İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

FARKLI TÜR, KARIŞIM VE ÇÖZÜCÜ ORTAMLARINA UYGULANABİLEN MODİFİYE CUPRAC ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÖLÇÜMLERİ

Yüksek Kimyager Saliha Esin ÇELİK
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

Danışman
Prof. Dr. Reşat APAK

Haziran, 2011

İSTANBUL

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

FARKLI TÜR, KARIŞIM VE ÇÖZÜCÜ ORTAMLARINA UYGULANABİLEN MODİFİYE CUPRAC ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÖLÇÜMLERİ

Yüksek Kimyager Saliha Esin ÇELİK
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı

Danışman
Prof. Dr. Reşat APAK

Haziran, 2011

İSTANBUL

Bu çalışma 02/06/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Reşat APAK (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Esma TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Adnan AYDIN
Marmara Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Prof. Dr. Hayati FİLİK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından T-1450/11092007 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bilimsel ve akademik kimliğiyle örnek aldığım doktora tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Reşat APAK'a doktora ve yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek ve yardımlarından dolayı en derin şükranlarımı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bilimsel kariyerimin her aşamasında çalışmalarıma özveriyle katkıda bulunan yüksek lisans tez danışmanım ve doktora 2. tez danışmanım Sayın Yard. Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ'ye en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını, her türlü ve özellikle bilimsel desteğini esirgemeyen değerli arkadaşım Yard. Doç. Dr. Mustafa ÖZYÜREK'e içtenlikle teşekkür ederim.

Tez izleme jürisinde yer alan sayın hocalarım Prof. Dr. Esma TÜTEM ve Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK'e tez çalışmalarıma verdikleri katkılardan dolayı çok teşekkür ederim.

Analitik Kimya Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma her türlü desteklerinden ve yardımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Değerli aileme desteklerinden ve gösterdikleri hoşgörüden dolayı yürekten teşekkür ederim.

Tezimle aynı adı taşıyan T-1450/11092007 numaralı doktora tez projesine destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve yurt içi doktora burs programı (2211) kapsamında doktora öğrenimim boyunca maddi destek sağlayan TÜBİTAK-Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB) Birimi'ne teşekkür ederim.

Haziran, 2011 **Saliha Esin ÇELİK**

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... **I**
İÇİNDEKİLER ..... **II**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **VI**
TABLO LİSTESİ ..... **IX**
SEMBOL LİSTESİ ..... **XI**
ÖZET ..... **XIII**
SUMMARY ..... **XIII**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL KISIMLAR **8**
2.1. OKSİDATİF GERİLİM VE ANTİOKSİDANLAR **8**
2.2. DOĞAL ANTİOKSİDANLAR VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ **14**
2.2.1. Askorbik Asit (C vitamini) **14**
2.2.2. E vitamini **14**
2.2.3. Polifenoller **15**
2.2.3.1. Flavonoidler *16*
2.2.3.2. Fenolik Asitler *18*
2.2.3.3. Fenolik Polimerler (Tanenler) *19*
2.2.4. Karotenoidler **20**
2.2.5. Tiyol Tipi Antioksidanlar **21**
2.2.5.1. Glutatyon *21*
2.2.5.2. Sistein *21*
2.2.6. Selenyum **22**
2.3. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ **22**
2.3.1. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri **22**
2.3.1.1. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi *22*
2.3.1.2. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi *23*
2.3.1.3. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA)Yöntemi *24*
2.3.1.4. Luminol Yöntemi *24*
2.3.1.5. Krosin Beyazlatma Yöntemi (Crocin Bleaching Assay) *25*
2.3.2. Elektron Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri **25**
2.3.2.1. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi *25*
2.3.2.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite)/ABTS Yöntemi *28*
2.3.2.3. FRAP (Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü)Yöntemi *29*
2.3.2.4. DPPH Yöntemi *30*

2.4. ANTİOKSİDAN KAPASİTEYE ETKİ EDEN FAKTÖRLER 31
2.4.1. Yapısal Etki 31
2.4.2. Çözücü Etkisi 34
2.4.3. Sinerjik Etki 39
2.4.4. Polimerizasyon Etkisi 41
2.4.5. Diğer Dış Faktörler 41
2.5. KOLON-SONRASI TÜREVLENDİRMELİ HAT-ÜSTÜ HPLC ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ 42
2.5.1. Hat-üstü HPLC-DPPH Yöntemi 44
2.5.2. Hat-üstü HPLC-ABTS Yöntemi 45
2.5.3. Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemi [148] 45
2.6. HAT-ÜSTÜ HPLC ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ UYGULAMALARI 46
2.7. SİKLODEKSTRİNLER VARLIĞINDA ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN KARAKTERİZASYONU 48
2.7.1. Doğal Siklodekstrinler 48
2.7.2. Modifiye Siklodekstrinler 50
2.7.3. İçerme Komplekslerinin Oluşum Mekanizması 51
2.7.4. İçerme Komplekslerinin Oluşum Sabitlerinin Eldesi 54
2.7.5. İçerme Kompleksi Oluşumunu Etkileyen Faktörler 57
2.7.6. İçerme Kompleksleri Oluşturma ve Analiz Yöntemleri 58
2.8. ANTİOKSİDAN-SİKLODEKSTRİN İÇERME KOMPLEKSLERİ İLE İLGİLİ UYGULAMALAR 60

3. MALZEME VE YÖNTEM 63

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR 63
3.2. KİMYASAL MADDELER 64
3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI 64
3.3.1. Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerine Çözücü Etkisi Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 64
3.3.2. Kolon-Sonrası Türevlendirmeli Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Bileşiklerin Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 66
3.3.3. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Doğal ve Türevlendirilmiş Siklodekstrinlerle İçerme Komplekslerinin Eldesi ve Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 67
3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER 67
3.4.1. Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerine Çözücü Etkisi Çalışmasında Uygulanan Yöntemler 67
3.4.1.1. Spektrofotometrik CUPRAC Yöntemi 67
3.4.1.2. CUPRAC-DCM Yöntemi 68
3.4.1.3. ABTS-Persülfat Yöntemi 69
3.4.1.4. FRAP Yöntemi 69
3.4.1.5. CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP Yöntemleri ile TAC Tayini 69
3.4.2. Kolon-Sonrası Türevlendirmeli Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Bileşiklerin Tayininde Uygulanan Yöntemler 71
3.4.2.1. Spektrofotometrik CUPRAC Yöntemi 71

3.4.2.2. HPLC Yöntemiyle Polifenolik Bileşiklerin Tayini 71
3.4.2.3. HPLC Yöntemiyle Polifenolik Bileşiklerin Sentetik Karışımlarının Tayini 72
3.4.2.4. HPLC Yöntemiyle Şifalı Bitki Ekstrelerindeki Antioksidan Bileşiklerin Tayini 73
3.4.2.5. Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemi 73
3.4.2.6. Spektrofotometrik CUPRAC, HPLC ve Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemlerinin Karşılaştırılması 75
3.4.3. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Doğal ve Türevlemdirilmiş Siklodekstrinlerle İçerme Komplekslerinin ve Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi Çalışmasında Uygulanan Yöntemler 75
3.4.3.1. Antioksidan-Siklodekstrin Sıvı İçerme Komplekslerinin Eldesi 75
3.4.3.2. UV-Vis Spektrofotometrik Analiz Yöntemi 76
3.4.3.3. Spektroflorimetrik Analiz Yöntemi 76
3.4.3.4. IR (Kızıl Ötesi) Spektroskopik Analiz Yöntemi 77
3.4.3.5. CUPRAC Yöntemi 77

4. BULGULAR 79

4.1. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNE ÇÖZÜCÜ ETKİSİ 79
4.1.1. Troloksun Farklı Çözücü Ortamlarında CUPRAC, ABTS-Persülfat ve FRAP Yöntemlerine Göre Kalibrasyon Denklemlerinin Belirlenmesi 79
4.1.2. Polifenolik Bileşiklerin CUPRAC Yöntemine Göre Farklı Çözücü Ortamlarında Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi 80
4.1.3. Polifenolik Bileşiklerin ABTS-Persülfat Yöntemine Göre Farklı Çözücü Ortamlarında Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi 87
4.1.4. Polifenolik Bileşiklerin FRAP Yöntemine Göre Farklı Çözücü Ortamlarında Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi 93
4.1.5. Metanol Çözücü Ortamında Sentetik Antioksidan Karışımlarının CUPRAC, ABTS-Persülfat ve FRAP Yöntemlerine Göre Değerlendirilmesi 98
4.1.6. CUPRAC, ABTS-Persülfat ve FRAP Yöntemlerinde Sinerjik ve Antagonistik Etkileşimlerin Değerlendirilmesi 100
4.1.7. Farklı Çözücü Ortamlarında Hazırlanan Yeşil Çay Ekstrelerinin CUPRAC, ABTS-Persülfat ve FRAP Yöntemlerine Göre Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Eldesi 100
4.1.8. BHT Katkılı Yeşil Çay Ekstresinin Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü 101
4.2. KOLON SONRASI TÜREVLENDİRMELİ HAT-ÜSTÜ HPLC-CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANTİOKSİDANLARIN TAYİNİ 102
4.2.1. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Metanol Ortamındaki Troloks Eşdeğeri Cinsinden Antioksidan Kapasite (TEAC) Katsayılarının Belirlenmesi 102
4.2.2. Polifenolik Bileşiklerin HPLC Yöntemi ile Tayini 103
4.2.3. Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemi 104

4.2.3.1. Akış Hızının Optimizasyonu *104*
4.2.3.2. CUPRAC Reaktifinin Derişiminin Optimizasyonu *105*
4.2.3.3. Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemiyle Polifenolik Bileşiklerin Tayini *106*
4.2.3.4. Çalışılan Polifenolik Antioksidanların Belirtme Sınırlarının (LOD) Belirlenmesi *109*
4.2.3.5. Çalışılan Polifenolik Antioksidanların CUPRAC Reaktifi Cu(II)-Nc İle Reaksiyon Kinetiğinin İncelenmesi *110*
4.2.3.6. Sentetik Karışım Çözeltilerinin Toplam Antioksidan Kapasite (TAC) Tayini *111*
4.2.3.7. Şifalı Bitki Ekstrelerinde TAC Tayini *114*
4.3. BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN DOĞAL VE TÜREVLENDİRİLMİŞ SİKLODEKSTRİNLERLE İÇERME KOMPLEKSLERİNİN VE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ 118
4.3.1. Antioksidan-Siklodekstrin Sıvı İçerme Komplekslerinin Eldesi 118
4.3.2. İçerme Komplekslerinin UV-Vis Spektrumlarının Eldesi 118
4.3.2.1. Rozmarinik asid (RA) *119*
4.3.2.2. Klorojenik Asid (CA) *123*
4.3.2.3. Kuersetin (QR) *126*
4.3.2.4. Rutin (RT) *129*
4.3.3. İçerme Komplekslerinin Floresans Spektrumlarının Eldesi 132
4.3.3.1. Rosmarinik asid (RA) *132*
4.3.3.2. Klorojenik asid (CA) *135*
4.3.3.3. Kuersetin (QR) *138*
4.3.3.4. Rutin (RT) *140*
4.3.4. İçerme Komplekslerinin Oluşum Sabitlerinin Hesaplanması 143
4.3.5. İçerme Komplekslerinin FT-IR Spektrumlarının Eldesi 146
4.3.6. İçerme Komplekslerinin Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi .. 148

5. TARTIŞMA VE SONUÇ 152

5.1. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNE ÇÖZÜCÜ ETKİSİ [168] 152
5.2. KOLON SONRASI TÜREVLENDİRMELİ HAT-ÜSTÜ HPLC-CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANTİOKSİDANLARIN TAYİNİ 159
5.3. BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN DOĞAL VE TÜREVLENDİRİLMİŞ SİKLODEKSTRİNLERLE İÇERME KOMPLEKSLERİNİN VE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ 168

KAYNAKLAR 176

ÖZGEÇMİŞ 193

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1 : İçerme kompleksleri oluşumunun şematik gösterimi **5**
Şekil 2.1 : Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin rektif türler lehine bozulmuş olması (oksidatif gerilim) **8**
Şekil 2.2 : Antioksidanların sınıflandırılması [70] **10**
Şekil 2.3 : C vitamininin kimyasal yapısı **14**
Şekil 2.4 : α-tokoferolün kimyasal yapısı **15**
Şekil 2.5 : Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı **16**
Şekil 2.6 : Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları **17**
Şekil 2.7 : Fenolik asitlerin (bazı hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitlerin) kimyasal yapıları **19**
Şekil 2.8 : Fenolik polimerlerin yapısı **20**
Şekil 2.9 : β-karotenin yapısı **20**
Şekil 2.10 : Glutatyonun yapısı **21**
Şekil 2.11 : Sistein ve sistinin kimyasal yapısı **21**
Şekil 2.12 : Analiz örneğinin eğri altında kalan alan (AUC) olarak ifade edilen antioksidan aktivitesi **23**
Şekil 2.13 : CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla ($Ar(OH)_n$) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu **27**
Şekil 2.14 : $ABTS^{\cdot+}$ katyonunun yapısı **28**
Şekil 2.15 : ABTS radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu. **29**
Şekil 2.16 : FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim **30**
Şekil 2.17 : Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı [73] **33**
Şekil 2.18 : HPLC sistemine entegre kolon sonrası (post-kolon) türevlendirme sistemi **44**
Şekil 2.19 : İki glukopiranoz molekülü arasındaki glikozidik oksijen köprüleri **48**
Şekil 2.20 : α-, β- ve γ- siklodekstrinlerin kimyasal yapıları **48**
Şekil 2.21 : Siklodekstrinlerin üç boyutlu yapıları [154] **49**
Şekil 2.22 : Modifiye siklodekstrinlerden bazılarının kimyasal yapıları **51**
Şekil 2.23 : İçerme kompleksleri stökiyometri oranları [160] **53**
Şekil 4.1 : CUPRAC-DCM yöntemiyle elde edilen butillenmiş hidroksi toluenin (BHT) tek başına ve BHA katkılı çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri **87**
Şekil 4.2 : CUPRAC yöntemi kullanılarak farklı metanol çözücü ortamlarında hazırlanan beşli sentetik lipofilik ve hidrofilik antioksidan karışımlarının beklenen ve deneysel ölçülen troloks eşdeğeri antioksidan kapasitelerinin (μM TR) karşılaştırılması (P= 0.05 için $F_{deneysel}$= 0.882, F_{kritik}= 6.608, $F_{deneysel} < F_{kritik}$). **98**
Şekil 4.3 : ABTS-persülfat yöntemi kullanılarak farklı metanol çözücü ortamlarında hazırlanan beşli sentetik lipofilik ve hidrofilik

antioksidan karışımlarının beklenen ve deneysel ölçülen troloks eşdeğeri antioksidan kapasitelerinin (μM TR) karşılaştırılması (P= 0.05 için $F_{deneysel} = 0.625$, $F_{kritik} = 6.608$, $F_{deneysel} < F_{kritik}$). **99**

Şekil 4.4 : FRAP yöntemi kullanılarak farklı metanol çözücü ortamlarında hazırlanan beşli sentetik lipofilik ve hidrofilik antioksidan karışımlarının beklenen ve deneysel ölçülen troloks eşdeğeri antioksidan kapasitelerinin (μM TR) karşılaştırılması (P= 0.05 için $F_{deneysel} = 0.040$, $F_{kritik} = 6.608$, $F_{deneysel} < F_{kritik}$). **99**

Şekil 4.5 : Hat-üstü HPLC-CUPRAC sisteminin şematik gösterimi **104**

Şekil 4.6 : Farklı akış hızlarında CUPRAC reaktifine karşı 2 x 10^{-4} M troloks çözeltisinin sinyal/gürültü (S/N) oranları **105**

Şekil 4.7 : Troloks standardının HPLC (280 nm) ve hat-üstü HPLC-CUPRAC (450 nm) yöntemlerine göre elde edilen kromatogramları ... **107**

Şekil 4.8 : Çay antioksidanlarının sentetik karışımının HPLC (280 nm) ve hat-üstü HPLC-CUPRAC (450 nm) yöntemlerine göre elde edilen kromatogramları **107**

Şekil 4.9 : Fenolik antioksidanların sentetik karışımının HPLC (280 nm) ve hat-üstü HPLC-CUPRAC (450 nm) yöntemlerine göre elde edilen kromatogramları **108**

Şekil 4.10 : Fenolik antioksidanların CUPRAC reaktifi Cu(II)-Nc kompleksi ile oksidasyon reaksiyonunun kinetiği **111**

Şekil 4.11 : İkili sentetik karışım çözeltilerinin TAC_{HPLC} ve $TAC_{hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ değerlerinin karşılaştırılması **112**

Şekil 4.12 : Yeşil çay ekstresinin HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC kromatogramları **115**

Şekil 4.13 : Siyah çay ekstresinin HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC kromatogramları **116**

Şekil 4.14 : Mercanköşk ekstresinin HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC kromatogramları **116**

Şekil 4.15 : Nane ekstresinin HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC kromatogramları **117**

Şekil 4.16 : 50 μM rosmarinik asid çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve artan derişimli (0 mM-8 mM) β-CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrumu **119**

Şekil 4.17 : 50 μM rosmarinik asid çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki UV-Vis spektrumları **122**

Şekil 4.18 : 50 μM klorojenik asid çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki UV-Vis spektrumları **125**

Şekil 4.19 : 50 μM kuersetin çözeltisinin tek başına ve 8 mM (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki UV-Vis spektrumları (pH=7, 25^{o}C) **128**

Şekil 4.20 : 50 μM rutin çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki UV-Vis spektrumları **131**

Şekil 4.21 : 50 μM rozmarinik asid çözeltisinin tek başına ve artan derişimli (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 355 nm, pH= 7, 25 ºC).....**134**
Şekil 4.22 : 50 μM rozmarinik asid çözeltisinin tek başına ve 8 mM CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 355 nm, pH= 7, 25 ºC).....**135**
Şekil 4.23 : 50 μM klorojenik asid çözeltisinin tek başına ve artan derişimli (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 330 nm, pH= 7, 25 ºC).....**137**
Şekil 4.24 : 50 μM klorojenik asid çözeltisinin tek başına ve 8 mM farklı CD çözeltileri varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 330 nm, pH= 7, 25 ºC) **138**
Şekil 4.25 : 50 μM kuersetin çözeltisinin tek başına ve artan derişimli (a) β-CD (b) HE-β-CD (c) HP-β-CD (d) M-β-CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 440 nm, pH= 7, 25 ºC).....**140**
Şekil 4.26 : 50 μM kuersetin çözeltisinin tek başına ve 8 mM farklı CD çözeltileri varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 440 nm, pH= 7, 25 ºC) **140**
Şekil 4.27 : 50 μM rutin çözeltisinin tek başına ve artan derişimli (a) β-CD (b) HE-β-CD (c) HP-β-CD (d) M-β-CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 440 nm, pH= 7, 25 ºC).....**142**
Şekil 4.28 : 50 μM rutin çözeltisinin tek başına ve 8 mM farklı CD çözeltileri varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 440 nm, pH= 7, 25 ºC).....**143**
Şekil 4.29 : Rosmarinik asidin 440 nm'de farklı β-CD derişimlerine karşı ölçülen floresans intensiteleri ve 1/[β-CD]-1/ΔF grafiği **144**
Şekil 4.30 : Klorojenik asidin 440 nm'de farklı β-CD derişimlerine karşı ölçülen floresans intensiteleri ve 1/[β-CD]-1/ΔF grafiği **145**
Şekil 4.31 : Kuersetinin 527 nm'de farklı β-CD derişimlerine karşı ölçülen floresans intensiteleri ve 1/[β-CD]-1/ΔF grafiği.....**145**
Şekil 4.32 : Rutinin 520 nm'de farklı β-CD derişimlerine karşı ölçülen floresans intensiteleri ve 1/[β-CD]-1/ΔF grafiği.....**146**
Şekil 4.33 : Katı numunelerin FT-IR spektrumları: (a) yalnız RA, (b) yalnız β-CD, (c) RA-β-CD içerme kompleksi, (d) yalnız α-CD, (e) RA-α-CD içerme kompleksi, (f) yalnız HE-β-CD (g) RA-HE-β-CD içerme kompleksi.....**147**
Şekil 4.34 : Katı numunelerin FT-IR spektrumları: (a) yalnız RA, (b) yalnız HP-β-CD, (c) RA-HP-β-CD içerme kompleksi, (d) yalnız M-β-CD, (e) RA-M-β-CD içerme kompleksi.....**148**
Şekil 4.35 : Serbest ve kompleksleşmiş rozmarinik asidin CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları.....**149**
Şekil 4.36 : Serbest ve kompleksleşmiş klorojenik asidin CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları.....**150**
Şekil 4.37 : Serbest ve kompleksleşmiş kuersetinin CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları.....**150**
Şekil 4.38 : Serbest ve kompleksleşmiş rutinin CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları.....**151**
Şekil 4.39 : Serbest RA ve RA-M-β-CD içerme kompleksinin CUPRAC reaktifi Cu(II)-Nc kompleksi ile oksidasyon reaksiyonunun kinetiği ...**151**

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 : Oksidatif gerilime sebep olan serbest radikal kaynakları **9**
Tablo 2.2 : Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, sübstitüsyon modelleri ve besin kaynakları [85] **18**
Tablo 2.3 : Siklodekstrinlerin özellikleri [153,154] **50**
Tablo 4.1 : Farklı çözücü ortamlarında CUPRAC yöntemine gore troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları **79**
Tablo 4.2 : Farklı çözücü ortamlarında ABTS-persülfat yöntemine göre troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları **80**
Tablo 4.3 : Farklı çözücü ortamlarında FRAP yöntemine gore troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları **80**
Tablo 4.4 : %100 EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi verileri **82**
Tablo 4.5 : %100 MeOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi verileri **83**
Tablo 4.6 : MeOH:H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi verileri **84**
Tablo 4.7 : MeOH:H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi verileri **85**
Tablo 4.8 : DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC-DCM yöntemi verileri **86**
Tablo 4.9 : %100 EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri **88**
Tablo 4.10 : %100 MeOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri **89**
Tablo 4.11 : MeOH:H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri **90**
Tablo 4.12 : MeOH:H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri **91**
Tablo 4.13 : DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri **92**
Tablo 4.14 : %100 EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin FRAP yöntemi verileri **93**
Tablo 4.15 : %100 MeOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin FRAP yöntemi verileri **94**
Tablo 4.16 : MeOH:H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin FRAP yöntemi verileri **95**

Tablo 4.17 : MeOH:H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin FRAP yöntemi verileri **96**
Tablo 4.18 : Beş farklı çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemi ile elde edilen TEAC katsayıları **97**
Tablo 4.19 : Farklı çözücü ortamlarında BHT-BHA ve BHT-NG bileşikleri arasındaki sinerjik ve antagonistik etkileşimler **100**
Tablo 4.20 : Farklı çözücü ortamlarında hazırlanan yeşil çay ektrelerinin toplam antioksidan kapasite ölçümlerinin CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemlerine göre değerlendirilmesi **101**
Tablo 4.21 : BHT katkılı yeşil çay ekstrelerinin toplam antioksidan kapasitelerinin (TAC) CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemleriyle ölçümü (Çözücü: MeOH/H_2O, 4:1 (v/v)) **101**
Tablo 4.22 : Metanol ortamında hazırlanan antioksidan bileşiklerin CUPRAC yöntemine göre troloks eşdeğeri cinsinden toplam antioksidan kapasite (TEAC) değerleri **102**
Tablo 4.23 : Troloks, çay antioksidanları ve fenolik antioksidanlarının HPLC kalibrasyon denklemleri, alıkonma zamanları ve lineer çalışma aralıkları **103**
Tablo 4.24 : Farklı CUPRAC reaktifi derişim oranlarında elde edilen troloksa eşdeğer Cu(I)-Nc pikinin sinyal/gürültü oranları **105**
Tablo 4.25 : Troloks, çay antioksidanları ve fenolik antioksidanlarının hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi uygulanarak elde edilen alıkonma zamanları, lineer çalışma aralıkları ve kalibrasyon denklemleri **109**
Tablo 4.26 : HPLC, hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemlerine göre hesaplanan ve literatürden alınan hat-üstü HPLC-DPPH yönteminin LOD değerleri **110**
Tablo 4.27 : Sentetik antioksidan karışımlarının CUPRAC, HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemleriyle TAC değerlerinin karşılaştırılması **113**
Tablo 4.28 : CUPRAC, HPLC (CUPRAC hesaplamalı), hat-üstü HPLC CUPRAC yöntemlerine göre bitki ekstrelerinin TAC değerleri **117**
Tablo 4.29 : 50 μM rozmarinik asidin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrum verileri **120**
Tablo 4.30 : 50 μM klorojenik asid çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrum verileri **123**
Tablo 4.31 : 50 μM kuersetin çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrum verileri **126**
Tablo 4.32 : 50 μM rutin çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrum verileri **129**
Tablo 4.33 : Antioksidan-siklodekstrin içerme komplekslerinin oluşum sabitleri **144**

SEMBOL LİSTESİ

CUPRAC : bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
Cu(II)-Nc : bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc : bakır(I)-neokuproin
ABTS : 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
FRAP : demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
DCM : diklorometan
HBA : hidrojen bağı akseptör
FRA : ferulik asid
BHA : butillenmiş hidroksi anizol
GSH : glutatyon
BHT : butillenmiş hidroksi toluen
HPLC : yüksek performanslı sıvı kromatografisi
DPPH : 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
CD : siklodekstrin
AO : antioksidan
ROS : reaktif oksijen türleri
ORAC : oksijen radikal absorbans kapasitesi
HRP : horse radish peroksidaz
TEAC : troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
$ABTS^{\cdot+}$: ABTS radikal katyonu
TPTZ : tripridiltriazin
TRAP : toplam radikal tutma parametresi
AAPH : azobis (2-amido propan)dihidroklorür
DCFH-DA : diklorofloresin-diasetat
DCF : diklorofloresin
TBARS : tiyobarbitürik asit reaktif maddeler
LDL : lipoprotein
HAT : hidrojen atomu transferi
ET : elektron transferi
TR : troloks
TAC : toplam antioksidan aktivite
FT-IR : fourier transform infrared spektrofotometre
GSH -Px : glutatyon peroksidaz
PE : fikoeritrin
AUC : eğri altında kalan alan
t_R : alıkonma zamanı
M : molar derişim
v/v : hacim/hacim

w/v : ağırlık/hacim
F : kompleks haldeki antioksidanın floresans intensitesi
F_0 : Serbest haldeki antioksidanın floresans intensitesi
ΔF_{max} : doymuş haldeki antioksidanın floresans intensitesi
K_f : içerme sabiti veya oluşum sabiti
[CD] : toplam siklodekstrin konsantrasyonu
K_c : kararlılık sabiti
ΔG^o : Gibbs serbest enerji değişimi
ΔH^o : standard entalpi değişimi
ΔS^o : standard entropi değişimi
QR : kuersetin
CT : kateşin
AA : askorbik asid
NG : naringenin
Vit E : vitamin E
LG : lauril gallat
NG : naringenin
TBHQ : *tert*-butil hidrokinon
MR : mirisetin
APG : apigenin
LT : luteolin
EGCG : epigallokateşingallat
ECG : epikateşingallat
EGC : epigallokateşin
EC : epikateşin
CFA : kaffeik asid
***p*-COU** : para kumarik asid
CA : klorojenik asid

ÖZET

FARKLI TÜR, KARIŞIM VE ÇÖZÜCÜ ORTAMLARINA UYGULANABİLEN MODİFİYE CUPRAC ANTİOKSİDAN KAPASİTE ÖLÇÜMLERİ

Biyolojik sıvılarda, gıda maddelerinde ve bitki ekstrelerinde (özütlerinde) bulunan lipofilik ve hidrofilik antioksidanların kapasite tayinine olanak sağlayan pek çok yöntem geliştirilmiş olmasına rağmen bu yöntemlerin birçok sakıncası veya uygulama kısıtları vardır. Bu tez çalışmasında; farklı antioksidan türlerine, karışımlarına ve çözücü ortamlarına uygulanabilecek, dünyada yaygın kullanım alanına sahip CUPRAC: 'Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite' yöntemi esaslı, basit, tekrarlanabilir, ucuz ve duyarlı yöntemlerin bilimsel çevrelerce yaygın bir şekilde kullanılabilecek referans yöntemler olarak geliştirilmesi ve antioksidan bileşiklerin farklı karışım ve çözücü ortamlarında antioksidan kapasitelerindeki değişimlerin bu yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

Çözücü etkisi, antioksidan bileşiklerin kimyasal davranışları üzerinde çok önemli bir parametredir. Bu çalışmanın ilk kısmında bazı lipofilik ve hidrofilik antioksidanların farklı çözücü ortamlarındaki (%100 EtOH (etanol), %100 MeOH (metanol), MeOH/H_2O (4:1, v/v), MeOH/H_2O (1:1, v/v) ve DCM (diklorometan)/EtOH (9:1, v/v)) toplam antioksidan kapasiteleri (TAC) incelenmiştir. Seçilen antioksidanların CUPRAC değerleri deneysel olarak troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) cinsinden belirlenmiştir ve diğer referans yöntemlerle (örn. (2,2'-azinobis(3-etil-benzotiazolin-6-sülfonik asid)/persülfat (ABTS/persülfat) ve demir(III) indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yöntemleri) bulunan değerlerle karşılaştırılmıştır. Antioksidanların sentetik karışımlarının TAC değerleri troloks eşdeğeri cinsinden deneysel olarak ölçülmüştür ve absorbansların toplamsallığı ilkesinden yararlanılarak teorik olarak bulunan değerlerle karşılaştırılmıştır. Bu sentetik karışımların çözücü seçimine bağlı olarak olası sinerjik (örn. DCM/EtOH ortamında BHT ve BHA) veya antagonistik davranışları incelenmiştir.

Karmaşık bitki matrikslerinde polifenollerin (flavonoidler, basit fenolik ve hidroksisinnamik asidler) seçimli tayini için yeni bir hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem bitki ekstrelerindeki antioksidanların kromatografik ayrımını, bileşen analizini ve kolon-sonrası tanımlanmasını eş zamanlı gerçekleştirmektedir. Polifenollerin ayrılması iki farklı mobil faz çözeltili (metanol ve %0.2 *o*-fosforik asid) gradient elüsyon kullanılarak C18 kolonunda gerçekleşmiştir. HPLC kolonunda ayrılan antioksidan bileşenler, türevlendirilmiş ürün oluşturmak için bir kolon-sonrası reaksiyon sarmalı içinde bakır(II)-neokuproin (Cu(II)-Nc) reaktifi ile reaksiyona girmektedir. CUPRAC reaktifi, antioksidanlar tarafından 450 nm'de maksimum absorpsiyona sahip bakır(I)-neokuproin (Cu(I)-Nc) kelatına indirgenmektedir. Cu(I)-Nc'den kaynaklanan absorbans artışı ölçülerek antioksidan bileşiklerin negatif pikleri izlenip değerlendirilmiştir. Polifenollerin kolon-sonrası türevlendirmeyi takiben 450 nm'deki belirtme sınırları (0.17-3.46 µM aralığında), türevlendirme yapılmadan 280 nm'de UV

yöntemiyle saptanan belirtme sınırlarıyla kıyaslanabilir düzeydedir. Geliştirilen yöntem *Camellia sinensis*, *Origanum marjorana* ve *Mentha* bitki ekstrelerindeki antioksidan bileşiklerin belirlenmesine başarıyla uygulanmıştır. Bu yöntem, hızlı, çok yönlü, geniş kapsamlı ve zahmetsiz olup kararlı reaktifler kullanmakta ve kompleks bitki örneklerindeki antioksidan bileşenlerin hat-üstü kalitatif ve kantitatif tayinine olanak sağlamaktadır.

Polifenollerin TAC değerlerinin ölçümü, antioksidanları suda çözünebilir kılmak amacıyla siklodekstrinlerin (CD) kullanımını gerektirmektedir. Bu çalışmanın son kısmında sudaki çözünürlükleri az olan antioksidanlardan rozmarinik asid (RA), klorojenik asid (CA), kuersetin (QR) ve rutinin (RT); doğal (α-CD, β-CD) ve modifiye (hidroksi-propil-β-CD, hidroksi-etil-β-CD, metil-β-CD) siklodekstrinler ile içerme (inklüzyon) kompleksleri incelenmiştir. Bu polifenollerin spektral özellikleri üzerinde siklodekstrinlerin etkisi, UV-Vis ve kararlı-hal floresans yöntemleri kullanılarak CD derişimlerinin değiştirilmesiyle sulu ortamda ölçülmüştür. Bu içerme komplekslerinin oluşum sabitleri floresans spektroskopik veriler kullanılarak Benesi-Hildebrand denklemine göre belirlenmiştir. Siklodekstrinler arasında maksimum içerme kabiliyeti M-β-CD'de gözlenmekte olup HP-β-CD, HE-β-CD, β-CD ve α-CD sırasıyla devam etmektedir. Katı içerme kompleksleri dondurarak kurutma yöntemiyle hazırlanmıştır ve fonksiyonel gruplar IR-spektroskopisi kullanılarak analiz edilmiştir. Siklodekstrinlerle kompleksleşmiş polifenollerin CUPRAC yöntemine göre antioksidan kapasitesi, yalnız haldeki polifenollere göre daha yüksek ölçülmüştür. TAC değerlerindeki artış, siklodekstrinler (özellikle M-β-CD) tarafından sağlanan hidrofobik bir çevrede artan molekül içi H- bağlanmasıyla polifenollerin 1 e- yükseltgenmiş *o*-kateşol yapılarının stabilizasyonu ile açıklanmaktadır.

SUMMARY

MODIFIED CUPRAC ANTIOXIDANT CAPACITY MEASUREMENTS APPLICABLE TO DIFFERENT SPECIES, MIXTURES AND SOLVENT MEDIA

Although many methods have been developed for the antioxidant capacity determination of lipophilic and hydrophilic antioxidants present in biological fluids, food and plant extracts, these methods have various disadvantages and restrictions of application. Thus the aim of this thesis work is to develop widely used CUPRAC (CUPric ion Reducing Antioxidant Capacity)-oriented, simple, reproducible, cost-efficient and sensitive assays, to apply these methods to divergent matrices of complex materials so that they may be accepted by scientists of different origins as reference methods of antioxidant assay, and to examine the changes in the antioxidant capacities of compounds in different species, mixture and solvent media with the aid of these methods.

Solvent effect is a crucial parameter on the chemical behaviour of antioxidant compounds. The first part of this study was undertaken to investigate the total antioxidant capacity (TAC) of certain lipophilic and hydrophilic antioxidants, measured in different solvent media such as ethanol (EtOH) (100%), methanol (MeOH) (100%), methanol/water (4:1, v/v), methanol/water (1:1, v/v), dichloromethane (DCM)/EtOH (9:1, v/v)). CUPRAC values of selected antioxidants were experimentally reported in this work as trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC), and compared to those found by reference TAC assays, *i.e.*, 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)/persulphate (ABTS/persulphate) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods. The TAC values of synthetic mixtures of antioxidants were experimentally measured as trolox equivalents and compared to those theoretically found by making use of the principle of additivity of absorbances. Possible synergistic (*e.g.*, BHT and BHA in DCM/EtOH) or antagonistic behaviours of these synthetic mixtures were investigated in relation to solvent selection.

A novel on-line HPLC-CUPric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) method was developed for the selective determination of polyphenols (flavonoids, simple phenolic and hydroxycinnamic acids) in complex plant matrices. The method carries out chromatographic separation, constituent analysis, and post-column identification of antioxidants simultaneously in plant extracts. The separation of polyphenols was performed on a C18 column using gradient elution with two different mobile phase solutions, *i.e.*, MeOH and 0.2% *o*-phosphoric acid. The HPLC–separated antioxidant polyphenols in the extracts react with copper(II)-neocuproine (Cu(II)-Nc) reagent in a post-column reaction coil to form a derivative. The CUPRAC reagent is reduced by antioxidants to the copper(I)-neocuproine (Cu(I)-Nc) chelate having maximum absorption at 450 nm. The negative peaks of antioxidant constituents were monitored by measuring the increase in absorbance due to Cu(I)-Nc. The detection limits of polyphenols at 450 nm (in the range of 0.17-3.46 μM) after post-column derivatization were comparable to those at 280 nm UV-detection without derivatization. The developed method was successfully applied to the identification of antioxidant compounds in crude extracts of *Camellia sinensis*, *Origanum marjorana* and *Mentha*. The method is rapid, inexpensive, versatile, nonlaborious, uses stable reagents, and

enables the on-line qualitative and quantitative estimation of antioxidant constituents of complex plant samples.

Measurement of TAC of polyphenols necessitates the use of cyclodextrins (CD) to solubilize antioxidants of poor aqueous solubility. The inclusion complexes of the slightly water soluble antioxidants, rosmarinic acid (RA), chlorogenic acid (CA), quercetin (QR) and rutin (RT) with native (α-cyclodextrin (α-CD), β-cyclodextrin (β-CD)) and modified (2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CD), 2-hydroxyethyl-β-cyclodextrin (HE-β-CD), and methyl-β-cyclodextrin (M-β-CD)) cyclodextrins were investigated in the last part of study. The effect of cyclodextrins on the spectral features of polyphenols was measured in aqueous medium using UV-Vis and steady-state fluorescence techniques by varying the concentrations of CDs. The formation constants of the inclusion complexes were determined from Benesi-Hildebrand equation using fluorescence spectroscopic data. Among the CDs, maximum inclusion ability was measured in the case of M-β-CD followed by HP-β-CD, HE-β-CD, β-CD and α-CD. Solid inclusion complexes were prepared by freeze drying, and their functional groups were analyzed by IR spectroscopy. Antioxidant capacity of CD-complexed polyphenols were measured to be higher than that of the lone polyphenols by the CUPRAC method. The mechanism of the TAC increase was interpreted as the stabilization of the 1-e oxidized *o*-catechol moiety of polyphenols by enhanced intramolecular H-bonding in a hydrophobic environment provided by CDs, mostly by M-β-CD.

1. GİRİŞ

Hidroksil radikali ($^{\cdot}OH$), süperoksit anyon radikali ($O_2^{-\cdot}$) ve peroksil radikali ($ROO^{\cdot}$) gibi reaktif oksijen türleri (ROS) vücutta aerobik solunum yoluyla ve dış kaynaklı UV radyasyonu, hava kirliliği ve beslenme yoluyla meydana gelmektedir. Radikalik türlerin oluşumu oksidatif gerilime ve lipid, DNA, protein ve diğer önemli biyolojik yapıların hasarına neden olmaktadır. Vücutta meydana gelen radikalik zincir reaksiyonları sonucunda hücresel yıpranma ve yaşlanma, kanser, kalp ve damar hastalıkları, Alzheimer ve bağışıklık sistemi hastalıkları oluşmaktadır [1-2].

Çeşitli hastalıklara yol açabilen ′oksidatif gerilim′le mücadele etmenin en önemli araçlarından biri, koruyucu hekimlik ve tedavi bağlamında antioksidan gıdalarca zengin bir beslenme rejimidir. Birçok çalışma meyve ve sebze ağırlıklı beslenmenin kardiyovasküler hastalıklar ve kanser oluşumunu engellediğini belirtmiştir. Bu olumlu etkiler özellikle meyve ve sebzelerde bolca bulunan polifenoller, karotenoidler, C vitamini ve tokoferol gibi antioksidan aktivite gösteren çeşitli bileşikler varlığında oluşmaktadır. Önemli hastalıkların önlenmesinde besin antioksidanlarının büyük rolü olduğunun kanıtlanması birçok antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Bu yöntemlerin başlıcaları peroksil radikali süpürme (ORAC [3], TRAP [4]), metal indirgeme gücü (FRAP [5], CUPRAC [6]), organik radikal süpürme (ABTS [7], DPPH [8]), lipid peroksidasyonu sırasında oluşan ürünlerin kantitatif tayini (TBARS, LDL oksidasyonu [9-10]) şeklinde özetlenebilir.

Antioksidanlar reaktif türleri hidrojen atom transfer (HAT) ve elektron transfer (ET) gibi iki temel mekanizmaya göre etkisiz hale getirirler. Bu mekanizmayı antioksidanın yapısal özellikleri, çözünürlüğü ve sistemin çözücüsü etkilemektedir. Bağ disosiyasyon entalpisi ve iyonizasyon potansiyeli mekanizmayı ve antioksidan etkinliğini belirlemede iki önemli faktördür [11-12]. Literatürde bu yöntemler etanol, etanol-su, aseton, metanol, metanol-su vb. farklı organik çözücü ortamlarında besin ekstreleri elde edilerek antioksidan kapasite tayininde sıkça kullanılmıştır. Son birkaç yıldır, bazı

araştırmacılar ekstraksiyon çözücüsünün antioksidan kapasite üzerine etkisini incelemek için çalışmalar yapmıştır [13-17]. Ancak tek bir antioksidan bileşiğin farklı çözücü ortamında göstermiş olduğu antioksidan kapasiteyi inceleyen sınırlı sayıda araştırma mevcuttur. Antioksidan bileşiklerin kimyasal davranışları üzerinde çözücü etkisi temel bir parametredir. Hidrofilik ve hidrofobik çözücü ortamlarında antioksidanlar benzer antioksidan aktivite göstermezler aksine çözücü ortamının değişmesiyle gösterdikleri antioksidan özellik farklılık gösterir. Çözücü türü ve polaritesi antioksidan kapasite ölçümlerinde önemli olan hidrojen atomu ve elektron transferini etkilemektedir [13,18]. Hidrojen atom transferi reaksiyonu esasına göre çalışan antioksidan kapasite yöntemleri çözücüden ve pH'dan göreceli bağımsızdır. Ayrıca reaksiyon hızlı olup genellikle saniye veya dakika mertebesinde tamamlanır [11]. Birçok araştırmacı polar çözücülerde hidrojen atomu bağlamanın fenolik antioksidanların H-atom donör aktivitelerinde önemli değişikliklere neden olduğunu ve fenoliklerin antioksidan kapasitelerini düşürdüğünü belirtmişlerdir [14,19]. ORAC, ABTS, FRAP, DPPH ve CUPRAC gibi sıkça kullanılan yöntemlerde çözücü etkisi mevcut olmakla birlikte çözücünün cinsi ve özellikleri her yöntemi farklı şekilde etkilemektedir.

Son yıllarda, antioksidan bileşiklerin besin ve diğer kompleks matrikslerden ekstraksiyonu ve toplam antioksidan kapasite tayininde farklı çözücüler kullanılarak bu çözücülerin antioksidan kapasiteye olası etkileri incelenmektedir. Ancak bir antioksidan bileşiğin farklı çözücülerde göstermiş olduğu antioksidan kapasiteye yer veren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu eksiklikten yola çıkarak, bu tez çalışmasında belli başlı antioksidan bileşiklerin (flavonoidler, fenolik asitler, vitaminler ve sentetik antioksidan bileşikler) %100 etanol (EtOH), %100 metanol (MeOH) ve MeOH/H_2O (4:1,v/v), MeOH/H_2O (1:1,v/v) ve diklorometan (DCM)-EtOH (9:1,v/v) çözücü ortamlarında çözeltileri hazırlanmıştır. Antioksidanlar üzerinde çözücü etkisinin araştırılması ve değerlendirilmesi çalışma grubumuzca toplam antioksidan kapasite tayininde kullanılmak üzere geliştirilen spektrofotometrik CUPRAC (bakır(II) indirgeyici antioksidan kapasite tayini) yöntemi [6], ET esaslı ABTS-persülfat [20] ve FRAP [5] yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Her bir çözücü ortamında her bileşiğin kalibrasyon eğrileri oluşturulmuş ve suda çözünebilen E vitamini analogu olan troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasite değerleri (TEAC), molar absorblama katsayıları, lineer çalışma aralıkları belirlenmiştir. Kullanılan bileşiklerden beşli sentetik

karışım çözeltileri hazırlanarak bu sentetik karışımların beklenen ve gözlenen antioksidan kapasiteleri mM troloks (TR) ekivalenti cinsinden hesaplanmıştır. Ayrıca bu çözücü ortamlarında hazırlanan yeşil çay ekstrelerine ilgili yöntemler uygulanarak antioksidan kapasitede meydana gelen değişimler incelenmiştir.

Son yıllarda geliştirilen ve biyolojik sıvılar, sebze, meyve ve bitki infüzyonları gibi kompleks matrikslerdeki antioksidan aktiviteyi belirleyebilen analitik yöntemlerden bazıları hat-üstü olarak kolon-sonrası (post-kolon) türevlendirme sistemi bağlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak modifiye edilmiştir [21-32]. HPLC sistemine entegre edilen post-kolon türevlendirme sistemleri kullanılarak bileşenlerine ayrılan örnek materyali, kromofor grubun UV ışığını absorbladığı UV dedektöre ulaşır ve pik olarak ekrana taşınır. Post-kolon türevlendirme sistemini oluşturmak için ikinci bir akış transfer sistemi eklenerek HPLC sistemi modifiye edilir. Antioksidanların tayininde en yaygın olarak kullanılan yöntemler; luminol kemiluminesans esaslı [21,22], UV esaslı serbest kararlı radikallerin ($DPPH^{\cdot}$ (2,2'-difenil-1-pikril hidrazil) [23,24] ve $ABTS^{\cdot+}$ (3-etil-benzotiazolin-6-sulfonik asid) radikalinin [25] kullanıldığı renksizleştirme yöntemleridir. Bu hat-üstü yöntemler, matriksin kromatografik yolla ayrılmasından sonra kompleks karışımındaki antioksidanlarla reaksiyon vererek hızlı bir şekilde belirlenmelerine olanak sağlamaktadır. Ancak bu radikallerin ömürleri kısa olduğundan antioksidan aktiviteyi kantitatif olarak belirlemek güçleşir. Bu radikalik reaktifler, sterik etki, çözücü bileşimi ve pH'dan etkilenerek reaksiyon kinetiklerinin değişimine neden olmaktadır [25]. Bunun yanısıra, doğal antioksidanların aktiviteleri, izole edilmeleri ve yapılarından dolayı saflaştırılmaları esnasında düşmektedir.

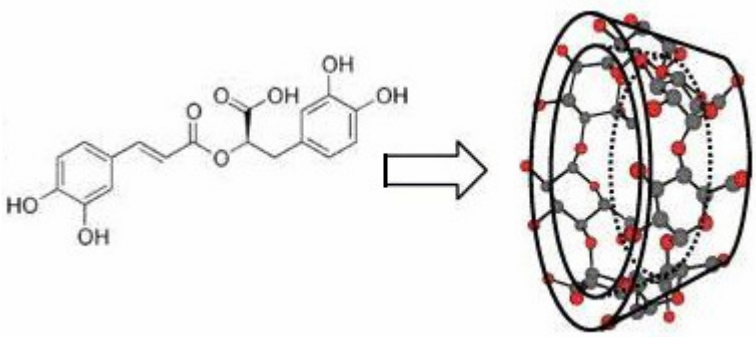
Hat-üstü yöntemlerin önemli avantajlarından biri, hızlı, çok yönlü, kararlı reaktifler kullanan ve duyarlı bir sistem olup karmaşık bitki örneklerindeki antioksidan bileşenlerin hat-üstü kalitatif ve kantitatif tayinine imkan vermesidir. Bu sistemler sayesinde UV belirlemeyle kantitatif tayine ek olarak, her bir bileşenin hat-üstü olarak antioksidan kapasitesi ölçülebilmekte ve toplam antioksidan kapasiteye (TAC) etkisi de hesaplanabilmektedir. Bununla birlikte, antioksidan aktivite göstermeyen bir bileşiğin belirlenmesi de eş zamanlı olarak yapılabilmektedir. Literatürde mevcut olan hat-üstü antioksidan kapasite tayin yöntemlerinde kullanılan radikalik reaktiflerin önemli

dezavantajlara sahip olmasından dolayı ve hat-üstü yöntemlerin bitki, sebze, meyve ve meyve sularında mevcut olan antioksidan bileşiklerin hızlı tayinine olanak sağlayan etkili bir yöntem olmasından dolayı bu çalışmada bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite (CUPRAC) metodolojisi kullanılarak yeni bir kolon-sonrası türevlendirme tekniğinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Diğer kolon sonrası reaktiflerle karşılaştırıldığında CUPRAC reaktifi fenolik lipofilisite, sterik etkiler, çözücü (mobil faz) bileşimi, pH, çözünmüş oksijen ve gün ışığına daha az duyarlıdır [6,33]. Bu sistemde HPLC kolonunda ayrılan antioksidan bileşenler, bir reaksiyon sarmalı içinde CUPRAC reaktifi olan Cu(II)-Nc ile reaksiyona girmektedir. Reaktif, antioksidanlar tarafından 450 nm'de maksimum absorbsiyon gösteren sarı renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenmektedir. Kolon sonrası CUPRAC reaktifiyle türevlendirilen ve her bir bileşenle reaktifin vermiş olduğu reaksiyon ürünü Cu(I)-Nc kelatının 450 nm'de belirlenmesiyle elde edilen kromatogramlardan yararlanılarak konsantrasyon ile negatif pik alanı arasında kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiklerinin korelasyon katsayıları oldukça yüksek bulunmuştur. Her bir bileşiğin antioksidan aktivitesi, konsantrasyon arttıkça kolon sonrası türevlendirme sonucu elde edilen negatif pik alanlarının artmasıyla ilişkilidir. Hat-üstü HPLC-CUPRAC sistemi olarak adlandırılan bu modifiye CUPRAC yöntemi sırasıyla referans bileşik olan troloksa, antioksidan bileşiklerin (kateşin ve türevleri, hidroksi sinnamik asitler ve hidroksi benzoik asitler vb.) standart çözeltilerine, sentetik karışımlarına ve bu bileşiklerin bazılarına sahip kompleks yapılı bitki örneklerinden yeşil çay, siyah çay, nane ve mercanköşke uygulanmıştır. 450 nm'de elde edilen negatif pik alanlarının toplamından yararlanılarak uygun bir korelasyon yardımıyla bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasite (TAC) değerleri hesaplanmıştır ve sonuçlar spektrofotometrik CUPRAC yöntemi sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Geliştirilen yöntem ile kompleks yapılı örneklerde bileşenlerin ayrılması, her bir bileşenin antioksidan kapasiteye katkısı ve ilgili bileşiklerin CUPRAC reaktifine cevap verip vermediği dolayısıyla antioksidan özellik gösterip göstermediği de hızlı ve duyarlı olarak belirlenebilmiştir.

Polifenoller, sağlığa yararlı bileşikler olup ikincil bitki metabolitleridir. Flavonoidler ise polifenollerin majör grubu olarak meyve ve sebzelerde bolca bulunmaktadır. Bu bileşikler antitümör (tümör oluşumunu önleyici), antimutajenik (mutasyon önleyici) ve antiaging (yaşlanmayı geciktirici) gibi sağlığa yararlı etkilere sahiptirler [34]. Bu

bileşiklerin terapötik yararları olmasına karşın sudaki çözünürlükleri çok düşüktür. Yüksek çözünürlük ise iyi biyoyararlanıma ve analiz yöntemlerinin daha kolay uygulanmasına olanak sağlar [35]. Dolayısıyla, bu bileşiklerin sudaki çözünürlüklerinin arttırılmasında siklodekstrin kullanımı önem kazanmaktadır.

Diğer yandan, siklodekstrinler 6, 7 ve 8 glukopiranoz birimi içeren (α-,β-,γ-siklodekstrin) doğal makro oligosakkaritlerdir. Siklodekstrinler, dış kısmı hidrofilik, iç kısmı hidrofobik yapılı kafes şeklinde moleküllerdir. Hidrofobik yapıya sahip siklodekstrinler çeşitli hidrofobik moleküllerle ev sahibi-misafir (host-guest) molekül etkileşimi sonucu içerme kompleksleri oluştururlar (Şekil 1.1) [36-38]. Kompleks oluşumu, su moleküllerinin çözeltideki daha hidrofobik yapılı misafir moleküllerle yer değiştirmesi sonucu meydana gelmektedir [39].



Şekil 1.1: İçerme kompleksleri oluşumunun şematik gösterimi

Siklodekstrinler; kozmetik, ilaç ve besin endüstrisinde kompleksleme ajanı olarak kullanılarak ilaç, vitamin, besin boyaları gibi çeşitli bileşiklerin sudaki çözünürlüğünü arttırmaktadırlar [40-42]. Siklodekstrin içerme prosesi sonucunda misafir moleküllerin fizikokimyasal ve farmasötik özellikleri değiştirilerek çözünürlüğün arttırılması, kimyasal stabilite ve biyoyararlanımın geliştirilmesi, toksisitenin azaltılması gibi sonuçlar görülmektedir [43,44]. Bu nedenle, siklodekstrinlerle çeşitli alanlarda kullanılan farmasötik moleküllerin içerme davranışını anlayabilmek önem teşkil etmektedir. Son yıllarda, çözünürlüğü az olan birçok antioksidan bileşiğin çözünürlüğünü ve kimyasal stabilitesini arttırmak amaçlı antioksidan-siklodekstrin içerme komplekslerinin karakterizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur [35,45-55]. Bu çalışmalarda, içerme komplekslerinin kapasitelerini ve fizikokimyasal özelliklerini

arttırmak için hem doğal siklodekstrinlerden hem de çeşitli hidrofilik, hidrofobik veya iyonik karakterli siklodekstrin türevlerinden yararlanılmaktadır. Siklodekstrinlerin içerme kompleksleri oluşturma yetenekleri siklodekstrinin iç kavite büyüklüğüne ve misafir molekülün büyüklüğüne, şekline ve hidrofobik özelliğine bağlıdır [49]. Çevrenin veya çözücü ortamının dielektrik özelliklerinin, moleküllerin spektral ve moleküler özelliklerini (örneğin absorbsiyon ve floresans intensitesi, piklerin pozisyonu) etkilediği bilinmektedir. Siklodekstrin kavitesine gömülü bir molekülün taşıdığı özelliklerin su içinde gösterdiği özelliklere oranla farklı olması beklenmektedir [47].

Geçmiş yıllarda kuersetin [35,46,53,56-59], morin [35,54], rutin [46,60,61], klorojenik asit [47,62], resveratrol [45,63], izokuersitrin [64] ve kaempferol [56,59] gibi antioksidanların siklodekstrinlerle etkileşmesi ile ilgili birçok makale yayınlanmıştır. Bu yayınlarda içerme komplekslerinin oluşumu diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), X-ışını difraktometrisi (XRPD), proton manyetik rezonans (1H-NMR), UV-görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis), Fourier transform-infrared spektroskopisi (FT-IR) ve floresans spektroskopisi (FL) yöntemleri kullanılarak kanıtlanmıştır. Yüksek duyarlılık, seçimlilik ve enstrümental kolaylığından dolayı floresans yöntemler, antioksidanların içerme komplekslerinin oluşumundaki olayların araştırılmasında ve kompleks oluşum sabitlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Literatürde yer alan çalışmaların çoğunluğunda ya tek bir polifenolün bir veya birkaç siklodekstrin ile kompleksinin karakterizasyonu veya tek bir siklodekstrin türü ile birkaç polifenolik bileşiğin karakterizasyonu incelenmiştir. Ayrıca bu çalışmaların birçoğunda kompleksleşmenin polifenolik bileşiğin antioksidan aktivitesi üzerine etkisi dikkate alınmamıştır. Bu eksiklikten yola çıkarak hidroksi sinnamik asitlerden rosmarinik asid ile klorojenik asidin, flavonoidlerden kuersetin ve glikozidi rutinin siklodekstrinlerle oluşturduğu içerme komplekslerinin spektrofotometrik ve spektroflorometrik karakterizasyonu yapılmıştır. Rosmarinik asidin doğal ve modifiye siklodekstrinlerle etkileşimi literatürde daha önce hiç incelenmemiş olup ilk kez bu tez çalışmasında incelenmiştir. Klorojenik asit, rutin ve kuersetinin ise α-siklodekstrin, β-siklodekstrin, hidroksi-propil-β-siklodekstrin, hidroksi-etil-β-siklodekstrin, metil-β-siklodekstrin ile etkileşimlerinden sadece bir veya ikisi incelenmiş olup hepsinin bir

arada incelendiği çalışma mevcut değildir. Bu çalışmada, dört farklı ve önemli antioksidan bileşiğin içerme kompleksleri incelenmiş, elde edilen komplekslerin CUPRAC yöntemiyle antioksidan kapasite değerleri belirlenmiştir. Kompleks oluşumu ile antioksidan kapasitedeki değişimler incelenmiştir. Antioksidan bileşiklerin siklodekstrin komplekslerinin stokiyometrisini ve oluşum sabitlerini belirlemek için floresans spektrumlarındaki kompleks intensitesi ile antioksidan bileşiğin tek başına göstermiş olduğu intensite farkından yararlanılarak antioksidan-CD komplekslerinin oluşum sabitleri Benesi-Hildebrand (Eşitlik 1.1) denklemi [65] yardımıyla hesaplanmıştır:

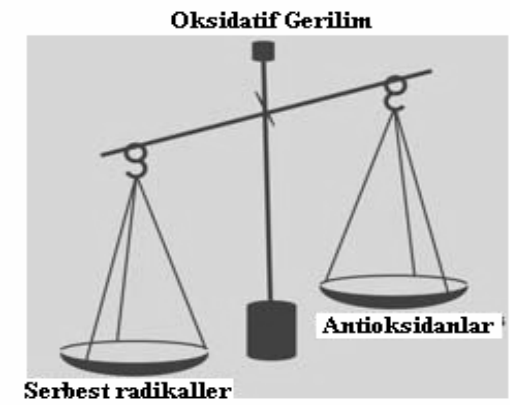
$$\frac{1}{[F - F_o]} = \frac{1}{\Delta F_{\max}} + \frac{1}{(\Delta F_{\max} K_f [CD])} \qquad (1.1)$$

FT-IR spektroskopisi kullanılarak CD'ler ile antioksidanların içerme kompleks oluşumları doğrulanmıştır. Serbest ve kompleksleşmiş antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasiteleri CUPRAC yöntemine göre incelenip değerlendirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. OKSİDATİF GERİLİM VE ANTİOKSİDANLAR

Oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, hücre solunumu ve normal metabolizma olayları esnasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur. Aerobik (oksijen soluyan) organizmalarda serbest radikal oluşumunu kontrol altında tutmak ve bu moleküllerin zararlı etkilerine engel olmak üzere antioksidan savunma sistemleri gelişmiştir. Ancak bazı durumlarda mevcut antioksidan savunma sistemi serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemez ve oksidatif gerilim (stres) olarak adlandırılan ve vücudun paslanması diye de tanımlanabilecek durum ortaya çıkar (Şekil 2.1) [66].



Şekil 2.1: Serbest radikaller ile antioksidan savunma sistemi arasındaki dengenin rektif türler lehine bozulmuş olması (oksidatif gerilim)

UV ışınları, ilaçlar, yağ oksidasyonu, immunolojik reaksiyonlar, radyasyon, stres, sigara, alkol ve biyokimyasal redoks reaksiyonları gibi pek çok yolla serbest radikal (ROS) oluşumu gerçekleşebilir (Şekil 2.2). Bu süreçlerde oluşan başlıca serbest radikaller; süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksid (H_2O_2), hidroksi radikal ($HO^{\cdot}$), peroksil radikal ($ROO^{\cdot}$), alkoksil radikal ($RO^{\cdot}$), hipoklorik asit ($OHCl^{-}$) ve peroksinitrit ($ONOO^{-}$)'tir. Oluşan serbest radikaller, aralarında ateroskleroz, kalp hastalıkları, kanser,

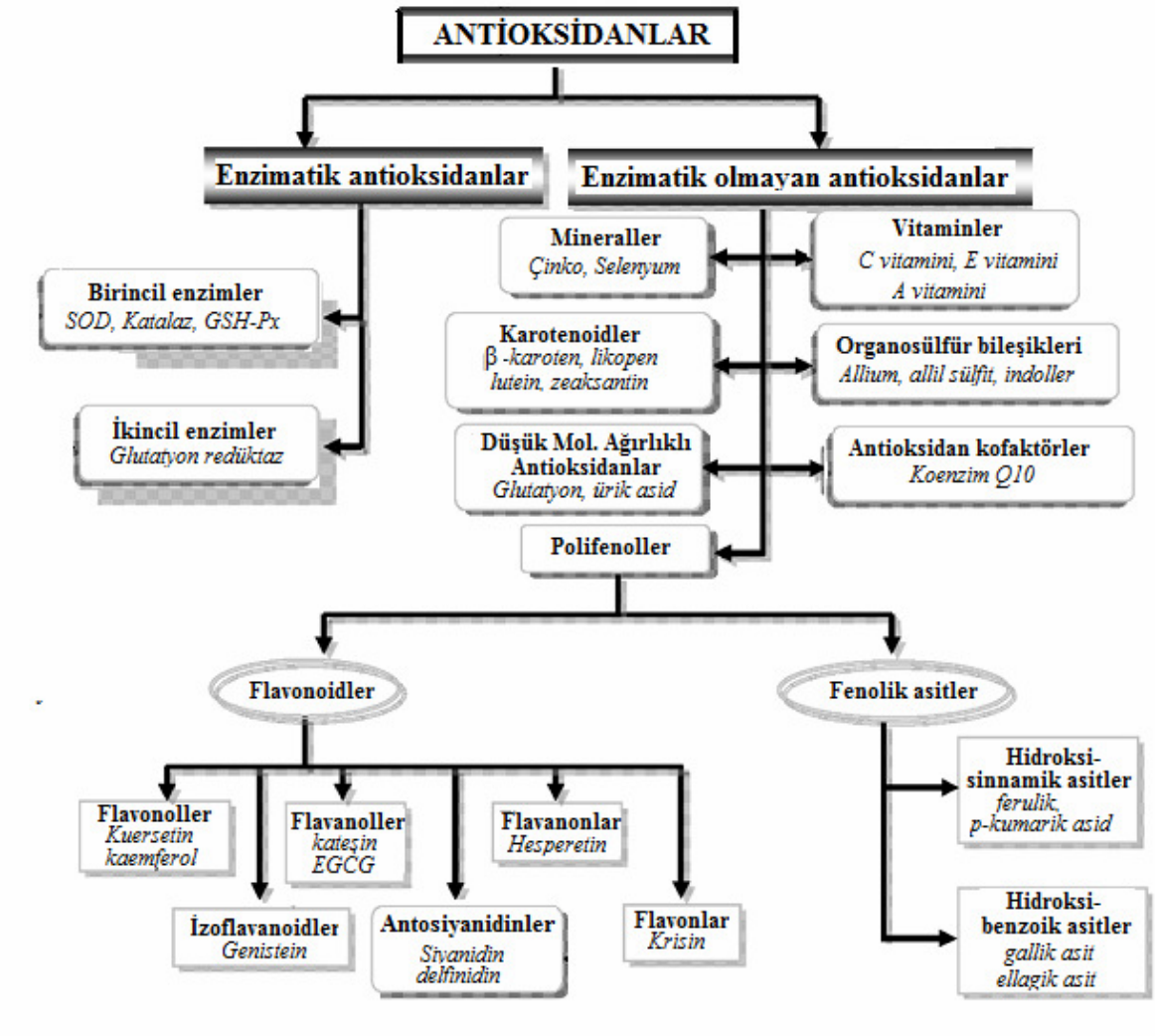
nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, akut renal yetmezlik, akciğer hastalıkları, anfizem, bronşit ve karaciğer hastalıkları gibi yaşlanmaya bağlı dejeneratif bozuklukların da yer aldığı patolojik durumların oluşumuna katkıda bulunurlar. Dokuları bu hasarlardan koruyabilmek için serbest radikallerin etkisiz duruma getirilmesi önemlidir. Bu zararlı etkiler, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar ile dengelenmektedir [66,67]. Reaksiyon şekillerine göre bu bileşikler iki gruba ayrılabilir: hızlı etkili antioksidanlar ve geciktiriciler. Hızlı etkili antioksidanlar mevcut oldukları sürece ROS reaksiyonlarını geciktirebilmekte veya engelleyebilmektedirler. Antioksidanlar tükendiği zaman reaksiyon engellenmemiş duruma geri dönmektedir. Bu nedenle hızlı etkili antioksidanlar reaksiyonun gecikme periyodunu etkiler ve periyodun uzunluğu antioksidan derişimine bağlıdır. Geciktiriciler, ROS ile daha yavaş reaksiyona girer. Derişimlerine bağlı olarak reaksiyon oranını yavaşlatabilirler fakat tamamen durdurmazlar. Antioksidanlar tarafından sunulan koruma sınırlıdır. Eğer ROS oluşumu biyolojik sistemlerin antioksidan kapasitesini aşarsa oksidatif gerilim oluşur [68].

Tablo 2.1: Oksidatif gerilime sebep olan serbest radikal kaynakları

SERBEST RADİKAL KAYNAKLARI		
✓ Stres	✓ Aşırı alkol tüketimi	✓ Doğum kontrol hapları
✓ Besin/Çevre kimyasalları	✓ Sigara kullanımı	✓ Aşırı fiziksel egzersiz
✓ Antioksidan yetersizliği	✓ Güneş ışınları (UV)	✓ Aşırı demir yüklemesi
✓ İlaçlar	✓ Aşırı besin tüketimi	✓ Kronik inflamasyonlar
	✓ Yaşlanma	✓ Elektromanyetik radyasyon

Antioksidanlar, yükseltgenebilen substratlara göre daha düşük derişimlerde, substratın prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi derecede engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Prooksidanlar (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan toksik maddelerdir [69]. Yaşayan organizmalarda kompleks antioksidan sistemler bulunmaktadır. Bu sistemler enzimatik olmayan antioksidanlar olarak bilinen albumin, glutatyon, askorbik asid, α-tokoferol, β-karoten, ürik asid, bilirubin, flavonoidler ve birçok polifenolik bileşik ile süperoksid

dismütaz, glutatyon peroksidaz, askorbat peroksidaz ve katalaz gibi enzimleri içerirler (Şekil 2.2) [70]. Bu antioksidanlar, hücrelere zarar veren reaktif türleri (serbest radikaller) etkin bir şekilde süpürerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu reaktif bileşiklerin (reaktif oksijen türleri vb.) varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidan bileşikleri ve enzimleri önemli kılmaktadır [71,72]. Biyolojik yapılarda ve gıdalarda mevcut olan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar çeşitli reaktif oksijen türlerinin süpürücüleri olarak bilinirler [72].



SOD= Süperoksit dismutaz; GSH-Px= Glutatyon peroksidaz, EGCG= Epigallokateşingallat

Şekil 2.2: Antioksidanların sınıflandırılması [70]

Antioksidanlar, serbest radikal türlerinin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek açısından dört ayrı şekilde etki ederler:

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

Antioksidanlar, vücut hücreleri tarafından üretildikleri (endojen) gibi, gıdalar yoluyla da (eksojen) alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C ve E vitaminleri), fenolik bileşikler (basit fenolik ve hidroksisinnamik asitler, flavonoidler vb.) ve karotenoidlerdir. Birçok araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [73]. Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Bu bileşikler oksidatif sistemde farklı şekillerde davranabilirler. Örneğin, oksijen derişimini düşürebilirler veya hidroksil radikali, süperoksit anyon radikali gibi ROS türlerini sönüme uğratırlar (süpürürler). Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri süpürerek zincir reaksiyonların başlamasını önlerler, metal iyonu katalizörlerini bağlarlar [74].

Antioksidan bileşikler gıdalarda doğal olarak bulundukları gibi, gıda sanayisinde ürünlerin kalitesini korumak ve besinsel değerlerini muhafaza etmek amacıyla sonradan eklenirler. Besinlerin acılaşmasını, çürümesini geciktirici özelliğe sahip bir grup kimyasal maddelerdir. Özellikle yağlarda, havadaki oksijenin sebep olduğu otooksidasyonu yavaşlatmak için kullanılmaktadırlar. Böylelikle yağların, tadını, kokusunu, rengini yani kalitesini ve raf ömrünü uzatırlar. Ortamda pek az miktarda bulunsalar bile etkin olan maddelerdir.

Zincirleme reaksiyon teorisine göre, oksijen ile otookside olabilen madde, oksijenle birleşmekte ve bu şekilde meydana gelen etkinleşmiş peroksil radikal ve molekülleri, enerjilerini maddenin yükseltgenebilen diğer molekülerine aktarmakta ve bu suretle besinlerdeki otooksidasyon devam etmektedir. Antioksidanlar bu zincir reaksiyonunu kırıcı rolü oynarlar. Yani bu bileşikler aktivasyon enerjisini kabul ederler, ancak bu enerjiyi başka moleküllere aktaramazlar. Bu şekilde, bir antioksidan molekülünün araya girmesiyle otookside olabilen maddenin birçok molekülü yükseltgenmekten kurtulur [75].

Antioksidan bileşiklerin önleyici rol oynadığı oksidasyon prosesinde iki yol izlenmektedir. Birincisi, aşağıda verilen lipid peroksidasyonda gerçekleşen H-atomu transferidir.

$$RH \rightarrow R\cdot \qquad \text{(RH: yağ molekülü, } R\cdot \text{ : aktif yağ molekülü)} \tag{2.1}$$

$$R\cdot + O_2 \rightarrow RO_2\cdot \qquad \text{(oksijenin eklenmesi)} \tag{2.2}$$

$$RO_2\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot \qquad \text{(H-atom transferi)} \tag{2.3}$$

İlk olarak $R^{\cdot}$ serbest radikali oluşur ve ikinci ve üçüncü reaksiyonlarda zincir reaksiyon meydana gelmektedir. Bu zincir döngüde çoğu yağ molekülü hidroperokside (ROOH) dönüşerek yağların oksidasyonuna ve acılaşmasına sebep olmaktadır. Eşitlik 2.2'de verilen reaksiyon çok hızlı olup yaklaşık 10^9 $M^{-1}s^{-1}$ mertebesindedir, Eşitlik 2.3'deki reaksiyonun hızı ise daha yavaş olup 10^1 $M^{-1}s^{-1}$'dir.

Genel formu ArOH olarak ifade edilen fenolik antioksidanlar zincir reaksiyonu aşağıda verilen reaksiyona göre yarıda kesmektedir:

$$RO_2\cdot + ArOH \rightarrow ROOH + ArO\cdot \tag{2.4}$$

$ArO^{\cdot}$ radikali kararlı bir serbest radikal olup RH substratı ile yavaş reaksiyona girerken $RO_2\cdot$ ile hızlı reaksiyon vermektedir bu nedenle "zincir-kırıcı" olarak ifade edilmektedirler. Örneğin α-tokoferol *in vivo* koşullarda en etkili yağda çözünebilir zincir kırıcı antioksidandır ve E vitaminin en aktif bileşenidir. *İn vivo* ortamda, α-tokoferol peroksil radikalleriyle 10^6 $M^{-1}s^{-1}$ hız mertebesinde reaksiyona girmektedir. Bu

reaksiyonun hızı, peroksil radikalleriyle lipid RH molekülleri arasındaki reaksiyonun hızından oldukça yüksektir. RH substratı veya ArOH moleküllerinin peroksil radikalleri ile reaksiyon hızı bu moleküllerden H-atomu transfer bariyer yüksekliğine bağlıdır. Eğer antioksidan molekülü ile peroksil radikali arasındaki reaksiyon ekzotermik ise bariyer yüksekliği düşecektir ve antioksidan peroksil radikali ile daha hızlı reaksiyona girecektir bu durum da peroksil radikalinin lipid substrat molekülü ile reaksiyonunu önlemiş olacaktır. Bu proses peroksil radikali dışındaki diğer serbest radikalleri de içermektedir [12].

Antioksidanların serbest radikalleri deaktive edebildiği ikinci mekanizma ise elektron transferidir. Bu mekanizmada, radikal katyonu oluşumunun ardından çözeltide hızlı ve reversibl bir deprotonasyon meydana gelir.

$$RO_2\cdot + ArOH \rightarrow ROO^- + ArOH^+ \quad \text{(elektron transferi)} \qquad (2.5)$$

$$ArOH^+ + H_2O \rightleftharpoons ArO\cdot + H_3O^+ \quad \text{(deprotonizasyon dengesi)} \qquad (2.6)$$

$$ROO^- + H_3O^+ \rightleftharpoons ROOH + H_2O \quad \text{(hidroperoksid oluşumu)} \qquad (2.7)$$

Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder.

Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle, hidrojen veya elektron donör araçları olarak indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir. Zincir kırıcı antioksidan etkinliğinin değerlendirilmesinde hem antioksidanın molekül başına verebildiği elektron veya giderebildiği serbest radikal sayısı (yani reaksiyon stökiyometrisi), hem de reaksiyon hızı (kinetik) önemlidir. Antioksidan aktivite, spesifik bir antioksidan ile spesifik bir oksidan arasındaki reaksiyona ait hız sabitini işaret eder ve bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır:

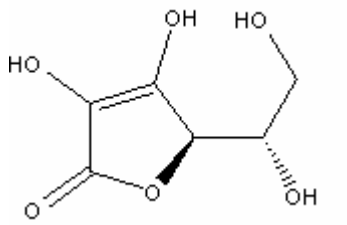
- Radikal süpürme yeteneği
- Hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- Metal kelatlama potansiyeli
- Diğer antioksidanlarla olan etkileşim [73]

2.2. DOĞAL ANTİOKSİDANLAR VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİ

2.2.1. Askorbik Asit (C vitamini)

Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C vitamini (Şekil 2.3) suda çözünebilen, bitkilerin kloroplastlarında ve hayvanların karaciğer veya böbreklerinde glikozdan sentezlenen güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Özellikle çilek, papaya, portakal, kivi, greyfurt, kavun, mango gibi meyvelerde, brokoli, brüksel lahanası, kırmızı veya yesil biber, domates, lahana, patates, karnıbahar gibi sebzelerde, portakal suyu, domates suyu gibi meyve sularında bol miktarda bulunmaktadır [76].

Askorbik asit plazma lipoproteinlerinin (LDL) ve yağların oksidasyonunu önler. Kan plazması ve hücre stozolü gibi vücudun sulu bölgelerinde etkili bir oksiradikal gidericidir [77]. C vitamini, reaktif oksijen, reaktif azot ve reaktif klor türlerini kolayca süpürür ve bu sayede diğer substratları oksidatif hasardan korur [78].

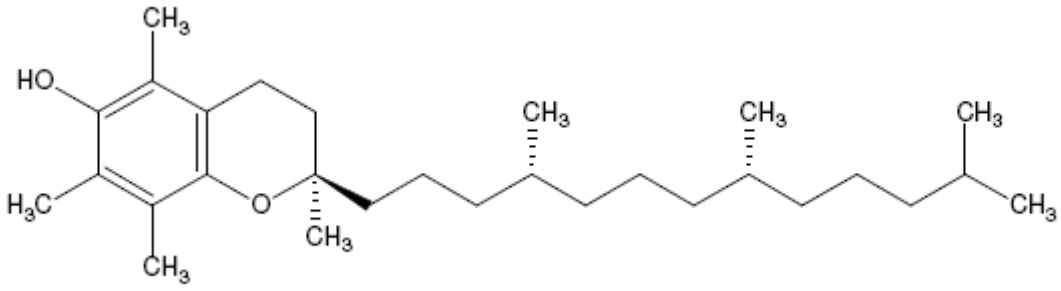


Şekil 2.3: C vitamininin kimyasal yapısı

2.2.2. E vitamini

E vitamini; α-, β-, γ-, δ- tokoferoller ve tokotrienolleri içeren grubu kapsayan ve yağlarda çözünen bir vitamindir. α-Tokoferol, özellikle D-α-tokoferol (Şekil 2.4) şeklinde doğal olarak oluşur ve en yüksek biyolojik aktiviye sahiptir. Hayvan organizması pek az miktarda içerir. Özellikle bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı

sebzelerde, baklagillerde, ceviz, fındık, süt ve yumurtada bulunurlar. Tokoferollerin kimyasal yapıları birbirine benzese de, bunların biyolojik etkileri oldukça farklıdır. E-vitamini olarak bilinen tokoferollerden 3 metil grubu taşıyan α-tokoferol vitamin olarak en etkili olanıdır. β ve γ tokoferoller, α izomerinin yarısı kadar, δ izomeri ise ancak yüzde biri kadar etkilidir. Tokoferoller, monofenolik yapıdaki doğal antioksidanlar olup özellikle α-tokoferol yağda çözünen en önemli antioksidandır [75, 79]. E vitamini vücut dokularında etkili bir zincir kırıcıdır ve antioksidan özellik göstermektedir. Bu vitaminin lipid peroksidasyonuna karşı savunma etkisinin olduğu ve hücre membranlarını serbest radikal saldırılarına karşı koruduğu düşünülmektedir [80].



Şekil 2.4: α-tokoferolün kimyasal yapısı

2.2.3. Polifenoller

Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında mevcut olan, fitokimyasalların en geniş kategorilerinden birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir. Besin fenolikleri; flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler olarak üç sınıfa ayrılır.

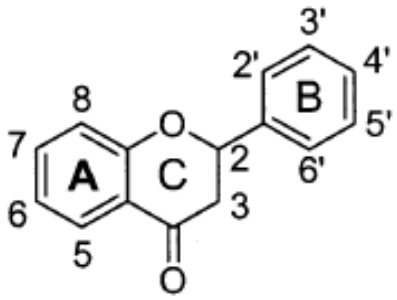
Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenolleri multifonksiyonel bileşikler olup, indirgeme aracı, hidrojen atom-donör antioksidanlar ve singlet oksijen söndürücü olarak, bazıları metal iyonu kelatlama özelliklerine sahip antioksidanlar olarak davranırlar [81]. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

- Okside olabilen substratlara oranla düşük derşimlerde bulunduklarında, otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [82].

- Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [83].

2.2.3.1. Flavonoidler

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük molekül ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6 karbonlu A, B ve C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.5). Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi mevcuttur. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar. Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grupları içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma (inhibe etme) özellikleri vardır. Yiyeceklerde genellikle 3-*orto* glikozidleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Bu gruptaki bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, pozisyonu ve sayısına göre farklı radikal yutma ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [84].



