T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hipokloröz Asit Süpürülmesine Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

Isaiah Oluwadamilare ODEYEMI

DANIŞMAN
Prof. Dr. SEMA DEMİRCİ ÇEKİÇ

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

İSTANBUL-2020

Bu çalışma, [19.06.2016] tarihinde aşağıdaki jüri tarafından [Kimya Anabilim Dalı, Analitik Kimya Programı]nda [Yüksek Lisans tezi] olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

[Prof. Dr.] [Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ](Danışman)
[İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Mühendislik Fakültesi]

[Prof. Dr.] [Reşat APAK]
[İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa]
[Mühendislik Fakültesi]

[Prof. Dr.] [Esra ÇAPANOĞLU GÜVEN]
[İstanbul Teknik Üniversitesi]
[Kimya-Metalurji Fakültesi]

20.04.2016 tarihli Resmi Gazete'de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'nın abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

ÖNSÖZ

En içten takdirim, bu işi gerçekleştirmek için bana bilgelik, bilgi ve anlayış kazandıran Yüce Tanrı'yadır. Sevgili ebeveynlerim Bay ve Bayan ODEYEMI'ye sevgi, dua ve muazzam destekleri için teşekkür ediyorum. Onların duaları olmadan "imkansız bir görev" olurdu. Bana gösterdikleri sevgi ve destek için arkadaşlarım Nada TAHER ve John OGUNRINDE'ye de teşekkür etmek istiyorum.

İhtiyaç duyduğum heran bana yardımcı olan samimi ve yardımsever hocam Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ'e profesyonel ve ahlaki rehberliği için teşekkür ederim. Başta Prof. Dr. Reşat APAK, Prof. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN ve Doç. Dr. Saliha Esin ÇELIK olmak üzere İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimya Bölümü yönetimine ve değerli hocalarına beni bu bölümün bir parçası olmaya değer buldukları ve çalışma sırasında sonsuz destek ve teknik tavsiyeleri için teşekkür ediyorum.

Laboratuvar arkadaşlarım, buradaki ailem ve hocalarım Seda UZUNBOY, Aslı Neslihan AVAN, Dr. Asiye Aslıhan AVAN, Zainab Majid Salim AL-LAMI ve Özge KARAKAŞ 'a bu çalışmadaki teşvik ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Yurtdışı Türkler ve Akrabalar Başkanlığı yönetimine ve Türkiye Cumhuriyeti'ne bu prestijli üniversitede öğrenimime devam etmem için bana tam burs verdiği için sonsuz şükranlarımı sunarım. Türk halkına beni aralarına kabul ettiği için çok teşekkür ederim.

Bu araştırma her meraklı zihne adanmıştır.

Haziran, 2020 Isaiah O. ODEYEMI

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ ..... **iv**
İÇİNDEKİLER ..... **v**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **ix**
TABLO LİSTESİ ..... **xiv**
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ ..... **xv**
ÖZET ..... **xix**
SUMMARY ..... **xxi**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **3**
2.1 SERBEST RADİKALLER NEDİR? 3
2.2 REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN BİYOLOJİK ROLLERİ 4
2.2.1 Reaktif oksijen türlerinin vücut dokusuna etkisi. 6
2.3 OKSİDATİF STRES 6
2.4 HİPOKLORÖZ ASİT 7
2.4.1 HOCl oluşumu 7
2.4.2 HOCl'in antimikrobiyal etkisi 8
2.4.3.1 HOCl'in $^{\bullet}OH$ Radikal'in oluşumundaki rolü *8*
2.4.3.2 HOCl'ın $^{\bullet}O_2$ oluşumundaki rolü *9*
2.4.3.3 HOCl'ın nitrit ile reaksiyonu sonucu NO_3^- oluşturması *9*
2.5 ANTİOKSİDANLAR 11
2.5.1 Antioksidanların sınıflandırılması 12
2.5.1.1 Doğal Antioksidanlar *14*
2.5.1.2 Enzimatik antioksidanlar *28*
2.5.2 Toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri. 32
2.5.2.1 CUPRAC (Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi *34*
2.5.2.2 ABTS/TEAC (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) Yöntemi *35*
2.5.3 Hipokloröz Asit Tayininde Kullanılan Yöntemler 36
2.5.3.1 TNB (5-tio-2-nitrobenzoik asit) Yükseltgenme Yöntemi *37*
2.5.3.2 Taurin Klorlama (KI / Taurin) Yöntemi *37*
2.5.3.3 Katalaz Deneyi *38*

2.5.3.4 Sığır Serumu Albümininin (BSA) Oksidasyonu *38*
2.5.3.5 HOCl süpürme Aktivitesi Deneyi için Spektroflorometrik Prob Olarak Rezorsinol kullanılması *38*
3. MALZEME VE YÖNTEM **40**
3.1 ALETLER VE KİMYASALLAR 40
3.1.1 Cihazlar 40
3.1.2 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler 40
3.2 ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI 41
3.2.1 Hipokloröz Asit Süpürme Yöntemi Çözeltileri 41
3.2.2 CUPRAC Yöntemi Çözeltileri 41
3.2.3 ABTS / TEAC Yöntemi Çözeltileri 42
3.2.4 HPLC-CUPRAC Yöntemi Çözeltileri 42
3.2.5 Sentetik Antioksidan çözeltilerinin Hazırlanması 42
3.2.6 Gerçek Örneklerin Analize hazırlanması 42
Green tea (Yeşil Çay) *42*
3.3 YÖNTEMLER 43
3.3.1 Hipokloröz Asit Süpürme Antioksidan Kapasite Yöntemi 43
3.3.2 CUPRAC Yöntemi 44
3.3.3 ABTS / TEAC Yöntemi 44
3.3.4 Kromatografik Tayin Yöntemi – HPLC 44
3.3.5 KI/taurin yöntemi 45
3.4 ÖNERİLEN YÖNTEMİN OPTİMİZE EDİLMESİ 45
3.4.1 Sodyum Hipoklorit Konsantrasyonunun Optimizasyonu 45
3.4.2 Çalışma pH'sının Optimizasyonu 46
3.5 SEÇİLEN BİREYSEL ANTİOKSİDANLARA YÖNTEMLERİN UYGULANMASI 46
3.5.1 Hipokloröz Asit Süpürme Yöntemi 46
3.5.2 CUPRAC Yöntemi 47
3.5.3 ABTS / TEAC Yöntemi 47
3.5.4 KI/Taurin Yöntemi 47
3.6 YÖNTEMİN AOX'UN İKİLİ VE ÜÇLÜ KARIŞIMLARINA UYGULANMASI 48
3.6.1 Önerilen Hipokloröz Asit Süpürme Yöntemi 49
3.6.1.1 Kalitatif Tayin Limiti, LOD ve Kantitatif Tayin Limiti, LOQ Hesaplanması *49*
3.6.2 CUPRAC Yöntemi 50

3.6.3 ABTS/TEAC Yöntemi 50
3.7 YÖNTEMLERİN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI 50
3.8 50
4. BULGULAR 52
4.1 YÖNTEM OPTİMİZASYONU 52
4.1.1 Sodyum Hipoklorit Konsantrasyonunun Optimizasyonu 52
4.1.2 pH Optimizasyonu 52
4.1.3 DMPD Konsantrasyonunun Optimizasyonu 53
4.1.4 Sıcaklığın Etkisi 54
4.1.5 Etanolün Etkisi 54
4.6 ÖNERİLEN YÖNTEMİN SEÇİLEN ÖRNEK ANTİOKSİDANLARA UYGULANMASI 54
4.6.1 Test edilen AOx bileşiklerinin geliştirilen yöntem ile belirlenen HOCl süpürme etkinliği sırası 60
4.7 SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDANLAR İÇİN CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI 60
4.7.1 Her AOx bileşiğinin Antioksidan kapasitesinin sırası 66
4.8 SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDANLAR İÇİN ABTS YÖNTEMİNİN UYGULANMASI 67
4.8.1 Her AOx bileşiğinin Antioksidan kapasitesinin sırası 73
4.9 AOX KARIŞIMLARININ ÖNERİLEN YÖNTEM İLE BELİRLENMESİ 73
4.9.1 İkili Karışımlar 73
4.9.2 Üçlü karışımlar 74
4.10 STANDART YÖNTEMLER İLE İKİLİ VE ÜÇLÜ KARIŞIMLARIN ANALİZİ 75
4.10.1 CUPRAC yöntemi kullanılarak AOx'ların ikili ve üçlü karışımlarının analizi 76
4.10.2 ABTS / TEAC yöntemi kullanılarak AOx'un ikili ve üçlü karışımlarının belirlenmesi 77
4.10.3 HPLC ANALİZİ SONUÇLARI 79
4.10.3.1 Standart AOx karışımına uygulanan HPLC yönteminin sonuçları 79
4.10.3.2 HPLC yöntemiyle gerçekleştirilen yeşil çay örneğinin analiz sonuçları 80
4.11 SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDANLAR İÇİN KI/TAURİN YÖNTEMİNİN UYGULANMASI 81
4.12 HER AOX BİLEŞİĞİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SIRASI 89
4.13 SPEARMAN KORELASYON KATSAYISI 89
4.14 GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANAN YÖNTEMLERİN SONUÇLARI 90

4.14.1 Toplam Antioksidan Kapasite Tayini.....90
4.14.2 Gerçek örneklere geri kazanım testlerinin uygulanması 92
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 94
KAYNAKLAR.....96
EKLER 108
ÖZGEÇMİŞ 109

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Oksijenin kısmi indirgenmesinin subsellüler kaynaklarını ve ilgili detoksifikasyon yollarını gösteren hücresel hidroperoksit metabolizmasının şematik gösterimi [5]. 5

Şekil 2.2: Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Türlerinin konsantrasyonları arasındaki dengenin şekilsel gösterimi, Kaynak: Dovepress[16] 7

Şekil 2.3: Serbest radikaller tarafından lipit peroksidasyonu (LPO) zincirlerinin başlatılması ve dallanmasında aktif nötrofiller tarafından üretilen HOC1'in katılımı. [39] 10

Şekil 2.4: Antioksidan tarafından serbest radikale bir elektronun aktarılması [47] 11

Şekil 2.5: Antioksidanların Sınıflandırılması [46] GSH-px: Glutatyon Peroksidaz, EGCG: Epigallo Kateşin Gallat, SOD = Süperoksit Dismutaz. 13

Şekil 2.6: E Vitamininin Yapısı 15

Şekil 2.7: Askorbat radikalinin oluşumu. 16

Şekil 2.8: C Vitamini Oksidasyonu 17

Şekil 2.9: Çifte bağdan bir elektron verilmesi ile karotenin oksidasyonu 19

Şekil 2.10: Flavonoidlerin Temel Kimyasal Yapısı 20

Şekil 2.11: Flavonların temel kimyasal yapısı 21

Şekil 2.12: Flavonollerin temel kimyasal yapısı 21

Şekil 2.13: Flavanonların temel kimyasal yapısı 22

Şekil 2.14: Flavanollerin temel kimyasal yapısı 22

Şekil 2.15: İzoflavonların temel kimyasal yapısı 23

Şekil 2.16: Antosiyaninlerin temel yapısal gösterimi 23

Şekil 2.17: Hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları 25

Şekil 2.18: Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları 26

Şekil 2.19: Yoğunlaştırılmış Tanenlerin kimyasal yapısı 27

Şekil 2.20: Tannik asidin kimyasal yapısı 27

Şekil 2.21: Bazı sentetik antioksidanların yapıları 32

Şekil 2.22: CUPRAC yönteminin kromojenik reaktifi olan Cu(II)-Nc kompleksinin antioksidanlar (Ar(OH)n) ile reaksiyonu sonucu sarı renkli Cu(I)-Nc bileşiğine indirgenmesi [153].....34

Şekil 2.23: $ABTS^{\bullet+}$ radikal.....36

Şekil 2.24: Rezorsinol probu ve AOX'un rekabetçi reaksiyonları sonucu flüoresans özellik göstermeyen klorlanmış prob oluşumu.....39

Şekil 3.1: Karşılık gelen radikal katyonik türlerini (pembe) oluşturmak için N, N-dimetil-p-fenilendiaminin (renksiz) HOCl ile oksidasyonu 44

Şekil 4.1: NaOCl Konsantrasyonunun Optimizasyonu 52

Şekil 4.2: Önerilen yöntem için pH optimizasyonu 53

Şekil 4.3: DMPD Optimizasyon için calibrasyon grafiği.....54

Şekil 4.4: Gallik Asit için elde edilen kalibrasyon grafiği 55

Şekil 4.5: Ferulik asit için elde edilen kalibrasyon grafiği.....55

Şekil 4.6: Trolox için elde edilen kalibrasyon grafiği 56

Şekil 4.7: L-Glutatyon için elde edilen kalibrasyon grafiği 56

Şekil 4.8: Kuersetin için elde edilen kalibrasyon grafiği.....56

Şekil 4.9: *p*-kumarik asit için elde edilen kalibrasyon grafiği.....57

Şekil 4.10: Kateşin için elde edilen kalibrasyon grafiği.....57

Şekil 4.11: Kafeik Asit için elde edilen kalibrasyon grafiği.....57

Şekil 4.12: Ürik Asit için elde edilen kalibrasyon grafiği 58

Şekil 4.13: Askorbik asit için elde edilen kalibrasyon grafiği.....58

Şekil 4.14: L-sistein için elde edilen kalibrasyon grafiği 58

Şekil 4.15: N-Asetilsistein için elde edilen kalibrasyon grafiği 58

Şekil 4.16: Bilirubin için elde edilen kalibrasyon grafiği.....59

Şekil 4.17: Epikateşin için elde edilen kalibrasyon grafiği 59

Şekil 4.18: Galik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.....61

Şekil 4.19: Ferulik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.....61

Şekil 4.20: Trolox için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 61

Şekil 4.21: L-Glutatyon için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 62

Şekil 4.22: Kuersetin için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 62

Şekil 4.23: *p*-kumarik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 62

Şekil 4.24: Kateşin için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.....63

Şekil 4.25: Kafeik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.....63

Şekil 4.26: Ürik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 64

Şekil 4.27: Askorbik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 64

Şekil 4.28: L-sistein için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 64

Şekil 4.29: N-Asetilsistein için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 65

Şekil 4.30: Bilirubin için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.....65

Şekil 4.31: Epikateşin için CUPRAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 65

Şekil 4.32: Galik Asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 67

Şekil 4.33: Ferulik asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 67

Şekil 4.34: Trolox için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 68

Şekil 4.35: L-Glutatyon için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 68

Şekil 4.36: Quercetin için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 68

Şekil 4.37: *p*-kumarik için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 69

Şekil 4.38: Kateşin için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 69

Şekil 4.39: Kafeik asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 69

Şekil 4.40: Ürik asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 70

Şekil 4.41: Askorbik asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 70

Şekil 4.42: L-sistein için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 70

Şekil 4.43: N-Asetilsistein için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 71

Şekil 4.44: Bilirubin için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 71

Şekil 4.45: Epicatechin için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği 72

Şekil 4.46: 280 nm'de standart antioksidan karışımına ait kromatogram (Galik asit[1] Epigallokateşin[2] Kateşin[3] Epigallokateşin gallat[4] Epikateşin[5] Epikateşin gallat[6]).....80

Şekil 4.47: 280 nm'de yeşil çay örneğinin analizinine ait kromatogram (Galik asit[1] Epigallokateşin[2] Kateşin[3] Epigallokateşin gallat[4] Epikateşin[5] Epikateşin gallat[6]).....81

Şekil 4.48: Galik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 82

Şekil 4.49: Ferulik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 82

Şekil 4.50: Troloks için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 83

Şekil 4.51: Glutatyon için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 83

Şekil 4.52: Kuersetin için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 84

Şekil 4.53: Parakumarik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 84

Şekil 4.54: Kateçin için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 85

Şekil 4.55: Kafeic Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 85

Şekil 4.56: Ürik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 86

Şekil 4.57: Askorbik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 86

Şekil 4.58: L-Sistein için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 87

Şekil 4.59: N-Asetilsistein için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 87

Şekil 4.60: Bilirubin için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 88

Şekil 4.61: Epikateçin için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği. 88

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Polifenolik bileşiklerin sınıflandırılması 24

Tablo 2.2: Toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları [151] 34

Tablo 4.1: Önerilen hipokloroz asit süpürme yöntemi ile test edilen AOx'lar için elde edilen doğrusal denklemler ve belirleme katsayıları (R^2). 59

Tablo 4.2: Seçilen AOx bileşikler için CUPRAC Yöntemi elde edilen kalibrasyon doğrularının lineer denklemleri ve belirleme katsayıları (R^2). 66

Tablo 4.3: Seçilen AOx bileşikler için ABTS / TEAC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait doğrusal denklemler ve regresyon katsayıları 72

Tablo 4.4: Hipokloröz asit süpürme yöntemi ile analizi gerçekleştirilen ikili AOx karışımları için % hata değerleri 74

Tablo 4.5: Hipokloröz asit süpürme yöntemi ile analizi gerçekleştirilen üçlü AOx karışımları için % hata değerleri 75

Tablo 4.6: CUPRAC yöntemini ile analizi gerçekleştirilen ikili ve üçlü AOx karışımları için % hata değerleri 77

Tablo 4.7: ABTS / TEAC yöntemi ile analizi gerçekleştirilen ikili ve üçlü AOx karışımları için % hata değerleri 79

Tablo 4.8: Çay antioksidanlarının HPLC yöntemiyle hesaplanan kalibrasyon denklemleri, alıkoyma süreleri ve doğrusal aralıklar 80

Tablo 4.9: Bireysel antioksidanlar KI / taurin yöntemiyle test edildiğinde elde edilen doğrusal denklemler ve regresyon katsayıları. 89

Tablo 4.10: Yeşil çayının (Gerçek Örnek) mmol TR / g eşdeğeri toplam antioksidan kapasitesi (TAC) değerleri 91

Tablo 4.11: Önerilen yöntemin ve Standart Hipokloröz asit süpürme yöntemi olan KI/Taurin Yöntemlerinin gerçek örneklere uygulanması ve sonuçların kıyaslanması 91

Tablo 4.12: Önerilen yöntemle standart ekleme testlerini kullanarak % geri kazanım ve% hatasını gösterir 93

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler **Açıklama**

$^1O_2$ / $O_2^{\bullet}$ **:** Singlet oksijen
HCOR **:** Aldehit
HCYS **:** Homosistein
HOBr **:** Hipobromöz asit
HOCl **:** Hipokloröz Asit
Asc **:** Dehidroaskorbat
$Asc^{\bullet-}$ **:** Askorbat Radikali
$ABTS^{\bullet+}$ **:** 2,2'–azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik acid)
NaAc **:** Sodyum asetat
NAC **:** N-Asetil Sistein
NaClO **:** Sodyum hipoklorit
$AscH^-$ **:** Askorbat
Nc **:** Neokuproin
NH_4Ac **:** Amonyum asetat
NO^- **:** Nitroksil anyonu
$NO^{\bullet}$ **:** nitrik oksit
NO^+ **:** Nitrozil katyonu
$NO_2^{\bullet}$ **:** Azot Dioksit Radikali
NO_2^+ **:** Nitril katyonu
$O_2^{\bullet-}$ **:** Superoksit
R^2 **:** Regresyon katsayısı
$^{\bullet}OH$ **:** Hidroksil radikali
ONOOH **:** Peroksinitrit

Kısaltmalar **Açıklama**

%E **:** Yüzde Hata
AA **:** Askorbik asit

A : Absorbans

ABTS/TEAC : ABTS/Troloks ekivalent antioksidan kapasite

AH : Antioksidan

AOx : Antioksidan

ATP : Adenozin trifosfat

BC : β-karoten

BHA : Butillenmiş hidroksianizol

BHT : Butillenmiş hidroksitoluen

Bn : Bilirubin

CAT : Katalaz

CAt : Kateşin hidrat

CBAs : Krosin-ağartma Yöntemi

CFA : Kafeik asit

CUPRAC : Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite (CUPRAC) Yöntemi

$CUPRAC_I$: Modifiye CUPRAC Yöntemi

$CUPRAC_N$: Normal CUPRAC Yöntemi

CVD : Kardiyovasküler hastalık

CYS : L-Sistein

DG : Dodesil gallat

DMPD : N, N-dimethyl-p-fenilen diamin

$DMPD\bullet^+$: DMPD radikal katyonu

DMPDQ : DMPD-yarı kinonu

DPPH• : 2,2-difenil-1-pikrilhidrasik radikali

DTNB : 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)

EC : Epikateşin

ECG : Epikateşin gallat

ECSOD : Hücrelerarası SOD

EDTA : Etilen diamintetraasetik asit

EGC : Epigallokateşin

EGCG : Epigallokateşingallat

EPO : Eozınofil Peroksidaz

ET : Elektron Transfer

EtOH : Etanol

FA : Ferulik asit

FRAP : Demir (III)-indirgeme antioksidan kapasite yöntemi
GA : Gallik asit
GPx : Glutatyon peroksidaz/redüktaz
GR : Glutatyon redüktaz
GSH : Glutatyon
GSSG : Yükseltgenmiş Glutayon
GST : Glutayon-S-transferaz
HAc : Asetik asit
HAT : Hidrojen Atom Transferi
IDD : İyodotironindeiyodinaz
LH : Lipit
LOO• : Lipit peroksil radikali
LPO : Lipit peroiksidasyonu
MPO : Miyeloperoksidaz
NADH : Nikotinamit adenin dinükleotit hidrojenaz
NADP : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
OG : Oktilgallat
ORAC : Oksijen radikali absorplama kapasitesi
PCA : p-kumarik asit
PG : propil gallat
QR : Kuersetin
RNS : Reaktif Azot Türleri
RO• : Alkoksi radikali
RO_2• : peroksil radikali
ROOH : Organoperoksit
ROS : Reaktif Oksijen Türleri
RSH : Tiyol
SOD : Superoksit dismutaz
SpTrxR : Spermatozoa-specific TrxR
TAC : Toplam Antioksidan Kapasite
TBHQ : tert-butilhidroksikinon
TNB : 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit
TOSCA : Toplam oksiradikal süpürme kapasite yöntemi
TR : Troloks

TR/g **:** Troloks eşdeğer/gram

TRAP **:** Toplam radikal-yakalama antioksidan parametresi

TrxR **:** tiyoreduktaz

UA **:** Urik asit

ΔA **:** Absorbans farkı

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hipokloröz Asit Süpürmeye Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

Isaiah Oluwadamilare ODEYEMI

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Sema Çekiç DEMİRCİ

Bu çalışmada, prob malzemesi olarak N, N-dimetil-p-fenilen diamin (DMPD) kullanılarak hipokloröz asit (HOCl) süpürülmesine dayanan spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. pH 4.0'de sodyum hipoklorit çözeltisinden üretilen hipokloröz asit, absorbansı 554 nm'de ölçülen koyu pembe renkli DMPD-yarıkinon (DMPDQ) yapılı katyonik radikalini oluşturmak üzere DMPD'yi yükseltger. Bununla birlikte, güçlü bir yükseltgen olan HOC1, reaksiyon ortamında hem DMPD hem de hipokloröz asit süpürücülerle reaksiyona girer ve burada reaksiyon ortamındaki mevcut HOCI için rekabet ederler. Hipokloröz asit süpürücüleri varlığında ortamdaki HOCl konsantrasyonu düşer ve bu da daha az $DMPD^{\bullet+}$ oluşumu anlamına gelir sonuç absorbans değerinde azalma olarak gözlenir. Bir antioksidanın reaksiyon sistemindeki hipokloröz asidi süpürme kabiliyeti, antioksidan kapasitesinin ölçüsüdür. Artan AOx konsantrasyonu ile ortaya çıkan çözeltinin absorbans değerinin düşmesi, AOx bileşiğinin veya antioksidan içeren numunenin hipokloröz asit süpürme kapasitesini gösterir. Geliştirilen yöntem, polifenoller, vitaminler ve enzimatik olmayan biyolojik antioksidanlar olmak üzere farklı AOx gruplarından temsili bileşiklere uygulandı. Antioksidanlar için ayrı ayrı absorbans-konsantrasyon grafikleri çizildiği zaman lineer bir doğru elde edildiği görüldü ki bu veriler arasında iyi bir korelasyon (R^2~ 1) olduğunu gösterdi. Geliştirilen yöntem yeşil çayına uygulandı. Elde edilen sonuçlar referans yöntemler olarak belirlenen Bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) Yöntemi, 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6- sülfonik

asit)/Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite (ABTS/TEAC) ve HPLC-CUPRAC yöntemleri ile karşılaştırıldı.

Yeşil çayın TAC değeri önerilen yöntem için 0,873±0,003 mmolTR / g olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar referans yöntemler olan, CUPRAC, ABTS / TEAC ve HPLC-CUPRAC yöntemleri ile elde edilenlerle karşılaştırıldı. Önerilen yöntemden elde edilen TAC değerleri, referans yöntemlerden elde edilen değerlerin iki katıdır (HPLC-CUPRAC yöntemi hariç). Bu, reaksiyon mekanizmalarındaki farktan dolayı açıklanabilir.

Daha uyumlu bir sonuç elde etmek için, üç farklı örneği, yeşil çayı, beyaz çayı ve siyah çayı, referans yöntemi olarak hipoklorik asit süpürme dayanan bir yöntemle (KI / Taurin yöntemi) test etmeye karar verdik. Önerilen yöntem kullanılarak yeşil çay, beyaz çay ve siyah çay için elde edilen değerler sırasıyla 0.776 ± 0.007, 0,525 ± 0,007 ve 0,361 ± 0,006 mmolTR / g'dir. Antioksidanların hipokloröz asit süpürme etkinlikleri yukarda belirtilen yöntem ile incelendi ve birbirleri ile Spearman korelasyon testi ile kıyaslandı. Geliştirilen yönteme en yakın sonuçların KI / taurin yöntemi ile elde edildiği belirlendi. Bu durum test edilen yöntemler göz önüne alındığında geliştirilen yöntem ile KI / taurin yönteminin benzer mekanizmalara dayanmasıyla açıklanmıştır. Hipokloröz asit süpürme yöntemi, göreceli olarak daha az analitik beceri gerektiren hızlı, ucuz ve etkili bir yöntemdir.]
Haziran 2020, [131] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Antioksidan kapasite, oksidatif stres, DMPD probu, hipokloröz asit süpürme, spektrofotometrik analiz.]

SUMMARY

DETERMINATION OF TOTAL ANTIOXIDANT CAPACITY BASED ON HYPOCHLOROUS ACID SCAVENGING

M.Sc. THESIS

Isaiah O. ODEYEMI

Istanbul University-Cerrahpasa
Institute of Graduate Studies
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Sema Çekiç DEMİRCİ

In this study, a spectrophotometric assay based on hypochlorous acid scavenging is introduced using N, N-dimethyl-p-phenylenediamine (DMPD) as probe material. The hypochlorous acid, which was generated from its corresponding sodium hypochlorite salt solution at pH 4.0, oxidizes DMPD to form a deep pink-coloured DMPD-semiquinone (DMPDQ) cationic radical whose absorbance is measured at 554 nm. However, HOCl, being a strong oxidant reacts with both DMPD and the hypochlorous acid scavengers in the reaction where they compete for the available HOCl in the reaction medium. In the presence of hypochlorous acid scavengers, the concentration of HClO in the reaction medium decreases, which means less $DMPD^{\bullet+}$ formation, resulting in a decrease in absorbance value. The ability of an antioxidant to scavenge hypochlorous acid in the reaction system is the measure of its antioxidant capacity. This was evident as the absorbance value of the resulting solution decreases with increasing concentration of AOx, which demonstrates the hypochlorous acid scavenging capacity of the AOx compound or antioxidant-containing sample. The developed method was applied to representative antioxidant compounds from different AOx groups such as polyphenolics, flavonoids, vitamins, non-enzymatic biological antioxidants. When absorbance-concentration plots were drawn for individual antioxidant samples, a linear line was

obtained which shows good correlation (R^2 ~ 1) between these data. The developed method was applied to Green tea. The obtained results were compared to those from Cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) / Trolox equivalent antioxidant capacity (ABTS/TEAC) assay and HPLC-CUPRAC.

The TAC value of green tea was determined as 0,873±0,003 mmolTR/g for the proposed method. The results obtained was compared with those obtained by the reference methods, CUPRAC, ABTS/TEAC and HPLC-CUPRAC. The TAC values obtained from the proposed method was twice the value of those obtained from the reference methods (with the exeception of the HPLC-CUPRAC method). This can be explained due to the deference in their reaction mechanisms.

In order to obtain a more relevant result, we decided to test three different samples, green tea, white tea and black tea with an hypochlorous acid scavenging-based method known as the KI/Taurine method as reference method. The values obtained for green tea, white tea and black tea using the proposed method are 0.776±0.007, 0,525±0,007 and 0,361±0,006 mmolTR/g respectively. The hypochlorous acid scavenging activities of antioxidants were examined by the method mentioned above and compared to each other with Spearman correlation test. It was determined that the closest results to the developed method were obtained with the KI / taurine method. This can be explained by the similarities between the mechanism of the developed method and the KI / taurine method. Hypochlorous acid scavenging assay is a quick, inexpensive and an effective method which requires relatively less analytical skills to be performed.]

June, 2020 [131] pages.

Keywords: [Antioxidant capacity, oxidative-stress, DMPD probe, hypochlorous acid scavenging, spectrophotometric assay.]

1. GİRİŞ

İnsan vücudundaki çeşitli fizyolojik faaliyetler sonucunda kaçınılmaz olarak bir takım reaktif oksijen ve azot türleri ortaya çıkar. Metabolizmanın hücresel sistemi için enerji üretme aracı olan solunum sırasında gerçekleşen kimyasal reaksiyonlar sonucu doğal yan ürünler olarak serbest radikaller oluşurlar. Bununla birlikte, bu serbest radikaller vücuttaki enzimatik olan yada olmayan doğal antioksidanlar (Askorbik asit, glutatyon vb) vasıtasıyla dengelenir. Serbest radikaller ya da diğer reaktif türler metabolizmada bir takım yararlı görevler üstlenmektedir.

Ayrıca antioksidanların fazlasının da prooksidan etkiye neden olduğu çeşitli kaynaklarca bildirilmiştir. Görüldüğü üzere ne reaktif türler tamamiyle zararlı ne de antioksidanlar tamamiyle yararlıdır. Önemli olan vücut içerisinde her iki türün de faaliyetlerine izin veren bir dengenin sağlanmasıdır. Vücuttaki reaktif türlerin fazlası vücutta doğal olarak bulunan ya da dışarıdan en çok gıdalar yoluyla alınan antioksidanlar tarafından tüketilir. Ancak bu dengenin oksidanlar lehine bozulması "Oksidatif stres" olarak adlandırılır ve bunun sonucunda reaktif türler proteinler, lipitler ve DNA gibi çeşitli biyolojik makromoleküller üzerinde hasara neden olabilirler. Bunun sonucunda diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar ve yaşlanma gibi olumsuz etkenler tetiklenebilir ya da mevcut etkiler hızlanabilir.

Ayrıca oksidatif stresin enflamasyonu tetikliyebildiği de bilinmektedir. Enflamasyon gerçekleştiğinde, nötrofil granülositleri, seyri engellemek için büyük ölçüde ROS olan antimikrobiyal ajanları serbest bırakır. Nötrofil granülositleri tarafından üretilen başlıca ROS olan hipokloröz asit yüksek oksidan ve klorlama kapasitesi sayesinde, solunum yoluyla elektron transferini okside ederek zararlı bakteriyel toksinleri nötralize eder. Bununla birlikte, bu reaksiyonun toksisitesi, konakçı (insan) vücutta faydalı bakterilerin de yok olmasına yol açar. Aynı zamanda, üretilen HOCl, alfa1-antiproteinazın etkisiz hale gelmesini sağlayarak, enflamatuar hastalıklarda insan dokularının proteolitik hasara neden olur.

Bazı araştırmalar, HOCl'nin canlı sistemdeki diğer radikal türler için öncü görevi görebileceğini göstermiştir. HOCl oluşumuna oksidatif stresin neden olduğu iltihaplanma, konakçıdaki oksidatif stresin bir ölçüsü olarak da işlev görebilir. Hipokloröz asit ayrıca ticari

olarak üretilen sodyum hipoklorit çözeltisinin bir asidik çözelti ile asitlendirilmesi ile de oluşturulabilir.

Geliştirilen spektroskopik yöntemde prob materyal olarak N,N-dimetil-*p*-fenilen diamin (DMPD) kullanılmakta olup hipokloröz asit süpürülmesine dayalı yeni bir spektrofotometrik yöntem önerilmiştir. Belirli antioksidanlar için hipokloröz asit süpürme kapasitesi, toplam antioksidan kapasitesinin bir ölçüsüdür. Hipokloröz asit, pH 4.0'de kendisine karşılık gelen sodyum hipoklorit çözeltisinden üretilmiştir. Daha sonra oluşan bu HOCl, DMPD'yi okside ederek, absorbansı 554 nm'de ölçülen koyu pembe renkli katyonik bir radikal olan ($DMPD^{\cdot+}$) oluşumuna neden olmaktadır. Artan HOCl konsantrasyonu ile DMPD'nin DMPDQ katyonik radikallerine yükseltgenmesi sonucu okunan absorbansta lineer bir artış görülmüştür. Bununla birlikte, AOx varlığında reaksiyon ortamında var olan HOCl, AOx tarafından süpürülür ve azalan HOCl miktarı ile birlikte bu bileşik tarafından yükseltgenen DMPD miktarı dolayısıyla bu yükseltgenme reaksiyonu ile ortamda oluşturulan $DMPD^{\cdot+}$ konsantrasyonu da azalmış olur. Bu da renk şiddetinde azalma olarak gözlemlenir. Yapılan denemeler renk şiddetindeki azalma ile antioksidan miktarı arasında bir doğru orantı olduğunu göstermiştir.

Geliştirilen yöntem, polifenoller, vitaminler ve enzimatik olmayan biyolojik antioksidanlar gibi farklı gruplarından temsili bileşiklere uygulanmıştır. Her bir antioksidan bileşiğinin artan konsantrasyonları için AOx varlığında elde edilen absorbans (A) değerleri ölçülmüş olup bu değerler antioksidan yokluğunda okunan absorbans değerinden çıkartılmış ve böylece ΔA'lar elde edilmiştir. Daha sonra AOx konsantrasyonuna karşı ΔA grafikleri çizilmiştir ve grafiklerin determinasyon katsayısı (R^2) değerleri 1'e yakın olan doğrular verdiği saptanmıştır. Tez çalışmasında önerilen yöntem, CUPRAC, ABTS/TEAC, HPLC-CUPRAC ve KI/Taurin olmak üzere dört farklı standart yöntem ile karşılaştırılmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1 SERBEST RADİKALLER NEDİR?

Serbest radikal, dış kabuğunda bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip olan ve bağımsız olarak var olabilen bir atom veya molekül olarak tanımlanır. Radikallerin dış kabuklarında eşleşmemiş elektronların bulunması, birçoğunu kararsız (kısa yarı ömürlü) ve oldukça reaktif hale getirir. Bu yüksek reaktivite nedeniyle, serbest radikaller stabiliteyi sağlamak için diğer bileşiklerden elektronları çekme eğilimindedir, bu da etkilenen bileşiğin bir elektron kaybetmesine ve devam eden bir zincir reaksiyonunun başlamasına neden olur. Bu reaksiyon, canlı hücrelerdeki normal reaksiyon mekanizmalarını değiştirebilir ve sonunda hücreye zarar verebilir. Serbest radikaller, insan vücudunda doğal olarak metabolik ve fizyolojik süreçler sırasında veya çevresel kirleticilere, endüstriyel kimyasallara, x-ışınlarına, ozon ve sigaraya maruz kalmanın bir sonucu olarak üretilebilirler.

Reaktif türler radikal olan veya radikal olmayan olmak üzere iki ana kategoride sınıflandırılır. Bunlar reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif azot türleri (RNS) ve Reaktif Halojen türleri (RHS) olabilir. Reaktif halojen türleri, reaktif klor türlerinden ve reaktif brom türlerinden oluşur.

Reaktif radikal türlerin örnekleri arasında;

- Hidroksil Radikali (˙OH)
- Superoksit ($O_2^{\bullet -}$),
- Alkoksi Radikali (RO•)
- Peroksi radikali (ROO•)
- Nitrik oksit (NO•)
- Azot dioksit (NO_2•) [**3**]

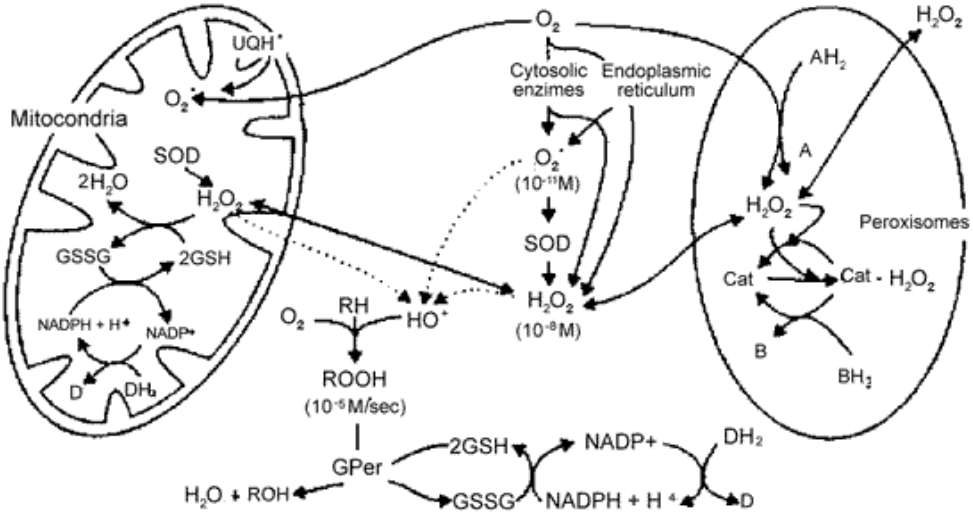
Radikal olmayan türler, serbest radikal türlerinin oluşumuna yol açan reaksiyonları başlatabilen moleküller veya iyonlardır. Radikal olmayan türlerin örnekleri;

- Hipokloröz asit (HOCl)

- Singlet Oksijen ($^1O_2$)
- Hidrojen peroksit (H_2O_2)
- Hipobromöz asit (HOBr)
- Ozon (O_3)
- Nitroksil anyonu (NO^-)
- Nitrosil katyonu (NO^+)
- Nitröz asit (HNO_2)
- Diazot tetroksit (N_2O_4),
- Diazot trioksit (N_2O_3)
- Nitronium (nitril) katyonu (NO_2^+)
- Organik peroksitler (ROOH)
- Aldehitler (HCOR)
- Peroksinitrit (ONOOH) [**4**]

2.2 REAKTİF OKSİJEN TÜRLERİNİN BİYOLOJİK ROLLERİ

Yapılan çalışmalar, hücresel enerji gereksinimleri için Adenozin trifosfat (ATP) üreten özel mitokondriyal membranlardaki aerobik hücrelerde sürekli olarak düşük molekül kütleli iki ROS olan, süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) ve nitrik oksit (NO) oluştuğunu göstermiştir (**Şekil 2.1**). Bu iki ROS arasındaki sinerji, NO'nun sitokrom oksidaz aktivitesi üzerindeki önleyici etkisi yoluyla hücre solunumunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Serbest radikallerin yüksek üretimi, mitokondrinin işlevselliğini etkileyerek apoptoz ve doku yaşlanmasına sebep olmaktadır. [**5, 6**].



