

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
2014-YL-004

**ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERLE ANTIOKSİDAN
KAPASİTE TAYİNİ VE KLASİK YÖNTEMLERLE
KARŞILAŞTIRILMASI**

Fatma Merve NACAĞ

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

AYDIN

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Fatma Merve NACAĞ tarafından hazırlanan Elektrokimyasal Yöntemlerle Antioksidan Kapasite Tayini ve Klasik Yöntemlerle Karşılaştırılması başlıklı tez, tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

Ünvanı, Adı Soyadı	Kurumu	İmzası
Başkan : Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER	ADÜ	
Üye : Prof. Dr. Mustafa BİRİNCİOĞLU	ADÜ	
Üye : Doç. Dr. Kubilay METİN	ADÜ	

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

Prof. Dr. AYDIN ÜNAY

Enstitü Müdürü

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Bu tezde sunulan tüm bilgi ve sonuçların, bilimsel yöntemlerle yürütülen gerçek deney ve gözlemler çerçevesinde tarafımdan elde edildiğini, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce, sonuç ve bilgilere bilimsel etik kuralların gereği olarak eksiksiz şekilde uygun atıf yaptığımı ve kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

.....

Fatme Merve NACAĞ

ÖZET

ELEKTROKİMYASAL YÖNTEMLERLE ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ VE KLASİK YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRILMASI

Fatma Merve NACAĞ

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı
Tez Danışman: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER
2014, 101 Sayfa

Oksidatif strese karşı koruyucu görevi olan antioksidanların pek çoğu elektrokimyasal aktiviteye sahip bileşiklerdir. Bunlardan en büyük grubu polifenoller oluşturmaktadır.

Bu çalışmada polifenoller grubuna ait 5 adet fenolik asit ile 3 adet sentetik antioksidanın çevrimli voltametri ile elektrokimyasal davranışları incelenmiş, belirlenen optimal koşullarda diferansiyel puls voltamogramları alınmıştır. Birinci oksidatif taramada ortaya çıkan pike veya piklere ait potansiyel, şiddet ve yük parametreleri dikkate alınarak o antioksidanların kapasiteleri hesaplanmış, en yüksek kapasite 100 kabul edilerek diğerlerine bağlı değerler atanmıştır. Aynı antioksidanların kapasiteleri klasik-spektrofotometrik yöntemlerden indirgeme gücü, TEAC ve DPPH yöntemleri ile hesaplanarak büyüklükleri kendi içlerinde bağlı olarak tanımlanmıştır. Parametre veya parametre kombinasyonları ile hesaplanan elektrokimyasal indis sonuçları ile klasik spektrofotometrik yöntem sonuçları karşılaştırılmış, aralarında bir korelasyon olup olmadığı çoklu regresyon ve Spearman sıralama korelasyon katsayısı yöntemleri ile araştırılmıştır.

Elektrokimyasal yöntem ile en yüksek korelasyonu veren klasik-spektrofotometrik yöntemin DPPH olduğu görülmüştür. Öte yandan, spektrofotometrik yöntemler kendi aralarında karşılaştırıldıklarında indirgeme gücü ile TEAC ve DPPH arasındaki korelasyonlarının dikkate değer olduğu, ancak, DPPH ve TEAC arasındaki korelasyonun düşük olduğu gösterilmiştir.

Anahtar sözcükler: Antioksidan kapasite, voltametri, DPPH, TEAC, indirgeme gücü, korelasyon.

ABSTRACT

ELECTROCHEMICAL METHODS FOR DETECTION OF ANTIOXIDANT CAPACITY AND COMPARISON WITH CLASSICAL METHODS

Fatma Merve NACAĞ

M.Sc. Thesis, Department of Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER
2014, 101 Pages

The most of the antioxidants that act against oxidative stress are electrochemically active components. The polyphenols group is the largest group among them.

In this study, electrochemical behavior of 5 phenolic acids and 3 synthetic antioxidant are examined by cyclic voltammetry, and the differential pulse voltammetry is executed at the optimal conditions determined. Antioxidant capacities are calculated with the use of potential, intensity and charge parameters of a peak (or peaks) observed in the first scan; a value of 100 is assigned to the highest capacity and the other capacities are valued relatively.

Capacities are also determined by reducing power, TEAC and DPPH of classical-spectrophotometric methods and for each method capacities are relatively valued assigning a value of 100 to the highest capacity. Measured/calculated capacities obtained with electrochemical and classical-spectrophotometrics methods are compared to see if a correlation exists between and among the methods. Existence or degree of correlation is sought with multiple regression and Spearman rank correlation coefficient methods.

Among classical-spectrophotometric methods DPPH showed highest correlation with the electrochemical method. On the other hand, when spectrophotometric methods are compared among themselves correlation between reducing power with TEAC and DPPH were remarkable while the correlation between DPPH and TEAC is very low.

Keywords: Antioxidant capacity, voltammetry, DPPH, TEAC, reducing power, correlation.

Hayattaki en değerlilerim olan ve varlıkları ile bana can katan sevgili

Anneciğim Meryem NACAĞ'a

Babacığım Cumali NACAĞ'a

Canımdan bir paręa olan biricik kardeşlerim

Dilan NACAĞ'a

ve

Çağrı NACAĞ'a

sonsuz teşekkürler.

ÖNSÖZ

Akademik kimliği ve kişiliği ile örnek aldığım, yanında çalışmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER'e yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarına özveriyle katkıda bulunan, her sorunumla yakından ilgilenen ve hiçbir zaman desteğini esirgemeyen çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. A. Alev KARAGÖZLER'e,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca desteklerini her zaman hissettiğim, aynı laboratuvarında çalışmaktan mutluluk duyduğum ve hayatımda özel yerleri olan Öğr. Gör. Dr. Mert SOYSAL'a, Yrd. Doç. Dr. Mihrican MUTİ ERDEM'e ve doktora öğrencisi Kübra GENÇDAĞ'a gösterdikleri sevgi, fedakarlık ve hoşgörü için,

Beni her zaman sabırla dinleyen, hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen, benim için çok kıymetli olan hocalarım Arş. Gör. Dr. Rukiye GÜMÜŞADA FIRINCI'ya ve Arş. Gör. Dr. Erkan FIRINCI'ya,

Her türlü desteği, ilgisi ve yardımlarından dolayı değerli arkadaşım ve hocam Arş. Gör. Rukiye YAVAŞER'e,

Ve dostluklarından mutluluk duyduğum, en sıkıntılı anlarımda bana moral veren, motivasyonumu arttıran çok değerli arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Çalışmalarım, eğitimim ve daha da önemlisi hayatım boyunca beni anlayış ve hoşgörü ile karşılayan, verdiğim her kararımda bana destek olan aileme minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Fatma Merve NACAK

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
BİLİMSEL ETİK BİLDİRİM SAYFASI	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xiii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xxi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER / KAYNAK ÖZETLERİ	3
2.1. Serbest Radikal Nedir	3
2.2. Serbest Radikaller Nasıl Oluşur	3
2.3. Oksidatif Stres Nedir.....	6
2.4. Antioksidan Nedir	6
2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Antioksidanların Sınıflandırılması.....	8
2.5.1. Doğal Antioksidanlar	10
2.5.1.1. Enzimatik Antioksidanlar.....	10
2.5.1.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	12
2.5.2. Sentetik Antioksidanlar.....	17
2.6. Çalışmada Kullanılan Doğal Antioksidan Bileşikler	18
2.6.1. Arbutin	18
2.6.2. Gallik Asit	18
2.6.3. P-Kumarik Asit	19
2.6.4. Sirincik Asit	19
2.6.5. Vitamin C (Askorbik Asit).....	20
2.7. Çalışmada Kullanılan Sentetik Antioksidanlar	21
2.7.1. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA)	21
2.7.2. Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT).....	22
2.7.3. Troloks	22
2.8. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri.....	23

2.8.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayin Yöntemleri.....	25
2.8.2. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayini (ABTS/TEAC).....	27
2.8.3. İndirgeme Gücü Tayini.....	28
2.8.4. Demir(III) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Yöntemi (FRAP).....	29
2.8.5. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC)	29
2.8.6. Folin-Ciocalteu Reaktif (FCR) İle Toplam Fenolik Bileşik Tayini.....	29
2.8.7. Ferrik Tiyosiyanat Yöntemi İle Total Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemi	30
2.8.8. Oksijen Radikal Absorbans Kapasite Yöntemi (ORAC).....	30
2.8.9. Toplam Radikal Tutma Parametresi Yöntemi (TRAP)..	30
2.8.10. Krosin Beyazlatma Yöntemi	31
2.9. Voltametri.....	31
2.10. Voltametrik Yöntemler.....	32
2.10.1. Çevrimli Voltametri (CV)	32
2.10.2. Puls Voltametrisi	34
2.10.2.1. Diferansiyel Puls Voltametrisi(DPV).....	34
2.11. Voltametri Kullanan Elektrotlar	35
2.11.1. Çalışma (İndikatör) Elektrotları.....	35
2.11.2. Referans Elektrotlar.....	37
2.11.3. Yardımcı (Karşıt) Elektrotlar.....	37
2.12. Kaynak Özetleri.....	38
3. MATERYAL VE YÖNTEM	45
3.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasallar	45
3.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	47
3.3. Deneylerde Kullanılan Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri.....	48
3.3.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini.....	48
3.3.2. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayini (ABTS/TEAC).....	48
3.3.3. İndirgeme Gücü Tayini.....	49
3.3.4. Voltametrik Ölçümler.....	50
3.3.5. Voltametrik Ölçümlerde Kullanılan İstatistik Yöntemleri	50
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	52
4.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini Sonuçları	52

4.2. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayini (ABTS/TEAC) Sonuçları...	58
4.3. İndirgeme Gücü Tayini Sonuçları.....	65
4.4. Antioksidan Kapasitenin Elektrokimyasal Yöntemlerle Tayin Sonuçları....	70
5. SONUÇ	89
KAYNAKLAR	91
ÖZGEÇMİŞ	101

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid
ABAP	2,2'-azobis-(2-amidinopropan)
ABTS	2,2'-azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT	Katalaz
CUPRAC	Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi
CV	Çevrimli voltametri
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DPV	Diferansiyel puls voltametrisi
EI	Elektrokimyasal indis
ESR	Elektron spin rezonans
ET	Elektron transferne dayanan reaksiyonlar
FCR	Folin-Ciocalteu reaktifi
B-PE	β -fikoeritrin
FRAP	Demir(III) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi
FTC	Ferrik Tiyosiyanat Yöntemi ile Total Antioksidan Aktivite Tayini
GAE	Gallik asit eşdeğeri
GPx	Glutatyon peroksidaz
GR	Glutatyon redüktaz

xx

GSH	Glutatyon
GSSG	Okside glutatyon
GST	Glutatyon-S-Transferaz
HAT	Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografis
NADP	Nikotinamid adenin dinükleotit
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (redükte)
ORAC	Oksijen radikal absorbands kapasite yöntemi
PTFE	Politetrafloroetilen
ROS	Reaktif oksijen türleri
RNS	Reaktif azot türleri
SOD	Süperoksit dismutaz
Std.Sapma	Standart sapma
TBHQ	Tersiyer bütihidroksikinon
TCA	Trikloroasetik asit
TEAC	Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayini
TRAP	Toplam radikal tutma parametresi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Oksidatif stres.....	6
Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması.....	9
Şekil 2.3. Vitamin C (askorbik asit) molekülünün kimyasal yapısı.....	12
Şekil 2.4. α -tokoferolün kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.5. Polifenolik bileşiklerin sınıflandırılması	14
Şekil 2.6. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.7. Antoksanin gruplarının kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.8. Antosiyanin ve antosiyanidin kimyasal yapısı.....	16
Şekil 2.9. Arbutin molekülünün kimyasal yapısı	18
Şekil 2.10. Gallik asit molekülünün kimyasal yapısı.....	18
Şekil 2.11. p-kumarik asit molekülünün kimyasal yapısı	19
Şekil 2.12. Sirincik asit molekülünün kimyasal yapısı	19
Şekil 2.13. Vitamin C molekülünün kimyasal yapısı.....	20
Şekil 2.14. BHA molekülünün kimyasal yapısı.....	21
Şekil 2.15. BHT molekülünün kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.16. Troloks molekülünün kimyasal yapısı.....	22
Şekil 2.17. DPPH radikalinin antioksidanlarla etkileşim mekanizması.....	25
Şekil 2.18. ABST'nin potasyum persülfatla oksidasyonu.....	27
Şekil 2.19. Çevrimli voltametri potansiyelin zamana bağlı ardışık tarama döngüsü.....	32
Şekil 2.20. Çevrimli voltametri potansiyelin zamana bağlı tarama döngüsü.....	33
Şekil 2.21. Tersinir bir elektrot tepkimesi için elde edilen akım-potansiyel eğrileri.....	33
Şekil 2.22. a) Giderek artan bir doğru akım potansiyeline sabit genlikli pulsların uygulanması, (b) Diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen I-E eğrisi.....	35

Şekil 2.23. Voltametrik çalışmada elektrotların genel sınıflandırılması.....	36
Şekil 4.1. Farklı derişimlerdeki arbutin molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi karşılaştırılması	53
Şekil 4.2. Farklı derişimlerdeki BHA molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi	53
Şekil 4.3. Farklı derişimlerdeki BHT molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi	54
Şekil 4.4. Farklı derişimlerdeki gallik asit molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi	54
Şekil 4.5. Farklı derişimlerdeki kumarik asit molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi	55
Şekil 4.6. Farklı derişimlerdeki sirincik asit molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi	55
Şekil 4.7. Farklı derişimlerdeki troloks molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi	56
Şekil 4.8. Farklı derişimlerdeki vitamin C molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi	56
Şekil 4.9. ABTS radikal katyonunun UV-görünür bölgede absorpsiyon spektrumu	58
Şekil 4.10. Troloks molekülü için TEAC standart çalışma	59
Şekil 4.11. Farklı derişimlerdeki arbutin molekülü için TEAC aktivitesi	60
Şekil 4.12. Farklı derişimlerdeki BHA molekülü için TEAC aktivitesi	60
Şekil 4.13. Farklı derişimlerdeki BHT molekülü için TEAC aktivitesi	61
Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki gallik asit molekülü için TEAC aktivitesi. Kabul edilebilir bir korelasyon katsayısı ile ilk 4 deneysel nokta dikkate alınarak çizilen kalibrasyon grafiği içteki grafikte gösterilmiştir (A).....	61
Şekil 4.15. Farklı derişimlerdeki kumarik asit molekülü için TEAC aktivitesi.....	62
Şekil 4.16. Farklı derişimlerdeki sirincik asit molekülü için TEAC aktivitesi.....	62
Şekil 4.17. Farklı derişimlerdeki vitamin C molekülü için TEAC aktivitesi.....	63

Şekil 4.18. Arbutin molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi...	65
Şekil 4.19. BHA molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi.....	66
Şekil 4.20. BHT molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi	66
Şekil 4.21. Gallik asit molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi.....	67
Şekil 4.22. Kumarik asit molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi	67
Şekil 4.23. Sirincik asit molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi.....	68
Şekil 4.24. Troloks molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi	68
Şekil 4.25. Vitamin C molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi.....	69
Şekil 4.26. Gallik asit molekülünün 0.1 M pH:1.93 Glisin HCl tamponunda alınan üç ardışık çevrimli voltamogramı.....	70
Şekil 4.27. Sirincik asit molekülünün 0.1 M pH:1.93 Glisin HCl tamponunda alınan üç ardışık çevrimli voltamogramı.....	71
Şekil 4.28. 0.5 mM arbutin molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları	72
Şekil 4.29. 0.5 mM BHA molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları	72
Şekil 4.30. 0.5 mM BHT molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları	73
Şekil 4.31. 0.5 mM gallik asit molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları	73
Şekil 4.32. 0.5 mM kumarik asit molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları	74

- Şekil 4.33. 0,5 mM sirincik asit molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları74
- Şekil 4.34. 0.5 mM troloks molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları75
- Şekil 4.35. 0.5 mM vitamin C molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları75
- Şekil 4.36. Spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntem ile elde edilen bağıl kapasitelerin grafiksel gösterimi.....82

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Reaktif oksijen ve azot türleri	5
Çizelge 4.1. DPPH radikal süpürücü aktiviteleri incelenen antioksidan bileşiklerin IC ₅₀	57
Çizelge 4.2. ABTS radikal katyonunun dalga boyu ve absorbands	58
Çizelge 4.3. Çalışılan antioksidan bileşiklerin TEAC yöntemi ile hesaplanan TEAC _{ABTS} değerleri	64
Çizelge 4.4. Çalışma kapsamındaki antioksidan bileşiklerin indirgeme gücü değerleri	69
Çizelge 4.5. Birinci taramada ortaya çıkan birinci ve ikinci piklerin pik potansiyelleri, pik şiddetleri (akımları) ve yükleri.....	77
Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan 8 antioksidana ait kütle, mol sayısı, yük, yük/kütle-GAE ve yük/mol sayısı-GAE olarak hesaplanan değerleri ..	79
Çizelge 4.7. Spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntem ile elde edilen bağıl kapasiteler ve kapasitelerin sıralaması.....	81
Çizelge 4.8. Spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntem ile hesaplanmış bağıl antioksidan kapasiteleri.....	85
Çizelge 4.9. Elektrokimyasal ve spektrofotometrik yöntemler arasındaki korelasyonun Spearman sıralama korelasyon katsayısı yöntemi ile hesaplanan korelasyon değerleri.....	87

1. GİRİŞ

Yüksek aktiviteye sahip bileşikler olan serbest radikaller, atomik ya da moleküler yapılarda eşleşmemiş bir veya daha fazla tek elektron taşıyan moleküllere verilen isimdir. Başka moleküller ile kolayca elektron alışverişine giren bu moleküllere oksidan moleküller veya reaktif oksijen türleri denilmektedir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

Serbest radikaller, yaşamsal faaliyetler sırasında veya solunum, enzim reaksiyonları, ootoksidasyon reaksiyonları gibi endojen kaynaklar ile sigara dumanı, hava kirliliği, UV ışınları ve radyasyon gibi çeşitli çevresel kaynakların etkisiyle meydana gelebilmektedirler (Young ve Woodside, 2000). Oluşan bu serbest radikallerin lipidler, proteinler ve DNA ile etkileşmesi sonucunda bu moleküller zarara uğrar ve normal fonksiyonları bozulur. Kalp rahatsızlığı, diyabet, kanser ve yaşlanma gibi birçok rahatsızlığın temelinde serbest radikallerin meydana getirdiği hasarların olduğu öne sürülmüştür (Akkuş, 2000).

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engeller. Bunların yapısında genellikle fenolik gruplar bulunur (Kahkönen vd., 1999). Vücutta kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşikler, elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize ederken kendileri serbest radikal haline dönüşmezler (Prior ve Cao, 2000).

İnsan vücudunu serbest oksijen radikallerine karşı korumada doğal ve fenolik bileşiklerce zengin meyve ve sebzelerin yararlı olduğu bilinmektedir. Günlük beslenmede antioksidan bileşiklerce zengin bu bitkisel besinler yeterince alınmadığı takdirde reaktif oksijen türleri ile bu antioksidan savunma sistemi arasındaki denge bozulabilir, bu durumda oksidatif stres kaçınılmaz olur (Arbos, vd., 2008).

Yapılan çalışmalarda reaktif oksijen türlerine karşı bitkisel kaynaklardaki fitonutrientlerin yararlı olduğu; meyve ve sebzelerin koruyucu etkilerinin içerdikleri C vitamini, E vitamini, karotenoidler, glutatyon, flavonoidler ve fenolik asitler, lipoik asit, riboflavin, selenyum ve çinko gibi doğal bileşiklerden dolayı olduğu bildirilmiştir (Halvorsen vd., 2002). Düzenli ve dengeli bir diyetle alınacak antioksidan bileşikler tarafından vücudun endojen savunma sisteminin desteklenmesi gerekliliği anlaşılmıştır. Son yıllarda antioksidanlarla

zenginleştirilmiş gıdalar giderek önem kazanmıştır. Bu nedenle de antioksidan aktiviteyi ölçmek üzere kullanılan çeşitli tayin yöntemlerinin geliştirilmesi ve karşılaştırılması son zamanlarda en önemli araştırma konularından biridir.

Bu tez kapsamında, sentetik ve doğal antioksidan temsilcileri olan antioksidanlar kullanılarak hem bazı klasik yöntemler hem de elektrokimyasal yöntemler ile ölçülen toplam antioksidan kapasite değerleri karşılaştırılarak:

- Elektrokimyasal yöntemlerin varsa avantaj ve dezavantajları ortaya konabilecek,

- Elektrokimyasal ve klasik yöntemlerin sonuçları arasında korelasyonun varlığı araştırılacaktır.

2. KURAMSAL TEMELLER / KAYNAK ÖZETLERİ

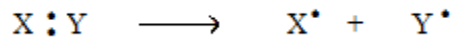
2.1. Serbest Radikal Nedir?

Radikaller, dış yörüngelerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren kimyasal maddelerdir. Böyle bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapılı bir organik molekül olabilir. Her türden kimyasal ve biyokimyasal tepkime daima atomların dış yörüngelerindeki elektronlar seviyesinde gerçekleşir. Dış yörüngelerde eşleşmemiş elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini artırdığı için radikaller reaktivitesi yüksek olan kimyasal türlerdir (Kılınç ve Kılınç, 2002).

2.2. Serbest Radikaller Nasıl Oluşur?

Dış çevrede ve hücre içinde çeşitli fiziksel faktörler ve kimyasal olaylar nedeniyle devamlı bir radikal yapımı vardır. Radikaller başlıca 3 temel mekanizma ile oluşurlar (Kılınç ve Kılınç, 2002).

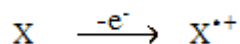
- a) Kovalent bağlı bir molekülün, ortak elektronların her birinin ayrı atomlarda kalacak şekilde homolitik kırılması ile.



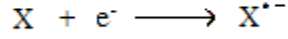
veya kovalent bağı oluşturan iki atomun bağdaki elektronlarının ikisinin birden aynı atomda kalarak heterolitik bölünme ile zıt yüklü iyon çiftleri oluşur ve bu türler de reaktiftir.



- b) Normal bir molekülün elektron kaybetmesi ile: Radikal özelliği taşımayan bir molekülün elektron kaybetmesi ile en dıştaki yörüngede eşleşmemiş elektron oluşmasıyla.



- c) Normal bir moleküle elektron transferi: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle bir elektron transferi sonucu dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşmasıyla.



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksel olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküller şeklinde olabilirler. Cu, Fe, Mn ve Mo gibi geçiş metalleri eşleşmemiş elektronlara sahip olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar (Akkuş, 2000).

En önemli serbest radikaller, oksijen ve azottan oluşan radikallerdir. Bu radikallerin bir listesi Çizelge 2.1'de gösterilmiştir (Halliwell ve Auroma, 1998).

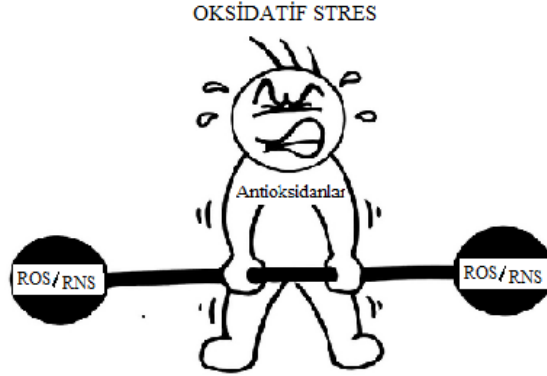
Çizelge 2.1. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri

Reaktif Oksijen Türleri (ROS)			
Radikaller		Radikal olmayanlar	
Süperoksit,	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit,	H_2O_2
Hidroksil,	OH^{\cdot}	Hipokloröz Asit,	$HOCl$
Peroksil,	RO_2^{\cdot}	Hipobromöz Asit,	$HOBr$
Alkoksil,	RO^{\cdot}	Ozon,	O_3
Hidroperoksil,	HO_2^{\cdot}	Singlet Oksijen,	$\Delta g O_2$

Reaktif Azot Türleri (RNS)			
Radikaller		Radikal olmayanlar	
Nitrik oksit,	NO^{\cdot}	Nitröz asit,	HNO_2
Azot dioksit,	NO_2^{\cdot}	Nitrozil katyonu,	NO^+
		Nitroksil anyonu,	NO^-
		Diazot tetroksit,	N_2O_4
		Diazot trioksit,	N_2O_3
		Peroksi nitrit,	$ONOO^-$
		Peroksi nitröz asit,	$ONOOH$
		Nitronyum katyonu,	NO_2^+
		Alkil peroksinitritler,	$ROONO$
		Nitril klorür,	NO_2Cl

2.3. Oksidatif Stres Nedir?

Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur (Şekil 2.1) (Halliwell ve Aruoma, 1991).



Şekil 2.1. Oksidatif stres

2.4. Antioksidan Nedir?

Antioksidanlar, yükseltenebilen substratlara göre daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir. Antioksidanlar, hücelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır (Cao ve Prior, 1999).

Antioksidanların insan sağlığındaki yerini belirleyen en önemli faktörler, onların kimyasal yapıları, çözünürlükleri, yapı/aktivite ilişkileri ve doğal kaynaklardan elde edilebilmeleridir (Kaur ve Kapoor, 2001).

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Rice-Evans, 1997). Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Bu bileşikler oksidatif sistemde farklı şekillerde davranabilirler. Örneğin; singlet oksijeni sönmeye uğratarak oksijen derişimini düşürebilirler. Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri tutma özelliğini kullanarak zincir reaksiyonlarının başlamasını önlerler, metal iyon katalizörlerini bağlarlar (Shahidi, 1996).

Bir antioksidanın aktivitesi şu faktörler ile belirlenir (Rice-Evans vd., 1997):

1. Hidrojen veya elektron donör aracı olarak gösterebildiği reaktivite (Genelde indirgeme potansiyeline bağlıdır).
2. Antioksidandan türeyen radikalın akıbeti.
3. Diğer antioksidanlarla etkileşim yeteneği.
4. Geçiş metali şelatlama potansiyeli.

2.5. Antioksidan Savunma Sistemleri ve Antioksidanların Sınıflandırılması

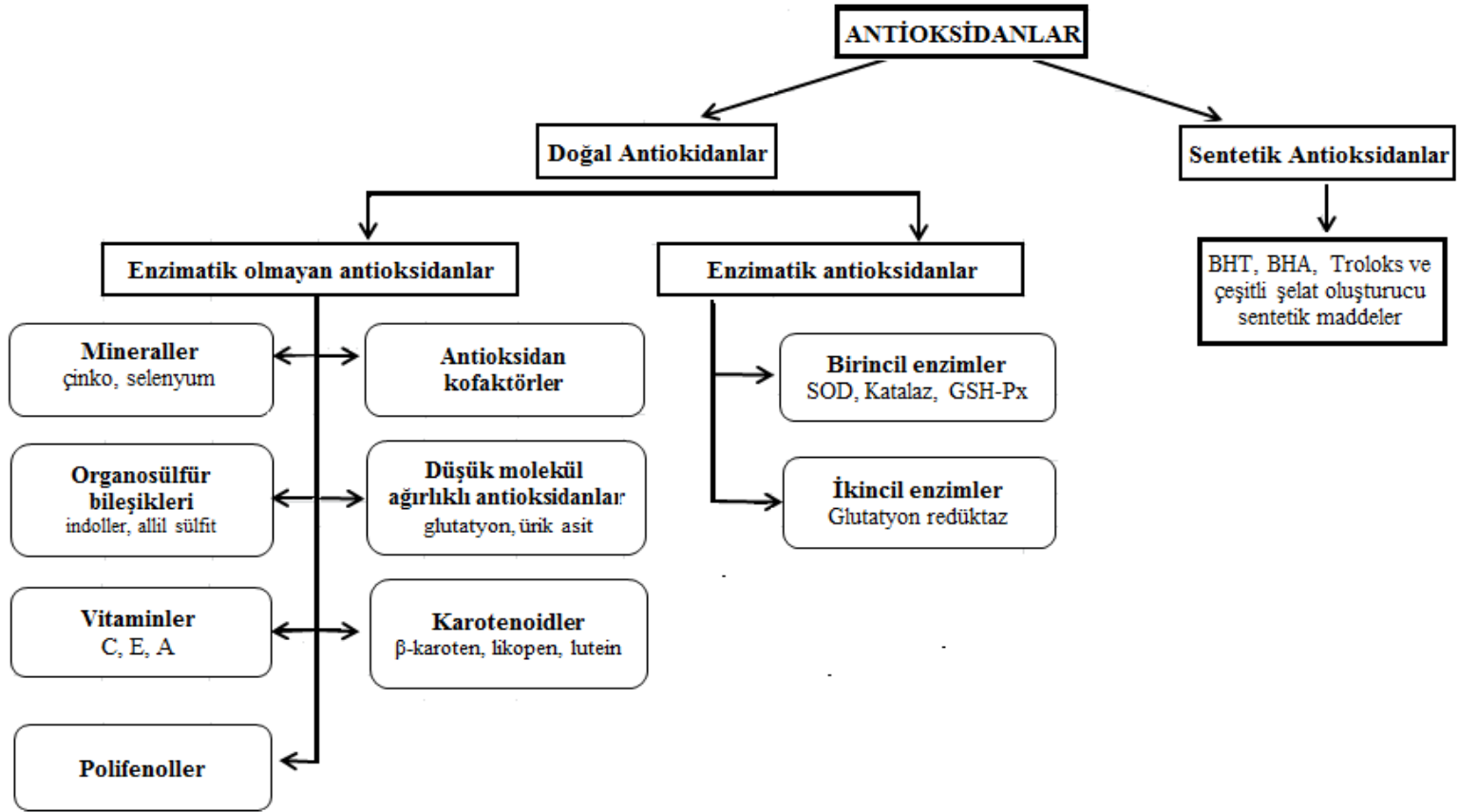
Antioksidanlar etkilerini başlıca iki şekilde gösterirler: (Temür, 2006)

I. Serbest radikal oluşumunun önlenmesi:

- Başlatıcı reaktif türevlerini uzaklaştırma etkisi.
- Oksijeni uzaklaştırıcı veya derişimini azaltıcı etki.
- Katalitik metal iyonlarını uzaklaştırıcı etki.

