

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GALVİNOKSİL RADİKALI BAZLI SPEKTROFOTOMETRİK
ANTIOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMİ VE YAYGIN OLARAK
KULLANILAN DİĞER YÖNTEMLERLE KIYASLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Adeviye Rana SELÇUK


Anabilim Dalı: Gıda Mühendisliği

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Yusuf YILMAZ

OCAK, 2012

YÜKSEK LİSANS TEZ ONAY FORMU

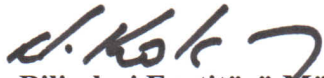
Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü 081161006 nolu öğrencisi Adeviye Rana Selçuk tarafından hazırlanan “**Galvinoxil Radikal Bazlı Spektrofotometrik Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi ve Yaygın Olarak Kullanılan Diğer Yöntemlerle Kıyaslanması**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : 
(Jüri Başkanı) **Doç. Dr. Yusuf YILMAZ (PAÜ, Mühendislik Fak.)**

Jüri Üyesi : 
Prof. Dr. Ümit DİVRİKLİ (PAÜ, Fen-Edebiyat Fak.)

Jüri Üyesi : 
Yrd. Doç. Dr. İlyas ÇELİK (PAÜ, Mühendislik Fak.)

Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 20/01/2012 tarih ve ..02/..16... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Nuri KOLSUZ

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğine beyan ederim.

İmza

: 

Öđrencinin Adı Soyadı : Adeviye Rana SELÇUK

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince beni yönlendiren ve deneyimlerinden yararlandığım, bu projede yer almamı sağlayan, maddi ve manevi destek veren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Yusuf YILMAZ'a çok teşekkür ederim. Projenin yazım aşamasında ve laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Oktay YEMİŞ'e ayrıca teşekkür ederim. Yüksek lisansım süresince farklı projelerde yer almamı sağlayan hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İlyas ÇELİK'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında bana moral desteğinde ve kaynak araştırmalarında yardımda bulunan arkadaşlarım Özge GÖKÇE ve Hacer DUMAN'a çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'nce (PAÜ BAP Proje No: 2010FBE40) desteklemiş olup, bu birimde çalışan tüm ekibe teşekkür ederim.

Eğitim hayatımın tüm çalışmalarında bana maddi ve manevi açıdan her zaman destek olan, varlıklarıyla beni cesaretlendiren, başta annem Müşerref DOĞUSAN olmak üzere, dedem Şakir DOĞUSAN, babam Mehmet SELÇUK, kardeşlerim Ahmet ve Esra SELÇUK, eniştem Niyazi KAĞNICI ve çok sevdiğim tüm aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Ocak 2012

Adeviye Rana SELÇUK

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller	2
1.2. Antioksidanlar	6
1.3. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	11
1.3.1. Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ile toplam fenol analizi	14
1.3.2. ABTS metodu.....	15
1.3.3. Ferrik iyon indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) metodu	18
1.3.4. DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil Radikal Süpürme Kapasitesi) metodu.....	20
1.4. Galvinoxil Radikali	24
2. MATERYAL-METOT	29
2.1. Materyal	29
2.2. Metot.....	29
2.2.1. Antioksidan bileşikler için kalibrasyon eğrisi oluşturulması ve lineer konsantrasyon aralığının belirlenmesi	29
2.2.2. Sıcaklık ve depolama süresinin galvinoxil radikali stabilitesi üzerine etkisi	30
2.2.3. Bazı saf bileşiklerin galvinoxil radikali üzerine etkisi.....	30
2.2.4. Galvinoxil radikali üzerine farklı solventlerin etkisi	31
2.2.5. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri	32
2.2.5.1 GRAC yöntemi	32
2.2.5.2 DPPH yöntemi	32
2.2.5.3 FRAP yöntemi	33
2.2.5.4 ABTS yöntemi	33
2.2.6. Toplam fenolik madde miktarı.....	34
2.2.7. Ticari meyve sularının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi.....	34
2.3. İstatistiksel Yöntemler	35
3. BULGULAR VE TARTIŞMA	36
3.1. Antioksidan Bileşikler İçin Kalibrasyon Eğrisi Oluşturulması ve Lineer Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi	36
3.2. Galvinoxil Radikal Çözeltilisinin Stabilitesinin Belirlenmesi	42
3.2.1. Reaksiyon süresinin tespit edilmesi.....	45

3.2.2. Depolama sıcaklık ve süresinin galvinoksil radikal çözültisi üzerine etkisi	45
3.3. Bazı Saf Bileşiklerin Galvinoksil Radikali Üzerine Etkisi	46
3.4. Galvinoksil Radikali Üzerine Farklı Solventlerin Etkisi	52
3.5. Ticari Meyve Sularının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi.....	59
3.6. Toplam Fenolik Madde Miktarı	61
4. SONUÇ	64
KAYNAKLAR	66
ÖZGEÇMİŞ	73

TABLO LİSTESİ

Tablolar

	Sayfa
1.1: Başlıca antioksidan kapasite tayin yöntemleri.....	12
2.1: Solvent türü ve Troloks varlığının galvinoxil radikali üzerine etkisinin belirlenmesi için kullanılan deneysel tasarım.....	31
3.1: Bazı saf bileşiklerin GRAC yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerleri.....	48
3.2: GRAC yönteminde gallik asit-kateşin karışımının farklı solventlerde Troloks eşdeğeri cinsinden sonuçları.....	54
3.3: Solventlerin polarite indeksi (Snyder skalası)	55
3.4: GRAC için farklı solventler içerisinde hazırlanan Troloks kalibrasyon eğrisi için eğim, kesim noktası ve R ² değerleri	56
3.5: Meyve sularının dört farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi ile karşılaştırılması	59
3.6: Farklı meyve sularında toplam fenolik madde sonuçları.....	62
3.7: Meyve suyu örneklerinde toplam fenolik madde içeriği, FRAP, DPPH, ABTS ve GRAC değerleri arasındaki ilişki (Pearson korelasyon katsayıları).....	63

ŞEKİL LİSTESİ

Şekiller

	Sayfa
1.1: ABTS radikal katyonunun absorpsiyon spekturumu.....	16
1.2: FRAP analizi reaksiyonu	19
1.3: DPPH serbest kararlı radikalın yapısı.....	21
1.4: DPPH radikali ile X anyonu reaksiyonu.....	22
1.5: Galvinoxilin kimyasal yapısı.....	25
3.1: Üç farklı galvinoxil radikali konsantrasyonlarında çizilen Troloks kalibrasyon eğrileri.....	38
3.2: Kateşin için lineer bölgenin tespit edilmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi	39
3.3: Troloks kalibrasyon eğrisi	40
3.4: Kateşin kalibrasyon eğrisi.....	40
3.5: Gallik asit kalibrasyon eğrisi	41
3.6: Askorbik asit kalibrasyon eğrisi.....	41
3.7: BHT kalibrasyon eğrisi.....	42
3.8: Galvinoxil radikalinin farklı konsantrasyonlardaki zamana bağlı Troloks varlığındaki spektrum taramaları.....	44
3.9: Farklı konsantrasyonlardaki Troloksun galvinoxil radikaliyle reaksiyonu sırasında karışımın zamana bağlı absorpsiyon kaybı.....	45
3.10: Çalışma çözeltisinin zamana bağlı göreceli kaybı	46
3.11: Saf bileşikler için kullanılan Troloks kalibrasyon eğrisi.....	47
3.12: Farklı solventlerde 0.5 mM Troloks varlığında solvent etkisi.....	53
3.13: Solvent olarak etanol kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi	56
3.14: Solvent olarak metanol kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi	57
3.15: Solvent olarak metanol-su (50:50 v/v) karışımı kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi.....	57
3.16: Solvent olarak metanol-su (30:70 v/v) karışımı kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi.....	58
3.17: Solvent olarak aseton-su (50:50 v/v) karışımı kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi	58

ÖZET

GALVİNOKSİL RADİKALİ BAZLI SPEKTROFOTOMETRİK ANTIÖKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMİ VE YAYGIN OLARAK KULLANILAN DİĞER YÖNTEMLERLE KIYASLANMASI

Bu çalışmada, galvinoksil radikali bazlı bir spektrofotometrik antioksidan aktivite tayin yöntemi modifiye edilmiştir. Modifiye edilen yöntem üzerine etki eden çözücü ve ortamdaki saf bileşen varlığı gibi faktörler irdelenmiştir. Meyve sularının antioksidan aktivitesi modifiye edilen yöntem ile tespit edilmiş ve yaygın olarak kullanılan diğer yöntemler (ABTS, FRAP ve DPPH yöntemleri) ile toplam fenolik madde içeriği arasındaki korelasyon incelenmiştir. Galvinoksil radikal çözeltisinin saklama koşullarına bağlı olarak stabilitesi belirlenmiştir. Galvinoksil radikal çözeltisinin en uygun çalışma konsantrasyonunun 10 µM olduğu sonucuna varılmıştır. Etanol içerisinde hazırlanmış saf bileşiklerin uygun lineer bölgeleri gallik asit için 0-25 µM, askorbik asit için 0-50 µM, kateşin için 0-40 µM, BHT için 0-500 µM ve Troloks için 0-1.66 µM olarak belirlenmiştir. Zamana bağlı absorpsiyon ölçümleri sonucunda analiz reaksiyon süresi 20 dakika olarak tespit edilmiştir. Glukoz, sakaroz, glisin, üre ve albümin gibi saf bileşiklerin galvinoksil radikali üzerine etkisi olup olmadığını belirlemek için belirli konsantrasyonlarda sulu çözeltileri hazırlanmış ve albüminin %0.006, tirozin, arginin ve sistinin %0.005'lik konsantrasyonları ve ürik asit çözeltileri az miktarda da olsa Troloks eşdeğeri cinsinden galvinoksil radikali savma kapasitesine sahip olduğu görülmüştür. Sonuç olarak literatürde galvinoksil radikali kullanılarak yapılan bazı çalışmalar temel alınarak, uygulanması basit, hızlı ve ucuz bir yöntem geliştirilmiştir. Orijinal yöntemde sonuçlar mol başına bağışlanan proton olarak ifade edilirken, modifiye edilen yöntemle belirlenen antioksidan aktivite sonuçları Troloks gibi yaygın kullanılan bileşiklerin eşdeğeri cinsinden ifade edilmekte ve böylece sonuçların birbiriyle kıyaslanması daha kolay hale gelmiştir.

Anahtar Kelimeler: Galvinoksil, Troloks, Antioksidan Aktivite, Gallik Asit

SUMMARY

SPECTROPHOTOMETRIC ASSAY FOR THE DETERMINATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY BASED ON GALVINOXYL RADICAL AND ITS COMPARISON WITH CONVENTIONAL METHODS

In this study, a spectrophotometric antioxidant activity assay based on galvinoxyl radical has been modified. The effects of extraction solvents and factors such as the presence of pure constituents on the modified method were discussed. Antioxidant activity of fruit juices were determined by the modified method and the correlation of the results of the modified method between other common methods (ABTS, FRAP and DPPH methods) and total phenolic content was obtained. Stability of the working radical solution of galvinoxyl was also determined. The most appropriate concentration of the working solution of galvinoxyl was 10 μM . Linear ranges of calibration curves for pure compounds were 0-25 mM for gallic acid, 0-50 mM for ascorbic acid, 0-40 mM for catechin, 0-500 μM for BHT and 0-1.66 μM for Trolox. The absorbance measurements with time-dependent analysis showed that the reaction time is 20 minutes. In order to study the effect of glucose, sucrose, glycine, urea and albumin on the modified method, various concentrations of these pure compounds were prepared in aqueous solutions. Albumin at 0.006%, tyrosine, arginine, and cystic at 0,005%, and uric acid, even at a small ratio, had a significant effect of the antioxidant activity values, showing Trolox equivalent antioxidant capacity. As a result, depending on the studies in the literature, this newly modified method based on galvinoxyl radical is simple, rapid and inexpensive method. In the original method, results were expressed as per mole of protons being donated, the antioxidant activity values of compounds are expressed as Trolox equivalent, and thus the results become easier to compare with each other.

Key Words: Galvinoxyl, Trolox, Antioxidant Activity, Gallik Asit

1. GİRİŞ

İnsanlarda yaşlanma ve kronik hastalıklar karmaşık biyolojik süreçler sonucu oluşur. Bu karmaşık süreçleri anlamak için çeşitli hipotezler öne sürülmüş ve bunlar deneysel olarak test edilmiştir. Yaşlanma ile ilgili olarak ileri sürülen hipotezler son yıllarda moleküler genetik ve deneysel tekniklerde sağlanan ilerlemeler ile açıklanmaya başlanmıştır (Gökpınar ve ark., 2006). İnsanların sağlıklı ve uzun bir yaşam sürmesi üzerine beslenmenin etkisinin kesin bir şekilde ortaya konulmasından sonra gelişmiş ülkelerde özellikle son yıllarda doğal antioksidan tüketimi üzerinde çok durulmaya başlanmıştır (Velioğlu, 2000).

Metabolizmanın işleyişi sırasında doğal bir proses olan oksidasyon, hücrelerin yaşamsal faaliyetleri için elzemdir. Bu bağlılığın yan etkisi, oksidatif değişimlere yol açan serbest radikallerin ve diğer reaktif oksijen türlerinin oluşmasıdır. Aşırı derecede serbest radikal oluştuğunda, süperoksit dismutaz, katalaz ve peroksidaz gibi koruyucu enzimler yetersiz kalabilir ve membran lipitleri, hücresel proteinler ile DNA ve enzimleri okside ederek yıkıcı ve ölümcül hücresel etkilere sebep olur. Oksidasyon kimyasal hasarın başlıca etkilerinden olan ransidite ve/veya besleyici kalitesinde, renk, aroma, tekstür özelliklerinde bozulma ile sonuçlanacak şekilde gıdaları etkileyebilir. Dünya’da üretilen meyve ve sebze mahsulünün yarısının hasat sırasında oluşan yıkıcı reaksiyonlardan dolayı kaybolduğu bilinmektedir (Antolovich ve ark, 2002).

Vücutta serbest radikallerle mücadele edebilen antioksidan bileşiklere olan ilgi son yıllarda artırmış; konuyla ilgili çalışmalar daha çok gıdaların ve farmasötik preparatların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesine yönelmiştir. Bu ilgi esas olarak yaşlanma sürecinde ve pek çok hastalığın patojenitesinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROT) yarattığı hasarlara yönelmiştir (Gökpınar ve ark., 2006). Hücrede ROT’nin giderek artan bir şekilde oluşturduğu zararlar esas olarak yaşlı hücrelerde

telomer erozyonu, genom kararsızlığı, DNA mutasyonları ve gen profillerindeki değişimleri kapsamaktadır (Wei ve Pang, 2005; Gökpınar ve ark., 2006).

Yaşlanma ile ilgili öne sürülen hipotezlerden en çok dikkat çekenini “Serbest Radikaller Teorisi”dir. Bu hipotez ilk olarak Harman (1956) tarafından ileri sürülmüştür. Serbest radikal molekülleri eşlenmemiş elektron içeren, çok kararsız, diğer moleküllerle çok hızlı reaksiyona giren ve kimyasal olarak kararlı hale gelebilmek için elektron almaya gereksinim duyan moleküllerdir. Bir moleküle saldırdığında onun elektronunu çalarak yükseltir ve bu yeni molekülün kendisi bir serbest radikal haline dönüşür. Bu şekilde başlayan bir zincir reaksiyonlar dizisi canlı hücrenin zarar görmesi ile sonuçlanır. Serbest radikallerin yarattığı en büyük zarar hücre zarları üzerinedir. Bunlar hücre zarlarından elektron çalarak eşlenir, hücre zarı ve sonuç olarak hücre yapısını bozar (Gökpınar ve ark., 2006). Serbest radikaller vücuttaki hücrelerin membranına, hücre yapısında bulunan lipitlere, proteinlere, nükleik asitlere ve DNA’ya zarar vermekte ve bunun sonucunda başta kanser, kronik hastalıklar, diyabet, katarakt, karaciğer tahribatı ve pek çok hastalığa neden olmaktadır. Bu radikaller hücrede membran, mitokondri, peroksizomlar ve endoplazmik retikulumda üretilmektedir (Velioğlu, 2000).

Oksidasyon, yiyeceklerin hazırlanması ve tüketimi esnasında ortaya çıkan temel değişikliklerden birisidir. Gıda bozulmalarındaki başlıca sebeplerden biri lipit oksidasyonudur. Lipit oksidasyonu beslenme sisteminde diğer değişiklikleri başlatır ve gıdaların kalitesi, besleyiciliği, rengi, kokusu, yapısı ve güvenilirliğini etkiler (Burak ve Çimen, 1999). Oksidatif reaksiyonlar, gıdanın besleyici kalitesini azaltır ve oksidasyon ürünleri potansiyel olarak toksiktir. Diğer yandan mutlak koşullar altında, lipit oksidasyonunun kısıtlı bir aşaması olgunlaşmış peynirlerde ve bazı kızarmış gıdalarda bazen hoş tat olarak kabul edilebilir (Fennema, 1996).

1.1. Serbest Radikaller

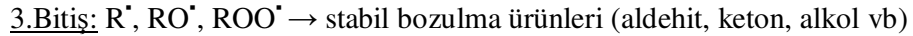
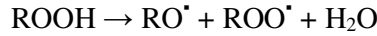
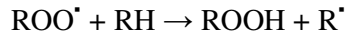
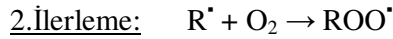
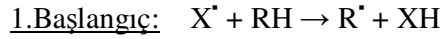
Kimyasal bileşikler iki veya daha çok elementin aralarında kimyasal bağ oluşturması ile meydana gelir. Bu bağlar negatif yüklü elektronlarla sarılmıştır ve bu elektronların düzeni bileşiğe kararlılık sağlar. Kararlı bileşiklerin elektronları

çiftlenmiş halde bulunur. Eğer elektron çiftlenmemiş ise molekül daha reaktif ve kararsız duruma geçer. Bir ya da daha fazla sayıda çiftlenmemiş elektrona sahip element veya bileşiklere “serbest radikal” denir (Gökpınar ve ark., 2006). En önemli özellikleri son derece reaktif olmalarıdır. Canlı dokusunda karşılaştıkları her madde ile reaksiyona girebilirler ve yarı ömürleri çok kısadır. Örneğin, hidroksil radikalının yarı ömrü saniyenin milyarda biri iken, alkoksi radikalının saniyenin milyonda biri kadardır (Velioğlu, 2000). Serbest radikallerin başlattığı zincirleme reaksiyonlar dizisi, antioksidanlar tarafından durduruluncaya kadar devam eder (Gökpınar ve ark., 2006). Potansiyel olarak zararlı reaktif oksijen türleri normal aerobik metabolizmanın sonucu olarak üretilirler. Bu serbest radikaller genellikle antioksidanlar tarafından *in vivo* ortamda uzaklaştırılır veya inaktive edilirler (Benzei ve Strain, 1996). Oksidasyon olayı aslında hayatın her evresinde yaşanan doğal bir süreçtir. Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir molekül olmasına rağmen aynı zamanda vücut içinde reaktif oksijen türlerinin oluşmasına neden olur. Reaktif oksijen türleri metabolizmaya zarar verebilecek bir dizi reaksiyonu başlatır ve bunlar canlı için aynı zamanda bir tehdit unsuru haline gelir. Serbest radikallerin oluşumu, yağlı diyetler, sağlıksız beslenme, sigara, ilaç tedavileri, alkol tüketimi, radyasyon, böcek ilaçları ve çevre kirliliği gibi nedenlerle başlamakta ve artmaktadır. Serbest radikaller bağışıklık sistemini zayıflatarak çeşitli hastalıklara ve erken yaşlanmaya yol açabilmektedir (Gökpınar ve ark., 2006).

Organizmada serbest radikaller gerek normal metabolik faaliyetlerin bir yan ürünü olarak, gerekse radyasyon, ilaçlar ve diğer zararlı kimyasalların etkisi ile oluşur. Metabolizma yan ürünleri olarak süperoksit anyonları (O_2^- , $O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot}) gibi mutajenler meydana gelir. Ayrıca NADPH (indirgenmiş formdaki nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) oksidaz gibi bazı enzimler küçük miktarlarda ROT üretir. Hücre içi ROT'nin % 90'dan fazlası aerobik solunum reaksiyonları zincirinde mitokondriumun iç membranında üretilir (Wei ve Pang, 2005). İki tarafı keskin bir bıçak gibi kabul edilen ROT, düşük dozlarda çeşitli stres tepkilerinde arabulucu gibi rol oynarken, yüksek dozlarda (oksidatif stres gibi) hücrel zararlar açar. Oksidan ve mutajen özellikte olan bu metabolizma yan ürünleri DNA, proteinler ve diğer makromoleküllerde tahribata hatta hücrenin ölümüne neden olarak kronik hastalıkları başlatır (Gökpınar ve ark., 2006). Canlı sistemlerde serbest radikaller anabolik ve katabolik süreçler sonucu

oluşabileceği gibi, radyasyon, ilaçlar, zehirli kimyasallar gibi maddelerin tesiri ile ortaya çıkabilirler. Hücre içinde oluşabilen serbest radikaller süperoksit anyonları, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit gibi oksijen içeren reaktif moleküllerdir ve Reaktif Oksijen Türleri (ROT) olarak adlandırılırlar. Hücre içinde diğer moleküller ile hızla reaksiyona girip onların yapısını bozacak zincirleme reaksiyonları başlatan bu oksidan moleküller ancak antioksidan moleküller tarafından çeşitli mekanizmalarla durdurulabilirler (Gökpınar ve ark., 2006).

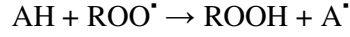
Birçok gıdada, ürünü oluşturan bileşenler ile havanın O₂'i arasında kendiliğinden ortaya çıkan ve 'otoksidasyon' adı verilen tepkimeler oluşur. Bazı oksidasyon tepkimeleri gıdalarda istenirken, pek çoğu vitamin kayıpları, renk değişimleri, yağların bozulması, besin değerlerinin azalması ve arzu edilmeyen tat ve koku değişimleri gibi kötü etkilere yol açtığından istenmemektedir (Saldamlı, 2007). Reaksiyon temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır.



(RH: yağ asidi esterleri, R[•]: yağ asidi serbest radikalleri, ROO[•]: peroksit yapısındaki serbest radikaller, ROOH: yağ asidi hidroperoksitleri) (Saldamlı, 2007).

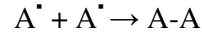
Başlangıç tepkimesinde az sayıda ancak çok reaktif radikaller ortaya çıkmaktadır. İlerleme aşamasında ise oksijen bu reaktif moleküllerle tepkimeye girerek yağ asidi hidroperoksitlerini oluşturur. Bu ürünler de yine serbest radikalleri doğurmakta ve tepkimeler zincirleme olarak gelişmektedir. Serbest radikallerin konsantrasyonu yeterince yüksekse, bitiş reaksiyonunda birbirleriyle tepkimeye girerek daha kararlı, karakteristik ransit yağ özelliklerindeki son ürünleri oluşturmaktadırlar (Saldamlı, 2007).

Antioksidanlar, zincir tepkimesinin 'ilerleme' aşamasında oluşan ROO[•] serbest radikale proton vererek zincir tepkimesini durdururlar. Oluşan A[•] molekülü serbest radikale kıyasla daha az reaktiftir.

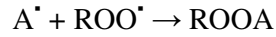


(AH: antioksidan, A^{\bullet} : antioksidan radikali)

Bitiş aşamasında serbest antioksidan radikalleri, ya kendi aralarında tepkimeye girer ve antioksidan molekülü yeniden oluşturur;



veya ilerleme aşamasında oluşmuş ROO^{\bullet} serbest radikali ile tepkimeye girer.



Serbest radikal, bir veya daha fazla sayıda eşlenmemiş elektron içerir (Halliwell ve ark., 1995). Triklorometil (CCl_3^{\bullet}), süperoksit (O_2^{\bullet}), hidroksil (HO^{\bullet}), peroksil (ROO^{\bullet}), ve nitrik oksit (NO^{\bullet}) gibi serbest radikallerin metabolizma tarafından üretildikleri bilinmektedir. Ayrıca gıdalarda ve biyolojik sistemlerde, oksijen molekülünün radikal olmayan türevleri (hidrojen peroksit (H_2O_2), hipoklorik asit ($HOCl$)) oluşturulur. Serbest radikallerin zincir reaksiyonundaki tüm bu reaktif oksijen türleri, bir maddenin radikal türlerini temizleme yeteneğini test eden antioksidan aktivitenin değerlendirilmesinde ilgili olabilir (Sanchez-Moreno, 2002; Halliwell, 1990; Halliwell ve ark., 1995).

Serbest radikaller, (a) radikal olmayan bir atom veya molekülden bir elektron çıkmasıyla veya (b) radikal olmayan bir atom veya moleküle bir elektron ilavesiyle oluşurlar (Laaksonen ve ark., 2002). Başlıca serbest radikal kaynakları şu şekilde sınıflandırılabilir (Laaksonen ve ark., 2002):

1- Endojen kaynaklar:

- Mitokondrial elektron transport zinciri
- Endoplazmik retikulum
- Redoks döngüsü
- Araşidonik asit metabolizması
- Fagositik hücreler ve endotelial hücreler gibi hücrelerdeki oksidatif reaksiyonlar

- Ksantin oksidaz, NADPH oksidaz gibi oksidan enzimler
- Otoksidasyon reaksiyonları.

