İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLOROMETRİK BİR ANTİOKSİDAN TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI

DOKTORA TEZİ

Dilek ÖZYURT

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

MAYIS 2014

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLOROMETRİK BİR ANTİOKSİDAN TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI

DOKTORA TEZİ

Dilek ÖZYURT

(509042207)

Kimya Anabilim Dalı

Kimya Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK

MAYIS 2014

İTÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün 509042207 numaralı Doktora Öğrencisi **Dilek ÖZYURT**, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı **"FLOROMETRİK BİR ANTİOKSİDAN TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI"** başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK** …….....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Reşat APAK** .....
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Gülçin YILMAZ .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Süleyman AKMAN .....
İstanbul Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. İkbal KOYUNCU .....
Yıldız Teknik Üniversitesi

Teslim Tarihi : 09 Nisan 2014

Savunma Tarihi : 05 Mayıs 2014

Anneme ve Babama,

ÖNSÖZ

Bilimsel, akademik ve insani kimliğiyle örnek aldığım doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Birsen Demirata ÖZTÜRK'e tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez izleme Komitemde yer alan çok kıymetli hocalarım Sayın Prof. Dr. Reşat APAK'a ve Sayın Doç.Dr. Gülçin YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma boyunca büyük bir özveri ile bana yardımcı olan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş.Gör. Dr. K. Işıl BERKER ÇETİN, Arş.Gör. F. Ayça ÖZDEMİR OLGUN'a ve analitik kimya bölümündeki arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Akademik hayatıma başladığım günden itibaren beni cesaretlendiren, maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli Annem Safiye ÖZYURT, Babam Saffet ÖZYURT ve kardeşlerim Yakup, Melek, Mesut ve Seda ÖZYURT'a canı gönülden teşekkür ederim.

Son olarak tezimle aynı adı taşıyan 32432 numaralı doktora tez projesine destek sağlayan İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne ve Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına teşekkür ederim.

Nisan 2014

Dilek ÖZYURT

(Yüksek Kimyager)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **vii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
KISALTMALAR ..... **xiii**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xvii**
FLOROMETRİK BİR ANTİOKSİDAN TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI ..... **xxi**
ÖZET ..... **xxi**
SUMMARY ..... **xxv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİ **5**
2.1 Antioksidanlar 5
2.2 Antioksidanların Sınıflandırılması 6
2.2.1 Kimyasal bileşimlerine göre 6
2.2.1.1 Fenolik yapıdaki antioksidanlar 6
2.2.1.2 Aromatik amino antioksidanlar ve organik sülfür bileşikleri 6
2.2.2 Etki mekanizmalarına göre 7
2.2.2.1 Birincil ya da zincir parçalayan antioksidanlar 7
2.2.2.2 İkincil Antioksidanlar 7
2.2.3 Kaynağına göre 7
2.2.3.1 Doğal antioksidanlar 7
2.2.3.2 Sentetik antioksidanlar 13
2.3 Antioksidanların Etki Mekanizmaları ve Antioksidan Kapasiteye Etki Eden Faktörler 16
2.4 Literatürdeki Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri 18
2.4.1 Hidrojen atom transferi esaslı yöntemler 18
2.4.1.1 TRAP (toplam peroksil radikal tutma antoksidan parametresi) yöntemi 19
2.4.1.2 Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) yöntemi 20
2.4.1.3 Luminol yöntemi 21
2.4.1.4 ORAC (oksijen radikal absorbans kapasitesi) yöntemi 21
2.4.2 Elektron transfer esaslı yöntemler 24
2.4.2.1 ABTS/ TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi) yöntemi 24
2.4.2.2 ABTS/ H_2O_2/ horseradish peroksidaz (HRP) yöntemi 25
2.4.2.3 DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi 25
2.4.2.4 FRAP (demir (III) indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi 26
2.4.2.5 Fe(III)-Ferrozin yöntemi 27
2.4.2.6 SDS Katkılı pH belli Ferrisiyanür Yöntemi 27
2.4.2.7 CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi 28
2.4.2.8 CERAC (seryum(IV) indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi 29
2.4.2.9 Folin-Ciocalteu yöntemi 29
2.5 Floresans Ölçümüne Dayalı Antioksidan Tayin Yöntemleri 30
2.6 Literatürde Ce(IV) ve Ce(III) Reaktifi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar 30

2.7 Lüminesans Spektroskopisi 34
2.7.1 Fotolüminesans 35
2.7.2 Fotolüminesası etkileyen faktörler 36
2.7.2.1 Yapısal Faktörler 36
2.7.2.2 Yapısal rijidite 37
2.7.2.3 Sıcaklık ve viskozite 37
2.7.2.4 Çözücü 37
2.7.2.5 pH 37
2.7.3 Moleküler floresans spektroskopisi 38
2.7.4 Floresans şiddeti ile derişim arasındaki ilişki 39
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR 43
3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler 43
3.2 Kullanılan Örnekler 43
3.2.1 Poşet çay örnekleri 43
3.2.2 Bitki çay örnekleri 43
3.2.3 Üzüm örnekleri 44
3.3 Kullanılan Cihazlar 44
3.4 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 44
3.4.1 CERAC, modifiye CERAC ve spectroflorometrik CERAC yöntemi çözeltilerinin hazırlanması 44
3.4.2 CUPRAC yöntemi çözeltilerinin hazırlanması 44
3.4.3 SDS katkılı ve pH'sı belirli modifiye Fe(III)-ferrisiyanür yöntemi çözeltilerinin hazırlanması 45
3.4.4 Folin-Ciocalteu yöntemi çözeltilerinin hazırlanması 45
3.4.5 Kullanılan antioksidan çözeltilerinin hazırlanması 45
3.4.6 Bitki çayı örneklerinin hazırlanması 45
3.4.6.1 Bitki çayı infüzyonlarının hazırlanması 45
3.4.6.2 Bitki çayı ekstraktlarının hazırlanması 46
3.4.7 Üzüm örneklerinin hazırlanması 46
3.5 Kullanılan Yöntemler 47
3.5.1 CERAC yöntemi 47
3.5.2 Modifiye CERAC yöntemi 48
3.5.3 Spektroflorometrik CERAC yöntemi 48
3.5.4 SDS katkılı ve pH'sı belirli modifiye Fe(III)-ferrisiyanür yöntemi 49
3.5.5 Folin-Ciocalteu yöntemi 50
3.6 İstatistiksel Analiz 50
4. DENEYSEL BULGULAR 51
4.1 Modifiye CERAC Yöntemi 51
4.1.1 Optimum deney koşullarının belirlenmesi 51
4.1.1.1 Ce(IV)'ün absorbansına ve dalgaboyuna asit etkisi 53
4.1.1.2 Sodyum sülfat iyonlarının Ce(IV)'ün maksimum dalgaboyuna ve absorbansına etkisi 53
4.1.1.3 Sitrik asit'in Ce(IV)'ün absorbansına etkisi 56
4.1.1.4 Ce(IV) ile sitrik asit etkileşimine sodyum sülfat iyonlarının etkisi. 57
4.1.1.5 Ce(IV) ile kuersetin etkileşimine sodyum sülfat iyonlarının etkisi 58
4.1.1.6 Ce(IV) ile kuersetin etkileşimine sitrik asitin etkisi 60
4.1.2 Antioksidan bileşiklerin kalibrasyon grafikleri 61
4.1.3 Sentetik karışımların analizi 66
4.1.4 Bitki ekstrelerine standart katkı yönteminin uygulanması 66
4.1.5 Modifiye CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımın belirlenmesi 67
4.1.6 İnterfere edici maddelerin etkisi 68

4.2 Spektroflorometrik CERAC Yöntemi 69
4.2.1 Uyarılma ve emisyon spektrumlarının çizimi 69
4.2.2 Ce(III)' ün kalibrasyon grafiği 69
4.2.3 Ce(III)'ün dalgaboyuna ve emisyon şiddetine asit etkisi 70
4.2.4 Sodyum sülfat iyonlarının Ce(III)'ün maksimum dalgaboyuna ve emisyon şiddetine etkisi 71
4.2.5 Spektroflorometrik CERAC yöntemi için optimum deney koşullarının belirlenmesi 72
4.2.5.1 Ce(IV) ile sitrik asit etkileşimine asit etkisi 72
4.2.5.2 Ce(IV) ile sitrik asit etkileşimine sodyum sülfat iyonlarının etkisi 73
4.2.5.3 Ce(IV) ile kuersetin reaksiyonuna asit ve sodyum sülfat iyonlarının etkisi 75
4.2.6 Spektroflorometrik titrasyon 78
4.2.6.1 Ce(IV)'ün antioksidanlarla titrasyonu 78
4.2.6.2 Antioksidanların Ce(IV) ile titrasyonu 79
4.2.7 Antioksidan-Ce(IV)'ün stokiyometrik oranlarının bulunması 80
4.2.8 Sentetik karışımların analizi 87
4.2.9 Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yönteminin toplamsallık testi 88
4.2.10 Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımın belirlenmesi 89
4.2.11 İnterferans çalışmaları 89
4.3 Geliştirilen Spektroflorometrik Yöntemin Gerçek Örneklere Uygulanması 92
4.3.1 Bitki çayı örnekleri 92
4.3.2 Üzüm örnekleri 96
4.3.3 Kuşburnu örnekleri 97
5. SONUÇLAR 101
5.1 Modifiye CERAC Yöntemi 101
5.2 Geliştirilen Spektroflorometrik CERAC Yöntemi 105
5.3 Gerçek Örneklere Uygulamaları 110
KAYNAKLAR 113
ÖZGEÇMİŞ 121

KISALTMALAR

AA : Askorbik asit
AO : Antioksidan
ABTS : 2,2'- azinobis(3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonat)
$ABTS^{\cdot+}$: ABTS radikal katyonu
ABTS/TEAC : Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
BHA : Bütillenmiş hidroksianisol
BHT : Bütillenmiş hidroksitoluen
CAT : Kateşin
CERAC : Seryum (IV) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
CFA : Kafeik asit
CL : Kemilüminesans
CUPRAC : Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite
Cys : Sistein
DNA : Deoksiribonükleik asit
DPPH : 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ET : Elektron transferi
FCR : Folin-Ciocalteu reaktifi
FLR : Florometrik
FRA : Ferulik asit
FRAP : Demir(III) iyonu indirgetici antioksidan gücü
GA : Gallik asit
GSH : Glutatyon (indirgenmiş hali)
HAT : Hidrojen atomu transferi
LOD : Gözlenebilme sınırı (Limit of detection)
LOQ : Tayin Sınırı (Limit of quantitation)
Nc : Neokuproin
NG : Naringin
NGN : Naringenin
ORAC : Oksijen radikal absorbans kapasitesi

QR **:** Kuersetin

RNS **:** Reaktif azot türleri

ROS **:** Reaktif oksijen türleri

RT **:** Rutin

SDS **:** Sodyum dodesil sülfat

TAC **:** Toplam antioksidan kapasite

TBHQ **:** Tersiyer bütilhidrokinon

TEAC **:** Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi

TR **:** Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetra methilkhroman-2-karboksilik asit)

TRAP **:** Toplam peroksil radikal tutma antoksidan parametresi

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Flavonoidlerin sınıflandırılması, adları, sübstitüsyon modelleri ve gıda kaynakları. 12
Çizelge 2.2 : Antioksidanların sınıflandırılması. 15
Çizelge 4.1 : 0,30 M H_2SO_4 ve 0,70 M Na_2SO_4 optimum deney koşullarında $2{,}0\times10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisine sitrik asit etkisi (λ_{mak}=320 nm). 56
Çizelge 4.2 : Na_2SO_4/ H_2SO_4 içeren $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) (λ_{mak}=320 nm, A=1,00) çözeltileri üzerine katılan $2{,}0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit'in etkisi. 58
Çizelge 4.3 : 0,01 M – 0,3 M H_2SO_4'li ortamda $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 derişiminin Ce(IV)'ün başlangıç absorbansına etkisi (λ_{mak}=320 nm). 59
Çizelge 4.4 : 0,01 M– 0,3 M H_2SO_4'li ortamda $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)+ $1{,}5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 derişiminin Ce(IV)'ün başlangıç absorbansına etkisi (λ_{mak}=320 nm). 60
Çizelge 4.5 : Kuersetin'in molar absorpsiyon katsayısı (λ_{mak}=320 nm) ve TEAC değerlerinin hesaplanması ($C_{trolox} = 8{,}0 \times 10^{-5}$; $\varepsilon_{trolox} = 1{,}38 \times 10^{4}$). 62
Çizelge 4.6 : Gıda antioksidanlarının modifiye CERAC yöntemi ile elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri, molar absorplama katsayıları (ε), lineer çalışma aralıkları, gözlenebilme (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri. 64
Çizelge 4.7 : Gıda antioksidan bileşiklerinin, modifiye CERAC ve literatürdeki diğer TAC yöntemlerinin TEAC değerleri. 65
Çizelge 4.8 : Antioksidan bileşiklerin üçlü sentetik karışımlarının modifiye CERAC yöntemi ile mM Troloks eşdeğeri cinsinden beklenen ve bulunan TAC'leri. 66
Çizelge 4.9 : Modifiye CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı (N=5). 68
Çizelge 4.10 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisine benzoik asit, asetil salisilik asit ve sakkaroz çözeltilerinin etkisi. 68
Çizelge 4.11 : Gıda ve plazma antioksidanlarının spektroflorometrik CERAC yöntemi ile elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri, eğim katsayıları (ε'), lineer çalışma aralıkları, gözlenebilme ve tayin sınırı değerleri. 84
Çizelge 4.12 : Gıda ve plazma antioksidanlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemiyle çizilen titrasyon eğrilerinden belirlenen stokiyometrik mol oranları. 85
Çizelge 4.13 : Gıda ve plazma antioksidanlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC ve diğer TAC yöntemlerine göre TEAC katsayıları. 86
Çizelge 4.14 : Antioksidan bileşiklerin ikili, üçlü ve dörtlü sentetik karışımlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemi ile mM Troloks eşdeğeri cinsinden beklenen ve bulunan TAC değerleri. 87

Çizelge 4.15 : Spektroflorometrik CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı (N= 5). 89
Çizelge 4.16 : Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemine çeşitli bileşiklerin girişim etkileri (N=3). 90
Çizelge 4.17 : 1,00 × 10^{-5} M Troloks'un geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemi ile analizinde çeşitli bileşiklerin girişim etkileri (N=3). 91
Çizelge 4.18 : Bitki çayı infüzyonlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC, CUPRAC, Ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemlerine göre TAC değerleri (mmol TR/ g örnek). 94
Çizelge 4.19 : Bitki çayı ekstraktlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC, CUPRAC, Ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemlerine göre TAC değerleri (mmol TR/ g örnek). 95
Çizelge 4.20 : Üzüm ve şarap ekstraktlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC, Modifiye CERAC, CUPRAC ve Modifiye Ferrisiyanür/ prusya mavi yöntemlerine göre mmol TR/ g eşdegeri cinsinden TAC değerleri. 97
Çizelge 4.21 : Üç farklı yöntemle ile hazırlanan kımızı renkli kuşburnu bitkisinin (İstanbul) meyve ve çekirdek kısımlarının TAC kıyaslanması. 98
Çizelge 4.22 : İstanbul ve Mersin yöresinden toplanan farklı renklerdeki ve olgunluklardaki çekirdeksiz kuşburnu meyvesinin TAC'lerinin kıyaslanması. 99

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Tokoferollerin ve Troloks'un yapısal formülleri. 9
Şekil 2.2 : Askorbik asidin yapısal formülü. 10
Şekil 2.3 : β – Karotenin yapısal formülü. 10
Şekil 2.4 : Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı. 10
Şekil 2.5 : Flavonoidlerin sınıflandırılması. 11
Şekil 2.6 : Fenolik asitlerin kimyasal yapıları. 13
Şekil 2.7 : Sentetik antioksidanların kimyasal yapıları. 14
Şekil 2.8 : Flavonoidlerin antioksidan kapasitelerine kimyasal yapılarının etkisini gösteren kimyasal yapı. 17
Şekil 2.9 : ORAC yöntemiyle antioksidanın koruyucu etkisinin, floresans bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alandan hesaplanması (Büyüktuncel, 2013). 23
Şekil 2.10 : ORAC yönteminin şematik prensip diyagramı. 23
Şekil 2.11 : ABTS ile persülfat arasındaki reaksiyon neticesinde oluşan ABTS radikalinin antioksidan bileşik ile etkileşimi. 25
Şekil 2.12 : $DPPH^{\cdot}$ radikalinin antioksidanlarla etki mekanizması. 26
Şekil 2.13 : FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim. 27
Şekil 2.14 : Ferrozin reaktifinin antioksidanlarla etki mekanizması. 27
Şekil 2.15 : Cu(I)-Nc kompleksinin (kelatının) kimyasal yapısı. 29
Şekil 2.16 : Ce(IV)-GSH-kinin CL reaksiyon mekanizması. 32
Şekil 2.17 : Bir molekülün singlet, uyarılmış singlet ve uyarılmış triplet halleri. 34
Şekil 2.18 : UV veya görünür bölge ışınını absorplayabilen bir moleküle ait enerji düzeyi diyagramı (Jablonski enerji diyagramı) (Url-1, 2014). 35
Şekil 2.19 : Spektroflorometrenin temel bileşenlerinin şematik olarak görünümü. 38
Şekil 2.20 : Bir molekül için uyarma ve floresans veya fosforesans spektrumları (Ersöz, 2010). 41
Şekil 3.1 : Ce(IV), kuersetin ve Ce(IV) + kuersetin çözeltilerinin referans saf suya karşı absorpsiyon spektrumları. 48
Şekil 4.1 : (A); Ce(III) ve (B); Ce(IV)'ün SO_4^{-2} ile kompleks iyonlarının tür dağılım grafiği (Fang ve diğ, 2002). 52
Şekil 4.2 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) spektrumuna H_2SO_4 derişiminin etkisi. 53
Şekil 4.3 : H_2SO_4 derişimi 0,01 M olan $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisinin maksimum dalgaboyuna 0,10 M – 0,90 M Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi. 54
Şekil 4.4 : H_2SO_4 derişimi 0,025 M olan $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisinin maksimum dalgaboyuna 0,10 M – 0,90 M Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi. 55
Şekil 4.5 : 0,05 M – 0,30 M H_2SO_4 derişim aralığında hazırlanan $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltilerinin absorbansına Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi (λ_{mak}=320 nm). 56

Şekil 4.6 : 0,01 M – 0,30 M sülfürik asit içeren $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $2,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit karışımına 0,10 M - 0,80 M Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi (λ_{mak}=320 nm). 57
Şekil 4.7 : 0,01 M – 0,3 M H_2SO_4'li ortamda $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1,0 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 derişiminin etkisi (λ_{mak}=320 nm). 59
Şekil 4.8 : 0,01 M - 0,30 M H_2SO_4 içeren $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1,5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımının 320 nm deki absorbansına Na_2SO_4 derişiminin etkisi. 60
Şekil 4.9 : Ce(IV) - kuersetin etkileşimine sitrik asitin etkisi. 61
Şekil 4.10 : QR, TR, RT, GA, CAT, NG, NGN, CFA, FRA ve AA derişim absorbans grafikleri (λ_{mak}=320 nm). 63
Şekil 4.11 : Isırgan otu ve kuşburnu ekstraktları ile kuersetin çözeltisinin etkileşimi. 67
Şekil 4.12 : 0,3 M H_2SO_4 ortamında Ce(III) ve Ce(IV) çözeltilerinin uyarılma ve emisyon spektrumları. 70
Şekil 4.13 : $5,0 \times 10^{-6}$ M – $2,0 \times 10^{-4}$ M derişim aralığındaki Ce(III) çözeltisinin kalibrasyon grafiği. 70
Şekil 4.14 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(III) çözeltisinin maksimum emisyon ve uyarılma dalgaboyuna H_2SO_4 çözeltisinin etkisi. 71
Şekil 4.15 : H_2SO_4 derişimi 0,30 M olan $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(III) çözeltisinin maksimum emisyon dalgaboyuna 0,05 M - 0,90 M Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi. 72
Şekil 4.16 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)+ $1,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit karışımına 0,05 M - 0,30 M H_2SO_4 çözeltilerinin etkisi. 73
Şekil 4.17 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)'e $1,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit etkisinin Na_2SO_4 ile giderilmesi (0,05 M H_2SO_4). 74
Şekil 4.18 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)'e $1,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit etkisinin Na_2SO_4 ile giderilmesi (0,1 M H_2SO_4). 74
Şekil 4.19 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)'e $1,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit etkisinin Na_2SO_4 ile giderilmesi (0,2 M H_2SO_4). 75
Şekil 4.20 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)'e $1,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit etkisinin Na_2SO_4 ile giderilmesi (0,3 M H_2SO_4). 75
Şekil 4.21 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1,0 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına H_2SO_4 etkisi. 76
Şekil 4.22 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1,5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 etkisi (0,05 M H_2SO_4). 76
Şekil 4.23 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1,5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 etkisi (0,1 M H_2SO_4). 77
Şekil 4.24 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1,5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 etkisi (0,2 M H_2SO_4). 77
Şekil 4.25 : $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1,5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 etkisi (0,3 M H_2SO_4). 78
Şekil 4.26 : $1,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)'ün troloks ile titrasyon eğrisi. 79
Şekil 4.27 : $2,0 \times 10^{-5}$ M troloks'un Ce(IV) ile titrasyon eğrisi. 80
Şekil 4.28 : Sabit derişimdeki Ce(IV) çözeltilerinin flavonoidler (QR, RT, CAT, NGN, NG) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm). 81
Şekil 4.29 : Sabit derişimdeki Ce(IV) çözeltilerinin fenolik asitler (GA, CFA, FRA) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm). 82
Şekil 4.30 : Sabit derişimdeki Ce(IV) çözeltilerinin vitaminler (AA, TR) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm). 82

Şekil 4.31 : Sabit derişimdeki Ce(IV) çözeltilerinin tiyol yapılı antioksidanlar (Cys, GSH) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm)..... 83
Şekil 4.32 : QR, RT, GA, Cys, CAT, NGN, NG, CFA, AA, FRA, GSH ve TR çözeltilerinin Ce(IV) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm). 83
Şekil 4.33 : Spektroflorometrik CERAC yöntemi ile yeşil çay, ada çayı ve ıhlamur çayı infüzyonları içinde troloks katkısının kalibrasyon doğrusu. 88

FLOROMETRİK BİR ANTİOKSİDAN TAYİN YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ VE UYGULAMALARI

ÖZET

Antioksidanlar, reaktif oksijen, nitrojen ve serbest radikaller gibi hastalıklara neden olan türler ile reaksiyona giren sağlığa yararlı bileşiklerdir. Bitki, meyve ve sebzeler antioksidan içeriği (vitaminler, fenolikler, hidrosinnamik asitler, falavonoidler, karotenoidler ve antosiyonin gibi) zengin gıdalardır. Beslenmemizde antioksidanca zengin meyve ve sebzelerin tüketimi, vücut hücrelerindeki DNA ve protein yapısının bozulmasını, lipit peroksidasyonunu, kanser, kalp hastalıkları, yaşlanmaya ve inflamatuar hastalıkların oluşumunu, engellemede en etkili yollardan biridir.

Antioksidanların kimyasal çeşitliliği, sebze, meyve ve bitki çay matrikslerinden ayrılmalarını ve miktarlarının tayinini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, sebze ve meyve ekstraktlarından toplam antioksidan kapasitenin (TAC) doğrudan analiz edilebileceği yöntemlerin geliştirilmesi günümüz çalışmalarında önemli yer teşkil etmektedir. TAC, karmaşık bir örnekteki tüm antioksidanların antioksidan kapasitelerinin toplamsallığını yansıtan entegre bir parametredir. Toplam antioksidan kapasitenin (reaksiyon termodinamiğine veya dönüşüm verimliliğine dayalı) veya aktivitenin (reaksiyon kinetiğine dayalı) ölçülebilmesi için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir. TAC yöntemleri, elektron transferine (ET), hidrojen atom transferine (HAT) ve ET/HAT transferine dayanan yöntemler olmak üzere üçe ayrılırlar ayrılırlar. ET'ne dayanan yöntemler;, FCR (Folin-Ciocalteu reaktif) yöntemi, FRAP (Demir iyonu indirgeyici antiosidan güç), CERAC (Seryum (IV) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) ve CUPRAC (Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemleridir. ABTS/TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasite), DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemleri ise ET/HAT transferine dayanan yöntemlerdir. Genellikle, ET esaslı yöntemler, HAT esaslı yöntemlere kıyasla daha pratik ve geniş kullanım alanına sahiptir. Çünkü bu yöntemler, ucuz, daha az zahmetli ve basit laboratuar cihazları gerektiren ve doğal ürünlerin rutin analizleri için yaygın bir şekilde kullanılan yöntemlerdir. Ancak, ET dayalı yöntemlerde, reaktif derişimleri, pH, çözücü ve inkübasyon süresi gibi parametrelerin farklılıklarından dolayı daha az tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmektedir. Kullanılan yöntemlerin standardize edilmesiyle bu sorunun önüne geçilebilir.

Bu çalışmanın amacı, gıdalardaki TAC'nin belirlenmesinde çokça kullanılan spektrofotometrik yöntemlere altenatif olarak basit, hızlı, hassasiyeti ve seçiciliği yüksek yeni spektroflorometrik bir yöntem geliştirilmesidir. Floresans metotlar, yüksek hassaiyet ve seçiciliğe sahip olmalarının yanında çok basit ve düşük maliyetli cihazların kullanıldığı yöntemlerdir.

Spektroflorometrik CERAC yöntemi, sülfat asitli ortamda Ce(IV) iyonları ile antioksidanlar arasındaki reaksiyon sonucu oluşan Ce(III) iyonlarının tayinine dayanan bir yöntemdir.

Bu çalışma kapsamında ilk olarak ortamda bulunan sitrik asit ve indirgen şeker gibi organik maddelerin varlığında Ce(IV) iyonlarının sadece antioksidan bileşiklerle

reaksiyona girdiği optimum deney koşullarının belirlenmesi ve belirlenen bu koşullarda modifiye CERAC yönteminin geliştirilmesi, ikinci olarak ise gıdaların TAC'lerinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemlere kıyasla hızlı, basit ve güvenilir bir yöntem olan spektroflorometrik yeni bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Floresans ölçümüne dayalı yöntemler, absorpsiyon ölçümüne dayalı yöntemlere göre daha çok tercih edilir çünkü florometrik yöntemlerin duyarlılıkları, emisyon bantlarının darlığı, Ce(IV) ve antioksidan bileşiklerin çalışılan dalgaboyunda floresans özellik göstermemeleri tercih edilme sebepleri olarak sıralanabilir. Ayrıca, spektrofotometrik yöntemlerin belirlenen optimum dalga boylarında, bitki pigmentlerinin girişim etkilerinin olduğu bilinmektedir buna karşılık florometrik yöntemlerde ise bu problem söz konusu olmaz.

Modifiye spektrofotometrik ve geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemleri için optimum koşullarının belirlenmesi amacıyla öncelikle pH'ın ve kompleks iyonların etkisi incelenmiştir. Ce(IV) sülfat çözeltisi, sülfirik asit ortamında uzun süre stabil kaldığı bilinmektedir fakat asitliğin azaltıldığı ortamlarda, $Ce(OH)_n^{4-n}$ formunda hidroliz kompleksleri oluşur. Sülfat iyonu, SO_4^{-2}, gibi kompleks iyonların ortamda bulunması Ce(IV)'ün, organik bileşikler ile kompleks yapma yeteneğini azalmaktadır. Ayrıca, Ce(IV)/Ce(III) indirgenme potansiyeli, SO_4^{-2} iyonlarının yeterli oranda bulunması durumunda da azaltılabilir.

Orijinal CERAC "Seryum (IV) indirgeyici antioksidan kapasite" yönteminde $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) iyonlarının, $1{,}50 \times 10^{-5}$ M sitrik asit varlığında%25'nin indirgendiği belirlendi. Sitrik asit, antioksidan bir bileşik olmamasına karşın benzer kimyasal yapıya sahip olması ve Ce(IV) ile reaksiyona girmesinden dolayı orijinal CERAC yöntemi için enterferans etki göstermektedir. Bu yüzden, yükseltgen Ce(IV) iyonlarının redoks potansiyelinin sadece gerçek antioksidanları etkilediği fakat sitrik asit, basit şeker ve farmakolojik içerikleri etkilemediği reaksiyon koşulları 0,30 M H_2SO_4 ve 0,70 M Na_2SO_4 sulu ortam olarak belirlendi. Böylece, modifiye CERAC yönteminde, kuersetinin TAC'sinin ölçümünde reaksiyon ortamında $1{,}0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit varlığının ihmal edilebilir bir hataya (%3) sebep olduğu söylenebilir.

Spektroflorometrik CERAC yönteminin reaktifi, Ce(IV) iyonları ile antioksidan molekülünün etkileşimi sonucu oluşan Ce(III), floresans özellik göstermektedir. Floresans özelliği gösteren Ce(III) iyonları 256 nm uyarılma ve 360 nm emisyon dalgaboyunda maksimum emisyon yapmaktadır. Antioksidan kapasite ve floresans şiddeti arasında korelasyon bulunmaktadır. Belirlenen dalga boyları, gerçek bitki pigmentlerinin 310 nm deki absorpsiyonundan etkilenmemektedir. Bu durum, CERAC, modifiye CERAC ve diğer absorpsiyon ölçümüne dayanan yöntemler için enterferans etki gösterirken geliştirilen bu yöntemde bu durum söz konusu değildir. Pekçok antioksidan için lineer çalışma aralığı spektrofotometrik yöntemlere kıyasla daha geniş bir aralıkta elde edildi. Örneğin kuersetin için $5{,}0 \times 10^{-7}$ M - $1{,}0 \times 10^{-5}$ M olarak belirlendi. Geliştirilen yöntem, troloks, kuersetin, gallik asit, askorbik asit, naringin, naringenin, kafeik asit, ferulik asit, glutatyon ve sistein gibi pek çok antioksidan bileşiğine uygulandı. Geliştirilen yöntem ile naringin-naringenin ve rutin-kuersetin çiftinin TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) katsayıları birbirine yakın bulunmasından dolayı Ce(IV) temelli bu yöntem muhtemelen flavonoid glikozitlerin aynı anda hidrolizini ve daha sonra hidroliz ürünlerinin oksidasyonuna yol açar, böylelikle bir moleküldeki OH grupları sayısının antioksidan kapasite ile orantılı olduğu gösterilmektedir.

Bir karışımdaki her bir antioksidanın, antioksidan kapasitelerinin toplamsallığı, TAC yöntemleri için önemli bir durumdur. Çünkü ölçülen TAC, her bir antioksidanın toplamı olmalıdır ve geliştirilen her bir yöntem bu kuralı sağlamalıdır. Bu amaçla, ikili, üçlü ve dörtlü olarak hazırlanan sentetik antioksidan karışımlarının spektroflorometrik CERAC yöntemi ile analizi yapılmıştır. Beklenen ve bulunan kapasite değerlerinin ±% 5 sapma ile birbiri ile uyumlu olduğu gözlemlendi. Ayrıca, spektroflorometrik CERAC yöntemi, kompleks karışımlara uygulandığında ise TAC'lerin toplamsallık ilkesini sağladığını ve belirlenen TEAC katsayılarının literatürdeki diğer antioksidan kapasite yöntemleri (ABTS, CUPRAC gibi) ile uyumlu olduğu gözlendi.

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve TAC'nin toplamsallığını göstermek için yapılan bir diğer deneysel çalışma ise standart ekleme yöntemi ile troloksun kalibrasyon grafiği, saf su içersinde ve üç bitki çayı infüsyonu içersinde çizilmiştir ve kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ($(1,86\pm0,02) \times 10^6$) birbirine paralel çıkmıştır. Bu sonuca bakılarak karmaşık ortamlarda bulunan çeşitli bileşenlerle, katkı yapılan antioksidanlar arasında uygulanan yöntem açısından Beer kanunu'ndan kimyasal sapmalara yol açacak nitelikte bir etkileşim olmadığı ve geliştirilen spketroflorometrik CERAC yöntemi ile örnek karışımlarının TAC değerinin doğru bir şekilde hesaplanabileceği tespit edilmiştir.

Gıda maddelerinde çokça bulunan, gerçekte antioksidan olmayan fakat benzer kimyasal davranış gösteren basit şekerler, sitrik asit ve tiyol grubu içermeyen amino asitlerin enterferans etkileri incelendiğinde, $5,0 \times 10^{-4}$ M enterferans çözeltisi (glikoz, fruktoz, mannitol, glisin, serin, valin, prolin ve alanin) varlığında Ce(III) oluşumunu etkileyecek şekilde Ce(IV) ile etkileşimediği tespit edildi. Ayrıca, yukarıda belirtilen bileşiklerin, antioksidan (troloks gibi) bir bileşiğin tayin edilmesine etkisi incelendiğinde ise troloks tayinini ±% 5'den daha az etkileyerek herhangi bir enterfere edici etkilerinin olmadığı tespit edildi. $1,0 \times 10^{-5}$ M troloks içeren çözeltinin tayininde 0,2 mg/mL nişasta çözeltisi ile çalışıldığında da herhangi bir enterfere edici bir etkisi gözlenmedi. Bulunan sonuçlara bakıldığında, benzer yapıdaki sitrik asit, basit şekerler ve tiyol grubu olmayan amino asitler ile etkileşmeyen sadece gerçek antioksidan moleküllerini yükseltgemesi için uygun bir potansiyele geldiği söylenebilir. Bu özelliği ile yüksek redoks potansiyeline sahip elektron transfer esaslı yöntemler arasında (Fe(III)- fenantrolin, $E^0 = 1,06$ V ve Folin reaktifinin potansiyeli bilinmemektedir) önemli bir fark yaratmaktadır. Ayrıca diğer bir üstünlüğüde, biyolojik açıdan önemli olan tiyol grubu antioksidanlarından sistein ve glutatyon ile reaksiyona girebilmesi ve TEAC değerlerinin belirlenebilmesidir.

Spektroflorometrik CERAC ve diğer elektron transfer esaslı toplam antioksidan tayin yöntemleri kullanılarak adaçayı, ısırgan otu, yeşilçay, papatya çayı, ıhlamur çayı ve nane çayları gibi şifalı bitkilerin infüzyonları ve metil alkol içersindeki ekstraktlarının analizi yapıldı. Analiz sonuçlarına bakıldığında karşılaştırmak amacıyla kullanılan yöntemlerin farklı redoks potansiyelleri ve farklı mekanizmaları olduğundan elde edilen kasapite değerleri birbirleri ile aynı çıkmamaktadır. Bulunan sonuçlar, CUPRAC, SDS katkılı pH'sı belirli Fe(III)-ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yönteminin sonuçları ile karşılaştırıldığında yeşilçay en yüksek antioksidan kapasite değerine sahipken papatya çayı en düşük antioksidan kapasite değerine sahiptir. Folin-ciocalteu yöntemi ile elde edilen kapasite değerlerinin diğer yöntemlere göre yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni ise fenolik antioksidanların pH 10'da protonlarını kaybetmesi, yükseltgenmeye daha müsait olması ve Folin reaktifinin belirsiz miktarda yüksek redoks potansiyeline sahip olmasıdır.

Spektroflorometrik CERAC yöntemi kullanılarak yapılan bir diğer uygulama ise farklı olgunluklardaki (yeşil, sarı, turuncu ve kırmızı renkli) ve farklı bölgelerden (İstanbul ve Mersin) toplanan kuşburnu bitkilerinin TAC'deki değişim incelendi. Kuşburnu örnekleri çeşitli ekstraksiyon (metanol ekstraksiyonu, geleneksel sıcak su infüzyonu, suda kaynatma) yöntemleri kullanılarak hazırlandı ve en yüksek ektraksiyon etkinliğini 10 dakika süre ile suda kaynatma yöntemi olarak belirlendi. Kuşburnu örneklerinin TAC'leri farklı elektron transfer esaslı yöntemler kullanılarak tayin edildi. Kırmızı renkli (tam olgun) kuşburnu meyvesinin en yüksek TAC sahip olduğu bulundu ve böylece meyvenin renginin, optimum olgunlaşma zamanını belirlemede uygun bir indikatör olduğu söylenebilir.

APPLICATIONS AND DEVELOPMENT OF A NEW FLUOROMETRIC ANTIOXIDANT METHOD

SUMMARY

Antioxidants are beneficial compounds to health that fight reactive oxygen and nitrogen species and free radicals that may eventually give rise to various diseases. Plant foods, fruit and vegetable are rich in antioxidant vitamins, phenolic and hydroxycinnamic acids, flavonoids, carotenoids, and anthocyanins. Consumption of vegetables and fruits in the diet is one of the most efficient ways of preventing DNA and protein damage, lipid peroxidation, cancer, atherosclerosis, ageing, and inflammatory diseases.

The chemical diversity of antioxidants makes it difficult to separate and quantify antioxidants from the vegetable, fruit and food matrix. Therefore it is desirable to establish methods that can measure the total antioxidant capacity (TAC) level directly from vegetable and fruit extracts. Total antioxidant capacity is an integrated parameter reflecting the cumulative action of all antioxidants in a complex sample. Several analytical methods have been developed to measure total antioxidant capacity (based on reaction thermodynamics or conversion efficiency) and total antioxidant activity (based on reaction kinetics). A mechanistic classification of total antioxidant capacity assays is the type of reaction: Electron transfer (ET)-, hydrogen atom transfer (HAT)- and ET/HAT based assays. ET-based assays include, FCR (Folin-Ciocalteu reagent) assay, FRAP (ferric ion reducing antioxidant power), CERAC (cerium (IV) ions reducing antioxidant capacity) and CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity) methods. ABTS/TEAC (trolox-equivalent antioxidant capacity), DPPH (2,2- diphenyl-1-picrylhydrazeyl) assays are an ET/HAT based methods. Generally, ET-based assays find wider practical use than HAT-based ones, because they are cheaper and less laborious, more flexible, and thus more suitable to routine testing of natural products. However, ET based assays may be less reproducible due to strong dependency on the protocol, such as reagent concentrations, pH, solvent, and time of incubation. The problem can be likely solved by standardization of protocols.

The purpose of this work was to develop and validate a rapid, simple and reliable fluorometric method as an alternative approach to the widely used spectrophotometric methods for the determination of total antioxidant capacity in food. Fluorescence method is particularly appealing for this purpose, because it combines very simple and relatively low-cost instrumentation with high sensitivity and selectivity.

Spektrofluorometric CERAC method is based on the determination of Ce(III) ions which were produced by the reaction of Ce(IV) ions with antioxidants in sulfuric acid medium.

In this study was firstly found optimal conditions (i.e., optimal sulfuric acid and sodium sulfate concentrations) for Ce(IV) oxidation of antioxidants but not of citric acid and reducing sugars and improved the modified CERAC method at the same

condition and secondly developed a rapid, simple and reliable fluorometric method as an alternative approach to the widely used spectrophotometric methods for the determination of total antioxidant capacity of foods. In addition, the fluorescence method was preferred to absorptimetric assay due to its sensitivity, narrowness of emission bands, and lack of fluorescence of either Ce(IV) reagent or antioxidant analyte at the analytical wavelength. Besides, the optimum wavelengths of spectrofluorometric methods do not show interfering effects with plant pigments, unlikely spectrophotometric methods.

The effects of pH value and complex ions on spectrofluorometric CERAC and modified spectrophotometric CERAC method were investigated prior to the determination of optimum conditions. Ce(IV) sulfate solutions in sulfuric acid medium are known to be stable over prolonged periods, but hydrolysis complexes of the type $Ce(OH)_n^{4-n}$ form in solutions of reduced acidities. The presence of complexing ions like sulfate may reduce the complexing ability of Ce(IV) with organic substrates, and may therefore retard the oxidation of organic compounds with Ce(IV), since Ce(IV)–organic substrate complexation is a prerequisite for fast inner-sphere electron transfer. Moreover, the Ce(IV)/Ce(III) reduction potential is decreased in the presence of appreciable concentrations of SO_4^{2-} ions, preferentially stabilizing the higher oxidation state.

25% of 2.0×10^{-4} M Ce(IV) ions were found to be reduced in 1.50×10^{-5} M citric acid medium by original CERAC (Ce(IV) reducing antioxidant capacity) method. Citric acid which is not an antioxidant copound but its similar chemical structure behaves like antioxidants and react with Ce(IV) ion, shows interfering effects for CERAC method. Therefore, 0.3 M H_2SO_4 and 0.70 M Na_2SO_4 in aqueous medium maintain the required redox potential for Ce(IV) ions not effecting citric acid, simple sugar molecules and pharmacological ingredients but antioxidants. As a result, total antioxidant capacity of quercetin in the presence of 1.0×10^{-4} M citric acid found by modified CERAC method causes an error of 3% which can be ignored.

Ce(III), the product of the reaction of spectrofluorometric CERAC method reagent with antioxidant molecules, show fluorescent properties. The fluorescent product, Ce(III), exhibits strong fluorescence at 360 nm with an excitation wavelength of 256 nm, the fluorescence intensity being correlated to antioxidant power of the original sample. Defined wavelengths are not affected by the absorption of real plant pigments at 310 nm. This interference effect can be seen in other methods based on absorption measurement such as CERAC and modified CERAC, etc. The linear concentration range for most antioxidants was quite wide, e.g., 5.0×10^{-7}–1.0×10^{-5} M for quercetin. The developed procedure was successfully applied to the TAC assay of antioxidant compounds such as trolox, quercetin, rutin, gallic acid, ascorbic acid, catechin, naringin, naringenin, caffeic acid, ferulic acid, glutathione, and cysteine. Since the TEAC (trolox-equivalent antioxidant capacity) coefficients found with the proposed method of naringin–naringenin and rutin–quercetin pairs were close to each other, this Ce(IV)-based assay probably caused the simultaneous hydrolysis of flavonoid glycosides to the corresponding aglycones and their subsequent oxidation such that the hydrolysis products exhibed antioxidant capacities roughly proportional the number of –OH groups contained in a molecule.

The additive antioxidant capacities of each antioxidant molecule in a mixture is an important issue as every measured total antioxidant capacity method must be the sum of measured capacties of every species found and, this rule must be maintained for

improved assay. For this reason, binary, ternary and quaternary synthetic antioxidant mixtures were analyzed by spectrofluorometric CERAC method. Expected and found capacity values were found in correlation with ± 5% of deviation. Moreover, the spectrofluorometric CERAC method was reproducible, additive in terms of TAC values of constituents of complex mixtures, and the TEAC coefficients of the tested antioxidant compounds gave good correlations with those found by reference methods such as ABTS and CUPRAC.

In order to prove the additiveness and accuracy of the method, calibration graphs of trolox in ultra-pure water and 3 different plant tea samples were drawn with the aid of standard addition method. The slope of calibration graphs were found to be parallel with a value of $((1.86 \pm 0.02) \times 10^6)$. This result shows that the method does not deviate from Beer's law by interfering other species found in complex chemical matrices but antioxidant molecules, and improved spectrofluorometric CERAC assay can measure the total antioxidant capacities of sample mixtures.

Molecules commonly found in food samples such as simple sugars, citric acid and aminoacids (not containing thiol groups) do not react with Ce(IV) effecting the formation level of Ce(III) when worked with 5.0×10^{-4} M interference solution (glucose, fructose, mannitol, glycine, serine, valine, proline, and alanine). In addition, the compounds mentioned above does not interfere the determination of an antioxidant molecule (such as trolox) more than ± 5%. When analyzing a trolox solution with a concentration of 1.0×10^{-5} M, no interference effects were observed at the presence of 0.2 mg/mL starch solution. After the investigation of experimental results, it can be concluded that the redox potential of reaction between Ce(IV) and antioxidant molecules disables the interference effects of simple sugars, citric acid and amino acids (without thiol groups). This property of the improved method increases its importance when compared to electron transfer-based methods (Fe(III)-phenanthrolin, E^0 = 1,06 V and Folin-Ciocalteu reagent's potential is not known) showing high redox potential. Another superiority of the method is its ability to react with biologically important molecules such as cysteine and glutathione belonging to the class of antioxidants with thiol groups.

Methyl alcohol extracts of curative plants such as sage, nettle, green tea, chamomile tea, linden, mint were anayzed both with spectrofluorometric CERAC and other electron-transfer based total antioxidant determination methods. When other methods are compared with spectrofluorometric CERAC method, different capacity values may be seen as a result of different reaction mechanisms and redox potantials. Green tea was found to have the highest antioxidant capacity value as chamomile tea has the the least when analyzed with CUPRAC, Fe(III)-ferricyanide (at the known pH and mixed SDS) and Folin-Ciocalteu methods. Antioxidant capacity values were found to be high by Folin-Ciocalteu method. The reason can be explained with unknown redox potential of Folin-Ciocalteu reagent and medium pH; as the phenolic antioxidants loose their protons at pH 10 and are inclined for oxidation.

Another practice of spectrofluorometric CERAC method is as follows; the various stages of maturity of rose hips (green, yellow, orange and red in color) and the place of collection (Istanbul, Mersin) resulted in some changes in TAC. Various extraction methods were compared; methanol extraction, traditional hot water infusion and boiling in water. Boiling in water for ten minutes was the method which demonstrated the highest extraction efficiency. TAC was determined using different electron transfer−based assays; spectrofluorometric CERAC, modified CERAC,

CUPRAC and Folin-Ciocalteau methods. The highest TAC was found in the red colored (fully ripe) rosehip fruit, suggesting that the color is a suitable indicator for optimal harvesting time.

1. GİRİŞ

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük derişimlerinde bile substratın prooksidanlar (reaktif oksijen, nitrojen ve serbest radikaller) ile başlatılan oksidasyon reaksiyonunu önemli derecede engelleyen ve böylece prooksidanların sebep olduğu hastalıkları önleyen sağlığa yararlı bileşiklerdir (Halliwell, 1999). Beslenmemizde antioksidanca (C vitamini, polifenoller, karotenoidler ve antosiyonin gibi) zengin meyve ve sebzelerin tüketimi, vücut hücrelerinin DNA ve protein yapısının bozulmasını, lipit peroksidasyonunu, kanser, kalp hastalıkları, yaşlanmaya ve inflamatuar hastalıkların oluşumunu engellemede en etkili yollardan biridir.

Antioksidanların kimyasal yapılarının farklı olması, sebze, meyve ve bitki çay matrikslerinden ayrılmalarını ve miktarlarının tayinini zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, sebze ve meyve ekstraktlarından TAC'nin doğrudan analiz edilebileceği yöntemlerin geliştirilmesi günümüz çalışmalarında önemli yer teşkil etmektedir. TAC, karmaşık bir örnekteki tüm antioksidanların antioksidan kapasitelerinin toplamsallığını yansıtan bir parametredir. Her bir bileşenin antioksidan kapasitesini ölçmez (MacDonald-Wicks ve diğ, 2006). Toplam antioksidan kapasitenin (reaksiyon termodinamiğine veya dönüşüm verimliliğine dayalı) veya aktivitenin (reaksiyon kinetiğine dayalı) ölçülebilmesi için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir. Genel olarak, TAC yöntemleri, elektron transferine (ET), hidrojen atom transferine (HAT) ve ET/HAT transferine dayanan yöntemler olmak üzere üçe ayrılırlar (Huang ve diğ, 2005; MacDonald-Wicks ve diğ, 2006; Prior ve diğ, 2005). ET'ne dayanan yöntemler; FCR, FRAP, CERAC ve CUPRAC yöntemleri, HAT'ne dayalı yöntemler; ORAC, TRAP yöntemleri ve ET/HAT'ne dayanan yöntemler ise; ABTS/TEAC ve DPPH yöntemleridir. Genellikle, ET esaslı yöntemler, HAT esaslı yöntemlere kıyasla daha pratik ve geniş kullanım alanına sahiptir. Çünkü bu yöntemler, ucuz, daha az zahmetli ve basit laboratuar cihazları gerektiren ve doğal ürünlerin rutin analizleri için yaygın bir şekilde kullanılan yöntemlerdir. Ancak, ET dayalı yöntemlerde, reaktif derişimleri, pH, çözücü ve inkübasyon süresi gibi

parametrelerin farklılıklarından dolayı daha az tekrarlanabilir sonuçlar elde edilmektedir.