II. Oluşan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi:

- Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif olan yeni bir moleküle çevirme “toplayıcı” etkidir. Antioksidan enzimler (SOD, katalaz, GSH-Px vb.) bu şekilde etkilidir.
- Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme “bastırıcı” etkidir. Askorbik asit (C vitamini), α -tokoferol (E vitamini), flavonoidler (kuersetin, kateşin vb.) bu tarz bir etkiye sahiptirler.
- Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki “zincir kırıcı” etkidir. Hemoglobın, seruloplazmin, albumin gibi bileşikler bu şekilde etki ederler.
- Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması “onarıcı” etkidir.



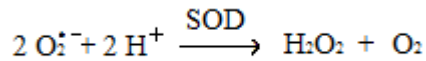
Şekil 2.2. Antioksidanların sınıflandırılması (Ratnam vd., 2006)

2.5.1. Doğal Antioksidanlar

2.5.1.1. Enzimatik antioksidanlar

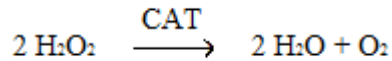
Gıdalarda ve bu gıdaları tüketen insanlarda bazı enzimler, oksidatif hasara yol açan oksijeni, hidrojen peroksit ve süperoksit anyon radikalleri gibi aktif oksijen türlerini uzaklaştırarak veya lipid hidroperoksitlerini azaltarak antioksidatif aktivite göstermektedir (Halliwell, 2001).

Süperoksit Dismutaz (SOD): Süperoksiti hidrojen peroksit ve moleküler oksijene çeviren reaksiyonu katalizleyen bir metalloenzimdir.

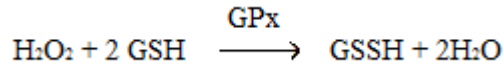


Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da isimlendirilir. Çünkü, süperoksit zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü bir başlatıcısıdır. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki $\text{O}_2^{\cdot -}$ düzeyleri kontrol altında tutulur.

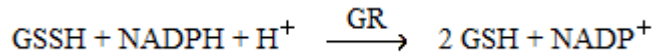
Katalaz (CAT): Katalaz esas olarak peroksizomlarda lokalize olmuştur ve yapısında 4 “hem” grubu bulunan bir hemoproteindir (Tudhope, 1967). Karaciğer ve eritrositlerde en yüksek aktiviteye sahiptir. SOD aracılığıyla oluşmuş olan hidrojen peroksit bir radikal olmamasına karşın en reaktif oksijen türü olan OH^{\bullet} radikalinin öncüsüdür. Bu nedenle birçok ROS’in den daha fazla oksidatif hasara neden olur. Katalaz hidrojen peroksiti su ve moleküler oksijene parçalar.



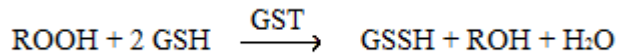
Glutasyon Peroksidaz (GPx): Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve büyük moleküllü lipid hidroperoksitlerinin indirgenmesinden sorumludur. Bu reaksiyonda hidrojen peroksit suya ve organik hidroperoksitler alkole indirgenirken, glutasyon (GSH) ise oksitlenmiş glutatyona (GSSG) yükseltgenir (Chaudiere ve Iliou, 1999).



Glutasyon Redüktaz (GR): GPx tarafından H_2O_2 ve diğer lipid peroksitlerin indirgenmesi esnasında glutasyon okside glutatyona dönüşmektedir. Bu okside halin tekrar redükte GSH'a dönüştürülmesi gereklidir. Çünkü organizmanın glutasyon deposu sınırlıdır. GR, NADPH varlığında glutasyon disülfiti (GSSG) tekrar redükte glutatyona (GSH) çevirir (Rice-Evans vd., 1991).



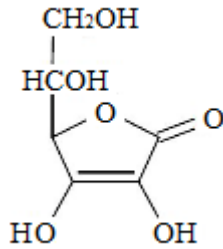
Glutasyon-S-Transferaz (GST): Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipid hidroperoksitlere (ROOH) karşı GST'lar Se-bağımsız glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterirler (Akkuş, 1995).



2.5.1.2. Enzimatik olmayan antioksidanlar

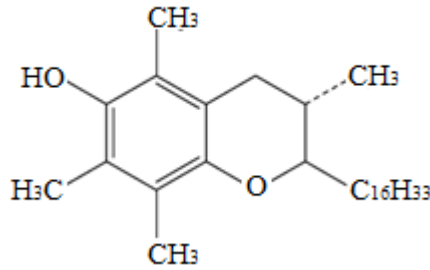
Enzim yapısında olmayan doğal antioksidanlardır. Bitki veya hayvan dokularında bulunan ya da bitkisel veya hayvansal kaynaklı bileşiklerin pişirilmesi veya işlem görmesi sonucu oluşan maddelerdir. Hemen hemen tüm bitkilerde, mikroorganizmalarda ve bazı hayvansal dokularda bulunurlar (Görünmezoğlu, 2008). En önemlileri arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve polifenoller bulunmaktadır.

Askorbik Asit: Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C-vitamini, diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilir ve serbest radikalleri doğrudan söndürebilen güçlü bir antioksidan kaynağıdır (Hudson, 1990). İndirgeyici bir ajan olan vitamin C süperoksit ve hidroksil radikalleri ile kolayca reaksiyona girerek onları temizler. Yine vitamin C, α -tokoferol radikalının α -tokoferole indirgenmesini sağlar (Yanbeyi, 1999).



Şekil 2.3. Vitamin C (askorbik asit) molekülünün kimyasal yapısı

Tokoferol: E vitamini, tokoferol yapısında olup α , β , γ ve δ olmak üzere dört tipin karışımıdır. Yapısında bulunan fenolik hidroksil gruplu aromatik halka vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. Antioksidan özellik α -tokoferolde en fazladır (Horwitt, 1986). Tokoferollerin gösterdiği aktivitenin esası, hidroksil grubunun hidrojenini lipid peroksil radikale aktarma yolu ile serbest radikalleri ve lipid peroksil radikallerini temizleyerek onların vücutta yaptıkları hasarı onarmaktır (Durmaz, 2002).



Şekil 2.4. α -tokoferolün kimyasal yapısı

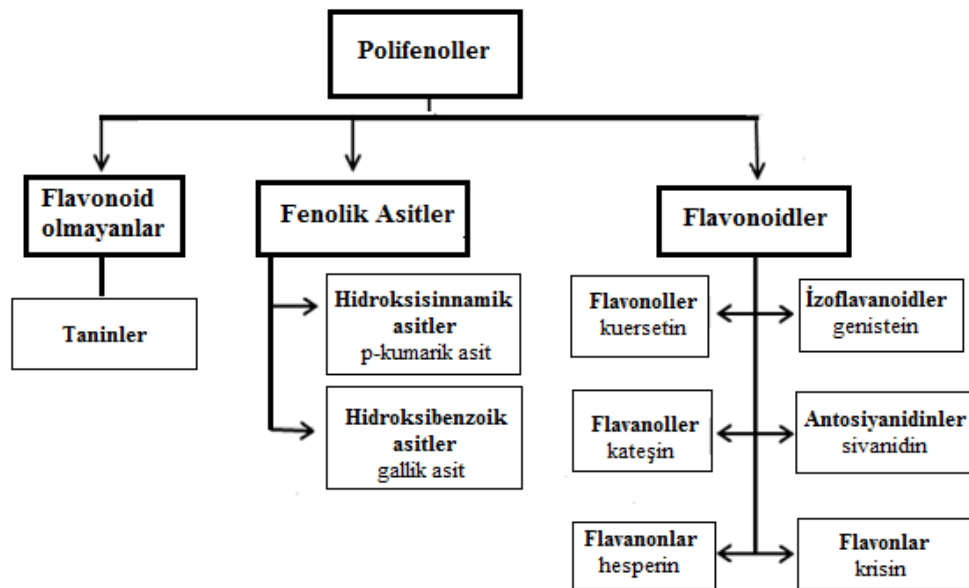
Karotenoidler: Bitkilerde sentezlenirler, fakat hayvanlar için önemlidirler. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renkleri bunlardan ileri gelir. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurta sarısı ve birçok meyvede bolca bulunurlar. Çeşitli savunma stratejileri arasında karotenoidler, singlet oksijen ve peroksit radikalleri olan reaktif oksijen türlerini süpürmede oldukça gereklidirler. Ayrıca singlet oksijen ve radikallerin oluşumunu içeren uyarıcı moleküllerin oluşmasında kuvvetli elektronik deaktivite edicilerdir (Young ve Lowe, 2001).

Polifenoller: Fenoller hidroksil grupları içerdikleri için radikal giderme yeteneğine sahiptirler. Bu sebepten önemli bitki bileşenleridir (Hatano vd., 1989). Fenolik maddelerin insan sağlığı üzerindeki etkileri önemli araştırma konularından biri olmuştur. Meyve ve sebzelerde zengince bulunan polifenolik bileşiklerin günlük bir gramın üzerinde alındığında gen mutasyonu ve kanser hücrelerinin oluşumu üzerine inhibitör etki gösterdiği rapor edilmiştir (Tanaka vd., 1998).

Birçok polifenolik bileşik birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun hem de toplam hidroksil gruplarının antioksidan aktivitesini büyük oranda etkilediği görülmüştür (Cao vd., 1997; Pannala vd., 2001; Burda ve Oleszek, 2001).

Bir polifenolün antioksidan olarak nitelendirilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

- Okside olabilen substratlara oranla düşük konsantrasyonlarda bulduklarında, ootoksasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir (Halliwell, 1990).
- Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu durdurmada kararlı olmalıdır (Shahidi ve Wanasundura, 1992).



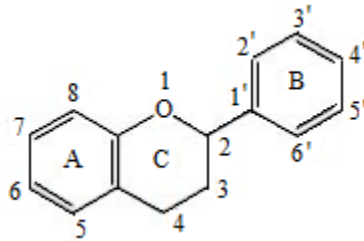
Şekil 2.5. Polifenolik bileşiklerin sınıflandırılması (Ratnam vd., 2006)

Fenolik Asitler: Bitkilerde çok miktarda bulunan fenolik asitler, diğer ismiyle fenil propanoidler, hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi sinnamik asitler (p-kumarik asit) oluşturur (Cadenas ve Packer, 2002). Yapılarındaki $CH=CH-COOH$ gruplarının varlığı, hidrojen verebilme yeteneklerini artırır. Ayrıca, benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirirler.

Hidroksibenzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler (gallik asit, sirincik asit). Monohidroksi benzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir; çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallere yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Dihidroksibenzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının pozisyonlarına bağlı olup, o-p pozisyonlarında aktivite yüksek olurken, m-p pozisyonlarına sahip olanlarda aktivite düşer (Rice-Evans vd., 1996).

Fenolik polimerler: Yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir (yoğunlaşmış taninler) Kateşin ve epikateşinin polimerleri besinlerde bulunan taninlerdir. Kırmızı ve beyaz şarapta, elma ve nar suyunda bulunurlar (Cadenas ve Packer, 2002).

Flavonoidler: Önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip ve düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bitki fenoliklerinin en geniş sınıfıdır.

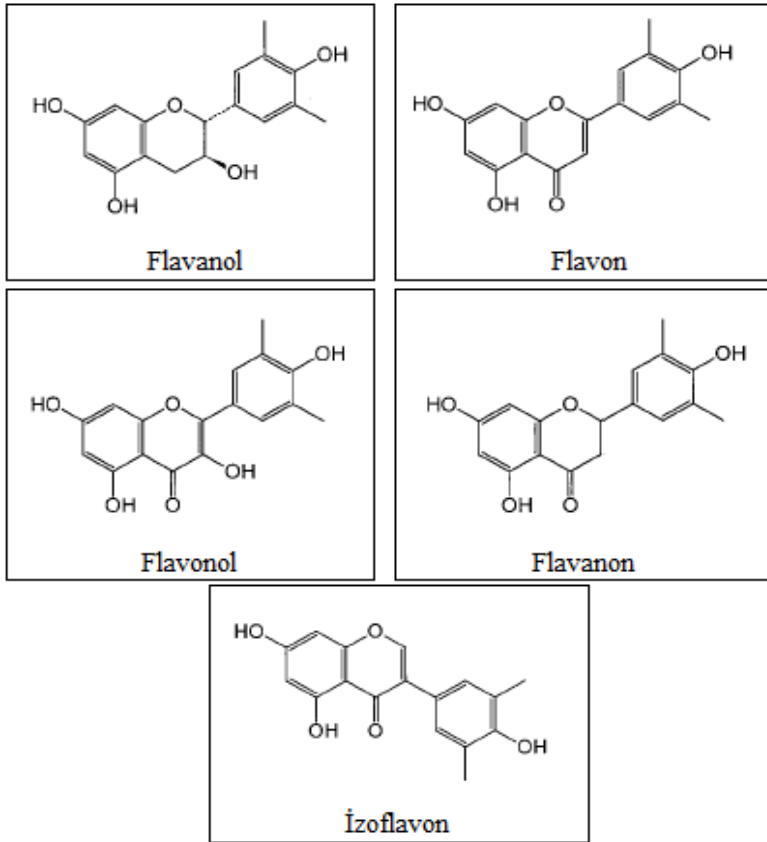


Şekil 2.6. Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı (Heim vd., 2002)

Flavonoidler $C_6-C_3-C_6$ karbon iskeleti ile karakterize edilirler (Peterson ve Dwyer, 1998). A ve B aromatik halkalar, C ise hetero halka olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.4).

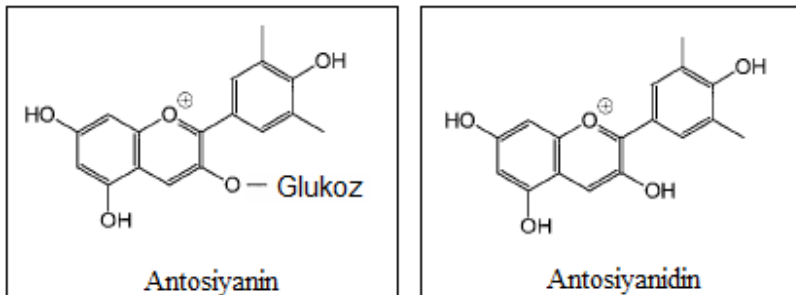
Flavonoidler meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri antoksaninler ve antosiyaninler olmak üzere iki sınıfa ayırır (Rice-Evans vd., 1997).

1. Antoksaninler



Şekil 2.7. Antoksanin gruplarının kimyasal yapıları

2. Antosiyanin ve antosiyanidinler



Şekil 2.8. Antosiyanin ve Antosiyanidin kimyasal yapısı

Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan aktivitelerinin yüksek olmasını belirleyen birkaç özellik vardır (Cos vd., 1998; Yıldız, 2007). Bunlar:

- Radikal formun daha yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan, B halkasındaki o-dihidroksi yapısı (Aynı zamanda bu yapıdan kararlı 3',4'-dikinonlar oluşur.).
- 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çift bağ, C halkasının 4. karbon atomunda keto grubunun oluşmasını sağlar ve bu da B halkasında radikalın elektron delokalizasyonunu artırır. Antioksidan güç, aromatik çekirdeğin elektron delokalizasyonuna bağlıdır. Bu bileşikler serbest radikallerle reaksiyona girdiğinde üretilen fenoksil radikalleri aromatik çekirdeğin rezonans etkisiyle kararlı hale getirilir. 2,3-çifte bağı, tüm moleküldeki rezonansı artırır.
- C halkasının 4. karbon atomunda keto grubu ile beraber C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyondaki hidroksil grupları maksimum radikal süpürme potansiyeli için gereklidir. Aynı zamanda 5-hidroksi-4-keto grubu güçlü bir metal şelatlayıcı olarak da antioksidan etkinliğe katkıda bulunur.

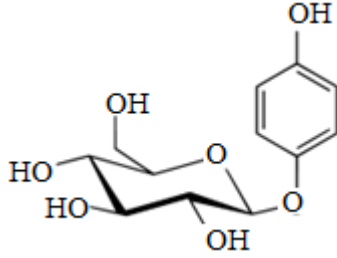
2.5.2. Sentetik Antioksidanlar

Besinlerde veya besinler alındıktan sonra canlı içinde serbest lipid radikallerinin oluşması antioksidanların insan beslenmesinin en önemli konularından biri olmasına sebep olmuştur. Besinlerin tat, renk ve vitamin değerlerinin korunması için antioksidan ilavesi gerekir. Bu amaçla gıdalara eklenen sentetik antioksidanlara bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve tersiyer bütül hidroksikinon (TBHQ) örnek verilebilir.

2.6. Çalışmada Kullanılan Doğal Antioksidan Bileşikler

2.6.1. Arbutin

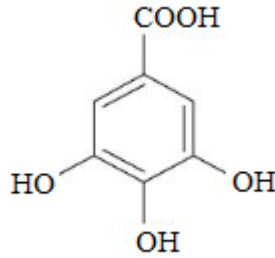
Arbutin ((2R,3S,4S,5R,6S)-2-Hidroksimetil-6-(4-hidroksifenoksi)oxane-3,4,5-triol; $C_{12}H_{16}O_7$) bir glikozittir. Tirosinazı önlediği için melaninin oluşmasını engeller. Bu sebepten arbutin deri rengini açan ajan olarak kullanılır. Buğdayda bol miktarda bulunur.



Şekil 2.9. Arbutin molekülünün kimyasal yapısı

2.6.2. Gallik Asit

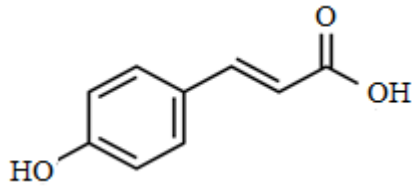
Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit; $C_7H_6O_5$), hidroksibenzoik asitler sınıfındandır. Gallik asit bitkilerden ekstrakte edilebilen doğal bir antioksidandır. Gıdalarda, ilaçlarda ve kozmetikte lipid peroksidasyonu ve çürümenin neden olduğu bozulmaları engellemek için kullanılmaktadır (Curcio vd., 2009).



Şekil 2.10. Gallik asit molekülünün kimyasal yapısı

2.6.3. p-Kumarik Asit

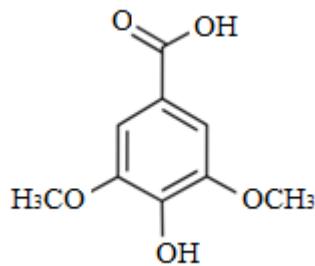
Kumarik asit [(E)-3-(4-hidroksifenil)-2-propenoik asit]; $C_9H_8O_3$], bir hidroksisinnamik asittir. Kumarik asidin, hidroksil grubunun o-, m- ve p-pozisyonlarına bağlanması ile üç farklı izomeri yapıya sahiptir. p- kumarik asit doğada en çok bulunan izomerdir. Kristal yapıda, suda kısmen çözünürken etanol ve dietilerde iyi çözünen bir maddedir. Domates, havuç ve sarımsakta bulunan bir antioksidandır.



Şekil 2.11. p-kumarik asit molekülünün kimyasal yapısı

2.6.4. Sirincik Asit

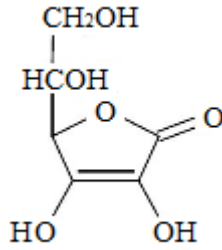
Sirincik asit (4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzoik asit; $C_9H_{10}O_5$), doğal olarak oluşan bir o-metillenmiş trihidroksibenzoik asidin bir türüdür.



Şekil 2.12. Sirincik asit molekülünün kimyasal yapısı

2.6.5. Vitamin C (Askorbik asit)

Vitamin C (askorbik asit; $C_6H_8O_6$) bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer, özellikle yeşil sebze, meyve ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. Vitamin C elektron donörüdür. Bir antioksidan veya indirgeyici ajan olarak C3-C4 bağından iki elektron verir ve serbest askorbat radikalini oluşturur. Bu radikal kararlı değildir ve diğer bileşiklerle reaksiyona girmez. Bu özellikler Vitamin C'yi ideal bir elektron donörü kılar.



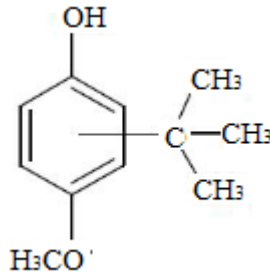
Şekil 2.13. Vitamin C molekülünün kimyasal yapısı

2.7. Çalışmada Kullanılan Sentetik Antioksidan Bileşikler

2.7.1. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA)

Sentetik bir antioksidan olan BHA, (2- tersiyer-bütül-4-hidroksianisol ve 3- tersiyer-bütül-4-hidroksianisol karışımı; $C_{11}H_{16}O_2$), beyaz, mumsu katı bir yapıya sahiptir. Hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda çözünebilir ancak suda çözünemeyen bir antioksidandır.

Bu antioksidanın gıdalarda kullanımına ilk olarak 1948 yılında ABD’de izin verilmiş olup günümüzde pek çok ülkede gıda olarak tüketilen katı ve sıvı yağlarda kullanılmaktadır. Yapısındaki hidroksil gruba karşı orto veya meta pozisyonunda yer alan tersiyer butil grubu nedeni ile BHA'ya "engelleyici fenol" adı verilmektedir. Bu sterik engellemenin, tersiyer butil grubun fenolik yapının antioksidatif aktivitesi ile girişim meydana getirmesi ve bu neden ile BHA'nın bitkisel yağlarda etkisinin az olmasına neden olduğu öne sürülmektedir (Eken, 2007).

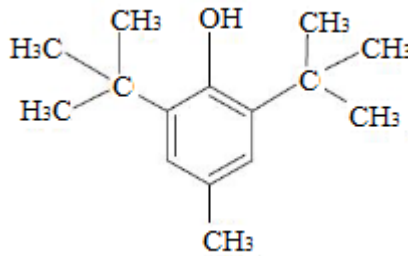


Şekil 2.14. BHA molekülünün kimyasal yapısı

2.7.2. Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT)

Bütillenmiş hidroksitoluen, (2,6-ditersiyeer butil-4-metil fenol; $C_{15}H_{24}O$), yağlarda iyi çözünebilen ancak suda çözünmeyen, beyaz renkli ve kristal yapıda bir maddedir.

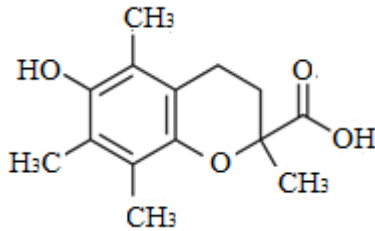
BHT ilk defa soya yağının otoksidasyonunda bozunma ürünleri tayin edilerek fark edilmiştir. BHT yağlar ve yağ asitlerinin oksidasyonunda okside olmuş lipidlerle verdiği reaksiyon sonucu peroksit radikallerinin etkisini yok eder (Çöllü, 2007).



Şekil 2.15. BHT molekülünün kimyasal yapısı

2.7.3. Troloks

Troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit; $C_{14}H_{18}O_4$], E vitamininin suda çözünür eşdeğeridir (Ree et al., 1999). Troloks canlı sistemlerde doğal olarak bulunan bir bileşik olmamakla birlikte pek çok antioksidan aktivite tayin yönteminde standart olarak kullanılır.



Şekil 2.16. Troloks molekülünün kimyasal yapısı

2.8. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

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

Reaksiyon mekanizmalarına göre antioksidan aktivite tayin yöntemleri başlıca iki gruba ayrılabilir:

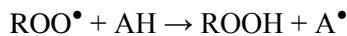
i) Hidrojen transferine dayanan reaksiyonlar (HAT)

Bu reaksiyonlar:

- a) Oksijen radikal absorban kapasite (ORAC)
- b) Toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP)
- c) İndüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otooksidasyonu
- d) Krosin beyazlatma olarak sıralanabilir.

HAT'a dayanan metotlar genellikle sentetik bir bir radikal oluşturucudan, yükseltgenebilir bir probdan ve bir antioksidandan oluşur.

ORAC, TRAP gibi HAT-temelli metotlarda peroksil radikali (ROO•) üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidan, radikaller için ortamdaki substrat ile yarışır. ROO• tercihen antioksidandan bir hidrojen atomu alır. Sonuçta ROO• ve hedef molekül arasındaki reaksiyon inhibe edilir veya geciktirilir (Ou vd., 2002, Huang vd., 2005, Prior vd., 2005).



ii) Tek elektron transferine dayanan reaksiyonlar (ET)

Bu reaksiyonlar:

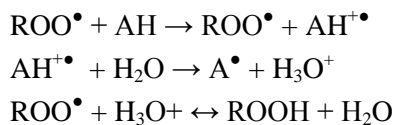
- a) Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ile toplam fenolik bileşik tayini
- b) Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite tayini (ABTS/TEAC)
- c) Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi (FRAP)
- d) DPPH radikal süpürücü aktivite tayini
- e) Kuprik iyon (Cu^{2+}) indirgeme antioksidan kapasite yöntemi (CUPRAC)
- f) Ferrik tiyosiyanat (FTC) yöntemi ile total antioksidan aktivite tayin yöntemi
- g) İndirgeme gücü yöntemi olarak sıralanabilir.

ET'ye dayanan metotlar, bir reaksiyon karışımında iki bileşen içerir. Antioksidan ve oksidan. Antioksidanın, Fe^{3+} , $\text{ABTS}^{\bullet+}$ gibi bir oksidan tarafından yükseltgenmesi sonucunda bir elektron antioksidandan oksidana transfer edilir, bu da oksidanın renk değişimine neden olur. UV/VIS spektrofotometre ile absorbans değişimi ölçülür. Bu absorbans değişiminin derecesi antioksidan derişimi ile orantılı olduğundan, antioksidanın indirgeyici kapasitesi tayininde kullanılır (Huang vd., 2005).

Antioksidan aktivite tayininde kullanılan metotlar substrat, prob, reaksiyon şartları ve antioksidan etkinin hesaplanma şekline göre birbirinden farklıdır. Bu yüzden farklı metotlardan alınan sonuçları karşılaştırmak son derece zordur (Frankel ve Meyer, 2000).

HAT- ve ET-temelli metotlar numunenin koruyucu antioksidan kapasitesi yerine radikal veya oksidan giderici kapasitesini ölçmeyi amaçlar.