Şekil 2.1: Oksijenin kısmi indirgenmesinin subsellüler kaynaklarını ve ilgili detoksifikasyon yollarını gösteren hücresel hidroperoksit metabolizmasının şematik gösterimi [5].

Serbest radikaller biyolojik evrim ve yaşamın kökeninde vazgeçilmez bir rol oynamaktadır [**7**]. Gen transkripsiyonu, sinyal iletimi ve hücrelerdeki çözünür guanilat siklaz aktivitesinin düzenlenmesi gibi kritik eylemlerden sorumlu olan oksijen radikalleri bulunmaktadır [**8**, **9**].

NO molekülleri sinyal iletiminde önemli bir rol oynar ve canlı hücrelerde hücre ve organ fonksiyonlarının çoğunda yer alır. Endotel hücreleri tarafından üretilen, vücutta bulunan NO miktarı, vasküler düz kas hücrelerinin gevşemesini ve çoğalmasını, trombosit agregasyonunu, trombozu, anjiyogenezi, lökosit yapışmasını, vasküler tonu ve hemodinamiği kontrol etmek için belirleyici bir faktördür **[10]**. NO ayrıca nöronlar tarafından nörotransmitter olarak hizmet etmek üzere üretilir ve makrofajdan olanlar immün savunma için kullanılır. Oksidanlar ve enzimlerin inhibitörü olarak, serbest radikaller ve diğer reaktif türler, protein, amino asitler, lipit ve DNA gibi biyomoleküllerin oksidasyonuna neden olarak hücre hasarına ve ölüme yol açabilir **[7, 11]**. Örneğin, süperoksit dismutazın fiziksel, kimyasal ve immünolojik özelliklerini değiştiren ve hücrelerdeki oksidatif hasarı daha da arttıran radyasyona bağlı ROS oluşumu da mümkündür. Serbest radikaller bağışıklık sistemindeki aktif makrofajlar ve diğer fagositler tarafından patojenlerin öldürülmesinden sorumlu olsalar bile [12], aynı zamanda birçok kronik hastalığın patogenezine öncülük ederek memeli hücrelerine zarar verebilirler. Bunlar memeli hücrelerindeki serbest radikallerin iki yönlü rolünü açıklar.

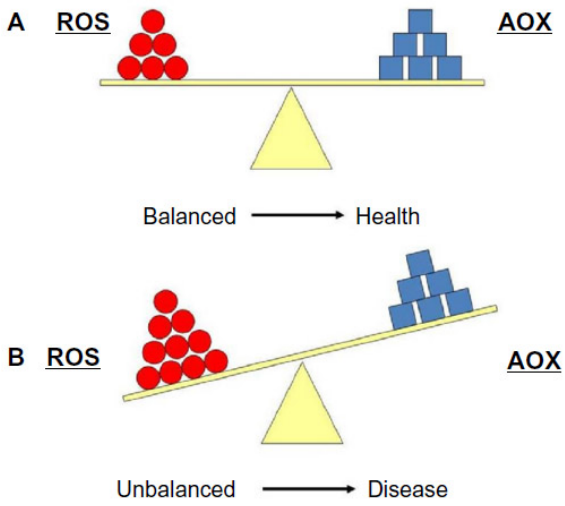
2.2.1 Reaktif oksijen türlerinin vücut dokusuna etkisi.

Serbest radikaller yüksek reaktivitesi nedeniyle, protein, lipit, DNA ve RNA gibi birçok biyolojik molekül için oldukça zararlıdırlar. ROS, proteinlerdeki amino asit yan zincirlerine, nükleik asitlerdeki bazlara ve doymamış yağ asitlerindeki çifte bağlara saldırabilir. Doğal olarak, hücreler, hücre içindeki çeşitli enzimlerin yardımıyla ROS homeostazını önemli ölçüde düşük bir seviyede tutarak ROS hasarına karşı kendilerini savunabilirler. Bununla birlikte, çevresel stres ve çeşitli hücresel fonksiyon bozuklukları nedeniyle, ROS seviyelerinde, vücuttaki hücrelerde önemli hasara neden olan kademeli bir artış vardır. Bu nedenle, iltihaplı hastalıklar, kanser, Alzheimer hastalığı, katarakt, kardiyovasküler hastalıklar, diyabet ve yaşlanma patogenezine önemli ölçüde katkıda bulunurlar **[2, 20]**.

Canlı organizmalar, ROS'un neden olduğu oksidatif hasarları azaltmak veya önlemek için, enzimatik, metal kelatlama ve serbest radikal süpürme faaliyetlerini içeren bir antioksidan savunma sistemi geliştirmişlerdir [**13**].

2.3 OKSİDATİF STRES

ROS/RNS'nin yararlı veya zararlı olacağı, canlı organizmada bulunan antioksidanlarla oranlarına bağlıdır. Düşük veya orta düzeyde, ROS/RNS çeşitli antimikrobiyal etkiler göstermiştir **[14, 15]**. Bununla birlikte, antioksidanlara kıyasla yüksek ROS ve RNS üretimi oksidatif ve nitrosatif strese neden olabilir. ROS ve RNS canlı organizmalarda biriktiğinde, hücreler radikallerin zincir reaksiyonlarını önlemek veya sonlandırmak için endojen antioksidanlar olarak bilinen bileşikler üretir. Böylece hücrelerde dengeli bir redoks durumu korunur. Bununla birlikte, serbest radikallerin miktarı antioksidanlarınkini aştığında, lipitler, proteinler ve DNA gibi hücresel moleküller zarar görür (Şekil 2.2). Bunun diyabet, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, solunum, nörodejeneratif bozukluklar ve hızlı yaşlanma gibi birçok kronik hastalığın temel nedeni olduğu bildirilmiştir.



Şekil 2.2: Reaktif Oksijen Türleri ve Antioksidan Türlerinin konsantrasyonları arasındaki dengenin şekilsel gösterimi, Kaynak: Dovepress[16]

2.4 HİPOKLORÖZ ASİT

Hipokloröz asit (HOCl), genellikle iltihaplanmaların olduğu yerde, heme-peroksidaz ailesi, nötrofil granülositleri, sistemdeki miyeloperoksidazlar (MPO) ile klorür iyonlarının, hidrojen peroksit (H_2O_2) ile in vivo olarak, oluşturduğu güçlü bir oksidan ve radikal olmayan reaktif oksijen türüdür (ROS).

2.4.1 HOCl oluşumu

Hipokloröz asit (HOCl), miyeloperoksidaz (MPO) katalizinde klor ve hidrojen peroksit reaksiyonu ile nötrofiller içinde üretilen güçlü bir oksitleyicidir ***(denklem i)***.

Ticari olarak üretilen sodyum hipoklorit çözeltisi, bir asit çözeltisi veya asidik tampon çözeltisi kullanılarak asitlendirildiğinde hipokloröz asit oluşturabilir ***(denklem ii).***

$$H_2O_2 + Cl_2 \rightarrow 2\ HOCl \qquad \text{i}$$

$$NaOCl + H^+ \rightarrow HOCl + Na^+ \qquad \text{ii}$$

2.4.2 HOCl'in antimikrobiyal etkisi

Enflamasyon meydana geldiğinde, nötrofil granülositleri, seyre karşı koymak için büyük ölçüde ROS olan antimikrobiyal ajanlar salgılar. Enflamasyon sırasında nötrofil granülositleri tarafından üretilen ana ROS olan hipokloröz asit, yüksek oksidan ve klorlama kapasitesi nedeniyle, solunum elektron transferini oksitleyerek zararlı bakteri toksinlerini nötralize eder [**17**]. Bununla birlikte, bu reaksiyonun toksisitesi, konakçı (insan) vücudunda yararlı bakterilerin yok edilmesine yol açar. Aynı zamanda, üretilen HOCl alfa 1-antiproteinazı inaktive edebilir, böylece enflamatuar hastalıklarda sağlıklı insan dokularının proteolitik hasarına neden olabilir [**18**]. Sang ve diğ., [**19**] HOC1'in patojenik mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkisi üzerine yaptığı araştırmada, 20, 40, 80 ppm HOCl'nin, maya, bakteri suşu ve mikobakteri gibi çeşitli bakterileri 1 dakika içinde öldürdüğünü görmüştür. HOCl, ticari olarak kullanılan çeşitli dezenfektanların ana bileşenidir. [**20**] Medilox®, aktif bileşen olarak HOCl içeren yaygın ticari dezenfektanlardan biridir ve çeşitli klinik bakteri izolatlarına karşı antimikrobiyal aktiviteler gösterir. Robson ve diğ. [**21**], esas olarak 3,5 ila 4,0 arasında pH'a sahip HOC1 içeren başka bir ticari ürün olan NVC-101'in etkili bir antimikrobiyal ajan olduğunu göstermiştir.

2.4.3 HOCl'ın diğer zararlı serbest radikallerin oluşumundaki rolü

HOC1 antimikrobiyal ajan olarak çeşitli faydaları olmasına rağmen, biyolojik sistemlerle yüksek reaktivitesi nedeniyle ve sitotoksisiteye neden olan diğer serbest radikaller için bir öncü görevi görebildiğini de belirtmek önemlidir. Bu durum kardiyovasküler hastalıklar, kanser, nörodejeneratif hastalıklar ve bunun gibi vücudun enflamatuar yanıtı ile ilişkili çeşitli hastalıkları tetikler [**22**]

2.4.3.1 HOCl'in •OH Radikal'in oluşumundaki rolü

Long ve diğ. [**23**], •OH'nin HOC1'nin $\bullet O_2^-$ radikali ile reaksiyonu sonucu oluştuğunu ifade etmiştir ***(denklem iii)***.

$$\mathbf{HOCl + {}^{\bullet}O_2^- \rightarrow {}^{\bullet}OH + O_2 + Cl^-} \qquad \textbf{iii}$$

Kozlov ve diğ.'e göre HOCl ayrıca geçiş metalleri ile •OH oluşturmak üzere reaksiyona girer. Sürekli akışlı ESR spektroskopisi kullanılarak, HOC1'in titanyum iyonları (Ti^{3+}) ile reaksiyonu sonucu •OH oluşumu ile Ti^{3+} iyonlarının oksidasyonuna neden olduğu doğrulanmıştır **[24]**. ***(denklem iv)***.

$$\mathbf{Ti^{3+} + HOCl \rightarrow Ti^{4+} + {}^{\bullet}OH + Cl^{-}} \qquad \mathbf{iv}$$

Panasenko [**25**], Candeias ve diğ. [**26**], pH 7,2'de Fe^{2+}'nın HOC1 tarafından Fe^{3+} ve •OH radikalini oluşturmak üzere oksitlendiğini belirtmişlerdir ***(denklem v)***.

$$\mathbf{[Fe\,(CN)_6]^{4-} + HOCl \rightarrow [Fe(CN)_6]^{3-} + {}^{\bullet}OH + Cl^{-}} \qquad \mathbf{v}$$

Ayrıca Sychev ve diğ. [**27**], HOCl'nin Fenton reaksiyonunda H_2O_2 yerine reaksiyona girerek •OH radikali üretebildiğini belirtmişlerdir ***(denklem vi)***.

$$\mathbf{Fe^{2+} + HOCl \rightarrow Fe^{3+} + {}^{\bullet}OH + Cl^{-}} \qquad \mathbf{vi}$$

2.4.3.2 HOCl'ın $^{\bullet}O_2$ oluşumundaki rolü

HOCl, singlet oksijen oluşturmak için H_2O_2 ile reaksiyona girer ***(denklem vii)***.

$$\mathbf{HOCl + H_2O_2 \rightarrow {}^{\bullet}O_2 + Cl^{-} + H^{+} + H_2O} \qquad \mathbf{vii}$$

Kagan ve diğ. [**28**], oluşan singlet oksijenin, lipit peroksidasyonunun başlatılmasına yol açan lipit hidroperoksidaz üretmek üzere doymamış lipit bağları ile reaksiyona girdiğini belirtmişlerdir.

2.4.3.3 HOCl'ın nitrit ile reaksiyonu sonucu NO_3^- oluşturması

$$\mathbf{HOCl + NO_2^{-} \rightarrow Cl^{-} + H^{+} + NO_3^{-}} \qquad \mathbf{viii}$$

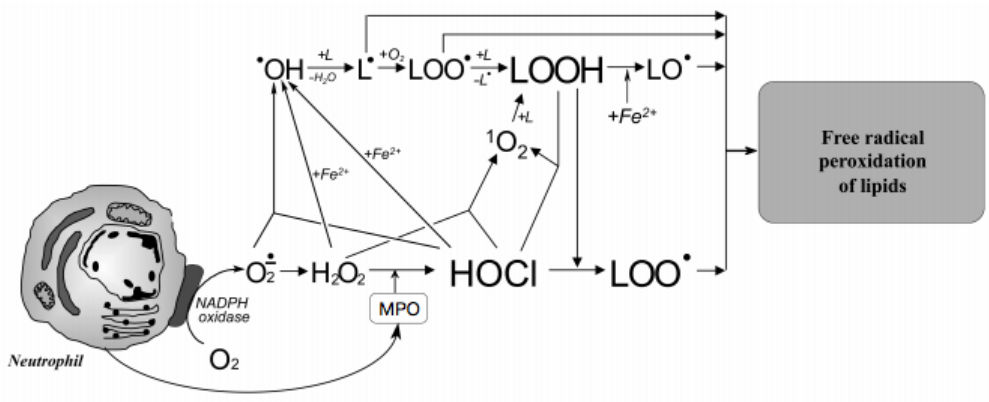
Panasenko ve diğ. [**29**]'e göre HOCl reaksiyon sırasında sadece nitrasyona neden olmakla kalmayıp aynı zamanda radikallere ayrışmasının bir sonucu olarak klorlama etkisine neden olan NO_2CI, nitril klorür oluşumuna da neden olmaktadır ***(denklem ix)***.

$$NO_2Cl \rightarrow {}^{\bullet}NO_2 + Cl^{\bullet} \qquad \text{ix}$$

Pattison [**30**] ve Clark ve diğ. [**31**], HOC1, monokloraminler ve HOCl'nini aşırısı içinde dikloraminler oluşturmak üzere alfa-amino asit gruplarıyla reaksiyona girdiğini bildirmiştir. HOCl serum lipoproteinlerinin lipit fazına nüfuz eder [**32**], lipofilik antioksidanları (karotenoidler, α-tokoferol) [**33**, **34**] yok eder ve böylece lipoprotein lipit fazının lipit peroksidasyonuna (LPO) direncini azaltır. [**35**].

Herhangi bir serbest radikal zincir reaksiyonu gibi, LPO'nun bir başlama aşaması vardır. Doğal radyoliz sonucunda eser miktarda H_2O_2 (yaklaşık 10^{-8} M) oluştuğu bilinmektedir **[36].**

HOCl, reaksiyon (vii)'ye göre H_2O_2 ile reaksiyona girip singlet oksijen oluşturarak [**37**], doymamış lipid bağlarını triplet oksijenden 1500 kat daha hızlı oksitleyebildiğinden hidroperoksitler oluşturarak LPO başlatabilir [**38**]. Bunun dışında, HOCl geçiş metali iyonları, özellikle Fe^{2+} ile reaksiyona girer **[26, 33, 168, 169]**, veya süperoksit anyon radikaliyle ($^{\bullet}O_2^-$) [**23**] [**170**], aşırı reaktif $^{\bullet}OH$ radikalinin oluşumuna neden olabilir. Bunun dışında, HOCl ile indüklenen (reaksiyon 5 veya 2) serbest radikal reaksiyonlarının etkili bir başlatıcısı olarak LPO'nun gelişmesinde rol oynayabilir.



Şekil 2.3: Serbest radikaller tarafından lipit peroksidasyonu (LPO) zincirlerinin başlatılması ve dallanmasında aktif nötrofiller tarafından üretilen HOC1'in katılımı. [39]

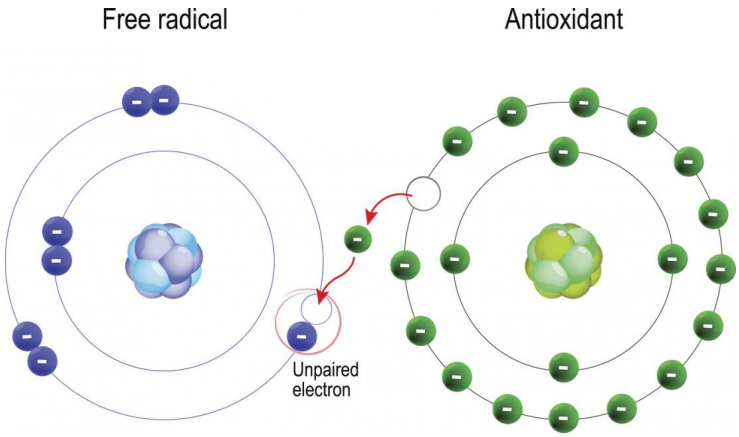
Bu nedenle, HOC1 çalışması, gıdaların, biyolojik sıvıların oksidasyonuna yol açan ve genel olarak oksidatif strese neden olan diğer serbest radikaller için büyük bir öncü olduğundan oldukça önemlidir. Bu, tarım ürünlerinin, gıda maddelerinin, biyolojik sıvının ve vücut

lipitlerinin zarar görmesinin temelini açıklar. Halojen içeren bileşikler içeren myeloperoksidaz (MPO-) ve Eozinofil peroksidaz (EPO)'ya bağlı aktiviteler dokulara ve organlara zarar verir, böylece artrit ve artroz, ateroskleroz, kardiyovasküler hastalıklar, vaskülit, astım fibrozu, akut solunum disfonksiyonu gibi çeşitli hastalıkların gelişimini teşvik eder. vb. [40-43]

2.5 ANTİOKSİDANLAR

Antioksidan, oksitlenebilir bir substrata kıyasla düşük konsantrasyonlarda mevcut olduğunda, bu substratın oksidasyonunu önemli ölçüde geciktiren veya önleyen maddelerdir. [**44**, **45**] [**Şekil 2.4**].

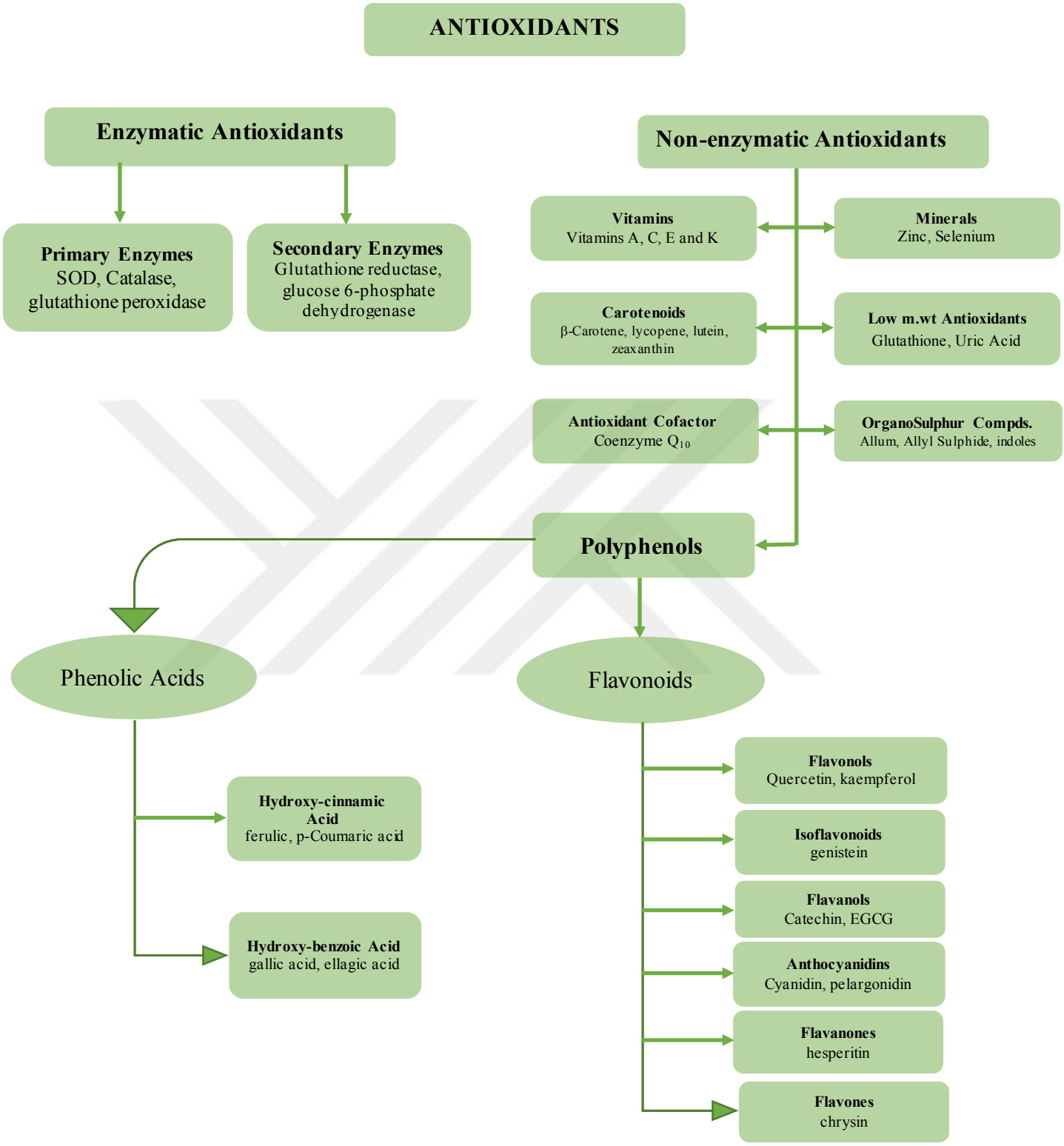
Canlı organizmalarda mevcut olan enzimatik antioksidanlar (örneğin süperoksit dismutaz, askorbat peroksidaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve Glutatyon, Askorbik asit, beta-karoten, ürik asit, alfa-tokoferol, albümin, bilirubin gibi enzimatik olmayan antioksidanların yanında dış kaynaklardan alınan flavonoidler gibi çeşitli polifenolik bileşikler antioksidan özellik göstermektedir [**46**] [**Şekil 2.5**]. Bu antioksidanlar, zararlı ROS'u süpürerek onları daha az zararlı veya tamamen zararsız ürünlere dönüştürürler. Sağlıklı bir yaşam sürmek için, insan vücudunda bulunan toplam antioksidan (enzimatik ve enzimatik olmayan) ve serbest radikallerin miktarında dengeye ihtiyaç vardır. Biyolojik sistemlerde bulunan veya gıdalardan alınan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanların çeşitli reaktif oksijen türlerini (ROS) süpürüldüğü bildirilmiştir. [**46**].



Şekil 2.4: Antioksidan tarafından serbest radikale bir elektronun aktarılması [47]

2.5.1 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar suda veya yağda çözünebilen (sırasıyla hidrofilik veya lipofilik) farklı kimyasal yapılara sahiptir ve bazıları insan vücudunda sentezlenirken bazıları da besinlerle alınır (sırasıyla endojen veya eksojen) **[48]**. Antioksidanlar ayrıca yapılarına ve kaynaklarına göre enzimler ve enzim olmayanlar veya doğal ve sentetik antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. Antioksidan enzimlere örnek olarak süperoksit dismutaz (SOD), Glutatyon peroksidaz (GPx) ve redüktaz, katalaz (CAT) vb. gösterilebilir. Enzimatik olmayan antioksidanlara ise askorbik asit, tokoferoller ve tokotrienoller, karotenoidler, fenolik bileşikler, glutatyon ve lipoik asit gibi besin türevi antioksidanlar ile ferritin, laktoferrin, albümin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcı proteinler örnek olarak verilebilir (**Şekil 2.5**).



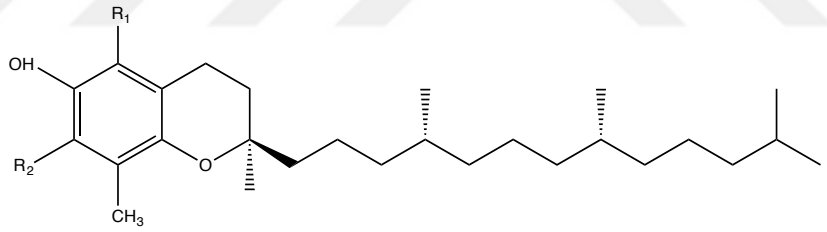
Şekil 2.5: Antioksidanların Sınıflandırılması [46] GSH-px: Glutatyon Peroksidaz, EGCG: Epigallo Kateşin Gallat, SOD = Süperoksit Dismutaz.

2.5.1.1 Doğal Antioksidanlar

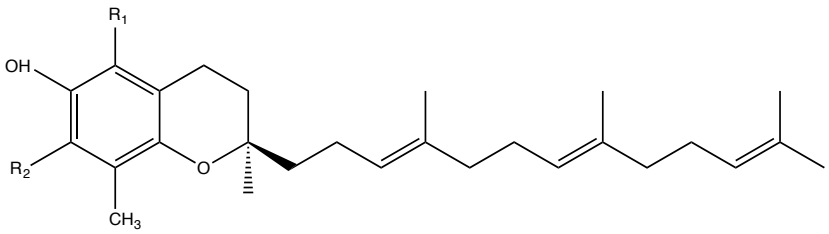
Doğal antioksidanlar, enzimatik ve enzimatik olmayan olarak iki ana gruba ayrılır. Enzimatik olmayan antioksidanlar, antioksidan aktivitelerini, enzimatik reaksiyonlar olmaksızın doğrudan reaksiyona girerek ve serbest radikal zincir reaksiyonlarını kırarak gerçekleştirir. Oksidatif strese karşı önemli birer savunma ajanıdırlar. Diyet kaynaklarından türetilen askorbik ve lipoik asit, polifenoller ve karotenoidler örnek olarak verilebilir.

2.5.1.1.1 E Vitamini

E vitamini ayrıca tokoferoller ve tokotrienoller olarak da adlandırılabilir. Bununla birlikte, hem tokoferollerin hem de tokotrienollerin α-, β-, γ- ve δ- olmak üzere dört izomeri vardır, bunlar sadece kroman halkasındaki metil gruplarının sayısı ve pozisyonlarına göre farklılık gösterir [**49**]. Hepsi antioksidan aktiviteye sahip olsa da, α-tokoferol hem kimyasal hem de biyolojik olarak en aktif olanıdır [**50, 51**]. Canlı organizmalarda bulunan E vitamini en yüksek biyolojik aktiviteye sahip olan α-tokoferoldür. Tokoferoller çoklu doymamış bitkisel yağlardan ve tahıl tohum çimlerinden elde edilebilirken, tokotrienoller palm yağları ve tahıl tohumlarının aleuron ve alueronun alt katmanlarında bulunur.



Tokoferoller



Tokotrienoller

α R_1=R_2=CH_3, β R_1=CH_3, R_2=H;

γ R_1=H, R_2=CH_3; δ R_1=R_2=H

Şekil 2.6: E Vitamininin Yapısı

Yapılan çalışmalar, sıçan karaciğeri mikrozomlarında α-Tokoferole göre α-Tokotrienol'ün 40-60 kat daha fazla antioksidan aktiviteye sahip olduğunu [**52**] ve α-Tokotrienol'ün lipozomal membranlarda, α-Tokoferole kıyasla daha fazla peroksil radikali süpürdüğünü göstermiştir [**53**]

α-tokoferolün antioksidan özelliği, oksijen ile reaksiyonuna dayanmaz. Antioksidan olmamasına rağmen birçok molekül oksijenle reaksiyona girer. Örneğin, β-Karoten oksijenle kolayca reaksiyona girer, ancak yine de güçlü bir antioksidan değildir **[54]**. Antioksidan reaksiyonu, oksijeni değiştirme yeteneğine değil, yağ asidiyle devam eden otoksidasyon radikal zincir reaksiyonuna müdahale etme yeteneğine dayanır. α-Tokoferol, zincir reaksiyonunun birincil ürünleri olan yağ asidi peroksil radikallerine saldırarak lipit peroksidasyon zinciri reaksiyonuna müdahale eder. [**55**]. α-tokoferolü bu kadar güçlü bir antioksidan yapan etmenler;

(i) başka bir reaksiyon başlatmadan önce peroksil radikali ile hızlı reaksiyona girmesi

(ii) radikalleri oksitleyici yağ asidinden uzaklaştırması ve daha fazla radikal reaksiyona girmesini önlemesi;

(iii) antioksidan reaksiyon sırasında oldukça kararlı bir radikal haline gelmesidir.

İdeal olarak, α-tokoferol, kararlı veya radikal olmayan bir ürün oluşturmak için diğer radikallerle (yağ asidi peroksil radikali veya tokoferil radikali gibi) reaksiyona girer. α-tokoferol bilinen en güçlü lipofilik antioksidan olarak kabul edilir [**56**]. Kimyasal bir reaksiyonda 6-OH tokoferolden çıkarıldığında, oluşan ürün tokoferol radikalidir. Tokoferol, tokoferoksil radikalini, C vitamini (askorbat) veya ubikinol gibi redoks aktif reaktiflerle indirgeyerek geri yüklenebilir. [**57-61**] Homojen bir çözelti fazı otoksidasyonunda, tokoferoksil radikali, radikal olmayan ürünler vermek üzere ikinci bir peroksil radikali ile reaksiyona girebilir. Bu ikinci reaksiyon, bir antioksidan olarak bir tokoferolün yok edilmesine yol açar. Böylece, bir α-tokoferol molekülü iki otoksidasyon zincirini sonlandırabilir.

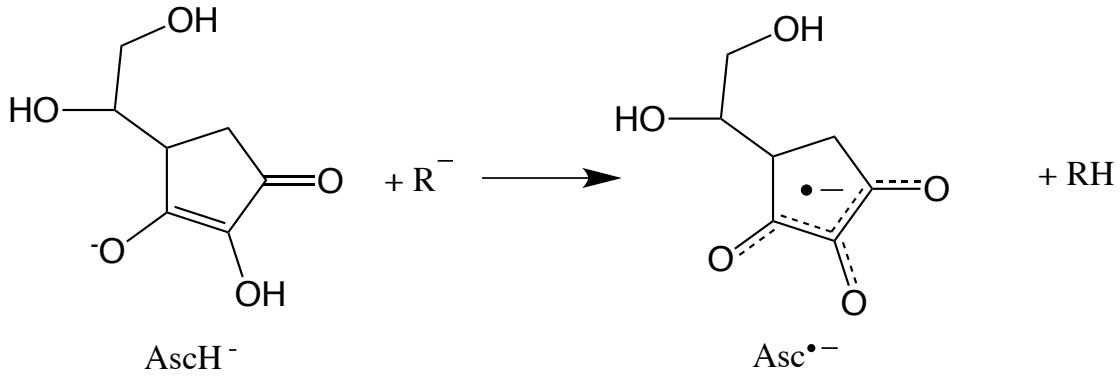
E vitamini kaynağı olan başlıca besinler sebzeler, meyveler, tohumlar ve tohum yağlarıdır. Ayçiçeği tohumları, zeytinyağı ve badem zengin α-tokoferol kaynakları iken, diğer tohumlar ve tohum yağları genellikle α-tokoferolden daha fazla γ-tokoferol içerir, bunun tersi yeşil yapraklar için geçerlidir. β-Tokoferol ve δ-tokoferol en az miktarda bulunur ve bu nedenle genel olarak farklı tokotrienollerdir. [**62**]

2.5.1.1.2 ***C vitamini***

C vitamini (askorbik asit ve askorbat olarak da bilinir), birçok hayvan tarafından glikozdan sentezlenen altı karbonlu bir laktondur. C vitamini suda çözünür bir vitamindir. Diyetle yetersiz C vitamini alındığında iskorbüt hastalığı görülebilir. [**63**]

C vitamini bir elektron vericisidir (indirgeyici ajan veya antioksidan) ve muhtemelen tüm biyokimyasal ve moleküler fonksiyonları bu özelliği ile açıklanabilir. C vitamini 11 enzim için elektron vericisi görevi görür **[64, 65]**. C vitamini, mide suyunda oluşan mutajenik N-nitrozo bileşiklerinin oluşumunu engelleyebilir **[66]**. Yüksek C vitamini alımının gastrik kanser riskini azalttığı düşünülmektedir [**67**] ancak tam bir neden-sonuç ilişkisi kurulamamıştır. C vitamini in vitro düşük yoğunluklu lipoproteinleri oksidasyona karşı korur ve kanda da benzer şekilde işlev görebilir [**68**].

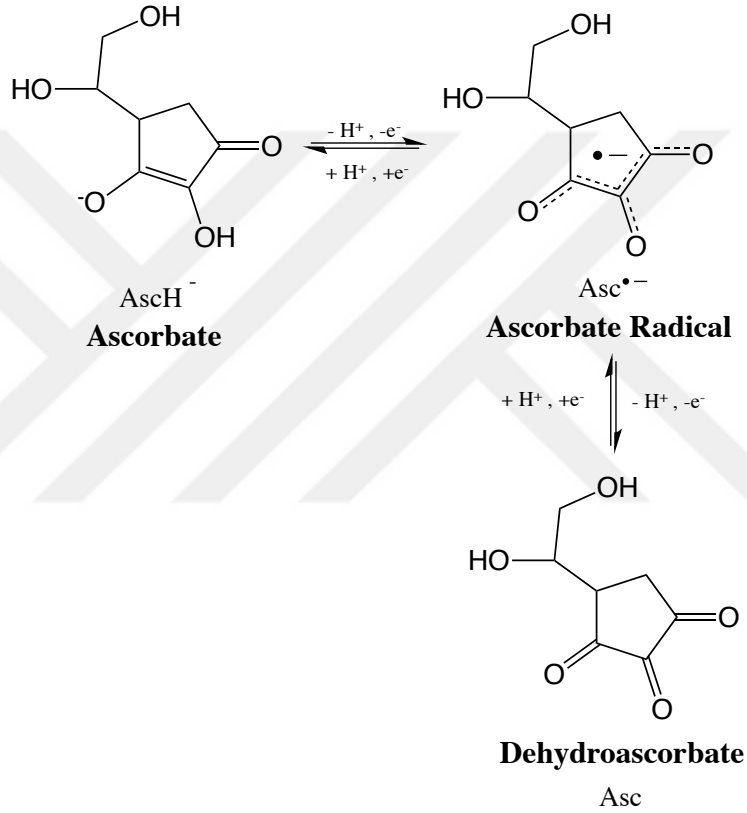
C vitamini cildimize elastik özellikler kazandıran kolajenin üretiminde önemli bir rol oynar. İnsanlar yaşlandıkça, derileri daha düşük seviyelerde kolajen içerir. Bu nedenle çoğu yaşlanma karşıtı krem, bol miktarda C vitamini içerir. C vitamini, esnekliği artırarak cildi genç ve sağlıklı tutar.



Şekil 2.7: Askorbat radikalinin oluşumu.

C vitamini eksikliği sonucu ortaya çıkan hastalıklardan birisi de anemidir. C vitamininin antioksidan özelliği, gıdada ve plazmada folatı stabilize edebilmesinden kaynaklanır [**69**] C vitamini, çözünebilir hem olmayan demirin emilimini kelat oluşumu yoluyla veya demiri indirgenmiş (demir içeren, Fe^{2+}) formda tutarak arttırır [**70, 71**]. Demir emilimini arttırmak için gereken C vitamini miktarı 25 mg ve üzeri olarak değişir ve büyük ölçüde gıdalarda bulunan

fitatlar ve polifenoller gibi inhibitörlerin miktarına bağlıdır [**72**]. Örneğin C vitamini (askorbat, $AscH^-$) serbest radikal molekülüne bir hidrojen atomu verebilir, böylece serbest radikali nötralize eder (askorbik asit, genellikle reaktif radikal türleri söndürmek için kendi hidroksil gruplarından hidrojen atomları vererek antioksidan görevi görür) ve kaybedilen elektron yoğunluğunu telafi etmek için kayıp hidrojenin yerine çift bağlar üretilir. Bununla birlikte, bu durum meydana geldiğinde, C Vitamini molekülünün kendisi oksitlenir ve glutatyon dahil çeşitli enzimler tarafından C Vitamini molekülünün kullanılabilir bir formuna geri indirgenir.



Şekil 2.8: C Vitamini Oksidasyonu

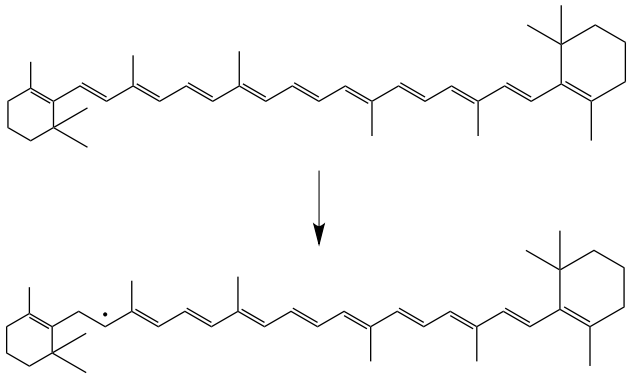
Ancak askorbik asit serbest radikali, rezonans yapısından dolayı çok kararlıdır [**73**]. C vitamini birçok meyve ve sebzede bulunur **[74]**. Narenciye ve meyve suları önemli C vitamini kaynaklarıdır, ancak kavun, kiraz, kivi, mango, papaya, çilek, tangelo, karpuz gibi diğer meyveler de değişken miktarda C vitamini içerir. Lahana, brokoli, Brüksel lahanası, karnabahar, lahana, hardal otu, kırmızı ve yeşil biber, bezelye, domates ve patates gibi sebzeler meyvelerden daha önemli C vitamini kaynağı olabilir.

2.5.1.1.3 **β-Karoten**

Karotenoidler, doğal olarak oluşan yağda çözünen renklendiricilerin yaygın bir grubudur. Karotenoid alımının %80-90'ı meyve ve sebze tüketiminden gelir. Tanımlanmış 700'den fazla doğal olarak oluşan karotenoid'den sadece altısı (β-karoten, β-kriptoksantin, a-karoten, likopen, lutein ve zeaksantin) toplam kan karotenoidlerinin %95'inden fazlasını oluşturur. β-Karoten (BC), sarı-turuncu meyve ve sebzelerde, koyu yeşil yapraklı sebzelerde bol miktarda bulunan doğal olarak oluşan bir karbon-hidrojen karotenoiddir [**75**]. Aynı zamanda gıdalarda en yaygın şekilde bulunan karotenoiddir [**76**]. BC trans (E) 'den cis (Z) izomerizasyonuna maruz kalırken, [**77**] (Tüm-E)- formu işlenmemiş karoten bakımından zengin bitkisel gıdalarda bulunan baskın izomerdir. [**78, 79**]

Beslenme; kardiyovasküler hastalıklar (CVD), kanserler ve dejeneratif beyin hastalıkları gibi birçok kronik hastalığın önlenmesinde önemli bir role sahiptir [**80**]. BC, kimyasal yapısı ve biyolojik membranlarla etkileşimi nedeniyle potansiyel antioksidan özelliğe sahiptir [**82**]. BC esaslı antioksidanların tüketiminin makula dejenerasyonu ve kataraktın önlenmesi için yararlı olduğu belirtilmiştir [**81**]. BC'nin singlet oksijeni a-tokoferolden çok daha yüksek bir verimle sönümlediği bilinmektedir [**83**]. Ek olarak, BC'nin (Z) -izomerlerinin in vitro antioksidan aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. [**84, 85**] BC sentetik formlarda da bulunur ve hurma yağı ve yosun gibi maddelerden ticari olarak elde edilir.

