

**TOPLAM FLAVONOİD MİKTARININ
GELİŞTİRİLEN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Dilek ÖZYURT**

Anabilim Dalı : KİMYA

Programı : KİMYAGERLİK

OCAK 2005

**TOPLAM FLAVONOİD MİKTARININ
GELİŞTİRİLEN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Dilek ÖZYURT
(509011110)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 27 Aralık 2004
Tezin Savunulduğu Tarih : 27 Ocak 2005**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Birsen DEMİRATA-ÖZTÜRK (İ.T.Ü)
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Tülay TULUN (İ.T.Ü)
Prof.Dr. Reşat APAK (İ.Ü)**

OCAK 2005

ÖNSÖZ

Bu tezin hazırlanması sırasında bana konu veren, tez çalışmamın başlangıcından sonuçlandırılmasına kadar her türlü bilgi ve laboratuvar imkanı sağlayan ve her zaman desteğini esirgemedi beni yönlendiren çok değerli hocam Prof. Dr. Birsen Demirata Öztürk'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmam için gerekli kimyasal maddeleri sağladığından dolayı Ülker AR-GE Grup Başkanlığına, UV-VIS spektrofotometrenin arıza yaptığı dönemlerde cihazlarını kullanmama izin vererek çalışmalarımın devamını sağlayan İstanbul Üniversitesi Analitik Kimya Bölüm Başkanı sayın hocam Prof.Dr. Reşat Apak'a ve asistanlarına, İTÜ'si Moleküler Biyoloji Bölümü hocalarından Uz.Dr. Gülseren PEKİN ve Nevin KARAGÜLER hocalarıma teşekkürü her zaman bir borç kabul ediyorum. Ayrıca floresans ölçümlerimde bana yardımcı olan araştırma görevlisi Halil Demir'e çok teşekkür ederim.

Tüm yüksek lisans öğrenim boyunca desteklerini esirgemeyen, şefkat, anlayış ve sabırlarından dolayı anneme ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

Aralık 2004

Dilek ÖZYURT

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	x
SUMMARY	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BÖLÜM	4
2.1. Antioksidanlar	4
2.2. Antioksidanların Kimyasal Bileşimlerine Göre Sınıflandırılması	6
2.2.1. Fenolik Yapıdaki Antioksidanlar	6
2.2.2. Aromatik Amino Antioksidanlar ve Organik Sülfür Bileşikleri	6
2.3. Antioksidanların Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması	6
2.3.1. Primer Antioksidanlar	7
2.3.2. Seconder Antioksidanlar	8
2.4. Sentetik Antioksidanlar ve Özellikleri	8
2.4.1. BHA(Bütillenmiş hidroksianisol)	8
2.4.2. BHT(Bütillenmiş hidroksitoluen)	8
2.4.3. TBHQ(Tersiyer bütıl hidrokinon)	9
2.5. Doğal Antioksidanlar	9
2.5.1. Tokoferoller	10
2.5.2. L-Askorbik Asit	11
2.5.3. Karotenoidler	11
2.5.4. Flavonoidler	11
2.5.4.1. Flavonoidlerin Yapı Özellikleri ve Sınıflandırılması	11
2.5.4.2. Flavonoidlerin Antioksidatif Etkileri	15
2.5.4.3. Literatürdeki Antioksidan Kapasitesi Ölçme yöntemleri	17
2.6. Endüstride Kullanılan Bitkiler	23
2.6.1. Isırgan Otu ve Özellikleri	23
2.6.2. Isırgan Otunun Kullanım Alanları	24
2.6.3. Diğer Şifalı Bitkilerin Özellikleri ve Kullanım Alanları	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	27
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler	27
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Bitkiler	27
3.3. Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması	28
3.3.1. 2×10^{-3} M Ce (IV) Sülfat Çözeltisinin Hazırlanması ve Ayarlanması	28
3.3.2. 2×10^{-3} M Ce (III) Nitrat Çözeltisinin Hazırlanması	29
3.4. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması	29
3.5. Toplam Flavonoid Miktarı Analiz Yöntemleri	29
3.5.1. Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem	29

3.5.2. Spektrofluorometrik Yöntem	30
3.6. Absorpsiyon Spektrumlarının Çizimi ve Dalga Boyunun Seçimi	30
3.6.1. Maksimum dalga boyuna asit miktarının etkisi	30
3.6.2. Absorpsiyon Spektrumları	32
3.7. Kalibrasyon Grafiklerinin Çizimi	35
3.7.1. Ce(IV)'ün Kalibrasyon Grafiği	35
3.7.2. Ce(IV) ve Quercetin arasındaki reaksiyon süresinin saptanması	36
3.7.3. Quercetin Kalibrasyon Grafiği	37
3.8. Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem ile ilgili Çalışmalar	40
3.8.1. Ce(IV) ile Quercetin Derişimleri Arasındaki Bağntı	40
3.8.2. Spektrofotometrik Titrasyon	41
3.8.2.1. Titrant olarak Ce(IV) çözeltisinin kullanılması	41
3.8.2.2. Titrant olarak Standart Quercetin çözeltisinin kullanılması	42
3.9. Çeşitli Flavonoidlerin ve Doğal Antioksidanların Geliştirilen Yöntemle Analizi ve Trolox Eş Değerlerinin (TEAC) Hesaplanması	44
3.9.1. Ce(IV) ve Trolox Reaksiyonunun İncelenmesi	44
3.9.1.1. Trolox Kalibrasyon Grafiğinin Çizimi	44
3.9.1.2. Spektrofotometrik Titrasyon	46
3.9.1.2.1. Titrant olarak Ce(IV) çözeltisinin kullanılması	46
3.9.1.2.2. Titrant olarak Standart Trolox çözeltisinin kullanılması	47
3.9.2. Ce(IV) ve Askorbik Asit Reaksiyonunun İncelenmesi	47
3.9.2.1. Askorbik Asit İçin Kalibrasyon Grafiğinin Çizimi	47
3.9.2.2. Spektrofotometrik Titrasyon	49
3.9.2.2.1. Titrant olarak Askorbik Asit çözeltisinin kullanılması	49
3.9.2.2.2. Titrant olarak Ce(IV) çözeltisinin kullanılması	50
3.10. Diğer Flavonoidlerin Ce(IV) İle Reaksiyonu	51
3.11. İnterfere Edici Maddelerin Etkisi	54
3.12. Analiz Yönteminin İstatiksel Değerlendirilmesi	54
3.13. Yöntemin Tayin Sınırlarının Saptanması	56
3.14. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklere Uygulanması	58
3.14.1. Lineerlik testleri	58
3.14.2. Isırgan Otunun Geliştirilen Yöntemle Analizi	59
3.14.3. Değişik Çay Örneklerin Geliştirilen Yöntemle Analizi	61
3.14.4. Geliştirilen Yöntemin Standart bir Yöntemle Karşılaştırılması	62
3.15. Spektrofluorometrik Yöntem	65
3.15.1. Floresans spektrumları	65
3.15.2. Ce(III)'ün Kalibrasyon Grafiği	65
3.15.3. Quercetin Spektrofluorometrik Kalibrasyon Grafiği	67
3.15.4. Ce(III)'ün Emisyonuna etki eden faktörler	70
3.15.5. Spektrofluorometrik Titrasyon	74
3.15.5.1. Titrant olarak Ce(IV) çözeltisinin kullanılması	74
3.15.6. Geliştirilen Florometrik Yöntemin Gerçek Örneklere uygulanması ve Standart bir Yöntemle Karşılaştırılması	75
4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	77
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	85