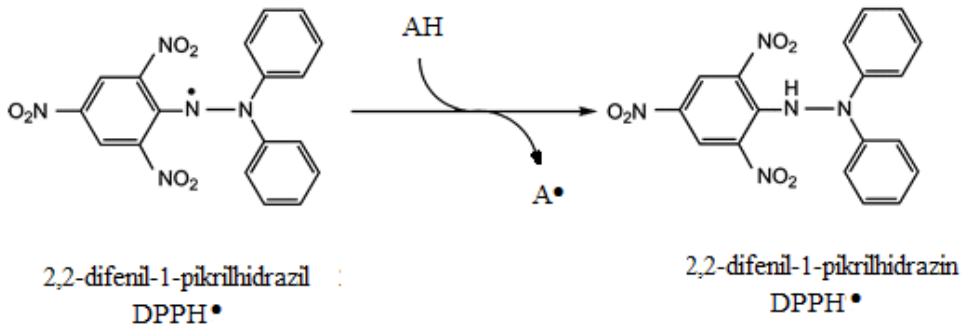
ET yöntemleri HAT yöntemlerine göre daha yavaş gerçekleşir ve çözücü-pH faktörlerinden etkilenir. Spektrofotometrik ET yöntemleri indirgendiği zaman renk değiştiren oksidanın antioksidan tarafından ne kadar güçlü indirgenebildiğini ölçer. Renk değişimi, çalışılan dalga boyunda absorbansın artması ya da azalması ile ifade edilebilir (Apak vd., 2007).



Antioksidan aktivite tayin yöntemlerinin prensipleri aşağıda açıklanmıştır.

2.8.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayin Yöntemi

Bu yöntem, DPPH[•] (2,2-difenil-1- pikrilhidrazil) radikalinin antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır. DPPH[•] (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali birkaç kararlı organik azot radikalinden biridir. Etanol ve metanoldeki çözeltisi mor renklidir ve 517 nm'de maksimum absorbans verir (Blois, 1958).



Şekil 2.17. DPPH radikalinin antioksidanlarla etkileşim mekanizması

DPPH çözeltisi ile hidrojen atomu verebilen molekülün (antioksidan) çözeltisinin karıştırılması DPPH radikalinin indirgenmesine ve çözeltinin başlangıçta mor olan renginin sarıya dönmesine sebep olur. Mor renkli çözeltinin 517 nm civarındaki absorbansının azalması ölçülerek reaksiyon takip edilir.

Antioksidanın farklı derişimleri ile karıştırılan DPPH[•]'in absorbansındaki değişim ölçülerek derişime karşılık gelen absorbans değerleri ile grafik çizilerek $y=ax+b$ denkleminde DPPH[•] derişimini yarıya düşüren (%50 azalmaya sebep olan) örnek miktarı mM cinsinden belirlenmekte ve IC_{50} (etkin derişim) değeri olarak ifade edilmektedir (Brand-Williams vd., 1995).

Avantajları:

- DPPH yöntemi basit ve hızlıdır. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verir (Preez-Jimenez vd., 2008).

Dezavantajları:

- DPPH yalnızca organik ortamda çözülebilir (özellikle alkol ortamında), sulu ortamda çözünmez. Bu durum hidrofilik antioksidanların rolünün yorumlanmasında önemli bir sınırlamadır (Arnao, 2000).
- Fenolik bileşiklerin ve gıdaların antioksidan aktivitesini ölçmek ve karşılaştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak, ölçümlerde ışığın etkisi göz ardı edilmemelidir. Metanol ve aseton içindeki DPPH'in 517 nm'deki absorbansı ışık altında, 120 dakikalık süre boyunca %20 ve %35 azalmaktadır. Karanlıkta ise 150 dakika süre boyunca önemli bir değişim olmadığı bulunmuştur (Özçelik vd., 2003).
- Bazı örnek bileşenleri, örneğin karotenoitler, DPPH'in 517 nm civarındaki absorbans spektrumuyla çakışabilirler (Nomura vd., 1997).
- DPPH, canlı organizmalarda bulunan radikallerin tersine, kararlı, uzun ömürlü bir azot radikalidir ve yüksek reaktivlikte, kısa ömürlü, lipid peroksidasyonunda rol alan peroksil radikallerine benzemez. Peroksil radikalleriyle hızlı reaksiyon veren çoğu antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir, hatta hiç reaksiyona girmeyebilir (Huang vd., 2005; Prior vd., 2005; Magalhaes vd., 2008)

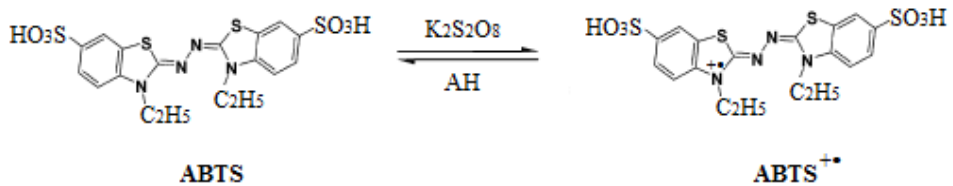
2.8.2. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayini (ABTS/TEAC)

Troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit], E vitamininin suda çözünür eşdeğeri (Re vd., 1999).

TEAC yöntemi ilk defa Miller vd. (1993) tarafından bulunmuş daha sonra Re vd. (1999) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem, ABTS [2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonat)] bileşiğinden renkli radikal kationu oluşturularak, bu kationun antioksidanlar tarafından indirgenmesi esasına dayanmaktadır.

Miller vd. (1993) tarafından geliştirilen orijinal yöntemde metilmiyoglobinin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu oluşan ferrilmiyoglobin radikalinin ABTS ile etkileşimi sonucu oluşan $ABTS^{+\bullet}$ radikal kationunun 660 nm, 734 nm, 820 nm dalga boylarında verdiği maksimum absorpsiyon değerleri ölçülmektedir. Antioksidanlar varlığında $ABTS^{+\bullet}$ radikal kationunun absorpsiyonunda belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesi troloks eşdeğeri cinsinden bulunur.

Re vd. (1999) tarafından geliştirilen yöntemde ise $ABTS^{+\bullet}$ radikal kationu, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Oluşan radikal kationu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 gün dayanıklıdır. Geliştirilen metodun orijinal metottan farkı hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmesi ve bir dekolorizasyon (renk giderimi) yöntemi olmasıdır. Yani sisteme antioksidan ilave edilmeden önce radikal kationu oluşmaktadır. Orijinal metotta ise antioksidan varlığında radikal meydana gelmektedir.



Şekil 2.18. ABTS'nin potasyum persülfatla oksidasyonu

TEAC metodunun diğeri bir modifikasyonu Van den Berg vd. (1999) tarafından geliştirilmiştir. Bu çalışmada bir azo bileşimi olan 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)HCl (ABAP) kullanılarak ABTS[•] radikal anyonu oluşturulmuştur. Yöntemde antioksidanlar radikalın oluşmasından önce eklenmektedir. Böylece radikal oluşumuna etki edecek olan bileşiklerin enterferansını önlemektedir. Bu yöntemde de hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan kapasitesi ölçülebilmektedir.

Avantajları:

- ABTS radikali hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebilir ve dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılabilir (Osman vd., 2006).

Dezavantajları:

- TEAC reaksiyonunun bitiş noktasına ulaşması uzun bir zaman alabilir. Böylece, kısa süreli bir bitiş noktasının kullanılması reaksiyon tamamlanmadan önce okuma yapılmasına ve daha düşük TEAC değerleri bulunmasıyla sonuçlanabilir (Prior vd., 2005).

2.8.3. İndirgeme Gücü Tayini

Oyaizu (1986) tarafından ortaya konan bu metoda göre indirgeme gücü, incelenen bileşimin dolaylı olarak toplam indirgeme potansiyelini göstermektedir.

$Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$ indirgenmesi ile meydana gelen renk değişimi 700 nm'de takip edilerek belirlenir. Sonuçlar, indirgeme potansiyeli yüksek ve aynı zamanda standart bir antioksidan madde olan askorbik asit (vitamin C) ile karşılaştırılarak yorumlanır.

2.8.4. Demir (III) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Yöntemi (FRAP)

Benzie ve Strain (1996) tarafından plazmanın demir (III)'ü indirgeme yeteneğinden yararlanılarak antioksidan gücünü ölçmek için geliştirilen bir yöntemdir. Demir(III)tripridiltiazin (Fe(III)-TPTZ) kompleksi antioksidan (indirgen) vasıtasıyla düşük pH ortamında demir(II)tripridiltiazin (Fe(II)-TPTZ) kompleksine indirgenir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi şiddetli mavidir ve 593 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir (Benzie ve Strain, 1996).

2.8.5. Bakır(II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC)

Bu yöntem, bir numunedeki antioksidanlar tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesi temeline dayanır. Apak ve arkadaşlarının (2004) geliştirdiği bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin veya Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorpsiyon veren bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır.

2.8.6. Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ile Toplam Fenolik Bileşik Tayini

Singleton ve arkadaşları (1999) tarafından önerilen bu metot daha sonra farklı uygulayıcılar tarafından geliştirilmiştir. Folin-ciocalteu reaktifi, fosfomolibdat ve fosfotungstat karışımı bir reaktif olup fenolik ve polifenolik antioksidanların kolorimetrik tayininde kullanılır (Singleton vd., 1999). Yöntemde fenolik bileşikler ya da diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyum'a elektron transfer edilir mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm'de spektroskopik olarak belirlenir. Bu reaktif sadece fenolik bileşikler tarafından değil fenolik olmayan bir çok bileşik (aromatik aminler, sülfür dioksit, askorbik asit, Cu (I) ve Fe (II) gibi) tarafından da indirgenebilir. Bu nedenle "toplam fenolik madde" belirlenmesi için uygun değildir. Son zamanlarda FC yöntemi toplam indirgeyici kapasitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır (Magakhaes vd., 2008).

2.8.7. Ferrik Tiyosiyanat Yöntemi ile Total Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemi (FTC)

Bu metot doymamış bir yağ asidi olan linoleik asidin fosfat tamponu ile oluşturulan emülsiyon ortamında 40°C’de oksijen ile inkübasyonunda oluşan lipid peroksidin miktarının ölçümüne dayanmaktadır. Yüksek absorbans düşük antioksidan aktiviteyi, düşük absorbans ise yüksek antioksidan aktiviteyi gösterir. Oluşan kırmızı-pembe renkli $FeSCN^{2+}$ kompleksinin 500 nm’de absorbansının ölçülmesi ile antioksidan bileşiğin lipid peroksidasyonunu ne derecede etkilediği belirlenebilir (Saha vd., 2004)

2.8.8. Oksijen Radikal Absorbans Kapasite Yöntemi (ORAC)

Cao ve arkadaşları (1993) tarafından geliştirilmiştir, peroksil radikalının sebep olduğu oksidasyonun antioksidanlar tarafından inhibe edilmesini temel almaktadır. Bu yöntem, peroksil radikalının floresans özellik gösteren bir molekül ile reaksiyonu ve bunun sonucunda floresans özelliği olmayan bir ürün meydana gelmesine dayanır. Okside olabilir protein molekülü olarak floresans özellik gösteren β -fikoeritrin (B-PE) ve peroksil radikallerini üretmek için 2,2’-azobis(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) kullanılır (Cao vd., 1993). Antioksidan kapasitesi, oluşan ürün miktarı ve floresanstaki azalma hızı ile tayin edilir.

2.8.9. Toplam Radikal Tutma Parametresi Yöntemi (TRAP)

TRAP yöntemi Wayner ve arkadaşları (1985) tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem bir azo bileşiğinin sıcaklıkla bozulması ile oluşturulan kontrollü bir lipid peroksidasyon reaksiyonu esnasında oksijen tüketiminin ölçülmesi temeline dayanır. Yöntemde serbest radikal oluşumunu başlatıcı olarak ABAP tarafından üretilen peroksil radikalleri kullanılır (Wayner vd., 1985).

2.8.10. Krosin Beyazlatma Yöntemi

Lussignoli ve arkadaşları (1999) tarafından geliştirilen kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntemde azo başlatıcının sıcaklıkla bozulması sonucu oluşan peroksil radikalleri tarafından bir karotenoid olan krosinin beyazlama derecesi ölçülmektedir. Yöntem AAPH'ın sıcaklıkla bozulması ile oluşan peroksil radikallerinin krosini oksidasyona uğratmasına (beyazlatma) dayanmaktadır, krosin beyazlaması 443 nm dalga boyunda spektrofotometre ile izlenmektedir (Prior ve Cao, 1999; Somogyi vd., 2007; Huang vd., 2005).

2.9. Voltametri (Tural vd., 2006)

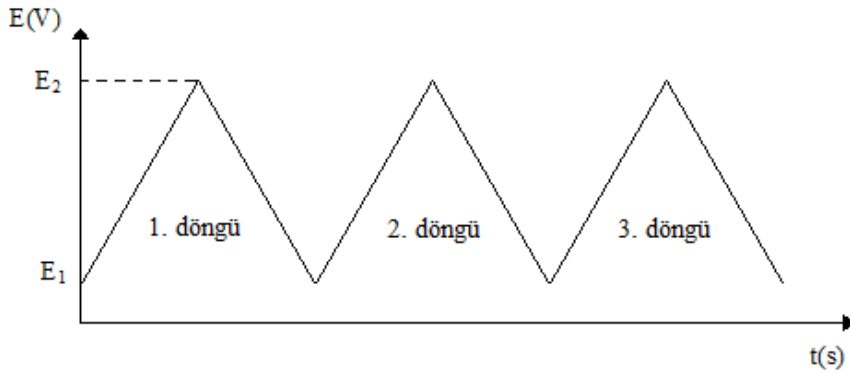
Maddelerin elektrokimyasal özelliklerinden yararlanarak, kalitatif ve kantitatif analizlerinin yapıldığı yöntemlere elektroanalitik yöntemler denir. Elektroanalitik yöntemler, farklı yükseltgenme basamağına sahip türlerin kolayca saptanabilmesi, bu yöntemlerin uygulanmasını sağlayan cihazların kromatograflara ve spektrofotometrelere göre çok daha ucuz olması ve genellikle kimyasal türlerin derişimini belirtmesi gibi üstünlüklere sahiptir (Henden vd., 2001).

Voltametri, iki ve üç elektrot içeren bir elektroliz hücresindeki elektrotlardan birine uygulanan potansiyelin fonksiyonu olarak geçen akımın ölçüldüğü elektrokimyasal bir yöntemdir. Elektroda uygulanan potansiyel kimyasal türlerin elektron vererek yükseltgenmesine ya da elektron alarak indirgenmesine neden olur. Elektrot yüzeyinde bu tür bir indirgenme ya da yükseltgenme gerçekleşirken elektron hareketinden dolayı da bir akım oluşur. Oluşan bu akımın şiddeti elektrolize uğrayan maddenin derişimi ile orantılıdır.

2.10. Voltametik Yöntemler

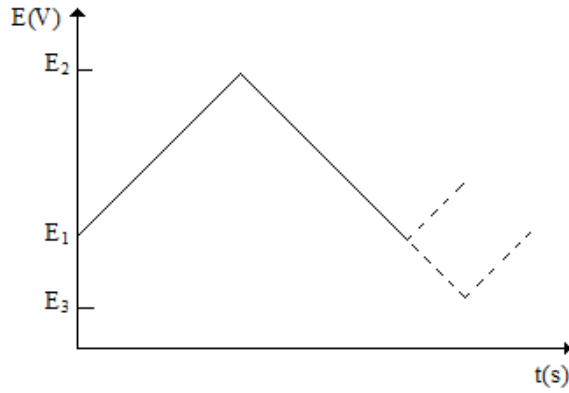
2.10.1. Çevrimli Voltametri (CV) (Nişli vd., 2012)

Çevrimli voltametri tekniğinde, potansiyel tarama işlemi döngüselidir. Potansiyel E_1 değerinden E_2 değerine belli bir hızla tarandıktan sonra, taramanın yönü çevrilerek çoğunlukla aynı hızla E_1 değerine ulaşılır (Şekil 2.19). Böylece elektrokimyasal tepkimeyle oluşan ürünün, ters döngüyle elektrokimyasal davranışını incelenir. Tarama tek bir döngüyle sonlanabileceği gibi, ardışık döngülerle defalarca yapılabilir.



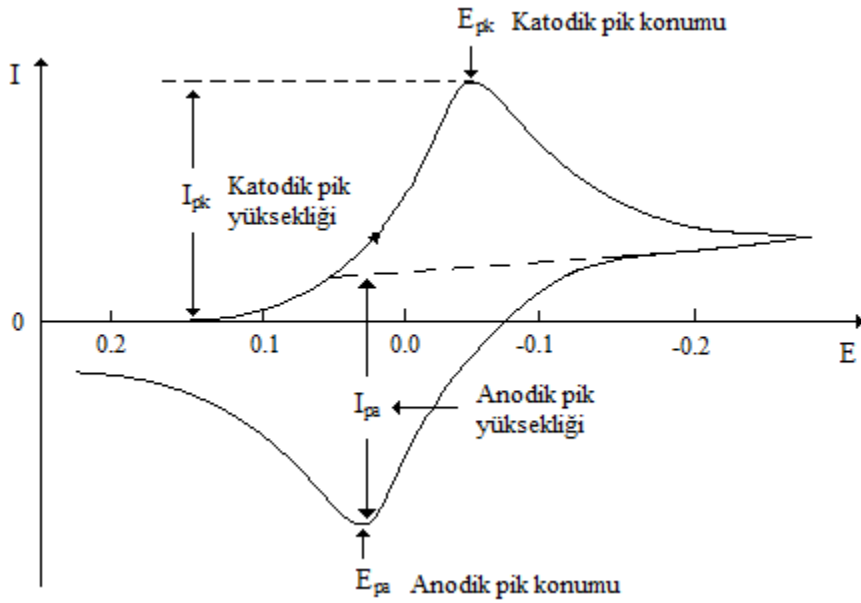
Şekil 2.19. Çevrimli voltametri potansiyelin zamana bağlı ardışık tarama döngüsü

Bu teknikte, başlangıç potansiyeli E_1 elektrot tepkimesinin daha başlamadığı bir potansiyel olabileceği gibi, herhangi bir potansiyel de olabilir. Benzer şekilde bitirme potansiyeli de E_1 değerinden farklı bir E_3 potansiyeli olabilir (Şekil 2.20).



Şekil 2.20. Çevrimli voltametri potansiyelin zamana bağlı tarama döngüsü

Tersinir bir elektrot olayı için elde edilen akım-potansiyel eğrisi Şekil 2.21’de verilmiştir.



Şekil 2.21. Tersinir bir elektrot tepkimesi için elde edilen akım-potansiyel eğrileri

Çevrimli voltamogramların ayrıntılı incelenmesi ile:

- bir sistemin hangi potansiyellerde ve kaç adımda indirgenip yükseltgendiğini, elektrokimyasal açıdan tersinir olup olmadığını,
- indirgenme ya da yükseltgenme ürünlerinin kararlı olup olmadığını,
- elektrot tepkimesinde rol alan maddelerin yüzeye tutunup tutunmadıklarını kolayca anlamak mümkündür.

2.10.2. Puls Voltametri (Nişli vd., 2012)

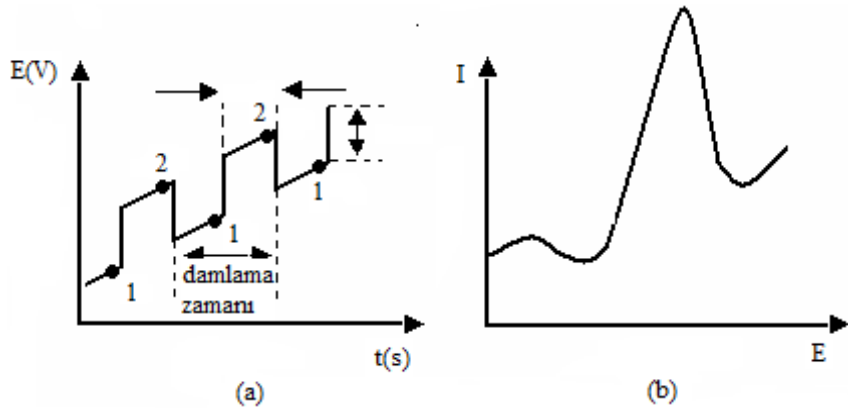
1960'larda normal polarografi, birçok laboratuvarında analitik bir araç olarak önemini kaybetti. Bunun en önemli sebebi, spektroskopik tekniklerin ortaya çıkmasıyla bu yöntemin yavaş, kullanımı zor ve tayin sınırının oldukça düşük kalmasıydı. Normal polarografi ile yapılan analizlerde tayin sınırının düşük olmasının nedeni; düşük konsantrasyonlarda elektrottaki elektriksel çift tabakanın yüklenmesinden oluşan kapasitif akımın, faradayik akıma göre oldukça büyük olmasıdır. Eğer kapasitif akımın ölçülen toplam akım içindeki katkısı azaltılırsa, daha küçük değerdeki faradayik akımlar ölçülebilir hale gelebilir ve böylece yöntemin duyarlığı artar. Bu yüzden normal puls ve diferansiyel puls teknikleri geliştirilmiştir.

2.10.2.1. Diferansiyel puls voltametri (DPV)

Normal puls voltametrisinde pulsun sonunda saptanan akım az da olsa kapasitif bileşen içerir. Bu bileşenin ölçülen akımdaki payını daha da azaltmak ve böylece seçiciliği arttırmak için pulsun başında ve sonundaki akımları ölçüp, farklarını alma yoluna gidilmiştir. Bu teknikle çalışan yöntem diferansiyel puls voltametri denir. Giderek artan bir doğru akım potansiyeline sabit genlikli pulsların uygulanması ve diferansiyel puls voltametrisinde elde edilen akım-potansiyel eğrisi Şekil 2.22'de verilmiştir.

Damlayan civanın çalışma elektrotu olarak kullanıldığı polarografide elektrota potansiyel pulsu ilk uygulandığında, damla üzerindeki yük arttığı için faradayik olmayan akımda bir dalgalanma olur. Bu akım zamanla üstel olarak azalır ve yüzey alanının çok az değiştiği damla ömrünün sonuna doğru sifira yaklaşır. Dolayısıyla akımı bu anda ölçmek sureti ile faradayik olmayan artık akım büyük oranda azaltılır ve sinyal/gürültü oranı artar. Bunun sonucunda duyarlık artar.

Bu teknik kullanılarak, tersinir elektrot reaksiyonlarında 1×10^{-8} M, tersinmez elektrot reaksiyonlarında ise 5×10^{-8} M madde tayini yapılabilmektedir.



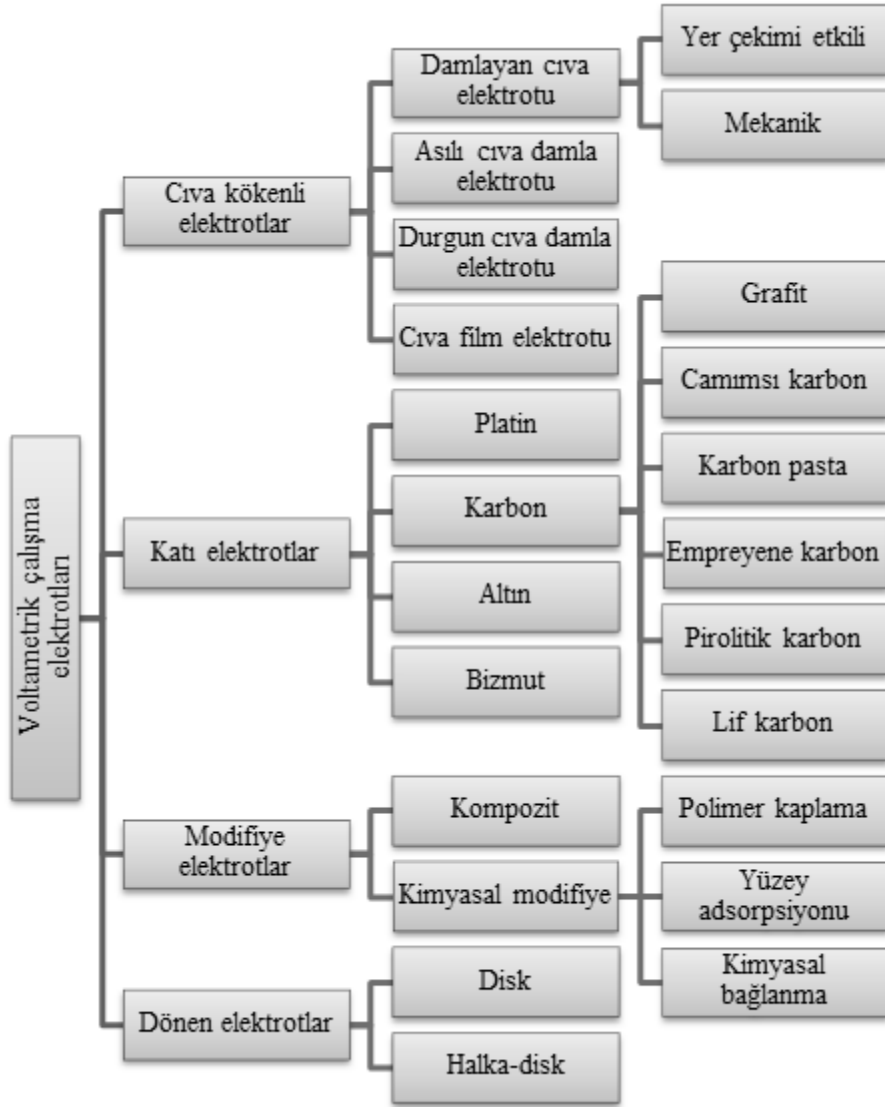
Şekil 2.22. (a) Giderek artan bir doğru akım potansiyeline sabit genlikli pulsların uygulanması. Akım 1 ve 2 noktalarında ölçülmektedir. (b) Diferansiyel puls voltammetrisinde elde edilen I-E eğrisi

2.11. Voltammetride Kullanılan Elektrotlar (Tural vd., 2006)

2.11.1. Çalışma (İndikatör) Elektrotları

Bu elektrot, yüzeyinde analitin yükseltgendiği veya indirgendiği elektrottur.

Voltammetride kullanılan elektrotların hem kimyasal hem de elektrokimyasal özellikleri önemlidir. Bu nedenle voltammetride sınırlı sayıda elektrot kullanılır. Bunlar, Şekil 2.23'de gösterilmiştir. Sabit ya da döndürülerek kullanılabilen bu elektrotların her birinin potansiyel çalışma aralığı farklıdır. Bu aralık elektrot türüne bağlı olduğu gibi, çözücüye, kullanılan elektrolit türüne ve pH'ya da bağlıdır. Çalışma aralığının katodik sınırını hidrojenin oluşumu ya da destek elektrolitinin indirgenmesi, anodik sınırını ise elektrot materyalinin ya da çözücünün yükseltgenmesi belirler.



Şekil 2.23. Voltametrik çalışma elektrotlarının genel sınıflandırılması

2.11.2. Referans Elektrot

Potansiyeli çalışılan çözeltinin bileşiminden bağımsız ve deney süresince sabit kalan elektrottur. Referans elektrot olarak en çok $Ag/AgCl$ veya doygun kalomel elektrot (DKE) kullanılmaktadır.

Bu elektrotlar küçük akım şiddetlerinde polarlanmazlar. Akım şiddeti artınca ideal konumlarından saparlar. Bu elektrotlardan anodik akım geçtiğinde metaller yükseltgenir ve ortamdaki aşırı klorürle çökeldiklerinden, elektrot yüzeyindeki derişimleri değişmez ve böylece potansiyelleri akımdan bağımsız olur. Bu elektrotlardan katodik akım geçtiğinde ise, çözünürlükten gelen metal iyonları indirgenir, elektrot yüzeyinde çökelek ayrışarak tekrar aynı denge düzeyinde metal iyonu oluşturur, böylece potansiyel yine değişmeden kalır.

Sudan başka çözücülerde çalışıldığında ise, uygun başka karşılaştırma elektrotları kullanılır. Örneğın asetonitrilde çalışılırken Ag/Ag^+ ($Ag/AgNO_3$) elektrotu kullanılır.