2- Eksojen kaynaklar:

- Diyet faktörleri
- Çevresel faktörler
- İlaçlar.

1.2. Antioksidanlar

Antioksidan, sağlık üzerine olumlu etkileri nedeniyle modern toplumda popülaritesi giderek artan bir kavram olup, ‘oksidasyonu önleyen veya bir başka ifadeyle peroksit veya oksijen tarafından gerçekleştirilen reaksiyonları engelleyen bir madde’ olarak ifade edilmektedir (Huang ve ark., 2005). Bunların pek çoğu bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), tersiyer bütillenmiş hidroksi kinon (TBHQ) gibi, çeşitli ürünlerde koruyucu olarak kullanılan maddelerdir. Antioksidanlar kaynaklarına göre doğal ve yapay olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Doğal antioksidanlar içinde tokoferoller, askorbik asit ve türevleri, aminoasitler, peptitler, proteinler yer almaktadır. Yapay antioksidanlardan en bilinenleri de BHA, BHT ve propil gallattır (PG) (Saldamlı, 2007).

Biyolojik anlamda antioksidanlar “ürünlere, koruma veya havadaki oksijenden dolayı gerçekleşen bozulmayı ertelemek için ilave edilen sentetik veya doğal maddeler” olarak tanımlanabilir. Biyokimya ve tıp alanında (E vitamini ve β -karoten gibi) antioksidanlar, hayvan dokularında oksidasyonun zararlı etkilerini engelleyebilen enzimler veya diğer organik maddelerdir. Etkili antioksidanlar radikal zincir reaksiyonlarını kırabilen radikal süpürücülerdir. Biyolojik olarak yapılan tanım, genel olarak bilinen antioksidanların tanımına daha uygundur. Polifenolik bileşikler, E ve C vitaminleri ile karotenoidleri içeren diyet antioksidanlarının, oksidatif stresin sebep olduğu hastalıklara karşı korumada etkili gıda bileşenleri olduğuna inanılmaktadır. Bu sebeple son zamanlarda antioksidanlara olan ilgi giderek artmaktadır (Huang ve ark., 2005). Enzimatik antioksidanlar vücudun serbest

radikallere karşı savunma mekanizması olarak üretmiş olduğu antioksidanlar olup, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi enzimlerdir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise diyet kaynaklı olup, antioksidan enzim kofaktörleri (Se, koenzim Q10), oksidatif enzim engelleyiciler (aspirin, ibuprofen), geçiş metali şelatörleri (EDTA), radikal süpürücüler (E ve C vitamini) bu gruba örnek verilebilir (Huang ve ark., 2005; Halliwell ve ark., 1990).

Tüm biyolojik organizmalar oksidatif strese karşı, çeşitli antioksidanlardan oluşan bir savunma mekanizması geliştirmiştir (Noguchi ve ark., 2000). Bu antioksidan mekanizmaları serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonu durdurarak, tekli (singlet) oksijeni bağlayarak veya metallerin katalizlediği oksidasyon reaksiyonlarında metali bağlayarak etki ederler (Velioglu, 2000). Antioksidanlar, diyetin temel bir maddesi olan lipitlerin oksidatif bozulmasını önleme yoluyla gıda kalitesini korurlar. Reaktif oksijen türleri ve antioksidan savunma sistemlerinin dengesizliği, biyolojik olarak ilgili makro moleküllerde kimyasal değişikliklerle sonuçlanabilir. Bu dengesizlik, pek çok hastalığın başlangıç ve gelişimi için uygun ortam sağlar (Burak ve Çimen, 1999). Antioksidanlar ile kanser, kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma, katarakt, metabolizma bozuklukları gibi bazı hastalıklar arasındaki ilişkiler günümüzde ortaya konulmuş bulunmakla birlikte konu üzerindeki bilgiler halen yetersiz olduğu düşünülmekte ve ilgili çalışmalara devam edilmektedir (Velioglu, 2000).

Antioksidanlar başlıca dört yolla oksidanları etkisiz hale getirirler (Gökpınar ve ark., 2006);

1. Süpürme etkisi (scavenging): Oksidanları daha zayıf yeni bir moleküle dönüştürerek etkisizleştirir. Antioksidan enzimler ve mikromoleküller bu yolla etki eder.
2. Söndürme etkisi (quenching): Oksidanlara bir hidrojen aktararak inaktive etmesine denir. Vitaminler, flavanoidler, timetazidin ve mannitol bu şekilde etki eder.
3. Zincir reaksiyonlarını kırma etkisi (chain breaking): Hemoglobin, serüloplazmin ve ağır mineraller oksidanları kendilerine bağlar ve inaktive eder.

4. Onarma etkisi (repair): Oksidatif hasar görmüş biyomolekülü onarırlar.

Canlı organizmalarda savunma sistemi olarak davranan antioksidanlar fonksiyonlarına dayanarak 4 aşamada görev yapar. Savunmanın ilk basamağı, serbest radikal formlarını önleyen koruyucu antioksidanlardır. Savunmanın 2. basamağı ise radikal savar antioksidanların zincir başlamasını önlemesi ve/veya zincir reaksiyonlarını kırmasıyla olur. Onarım ve *de novo* antioksidanları 3. savunma basamağıdır. Dördüncüsü ise serbest radikallerin üretim ve reaksiyonlarının olduğu yerde uyum sağlayarak, formu indirmek ve yeterli miktarda antioksidanı doğru tarafa taşımaktır (Noguchi ve ark., 2000).

Cansız bir maddenin otooksidasyonu radikal zincir reaksiyonları ile meydana gelirken, biyolojik sistemdeki oksidasyon öncelikle redoks enzimleri tarafından tetiklenir. Bununla birlikte, radikal zincir reaksiyonları ile gerçekleşen enzimatik olmayan yağ otoksidasyonu meydana gelebilir ve oksidatif strese neden olur. Sonuç olarak biyolojik antioksidanlar, (süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksitler gibi) enzimatik ve (oksidatif enzim engelleyiciler, antioksidan enzim kofaktörleri) enzimatik olmayan antioksidanlar ile geçiş metali şelatlayıcılarını içerirler (Halliwell ve ark., 1990).

Antioksidanlar, geçiş metali veya enzim katalizi gibi potansiyel bir oksidantı ortadan kaldırarak ROT'leri engellemediği sürece, redoks reaksiyonu gerçekleşebilir. Antioksidanlar, oksitleyici türler ile substrat yerine reaksiyona girerek, oksidasyonu azaltır. Askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanlar, indirgeyiciler olarak tanımlanabilir ve indirgeyicilerin oksidantları inaktivasyonu, başka bir oksidasyon pahasına da olsa azalan bir redoks reaksiyonu olarak bilinir (Benzei ve ark., 1996).

Düzenli çalışan bir metabolizmada mitokondriyel sitokrom sistemi, sitozoldaki organelleri oksidantların zararlı etkilerinden korur. Bu sistemin yetersiz kaldığı durumlarda doğal enzimler devreye girer. Enzimlerce etkisiz hale getirilemeyen oksidantlar ilk olarak hücre membranındaki lipitleri etkileyerek "lipit peroksidasyonu"nu başlatır. Lipit peroksidasyonu, membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) serbest oksijen radikalleri tarafından peroksitler, alkoller, aldehytler gibi çeşitli ürünlere yıkılması reaksiyonudur ve sonuçta ortaya çıkan biyo-aktif aldehytler hücre hasarına neden olur. Lipit peroksidasyonu sırasında

yeterli düzeyde E ve C gibi antioksidan vitaminlerin bulunması halinde bu tip hücrel hasarların önüne geçilebilir (Gökpınar ve ark., 2006).

Diyet kaynaklı antioksidanlar, radikal zincir reaksiyonlarını durdurmak için reaktif oksijen türleri/reaktif azot türlerini (ROT/RAT) sönmleyebilir veya reaktif oksidanları engelleyebilir. Bu antioksidanlar, geniş ölçüde radikal zincir reaksiyonları engelleyiciler, metal şelatlayıcılar, oksidatif enzim engelleyiciler ve antioksidan enzim kofaktörlerini ihtiva ederler. Antioksidan enzim kofaktörlerinden olan selenyum, peroksitleri alkol ve suya indirgeyen enzimlerin yapısında selenoprotein olarak bulunur (glutasyon peroksidazlar gibi). Selenyumun, (ROT/RAT) sönmleyiciler kadar direkt bir fonksiyonu yoktur. Bu nedenle, selenyum bileşiklerinin canlı içindeki antioksidan kapasitesi, selenyumun biyolojik rolünü tam olarak göstermez (Halliwell ve ark., 1990).

Biyolojik sistemlerde antioksidanların en az 4 genel kaynağı vardır (Prior ve ark., 2005):

- (1) enzimler, örneğin, süperoksit dismutaz, glutasyon peroksidaz ve katalaz
- (2) büyük moleküller (albümin, seruloplazmin, ferritin, diğer proteinler)
- (3) küçük moleküller (askorbik asit, glutasyon, ürik asit, tokoferol, karotenoidler, (poli)fenoller) ve
- (4) bazı hormonlar (östrojen, angiotensin, melatonin, vs).

Doğal antioksidanlar arasında enzimler (süperoksit dismutaz-SOD, katalaz-CAT, glutasyon peroksidaz-GP, glutasyon redüktaz, sitokrom-C-oksidad, hidroksiperoksidaz), makro moleküller (seruloplazmin, transferrin, ferritin, miyogloblin, haptoglobilin) ve mikro moleküller (β -karoten, A vitamini, C vitamini, E vitamini, tokoferoller, tiol içerenler, glutasyon (GSH), N-asetil sistein, metionin, kaptopril, ubiguinon) sayılabilir (Gökpınar ve ark., 2006). Tokoferollerden insan vücudunda en çok α -tokoferol, daha sonra da γ -tokoferol bulunur. Tokoferol türlerinin antioksidan aktiviteleri arasında farklar vardır ve singlet oksijeni süpürme kapasitesi $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ tokoferole doğru gittikçe azalır. E vitamininin antioksidan özelliği, serbest radikallerin başlattığı lipit peroksidasyonunu inhibe etmesinden ileri gelir (Gökpınar ve ark., 2006).

Antioksidatif etkileriyle en çok bilinen bileşikler, C ve E vitaminleri, karatenoidler ve fenolik bileşiklerdir. Antioksidan vitaminler olarak bilinen C ve E vitaminleri ile bir provitamin A olan, β -karoten, antioksidan savunma mekanizmasında oksijenin aktif formlarını yok ederek ve zincir kırıcı antioksidanlar olarak etki göstermektedirler. Bunlar hem tek başlarına hem de sinerjist olarak görev yaparak oksidatif reaksiyonları geciktirir veya engeller (Cemeroğlu, 2010). Fenoliklerin antioksidan etkileri ise, serbest radikalleri bağlamaları, metallere şelat oluşturmaları ve lipoksigenaz enzimini inaktive etmeleri ile açıklanmaktadır (Nakilcioğlu ve Hışıl, 2011). Fenolik antioksidanlar serbest radikal sonlandırıcı ve metal şelatlayıcı gibi işlev görürler. Fenolik bileşikler ve onların bazı türleri otooksidasyonun önlenmesinde çok etkilidirler. Bazı bitki fenolikleri son zamanlarda antioksidanlar olarak kabul edilmekte ve ticari olarak üretilmektedir. Bu açıdan diyetle koruyucu etki sağlayan bu antioksidanların gıdalardaki biyolojik mevcudiyetinin ve alınması gereken düzeylerinin bilinmesi önemli görülmektedir (Burak ve Çimen, 1999).

Antioksidanlar, gıdaların yapısında doğal olarak bulunabildiği gibi, Maillard Reaksiyonu'nda olduğu gibi gıdalardaki kimyasal reaksiyonların sonucunda da oluşabilirler veya doğal kaynaklardan ekstrakte edilerek gıdalara katılabilirler (Cemeroğlu, 2010). Fenolikler, gıdalarda bulunan başlıca antioksidan bileşikleridir. Özellikle, meyve ve sebzelerde yaygın olarak bulunan 'flavonoidler' güçlü antioksidan aktivite göstermektedirler (Cemeroğlu, 2010). Klinik denemeler ve epidemiyolojik çalışmalar, meyve ve sebze tüketimi ile kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve diğer bazı kronik rahatsızlıkların oluşumu arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir. Meyve ve sebzelerde bulunan ve antioksidan aktiviteye sahip fenolik bileşikler, vitaminler (C ve E) ve karotenoidler, oksidatif stresle ilişkili bu hastalıklardan korunmada etkili bileşikler olarak öne çıkmaktadırlar. Bu nedenle, özellikle diyetle alınan gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi üzerine büyük bir ilgi oluşmuştur. Ancak, bu konudaki en büyük eksiklik, gıdaların antioksidan kapasitesini güvenilir bir şekilde ölçülebilen, geçerliliği kabul edilmiş bir yöntemin bulunmamasıdır (Huang ve ark., 2005).

Suda çözünen bir vitamin olan C vitamini vücut sıvısında genellikle askorbat olarak bulunur. Kolayca elektron vererek dehidro askorbik asite kendiliğinden okside olur ve süperoksit, hidrojen peroksit, hipoklorit, hidroksil radikali, peroksil radikali

ve singlet oksijeni süpürücü etki gösterir. C vitamini lipit peroksidasyonunu başlatmadan peroksil radikallerini su fazında inhibe ederek, biyolojik membranları peroksidatif hasardan korur (Gökpınar ve ark., 2006).

Diğer önemli antioksidan maddeler arasında karotenoidler gelmektedir. Karotenoidler sadece fitoplankton, algler, bitkiler ve sınırlı sayıdaki mantar ve bakteriler tarafından üretilebilen, doğada 700'ün üzerinde yağda çözünebilen pigmente sahip olan bir ailedir. Karotenoidler genel olarak havuç, domates, greyfurt, portakal, ıspanak gibi sebze ve meyvelerin kırmızı, turuncu, sarı ve yeşil renklerinden sorumludur. Karotenoidler hücreyi oksidatif stresten; triplet molekülleri ve singlet oksijeni süpürerek, serbest radikalleri inhibe ederek korur. β -Karoten gibi yağda çözünen pigmentler serbest radikalleri savar ve lipofilik yapıda olmalarından ötürü özellikle ROT'nin hücre içi membran yapıları üzerindeki oksidatif baskısını azaltır. Ayrıca katalaz, peroksidaz ve süper oksit dismutaz gibi karaciğer enzimlerinin yeniden onarılmasını sağlar (Gökpınar ve ark., 2006).

Maddelerin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde *in vitro*, *in vivo* veya *ex vivo* gibi değişik yöntemler kullanılabilir. *In vitro* veya *ex vivo* yöntemler antioksidan aktivite konusunda yararlı kanıtlar sağlar ama bu yöntemlerle elde edilen sonuçların biyolojik sistemlere uyarlanması her zaman mümkün olmamaktadır. Diğer yandan, antioksidanların *in vivo* ölçümlerinde değişik zorluklar vardır (Antolovich ve ark, 2002).

1.3. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

Antioksidan etkinliğinin belirlenmesi amacıyla geliştirilen, birçok farklı substrat ve değişik kompozisyonda sistemlerin kullanıldığı çeşitli analitik metotlar bulunmakla birlikte, bunların çoğunluğu hala gelişme aşamasındadır (Cemeroğlu, 2010). Gıdalarda antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar genel anlamda, hidrojen atomu transfer reaksiyonu esaslı analizler ve tek elektron transfer reaksiyonu esaslı analizler olarak incelenmektedir (Halliwell ve ark., 1990). Tablo 1.1'de antioksidan etkinliğinin belirlenmesi amacıyla kullanılan başlıca antioksidan kapasite tayin yöntemleri gösterilmiştir:

Tablo 1.1: Başlıca antioksidan kapasite tayin yöntemleri (Cemeroğlu, 2010)

Hidrojen atomu transferi reaksiyonuna dayalı yöntemler	ORAC (Oksijen radikal absorban kapasitesi)
	TRAP (Toplam radikal yakalama antioksidan parametresi)
	Krokin ağartma yöntemi
	IOU (İnhibe edilmiş oksijen alımı)
	Linoleik asit oksidasyonunun inhibisyonu
Elektron transferi reaksiyonuna dayalı yöntemler	LDL oksidasyonunun inhibisyonu
	TEAC (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi)
	DPPH (Difenil-1-pikrilhidrazil)
	FRAP (Ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi)
	Bakır (II) indirgeme kapasitesi
	Folin-Ciocalteu ayracı ile toplam fenol tayini

Antioksidanlar üzerine yapılan bilimsel araştırmalara bakılırsa, antioksidan kapasiteyi tanımlayan ve farklı araştırmalarca yapılan birçok terim bulunur. Terimlerden biri, toplam antioksidan kapasiteyi (veya etki, güç, parametre, potansiyel ve aktivite) tanımlar. Bir kimyasalın 'aktivitesi' basınç, sıcaklık, reaksiyon ortamı ve referans noktaları gibi spesifik reaksiyon koşulları ele alınmadan anlamsız olur. Çünkü antioksidan aktivite ölçümü, spesifik koşullar altında uygulanan kimyasal reaktifliği gösterir (Sanchez-Moreno, 2002; Huang ve ark., 2005).

Antioksidanların kimyasal reaksiyon içermelerine dayanarak, major antioksidan kapasite analizleri iki kategoriye ayrılabilir (Huang ve ark., 2005; Sanchez-Moreno, 2002);

(1) Hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonu esaslı analizler

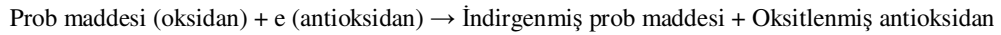
(2) Tek elektron transfer (TET) reaksiyonu esaslı analizler.

HAT esaslı analizler, rekabetçi reaksiyon kinetiklerini izler ve belirleme kinetik eğrilerden sağlanır. HAT esaslı metotlar, genellikle bir sentetik serbest radikal üretici, bir oksitlenebilir moleküler substrat ve bir antioksidandan oluşurlar. TET esaslı analizler, reaksiyon son noktasının indikatörü olarak oksidan ile bir

redoks reaksiyonu içerir. HAT ve TET esaslı analizler, bir örneğin önleyici antioksidan kapasitesi yerine radikal süpürme kapasitesi ölçümünü yaparlar. Çünkü antioksidanların, oksidantlara (özellikle peroksil radikaller) karşı nispi reaksiyon hızları, harcanan antioksidan kapasitesi için anahtar bir parametredir (Prior ve ark., 2005).

HAT reaksiyonlarına bağlı olan analizler indirgenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otoksidasyonu inhibisyonunu, oksijen radikal absorban kapasitesini (ORAC), toplam radikal trapping antioksidan parametresini (TRAP) ve krokin ağarma deneylerini içerir. TET reaksiyonlarına dayanan analizler oksidantı azaltan ve bu sırada renk değişimi yapan antioksidan kapasitesini ölçer. Renk değişiminin derecesi, örneğe ait antioksidan konsantrasyonu ile bağlantılıdır (Huang ve ark., 2005).

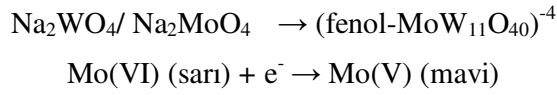
TET esaslı analizler kategorisinde; Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenol testleri (FCR), Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) analizi, demir iyonu indirgeyen antioksidan gücü analizi (FRAP), N,N-dimetil-p-fenildiamin (DMPD) analizi, DPPH analizlerini ve Cu(II) indirgeme kapasitesi analizi yer almaktadır. Bu metotlar, reaksiyon karışımında antioksidan ve oksidant olmak üzere iki komponent içerir. Bunlar aşağıdaki elektron transfer reaksiyonuna göre temellendirilmiştir (Huang ve ark., 2005);



Substratın (proben) kendisi antioksidandan bir elektron ayırır, bu örnekte renk değişimine neden olur. Renk değişiminin derecesi antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Reaksiyon, renk değişiminin durduğu anda sona erer. Absorbans değişimi (ΔA), lineer bir eğri veren antioksidan konsantrasyonuna karşı çizilir. Eğrinin eğimi antioksidanın indirgeme kapasitesini gösterir bu da Troloks eşdeğeri (TE) veya gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak tanımlanır. Bu analizler, klasik kimya analizlerindeki redoks titrasyonuna benzer. Çünkü bu analizlerde, rekabet edebilen bir reaksiyon yoktur ve oksijen radikali de yoktur. Analiz sonuçlarının, bir örnekteki antioksidan kapasite ile nasıl ilişkisi olduğu şüphelidir. Korelasyon yapmak için, antioksidan kapasitenin indirgeme kapasitesine eşit olduğu varsayılır (Benzei ve ark., 1999).

1.3.1. Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ile toplam fenol analizi

Toplam antioksidan kapasite analizleri ile sadece fenollerin mi yoksa fenoller ile birlikte metal şelatlayıcılar gibi indirgeyici ajanların da mı tespit edilebildiği konusunda halen tartışmalar mevcuttur. FC analizi yıllardır doğal gıdalardaki toplam fenolikleri ölçmek için kullanılmıştır, ancak oksidasyon/redüksiyon reaksiyonunun temel mekanizması molibdotungstate ajanı tarafından fenol oksidasyonu sonucu 745-750 nm dalga boylarında renk veren ve tirozin proteini analizinde kullanılan kimyasal ajanlar için amaçlanmıştır (Prior ve ark., 2005).

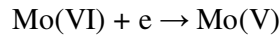


Yöntemin ilkesi, fenolik bileşiklerin bazik ortamda FC ayracını indirgeyip kendilerinin yükseltgenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin-Ciocalteu ayracı burada yükseltgeyici bileşik olarak rol almaktadır. Reaksiyon sonucunda indirgenmiş ayracın oluşturduğu mavi rengin fotometrik olarak ölçülmesiyle, analizi yapılan örnekteki fenolik bileşiklerin toplam miktarlarının hesaplanması mümkün olmaktadır. Ortamda bulunan kükürt dioksit ve askorbik asit analizi olumsuz yönde etkilemektedir. Bu nedenle askorbik asit ve SO₂ içeren ürünlere bu yöntem ya uygulanmamalı veya önce bu indirgenler yöntemine göre iyot titrasyonu ile yükseltgendikten sonra analize alınmalıdır. Bununla birlikte yüksek miktarda fenolik bileşik, fakat az miktarda askorbik asit içeren örneklerde askorbik asidin olumsuz etkisi dikkate alınmayabilir (Cemeroğlu, 2010).

FC metodunun temeli fenolik grupların fosfomolibdik ve fosfotungustik asitler ile oksidasyonuna dayanır. Oksidasyondan sonra yeşil-mavi renkteki kompleks 2 saatlik reaksiyon süresinden sonra 750 nm dalga boyunda ölçülür (Schlesier ve ark., 2002). Singleton ve ark. (1999) bu analizi şarapta toplam fenol analizi için kullanmışlardır ve ardından analiz birçok uygulama alanı bulmuştur. FCR esaslı analiz, genellikle toplam fenol (veya fenolik) analizi olarak bilinir. Genel olarak FC reaktifi ile belirlenen fenolikler çoğunlukla gallik asit eşdeğerlerinde ifade edilir. FC yöntemi seçici olamayıp ABTS metodu (TEAC) ile benzerlik gösterir. Bu metot ile polifenoller ve monofenoliklerin her ikisini de belirlemek mümkündür. FC yönteminin ABTS'ye göre avantajı, verdiği absorbans yönündedir. Diğerlerinde ise

analizlenecek ürünleri için uygulanan işlemler oldukça duyarlıdır. Diğer taraftan, FCR metodu antioksidan aktiviteyi belirlemek için pek uygun değildir. Gerçekte bu metot gıdaların kabaca antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılan en iyi metotlardandır, ancak analizlenen gıdalar önemli miktarda protein ihtiva etmemelidir (Stevanato ve ark., 2004; Huang ve ark., 2005).

FCR, ilk olarak sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 g), sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25 g) derişik hidroklorik asitten (HCl, 100 mL) oluşan karışımın kaynaması ile hazırlanır. Kaynamadan sonra, lityum sülfat kuvvetli sarı çözelti olması için karışıma eklenir ve FC reaktifi elde edilir. İndirgen maddelerin kontaminasyonu yeşil renge neden olur ve brom gibi oksidan madde ilavesi ile istenen sarı renk tekrar kazanılabilir. FC reaktifinin tam olarak kimyasal yapısı bilinmez ancak heterofolifosfotantat-molibdat içerdiği düşünülmektedir. Ardışık geri dönüşümsüz bir veya iki elektron indirgeme reaksiyonları mavi türlere neden olur. Aslında, molibden komplekste indirgenmesi daha kolay olandır ve indirgeyiciler ile Mo(VI) arasında elektron transfer reaksiyonları meydana gelir:



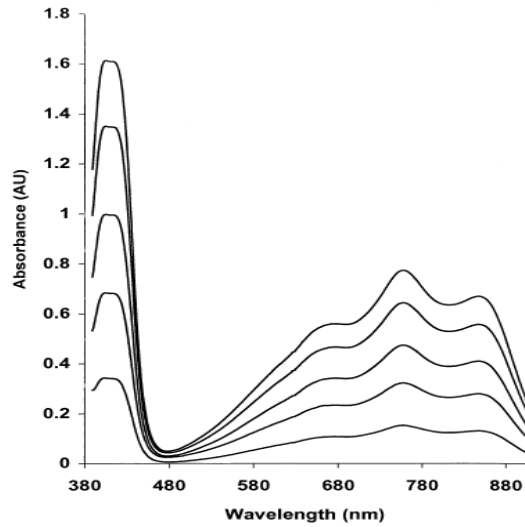
FC reaktifi fenolik bileşikler için spesifik değildir çünkü, birçok fenolik olmayan maddeler tarafından da indirgenebilir (C vitamini ve Cu(I) gibi). Fenolik maddeler yalnızca bazik koşullar altında FCR ile reaksiyona girer (sodyum karbonat ile pH 10'a ayarlanır). Bir fenolik proton ayırma, FCR indirgeme yeteneği olan bir fenolat anyonuna neden olur. Bu olay, reaksiyonun elektron transfer mekanizması yoluyla gerçekleştiği düşüncesini destekler. FCR'nin tanımlanmamış kimyasal yapısına rağmen, FCR ile toplam fenol analizi kullanışlı, kolay ve tekrarlanabilir (Huang ve ark., 2005).