Bu çalışmanın amacı, gıdalardaki TAC'nin belirlenmesinde çokça kullanılan spektrofotometrik yöntemlere altenatif olarak basit, hızlı, hassasiyeti ve seçiciliği yüksek yeni spektroflorometrik bir yöntem geliştirilmesidir. Floresans metotlar, yüksek hassaiyet ve seçiciliğe sahip olmalarının yanında çok basit cihazların kullanıldığı yöntemlerdir.

Spektroflorometrik CERAC yöntemi, sülfat asitli ortamda Ce(IV) iyonları ile antioksidanlar arasındaki redoks reaksiyon sonucu, antioksidan bileşikler yükseltgenerek kinon yapısına dönüşürken, Ce(IV) iyonları indirgenerek Ce(III) iyonlarının oluşumuna neden olur ve oluşan Ce(III) iyonlarının floresans şiddetinin ölçümüne dayanan bir yöntemdir. Ce(IV) iyonları floresans özelliğe sahip değilken Ce(III) iyonları floresans özelliğe sahiptir. Ce(IV) iyonlarının indirgenmesinin bittiği noktada Ce(III) iyonları maksimum floresans şiddetine ulaşır. Bu noktadaki toplam antioksidan içeriği başlangıçta alınan Ce(IV) iyonlarının derişimlerine eşdeğerdir. Floresans özelliği gösteren Ce(III) iyonları 256 nm uyarılma ve 360 nm emisyon dalgaboyunda maksimum emisyon yapmaktadır. Belirlenen dalga boyları, gerçek bitki pigmentlerinin 310 nm deki absorpsiyonundan etkilenmemektedir. Bu durum, diğer absorpsiyon ölçümüne dayanan yöntemler için enterferans etki gösterirken geliştirilen bu yöntemde söz konusu değildir.

Seryum bileşikleri asitli ortamda $KMnO_4$ kadar kuvvetli yükseltgen bileşiklerdir. Ce (IV) iyonları seyreltik sülfürik asitli ortamda kararlıdırlar (Aly ve diğ, 2001). Sulu çözeltilerinde serbest metal iyonları dışında çeşitli anyonik ve katyonik kompleksler biçiminde bulunurlar. Orta asitlikteki çözeltilerde Ce(IV) iyonları $Ce(OH)^{3+}$, $Ce(OH)_2^{2+}$ şeklinde bazik tuzlar vererek hidrolizlenir ve pH artışına paralel olarak çökme görülebilir; bunu önlemek için asidik ortamda çalışılması gerekmektedir. Yüksek asit derişimi, serbest Ce(IV) iyonlarının kompleks iyonlara oranla daha fazla oluşmasına neden olur. Ce(IV) iyonun yükseltgeme kuvveti ve kararlılığı ortamda bulunan asidin cinsine ve derişimine göre değişmektedir (Fang ve diğ, 2002). Ce(IV), nitrat asitli ortamda fazla kararlı olmayan ve zamanla bozunan çözeltiler oluşturur. Literatürdeki bazı çalışmalarda HCl ve $HClO_4$' ün floresans ölçümlerde yüksek kör okumalarına neden olduğuna rastlanmıştır (Mohamed ve diğ, 2005). Bu kapsamda geliştirilecek spektroflorometrik yöntemde asit türü olarak öncelikle

sülfürik asit ile çalışılmış ve sülfürik asit derişiminin floresans şiddetine etkisi incelenmiştir.

Ce(IV)/Ce(III) çiftinin redoks potansiyeli 1,7 V (1,0 M $HClO_4$)'den, 1,61 V (1,0 M HNO_3), 1,44 V (1,0 M H_2SO_4)'e kadar değişmektedir. Bu potansiyel değişimi, ortam pH'nın değişimine paralel olarak çözeltideki serbest Ce(IV) iyonları ve kompleks tuzlarının oluşumundan kaynaklanmaktadır.

$$Ce^{4+} + e^{-} \rightarrow Ce^{3+} \qquad E^{\circ} = 1{,}44 \text{ V} \ (1{,}0 \text{ M } H_2SO_4) \qquad (\mathbf{1.1})$$

Örneğin H_2SO_4, $HClO_4$'den daha kuvvetli Ce(IV)-kompleksleri oluşturduğundan yukarıdaki yarı-pil reaksiyon dengesi sola kayar ve potansiyel azalır.

$$E_{Ce4+/Ce3+} = 1{,}44 + 0{,}059 \text{ x log } ([Ce^{4+}] / [Ce^{3+}]) \qquad (\mathbf{1.2})$$

Araştırma grubumuzca geliştirilen CERAC yönteminde (Ozyurt ve diğ, 2007) gıda maddelerine katkı maddesi olarak katılan sitrik asidin Ce(IV) ile reaksiyona girerek indirgendiği ve Ce(III) oluşumuna neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kuersetin gibi bazı antioksidanların da beklenenin ötesinde aşırı oksidasyona uğradığı düşünülmektedir. Ce(IV)'ün pH'a bağlı olarak yükseltgeme potansiyeli değişmesi nedeni ile reaksiyon ortamının pH değiştirilerek hem Ce(IV)'ün işlev görebileceği hem de aşırı oksidasyonun önleneceği bir asit derişimi seçildi. Ayrıca Ce(IV)'ü stabilize eden Na_2SO_4, H_3PO_4 ve fosfat asidi türevleri, Ce(IV) ile kuvvetli kompleksler oluşturlar. Bu bileşikler reaksiyon dengesini sola kaydırarak Ce(IV)-Ce(III) redoks çiftinin standart indirgenme potansiyelini azaltabilirler.

Bu çalışma kapsamında ilk olarak ortamda bulunan sitrik asit ve indirgen şeker gibi organik maddelerin varlığında Ce(IV) iyonlarının sadece antioksidan bileşiklerle reaksiyona girdiği optimum deney koşullarının belirlenmesi ve belirlenen bu koşullarda CERAC yönteminin modifiye edilmesi, ikinci olarak ise gıdaların TAC'lerinin belirlenmesi için spektrofotometrik yöntemlere kıyasla hızlı, basit ve güvenilir bir yöntem olan spektroflorometrik yeni yöntem geliştirilmesidir. Floresans ölçümüne dayalı yöntemler, absorpsiyon ölçümüne dayalı yöntemlere göre daha çok tercih edilir çünkü florometrik yöntemlerin duyarlılıkları, emisyon bantlarının darlığı, Ce(IV) ve antioksidan bileşiklerin çalışılan dalgaboyunda floresans özellik göstermemeleri tercih edilme sebepleri olarak sıralanabilir. Ayrıca, spektrofotometrik yöntemlerin belirlenen optimum dalga boylarında, bitki pigmentlerinin girişim etkilerinin olduğu bilinmektedir buna karşılık florometrik yöntemlerde ise bu

problem söz konusu olmaz. Bu nedenle öncelikle optimum çalışma koşulları (pH, kompleksleştirici iyon gibi) belirlenmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra geliştirien spektroflorometrik CERAC yöntemi lineerlik, toplamsallık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım açısından valide edilmiştir. Bu amaçla, antioksidanların kalibrasyon grafikleri çizilerek TEAC değerleri belirlenmiştir. Bulunana TEAC değerleri literatürdeki diğre TAC yöntemleri ile kıyaslanmıştır. Geliştirilen yöntemin dogruluğunun kıyaslanması amacı ile sentetik karışımların analizi yapılmıştır. Ayrıca ortamda bulunabilecek antioksidan moleküller dışındaki bileşiklerin girişim etkileri incelenmiştir.

Üçüncü olarak ise modifiye spektrofotometrik ve geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemleri, bitki çayları (adaçayı, ısırgan otu, yeşilçay, papatya çayı, ıhlamur çayı ve nane çayı), üzüm ve kuşburnu bitkisi örneklerinin TAC belirlenmesinde kullanılmış ve literatürdeki diğer TAC yöntemleri ile bulunan sonuçlar kıyaslanmıştır.

2. GENEL BİLGİ

2.1 Antioksidanlar

Antioksidanlar, prooksidan oluşumunu ve lipid oksidasyonunu engelleyen veya geciktiren onları toksik olmayan ürünlere çeviren, vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi gıdalarla da alınan bir grup kimyasal maddelerdir. Yapılan çalışmalarda gıdalarda bolca bulunan flavonoidler, fenolik asitler, karotenoidler, vitaminler ve tokoferol gibi bileşiklerin antioksidan aktivite özelliği gösterdiği bulunmuştur (Rice-Evans ve diğ, 1996).

Antioksidanların öyküsü prooksidanlar (ROS, RNS ve serbest radikaller) ile başlar. Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve hastalıklara yol açan toksik (zehirli) maddelerdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren prooksidanları etkinlikle indirgeyerek toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron bulunduran moleküller olarak ifade edilirler (Dündar ve Aslan, 2000; Halliwell ve Gutteridge, 1999). Orbitallerin de bir ya da daha fazla çiftlenmemiş elektron taşıyan halojen atomları (Cl ve Br gibi), hidrojen atomu, Na, K gibi alkali metal atomları ve oksijenin redüksiyon ara ürünleri, süper oksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$) gibi bağımsız, kısa ömürlü, reaktif atomlar serbest radikal olarak tanımlanmaktadır (Dündar ve Aslan, 2000).

Serbest radikaller, kirli havalarda, sigara dumanında, radyasyonda, bitki koruma ilaçlarında, bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında bulunurlar. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) (süper oksit anyon radikali ($O_2^{\cdot -}$), hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$), peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$)) oluşumunun, biyolojik sistemin antioksidan kapasitesinden daha fazla olması oksidatif gerilimin oluşumuna yol açmakta ve lipid, DNA, protein gibi diğer biyolojik yapıların hasarına neden olmaktadır. Özellikle vücutta meydana gelen radikalik zincir reaksiyonları sonucunda oluşan ROS organizmalarda kanser, kroner kalp hastalıkları, hücresel yıpranma ve yaşlanma, bağışıklık sistemi hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (Halliwell ve Gutteridge, 1999) Antioksidanlar, kendileri de yükseltgenebilen maddeler olup

serbest radikal zincirleme reaksiyonunu kırıcı rol oynarlar. Bu nedenle, ROS'den kaynaklanan hastalıklarla savaşmanın en iyi yolu antioksidanca zengin gıdalarla beslenerek ROS oluşumunu engellemektir.

2.2 Antioksidanların Sınıflandırılması

2.2.1 Kimyasal bileşimlerine göre

Antioksidanları kimyasal bileşimlerine göre üç grup altında toplayabiliriz. Fenolik yapıdaki antioksidanlar, aromatik amino antioksidanlar ve organik sülfür bileşikleri (Keskin ve Erkmen, 1987).

2.2.1.1 Fenolik yapıdaki antioksidanlar

Polifenoller; flavonoidleri, fenolik asitleri ve fenolik polimerleri içeren fitokimyasalların en geniş gruplarından birini oluşturan güçlü antioksidanlardır. Antioksidan aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bu bileşikler hidrokinon olup tersinir olarak kinona yükseltgenirler. Fenolün kendisi antioksidan özelliğe sahip değilken yer değişimli benzenler, birden fazla benzen halkası içeren aromatik bileşikler veya heterosiklik bileşiklerin yapıları orto ve para bileşiklerine benziyorsa antioksidan etki gösterebilirler. Polifenolik antioksidanlar düşük derişimlerde serbest radikallerle ile etkileşime girerek otooksidasyonu geciktirici veya durdurucu etki göstermektedir (Halliwell, 1990). Polifenolik antiokisdanların aktivitesi, radikal süpürme yeteneğine, hidrojen veya elektron donör olarak göstermiş olduğu reaktiviteye, metal şelatlama potansiyeline ve diğer antioksidanlarla etkileşimine bağlıdır (Shahidi ve Wanasundara, 1992; Rice-Evans ve diğ, 1997).

2.2.1.2 Aromatik amino antioksidanlar ve organik sülfür bileşikleri

Aromatik amino antioksidanlar da genellikle fenollü antioksidanlara benzerler, yalnız hidroksil grupları kısmen veya tamamen amino grupları ile yerlerini değiştirmişlerdir. Kuvvetli antioksidanlardan olan kükürtlü organik bileşikler fenolik yapıda olmayan antioksidanlardandır. İnsan vücudunda enzimatik olmayan kükürtlü antioksidanların en başta geleni bir tripeptid olan glutatyon'dur. Örnek verecek olursak β-β^1 ditiyo propiyonik asit ve esterleri özellikle dilauril ve distearil ditiyopropiyanatlar bu grupta yer almaktadır (Keskin ve Erkmen, 1987).

2.2.2 Etki mekanizmalarına göre

Antioksidanları etki mekanizmalarına göre de sınıflandırabiliriz. Birincil antioksidanlar ve ikincil antioksidanlar.

2.2.2.1 Birincil ya da zincir parçalayan antioksidanlar

Elektron vererek, serbest radikal zincir reaksiyonunu kıran ve çoğunlukla fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Serbest radikaller ile reaksiyona girerek, daha kararlı ürünler oluşturup, hidroperoksit oluşumunu engellerler. Sentetik veya doğal yapıda olabilirler. Tokoferoller, flavonoidler, alkali gallatlar, bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve tersiyer bütilhidrokinon (TBHQ) en önemlileridir.

2.2.2.2 İkincil Antioksidanlar

Oksidasyon hızını azaltan bileşiklerdir. Etki mekanizmaları, metal iyonlarını yakalamak, oksijen molekülünü tutmak, hidroperoksitleri radikal olmayan bileşiklere parçalamak, ultraviyole ışınlarını absorblamak veya oksijen atomunu etkisiz hale getirmek şeklinde olabilir. İkincil antioksidanların diğer adı ise antioksidan sinerjistleridir. Antioksidanların sinerjist etkileri, ortamda bulunan diğer birincil antioksidanlara bağlıdır. Ortamda birincil antioksidanlar bulunmadığı durumlarda antioksidan aktiviteleri çok düşüktür veya antioksidan aktivite göstermezler. Askorbik asit, ortamda tokoferollerin ya da diğer fenolik maddelerin bulunması ile sinerjist etki gösterirler (Hudson, 1990). Askorbik asit (C vitamini), β- karoten, amino asitler ve fosfolipidler en önemli ikincil antioksidanlardandır.

2.2.3 Kaynağına göre

Antioksidanları kaynağına göre de doğal antioksidanlar ve sentetik antioksidanlar olarak sınıflandırabiliriz.

2.2.3.1 Doğal antioksidanlar

Doğal antioksidanları enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar olarak iki grup altında toplaya biliriz. Enzimatik antioksidanlar, enzim kofaktörleri vücutta üretilebilen, düsük mol kütleli moleküllerdir. Enzimatik olmayan antioksidanlar ise vücuda beslenme yoluyla alınan doğal antioksidanlardandır. Beslenme yoluyla alınan antioksidan maddelerin başında polifenoller, vitaminler, karotenoidler, organosülfürlü bilesikler ve mineraller olarak sınıflandırabiliriz (Çizelge 2.2). Canlı metabolizmalarında ve gıdalarda mevcut olan enzimatik ve enzimatik olmayan

antioksidanlar ROS'ni uzaklaştırarak veya lipid hidroperoksitlerini azaltarak antioksidan özellik göstermektedir (Ratnam ve diğ, 2006).

Enzimatik antioksidanlar

Süperoksit dismutaz (SOD); canlı organizmalarının tüm hücrelerinde üretilir. SOD ROS'lerini ortamdan uzaklaştırırken süperoksit anyon radikalini hidrojen peroksite dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimlerdir (Helle ve diğ, 1997).

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \xrightarrow{\textbf{SOD}} O_2 + H_2O_2 \qquad (\textbf{2.1})$$

Glutatyon peroksidaz (GSH-Px); selenyum içerikli tetrametrik bir proteindir**.** Glutatyonu yükseltgeyerek hidrojen peroksiti suya dönüstürür. Glutatyonun yükseltgenmiş formu (GSSG) ise glutatyon redüktazla katalizlenerek indirgenir.

$$2GSH + H_2O_2 \xrightarrow{\textbf{GSH-Px}} GSSG + H_2O \qquad (\textbf{2.2})$$

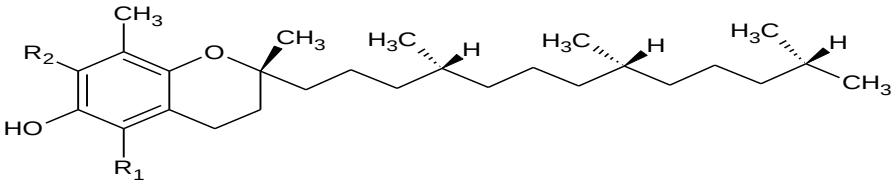
Katalaz enzimi; canlı metabolizma hücrelerinde hidrojen peroksitin moleküler oksijen ve suya parçalanmasını sağlar böylece hücreler için zararlı olan hidroksil radikalinin oluşumunu engeller. Ayrıca, katalaz enzimi peroksidatif reaksiyonların olusturduğu alkoller, formaldehit, formik asit ve fenoller gibi toksik bilesiklerin etkilerini azaltmada da rol oynar (Ratnam ve ark., 2006).

$$H_2O_2 \xrightarrow{\textbf{katalaz}} H_2O + ½\ O_2 \qquad (\textbf{2.3})$$

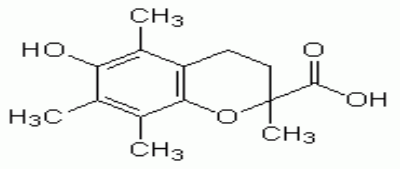
Enzimatik olmayan antioksidanlar

Meyve, sebze ve bitki çayları ile günlük diyetimizde alabildiğimiz antioksidanlardır. Gıdalarda mevcut ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca enzimatik olmayan doğal antioksidanlar; Mineraller (çinko, selenyum), Vitaminler (vitamin C, vitamin A, vitamin K, vitamin E), Karotenoidler (β-karoten, likopen, lutein), Organosulfür bilesikleri (allil sülfit), Polifenoller (flavonoidler, polifenolik asitler), Düsük molekül ağırlıklı antioksidanlar (ürik asit), antioksidan kofaktörler (koenzim Q10), melatonin ve indol türevleri'dir. Bunlar çeşitli sebze, meyve ve tahıllarda ve şifalı bitkilerde (portakal, yabanmersini, böğürtlen,soğan, arı reçinesi, yeşil çay, biberiye, ısırgan otu) bolca bulunurlar. Bitkisel dokularda bulunan tokoferol, askorbik asit, karotenoid ve flavonoidler fenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır.

E vitamini (tokoferoller); hücre membranlarını, lipid peroksidasyonundan koruyan yağda çözünen bir antioksidandır. Doğada E vitamini aktivitesine sahip 8 çeşit tokoferol bulunmaktadır. Monofenolik yapıdaki doğal antioksidanlardandır. Tokoferoller iki yerinde izoprenoid zincir taşıyan C-6 hidroksi kroman trüvleri olup, birbirlerinden C-5., C-7., C-8. yerlerindeki değişenleri ile ayrılır. Bunlardan en önemlisi α- tokoferoldür. Hayvansal kaynaklı besinlerde az miktarda bulunmalarına karşın bitkisel kaynaklı besinlerde bol miktarda bulunur. Bezelye, fasulye, havuç gibi sebzeler, tahıl ve tahıl ürünleri zengin tokoferol kaynaklarıdır (Aust ve diğ, 2001). α-tokoferollün suda çözünen analoğu olan troloks toplam antioksidan kapasite tayin yöntemlerinde sıkça kullanılan standart maddelerdir. Tokoferollerin en önemlileri ve Troloks Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



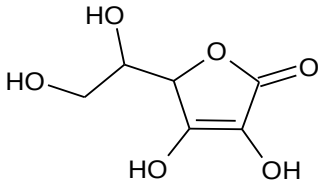
R_1 = CH3, R_2 = CH_3, α -tokoferol
R_1 = CH3, R_2 = H, β -tokoferol
R_1 = H, R_2 = CH_3, γ -tokoferol
R_1 = H, R_2 = H, δ -tokoferol



Troloks

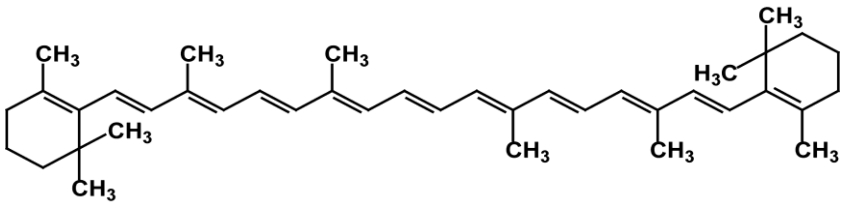
Şekil 2.1 : Tokoferollerin ve Troloks'un yapısal formülleri.

Askorbik asit (C vitamini); doğada pek çok bitki ve meyvede bulunan doğal bir antioksidandır (Şekil 2.2). Doğal kaynaklardan ekstraksiyon ile elde edilebildikleri gibi kimyasal olarak da sentezlenebilirler. Askorbik asit, lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu elektron vererek durdurur ayrıca α-tokoferol radikalini tekrardan α-tokoferol'e indirgiyerek antioksidan aktivitesine sinerjik etki sağlamaktadır. İnsan vücudunda üretilemeyen askorbik asit, çilek, portakal, kivi, greyfurt,domates, brokoli, kırmızı ve yeşil biber gibi meyve ve sebzelerde bol miktarda bulunmaktadır (Hudson, 1990).



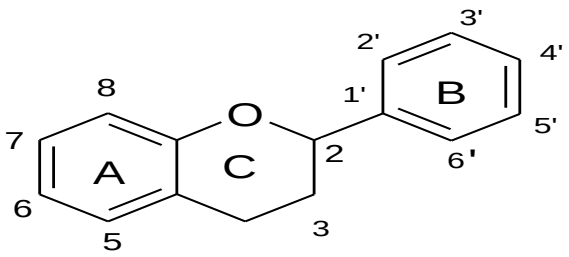
Şekil 2.2 : Askorbik asidin yapısal formülü.

Karotenoidler; yüksek derecede doymamış izoprenidlerdendir. Çifte bağların konjuge yapıda olmalarından dolayı kuvvetli renklidirler. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renkleri bunlardan ileri gelir. Lipofilik antioksidanlar grubuna giren ve suda çözünmeyen fakat yağlarda ve organik çözücülerde çözünen pigmentlerdir. En önemlileri, β- karoten, α- karoten, lutein ve likopendir. En yaygın olarak kullanılanı da, A vitaminin de kaynağını oluşturan β- karotendir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 : β – Karotenin yapısal formülü.

Flavonoidler; bitkilerin sekonder matabolitleri arasında biyolojik etkilerinden dolayı en önemli bileşik sınıflarından birisidir. Bu bileşiklere bitkilerin tüm organlarında rastlanır. Günümüze kadar bitkilerden 6000'den fazla flavonoid özellikli bileşik bulunmuştur. Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının (A ve B) propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ($C_6 – C_3 – C_6$) yapısı teşkil eder. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.4). Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar.

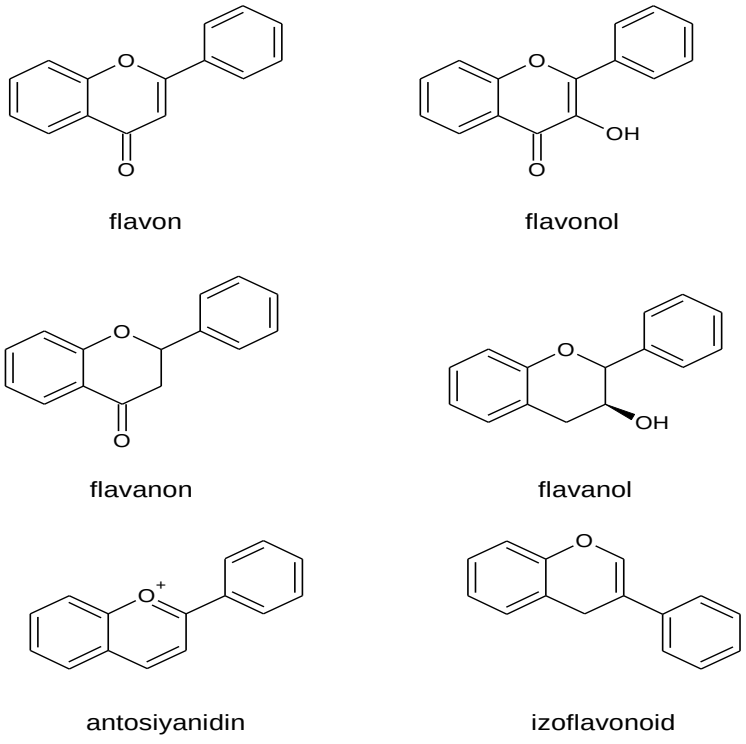


Şekil 2.4 : Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı.

Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması nedeniyle, flavonoidler alt sınıflara ayrılır. Altı üyeli, hetero halkanın oluşması ile meydana

gelen trisiklik sistem ise, hetero halkanın yükseltgenme derecesine bağlı olarak, iki farklı yapıda bulunabilir. Bunlardan birisi flavon, diğeri ise flavandır. Genellikle flavon türevlerine flavonoidler, flavan türevlerine ise flavanoidler denir (Bilaloğlu ve Harmandar, 2004). Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları (Şekil 2.5), sınıflandırılması, adları ve bazı besin kaynakları çizelge 2.1'de verilmiştir (Heim ve diğ, 2002).

Son zamanlarda yürütülen araştırmalar, bazı flavonoidlerin superoksit (Bors ve diğ, 1990) ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığını (Yuting ve diğ, 1990), lipid peroksil radikallerini indirgediğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (Javanovic ve diğ, 1994). Gıdalarda yaygın olarak 3-*orto* glikozitleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Flavonoid bileşiklerin yapılarına bağlanan hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal bağlama aktivitesine sahiptirler (Heim ve diğ, 2002; Ma ve Cheung, 2007).

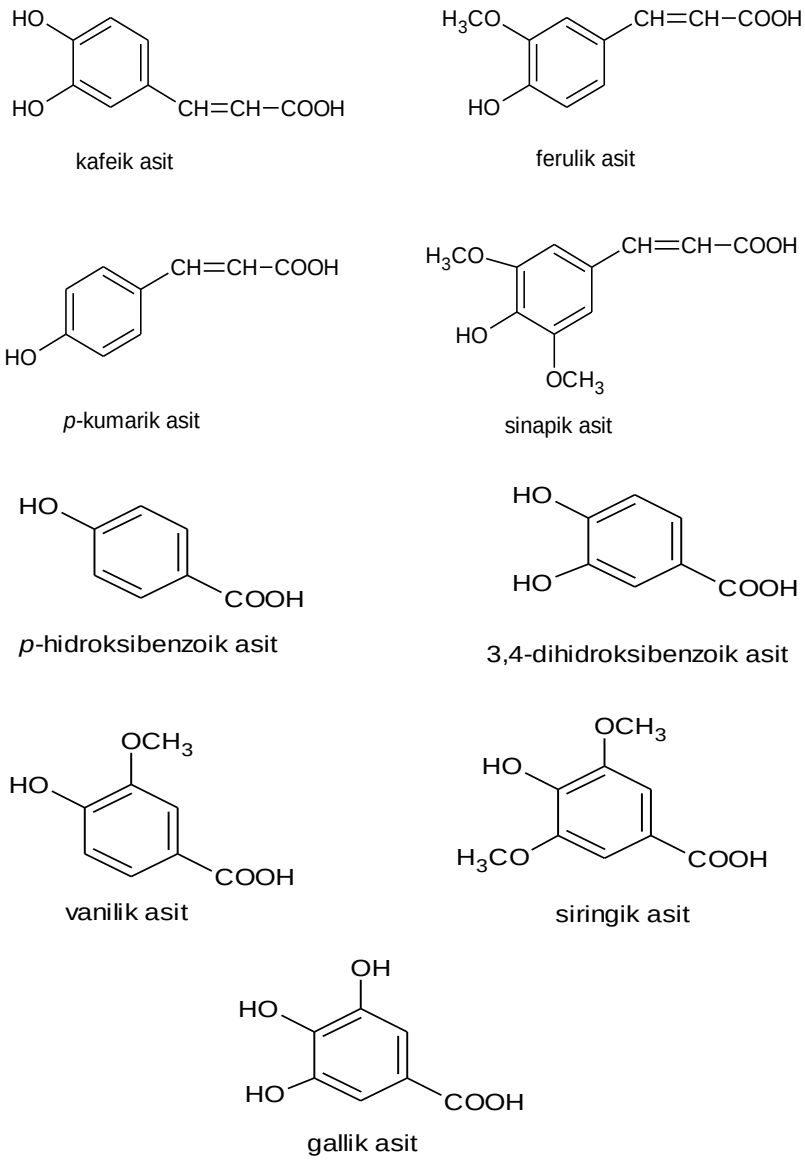


Şekil 2.5 : Flavonoidlerin sınıflandırılması.

Çizelge 2.1 : Flavonoidlerin sınıflandırılması, adları, sübstitüsyon modelleri ve gıda kaynakları.

Flavonoid sınıfları	Adları	Sübstitüsyon modelleri	Gıda kaynakları
Flavonlar	Apigenin, Luteolin	5,7,4'-OH; 5, 7, 3', 4'-OH	Elma kabuğu, Kereviz, Kırmızı şarap, Kırmızı biber
Flavonoller	Quercetin, Rutin, Kamferol, Morin	3,5,7, 3', 4'-OH; 5, 7, 3', 4'-OH,3-rutinoz; 3,5,7, 4'-OH; 3,5,7, 3', 4', 5'-OH	Soğan, Elma, Çay, Üzüm, Brokoli, Isırgan otu
Flavanoller	Kateşin, Epikateşin, Epigallokateşin gallat	3,5,7, 3', 4'-OH; 3,5,7, 3', 4', 5'-OH; 3,5,7, 3', 4', 5'-OH, 3-gallat	Çay
Flavanonlar	Hesperidin, Naringenin, Naringin	3,5,3'-OH, 4'-OMe,7-rutinoz; 5, 7, 4'-OH; 5, 4'-OH,7-ramnoglukoz	Turunçgiller, Greyfurt
Antosiyaninler	Siyanidin	3,5,7, 3', 4'-OH	Üzümsü renkli meyveler, vişne, çilek, kırmızı üzüm
İzoflavonlar	Genistin, Daidzein	5, 4'-OH,7-glukoz; 7, 4'-OH	Soya fasülyesi

Fenolik asitler; bitkilerde çok miktarda bulunan hidroksi-sinnamik ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur (Şekil 2.6). Hidroksi-sinnamik asitler; p-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit ve klorojenik asit'den oluşmaktadır. Yapılarındaki -CH=CH-COOH gruplarının varlığı, hidrojen atomu verebilme yeteneklerini arttırır. Hidroksi-benzoik asitler; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit ve resorsilik asittir (Heim ve diğ, 2002).

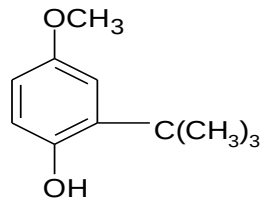


Şekil 2.6 : Fenolik asitlerin kimyasal yapıları.

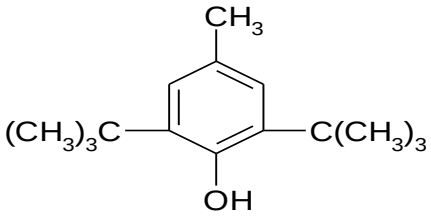
2.2.3.2 Sentetik antioksidanlar

Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), hayvansal ve bitkisel yağlarda yüksek oranda çözülebilen çok etkili fenolik yapıdaki sentetik bir antioksidandır. BHA'nın etkisi, hayvansal yağlardaki performansına kıyasla bitkisel yağlarda daha etkisizdir. Bunun nedeni, bitkisel yağlardaki önemli miktardaki doğal tokoferol içeriğidir. BHA'nın diğer önemli bir özelliği ise, BHT ve galat esterleri ile sinerjik etki oluşturmaktadır. Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), hayvansal yağlarda çok etkilidir ama aynı durum bitkisel yağlar için geçerli değildir. BHT, BHA ile aynı özelliklere sahip olmasına karşın gıda işlem proseslerinde yüksek sıcaklıklara dayanma kapasitesi BHA kadar iyi değildir. Gıdalarda kullanımı % 0,02 oranındadır. Tersiyer bütil hidrokinon (TBHQ), bitkisel yağlar için en etkili antioksidanlardandır. Yüksek sıcaklıklara

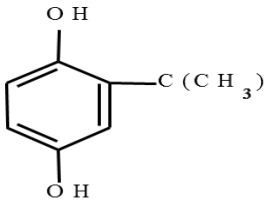
dayanıklıdır ve BHA ve BHT'den daha az uçucudur. Amerika'da kullanımına izin verilmesine karşın Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır. Sentetik antioksidanlar, gıdalara % 0,02 oranında katılır (Şekil 2.7).



BHA (Butillenmiş hidroksianizol)



BHT (Butillenmiş hidroksitoluen)



TBHQ (Tersiyer bütil hidrokinon)

Şekil 2.7 : Sentetik antioksidanların kimyasal yapıları.

Çizelge 2.2 : Antioksidanların sınıflandırılması.

ANTİOKSİDANLAR							
Enzimatik Antioksidanlar	**Enzimatik Olmayan Antioksidanlar**						
Enzimler	**Mineraller**	**Vitaminler**	**Karotoneidler**	**Orgonosülfür bileşikleri**	**Kofaktörler**	**Polifenoller**	
SOD, Katalaz, GSH-Px	Çinko, Selenyum	A, C, E, K	β-karoten, Likopen, Lutein	Allium, Allil sülfit, İndoller	Koenzim Q10	**Flavonoidler** (Flavonoller, İzoflavanoidler, Flavanoller, Antosiyanidinle, Flavanonlar, Flavonlar)	**Fenolik Asitler** (Hidroksi-sinamik asitler; ferulik, *p*-kumarik asit, Hidrobenzoik asitler; gallik asit, ellagik asit)

2.3 Antioksidanların Etki Mekanizmaları ve Antioksidan Kapasiteye Etki Eden Faktörler

Antioksidanların, ROS'nin oluşumunu engellemek ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Bu etki mekanizmalarını sıralayacak olursak (Rice-Evans ve diğ, 1997; Shahidi, 1996):

Toplayıcı etki; ROS'ni etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif olan yeni bir moleküle çevirirler. Antioksidan enzimler ROS ile bu şekilde etkileşirler.

Bastırıcı etki; ROS'leri ile etkileşip onlara hidrojen iyonu aktararak aktivitelerini azaltma veya önleme şeklinde etki ederler. Askorbik asit, α-tokoferol, flavonoidler bu şekilde etki ederler.

Zincir kırıcı etki; ROS'ni bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp aktivitelerini engeleyici etkidir. Hemoglobin, albümin gib bileşikler bu şekilde etki eder. Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincir reaksiyonlarını kırmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bundan dolayı antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder.

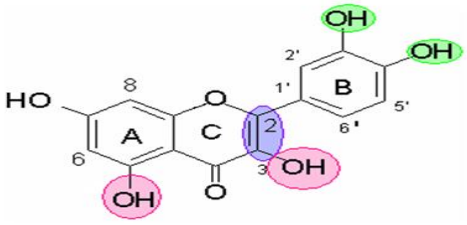
Onarıcı etki; serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması şeklinde etki eder.

Polifenollik antioksidanlar bitki dünyasının büyük bir kısmında yer almakta ve güçlü antioksidanlar olup antioksidan özellikleri kimyasal yapılarına bağlıdır (Brown ve diğ, 1998; Sabe ve diğ, 1996). Polifenolik antioksidanların (flavonoidlerin ve metabolitlerinin) konfigürasyonlarının ve toplam hidroksil gruplarının antioksidan kapasiteyi büyük oranda etkilediği bulunmuştur (Cao ve diğ, 1996, 1997; Heim ve diğ, 2002).

Fenolik asitleri ve flavonoidlerin serbest radikalleri süpürme yeteneği, indirgeme potansiyellerinin alkil peroksit radikalinden ve superoksit radikalinden daha düşük olmasından kaynaklanır. Bu şekilde serbest radikallerin inaktivasyonu sağlanır (Shahidi ve Wanasundara, 1992).

Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin farklılaşmasına neden olan unsurları sıralayacak olursak:

- ✓ B halkasındaki o-dihidroksi yapısı elektron delokalizasyonunu sağlar ve radikal formun stabilitesini arttırır.
- ✓ 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ, C halkasının 4. karbon atomunda keto grubunun oluşmasını sağlar ve radikalin B halkasında elektron delokalizasyonu artırır.
- ✓ C ve A halkasında 3. ve 5. Pozisyonlarında bulunan hidroksil grupları maksimum radikal süpürme potansiyeli için gereklidir.
- ✓ Flavonoidlerin antioksidan etkileri hidroksillenme derecesine göre artarken, yapıya bağlanan glikozit yapılara göre de azalır (Shahidi ve Wanasundara, 1992).



Şekil 2.8 : Flavonoidlerin antioksidan kapasitelerine kimyasal yapılarının etkisini gösteren kimyasal yapı.

Flavanoidlerin antioksidan etkisi direkt olarak hidroksilasyon derecesi ile ilgilidir. Flavonoidler hidroksil ve peroksil radikallerini ve superoksit anyonunu etkili bir şekilde söndürür (Bors ve diğ, 1990). B halkasının 3',4'-dihidroksi subtitüsyonu antioksidan aktiviteyi arttırır (örnek: kuersetin). B halkasının para pozisyonunda bulunan hidroksil gruplarına sahip bileşiklerde güçlü antioksidan etki gözükmektedir. Flavonoidlerin serbest radikalleri süpürme yeteneği, en çok 3-OH ve 3',4'-dihidroksi kateşol yapısına sahip olmalarına bağlıdır. Örneğin kuersetin, siyanidin ve kateşinin antioksidan kapasiteleri bu özelliklere sahip olduklarından dolayı yüksektir (Heim ve diğ, 2002). Bu ilk üç özellik kuersetinin yapısında olduğu için flavonoidler içinde en yüksek antioksidan kapasite değerine sahipdir. Şekil 2.8'de, kuersetinin kimyasal yapısı üzerinden antioksidan kapasiteyi belirleyen özellikleri incelediğimizde ise öncelikle orto-dihidroksillenmiş B halkası (kateşol yapının), C halkasınadaki mor renkle gösterilen doymamış yapının, C halkasındaki 4-okso fonksiyonel grubun bulunması, yeşil ve pembe renkli bölgelerde hidroksil gruplarının bulunması kuersetinin çok güçlü bir antioksidan olmasına sebep olmaktadır.

2.4 Literatürdeki Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

Antioksidan bileşiklerin, bitki, sebze ve meyve ekstraktlarının, biyolojik sıvıların toplam antioksidan kapasite veya aktivitesini ölçmek için literatürde çok sayıda metot geliştirilmiştir. Antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite birbiriyle sıklıkla karıştırılan terimlerdir fakat bu iki terim birbirlerinden farklı anlamlarda kullanılmaktadır. Antioksidan aktivite, bir antioksidan ile oksidan arasındaki reaksiyonun hız sabitinden bahsetmektedir. Antioksidan kapasite ise belli bir miktar örneğin serbest radikal süpürme miktarını ölçer. TAC ölçümleri, örnek içersindeki antioksidanların heterojen karışımlarının serbest radikalleri süpürme yeteneklerinin bir ölçüsüdür. Literatürdeki antioksidan kapasite yöntemlerinde farklı oksidan bileşikleri kullandığından ve farklı optimum şartlar içersinde çalışıldığından dolayı aynı örnek için farklı antioksidan kapasite değerleri elde edilmektedir (Ghiselli ve diğ, 2000). TAC yöntemleri, elektron transferine (ET), hidrojen atom transferine (HAT) ve ET/HAT transferine dayanan yöntemler olmak üzere kimyasal reaksiyon açısından temel olarak üçe ayrılırlar (Huang ve diğ, 2005; MacDonald-Wicks ve diğ, 2006; Prior ve diğ, 2005).

ET'ne dayanan yöntemler; FCR, FRAP, CUPRAC ve CERAC yöntemleri, HAT'ne dayalı yöntemler; TRAP**,** Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA)**,** Luminol ve ORAC yöntemleri ve ET/HAT'ne dayanan yöntemler ise; ABTS/ TEAC ve DPPH yöntemleridir. Ancak bu yöntemlerin birçok eksikliği ve uygulama sınırları olmasından dolayı yeni antioksidan tayin yöntemleri geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (Lesuy ve diğ, 2001; Apak ve diğ, 2007; MacDonald-Wicks ve diğ, 2006; Huang ve diğ, 2005; Frankel ve Meyer, 2000).

2.4.1 Hidrojen atom transferi esaslı yöntemler

Antioksidan tayin yöntemlerinin reaksiyon kinetiklerinin doğrudan ölçümü deneysel olarak zordur. Bu nedenle antioksidan kapasitenin ölçümü için uygun yöntemler gerekmektedir. Son zamanlardaki klorometrik veya florometrik antioksidan kapasite yöntemlerinin çoğu zincir yayılma basamağı olmaksızın bir radikal reaksiyonu sağlarlar. Genelde bu yöntemler, okside olduğunda floresans özellik gösteren moleküler prob ihtiva eden çözeltilere peroksil radikallerinin sürekli akışı ile gerçekleşir. Ayrıca, eklenen antioksidanlar oksidasyon için probe ile yarışırlar. Antioksidan ilave edilmeden ve antioksidan ilave edildikten sonraki aradaki farkın belirlenmesi bileşiğin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde yardımcı olur.

HAT'e temeline dayanan yöntemler sentetik bir radikal üreticiden, yükseltgenebilir moleküler probdan ve bir antioksidan bileşikten oluşur (Huang ve diğ, 2005; Ou ve diğ, 2001).

2.4.1.1 TRAP (toplam peroksil radikal tutma antoksidan parametresi) yöntemi

TRAP (Total peroxyl radical-trapping antioxidant parameter) yöntemi, insan plazma ve serumdaki TAC'sini ölçmek için kullanılan başlıca metotlardandır. TRAP ve modifiye TRAP yöntemleri; bir örnekte bulunan tüm antioksidanların tükenmesi için gerekli zamanın ölçümüne dayanan yöntemlerdir.

Wayner ve diğ. (1985) geliştirmiş olduğu bu metot,seum veya plazmada TAC ölçümü için kullanılan başlıca yöntemlerdendir. TRAP yöntemi, 2,2´-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür (AAPH), peroksil radikallerinin oluşumunda kullanılır. Peroksil radikallerinin lipid substratından hidrojen koparmaya yeterli enerjileri vardır ve böylece bir lipid peroksidasyon zinciri başlatırlar. Wayner yönteminde çözünmüş oksijenin reaksiyon boyunca tüketiminin ölçülmesi ile oksidasyon hızı belirlenir. Bu oksidasyon, indüksiyon periyodu boyunca plazmadaki antioksidanlar tarafından engellenmektedir. İndüksiyon periyodu ölçülerek plazmadaki TAC'si, iç standart olarak kullanılan troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır ve plazmanın bir litresiyle süpürülmüş peroksil radikallerinin mikromolleri cinsinden ifade edilir (Wayner ve diğ, 1985). TRAP yönteminin en önemli dezavantajı, oksijen elektrodu ile ilgilidir. Oksijen elektrodu, gereken zaman periyodunda kararlılığını sağlayamamaktadır ve oksijen tüketimi doğru olarak tayin edilememektedir. Ayrıca her bir örneğin analizi çok uzun bir zaman almasından dolayı pratik bir yöntem değildir.

DeLange ve Glazer (1989) tarfından modifiye edilen TRAP yönteminde floresans prob olarak R-PE (R-fikoeritrin) kullanılmıştır. Ortamdaki serbest radikaller R-PE'nin floresansında azalmaya neden olur bu durumda antioksidanlar tarafından yavaşlatılır, oksidatif reaksiyonların görüntülenmesine imkan sağlar. Bu yöntem ile doğrudan peroksil radikallerinin hedef molekül üzerine etkisi ölçülmüş olur ve oksijen tüketiminin ölçülmünden kaynaklanan hatalar da giderilmiş olur. Bu yöntemin zayıf noktasi ise R-PE oksidasyonu üzerinde yalnız antioksidanların etkilerinin ölçülebilmesidir (DeLange ve Glazer, 1989).

Ghiselli ve diğ. (2000) geliştirdiği yöntemde ise orijinal TRAP esas alınarak AAPH (2,2´- azobis (2-amidino propan) dihidroklorürün bozunması vasıtasi ile sabit hızda peroksil radikali üretme özelliğine dayanır. AAPH'nin eklenmesiyle floresans özellikteki R-PE'nin floresansında lineer bir azalma meydana gelir(λ_{ex} = 495 nm ve λ_{em} = 575 nm). Plazma ve yalnız antioksidanların eklenmesiyle de antioksidan miktarıyla orantılı olarak bir gecikme meydana getirilir.

$$C_{troloks} / T_{troloks} = \chi / T_{plazma} \quad \textbf{(2.4)}$$

$C_{troloks}$; troloks derişimi, $T_{troloks}$; troloks bulunduğu ortamdaki R-PE'nin kinetik grafiğinin gecikme zamanı, χ; plazmanın antioksidan kapasitesi, T_{plazma} ; plazmanın bulunduğu ortamdaki kinetik grafiğin gecikme zamanıdır. Daha sonra bulunan değer troloksun stokiyometrik faktörü ve örneğin seyrelme faktörü ile çarpılarak elde edilir ($\mu molL^{-1}$). Bu yöntem de özellikle biyolojik sıvılar ile çalışıldığında çeşitli sorunlar yaşanmıştır. Örneğin kan ile çalışıldığında işlemler boyunca antioksidanların stabil kalmadığı, çalışılan biyolojik örnekler içersinde protein ve urik asit olması durumunda analiz sonuçlarına etki ettiği gözlenmiştir (Ghiselli ve diğ, 2000). TRAP yönteminin en önemli avantajı serum ve plazma gibi biyolojik materyallerdeki glutatyon, ürik asit ve askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanların süpürücü aktivitelerini ölçerler (Huang ve diğ, 2005). TRAP yönteminin en büyük dezavantajı ise karışık ve zaman alıcı bir yöntemdir.

2.4.1.2 Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) yöntemi

Valkonen ve Kuusi (1997)'nin geliştirmiş olduğu bu yöntemin temelini de TRAP yöntemi oluşturmaktadır. Bu analiz yönteminde AAPH, peroksil radikali oluşturmak için kullanılmakta ve DCFH-DA ise yükseltgenebilen subsurat olarak kullanılmaktadır. Peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan diklorofloresein (DCF) yüksek floresans özelliğe sahiptir. DCF, 480 nm de uyarılıp 526 nm de emisyon yapmaktadır. Ayrıca 504 nm de maksimum absorbansa sahiptir. Bu açıdan hem floresans yöntemi hem de spektrofotometrik yöntem kullanılarak DCF miktarı ve buna bağlı olarak TAC'si hesaplanır. Bu yöntemde TAC'si iki aşamada hesaplanmaktadır. İlk aşamada, numune içindeki antioksidanların kapasitesi, gecikme zamanı cinsinden hesaplanır daha sonra aynı numune üzerine miktarı bilinen trolox çözeltisi ilave edilir, trolox çözeltisi serbest radikaller tarafından tüketilir ve böylece ikinci gecikme zamanı hesaplanır. Bu iki

gecikme zamanı arasındaki farktan yararlanarak trolox cinsinden TAC'si bulunur (MacDonald-Wicks ve diğ, 2006).

2.4.1.3 Luminol yöntemi

Alho ve Leinonen (1999)'in geliştirmiş olduğu bu yöntemin temelini kemiluminesans-TRAP yöntemi oluşturmaktadır. AAPH bileşiğinden elde edilen peroksil radikalleri yükseltgenebilir subsrat (luminol) ile oksidasyonu sonucu ışık yayan luminol radikalleri oluşur. Oluşan bu ışık luminolmetre denilen cihazlarla ölçülür. Örnekteki antioksidanlar kemiluminesans ışımasının oluşumunu belli bir zaman için engeller (gecikme zamanı). Gecikme zamanı örnekteki toplam antioksidan potansiyeli ile doğrudan orantılıdır. Elde edilen sonuçlar trolox cinsinden hesaplanır (Ghiselli ve diğ, 2000; Whitehead ve diğ, 1995).