KISALTMALAR

AAPH	: 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate)
AUC	: Area-under-curve
DCF	: Dichlorofluorescein
DCFH-DA	: Dichlorofluorescein-diacetate
FRAP	: Ferric reducing/antioxidant power
ORAC	: Oxygen radical absorbance capacity
PE	: Phycoerythrin
TEAC	: Trolox equivalent antioxidant capacity
TOSC	: Total oxyradical scavenging capacity
TRAP	: Total radical trapping parameter
Trolox	: 6-hydroxyl-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1.	Flavonoid Türleri ve Onların Gıda Kaynakları.....	14
Tablo 3.1.	Maksimum dalga boyuna $[H^+]$ iyonlarının etkisi	31
Tablo 3.2.	Ce(IV) için absorbands değerleri	35
Tablo 3.3.	Ce(IV)-quercetin reaksiyon süresinin saptanması.....	36
Tablo 3.4.	Başlangıç derişimi 2.10^{-4} M olan Ce(IV) çözeltisinin farklı konsantrasyonlardaki quercetin çözeltileri ile reaksiyonu sonucu artan Ce(IV) çözeltilerinin absorbands değerleri	38
Tablo 3.5.	Ce(IV)-quercetin reaksiyonu için çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ve mol oranları	39
Tablo 3.6.	Ce(IV) ile quercetin arasındaki spektrofotometrik titrasyon.....	44
Tablo 3.7.	Ce(IV)- trolox reaksiyonu için çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ve mol oranları.....	45
Tablo 3.8.	Ce(IV)- askorbik asit reaksiyonu için A: kalibrasyon grafiğı sonuçları B: Askorbik asit ile titrasyon sonuçları C: Ce(IV) ile titrasyon sonuçları.....	48
Tablo 3.9.	Ce(IV)- flavonoidler arasındaki reaksiyon için çizilen Kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ve mol oranları.....	51
Tablo 3.10.	Flavonoidlerin geliştirilen yöntemle hesaplanan molar absorpsiyon katsayıları ve trolox eşdeğerleri (TEAC).....	53
Tablo 3.11.	3×10^{-4} Ce(IV) çözeltilerine asetil slisilik asit çözeltilerinin etkisi	54
Tablo 3.12.	3×10^{-4} Ce(IV) çözeltilerine benzoik asit çözeltilerinin etkisi	54
Tablo 3.13.	Analiz yönteminin istatistiksel değeriendirilmesi için yapılan deney sonuçları.....	55
Tablo 3.14.	Geliştirilen yöntemin istatistiksel değeriendirilmesi.....	56
Tablo 3.15.	Geliştirilen yöntemin alt tayin sınırının hesaplanması	57
Tablo 3.16.	Isırgan otu ekstraktlarına geliştirilen analiz yönteminin uygulanması.....	60

Tablo 3.17.	Çeşitli Bitki ekstraktlarına geliştirilen analiz yönteminin uygulanması ve quercetin eşdeğerliklerinin hesaplanması	61
Tablo 3.18.	Çeşitli Bitki ekstraktlarına geliştirilen analiz yönteminin uygulanması ve trolox eşdeğerlerinin hesaplanması.....	62
Tablo 3.19.	Geliştirilen yöntemin ısırgan otu ekstraktlarına uygulanması ve aynı örneğin klasik bir yöntem ile analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	63
Tablo 3.20.	Geliştirilen yöntemin bitki çaylarına uygulanması ve aynı örneğin klasik bir yöntem ile analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....	64
Tablo 3.21.	Ce(III) için 360 nm deki emisyon değerleri.....	66
Tablo 3.22.	Başlangıç konsantrasyonu $3,3 \times 10^{-4}$ M olan Ce(IV) çözeltisinin farklı konsantrasyonlardaki quercetin çözeltileri ile reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III)'ün emisyon değerleri.....	68
Tablo 3.23.	Geliştirilen yöntemin ısırgan otu ekstraktlarına uygulanması ve aynı örneğin klasik bir yöntem ile analizi yapılarak sonuçların karşılaştırılması.....	76

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : Sentetik Antioksidanlar.....	9
Şekil 2.2 : Tokoferollerin yapısal formülleri ve Trolox.....	10
Şekil 2.3 : L-Askorbik Asit	11
Şekil 2.4 : β – Karoten.....	11
Şekil 2.5 : Flavonoidlerin genel yapısı.....	12
Şekil 3.1 : Quercetin yapısal formülü.....	28
Şekil 3.2 : Asit konsantrasyonunun Ce(IV) çözeltisinin dalga boyu ve absorbansına Etkisi.....	31
Şekil 3.3 : Ce(IV), quercetin ve Ce(IV)+quercetin çözeltilerinin referans saf suya karşı absorpsiyon spektrumları.....	33
Şekil 3.4 : Çeşitli flavonoidlerin ve doğal antioksidanların referans saf suya karşı absorpsiyon spektrumları.....	34
Şekil 3.5 : Ce(IV)' ün kalibrasyon grafiği.....	36
Şekil 3.6 : Ce(IV)-Quercetin arasındaki reaksiyon süresinin saptanması.....	37
Şekil 3.7 : Ce(IV)-Quercetin reaksiyonu için kalibrasyon grafiği	38
Şekil 3.8 : Farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki Ce(IV) çözeltileri ile çizilen quercetin kalibrasyon grafikleri.....	40
Şekil 3.9 : $8,61 \times 10^{-6}$ M (■) ve $2,152 \times 10^{-5}$ M (▲) quercetin çözeltilerinin standart Ce(IV) çözeltisi ile titrasyonu	41
Şekil 3.10. : $8,61 \times 10^{-6}$ M quercetinin standart Ce(IV) çözeltisi ile titrasyonu.....	42
Şekil 3.11 : $3,1 \times 10^{-4}$ M (■) ve $1,85 \times 10^{-4}$ M (▲) Ce(IV) çözeltilerinin değişen konsantrasyonda quercetin çözeltisi ile titrasyonu.....	43
Şekil 3.12 : $1,85 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisi ile değişen konsantrasyonda quercetinin titrasyonu.....	43
Şekil 3.13 : Farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki Ce(IV) çözeltileri ile aynı şekilde çizilen trolox kalibrasyon grafikleri.....	45
Şekil 3.14 : $5,0 \times 10^{-5}$ M trolox çözeltisinin standart Ce(IV) çözeltisi ile spektrofotometrik tirasyonu.....	46