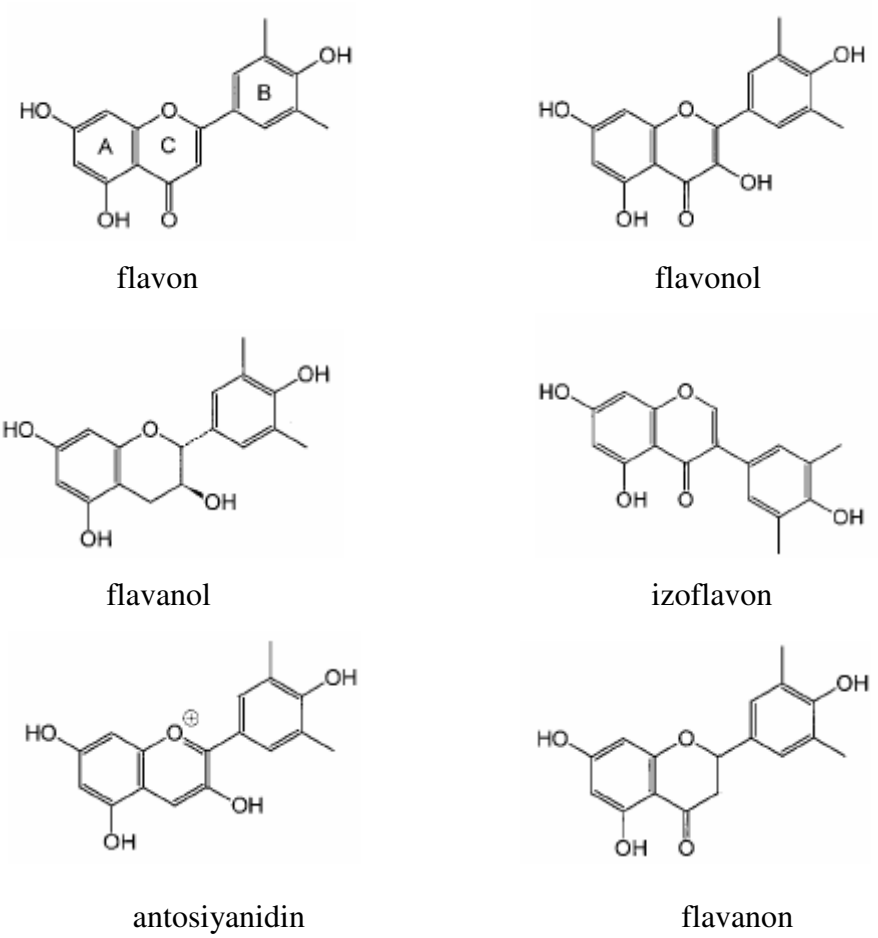
Şekil 2.5: Flavonoidlerin genel kimyasal yapısı

Flavonoidler, fenolik ve furan halkalarından oluşan benzo-γ-furan türevleridir [84]. Bu bileşikler; A, B ve C halkalarından oluşan halka yapısında çeşitli hidroksil, metoksi ve glikozid yan grupları içerirler. Halkalar arasındaki yapısal değişiklikler flavonoidleri çeşitli sınıflara ayırmaktadır (Şekil 2.6) [81]:

1. Antoksantinler

- Flavanoller
- Flavonlar
- Flavonoller
- Flavanonlar
- İzoflavonlar

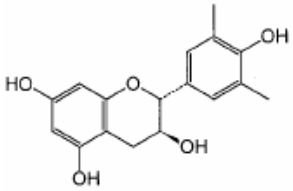
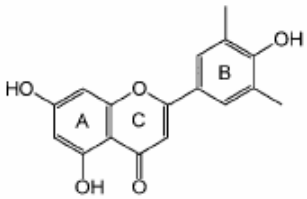
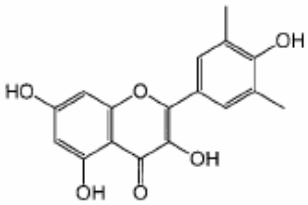
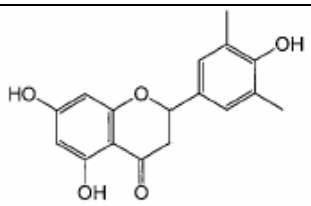
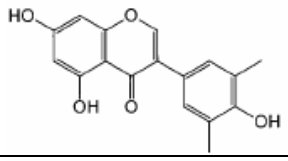
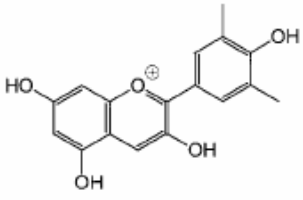
2. Antosiyanin ve antosiyanidinler



Şekil 2.6: Flavonoidlerin temel kimyasal yapıları

Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, sübstitüsyon modelleri ve bazı besin kaynakları Tablo 2.2'de verilmiştir [84].

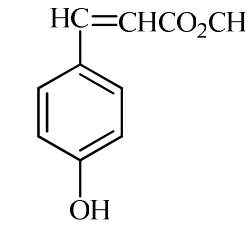
Tablo 2.2: Flavonoidlerin sınıflandırılması, genel yapıları, adları, sübstitüsyon modelleri ve besin kaynakları [84]

Sınıfı	Adları	Genel Yapıları	Sübstitüsyon Modelleri	Besin Kaynakları
Flavanol	(+)-Kateşin (-)-Epikateşin Epigallokateşin Epikateşin gallat Epigallokateşin gallat		3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3',4'-OH, 3-gallat 3,5,7,3',4',5'-OH,3-gallat	Çay Çay Çay Çay Çay
Flavon	Apigenin Rutin Luteolin		5,7,4'-OH 5,7,3',4'-OH, 3-rutinoz 5,7,3',4'-OH	Maydonoz, kereviz sapı K.şarap, domates kabuğu, turunçgiller Kırmızı biber
Flavonol	Kaempferol Kuersetin Mirisetin Morin		3,5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH 3,5,7,3',4',5'-OH	Brokoli, greyfurt, çay Soğan, brokoli, domates, çay, k. şarap, elma Üzüm, böğürtlen, K.şarap
Flavanon	Naringin Naringenin Hesperidin Hesperetin		5,4'-OH, 7-ramnoglukoz 5,7,4'-OH 3,5,3'-OH,4'-OMe,7-rutinoz 3,5,3'-OH,4'-OMe	Turunçgiller, greyfurt Turunçgiller Portakal Portakal
Izoflavon	Genistin Genistein Daidzin Daidzein		5,4'-OH,7-glukoz 5,7,4'-OH 4'-OH, 7-glukoz 7,4'-OH	Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi Soya fasulyesi
Antosiya-nidin	Apigenidin Siyanidin Malvidin		5,7,4'-OH 3,5,7,3',4'-OH 3,5,7,4'-OH, 3', 5'-OMe	Renkli meyveler Vişne, çilek Kırmızı üzüm, şarap

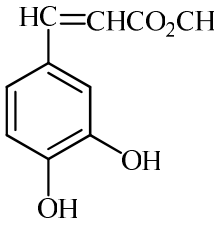
2.2.3.2. Fenolik Asitler

Bitkilerde çok miktarda bulunan fenolik asitler, diğer ismiyle fenil propanoidler, hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitleri içeren iki gruptan oluşur. Fenolik asitlerin çoğunu hidroksi sinnamik asitler oluşturur [77]. L-fenil alanin veya L-tirosinden

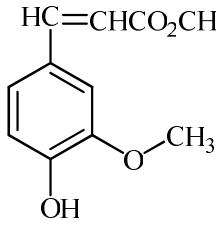
p-kumarik, ferulik, kafeik, sinapik ve klorojenik asit meydana gelir (Şekil 2.7). Yapılarındaki –CH=CH-COOH gruplarının varlığı, hidrojen atomu verebilme yeteneklerini arttırmanın yanısıra benzoik asitlere göre radikalleri daha kararlı hale getirebilirler. Hidroksi benzoik asitler yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik asit, vanilik asit, şiringik asit, resorsilik asit, protokateşuik asit'dir.



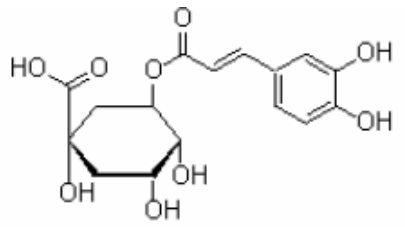
p-kumarik asid



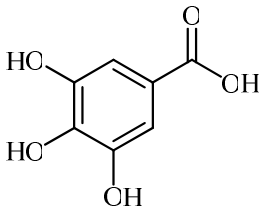
kaffeik asid



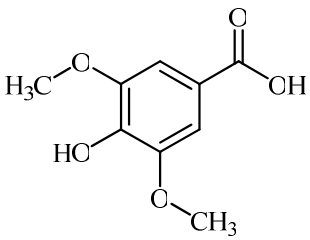
ferulik asid



Klorojenik asid



gallik asid

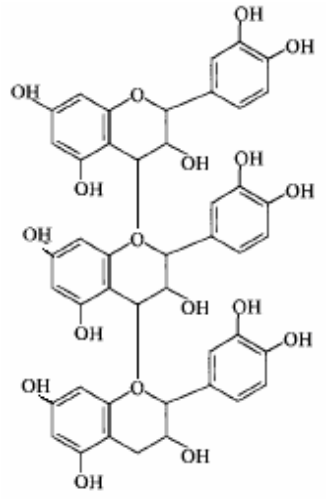


şiringik asid

Şekil 2.7: Fenolik asitlerin (bazı hidroksi sinnamik ve hidroksi benzoik asitlerin) kimyasal yapıları

2.2.3.3. Fenolik polimerler (Tanenler)

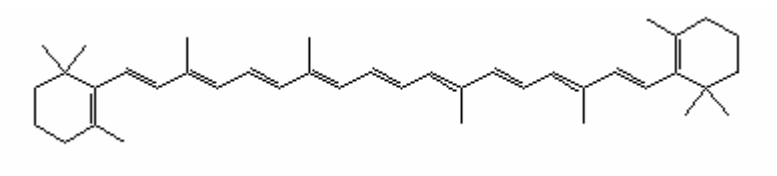
Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Yoğunlaşmış tanenler bu gruba girerler. Bugün besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşinin polimerleri anlaşılmaktadır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir. Kırmızı ve beyaz şarapta, elma ve nar suyunda mevcutturlar [80].



Şekil 2.8: Fenolik polimerlerin yapısı

2.2.4. Karotenoidler

Karotenoidler; bitkilerde sentezlenirler, fakat hayvanlar için önemlidirler. En önemlileri, β-karoten, likopen, lutein ve zeaksantindir. Yüksek derecede doymamış izoprenidlerdendir. Çifte bağların konjuge oluşundan kuvvetli renklidirler. Açık sarıdan kırmızıya kadar renkli, birçok bitki ve hayvanlarda bulunan, azot içermeyen, suda çözünmeyen fakat yağlarda ve organik çözücülerde çözünen pigmentlerdir. Birçok sebze, meyve ve çiçeklerin karakteristik renkleri bunlardan ileri gelir. Havuç, mısır, domates, tereyağı, süt, yumurta sarısı ve birçok meyvede bolca bulunurlar. En yaygın kullanılanı A-provitamini olarak da bilinen β-karoten'dir (Şekil 2.9). A-vitamininin kendiliğinden antioksidan özelliği bulunmazken, β-karoten antioksidan aktiviteye sahiptir [75].

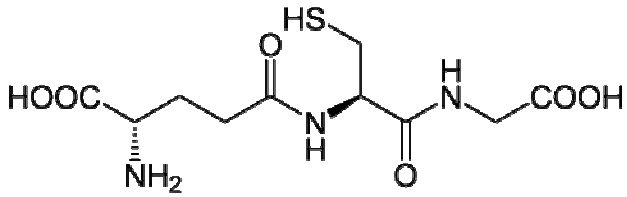


Şekil 2.9: β-karotenin yapısı

2.2.5. Tiyol Tipi Antioksidanlar

2.2.5.1. Glutatyon

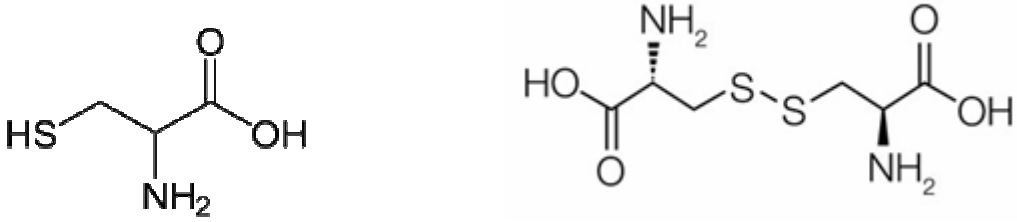
Tiyol grubu içeren endojen antioksidan bileşiklerden en önemlisi glutatyondur (Şekil 2.10). Glutatyon (GSH), tüm memeli hücrelerinde bol miktarda (0.5-10 mM) sentezlenir. Hemen hemen tüm yaşayan hücrelerde yüksek konsantrasyonlarda bulunan bu endojen antioksidanın birçok önemli fonksiyonel rolü vardır. İçerdiği tiyol grubu aracılığı ile hücre içinde redoks potansiyeli yüksek bir ortam sağlayarak, hücreyi oksidatif hasarlara karşı korur [85].



Şekil 2.10: Glutatyonun yapısı

2.2.5.2. Sistein

Glutatyon gibi tiyol içeren düşük molekül ağırlıklı endojen bileşiklerden olan sistein ve sisteinin disülfürü olan sistin fizyolojik ve patolojik olaylar açısından önemlidir. Sistein, hücrelerin toksik türlerden korunmasında önemli rolü olan GSH'ın sentetik bir ön maddesidir [86]. Sülfidril grubu içeren bir aminoasit olan sisteinin dokulardaki miktarı diğer aminoasitlerin miktarından daha azdır. Sisteinin oksijene karşı olan kendine has reaktifliği ve tehlikeli reaktif oksijen türlerinin oluşumuyla birlikte yürüyen sisteinin sistine yükseltgenmesi, dokudaki sistein miktarının düşük olmasının nedenidir. Sistein, hem reaktif oksijen süpürücü hem de reaktif oksijen kaynağı olabilir [87].



Sistein Sistin

Şekil 2.11: Sistein ve sistinin kimyasal yapısı

2.2.6. Selenyum

Selenyum sağlık için gerekli olan bir mineraldir. Selenyum protein ve DNA sentezine katkıda bulunur. Selenyum vücutta selenoprotein adı verilen bazı önemli enzimlerin oluşumunda önemli rol oynar. Bunlar enzimatik antioksidanlardır (glutatyon peroksidaz, tioredoksin redüktaz) ve hücreyi hasardan korurlar. Selenyum bağışıklık sistemini kuvvetlendirir, antioksidan özelliği vardır ve tiroid bezinin iyi çalışmasını sağlar. Ceviz, et, sakatatlar, balık ve kabuklu deniz ürünleri, kepekli unlar, süt ürünleri, sebze ve meyveler ve yumurta gibi besinlerde bol miktarda selenyum vardır [88].

2.3. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

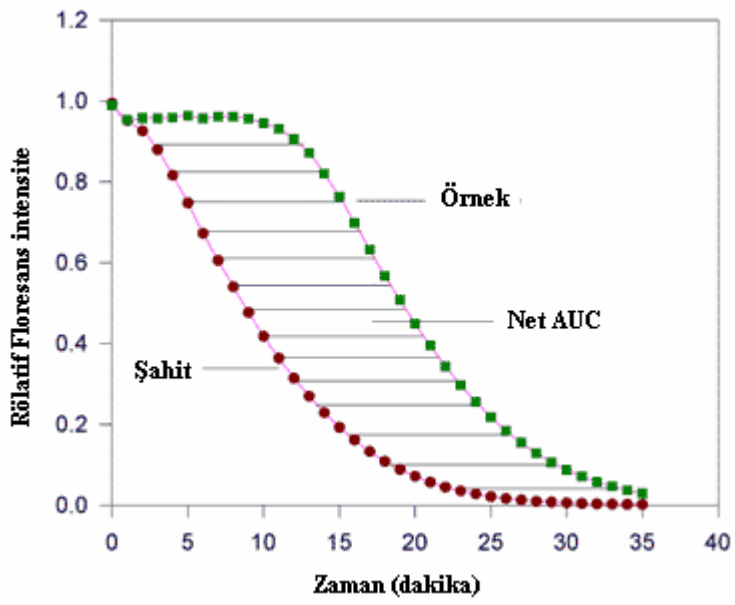
Antioksidan kapasiteyi ölçmek için bugüne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir. Toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemler, hidrojen atom transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. HAT temelli yöntemlerin birçoğu azo-bileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmalı kinetik reaksiyonları kullanmaktadır. ET temelli yöntemler ise antioksidanın oksidanı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile ilişkilidir [68].

2.3.1. Hidrojen Atomu Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

2.3.1.1. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yöntemi [3,89,90]; büyük oranda Glazer [91] tarafından yayınlanan çalışmayı esas alır. Peroksil radikalini oluşturmak için 2,2'-azobis (2-amido propan) hidroklorür (AAPH) hidroksil radikalini oluşturmak için Cu(II) - H_2O_2 ve yükseltgenebilen protein substratı olarak β-fikoeritrin (B-PE) kullanılmaktadır. Oluşturulan radikaller ile fikoeritrin arasındaki yükseltgenme reaksiyonu sonucunda, fikoeritrinin floresansındaki zamana bağlı düşüş ölçülerek toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Serbest radikal etkisini inceleyen ve miktar tayininde eğri altında kalan alan (area under curve-AUC) tekniğini kullanan (Şekil 2.12) bu yöntem, antioksidanların serbest radikalleri hem inhibe etme yüzdesini ve hem de inhibe etme süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir [90]. Net AUC, antioksidan miktarıyla orantılıdır. B-PE dalga

boyu emisyonu, yüksek floresans verimi, ROS'a hassasiyeti ve suda çözünürlüğü nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak çok fazla çeşitliliğe sahiptir. Işık ile beyazlayabilir, polifenoller ile ilişkiye girmektedir ve bu nedenle floresans kayıpları olmaktadır. Bu dezavantajlarından dolayı B-PE yerine florescein (FL) kullanılmaktadır. FL sentetik protein olmayan probtur. B-PE'nin sınırlamalarını gidermektedir. Buna ilave olarak ürün örnekleri klasik HAT reaksiyon mekanizmasına uygundur. FL kesin, sağlam ve doğru sonuçlar vermektedir ancak pH'a duyarlıdır [68].



Şekil 2.12: Analiz örneğinin eğri altında kalan alan (AUC) olarak ifade edilen antioksidan aktivitesi

2.3.1.2. TRAP (Toplam Radikal Tutma Parametresi) Yöntemi

Wayner ve diğ. tarafından geliştirilen toplam radikal tutma parametre (TRAP) yöntemi plazma veya serumdaki toplam antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılan başlıca yöntemlerden biridir [92].

Bu yöntemde; plazma ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan peroksitlenebilen maddelerden ve 2,2'-azobis (2-amido propan) hidroklorürden (AAPH) meydana gelen peroksil radikalleri kullanılır. Plazmaya AAPH'ün ilavesinin ardından reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülmesiyle yükseltgenebilen maddelerin oksidasyonu gözlenmektedir. Bu oksidasyon indüksiyon periyodu boyunca plazmadaki antioksidanlar tarafından engellenmektedir. İndüksiyon periyodu ölçülerek plazmadaki toplam antioksidan kapasitesi, iç standart olarak kullanılan troloks eşdeğeri cinsinden

hesaplanmaktadır [92]. TRAP yönteminin en önemli dezavantajı, oksijen elektrodu ile ilgilidir. Oksijen elektrodu, gereken zaman periyodunda kararlılığını sağlayamamaktadır [94]. Ayrıca TRAP indeksine C ve E vitamini gibi antioksidanların az katkı sağlaması önemli bir sakıncadır.

2.3.1.3. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi

Temelini TRAP yönteminin oluşturduğu bu yöntem, Valkonen ve Kuusi tarafından geliştirilmiştir [94]. Yöntemde AAPH peroksil radikali oluşturmak için, DCFH-DA ise yükseltgenebilen substrat olarak kullanılmıştır. Peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucunda oluşan diklorofloresin (DCF) yüksek floresans özelliğe sahiptir. 480 nm'de uyarılıp 526 nm'de emisyon yapmaktadır. 504 nm'de de maksimum absorbsiyon göstermektedir. Yöntemin uygulanması sonucunda DCF miktarı ve buna bağlı olarak toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Toplam antioksidan kapasitesi iki aşamada hesaplanmaktadır. İlk aşamada, numune içindeki antioksidanların kapasitesi gecikme zamanı cinsinden hesaplanıp ardından aynı numune üzerine miktarı bilinen troloks çözeltisi ilave edilir. Troloks çözeltisi serbest radikaller tarafından tüketildikten sonra ikinci gecikme zamanı hesaplanır. Bu iki gecikme zamanı arasındaki farktan yararlanılarak troloks cinsinden toplam antioksidan kapasitesi hesaplanır [94].

2.3.1.4. Luminol Yöntemi

İlk olarak Metsä-Ketelä ve diğ. tarafından 1991'de geliştirilen ve yayınlanan kemiluminesans bazlı TRAP yöntemi, daha sonra Alho ve Leinonen tarafından detaylı şekilde tanımlanmıştır [95]. AAPH bileşiğinden meydana gelen peroksil radikallerinin yükseltgenebilir substratı (luminol) oksidasyonu sonucu ışık yayan luminol radikalleri oluşmaktadır. Oluşan ışık luminolmetre denilen cihazlarla ölçülmektedir. Antioksidan özelliği olan bir madde, kemiluminesans ışımasının oluşumunu belli bir zaman (gecikme zamanı) için engeller. Gecikme zamanı bir örnekteki toplam antioksidan potansiyeli ile doğrudan orantılıdır. Elde edilen sonuçlar troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır.

Whitehead ve diğ. tarafından orijinal luminol yöntemine bazı ilaveler yapılmıştır [96]. Luminol maddesinin hidrojen peroksit veya perborat ile yükseltgenmesinden yararlanılır. Reaksiyonun daha hızlı gerçekleşebilmesi için katalizör olarak HRP (horse radish peroksidaz) kullanılmış ve ışık yayılması daha çabuk olmuştur. Normal şartlar altında bu reaksiyon hızla azalan düşük şiddetli bir ışık yayılması olarak gerçekleşir. Reaksiyon ortamına *p*-iyodofenol ilave edildiği zaman ışık emisyonu daha şiddetli, uzun süreli ve kararlı hale gelir. Işığın luminol radikalleri tarafından yayılması için ortamdaki bütün antioksidanların tüketilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu yöntem antioksidan girişimine karşı duyarlıdır. Bu yöntemin en önemli dezavantajı, incelenen antioksidanların yalnızca AAPH'dan oluşan radikalleri değil luminol radikallerini de indirgemesidir [96].

2.3.1.5. Krosin Ağartma Yöntemi (Crocin Bleaching Assay)

Bu yöntemde azo başlatıcının termal bozulması sonucu oluşan peroksil radikalleri tarafından bir karotenoid olan krosinin beyazlama derecesi ölçülmektedir. Yöntem AAPH'ın termal bozulması ile oluşan peroksil radikallerinin krosini oksidasyona uğratmalarına (ağartmaya) dayanmaktadır. Bu yöntemin gıda örnekleri için uygulanması sınırlıdır. Bazı fitokimyasalların reaksiyon oran sabitleri krosine benzerdir ve bu nedenle gecikme fazı yoktur. Halbuki diğer kimyasallar gecikme fazına sahiptir. Ağartma olayında redüksiyon zamanı çok kısadır. Krosin safrandan ekstrakte edilen doğal pigmentler karışımıdır ve çok fazla çeşitlilik gösterir ki bu özelliği kantitatif prosedürlerde endüstriyel kullanımını sınırlandırmaktadır [97].

2.3.2. Elektron Transferine Dayalı Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

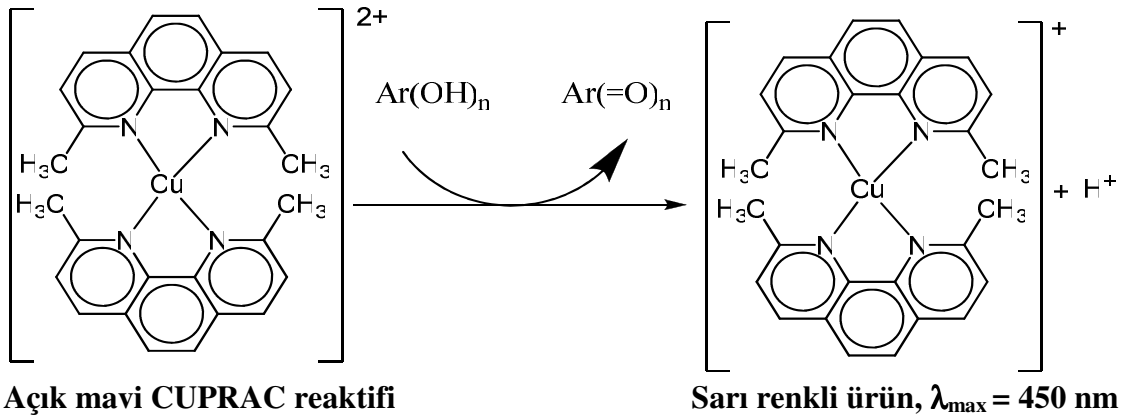
2.3.2.1. CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Çalışma grubumuz tarafından kromojenik oksidan olan Cu(II)-neokuproin reaktifi kullanılarak, plazma antioksidanları, flavonoidler, gıda polifenolleri, C vitamini ve E vitamini için basit, geniş alanda uygulanabilen bir antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu reaktif, kararlı, ucuz, kolay ulaşılabilen, hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara cevap verebilen bir reaktiftir. Toplam antioksidan kapasite tayininde kullanılan bu yöntem dünya literatürüne CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) adıyla kazandırılmıştır [6]. Bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-

fenantrolin (Neokuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc) antioksidan bileşikler varlığında 450 nm'de maksimum absorbans veren bakır(I)-neokuproin [Cu(I)-Nc] kelatına (Şekil 2.10) indirgenme yeteneğinden yararlanılarak antioksidanların antioksidan kapasiteleri ölçülebilmektedir. Bu özellikten yola çıkarak geliştirilen antioksidan kapasite yöntemi 'bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi' kısaca CUPRAC yöntemi olarak adlandırılmıştır.

CUPRAC yöntemi; toplam antioksidan kapasitesi (TAC) bakır(II) iyonu indirgeyici kapasitesi cinsinden bitkisel çaylara [98], Van otlu peynirine [99], Ayvalık yöresi endemik bitkilerine [100], kayısı ekstraktlarına [101] uygulamalar şeklinde ve insan serumuna [102,103], hidroksil radikal süpürücü maddelere [104,105], flavonoidler yanında tek başına askorbik asidin tayinine [106], bazı polifenolik bileşiklere [107,108], zayıf asidik katyon değiştirici reçine kullanılarak askorbik asitin önderiştirilmesine [109], hidrofilik ve lipofilik antioksidanların metil-β-siklodekstrin kullanılarak birlikte tayinine [110], lipofilik ve hidrofilik antioksidanların, %2'lik metil-β-siklodekstrin ile içerme kompleksleri oluşturularak tek bir çözücü içinde yanyana tayinine [111], katalaz enzimi yardımıyla fenoliklerin ve flavonoidlerin hidroksil radikali süpürme aktivitelerinin ve ksantin oksidaz inhibisyon aktivitelerinin tayinine [112,113], salisilat probu varlığında fenolik bileşiklerin hidroksil radikali süpürme aktivite tayinine [114], endüstriyel bitkilerden üretilen doğal boyaların fenolik içeriklerinin belirlenmesine [115], fenolik bileşiklerin hidrojen peroksit süpürme aktivitelerinin tayinine [116] ve Nafion membran yüzeyine CUPRAC reaktifinin emdirilerek düşük maliyetli optik yeni bir antioksidan sensörünün geliştirilmesine [117] modifiye edilerek başarıyla uygulanmıştır. Uygun konumlanmış fenolik hidroksiller, CUPRAC redoks reaksiyonu ile tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı (Şekil 2.13), 450 nm'de maksimum absorbans verir.

Bu yöntem; Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin (Nc) çözeltisi ve amonyum asetat tampon (pH=7) çözeltisinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisi (direkt veya asit hidrolizi sonunda) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbans değerlerinin ölçülmesinden ibarettir.



Şekil 2.13: CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla ($Ar(OH)_n$) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu

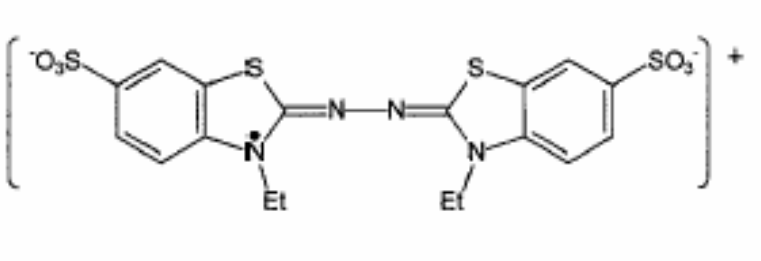
Askorbik asit, gallik asit ve kuersetin için renk oluşumu hızlı olurken naringin, naringenin gibi yavaş reaksiyona giren antioksidanlar için 50 ^{o}C'de 20 dakika inkübasyon işlemi uygulanmaktadır. Flavonoid glikozidlerine % 50 metanol içeren son çözeltide 1.2 M HCl ile hidroliz işlemi uygulanarak, maksimum indirgeme güçlerini daha fazla gösterdikleri aglikonları haline dönüşmeleri sağlanarak yöntem uygulanmıştır. Yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilmektedir. Troloks (vitamin E'nin suda çözülebilir analogu) antioksidan aktivite için yaygın olarak kabul edilen bir standart olduğundan CUPRAC yöntemi sonuçları troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır. Aşağıda verilen antioksidan bileşiklerin yükseltgenmesi reaksiyonunda antioksidan bileşikler aynı zamanda indirgen maddeler olduklarından, kromojen bir oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifini indirgemektedirler:

$$2n\ Cu(Nc)_2^{2+} + Ar(OH)_n \rightarrow 2n\ Cu(Nc)_2^{+} + Ar(=O)_n + 2n\ H^{+} \qquad (2.8)$$

n adet reaktif fenolik –OH grubu içeren her flavonoid bu hidroksil gruplarının konumuna ve molekülün toplu konjugasyon derecesine göre yaklaşık 2n-e donör olarak davranır. Troloks, E- ve C- vitaminleri Cu(II)-Nc kelatına karşı 2-e donördür. Bazı polifenollerin troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) teorik olarak n olursa, polifenollerin ilgili molar absorptiviteleri ($7.5\text{-}8.5 \times 10^3$).2n L $mol^{-1}cm^{-1}$ olacaktır.

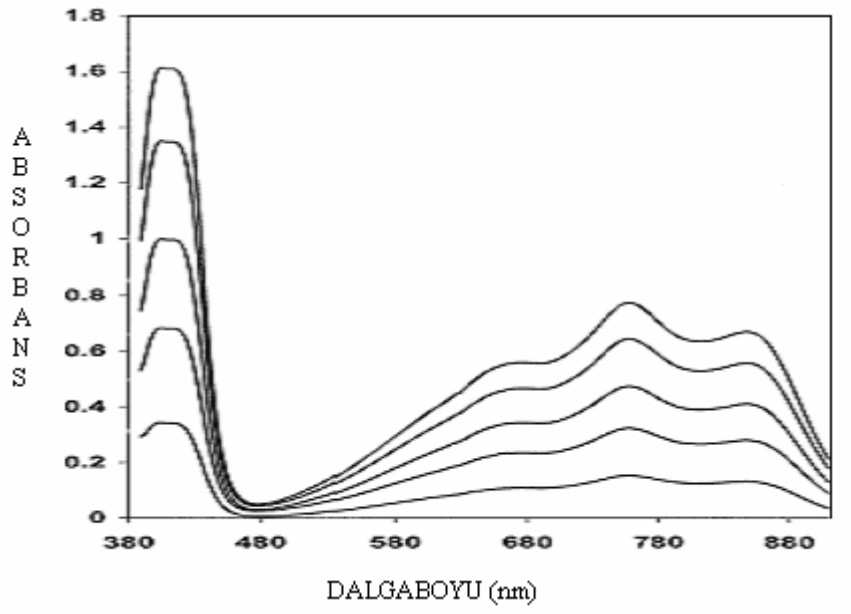
2.3.2.2. TEAC (Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasitesi) / ABTS Yöntemi

Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve diğ. [7] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) ($ABTS^{\cdot+}$) kromojen radikal katyonunun absorbansının hidrojen verici antioksidanlar tarafından inhibe edilmesine dayanan bir yöntemdir. Absorbanstaki azalmadan yararlanılarak toplam antioksidan kapasitesi troloks cinsinden verilmektedir.



Şekil 2.14: $ABTS^{\cdot+}$ katyonunun yapısı

Orjinal yöntemde $ABTS^{\cdot+}$ katyonu metmiyoglobinin H_2O_2 ile aktivasyonu sonucu meydana gelen ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşiminden meydana gelmektedir. $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun karakteristik uzun dalgaboylu absorbsiyon spektrumu 660, 734 ve 820 nm'de maksimum vermektedir [7,93]. Re ve diğ. [20] tarafından modifiye edilen TEAC yönteminde ise $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonu ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Oluşan radikal katyonu oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 2 gün dayanıklıdır. Geliştirilen yöntemin orijinal yöntemden farkı hem lipofilik hem hidrofilik antioksidanlara uygulanabilmesi ve bir dekolorizasyon (renk giderimi) yöntemi olmasıdır.



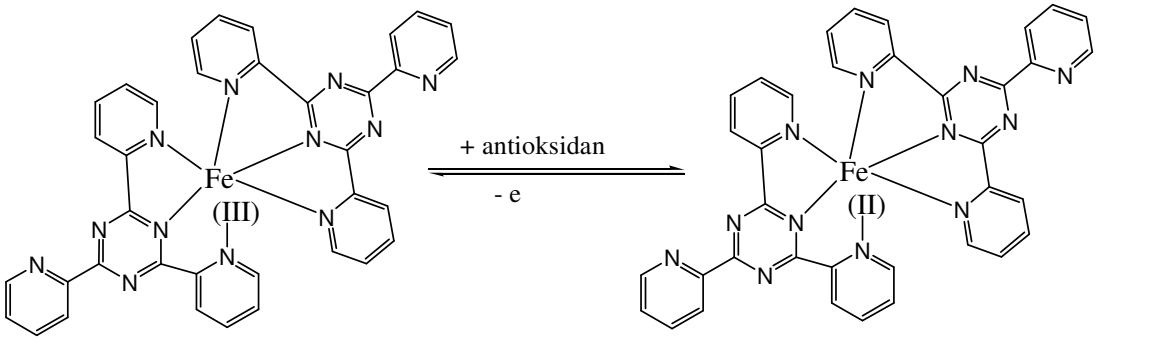
Şekil 2.15: ABTS radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu.

TEAC yönteminin diğer bir modifikasyonu van den Berg ve diğ. tarafından geliştirilmiştir [118]. Bu çalışmada bir azo bileşiği olan 2,2'-azobis-(2-amidinopropan)HCl (ABAP) kullanılarak $ABTS^{\cdot-}$ radikal anyonu oluşturulmuştur. Yöntemde antioksidanlar radikalin oluşmasından önce eklenmektedir. Böylece radikal oluşumuna etki edecek olan bileşiklerin girişimi önlenmektedir. Bu yöntemde de hem hidrofilik hem lipofilik antioksidan kapasitesi ölçülebilmektedir [118]. Diğer bir yenilik Arnao ve diğ. tarafından ortaya konulmuştur. Burada $ABTS^{\cdot+}$ radikalinin oluşumunda HRP kullanılmıştır. $ABTS/H_2O_2/HRP$ enzimatik sistem kullanılarak hidrofilik ve lipofilik antioksidan aktivitesi ölçülebilmektedir [119].

2.3.2.3. FRAP (Demir(III) İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi

Benzie ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde, oksidan olarak Fe^{3+} kullanılmaktadır [5]. Bu yöntemde Fe^{3+}-tripridiltriazin (Fe^{3+}-TPTZ) kompleksi, asidik pH ortamında (pH=3.6) indirgen özellik gösteren antioksidan bir madde ile Fe^{2+}-tripridiltriazin (Fe^{2+}-TPTZ) kompleksine indirgenir (Şekil 2.16). Fe^{2+}-TPTZ kompleksi şiddetli bir mavi renk vermektedir. Oluşan bu Fe^{2+}-TPTZ kompleksinin 593 nm'de absorbansı ölçülerek elektron verici antioksidanların indirgeme gücü (ya da kapasitesi) toplam olarak ölçülmektedir [5]. Orijinal FRAP yönteminde 4 dakika içerisindeki fark absorbans ($\Delta A = A_{4min} - A_{0min}$) ölçülmektedir. 1 FRAP birimi, 1 mol Fe(III)'ün Fe(II)'ye

indirgenmesi olarak tanımlanmaktadır. Yani TEAC'tan farklı olarak Fe^{2+}-eşdeğer indirgen kapasite kullanılmaktadır.



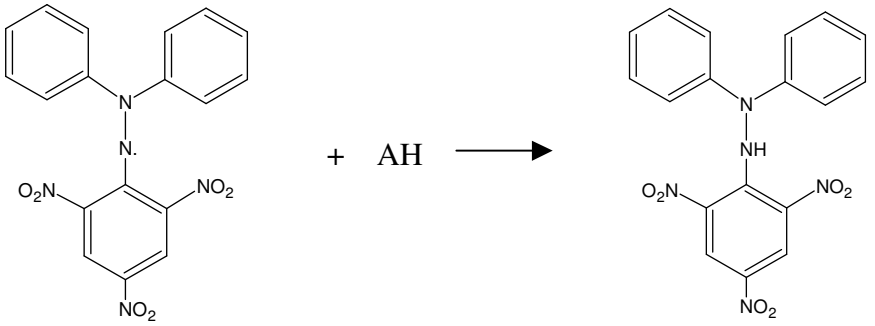
Şekil 2.16: FRAP reaktifi ile antioksidan bileşik arasındaki etkileşim

Basit ve ucuz bir yöntem olan FRAP yöntemi renkli bir bileşik oluşturmak üzere antioksidanların indirgeyebilme yeteneğini ölçmektedir. Bu yöntemin diğer bir özelliği de biyolojik bir örnekte bulunan antioksidanların hem Fe(III)-TPTZ kompleksini Fe(II)-TPTZ kompleksine indirgemesi hem de Fe(II) iyonlarının ortamdaki H_2O_2 ile reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil radikalleri ile etkileşmesinden dolayı antioksidan kapasitesinin direkt olarak ölçülememesidir. Diğer bir deyişle, FRAP yöntemi toplam antioksidan gücü tayin edebilen dolaylı bir yöntemdir [69]. pH=3.6'da uygulanan FRAP yöntemi fizyolojik pH'larda çalışmadığından bulunan sonuçların insan vücudundaki redoks reaksiyonlarına uyarlanması beklenmemelidir. Yöntemin asidik pH'larda çalışması, protonlarını vermemiş bazı antioksidanların kolay yükseltgenememesine ve dolayısıyla toplam antioksidan kapasitesinin olduğundan düşük bulunmasına yol açabilmektedir. Ayrıca bu yöntemin diğer bir eksikliği, plazma antioksidanlarını dolaylı olarak ölçerken *in vivo* koşullarda önemli bir tiyol (-SH) grubu antioksidanı olan glutatiyon ile reaksiyon vermemesidir.

2.3.2.4. DPPH Yöntemi

Bu yöntem; antioksidanların kararlı bir serbest radikal olan DPPH· (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH· radikali 517 nm'de maksimum absorbsiyon verir. Etanol veya metanollü DPPH· çözeltisine

antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalin rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir [8].



(2.9)

Bu yöntem hızlı ve basit olmasına rağmen bazı bileşenlerin (özellikle karotenoidler) 515 nm' de DPPH ile çakışık spektrum vermesi analizin yorumunu güçleştirir. Ayrıca çoğu antioksidan sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş reaksiyona girer. Bundan dolayı yöntem; $DPPH^{\cdot}$ ile reaksiyona giren antioksidanların antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir değerlendirme vermez. Bunlara ek olarak DPPH'ın rengi, ışık, hava oksijeni, rutubet ve pH'a fazlaca duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçlar eldesi güçtür.

2.4. ANTİOKSİDAN KAPASİTEYE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

Antioksidanlar reaktif türleri hidrojen atom transfer (HAT) ve elektron transfer (ET) gibi iki temel mekanizmaya göre etkisiz hale getirirler. Bu mekanizmayı antioksidanın yapısı, özellikleri, sistemin çözücüsü ve dış faktörler (sterik etki, polimerizasyon vb.) etkilemektedir. Bu faktörlere bağlı olarak antioksidan kapasitede değişimler meydana gelmektedir.

2.4.1. Yapısal Etki

En önemli antioksidan sınıflarından flavonoidlerin ve metabolitlerinin antioksidan aktivitesi halkalı çekirdeksel yapılarındaki fonksiyonel grupların yerleşmesine bağlıdır. Flavonoidlerin yapılarındaki sübstitüentlerin yerleşimi, flavan iskeletinin tek başına göstermiş olduğu antioksidan aktiviteyi yükseltebilmektedir. Birçok polifenolik antioksidan birbirleriyle karşılaştırıldığında, hem konfigürasyonun, hem de toplam

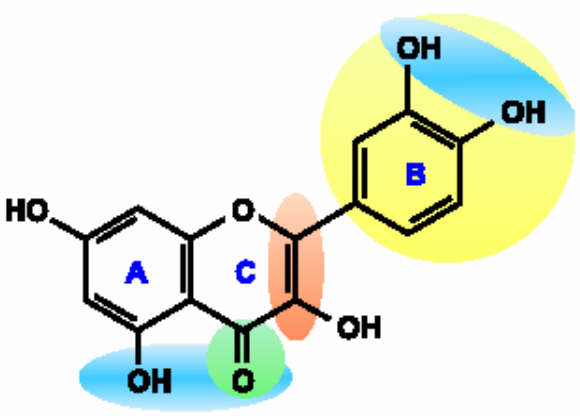
hidroksil grupları sayısının antioksidan aktiviteyi büyük oranda etkilediği görülmüştür [68,120,121].

Serbest radikal süpürme kapasitesinin hidroksil sübstitüentlerinin yüksek reaktivitesine bağlı olduğu aşağıdaki reaksiyonda görülmektedir:

$$A\text{-}OH + R^{\cdot} \rightarrow A\text{-}O^{\cdot} + RH \qquad (2.10)$$

Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin farklılaşmasında kapasite değerlerini belirleyen birkaç husus vardır (Şekil 2.5):
i.) B halkasındaki *o*-dihidroksi yapısı (1-e veren flavonoidin ariloksi radikal formunun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan)
ii.) 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalin B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran)
iii.) C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyondaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan) [83]

Bu özelliklerden bir ya da daha fazlasına sahip flavonoidler oldukça yüksek antioksidan etki gösterirler [81]. Flavonoidler tarafından serbest radikallerin süpürülme yeteneği, en çok serbest 3-OH grubunun varlığına bağlıdır. 3-OH ve 3',4' kateşol yapısına sahip olan flavonoidler radikallere karşı daha etkilidirler. Örneğin kuersetin, siyanidin ve kateşinin antioksidan kapasiteleri bu özelliklerinden dolayı yüksektir [84]. Şekil 2.17'de, çok güçlü bir antioksidan olan kuersetinin kimyasal yapısı üzerinde antioksidan kapasitesini belirleyen özellikleri incelediğimizde, bu özelliklerden en önemlisi daha önce belirtildiği gibi sarı renkle gösterilen kateşol veya *orto*-dihidroksillenmiş B halkasıdır. Diğer önemli özellikler; C halkasında kırmızı renkle gösterilmiş olan doymamış yapı, yeşil renkle gösterilen 4-okso fonksiyonunun varlığıdır. Kateşol grubu ve diğer fonksiyonlar (mavi renkli) demir ve bakır gibi transizyon metallerini kelatlama yeteneği sağlar [122].



Şekil 2.17: Flavonoidlerin klasik antioksidan kapasitelerini belirlemede önemli olan özellikleri gösteren kimyasal yapı [74]

Bununla beraber lipid peroksidasyonu inhibisyonunda flavonoidlerin (Tablo 2.2) yapı-aktivite ilişkisi detaylı olarak incelendiğinde [123];

a) Hidroksil gruplarının sayısı;

A ve B halkalarında polihidroksillenmiş yapıların önemi, kuersetin, mirisetin, (+)-kateşin, morin ve fisetinin, apigenin, hesperetin, hesperidin, naringenin, naringine göre karşılaştırılmasıyla belirlenmeye çalışılmıştır. İlk gruptakiler 4-6 arasında, ikinci gruptakiler 1-3 arasında hidroksil tasıyan flavonoidlerdir. Flavonoidlerin hidroksil radikali süpürme aktivitesi, B halkasındaki hidroksil grupları sayısıyla (özellikle C-3' konumunda) artar ve hidroksil grupları sayısının azalmasıyla hızlı bir şekilde azalır. Mirisetinin (Hidroksil konumları: 3,5,7,3',4',5') hidroksil radikali süpürme aktivitesi kamferolden (Hidroksil konumları: 3,5,7,4') daha kuvvetlidir.

b) Hidroksil konumları;

A halkasındaki C-5 ve C-7, B halkasındaki C-3' ve C-4' ve C halkasındaki C-3 konumundaki hidroksil gruplarının varlığı lipid peroksidasyonun inhibisyonuna katkıda bulunur. Flavonoller, antiperoksidatif aktivite için C-2' konumunda bir hidroksil grubu ve pirogallol grubuna (C-3', C-4', C-5') gereksinim duyarlar.

c) C halkasındaki 3. karbon atomu üzerinde hidroksil grubunun varlığı;

Bu yapıya sahip fisetin, (+)-kateşin, kuersetin, mirisetin ve morin; lipid peroksidasyonunu, C-3. karbon atomu üzerinde hidroksil grubu taşımayan apigenin, hesperetin ve naringenine göre daha kuvvetli inhibe eder.

d) Şeker yapısının varlığı;

Genelde flavonoid glikozitleri, karşılığı olan aglikon türlerine göre daha düşük antioksidan kapasite gösterirler. Malondialdehit üretiminin inhibisyonunda apigenin, naringenin, hesperetin, kuersetin ve mirisetin karşılık gelen glikozitlerine göre daha etkilidir. Şeker yapısı, sterik engellemeden ötürü çok yakın konumda bulunan hidroksil gruplarının antiperoksidasyon verimini azaltır.

f) Metoksi gruplarının varlığı;

Sterik engellemeden dolayı flavonoidlerin antiperoksidatif verimini azaltır. Ancak aynı sayıda hidroksil grubu içeren flavonoidlerde –OH'e göre orto- ve para- konumundaki – OMe grupları, elektron desteğiyle ariloksi radikallerini stabilize edeceğinden sonuçta antioksidan aktiviteyi arttırırlar.

2.4.2. Çözücü Etkisi

Antioksidan bileşiklerin kimyasal davranışları üzerinde çözücü etkisi temel bir parametredir. Hidrofilik ve lipofilik ortamlarda antioksidanlar benzer antioksidan aktivite göstermezler aksine çözücü ortamının değişmesiyle gösterdikleri antioksidan özellik farklılık gösterir. Çözücü türü ve polaritesi antioksidan kapasite ölçümlerinde önemli olan hidrojen atomu ve elektron transferini etkilemektedir [13,18]. Polar çözücülerde, hidrojen atomu bağlanması fenolik antioksidanların H-atom donör aktivitelerinde önemli değişikliklere neden olmakta ve ölçülen antioksidan kapasitesini etkilemektedir [14,19]. Hidrojen atom transferi reaksiyonu esasına göre çalışan antioksidan kapasite yöntemleri çözücüden ve pH'dan göreceli bağımsızdır. Ayrıca reaksiyon hızlı olup genellikle saniye veya dakika mertebesinde tamamlanmaktadır [11]. Sıkça kullanılan antioksidan kapasite tayin yöntemlerinde çözücü etkisi mevcut olmakla birlikte çözücünün cinsi ve özellikleri her yöntemi farklı şekilde etkilemektedir.

Çözücü etkisi teorisine kısa bir giriş yapılacak olursa, lipid otooksidasyonu prosesinde fenoliklerin (kateşol içeren) antioksidan aktiviteleri fenolik H-atomunun peroksil ($ROO^{\cdot}$) radikallerine transfer olabilme etkinliğine bağlıdır [124]. Bu oksidasyon reaksiyonlarının (örn. Hidrojen (H)-atom veya proton-bağlı elektron (e) transferi vasıtasıyla) hızları fenol halka substituentlerinin yapısı ve pozisyonu kadar çözücünün H-bağı-alma ve anyon solvatasyon yeteneğinden ciddi olarak etkilenmektedir [125]. Fenolik bileşik ve peroksil radikali arasındaki H-atomu transfer mekanizması, türler

arasındaki H-bağlı kompleksin oluşumunu gerektirmektedir (Denklem 2.11). Fenol molekülünden (ArOH) peroksil radikaline H-atomu transferi aşağıdaki reaksiyonlar üzerinden yürür ve çıkan proton hem peroksil radikaline (ROOH formuna dönüşür) hem de hidrojen bağı akseptör (HBA) çözücüye transfer olmaktadır [126]. Yüksek dielektrik sabitine sahip çözücülerde fenolden peroksil radikaline tek elektron transferi peroksil radikali ile fenolik bileşik arasındaki redoks potansiyeli ($\Delta E_{ROO\cdot - ArOH}$) > 0 ise gerçekleşmektedir [12,127].

$$ROO^{\cdot} + ArOH \leftrightarrow (ROO^{\cdot}\ldots HOAr)_{\text{çözücü kafesi}} \quad (2.11)$$

$$(ROO^{\cdot}\ldots HOAr)_{\text{çözücü kafesi}} \rightarrow (ROOH\ldots{}^{\cdot}OAr)_{\text{çözücü kafesi}} \rightarrow \text{difüzyon} \quad (2.12)$$

$$ROO^{\cdot}\ldots HOAr \rightarrow (ROO^{-}\ldots{}^{+\cdot}OAr)_{\text{çözücü kafesi}} \rightarrow (ROOH\ldots{}^{\cdot}OAr)_{\text{çözücü kafesi}}$$

$$\rightarrow \text{difüzyon} \quad (2.13)$$

$$ROO^{\cdot} + HOAr \rightarrow (ROO^{-}\ldots{}^{+\cdot}HOAr)_{\text{çözücü kafesi}} \rightarrow ROO^{-} + H^{+} + ArO^{\cdot} \quad (2.14)$$

Bu bağlamda, polar yapılı çözücülerin bu prosesin hızı üzerinde çift taraflı etkisi mevcuttur. Birincisi, iyon çiftini kararlı kılmasından ve tüm e- transferini hızlandırmasından dolayı elektron transferini kolay gerçekleştirirler. Diğer yandan, ArOH molekülü ile HBA çözücü molekülü arasındaki H-bağlı kompleks oluşumundan dolayı, ArOH molekülü ile peroksil radikali arasında meydana gelen kompleksin oluşumuna mani olurlar. Bu durumda, tüm hidrojen atomu transferi yavaşlar [126, 127]. H-atomu transfer hızı, fenolik bileşik ile çözücü arasındaki etkileşimin gücüne diğer bir deyişle K denge sabitine bağlıdır (Denklem 2.15) [127].

$$ArOH + S \overset{K}{\rightleftharpoons} (ArOH^{\cdots}S) \quad \text{S:polar çözücü} \quad (2.15)$$

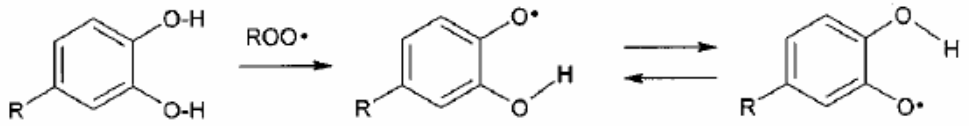
İyonlaşabilen çözücülerde e- transferinin hızlanmasına örnek olarak $DPPH^{\cdot}$ radikalinin fenollerle oksidasyonu verilebilir. Bu proseste, asidik iyonizasyon sonucu fenolün fenoksid (ArO^{-}) anyonuna dönüşmesi nedeniyle alkoller ve hidroksilik olmayan di-n-butil eter, asetonitril, tetrahidrofuran ve dimetilsülfoksid gibi polar çözücülerde hız sabitlerinin anormal derecede arttığı görülmüştür [125].

Antioksidanlar radikalleri hidrojen atom transfer (HAT) ve elektron transfer (ET) gibi iki temel mekanizmaya göre etkisiz hale getirirler. Bu mekanizmayı ve antioksidan etkinliğini antioksidanın yapısı, özellikleri, çözünürlüğü, sistemin çözücüsünün yanısıra bağ disosiyasyon enerjisi (BDE) ve iyonizasyon potansiyeli (IP) gibi iki önemli faktör belirler. BDE hidrojen atom-transfer mekanizmasıyla ($ArOH \rightarrow ArO^{\cdot}$), IP ise elektron transferi ($ArOH \rightarrow ArOH^{+}$) ile ilişkilidir. ArOH molekülündeki OH bağı ne kadar zayıf olursa serbest radikaller ile reaksiyon daha hızlı gerçekleşecektir. Örneğin her fenolik antioksidan suda HO-H bağının çok yüksek BDE'ne (119 kcal/mol) sahip olmasından dolayı $OH^{\cdot}$ radikali ile reaksiyona girebilmektedir. Dolayısıyla ArOH ile gerçekleşen tüm reaksiyonlar Denklem 2.16'daki gibi ekzotermik olarak gerçekleşir.

$$HO^{\cdot} + ArOH \rightarrow HOH + ArO^{\cdot} \qquad (2.16)$$

Hidroperoksidlerin oluşumunda peroksil radikali gibi diğer radikaller ise düşük BDE'ne sahiptir. Bu değer yaklaşık 88 kcal/mol'dür. Bunun sonucu olarak serbest radikaller termonötral bir reaksiyonda fenol ile (BDE ≈ 88 kcal/mol) yavaş reaksiyon verirken, α-tokoferol (BDE ≈ 77 kcal/mol) ile ekzotermik reaksiyon sonucu hızlı reaksiyon verirler. Bu nedenle α-tokoferol lipid peroksidasyonunu önleyen zincir-kırıcı bir antioksidan iken fenol değildir.

Fenolik antioksidanların H-atom donör aktiviteleri üzerinde hidrojen bağlarının önemli bir rolü olduğunu kantitatif olarak kanıtlayan çalışmalar yapılmıştır [126-128]. Bu çalışmalar protik veya non-protik (protik olmayan) çözücülerle kaplanan antioksidanların aktiviteleri üzerinde ortamın etkisini araştıran birçok çalışmaya yararlı kaynak oluşturmuştur. Fenolik antioksidan aktivite üzerinde kinetik çözücü etkisi için 2 önemli kural belirtilmiştir: (1) Kinetik çözücü etkisinin boyutları hidrojen bağı donör (örn. antioksidan) ile hidrojen bağı akseptör çözücü (protik veya protik olmayan) arasındaki etkileşimin kuvveti (2) fenolik yapıdaki hidroksil grubundan hidrojen atomunun çıkarılmasında kinetik çözücü etkisinin çıkarılan radikalin yapısından bağımsız olmasıdır. Kateşol gruplarına sahip fenolik bileşiklerde antioksidan aktiviteyi kontrol eden temel faktör peroksil radikalinin inaktivasyonu sonucu oluşan ariloksi radikalinin molekül içi H- bağları yoluyla stabilizasyonudur (Denklem 2.17) [19, 124].



(2.17)

Yüksek hidrojen bağı akseptör çözücüler moleküller arası hidrojen bağlarından dolayı bu stabilizasyona girişim yaparlar. Yani, kateşolün (veya flavonoid) daha iyi solvate olmasıyla daha stabil hale gelmesi ve oluşan ariloksi semikinon radikalinin destabilizasyonunun etkisiyle, hidrokarbon çözücülere bağlı olarak polifenollerin bağ disosiasyon enerjisinin artması beklenir. Bu etki, çözücüyle etkileşen fenole peroksil radikalinin ulaşımında sterik engel oluşturarak H-atomu ayrılma reaksiyonunun hız sabitinin azalmasına neden olurken; ariloksil radikalinin stabilizasyonu, bağ disosiasyon enerjisini azaltmakta ve hız sabitini arttırmaktadır [19,128,129]. Reaksiyona giren fenolik hidroksil grubundaki oksijen atomu kuvvetli π donör iken ariloksi radikalindeki oksijen atomu kuvvetli π akseptördür. Bu nedenle karbonil grubu gibi elektron alıcı gruplar bağ disosiasyon enerjisini arttırırken, hidroksil grubu gibi elektron verici gruplar bağ disosiasyon enerjisini azaltırlar ve böylece reaksiyon hızlarını arttırmış olurlar [129].

Molekül içi H-bağlanma stabilizasyonu ariloksi/kateşol çiftinin standart redoks potansiyelini düşürerek fenolik bileşiği daha güçlü bir antioksidan yapmaktadır. HBA çözücülerle fenolik hidroksil gruplarının moleküller arası H-bağlanması antioksidan aktiviteyi düşürmektedir. Yani, polifenollerin H-atom transfer kinetikleri değerlendirildiğinde, lineer H-bağı (ArOH…S formunda, çözücü (S) molekülü ile birlikte) ile lineer olmayan H-bağı (molekül içi H-bağı) arasında bir ayrım yapmak gerekir. Çünkü sadece lineer H-bağı fenolik yapıdaki hidroksil grubundan hidrojen atomunun çıkarılmasını önlemektedir [130]. Diğer bir deyişle kateşol, HBA çözücüsü içinde serbest –OH molekülü ile sadece bir lineer H-bağı yapabilmektedir. Yani, kateşol molekül içi bağlanmış hidroksil gruplarının yardımıyla peroksillerle reaksiyona girmeye devam etmektedir [126].

Antioksidan kapasite üzerine çözücü etkisi ile ilgili literatürde birçok çalışma mevcuttur. ORAC, ABTS, FRAP ve DPPH gibi sıkça kullanılan yöntemlerde çözücü

etkisi mevcut olmakla birlikte çözücünün cinsi ve özellikleri her yöntemi farklı şekilde etkilemektedir. Jimenez ve Saura-Calixto farklı solventlerde gallik asit-kateşin karışımı için sulu çözeltide gözlenen kapasitenin metanol-su içerisinde gözlenene oranla %40 daha yüksek olduğunu, metanol-su karışımlarında su oranı arttıkça kapasitede artış olduğunu gözlemişlerdir [13]. FRAP yönteminde ise sulu çözelti ile metanollü çözelti arasında çok fark olmadığı ancak metanol-su karışımlarında su oranı yükseldikçe kapasitenin tek sulu çözeltiye göre arttığı görülmüştür. Yani genel olarak çözücü polaritesindeki artışa bağlı olarak antioksidan kapasitede artış görülmektedir. Ancak bu sonuç %100 geçerliliği olan bir sonuç olmamakla birlikte yöntemlerin çalışma mekanizmasına, kullanılan antioksidan bileşiklerin kimyasal yapılarına ve çözücü özelliklerine birebir bağlıdır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre ORAC yönteminde solvent etkisi çok yüksek iken DPPH yönteminde bu etki minimum bulunmuştur. Çözücü polaritesi azaldıkça ORAC değeri yükselme eğilimi göstermiştir. Farklı çözücüler arasında gözlenen tüm bu farklılıklar, standart antioksidan ve karışımlarına oranla besin veya diğer kompleks matrikslerde daha fazla olacaktır. Bu nedenle antioksidan kapasiteleri karşılaştırırken aynı çözücülerle hazırlanan çözeltiler veya ekstreler ölçülmelidir. Aksi takdirde sonuçlar çok farklı olabilir ve direkt olarak yöntemleri karşılaştırmak anlamlı olmaz [13].

Pinelo ve arkadaşları bitki matriksinde en çok bulunan kuersetinin antioksidan kapasitesi üzerinde çözücü etkisini incelemek için kuersetinin etanol, metanol ve etanol/su (1:9,v/v) çözeltilerini hazırlayarak DPPH yöntemini uygulamışlardır [14]. Çözücüler farklı kimyasal özelliklerine göre seçilmişlerdir. Örneğin, kuersetin içeren meyve ve sebze türlerinin hepsinde bol miktarda su ve etanol bulunduğu için seçilmiştir. Metanol bu ortamlarda sık bulunmamasına rağmen, özelikleri açısından su ve etanolün arasında yer aldığından antioksidan aktivitenin değerlendirilmesi hakkında ipuçları verebilecek bir çözücü olduğu için seçilmiştir. Yazarlar aynı derişimde kuersetin için çözücü polaritesi değiştikçe antiradikal aktivitenin arttığını tespit etmişlerdir [14].

Pedrielli ve arkadaşları kuersetin ve epikateşinin metil linoleatın otoksidasyonu zincir kırıcı reaksiyonunun hız sabitleri üzerine çözücü etkisini araştırmışlardır [19]. HBA çözücülerde ve hidrojen atomu bağlamayan çözücülerde peroksil radikallerine H- atomu transfer reaksiyonunun hız sabitleri sulu ortam ve apolar ortamlardaki antioksidan

mekanizmalarını karşılaştırmak amacıyla incelendiğinde, HBA çözücüsü olan *tert*-butil alkol çözücü ortamında elde edilen hız sabitlerinin HBA çözücüsü olmayan klorbenzen ortamına göre 20 kat düşük olduğu görülmüştür. α-tokoferol için ise çözücü etkisiyle hız sabitinde 4 kat düşüş gözlenmiştir. Bu şekilde otoksidasyon reaksiyonlarında hız sabitlerinin çözücünün yapısından yüksek oranda etkilendiği sonucuna varılmıştır [19].

Foti ve arkadaşları bazı flavonoidlerin, kateşol türevlerinin, hidrokinon ve monofenollerin antioksidan etkinliği üzerine polar (asetonitril ve *tert*-butil alkol) ve apolar (siklohekzan) çözücülerin etkisini araştırmışlardır [126]. Çalışılan antioksidanların etkinliği apolar organik çözücülerde daha çok görülmekte iken *tert*-butil alkol gibi kuvvetli HBA çözücülerde bu bileşikler antioksidan gibi davranmamaktadır. Asetonitrilde (zayıf HBA çözücü) ise kateşol yapısı içeren tüm bileşikler güçlü antioksidan özellik sergilemektedirler [126].

Barclay ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada hekzan, 1-propanol, *tert*-butil alkol ve asetonda bazı fenol ve kateşollerin hidrojen atom verme aktiviteleri DPPH yöntemiyle incelenmiştir [124]. Hekzandan hidrojen atom alıcı çözücülere doğru ikinci derece hız sabitlerinde azalma gözlenmiştir. Örneğin aseton kuvvetli HBA çözücü olduğundan hız sabiti en düşük bulunmuştur. Bu durum asetonun alkollere oranla fenolik yapıdaki H-atomunun kopmasında daha etkili olduğunu göstermektedir.

2.4.3. Sinerjik Etki

Günlük diyette antioksidanların birçoğu bir arada alınmaktadır. Bu sebeple, antioksidanların beraber oluşturacakları etki merak konusu olmuş ve bu yönde birçok araştırma yapılmıştır. Gıda kaynaklı antioksidanların başında gelen fenolik ve protein yapılı antioksidanlar, benzer yapılarla molekül düzeyinde etkileşim içindedirler. Tek başlarına sahip oldukları antioksidan aktiviteleri onların radikal süpürme kapasiteleri ve dolayısıyla olumlu sağlık etkileri hakkında fikir verirken, diğer protein ve fenolik yapılarla yapacakları etkileşimler sonucu bulunan yeni etkinin tespiti büyük önem taşımaktadır. Gıda kaynaklı antioksidanların büyük bir kısmını protein ve fenolik yapıdaki antioksidanlar oluşturmaktadır ve tek başlarına yüksek antioksidan aktivitesine sahiptirler. Fakat bu maddeler birbirleriyle veya insan vücudundaki bir takım yapılarla (enzim, membran, vs) etkileşimde bulunabilmekte, dolayısıyla antioksidan

aktivitelerinde ve etkileştikleri maddelerin biyolojik rollerinde önemli değişimlere yol açabilmektedirler. Bu durum, etkileşmenin nasıl olduğu, aktivitelerinin ne durumda olduğu ve muhtemel sonuçlarının ne olacağı sorularını gündeme getirmektedir. Daha önemli olarak insan vücudu baz alınıp hücre düzeyinde olaylara bakıldığında; enzim, hücre membranı ve bazı büyüme faktörleriyle olabilecek etkileşimler olumlu veya olumsuz önemli metabolik değişimlere yol açabilmektedir [131].

Antioksidanların gıda ortamında beraber bulunmaları sonucunda antioksidan kapasite üç farklı şekilde yorumlanabilir:
- Fenolik ve protein yapıdaki antioksidanlar bir arada bulunarak toplam antioksidan aktiviteyi her ikisinin toplam etkisi şeklinde zenginleştirirler.
- Birbirleriyle antioksidan aktiviteyi arttırıcı yönde etkileşerek pozitif bir sinerjik etki yaratırlar.
- Birbirleriyle antioksidan aktiviteyi azaltıcı yönde etkileşerek negatif bir sinerjik etki (antagonistik etki) yaratırlar [132].

Bu üç farklı tip etkileşim temelde antioksidanların kimyasal yapıları ve reaktiflikleriyle ilişkili olarak açıklanabilir.

Heo ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, klorojenik asidin onbir değişik fenolikle ikili karışımlarının antioksidan kapasitesi ABTS yöntemiyle analiz edilmiş ve klorojenik asidin diğer fenoliklerin toplam antioksidan kapasitesine yaptığı katkı incelenmiştir [133]. Klorojenik asidin, siyanidin, peonidin 3-glukozid, kuersetin ve kuersetin 3-galaktoz'a eklenmesi, toplam antioksidan kapasitesinin azalmasına neden olmuştur. Oysa diğer yedi fenoliğin toplam antioksidan kapasitesi klorojenik asitle artmıştır. Bu sonuçlardan bazı fenoliklere (siyanidin, peonidin 3-glukozid, kuersetin ve kuersetin 3-galaktoz) klorojenik asidin eklenmesinin sinerjik etki oluşturmadığı, diğer fenoliklerde ise sinerjik etkiye sebep olduğu gözlenmiştir. İki fenolik model karışımının değişik konsantrasyon oranları, değişik sonuçlar ortaya koymuştur. Konsantrasyonları bilinen bazı fenolik karışımların toplam antioksidan kapasite ölçümleri, fenoliklerin tek başlarına göstermiş oldukları antioksidan kapasitelerinin toplamına eşit bulunmuş, bu da çalışılan fenoliklerin arasında sinerjik bir etki olmadığını göstermiştir [133].

Liu ve arkadaşları DPPH yöntemiyle; likopenin vitamin E, vitamin C, ve β- karoten ile ikili, üçlü ve dörtlü karışımlarında sinerjik etkiyi araştırmıştır [134]. İki antioksidan içeren muhtemel altı kombinasyon hazırlanmıştır. Bunlardan sadece üç kombinasyon önemli miktarda likopen içermektedir ve bu karışımlarda en yüksek sinerjik etki sırasıyla likopen-vitamin E > likopen-vitamin C > likopen-β-karoten şeklinde ölçülmüştür. Hazırlanan üçlü kombinasyonlarda likopen, vitamin E ve vitamin C önemli derecede sinerjik etki göstermiştir. Likopen, vitamin E, β-karoten karışımında ise vitamin C' nin çıkarılıp β-karoten'in eklenmesiyle sinerjik etki azalmıştır. Dörtlü kombinasyonlarda ise vitamin içeriği fazla olan karışımların radikal süpürme etkinliği daha yüksek bulunmuştur [134].

2.4.4. Polimerizasyon Etkisi

Polimerizasyon kısaca otooksidasyonun ilerlemesi ile parçalanmayı takiben yeni moleküllerin oluşumu olarak tanımlanabilir. Özellikle yağlarda karşımıza çıkan bu olay sonucu meydana gelen oluşumlar; aldehitler, ketonlar, organik asidler ve bunların hidroksi türevleri gibi bileşiklerdir. Bazı flavonoidlerin polimerizasyon reaksiyonlarına gösterdiği yatkınlık sonucunda yapılarının değiştiği ve bunun sonucu olarak da radikal süpürme özeliklerinde değişimler olduğu bildirilmiştir [132].

Flavonoidlerin çekirdeksel yapısının polimerleşmesi, konjügasyon ve elektron delokalizasyonu vasıtasıyla daha kararlı olan flavonoid radikalini sağlayarak antioksidan aktiviteyi arttırmaktadır [84]. Plumb ve arkadaşlarının kateşinler ve antosiyaninler üzerinde polimerizasyon, yapıya galloil ve şeker gruplarının bağlanmasının etkisi ile ilgili yaptığı çalışmada kateşinlerin monomerden trimere doğru yani polimerizasyon arttıkça antioksidan etkisinin arttığı ve buna zıt olarak yağ fazında ise antioksidan aktivitenin polimerizasyonla azaldığı belirtilmiştir [136].

2.4.5. Diğer Dış Faktörler

Gıdalarda bulunan protein ve fenolik yapıdaki antioksidanların etkileşmelerinde gıda işleme koşullarının da büyük etkisi bulunmaktadır. Örneğin gıdaların çözünürlüğünün arttırılması, saflaştırma veya gıdaya fonksiyonel özellik kazandırmak amaçlı bazı işleme teknikleri alkali ortamlarda gerçekleşmektedir. Bu alkali işleme koşullarının fenoliklerle proteinlerin arasındaki etkileşimi destekleyici ortamlar olduğu bildirilmiştir [137].

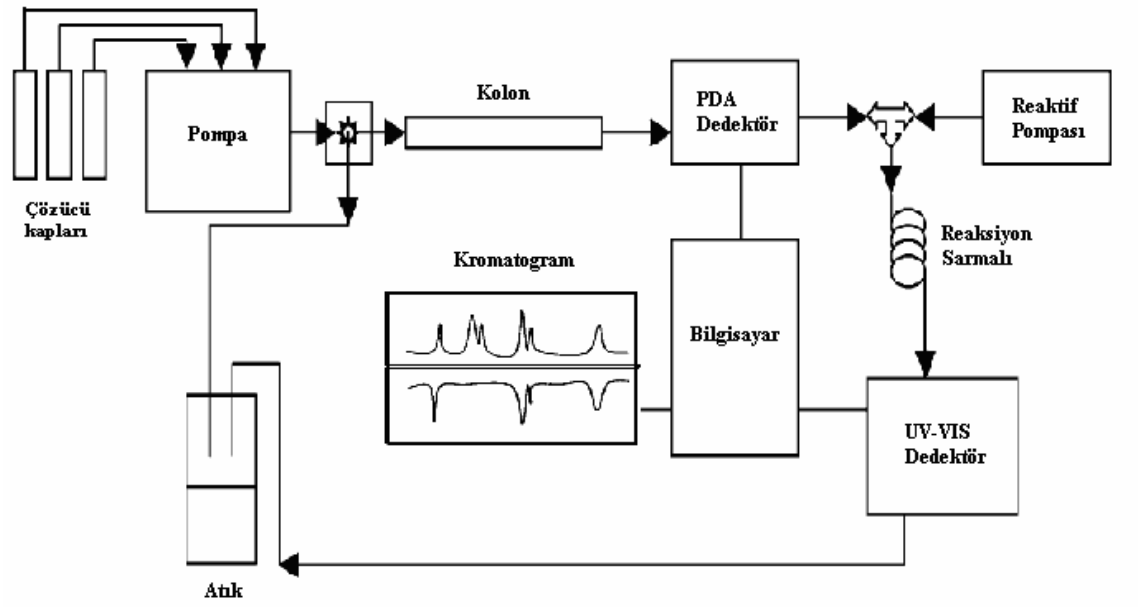
Antioksidan etkileşimleri üzerinde, gıdaların işlendikleri sıcaklık da önemli bir etkiye sahiptir. Tsai ve arkadaşları bezelyelerle yaptıkları çalışmalarda ısıtma sırasında fenolik bileşiklerin bezelyelerdeki antioksidan kapasitelerinde artışa neden olduğunu ve bu artışın nedeninin de fenol-protein etkileşmelerine bağlı olduğunu belirtmişlerdir [138].

İşleme koşullarına paralel olarak katkı maddesi şeklinde gıdalarda kullanılan antioksidan özellikteki maddeler de toplam antioksidan etkide farklılıklara yol açabilmektedir. Gad ve arkadaşları yağı alınmış süte farklı (%2-10%) oranlarda biberiye ve yeşil çay ekstreleri ilave ederek oluşturdukları fonksiyonel gıdanın antioksidan özelliklerini incelemişlerdir [139]. Pastorizasyon sırasındaki ısıl işlem, birbirleriyle kompleks yapı oluşturmuş süt proteinleri ve fenolikler arasındaki bağları kırarak fenoliklerin ortamda serbest hale geçmelerini sağlamış ve ilave antioksidanlar içeren fonksiyonel yağsız sütün antioksidan aktivitesini büyük ölçüde arttırmıştır. Yine Staszewski ve arkadaşları tarafından yeşil çayın gıdalardaki proteinlerle etkileşimi sonucu antimikrobiyal etkisinde azalma olduğu belirtilmiştir [140]. Gıdaların depolanma sürecinde de protein ve fenolikler arasında etkileşimler gerçekleşebilmektedir. Yine okside olmuş fenollerle proteinler arasında gerçekleşen enzimatik esmerleşme reaksiyonları, gıdalarda işleme sırasında kalite kaybına ve depolama sırasında gıdaların bozulmalarına neden olabilmektedir [137]. Depolama sırasında olan etkileşimlere bira, şarap ve berrak meyve sularında görülen bulanıklık sorunu da örnek olarak verilebilir. Bu etkileşim polifenollerle prolince zengin olan proteinlerin etkileşimine bir örnektir [141]. Yine depolama sırasında olabilecek etkileşimlere başka bir örnek de Fukui ve arkadaşları tarafından rapor edilen üzüm, üzüm suyu ve şarapta bulunan proteinlerin flovonoidlerle etkileşmesidir [142]. Bu etkileşim sonucunda üzüm ve şaraplardaki buruklukta azalma tespit edilmiştir. Ayrıca etkileşimin ortamdaki jelatin ve sentetik peptitlerle de gerçekleştiği ve bunun bulanmaya veya çökelti oluşumuna neden olduğu da rapor edilmiştir.

2.5. KOLON-SONRASI TÜREVLENDİRMELİ HAT-ÜSTÜ HPLC ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Son yıllarda geliştirilen ve biyolojik sıvılar, sebze, meyve ve bitki infüzyonları gibi kompleks matrikslerdeki antioksidan aktiviteyi belirleyebilen analitik yöntemlerden

bazıları hat-üstü olarak yüksek performanslı sıvı kromatografisine eklenen sistemler kullanılarak modifiye edilmiştir [21-32]. HPLC sistemine entegre edilen post-kolon (kolon sonrası) türevlendirme sistemleri (Şekil 2.18) kullanılarak bileşenlerine ayrılan örnek materyali, kromofor grubun UV ışığını absorbladığı UV dedektöre ulaşır ve pik olarak ekrana taşınır. Post-kolon türevlendirme sistemini oluşturmak için ikinci bir akış transfer sistemi eklenerek HPLC sistemi modifiye edilir. Tipik olarak bir pompa, tubing (boru takımı), bağlantı tesisatı ve reaksiyon bobininden oluşur. Türevlendirme reaktifi kolon ile dedektör arasında sisteme dahil edilir. Reaktif ile kompleks oluşturan bileşenler dedektöre ulaşır ve sinyal elde edilir. Post kolon sistemi genellikle aminoasidler [143], antibiyotikler [144] aflatoksinler [145,146], alkali metalleri [147] tayin etmek için sıkça kullanılır. Bunun yanı sıra antioksidan tayini için geliştirilen yöntemler de mevcuttur. Antioksidanların tayininde en yaygın olarak kullanılan yöntemler; luminol kemiluminesans esaslı [21,22] ve UV esaslı serbest kararlı radikallerin ($DPPH^{\cdot}$ [23,24] ve $ABTS^{\cdot+}$) [25] kullanıldığı renksizleştirme yöntemleridir. Bu hat-üstü yöntemler, matriksin kromatografik yolla ayrılmasından sonra kompleks karışımındaki antioksidanların hızlı bir şekilde belirlenmesine olanak sağlamaktadır [25]. Bu sistemlerde kompleks yapılı örneklerde bileşenlerin ayrılması, her bir bileşenin antioksidan kapasiteye katkısı ve ilgili bileşiklerin reaktife cevap verip vermediği dolayısıyla antioksidan özellik gösterip göstermediğinin hızlıca belirlenebilmesi önemli avantajlar sağlamaktadır. Hat-üstü HPLC yoluyla toplam antioksidan kapasiteye katkıda bulunan ve bulunmayan bileşiklerin aynı anda hızlıca belirlenmesi, gıda antioksidan araştırmalarına önemli destek vercek bir uygulamadır.



Şekil 2.18: HPLC sistemine entegre kolon sonrası (post-kolon) türevlendirme sistemi

2.5.1. Hat-üstü HPLC-DPPH Yöntemi

Koleva ve arkadaşları metanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi kullanarak kompleks karışımlardaki (bazı bitki türleri) radikal süpürücü bileşenleri belirlemek için hızlı bir hat-üstü yöntem geliştirmişlerdir [23]. HPLC kolonunda ayrılan bileşenler kolon-sonrası reaksiyon modülünde DPPH çözeltisiyle tepkimeye girmekte ve radikalin süpürücü bileşenler tarafından süpürülmesi 517 nm'de negatif pikler şeklinde belirlenebilmektedir. Hidrojen atomu verme yeteneğine bağlı olarak bileşenin antioksidan aktivitesi ne kadar yüksekse, $DPPH^{\cdot}$ radikalinin 515 nm'deki absorpsiyonundaki düşüş o kadar hızlı olmaktadır. Yöntemde $DPPH^{\cdot}$ radikalinin derişiminin optimizasyonu yüksek sinyal/gürültü (S/N) oranları elde edilecek şekilde sağlanmıştır. S/N oranları üzerinde reaksiyon süresi ve çalışma pH'sının etkisi de incelenmiştir.

DPPH kolon sonrası belirtme sistemlerinin bazı dezavantajları vardır:

(i) Çözünmüş oksijenden dolayı meydana gelen zemin çizgisi (baseline) kaymasını azaltmak için $DPPH^{\cdot}$ çözeltisinin temizlenmesinin gerekliliği

(ii) $DPPH^{\cdot}$ radikalinin gün ışığındaki kararsızlığından analitlerin belirlenmesinde meydana gelen değişimler

(iii) Fenolik-DPPH$^{\cdot}$ reaksiyon kinetiğinin yavaş ve karmaşıklığından dolayı pik alanlarında meydana gelen azalmalar

(iv) Kolon-sonrası karışım çözeltisindeki nötral koşullardan sapmaya sebep olan reaksiyon sarmalındaki olası birikme

(v) Belirli DPPH$^{\cdot}$ derişiminin dışında artan gürültü seviyesi [24,26]

2.5.2. Hat-üstü HPLC-ABTS Yöntemi

İlk kez Koleva ve arkadaşları tarafından uygulanan bu yöntem, HPLC kolonunda ayrılan radikal süpürücü bileşenler tarafından sarmal yapılı reaksiyon modülünde ABTS$^{\cdot+}$ kromojen radikal katyonunun 734 nm'de absorbansının inhibe edilmesine dayanmaktadır [25]. Bileşenler bu dalgaboyunda negatif pikler olarak belirlenmektedir. ABTS$^{\cdot+}$ radikal katyonunun nötral DPPH radikaline göre sudaki çözünürlüğü daha yüksek olup ABTS radikal çözeltisi MeOH/H_2O (1:9, v/v) içeren pH 7.4 fosfat tamponu ortamında hazırlanmıştır. Yöntemin duyarlılığı için ABTS$^{\cdot+}$ radikali derişimi 5.5 μM, reaktif çözeltisinin akış hızı 0.5 mL/dak olarak belirlenmiştir. Hat-üstü belirleme yöntemlerinin avantajlarının yanısıra radikalik reaktiflerin kullanıldığı yöntemlerde bazı dezavantajlar görülmektedir. Örneğin, bu radikallerin ömürleri kısa olduğundan antioksidan aktiviteyi kantitatif olarak belirlemek güçleşir. Ayrıca, doğal antioksidanların aktiviteleri, izole edilmeleri ve yapısal özelliklerinden dolayı saflaştırılmaları esnasında düşmektedir.