Whitehead ve diğ. (1992) orijinal luminol yöntemine bazı ilaveler yaparak geliştirmiştir (Ghiselli ve diğ, 2000; Huang ve diğ, 2005). Luminollün H_2O_2 veya perborat ile yükseltgenmesinden yararlanılır. Reaksiyonun daha hızlı gerçekleşebilmesi için katalizör (HRP;horserodish peroksidase) kullanılmış ve ışık yayılması daha çabuk olmuştur. Normal şartlar altında bu reaksiyon hızla azalan düşük şiddetli bir ışık yayılması olarak gerçekleşir. Reaksiyon ortamına p-iyodofenol ilave edildiği zaman ışık emisyonu daha şiddetli, uzun süreli ve kararlı bir hale gelir. Işığın luminol radikalleri tarafından yayılması için ortamdaki bütün antioksidanların tüketilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu yöntem antioksidan girişimine karşı duyarlıdır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, incelenen antioksidanların yalnızca AAPH' dan oluşan radikalleri değil luminol radikallerini de indirgeyebilecek olmasıdır.

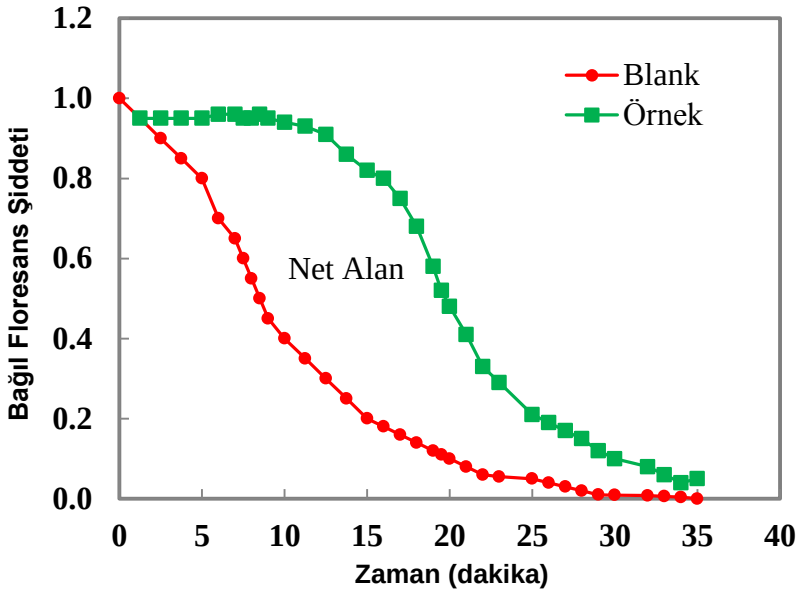
TRAP ve benzer yöntemler, mevcut antioksidanlar hakkında bilgi verir ancak tek tek antioksidan bileşiklere uygulandığında sadece ortama katılan antioksidan bileşiğin molekül başına yakaladığı radikal sayısını ifade eden stokiyometrik faktörlerle belirtilir. İndüksiyon(gecikme) zamanlarının ölçümüne dayalı bu yöntemlerin diğer bir sakıncası da karmaşık örneklerde sinyal eldesinin bazen yavaş olması ve bir indüksiyon zamanı değerlendirmesine olanak vermemesidir.

2.4.1.4 ORAC (oksijen radikal absorbans kapasitesi) yöntemi

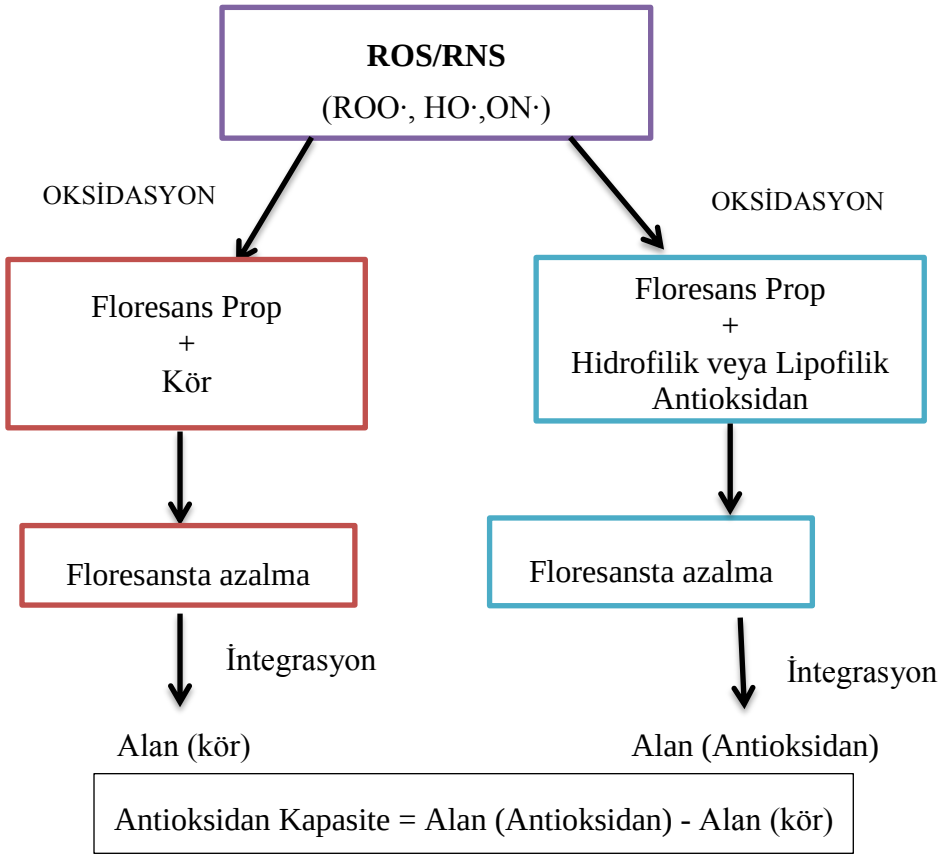
ORAC yöntemi ve benzeri yöntemler de, tayin edilecek antioksidan bileşiğin serbest radikal bulunan bir ortama ilave edilmesi sonucu ortamdaki radikalin tüketiminin

ölçümüne dayanan yöntemlerdir. ORAC yönteminde peroksil radikallerini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikali oluşturmak için Cu(II)-H_2O_2, yükseltgenebilir substrat olarak β- veya R-PE (R-fikoeritrin) kullanılmıştır. β- veya R-PE substratının peroksil veya hidroksil radikalleri varlığında gösterdiği floresansın zamanla lineer olarak azalmasından yararlanılarak TAC'si hesaplanmaktadır. Serbest radikal etkisini inceleyen ve eğri altında kalan alan tekniğini miktar tayininde kullanan bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini hem de süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir. ORAC yöntemi ile değişik biyolojik örneklerin, melatoninin, flavonoidlerin, çay, meyve ve sebzeler gibi kompleks matrislerin ve hayvan dokularının antioksidan kapasitesi hakkında bilgi edinebiliriz (Cao ve diğ, 1998, 1999; Frankel ve Meyer, 2000; Ghiselli ve diğ, 2000; Wayner ve diğ, 1985).

ORAC yöntemi başlangıçta Ghiselli ve diğ. (2000) ve Glazer (1990) tarafından çalışılmıştır. Cao ve diğ. (1993) tarafından geliştirilmiştir. Orjinal ORAC yönteminde peroksil radikallerini oluşturmak için AAPH, yükseltgenebilir substrat olarak β- PE (β -fikoeritrin) kullanılmıştır. Fakat β- PE kullanımının uyarma ışını ile fotokimyasal olarak bozunması, kullanılan proteinin peroksil radikalleri ile tutarsız sonuçlar vermesi düşük ORAC değerlerini elde etmemize neden olur. Ou ve diğ (2001), arkadaşları yöntemi modifiye ederek probu değiştirmiş ve yükseltgenebilir substrat olarak Fluorescein (FL) kullanmıştır. Trolox ile FL çözeltileri karıştırılıp 37˚C'de inkübe edilir ve AAPH ilavesiyle reaksiyon başlatılır. Floresans şiddeti (485 nm uyarılma, 525 nm emisyon) 35 dakikaya kadar her bir dakika için ölçülür. Reaksiyon süresince FL tükenir ve floresan şiddeti azalır. ORAC yönteminde eğri altındaki net AUC ($AUC_{örnek} - AUC_{boş}$) alanı hesaplanır (Şekil 2.9-10). Trolox derişimi ile net AUC arasında grafik çizilir ve standart eğri kullanılarak örneğin trolox ekivalenti olarak aktivitesi hesaplanır (Prior ve diğ, 2013). ORAC testi hidrofilik ve lipofilik ekstrelerin antioksidan kapasitesini ölçer. Ancak, ORAC reaksiyonu sıcaklığa duyarlı bir reaksiyon olduğundan, reaksiyon boyunca sıcaklık kontrolü önemlidir. Küçük sıcaklık farklılıkları tekrar üretilebilirliği azaltır. Uzun analiz zamanı (~1 saat) önemli bir eleştiri olmuştur.



Şekil 2.9 : ORAC yöntemiyle antioksidanın koruyucu etkisinin, floresans bozunma eğrisinin altındaki integre edilmiş net alandan hesaplanması (Büyüktuncel, 2013).



Şekil 2.10 : ORAC yönteminin şematik prensip diyagramı.

2.4.2 Elektron transfer esaslı yöntemler

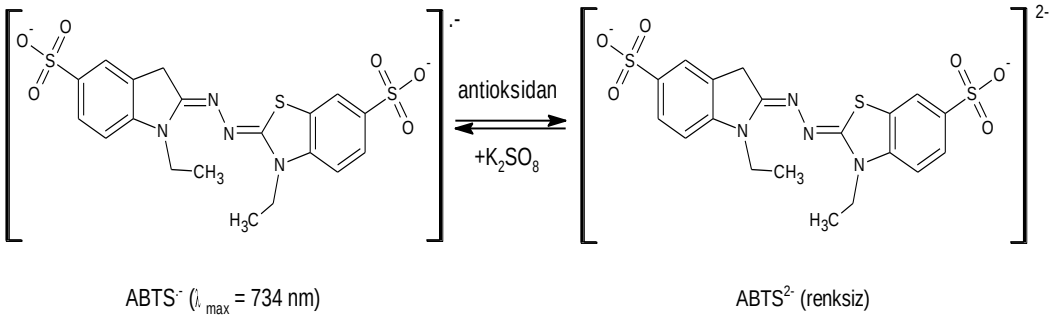
2.4.2.1 ABTS/ TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi) yöntemi

ABTS/TEAC yöntemi ilk defa Miller ve diğ. (1993) tarafından geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemde $ABTS^{\cdot+}$(2,2′- azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6 sülfonat) bileşiğinden renkli katyon oluşturarak, bu katyonu oluşturarak, bu katyonun antioksidanlar tarafından indirgenmesi temeline dayanmaktadır.

TEAC yönteminde; metilmiyoglobinin H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu oluşan ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşmesinden meydana gelen $ABTS^{\cdot+}$(2,2′- azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat) radikal katyonunun 645 nm, 734 nm ve 815nm dalgaboylarında verdiği maksimum absorbansının antioksidanlar tarafından söndürülmesine dayanır. Radikal katyonunun absorbansındaki azalmadan yararlanılarak antioksidan kapasitesi trolox eşdeğeri cinsinden verilir (Miller ve diğ, 1993). TEAC yöntemiyle plazma antioksidanlarının ve bitkilerdeki flavonoid ve fenolik asitlerin radikal süpürme aktiviteleri bulunmuştur. TEAC kapasitesi, incelenen antioksidanın 1mM'lık çözeltisinin ABTS radikalinin absorbansını azaltmada kaç mM trolox çözeltisine eşdeğer davrandığının göstergesidir. (Rice-Evans ve Miller, 1994; Rice-Evans ve diğ, 1996). Bu yöntemin dezavantajı, numuneler içindeki antioksidan maddelerin $ABTS^{\cdot+}$ radikallerini indirgemesi yanında ferrilmiyoglobin radikallerini de indirgeyebilmesidir.

TEAC yöntemi, Re ve arkadaşları tarafından modifiye edilmiştir. Modifiye edilen bu yöntemde $ABTS^{\cdot+}$ radikali, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu şekilde hazırlanan $ABTS^{\cdot+}$ radikali, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 2 gün süresince dayanıklıdır (Re ve diğ, 1999; Labrinea ve Georgiou, 2004). TEAC yönteminin uygulaması, kolay olduğundan pek çok araştırma laboratuarında TAC ölçümleri için kullanılmaktadır. Radikal düşük redoks potansiyeline sahiptir (0,68 V) ve düşük redoks potansiyeline sahip fenoliklerin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için ugundur. $ABTS^{\cdot+}$ radikali hem sulu hem de organik çözücü ortamlarında çözündüğü için hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayinine olanak tanır. Ancak, ABTS radikali kullanılarak bulunan TAC ölçümleri farklı modifikasyonlar sonucu farklı değerler elde edilmesine sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda sonuçlar troloks antioksidan standardının gösterdiği aktiviteye oranlanarak antioksidan derişiminin troloks eşdeğeri olarak bulunmasına neden olmaktadır. Bu durumda çalışılan ortama bağlı olarak bulunan sonuçlar birbirinden

farklı çıkabilmektedir. TEAC yönteminin bir diğer dezavantajı ise bazı antioksidanların yavaş reaksiyona girmelerinde dolayı 4-6 dakika içinde yapılan ölçümlerde reaksiyon tamamlanmadan okumalar yapıldığından daha düşük TEAC değerlerinin bulunmasına neden olmaktadır (Prior ve diğ, 2005).



Şekil 2.11 : ABTS ile persülfat arasındaki reaksiyon neticesinde oluşan ABTS radikalinin antioksidan bileşik ile etkileşimi.

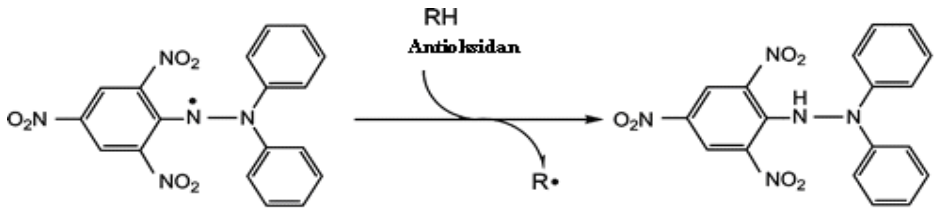
2.4.2.2 ABTS/ H_2O_2/ horseradish peroksidaz (HRP) yöntemi

Arnao ve diğ. (2001), orijinal TEAC yöntemini modifiye ederek enzimatik tayin yöntemi geliştirmişlerdir. $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun oluşumunda katalizör olarak HRP kullanılmıştır. $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun 414 nm de antioksidan ilave edilmeden ve edildikten sonraki absorbans değerindeki azalma ölçülerek toplam antioksidan aktivitesi bulunmuştur. Bu yöntem ile hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidan aktivitesi tayin edilebilmektedir (Arnao ve diğ, 2001; Cano ve diğ, 1998; Chen ve diğ, 2007).

$$ABTS + H_2O_2 \xrightarrow{HRP} ABTS^{+} + H_2O \qquad \textbf{(2.5)}$$

2.4.2.3 DPPH (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemi

DPPH yöntemi, $DPPH^{\cdot}$ radikalinin antioksidanlar tarafından redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürücü etkilerinin ölçümüne dayalı bir yöntem olup basit, hızlı ve yüksek hassasiyete sahip olduğundan antioksidan tayinlerinde tercih edilen yöntemlerdendir. Şekil 2.12'de $DPPH^{\cdot}$ radikali kararlı, ticari olarak kullanabilen azotlu reaktiflerdendir ve koyu menekşe renktedir. Bu radikalin antioksidanlar ile etkileştip hidrojen aldığı mekanizma gösterilmektedir. Oluşan kırmızı renkli $DPPH^{\cdot}$ radikalinin 517 nm'de maksimum absorbansındaki azalışı ölçülerek toplam antioksidan aktivitesi ölçülmektedir. $DPPH^{\cdot}$ radikali sadece organik çözücü ortamında çözündüğünden hidrofilik antioksidanların tayinin de yetersizdir. DPPH, oksijen, ışık, nem ve pH değişimlerinden etkilenmektedir (Magalhães ve diğ, 2006).



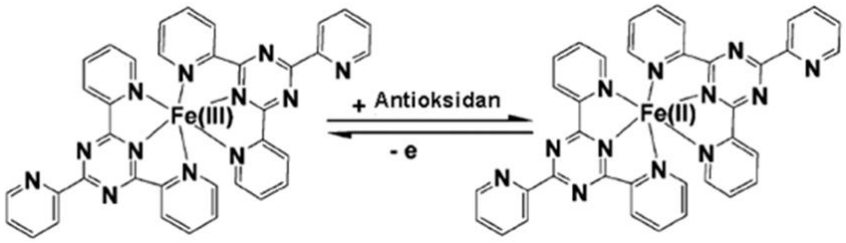
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil radikali (DPPH$^{\cdot}$) 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)

Şekil 2.12 : DPPH$^{\cdot}$ radikalinin antioksidanlarla etki mekanizması.

2.4.2.4 FRAP (demir (III) indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi

Benzie ve Strain (1996) tarafından geliştirilen bu yöntemde pH 3,6 ortamında Fe(III)-tripridiltriazin (Fe(III)– TPTZ) kompleksi antioksidanların etkisi ile Fe(II)-tripridiltriazin (Fe(II) – TPTZ) kompleksine indirgenir. Meydana gelen mavi renkli Fe(II)– TPTZ kompleksi 593 nm de maksimum absorbans vermektedir (Şekil 2.13). Basit ve ucuz bir yöntem olan FRAP metodu renkli bir bileşik oluşturmak üzere antioksidanları indirgeyebilme kapasitelerini ölçmektedir (Benzie ve Szeto, 1999).

Canlı metabolizmalarındaki antioksidan kapasitelerinin FRAP yöntemi ile ölçülmesi durumunda, Fe(II) iyonlarının ortamdaki H_2O_2 iyonları ile etkileşmesi ($^{\cdot}OH$) hidroksi radikallerinin oluşmasına sebep olur. Bu nedenle örnek numuneler içindeki antioksidanların Fe(III)-tripridiltriazin (Fe(III)–TPTZ) kompleksini indirgemesi yanında ortamdaki hidroksil radikalleri ile de etkileşmesinden dolayı antioksidan kapasitesi direkt olarak değil indirek olarak ölçülebilir. Bu nedenle FRAP basit ve ucuz bir yöntem olmasına karşın canlı metabolizmalarındaki bazı antioksidanlar (tiyol grubu içeren, GSH gibi) tayin edilememesi ve bazı hidroksisinnamik asitlerle reaksiyonunun protokol süresinde tamamlanamamasıdır (Benzie ve Strain, 1996; Benzie ve Szeto, 1999; Raquel ve diğ, 2000). Demir(III) indirgeme kapasitesi yoluyla yapılan çalışmalar genellikle geç reaksiyon verir, bunun sebebi yüksek spin demir(III)'ün d orbitallerinde 5 tane eşleşmemiş elektron bulunmasından dolayıdır. Yarı dolu ve tam dolu orbitaller asal gazlarınınkine benzeyen bir kararlılığa, dolayısıyla inertliğe işaret etmektedir. Burada Sert bir Lewis asidi olan Fe(III)'in koordinatif olarak doymuş halde, yumuşak bir Lewis bazı olan tiyol –SH gruplarına saldırmamasıda etken olabilmektedir.

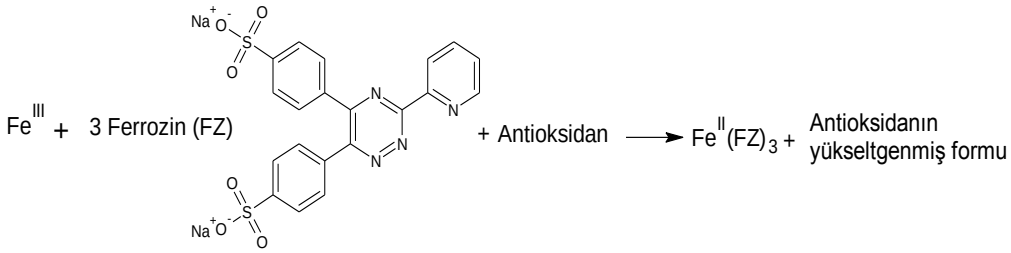


$[Fe(III)(TPTZ)_2]^{3+}$ $[Fe(II)(TPTZ)_2]^{2+}$, λ_{max}= 593nm

Şekil 2.13 : FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim.

2.4.2.5 Fe(III)-Ferrozin yöntemi

Bu yöntem, pH 5,5 ortamında Fe(III)-Ferrozin kompleksinin antioksidanlarla etkileşip Fe(II)-Ferrozin kompleksine indirgenemesi ve oluşan magenta rengi kompleksin 562 nm dalgaboyunda absorbansının ölçülmesi esasına dayanır (Şekil 2.14) (Berker ve diğ, 2010b). Ferrozin yöntemi yüksek molar absorblama katsayısına sahip olmasından dolayı hassas bir yöntemdir (Molina-Diaz ve diğ, 1998; Stookey, 1970). Aynı zamanda maliyetinin de düşük olması bu yöntemin avantajlarındandır. Berker ve diğ. (2010) tarafından geliştirilen bu yöntem bitki çaylarına uygulanarak toplam antioksidan kapasite değeri hesaplanmıştır.



Şekil 2.14 : Ferrozin reaktifinin antioksidanlarla etki mekanizması.

2.4.2.6 SDS Katkılı pH belli Ferrisiyanür Yöntemi

Orijinal Ferrisiyanür yönteminin temeli $[Fe(CN)_6]^{3-}$'ün antioksidanlarla etkileşip $[Fe(CN)_6]^{4-}$'e indirgenmesi, oluşan $[Fe(CN)_6]^{4-}$'ün de ortamdaki Fe(III) ilavesiyle Prusya mavisi oluşturmasına dayanmaktadır. Oluşan Prusya mavisi bir yük-transfer kompleksidir (Berker ve diğ, 2007). Gerçek yükseltgenin Fe(III) veya $Fe(CN)_6^{3-}$ oluşu, ürün olarak Prusya mavisi oluşumunu etkilemez.

$$Fe^{3+} + AO \rightarrow Fe^{2+} + AO \text{ yükseltgenmiş hali} \quad \textbf{(2.6)}$$

$$Fe^{2+} + Fe(CN)_6^{3-} \rightarrow Fe[Fe(CN)_6]^- \quad \textbf{(2.7)}$$

veya

$$Fe(CN)_6^{3-} + AO \rightarrow Fe(CN)_6^{4-} + AO \text{ yükseltgenmiş hali} \quad \textbf{(2.8)}$$

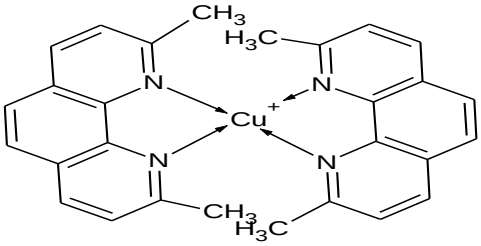
$$Fe(CN)_6^{4-} + Fe^{3+} \rightarrow Fe[Fe(CN)_6]^- \quad \textbf{(2.9)}$$

Oluşan Prusya mavisi kompleksinin 700 nm de (A700) köre karşı absorbansları ölçülür. Orijinal ferrisiyanür yönteminde gözlenen çökmenin önüne geçmek amacıyla yöntem % 1'lik SDS (sodyum dodesil sülfat) kullanılarak modifiye edilmiştir. Oluşan Prusya mavisinin absorbansı 750 nm'de (A_{750}) köre karşı ölçülür (Berker ve diğ, 2007). Oluşan rengin stabilitesinin yaklaşık 1/2 saat sürmesi de orijinal ferrisiyanür yöntemine getirilen bir yeniliktir. Ancak modifiye edilen bu yöntemde aşırı oksidasyon söz konusu olmaktadır.

2.4.2.7 CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) yöntemi

CUPRAC yöntemi, kromojenik bir oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc (bakır(II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifinin indirgen özellikli antioksidanlar tarafından indirgenmesi sonucu oluşan Cu(I)-Nc (bakır(I)-neokuproin) kelatının 450 nm'de absorbansının ölçülmesi esasına dayanan spektrofotometrik antioksidan kapasite tayin yöntemidir (Apak ve diğ, 2004). CUPRAC yönteminde, Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat (pH= 7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, çözeltinin üzerine antioksidan ilave edilir ve 30 dakika sonunda antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir. CUPRAC yöntemi hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanların toplam miktar tayinine elverişli, ucuz ve kolay bir yöntemdir. CUPRAC yöntemi oldukça yaygın bir kullanıma sahip olup,bitki çaylarına (Apak ve diğ, 2006), kayısı ekstraktlarına (Güçlü ve diğ, 2006), insan serumuna (Apak ve diğ, 2005), suda çözülebilen radikal süpürücülere (Bektaşoğlu ve diğ, 2006), bazı polifenolik bileşiklerin tayininde (Apak ve diğ, 2008), flavonoidler varlığında tek başına askorbik asit tayininde (Özyürek ve diğ, 2007a), zayıf asidik katyon değiştiri reçine kullanarak CUPRAC yöntemi reaksiyon ürünü olan $Cu(Nc)_2^+$ kelat kompleksinin önderiştirilmesinde (Özyürek ve diğ, 2007b), lipofilik ve hidrofilik antioksidanların çözünmelerini kolaylaştırıcı bir oligosakkarid olan metil-beta-siklodekstrin kullarak birlikte tayininde (Çelik ve diğ, 2007) modifiye edilerek yöntem başarıyla uygulanmıstır. Bu reaksiyonda polifenoller kendine tekabül eden kinonlara yükseltgenmektedirler.

$$n\ Cu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n \rightarrow n\ Cu(Nc)_2^{+} + Ar(=O)_n + n\ H^+ \qquad \textbf{(2.10)}$$



CUPRAC: Bis(neokuproin)bakır(I) kelat katyonu

Şekil 2.15 : Cu(I)-Nc kompleksinin (kelatının) kimyasal yapısı.

2.4.2.8 CERAC (seryum(IV) indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi

CERAC yönteminin temelini, Ce(IV) ile antioksidanlar arasındaki redoks reaksiyonu oluşturmaktadır. Başlangıçtaki Ce(IV)'ün maksimum dalgaboyundaki (320 nm) absorbans değeri, Ce(IV)'ün antioksidanlar ile reaksiyonu sonucu azalmaktadır. Ce(IV)'ün absorpsiyonundaki bu azalmadan yararlanarak toplam antioksidan miktarı hesaplanmıştır (Ozyurt ve diğ, 2007). CERAC yönteminde, $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisi üzerine antioksidan çözeltisi ilave edilmiş ve karışım biraz karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletilmiştir. Reaksiyon karışımının absorbansı 320 nm de 0,30 M H_2SO_4 ortamında saf suya karşı ölçülmesinden ibarettir. CERAC yöntemi, glikoz bağlı antioksidanların, antioksidan aktivitesini diğer yöntemlere oranla daha yüksek bulmuştur. Bu durum çalışılan ortamda glikoz yapıdaki antioksidanların hidroliz olduğunu göstermektedir. CERAC yöntemi kullanılarak Türkiye'de yetişen kırmızı, sarı ve beyaz soğanların TAC belirlenmiş ve en yüksek antioksidan kapasitenin kırmızı kabuklu soğanda olduğu bulunmuştur (Ozyurt ve diğ, 2013).

2.4.2.9 Folin-Ciocalteu yöntemi

Önceleri protein analizi için geliştirilen Folin-Ciocalteu yöntemi daha sonra toplam fenolik yapı tayininde kullanılmıştır (Folin ve Ciolcalteu, 1927; Singleton ve diğ, 1999). pH 10 ortamında çalışılan bu yöntemde, Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR), molibdofosfotungstik heteropoliasittir ($3H_2O.P_2O_5.13WO_3.\ 5MoO_3.10\ H_2O$). FCR bulunan Mo(VI)'ın fenolik yapılar varlığında Mo(V)'e indirgenmesiyle oluşan mavi renkli kompleksin 765 nm dalgaboyunda absorbansının ölçülmesi esası üzerine dayanmaktadır. Standart olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak (mg/L) ifade edilir.

$$\text{Mo(VI) (sarı)} + e^- \text{ (antioksidan)} \rightarrow \text{Mo(V) (mavi)} \qquad \textbf{(2.11)}$$

Bu yöntemde elde edilen TAC değerleri yüksek çıkmaktadır. Bunun nedeni şu şekilde açıklanabilir; fenolik antioksidanların pH 10'da protonlarını kaybetmesi, yükseltgenmeye daha müsait olması ve FCR'nin yüksek redoks potansiyeline sahip olmasıdır. Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik bileşen analizi sulu fazda bazik ortamda yapılmaktadır. Bahsedilen bu yöntem lipofilik antioksidan analizi için elverişli değildir. Amino asitler, sitrik asit, vitamin C ve indirgen sekerler bu yöntemde enterfere edici etki göstermektedirler. Ayrıca, yöntemin analiz süresinin uzun olması, rutin analizler için uygulamasını zorlaştırmaktadır (Magalhães ve diğ, 2006).

Folin-Ciocalteu (FC) yöntemi ile lipofilik antioksidanların ve askorbik asidin tayini yapılamamaktadır. Bu sebeple yöntem, Berker ve diğ.(2013) tarafından lipofilik ve hidrofilik antioksidanların beraber tayinine olanak sağlayacak şekilde modifiye edilmiştir. Modifiye Folin-Ciocalteu yönteminde FCR, iso-butil alkol ile 1:2 (v/v) oranında seyreltilerek çalışılmıştır. Alkali ortamda çalışılan bu yöntemde (pH 10) orjinal folin yöntemine göre daha kısa sürede (20 dakika) analizler yapılabilmiştir.

2.5 Floresans Ölçümüne Dayalı Antioksidan Tayin Yöntemleri

Literatürde, TAC tayinini spektroflorometrik yollarla yapan yöntemler mevcuttur. Bu yöntemlerin pekçoğu HAT esasına dayanmaktadır: ORAC, TRAP, Luminol ve Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) yöntemlerini sıralayabiliriz. Bu yöntemlerle ilgili detaylı bilgiler Bölüm 2.4.1 de anlatılmıştır.

2.6 Literatürde Ce(IV) ve Ce(III) Reaktifi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

Zhao ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, akış enjeksiyon analiz yöntemi kullanılarak ilaçlarda etken madde olarak kullanılan tiyopronin analizi için yeni bir kemilüminesans (CL) sistemi önerilmiştir. Sülfürik asit ortamında aşağıda gösterilen reaksiyon mekanizması ile analizler yapılmıştır (Zhao ve diğ, 1997).

$$CeIV + Tiopronin\ (thiol)Red \rightarrow CeIII^* + TioproninOx$$

$$CeIII^* \text{ or } CeIII\text{-}Tiopronin\ complex^* + Quinine \rightarrow CeIII \text{ or } CeIII\text{-}Tiopronin + Quinine^*$$

$$Quinine^* \rightarrow Quinine + light \qquad \textbf{(2.12)}$$

Ma ve arkadaşlarını yapmış olduğu bu çalışmada, akış enjeksiyon analiz yöntemi kullanılarak taze sebzelerde bulunan askorbik asit analizi için CL ölçümüne dayalı

bir yöntem kullanılmıştır. Sülfürik asit ortamında Ce(IV) ile rodamin B (rhodamine B) arasındaki redoks reaksiyonu sonucu oluşan $[RhB^-]_{ox}$ ortamdaki askorbik asit ile reaksiyona girerek $[RhB^-]_{ox}$* oluşumuna neden olur ve oluşan kemilüminesansın ölçümüyle analiz yapılır (Ma ve diğ, 2002).

Xi ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, CL yöntemi kullanılarak barbiturik asidin tayini yapılması amaçlanmıştır. Sülfürik asit ortamında Ce(IV) ile rutenyum (II) arasındaki redoks reaksiyonu sonucu oluşan rutenyum(III) ortamdaki barbitürik asit ile reaksiyona girerek $(Ru(phen)_3^{2+})$* oluşumuna neden olur ve $(Ru(phen)_3^{2+})$* den yayılan emisyonun ölçümüyle analiz yapılır (Xi ve diğ, 2003).

$$Ru(phen)_3^{2+} + Ce(IV) \rightarrow Ce(III) + Ru(phen)_3^{3+}$$

$$Ru(phen)_3^{3+} + [\text{the radical intermediates}]^* \rightarrow [Ru(phen)_3^{2+}]^* + \text{products}$$

$$[Ru(phen)_3^{2+}]^* \rightarrow Ru(phen)_3^{2+} + hv \qquad \textbf{(2.13)}$$

Nie ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, insan serumundaki sisteinin analizi için yeni bir CL sistemi geliştirilmiştir. Sülfürik asit ortamında Ce(IV) ile sistein arasındaki redoks reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III)* ortamdaki kinin (quinine) ile reaksiyona girerek kinin* oluşumuna neden olur ve oluşan kemilüminesansın ölçümüyle analiz yapılır (Nie ve diğ, 2003).

Guo ve arkadaşlarını yapmış olduğu bu çalışmada, akış enjeksiyon analiz yöntemi kullanılarak antibiyotik ilaçların etken maddelerinden tetrasiklin (tetracycline) analizi için yeni bir CL yöntemi geliştirilmiştir. Sülfürik asit ortamında Ce(IV) ile tris(2,2´-bipiridin)rutenyum (II) arasındaki redoks reaksiyonu sonucu oluşan rutenyum(III) ortamdaki tetrasiklin ile reaksiyona girerek $(Ru(bpy)_3^{2+})$* oluşumuna neden olur ve oluşan kemilüminesansın ölçümüyle analiz yapılır (Guo ve diğ, 2004).

Liu ve Huang'ın yapmış olduğu bu çalışmada, asidik çözelti içerisinde Ce(IV) ile pentolamin'in reaksiyonu sonucu ışık emisyonu oluşmaktadır. Tepkime içinde kullanılan asidin doğası ve derişimi kemilüminesan (CL) emisyonu üzerinde çok güçlü bir etkiye sahiptir. Bu yüzden, derişim aralığı 5.0×10^{-2} – 2.4 mol/L olan dört farklı asit (örneğin, HCl, HNO_3, H_2SO_4, and H_3PO_4) çözeltisi ile çalışılarak en uygun asit çözeltisi ve konsantrasyon aralığı belirlenmeye çalışıldı. Fosforik asit ortamı içersinde herhangi bir CL tepkisi gözlenmemiştir. Bunun nedeninin, Ce(IV) ile fosforik asidin bir çökelme ürünü oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu çalışmada nitrik asit en yüksek sinyali verdiğinden 1,8 mol/L

nitrik asit ile çalışılmıştır. Nitrik asit ortamında 360 nm de Ce(IV) ile fentolamin reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III)'ün zayıf emisyonu gözlemlenirken ortamda rhodamine 6G olması durumunda ise 560 nm de rhodamine 6G maksimum floreasans piki gözlenmektedir. Reaksiyon mekanizmasını aşağıdaki şekli ile özetleyebiliriz (Liu ve Huang, 2004).

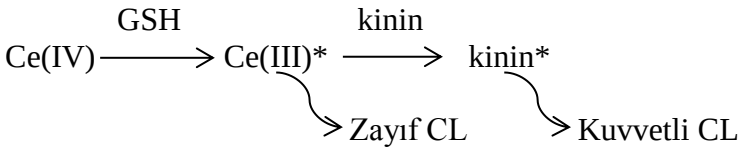
$$Ce(IV) + PHE^{red} \rightarrow Ce(III)^{*} + PHE^{Ox}$$

$$Ce(III)^{*} \rightarrow Ce(III) + h\nu$$

$$Ce(III)^{*} + Rh6G \rightarrow Ce(III) + Rh6G^{*}$$

$$Rh6G^{*} \rightarrow Rh6G + h\nu \text{ (kuvvetli CL)} \qquad \textbf{(2.14)}$$

Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, biyolojik sıvılarda (tavşan kanı ve fare beyninde) tiyol grubu içeren glutatyon analizi için basit, duyarlı ve selektif bir CL yöntem önerilmiştir. Sülfürik asit ortamında Ce(IV) ile Glutatyon (GSH) arasındaki redoks reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III)* zayıf CL ışımını yaparken ortamda kinin(quinine) bulunması durumunda kinin uyarılmasını sağlayarak daha kuvvetli CL ışınımların oluşmasını sağlar (Wang ve diğ, 2006).



Şekil 2.16 : Ce(IV)-GSH-kinin CL reaksiyon mekanizması.

Cui ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada 53 organik bileşiğin Ce(IV) ile rhodamine 6G'ün kemilüminesansına etkileri akış enjeksiyon analiz yöntemi ile araştırıldı ve organik bileşiklerin molekül yapıları ile kemilüminesansları arasındaki ilişki incelendi. 32 fenolik bileşiğin (fenoller, polifenoller, fenolik asitler, hidrosinamik asitler ve flavonoidler) kemilüminesansının arttığı bulunmuştur. Fenolik hidroksillerin CL oluşumunda başlıca aktif gruplar olduğu belirlendi. Kemilüminesansın büyüklüğünün benzen halkasına bağlı grupların pozisyon ve türüyle ilgili olduğu bulundu. Bu çalışmada, sülfirik asit ortamında Ce(IV) ile fenolik bileşikler ve rodamin 6G reaksiyona girerek uyarılmış Ce(III)'ün oluşur. Ce(III)'ten kaynaklı zayıf emisyon ışınları ortamda rhodamine 6G olması durumunda ise 555 nm de rhodamine 6G maksimum floreasans piki gözlenmektedir (Cui ve diğ, 2006).

Rezaei ve Mokhtari'nin yapmış olduğu bu çalışmada, akış enjeksiyon analiz yöntemi kullanılarak sistein analizi için yeni bir CL sistemi geliştirilmiştir. Sülfürik asit ortamında Ce(IV) ile rutenyum (II) arasındaki redoks reaksiyonu sonucu oluşan

rutenyum(III) ortamdaki sistein ile reaksiyona girerek (Ru(phen)32+)* oluşumuna neden olur ve oluşan kemilüminesansın ölçümüyle analiz yapılır. Gerçek örnek olarak protein tozlarının, şampuan ve nehir sularının analizi yapılmıştır (Rezaei ve Mokhtari, 2007).

$$Ru(phen)_3^{2+} + Ce(IV) \rightarrow Ce(III) + Ru(phen)_3^{3+}$$

$$Ru(phen)_3^{3+} + Cysteine \rightarrow [Ru(phen)_3^{2+}]^* + product$$

$$[Ru(phen)_3^{2+}]^* \rightarrow Ru(phen)_3^{2+} + hv \qquad \textbf{(2.15)}$$

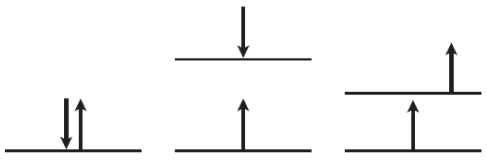
Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada, synephrine belirlenmesi için yeni bir CL yöntem tanımlanmıştır. Nitrik asit ortamında Ce(IV) ile synephrine arasındaki redoks reaksiyonu temeline dayanmaktadır ve lüminefor grup olarak kullanılan rodamin B'nin CL şiddetinin ölçümüne dayanmaktadır (Wang ve diğ, 2007).

Ferreira ve Avaca'nın yapmış olduğu bu çalışmada, çeşitli organik bileşikler için doğrudan elektron transferine dayalı antioksidan kapasite (CRAC) yöntemi geliştirilmiştir. Ce(IV) iyonlarının organik bileşikler (tannik asit, kersetin, rutin, gallik asit, kateşin, askorbik asit, BHA, Troloks) ile indirgenmesi sonucu ortamda kalan Ce(III) iyonlarının kronoamperometri tekniği kullanılarak ölçülmesi ile çalışmalar yapılmıştır. Kronoamperometri tekniği, çözeltiye daldırılmış olan çalışma elektrodu potansiyelinin ani olarak değiştirilmesi ile durgun ortamda akım–zaman ilişkisinin gözlenmesine dayanır. Yapılan çalışmada antioksidanların TEAc katsayılarına göre sıraladığında; tannic acid >> kuersetin> rutin> gallik asit≈ ckateşin > askorbik asit > BHA > Troloks. Geliştirilen yöntemin literatürdeki diğer toplam antioksidan yöntemlerinden FRAP yöntemi ile uyumlu korelasyon (R^2 = 0.937) gösterdiği bulunmuştur. Kuvvetli bir oksidan olan $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$ asidik ortamda (H_2SO_4 0.5 M), Ag/AgCl (KCl 3.0 M) elektroduna karşı 1.29 V redoks potansiyeline sahiptir ve bu değer diğer antioksidan yöntemlerine göre (ABTS / 0.90 V ve FRAP / 0.92 V) daha yüksektir. Bu yüzden kronoamperometrik yöntemi kullanılarak yapılan bu çalışmada, Ce(IV)'ün kalan konsantrasyonu, indirgeme basamağının 0,8 V (ya da biraz daha yüksek değerlere), olduğu durumlarda belirlenmiştir (Ferreira ve Avaca, 2008).

2.7 Lüminesans Spektroskopisi

Lüminesans, çeşitli şekillerde enerji absorplayarak elektronik olarak uyarılmış bir molekülün temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışıma enerjisi halinde geri vermesi olayına denir. Lüminesans uyarılma esnasında kullanılan enerjinin kaynağına göre sınıflandırılır. Uyarılma enerji kaynağı olarak ultraviyole (UV), görünür bölge (VIS) veya infrared (IR) bölgeden bir ışıma kullanılırsa gözlenen lüminesans, fotolüminesans; bir kimyasal tepkime tarafından sağlanıyorsa CL olarak adlandırılır. Kemilüminesans oluşumunda etkin olan kimyasal bir canlı metabolizmasında gerçekleşiyorsa biyolüminesans, elektrokimyasal olarak bir elektrot yüzeyinde gerçekleşiyorsa elektrokemilüminesans adını alır (Valuer, 2002).

Lüminesans olayı genel olarak moleküllerin değerlik orbitallerinde bulunan bir elektronun bir etken tarafından uyarılması sonucunda başlatılır. Moleküler floresans olayı moleküldeki bağ elektronlarının, özellikle π bağı elektronlarının bir foton ile etkileşmesinden oluşmaktadır. Bir orbitalde temel halde en fazla iki elektron ters spinlerde eşleşmiş olarak bulunabilir. Bu duruma spektroskopide uyarılmış singlet hal, singlet haldeki bir molekül enerji absorpsiyonu ile sipinini değiştirmeden üst enerji düzeylerine uyarılırsa bu duruma uyarılmış singlet hal, bazı durumlarda da uyarılmış singlet haldeki elektronun sipinin yönünde değişim gözlenir, bu duruma ise uyarılmış triplet hal denir (Şekil 2.17).

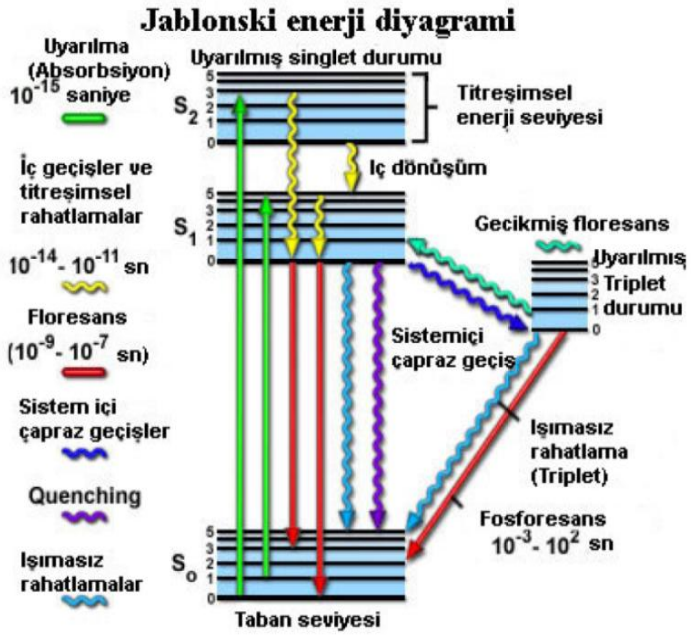


Şekil 2.17 : Bir molekülün singlet, uyarılmış singlet ve uyarılmış triplet halleri.

Triplet seviyeye düşmek üzere spini ters döndüren elektron bu is için bir enerji harcamıştır. Bu nedenle triplet durumunun enerjisi singlet durumununkinden biraz daha düşüktür. Singlet temel durumdan doğrudan doğruya uyarılmış triplet duruma geçiş olmaz. Ancak uyarılmış singlet durumdan uyarılmış triplet durumuna geçiş olabilmektedir. Uyarılmış triplet durumda elektronun spininin başlangıçtaki yönüne dönmesine bir direnç oluştuğundan bu durumun ömrü uyarılmış singlet halin ömründen daha uzun sürmektedir (10^{-4} - 10^{2} s).

2.7.1 Fotolüminesans

Fotolüminesans, bir maddenin absorpladığı bir ışımayı aynı veya daha uzun dalga boyunda bir ışıma olarak geri vermesi olayıdır. Bu durum floresans ve fosforesans olmak üzere iki kısma ayrılır. Bir maddenin floresans özelliği, üzerine uygun dalga boyunda bir ışıma düşürülür düşürülmez başlar ve ışıma kesilir kesilmez de kaybolur. Fosforesans özelliği ise madde üzerine uygun dalga boyunda bir ışıma düşürülür düşürülmez başlar ve ışıma kesildkten sonra bir süre daha devam eder.



Şekil 2.18 : UV veya görünür bölge ışınını absorplayabilen bir moleküle ait enerji düzeyi diyagramı (Jablonski enerji diyagramı) (Url-1, 2014).

Şekil 2.18'de fotolüminesans gösteren bir molekülün kısmi enerji diyagramı görülmektedir. En alttaki yatay çizgi S_0, molekülün temel durumunun enerjisini bildirmektedir. Çözeltideki tüm moleküller oda sıcaklığında bu enerji durumundadır. S_1 ve S_2 birinci ve ikinci uyarılmış singlet durumlar ve T_1 ise birinci uyarılmış triplet durumdur. Birinci uyarılmış triplet durumun enerjisi eşdeğer singlet durumun enerjisinden daha düşüktür. Çok sayıdaki titreşimsel enerji seviyeleri de şekil 2.18'de gösterilmiştir. Molekülün uyarma dalgaboyu λ_1 ve λ_2 gibi iki farklı dalgaboyundaki ışının soğurumu ile olmuştur. Daha yüksek enerjili λ_2 dalga boylu ışının soğurumu ile daha yüksek enerjili S_2 uyarılmış singlet duruma geçerken ($S_0 \rightarrow S_2$) daha uzun dalga boylu λ_1 ışının soğurumu ile daha düşük enerjili S_1, uyarılmış singlet duruma geçiş ($S_0 \rightarrow S_1$) olmaktadır. Bu soğurum ile uyarılmış singlet durumu çeşitli titreşimsel seviyelerine geçiş olabilmektedir. Molekül önce çözücü molekülleri ile

çarpışmalar gibi bazı ışınmasız yollar ile yaklaşık 10^{-13} sn'de uyarılmış singlet durumun en düşük enerjili titreşimsel seviyesine iner. Temel duruma dönme, molekülün ve dış koşulların durumuna bağlı olarak ışımasız veya ısıma yaparak olabilir. Işıma, floresans veya fosforesans yayma olmak üzere iki farklı şekilde olabilmektedir. Molekülün temel hale geçişte seçtiği yol uyarılmış halin en kısa süreli olduğu yoldur. Yani eğer floresans yayma işlemi, ışımasız yola kıyasla daha çabuk oluyorsa floresans yayar. Işımasız yol daha hızlı ise ışın yayma ya çok azdır veya yoktur. Eğer uyarılmış singlet hal nispeten dayanıksızsa molekül temel duruma genellikle ısıma yaymaksızın döner. Temel duruma dönmenin dışında uyarılmış veya temel durumların çeşitli titreşimsel seviyelerinden en düşük seviyeye inişlerde yada bir uyarılmış singlet halden bir başkasına veya uyarılmış triplet hale geçişte ışımasız enerji kayıpları olmaktadır.