Şekil 3.15	: $2,3 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisinin 320 nm'de trolox çözeltisi ile spektrofotometrik tirasyonu.....	47
Şekil 3.16	: Askorbik Asit Kalibrasyon grafiği.....	48
Şekil 3.17	: $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine değişen konsantrasyonlardaki askorbik asit çözeltisi ile Spektrofotometrik titrasyonu.....	49
Şekil 3.18	: $2,7 \times 10^{-5}$ M askorbik asit çözeltisinin standart Ce(IV) çözeltisi ile spektrofotometrik tirasyonu.....	50
Şekil 3.19	: Kateşinin Kalibrasyon Grafiği.....	51
Şekil 3.20	: Gallik Asitin Kalibrasyon Grafiği.....	52
Şekil 3.21	: Naringin Kalibrasyon Grafiği.....	52
Şekil 3.22	: Naringenin Kalibrasyon Grafiği.....	53
Şekil 3.23	: Sulu Isırgan otu ekstraktı ile Quercetin çözeltisinin etkileşimi.....	58
Şekil 3.24	: Sulu Isırgan otu ekstraktının $4,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisi ile tayini...	60
Şekil 3.25	: 1×10^{-4} M Ce(III) çözeltisinin floresans (emiyon) spektrumu.....	65
Şekil 3.26	: $1,0 \times 10^{-5}$ M – $2,0 \times 10^{-4}$ M arasında değişen lineer aralıktaki Ce(III) kalibrasyon grafiği.....	67
Şekil 3.27	: Quercetin'in spektrofotometrik kalibrasyon grafiği.....	69
Şekil 3.28	: Quercetin'in logaritmik kalibrasyon grafiği.....	69
Şekil 3.29	: $1,2 \times 10^{-3}$ M Ce(III) çözeltilerine $0,16 \times 10^{-4}$ - $2,08 \times 10^{-4}$ arasında değişen Ce(IV) çözeltilerinin ilavesi ile emiyon değerlerinin değişimi.....	71
Şekil 3.30	: $1,2 \times 10^{-3}$ M Ce(III) çözeltilerine $0,16 \times 10^{-4}$ - $2,08 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltilerinin ilavesi ile emiyon değerlerinin logaritmik değişimi.....	71
Şekil 3.31	: 4×10^{-5} - 4×10^{-4} M arasında değişen Ce(III) ile 4×10^{-4} - 4×10^{-5} arasında değişen Ce(IV) çözeltilerinin konsantrasyonları ile emiyon değerlerindeki değişimi.....	73
Şekil 3.32	: 4×10^{-5} - 4×10^{-4} M arasında değişen Ce(III) ile 4×10^{-4} - 4×10^{-5} arasında değişen Ce(IV) çözeltilerinin konsantrasyonları ile logaritmik emiyon değerlerindeki değişim	73
Şekil 3.33	: 1×10^{-5} M quercetin'in standart Ce(IV) çözeltisi ile titrasyonu.....	75

TOPLAM FLAVONOİD MİKTARININ GELİŞTİRİLEN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM İLE TAYİNİ

ÖZET

Antioksidanlar canlı metabolizmalarında serbest radikallerle savaşan moleküllerdir. Serbest radikaller vücudumuzun yapı taşları olan hücrelere zarar verirler. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin bozulması oksidatif strese sebep olmaktadır. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren prooksidanları (yani reaktif oksijen ve azot türlerini, serbest radikalleri) etkinlikle indirgeyerek toksik olmayan ürünlere dönüştüren veya oksidasyonu ciddi ölçüde engelleyen yada geciktiren moleküllerdir.

Gıdalarda mevcut ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar; esas olarak vitaminler (askorbik asit: C-vitamini ve α -tokoferol: E-vitamini), karotenoidler (A-vitamini), flavonoidlerden oluşmaktadır. Bunlar çeşitli sebze, meyve ve tahıllarda ve şifalı bitkilerde bolca bulunurlar. Doğal antioksidanlardan flavonoidler bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır. Vücudumuz tarafından üretilmeyen flavonoidleri, sebze ve meyveleri tüketerek bünyemize almaktayız.

Bu çalışmanın amacında insan sağlığı ve gıda maddeleri için önemli olan doğal antioksidanlardan flavonoidlerin analizi için basit, tekrarlanabilirliği yüksek, reaksiyon basamakları az, ucuz ve spesifik olmayan cihazlarla yapılan bir yöntem geliştirilmek istenmiştir.

Metot sülfat asitli ortamda Ce(IV)'ün maksimum dalga boyundaki (320 nm) absorbans değeri, Ce(IV)'ün flavonoidler ile reaksiyonu sonucu azalmaktadır. Ce(IV)'ün maksimum dalga boyundaki bu azalmadan yararlanarak indirekt olarak toplam flavonoid miktarını hesaplayabilmektedir. Ayrıca bulunan sonuçların tekrarlanabilirliğini göstermek için geliştirilen spektrofotometrik yöntem uygulanmıştır. Ce(IV) floresans özelliğe sahip değilken Ce(III) floresans özelliğe sahiptir. Flavonoidler ile Ce(IV)'ün reaksiyon sonucu oluşan Ce(III)'ün floresansı ölçülerek toplam flavonoid miktarı hesaplanabilmektedir.

Yapılan deneysel çalışmalarda ilk olarak Ce(IV)'ün maksimum dalga boyunu gösterdiği asit konsantrasyonu ve quercetin ile reaksiyona girme süresi tayin edildi. Maksimum dalga boyu 320 nm, sülfirik asit konsantrasyonu 0,3 M ve bekleme süresi 30 dakika olarak tespit edildi. Quercetin, kalibrasyon grafiği oluşturmak için kullanıldı. $2,0 \times 10^{-4}$ M sabit Ce(IV) çözeltilere gittikçe artan miktarlarda ($2,12 \times 10^{-6}$ – $8,48 \times 10^{-6}$ M) quercetin çözeltileri ilave edildi. Çözeltilerin absorpsiyon ve quercetin konsantrasyonu arasında çizilen kalibrasyon eğrisi ise aşağıdaki eşitliği vermiştir.

$$A_{320} = 0,985 - 1,03 \times 10^5 C_{\text{quercetin}} \quad (R^2 = 0,9987)$$

Ayrıca quercetin ve Ce(IV) arasındaki reaksiyonun tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla kalibrasyon denemeleri 6 kez tekrarlandı. Ce(IV) - quercetin arasındaki çizilen kalibrasyon eğrilerinin ortalama molar absorptivitesi $\epsilon = 1,03 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bulunmuştur. Çizilen kalibrasyon eğrilerinin x eksenini kestiği noktadaki quercetin konsantrasyonu başlangıçta alınan Ce(IV) konsantrasyonuna ekivalenttir ve elde edilen sonuçlarda 1 mol quercetin için yaklaşık 20 mol Ce(IV) ile reaksiyona girdiği bulunmuştur. Quercetin ve seryumun mol oranını bulmak için, ayrıca uygulanan spektrofotometrik titrasyon yöntemiyle de aynı oran (1:20) bulunmuştur.