2.11.3. Yardımcı (Karşıt) Elektrotlar

İki elektrotlu sistemlerdeki polarlanmayan elektrot, üzerinden akım geçtiğı için, yüksek akımlarda polarlanır. Ayrıca çözelti direnci yüksek ise bu direnci yenmek için gerekli olan potansiyel (IR) önemli bir düzeye çıkar. Bu iki nedenden dolayı çalışma elektrotunun polarizasyon potansiyeli hatalı okunabilir. Bunun sonucu olarak $i = f(E)$ eğrileri yatıklaşırlar ve belirli bir noktadan sonra pikler kaybolur. Bu sorun, sistemde üçüncü bir elektrot kullanılarak çözümlenir. Akım, çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot ikilisinden geçirilir ve çalışma elektrotunun potansiyeli karşılaştırma elektrotuna karşı sıfır akım altında saptanır. Akım yardımcı elektrot üzerinden geçtiğı için bu elektrotların soy metal olmaları gerekir. Bu nedenle daha çok platin, grafit, tantal ya da tungsten tel çubuklar kullanılır. Bu elektrotların yüzey alanı çalışma elektrotu alanının en az 50 katı olmalıdır. Ayrıca çok küçük hacimlerle çalışıldığında yardımcı elektrotta oluşan ürünlerin, çalışma elektrotunda girişim yapmayacağı elektrot türü seçilmelidir.

2.12. Kaynak Özetleri

Antioksidanların kullanımının gün geçtikçe artması bu bileşikler üzerinde yapılan çalışma sayısının da artmasına neden olmuştur. Bu çalışmalarda antioksidan bileşiklerin aktivitelerinin ölçülebilmesi için geliştirilmiş metotlardan ve bu metotlar sayesinde antioksidan aktivite terimine daha iyi bir açıklama getirilmektedir.

Miller ve diğerleri antioksidan kapasitenin ölçülebilmesi için yeni bir metot geliştirmişler ve bu metodu prematüre bebeklerde antioksidan statünün belirlenmesinde kullanmışlardır. ABTS^{•+} radikal katyonunun absorpsiyonunu temel alan bu yöntem ile vücut sıvılarının ve ilaç çözeltilerinin antioksidan kapasitesini ölçmek mümkündür. Bu nedenle metot farmakolojik ve gıda uygulamaları açısından büyük önem taşımaktadır. Fizyolojik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasiteleri ve ilaçların ABTS^{•+} radikal katyonunu süpürme yetenekleri 1 mmol Trolox'a eşdeğer olarak verildiğinden TEAC (Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayini) yöntemi olarak adlandırılmaktadır (Miller vd., 1993).

Re ve arkadaşları flavonoidler, hidroksisinnamatlar, karotenoidler ve plazma antioksidanlarını içeren hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlara uygulanabilen yeni bir renk giderimi yöntemi ortaya koymuşlardır. Bu yöntemde ABTS potasyum persülfat ile oksitlenip hidrojen donörü olan bir antioksidan varlığında indirgenmektedir (Re vd., 1999).

Kahkönen ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada fenolik bileşikler içeren çok sayıda (92 adet) bitki ekstraktının antioksidan aktivitesi metil linoleat otooksidasyonu yöntemi ile belirlenmiştir. Ekstraktların toplam fenolik içeriğinin FC ile belirlendiği bu çalışmada yenilebilir bitkilerin çoğunda total fenolik içerik ile antioksidan aktivitenin çok yüksek olduğu gösterilmiştir. Yenilebilir bitkilerden çilek gibi küçük taneli bitkilerin, yenilemeyenlerden ise söğüt ve kızılçam kabukları gibi bitkilerde antioksidan aktivitenin çok yüksek olduğu gösterilmiştir (Kahkönen vd., 1999).

Aruoa'nın antioksidan aktivite indislerinin ölçülmesinde kullanılan in vitro analitik metotların mekanizmalarının açıkladığı bu çalışmada metotların çoğunlukla farklı değerler verdiği ve bu nedenle in vitro antioksidan aktivite değerlendirmeleri için birden fazla metot sonuçlarının kullanılması gerektiği önerilmiştir. Ayrıca, bitkisel besin maddelerinde ve canlı hücrelerde biyoaktif bileşenlerin antioksidan aktivite mekanizmalarına örnekler verilerek bahsedilmiş ve güvenilir in vivo metotların geliştirilmesi önerilmiştir (Aruoa, 2003).

Huang ve arkadaşları bu çalışmada antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin kimyasal temellerini araştırmışlardır. Bu yöntemler gerçekleşen reaksiyonlara göre HAT temelli ve ET temelli olmak üzere iki gruba ayrılmıştır. HAT temelli yöntemde antioksidan ve oksidan bileşik azo bileşiklerinin dekompozisyonu sonucu oluşan peroksil radikalleri için birbirleriyle yarışmaktadır. ET temelli yöntemlerde ise oksidan madde, antioksidan bileşik tarafından indirgenmekte ve meydana gelen renk değişiminin ölçülmesi ile antioksidan kapasite belirlenmektedir. Antioksidan bileşiklerin aktivitelerinin belirlenmesinde en az iki yöntemin uygulanması gerektiği belirlenmiştir (Huang vd., 2005).

Thaipong ve arkadaşları bu çalışmada guava meyvesinin metanol ve diklorometan da hazırlanan ekstraktlarının antioksidan aktivitelerini ABTS, DPPH, FRAP ve ORAC yöntemleri kullanılarak belirlemişler ve FRAP yönteminin basitlik, hız ve tekrarlanabilirlik açısından en iyi olduğu göstermişlerdir. Ayrıca, FRAP ile elde edilen sonuçların aynı ekstraktlarda tayin edilen askorbik asit ve toplam fenolik düzeyleri ile en iyi korelasyona sahip olduğu belirtilmiştir (Thaipong vd., 2006).

Stratil ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada yaygın olarak kullanılan bitkilerden elde edilmiş ekstraktlardaki fenolik bileşikler Folin-Ciocalteu metodu ile antioksidan aktiviteler ise TEAC, DPPH ve FRAP metotları ile tayin edilmiştir. Kateşin, gallik asit, kafeik asit, felik asit, troloks, askorbik asit ve demir II sülfat standartları dikkate alınarak yapılan metotlar arasındaki korelasyonun çok iyi olduğu gösterilmiştir. Koyu renkli bitkilerin antioksidan aktivitelerinin çok yüksek patates, kabak ve salatalık gibi sulu bitkilerin aktivitelerinin ise çok düşük olduğu belirlenmiştir (Stratil vd., 2006).

Farklı molekül yapılarına sahip antioksidan bileşiklerin aktiviteleri arasında farklı antioksidan aktivite tayin metotları kullanılarak yapılan karşılaştırmalar yapı-fonksiyon ilişkisinin aydınlatılmasında yararlı olmaktadır. Bu amaçla yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Hongyu tarafından flavonoid antioksidanların yapı-aktivite ilişkilerinin incelendiği bu çalışmada orto- konumunda hidroksil grubu bulunan flavonoidlerin serbest oksijen radikallerini süpürme etkilerinin meta- konumunda hidroksil bulunduran flavonoidlere oranla daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeni olarak orto-hidroksi yapılarının molekül içi hidrojen bağları ile kararlı hale gelmesi öne sürülmüştür. Ayrıca C halkasının B halkasını çok az etkilediği ve çoğu flavonoidde B halkasındaki hidroksil grupları orto- konumunda bulunduğu için bu grupların serbest oksijen radikallerini süpürme aktivitelerinin daha fazla olduğu savunulmaktadır (Hongyu, 1999).

Pannala ve arkadaşları flavonoidlerin kimyasal ve antioksidatif özelliklerini incelemişlerdir. Bu çalışmada B halkasındaki orto-hidroksi yapı ve C halkasındaki 4-okso fonksiyonu ile konjuge olmuş 2,3 çift bağın serbest radikal süpürücü aktivitede rol oynadığını belirtmişler ve bu özellikten yararlanarak flavonoidlerin ABTS⁺⁺ süpürme aktivitelerini araştırmışlardır (Pannala vd., 2001).

Peyrat-Maillard ve arkadaşları fenolik antioksidanlar arasındaki sinerjik ve antagonistik etkileri incelemişlerdir. Bunun için antioksidanların eşit molar oran içeren ikili karışımlarının antioksidan güçleri AAPH metodu ile test edilmiş ve karışımın antioksidan gücü antioksidanların bireysel güç toplamları ile karşılaştırılmıştır. Sinerjik etki gösteren karışımlar: rosmarinik asit/ kuersetin, rosmarinik asit/ kafeik asit. Antagonistik etki gösteren karışımlar: alfa tokoferol/ kafeik asit, alfa tokoferol/ rosmarinik asit, (+)-kateşin/ kafeik asit ve kafeik asit/quarcetin. Karışımlarda gözenen sinerjik/antagonistik etkiler antioksidanlar arasındaki, moleküllerin kimyasal yapısı ve kararlı moleküller arası kompleks oluşumları dikkate alınarak, mekanizma ile açıklanmaya çalışılmıştır (Peyrat-Maillard vd., 2003).

Villano ve arkadaşları polifenolik bileşiklerin DPPH radikalini süpürme etkinliklerini incelemişlerdir. Yapılan bu çalışmada yapılarındaki hidroksil grubu sayısına bağlı olarak en yüksek değerlere flavan-3-ollerde rastlanmıştır. Gallik

aside benzer bileşiklerin DPPH radikalini büyük ölçüde süpürdükleri belirtilmiştir (Villano vd., 2007).

Tabart ve diğerlerinin çeşitli yöntemlerle (TEAC, DPPH, ORAC, kırmızı kan hücresi hemolizi ve ESR) fenolik bileşikler, askorbik asit ve glutatyonun antioksidan aktivitelerini ölçtükleri bu çalışmada TEAC yönteminde askorbik asidin Troloks'dan daha az, kaempferolün ve rutin'in Troloks ile benzer, mirisetinin daha yüksek aktivite gösterdiği, antosiyaninler ve bir fenolik asit olan gallik asidin ise iki kat fazla antioksidan etki gösterdiğini belirlemişlerdir. DPPH yönteminde ise flavonollerin Troloksa yakın radikal süpürücü etkilerinin olduğu görülmüştür (Tabart vd., 2009).

Krishnaiah ve arkadaşları tıbbi amaçla kullanılan bazı bitkilerin çok yüksek antioksidan potansiyeline sahip olduğu fikrinden yola çıkarak bu bitkilerin gövde, kök, kabuk, yaprak, meyve ve tohumları ile çalışmışlar ve birçok bitkisel türün BHT ve BHA gibi sentetik antioksidanlara benzer antioksidan aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir. Ayrıca, DPPH radikal süpürücü aktivite tayininde askorbik asidin BHT'den daha etkili olduğu görülmüştür (Krishnaiah vd., 2010).

Spektroskopik antioksidan kapasite tayininde kullanılan yöntemlerin yanı sıra antioksidanların kapasitesinin belirlenmesinde voltametrik yöntemlerle ilgili pek çok çalışma mevcuttur. Bu amaçla yapılan bazı çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Diego ve arkadaşları bu çalışmada bitki besin maddelerine eklenen ve farmasotik endüstrisinde kullanılan TBHQ, BHA, BHT, I-1076, I-1010, propil gallat ve askorbik asitin iki farklı elektrot üzerindeki elektrokimyasal davranışları voltametrik ve amperometrik tekniklerle incelenmiştir. Elektrotlar: parafinin bağlayıcı olarak kullanıldığı ticari karbon pasta ve bağlayıcı olarak kütlece %40 PTFE'nin kullanıldığı grafit elektrotlardır. Hidrofobik antioksidanların (BHT, I-1076, I-1010) grafit PTFE üzerinde yanıt vermediği, ancak, diğer elektrot üzerinde analitik olarak işe yarayabilen bir yanıt verdiği görülmüştür. Öte yandan, PTFE grafit elektrotun hidrofobitesisi düşük antioksidanlar (propil gallat ve TBHQ) için avantajlı olduğu ifade edilmiştir. Bahsedilen antioksidanların elektrokimyasal davranışlarının elektrot yüzey kimyası ile antioksidanın lipofilitesi arasındaki etkileşme ile bağlantılı olabileceği öne sürülmüştür (Diego vd., 1999).

Chevion ve arkadaşlarının antioksidan kapasitenin çevrimli voltametri kullanılarak değerlendirilebileceğini öne sürdüğü bu çalışmada çevrimli voltametri, kan plazma, doku homojenat ve bitki ekstraktlarına uygulanmıştır. Düşük molekül kütleli antioksidanların yükseltgenmesi ile çevrimli voltamogramlarda ortaya çıkan piklerin konum itibari ile biyolojik oksidasyon potansiyelini, pik alanlarının ise okside olan türlerin derişimlerini gösterdiği ifade edilmiştir. Ayrıca, oksidatif stresin HPLC elektrokimyasal dedeksiyon ile belirlenen toplam askorbat ve oksitlenmiş askorbat miktarları vasıtasıyla ifade edilmesi önerilmiş ve tüm bu parametreler sağlıklı, şeker hastası ve kemik iliği tranpartasyonundan önce yüksek radyasyona maruz bırakılmış insanlarda ölçülmüş, elektroanalitik metodun sağlam ve hasta örneklerin hızlı bir şekilde saptaması için yaygın olarak kullanılabileceği önerilmiştir (Chevion vd., 2000).

Korotkova ve arkadaşlarının antioksidan aktivitenin voltametrik olarak ilginç, uygun ve özellikle duyarlı bir şekilde tayin edilebileceğinin öne sürüldüğü bu çalışmada askorbik asit, sitrik asit ve glukoz ile yeşil çay ekstraktı ve elma sirkesi gibi bitkisel ekstraktlar ile bazı farmasotik maddelerin antioksidan aktiviteleri, bunların oksijen ile doyurulmuş çözeltilerindeki antioksidan aktivite nedeni ile azalan oksijenin miktarının cıva film elektrot ile ölçülebileceği gösterilmiştir (Korotkova vd., 2002). Yine aynı grup, bir sonraki çalışmalarında ise 12 bitkinin su-alkol ekstraktları ile bazı standart antioksidanların antioksidan aktivite katsayıları oksijen ile doyurulmuş ekstrakt çözeltilerindeki antioksidan etki nedeni ile azalan oksijen miktarının cıva film elektrot ile ölçüldüğü bu çalışmanın biyolojik olarak aktif türlerin oksijen ile etkileşim mekanizmalarının aydınlatılabileceği öne sürülmüştür (Korotkova vd., 2003).

Sinnamik asitler, flavan-3-oller ve flavonoller gibi bazı örneklerdeki doğal fenolik antioksidanların camsı karbon elektrot kullanılarak elde edilen iki farklı pH ortamından alınan diferansiyel puls voltamogramlarının flavonoidler ve toplam fenolik asitlerin seçimli tayinine imkan verdiği gösterilen bu çalışmada yöntem elma ve armut suları ile taze elma ve armut numunelerine uygulanmıştır. Fenolik asitler ve flavan-3-ollerin birlikte bulunduğu numunelerin antioksidan gücünün yüksek, buna karşılık flavan-3-ollerin ve parmak izi fenoliklerin (filorizdin ve arbutin) bulunması halinde antioksidan gücün düşük olduğu gibi bir saptama yapılmıştır. Yöntemin pik yüksekliği ve potansiyel tekrarlanabilirliğinin çok iyi olduğu ifade edilmiştir (Blasco vd., 2004).

Sousa ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada bazı fenolik asitlerin (kafeik, klorojenik, sinapik, ferulik ve p-kumarik asit) camsı karbon elektrotlar üzerindeki çevimli voltamogram pik konumları dikkate alınarak bunların antioksidan aktiviteleri sıralanmıştır. Bu sıralamanın geçerliliği DPPH yöntemi ile de kanıtlanmıştır. Askorbik asitin elektrokimyasal olarak elektrot yüzeyine çöktürülerek modifiye edilmiş camsı karbon elektrotlarda yukarıda sayılan asitlerde sadece kafeik ve klorojenik asidin elektrot yüzeyi ile spesifik etkileşme nedeni ile voltametrik yanıt verdikleri, diğerlerinin vermediği böylece bu iki asidin portakal suyu gibi karmaşık matrislerde seçimli olarak tayin edilebileceği belirtilmiştir (Sousa vd., 2004).

Piljac-Zegarac ve arkadaşları tarafından yapılan bu çalışmada 10 adet meyve çayının demleme ekstraktlarının asetat tamponunda (pH:3) camsı karbon elektrot ile alınan çevrimli voltamogramlarında 600 mV'taki yük değerleri ölçülerek antioksidan kompozit indisleri hesaplanmıştır (Piljac-Zegarac vd., 2010). Aynı grubun başka bir çalışmasında ise, aynı çay ekstraktları için FRAP, DPPH ve ABTS yöntemleri ile elde edilen kapasiteleri ile elektrokimyasal olarak elde edilen kapasiteler arasında çok iyi bir korelasyon olduğu gösterilmiştir (Belscak vd., 2011).

Aguirre ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada üzüm, ahududu, kırmızı şaraptaki antosiyaninler oldukça karmaşık bir ekstraksiyon yöntemi ile ekstraksiyon edildikten sonra toplam miktarları diferansiyel pH ile ekstraktların antosiyanin bileşeni HPLC/MS ile ve bu ekstraktların antioksidan kapasiteleri ise TEAC yöntemi ile belirlenmiştir. Aynı ekstraktların camsı karbon elektrot ile alınan çevrimli ve diferansiyel puls voltamogramlarının ikişer pik gösterdiği görülmüştür. Birinci pikin B halkasındaki OH grubundan ikinci pikin ise A halkasındaki 5,7-dihidroksil gruplarından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Sonuç olarak diferansiyel puls voltametrimin kırmızı şarapların antioksidan özelliğini karakterize etmede iyi bir yöntem olabileceği öne sürülmüştür (Aguirre vd., 2010).

Arteaga ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada baharatlar ve bazı ilaçlarda bulunan düşük molekül kütleli bazı antioksidanların aktiviteleri elektrokimyasal ve DPPH yöntemleri ile ayrı ayrı çalışılmıştır. Fenolik halkadaki R gruplarının molekülün serbest radikal süpürücü özelliği ve aynı zamanda elektrokimyasal davranışını da belirlediği ifade edilmiştir (Arteaga vd., 2012).

Rebello ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada İspanya’da şarapları ile tanınmış bir bölgeden elde edilen şarapların polifenol içerikleri kimyasal (FC ve ABTS) ve elektrokimyasal (CV ve DPV) teknikler ile ölçülmüştür. Tüm şarap tipleri birlikte ele alındığında CV sonuçları ile FC veya ABTS sonuçları arasında liner olmayan bir ilişki gözlenmişken DPV sonuçları ile ABTS sonuçları arasında oldukça iyi bir lineer korelasyon olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, şarapların gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilen antioksidan kapasitelerinin elektrokimyasal tayininde ölçülen kapasitenin elektroliz zemin çözeltilisine, elektrokimyasal yöntemin kendisine ve kapasitenin hesaplanmasında pik şiddeti veya yükünün dikkate alınıp alınmadığına bağlı olabileceği öne sürülmüştür (Rebello vd., 2013).

Lino ve çalışma arkadaşları antioksidan kapasitenin elektrokimyasal bir indis yardımıyla belirlenebileceğini öne sürmüştür. Çalışmada seçilen şarapların elektrokimyasal indis ile hesaplanan antioksidan kapasitelerinin diğer klasik yöntemlerle (DPPH, TEAC, FCR) belirlenen kapasitelerle arasında iyi bir korelasyon olduğu gözlenmiştir (Lino vd., 2014).

Glod ve çalışma arkadaşlarının bitki ekstraktlarının toplam antioksidan kapasitesinin çevrimli voltamogramlarında ortaya çıkan piklerin hem potansiyelleri hem de alanları dikkate alınarak hesaplanmasının uygun ve universal bir yöntem olacağını dikkate alan çalışmada toplam antioksidan aktivitesinin hesaplanmasına ilişkin bir formül verildikten sonra 14 adet bitki ekstraktının DPV, HPLC (0,2 ve 1 volt) DPPH ve FCR metotları ile hesaplanan antioksidan kapasiteleri karşılaştırılmıştır. Sonuçlar arasındaki farklar bazı metotların zayıf antioksidanların bazılarının ise kuvvetli antioksidanların aktivitelerini ölçmeye yönelik olmaya tasarlanmış olmasından kaynaklandığı ifade edilmiştir. Önerilen hesaplama yönteminin ise hem zayıf hem de kuvvetli antioksidanları birlikte değerlendiren bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (Glod vd., 2014).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. DeneYlerde Kullanılan Kimyasallar

	Marka
ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) diazonyum tuzu]	Fluka
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil)	Aldrich
Demir (III) klorür hegzahirat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Merck
Etil alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)	Sigma-Aldrich
Glisin HCl	Sigma-Aldrich
Metil alkol (CH_3OH)	Sigma-Aldrich
Potasyum heksasiyanoferrat(III) ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$)	Sigma-Aldrich
Potasyum persülfat ($\text{K}_2\text{O}_8\text{S}_2$)	Fluka
Sodyum hidroksit (NaOH)	Sigma-Aldrich
Sodyum fosfat dibasic anhidrat (Na_2HPO_4)	Sigma
Sodyum fosfat monobasic (NaH_2PO_4)	Sigma
Sodyum klorür (NaCl)	Sigma
Trikloro asetik asit (TCA)	Carlo Erba

Kullanılan Antioksidanlar

	Marka
Arbutin	Sigma
Askorbik Asit (Vitamin C)	Sigma-Aldrich
BHA (Bütillenmiş Hidroksi anisol)	Sigma-Aldrich
BHT (Bütillenmiş Hidroksi toluen)	Aldrich
Galik asit	Sigma-Aldrich
p-kumarik asit	Sigma-Aldrich
Sirincik Asit	Sigma
Troloks [(±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit]	Aldrich

3.2. DeneYlerde Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihaz	Üretici Firma
Ivium Compact Stat (Elektrokimyasal analizör)	Ivium Technologies B.V.
(UV-1601) Spektrofotometre	Shimadzu
Cell stand	BASİ
pH metre	Orion Star, Thermo Scientific
Terazi	XB Serisi, Precisa
Vorteks	Classic, Velp Scientifica
Manyetik karıştırıcı	MS 3000 serisi, Misung Scientific Co.
Sonikatör	Bandelin Sonorex
Ultra saf su cihazı	LABCONCO WaterPro PS
Ag/AgCl referans elektrot	BASİ
Pt karşıt elektrot	BASİ
Mikropipetler	Axygen
Su banyosu	Memmert (WB14)

3.3. DeneYlerde Kullanılan Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

3.3.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini

DPPH radikal süpürücü aktivite tayini Brand-Williams vd. (1995)'a göre yapıldı. DPPH' in metanoldeki çözeltisinden (1.0×10^{-4} M) 1 mL alınarak üzerine 3 mL 0-0.5 mM derişim aralığında etanolde çözülerek hazırlanmış örnek (antioksidan) çözeltisi eklendi ve vorteks ile şiddetle çalkalandı. Otuz dakika karanlıkta bekletildikten sonra 517 nm' de absorbans okundu. İşlemler 5 tekrarlı (n=5) yapıldı.

Yüzde inhibisyon (DPPH Radikal Süpürücü Aktivite) aşağıdaki formülden hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [A_{\text{Kontrol}} - A_{\text{Örnek}} / A_{\text{Kontrol}}] \times 100$$

A: Absorbans

Kontrol numunesi olarak DPPH çözeltisi ve örneğin çözüldüğü çözücü kullanıldı. Bulunan yüzde inhibisyona karşılık gelen derişimler grafiğe geçirildi. $y = ax + b$ denkleminde DPPH derişimini yarıya düşüren örnek miktarı mM cinsinden bulunarak IC_{50} değerleri hesaplandı.

Her bir antioksidan için çizilen grafikler antioksidan alfabetik sıra izlenerek BULGULAR bölümünde gösterilmiştir.

3.3.2. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayini (ABTS/TEAC)

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite tayini, Miller vd. (1993) ve Dubeau vd. (2010)' a göre bazı değışiklikler uygulanarak yapıldı. ABTS' nin sudaki çözeltisi (14 mM) ile potasyum persülfat çözeltisi (5 mM) karıştırıldı. Çözelti oda sıcaklığında, alüminyum folyo ile sarılmış koyu renkli bir şişede 2 gün mekanik karıştırıcıda karıştırılarak karanlıkta bekletildi. Kullanıma hazır hale gelen mavi-yeşil renkli ABTS radikal çözeltisi, buradan alınan küçük kısımların 730 nm'deki absorpsiyon 0.700 ± 0.010 olacak şekilde ultra saf su ile 1:80 oranında seyreltildi. Her defasında kuvartz küvete 1 mL seyreltilmiş ABTS radikal çözeltisinden ilave edilip önce 730 nm'de absorbans okundu (A_K), daha sonra küvetteki çözelti

üzerine 0-0.5 mM derişim aralığında etanolde çözülen antioksidan çözeltilerinden 50 µL eklenerek altıncı dakikanın sonunda 730 nm’de tekrar absorbens değerleri okundu (A_6). Her bir antioksidan derişimi için 5 ölçüm ($n=5$) yapıldı. Altıncı dakikadaki absorbens değerlerinden (A_6) kontrolün absorbens değerleri (A_K) çıkarılarak her bir antioksidan için ΔA değerleri elde edildi.

$$\begin{aligned} \% \text{ İnhibisyon} &= [A_K - A_6 / A_K] \times 100 \\ &= [\Delta A / A_K] \times 100 \end{aligned}$$

Hesaplanan % inhibisyon değerleri antioksidan derişimine karşı grafiğe geçirildi. Grafiklerden elde edilen eğimler Troloks ile çizilen standart çalışma grafiğinden elde edilen eğime oranlanarak incelenen her antioksidan bileşik için TEAC/ABTS değerleri hesaplandı.

Her bir antioksidan için çizilen grafikler antioksidan alfabetik sıra izlenerek BULGULAR bölümünde gösterilmiştir.

3.3.3. İndirgeme Gücü Tayini

İndirgeme gücü tayini Oyaizu (1986)’ya göre yapıldı. İndirgeme gücü ölçülecek olan antioksidanların 0.1-0.5 mM derişim aralığında stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 500’er µL alınarak 15 mL’lik cam tüplere kondu. Üzerlerine toplam hacim 1,0 mL olacak şekilde ultra saf su eklendi. Bu çözeltilerin üzerine 2.5’er mL fosfat tamponu (0.2 M pH 6.6) ve 2.5’er mL potasyum ferrisiyanür (%1’lik) ilave edilerek 50 °C’de 20 dakika su banyosunda bekletildi. Daha sonra 2.5 mL % 10’luk trikloroasetik asit (TCA) ilave edildi ve vortekslendi. Buradan alınan 2.5 mL’lik örneklere 2.5 mL ultra saf su ve 0.5 mL demir (III) klorür (% 0.1’lik) ilavesi ile 700 nm’de absorbens okundu. 0.5 mM derişimdeki örneklerin indirgeme gücü değerleri aynı derişimdeki askorbik asidin indirgeme gücü yüzdesi (%Askorbik asit) olarak hesaplandı. İşlemler 5 tekrarlı olarak yapıldı.

Her bir antioksidan için çizilen grafikler antioksidan alfabetik sıra izlenerek BULGULAR bölümünde gösterilmiştir.

3.3.4. Voltametrik Ölçümler

Tüm elektrokimyasal ölçümlerde üçlü elektrot sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrotu olarak kalem grafit elektrot (tombo uç), referans elektrot olarak Ag/AgCl elektrot, yardımcı elektrot olarak ise platin tel kullanılmıştır. Tüm voltametrik ölçümler glisin HCl (0.1 M pH 1.93) tampon çözeltisi içinde Faraday kafesinde gerçekleştirilmiştir.

Çevrimli Voltametri (CV) Koşulları:

$E_{\text{başlangıç}}$: -0.800 V
$E_{\text{çevrim}}$: 1.500 V
E_{son}	: -0.800 V
$E_{\text{adım}}$: 4 mV
Tarama hızı	: 50 mV/s

Diferansiyel Puls Voltametri (DPV) Koşulları:

$E_{\text{başlangıç}}$: -0.300 V
E_{son}	: 1,200 V
Puls süresi	: 50 ms
Puls genliği	: 50 mV
$E_{\text{adım}}$: 4 mV
Tarama hızı	: 20 mV/s

3.3. Voltametrik Ölçümlerde Kullanılan İstatistik Yöntemleri

Analitik kimyada regresyon analit derişim (c) ile analitin kullanılan cihaz/yöntemde neden olduğu sinyal (S) arasındaki ilişkinin ortaya çıkarıldığı bir istatistik yöntemdir. Kimyacı genellikle bu ilişkinin doğrusal olduğu derişim aralığı ile ilgilenir. Regresyon işlemi bazı hesap makinaları ile veya excel ve minitab gibi istatistik programları ile yapılır.