Isıma yaymaksızın ortaya çıkan başlıca enerji kaybı işlemleri şunlardır: Titreşimsel dinlenme, iç dönüşüm, sistemler arası geçiş, enerji nakli.

2.7.2 Fotolüminesası etkileyen faktörler

Bir bileşiğin floresans gösterip göstermemesi ve floresans ışınının şiddeti, hem molekül yapısına hem de kimyasal çevreye bağlıdır. Bu faktörleri sıralayacak olursak; yapısal faktörler, moleküler katılık, sıcaklık, viskozite, çözücü ve pH'dır.

2.7.2.1 Yapısal Faktörler

Bir molekülün floresans gösterebilmesi için ilk koşul UV veya görünür alandaki ışımayı absorplamasıdır. Bu absorpsiyon ne kadar yüksek olursa yayılan floresansın şiddeti o kadar kuvvetli olur.

Basit alifatik yapılı bileşikler absorpladıkları enerjiyi ışın yaymaksızın harcarlar ve floresans göstermezler. Ketonlar, aldehitler, karboksilli asitler, amidler, esterler gibi π bağlı hetero atom içeren bileşikler az floresans gösterirler. Polienler ve aromatik bileşikler ve türevleri ise floresans özellik gösteren bileşiklerdir. Özellikle bunların düzlemsel ve katı yapıda olanlarının floresans etkinliği yüksektir. Benzenin kendisi zayıf floresans gösterir. Benzen halkasının sübstütüsyonu floresansı olumlu ya da olumsuz etkiler. $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin olduğu bileşikler floresans özellik gösterirken, $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin baskın olduğu moleküllerde ise fosforesans özellik görülmektedir. -OH, $-NH_2$, -NHR, -NRR', -OR gibi sübstiüentler floresansa ya etkili

olmazlar ya da arttırırlar. -COOH, -NO, -RCO, -RHO, -N=N, -Br, -Cl gibi elementler floresansı azaltıcı etki gösterirler.

2.7.2.2 Yapısal rijidite

Yapısal rijidite, organik bileşiklerde yer alan fonksiyonel grupların birbirinden bağımsız hareket kabiliyetlerinin molekül içi bağlarla sınırlandırılmasıdır. Yapısal rijidite, hareket serbestliğini azalttığından, triplet durulma, sistemler arası geçişler ve moleküller arası çarpışmalar gibi ışın yaymadan geçiş olasılıkları azdır.

Örneğin; Fluoresein çözelti içinde kuvvetli floresans göstermesine karşılık moleküler katılık göstermeyen fenolftaleinin böyle bir özelliği yoktur. Metal iyonları ile ketal oluşturmada titreşimleri azaltan moleküler katılık saptandığından floresansı arttırır. Örneğin; alüminyum ile ketal oluşturmadan önce naftalen grupları azo grubu etrafında serbestçe dönebilmektedir. Ketal oluşumundan sonra molekül düzlemsel ve katı bir duruma geçer.

2.7.2.3 Sıcaklık ve viskozite

Sıcaklığın artması ve çözücünün viskozitesinin azalması, uyarılmış molekül ile diğer moleküllerin çarpışması ve ayrıca sistemler arası geçişlerin olasılığını arttırmaktadır. Düşük sıcaklıkta ve yüksek viskoziteli ortamda ise dinlenme zamanı uyarılmış durumun ömründen daha uzun olmakta ve floresans artmaktadır.

2.7.2.4 Çözücü

Kullanılan çözücüler floresans şiddetinin veya floresansın görüldüğü dalgaboyunun değişmesine neden olabilir. Çözücünün genellikle uyarılmış durumundaki moleküller ile H bağı oluşturması temel hale ışımasız dönüş işleminin hızını arttırdığından floresansın şiddetinde azalma olur. -OH, -COOH, $-NH_2$ bağı oluşturabilecek gruplar içeren maddelerin analizinde çözücü seçimine dikkat edilmelidir. Bir veya daha çok sayıda ağır atom içeren çözücüler, sistemler arası geçiş olasılığını arttırdıklarından floresansı azaltırlar.

2.7.2.5 pH

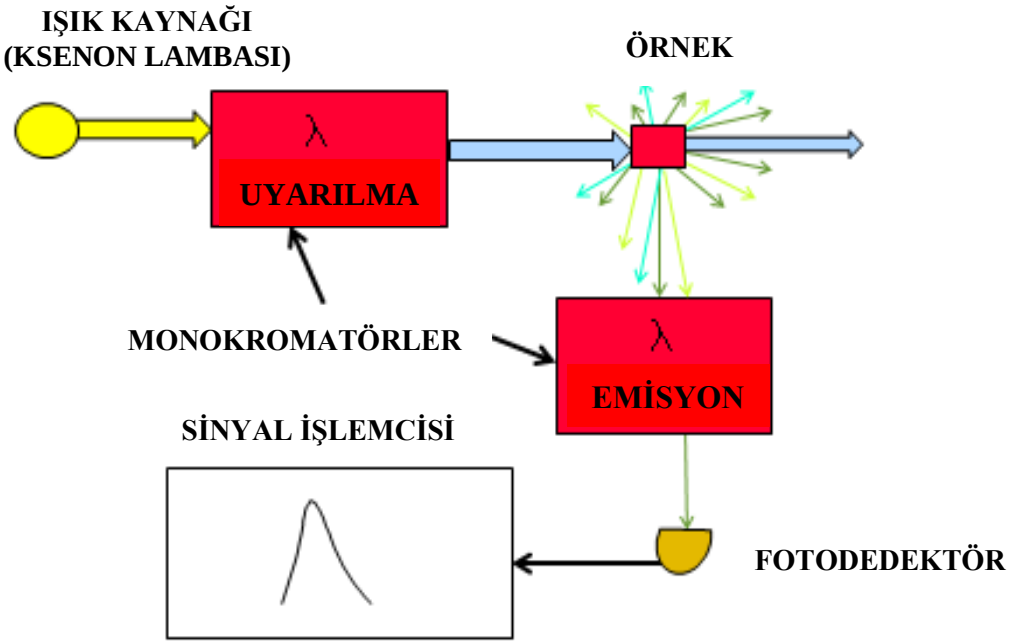
Asidik ve bazik grup içeren bir bileşiğin floresansı ortamın pH'ına bağlıdır. Örneğin; nötr ortamda fenol floresans gösterirken, bazik ortamda floresans etki göstermeyen anyonuna dönüşür. Anilin, nötr ve bazik ortamda iken görünür alanda floresans gösterir. Çözelti asitlendirildiğinde bu floresans kaybolur. Bu şekilde ortamın pH'ına

bağlı olarak floresans gösterebilen asit-baz titrasyonlarında indikatör olarak yararlanılabilir.

2.7.3 Moleküler floresans spektroskopisi

Moleküllerin floresans yayma özelliklerinden yararlanılarak geliştirilen moleküler floresans spektroskopisi ile eser miktarlardaki birçok organik ve anorganik maddelerin, özellikle biyokimya, çevre kirliliği analizlerinde kalitatif ve kantitatif analizleri yapılabilmektedir. Maddenin yaydığı floresans ışınının dalgaboyu, madde için karakteristik olmasından yararlanılarak kalitatif analizi yapılır. Diğer taraftan yöntemin daha yaygın olarak kullanma alanı kantitatif tayinlerdir. Belirli bir derişim aralığında yayılan floresans ışınının şiddeti, derişimi ile orantılı olduğundan; bu maddelerin miktar tayinleri yapılabilmektedir.

Spektroflorometrik yöntemlerin en önemli üstünlüğü kolorimetrik veya spektrofotometrik yöntemlerle tayin edilemeyen çok düşük derişimlerdeki çözeltilerin (10^{-4} - 10^{-9} µM) analizinin yapılabilmesi yani duyarlılığıdır. Ayrıca floresans gösteren maddelerin çok fazla sayıda olmaması yöntemin seçiciliğini diğerlerine kıyasla arttırmaktadır. Fakat diğer taraftan bu son özellik yöntemin uygulama alanını sınırlı tutmaktadır (Skoog ve diğ, 1998).



Şekil 2.19 : Spektroflorometrenin temel bileşenlerinin şematik olarak görünümü.

Spektroflorometrik cihazların bileşenleri temelde absorpsiyon spektroskopisinde kullanılan ile benzer yapıdadır. Ancak, cihaz bileşenlerinin yerleşimi bakımından

absorpsiyon sistemlerinden ayrılırlar (Şekil 2.19). Işık kaynağından gelen ışımanın dedektör üzerine düşmesini önlemek için dedektör ışık yoluna 90˚'lik açı ile yerleştirilir. Burdaki amaç, detektöre sadece örnek çözeltisindeki moleküller tarafından yayılan floresans ışımasının ulaşmasını ve uyaran ışığın detektöre ulaşmasını önlemektir. Frontal yöntemde floresans ölçümleri 370˚ açıdan yapılır. Genellikle derişimi yüksek çözeltiler, opak örnekler ile çalışılırken bu yöntem tercih edilir.

Floresans ışının şiddeti gelen ışının şiddetine bağlı olduğundan ışık kaynağının kuvveti önemlidir. En çok kullanılan ışık kaynakları; civa ark lambası veya ksenon ark lambasıdır. Ksenon lamba değişik dalga boylarında çok fazla değişmeyen bir yayınım gösterirken, civa lamba belirli dalga boylarında yüksek şiddette bandlar halinde yayınım yapmaktadır. Ksenon lamba genellikle farklı dalga boylarında çalışıldığında tercih edilir. Civa lamba ile daha hassas analizlerin yapılması mümkündür. Örnek çözeltilerini içeren küvetler, kuvartz veya camdan yapılmıstır.

2.7.4 Floresans şiddeti ile derişim arasındaki ilişki

Bir molekülün floresans etki gösterebilmesi için önce üzerine gönderilen ışımayı absorplaması gerekmektedir. Floresans ışınının şiddeti (F) maddenin derişimi ile ancak düşük derişimlerde doğru orantılıdır. Absorbansın 0,05 den fazla olduğu derişimlerde doğrusallık bozulur. Yüksek derişimde gelen ışının tümü çözeltinin ilk tabakaları tarafından absorplanır ve çözeltinin uzak kısımlarına ulaşamaz. Beer yasasına göre, çözeltiden absorplanmadan geçen ışın fraksiyonu transmitasyon olarak tanımlanır ve T ile gösterilir:

$$T = I_t / I_0 = e^{-\varepsilon b C} \;;\; A = I_t / I_0 = 1 - e^{-\varepsilon b C} \qquad \textbf{(2.16)}$$

A = Absorbans

I_0 = Gelen ışının şiddeti

I_t = Geçen ışının şiddeti (ortamı terkeden)

ε = Molar absorplama katsayısı

b = Tabaka kalınlığı, cm (ışının absorpsiyon ortamında katettiği yol)

C = Derişim (mol/L)

Ölçülen floresans ışının şiddeti F, absorplanan ışının miktarına bağlıdır.

$$F = k.Q_f .I_{ab} \qquad \textbf{(2.17)}$$

k: kullanılan alete ait bir sabittir. Floresans yayma her yöne olmasına rağmen ancak belirli bir bölümü ölçülebilmektedir. Bu nedenle k, ölçülen fotonların yayılan fotonlara oranıdır.

Q_f : Floresans kuantum verimidir ve absorplanan birim foton kuantum başına yayılan foton kuantum sayısıdır. 0-1 arasında bir değer alır

Kuantum Verimi ***(Q_f),*** floresans veya fosforesans ile yayılan foton sayısının absorplanmış foton sayısına oranıdır ve Q_f ile ifade edilir.

$$Q_f = k_f / (k_f + k_{ISC} + k_{nr} + k_q + k_r) \qquad \textbf{(2.18)}$$

Floresans yarıömrü (T), uyarılmış seviyedeki molekülün temel elektronik seviyeye geçmeden önce geçirdiği zaman floresans lifetime olarak tanımlanır ve T ile gösterilir.

$$T = \tau / (\tau + k) \qquad \textbf{(2.19)}$$

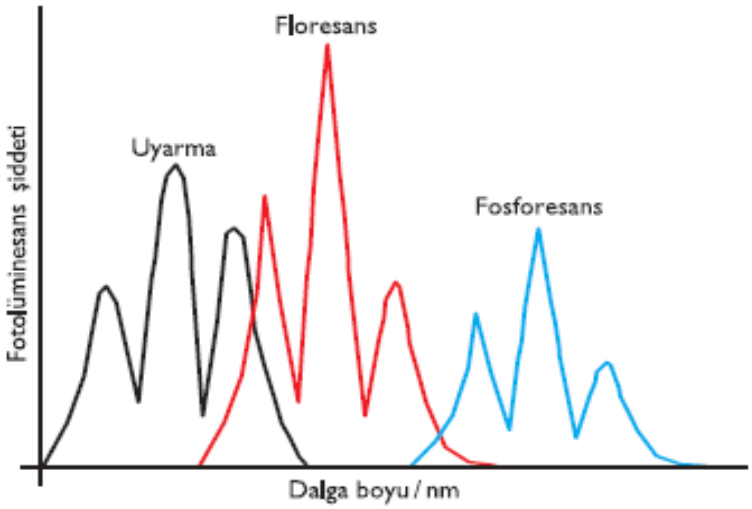
Floresans ışınının şiddeti ile floresans yayan maddenin derişimi arasında çizilecek grafik düşük derişimler için doğrusaldır.

- ✓ Gelen ışının şiddetine doğrudan bağlıdır. Gelen ışının şiddetinin arttırılması ile duyarlılık kolayca arttırılabilir. Fakat gelen ışının şiddeti arttırıldıkça çözücü ve bazı kirliliklerden oluşan fotodekompozisyon olabilir. Floresans da artar.
- ✓ Molar absorplama katsayısı ile orantılıdır. Bu nedenle uyarma ışınının dalgaboyunun, maksimum soğurum dalgaboyunda olması gereklidir.
- ✓ Kantitatif analiz çalışmalarda analiz edilen maddenin bilinen derişimlerdeki çözeltilerinin floresans değerleri ölçülür ve standart maddelerinkine oranlanır. Derişim ile bunlara eşdeğer bağıl floresans şiddetleri arasında çizilen eğri yardımıyla bilinmeyen derişim bulunur. Tüm ölçümlerde uyarma kaynağı, çözücü, sıcaklık, pH vb. deney koşulları aynı olmalıdır.
- ✓ Yayılan floresans ısının çözeltideki bileşenler tarafından soğurulması nedeniyle şiddetinin azalması olayına söndürme (Quenching) denir. Maddenin kendi kendini söndürmesi olayına çevreye bağlı sönme (self quenching) denir. Derişim artması ile bu durum ortaya çıkar.

Söndürme; uyarılmış durumundaki moleküllerin safsızlık olarak bulunan yabancı moleküller ile çarpışması sonucu ışımasız enerji kaybı ile de olabilir. (safsızlık söndürmesi: impurity quenching). Ayrıca ortamda bulunan çözünmüş haldeki oksijen, ağır metaller veya paramağnetikler sistemler arası geçiş hızını etkilediklerinden sönmeye neden olabilirler. Sıcaklık ve pH değişimleri de sönmeye neden olabilir. Maddenin uzun süre UV ışınına maruz bırakılması sonucu fotokimyasal reaksiyon olabileceğinden floresans azalır.

Self-absorpsiyon; uyarılmış düzeydeki moleküllerin yapmış olduğu floresans veya fosforesans ışımasının aynı maddenin uyarılmış molekülleri tarafından absorpanması sonucunda gerçekleşir.

Fotolüminesans ölçümleri esnasında bir molekül için, uyarma ve floresans veya fosforesans spektrumu için molekül tarafından yayılan ışıma ölçülür (Şekil 2.20). Aynı moekül için floresans ve fosforesans ölçümleriyle farklı spektrumlar elde edilirken tek bir uyarma spektrumu elde edilir. Bir maddenin absorpsiyon spektrumu ile floresans emisyon spektrumu birbirlerinin ayna görüntüsüdür. Ayrıca, bir moleküle ait uyarma spektrumu o molekülün absorpsiyon spektrumuna fiziksel olarak benzemesine karşılık ölçülen değerler birbirinden farklıdır.



Şekil 2.200 : Bir molekül için uyarma ve floresans veya fosforesans spektrumları (Ersöz, 2010).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Seryum(IV) sülfat tetrahidrat ($Ce(SO_4)_2.4H_2O$), seryum(III) nitrat hekza hidrat ($Ce(NO_3)_3.6H_2O$), Folin-Ciocalteu fenol reaktifi, demir(III) klorür hekza hidrat ($FeCl_3.6H_2O$), potasyum hekzasiyano ferrat(III) ($K_3[Fe(CN)_6]$), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc), bakır(II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$), kuersetin dihidrat (QR), trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (TR), rutin (RT), gallik asit (GA), kateşin (CAT), naringin (NG), naringenin (NGN), L-askorbik asit (AA), kafeik asit (CFA), ferulik asit (FRA), glutatyon (GSH), sistein (Cys), sitrik asit, nişasta, susuz sodyum sülfat (Na_2SO_4), sodyum karbonat (Na_2CO_3), sodyum potasyum tartarat ($NaKC_4H_4O_6$), bakır(II) sülfat ($CuSO_4$), amonyum asetat (CH_3COONH_4), sodium dodesil sülfat (SDS), fosforik asit (H_3PO_4), sülfürik asit (H_2SO_4), hidroklorik asit (HCl), trikloro asetik asit (TCA), % 97'lik etil alkol (EtOH). Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

3.2 Kullanılan Örnekler

3.2.1 Poşet çay örnekleri

İstanbul'da yerel bir marketten rast gele seçim yötemine göre temin edilmiştir:

Yeşil çay (*Camellia sinensis*) ve Isırgan otu çayı (*Urtica dioica/urens*) Doğa Company Co.; Ihlamur çayı (*Tilia*), Nane çayı (*Mentha spicata*) ve Ada çayı (*Salvia officinalis*) Doğadan Company Co.; Papatya çayı (*Matricaria chamomilla L.*) Lipton, Trakya Sanayi ve Ticaret A.Ş.

3.2.2 Bitki çay örnekleri

Yaş Kuşburnu örnekleri, İstanbul Teknik Üniversitesi kampüsünden (İstanbul) 2011 yılının ağustos ve ekim aylarında ve Mut Kozlar Yaylasından (Mersin) 2011 yılının ağustos ayında toplanmıştır. Kuşburnu örneklerinin olgunluk seviyeleri kuşburnu meyvesinin rengine göre sınıflandırılmıştır. Örnekler renklerine göre, yeşil (ham), açık sarı, sarı, turuncu, kırmızı (en olgun) olarak olgunluk seviyelerine ayrılmıştır.

Bütün örnekler, oda sıcaklığında cam desikatörde yaklaşık 120 saatte kurutuldu. Öğütülen örnekler oda sıcaklığında kapalı kaplarda muhafaza edilmiştir.

3.2.3 Üzüm örnekleri

Kullanılan beyaz ve kara üzümler Şişli Cevahir Alışveriş Merkezi Migros Marketten alınmıştır. Beyaz ve kara üzüm örnekleri saf su ile yıkanmış, oda sıcaklığında bekletilerek suyu giderilmiştir.

3.3 Kullanılan Cihazlar

Absorpsiyon ölçümleri için Varian Cary 100-model UV/VIS spektrofotometre, ışık yolu 1 cm olan kuvars küvet, florometrik ölçümler için ise Varian Cary Eclipse model Floresans spektrofotometre, ışık yolu 1 cm olan dört tarafı geçirgen kuvars küvet kullanılmıştır. Kimyasal maddelerin tartılmasında Gec Avery Hassas terazi, çözelti almak için 5-50 µl arası değişebilen Genex Beta marka mikro pipet, 200 µl, 500 µl, 1000 µl'ler için sabit hacimli Brand Trasferpette marka mikro pipetler, 1-10 mL arası değişen Ependorf marka mikro pipet kullanılmıştır. Hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Heidolph marka mini karıştırıcı kullanılmıştır.

3.4 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.4.1 CERAC, modifiye CERAC ve spectroflorometrik CERAC yöntemi çözeltilerinin hazırlanması

$1{,}0 \times 10^{-3}$ M Ce(IV) sülfat çözeltisi hazırlamak için 0,0404 g $Ce(SO_4)_2.4\,H_2O$ tartılıp üzerine bir miktar saf su eklendikten sonra 100 mL'lik balon jojeye aktarılmıştır. Daha sonra üzerine 17,0 mL % 98'lik H_2SO_4 eklendi ve 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. 1,0 M Na_2SO_4 çözeltisi için 35,50 g Na_2SO_4 tartılıp üzerine bir miktar saf su eklendikten sonra 250 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve 250 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. $2{,}0 \times 10^{-3}$ M Ce(III) nitrat çözeltisi hazırlamak için ise yaklaşık 0,0868 g $Ce(NO_3)_3.6H_2O$ 25,0 mL saf su ile çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jojede saf su ile 100 mL'ye tamamlanmıştır.

3.4.2 CUPRAC yöntemi çözeltilerinin hazırlanması

$1{,}0 \times 10^{-2}$ M Cu(II) klorür çözeltisi hazırlamak için 0,4262 g $CuCl_2.2H_2O$ tartılıp 250 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. $7{,}5 \times 10^{-3}$ M neocuproin (Nc) çözeltisi için 0,156 g tartılıp bir miktar % 97'lik etil alkolde çözüldükten sonra 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve 100 mL'ye etil alkol ile tamamlanmıştır. 1,0 M amonyum asetat

(NH_4Ac) hazırlamak için ise 19,27 g tartılıp üzerine bir miktar saf su eklendikten sonra 250 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve 250 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

3.4.3 SDS katkılı ve pH'sı belirli modifiye Fe(III)-ferrisiyanür yöntemi çözeltilerinin hazırlanması

% 1 (w/v) potasyum ferrisiyanür çözeltisi hazırlamak için 1,0 g $K_3[Fe(CN)_6]$ tartılıp üzerine bir miktar saf su ilave ettikten sonra 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış, üzerine 1,0 mL 1,0 M'lık HCl eklenmiş ve 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. % 0,2 (w/v) demir(III) klorür çözeltisi hazırlamak için 0,2 g $FeCl_3.6H_2O$ tartılıp üzerine bir miktar saf su ilave ettikten sonra 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış, üzerine 1,0 mL 1,0 M'lık HCl çözeltisi eklenmiş ve 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. % 1 (w/v) sodyum dodesil sülfat (SDS) hazırlamak için 1,0 g SDS tartılıp üzerine bir miktar saf su ilave ettikten sonra 100 mL'lik balon jojeye aktarılmış ve 100 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır.

3.4.4 Folin-Ciocalteu yöntemi çözeltilerinin hazırlanması

Folin-Ciocalteu fenol reaktifi 1:3 (v/v) oranında saf su ile seyreltilmesi ile hazırlanmıştır. Lowry A çözeltisi; 2,0 g Na_2CO_3'ın 100 mL 0,1 M NaOH çözeltisi içinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Lowry B çözeltisi; 0,05 g $CuSO_4$'ın 10 mL % 1'lik sodyum potasyum tartarat ($NaKC_4H_4O_6$) çözeltisi içinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Lowry C çözeltisi; hazırlanan 100 mL Lowry B çözeltisinin üzerine 2 mL Lowry A çözeltisi ilave edilerek hazırlanmıştır.

3.4.5 Kullanılan antioksidan çözeltilerinin hazırlanması

Kullanılan antioksidan çözeltilerinin derişimleri $1,0 \times 10^{-3}$ M olacak şekilde mutlak etil alkolde hazırlanmıştır. Askorbik asit, glutatyon ve sistein standart çözeltileri $1,0 \times 10^{-3}$ M derişimde suda günlük olarak hazırlanmıştır**.**

3.4.6 Bitki çayı örneklerinin hazırlanması

3.4.6.1 Bitki çayı infüzyonlarının hazırlanması

Tartımları 1,3- 1,6 g arasında değişen Yeşil çay (*Camellia sinensis*), ısırgan otu çayı (*Urtica dioica/urens*), ıhlamur çayı (*Tilia*), nane çayı (*Mentha spicata*), ada çayı (*Salvia officinalis*), papatya çayı (*Matricaria chamomilla L.*) poşetleri 250 mL taze kaynatılmış destile su içinde önce 2 dakika boyunca daldırılıp çıkartılarak ve daha sonra 3 dakika boyunca bekletilmiştir. Toplam 5 dakika sonunda demlenen bitki çayı infüzyonları oda sıcaklığına geldikten sonra siyah bantlı süzgeç kağıdı ile

süzülmüştür. Oluşturulan infüzyonların her birinin hacmi 250 mL ye destile su ile tamamlanmıştır. Deneysel çalışmalarda bitkisel poşet çay infüzyonlarının taze hazırlanmış çözeltileri kullanılmıştır.

Kuru Kuşburnu (*Rosa canina L.*) örneklerinden 1'er g tartılıp polimer malzemeden yapılmış keseler içine konarak poşet çay örneklerine benzetilmiş ve aynı işlemler bu örneklere de uygulanmıştır. Çözeltiler taze hazırlanmıştır.

Ayrıca, kuşburnu örneklerine kaynatma işlemi uygulanmıştır. 1'er gr tartılan kuşburnu tozlarının üzerine 250 mL kaynar su ilave edildikten sonra kaynatma işlemine 5, 10, 15, 20 ve 25 dakika boyunca devam edilmiştir. Çayı infüzyonları oda sıcaklığına geldikten sonra siyah bantlı süzgeç kâğıdı ile süzülmüştür. 250 mL ye destile su ile tamamlanmıştır. Çözeltiler taze hazırlanmıştır.

3.4.6.2 Bitki çayı ekstraktlarının hazırlanması

Doğadan toplanıp kurutularak hazırlanan kuşburnu ile yukarıda kullanılan poşet bitki çay örneklerinin ekstraktları aşağıdaki prosedür ile hazırlanmıştır.

1,0 gr bitki çayı örneği üzerine 20,0 mL % 80 (v/v)'lik metil alkol çözeltisi ilave edildikten sonra 1 saat çalkalayıcıda 350 rpm hızla çalkalamıştır. Süzüntü siyah bant süzgeç kağıdından geçirilerek süzülmüştür. Kalıntıya 20,0 mL % 80 (v/v)'lik metil alkol ilave edilmiştir. 45 dak çalkalayıcıda 350 rpm hızla çalkaladıktan sonra süzüntü siyah bant süzgeç kağıdından geçirilerek süzülmüştür. Kalıntıya tekrar 10,0 mL % 80 (v/v)'lik metil alkol ilave edilip ekstraksiyona devam edilmiştir. 15 dak çalkalayıcıda 350 rpm hızla çalkaladıktan sonra süzüntü siyah bant süzgeç kağıdından süzülmüştür. Her üç aşama sonrasında elde edilen süzüntüler 50,0 mL balonjoje ye aktarılmış ve toplam hacim 50 mL'ye % 80 (v/v)'lik metil alkol çözeltisi ile tamamlanmıştır.

3.4.7 Üzüm örneklerinin hazırlanması

Parçalayıcıda bütün halinde (meyve ve çekirdekleri ile) parçalanan üzümlerden 10,0 gr alınıp üzerine 40 mL % 80 (v/v)'lik metil alkol çözeltisi ilave edildikten sonra 1 saat çalkalayıcıda 350 rpm hızla çalkalanmıştır. Süzüntü siyah bant süzgeç kağıdından geçirilerek süzülmüştür. Kalıntıya 40 mL % 80 (v/v)'lik metil alkol ilave edilmiştir. 45 dak çalkalayıcıda 350 rpm hızla çalkaladıktan sonra süzüntü siyah bant süzgeç kağıdından geçirilerek süzülmüştür. Kalıntıya tekrar 20 mL % 80 (v/v)'lik metil alkol ilave edilip ekstraksiyona devam edilmiştir. 15 dak çalkalayıcıda 350 rpm

hızla çalkaladıktan sonra süzüntü siyah bant süzgeç kağıdından süzülmüştür. Her üç aşama sonrasında elde edilen süzüntüler 100 mL balonjoje ye aktarılmış ve toplam hacim 100 mL'ye % 80 (v/v)'lik metil alkol çözeltisi ile tamamlanmıştır.

3.5 Kullanılan Yöntemler

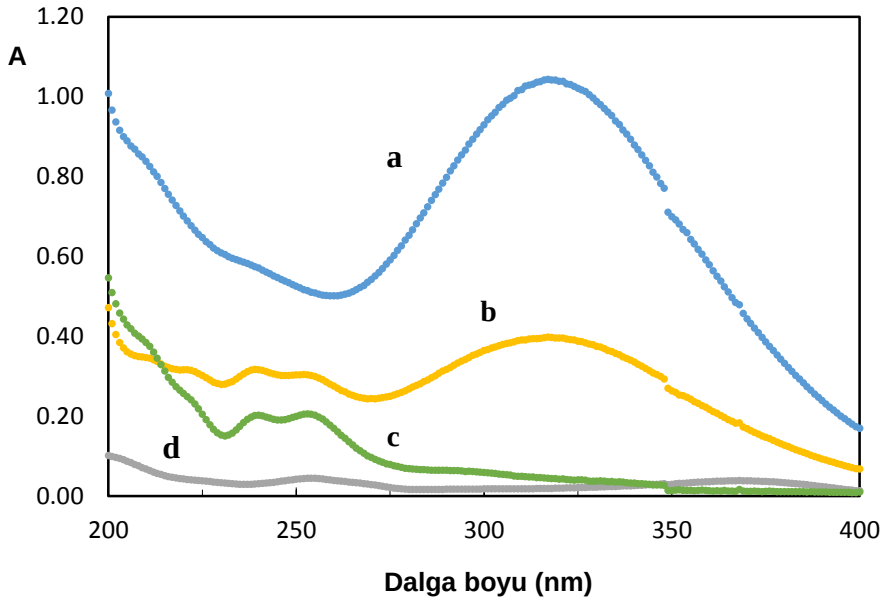
Bu çalışmada TAC tayini için, yeni geliştirilen spektroflorometrik-CERAC ve bu yöntemin sonuçlarını karşılaştırmak üzere CERAC, modifiye CERAC, CUPRAC, SDS katkılı ve pH'sı belirli modifiye Fe(III)-ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemleri kullanılmıştır.

3.5.1 CERAC yöntemi

Bitki ekstraktları ve fonksiyonel gıdaların, toplam antioksidan miktarının indirekt spektrofotometrik yöntem ile tayinin temelini, Ce(IV) ile antioksidanlar arasındaki redoks reaksiyonu sonucu Ce(IV)'ün 320 nm'de absorbansındaki azalışın ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Şekil 3.1). Ce(IV)'ün absorpsiyonundaki bu azalmadan yararlanarak dolaylı olarak toplam antioksidan miktarı hesaplanmaktadır.

Geliştirilen CERAC yönteminde optimum çalışma koşulları dalgaboyunun kaymasının engellendiği ve maksimum absorbans değerinin okunduğu 0,3 M H_2SO_4 olarak belirlenmiş ve bu koşullarda örneklerin toplam antioksidan içeriği aşağıdaki prosedüre göre belirlenmiştir.

1,0 mL $2{,}0 \times 10^{-3}$ M $Ce(SO_4)_2$ + x mL antioxidant çözeltisi + (9-x) mL H_2O olacak şekilde toplam hacim 10,0 mL olan çözeltiler hazırlanıp oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 320 nm de kör çözeltiye (saf suya) karşı absorbansları ölçülür (Ozyurt ve diğ, 2007).



Şekil 3.1 : Ce(IV), kuersetin ve Ce(IV) + kuersetin çözeltilerinin referans saf suya karşı absorpsiyon spektrumları.

(a) $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV); **(b)** $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $4{,}0 \times 10^{-6}$ M kuersetin; **(c)** $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ kuersetin; **(d)** $1{,}0 \times 10^{-5}$ M kuersetin

3.5.2 Modifiye CERAC yöntemi

Bu doktora tezi kapsamında öncelikle CERAC yöntemi modifiye edilmiştir. Sonuçlar kısımında ayrıntılı şekilde incelenen CERAC yöntemi optimize edildikten sonra aşağıdaki modifiye CERAC prosedürü oluşturulmuştur.

1,0 mL $2{,}0 \times 10^{-3}$ M $Ce(SO_4)_2$ çözeltisi + 7,0 mL 1,0 M Na_2SO_4 çözeltisi + x mL antioksidan çözeltisi 20 mL'lik deney tüpüne konulduktan sonra saf su ile 10 mL'ye tamamlanır (son çözeltinin asit derişimi 0,30 M H_2SO_4 olacak şekilde ayarlanır). 30 dakika oda sıcaklığında örnekler bekletilir ve 320 nm de köre karşı absorbanslar ölçülür (Ozyurt ve diğ, 2010).

3.5.3 Spektroflorometrik CERAC yöntemi

Yapılan çalışmalar sonucu bu tez kapsamında geliştirilen yeni metotda örneklerin analizleri spektroflorometrik titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir. Spektroflorometrik titrasyon yönteminde iki farklı prosedür kullanılmıştır ve çalışma prosedürleri aşağıdaki şekilde oluşturulmuştur (Ozyurt ve diğ, 2011).

Ce(IV)'ün antioksidanlarla titrasyonu:

Bu yöntemde Ce(IV) miktarı sabit tutularak, gittikçe artan miktarlarda antioksidan ilave edilmiştir:

1,0 mL 1,0 × 10^{-3} M Ce(IV) çözeltisi + 7,0 mL 1,0 M Na_2SO_4 çözeltisi + x mL antioksidan çözeltisi 20 mL'lik deney tüpüne konulduktan sonra saf su ile 10 mL'ye tamamlanır. 30 dakika oda sıcaklığında örnekler bekletilir ve 256 nm uyarılma ve 360 nm emisyon dalgaboyunda örneklerin emisyon şiddetleri ölçüldü. Titrasyon grafiği antioksidan çözeltilerinin derişimleri ve ölçülen floresans şiddetleri arasında çizilmiştir.

Antioksidanların Ce(IV) ile titrasyonu:

Bu yöntemde sabit miktardaki antioksidan çözeltileri üzerine değişen miktarlarda Ce(IV) çözeltisi ilave edilmiştir:

7,0 mL 1,0 M Na_2SO_4 çözeltisi + x mL Ce(IV) çözeltisi + 1,0 mL 1,0 × 10^{-4} M antioksidan çözeltisi 20 mL'lik deney tüpüne konulduktan sonra saf su ile 10 mL'ye tamamlanır (son çözeltinin asit derişimi 0,30 M H_2SO_4 olacak şekilde ayarlanır). 30 dakika oda sıcaklığında örnekler bekletilir ve 256 nm uyarılma ve 360 nm emisyon dalgaboyunda örneklerin emisyon şiddetleri ölçülmüştür. Titrasyon grafiği Ce(IV) çözeltilerinin derişimleri ve ölçülen floresans şiddetleri arasında çizilmiştir.

3.4.4 CUPRAC yöntemi

CUPRAC yönteminde oluşan mavi renkli Cu(II)-Nc kompleksi antioksidanlarla etkileşip sarı renkli Cu(I)-NC kompleksine indirgenmektedir (Apak ve diğ, 2004; Güçlü ve diğ, 2006). Bundan yararlanılarak bitki ve gıda örneklerindeki TAC'si hesaplanmaktadır.

1,0 mL 1,0 × 10^{-2} M $CuCl_2$ çözeltisi + 1,0 mL 7,5 × 10^{-3} M neocuproin (Nc) çözeltisi + 1,0 mL 1,0 M NH_4Ac çözeltisi + x mL antioksidant çözeltisi + (1,1-x) mL H_2O olacak şekilde toplam hacmi 4,1 mL olan çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 450 nm de kör çözeltiye karşı absorbansları ölçüldü.

3.5.4 SDS katkılı ve pH'sı belirli modifiye Fe(III)-ferrisiyanür yöntemi

x mL antioksidan çözeltisi + (1-x) mL % 96 EtOH çözeltisi + 6,3 mL H_2O + 0,2 mL 1,0 M HCl + 1,5 mL % 1 (w/v) Ferrisiyanür çözeltisi + 0,5 mL % 1 (w/v) SDS çözeltisi + 0,5 mL % 0,2 (w/v) $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ çözeltisi içeren ve toplam hacmi 10 mL olan çözeltiler hazırlandı. Hazırlanan çözeltiler 30 dakika oda sıcaklığında

bekletildikten sonra 750 nm de kör çözeltiye karşı absorbansları ölçülmüştür (Berker ve diğ, 2010a).

3.5.5 Folin-Ciocalteu yöntemi

x mL örnek çözeltisi + (2-x) mL H_2O + 2,5 mL Lowry C çözeltisi ilave edildikten sonra çözelti karışımı 10 dakika bekletilir. Daha sonra üzerine 0,25 mL Folin reaktifi ilave edilir ve toplam hacmi 4,75 mL olan çözeltiler hazırlanır. Hazırlanan çözeltiler 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 750 nm de kör çözeltiye karşı absorbansları ölçülmüştür (Singleton ve diğ, 1999).

3.6 İstatistiksel Analiz

Deneysel analiz sonuçlarının ortalamaları ve ortalamaların standart sapmaları Microsoft Ofise 2010 Excel programı ile hesaplanmıştır. Sonuçlar, "ortalama değer ± standart sapma" şeklinde verilmiştir. F testi ve korelasyon katsayıları (r); ANOVA (ANalysis Of VAriance) yinelemesiz çift etken ve korelasyon (0.00-0.25 Çok zayıf ilişki; 0.26-0.49 Zayıf ilişki; 0.50-0.69 Orta ilişki; 0.70-0.89 Yüksek ilişki; 0.90-1.0 Çok yüksek ilişki) programları kullanılarak (Microsoft Excel 2010 Ofis) hesaplandı. Ayrıca kalibrasyon doğrularının eğim ve kayımları hata değerleri ile verildi (Miller ve Miller, 1993).

4. DENEYSEL BULGULAR

4.1 Modifiye CERAC Yöntemi

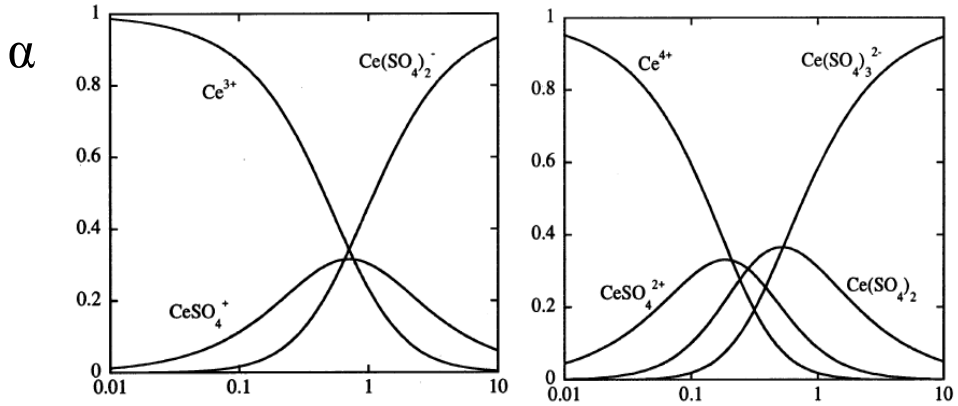
4.1.1 Optimum deney koşullarının belirlenmesi

CERAC yönteminin optimum çalışma koşullarından en önemlisi olan sülfat asiti derişimi, dalgaboyunun kaymasının engellendiği ve maksimum absorbans değerinin okunduğu 0,3 M H_2SO_4 olarak belirlenmiş ve bu koşullarda bitki ekstraktlarının toplam antioksidan içeriği hesaplanmıştır (Ozyurt ve diğ, 2007). CERAC yönteminde, gıda maddelerine katkı maddesi olarak katılan sitrik asitin Ce(IV) ile reaksiyona girerek antioksidan tayinlerini bozduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle bu tez kapsamında öncelikle CERAC yöntemi modifiye edilerek sitrik asitin interfere etkisinin giderildiği koşullar belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu amaçla Ce(IV)'ün yükseltgeme potansiyelinin sitrik asidi yükseltgemeyeceği, ancak antioksidanlarla reaksiyona gireceği potansiyele düşürmek için çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda öncelikle "*oksidasyon potansiyelini etkileyen ortamdaki hidrojen iyonu derişimi ve Ce(IV) ile kompleks yapıcı iyonların etkisi"* araştırılmıştır.

Ce(IV) iyonu sülfürik asitli ortamda kararlıdır (Aly ve diğ, 2001). Orta asitlikteki çözeltilerde Ce(IV) iyonu $Ce(OH)^{3+}$, $Ce(OH)_2^{2+}$ şeklinde bazik tuzlar vererek hidrolizlenir ve pH artışına paralel olarak çökme görülebilir; bunu önlemek için asidik ortamda çalışılması gerekmektedir. Yüksek H_2SO_4 derişimlerinde Ce(IV) ve Ce(III) iyonları sülfat iyonları ile kolayca kompleks yaparlar. Şekil 4.1'de H_2SO_4 ortamında (denge sabitlerinden yararlanılarak hesaplanan) Ce(IV) ve Ce(III)'ün SO_4^{-2} ile kompleks iyonları tür dağılım grafiği gösterilmektedir. Ağırlıklı olarak Ce(III) varlığında sülfat iyonu derişimini 0,5 M'den daha az olduğunda serbest Ce(III) iyonları mevcut iken sülfat iyonu derişimini 0,5 M'den daha fazla olduğu koşullarda $CeSO_4^+$ ve/veya $Ce(SO4)_2^-$ kompleks iyonlarının mevcut olduğu görülmektedir. Ağırlıklı olarak Ce(IV) varlığında ise sülfat iyonu derişimi 0,15 M'den daha az olduğunda serbest Ce(IV) iyonları mevcut iken, sülfat iyonu derişimi 0,15 M'den daha fazla olduğu koşullarda $CeSO_4^{2+}$, $Ce(SO_4)_3^{2-}$ ve $Ce(SO_4)_2$ kompleks iyonlarının mevcut olduğu görülmektedir. Ce(IV) iyonlarının Ce(III)'e oranla sülfat

iyonları ile daha kuvvetli kompleks oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.1) (Fang ve diğ, 2002).



(A) SO_4^{-2} Derişimi (mol/L) **(B)** SO_4^{-2} Derişimi (mol/L)

Şekil 4.1 : (A); Ce(III) ve (B); Ce(IV)'ün SO_4^{-2} ile kompleks iyonlarının tür dağılım grafiği (Fang ve diğ, 2002).

Kuvvetli bir oksidan olan $Ce(SO_4)_2.4H_2O$ asidik ortamda (H_2SO_4 0,5 M), Ag/AgCl (KCl 3,0 M) elektroduna karşı 1,29 V redoks potansiyeline sahiptir ve bu değer diğer antioksidan yöntemlerinin potansiyelinden (ABTS/0,90 V ve FRAP/0,92 V) daha yüksektir (Ferreira ve Avaca, 2008). Ce(IV) iyonun yükseltgeme kuvveti ve kararlılığı ortamda bulunan asidin cinsine ve derişimine göre değişmektedir. Ce(IV)/Ce(III) çifti, 1,7 V (1,0 M $HClO_4$), 1,61 V (1,0 M HNO_3), 1,44 V (1,0 M H_2SO_4) gibi farklı redoks potansiyellerine sahiptir. Bu potansiyel değişimi, ortam pH'ına bağlı olarak çözeltideki serbest Ce(IV) iyonlarının kompleks tuzlar oluşturmasından kaynaklanmaktadır.

$$Ce^{4+} + e^- \rightarrow Ce^{3+} \qquad E^\circ = 1{,}44 \text{ V} \ (1{,}0 \text{ M } H_2SO_4) \qquad \textbf{(4.1)}$$

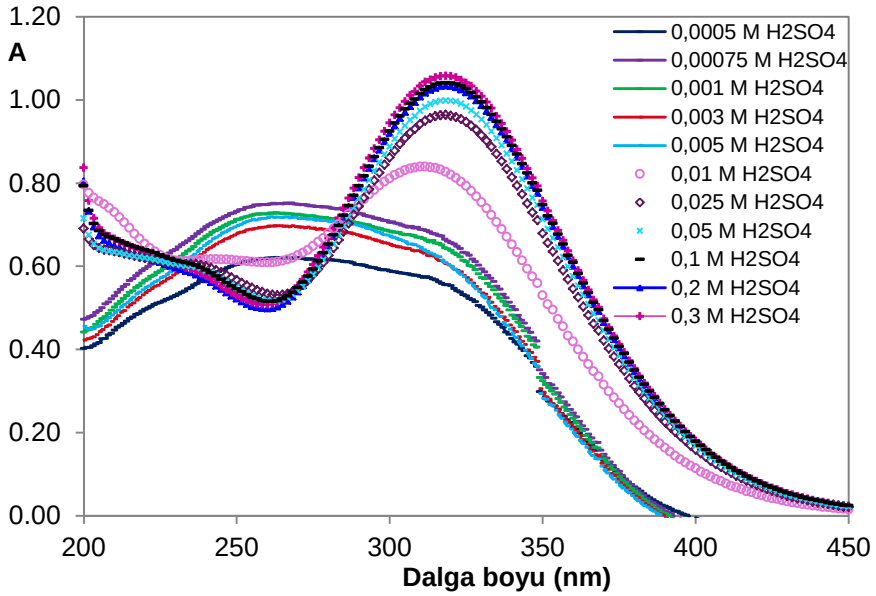
Örneğin H_2SO_4, $HClO_4$'den daha kuvvetli Ce(IV)-kompleksleri oluşturduğundan yukarıdaki yarı-pil reaksiyon dengesi sola kayar ve potansiyel azalır.

$$E_{Ce4+/Ce3+} = 1{,}44 + 0{,}059.\log\left([Ce^{4+}] / [Ce^{3+}] \right) \qquad \textbf{(4.2)}$$

Ayrıca, Na_2SO_4, H_3PO_4 ve fosfat asidi türevleri, Ce(IV) ile kuvvetli kompleksler oluşturlar. Bu bileşikler reaksiyon dengesini sola kaydırarak Ce(IV)/Ce(III) redoks çiftinin standart indirgenme potansiyelini azaltabilirler. Bu yaklaşımla modifiye CERAC yönteminin geliştirilmesinde temel olarak Ce(IV)'ün redoks potansiyelini etkileyecek faktörler incelenmiştir.

4.1.1.1 Ce(IV)'ün absorbansına ve dalgaboyuna asit etkisi

Ce(IV)'ün absorpsiyon spektrumunun asit derişimine bağlı olarak değiştiği ve maksimum absorbans değerinin kaydığı ön denemelerle gözlenmiştir. Bu nedenle maksimum absorbans değerinin okunduğu dalgaboyuna asit miktarının etkisini belirlemek için, son H_2SO_4 derişimi $5{,}0 \times 10^{-4}$ - 0,30 M olacak şekilde $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözetilerin 200 - 450 nm dalga boyları arasında absorpsiyon spektrumları saf suya karşı çizilmiştir (Şekil 4.2). $5{,}0 \times 10^{-4}$ - $5{,}0 \times 10^{-3}$ M H_2SO_4 içeren $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltilerinin maksimum absorbansın gözlendiği dalgaboyunun asit derişimi arttıkça 320 nm dalgaboyuna doğru kaydığı ve 0,025 M H_2SO_4 derişiminden sonra 320 nm de sabit kaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.2 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) spektrumuna H_2SO_4 derişiminin etkisi.