Farklı Ce(IV) başlangıç derişimleri için absorbans ve quercetin konsantrasyonları arasında çizilen eğrilerin eğimleri birbirine paralel ve eşit bulunmuştur. Bu incelemeler geliştirilen metodun molar absorptivitesinin Ce(IV)'ün başlangıç konsantrasyonuna bağlı olmadığını göstermiştir.

Geliştirilen spektrofotometrik yönetim için verilen işlem basamakları sırasıyla takip edilerek **trolox, askorbik asid, kateşin, gallik asid, naringin ve narigenin** içinde uygulandı. Her bir bileşiğin trolox eşdeğerliği hesaplandı. Bulunan sonuçlar, $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radikal yöntemiyle bulunan TEAC değerleriyle karşılaştırıldı. Askorbik asit ve trolox arasındaki 1: 1 oran bulundu. Diğer flavonoidlerden, naringin ve naringenin TEAC değerleri literatüre göre daha büyük bulundu. Bunun sebebinin ortamın asitliğinin yüksek olması, bu iki flavonoidin hidrolize uğramış olabileceğini göstermektedir.

Bu çalışmanın ikinci kısmında ise, flavonoidlerin, Ce(IV) ile reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III)'ün emisyon değerlerinin ölçülmesine dayanan spektrofotometrik bir yöntem kullanıldı. Ce(IV) floresans özelliğe sahip değil iken Ce(III) floresans özelliğe sahiptir. Böylece Ce(IV)'ün flavonoidler ile reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III)'ün emisyon değerleri okunarak direkt olarak toplam flavonoid miktarı tayini yapıldı. Floresan türleri (Ce(III)), 260 nm de uyarılır 360 nm de emisyon yapar. $3,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ sabit Ce(IV) çözeltilerine gittikçe artan miktarlarda ($2,06 \times 10^{-6} \text{ M}$ – $2,605 \times 10^{-5} \text{ M}$) quercetin çözeltileri ilave edilerek, emisyon ve quercetin konsantrasyonu arasında kalibrasyon eğrisi çizildi. Kalibrasyon grafiğinden Ce(IV) ile quercetin arasındaki reaksiyonun yaklaşık 1: 20 oranında olduğu bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemler gerçek örneklerle uygulandı. Bunun için karadeniz bölgesinden toplanan ısırgan otuna, analiz yöntemlerinde belirtilen prosedür uygulandı. Ayrıca sulu ısırgan otu ekstraktına $\text{ABTS}^{+\cdot}$ radikal yöntemi de uygulandı. Geliştirilen metodlarla elde edilen sonuçlara ve standart yöntem ile elde edilen sonuçlara t- ve F-testleri uygulandı. Isırgan otu için yapılan istatistiksel değerlendirmeler, her iki yöntemde ortalamalar ve standart sapmalar açısından anlamlı bir fark olmadığını gösterdi.

Sonuç olarak sağlığımız için önemli olan antioksidan bileşiklerin tayini için uygulaması kolay, deney süresi kısa, hassasiyeti yüksek, masrafsız, uçucu organik çözücüler ve ekstraksiyon gibi işlemler ve gelişmiş aletler gerektirmeyen indirek bir yöntem geliştirilmiştir. Ayrıca reaksiyon sonucu oluşan ürünün floresans özelliğinden yararlanarak florometrik bir yöntem de önerilmiştir. Spektrofotometrik yöntemlerin en temel avantajı absorpsiyon spektrofotometrik yöntemlere göre daha hassas olmasıdır.

THE DETERMATION OF TOTAL FLAVONOID AMOUNT BY A MODIFIED SPECTROPHOTOMETRIC METHOD

SUMMARY

Antioxidants are vital in combating the free radicals which damage the cells in our bodies and an imbalance of free radicals causes oxidative stress which can cause grave disturbances in cell metabolism such as DNA and protein damage, lipid peroxidation, cancer, atherosclerosis, ageing, inflammatory activities. Sources of free radicals include metabolism by-products, neutrophils, UV radiation, pollution, fatty foods, chemicals, cigarette smoke. Prooxidants which damage the cells in our bodies are reduced and transformed non-toxic products and lipid peroxidation can be prevented or delayed by antioxidants.

Plants contain a wide variety of free radical scavenging natural antioxidants such as flavonoids, antocyanins, carotenoids, vitamins(ascorbic acid; C vitamini, α -tokoferol; E-vitamin) There are a lot of natural antioxidants in medicinal plants, various fruit, vegetables and grains. Natural antioxidants are increasing attention and flavonoids are some of the powerful and effective antioxidant compounds found in plants. We are unable to produce flavonoid ourselves, so we must get them from the food.

The purpose of this study is to develop a method which is simple for analyzing flavonoids from natural antioxidants that are important for human health and nutrients and with high repeatability with less number of reaction, applicable by cheap and non-specific equipments.

The maximum absorbance value of Ce (IV) at the wave length of 320 nm in acidic medium decreases during the reaction of Ce (IV) with flavonoids. Thus, the total amount of flavonoid can be calculated indirectly depending on the decreased absorbance value. Besides, a spectrofluorometric method of which precision is quite high has been proposed. This method depends on the fluorescence properties of Ce(III) ion obtained by the reduction of Ce(IV) ion with flavonoids.

Pre-experimental studies involved the determination of acid concentration (0,3 M) of the reaction to obtain the wave length (320 nm) at which maximum absorbance occurs for the reaction between Ce(IV) and quercetin, and also the determination of reaction time (30 minutes). Quercetin was used to process a calibration graphic. Calibration curve was drawn by adding different amount of quercetin (2.12×10^{-6} - 8.48×10^{-6}) to 2.0×10^{-4} M Ce(IV) solutions. Absorbance value is given below;

$$A_{320} = 0,985 - 103491 C_{\text{quercetin}} \quad (R^2 = 0,9987)$$

Calibration procedures were repeated six times to find out reproducibility of the reaction between quercetin and Ce(IV). The average molar absorptivity of the curve of Ce(IV) and quercetin was found as $\epsilon=103 \times 10^5$. The intersection point at X axis of the calibration curve confirmed the initial Ce(IV) concentration. The result show that mole ratio of quercetin to Ce(IV) was 1:20. A spectrophotometric titration was also used for the investigation of the mol ratio of quercetin an Ce(IV), and tha same result was found as 1:20.