İşlem sonunda $S = ac + b$ gibi bir doğru denklemi elde edilir. Burada a doğrunun eğimi, b ise sinyal eksenindeki kesim noktasıdır. Elde edilen doğruya kalibrasyon doğrusu denir. Bu doğru denklemi kullanılarak bir test çözeltisindeki analit derişimi hesaplanır. İstatistik paketler kullanıldığında doğru denkleminde başka doğrunun eğimi ve kesim noktasının standart sapmaları da hesaplanmaktadır. Test çözeltisindeki analit derişimin güven aralığı bu iki parametredeki standart sapmalar dikkate alınarak hesaplanır.

Regresyon hesabında hesaplanan çok önemli bir büyüklük korelasyon katsayısıdır (r veya R ile gösterilir). Bu büyüklük kalibrasyon grafiğindeki deneysel veri noktalarının hesaplanan doğru denklemi arasındaki uyumluluğu gösteren bir büyüklüktür. Pozitif veya negatif değerler alabilir; ancak, sayı 1'e ne kadar yakın ise uyumluluk o ölçüde iyidir. $R < 0,95$ olması halinde c ve S arasındaki ilişkinin lineer olmadığı kabul edilerek c ve S arasındaki ilişki bir başka model ile (kuadratik, üstel, logaritmik vb.) açıklanabilir.

Regresyon iki farklı metodun sonuçlarının karşılaştırılarak aralarında bir korelasyon olup olmadığının gösterilmesi için de kullanılır. İki farklı metod veya cihazla elde edilmiş veri seti arasındaki korelasyon bu kez R^2 ile değil çoklu R ile ifade edilmelidir (Miller ve Miller, 2000). Çoklu R ne kadar büyükse korelasyonun o kadar iyi olduğu söylenebilir.

Farklı yöntemlerle elde edilen sonuçlar arasındaki korelasyonu test etmenin bir başka yolu Spearman sıralama korelasyon katsayısı metodudur. Bu metotta sonuçlar küçükten büyüğe (veya büyükten küçüğe) sıralanır. Metod, sonuçların mutlak sayısal büyüklüklerini değil verilen sıra numaraları arasındaki korelasyonu araştırır. Null hipotezi, sonuçlar arasında bir korelasyon olmadığı şeklindedir. Hesaplanan katsayı, numune sayısı ve belli olasılık değerleri için hazırlanan tablodaki kritik değerden büyükse hipotez reddedilir, yani incelenen sonuçlar arasında korelasyon vardır (Miller ve Miller, 2000).

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

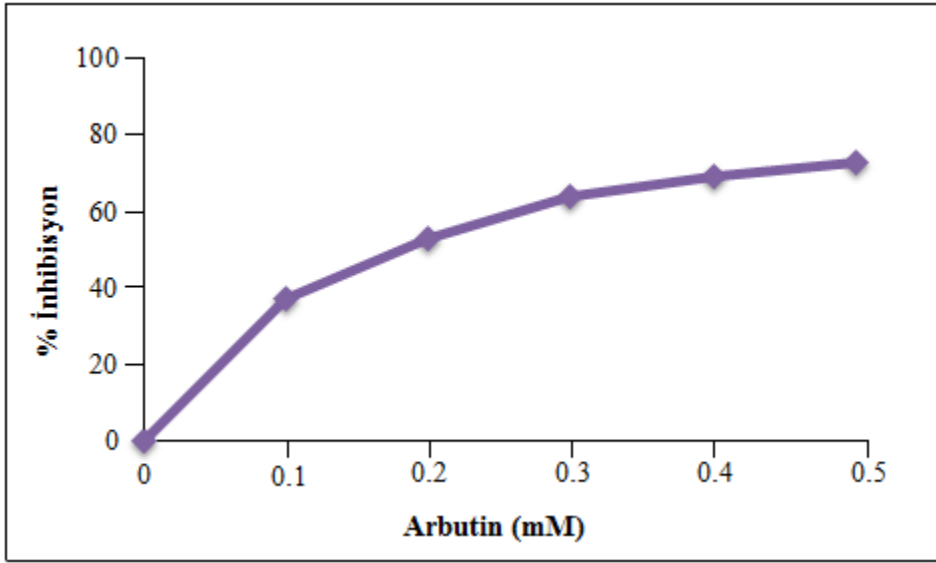
DPPH, TEAC ve İndirgeme gücü spektrofotometrik yöntemler ile her bir antioksidan için çizilen kalibrasyon grafikleri, antioksidanların alfabetik sırası izlenerek gösterilmiştir.

4.1. DPPH Radikal Süpürücü Aktivite Tayini Sonuçları

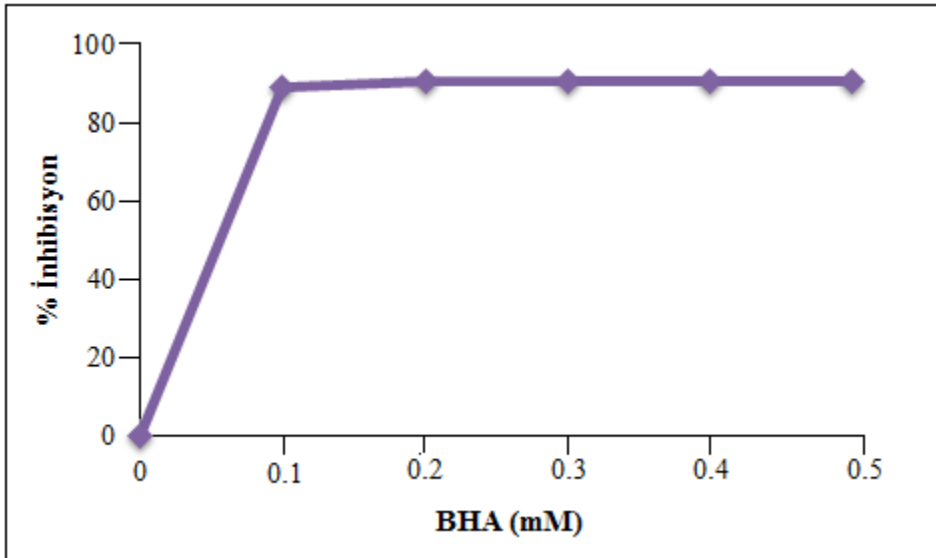
DPPH radikali (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) doğal olmayan kararlı bir radikal olup antioksidan aktivite tayinlerinde standart olarak kullanılmaktadır. Kararlı bir diyamanyetik molekül oluşturmak için bir elektron veya hidrojen radikalini bünyesine kabul eder. Deney, belli derişimde hazırlanan antioksidan çözeltisinin, içinde belirli miktarda DPPH bulunan çözelti ile karıştırılması ile meydana gelen reaksiyon sonucunda 517 nm’de absorbans değerlerinin okunması ile gerçekleşir.

- Antioksidan ile DPPH’in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği absorbans ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal süpürme aktivitesi o kadar yüksek demektir.
- Antioksidan derişimi arttıkça absorbans değeri düşmektedir. Absorbansın düşmesinin sebebi radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu hidrojen bağlanması ile radikalın süpürülmesidir.
- Hesaplanan IC₅₀ değerleri ne kadar düşüğe radikal süpürücü aktivite o kadar yüksektir.

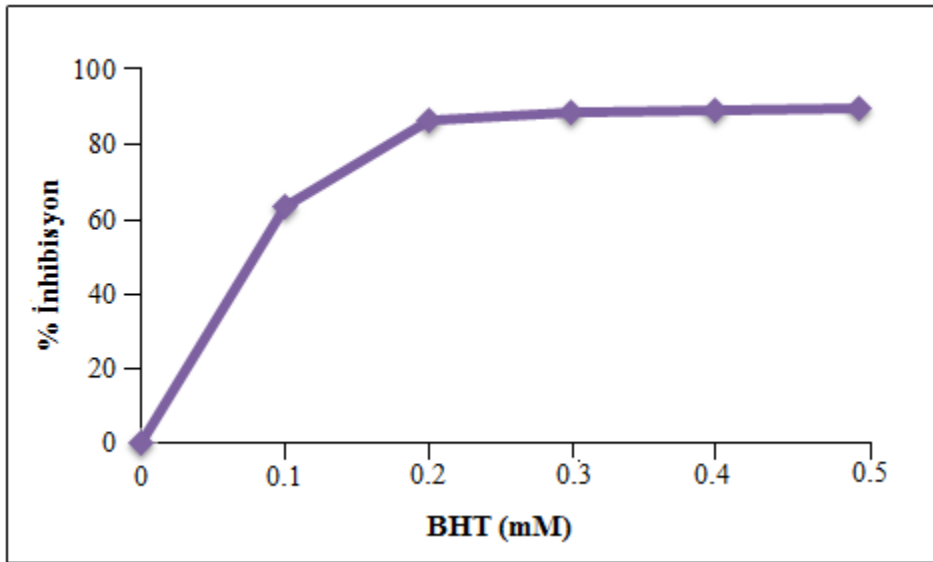
Farklı derişimlerdeki standart antioksidan örnekler için elde edilen DPPH radikali süpürme aktivitelerinin % inhibisyon cinsinden hesaplanmasına imkan veren antioksidan aktivite kalibrasyon grafikleri aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir.



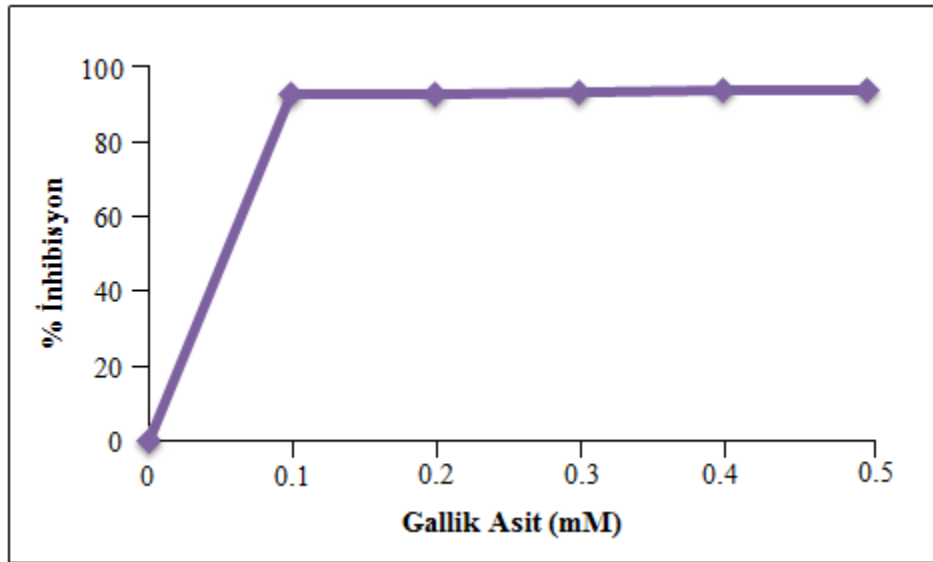
Şekil 4.1. Farklı derişimlerdeki arbutin molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi



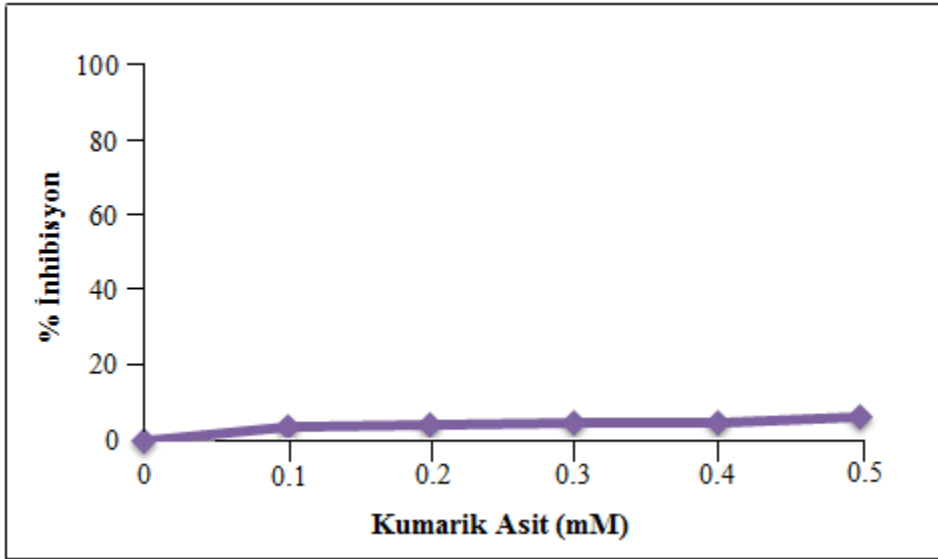
Şekil 4.2. Farklı derişimlerdeki BHA molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi



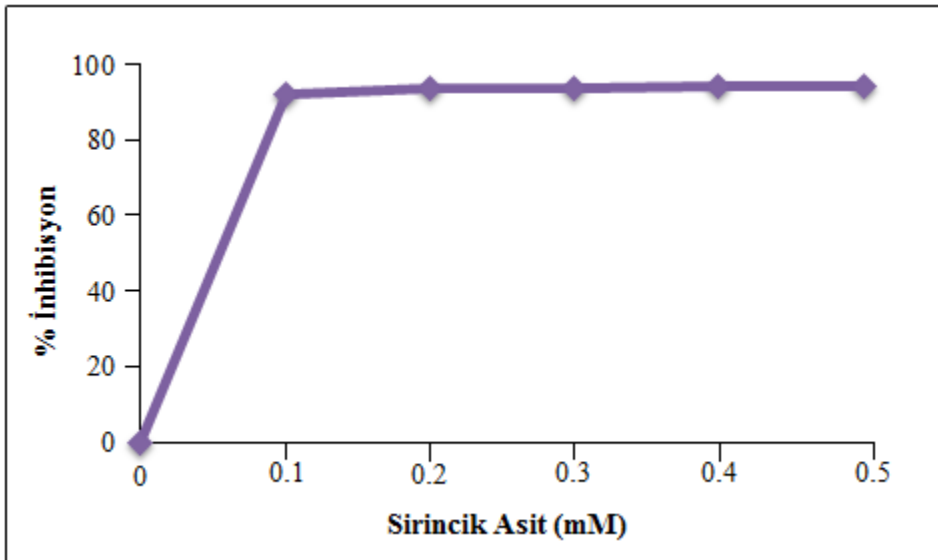
Şekil 4.3. Farklı derişimlerdeki BHT molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi



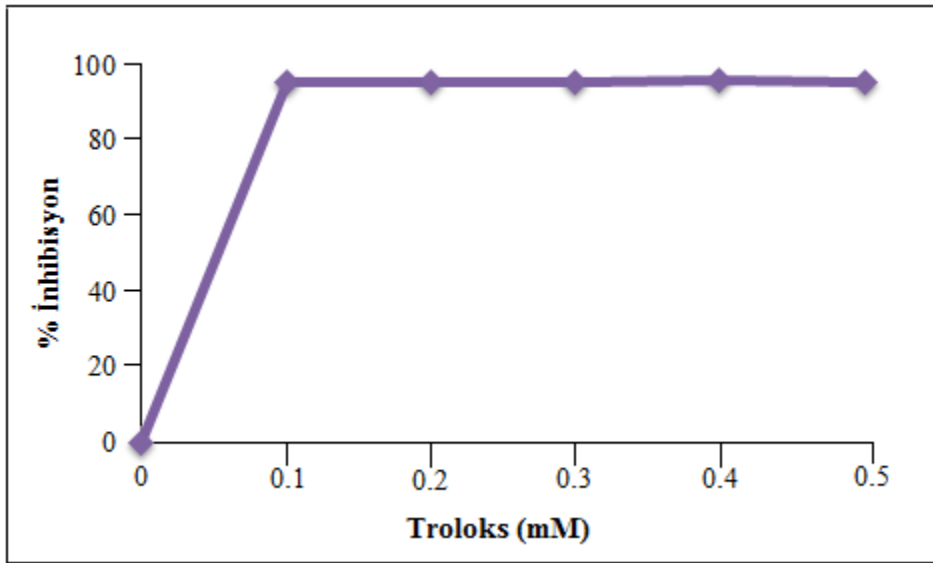
Şekil 4.4. Farklı derişimlerdeki gallik asit molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi



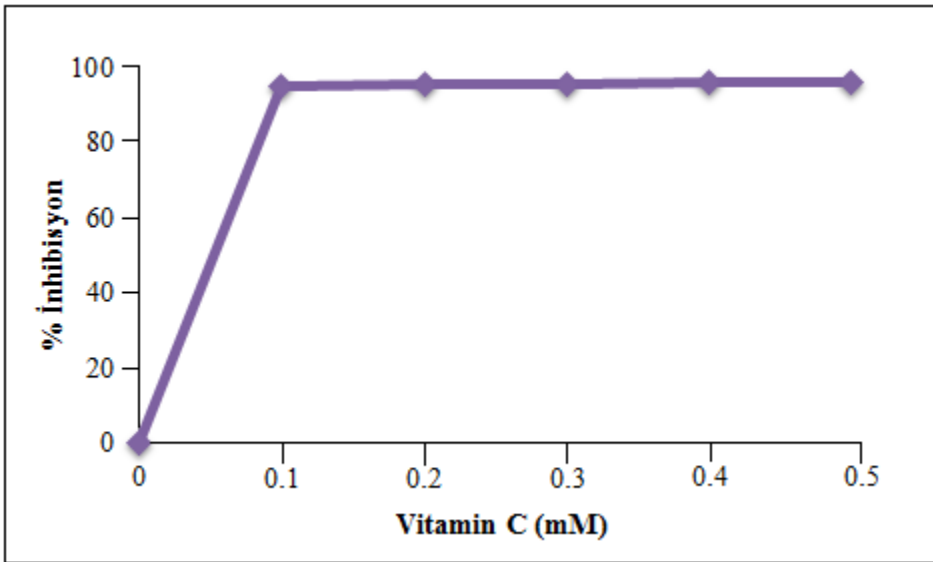
Şekil 4.5. Farklı derişimlerdeki kumarik asit molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi



Şekil 4.6. Farklı derişimlerdeki sirincik asit molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi



Şekil 4.7. Farklı derişimlerdeki troloks molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi



Şekil 4.8. Farklı derişimlerdeki vitamin C molekülünün DPPH radikal süpürücü aktivitesi

Grafiklerden lineer regresyon analizi ile hesaplanan IC_{50} değerleri izelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. DPPH radikal süpürücü aktiviteri incelenen antioksidan bileşiklerin IC_{50} değerleri

Antioksidan	$IC_{50} \pm \text{Std. Sapma (mM)}$
Arbutin	0.1353 ± 0.0052
BHA	0.0563 ± 0.0006
BHT	0.0789 ± 0.0031
Gallik asit	0.0537 ± 0.0001
Kumarik asit	1.4225 ± 0.0609
Sirincik asit	0.0541 ± 0.0002
Troloks	0.0525 ± 0.0000
Vitamin C	0.0527 ± 0.0001

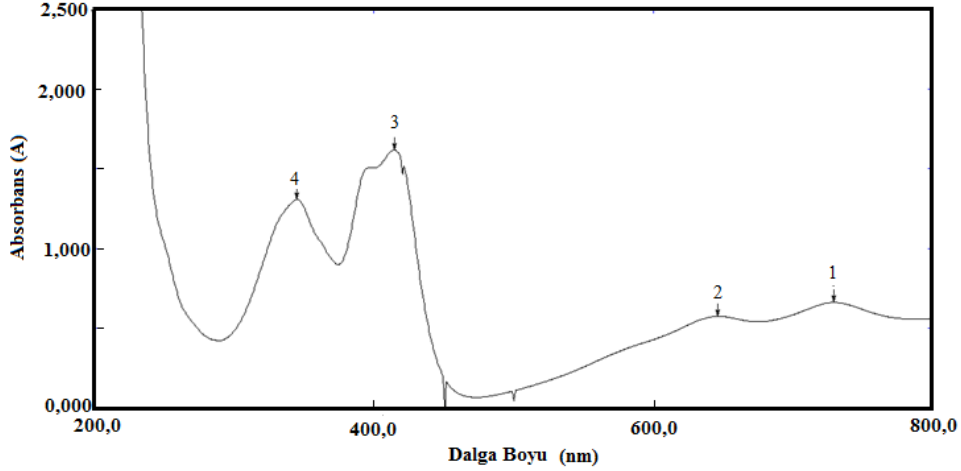
İncelenen antioksidanlardan BHA, BHT ve Troloks sentetik antioksidanlardır; diğerleri ise doğaldır. Sentetik ve doğal antioksidanlardan yukarda hesaplanan IC_{50} itibariyle antioksidan güçleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir:

Sentetik antioksidanlar: Troloks > BHA> BHT

Doğal antioksidanlar: Vitamin C> Gallik asit> Sirincik asit> Arbutin> Kumarik asit

4.2. Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite Tayini (TEAC) Sonuçları

ABTS radikal katyonunun süpürme etkisinin ölçülmesi için kullanılacak dalga boyuna karar vermek için, bölüm 3.3.2.'de derişimleri belirtilen ABTS/potasyum persülfat karışımı ile önce ABTS radikal absorpsiyon spektrumu alındı (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. ABTS radikal katyonunun UV-görünür bölgede absorpsiyon spektrumu

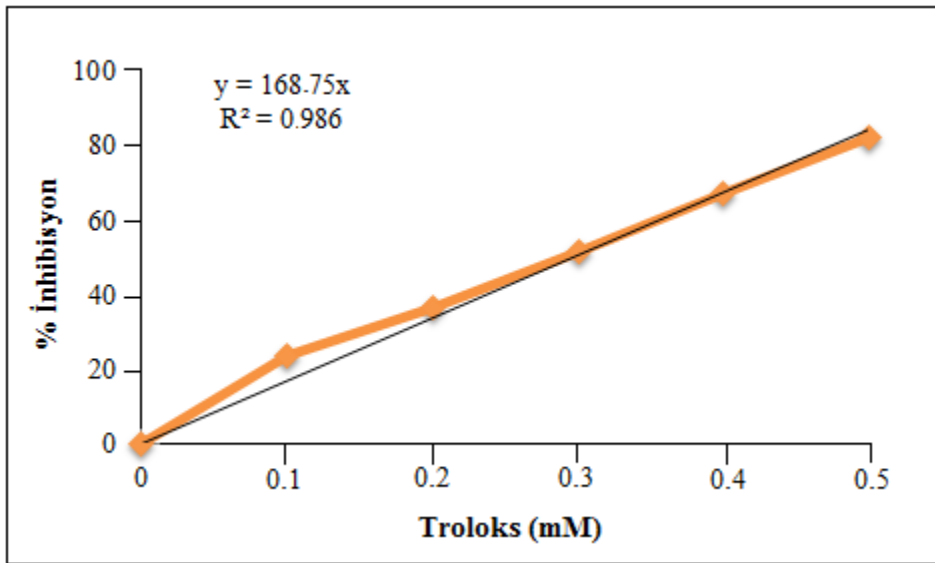
Spektrumda 4 ayrı absorbans maksimumları görülmektedir. Bunların dalga boyları ve absorbans değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.2.).

Çizelge 4.2. ABTS radikalinin katyonunun dalga boyu ve absorbans değerleri

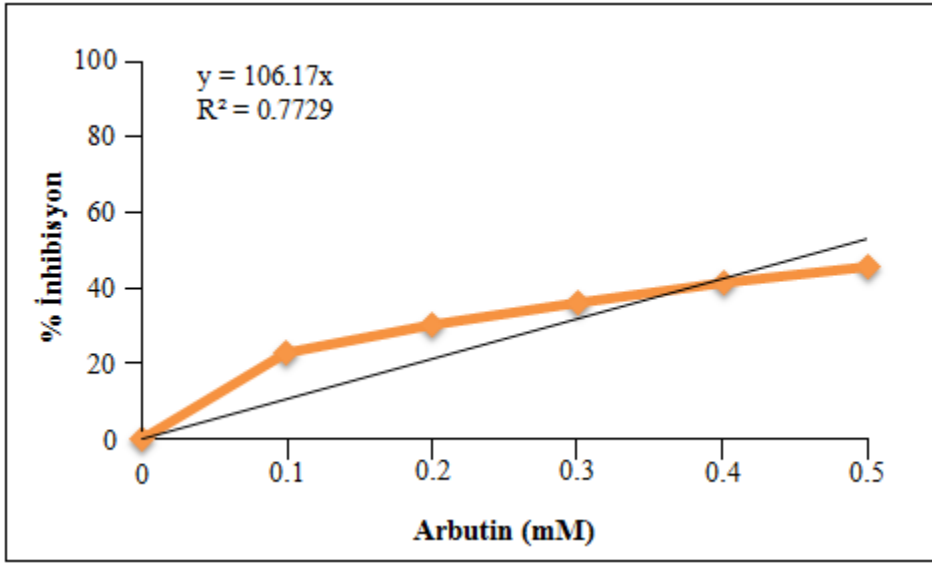
No.	Dalga Boyu (nm)	Absorbans
1	730.50	0.663
2	646.50	0.576
3	414.50	1.616
4	345.00	1.308

Uygulanan yöntemde belirtildiği gibi dalga boyu seçiminde absorbansları 1'den büyük olan 3 ve 4 no'lu bantlar dalga boyu seçiminde dikkate alınmamıştır. 1 ve 2 no'lu bantlardan absorbansı daha yüksek olan 1 no'lu bandın maksimum dalga boyu 730 nm olduğu için çalışılacak dalga boyu olarak 730 nm'ye karar verilmiştir.

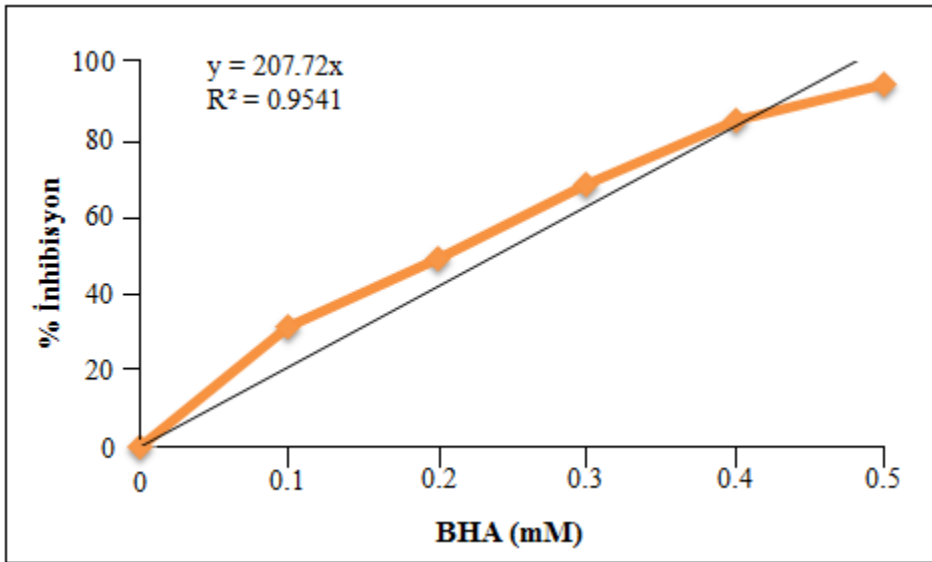
Bu yöntemde troloks standart antioksidandır. Troloks ve diğer antioksidan bileşiklerin, bölüm 3.3.2.'de anlatıldığı gibi hesaplanan %inhibisyon değerleri ile antioksidan derişimi arasında çizilen grafikler aşağıda gösterilmiştir. %inhibisyon radikalın süpürme gücünü, yani, antioksidan aktivitesini göstermektedir.