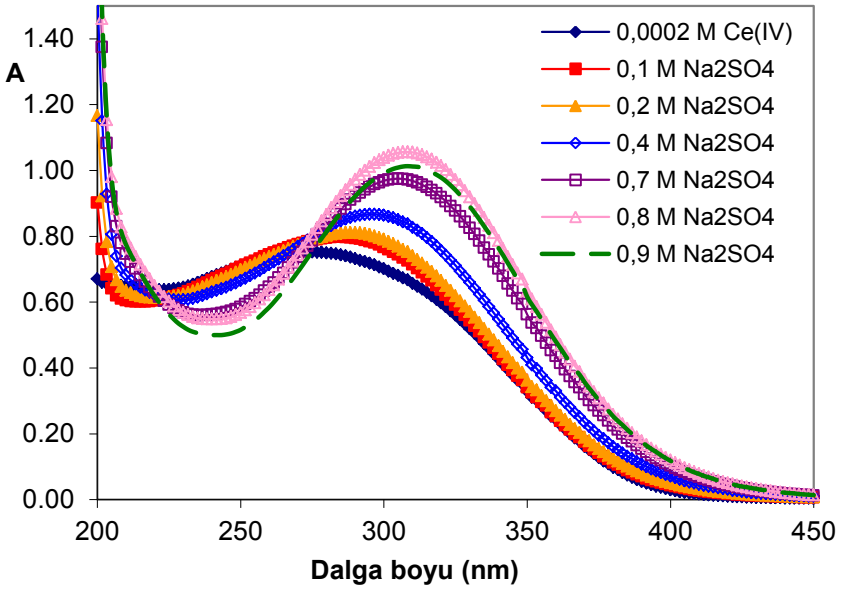
4.1.1.2 Sodyum sülfat iyonlarının Ce(IV)'ün maksimum dalgaboyuna ve absorbansına etkisi

Bölüm 4.1.1'de açıklandığı gibi Ce(IV)/Ce(III)'ün redoks potansiyeli ortam pH'ına bağlı olarak değişmektedir. Aynı zamanda ortamda bulunan anyonlar ile (sülfat, fosfat, v.b.) çözeltideki serbest Ce(IV) iyonlarının kompleks tuzlar oluşturmasından kaynaklanmaktadır. Ce(IV) iyonlarının sülfat iyonları ile kompleks oluşumu, asit derişimini minimum değerde (asit derişimine bağlı olarak sabit dalgaboyunun elde edildiği derişim) sabit tutarak, sülfat iyonlarını ise gittikçe artan değerlerde alarak hazırlanan çözeltilerin absorpsiyon spektrumları ile incelenmiştir. Bu amaçla 0,01 M ve 0,025 M H_2SO_4 içeren $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine 0,10 M - 0,90 M arasında değişen Na_2SO_4 çözeltileri ilave edildi. Hazırlanan çözeltilerin 200 - 450 nm

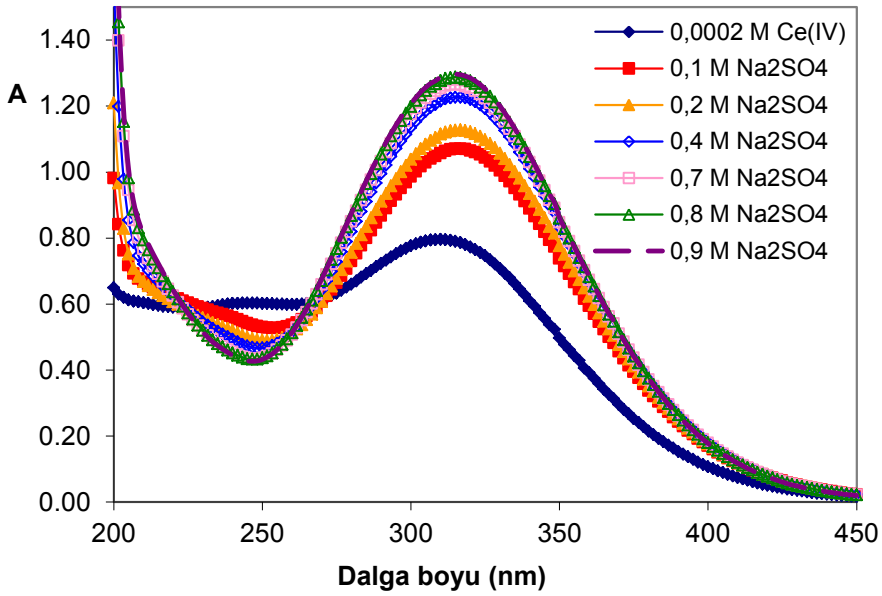
dalga boyları arasında absorpsiyon spektrumları saf suya karşı çizilmiştir (Şekil 4.3 – Şekil 4.4.).

Şekil 4.3'de 0,01 M H_2SO_4 içeren Ce(IV) çözeltisinin sülfat iyonu derişimi arttıkça maksimum dalgaboyunun 320 nm ye kaydığı ve absorbansın artığı gözlenmiştir.

Şekil 4.4'de ise 0,025 M H_2SO_4 içeren Ce(IV) çözeltisine 0,40 M – 0,90 M Na_2SO_4 ilavesi ile hazırlanan çözeltilerin alınan absorpsiyon spektrumlarında, sülfat iyonu arttıkça maksimum dalgaboyunun 320 nm ye kaydığı ve 0,70 M Na_2SO_4 derişiminden sonra sabitlendiği gözlenmiştir.

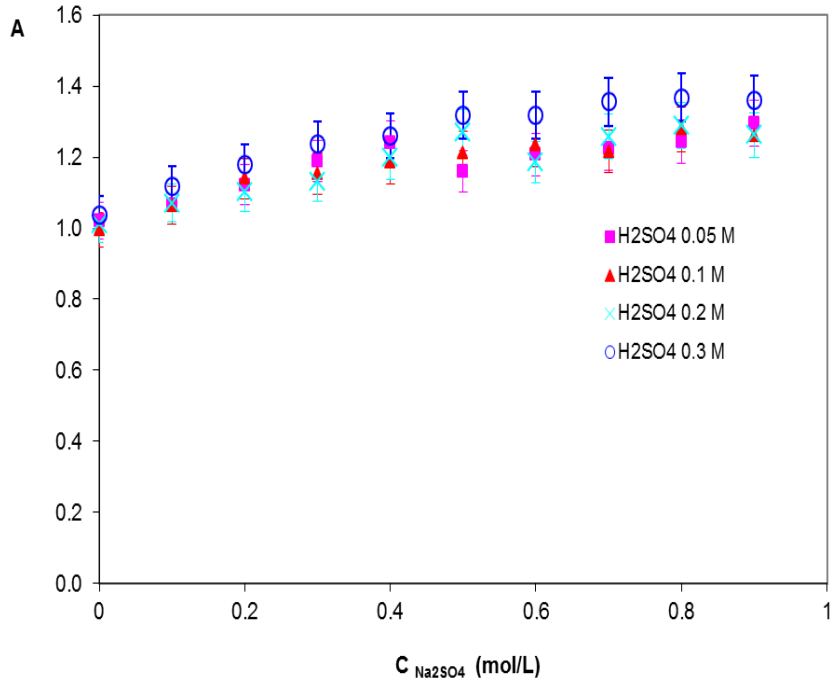


Şekil 4.3 : H_2SO_4 derişimi 0,01 M olan $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisinin maksimum dalgaboyuna 0,10 M – 0,90 M Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi.



Şekil 4.4 : H_2SO_4 derişimi 0,025 M olan $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisinin maksimum dalgaboyuna 0,10 M – 0,90 M Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi.

Yukarıdaki deneylerde $2,0 \times 10^{-4}$ Ce(IV) çözeltisi üzerine (0,01 M ve 0,025 M H_2SO_4 içeren) Na_2SO_4 çözeltisi ilave edildikçe absorbansın arttığı tespit edildi. Bu durumun diğer asit derişimlerinde de etkili olup olmadığını test etmek üzere aynı miktardaki Ce(IV) çözeltilerine, asit derişimleri 0,05; 0,10; 0,20 ve 0,30 M olacak şekilde sabit tutularak, artan miktarlarda Na_2SO_4 ilave edilmiştir (Şekil 4.5). Sonuç olarak yanyana bulunan H_2SO_4 ve Na_2SO_4'ın asit ve redoks potansiyeli üzerine tampon etkisi yaparak optimizasyonu kolaylaştırdığı, 0,70 M Na_2SO_4 derişimine kadar absorbansın arttığı bu derişimden sonra ise absorbans ve dalgaboyunun sabit kaldığı belirlenmiştir.



Şekil 4.5 : 0,05 M – 0,30 M H_2SO_4 derişim aralığında hazırlanan 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) çözeltilerinin absorbansına Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi (λ_{mak}=320 nm).

4.1.1.3 Sitrik asit'in Ce(IV)'ün absorbansına etkisi

Belirlenen 0,30 M H_2SO_4 ve 0,70 M Na_2SO_4 optimum deney koşullarında 8,0 × 10^{-6} M - 2,0 × 10^{-4} M sitrik asit çözeltilerinin 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) çözeltisi ile etkileşimi sonucu Ce(IV)'ün 320 nm dalgaboyundaki maksimum absorbansına sitrik asit derişimlerinin etkisi incelenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Çizelgeden görüldüğü üzere optimum çalışma ortamında 8,0 × 10^{-6} M – 2,0 × 10^{-4} M sitrik asit çözeltisinin bulunması Ce(IV)'ün absorbansını önemli ölçüde azaltmadığı gözlenmiştir.

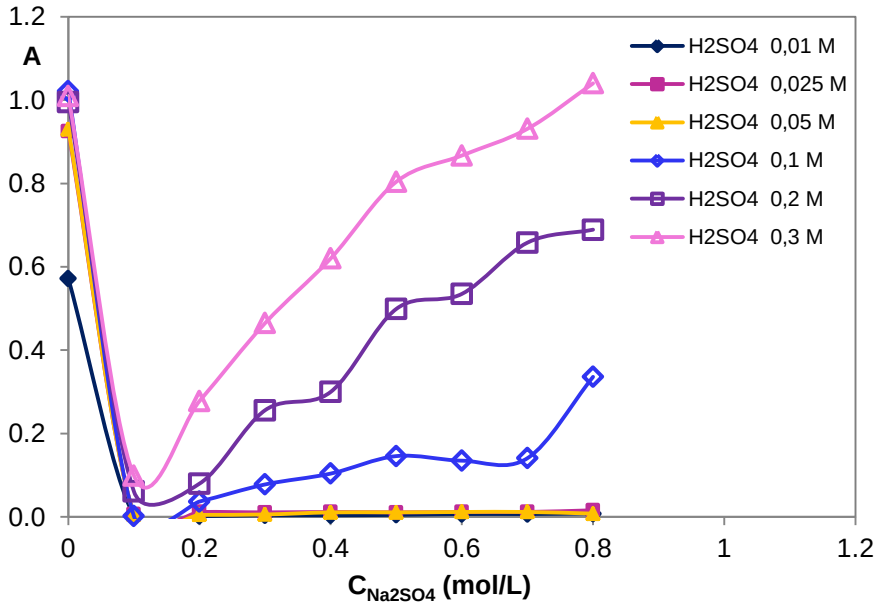
Çizelge 4.1 : 0,30 M H_2SO_4 ve 0,70 M Na_2SO_4 optimum deney koşullarında 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) çözeltisine sitrik asit etkisi (λ_{mak}=320 nm).

[Sitrik Asit] × 10^5	Absorbans	Ce(IV) absorbansındaki % azalma
-	1,190	-
0,80	1,187	0,25
1,60	1,189	0,08
2,00	1,190	0,00
3,20	1,189	0,08
6,40	1,173	1,42
12,8	1,164	2,18
20,0	1,154	**3,02**

4.1.1.4 Ce(IV) ile sitrik asit etkileşimine sodyum sülfat iyonlarının etkisi.

Bölüm 4.1.1.3'de yapılan deney sonucu sitrik asitin belirlenen optimum koşullarda Ce(IV) iyonlarını indirgemediği tespit edildi. Sitrik asitin diğer sülfat asidi ve Na_2SO_4 derişimlerindeki etkisini taramak için aşağıdaki deneyler yapılmıştır.

Son H_2SO_4 derişimi 0,01 M - 0,30 M olacak şekilde H_2SO_4 içeren $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine son derişimleri 0,10 M – 0,80 M arasında olacak şekilde değişen Na_2SO_4 çözeltileri ilave edilmiştir. Bu çözeltilere, $2,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit çözeltisi ilave edildikten sonra çözeltilerin 320 nm dalgaboyunda absorbans değerleri ölçülmüştür. Ölçülen absrbans değerleri ile Ce(IV) çözeltilerinin sitrik asit ile etkileşimi incelendiğinde 0,01 M - 0,05 M H_2SO_4 içeren Ce(IV) çözeltilerinin sitrik asit ile etkileşimi sonucu Ce(IV)'ün tamamen indirgendiği gözlenmiştir. Buna karşılık 0,10 M – 0,30 M H_2SO_4 içeren Ce(IV) çözeltilerinde asit derişimi arttıkça Ce(IV)'ün sitrik asit tarafından indirgenmesinin önemli ölçüde engellendiği görülmüştür. Sonuçlar Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2 de verilmiştir.



Şekil 4.6 : 0,01 M – 0,30 M sülfürik asit içeren $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $2,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit karışımına 0,10 M - 0,80 M Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi (λ_{mak}=320 nm).

Çizelge 4.2 : Na_2SO_4/ H_2SO_4 içeren $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) (λ_{mak}=320 nm, A=1,00) çözeltileri üzerine katılan $2,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit'in etkisi.

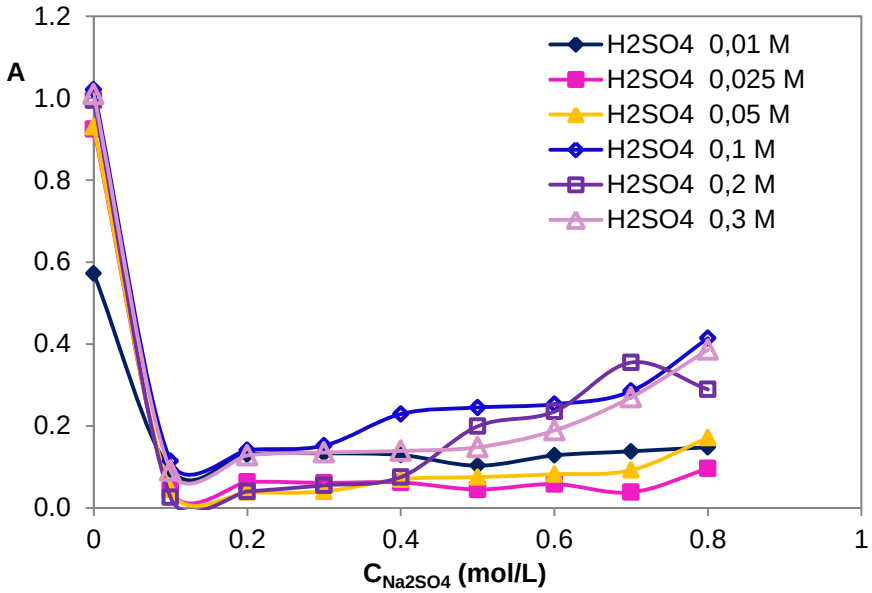
$[Na_2SO_4]$	**Ce(IV) başlangıç absorbansındaki % azalma**					
	$[H_2SO_4]$					
	0,01	**0,025**	**0,05**	**0,10**	**0,20**	**0,30**
0,00	99,95	92,43	99,56	99,80	93,80	90,20
0,10	99,47	99,56	99,56	96,40	92,00	72,50
0,20	99,65	99,65	99,35	92,40	74,30	54,00
0,30	99,55	99,55	99,35	89,80	70,00	38,60
0,40	99,55	99,57	99,57	85,60	50,00	20,40
0,50	99,12	99,78	98,82	86,70	46,20	14,00
0,60	98,77	99,71	98,71	86,10	33,80	**7,80**
0,70	98,77	99,51	98,71	66,60	30,70	**3,00**
0,80	98,68	98,60	99,14	70,70	23,20	**2,30**

Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi asit derişimi 0,30 M ve Na_2SO_4 derişimi 0,70 M olduğu deney koşullarında ekimolar sitrik asitin Ce(IV)'ün başlangıç absorbansına % 3 oranında etki ettiği, daha düşük sitrik asit derişimlerinde ise bu etkinin giderek azaldığı ve bu koşulların optimum koşullar olarak alınabileceği tespit edilmiştir.

4.1.1.5 Ce(IV) ile kuersetin etkileşimine sodyum sülfat iyonlarının etkisi

Bölüm 4.1.1.4'de Ce(IV)'ün sitrik asit ile etkileşiminin önemli ölçüde engellendiği Na_2SO_4 derişimi 0,70 M olarak belirlenmiştir. Na_2SO_4'ın sitrik asit üzerindeki engeleyici etkisinin antioksidanlar ile Ce(IV) arasında da etkili olup olmadığını anlamak için bir seri deney yapılmıştır.

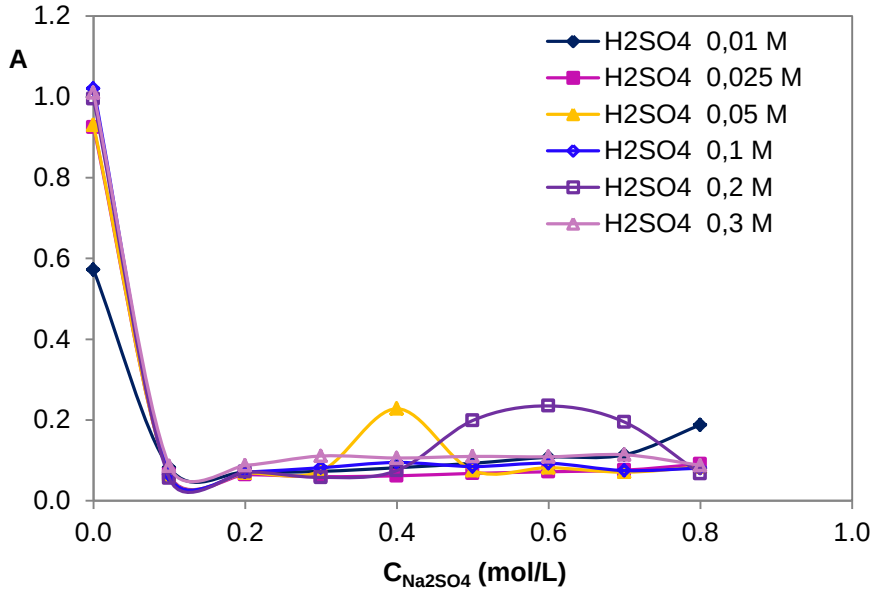
0,01 M - 0,05 M derişim aralığında H_2SO_4 içeren çözeltilerle yapılan çalışmalarda sitrik asitin Ce(IV)'ü tamamen indirgemesinden dolayı bu asit derişimlerinde çalışılmamıştır. Bu nedenle, son asit derişimi 0,10 - 0,30 M olacak şekilde H_2SO_4 içeren $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine 0,10 M - 0,70 M arasında değişen Na_2SO_4 çözeltileri ilave edilmiştir. Bu çözeltilerin herbirine, $1,0 \times 10^{-5}$ M kuersetin çözeltisi ilave edildikten sonra çözeltilerin absorbans değerleri ölçülmüştür. Aynı işlemler $1,5 \times 10^{-5}$ M sabit miktardaki kuersetin için tekrarlanmıştır. Şekil 4.7 ve Şekil 4.8 ve Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de gösterilen sonuçlara göre Na_2SO_4 iyonlarının kuersetin ile Ce(IV)'ün etkileşimini önemli ölçüde engellemediği tespit edilmiştir.



Şekil 4.7 : 0,01 M – 0,3 M H_2SO_4'li ortamda 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) + 1,0 × 10^{-5} M kuersetin karışımına Na_2SO_4 derişiminin etkisi (λ_{mak}=320 nm).

Çizelge 4.3 : 0,01 M – 0,3 M H_2SO_4'li ortamda 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) + 1,0 × 10^{-5} M kuersetin karışımına Na_2SO_4 derişiminin Ce(IV)'ün başlangıç absorbansına etkisi (λ_{mak}=320 nm).

[Na_2SO_4]	**Ce(IV) başlangıç absorbansındaki % azalma**					
	[H_2SO_4]					
	0,01	**0,025**	**0,05**	**0,10**	**0,20**	**0,30**
0,00	94,0	96,0	96,0	92,0	97,0	87,0
0,10	85,0	95,0	95,0	89,0	97,0	91,0
0,20	77,0	93,0	96,0	86,0	96,0	87,0
0,30	77,0	93,0	96,0	85,0	94,0	87,0
0,40	77,0	93,0	92,0	78,0	92,0	86,0
0,50	82,0	95,0	92,0	76,0	80,0	94,0
0,60	78,0	94,0	91,0	75,0	76,0	81,0
0,70	76,0	96,0	90,0	72,0	64,0	**73,0**
0,80	74,0	89,0	82,0	60,0	71,0	62,0



Şekil 4.8 : 0,01 M - 0,30 M H_2SO_4 içeren 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) + 1,5 × 10^{-5} M kuersetin karışımının 320 nm deki absorbansına Na_2SO_4 derişiminin etkisi.

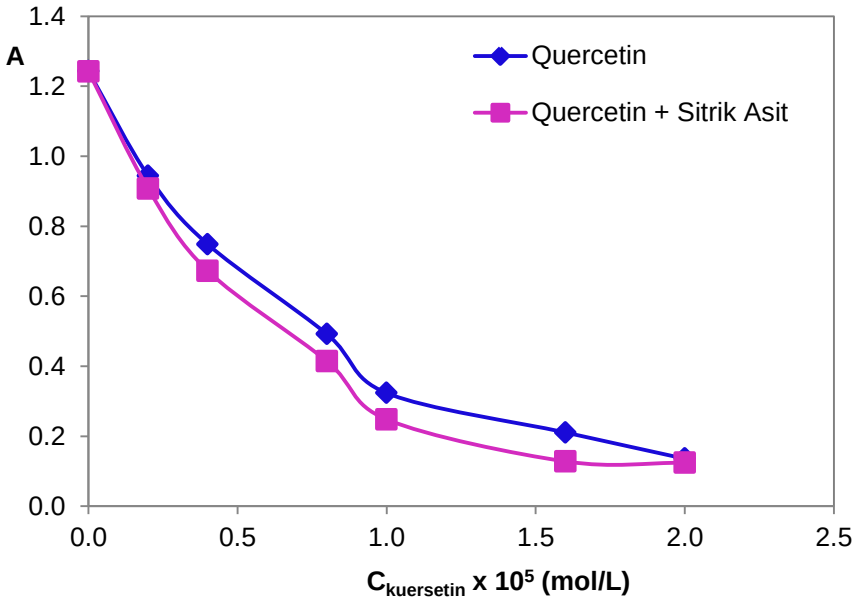
Çizelge 4.4 : 0,01 M– 0,3 M H_2SO_4'li ortamda 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV)+ 1,5 × 10^{-5} M kuersetin karışımına Na_2SO_4 derişiminin Ce(IV)'ün başlangıç absorbansına etkisi (λ_{mak}=320 nm).

[Na_2SO_4]	**Ce(IV) başlangıç absorbansındaki % azalma [H_2SO_4]**					
	0,01	**0,025**	**0,05**	**0,10**	**0,20**	**0,30**
0,00	89,0	93,0	92,0	96,0	95,0	92,0
0,10	86,0	93,0	89,0	93,0	94,0	91,0
0,20	88,0	93,0	86,0	92,0	93,0	91,0
0,30	87,0	94,0	85,0	92,0	92,0	89,0
0,40	86,0	93,0	78,0	75,0	90,0	89,0
0,50	84,0	92,0	76,0	92,0	92,0	90,0
0,60	81,0	92,0	75,0	91,0	91,0	89,0
0,70	80,0	91,0	72,0	92,0	93,0	**91,0**
0,80	67,0	90,0	60,0	91,0	92,0	88,0

4.1.1.6 Ce(IV) ile kuersetin etkileşimine sitrik asitin etkisi

Belirlenen optimum koşullarda, 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) çözeltilerine son derişimleri 2,0 × 10^{-6} - 2,0 × 10^{-5} M arasında değişen kuersetin çözeltileri ilave edildi. Çözelti karışımı oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra çözelti karışımlarının absorbans değerleri aynı dalgaboyunda ölçülmüş ve kuersetin derişimleri ile absorbanslar arasında grafik çizilmiştir (Şekil 4.9-A). Aynı işlemler hazırlanan 2. seri

çözeltilere son derişimleri 1,0 × 10^{-4} M olacak şekilde sitrik asit çözeltisi ilave edilerek tekrarlanmıştır (Şekil 4.9-B). Şekil 4.9'da görüldüğü gibi belirlenen optimum koşullarda kuersetin ile Ce(IV) iyonlarının stokiyometrik oranlarda reaksiyona girdiği ve aynı derişimdeki kuersetin çözeltilerine sabit miktarda sitrik asit ilave edilerek tekrarlanan deney sonuçlarına göre sitrik asitin girişim etkisi yapmadığı tespit edilmiştir. Literatürde, TAC yöntemlerinde gerçek antioksidan olarak sınıflandırılmamış sitrik asitin etkisinin giderilmesi, önemli bir bulgudur (Pizzocaro ve diğ, 1993). Besinlerdeki antioksidanların çoğunun oksidasyon potansiyelleri 0,1–0,6 V (SHE karşı) aralığında olduğundan, TAC yöntemlerinde kullanılan reaktifin potansiyelininde 0,6 V'dan yüksek olması beklenmektedir. Ancak gıda örneklerinde yaygın olarak bulunan, gerçekte antioksidan olmayan fakat benzer kimyasal davranış gösteren (basit şekerler, sitrik asit ve tiyol grubu içermeyen amino asitler v.b.) bileşiklerin yükseltgenme potansiyelinden de düşük olmalıdır. Yaptığımız optimazasyon çalışması ile bu koşullar sağlanmıştır.



Şekil 4.9 : Ce(IV) - kuersetin etkileşimine sitrik asitin etkisi.

A (♦) : 2,0×10^{-4} M Ce(IV) + kuersetin (2,0×10^{-6} - 2,0×10^{-5} M)
B (■) : 2,0×10^{-4} M Ce(IV) + 1,0×10^{-4} M sitrik asit + kuersetin (2,0×10^{-6} - 2,0×10^{-5} M).

4.1.2 Antioksidan bileşiklerin kalibrasyon grafikleri

Optimum deney koşullarında 2,0 × 10^{-5} M – 6,0 × 10^{-4} M arasında değişen derişimlerdeki Ce(IV) çözeltisinin kalibrasyon grafiğinin eşitliği aşağıdaki denklemde gösterilmektedir.

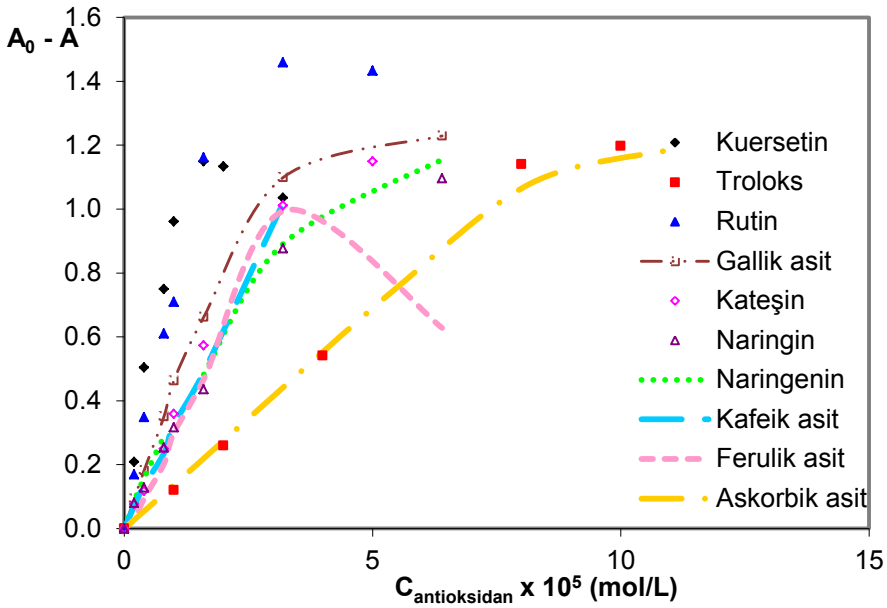
$$A_{320} = 6{,}1800 \times 10^3 \, C_{Ce(IV)} - 0{,}0081 \quad (R^2 = 0{,}9998) \qquad \textbf{(4.3)}$$

Modifiye CERAC yöntemi kullanılarak kuersetin için çizilen kalibrasyon grafiklerinden molar absorpsiyon katsayısı $(9{,}44 \pm 0{,}13) \times 10^4$ bulunmuştur (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5 : Kuersetin'in molar absorpsiyon katsayısı (λ_{mak}=320 nm) ve TEAC değerlerinin hesaplanması ($C_{trolox} = 8{,}0 \times 10^{-5}$; $\varepsilon_{trolox} = 1{,}38 \times 10^4$).

[Ce(IV)]	**[Kuersetin]**	**[Ce(IV)]/ [Kuersetin]**	**TEAC mol oranları [troloks]/ [kuersetin]**	**$\varepsilon_{kuersetin}$ (L mol^{-1} cm^{-1})**	**TEAC $\varepsilon_{kuersetin}/\varepsilon_{trolox}$**
$2{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}15 \times 10^{-5}$	17,40	6,96	$9{,}61 \times 10^4$	6,96
$2{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}23 \times 10^{-5}$	16,30	6,52	$9{,}31 \times 10^4$	6,74
$2{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}28 \times 10^{-5}$	15,52	6,21	$9{,}53 \times 10^4$	6,90
$2{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}26 \times 10^{-5}$	15,87	6,35	$9{,}32 \times 10^4$	6,75
$2{,}0 \times 10^{-4}$	$1{,}41 \times 10^{-5}$	14,18	5,67	$9{,}44 \times 10^4$	6,86
ORTALAMA		15,85 ±1,17	6,34 ±0,47	(9,44±0,13) x 10^4	6,84 ±0,09

Belirlenen optimum koşullarda seçilen çeşitli standart gıda antioksidanların (troloks, askorbik asit, gallik asit, kateşin, rutin, kuersetin, naringin, naringenin, kafeik asit, ferulik asit) kalibrasyon grafikleri yukarıda anlatıldığı şekilde çizilmiştir (Şekil 4.10). Bu grafiklerden hesaplanan her bir antioksidan için lineer kalibrasyon denklemleri, molar absorplama katsayıları (ε), lineer çalışma aralıkları, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) Çizelge 4.6 da, TEAC değerleri (1 mM antioksidan çözeltisinin eşdeğer davrandığı troloks çözeltisinin mM miktarı) ise Çizelge 4.7 de görülmektedir. Antioksidanların TEAC değerleri $\varepsilon_{antioksidan}/\varepsilon_{troloks}$ oranından hesaplanmıştır. Bulunan TEAC değerleri literatürde yer alan CUPRAC ve ABTS/TEAC yöntemleri ile kıyaslanmıştır (Apak ve diğ, 2007).



Şekil 4.10 : QR, TR, RT, GA, CAT, NG, NGN, CFA, FRA ve AA derişim absorbans grafikleri (λ_{mak}=320 nm).

Çizelge 4.6 : Gıda antioksidanlarının modifiye CERAC yöntemi ile elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri, molar absorplama katsayıları (ε), lineer çalışma aralıkları, gözlenebilme (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) değerleri.

Antioksidanlar	**Lineer kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı**	**ε ($L\ mol^{-1}\ cm^{-1}$)**	**Lineer calısma aralığı, ($\times\ 10^5$ M)**	***Tespit Sınırı (LOD), (mol/L)**	***Tayin Sınırı (LOQ), (mol/L)**
Trolox	$A= (1,38 \pm 0,06) \times 10^4 \times C_{TR} -0,0147 \pm 0,0289$, $r = 0,9991$	$1,38 \times 10^4$	1,00 - 10,00	$2,10 \times 10^{-6}$	6.98×10^{-6}
Kuersetin	$A= (9,44 \pm 1,54) \times 10^4 \times C_{QR} +0,0243 \pm 0,0931$, $r = 0,9961$	$9,44 \times 10^4$	0,10 – 1,00	$3,01 \times 10^{-7}$	1.00×10^{-6}
Rutin	$A= (5,31 \pm 0,33) \times 10^4 \times C_{RT} +0,0138 \pm 0,0183$, $r = 0,9990$	$5,31 \times 10^4$	0,20 – 2,00	$5,44 \times 10^{-7}$	1.82×10^{-6}
Gallik asit	$A= (4,54 \pm 0,34) \times 10^4 \times C_{GA} -0,0002 \pm 0,0205$, $r = 0,9991$	$4,54 \times 10^4$	0,24 – 2,40	$6,37 \times 10^{-7}$	2.12×10^{-6}
Askorbik asit	$A= (1,33 \pm 0.07) \times 10^4 \times C_{AA} +0,0080 \pm 0,0316$, $r = 0,9996$	$1,33 \times 10^4$	1,00 - 10,00	$2,18 \times 10^{-6}$	7.25×10^{-6}
Kateşin	$A= (3,42 \pm 0.38) \times 10^4 \times C_{CAT} -0,0039 \pm 0,0322$, $r = 0,9969$	$3,42 \times 10^4$	0,30 – 3,00	$8,45 \times 10^{-7}$	2.82×10^{-6}
Naringin	$A= (2,68 \pm 0.17) \times 10^4 \times C_{NG} +0,0228 \pm 0,0253$, $r = 0,9984$	$2,68 \times 10^4$	0,40 – 4,00	$1,08 \times 10^{-6}$	3.60×10^{-6}
Naringenin	$A= (2,72 \pm 0.24) \times 10^4 \times C_{NGN} +0,0372 \pm 0,0346$, $r = 0,9971$	$2,72 \times 10^4$	0,40 – 3,20	$1,06 \times 10^{-6}$	3.54×10^{-6}
Kafeik asit	$A= (3,16 \pm 0.12) \times 10^4 \times C_{CFA} -0,0001 \pm 0,0177$, $r = 0,9994$	$3,16 \times 10^4$	0,40 – 3,20	$9,15 \times 10^{-7}$	3.05×10^{-6}
Ferulik Asit	$A= (3,02 \pm 0.15) \times 10^4 \times C_{FRA} -0,0187 \pm 0,0215$, $r = 0,9991$	$3,02 \times 10^4$	0,40 – 3,20	$9,58 \times 10^{-7}$	3.19×10^{-6}

***LOD** = 3s/m; **LOQ**; 10s/m; **s**: kör değerin standart sapması, **m**:kalibrasyon eğrisinin eğimi (molar absorplama katsayısı)

Çizelge 4.7 : Gıda antioksidan bileşiklerinin, modifiye CERAC ve literatürdeki diğer TAC yöntemlerinin TEAC değerleri.

Antioksidanlar	**Mol oranları {[Ce(IV)]/[Antioksidan]}**	**$TEAC_{Modifiye\ CERAC}$ (mol AO / mol troloks)**	**$TEAC_{Modifiye\ CERAC}$ (ε_{AO} / $\varepsilon_{troloks}$)**	**[a]$TEAC_{ABTS}$**	**[a]$TEAC_{CUPRAC}$**
Kuersetin	15,85	6,34	6,84	2,77	4,38
Rutin	8,68	3,47	3,84	1,15	2,56
Kateşin	5,62	2,24	2,47	3,14	3,09
Naringin	4,47	1,78	1,93	0,62	0,02
Naringenin	4,80	1,92	1,95	0,64	0,05
Gallik asit	7,80	3,12	3,27	3,48	2,62
Kafeik asit	5,20	2,08	2,28	1,39	2,89
Ferulik Asit	4,95	1,98	2,18	2,16	1,20
Askorbik asit	2,25	0,90	1,00	1,03	0,96
Trolox	2,50	1,00	1,00	1,00	1,00

TEAC Katsayılarının İstatiksel Karşılaştırmaları	Anova: Yinelemesiz çift-etken	ABTS ve Modifiye CERAC (Rutin ve Naringin Hariç)	P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 1,588; $F_{kritik(1,\ 7)}$ = 5,591; **$F_{deneysel}$ < $F_{kritik(tablo)}$**
		CUPRAC ve Modifiye CERAC (Rutin ve Naringin Hariç)	P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 2,259; $F_{kritik(1,\ 7)}$ = 5,591; **$F_{deneysel}$ < $F_{kritik(tablo)}$**
		ABTS, CUPRAC ve Modifiye CERAC	P = 0,05; $F_{deneysel}$ =3,509; $F_{kritik(2,\ 18)}$ = 3,554; **$F_{deneysel}$ < $F_{kritik(tablo)}$**
	Korelasyon Katsayıları	ABTS ve Modifiye CERAC	$TEAC_{ABTS}$ = 0,3185$TEAC_{Modifiye\ CERAC}$ + 0,8858 (**r = 0,5101**)
		CUPRAC ve Modifiye CERAC	$TEAC_{CUPRAC}$ = 0,6514$TEAC_{Modifiye\ CERAC}$ + 0,1339 (**r = 0,7723**)

[a]TEAC Katsayıları; kaynak (Apak ve diğ, 2007).

4.1.3 Sentetik karışımların analizi

Sentetik antioksidan karışımlarının beklenen ve bulunan kapasite (mM TR eşdeğeri cinsinden) değerlerini hesaplamak için üçlü sentetik antioksidan karışımları hazırlanmıştır. Hazırlanan karışımların TAC'si modifiye CERAC yöntemi ile belirlenmiştir. Bulunan (deneysel) toplam antioksidan kapasite ($TAC_{bulunan}$), ölçülen absorbansın troloksun molar absorptivite değerine bölümünün 1000 katıdır (mM TR eşdeğeri TAC'si). Beklenen kapasite değeri ($TAC_{beklenen}$) ise eşitlik 4.4 ile hesaplanarak bulunmuştur (Çizelge 4.8).

$$(TAC)_{beklenen} = (TEAC)_1.C_1 + (TEAC)_2.\ C_2 + (TEAC)_3.C_3 \qquad \textbf{(4.4)}$$

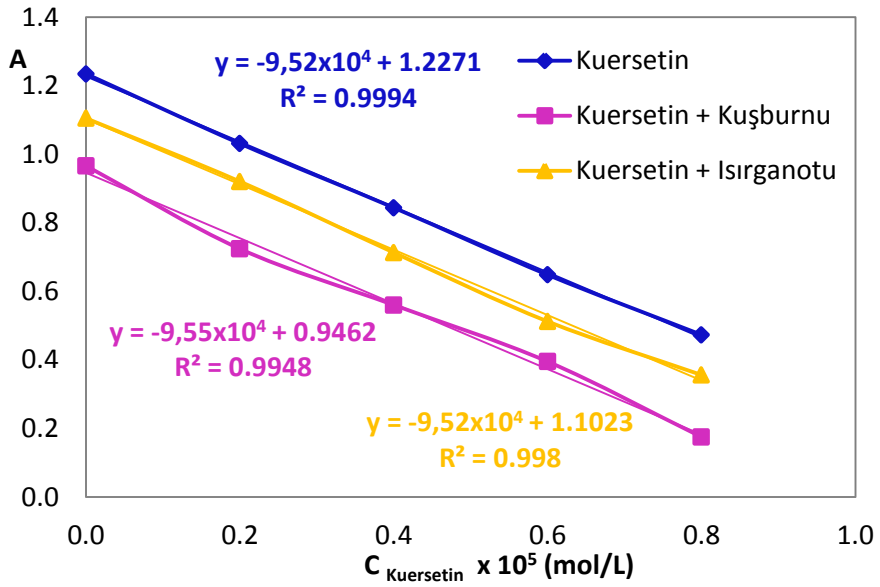
Çizelge 4.8 : Antioksidan bileşiklerin üçlü sentetik karışımlarının modifiye CERAC yöntemi ile mM Troloks eşdeğeri cinsinden beklenen ve bulunan TAC'leri.

Antioksidan karışımları	Beklenen kapasite mM Troloks eşdeğeri	Bulunan kapasite mM Troloks eşdeğeri	Bağıl hata (%)
$1{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kuersetin $1{,}0 \times 10^{-3}$ mM Gallik Asit $1{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kateşin	0,0126	0,0125 ± 0,0002	0,79
$1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Rutin $1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Trolox $1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Askorbik asit	0,0584	0,0568 ± 0,0006	-2,72
$2{,}0 \times 10^{-3}$ mM Naringin $2{,}0 \times 10^{-3}$ mM Ferulik Asit $6{,}0 \times 10^{-3}$ mM Askorbik asit	0,0142	0,0144 ± 0,0004	1,40
$5{,}0 \times 10^{-3}$ mM Gallik asit $5{,}0 \times 10^{-3}$ mM Trolox $5{,}0 \times 10^{-3}$ mM Rutin	0,0406	0,0403 ± 0,0004	-0,74
$5{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kateşin $5{,}0 \times 10^{-3}$ mM Naringenin $1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Askorbik asit	0,0322	0,0321 ± 0,0007	0,31
TAC değerlerinin İstatiksel Karşılaştırmaları (Anova: Yinelemesiz çift-etken)	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 1,453; $F_{kritik(1,4)}$ = 7,709 $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$**		

4.1.4 Bitki ekstrelerine standart katkı yönteminin uygulanması

Optimum deney koşullarında $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltilerine son derişimleri $2{,}0 \times 10^{-6}$ – $8{,}0 \times 10^{-6}$ M arasında değişen kuersetin çözeltileri ilave edilmiştir. Çözelti karışımları oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra absorbans değerleri 320 nm de referans saf suya karşı ölçülmüş ve kuersetin derişimleri ile absorbanslar arasında grafik çizilmiştir (Şekil 4.11-A). Aynı şekilde hazırlanan 2. ve 3. seri

çözeltilere sırasıyla 0,05 mL ısırgan otu (2,5 gr ısırgan otu / 250 mL) ve 0,1 mL kuşburnu (2,5 gr kuşburnu çayı / 250 mL) ekstraktlarından eklendikten sonra aynı işlemler uygulanmıştır. Karışımların absorbans değerleri ölçülmüş ve kuersetin derişimleri ile absorbanslar arasında grafikler çizilmiştir (Şekil 4.11-B – Şekil 4.11-C). Şekil 4.11'de görüldüğü gibi bu doğruların eğimlerinin birbirine paralel olması bitki çayları içindeki fenolik yapıdaki bileşiklerin kuarsetinle Beer kanundan kimyasal sapmalara yol açacak mahiyette ek etkileşim olmadığını gösterir.



Şekil 4.11 : Isırgan otu ve kuşburnu ekstraktları ile kuersetin çözeltisinin etkileşimi.

A (♦) : 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) + kuersetin
B (▲) : 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) + 0,05 mL ısırgan otu + kuersetin
C (■) : 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) + 0,1 mL kuşburnu çayı + kuersetin.

4.1.5 Modifiye CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımın belirlenmesi

Modifiye CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği (%RSD) ve geri kazanımın belirlenmesi için ısırgan otu ve kuşburnu çayı infüzyonlarına kuersetin katkısı yapılmıştır. Deney tüplerine 50 µL ısırgan otu çay infüzyonu ve 400 µL ve 800 µL 1,0 × 10^{-4} M kuersetin çözeltisinden ilave edilmiştir. Aynı deney kuşburnu çayı infüzyonu içinde tekrarlanmıştır. 100 µL kuşburnu çayına, 300 µL ve 600 µL 1,0 × 10^{-4} M kuersetin çözeltisinden ilave edilmiştir. Kuersetin katkısı yapılan çözeltilere modifiye CERAC yöntemi uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9 : Modifiye CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı(N=5).

Bitki çaylarına QR katkısı	Eklenen Derişim, (mol/L)	Bulunan Derişim, (mol/L)	Relatif Standart Sapma, RSD (%)	Geri Kazanım (%)
Isırgan otu	$4{,}00 \times 10^{-6}$	$(4{,}11 \pm 0{,}09) \times 10^{-6}$	2,19	102,8
	$8{,}00 \times 10^{-6}$	$(7{,}85 \pm 0{,}12) \times 10^{-6}$	1,53	98,1
Kuşburnu çayı	$3{,}00 \times 10^{-6}$	$(3{,}07 \pm 0{,}10) \times 10^{-6}$	3,26	102,3
	$6{,}00 \times 10^{-6}$	$(5{,}99 \pm 0{,}08) \times 10^{-6}$	1,34	99,8

4.1.6 İnterfere edici maddelerin etkisi

Ortamda bulunabilecek diğer organik bileşiklerin bozucu etkisini araştırmak üzere optimum koşullarda 1,0 mL $2{,}0 \times 10^{-3}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine, farklı derişimlerde bozucu iyon ilave ettikten sonra toplam hacim 10 mL'ye tamamlanmış ve 30 dakika sonra absorbansları ölçülmüştür. Bozucu bileşik olarak asetil salisilik asit, benzoik asit ve sakkaroz çözeltilerinin farklı miktarları ile Ce(IV)'ün etkileşimi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.10 da verilmiştir. $3{,}0 \times 10^{-5}$ M asetil salisilik asit, $1{,}0 \times 10^{-3}$ M Benzoik asit ve $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Sakkaroz miktarlarının Ce(IV)'ün başlangıç absorbansında (1,24 ± 0,04) azalmaya sebep olmadığı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisine benzoik asit, asetil salisilik asit ve sakkaroz çözeltilerinin etkisi.

	Derişim, (mol/L)	Absorbans (λ_{320}, nm)	Relatif Hata, (%)
Benzoik Asit	0	1,2424	-
	$4{,}0 \times 10^{-4}$	1,2417	0,05
	$6{,}0 \times 10^{-4}$	1,2315	0,87
	$8{,}0 \times 10^{-4}$	1,2250	1,74
	$1{,}0 \times 10^{-3}$	1,2047	3,03
Asetil Salisilik Asit	0	1,2424	-
	$3{,}0 \times 10^{-6}$	1,2220	1,64
	$1{,}5 \times 10^{-5}$	1,2148	2,22
	$3{,}0 \times 10^{-5}$	1,2053	2,98
Sakkaroz	0	1,2424	-
	$5{,}0 \times 10^{-5}$	1,2399	0,20
	$1{,}0 \times 10^{-4}$	1,2335	0,72
	$1{,}5 \times 10^{-4}$	1,2280	1,16
	$2{,}0 \times 10^{-4}$	1,2187	1,94

4.2 Spektroflorometrik CERAC Yöntemi

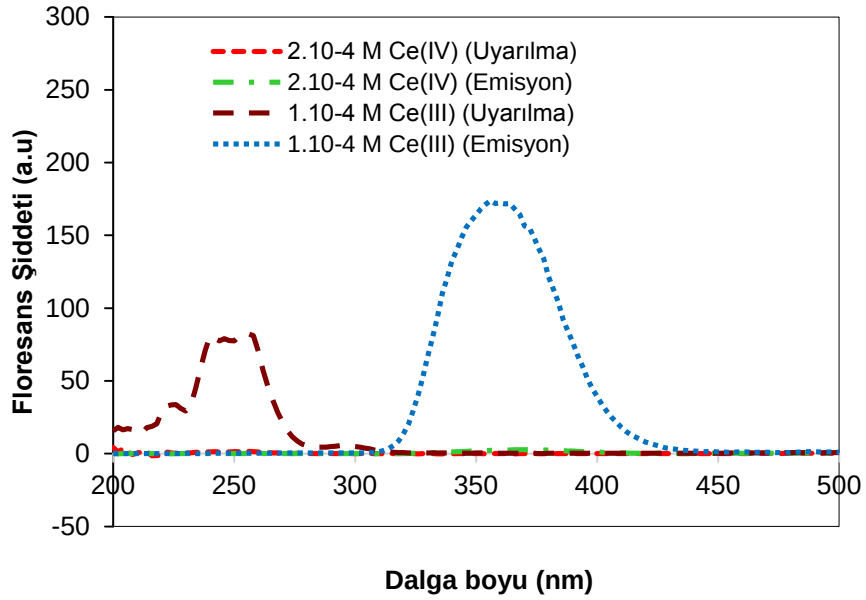
CERAC (spektrofotometrik) yöntemlerinde Ce(IV) ve antioksidanlar arasındaki nicel redoks reaksiyonu ve koşulları spektrofotometrik olarak incelenmiştir. Bu incelemeler sırasında 225-275 nm dalga boyları arasındaki absorpsiyon spektrumlarından Ce(III) iyonlarının oluştuğu tespit edilmiştir (Şekil 3.1 b-c). Ce(IV) iyonlarının floresans özellik göstermemesi, buna karşılık Ce(III) iyonlarının kuvvetli emisyon vermesinden yararlanılarak florometrik CERAC yöntemi geliştirilmiştir. CERAC yönteminde geliştirilen optimum koşulların emisyon şiddeti üzerine etkileri incelenmiştir. Geliştirilen yeni yöntem lineerlik, toplamsallık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım açısından valide edilmiş ve gerçek örneklere uygulanmıştır.