Antioksidanların oksidasyonun önlenmesindeki bir diğer mekanizması da çifte bağ üzerinden bir elektron vermesidir. Çifte bağlardaki elektronlar molekülde daha gevşek tutulduğundan, elektron daha kolay verilir. Genellikle, bu mekanizmayı kullanan antioksidanlar apolardır ve orta uzunlukta hidrokarbon zincirleri içerirler. Bu yöntemi kullanan üç önemli doğal antioksidan, karoten, likopen ve A vitaminidir. Karoten ve likopen, her ikisi de benzer kimyasal yapılara sahip oldukları ve karotenoid molekül ailesinden oldukları için çok benzer antioksidan aktivite mekanizmalarına sahiptirler.



Şekil 2.9: Çifte bağdan bir elektron verilmesi ile karotenin oksidasyonu

2.5.1.1.4 Polifenolik Bileşikler

Polifenoller, iki veya daha fazla fenol grubuna sahip bileşiklerdir. Genellikle bitkilerde bulunan ve en önemli doğal antioksidan grubunu oluşturan bu bileşikler, insan yaşamı için gerekli olan biyoaktif maddelerdir. Gıdalardan elde edilen fenolikler üç farklı gruba ayrılır; flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler. Bu moleküller bitkilerin sekonder metabolitleridir ve genellikle çevresel stres koşullarına karşı savunma görevi görürler.

Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Çok fonksiyonlu bileşikler olan bitki polifenolleri, indirgeyici ajan, hidrojen atomu verici antioksidan ve singlet oksijen tutucu olarak işlev görür. Bazıları ayrıca metal iyonu kelatlama özelliğine sahiptir [**86**]. Bununla birlikte, bir polifenolün antioksidan olarak tanımlanması için, iki temel koşulu sağlaması gerekir:

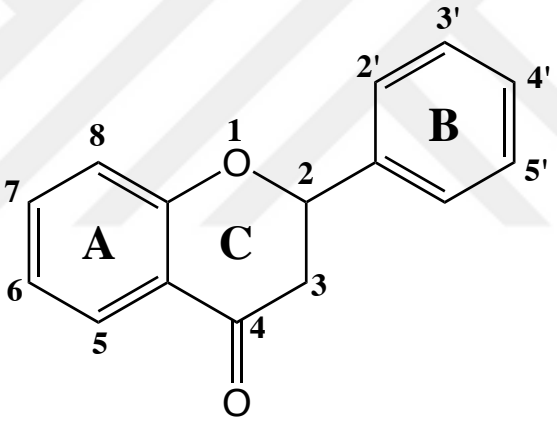
- Oksitlenebilir substratlara kıyasla daha düşük konsantrasyonda mevcut olduklarında, serbest radikallerin neden olduğu otoksidasyonu veya oksidasyonu önleyebilmesi veya geciktirebilmesi [**87**]

- Süpürme işleminin sonunda oluşan radikalin, oksidasyon zinciri reaksiyonunu kırmak için kararlı olması [**88**]

Flavonoidler

Flavonoidler, düşük molekül ağırlıklı, önemli antioksidan ve kelatlayıcı özelliklere sahip olan en büyük bitki fenolikleri sınıfını oluştururlar. Bunlar, 6-karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşiklerdir ve hetero halkanın oksidasyon derecesine göre farklılık

gösterirler. A ve B aromatik halka, C ise hetero halkadır. **Şekil 2.10'da** gösterildiği gibi, C halkasındaki karbon atomları oksijenden başlayarak numaralandırılırken, B halkasındaki karbon atomları primer (') sayılarla gösterilir. -OH (Hidroksil) grubu bağlarının farklı pozisyonlarına dayanarak oluşturulan 6000'den fazla flavonoid türü vardır ve doğal olarak yapraklarda, çiçeklerde ve bitki köklerinde bulunur [**89**]. Sebze, meyve, tıbbi ve aromatik bitkiler, kırmızı şarap, kakao ve çaylarda yüksek miktarlarda bulunurlar. Yüksek antioksidan aktivitelerinin nedeni olarak kabul edilen aromatik halkalara bağlı birçok fenolik hidroksil grubu içerirler. Ayrıca metal kelatlama, lipit peroksidasyon inhibisyonu ve diğer reaktif oksijen türlerinin aktivitelerinin önlenmesi gibi özelliklere de sahiptir. Gıdalarda genellikle 3-orto glikozitler ve polimerler şeklinde bulunurlar. Bu gruptaki bileşikler, yapılarına bağlanan grupların tipine, pozisyonuna ve sayısına bağlı olarak farklı radikal süpürme ve kelatlama aktivitesine sahiptir [**90]**.



Şekil 2.10: Flavonoidlerin Temel Kimyasal Yapısı

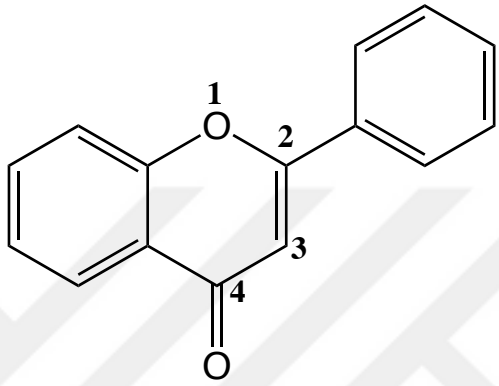
Flavonoidler yapılarındaki farka bağlı olarak iki gruba ayrılabilir; **Şekil 2.10** [**91]**

- Antosiyaninler ve antosiyanidinler
- Antoksantin

Antoksantinler renksiz, beyaz veya sarımsı renkte olabilir ve ayrıca beş farklı grupta sınıflandırılır; flavonoller, flavanoller, flavonlar, flavanonlar ve izoflavonlar

Flavonlar

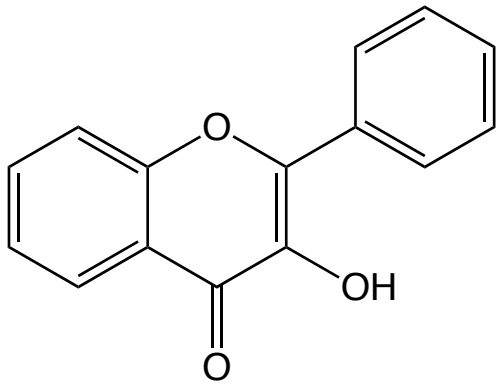
Şekil 2.11'de gösterildiği gibi, flavonlar, C-2 ve C-3 atomları arasında karakteristik çift bağa sahiptir. Genellikle bitkilerin aglikonları veya glikozit bölgelerinde bulunurlar. Bu grubun en önemli temsilcileri krisin, apigenin ve luteolin'dir. Krisin bal'da, çarkıfelek çiçekleri ve meyve kabuklarında bulunurken, acı biber en yaygın luteolin kaynağıdır, apigenin ise maydanoz, kereviz ve papatya çayında bulunur.



Şekil 2.11: Flavonların temel kimyasal yapısı

Flavonoller

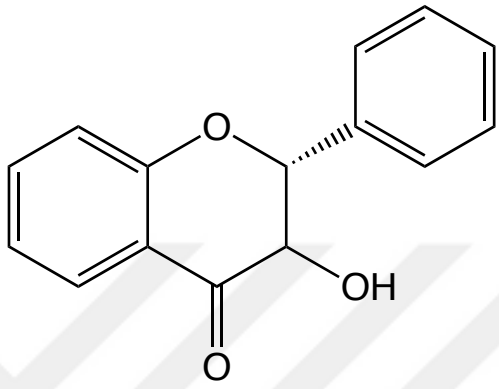
2-fenil benzopiran halkasının C-3 konumunda bir hidroksil grubunun varlığı, bazen hidroksiflavonlar olarak adlandırılan flavonollerin temel kimyasal yapısını oluşturur. Bitkilerde türevleri, metoksi ve hidroksil gruplarının farklı konumlanmasıyla oluşur. Bu grup kuersetin, mirisetin, fisetin ve kaempferol ile temsil edilir. Kırmızı soğan, elma, lahana kayda değer miktarda kuersetin içerir. Kaempferol domates, yeşil çay, patates, üzüm vb.'de Mirisetin çilek, fındık, çay ve kırmızı şarapta bulunur.



Şekil 2.12: Flavonollerin temel kimyasal yapısı

Flavanonlar

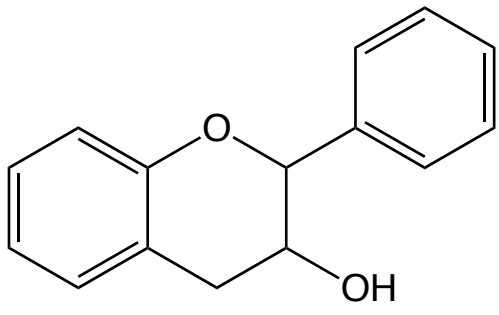
Flavonlar ve flavanonlar arasındaki tek fark, C halkasında çift bağ bulunmamasıdır. [**Şekil 2.13**] Bu grup en çok Hesperitin, Naringenin, Eriodiktiol ve homoeriodiktiol ile temsil edilir. Hesperitin çoğunlukla tatlı portakal ve limonlarda bulunur, naringenin greyfurttaki ana flavanondur ve diğer meyve ve bitkilerde de bulunabilir [**86**].



Şekil 2.13: Flavanonların temel kimyasal yapısı

Flavanoller

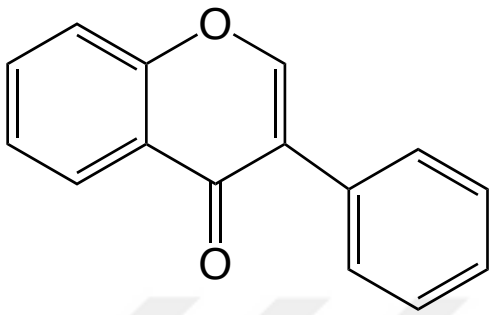
C-Halkası üzerindeki 4. karbon (C-4) atomundaki oksijen -CH_2 grubu ile değiştirildiğinde bir flavanol oluşur. Bu gruptaki en önemli bileşikler kateşin, epikateşin, gallat ve bunların kombinasyonlarından oluşur. [**Şekil 2.14**] Yeşil çay, siyah çay, şeftali ve elmada önemli miktarda bulunurlar. Ayrıca, kırmızı ve beyaz şarapta kayda değer miktarda bulunurlar. [**91**].



Şekil 2.14: Flavanollerin temel kimyasal yapısı

Izoflavonlar

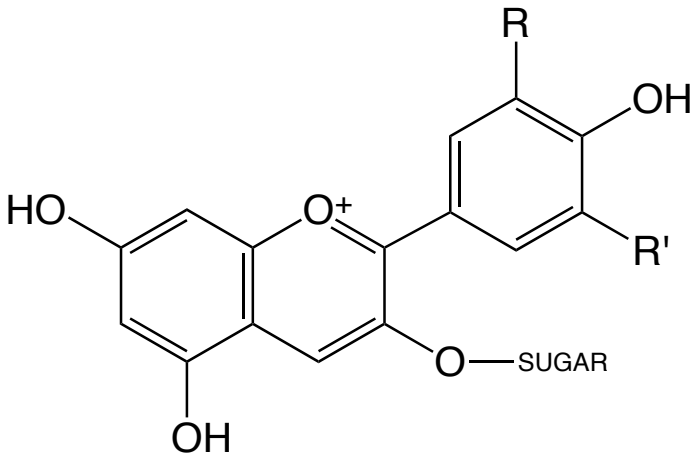
İzoflavonlar, aromatik B-halkasının, C-halkasının üçüncü karbon atomuna bağlanmasıyla oluşur ve flavonların bir izomeri olarak adlandırılır. Bu grubun en yaygın temsilcileri soya fasulyesinde ve diğer baklagillerde bulunan, Daidzein, Genistein ve Glisitindir [**86**]



Şekil 2.15: İzoflavonların temel kimyasal yapısı

Antosiyaninler

Antosiyaninler flavanollere şeker bağlanmasıyla oluşurlar. Flavanollerin B halkasına -OH grubu eklenir ve daha sonra şeker türüne veya bağlanma pozisyonuna göre adlandırılır. Yapılarında şeker bulundurmayanlar *antosiyanidinler* olarak bilinir. Bu bileşikler suda çözünür pigmentlerin en büyük sınıfını oluşturur ve meyvelerdeki kırmızı, pembe ve mor renkten sorumludur. Renkleri pH'ın bir fonksiyonu olarak değişir ve çoğunlukla Siyandin, Malvidin, delfinidin ve peonidin ile temsil edilir [**92**].



Şekil 2.16: Antosiyaninlerin temel yapısal gösterimi

Tablo 2.1: Polifenolik bileşiklerin sınıflandırılması

Sınıf	Adı	Süpstitüsyon Modelleri	Gıda Kaynakları
Flavon	Apigenin	5,7,4’-OH	Maydonoz, kereviz sapı
	Rutin	5,7,3’,4’-OH, 3-rutinoz	K. Şarap, domates
	Luteolin	5,7,3’,4’-OH	kabuğu, turunçgiller
			Kırmızı biber
Flavonol	Kaempferol	3,5,7,4’-OH	Brokoli, greyfurt, çay
	Quercetin	3,5,7,3’,4’-OH	Soğan, brokoli, domates,
	Mirisetin	3,5,7,3’,4’,5’-OH	çay, k. Şarap, elma
	Morin	3,5,7,3’,4’,5’-OH	Üzüm, böğürtlen, K.
			Şarap
Flavanon	Naringin	5,4’-OH,	Turunçgiller, greyfurt
	Naringenin	7-ramnoglukoz 5,7,4’-	Turunçgiller
	Hesperidin	OH	Portakal
	Hesperetin	3,5,3’-OH,	Portakal
		4’-OMe,	
		7-rutinoz 3,5,3’-OH,	
		4’-OMe	
Izoflavonler	Genistin	5,4’-OH,7-glukoz 5,7,4’-	Soya fasulyesi Soya
	Genistein	OH 4’-OH, 7-glukoz	fasulyesi Soya fasulyesi
	Daidzin	7,4’-OH	Soya fasulyesi
	Daidzein		
Anthocyanidin	Apigenidin	5,7,4’-OH 3,5,7,3’,4’-	Renkli meyveler ViĢne,
	Siyanidin	OH 3,5,7,4’-OH, 3’, 5’-	çilek Kırmızı üzüm,
	Malvidin	OMe	wines.

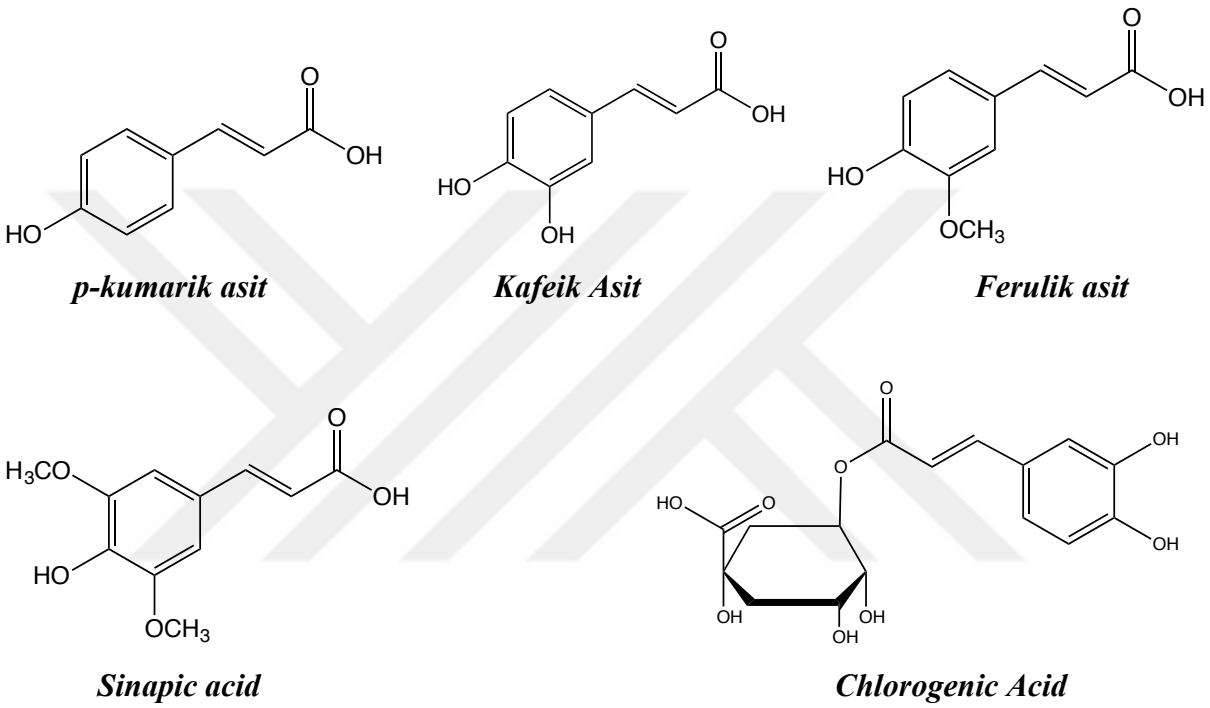
2.5.1.1.5 **Fenolik Asitler**

Bitkilerde bol bulunan fenolik asitler yapısal özelliklerine göre hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik asitler olarak iki başlık altında değerlendirilir. Hidroksisinnamik asitler gıdalarda en sık bulunan türdür [**93**].

Hidroksisinnamik asitler

Hidroksisinnamik asitler fenil-propanoid türevleridir ve genellikle bitkisel gıdalarda bulunur [**94**]. Hidroksisinnamik asitler, bitkilerin fenolik metabolizmasında merkezi bir rol oynayan ve fenilalaninin biyosentetik türevleri olan fenolik bileşiklerdir. Bu bileşikler aynı zamanda flavonoidlerin öncüsüdür ve bitkilerdeki hücre duvarı yapısına dahil edilir [**95**]. Genel olarak, fenolik asitler bitkilerde esterleri halinde veya şekerler, organik asitler veya yağlarla birleşmiş

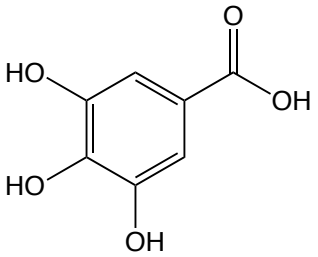
halde bulunur [**96**]. Hidroksisinnamik asitler trans pozisyonunda daha kararlıdır. Bununla birlikte, UV ışınlarına maruz kaldıklarında, trans izomerden cis izomerine dönüştürülürler [**97, 98**] Bu bileşikler meyve, sebze, çiçekler, kabuklu yemişler, tohumlar ve şarap, çay, kahve ve zeytinyağı gibi bitkisel kaynaklı ürünlerde bulunur [**93**, **99**]. Kafeik asidin kinik asit esteri olan klorojenik asit, kafeik asit ve *p*-kumarik asit, elma, armut, üzüm ve erik gibi meyvelerde ve adaçayı, nane ve kekik gibi bitkilerde bulunan en yaygın hidroksisinnamik asitlerdir. [**93**].



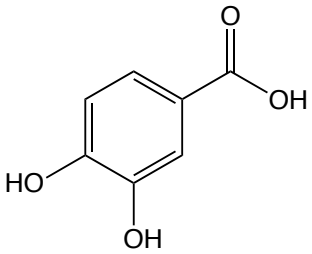
Şekil 2.17: Hidroksisinnamik asitlerin kimyasal yapıları

Hidroksibenzoik asit

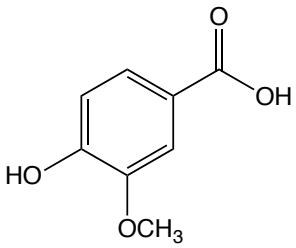
Hidroksibenzoik asitler doğrudan benzoik asitten türetilir ve yapılarına dahil edilen hidroksi ve metoksi gruplarının sayısı ve yerine göre farklandırılır. Gallik asit, vanilik asit, siringik asit ve protokatekuik asit en yaygın hidroksibenzoik asitlerdir. En etkili hidroksil radikal süpürücüleri monohidroksibenzoatlardır [**86**].



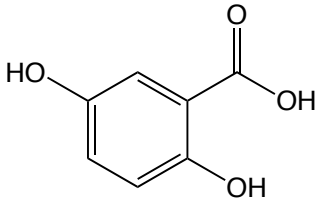
Gallik asit



Protokatekuik Asit



Vanilik Asit



Gentisik Asit

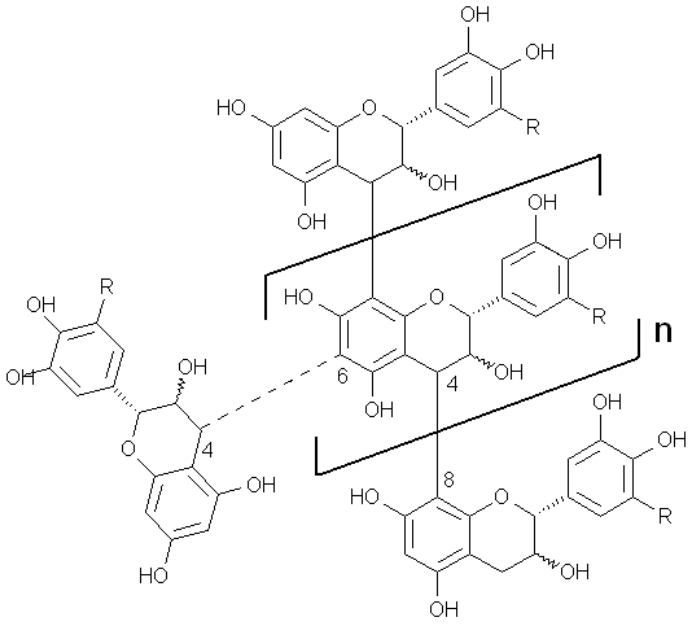
Şekil 2.18: Hidroksibenzoik asitlerin kimyasal yapıları

Fenolik Polimerler (Tanenler)

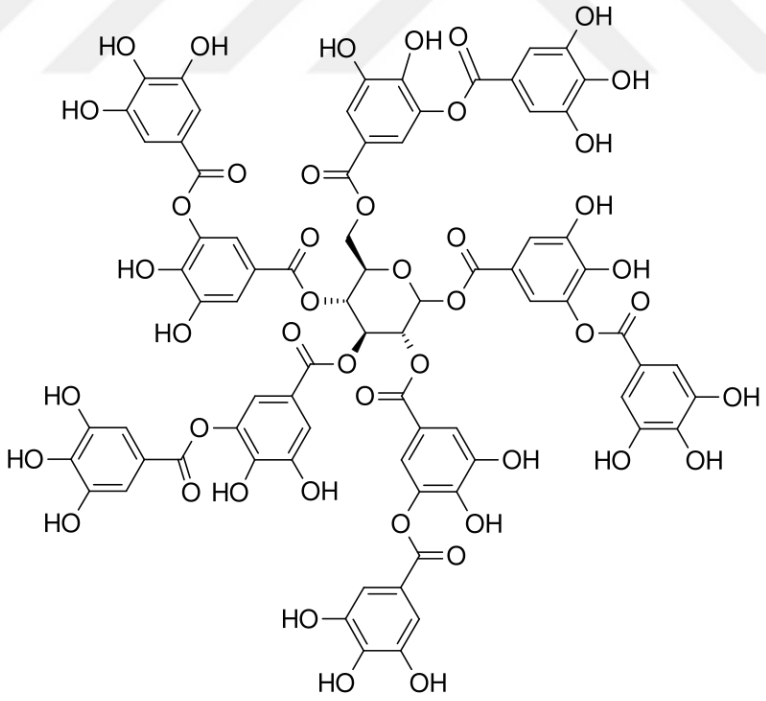
Tanenler suda çözünür, yüksek moleküler ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir. Fenolik polimerler kondanse ve hidroliz olabilen tanenler olarak iki gruba ayrılır.

Kondanse tanenler (Proantosiyanidinler) **Şekil 2.19**, oluştukları bileşiğe bağlı olarak, prosiyanidin (epikateşin ve kateşinden oluşur) ve prodelfinidin (kateşin ve gallokateşinden oluşur) isimlerini alırlar. Gıda tanenleri kateşin ve epikateşin polimerleridir ve acı tadı olan koyu renkli bileşiklerdir.

Hidroliz olabilen tanenler çekirdek olarak d-glikoz içeren moleküllerdir. Bu poliollerin hidroksi grupları, kısmen veya tamamen gallik asit (gallo tanenler) ve elagik asit (elagitanninler) gibi fenolik gruplarla esterleşir (**Şekil 2.20**).



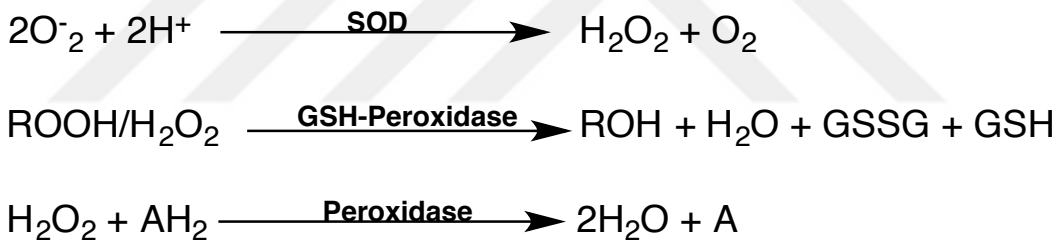
Şekil 2.19: Yoğunlaştırılmış Tanenlerin kimyasal yapısı


HO
OH
HO
O
OH
OH
OH
HO
OH
O
O
O

2.5.1.2 Enzimatik antioksidanlar

Antioksidan enzimler, serbest radikalleri hücresel bileşenlere saldırmadan önce stabilize edebilir veya deaktive edebilir. Ek olarak, serbest radikallerin neden olduğu hasarı en aza indirmek için oksitleyici zincir reaksiyonunu da kırabilirler. Serbest radikallere maruziyeti azaltarak ve antioksidan enzim yönünden zengin gıdaların veya antioksidan enzim takviyelerinin alımını artırarak, vücudumuzun serbest radikal ile ilgili sağlık problemleri riski azaltılabilir [**100**]. Bu nedenle antioksidan enzimler, optimum hücresel ve sistemik sağlığı korumak için kesinlikle önemlidir.

Bazı antioksidanları yeniden oluşturabilen onarım enzimleri SOD, GPx, glutatyon redüktaz (GR), CAT ve diğer metaloenzimlerdir. SOD, CAT ve GPx, ROS'a karşı karşılıklı olarak destekleyici bir savunma sistemi oluşturur. SOD, O_2^-'i kararlı hale getirirken katalaz ve peroksidazlar da H_2O_2 için aynı şeyi yapar.



Denklem x :Enzimatik antioksidanın etki mekanizması.

Antioksidan enzimler -GPx, hem peroksidaz, CAT ve SOD- oksidatif toksik ara maddeleri metabolize eder ve optimum katalitik aktivite için selenyum, demir, bakır, çinko ve manganez gibi mikro besin kofaktörleri gerektirir [**102**].

Antioksidan enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx), serbest radikallerin yok edilmesinde birincil savunma hattıdır. Glutatyon vücutta birkaç rol oynar, örneğin C vitamininin etkinliğini arttırır. SOD önce hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijen (O_2) oluşturmak için radikal süperoksidi (O_2^-) (bir elektron ekleyerek) indirger. Katalaz ve GPx, hidrojen peroksidi indirgemek ve sonuçta su (H_2O) açığa çıkarmak için protein glutatyonu ile aynı anda çalışır. Yükseltgenmiş glutatyon daha sonra başka bir antioksidan enzim glutatyon redüktaz tarafından indirgenir. Birlikte, oksitlenmiş DNA'yı onarır,

oksitlenmiş proteini bozundurur ve oksitlenmiş lipidleri (hücre zarlarının bir bileşeni olan yağ benzeri maddeler) yok ederler. Diğer bazı enzimler daha fazla hasardan korunmak için ikincil bir antioksidan savunma mekanizması görevi görür. [**102**]

SOD

SOD, yüksek derecede reaktif süperoksit anyonunun O_2'ye ve daha az reaktif H_2O_2 türlerine olan dismutasyonunu katalize eden antioksidan enzimdir. Peroksit CAT veya GPx reaksiyonları ile yok edilebilir [**103**-**105**]. İnsanlarda üç SOD formu vardır, sitosolik Cu / Zn-SOD, mitokondriyal Mn-SOD ve hücre dışı SOD (ECSOD) [**106**, **107**]. SOD, Ping Pong tipi bir mekanizmada aktif bölgede geçiş metal iyonunun art arda oksidasyonu ve indirgenmesiyle $O_2^{\bullet-}$'yi yok eder [**108**]. Bütün SOD tipleri azid ve florür gibi tek yüklü anyonları bağlar, ancak Fe, Mn veya Cu / Zn-SOD'ların duyarlılıklarında belirgin farklılıklar kaydedilmiştir. Cu / Zn-SOD, N^{3-}, CN^-, [**109**] ve F^- tarafından rekabetçi bir şekilde inhibe edilir [**110**].

SOD cildimizde bulunur ve vücudumuzun fibroblast adı verilen yeterli miktarda cilt inşa hücresi üretmesi önemlidir. SOD'un yaygın doğal kaynakları arasında lahana, Brüksel lahanası, buğday, arpa ve brokoli bulunur.

CAT

Katalaz (CAT), hidrojen peroksitin degradasyonundan sorumlu bir enzimdir. Neredeyse tüm hayvan hücrelerinde bulunan koruyucu bir enzimdir. İnsan eritrosit katalazının fonksiyonları arasında H_2O_2'nin su ve oksijene dekompozisyonunun katalizlenmesi bulunur. Polipeptit zincirinin bir tetrameridir. Kimyasal antioksidanlarda olduğu gibi, hücreler etkileşimli bir antioksidan enzim ağı ile oksidatif strese karşı korunur [**111**].

GPx

Glutatyon peroksidaz (GPx), hücreleri hidrojen ve lipit peroksitler gibi serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan korumaktan sorumlu bir enzimdir. GPx, dört özdeş alt birimin her birinde, enzim aktivitesi için gerekli olan tek bir selenosistein (Sec) kalıntısı içerir [**112**].

Memelilerde beş GPx izoenzimi bulunur. Bu nedenle glutatyon peroksidazın işlevi, lipit hidroperoksitlerini karşılık gelen alkollere indirgemek ve serbest H_2O_2'yi suya dönüştürmektir. Vücuttaki GPx seviyeleri, ana antioksidan olan glutatyon ile yakından ilişkilidir. Glutatyon bir (kısaca GSH), hücreleri sadece kirliliğin kötü etkilerine karşı korumakla kalmayan bir tripeptittir; aynı zamanda vücudun bağışıklık sistemini güçlendirici görev görür. Hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunur ve serbest radikallerin oksidasyonuyla zarar görmeleri durumunda, bunların indirgenmiş durumda tutulmasında önemli bir rol oynar.

Glutatyon, C ve E vitamini, selenyum ve glutatyon peroksidaz gibi bazı antioksidanların kombinasyonu, vücudun serbest radikallere karşı savaşmasına yardımcı olma konusunda çok güçlüdür. GSH, kırmızı kan hücrelerinin bozulmadan kalmasını ve beyaz kan hücrelerinin (bağışıklıktan sorumlu olan) korumasını sağlar. Glutatyon sebze ve meyvelerde bulunur, ancak pişirildiğinde etkinliği önemli ölçüde azalır.

Glutatyon-S-transferaz (GST), hem endojen hem de ksenobiyotik olan çok sayıda substrat ile çoklu reaksiyonlar verebilen bir sitosolik, mitokondriyal ve mikrozomal proteinlerin listesini içeren bir enzim ailesidir. GST'ler, sulu hücresel ve ekstra hücresel ortamlarda ve oradan vücuttan çözünmeyi kolaylaştırmak için bu bileşikleri indirgenmiş glutatyon ile konjuge ederek ksenobiyotiklerin faz II biyotransformasyonuna katkıda bulunur. GST'ler, indirgenmiş glutatyonun sülfhidril grubu yoluyla, çok çeşitli substratlar üzerindeki elektrofilik merkezlere konjügasyonunu katalize eder. Bu aktivite peroksidize lipitler gibi endojen bileşiklerin detoksifikasyonunda ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında faydalıdır.

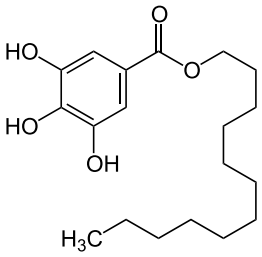
Glutatyon redüktaz (GR), hücre içi glutatyon (GSH) seviyelerinin korunmasına yardımcı olarak hücre içindeki oksidatif hasarın önlenmesinde dolaylı fakat önemli bir rol oynar. GSH, glutatyon peroksidaz (GP) enzimi ile birlikte, hücresel hidrojen peroksit seviyelerini en aza indirmekten sorumlu etkili indirgeyicidir. GSH'nin yenilenmesi GR tarafından katalizlenir. GR, hidrojen donörü olarak β-nikotinamid dinükleotid fosfat (NADPH) kullanarak yükseltgennmiş glutatyonun (GSSG) indirgenmiş glutatyona indirgenmesini katalize eder. NADPH gibi moleküller, çeşitli enzimatik işlemlerde hidrit donörleri olarak işlev görür. NADPH'nin, GSSG'nin GSH'ye yeniden indirgenmesindeki rolü ve böylece glutatyonun antioksidatif gücünü muhafaza etmesi nedeniyle dolaylı olarak çalışan bir antioksidan olarak hareket ettiği ileri sürülmüştür.

Doğal antioksidan kaynakları

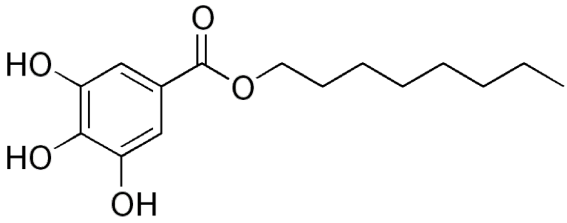
İnsan vücudunda üretilmeyen antioksidanların çoğu bitkisel ya da hayvansal kaynaklı gıdalar yoluyla alınır. C ve E vitaminleri, β-karoten ve koenzim Q, gıdalar yoluyla alınan en yaygın antioksidanlarıdır, bunlardan E vitamini bitkisel yağlarda ve buğday tohumu içinde bol miktarda bulunur. Yağda çözünen vitaminler, bağırsakta emilir ve plazmada lipoproteinler tarafından taşınır. E vitamininin 8 doğal izomerik formu arasında, **α**-tokoferol en yaygın ve güçlü formudur. Yağda çözünür olan E vitamini, plazma zarının lipit peroksidasyonunu etkili bir şekilde önleyebilir [**114**, **115**].

Bitkiler (meyveler, sebzeler, şifalı otlar) fenolik bileşikler (fenolik asitler, flavonoidler, kinonlar, kumarinler, lignanlar, stilbenler, tanenler vb.), Azot bileşikleri (alkaloidler, aminler, betalainler vb.), vitaminler, terpenoidler (karotenoidler dahil) ve antioksidan aktivite bakımından zengin diğer endojen metabolitler gibi çeşitli serbest radikal süpürücü moleküller içerebilir. [**116-119**]

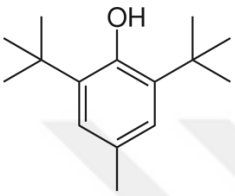
Sentetik antioksidanlar, doğada bulunmayan ve lipit oksidasyonunu önlemeye yardımcı olmak için koruyucu olarak gıdalara eklenen kimyasal olarak sentezlenmiş bileşiklerdir. Doğal antioksidanların kararsızlığı nedeniyle, katı ve sıvı yağları stabilize etmek için çeşitli sentetik antioksidanlar kullanılmıştır. Butillenmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA), asıl olarak petrolü yapışkan formdaki oksidanlardan korumak için geliştirilmiştir [**120**]. Bununla birlikte, bu bileşikler 1954'ten beri gıdalarda antioksidan olarak kullanılmaktadır. [**121**] BHT ve BHA sadece benzer isimlere değil, benzer yapılara ve antioksidan aktiviteye sahiptir ve genellikle katı ve sıvı yağlarda birlikte kullanılır. Her ne kadar BHT ve BHA "genel olarak güvenli kabul edilen" maddeler listesine dahil edilse de bazı kronik toksisite çalışmaları, BHT'nin yüksek seviyelerde tüketildiğinde tümör gelişimini hızlandırıcı etkileri olduğu göstermiştir [**122**, **123**]. Aksine, BHA ve BHT'nin her ikisi de muhtemelen antioksidan işlevleri yoluyla önemli karsinogenez inhibitörleri olabilir [**124**]. Bu nedenle, bu antioksidanları uzaklaştırmak için bazı girişimler olmuştur, TBHQ (tert-butilhidroksikinon), yem endüstrisinde yaygın olarak kullanılan bir başka sentetik antioksidandır. BHT ve BHA gibi, TBHQ da bir benzen halkasına veya fenol yapısına sahiptir. Sentetik antioksidanların diğer örnekleri propil gallat (PG), dodesil gallat (DG), oktilgallat (OG) ve etilen diaminetetraasetik asittir (EDTA).



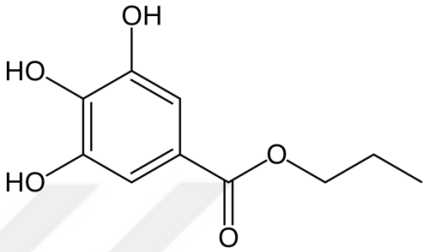
Dodesil gallat



Oktil Galat



Butillenmiş hidroksitoluen



Propil Gallat

Şekil 2.21: Bazı sentetik antioksidanların yapıları

2.5.2 Toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri.

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri reaksiyon mekanizmalarına göre iki ana gruba ayrılabilir. Birinci grup elektron transferine (ET), diğeri hidrojen atom transferine (HAT) dayanmaktadır. Bu iki mekanizma, serbest radikalleri etkisiz hale getirmekle aynı hedefe yönelik olsa da, ilgili ikincil reaksiyonlar ve kinetikler farklıdır.

ET mekanizmasında bir serbest radikal türünü stabilize etmek için bir elektron transfer edilerek radikal etkisiz hale getirilir. Elektron transfer mekanizması, genellikle oksidanın bir antioksidan tarafından indirgenmesiyle renkte meydana gelen değişimle tanımlanır [**126**].