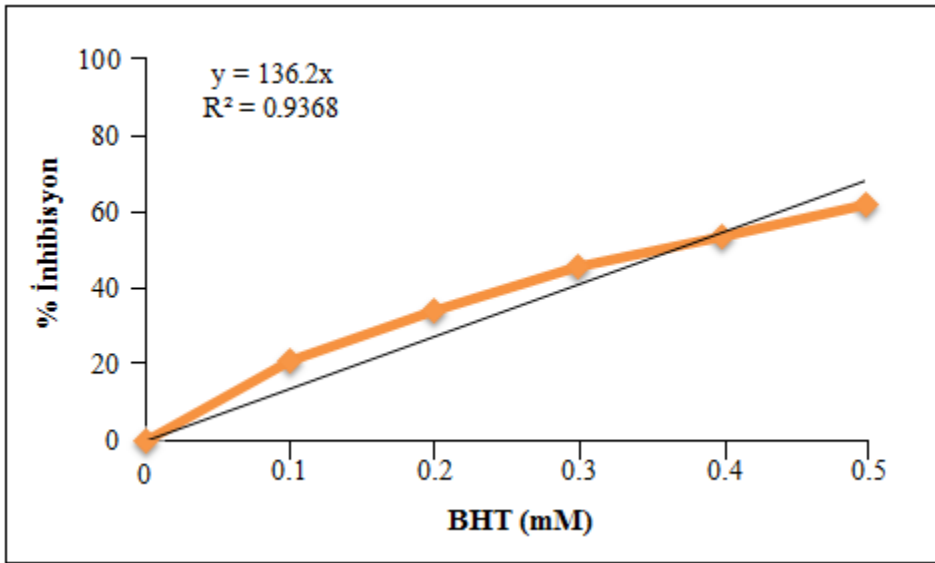
Şekil 4.10. Troloks molekülü için TEAC standart çalışma grafiği



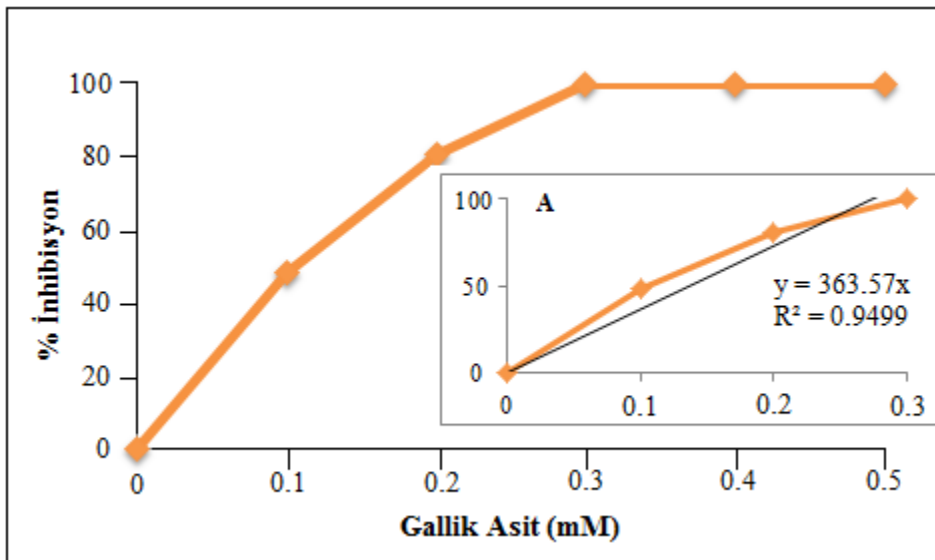
Şekil 4.11. Farklı derişimlerdeki arbutin molekülü için TEAC aktivitesi



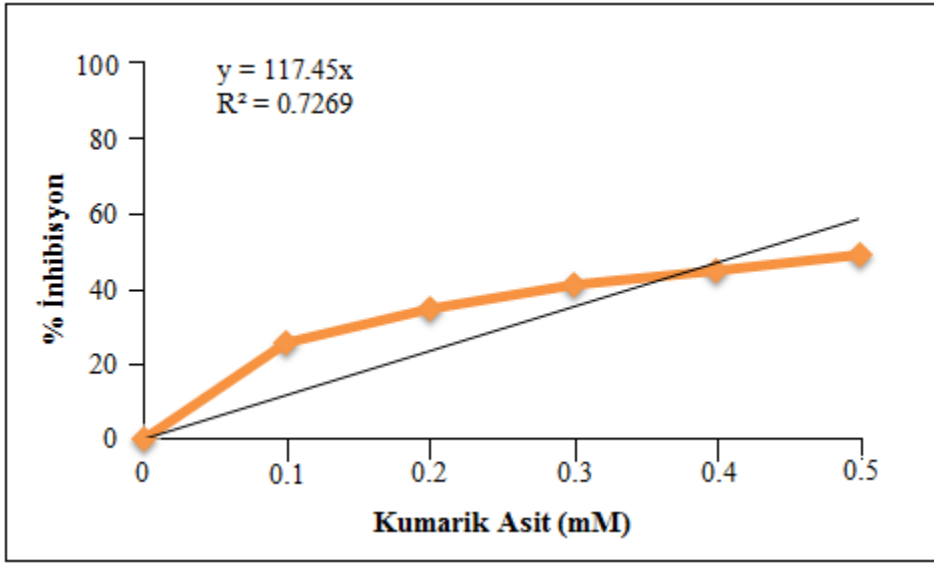
Şekil 4.12. Farklı derişimlerdeki BHA molekülü için TEAC aktivitesi



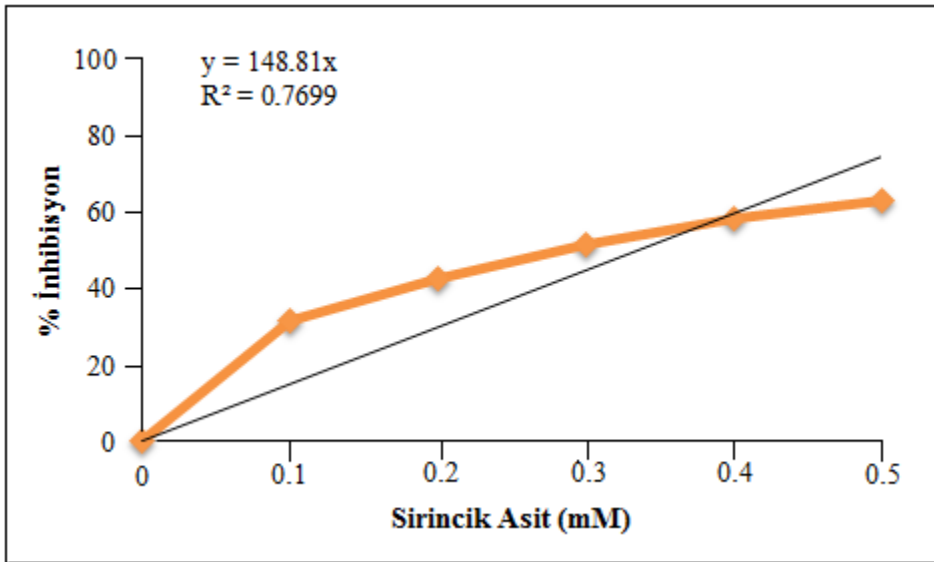
Şekil 4.13. Farklı derişimlerdeki BHT molekülü için TEAC aktivitesi



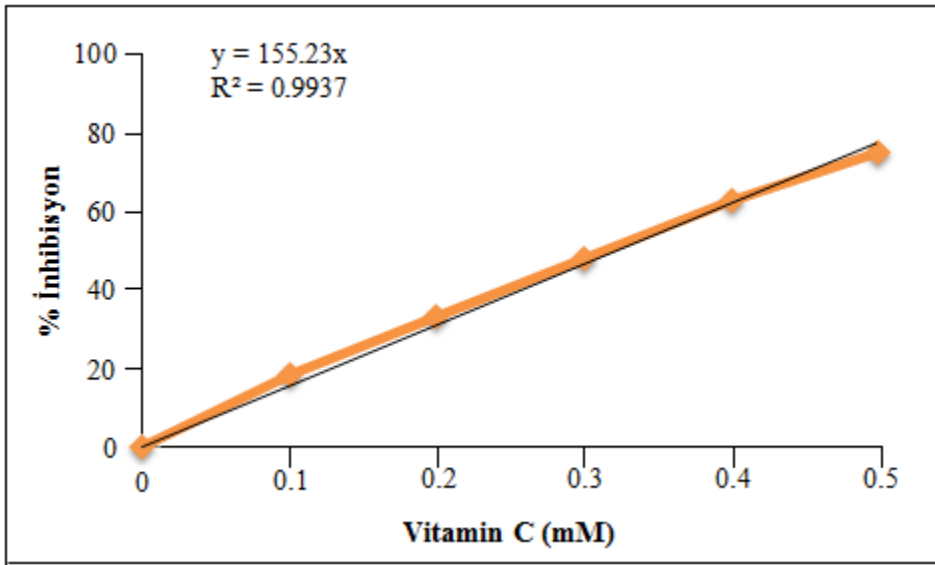
Şekil 4.14. Farklı derişimlerdeki gallik asit molekülü için TEAC aktivitesi Kabul edilebilir bi korelasyon katsayısı ile ilk 4 deneysel nokta dikkate alınarak çizilen kalibrasyon grafiği içteki grafiğte gösterilmiştir(A).



Şekil 4.15. Farklı derişimlerdeki kumarik asit molekülü için TEAC aktivitesi



Şekil 4.16. Farklı derişimlerdeki sirincik asit molekülü için TEAC aktivitesi



Şekil 4.17. Farklı derişimlerdeki vitamin C molekölü için TEAC aktivitesi

Her bir antioksidan için çizilen kalibrasyon doğru denklemindeki eğimlerin Troloks için hesaplanan eğime oranlanarak elde edilen $TEAC_{ABTS}$ değerleri aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3. Çalışılan antioksidan bileşiklerin TEAC yöntemi ile hesaplanan $TEAC_{ABTS}$ değerleri

Antioksidan	$TEAC_{ABTS} \pm \text{Std. sapma}$
Arbutin	0.6292 ± 0.0022
BHA	1.2309 ± 0.0021
BHT	0.8071 ± 0.0052
Gallik asit	2.1545 ± 0.0057
Kumarik asit	0.6960 ± 0.0025
Sirincik asit	0.8819 ± 0.0033
Troloks	1.0000
Vitamin C	0.9198 ± 0.0014

Yukarıdaki çizelge göre antioksidan güç sıralaması:

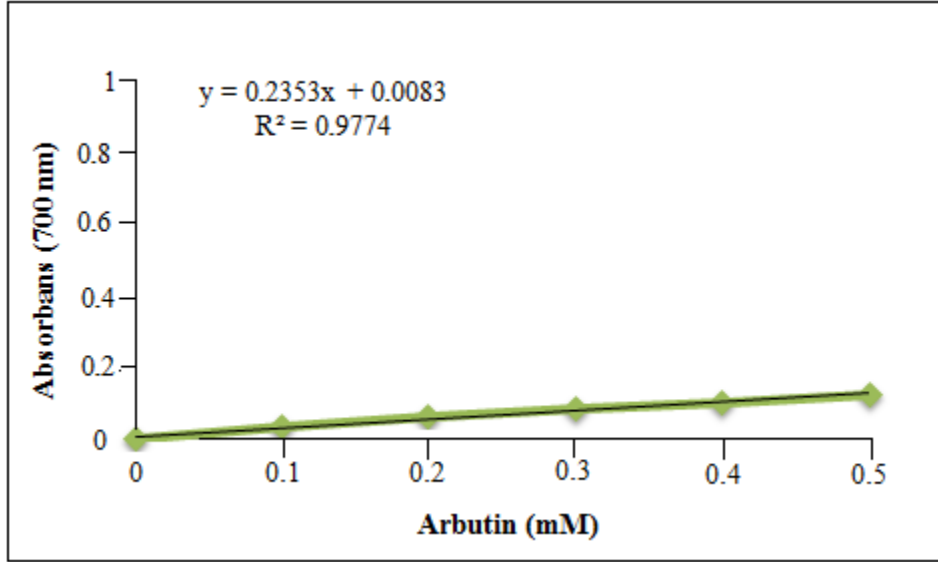
Sentetik antioksidanlar: BHA> Troloks> BHT

Doğal antioksidanlar: Gallik asit> Vitamin C> Sirincik asit>Kumarik asit> Arbutin

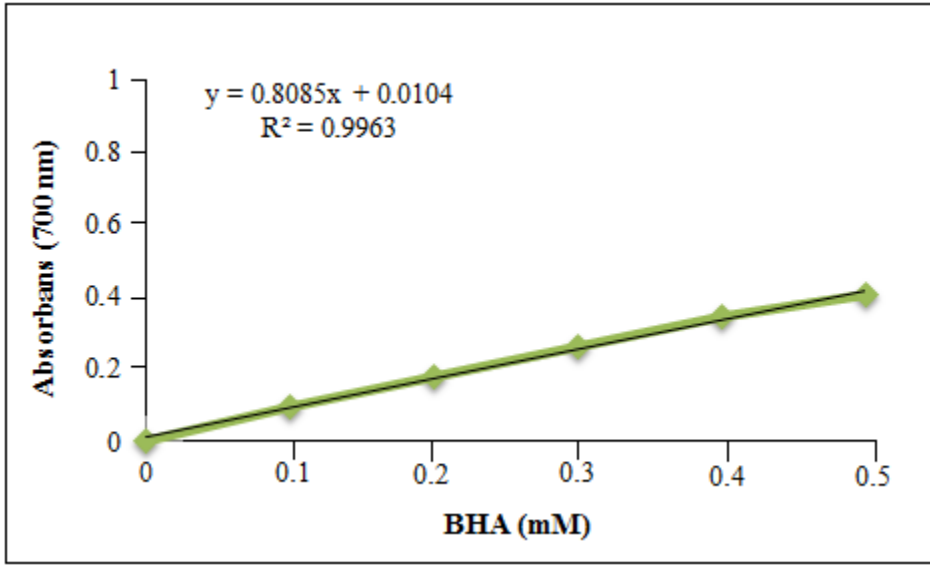
4.3. İndirgeme Gücü Tayini Sonuçları

Bir bileşiğin indirgeme gücü onun antioksidan aktivitesinin ölçüsüdür. İndirgeme gücünde belirlenen ortamda başlangıçta bulunan Fe^{3+} iyonlarının Fe^{2+} iyonlarına ne ölçüde indirgiğidir. Fe^{2+} 'nin 700 nm'deki absorbansının ölçülerek antioksidanların indirgeme gücü hesaplanır. Yüksek indirgeme gücü yüksek antioksidan kapasitesini karşılık gelir.

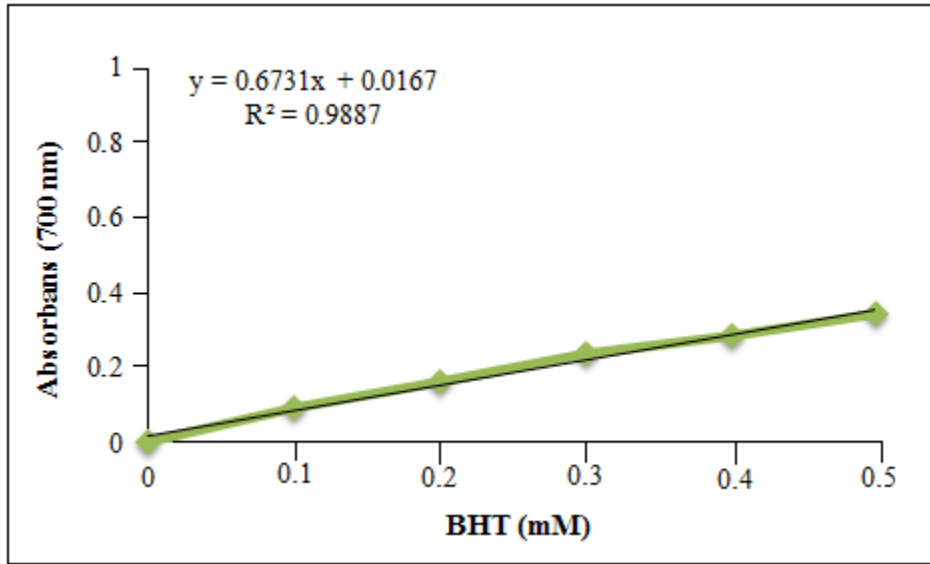
Çalışmada kullanılan antioksidan bileşiklerinin farklı derişimlerine karşı ölçülen absorbans değerleri ile çizilen kalibrasyon grafikleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 4.18-25). Bu yöntemde standart antioksidan vitamin C'dir. Diğer antioksidanların indirgeme gücü, bunların 0.5 mM derişimdeki çözeltisinin absorbansının 0.5 mM vitamin C çözeltisinin absorbansına oranlanması ile hesaplanır. Vitamin C için indirgeme gücü keyfi olarak 100 kabul edilmiştir.



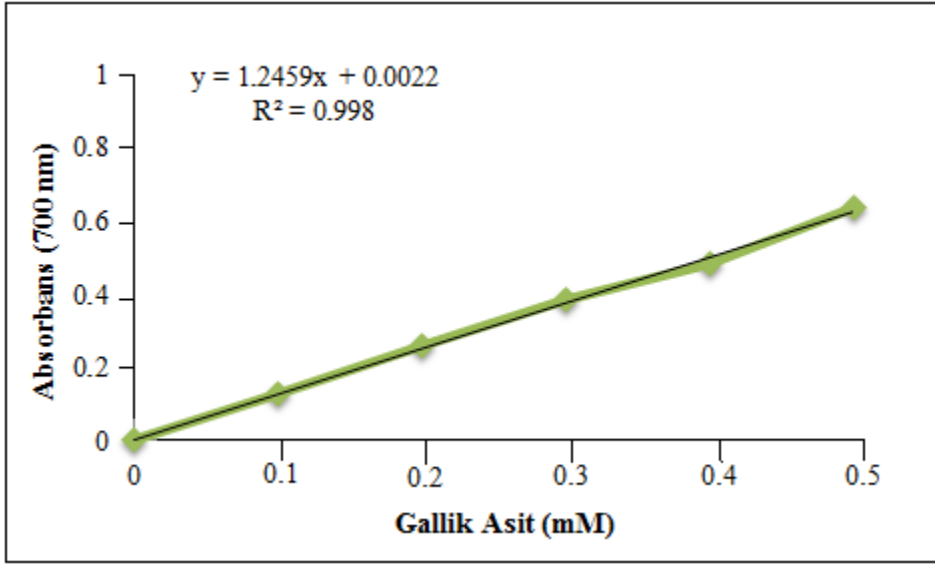
Şekil 4.18. Arbutin molekülünün indirgeme gücünün derişime bağlı değişimi



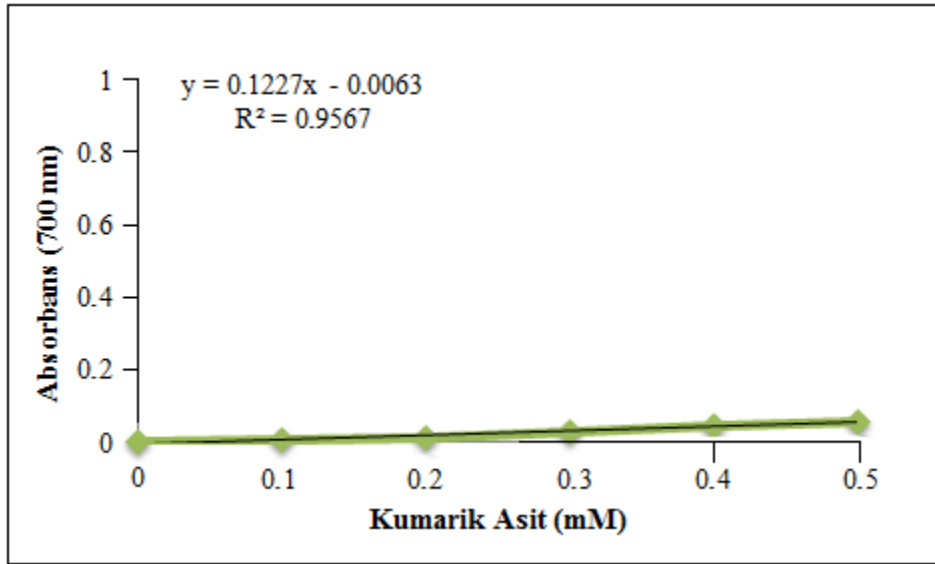
Şekil 4.19. BHA molekülünün indirgeme gücünün derişime bağılı değişimi



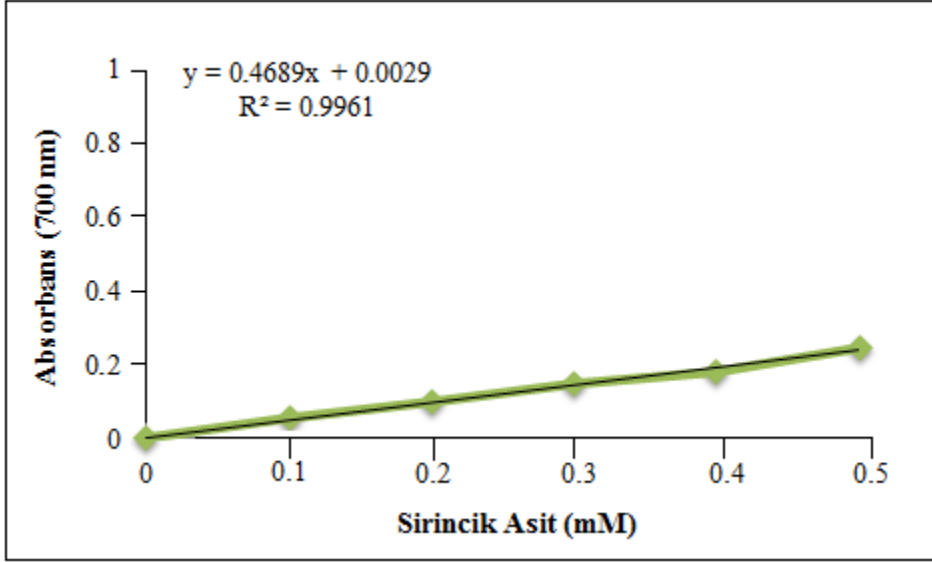
Şekil 4.20. BHT molekülünün indirgeme gücünün derişime bağılı değişimi



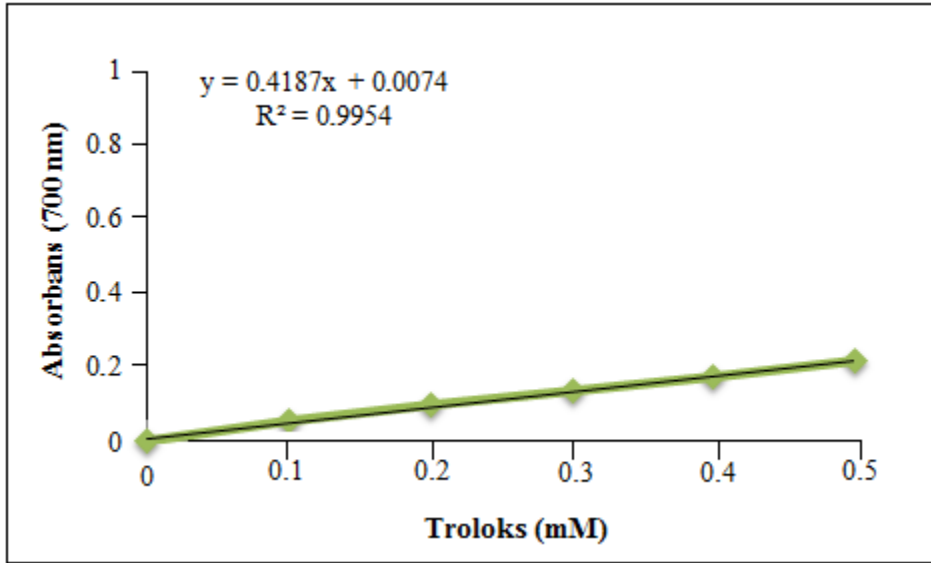
Şekil 4.21. Gallik asit molekülünün indirgeme gücünün derişime bağı değişimi



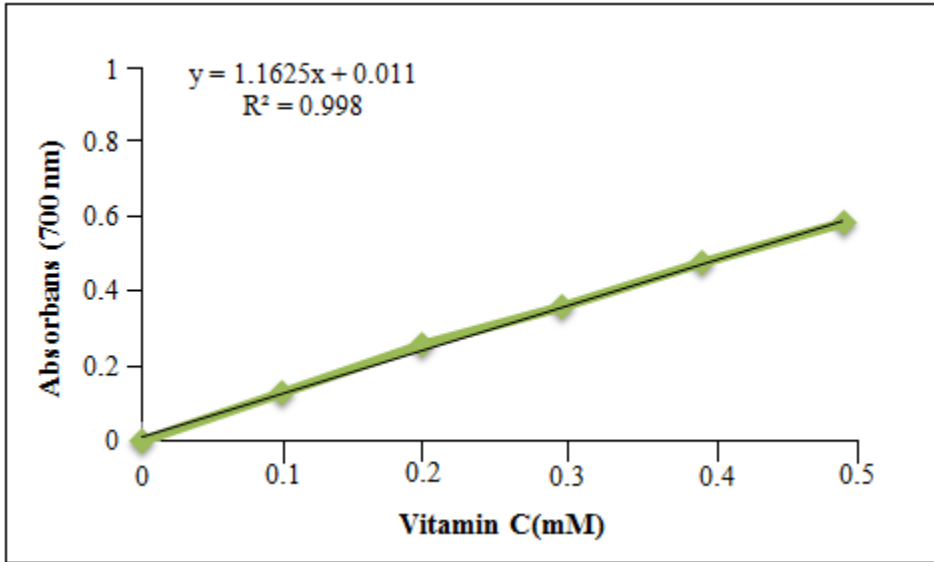
Şekil 4.22. Kumarik asit molekülünün indirgeme gücünün derişime bağı değişimi



Şekil 4.23. Sirincik asit molekülünün indirgeme gücünün derişime bağılı değişimi



Şekil 4.24. Troloks molekülünün indirgeme gücünün derişime bağılı değişimi



Şekil 4.25. Vitamin C molekülünün indirgeme gücünün derişime bağılı değişimi

Çizelge 4.4. Çalışma kapsamındaki antioksidan bileşiklerin indirgeme gücü değerleri

Antioksidan	İndirgeme Gücü ± Std.Sapma (%Vitamin C)
Arbutin	20.74 ± 0.2363
BHA	68.88 ± 0.9585
BHT	58.45 ± 0.6464
Gallik asit	108.7 ± 0.3768
Kumarik asit	9.94 ± 0.5668
Sirincik asit	41.48 ± 0.3575
Troloks	36.90 ± 0.3154
Vitamin C	100.0

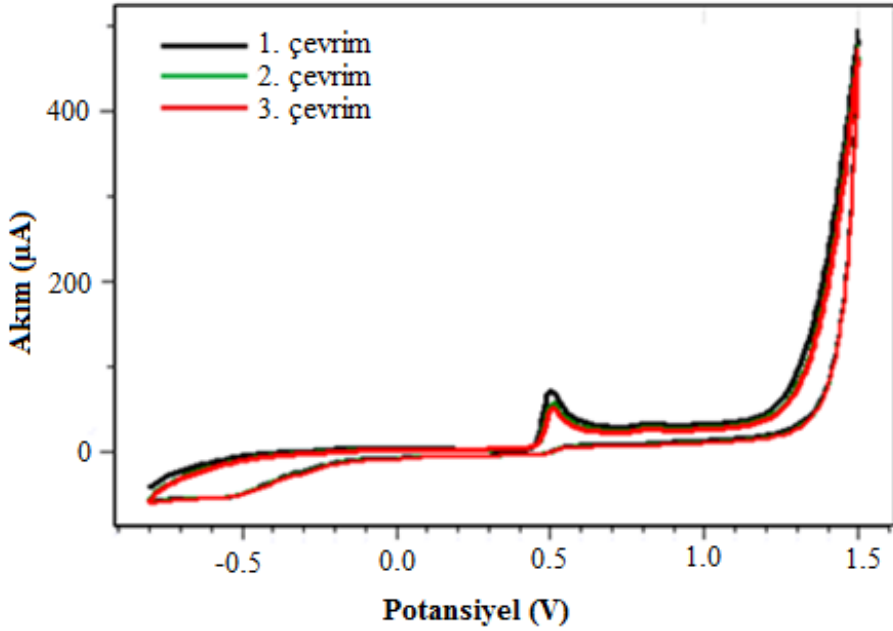
Yukarıdaki çizelge göre antioksidan güç sıralaması:

Sentetik antioksidanlar: BHA> BHT> Troloks

Doğal antioksidanlar: Gallik asit> Vitamin C> Sirincik asit> Arbutin> Kumarik asit

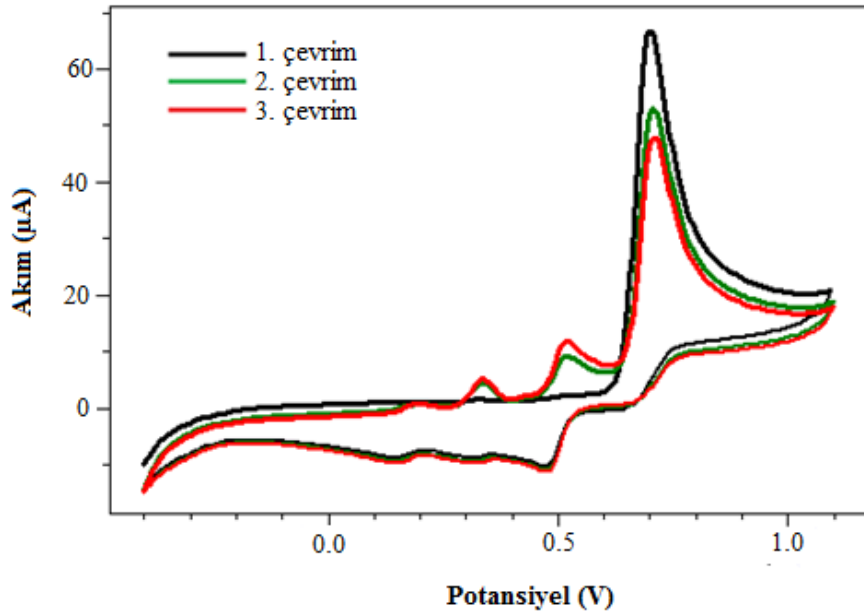
4.4. Antioksidan Kapasitenin Elektrokimyasal Yöntemlerle Tayin Sonuçları

Materyal ve metot bölümünde değinildiği gibi Glisin HCl (pH:1.93) çözeltisinde derişimi 0.5 mM olacak şekilde hazırlanan antioksidan çözeltilerinin kalem grafit elektrotlar kullanılarak geniş sayılabilecek bir potansiyel aralığında çevrimli voltamogramları kaydedildi. Örnek olarak aşağıda (şekil 4.25.) gallik aside ait üç ardışık çevrimli voltamogram görülmektedir.