4.2.1 Uyarılma ve emisyon spektrumlarının çizimi

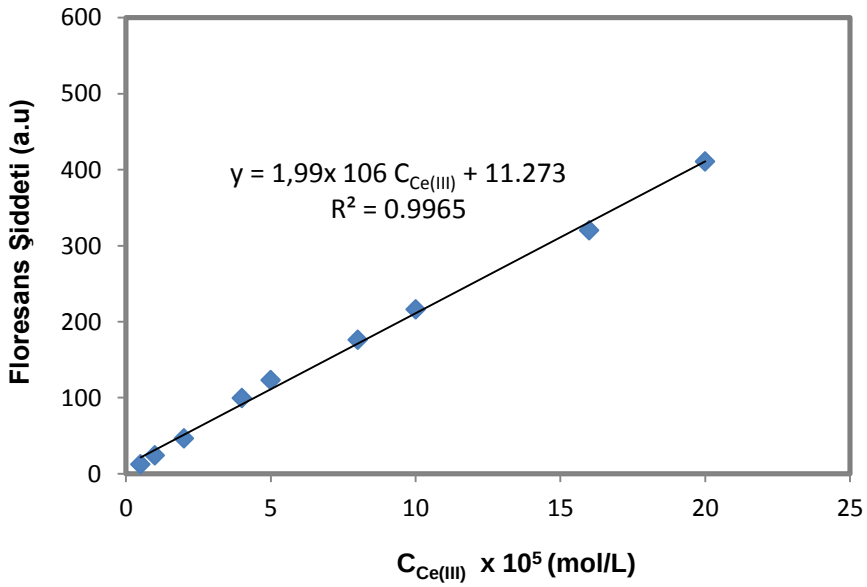
Floresans ölçümleri için kullanılan Cary Eclipse sisteminde iki monokromatör mevcut olup bunlardan biri emisyon diğeri uyarma monokromatörüdür. Uyarılma ve emisyon spektrumlarının oluşturulması için sabit uyarılma monokromatörü ile emisyon taraması; sabit emisyon monokromatörü ile uyarılma taraması yapılmıştır. Tez kapsamında uyarma-emisyon spektrumlarının alınmasında aynı yöntem uygulanmıştır. $1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(III) çözeltisinin 200 - 500 nm dalga boyları arasında emisyon ve uyarılma spektrumu alınmıştır (Şekil 4.12). Şekil 4.12'de görüldüğü gibi maksimum uyarılma dalgaboyu 256 nm ve emisyon dalgaboyu ise 360 nm olarak belirlenmiştir. $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) iyonlarının aynı dalga boyları arasında alınan emisyon ve uyarılma spektrumlarında floresansının olmadığı gözlenmiştir.

4.2.2 Ce(III)' ün kalibrasyon grafiği

Bölüm 3.3.1'de bahsedildiği şekilde hazırlanan Ce(III) çözeltisinden son derişimi $5{,}0 \times 10^{-6}$ M - $2{,}0 \times 10^{-4}$ M arasında değişen çözeltiler hazırlanmıştır. 256 nm de uyarılan bu çözeltilerin 360 nm deki emisyon değerleri ölçülmüştür. Şekil 4.13'de görüldüğü gibi bu derişim aralığında emisyon ile derişim değerleri arasında çizilen kalibrasyon grafiği doğrusaldır.



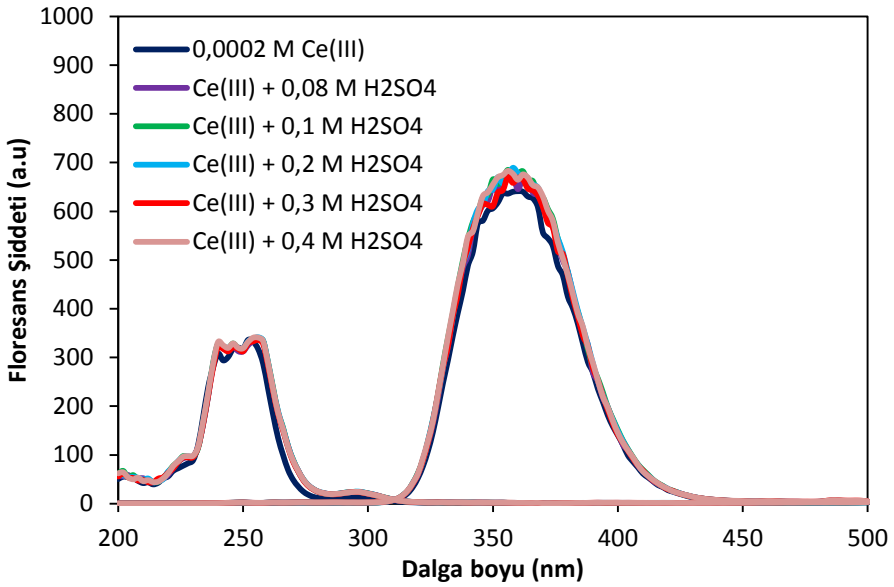
Şekil 4.12 : 0,3 M H_2SO_4 ortamında Ce(III) ve Ce(IV) çözeltilerinin uyarılma ve emisyon spektrumları.



Şekil 4.13 : $5{,}0 \times 10^{-6}$ M – $2{,}0 \times 10^{-4}$ M derişim aralığındaki Ce(III) çözeltisinin kalibrasyon grafiği.

4.2.3 Ce(III)'ün dalgaboyuna ve emisyon şiddetine asit etkisi

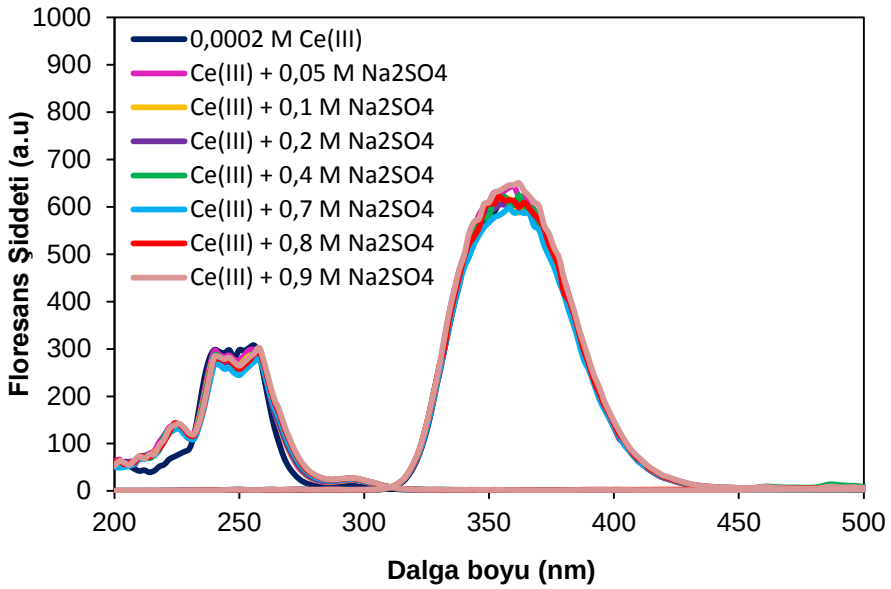
Ce(III)'ün maksimum uyarılma ve emisyon dalgaboyunu optimize etmek için, son asit derişimi 0,08 M - 0,40 M olacak şekilde sülfat asidi içeren $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(III) çözeltilerinin 200 nm - 500 nm dalga boyları arasında emisyon spektrumları saf suya karşı çizilmiştir. Asit derişimi artmasına karşın Ce(III)'ün uyarılma ve emisyon dalgaboyunun ve floresans şiddetinin değişmediği gözlenmiştir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14 : 2,0 × 10^{-4} M Ce(III) çözeltisinin maksimum emisyon ve uyarılma dalgaboyuna H_2SO_4 çözeltisinin etkisi.

4.2.4 Sodyum sülfat iyonlarının Ce(III)'ün maksimum dalgaboyuna ve emisyon şiddetine etkisi

Ce(IV)'ün oksidasyon potansiyelinin düşürülmesi için Na_2SO_4 çözeltileri kullanılarak CERAC yöntemi modifiye edilmişti (Bölüm 4.1). Bu nedenle florometrik yöntemde emisyon değerlerine ve dalga boylarına sülfat iyonlarının etkisi incelenmiştir. Son H_2SO_4 derişimi 0,30 M olan 2,0 × 10^{-4} M Ce(III) çözeltileri üzerine 0,05 M - 0,90 M Na_2SO_4 ilave edilmiş ve 200 nm - 500 nm dalga boyları arasında floresans spektrumları çizilmiştir (Şekil 4.15). Şekilde görüldüğü gibi Ce(III)'ün uyarılma ve emisyon dalga boylarında önemli bir kaymanın olmadığı ve floresans şiddetinin Na_2SO_4 derişiminin artmasına bağlı olarak değişmediği gözlenmiştir.



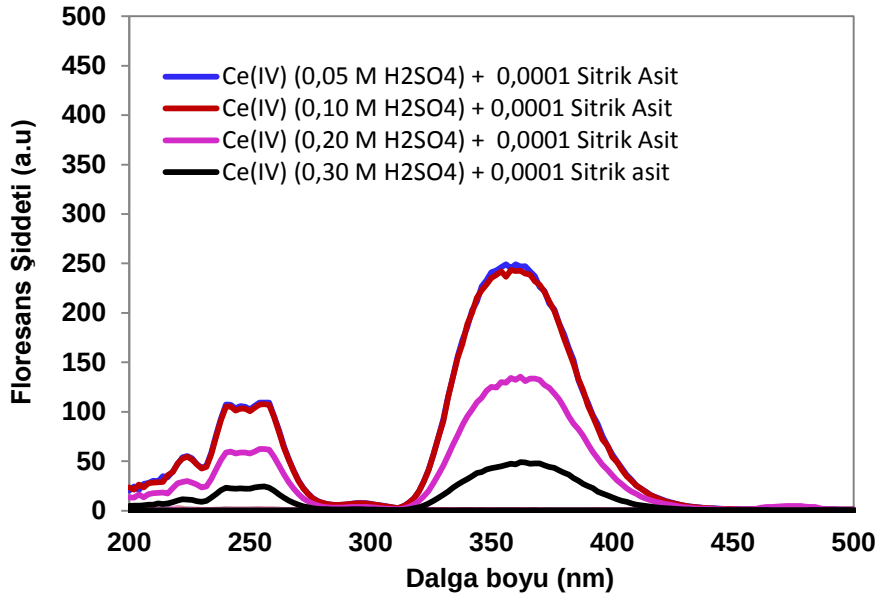
Şekil 4.15 : H_2SO_4 derişimi 0,30 M olan $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(III) çözeltisinin maksimum emisyon dalgaboyuna 0,05 M - 0,90 M Na_2SO_4 çözeltilerinin etkisi.

4.2.5 Spektroflorometrik CERAC yöntemi için optimum deney koşullarının belirlenmesi

Modifiye CERAC yönteminde sülfat asidi ve sodyum sülfat derişimlerinin yöntem üzerinde etkili olduğu, Ce(IV)/Ce(III) redoks çiftinin potansiyelini düşürerek, bozucu iyonların etkisini giderdiği belirlenmiştir. Belirlenen bu koşulların Ce(III)'ün floresansına etki etmediği üsteki deneylerde tespit edilmiştir. Ancak, ortamda Ce(IV) ve antioksidan bileşikler bulunduğunda bu koşulların etkileri aşağıdaki deneyler ile araştırılmıştır.

4.2.5.1 Ce(IV) ile sitrik asit etkileşimine asit etkisi

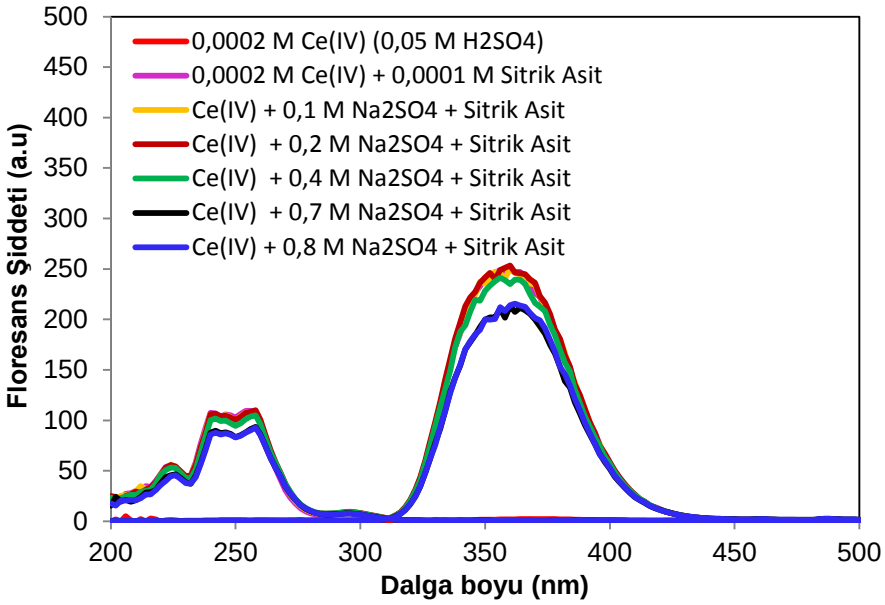
Asit derişimi 0,05 M - 0,30 M olacak şekilde H_2SO_4 içeren $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltilerine sabit $1,0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit çözeltisi ilave edildikten sonra çözeltilerin 200 - 500 nm dalga boyları arasında floresans şiddetleri ölçülmüştür (Şekil 4.16). Ce(IV) - sitrik asit reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III)'ün emisyonu, 0,05 M ve 0,10 M H_2SO_4 derişimlerinde değişmezken, asit derisimi arttıkça floresans şiddetinin azaldığı gözlenmiştir. Bunun nedeni ise H_2SO_4 derişimi artarken asitten gelen sülfat iyonlarının Ce(IV) ile kompleks oluşturmasıdır. Böylece serbest Ce(IV) iyonlarının sitrik asit ile etkileşimi engellenmiş ve de Ce(III) oluşumunun azalmasına sebep olmuştur.



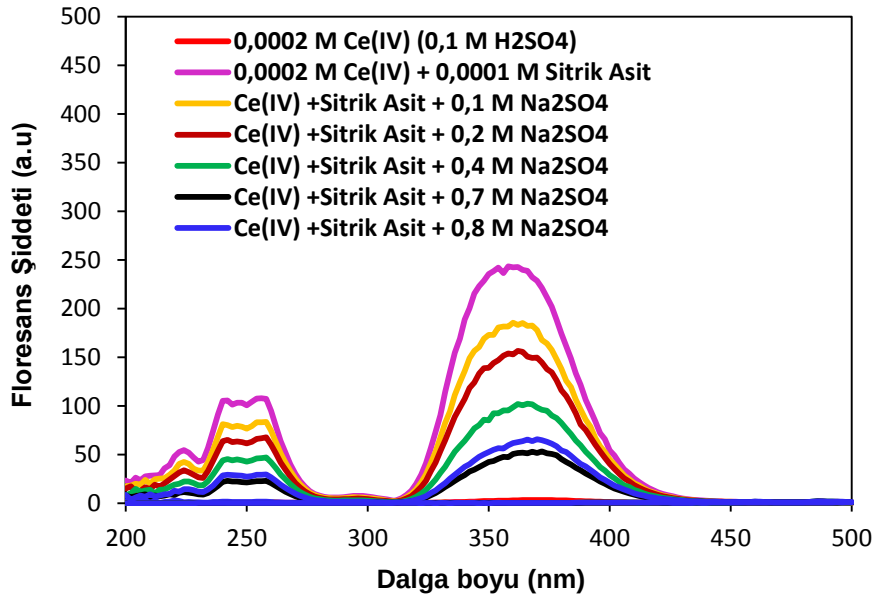
Şekil 4.16 : 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV)+ 1,0 × 10^{-4} M sitrik asit karışımına 0,05 M - 0,30 M H_2SO_4 çözeltilerinin etkisi.

4.2.5.2 Ce(IV) ile sitrik asit etkileşimine sodyum sülfat iyonlarının etkisi

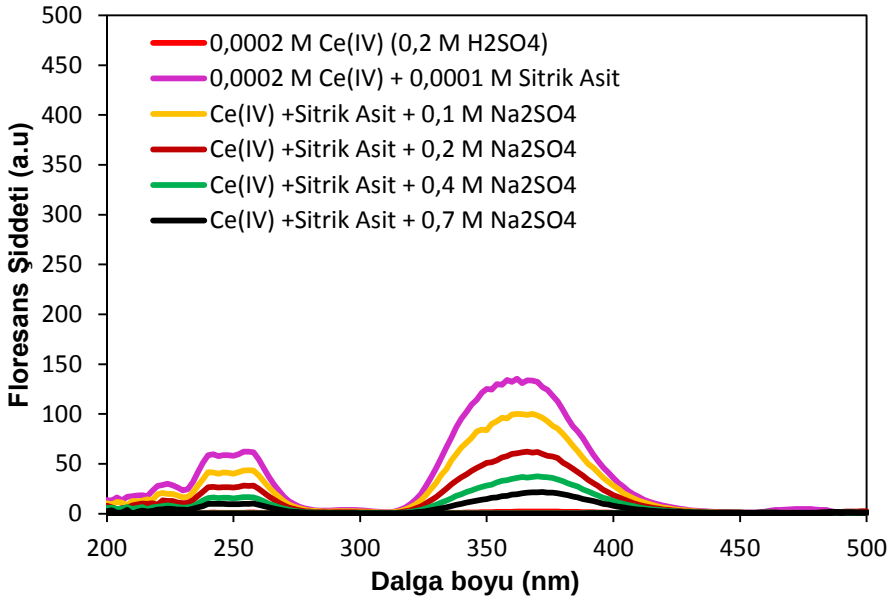
Sodyum sülfat çözeltisi kullanılarak 0,3 M'dan daha düşük asit derişimlerinin kullanılıp kullanılamıyacağı araştırılmıştır. Bunun için H_2SO_4 derişimi 0,05 M - 0,30 M arasında olacak şekilde hazırlanan 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV)'ün seri çözeltileri üzerine 0,10 M - 0,80 M arasında değişen Na_2SO_4 çözeltileri ilave edilmiştir. Bu çözeltilere, sabit 1,0 × 10^{-4} M sitrik asit çözeltisi ilave edildikten sonra çözeltilerin 200 nm - 500 nm dalga boyları arasında floresans şiddetleri ölçülmüştür (Şekil 4.17 – Şekil 4.20). Yapılan deneylerden, reaksiyon ortamının minimum 0,3 M H_2SO_4 içermesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Sülfat iyonlarının ise artması gerektiği (0,7 M) görülmüştür. Bu durumda redoks potansiyelinin düşürülmesi yani sitrik asidin bozucu etkisinin giderilmesi % 95 oranında sağlanmıştır. Sonuç olarak geliştirilen florometrik yöntemle optimum reaksiyon koşulları H_2SO_4 derişimi 0,30 M ve Na_2SO_4 derişimi 0,70 M olarak belirlenmiştir.



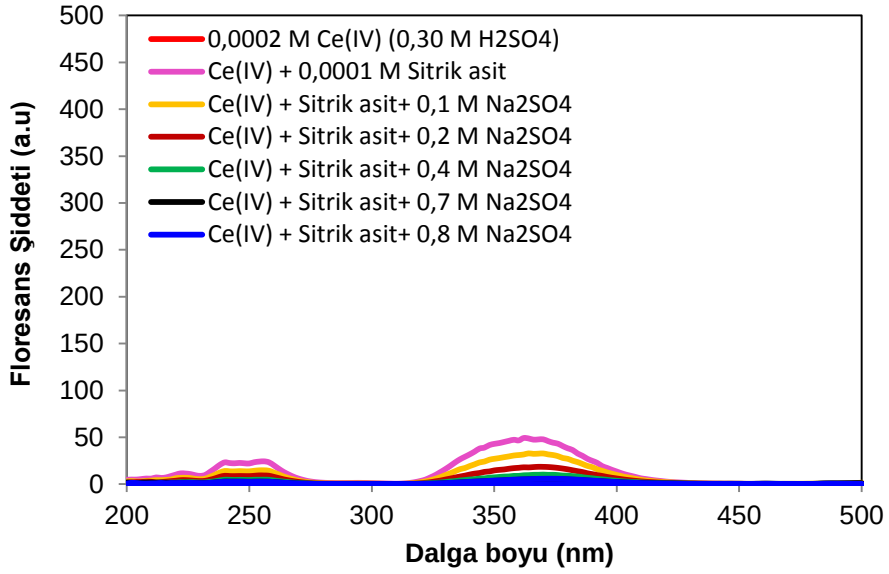
Şekil 4.17 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)'e $1{,}0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit etkisinin Na_2SO_4 ile giderilmesi (0,05 M H_2SO_4).



Şekil 4.18 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)'e $1{,}0 \times 10^{-4}$ M sitrik asit etkisinin Na_2SO_4 ile giderilmesi (0,1 M H_2SO_4).



Şekil 4.19 : 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV)'e 1,0 × 10^{-4} M sitrik asit etkisinin Na_2SO_4 ile giderilmesi (0,2 M H_2SO_4).

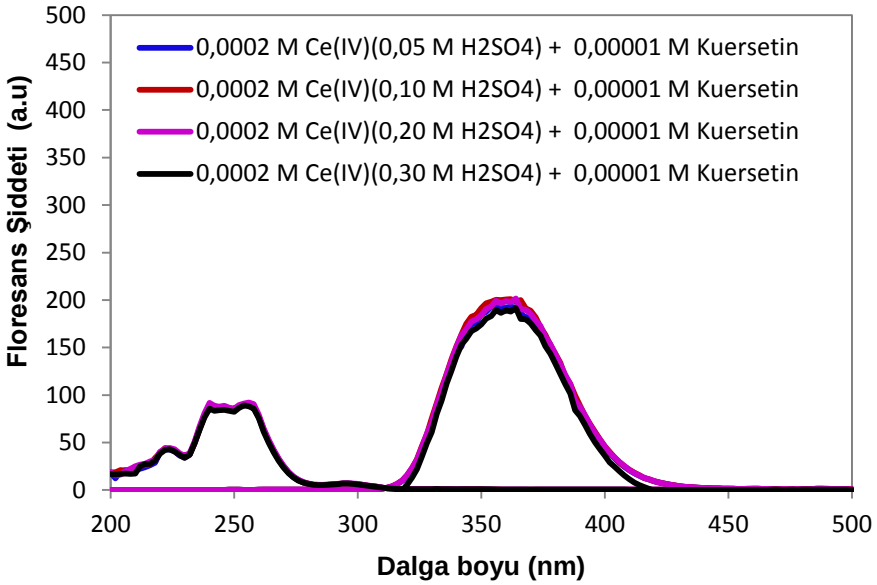


Şekil 4.20 : 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV)'e 1,0 × 10^{-4} M sitrik asit etkisinin Na_2SO_4 ile giderilmesi (0,3 M H_2SO_4).

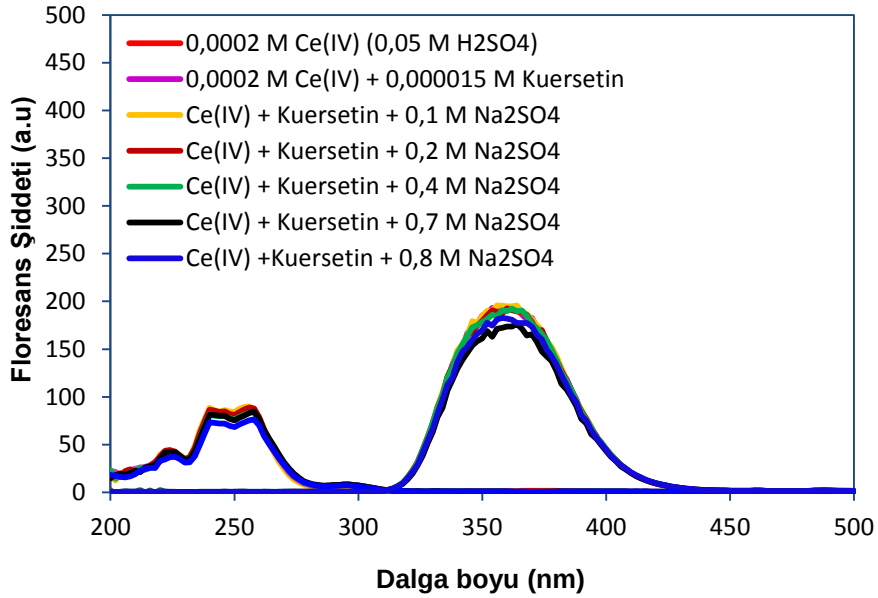
4.2.5.3 Ce(IV) ile kuersetin reaksiyonuna asit ve sodyum sülfat iyonlarının etkisi

Ce(IV)-sitrik asit etkileşimini incelemek için yapılan deneyler Ce(IV)-kuersetin için de yapılmış ve sülfat asidi ve sodyum sülfat etkisi incelenmiştir (Şekil 4.21 - Şekil 4.25). Sitrik asitidin etkilemediği koşullarda (0,3 M H_2SO_4 ve 0,7 M Na_2SO_4)

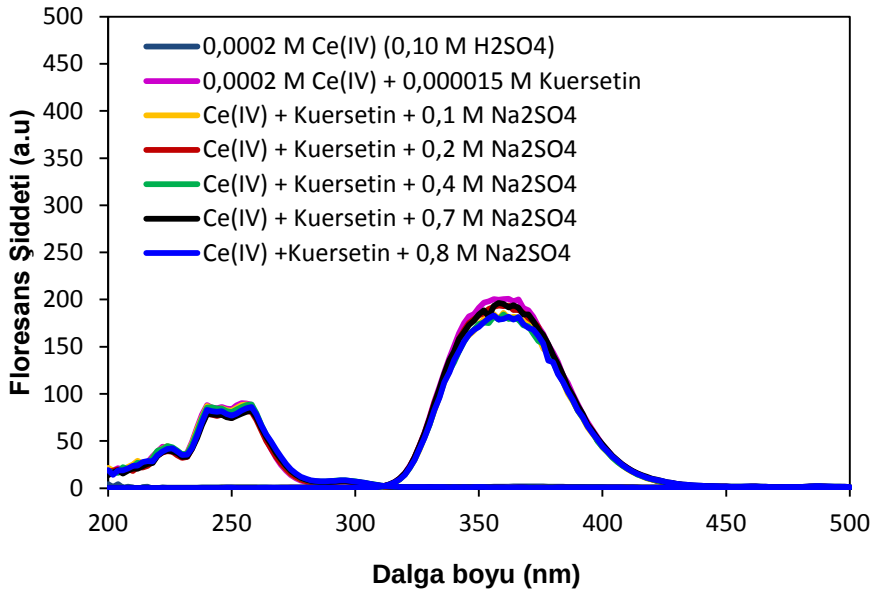
kuersetinin ölçülebilirliği tespit edilmiştir. Kuersetin için belirlenen bu reaksiyon koşulları diğer antioksidanlara da uygulanmıştır.



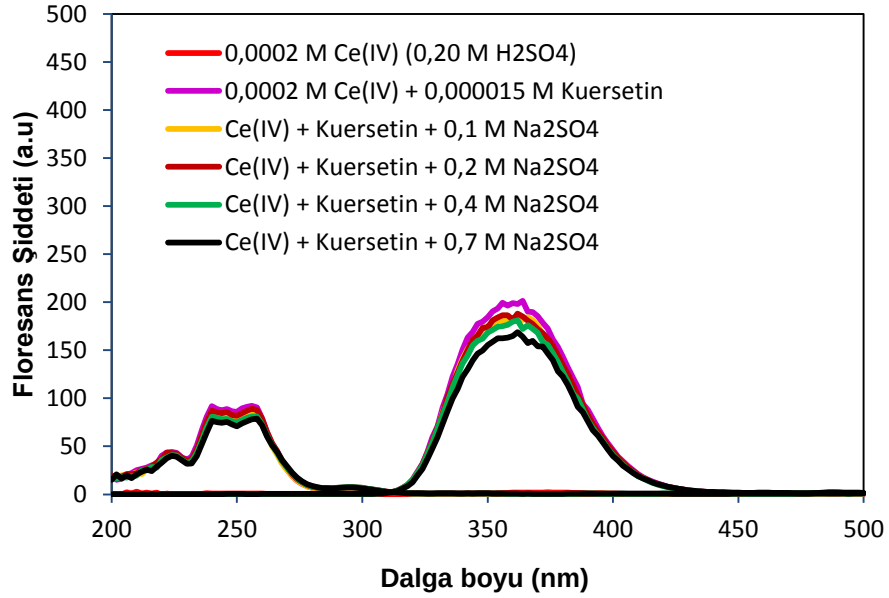
Şekil 4.21 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına H_2SO_4 etkisi.



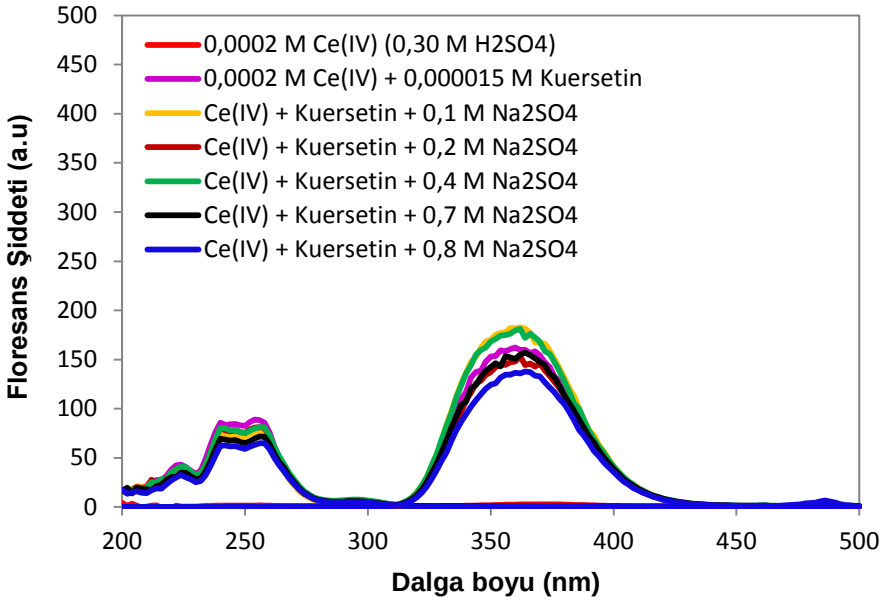
Şekil 4.22 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 etkisi (0,05 M H_2SO_4).



Şekil 4.23 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 etkisi (0,1 M H_2SO_4).



Şekil 4.24 : $2{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}5 \times 10^{-5}$ M kuersetin karışımına Na_2SO_4 etkisi (0,2 M H_2SO_4).



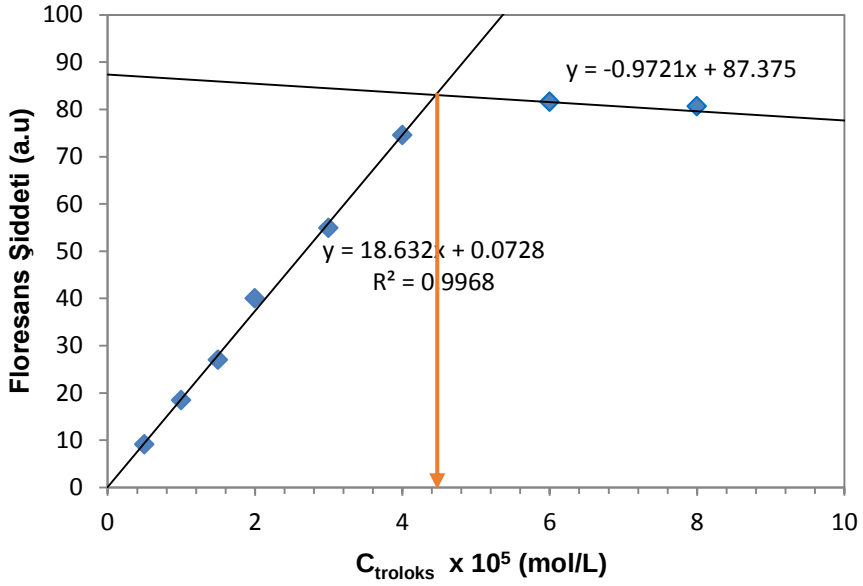
Şekil 4.25 : 2,0 × 10^{-4} M Ce(IV) + 1,5 × 10^{-5} M kuersetin karışımına Na_2SO_4 etkisi (0,3 M H_2SO_4).

4.2.6 Spektroflorometrik titrasyon

TAC tayini için geliştirilen "spektroflorometrik CERAC" yönteminde çalışma metodu olarak titrasyon yöntemi seçilmiştir. Titrant olarak Ce(IV) veya antioksidan çözeltileri kullanılarak iki yol izlenmiştir. Floresans titrasyon deneylerinin hepsi sulu çözeltide ve reaksiyon koşullarında 256 nm de uyarılıp 360 nm dalgaboyunda emisyonları ölçülmüştür.

4.2.6.1 Ce(IV)'ün antioksidanlarla titrasyonu

20 mL'lik tüplere 1,0 mL 1,0 × 10^{-3} M Ce(IV) çözeltisi ve 7,0 mL 1,0 M Na_2SO_4 çözeltisi ilave edildikten sonra sırası ile son derişimleri 5,0 × 10^{-6} M - 8,0 × 10^{-5} M olacak şekilde troloks çözeltileri ilave edilmiştir. Çözeltilerin son asit derişimi 0,3 M olacak şekilde ayarlandıktan sonra saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 30 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 360 nm dalgaboyunda emisyon şiddetleri ölçülmüştür. Emisyon değerleri ile troloks derişimleri arasında titrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.26).



Şekil 4.26 : $1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)'ün troloks ile titrasyon eğrisi.

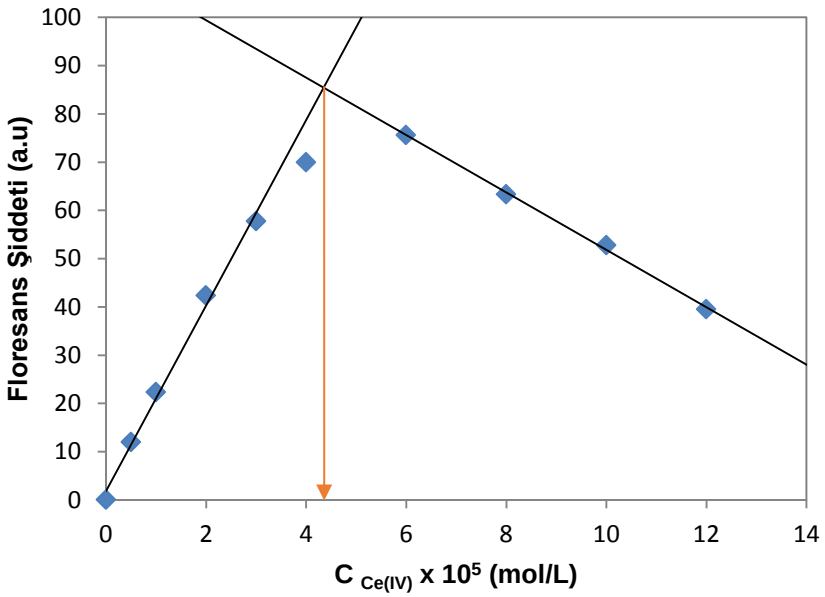
Titrant olarak troloks kullanıldığında titrasyon eğrisinin dönüm noktasına kadar lineer olarak arttığı Şekil 4.26'da görülmektedir. Dönüm noktasından sonra (Ce(IV) iyonlarının tükendiği durumda) oluşan Ce(III) miktarı sabit kaldığından ve çalışılan uayarılma ve emisyon dalga boylarında floresans özellik göstermediğinden eğri x-eksenine paraleldir. Genellikle antioksidanların emisyon yapılan dalga boylarında ciddi bir absorpsiyonları olmadığından ve derişimleri düşük olduğundan bu paralellik genellikle bozulmamaktadır. Tersi olduğu durumlarda dönüm noktasından sonra antioksidanların absorpsiyondan kaynaklanan emisyondaki düşüş eğride aşağıya doğru dönme meydana getirmektedir. Ce(IV) iyonlarının dönüm noktasına kadar ortamda fazlası bulunduğundan self absorpsiyonundan dolayı bölgenin lineerliğinin bozulmasına sebep olabilmektedir (derişime bağlı olarak). Bu durum dönüm noktasının belirginliğini etkilememektedir. Bu sonuçlara göre toplam antioksidan miktarı iki şekilde hesaplanır. Birinci hesaplama yönteminde dönüm noktasına kadar lineer olan bölgenin eğiminden hesaplanır. İkinci hesaplama yönteminde ise başlangıçta alınan sabit Ce(IV) miktarına eşdeğer antioksidan miktarı, dönüm noktasındaki harcanan titrant miktarından hesaplanır.

4.2.6.2 Antioksidanların Ce(IV) ile titrasyonu

20 mL'lik tüplere 0,2 mL $1{,}0 \times 10^{-3}$ M troloks çözeltisi ve 7,0 mL 1,0 M Na_2SO_4 çözeltisi ilave edildikten sonra sırası ile son derişimleri $5{,}0 \times 10^{-6}$ M - $1{,}2 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde Ce(IV) çözeltileri ilave edilmiştir. Çözeltilerin son asit derişimi 0,3 M olacak şekilde ayarlandıktan sonra saf su ile 10 mL'ye tamamlanmıştır. 30 dakika

oda sıcaklığında bekletildikten sonra 360 nm dalgaboyunda emisyon şiddetleri ölçülmüştür. Emisyon değerleri ile Ce(IV) derişimleri arasında titrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.27).

Titrant olarak Ce(IV) çözeltisi kullanıldığında titrasyon dönüm noktasına kadar Ce(IV) tüketildiğinden ortamda bulunmaz. Bu nedenle dönüm noktasına kadar Ce(IV)'ten ileri gelen bir söndürme meydana gelmez. Antioksidanların emisyon yapılan dalgaboyunda absorbansları az ve/veya olmadığından dönüm noktasına kadar antioksidanlardan da kaynaklanan bir söndürme görülmez. Şekil 4.27'de de görüldüğü gibi emisyon değerleri ile titrant arasındaki eğri dönüm noktasına kadar lineer olarak artmaktadır. Şekilde dönüm noktasından sonra floresans şiddetinde azalma görülmektedir. Bunun nedeni ise ortamda bulunan fazla Ce(IV) iyonlarının antioksidanların tükenmesi ile sabit kalan Ce(III) iyonlarının emisyonunu söndürmesinden kaynaklanmaktadır. Eğrinin dönüm noktasından sabit antioksidan miktarına eşdeğer Ce(IV) miktarı hesaplandı.



Şekil 4.27 : 2,0 × 10^{-5} M troloks'un Ce(IV) ile titrasyon eğrisi.

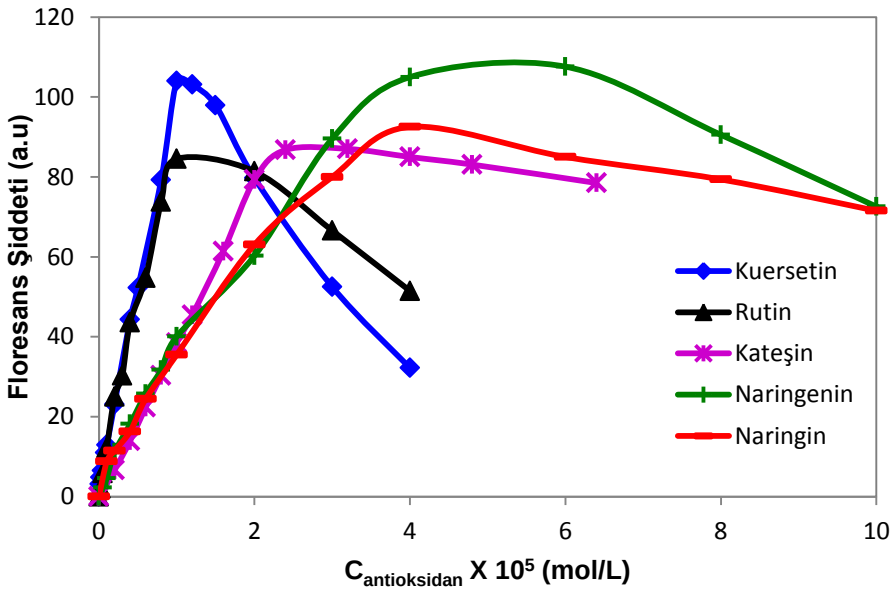
4.2.7 Antioksidan-Ce(IV)'ün stokiyometrik oranlarının bulunması

Belirlenen optimum şartlarda, troloks, kuersetin, rutin, gallik asit, kateşin, naringenin, naringin, ferulik asit, kafeik asit, askorbik asit, glutatyon ve sistein gibi antioksidanların spektroflorometrik CERAC yöntemi kullanılarak titrasyon grafikleri her iki yöntemlede çizildi (Şekil 4.28 - Şekil 4.32).

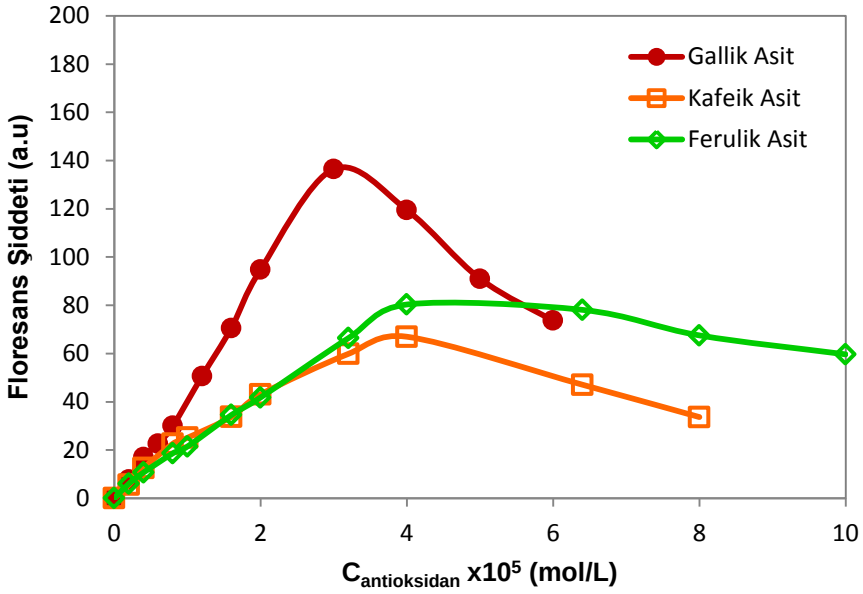
Antioksidan kullanılarak (titrant) çizilen titrasyon eğrilerinin lineer bölgesi (dönüm noktasına kadar olan bölge) belirlenerek çalışma doğruları oluşturuldu. Bu grafiklerden hesaplanan her bir antioksidan için lineer kalibrasyon denklemleri, eğim katsayıları (ε'), lineer çalışma aralıkları, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) çizelge 4.11 de verildi.

Her iki yöntemle çizilen titrasyon eğrilerinin dönüm noktasından bulunan stokiyometrik mol oranları çizelge 4.12'de gösterildi.

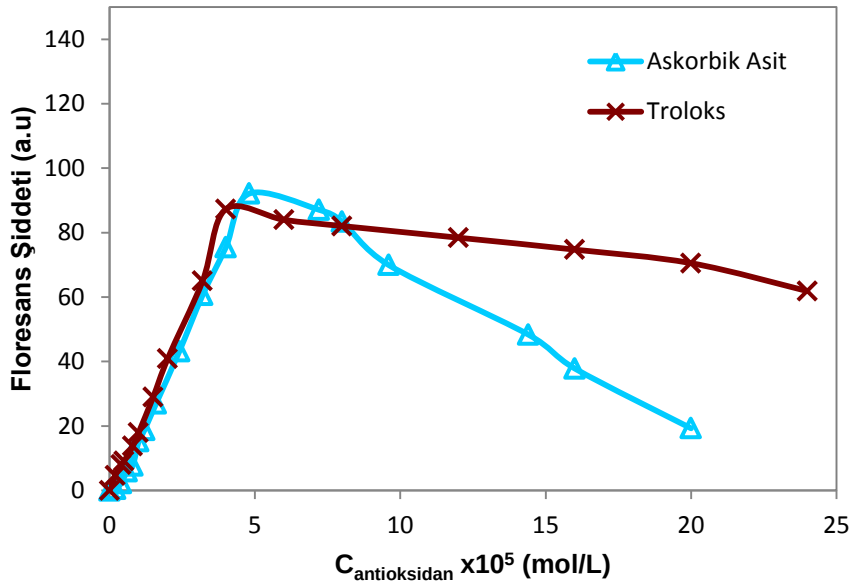
Antiosidanların TEAC değerleri ise spektroflorometrik titrasyon yöntemi kullanılarak her bir antioksidan için bulunan mol oranlarının troloks için bulunan mol oranına bölünmesi sonucunda ve $\varepsilon'_{antioksidan}$ / $\varepsilon'_{troloks}$ oranından hesaplandı. Bulunan TEAC değerleri ile literatürdeki diğer toplam antioksidan yöntemleri için belirlenen TEAC değerleri çizelge 4.13 de gösterildi.



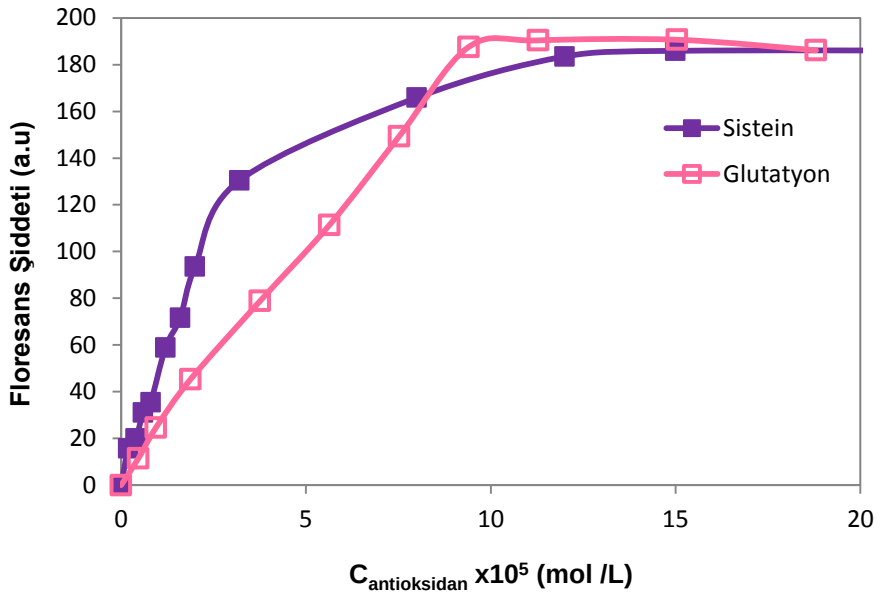
Şekil 4.28 : Sabit derişimdeki Ce(IV) çözeltilerinin flavonoidler (QR, RT, CAT, NGN, NG) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm).