2.5.3. Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemi [148]

Bu yöntemde, öncelikle HPLC cihazına entegre edilen kolon sonrası türevlendirme sistemi ile karmaşık yapılı matrikslerde mevcut olan antioksidan bileşikler kolonda ayrılmaktadır. HPLC kolonunda ayrılan bileşenler sarmal yapılı kolon sonrası reaksiyon modülünde CUPRAC reaktifi olan Cu(II)-Nc ile reaksiyona girdikten sonra oluşan Cu(I)-Nc kelatının 450 nm dalgaboyunda dedekte edilmektedir. 450 nm'de elde edilen kromatogramlar antioksidan bileşiklerin her birine ekivalent oranda oluşan Cu(I)-Nc kelatının piklerini içermektedir. Referans bileşik olarak seçilen troloksun farklı derişimleri ile troloksa eş değer miktarda açığa çıkan Cu(I)-Nc kelatına ait 450 nm'deki piklerin alanları arasında çizilen kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak her bir antioksidan bileşiğin ve kompleks yapılı matriksin troloks eşdeğeri cinsinden toplam antioksidan kapasitesinin belirlenmesi sağlanmaktadır. Geliştirilen bu yeni yöntem ile

spektrofotometrik bir yöntem olan CUPRAC yöntemini kromatografi ile bütünleştirerek hem bileşenlerin duyarlı olarak belirlenmesi hem de CUPRAC yöntemi modifiye edilip kolon sonrası türevlendirme sistemine uygulanarak toplam antioksidan kapasitenin tayin edilebilmesi sağlanmıştır.

2.6. HAT-ÜSTÜ HPLC ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ UYGULAMALARI

Koleva ve arkadaşları, metanolde hazırlanmış DPPH çözeltisi kullanarak kompleks karışımlardaki (bazı bitki türleri) radikal süpürücü bileşenleri belirlemek için hızlı bir hat-üstü yöntem geliştirmişlerdir. HPLC kolonunda ayrılan bileşenler kolon sonrası reaksiyon modülünde DPPH çözeltisiyle tepkimeye girmekte ve radikalin süpürücü bileşenler tarafından süpürülmesi 517 nm'de negatif pikler şeklinde belirlenebilmektedir [23].

Bandoniene ve Murkovic elmada mevcut olan fenolik antioksidanları (kateşin, epikateşin, klorojenik asit, kafeik asit vb.) serbest $DPPH^{\cdot}$ radikali kullanarak hat-üstü HPLC yöntemiyle belirlemiştir. Hidrojen iyonu verme yeteneğine bağlı olarak bileşenin antioksidan aktivitesi ne kadar yüksekse, $DPPH^{\cdot}$ radikalinin 515 nm'deki absorpsiyonundaki düşüş o kadar hızlı olmaktadır [24]. Aynı yazarlar DPPH yöntemi ve hat-üstü HPLC-DPPH yöntemini *Salvia* türlerinin ekstrelerine uygulayarak radikal süpürücü bileşenlerin belirlenip süpürme aktivitelerinin tayinini gerçekleştirmişlerdir [28].

Exarchou ve arkadaşları tarafından farmasötik amaçlı kullanılan metanollü bazı bitki ekstrelerinde hat-üstü kolon sonrası türevlendirme sistemi kullanılarak bileşenler tayin edilmiştir [29]. Reaktif olarak $DPPH^{\cdot}$ ve $ABTS^{\cdot+}$ radikalleri kullanılarak bileşenlerin radikal süpürme kabiliyetleri incelenmiştir. Isırgan otu, kuşburnu, ıhlamur gibi bitkilerde mevcut olan kuersetin, kuersitrin, rutin, kaempferol, klorojenik asid, ferulik asid gibi antioksidanların kolondan ayrılmasından sonra tayin ve ölçüm gerçekleşmiştir. Radikallerin indirgenmesi sonucu DPPH için 512 nm'de, ABTS için 734 nm'de negatif pikler ile türler belirlenmektedir [29].

Çapanoğlu ve arkadaşları tarafından domatesin taze halinden salça haline dönüşümüne kadar geçen tüm proses basamaklarında toplam antioksidan kapasitelerinin incelendiği çalışmada hidrofilik, lipofilik ve toplam antioksidan içeriklerinin yanı sıra HPLC-ABTS hat-üstü belirleme sistemi kullanılarak sulu metanollü domates ekstrelerinde hangi bileşenlerin bulunduğu tespit edilmiştir [31].

Bartasiute ve ekibi geliştirilen hat-üstü DPPH yöntemlerinde $DPPH^{\cdot}$ radikal çözeltisinin saf metanol içinde yavaş kinetik gösterdiği ve reaksiyonun tam olarak tamamlanmadığını belirtip *in vivo* ortamda metanol-tampon çözücü karışımında hazırlanan DPPH'ın kullanıldığı yöntemin öngörülebilirliğini amaçlayan bir çalışma yapmışlardır [27]. Bu çalışmada, fizyolojik pH'da sulu tampon içeren ortamda hızlı bir denge sağlanmaktadır. Bu yeni uygulamada araştırmacılar sulu ortamda DPPH reaksiyonunu tanımlamak için termodinamik bir model geliştirmişlerdir [27].

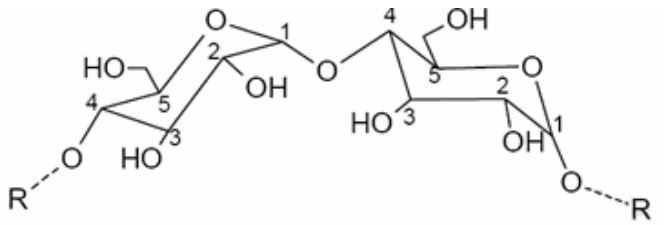
Stewart ve ekibi ise yeşil ve siyah çaydaki fenolik bileşiklerin antioksidan aktivite tayini için hat-üstü HPLC-ABTS yöntemini uygulamışlardır [31]. Her bir çay bileşeninin antioksidan potansiyeli kantitatif olarak belirlenmiş ve gallatlanmış kateşinlerin radikal süpürme aktivitesinin en yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre siyah çayın toplam antioksidan kapasitesinin sadece %20'lik kısmının RP-HPLC ile belirlenen bileşenler tarafından oluşturulduğu görülmüştür. Bu da kateşin ve türevleri dışında teaflavinler ve tearubigenlerin siyah çay antioksidanları arasında ne denli önemli olduğunu da göstermektedir [31].

Koşar ve arkadaşları DPPH radikalinin kullanıldığı online yöntemlerde zemin (baseline) kayması ve artan zemin gürültüsünü azaltmak için DPPH çözeltisini sitrik asit-disodyum hidrojen fosfat, sitrik asit-sodyum sitrat, fosfat ve asetat tampon çözeltileri gibi farklı çözücü ortamlarında hazırlamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre, pH 7.6 sitrik asit-sodyum sitrat tampon çözeltisinde hazırlanan DPPH çözeltisinin en kararlı olduğu ve bu ortamda baseline kaymalarının ve gürültü miktarının minimum olduğu görülmüştür [32].

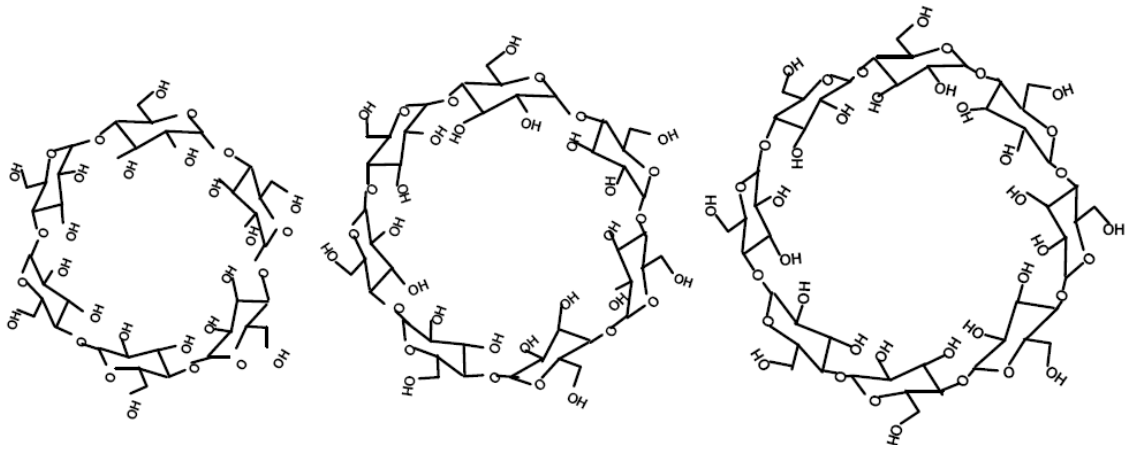
2.7. SİKLODEKSTRİNLER VARLIĞINDA ANTİOKSİDAN BİLEŞİKLERİN KARAKTERİZASYONU

2.7.1. Doğal Siklodekstrinler

Siklodekstrinler (CD'ler), nişastanın siklodekstrin glikoziltransferaz (SGTaz) enzimi ile parçalanması ile elde edilen α (1-4) glikozidik oksijen köprüleri ile birbirine bağlı glukopiranoz birimlerinden (Şekil 2.19) oluşan ve indirgen olmayan siklik maltooligosakkaritlerdir [149,150]. Bunlar aynı zamanda, sikloamilozlar, siklomaltozlar ve Schardinger dekstrinleri olarak da isimlendirilmektedirler [151]. 6-12 glikoz ünitesinden oluşan CD'lerin bulunduğu belirlenmiştir, ancak bunlardan sadece alfa (α), beta (β) ve gama (γ) CD olarak isimlendirilen ve sırası ile 6, 7 ve 8 glikoz ünitelerinden oluşan CD'ler endüstriyel olarak üretilmekte ve kullanılmaktadır (Şekil 2.20) [152]. 6 glikoz ünitesinden daha az glikoz içeren CD'lerin üretiminin sterik olarak mümkün olmadığı bildirilmiştir [40,152].

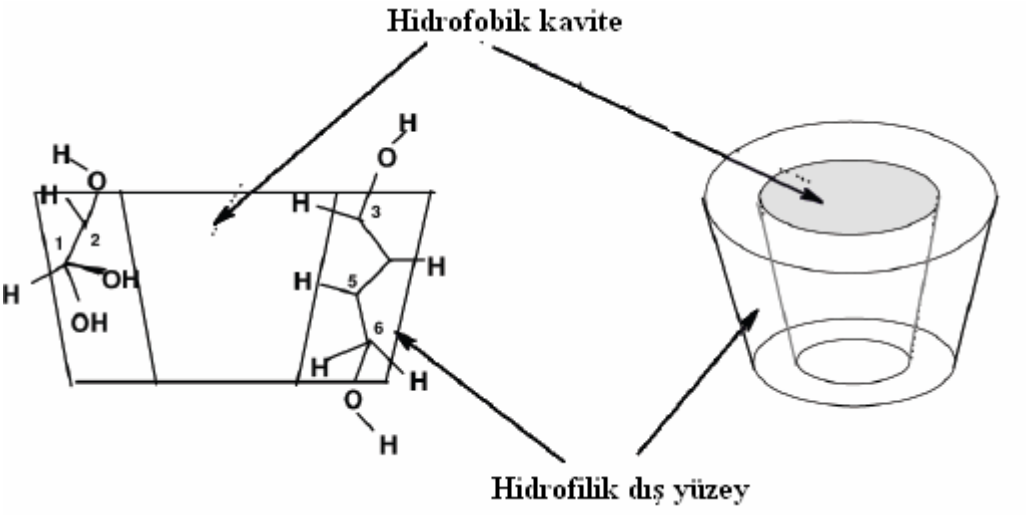


Şekil 2.19: İki glukopiranoz molekülü arasındaki glikozidik oksijen köprüleri



Şekil 2.20: α-, β- ve γ- siklodekstrinlerin kimyasal yapıları

CD moleküllerini çevreleyen halka gerçekte konik bir silindir şeklindedir. CD kavitesi hidrojen atomları ve glukozidik oksijen köprüleriyle kaplanmıştır. Glukozidik oksijen köprülerindeki bağlanmamış elektron çiftleri kavite içerisinde yüksek elektron yoğunluğu oluşturur ve Lewis bazı karakteristik özelikleri göstermesini sağlar [150]. Sekonder hidroksil grupları (C2 ve C3) halkanın geniş kenarında, primer hidroksil (C6) grupları ise diğer kenarda bulunmaktadır. Hidroksil gruplarının molekülün dış yüzeyinde bulunması CD'lerin suda çözünmesini yani hidrofilik özellikte olmasını sağlamaktadır [151]. Kavitede ise molekülün apolar özellikte olmasını sağlayan C3 ve C5 hidrojen atomları ve glikozidik oksijen köprüleri bulunmaktadır (Şekil 2.21). Kavitenin apolar özelliği CD'lerin birçok hidrofobik moleküllerle içerme kompleksleri oluşturabilmesini sağlamaktadır [153].



Şekil 2.21: Siklodekstrinlerin üç boyutlu yapıları [154]

Siklodekstrinlerin çeşitli özellikleri Tablo 2.3'de verilmiştir. β-CD'nin sudaki çözünürlüğü (%1.85), α-CD (%14.5) ve γ-CD'e (%23.2) göre oldukça düşüktür. CD molekülünde bir glikopiranoz biriminin C2 hidroksil gruplarının bitişiğindeki C3 hidroksil grupları ile hidrojen bağları oluşturabildiği ve bu hidrojen bağları ile molekülde sekonder bir hidrojen kemerinin oluştuğu ve bunun da β-CD'e çok sağlam bir yapı kazandırdığı belirtilmiştir. Bu hidrojen bağlarının β-CD'nin ortamda bulunan su molekülleri ile hidrojen bağı oluşturabilme yeteneğini azalttığı ve böylece çözünürlüğünü düşürdüğü bildirilmiştir [40,155]. α-CD'de ise hidrojen kemeri tamamlanmamış durumdadır, çünkü moleküldeki bir glukopiranoz birimi bükülmüş

pozisyondadır. Buna bağlı olarak 6 hidrojen bağı yerine 4 hidrojen bağı oluşabilmektedir. γ-CD ise oldukça esnek bir yapıya sahip olduğundan çözünürlüğü en yüksek olan CD'dir [43].

Tablo 2.3: Siklodekstrinlerin özellikleri [153,154]

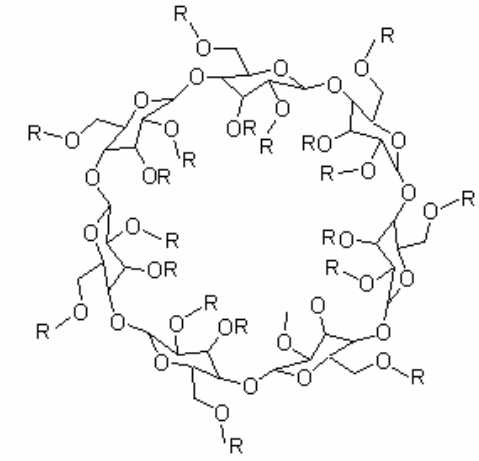
Özellik	α-CD	β-CD	γ-CD
Glikoz birim sayısı	6	7	8
Molekül ağırlığı	972	1135	1297
25^{o} C'de sudaki çözünürlük (% w/v)	14.5	1.85	23.2
Dış çap (A^{o})	14.6	15.4	17.5
Kavite çapı (A^{o})	4.7-5.3	6.0-6.5	7.5-8.3
Yüksekliği (A^{o})	7.9	7.9	7.9
Kavite hacmi (A^{o})	174	262	427

2.7.2. Modifiye Siklodekstrinler

CD'lerin suda çözünürlükleri aynı glikoz birimine sahip olan doğrusal dekstrinlere oranla oldukça düşüktür [156]. Bu nedenle, suda çözünen CD türevleri elde edebilmek için CD'ler modifiye edilebilmektedir [157]. CD'lerde her bir glukopiranoz biriminde fonksiyonları ve reaktiviteleri birbirinden farklı olan 3 serbest hidroksil grubu bulunmaktadır. Örneğin, bir β-CD molekülünde 21 hidroksil grubu aminasyon, esterifikasyon ve eterifikasyon gibi yöntemlerle çeşitli fonksiyonel grupların bağlanması ile modifiye edilebilmektedir [157,158]. Bir bazik çözeltide çözündürülmüş propilen oksit ile muamele edilmesiyle, 2-hidroksi propil β-CD'ler oluşmakta ve böylece çözünürlüğü %1.85'ten (w/v) %60'a (w/v) çıkarılabilmektedir [153,157].

CD'lerin modifikasyonları, genellikle fonksiyonel grupların moleküldeki hidroksil gruplarına rastgele yerleştirilmesi ile kısmi olarak yapılmaktadır. Hidroksil gruplarının tamamına fonksiyonel grupların yerleştirilmesiyle elde edilen modifiye CD'lerin çözünürlüklerinin kısmi olarak modifiye edilenlere göre daha düşük olduğu belirtilmiştir [157]. CD'lerin kimyasal modifikasyonları ile çözünürlüklerinin arttırılmasının yanında ışık ve oksijene dayanıklılığı da arttırılmakta ve misafir molekülün kimyasal aktivitesinin kontrolüne yardımcı olmaktadır [149]. Günümüzde, çeşitli modifikasyonlarla 1500 farklı CD türevi yapılmış ve literatürde tanımlanmıştır.

Bunların 100'den fazlası saf kimyasal olarak pazarlanmaktadır. Ancak, bunların toksikolojik değerlendirmeleri çok pahalı ve zaman alan süreçler olduğu için, sadece birkaç modifiye CD'nin endüstriyel uygulamalarına izin verilmektedir. Yeni modifiye edilmiş CD'ler aslında kullanılanlardan daha iyi özelliklerde olmadığından bunların kullanım alanlarının çok yavaş artacağı veya gelişeceği belirtilmiştir [157]. Endüstriyel olarak kullanılan modifiye CD'ler: R-M-β-CD (rastgele metillenmiş β-CD), HP- β-CD (hidroksipropil β-CD), HE-β-CD (hidroksietil β-CD), DM-β-CD (heptakis (2,6-dimetil) β-CD), TM-β-CD (heptakis (2,3,6 trimetil) β-CD)'dir (Şekil 2.22) [149].



Hidroksi-etil β-siklodekstrin, R= CH_3CH_2OH veya H
Hidroksi-propil β-siklodekstrin, R= $CH_2CHOHCH_3$ veya H
Metil β-siklodekstrin (M-β-CD), R= CH_3 veya H)

Şekil 2.22: Modifiye siklodekstrinlerden bazılarının kimyasal yapıları

2.7.3. İçerme Komplekslerinin Oluşum Mekanizması

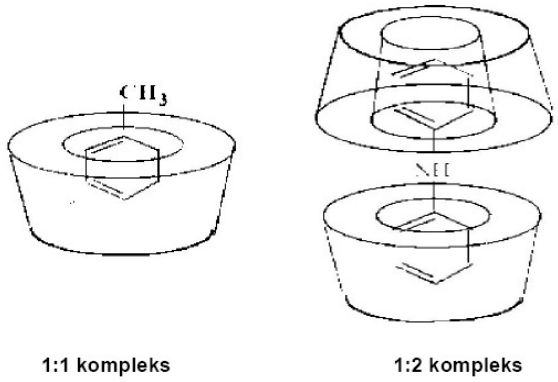
Siklodekstrinler polar hidrofilik bir dış yüzeye ve hidrofilik ortamda hidrofob bileşiklere ev sahipliği yapmalarını sağlayan hidrofobik bir iç yüzeye sahiptir. Siklodekstrin molekülünün içindeki boşluğun başka bir molekül tarafından doldurulmasıyla oluşan komplekse içerme kompleksi adı verilmektedir. Bu komplekslerde misafir molekül siklodekstrin (ev sahibi) boşluğu tarafından tutulmaktadır [153]. Kompleks oluşumu sonrası misafir molekülün bazı fiziksel özellikleri değişebilmektedir. Örneğin oksidasyon, hidroliz ve fotokimyasal reaksiyonlara karşı dayanımı artabilmekte, uçucu maddelerin buharlaşma hızları önemli ölçüde azalabilmekte ve bunların daha kontrollü ve kademeli olarak serbest bırakılması sağlanabilmektedir. Ayrıca düşük çözünürlüğe sahip maddelerin, kompleks formundayken çözünürlükleri artmaktadır. Siklodekstrinler; kozmetik, ilaç ve besin endüstrisinde kompleksleme ajanı olarak kullanılarak ilaç, vitamin, besin boyaları gibi

çeşitli bileşiklerin sudaki çözünürlüğünü arttırmaktadırlar [40-42]. Siklodekstrin içerme prosesi sonucunda misafir moleküllerin fizikokimyasal ve farmasötik özellikleri değiştirilerek çözünürlüğün arttırılması, kimyasal stabilite ve biyoyararlanımın geliştirilmesi, toksisitenin azaltılması gibi sonuçlar görülmektedir [43,44]. CD'lerin sulu çözeltilerinde kavitedeki su molekülleri ile kavite arasında apolar-polar etkileşim olduğundan ortamın entalpisi yüksektir. Ortama apolar bir bileşik (misafir) ilave edildiğinde su molekülleri kaviteden ayrılır, misafir moleküller kavite ile apolar-apolar etkileşim sağlayarak kavitenin zorlanması azalır ve daha stabil ve düşük enerjili bir yapı oluşur [42,43,149]. Kompleks oluşumunun temel itici gücü entalpice zengin su moleküllerinin kaviteden ayrılmasıdır [155]. İçerme kompleksleri oldukça stabildirler ve ortamdan kristalizasyonla kolayca ayrılabilmektedirler [150]. Misafir moleküllerin CD'ye bağlanması sabit veya kalıcı değildir, ancak, dinamik bir denge söz konusudur. Bağlanma gücü ev sahibi-misafir moleküllerin birbirlerine uygunluğuna ve yüzey atomları arasındaki lokal özgül etkileşime bağlıdır. Siklodekstrin ile misafir molekülleri arasında hidrojen köprüleri, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşim gibi kovalent olmayan fiziksel etkileşimler meydana gelmekte ve çözeltide dissosiasyon-assosiasyon dengesi oluşmaktadır [153,159]. Siklodekstrinlerin içerme kompleksi oluşturmalarında 2 önemli faktör rol oynamaktadır. Bunlardan birincisi, kompleks oluşturacak kimyasal maddenin boyutu veya misafir moleküldeki fonksiyonel gruplardır. Siklodekstrinler sadece kavitasyon çapına uygun büyüklükteki moleküllerle içerme kompleksi oluşturabilmektedir. İyi bir kompleks oluşumu için bağlanacak molekülün siklodekstrinin boşluğunu doldurması ve boşluğun çeperleri ile temas halinde olması gerekmektedir. İkinci önemli faktör ise; siklodekstrin, misafir molekül ve çözücü arasındaki termodinamiksel etkileşimdir. Kompleks oluşması için misafiri siklodekstrinin içine itecek bir kuvvet olmalıdır.

Her üç CD'nin de kavite yükseklikleri aynı olduğu için, glikoz ünitesi sayısı sadece kavitenin çap ve hacmini belirlemektedir. Bu boyutlara göre α-CD'ler tipik olarak düşük moleküllü veya alifatik yan zincirli bileşiklerle, β-CD'ler aromatik ve hete-rosiklik bileşiklerle, γ-CD ise makrosiklik ve steroidler gibi daha büyük moleküllerle kompleks oluşturabilmektedirler [153]. CD'lerle içerme kompleksleri oluşturulurken, misafir moleküller ev sahibi kavitesinde geçici olarak hapsedildiği veya kilitlendiği için, misafir moleküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinde önemli değişiklikler

oluşur [149]. CD'lerin kompleks oluşumu ile en önemli kullanım amacı çözünürlüğü az olan bileşiklerin sudaki çözünürlüğünü arttırmaktır [160]. Bunun yanında moleküllerin ısı, ışık ve oksidasyonun yıkıcı etkilerine karşı koruyarak ürünlerin raf ömrünün uzatılması, istenmeyen koku ve tatların maskelenmesi gibi pek çok amaçla da kullanılabilmektedir [149,150].

Siklodekstrin boşluklarının değişik boyutlarda olması birden fazla içerme kompleksi oluşma olanağını sağlayabilmektedir. Böylece değişik boyutlardaki moleküllerle kompleks oluşabilmektedir. γ-siklodekstrin daha geniş kavitasyona sahip olması nedeniyle α- ve β-CD'lerden farklı olarak üçlü içerme kompleksi oluşturabilmektedir. Genellikle misafir molekül ile siklodekstrin arasında kompleks oluşurken 1:1 stokiometrik oran beklenmektedir. Ancak bazı bileşiklerde 1:2 veya 2:1 kompleks oluşumu gözlenebilmektedir (Şekil 2.23). 1:2 kompleks oluşumunda misafir molekülün her iki ucu ayrı bir siklodekstrin tarafından tutulmaktadır. 2:1 kompleks oluşumunda ise iki misafir molekül bir CD ile kompleks oluşturmaktadır [161].



Şekil 2.23: İçerme kompleksleri stökiyometri oranları [161]

Genel olarak, kompleks oluşumu sırasında, dengeyi içerme kompleksi oluşum yönüne kaydıracak, enerji açısından uygun 4 etkileşim bulunmaktadır. Bunlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

i) Apolar siklodekstrin boşluğundan polar su moleküllerinin çıkması

ii) Su moleküllerinin çıkması nedeniyle hidrojen bağlarının sayısındaki artış

iii) Hidrofobik misafir molekülü ile sulu ortam arasındaki itici etkileşimlerin azaltılması

iv) Misafir molekülün siklodekstrinin apolar boşluğuna girmesi ile hidrofobik etkileşimlerin artması [153]

2.7.4. İçerme Komplekslerinin Oluşum Sabitlerinin Eldesi

Ortamda serbest moleküller ile CD boşluğuna yönelen moleküller bir denge halindedir. "Molekül-CD" komplekslerinin kararlılık (K_s) veya oluşum sabitinin (K_f) ölçümü önemlidir. Çünkü bu sabit, misafir bileşiğin fizikokimyasal özelliklerinin değişiminin bir göstergesidir. K sabitlerini belirlemede kullanılan yöntemlerin çoğu misafir molekülün fizikokimyasal özelliklerindeki değişimlere dayanmaktadır. Molekül-CD komplekslerindeki denge

$$CD + G \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftarrows}} CD\text{-}G \qquad (2.18)$$

şeklinde yazılabilir (CD: Siklodekstrin, G: Misafir molekül). Denge sabiti ise, $K_c = K_1 / K_2$ şeklinde belirtilir.

Kompleks sistemlerin büyük bir kısmı oda sıcaklığında hızla dengeye ulaştığından, bu sistemler denge yaklaşımı ile incelenebilir. Kararlılık sabitinin (K_s) kompleks oluşum stokiometrisini de göstermesi açısından $K_{m:n}$ şeklinde gösterilmesi daha uygun olmaktadır. Bu durumda:

$$\underset{(a-mx)}{m\,CD} + \underset{(b-nx)}{n\,G} \overset{K_{m:n}}{\rightleftarrows} \underset{(x)}{CD_mG_n} \qquad (2.19)$$

ve assosiasyon sabiti,

$$K_{m:n} = x / [(a-mx)^m . (b-nx)^n] \qquad (2.20)$$

şeklinde gösterilebilmektedir.

Dissosiasyon sabiti de,

$$K_d = [(a-mx)^m . (b-nx)^n] / x = 1 / K_s \text{ veya } 1 / K_{m:n} \qquad (2.21)$$

şeklinde ifade edilebilmektedir. Denge derişimlerinin bulunması, ortamdaki çeşitli türlerin nicel özellikleri, iletkenlikleri, optik absorpsiyonları gibi fiziksel özelliklerinin ölçümü temeline dayanmaktadır [153].

Siklodekstrinlerle kompleks oluşumunda sıkça kullanılan analitik yaklaşımlardan biri Higuchi ve Connors tarafından belirtilen faz-çözünürlük yöntemidir [162]. Bu yöntem, çözünmesi istenen moleküle siklodekstrin veya ligand gibi çözündürücü moleküllerin etkisini içermektedir. Deneysel olarak, misafir bileşiğin aşırısı farklı derişimlere sahip siklodekstrin çözeltilerine eklenerek belli bir sıcaklıkta ve belli bir süre karıştırılmak

suretiyle reaksiyona sokulur. Dengeye ulaşıldıktan sonra her bir çözelti spektrofotometrik olarak analizlenir ve misafir bileşiğin ne kadarının çözündüğü hesaplanır. Çözünen madde miktarı ile siklodekstrin konsantrasyonu arasında faz-çözünürlük diagramları oluşturulur. Eğer 1:1 kompleks oluşumu söz konusuysa aşağıdaki denkleme göre lineer faz diagramlarının eğiminden yararlanılarak komplekslerin kararlılık sabitleri elde edilir.

$$K_s = \frac{eğim}{S_o(1-eğim)} \qquad (S_o\text{:çözünürlük}) \qquad (2.22)$$

Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG^o), standart entalpi değişimi (ΔH^o) ve standart entropi değişimi (ΔS^o) gibi termodinamik parametreler, siklodekstrin kompleksinin stabilite sabitinin sıcaklık bağımlılığından elde edilebilir. Reaksiyonun serbest enerjisi, aşağıdaki bağıntı kullanılarak denge sabitinden türetilmektedir:

$$\Delta G^o = -R.T.\ln K_{1:1} \qquad (2.22)$$

Reaksiyonun entalpisi farklı sıcaklıklarda elde edilen $K_{1:1}$ değerlerini kullanarak, Van't Hoff denklemiyle hesaplanabilmektedir. Eğer iki farklı sıcaklıkta K_s değerleri belirlenmiş ise:

$$\text{Log}\,(K_2/K_1) = [-\Delta H^o / (2{,}303.R)].[(T_2-T_1)/ T_1.T_2)] \qquad (2.23)$$

denklemi elde edilir. Kompleks oluşturma reaksiyonunun entropisi ise;

$$\Delta G^o = \Delta H^o - T.\Delta S^o \qquad (2.24)$$

denklemi kullanılarak hesaplanabilmektedir.

Kompleks oluşumu oldukça büyük ve negatif bir ΔH^o değeri ile pozitif veya negatif olabilen bir ΔS^o değeri ile birleşmiş olup, aynı zamanda misafir moleküllerin özelliklerine de bağlıdır [153]. ΔH^o değerinin negatif olması siklodekstrinler ile misafir molekülleri arasındaki etkileşimin ekzotermik olduğunu göstermektedir. Bu molekülleri birbirine bağlamada en etkin güç hidrofobik etkileşimdir ve etkileşim bu negatif ΔS^o değerleriyle birlikte oluşmaktadır. Sıcaklığın artmasıyla hidrojen bağları kırılır ve entropi etkisi düşer. Ayrıca, ΔH^o daha ekzotermik hale gelir ve etkisi oldukça mühimdir [163]. Klasik hidrofobik etkileşimler entropi üzerinden yürümekle birlikte siklodekstrin kompleksleşmesi bu gruba dahil değildir, aksine bu proses entalpik olarak yürüyen proseslerdendir. Çünkü, CD'lerin sulu çözeltilerinde kavitedeki su molekülleri hidrojen bağlama potansiyellerini göstermediklerinden ortamın entalpisi yüksektir. Ortama sudan daha az polar bir bileşik (misafir) ilave edildiğinde su molekülleri ile misafir moleküller

yer değiştirir ve misafir moleküller kavite ile apolar-apolar etkileşim sağlayacağından sistemin enerjisi azalır [153].

Connors, bir kompleksin hesaplanan stökiyometrisi yanlış olduğunda, hesaplanan stabilite sabitinin de tamamen yanlış olacağını belirtmektedir [38]. Kararlılık sabitlerinin tayininde en çok kullanılan yöntemler, potansiyometri, polarografi, amperometri, spektroskopi ve diğer optik yöntemler ile çözünürlük ve sıvı-sıvı dağılımını esas alan yöntemlerdir. Deneysel koşullara göre değişik yöntemler kullanılmasına karşın genel de potansiyometrik (elektrokimyasal) ve spektroskopik yöntemler tercih edilmektedir.

i) Potansiyometrik yöntem: Bu yöntem çalışma kolaylığı ve kesinliği nedeniyle kararlılık sabitlerinin tayininde oldukça sık kullanılmaktadır. Ancak her zaman uygun bir çalışma elektrodunun bulunamaması ve çok seyreltik çözeltilerde çalışılamaması bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır.

ii) Spektroskopik yöntem: Bu yöntem misafir molekülün çözeltide siklodekstrin ile kompleks oluşturduktan sonra absorptivitesindeki değişiklik esasına dayanmaktadır. Yöntemin kullanımı basit kompleksler dışındaki ortamlarda, parametre sayısı çok arttığı için sınırlıdır [161].

Siklodekstrinlerle misafir moleküllerin etkileşimi sonucu oluşan içerme komplekslerinin oluşum sabitlerinin (K_f) belirlenmesinde Benesi-Hildebrand denklemi [164] literatürde sıklıkla kullanılmaktadır. Misafir molekülün aşırısında ve artan siklodekstrin derişimlerinde UV-vis absorpsiyonu ve/veya floresans spektrumlarındaki değişimleri analiz ederek oluşum sabitleri hesaplanabilmektedir. Aşağıda kararlı-hal (steady-state) florimetrik ölçümlere göre modifiye edilmiş Benesi-Hildebrand denklemi görülmektedir:

$$\frac{1}{[F - F_o]} = \frac{1}{\Delta F_{\max}} + \frac{1}{(\Delta F_{\max} K_f [CD])} \qquad (2.25)$$

F: Kompleks haldeki antioksidanın floresans intensitesi

F_0: Serbest haldeki antioksidanın floresans intensitesi

ΔF_{max}: Doymuş haldeki antioksidanın floresans intensitesi

K_f: İçerme sabiti veya oluşum sabiti

[CD]: Toplam siklodekstrin konsantrasyonu

$\frac{1}{[F-F_o]} = y$; $\frac{1}{[CD]} = x$; $\frac{1}{\Delta F_{max}} = kayım$; $\frac{1}{(\Delta F_{max} K_f)} = eğim$ ise; K_f = kayım x eğim^{-1} olarak ifade edilmektedir. Benesi-Hildebrand denklemine göre 1/[CD] ile 1/ΔF değerleri arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin kayım ve eğim değerleri kullanılarak [kayım/eğim] oranından içerme komplekslerinin oluşum sabitleri hesaplanmaktadır. 1/ΔF ile 1/[CD] arasında çizilen grafiklerin doğrusallığı (resiprokal doğrusal eğriler) elde edilen içerme komplekslerinin 1:1 oranda kompleks oluşturduğunu göstermektedir.

2.7.5. İçerme Kompleksi Oluşumunu Etkileyen Faktörler

İçerme kompleksi oluşumunu etkileyen faktörler aşağıda özetlenmektedir:

a) Çözelti Dinamiği: Kristal formdayken siklodekstrinin sadece yüzeydeki molekülleri kompleks oluşturmaya uygundur. Çözelti formunda ise daha fazla siklodekstrin molekülü kompleks yapmaya elverişli hale gelmektedir. Isıtma, siklodekstrinin ve bunun yanı sıra misafir molekülün çözünürlüğünü arttırmakta ve bu da kompleks oluşturma ihtimalini yükseltmektedir. Misafir molekül çözünebilir formdaysa veya ince partiküller halinde disperse olmuş ise kompleks oluşumu daha hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir.

b) Sıcaklık Etkisi: Sıcaklığın siklodekstrin kompleksleri üzerinde birden çok etkisi vardır. Sıcaklık kompleksin çözünürlüğünü arttırırken aynı zamanda stabilitesini düşürebilmektedir. Bu etkilerin genellikle dengelenmesi gerekmektedir. Kompleksin ısı dayanımı misafir molekülden moleküle farklılık göstermektedir. Çoğu kompleks 50-60^o C'da parçalanmaya başlarken, özellikle misafir molekülün güçlü bağlarla tutunduğu veya çözünürlüğü düşük olan kompleksler daha yüksek sıcaklıklara dayanabilmektedir.

c) Çözücülerin Kullanımı: Su kompleksleşme reaksiyonlarının gerçekleştirilmesinde en çok kullanılan çözücüdür. Çözücü içinde ne kadar çözünmüş siklodekstrin varsa o kadar molekül kompleksleşme için uygun duruma gelir. Eğer çözücü siklodekstrin ile kompleks oluşturmuşsa, misafir molekül siklodekstrin boşluğundaki çözücü ile yer değiştirme yeteneğine sahip olmalıdır. Örneğin su çok kolay bir şekilde yer değiştirebilmektedir. Eğer çözücü içermeyen kompleksler isteniyorsa kullanılan çözücü kolaylıkla uzaklaştırılabilir olmalıdır. Bütün misafirler su içinde çözünmeye hazır durumda değildir. Bu durum kompleks oluşumunun çok yavaş (veya imkansız) olmasına yol açmaktadır. Bazı durumlarda misafir molekülü çözmek için organik çözücü kullanımı gerekmektedir. Bu çözücü siklodekstrin ile kompleks oluşturmamalı

ve buharlaşma ile kolayca uzaklaştırılabilmelidir. Etanol ve dietil eter, bu tip çözücülere iyi örneklerdir.

d) Suyun Etkisi: Su miktarı arttıkça siklodekstrin ve misafir molekülün çözünürlüğü artmakta ve böylece kompleksleşme daha kolay oluşmaktadır. Fakat su miktarının çok fazla arttırılması durumunda, siklodekstrin ve misafir molekülün çözeltisi daha konsantre çözeltilerdeki kadar birbirlerine temas edemeyecek şekilde seyreltikleşmiş olmaktadır. Kompleksleşmenin yeterince hızlı bir şekilde gerçekleşmesini sağlamak için su miktarının yeterince düşük tutulması gerekmektedir. Yağlar gibi yüksek molekül ağırlığındaki bileşiklerin siklodekstrin ile etkileşmekten çok birbirleriyle ilişki kurma eğilimleri vardır. Bu gibi durumlarda, daha fazla miktarda ve iyi karıştırılarak su kullanımı, yağ moleküllerini birbirinden çok daha iyi izole edecek ve onların daha iyi disperse olmalarını sağlayacaktır. Yağ molekülleri siklodekstrin ile temas haline geldiğinde daha az miktarda suyun kullanıldığı duruma kıyasla daha yüksek stabilitede kompleks oluşturmaktadır [153].

2.7.6. İçerme Kompleksleri Oluşturma ve Analiz Yöntemleri

İçerme kompleksleri çözelti ve katı formda olmak üzere aşağıdaki teknikler kullanılarak hazırlanmaktadır:

(i) Sıvı karışım (liquid mixture) yöntemi
(ii) Birlikte çöktürme (Co-precipitation) yöntemi
(iii) Birlikte buharlaştırma (Co-evaporation) yöntemi
(iv) Sulu hamur (Slurry) kompleksleşmesi
(v) Pasta (Paste) kompleksleşmesi
(vi) Nemli karıştırma ve ısıtma (Damp mixing and heating) yöntemi
(vii) Ekstrüksiyon (Extrusion) yöntemi
(viii) Kuru karıştırma (Dry mixing) yöntemi [153]

İçerme kompleksleri fizikokimyasal ve termodinamik yöntemlerle çabuk ve direkt olarak analiz edilebilmektedir. İçerme komplekslerinin oluşumu için gerekli olan enerji ve stabilite sabiti çeşitli yöntemlerle tayin edilmektedir:

(i) X-ışını kırınımı yöntemi: Bu yöntem içerme kompleks oluşumunun tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Eğer X-ışını kaynaktan belli bir açıyla toz maddeler

üzerine düşürülürse, maddenin kristal yapısına göre kırınıma uğrayarak, maddenin durumuna ilişkin ve bir dedektör tarafından algılanabilen yükseklikte pikler vermektedir. Kristal yapıya ait kırınım sonucu dedektörlerle algılanabilen inişli çıkışlı eğriler, incelenen her bir madde için karakteristiktir. Eğer içerme kompleksi oluşmuşsa, kompleksin X-ışını analiz sonuçlarında belirgin farklılıklar görülmektedir.

(ii) Termal yöntemler: Bu yöntemlerin başlıcaları termodinamik sistem (TAS), diferansiyel tarama kalorimetrisi (DSC) ve diferansiyel termal analiz (DTA) yöntemleridir. Bu yöntemlerden DTA yöntemi, sıcaklığın bir fonksiyonu olarak faz dönüşmesinin neden olduğu endotermik ve ekzotermik entalpi değişikliklerini saptamaktadır. DSC ise fazların dönüşüm ısılarını kantitatif olarak saptamaktadır. DSC ile kimyasal maddenin saflık kontrolü de yapılabilmektedir.

(iii) Nükleer magnetik rezonans yöntemi: İçerme komplekslerinin tayininde kullanılan en önemli yöntemlerden biridir. Siklodekstrinin ve etken maddenin belirli yerlerinin magnetik alanda sinyallerin değişimlerinden siklodekstrin ile etken madde arasındaki etkileşimin olduğu yerler saptanabilmektedir. Misafir molekül ve misafir molekülün siklodekstrin ile oluşturduğu içerme kompleksinin, NMR spektrumları karşılaştırıldığında bir değişim varsa, bu durum siklodekstrin ile misafir molekül arasında etkileşim olduğu anlamına gelmektedir.

(iv)Kromatografik yöntem: Bu yöntem genellikle uçucu maddeler için kullanılmaktadır. Eğer kompleks bir çözücüde dayanıklı ise ince tabaka kromatografisi uygulanabilmektedir. Sıvı kromatografisi, misafir molekülün minimum miktarı kullanıldığı zaman oluşan siklodekstrin komplekslerinin stabilite sabitlerini tayin etmek için de kullanılmaktadır.

(v) Spektroskopik yöntemler: Ultraviyole (UV), infrared spektroskopisi (IR) ve floresans spektroskopileri içerme kompleksi oluşup oluşmadığını tayin etmek için uygun birer yöntemdir. Bir etken maddenin siklodekstrin ile etkileşim ve bağlanma durumları, UV ve görünür bölge spektrumları incelendiğinde piklerde meydana gelen hipsokromik veya batokromik kaymalara bakılarak anlaşılabilmektedir [161].

2.8. ANTİOKSİDAN-SİKLODEKSTRİN İÇERME KOMPLEKSLERİ İLE İLGİLİ UYGULAMALAR

Geçmiş yıllarda kuersetin [35,46,53,56-59], morin [35,54], rutin [46,60,61], klorojenik asit [47,62], resveratrol [45,63], izokuersitrin [64] ve kaempferol [56,59] gibi antioksidanların siklodekstrinlerle etkileşmesi ile ilgili birçok makale yayınlanmıştır. Bu yayınlarda içerme komplekslerinin oluşumu diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC), X-ışını difraktometrisi (XRPD), proton manyetik rezonans (1H-NMR), UV-görünür bölge spektroskopisi (UV-Vis), Fourier transform-infrared spektroskopisi (FT-IR) ve floresans spektroskopisi (FL) yöntemleri kullanılarak kanıtlanmıştır. Yüksek duyarlılık, seçimlilik ve enstrümental kolaylığından dolayı floresans yöntemler, antioksidanların içerme komplekslerinin oluşumundaki olayların araştırılmasında ve kompleks oluşum sabitlerinin belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Calabro ve arkadaşları, 3-hidroksiflavon, morin ve kuersetin gibi bazı flavonoidlerin α- ve β-CD ile birlikte buharlaştırma yöntemiyle elde edilen içerme komplekslerinin yapısal özelliklerini, stokiyometrik oranlarını ve kararlılık sabitlerini faz-çözünürlük çalışmaları ile belirlemişlerdir. Flavonollerin antioksidan aktiviteleri üzerine moleküler kuşatmanın (encapsulation) etkisi; batofenantrolin testi, Comet yöntemi ve lipid peroksidasyon gibi biyolojik yöntemlerle belirlenmiştir. Yazarlar, siklodekstrinlerle kompleksleşmenin hem antioksidan aktiviteyi geliştirdiğini hem de biyolojik yapılarda çözünürlüğü arttırdığını gözlemlemişlerdir [35].

Stražišar ve arkadaşları [52], *o*-, *m*- ve *p*-kumarik asidin (COU) β-CD ile 1:1 oranda içerme komplekslerini oluşturup K_f değerlerini sırasıyla faz-çözünürlük diagramlarından yararlanarak 390 M^{-1}, 2810 M^{-1} ve 49000 M^{-1} olarak ölçmüşlerdir. *o*-COU-β-CD ve *m*-COU-β-CD komplekslerinin antioksidan aktivitesi serbest formlarında göstermiş oldukları aktiviteye oranla artarken *p*-COU-β-CD kompleksinin aktivitesinde bir değişiklik gözlenmemiştir.

Bazı çay kateşinlerinin doğal β-CD ve 2 tane türevlendirilmiş β-CD (HP-β-CD ve DM-β-CD) ile içerme komplekslerinin antioksidan aktiviteleri ORAC-FL (floresein) ve ORAC-PGR (pirogallol kırmızısı) yöntemleriyle incelenen bir çalışmada, multi-

belirleme mikroplaka okuyucu kullanılarak CD yokluğunda ve varlığında hazırlanan kateşinlerin antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir. ORAC-FL yöntemine göre antioksidan etkinliklerinin epigallokateşin gallat (EGCG) ve gallokateşingallat (GCG) için kompleksleşme ile 2 kat arttığı gözlenirken kateşin için antioksidan kapasitenin düştüğü görülmüştür. İçerme dengesinde serbest kateşin (CT) ve EGCG yüzdesi β-CD > HP-β-CD > DM-β-CD şeklinde bulunmuştur. Kompleksleşmenin, A halkası üzerinden gerçekleştiği ve B halkasındaki hidroksil ve galloil gruplarının kavite dışında kaldığı belirtilmiştir [165].

Bergonzi ve ekibi [59] galangin, kaempferol ve kuersetinin α-CD, β-CD ve γ-CD'lerle içerme komplekslerini dondurarak kurutma (freeze-drying) ve hamur yoğurma (kneading) teknikleri kullanarak oluşturmuştur. DSC, IR ve NMR yöntemleri ile komplekslerin karakterizasyonu yapılmıştır. Flavonollerin siklodekstrinler varlığındaki suda çözünürlüğü hesaplanmış ve β-CD varlığında kuersetin ve kaempferolün çözünürlüğünün arttığı belirlenmiştir.

Mercader-Ros ve ekibi benzer şekilde kuersetin, kaempferol ve mirisetinin HP-β-CD'ler varlığında, antioksidan kapasitelerindeki değişimi incelemişler ve her birinin çözünürlüklerini, oluşum sabitlerini ve ortamda kompleksleşmeden kalan serbest flavonol derişimini hesaplamışlardır. K_f değerleri sırayla 1411, 900 ve 850 M^{-1} olarak belirtilmiştir. Farklı siklodekstrin derişimlerinde çalışılmış ve troloks eşdeğeri antioksidan kapasitenin HP-β-CD derişimi arttıkça arttığı gözlenmiştir [57].

Alvarez Parilla ve ekibi önemli elma polifenolleri olan klorojenik asid, rutin ve kuersetinin β-CD ile kompleksleşmesi ve antioksidan aktivitesi üzerine yaptıkları çalışmada, floresans spektroskopisi kullanarak Benesi-Hildebrand denkleminden kompleks stabilite sabitlerini hesaplayıp komplekslerin oluşumunu DSC ölçüm sonuçlarına göre doğrulamışlardır. Stabilite sabitleri kuersetin için 1138 M^{-1}, klorojenik asid için 465 M^{-1}, rutin için 224 M^{-1} olarak hesaplanmıştır. Her üç polifenolün komplekleşme sonucu antioksidan aktivitesinde %7-14 arasında değişen oranlarda artış meydana gelmiştir [46].

Jullian ve arkadaşları, kuersetinin (QR) üç farklı β-CD ile içerme kompleksleri üzerine yaptıkları çalışmada faz-çözünürlük diagramlarından elde edilen sonuçlara göre 1:1 oranında kompleks oluşumu gözlendiği, siklodekstrinler arasında kuersetin ile kompleksleşme yeteneğinin büyükten küçüğe HP-β-CD > sülfobutil eter-β-CD (SBE-β-CD) > β-CD şeklinde olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmada kuersetin ve CD komplekslerinin antioksidan etkinliği DPPH yöntemine göre yapılmış ve QR-SBE-β-CD kompleksinin en reaktif tür olduğu belirtilmiştir [53].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada; kimyasal maddelerin ve gerçek örneklerin tartımı için RADWAG marka Was 220X model analitik terazi, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Elektromag (Türkiye) girdap karıştırıcı, şifalı bitki ekstraklarının hazırlanmasında Adams Dynac santrifüj cihazı ve Ultra-Turrax CAT X-620 model homojenizatör (Staufen, Almanya), çözeltilerin pH'larının belirlenmesinde E512 Metrohm Herisau pH-metre, inkübasyon işlemi için IKA HB4 basic su banyosu, örneklerin kurutulmasında Telstar Cyrodos (İspanya) dondurarak kurutucu (freeze-dryer) cihazı, absorbans ölçümlerinde Varian Cary 100 Bio model UV-görünür alan spektrofotometresi ve Varian CARY 1E UV-görünür alan spektrofotometresi (CA, USA) ve ölçüm yapmak için 1 çift 1 cm'lik Hellma (Müllheim, Almanya) kuartz küvet, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, HPLC analizleri için Waters Breeze^{TM} 2 Model HPLC cihazı (Milford, MA, USA): 1525 model ikili pompa, termostatlı kolon fırını, 2998 model fotodiyot dizisi dedektör (PDA) (Chelmsford, MA, USA), Hamilton marka 25 µL-şırınga (Reno, NV, USA), ACE C18 analitik kolon (4.6 mm×250 mm, 5 µm) (Milford, MA, USA) kullanılmıştır. Waters HPLC sistemi data analizleri Empower PRO (Waters Associates, Milford, MA, USA) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. HPLC-kolon sonrası sisteminde yer alan RXN-100 reaksiyon sarmalı (hacim 1 mL, yaklaşık toplam uzunluk 5 m, Waters) içeren reaksiyon modülü (Waters, USA) kullanılmıştır. Spektroflorometrik ölçümler için spektroflorimetrik ölçümler için Perkin Elmer LS55 Luminesans Spektrofotometre (USA) ve 1 adet 1 cm'lik Hellma (Müllheim, Almanya) semi-mikro floresans kuartz küvet, infrared spektrometrik ölçümler için Digilab Excalibur-FTS 3000 MX model (USA) infrared spektrometre cihazı kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler: neokuproin (Nc) (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin), gallik asid (GA), klorojenik asid (CA), kuersetin (QR), rutin (RT), rozmarinik asid (RA), naringenin (NG), asetonitril, ferulik asid (FRA), *p*-kumarik asid (*p*-COU), troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asid) (TR), E vitamini (vit E), glutatyon (GSH), kateşin (CT), (-)epigallokateşin gallat (EGCG), (-)epikateşin gallat (ECG), (-)epigallokateşin (EGC), (-)epikateşin (EC), butillenmiş hidroksi anizol (BHA), butillenmiş hidroksi toluen (BHT), tersiyer butil hidrokinon (TBHQ), mutlak etil alkol (EtOH), hidroklorik asid (HCl), metanol (MeOH), glasiyal asetik asid (HAc), sodyum asetat trihidrat ($NaAc.3H_2O$), demir(III) klorür hekza hidrat ($FeCl_3.6H_2O$), ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin 6-sülfonik asid) diamonyum tuzu), TPTZ (2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazin), lauril gallat (LG), potasyum persülfat ($K_2S_2O_8$), diklorometan (DCM), luteolin (LT), apigenin (APG), mirisetin (MR), kafeik asid (CFA), disodyum hidrojen fosfat dihidrat ($Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$), sodyum dihidrojen fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4{\cdot}2H_2O$), amonyum dihidrojenfosfat ($NH_4H_2PO_4$), *o*-fosforik asit (H_3PO_4) kullanılmıştır. Kullanılan kimyasallar analitik saflıktadır.

Yeşil çay, mercanköşk ve nane Malatya Pazarı A.Ş., siyah çay Çaykur A.Ş.'den temin edilmiştir.

3.3. ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerine Çözücü Etkisi Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

i-) **Polifenolik bileşikler:** Standart antioksidan bileşiklerin 10^{-3} M'lık çözeltileri %100 EtOH, %100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v), DCM/EtOH (9:1, v/v) içerisinde hazırlandı. Glutatyon % 100 MeOH ortamında çözünmediğinden %99 MeOH/H_2O (v/v) içinde hazırlanmıştır. E vitamini MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında çözünmediğinden ilgili çözeltileri hazırlanamamıştır.

ii-) **Yeşil çay ekstrelerinin hazırlanması:** Yeşil çay bitkisinden 2 g tartım alınarak MeOH/H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan yeşil çay ekstresi ilgili çözücüde bir

gece bekletildi [101] ve ardından Ultra-Turrax CAT X-620 homojenizatör cihazı kullanılarak homojenize edildi. Ekstreler katı kısımdan ayrılıp aynı işlem 3 defa 25 mL MeOH/H_2O (4:1, v/v) ile tekrarlandı. Ekstreler birleştirilip 10 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi ve santrifüj işleminden sonra adi süzgeç kağıdında süzülerek son hacim MeOH/H_2O (4:1, v/v) ile 100 mL'ye tamamlandı. Yeşil çay ekstresi ilgili analizler yapılana kadar buzdolabında (+4 ºC) bekletildi. Analiz öncesinde 0.45 μm-gözenek çaplı poliester filtreden (GF/PET-45/25) geçirilerek ilgili analizlerde kullanıldı [101].

Farklı çözücü ortamlarında yeşil çay ekstrelerinin toplam antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesi için MeOH/H_2O (4:1, v/v) ortamında hazırlanan yeşil çay numunesi 1:20 oranında seyreltildi. Seyreltilmiş ekstreden 2'şer mL alınıp ayrı ayrı tüplere konuldu ve dondurarak soğutucu (freeze-dryer) cihazında 1 saat boyunca kurutuldu. Kalıntılar 2 mL % 100 EtOH veya % 100 MeOH veya MeOH/H_2O (1:1, v/v) ile çözeltiye alınıp ilgili analizlerde kullanıldı.

Katkısız ve sentetik antioksidan (BHT) katkısı yapılmış yeşil çay ekstresinin toplam antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için MeOH/H_2O (4:1, v/v) ortamında hazırlanmış yeşil çay ekstresi 1:20 oranında seyreltildi. İki farklı şilifli erlene 4'er mL ekstre konup üzerine 1 mL 1 mM BHT çözeltisi (MeOH/H_2O (4:1, v/v)) veya 1 mL MeOH/H_2O (4:1, v/v) çözeltisi eklendi ve freeze dryer cihazında 1 saat boyunca kurutuldu. Kalıntı 2 mL MeOH/H_2O (4:1, v/v) ile çözeltiye alınıp ilgili analizlerde kullanıldı.

iii) **CUPRAC yöntemi:** Cu(II) klorür çözeltisi, $1.0x10^{-2}$ M olacak şekilde bakır(II) klorür dihidrat'tan ($CuCl_2.2H_2O$) 0.4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Amonyum asetat (NH_4Ac) tamponu, 1 M (pH=7.0) olacak şekilde NH_4Ac'dan 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Nc) çözeltisi, $7.5x10^{-3}$ M olacak şekilde 0.039 g tartım alınıp mutlak etil alkolle çözülüp 25 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

iv-) **ABTS-persülfat yöntemi:** ABTS'den 0.1920 g tartım alınıp su ile 50 mL'ye tamamlanarak 7 mM ABTS çözeltisi hazırlandı. ABTS stok çözeltisi içine, son konsantrasyonu 2.45 mM olacak şekilde 0.0331 g $K_2S_2O_8$ ilave edildi. Elde edilen $ABTS^{\cdot+}$ radikal çözeltisi, 12-16 h. boyunca karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten

sonra kullanıma hazır hale gelmektedir. Bu stok çözelti etil alkol ile 1:10 seyreltilerek kullanıldı.

v-) **FRAP yöntemi:** Demir(III) klorür çözeltisi, demir(III) klorür hekzahidrattan ($FeCl_3.6H_2O$) son konsantrasyonu 2 x 10^{-2} M olacak şekilde tartım alınıp 1 mL 1M HCl içinde çözülerek H_2O ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlandı. TPTZ çözeltisinin son konsantrasyonu 10^{-2} M olacak şekilde tartım alınarak 50 mL'ye %96'lık etil alkol ile tamamlanarak hazırlandı. pH=3.6 0.3 M asetik asit-sodyum asetat trihidrat tamponu, 3.1 g sodyum asetat trihidrat tartılıp 16 mL glasiyal asetik asit ile 1 L'ye su ile tamamlanarak hazırlandı. FRAP reaktifi sırasıyla 0.3 M $CH_3COOH/CH_3COONa.3H_2O$ tamponu (pH=3.6), 2 x 10^{-2} M $FeCl_3.6H_2O$ çözeltisi ve 10^{-2} M TPTZ reaktifi 10:1:1 oranında karıştırılarak hazırlandı.

3.3.2. Kolon-Sonrası Türevlendirmeli Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Bileşiklerin Tayininde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

i-) **Polifenolik bileşiklerin hazırlanması:** Antioksidan bileşiklerin standart çözeltileri 10 mM olacak şekilde metanolde hazırlandı. Apigenin (bazik ortamda çözündüğünden) stok çözeltisi KOH ve etanol karışımında hazırlandı. Tüm stok çözeltiler -20° C'de muhafaza edildi.

ii-) **Şifalı bitki ekstrelerinin hazırlanması:** Kuru şifalı bitki örnekleri değirmenden geçirildikten sonra her bir bitki örneğinden 2 g alınarak MeOH/H_2O (4:1, v/v) içerisinde bir gece bekletildi ve Güçlü ve arkadaşları [101] tarafından uygulanan ekstraksiyon yöntemine göre hazırlandı. İlgili analizler yapılana kadar buzdolabında (+4 ºC) bekletildi. Analiz öncesinde 0.45 μm-gözenek çaplı poliester filtreden (GF/PET-45/25) geçirilerek kullanıldı.

iii-) **CUPRAC reaktifinin hazırlanması:** Kolon sonrası reaksiyon modülünde kullanılmak için 10 mM bakır(II) klorür çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tampon çözeltisi bidestile su içinde hazırlandı. 7.5 mM neokuproin çözeltisi HPLC saflıkta etanolde hazırlandı. CUPRAC reaktifi bu çözeltilerin 1:1:1 (v/v/v) oranında karıştırılmasıyla hazırlandı. Analiz öncesi ve analiz süresince reaktif gün ışığına ve hava oksijenine karşı muhafaza edildi.

iv-) **HPLC yöntemi:** Gradient elüsyonun kullanıldığı HPLC analizinde hareketli faz metanol ve % 0.2 o-fosforik asid ikili sisteminden oluşmaktadır. % 0.2 o- fosforik asid çözeltisi, 2 mL o-fosforik asidin bidestile su ile 1 litreye tamamlanmasıyla hazırlandı.

3.3.3. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Doğal ve Türevlendirilmiş Siklodekstrinlerle İçerme Komplekslerinin Eldesi ve Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi Çalışmasında Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

i-) **Standart çözeltilerinin hazırlanması:** 1 mM standart antioksidan çözeltileri metanolde, 10 mM standart siklodekstrin (α-CD, β-CD, hidroksi-etil-β-CD, hidroksi-propil-β-CD, metil-β-CD) çözeltileri ve 0.5 M pH=7 fosfat tamponu (NaH_2PO_4/Na_2HPO_4) destile suda hazırlandı.

ii-) **Antioksidan-siklodekstrin sıvı içerme komplekslerinin hazırlanması:** Sulu içerme komplekslerin eldesi için literatürde mevcut olan bir yöntem uygulandı [47,62]. Tüplere ayrı ayrı 0.5'er mL 1 mM antioksidan çözeltisi konup üzerlerine 10 mM siklodekstrin çözeltilerinden son konsantrasyonları sırasıyla 0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 8 mM olacak şekilde ilave edildi. Bu çözelti karışımlarına 1'er mL 0.5 M pH 7 NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 tamponu eklenerek toplam 10 mL olacak şekilde destile su ile hacme tamamlandı. Ardından tüplerin ağızları kapatılıp vorteks karıştırıcıda 1 dakika süre ile karıştırıldı. Çözeltiler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltiler ilgili analizlerler için kullanıldı.

iii-) **Antioksidan-siklodekstrin katı içerme komplekslerinin hazırlanması:** Katı komplekslerin hazırlanması için 1 mmol CD ve 1 mmol antioksidan bileşiği 10 mL MeOH:H_2O (1:1, v/v) içerisinde çözülüp iyice karıştırıldı. Çözelti şilifli erlenlere aktarılıp 6 saat freeze dryer'da kurutuldu. Denemeler farklı CD'ler ile aynı şekilde tekrarlandı. Elde edilen katı kompleksler agat havanda toz hale getirildi ve ilgili analizlerde kullanıldı.

3.4. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.4.1. Polifenolik Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerine Çözücü Etkisi Çalışmasında Uygulanan Yöntemler

3.4.1.1. Spektrofotometrik CUPRAC Yöntemi

i-) Normal yöntem (N): Bir deney tüpü içerisine 10 mM bakır(II) çözeltisi, 7.5 mM neokuproin çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tampon çözeltisinden sırasıyla 1'er mL eklendi. Üzerine (x) mL 1 mM standart antioksidan çözeltisi ve (1.1-x) mL çözücü (polifenolik bileşiklerin hazırlandığı çözücü ortamı) ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 4.1 ml olacak şekilde çözeltiler hazırlandıktan sonra tüpler oda

koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı, oluşan Cu(I)-Nc kelatının renginin karakteristik dalgaboyu olan 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü.

1mL Cu(II) + 1mL Nc + 1mL NH_4Ac + x mL ArOH çöz. + (1.1-x) mL çözücü (3.1)

V_{toplam} = 4.1 mL

ii-) İnkübasyonlu yöntem (I): Normal prosedüre göre cam tüplerde hazırlanan çözeltiler, tüplerin ağızları kapatılarak 20 dakika boyunca 50°C'lik su banyosunda bekletildi. 20 dakika sonunda tüpler su banyosundan çıkarılıp musluk suyu altında soğutuldu ve beklemeden referansa karşı 450 nm'de absorbansları ölçüldü.

Normal ve inkübasyonlu CUPRAC yöntemiyle ölçülen absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri, regresyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları ve TEAC (troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) değerleri hesaplandı. TEAC katsayıları her bir bileşiğin molar absorblama katsayılarının (ε) aynı deneysel şartlarda referans bileşik olan troloksun ε değerine oranlanarak hesaplandı (Eşitlik 3.2).

$$TEAC_{AOX} = \frac{\varepsilon_{AOX}}{\varepsilon_{TR}} \quad \text{(AOX: antioksidan, TR: troloks)} \qquad (3.2)$$

3.4.1.2. CUPRAC-DCM Yöntemi

Bu yöntem, sentetik veya gerçek örneklerde lipofilik antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için geliştirilen bir yöntemdir [103]. Deney tüpüne 1'er mL Cu(II) klorür çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tampon çözeltisi (pH=7) ve toplam antioksidan kapasitesi ölçülmek istenen DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanmış antioksidan bileşik ilave edildi. Organik fazda (DCM fazı) oluşan Cu(I)-Nc kelatının renginin karakteristik dalgaboyu olan 450 nm'de absorbans değerleri ölçüldü. CUPRAC-DCM yönteminin uygulanışı şu şekildedir:

1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH_4Ac + x mL ArOH + (4-x) mL DCM (3.3)

V_{toplam} = 7 mL

pH=7 tamponu varlığında Cu(II)-Nc kompleksinin bulunduğu ortama farklı hacimlerde (x mL) 1 mM DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan çözeltiden ilave edildi. Üzerine (4-x) mL DCM eklenip girdap karıştırıcıda karıştırıldı. Tüplerin ağzı kapalı bir şekilde sulu ve organik fazların birbirinden tamamen ayrılması ve Cu(II)-Nc ile antioksidan arasında meydana gelen redoks reaksiyonunun tamamlanması için oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletildi. Süre sonunda üstte kalan sulu faz bir pipet yardımıyla alınıp organik kısmın referansa karşı 450 nm'de absorbans değerleri kaydedildi. Absorbans değerleri ile konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin doğru denklemleri, regresyon katsayıları, lineer çalışma aralıkları ve TEAC katsayıları (Eşitlik 3.2) hesaplandı. DCM çözeltisinin kaynama noktasının düşük olması nedeniyle hızlı buharlaşmayı engellemek için DCM çözeltisi +4 ^{o}C'de bekletildi.

i-) **Butillenmiş Hidroksi Toluen'nin (BHT) Standart Katkı Yöntemi Uygulanarak CUPRAC-DCM Yöntemiyle Tayini**

DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanmış BHT çözeltisine CUPRAC-DCM yöntemi uygulandı. BHT sahip olduğu gerçek antioksidan kapasiteyi bu çözücü ortamında gösteremediğinden iç standard olarak seçilen BHA çözeltisi (1 mM, 50 μL) ile standard katkı yöntemi uygulanıp CUPRAC-DCM yöntemine göre absorbans değerleri ölçüldü. BHT'nin hem tek başına hem de BHA varlığında elde edilen kalibrasyon denklemleri belirlendi ve TEAC katsayıları hesaplandı.

3.4.1.3. ABTS-Persülfat Yöntemi

Kullanıma hazır hale gelen mavi-yeşil renkli $ABTS^{\cdot+}$ radikal çözeltisi etil alkolle 1:10 oranında seyreltildi. 1 mL $ABTS^{\cdot+}$ çözeltisi üzerine 4 mL EtOH ilave edilip 734 nm'de 6. dakika sonundaki absorbans değerleri kaydedildi. Daha sonra 1 mM farklı çözücü ortamında hazırlanan standart antioksidan bileşiklerden belli bir hacim aralığında (x mL) örnek alınıp üzerine 1 mL $ABTS^{\cdot+}$ çözeltisi ve (4-x) mL EtOH ilave edildi. Ardından aynı dalgaboyunda 6. dakika sonundaki absorbans değerleri ölçüldü. Radikalin absorbans değerinden örneğin bulunduğu çözeltinin absorbansı çıkarılarak ΔA değerleri elde edildi. Elde edilen ölçümler neticesinde her bir antioksidan bileşiğin kalibrasyon grafiği, doğru denklemi, lineer çalışma aralığı ve TEAC katsayıları (Eşitlik 3.2) elde edildi.

3.4.1.4. FRAP Yöntemi

Hazırlanan FRAP reaktifinden 3 mL alınıp üzerine 1 mM farklı çözücü ortamında hazırlanan standart antioksidan bileşiklerden belli bir hacim aralığında (x mL) örnek alınıp üzerine (0.4-x) mL H_2O eklendi. 6. dakika sonunda dalga boyu 595 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı. Elde edilen yöntem verilerine göre ilgili antioksidan bileşiklerin her bir çözücü ortamında doğru denklemleri, lineer çalışma aralıkları ve troloks eşdeğeri cinsinden TEAC katsayıları (Eşitlik 3.2) hesaplandı.

3.4.1.5. CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP Yöntemleri ile TAC Tayini

i-) **Sentetik Karışım Çözeltilerinin TAC tayini**

Polifenolik bileşiklerin her birinin farklı metanol yüzdeleri içeren çözeltileri hazırlanıp farklı kombinasyonlarda beşli sentetik karışımlar hazırlandı. Bu sentetik karışımların beklenen ve deneysel ölçülen antioksidan kapasiteleri CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemleri uygulanarak μM troloks ekivalenti cinsinden Eşitlik (3.4) ve (3.5)'e göre hesaplandı.

$$\text{Beklenen Kapasite} = TEAC_1.C_1 + TEAC_2.\ C_2 + TEAC_3.\ C_3 \qquad (3.4)$$

(TEAC: troloks eşdeğeri antioksidan kapasite; C: konsantrasyon)

$$\text{Deneysel Ölçülen Kapasite} = \frac{\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}}{\varepsilon_{TR}} \text{ x } 10^3 \qquad (3.5)$$

ii-) **Yeşil Çay Ekstresine Butillenmiş Hidroksi Toluen (BHT) Standart Katkısı Yapılması**

BHT katkılı yeşil çay ekstresinin toplam antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için Bölüm 3.3.1 (ii)'de belirtilen şekilde hazırlanan katkılı ve katkısız yeşil çay ekstrelerinden 50 μL'şer numune alınıp sırasıyla CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemleri uygulandı.

iii-) **Farklı Çözücü Ortamlarında Hazırlanan Yeşil Çay Ekstrelerinin TAC Tayini**

Farklı çözücülerde yeşil çay ekstrelerinin antioksidan kapasitelerinin değerlendirilmesi için %100 EtOH, % 100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v) ortamında hazırlanmış yeşil çay ekstrelerinden belirli hacimde numune alınarak CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemleri uygulandı.

3.4.2. Kolon-Sonrası Türevlendirmeli Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemiyle Antioksidan Bileşiklerin Tayininde Uygulanan Yöntemler

3.4.2.1. Spektrofotometrik CUPRAC Yöntemi

Metanolde hazırlanan kateşin ve türevlerine, flavonoid ve fenolik bileşiklere (apigenin KOH + EtOH ortamında hazırlanmıştır), troloksa ve şifalı bitki ekstrelerine CUPRAC yöntemi [6] uygulandı. Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 10 mM Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL 7.5 mM neokuproin çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat tampon çözeltisi (pH 7) ilave edildi. Üzerine x ml antioksidan çözeltisi veya bitki ekstresi ve (1,1 – x) mL distile su ilave edilerek çözeltiler karıştırıldı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'deki absorbansları ölçüldü. Metanol ortamında tüm antioksidan bileşiklerin molar absorplama katsayıları (ε) molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon eğrilerinin eğimleri hesaplanarak elde edildi. Her bir bileşiğin ε değerleri aynı deneysel şartlarda referans bileşik olan troloksun ε değerine oranlanarak tüm antioksidan bileşikleri için TEAC değerleri Eşitlik (3.2)'e göre hesaplandı.

Son konsantrasyonları 0.1 mM olacak şekilde hazırlanan sentetik antioksidan karışım çözeltileri hazırlanıp her birine spektrofotometrik CUPRAC yöntemi uygulanarak TAC değerleri mM cinsinden Eşitlik (3.5)'e göre hesaplandı.

MeOH/H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan şifalı bitki ekstreleri aynı çözücü ile 1:50 oranında seyreltilip her bir ekstreden farklı hacimlerde (yeşil çay: 0.1 mL; siyah çay: 0.3 mL; nane: 0.2 mL; mercan köşk: 0.2 mL) örnek alınarak ayrı ayrı CUPRAC yöntemi uygulandı, denemeler 3'er kez tekrarlandı ve toplam antioksidan kapasiteleri Eşitlik (3.6)'da verilen hesaba göre belirlendi.

$$TAC_{mmol/g} = \frac{\text{Absorbans}}{\varepsilon_{TR}} \text{ x } \frac{\text{Toplam hacim}}{\text{Alınan örnek hacmi}} \text{ x seyrelme oranı x } \frac{\text{Toplam ekstre hacmi (mL)}}{\text{Bitki miktarı (g)}} \qquad (3.6)$$

3.4.2.2. HPLC Yöntemiyle Polifenolik Bileşiklerin Tayini

Polifenolik bileşiklerin HPLC yöntemi kullanılarak tayin edilmesi için ters faz HPLC yöntemleri kullanıldı. Tüm antioksidan bileşiklerin metanolde hazırlanan standart çözeltileri (apigenin KOH + EtOH ortamında hazırlandı) HPLC sistemine enjekte

edildi. Ayırmalar ACE marka C18 kolonunda (250x4.6 mm i.d, 5 µm partikül büyüklüğü) gerçekleştirildi. Metanol (A) ve % 0.2 *o*-H_3PO_4 içeren bidestile su (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazlar kullanılarak 3 farklı gradient elüsyon programı uygulandı. Bu elüsyon programları kullanılarak kateşin ve türevleri, bazı flavonoidler ve fenolik asitler ve troloks standardı için aşağıda detayları verilen HPLC yöntemleri uygulandı.

i-) Çay kateşinlerinin RP-HPLC ile analizi: Çayda bulunan bileşenlerin belirlenmesinde Wang ve ark. [166] tarafından uygulanan yöntem modifiye edildi. Gradient elüsyon şartları şu şekildedir: 1. dakika %0 A – %100 B (Eğim 1.0), 20. dakika %70 A – %30 B (Eğim 1.0), 25. dakika %0 A – %100 B (Eğim 1.0). Örnek hacmi 20 µL, akış hızı 0.8 mL/dakika, belirtme dalgaboyu 280 nm, elüsyon süresi 25 dakika olarak belirlendi.

ii-) Fenolik antioksidanların RP-HPLC ile analizi: Fenolik antioksidanların belirlenmesinde Yıldız ve ark. [167] tarafından uygulanan yöntem kullanıldı. Gradient elüsyon şartları şu şekildedir: 8. dakika %7 A – %93 B (Eğim 1.0), 13. dakika %30 A – %70 B (Eğim 1.0), 45. dakika %66 A – %34 B (Eğim 1.0), 50. dakika %7 A – %93 B (Eğim 1.0). Örnek hacmi 20 µL, akış hızı 0.8 mL/dakika, belirtme dalgaboyu 280 nm, elüsyon süresi 50 dakika olarak belirlendi.

iii-) Troloksun RP-HPLC ile analizi: Gradient elüsyon şartları şu şekildedir: 5. dakika %50 A – %50 B (Eğim 1.0), 13. dakika %80 A – %20 B (Eğim 1.0), 15. dakika %50 A – %50 B (Eğim 1.0) Örnek hacmi 20 µL, akış hızı 0.8 mL/dakika, belirtme dalgaboyu 280 nm, elüsyon süresi 15 dakika olarak belirlendi.

Yukarıda detayları verilen elüsyon programları kullanılarak çay kateşinleri için 4×10^{-5} – 2×10^{-4} M; fenolik antioksidanlar için 2×10^{-5} – 2×10^{-4} M; troloks için 1×10^{-5} – 1×10^{-3} M derişim aralığında çalışılarak 280 nm'de kalibrasyon denklemleri, regresyon katsayıları ve alıkonma zamanları belirlendi.

3.4.2.3. HPLC Yöntemiyle Polifenolik Bileşiklerin Sentetik Karışımlarının Tayini

Son konsantrasyonları 0.1 mM olacak şekilde hazırlanan farklı kombinasyonlarda sentetik antioksidan karışım çözeltileri hazırlanıp her bir karışım çözeltisine HPLC yöntemi uygulandı. Karışımın toplam antioksidan kapasite (TAC) değerleri mM cinsinden Eşitlik (3.7)'de verilen denkleme göre hesaplandı.

$$TAC_{HPLC} = \sum_{i=1}^{n} C_i \; TEAC_i \qquad (3.7)$$

(C_i : i- bileşeninin HPLC yoluyla bulunan derişimini; TEACi : i- bileşeninin CUPRAC yöntemine göre TEAC katsayısını ifade etmektedir.)

3.4.2.4. HPLC Yöntemiyle Şifalı Bitki Ekstrelerindeki Antioksidan Bileşiklerin Tayini

Bitki ekstreleri belirli oranlarda seyreltilerek (yeşil çay (1:10), siyah çay (1:5), mercan köşk (1:5), nane (1:10)) ve filtreden geçirilerek ilgili elüsyon programları uygulandı. Ekstrelerdeki bileşenler standard katkı yöntemi ile belirlendi ve kantitatif değerlendirmeleri yapıldı. Bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasite (TAC) değerleri mmol TR/g cinsinden Eşitlik (3.8)'de verilen denkleme göre yapıldı.

$$TAC_{HPLC} = \sum_{i=1}^{n} C_i \; TEAC_i \text{ x seyrelme oranı x } \frac{\text{Toplam ekstre hacmi (mL)}}{\text{Bitki miktarı (g)}} \qquad (3.8)$$

3.4.2.5. Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemi

Kolon-sonrası belirlemeli hat-üstü sistem, HPLC sistemine bir kolon-sonrası reaksiyon modülü (içerisinde yaklaşık 5 m uzunluğunda reaksiyon sarmalı bulunan) ve CUPRAC reaktif pompasının eklenmesiyle oluşturuldu (Şekil 4.5). Hat-üstü HPLC-CUPRAC yönteminde Cu(II)-Nc kompleksi olan CUPRAC reaktifinin derişimi ve akış hızı optimize edildikten sonra çay kateşinleri, polifenolik antioksidanlar ve referans madde troloks için uygulanan HPLC yöntemlerinin gradient elüsyon şartları değiştirilmeden sadece dalgaboyu 450 nm'ye ayarlanarak elüsyon işlemleri gerçekleştirildi. İlgili gradient elüsyon programına göre HPLC kolonunda ayrılan bileşenler kolon-sonrası reaksiyon modülünde bulunan reaksiyon sarmalı içinde reaktif pompasından belli bir akış hızında pompalanan CUPRAC reaktifi ile reaksiyona sokuldu. Yaklaşık 1 dakikalık reaksiyon süresi sonunda Cu(II)-Nc kompleksi antioksidan bileşiklerce indirgenerek Cu(I)-Nc kelatına dönüştürüldü. Reaksiyon modülünden dedektöre gelen reaksiyon ürününün ışığı maksimum olarak soğurduğu 450 dalgaboyunda antioksidan bileşiğe eşdeğer oranda Cu(I)-Nc kelatına ait kromatogram elde edildi. Antioksidan bileşiklere eşdeğer oranda oluşan Cu(I)-Nc pik alanlarından yararlanılarak analiz edilen antioksidan bileşiklerin hat-üstü olarak troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasiteleri ölçüldü. Hat-üstü sistem ile elde edilen pikler negatif bölgede

gösterildiğinden (Şekil 4.5) pik "negatif pik", pik alanı "negatif pik alanı" olarak adlandırıldı.

i-) CUPRAC reaktifi akış hızının optimizasyonu: 2 x 10^{-4} M troloks çözeltisi kullanılarak hat-üstü HPLC-CUPRAC sisteminde CUPRAC reaktifinin akış hızı optimize edildi. Öncelikle reaktif bulunan kabın ağzı ve yüzeyi ışık ve hava almayacak şekilde sarıldı. 0.2 – 0.6 ml/dakika hızlarında CUPRAC reaktifi pompalanarak troloks için kullanılan elüsyon programı uygulandı ve her bir akış hızı için troloksa eşdeğer Cu(I)-Nc kelatının 450 nm'de kromatogramları elde edildi. Sabit troloks derişimine karşılık akış hızları değiştirilerek sinyal/gürültü (S/N) oranları Waters Empower yazılımı kullanılarak otomatik olarak hesaplandı. Akış hızları ile S/N değerleri arasında grafik çizildi.

ii-) CUPRAC reaktifinin derişiminin belirlenmesi: 2 x 10^{-4} M troloks çözeltisi kullanılarak hat-üstü HPLC-CUPRAC sisteminde CUPRAC reaktifinin derişimi optimize edildi. 3.33 mM Cu(II)/2.5 mM Nc/0.33 M NH_4Ac (1:1:1 (v:v:v)) ve 1.66 mM Cu(II)/1.25 mM Nc/0.166 M NH_4Ac (1:1:1 (v:v:v)) oranları kullanılarak 0.5 mL/dakika akış hızında CUPRAC reaktifi kolon-sonrası reaksiyon modülüne pompalandı. Troloksa eşdeğer Cu(I)-Nc kelatının kromatogramları elde edildi. Bu derişimlerdeki Cu(I)-Nc pikinin S/N değerleri, Waters Empower yazılımı kullanılarak otomatik olarak hesaplandı.

iii-) Hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle polifenolik bileşiklerin tayini ve şifalı bitkilerin analizi: Polifenolik bileşiklerin belirlenmesinde kullanılan ve detayları yukarıda verilen 3 farklı elüsyon programının mevcut dalgaboyları 450 nm'ye ayarlanarak hat-üstü analiz işlemleri gerçekleştirildi.