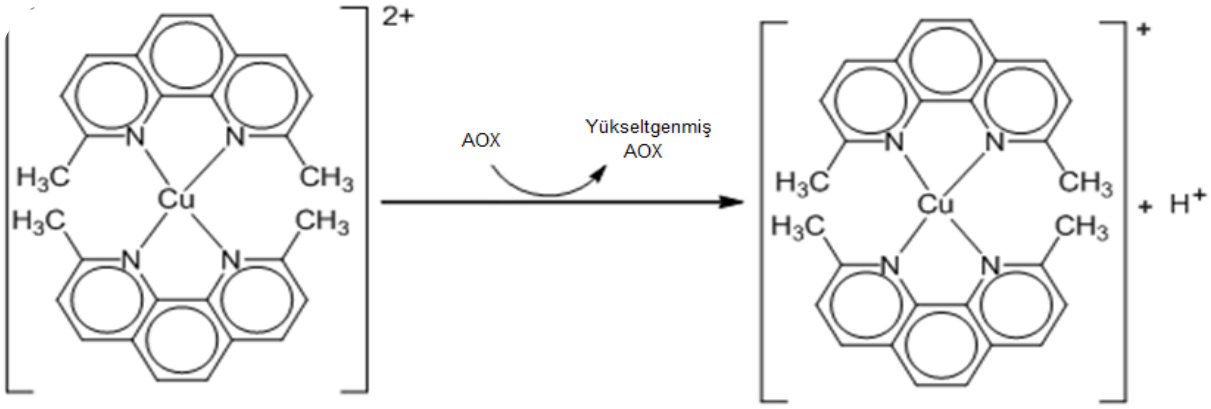
İkinci grup olan HAT esaslı yöntemler ise, antioksidanın bir hidrojen atomu vererek serbest radikal türünü etkisiz hale getirme yeteneğine dayanmaktadır. HAT mekanizması hızlı olup çözücü ve pH'ın doğasından bağımsızdır. Bununla birlikte, reaksiyon ortamındaki diğer indirgeyici ajanların varlığı, incelenen antioksidan ile birleştiğinde, HAT testini zorlaştırır ve önemli hatalara yol açabilir [**127**].

Yöntem	Reaksiyon Mekanizması	Özellikleri	Kaynaklar
Toplam radikal tutucu antioksidan parametre (TRAP)	HAT	Tuzak deneyi, suda çözünür ROO· üreterek lipit peroksidasyonunun başlatılmasını içerir ve bilinen tüm zincir kırıcı antioksidanlara duyarlıdır.	[142]
Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi testi (TOSCA)	HAT	Bu, α-keto-γ-methiyolbutirik asidin (KMBA) ROS tarafından inhibisyonunu değerlendirir. Antioksidan aktivite, head space gaz kromatografisi (HS-GC) ile izlenen bir kontrol reaksiyonuna göre KMBA'nın ayrışması sırasında oluşan etilen konsantrasyonu ile ölçülür.	[143]
Oksijen radikal antioksidan kapasite (ORAC)	HAT	ORAC deneyi, AAPH gibi azo bileşiklerinin termal ayrışması ile başlatılan peroksil radikalinin neden olduğu oksidasyonun inhibisyonuna dayanır.	[144]
Crocin beyazlatma deneyleri (CBAs)	HAT	CBA, hidrojen atomlarının soyutlanmasına ve / veya krosinin polien yapısına radikal eklenmesine dayanır ve krosin ağartılmasından sorumlu konjüge sistemin bozulmasına neden olur.	[145]
2,2-difenil-1-pikrilhidrasil radikalinin (DPPH·) inhibisyonu	ET or HAT	Antioksidanların DPPH'ye karşı temizleme kapasitesinin ölçülmesine dayanan kolorimetrik yöntem *	[146]
2,2 '- azino-bis- (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) ($ABTS^{\cdot+}$) katyon radikali'nin inhibisyonu	ET or HAT	$ABTS^{*+}$ 'nın çürümesini bir antioksidan ajan varlığında değerlendirmek için kolorimetrik yöntem.	[147]
Folin-Ciocalteu reaktifi ile toplam fenol tayini	ET	Yüksek düzeyde bazik oksitlenmiş fenolik bileşiklerde bir fosfobolibdat ve fosfotungtat karışımı	[148]
Demir (III) indirgeyici antioksidan kapasite (FRAP)	ET	Fe^{3+} -tripiridiltriazin kompleksinin (Fe^{3+}-TPTZ) kompleksinin (Fe^{2+}-TPTZ) formuna dönüştürerek değerlendiren kolorimetrik yöntem.	[149]
Toplam antioksidan kapasite	ET	Bu yöntem, lipit oksidasyonunun ilk aşamasında peroksidaz seviyesini ölçmek için kullanılır. Peroksitler, Fe^{3+} oluşturmak için Fe^{2+} ile reaksiyona giren linoleik asit oksidasyonu sırasında oluşur ve daha sonra bu iyonlar tiyosiyanat ile bir kompleks oluşturur.	[150]

Tablo 2.2: Toplam antioksidan kapasite tayin yöntemleri ve reaksiyon mekanizmaları [151]

2.5.2.1 CUPRAC (Bakır (II) indirgeyici antioksidan kapasite) yöntemi

Bu yöntem Apak ve ark. tarafından geliştirilmiştir [**138**]. Yöntem, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin, Nc) ve bakır (II) iyonundan oluşan bakır(II)-neokuproin kompleksinin bakır(I)-neokuproin formuna indirgenmesine dayanır **Şekil.2.22** Antioksidan kapasite, 450 nm'de oluşan sarı kompleksin absorbansının ölçülmesiyle belirlenir. Cu(II)-neokuproin kompleksinin Cu(I)-neokuproin indirgenmesi nedeniyle, yöntem, Kuprik İyon İndirgeyici Antioksidan Kapasite, CUPRAC olarak adlandırılmıştır.



(II) -neokuproin kompleksi ile

Açik Mavi

(I) -neocuproin Şelat ile

Sarı

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

Şekil 2.22: CUPRAC yönteminin kromojenik reaktifi olan Cu(II)-Nc kompleksinin antioksidanlar (Ar(OH)n) ile reaksiyonu sonucu sarı renkli Cu(I)-Nc bileşiğine indirgenmesi [153].

Yöntemde eşit hacimlerde bakır (II) klorür, neokuproin, pH 7.0 amonyum asetat tampon çözeltisi ile antioksidan bileşiğin veya numune ekstraktının uygun konsantrasyonunun karıştırılmasıyla elde edilen çözeltinin oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyonu sonucunda oluşan absorbans 450 nm'de okunur. Askorbik asit, gallik asit ve kuersetin ile renk oluşumu

hızlı olmakla birlikte (yöntem **CUPRAC$_N$** olarak belirtilmektedir) naringin ve naringenin ile renk oluşumu oldukça yavaş ilerler ve bu nedenle 50°C'de 20 dakika inkübasyon gerektirir ve yöntem **CUPRAC$_I$** olarak belirtilir. Yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilir.

2.5.2.2 ABTS/TEAC (Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) Yöntemi

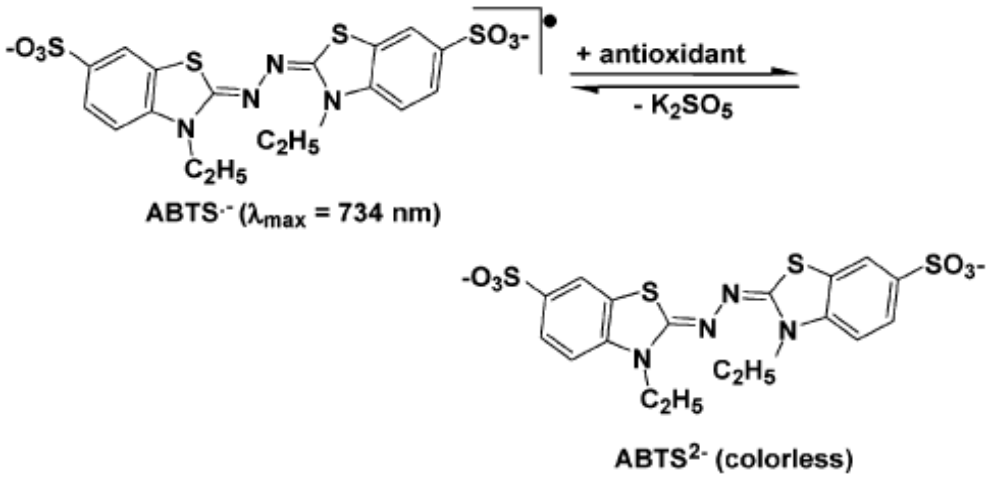
Miller ve ark. [**139**, **140**] tarafından geliştirilen yöntemde, **Şekil 2.23.**, H_2O_2 ve methemoglobinden meydana gelen ferrilmiyoglobinin 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) ile reaksiyonu ile oluşturulan $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonu 660, 734 ve 820 nm'de maksimum absorbansa sahiptir. 6 dakika sonra, antioksidan varlığında, absorbans 734 nm'de ölçülür. Aynı koşullar altında, radikal çözeltinin absorbansı da okunur ve iki çözelti arasındaki fark (ΔA) belirlenir.

$$\mathbf{Myoglobin + H_2O_2 \longrightarrow Ferrylmyoglobin + H_2O}$$

$$\mathbf{ABTS + Ferrylmyoglobin \longrightarrow ABTS^{\bullet+} + Myoglobin}$$

Denklem xi :

$ABTS^{\bullet+}$ radikali, ABTS'nin persülfat, hidrojen peroksit (peroksidaz) veya mangan dioksit ile oksidasyonuyla elde edilir. Bu yöntem, kromojenik radikal katyonunun ($ABTS^{\bullet+}$) antioksidan ajan tarafından inhibisyonuna dayanır ve Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite olarak ifade edilir. Re ve ark. tarafından değiştirilmiş TEAC yönteminde [**141**], ABTS'nin potasyum persülfat ile yükseltgenmesiyle üretilen $ABTS^{\bullet+}$ radikal katyonları kullanılmıştır.



Şekil 2.23: $ABTS^{\bullet+}$ radikal

Üretilen bu ABTS radikalleri, karanlıkta oda sıcaklığında tutulduğunda 2 gün boyunca stabildir. Bu yöntem hem lipofilik hem de hidrofilik sistemlerde kullanılabilir. Yöntemde, radikal çözeltisine eklenen antioksidan konsantrasyonuna bağlı olarak absorbanstaki azalma, 6 dakika sonra 734 nm'de ölçülür. Cano ve ark. tarafından hidrofilik antioksidan aktiviteyi ölçmek için geliştirilen bir başka yöntemde [**142**], ABTS radikal katyonunu ($ABTS^{\bullet+}$) hazırlamak için ABTS / H_2O_2 / HRP (yaban turpu peroksidaz) sistemi kullanılmıştır. Bu yöntemin birçok avantajı vardır, çünkü birçok istenmeyen reaksiyonu önler, yüksek sıcaklık gerektirmez ve geniş bir pH aralığında çalışılabilir. Bu yöntem ayrıca numunelerin içsel peroksidaz aktivitesinin neden olduğu girişimleri de önler. Aynı örnekteki hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidan aktivite, çözelti hazırlama ortamını değiştirerek bu yöntemle ölçülebilir [**143**, **144**].

2.5.3 Hipokloröz Asit Tayininde Kullanılan Yöntemler

HOCl saptanmasında, spektrofotometrik, florometrik veya kemilüminesans probları kullanılarak farklı mekanizmalar gerektiren çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Prob malzemeleri, kolayca tespit edilebilen renkli bir ürün oluşturmak için HOCl ile reaksiyona giren moleküllerdir. Apak ve ark. [**145**], prob olarak yüksek floresans özellik gösteren bir bileşik olan rezorsinol (1,3-dihidroksibenzen) kullanmıştır. Probun, HOC1 ile reaksiyonu sonucu floresan yoğunluğundaki azalmadan yararlanılmıştır. Floresans yoğunluğundaki azalma, araştırılan bileşiğin veya antioksidanın HOCl süpürme kabiliyetine bağlıdır. Ching [**146**] ve Magalhaes ve

arkadaşları [**147**], TNB, 5-tiyo-2-nitrobenzoik asidi kullanmıştır; buradaki absorbansı, HOC1 tarafından DTNB'ye oksidasyonunu azaltır, 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoik asit) antioksidanlar tarafından inhibe edilir ve belirli bir süre sonra ölçülür. Tiyol gruplarına sahip bileşiklerin TNB üretmek için reaksiyona girdiği belirlenmiştir. Bu çalışmaların ardından Yan ve ark. [**148**], sığır serum albüminin karbonil içeriğinin, antioksidan varlığında inhibe edilen HOC1 ile oksidasyonuyla arttığı gözlemine dayanan yeni bir yöntem geliştirmiştir.

2.5.3.1 TNB (5-tio-2-nitrobenzoik asit) Yükseltgenme Yöntemi

Proteinlerde serbest tiyollerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit (TNB) / 5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) DTNB sistemidir. TNB, DTNB'nin serbest tiyol ile reaksiyonu sonucunda üretilir ve 412 nm dalga boyunda güçlü absorpsiyonla ($\varepsilon 412 = 13.600\ M^{-1}\ cm^{-1}$) tiyollerin mikromolar konsantrasyonda saptanmasına izin verir. [**149**]

DTNB + RSH → TNB + RS-TNB (disülfid Karışımları) **xii**

TNB bileşiği, HOCl ile DTNB'ye oksitlenebilir. TNB reaktifinin bu özelliği takip edilerek, çeşitli numunelerin HOCl süpürücü aktivitesi, HOCl süpürücü bileşiklerin varlığında ve yokluğunda 412 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek belirlenmiştir. HOCl süpürücü bileşiklerin varlığında, absorbans değerinde azalma önlenir. Bununla birlikte, glutatyon, sistein, dihidrolipoik asit gibi serbest tiyol grupları içeren bileşikler, bu yöntemde etkileşime neden olur.

2.5.3.2 Taurin Klorlama (KI / Taurin) Yöntemi

Weiss ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntem [**150**] taurinin (2-amino etansülfonik asit) HOC1 ile reaksiyona sokulması ile taurin kloraminin oluşumuna dayanmaktadır.

$HOCl + H_2N\text{-}CH_2CH_2SO_3H \rightarrow ClNH\text{-}CH_2CH_2SO_3H + H_2O$ **xiii**

Taurin ***Taurin Kloramin***

Hipokloröz asitin taurin ile reaksiyonu sonucu oluşan kararlı taurin kloramin doğrudan 250 nm dalga boyunda tespit edilebilmesine rağmen, bu yöntemin düşük ekstinksiyon katsayısı (~ 398 M^{-1} cm^{-1}) nedeniyle yeterince hassas olmadığı düşünülmektedir. 1 mol taurin kloramin, 2 mol oksidana eşdeğeridir. Taurin kloramin konsantrasyonunun belirlenmesi, 2 mol iyodür (I^-), iyot (I_2) veya 2 mol TNB'nin 1 mol DTNB'ye oksidasyonu ile daha duyarlı hale getirilmiştir. İyodürün iyota oksidasyonundan kaynaklanan sarı rengin absorbans değeri (ε350 = 22.900 M^{-1} cm^{-1}) 350 nm'de ölçülür. Süpürücü maddenin varlığında ve yokluğunda oluşan taurin kloramin miktarı, süpürücü maddenin aktivitesinin göstrgesidir.

2.5.3.3 Katalaz Deneyi

Bu yöntem Aruoma ve arkadaşları [**150**] tarafından geliştirilmiştir ve prensibi, 37°C'de HOC1 ile inkübasyon yoluyla katalaz enziminin inaktivasyonuna dayanmaktadır. katalaz enziminin 404 nm'de okunan absorbans değeri, HOCl varlığında azalır. Hipokloröz asit süpürleme etkinliği, 37°C'de fosfat tamponu, katalaz ve HOCl içeren karışımın 20 dakikalık inkübasyonundan sonra süpürücünün varlığında ve yokluğunda ölçülen absorbans değerleri kullanılarak belirlenir. Katalaz enziminin HOC1 ile inaktivasyonu, süpürücü ajanlar varlığında inhibe edilir.

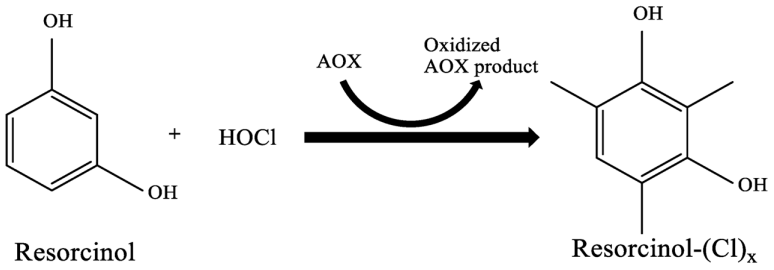
2.5.3.4 Sığır Serumu Albümininin (BSA) Oksidasyonu

Yan ve diğ. [**151**], sığır serum albümininin karbonil içeriğinin hipokloröa asit oksidasyonu ile arttığını gözlemlemiştir. Karbonil gruplarındaki bu artış, hipoklorik asit süpürücüsünün konsantrasyonuna bağlı olarak inhibe edilir.

2.5.3.5 HOCl süpürme Aktivitesi Deneyi için Spektroflorometrik Prob Olarak Rezorsinol kullanılması

Bu yöntem Özyürek ve ark. tarafından geliştirilmiştir [**152**]. Bu yöntem rezorsinolün HOCl varlığında klorlanarak fluorasans özellik göstermeyen bir ürüne dönüşümüne dayanır. HOCl 10 dakika boyunca inkübe edilen çözeltide hem rezorsinol hem de HOCl süpürücüler ile

reaksiyona girer ki böylece süpürücüler HOCl için reorsinol ile reakabet halindedir. Böylece flüoresans şiddetindeki göreli artış HOCl süpürücülerin antioksidan aktiviteleri ile orantılıdır.



Şekil 2.24: Rezorsinol probu ve AOX'un rekabetçi reaksiyonları sonucu flüoresans özellik göstermeyen klorlanmış prob oluşumu

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1 ALETLER VE KİMYASALLAR

3.1.1 Cihazlar

Kimyasal maddelerin ve örneklerin tartımı, Radwag AS 220/C/2 analitik terazi kullanılarak yapıldı. Çözeltilerin hazırlanması sırasında, katı malzemelerin çözünmelerini sağlamak için Elmasonik marka ultrasonik banyo kullanılmıştır. Çözeltilerin karıştırılması için VELP Scientifica ZX3 vortex kullanıldı. Deneyler sırasında çözeltilerin pH'ının ölçümü HANNA HI 221 pH metre kullanılarak yapıldı. Distile su elde etmek için GFL 2008 kullanıldı. 1,0 cm ışın yoluna sahip HELLMA kuvars küvet çifti kullanılarak Varian CARRY 100 UV-Vis spektrofotometresi ile absorbans ölçümleri yapıldı.

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Deneylerde kullanılan tüm reaktifler ve kimyasallar analitik saflıktadır. Sodyum hipoklorit (NaOCl), etanol (EtOH), asetik asit, sodyum asetat, N,N-dimetil-p-fenilendiamin hidroklorür (DMPD), gallik asit (GA), ferulik asit (FA), askorbik asit (AA), p-kumarik asit (PCA), bilirubin (Bn), N-Asetil Sistein (NAC), kuersetin (QR), ürik asit (UA), L-glutatyon (GSH), L-sistein (CYS), trolox ((R)-(+)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (TR) ve potasyum persülfat, Sigma-Aldrich'den (St. Louis, MO, ABD), bakır (II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_20$) Merck'den (Darmstadt, Almanya), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) hidroklorür, 2,2'-azino-bis (3-etilbenzitiyazolin-6-sülfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS), kafeik asit (CFA), kateşin hidrat (CAT) Sigma'dan (St. Louis, MO, ABD), amonyum asetat (NH_4Ac) Riedel de Haen'den (Steinheim, Almanya) satın alınmıştır. Yeşil çay (kullanıma hazır poşet çaylar, yerel marketten (İstanbul, Türkiye) satın alındı.

3.2 ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.2.1 Hipokloröz Asit Süpürme Yöntemi Çözeltileri

Sodyum hipoklorit çözeltisi (NaOCl)

Sodyum Hipoklorit çözeltisi, 7×10^{-4} M olacak şekilde 1,64 M NaOCl stok (1,206 g/cm^3) çözeltisinden, distile suyla iki aşamada seyreltilerek hazırlandı. Öncelikle ara stok olan 10^{-2}M NaClO çözeltisini hazırlamak için 1,64 M'lık derişik çözeltiden 0.6 mL alınarak hacmi distile suyla 100 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 1,75 mL alınarak son hacim 25 mL olacak şekilde balon joje içerisinde distile suyla seyreltilerek 7×10^{-4} M'lık NaOCl çalışma çözeltisi hazırlandı.

N, N-Dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD)

$1{,}5\times10^{-3}$M olacak şekilde 0,0156 g N,N-Dimetil-*p*-fenilendiamin (DMPD)'in distile su içinde çözülüp hacminin 50 mL'ye distile suyla tamamlanmasıyla hazırlandı.

pH 4.0 HAc/NaAc Tampon Çözeltisi

0,2 M HAc/NaAc tampon çözeltisi, 0,2 M HAc ve 0,2 M NaAc çözeltilerinin karıştırılmasıyla hazırlandı. 100 ml pH 4,0 tampon çözeltisi, 82,0 mL HAc ile 18,0 ml NaAc'ın karıştırılmasıyla hazırlandı.

3.2.2 CUPRAC Yöntemi Çözeltileri

CUPRAC yönteminde 10^{-2} M $CuCl_2.2H_2O$, 1,0 M amonyum asetat (NH_4Ac) ve $7{,}5\times10^{-3}$ M neocuproine (Nc) çözeltisi kullanıldı. 10^{-2} M $CuCl_2.2H_2O$ için 0,17048 g $CuCl_2.2H_2O$ distile su içerisinde çözülerek 100 mL'ye tamamlandı. NH_4Ac hazırlamak için 7,708 g katı madde distile su içinde çözülerek 100 mL'ye tamamlandı. $7{,}5\times10^{-3}$ Nc çözeltisi, 0,09177 g katı maddenin etanol içerisinde çözülerek hacmin etanolle 50 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

3.2.3 ABTS / TEAC Yöntemi Çözeltileri

ABTS / TEAC metodu için potasyum persülfat ve ABTS, ayrı ayrı distile suda çözüldü ve daha sonra stok $ABTS^{\bullet+}$ çözeltisi elde etmek için karıştırıldı. Karışımdaki nihai ABTS ve potasyum persülfat konsantrasyonları sırasıyla 2,45 mM ve 7,0 mM'dir. $ABTS^{\bullet+}$ stok çözeltisi kullanılmadan önce etanol ile 50 kat seyreltildi.

3.2.4 HPLC-CUPRAC Yöntemi Çözeltileri

GA, EGC, CAt, EGCG, EC, ECG gibi tüm standart antioksidan çözeltileri metanol içinde hazırlandı ve analizden önce -20ºC'de saklandı. $CuCl_2$ çözeltisi (10 mM) ve amonyum asetat tampon çözeltisi (1,0 M, pH 7) bidestile su (Millipore simpak1 Synergy 185, US) ve etanol içinde neocuproin çözeltisi (7,5 mM) içinde hazırlandı.

3.2.5 Sentetik Antioksidan çözeltilerinin Hazırlanması

Antioksidanların stok çözeltileri şu şekilde hazırlandı; $1{,}0\times10^{-2}$ M GA, FA, TR, QR, CFA, PCA, CAT ve EpiCAT, uygun miktarda katı maddenin etanol içinde çözülmesiyle hazırlandı. $1{,}0 \times 10^{-2}$ M GSH, AA ve NAC uygun miktardaki katılarının distile su içinde çözülmesiyle hazırlandı. $1{,}0 \times 10^{-2}$ M CYS hazırlamak için, uygun miktarda katı, 0,5 mL 1,0 M HCl içerisinde çözüldü ve hacmi 25 mL'ye distile su ile tamamlandı. $1{,}0\times10^{-2}$ M UA ve BN, uygun miktarlarının, 1 mL 1,0 M NaOH içerisinde çözülmesinden sonra distile su ile hazırlandılar. İlgili stok antioksidan çözeltileri, gerektiğinde her bir yöntem için çalışma çözeltilerini hazırlamak üzere seyreltildi.

3.2.6 Gerçek Örneklerin Analize hazırlanması

Green tea (Yeşil Çay)

Örnek olarak yeşil çayı kullanıldı. Bunun için yeşil çay poşeti (1,0328 g) tartıldıktan sonra Apak ve arkadaşların tarafından tarif edildiği gibi demlendi [**153**]. Yeşil çay poşeti 2 dakika boyunca 100 mL kaynamış suya daldırıp çıkarıldıktan sonra 3 dakika da su içerisinde bekletilerek demlendi. Demlenmiş yeşil çay çözeltisi oda sıcaklığına soğutuldu ve süzgeç

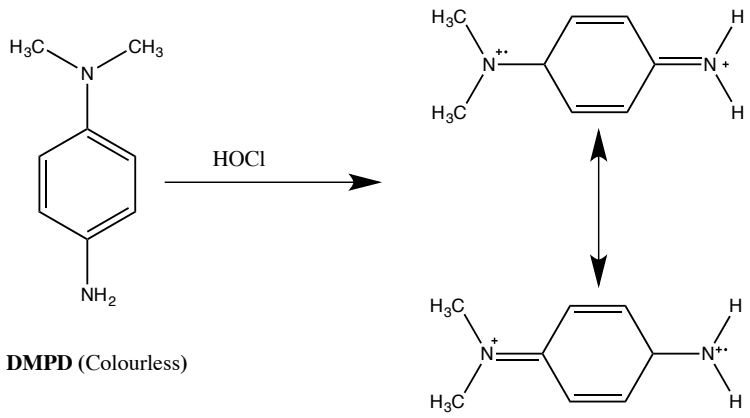
kağıdından süzüldü. Hazırlanan numune çözeltisi, önerilen hipokloröz süpürme yöntemi, CUPRAC ve ABTS / TEAC yöntemleri için 10 kat seyreltildi.

3.3 YÖNTEMLER

3.3.1 Hipokloröz Asit Süpürme Antioksidan Kapasite Yöntemi

1,0 mL 0,2 M NaAc / HAc tampon çözeltisi (pH=4,0), 1,0 mL NaOCl ($7{,}0 \times 10^{-4}$), (2-x) mL EtOH, x mL AOx ve 1,0 mL $1{,}5 \times 10^{-3}$ M DMPD çözeltisi karıştırıldıktan sonra elde edilen çözeltinin absorbansı 554 nm'de okundu.

Bu yöntemde, prob malzemesi olarak N,N-dimetil-*p*-fenilendiamin kullanılarak hipokloröz asit süpürülmesine dayalı olarak bitki, gıda veya biyolojik sıvıların toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Renksiz prob olan DMPD, HOC1 ile reaksiyonu sonucu, 554 nm'de maksimum absorbansa sahip karakteristik pembe renge sahip olan DMPD-semikinon (DMPDQ) adı verilen ilgili katyonik türlerine oksitlenir. Bir antioksidan veya HOCl süpürücüsünün varlığında, katyonik DMPD türlerinin kosantrasyonu düşüp, absorbansı düşüldüğü ortamdaki HOCl süpürülmüş olur. Bir antioksidanın mevcut HOC1'i süpürme kabiliyeti, antioksidan kapasitesinin bir ölçüsüdür. Antioksidan konsantrasyonu arttıkça absorbans değerinde göreceli bir azalma yani reaksiyon karışımının renginde azalmaya neden olur.



DMPD (Colourless)

DMPD$^{\bullet+}$ radical cation (Pink)

Şekil 3.1: Karşılık gelen radikal katyonik türlerini (pembe) oluşturmak için N, N-dimetil-p-fenilendiaminin (renksiz) HOCl ile oksidasyonu

3.3.2 CUPRAC Yöntemi

1,0 mL 1,0 × 10^{-2} M $CuCl_2.2H_2O$, 1,0 mL 7,5 × 10^{-3} M Nc, 1,0 mL pH 7.0 tamponu (1,0 M NH_4Ac) + (2,0 - x mL) distile su / veya EtOH (numune çözeltisine bağlı olarak) ve x mL numune (AOx bileşiklerinin tek başına, ikili veya üçlü karışımları ile gerçek örnek olarak yeşil çay) belirtilen sırada karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilip reaktif körüne karşı 450 nm'de absorbansı okundu.

3.3.3 ABTS / TEAC Yöntemi

Serbest radikal süpürme aktivitesi, ABTS radikal katyon süpürme deneyi ile belirlendi. Teste göre, (1-x) mL etanol + x mL numune çözeltisi (AOx bileşiklerinin / gerçek numune yeşil çayı'nın tek başına, ikili veya üçlü karışımları) ve 2 mL $ABTS^{+\cdot}$ çözeltisi bu sırayla eklendi. Karışım 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra elde edilen çözeltinin absorbansı, 734 nm'de referans olarak etanole karşı okundu.

3.3.4 Kromatografik Tayin Yöntemi – HPLC

Analizler ters faz HPLC yöntemine göre ACE C18 kolonu (4,6 mm × 250 mm, 5 μm partikül boyutu) (Milford, MA, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Mobil faz iki çözücüden, yani bidestile su (B) içinde metanol ve % 0,2 o-H_3PO_4'ten (A) meydana gelmiştir. Seçilen elüsyon standart antioksidan bileşikleri ve programı çay antioksidanlarının tayini için kullanıldı. Çay antioksidanlarının analizi için aşağıdaki parametreler kullanılarak gradiyent elüsyon yapıldı [**154**]; (Örnek = 20 μL; akış hızı = 0,8 mL dk^{-1} $\boldsymbol{\lambda}$= 280 nm): 1dk %0 A-%100 B (eğim 1.0); 20dk %70 A – %30 B (eğim 1.0); 25 dakika %0 A –%100 B (eğim 1.0). Yukarıdaki çalışma modlarının yardımıyla, ilgili antioksidanlar için bulunan konsantrasyon, konsantrasyonile pik alanları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri ve bu grafiklerden elde edilen doğru denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır.

Yeşil çayda bulunan toplam antioksidan kapasite aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır ***Denklem xiv.*** HPLC ile belirlenen konsantrasyonlar spektrofotometrik yöntemle belirlenen **TEAK** (Trolox eşdeğeri antioksidan kapasite) katsayıları ile çarpıldı ve yeşil çayın toplam antioksidan kapasitesinin hesaplanması için bulunan değerler toplandı.

HPLC-CUPRAC ifadesi, HPLC'de belirlenen konsantrasyonların CUPRAC yöntemindeki TEAK katsayılarıyla çarpılmasıyla hesaplanan kapasiteye karşılık gelir. Bu hesaplanan kapasite değerleri hem kromatografik hem de spektrofotometrik verilere dayandığından, her iki enstrümantal tekniğin sembolleri de bunları belirtmek için kullanılır.

$$\textbf{\textit{Toplam Antioksidan kapasite}}\ (\textbf{\textit{TAC}}) = \sum_{i=1}^{n} \textbf{Ci}\ (\textbf{TEAK})\textbf{i} \qquad \textbf{xiv}$$

$$\textbf{TEAK}_{\textbf{coefficient of AOx}} = (\epsilon_{\textbf{AOx}}) / (\epsilon_{\textbf{Trolox}}) \qquad \textbf{xv}$$

ϵAOx ve ϵTrolox, kalibrasyon denkleminden eğim değeri olarak belirlenen antioksidanların ve Trolox'un molar ekstinksiyon katsayılarıdır. $\mathbf{C}_i$, HPLC yöntemi ile belirlenen bileşik i- 'nin konsantrasyonudur; **TEAK**i; Seçilen kapasite ölçüm yöntemine göre i-bileşeninin TEAK katsayısını ifade eder. [**155**, **156**]

3.3.5 KI/taurin yöntemi

Referans yöntem olarak seçilen KI/Taurin yöntemine [12] göre 0.5 mL taurin (0.15 M), 1.0 mL pH=7.4 fosfat tamponu (0.2 M), x=0-2.0 mL arasında farklı hacimlerde süpürücü çözeltisi (uygun konsantrasyonda), (2.0-x) mL distile su, 0.2 mL HOCl çözeltisi ilave edilerek iyice çalkalandıktan sonra 0.5 mL KI (2.0 M) çözeltisi eklenerek 350 nm dalgaboyunda suya karşı absorbans değerleri ölçülmüştür.

3.4 ÖNERİLEN YÖNTEMİN OPTİMİZE EDİLMESİ

3.4.1 Sodyum Hipoklorit Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Optimum NaOCl konsantrasyonunun belirlenmesi için deneyler aşağıda anlatılan şekilde gerçekleştirildi: Sırasıyla 1 mL HAc/NaAc (0,2 M) tampon çözeltisi pH 5,7 NaAc, (1-x) mL su, x mL 10^{-2} M NaOCl çözeltisi, 1,0 mL distile su ve 1,0 mL 4,8 × 10^{-3} M DMPD eklendi. Elde edilen çözeltilerin spektrumu alındığında 554 ve 515 nm'de iki pik görüldü. 554 nm dalgaboyunda elde edilen absorbanslar daha yüksek olduğundan çalışma dalgaboyu 554 nm olarak belirlendi. Konsantrasyona karşı absorbans grafiği çizildi.

3.4.2 Çalışma pH'sının Optimizasyonu

İşlem daha önce belirtildiği gibi tekrarlandı. Bununla birlikte, diğer bütün koşulları sabit tutarak, prosedür, reaksiyon ortamı için en uygun pH değerini seçmek üzere farklı tampon çözeltiler kullanılarak gerçekleştirildi. Bunun için çeşitli pH'larda Hac/NaAc ve fosfat tamponları kullanılarak pH 2,98 – 8,0 arası test edildi.

3.5 SEÇİLEN BİREYSEL ANTİOKSİDANLARA YÖNTEMLERİN UYGULANMASI

3.5.1 Hipokloröz Asit Süpürme Yöntemi

Bu yöntemde DMPD bileşiği bir reaktif oksijen türü olan HOCl tarafından pembe renkli katyonik yarı kinon türevleri olan (DMPDQ) radikallerini oluşturmak üzere reaksiyon verir. Ancak AOx bileşikler varlığında HOCl bu bileşikler tarafından süpürüleceğinden reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu azalacak ve dolaylı olarak açığa çıkan DMPDQ miktarı da düşecektir. Bu da absorbansta düşüş olarak gözlemlenecektir. Önerilen yöntem, polifenoller, vitaminler, enzimatik olmayan antioksidanlardan aşağıda belirtilen temsili örneklere uygulanmıştır. Fenolik asitler: Galik asit (GA), Ferulik asit (FA), *p*-Kumarik asit (PCA) ve kafeik asit (CFA), flavanoller: Catechin (CAt), epicatechin (EC); Flavonoller: Quercetin (QR), vitaminler; askorbik asit (AA), tiyoller; L-Glutatyon (GSH), L-Sistein (CYS), N-asetil sistein (NAC) ve enzimatik olmayan plazma antioksidanları: ürik asit (UA) ve bilirubin **(**BR**)** ve troloks (TR)

Çalışmada kullanılan konsantrasyonlar ve hacim aralıkları aşağıdaki şekilde özetlenebilir: $1,0\times 10^{-4}$ M GA, FA, CFA, GSH, CYS, TR, NAC, AA, QR, UA, EC, BN, $1,0\times10^{-5}$ M CAt ve 10^{-2} M PCA kullanılmıştır. Test edilen hacim aralıkları, GA için 0,2-1,2 mL, FA için 0,4-2,0 mL, TR için 0,2-1,4 mL, GSH için 0,1-0,5 mL, QR için 0,1-0,7 mL, PCA için 0,1-0,7 mL, CAt için 0,4-2,0 mL, CFA için 0,2-1,8 mL, UA için 0,1-0,9 mL, AA için 0.4-1.8 mL, LCYS için 0.2-1.0 mL, NAC için 0.1-0.6 mL, BR için 0.2-0.9 mL, EC için 0,1-0,8 mL arası idi. Yöntem 3.3.1 bölümü'nde belirtildiği gibi uygulandı. AOx varlığında elde edilen absorbans değeri $\mathbf{A_i}$ olarak

ve herhangi bir AOx yokluğunda elde edilen absorbans değeri ise **A_0** olarak kaydedildi ve absorbans farkı **A_0-A_i** formülü kullanılarak hesaplandı ve **ΔA** olarak adlandırıldı.

3.5.2 CUPRAC Yöntemi

$1{,}0\times10^{-4}$ M GA, FA, TR, QR ve UA'den 0,05-0,3 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M GSH'den 0,2-1,0 mL; $1{,}0\times10^{-3}$ M PCA'ten 0,05-0,3 mL; $1{,}0\times10^{-5}$ M CAt'den 0,05-0,3 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M CFA'ten 0,05-0,25 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M AA'ten 0,1-0,6 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M L-CYS'den 0,1-0,3 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M NAC'den 0,1-0,6 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M BR'den 0,1-0,6 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M EC'den 0,05-0,25 mL arasında değişen farklı hacimlerde numuneler alınarak yöntem 3.3.2 bölümü'nde belirtildiği gibi uygulandı.

3.5.3 ABTS / TEAC Yöntemi

Bu amaç için, $1{,}0\times10^{-4}$ M GA'dan 0,05 – 1,2 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M FA'dan 0,05-0,25 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M TR'dan 0,05-0,4 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M GSH'den 0,05-0,25 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M QR'den 0,05-0,25 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M PCA'ten 0,1-0,5 mL; $1{,}0\times10^{-5}$ M CAt'den 0,05-0,4 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M CFA'ten 0,05-0,5 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M UA'ten 0,05-0,4 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M AA'ten 0,2-1,0 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M L-CYS'den 0,05-0,35 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M NAC'den 0,1-0,6 mL; $1{,}0\times10^{-5}$ M BR'den 0,1-1,0 mL; $1{,}0\times10^{-4}$ M EC'den 0,1-0,45 mL arasında değişen farklı hacimler alınarak yöntem, 3.3.3 bölümü'nde belirtildigi gibi uygulandı. AOx'lerin farklı konsantrasyonları varlığında elde edilen absorbans değeri (A_i) ve herhangi bir AOx yokluğunda elde edilen absorbans değeri (A_0) arasındaki farktan (A_0-A_i) ΔA değeri hesaplandı.

3.5.4 KI/Taurin Yöntemi

Bu amaç için, $1{,}0\times10^{-4}$ M GA'dan 2,38 – 14,3 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M FA'dan 9,52 - 47,62 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M TR'dan 2,38 – 14,28 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M GSH'den 2,38 – 14,38 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M QR'den 1,19 – 7,14 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M PCA'ten 238,0 – 1190,47 **µM**; $1{,}0\times10^{-5}$ M CAt'den 1,19 – 8,33 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M CFA'ten 1,19 – 5,95 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M UA'ten 2,38 – 16,66 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M AA'ten 2,38 – 14,28 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M L-CYS'den 2,38 – 11,90 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M NAC'den 2,38 – 14,28 **µM**; $1{,}0\times10^{-5}$ M BR'den 2,38 – 14,28 **µM**; $1{,}0\times10^{-4}$ M EC'den 1,19 – 7,14 **µM**

arasında değişen farklı hacimler alınarak yöntem, 3.3.5 bölümü'nde belirtildigi gibi uygulandı. AOx'lerin farklı konsantrasyonları varlığında elde edilen absorbans değeri (A_i) ve herhangi bir AOx yokluğunda elde edilen absorbans değeri (A_0) arasındaki farktan (A_0-A_i) ΔA değeri hesaplandı.