The slope of curves were found to be equal and parallel to each other. This result showed that initial Ce(IV) concentration is not related to the molar absorbtivity of the proposed method.

All the process steps of the proposed spectrophotometric method were applied in same way to the **trolox, ascorbic acid, catechin, gallic acid, naringin and naringenin**. Tralox equivalency of each compound were calculated and the results were compared with the TEAC values which were found by the $ABTS^{\cdot+}$ radical method. The mol ratio between ascorbic acid and trolox were determined as 1:1. TEAC values of naringin and naringenin were found to be high compare to literature value. It was concluded that this difference might be due to the hydrolysis phenomenon of flavonoids in question in the largely acidic media.

In the second part of this study, spectrofluorometric method which is based on measuring the emission of Ce(III) that appears as a result of the reduction reaction between flavonoids and Ce(IV) ions which is non-fluorescent. Thus, total flavonoid amount was possible to calculate by measuring the fluorescence intensity of the Ce(III). The fluorescent species (Ce(III)), have excitation and emission at 260 nm and 360 nm, respectively. By adding increasing quercetin solutions ($2,06 \times 10^{-6}$ M - $2,605 \times 10^{-5}$ M) to the constant $3,3 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) solutions, the calibration cure was drawn between emission intensity and quercetin concentration. The change in fluorescence intensity against concentration of quercetin was linear. It is also found that the reaction between Ce(IV) and quercetin is nearly 1:20.

The developed methods were applied to the real samples. For this process, the nettle samples which were collected from the Black Sea Region were used. The extract of nettle sample was also tried with $ABTS^{\cdot+}$ radikal method. For the nettle, F- and t-tests applied to the experimental results of two methods showed that no significant difference existed.

As a result, for the determination of antioxidant compounds that are important for human health, an indirect method which is easily applicable, with short experiment time, cheap, with high sensitive and it does not need sophisticated equipments and process like extraction and volatile organic solvents was developed. Besides, fluorescence properties of Ce(III) ion gave the possibility to improve the spectrofluorometric method for the determination of flavonoids. The main advantage of the spectrofluorometric methods is that they are more sensitive than absorption spectrophotometric methods.

1. GİRİŞ

Antioksidanlar, uzun yaşamayı ve sağlıklı kalmamızı sağlayan ve vücut hücreleri tarafından üretildiği gibi gıdalarla da alınan bir grup kimyasal maddelerdir. Antioksidanlar, kendileri de yükseltgenebilen maddeler olup serbest radikal zincirleme reaksiyonunu kırıcı rol oynarlar. Kişiler antioksidan içeren yiyeceklerle beslenerek serbest radikallerin zararlarını azaltabilirler.

Serbest radikaller yüksek aktiviteye sahip bileşiklerdir. Kararlı değildirler ve hemen başka moleküllerle reaksiyona girerler. Kirli havada, sigara dumanında, radyasyonda, bitki koruma ilaçlarında, bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında bulunurlar. Serbest radikallerin vücuttaki hücrelere saldırması pek çok hastalığa sebep olmaktadır. Dokularda oluşan zararın, damar sertliği ve kalp hastalıklarını başlıca nedeni olduğu düşünülmektedir [1, 2]. Serbest radikaller aynı zamanda, hücrelerin genetik kodunu içinde taşıyan; hücrenin üretimini ve büyümesini sağlayan DNA de etki eder. Bunun sonucunda hücre ölümlerinin artmasıyla erken yaşlanmaya, öte yandan hücrelerin değişimine neden olması da kanser ve benzeri hastalıkları destekleyen hücre dizinlerinin oluşumuna neden olur [1].

Vücudumuz serbest radikalleri tanıyan ve etkisiz hale getiren bir sisteme sahiptir. Bu sistem enzimler ile antioksidan olan pek çok vitamin ve mineralleri içerir. Antioksidan sistem, serbest radikalleri hücre zarına, DNA ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çeker ve bağlar. Bu yolla antioksidan gıdalar, kalp hastalıklarına, kalp krizine, kansere ve erken yaşlanmaya karşı etkili bir koruyucu olarak görev yaparlar.

Bitkisel dokularda bol miktarda bulunan flavonoid, tokoferol, askorbik asit ve karotenoidler fenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır. Doğal antioksidanlar içersinde önemli bir yer teşkileden flavonoidler ise bitkilerde bol miktarda bulunmaktadır.

Flavonoidler; bitkilerde fotosentez sonucu oluşan çeşitli bileşiklerin genel adıdır. Flavonoid molekülleri polifenolik yapıdadır ve çoğunlukla bitkinin yaprağında ve meyvesin de bulunur. Flavonoidler, bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi önemli özelliklere sahiptir [3].

Son yıllarda, flavonoidlerin endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılması için yürütülen araştırmaların sayısı artmaktadır. Bu bileşiklerin, antioksidan özellikleri, çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri, metallerle tepkimede bulunması gibi özelliklerinden dolayı besin, tekstil, deri, metallurji, tıp, ziraat ve benzer alanlarda kullanılma olasılıkları artmaktadır. Bazı flavonoidlerin, UV-ışınlarından koruma özelliklerine sahip olmaları sebebiyle kozmetik ürünlerde, özellikle kremlerde önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip olan flavonoidlerin sentetik üretimi günümüzde gerçekleşemediğinden dolayı, elde edilmeleri için flavonoidli bitkiler kullanılır. Bu nedenle yeni flavonoidlerin elde edilmesi ve kullanım alanlarının genişletilmesi güncel ve önemli konulardandır.

Günümüzde şifalı bitkilerin sağlık ve gıda sektöründe kullanımının artmasından dolayı bu bitkiler içerisinde bol miktarda bulunan doğal antioksidanların incelenmesi merak konusu olmuştur. Bitki ekstraktlarının kolay elde edilebilir ve maliyetinin düşük olması endüstrideki kullanım alanlarını da genişletmektedir. Örneğin, halk arasında prostat, kanser tedavilerinde ve romatizma hastalıklarına karşı çay olarak kullanılan ısırgan otu, yine bu hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçlarda da yer almaktadır. Flavonoidlerin bitkiler içerisinde bol miktarda bulunmasından dolayı bitki ekstraktları içerisindeki toplam flavonoid miktarı belirlenmesi amacı ile basit bir analiz yöntemi geliştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemde, quercetin, konsantrasyonu bilinen Ce(IV) çözeltisi ile reaksiyona sokulur ve artan Ce(IV)'ün 320 nm de absorpsiyon değeri okunur. Başlangıçtaki Ce(IV) absorpsiyonundaki düşüş hesaplanarak indirekt olarak toplam flavonoid miktarı hesaplanır.