Çay kateşinleri ve fenolik antioksidanlar için 4 x 10^{-5} – 2 x 10^{-4} M; troloks için 1 x 10^{-5} – 1 x 10^{-3} M derişim aralığında çalışılarak 450 nm'de negatif pik alanı-konsantrasyon arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin denklemleri, regresyon katsayıları ve bileşenlerin kolonda alıkonma zamanları belirlendi.

Son konsantrasyonları 0.1 mM olacak şekilde sentetik antioksidan karışım çözeltileri hazırlandı. Her bir karışım çözeltisi hat-üstü HPLC-CUPRAC sistemine enjekte edildi. Kromatogramlarda her bir bileşene ait negatif pik alanlarının toplamı kullanılarak sentetik karışım çözeltilerinin TAC değerleri mM cinsinden Eşitlik (3.9)'da verilen

denkleme göre hesaplandı. Denklemde verilen y_i antioksidan bileşiklerin ilgili sentetik karışım kromatogramında elde edilen toplam negatif pik alanını, eğim ise 450 nm'de troloksun kalibrasyon doğrusuna ait eğimi ifade etmektedir. Bu şekilde, 450 nm'de elde edilen negatif pik alanlarının troloksa ait kalibrasyon doğrusunun eğimine bölünmesiyle ilgili karışım çözeltisinin troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasitesi (TAC) ölçülebilmektedir.

$$TAC_{\text{on-line HPLC-CUPRAC}} = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_i}{\text{eğim}} \text{ x } 10^3 \qquad (3.9)$$

Bitki ekstreleri belirli oranlarda seyreltilerek (yeşil çay (1:50), siyah çay (1:2), mercan köşk (1:30), nane (1:10)) ve filtreden geçirilerek ilgili elüsyon programları uygulandı. Ekstrelerdeki bileşenler standart katkı yöntemi ile belirlendi ve kantitatif değerlendirmeleri yapıldı. Bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasite değerleri mmol TR/g cinsinden Eşitlik (3.10)'da verilen denkleme göre yapıldı. Denklemde verilen y_i şifalı bitki ekstrelerinde varlığı tespit edilen bileşenlere ait negatif pik alanları toplamını, eğim ise 450 nm'de troloksun kalibrasyon doğrusuna ait eğimi ifade etmektedir.

$$TAC_{\text{on-line HPLC-CUPRAC}} = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_i}{\text{eğim}} \text{ x } 10^3 \text{ x seyrelme oranı x } \frac{\text{Toplam ekstre hacmi (mL)}}{\text{Bitki miktarı (g)}} \qquad (3.10)$$

3.4.2.6. Spektrofotometrik CUPRAC, HPLC ve Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemlerinin Karşılaştırılması

Spektrofotometrik CUPRAC yöntemi, HPLC yöntemi ve hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemleri ile sentetik antioksidan karışımlarının ve bitki ekstrelerinin TAC değerleri birbiriyle karşılaştırıldı ve uygulanan yöntemlere f- ve t- tesleri uygulandı.

3.4.3. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Doğal ve Türevlemdirilmiş Siklodekstrinlerle İçerme Komplekslerinin ve Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi Çalışmasında Uygulanan Yöntemler

3.4.3.1. Antioksidan-Siklodekstrin Sıvı İçerme Komplekslerinin Eldesi

İçerme komplekslerinin eldesi için sıvı karışımı yöntemi uygulandı. Haiyun ve arkadaşlarının belirttiği yönteme göre [46, 61] tüplere ayrı ayrı 0.5'er mL 1 mM

antioksidan çözeltisi konup üzerlerine 10 mM siklodekstrin çözeltilerinden son konsantrasyonları sırasıyla 0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 8 mM olacak şekilde ilave edildi. Bu çözelti karışımlarına 1'er mL 0.5 M pH 7 NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 tamponu eklenerek toplam 10 mL olacak şekilde destile su ile hacme tamamlandı. Ardından tüplerin ağızları kapatılıp vorteks karıştırıcıda 1 dakika süre ile karıştırıldı. Çözeltiler oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltiler ilgili analizlerler için kullanıldı.

3.4.3.2. UV-vis Spektrofotometrik Analiz Yöntemi

Son konsantrasyonu 50 µM olan antioksidan bileşiklerle, siklodekstrin konsantrasyonunun (0 mM – 8 mM) arttırılmasına bağlı olarak elde edilen içerme komplekslerinin 25 ± 1^0C'de 200-450 nm aralığında spektrumları çizildi. 8 mM CD içeren kompleks spektrumlarında diğer konsantrasyonlara göre daha fazla değişim gözlendiğinden (dalgaboyu kayması ve absorbans değişimi), UV-Vis spektrumlarda serbest antioksidan bileşik ile 8 mM CD içeren kompleks çözeltisinin spektrumları birarada verildi. Seçilen dalgaboyu aralığında siklodekstrinlerin tek başlarına göstermiş oldukları UV-Vis spektrumları da elde edilerek girişime neden olacak absorbsiyonun gözlenip gözlenmediği incelendi.

3.4.3.3. Spektroflorimetrik Analiz Yöntemi

Florimetrik ölçümler, her bir antioksidan bileşik için eksitasyon ve emisyon dalgaboyları belirlenerek gerçekleştirildi. Tüm emisyon spektrumları 10 nm eksitasyon ve emisyon slit aralıkları seçilerek elde edildi. Sabit konsantrasyonlu (50 µM) antioksidan bileşiklerin pH 7 fosfat tamponu ortamında tek başlarına ve artan siklodekstrin konsantrasyonuna bağlı olarak ilgili komplekslerinin 300-600 nm aralığında floresans spektrumları çizildi. Ayrıca çalışılan siklodekstrinlerin ilgili dalga boylarında uyarmalı emisyon spektrumları da çizilerek seçilen dalgaboyu aralığında önemli bir intensiteye sahip olup olmadıkları incelendi.

i-) Florimetrik ölçümlere dayalı Benesi-Hildebrand denklemi kullanılarak kompleks oluşum sabitlerinin eldesi: Derişimi sabit tutulan (50 µM) antioksidan bileşiklerin artan siklodekstrin derişimlerinde (0 mM - 8 mM) floresans spektrum-larındaki değişimleri analiz ederek kompleks oluşum sabitleri hesaplandı. Aşağıda kararlı-hal (steady-state) florimetrik ölçümlere göre modifiye edilmiş Benesi-Hildebrand denklemi görülmektedir:

$$\frac{1}{[F-F_o]}=\frac{1}{\Delta F_{\max}}+\frac{1}{(\Delta F_{\max}K_f[CD])} \qquad (2.25)$$

F: Kompleks haldeki antioksidanın floresans intensitesini; F_0: Serbest haldeki antioksidanın floresans intensitesini; ΔF_{max}: Doymuş haldeki antioksidanın floresans intensitesini; K_f: İçerme sabiti veya oluşum sabitini; [CD]: Toplam siklodekstrin konsantrasyonunu ifade etmektedir. Denklemde yer alan

$$\frac{1}{[F-F_o]}=\text{y} \quad ; \quad \frac{1}{[CD]}=\text{x} \quad ; \quad \frac{1}{\Delta F_{\max}}=kayım \quad ; \quad \frac{1}{(\Delta F_{\max}K_f)}=eğim \quad \text{ise ;}$$

K_f = kayım.eğim^{-1} olarak ifade edilmektedir. Benesi-Hildebrand denklemine göre 1/[CD] ile 1/ΔF değerleri arasında çizilen kalibrasyon eğrilerinin kayım ve eğim değerleri kullanılarak [kayım/eğim] oranından içerme komplekslerinin oluşum sabitleri hesaplandı.

3.4.3.4. IR (Kızıl Ötesi) Spektroskopik Analiz Yöntemi

1 mmol CD ve 1 mmol antioksidan bileşiği 10 mL MeOH:H_2O (1:1, v/v) içerisinde çözülüp iyice karıştırılarak 1:1 oranda hazırlanan içerme kompleksleri freeze-dryer cihazında kurutulduktan sonra elde edilen katı numuneler bir havan içinde KBr (potasyum bromür) ile 1:150 (w/w) oranında homojen bir şekilde karıştırıldı. Katı komplekslerin (rosmarinik asid ve ilgili içerme kompleksleri) IR spektrumları infrared spektrometre cihazında 4000-400 cm^{-1} spektral aralıkta elde edildi ve saf antioksidan bileşik, saf siklodekstrin ve antioksidan-siklodektrin kompleks spektrumları birbiriyle karşılaştırıldı.

3.4.3.5. CUPRAC Yöntemi

Saf antioksidan bileşikler ve CD'lerle oluşturdukları sıvı içerme komplekslerinin troloks eşdeğeri antioksidan kapasite katsayıları CUPRAC yöntemine göre belirlendi. Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 1.0 x 10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL 7.5 x 10^{-3} M neokuproin çözeltisi ve 2 mL 1 M amonyum asetat tampon çözeltisi (pH 7) ilave edildi. Üzerine x ml 1 mM antioksidan çözeltisi veya x mL 50 μM antioksidan ve 8 mM CD içeren antioksidan-siklodekstrin kompleks çözeltisi ve (1–x) ml distile su ilave edilerek çözeltiler karıştırıldı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'deki

absorbansları ölçüldü. Antioksidan derişimi ile absorbans değerleri arasında kalibrasyon denklemleri elde edilip serbest ve kompleksleşmiş antioksidan bileşiklerin CUPRAC yöntemine göre molar absorptivite değerleri hesaplandı. Bu değerler troloksun metanol ortamında CUPRAC yöntemine göre elde edilen ε_{TR} değerine oranlanarak TEAC katsayıları belirlendi. Bu yöntemde, orijinal CUPRAC yönteminden farklı olarak çözeltiye 2 mL 1 M NH_4Ac tamponu ilave edildi ve toplam çözelti hacmi 5 mL olarak alındı. Elde edilen verilere göre antioksidan kapasitede oluşacak mevcut değişimler incelendi.

4. BULGULAR

4.1. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNE ÇÖZÜCÜ ETKİSİ

4.1.1. Troloksun Farklı Çözücü Ortamlarında CUPRAC, ABTS-Persülfat ve FRAP Yöntemlerine Göre Kalibrasyon Denklemlerinin Belirlenmesi

%100 EtOH, %100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v), MeOH/H_2O (1:1, v/v) ve DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamlarında 1 mM derişiminde hazırlanmış troloks çözeltisine ayrı ayrı CUPRAC (normal yöntem (N) ve inkübasyonlu yöntem (I)), ABTS-persülfat ve FRAP yöntemleri uygulanarak konsantrasyon-absorbans arasında çizilen kalibrasyon grafiklerinin doğru denklemleri (*y*: absorbans, *c*: derişim) *ve* korelasyon katsayıları (*r*) hesaplanmıştır (Tablo 4.1, 4.2 ve 4.3).

Tablo 4.1: Farklı çözücü ortamlarında CUPRAC yöntemine gore troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Çözücü Ortamı	Lineer Kalibrasyon Denklemi	r
% 100 EtOH	y=1.67x10^4c-0.033 (N)	0.9999
	y=1.86x10^4c+0.002 (I)	0.9996
% 100 MeOH	y=1.58x10^4c-0.010 (N)	0.9995
	y=1.60x10^4c-0.008 (I)	0.9993
MeOH/H_2O (4:1, v/v)	y=1.50x10^4c-0.002 (N)	0.9999
	y=1.52x10^4c-0.013 (I)	0.9987
MeOH/H_2O (1:1, v/v)	y=1.57x10^{4}c-0.025 (N)	0.9991
	y=1.62x10^4c-0.030 (I)	0.9993
DCM/EtOH (9:1, v/v)	y=1.68x10^4c- 0.020	0.9995

Tablo 4.2: Farklı çözücü ortamlarında ABTS-persülfat yöntemine gore troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Çözücü Ortamı	Lineer Kalibrasyon Denklemi	r
% 100 EtOH	y=2.60x10^4c+0.002	0.9996
% 100 MeOH	y=2.61x10^4c-0.009	0.9991
MeOH/H_2O (4:1, v/v)	y=2.65x10^4c+0.018	0.9991
MeOH/H_2O (1:1, v/v)	y=2.56x10^4c-0.010	0.9988
DCM/EtOH (9:1, v/v)	y= 2.33 x10^4c-0.006	0.9995

Tablo 4.3: Farklı çözücü ortamlarında FRAP yöntemine gore troloksun kalibrasyon eğrilerinden elde edilen lineer kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları

Çözücü Ortamı	Lineer Kalibrasyon Denklemi	r
% 100 EtOH	y=4.20x10^4c+0.014	0.9995
% 100 MeOH	y=4.32x10^4c-0.005	1.00
MeOH/H_2O (4:1, v/v)	y=4.34x10^4c+0.001	0.9998
MeOH/H_2O (1:1, v/v)	y=4.10x10^4c-0.009	0.9999
DCM/EtOH (9:1, v/v)	ND	ND

ND: Dedekte edilememiştir.

4.1.2. Polifenolik Bileşiklerin CUPRAC Yöntemine Göre Farklı Çözücü Ortamlarında Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi

%100 EtOH, %100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v), MeOH/H_2O (1:1, v/v) ve DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamlarında 1 mM derişimindeki antioksidan bileşiklerin (kuersetin, ferulik asid, kateşin, askorbik asid, naringenin, glutatyon, vitamin E, lauril gallat, butillenmiş hidroksi anizol, butillenmiş hidroksi toluen, *tert*-butil hidrokinon) molar absorplama katsayıları (ε), TEAC değerleri, lineer çalışma aralıkları normal ve inkübasyonlu CUPRAC yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki

kalibrasyon doğru denklemleri hesaplanarak elde edilmiştir (Tablo 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7). DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan bileşikler için CUPRAC-DCM yöntemi uygulanmıştır (Tablo 4.8). Vitamin E'nin MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamlarında homojen bir çözeltisi hazırlanamadığından ölçüm yapılamamıştır. Glutatyon %100 EtOH ve % 100 MeOH'de çözünmediği için %99 EtOH/H_2O (v/v) ve %99 MeOH:H_2O (v/v) çözeltilerine yöntem uygulanmıştır. DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında butillenmiş hidroksi toluen (BHT) gerçek antioksidan kapasitesini tek başına gösteremediği için butillenmiş hidroksi anizol (BHA) bir iç standart gibi kullanılarak BHA varlığında BHT'nin antioksidan etkinliği CUPRAC-DCM yöntemi uygulanarak belirlenmiştir (Tablo 4.9). Yalnız BHT'nin gösterdiği ve standart katkı sonucu elde edilen kalibrasyon eğrileri Şekil 4.1'de verilmiştir.

Tablo 4.4: %100 EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	ε ε_{ink}	TEAC $TEAC_{ink}$	Lineer Aralık
Kuersetin	$y=7.33x10^4c+0.012$ $r=0.9995$	7.33×10^4	4.38	$5.19 \times 10^{-7} – 1.9 \times 10^{-5}$
Ferulik Asit	$y=2.00x10^4c+0.008$ $r=0.9990$	2.00×10^4	1.20	$2.46 \times 10^{-6} – 6.74 \times 10^{-5}$
	$y=2.28x10^4c-0.002$ $r=0.9994$	2.28×10^4	1.23	$2.29 \times 10^{-6} – 5.94 \times 10^{-5}$
Kateşin	$y=5.16x10^4c+0.013$ $r=0.9996$	5.16×10^4	3.09	$3.20 \times 10^{-7} – 2.50 \times 10^{-5}$
	$y=6.6x10^4c+0.028$ $r=0.9998$	6.60×10^4	3.56	$3.50 \times 10^{-8} – 1.90 \times 10^{-5}$
Askorbik Asit	$y=1.59x10^4c-0.06$ $r=0.9999$	1.59×10^4	0.96	$5.60 \times 10^{-6} – 8.50 \times 10^{-5}$
Naringenin	$y=9.17x10^2c+0.04$ $r=0.9992$	9.17×10^2	0.05	$1.09 \times 10^{-5} – 1.48 \times 10^{-3}$
	$y=4.23x10^4c+0.015$ $r=0.9997$	4.23×10^4	2.28	$8.29 \times 10^{-7} – 3.28 \times 10^{-5}$
Glutatyon	$y=9.47x10^3c+0.0005$ r=0.9998	9.47×10^3	0.57	$5.23 \times 10^{-6} – 1.48 \times 10^{-4}$
Vitamin E	$y=1.83x10^4c-0.06$ $r=0.9996$	1.83×10^4	1.10	$6.13 \times 10^{-6} – 7.73 \times 10^{-5}$
	$y=1.91x10^4c-0.02$ $r=0.9999$	1.91×10^4	1.03	$2.60 \times 10^{-6} – 7.00 \times 10^{-5}$
Lauril Gallat	$y=2.72x10^4c-0.012$ $r=0.9995$	2.72×10^4	1.63	$2.28 \times 10^{-6} – 5.19 \times 10^{-5}$
	$y=3.74x10^4c-0.007$ $r=0.9995$	3.74×10^4	2.01	$1.52 \times 10^{-6} – 3.76 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Anizol	$y=2.34x10^4c+0.002$ $r=0.9994$	2.34×10^4	1.40	$2.05 \times 10^{-6} – 5.97 \times 10^{-5}$
	$y=2.86x10^4c-0.006$ $r=0.9997$	2.86×10^4	1.54	$1.96 \times 10^{-6} – 4.92 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Toluen	$y=1.92x10^4c+0.047$ $r=0.9951$	1.92×10^4	1.15	$1.56 \times 10^{-7} – 7.05 \times 10^{-5}$
	$y=3.36x10^4c+0.018$ $r=0.9989$	3.36×10^4	1.81	$9.52 \times 10^{-7} – 4.11 \times 10^{-5}$
Tert-Butil Hidrokinon	$y=1.57x10^4c+0.007$ $r=0.9994$	1.57×10^4	0.94	$2.74 \times 10^{-6} – 8.87 \times 10^{-5}$
	$y=1.60x10^4c-0.003$ $r=0.9994$	1.60×10^4	0.86	$3.31 \times 10^{-6} – 8.77 \times 10^{-5}$

Tablo 4.5: %100 MeOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	ε ε_{ink}	TEAC $TEAC_{ink}$	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	$y=8.76x10^4c+0.007$ $r=0.9996$	8.76×10^4	5.54	$4.91 \times 10^{-7} – 1.59 \times 10^{-5}$
	$y=9.47x10^4c+0.01$ $r=0.9993$	9.47×10^4	5.92	$4.22 \times 10^{-7} – 1.47 \times 10^{-5}$
Ferulik Asid	$y=2.17x10^4c-0.005$ $r=0.9995$	2.17×10^4	1.38	$2.53 \times 10^{-6} – 6.47 \times 10^{-5}$
	$y=2.28x10^4c+0.003$ $r=0.9992$	2.28×10^4	1.43	$2.06 \times 10^{-6} – 6.13 \times 10^{-5}$
Kateşin	$y=5.85x10^4c-0.028$ $r=0.9999$	5.85×10^4	3.70	$1.33 \times 10^{-6} – 2.44 \times 10^{-5}$
	$y=6.61x10^4c+0.004$ $r=0.9993$	6.61×10^4	4.13	$6.96 \times 10^{-7} – 2.11 \times 10^{-5}$
Askorbik Asid	$y=1.77x10^4c-0.005$ $r=0.9999$	1.77×10^4	1.12	$3.11 \times 10^{-6} – 7.94 \times 10^{-5}$
Naringenin	$y=9.03x10^3c-0.004$ $r=0.9998$	9.03×10^3	0.57	$5.98 \times 10^{-6} – 1.55 \times 10^{-5}$
	$y=4.86x10^4c+0.011$ $r=0.9998$	4.86×10^4	3.04	$8.02 \times 10^{-6} – 2.86 \times 10^{-5}$
Glutatyon (%99 MeOH)	$y=8.84x10^3c+0.03$ $r=0.9992$	8.84×10^3	0.56	$2.26 \times 10^{-6} – 1.55 \times 10^{-4}$
	$y=1.04x10^4c-0.01$ $r=0.9994$	1.04×10^4	0.65	$5.77 \times 10^{-6} – 1.36 \times 10^{-4}$
Vitamin E	$y=1.62x10^4c-0.019$ $r=0.9984$	1.62×10^4	1.02	$4.26 \times 10^{-6} – 8.76 \times 10^{-5}$
	$y=1.43x10^4c+0.002$ $r=0.9986$	1.43×10^4	0.89	$3.36 \times 10^{-6} – 9.78 \times 10^{-5}$
Lauril Gallat	$y=2.66x10^4c+0.002$ $r=0.9999$	2.66×10^4	1.68	$1.80 \times 10^{-6} – 5.26 \times 10^{-5}$
	$y=4.14x10^4c-0.006$ $r=0.9993$	4.14×10^4	2.59	$1.35 \times 10^{-6} – 3.40 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Anizol	$y=2.33x10^4c+0.024$ $r=0.9999$	2.33×10^4	1.48	$1.12 \times 10^{-6} – 5.90 \times 10^{-5}$
	$y=2.72x10^4c-0.006$ $r=0.9996$	2.72×10^4	1.70	$2.06 \times 10^{-6} – 5.17 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Toluen	$y=2.46x10^4c+0.022$ $r=0.9992$	2.46×10^4	1.56	$1.14 \times 10^{-6} – 5.60 \times 10^{-5}$
	$y=3.55x10^4c+0.016$ $r=0.9995$	3.55×10^4	2.22	$9.58 \times 10^{-7} – 3.90 \times 10^{-5}$
Tert-Butil Hidrokinon	$y=1.57x10^4c-0.016$ $r=0.9997$	1.57×10^4	0.99	$4.20 \times 10^{-6} – 9.02 \times 10^{-5}$
	$y=1.53x10^4c-0.012$ $r=0.9992$	1.53×10^4	0.96	$4.05 \times 10^{-6} – 9.23 \times 10^{-5}$

Tablo 4.6: MeOH:H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi verileri

Antioksidan	**Doğru Denklemi**	**ε** **ε_{ink}**	**TEAC** **$TEAC_{ink}$**	**Lineer Aralık (M)**
Kuersetin	$y=7.83x10^4c-0.002$ $r=0.9995$	7.83×10^4	5.22	$6.64 \times 10^{-7} – 1.79 \times 10^{-5}$
	$y=8.06x10^4c+0.04$ $r=0.9991$	8.06×10^4	5.28	$1.24 \times 10^{-7} – 1.69 \times 10^{-5}$
Ferulik Asid	$y=1.93x10^4c+0.006$ $r=0.9998$	1.93×10^4	1.29	$2.28 \times 10^{-6} – 7.22 \times 10^{-5}$
	$y=2.09x10^4c-0.009$ $r=0.9991$	2.09×10^4	1.37	$2.82 \times 10^{-6} – 6.74 \times 10^{-5}$
Kateşin	$y=4.96x10^4c+0.054$ $r=0.9993$	4.96×10^4	3.31	$1.21 \times 10^{-7} – 2.71 \times 10^{-5}$
	$y=6.64x10^4c+0.008$ $r=0.9998$	6.64×10^4	4.37	$6.32 \times 10^{-7} – 2.09 \times 10^{-5}$
Askorbik Asid	$y=1.69x10^4c-0.012$ $r=0.9999$	1.69×10^4	1.11	$3.67 \times 10^{-6} – 8.36 \times 10^{-5}$
Naringenin	$y=1.06x10^4c-0.002$ $r=0.9990$	1.06×10^4	0.71	$4.91 \times 10^{-6} – 1.32 \times 10^{-4}$
	$y=5.70x10^4c-0.02$ $r=0.9988$	5.70×10^4	3.74	$1.23 \times 10^{-6} – 2.49 \times 10^{-5}$
Glutatyon	$y=8.05x10^3c+0.01$ $r=0.9997$	8.05×10^3	0.54	$4.97 \times 10^{-6} – 1.73 \times 10^{-4}$
	$y=7.86x10^3c+0.03$ $r=0.9989$	7.86×10^3	0.52	$2.54 \times 10^{-6} – 1.74 \times 10^{-4}$
Vitamin E	-	-	-	-
Lauril Gallat	$y=2.79x10^4c+0.005$ $r=0.9993$	2.79×10^4	1.86	$1.61 \times 10^{-6} – 5.00 \times 10^{-5}$
	$y=4.25x10^4c-0.007$ $r=0.9989$	4.25×10^4	2.79	$1.34 \times 10^{-6} – 3.31 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Anizol	$y=2.25x10^4c+0.008$ $r=0.9999$	2.25×10^4	1.50	$1.87 \times 10^{-6} – 6.19 \times 10^{-5}$
	$y=2.69x10^4c+0.011$ $r=0.9996$	2.69×10^4	1.76	$1.45 \times 10^{-6} – 5.16 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Toluen	$y=3.11x10^4c+0.001$ $r=0.9997$	3.11×10^4	2.07	$1.58 \times 10^{-6} – 4.50 \times 10^{-5}$
	$y=3.57x10^4c+0.022$ $r=0.9997$	3.57×10^4	2.34	$7.84 \times 10^{-7} – 3.86 \times 10^{-5}$
Tert-Butil Hidrokinon	$y=1.57x10^4c-0.016$ $r=0.9997$	1.57×10^4	1.08	$4.20 \times 10^{-6} – 9.02 \times 10^{-5}$
	$y=1.67x10^4c+0.006$ $r=0.9988$	1.67×10^4	1.10	$2.63 \times 10^{-6} – 8.35 \times 10^{-5}$

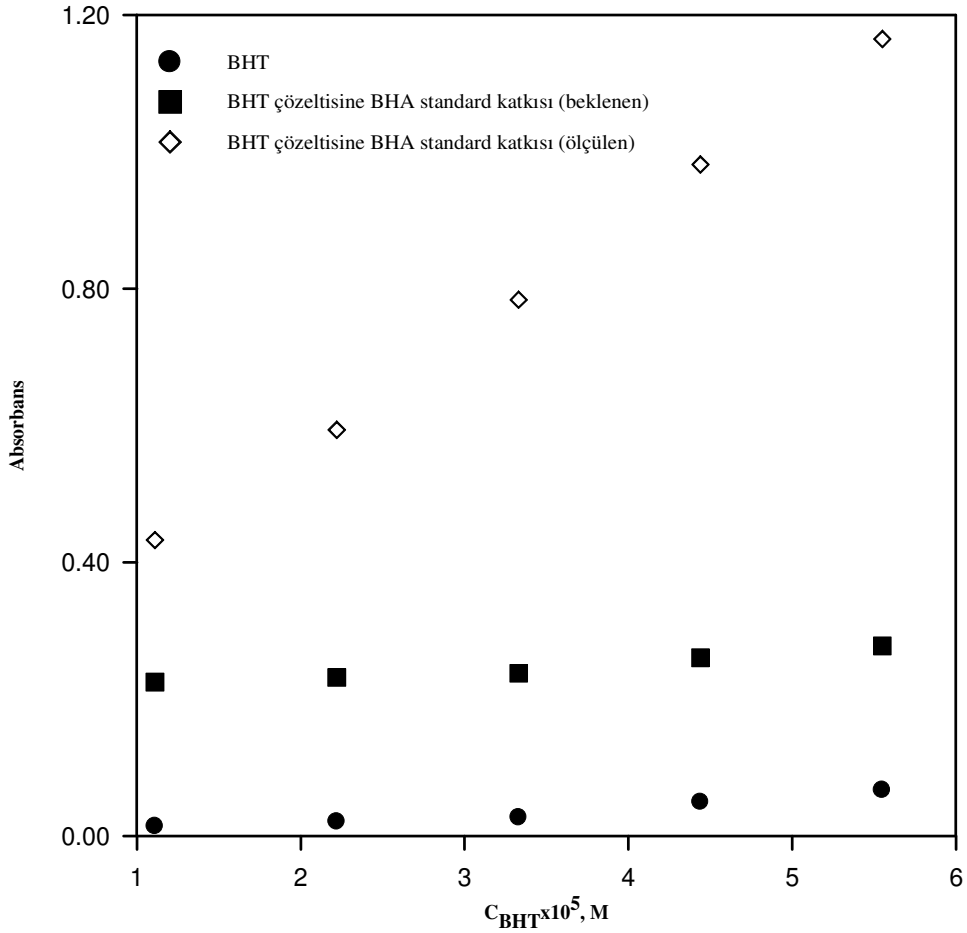
Tablo 4.7: MeOH:H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	ε ε_{ink}	TEAC $TEAC_{ink}$	Lineer Aralık
Kuersetin	y=9.09x10^4c+0.015 r=0.9999	7.33 x 10^4	5.78	3.85 x 10^{-7} – 1.54 x 10^{-4}
	y=9.8210^4c+0.02 r=0.9992	9.82 x 10^4	6.06	3.05 x 10^{-7} – 1.40 x 10^{-4}
Ferulik Asid	y=2.05x10^4c+0.022 r=0.9995	2.05 x 10^4	1.30	1.37 x 10^{-6} – 6.72 x 10^{-5}
	y=2.51x10^4c-0.037 r=0.9999	2.51 x 10^4	1.55	3.47 x 10^{-6} – 5.72 x 10^{-5}
Kateşin	y=5.44x10^4c-0.004 r=0.9992	5.44 x 10^4	3.46	9.26 x 10^{-7} – 2.58 x 10^{-5}
	y=7.01x10^4c+0.006 r=0.9994	7.01 x 10^4	4.33	6.27 x 10^{-7} – 1.99 x 10^{-5}
Askorbik Asid	y=1.63x10^4c-0.016 r=0.9992	1.63 x 10^4	1.04	4.05 x 10^{-6} – 8.69 x 10^{-5}
Naringenin	y=5.63x10^3c+0.07 r=0.9782	5.63 x 10^3	0.36	1.78 x 10^{-6} – 2.36 x 10^{-4}
	y=3.42x10^4c+0.11 r=0.9904	3.42 x 10^4	2.18	1.14 x 10^{-6} – 4.06 x 10^{-5}
Glutatyon	y=8.54x10^3c+0.045 r=0.9989	8.54 x 10^3	0.54	5.85 x 10^{-7} – 1.59 x 10^{-4}
	y=8.55x10^3c+0.036 r=0.9993	8.55 x 10^3	0.53	1.64 x 10^{-6} – 1.60 x 10^{-4}
Vitamin E	-	-	-	-
Lauril Gallat	y=3.02x10^4c-0.013 r=0.9998	3.02 x 10^4	1.92	2.09 x 10^{-6} – 4.68 x 10^{-5}
	y=3.93x10^4c-0.023 r=0.9998	3.93 x 10^4	2.43	1.86 x 10^{-6} – 3.62 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=2.28x10^4c+0.003 r=0.9993	2.28 x 10^4	1.45	1.59 x 10^{-6} – 6.88 x 10^{-5}
	y=2.92x10^4c+0.005 r=0.9992	2.92 x 10^4	1.80	1.54 x 10^{-6} – 4.78 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=3.01x10^4c+0.006 r=0.9996	2.94 x 10^4	1.92	2.04 x 10^{-6} – 4.80 x 10^{-5}
	y=3.22x10^4c+0.009 r=0.9996	3.22 x 10^4	1.99	1.27 x 10^{-6} – 4.32 x 10^{-5}
Tert-Butil Hidrokinon	y=1.72x10^4c-0.015 r=0.9998	1.72 x 10^4	1.10	3.78 x 10^{-6} – 8.23 x 10^{-5}
	y=1.66x10^4c-0.002 r=0.9997	1.66 x 10^4	1.02	3.13 x 10^{-6} – 8.45 x 10^{-5}

Tablo 4.8: DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC-DCM yöntemi verileri

Antioksidan	**Doğru Denklemi**	**Lineer aralık (M)**	**ε**	**TEAC**
Kuersetin	y=5.68x10^4c+0.02 r=0.9982	5.28 x 10^{-7} – 2.43 x 10^{-5}	5.68 x 10^4	3.38
Ferulik Asit	y=1.89x10^4c+0.006 r=0.9985	2.37 x 10^{-6} – 7.50 x 10^{-5}	1.86 x 10^4	1.11
Kateşin	y=5.52x10^4c+0.03 r=0.9993	3.62 x 10^{-7} – 2.48 x 10^{-5}	5.52 x 10^4	3.30
Askorbik Asit	y= 1.49x10^4c+0.031 r=0.9993	1.28 x 10^{-6} – 9.20 x 10^{-5}	1.49 x 10^4	0.89
Naringenin	y=1.80x10^4c+0.05 r=0.9985	5.55 x 10^{-7} – 7.50 x 10^{-5}	1.80 x 10^4	1.07
Vitamin E	y=1.86x10^4c-0.011 r=0.9991	3.28 x 10^{-6} – 7.59 x 10^{-5}	1.86 x 10^4	1.11
Lauril Gallat	y=4.09x10^4c-0.02 r=0.9990	4.89 x 10^{-7} – 3.45 x 10^{-5}	4.09 x 10^4	2.42
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=1.63x10^4c+0.036 r=0.9996	8.59 x 10^{-7} – 8.37 x 10^{-5}	1.63 x 10^4	0.97
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=1.22x10^3c-0.005 r=0.9678 y*=1.61x10^4c+0.25 r=0.9991	4.52 x 10^{-5} – 1.16 x 10^{-3} 6.19 x 10^{-7} – 8.67 x 10^{-5}	1.22 x10^3 1.61 x 10^4	0.07 0.95
Tert-Butil Hidrokinon	y=1.54x10^4c+0.009 r=0.9986	1.95 x 10^{-6} – 9.24 x 10^{-5}	1.54 x 10^4	0.95

*BHA iç standardı varlığında elde edilen denklem



Şekil 4.1: CUPRAC-DCM yöntemiyle elde edilen butillenmiş hidroksi toluenin (BHT) tek başına ve BHA katkılı çözeltilerinin kalibrasyon eğrileri

4.1.3. Polifenolik Bileşiklerin ABTS-Persülfat Yöntemine Göre Farklı Çözücü Ortamlarında Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi

%100 EtOH, %100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v), MeOH/H_2O (1:1, v/v) ve DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamlarında 1 mM derişimindeki antioksidan bileşiklerin (kuersetin, ferulik asid, kateşin, askorbik asid, naringenin, glutatyon, vitamin E, lauril gallat, butillenmiş hidroksi anizol, butillenmiş hidroksi toluen, *tert*-butil hidrokinon) molar absorplama katsayıları (ε), TEAC değerleri ve lineer çalışma aralıkları ABTS-persülfat yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri hesaplanarak elde edilmiştir (Tablo 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13). Vitamin E'nin MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamlarında homojen bir

çözeltisi hazırlanamadığından ölçüm yapılamamıştır. Glutatyon %100 etil alkol ve % 100 metil alkolde çözünmediği için %99 EtOH:H_2O (v:v) ve %99 MeOH:H_2O çözeltilerine ABTS-persülfat yöntemi uygulanmıştır. Naringenin ABTS-persülfat yöntemine cevap vermektedir ancak lineer olarak tayin edilebildiği konsantrasyon aralığı belirlenemediği gibi deneysel veriler de tekrarlanabilir değildir. Bu nedenle veriler tablolarda (Tablo 4.10, 4.11 ve 4.12) verilmemiştir.

Tablo 4.9: %100 EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	ε	TEAC	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	y=7.21x10^4c+0.039 r=0.9995	7.21 x 10^4	2.77	1.53 x 10^{-7} – 1.89 x 10^{-5}
Ferulik Asit	y=5.62x10^4c+0.02 r=0.9994	5.62 x 10^4	2.16	5.34 x 10^{-7} – 2.46 x 10^{-5}
Kateşin	y=8.18x10^4c+0.069 r=0.9991	8.18 x 10^4	3.15	5.34 x 10^{-7} – 1.63 x 10^{-5}
Askorbik Asit	y=2.81x10^4c-0.009 r=0.9999	2.81 x 10^4	1.08	2.10 x 10^{-6} – 5.01 x 10^{-5}
Naringenin	y=1.66x10^4c+0.29 r=0.9723	1.66 x 10^4	0.64	1.81 x 10^{-5} – 6.68 x 10^{-5}
Glutatyon	y=4.06x10^4c+0.023 r=0.9998	4.06 x 10^4	1.56	6.65 x 10^{-7} – 3.39 x 10^{-5}
Vitamin E	y=2.65x10^4c+0.003 r=0.9962	2.65 x 10^4	1.02	1.77 x 10^{-6} – 5.27 x 10^{-5}
Lauril Gallat	y=6.38x10^4c+0.025 r=0.9959	6.38 x 10^4	2.45	3.92 x 10^{-7} – 2.16 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=2.65x10^4c-0.013 r=0.9974	2.65 x 10^4	1.02	2.38 x 10^{-6} – 5.33 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=1.22x10^4c+0.016 r=0.9996	1.22 x 10^4	0.47	3.97 x 10^{-6} – 1.13 x 10^{-4}
Tert-Butil Hidrokinon	y=2.59x10^4c-0.008 r=0.9996	2.59 x 10^4	1.00	2.24 x 10^{-6} – 5.44 x 10^{-5}

Tablo 4.10: %100 MeOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri

Antioksidan	Denklem	ε	TEAC	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	y=7.44x10^4c+0.036 r=0.9995	7.44 x 10^4	2.85	1.88 x 10^{-7} – 1.83 x 10^{-5}
Ferulik Asid	y=5.50x10^4c+0.013 r=0.9959	5.50 x 10^4	2.11	6.73 x 10^{-7} – 2.52 x 10^{-5}
Kateşin	y=7.69x10^4c-0.017 r=0.9996	7.69 x 10^4	2.95	8.71 x 10^{-7} – 1.84 x 10^{-5}
Askorbik Asid	y=2.24x10^4c-0.003 r=0.9991	2.24 x 10^4	0.86	2.37 x 10^{-6} – 6.26 x 10^{-5}
Naringenin	-	-	-	-
Glutatyon	y=3.18x10^4c+0.005 r=0.9999	3.18 x 10^4	1.22	1.41 x 10^{-6} – 4.39 x 10^{-5}
Vitamin E	y=2.62x10^4c-0.03 r=0.9972	2.62 x 10^4	1.00	3.05 x 10^{-6} – 5.46 x 10^{-5}
Lauril Gallat	y=5.89x10^4c+0.04 r=0.9947	5.89 x 10^4	2.26	1.70 x 10^{-7} – 2.31 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=2.62x10^4c-0.018 r=0.9994	2.62 x 10^4	1.00	2.60 x 10^{-6} – 5.41 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=1.32x10^4c+0.007 r=0.9999	1.32 x 10^4	0.50	3.26 x 10^{-6} – 1.06 x 10^{-4}
Tert-Butil Hidrokinon	y=2.20x10^4c+0.005 r=0.9997	2.20 x 10^4	0.84	2.04 x 10^{-6} – 6.34 x 10^{-5}

Tablo 4.11: MeOH:H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri

Antioksidan	Denklem	ε	TEAC	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	y=6.50x10^4c-0.031 r=0.9999	1.35 x 10^5	2.54	1.25 x 10^{-6} – 2.20 x 10^{-5}
Ferulik Asid	y=5.39x10^4c+0.022 r=0.9966	5.39 x 10^4	2.10	5.19 x 10^{-7} – 2.56 x 10^5
Kateşin	y=6.62x10^4c+0.03 r=0.9965	6.62 x 10^4	2.59	3.02 x 10^{-7} – 2.07 x 10^{-5}
Askorbik Asid	y=2.81x10^4c+0.006 r=0.9995	2.81 x 10^4	1.10	1.57 x 10^{-6} – 4.96 x 10^{-5}
Naringenin	-	-	-	-
Glutatyon	y=3.82x10^4c-0.009 r=0.9999	3.82 x 10^4	1.49	1.54 x 10^{-6} – 3.69 x 10^{-5}
Vitamin E	-	-	-	-
Lauril Gallat	y=3.86x10^4c+0.004 r=0.9999	3.86 x 10^4	1.51	1.19 x 10^{-6} – 3.62 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=2.52x10^4c-0.015 r=0.9988	2.52 x 10^4	0.99	2.58 x 10^{-6} – 5.62 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=1.54x10^3c+0.01 r=0.9995	1.54 x 10^3	0.60	2.60 x 10^{-6} – 9.02 x 10^{-5}
Tert-Butil Hidrokinon	y=2.62x10^4c-0.02 r=0.9976	2.62 x 10^4	1.02	2.67 x 10^{-6} – 5.42 x 10^{-5}

Tablo 4.12: MeOH:H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri

Antioksidan	Denklem	ε	TEAC	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	y=6.91x10^4c+0.012 r=0.9991	6.91 x 10^4	2.60	5.50 x 10^{-7} – 2.01 x 10^{-5}
Ferulik Asid	y=5.58x10^4c+0.02 r=0.9994	5.58 x 10^4	2.10	5.38 x 10^{-7} – 2.47 x 10^{-5}
Kateşin	y=7.72x10^4c+0.023 r=0.9987	7.72 x 10^4	2.91	3.50 x 10^{-7} – 1.78 x 10^{-5}
Askorbik Asit	y=2.18x10^4c+0.014 r=0.9980	2.18 x 10^4	0.82	1.65 x 10^{-6} – 6.36 x 10^{-5}
Naringenin	-	-	-	-
Glutatyon	y=3.14x10^4c+0.008 r=0.9992	3.14 x 10^4	1.18	1.34 x 10^{-6} – 4.43 x 10^{-5}
Vitamin E	-	-	-	-
Lauril Gallat	y=7.01x10^4c+0.002 r=0.9993	7.01 x 10^4	2.64	6.85 x 10^{-7} – 1.99 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=3.04x10^4c-0.017 r=0.9995	3.04 x 10^4	1.14	2.20 x 10^{-6} – 4.66 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=1.31x10^4c-0.003 r=0.9999	1.31 x 10^4	0.49	4.05 x 10^{-6} – 1.07 x 10^{-5}
Tert-Butil Hidrokinon	y=2.96x10^4c-0.007 r=0.9993	2.96 x 10^4	1.12	1.93 x 10^{-6} – 4.75 x 10^{-5}

Tablo 4.13: DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin ABTS-persülfat yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	ε	TEAC	Lineer aralık (M)
Kuersetin	y=4.65x10^4c+0.062 r=0.9952	4.65 x 10^4	2.00	1.72 x 10^{-7} – 2.88 x 10^{-5}
Ferulik Asit	y=3.39x10^4c+0.001 r=0.9999	3.39 x 10^4	1.45	1.47 x 10^{-5} – 4.13 x 10^{-5}
Kateşin	y=2.94x10^4c+0.06 r=0.9995	2.94 x 10^4	1.26	3.40 x 10^{-7} – 4.55 x 10^{-5}
Askorbik Asid	y=2.11x10^4c+0.011 r=0.9989	2.11 x 10^4	0.91	1.85 x 10^{-6} – 6.59 x 10^{-5}
Naringenin	y=5.50x10^4c+0.20 r=0.9949	5.50 x 10^4	2.36	1.82 x 10^{-7} – 2.18 x 10^{-5}
Vitamin E	y=2.08x10^4c-0.017 r=0.9969	2.08 x 10^4	0.89	3.22 x 10^{-6} – 6.82 x 10^{-5}
Lauril Gallat	y=5.46x10^4c-0.014 r=0.9983	5.46 x 10^4	2.34	1.17 x 10^{-6} – 2.59 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=2.65x10^4c-0.039 r=0.9998	2.65 x 10^4	1.14	3.36 x 10^{-6} – 5.43 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=3.69x10^3c-0.156 r= 0.9804 y*=2.44x10^4c-0.065 r=0.9993	3.69 x 10^3 2.44 x 10^4	0.16 1.04	3.36 x 10^{-6} – 5.43 x 10^{-5} 2.04 x 10^{-7} – 5.46 x 10^{-5}
Tert-Butil Hidrokinon	y=2.83x10^4c+0.005 r=0.9995	2.83 x 10^4	1.21	1.59 x 10^{-6} – 4.92 x 10^{-5}

*BHA iç standardı varlığında elde edilen denklem

4.1.4. Polifenolik Bileşiklerin FRAP Yöntemine Göre Farklı Çözücü Ortamlarında Molar Absorplama Katsayıları, Lineer Çalışma Aralıkları ve TEAC Katsayılarının Belirlenmesi

%100 EtOH, %100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamlarında 1 mM derişimindeki antioksidan bileşiklerin (kuersetin, ferulik asid, kateşin, askorbik asid, naringenin, glutatyon, vitamin E, lauril gallat, butillenmiş hidroksi anizol, butillenmiş hidroksi toluen, *tert*-butil hidrokinon) molar absorplama katsayıları (ε), TEAC değerleri, lineer çalışma aralıkları FRAP yöntemine göre molar konsantrasyon-absorbans arasındaki kalibrasyon doğru denklemleri hesaplanarak elde edilmiştir (Tablo 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17). DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında FRAP yönteminin antioksidanlara cevap vermediği gözlenmiştir. Vitamin E'nin MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamlarında homojen bir çözeltisi hazırlanamadığından ölçüm yapılamamıştır. NG ve GSH, FRAP yöntemiyle dedekte edilememiştir.

Tablo 4.14: %100 EtOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin FRAP yöntemi verileri

Antioksidan	Denklem	ε	TEAC	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	y=1.23x10^5c+0.008 r=0.9993	1.23x10^5	2.85	3.41 x 10^{-7} – 1.13 x 10^{-5}
Ferulik Asit	y=4.73x10^4c+0.003 r=0.9996	4.73x10^4	1.09	9.94 x 10^{-7} – 2.95 x 10^{-5}
Kateşin	y=4.43x10^4c-0.002 r=0.9999	4.43x10^4	1.02	1.17 x 10^{-6} – 3.16 x 10^{-5}
Askorbik Asit	y=4.49x10^4c-0.007 r=0.9994	4.49x10^4	1.03	1.27 x 10^{-6} – 3.13 x 10^{-5}
Naringenin	-	-	-	-
Glutatyon	-	-	-	-
Vitamin E	y=4.39x10^4c-0.001 r=0.9994	4.39x10^4	1.02	1.16 x 10^{-6} – 3.19 x 10^{-5}
Lauril Gallat	y=2.43x10^4c-0.016 r=0.9989	2.43x10^4	0.56	2.72 x 10^{-6} – 5.83 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=5.52x10^4c-0.007 r=0.9994	5.52x10^4	1.28	1.03 x 10^{-6} – 2.55 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=8.55x10^4c-0.009 r=0.9983	8.85x10^3	0.20	7.27 x 10^{-6} – 1.30 x 10^{-4}
Tert-Butil Hidrokinon	y=4.20x10^4c-0.015 r=0.9997	4.20x10^4	0.97	1.55 x 10^{-6} – 3.37 x 10^{-5}

Tablo 4.15: %100 MeOH çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin FRAP yöntemi verileri

Antioksidan	Denklem	ε	TEAC	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	$y=1.17x10^5c+0.002$ $r=0.9999$	1.17×10^5	2.79	$4.10 \times 10^{-7} – 1.19 \times 10^{-5}$
Ferulik Asid	$y=3.68x10^4c+0.014$ $r=0.9999$	3.68×10^4	0.88	$9.78 \times 10^{-7} – 3.77 \times 10^{-5}$
Kateşin	$y=4.16x10^4c+0.026$ $r=0.9994$	4.16×10^4	0.99	$5.77 \times 10^{-7} – 2.98 \times 10^{-5}$
Askorbik Asid	$y=4.24x10^4c+0.007$ $r=0.9996$	4.24×10^4	1.01	$1.01 \times 10^{-6} – 3.26 \times 10^{-5}$
Naringenin	-	-	-	-
Glutatyon	-	-	-	-
Vitamin E	$y=4.02x10^4c+0.007$ $r=0.9998$	4.02×10^4	0.96	$1.07 \times 10^{-6} – 3.47 \times 10^{-5}$
Lauril Gallat	$y=2.33x10^4c+0.014$ $r=0.9993$	2.33×10^4	0.55	$2.75 \times 10^{-6} – 5.95 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Anizol	$y=5.52x10^4c+0.002$ $r=0.9999$	5.52×10^4	1.31	$8.69 \times 10^{-7} – 2.53 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Toluen	$y=6.08x10^3c-0.009$ $r=0.9994$	6.08×10^3	0.14	$9.70 \times 10^{-6} – 2.32 \times 10^{-4}$
Tert-Butil Hidrokinon	$y=4.10x10^4c+0.044$ $r=0.9992$	4.10×10^4	0.98	$1.46 \times 10^{-7} – 3.31 \times 10^{-5}$

Tablo 4.16: MeOH:H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin FRAP yöntemi verileri

Antioksidan	Denklem	ε	TEAC	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	$y=1.17x10^5c-0.003$ $r=0.9998$	$1.17x10^5$	2.70	$4.53 \times 10^{-7} – 1.20 \times 10^{-5}$
Ferulik Asid	$y=3.68x10^4c+0.007$ $r=0.9993$	$3.68x10^4$	0.85	$1.17 \times 10^{-6} – 3.79 \times 10^{-5}$
Kateşin	$y=4.30x10^4c+0.013$ $r=0.9999$	$4.30x10^4$	0.99	$8.60 \times 10^{-7} – 3.22 \times 10^{-5}$
Askorbik Asid	$y=4.03x10^4c+0.001$ $r=0.9997$	$4.03x10^4$	0.93	$1.22 \times 10^{-6} – 3.47 \times 10^{-5}$
Naringenin	-	-	-	-
Glutatyon	-	-	-	-
Vitamin E	-	-	-	-
Lauril Gallat	$y=2.49x10^4c-0.008$ $r=0.9996$	$2.49x10^4$	0.57	$2.33 \times 10^{-6} – 5.65 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Anizol	$y=4.81x10^4c+0.002$ r=0.9994	$4.81x10^4$	1.11	$9.98 \times 10^{-7} – 2.91 \times 10^{-5}$
Butillenmiş Hidroksi Toluen	$y=5.96x10^3c-0.014$ $r=0.9990$	$5.96x10^3$	0.14	$1.07 \times 10^{-5} – 2.37 \times 10^{-4}$
Tert-Butil Hidrokinon	$y=4.40x10^4c+0.019$ $r=0.9994$	$4.40x10^4$	1.01	$7.05 \times 10^{-7} – 3.14 \times 10^{-5}$

Tablo 4.17: MeOH:H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin FRAP yöntemi verileri

Antioksidan	Denklem	ε	TEAC	Lineer Aralık (M)
Kuersetin	y=1.35x10^5c-0.03 r=0.9999	1.35 x 10^5	3.27	4.10 x 10^{-7} – 1.19 x 10^{-5}
Ferulik Asid	y=3.96x10^4c+0.035 r=0.9992	3.96 x 10^4	0.96	9.78 x 10^{-7} – 3.77 x 10^{-5}
Kateşin	y=4.60x10^4c-0.015 r=0.9993	4.60 x 10^4	1.12	5.77 x 10^{-7} – 2.98 x 10^{-5}
Askorbik Asid	y=4.64x10^4c+0.009 r=0.9998	4.64 x 10^4	1.13	1.01 x 10^{-6} – 3.26 x 10^{-5}
Naringenin	-	-	-	-
Glutatyon	-	-	-	-
Vitamin E	-	-	-	-
Lauril Gallat	y=2.34x10^4c+0.014 r=0.9997	2.34 x 10^4	0.57	2.75 x 10^{-6} – 5.95 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Anizol	y=5.24x10^4c+0.017 r=0.9988	5.24 x 10^4	1.28	8.69 x 10^{-7} – 2.53 x 10^{-5}
Butillenmiş Hidroksi Toluen	y=7.00x10^3c+0.01 r=0.9998	6.08 x 10^3	0.17	9.70 x 10^{-6} – 2.32 x 10^{-4}
Tert-Butil Hidrokinon	y=4.99x10^4c-0.036 r=0.9994	4.10 x 10^4	1.22	1.46 x 10^{-7} – 3.31 x 10^{-5}

Bu çalışma kapsamında kullanılan tüm lipofilik veya hidrofilik özelliğe sahip antioksidan bileşiklerin %100 EtOH, %100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v), MeOH/H_2O (1:1, v/v) ve DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamlarında 1 mM derişiminde hazırlanmış çözeltilerinin CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemlerine göre elde edilen TEAC katsayıları özetle Tablo 4.18'de verilmiştir.

Tablo 4.18: Beş farklı çözücü ortamında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemi ile elde edilen TEAC katsayıları

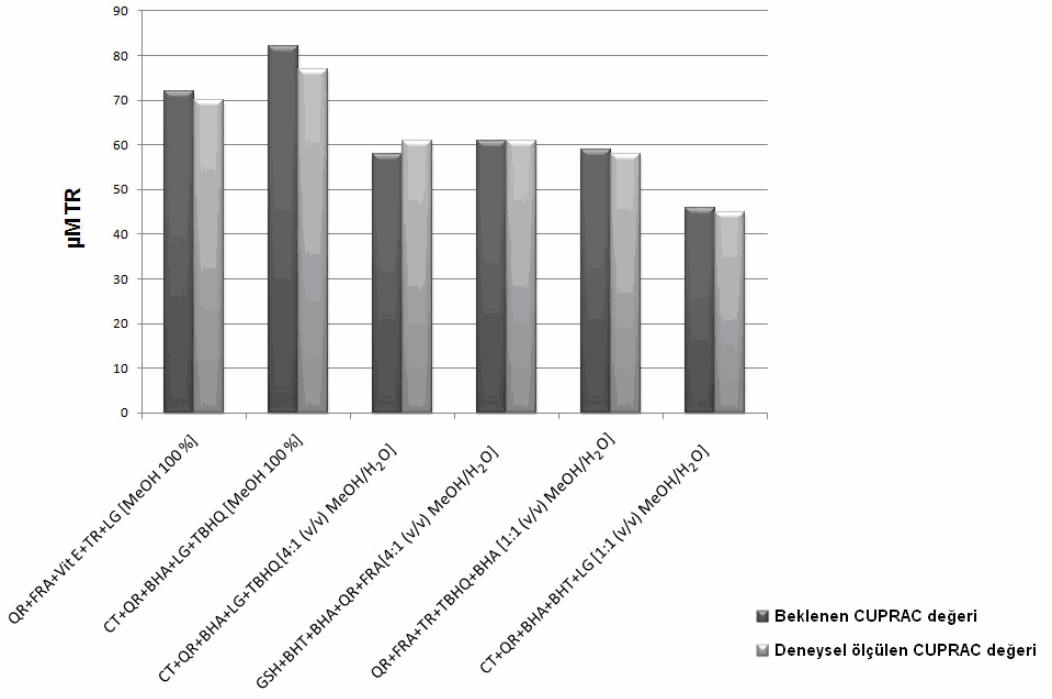
	$TEAC_{CUPRAC}$					**$TEAC_{ABTS\text{-}persülfat}$**					**$TEAC_{FRAP}$**			
Antioksidan	EtOH %100	MeOH %100	MeOH/ H_2O (4:1, v/v)	MeOH/ H_2O (1:1, v/v)	DCM/ EtOH (9:1, v/v)	EtOH %100	MeOH %100	MeOH/ H_2O (4:1, v/v)	MeOH/ H_2O (1:1, v/v)	DCM/ EtOH (9:1, v/v)	EtOH %100	MeOH %100	MeOH/ H_2O (4:1, v/v)	MeOH/ H_2O (1:1, v/v)
Troloks (TR)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Kuersetin (QR)	4.38	5.54	5.22	5.78	3.38	2.77	2.85	2.60	2.54	2.00	2.79	2.85	2.70	3.27
Ferulik Asid (FRA)	1.20	1.38	1.29	1.30	1.11	2.16	2.11	2.10	2.10	1.45	0.88	1.09	0.85	0.96
Kateşin (CT)	3.09	3.70	3.31	3.46	3.30	3.15	2.95	2.91	2.59	1.26	0.99	1.02	0.99	1.12
Askorbik Asid (AA)	0.96	1.12	1.11	1.04	-	1.08	0.86	0.82	1.10	-	1.01	1.03	0.93	1.13
Naringenin[a] (NG)	0.05 (2.28)	0.57 (3.04)	0.71 (3.74)	0.36 (2.11)	1.07	0.64	-	-	-	2.36	ND	ND	ND	ND
Glutatyon (GSH)	0.57	0.56	0.54	0.54	-	1.56	1.22	1.18	1.49	-	ND	ND	ND	ND
Vitamin E	1.10	1.02	-	-	1.11	1.02	1.00	-	-	0.89	0.96	1.02	-	-
Lauril gallat (LG)	1.63	1.68	1.86	1.92	2.42	2.45	2.26	2.64	2.54	2.34	0.55	0.56	0.57	0.57
Butillenmiş Hidroksi Anizol (BHA)	1.40	1.48	1.50	1.45	0.97	1.02	1.00	1.14	0.99	1.14	1.31	1.28	1.11	1.28
Butillenmiş hidroksi Toluen[b] (BHT)	1.15	1.56	2.07	1.92	0.07 0.95[b]	0.47	0.50	0.49	0.60	0.16 1.04[b]	0.14	0.20	0.14	0.17
Tert-Butil Hidrokinon (TBHQ)	0.94	0.99	1.08	1.10	0.95	1.00	0.84	1.12	1.02	1.21	0.98	0.97	1.01	1.22

[a] $TEAC_{CUPRAC}$ kolonunda ( ) içinde verilen değerler naringeninin $TEAC_{ink}$ değerleridir.

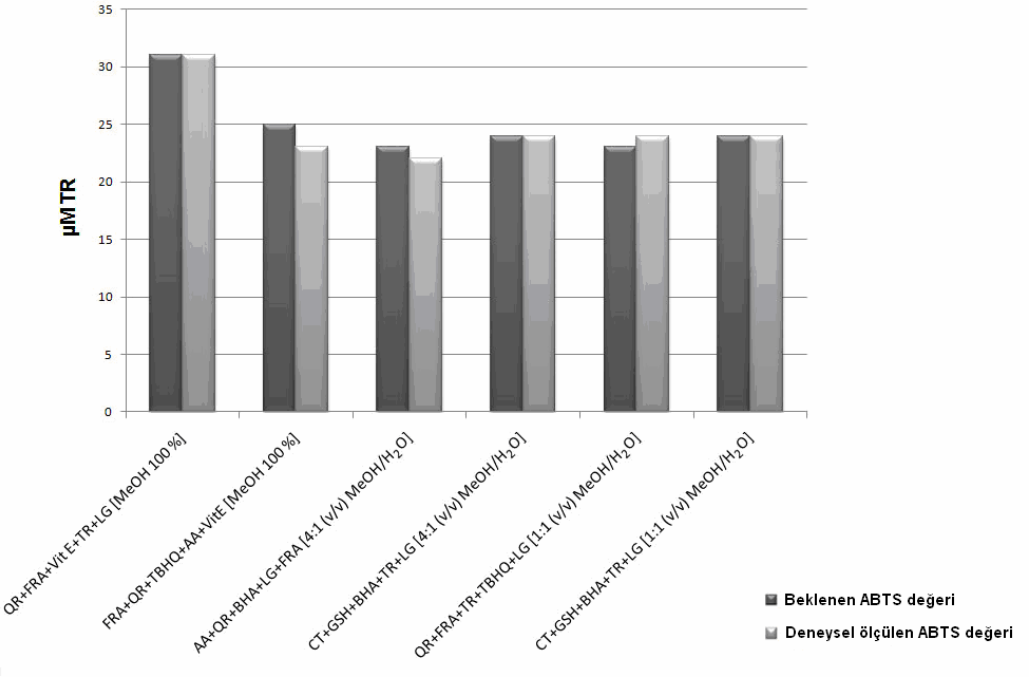
[b] BHT'nin BHA iç standardı varlığındaki $TEAC_{CUPRAC}$ ve $TEAC_{ABTS\text{-}persülfat}$ değerleridir.

4.1.5. Metanol Çözücü Ortamında Sentetik Antioksidan Karışımlarının CUPRAC, ABTS-Persülfat ve FRAP Yöntemlerine Göre Değerlendirilmesi

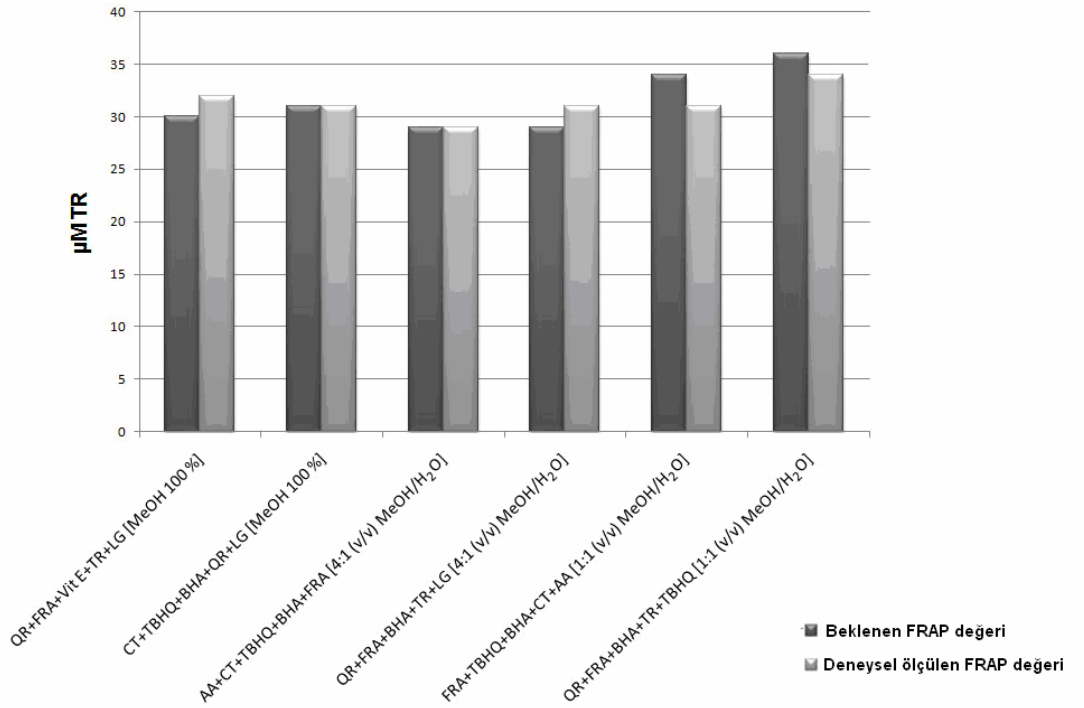
Konsantrasyonları 1 mM olan antioksidan bileşikler için farklı kombinasyonlarda beşli karışımlar oluşturulup CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemlerine göre antioksidan kapasitelerin toplamsallığı varsayımıyla beklenen ve deneysel ölçülen antioksidan kapasiteleri μM troloks ekivalenti cinsinden Eşitlik (3.4) ve (3.5)'e göre hesaplanmıştır. Şekil 4.2'de CUPRAC yöntemi sonuçları, Şekil 4.3'de ABTS-persülfat yöntemi sonuçları, Şekil 4.4'de FRAP yöntemi sonuçları verilmiştir.



Şekil 4.2: CUPRAC yöntemi kullanılarak farklı metanol çözücü ortamlarında hazırlanan beşli sentetik lipofilik ve hidrofilik antioksidan karışımlarının beklenen ve deneysel ölçülen troloks eşdeğeri antioksidan kapasitelerinin (μM TR) karşılaştırılması (P= 0.05 için $F_{deneysel}$= 0.882, F_{kritik}= 6.608, $F_{deneysel} < F_{kritik}$).



Şekil 4.3: ABTS-persülfat yöntemi kullanılarak farklı metanol çözücü ortamlarında hazırlanan beşli sentetik lipofilik ve hidrofilik antioksidan karışımlarının beklenen ve deneysel ölçülen troloks eşdeğeri antioksidan kapasitelerinin (µM TR) karşılaştırılması (P= 0.05 için $F_{deneysel}$ = 0.625, F_{kritik}= 6.608, $F_{deneysel} < F_{kritik}$).



Şekil 4.4: FRAP yöntemi kullanılarak farklı metanol çözücü ortamlarında hazırlanan beşli sentetik lipofilik ve hidrofilik antioksidan karışımlarının beklenen ve deneysel ölçülen troloks eşdeğeri antioksidan kapasitelerinin (µM TR) karşılaştırılması (P= 0.05 için $F_{deneysel}$= 0.040, F_{kritik}= 6.608, $F_{deneysel} < F_{kritik}$).

4.1.6. CUPRAC, ABTS-Persülfat ve FRAP Yöntemlerinde Sinerjik ve Antagonistik Etkileşimlerin Değerlendirilmesi

% 100 MeOH ve DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan ve konsantrasyonları 1 mM olan BHT ve BHA çözeltilerinden belirli hacimlerde alınıp iki farklı çözücüde ikili sentetik karışımları hazırlanmıştır. % 100 MeOH'de hazırlanmış 0.1 mM NG ve 1 mM BHT çözeltilerinden ikili sentetik karışım çözeltisi hazırlanmıştır. Bu karışım çözeltilerine CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemleri uygulanarak beklenen ve deneysel ölçülen antioksidan kapasiteleri μM troloks ekivalenti cinsinden Eşitlik (3.4) ve (3.5)'e göre hesaplanmıştır. İkili sentetik karışımları oluşturan antioksidan bileşikler arasında sinerjik veya antagonistik etkileşimler incelenmiştir (Tablo 4.19).

Tablo 4.19: Farklı çözücü ortamlarında BHT-BHA ve BHT-NG bileşikleri arasındaki sinerjik ve antagonistik etkileşimler

Sentetik Karışım Çözeltisi	TAC_{CUPRAC} (μM TR)		$TAC_{ABTS\text{-}persülfat}$ (μM TR)		TAC_{FRAP} (μM TR)	
	Beklenen Kapasite	Deneysel Ölçülen Kapasite	Beklenen Kapasite	Deneysel Ölçülen Kapasite	Beklenen Kapasite	Deneysel Ölçülen Kapasite
0.2 mL 0.1 mM NG 50 μL 1 mM BHT (%100 MeOH)	24 42[b]	22 29[b]	-[a]	-[a]	ND	ND
20 μL 1 mM BHA 50 μL 1 mM BHT (% 100 MeOH)	37	39	9	5	10	16
50 μL 1 mM BHA 50 μL 1 mM BHT (DCM/EtOH (9:1; v/v)	12	24[c]	13	23[c]	ND	ND

ND: Dedekte edilememiştir.

[a] NG'nin çalışma derişimi aralığında ABTS/persülfat yöntemi tekrarlanabilir değildir.

[b] TAC (inkübasyonlu CUPRAC yöntem verileri)

[c] Karışım çözeltisinde BHA ve BHT'nin yan yana olması sonucu sinerjik etki gözlenmiştir.

4.1.7. Farklı Çözücü Ortamlarında Hazırlanan Yeşil Çay Ekstrelerinin CUPRAC, ABTS-Persülfat ve FRAP Yöntemlerine Göre Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Eldesi

Bölüm 3.3.1 (ii)'de belirtilen şekilde ve %100 EtOH, % 100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan yeşil çay ekstrelerine

CUPRAC, ABTS-persülfat, FRAP yöntemleri uygulanmıştır ve denemeler 3'er kez tekrar edilmiştir. TAC değerleri Eşitlik (3.6)'da verilen hesaplama yöntemine göre mmol TR/g cinsinden hesaplanarak birbiriyle karşılaştırılmıştır (Tablo 4.20).

Tablo 4.20: Farklı çözücü ortamlarında hazırlanan yeşil çay ektrelerinin toplam antioksidan kapasite ölçümlerinin CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemlerine göre değerlendirilmesi

Yeşil çay ekstresi	**TAC_{CUPRAC} (mmol g^{-1} TR)**	**$TAC_{ABTS\text{-}persülfat}$ (mmol g^{-1} TR)**	**TAC_{FRAP} (mmol g^{-1} TR)**
%100 EtOH	1.00 ± 0.026	1.20 ± 0.096	0.44 ± 0.023
%100 MeOH	0.88 ± 0.015	1.08 ± 0.087	0.38 ± 0.020
MeOH/H_2O (4:1, v/v)	1.19 ± 0.036	1.34 ± 0.036	0.47 ± 0.010
MeOH/H_2O (1:1, v/v)	1.01 ± 0.015	1.26 ± 0.055	0.41 ± 0.010

4.1.8. BHT Katkılı Yeşil Çay Ekstresinin Toplam Antioksidan Kapasite Ölçümü

CUPRAC, ABTS-persülfat, FRAP yöntemleri Bölüm 3.3.1.'de belirtilen şekilde hazırlanan BHT katkılı ve katkısız yeşil çay ekstrelerinin (MeOH/H_2O, 4:1 (v/v)) toplam antioksidan kapasiteleri CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemleri uygulanarak mmol TR/g cinsinden belirlenmiştir. BHT katkılı yeşil çay ekstrelerinin ise $TAC_{beklenen}$ ve $TAC_{deneysel\ ölçülen}$ değerleri hesaplanmıştır. $TAC_{deneysel\ ölçülen}$ değerleri Eşitlik (3.5) kullanılarak hesaplanmıştır. $TAC_{beklenen}$ değerleri katkısız yeşil çay ekstresinin TAC değeri ile BHT'nin tek başına göstermiş olduğu $TAC_{beklenen}$ değerinin toplanmasıyla elde edilmiştir (Tablo 4.21). Toplam antioksidan kapasite sonuçları birbiriyle karşılaştırılmıştır.

Tablo 4.21: BHT katkılı yeşil çay ekstrelerinin toplam antioksidan kapasitelerinin (TAC) CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemleriyle ölçümü (Çözücü: MeOH/H_2O, 4:1 (v/v))

Örnek	**TAC_{CUPRAC} (mmol g^{-1} TR)**	**$TAC_{ABTS\text{-}persülfat}$ (mmol g^{-1} TR)**
Yeşil çay	1.24 ± 0.03	1.08 ± 0.06
Yeşil çay + BHT	$TAC_{beklenen}$: 1.75 ± 0.03 $TAC_{deneysel\ ölçülen}$: 1.66 ± 0.04	$TAC_{beklenen}$: 1.20 ± 0.06 $TAC_{deneysel\ ölçülen}$: 1.26 ± 0.09

4.2. KOLON SONRASI TÜREVLENDİRMELİ HAT-ÜSTÜ HPLC-CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANTİOKSİDANLARIN TAYİNİ

4.2.1. Bazı Polifenolik Bileşiklerin Metanol Ortamındaki Troloks Eşdeğeri Cinsinden Antioksidan Kapasite (TEAC) Katsayılarının Belirlenmesi

Referans antioksidan olarak belirlenen troloksun %100 metanolde hazırlanan standard çözeltisine uygulanan CUPRAC yöntemi verileri ile absorbans ve derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiğinin eğiminden molar absorplama katsayısı hesaplanmıştır (Tablo 4.1). %100 metanolde hazırlanan gallik asid, kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epigallokateşingallat, klorojenik asid, kafeik asid, p-kumarik asid, ferulik asid, rozmarinik asid, mirisetin, kuersetin, luteolin ve KOH+EtOH çözücü karışımında hazırlanan apigeninin CUPRAC yöntemine göre molar absorblama katsayıları belirlenip bu değerlerin troloksun molar absorplama katsayısına bölünmesiyle elde edilen (Eşitlik 3.2) troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) hesaplanmıştır (Tablo 4.22).

Tablo 4.22: Metanol ortamında hazırlanan antioksidan bileşiklerin CUPRAC yöntemine göre troloks eşdeğeri cinsinden toplam antioksidan kapasite (TEAC) değerleri

Antioksidan	**$TEAC_{CUPRAC}$**
Troloks (TR)	1.00 ± 0.05
Gallik asit (GA)	2.98 ± 0.06
Kateşin (CT)	3.70 ± 0.12
Epikateşin (EC)	3.80 ±0.12
Epigallokateşin (EGC)	3.96 ± 0.17
Epikateşingallat (ECG)	5.60 ± 0.13
Epigallokateşingallat (EGCG)	6.33 ± 0.21
Klorojenik asid (CA)	2.88 ± 0.03
Kafeik asid (CFA)	3.40 ± 0.08
p-Kumarik asid (COU)	1.12 ± 0.04
Ferulik asid (FRA)	1.38 ± 0.08
Rozmarinik Asit (ROS)	4.95 ± 0.33
Mirisetin (MR)	4.10 ± 0.27
Kuersetin (QR)	5.57 ± 0.32
Luteolin (LT)	3.27 ± 0.13
Apigenin* (APG)	0.13 ± 0.01

*Apigenin KOH+EtOH karışımında hazırlanmıştır.

4.2.2. Polifenolik Bileşiklerin HPLC Yöntemi ile Tayini

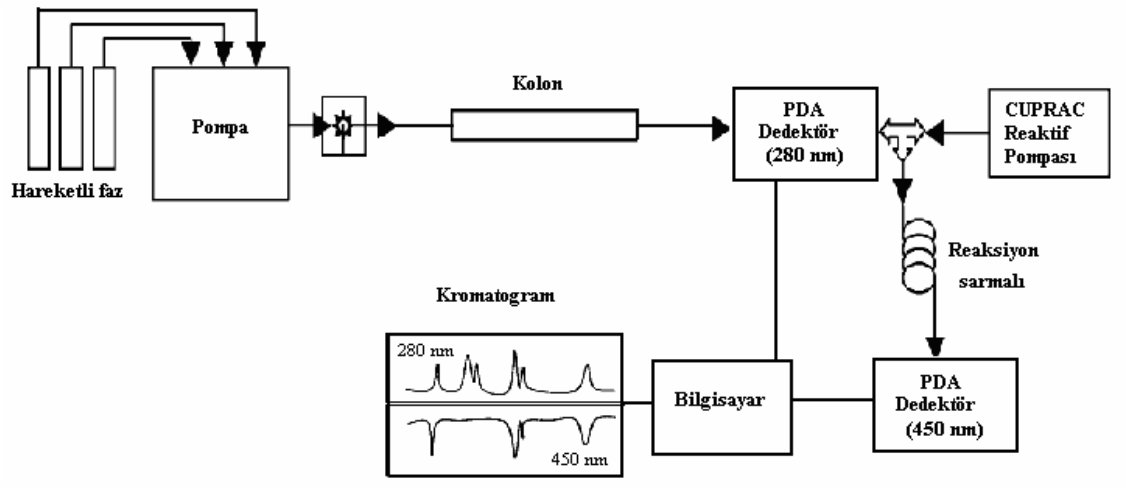
Metanol (A) ve %0.2 *o*-H_3PO_4 içeren bidestile su (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazlar kullanılarak geliştirilen ve Bölüm 3.4.2.2'de detayları verilen 3 farklı gradient elüsyon programı kullanılarak troloksun, çay antioksidanlarının ve fenolik antioksidanların HPLC yöntemiyle tayini gerçekleştirilmiştir. Tablo 4.23'de polifenolik bileşiklerin ilgili HPLC yöntemleri ile elde edilen alıkonma zamanları (t_R, lineer çalışma aralıkları, pik alanları (*y*) ile derişim (*c*) arasında çizilen kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları (*r*) görülmektedir.

Tablo 4.23: Troloks, çay antioksidanları ve fenolik antioksidanlarının HPLC kalibrasyon denklemleri, alıkonma zamanları ve lineer çalışma aralıkları

Antioksidan	**t_R (dak)**	**Lineer Aralık (mol L^{-1})**	**Kalibrasyon Denklemi ve korelasyon katsayısı (*r*)**
Referans			
Troloks	11.57	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	$y = 3.18 \times 10^{9} c - 7.95 \times 10^{3}$ $r = 0.9999$
Çay antioksidanları			
Gallik asid	9.88	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.38 \times 10^{10} c + 1.43 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
(-) Epigallokateşin	13.74	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.46 \times 10^{9} c + 1.75 \times 10^{3}$ $r = 0.9999$
(+) Kateşin	14.13	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 6.88 \times 10^{9} c - 1.30 \times 10^{4}$ $r = 0.9998$
(-) Epigallokateşin gallat	15.09	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.73 \times 10^{10} c - 2.29 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
(-) Epikateşin	16.04	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 7.79 \times 10^{9} c + 4.05 \times 10^{3}$ $r = 0.9999$
(-) Epikateşin gallat	17.11	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 8.77 \times 10^{9} c + 1.41 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
Fenolik antioksidanlar			
Kateşin	17.87	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 6.50 \times 10^{9} c + 7.46 \times 10^{3}$ $r = 0.9999$
Klorojenik asid	19.08	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.58 \times 10^{10} c + 1.54 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
Kafeik asid	21.15	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.82 \times 10^{10} c + 1.62 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
p-Kumarik asid	25.40	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 2.31 \times 10^{10} c - 1.66 \times 10^{4}$ $r = 0.9995$
Ferulik asid	26.25	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.72 \times 10^{10} c + 6.41 \times 10^{3}$ $r = 0.9999$
Rozmarinik asid	32.00	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.78 \times 10^{10} c + 6.97 \times 10^{3}$ $r = 0.9999$
Mirisetin	32.61	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.06 \times 10^{10} c + 7.43 \times 10^{3}$ $r = 0.9999$
Kuersetin	38.16	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.29 \times 10^{10} c + 3.93 \times 10^{2}$ $r = 0.9999$
Luteolin	39.56	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.49 \times 10^{10} c - 3.16 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
Apigenin	43.79	$2 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.84 \times 10^{10} c - 1.46 \times 10^{4}$ $r = 0.9994$

4.2.3. Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemi

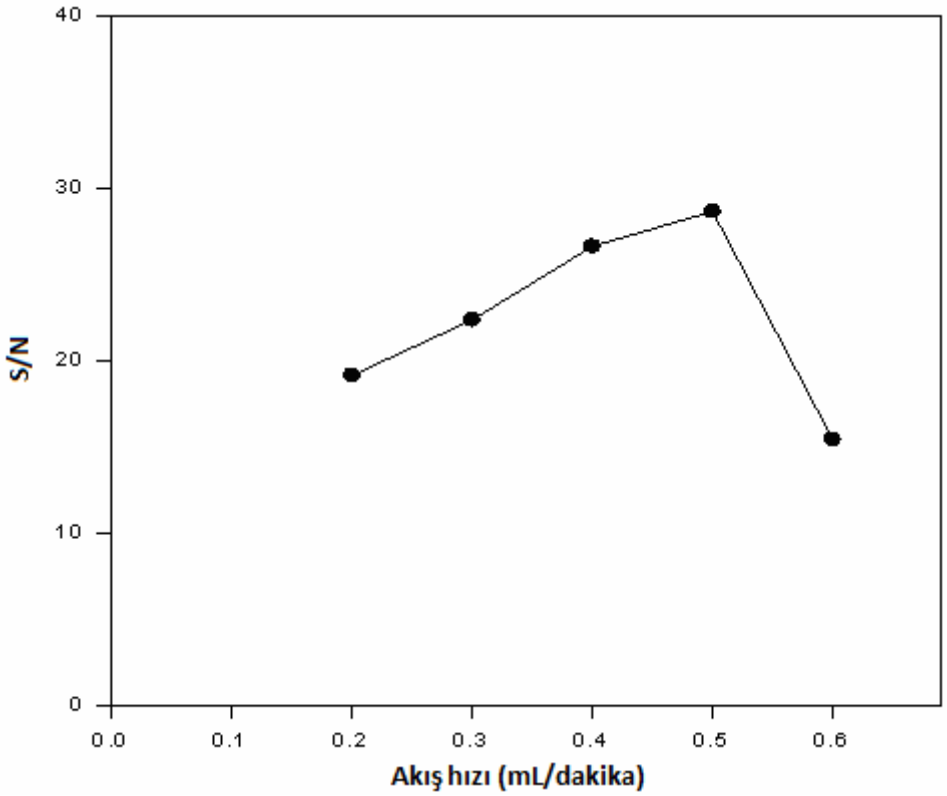
HPLC sistemine bir kolon-sonrası reaksiyon modülü (içerisinde yaklaşık 5 m uzunluğunda reaksiyon sarmalı bulunan) ve CUPRAC reaktifi içeren reaktif pompasının eklenmesiyle oluşan hat-üstü HPLC-CUPRAC sistemi Şekil 4.5'de şematik olarak verilmiştir.