3.6 YÖNTEMİN AOX'UN İKİLİ VE ÜÇLÜ KARIŞIMLARINA UYGULANMASI

Yöntemlerin toplamsallığını incelemek için farklı ikili ve üçlü karışımlar hazırlandı ve ilgili yöntem uyguladı. Yöntemler önce karışımı oluşturan antioksidanlara tek tek sonra karışıma uygulandı. Hipokloröz süpürme ve ABTS/TEAC yöntemlerinde absorbanstaki değişimi (**ΔA**) belirlemek için AOx olmadan da yöntem uygulandı ve yüzde hataların (**%E**) hesaplanmasında kullanıldı. **%E**, teorik absorbansın veya teorik absorbanstaki değişimin ($\mathbf{\Delta A_{teorik}}$) deneysel absorbanstan çıkarılması ($\mathbf{\Delta A_{deneysel}}$) ve teorik absorbansa (veya teorik absorbanstaki $\mathbf{\Delta A_{teorik}}$ olarak değişmesi) bölünüp 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı. $\mathbf{\Delta A_{teorik}}$, ikili veya üçlü karışımı oluşturan AOx ların tek tek $\mathbf{\Delta A_i}$ değerlerinin toplamından elde edilir. İkili ve üçlü karışımdan ($\mathbf{A_{karışım}}$) elde edilen absorbans değeri, antioksidan ($\mathbf{A_0}$) yokluğunda elde edilen absorbans değerinden çıkarıldı ve elde edilen değer, $\mathbf{\Delta A_{deneysel}}$ olarak kaydedildi.

Matematiksel olarak; iki antioksidan karışımı için **x** ve **y;**

$$\mathbf{\%E = \frac{\Delta A\ deneysel - \Delta A\ teorik}{\Delta A\ teorik} \times 100} \qquad \textbf{xvi}$$

$$\mathbf{\Delta A_{deneysel} = A_0 - A_{karişim}} \qquad \textbf{xvii}$$

$$\mathbf{\Delta A_{teorik} = (A_0 - A_{ix}) + (A_0 - A_{iy})} \qquad \textbf{xviii}$$

A_{ix} ve A_{iy}, sırasıyla x ve y antioksidanları için elde edilen absorbans değerleridir.

Bununla birlikte, CUPRAC yönteminde, teorik ve deneysel absorbans doğrudan ölçümden elde edilebildiğinden absorbanstaki değişimi belirlemeye gerek yoktur.

$$\mathbf{A_{teorik} = A_{ix} + A_{iy}}$$

ve $\mathbf{A_{deneysel} = A_{karışım}}$

Bu nedenle, $\mathbf{\%E = \frac{A\ deneysel - A\ teorik}{A\ teorik} \times 100}$

3.6.1 Önerilen Hipokloröz Asit Süpürme Yöntemi

Bu yöntemin katkısını araştırmak için, onbir farklı ikili ve dört üçlü karışım test edildi ve yüzde hataları, %E hesaplandı. İkili karışımlar için; 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$M GA + 0,2 mL $1{,}0\times10^{-2}$M FA, 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$M TR + 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M AA, 0.1 mL $1{,}0\times10^{-5}$ M CAT + 0,1 mL $1{,}0\times10^{-4}$M EC, 0,2 mL $1{,}0\times10^{-2}$M FA + 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$M PCA, 0,1mL $1{,}0\times10^{-4}$M QR + 0,1mL $1{,}0\times10^{-5}$ M CAt, 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M NACYS + 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M TR, 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$M GA + 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M AA, 0,1 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M GA + 0,1 mL $1{,}0\times10^{-4}$M NACYS, 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M CYS + 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$M TR, 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M CYS + 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M AA, 0,2 mL $1{,}0\times10^{-2}$ M PCA + 0,2 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M CFA. Üçlü karışımlar için; 0,4 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M TR + 0,4 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M AA + 0,4 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M CYS, 0,4 mL $1{,}0\times10^{-2}$ M PCA + 0,4 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M CFA + 0,4 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M FA, 0,1mL $1{,}0\times10^{-5}$ M CAt + 0,1 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M EC + 0,1 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M TR, 0,1 mL $1{,}0\times10^{-5}$ M CAt + 0,1 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M EC + 0,1 mL $1{,}0\times10^{-4}$ M CYS kullanıldı. Yöntem, malzemeler ve yöntemler bölümünde daha önce belirtildiği gibi uygulandı, yüzde hatalar hesaplandı ve kaydedildi.

3.6.1.1 Kalitatif Tayin Limiti, LOD ve Kantitatif Tayin Limiti, LOQ Hesaplanması

Kalitatif tayin sınırı, LOD, belirtilen bir güven seviyesi ile o maddenin blank değerinin standart sapmasından hesaplanan en düşük miktardır. Kamtitatif tayin sınırı, LOQ, bir numunedeki uygun hassasiyet ve doğrulukla kantitatif olarak belirlenebilen en düşük analit miktarı olarak tanımlanır. LOD ve LOQ, aşağıda verilen formülden hesaplanmıştır;

$$\mathbf{LOD = (SD/m) \times 3} \qquad \mathbf{xix}$$

$$\mathbf{LOQ = (SD/m) \times 10} \qquad \mathbf{xx}$$

"SD", "referans (blank)" ın standart sapmasını temsil eder ve "m", kalibrasyon denkleminden elde edilen bir antioksidana özgü eğim değerini gösterir.

3.6.2 CUPRAC Yöntemi

Üç farklı ikili karışıma yöntem uygulandı; 0,4 mL 1,0 × 10^{-4} M GA + 0,4 mL 1,0 x 10^{-4} M FA, 0,2 mL 1,0 × 10^{-4} M CAT + 0,2 mL 1,0 × 10^{-4} M EC, 0,4 mL 1,0 × 10^{-4} M TR + 0,4 mL 1,0 × 10^{-4} M AA. Ayrıca, üç farklı üçlü karışım test edildi. 0,1 mL 1,0 × 10^{-4} M CAT + 0,1 mL 1,0 × 10^{-4} M EC + 0,6 mL 1,0 × 10^{-4} M CYS, 0,2 mL 1,0 × 10^{-4} M PCA + 0,1 mL 1,0 × 10^{-4} M CFA + 0,4 mL 1,0 × 10^{-4} M FA, 0,4 mL 1,0 × 10^{-4} M TR + 0,4 mL 1,0 × 10^{-4} M AA + 0,4 mL 10^{-4} M CYS. Yöntem, malzemeler ve yöntem bölümünde daha önce belirtildiği gibi uygulandı.

3.6.3 ABTS/TEAC Yöntemi

İki farklı ikili karışım test edildi; 0,1 ml 1,0 × 10^{-4} M CAT + 0,1 mL 1,0 × 10^{-4} M EC, 0,2 mL 1,0 × 10^{-4} M TR + 0,2 mL 1,0 × 10^{-4} M AA. Ayrıca, iki üçlü karışım test edildi; 0,05 mL 1,0 × 10^{-4} M CAT + 0,1 mL 1,0 × 10^{-4} M EC + 0,05 mL 1,0 × 10^{-4} M CYS, 0,2 mL 1,0 × 10^{-4} M TR + 0,3 mL 1,0 × 10^{-4} M AA + 0,2 mL 1,0 × 10^{-4} M CYS. Yöntem, malzemeler ve yöntemler bölümünde daha önce belirtildiği gibi uygulandı.

3.7 YÖNTEMLERİN GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANMASI

Yeşil çay **2.2.5.1**'de belirtildiği gibi hazırlandıktan sonra, çözelti kullanılmadan önce on kat seyreltildi. Hipokloröz asit süpürme yöntemi ve ABTS / TEAC için, 0,1 mL ve CUPRAC yöntemi için 0,25 mL örnek çözeltisi alınarak her bir yöntem beşer kez uygulandı.

Gerçek örnek içerisine standart katkı yapılarak % E değerleri hesaplamak için 0,2 mL 1.0 × 10^{-4} M QR ve 0,1 mL 10 kat seyreltilmiş yeşil çay örneği kullanıldı. Bunun için ilk olarak tek başlarına standartlar ve çay örneklerine ardından bunların karışımlarına yöntemler uygulanarak absorbans değerleri okundu. Elde edilen sonuçlardan % E değerleri hesaplandı.

3.8 % Geri Kazanım Hesaplama

Gerçek örnekler olarak seçilen yeşil çay, beyaz çay ve siyah çay üzerine çayda en çok bulunan antioksidanlar olan GA, CAT ve EC için standat katkılar yapıldı ve gerçek örnek içerisine katılan AOx miktarının doğru belirlenip belirlenemediği araştırıldı.

$$\textbf{\% Geri kazanım} = \frac{\Delta Abs_{karışım} - \Delta Abs_{çay}}{\Delta Abs_{AOx}} \times 100 \qquad \textbf{(xxi)}$$

Çay örneklerinde standart antioksidanlar olarak çayda bolca bulunduğu bilinen CAT, EC ve GA kullanıldı. Yeşil çay üzerine CAT ve GA katkıları yapılırken, siyah çay ve beyaz çaya EC ve GA katkıları yapıldı. Bu amaçla öncelikle 0,1 mL yeşil çay üzerine 0,1 mL 10^{-4} M CAT eklendi, ardından 0.05 mL yeşil çay üzerine 0.05 mL 10^{-4}M GA katkısı yapıldı.

Beyaz çay ile yapılan denemelerde 0,1 mL çay örneği üzerine 10^{-4} M konsantrasyonundaki EC ve GA'in 0,1 mL'lik hacimleri ayrı ayrı eklendi.

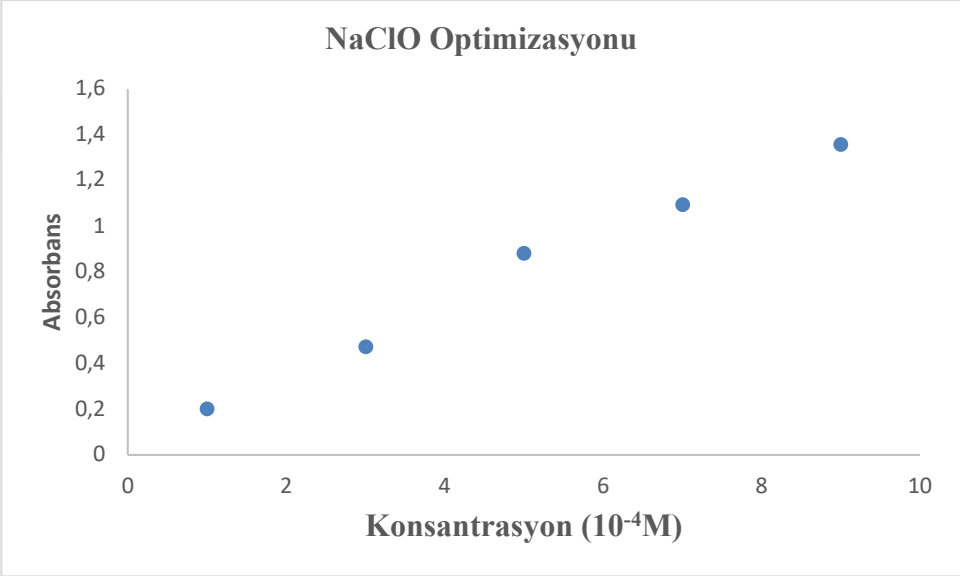
Siyah çay için 0,1 mL siyah çay üzerine 0.2 mL 10^{-4}M EC ve 0.05 mL 10^{-4}M GA eklendi. Denemelerde önerilen yöntem önce çay örnekleri ve antioksidanlara ayrı ayrı sonra karışım halinde uygulandı. Hesaplanan absorbans farklarından yararalanılarak yüzde geri kazanım ve yüzde hata değerleri yukarıda gösterilen denklemler kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar tablo 4.12'de gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 YÖNTEM OPTİMİZASYONU

4.1.1 Sodyum Hipoklorit Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Önerilen yöntem için optimum sodyum hipoklorit konsantrasyonunun belirlenmesi, malzemeler ve yöntemler bölümünde tarif edildiği gibi gerçekleştirildi. Farklı konsantrasyonlarda NaOCl denendi ve elde edilen sonuçlar aşağıdaki şekilde gösterildi.



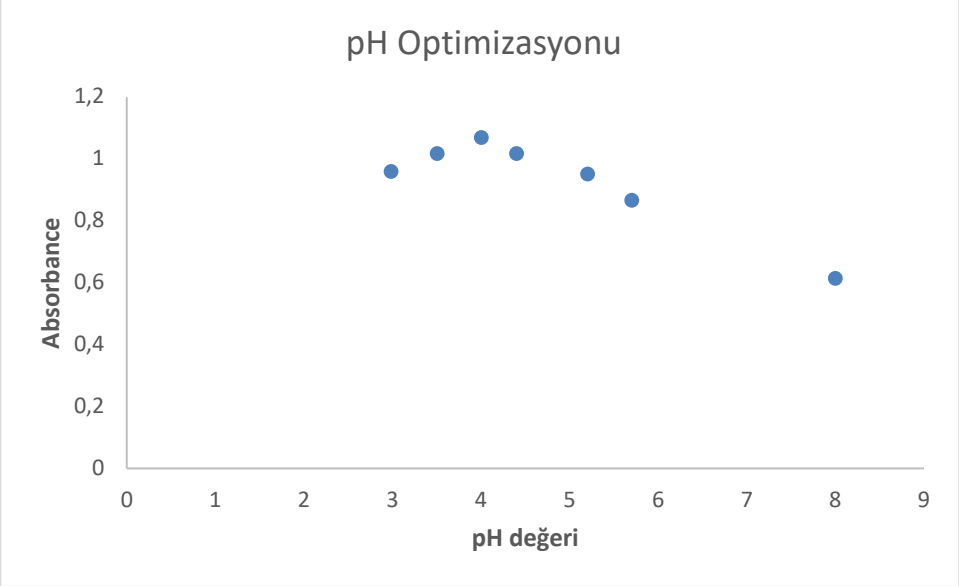
Şekil 4.1: NaOCl Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Şekil 4.1'de NaOCl'nun konsantrasyonu ile elde edilen absorbanslar arasında doğrusal bir korelasyon olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, Lambert-Beer prensibine göre, 1,0'in üzerindeki absorbans değerlerinin, çeşitli hata ve sapmalara eğilimli olduğu söylenmektedir. Bu nedenle NaOCl için optimize edilmiş konsantrasyon, 1,093 absorbans değeri veren $7{,}0 \times 10^{-4}$ M olarak seçilmiştir.

4.1.2 pH Optimizasyonu

Reaksiyon ortamı için en iyi pH'ın belirlenmesi işlemi malzemeler ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi yapıldı. Absorbansın pH = 9 ile 4 arasında artan asitlik veya azalan pH değerleri

ile arttığı gözlendi. Ancak, pH = 4'ün altındaki değerlerde absorbansta bir düşüş olduğu saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar şekil 4.2'de gösterilmiştir.

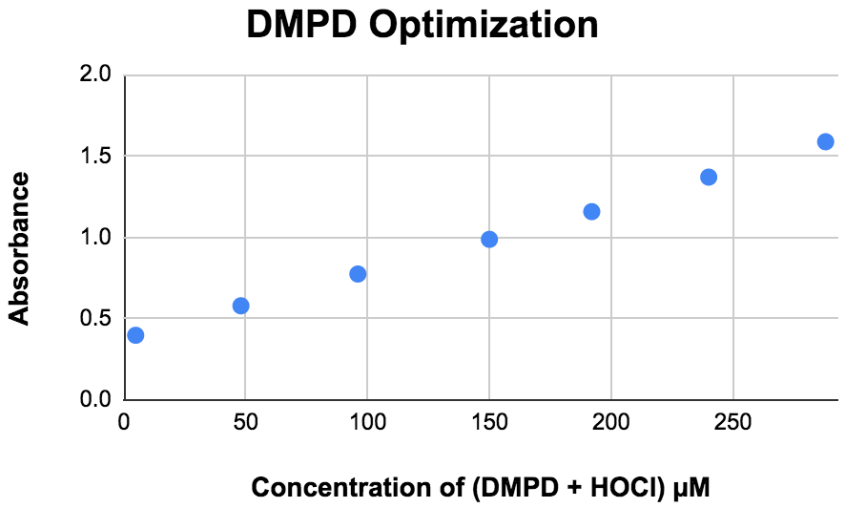


Şekil 4.2: Önerilen yöntem için pH optimizasyonu

Şekil 4.2'de görüldüğü gibi önerilen yöntemin asidik şartlarda daha iyi sonuç verdiği görülmüş olup, yüksek absorbans değerine bağlı hata ve sapmalardan kaçınmak için, optimum pH değerimiz olarak 1,07 absorbans veren 4,0 olarak seçilmiştir. Önerilen hipokloröz süpürme yönteminde optimum pH, 4 olarak belirlenmiş ve denemeler pH = 4,0 HAc-NaAc tampon çözeltisi varlığında gerçekleştirilmiştir.

4.1.3 DMPD Konsantrasyonunun Optimizasyonu

Malzemeler ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi optimum DMPD konsantrasyonu da incelenmiştir. Lambert-Beer kanunundan olası sapmalar dikkate alındığında, absorbansın tercih edilen 0,1-1,0 aralığında olduğu farklı DMPD konsantrasyonları denendi. Optimum konsantrasyon, $1{,}5 \times 10^{-3}$ M olarak seçildi.



Şekil 4.3: DMPD Optimizasyon için calibrasyon grafiği

4.1.4 Sıcaklığın Etkisi

Önerilen yöntem farklı sıcaklıklarda tekrarlanarak sıcaklık etkisi araştırılmıştır. Bu amaçla yöntem öncelikle 25ºC ve 37ºC de denenmiştir. Farklı sıcaklığın absorbanslar üzerinde önemli bir etkisinin olmadığı görüldüğü için reaksiyon oda sıcaklığında gerçekleştirildi.

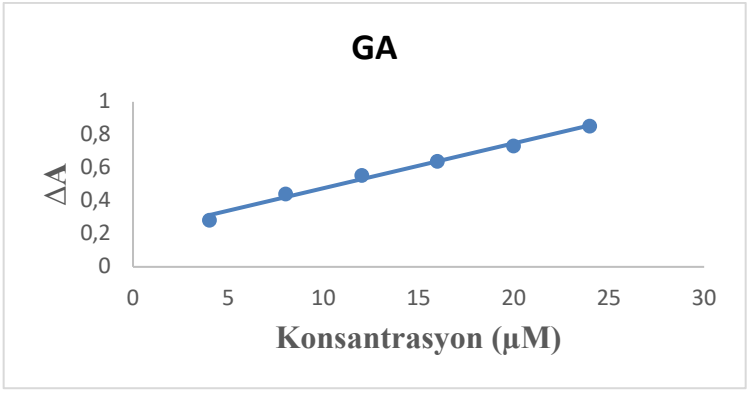
4.1.5 Etanolün Etkisi

Çeşitli antioksidanların hazırlanmasında çözücü olarak kullanıldığı için etanolün etkisi malzemeler ve yöntemler bölümünde anlatıldığı gibi incelendi. Etanol varlığının yöntem üzerine önemli bir etkisi olmadığı görüldü.

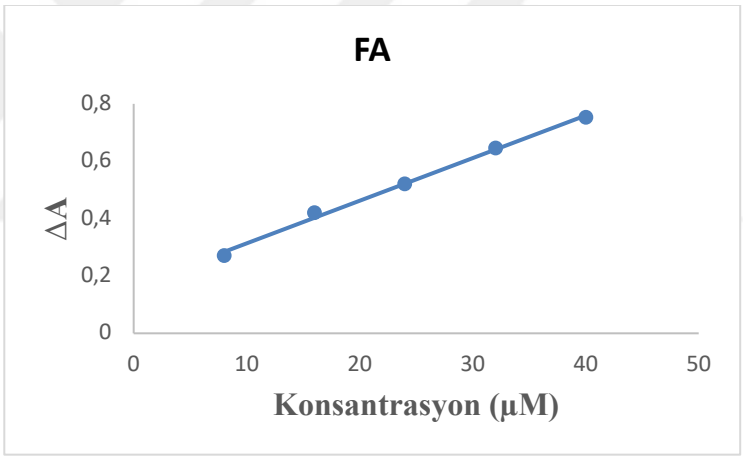
4.6 ÖNERİLEN YÖNTEMİN SEÇİLEN ÖRNEK ANTİOKSİDANLARA UYGULANMASI

Önerilen hipokloröz asit süpürme yöntemi, malzemeler ve yöntemler bölümünde belirtildiği şekilde değişik antioksidan kategorilerinden seçilen antioksidanlara; Galik (GA), *p*-kumarik asit (PCA), Kafeik asit (CFA) ve Ferulik asit (FA), askorbik asit (AA) ve Trolox (TR), L-Glutatyon (GSH), Quercetin (QR), Catechin (CAt) ve epi-Catechin (EC), sistein (L-CYS), N-asetilsistein (NAC), bilirubin (BR) ve ürik asit (UA) uygulandı. Antioksidan konsantrasyonu

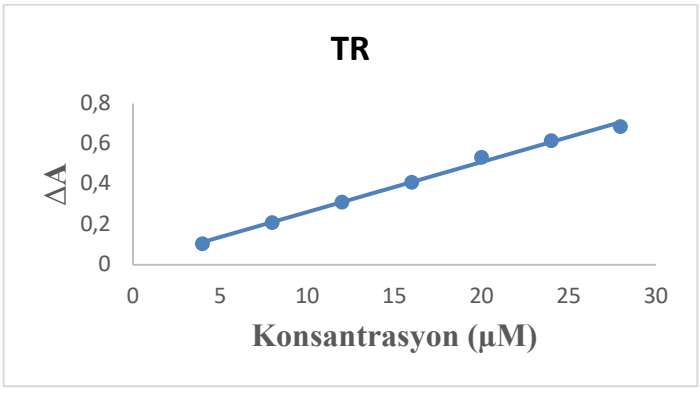
antioksidan varlığında ve yokluğunda yöntem uygulandıktan sonra hesaplanan absorbans farkına (ΔA) karşılık grafiğe alındı.



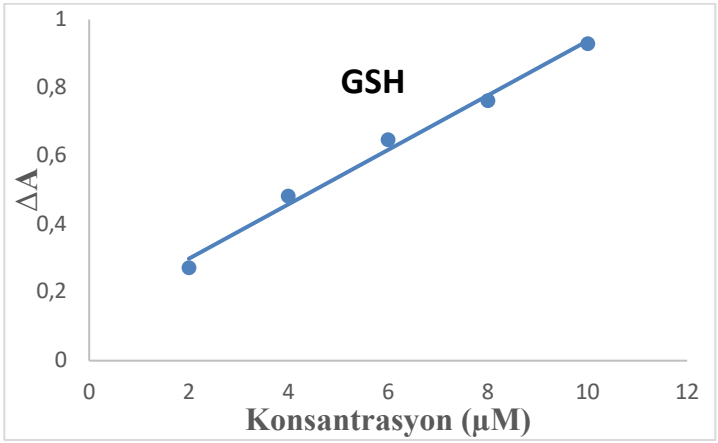
Şekil 4.4: Gallik Asit için elde edilen kalibrasyon grafiği



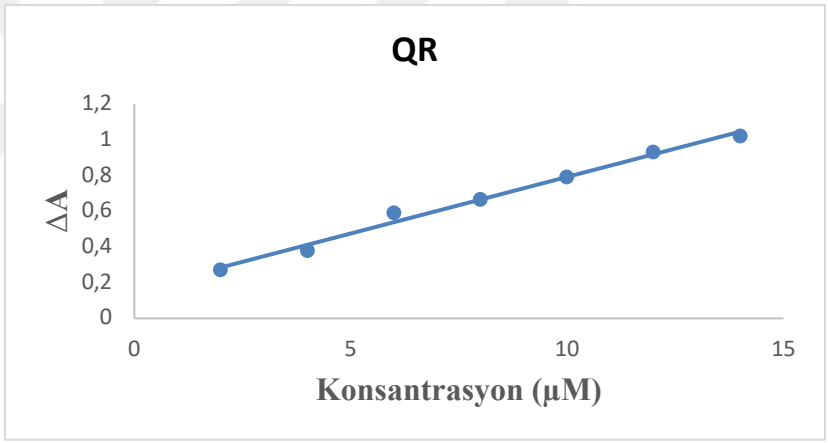
Şekil 4.5: Ferulik asit için elde edilen kalibrasyon grafiği



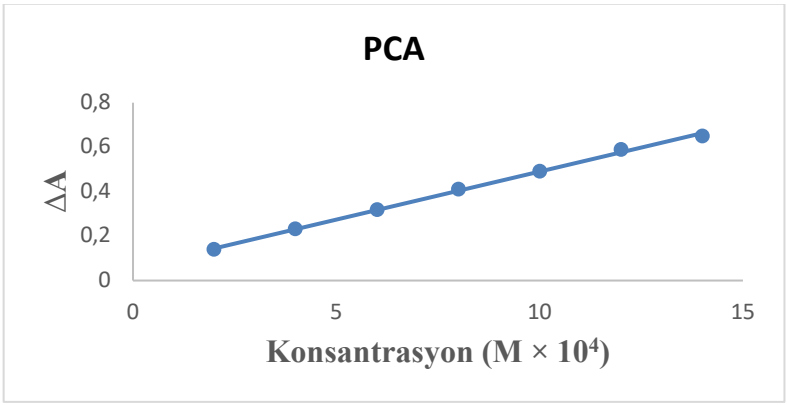
Şekil 4.6: Trolox için elde edilen kalibrasyon grafiği



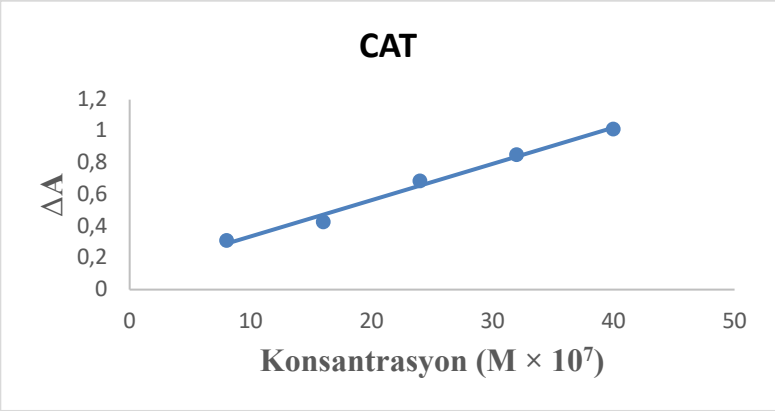
Şekil 4.7: L-Glutatyon için elde edilen kalibrasyon grafiği



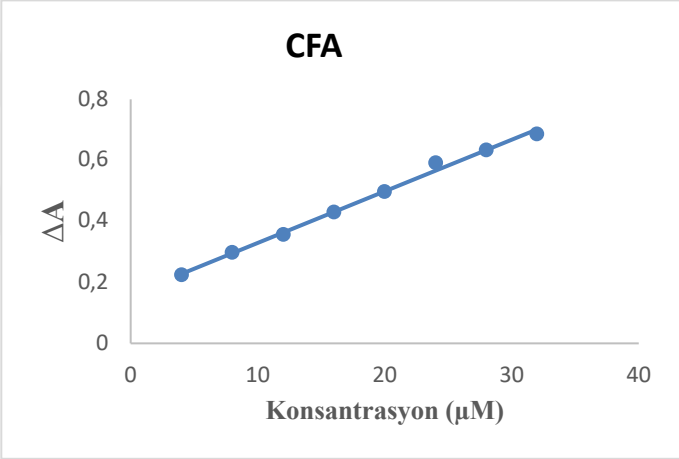
Şekil 4.8: Kuersetin için elde edilen kalibrasyon grafiği



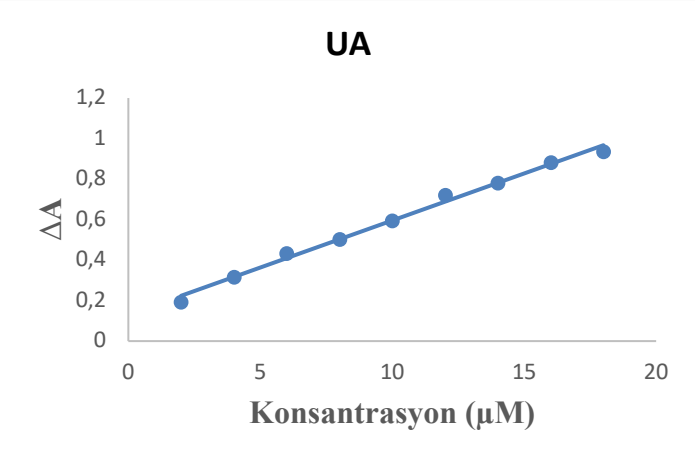
Şekil 4.9: *p*-kumarik asit için elde edilen kalibrasyon grafiği



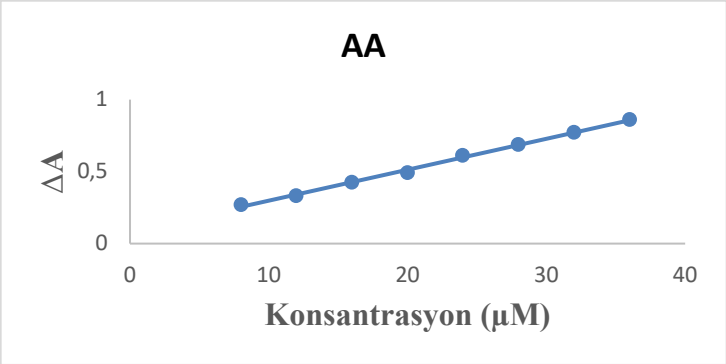
Şekil 4.10: Kateşin için elde edilen kalibrasyon grafiği



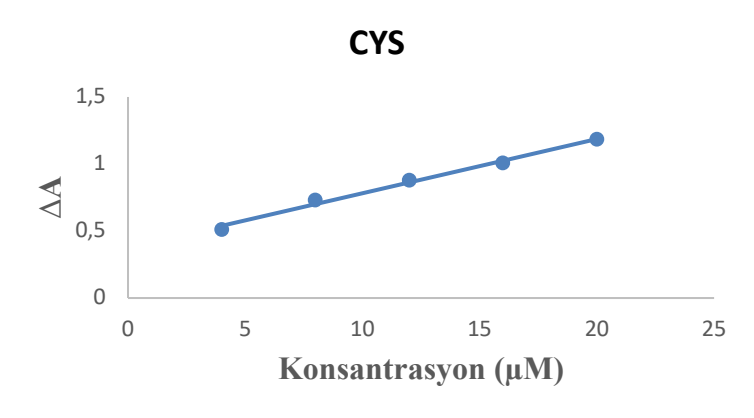
Şekil 4.11: Kafeik Asit için elde edilen kalibrasyon grafiği



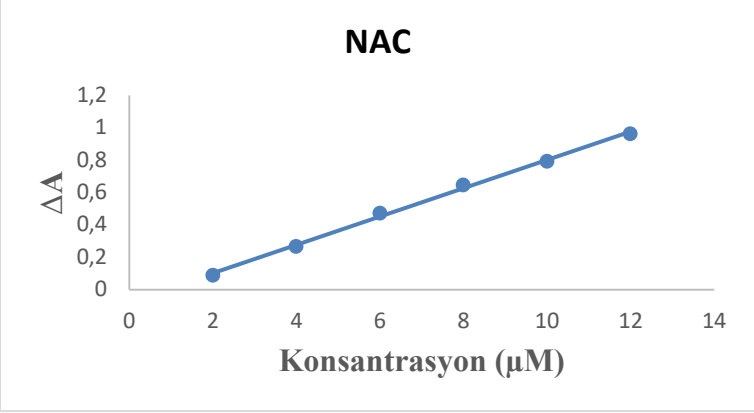
Şekil 4.12: Ürik Asit için elde edilen kalibrasyon grafiği



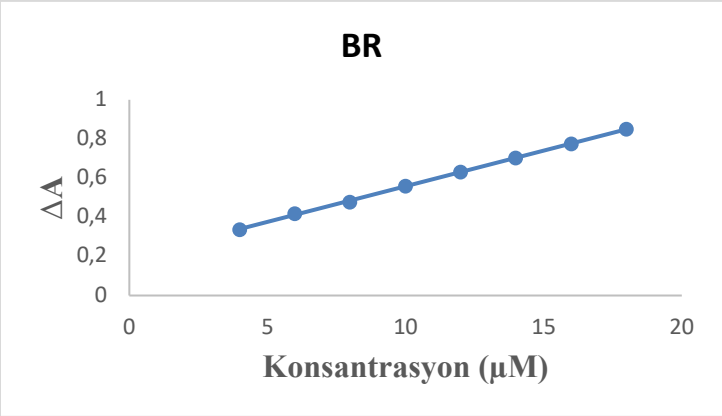
Şekil 4.13: Askorbik asit için elde edilen kalibrasyon grafiği



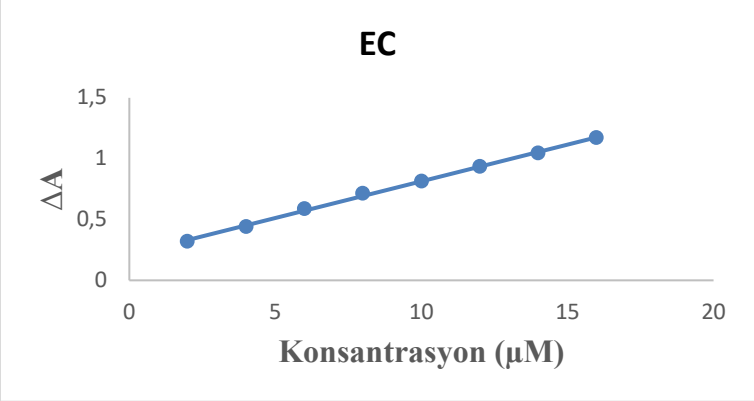
Şekil 4.14: L-sistein için elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.15: N-Asetilsistein için elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.16: Bilirubin için elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.17: Epikateşin için elde edilen kalibrasyon grafiği

Tablo 4.1: Önerilen hipokloroz asit süpürme yöntemi ile test edilen AOx'lar için elde edilen doğrusal denklemler ve belirleme katsayıları (R^2).

AOx	Son Konsantrasyon (µM)	Kalibrasyon grafiğine ait doğru denklemi	Belirleme katsayısı (R^2)	LOD (µM)	LOQ (µM)
GA	4.0 – 24.0	**ΔA** = (2.72×10^4) C + 0.2045	0.9895	0.133	0.442
FA	8.0 - 40.0	**ΔA** = (1.47×10^4) C + 0.1669	0.9966	0.245	0.817
TR	4.0 – 28.0	**ΔA** = (2.48×10^4) C + 0.0139	0.9957	0.146	0.485
GSH	2.0 -10.0	**ΔA** = (7.98×10^4) C + 0.1394	0.9901	0.452	0.151
QR	2.0 – 14.0	**ΔA** = (6.34×10^4) C + 0.1582	0.9891	0.570	0.190
PCA	2.0 – 14.0	**ΔA** = (4.32×10^2) C + 0.058	0.9977	8.353	27.845

CAT	8.0 – 40.0	**ΔA** = (2.29×10^{5}) C + 0.1068	0.9896	0.016	0.053
CFA	4.0 – 36.0	**ΔA** = (1.69×10^{4}) C + 0.16	0.9942	0.213	0.710
UA	2.0 – 18.0	**ΔA** = (4.65×10^{4}) C + 0.1311	0.9911	0.078	0.259
AA	8.0 – 36.0	**ΔA** = (2.15×10^{4}) C + 0.0833	0.9965	0.168	0.560
CYS	4.0 – 20.0	**ΔA** = (4.05×10^{4}) C + 0.3769	0.9920	0.089	0.297
NAC	2.0 – 12.0	**ΔA** = (8.74×10^{4}) C - 0.0726	0.9972	0.041	0.137
BR	4.0 – 18.0	**ΔA** = (3.64×10^{4}) C + 0.1942	0.9995	0.099	0.330
EC	2.0 – 16.0	**ΔA** = (6.03×10^{4}) C + 0.211	0.9979	0.060	0.200

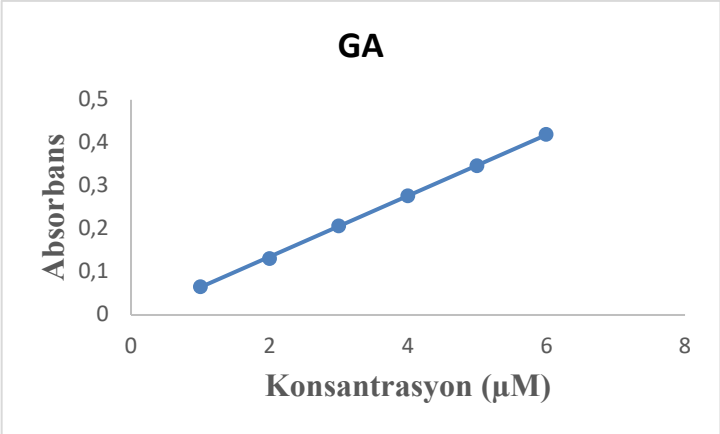
4.6.1 Test edilen AOx bileşiklerinin geliştirilen yöntem ile belirlenen HOCl süpürme etkinliği sırası

Herbir AOx için konsantrasyon ile ΔA arasında çizilen kalibrasyon doğrularının eğiminden hesaplanan molar ekstinksiyon katsayıları (ε) karşılaştırıldığında bu değer ne kadar yüksekse söz konusu bileşiğin o kadar düşük konsantrasyonlarının HOCl'nin süpürülmesinde etkili olacağının göstregesidir. Dolayısıyla daha yüksek bir eğim değeri daha düşük bir konsantrasyon anlamına geldiğinden, daha yüksek bir eğim değerinin daha yüksek bir antioksidan kapasitesine işaret ettiği sonucuna varılabilir. Her bir bileşiğin antioksidan kapasitesi, azalan eğim değerlerine göre düzenlendiğinde aşağıdaki AOx sırası elde edilmiştir:

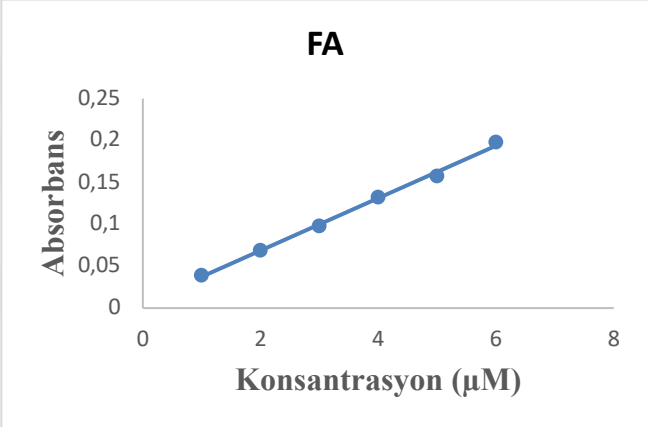
CAt > NAC > GSH > QR > EC > UA > LCYS > BR > GA > TR > AA > CFA > FA > PCA

4.7 SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDANLAR İÇİN CUPRAC YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

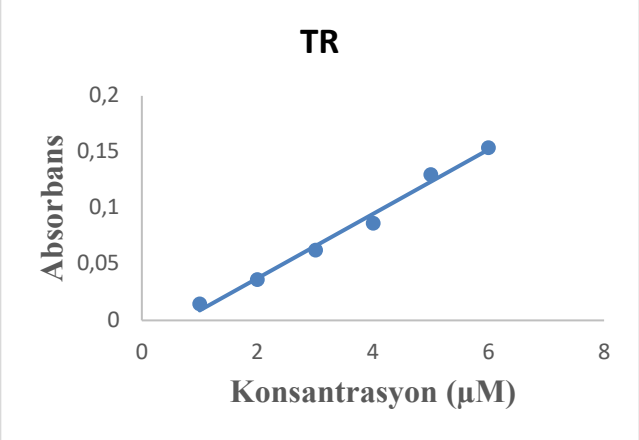
CUPRAC yöntemi malzemeler ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi uygulandı, antioksidan bileşik konsantrasyonuna karşılık absorbans arasında lineer kalibrasyon grafiği çizildi. Elde edilen grafikler şekilde gösterildi.