Şekil 4.26. Gallik asit molekülünün 0.1 M pH:1.93 Glisin HCl tamponunda alınan üç ardışık çevrimli voltamogramı

Çevrimli voltametri ile elektrokimyasal davranışı incelenen 8 antioksidandan sadece gallik asitte pozitif yöndeki ilk taramada birden fazla (iki adet) pik ortaya çıkmaktadır; diğerlerinin tümünde pozitif yöndeki taramada bir pik vardır. Ancak antioksidanlardan arbutin, BHA ve sirincik asidin ikinci çevrimlerinden itibaren ilk çevrimdeki pikten daha negatif potansiyelde ve şiddetleri genellikle birinci pikten daha düşük olan ikinci ve üçüncü piklere rastlanmıştır. Örnek olmak üzere sirincik aside ait çevrimli voltamogram aşağıda gösterilmektedir (Şekil 4.27.)



Şekil 4.27. Sirincik asit molekülünün 0.1 M pH:1.93 Glisin HCl tamponunda alınan üç ardışık çevrimli voltamogramı

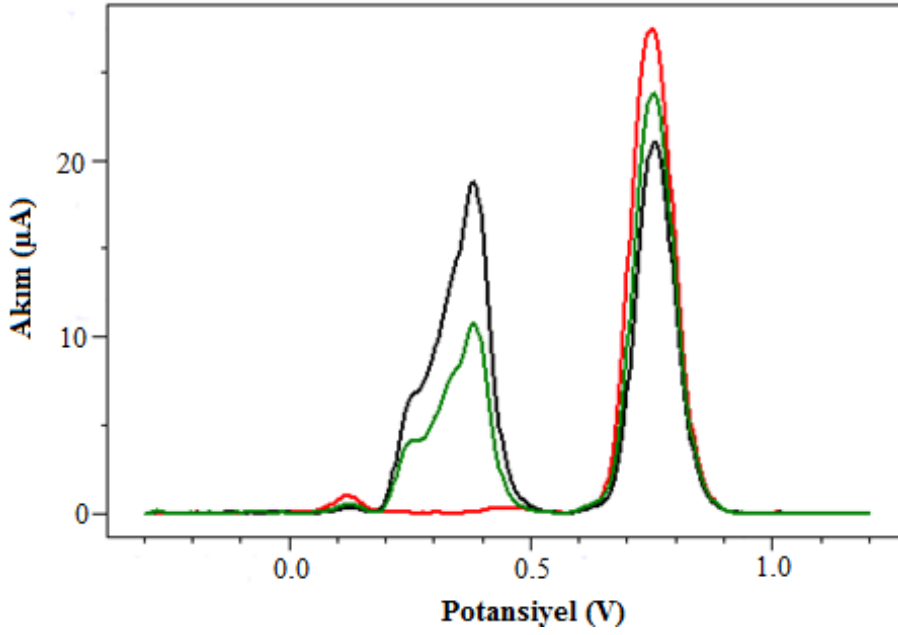
Antioksidan kapasitenin hesaplanmasında dikkate alınacak pik (veya piklerin) ortaya çıktığı potansiyel aralığı dikkate alınarak her antioksidanın, çevrimli voltamogramı alınırken kullanılan potansiyel aralığından daha dar olan bir potansiyel aralığında ve yükseltgenme yönünde diferansiyel puls voltamogramları alınmıştır. Her bir antioksidana ait diferansiyel puls voltamogramları aşağıdaki şekillerde gösterilmiştir (Şekil 4.28–35).

Bütün DP voltamogramlarında:

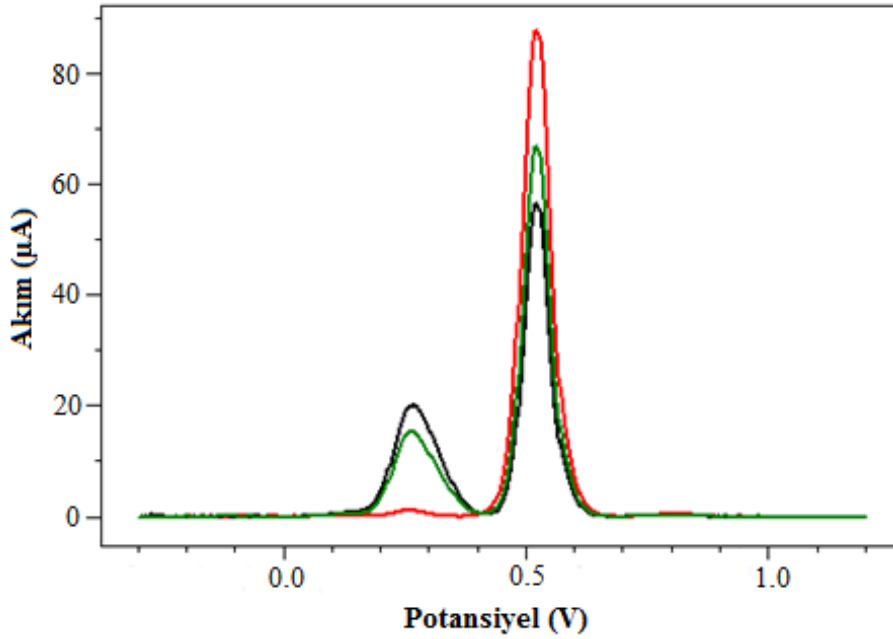
Kırmızı: Birinci DP taraması

Yeşil: İkinci DP taraması

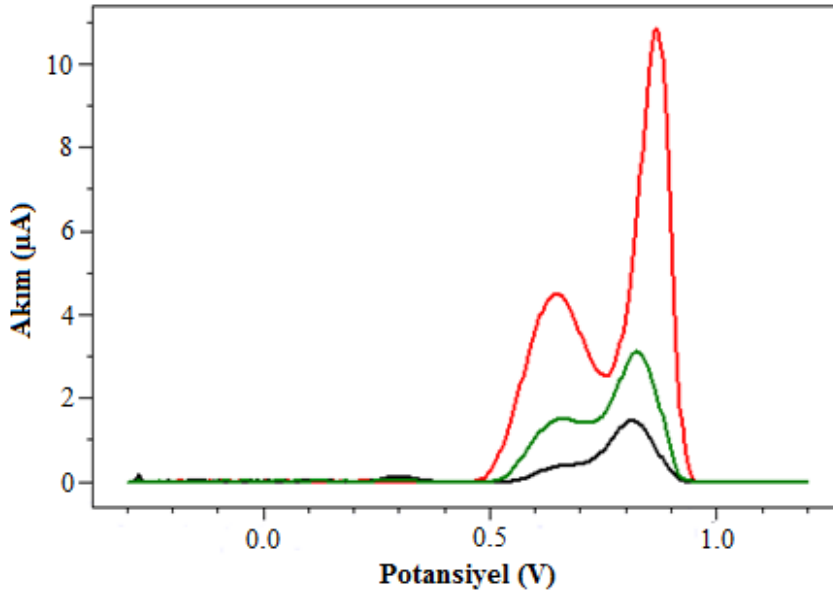
Siyah: Üçüncü DP taraması



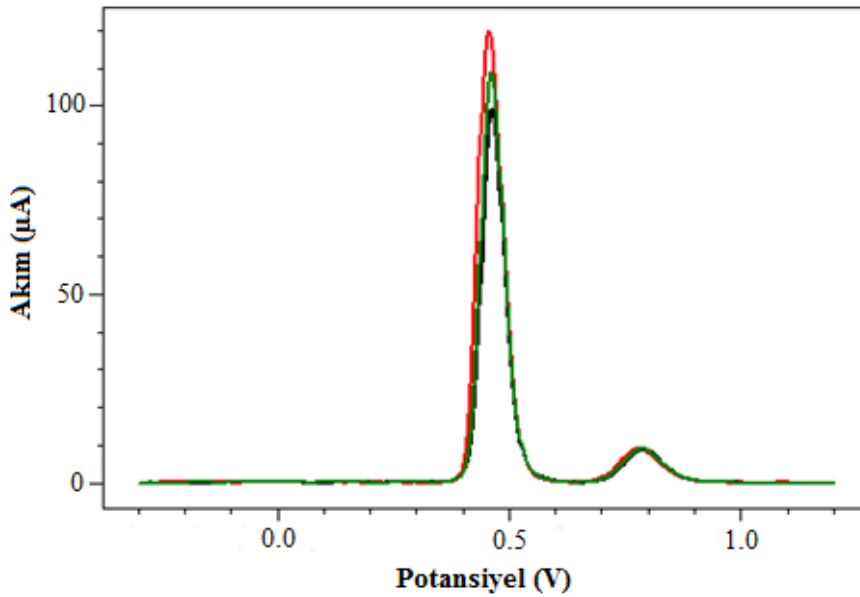
Şekil 4.28. 0.5 mM arbutin molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları



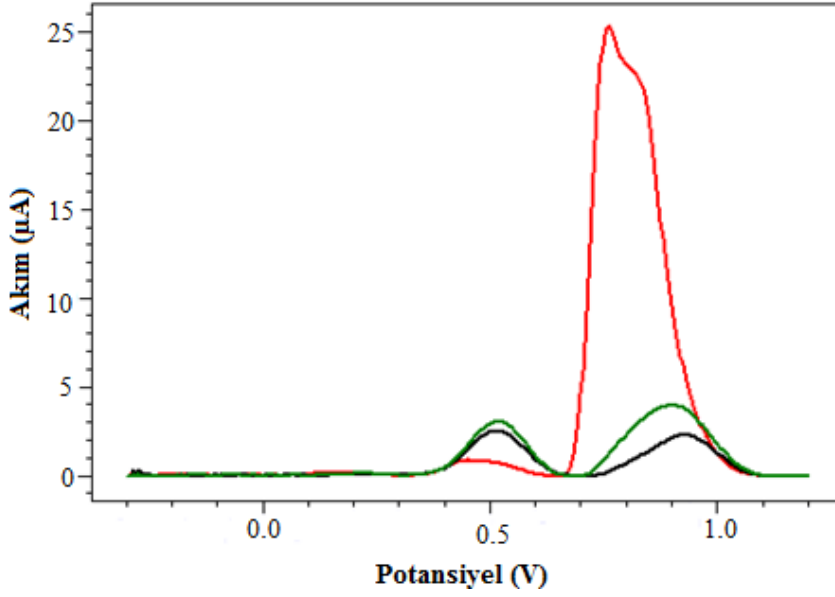
Şekil 4.29. 0.5 mM BHA molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları



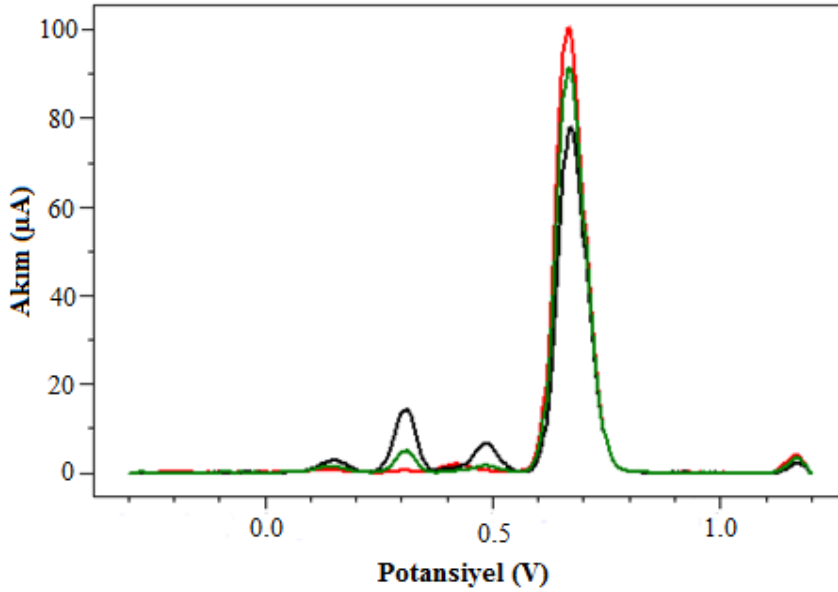
Şekil 4.30. 0.5 mM BHT molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları



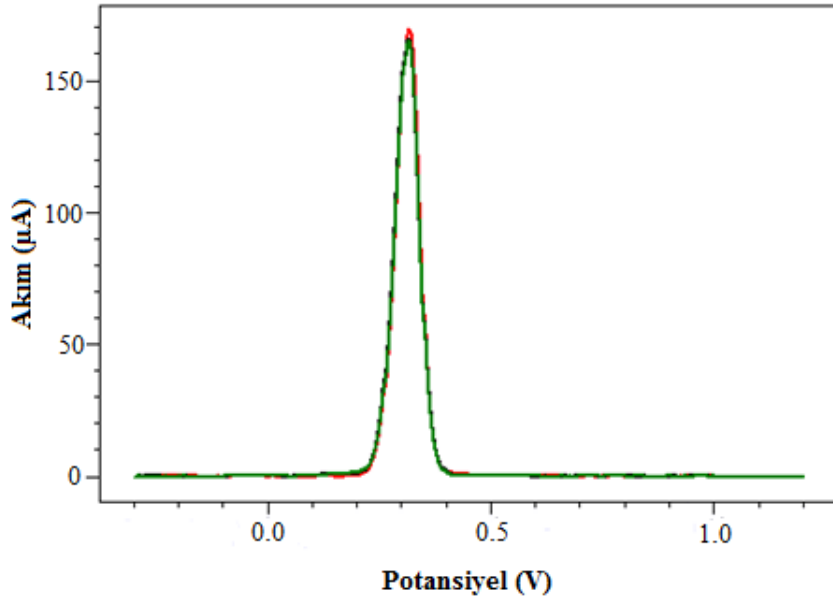
Şekil 4.31. 0.5 mM gallik asit molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları



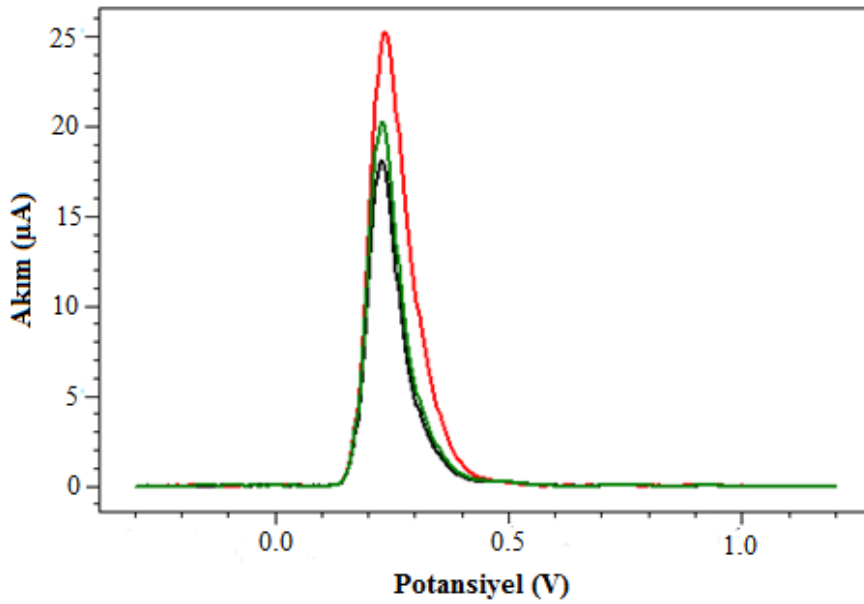
Şekil 4.32. 0.5 mM kumarik asit molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları



Şekil 4.33. 0.5 mM sirincik asit molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları



Şekil 4.34. 0.5 mM Troloks molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları



Şekil 4.35. 0.5 mM vitamin C molekülünün 0.1 M Glisin HCl (pH:1.93) tamponunda anodik tarama ile elde edilen diferansiyel puls voltamogramları

Yukarıdaki voltamogramlar analizör olarak kullanılan Ivium Compact Stat'ın veri işleme yazılımında bulunan zemin düzeltme (baseline correction) modülü vasıtasıyla çizdirilen voltamogramlardır. Voltamogramlardaki birinci, varsa ikinci piklerin pik potansiyelleri, pik şiddetleri (akımları) ve pik altındaki alana karşılık gelen yükleri aşağıdaki çizelgede gösterilmektedir. Çizelgedeki pik alanı ve yüksekliği birinci taramada ortaya çıkan pike (gallik asit için piklere) ait değerlerdir (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Birinci taramada ortaya çıkan birinci ve ikinci piklerin pik potansiyelleri, pik şiddetleri (akımları) ve yükleri

Antioksidan	1.pik			2.pik		
	Potansiyel	Akım (A)	Yük (Q)	Potansiyel	Akım (A)	Yük (Q)
Arbutin	0.752	2.7421E-05	1.4975E-04			
BHA	0.524	8.9966E-05	3.3602E-04			
BHT	0.648	2.9381E-06	5.9552E-05*			
	0.868	9.7688E-06				
Gallik asit	0.456	1.2008E-04	4.0553E-04	0.776	8.9396E-06	4.9514E-05
Kumarik asit	0.760	2.5307E-05	2.1713E-04			
Sirincik asit	0.664	1.0043E-04	3.9420E-04			
Troloks	0.316	1.6980E-04	5.7854E-04			
Vitamin C	0.236	2.5303E-05	1.3755E-04			

*: pikler arasındaki rezülasyon iyi olmadığı için toplam yük değeri verilmiştir.

Kaynak özetlerinde değinildiği gibi antioksidanların indirgeme gücünün, bir başka deyişle antioksidan kapasitesinin/gücünün, pek çok araştırmacı tarafından bunların oksidasyon pik konumlarının potansiyeli ile orantılı olduğu ifade edilmiştir. Buna göre bir türün (antioksidanın) indirgenme potansiyeli ne kadar düşük ise (elektron verme eğilimi ne kadar yüksek ise) indirgeme gücü, yani antioksidan kapasitesi o kadar yüksektir. Öte yandan, kapasitenin pik potansiyeli konumundan ziyade pik alanı altındaki yük ile ifade edilmesinin daha doğru olduğunu öne süren çalışmalar da mevcuttur (Chevion vd., 2000; Glod vd., 2014).

Pik potansiyellerinin antioksidanların kapasitelerinin ifadesi olarak dikkate alınması, antioksidanların güçlerinin sadece sıralanmasına imkan verecektir. Kapasitelerin sıralanması bir ölçü olmakla birlikte daha gerçekçi bir karşılaştırmaya imkan vermesi açısından pik alan büyüklüklerinin (yani yüklerin) hesaplanmasının daha doğru olacağı düşünülmüş ve her bir antioksidanın kapasitesi bu şekilde hesaplanmıştır. Bu hesaplamada birinci taramada ortaya çıkan pikler dikkate alınmıştır. İlk hesaplamada, birden fazla pik içeren türler için (gallik asit için) piklerin tümü değil, en belirgin pik dikkate alınmıştır. Pik yükleri, piki meydana getiren antioksidan külesine bölünerek birim kütle başına antioksidan kapasiteler hesaplanmış ve hesaplanan kapasiteler gallik asit için hesaplanan yüke oranlanarak her bir antioksidanın kapasitesi gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak hesaplanmıştır. Aşağıdaki çizelge 4.6'da incelenen 8 antioksidana ait kütle, mol sayısı, yük, yük/kütle GAE olarak ve yük/mol sayısı GAE olarak verilmiştir.

Çizelge 4.6. Çalışmada kullanılan 8 antioksidana ait kütle, mol sayısı, yük, yük/kütle-GAE ve yük/mol sayısı-GAE olarak hesaplanan değerleri

Antioksidan	Kütle (g)	Mol sayısı (mol)	Yük (Q)	Yük / kütle - GAE		Yük / mol sayısı - GAE	
Gallik Asit	4.71E-04	2.50E-06	4.0553E-04	0.862		162	
Arbutin	6.81E-04	2.50E-06	1.4975E-04	0.220	0.255GA	59.9	0.369GA
BHA	4.51E-04	2.50E-06	3.3602E-04	0.746	0.865GA	134	0.829GA
BHT	5.51E-04	2.50E-06	5.9552E-05	0.108	0.125GA	23.8	0.147GA
Kumarik Asit	4.10E-04	2.50E-06	2.1713E-04	0.529	0.614GA	86.9	0.536GA
Sirincik Asit	4.95E-04	2.50E-06	3.9420E-04	0.796	0.923GA	158	0.972GA
Troloks	6.26E-04	2.50E-06	5.7854E-04	0.926	1.07GA	231	1.43GA
Vitamin C	4.40E-04	2.50E-06	1.3755E-04	0.312	0.362GA	55.0	0.339GA

Çizelde 4.6.'dan görüldüğü gibi bu şekilde yapılan hesaplamada kapasitesi en yüksek olan antioksidan troloktur.

Elektrokimyasal olarak hesaplanan antioksidan kapasitelerin diğer yöntemlerle, özellikle de klasik spektrofotometrik yöntemlerle hesaplananlarla karşılaştırılması ve bunlar arasındaki korelasyon pek çok çalışmanın konusu olmuştur (Sousa vd., 2004; Piljac-Zegarac vd., 2010; Aguirre vd., 2010; Arteaga vd., 2012; Rebelo vd., 2013; Lino vd., 2014; Glod vd., 2014). Farklı yöntemler arasındaki korelasyonu grafiksel veya sayısal olarak ifade etmek mümkündür.

Bu tez çalışmasında kapasite tayin yöntemleri olarak kullanılan spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntem ile elde edilen kapasiteler, her yöntemde en yüksek kapasite 100 kabul edilerek, diğerleri buna bağlı olarak hesaplanmış ve hesaplanan değerler aşağıda çizelge 4.7.'de gösterilmiştir. Bu çizelgede bağlı kapasitelerin yanında kapasitelerin sıralaması da gösterilmiştir.

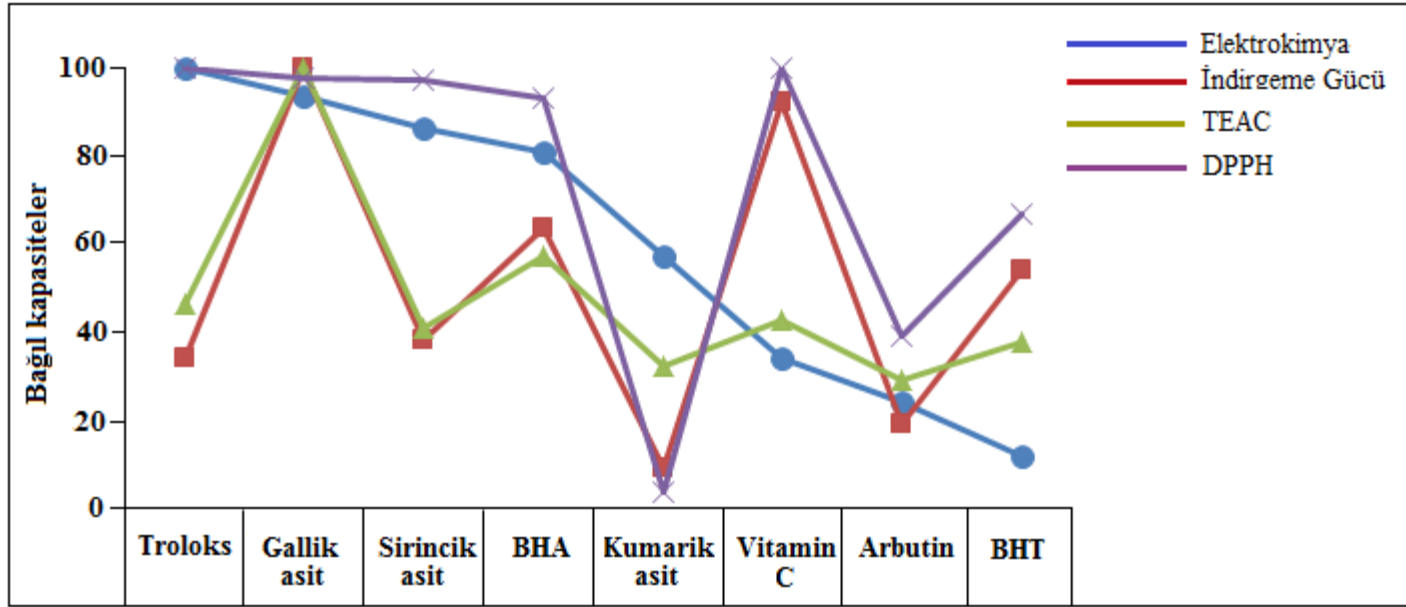
Ayrıca, bağlı kapasiteler aşağıdaki şekil 4.36.'te grafiksel olarak da gösterilmektedir.

Çizelge 4.7. Spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntem ile elde edilen bağıl kapasiteler ve kapasitelerin sıralaması

Antioksidan	Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri							
	Elektrokimya		İndirgeme Gücü		TEAC		DPPH	
	Bağıl kapasite	Sıralama	Bağıl kapasite	Sıralama	Bağıl kapasite	Sıralama	Bağıl kapasite	Sıralama
Troloks	100	1	34.0	6	46.4**	3	100	1
Gallik asit	93.3	2	100	1	100	1	97.8	3
Sirincik asit	86.1	3	38.2	5	40.9	5	97.0	4
BHA	80.7	4	63.4	3	57.1	2	93,3	5
Kumarik asit	57.3	5	9.14	8	32.3	7	3.69	8
Vitamin C	33.8	6	92.0 *	2	42.7	4	99.6	2
Arbutin	23.8	7	19.1	7	29.2	8	38.8	7
BHT	11.7	8	53.8	4	37.5	6	66.5	6

* :Standart olarak

** :Standart olarak



Şekil 4.36. Spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntem ile elde edilen bağlı kapasitelerin grafiksel gösterimi

Şekil 4.36.'e bakıldığında, elektrokimyasal yöntem ile elde edilen sonuçlar ile diğer yöntemler arasında bir korelasyon yapılamayacağı gibi bir sonuca varılmaktadır. Ancak, spektrofotometrik yöntemler kendi aralarında karşılaştırıldıklarında indirgeme gücü ve TEAC arasında, vitamin C ve kumarik asit hariç, bir korelasyonun olduğu sezilebilir.