Şekil 4.5: Hat-üstü HPLC-CUPRAC sisteminin şematik gösterimi

4.2.3.1. Akış Hızının Optimizasyonu

2 x 10^{-4} M troloks çözeltisi kullanılarak hat-üstü HPLC-CUPRAC sisteminde CUPRAC reaktifinin akış hızı optimize edilmiştir. 0.2 – 0.6 mL/dakika hızlarında CUPRAC reaktifi pompalanarak 450 nm'de troloksa eşdeğer Cu(I)-Nc kelatının kromatogramları elde edildi. Sabit troloks derişimine karşılık akış hızları değiştirilerek pikin sinyal/gürültü (S/N) oranları Waters Empower yazılımı ile otomatik olarak hesaplanmıştır ve akış hızı ile S/N değerleri arasında grafik çizilmiştir (Şekil 4.6). En yüksek S/N oranı 0.5 mL/dakika akış hızında elde edildiğinden optimum akış hızı 0.5 mL/dakika olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6: Farklı akış hızlarında CUPRAC reaktifine karşı 2 x 10^{-4} M troloks çözeltisinin sinyal/gürültü (S/N) oranları

4.2.3.2. CUPRAC Reaktifinin Derişiminin Optimizasyonu

2 x 10^{-4} M troloks çözeltisi kullanılarak hat-üstü HPLC-CUPRAC sisteminde CUPRAC reaktifinin derişimi optimize edilmiştir. Tablo 4.24'de farklı derişim oranları kullanılarak 0.5 mL/dakika akış hızında ve 450 nm'de dedekte edilen troloksa eşdeğer Cu(I)-Nc kelatının pikinin S/N değerleri görülmektedir. Bu verilere göre yüksek S/N değerine sahip CUPRAC reaktifi derişim oranı 3.33 mM Cu(II) / 2.5 mM Nc / 333 mM NH_4Ac (1:1:1, v/v/v) CUPRAC reaktif derişimi olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.24: Farklı CUPRAC reaktifi derişim oranlarında elde edilen troloksa eşdeğer Cu(I)-Nc pikinin sinyal/gürültü oranları

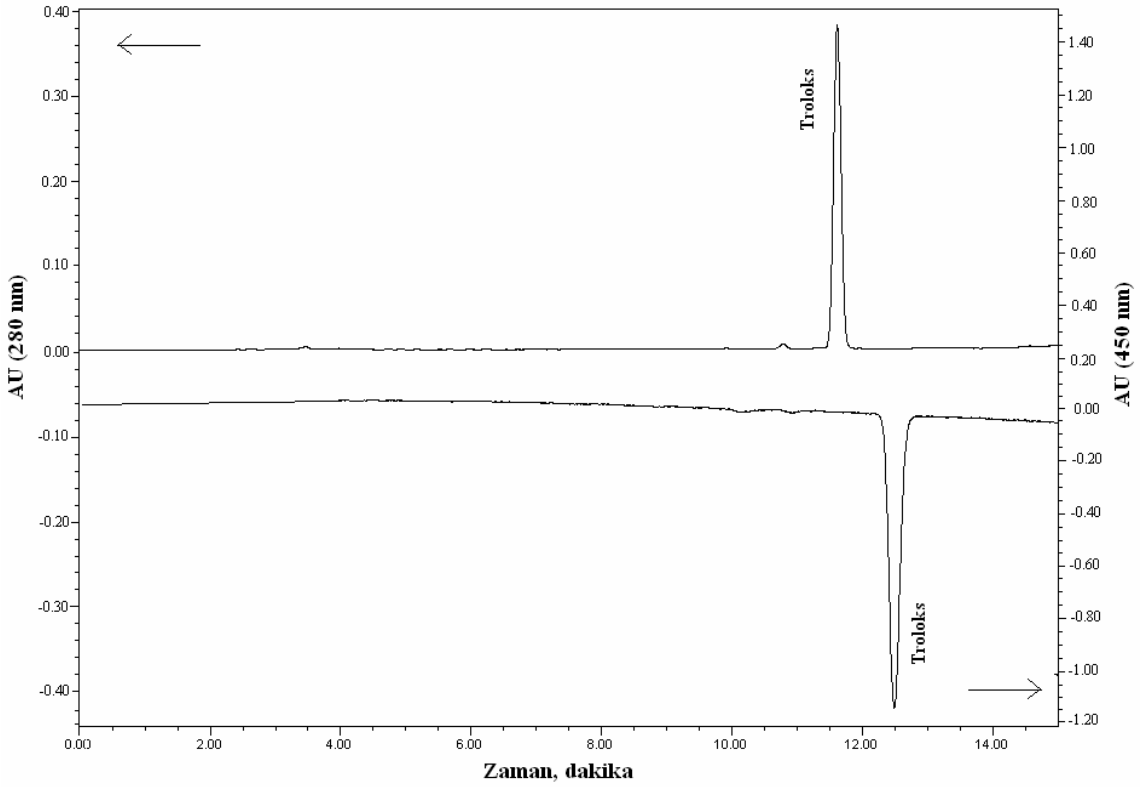
CUPRAC reaktifi derişimi	**Sinyal/gürültü oranı**
1.66 mM Cu(II) / 1.25 mM Nc / 166 mM NH_4Ac (1:1:1, v/v/v)	22.1
3.33 mM Cu(II) / 2.5 mM Nc / 333 mM NH_4Ac (1:1:1, v/v/v)	29.6

4.2.3.3. Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemiyle Polifenolik Bileşiklerin Tayini

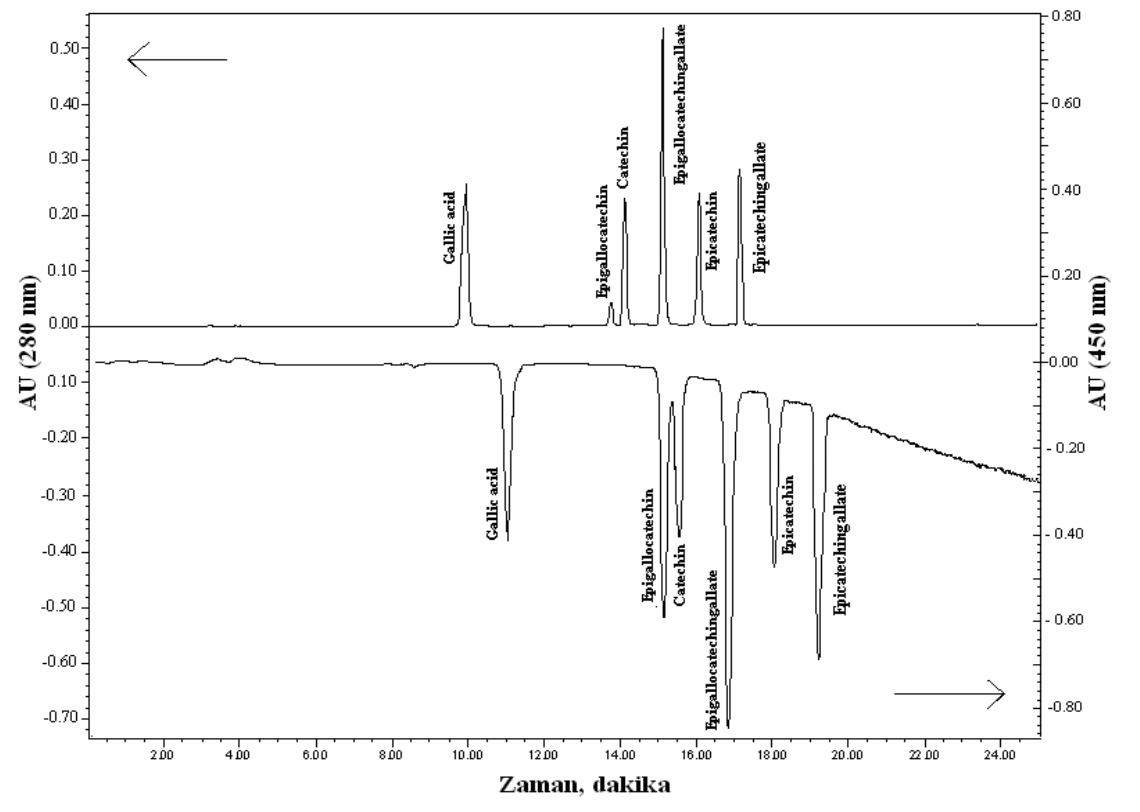
Troloks, çay antioksidanları ve fenolik antioksidanların hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle tayini gerçekleştirilmiştir. Metanol (A) ve %0.2 % 0.2 *o*-H_3PO_4 içeren bidestile su (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazlar kullanılarak geliştirilen ve Bölüm 3.4.2.2'de detayları verilen 3 farklı gradient elüsyon programı kullanılmıştır. Her bir gradient elüsyon programında 280 nm olarak belirlenen dalgaboyu, hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi için (Şekil 4.5) 450 nm'ye ayarlanmıştır.

Referans antioksidan troloksa ait kromatogramda pozitif alan 280 nm'deki absorbsiyonu ifade ederken, negatif alan 450 nm'de troloksa eşdeğer oranda elde edilen Cu(I)-Nc kelatının absorbsiyonunu ifade etmektedir (Şekil 4.7). Benzer şekilde çay antioksidanlarının (Şekil 4.8) ve fenolik antioksidanların (Şekil 4.9) belirlendiği HPLC elüsyon programları uygulanarak 280 nm (pozitif değerler) ve 450 nm (negatif değerler) dalgaboyundaki absorbsiyonlar elde edilmiştir. Kromatogramlardan elde edilen verilere göre, antioksidan bileşiklerin derişimi ile negatif pik alanları arasında kalibrasyon eğrileri çizilerek denklemleri hesaplanmıştır. Bu kalibrasyon denklemleri kolon sonrası CUPRAC reaktifiyle türevlendirilen ve her bir bileşenle reaktifin vermiş olduğu reaksiyon ürünü Cu(I)-Nc kelatının 450 nm'de belirlenmesiyle elde edilmiştir.

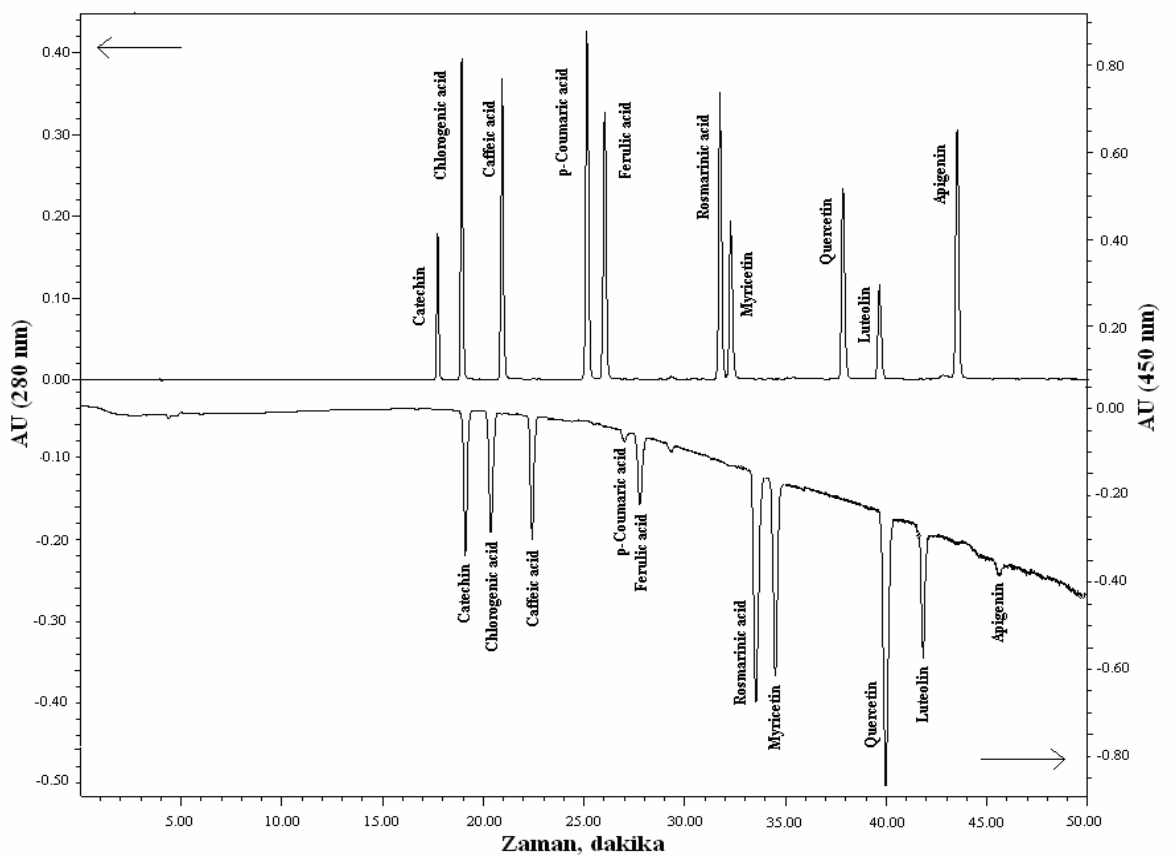
Tablo 4.25'de, hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi ile polifenolik bileşiklerin 450 nm'de elde edilen alıkonma zamanları (t_R), lineer çalışma aralıkları, negatif pik alanları (*y*) ile derişim (*c*) arasında çizilen kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları (*r*) görülmektedir.



Şekil 4.7: Troloks standardının HPLC (280 nm) ve hat-üstü HPLC-CUPRAC (450 nm) yöntemlerine göre elde edilen kromatogramları



Şekil 4.8: Çay antioksidanlarının sentetik karışımının HPLC (280 nm) ve hat-üstü HPLC-CUPRAC (450 nm) yöntemlerine göre elde edilen kromatogramları



Şekil 4.9: Fenolik antioksidanların sentetik karışımının HPLC (280 nm) ve hat-üstü HPLC-CUPRAC (450 nm) yöntemlerine göre elde edilen kromatogramları

Tablo 4.25: Troloks, çay antioksidanları ve fenolik antioksidanlarının hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi uygulanarak elde edilen alıkonma zamanları, lineer çalışma aralıkları ve kalibrasyon denklemleri

Antioksidan	**t_R (dak)**	**Lineer Aralık (mol L^{-1})**	**Kalibrasyon Denklemi ve korelasyon katsayısı (*r*)**
Referans			
Troloks	12.49	$1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-3}$	$y = 1.32 \times 10^{10}c + 3.33 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
Çay antioksidanları			
Gallik asid	11.32	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 3.07 \times 10^{10}c + 3.21 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
(-) Epigallokateşin	15.06	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 3.37 \times 10^{10}c + 1.06 \times 10^{5}$ $r = 0.9999$
(+) Kateşin	15.39	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.92 \times 10^{10}c + 8.57 \times 10^{4}$ $r = 0.9997$
(-) Epigallokateşin gallat	16.38	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 5.69 \times 10^{10}c + 1.30 \times 10^{5}$ $r = 0.9998$
(-) Epikateşin	17.32	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 2.20 \times 10^{10}c + 6.57 \times 10^{4}$ $r = 0.9996$
(-) Epikateşin gallat	18.34	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 4.31 \times 10^{10}c + 7.81 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
Fenolik antioksidanlar			
Kateşin	19.29	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.88 \times 10^{10}c + 7.46 \times 10^{4}$ $r = 0.9992$
Klorojenik asid	20.64	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.66 \times 10^{10}c + 6.99 \times 10^{4}$ $r = 0.9996$
Kafeik asid	22.87	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.83 \times 10^{10}c + 9.17 \times 10^{4}$ $r = 0.9992$
p-Kumarik asid	27.36	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.60 \times 10^{9}c + 1.23 \times 10^{4}$ $r = 0.9990$
Ferulik asid	28.09	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.19 \times 10^{10}c + 1.03 \times 10^{4}$ $r = 0.9993$
Rozmarinik asid	33.97	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 3.40 \times 10^{10}c + 5.82 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
Mirisetin	34.85	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 3.10 \times 10^{10}c + 3.26 \times 10^{4}$ $r = 0.9995$
Kuersetin	40.34	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 5.84 \times 10^{10}c + 2.15 \times 10^{4}$ $r = 0.9999$
Luteolin	42.32	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 3.87 \times 10^{10}c + 8.38 \times 10^{4}$ $r = 0.9998$
Apigenin	46.05	$4 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-4}$	$y = 1.12 \times 10^{9}c - 5.49 \times 10^{3}$ $r = 0.9999$

4.2.3.4. Çalışılan Polifenolik Antioksidanların Belirtme Sınırlarının (LOD) Belirlenmesi

Tablo 4.26'de troloks, çay antioksidanları ve fenolik antioksidanların UV belirtmeli HPLC yöntemi (280 nm), geliştirilen hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi (450 nm) ve literatürde sıklıkla kullanılan hat-üstü HPLC-DPPH yöntemi ile belirlenen LOD (belirtme sınırı) değerleri gösterilmiştir. LOD değerleri μM cinsinden hesaplanmıştır.

İlgili antioksidanların 280 nm ve 450 nm'deki alıkonma zamanları da karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Hat-üstü HPLC-CUPRAC verilerine göre hesaplanan LOD değerleri hat-üstü HPLC-DPPH yöntemi LOD değerlerine oranla oldukça düşük bulunmuştur.

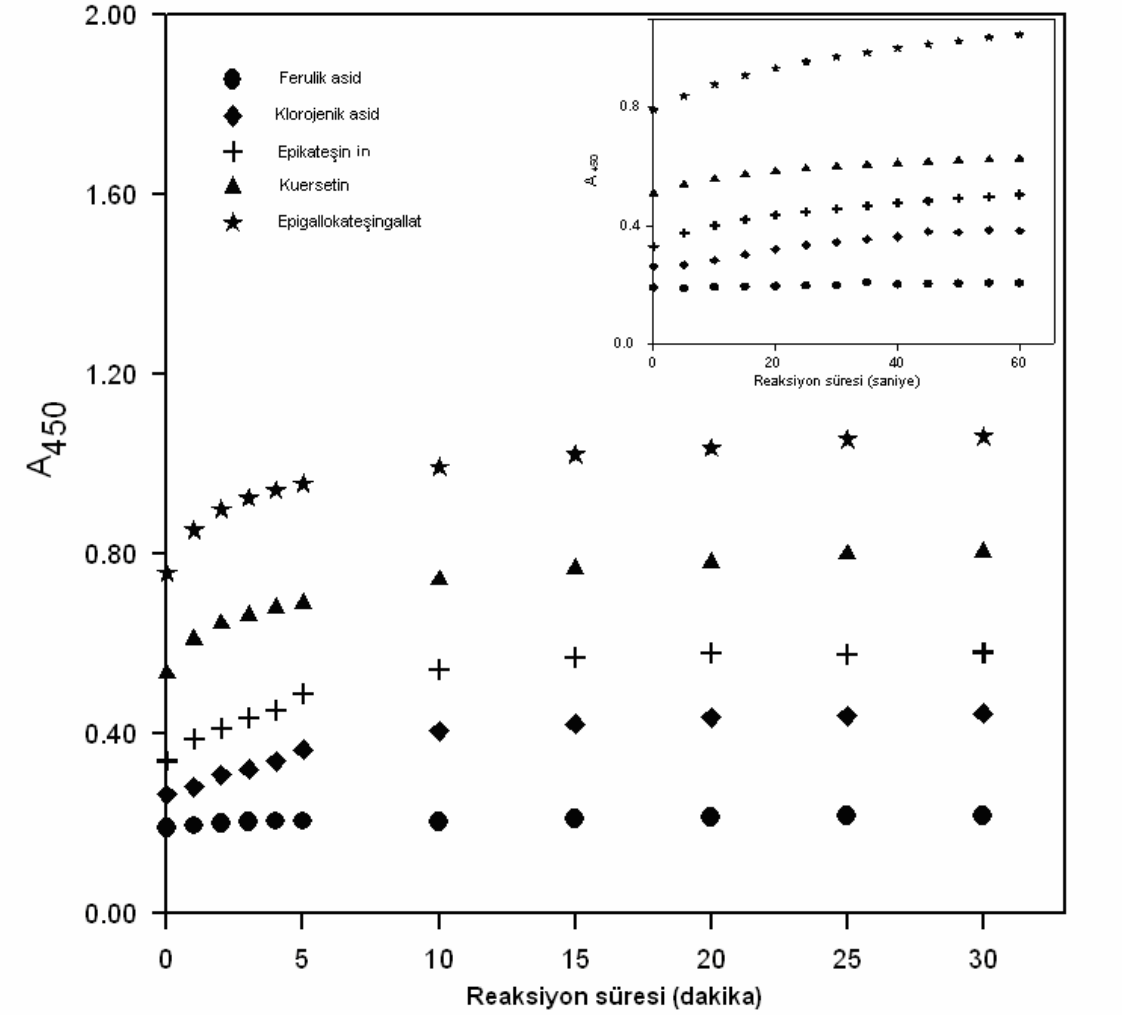
Tablo 4.26: HPLC, hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemlerine göre hesaplanan ve literatürden alınan hat-üstü HPLC-DPPH yönteminin LOD değerleri

Antioksidan	**$t_{R\ HPLC}$ (dakika)**	**$t_{R\ Hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ (dakika)**	**280 nm LOD (µM)**	**450 nm LOD (µM)**	**$LOD_{(DPPH)}$ (µM) [23,24]**
Referans					
Troloks	11.57	12.49	3.37	1.14	6.00
Çay antioksidanları					
Gallik asid	9.88	11.32	0.47	0.48	
(-) Epigallokateşin	13.74	15.06	0.54	1.42	
(+) Kateşin	14.13	15.39	2.55	1.98	
(-) Epigallokateşin gallat	15.09	16.38	1.79	1.03	
(-) Epikateşin	16.04	17.32	0.23	0.73	10.69
(-) Epikateşin gallat	17.11	18.34	0.72	0.82	2.49
Fenolik antioksidanlar					
Kateşin	17.87	19.29	0.52	1.78	32.46
Klorojenik asid	19.08	20.64	0.44	1.89	21.20
Kafeik asid	21.15	22.87	0.40	2.25	10.60
p-Kumarik asid	25.40	27.36	0.97	3.46	
Ferulik asid	26.25	28.09	0.17	0.39	39.69
Rozmarinik asid	32.00	33.97	0.18	0.77	2.30
Mirisetin	32.61	34.85	0.32	0.47	
Kuersetin	38.16	40.34	0.04	0.17	0.98
Luteolin	39.56	42.32	2.86	0.97	
Apigenin	43.79	46.05	1.07	2.21	

4.2.3.5. Çalışılan Polifenolik Antioksidanların CUPRAC Reaktifi Cu(II)-Nc İle Reaksiyon Kinetiğinin İncelenmesi

Kolon-sonrası reaksiyon modülünde CUPRAC reaktifi ile polifenolik bileşiklerin reaksiyona girme süreleri, hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle elde edilen alıkonma süreleri ile HPLC yöntemiyle elde edilen alıkonma süreleri arasındaki farktan elde edilmiştir. Bu fark yaklaşık 1 dakika olarak belirlenmiştir. Bu sebeple spektrofotometrik CUPRAC yöntemi kullanılarak polifenolik bileşiklerin Cu(II)-Nc reaktifi ile oksidasyon reaksiyonunun kinetiği incelenmiştir. Orijinal CUPRAC yönteminde optimum reaksiyon süresi 30 dakika olarak belirlendiğinden bazı polifenolik bileşiklerin (ferulik asid, klorojenik asid, epikateşin, kuersetin ve epigallokateşin gallat (C_{son}: 9.76 µM)) 1 dakikalık ve 30 dakikalık inkübasyon süresince 450 nm'deki absorbans değişimlerini gösteren kinetik grafiği çizilmiştir

(Şekil 4.10). Grafiklerden elde edilen verilere göre oksidasyon reaksiyonunun %80'ninin ilk 1 dakikada gerçekleştiği görülmüştür.



Şekil 4.10: Fenolik antioksidanların CUPRAC reaktifi Cu(II)-Nc kompleksi ile oksidasyon reaksiyonunun kinetiği

4.2.3.6. Sentetik Karışım Çözeltilerinin Toplam Antioksidan Kapasite (TAC) Tayini

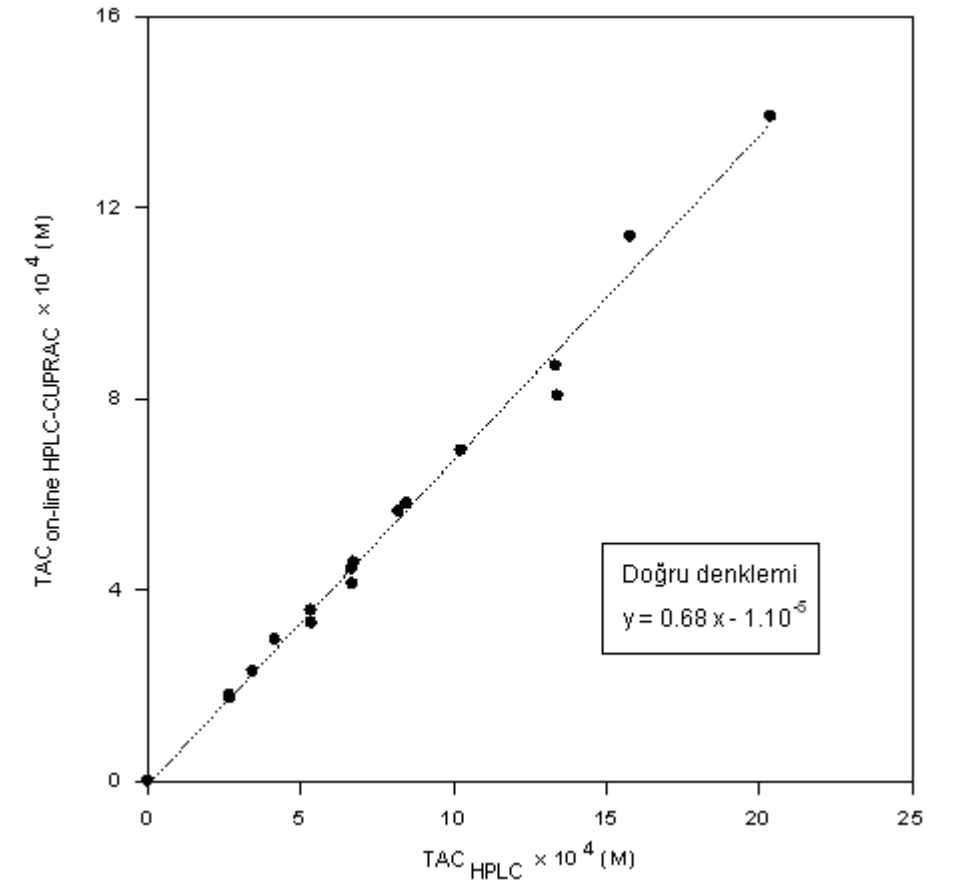
Son konsantrasyonları 0.1 mM olacak şekilde hazırlanan 4 farklı kombinasyonda ikili sentetik antioksidan karışım çözeltileri hazırlanıp her bir karışım çözeltisi HPLC sistemine enjekte edilerek ilgili pik alanlarından bileşiklerin derişimleri belirlenmiştir ve sentetik karışımın toplam antioksidan kapasite (TAC) değerleri mM cinsinden Eşitlik (3.7)'de verilen denkleme göre hesaplanmıştır. Aynı karışım çözeltilerine hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi uygulandıktan sonra 450 nm'de elde edilen negatif pik

alanları toplamı kullanılarak Eşitlik (3.9)'a göre $TAC_{Hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ değerleri elde edilmiştir. 280 nm'deki TAC_{HPLC} değerleri ile 450 nm'deki $TAC_{hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ değerleri arasında kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.11). Bu grafiğin denklemi;

$$y = 0.68\ x - 1.10^{-5} \quad r = 0.9947 \tag{4.1}$$

olarak elde edilmiştir. Doğrunun eğimi olan 0.68 değeri, hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle elde edilen TAC bulgularının HPLC yöntemiyle elde edilen bulguların %68'i olduğunu göstermektedir. Bu nedenle (1/0.68) = 1.47 sabiti kullanılarak gerçek $TAC_{hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ değerleri hesaplanmıştır:

$$TAC_{HPLC} = 1.47 \times TAC_{hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC} \tag{4.2}$$



Şekil 4.11: İkili sentetik karışım çözeltilerinin TAC_{HPLC} ve $TAC_{Hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ değerlerinin karşılaştırılması

Son derişimleri 0.1 mM olan dörtlü antioksidan karışım çözeltileri hazırlanıp bu çözeltilerin mM troloks eşdeğeri TAC değerleri; orijinal CUPRAC yöntemi, HPLC yöntemi ve geliştirilen hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle hesaplanmıştır. TAC değerleri, CUPRAC yöntemi için Eşitlik (3.5)'de; HPLC yöntemi için Eşitlik (3.7)'de; hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi için Eşitlik (3.9)'da ve Eşitlik (4.2)'de verilen denklemlere göre hesaplanmıştır. Hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi sonuçları 1.47 sabiti kullanılarak hesaplandığından bu değerlere düzeltilmiş değerler denilmiştir. Tüm hesaplama şekilleri kullanılarak her üç yönteme göre sentetik karışım çözeltilerinin mM TR eşdeğeri cinsinden TAC değerleri birbiriyle karşılaştırılmıştır. Yöntemler 3'er kez tekrar edilmiştir (N=3) ve ortalama TR derişimi verilmiştir. Yöntemlerin ikili olarak karşılaştırılmasında F- (varyans testi) ve t- testleri kullanılmıştır (Tablo 4.27).

Tablo 4.27: Sentetik antioksidan karışımlarının CUPRAC, HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemleriyle TAC değerlerinin karşılaştırılması

Karışım örneği	**Yöntem**	**Ort. Derişim (mM)**	**Std. Sapma (s)**	**S[a]**	**t**	**t_{tablo}**	**F**	**F_{tablo}**
Karışım 1[b]	Hat-üstü HPLC-CUPRAC[c]	1.37	0.05	-	-	-	-	-
	CUPRAC	1.47	0.04	0.04	2.70	2.78	1.56	19.00
Karışım 1[b]	Hat-üstü HPLC-CUPRAC[c]	1.37	0.05	-	-	-	-	-
	HPLC	1.45	0.03	0.04	2.37	2.78	2.78	19.00
Karışım 2[d]	Hat-üstü HPLC-CUPRAC[c]	1.67	0.06	-	-	-	-	-
	CUPRAC	1.71	0.03	0.05	1.03	2.78	4.00	19.00
Karışım 2[d]	Hat-üstü HPLC-CUPRAC[c]	1.67	0.06	-	-	-	-	-
	HPLC	1.69	0.03	0.05	0.51	2.78	4.00	19.00

[a] $S=\left[\left(\left(n_1-1\right)\cdot s_1^2+\left(n_2-1\right)\cdot s_2^2\right)\Big/\left(n_1+n_2-2\right)\right]^{1/2}$ ve $t_{exp}=\left(\bar{a}_1-\bar{a}_2\right)\Big/\left[S\cdot\left(1/n_1+1/n_2\right)^{1/2}\right]$

S: toplanmış standart sapma; s_1 ve s_2 numune sayısı n_1 ve n_2 olan iki nüfusun standart sapmaları; $\bar{a}_1$ ve $\bar{a}_2$ örnek ortalamaları; t= ($n_1 + n_2 - 2$) serbestlik derecesi ($n_1 = n_2 = 3$).

[b] Karışım 1= QR + FRA + ROS + CA; her bileşenin son derişimi= 0.1 mM

[c] Hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi sonuçları düzeltilmiş değerlerdir.

[d] Karışım 2= GA + EGCG + EC + EGC; her bileşenin son derişimi = 0.1 mM

4.2.3.7. Şifalı Bitki Ekstrelerinde TAC Tayini

MeOH/H_2O (4:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan şifalı bitki ekstreleri orijinal spektrofotometrik CUPRAC yöntemi, HPLC yöntemi ve hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi ile analiz edilmiştir. CUPRAC yöntemi için; MeOH/H_2O (4:1, v/v) ile 1:50 oranında seyreltilen her bir ekstreden farklı hacimlerde (yeşil çay: 0.1 mL; siyah çay: 0.3 mL; nane: 0.2 mL; mercan köşk: 0.2 mL) örnek alınarak ayrı ayrı CUPRAC yöntemi uygulanmıştır. Denemeler 3'er kez tekrarlanıp bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasiteleri Eşitlik (3.6)'dan hesaplanmıştır.

HPLC analizi için, bitki ekstreleri belirli oranlarda seyreltilip (yeşil çay (1:10), siyah çay (1:5), mercan köşk (1:5), nane (1:10)) filtreden geçirilerek ilgili elüsyon programları uygulanmıştır (Şekil 4.12-Şekil 4.15). Ekstrelerdeki bileşenler standart katkı yöntemi ile belirlendikten sonra her birinin derişimleri kalibrasyon denklemleri kullanılarak hesaplanmıştır. Bitki ekstrelerinin HPLC (CUPRAC hesaplamalı) yöntemi ile toplam antioksidan kapasite (TAC) değerleri CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları kullanılarak Eşitlik (3.8)'den hesaplanmıştır.

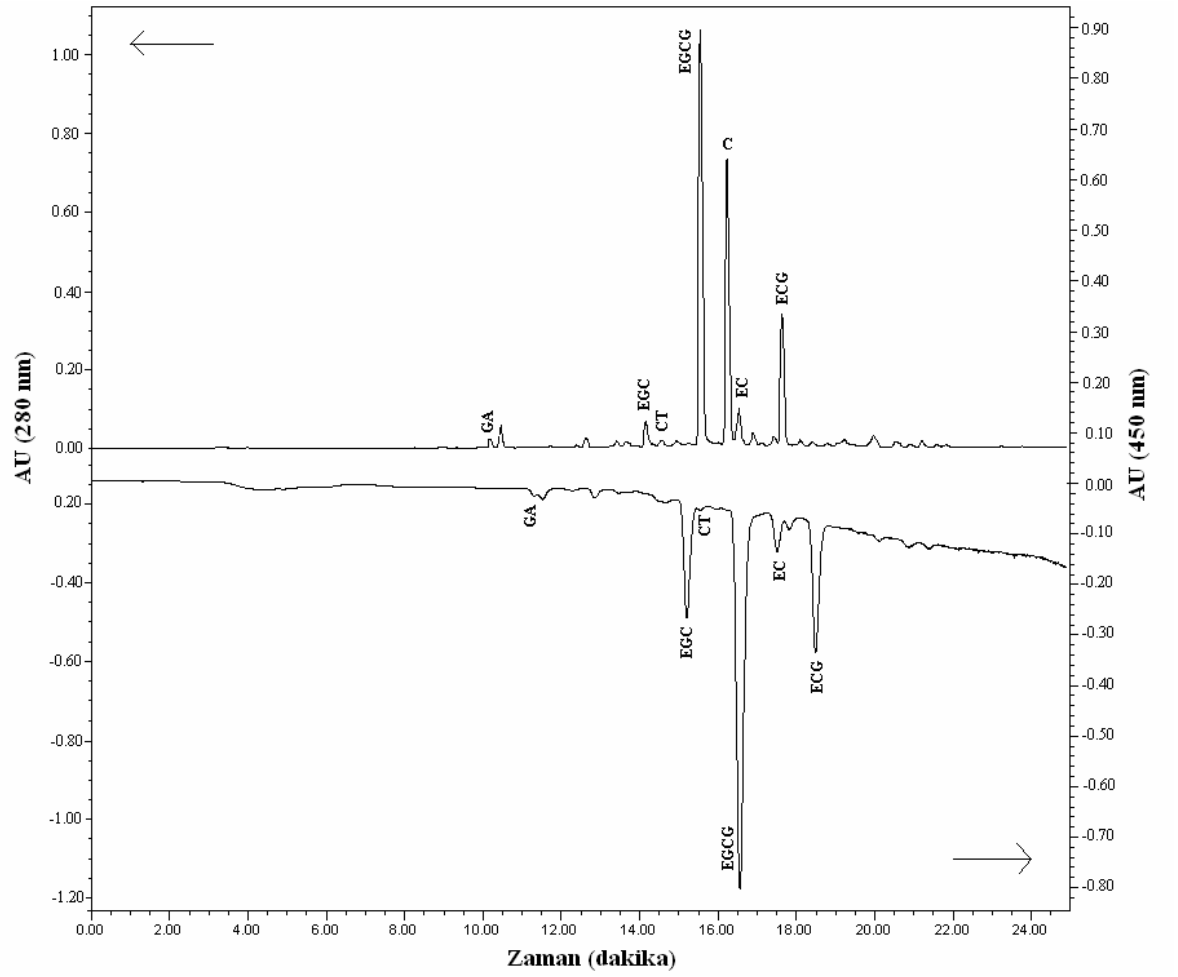
Hat-üstü HPLC-CUPRAC analizi için, bitki ekstreleri belirli oranlarda seyreltilip (yeşil çay (1:50), siyah çay (1:2), mercan köşk (1:30), nane (1:10)) filtreden geçirilerek ilgili elüsyon programları uygulanmıştır (Şekil 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15). Ekstrelerdeki bileşenler standart katkı yöntemi ile belirlendikten sonra toplam negatif pik alanları hesaplanmış ve bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasitesi (mmol TR/g) için Eşitlik (3.10)'da verilen denklemde yerine konulup sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırmalı olarak Tablo 4.28'de verilmiştir. Bulgular %95 güvenilirlik düzeyine göre belirli bir aralıkta verilmiştir. HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntem bulguları ANOVA testi uygulanarak karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de verilen kromatogramlarda kısaltmaları kullanılan yeşil çay ve siyah çay bileşenlerinden GA: gallik asidi; EGC: epigallokateşini; CT: kateşini; EGCG: epigallokateşin gallatı; C: kafeini; EC: epikateşini; ECG: epikateşin gallatı ifade etmektedir.

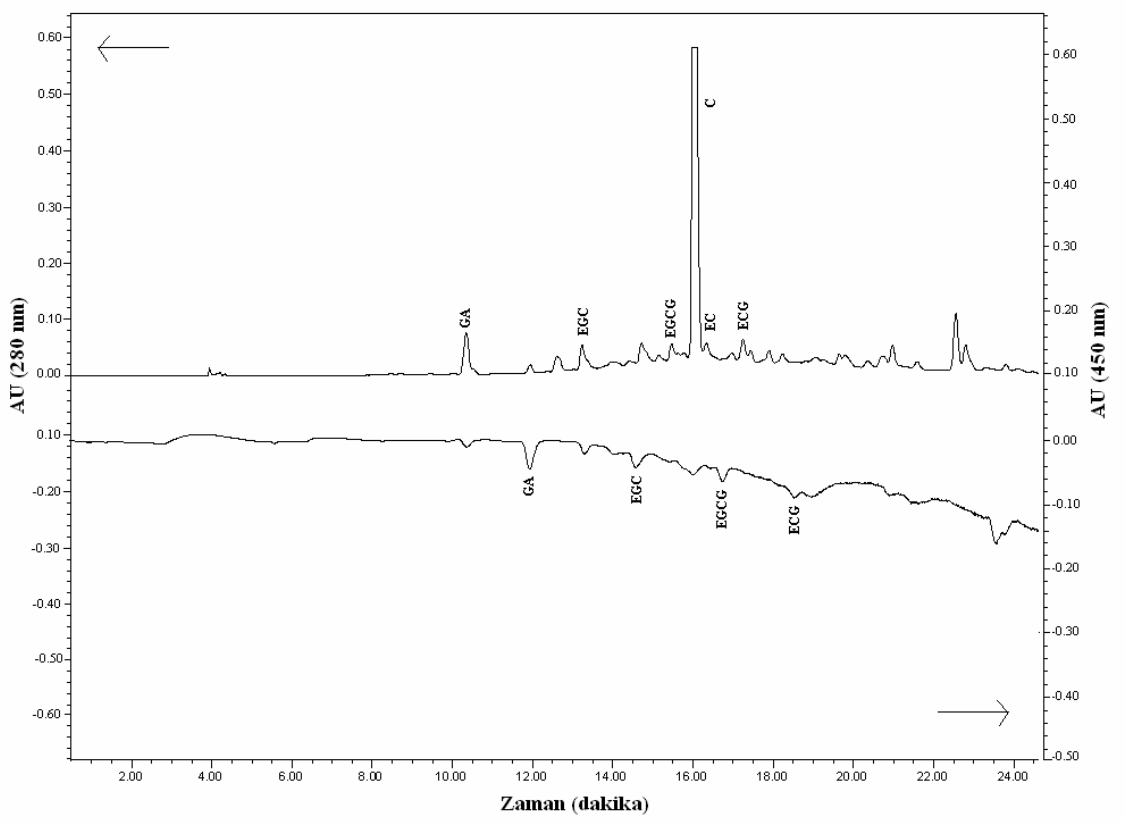
Şekil 4.14'de verilen kromatogramlarda kısaltmaları kullanılan mercanköşk ekstresinde bulunan bileşenlerden CFA: kafeik asidi; COU: *p*-kumarik asidi; ROS: rozmarinik asidi; MR: mirisetini; LT: luteolini; APG: apigenini ifade etmektedir.

Şekil 4.15'de verilen kromatogramlarda kısaltmaları kullanılan nane ekstresinde bulunan bileşenlerden ROS: rozmarinik asidi; MR: mirisetini; QR: kuersetini ifade etmektedir.

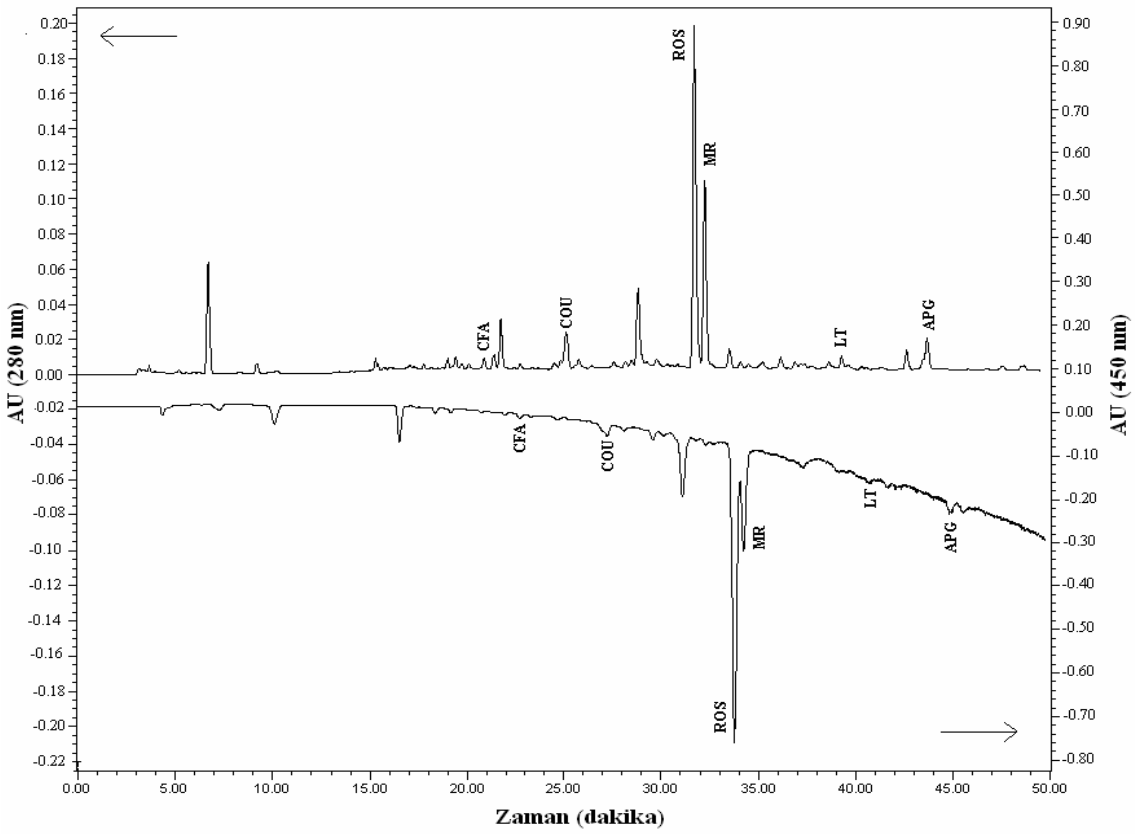
Pozitif yönlü kromatogramlar 280 nm'de belirlenen bileşenlere, negatif yönlü kromatogramlar 450 nm'de belirlenen bileşenlere eşdeğer oranda oluşan Cu(I)-Nc kelatına ait piklerden oluşmaktadır.



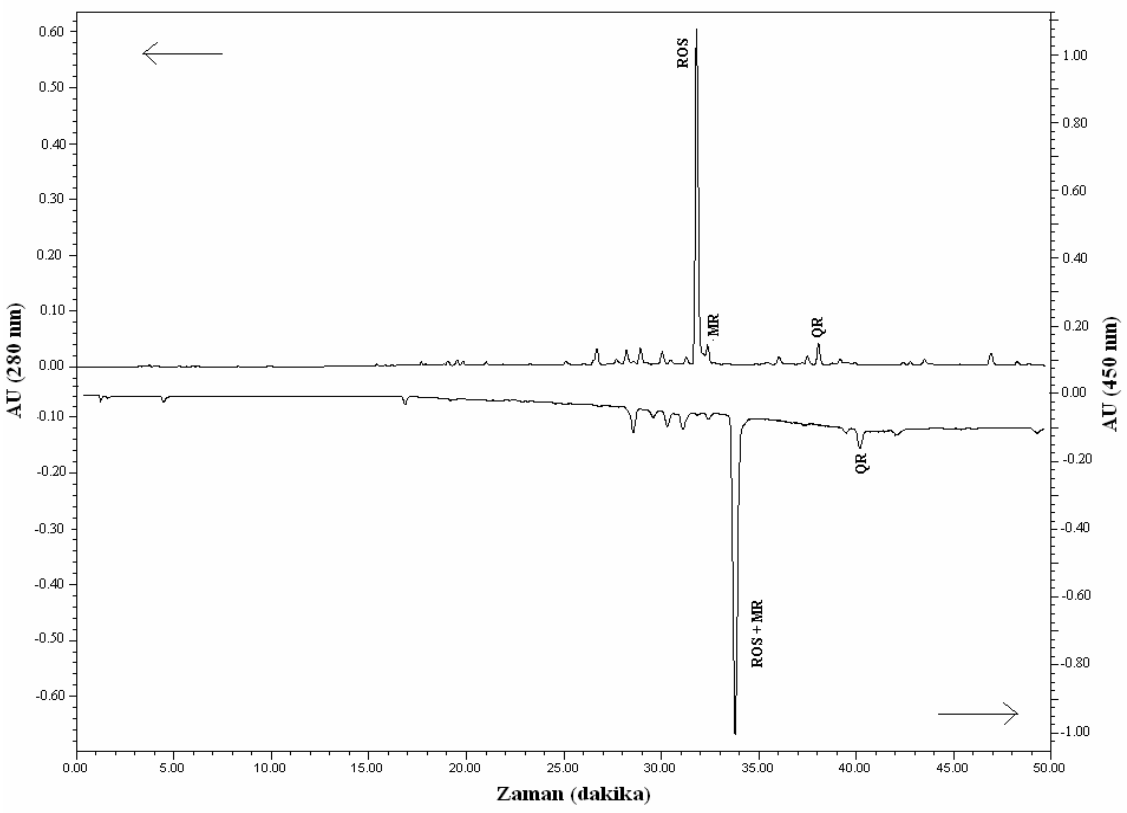
Şekil 4.12: Yeşil çay ekstresinin HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC kromatogramları



Şekil 4.13: Siyah çay ekstresinin HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC kromatogramları



Şekil 4.14: Mercanköşk ekstresinin HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC kromatogramları



Şekil 4.15: Nane ekstresinin HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC kromatogramları

Tablo 4.28: CUPRAC, HPLC (CUPRAC hesaplamalı), hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemlerine göre bitki ekstrelerinin TAC değerleri

Bitki ekstresi	**Botanik İsmi**	**CUPRAC Yöntemi (mmol TR g^{-1})**	**HPLC (CUPRAC hesaplamalı) Yöntemi (mmol TR g^{-1})**	**Hat-üstü HPLC-CUPRAC Yöntemi (mmol TR g^{-1})**
Yeşil çay	*Camellia Sinensis*	1.19±0.03	1.03±0.04	1.12±0.05
Siyah çay	*Camellia Sinensis*	0.27±0.04	0.044±0.001	0.046±0.002
Nane	*Mentha*	0.85±0.04	0.47±0.03	0.49±0.04
Mercanköşk	*Origanum Marjorana*	0.51±0.01	0.28±0.04	0.26±0.03

(i) HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemleri ANOVA testine gore karşılaştırılmıştır.

($P = 0.05$ için $F_{deneysel} = 0.25$, $F_{kritik\ (tablo)} = 10.13$, $F_{deneysel} < F_{kritik\ (tablo)}$)

(ii) Bulgular $\mu = \overline{x} \pm \frac{t_{\alpha}\ s}{\sqrt{N}}$ denklemine göre hesaplanmıştır (N=3, $t_{.95} = 4.303$).

4.3. BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN DOĞAL VE TÜREVLENDİRİLMİŞ SİKLODEKSTRİNLERLE İÇERME KOMPLEKSLERİNİN VE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

4.3.1. Antioksidan-Siklodekstrin Sıvı İçerme Komplekslerinin Eldesi

Rozmarinik asit (RA), klorojenik asid (CA), kuersetin (QR) ve rutin (RT) antioksidan bileşiklerinin α-CD, β-CD, hidroksi-etil-β-CD, hidroksi-propil-β-CD, metil-β-CD gibi makrosiklik oligosakkaritlerle içerme kompleksleri incelenmiştir. Çözelti fazında içerme kompleksleri hazırlanmasında sıvı karışımı yöntemi uygulanmıştır [46,61].

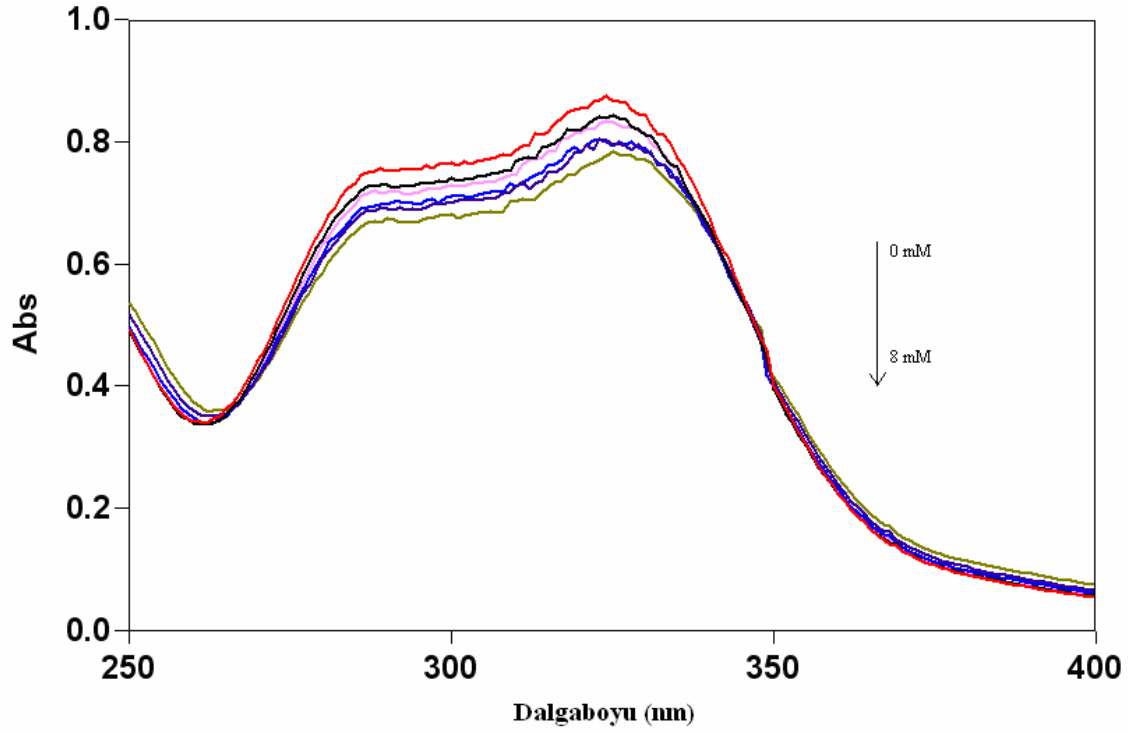
Deney tüplerine ayrı ayrı 0.5'er mL 1 mM antioksidan çözeltisi (rozmarinik asit:RA) konup üzerlerine 10 mM β-CD çözeltisinden son konsantrasyonları sırasıyla 0 mM, 0.5 mM, 1 mM, 2 mM, 4 mM ve 8 mM olacak şekilde ilave edilmiştir. Bu çözelti karışımlarına 1'er mL 0.5 M pH 7 NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 tamponu eklenerek toplam 10 mL olacak şekilde destile su ile hacme tamamlanmıştır. Ardından tüplerin ağızları kapatılıp vorteks karıştırıcıda 1 dakika süre ile karıştırılmıştır. Çözeltiler oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletilmiştir.

0.5 mL 1 mM metanollü antioksidan çözeltisi + x mL (x=0 mL-8 mL) sulu CD çözeltisi + 1 mL pH 7 NaH_2PO_4/Na_2HPO_4 tamponu + (8.5-x) mL H_2O

$V_{toplam} = 10$ mL (4.3)

4.3.2. İçerme Komplekslerinin UV-Vis Spektrumlarının Eldesi

Son konsantrasyonu 50 μM olan ilgili antioksidan bileşiklerle, siklodekstrin derişiminin (0 mM – 8 mM) arttırılmasına bağlı olarak elde edilen içerme komplekslerinin 25±1 ^oC'de 200-450 nm dalgaboyu aralığında spektrumları elde edilmiştir. Karışım çözeltisindeki CD derişimi arttıkça fosfat tamponu varlığında saf antioksidan çözeltisine ait spektrumdaki absorbans değerlerinde azalma ve maksimum dalgaboyunda birkaç nm'lik dalgaboyu kayması meydana gelmektedir. Bu spektrumlara örnek olarak 50 μM rosmarinik asidin 25 ºC'de tek başına ve artan konsantrasyonlu β-CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrumu Şekil 4.16'da gösterilmektedir.



Şekil 4.16: 50 µM rosmarinik asid çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve artan derişimli (0 mM-8 mM) β-CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrumu

8 mM CD içeren kompleks spektrumlarında diğer konsantrasyonlara göre daha fazla değişim gözlendiğinden (dalgaboyu kayması ve absorbans değişimi), UV-Vis spektrumlarda yalnız serbest antioksidan bileşik ile 8 mM CD içeren kompleks çözeltisinin spektrumları birarada verilmiştir.

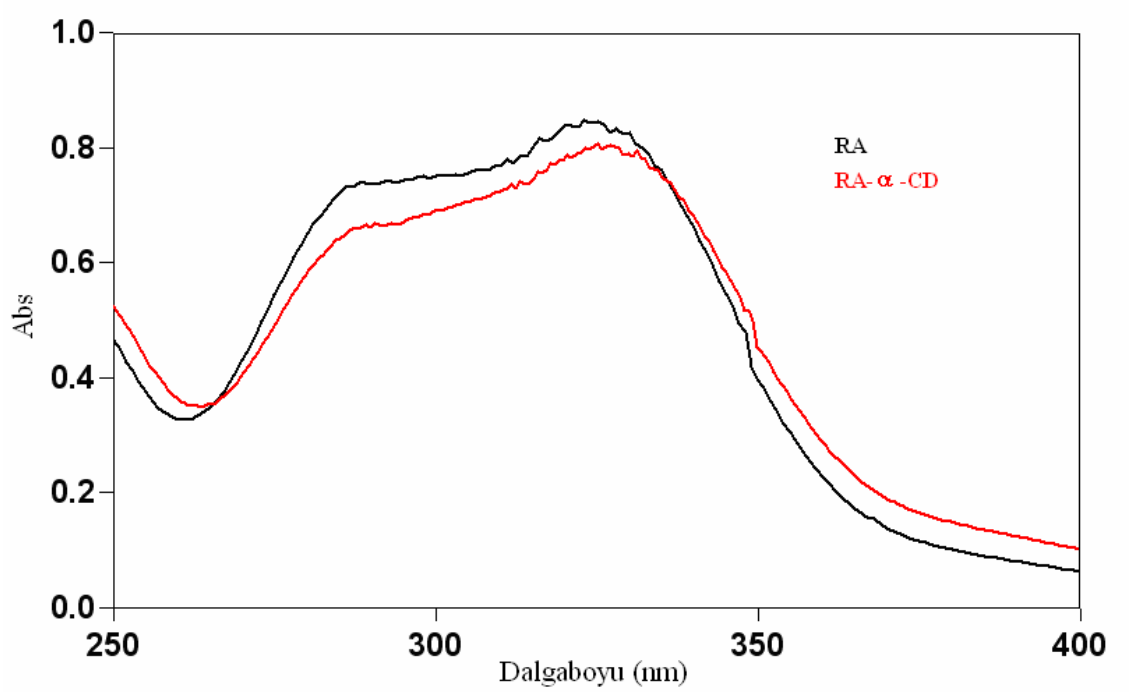
4.3.2.1. Rozmarinik asid (RA)

Sabit konsantrasyonlu (50 µM) rozmarinik asid çözeltisinin tek başına (pH 7 fosfat tamponu varlığında) ve 8 mM doğal ve türevlendirilmiş siklodekstrin içeren çözeltiler varlığında UV-Vis bölgede 250-400 nm dalgaboyu aralığında spektrumları elde edilmiştir (Şekil 4.17). Bu spektrumlara ait bulgular Tablo 4.29'da verilmiştir.

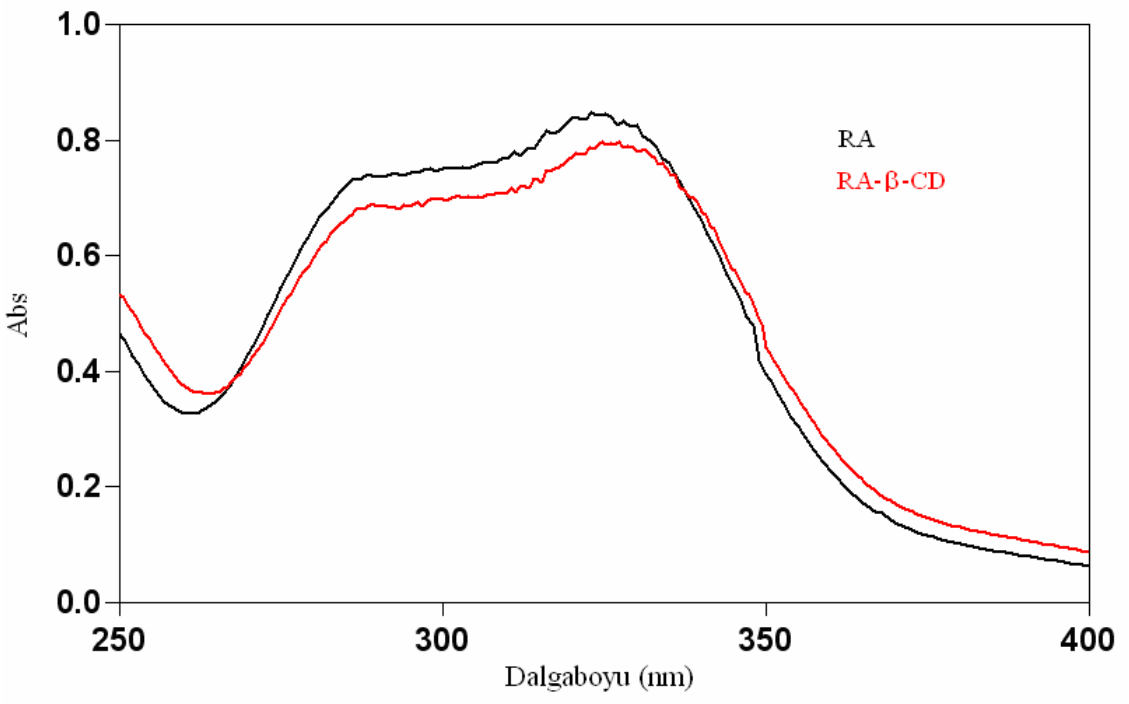
Tablo 4.29: 50 µM rozmarinik asidin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrum verileri

Çözelti içeriği	Maksimum Dalgaboyu (nm)	Absorbans
50 µM RA	324	0.85
50 µM RA + 8 mM α-CD	327	0.81
50 µM RA + 8 mM β-CD	327	0.79
50 µM RA + 8 mM HE-β-CD	328	0.79
50 µM RA + 8 mM HP-β-CD	328	0.79
50 µM RA + 8 mM M-β-CD	328	0.79

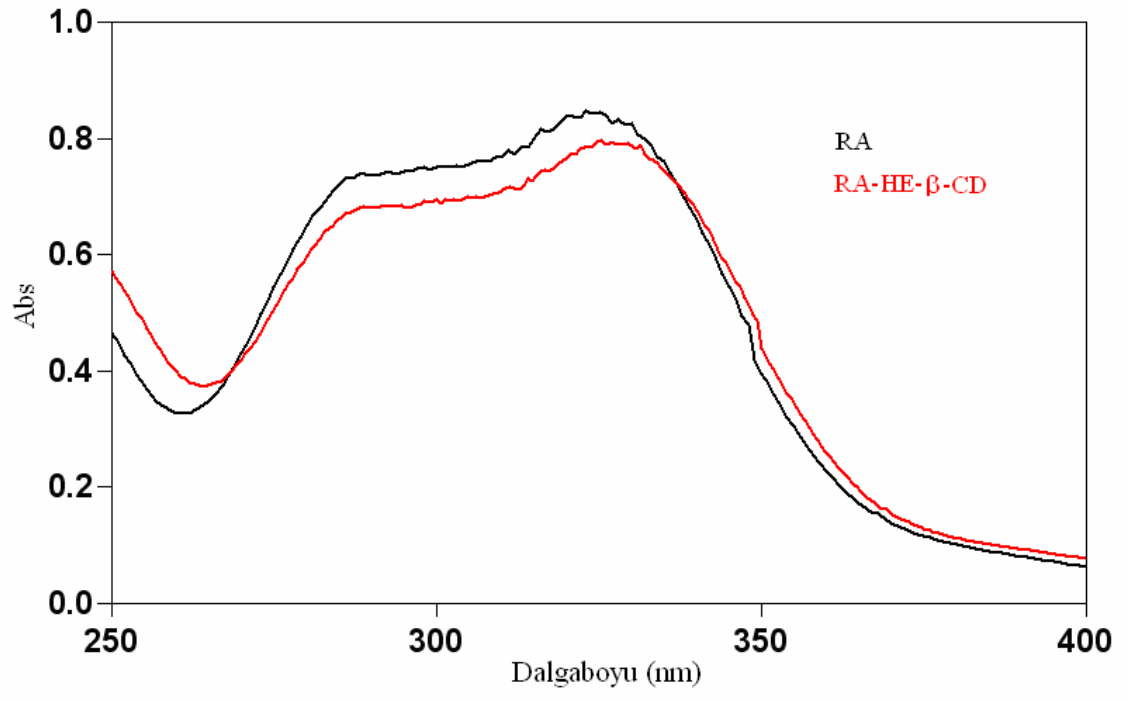
(a)



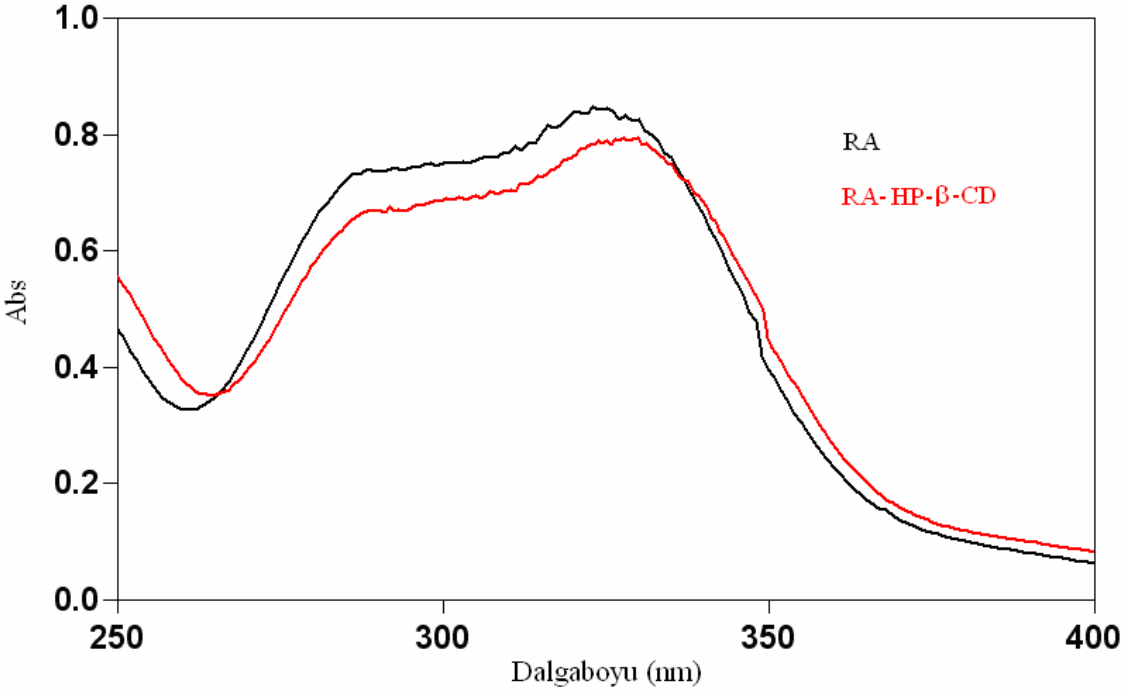
(b)


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Abs
250
300
350
400
Dalgaboyu (nm)
RA
RA-β-CD

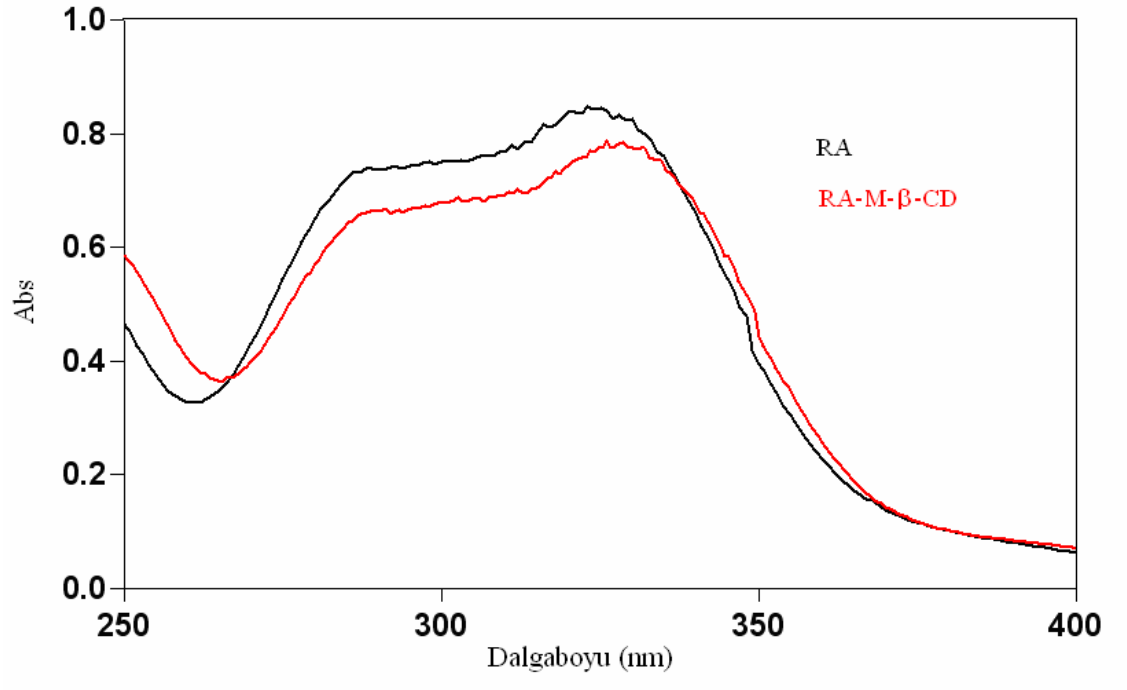
(c)


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Abs
250
300
350
400
Dalgaboyu (nm)
RA
RA-HE-β-CD

(d)



(e)



Şekil 4.17: 50 µM rosmarinik asid çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki UV-Vis spektrumları

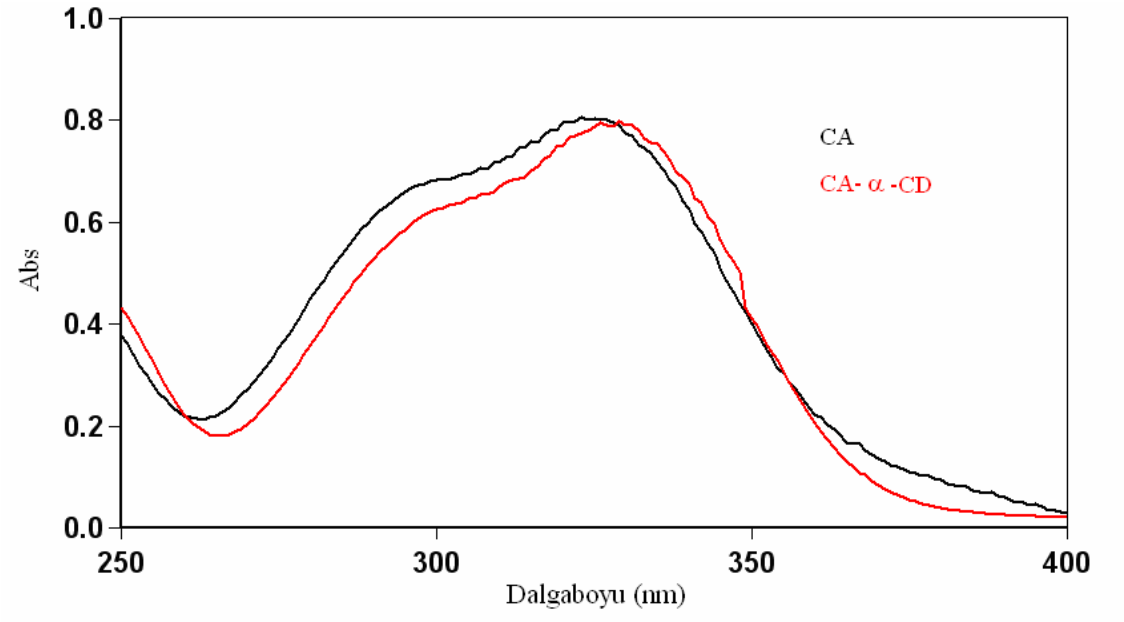
4.3.2.2. Klorojenik Asid (CA)

Sabit derişimli (50 µM) klorojenik asid çözeltisinin tek başına ve 8 mM doğal ve türevlendirilmiş siklodekstrin içeren çözeltiler varlığında UV-Vis bölgede 250-400 nm dalgaboyu aralığında spektrumları elde edilmiştir (Şekil 4.18). Bu spektrumlara ait bulgular Tablo 4.30'da verilmiştir.