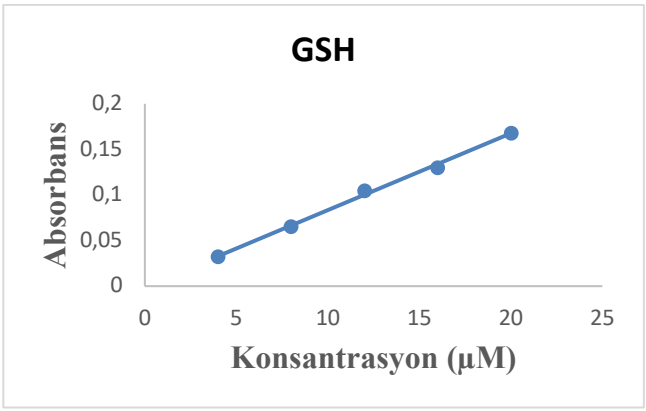
Şekil 4.18: Galik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



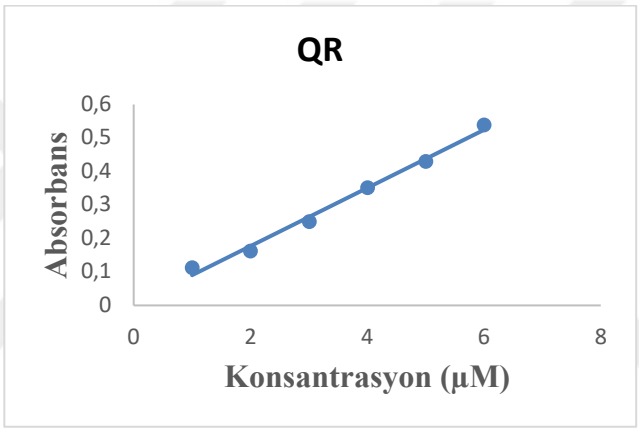
Şekil 4.19: Ferulik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



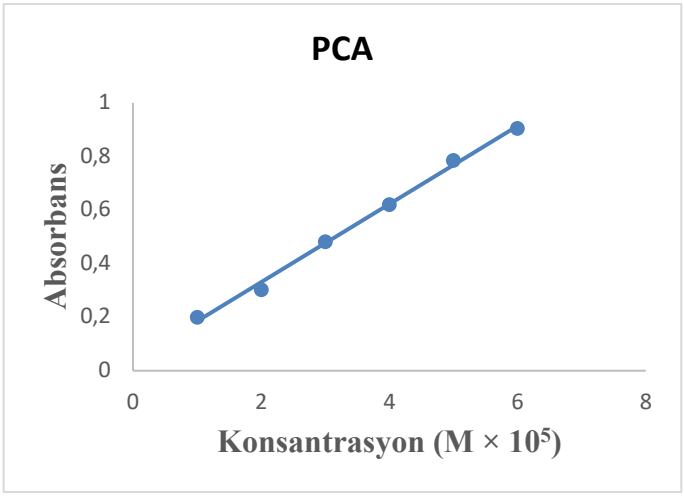
Şekil 4.20: Trolox için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



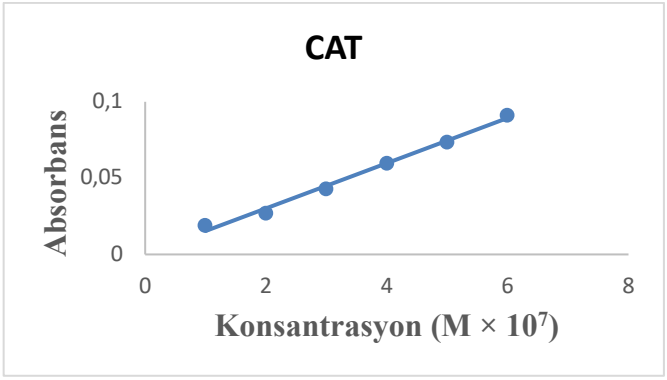
Şekil 4.21: L-Glutatyon için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



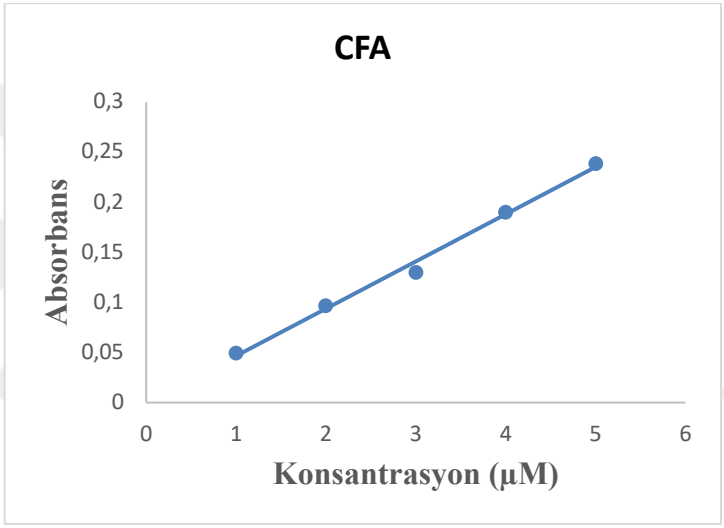
Şekil 4.22: Kuersetin için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



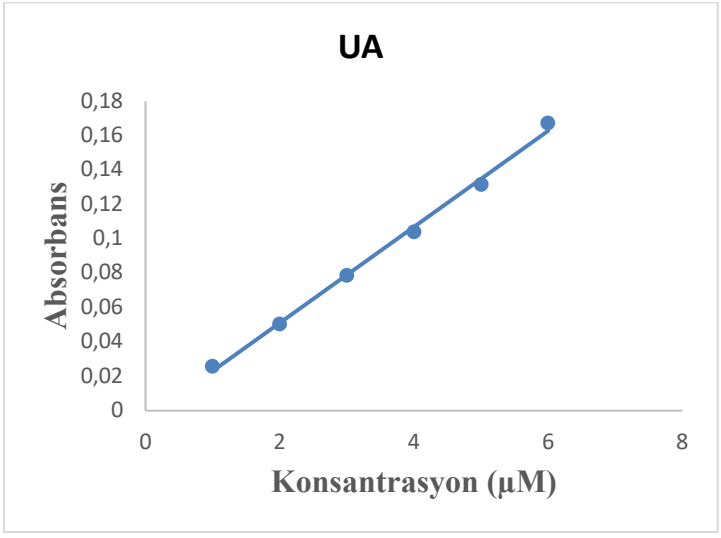
Şekil 4.23: *p*-kumarik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



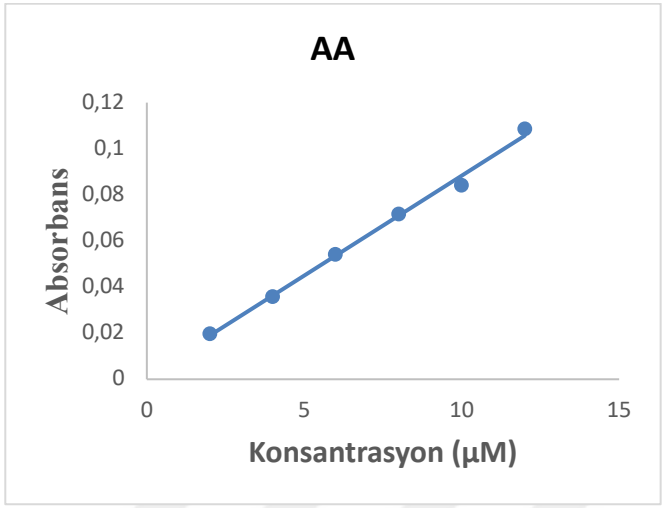
Şekil 4.24: Kateşin için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



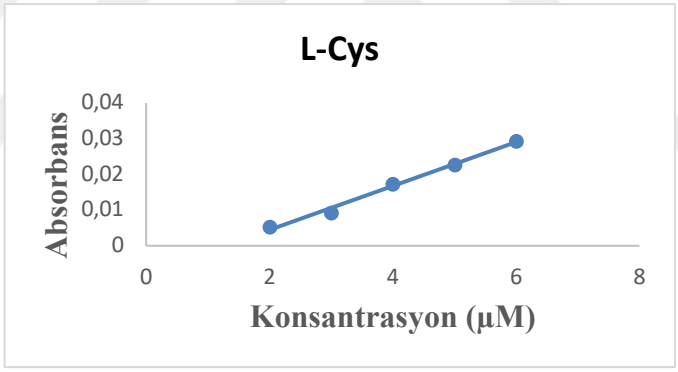
Şekil 4.25: Kafeik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



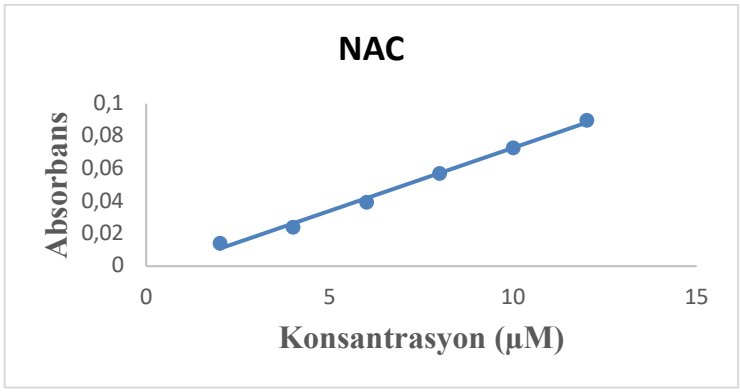
Şekil 4.26: Ürik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



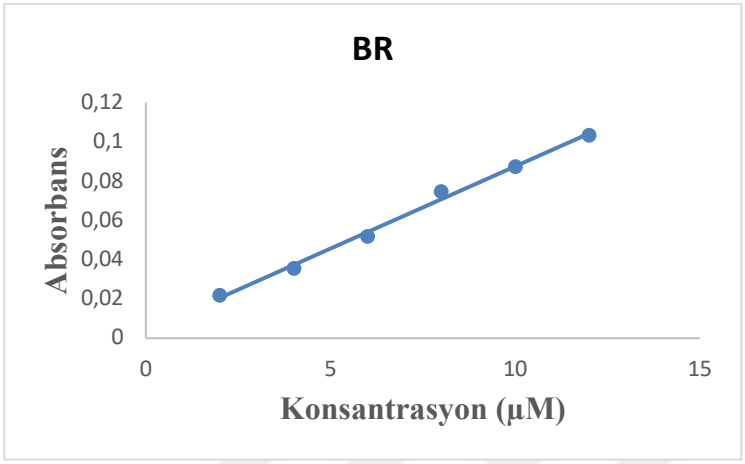
Şekil 4.27: Askorbik asit için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



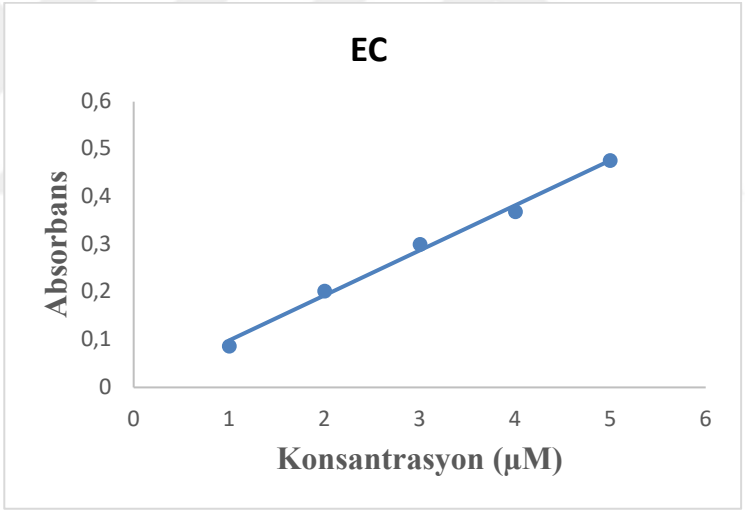
Şekil 4.28: L-sistein için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



Şekil 4.29: N-Asetilsistein için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



Şekil 4.30: Bilirubin için CUPRAC yöntemiyle elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



Şekil 4.31: Epikateşin için CUPRAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği

Tablo 4.2: Seçilen AOx bileşikler için CUPRAC Yöntemi elde edilen kalibrasyon doğrularının lineer denklemleri ve belirleme katsayıları (R^2).

AOx	Son Konsantrasyon (µM)	Kalibrasyon grafiğine ait doğru denklemi	Belirleme katsayısı (R^2)
GA	1.0 – 6.0	$A = (7.09\times10^4)\ C - 0.0065$	0.9998
FA	1.0 – 6.0	$A = (3.13\times10^4)\ C + 0.0061$	0.9967
TR	1.0 – 6.0	$A = (2.87\times10^4)\ C - 0.0198$	0.9889
GSH	4.0 – 20.0	$A = (8.42\times10^3)\ C - 0.0008$	0.9968
QR	1.0 – 6.0	$A = (8.68\times10^4)\ C + 0.0034$	0.9915
PCA	1.0 – 6.0	$A = (1.46\times10^4)\ C + 0.0392$	0.9964
CAT	1.0 – 6.0	$A = (1.48\times10^5)\ C + 0.0006$	0.9918
CFA	1.0 – 5.0	$A = (4.72\times10^4)\ C - 0.0006$	0.9935
UA	1.0 – 6.0	$A = (2.79\times10^4)\ C - 0.0049$	0.9967
AA	2.0 – 12.0	$A = (8.66\times10^3)\ C + 0.0017$	0.9949
CYS	2.0 – 6.0	$A = (6.15\times10^3)\ C - 0.0078$	0.9919
NAC	2.0 – 12.0	$A = (7.76\times10^3)\ C - 0.0047$	0.9942
BR	2.0 – 12.0	$A = (8.37\times10^3)\ C + 0.0038$	0.9951
EC	1.0 – 5.0	$A = (9.45\times10^4)\ C + 0.004$	0.9936

Tablo 4.2'de, Bireysel antioksidanlar CUPRAC yöntemiyle test edildiğinde elde edilen doğrusal denklemlerin ve regresyon katsayılarının bir özetini gösterir.

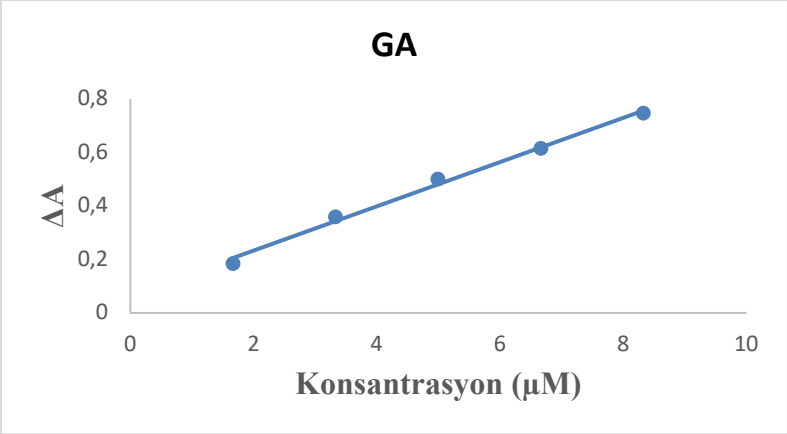
4.7.1 Her AOx bileşiğinin Antioksidan kapasitesinin sırası

Yine, her bir bileşiğin antioksidan kapasitesi, azalan eğim değerlerine göre düzenlenmiştir. Solda en yüksek antioksidan kapasiteye ve sağda en düşük kapasiteye sahip AOx bileşiğini gösterir.

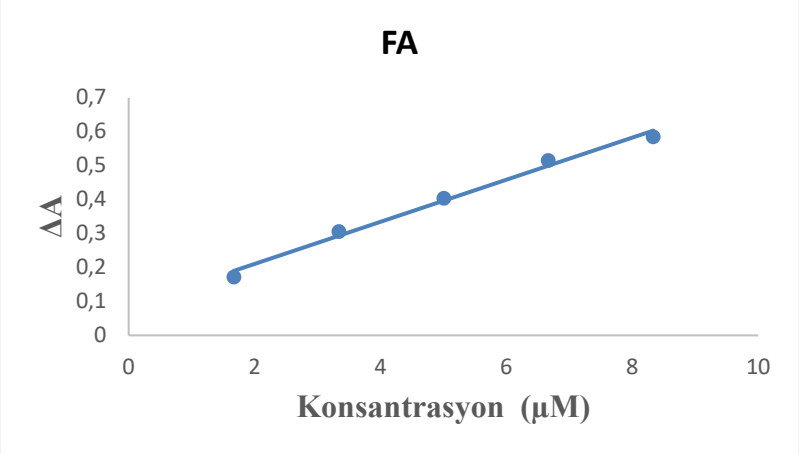
CAt > EC > QR > GA > CFA > FA > TR > UA > PCA > AA > GSH > BR > NAC > LCYS

4.8 SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDANLAR İÇİN ABTS YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

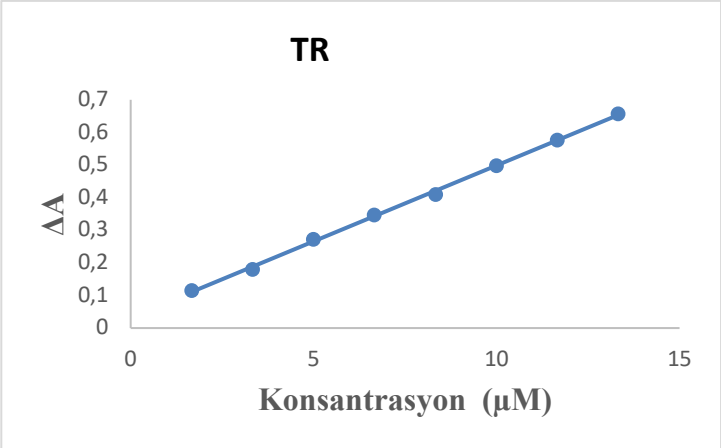
ABTS/TEAC yöntemi malzemeler ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi uygulandı, antioksidan bileşik konsantrasyonuna karşılık absorbans değişimleri arasında lineer kalibrasyon grafiği çizildi. Elde edilen grafikler şekilde gösterildi.



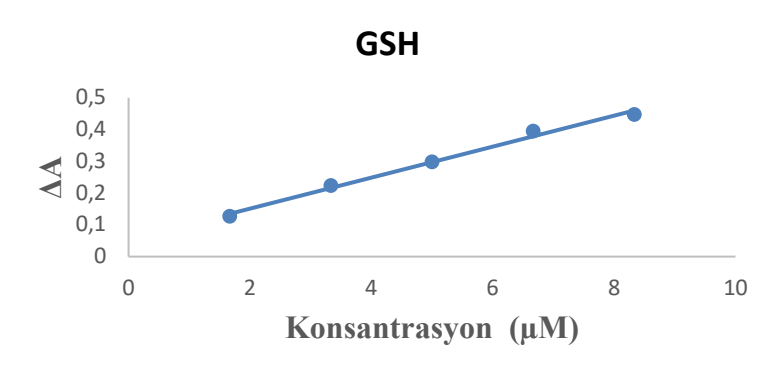
Şekil 4.32: Galik Asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



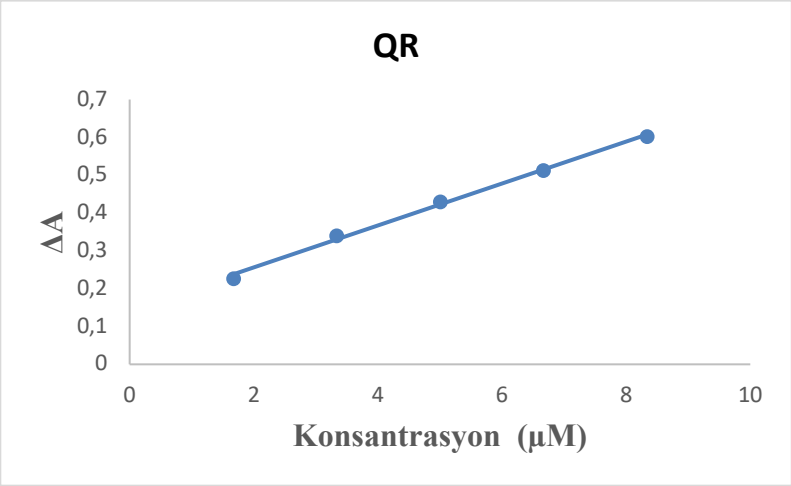
Şekil 4.33: Ferulik asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



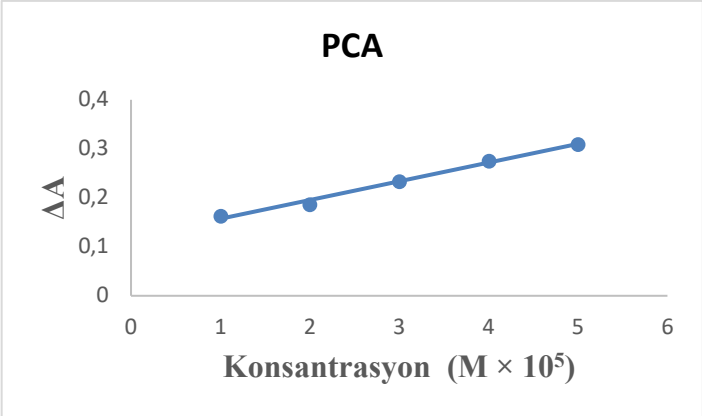
Şekil 4.34: Trolox için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



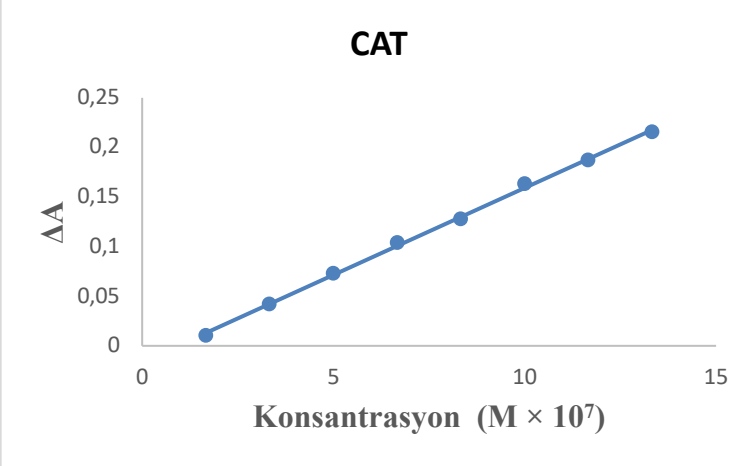
Şekil 4.35: L-Glutatyon için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



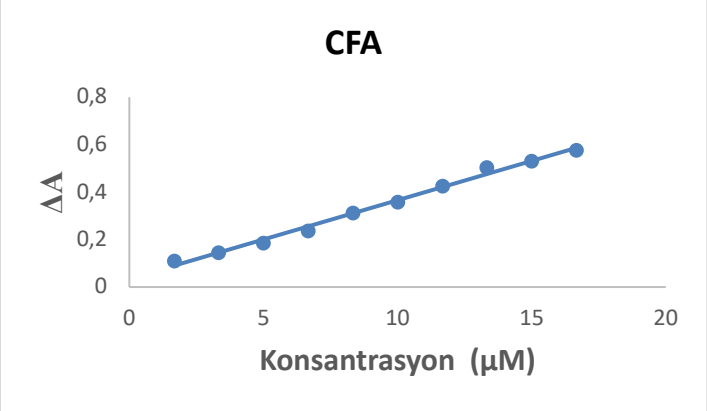
Şekil 4.36: Quercetin için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



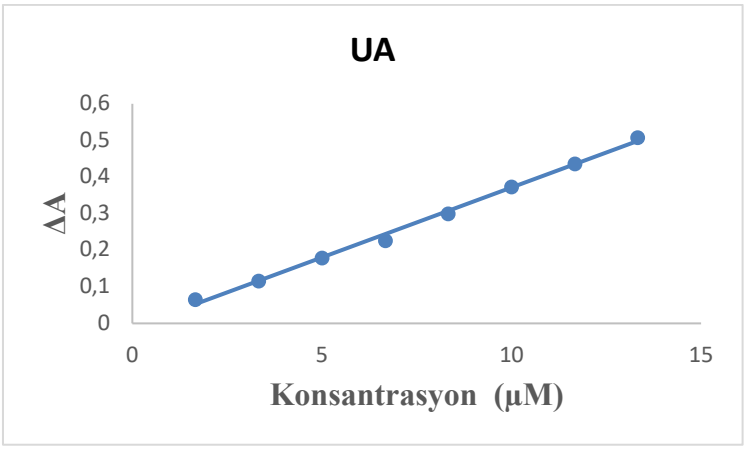
Şekil 4.37: *p*-kumarik için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



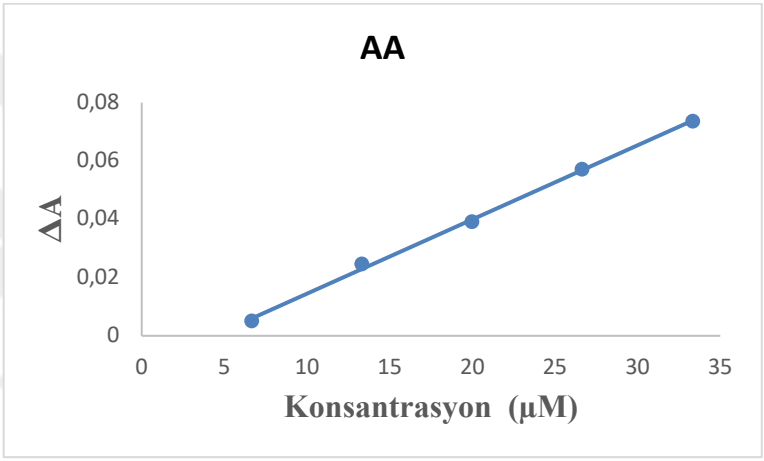
Şekil 4.38: Kateşin için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



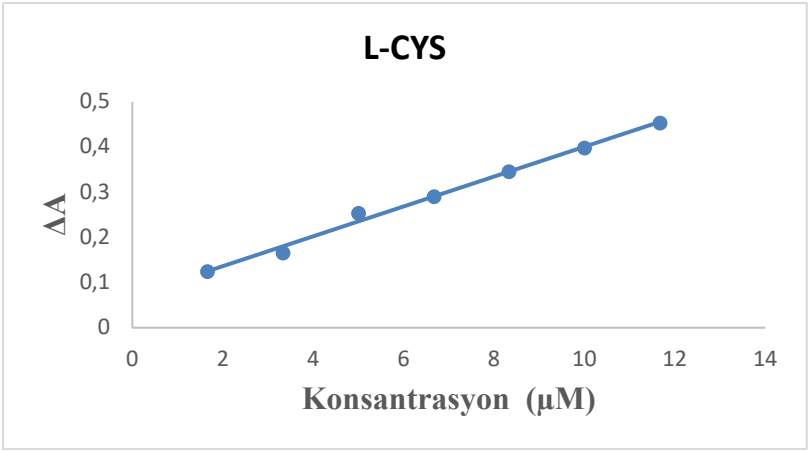
Şekil 4.39: Kafeik asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



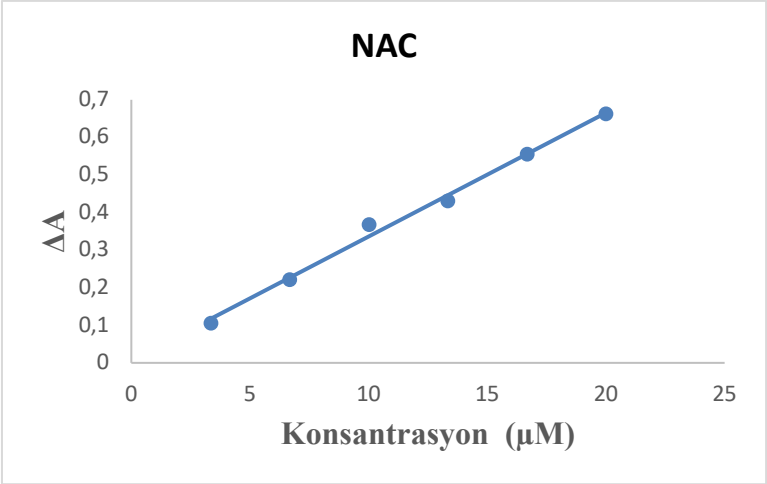
Şekil 4.40: Ürik asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



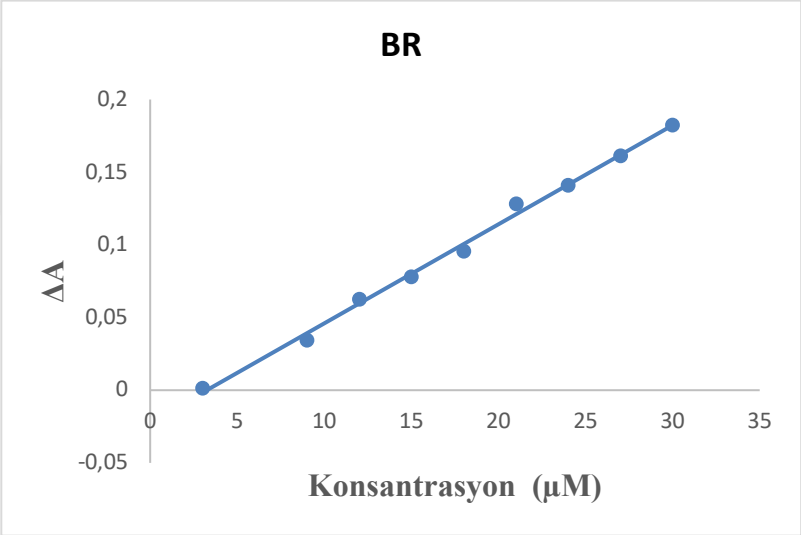
Şekil 4.41: Askorbik asit için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



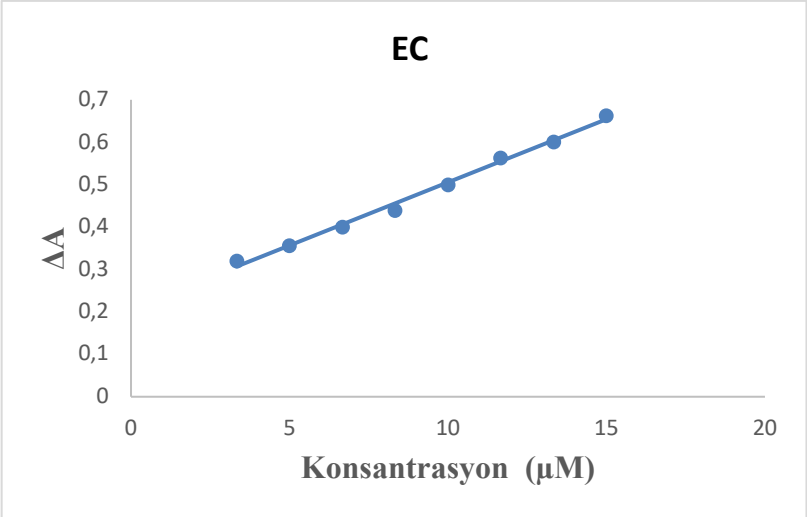
Şekil 4.42: L-sistein için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



Şekil 4.43: N-Asetilsistein için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



Şekil 4.44: Bilirubin için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği



Şekil 4.45: Epicatechin için ABTS/TEAC yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği

Tablo 4.3: Seçilen AOx bileşikler için ABTS / TEAC yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiklerine ait doğrusal denklemler ve regresyon katsayıları

AOx	Son Konsantrasyon (µM)	Kalibrasyon grafiğine ait doğru denklemi	Belirleme katsayısı (R^2)
GA	1.0 – 8.3	$\Delta A = (8.27\times10^4)\ C + 0.0677$	0.9942
FA	1.0 – 8.3	$\Delta A = (6.20\times10^4)\ C + 0.0864$	0.9902
TR	1.0 – 13.3	$\Delta A = (4.66\times10^4)\ C + 0.0332$	0.9989
GSH	1.0 – 8.3	$\Delta A = (4.88\times10^4)\ C + 0.0534$	0.9915
QR	1.0 – 8.3	$\Delta A = (5.54\times10^4)\ C + 0.1454$	0.9962
PCA	1.0 – 5.0	$\Delta A = (3.82\times10^3)\ C + 0.119$	0.9916
CAT	1.0 – 13.3	$\Delta A = (1.75\times10^5)\ C - 0.0162$	0.9988
CFA	1.0 – 17.0	$\Delta A = (3.31\times10^4)\ C + 0.0349$	0.9921
UA	1.0 – 13.3	$\Delta A = (3.82\times10^4)\ C - 0.0109$	0.9965
AA	6.0 – 33.3	$\Delta A = (2.55\times10^3)\ C - 0.011$	0.9985
CYS	1.0 – 12.0	$\Delta A = (3.31\times10^4)\ C + 0.0702$	0.9933
NAC	3.0 – 20.0	$\Delta A = (3.29\times10^4)\ C + 0.007$	0.9926
BR	3.0 – 30.0	$\Delta A = (6.84\times10^3)\ C - 0.0224$	0.9943
EC	3.0 – 15.0	$\Delta A = (2.98\times10^4)\ C + 0.208$	0.9923

4.8.1 Her AOx bileşiğinin Antioksidan kapasitesinin sırası

Her bir bileşiğin antioksidan kapasitesi, azalan eğim değerlerine göre düzenlenmiştir. Solda en yüksek antioksidan kapasiteye ve sağda en düşük kapasiteye sahip AOx bileşiğini gösterilmiştir.

CAt > GA > FA > QR > GSH > TR > UA > LCYS > CFA > NAC > EC > BR > PCA > AA

4.9 AOX KARIŞIMLARININ ÖNERİLEN YÖNTEM İLE BELİRLENMESİ

4.9.1 İkili Karışımlar

Geliştirilen hipokloröz asit süpürme yönteminin toplamsallığını araştırmak için prosedür farklı ikili ve üçlü antioksidan karışımlarına uyguandı. İşlem, malzemeler ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi yapılmış olup karışımlar için % Hata hesaplandı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda listelendi.

% Hata= $\{(\Delta A_{Deneysel} - \Delta A_{Teorik})/ \Delta A_{Teorik}\}\times 100$ formülü kullanılarak hesaplanmıştır.

HİPOKLORÖZ ASİT SÜPÜRME YÖNTEMİ İLE İKİLİ KARIŞIMLARIN ANALİZİ

AOx	**Abs**	**Abs (AOx'sız)**	**ΔA**	**% Hata**
GA	0.6729	1.2220	0.4581	
FA	0.7604		0.3336	
GA+FA	0.5023		0.7197	-9.09
TR	0.8224	1.0096		
AA	0.8280		0.1872	
TR + AA	0.6078		0.4018	+0.089
CAT	0.7491	1.0791	0.3300	
EC	0.6430		0.4361	
CAT + EC	0.3119		0.7672	-0.14
FA	0.9926	1.1596	0.167	

PCA	0.8730		0.2866	
FA+ PCA	0.7177		0.4419	-2.58
QR	0.7521	1.1908	0.4387	
CAT	0.7100		0.4808	
QR + CAT	0.3470		0.8438	-8.23
NAC	0.6338	1.0211	0.3873	
TR	0.8755		0.1456	
NAC + TR	0.5006		0.5205	-2.33
GA	0.6643	1.2384	0.5741	
AA	1.0905		0.1479	
GA + AA	0.5627		0.6757	-6.41
GA	0.9928	1.2445	0.2517	
NAC	0.9369		0.3076	
GA + NAC	0.6431		0.6014	-7.53
CYS	0.6029	1.2374	0.6345	
TR	0.9863		0.2511	
CYS + TR	0.3882		0.8492	-4.11
CYS	0.6279	1.2373	0.6094	
AA	1.1543		0.083	
CYS + AA	0.5213		0.716	+3.4
PCA	0.9417	1.3591	0.4174	
CFA	1.0558		0.3033	
PCA + CFA	0.6892		0.6699	-7.05

Tablo 4.4: Hipokloröz asit süpürme yöntemi ile analizi gerçekleştirilen ikili AOx karışımları için % hata değerleri

4.9.2 Üçlü karışımlar

Hipokloröz asit süpürme yönteminin toplamsallığını araştırmak için prosedür dört farklı üçlü antioksidan karışımı ile test edildi. İşlem, malzemeler ve yöntem bölümünde belirtildiği gibi gerçekleştirildi ve karışımlar için % Hatalar hesaplandı. Elde edilen sonuçlar aşağıdaki tabloda listelendi.

HİPOKLORÖZ ASİT SÜPÜRME YÖNTEMİ İLE ÜÇLÜ KARIŞIMLARIN ANALİZİ

AOx	Abs	Abs (AOx olmadan)	ΔA	%Hata
TR	0.8384	1.1639	0.3255	
AA	1.1568		0.0071	
CYS	0.6543		0.5096	
TR + AA+ CYS	0.3380		0.8259	-1.94
PCA	0.8286	1.2627	0.4341	
CFA	0.9711		0.2916	
FA	1.0386		0.2241	
PCA + CFA + FA	0.3313		0.9314	-1.93
CAT	0.9061	1.3093	0.4032	
EC	0.8011		0.5082	
TR	1.1588		0.1505	
CAT + EC + TR	0.3000		1.0093	-4.95
CAT	0.9788	1.1883	0.2095	
EC	0.9206		0.2677	
CYS	1.0510		0.1373	
CAT + EC + CYS	0.5999		0.5884	-4.25

Tablo 4.5: Hipokloröz asit süpürme yöntemi ile analizi gerçekleştirilen üçlü AOx karışımları için % hata değerleri

4.10 STANDART YÖNTEMLER İLE İKİLİ VE ÜÇLÜ KARIŞIMLARIN ANALİZİ

Referans yöntem olarak kullanılan CUPRAC ve ABTS/TEAC yöntemleri sentetik antioksidan karışımlarına uygulanarak % hata değerleri hesaplandı.

