

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

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

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

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

Prof. Dr. Serap AÇIKGÖZ
Enstitü Müdürü

İNTİHAL BEYAN SAYFASI

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

Adı Soyadı : Asiye ARDAĞ

İmza :

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİNİN ANALİTİK AÇIDAN KARŞILAŞTIRILMASI

Asiye ARDAĞ

Adnan Menderes Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

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

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

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

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

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

ABSTRACT

M. Sc. Thesis

**ANALYTICAL COMPARISON OF
ANTIOXIDANT CAPACITY DETERMINATION METHODS**

Asiye ARDAĞ

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

Supervisor: Prof. Dr. A. Ersin KARAGÖZLER

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

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

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

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

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

ÖNSÖZ

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

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

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

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

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

Asiye ARDAĞ

İÇİNDEKİLER

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

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

SİMGELER DİZİNİ

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

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

ÇİZELGELER DİZİNİ

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