Çalışmanın diğer kısmında ise Ce(IV)'ün flavonoidler ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan Ce(III)'ün emisyonun, spektrofotometreyle ölçümüne dayanmaktadır. Ce(IV) floresans özellik göstermemesine karşılık Ce(III) floresans özellik gösterir.

Ce(IV)'ün tamamen bittiği anda Ce(III)'ün emisyon değerlerindeki artış durur ve bu noktadaki Ce(IV) konsantrasyonu belirlenerek bitki ekstraktları içindeki toplam flavonoid miktarı hesaplanır.

Sonuç olarak bu çalışma kapsamında önemli bir doğal antioksidan olan flavonoidlerin bitki ekstraktları içindeki toplam flavonoid miktar analizi için basit, hassas, ucuz ve uygulanması kolay bir yöntem geliştirilmiştir.

2. GENEL BÖLÜM

2.1. ANTİOKSİDANLAR

Antioksidanlar vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalarla da alınan ve oksidasyona bağlı olarak oluşan lezzet bozulmasını veya gıdadaki acılaşmayı geciktirebilecek, önleyebilecek özellikteki bir grup kimyasal maddedir.

Antioksidanlar sadece gıdaların son kullanma tarihlerini uzatmakla kalmaz aynı zamanda uzun yaşamayı ve sağlıklı kalmamızı da sağlar. Oksidatif stres, kendini çeşitli kalp damar patolojileri (arterioskleroz ve hipertansiyon), diyabet, hücre yıpranması ve yaşlanma, kıkırdak iltihabından gelen patoloji, solunum yolu hastalıkları, Down sendromu ve kanser gibi çeşitli insan hastalıklarında hissettirir [1]. Oksidatif strese karşı günümüzde tıp alanında büyük ölçüde gerek hastaların ve gerekse sağlıklı insanların diyetlerinin koruyucu ve tedavi edici hekimlik bağlamında doğal ve yapay antioksidanlarla takviye edilmesini gerekli kılmaktadır.

Antioksidanların öyküsü serbest radikallerle başlar. Serbest radikaller ve reaktif karakterli maddeler ile bu maddeleri üreten tüm faktörler ‘oksidan’ veya ‘prooksidan’ olarak tanımlanır. Orbitallerinde bir yada daha fazla çiftlenmemiş elektron taşıyan halojen atomlar (Cl ve Br), hidrojen atomu, Na, K gibi alkali metal atomları ve oksijenin redüksiyon ara ürünleri, süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil ($OH^\cdot$) gibi bağımsız, kısa ömürlü, reaktif atomlar serbest radikal olarak tanımlanmaktadır [4]. Antioksidanlar, yükseltgenebilen bileşiklere göre daha düşük konsantrasyonlarda, bileşiklerin prooksidanlarla başlatılan oksidasyonunu ciddi ölçüde engelleyen ya da geciktiren maddelerdir. Prooksidanlar (serbest radikaller ve reaktif oksijen ve azot türleri) ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlere oksidatif hasar oluşturabilen ve bunun sonucunda patolojik olaylara ve hastalıklara yol açabilen toksik (zehirli) maddelerdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren prooksidanları etkinlikle indirgeyerek toksik olmayan ürünlere dönüştürürler.

Oksidatif stres (gerginlik); oksidatif lezyonlara, doku hasarına, mutasyonlara ve hücre ölümüne yol açabilen reaktif oksijen ve reaktif azot türlerinin yani serbest

radikallerin aşırı üretimiyle tetiklenir. Serbest radikaller, kirli havalarda, sigara dumanında, radyasyonda, bitki koruma ilaçlarında, bozulmuş gıdalarda ve normal vücut metabolizmasında bulunurlar. Serbest radikaller aynı zamanda; hücrelerin genetik kodunu içinde taşıyan nükleik asitlere (DNA) de etki eder. Hücrelerin genetik kodları değiştiğinde ölebilirler, çünkü ana hücreden gelen mesajı uzun süreli olarak okuyamazlar. Aşırı hücre ölümü erken yaşlanmaya yol açar ve öte yandan hücreler değişime uğrar, kanser ve benzeri hastalıkları destekleyen hücre grupları oluşur [1]. Dokulardaki hücre yaşlanması; serbest radikallerin zararları sonucu dokuların erken yaşlanması ile oluşan hücre kalıntılarının çoğalmasındır [5]. Serbest radikaller pankreasta yoğunlaşırsa şeker hastalığına, gözde katarakta, kanda ise kalp ve dolaşım sistemi hastalıklarına sebep olur.

Vücudumuz serbest radikalleri tanıyan ve etkisiz hale getiren bir sisteme sahiptir. Bu sistem enzimler ile antioksidan olan pek çok vitamin ve minerali içerir. Gıdalarda da dış tesirler sonucu meydana gelen serbest radikallere karşı koymak üzere vazifelendirilmiş moleküllerde bulunmaktadır. İşte bu savunma moleküllerine **‘antioksidan’** denilir. Antioksidan sistem; serbest radikalleri hücre zarına, nükleik asitlere (DNA) ve hücre bileşenlerine saldırmadan kendine çeker ve bağlar. Bu yolla antioksidan gıdalar, kalp hastalıklarına, kalp krizine, kansere, erken yaşlanmaya karşı koruyucu, gıdalardaki acılaşmayı önleyici ve raf ömrünü uzatıcı maddeler olarak görev yaparlar.

Antioksidanlar, yağların oksidasyonunu önlemekte veya yavaşlamakta vazifeli moleküller olarak da tanımlanır. Yağa veya yağlı gıdalara ilave edildiklerinde, acılaşma olarak bilinen bozulma olayı asgariye indirilir. Ayrıca zehirli (toksik) oksidasyon ürünlerinin oluşmasını engellemede ve gıdanın besin kalitesinin muhafaza edilmesinde rolleri vardır. Böylece raf ömrü diye adlandırılan dayanma süresinin uzamasına katkıda bulunurlar. Gıdalardaki antioksidanların tesirleri, serbest radikal oluşmasını engelleyici veya var olan serbest radikalleri tesirsiz hale getirici bir özellikte olmalarından kaynaklanır.

2.2. ANTİOKSİDANLARIN KİMYASAL BİLEŞİMLERİNE GÖRE SINIFLANDIRILMASI [6]

2.2.1. Fenolik Yapıdaki Antioksidanlar

Antioksidanların en önemlileri, fenol grubu içerenler veya bunların hidroksi türevleridir. Bu bileşikler hidrokinon olup tersinir olarak kinona yükseltgenirler. Fenolün kendisi antioksidan özelliğe sahip değilken yer değişimli benzenler, birden fazla benzen halkası içeren aromatik bileşikler veya heterosiklik bileşiklerin yapıları orto ve para bileşiklerine benziyorsa antioksidan etki gösterebilirler. Örneğin, flavonoidlerden flavon, flavonol ve flavanonlar, bitkisel dokularda bulunan fenolik bileşiklerdir ve doğal antioksidanlardır. Susam yağında bulunan sesamol bir tek serbest hidroksi grubu olduğu halde, bu grup, oksijenlerden birine göre para durumunda olduğundan antioksidandır. Doğal fenollü antioksidanların bir diğer grubu tokoferollerdir. Antioksidan özelliği en yüksek olan δ -tokoferoldür. Hidrokafeik asid, tanenler, ve şekerlerle birleşmiş mono ve digallik asitler fenolik yapıdaki antioksidan gruba girmektedir.