1.3.2. ABTS metodu

ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonikasit)) metodu ilk olarak, biyolojik örnekleri test etmek için Miller ve arkadaşları (1993) tarafından biyolojik örneklerin antioksidan kapasitesini belirlemek üzere önerilmiştir. Daha sonra Re ve arkadaşları (1998) tarafından geliştirilerek gıda ekstraktları ve doğal suda çözünen

fenolikler gibi çeşitli bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi amacıyla geniş ölçüde uygulanmıştır (Rice-Evans ve ark., 1998; Cemeroğlu, 2010). ABTS, maksimum 342 nm dalga boyunda absorblanır, suda yüksek çözünürlüğe ve kimyasal stabiliteye sahiptir. Geliştirilmiş biçimde, $ABTS^-$ (oksidan), $ABTS^{2-}$ 'nin persülfat oksidasyonu ile üretilmiştir (Huang ve ark., 2005).

Bu yöntem, ABTS'nin oksidasyonu ile üretilen $ABTS^+$ radikal çözeltisi üzerine, antioksidan içeren bir örneğin eklenmesi sonucu radikalın indirgenmesi temeline dayanmaktadır. Orijinal ABTS analizi, metmyoglobin (radikal katyon üretmesi için ABTS içinde ve antioksidanların varlığında/yoklunda) hidrojen peroksit ile aktivasyonuna dayanır. Metodun amacı, bir fenolik içerikli örneğe eklenen ABTS'nin oksitlenmesi ile oluşan $ABTS^+$ radikal-katyonun (Şekil 1.1) bozulmasını gözlemektir. Mavi/yeşil renkli $ABTS^+$ radikali, 600-750 nm dalga boyu aralığında güçlü bir absorpsiyona sahiptir ve spektrofotometrede kolaylıkla tespit edilebilmektedir. $ABTS^+$ radikali, antioksidan bir bileşikle reaksiyona girdiğinde radikal, ABTS'nin renksiz formuna çevrilmektedir. Reaksiyon sonucu harcanan $ABTS^+$ miktarı ise Troloks (sentetik bir antioksidan) eşdeğeri olarak hesaplanmakta ve sonuç 'TEAC değeri' olarak ifade edilmektedir. Fenoliklerin yokluğunda $ABTS^+$ oldukça kararlıdır. Ancak fenolikler gibi $ABTS^+$ 'yi renksiz forma dönüştüren H verici atom ile enerjik bir şekilde reaksiyona girer (Re ve ark., 1998; Cemeroğlu, 2010).



Şekil 1.1: ABTS radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu (Re ve ark., 1998).

Miller ve arkadaşları (1993) tarafından kullanılan orjinal yöntemde ABTS⁺ radikali, peroksidaz varlığında hidrojen peroksit ve metmiyoglobinin oluşturduğu ferrimioglobin ile ABTS arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu üretilmektedir. Re ve ark. (1998) tarafından geliştirilen yöntemde ise, ABTS⁺ radikali, ABTS'nin doğrudan potasyum persülfat ile oksidasyonu ile üretilmektedir (Cemeroğlu, 2010).

Spesifik olarak, 7 mM ABTS amonyum suda çözünür ve 2,45 mM potasyum persülfat ile muamele edilir ve karışım koyu mavi çözelti olana kadar yaklaşık 12-16 saat boyunca oda sıcaklığında bırakılır. Bu çözelti, absorbans 734 nm'de 0.7'ye ulaşınca kadar etanol veya tampon (pH 7.4) ile seyreltilir. En son oluşan çözeltinin 1 mL'si 10 µL örnek ile karıştırılır. Absorbans, 30°C'de okunur daha sonra yine 30°C'de 1., 4. ve 6. dakikalarda okunur. Absorbans değerleri arasındaki fark, antioksidan konsantrasyonuna karşı bir doğru vermek için çizilir. ABTS'nin absorbans değişimi ile aynı yüzdeyi veren antioksidanların konsantrasyonu 1 mM Troloks'tur ki, bu da TEAC olarak ifade edilir. Tek bir antioksidan için TEAC, bir antioksidan molekülü başına harcanan radikal katyon ABTS⁺'nin sayısıdır (Huang ve ark., 2005).

ABTS metodu ticari tanımlamasında ABTS⁺, peroksidaz varlığında ve metmiyoglobinden elde edilen radikal ferrimioglobin ile ABTS'nin reaksiyonu sonucu üretilmiştir. Referans antioksidan seçimi ve ABTS⁺ üretimi ile ilgili bu protokolün değişik modifikasyonları önerilmiştir (Romay ve ark., 1996; Flogliano ve ark., 1999). Schleisier ve ark. (2002) ile De Beer ve ark. (2003) ABTS'den ABTS⁺ üretimi için K₂S₂O₈'i önermişlerdir. Kim ve ark. (2002) Troloks yerine referans antioksidan olarak askorbik asit kullanımını tavsiye etmiştir.

Uygulama kolaylığı nedeniyle ABTS metodu, antioksidan kapasite çalışmaları için birçok araştırma laboratuvarında kullanılır. Birçok bileşiğin ve gıda örneklerinin TEAC değerleri belirlenir. Saf antioksidan bileşikleri için TEAC değerleri, antioksidanın verdiği birçok elektron ile TEAC değeri arasında net bir korelasyon göstermez. Askorbik asidin (1.05), α-tokoferolun (0.97) ve ürik asitin (1.01) TEAC değeri hemen hemen aynı olduğu halde, ürik asit bir elektron verebilirken (oksitlenmiş formu için), diğerleri iki elektron redükleyicilerdir. Ferülik asit (1.9) ve *p*-kumarik asitin (2.0) de kıyaslanabilir TEAC değerleri vardır. Bununla birlikte, kafeik asitin TEAC değeri 1.0 olduğu halde, yapısı ferülik asidinkine benzemektedir. Ayrıca, kuersetin (3.0) ve kampferolün (1.0) yapı

benzerlikleri olmasına rağmen aralarındaki TEAC değeri farkı oldukça şaşırtıcıdır (Huang ve ark., 2005).

TEAC yöntemi, hem suda hem de yağda çözünebilen antioksidanların, saf bileşiklerin ve gıda ekstraktlarının antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için uygun bir yöntemdir (Re ve ark., 1998). Bu yöntemin en büyük avantajı, her araştırma laboratuvarında rutin antioksidan kapasite tayinlerinin gerçekleştirilmesine imkan veren nispeten basit bir yöntem olmasıdır (Cemeroğlu, 2010). Bu nedenle, TEAC yöntemi birçok araştırma laboratuvarında, çeşitli bileşiklerin ve gıda örneklerinin antioksidan kapasitesini belirlemek üzere yaygın olarak kullanılmaktadır (Huang ve ark., 2005).

ABTS (TEAC) metodunun avantaj ve dezavantajları aşağıda özetlenmiştir;

- Uygulanması kolay olduğundan pek çok laboratorda ve çalışmada kullanılmaktadır.
- ABTS⁺ katyonu antioksidanlar ile çok kısa sürede reaksiyona girer ve geniş bir pH aralığında çalışılabilir.
- ABTS⁺ katyonu hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebilir, böylelikle hidrofilik ve lipofilik pek çok ortamda kullanılabilir.
- Analizde kullanılan ABTS radikali memeli biyolojisinde bulunmadığından fizyolojik olmayan bir radikal kaynağıdır.
- Nispeten uzun süreli ve zahmetli bir metottur (Prior, 2005).

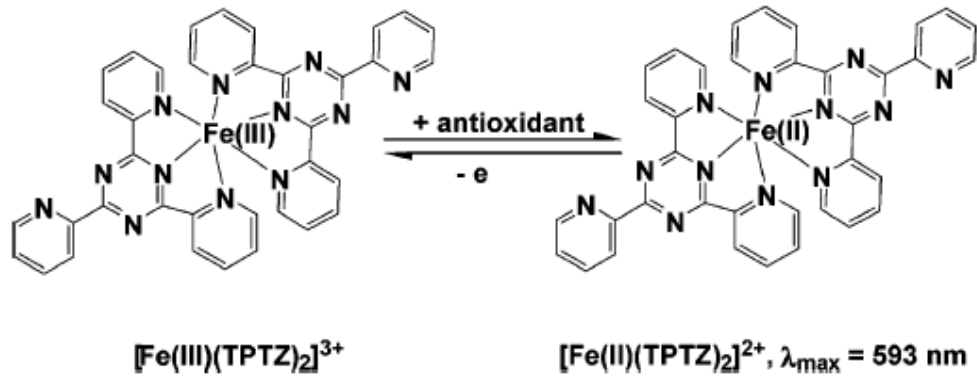
1.3.3. Ferrik iyon indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) metodu

FRAP yöntemi ilk olarak Benzei ve Strain (1996) tarafından, plazmada indirgeme gücünü ölçmek için geliştirilmiştir, ama yöntem sonradan bitkilerde antioksidan analizi için adapte edilerek kullanılmıştır. Reaksiyon ferrik 2,4,6-tripiridril-s-triazin'in (TPTZ) renkli bir ürüne indirgenmesini ölçer (Şekil 1.3).

Reaksiyon, bileşikleri $<0.7V$ 'nin (Fe^{+2} -TPTZ'nin redoks potansiyeli) redoks potansiyelleri ile birlikte tutar, bu sebeple FRAP hücrelerde ve dokularda redoks halini sürdürebilmek için makul bir korumadır. İndirgeme gücü hidroksilasyonun

derecesine ve polifenollerdeli konjugasyonun boyutu ile ilişkilendirilmiş şekilde ortaya çıkar. Ancak, FRAP radikal söndürme (H transferi) ile tesir eden bileşikleri (özellikle tioller ve proteinler) belirleyemez (Prior ve ark., 2005).

FRAP analizi de elektron transfer reaksiyonlarıdır. FRAP yöntemi fenoliklerin Fe^{+3} ü Fe^{+2} ye indirgeme yeteneklerine dayalı bir metottur. Bu reaksiyonda TPTZ varlığında redüksiyona Fe^{+2} ile kompleks yapmış renkli bileşenlerin oluşumu eşlik etmektedir. Bu duruma askorbik asitin eşdeğerlerinde de rastlanmaktadır. FRAP yöntemi kırmızı şaraplarda antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için uygulanmaktadır.



Şekil 1.2: FRAP analizi reaksiyonu (Huang ve ark., 2005).

FRAP analizindeki oksidan, TPTZ (2,5 mL, 10 mM 40 mM HCl'de), 25 mL asetat tamponu ve 2,5 mL $FeCl_3 \cdot H_2O$ (20 mM)'nin karıştırılması ile hazırlanır. Karışım 'FRAP reaktifi' olarak adlandırılır. Son çözelti, Fe(III) (1,67 mM) ve TPTZ (0,83 mM) içerir. Bu nedenle TPTZ, Fe(III) ve(TPTZ) arasındaki ideal reaksiyon stokiometresi bakımından yetersizdir. Oksidan sadece Fe(III)(TPTZ)₂ içermez, aynı zamanda gıda ekstratında Fe(III) bağlayabilen birçok metal şelatlayıcılar ile potansiyel probleme neden olabilen diğer Fe(III) türlerini de içerir. Antioksidanlar ile tepkime yapabilen kompleks formlar oluşturur. FRAP reaktifi 37°C'ye ısıtılır ve reaktif körü 593 nm'de ayarlanır. Daha sonra 10 µL'lik örnek ve 30 µL su eklenir. Absorbans değerleri 0.5 saniyeden sonra ve 4 dakika boyunca her 15 saniyede bir alınır. Absorbans değişimi (ΔA) hesaplanır ve bir Fe(II) standart çözeltisi ile ilgisi kurulur. ΔA lineer olarak antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır. Bir FRAP birimi, 1 mol Fe (III)'ün Fe (II)'ye indirgenmesi olarak tanımlanır. Askorbik asit, α-tokoferol ve ürik asit için FRAP değerleri aynıdır (Huang ve ark., 2005).

FRAP metodunun avantaj ve dezavantajları aşağıda özetlenmiştir (Prior, 2005);

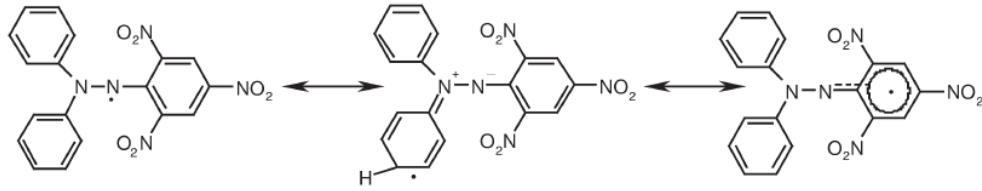
- Reaksiyon çözeltisi 30 dakikadan daha kısa sürede okuma yapılırsa doğru sonuç alınamaz, çünkü fenolik bileşiklerin reaksiyon hızları değişiklik gösterir.
- Glutatyon gibi tiol antioksidanlar için ölçüm yapamaz.
- FRAP, yalnızca ferrik demir iyonu indirgeme kapasitesi esasına dayanır
- Diğer yöntemlere kıyasla daha basit, hızlı, ucuz, güçlü ve özel ekipmanlar gerektirmeyen bir metottur. Otomatik, yarı otomatik ve manuel olarak kullanımı uygulanabilir.

1.3.4. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil radikal süpürme kapasitesi) metodu

Bu yöntem, antioksidan aktivite belirlenmesinde en eski metottur. Bu bahsedilen metot ilk olarak 1950'lerde doğal materyallerdeki H donörlerini (vericilerini) incelemek için kullanılmıştır. Daha sonraları gıdaların ve fenoliklerin antioksidan potansiyellerini belirlemek için kullanılmaya başlanmıştır. DPPH testi; 2,2-difenil-1-pikrikhidrazil kararlı serbest kararlı radikale karşı antioksidanların (H donörleri içeren) radikal savma özelliğinin ölçümünü esas alır (Sanchez-Moreno, 2002).

Bu yöntem, antioksidan bileşiklerin mor renkli stabil bir bileşik olan DPPH (2,2-difenil-1-pikrikhidrazil) radikalini (Şekil 1.4) indirgeme yeteneklerinin ölçümüne dayanmaktadır. İndirgenme reaksiyonu, elektron spin rezonans (ESR) veya dekolorizasyon yöntemi ile değerlendirilmektedir. Çoğunlukla kullanılan teknik, UV-Vis spektrofotometrede radikal çözeltisinin absorbans değerindeki değişimin izlendiği dekolorizasyon yöntemidir. Nitekim, mor renkli DPPH[•] radikali, 515-517 nm dalgaboyunda kuvvetli bir absorpsiyon göstermekte ve bu durum spektrofotometrede kolaylıkla belirlenebilmektedir (Prior ve ark., 2005; Sanchez-Moreno, 2002). Dekolorizasyon yöntemi, ilk olarak Brand-Williams ve arkadaşları

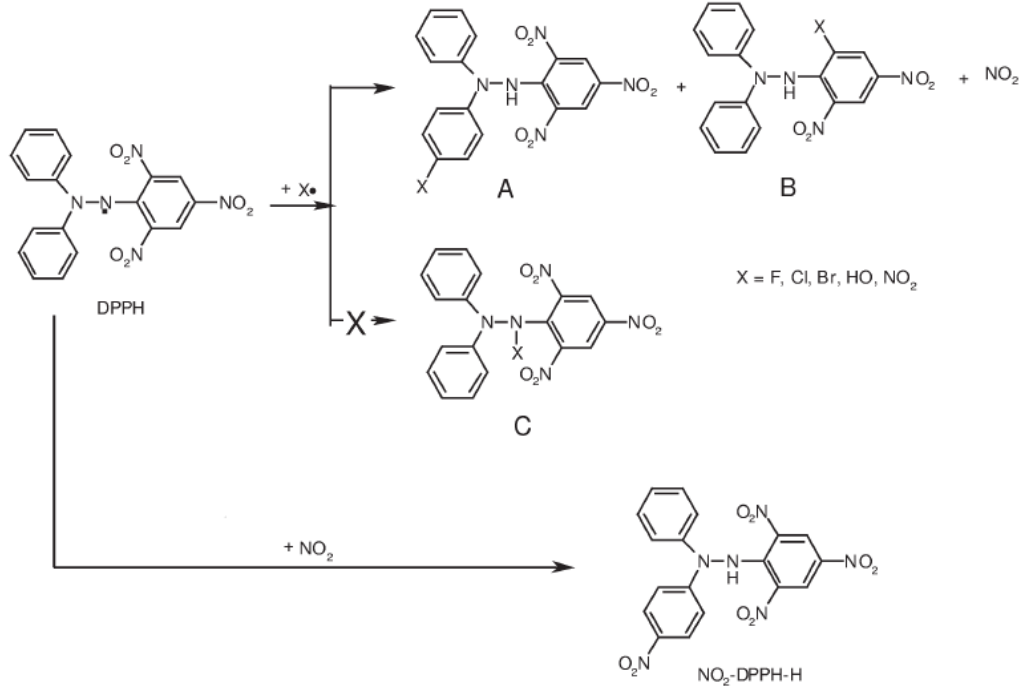
(1995) tarafından çeşitli antioksidan bileşiklerin antiradikal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla uygulanmıştır (Cemeroğlu, 2010).



Şekil 1.3: DPPH serbest kararlı radikalın yapısı (Ionita, 2005)

Yöntem temel olarak, metanol ya da etanolde hazırlanan DPPH[•] radikal çözeltisi üzerine antioksidan bileşiğin eklenmesi sonucu, radikal çözeltisinin renginde meydana gelen azalmanın spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. Yoğun mor renkli DPPH[•] radikal çözeltisi, antioksidan aktiviteye sahip ekstrakt ile karıştırılınca, antioksidan bileşik ortama bir hidrojen atomu vermek suretiyle stabil, radikal olmayan DPPH formuna dönüşmektedir. Bu dönüşüm sırasında eş zamanlı olarak yoğun mor renk (DPPH[•]) kaybolmakta ve indirgeme sonucu sarı renk (DPPH) oluşmaktadır (Cemeroğlu, 2010). Bu reaksiyon kısaca Şekil 1.5'te özetlenmiştir.

Bu yöntemde en önemli parametrelerden bir tanesi EC₅₀ (efficient concentration/ etkin konsantrasyon) değeridir ve analiz sonuçları genel olarak 'EC₅₀ değeri' ile değerlendirilmektedir. 'EC₅₀ değeri', 'ortamda bulunan DPPH radikalının %50'sini inhibe eden antioksidan maddesinin konsantrasyonu' olarak ifade edilmektedir (Sanchez-Moreno, 2002). Bu değer ne kadar küçük olursa, antioksidan aktivite o kadar yüksek demektir. EC₅₀ değeri ile antioksidan aktivite arasındaki bu ters orantı, sonuçların yorumlanmasını güçleştirmektedir. Bu nedenle, sonuçlar ifade edilirken genellikle, EC₅₀ değeri'nin tersi (1/EC₅₀ değeri) alınarak hesaplanan 'AE (antiradikal efficiency/ antiradikal etkisi) değerinden' yararlanılmaktadır. Antioksidan aktivite düzeyi; % inhibisyon, (kalıntı konsantrasyon), 'etkili konsantrasyon' şeklinde ifade edilebileceği gibi Troloks, BHT, askorbik asit gibi yapay bir antioksidan eşdeğeri olarak da ifade edilebilmektedir (Cemeroğlu, 2010).



Şekil 1.4: DPPH radikali ile X anyonu reaksiyonu (Ionita, 2005).

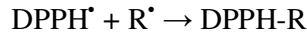
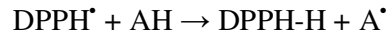
Yöntemde önemli parametrelerden bir diğeri de 'reaksiyon süresi'dir. Reaksiyon süresi antioksidan özelliğe sahip substrata bağlıdır. Dolayısıyla sabit bir reaksiyon süresi olmadığı, her gıda maddesi için bu sürenin değişebileceği unutulmamalı ve her ekstrakt için bu süre titizlikle belirlenmelidir. Reaksiyon süresi, başlangıç anı ile reaksiyonun tamamlandığı yani spektrofotometrede absorbans değişiminin bittiği zaman aralığıdır. DPPH radikali üzerine, ilgili gıda ekstraktı eklendikten sonra spektrofotometrede absorbans değişimi izlenerek bu süre belirlenebilmektedir (Cemeroğlu, 2010).

DPPH yöntemi, kolay, hızlı, hassas, tekrarlanabilir ve UV-Vis spektrofotometre dışında herhangi bir ekipman gerektirmeyen bir yöntemdir. Ayrıca, analizde kullanılan radikal çözeltisinin önceden oluşturulması gerekmemekte, radikal ticari olarak hazır şekilde temin edilebilmektedir. Bu nedenlerle, DPPH yöntemi birçok araştırma laboratuvarında, çeşitli bileşiklerin ve gıda örneklerinin antioksidan kapasitesini belirlemek üzere yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu avantajlarına karşın, çalışılan dalgaboyu (515-517 nm) bu yöntemin en büyük dezavantajıdır. Çünkü bu dalgaboyunda özellikle karotenoidler gibi bazı bileşenler analizi interfere etmektedir. Dolayısıyla spektrofotometrede elde edilen değer, analizi interfere eden

bu bileşenlerden kaynaklanabilmektedir. Bu tip ekstraktlarda DPPH yöntemi ile elde edilen sonuçlarla diğer bir antioksidan yöntemi ile elde edilen sonuçlar arasında zayıf bir korelasyon olmaktadır (Prior ve ark., 2005; Sanchez-Moreno, 2002). Ionita (2005), DPPH serbest kararlı radikalinin aktif oksijen türleri için iyi bir savor olmadığını bildirmiştir.

Bu yöntemin uygulanmasında, çeşitli araştırmacılar tarafından farklı başlangıç radikal konsantrasyonları ve farklı reaksiyon süreleri kullanılmaktadır. DPPH yönteminin ilkesi, mor renkli stabil bir bileşik olan DPPH radikalinin, test bileşiği ile reaksiyonundan sonra indirgenmesi sonucu, renkte meydana gelen azalmanın spektrofotometrede 515 nm dalgaboyunda ölçülmesine dayanmaktadır (Cemeroğlu, 2010). 1 mM DPPH radikal çözeltisi hazırlanır. Örneğin, 100mL'lik bir çözelti hazırlamak için 0.03943g DPPH tartılır, bir miktar metanol içinde çözdürülerek kayıpsız şekilde 100 mL'lik bir ölçü balonuna aktarılır ve metanol ile balon hacmine tamamlanır. Böylece, 1 mM'lik 100 mL DPPH çözeltisi hazırlanmış olur. Bu çözelti, her gün taze olarak hazırlanmalı ve gün içinde ölçüm yapılmadığı anlarda alüminyum folyoya sarılı bir şekilde, karanlık bir ortamda ve +4°C'de muhafaza edilmelidir (Cemeroğlu, 2010).

DPPH; H donörleri ile oluşan reaksiyon da ABTS⁺'den daha seçicidir. ABTS⁺'den farklı olarak DPPH, B- halkalarında sadece 1 OH grubu bulduran aromatik asitlerle ve hiç OH grubu buldurmeyen flavonoidler ile reaksiyona girmez (Barut ve Kural, 2006).



DPPH metodu genel olarak aşağıdaki prosedürü izler:

Metanol içindeki DPPH çözeltisi örnek çözeltisi ile karıştırılır. Karışımın reaksiyon ilerleyiş absorbanı, 30 dakika boyunca 517 nm'de veya absorbanı stabil olana kadar izlenir. Reaksiyon sırasında çözelti rengi açılır (Prior ve ark., 2005).

Kalan DPPH yüzdesi;

$$\% \text{ DPPH}_{\text{kalan}} = 100 \times [\text{DPPH}]_{\text{kalan}} / [\text{DPPH}]_{t=0} \text{ olarak hesaplanır.}$$

Yüzde $DPPH_{kalan}$, antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır ve başlangıç DPPH konsantrasyonunu %50 oranında düşürmek için gerekli konsantrasyonu EC_{50} olarak tanımlanır. EC_{50} konsantrasyonu ile kararlı duruma ulaşmak için gerekli zaman kinetik eğriden hesaplanır (Prior ve ark., 2005).

DPPH testi dinamik ve statik şekilde yapılabilir. Dinamik şekilde, fenolik içeren örnek eklendiğinde izlenen DPPH azalama hızının ölçülmesi esas alınmıştır. Statik şekilde ise örnek analizi ile hapsedilen DPPH miktarının belirlenmesi yer almaktadır (Barut ve Kural, 2006).