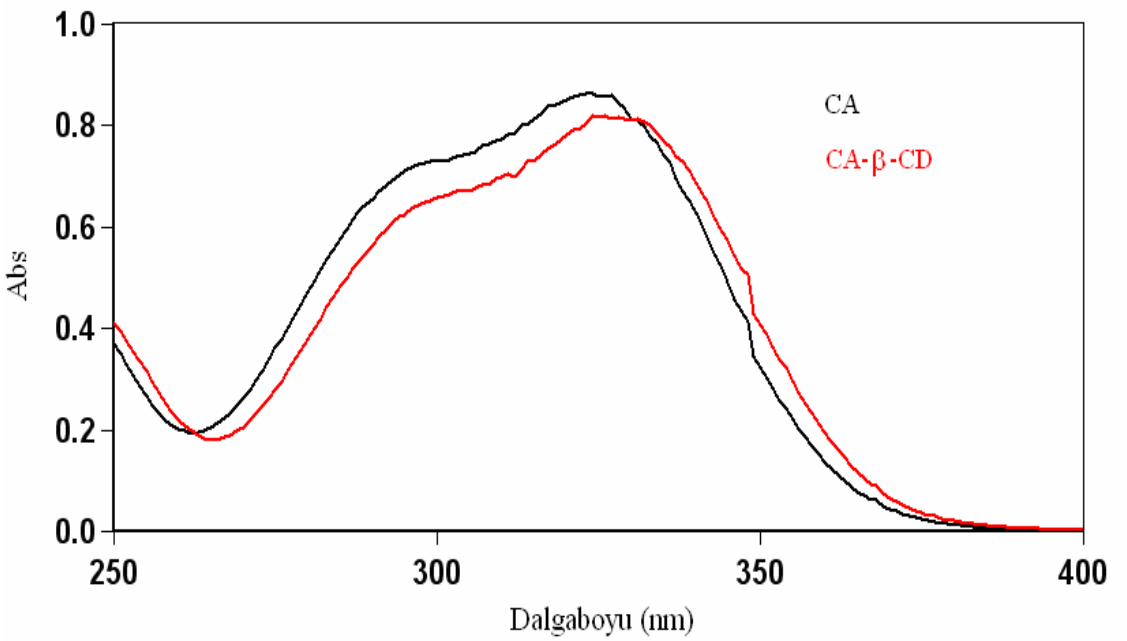
Tablo 4.30: 50 µM klorojenik asid çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrum verileri

Çözelti içeriği	**Maksimum Dalgaboyu (nm)**	**Absorbans**
50 µM CA	325	0.81
50 µM CA + 8 mM α-CD	329	0.80
50 µM CA + 8 mM β-CD	329	0.77
50 µM CA + 8 mM HE-β-CD	330	0.78
50 µM CA + 8 mM HP-β-CD	329	0.78
50 µM CA + 8 mM M-β-CD	330	0.75

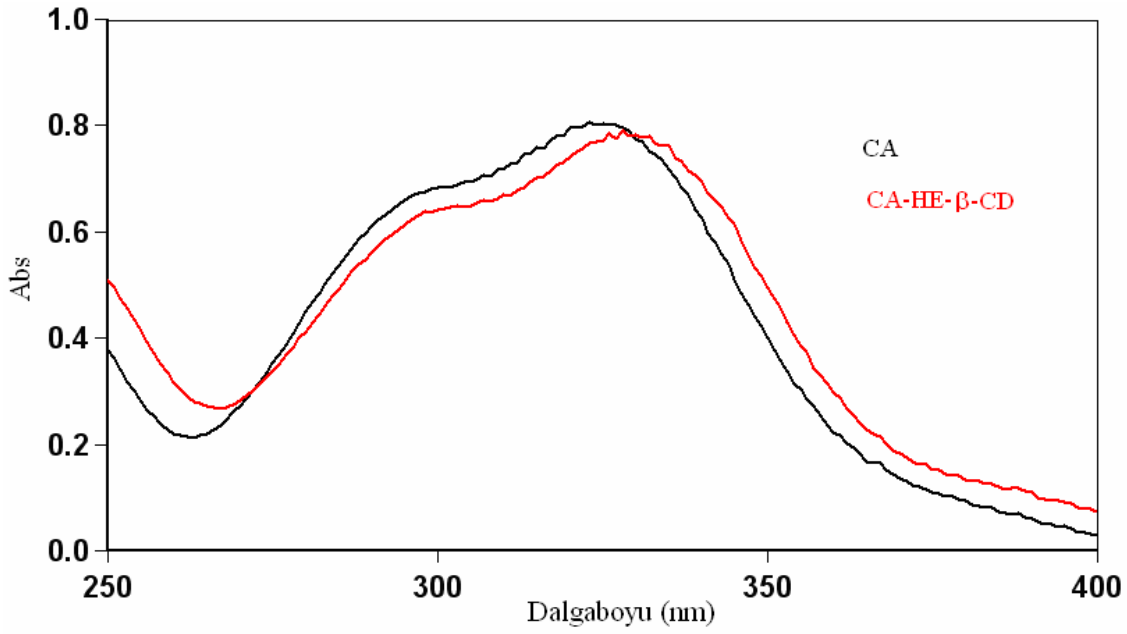
(a)



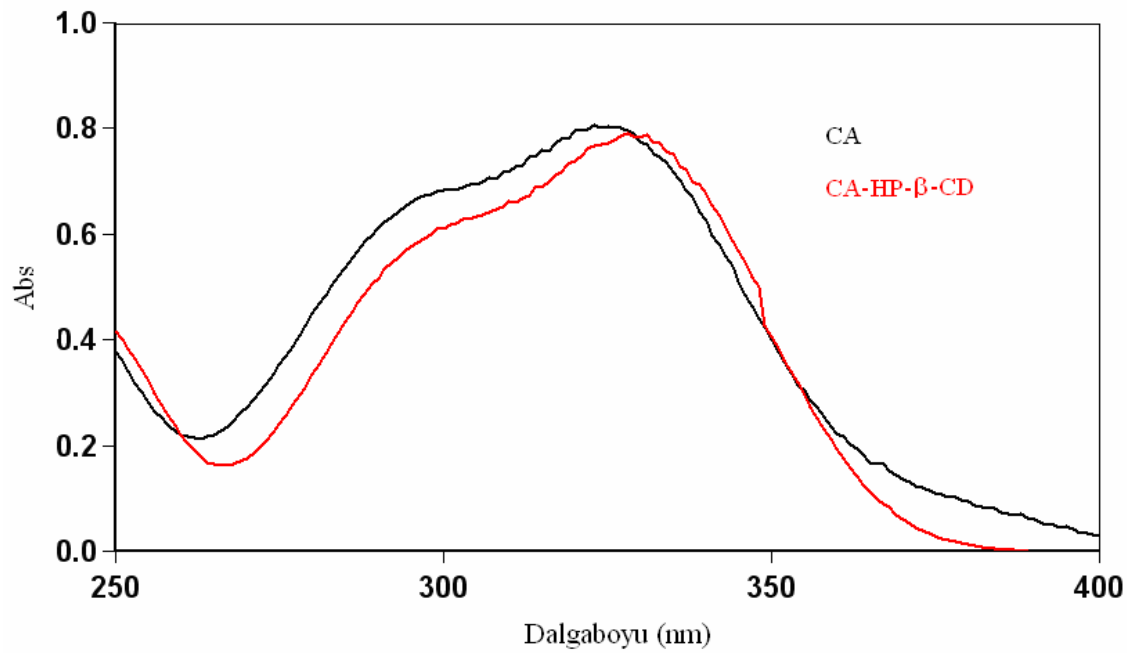
(b)


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Abs
250
300
350
400
Dalgaboyu (nm)
CA
CA-β-CD

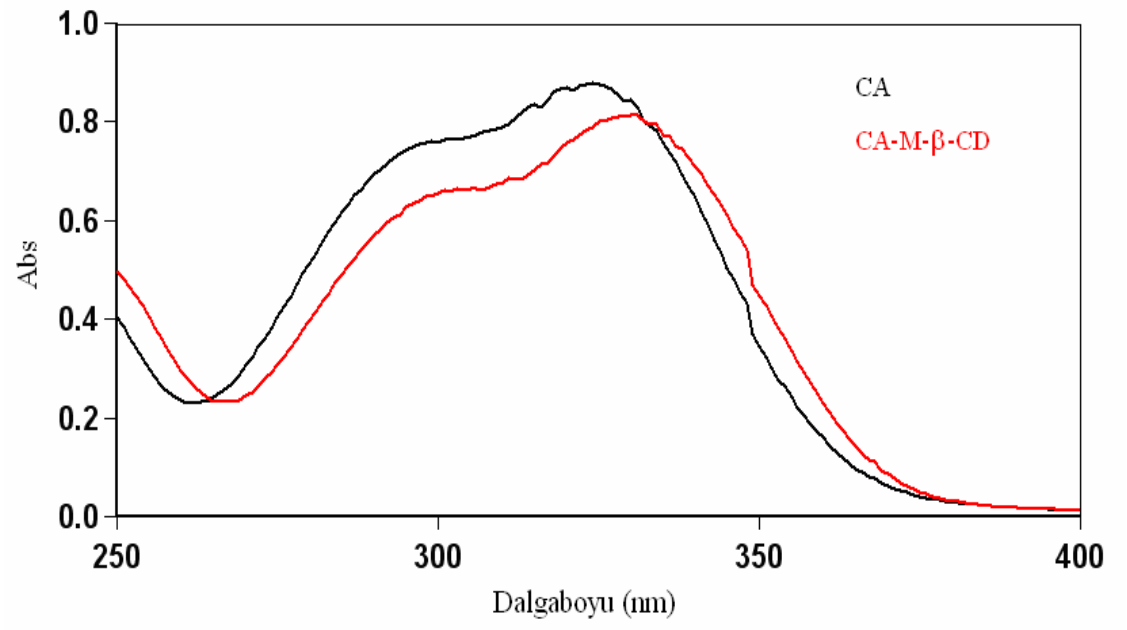
(c)


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
Abs
250
300
350
400
Dalgaboyu (nm)
CA
CA-HE-β-CD

(d)



(e)



Şekil 4.18: 50 µM klorojenik asid çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki UV-Vis spektrumları

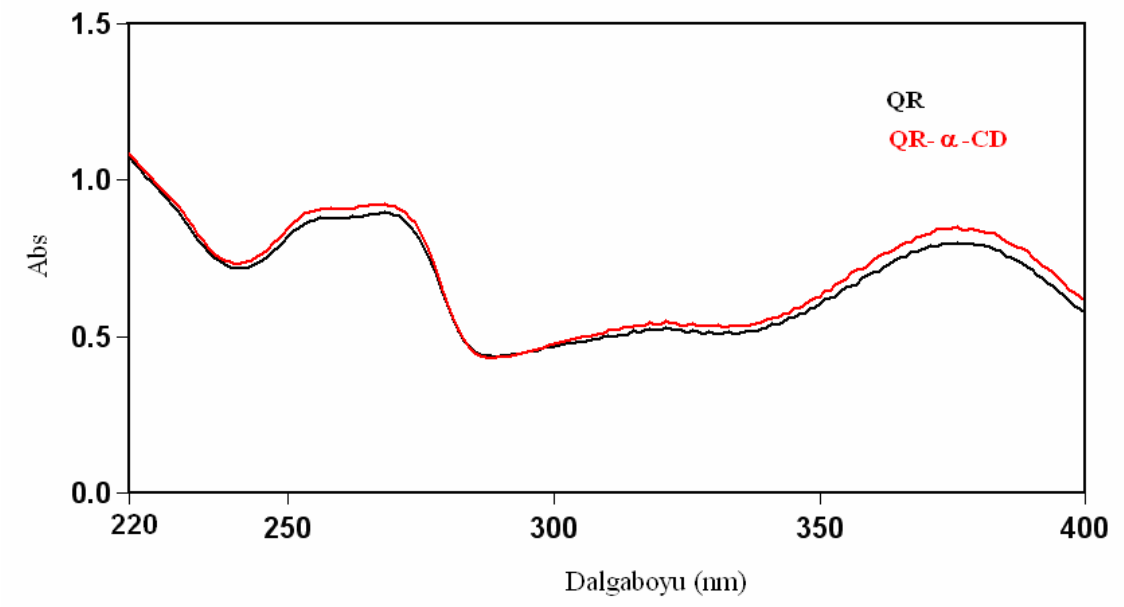
4.3.2.3. Kuersetin (QR)

Sabit derişimli (50 µM) kuersetin çözeltisinin tek başına ve 8 mM doğal ve türevlendirilmiş siklodekstrin içeren çözeltiler varlığında UV-Vis bölgede 220-400 nm dalgaboyu aralığında spektrumları elde edilmiştir (Şekil 4.19). Bu spektrumlara ait bulgular Tablo 4.31'de verilmiştir.

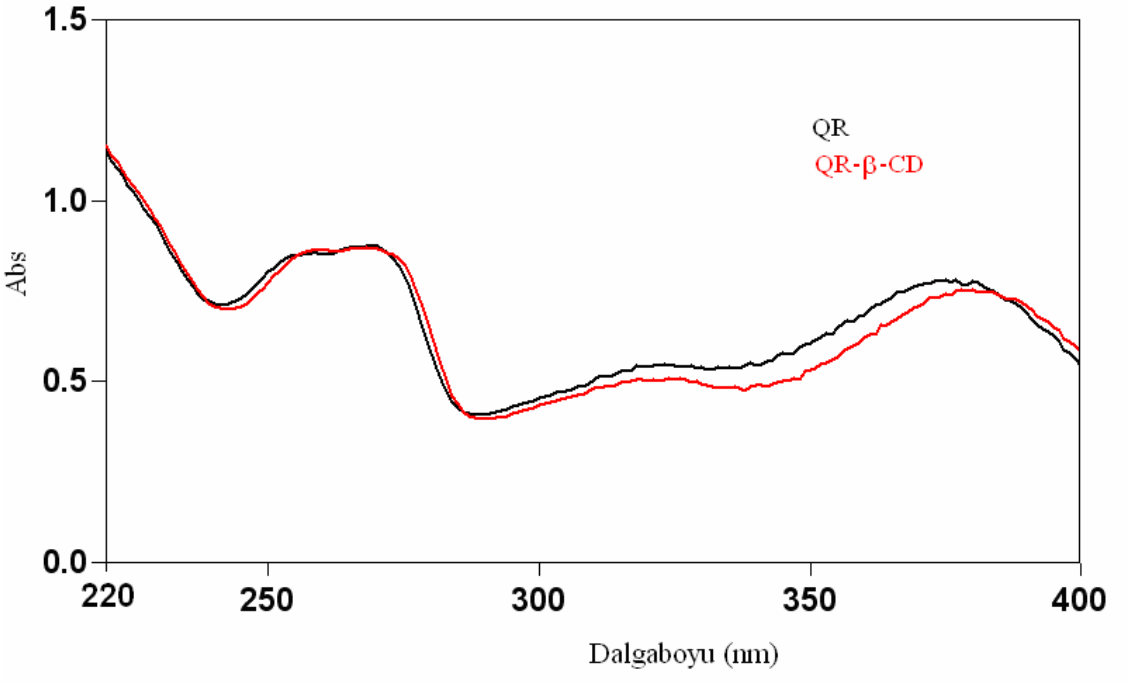
Tablo 4.31: 50 µM kuersetin çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrum verileri

Çözelti içeriği	**Maksimum Dalgaboyu (nm)**	**Absorbans**
50 µM QR	256; 270; 377	0.86; 0.88; 0.78
50 µM QR + 8 mM α-CD	256; 269; 378	0.91; 0.92; 0.85
50 µM QR + 8 mM β-CD	257; 270; 381	0.86; 0.87; 0.75
50 µM QR + 8 mM HE-β-CD	258; 271; 381	0.92; 0.90; 0.76
50 µM QR + 8 mM HP-β-CD	258; 273; 382	0.90; 0.87; 0.78
50 µM QR + 8 mM M-β-CD	257; 275; 381	0.98; 0.82; 0.82

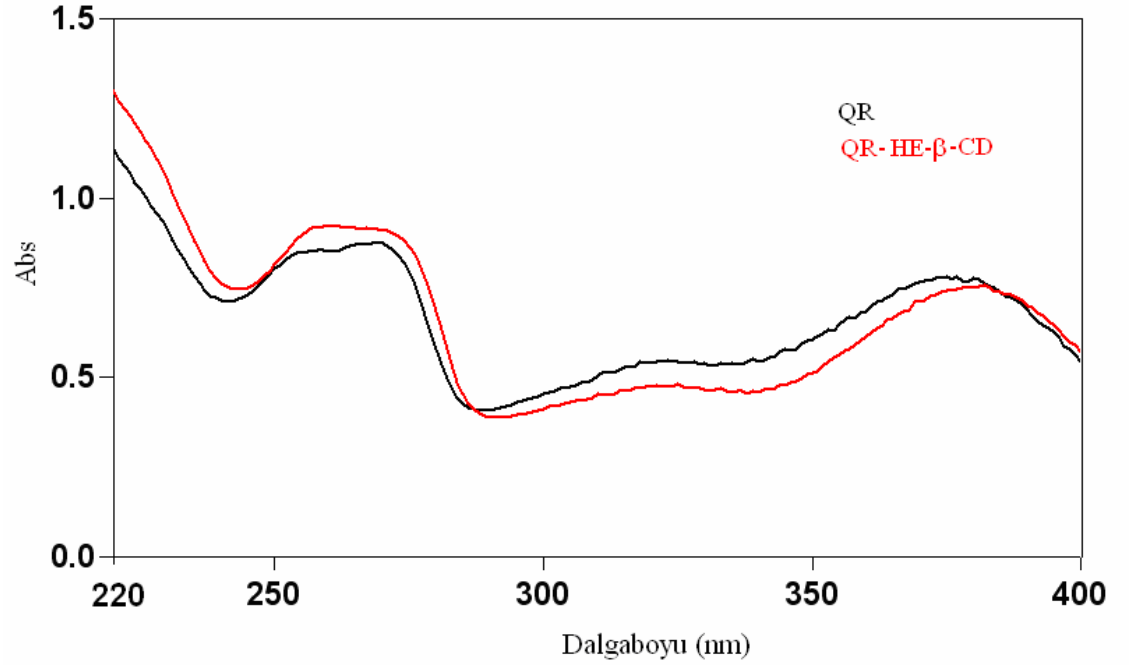
(a)



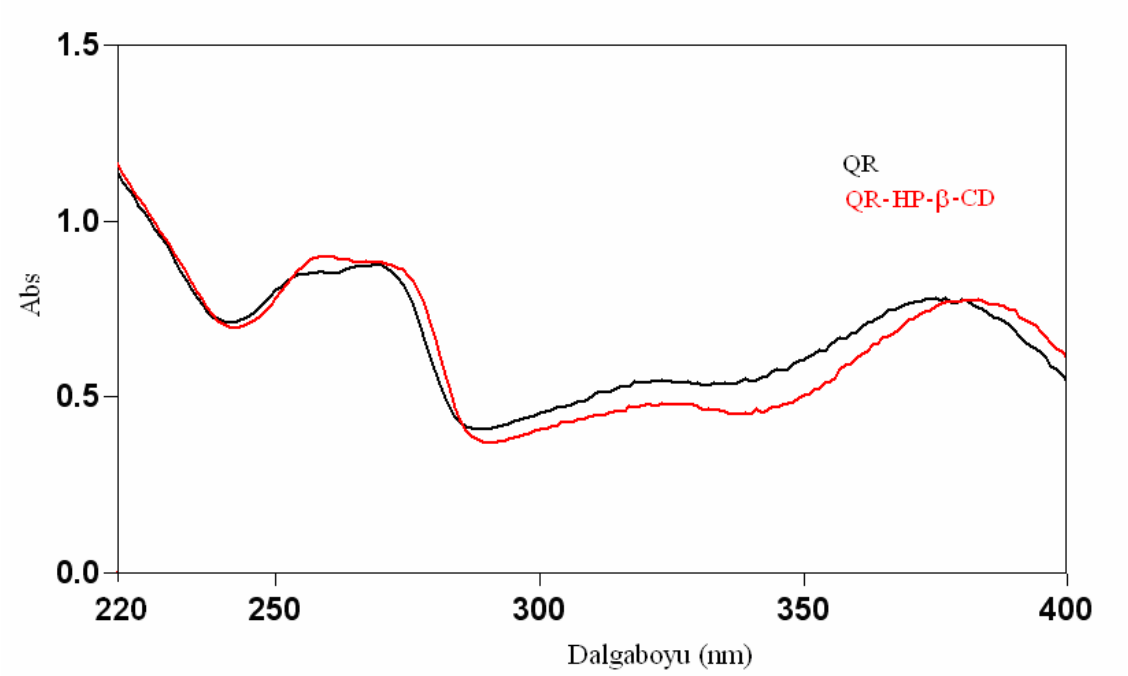
(b)


1.5
1.0
0.5
0.0
Abs
220
250
300
350
400
Dalgaboyu (nm)
QR
QR-β-CD

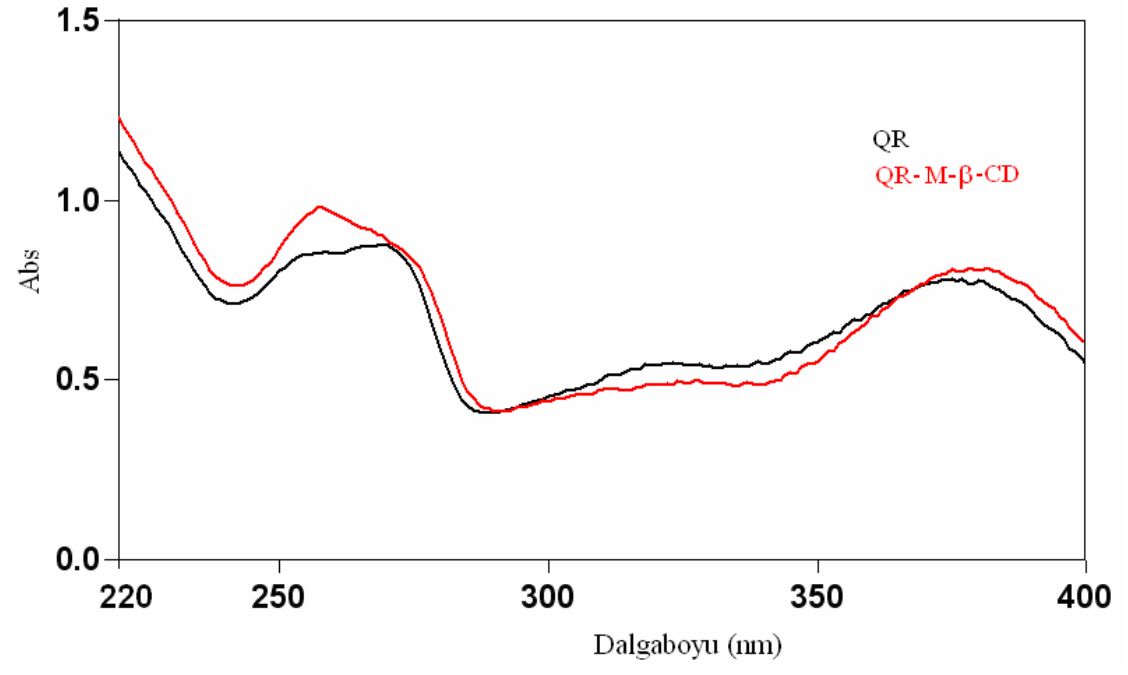
(c)


1.5
1.0
0.5
0.0
Abs
220
250
300
350
400
Dalgaboyu (nm)
QR
QR-HE-β-CD

(d)



(e)



Şekil 4.19: 50 µM kuersetin çözeltisinin tek başına ve 8 mM (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki UV-Vis spektrumları (pH=7, 25^{o}C)

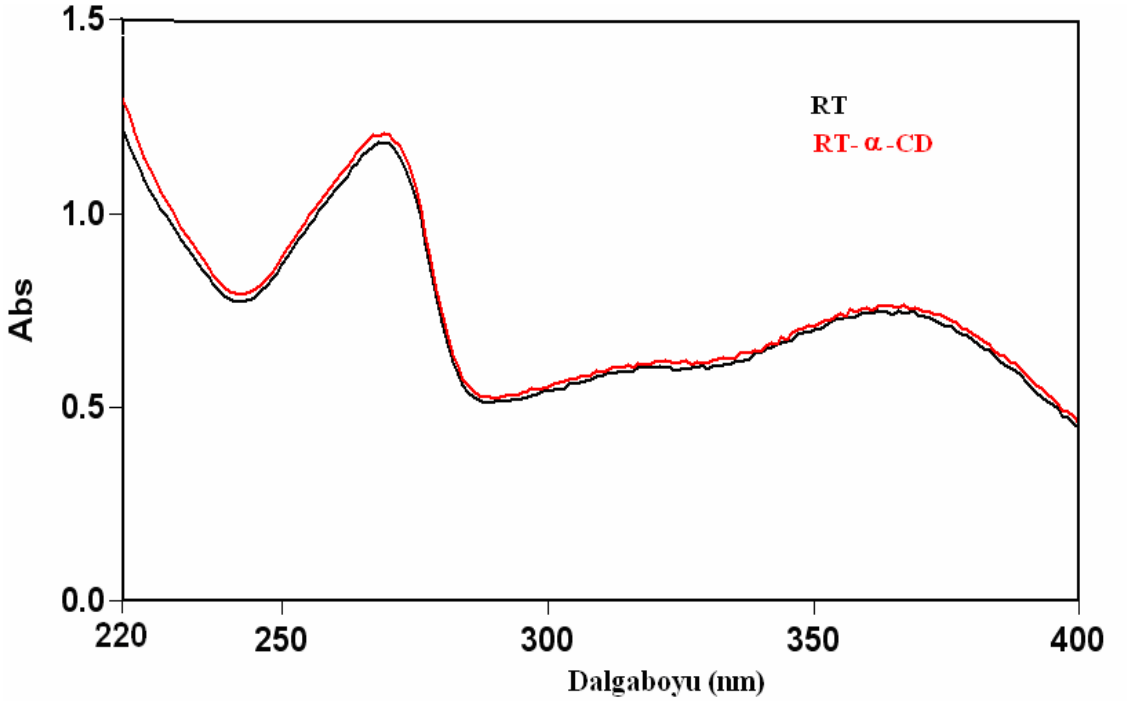
4.3.2.4. Rutin (RT)

Sabit derişimli (50 µM) rutin çözeltisinin tek başına ve 8 mM doğal ve türevlendirilmiş siklodekstrin içeren çözeltiler varlığında UV-vis bölgede 220-400 nm dalgaboyu aralığında spektrumları elde edilmiştir (Şekil 4.20). Bu spektrumlara ait bulgular Tablo 4.32'da verilmiştir.

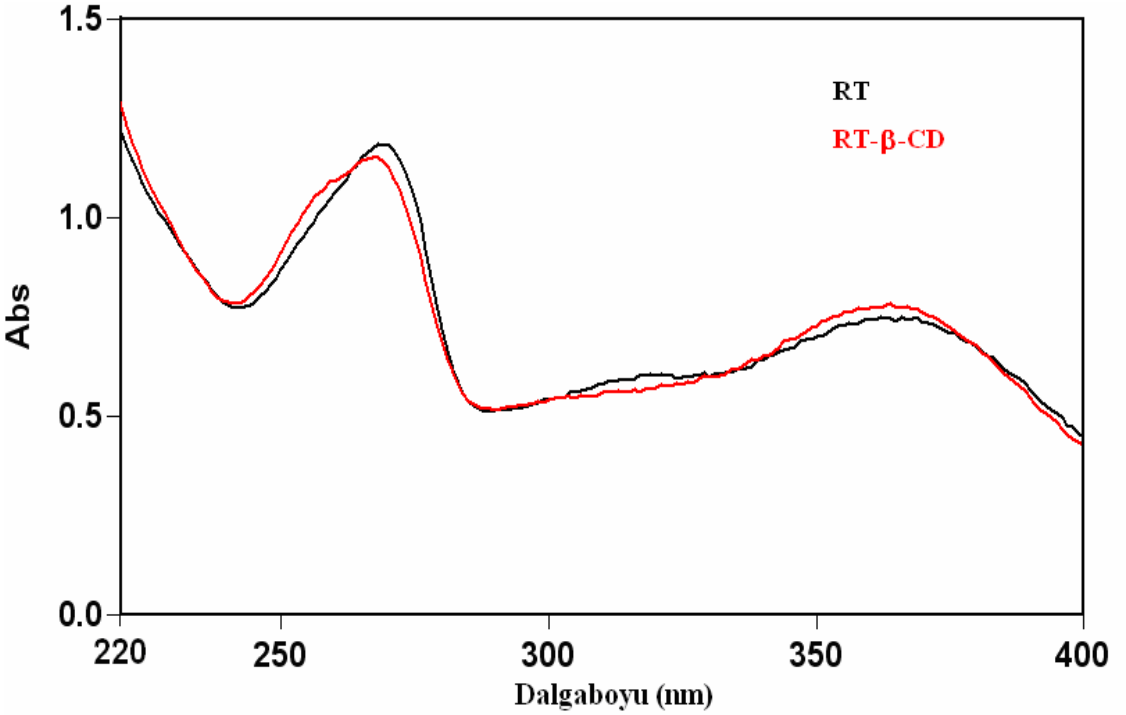
Tablo 4.32: 50 µM rutin çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrum verileri

Çözelti içeriği	**Maksimum Dalgaboyu (nm)**	**Absorbans**
50 µM RT	270; 367	1.14; 0.70
50 µM RT + 8 mM α-CD	270; 367	1.15; 0.71
50 µM RT + 8 mM β-CD	259; 268; 364	0.97;1.05; 0.70
50 µM RT + 8 mM HE-β-CD	258; 267; 364	1.01;1.08; 0.69
50 µM RT + 8 mM HP-β-CD	256; 267; 366	0.94; 1.03; 0.70
50 µM RT + 8 mM M-β-CD	263; 364	1.04; 0.72

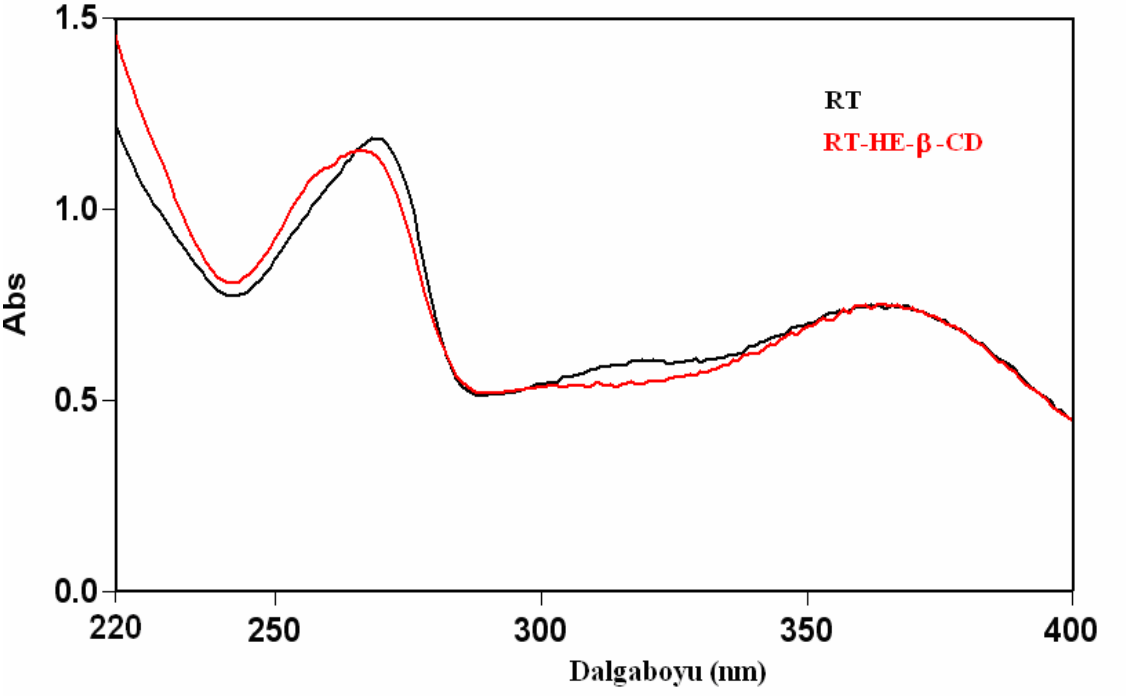
(a)



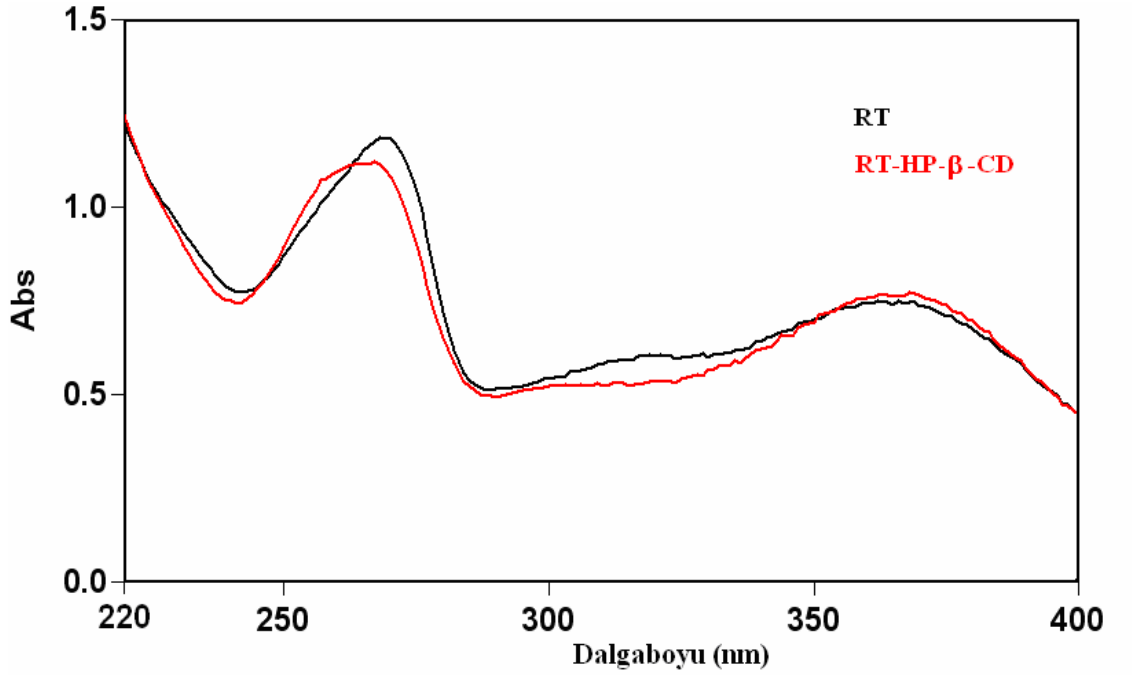
(b)


1.5
1.0
0.5
0.0
Abs
220
250
300
350
400
Dalgaboyu (nm)
RT
RT-β-CD

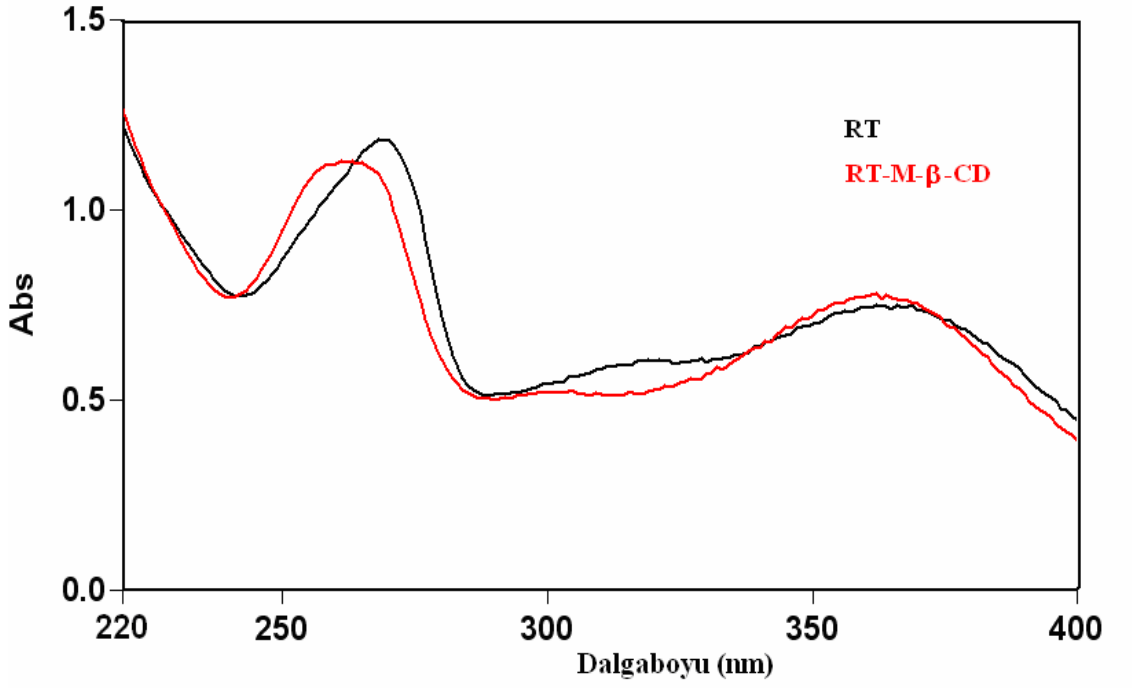
(c)


1.5
1.0
0.5
0.0
Abs
220
250
300
350
400
Dalgaboyu (nm)
RT
RT-HE-β-CD

(d)



(e)



Şekil 4.20: 50 µM rutin çözeltisinin 25 ºC'de tek başına ve 8 mM (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki UV-Vis spektrumları

pH 7 fosfat tamponu varlığında siklodekstrin çözeltilerinin (C = 8 mM) sahip oldukları UV-Vis spektrumları çizilerek, ölçüm yapılan dalgaboyu aralığında herhangi bir girişime neden olacak absorbsiyon göstermediği görülmüştür.

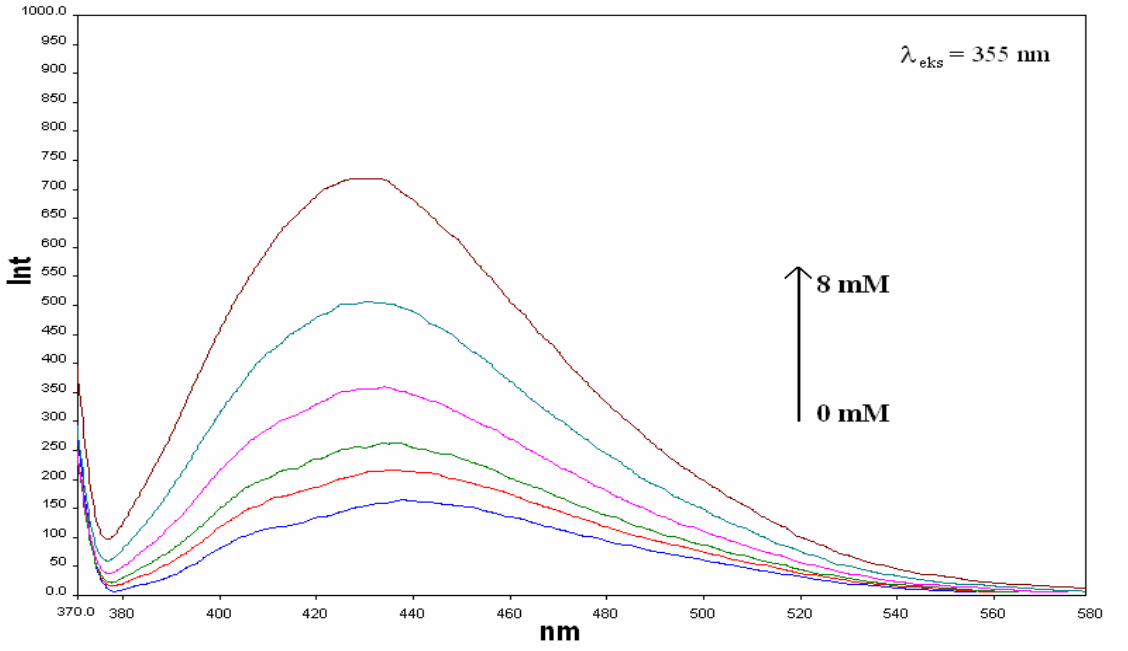
4.3.3. İçerme Komplekslerinin Floresans Spektrumlarının Eldesi

Her bir antioksidan bileşiğin eksitasyon ve emisyon dalgaboyları belirlendikten sonra, antioksidan bileşiklerin derişimleri (50 µM) sabit tutulup artan siklodekstrin derişimine (0-8 mM) bağlı olarak belli bir dalgaboyu aralığında floresans spektrumları elde edilmiştir (Şekil 4.21, 4.23, 4.25 ve 4.27). Ayrıca 8 mM (maksimum çalışma konsantrasyonu) siklodekstrin çözeltileri hazırlanıp her bir bileşiğin uyarılma dalga boyunda uyarma yaparak çalışılan siklodekstrin çözeltilerinin floresans spektrumları elde edilmiştir (tezde yer verilmemiştir). Bu spektrum, maksimum derişime sahip siklodekstrin çözeltilerinin ihmal edilebilir bir intensite verdiğini göstermektedir.

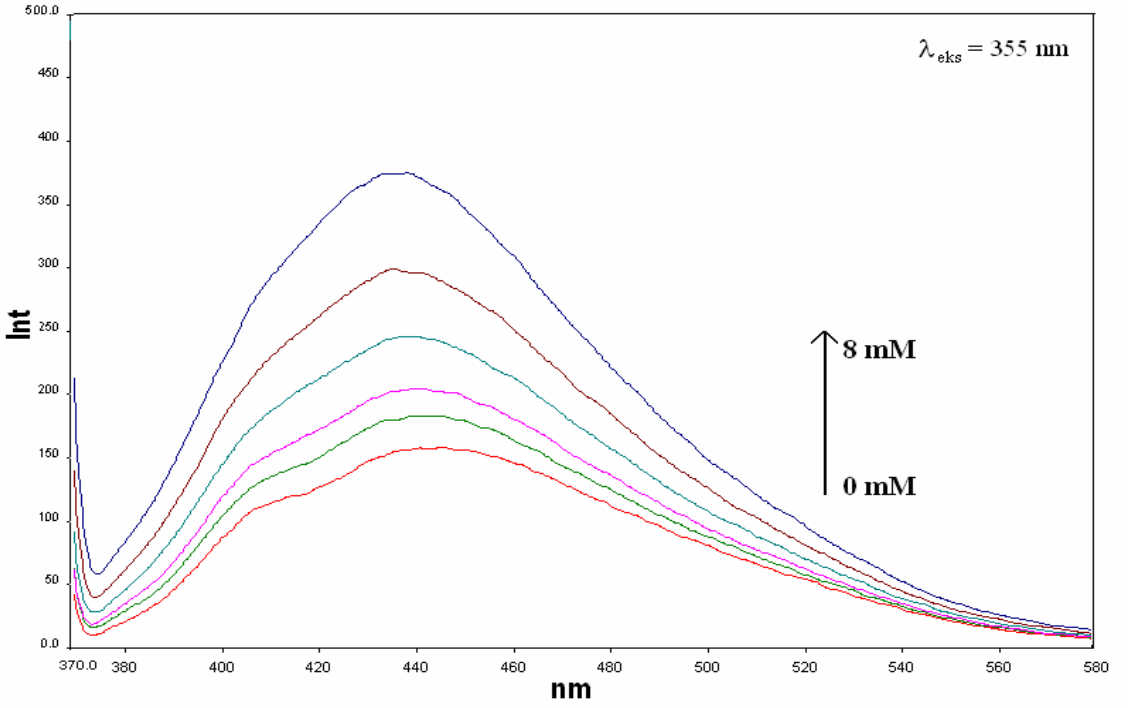
4.3.3.1. Rosmarinik asid (RA)

Rosmarinik asit için λ_{eks} 355 nm, λ_{em} 442 nm olup farklı CD türleri varlığında elde edilen floresans spektrumları 370-580 nm dalgaboyu aralığında verilmiştir (Şekil 4.21 (a-e)). Rozmarinik asidin pH=7'de ilgili siklodekstrin çözeltileri (8 mM) varlığındaki floresans spektrumu tek bir spektrum halinde Şekil 4.22'de verilmiştir.

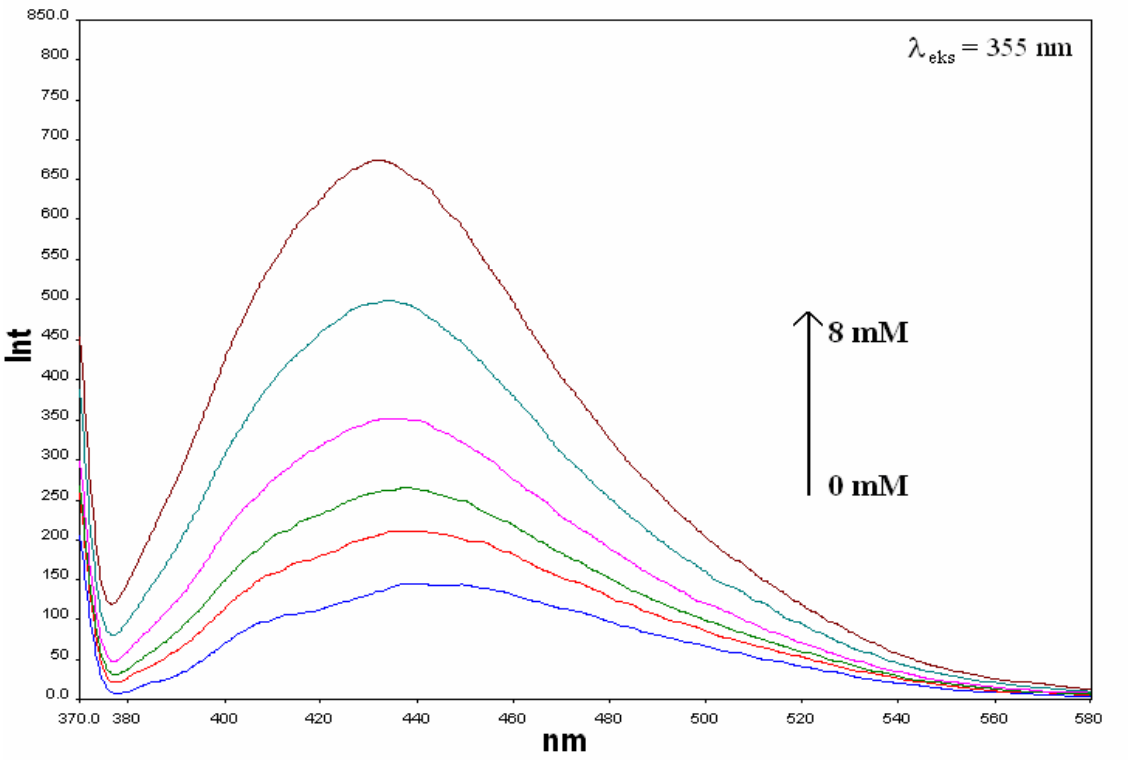
(a)



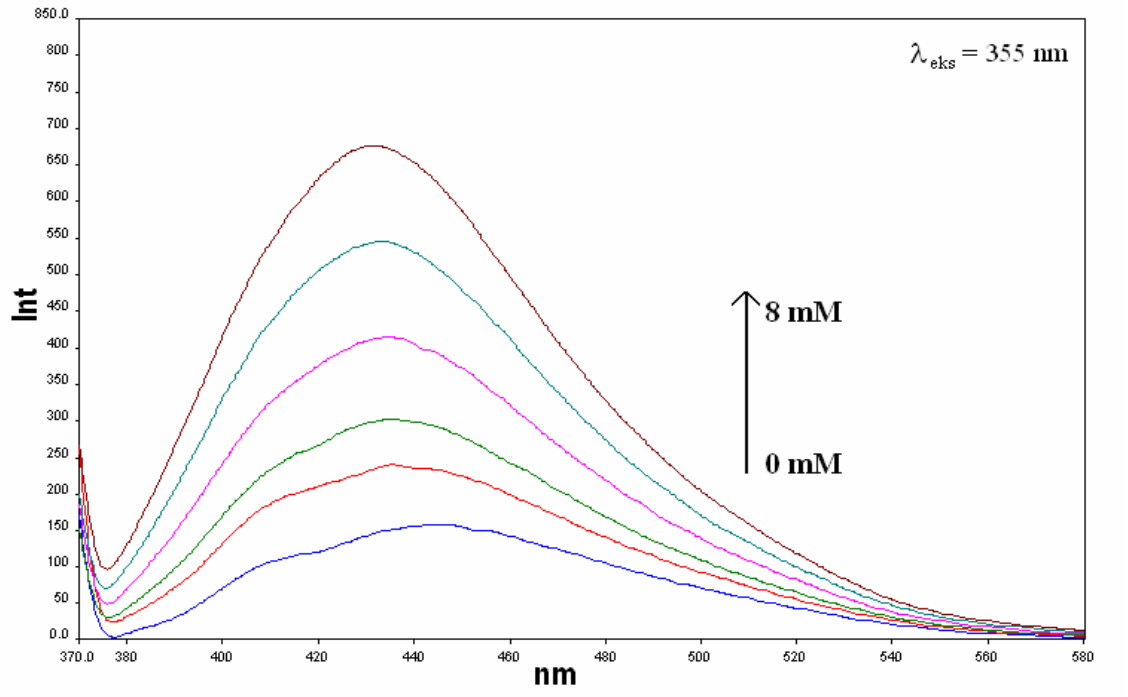
(b)


λeks = 355 nm
8 mM
0 mM
Int
nm
500.0
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0.0
370.0
380
400
420
440
460
480
500
520
540
560
580

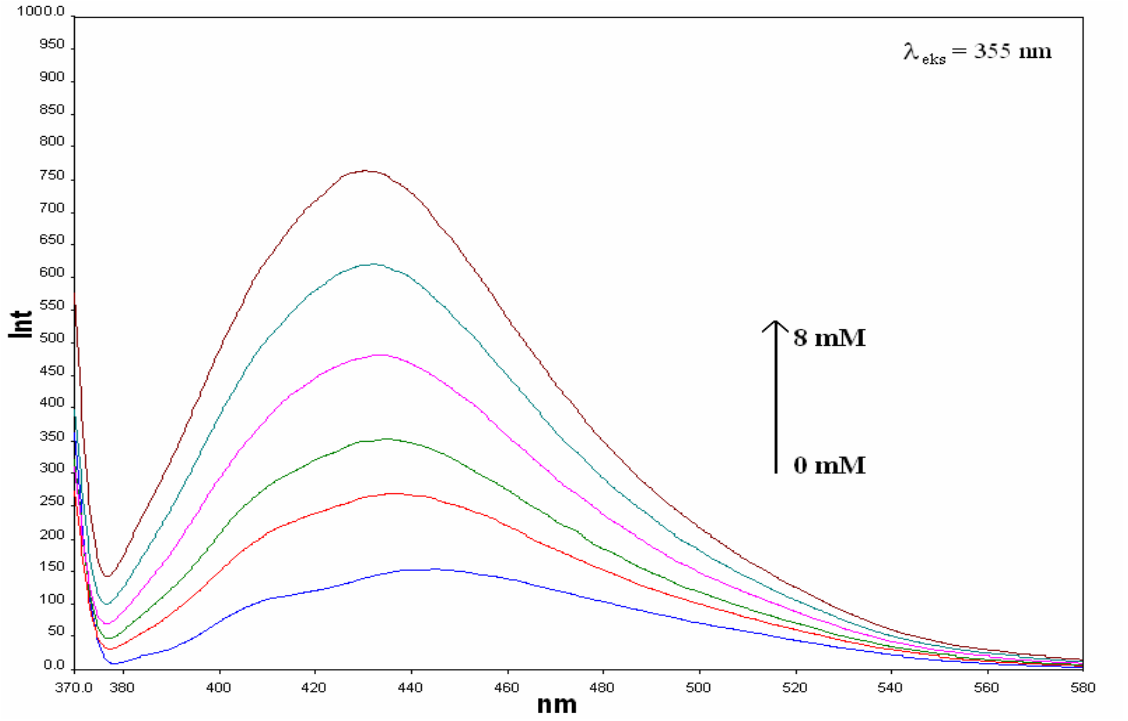
(c)


λeks = 355 nm
8 mM
0 mM
Int
nm
850.0
800
750
700
650
600
550
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0.0
370.0
380
400
420
440
460
480
500
520
540
560
580

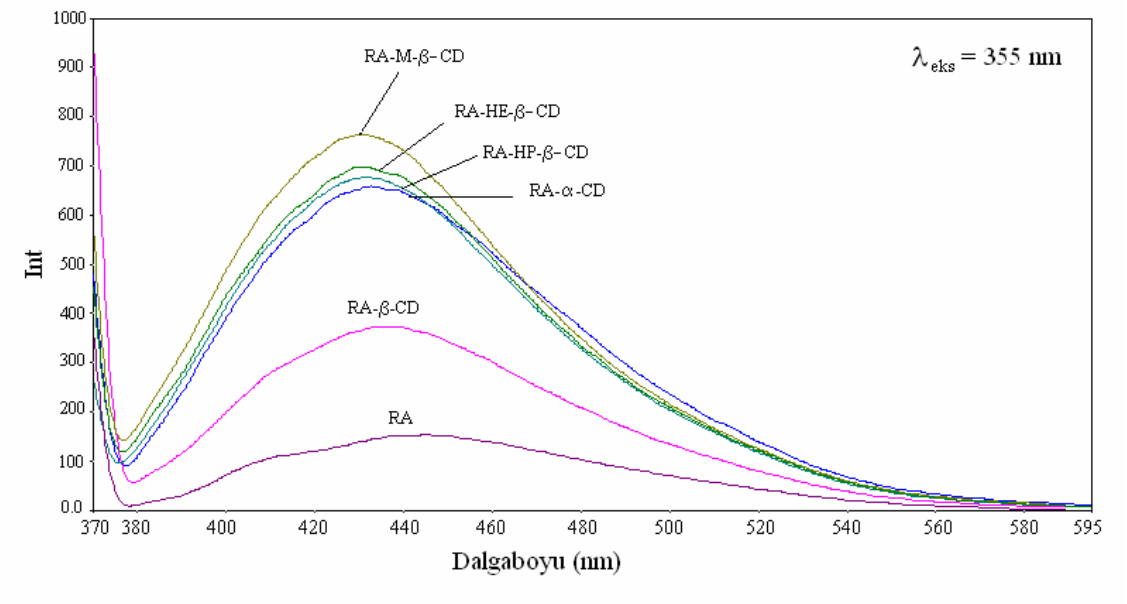
(d)



(e)



Şekil 4.21: 50 µM rozmarinik asid çözeltisinin tek başına ve artan derişimli (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 355 nm, pH= 7, 25 ºC)

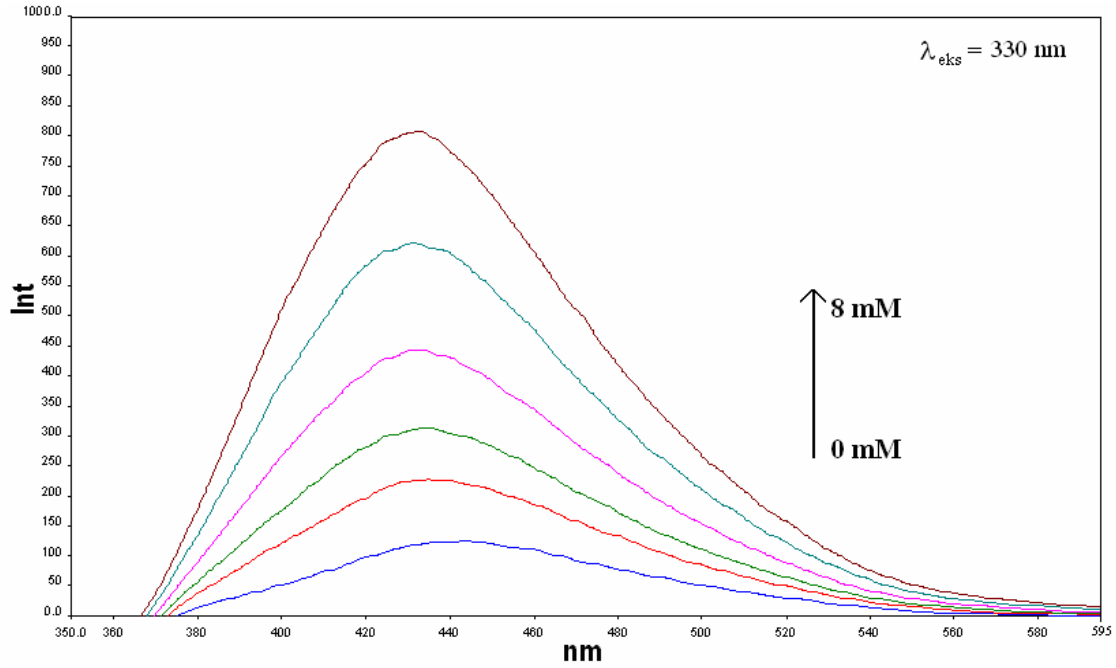


Şekil 4.22: 50 µM rozmarinik asid çözeltisinin tek başına ve 8 mM CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 355 nm, pH= 7, 25 ºC)

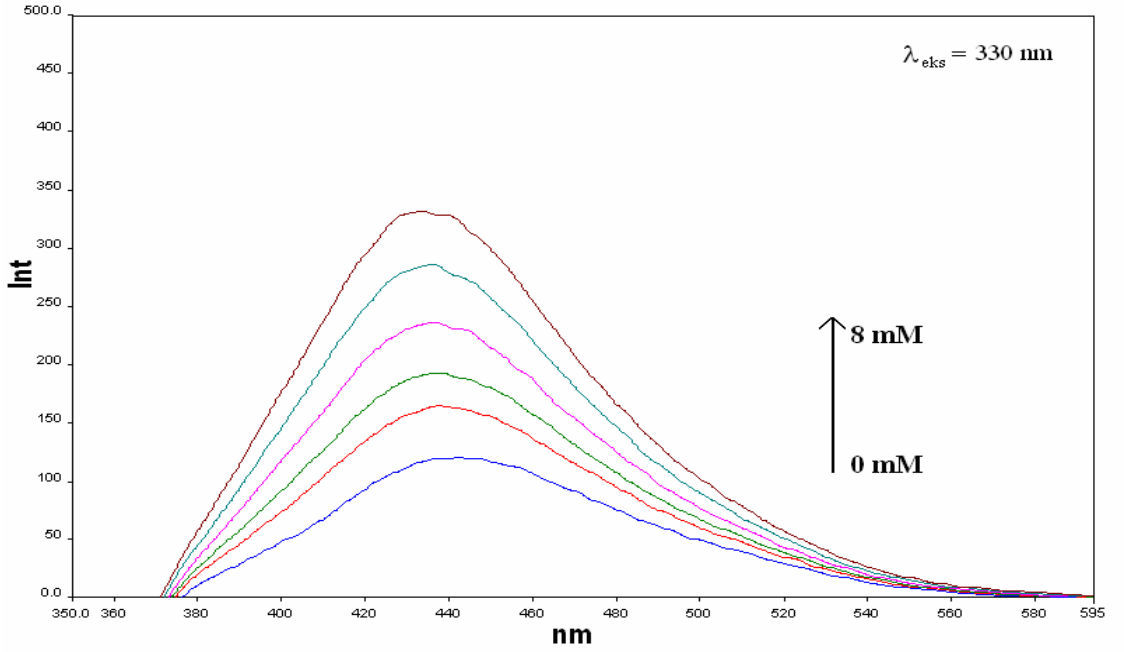
4.3.3.2. Klorojenik asid (CA)

Klorojenik asit için λ_{eks} 330 nm, λ_{em} 440 nm olup floresans spektrumları 350-600 nm dalgaboyu aralığında elde edilmiştir (Şekil 4.23 (a-e)). Klorojenik asidin pH=7'de ilgili siklodekstrin çözeltileri (8 mM) varlığındaki floresans spektrumu tek bir spektrum halinde Şekil 4.24'de verilmiştir.

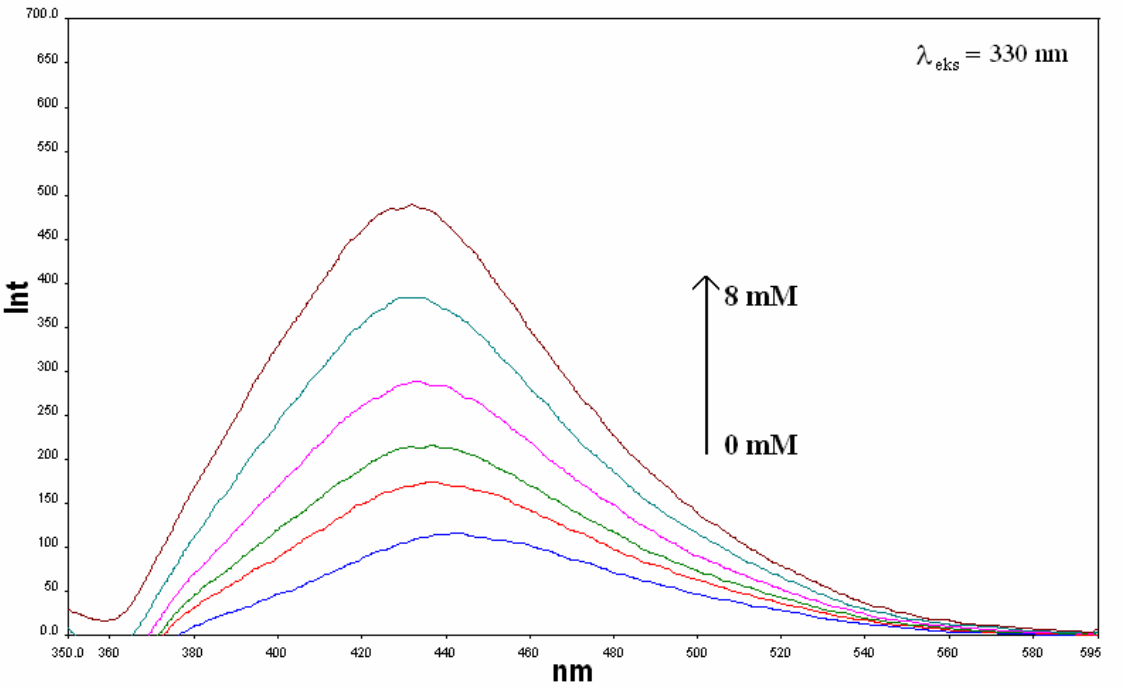
(a)



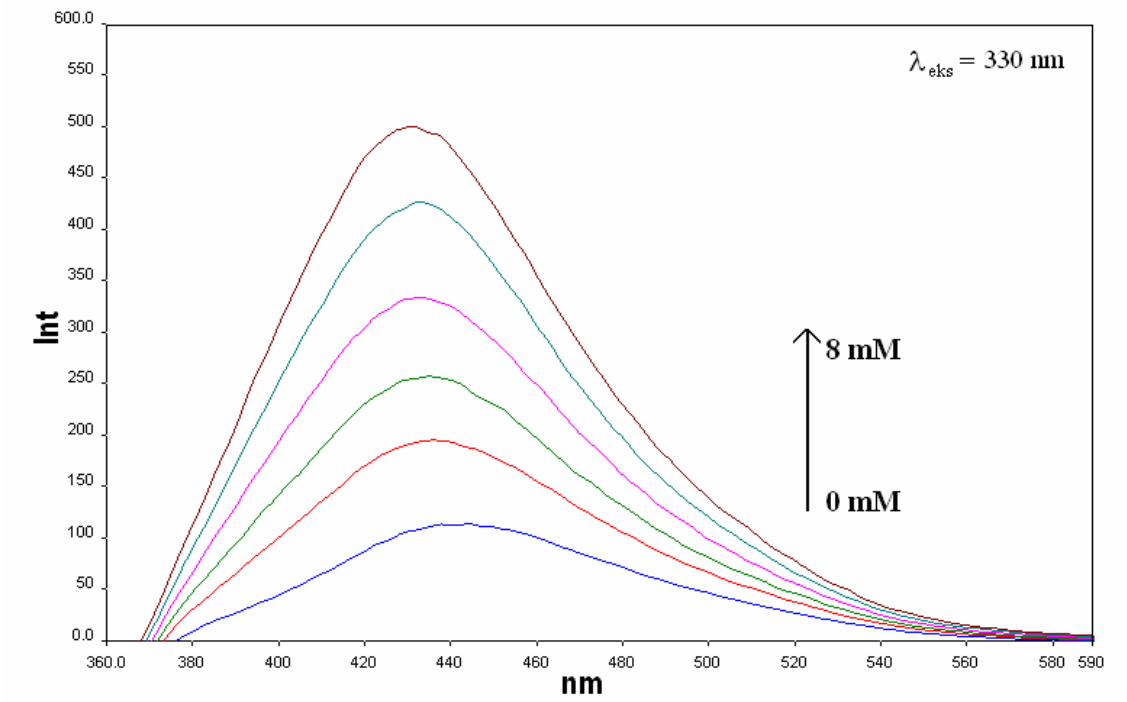
(b)



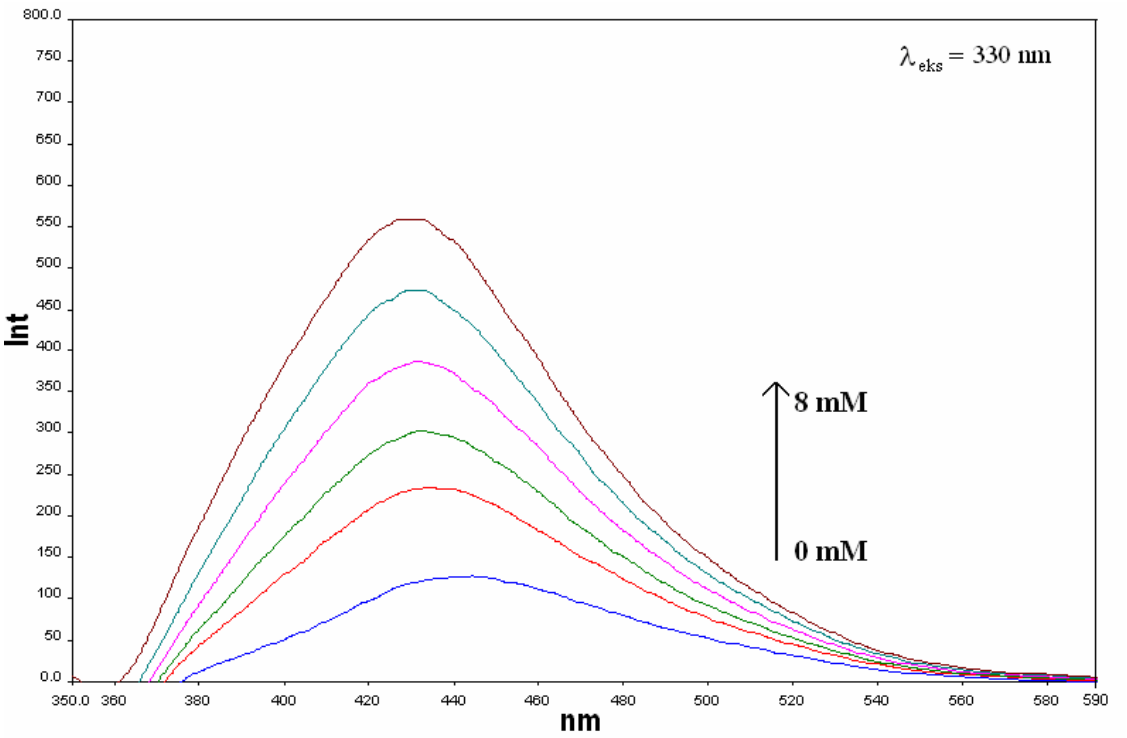
(c)



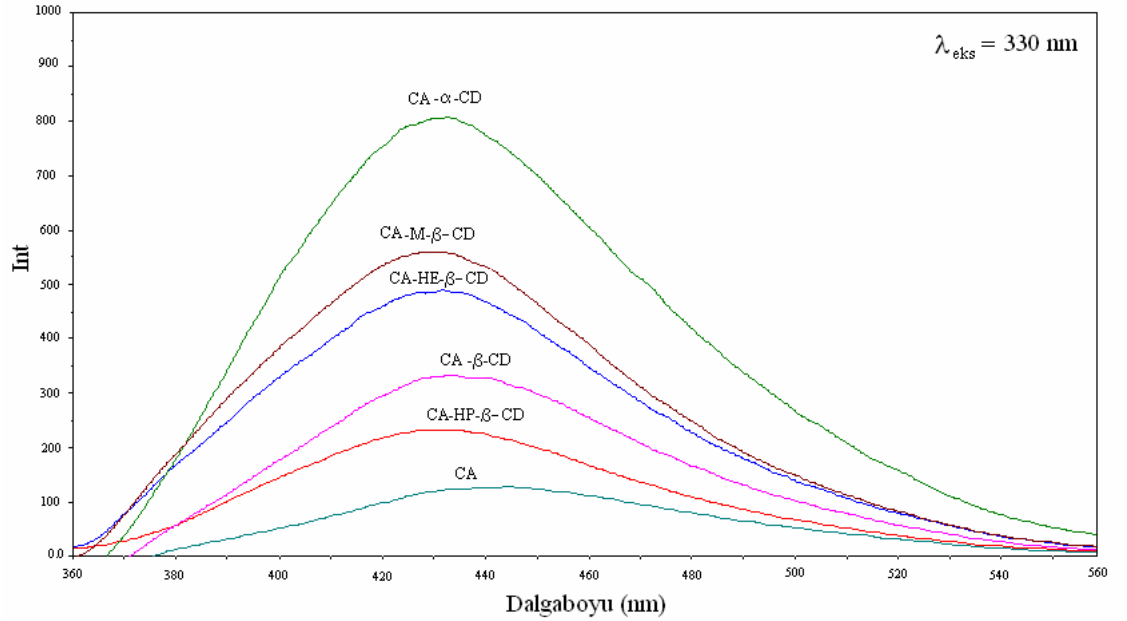
(d)



(e)



Şekil 4.23: 50 µM klorojenik asid çözeltisinin tek başına ve artan derişimli (a) α-CD (b) β-CD (c) HE-β-CD (d) HP-β-CD (e) M-β-CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 330 nm, pH= 7, 25 ºC)

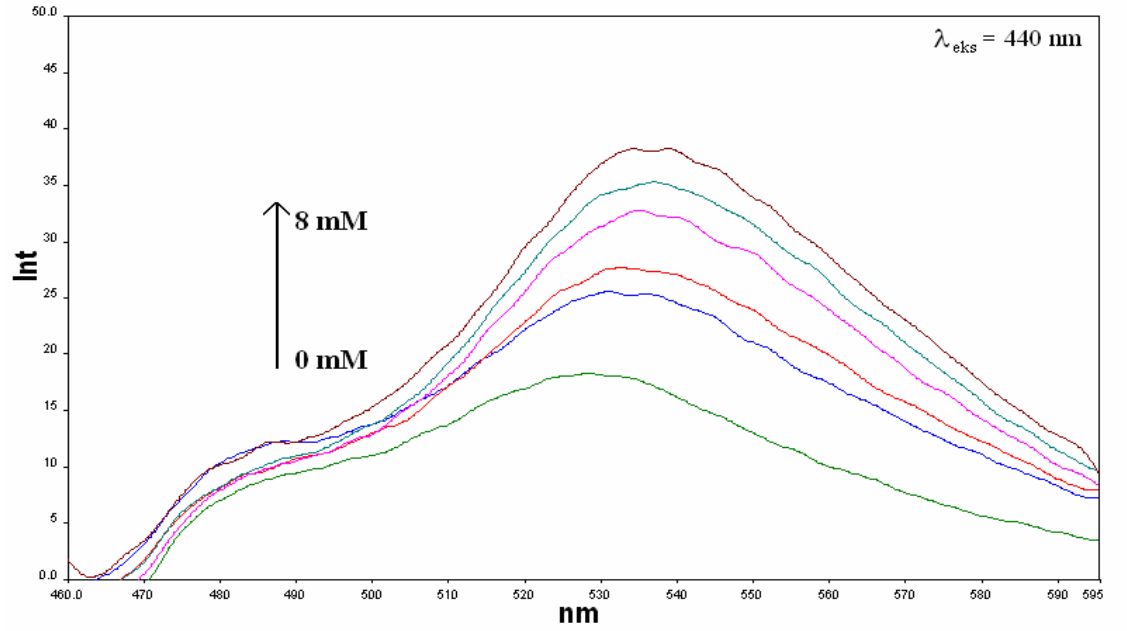


Şekil 4.24: 50 µM klorojenik asid çözeltisinin tek başına ve 8 mM farklı CD çözeltileri varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 330 nm, pH= 7, 25 ºC)

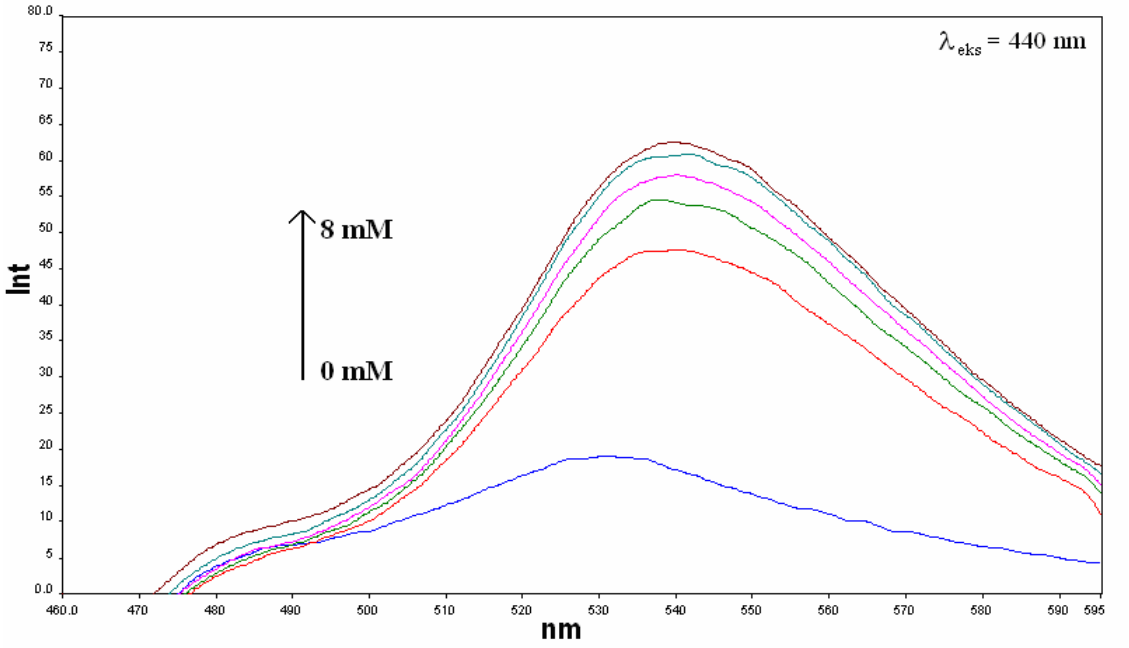
4.3.3.3. Kuersetin (QR)

Kuersetin için λ_{eks} 440 nm, λ_{em} 527 nm olup CD varlığında elde edilen floresans spektrumları 460-595 nm dalgaboyu aralığında görüntülenmiştir (Şekil 4.25). Kuersetin ile α-CD arasında beklenilen ve sıralı bir floresans intensite artışı gözlenmediği için spektrumu verilmemiştir. Kuersetinin pH=7'de ilgili siklodekstrin çözeltileri (8 mM) varlığındaki floresans spektrumu tek bir spektrum halinde Şekil 4.26'da görülmektedir.

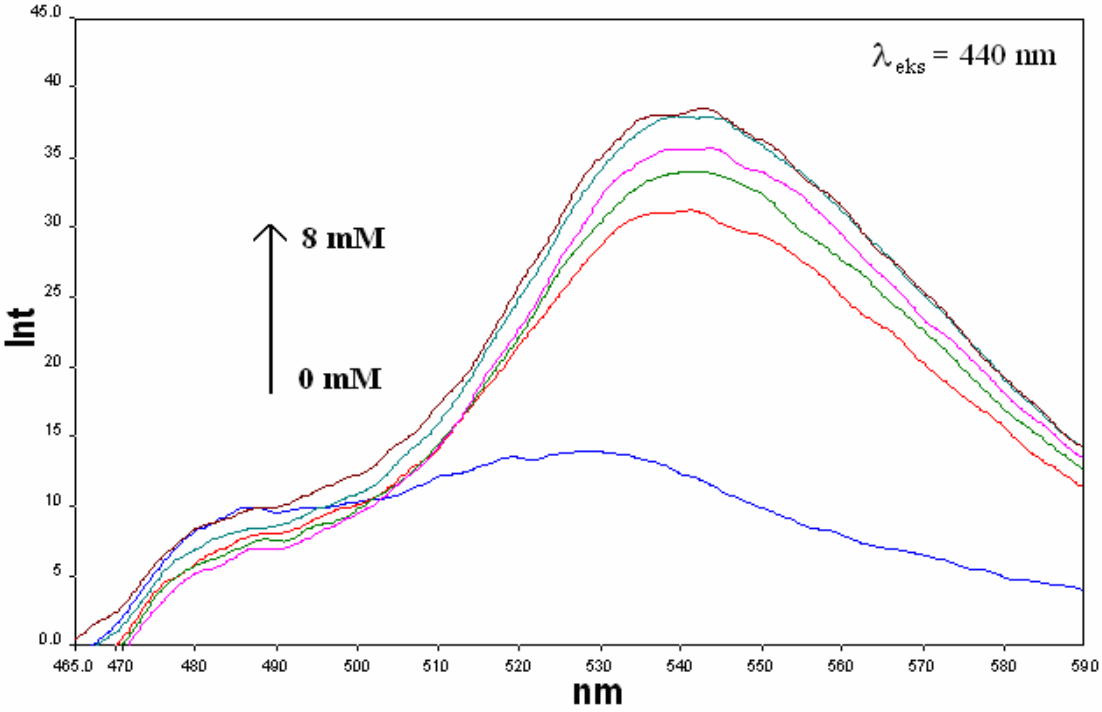
(a)



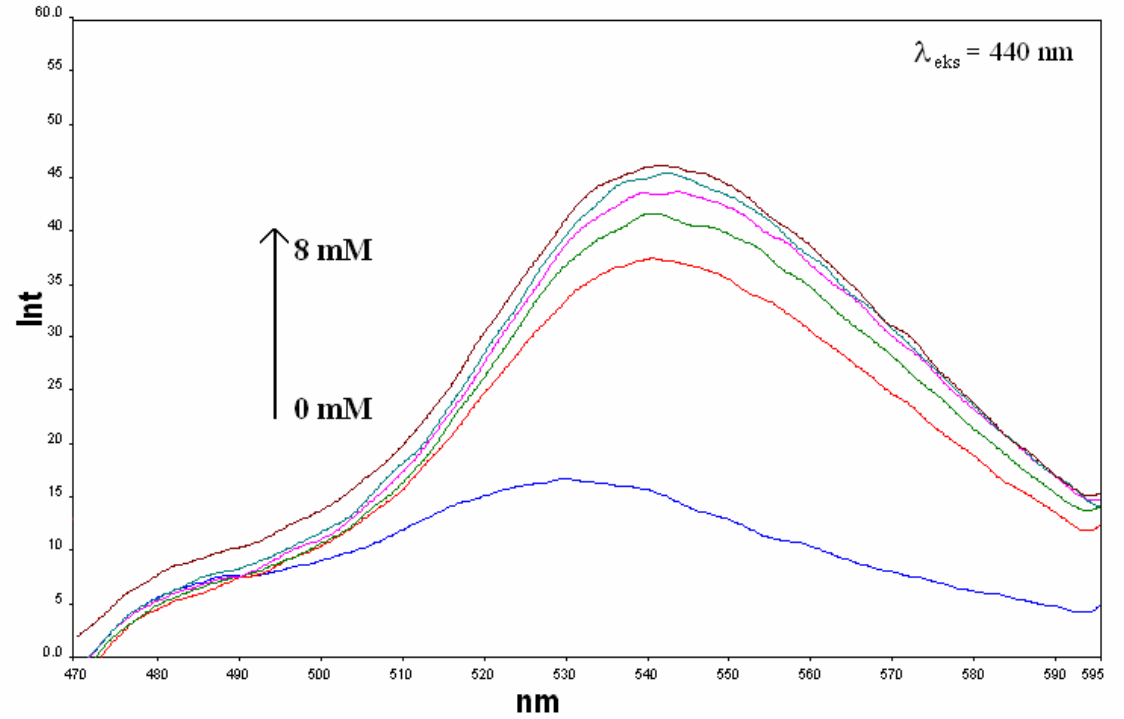
(b)



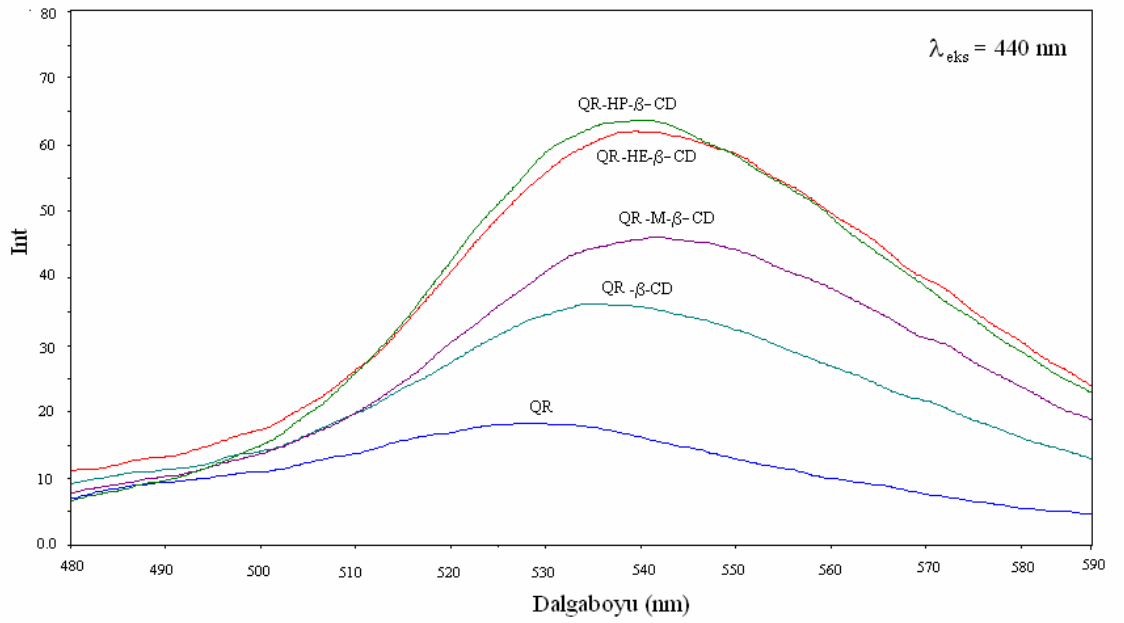
(c)



(d)



Şekil 4.25: 50 µM kuersetin çözeltisinin tek başına ve artan derişimli (a) β-CD (b) HE-β-CD (c) HP-β-CD (d) M-β-CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 440 nm, pH= 7, 25 ºC)



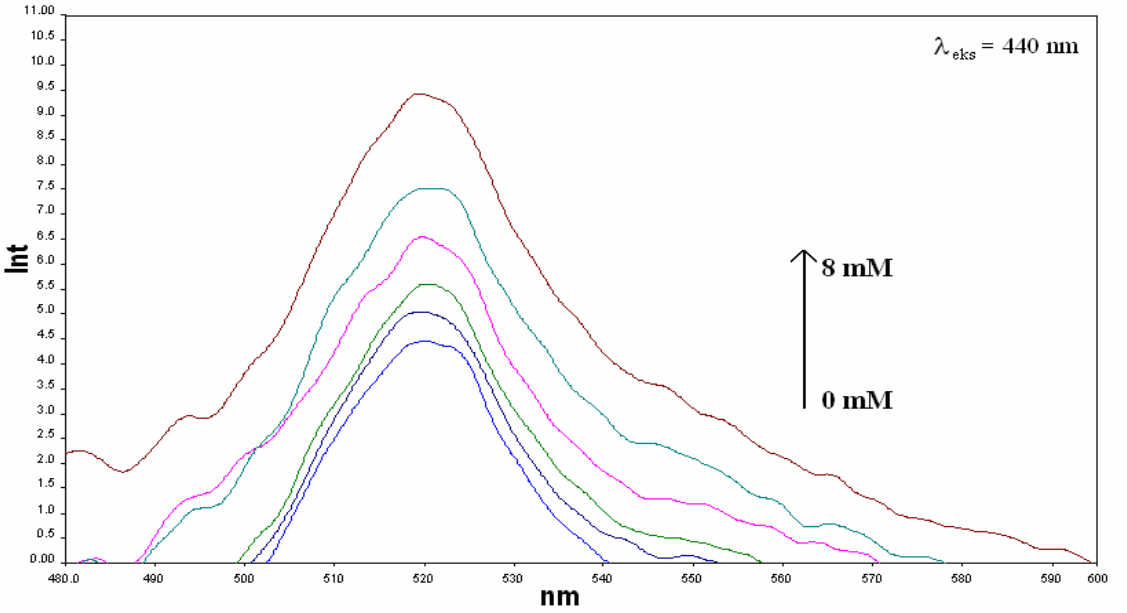
Şekil 4.26: 50 µM kuersetin çözeltisinin tek başına ve 8 mM farklı CD çözeltileri varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 440 nm, pH= 7, 25 ºC)

4.3.3.4. Rutin (RT)

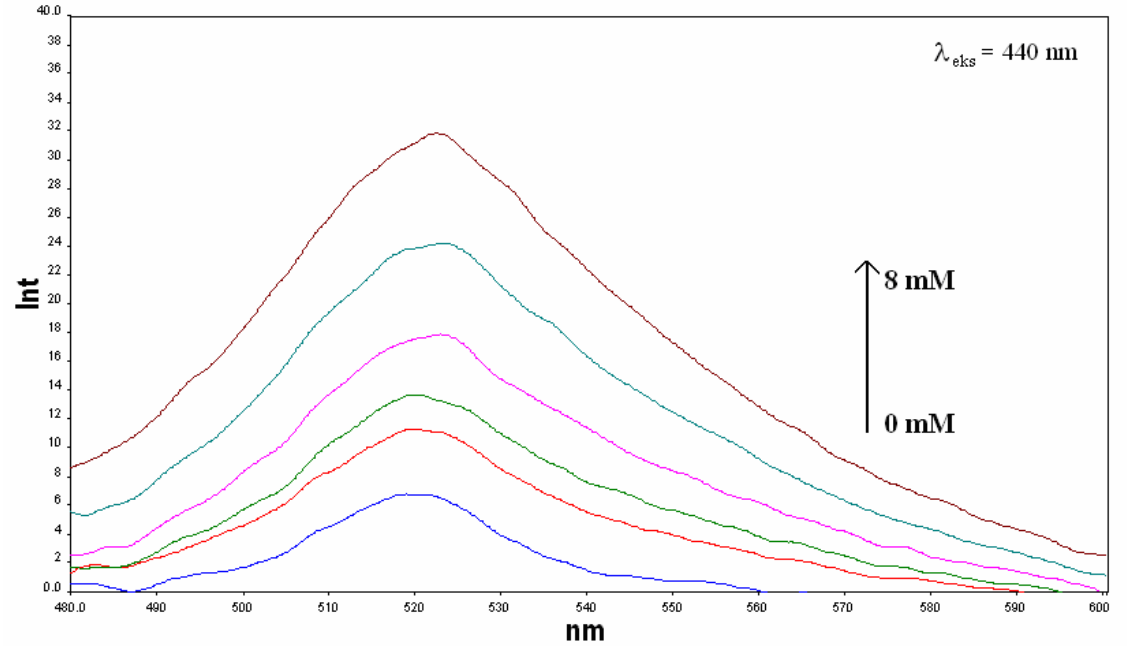
Kuersetinin glikozidi olan rutin için λ_{eks} 440 nm, λ_{em} 520 nm olup floresans spektrumları 480-600 nm dalgaboyu aralığında elde edilmiştir (Şekil 4.27). Rutin ile α-

CD arasında beklenilen ve sıralı bir floresans intensite artışı gözlenmemiştir (spektruma tez çalışmasında yer verilmemiştir). Rutinin pH=7'de ilgili siklodekstrin çözeltileri (8 mM) varlığındaki floresans spektrumu tek bir spektrum halinde Şekil 4.28'de verilmiştir.