4.10.1 CUPRAC yöntemi kullanılarak AOx'ların ikili ve üçlü karışımlarının analizi

CUPRAC yöntemi, materyaller ve yöntemler bölümünde belirtilen şekilde ikili ve üçlü antioksidan karışımlarına uygulandı. Aşağıdaki tabloda, test edilen antioksidanların bireysel ve karışım olması durumunda elde edilen absorbansları ve ilgili % hatalarını, ***Denklem xvi*** gösterdiği gibi hesaplandi.

CUPRAC YÖNTEMİ İLE İKİLİ KARIŞIMLARIN ANALİZİ

AOx	**Abs (AOx)**	**%Hata**
GA	0.5653	
FA	0.2711	
GA + FA	0.8396	-0.38
EC	0.5580	
CAT	0.3953	
EC +CAT	1.0087	-5.8
TR	0.1909	
AA	0.0163	
TR + AA	0.2144	-3.47

CUPRAC YÖNTEMİ İLE ÜÇLÜ KARIŞIMLARIN ANALİZİ

AOx	Abs	%Hata
CAT	0.2776	
EC	0.2402	
CYS	0.0698	
CAT + EC + CYS	0.6439	-9.5
PCA	0.1199	
CFA	0.2190	
FA	0.3215	
PCA + CFA + FA	0.6311	+4.4
TR	0.1971	
AA	0.0294	
CYS	0.0400	
TR + AA + CYS	0.2692	-1.01

Tablo 4.6: CUPRAC yöntemini ile analizi gerçekleştirilen ikili ve üçlü AOx karışımları için % hata değerleri

4.10.2 ABTS / TEAC yöntemi kullanılarak AOx'un ikili ve üçlü karışımlarının belirlenmesi

ABTS / TEAC yöntemi, materyaller ve yöntemler bölümünde belirtilen şekilde ikili ve üçlü antioksidan karışımlarına uygulandı. Aşağıdaki tabloda, test edilen antioksidanların bireysel ve karışım olması durumunda elde edilen absorbansları ve ilgili % hatalarını göstermektedir.

ABTS / TEAC YÖNTEMİ İLE İKİLİ KARIŞIMLARIN ANALİZİ

AOx	**A_i (AOx varlığında absorbans)**	**A_0 (Boşluğun absorbansı)**	**ΔA**	**%Hata**
CAT	0.6052	0.8399	0.2347	
EC	0.5741		0.2658	
CAT + EC	0.3339		0.506	-1.1
TR	0.8189	1.1335	0.3146	
AA	1.1006		0.0329	
TR + AA	0.7525		0.381	-9.6

ABTS / TEAC YÖNTEMİ İLE ÜÇLÜ KARIŞIMLARIN ANALİZİ

AOx	**A_i**	**A_0**	**ΔA**	**%Hata**
CAT	0.6725	0.9199	0.2474	
EC	0.4272		0.4927	
CYS	0.8821		0.0378	
CAT + EC + CYS	0.1552		0.7779	-1.7
TR	0.8070	1.1036	0.2966	
AA	1.1015		0.0021	
CYS	0.9895		0.1141	
TR + AA + CYS	0.6703		0.4333	-4.97

Tablo 4.7: ABTS / TEAC yöntemi ile analizi gerçekleştirilen ikili ve üçlü AOx karışımları için % hata değerleri

4.10.3 HPLC ANALİZİ SONUÇLARI

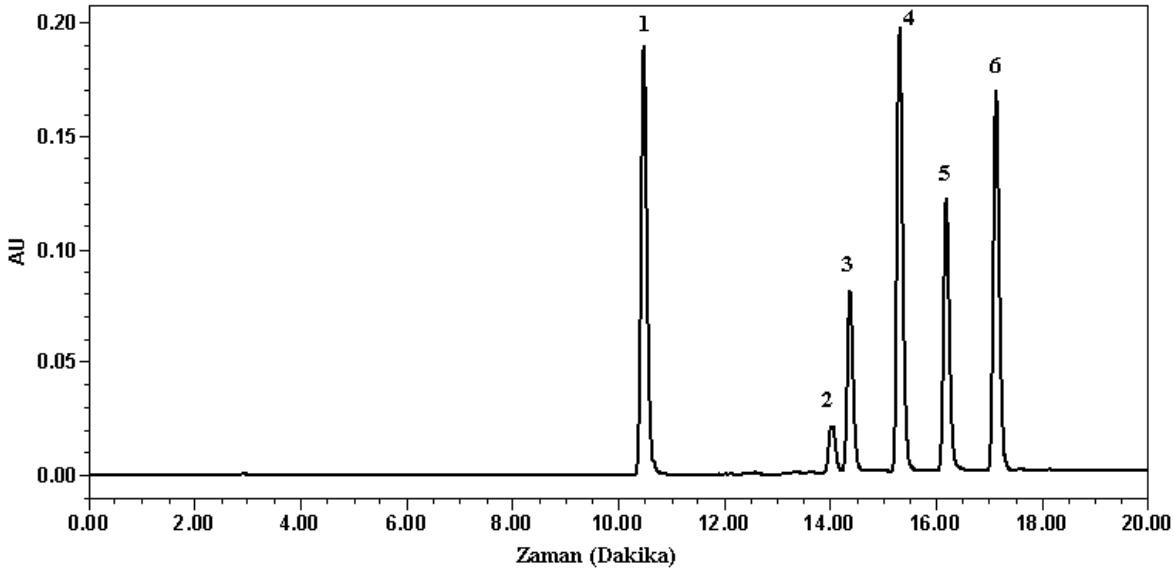
Kromatografik ayırma, malzeme ve yöntemlerin bölümünde açıklandığı gibi gerçekleştirildi. Öncelikle yeşil çayda bulunduğu literatürler yardımıyla bilinen sentetik standart antioksidanların bir karışımı hazırlandı ve belirlenmiş olan prosedür uygulanarak bu bileşiklerin ayrılarak tayini gerçekleştirildi ve ilgili kromatogram aşağıda gösterildi (**Şekil 4.45)** Daha sonra yeşil çay gerçek numunesi çözeltisi, **Şekil 4.46'da** gösterildiği gibi ayırma için kolondan geçirildi.

4.10.3.1 Standart AOx karışımına uygulanan HPLC yönteminin sonuçları

HPLC yöntemi ile analiz edilen yeşil çay örneğinde varlığı belirlenen çay antioksidan bileşiklerin standartlarının derişimleri ile pik alanları arasında oluşturulan kalibrasyon grafiklerinden elde edilen veriler **Tablo 4.8**'de özetlenmiştir.

Antioksidan	**T_R (Dakika)**	**Lineer Aralık (Mol L^{-1})**	**Kalibrasyon Denklemi**	**Belirleme Katsayısı (R^2)**
Gallik Asit (GA)	10.60	5×10^{-6} - 1×10^{-4}	$y = 1.498\times10^{10}C + 37537$	0.9999
Epigallokateşin (EGC)	13.86	5×10^{-6} - 1×10^{-4}	$y = 1.53\times10^{9}C + 4017$	0.9999
Kateşin (CAt)	14.40	5×10^{-6} - 1×10^{-4}	$y = 6.1\times10^{9}C + 15363$	0.9999
Epigallokateşin gallat (EGCG)	15.14	5×10^{-6} - 1×10^{-4}	$y = 1.54\times10^{10}C + 19180$	0.9999
Epikateşin (EC)	16.50	5×10^{-6} - 1×10^{-4}	$y = 9.48\times10^{9}C + 24732$	0.9999
Epikateşin Gallat	17.19	5×10^{-6} - 1×10^{-4}	$y = 1.34\times10^{10}C + 21997$	0.9999

Tablo 4.8: Çay antioksidanlarının HPLC yöntemiyle hesaplanan kalibrasyon denklemleri, alıkoyma süreleri ve doğrusal aralıklar

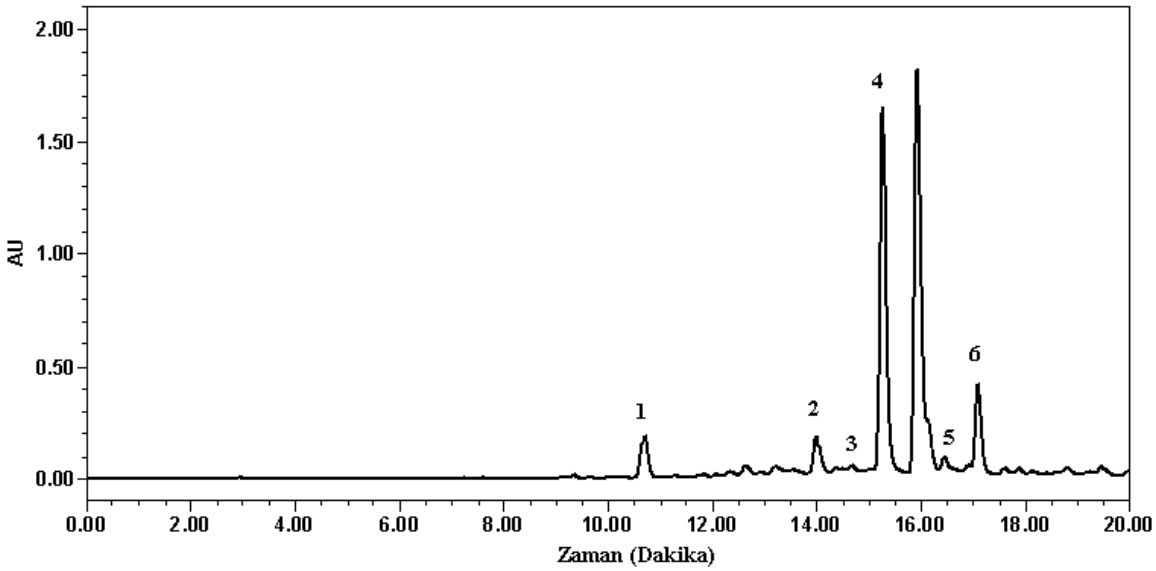


Şekil 4.46: 280 nm'de standart antioksidan karışımına ait kromatogram (Galik asit[1] Epigallokateşin[2] Kateşin[3] Epigallokateşin gallat[4] Epikateşin[5] Epikateşin gallat[6])

Yukarıdaki şekil, analiz edilecek yeşil çay örneklerinde bulunduğu bilinen sentetik standart antioksidan karışımının kromatogramını göstermektedir.

4.10.3.2 HPLC yöntemiyle gerçekleştirilen yeşil çay örneğinin analiz sonuçları

Analiz edilen yeşil çay numunesi, **4.2.5** bölümünde belirtildiği gibi destile su içinde uygun şekilde demlendi. Ardından elde edilen çözelti HPLC'ye enjekte edilmeden önce süzüldü. 280 nm'de elde edilen kromatogram ve bulunan antioksidanlar aşağıdaki **Şekil 4.46**'da göstermektedir. HPLC yöntemiyle ayrılan bileşiklerin konsantrasyonu, daha önce elde edilen kalibrasyon denklemlerinden yararlanılarak hesaplandı. Daha sonra yeşil çayın TAC değeri, yukarıdaki ***denklem xiv***'te gösterilen formül kullanılarak belirlendi. HPLC-CUPRAC yöntemi ve önerilen yöntem ile elde edilen TAC değerleri birbirine oldukça yakın olmakla birlikte, HPLC-CUPRAC yöntemi ile elde edilen TAC değeri, sunulan yönteminkine kıyasla çok az düşüktür. HPLC-CUPRAC yönteminin değerindeki düşüş, HPLC ile ayrılmayan ve dolayısıyla yeşil çayın TAC değeri hesaplanırken dikkate alınmayan bazı bileşiklerden kaynaklandığı düşündürmektedir.

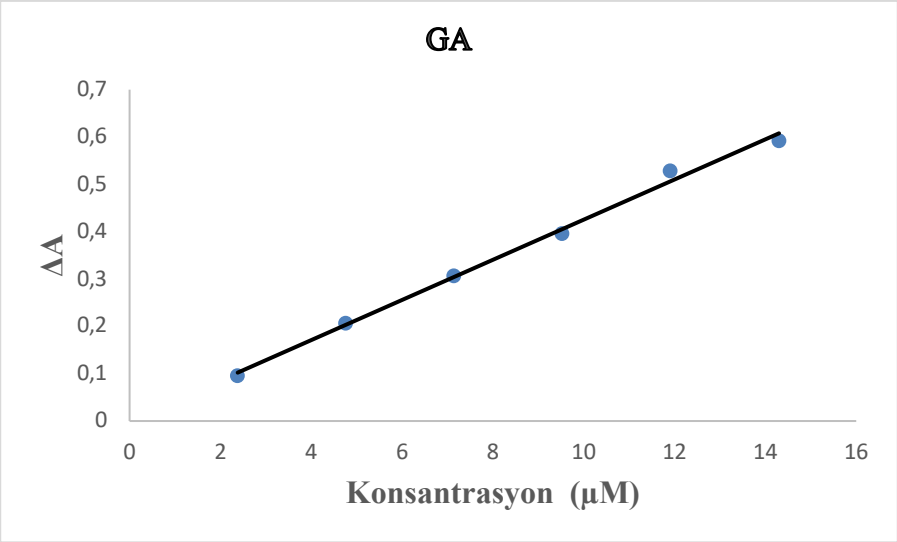


Şekil 4.47: 280 nm'de yeşil çay örneğinin analizinine ait kromatogram (Galik asit[1] Epigallokateşin[2] Kateşin[3] Epigallokateşin gallat[4] Epikateşin[5] Epikateşin gallat[6])

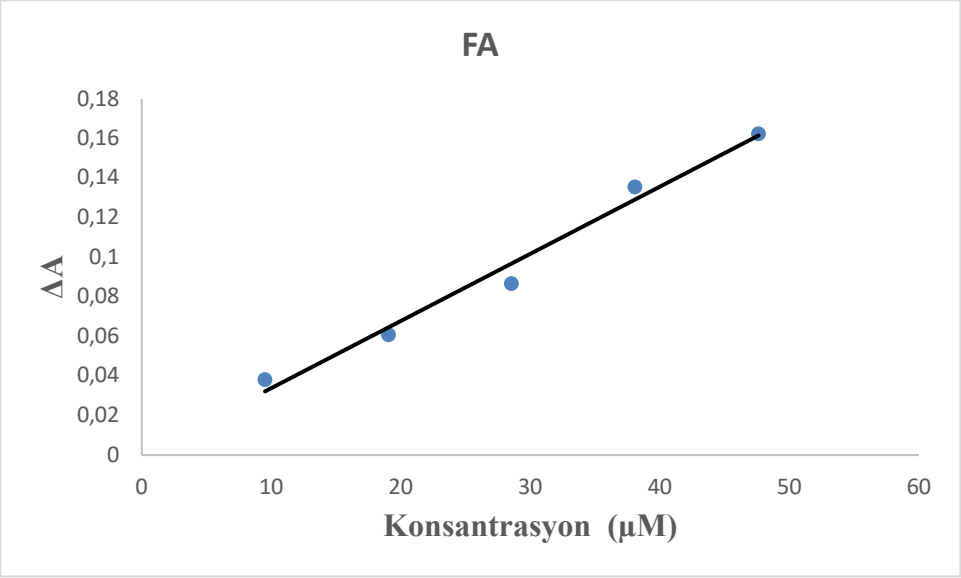
Kromatogramdaki numaralandırılmamış pikin kafeine ait olduğu belirlenmiştir. Kafein, indirgeyici fenolik hidroksil gruplarının eksikliği nedeniyle antioksidan etkiye sahip olmadığından, yeşil çay örneğinin TAC hesaplamasında dikkate alınmamıştır [**157**].

4.11 SEÇİLEN SENTETİK ANTİOKSİDANLAR İÇİN KI/TAURİN YÖNTEMİNİN UYGULANMASI

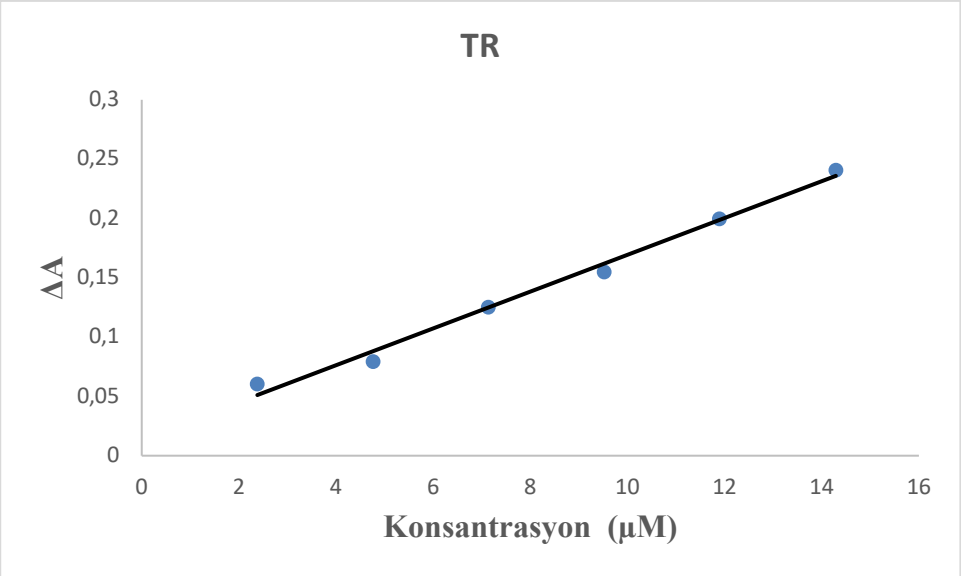
KI/taurin yöntemi malzemeler ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi uygulandı, antioksidan bileşik konsantrasyonuna karşılık absorbans değişimleri arasında lineer kalibrasyon grafiği çizildi. Elde edilen grafikler şekilde gösterildi.



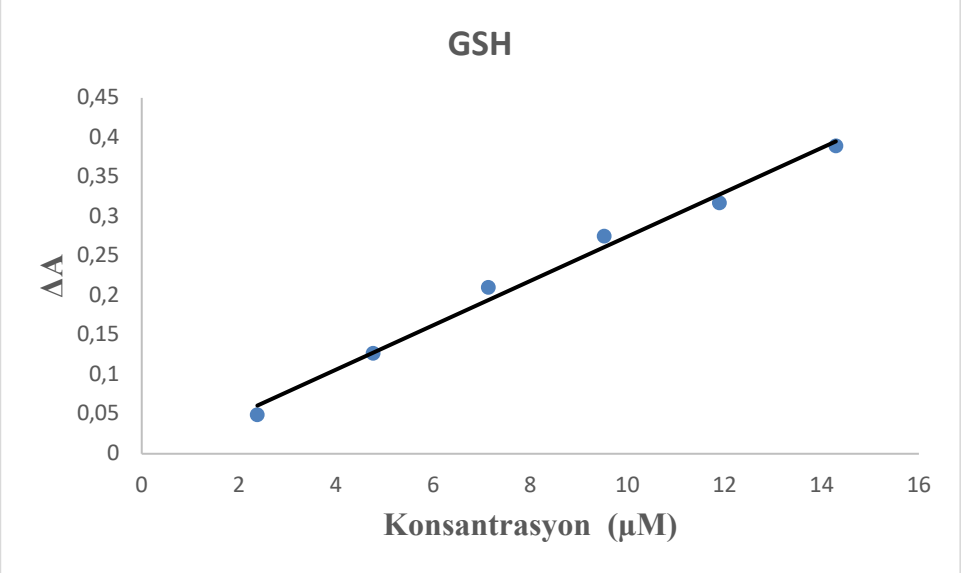
Şekil 4.48: Galik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



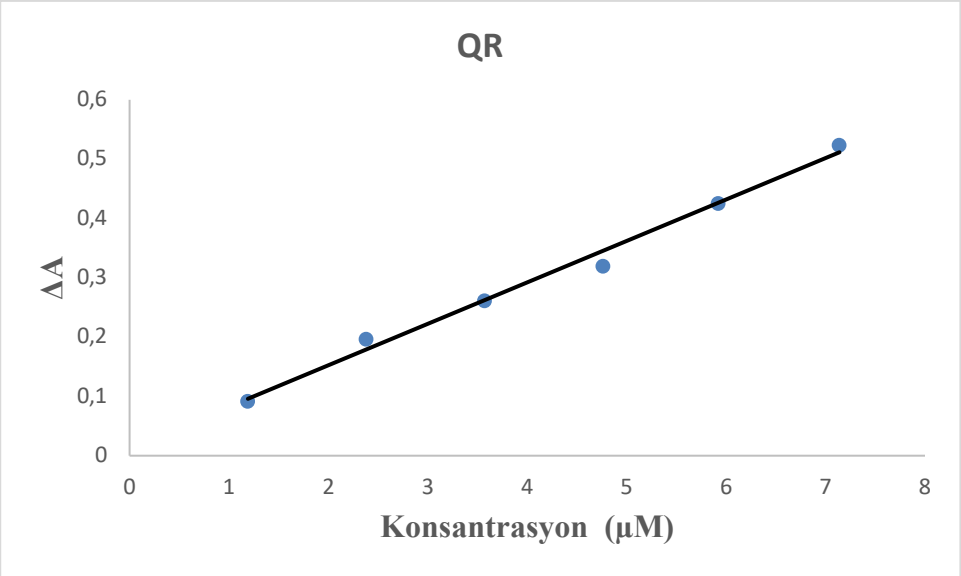
Şekil 4.49: Ferulik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



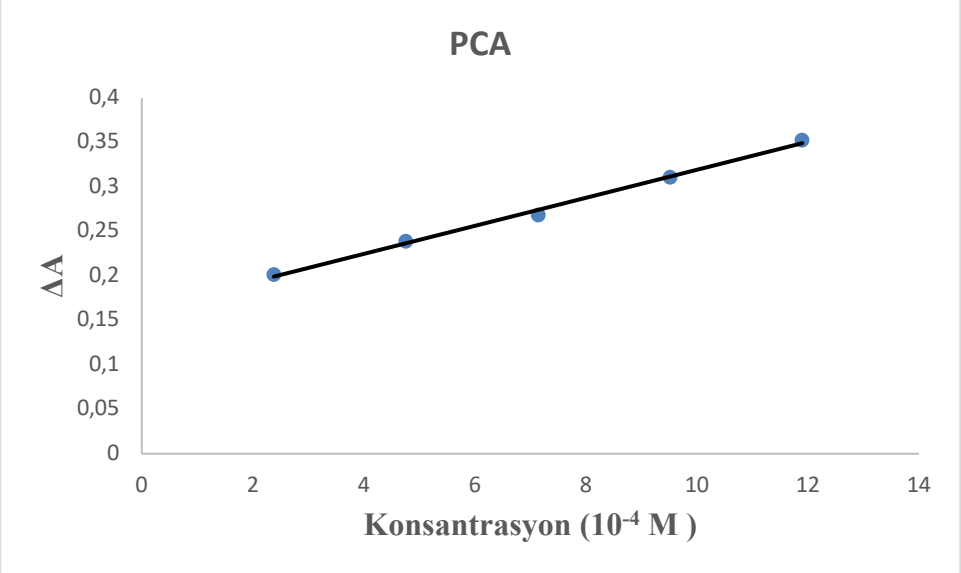
Şekil 4.50: Troloks için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



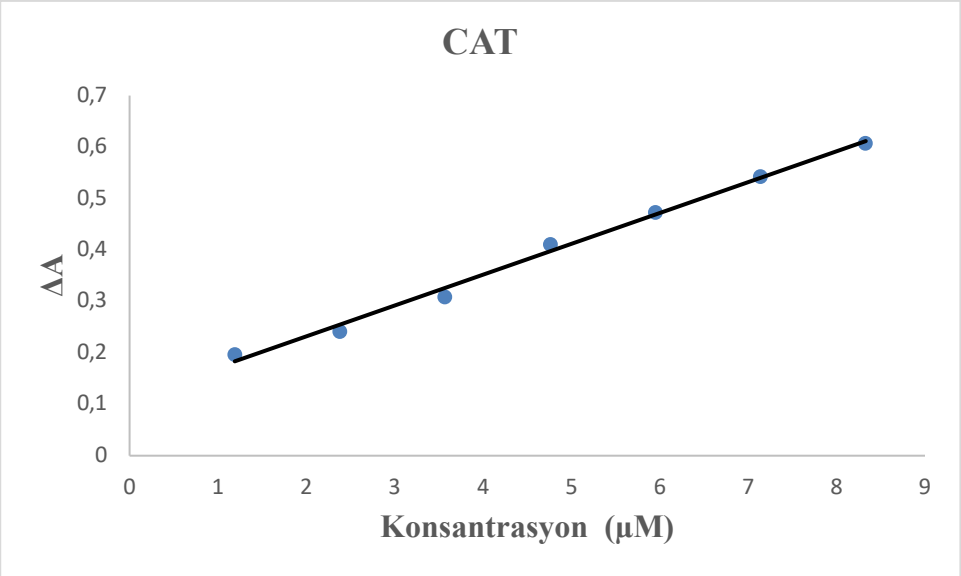
Şekil 4.51: Glutatyon için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



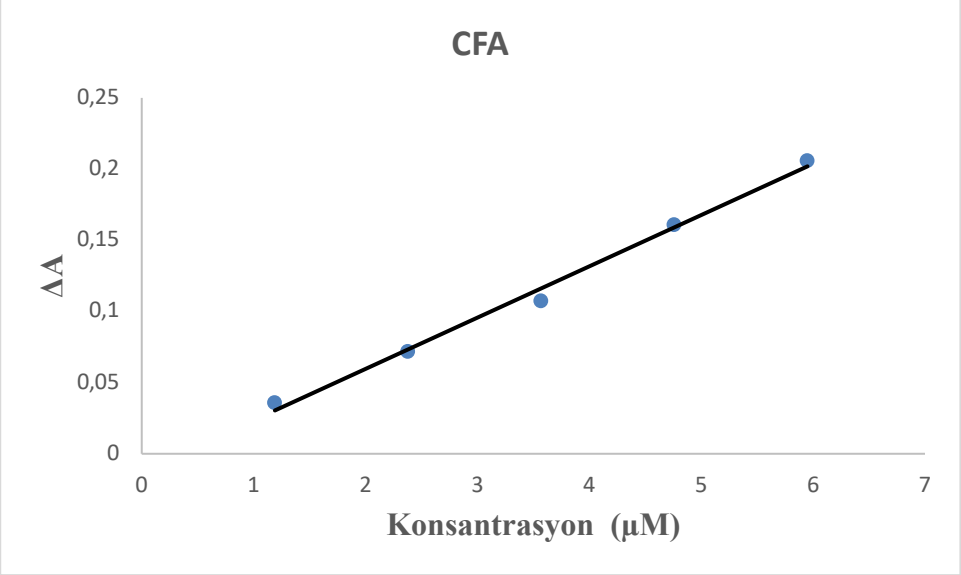
Şekil 4.52: Kuersetin için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



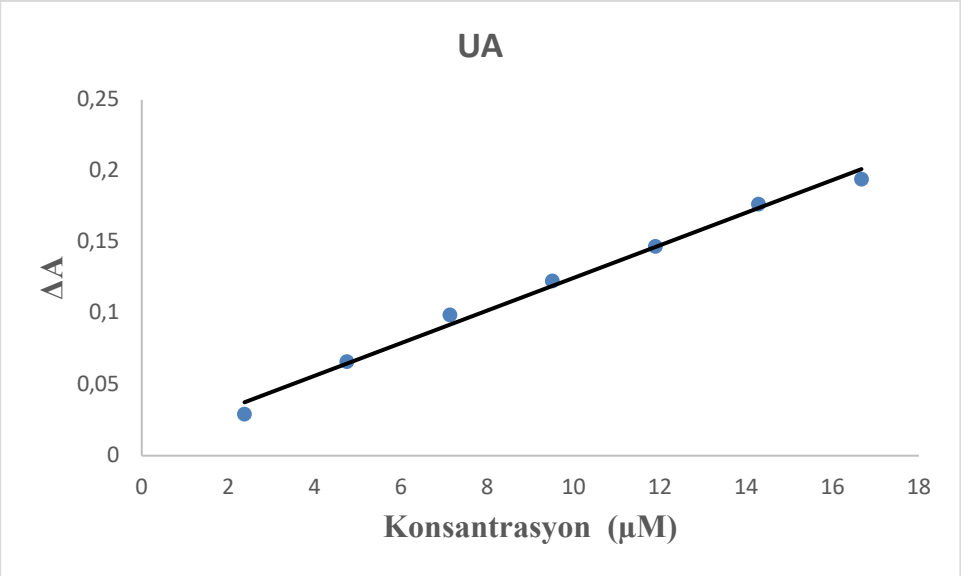
Şekil 4.53: P-kumarik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



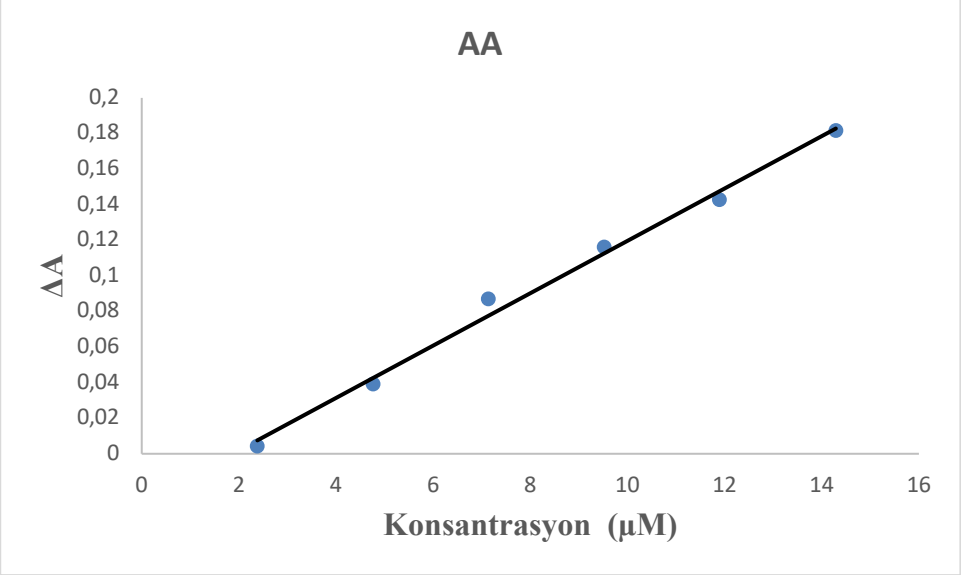
Şekil 4.54: Kateçin için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



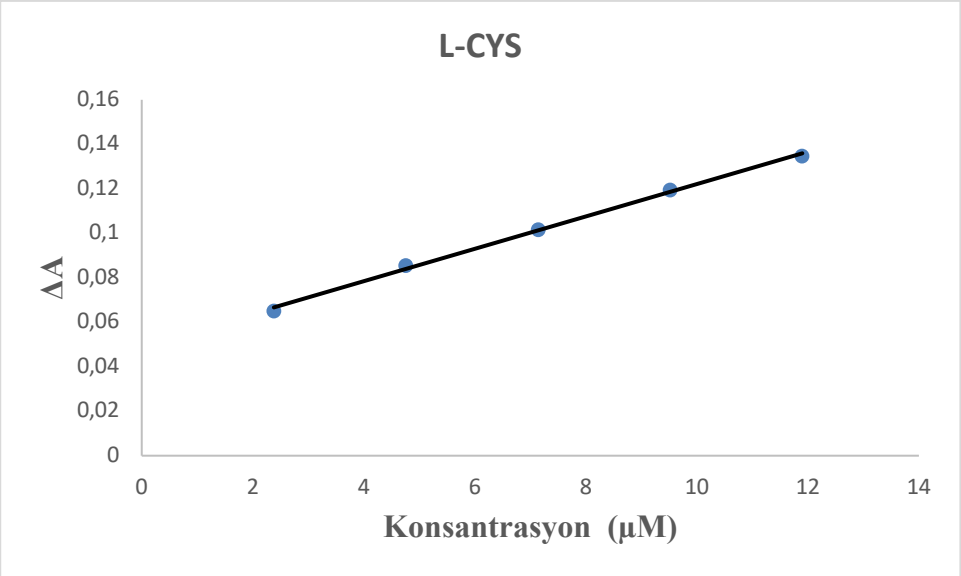
Şekil 4.55: Kafeic Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



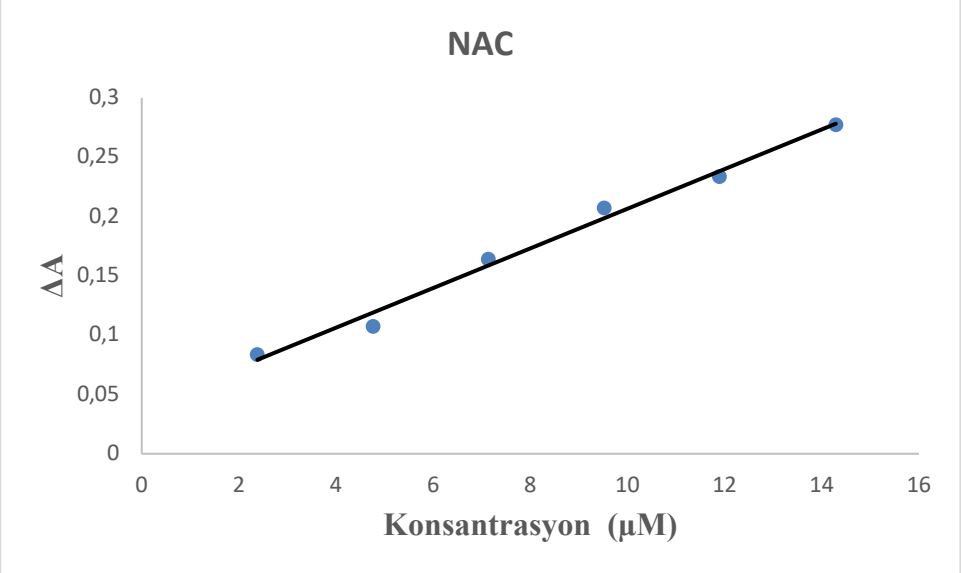
Şekil 4.56: Ürik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



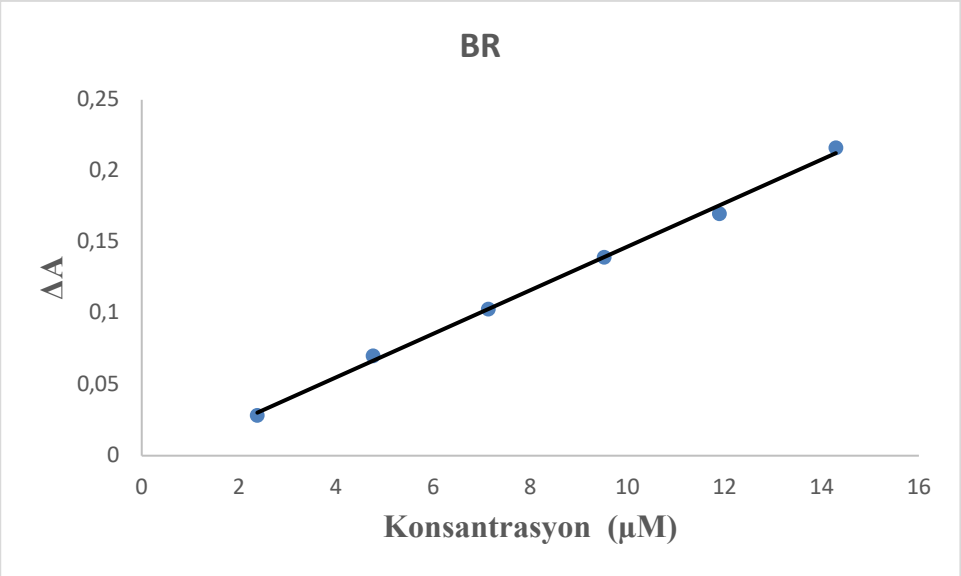
Şekil 4.57: Askorbik Asit için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



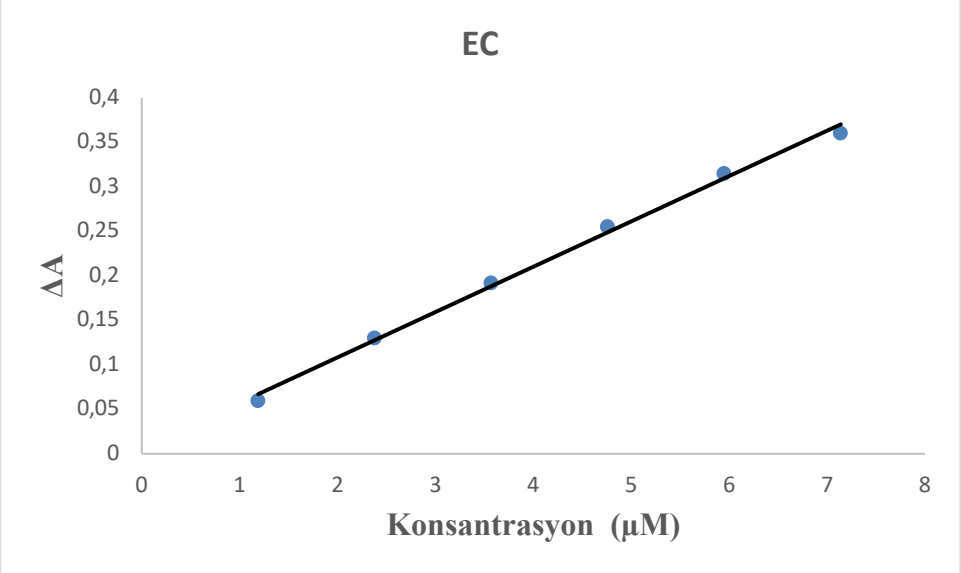
Şekil 4.58: L-Sistein için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.59: N-Asetilsistein için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.60: Bilirubin için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.



Şekil 4.61: Epikateçin için, KI/taurin yönteminde elde edilen lineer kalibrasyon grafiği.

Tablo 4.9: Test edilen antioksidanlar için KI / taurin yöntemiyle elde edilen doğrusal kalibrasyon denklemleri ve belirleme katsayıları.

AOx	Çalışılan Konsantrasyon Aralığı (µM)	Kalibrasyon grafiğine ait doğru denklemi	Belirleme katsayısı (R^2)
GA	2.38 – 14.3	**ΔA** = (42449)C + 0,001	0,9951
FA	9.52 – 47.62	**ΔA** = (3396,8)C - 0,0001	0,9817
TR	2.38 – 14.28	**ΔA** = (15515)C + 0,0142	0,9900
GSH	2.38 – 14.28	**ΔA** = (28054)C - 0,0059	0,9909
QR	1.19 – 7.14	**ΔA** = (69670)C + 0,0131	0,9904
PCA	238.0 – 1190.47	**ΔA** = (157,46)C + 0,1616	0,9963
CAT	1.19 – 8.33	**ΔA** = (59934)C + 0,112	0,9940
CFA	1.19 – 5.95	**ΔA** = (36011)C - 0,0125	0,9931
UA	2.38 – 16.66	**ΔA** = (11466)C + 0,0102	0,9913
AA	2.38 – 14.28	**ΔA** = (14717)C - 0,0275	0,9933
CYS	2.38 – 11.90	**ΔA** = (7274,4)C + 0,0493	0,9976
NAC	2.38 – 14.28	**ΔA** = (16714)C + 0,0394	0,9901
BR	2.38 – 14.28	**ΔA** = (15308)C - 0,0063	0,9972
EC	1.19 – 7.14	**ΔA** = (50938)C + 0,0064	0,9963

4.12 HER AOX BİLEŞİĞİNİN ANTİOKSİDAN AKTİVİTE SIRASI

Her bir bileşiğin antioksidan aktivitesi, azalan eğim değerlerine göre düzenlenmiştir. Solda en yüksek antioksidan kapasiteye ve sağda en düşük aktiviteye sahip AOx bileşiğini gösterir.