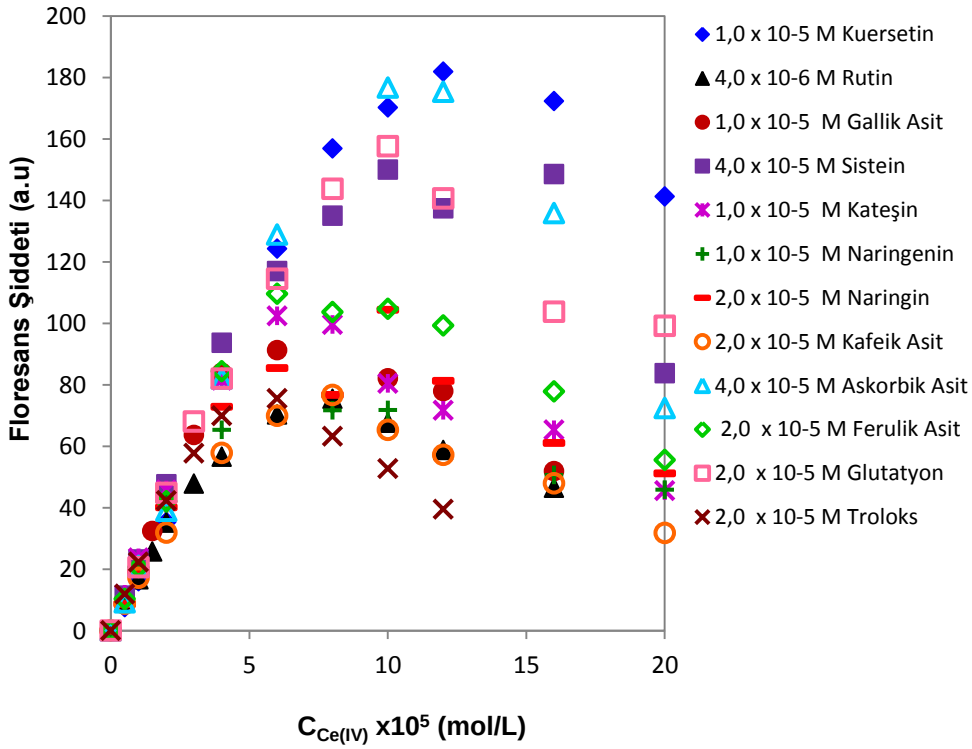
Şekil 4.29 : Sabit derişimdeki Ce(IV) çözeltilerinin fenolik asitler (GA, CFA, FRA) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm).



Şekil 4.30 : Sabit derişimdeki Ce(IV) çözeltilerinin vitaminler (AA, TR) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm).



Şekil 4.31 : Sabit derişimdeki Ce(IV) çözeltilerinin tiyol yapılı antioksidanlar (Cys, GSH) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm).



Şekil 4.32 : QR, RT, GA, Cys, CAT, NGN, NG, CFA, AA, FRA, GSH ve TR çözeltilerinin Ce(IV) ile titrasyon eğrileri (λ_{mak}=360 nm).

Çizelge 4.11 : Gıda ve plazma antioksidanlarının spektroflorometrik CERAC yöntemi ile elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri, eğim katsayıları (ε'), lineer çalışma aralıkları, gözlenebilme ve tayin sınırı değerleri.

Antioksidanlar	**Lineer kalibrasyon denklemi, korelasyon katsayısı**	**‡ε'**	**Lineer calısma aralığı, (× 10^5 M)**	**Tespit Sınırı, *(LOD)**	**Tayin Sınırı *(LOQ)**
Kuersetin	$F = (1{,}00 \pm 0{,}03) \times 10^7 \times C_{QR} + 2{,}3732 \pm 1{,}4482$, $r = 0{,}9990$	$1{,}00 \times 10^7$	0,05 – 1,00	$8{,}35 \times 10^{-8}$	$2{,}78 \times 10^{-7}$
Rutin	$F = (9{,}14 \pm 0{,}62) \times 10^6 \times C_{RT} + 1{,}5339 \pm 2{,}3524$, $r = 0{,}9971$	$9{,}14 \times 10^6$	0,05 – 1,00	$9{,}14 \times 10^{-8}$	$3{,}05 \times 10^{-7}$
Kateşin	$F = (3{,}96 \pm 0{,}11) \times 10^6 \times C_{CAT} - 1{,}2417 \pm 1{,}1507$, $r = 0{,}9995$	$3{,}96 \times 10^6$	0,20 – 2,00	$2{,}11 \times 10^{-7}$	$7{,}02 \times 10^{-7}$
Naringin	$F = (3{,}02 \pm 0{,}34) \times 10^6 \times C_{NG} + 3{,}7257 \pm 3{,}0437$, $r = 0{,}9952$	$3{,}02 \times 10^6$	0,10 – 2,00	$2{,}76 \times 10^{-7}$	$9{,}21 \times 10^{-7}$
Naringenin	$F = (3{,}35 \pm 0{,}38) \times 10^6 \times C_{NGN} - 0{,}5271 \pm 2{,}1101$, $r = 0{,}9953$	$3{,}35 \times 10^6$	0,10 – 1,00	$2{,}48 \times 10^{-7}$	$8{,}29 \times 10^{-7}$
Gallik asit	$F = (4{,}04 \pm 0{,}36) \times 10^6 \times C_{GA} - 0{,}6831 \pm 3{,}8452$, $r = 0{,}9961$	$4{,}04 \times 10^6$	0,20 – 2,00	$2{,}06 \times 10^{-7}$	$6{,}88 \times 10^{-7}$
Kafeik asit	$F = (2{,}61 \pm 0{,}22) \times 10^6 \times C_{CFA} + 0{,}6665 \pm 2{,}1452$, $r = 0{,}9982$	$2{,}61 \times 10^6$	0,20 – 2,00	$3{,}20 \times 10^{-7}$	$1{,}06 \times 10^{-6}$
Ferulik asit	$F = (1{,}99 \pm 0{,}06) \times 10^6 \times C_{FRA} + 1{,}9205 \pm 1{,}2393$, $r = 0{,}9993$	$1{,}99 \times 10^6$	0,20 – 4,00	$4{,}20 \times 10^{-7}$	$1{,}40 \times 10^{-6}$
Glutatyon	$F = (1{,}18 \pm 0{,}07) \times 10^6 \times C_{GSH} + 0{,}1073 \pm 3{,}6188$, $r = 0{,}9982$	$1{,}18 \times 10^6$	0,47 – 9,40	$7{,}09 \times 10^{-7}$	$2{,}36 \times 10^{-6}$
Sistein	$F = (2{,}55 \pm 0{,}08) \times 10^6 \times C_{Cys} - 0.6160 \pm 1{,}2020$, $r = 0{,}9997$	$2{,}55 \times 10^6$	0,20 – 3,20	$3{,}26 \times 10^{-7}$	$1{,}09 \times 10^{-6}$
Askorbik asit	$F = (2{,}01 \pm 0{,}09) \times 10^6 \times C_{AA} - 4{,}6888 \pm 1{,}9695$, $r = 0{,}9981$	$2{,}01 \times 10^6$	0,20 – 4,80	$4{,}16 \times 10^{-7}$	$1{,}38 \times 10^{-6}$
Trolox	$F = (1{,}86 \pm 0{,}13) \times 10^6 \times C_{TR} - 0{,}0563 \pm 2{,}3985$, $r = 0{,}9964$	$1{,}86 \times 10^6$	0,20 - 4,00	$4{,}48 \times 10^{-7}$	$1{,}49 \times 10^{-6}$

‡ **ε';** Antioksidan derişimleri ile floresans şiddetleri arasında çizilen titrasyon eğrisinden edilen lineer doğrunun eğimi,
***LOD** = 3s/ε'; **LOQ**; 10s/ε'; **s**: kör değerin standart sapması.

Çizelge 4.12 : Gıda ve plazma antioksidanlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemiyle çizilen titrasyon eğrilerinden belirlenen stokiyometrik mol oranları.

Antioksidanlar	Mol Oranları (Antioksidan ile Ce(IV) titrasyonu) {[Ce(IV)] / [Antioksidan]}	Mol Oranları (Ce(IV) ile antioksidan titrasyonu) {[Ce(IV)] / [Antioksidan]}
Flavonoller		
Kuersetin	10,30	10,78
Rutin	11,18	12,62
Flavon-3-oller		
Kateşin	6,00	5,10
Flavanon		
Naringin	3,28	3,18
Naringenin	2,97	3,16
Fenolik Asitler		
Gallik asit	4,65	4,53
Hidroksisinamik Asitler		
Kafeik asit	3,46	3,04
Ferulik asit	2,38	3,00
Tiyoller		
Glutatyon	1,04	1,56
Sistein	2,77	2,06
Diğerleri		
Askorbik asit	2,23	2,40
Trolox	2,25	2,29
İstatiksel Karşılaştırmalar Anova: Yinelemesiz çift-etken	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 0,304 $F_{kritik(1,11)}$ = 4,844; $F_{deneysel}$ < $F_{kritik(tablo);}$**	

Çizelge 4.13 : Gıda ve plazma antioksidanlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC ve diğer TAC yöntemlerine göre TEAC katsayıları.

Antioksidanlar	$TEAC_{florometrik\ CERAC}$ (AO ile Ce(IV) titrasyonu)	$TEAC_{florometrik\ CERAC}$ (Ce(IV) ile AO titrasyonu)	$TEAC_{florometrik\ CERAC}$ (ortalama)	$TEAC_{florometrik\ CERAC}$ (ε'_{AO} / $\varepsilon'_{Troloks}$)	[a]$TEAC_{Modifiye\ CERAC}$	[b]$TEAC_{ABTS}$	[b]$TEAC_{CUPRAC}$
Kuersetin	4,58	4,71	4,65	5,38	6,84	2,77	4,38
Rutin	4,97	5,51	5,24	4,91	3,84	1,15	2,56
Kateşin	2,67	2,22	2,44	2,13	2,47	3,14	3,09
Naringin	1,46	1,39	1,42	1,62	1,93	0,62	0,02
Naringenin	1,32	1,38	1,35	1,80	1,95	0,64	0,05
Gallik asit	2,07	1,98	2,02	2,17	3,27	3,48	2,62
Kafeik asit	1,54	1,33	1,44	1,40	2,28	1,39	2,89
Ferulik asit	1,06	1,31	1,18	1,07	2,18	2,16	1,20
Glutatyon	0,46	0,68	0,57	0,63	-	0,70	0,57
Sistein	1,23	0,90	1,07	1,37	-	-	0,39
Askorbik asit	0,99	1,05	1,02	1,08	1,00	1,03	0,96
Trolox	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

TEAC Katsayılarının İstatiksel Karşılaştırmaları	**Anova: Yinelemesiz cift etken**	Florometrik CERAC **(ε'_{AO}/$\varepsilon'_{Troloks}$) ve** (ortalama)	P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 1,231 $F_{kritik(1, 11)}$ = 4,844; $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$
		Modifiye CERAC **ve** Florometrik CERAC	P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 2,762 $F_{kritik(1, 9)}$ = 5,117; $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$
		ABTS ve Florometrik CERAC	P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 0,703 $F_{kritik(1, 10)}$ = 4,965; $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$
		CUPRAC ve Florometrik CERAC	P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 0,940 $F_{kritik(1, 11)}$ = 4,844; $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$
		Florometrik CERAC; Modifiye CERAC; ABTS;CUPRAC	P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 1,871 $F_{kritik(4, 36)}$ = 2,634; $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$
	Korelasyon Katsayıları	Florometrik CERAC**(ε'_{AO}/$\varepsilon'_{Troloks}$) ve** (ortalama)	$TEAC_{FLR\ CERAC}$ (ε'_{AO} / $\varepsilon'_{Troloks}$)=1,0029$TEAC_{FLR\ CERAC\ (ortalama)}$ + 0,091 (r =0,9801)
		Modifiye CERAC **ve** Florometrik CERAC	$TEAC_{Modifiye\ CERAC}$ = 0,9275$TEAC_{FLR\ CERAC}$ + 0,6578 (r = 0,8326)
		ABTS ve Florometrik CERAC	$TEAC_{ABTS}$ = 0,2405$TEAC_{FLR\ CERAC}$ +1,1555 (r = 0,3481)
		CUPRAC ve Florometrik CERAC	$TEAC_{CUPRAC}$ = 0,6805$TEAC_{FLR\ CERAC}$ + 0,3173 (r = 0,7167)

[a]TEAC Katsayıları; kaynak (Ozyurt ve diğ, 2010). [b]TEAC Katsayıları; kaynak (Apak ve diğ, 2007).

4.2.8 Sentetik karışımların analizi

Antioksidan bileşiklerden oluşan ikili, üçlü ve dörtlü sentetik karışımların TAC'si geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemi yardımı ile belirlendi. Hesaplanılarak bulunan TAC değerleri $(TAC)_{beklenen}$ ile deneysel olarak bulunan TAC değerleri $(TAC)_{bulunan}$ değerleri kıyaslandı ve sonuçlar çizelge 4.14 de gösterilmektedir. Bulunan (deneysel) TAC, ölçülen floresans şiddetinin troloksun eğim katsayısına bölümünün 1000 katıdır (mM TR eşdeğeri TAC'si). Beklenen emisyon değerleri ise eşitlik 4.5 de ifade edildiği gibi hesaplanarak bulunur.

$$\text{Toplam antioksidan kapasite } (TAC)_{beklenen} = (TEAC)_1.(C)_1 + (TEAC)_2.(C)_2 + \ldots + (TEAC)_n.(C)_n \qquad \textbf{(4.5)}$$

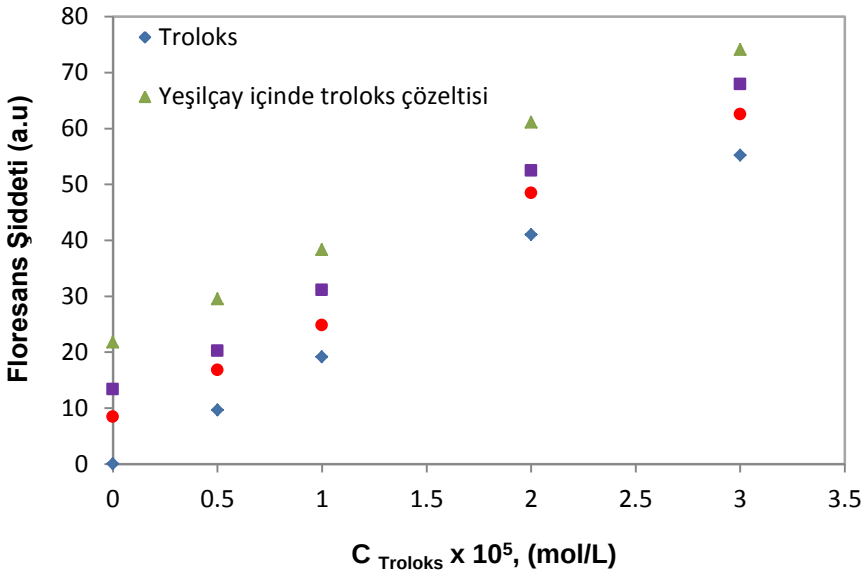
Çizelge 4.14 : Antioksidan bileşiklerin ikili, üçlü ve dörtlü sentetik karışımlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemi ile mM Troloks eşdeğeri cinsinden beklenen ve bulunan TAC değerleri.

Sentetik Karışımlar	*Beklenen kapasite mM TR eşdeğeri	Bulunan kapasite mM TR eşdeğeri	Bağıl Hata (%)
$5{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kuersetin $2{,}0 \times 10^{-2}$ mM Troloks	0,0469	0,0449 ± 0,0004	-4,26
$1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Ferulik asit $2{,}0 \times 10^{-2}$ mM Gallik asit	0,0541	0,0555 ± 0,0005	2,59
$1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Rutin $2{,}0 \times 10^{-2}$ mM Glutatyon	0,0617	0,0628 ± 0,0004	1,78
$5{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kafeik Asit $5{,}0 \times 10^{-3}$ mM Rutin $1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Troloks	0,0416	0,0423± 0,0007	1,68
$2{,}0 \times 10^{-2}$ mM Gallik Asit $8{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kateşin $1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Naringin $1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Glutatyon	0,0766	0,0726± 0,0003	-5,27
$1{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kafeik asit $1{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kateşin $2{,}0 \times 10^{-2}$ mM Sistein	0,0372	0,0385± 0,0006	3,49
$2{,}0 \times 10^{-3}$ mM Askorbik Asit $2{,}0 \times 10^{-2}$ mM Gallik Asit $1{,}0 \times 10^{-2}$ mM Glutatyon $4{,}0 \times 10^{-3}$ mM Kuersetin	0,0734	0,0706± 0,0004	3,54
TAC'nin İstatiksel Karşılaştırmaları Anova: Yinelemesiz çift-etken	**P = 0,05, $F_{deneysel}$ = 0,519 $F_{kritik(1,6)}$ = 5,987 $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$**		

*Beklenen kapasite değerleri $TEAC_{florometrik\ CERAC}$ $(\varepsilon'_{AO} / \varepsilon'_{Troloks})$ katsayıları kullanılarak hesaplandı.

4.2.9 Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yönteminin toplamsallık testi

Bir antioksidan karışımının antioksidan kapasite değerinin, karışımda bulunan herbir antioksidanın ayrı ayrı kapasite değerleri toplamına eşit olması, antioksidan kapasitelerinin toplamsallığı olarak ifade edilir (Apak ve dig, 2007). Bitki infüsyonlarındaki antioksidan kapasitenin toplamsallığının belirlenmesi için standart ekleme yöntemi kullanılarak analizler yapılmıştır. Bu amaçla 1,0 × 10^{-4} M Ce(IV) çözeltilerine son derişimleri 5,0 × 10^{-6} – 3,0 × 10^{-5} M arasında değişen troloks çözeltileri ilave edildi. Aynı şekilde hazırlanan 2., 3. ve 4. seri çözeltilere sırasıyla 0,05 mL yeşil çay (2,5 gr yeşil çay / 250 mL), 0,1 mL Ada çayı çayı (2,5 gr Ada çayı / 250 mL) ve 0,1 mL Ihlamur çayı (2,5 gr ıhlamur çayı / 250 mL) ekstraktlarından eklendikten sonra çözelti karışımları oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra floresans şiddetleri 360 nm de ölçüldü ve troloks derişimleri ile floresans şiddetleri arasında grafik çizildi (Şekil 4.33). Troloksun tek başına ve şifalı bitki infüzyonlarının içindeki kalibrasyon doğrularının paralel olduğu tespit edildi. Kalibrasyon grafiklerinin doğrularının paralel çıkması bitki infüzyonlarındaki fenolik yapıdaki bileşiklerin troloks ile kimyasal sapmalara yol açacak nitelikte interfere edici etkisinin olmadığı söylenebilir.



Şekil 4.33 : Spektroflorometrik CERAC yöntemi ile yeşil çay, ada çayı ve ıhlamur çayı infüzyonları içinde troloks katkısının kalibrasyon doğrusu.

Sadece troloks; $F = 0{,}551 + 1{,}88 \times 10^{6} \times C_{trolox}$, $R^2 = 0{,}9944$
Yeşil çay içinde troloks; $F = 21{,}36 + 1{,}81 \times 10^{6} \times C_{trolox}$, $R^2 = 0{,}9911$
Ada çayı içinde troloks; $F = 12{,}54 + 1{,}88 \times 10^{6} \times C_{trolox}$, $R^2 = 0{,}9952$
Ihlamur içinde troloks; $F = 0{,}791 + 1{,}86 \times 10^{6} \times C_{trolox}$, $R^2 = 0{,}9923$

4.2.10 Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımın belirlenmesi

Spektroflorometrik CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği (%RSD) ve geri kazanımın belirlenmesi için yeşil çay, ada çayı ve ıhlamur çayı infüzyonlarına troloks katkısı yapıldı. Üç seri hazırlanan deney tüplerine sırasıyla 50 µL yeşil çay, 100 µL ada çayı ve 100 µL ıhlamur çayı infüzyonları ilave edildi. Bu serilere 200 µL ve 300 µL $1{,}0 \times 10^{-3}$ M troloks çözeltileri sırayla ilave edildi. Troloks katkısı yapılan çözeltilerin analizi spektroflorometrik CERAC yöntemi ile yapıldı. Sonuçlar Çizelge 4.15'de verilmiştir.

Çizelge 4.15 : Spektroflorometrik CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımı (N= 5).

Bitki çaylarına TR katkısı	Eklenen Derişim, (mol/L)	Bulunan Derişim, (mol/L)	Relatif Standart Sapma, RSD, (%)	Geri Kazanım, (%)
Yeşil çay	$2{,}00 \times 10^{-5}$	$(2{,}09 \pm 0{,}07) \times 10^{-5}$	3,35	104,5
	$3{,}00 \times 10^{-5}$	$(2{,}78 \pm 0{,}18) \times 10^{-5}$	6,47	92,7
Ada çayı	$2{,}00 \times 10^{-5}$	$(2{,}09 \pm 0{,}08) \times 10^{-5}$	3,83	103,8
	$3{,}00 \times 10^{-5}$	$(2{,}90 \pm 0{,}11) \times 10^{-5}$	3,79	96,7
Ihlamur çayı	$2{,}00 \times 10^{-5}$	$(2{,}12 \pm 0{,}05) \times 10^{-5}$	2,36	106,3
	$3{,}00 \times 10^{-5}$	$(2{,}87 \pm 0{,}13) \times 10^{-5}$	4,53	95,7

4.2.11 İnterferans çalışmaları

Bitkisel gıdalarda ve gıda maddelerinde genellikle bulunan, gerçekte antioksidan olmayan fakat benzer kimyasal davranış gösteren basit şekerler, sitrik asit ve tiyol grubu içermeyen amino asitlerin girişim etkileri iki yolla incelendi:

Birinci yöntemde girişim maddeleri ile Ce(IV) iyonları arasında reaksiyon olup olmadığı araştırıldı. Sabit miktarda alınan Ce(IV) çözeltileri üzerine interfere edici madde olarak glikoz, fruktoz, mannitol, glisin, serin, valin, prolin, alanin ve nişasta çözeltileri eklendi. Ölçülen floresans şiddetlerinden bu bileşiklerinin Ce(V) ile reaksiyona girmediği, bağıl hataların ±% 5 değerleri arasında kaldığı görülmüştür (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 : Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemine çeşitli bileşiklerin girişim etkileri (N=3).

Karışımın bileşimi	Floresans şiddeti, (a.u)	Relatif hata, (%)
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)	1,283(±0,007)	-
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M L-Alanin	1,349(±0,005)	5,14
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Prolin	1,215(±0,011)	-5,30
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Valin	1,275(±0,009)	-0,62
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Serin	1,228(±0,004)	-4,29
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Glisin	1,241(±0,006)	-3,27
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Lizin	1,345(±0,005)	4,83
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Fruktoz	1,248(±0,010)	-2,73
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Glikoz	1,262(±0,007)	-1,64
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Mannitol	1,333(±0,005)	3,90
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + 0,2 mg / mL Nişasta	1,316(±0,013)	2,57

İkinci yöntemde ise birinci yöntemdeki çözeltilerin (Ce(IV) + interferans bileşik) üzerine sabit $1{,}0 \times 10^{-5}$ M troloks çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan bu çözeltilerin analizi spektroflorometrik CERAC yöntemi ile yapıldı. Bulunan sonuçlar eklenen troloks miktarı ile karşılaştırıldı (Çizelge 4.17). Bu bileşiklerin troloks tayinini ±% 5'den daha az etkilediği tespit edildi.

Çizelge 4.17 : $1{,}00 \times 10^{-5}$ M Troloks'un geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemi ile analizinde çeşitli bileşiklerin girişim etkileri (N=3).

Karışımın bileşimi	**Bulunan TR (mol/L)**	**Relatif hata, (%)**
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + 0 interfere bileşik	$1{,}01\ (\pm 0{,}03) \times 10^{-5}$	1,21
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M L-Alanin	$0{,}96\ (\pm 0{,}05) \times 10^{-5}$	-4,00
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Prolin	$0{,}97\ (\pm 0{,}13) \times 10^{-5}$	-3,00
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Valin	$1{,}03\ (\pm 0{,}08) \times 10^{-5}$	2,88
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Serin	$0{,}95\ (\pm 0{,}04) \times 10^{-5}$	-4,99
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Glisin	$0{,}98\ (\pm 0{,}02) \times 10^{-5}$	-2,01
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Lizin	$1{,}02\ (\pm 0{,}01) \times 10^{-5}$	2,48
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Fruktoz	$0{,}95\ (\pm 0{,}03) \times 10^{-5}$	-5,03
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Glikoz	$1{,}04\ (\pm 0{,}06) \times 10^{-5}$	4,31
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + $5{,}0 \times 10^{-4}$ M Mannitol	$0{,}97\ (\pm 0{,}09) \times 10^{-5}$	-3,30
$1{,}0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1{,}0 \times 10^{-5}$ M TR + 0,2 mg / mL Nişasta	$0{,}96\ (\pm 0{,}07) \times 10^{-5}$	-4,40

4.3 Geliştirilen Spektroflorometrik Yöntemin Gerçek Örneklere Uygulanması

4.3.1 Bitki çayı örnekleri

Geliştirilen yöntemin gerçek örneğe uygulanması ve literatürdeki toplam antioksidan tayin yöntemleriyle karşılaştırılması amacıyla ada çayı, ısırgan otu, yeşil çay, papatya çayı, ıhlamur çayı ve nane çaylarının infüzyonları ve ekstraktları ile çalışıldı. Bitki çay infüzyonları ve ekstraktları bölüm 3.3.6'da anlatıldığı şekilde hazırlandı. Hazırlanan infüzyon ve ekstraktların TAC'leri geliştirilen spektroflorometrik CERAC, CUPRAC, modifiye ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemleriyle analiz edildi. Bitkilerin mmol Troloks/g eşdeğeri cinsinden TAC değerleri CUPRAC, modifiye ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemleri için eşitlik 4.6 dan, spektroflorometrik CERAC yöntemi için ise eşitlik 4.7'den yararlanılarak hesaplandı.

$$\text{TAC (mmol Troloks/g)} : (A/\varepsilon_{\text{Troloks}}) \times V_s / V_{ö} \times SF \times V_E / m \qquad \textbf{(4.6)}$$

$A_{: \text{Ölçülen}}$ absorbans
$\varepsilon_{\text{Troloks}}$: Troloksun molar absoprsiyon katsayısı (mol^{-1} L cm^{-1})
V_s: Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)
$V_{ö}$: Örnek hacmi (mL)
SF: Seyreltme faktörü
V_E: Ekstraktların veya infüzyonların hazırlandığı son hacim (mL)
m: Örnek ağırlığı (g)

$$\text{TAC (mmol Troloks/g)} = C_{ce(IV)} / SO_{\times} V_s / V_{ö} \times SF \times V_E / m \qquad \textbf{(4.7)}$$

$C_{ce(IV)}$: Başlangıç Ce(IV) derişimi (mol/L)
SO: Ce(IV)- Troloks arasındaki stokiyometrik Oran (2,27)
V_s: Floresans şiddetinin ölçüldüğü son hacim (mL)
$V_{ö}$: Dönüm noktasındaki örnek hacmi (mL)
SF: Seyreltme faktörü
V_E: Ekstraktların veya infüzyonların hazırlandığı son hacim (mL)
m: Örnek ağırlığı (g)

Bitki çay infuzyonları ve ekstraktlarının TAC değerleri Çizelge 4.18 ve 4.19 da verildi. Hem infüzyonlarda hem de ekstraktlardaki kapasite değerlerine bakıldığında, yeşil çay en yüksek antioksidan kapasite değerine sahipken papatya çayı en düşük antioksidan kapasite değerine sahiptir. Yöntemlerin bir biri ile uyumuna bakıldığında ise yinelemesiz çift etkenli ANOVA testi uygulandığında yöntemlerin kesinlikleri arasında fark olduğu söylenebilir anacak hangi yöntemden kaynaklandığını hakkında kesin bir yargıya varamayız. Ayrıca, sebebini anlamak için ANOVA testi, geliştirilen spektroflorometrik CERAC ve diğer antioksidan yöntemleri ile kıyaslığında

Ferrisiyanür yöntemi ile aralarında bir fark olduğunu söyleyebiliriz. Yöntemler arasındaki korelasyona bakıldığında ise her bir yöntem ile geliştirilen spektroflorometrik CERAC yönteminin korelasyonlarının 0,90'nın üzerinde olması uyumları açısından çok iyi olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.18 : Bitki çayı infüzyonlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC, CUPRAC, Ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemlerine göre TAC değerleri (mmol TR/ g örnek).

Bitki çayı örnekleri	Spektroflorometrik CERAC Yöntemi	CUPRAC Yöntemi	Ferrisiyanür Yöntemi	Folin-Ciocalteu Yöntemi
Ada çayı	0,667 ± 0,003	0,963± 0,002	0,446 ± 0,004	0,925± 0,010
Isırgan otu	0,566 ± 0,004	0,656± 0,004	0,270 ± 0,001	0,570 ± 0,004
Yeşil çay	0,824 ± 0,006	1,040± 0,020	0,864 ± 0,005	1,010± 0,010
Papatya	0,252 ± 0,007	0,169± 0,005	0,129 ± 0,009	0,287± 0,003
Ihlamur	0,254 ± 0,001	0,263± 0,004	0,106 ± 0,011	0,354± 0,007
Nane	0,528 ± 0,008	0,669± 0,007	0,320 ± 0,004	0,420 ± 0,005

TAC'nin İstatiksel Karşılaştırmaları	**Anova: Yinelemesiz cift etken**	Florometrik CERAC, CUPRAC	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ =3,941 $F_{kritik(1, 5)}$ = 6,608; $F_{deneysel} < F_{kritik}$**
		Florometrik CERAC, Ferrisiyanür	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ =11,534 $F_{kritik(1, 5)}$ = 6,608; $F_{deneysel} < F_{kritik}$**
		Florometrik CERAC, Folin	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 2,175 $F_{kritik(1, 5)}$ = 6,608; $F_{deneysel} < F_{kritik}$**
		Florometrik CERAC, CUPRAC, Ferrisiyanür, Folin	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 8,978 $F_{kritik(3,15)}$ = 3,287; $F_{deneysel} < F_{kritik}$**
	Korelasyon Katsayıları	Florometrik CERAC, CUPRAC	**TAC_{CUPRAC} =1,532 $TAC_{FLR\ CERAC}$- 0,162 (r =0,9827)**
		Florometrik CERAC, Ferrisiyanür	**$TAC_{Ferrisiyanür}$ =1,124 $TAC_{FLR\ CERAC}$ -0,223 (r =0,9167)**
		Florometrik CERAC, Folin	**TAC_{Folin} = 1,232 $TAC_{FLR\ CERAC}$ -0,0436 (r = 0,9188)**

Çizelge 4.19 : Bitki çayı ekstraktlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC, CUPRAC, Ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemlerine göre TAC değerleri (mmol TR/ g örnek).

Bitki çayı örnekleri	Spektroflorometrik CERAC Yöntemi	CUPRAC Yöntemi	Ferrisiyanür Yöntemi	Folin-Ciocalteu Yöntemi
Ada çayı	0,610 ± 0,004	0,998± 0,001	0,067± 0,003	0,126± 0,004
Isırgan otu	0,769± 0,001	0,622± 0,005	0,178± 0,005	0,085± 0,005
Yeşil çay	0,831± 0,006	1,140± 0,010	0,847± 0,009	0,921± 0,001
Papatya	0,038± 0,003	0,080± 0,009	0,044± 0,005	0,060± 0,003
Ihlamur	0,370± 0,008	0,455± 0,006	0,182± 0,002	0,094± 0,002
Nane	0,586± 0,009	0,376± 0,002	0,227± 0,001	0,107± 0,004

TAC'nin İstatiksel Karşılaştırmaları	**Anova: Yinelemesiz cift etken**	Florometrik CERAC, CUPRAC	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ =0,639 $F_{kritik(1, 5)}$ = 6,608; $F_{deneysel} < F_{kritik}$**
		Florometrik CERAC, Ferrisiyanür	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 6,554 $F_{kritik(1, 5)}$ =6,608; $F_{deneysel} < F_{kritik}$**
		Florometrik CERAC, Folin	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 5,819 $F_{kritik(1, 5)}$ = 6,608; $F_{deneysel} < F_{kritik}$**
		Florometrik CERAC, CUPRAC, Ferrisiyanür, Folin	**P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 6,436 $F_{kritik(3,15)}$ = 3,287, $F_{deneysel} < F_{kritik}$**
	Korelasyon Katsayıları	Florometrik CERAC, CUPRAC	**TAC_{CUPRAC} = 1,097$TAC_{FLR\ CERAC}$+0,026 (r =0,8035)**
		Florometrik CERAC, Ferrisiyanür	**$TAC_{Ferrisiyanür}$= 0,609$TAC_{FLR\ CERAC}$ -0,068 (r =0,5966)**
		Florometrik CERAC, Folin	**TAC_{Folin} = 0,620 $TAC_{FLR\ CERAC}$ -0,099 (r = 0,5346)**

4.3.2 Üzüm örnekleri

Analizi yapılan diğer örnekler ise beyaz üzüm ve kara üzümdür. Üzüm örnekleri bölüm 3.3.6'da anlatıldığı şekilde hazırlandı. Hazırlanan ekstraktların TAC'leri geliştirilen spektroflorometrik CERAC, Modifiye CERAC, CUPRAC ve modifiye ferrisiyanür yöntemleriyle analiz edildi (Çizelge 4.20). Üzüm örneklerinin mmol Troloks/g eşdeğeri cinsinden TAC değerleri hesabı CUPRAC ve modifiye ferrisiyanür yöntemleri için eşitlik 4.6'dan, geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntem ile analizlerinde ise eşitlik 4.7 den ve modifiye CERAC yöntemi için ise eşitlik 4.8 den yararlanıldı.

$$\text{TAC (mmol Troloks/g)} : (A_0 - A/\varepsilon_{Troloks}) \times V_s / V_{ö} \times SF \times V_E / m \qquad \textbf{(4.8)}$$

A_0 : Ce(IV) iyonlarının 320 nm deki başlangıç absorbansı
A : Ölçülen absorbans
$\varepsilon_{Troloks}$: Troloksun molar absoprsiyon katsayısı (mol^{-1} L cm^{-1})
V_s : Absorbansın ölçüldüğü son hacim (mL)
$V_{ö}$: Örnek hacmi (mL)
SF : Seyreltme faktörü
V_E : Ekstraktların veya infüzyonların hazırlandığı son hacim (mL)
m : Örnek ağırlığı (g)

Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemiyle bulunan TAC değerleri diğer toplam antioksidan yöntemleri ile karşılaştırıldı. Çizelge 4.20 deki üzüm ekstraktlarının kapasite değerleri birbirleri ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Üzüm örneklerinin kapasite değerlerine bakıldığında, kara üzüm en yüksek antioksidan kapasite değerine sahip olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.20 : Üzüm ve şarap ekstraktlarının geliştirilen spektroflorometrik CERAC, Modifiye CERAC, CUPRAC ve Modifiye Ferrisiyanür/ prusya mavi yöntemlerine göre mmol TR/ g eşdegeri cinsinden TAC değerleri.

TAC Yöntemleri	**Üzüm örnekleri**	
	Beyaz Üzüm	**Kara Üzüm**
Spektroflorometrik CERAC	$(6,67\pm 0,08) \times 10^{-3}$	$(5,66\pm 0,11) \times 10^{-3}$
Modifiye CERAC	$(1,62\pm 0,04) \times 10^{-3}$	$(7,21\pm 0,07) \times 10^{-3}$
CUPRAC	$(1,75\pm 0,09) \times 10^{-3}$	$(4,08\pm 0,04) \times 10^{-3}$
Modifiye Fe(III)-Ferrisiyanür	$(7,25\pm 0,07) \times 10^{-4}$	$(1,66\pm 0,06) \times 10^{-3}$
TAC'nin İstatiksel Karşılaştırmaları Anova: Yinelemesiz çift-etken	**$P = 0,05$; $F_{deneysel} = 2,327$ $F_{kritik}(3, 3) = 9,277$ $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$**	

4.3.3 Kuşburnu örnekleri

Bu çalışmada ülkemizde bol miktarda bulunan İstanbul ve Mersin bölgelerinden toplanan kuşburnu bitkisinin farklı olgunluk ve renkleri göz önünde bulundurularak TAC'si incelendi. Hazırlanan ekstraksiyon çözeltilerinin TAC'leri spektroflorometrik CERAC, CUPRAC ve Folin-Ciocalteu yöntemleri ile belirlendi (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21'deki sonuçlara bakıldığında en yüksek toplam antiosidan kapasite ve toplam fenolik miktarı su ile kaynatma yöntemi ile bulunduğu gözlendi. Ayrıca kaynatma süresinin toplam antoksidan kapasiteye etkisine bakıldığında minumum 10 dakika kaynatmanın örnek hazırlamada yeterli olduğunu söyleyebiliriz (Çizelge 4.21). Bundan sonraki çalışmalarda da farklı tarihlerde toplanan farklı renklerdeki kuşburnu bitkisinin çekirdeksiz meyve kısımları 10 dakika boyunca kaynatılarak hazırlandı. Hazırlanan örneklerin TAC'leri spektroflorometrik CERAC ve Folin-Ciocalteu yöntemleri ile tayin edildi (Çizelge 4.22). Sonuçlara bakıldığında, kırmızı renkli kuşburnu örneklerinin TAC'lerinin daha yüksek olduğu görülmektedir. Sonuç olarak, kuşburnu meyvesinin renginin, olgunlaşma zamanını belirlemede yardımcı olabileceği söylenebilir.

Çizelge 4.21 : Üç farklı yöntemle ile hazırlanan kımızı renkli kuşburnu bitkisinin (İstanbul) meyve ve çekirdek kısımlarının TAC kıyaslanması.

Yöntemler	Örnek Hazırlama		Meyve	Çekirdek	Ticari kuşburnu çayı
Spektroflorometrik	Metanol Ekstraksiyon		0,820± 0,007	0,112± 0,002	0,646± 0,009
CERAC	Sıcak su infüzyonu		0,985± 0,004	0,091± 0,005	0,882± 0,004
(mmol troloks / g örnek)	Su ile kaynatma	5 min	1,180± 0,009	0,072± 0,003	1,078± 0,006
		10 min	1,250± 0,005	0,081± 0,004	1,226± 0,010
		15 min	1,200± 0,003	0,071± 0,004	1,154± 0,005
		20 min	1,155± 0,003	0,073± 0,006	1,110± 0,008
		25 min	1,002± 0,001	0,065± 0,002	1,056± 0,004
CUPRAC (mmol troloks /	Metanol Ekstraksiyon		0,768± 0,002	0,108± 0,004	0,593± 0,003
g örnek)	Sıcak su infüzyonu		0,979± 0,003	0,082± 0,002	0,775± 0,001
	Su ile kaynatma	5 min	1,155± 0,003	0,065± 0,001	0,995± 0,013
		10 min	1,271± 0,001	0,073± 0,001	1,208± 0,008
		15 min	1,200± 0,005	0,070± 0,006	1,118± 0,004
		20 min	1,153± 0,001	0,065± 0,008	1,090± 0,012
		25 min	0,983± 0,007	0,069± 0,010	1,057± 0,009
Folin-Ciocalteu	Metanol Ekstraksiyon		0,918± 0,001	0,132± 0,007	0,715± 0,004
(mmol troloks / g örnek)	Sıcak su infüzyonu		0,976± 0,006	0,110± 0,002	0,906± 0,003
	Su ile kaynatma	5 min	1,202± 0,004	0,184± 0,001	1,262± 0,005
		10 min	1,450± 0,004	0,176± 0,003	1,401± 0,003
		15 min	1,365± 0,003	0,166± 0,001	1,380± 0,007
		20 min	1,201± 0,005	0,161± 0,005	1,222± 0,009
		25 min	1,154± 0,002	0,164± 0,004	1,176± 0,006

Çizelge 4.22 : İstanbul ve Mersin yöresinden toplanan farklı renklerdeki ve olgunluklardaki çekirdeksiz kuşburnu meyvesinin TAC'lerinin kıyaslanması.

Örneklerin Renkleri	Spektroflorometrik CERAC (mmol troloks/ g örnek)		Folin-Ciocalteu (mmol troloks/ g örnek)	
	İstanbul	**Mersin**	**İstanbul**	**Mersin**
Yeşil	0,815± 0,012	1,010± 0,005	1,269± 0,001	1,582± 0,015
Sarı	0,957± 0,004	1,152± 0,003	1,310± 0,003	1,659± 0,007
Turuncu	0,966± 0,002	1,212± 0,001	1,391± 0,005	1,685± 0,003
Kırmızı	1,037± 0,005	1,238± 0,003	1,443± 0,004	1,705± 0,005

5. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasının amacı, gıdalardaki TAC'sinin belirlenmesinde yaygın kullanılan spektrofotometrik yöntemlere altenatif olarak basit, hızlı, hassasiyeti ve seçiciliği yüksek yeni bir spektroflorometrik bir yöntem geliştirilmesidir. Geliştirilen yöntem, antioksidan bileşiklerin Ce(IV) iyonunu indirgemesine ve oluşan Ce(III) iyonlarının floresansının ölçülmesine dayandığından "*Spektroflorometrik CERAC*" (Spectrofluorometric CERium Antioxidant Capacity) yöntemi olarak adlandırılmıştır (Ozyurt ve diğ, 2011). Günümüzde spektrofotometrik esaslı toplam antioksidan tayin yöntemleri yaygın olarak kullanılmasına karşın hassasiyeti daha fazla olan ve pratik uygulamaya sahip spektroflorometrik toplam antioksidan tayin yöntemleri çok yaygın değildir. Floresans metotlar, yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip yöntemlerdir (Frankel ve Meyer, 2000; Ghiselli ve diğ, 2000; Wayner ve diğ, 1985). Ayrıca spektrofotometrik yöntemlerden farklı olarak floresans yöntemlerin doğrusal çalışma aralıkları genelde daha geniştir.

Bu tez kapsamında, seryum indirgeyici toplam antioksidan yöntemi (CERAC) modifiye edilmiş (*modifiye* CERAC) ve spektroflorometrik yöntem (*Spektroflorometrik CERAC*) geliştirilerek literatüre kazandırılmıştır.

5.1 Modifiye CERAC Yöntemi

Tezin bu bölümünde, Ce(IV)'ün indirgen şeker ve sitrik asidi etkilemediği sadece antioksidan bileşikleri etkilediği reaksiyon ortamı belirlenmeye çalışılmıştır. Bu, geliştirilen tayin yönteminin sadece antioksidan bileşiklere yanıt verme seçiciliğini göstermek bakımından gereklidir. Sülfürik asit ortamındaki Ce(IV) sülfat çözeltilerinin uzun süre kararlı kaldığı bilinmektedir. $Ce(OH)_n^{4-n}$ formundaki hidroliz kompleksleri ise asitliğin azaldığı durumlarda oluşmaktadır (Aly ve diğ, 2001; Cho ve diğ, 1999; Czappa, 1974; Fang ve diğ, 2002; Ozyurt ve diğ, 2007). Czappa (1974), farklı asit ortamlarında ve derişimlerde, seryum(IV) iyonunun asit anyonlarıyla kompleks yaparak (örneğin, sülfato-kompleksleri oluşumu yoluyla) reaktivitesinin azaldığını ve glukoz'u yükseltgeme özelliğinin yavaşlatılabileceğini belirtmiştir. Ce(IV)-hidroliz kompleksleri oluşumu da $E_{Ce(IV)/Ce(III)}$ potansiyelini

düşürerek benzer bir etki göstermelidir. Fang ve diğ. (2002) ise Ce(III)/Ce(IV) serbest metalik iyonların derişim oranın sülfat asidi derişiminin artması ile azaltılabileceğini ifade etmiştir. Bu çalışmaların sonuçlarına dayanarak bu tez kapsamında, antioksidan bileşiklerin Ce(IV) ile oksidasyonunun (diğer organik bileşiklerden etkilenmeden) kontrollü olarak yürütülmesi üzerine incelemeler spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. Ce(IV)'ün H_2SO_4 ve Na_2SO_4 bileşiklerinin farklı kombinasyon ve derişimlerini içeren ortamlarda antioksidanlarla reaksiyonu gerçekleştirilmiş ve en uygun asit ve sülfat derişimi maksimum absorbans ve dalgaboyunun sabit kaldığı 0,025 M H_2SO_4 ve 0,7 M Na_2SO_4 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.2 - Şekil 4.4). Genel olarak, maksimum absorpsiyon dalgaboyunun sabitlenmesi, tek türlerin UV-absorpsiyonu ile ilişkilidir. Eğer bu türler kayda değer derişimlerde oluşturulursa ve bu derişimlerde doyum noktasına ulaşılırsa absorbans değeri sabit dalgaboyunda belirli bir seviyede kalır. Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de görüldüğü gibi sülfürik asit ve sodyum sülfat'ın optimum kombinasyonu ile Ce(IV)'ün 320 nm de, maksimum absorbans dalgaboyu ve absorbansı, sabit hale getirilmiş ve bu dalgaboyunda ölçülen absorbans doygunluk seviyesine ulaşmıştır. Belirlenen kritik asit seviyesi Ce(IV)'ün hidrolizini bastırarak absorbans ve dalgaboyunu sabitlemekle beraber sitrik asidin girişimini engellememiştir. Ancak asit derişiminin kritik seviyeden itibaren arttırılması ile sitrik asidin etkisinin azaltıldığı ve 0,3 M asit derişiminde giderildiği belirlenmiştir (Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2).

Sonuç olarak 0,30 M H_2SO_4 + 0,70 M Na_2SO_4 kararlı koşul olarak seçilmiş ve basit şeker ve sitrik asit gibi bileşiklerin girişim etkileri Ce(IV)/Ce(III) redoks potansiyelinin düşürülmesi ile önlenmiştir:

$$Ce^{4+} + e^- \leftrightarrows Ce^{3+} \qquad (1{,}0\ M\ H_2SO_4)\ \ E = 1{,}44\ V\ dur.$$

$$E_{Ce} = E^{\circ}_{Ce} + (RT / F) \times \log ([Ce^{4+}] / [Ce^{3+}]) \qquad \textbf{(5.1)}$$

Ce(IV) iyonlarının hidroksit ($CeOH^{3+}$) ve sülfat kompleksleri ($CeSO_4^{2+}$) ile seçici olarak stabilize edilmesi serbest Ce(IV) iyonlarının etkin derişiminin azalmasına sebep olur. Böylece Ce(IV)/Ce(III) yarı pil denge reaksiyonu Le Chatelier prensibine göre sola kayar ve gerçek indirgeme potansiyeli (E_{Ce}), azalır. Asitliği düşük ve sülfat derişimi fazla olan ortamda, Ce(IV) daha az güçlü bir oksidan olabilir ve böylece geliştirilen reaktif ile sadece gerçek antioksidanlar yükseltgenirken diğer organik bileşiklerin oksidasyonu engellenmiş olur. Bu koşullar, özellikle kuersetin gibi oksidasyon potansiyeli düşük olan bileşiklerin (0,10 V; Yang ve diğ, 2001) sitrik asit

(1,10 V; Colucci ve diğ, 1999) gibi oksidasyon potansiyeli yüksek olan bileşikler varlığında oksidasyonu için yararlı olabilir. Sitrik asit ortamında kuersetin ile yapılan deneyler de, belirlenen optimum koşullarda Ce(IV)'un kuersetini yükseltgemesine karşılık sitrik asit ile önemli bir oranda etkileşmediğini göstermiştir. Pek çok gıda antioksidanının standart hidrojen elektroda karşı ölçülen oksidasyon potansiyeli 0,10 V - 0,60 V arasındadır ve bu nedenle analizlerde kullanılan TAC yöntemlerindeki reaktifin redoks potansiyelinin 0,60 V - 0,70 V aralığına olabildiğince yakın değişmesi yöntemin kullanışlılığı açısından önem taşımaktadır.