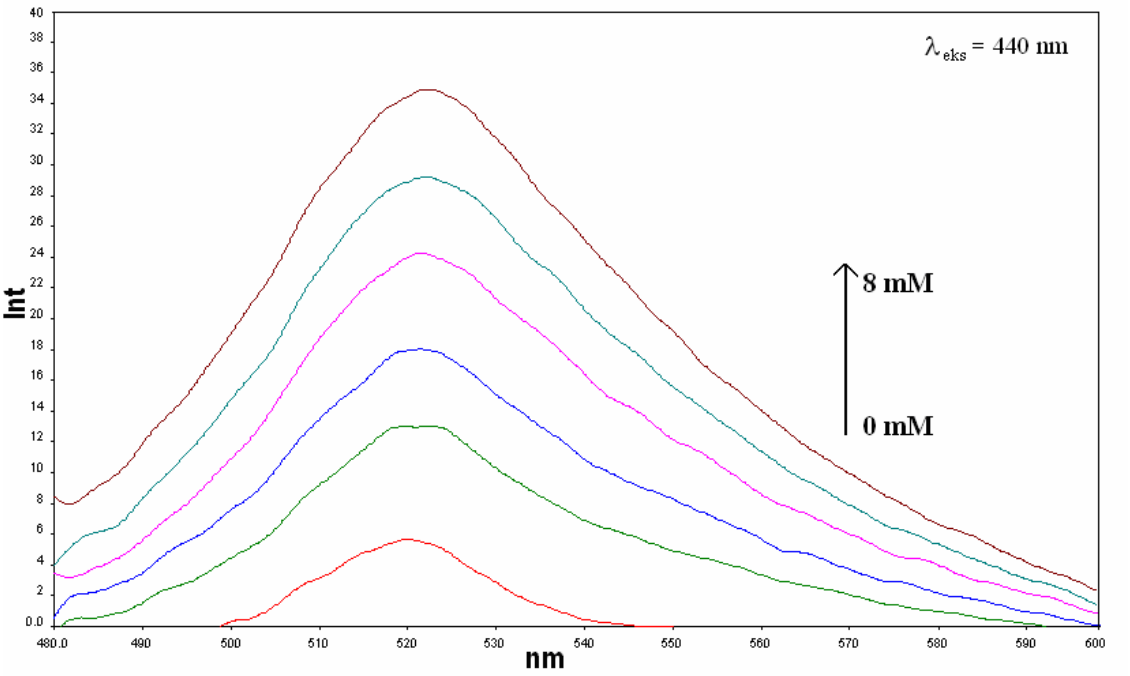
(a)



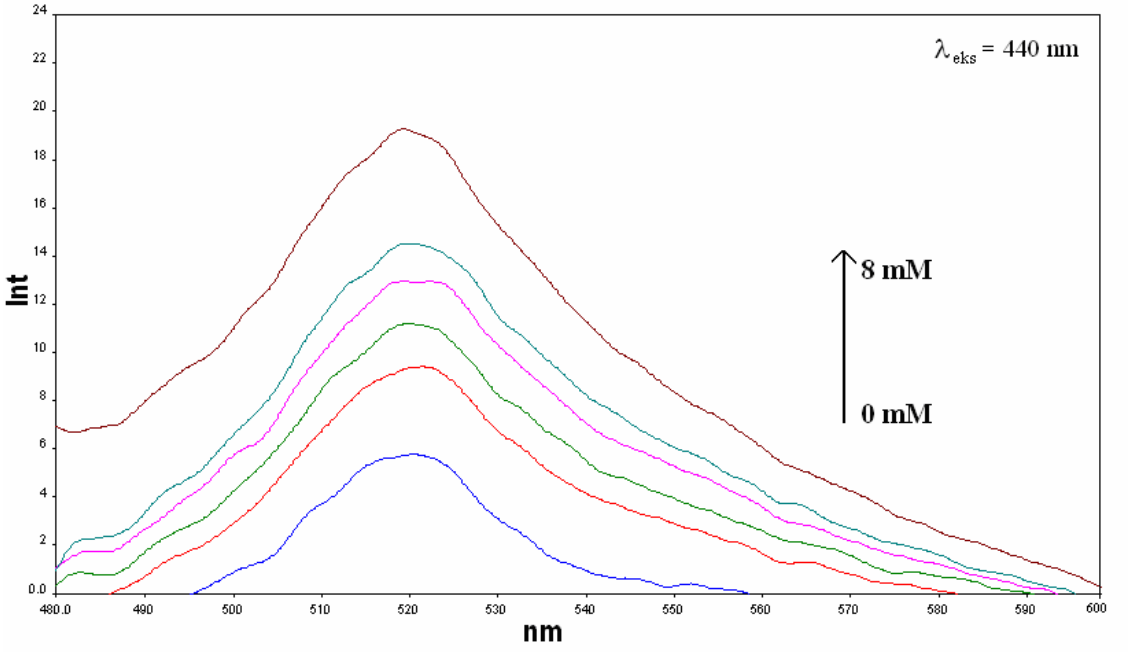
(b)



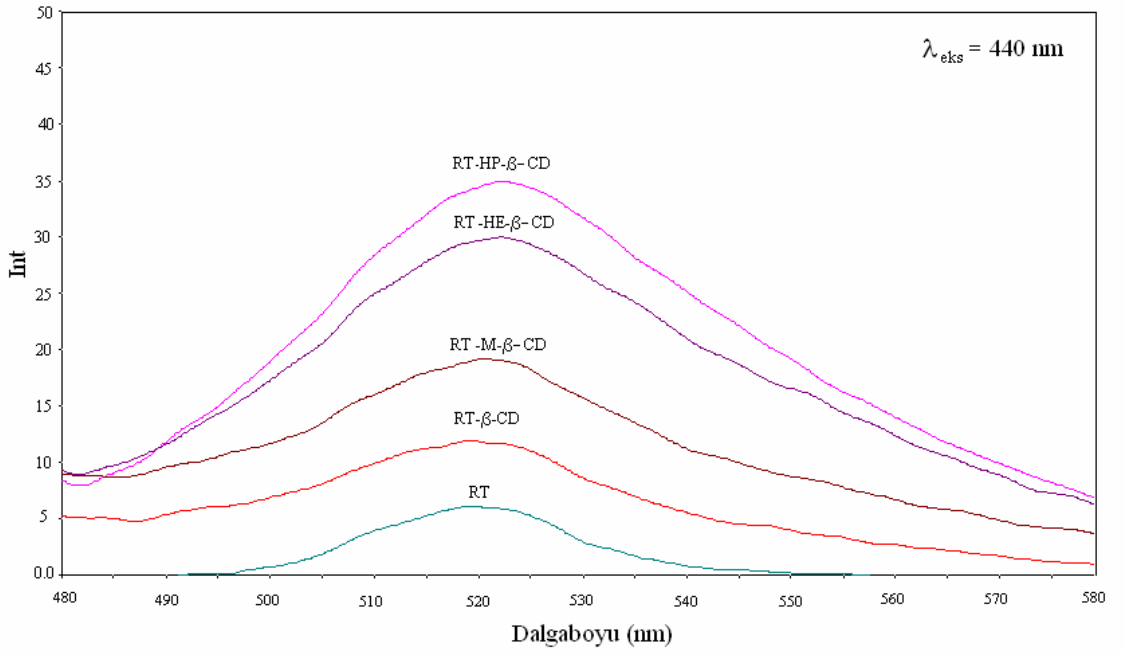
(c)



(d)



Şekil 4.27: 50 µM rutin çözeltisinin tek başına ve artan derişimli (a) β-CD (b) HE-β-CD (c) HP-β-CD (d) M-β-CD varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 440 nm, pH= 7, 25 ºC)



Şekil 4.28: 50 µM rutin çözeltisinin tek başına ve 8 mM farklı CD çözeltileri varlığındaki floresans spektrumları (λ_{eks} = 440 nm, pH= 7, 25 ºC)

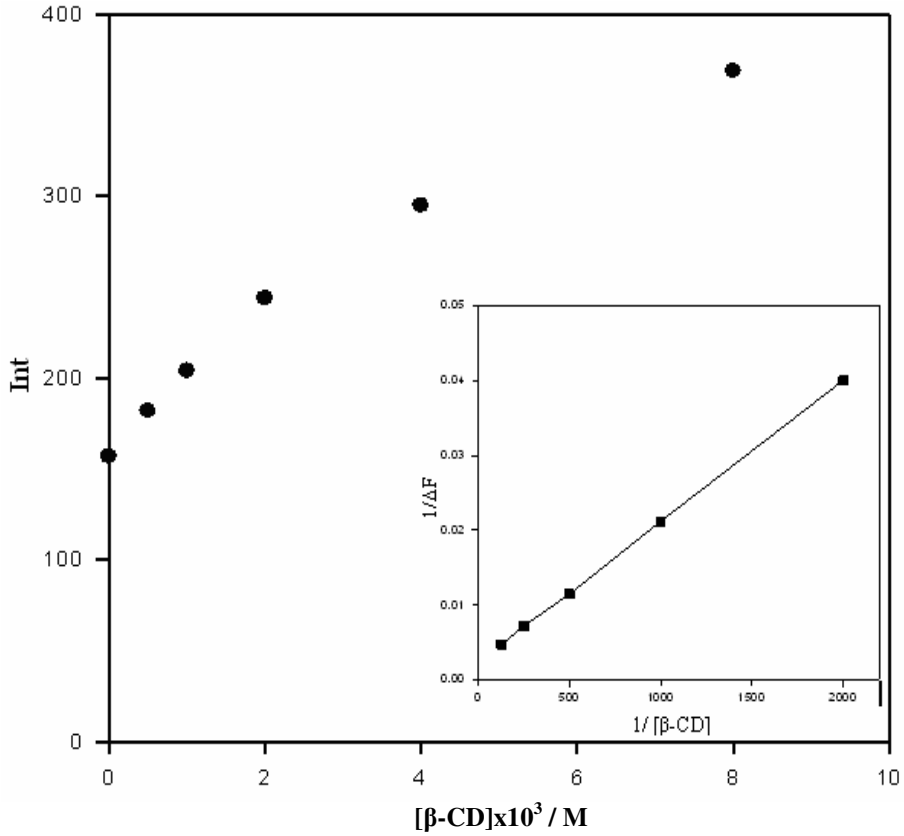
4.3.4. İçerme Komplekslerinin Oluşum Sabitlerinin Hesaplanması

Siklodekstrin derişimlerine karşı 50 µM antioksidan çözeltilerinin artan siklodekstrin derişimine (0-8 mM) bağlı olarak ölçülen floresans intensiteleri kullanılarak [CD] ile intensite değerleri arasında kalibrasyon grafikleri çizilmiştir. Rozmarinik asid, klorojenik asid, kuersetin ve rutin ile bazı doğal ve türevlendirilmiş siklodekstrinlerin içerme komplekslerinin oluşum sabitleri, kararlı-hal (steady-state) florimetrik ölçümlere göre modifiye edilmiş Benesi-Hildebrand denklemi (Eşitlik 2.25) kullanılarak hesaplanmıştır. Bu denkleme göre [CD] ile intensite değerleri arasında çizilen kalibrasyon grafiklerinin 1/[CD] ile 1/ΔF arasındaki resiprokal eğrileri oluşturulduktan sonra [kayım/eğim] oranından içerme komplekslerinin oluşum sabitleri hesaplanmıştır (Tablo 4.33). Bu grafiklerin 1/[CD] ile 1/ΔF değerleri arasında çizilen resiprokal eğrileri, kalibrasyon grafikleriyle birlikte gösterilmektedir. Şekil 4.29, 4.30, 4.31 ve 4.32'de çalışılan her bir antioksidan bileşik için β-CD varlığında elde edilen grafikler görülmektedir.

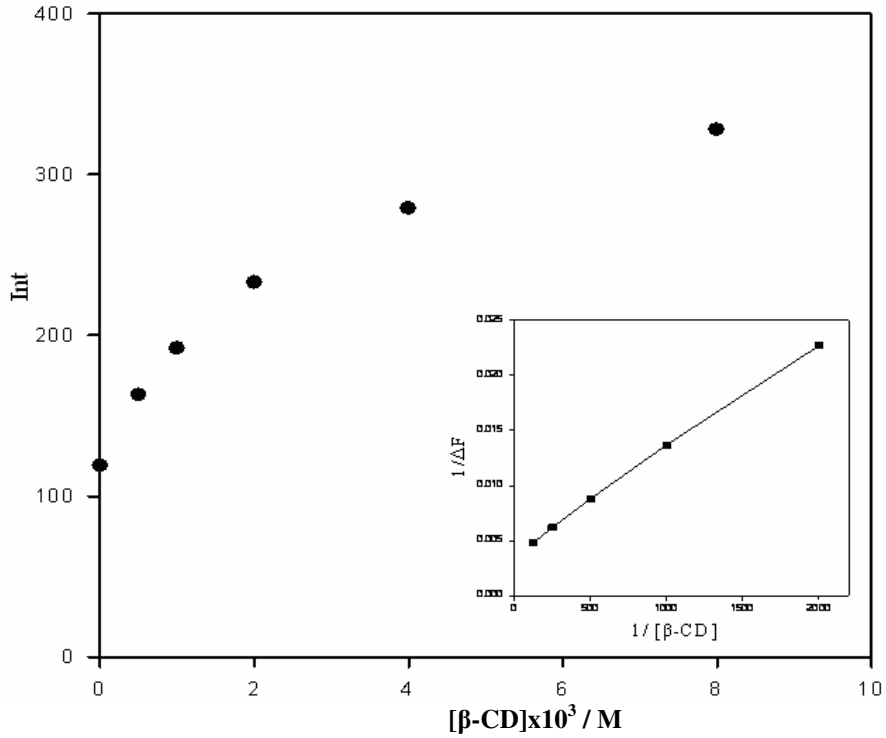
Tablo 4.33:Antioksidan-siklodekstrin içerme komplekslerinin oluşum sabitleri

Antioksidan bileşikler	**K_f (M^{-1})**				
	α-CD	**β-CD**	**HE-β-CD**	**HP-β-CD**	**M-β-CD**
Rosmarinik asit	82±7	164±65	168±57	267±54	328±39
Klorojenik asit	249±65	412±14	208±32	440±27	584±25
Rutin	-[a]	122±33	292±45	562±42	838±94
Kuersetin	-[a]	1026±151	3685±315	5200±561	4334±444

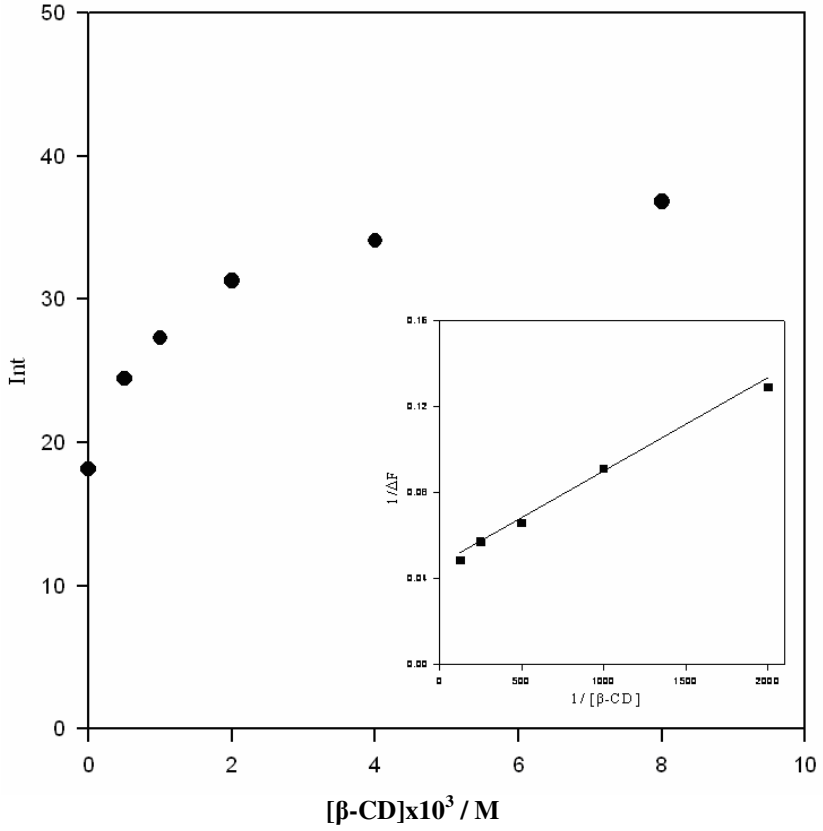
[a] : RT-α-CD ve QR-α-CD kompleksinin K_f sabiti ölçülememiştir.



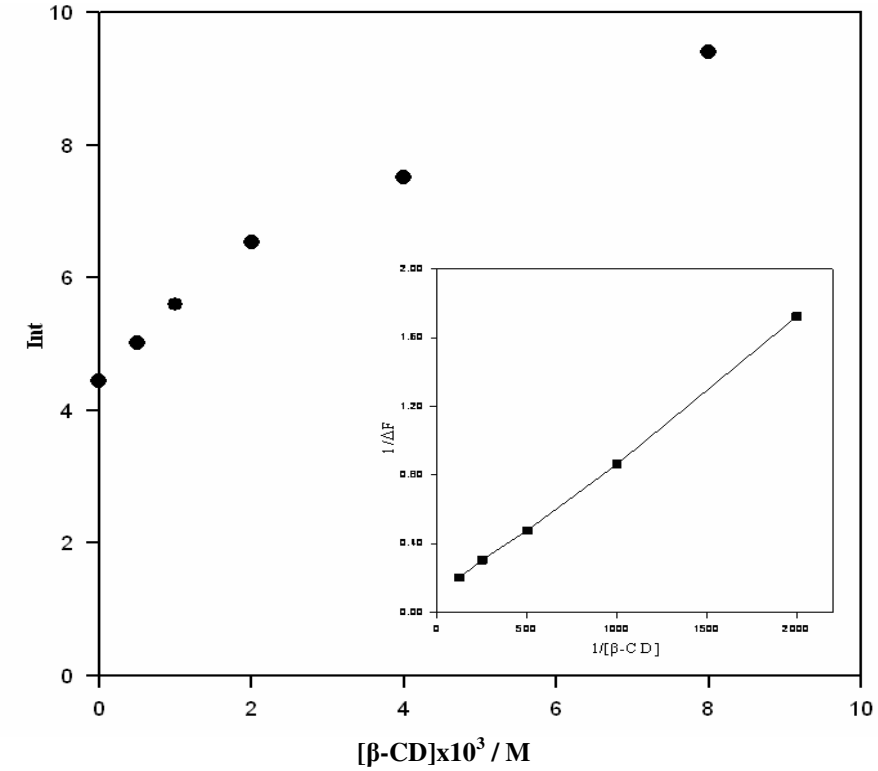
Şekil 4.29: Rosmarinik asidin 440 nm'de farklı β-CD derişimlerine karşı ölçülen floresans intensiteleri ve 1/[β-CD]-1/ΔF grafiği



Şekil 4.30: Klorojenik asidin 440 nm'de farklı β-CD derişimlerine karşı ölçülen floresans intensiteleri ve 1/[β-CD]-1/ΔF grafiği



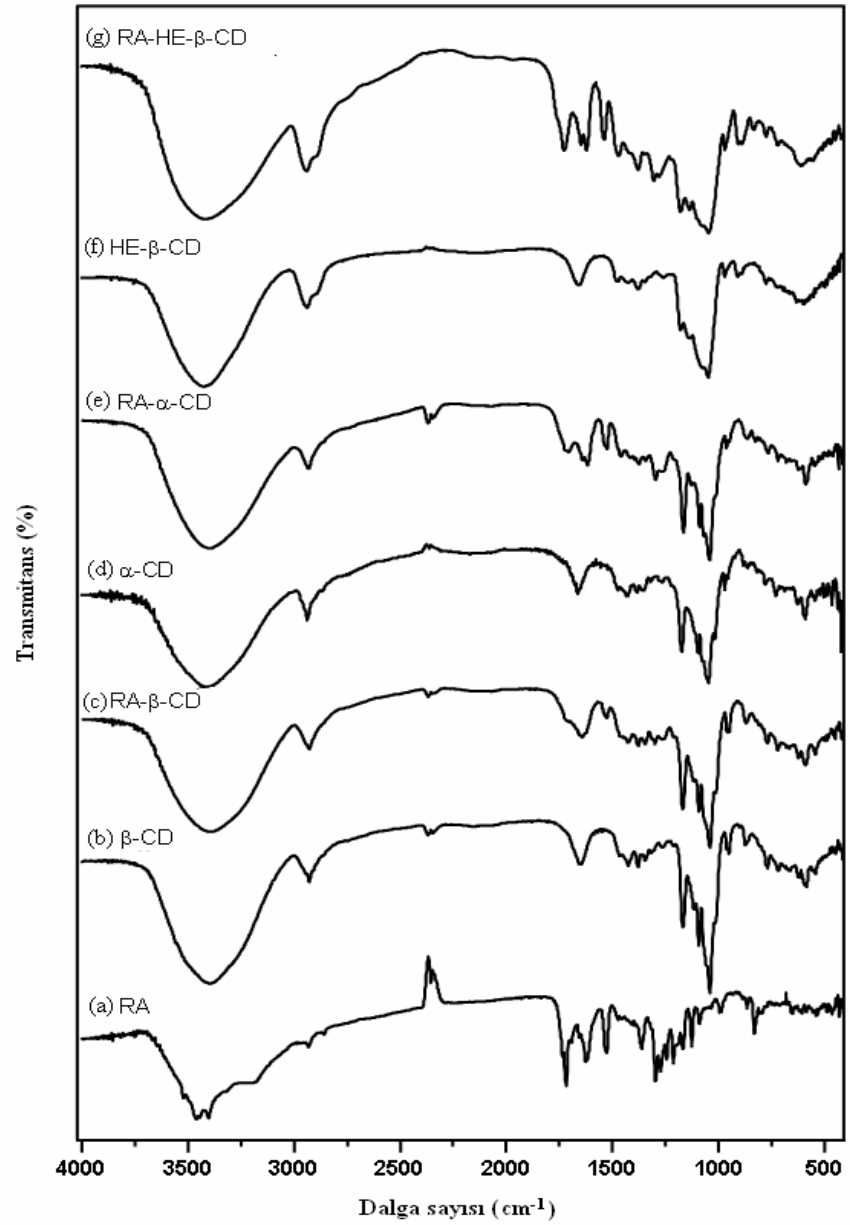
Şekil 4.31: Kuersetinin 527 nm'de farklı β-CD derişimlerine karşı ölçülen floresans intensiteleri ve 1/[β-CD]-1/ΔF grafiği



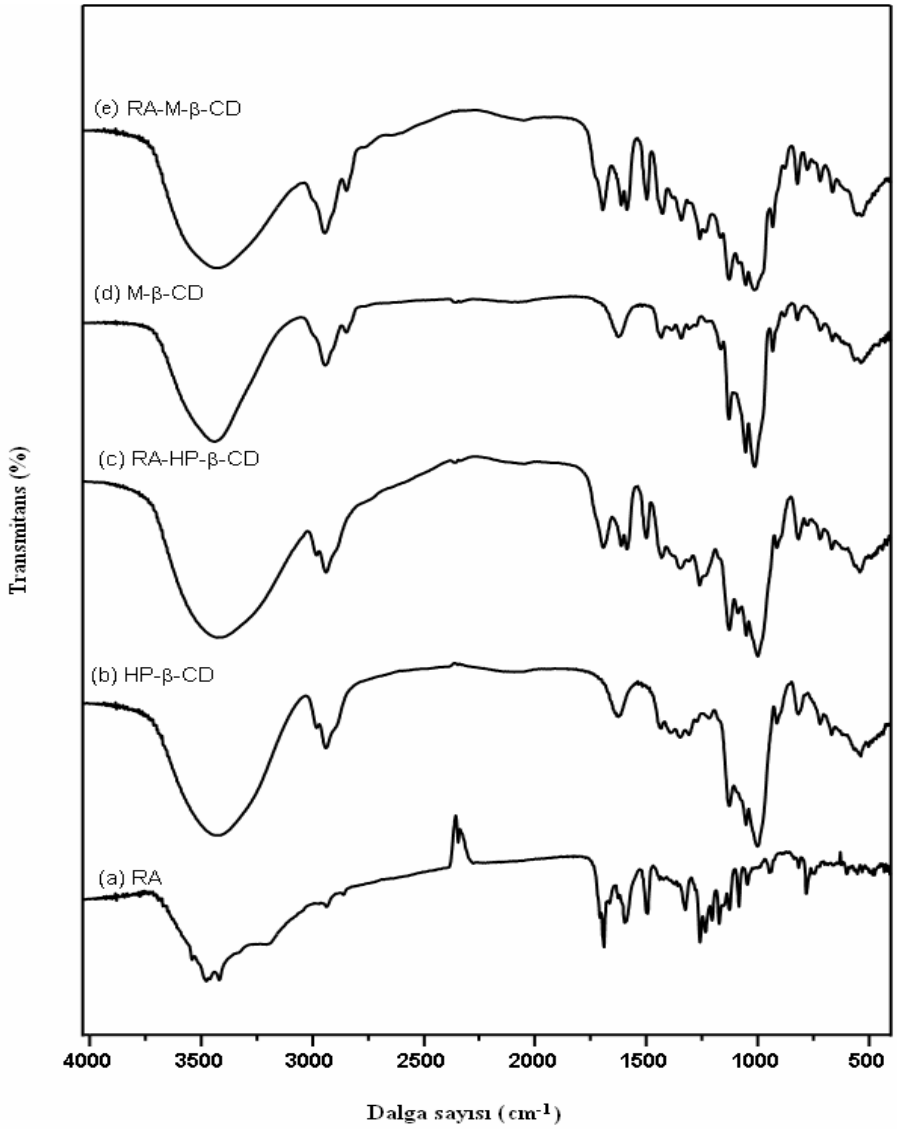
Şekil 4.32: Rutinin 520 nm'de farklı β-CD derişimlerine karşı ölçülen floresans intensiteleri ve 1/[β-CD]-1/ΔF grafiği

4.3.5. İçerme Komplekslerinin FT-IR Spektrumlarının Eldesi

Rozmarinik asid ile farklı CD'ler arasında oluşturulan katı içerme komplekslerinin eldesi için birlikte çöktürme yöntemi kullanılmıştır. Freeze-dryer cihazında kurutularak hazırlanan RA-α-CD, RA-β-CD, RA-HE-β-CD, RA-HP-β-CD ve RA-M-β-CD katı içerme komplekslerinin, toz halinde saf rozmarinik asidin ve saf siklodekstrin FT-IR spektrumları infrared spektrometre cihazında 4000-400 cm^{-1} spektral aralıkta elde edilmiştir (Şekil 4.33 ve 4.34).



Şekil 4.33: Katı numunelerin FT-IR spektrumları: (a) yalnız RA, (b) yalnız β-CD, (c) RA-β-CD içerme kompleksi, (d) yalnız α-CD, (e) RA-α-CD içerme kompleksi, (f) yalnız HE-β-CD (g) RA-HE-β-CD içerme kompleksi



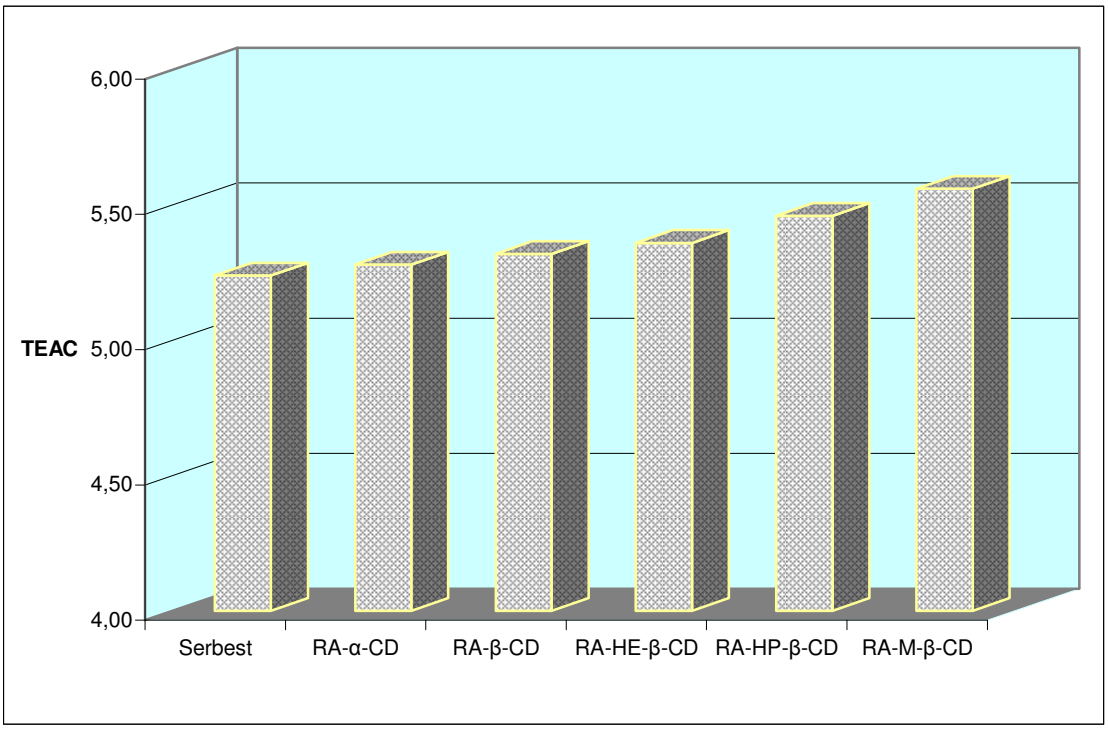
Şekil 4.34: Katı numunelerin FT-IR spektrumları: (a) yalnız RA, (b) yalnız HP-β-CD, (c) RA-HP-β-CD içerme kompleksi, (d) yalnız M-β-CD, (e) RA-M-β-CD içerme kompleksi

4.3.6. İçerme Komplekslerinin Antioksidan Kapasitelerinin İncelenmesi

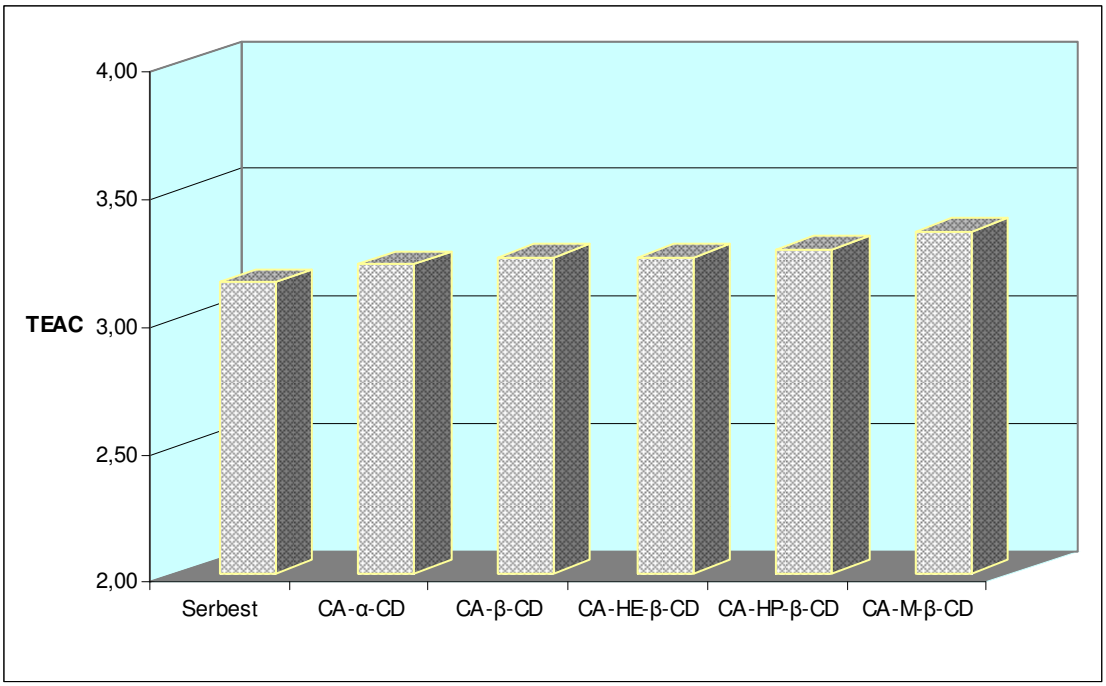
Saf antioksidan bileşikler ve bu antioksidan bileşiklerin α-CD, β-CD, hidroksi-etil-β-CD, hidroksi-propil-β-CD, metil-β-CD ile pH=7 ve 25^{o}C'de oluşturdukları sıvı içerme komplekslerinin troloks eşdeğeri antioksidan kapasite katsayıları CUPRAC yöntemine göre belirlenmiştir. Antioksidan kapasitenin incelenmesi için değişimin en yüksek olduğu belirlenen 8 mM CD içeren antioksidan çözeltileri kullanılmıştır. Her bir antioksidan bileşik ve ilgili içerme komplekslerinin CUPRAC yöntemi verileri kullanılarak kalibrasyon denklemleri oluşturulmuştur. Serbest ve kompleksleşmiş türlere ait molar absorplama katsayıları troloksun metanollü çözelti ortamında sahip

olduğu ε_{TR} (1.58 x 10^4 $Lmol^{-1}cm^{-1}$) değerine bölünerek Eşitlik 3.2'de verilen denkleme göre hesaplanmıştır. Serbest ve kompleksleşmiş antioksidan bileşiklere ait TEAC değerleri Şekil 4.35, 4.36, 4.37 ve 4.38'de bar grafikleri şeklinde karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir.

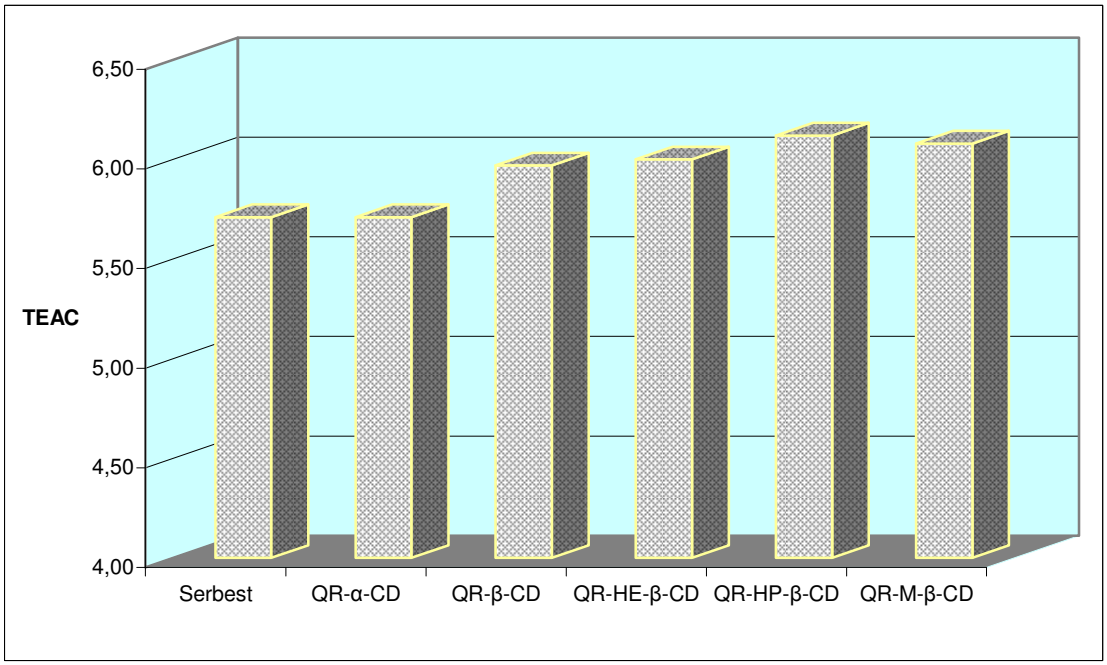
Serbest ve kompleksleşmiş antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitesini değerlendirmek için kullanılan CUPRAC yöntemiyle bileşiklerin oksidasyon reaksiyonu kinetiği incelenmiştir. 50 µM rozmarinik asid çözeltisi ve 8 mM M-β-CD varlığında hazırlanan RA-M-β-CD içerme kompleks çözeltisinden 0.4'er mL numune alınıp CUPRAC yöntemi uygulanarak 30 dakikalık reaksiyon süresince A_{450} değerlerindeki değişimler incelenmiş ve Şekil 4.39'daki grafikte serbest ve kompleks formundaki rozmarinik aside ait absorbans değerleri karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



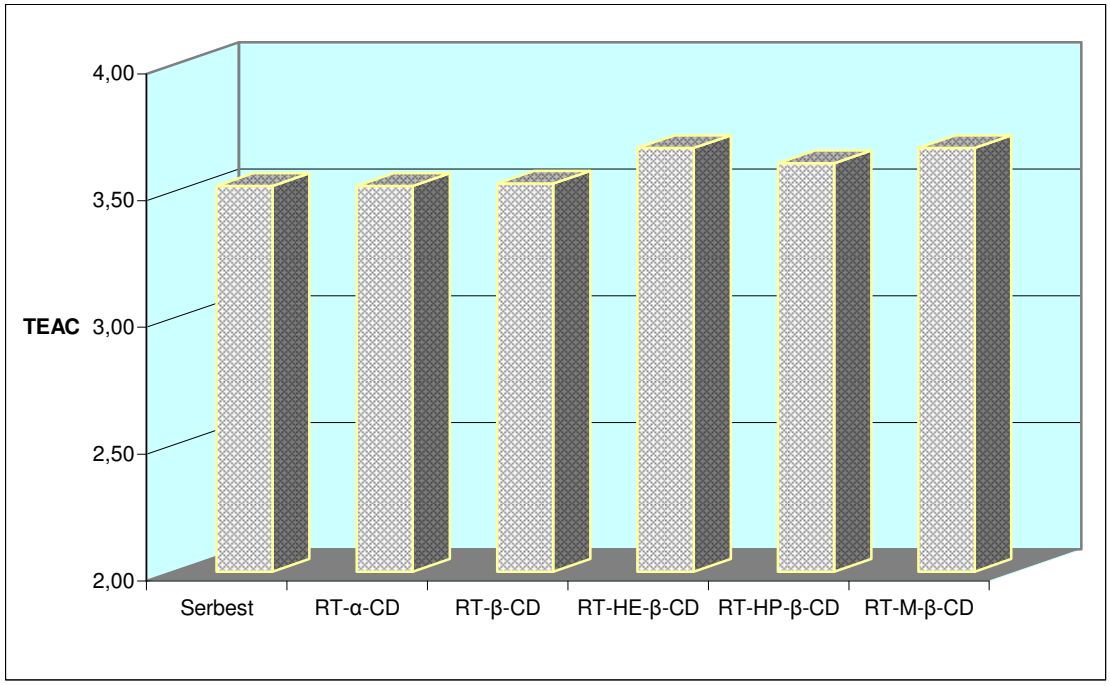
Şekil 4.35: Serbest ve kompleksleşmiş rozmarinik asidin CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları



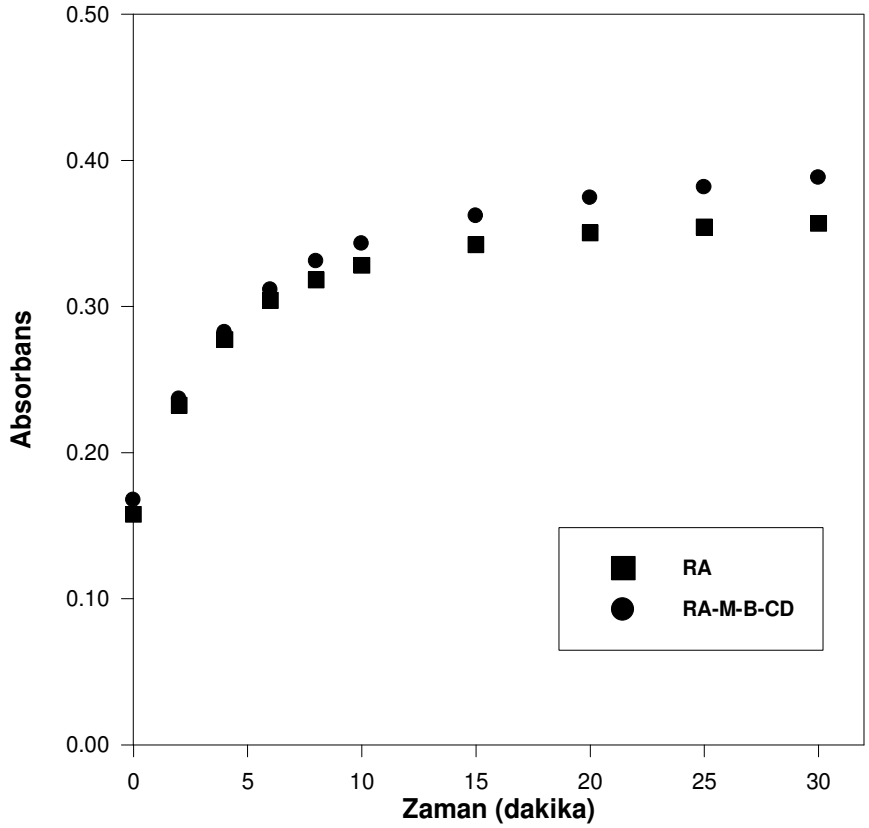
Şekil 4.36: Serbest ve kompleksleşmiş klorojenik asidin CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları



Şekil 4.37: Serbest ve kompleksleşmiş kuersetinin CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları



Şekil 4.38: Serbest ve kompleksleşmiş rutinin CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC katsayıları



Şekil 4.39: Serbest RA ve RA-M-β-CD içerme kompleksinin CUPRAC reaktifi Cu(II)-Nc kompleksi ile oksidasyon reaksiyonunun kinetiği

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNE ÇÖZÜCÜ ETKİSİ [168]

Antioksidanlar radikalleri hidrojen atom transfer (HAT) ve elektron transfer (ET) gibi iki temel mekanizmaya göre etkisiz hale getirirler. Bu mekanizmayı antioksidanın yapısı, özellikleri, çözünürlüğü, dağılım katsayısı ve sistemin çözücüsü etkilemektedir. Bağ disosiyasyon enerjisi ve iyonizasyon potansiyeli, mekanizmayı ve antioksidan etkinliğini belirlemede iki önemli faktördür [11]. Bu çalışma kapsamında ilk olarak, fenolik bileşiklerin antioksidan davranışı üzerine çözücü etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Farklı çözücü ortamlarında polifenolik bileşiklerin TAC değerlerinin belirlenmesinde CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemleri kullanılarak bulgular karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Çözücü ortamları olarak %100 EtOH, %100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v), MeOH/H_2O (1:1, v/v) ve DCM/EtOH (9:1, v/v) seçilmiştir. Bu çalışmada kullanılan polifenolik antioksidanlar farklı sınıfları temsil edecek şekilde seçilmiştir. Bu bileşikler kuersetin (flavonol), kateşin (flavanol), naringenin (flavanon), ferulik asid (hidroksi sinnamik asid), glutatyon (tiyol-grubu antioksidan), lauril gallat, butillenmiş hidroksi toluen, butillenmiş hidroksi anizol ve *tert*-butil hidrokinon (sentetik antioksidan), askorbik asid ve Vitamin E'dir (vitaminler).

Farklı çözücü ortamlarında 1 mM derişiminde hazırlanan polifenolik bileşiklerin antioksidan kapasiteleri suda çözünebilir E vitamini analogu olan mM troloks eşdeğeri cinsinden değerlendirildiğinden, troloksun ilgili çözücü ortamlarında CUPRAC (Tablo 4.1), ABTS-persülfat (Tablo 4.2) ve FRAP (Tablo 4.3) yöntemlerine göre kalibrasyon denklemleri oluşturulmuştur. İndirgen gücü ölçülecek antioksidan bileşiğin 1 mM'lık çözeltisinin aktivitesine eşdeğer olan troloksun milimolar konsantrasyonu, TEAC kapasite katsayısını ifade eder ve birimsizdir. TEAC değerleri antioksidan bileşiklerin

molar absorplama katsayılarının (ε) troloksun ilgili koşullar altındaki ε değerine oranlanarak hesaplanmıştır. Bu molar absorplama katsayıları (ε) ise; %100 EtOH, %100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v), MeOH/H_2O (1:1, v/v) ve DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamlarında hazırlanan polifenolik bileşiklerin CUPRAC yöntemi (Tablo 4.4, 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8), ABTS-persülfat yöntemi (Tablo 4.9, 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13), FRAP yöntemi (Tablo 4.14, 4.15, 4.16 ve 4.17) uygulanarak belirlenen molar absorplama katsayıları (ε), TEAC değerleri, lineer çalışma aralıklarındaki molar konsantrasyona karşı absorbans şeklinde çizilen kalibrasyon doğru denklemlerinin eğimlerinden elde edilmiştir. Yapılan çalışmada CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemiyle elde edilen TEAC değerleri çözücülerin davranışına (polarite, HBA vb.) bağlı olarak değişiklik göstermiştir. Çözücü etkisi her üç yönteme göre incelenip sonuçlar değerlendirilmiştir. Çözücüler arasında TEAC değerleri önemli değişiklik gösteren bileşikler için, en yüksek TEAC değerini hangi çözücü ortamında gösterdiğini belirtmek için koyu renk kullanılmıştır. İlgili çözücü ortamlarında antioksidan bileşiklerin TEAC değerleri Tablo 4.18'de özet halinde gösterilmiştir.

CUPRAC yöntemi sonuçlarına göre bileşiklerin TEAC katsayıları %100 metanol çözücü ortamında %100 etanol çözücü ortamına oranla daha yüksek bulunmuştur. Örneğin; QR, CT ve BHT'nin %100 metanollü ortamdaki $TEAC_{CUPRAC}$ değerlerinin etanollü ortamdakine göre daha yüksek olmasının nedeni, anyon (fenolat) solvatasyonu yapabilen iyonlaşabilir çözücülerde e- transferinin kolaylaşmasından kaynaklanır çünkü metanol, iyonizasyonu en iyi sağlayan alkoldür [125]. Yavaş reaksiyon veren ve gerçek kapasitesinin inkübasyon işlemi sonrası gözlendiği naringenin için etanolde 0.05 ve inkübasyon sonrası 2.28 $TEAC_{CUPRAC}$ değeri elde edilirken MeOH/H_2O (4:1, v/v) ortamında bu değer 0.71 ve 3.74'e çıkmıştır. DCM/EtOH (9:1, v/v) çözücü ortamında ise naringenin 1.07 gibi yüksek bir antioksidan etki göstermiştir. Buna göre, naringeninin antioksidan etkinliği çözücü cinsine ve sıcaklığa bağlı olup lipofilik ortamda daha yüksek kapasite görülmektedir. Bunun yanısıra, NG ABTS-persülfat yöntemine cevap vermesine rağmen, metanol ortamında lineer olarak tayin edilebildiği konsantrasyon aralığı belirlenememekte ve tekrarlanabilir deneysel sonuçlar elde edilememektedir. Bu nedenle TEAC değeri tespit edilememiştir.

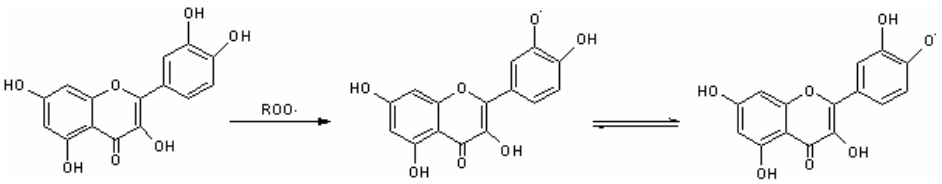
Kuersetin için en yüksek $TEAC_{CUPRAC}$ değeri MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında gözlenirken, en yüksek $TEAC_{ABTS\text{-}persülfat}$ %100 metanolde elde edilmiştir. Ancak genel olarak, ABTS yönteminde %100 metanol çözücü ortamında CUPRAC yönteminin aksine kapasitelerde düşüş gözlenmiştir. FRA, BHA ve GSH için önemli bir değişim olmazken, BHT için MeOH/H_2O (4:1, v/v) ortamında en yüksek kapasite değerine ulaşılmıştır (Tablo 4.18).

FRAP yönteminde %100 MeOH'den % 80'e kapasitelerde düşüş, %80'den %50 MeOH ortamına geçildiğinde kapasitelerde artış gözlenmiştir. FRAP yöntemi hidrofilik bir antioksidan yöntemi olduğundan lipofilik antioksidanları düzgün cevap vermemektedir [108]. Bu çalışmada, CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemlerinin polar ve apolar çözücü ortamlarında hem hidrofilik ve hem lipofilik antioksidanların antioksidan kapasitelerini belirlemede oldukça başarılı olduğu görülmektedir. Çünkü, her iki yöntem de su ve alkol gibi polar çözücü karışımları kadar düşük polarlıkta çözücü karışımlarında da solvate olabilen univalent (+1 yüklü) kromofor türlere ($ABTS^{\cdot+}$, $Cu(Nc)_2^{+}$) sahiptir. FRAP yönteminde ise divalent yüklü ve sulu faza yüksek afinite gösteren (kromoforun çözücü su molekülleri ile iyon-dipol etkileşimlerinden dolayı) $Fe(TPTZ)_2^{2+}$ türü meydana geldiğinden esas olarak hidrofilik antioksidanları belirlemede başarılıdır [108].

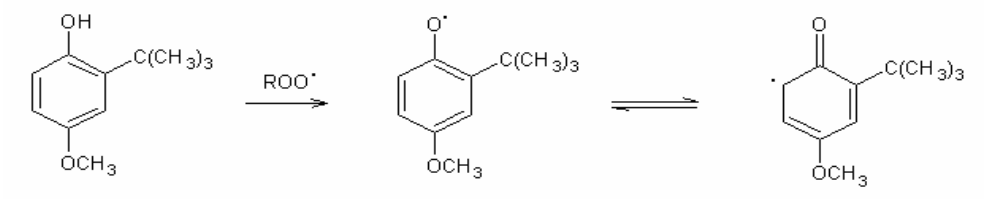
NG ve GSH, FRAP yöntemiyle dedekte edilememiştir. Yavaş reaksiyon veren antioksidanlar ve tiyol bileşiklerine FRAP yöntemi çok yavaş ve düşük derecede cevap vermektedir (pratikçe cevap vermemektedir). Bu, yöntemin en önemli dezavantajlarından biridir. CUPRAC yöntemi tiyol grubu içeren antioksidanları yükseltgemede yeteri kadar hızlı iken, FRAP yöntemi [5] glutatyon gibi tiyol grubu taşıyan ve canlı bitki ve hayvan hücresinde bulunan önemli bir antioksidanı ölçememektedir. Bunun nedeni, büyük olasılıkla yüksek spin gösteren Fe(III)'ün kimyasal bir inertlik sağlayan yarı dolu d-orbitallerine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Cu(II)'nin elektronik yapısı yüksek-spin demir(III)'den daha hızlı kinetik göstermesine neden olmaktadır. Yapılan bir çalışmada 1,10-fenantrolin varlığında sisteinin demir(III) ile vermiş olduğu redoks reaksiyonunun çok yavaş gerçekleşmekte olduğu gözlenmiş ve bu nedenle reaksiyonun hızlanması için katalizör olarak bakır(II) ilave edilmiştir [169]. Bununla ilişkili olarak, Gorinstein ve arkadaşları

[170] çiğ ve işlenmiş sarımsak ektsrelerinin antioksidan aktivitelerini incelemişler ve FRAP yöntemi ile elde edilen sonuçların CUPRAC yöntemindekine oranla oldukça düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Bu sonuç CUPRAC yönteminin FRAP yöntemine üstünlüğünü vurgulamaktadır.

Üç yöntemin sonuçlarına göre, çalışılan her antioksidan bileşiğin antioksidan kapasitesi yöntemin çalışma mekanizması, antioksidanın yapısı ve özellikleri, çözünürlük ve dağılım katsayısı ve çözücü cinsine göre değişmektedir. Ingold ve arkadaşları tarafından rapor edilen önceki çalışmalar fenolik antioksidanların H-atom donör aktiviteleri üzerine hidrojen bağlanmanın rolünü kanıtlamaktadır. Bu çalışmalar protik veya non-protik (protik olmayan) çözücüler içindeki antioksidanların aktiviteleri üzerinde kinetik çözücü etkisi kurallarını kullanarak ortamın etkisini araştıran birçok çalışmaya yararlı kaynak oluşturmuştur [126]. Barclay ve arkadaşları [124] kateşol gruplarına sahip fenolik bileşiklerde antioksidan aktiviteyi kontrol eden temel faktörün peroksil radikalinin inaktivasyonu sonucu oluşan ariloksil radikalinin molekül içi H-bağlarının rezonans stabilizasyonu olduğunu belirtmişlerdir (Denklem 5.1 ve 5.2). Bunun nedeni, oksidasyon dengesidir: Ar-OH $\leftrightarrow$ Ar-O$^{\cdot}$ + H$^{\cdot}$ reaksiyonu ariloksi (Ar-O$^{\cdot}$) radikalinin rezonans stabilizasyonu ile sağ tarafa kaymıştır. Ar-O$^{\cdot}$/Ar-OH redoks çiftinin standart redüksiyon potansiyeli düşerek Ar-OH fenolik antioksidanı daha güçlü antioksidan yapmaktadır.



(5.1)



(5.2)

Yüksek hidrojen bağ alıcı çözücüler moleküller arası hidrojen bağlarından dolayı bu stabilizasyona interfere ederler. Yani, kateşolün (veya flavonoid) daha iyi solvate olmasıyla daha stabil hale gelmesi ve oluşan ariloksil semikinon radikalinin destabilizasyonunun etkisiyle, hidrokarbon çözücülere bağlı olarak polifenollerin bağ disosiasyon enerjisinin artması beklenir. Bu etki, solventle etkileşen fenole peroksil radikalinin ulaşımında sterik engel oluşturarak H-atomu ayrılma reaksiyonunun hız sabitinin azalmasına neden olurken ariloksil radikalinin stabilizasyonu bağ disosiasyon enerjisini azaltmakta ve hız sabitini arttırmaktadır [19,128,129]. Bu durum, kateşinin MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamındaki antioksidan aktivitesinin ABTS-persülfat yöntem bulgularına göre saf metanol ortamına oranla daha düşük olmasını açıklamaktadır. Ancak kateşinin alkollü çözeltilerde $TEAC_{ABTS}$ değerlerinin DCM/EtOH ortamına göre daha yüksek olması alkollerdeki fenolat anyonundan zenginleştirilmiş e- transferiyle açıklanabilir. Bu nedenle ABTS hem HAT- hem ET-esaslı bir yöntemdir (Tablo 4.18). Diğer yandan, Çekiç ve arkadaşları yüksek derişimli üre tamponu varlığında olası kateşin polimerizasyonu sonucu kateşinlerin CUPRAC kapasitesinin arttığını belirtmişlerdir [171]. Bu durumun nedeni, flavonoidlerin çekirdeksel yapısının polimerleşmesi, konjügasyon ve elektron delokalizasyonu vasıtasıyla daha kararlı olan flavonoid radikalini sağlayarak antioksidan aktiviteyi arttırmasıdır [84]. Saf alkol veya alkollü sulu çözeltilerde kateşin dimer ve trimerleri uygun π orbitallerinin üst üste çakışmasından dolayı konjugasyonu arttırmakta bu da kateşinin $TEAC_{CUPRAC}$ değerinin 3.3'den (MeOH/H_2O (4:1, v/v)) 3.7'ye (%100 MeOH) benzer şekilde $TEAC_{ABTS\text{-}persülfat}$ değerlerinin 2.6'dan (MeOH/H_2O (1:1, v/v)) 2.95'e (%100 MeOH) yükselmesini açıklamaktadır.

Antioksidan kapasite üzerinde çözücülerin polarite etkisi ve H- atomu bağlama yeteneğini daha iyi gözlemlemek için polar olmayan DCM çözücüsü seçilmiştir ve DCM/EtOH (9:1, v/v) karışımı kullanılmıştır. Bu çözücü ortamında CUPRAC yöntemi ve ABTS-persülfat yöntemi uygulanırken, FRAP yöntemi uygulanamamıştır. Çünkü bu yöntemde, $Fe(TPTZ)_2^{2+}$ kromoforunun (2+) yükünden dolayı polar olmayan çözücülere zayıf bir eğilim söz konusudur. İlgili antioksidan bileşiklerin diklorometanda göstermiş oldukları antioksidan kapasiteleri modifiye edilen CUPRAC yöntemiyle gözlenmiştir. Modifiye CUPRAC yöntemi (CUPRAC-DCM yöntemi) orijinal CUPRAC yöntemi esasına bağlı kalınarak ilgili antioksidanlar varlığında oluşan sarı renkli Cu(I)-Nc

kelatının diklorometan fazına geçmesi sonucu bu fazın referans çözeltiye karşı 450 nm'de absorbansının ölçülmesinden ibarettir. Bu yöntem sayesinde antioksidan bileşiklerin kapasitelerinde diklorometanın göstermiş olduğu çözücü etkisini araştırmak mümkün olmuştur. Naringenin etanolde 0.05 gibi düşük $TEAC_{CUPRAC}$ değeri gösterirken diklorometan-etil alkol çözücü ortamında bu değer 1.07, ABTS-persülfat yönteminde 2.36 olarak ölçülmüştür. DCM/EtOH (9:1, v/v) ortamında BHT'in $TEAC_{CUPRAC}$ değeri 0.07, $TEAC_{ABTS}$ değeri 0.16 iken bu değerler iç standart olarak BHA'un kullanılmasıyla 0.95 ve 1.04'e yükselmiştir (Tablo 4.18). Bu durum BHT bileşiğinin sahip olduğu gerçek antioksidan kapasitesini polar olmayan çözücü ortamında BHA varlığında gösterebildiği veya sinerjik etkileşim sonucu sahip olduğu antioksidan gücün arttığı sonucunu akla getirmektedir. Polar çözücü ortamlarda (EtOH ve MeOH) BHT'nin TEAC değerleri 1'in üzerinde iken polar olmayan ortamda yaklaşık ~0.10 bulunmuştur. BHT'nin 1 e- oksidasyonuyla oluşan ariloksi radikalleri büyük olasılıkla moleküllerarası H-bağlanma ile kararlı yapıya dönüşmekte ve BHT moleküllerinin dimerizasyonu (*para-para* kapling reaksiyonu) gerçekleşmektedir. Çünkü peroksil radikalleriyle oksidasyonu sırasında BHT'nin stokiyometrik faktörünün 2 olduğu belirtilmiştir [172,173]. Plumb ve arkadaşlarının kateşinler ve antosiyaninler üzerinde polimerizasyon, yapıya galloil ve şeker gruplarının bağlanmasının etkisi üzerine yaptığı çalışmada kateşinlerin monomerden trimere doğru yani polimerizasyon arttıkça antioksidan etkisinin arttığı ve buna zıt olarak yağ fazında ise antioksidan aktivitenin polimerizasyonla azaldığı belirtilmiştir [136]. Yapılan bu çalışmalar BHT'nin antioksidan kapasitesinin apolar çözücülerde alkollü çözeltilere oranla oldukça düşük çıkmasını doğrulamaktadır. Bununla birlikte, BHT alkollü çözeltilerde dimerizasyonun etkisiyle e- transferinin artmasından dolayı daha yüksek aktivite göstermektedir. BHT'nin geometrik yapısı da e- transferine sterik engellemeyi kaldırabilmektedir. Diğer taraftan, DCM çözücü siteminde oluşan polimerik agregatlar antioksidan kapasiteyi düşürmektedir. Bu bağlamda; BHA'nın, BHT ile aynı karışımda bulunduğunda DCM çözeltisi içindeki BHT agregatlarını depolimerize edip BHT'nin gerçek antioksidan kapasitesini göstermesini sağladığı düşünülebilir. BHT'nin yanısıra kuersetin, kateşin ve ferulik asidin apolar çözücülerdeki antioksidan kapasitesinin düştüğü CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemleriyle gözlenmiştir (Tablo 4.18). Özetle, test edilen antioksidan molekülün çözücü veya diğer antioksidan moleküllerle olası etkileşimi asosiyatif veya disosiyatif etkileşimlere ve H- bağlanmasına sebep

olmaktadır. Bu durum da oksidatif proses sırasında oluşan ariloksi radikalinin seçimli stabilizasyonuna dayanarak antioksidan kapasitede artışa sebep olmaktadır.

Her bir antioksidan bileşiğin toplam antioksidan kapasiteyi etkileyecek nasıl bir etkileşime girdiği önemli bir unsurdur. Bu durumdan yola çıkılarak, çalışılan antioksidan bileşiklerden ilgili çözücü ortamlarında farklı kombinasyonlarda beşli sentetik karışımlar hazırlanıp bu karışımlara CUPRAC, ABTS-persülfat ve FRAP yöntemleri uygulanmıştır. Sentetik karışım çözeltilerinin $TAC_{beklenen}$ (Eşitlik 3.4) ve $TAC_{deneysel\ ölçülen}$ (Eşitlik 3.5) değerleri mM troloks eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Beklenen ve deneysel olarak ölçülen kapasitelerin genellikle birbiriyle uyumlu olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4). Bu durum oluşturulan sentetik karışım ortamında antioksidanların enterfere edici bir kimyasal etkileşim göstermedikleri ve absorbansların toplamsallığı ilkesinin çözücü değişiminden kaynaklanan istisnalarla birlikte korunduğu anlamına gelmektedir.

Spesifik bir örnek vermek gerekirse; metanol ortamında BHT ile NG, DCM/EtOH ortamında BHT ve BHA ikili karışım çözeltileri sırasıyla antagonist ve sinerjik etki göstermiştir (Tablo 4.19). BHT ile BHA'nın DCM/EtOH çözücü ortamında sinerjik etkileşimi CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemleriyle belirlenmiştir (FRAP yöntemi DCM ortamında cevap vermemektedir). Bu durum polar olmayan bir çevrede depolimerizasyon ve moleküller arası H- bağlanma reaksiyonları ile açıklanabilmektedir. Sinerjizmin diğer bir nedeni, olasılıkla fenolik -OH moleküllerine kolay ulaşılabilinmesidir. Çünkü, H- bağlarından dolayı BHT'ye yakın konumda duran ve Cu(II)-Nc veya $ABTS^{\cdot+}$ prob molekülleriyle yükseltgenen BHA molekülleri, BHT moleküllerini ani oluşan oksidatif atağa yatkın hale getirmektedirler [124].

%100 EtOH, % 100 MeOH, MeOH/H_2O (4:1, v/v) ve MeOH/H_2O (1:1, v/v) çözücü ortamında hazırlanan yeşil çay ekstrelerinin CUPRAC, ABTS-persülfat, FRAP yöntemlerine göre TAC değerleri Eşitlik (3.6)'da verilen hesaplama yöntemine göre mmol TR/g cinsinden verilmiştir (Tablo 4.20). CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemlerinde TAC sıralaması MeOH/H_2O (4:1, v/v) > MeOH/H_2O (1:1, v/v) > %100 EtOH > % 100 MeOH şeklindedir. FRAP yönteminde ise sıralama MeOH/H_2O (4:1, v/v) > %100 EtOH > MeOH/H_2O (1:1, v/v) > % 100 MeOH şeklindedir. Yeşil çayda

bulunan antioksidan bileşenlerin MeOH/H_2O (4:1, v/v) en etkili, % 100 MeOH ortamında ise en zayıf etki gösterdiği görülmektedir. Bu durumun yeşil çay antioksidanlarının hidrofilik-lipofilik dengesinden ileri gelmesi olasıdır. BHT-katkılı yeşil çay ekstrelerinin MeOH/H_2O (4:1, v/v) ortamında TAC değerleri CUPRAC ve ABTS-persülfat yöntemleri ile karşılaştırmalı olarak irdelenmiştir (Tablo 4.21). Sonuçlara bakıldığında, yeşil çay ekstresi içinde test edilen antioksidanların Beer Kanunu'ndan sapmaya yol açacak herhangi bir kimyasal etkileşime girmedikleri gözlenmiştir.

5.2. KOLON SONRASI TÜREVLENDİRMELİ HAT-ÜSTÜ HPLC-CUPRAC YÖNTEMİ İLE ANTİOKSİDANLARIN TAYİNİ

Bu çalışmada kompleks matrikslere uygulanabilecek, basit, hızlı, CUPRAC yöntemi esaslı ve HPLC ile entegre edilmiş kolon-sonrası dedekiyonlu "hat-üstü HPLC-CUPRAC" yöntemi olarak adlandırılan bir toplam antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Şekil 4.5'de şematik olarak gösterilen bu sistem yardımıyla analitik kolonda ayrılan bileşenler bir pompa yardımıyla sisteme eklenen CUPRAC reaktifi (Cu(II)-Nc kompleksi) ile reaksiyona girmekte ve bu redoks tepkimesi sonucu bileşenlere eşdeğer oranda Cu(I)-Nc kelatı oluşmaktadır. Kromatografik ayırma ile antioksidan kapasite tayininin eş zamanlı gerçekleştiği bu hat-üstü sistemde elde edilen kromatogramlardan pozitif yönlü olanlar ilgili bileşenlerin 280 nm'deki absorbsiyonunu, negatif yönlü olanlar ise 450 nm'de bileşenlere eşdeğer oranda oluşan Cu(I)-Nc kelatının absorbsiyonunu göstermektedir.

Geliştirilen hat-üstü HPLC-CUPRAC belirleme sistemi sırasıyla referans bileşik olan troloksa, antioksidan bileşiklerin (gallik asid, kateşin ve türevleri, ferulik asid, *p*-kumarik asid, klorojenik asid, kuersetin, luteolin, rozmarinik asid, mirisetin) standart çözeltilerine, bu bileşiklerin bazılarını ihtiva eden bitki ekstrelerine (yeşil çay (*C. sinensis*), siyah çay (*C. sinensis*), nane (*Mentha*), mercanköşk (*O. marjorana*) uygulanmıştır. Bu sistemde, HPLC kolonunda 280 nm'de belirlenen ve ayrılan bileşenler (elüat) CUPRAC reaktifi (Cu(II):Nc:NH_4Ac (1:1:1:, v/v/v)) ile kolon-sonrası reaksiyon modülü içindeki reaksiyon sarmalında karışmaktadır. Buradan çıkan elüat PDA (foto-diyot dizisi) dedektöre ulaştıktan sonra 450 nm'de absorbans değerleri

ölçülerek kromatogramlara negatif pikler olarak yansımaktadır. Bu piklerin alanlarından yararlanılarak antioksidan kapasiteleri belirlenmektedir. Referans standart troloks, çay kateşinleri ve fenolik antioksidanları belirlemek için Bölüm 3.4.2.2'de detayları verilen gradient elüsyon programları kullanılmıştır.

Kullanılan antioksidan bileşikler %100 metanol ortamında hazırlandığı için öncelikle orijinal CUPRAC yöntemi uygulanarak bu çözücü ortamında her bir bileşiğin troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değeri, molar absorblama katsayılarının troloksun aynı şartlarda elde edilen molar absorblama katsayısına bölünmesiyle saptanmıştır (Tablo 4.22). Metanollü ortamda troloksun molar absorblama katsayısı 1.58×10^4 L mol^{-1} cm^{-1} olarak bulunmuştur.

Troloks, çay antioksidanları ve fenolik antioksidan standartları tek tek ve sentetik karışımları halinde ilgili referans HPLC yöntemlerine [166,167] küçük modifikasyonlar yapılarak analiz edilmiştir. Antioksidanların sentetik karışımları ters faz C18 kolonunda ayrıldıktan sonra 280 nm'de dedekte edilmiştir. İlgili HPLC yöntemleri ile elde edilen alıkonma zamanları (t_R), lineer çalışma aralıkları, pik alanları (y) ile derişim (c) arasında çizilen kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları (r) Tablo 4.23'de verilmiştir. Korelasyon katsayıları 0.9994-0.9999 arasında değişmekle birlikte 1'e oldukça yakın çıkmıştır.

Hat-üstü HPLC-CUPRAC sisteminde ilgili HPLC yöntemlerinin belirtme dalgaboyları 450 nm'ye ayarlandıktan sonra C18 kolonunda ayrılan bileşenler kolon-sonrası reaksiyon modülünde CUPRAC reaktifi ile reaksiyona girmektedir. Kolon-sonrası elüatı içinde oluşan Cu(I)-Nc kelatı, 450 nm'de dedekte edilmektedir. Bu hat-üstü yöntemin enstrümantal parametreleri optimize edilmiştir. Genel olarak, kolon-sonrası HPLC sistemlerinde gürültü miktarı türevlendirme reaktifinin derişimi azaldıkça düşmektedir. Ancak aynı zamanda sinyal miktarı da azalmaktadır. Türevlendirme reaktifinin yüksek derişimlerinde çalışılması, polar olmayan bir ortamda reaksiyon sarmalının tıkanmasına yol açmaktadır. Bu sebeple, hem reaksiyon sarmalına beslenen CUPRAC reaktifinin derişimi hem de kolon-sonrası pompanın akış hızı, sinyal/gürültü oranı minimize edilecek şekilde optimize edilmiştir. Pompa hızı yüksek S/N oranı sağlayan 0.5 mL/dakika olarak belirlenmiştir (Şekil 4.6). Tablo 4.24'de farklı derişim

oranları kullanılarak 0.5 mL/dakika akış hızında ve 450 nm'de dedekte edilen troloksa eşdeğer Cu(I)-Nc kelatının pikinin S/N değerleri görülmektedir. Bu verilere göre yüksek S/N değerine sahip CUPRAC reaktifi derişim oranı 3.33 mM Cu(II) / 2.5 mM Nc / 333 mM NH_4Ac (1:1:1, v/v/v) CUPRAC reaktif derişimi olarak belirlenmiştir. Optimize edilen yöntem sırasıyla troloks, çay antioksidanları ve fenolik antioksidanlara uygulanarak 450 nm'de edilen Cu(I)-Nc absorbsiyonuna dayalı negatif pikler edilmiştir. Alıkonma zamanları (t_R, lineer çalışma aralıkları, pik alanları (y) ile derişim (c) arasında çizilen kalibrasyon denklemleri ve korelasyon katsayıları (r) Tablo 4.25'de verilmiştir. Korelasyon katsayıları 0.9990-0.9999 arasında değişmektedir. Troloksun 280 nm'de vermiş olduğu UV kromatogramı (pozitif pikler) ve 450 nm'de yapmış olduğu absorbsiyon sonucu elde edilen kromatogram (negatif pikler) Şekil 4.7'de görülmektedir. Şekil 4.8 ve 4.9'da verilen kromatogramlar ise çay antioksidanları ve fenolik antioksidanlara aittir.

Literatürde hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle karşılaştırılabilecek iki tane hat-üstü antioksidan kapasite tayin yöntemi mevcuttur. Bu yöntemler ilk kez Koleva ve arkadaşları tarafından geliştirilen hat-üstü HPLC-DPPH [23] ve hat-üstü HPLC-ABTS [25] yöntemleridir. Her iki yöntem de renkli radikallerin renksizleştirilmesine dayalı yöntemler olup bu yöntemlerde kullanılan reaktiflerin başlangıç derişimleri çok dikkatli optimize edilmelidir, çünkü konsantre antioksidan çözeltileri toplu bir renksizleştirmeye sebep olabilir. Örneğin, DPPH derişiminin 10 faktöre kadar değiştirildiği rapor edilmiştir [174]. Analit derişimleri çok yüksek olduğunda yüksek derişimli DPPH reaktifi kullanılması gerekmektedir ve bu durum kolonda tkanmalara neden olabilir. Bu durum kolon-sonrası CUPRAC yöntemi için geçerli değildir, çünkü CUPRAC yöntemi renk oluşumuna dayalı bir yöntemdir. Diğer yandan ORAC ve TRAP gibi doğrudan ölçüm yöntemleri, hat-üstü HPLC tekniğiyle bağdaştırılamamıştır.

HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemlerinde analizler 3'er kez tekrarlanarak üç ölçümün rölatif standart sapmaları (RSD) belirlenmiştir. Bu değerler farklı derişimlerdeki polifenoller için %1.8 ile %4.4 arasında değişmektedir. Tüm çalışılan antioksidan bileşiklerin 280 ve 450 nm'de elde edilen belirtme sınırları (LOD = $3\sigma_{blank}$ / m olup; σ_{blank}: şahit çözeltinin standart sapmasını, m kalibrasyon eğrisinin

eğimini (A_{450} = *m*C + n) ifade etmektedir.) Tablo 4.26'da verilmiştir. Bu bulgular hem HPLC hem hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemleriyle polifenollerin yüksek hassasiyetle ve düşük derişimlerde tayin edildiğini göstermektedir. Ayrıca hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle belirlenen LOD değerlerinin hat-üstü HPLC-DPPH yöntemine ait LOD değerlerinden oldukça düşük olduğu gözlenmiştir. Böylece geliştirilen hat-üstü HPLC-CUPRAC yönteminin hat-üstü HPLC-DPPH yönteminden çok daha hassas bir yöntem olduğu kanıtlanmıştır.

Tablo 4.25'de verilen hat-üstü HPLC-CUPRAC verileri incelendiğinde çay antioksidanları arasında en yüksek antioksidan kapasiteyi, sahip olduğu hidroksil gruplarının sayısı ve konumundan dolayı epigallokateşingallatın gösterdiği görülmüştür. Antioksidan kapasiteleri büyükten küçüğe EGCG > ECG > EGC > GA > EC > CT şeklinde sıralanmaktadır. Fenolik antioksidanlar arasında en yüksek antioksidan kapasiteyi B-halkasındaki *o*-kateşol yapısı ve 2,3 çifte bağa sahip olmasından dolayı kuersetin göstermektedir. Fenolik antioksidanlar arasında ise antioksidan kapasite büyükten küçüğe QR > LT > ROS > MR > CT > CFA > CA > FRA > *p*-COU > APG şeklinde sıralanmaktadır. Kaffeik asid dimeri olan rozmarinik asid hidroksi sinnamik asitler içinde en yüksek antioksidan kapasiteyi göstermiştir çünkü yapısında 4 adet hidroksil grubuna sahiptir [81]. Ayrıca rozmarinik asid oksidasyonu esnasında oluşan ariloksi radikallerini stabilize edecek konjüge bir yapıya sahiptir. Ariloksi radikali/fenol çiftinin redoks potansiyeli molekül içi hidrojen bağlanmasının etkisiyle fenolün stabilize olmasının bir sonucu olarak düşmektedir. Böylece fenolik bileşikler daha güçlü antioksidan özelliğe sahip olmaktadırlar. Metanol ortamında gallik asid ve luteolin haricindeki tüm antioksidan bileşikler spektrofotometrik CUPRAC yöntemindekiyle uyumlu antioksidan kapasite göstermektedir [168]. Gallik asid ve luteolin, kolon-sonrası belirlemede CUPRAC reaktifi ile büyük olasılıkla daha hızlı reaksiyon kinetiği göstermektedir. Antioksidanların farklı kinetik davranışları antioksidan aktiviteyi değerlendirmede önemli bir noktadır ki kolon-sonrası belirlemeli sistemlerde, reaksiyon sarmalının uzunluğu ile orantılı olan bir zaman kısıtlaması söz konusudur.