Yukarıda, farklı antioksidanların kapasitenin sıralamasında yükseltgenme pik potansiyellerinin de dikkate alınabileceği belirtilmişti. Kaynak özetlerinde değinilen bazı çalışmalarda (Glod vd., 2014) pik potansiyelleri ile pik yüklerinin birlikte ele alındığı ve böylece elde edilen değerlerin antioksidanların kapasitelerinin hesaplanmasında çok daha uygun olduğu belirtilerek “elektrokimyasal indis” tanımı geliştirilmiştir. Pik yükleri ile hesaplanan elektrokimyasal kapasite ile diğer klasik yöntemler ile hesaplanan kapasiteler arasındaki korelasyonun çok düşük olduğu görüldüğünden (Şekil 4.36.) pik potansiyelleri, şiddetleri ve yüklerini birlikte dikkate alan elektrokimyasal indislerin hesaplanarak farklı yöntemler arasındaki karşılaştırma ve korelasyon arayışının bu hesaplama ile yapılmasının daha uygun olabileceği düşünülmüştür.

Bir antioksidan için elektrokimyasal indisler o antioksidanın diferansiyel puls voltamogramdaki bir pikin şiddetinin (amper) o pikin potansiyeline (volt) veya pik yükünün (coulomb) o pikin potansiyeline (volt) bölünerek hesaplanır. Bu hesaplamada bir diferansiyel puls voltamogramındaki en belirgin pikler veya tüm pikler dikkate alınabilir. Böylece, 4 farklı indis tanımlanmıştır. Bunlar:

(EI)₁: En belirgin pik dikkate alınarak hesaplanan şiddet / potansiyel oranı

(EI)₂: En belirgin pik dikkate alınarak hesaplanan yük / potansiyel oranı

(EI)₃: Tüm pikler dikkate alınarak hesaplanan şiddet / potansiyel oranı

(EI)₄: Tüm pikler dikkate alınarak hesaplanan yük / potansiyel oranı

İncelenen 8 antioksidana ait sadece yükün dikkate alındığı yöntem, yukarıda açıklanan şekilde hesaplanan elektrokimyasal indisler ve diğer üç spektrofotometrik yöntemle hesaplanan kapasiteler aşağıdaki çizelge 4.8.'de gösterilmiştir. Bu çizelgede her bir yöntemdeki en yüksek kapasite 100 kabul edilmiş, diğerleri buna bağlı olarak hesaplanmıştır. Tüm elektrokimyasal kapasiteler birim kütle başına hesaplanan değerlerdir. Materyal ve metot bölümünün 3.3. alt başlığında belirtilen farklı yöntemlerle elde edilen sonuçların aralarında bir korelasyon olup olmadığını araştırmak için kullanılan ve bir tür çoklu regrasyon sayılabilecek yöntemle elde edilen korelasyon katsayıları çizelge 4.8'in en alt satırında verilmiştir.

Çizelge 4.8. Spektrofotometrik yöntemler ve elektrokimyasal yöntem ile hesaplanmış bağıl antioksidan kapasiteleri*

Antioksidan	Elektro- kimya	(EI) ₁	(EI) ₂	(EI) ₃	(EI) ₄	İndirgeme Gücü	TEAC	DPPH
		En belirgin pik (I/V)	En belirgin pik (Q/V)	tüm pikler (I/V)	tüm pikler (Q/V)			
Troloks	100	100	100	100	100	33.95	46.41	100
Gallik asit	93.3	65.3	64.7	68.2	69.5	100	100	97.76
Sirincik asit	86.1	35.5	41.0	35.5	41.0	38.16	40.93	97.04
BHA	80.7	44.4	48.6	44.4	48.6	63.37	57.13	93.25
Kumarik asit	57.3	9.45	23.9	9.45	23.9	9.144	32.30	3.691
Vitamin C	33.8	28.3	45.5	28.3	45.5	92.00	42.69	99.62
Arbutin	23.8	6.24	10.0	6.24	10.0	19.08	29.20	38.80
BHT	11.7	3.34	4.76	3.34	4.76	53.77	37.46	66.54
Çoklu R		0.8338	0.8272	0.8363	0.8338	0.1194	0.5634	0.4642

*Tüm kapasiteler birim kütle başına hesaplanan kapasitelerdir.

Yukarıdaki çizelgede verilen çoklu R değerleri, elektrokimya (Q) yöntemi dışındaki yöntemlerle hesaplanan bağıl kapasitelerin elektrokimya (Q) yöntem değerleri ile arasındaki korelasyonu göstermektedir. Elektrokimya (Q) yöntem değerleri ile elektrokimyasal indis tanımları uyarınca hesaplanan değerler arasındaki korelasyonun yüksek olması şaşırtıcı olmamalıdır. Öte yandan, elektrokimya (Q) kapasite değerleri ile spektrofotometrik yöntemlerle hesaplanan kapasite değerleri arasındaki korelasyonun çok iyi olmadığı görülmektedir. Ancak, korelasyon dereceleri karşılaştırıldığında TEAC ile elektrokimya (Q) arasındaki korelasyonun en iyi olduğu görülmektedir (Çoklu R= 0.5634). Spektrofotometrik yöntemlerle hesaplanan kapasiteler kendi aralarında karşılaştırıldığında indirgeme gücü ile TEAC ve DPPH arasındaki korelasyonun oldukça yüksek (0.7329 ve 0.7011), DPPH ve TEAC arasındaki korelasyonun ise düşük (0.5511) olduğu görülmektedir.

Bu sonuçlar şaşırtıcı olmamalıdır. Literatürde bazen az veya çok sayıda numunenin antioksidan kapasitelerinin farklı yöntemlerle hesaplandığı onlarca çalışmada, farklı yöntemlerle hesaplanan bağıl antioksidan kapasitelerin sıralamasının farklı olduğu görülmektedir. Ayrıca, farklı yöntemlerle hesaplanan kapasitelerin mutlak veya bağıl değerlerinin bazen yakın, bazen de oldukça farklı olmasından ötürü yöntemler arasındaki korelasyonun kimi durumlarda iyi kimi durumlarda düşük olduğu görülmektedir. Ancak, korelasyonun yüksek olduğu ifade edilen çalışmalarda sayısal bir ölçü hemen hemen hiçbir zaman verilmemiştir.

Yukarıdaki çizelge (çizelge 4.8) elektrokimya (Q) dışındaki yöntemler ile ölçülen veya elektrokimyasal indisler olarak hesaplanan sonuçlar ile elektrokimya (Q) sonuçlarını karşılaştırmakta ve her birinin ayrı ayrı elektrokimya (Q) ile olan korelasyonunu ortaya koymaktadır. Materyal ve metot bölümünün 3.3. alt başlığında belirtilen Spearman sıralama korelasyon katsayısı yöntemi çizelge 4.8'deki tüm sonuçları sadece elektrokimya (Q) yöntemine göre değil, kendi aralarında da karşılaştırarak korelasyonun var olup olmadığını ortaya çıkaran non-parametrik bir korelasyon yöntemidir. Bu istatistik yöntem ile elde edilen korelasyon katsayıları aşağıdaki çizelge 4.9'da gösterilmiştir. $n=8$ ve $P=0.05$ için tabloda iki yönlü test için verilen kritik değer 0.738'dir. Aşağıdaki tabloda 0.738'den büyük olan korelasyon katsayıları, karşılaştırılan iki sıra arasında önemli sayılabilecek bir korelasyonun var olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.9. Elektrokimyasal ve spektrofotometrik yöntemler arasındaki korelasyonun Spearman sıralama korelasyon katsayısı yöntemi ile hesaplanan korelasyon değerleri

	Elektro- kimya	(EI)₁	(EI)₂	(EI)₃	(EI)₄	İndirgeme Gücü	TEAC	DPPH
Elektrokimya	1.000	0.834	0.827	0.836	0.833	0.119	0.563	0.464
(EI)₁ (I/V)	0.834	1.000	0.981	1.000	0.984	0.277	0.544	0.654
(EI)₂ (Q/V)	0.827	0.981	1.000	0.980	0.999	0.288	0.494	0.633
(EI)₃ (I/V)	0.836	1.000	0.980	1.000	0.983	0.293	0.566	0.655
(EI)₄ (Q/V)	0.833	0.984	0.999	0.983	1.000	0.316	0.536	0.636
İndirgeme Gücü	0.119	0.277	0.288	0.293	0.316	1.000	0.733	0.701
TEAC	0.563	0.544	0.494	0.566	0.536	0.733	1.000	0.514
DPPH	0.464	0.654	0.633	0.655	0.636	0.701	0.514	1.000

Spearman sıralama korelasyon katsayısı istatistik yöntemi ile yöntemler arasında elde edilen katsayıların gösterdiği korelasyonlar, çoklu regresyonun gösterdiği korelasyonlara çok benzemektedir. Beklendiği gibi elektrokimyasal yöntemle ortaya çıkan pikin potansiyeli, pik şiddeti ve pik yükü dikkate alınarak çeşitli şekillerde ifade edilen bağıl kapasiteler arasındaki korelasyonun çok yüksek olduğu görülmektedir (Bakınız birinci satırın 2-5 sütunlarındaki değerler).

Spektrofotometrik yöntemler kendi aralarında karşılaştırıldığında, her ne kadar kritik değer olan 0.738 aşlamamakla birlikte, özellikle indirgeme gücü-TEAC (0.733) ve indirgeme gücü-DPPH (0.701) arasındaki korelasyonun oldukça iyi olduğu görülmektedir.

Spektrofotometrik yöntemle ile elektrokimyasal yöntem veya indislerle bulunan sonuçlar arasındaki korelasyonlar karşılaştırıldığında DPPH yöntem sonuçlarının diğer iki yöntem (indirgeme gücü ve TEAC) daha yüksek bir korelasyon gösterdiği görülmektedir. Elektrokimyasal yöntem ve DPPH yöntemlerini karşılaştırmada elektrokimyasal yöntemle elde edilen tüm piklere ait toplam yük/potansiyel veya toplam şiddet/potansiyel değerleri ile ifade edilen indislerin dikkate alınmasının daha uygun olduğu görülmektedir.

5. SONUÇLAR

Giriş bölümünde söylendiği gibi: insan vücudunu serbest oksijen radikallerine karşı korumada fenolik bileşiklerce zengin meyve ve sebzelerin yararlı olduğu çok sayıda çalışmada ifade edilmektedir. Sadece polifenolik bileşikler değil vitamin C, E ve A ile bazı karotenoidlerin de antioksidan özellik gösterdiği bilinmektedir. Antioksidan kapasiteyi güçlendirmek üzere bazı besinlere sentetik antioksidanlar ilave edilmektedir.

Bir antioksidanın kapasitesini veya bir numunedeki antioksidanların toplam kapasitesini ölçmek üzere kullanılan yöntemleri avantaj ve dezavantajları her zaman tartışma konusu olmaktadır. Elektrokimyasal yöntemler gerek ölçüm için gerekli cihazların fiyatı ve elde edilebilirliği gerekse ölçüm yönteminin hızı ve kolaylığı itibarıyla dikkate alınması gereken yöntemlerdir. Elektrokimyasal yöntemler arasında özellikle diferansiyel puls voltametrisi, duyarlılığı, hızı ve kolay uygulanması bakımından tercih edilen bir yöntem olmaktadır.

Bu çalışmada 5'i doğal, 3'ü yapay 8 adet antioksidanın elektrokimyasal davranışları çevrimli voltametri ile incelenerek antioksidanın kapasitesini belirlemede daha sonra kullanılacak olan diferansiyel puls voltametrisinin çalışma koşulları belirlenmiştir. Antioksidanların diferansiyel puls voltamogramlarındaki pik veya piklerin potansiyelleri, pik şiddetleri ve pik yükleri kaydedilmiştir. Antioksidanın kapasitesini hesaplamada kullanılmak üzere, voltamogramın birinci taramasındaki en belirgin veya varsa tüm piklerin yukarıdaki parametrelerinin (potansiyel, şiddet ve yük) kullanıldığı elektrokimyasal indisler tanımlanmıştır.

Aynı antioksidanların klasik antioksidan kapasite ölçüm yöntemi olarak bilinen indirgeme gücü, TEAC ve DPPH yöntemleri kapasiteleri ölçülmüştür. Her üç yöntem spektrofotometrik ölçüm esasına dayanan yöntemlerdir.

Bir numunenin, örneğin bitki ekstraktının, farklı yöntemlerle ölçülen kapasitelerinin farklı olduğunu gösteren çok sayıda çalışma mevcuttur. Farklı yöntemler ile ölçülen toplam kapasiteler mutlak veya bağıl büyüklük olarak farklı olabilmekte veya numunelerin kapasitelerinin bağıl sıralaması yöntemden yöntem farklılık gösterebilmektedir.

Bu çalışmada elektrokimyasal yöntemle yapılan kapasite ölçümünün basit, hızlı ve kolay uygulanabildiği gösterilmiştir. Ayrıca, elektrokimyasal yöntem sonuçları ile spektrofotometrik ölçümlere dayanan üç yöntemin sonuçları karşılaştırılarak aralarında bir korelasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Elektrokimyasal yöntem ve spektrofotometrik yöntemleri karşılaştırmada en yüksek korelasyon DPPH sonuçları ile elde edilmiştir. Ayrıca, bu karşılaştırmada elektrokimyasal yöntemle elde edilen tüm piklere ait toplam yük/potansiyel veya toplam şiddet/potansiyel değerleri ile ifade edilen indislerin dikkate alınmasının daha uygun olduğu görülmüştür.

Aynı ortamda bulunan iki veya daha fazla antioksidanın, bunların toplam kapasitesi üzerindeki sinerjik etkileri maalesef incelenememiştir. Böyle bir incelemenin bu tezi daha da zenginleştireceğine kuşku yoktur.

Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde ve farklı birimlerinde özellikle bitki besin maddelerinin antioksidan kapasitelerinin belirlendiği çalışmaların yapılmakta olduğu bilinmektedir. Antioksidan kapasitenin elektrokimyasal yöntem ile belirlenmesi, yöntemin hızı ve duyarlılığı ile ve ayrıca işlemlerin basitliği ve reaktif gerektirmemesi bakımlarından tercih edilebilir bir yaklaşım olduğu ortaya konmuştur. Elektrokimyasal yöntemin bitki besin maddelerinin ve antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu bilinen meyve suları ve kırmızı şaraplar gibi numunelere uygulanması literatüre katkı yapan sonuçların ortaya çıkmasına imkan verecektir.

KAYNAKLAR

- Aguirre, M. J., Chen, Y. Y., Isaacs, M., Matsuhira, B., Mendoza, L., Torres, S. 2010. Electrochemical behaviour and antioxidant capacity of anthocyanins from Chilean red wine, grape and raspberry. **Food Chemistry**, 121(1): 44-48.
- Akkuş İ. 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- Apak R., Güçlü K., Demirata B., Ozyürek M., Celik S.E., Bektaşoğlu B., Berker K.I., Ozyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. **Molecules**, 12(7): 1496-1547.
- Apak R., Güçlü K., Ozyurek M., Karademir S.E. 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(26): 7970-81.
- Arbos, K.A., Claro, L.M. Borges, L., Santos, C.A.M., Weffort-Santos, A.M. 2008. Human erythrocytes as a system for evaluating the antioxidant capacity of vegetable extracts. **Nutrition Research**, 28(7): 457-463).
- Arnao, M.B. 2000. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food Science and Technology**, 11: 419-421.
- Arteaga, J.F., Ruiz-Montoya, M., Palma, A., Alonso-Garrido, G., Pintado, S., Rodríguez-Mellado, J.M. 2012. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. **Molecules**, 17(5): 5126-5138.
- Aruoma O.I. 2003. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 523-524: 9-20.
- Benzie, I.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power'; the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, 239(1): 70-76.
- Belscak, A., Bukovac, N., Piljac-Zegarac, J.2011. The influence of ascorbic acid and honey addition on the antioxidant properties of fruit tea infusions. **Journal of Food Biochemistry**, 35(1): 195-212.

- Blasco, A.J., Gonzalez, M.C., Escarpa, A. 2004. Electrochemical approach for discriminating and measuring predominant flavonoids and phenolic acids using differential pulse voltammetry: towards an electrochemical index of natural antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, 511(1): 71–81.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, 181: 1199-1200.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, 28(1): 25-30.
- Burda, S., Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(6): 2774-2779.
- Cadenas, E., Packer, L. 2002. Handbook of antioxidants, Second Edition Marcel Dekker, New York.
- Cao, G., Alessio, H.M., Cutler, R.G. 1993. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, 14(3): 303-311.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L. 1997. Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, 22(5): 749-760.
- Cao, G., Prior, R.L. 1999. In vivo antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology and Medicine**, 27(11-12): 1173-1181.
- Chaudiere, J., Ferrari-Iliou, R. 1999. Intracellular antioxidants: from chemical to biochemical mechanisms. **Food and Chemical Toxicology**, 37(9-10): 949-962.
- Chevion, S., Roberts M.A., Chevion, M. 2000. The use of cyclic voltammetry for the evaluation of antioxidant capacity. **Free Radical Biology and Medicine**, 28(6): 860–870.
- Cos, P., Ying, L., Calomme, M., Hu, J.P., Cimanga, K., Van Poel, B., Pieters, L., Vlietinck, A.J., Berghe, D.V. 1998. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, 61(1): 71–76.
- Curcio M., Puoci, F., Iemma, F., Parisi, O.I., Cirillo, G., Spizzirri, U.G., Picci, N. 2009. Covalent insertion of antioxidant molecules on chitosan by a free radical grafting procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 57(13): 5933–5938.

- Çöllü, Z. 2007. *Urtica Pilulifera* L. bitkisinin antioksidan aktivitesinin araştırılması. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Samsun.
- Diego,E., Agüi, L., Gonzalez-Cortes, A., Yanez-Sedeno,P., Pingarron, J.M., Kauffmann, J. 1998. Critical comparison of paraffin carbon paste and graphite-poly(tetrafluoroethylene) composite electrodes concerning the electroanalytical behavior of various antioxidants of different hydrophobicity. **Electroanalysis**, 10(1): 33-38.
- Dubeau, S., Samson, G., Tajmir-Riahi, H.A. 2010. Dual effect of milk on the antioxidant capacity of green, Darjeeling, and English breakfast teas. **Food Chemistry**, 122(3): 539–545.
- Durmaz, G. 2002. Kayısı meyvesinin ve kavrulmuş kayısı çekirdeğinin antioksidan özellikleri. İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Malatya.
- Eken, S. 2007. Bazı materyallerde antioksidan tayinleri. Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Frankel, E.N., Meyer, A.S. 2000. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80(13): 1925-1941
- Glod, B. K., Kiersztyn, I., Piszcz, P. 2014. Total antioxidant potential assay with cyclic voltammetry and/or differential pulse voltammetry measurements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 719: 24-29.
- Görünmezoğlu, Ö. 2008. Kayısı ve incir meyvelerinin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Aydın.
- Halliwell, B. 1990. How to characterise a biological antioxidant. **Free Radical Research Communication**, 9(1): 1-32.
- Halliwell, B., Aruoma O.I. 1991. DNA damage by oxygen-derived species: Its mechanisms and measurement in Mammalian systems. **FEBS Letters**, 281(1-2): 9-19.
- Halliwell, B., Aruoma. O.I. 1998. Free radicals and antioxidants: The need for in vivo markers of oxidative stress. **Journal of American Oil Chemistry Society**, 75(2): 199–212.
- Halliwell, B. 2001. Food-Derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo. Handbook of Antioxidants, 690 p., Los Angeles.

- Halvorsen, B.L., Holte, K., Myhrstad, M.C., Barikmo, I., Hvattum, E., Remberg, S.F., Wold, A.B., Haffner, K., Baugerqd, H., Andersen, L.F., Moskaug, Q., Jacobs, D.R.Jr., Blomhoff, R. 2002. A systematic screening of total antioxidants in dietary plants. **The Journal of Nutrition**, 132(3): 461-471.
- Hatano, T., Edamatsu, R., Mori, A., Fujita, Y., Yasuhara, E. 1989. Effect of interaction of tannins with co-existing substances. VI. Effects of tannins and related polyphenols on superoxide anion radical and on DPPH radical. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 37: 2016–2021.
- Heim, K.E., Tagliaferro, R.A., Bobilya, D.J. 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, 13(10): 572-584.
- Henden, E., Gökçel, H.İ., Ertaş, F.N. 2001. Eser Analiz Yaz Okulu. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim Dalı, pp. 151-160, İzmir.
- Hongyu, Z. 1999. Theoretical elucidation of structure-activity relationship of flavonoid antioxidants. **Science in China**, 42(1): 106-112.
- Horwitt, M.K. 1986. Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin-tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B- 6. **American Journal of Clinical Nutrition**, 44(6): 973-985.
- Huang D., Ou B., Prior R.L. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(6): 1841-1856.
- Hudson, B.J. 1990. Food antioxidants, Elsevier Science, USA
- Kahkönen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M. 1999. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 47(10): 3954-3962.
- Kaur, C., Kapoor, H.C. 2001. Antioxidants in fruits and vegetables—the millennium's health. **International Journal of Food Science and Technology**, 36(7): 703–725.
- Kılınç, K., Kılınç, A. 2002. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. **Hacettepe Tıp Dergisi**, 33(2): 110-118.
- Koleva, I.I., van Beek, T.A., Linssen, J.P.H., de Groot, A., Evstatieva, L.N. 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, 13(1): 8-17.

- Korotkova, E.I., Karbainov, Y.A., Shevchuk, A.V. 2002. Study of antioxidant properties by voltammetry. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 518(1): 56–60
- Korotkova, E.I., Karbainov, Y.A., Avramchik, O.A. 2003. Investigation of antioxidant and catalytic properties of some biologically active substances by voltammetry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 375(3): 465–468
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R., Nithyanandam, R. 2011. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, 89(3): 217-233.
- Lino, F.M.A., de Sa, L.Z., Torres, I.M.S., Rocha, M.L., Dinis, T.C.P., Ghedini, P.C., Somerset, V.S., Gil, E.S. 2014. Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines. **Electrochimica Acta**, 128: 25–31.
- Lussignoli, S., Fraccaroli, M., Andrioli, G., Brocco, G., Bellavite, P. 1999. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma. **Analytical Biochemistry**, 269(1): 38–44.
- Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L. 2008. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, 613(1): 1–19.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, 84(4): 407-412.
- Miller, J.N., Miller, J.C. 2000. Statistics and chemometrics for analytical chemistry, fourth edition. Pearson education.
- Nişli, G., Yenigül, B., Ertaş, F.N. 2012. II. Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu. Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Çanakkale.
- Nomura, T., Kikuchi, M., Kubodera, A., Kawakami, Y. 1997. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthin with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). **Biochemistry and Molecular Biology International**, 42(2): 361-370.
- Osman, A.M., Wong, K.K., Hill, S.J., Fernyhough, A. 2006. Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 340(2): 597-603.

- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: A comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(11): 3122-3128.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: oxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, 44(6): 307-315.
- Ozcelik, B., Lee, J.H., Min, D.B. 2003. Effects of light, oxygen, and pH on the absorbance of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. **Journal of Food Science**, 68(2): 487-490.
- Pannala, A.S., Chan, T.S., O'Brien, P.J., Rice-Evans, C.A. 2001. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: Fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 282(5): 1161-1168.
- Perez-Jimenez, J., Arranz, S., Taberner, M., Diaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goni, I., Saura-Calixto, F. 2008. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. **Food Research International**, 41(3): 274-285.
- Peterson, J., Dwyer, J. 1998. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, 18(12): 1995-2018.
- Peyrat-Maillard, M.N., Cuvelier, M.E., Berset C. 2003. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) Dihydrochloride (AAPH)- Induced Oxidation: Synergistic and antagonistic effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 80(10): 1007-1012.
- Piljac-Zegarac, J., Valek, L., Stipcevic, T., Martinez, S. 2010. Electrochemical determination of antioxidant capacity of fruit tea infusions. **Food Chemistry**, 121(3): 820-825.
- Prior, R.L., Cao, G. 2000. Analysis of botanicals and dietary supplements for antioxidant capacity. a review. **Journal of AOAC International**, 83(4): 950-956.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 53(10): 4290-4302.
- Ratnam, D.V., Ankola, D.D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M.N. 2006. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, 113(3): 189-207.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, 26(9-10): 1231-1237.
- Rebello, M. J., Rego, R., Ferreira, M., Oliveira M.C. 2013. Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods. **Food Chemistry**, 141(1): 566-573.
- Rice-Evans, C.A., Diplock, A.T., Symons, M.C.R. 1991. Techniques in free radicals research. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier, Amsterdam.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, 20(7): 933-956.
- Rice-Evans, C., Miller, N., Paganga, G. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, 2(4): 152-159.
- Saha, K., Lajis, N.H., Israf, D.A., Hamzah, A.S., Khozirah, S., Khamisa, S., Syahida, A. 2004. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 92(2-3): 263-267.
- Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D. 1992. Phenolic antioxidants. **Critical Review of Food Science and Nutritional**, 32: 67-103.
- Shahidi, F. 1996. Natural antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications, AOCS Press, Champaign, IL.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, 299: 152-178.
- Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay Z., Nagy, G. 2007. Antioxidant measurements. **Physiological. Measureent**, 28(4): R41-R55.
- Sousa, W.R., da Rocha, C., Cardoso, C.L., Silva, D.H.S., Maria Valnice B. Zanoni, M.V.B. 2004. Determination of the relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. **Journal of Food Composition and Analysis**, 17(5): 619-633
- Stratil, P., Klejdus, B., Kuban, V. 2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables- evaluation of spectrophotometric methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54(3): 607-616.

- Tabart, J., Kevers, C., Pincemail, J., Defraigne, J.O., Dommes, J. 2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chemistry**, 113(4): 1226–1233.
- Tanaka, M., Kuei, C.W., Nagashima, Y., Taguchi, T. 1988. Application of antioxidative Maillard reaction products from histidine and glucose to sardine products. **Nippon Suisan Gakkaishi**, 54(8): 1409–1414.
- Temür, N.2006. Çam, kavak, söğüt ve armut ağaçları üzerinde yetişen ökse otu (viscumalbum L.) bitkilerinin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Tokat.
- 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(6-7): 669-675.
- Tudhope, G.R. 1967. Red cell catalase in health and in disease, with reference to the enzyme activity in anaemia. **Clinical Science**, 33(1): 165–182.
- Tural, H., Gökçel, H.İ., Ertaş, F.N. 2006. Enstrümental Analiz I Elektroanalitik Yöntemler. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Yayınları, pp.194-197, İzmir.
- van den Berg, R., Haenen, G.R.M.M., van den Berg, H., Bast, A. 1999. Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, 66(4): 511-517.
- Villano, D., Fernandez-Pachon, M.S., Moya, M.L., Troncoso, A.M., Garcia-Parrilla, M.C. 2007. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, 71(1): 230–235.
- Yanbeyi, S. 1999. Aspirin ve antioksidant buthylated hydroxyanisole'ün tavşanlarda eritrosit total katalaz, süperoksit dismutaz ve glutatyon peroksidaz aktiviteleri üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Biyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun.
- Yıldız, L. 2007. bazı bitki örneklerinde antioksidan kapasitenin spektrofotometrik ve kromatografik tayini. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.
- Young, A.J., Lowe, G.M. 2001. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 385(1): 20–27.
- Young, I.S., Woodside, J.V. 2001. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, 54(3): 176-186.

Wayner, D.D., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S. 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capability of human-blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma-proteins. **FEBS Letters**, 187(1): 33-37.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Fatma Merve NACAK

Doğum Yeri ve Tarihi : Seyitgazi / 11.07.1988

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, 2007-2012

Yüksek Lisans Öğrenimi : Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı, 2012-2014

Bildiği Yabancı Diller : İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Makaleler

Mihrican Muti, Kübra Gençdağ, Fatma Merve Nacak, Alican Aslan, Colloids Surfaces B. Biointerfaces 106 (2013), 181-6.

b) Bildiriler

c) Katıldığı Projeler

Elektrokimyasal Yöntemlerle Antioksidan Kapasite Tayini Ve Klasik Yöntemlerle Karşılaştırılması, BAP Projesi, FEF 14024, 2014.

İLETİŞİM

E-posta Adresi : fmervenacak@gmail.com

Tarih :