DPPH metodunun avantaj ve dezavantajları aşağıda özetlenmiştir (Prior ve ark., 2005);

- Basit, tekrarlanabilir ve sadece UV spektrofotometreye gereksinim duyar, bu sebeplerden dolayı antioksidan kapasitesi analizlerinde yaygın şekilde kullanılmaktadır.
- 515 nm'de test bileşenlerinin spektrası DPPH'inkini aşarsa yorumlaması karışıktır.
- Analizdeki reaksiyon DPPH hem oksidan hem de sustrat olduğundan yarışmalı reaksiyon değildir.

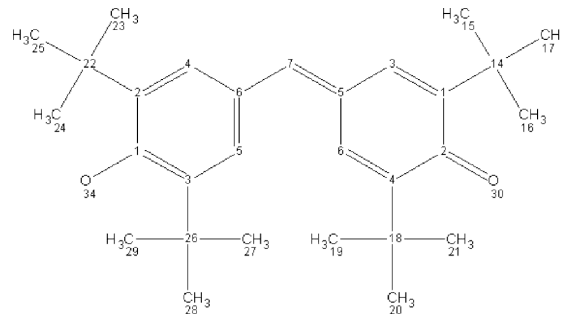
1.4. Galvinoxil Radikali

Doğal antioksidanları belirlerken, toplam antioksidan gücü ölçmek için hızlı ve basit metot kullanmak çok önemlidir. Bu amaçla şimdiye kadar pek çok analiz ortaya konmuştur. Bu analizler, antioksidanların reaksiyona girdiği oksidatif türlerin çeşitlerine göre üç kategoride sınıflandırılabilir. Birinci kategoride antioksidanlar, otoksidasyon reaksiyonunda aracı türler olarak meydana gelen peroksidiklerle reaksiyona girer. Antioksidan aktivitesi organik çözelti veya miseller sistemdeki otoksidasyona karşı engelleyici etkisini ölçme yoluyla görüntülenir. İkinci kategoride antioksidanlar metal belirteci indirgerler. Çoğunlukla potasyum permanganat, demir klorür ve FCR kullanılır. Üçüncü kategoride antioksidanlar stabil radikallerle reaksiyona girerler. Bu amaçla DPPH, ABTS radikal katyonu ve DMPD radikal katyonu kullanılır (Ochiai ve ark., 2003).

Ochiai ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada kararlı radikal olarak galvinoksil radikali kullanmışlardır. Elektron spin rezonans (ESR) spektroskopisi analizi galvinoksil savmaya dayalı olarak antioksidan aktiviteyi belirleyebilir. Ancak bu ESR, pahalı bir cihazı ve basit olmayan deneysel prosedürü gerektirir. Yazarlar galvinoksil radikali kullanılarak antioksidan aktiviteyi ölçmek için spektroskopik bir metot geliştirilmiştir. Flavonoidler gibi antioksidanların varlığında dekolorize olabilen galvinoksil radikali 432 nm’de stabil absorpsiyon göstermiştir. Deneysel protokol ESR analizine kıyasla basit ve ucuzdur. Hidrofilik ve hidrofobik antioksidanlar aynı prosedür izlenerek analiz edilebilir. Hassaslığı 1 µM’den daha az konsantrasyonlarda bile antioksidanı belirleyebilecek kadar yeterince yüksektir. Bu analizde fenoller, hidrokisinsamik asitler, kromanlar, flavonlar, flavononlar, flavanoller, kumarinlar ve askorbik asit analiz edilmiş ve hassaslık - yapı bağıntısı tartışılmıştır.

Galvinoksil oda sıcaklığında ferromanyetik faz sergileyen stabil ve devamlı bir radikal olmasından dolayı en çok ümit veren radikallerden biridir. Prensipte eşlenmemiş elektron içeren her atom veya molekül radikal olarak önceden tanımlanmıştır. Ancak yalnızca bazıları çevre koşullarda ve adsorpsiyon sırasında stabil ve devamlı karardır (Niermann ve ark., 2006).

Organik radikallerin manyetik davranışları hakkındaki çalışmalar 1957’de galvinoksile (2,6-di-tert-butil-4-3,5-di-tert-butil-4-oksikloheksa-2,5-dieniliden-emetil-fenoksi) olan ilgi ile başlamıştır. Molekül ilk kez, kaşifi “Copping-radikal,” diye adlandırdıktan sonra, açıkça kendi ilk ismi olan Galvin ile düzenlenerek günümüzdeki haliyle isimlendirilmiştir. Galvinoksil kristali ile yapılan çalışmalar, manyetik özelliklerinin sıcaklığa bağlı olarak değiştiğini göstermiştir (Niermann ve ark., 2006). Şekil 1.6’da galvinoksilin kimyasal yapısı görülmektedir.

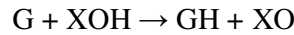


Şekil 1.5: Galvinoksilin kimyasal yapısı (Niermann ve ark., 2006).

Galvinoksil radikali iki *p*-benzokuinonemetid (DMBQM) parçaları olarak düşünülebilir. Galvinoksil radikali, ferromanyetiktir. Maddelerin manyetik özelliklerini belirleyen iki grup özellik vardır: bireysel moleküler türlerin özellikleri (elektronik yapı, kararlılık) ve kristal paketlemeye bağlı spatial (uzamsal, uzaysal) ihtiyaçlar. Geniş hacim kaplayan *t*-Bu (tersiyer bütül) grupları galvinoksil radikalini, moleküllerin rekombinasyonunu ve kovalent bağların oluşumunu engelleyerek stabil halde tutarlar (Novak ve Kovac, 2005).

Shi ve Niki (1998) galvinoksil radikalini kullanarak geliştirdikleri bir teknik ile yaptıkları stokiyometrik ve kinetik çalışmalarla Ginkgo biloba ile bazı antioksidanların antioksidan aktivitesini karşılaştırarak sunmuştur. Stokiyometrik çalışmalar bir molekül tokoferolün bir molekül galvinoksil ile reaksiyona girdiğini göstermiştir. Bir molekül galvinoksil, sırasıyla 4.0, 1.9 ve 3.1 molekül kuarsetin, kamferol ve propil gallat ile reaksiyona girmektedir.

Stokiyometrik çalışmada, kararlı bir fenoksi radikal olan galvinoksil etanolde 428 nm'de güçlü bir absorpsiyon pikine sahiptir. Bu hidrojen bağışlayan serbest radikal savarlar tarafından indirgenebilir ve çeşitli bileşiklerin antioksidatif aktivitesini belirlemek için kullanılır. Hidrojen bağışlayan antioksidan ile galvinoksilin reaksiyonu aşağıdaki eşitlikteki gibidir:



Prensip olarak bir galvinoksil radikali bir aktif hidroksil grubu ile reaksiyona girer. Böylece galvinoksil ile reaksiyona giren aktif fenolik hidrojenlerinin miktarını, galvinoksil konsantrasyonunun hidrojen bağışlayıcı serbest radikal savar konsantrasyonundan daha çok olduğu koşullarda reaksiyon çözeltisinde galvinoksil absorbansının azalması ile belirleyebiliriz (Shi ve Niki, 1998).

Shi ve Niki (1998) denemelerinde kullanılacak galvinoksil konsantrasyonunu en yüksek 10 µM, saf bileşikler için 0.1-2.0 µM olarak tayin etmişlerdir. Reaksiyon galvinoksil etanol çözeltisinin hidrojen bağışlayıcı bileşikle karışımı ile başlayıp 20 dakika boyunca devam eder. Reaksiyon süresi sonunda 428 nm'de elde edilen absorbans düşüşü spektrofotometre ile elde edilir. Galvinoksilin etanol çözeltisindeki kinetik çalışmaları da 428 nm'de elde edilmiştir (Shi ve Niki, 1998).

Galvinoksil, antioksidanların reaksiyonlarını çalışmak için prob olarak kullanılan kararlı bir serbest radikaldir (Smith ve ark., 2000). Galvinoksil ile yapılan testlerde, E vitamini ve askorbik asit ile kolay ve çabuk reaksiyona girmiş ve araştırmacılar galvinoksil analizini yeni potansiyel antioksidanları belirlerken kıyaslamalarda kullanılmıştır (örn: Shi ve Niki, 1998). Bu metot ile, test devam ederken izole edilen bileşiklerin degradasyonu ile ilişkilendirilen antioksidan aktivite kaybının ölçümü alınabilir (Smith ve ark., 2000).

Organik radikaller organik reaksiyonlarda genellikle kararsız geçiş ortamları olarak bilinirler. Ancak, galvinoksil kristal radikalleri gibi bazı organik radikaller ve nitroksil, uygun atmosferde birkaç aydan birkaç yıla kadar dayanabilecek kadar çok kararlıdır (Kaneko ve ark., 2000).

Greene ve Adam (1963) galvinoksilin kararlılığı üzerine çalışmalarda bulunmuşlardır. Karanlık ortamda $10^{-3}M$ 'lık galvinoksil çözeltisinin, konsantrasyonu indüksiyon periyodu hızla düştükten sonra optik yoğunluğunda dakikalarca nerdeyse hiçbir değişiklik geçirmediğini gözlemişlerdir. Galvinoksil çözeltisi oksijenli ortamda karıştırıldığında, galvinoksil azalması oranı (spektrofotometrik olarak takibinde) oksijen alımı oranı ile çok yakın paralellik göstermiştir. Galvinoksil mol başına oksijen tüketimi 1.4 mol olmuştur. Kosaki ve ark. (1969) yaptıkları çalışmada galvinoksil radikalinin termodinamik özelliklerini incelemişlerdir. Galvinoksil radikalinin ısı kapasitesi ve fenol derivatı ölçülmüş ve elde edilen sonuç anormal bir şekilde ısı kapasitesi, sadece manyetik hal değişimi ısısını karşılayan $81.5^{\circ}K$ olarak bulunmuştur.

Tsuchiya ve ark. (1985) 2.5mM galvinoksil ve 25mM askorbik asit içeren iki metanol çözeltisini oda sıcaklığında karıştırmış ve galvinoksil ani bir şekilde azalma göstermiştir. Diğer yandan ise, sistein veya glutatyon ile karıştırıldığında ise zamanla kademeli olarak azalma göstermiş ve ilk nokta iyi bir lineer hat vermiştir. Sonuçta, galvinoksil radikali hidrojen atomu alarak indirgeyen ajanlar ile etkileşimde olmuştur. ESR cihazı kullanarak elde edilen değerlere göre galvinoksilin her sistemde göreceli reaktivitenin askorbik asit>sistein>glutatyon şeklinde azaldığını göstermiştir.

Bu yüksek lisans tezinde, galvinoksil radikali bazlı bir spektrofotometrik antioksidan aktivite tayin yöntemi modifiye edilmiştir. Modifiye edilen yöntem

üzerine etki eden solvent ve ortamdaki saf bileşen varlığı gibi faktörler irdelenmiştir. Meyve sularının antioksidan aktivitesi modifiye edilen yöntem ile tespit edilmiş ve yaygın olarak kullanılan diğer yöntemler (ABTS, FRAP ve DPPH yöntemleri) ile toplam fenolik madde içeriği arasındaki korelasyon incelenmiştir. Galvinoksil radikal çözeltisinin muhafaza koşullarına bağlı olarak stabilitesi belirlenmiştir.

2. MATERYAL- METOT

2. 1. Materyal

Analizlerde; Folin Ciocalteu reagent (Merck, Almanya), sodyum karbonat, glasiyel asetik asit, HCl, FeCl₃.6H₂O, (Riedel-de Haen, Almanya), gallik asit, TroloxTM, kateşin, BHT, askorbik asit, galvinoxil, TPTZ, DPPH (Sigma-Aldrich, Almanya), sodyum asetat (Kimetsan, Ankara Türkiye), kimyasalları kullanılmıştır. Çözücü olarak HPLC saflıktaki etanol, metanol ve aseton kullanılmıştır.

Bu çalışmada kullanılan meyve suları ulusal şubeleri olan bir marketten temin edilmiştir. Meyve sularından (%100 meyve suyu) çeşit olarak nar, portakal, üzüm, elma ve domates suyu seçilmiştir.

2. 2. Metot

2. 2. 1. Antioksidan bileşikler için kalibrasyon eğrisi oluşturulması ve lineer konsantrasyon aralığının belirlenmesi

Galvinoxil radikalinin çalışma çözeltilisinin uygun konsantrasyon aralıkları belirlenmiştir. GRAC yöntemi için çalışma çözeltilisinde kullanılacak olan konsantrasyonu belirlerken sırasıyla 4, 8 ve 10 µM'lık konsantrasyonlarda (küvet içi son konsantrasyon) çalışma çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışma çözeltisi, stok çözelti seyreltilerek hazırlanmış ve bu amaçla stok çözelti gradient etanol ile son absorbans 1.20±0.02 olacak şekilde seyreltilmiştir. Çalışma çözeltileri ile uygun farklı Troloks konsantrasyonlarında kalibrasyon eğrisi çizdirilmiştir. Troloks kalibrasyon eğrisi için spektrofotometre küvetindeki son konsantrasyon 1.66 µM'dan düşük olacak şekilde

Troloks çözeltisi hazırlanmıştır. Troloks kalibrasyon eğrisinde en iyi sonucu veren konsantrasyon galvinoksil çalışma çözeltisinin konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. DPPH, FRAP ve ABTS yöntemleri için daha önceden belirlenen ve kullanılan Troloks konsantrasyonlarında kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. GRAC yönteminde ise Bölüm 2.2.5.1’de anlatıldığı şekilde hazırlanan galvinoksil çalışma çözeltisi kullanılarak farklı konsantrasyonlarda etanol içerisinde hazırlanan Troloks, gallik asit, BHT, askorbik asit ve kateşin gibi saf bileşikler için kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir ve her bir saf bileşik için kalibrasyon eğrilerinin lineer bölgeleri belirlenmiştir. Lineer bölgeler tespit edildikten sonra çalışma en az dört tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

2. 2. 2. Sıcaklık ve depolama süresinin galvinoksil radikali stabilitesi üzerine etkisi

Stabilite testine başlamadan önce analiz sırasında çalışma çözeltisinin absorbans kaybını belirlemek için 320-500 nm dalgaboyunda çözeltinin farklı konsantrasyonlardaki Troloks varlığında spektrum taraması elde edilmiştir. Galvinoksil radikalının stabilitesini belirlemek amacıyla stok ve çalışma çözeltileri farklı sıcaklıklarda ve sürelerde depolanmıştır. Bunun için ilk gün stok galvinoksil çözeltisinden çalışma çözeltisi hazırlanarak okuma yapılmıştır. Çalışma çözeltisi +4°C ve -22°C’de amber şişelerde 5 gün süreyle muhafaza edilmiştir. Depolanan çalışma çözeltilerinin absorbans ölçümleri spektrofotometrede 428 nm dalga boyunda her gün aynı saatte yapılmıştır. Stabilite testi için bu çalışma farklı zamanlarda 3 kez tekrar edilmiştir. İlk gün okunan absorbans ölçümleri yüz birim kabul edilerek, göreceli absorbans düşüşleri hesaplanmıştır.

2. 2. 3. Bazı saf bileşiklerin galvinoksil radikali üzerine etkisi

Saf bileşiklerin galvinoksil radikali üzerine etkisini izlemek için Troloks standart kalibrasyon eğrisi çizdirilmiştir. Saf bileşiklerden; glisin %0.01, albümin %0.003 ve 0.006, tirozin, arginin ve sistin %0.0005 ve 0.005, glukoz ve sakaroz %5, üre %0.0525 ve ürik asit %0.01’lik çözeltileri hazırlanmıştır. 3800 µL galvinoksil

çalışma çözeltisi 200 µL örnek ilave edilerek spektrofotometrede 428 nm’de okuma yapılmıştır. Sonuçlar standart sapma ile birlikte ifade edilmiştir.

2. 2. 4. Galvinoksil radikali üzerine farklı solventlerin etkisi

Galvinoksil radikalının farklı solventler ile çalışıldığında sonuçların değişkenliğini belirlemek amacıyla solvent olarak etanol, metanol, aseton ve su kullanılmıştır. Ayrı ayrı 10mM gallik asit çözeltisi ile 10mM kateşin çözeltisi hazırlanmıştır ve bu iki çözelti hacimce 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Etanol, metanol, metanol-su (50:50 v/v), metanol-su (30:70 v/v), aseton-su (50:50 v/v) solventleri kullanılarak, Troloks kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Bu eğriler kullanılarak gallik asit-kateşin karışımının Troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan aktivitesi tayin edilmiştir.

Ekstraksiyon solventi türünün Troloks varlığında ve yokluğunda galvinoksil radikali üzerine etkisinin araştırılması için önce galvinoksil çalışma çözeltisi 428 nm dalga boyunda absorbans yaklaşık 1.20 ± 0.02 olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra çalışma çözeltisinin içerisine belirli hacimde solvent ve/veya Troloks çözeltisi ilave edilerek (Tablo 2.1) 30 dakika boyunca 1 dakikalık periyotlarla spektrum taraması yapılmıştır. Süre sonunda galvinoksilin yüzde kaybı belirlenmiştir.

Tablo 2.1: Solvent türü ve Troloks varlığının galvinoksil radikali üzerine etkisinin belirlenmesi için kullanılan deneysel tasarım.

Deney No	Solvent türü	Troloks varlığı
1	Etanol	-
2	Etanol	Troloks
3	Metanol	-
4	Metanol	Troloks
5	Su	Troloks
6	Aseton	Troloks
7	Aseton	-

Her bir deneyde 3600 µL galvinoxil çalışma çözeltisi, 200 µL solvent ve 200 µL Troloks çözeltisi (0.5µM) kullanılmıştır. Troloks içermeyen denemelerde ise etanol ilave edilmiştir.

2. 2. 5. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

2. 2. 5. 1. GRAC yöntemi

Galvinoxil stok çözeltisi etanol içerisinde konsantrasyonu 67mg/100mL (1600 µM) olacak şekilde hazırlanmıştır. Çalışma çözeltisi, stok çözelti seyreltilerek hazırlanmış ve bu amaçla stok çözelti gradient etanol ile son absorbans 1.20 ± 0.02 olacak şekilde seyreltilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Troloks ile elde edilmiştir. Troloks kalibrasyon eğrisi için spektrofotometre küvetindeki son konsantrasyon 1.66 µM'dan düşük olacak şekilde Troloks çözeltisi hazırlanmıştır. Deneylerde 200 µL örnek veya standart 3800 µL galvinoxil çalışma çözeltisi ile karıştırılarak test tüplerinde karıştırılmış ve reaksiyona karanlık bir ortamda 20 dakika devam edilmiştir. Bu süre sonunda renkli ürünün absorbansı spektrofotometrede (T80 UV/VIS Spectrometer, PG Instruments Ltd., İngiltere) 428 nm dalga boyunda okunmuştur. Örnekler için absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisinin içine düşmesi için örnekler gerektiğince kat seyreltilmiştir.

2. 2. 5. 2. DPPH yöntemi

DPPH stok çözeltisi metanol içerisinde son konsantrasyonu 24mg/100mL olacak şekilde hazırlanmış ve kullanım öncesinde -20°C 'de depolanmıştır. Çalışma çözeltisi, stok çözelti seyreltilerek hazırlanmış ve bu amaçla stok çözelti metanol ile son absorbans 1.20 ± 0.02 olacak şekilde seyreltilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Troloks ile elde edilmiştir. Troloks kalibrasyon eğrisi için spektrofotometre küvetindeki son konsantrasyon 50µM'dan düşük olacak şekilde Troloks çözeltisi hazırlanmıştır. Deneylerde 150µL örnek veya standart 2850µL DPPH çalışma çözeltisi ile karıştırılarak test tüplerinde karıştırıldı ve reaksiyona karanlık bir ortamda 60 dakika devam edilmiştir. Bu süre sonunda renkli ürünün absorbansı 515 nm dalga boyunda

spektrofotometrede okunmuştur. Örneklere ait absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisinin içine düşmesi için örnekler gerektiğince kat seyreltilmiştir (Thaipong ve ark. 2006).

2. 2. 5. 3. FRAP yöntemi

Asetat tamponu (300mM) hazırlamak için 3.1g sodyum asetat.3H₂O tartılarak üzerine 16mL glasiyal asetik asit ilave edilmiştir. Karışım 1L ölçü balonuna alındı ve hacim çizgisine kadar distile suyla tamamlanmıştır. pH'nın 3.6 olup olmadığı kontrol edildi ve çözelti 4°C sıcaklıkta buzdolabında saklanmıştır. Seyreltik HCl (40mM) çözeltisi hazırlamak amacıyla 1.46mL derişik HCl (11M) alınıp, 1L ölçü balonuna alındı ve hacim çizgisine kadar distile suyla tamamlanmıştır. Oda sıcaklığında depolanmıştır. TPTZ (10mM) çözeltisi hazırlamak için 0.031g TPTZ tartılır üzerine 10mL seyreltik HCl (40mM) konulur. Karışım 50°C'de su banyosunda çözdürülür. Bu karışım deney günü taze olarak hazırlanmıştır. Demir (III) klorür çözeltisi için ise (20mM), 0.054g FeCl₃.6H₂O 10mL distile suda çözdürüldü. Bu karışım deney günü taze olarak hazırlanmıştır. FRAP karışımı hazırlama amacıyla 25mL asetat tamponu 2.5mL TPTZ ve 2.5mL FeCl₃ ile karıştırılmış ve kullanılmadan önce 37°C sıcaklıktaki su banyosunda tutulmuştur. Bu karışım deney günü taze olarak hazırlanmıştır. Troloks kalibrasyon eğrisi için spektrofotometre küvetindeki son konsantrasyon 50µM'dan düşük olacak şekilde Troloks çözeltisi hazırlanmıştır. Deneylerde 150µL örnek veya standart 2850µL FRAP karışımıyla karıştırılarak test tüplerinde karıştırılmış ve reaksiyona karanlık bir ortamda 30 dakika devam edilmiştir. Bu süre sonunda elde edilen renkli ürünün (demir tripidriltriazin kompleksi) absorbansı 593nm dalga boyunda okunmuştur. Örneklere ait absorbans değerlerinin kalibrasyon eğrisinin içine düşmesi için örnekler gerektiğince kat seyreltilmiştir (Thaipong ve ark. 2006).

2. 2. 5. 4. ABTS yöntemi

Spesifik olarak, 7.4 mM'lık ABTS amonyum suda çözüldürülmüş ve 2.6 mM'lık potasyum persülfat ile hacmen 1:1 oranında karıştırılmıştır. Karışım koyu

mavi çözelti olana kadar yaklaşık 12-16 saat boyunca oda sıcaklığında bırakılmıştır. Bu çözelti, absorban 734 nm’de son absorban 1.20 ± 0.02 olacak şekilde metanol ile seyreltilmiştir. Kalibrasyon eğrisi Troloks ile elde edilmiştir. Deneylerde $150\mu\text{L}$ örnek veya standart $2850\mu\text{L}$ ABTS karışımıyla karıştırılarak test tüplerinde karıştırıldı ve reaksiyona karanlık bir ortamda iki saat devam edilmiştir. Sonuçlar TEAC olarak ifade edilmiştir.

2. 2. 6. Toplam fenolik madde miktarı

Toplam fenolik madde tayininde Micro-adapted Folin Ciocalteu yöntemi kullanılmıştır (Cemeroğlu ve Ark., 2007). Folin Ciocalteu ajanı, hacmen 1:10 oranında distile su kullanılarak seyreltilmiş ve analiz öncesinde kahverengi cam şişede depolanmıştır. Sodyum karbonat çözeltisi (%20) hazırlamak amacıyla 75g/L olacak şekilde sodyum karbonat tartılmış ve ölçü balonu distile suyla hacim çizgisine tamamlanmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi hazırlamak için 500mg/L konsantrasyonda stok çözelti hazırlanmış ve lineer bölgede son konsantrasyon 5-100mg/L olacak şekilde seyreltme yapılmıştır. 2mL örnek veya standart alınmış ve üzerine 10mL seyreltilmiş FC ajanı ilave edilmiştir. Reaksiyon başladıktan 1 dakika sonra ve 8 dakika öncesinde 8mL %20’lik sodyum karbonat ilave edilmiş ve karışım 2 saat karanlık bir ortamda bırakılmıştır. Süre sonunda absorbanlar 760nm dalga boyunda okunmuştur. Değerlerin kalibrasyon eğrisi içine düşmesi için örnekler gereğince kat seyreltilmiştir.

2. 2. 7. Ticari meyve sularının antioksidan aktivitesinin belirlenmesi

Analizlerde kullanılan %100 meyve suları berrak olmadığından analiz öncesinde 4°C ’de 16000g ’de 10 dakika santrifüjlenerek (Hettich Zentrifugen, Universal 30RF, Almanya) berrak süpernatant (üst faz) kısım kullanılmıştır. Elde edilen süpernatantlar seyreltme gerektiğinde analiz yöntemine uygun solventler kullanılarak seyreltme işlemi yapılmıştır. GRAC analizi bekleme süresi sonunda bazı meyve sularında bulanıklık gözlenmiştir. Bulanıklık sonucu etkileyeceğinden dolayı

spektrofotometrede okuma yapmadan önce nar, portakal ve domates suları 2200g'de oda sıcaklığında tekrar santrifüjleme yapılmıştır.