Optimum koşulları belirlenen yöntem ile çeşitli gıda antioksidan bileşiklerinin (kuersetin, rutin, gallik asit, kateşin, kafeik asit, ferulik asit, naringenin, naringin, troloks, askorbik asit) kalibrasyon grafikleri çizilmiş ve her bileşik için lineer kalibrasyon denklemleri, korelasyon katsayıları (r), molar absorplama katsayıları (ε), lineer çalışma aralıkları, gözlenebilme (LOD) ve tayin sınırları (LOQ) hesaplanmıştır (Çizelge 4.6).

Antioksidanların TEAC değerleri, herbir antioksidanın molar absorplama katsayısının troloksun molar absorplama katsayısına oranlanması ile hesaplanmıştır. Modifiye CERAC, ABTS/persülfat ve CUPRAC yöntemleri ile elde edilen TEAC değerleri kendi aralarında ANOVA testi uygulanarak kıyaslanmıştır (P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 3,509; $F_{kritik\ (2,\ 18)}$ = 3,554). Test sonucu elde edilen $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$'e göre TEAC katsayılarının kesinlikleri arasında bir fark olmadığı söylenebilir. Aritmetik ortalamalar arasında ise doğal olarak anlamlı farklar vardır, çünkü her bir TAC yöntemi kendine özgü bir termodinamik ve kinetiğe sahiptir ve aynı bir TAC yönteminin farklı versiyonları arasında bile tam bir uyuşma beklenemez.

Yöntemler arasındaki korelasyon incelendiğinde ise Modifiye CERAC ve CUPRAC yöntemi ile elde edilen TEAC katsayıları arasındaki korelasyon'nun (r = 0,7723) yüksek ilişkili olduğu, ABTS/persülfat yöntemi ile kıyaslandığında korelasyon katsayısının gücü ise orta ilişkili olarak bulunmuştur (r = 0,5101). Korelasyon katsayılarının 0,90'dan düşük bulunmasının sebebi ise glikozit yapıdaki flavonoidlerin (naringin, rutin gibi) ve benzer molekül yapısındaki glikoz içermeyen flavonoidlerin (naringenin, kuersetin gibi) TEAC değerlerinin modifiye CERAC yöntemi ile birbirlerine yakın bulunmasına karşılık CUPRAC ve ABTS yöntemlerinde ise glikozit yapıdaki flavonoidlerin (naringin gibi) TEAC değerlerinin çok daha düşük bulunmasıdır. Bunun olası sebebi, CERAC yönteminin uygulandığı

belirgin asidik ortamda, flavonoid glikositlerin hem hidroliz olması hem de Ce(IV) ile yükseltgenmesidir. CUPRAC ve ABTS yöntemlerinde hidroliz koşulları uygulanarak söz konusu bileşiklerin TEAC değerleri arttırılabilir.

Benzer molekül yapısındaki antioksidan bileşiklerin aktivitelerinin kıyaslanmasında hidroksil gruplarının sayısı ve konumu önemlidir. Özellikle polifenolik yapıdaki flavonoidlerin antioksidan gücü toplam hidroksil grubu sayısı ve B halkasındaki *o*-dihidroksi yapısının varlığı ile pozitif yönde etkilemektedir (Robards ve diğ, 1999). Flavonollerin A ve C halkalarındaki 5-OH-4-keto grubu, ikili halka sistemini bağlayan 2,3-çifte bağı ve B halkasının 3',4'-dihidroksi yapılarını içermeleri (kuersetin, rutin gibi) diğer flavonoid gruplarına kıyasla daha güçlü antioksidan özellik göstermelerine sebep olmaktadır (Rice-Evans ve diğ, 1996; 1997; 1999). İki veya daha fazla elektron verici gruplara sahip fenolik bileşikler (hidroksisinnamik asitler de) ise monosubstitüye fenollerden daha düşük pik potansiyeline ve daha yüksek antioksidan gücüne sahiptir. Modifiye CERAC yöntemi ile belirlenen kuersetin, rutin, gallik asit, kateşin, kafeik asit, ferulik asit, naringenin, naringin, troloks, askorbik asit'in TEAC değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralamasının literatürdeki sonuçlarla ve yukarıdaki açıklamalarla uyumlu olduğunu söyleyebiliriz: Kuersetin (5-OH, 6,84) > rutin (4-OH, 3,84) > gallik asit (4-OH, 3,27) > kateşin (5-OH, 2,47) > kafeik asit (3-OH, 2,28) ≥ ferulik asit (2-OH, 2,18) > naringenin (3-OH, 1,95) ≥ naringin (2-OH, 1,93) > troloks (2-OH, 1,0) ≥ askorbik asit (4-OH, 1,0)

CUPRAC yöntemi ile kuersetin > kateşin > kafeik asit > gallik asit ≥ rutin > ferulik asit > troloks ≥ askorbik asit > naringin > naringenin sıralaması elde edilmiştir. Ayrıca bu sıralamada naringin'in asit ile hidroliz edildikten sonra belirlenen TEAC değeri kafeik asit ve ferulik asit arasında yer almaktadır.

ABTS/persülfat yönteminde ise; gallik asit > kateşin > kuersetin > ferulic acid > caffeic acid > askorbik asit ≥ troloks > naringenin ≥ naringin olarak sıralanmaktadır.

Sıralamanın hemen hemen benzer olmasına karşılık, Modifiye CERAC ve diğer toplam antioksidan yöntemleri ile elde edilen TEAC değerlerinin birbirlerinden farklı olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin yöntemlerin farklı redoks potansiyellerine sahip olmalarından kaynaklandığı söylenebilir.

Toplamsallık ilkesine göre karışımda bulunan her bir antioksidanın ayrı ayrı kapasite değerleri toplamı TAC değerini vermektedir. Sentetik antioksidan karışımlarının

Modifiye CERAC yöntemi ile yapılan analiz sonuçlarının teorik olarak beklenen kapasite değerleri ile uyumlu sonuçlar verdiği ve Beer kanunundan kimyasal sapmaların olmadığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.8). Sentetik karışımların beklenen ve bulunan kapasite değerlerine F testi (yinelemesiz çift etkenli ANOVA) uygulanmış ve değerlerin kesinlikleri açısından anlamlı bir fark olmadığı ve bulunan sonuçların % 95 güvenirlik düzeyinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir ($P = 0,05$; $F_{deneysel} = 1,453$; $F_{kritik(1,4)} = 7,709$, $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$).

Antioksidan kapasitelerin toplamsallık ilkesinin belirlenmesinde uygulanan diğer bir yöntemde karmaşık yapılı gıdalara ve bitkilere standart antioksidan katkısı yapılmasıdır. Sadece seçilen çözelti ortamında tek başına kuersetinin ve bitki çayı infüzyonlarına ilave edilen kuersetinin kalibrasyon doğruları modifiye CERAC yöntemi ile çizilmiştir. Doğruların birbirine paralel olmasına dayanarak karmaşık ortamlarda kuersetinin Beer Kanunu'ndan kimyasal sapmalara yol açacak şekilde bir etkileşime girmediği söylenebilir (Şekil 4.11). Bu durum antioksidan kapasite toplamsallık ilkesi için gerekli olan bir koşuldur. Isırgan otu ve kuşburnu çay infüzyonlarına kuersetin katkısı ile tekrarlanabilirlik ve geri kazanım deneyleri yapılmıştır. Modifiye CERAC yöntemi için en yüksek RSD değeri % 3,26, geri kazanım değerleri ise % 98,1 ile % 102,8 arasında bulunmuştur.

Geliştirilen modifiye CERAC yöntemine sitrik asitin dışında benzoik asit, asetil salisilik asit ve sakkaroz gibi maddelerin de girişim etkileri incelendi. Gıdalarda bulunan bu organik bileşiklerin optimum deney koşullarında % 95 güven aralığında Ce(IV) iyonları ile etkileşmediği tespit edildi. Sonuç olarak tezin bu bölümünde diğer organik bileşiklerin girişim etkilerinin giderildiği spektrofotometrik modifiye CERAC yöntemi geliştirilmiştir.

5.2 Geliştirilen Spektroflorometrik CERAC Yöntemi

Floresans metotlar, yüksek hassasiyet ve seçiciliğe sahip olmalarına karşılık kullanımı basit cihazlara elverişli yöntemlerdir. Floresans ölçümüne dayalı yöntemler, duyarlılıkları ve emisyon bantlarının darlığı nedeni ile absorpsiyon ölçümüne dayalı yöntemlere göre daha çok tercih edilir. Tezin bu bölümünde modifiye CERAC yönteminin dayandığı reaksiyon ele alınmış ve reaksiyon sonucu oluşan Ce(III) iyonlarının floresans özellik göstermelerine dayanarak yöntem geliştirilmiştir. Reaksiyona giren Ce(IV) ve antioksidan bileşikler uyarılma ve

emisyon dalga boylarında floresans özellik göstermemektedir. Ayrıca, spektrofotometrik yöntemlerde belirlenen optimum dalga boylarında diğer organik bileşiklerin absorbans yaparak girişim etkileri gösterdikleri bilinmektedir (Ozyurt ve diğ, 2007, 2010). Buna karşılık florometrik yöntemlerde bu problem söz konusu olmaz.

Spektroflorometrik CERAC yöntemi, sülfat asitli ortamda Ce(IV) iyonları ile antioksidanlar arasındaki reaksiyon sonucu oluşan Ce(III) iyonlarının 256 nm'de uyarılıp 360 nm'de emisyonunun ölçümüne dayanan bir yöntemdir (Şekil 4.12).

Geliştirilen florometrik yöntemde modifiye CERAC yönteminde belirlenen optimum koşullar kullanılmakla beraber floresans ölçümüne etki edecek faktörler de sırayla incelenmiştir. Metot, Ce(III)'ün floresansının ölçümüne dayalı olduğundan öncelikle sentetik hazırlanan Ce(III) çözeltilerinin floresansına sülfürik asit ve sodyum sülfat miktarlarının etkisi incelenmiş ve herhangi bir girişimleri tespit edilmemiştir (Şekil 4.14 - Şekil 4.15).

Spektroflorometrik CERAC yönteminde de Ce(IV)/Ce(III) çiftinin redoks potansiyelinin kontrolü amacıyla sülfat asidi ve sodyum sülfat miktarları değiştirilerek sitrik asidin reaksiyon vermediği en uygun oran tespit edilmeye çalışılmış ve reaksiyon koşulları sülfürik asit derişimi 0,30 M ve sodyum sülfat derişimi 0,70 M olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16 – Şekil 4.20). Şekillerde görüldüğü gibi bu koşullarda sitrik asidin bozucu etkisinin giderilmesi % 95 oranında sağlanmıştır.

Aynı deneyler kuersetin ilave edilerek tekrarlanmış ve belirlenen optimum deney koşullarında Ce(IV)'un kuersetini yükseltgemesine karşılık sitrik asit ile önemli bir oranda etkileşmediği görülmüştür (Şekil 4.21 – Şekil 4.25).

Optimum koşullar belirlendikten sonra bu yöntem lineerlik, toplamsallık, tekrarlanabilirlik ve geri kazanım açısından valide edilmiştir. Standart hazırlanan Ce(III) çözeltileri ile kalibrasyon grafiği çizilmiş ve floresans şiddetine karşı gelen derişim şeklindeki lineer kalibrasyon denklemi eşitlik 5.2'de verilmiştir.

$$F_{360} = 1{,}99 \times 10^{6}\, C_{Ce(III)} + 11{,}273 \qquad R^2 = 0{,}9965 \qquad \textbf{(5.2)}$$

Geliştirilen yöntem ile herbir antioksidanın lineer kalibrasyon grafikleri oluşturulmuş, ve lineer kalibrasyon denklemleri, korelasyon katsayıları (r), eğim

katsayıları (ε'), lineer çalışma aralıkları, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ) Çizelge 4.11 de verilmiştir.

Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yönteminde çalışılan bazı türlerin emisyon dalgaboyunda absorpsiyon yapması ve kalibrasyon eğrilerinin lineerliğinin bozulması göz önüne alınarak, dış-standartlar yöntemi yerine spektroflorometrik titrasyon yöntemi ile çalışılmıştır. Reaktif olarak hem Ce(IV) hem de antioksidanlar kullanılarak yapılan titrasyon eğrilerinin dönüm noktalarından stokiometrik oranlar bulunmuş ve her iki yöntemle bulunan değerler F testi ile kıyaslanmıştır (Çizelge 4.12). Uygulanan F testine (yinelemesiz çift etkenli ANOVA) göre P = 0,05; $F_{deneysel}$ = 0,304; $F_{kritik(1,11)}$ = 4,844; $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$ bulunmuş ve değerlerin kesinlikleri açısından anlamlı bir fark olmadığı ve bulunan sonuçların % 95 güvenirlik düzeyinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemde herbir antioksidan için bulunan TEAC katsayıları, test edilen antioksidanın eğim katsayısının (ε'_{AO}), troloksun eğim katsayısına (ε'_{AO}), oranı şeklinde ve/veya Ce(IV)'ün antioksidanlarla çizilen titrasyon eğrilerinin dönüm noktasından bulunan stokiyometrik mol oranlarının, troloks için bulunan stokiyometrik mol oranına oranı şeklinde belirlenmiştir (Çizelge 4.13). Spektroflorometrik CERAC yöntemi ile belirlenen TEAC değerlerinin büyükten küçüğe doğru sıralanması aşağıda verilmiştir:

RT (4-OH, 5,24) > QR (5-OH, 4,65) > CAT (5-OH, 2,44) > GA (4-OH, 2,02) > CFA (3-OH, 1,44) ≥ NG (2-OH, 1,42) ≥ NGN (3-OH, 1,35) > FRA (2-OH, 1,18) > AA (4-OH, 1,02) ≥ TR (2-OH, 1,0),

Literatürdeki diğer antioksidan yöntemleri ile sıralama aşağıda verilmiştir (Ozyurt ve diğ, 2010; Apak ve diğ, 2007):

Modifiye CERAC yönteminde:

QR > RT > GA > CAT > CFA ≥ FRA > NGN ≥ NG > TR ≥ AA,

CUPRAC yönteminde:

QR > CAT > CFA > GA ≥ RT > FRA > TR ≥ AA > NG > NGN,

ABTS/persülfat yönteminde:

GA > CAT > QR > FRA > CFA > RT > AA ≥ TR > NGN ≥ NG,

Spektroflorometrik CERAC ve diğer toplam antioksidan yöntemlerine bakıldığında TEAC değerlerinin birbirlerinden farklı, sıralamanın ise benzer olduğu gözlenmiştir. Bu durumun, yöntemlerin farklı reaksiyon mekanizmalarına ve redoks potansiyellerine sahip olmalarından kaynaklandığını söyleyebiliriz.

Spektroflorometrik CERAC yöntemiyle bulunan TEAC değerleri yukarıda verilen diğer yöntemlerin TEAC değerleri ile istatiksel yöntemlerle de kıyaslanmıştır (Çizelge 4.13).

Antioksidan bileşiklerin spektroflorometrik CERAC yöntemi ve referans yöntemler olan Modifiye CERAC, ABTS/persülfat ve CUPRAC yöntemlerine göre TEAC katsayıları F testi ile kıyaslanmıştır ($P = 0,05$; $F_{deneysel} = 1,871$; $F_{kritik(4,\ 36)} = 2,634$; $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$). Uygulanan yinelemesiz çift etkenli ANOVA testine göre yöntemlerin TEAC katsayılarının kesinlikleri arasında bir fark olmadığı ve bulunan TEAC katsayılarının % 95 güvenirlik düzeyinde diğer TAC yöntemleri ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Geliştirilen spektroflorometrik CERAC, modifiye CERAC, CUPRAC ve ABTS/persülfat yöntemlerinin TEAC katsayıları arasındaki korelasyon incelenmiştir. Spektroflorometrik CERAC'ın, modifiye CERAC (spektrofotometrik) ve CUPRAC yöntemleri ile ayrı ayrı kıyaslanmasında korelasyonun yüksek ilişkili ($r = 0,8326$; $r = 0,7167$) ve ABTS/persülfat yöntemi ile kıyasladığımızda ise korelasyonun zayıf ilişkili olduğu görülmüştür ($r = 0,3481$). Spektroflorometrik CERAC yöntemi ile ABTS/persülfat yöntemi arasındaki korelasyon katsayısının zayıf ilişkili olmasının sebebi, spektroflorometrik CERAC yönteminde glikozit yapıdaki flavonoidlerin (naringin, rutin gibi, hidroliz işlemi uygulanmadan) TEAC değerlerinin, yapısında glikoz içermeyen benzer molekül yapısındaki flavonoidlerin (naringenin, kuersetin gibi) TEAC değerlerine yakın değerler elde edilmesidir. Çünkü diğer elektron taransfer esaslı antioksidan tayin yöntentemlerinde (CUPRAC, FRAP, ABTS) glikozit yapıdaki flavonoidlerin (naringin gibi) TEAC değerleri çok düşüktür. CUPRAC yöntemi 0,6 V civarında bir redoks potansiyeline sahiptir ve CUPRAC yöntemi ile spektroflorometrik CERAC yönteminin korelasyonunun yüksek ilişkili çıkması geliştirilen yöntemin geçerliliği açısından önem taşımaktadır.

Antioksidan kapasitelerinin toplamsallığı, TAC yöntemleri için önemlidir. Çünkü karmaşık bir matriks için ölçülen TAC, matriksi oluşturan antioksidan unsurların bireysel antioksidan kapasitelerinin toplamı olmalıdır ve geliştirilen her yöntem bu kuralı sağlamalıdır. Bu amaçla, ikili, üçlü ve dörtlü olarak hazırlanan sentetik antioksidan karışımlarının spektroflorometrik CERAC yöntemi ile analizi yapılmış ve beklenen ve bulunan kapasite değerlerinin ± % 5 sapma ile birbiri ile uyumlu olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.14). Ayrıca, sentetik karışımların analizinde beklenen ve bulunan kapasite değerlerine F testi uygulanmıştır. Beklenen ve bulunan kapasite değerlerinin kesinlikleri açısından anlamlı bir fark olmadığı ve bulunan sonuçların % 95 güvenirlik düzeyinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir ($P = 0,05$; $F_{deneysel} = 0,519$; $F_{kritik(1,6)} = 5,987$, $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$).

Geliştirilen yöntemin doğruluğunu ve TAC'nin toplamsallığını göstermek için yapılan bir diğer deneysel çalışma ise standart ekleme yöntemidir. Saf troloks çözeltisi ve bitki çayı infüsyonlarına katkılanmış troloks çözeltileri ile çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ($(1,86\pm0,02) \times 10^6$) birbirine özdeş (yani doğrular paralel) çıkmıştır (Şekil 4.33). Bu sonuca bakılarak karmaşık ortamlarda bulunan çeşitli bileşenlerle, katkı yapılan antioksidanlar arasında uygulanan yöntem açısından Beer kanunu'ndan kimyasal sapmalara yol açacak nitelikte bir etkileşim olmadığı ve geliştirilen spketroflorometrik CERAC yöntem ile örnek karışımlarının TAC değerinin doğru bir şekilde hesaplanabileceği tespit edilmiştir.

Spektroflorometrik CERAC yönteminin tekrarlanabilirliği ve geri kazanımın araştırılması amacı ile yeşil çay, ada çayı ve ıhlamur çayı infüzyonlarına troloks katkısı yapılmıştır (Çizelge 4. 15). Tekrarlanabilirliğin göstergesi olan RSD spektroflorometrik CERAC yöntemi için % 6,47 olarak bulundu. Geri kazanım değerleri ise % 92,7 ile % 106,3 arasında değişmektedir.

Basit şekerler, sitrik asit ve tiyol grubu içermeyen amino asitler (glikoz, fruktoz, mannitol, glisin, serin, valin, prolin, alanin) ve nişasta, Ce(IV) ile optimum koşullarda reaksiyona sokulmuş ve reaksiyon vermediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.16). Ayrıca, yukarıda belirtilen deney antioksidan varlığında tekrarlanmış, bu bileşiklerin Ce(IV) + antioksidan (troloks) reaksiyonunu ± % 5'den daha az etkilediği tespit edilmiştir (Çizelge 4.17). Buna göre, spektroflorometrik CERAC yöntem reaktifinin redoks potansiyelinin [Ce(IV)/Ce(III)] antioksidan olmayan bileşiklerle reaksiyon vermeyecek uygun bir potansiyele geldiği söylenebilir. Ayrıca,

yöntemimizin diğer bir üstünlüğü de, biyolojik açıdan önemli olan tiyol grubu antioksidanlarından sistein ve glutatiyon ile reaksiyona girebilmesi ve TEAC değerlerinin belirlenebilmesidir.

5.3 Gerçek Örneklere Uygulamaları

Spektroflorometrik CERAC ve diğer elektron transfer esaslı toplam antioksidan tayin yöntemleri kullanılarak ada çayı, ısırgan otu, yeşil çay, papatya çayı, ıhlamur çayı ve nane çayları gibi şifalı bitkilerin infüzyonları ve metil alkol içersindeki ekstraktlarının analizi yapıldı (Çizelge 4.18 - Çizelge 4.19).

Bitki infüzyon sonuçlarına uygulanan F testine (ANOVA) göre yöntemlerin TAC değerlerinin kesinlikleri arasında bir fark olduğu söylenebilir ($P = 0,05$; $F_{deneysel} = 8,978$; $F_{kritik(3,15)} = 3,287$; $F_{deneysel} < F_{kritik}$). Bu uyumsuzluk, SDS katkılı pH'sı belirli Fe(III)-ferrisiyanür yöntemi ile elde edilen sonuçların diğer yöntemlere kıyasla daha düşük TAC değerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Sadece, SDS katkılı pH'sı belirli Fe(III)-ferrisiyanür yöntemi ile spektroflorometrik CERAC yönteminin F testine göre karşılaştırılmasında kesinlikleri arasında bulunan fark bu durumu açıklamaktadır ($P = 0,05$; $F_{deneysel} = 11,534$; $F_{kritik(1, 5)} = 6,608$; $F_{deneysel} < F_{kritik}$). Bu durum göz önüne alınarak Fe(III)-ferrisiyanür yöntemi kıyaslama dışında tutularak F testi tekrarlanmış ve spektroflorometrik CERAC yöntemi ile diğer yöntemler arasında bir fark olmadığı tespit edilmiştir. ($P = 0,05$; $F_{deneysel} = 2,204$; $F_{kritik(2, 10)} = 4,103$; $F_{deneysel} < F_{kritik}$) (Çizelge 4.18). Bu yöntemlerle bulunan TAC değerleri arasındaki korelasyona bakılmış ve korelasyonun çok yüksek ilişkili olduğu bulunmuştur (TAC_{CUPRAC} / $TAC_{Spektroflorometrik\ CERAC}$, $r = 0,9827$; $TAC_{Ferrisiyanür}$ / $TAC_{Spektroflorometrik\ CERAC}$, $r = 0,9167$; TAC_{Folin} / $TAC_{Sektroflorometrik\ CERAC}$, $r = 0,9188$) (Çizelge 4.18).

Bitki örneklerinin ekstraksiyon sonuçlarına bakıldığında ise benzer sonuçlar elde edilmiştir (Çizelge 4.19).

Spektroflorometrik CERAC yöntemine göre bitki çaylarının sıralamalarına bakıldığında ise yeşil çay > ada çayı > ısırgan otu > nane > ıhlamur ≥ papatya; CUPRAC yöntemine göre yeşil çay > ada çayı > nane ≥ ısırgan otu > ıhlamur > papatya; SDS katkılı pH'sı belirli Fe(III)-ferrisiyanür yönteminde yeşil çay > ada çayı > nane > ısırgan otu > papatya > ıhlamur; Folin-ciocalteu yöntemin de ise yeşil çay > ada çayı > ısırgan otu > nane > ıhlamur > papatya'dır. Geliştirilen yöntem ile

elde edilen sonuçlar, CUPRAC, Fe(III)-ferrisiyanür ve Folin-Ciocalteu yöntemlerinin sonuçları ile benzer sıralamada olup, bütün yöntemlerde yeşil çay en yüksek antioksidan kapasite değerine sahipken papatya çayı en düşük antioksidan kapasite değere sahiptir.

Diğer gerçek örnek olarak beyaz ve kara üzüm meyveleri seçilmiştir. Üzüm örneklerinin TAC'leri geliştirilen spektroflorometrik CERAC, modifiye CERAC, CUPRAC ve Fe(III)-ferrisiyanür yöntemleriyle tayin edilmiştir (Çizelge 4.20). Geliştirilen spektroflorometrik CERAC yöntemiyle bulunan TAC değerleri belirtilen diğer TAC yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Bulunan sonuçların kesinlikleri açısından anlamlı bir fark olmadığı ve % 95 güvenirlik düzeyinde benzerlik gösterdiği belirlenmiştir **(**$P = 0,05$; $F_{deneysel} = 2,327$; $F_{kritik(3,\ 3)} = 9,277$; $F_{deneysel} < F_{kritik(tablo)}$**)**. Üzüm örneklerinin kapasite değerlerine bakıldığında, kara üzümün en yüksek TAC değerine sahip olduğu görülmektedir.

Diğer gerçek örnek olarak kuşburnu bitkisi seçilmiş, farklı olgunluk, renk ve infüzyon hazırlama yöntemleri göz önüne alınarak TAC değerleri spektroflorometrik CERAC, CUPRAC ve Folin-Ciocalteu ile belirlenmiştir. En yüksek TAC miktarı su ile kaynatma yöntemi ile bulunmuştur (Çizelge 4.21). Ayrıca kaynatma süresinin etkisine bakıldığında 10 dakika kaynatmanın örnek hazırlamada yeterli olduğu söylenebilir. Farklı renklerdeki kuşburnu bitkisi (10 dakika süreyle) kaynatılarak hazırlanan örneklerin TAC değerleri spektroflorometrik CERAC ve Folin-Ciocalteu yöntemleri ile tayin edildi (Çizelge 4.22). Sonuçlara bakıldığında, kırmızı renkli kuşburnu örneklerinin TAC değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, meyve renginin, olgunlaşma zamanını belirlemede yardımcı olabileceği söylenebilir. Folin-Ciocalteu yöntemi ile elde edilen kapasite değerleri spektroflorometrik CERAC yöntemine göre yüksek çıkmıştır. Bunun nedeni ise fenolik antioksidanların pH 10'da protonlarını kaybetmesi ve böylece yükseltgenmeye daha müsait olması (bir diğer deyişle ortam pH'sının kaleviliğinden ötürü abartılı TAC değerleri bulunabilmesi) ve Folin reaktifinin belirsiz miktarda yüksek redoks potansiyeline sahip olmasıdır.

KAYNAKLAR

Alho, H. & Leinonen, J. (1999). Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Methods of Enzymology, 234,* 279-293.

Aly, F. A., Alarfaj, N. A., & Alwarthan, A. A. (2001). Flow-injection chemiluminometric analysis of some benzamides by their sensitizing effect on the cerium-sulphite reaction, *Talanta, 54,* 715–725.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method, *Journal of Agricultral and Food Chemistry, 52,* 7970 –7981.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S.E., Altun, M. (2005). Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC Method, *Free Radical Research, 39,* 949-961.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., Erçağ, E. (2006). The CUPRAC antioxidant capacity and polyphenolics content of some herbal teas, *International Journal of Food Science and Nutrition, 57,* 292-304.

Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., Özyurt, D. (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules, 12,* 1496–1547.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Çelik, S. E. (2008). Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay, *Microchimica Acta, 160,* 413-419.

Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chemistry, 73,* 239-244.

Aust, O., Sies, H., Stahl, W., & Polidori, M. C. (2001). Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids, *Journal of Chromatography A, 936,* 83-93.

Bektaşoğlu, B., Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., Apak, R., (2006), Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a Modified CUPRAC Method, *Biochemical and Biophysical Research Communications, 345,* 1194-1200.

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

Benzie, I. F. F. & Szeto, Y. T. (1999). Total antioxidant capacity of teas by the Ferric Reducing/ Antioxidant Power Assay, *Journal of Agricultral and Food Chemistry, 47,* 633 – 636.

Berker, K. I., Güçlü, K., Tor, İ., Demirata, B., Apak, R. (2010a). Total antioxidant capacity assay using optimized Ferricyanide/Prussian blue method, *Food Analytical Methods, 3,* 154 –168.

Berker, K. I., Güçlü, K., Demirata, B., & Apak, R. (2010b). A novel antioxidant assay of ferric reducing capacity measurement using ferrozine as the colour forming complexation reagent, *Analytical Methods, 2,* 1770-1778.

Berker, K. I., Ozdemir Olgun, F. A., Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R. (2013). Modified Folin−Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61,* 4783-4791.

Bilaloğlu, G. V. & Harmandar, M. (2004). *Flavonoidler molekül yapıları, kimyasal özellikleri, biyolojik aktiviteleri, belirleme teknikleri*, İstanbul, Aktif Yayınevi.

Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies, *Methods Enzymol, 186,* 343-355.

Brown, J. A., Khodr, H., Hider, R. C., & Rice-Evans, C. (1998). Structural dependence of flavonoid interactions with Cu^{2+} ions: implications for their antioxidant properties, *Biochemical Journal, 330,* 1173-1178.

Cao, G. H., Alessio, H. M., & Cutler, R. G. (1993). Oxygen-Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine, 14,* 303-311.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1996). Antioxidant capacity of tea and commmon vegetables, *Journal of Agricultral and Food Chemistry, 44,* 3426 – 3431.

Cao, G., Sofic, E., & Prior, R. L. (1997). Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: Structure-Activity Relationships, *Free radical Biology & Medicine, 22,* 749 – 760.

Cao, G. & Prior, R. L. (1998). Comparision of differnt analtical methods for assesing total antioxidant capacity of human serum, *Clinical Chemistry, 44,* 1309 – 1315.

Cao, G. & Prior, R. L. (1999). In vivo antioxidant capacity: comparision of different analytical methods, *Free radical Biology & Medicine, 27,* 1173-1181.

Cano, A., Hernández-Ruíz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M., Arnao1, M. B. (1998). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material, *Phytochemical Analysis, 9,* 196–202.

Chen, Y. H., Chang, F. R., Lin, Y. J., Wang, L., Chen, J. F., Wua, Y. C., Wub, M. J. (2007). Identification of phenolic antioxidants from Sword Brake fern (Pteris ensiformis Burm.), *Food Chemistry, 105,* 48-56.

Colucci, J., Montalvo, V., Hernandez, R., & Poullet, C. (1999). Electrochemical oxidation potential of photocatalyst reducing agents, *Electrochimica Acta, 44*, 2507–2514.

Cui, H., Zhang, Q., Myint, A., Ge, X., Liu, L. (2006). Chemiluminescence of cerium(IV)–rhodamine 6G–phenolic compound system, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 181*, 238–245.

Czappa, D.J. (1974). *The role of acid in the Cerium(IV) oxidation of carbohydrates*. (PhD Thesis). The Institute of Paper Chemistry, Appleton, Wisconsin.

Çelik, S.E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2007). CUPRAC total antioxidant capacity assay of lipophilic antioxidants in combination with hydrophilic antioxidants using the macrocyclic oligosaccharide methyl β-cyclodextrine as the solubility enhancer, *Reactive and Functional Polymers, 67*, 1548-1560.

DeLange, R. J. & Glazer, A. N. (1989). Phycoerythrin fluorescence based assay for peroxyl radicals: a screen for biologically relevant protective agents, *Analytical Biochemistry, 177*, 300-306.

Demirata, B., Özen, G., Filik, H., Tor, I., Afsar, H. (1998). Spectrofluorometric determination of hydrogen peroxide, *Journal of Fluorescence, 8,* 185–189.

Dündar, Y. & Aslan, R. (2000). *Hekimlikte Oksidatif Strees ve Antioksidanlar*, Ankara, Uyum ajans.

Ersöz, A. (2010). Aletli Analiz, *Lüminesans Spektroskopisi*, (Sf. 84-95), Eskişehir, Anadolu Üniversitesi Yayınları. http://ue.anadolu.edu.tr/eKitap/KIM202U.pdf

Fang, B., Iwasa, S., Wei, Y., Arai, T., Kumagai, M. (2002). A study of the Ce(III)/Ce(IV) redox couple for redox flow battery application, *Electrochimica Acta, 47*, 3971–3976.

Ferreira, R. Q. & Avaca, L. A. (2008). Electrochemical Determination of the Antioxidant Capacity: The Ceric Reducing/Antioxidant Capacity (CRAC) Assay, *Electroanalysis, 20*, 1323–1329.

Folin, O. & Ciolcalteu, V. (1927). Tyrosine and tryptophan determinations proteins, *The Journal of Biological Chemistry,73,* 627-649.

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***,** 1925-1941.

Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Saccini, C. (2000). Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status, *Free Radical Biological Medicine, 29***,** 1106-1114.

Glazer, A. N. (1990). Phycoerytrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Method Enzymol, 186*, 161-168.

Guo, L., Xie, Z., Lin, X., Liu, X., Zhang, W. Chen, G. (2004). Flow injection chemiluminescent determination of tetracycline using a tris(2,2′-bipyridine)ruthenium(II)–cerium(IV) sulphate system, *Luminescence, 19*, 64–68.

Güçlü, K., Altun, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., Apak, R. (2006). Antioxidant capacity of fresh, sun- and sulfited-dried malatya apricot(Prunus Armeniaca) assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and Folin Methods, *International Journal of Food Science & Technology, 41,* 76 –85.

Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant, *Free Radical Research Comminucation, 9,* 1–32.

Halliwell, B. (1999). Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning), *Free Radical Research, 31,* 261–272.

Heim, K. E., Tagliaferro, R., & Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry, 13,* 572-584.

Helle, R. A., Jesper, B. N., & Fleming, N. (1997). Antioxidative enzyme activities in human erythrocytes, *Clinical Chemistry, 43,* 562-568.

Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays, *Journal of Agricultral and Food Chemistry, 53,* 1841–1856.

Hudson, B. J. (1990). *Food Antioksidants,* USA, Elsevier Science.

Javanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjonovic, B., Simic, M. G. (1994). Flavonoids as antioksidants, *Journal American Chemical Society,116,* 4846-4851.

Keskin, H. & Erkmen, G. (1987). *Besin Kimyası,* İstanbul, Güryay matbacılık.

Labrinea, E. P. & Georgiou, C.A. (2004). Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay**,** *Analytica Chimica Acta, 526,* 63-68.

Lesuy, S., Evelson, P., Campos, A. M., & Lissi, E. (2001). Methodologies for evaluation of total antioxidant activities in complex mixtures: A critical review, *Biology Research (Santiago), 34***,** 51-73.

Liu, W. & Huang, Y. (2004). Cerium(IV)-based chemiluminescence of phentolamine sensitized by rhodamine 6G, *Analytica Chimica Acta, 506,* 183–187.

Ma, Y. T. & Cheung, P. C. K. (2007). Spectrophotometric determination of phenolic compounds by enzymatic and chemical methods- A comparison of structure- activity relationship, *Journal of Agricultral and Food Chemistry, 55,* 4222 – 4228.

Ma, Y., Zhou, M., Jin, X., Zhang, B., Chen, H., Guo, N. (2002). Flow–injection chemiluminescence determination of ascorbic acid by use of the cerium(IV)–Rhodamine B system, *Analytica Chimica Acta, 464*, 289–293.

MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., & Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture, 86,* 2046–2056.

Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2006). Automatic method for determination of total antioxidant capacity

using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl assay, *Analytica Chimica Acta, 558*, 310–318.

Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioksidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clinical Science, 84*, 407-412.

Mohamed, F. A., Mohamed, H. A., Hussein, S. A., & Ahmed, S. A. (2005). A validated spectrofluorimetric method for determination of some psychoactive drugs, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analytsis, 39*, 139–146.

Molina-Diaz, A., Ortega-Carmona, I., & Pascual-Reguera, M. I. (1998). Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid with ferrozine by flow-injection analysis, *Talanta, 47*, 531-536.

Nie, L., Ma, H., Sun, M., Li, X., Su, M., Liang, S. (2003). Direct chemiluminescence determination of cysteine in human serum using quinine-Ce(IV) system, *Talanta, 59*, 959-964.

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., & Prior, R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe, *Journal of Agricultral and Food Chemistry, 49*, 4619-4626.

Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2007). Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement, *Talanta, 71*, 1155–1165.

Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2010). Modified cerium(IV)-based antioxidant capacity (CERAC) assay with selectivity over citric acid and simple sugars, *Journal of Food Composition and Analysis, 23*, 282–288.

Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R. (2011). Determination of total antioxidant capacity by a new spectrofluorometric method based on Ce(IV) reduction: Ce(III) fluorescence probe for CERAC assay, *Journal of Fluorescence, 21*, 2069–2076.

Ozyurt, D., Goc, B., Demirata, B., & Apak, R. (2013). Effect Of Oven And Microwave Heating on the Total Antıoxıdant Capacity Of Dietary Onions Grown in Turkey, *International Journal of Food Properties, 16*, 536–548.

Özyürek, M., Güçlü, K., Bektaşoğlu, B., & Apak, R. (2007a). Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the Modified CUPRAC Method with extractive separation of flavonoids-La(III) complexes, *Analytica Chimica Acta, 588*, 88-95.

Özyürek, M., Çelik, S. E., Berker, K. I., Güçlü, K. Tor, İ., Apak, R. (2007b). Sensitivity enhancement of CUPRAC and iron (III)-phenanthroline antioxidant assays by preconcentration of colored reaction products on a weakly acidic cation exchanger, *Reactive and Functional Polymers, 67*, 1478-1486.

Pizzocaro, F., Torreggiani, D., & Gilardi, G., (1993). Inhibition of apple polyphenol oxidase (PPO) by ascorbic acid, citric acid and sodium chloride, *Journal of Food Processing and Preservation, 17*, 21–30.

Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of Plasma and Other Biological and Food Samples, *Journal of Agricultral and Food Chemistry, 51*, 3273–3279.

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*, 4290–4302.

Raquel, P., Laura, B., & Saura-Calixto, **F.** (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing/antioxidant assay, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*, 3396-3402.

Ratnam, D.V., Ankola, D. D., Bhardwaj, V., Sahana, D.K., Kumar, M. N. V. R. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release, 113***,** 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 & Medicine, 26*, 1231-1237.

Rezaei, B. & Mokhtari, A. (2007). A simple and rapid flow injection chemiluminescence determination of cysteine with $Ru(phen)_3^{2+}$-Ce(IV) system, *Spectrochimica Acta Part A, 66*, 359–363.

Rice-Evans, C. & Miller, N. J. (1994). Total antioksidant status in plasma and body fluids, *Methods in Enzymology, 234*, 279-293.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine, 20*, 933-956.

Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., & Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compouds, *Trends in Plant Science, 2*, 152-159.

Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits, *Food Chemistry, 66*, 401-436.

Sabe, V. A., Berg, D. J, Griffoen, D. H., Bennokom, W. P., Bast, A. (1996). Structural aspects of antioxidants activity of flavonoids, *Free Radical Biology & Medicine, 20*, 331-342.

Shahidi, F. & Wanasundara, P. K. J. (1992). Phenolic antioxidants, *Critical Review of Food Science and Nutritional, 32*, 67-103.

Shahidi, F. (1996). *Natural antioxidants, chemistry, health effects and applications*, Champaign, Illinois, AOCS Press.

Simic, A., Manojlovic, D., Segan, D., & Todorovic, M. (2007). Electrochemical behavior and antioxidant and prooxidant activity of natural phenolics, *Molecules, 12*, 2327-2340.

Singleton, V.L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol, 299*, 6287-6293.

Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Enstrümental Analiz İlkeleri* (E. Kılıç ve H. Yılmaz, Çev.). Ankara, Bilim yayıncılık.

Stookey, L. L. (1970). A New spectrophotometric reagent for iron, *Analytical Chemistry, 42*, 779-781.

Url-1< *http://www.olympusmicro.com*>, erişim tarihi 15.04.2014.

Valeur, B. (2002). *Molecular Fluorescence Principles and Applications*, Germany, Wiley-VHC.

Valkonen, M. & Kuusi, T. (1997). Spectrophotometric assay for total peroxyl radicaltrapping antioxidant potential in human serum, *Journal of Lipid Research, 38*, 823- 833.

Wang, R., Wan, L., Li, Q., Liu, X., Huang, Y. (2007). Chemiluminescence of synephrine based on the cerium(IV)–rhodamine B system, *Luminescence, 22*, 140–146.

Wang, S., Ma, H., Li, J., Chen, X., Bao, Z., Sun, S. (2006). Direct determination of reduced glutathione in biological fluids by Ce(IV)–quinine chemiluminescence, *Talanta, 70*, 518–521.

Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., & Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters, 187*, 33-37.

Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G., & Maxwell, S. R. J. (1992). Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Analytica Chimica Acta, 266*, 265-277.

Whitehead, T. P., Robinson, D., Allaway, S., Syms, J., Hale, A. (1995). Effect of Red Wine Ingestion on the Antioxidant Capacity of Serum, *Clinical Chemistry, 41*, 32-35.

Xi, J., Ai, X., & He, Z. (2003). Chemiluminescence determination of barbituric acid using $Ru(phen)_3^{2+}$–Ce(IV) system, *Talanta, 59*, 1045-1051.

Yang, B., Kotani, A., Aral, K., & Kusu, F. (2001). Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials, *Analytical Sciences, 17*, 599–604.

Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian, J., & Yong, J. (1990). Flavonoids as superoxide scanvengers and antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine, 9*, 19-21.

Zhao, Y., Baeyens, W. R. G., Zhang, X., Calokerinos, A. C., Nakashima, K., Weken, G. V. D. (1997). Chemiluminescence Determination of Tiopronin by Flow Injection Analysis Based on Cerium(IV) Oxidation Sensitized by Quinine, *Analyst, 122*, 103–106.



ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Dilek Özyurt

Doğum Yeri ve Tarihi: Trabzon-1980

Adres: İTÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Ayazağa Kampüsü, 34467, Maslak- İstanbul

E-Posta: ozyurtd@itu.edu.tr

Lisans: Karadeniz Teknik Üniversitesi-2001

Yüksek Lisans : İstanbul Teknik Üniversitesi-2005

Mesleki Deneyim ve Ödüller: İstanbul Teknik Üniversitesinde 2005 yılından bu zamana kadar Uzman kadrosunda çalışmaktayım.

Yayın ve Patent Listesi:

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2007). Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement, *Talanta, 71*, 1155–1165.
- **Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I., Özyurt, D.** (2007). Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules, 12*, 1496–1547.
- **Ari, F., Celikler, S., Oran, S., Balikci, N., Ozturk, S., Ozel, M. Z., Ozyurt, D., Ulukaya, E.** (2012). Genotoxic, Cytotoxic, and Apoptotic Effects of Hypogymnia physodes (L.) Nyl. on Breast Cancer Cells, *Environmental Toxicology, 29* (7), 804-813.
  doi: 10.1002/tox.21809.
- **Ozyurt, D., Goc, B., Demirata, B., & Apak, R.** (2013). Effect Of Oven And Microwave Heating on the Total Antıoxıdant Capacity Of Dietary Onions Grown in Turkey, *International Journal of Food Properties, 16*, 536–548.
- **Berker, K. I., Ozdemir Olgun, F. A., Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R.** (2013). Modified Folin−Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants, *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61*, 4783-4791.

- **Ozdemir Olgun, F. A., Ozyurt, D., Berker, K. I., Demirata, B., Apak, R.** (2014). Folin-Ciocalteu spectrophotometric assay of ascorbic acid in pharmaceutical tablets and orange juice with pH adjustment and preextraction of lanthanum (III)-flavonoid complexes., *Journal of the Science Food and Agricultural*, 94 (12), 2401-2408.

  doi: 10.1002/jsfa.6569.

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2004). Determination of Total Flavonoid Content in the Urtica Dioica L. by a New Spectrophotometric Method, *4th AACD Congress*, *Proceedings of the 4thAegean Analytical Chemistry Days*, (pp. 263-265). Kusadası, Turkey, September 29-October 03.
- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2005). Determination of total antioxidant capacity of plants extracts by a new spectropfluorometric method, *EURO FOOD CHEM XIII*, Hamburg, September 19-21.
- **Ozyurt, D. & Demirata, B.** (2007). Spektrofotometrik yöntemle Nar'da antioksidan miktarının tayini, *X. Ulusal Spektroskopi kongresi*, İzmir, Turkiye, Temmuz 04-07.
- **Ozyurt, D. & Demirata, B.** (2007). Üzüm ve üzüm ürünlerinde spektroflorometrik yöntemle antioksidan miktarının tayini, *X. Ulusal Spektroskopi kongresi*, İzmir, Turkiye, Temmuz 04-07.
- **Ozyurt, D., Karasakal, A., Demirata, B., & Apak, R.** (2007). Determination of Total Antioxidant Capacity of Rosa Canina L. (rosehip) by CERAC (Ceric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Method, *XIV. Uluslararası EuroAnalysis Kongresi*, Antwerp, Belgium, September 09-14.
- **Ozyurt, D. & Demirata, B.** (2008). Total Antioxidant Capacity Of Pomegranate (Punica Granatum) Using Spectrophotometric Method (CERAC), *XIII Italian Hungarian Symposium On Spectrochemistry: Environmental Contamination And Food Safety*, Bologna, Italy, April 20-24.
- **Ozyurt, D. & Demirata, B.** (2008). Selective Spectrophotometric Determination Of Trolox As Ce(IV) Complex, *6th AACD Congress*, Pamukkale, Denizli, Turkey, October 09-12.
- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2008). Effect Of Microwave And Oven Heating On The Antioxidant Content Of Rosehip İnfusion (Herbal Tea), *6th AACD Congress*, Denizli, Turkey, October 09-12.
- **Demirata, B., Ozyurt, D., Goc, B., & Apak, R.** (2009). Investigation of total antioxidant contents by spectrophotometric methods of heat−processed dietary onion plants in Turkey, *Colloquim spectroscopicum Internationale XXXVI*, Budapeşte, Macaristan, August 30- September 03.
- **Demirata, B., Ozyurt, D., Alvan, S., & Apak, R.** (2012). Determination of sulphur dioxide and antioxidants in wine by spectroscopic methods, *XXth SCSC, ESAS 2012*, Tatranska Lomnica, Slovakia, October, 7-12.
- **Kar, F., Ozyurt, D., & Demirata, B.** (2012). Total Antioxidant Capacities of Methanol and Water Extract of the horse tail (Equisetum Arvense) Species Wildly Growing in Kutahya and Tekirdag, *8th Aegean Analytical Chemistry Days*, Izmir, Turkey, September 16-20.

- **Ozyurt, D., Demirata, B., Apak, R., Hamilton, J., Lewis, A., Ozel, M. Z.** (2008). Analysis of volatile compounds by using direct thermal desorption GCxGC- TOF/MS and determination of antioxidant capacity during different maturity stages of rose hips, *64th annual Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy, PITTCON 2013*, , Philadelphia, USA, March 18-24.
- **Kar, F., Ozyurt, D., & Demirata, B.** (2013). Total Antioxidant Capacities of Methanol and Water Extract of the horse tail (Equisetum Arvense) and walfs claw (Lycopodium Clavatum) Species Wildly Growing in Kutahya and Trakya, *6th Black Sea Basin Conferance on Analytical Chemistry*, Trabzon, Turkey September 10-14.

TEZDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2010). Modified cerium(IV)-based antioxidant capacity (CERAC) assay with selectivity over citric acid and simple sugars, *Journal of Food Composition and Analysis, 23*, 282–288.
- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2011). Determination of total antioxidant capacity by a new spectrofluorometric method based on Ce(IV) reduction: Ce(III) fluorescence probe for CERAC assay, *Journal of Fluorescence, 21*, 2069–2076.
- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2007). Total Antioxidant Capacity of Commercial Grape, Grape Juices and Wine Evaluated by Spectrofluorimetric Method, *XIV. Uluslararası EuroAnalysis Kongresi*, Antwerp, Belgium, September 09-14.
- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2009). Modified cerium(IV)−based spectrophotometric antioxidant capacity measurement in sulfuric acid−sodium sulfate medium with selectivity over citric acid and simple sugars, *XV. Uluslararası EuroAnalysis Kongresi*, İnnsbruck, Avusturya, September 06-10.
- **Ozyurt, D., Demirata, B., & Apak, R.** (2010). Determination of the Total Antioxidant Capacity by a New Spectrofluorometric CERAC (Ceric Reducing Antioxidant Capacity) Method, *3rd EuCheMS Chemistry Congress*, Nürnberg, Almanya, August 29- September 02.