QR>CAT>EC>GA>CFA>GSH>NAC>TR>BR>AA>UA>LCYS>FA>PCA

4.13 SPEARMAN KORELASYON KATSAYISI

Spearman korelasyon katsayısı, eşleştirilmiş veriler arasındaki ilişkinin istatiksel bir ölçüsüdür. Spearman korelasyon katsayısı aşağıdaki denklem'e göre hesaplandı.

$$\mathbf{r_s = 1 - \frac{6\sum di^2}{n(n^2-1)}} \qquad \textbf{(xxii)}$$

r_s = Spearman sıralama analiz korelasyonu

d_i = İki sira arasındaki fark

n = Örnek sayısı

Spearman yönteminde iki sıra arasındaki uyumu gösteren katsayılar aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Spearman's correlation, accessed May, 2020).

- 00 – 0.019 "Çok zayıf"
- 0.20 – 0.39 "Zayıf"
- 0.40 – 0.59 "Ilımlı"
- 0.60 – 0.79 "Güçlü"
- 0.80 – 1.0 "Çok güçlü"

Taurin Metodu;
QR>CAT>EC>GA>CFA>GSH>NAC>TR>BR>AA>UA>LCYS>FA>PCA
Önerilen metodu;
CAT>NAC>GSH>QR>EC>UA>LCYS>BR>GA>TR>AA>CFA>FA>PCA

Önerilen yöntemdeki antioksidan aktivite sırası, Spearman'ın korelasyon testi kullanılarak KI / Taurine yöntemiyle karşılaştırıldı. Elde edilen $\mathbf{r_s}$ değeri kılavuzla karşılaştırıldı. $\mathbf{r_s}$ değeri 0.6088 olup bu iki düzen arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir.

4.14 GERÇEK ÖRNEKLERE UYGULANAN YÖNTEMLERİN SONUÇLARI

4.14.1 Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

Gerçek örnek olarak denenen yeşil çayında toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için önerilen hipokloröz asit süpürme yöntemi uygulandı. Bu yöntemle elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla standart yöntemler olarak CUPRAC ve ABTS / TEAC yöntemleri kullanıldı. Yeşil çay örneği için ayrıca TAC değeri bir de HPLC-CUPRAC yöntemi kullanılarak analiz edildi. Malzemeler ve yöntemler bölümünde belirtildiği gibi deneysel

prosedürler takip edildi. Sonuçlar aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi mmol TR / g eşdeğeri olarak hesaplandı.

Numuneler	Hipokloröz asit süpürme yöntemi (mmolTR/g)	CUPRAC (mmolTR/g)	ABTS (mmolTR/g)	HPLC-CUPRAC (mmolTR/g)
Green Tea (Yeşil çay)	0,873±0,003	0,477±0,010	0,376±0,015	0,809±0,018

Tablo 4.10: Yeşil çayının (Gerçek Örnek) mmol TR / g eşdeğeri toplam antioksidan kapasitesi (TAC) değerleri

Numuneler	Önerilen Yöntemi (mmol TR/g)	Taurin/KI (mmol TR/g)
Green Tea (Yeşil çay)	0,776±0,007	1,025±0,008
White Tea (Beyaz çay)	0,525±0,007	0,598±0,06
Black Tea (Siyah çay)	0,361±0,006	0,413±0,07

Tablo 4.11: Önerilen yöntemin ve Standart Hipokloröz asit süpürme yöntemi olan KI/Taurin Yöntemlerinin gerçek örneklere uygulanması ve sonuçların kıyaslanması

Yukarıdaki tablo 4.10'dan da görüldüğü üzere TAC değerlerindeki farklılık yöntemlerin dayandığı prensiplerin farklılıklarıyla açıklanabilir. Geliştirilen yöntemde TAC değeri AOx bileşiklerin HOCl süpürme etkinliğini ölçerken, ABTS/TEAC yönteminde oluşan (+) yüklü ABTS radikalinin süpürülmesi baz alınmaktadır. CUPRAC yöntemi ise diğerlerinden farklı olarak redoks esasına dayanmaktadır. Sonuçlarda çok büyük farklılıklar görülmesi üzerine geliştirilen yöntemi kıyaslamak üzere yine hipokloröz asit süpürme aktivitesini ölçen bir başka standart yöntem (KI/Taurin) kullanıldı. Elde edilen sonuçlar tablo 4.11'de verilmiştir. Tablo 4.11'den de görüldüğü üzere her iki yöntem (geliştirilen metod ve KI/Taurin) aynı parametreyi ölçtükleri için sonuçlar CUPRAC ve ABTS/TEAC yöntemlerine göre çok daha benzer çıkmıştır. Ayrıca geliştirilen yöntem ve KI/Taurin metodları ile antioksidanların hipokloröz asit süpürme etkinlikleri araştırılmış ve her iki yöntem için ayrı ayrı hipokloröz asit süpürme etkinliği sırası elde edilmiştir. AOx sıralamaları herbir yöntem için AOx'lerin kalibrasyon

denklemlerinin gösterildiği tablonun altında verilmiştir. Daha sonra Spearman yöntemi kullanılarak sıralamalar arasındaki tutarlılık incelenmiştir. Buna göre çıkan sonuç 0.6088 olup iki farklı yöntemle yapılan sıralamalar arasındaki uyumun güçlü olduğu belirlenmiştir (Bölüm 4.13)

4.14.2 Gerçek örneklere geri kazanım testlerinin uygulanması

Gerçek örnekler olarak seçilen yeşil çay, beyaz çay ve siyah çay üzerine en çok bulunan antioksidanlar olan GA, CAT ve EC için standat katkılar yapıldı ve gerçek örnek içerisine katılan AOx miktarının doğru belirlenip belirlenemediği araştırıldı. Bu amaçla seçilen antioksidanların farklı miktarları gerçek örnekler üzerine eklendi geliştirilen yöntem katkılı ve katkısız örneklere uygulandı elde edilen sonuçlar, hesaplanan geri kazanım değerleri ve % hatalar tablo 4.12'de gösterildi. Sonuçlar geri kazanım yüzdelerinin yüksek, hata değerlerinin düşük olduğunu gösterdi. Bu da geliştirilen yöntemin gerçek örneklere başarı ile uygulanabileceğinin göstergesi olarak değerlendirildi.

AOx	ΔAbs (Deneysel)	Teorik Değerler	%Geri Kazanım	%Hata
Yeşil Çay	0.2015			
CAT	0.1206			
Karışım	0.2984	0.3221	80.4	-7.36
Yeşil Çay	0.2272			
GA	0.1076			
Karışım	0.3053	0.3348	72.6	-8.81
Beyaz Çay	0.2546			
EC	0.081			
Karışım	0.3278	0.3356	90.4	-2.32
Beyaz Çay	0.1872			
GA	0.0899			

Karışım	0.2593	0.2771	80.2	-6.42
Siyah Çay	0.2268			
EC	0.2366			
Karışım	0.4284	0.4634	85.2	-7.55
Siyah Çay	0.1769			
GA	0.0459			
Karışım	0.2373	0.2228	131.6	6.50

Tablo 4.12: Önerilen yöntemle standart ekleme testlerini kullanarak % geri kazanım ve% hatasını gösterir ⌋

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Yapılan tez çalışmasında toplam antioksidan kapasite (TAC) belirlenmesi amacıyla yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Gerçek örnek olarak kullanılan yeşil çayın TAC değeri, mmol TR / g eşdeğeri cinsinden ölçülmüş ve 0,776±0,007 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte, yeşil çay için uygulanan HPLC-CUPRAC yönteminden elde edilen TAC değeri ile önerilen yöntem kullanılarak bulunan değer karşılaştırıldığında önemli bir yakınlık olduğu da görülmüştür. Şekil 4.47'da yeşil çay örneğinde bulunan tüm antioksidanları ve kafeini (pik 5) göstermektedir. Kafein içeriğinde indirgeyici fenolik hidroksil grubu olmaması nedeniyle herhangi bir antioksidan kapasiteye sahip olmadığından TAC hesaplanmasında dikkate alınmamıştır. Ayrıca HPLC ile ayrılmayan veya düşük konsantrasyon nedeniyle bazı antioksidan bileşenlerin kromatogramda açıkça ayrılmadığı da düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlar Çelik ve ark. tarafından gerçekleştirilen HPLC-CUPRAC yöntemi ile yeşil çayın toplam antioksidan kapasitesi sonuçlarıyla uymaktadır [**157**].

Önerilen yöntem için her bir bileşiğin HOCl süpürme etkinliği, bireysel antioksidanlar için çizilen kalibrasyon grafiklerinden elde edilen doğruların eğim değerleri göz önüne alınarak sıralanmış ve standart yöntemler için de benzer bir işlem yapılmıştır. Bölüm 4.6.1, 4.7.1 ve 4.8.1, 4.12. de gösterildiği gibi tüm yöntem için de en etkin AOx bileşiklerin kateşin ve kuersetin olduğu sonucuna varılmıştır.

Nispeten düşük sayılabilecek standart sapma değerleri, tekrarlanabilirliği doğrular niteliktedir. Geliştirilen yöntem analiz süresinin kısalığı ve uygulama kolaylığı gibi önemli avantajlara sahiptir. Hipokloröz asit süpürme testi, çok fazla analitik beceri gerektirmeyen hızlı, ucuz ve etkili bir yöntemdir.

Önerilen yöntemin toplamsallığı, farklı ikili ve üçlü antioksidan karışımları test edilerek incelenmiştir. Tablo 4.4 ve 4.5'te gösterildiği gibi, % hata değerleri ikili karışımlar için ± 0.089 ila ± 9.00 ve üçlü karışımlar için ± 1.93 ila ± 4.95 arasında çıkmış olup nispeten düşük hata oranları önerilen analitik yöntemin toplamsallığını ifade etmektedir. İkili karışımlar dikkate alındığında CAT + EC önerilen yöntemde + %0.14 ile en düşük %hata değerini verirken, standart yöntemler, CUPRAC ve ABTS sırasıyla - %5.8 ve - % 1.1 vermiştir (Tablo 4.6 ve 4.7). Aynı şekilde, üçlü karışımlar dikkate alındığında TR + AA + CYS önerilen yöntemde - %1.94 gibi nispeten düşük bir % hata verirken, standart yöntemler, CUPRAC ve ABTS sırasıyla - %1.01 ve -% 4.97 vermiştir (Tablo 4.6 ve 4.7).

Önerilen yöntem, diğer iki standart yöntemle birlikte, CUPRAC ve ABTS, gerçek örneğe (yeşil çay) uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.9'da, mmol TR / g olarak gösterilmiştir. Sonuçlardaki farklılıkların yöntemlerin dayandığı farklı mekanizmalardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bunun üzerine hipokloröz asit süpürme etkinliğini ölçtüğü bilinen KI/Taurin yöntemi de bir diğer standart metod olarak kullanılmış ve sonuçlar bu yöntem ile elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılmıştır. Beklendiği üzere daha yakın bir etki mekanizmasına dayanan bir standart yöntem kullanıldığında daha benzer sonuçlar elde edilmiştir. KI/Taurin ve önerilen yöntemler gerçek örnekler olarak yeşil çay, beyaz çay ve siyah çaya uygulanmıştır. Ayrıca antioksidan bileşiklerin HOCl süpürme etkinlikleri de her iki yöntem için bireysel olarak hesaplanmış ve süpürme etkinliği sırası oluşturulmuştur. Önerilen yöntem ile elde edilen süpürme aktivitesi sıraları standart yöntemler ile elde edilen sıralamalar ile kıyaslandığında en büyük uyumun KI/Taurin yöntemiyle elde edildiği görülmüştür. Bu durum yine yöntemlerin dayandığı benzer etki mekanizmaları ile açıklanabilir. Bununla birlikte, HPLC-CUPRAC yöntemi ile bulunan TAC değerinin önerilen yöntemin ile karşılaştırıldığında sırasıyla 0.809 ve 0.873 mmol-TR/g olup, iki değer arasındaki farkın, HPLC-CUPRAC yöntemi hesaplanmasında dikkate alınmayan diğer bileşenlerden kaynaklandığına inanılmaktadır.

HOCl, insan bakterisit sisteminin en önemli bileşenidir. Bununla birlikte, yüksek reaktivitesi ve diğer radikalleri oluşturma kabiliyeti nedeniyle, biyolojik olarak önemli olan çeşitli moleküllerle reaksiyona girerek sitotoksik hale gelir ve kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve benzeri çeşitli hastalıklara yol açar. Vladimirov ve arkadaşları, HOCl'i insan vücudundaki en önemli serbest radikal öncülerinden biri olarak tanımlamışlardır [**2**].

HOCl kendi başına güçlü bir oksidan olarak, çeşitli biyolojik moleküllerin oksidatif hasarından sorumludur. Bununla birlikte, HOCl negatif etkisi, organik sistemde mevcut olan enzimatik ve enzimatik olmayan AOx bileşikler tarfından yok edilebilir. Yine bilindiği üzere gıdalar da önemli AOx kaynaklarıdır. Bu, nedenle vücut sıvılarında ve gıda maddelerinde TAC'nin araştırılması önemlidir. Hipokloröz asit süpürmeye dayalı toplam antioksidan kapasiteyi belirlemek için önerilen yöntem TAC değerinin belirlenmesinde kolaylıkla kullanılabilme özelliğine sahiptir.

KAYNAKLAR

1. [Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 1.Classification, Physicochemical Principles, Mechanisms, and Electron Transfer (ET)-Based Assays Reşat Apak,*,† Mustafa Özyürek,† Kubilay Güçlü,† and Esra Çapanoğlu‡

2. 14 Vladimirov, Iu. A. (1998) Vestnik Ros. Akad. Med. Nauk, No. 7, 43-51.

3. Halliwell B. Free Radicals and other reactive species in disease. Nature Encyclopedia of life sciences. 2001. p. 1–7.

4. Kohen R, Nyska A. Invited review Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. Toxicol Pathol. 2002;30(6):620–650. [PubMed] [Google Scholar]

5. Free radical chemistry in biological systems LAURA B VALDEZ, SILVIA LORES ARNAIZ, JUANITA BUSTAMANTE, SILVIA ALVAREZ, LIDIA E COSTA, ALBERTO BOVERIS BioFree radicals l. Res. v.33 n.2 Santiago 2000

6. BOVERIS A, CADENAS E (1997) Cellular sources and steady-state levels of reactive oxygen species. In: CLERCH LB, MASSARO DJ (eds) Oxygen, Gene Expression, and Cellular Function. NY: Marcel Dekker, Inc. pp:1-25

7. J.M. McCordThe evolution of free radicals and oxidative stress Am J Med, 108 (2000), p. 652 ArticleDownload PDFView Record in ScopusGoogle Scholar

8. M. Zheng, G. Storz Redox sensing by prokaryotic transcription factors Biochem Pharmacol, 59 (2000), p. 1 Article Download PDFView Record in ScopusGoogle Scholar

9. H.M. LanderAn essential role for free radicals and derived species in signal transduction FASEB J, 11 (1997), p. 118 View Record in ScopusGoogle Scholar

10. L.J. Ignarro, G. Cirino, A. Casini, C. NapoliNitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview J Cardiovasc Pharmacol, 34 (1999), p. 879 View Record in ScopusGoogle Scholar

11. FreidovichFundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? Ann NY Acad Sci, 893 (1999), p. 13 Google Scholar

12. Yun-ZhongFang Free radicals, antioxidants and nutrition. https://doi.org/10.1016/S0899-9007(02)00916-4

13. Emad M. Atta[a,b]*, Nawal H. Mohamed[c,d] and Ahmed A. M. Abdelgawad[d] ANTIOXIDANTS: AN OVERVIEW ON THE NATURAL AND SYNTHETIC TYPES Eur. Chem. Bull. 2017, 6(8), 365-375 DOI: 10.17628/ecb.2017.6.365-375

14. Valko M, Leibfritz D, Moncola J, Cronin MT, Mazura M, Telser J. Review Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39(1):44–84. [PubMed] [Google Scholar

15. Nordberg J, Arner EJ. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian Thioredoxin system. Free Radical Biol Med. 2001;31(11):1287–1312. [PubMed] [Google Scholar

16. https://www.dovepress.com/oxidative-stress-and-its-downstream-signaling-in-aging-eyes-peer-reviewed-fulltext-article-CIA

17. Chong-Hou Sam,1 Hsein-Kun Lu2 * 1 School of Dentistry, College of Oral Medicine, Taipei Medical University, Taipei, Taiwan 2 Clinical Periodontics, Department of Dentistry, Taipei Medical University Hospital, Taipei, Taiwan The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease pg. 48

18. Halliwell and Gutterridge, 1990; Hippeli and Elsner, 1999

19. Sang Phil Shin, Mun Sup Kim, Sung Hee Cho, Ji Hyung Kim, Casiano H. Choesca Jr, Jee Eun Han, Jin Woo Jun, Se Chang Park

20. Chai TY, Kim WB. Bactericidal Effect of Disinfectant a Super-oxidized Water, Medilox®. Korean J Nosocomial Infect Control 1998; 3(1): 1-6.

21. Robson MC, Payne WG, Ko F, Mentis M, Donati G, Shaffi SM, Culverhouse S, Wang L, Khosrovi B, Najafi R, Cooper DM, Bassiri M. Hypochlorous Acid as a Potential Wound Care Agent Part II. Stabilized Hypochlorous Acid: Its Role in Decreasing Tissue Bacterial Bioburden and Overcoming the Inhibition of Infection on Wound Healing. J Burns Wounds 2007; 6: 80-90.

22. Panasenko, O. M., and Sergienko, V. I. (2010) Vestnik Ros. Akad. Med. Nauk, No. 1, 27-39

23. Long, C. A., and Bielski, B. H. J. (1980) J. Phys. Chem., 84, 555-557. which was confirmed experimentally. Candeias, L. P., Stratford, M. R., and Wardman, P. (1994) Free Radic. Res., 20, 241-249.

24. Kozlov, Yu. A., Moravskii, A. P., Purmal', A. P., and Shuvalov, V. F. (1981) Zh. Fiz. Khim., 55, 764-766.

25. Panasenko, O. M., Arnhold, J., and Sergienko, V. I. (2002) Biol. Membr. (Moscow), 19, 403-434

26. Candeias, L. P., Stratford, M. R., and Wardman, P. (1994) Free Radic. Res., 20, 241-249.

27. Sychev, A. Ya., and Isak, V. G. (1995) Russ. Chem. Rev., 64, 1105-1129

28. Kagan, V. E., Orlov, O. N., and Prilipko, L. L. (1986) Advances in Science and Technology, Ser. Biophysics [in Russian], Vol. 18, VINITI, Moscow.

29. Panasenko, O. M., Briviba, K., Klotz, L.-O., and Sies, H. (1997) Arch. Biochem. Biophys., 343, 254-259.

30. Pattison, D. I., and Davies, M. J. (2001) Chem. Res. Toxicol., 14, 1453-1464.

31. Clark, R. A., Szot, S., Williams, M. A., and Kagan, H. M. (1986) Biochem. Biophys. Res. Commun., 135, 451-457.

32. Panasenko, O. M., Evgina, S. A., and Sergienko, V. I. (1993) Bull. Exper. Biol. Med., 115, 373-375.

33. Panasenko, O. M., Arnhold, J., and Sergienko, V. I. (2002) Biol. Membr. (Moscow), 19, 403-434.

34. Panasenko, O. M., Briviba, K., Klotz, L.-O., and Sies, H. (1997) Arch. Biochem. Biophys., 343, 254-259.

35. Panasenko, O. M., Panasenko, O. O., Briviba, K., and Sies, H. (1997) Biochemistry (Moscow), 62, 1140-1145.

36. Arnhold, J., Müller, S., Arnold, K., and Grimm, E. (1991) J. Biolumin. Chemilumin., 6, 189-192

37. Held, A. M., Halko, D. J., and Hurst, J. K. (1978) J. Am. Chem. Soc., 100, 5732-5740

38. Kagan, V. E., Orlov, O. N., and Prilipko, L. L. (1986) Advances in Science and Technology, Ser. Biophysics [in Russian], Vol. 18, VINITI, Moscow

39. O. M. Panasenko1,2*, I. V. Gorudko3 , and A. V. Sokolov 1,4., Hypochlorous Acid as a Precursor of Free Radicals in Living Systems., Russian in Uspekhi Biologicheskoi Khimii, 2013, Vol. 53, pp. 195-244.

40. Hypochlorous Acid as a Precursor of Free Radicals in Living Systems O. M. Panasenko1,2*, I. V. Gorudko3 , and A. V. Sokolov 1,4

41. Klebanoff, S. J. (2005) J. Leukoc. Biol., 77, 598-625.

42. Winterbourn, C. C., Vissers, M. C. M., and Kettle, A. J. (2000) Curr. Opin. Hematol., 7, 53-58.

43. Hoy, A., Leininger-Muller, B., Kutter, D., Siest, G., and Visvikis, S. (2002) Clin. Chem. Lab. Med., 40, 2-8.

44. Halliwell, B., Free Rad. Res. Commun., 1990, 9, 1-32. https://doi.org/10.3109/10715769009148569

45. Halliwell, B., Adv. Pharmacol., 1997, 38, 3-20. https://doi.org/10.1016/S1054-3589(08)60976-X

46. Chipault, J. R., Antioxidants for Use in Foods, Vol II, ed. by Lundberg W., Interscience, New York, 1962.

47. https://www.medicalnewstoday.com/articles/318652.php#What-are-free-radicals last visit: 30 December 2019

48. Tilman Grune. The handbook of Environmental Chemistry Vol. 2, Part O (2005): 77-90 DOI 10.1007/b101147

49. Machlin, L. J., Handbook of Vitamins, 2ed. Marcel Dekker, New York, 1991.

50. Yoshida, Y., Niki, E., Noguchi, N., Chem. Phys. Lipids, 2003, 123, 63-75. https://doi.org/10.1016/S0009-3084(02)00164-0

51. Schneider, C., Mol. Nutr. Food Res., 2005, 49, 7-30.htt ps://doi.org/10.1002/mnfr.200400049

52. Servinova, E., Kagan, V., Han, D., Packer, L., Free Rad. Biol. Med., 1991, 10, 263-275. https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90033-Y

53. Suzuki, Y. J., Tsuchiya, M., Wassall, S. R., Choo, Y. M., Govil, G., Kagan, V. E., Packer, L., Biochemistry, 1993, 32, 10692-10699. https://doi.org/10.1021/bi00091a020

54. Burton, W., Ingold, K. U., Science, 1984, 224, 569-573. https://doi.org/10.1126/science.6710156

55. Burton, W., Ingold, K.U., J. Am. Chem. Soc., 1981, 103, 6472-6477. https://doi.org/10.1021/ja00411a035

56. Wijtmans, M., Pratt, D. A., Valgimigli, L., DiLabio, G. A., Prattet, D. A., Pedulli, G. F., Porter, N. A., Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 2003, 42(26), 4370-4373. https://doi.org/10.1002/anie.200351881

57. Niki, E., Saito, T., Kawakami, A., Kamiya, Y. J., Biol. Chem., 1984, 259, 4177-4182.

58. Doba, T., Burton, G. W., Ingold, K. U., Biochim. Biophys. Acta., 1985, 835, 298-303.

59. Liebler, D. C., Kling, D. S., Reed, D. J., J. Biol. Chem., 1986, 261, 12114-12119.

60. Neuzil, J., Stocker, R., J. Biol. Chem., 1994, 269, 16712- 16719.

61. Shi, H., Noguchi, N., Niki, E., Biol. Med., 1999, 27, 334- 346.

62. Grusak, M. A., DellaPenna, D., Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1999, 50, 133-161. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.133

63. Stewart, C. P., Guthrie, D., Lind's treatise on scurvy, Edinburgh, University Press, Edinburgh, 1953

64. Levine, M., N. Engl. J. Med., 1986, 314, 892-902. https://doi.org/10.1056/NEJM198604033141407

65. Englard, S., Seifter, S., Annu. Rev. Nutr., 1986, 6, 365-406. https://doi.org/10.1146/annurev.nu.06.070186.002053

66. Correa, P., Cancer Res., 1992, 52, 6735-6740.

67. Byers, T., Guerrero, N., Am. J. Clin. Nutr., 1995, 62, 1385S-1392S.

68. Jialal, I., Grundy, S. M., J. Clin. Inv., 1991, 87, 597-601. https://doi.org/10.1172/JCI115035

69. Stokes, P. L., Melikian, V., Leeming, R. L., PortmanGraham, H., Blair, J. A., Cooke, W. T., Am. J. Clin. Nutr., 1975, 28, 126-9.

70. Hallberg, D., Brune, M., Rossander-Hulthen, L., Ann. NY Acad. Sci., 1987, 498, 324-332. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1987.tb23771.x

71. Hallberg, L., Rossander, L., Persson, H., Svahn, E., Am. J. Clin. Nutr., 1982, 36, 846-850.

72. Hallberg, L., Scand. J. Gastroenterol. Suppl., 1987, 129, 73-79. https://doi.org/10.3109/00365528709095855

73. Buettner, G. R., Radiat. Res., 1996, 145, 532-541. https://doi.org/10.2307/3579271

74. Haytowitz, D., J. Nutr., 1995, 125, 1952-1955

75. Krinsky, N. I., Johnson, E. J., Mol. Aspects Med., 2005, 26, 459-516. https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001

76. Rodriguez-Amaya, D. B., Kimura, M., Godoy, H. T., Amaya-Farfan, J., J. Food Compos. Anal., 2008, 21, 445-463. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2008.04.001

77. Zechmeister, L., Tuzson, P., Biochem. J., 1938, 32, 1305- 1311. https://doi.org/10.1042/bj0321305

78. Castenmiller, J. J., West C. E., Ann. Rev. Nutr., 1998, 18, 19-38. https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.18.1.19

79. Failla, M. L., Thakkar, S. K., Kim, J. Y., J. Agric. Food Chem., 2009, 57, 10922-10927. https://doi.org/10.1021/jf900415g

80. S., Nurmi, T., Mursu, J., Rissanen, T. H., Am. J. Clin. Nutr., 2006, 83, 1265-1271.

81. Agte, V., Tarwadi, K., Ophthalmic Res., 2010, 44, 166-172. https://doi.org/10.1159/000316477

82. Riccioni, G., Curr. Atheroscler. Rep., 2009, 11, 434-439. https://doi.org/10.1007/s11883-009-0065-z

83. Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H., Arch. Biochem. Biophys., 1989, 274, 532-538. https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90467-0

84. Levin, G., Mokady, S., Free Radic. Biol. Med., 1994, 17, 77-82. https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)90009-4

85. Levin, G., Yeshurun, M., Mokady, S., Nutr. Cancer, 1997, 27, 293-297. https://doi.org/10.1080/01635589709514540

86. Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, Free Radical Biology & Medicine, 20(7), 933-956.

87. Halliwell, B., 1990, How to Characterise a Biological Antioxidant, Free Radical Research Comminucation, 9, 1-32

88. Shahidi, F., Wanasundara, P.K.J., 1992, Phenolic Antioxidants. Critical Review of Food Science and Nutritional. 32, 67-103

89. Ferrer J., Austin M., Stewart C. J., Noel J., 2008, Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 356-370.

90. 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.

91. Keskin, H., Erkmen G., 1987, Besin Kimyası, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul

92. Wallace, T.C., Giusti, M.M., 2015, Anthocyanins, Advances in Nutrition, 6, 620-622.

93. Cadenas, E. and Packer, L., 2002, Handbook of Antioxidants, 2nd ed., Marcel Dekker, Newyork-Basel, ISBN: 0-8247-0547-5.

94. Abu-Amsha, R., Croft, K.D., Puddey, I.B., Proudfoot, J.M., Beilin, L.J., 1996, Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoproptein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine, Clinical Science, 91, 449-458

95. Heller, W., Forkmann, G., 1994, Biosynthesis of flavonoids, The flavonoids, Advances in Research since 1986, In: Harborne J.B. (ed.), London: Chapman & Hall, 499-535.

96. Wallace, G., Fry, S.C., 1994, Phenolic components of the plant cell wall, international Review of Cytology, 151, 229-267.

97. Spanos, G.A., Wrolstad, R.E., 1992, Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processes and storage: A review, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40(9), 1478-1487.

98. Kahnt, G., 1967, Trans-cis-equilibrium of hydroxycinnamic acids during irradiation of aqueous solutions at different pH, Phytochemistry, 6(5), 755-758)

99. Herrmann, K., 1989, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, Critical review Food Science and Nutrition, 28(4), 315-347.

100. Worthington Enzyme Manual. Worthington Biochemical Corp., 1993

101. Krishnamurthy, P., Wadhwani, A., Antioxidant enzymes and human health, antioxidant enzyme, El-Missiry, M. A. (ed.), InTech, 2012

102. Fridovich, I., Annu. Rev. Biochem., 1995, 64, 97-112. https://doi.org/10.1146/annurev.bi.64.070195.000525 ,

103. Teixeira, H. D., Schumacher, R. I Meneghini, R., Proc. Natl. Acad. Sci., 1998, 95, 7872-7875. https://doi.org/10.1073/pnas.95.14.7872 ,

104. Sandalio, L. M., Lo´pez-Huertas, E., Bueno, P., del Rio, L. A., Free Radic. Res., 1997, 26, 187-194. https://doi.org/10.3109/10715769709097798

105. Sandström, J., Nilsson, P., Karlsson, K., Marklund, S. L., J. Biol. Chem., 1994, 269, 19163-19166.

106. Sun, E., Xu, H., Liu, Q., Zhou, J., Zuo, P., Wang, J., Biol. Trace. Elem. Res.,1995, 48, 231-238. https://doi.org/10.1007/BF02789405

107. Meier, B., Scherk, C., Schmidt, M., Parak, F., Biochem. J., 1998, 331, 403-407. https://doi.org/10.1042/bj3310403

108. Leone, M., Cupane, A., Militello, V., Stroppolo, M. E., Desideri, A., Biochemistry, 1998, 37, 4459-4464. https://doi.org/10.1021/bi971878e

109. Vance, C. K., Miller, A. F., Biochemistry, 1998, 37, 5518- 5527. https://doi.org/10.1021/bi972580r

110. Reaume, A., Elliott, J., Hoffman, E., Kowall, N., Ferrante, R., Siwek, D., Wilcox, H., Flood, D., Beal, M., Brown, R., Scott, R., Snider, W., Nat., Genet., 1996, 13(1), 43- 77. https://doi.org/10.1038/ng0596-43

111. Speranza, M. J., Bagley, A. C., Lynch R. E., J. Biol. Chem., 1993, 268, 19039-19043

112. Hossain, A., Asada, K., J. Biol. Chem., 1985, 260, 12920- 12926

113. Burton, G. W., Ingold, K.U., Ann. N.Y. Acad. Sci., 1989, 570, 7-22. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1989.tb14904.x

114. Burton, G. W., Ingold, K. U., CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine, Vol. II, Miguel, A., Quintanilha, A. T., Weber, H.,(Eds.), CRC Press Inc. Boca Raton, FL., 1990.

115. Cai, Y. Z., Sun, M., Corke, H., J. Agric. Food Chem., 2003, 51(8), 2288-2294. https://doi.org/10.1021/jf030045u

116. Cotelle, N., Bernier, J. L., Catteau, J. P., Pommery, J., Wallet, J. C., Gaydou, E. M., Free Rad. Bio. Med., 1996, 20(1), 35-43. https://doi.org/10.1016/0891-5849(95)02014-4

117. Velioglu, Y. S., Gao, G., Mazza, L., Oomah, B. D., J. Agric. Food Chem., 1998, 46(10), 4113-4117. https://doi.org/10.1021/jf9801973

118. Zheng, W., Wang, S. Y., J. Agric. Food Chem., 2001, 49(11), 5165-5170. https://doi.org/10.1021/jf010697n

119. Simec, M. G., Porter, K. M., Autoxidation in Foods and Biological Systems, Plenum Press, New York, 1980. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9351-2

120. Sherwin, E. R., J. Am. Oil Chem. Soc., 1976, 53, 430-436. https://doi.org/10.1007/BF02605739

121. Kaczmarski, M., Wojicicki, J., Samochowiee, L., Dutkiewicz, T., Sych, Z., Pharmazie, 1999, 54, 303-306.

122. Witschi, H. P., Toxicology, 1981, 21, 95-104. https://doi.org/10.1016/0300-483X(81)90120-7

123. Benson, A. M., Cha, Y., Bueding, E., Heine, H. S., Talalay, P., Cancer Res., 1979, 39, 2971-2977

124. Buttriss, J. L., Hughes, J., Kelly, C. N. M., Stanner, S., Nutr. Bull., 2002, 27(4), 227-236. https://doi.org/10.1046/j.1467-3010.2002.00267.x

125. Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53:1841-1856. DOI: 10.1021/jf030723c

126. Prior RL, Wu X, Schaich K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005;53: 4290-4302. DOI: 10.1021/jf0502698

127. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total peroxyl radical trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. The important contribution made by plasma proteins. FEBS Letters. 1985;187(1):33-37. DOI: 10.1016/0014-5793(85)81208-4

128. Winston GW, Regoli F, Dugas AJJ, Fong JH, Blanchard KA. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. Free Radical Biology & Medicine. 1998;24(3):480-493. DOI: 10.1016/ S0891-5849(97)00277-3

129. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radical Biology & Medicine. 1997;22:749-760. DOI: 10.1016/S0891-5849(96)00351-6

130. Bors W, Michel C, Saran M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin: A rapid test for quantifying antioxidant activity. Biochimica et Biophysica Acta. 1984;796:312-319. DOI: 10.1016/0005-2760(84)90132-2

131. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT- Food Science and Technology. 1995;28:25-30. DOI: 10.1016/ S0023-6438(95)80008-5

132. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology & Medicine. 1999;26:1231-1237. DOI: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3]

133. Singleton VL, Orthofer R, LamuelaRaventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. Methods in Enzymology 1999;299(1):152-178. DOI: 10.1016/ S0076-6879(99)99017-1

134. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. Analytical Biochemistry. 1996;239:70-76. DOI: 10.1006/ abio.1996.0292

135. Roginsky V, Lissi EA. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. Food Chemistry. 2005;92(2):235-254. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.08.004

136. Norma Francenia Santos-Sánchez, Raúl Salas-Coronado, Claudia Villanueva-Cañongo and Beatriz Hernández-Carlos., Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism., *intechopen* https://api.intechopen.com/chapter/pdf-preview/66259

137. R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S.E. Karademir, "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", *J. Agric. Food Chem.*, 52 (2004) 7970-7981

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

139. Miller, N.J., Rice-Evans, C., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods in enzymology*, 234, 279-293

140. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.

141. Cano, A., Hernandez-Ruiz, J., Garcia-Canovas, F., Acosta, M., Arnao, M.B., 1998, An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material, phytochemical Analysis, 9(4), 196-202.

142. Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., 1998, Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology, *Recent Research Developments in Agricultural & Food Chemistry*, 2, 893-905.

143. Arnao, M.B., Cano, A., Acosta, M., 2001, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, Food Chemistry, 73(2), 239-244.

144. Mustafa Özyürek, Burcu Bekdeşer, Kubilay Güçlü, and Reşat Apak* Resorcinol as a Spectrofluorometric Probe for the Hypochlorous Acid Scavenging Activity Assay of Biological Samples

145. T.L. Ching, J. Dejong, A. Bast Anal. Biochem., 218 (1994), p. 377

146. Luis M. Magalhaes, Marcela A. Segundo, Salette Reis, Jose L.F.C Lima https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.02.047

147. L.J. Yan, M.G. Traber, H. Kobuchi, S. Matsugo, H.J. Tritschler, L. Packer Arch.Biochem. Biophys., 327 (1996), p. 330

148. Landino, L.M., Mall, C.B., Nicklay, J.J., Dutcher, S.K., Moynihan, K.L., 2008, Oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid by the biologically relevant oxidants peroxynitrite anion, hydrogen peroxide and hypchlorous acid, Nitric Oxide Biology and Chemistry, 18,11-18.

149. Weiss, S.J., Klein, R., Slivka, A.,Wei, M., 1982, Chlorination of taurine by human neutrophils, evidence for hypochlorous acid generation, Journal of Clinical Investigation, 70, 598-607

150. Aruoma, O.I., Halliwell, B., 1987, Action of hypochlorous acid on the antioxidant protective enzymes superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase, Biochemical Journal, 248, 973-976.

151. Yan, L.J., Traber, M.G., Kobuchi, H., Matsugo, S., Tritschler, H.J., Packer, L., 1996, Efficacy of hypochlorous acid scavengers in the preventention of protein carbonyl formation, Archives of Biochemistry and Biophyics, 327, 330-334.

152. Mustafa Özyürek, Burcu Bekdeşer, Kubilay Güçlü, and Reşat Apak., Resorcinol as a Spectrofluorometric Probe for the Hypochlorous Acid Scavenging Activity Assay of Biological Samples., dx.doi.org/10.1021/ac302369p | Anal. Chem. 2012, 84, 9529−9536

153. REŞAT APAK, KUBILAY GÜÇLÜ, MUSTAFA ÖZYÜREK, AND SALIHA ESIN KARADEMIR., 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. J. Agric. Food Chem. 2004, 52, 7970−7981

154. H. Wang, G.J. Provan, K. Helliwell, Food Chem. 81 (2003) 307–312.

155. Mustafa Özyürek, Kubilay Güçlü¸ Esma Tütem, Kevser Sözgen Başkan, Erol Erçağ, S. Esin Çelik, Sefa Baki, Leyla Yıldız, Şeyda Karaman and Reşat Apak; A comprehensive review of CUPRAC methodology.; *The Royal Socıety of Chemıstry 2011*

156. Leyla Yıldız, Kevser Sözgen Başkan, Esma Tütem⁎, Reşat Apak., Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle., doi:10.1016/j.talanta.2008.06.028

157. Saliha Esin Çelik, Mustafa Özyürek, Kubilay Güçlü, Reşat Apak., Determination of antioxidant by a novel on-line HPLC*cupric antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection., *Analytica Chemica Acta* 674(2010)79-88 (2010)

EKLER

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	ISAIAH O. ODEYEMI
Doğum Yeri	IBADAN
Doğum Tarihi	26.01.1990
Uyruğu	❒ T.C. ☑ Diğer: NİJERYA
Telefon	+905063868543
E-Posta Adresi	Odeyemiisaiah14@gmail.com
Web Adresi	

Eğitim Bilgileri Lisans	
Üniversite	EKITI DEVLET UNİVERSİTESİ, NİJERYA
Fakülte	FEN
Bölümü	KİMYA
Mezuniyet Yılı	2014

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Enstitü Adı	Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Anabilim Dalı	Kimya Anabilim Dalı
Programı	Analitik Kimya

Makale ve Bildiriler