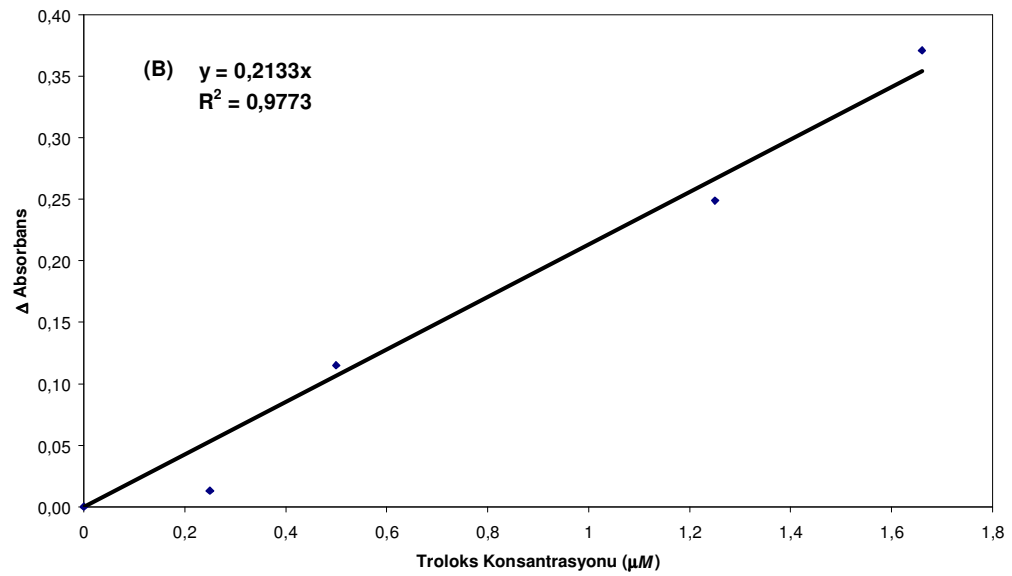
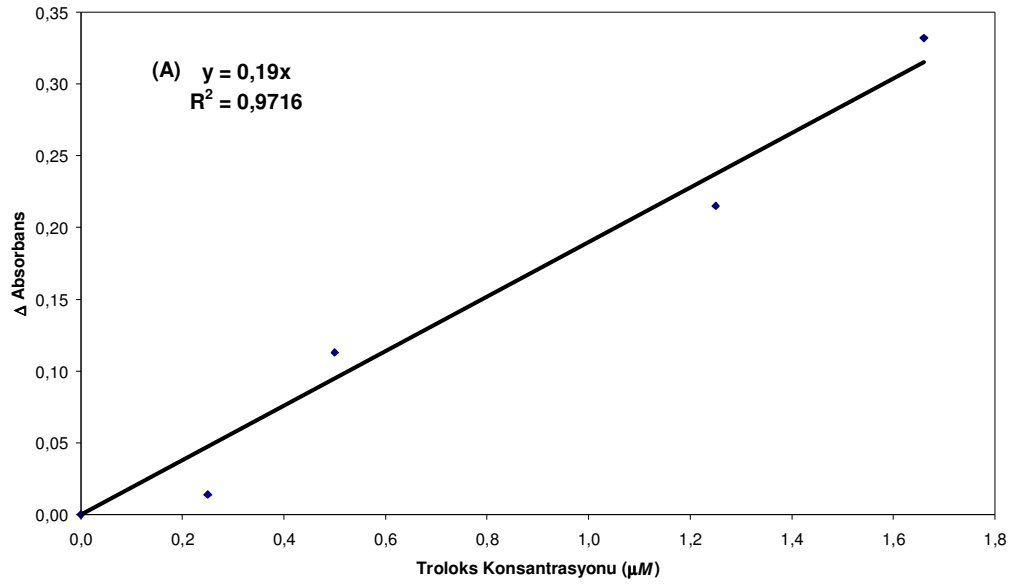
2.3. İstatistiksel Yöntemler

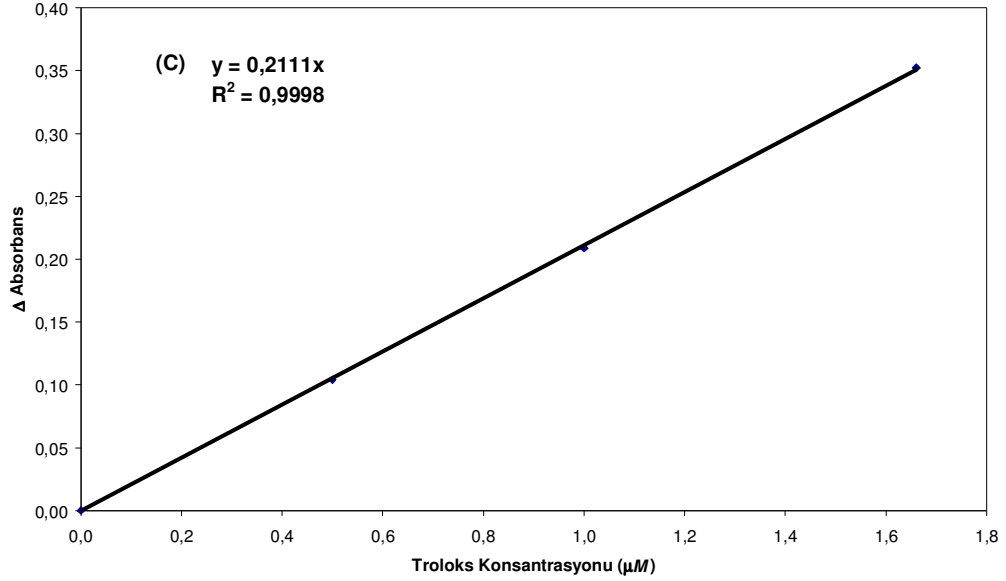
Sonuçlar İstatistiksel Analiz Sistemi yazılımını kullanılarak analiz edilmiştir (SAS Institute, 1990). Değerler arasındaki önemli farklılıkları belirlemek için (Tukey çoklu karşılaştırma testi) kullanılmıştır. Çalışılan parametreler arasındaki Pearson korelasyon katsayılarını (R) belirlemek için PROC CORR kullanılmıştır.

3. BULGULAR VE TARTIŞMA

3.1. Antioksidan Bileşikler İçin Kalibrasyon Eğrisi Oluşturulması ve Lineer Konsantrasyon Aralığının Belirlenmesi

Çalışmanın ilk aşamasında, kullanılacak galvinoxil radikal çözeltisinin uygun çalışma konsantrasyonu belirlenmiştir. Bu amaçla çalışılacak galvinoxil radikal çözeltisinin konsantrasyonu literatür bilgileri ışığında 4, 8 ve 10 µM galvinoxil radikali seçilmiştir. Seçilen bu üç galvinoxil radikal konsantrasyonunda Trolox standart maddesi yardımı ile kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Bu eğrileri tanımlayan eşitlikler ve bu eşitliklerin regresyon katsayıları Şekil 3.1’de toplu halde gösterilmiştir. 4, 8 ve 10 µM galvinoxil radikali konsantrasyonları ile elde edilen eğrilerin regresyon katsayıları (R^2) sırasıyla 0.9716, 0.9773 ve 0.9998 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler ışığında, 10 µM konsantrasyonundaki galvinoxil radikal çözeltisinin en uygun çalışma çözeltisi olduğu sonucuna varılmıştır. 10 µM konsantrasyonundaki Trolox içermeyen galvinoxil çözeltisinin 428 nm’deki absorbans değeri yaklaşık 1.3 olarak belirlenmiş ve çalışmanın diğer aşamalarına bu konsantrasyonla devam edilmiştir.

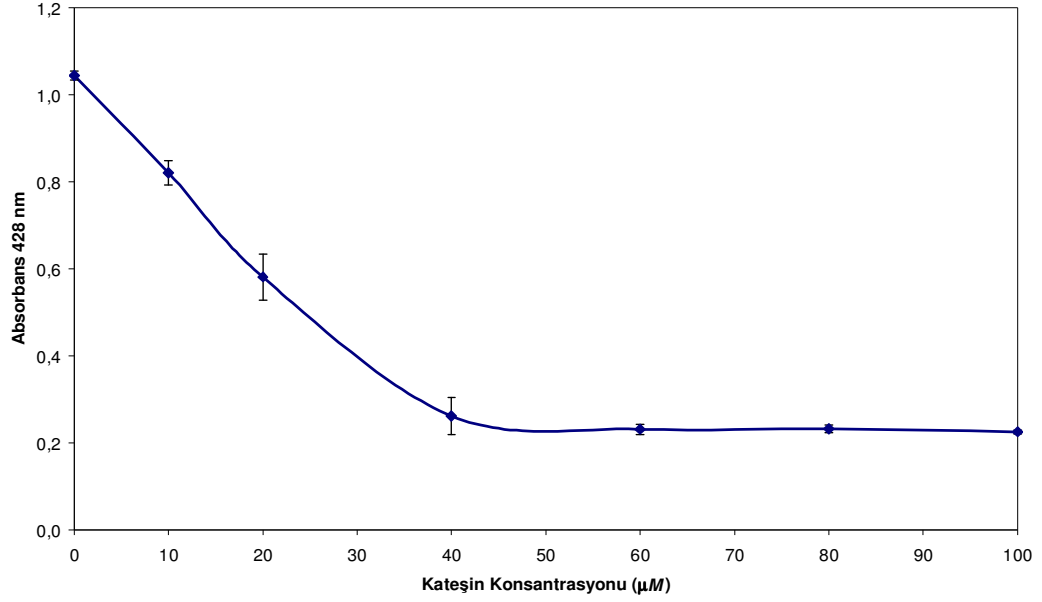




Şekil 3.1: Üç farklı galvinoxil radikali konsantrasyonlarında çizilen Trolox kalibrasyon eğrileri (A: 4µM, B: 8µM, C 10µM).

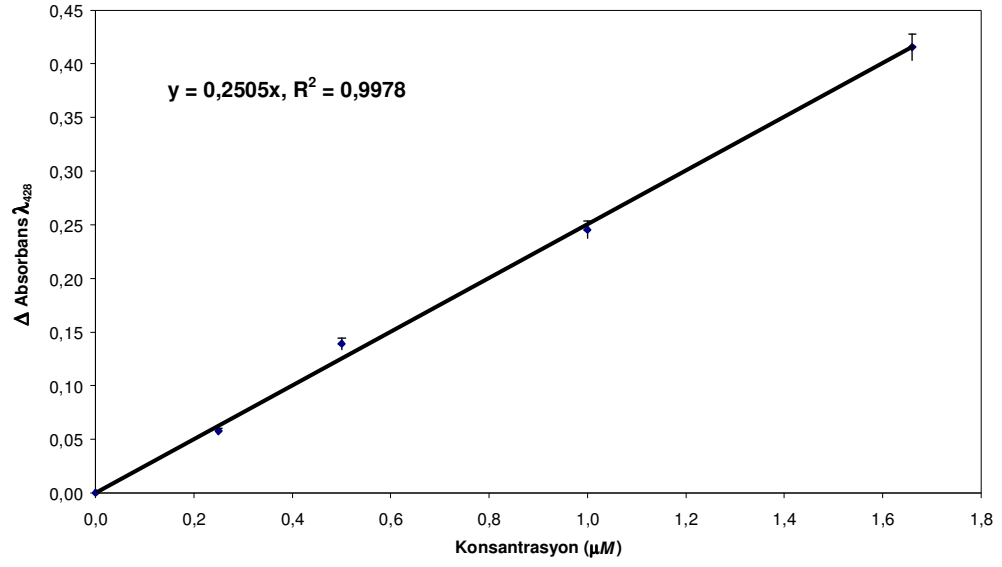
Çalışma çözeltisinin uygun konsantrasyonu belirlenmesinden sonra, gallik asit, askorbik asit ve kateşin gibi saf bileşikler etanol içerisinde hazırlanmış ve bu bileşikler için kalibrasyon eğrileri oluşturulması aşamasına geçilmiştir. Ancak, bu saf bileşiklerin her birinin Trolox standardında olduğu gibi uygun lineer bölgelerin saptanması gerekmiştir. Bu amaçla, bu bileşiklerden farklı konsantrasyonlar galvinoxil çalışma çözeltisi ile reaksiyona sokularak, kalibrasyon eğrilerinin bu bileşiklere ait lineer bölgeleri tespit edilmiştir.

Kateşin için lineer bölge belirlenirken ilk olarak 0- 100 µM konsantrasyon aralığındaki kateşin çözeltileri galvinoxil radikal çözeltisi ile reaksiyona sokulmuş ve 428 nm'deki absorbans değerlerindeki azalmalar grafiğe aktarılmıştır. Şekil 3.2'den de anlaşılacağı üzere saf kateşin bileşiği için lineer bölgenin 0-40 µM konsantrasyonundaki indirgeme aralığı olduğu saptanmıştır. Kateşin için kalibrasyon eğrisi bu konsantrasyon aralığı kullanılarak elde edilmiştir.

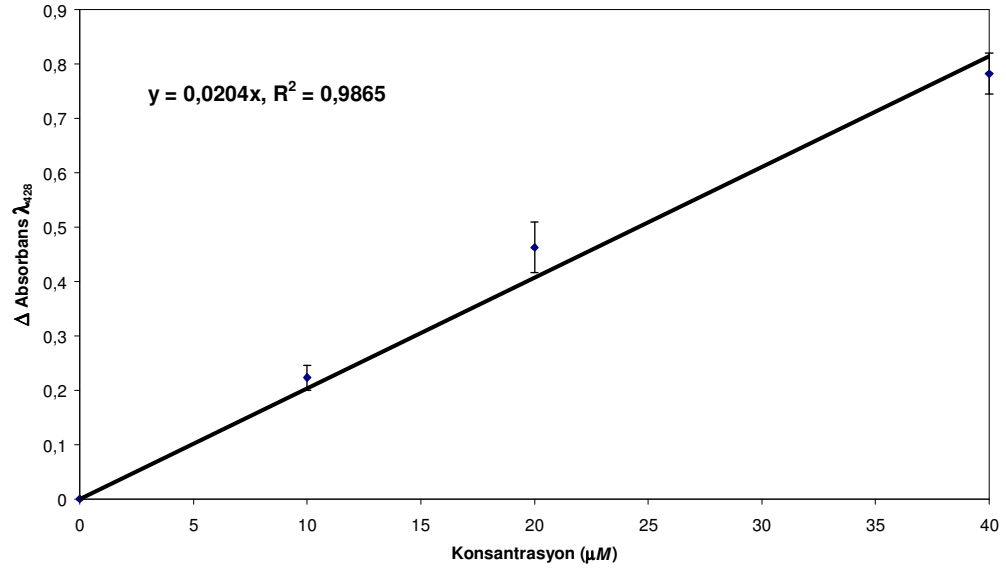


Şekil 3.2: Farklı konsantrasyonlarda kateşin için lineer bölgenin tespit edilmesinde kullanılan kalibrasyon eğrisi

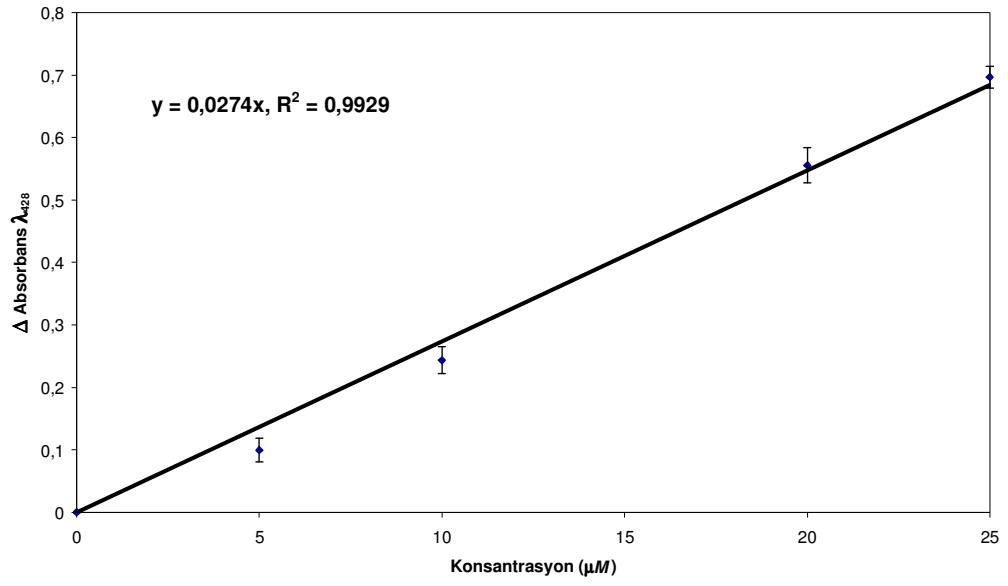
Benzer şekilde diğer saf bileşikler için de lineer bölgeler belirlenmiş ve bu lineer bölgeler baz alınarak bu bileşiklere ilişkin kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Kalibrasyon eğrilerinin elde edildiği konsantrasyon aralıkları Troloks için 0-1.66 μM (Şekil 3.3), kateşin için 0-40 μM (Şekil 3.4), gallik asit için 0-25 μM (Şekil 3.5), askorbik asit için 0-50 μM (Şekil 3.6) ve BHT için 0-500 μM (Şekil 3.7) olduğu saptanmıştır.



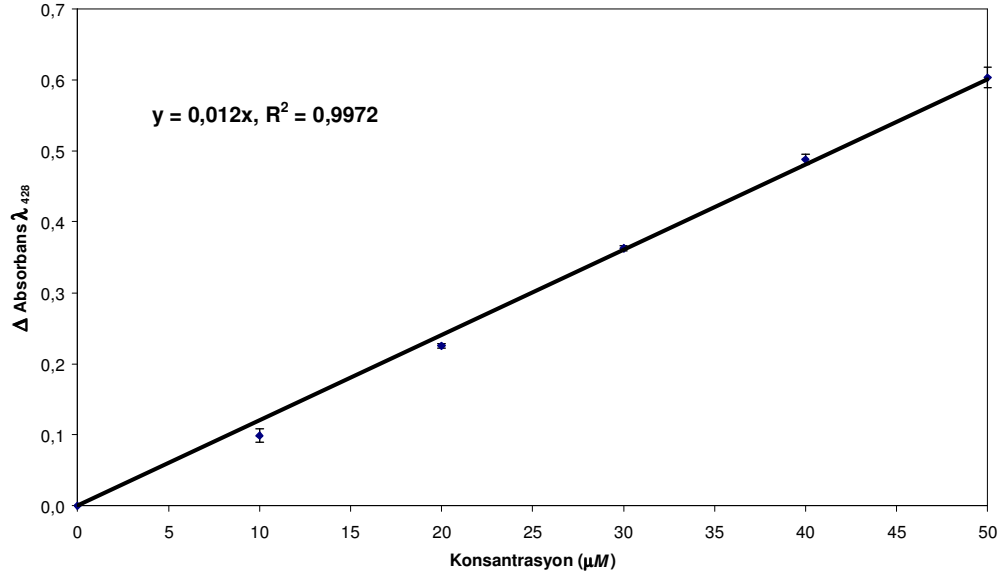
Şekil 3.3: Troloks kalibrasyon eğrisi



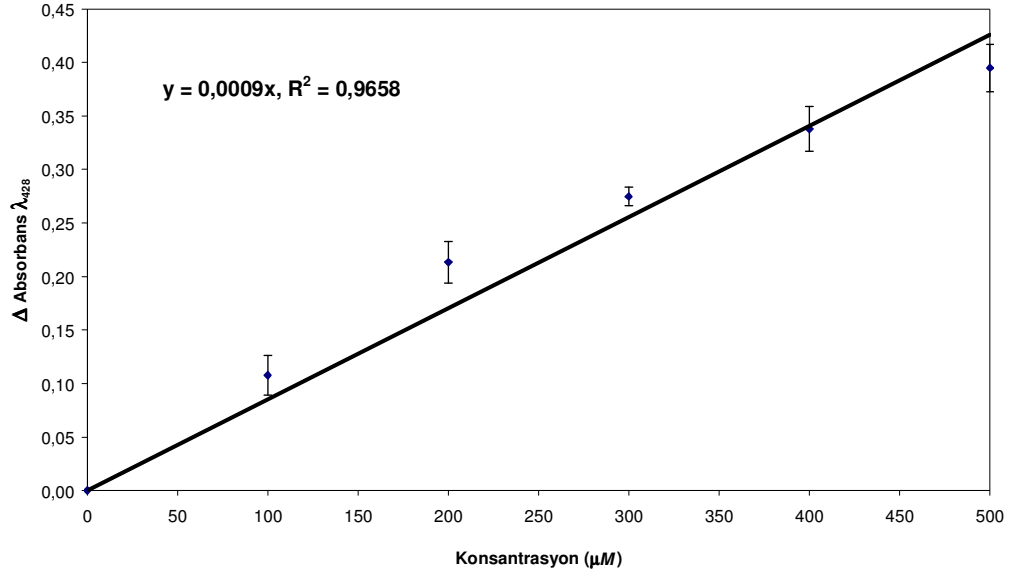
Şekil 3.4: Kateşin kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.5: Gallik asit kalibrasyon eğrisi



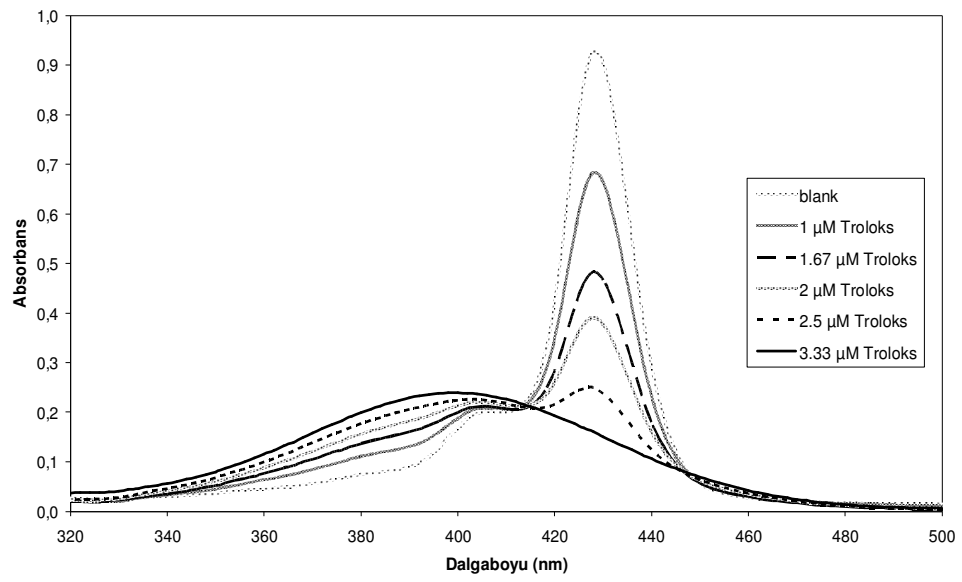
Şekil 3.6: Askorbik asit kalibrasyon eğrisi



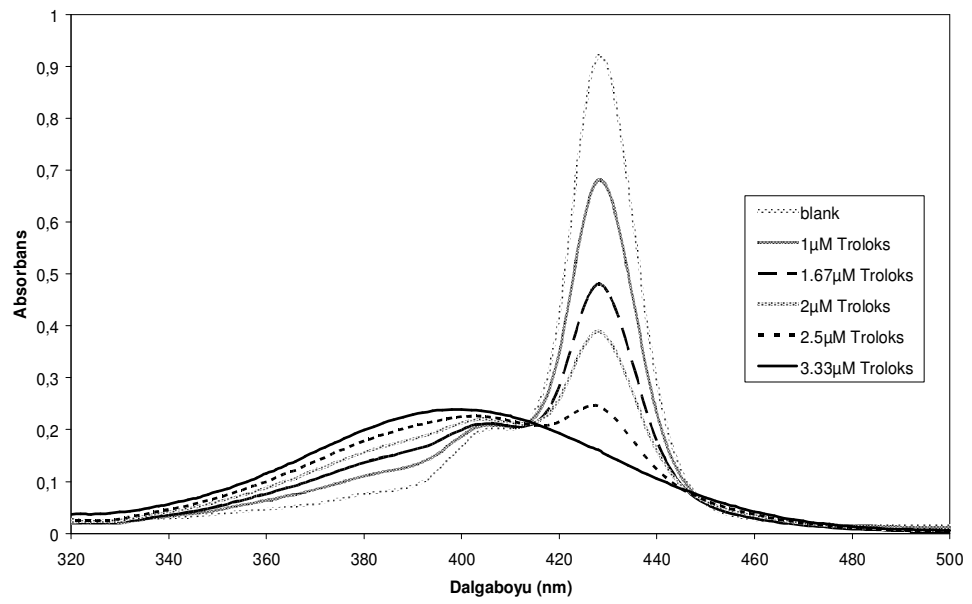
Şekil 3.7: BHT kalibrasyon eğrisi

3. 2. Galvinoxil Radikal Çözeltilisinin Stabilitésinin Belirlenmesi

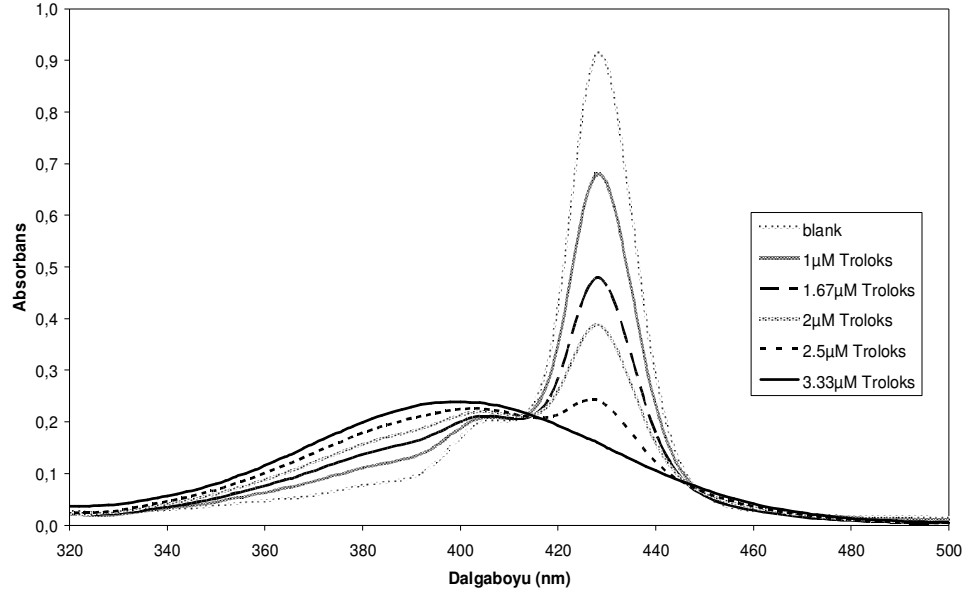
Galvinoxil çalışma çözeltilisinde belirlenen konsantrasyonlarda (Şekil 3.3) Trolox radikali hazırlanmış ve analiz sırasında çalışma çözeltilisinin zamana bağlı absorbans kaybını belirlemek için 320-500 nm dalga boyunda çözeltilinin farklı konsantrasyonlardaki Trolox varlığında spektrum taraması elde edilmiştir (Şekil 3.8 A-D). Çalışmaya 15 dakika devam edilmiştir. Analiz reaksiyon süresini belirlemede kullanılmıştır. Zamana bağlı olarak absorbans değerlerinde azalma şekillerde görülmektedir, ancak 428nm dalga boyunda absorbansların takip edilmesi halinde Trolox konsantrasyonu arttıkça, absorbans düşüşünün arttığı daha net görülebilmektedir. E vitamininin suda çözünen analogu olan Troloxun ortamda fazla miktarda bulunması, galvinoxil radikalının daha fazla hidrojen atomu alarak renginin açılmasına neden olmaktadır.