Sentetik antioksidanlardan propilgallat, dodesil galat, norhidroguyaretik asit (NDGA) ve bütillenmiş hidroksianisol (BHA) da fenolik yapıdadır.

2.2.2. Aromatik Amino Antioksidanlar ve Organik Sülfür Bileşikleri

Aromatik amino antioksidanlar da genellikle fenollü antioksidanlara benzerler, yalnız hidroksi grupları kısmen veya tamamen amino grupları ile yerlerini değiştirmişlerdir.

Kuvvetli antioksidanlardan olan kükürtlü organik bileşikler fenolik yapıda olmayan antioksidanlardır. Örnek verecek olursak β - β^I ditiyo propiyonik asit ve esterleri özellikle dilauril ve distearil ditiyopropiyanatlar bu grupta yer almaktadır.

2.3. ANTİOKSİDANLARIN ETKİ MEKANİZMALARINA GÖRE SINIFLANDIRILMASI

Bir maddenin potansiyel bir antioksidan olarak kabul edilebilmesi için gerekli olan önemli kriterler şunlardır:

- Radikal temizleme kapasitesi,
- Metal şelasyonu yapabilme özelliği,

- Amfifilik karakter,
- Biyoyararlanım ve güvenlik,
- Diğer antioksidanlar ile etkileşim,
- Metabolik rejenerasyon yeteneğidir.

Antioksidanlar kendileri de genellikle yükseltgene bilen maddeler olup, bu nedenle zincirleme reaksiyonu koparıcı rolü oynamaktadırlar. Bu şekilde otookside olabilen bir maddenin yükseltgeme reaksiyonunu da yavaşlatırlar. Ancak antioksidanların kendileri de yükseltgenerek bozundukları için yalnız sınırlı bir zaman için koruma rolünü gerçekleştirebilirler ve tüm antioksidan molekülleri kaybolunca madde de ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder.

UV ışığının etkisi sonucunda, lipidler ile oksijen arasında 'otooksidasyon' adı verilen serbest radikal zincir reaksiyonu oluşmaktadır. Başlangıç reaksiyonunda serbest radikaller şekillenmekte, reaksiyonun ilerleme aşamasında serbest radikaller daha kararlı radikallere dönüşmektedir. Başlangıç reaksiyonu için aktivasyon enerjisi gereklidir. Bu enerji ise reaksiyonu teşvik eden proooksidan etkenler tarafından sağlanır [7]. Ancak antioksidanların halkalı yapılarından dolayı, oluşan antioksidan radikalinin reaktivitesi düşüktür ve yeni reaksiyon zincirlerini başlatamazlar. Eğer serbest radikal miktarı artmaya devam ederse, tüm antioksidan reaksiyona girecek ve oksidasyon herhangi bir engel olmadan gelişecektir. Bundan dolayı belirli bir sınır için de antioksidan miktarının artması koruma özelliğini de artırmaktadır. Bununla birlikte belirli bir noktadan sonra katılan antioksidanların etkisi azalmaya başlar. Bu durum belki de antioksidanın kendisinin zincirleme reaksiyona girmeksizin yükseltgene bilmesinden ileri gelmektedir.

Antioksidanları etki mekanizmalarına göre iki grup altında toplayabiliriz.

2.3.1. Primer Antioksidanlar

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

Otooksidasyon reaksiyonları üzerinde, antioksidan konsantrasyonunun etkisi pek çok faktöre bağlıdır. Antioksidanların yapısı, oksidasyon koşulları, oksidasyona uğramış yapıdaki değişimler sayılabilir. Fenolik antioksidanların, antioksidan aktivitesi yüksek konsantrasyonlarda etkinliğini yitirmektedir. Bunlar prooksidan yapı kazanmaktadır.

2.3.2. Seconder Antioksidanlar

Oksidasyon hızını azaltan bileşiklerdir. Etki mekanizmaları, metal iyonlarını yakalamak, oksijen molekülünü tutmak, hidroperoksitleri radikal olmayan bileşiklere parçalamak, ultraviyole ışınlarını absorblamak veya oksijen atomunu etkisiz hale getirmek şeklinde olabilir. İkincil antioksidanların diğer adı ile antioksidan sinerjistleridir. Antioksidanların sinerjist etkileri, ortamda bulunan diğer primer antioksidanlara bağlıdır. Ortamda primer antioksidanlar bulunmadığı durumlarda antioksidan aktiviteleri çok düşüktür veya antioksidan aktivite göstermezler. Askorbik asit, ortamda tokoferollerin yada diğer fenolik maddelerin bulunması ile sinerjist etki gösterirler [8]. Askorbik asit (C vitamini), β - karoten, amino asitler ve fosfolipidler en önemli seconder antioksidanlardandır.

2.4. SENTETİK ANTİOKSİDANLAR VE ÖZELLİKLERİ

2.4.1. BHA

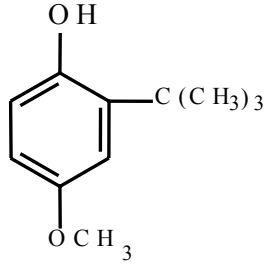
Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), hayvansal ve bitkisel yağlarda yüksek oranda çözülebilen çok etkili bir sentetik antioksidandır. BHA' nın etkisi, hayvansal yağlardaki performansına kıyasla bitkisel yağlarda daha etkisizdir. Bunun nedeni, bitkisel yağlardaki önemli miktardaki doğal tokoferol içeriğidir. BHA'nın diğer önemli bir özelliği ise, BHT ve galat esterleri ile sinerjik etki oluşturmaktadır. Gıdalarda kullanımı %0,02 olarak kısıtlanmıştır.

2.4.2. BHT

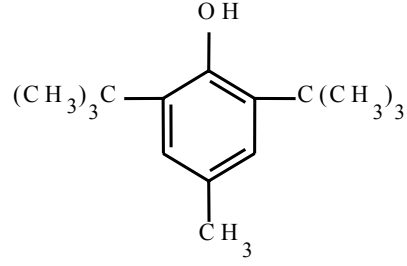
Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), hayvansal yağlarda çok etkilidir ama aynı durum bitkisel yağlar için geçerli değildir. BHT, BHA ile aynı özelliklere sahip olmasına karşın gıda işlem proseslerinde yüksek sıcaklıklara dayanma kapasitesi BHA kadar iyi değildir. Gıdalarda kullanımı %0,02 oranındadır.