Şekil 4.10 CUPRAC yönteminin hızlı bir yöntem olduğunu ve test edilen antioksidanların birçoğunun ilk 1 dakika içinde molar absorptivitelerinin %80'ine

ulaştığını göstermektedir. Burada amaç, bu süre içinde maksimum molar absorptiviteye ulaşılmasından öte kolon-sonrası reaksiyon sonucunda antioksidan bileşenlerin konsantrasyonlarının kesin bir şekilde hesaplanabilmesi için 1 dakika içinde optimal molar absorptiviteye ulaşmaktır. Bu süre içinde reaksiyonun tamamlanma olasılığının düşük olduğu DPPH veya fosfomolibden mavisi reaktifleri kullanan hat-üstü yöntemlerde kinetik problemleri aşmak için 60^{o}C'nin üzerindeki ortam sıcaklıkları gerekebilmektedir [175], çünkü kolon-sonrası reaksiyon sarmalının uzunluğu tüm bu yöntemlerde ortak olduğundan aynı süre içinde reaksiyonun pratikçe tamamlanabilirliği, bir gereksinme olarak ortaya çıkmaktadır.

Son konsantrasyonları 0.1 mM olacak şekilde hazırlanan farklı kombinasyonlarda sentetik antioksidan karışım çözeltilerinin toplam antioksidan kapasite (TAC) değerleri mM TR eşdeğeri cinsinden spektrofotometrik CUPRAC yöntemi, HPLC (CUPRAC hesaplamalı) yöntemi ve kolon-sonrası belirlemeli hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemi ile ölçülmüştür. Bu üç yönteme göre TAC değerlerinin hesaplanması aşağıda verilmiştir:

$$\text{(i) } TAC_{CUPRAC} = \frac{\text{Absorbans (toplam)} \pm \text{kayım}}{\varepsilon_{TR}} \text{ x } 10^3 \qquad (5.3)$$

Sentetik veya gerçek numunelerin deneysel olarak ölçülen TAC_{CUPRAC} değerleri 450 nm'de ölçülen absorbans değerinin troloksun molar absorptivitesine (ε_{TR} = 1.58 x 10^4 $Lmol^{-1}cm^{-1}$) bölünmesiyle hesaplanmaktadır.

$$\text{(ii) } TAC_{HPLC} = \sum_{i=1}^{n} C_i \; TEAC_i \qquad (3.7)$$

Sentetik veya gerçek numunelerin TAC_{HPLC} değerleri, HPLC'de belirlenen bileşenlerin konsantrasyonları ile $TEAC_{CUPRAC}$ katsayılarının çarpılıp toplamının elde edilmesi ile hesaplanmaktadır (C_i : i- bileşeninin HPLC yoluyla bulunan derişimini; $TEAC_i$: i-bileşeninin CUPRAC yöntemine göre TEAC katsayısını ifade etmektedir.).

$$\text{(iii) } TAC_{\text{on-line HPLC-CUPRAC}} = \frac{\sum_{i=1}^{n} y_i}{\text{eğim}} \text{ x } 10^3 \qquad (3.9)$$

Sentetik veya gerçek numunelerin kolon-sonrası belirlemeli hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle elde edilen $TAC_{hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ değerleri, bileşenlere eşdeğer Cu(I)-Nc kelatının 450 nm'de elde edilen negatif pik alanları toplamının troloksa ait kalibrasyon doğrusunun eğimine bölünmesiyle hesaplanmaktadır (y_i antioksidan bileşiklerin ilgili sentetik karışım kromatogramında elde edilen toplam negatif pik alanını, eğim ise 450 nm'de troloksun kalibrasyon doğrusuna ait eğimi ifade etmektedir.). Hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle troloksa ait kalibrasyon denklemi $y= 1.32 \times 10^{10} C_{TR} + 3.31 \times 10^{4}$ olarak belirlenmiştir. Bu durumda, Eşitlik (3.9)'da eğim olarak 1.32×10^{10} değeri kullanılmıştır.

İkili sentetik karışım çözeltilerinin 280 nm'deki TAC_{HPLC} değerleri ile 450 nm'deki $TAC_{hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ değerleri arasında kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.11). Bu grafiğin denklemi;

$$y = 0.68\ x - 1.10^{-5} \quad r= 0.9947 \qquad (4.1)$$

olarak elde edilmiştir. Doğrunun eğimi olan 0.68 değeri , hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemiyle elde edilen TAC bulgularının HPLC yöntemiyle elde edilen bulguların %68'i olduğunu göstermektedir. Bu nedenle (1/0.68) = 1.47 sabiti kullanılarak gerçek $TAC_{hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC}$ değerleri hesaplanmıştır:

$$TAC_{HPLC} = 1.47 \times TAC_{hat\text{-}üstü\ HPLC\text{-}CUPRAC} \qquad (4.2)$$

Sentetik antioksidan karışım çözeltilerinin TAC değerleri her üç yönteme göre değerlendirilip karşılaştırılmıştır. Deneysel verilerin (örneğin standard sapmanın toplu tahmininden hesaplanan $|t|$ ve varyans oranından hesaplanan F değeri) kritik değerleri aşmadığı görülmüştür (Tablo 4.27). Bu durum yöntemler arasında kesinlik ve doğruluk açısından önemli bir farklılık olmadığını göstermektedir.

Tablo 4.28'de yeşil çay, siyah çay, nane ve mercanköşk bitki ekstrelerinin CUPRAC, HPLC ve hat-üstü HPLC-CUPRAC yöntemleri uygulanarak mmol TR/g eşdeğeri cinsinden TAC değerleri verilmiştir. Gerçek örnekler için işlemler (gruplar)-arasında (between-treatments) ve artıkların [176] (residuals) karelerinin-ortalamalarını (mean-squares) içeren *F*-testinin uygulandığı iki-yönlü varyans analizi (ANalysis Of VAriance (ANOVA)) karşılaştırması sonucunda işlemler (gruplar) arasında anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Diğer taraftan, deneysel olarak bulunan HPLC sonuçları ile hat-

üstü HPLC-CUPRAC bulguları %95 güvenirlik düzeyinde benzerlik göstermektedir (P = 0.05 için $F_{deneysel}$ = 0.25, $F_{kritik\ (tablo)}$ = 10.13, $F_{deneysel} < F_{kritik\ (tablo)}$). Sonuçta, önerilen yöntem gerçek örnekler için valide edilmiştir. CUPRAC yöntemi bulguları HPLC-esaslı yöntemlere göre yüksek çıkmıştır, çünkü HPLC yöntemlerinde bitki ektresinde bulunan tüm antioksidan bileşenlerin tek tek belirlenmesi gerekmektedir ancak bu durum her zaman mümkün olmaz.

Yeşil çay, siyah çay, nane ve mercanköşk ekstrelerine ait UV (280 nm) ve CUPRAC toplam antioksidan kapasite (450 nm) kromatogramları elde edilmiştir (Şekil 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15). Bitki ekstrelerinde HPLC ile tespit edilebilen bileşenlerin derişimleri hesaplanıp TAC değerleri Eşitlik (3.7) kullanılarak belirlenmiştir. Her bir bitki ekstresi için TAC_{HPLC} değerleri spektrofotometrik olarak hesaplanan TAC_{CUPRAC} değerlerine oranlanarak HPLC yardımıyla hesaplanan kapasitenin spektrofotometrik yolla bulunan kapasitenin % kaçını temsil edebildiği tespit edilmiştir. Buna göre, HPLC yöntemiyle yeşil çayda toplam kapasitenin %87'si, siyah çayda %16'sı, nane ve mercanköşkde % 55'i belirlenebilmiştir (Tablo 4.28).

HPLC analizlerine göre, yeşil ve siyah çayda gallik asid, kateşin, epikateşin, epigallokateşin, epikateşin gallat ve epigallokateşin gallat bulunmaktadır. EGCG, yeşil çayda içerik ve toplam kapasiteye katkısı bakımından en büyük paya sahiptir. Sonra sırasıyla ECG, EGC, EC, GA ve CT gelmektedir. Çaydaki kafein içeriği yüksek olmakla beraber antioksidan kapasiteye herhangi bir etkisi yoktur. Çünkü, kafein (1,3,7-trimetil-1H-purin-2,6(3H,7H)-dion) indirgeyici fenolik hidroksil gruplarına sahip değildir ve bu nedenle antioksidan özellik göstermez. Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'de negatif yönlü kromatogramlarda kafeine ait bir pikin gözlenmemesi de bu durumu ispatlamaktadır. Bu sonuç, hat-üstü HPLC-CUPRAC yönteminin önemli bir avantajıdır, bu şekilde antioksidan özellik göstermeyen bileşenler belirlenebilmektedir. Yeşil çaydaki antioksidan kapasite CUPRAC yöntemiyle 1.19±0.03 mmol TR/g, HPLC ile 1.03±0.04 mmol TR/g, HPLC-CUPRAC hat-üstü belirleme sonucu 1.12±0.05 mmol TR/g olarak bulunmuştur. Siyah çayda ise kafein asli bileşen olup diğer kateşin türevlerinin derişimi ve antioksidan kapasiteye katkısı azdır (Şekil 4.13). Orijinal CUPRAC yöntemiyle toplam kapasite 0.27±0.04 mmol TR/g bulunurken HPLC ile bunun sadece %16'lık kısmı belirlenebilmektedir. Siyah çay HPLC ile ayrılamayan ve

belirlenemeyen tearubigin ve teaflavin denilen fenolik gruplara sahiptir. Bu bileşikler kompleks flavan-3-ol polimerleri olup fermantasyon işlemi sırasında indirgenirler ve polimerik antosiyanidinler olan tearubiginler ters-faz HPLC kolonundan elüe olamadıklarından bir hat-üstü antioksidan belirleme sistemiyle ölçülememektedirler. Stewart ve ark. tarafından yapılan çalışmada elde edilen sonuçlara göre siyah çayın toplam antioksidan kapasitesinin sadece %20'lik kısmının HPLC ile belirlenen bileşenler tarafından oluşturulduğu görülmüştür [32]. Bu da tearubiginlerin siyah çay antioksidanları arasında ne denli önemli olduğunu göstermektedir.

Mercanköşk bitki ekstresinde başta ROS, MR olmak üzere CFA, COU, LT ve APG tespit edilebilmiştir (Şekil 4.14). Bu bileşenler toplam kapasitenin %55'lik kısmını oluşturmaktadır. Saptanan bileşenlerin negatif pik alanları toplamından yararlanarak hat-üstü sistem yardımıyla 0.49±0.04 mmol TR/g kapasite bulunmuştur. Nanede ise ROS en önemli bileşen olup MR ve QR'in katkısı azdır (Şekil 4.15). Hat-üstü sistem yardımıyla toplam kapasite 0.26±0.03 mmol TR/g bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin en önemli avantajı hat-üstü sistemin HPLC esaslı bir antioksidan kapasite tayin yöntemi olmasıdır. Bu yöntem HPLC gibi yüksek çözünürlüklü ayırma yöntemini kolon-sonrası hızlı kimyasal reaksiyonla bütünleştirip kompleks matrikslerdeki aktif bileşiklerin türlerini tam olarak belirleyebilmektedir [174]. Bu sistem hızlı, çok yönlü, zahmetsiz, kararlı reaktifler kullanan bir sistem olup karmaşık bitki örneklerindeki antioksidan bileşenlerin hat-üstü kalitatif ve kantitatif tayinine imkan vermektedir. UV belirleme ile kantitatif tayine ek olarak, her bir bileşenin hat-üstü olarak antioksidan kapasitesi ölçülebilmekte ve toplam antioksidan kapasiteye (TAC) katkısı da hesaplanabilmektedir. Bununla birlikte, antioksidan aktivite göstermeyen bir bileşiğin belirlenmesi de aynı anda gözlenebilmektedir. Antioksidan analizinde kullanılan bu hat-üstü prosedürde kromatogramlar geleneksel kromatogramlardan daha kullanışlıdır, çünkü hangi kromatografik bandın antioksidan bileşiklere ait olduğu eş zamanlı olarak belirlenebilmektedir. Bu avantajlı durum antioksidan tayinine özgünlük katmaktadır. CUPRAC yöntemi esaslı ve HPLC sistemine entegre edilmiş hat-üstü antioksidan kapasite tayin yöntemi yoluyla çeşitli karmaşık yapılı matrislerin içeriklerine göre değerlendirilmesi, içeriklerindeki antioksidan bileşenlerin tek tek ve topluca analiz edilmesi ve bileşiklerin her birinin

antioksidan kapasitesi ve toplam kapasiteye katkısının eş zamanlı belirlenebilmesi mümkün olmuştur.

Literatürde bulunan çalışmalardan kolon-sonrası HPLC yöntemlerinde reaktif derişimi ve reaksiyon süresinin baseline (zemin) gürültüsüne neden olduğu görülmektedir [177]. Bunun önüne geçmek için DPPH çözeltisinin helyum ile temizlenmesi (O_2 eliminasyonu) ve gradient elüsyon sırasında basınçtaki değişimlerin azaltılması için metanol yerine asetonitril önerilmiştir, ancak %96 asetonitril içinde tamponlanmış DPPH çözeltisi kullanılarak kolon-sonrası nötralleştirme işlemi reaksiyon sarmalında tıkanıklığa yol açmıştır [26]. Farklı araştırmacılar, uygun bir tampon çözelti kullanılarak mobil fazın pH'ının değiştirilmesi ile baseline gürültüsünün ve kaymasının minimize edilebileceğini söylemişlerdir [32]. Baseline kaymalarının tek bir nedeni olduğuna ilişkin literatürde ortak bir kanaate varılamadığından bu çalışmada oluşan baseline kaymalarının gradient elüsyondaki çözücü ortamının polarite ve viskozite farklılıklarından kaynaklı olarak reaksiyon ürünü Cu(I)-Nc kelatının reaksiyon sarmalında olası birikiminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Renkli Cu(I)-Nc kelatı hava, güneş ışığı, pH ve nem gibi çeşitli parametrelere göreceli olarak duyarsız olduğundan (örneğin, radikalik bir reaktif olan DPPH bu parametrelere fazlaca duyarlıdır) oluşan baseline kaymaları DPPH yöntemine kıyasla daha düşüktür. Bu baseline kaymaları kromatografik bandların pik alanlarının doğru şekilde belirlenmesini etkilememektedir. Kolon-sonrası reaksiyon sarmalında renkli Cu(I)-Nc kelatının oluşumu yöntem süresi içinde birçok polifenolün kantitatif tayini için yeterli olmaktadır. CUPRAC reaktifi diğer kromojenik reaktiflere (ABTS, DPPH vb.) oranla daha kararlı ve kolay ulaşılabilirdir. Bu yöntem ile LC-MS gibi karmaşık ve yüksek maliyetli cihazlara gerek kalmadan kısa sürede doğru sonuç alınmaktadır. CUPRAC reaktifi ile indirgen şekerler ve sitrik asid yükseltgenemediğinden kompleks matrikslerde bulunan ve hakiki antioksidan olmayan bu bileşikler kolon-sonrası belirlemede negatif pikler halinde görüntülenemeyecektir; bu da yöntemin antioksidan seçimliliğini göstermektedir.

5.3. BAZI POLİFENOLİK BİLEŞİKLERİN DOĞAL VE TÜREVLENDİRİLMİŞ SİKLODEKSTRİNLERLE İÇERME KOMPLEKSLERİNİN VE ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN İNCELENMESİ

Birçok farklı tipte molekül ile içerme kompleksi oluşturabilme kabiliyetlerinden dolayı, bir çözeltide siklodekstrinlerin varlığı misafir moleküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin değişmesine sebep olur. Bu moleküllerin CD kavitesinin içine girmesi sonucu absorbsiyon spektrumlarında veya floresans özellikte olanlarının floresans spektrumlarında farklılıklar meydana gelir. Kompleks oluşumuyla spektrumlarda kırmızıya kayma (batokromik kayma) veya maviye kayma (hipsokromik kayma) görülmesi, kompleksin oluştuğunu doğrulamaktadır. Bu çalışmada rosmarinik asit, klorojenik asit, kuersetin ve rutin için doğal (α-CD, β-CD) ve modifiye siklodekstrinler (hidroksi-propil-β-CD, hidroksi-etil-β-CD, metil-β-CD) ile içerme kompleksleri elde edilmiştir. Bu komplekslerin spektrofotometrik ve spektroflorometrik karakterizasyonu yapıldıktan sonra kompleksleşmenin antioksidan aktivitesi üzerindeki etkileri irdelenmiştir.

Son konsantrasyonu 50 μM olan ilgili antioksidan bileşiklerle, siklodekstrin derişiminin (0 mM – 8 mM) arttırılmasına bağlı olarak elde edilen içerme komplekslerinin 25±1 ^{o}C'de 200-450 nm dalgaboyu aralığında spektrumları elde edilmiştir. Karışım çözeltisindeki CD derişimi arttıkça fosfat tamponu varlığındaki saf antioksidan çözeltisine ait spektrumdaki absorbans değerlerinde azalma ve maksimum dalgaboyunda birkaç nm'lik dalgaboyu kayması meydana gelmektedir. Bu spektrumlara örnek olarak 50 μM rosmarinik asidin 25 ºC'de tek başına ve artan konsantrasyonlu β-CD varlığında elde edilen UV-Vis spektrumunda (Şekil 4.16) rosmarinik asidin maksimum dalgaboyu 324 nm iken içerme kompleks oluşumu sonucu maksimum dalgaboyu 3 nm daha uzun dalgaboyuna kaymıştır (Tablo 4.29). Absorbans değerlerinde de kompleks oluşumu ile düşüş gözlenmiştir. Diğer komplekslere ait UV-vis spektrumlar Şekil 4.17'de verilmektedir.

Klorojenik asidin maksimum dalga boyu 325 nm olarak ölçülmüştür (Şekil 4.18). Kompleks oluşumları sonrasında dalgaboylarında 4-5 nm daha uzun dalgaboyuna (329-330 nm) kayma gözlenirken absorbans değerleri düşmüştür (Tablo 4.30).

Kuersetin 268 nm ve 375 nm dalgaboylarında maksimum vermekle birlikte 256 nm'de de spektrum omuz vermektedir. Kompleks oluşumu ile kuersetinin spektrumunda bazı absorbans ve dalgaboyu değişimleri gözlenmiştir. Özellikle β-CD türevlerinde 375 nm'deki band yaklaşık 5 nm daha uzun dalgaboyuna kayarak 380 nm'de ortaya çıkmıştır (Şekil 4.19 (b-e). Bu dalgaboyunda ölçülen absorbans β-CD, HE-β-CD ve HP-β-CD komplekslerinde hafif bir düşüşe, M-β-CD kompleksinde artışa sebep olmuştur. Kuersetin için 256 nm'de okunan absorbans değeri özellikle HP-β-CD, HE-β-CD ve M-β-CD komplekslerinde ciddi yükselme göstermiştir (Tablo 4.31).

Rutin 270 nm ve 367 nm olmak üzere 2 band vermektedir. 270 nm'de maksimum absorpsiyon bandı görülmektedir. RT ile α-CD arasında bir kompleks oluşumundan kaynaklanan dalgaboyu değişimi gözlenmemekte ve bu dalgaboylarında ölçülen absorbans değerleri birbirine oldukça yakın çıkmaktadır (Şekil 4.20-a). Rutinin β-CD komplekslerinin spektrumlarına bakıldığında 259 nm'de bir omuz oluştuğu görülmektedir ve HE-β-CD ve HP-β-CD ile oluşan komplekslerde bu dalgaboyu 258 ve 256 nm'ye kaymıştır (Tablo 4.32). Maksimum absorbsiyon dalgaboyu da 2-3 nm kısa dalgaboyuna kayarak (hipsokromik kayma) absorbanslarda düşüş gözlenmiştir (Şekil 4.20 (b-d)). Bunun yanı sıra diğer RT-CD komplekslerinden farklı olarak RT-M-β-CD kompleksi 258'de omuz vermeyip maksimum dalgaboyu 263 nm olan geniş bir absorbsiyon bandı vermektedir (Şekil 4.20-e). Çalışılan tüm siklodekstrin türlerinin tek başlarına ve maksimum çalışma konsantrasyonunda (8 mM) UV spektrumları elde edilerek bu CD'lerin UV absorbsiyonunun ihmal edilir seviyede olduğu da görülmüştür.

Spektrumlarda gözlenen batokromik veya hipsokromik kayma polifenollerin kromofor gruplarının kompleks oluşumu sonucu daha hidrofobik bir çevreye girdiğini göstermektedir [35]. CD varlığında spektrumlarda oluşan absorbans ve dalgaboyu değişimleri bu polifenolik bileşiklerin CD'lerle içerme kompleksleri oluşturabildiklerini kanıtlamaktadır.

Her bir antioksidan bileşiğin eksitasyon ve emisyon dalgaboyları belirlendikten sonra, antioksidan bileşiklerin konsantrasyonu (50 μM) sabit tutulup artan siklodekstrin

konsantrasyonuna (0-8 mM) bağlı olarak belli bir dalgaboyu aralığında floresans spektrumları elde edilmiştir (Şekil 4.21, 4.23, 4.25 ve 4.27). Rosmarinik asit için λ_{eks} 355 nm, λ_{em} 442 nm olup floresans spektrumları 370-580 nm dalgaboyu aralığında elde edilmiştir (Şekil 4.21 (a-e)). Siklodekstrin konsantrasyonları arttıkça floresans intensitelerinde artış gözlenmiştir. Ayrıca UV spektrumlarının tersine kompleks oluşumu sonrası hipsokromik kayma tespit edilmiştir. Siklodekstrin konsantrasyonu arttıkça 10 nm daha kısa dalgaboyuna kademeli olarak kayma gözlenmiştir. Klorojenik asit için λ_{eks} 330 nm, λ_{em} 440 nm olup floresans spektrumları 350-600 nm dalgaboyu aralığında elde edilmiştir (Şekil 4.23 (a-e)). Siklodekstrin konsantrasyonları arttıkça floresans intensitelerinde artış gözlenmiştir. Kompleks oluşumu nedeniyle spektrumda hipsokromik kayma tespit edilmiştir (9 nm daha kısa dalgaboyuna kayma olmuştur). Kuersetin için λ_{eks} 440 nm, λ_{em} 527 nm olup floresans spektrumları 460-595 nm dalgaboyu aralığında elde edilmiştir (Şekil 4.25 (a-e)). Kuersetin ile siklodekstrinler arasındaki etkileşim sonucu, siklodekstrin konsantrasyonları arttıkça floresans intensitelerinde artış gözlenmiştir ve kompleks oluşumu ile spektrumlarında batokromik kayma tespit edilmiştir. Siklodekstrin konsantrasyonu arttıkça yaklaşık 10-12 nm daha uzun dalgaboyuna (537-540 nm) kayma gözlenmiştir. Ancak kuersetin ile α-CD arasında beklenilen ve sıralı bir floresans intensite artışı gözlenmediği için spektrumu verilmemiştir. Kuersetinin glikozidi olan rutin için λ_{eks} 440 nm, λ_{em} 520 nm olup floresans spektrumları 480-600 nm dalgaboyu aralığında elde edilmiştir (Şekil 4.27 (a-e)). Siklodekstrin konsantrasyonları arttıkça floresans intensitelerinde artış gözlenmiştir. Ancak rutin ile α-CD arasında beklenilen ve sıralı bir floresans intensite artışı gözlenmemiştir. β-CD ile kompleks oluşumu sonucu floresans intensitesi artarken dalgaboyunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir. HE-β-CD, HP-β-CD ve M-β-CD ile kompleks oluşumu sonucu dalga boyunda 2-3 nm batokromik kayma meydana geldiği görülmüştür.

Tek başlarına ilgili CD çözeltilerinin, polifenolik bileşiklerin emisyon dalgaboylarında ihmal edilebilir düzeyde intensite verip vermediği incelenip elde edilen sonuçlardan maksimum çalışma konsantrasyonunda bile intensitenin ihmal edilebilir düzeyde olduğu görülmüştür.

Floresans ölçüm sonuçları emisyon spektrumlarındaki hipsokromik kaymanın siklodekstrinlerle antioksidan bileşiklerinin etkileştiğinin bir kanıtıdır. Siklodekstrin varlığında floresans intensitelerindeki artış, dış çevrelerindeki değişime bağlı olarak floresan moleküllerin tamamının veya bir kısmının hidrofobik CD kavitesine girmesiyle ilgilidir [46,47,178,179]. Genel olarak, oluşan kaymanın boyutunu kaba olarak bu durum belirlemektedir. Polifenolik bileşiklerin siklodekstrinin hidrofobik iç kavitesine gömülmesiyle yüksek rijidite (esnemezlik) oluşmakta ve böylece floresans intensitelerinde artma meydana gelmektedir. Molekülün aromatik kısmı daha hidrofobik olan CD kavitesine girerken, diğer kısmı sulu fazda kalmaktadır [47].

Polifenolik bileşiklerin suda çözünürlükleri farklı CD çözeltileri varlığında gözlenmiştir. Çözünürlüğün artmasının temel mekanizması, hidrofobik etkileşimler vasıtasıyla hidrofobik bileşikler veya moleküllerin lipofilik kısımlarının CD'lerin hidrofobik kavitesine girmesi olarak önerilmektedir [180].

Siklodekstrin uygulamalarında, içerme komplekslerinin stokiyometrisi ve dissosiyasyon dengesi önemli parametrelerdir. Bir CD kompleksi suda çözündüğünde veya vücut sıvısı içine yerleştirildiğinde, dengede hemen serbest bileşenlere dissosiye olur. Oluşum sabiti (K_f) kompleksin bağlanma gücünü ve komplekstek misafir bileşenin fizikokimyasal özelliklerindeki değişimleri değerlendirmede kullanılan yararlı bir değişkendir. Komplekslerin dissosiyasyon derecesi K_f 'nin büyüklüğüne bağlı olduğu gibi çeşitli çevresel faktörlere de (seyrelme, sıcaklık) bağlıdır [48]. Antioksidan bileşiklerin siklodekstrin komplekslerinin stokiyometrisini ve stabilite sabitlerini belirlemek için floresans spektrumlarındaki kompleks intensitesi ile antioksidan bileşiğin tek başına göstermiş olduğu floresans intensitesi farkından yararlanılmıştır. Bunun için Eşitlik (2.25)'de verilen Benesi-Hildebrand denklemi kullanılmıştır. Emisyon dalga boyundaki ΔF^{-1} ile $[CD]^{-1}$ resiprokal değerler arasındaki doğrusal eğriler elde edilmiştir (Şekil 4.30, 4.31, 4.32 ve 4.33). Bu grafiklerin doğrusallığı elde edilen AOX:CD komplekslerinin 1:1 oranda kompleks oluşturduğunu kanıtlamaktadır. Bu sonuç diğer analitik yöntemlerin kullanıldığı sonuçlarla birebir örtüşmektedir [50, 181, 182]. Çalışılan polifenoller için 25±1 ºC'de α-CD, β-CD, HE-β-CD, HP-β-CD ve M-β-CD ile hazırlanan içerme komplekslerinin Benesi-Hildebrand metodu kullanılarak elde edilen içerme sabitleri Tablo 4.33'de verilmiştir. RA için K_f

değerleri sırasıyla: 82±7; 164±65; 168±57; 267±54 ve 328±39 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar en yüksek içerme yeteneğinin M-β-CD'de, en düşük α-CD'de olduğunu göstermektedir. CA'in α-CD, β-CD, HE-β-CD, HP-β-CD ve M-β-CD ile elde edilen komplekslerinin K_f sabitleri sırasıyla 249±65; 412±14; 208±32; 440±27 ve 584±25 olarak bulunmuştur. CA-β-CD kompleksinin stabilite sabiti 412±14 M^{-1}, literatürde yer alan K_f değerlerine (420±50 M^{-1} [46] ve 424 M^{-1} [47]) oldukça yakın bulunmuştur. Rutin ve kuersetinin artan α-CD konsantrasyonunda beklenilen ve sıralı bir floresans intensite artışı gözlenemediğinden kompleks oluşum sabiti hesabı için gerekli veriler elde edilememiştir. RT'in β-CD, HE-β-CD, HP-β-CD ve M-β-CD ile elde edilen komplekslerinin K_f sabitleri sırasıyla 122±33; 292±45; 562±42; 838±94 olarak hesaplanmıştır. QR'in β-CD, HE-β-CD, HP-β-CD ve M-β-CD ile elde edilen komplekslerinin K_f sabitleri ise sırasıyla 1026±151; 3685±315; 5200±561; 4334±444 olarak bulunmuştur. RT-β-CD kompleksinin K_f değeri 122±33 ile QR-β-CD kompleksinin K_f değeri 1026±151; Alvarez-Parrilla ve arkadaşları [46] tarafından bulunan değerlerle (RT-β-CD için 250±48; QR-β-CD için 1284±106) örtüşmektedir. Elde edilen sonuçlara bakılacak olursa, genel olarak modifiye siklodekstrinlerin doğal siklodekstrinlere oranla daha güçlü içerme kabiliyetine sahip olduğu görülmektedir. Bunun nedeni, ilgili sübstitüsyonların (metil, propil, hidroksi propil vs.) doğal β-CD'lerin giriş kısmını genişletmeleri ve güçlü molekül içi hidrojen bağlarını yok etmelerinden kaynaklanabilir. Bu durum misafir moleküllerin modifiye CD kavitesine daha kolay ulaşabilmesini ve daha yüksek oluşum sabitleri vermesine neden olur [183]. Oluşum sabitlerinin büyüklüğü Gibbs serbest enerjisindeki negatif değişimle ilişkilidir. Entalpik yürüyen içerme prosesinde CD'ler ile polifenoller arasındaki zayıf Van der Waals ve H-bağları gibi moleküllerarası kuvvetler önemli rol oynamaktadır [47].

FT-IR spektroskopisi CD'ler ile antioksidanların içerme kompleks oluşumlarını doğrulamak amacıyla literatürde sıklıkla kullanılmıştır [52,110,111,184]. IR spektrumları elde edilecek freeze-dried (dondurarak kurutulmuş) RA-CD komplekslerine ait ürünler MeOH/H_2O (1:1, v/v) içinde hazırlanmıştır, çünkü suyla karışabilen çözücüler arasında metanol, CD'lerin lipofilik çevresine fenolik antioksidanlara göre düşük afinite gösterdiğinden ilgili spektrumları etkilemesi beklenemez [35]. Şekil 4.33 ve 4.34'de rosmarinik asidin ve içerme komplekslerinin

spektrumları görülmektedir. Bu spektrumlarda önemli farklılıklar gözlenmiştir. 1200 cm^{-1}'de gözlenen fenolik –OH gerilme titreşimleri ile 1500 cm^{-1} civarında gözlenen aromatik –OH gerilme titreşimleri rosmarinik aside ait olup içerme komplekslerinde bu bandların ortadan kaybolduğu görülmüştür. İçerme komplekslerinin FT-IR spektrumlarında siklodekstrinler için karakteristik pikler olan 2930 cm^{-1} (-OH gerilme), 1030 cm^{-1} (C-O-C gerilme) spesifik absorpsiyon pikleri gözlenmektedir. Tüm içerme komplekslerinde 3400 cm^{-1}'de -H bağlanması sonucu oluşan -OH gerilme titreşimlerinin geniş absorpsiyon bandı görülmektedir. Saf rosmarinik asidde ise -OH gerilmesinden kaynaklanan dar bir pik görülmektedir. Kompleksleşme ile rosmarinik aside ait keskin 818 cm^{-1} piki, 1285 cm^{-1} pikinde (RA-α-CD ve RA-HE-β-CD komplekslerinde bu piklerde azalma gözlenirken RA-β-CD, RA-M-β-CD ve RA-HP-β-CD kompleks spektrumlarında bu pikler tamamen kaybolmaktadır), 1710 cm^{-1} pikinde (tüm komplekslerde bu pikte önemli bir azalma gözlenmektedir) meydana gelen değişimler rosmarinik asidin siklodekstrin kavitesine girdiğini ve kompleks oluşumunu kanıtlamaktadır.

Polifenollerin, dış kısmı hidrofilik karakterli siklodekstrinlerle kompleksleşmesi sonucu polifenol moleküllerinin bir parçası veya tamamı CD kavitesi içine girdiğinden özellikle lipofilik karakterli antioksidan bileşiklerin hidrofilik çözücü ortamında tayin edilmesi kolaylaşmaktadır [53]. Çözünürlüğü az olan birçok antioksidan bileşiğin çözünürlüğünü ve kimyasal stabilitesini arttırmak amaçlı antioksidan-siklodekstrin içerme kompleksleri elde edilmektedir. Kompleksleşme sonucu çözünürlüğün yanısıra polifenollerin antioksidan aktivitelerinin de değişip değişmediği önemlidir. Bu tez çalışmasında ilgili antioksidanların α-CD, β-CD, HE-β-CD, HP-β-CD ve M-β-CD ile verdiği komplekslerin antioksidan kapasite değişimleri CUPRAC yöntemiyle gözlenmiştir. Serbest ve kompleksleşmiş antioksidan bileşiklere ait TEAC değerleri Şekil 4.35, 4.36, 4.37 ve 4.38'de çubuk grafikleri şeklinde karşılaştırmalı olarak gösterilmiştir. Elde edilen $TEAC_{CUPRAC}$ değerlerine göre kompleksleşmenin antioksidan kapasitesini az da olsa arttırdığı sonucu çıkmıştır. Bu sonuç literatürdeki diğer sonuçlarla birebir örtüşmektedir [46,47,57]. Serbest ve komplekşleşmiş rosmarinik asit için kapasite sıralaması şu şekildedir: $TEAC_{RA\text{-}M\text{-}\beta\text{-}CD}$ (5.56) > $TEAC_{RA\text{-}HP\text{-}\beta\text{-}CD}$ (5.46) > $TEAC_{RA\text{-}HE\text{-}\beta\text{-}CD}$ (5.36) > $TEAC_{RA\text{-}\beta\text{-}CD}$ (5.32) > $TEAC_{RA\text{-}\alpha\text{-}CD}$ (5.28) > $TEAC_{RA}$ (5.24). Klorojenik asit için de sıralama aynı şekilde bulunmuştur:

TEAC $_{CA\text{-}M\text{-}\beta\text{-}CD}$ (3.34) > TEAC $_{CA\text{-}HP\text{-}\beta\text{-}CD}$ (3.27) > TEAC $_{CA\text{-}HE\text{-}\beta\text{-}CD}$ (3.24) = TEAC $_{CA\text{-}\beta\text{-}CD}$ (3.24) > TEAC $_{CA\text{-}\alpha\text{-}CD}$ (3.21) > TEAC $_{CA}$ (3.14). Antioksidan kapasite sıralaması rutin için sırayla şu şekilde bulunmuştur: TEAC $_{RT\text{-}M\text{-}\beta\text{-}CD}$ (3.67) = TEAC $_{RT\text{-}HE\text{-}\beta\text{-}CD}$ (3.67) > TEAC $_{RT\text{-}HP\text{-}\beta\text{-}CD}$ (3.61) > TEAC $_{RT\text{-}\beta\text{-}CD}$ (3.53) > TEAC $_{RT\text{-}\alpha\text{-}CD}$ (3.52) = $TEAC_{RT}$ (3.52). Kuersetin için ise sıralama şöyledir: TEAC $_{QR\text{-}HP\text{-}\beta\text{-}CD}$ (6.12) > TEAC $_{QR\text{-}M\text{-}\beta\text{-}CD}$ (6.08) > TEAC $_{QR\text{-}HE\text{-}\beta\text{-}CD}$ (6.00) > TEAC $_{QR\text{-}\beta\text{-}CD}$ (5.97) > TEAC $_{QR\text{-}\alpha\text{-}CD}$ (5.71) = $TEAC_{QR}$ (5.71). Antioksidan kapasitenin kompleksleşme ile artmasının nedeni, polifenolik bileşiklerin *o*-dihidroksi fenil gruplarının siklodekstrinlerin daha az polar olan iç kavitesine girmesi ve polar olmayan bir çevrede molekül içi H- bağlarının kuvvetlenmesiyle polifenolün *o*-kateşol yapısından 1 e- oksidasyonu sonucu oluşan ariloksi radikallerinin rezonans stabilizasyonunun artmasıdır. Yükseltgenmiş haldeki polifenolik bileşiğin ariloksi radikalinin stabilizasyonu sonucu, polifenolün yükseltgenmiş ve indirgenmiş halleri arasındaki redüksiyon potansiyeli azalmaktadır, bu azalma antioksidanı biraz daha güçlü kılmaktadır. $TEAC_{RA\text{-}M\text{-}\beta\text{-}CD}$ değeri $TEAC_{RA}$ değerine oranla metanollü çözeltilerde %6.11 artmıştır. Aynı prosedür etanollü çözeltilerde denendiğinde bu artış sadece %2.38 olmuştur. Bunun nedeni, metanolün iyonizasyonu arttırmasıdır [125]. Böylece, oluşan fenolat anyonu (konjüge baz) fenolik bileşikten (konjüge asid) daha kolay yükseltgenmektedir. Genelde, içerme kompleksleşme olgusu redoks davranışı ile yarışmaktadır. Bu nedenle ilk bakışta antioksidan aktivitenin kompleksleşme ile azalması beklenmektedir. Ancak, TAC ölçümlerinde kullanılan kromojenik yükseltgeme araçları ile reaksiyona giren antioksidan bileşiklerin redoks denge sabitleri kompleks oluşum sabitlerinden oldukça yüksektir. Bununla beraber, CD kompleksleşmesi çözünürlüğü ve antioksidanların kromojenik reaktiflere ulaşabilirliğini arttırmaktadır. Kompleksleşme ile polifenollerin antioksidan kapasitelerinde az bir artma gözlenmiştir. Özyürek ve arkadaşları sentetik antioksidan BHT'nin M-β-CD içeren 1:9 H_2O-aseton çözeltisi içinde %4 (w/v)'den yüksek CD bulunması durumunda CUPRAC absorbansının düştüğünü belirtmişlerdir [112]. Büyük olasılıkla, yüksek CD derişimlerinde antioksidanların içerme kompleksleşme dengeleri oksidasyon dengelerine baskın gelerek antioksidan kapasitelerini negatif etkilemektedir. Huang ve arkadaşları [185] lipofilik antioksidanların ORAC antioksidan aktivitelerini ölçmek için %7 (w/v) rastgele M-β-CD (R-M-β-CD) içeren aseton-su karışımları kullanmıştır. Diğer yandan Özyürek ve arkadaşları %2 (w/v) M-β-CD kritik konsantrasyonuna kadar BHT ve AA'in aseton-su

çözeltilerinin absorbanslarının arttığını, bu derişimin üstünde absorbans değerlerinin platoya ulaştığını ve daha sonra BHT için düştüğünü belirtmiştir [112]. Bir fenolik bileşiğin ΔE redüksiyon potansiyel farkına sahip bir redoks reaksiyonuna ilişkin K redoks denge sabiti için Nernst denklemi $\Delta E = (RT/nF)\ Ln\ K = (0.05916/n)\ Log\ K$ olarak ifade edilmektedir. $Cu^{II,I}$-Nc'e ait standard redüksiyon potansiyeli 0.6 V [186] ve polifenolik bileşiklerden rozmarinik asidin Ag/AgCl'e karşı anodik pik potansiyeli (E_{pa}) 0.266 V [187] olarak alındığında rozmarinik asidin CUPRAC reaktifi ile gösterdiği 1-e oksidasyon denge sabiti yaklaşık $\approx 4.4 \times 10^5$ olarak beklenmektedir. Diğer yandan, RA ile en yüksek kompleks oluşum sabitine sahip RA-M-β-CD kompleksinin K_f değeri 328±39 olarak belirlenmiştir. Bu değer ilgili denge sabitinin yaklaşık binde biri kadardır. Yani, CD ile kompleksleşmiş rozmarinik asidin antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde CD derişiminin kritik öneme sahip olmadığı görülmektedir. Bu nedenle, Ag/AgCl'e karşı 1.15 V oksidasyon potansiyeline BHT'nin %4 (w/v)'den daha düşük derişimlerde, CD ortamında antioksidan kapasite ölçümü yapılmıştır [111]. Diğer bir deyişle, bu çalışmada polifenolik bileşiklerin CUPRAC antioksidan kapasiteleri yaklaşık %1 (w/v) CD varlığında ölçülmüştür. Ancak CD derişim faktörünün, redoks potansiyelleri CUPRAC reaktifinin redoks potansiyeline yakın antioksidan bileşikler için önemli olabileceği düşünülmektedir. CD'lerin her ne kadar polifenolik antioksidanların çözünürlüğünü arttırarak antioksidan gücünü koruyabilirlerse de belirli bir kritik derişimin üzerinde antioksidan kapasiteyi olumsuz etkileyebilecekleri gösterilmiştir. Bu gözlemler antioksidanların farklı çözücü ortamlarında depolanma yetileri ve raf ömürleri üzerinde yararlı bilgiler sunabilir.

Sonuç olarak yapılan çalışmalardan daha önce orijinal CUPRAC yöntemiyle elde edilen toplam antioksidan kapasite bulgularına ilave olarak farklı çözücü ortamlarında (organik çözücüler) ve farklı türlerdeki (antioksidan-siklodekstrin içerme kompleksleri) antioksidan bileşiklere CUPRAC yöntemi uygulanabilir kılınmıştır. Bunlara ek olarak, ilk kez CUPRAC yöntemi esaslı hat-üstü bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda ana CUPRAC yöntemi kendisinden türeyen modifiye CUPRAC yöntemleriyle birlikte bütünleşmiş bir antioksidan ölçüm paketi olarak dünya literatürüne katkı sağlamaktadır.

KAYNAKLAR

1. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C., 1984, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochemical Journal*, 219, 1-14.

2. GLIZCZYNSKA- SWIGLO, A., 2006, Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays, *Food Chemistry*, 96,131-136.

3. CAO, G., ALESSIO, H.M., CUTLER, R. G., 1993, Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants, *Free Radical Biology & Medicine*, 14, 303-311.

4. WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K.U., LOCKE, S., 1985, Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 187, 33-37.

5. BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J., 1996, Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power'; the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.

6. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

7. MILLER, N.J., RICE EVANS, C.A., DAVIES, M.J., 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.

8. SANCHEZ, M.C., LARRAURI, J.A., CALIXTO, S.F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.

9. HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M., ARUOMA O.I., 1987, The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals, *Analytical Biochemistry*, 165, 215-219.

10. HALLIWELL, B., GROOTVELD, M., GUTTERIDGE, J.M.C., 1988, Methods for the measurement of hydroxyl radicals in biological systems: deoxyribose degradation and aromatic hydroxylation, *Methods of Biochemical Analysis*, 33, 59-90.

11. PRIOR, R., WU X., SCHAICH, K., 2005, Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.

12. WRIGHT, J.S., JOHNSON, E.R, DILABIO, G.A., 2001, Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants, *Journal of American Chemical Society*, 123, 1173-1183.

13. PEREZ-JIMENEZ, J. & SAURA-CALIXTO, F., 2006, Effect of solvent and certain food consituents on different antioxidant capacity assays, *Food Research International*, 39, 791-800.

14. PINELO, M., MANZOCCO, L., NUNEZ, M.J., NICOLI, M.C., 2004, Solvent effect on quercetin antioxidant capacity, *Food Chemistry*, 88, 201-207.

15. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., GÜNGÖR, N., APAK, R., 2008, Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl-beta-cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica Chimica Acta,* 630, 28-39.

16. YILMAZ, Y., TOLEDO, R.T., 2006, Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols, *Journal of Food Composition and Analysis,* 19, 41-48.

17. ZHOU, K., YU, L., 2004, Effects of extraction solvent on wheat antioxidant activity estimation, *LWT-Food Science and Technology*, 37, 717-721.

18. FINOTTI, E., MAJO, D.D., 2003, Influence of solvents on the antioxidant property of flavonoids, *Nahrung/Food*, 47, 186-187.

19. PEDRIELLI, P., PEDULCI G.F., SKIBSTED, L.H., 2001, Antioxidant mechanism of flavonoids. Solvent effect on rate constant for chain breaking reaction of quercetin and epicatechin in autoxidation of methyl linoleate, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4, 3034-3040.

20. PELLEGRINI, RE, R., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS C.A., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay, *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.

21. DAPKEVICIUS, A., VAN BEEK, T.A., NIEDERLÄNDER, H.A.G., DE GROOT, A.E., 1999, On-line detection of antioxidative activity in high-performance liquid chromatography eluates by chemiluminescence, *Analytical Chemistry,* 71, 736-740.

22. OGAWA, A.A.H., TANIZAWA, H., MIYAHARA, T., TOYO'OKA, T., 1999, On-line screening method for antioxidants by liquid chromatography with chemiluminescence detection, *Analytica Chimica Acta*, 383, 221-230.

23. KOLEVA, I.I., NIEDERLÄNDER, H.A.G., VAN BEEK, T.A., 2000, An on-line RP-HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures, *Analytical Chemistry,* 72, 2323-2328.

24. BANDONIENE, D., & MURKOVIC, M., 2002, On-Line RP-HPLC-DPPH Screening Method for Evaluation of Radical Scavenging Phenols Extracted from Apples (*Malus domestica L.*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2482-2487.

25. KOLEVA, I.I., NIEDERLÄNDER, H.A.G., VAN BEEK, T.A., 2001, Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavenging compounds in complex mixtures, *Analytical Chemistry,* 73, 3373-3381.

26. DAPKEVICIUS, A., VAN BEEK, T.A., NIEDERLÄNDER, H.A.G., 2001, Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates, *Journal of Chromatographia A*, 912, 73-82.

27. BARTASIUTE, A., WESTERINK, B.H.C., VERPOORTE, E., NIEDERLANDER, H.A.G., 2007, Improving the in vivo predictability of an on-line HPLC stable free radical decolorization assay for antioxidant activity in methanol–buffer medium, *Free Radical Biology & Medicine*, 42, 413-423.

28. BANDONIENE, D., MURKOVIC, M., PFANNHAUSER, W., VENSKUTONIS, P.R., GRUZDIENE, D., 2002, Detection and activity evaluation of radical scavenging compounds by using DPPH free radical and on-line HPLC-DPPH methods, *European Food Research Technology*, 214, 143-147.

29. EXARCHOU,V., FIAMEGOS, Y.C., VAN BEEK, T., NANOS, C., VERVOORT, J., 2006, Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants, *Journal of Chromatography A*, 1112, 293-302.

30. ÇAPANOĞLU, E., BEEKWILDER, J., BOYACIOĞLU, D., HALL, R., & DE VOS, R., 2008, Changes in antioxidant and metabolite profiles during production of tomato paste, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 964- 973.

31. STEWART, A.J., MULLEN, W., & CROZIER, A., 2005, On-line high-performance liquid chromatography analysis of the antioxidant activity of phenolic compounds in green and black tea, *Molecular Nutrition & Food Research,* 49, 52-60.

32. KOŞAR, M., DORMAN, D., BAŞER, K., HILTUNEN, R., 2004, An improved HPLC post-column methodology for the identification of free radical scavenging phytochemicals in complex mixtures, *Chromatographia*, 60, 635-638.

33. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ALTUN, M., 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method, *Free Radical Research*, 39, 949-961.

34. ARTS, I.C., HOLLMAN, P.C., 2005, Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 317-325.

35. CALABRO, M.L., TOMMASINI, S., DONATO, P., RANERI, D., STANCANELLI, R., FICARRA, P., FICARRA, R., COSTA, C., CATANIA, S., RUSTICHELL, C., GAMBERINI, G., 2004, Effects of α- and β-cyclodextrin complexation on the physico-chemical properties and antioxidant activity of some 3-hydroflavones, *Journal of Pharmacology and Biomedical Analysis*, 35, 365-377.

36. LI, S. & PURDY, W.C., 1992, Cyclodextrins and their applications in analytical chemistry, *Chemical Reviews*, 92, 1457-1470.

37. INOUE, Y., 1993, NMR studies of the structure and properties of cyclodextrins and their inclusion complexes, *Annual Reports on NMR Spectroscopy*, 27, 59-101.

38. CONNORS, K.A., The stability of cyclodextrin complexes in solution, *Chemical Reviews*, 97 (1996) 1325–1357.

39. VERRONE,R., CATUCCI, L., COMSA, P., FINI, P., AGOSTIANO, A., LIPPOLIS, V., PASCALE, M., 2007, Effect of beta-cyclodextrin on spectroscopic properties of ochratoxin A in aqueous solution. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57, 475-479.

40. LOFTSSON, T. & BREWSTER, M.E., 1996, Pharmaceutical applications of cyclodextrins. 1. Drug solubilization and stabilization, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 1017–1025.

41. BUSCHMANN, H.-J. & SCHOLLMAYER, E., 2002, Applications of cyclodextrins in cosmetic products, *Journal of Cosmetic Science*, 53, 185–191.

42. SZEJTLI, J., 1988, *Cyclodextrin Technology*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

43. SZEJTLI, J., 1998, Introduction and general overwiev of cyclodextrin chemistry, *Chemical Reviews*, 98, 1743-1754.

44. UEKAMA, K., HIRAYAMA, F., IRIE, T., 1998, Cyclodextrin drug carrier systems, *Chemical Reviews*, 98, 2045-2076.

45. LU, Z., CHENG, B., HU, Y., ZHANG, Y., ZOU, G., 2009, Complexation of resveratrol with cyclodextrins: Solubility and antioxidant activity, *Food Chemistry*, 113, 17-20.

46. ALVAREZ-PARRILLA, E.L., DE LA ROSA, A., TORRES-RIVAS, F., RODRIGO-GARCIA, J., GONZALEZ-AGUILAR, G., 2005, Complexation of apple antioxidants: chlorogenic acid, quercetin and rutin by β-cyclodextrin (β-CD), *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 53,121-129.

47. GORNAS, P., NEUNERT, G., BACZYNSKI, K., POLEWSKI, K., 2009, Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study, *Food Chem*istry, 114, 190-196.

48. TOMMASINI, S., RANERI, D., FICARRA, R., CALABRO, M.L., STANCANELLI, R., FICARRA, P., 2004, Improvement in solubility and dissolution rate of flavonoids by complexation with β-cyclodextrin, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35, 379–387.

49. LI, J., ZHANG, M., CHAO, J., SHUANG, S., 2009, Preparation and characterization of the inclusion complex of Baicalin (BG) with β-CD and HP-β-CD in solution: An antioxidant ability study, *Spectrochimica Acta A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73, 752-756.

50. IRWIN, P., BROUILLETTE, J., GIAMPA, A., HICKS, K., GEHRING, A., TU, S.-I, 1999, Cyclomaltoheptaose (beta-cyclodextrin) inclusion complex formation with chlorogenic acid: hydration enthalpy, the solvent entropy (hydrophobic effect), and enthalphy-entropy compensation, *Carbohydrate Research*, 332, 67-76.

51. POLYAKOV, N., LESHINA, T.V., KONOVALOVA, T.A., HAND, E.O., KISPERT, L.D., 2004, Inclusion complexes of carotenoids with cyclodextrins: ^{1}H NMR, EPR and optical studies, *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 872-880.

52. STRAŽIŠAR, M., ANDRENŠEK, S., ŠMIDOVNIK, A., 2008, Effect of β-cyclodextrin on antioxidant activity of coumaric acids, *Food Chemistry*, 110, 636-642.

53. JULLIAN, C., MOYANO, L., YANEZ, C., OLEA-AZAR, C., 2007, Complexation of quercetin with three kinds of cyclodextrin: An antioxidant study, *Spectrochimica Acta*, 67, 230-234.

54. JULLIAN, C., OROSTEGUIS, T., PEREZ-CRUZ, F., SANCHEZ, P., MENDIZABAL, F., OLEA-AZAR, C., 2008, Complexation of morin with three kinds of cyclodextrin: A thermodynamic and reactivity study, *Spectrochimica Acta Part A*, 71, 269-275.

55. IACONINOTO, A., CHICCA, M., PINAMONTI, S., CASOLARI, A., BIANCHI, A., SCALIA, S., 2004, Influence of cyclodextrin complexation on the photodegradation and antioxidant activity of α-tocopherol, *Pharmazie*, 59, 30-33.

56. KIM, H., CHOI, J., JUNG, S., 2009, Inclusion complexes of modified cyclodextrins with some flavonols, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 64, 43-47.

57. MERCADER-ROS, M.T., LUCAS-ABELLAN, C., FORTEA, M.I., GABALDON, J.A., NUNEZ-DELICADO, E., 2010, Effect of HP-β-cyclodextrins complexation on the antioxidant activity of flavonols, *Food Chemistry,* 118, 769-773.

58. LUCAS-ABELLÁN, C., FORTEA, M.I., GABALDÓN, J.A., NÚÑEZ-DELICADO, E., 2008, Encapsulation of quercetin and myricetin in cyclodextrins at acidic pH, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 56, 255–259.

59. BERGONZI, M.C., BILIA, A.R., DI BARI, L., MAZZI, G., VINCIERI, F.F., 2007, Studies on the interactions between some flavonols and cyclodextrins, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 17, 5744-5748.

60. CALABRO, M.L., TOMMASINI, S., DONATO, P., STANCANELLI, R., RANERI, D., CATANIA, S., COSTA, C., VILLARI, V., FICARRA, P., FICARRA, R., 2005, The rutin/β-cyclodextrin interactions in fully aqueous solution: spectroscopic studies and biological assays, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 1019-1027.

61. HAIYUN, D., JIANBIN, C., GUOMEI, Z., SHAOMIN, S., JINHAO, P., 2003, Preparation and spectral investigation on inclusion complex of β-cyclodextrin with rutin, *Spectrochimica Acta Part A*, 59, 3421-3429.

62. ZHAO, M. WANG, H., YANG, B., TAO, H., 2010, Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its microbial activity, *Food Chemistry*, 120, 1138-1142.

63. LÓPEZ-NICOLÁS, J., M., NÚÑEZ-DELICADO, E., PÉREZ- LÓPEZ, A. J., BARRACHINA, Á.C., CUADRA-CRESPO, P., 2006, Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β-cyclodextrin

complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Chromatographia A*, 1135, 158-165.

64. WANG, Y., QIAO, X., LI, W., ZHOU, Y., JIAO, Y., YANG, C., DONG, C., INOUE, Y., SHUANG, S., 2009, Study on the complexation of isoquercitrin with β-cyclodextrin and its derivatives by spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, 650, 124-130.

65. CONNORS, K.A., Binding Constants. The measurement of molecular complex stability, Wiley, New York, 1987.

66. KOPÁNİ, M., CELEC, P., DANİŠOVİČ, L., MİCHALKA, P., BİRÓ, C., 2006, Oxidative stress and electron spin resonance, *Clinica Chimica Acta*, 364, 61-66.

67. HALLIWELL, B., ARUOMA O.I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species: its mechanisms and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters*, 281, 9-19.

68. CAO, G., SOFIC, E., PRIOR, R.L., 1997, Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships, *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 749-760.

69. CAO, G., PRIOR R.L., 1999, *In vivo* Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.

70. RATNAM D.V., ANKOLA, D.D., BHARDWAJ, V., SAHANA, D.K., KUMAR, M.N.V.R., 2006, Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective, *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207.

71. SROKA, Z., CISOWSKI, W., 2003, Hydrogen peroxide scavenging, antioxidant and anti-radical activity of some phenolic acids, *Food and Chemical Toxicology*, 41, 753-758.

72. CAO, G., PRIOR, R.L., 1998, Comparison of different analytical methods for assesing total antioxidant capacity of human serum, *Clinical Chemistry*, 44, 1309-1315.

73. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1997, Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, *Trends in Plant Science*, 2, 152-159.

74. SHAHIDI, F., 1996, *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS Press, Champaign, Illinois, 0-935315-77-2.

75. KESKİN, H., ERKMEN G., 1987, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci basım, İstanbul.

76. HUDSON, B., J., 1990, *Food Antioxidants*, Elsevier Science, USA.

77. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.

78. HALLIWELL, B., 1996, Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo?, *Free RadicalResearch*, 25, 439-454.

79. BRIGELIUS-FLOHE, R., TRABER, M. G., 1999, Vitamin E: function and metabolism, *FASEB Journal,* 13, 1145-1155.

80. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, Second Edition, New York, 0-8247-0547-5.

81. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N. J., PAGANGA, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.

82. HALLIWELL, B., 1990, How to characterise a biological antioxidant, *Free Radical Research Comminucation*, 9, 1-32.

83. SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.K.J., 1992, Phenolic antioxidants, *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32, 67-103.

84. 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.

85. JOHN, P. & RICHIE, J.R., 1992, The role of glutathione in aging and cancer, *Experimental Geroniology*, 27, 615-626.

86. CURELLO, S., CECONI, C., CARGNONI, A., CORNACCHIARI, A., FERRARI, R., ALBERTINI, A., 1987, Improved procedure for determining glutathione in plasma as an index of myocardial oxidative stress, *Clinical Chemistry,* 33, 1448-1449.

87. NATH, K.A., SALAHUDEEN A.K., 1993, Autooxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate, *American Journal of Physicology*, 264, 306-314.

88. TAPIERO, H., TOWNSEND, D.M., TEW, K.D., 2003, The antioxidant role of selenium and seleno-compounds, *Biomedicine&Pharmotherapy*, 57, 134-144.

89. CAO, G., VERDON, C.P., WU, A.H.B., WANG, H., PRIOR, R.L., 1995, Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II, *Clinical Chemistry*, 41, 1738-1744.

90. CAO, G., PRIOR, R.L., 1999, The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods in Enzymology* 299, 50-62.

91. GLAZER, A.N., 1990, Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Methods in Enzymology*, 186, 161-168.

92. WAYNER, D.D.M., BURTON, G.W., INGOLD, K., LOCKE, U.S., 1985, Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 187, 33-37.

93. MILLER, N.J., RICE-EVANS, C.A., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods of Enzymology*, 234, 279-293.

94. VALKONEN, M., KUUSI, T., 1997, Spectrophotometric assay for total radical-trapping antioxidant potential in human serum, *Journal of Lipid Research*, 38, 823-833.

95. ALHO, H., LEINONEN, J., 1999, Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Methods of Enzymology*, 299, 3-14.

96. WHITEHEAD, T.P., THORPE, G.H.G., MAXWELL, S.R.J., 1992, Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Analytica Chimica Acta*, 266, 265-277.

97. BORS, W., MICHEL, C., SARAN, M., 1984, Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin. A rapid test for quantifying antioxidant activity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 796, 312-319.

98. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ERÇAĞ, E., 2006, The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Science and Nutrition,* 57, 292-304.

99. ÇELIK, S.E., ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K.I., BERKER, K., ÖZGÖKÇE, F., APAK, R., 2008, Antioxidant capacities of herbal plants used in the manufacture of Van herby cheese: 'Otlu peynir', *International Journal of Food Properties,* 11, 747-761.

100. ALPINAR, K., ÖZYÜREK, M., KOLAK, U., GÜÇLÜ, K., ARAS, Ç., ALTUN, M., ÇELİK, S.E., BERKER, K.I., BEKTAŞOĞLU, B., APAK, R., 2009, Antioxidant capacities of some food plants wildly grown in Ayvalik of Turkey, *Food Science and Technology Research,* 15, 59-64.

101. GÜÇLÜ, K., ALTUN, M., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., APAK, R., 2006, Antioxidant capacity of fresh, sun- and sulfited-dried malatya apricot (*Prunus Armeniaca)* assayed by CUPRAC, ABTS/TEAC and folin methods, *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 76-85.

102. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ALTUN, M., 2005, Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II)-

neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method, *Free Radical Research*, 39, 949-961.

103. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., 2006, A novel total antioxidant capacity measurement for food and plasma antioxidants: CUPRAC method. (meeting abstract indexed in SCI), *FEBS Journal*, 273, 72.

104. BEKTAŞOĞLU, B., ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2006, Novel hydroxyl radical scavenging antioxidant activity assay for water-soluble antioxidants using a modified CUPRAC method, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 345, 1194-1200.

105. BEKTAŞOĞLU, B., ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2006, Hydroxyl radical antioxidant activity assay using a modified CUPRAC method (meeting abstract indexed in SCI)", *FEBS Journal*, 273, 301.

106. ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., BEKTAŞOĞLU, B., APAK, R., 2007, Spectrophotometric determination of ascorbic acid by the modified CUPRAC method with extractive separation of flavonoids-La(III) complexes, *Analytica Chimica Acta*, 588, 88-95.

107. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., 2008, Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) assay, *Microchimica Acta*, 160, 413-419.

108. APAK, R., GÜÇLÜ, K., DEMİRATA, B., ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., BEKTASOGLU, B., BERKER, K.I., OZYURT, D., 2007, Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay, *Molecules*, 12, 1496-1547.

109. ÖZYÜREK, M., ÇELİK, S.E., BERKER, K.I., GÜÇLÜ, K., TOR, İ., APAK, R., 2007, Sensitivity enhancement of CUPRAC and iron(III)-phenanthroline antioxidant assays by preconcentration of colored reaction products on a weakly acidic cation exchanger. *Reactive and Functional Polymers*, 67, 1478-1486.

110. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2007, CUPRAC Total antioxidant capacity assay of lipophilic antioxidants in combination with hydrophilic antioxidants using the macrocyclic oligosaccharide methyl B-cyclodextrine as the solubility enhancer, *Reactive and Functional Polymers*, 67, 1548-1560.

111. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., GÜNGÖR, N., APAK, R., 2008, Simultaneous total antioxidant capacity assay of lipophilic and hydrophilic antioxidants in the same acetone-water solution containing 2% methyl-beta-cyclodextrin using the cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica Chimica Acta,* 630, 28-39.

112. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2008, Hydroxyl radical scavenging assay of phenolics and flavonoids with a modified cupric

reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method using catalase for hydrogen peroxide degradation, *Analytica Chimica Acta,* 616, 196-206.

113. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2009, Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method, *Analytica Chimica Acta,* 636, 42-50.

114. BEKTAŞOĞLU, B., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2008, Hydroxyl radical detection with a salicylate probe using modified CUPRAC spectrophotometry and HPLC, *Talanta*, 77, 90-97.

115. BENER, M., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2010, Polyphenolic contents of natural dyes produced from industrial plants assayed by HPLC and novel spectrophotometric methods, *Industrial Crops & Products*, 32, 499-506.

116. ÖZYÜREK, M., BEKTAŞOĞLU, B., GÜÇLÜ, K., GÜNGÖR, N., APAK, R., 2010, A novel hydrogen peroxide scavenging assay of phenolics and flavonoids using cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) methodology, *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 689-698.

117. BENER, M., ÖZYÜREK, M., GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2010, Development of a Low-Cost Optical Sensor for Cupric Reducing Antioxidant Capacity Measurement of Food Extracts, *Analytical Chemistry*, 82, 4252-4258.

118. VAN DEN BERG, R., HAENEN, R.M.M., VAN DEN BERG, H., BAST, A., 1999, Applicability of an improved trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures, *Food Chemistry*, 66, 511-517.

119. 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.

120. SEKHER, PANNALA, A., CHAN, T.S., O'BRIEN, P.J., RICE-EVANS, C.A., 2001, Flavonoid B-Ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282, 1161-1168.

121. BURDA, S., OLESZEK, W., 2001, Antioxidant and antiradical activities of flavonoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2774-2779.

122. WILLIAMS, R.J., SPENCER, J.P.E., RICE-EVANS, C., 2004, Flavonoids: Antioxidants or Signalling Molecules?, *Free Radical Biology and Medicine*, 36, 838-849.

123. COOK, N.C., SAMMAN, S., 1996, Flavonoids–Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources*, Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.

124. BARCLAY, L.R.C., EDWARDS, C.E., VINQVIST, M.R., 1999, Media effects on antioxidant activities of phenols and catechols, *Journal of American Chemical Society*, 121, 6226-6231.

125. LITWINIENKO, G., INGOLD, K.U., 2003, Abnormal effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH.) in alcohols, *Journal of Organic Chemistry*, 68, 3433-3438.

126. FOTI, M., RUBERTO, G., 2001, Kinetic solvent effects on phenolic antioxidants determined by spectrophotometric measurements, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 342-348.

127. VAGLIMIGLI, L., BANKS, J.T., INGOLD, K.U., LUSZTYK, J., 1995, Kinetic solvent effects on hydroxylic hydrogen atom abstractions are independent of the nature of the abstracting radical, *Journal of American Chemical Society*, 117, 9966-9971.

128. JOVANOVIC, S.V, JANKOVIC, I., JOSIMOVIC, L, 1992, Electron-transfer reactions of alkyl peroxyl radicals, *Journal of American Chemical Society*, 114, 9018-9021.

129. MCPHAIL, D.B., HARTLEY, R.C., GARDNER, P.T., DUTHIE, G.G., 2003, Kinetic and stoichiometric assessment of the antioxidant activity of flavonoids by electron spin resonance spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1684-1690.

130. De HEER, M.I., MULDER, P., KORTH, H.-G., INGOLD, K.U., LUSZTYK, J., 2000, Hydrogen atom abstraction kinetics from intramolecularly hydrogen bonded ubiquinol-0 and other (poly)methoxy phenols, *Journal of American Chemical Society*, 122, 2355-2360.

131. DEMİRBUKER KAVAK, D., 2010, Gıda Antioksidanlarının Etkileşimleri: Polifenol-Protein Etkileşimleri, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5, 9-16.

132. PINELO M., MANZOCCO L., NUNEZ M. J., NICOLI M. C., 2004, Interaction among Phenols in Food Fortification: Negative Synergism on Antioxidant Capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1177-1180.

133. HEO, H.J., KIM, Y.J., CHUNG, D., KIM, D.O., 2007, Antioxidant capacities of individual and combined phenolics in a model system, *Food Chemistry*, 104, 87-92.

134. LIU, D., SHI, J., IBARRA, A.J., KAKUDA, Y., XUE, S.J., 2008, The scavenging capacity and synergistic effects of lycopene, vitamin E, vitamin C, and β-carotene mixtures on the DPPH free radical, *LWT-Food Science and Technology*, 41, 1344–1349.

135. ALBAYRAK, S., SAĞDIÇ, O., AKSOY, A., Bitkisel Ürünleri ve Gıdaların Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26, 401-409.

136. PLUMB, G.W., DE PASCUAL-TERESA, S., SANTOS-BUELGA, C., CHEYNIER, V., WILLIAMSON, G., 1998, Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation, *Free Radical Research*, 29, 351-358.

137. KROLL J., RAWEL H.M., 2001, Reactions of Plant Phenols with Myoglobin: Influence of Chemical Structure of the Phenolic Compounds, *Journal of Food Science*, 66, 48-58.

138. TSAI, P.J., HUANG, H.P., 2003, Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle, *Food Research International*, 37, 313–318.

139. GAD, S.A., EL-SALAM, M.H., 2010, The antioxidant properties of skim milk supplemented with rosemary and green tea extracts in response to pasteurisation, homogenisation and the addition of salts, *International Journal of Dairy Technology*, 63, 349-355.

140. STASZEWSKI, N.M., PILOSOF, A. M. R., JAGUS, R.J, 2011, Antioxidant and antimicrobial performance of different Argentinean green tea varieties as affected by whey proteins, *Food Chemistry*, 125, 186-192.

141. SIEBERT K. J., 1999, Effects of Protein-Polyphenol Interactions on Beverage Haze, Stabilization, and Analysis, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 353-362.

142. FUKUI, M., YOKOTSUKA, K., ISHII, R., O'MAHONY, M., ROUSSEAU, B., 2002, Investigation of Potential Taste Reduction of Catechin and Grape Seed Dimeric Phenols in Water by Wine Proteins, *Lebensmittel-Wissenscahft und Technologie*, 35, 355-361.

143. LOPEZ-GRIO, S., TORRES-LAPASIO, J.R., BAEZA-BAEZA, J.J., GARCIA-ALVAREZ-COQUE, M.C., 2000, Micellar liquid chromatographic separation of aminoacids using pre- and post-column o-phthalaldehyde/N-acetylcysteine derivatization, *Analytica Chimica Acta*, 418, 153-165.

144. MOROVJAN, G., CSOKAN, P. P., NEMETH-KOND, L., 1998, HPLC determination of colistin and aminoglycoside antibiotics in feeds by post-column derivatization and fluorescence detection, *Chromatographia*, 48, 32-36.

145. JOSHUA, H., 1993, Determination of aflatoxins by reversed-phase high-performance liquid chromatography with post-column in-line photochemical derivatization and fluorescence detection, *Journal of Chromatography A*, 654, 247-254.

146. MUSCARELLA, M., LO MAGRO, S., NARDIELLO, D., PALERMO, C., CENTONZE, D., 2008, Development of a new analytical method for the determination of fumonisins B_1 ve B_2 in food products based on high performance liquid chromatography and fluorimetric detection with post-column derivatization, *Journal of Chromatography A*, 1203, 88-93.

147. LUCY, C.A., DINH, H.N., 1994, Kinetics and Equilibria the Zn-EDTA-PAR Postcolumn Reaction Detection System for the Determination of Alkaline Earth Metals, *Analytical Chemistry*, 66, 793-797.

148. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M. GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2010, Determination of antioxidants by a novel on-line HPLC-cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection, *Analytica Chimica Acta* , 674, 79-88.

149. SINGH, M., SHARMA, R., BANERJEE, U.C., 2002, Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnology Advances*, 20, 341-359.

150. VAN DER VEEN, B.A., UITDEHAAG, J.C.M., DIJKSTRA, B.W., DIJKHUIZEN, L., 2000, Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1543, 336-360.

151. VAN DE MANAKKER, F., VERMONDEN, T., VAN NOSTRUM, C.F., HENNINK, W.E., 2009, Cyclodextrin-based polymeric materials: synthesis, properties, and pharmaceutical/biomedical applications, *Biomolecules*, 10, 3157-3175.

152. CRINI, G., MORCELLET, M., 2002, Synthesis and applications of adsorbents containing cyclodextrins. *Journal of Separation Science*, 25, 789-813.

153. DEL VALLE, E.M.M., 2004, Cyclodextrins and their uses, *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046.

154. ZHANG, M.Q., REES, D., 1999, A review of recent applications of cyclodextrins for drug discovery, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 9, 1697-1717.

155. SZEJTLI, J., 2004, Past, present, and future of cyclodextrin research. *Pure and Applied Chemistry*, 76, 1825-1845.

156. MAGNUSDOTTIR A, MASON M, LOFTSSON T., 2002, Cyclodextrins, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44, 213-218.

157. LOFTSSON, T, DUCHENE, D., 2007, Cyclodextrins and their pharmaceutical application, *International Journal of Pharmaceutics*, 329(1-2), 1-11.

158. EASTBURN, S.D., TAO, B.Y., 1994, Applications of modified cyclodextrins. *Biotechnology Advances*, 12, 325-339.

159. TAWARAH, K.M., KHOURI, S.J., 2000, Determination of the stability and stoichiometry of p-methyl red inclusion complexes with γ-cyclodextrin, *Dyes and Pigments*, 45, 229-233.

160. MOURTZINOS, I., KALOGEROPOULUS, N., PAPADAKIS, S.E., KONSTANTINOU, K., KARATHANOS, V.T., 2008, Encapsulation of nutraceutical monoterpens in β-cyclodextrin and modified starch. *Journal of Food Science*, 73, 89-94.

161. YURDAKUL B. S., *Siklodekstrinlerin Tekstil Boyama ve Yıkama İşlemlerinde Kullanımı*, (Yüksek Lisans Tezi), Dokuz Eylül Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 2002.

162. HIGUCHI, T., CONNORS, K.A, 1965, Phase-solubility techniques, *Advanced Analytical Chemistry Instruments*, 4, 117-212.

163. GÖKTÜRK, S., TALMAN, R.Y., 2008, Effect of temperature on the binding and distribution characteristics of thionine in sodium dodecylsulfate micelles, *Journal of Solution Chemistry,* 37, 1709-1723.

164. BENESI, H.A., HILDEBRAND, J.H., 1949, A spectrophotometric investigation of the interaction of iodine with aromatic hydrocarbons, *Journal of American Chemical Society*, 71, 2073-2707.

165. FOLCH-CANO, C., JULLIAN, C., SPEISKY, H., OLEA-AZAR, C., 2010, antioxidant activity of inclusion complexes of tea catechins with β-cyclodextrins by ORAC assays, *Food Research International*, 43, 2039-2044.

166. WANG, H., PROVAN, G.J., HELLIWELL, K., 2003, HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors, *Food Chemistry*, 81, 307-312.

167. YILDIZ, L., SÖZGEN BAŞKAN, K., TÜTEM, E., APAK, R., 2008, Combined HPLC-CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay of parsley, celery leaves, and nettle, *Talanta*, 77, 304-313.

168. ÇELİK, S.E., ÖZYÜREK, M. GÜÇLÜ, K., APAK, R., 2010, Solvent effects on the antioxidant capacity of lipophilic and hydrophilic antioxidants measured by CUPRAC, ABTS/persulphate and FRAP methods, *Talanta*, 81, 1300-1309.

169. TESHIMA, N., KATSUMATA, H., KURIHARA, M., SAKAI, T., KAWASHIMA, T., 1999, Flow-injection determination of copper(II) based on its catalysis on the redox reaction of cysteine with iron(III) in the presence of 1,10-phenantroline, *Talanta*, 50, 41-47.

170. GORINSTEIN, S., JASTRZEBSKI, Z., LEONTOWICZ, H., LEONTOWICZ, M., NAMIESNIK, J., NAJMAN, K., PARK, Y.-S., HEO, B.-G., CHO, J.-Y., BAE, J.-H., 2009, Comparative control of the bioactivity of some frequently

consumed vegetables subjected to different processing conditions, *Food Control*, 20, 407-413.

171. DEMİRCİ ÇEKİÇ, S., SÖZGEN BAŞKAN, K., TÜTEM, E., APAK, R., 2009, Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol–containing proteins in admixture with polyphenols, *Talanta*, 79, 344-351.

172. HORSWILL, E.C., HOWARD, J.A., INGOLD, K.U., 1966, The oxidation of phenols, *Canadian Journal of Chemistry*, 44, 985-991.

173. FUJISAWA, S., ATSUMI, T. MURAKAMI, Y. KADOMA, Y., 2005, Dimerization, ROS formation, and biological activity of o-methoxyphenols, *Archives of Immunology and Experimental Therapy*, 53, 28-38.

174. NIEDERLANDER, H.A.G., VAN BEEK, T.A., BARTASIUTE, A., KOLEVA, I.I., 2008, Antioxidant activity assays on-line with liquid chromatography, 1210, 121-134.

175. OKI, T., KOBAYASHI, M., NAKAMURA, T., OKUYAMA, A., MASUDA, M., SHIRATSUCHI, H., SUDA, I., 2006, Changes in Radical-scavenging Activity and Components of Mulberry Fruit During Maturation, *Journal of Food Science*, 71, 18-22.

176. MILLER, J.C., MILLER, J.N., *Statistics for Analytical Chemists*, 3rd ed., Ellis Horwood and Prentice Hall, New York and London, 1993.

177. ZHANG, Q., VAN DER KLIFT, E.J.C., JANSSEN, H.-G., VAN BEEK, T.A., 2009, An on-line normal-phase high performance liquid chromatography method for the rapid detection of radical scavengers in non-polar food matrixes, *Journal of Chromatographia A*, 1216, 7268-7274.

178. LEZCANO, M., AL-SOUFI, W., NOVO, M., RODRIGUEZ-NUNEZ, E., VASGUEZ TATO, A., 2002, Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha- and beta-cyclodextrins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 108-112.

179. AL-HASSAN, K.A., KHANFER, M.F., 1998, Fluorescence Probes for Cyclodextrin Interiors, *Journal of Fluorescence,* 8, 139-152.

180. DAMIANI, E., TURSILLI, R., CALOSARI, A., ASTOLFI, P., GRECI, L., SCALIA, S., 2005, Effect of complexation with randomly methylated beta-cyclodextrin on the aqueous solubility, photostability and antioxidant activity of an indolinonic nitroxide radical, *Free Radical Research*, 39, 41-49.

181. RODRIGUES, E., VAZ, S., GIL, V.M.S.S., CALDERIA, M.M., MOREIRA DA SILVA, A.M.G., 2002, Inclusion of Polyphenol Oxidase Substrates in β-Cyclodextrin: A ^{1}H-NMR Study, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 44, 395-397.

182. IRWIN, P., KING, G., HICKS, K., 1995, Cyclomaltoheptaose (β-cyclodextrin) and hydroxyethyl-substituted β-cyclodextrin inclusion complex formation with chlorogenic acid: solvent effects on inclusion complex stability, *Carbohydrate Research*, 269, 201-216.

183. BREWSTER, M.E., LOFTSSON, T., 2007, Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 645-666.

184. FICARRA, R., TOMMASINI, S., RANERI, D., CALABRO, DI BELLA, M.L., RUSTICHELLI, M.R.C., GAMBERINI, M.C., FICARRA, P., 2002, Study of flavonoids/β-Cyclodextrin inclusion complexes by NMR, FT-IR, DSC, X-ray investigation, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 1005-1014.

185. HUANG, D., OU, B., HAMPSCH-WOODILL, M., FLANAGAN, J.A., DEEMER, E.K., 2002, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1815-1821.

186. TÜTEM, E., APAK, R., BAYKUT, F., 1991, Spectrophotometric determination of trace amounts of copper(I) and reducing agents with neocuproine in the presence of copper(II), *Analyst*, 116, 89-94.

187. HOTTA, H., NAGANO, S., UEDA, M., TSUJINO, Y., KOYAMA, J., OSAKAI, T., 2002, Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1572, 123-132.

ÖZGEÇMİŞ

01.11.1979 tarihinde İstanbul'da doğdu. 1990 yılında Mecidiye İlkokulu'ndan, 1997 yılında Adile Mermerci Anadolu Lisesi'nden mezun oldu. 1998-2002 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümünde öğrenim gördü. Ekim 2002 tarihinde İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bilim Dalı Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2001 yılı yaz döneminde BAYER İlaç Fabrikaları A.Ş.'de zorunlu stajını tamamladı, aynı yerde 2003 yılı yaz döneminde geçici süreyle çalıştı. 30 Aralık 2005 tarihinde İ.Ü. Mühendislik Fakültesi'ne Araştırma Görevlisi olarak atandı. Haziran 2005 tarihinde "Bazı polifenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin tayini" başlıklı tezini tamamlayarak Yüksek Kimyager ünvanını aldı. 2005 Eylül ayında İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bilim Dalı Analitik Kimya Programı'nda doktora eğitimine başladı. Aynı yıl TÜBİTAK Yurtiçi Doktora Programı kapsamında doktora bursu almaya hak kazandı. Halen Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak çalışmalarını sürdürmektedir. Evli ve 1 çocuk annesidir.