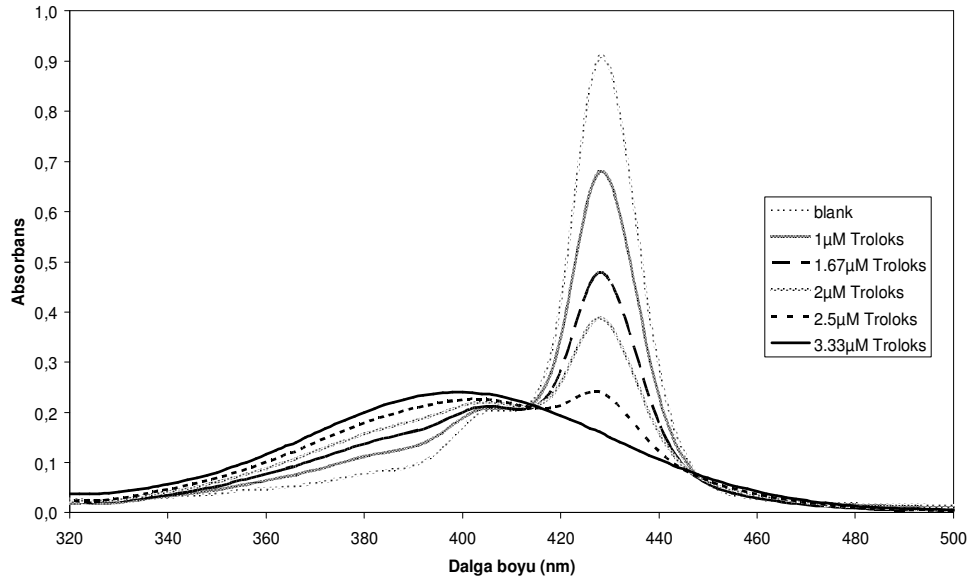
A



B



C

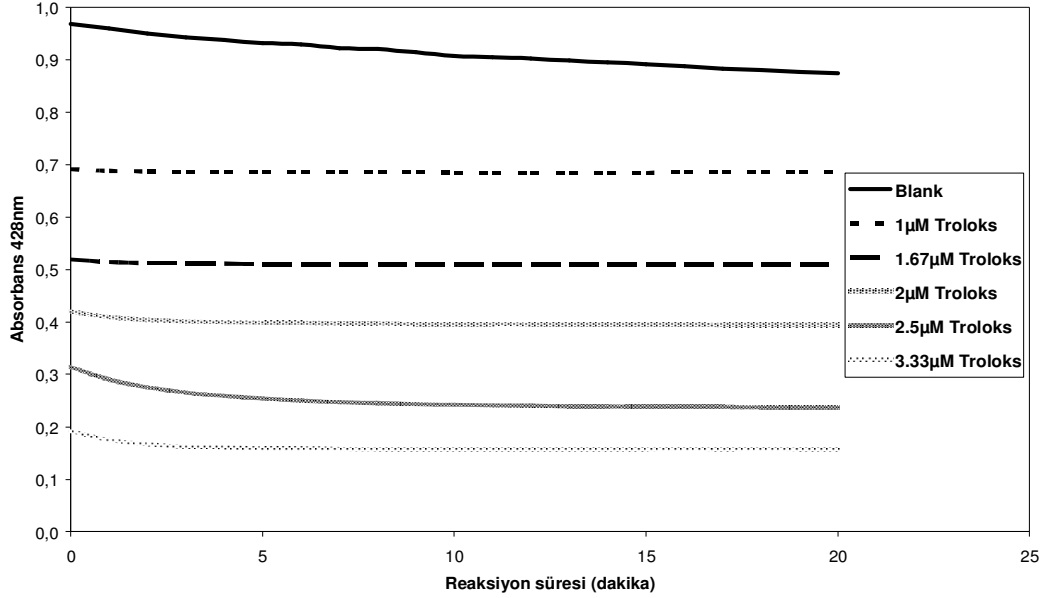


D

Şekil 3.8: Galvinoxil radikalinin farklı konsantrasyonlardaki zamana bağlı Trolox varlığındaki spektrum taramaları (A: Başlangıç, B: 5. dakika, C: 10. dakika, D: 15. dakika)

3.2.1. Reaksiyon süresinin tespit edilmesi

Kalibrasyon eğrisini elde etmede kullanılan farklı konsantrasyonlardaki Troloks çözeltisinin absorbans değerleri 428 nm dalga boyunda 20 dakika boyunca her iki dakikada bir ölçülmüştür (Şekil 3.9). Troloks çözeltisinin absorbans değerleri 20 dakika sonunda plato şeklinde olup reaksiyon süresinin bittiğine işaret etmektedir. Bu nedenle, platoya ulaşmak için gerekli olan süre 20 dakika olarak belirlenmiştir.



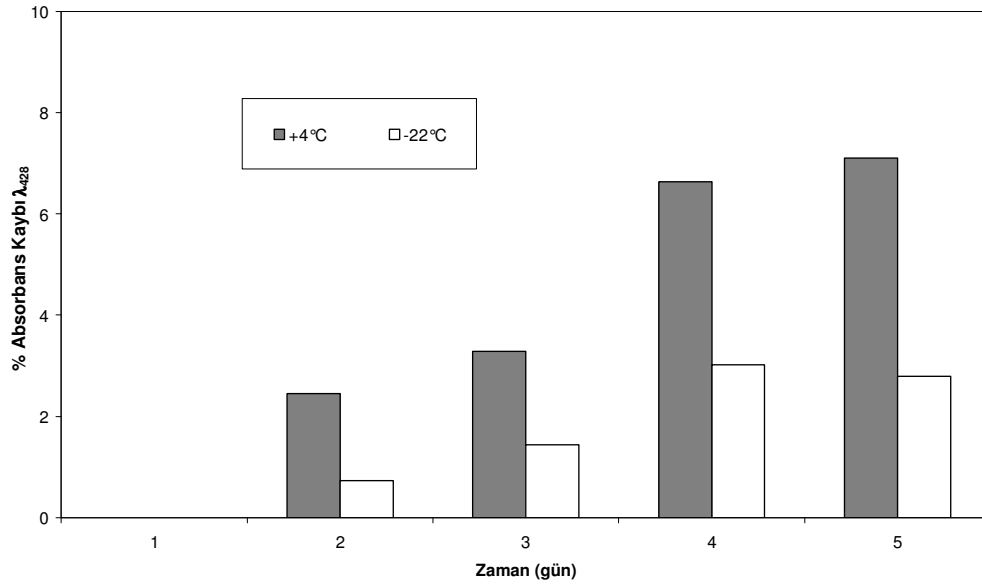
Şekil 3.9: Farklı konsantrasyonlardaki Troloksun galvinoxil radikaliyle reaksiyonu sırasında karışımın zamana bağlı absorbans kaybı

3.2.2. Depolama sıcaklık ve süresinin galvinoxil radikal çözeltisi üzerine etkisi

Analiz süresince kullanılacak olan galvinoxil radikali çalışma çözeltisinin stabilitesini belirlemek amacıyla hazırlanan çalışma çözeltisinin farklı sıcaklıklarda depolanarak beş gün süreyle her gün aynı zamanda absorbans değerleri elde edilmiştir. İlk gün okunan değerler 100 birim kabul edilerek beş gün boyunca elde edilen absorbans kayıplarına göre Şekil 3.10'daki grafik elde edilmiştir. Çalışma çözeltisinin +4°C'de depolanmasıyla, ilk üç gün boyunca stabilitesinde %4 oranında, -22°C'de depolanmasıyla ise %2'lik bir azalma izlenmiştir. -22°C'de muhafaza edilen çalışma çözeltisinin +4°C'ye göre daha stabil olduğu saptanmıştır. Hazırlanan

çalışma çözeltileri üç günden fazla depolandığı takdirde absorbans değerlerinde düşüşün arttığı gözlenmiştir. Analiz süresince ilk gün hazırlanan çalışma çözeltisinin ilk üç gün boyunca kullanılabilceği uygun görülmüştür.

DPPH metodunda, hazırlanan 1 mM'lik DPPH çözeltisi, her gün taze olarak hazırlanmalı ve gün içinde ölçüm yapılmadığı anlarda alüminyum folyoya sarılı bir şekilde, karanlık bir ortamda ve +4 C de muhafaza edilmelidir. ABTS metodu için hazırlanan 7mM'lık ABTS çözeltisi ise, oda sıcaklığında ve karanlık bir ortamda en az 12-16 saat bekletilerek ABTS⁺ radikal çözeltisinin oluşması sağlanır. Bu şekilde hazırlanan radikal çözeltisi 2-3 gün stabil kalmaktadır. Bu stok çözelti analiz sırasında absorbans yaklaşık 1.1 olacak şekilde seyreltilerek, günlük kullanılır. (Cemeroğlu, 2010).

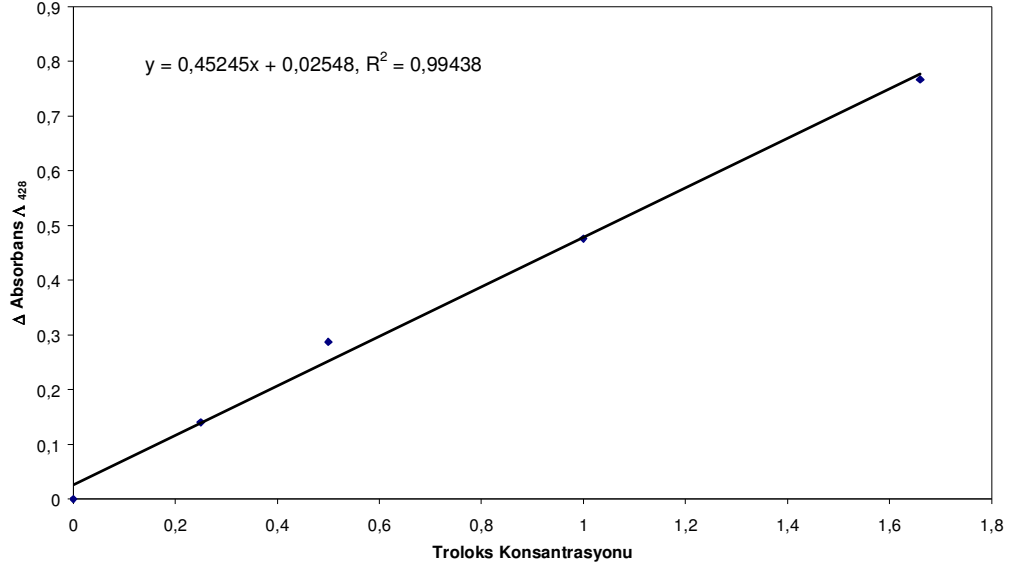


Şekil 3.10: Çalışma çözeltisinin zamana bağlı göreceli kaybı

3. 3. Bazı Saf Bileşiklerin Galvinoksil Radikali Üzerine Etkisi

Gıda maddelerinin yapısında karbonhidratlar, proteinler, pigmentler, organik asitler gibi birçok bileşeni eş zamanlı olarak yapısında bulundurduğu unutulmamalıdır. Bu nedenle bu bileşenlerin analizi interfere edip etmediğini saptamak gerekmektedir. Bu amaçla, glukoz, sakaroz, glisin, üre ve albümin gibi saf

bileşiklerin galvinoksil radikali üzerine etkisi olup olmadığını belirlemek için belirli konsantrasyonlarda sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan konsantrasyonlardaki saf bileşiklerin Troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan aktivitesi Troloks standart kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.11) kullanılarak belirlenmiştir.



Şekil 3.11: Saf bileşikleri için kullanılan Troloks kalibrasyon eğrisi

Saf bileşiklerden glukoz ve sakaroz çözeltisi %5, glisin %0.01, üre %0.0525, albümin %0.003 ve %0.006, tirozin, arginin ve sistinin %0.0005 ve %0.005, ürik asit %0.01'lik konsantrasyonlarında hazırlanmıştır. Elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi üzerinde okuma yapılmış ve sonuçlar standart sapmaları ile birlikte Tablo 3.1 elde edilmiştir.

Albümin, tirozin ve argininin düşük konsantrasyonları ile glukoz, sakaroz, glisin ve üre çözeltilerinin her iki konsantrasyonuyla gerçekleştirilen deneylerde karışımları absorbans değerleri Troloks kalibrasyon eğrisi içerisinde yer almamıştır. Bu bileşikler için bulunan değerlerin istatistiksel anlamda sıfır olup olmadığı ile ilgili hipotez testi sonucunda ise, ortalama değerlerin sıfırdan farklı olmadığı bulunmuştur (Tablo 3.1). Albüminin %0.006, tirozin, arginin ve sistinin %0.005'lik konsantrasyonları ve ürik asit çözeltileri az miktarda da olsa Troloks eşdeğeri cinsinden galvinoksil radikali savma kapasitesine sahip olup, bulunan ortalamalar istatistiksel anlamda sıfırdan farklı olduğu görülmüştür.

Tablo 3.1: Bazı saf bileşiklerin GRAC yöntemiyle elde edilen antioksidan aktivite değerleri

Bileşik	GRAC (μM Troloks Eşdeğeri)
Glukoz (%5)	0*
Sakaroz (%5)	0
Albümin	
%0.003	0
%0.006	0.1068 \pm 0.0392
Tirozin	
%0.0005	0
%0.005	0.1232 \pm 0.0255
Arginin	
%0.0005	0
%0.005	0.1178 \pm 0.0563
Sistin	
%0.0005	0.0723 \pm 0.0190
%0.005	0.1206 \pm 0.0247
Glisin (%0.01)	0
Üre (%0.0525)	0
Ürik asit (%0.01)	1.4727 \pm 0.0114

* İstatistiksel analiz sonuçlarına göre bu değerler sıfırdan farklı bulunmamıştır.

Perez-Jimenez ve Saura-Calixto (2006) glukoz, tirozin, arginin ve albumin gibi saf bileşikleri, su ve asetonlu su (%50) olmak üzere iki ayrı solventte hazırlayarak hem bileşiklerin hem de hazırlandıkları solventin ORAC, ABTS, FRAP ve DPPH yöntemleriyle bulunan antioksidan aktivite değerleri üzerine etkisini incelemiştir. Yazarlar sonuçlar arasında açık bir farklılık gözlemiştir. Sulu çözeltiler söz konusu olduğunda, FRAP ve DPPH sonuçları arasında benzerlikler görülürken, sistin FRAP yönteminde, arginin ve sistin ise DPPH yönteminde pozitif sonuç vermiştir. Çalışılan diğer bileşiklerden glukoz, pektin, galakturonik asit, tirozin, triptofan ve albumin ise bu iki yöntemde herhangi bir antioksidan aktivite

göstermemiştir. ABTS yönteminde ise tüm amino asitler ve proteinler için pozitif sonuç gözlenmiştir. Adı geçen bu çalışmada, amino asit ve protein içeriği yüksek olan gıdalarda, bu gıda bileşenlerinin çalışılan antioksidan kapasite yöntemleri ile etkileşim halinde olabileceği ve sonuçların ciddi oranda etkilenebileceği bildirilmiştir. Özellikle tirozin ve triptofan, çok düşük konsantrasyonlarında bile, ORAC ve ABTS yöntemlerinde yüksek antioksidan aktivite değerleri göstermiştir. Bu nedenle proteince zengin gıdalarda ABTS ve ORAC yöntemleri uygulanmadan önce belli aminoasitlerin konsantrasyonlarının dikkate alınması gerektiğini bildirmişlerdir.

Solvent olarak su yerine asetonlu su (%50) kullanıldığında sonuçlar arasında pek bir fark gözlenmemekle birlikte tirozin ve triptofanın varlığı ORAC ve ABTS yöntemi sonuçları üzerine etkisi önemli bir oranda artmıştır. FRAP ve DPPH yönteminde ise herhangi bir etkinin olmadığı görülmüştür (Perez-Jimenez ve Sauro-Calixto, 2006).

Polifenoller ve saf bileşiklerle hazırlanan karışımların yalnızca bir kısmı, polifenol çözeltisinin tek başına elde ettiği sonuçlardan önemli derecede farklı sonuçlar vermesine rağmen, bazıları -tirozin, triptofan ve albümin- çok düşük konsantrasyonlarda test edildiğinden sulu organik çözeltilerinin konsantrasyonlarında daha fazla müdahale olacağı (interfere) zannedilmektedir. Örneğin, buğday unu %0.54 tirozin ve pirinç %0.21 triptofan içerirken, bu çalışmada tirozin ve triptofan %0.0005 konsantrasyonlarında çalışılmıştır (Perez-Jimenez ve Sauro-Calixto, 2006).

Gıdaların ısıtma işlem süresince oluşan Maillard reaksiyonu ürünlerinin toplam antioksidan kapasitesi ORAC_{PE} yöntemi kullanılarak belirlenebilir. Yılmaz ve Toledo (2005), suda çözünebilir glukoz-histidin karışımına ısıtma işlemi uygulanmasıyla oluşan Maillard reaksiyonu ürünlerinin antioksidan aktivitesini ORAC_{PE} ile belirleyen bir çalışma yapmışlardır. Glukoz ve histidinden oluşan model sisteme ısıtma işlemi uygulanarak ORAC_{PE} yöntemi ile çalışılmış, çalışmada Maillard reaksiyonu ürünlerinin, *in vitro* koşullarda antioksidatif aktivitenin indikatörü olarak, peroksil radikal savma aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir (Yılmaz ve Toledo, 2005). Bu çalışmada histidin tek başına peroksil radikal savma aktivitesi göstermiş, ORAC_{PE} değerleri ise 0.50 ile 0.63 µmol Trolox/mg His arasında bulunmuştur. Buna rağmen, ne ısıtma süresi ne de sıcaklık histidinin ORAC_{PE} değerlerini önemli derecede etkilememiştir (P>0.05). Glukoz da tek başına değerlendirilmiş ama

ORAC_{PE} yönteminde antioksidan aktivitesi bulunmamıştır (Yılmaz ve Toledo, 2005). ORAC yöntemi florometrik bir yöntem olup, radikal olarak AAPH kullanılmaktadır. Şekerlerin serbest radikal savma kabiliyetleri kullanılan antioksidan aktivite belirleme yöntemi ile doğrudan ilişkilidir. Bitki bilim üzerinde yapılan çalışmalarda (Van den Ende ve Valluru, 2009) aynı molar konsantrasyondaki şekerlerin serbest radikal savma kapasitelerinin, yapılarında buldukları toplam hidroksil gruplarıyla bağlantılı olduğunu ve sekiz OH grubu bulunduran sakarozun, beş OH grubu içeren glukoz ve fruktozdan daha iyi radikal savma kapasitesine sahip olabileceğini belirtmişlerdir. Şimdiye kadar, sakaroz antioksidan bir bileşik olarak tanımlanmamıştır. Bunun sebeplerinden biri de şimdiye kadar yapılan çalışmaların tamamen *Arabidopsis* (bir bitki çeşidi) üzerine odaklanmış olmasıdır. Bu görüş makalesinde, özellikle yüksek çözünürlüklü şeker konsantrasyonuna sahip dokularda, sukrozil oligosakkaritlerin (SOS) fenolik bileşiklerle sinerjistik etkileşimin, redoks sistemin bir parçası olabileceğini, reaktif oksijen türlerini (quenching) söndürebileceğini ve stres toleransını sağlayabileceği hipotezini öne sürmüşlerdir.

Pazdziach-Czochra ve Widenska (2002) hidrojen peroksit savma aktivitesini spektrofotometrik bir yöntemle tayin etmeye çalışmışlar ve yöntemi tayin ederken Troloks ile çeşitli fenolik bileşikler kullanmışlardır. Troloksu 1 birim kabul ederek BHA'nın antioksidan aktivitesini 1.82 mmol Troloks eşdeğeri/L olarak tespit etmişlerdir. Peinado ve ark. (2010) üzüm sırasında fenolikler üzerine yaptıkları çalışmada şekerlerin polifenoller için koruyucu fonksiyonu olduğunu ve bununla ilgili daha çok çalışma yapılması gerektiğini bildirmişlerdir. Morelli ve ark. (2003) karbonhidratların antioksidan aktiviteleri üzerine çalışmışlar ve değişik metodlarla (elektron paramanyetik rezonans bulma ve DPPH gibi) ölçüm yapmışlardır. Sonuç olarak çalışılan disakkaritlerin monosakkaritlerden daha aktif ve hidroksi radikalden daha az zarara uğradığını görmüşlerdir.

Albümin, tiol grupları ile ana ekstracellüler bir antioksidan molekülü olduğu bilinmektedir. Plazma proteindir ve çeşitli biyolojik fonksiyonları vardır. Albüminin antioksidan mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte. Tüm gözlemler, albuminin HeLa hücrelerine (HeLa hücreleri dünya çapında, kanser araştırması yapan birçok laboratuarda kültürlerde kullanılan özel hücrelerdir, hücre kültürleri kendini yenileyebildiği için kanser gibi türlü araştırmalarda yaygın olarak kullanılır) karşı koruyucu etkisinin, tiol grupları azaldığında etkisini yitirdiğini göstermiştir. Bu

antioksidan etkinin kullanılan sisteme ve hedef olarak çalışılan serbest radikale bağlı olduğunu onaylar niteliktedir. Albümin yapısı değişimi, ya proteinde antioksidan aminoasit pozisyonlarının modifikasyonuna ya da disülfid bağlarının formasyonu ile antioksidan özelliklerinin değişimi ile sonuçlanabilir (Faure ve ark., 2005).

Hücrel model kullanılarak yapılan bir çalışmada albüminin reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (Kouo ve ark., 1999). Stocker ve arkadaşları (1987) albümine bağlı bilirubin peroksil radikallere karşı davranışını incelemiş ve 1 mol alb-bilirubin 2 mol peroksil radikalini savabildiği ve az miktarda bilirubin plazmasının, albümine bağlı yağ asitlerinin oksidasyonunu engellemede etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Roche ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları derlemede, kan plazmasındaki albümin en verimli protein olduğu ve antioksidan aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir. Molekül multiple bağlama bölgeleri ve serbest radikal-hapsetme özellikleri sayesinde bu aktiviteyi göstermektedir. İşlevi redoks durumundaki değişiklikler, albüminin yapısı ve faydalı antioksidan özellikleri ile değişebilir.

L-tirozin ve L-DOPA'nın (3,4-dihidroksi-L-fenilalanin) antioksidan ve antiradikal özelliklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada (Gülçin, 2007) antioksidan özellikleri DPPH, ABTS gibi değişik yöntemler kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre L-tirozin ve L-DOPA antilipit peroksidasyonu, indirgeme gücü, ABTS, DPPH ve süperoksit anyon radikal süpürme, hidrojen peroksit süpürme ve metal şelatlama gibi değişik *in vitro* koşullarda etkili antioksidanlar olarak bulunmuştur (Gülçin, 2007). Harısa ve arkadaşları (2009) sarımsağın iltihabi bağırsak hastalığına karşı antioksidan etkisi ile ilgili yaptıkları çalışmada L-arginin ilavesinin sarımsağın antioksidan etkisini artırabileceği sonucuna varmışlardır.

Glukoz, sakaroz, glisin ve ürenin antioksidan aktivite analiz sonuçlarını etkileyecek sonuçları olmadığı görülmüştür. Albümin, tirozin ve argininin düşük dozlarda herhangi bir etkisi olmazken yüksek konsantrasyonlarda sonucu etkilediği görülmüştür. Analiz edilecek gıdanın içeriğindeki yüzdelere göre sonuçlar hesaplanırken dikkate alınmalıdır. Metabolizmadan antioksidan atımı ile ilgili çalışmalar yapılırsa idrarda ürik asitin sonuçları etkilediği göz önünde bulundurulmalıdır.

3. 4. Galvinoksil Radikali Üzerine Farklı Solventlerin Etkisi

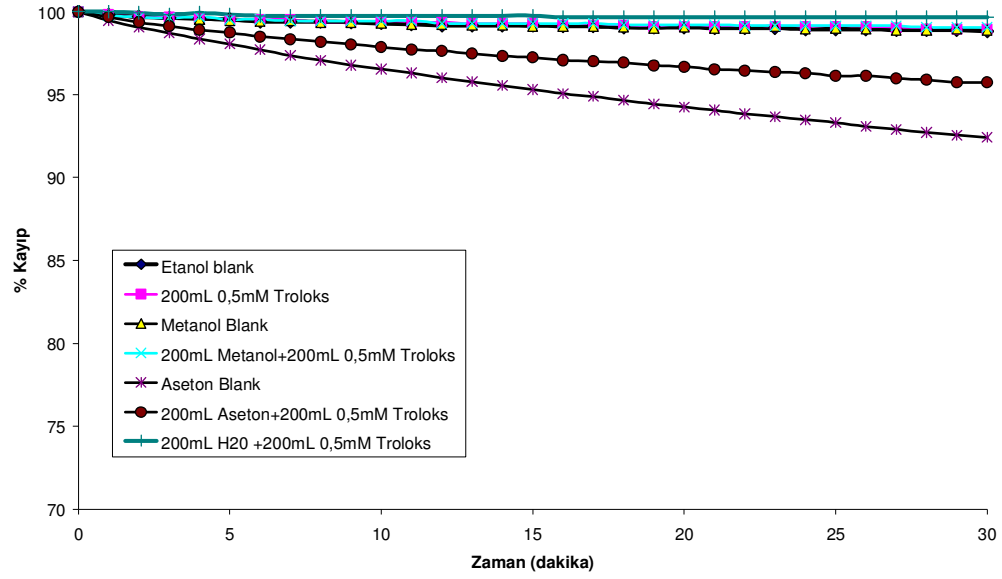
Solvent etkisi antioksidan bileşiklerin kimyasal davranışlarında önemli bir parametredir. Değişik polaritelerdeki ekstraksiyon solventlerinin seçiminin, HAT ve ET esaslı antioksidan reaksiyonlarının performansına önemli derecede etkisi olabilir (Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2006).

Barclay ve arkadaşları (1999) antioksidan olarak kateşollerin (bu nedenle flavonoidlerin çoğu da) aktivitesini kontrol etmek için ana faktörün, (ilk) peroksil radikalinin inaktivasyonundan sonra oluşan aroksil radikalın intramoleküler (molekül içinde meydana gelen) H-bağı ile stabilizasyonu olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Solvent tipi ve polaritesi, antioksidan kapasite ölçümlerinde önemli rol oynayan tekli elektron transferini (TET) ve hidrojen atomu transferini (HAT) etkilemektedir (Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2006). Bu sebeple çalışmanın bu aşamasında Perez-Jimenez ve Saura-Calixto'dan (2006) yola çıkarak GRAC metodu için farklı solventlerle çalışılmıştır.

Literatürde DPPH ve FRAP gibi metotlarda, gıda ekstraktlarında antioksidan kapasiteyi belirlemek için, etanol (Yu ve ark., 2002), çeşitli oranlarda etanol/su, çeşitli oranlarda aseton/su (Yılmaz ve Toledo, 2006) ve çeşitli oranlarda metanol/su (Yılmaz ve Toledo, 2006) gibi farklı ekstraksiyon solventleri ile çalışılmıştır. Yılmaz ve Toledo (2006) etanol, metanol ve asetonun çeşitli oranlarda sulu karışımları ile üzüm çekirdeklerinden fenolik bileşikleri ekstrakte edip, bu ekstraktların toplam fenolik içeriğini belirlemişlerdir. Ekstraksiyon solventi olarak kullanılan bu çözeltilerden sulu çözeltilerin saf halde olmalarından daha iyi sonuçlar elde edildiğini (etanol %50-70, metanol %50-60, aseton %75, optimum oranlar) bildirmişlerdir.

GRAC yöntemi için ekstraksiyon solventinin etkisini izlemek için hazırlanan örneklerin absorbans değerleri 30 dakika boyunca 428 nm dalga boyunda takip edilmiştir. Elde edilen grafikte (Şekil 3.12) ilk okunan değer 100 birim olarak kabul edilip reaksiyon sürecince göreceli absorbans yüzde cinsinden ifade edilmiştir.



Şekil 3.12: Farklı solventlerde 0.5 mM Troloks varlığında solvent etkisi

Şekil 3.12’de görüldüğü gibi ekstraksiyon solventi olarak aseton kullanıldığında reaksiyon süresi sonuna kadar analiz karışımında zamana bağlı %5’lik ciddi bir azalma olarak sonucu etkilediği, diğer solventlerde ise en fazla %2’lik bir azalma olduğu görülmüştür.

Farklı solventlerin galvinoksil radikali üzerine etkisini görmek için literatür bilgileri ışığında (Perez-Jimenez ve Saura-Calixto, 2006) ayrı ayrı 10 mM gallik asit çözeltisi ile 10 mM kateşin çözeltisi hazırlanıp, bu iki çözelti hacmen 1:1 oranında karıştırılarak kullanılmıştır. Solvent olarak etanol (Şekil 3.13), metanol (Şekil 3.14), metanol-su (50:50 v/v) (Şekil 3.15), metanol-su (30:70 v/v) (Şekil 3.16), aseton-su (50:50 v/v) (Şekil 3.17) kullanılarak, her biri için ayrı Troloks kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.

Bu eğriler kullanılarak gallik asit-kateşin karışımının Troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan aktivitesi tayin edilmiştir (Tablo 3.2). Reaksiyonun gerçekleştiği ortamın polaritesinin reaksiyonu etkilediği görülmüştür. Kullanılan solventin farklılığı GRAC yönteminde elde edilen sonuçları etkilemiştir. Jimenez ve Calixto’nun (2006) dört antioksidan kapasite yöntemini (ORAC, ABTS, FRAP, DPPH) kıyasladığı çalışmada solventin analizi etkilediğini ancak bu etkinin hepsinde aynı şekilde olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada dört antioksidan aktivite tayin

yönteminde metanol, metanol-su (50:50 ve 30:70), aseton-su (50:50) gibi farklı altı şekilde ekstraksiyon solventi kullanarak sonucu etkileyip etkilemediğini tartışmışlardır. Solvent etkisinin en yüksek olduğu yöntem ORAC, en düşük olduğu yöntemin ise DPPH olduğunu, ABTS yönteminde daha polar olan solventin daha iyi sonuç elde ettiğini bildirmişlerdir. Antioksidan kapasiteyi kıyaslama yaparken yöntemin içerdiği çözeltilerin hazırlandığı solventlerle ekstraksiyonun yapıldığı solventlerin aynı olması gerektiğini, bunun aksi takdirde sonuçların çok değişiklik göstereceğinden dolayı direkt kıyaslamamın anlamsız olacağı kanaatine varmışlardır. Sonuç olarak her antioksidan kapasite yöntemi için, ekstraksiyonda kullanılan solventle aynı kalibrasyon eğrisine sahip olmasıyla bağlantılıdır, standart solvente bağlı olarak farklı davranabilir.

Bu bilgiler ışığında GRAC yönteminde solvent etkisini belirlerken, kullanılan solvent ile ekstraksiyonunki aynı kullanılmıştır. Galvinoxil radikalının solventten ne kadar etkilendiği ve gallik asit-kateşin karışımının Troloks eşdeğeri cinsinden elde edilen sonuçları değerlendirilmiştir.

Tablo 3.2: GRAC yönteminde gallik asit-kateşin karışımının farklı solventlerde Troloks eşdeğeri cinsinden sonuçları

Solvent	GRAC ($\mu\text{mol Troloks/g}$)
Etanol	1405.5 \pm 92.3 ^a
Metanol	868.3 \pm 77.9 ^b
Metanol – su (50:50)	779.1 \pm 86.9 ^c
Metanol – su (30:70)	686.4 \pm 25.8 ^d
Aseton – su (50:50)	569.8 \pm 51.3 ^e

* Farklı harfler ortalamaların istatistiksel açıdan önemli olduğunu göstermektedir (p<0.05).

GRAC yönteminde karışıma ait Troloks eşdeğeri cinsinden en yüksek değer solvent olarak etanol kullanıldığında elde edilmiştir. Gallik asit ve kateşin karışımının Troloks eşdeğeri cinsinden en düşük değeri ise aseton-su (50:50)

karışımında tespit edilmiştir (Tablo 3.2). Metanolün saf veya su ile karıştırılarak kullanıldığı durumlarda da aralarında istatistiksel açıdan önemli derecede fark olup, metanol oranı azaldıkça okunan değer de azalmıştır. Bu farklılığın sebebi olarak ortamın polaritesinin etkili olduğu söylenebilir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3: Solventlerin polarite indeksi (Snyder skalası)

Solvent	Polarite indeksi
Etanol	5.2
Metanol	6.6
Metanol – su (50:50)	7.8
Metanol – su (30:70)	8.3
Aseton – su (50:50)	7.2

Solventin polaritesi arttıkça hazırlanan karışımın antioksidan değeri düşmüştür. İstisna aseton olmuştur. Literatürde aseton-su karışımı için en iyi ekstraksiyon çözeltisi oranının %75'in en iyisi olmakla birlikte %50'den fazla olan oranların uygun olduğu olarak bildirilmiştir (Yılmaz ve Toledo, 2006).

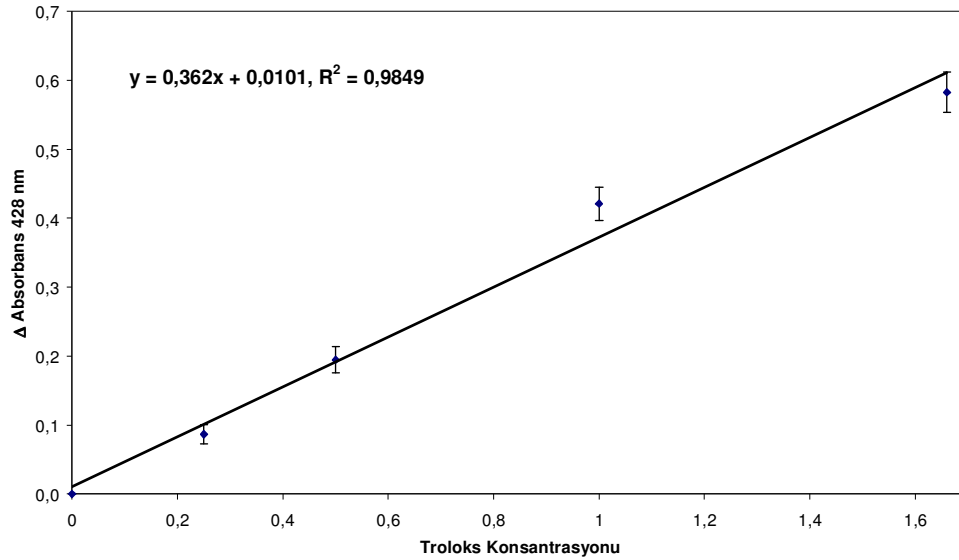
Negi ve Jayaprakasha (2008) tarafından, nar kabuğunda yapılan çalışmada da ekstraksiyon solventi olarak aseton, metanol, etanol ve su kullanılmış ve en yüksek antioksidan aktivite değerinin MeOH ile ekstraksiyon sonunda bulunduğu bunu asetonla elde edilen ekstraktların takip ettiği belirtilmiştir. Yasoubi ve ark. (2007) tarafından nar kabuğunda yürütülen çalışmada ise en yüksek fenolik madde miktarı ve antioksidan aktivite değeri aseton ile elde edilen ekstraktlarda saptanmıştır. Bunu sırasıyla, metanol, etanol, su ve etilasetatın takip ettiği belirtilmiştir. Görüldüğü gibi, farklı çalışmalarda en yüksek fenolik madde ve antioksidan aktivitenin belirlendiği ekstraksiyon solventleri farklılık göstermektedir. Bunun başlıca nedeninin, kullanılan narın çeşidine bağlı olarak kabuğun fenolik kompozisyonunun farklılık göstermesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nar kabuğunda bulunan fenolik bileşenlerin polaritesi hangi solventin polaritesine daha yakınsa onda çözünecek ve dolayısıyla o ekstraktta daha fazla fenolik madde miktarı tayin edilecek ve buna bağlı olarak da daha yüksek antioksidan aktivite belirlenecektir (Tağı, 2010).

Tablo 3.4: GRAC için farklı solventler içerisinde hazırlanan Troloks kalibrasyon eğrisi için eğim, kesim noktası ve R² değerleri

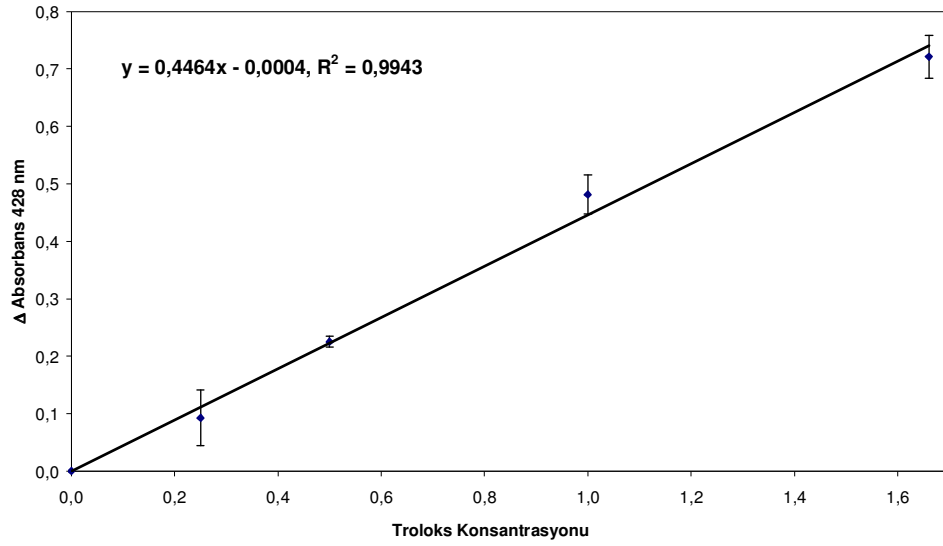
Solvent	Denklemler*	R ²
Etanol	$y=0.3620x + 0.0101$	0.9849
Metanol	$y=0.4464x - 0.0004$	0.9943
Metanol/Su (50:50)	$y=0.3529x + 0.0336$	0.9597
Metanol/Su (30:70)	$y=0.3961x + 0.0113$	0.9603
Aseton/Su (50:50)	$y=0.3832x + 0.0175$	0.9623

* y absorbans, x konsantrasyonu ifade etmektedir.

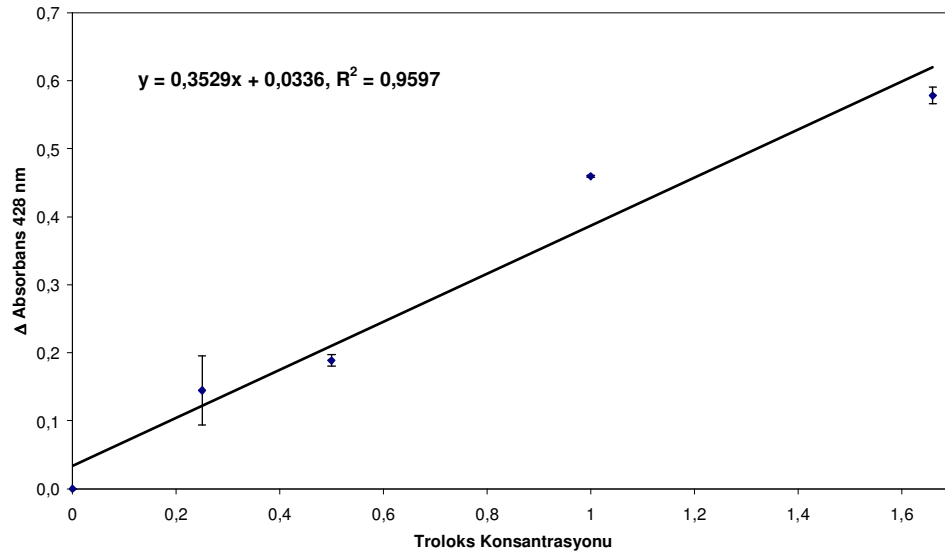
Elde edilen grafiklere (Şekil 3.13-17) göre etanol ve metanol kullanılarak hazırlanan galvinoksil radikali ile elde edilen kalibrasyon eğrilerinin, diğer solventlerle hazırlananlara göre daha lineer olduğu görülmüştür.



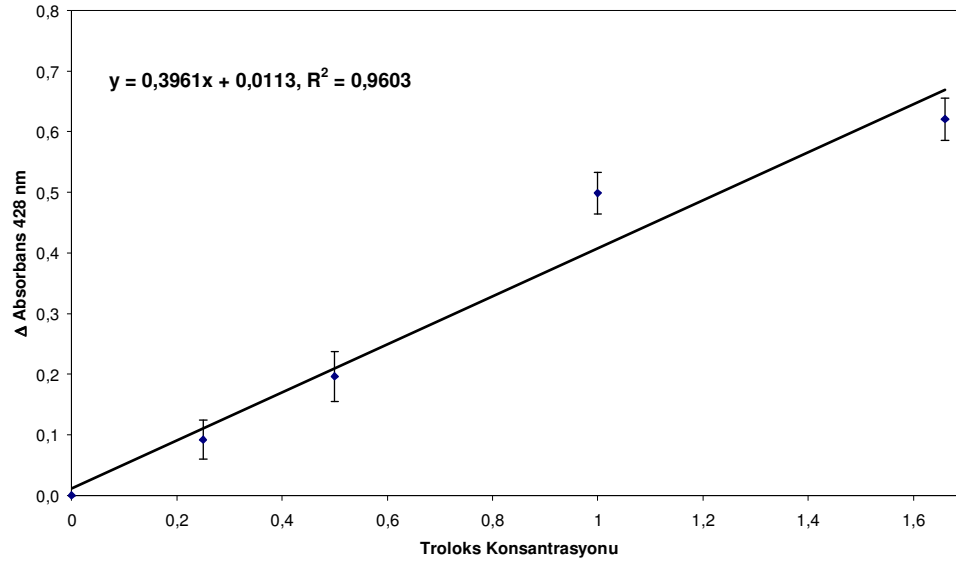
Şekil 3.13: Solvent olarak etanol kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi



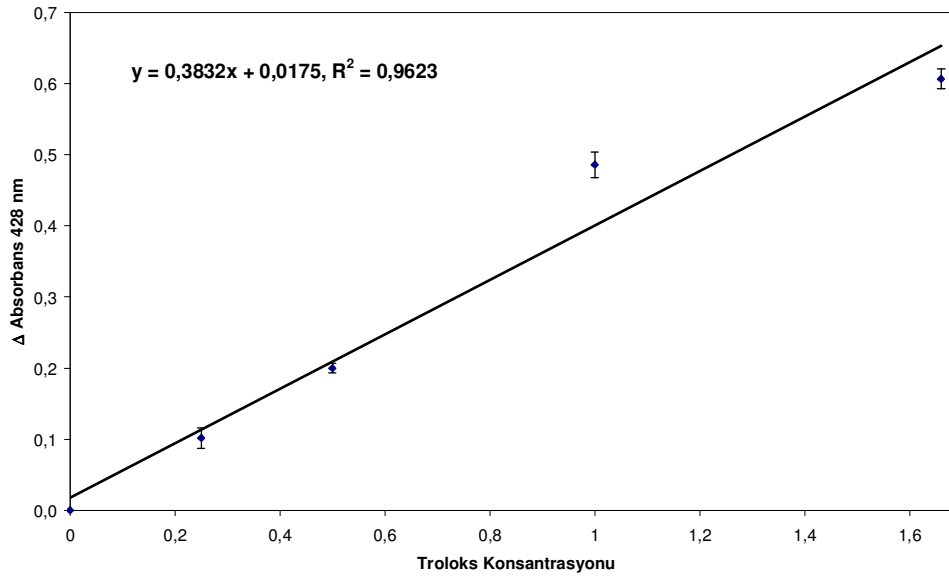
Şekil 3.14: Solvent olarak metanol kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.15: Solvent olarak metanol-su (50:50 v/v) karışımı kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.16: Solvent olarak metanol-su (30:70 v/v) karışımı kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.17: Solvent olarak aseton-su (50:50 v/v) karışımı kullanıldığında elde edilen Troloks kalibrasyon eğrisi

3. 5. Ticari Meyve Sularının Antioksidan Aktivitesinin Belirlenmesi

Aynı ticari markanın nar, üzüm, portakal, elma ve domates suları seçilerek, yaygın olarak kullanılan antioksidan aktivite tayin yöntemlerinden FRAP, DPPH ve ABTS yöntemleri GRAC ile birlikte analiz edildi. Ticari meyve sularının farklı yöntemlerle antioksidan aktivite değerleri Tablo 3.5'te görülmektedir.

Galvinoksil radikali kullanılarak modifiye edilen yöntem için uygun çalışma koşulları belirlendikten sonra meyve sularında analizler yapılmıştır ve analiz sonuçları diğer antioksidan aktivite tayin yöntemleri ile kıyaslanmıştır. GRAC yönteminin sonuçlarına göre tüm örneklerin antioksidan aktivite değerleri istatistiksel açıdan önemli bulunmuş ($P<0.05$) ve en yüksek değer nar suyunda bulunmuştur. Bu yöntemle elde edilen meyve sularına ait antioksidan aktivite değerleri küçükten büyüğe doğru şu şekilde sıralanmaktadır: elma>domates>üzüm>portakal>nar.

Tablo 3.5: Meyve sularının dört farklı antioksidan aktivite tayin yöntemi ile karşılaştırılması

Örnek	GRAC*	DPPH	FRAP	ABTS
	(µmol Troloks Eşdeğeri/mL)			
Nar	243,14 ± 4,73 ^a	4154,16 ± 105,68 ^a	3632,86 ± 83,01 ^a	4125,48 ± 127,02 ^a
Üzüm	56,60 ± 1,05 ^c	701,09 ± 19,06 ^b	717,42 ± 17,42 ^b	996,98 ± 72,89 ^b
Portakal	194,12 ± 4,43 ^b	64,88 ± 15,75 ^c	186,34 ± 6,06 ^c	241,65 ± 32,59 ^c
Elma	1,49 ± 0,30 ^e	15,21 ± 0,52 ^c	20,75 ± 1,00 ^d	40,96 ± 1,39 ^d
Domates	13,04 ± 0,50 ^d	59,26 ± 1,88 ^c	54,85 ± 1,55 ^d	109,39 ± 5,08 ^d

*Aynı sütun içerisinde farklı harfler ortalamaların istatistiksel açıdan önemli olduğunu göstermektedir ($P<0.05$).

DPPH, FRAP ve ABTS yöntemlerinde nar ve üzüm suyunda Troloks eşdeğeri cinsinden en yüksek değerler elde edildi. Troloks eşdeğeri cinsinden değerler kıyaslandığında meyve sularına ait antioksidan aktivite değerleri küçükten büyüğe doğru şu şekilde sıralanmaktadır:

elma>domates> portakal > üzüm > nar.

Tüm sonuçlar, μmol Troloks eşdeğeri/mL cinsinden elde edilmiştir. Literatürde yapılan diğer çalışmalarda birimler farklı hesaplandığından elde edilen sonuçlarla birebir kıyaslamak mümkün değildir.

Literatürden elde edilen bilgilere göre FRAP yöntemi ile yapılan çalışmalarda; portakal pulpunda yaklaşık olarak 1.9 mmol/100 g (Guo ve ark., 2003), elma suyunda 6774 μmol TEAC/L (Schilling ve ark., 2007) ve 9.5 ile 13.8 g AA/kg (García ve ark., 2009) arasında değişen sonuçlar elde etmişlerdir. Yedi farklı ticari nar suyunda yapılan bir çalışmada ise (Tezcan ve ark., 2009) 18 - 122 mmol/L Fe^{+2} arasında değerler elde etmişlerdir. Guo ve arkadaşları (2008) nar suyunun elma suyundan daha iyi bir antioksidan olduğunu iddia eden çalışmalarında nar suyunun 5.4 mmol/L, elma suyunun 3.1 mmol/L antioksidan aktivite değeri olduğunu tespit etmişlerdir. Domateste 1.2-3.7 mM FRAP/g taze ağırlık (İlahy ve ark., 2011) arasında değişen sonuçlar elde etmişler. Wootton-Beard ve arkadaşları (2011) sebze sularında yaptıkları çalışmada 2251 ile 2463 μmol /L arasında FRAP değerler elde etmişler.

DPPH yöntemi ile yapılan çalışmalarda; elma suyunda 11.1-15.9 g AA/kg (García ve ark., 2009), ve 10601 μmol TEAC/L (Schilling ve ark., 2007) bulunmuştur. Yapılan başka bir çalışmada İran'daki sekiz farklı nar suyu çeşitlerinde Mousavinejad ve ark., (2009) 18.6-42.8 mM Troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan aktiviteye sahip olduğunu tespit etmişlerdir.

ABTS yöntemi ile yapılan çalışmalarda, Çam ve arkadaşları (2009), sekiz farklı çeşit nar suyunda 221.2 ile 418.3 TEAC mg/100mL arasında değişen sonuçlar elde ederken, Apaydın (2008), nar suyu konsantresi depolama sürecindeki değişimleri incelediği çalışmada 17.49 (mM Troloks/mL nar suyu) sonuçlarını elde etmişlerdir. Schilling ve arkadaşları (2007), elma suyunda 8419 μmol TEAC/L değerlerini elde etmişler.

Üzümlerde bulunan polifenoller başlıca iki grup altında toplanır. Flavonoidler ve flavonoid olmayan bileşikler. Üzümde en yaygın olan flavonoidler; flavonoller (kuarsetin, kampferol, mirisetin), flavan-3-ol'ler (kateşin, epikateşin, tanenler) ve antosiyaninlerdir. Flavonoid olmayan bileşikler ise hidroksisinamik asit ve gallik asit türevleri ile *trans*-resveratrol'dür (Cabaroğlu ve Yılmaztekin, 2006). Sanchez-Moreno (1999) üzümde genellikle bulunan polifenoller: kafeik asit, ferulik asit,

gallik asit, kuarsetin, rutin, tannik asit ve resveratrol. Gollücke (2009), ESI-MS ile üzüm suyundan elde edilen bileşenler; peonidin-3-*O*-glukozit, dimmer heksoz, malvidin, kafeoiltartarik asit, peonidin.

Taze, olgun, kırmızı bir domatesin 20-30mg/100g askorbik asit (C Vitamini), 4-10mg/100g likopen içerdiği tespit edilmiştir. Domatesin doğal yapısında antioksidan bileşik olarak tokoferol, askorbik asit, likopen ve β -karoten gibi maddeler bulunmaktadır (Maslarova, 2001). Domates, içerdiği yüksek oranda likopen ve fenolik maddeler nedeniyle dikkat çekmektedir (Demiray, 2009). Müler (2011) domates suyu likopen, portakal suyu karoten, bileşenlerin antioksidan aktivitelerini karşılaştırmış.

Portakal suyunda başlıca organik asit (Kelebek ve ark., 2009) sitrik asit olarak bulunmuş, portakal çeşitlerinde flavanon başlıca flavonoidlerdendir. Portakal suyu ve şarabında, en çok narirutin, hesperidin, apigenin, sonra daha az miktarlarda naringin neohesperidin ve didimin olmak üzere altı flavanon tespit edilmiştir. Ferulik asit, portakal suyunda en baskın hidroksisinnamik asitlerdendir.

Elma suyunda en çok bulunan fenolik bileşikler, klorogenik asit, kafeik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, kateşin, epikateşin, prosiyanidinler (B1, B2, trimer C1), rutin ve floridzindir (Karaman ve ark., 2010).

3. 6. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Aynı ticari markanın nar, üzüm, portakal, elma ve domates suları seçilerek, toplam fenolik madde içerikleri de analiz edildi. Ticari meyve sularının toplam fenolik madde içerikleri Tablo 3.6'da görülmektedir.

Tablo 3.6: Farklı meyve sularında toplam fenolik madde sonuçları

Örnek	Toplam fenolik madde miktarı (mg Gallik Asit Eşdeğeri/L)
Nar	5663.22 ± 159.185 ^a
Üzüm	1943.21 ± 52.524 ^b
Portakal	489.81 ± 15.894 ^c
Elma	121.61 ± 0.998 ^c
Domates	280.97 ± 4.354 ^d

* Farklı harfler ortalamaların istatistiksel açıdan önemli olduğunu göstermektedir (P<0.05).

Meyve sularında toplam fenolik madde içerikleri DPPH, FRAP ve ABTS analizleri ile benzer şekilde sırasıyla nar > üzüm > portakal > domates > elma şeklindedir.

Tezcan ve ark. (2009), yedi farklı ticari nar suyunda yaptıkları çalışmada 144 ile 10086 mg GAE/L arasında değişen yedi farklı değer, yapılan başka bir çalışmada ise İran'daki sekiz farklı nar suyu çeşidinde 2380 ile 9300 mg/L (Mousavinejad ve ark., 2009) arasında değişen toplam fenol içeriği tespit etmişlerdir. Nar suyunun elma suyundan daha iyi bir antioksidan olduğunu açıklayan çalışmada nar suyunun 112.3 (mg%) elma suyunun 22 (mg%) toplam fenol içeriğine sahip olduğunu bildirmişlerdir (Guo ve ark., 2008). Nar suyu konsantresinde 1505 mg gallik asit/ L (Apaydın, 2008), elma suyunda 5.5 ile 10.9 g gallik asit/kg (García ve ark., 2009), ve domateste 168 ile 215 (mg GAE/kg taze ağırlık) (Ilahy ve ark. 2011) arasında toplam fenolik madde içeriği sonuçları elde edilmiş.

Singleton ve Rossi (1965) tarafından tanımlanmış bulunan Folin-Ciocalteu yöntemine göre yapılmıştır. Bu yöntemin ilkesi, fenolik bileşiklerin alkali ortamda Folin-Ciocalteu ayırıcını indirgeyip, kendilerinin oksitlenmiş forma dönüştüğü bir redoks reaksiyonuna dayanmaktadır. Folin ayırıcı ile muamele edildikten sonra oluşan mavi renk, spektrofotometrede 720nm dalga boyunda şahide karşı okunmuştur. Örnekte ölçülen absorbans değerinin gallik asit cinsinden eşdeğeri olan fenolik bileşik miktarı, gallik asit ile hazırlanmış olan standart kurvenin

denkleminde hesaplanmıştır. Örnekteki toplam fenolik bileşik miktarı ‘mg gallik asit/ L’ cinsinden ifade edilmiştir (Tağı, 2010).

Meyve sularında dört farklı antioksidan aktivite ve toplam fenol içeriği arasındaki Pearson korelasyon sonuçları Tablo 3.7’deki gibidir. Korelasyon sonuçları FRAP, DPPH, ABTS ve toplam fenol içeriği benzer çıkarken, GRAC metodunun bunlara kıyasla daha az benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bunun olası sebebinin GRAC metodunun hidrojen bağışlama özelliği temeline bağlı olması, diğer metodların ise elektron transferi esaslı analizler olmasıyla alakalı olduğu düşünülmektedir.

Tablo 3.7: Meyve suyu örneklerinde toplam fenolik madde içeriği, FRAP, DPPH, ABTS ve GRAC değerleri arasındaki ilişki (Pearson korelasyon katsayıları)

	Toplam fenol içeriği	FRAP	DPPH	ABTS	GRAC
Toplam fenol içeriği	1.000 25	0.991 (< .0001) 25	0.986 (< .0001) 24	0.995 (< .0001) 25	0.703 (< .0001) 25
FRAP		1.000 25	0.999 (< .0001) 24	0.999 (< .0001) 25	0.724 (< .0001) 25
DPPH			1.000 24	0.996 (< .0001) 24	0.751 (< .0001) 24
ABTS				1.000 25	0.716 (< .0001) 25
GRAC					1.000 25

4. SONUÇ

Bu çalışma ile, galvinoksil radikali kullanılarak modifiye edilen metodun çalışma koşulları optimize edilmiş ve antioksidan aktivite tayininde kullanılan ABTS, DPPH ve FRAP gibi yöntemlerle ilişkisi irdelenmiştir. Çalışmanın ilk aşamasında, kullanılacak galvinoksil radikal çözeltisinin uygun çalışma konsantrasyonu 10 μM olarak belirlenmiştir. Çalışma çözeltisinin uygun konsantrasyonu belirlenmesinden sonra, gallik asit, askorbik asit ve kateşin gibi saf bileşikler etanol içerisinde hazırlanmış ve her birinin Troloks standardında olduğu gibi uygun lineer bölgeleri saptanarak bu bileşikler için kalibrasyon eğrileri oluşturulmuştur. Lineer bölgeler Troloks için 0-1.66 μM , kateşin için 0-40 μM , gallik asit için 0-25 μM , askorbik asit için 0-50 μM ve BHT için 0-500 μM olarak saptanmıştır. Analiz sırasında çalışma çözeltisinin zamana bağlı absorbands kaybını belirlemek için 320-500 nm dalga boyunda çözeltinin farklı konsantrasyonlardaki Troloks varlığında spektrum taraması elde edilerek analiz reaksiyon süresini 20 dakika olarak belirlenmiştir. Galvinoksil radikali çalışma çözeltisinin -22°C 'de depolanmasıyla $+4^{\circ}\text{C}$ 'ye göre daha stabil olduğu ise saptanmıştır. Analiz süresince ilk gün hazırlanan çalışma çözeltisinin gerektiği şartlarda ilk üç gün boyunca kullanılabileceği uygun görülmüştür. Glukoz, sakaroz, glisin, üre ve albümin gibi saf bileşiklerin galvinoksil radikali üzerine etkisi olup olmadığını araştırıldığında, albümin, tirozin ve argininin düşük konsantrasyonları ile glukoz, sakaroz, glisin ve üre çözeltilerinin ise her iki konsantrasyonuyla gerçekleştirilen deneylerde karışımları absorbands değerleri Troloks kalibrasyon eğrisi içerisinde yer almamıştır. Bu bileşikler için bulunan değerlerin istatistiksel anlamda sıfır olup olmadığı ile ilgili hipotez testi sonucunda ise, ortalama değerlerin sıfırdan farklı olmadığı bulunmuştur. Albüminin %0.006, tirozin, arginin ve sistinin %0.005'lik konsantrasyonları ve ürik

asit çözeltileri az miktarda da olsa Troloks eşdeğeri cinsinden galvinoksil radikali savma kapasitesine sahip olup, analiz edilecek materyalin bu bileşenleri ihtiva ettiği oranın sonuçlar açısından önemli olduğu görülmüştür.

Modifiye edilen metodun gerçekleşeceği en uygun solventi belirlemek için etanol, metanol, aseton ve su ile çalışılmıştır. Elde edilen kalibrasyon eğrilerine göre solvent olarak etanolün daha uygun olduğu görülmüştür. Ekstraksiyon solventinin metoda etkisi ise asetonun kayda değer bir şekilde etkilediği etanol ve diğerleri için ise makul olduğu görülmüştür.

Modifiye edilen galvinoksil radikali bazlı metodu diğer yaygın olarak kullanılan metotlarla kıyaslamak amacıyla meyve sularının antioksidan aktiviteleri dört farklı yöntemle belirlenmiştir. FRAP, DPPH, ABTS ve toplam fenol içeriği benzer çıkarken, GRAC metodunun bunlara kıyasla daha az benzerlik gösterdiği görülmektedir. Ancak bunun olası sebebinin GRAC metodunun hidrojen bağışlama özelliği temeline bağlı olması, diğer metotların ise elektron transferi esaslı analizler olmasıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. GRAC metodunun avantajları olarak; kullanılacak çözeltilerin hazırlanışının kolay, analiz süresinin kısa olması, sonuçların anlaşılır olması, tekrarlanabilirliğinin kolay olması sayılabilir. Shi ve Niki'nin (1998) kullandığı yöntem, bileşiklerin molü başına bağışlanan hidrojen molekülü sayısını ölçmek üzerine kuruludur. Bu tez çalışmasında, sonuçlar antioksidan aktivite tayininde yaygın olarak kullanılan Troloks gibi saf bileşikler üzerinden verilmekte ve sonuçların anlaşılabilmesi ile karşılaştırılabilmesini kolaylaştırmaktadır.

KAYNAKLAR

Apaydın, E., 2008: Nar Suyu Konsantresi Üretim ve Depolama Sürecinde Antioksidan Aktivitedeki Değişimler, Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara Üniversitesi.

Abul-Fadl, M.A.M., 1949: Colorimetric determination of potassium by Folin-Ciocalteu phenol reagent, *Biochemical Journal*, 44(3): 282–285.

Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K., 2002: Methods for testing antioxidant activity, *The Analyst*, 127, 183-198.

Barclay, L.R.C., Edwards, C.E., Vinqvist, M.R., 1999: Media effects on antioxidant activities of phenols and catechols, *American Chemical Society*, 121, 6226-6231.

Benzie, I.F.F. and Strain J.J., 1996: The Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

Burak, M. and Çimen, Y., 1999: Flavonoidler ve antioksidan özellikleri, *Turkish Clinical Journal of Medicinal Science*, 19, 296-304.

Çam, M., Hışıl, Y., Durmaz, G., 2009: Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods, *Food Chemistry*, 112, 721–726.

Cemeroğlu, B., 2010: Gıdalara Uygulanan Bazı Özel Analiz Yöntemleri, *Gıda Analizleri*, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara, 657p.

Demiray, E., 2009: Kurutma İşleminde Domatesin Likopen, β -Karoten, Askorbik Asit Ve Renk Değişim Kinetiğinin Belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Fen Bilimleri Enstitüsü, Pamukkale Üniversitesi.

Duthie, G.G., 1999: Determination of activity of antioxidants in human subjects, *Proceedings of the Nutrition Society*, 58, 1015-1024.

Faure, P., Troncy, L., Lecomte, M., Wiernsperger, N., Lagarde, M., Ruggiero, D., Halimi, S., 2005: Albumin antioxidant capacity is modified by methylglyoxal, *Diabetes & Metabolism*, 31, 169-177.

García, Y.D., Valles, B.S., Lobo, A.P., 2009: Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace, *Food Chemistry* 117, 731–738.

Greene F.D., and Adam, W., 1963: Autoxidation of galvinoxyl, *The Journal Organic Chemistry*, 28 (12), 3550–3551.

Gollücke, A.P.B., Catharino, R.R., Cristina de Souza, J., Eberlin, M.N., Tavares, D.Q., 2009: Evolution of major phenolic components and radical scavenging activity of grape juices through concentration process and storage, *Food Chemistry*, 112, 868–873.

Gökpinar, Ş., Koray, T., Akçiçek, E., Göksan, T., Durmaz, Y., 2006: Algal antioksidanlar, *Ege Üniversitesi Su Ürünleri Dergisi*, 23, 85-89.

Guo, Q., Rimbach, G., Moini, H., Weber, S., Packer, L., 2002: ESR and cell culture studies on free radical-scavenging and antioxidant activities of isoflavonoids, *Toxicology* 179, 171–180.

Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y., 2003: Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay, *Nutrition Research*, 23, 1719–1726.

Guo, C., Wei, J., Yang, J., Xu, J., Pang, W., Jiang, Y., 2008: Pomegranate juice is potentially better than apple juice in improving antioxidant function in elderly subjects, *Nutrition Research*, 28, 72–77.

Gülçin, İ., 2007: Comparison of in vitro antioxidant and antiradical activities of L-tyrosine and L-DOPA, *Amino Acids*, 32, 431–438.

Halliwell, B., 1990: How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Communications*, 9, 1-32.

Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., and Aruoma, O.I., 1995: The characterization of antioxidants, *Food Chemistry*, 33, 601-617.

Harisa, G.E.I., Abo-Salem, O.M., El Sayed, E.M., Taha, E.I., and El-Halawany, N., 2009: L-arginine augments the antioxidant effect of garlic against acetic acid - induced ulcerative colitis in rats, *Pakistan Journal Pharmaceutical Sciences*, 22(4), 373-380.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L., 2005: The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.

Iacopini, P., Baldi, M., Storchi, P., Sebastiani L., 2008: Catechin, epicatechin, quercetin, rutin and resveratrol in red grape: Content, in vitro antioxidant activity and interactions, *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 589– 598.

Ilahy, R., Hdidier, C., Lenucci, M.S., Tlili I., Dalessandro G., 2011: Antioxidant activity and bioactive compound changes during fruit ripening of high-lycopene tomato cultivars, *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 588–595.

Ionita, P., 2005: Is DPPH Stable free radical a good scavenger for oxygen active species? *Chemical Paper*, 59(1), 11-16.

Jerzykiewicz M. and Ćwieląg-Piasecka, I., 2011: Antioxidative and Anticorrosive Properties of Bioglycerol, In *Biodiesel – Quality, Emissions and By-Products*. (Eds, Montero G. and Stoytcheva M.), InTech Publisher, Rijeka, Croatia.

Kaneko, T., Yamamoto, T., Tatsumi, H., Aoki, T., Oikawa, E., 2000: Synthesis of galvinoxyl unit-containing derivatives of poly(phenylacetylene) and polystyrene, and oxygen permeation behavior of their membranes, *Polymer*, 41: 4437-4444.

Kosaki, A., Suga, H., and Seki, S., Mukai, K. and Deguchi, Y., 1969: Thermodynamic properties of galvinoxyl radical and its phenol derivative; mechanism of the phase transition, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 42, 1525-1530.

Kouoh, F., Gressier, B., Luyckx, M., Brunet, C, Dine, T, Cazin, M, Cazin J.C., 1999: Antioxidant properties of albumin: effect on oxidative metabolism of human neutrophil granulocytes, *IL Farmaco* 54, 695–699.

Laaksonen, D.E. and Atalay, M., 2002: Oxidative stress, *Journal of Sports Science and Medicine*, 1, 1-14.

Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J ve Gopinathan, V., 1993: A Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates, *Clinic Science*, 84(4), 407-412.

Morelli, R., Russo-Volpe, S., Bruno, N., Lo Scalzo, R., 2003: Fenton-dependent damage to carbohydrates: free radical scavenging activity of some simple sugars, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (25), 7418-7425.

Mousavinejad, G., Emam-Djomeh, Z., Rezaei, K., Khodaparast, M.H.H., 2009: Identification and quantification of phenolic compounds and their effects on antioxidant activity in pomegranate juices of eight Iranian cultivars, *Food Chemistry* 115, 1274–1278.

Müller, L., Fröhlich, K., Böhm, V., 2011: Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay, *Food Chemistry*, 129, 139–148.

Nakilcioğlu, E., Hışıl, Y., 2011: Üzümsü meyvelerin fenolik madde içerikleri: böğürtlen, kızılıcık ve çilek, *Akademik Gıda*, 71-78.

Fennema, O.R., 1996: Lipids, *Food Chemistry*, Marcel Dekker Inc., NewYork, 1067p. (bölüm yazarı: Nawar, W.W.)

Negi, P.S., Jayaprakasha, G.K., 2008: Antioxidant and antimicrobial activities of *Punica granatum* peel extracts. *Food Microbiology and Safety*, 68(4), 1473-1477.

Nierman, N., Degefa, T. H., Walder, L., Zielke, V., Steinhoff, H.-J., Onsgaard, J., and Speller, S., 2006: Galvinoxyl monolayers on Au(111) studied by STM, EPR, and cyclic voltammetry, *Physical Review B* 74, 235424.(13 syf)

Noguchi, N., Watanabe, A., and Shi H., 2000: Diverse functions of antioxidants, *Free Radical Research*, 33, 809-817.

Novak, I., Kovac, B., 2005: Electronic structure of galvinoxyl radical, *Chemical Physics Letters*, 413, 351-355.

Ochiai, T., Fujita, R., Iwai, K., and Hamamoto, T., 2003: Highly sensitive spectroscopic method for measuring antioxidant activity using galvinoxyl radical, *Japanese Journal Food Chemistry*, 10(1), 13-21.

Pazdzioch- Czochra, M., Widenska, A., 2002: Spectrofluorimetric determination of hydrogen peroxide scavenging activity, *Analytica Chimica Acta*, 452, 177-184.

Pedrielli, P., Pedulli, G. F., and Skibsted, L. H., 2001: Antioxidant mechanism of flavonoids. solvent effect on rate constant for chain-breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 49, 3034-3040.

Peinado, J., Lopez de Larma, N., Peinado, R.A, 2010: Synergistic antioxidant interaction between sugars and phenolics from a sweet wine, *European Food Research and Technology*, 231, 363-370.

Perez-Jimenez, J. and Saura-Calixto F., 2006: Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays, *Food Research International*, 39, 791-800.

Prior, R.L., Wu, X., and Schaich, K., 2005: Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C., 1998: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.

Roche, M., Rondeau, P., Singh, N.R., Tarnus, E., Bourdon, E., 2008: The antioxidant properties of serum albumin, *FEBS Letters*, 582, 1783–1787.

Rodriguez, J., Olea-Azar, C., Cavieres, C., Norambuena, E., Delgado-Castro, T., Soto-Delgado, J., ve Araya-Maturana R., Antioxidant properties and free radical-scavenging reactivity of a family of hydroxynaphthalenones and dihydroxyanthracenones, 7058-7065.

Saldamlı, İ., 2007: *Gıda Kimyası, Hacettepe Üniversitesi Yayınları*, Ankara.

Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F., 1999: Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents, *Food Research International* 32, 407-412.

Sanchez-Moreno, C., 2002: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems, *Food Science Technology*, 8 (3), 121-137.

Schilling, S., Alber, T., Toepfl, S., Neidhart S., Knorr D., Schieber A., Carle R., 2007: Effects of pulsed electric field treatment of apple mash on juice yield and quality attributes of apple juices, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 8, 127–134

Shi, H. and Niki, E., 1998: Stoichiometric and kinetic studies on Ginkgo biloba extract and related antioxidants, *Lipids*, 33(4):365-370.

Smith, M.A.L., Marley, K.A., Seigler, D., Singletary, K.W. and Meline, B., 2000: Bioactive properties of wild blueberry fruits, *Journal of Food Science*, 65(2), 352-356.

Stocker, R., Glazer, A. N., Ames, B. N., 1987: Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84, 5918-5922.

Tağı, Ő., 2010: Nar Suyu Üretim AŐamalarında Antimikrobiyel Aktivite ve Fenolik Madde Miktarındaki Değişimler, *Ankara Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi Kesin Raporu.*

Tezcan, F., Gültekin-Özğüven, M., Diken, T., Özçelik, B., Erim, F.B., 2009: Antioxidant activity and total phenolic, organic acid and sugar content in commercial pomegranate juices, *Food Chemistry*, 115 873–877.

Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L. & Byrne, D.H., 2006: Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669–675.

Tsuchiya, J., Yamada, T., Niki, E., and Kamiya Y., 1985: Interaction of galvinoxyl radical with ascorbic acid, cysteine, and glutathione in homogeneous solution and in aqueous dispersions, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 58, 326-330.

Van den Ende, W., and Valluru, R., 2009: Sucrose, sucrosyl oligosaccharides, and oxidative stress: scavenging and salvaging?, *Journal of Experimental Botany*, 60(1), 9–18.

Velioğlu, S., 2000: Doğal antioksidanların insan sağlığına etkileri, *Gıda*, 25(3), 167-176.

Wei, Y.H., Pang, C.Y., 2005: The role of mitochondria in the human ageing process. *Biotech International*, 17, 8-13.

Wootton-Beard, P. C., Moran, A., Ryan, L., 2011: Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin-Ciocalteu methods, *Food Research International* 44, 217–224.

Yilmaz, Y. and Toledo, R., T., 2004: Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 255-260.

Yilmaz, Y. and Toledo, R., 2005: Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products, *Food Chemistry*, 93, 273-278.

Yu, L., Perret, J., Davy, B., Wilson, J., and Melby, C.L., 2002: Antioxidant properties of cereal products, *Journal of Food Science*, 67, (7), 2600-2603.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Adeviye Rana SELÇUK

Doğum Yeri ve Tarihi: Eskişehir / 20.04.1985

Adres: Eğitim Mah., Orkide Sokak, No:11 Daire:16 Kadıköy / İstanbul

Lisans: Pamukkale Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

Yayın Listesi:

- Selçuk, A.R. ve Yılmaz, Y., 2009: İşlenmiş üzüm çekirdeği tozu ilavesinin lokum benzeri bir ürünün toplam fenolik madde içeriği ile antioksidan aktivitesi üzerine etkisi. Akademik Gıda, 7(5): 56-61.
- Gökçe, Ö., Selçuk, R., Yılmaz, Y., Gürsoy, O., 2009: Süt ve süt ürünlerinde bitkisel ekstraktların fonksiyonel bileşen olarak kullanılması. Pamukkale Süt ve Ürünleri Sempozyumu Bildiriler Özet Kitabı, sayfa 65, 21-23 Mayıs, Pamukkale Üniversitesi, Kınıklı, Denizli.
- Selçuk, A.R., Demiray, E., Yılmaz, Y., 2011: Antioxidant activity of grape seeds obtained from molasses (pekmez) and winery production. Akademik Gıda, 9(5): 39-43.

Görev Aldığı Projeler:

- Tübitak Hızlı Destek Projesi no: 110-O-055 Boza üretiminde sarı leblebi unu kullanım imkanları ve karakteristik özelliklerin belirlenmesi.
- KOSGEB Projesi kapsamında Ar-Ge Mühendisliği (Has Burcu Unlu Mamüller) İşlenmiş üzüm çekirdeğinin unlu mamüllerde kullanımı.