2.4.3 TBHQ

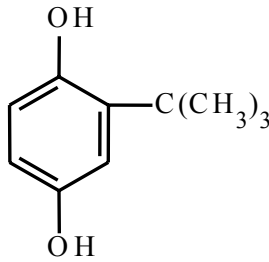
Tersiyer bütıl hidrokinon (TBHQ), bitkisel yağlar için en etkili antioksidanlardandır. Yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır ve BHA ve BHT'den daha az uçucudur. Amerika'da kullanımına izin verilmesine karşın Avrupa Birliği ülkelerinde kullanımı yasaklanmıştır. Gıdalarda kullanımı %0,02 oranında katılır.



Bütillenmiş hidroksianisol
(BHA)



Bütillenmiş hidroksitoluen
(BHT)



Tersiyer bütıl hidrokinon
(TBHQ)

Şekil 2.1. Sentetik Antioksidanlar

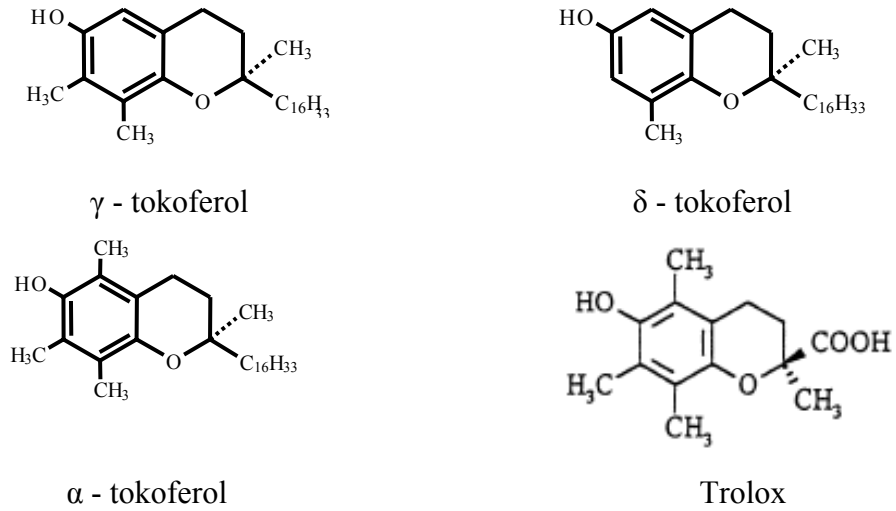
2.5. DOĞAL ANTIOKSİDANLAR [8]

Gıdalarda mevcut ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar; esas olarak vitaminler (özellikle askorbik asit: C-vitami ve α-tokoferol: E-vitami), karotenoidler (A-vitami), flavonoidler, oligomerik proantosiyanidin gruplarının da içinde bulunduğu polifenoller ve glutatyon, N-asetilsistein türü protein ve aminoasid bileşikler, olarak sınıflandırabiliriz. Bunlar çeşitli sebze, meyve ve tahıllarda ve şifalı bitkilerde (portakal, yabanmersini, böğürtlen,soğan, arı reçinesi, yeşil çay, biberiye, ısırgan otu) bolca bulunurlar.

Bitkisel dokularda bulunan tokoferol, askorbik asit, karotenoid ve flavonoidler fenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır.

2.5.1. Tokoferoller

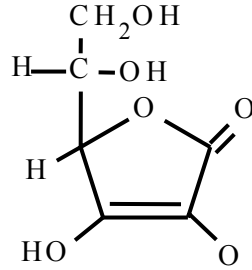
Doğada, E vitamini aktivitesine sahip 8 çeşit tokoferol bulunmaktadır. Monofenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır. Tokoferoller iki yerinde izoprenoid zincir taşıyan C-6 hidroksi kroman trüvleri olup, birbirlerinden C-5., C-7., C-8. yerlerindeki değişimleri ile ayrılır. Bunlardan en önemlisi α - tokoferoldür. Hayvansal kaynaklı besinlerde az miktarda bulunmalarına karşın bitkisel kaynaklı besinlerde bol miktarda bulunur. Bezelye, fasulye, havuç gibi sebzeler, tahıl ve tahıl ürünleri zengin tokoferol kaynaklarıdır. α - tokoferollün suda çözünen analogu olan Trolox'da toplam antioksidan ölçme yöntemlerinde sıkça kullanılan doğal antioksidanlardır. Tokoferollerin en önemlileri ve Trolox şekil 2.2' de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Tokoferollerin yapısal formülleri ve Trolox

2.5.2. L-Askorbik Asit

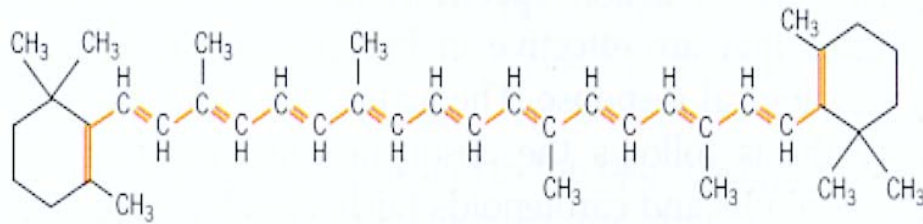
Askorbik asit (C vitamini), doğada pek çok bitkisel ve hayvansal kaynaklı besinlerde bulunan doğal bir antioksidandır (şekil 2.3). Doğal kaynaklardan ekstraksiyon ile elde edilebildikleri gibi kimyasal olarak da sentezlenebilirler.



Şekil 2.3. L-Askorbik Asit

2.5.3. Karotenoidler

Yağda çözünebilir doğal antioksidanlardır ve doğada 500'den fazla çeşidi bulunmaktadır. En yaygın olarak kullanılanı da, A vitaminin de kaynağını oluşturan β - karotendir (şekil 2.4).



Şekil 2.4. β - Karoten

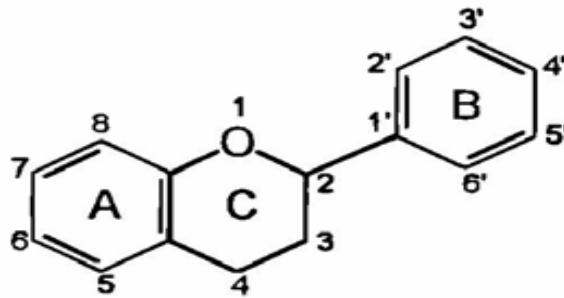
2.5.4. Flavonoidler [9]

Bitkilerin sekonder metabolitleri arasında biyolojik etkilerinden dolayı en önemli bileşik sınıflarından birisi flavonoidlerdir. Bu bileşiklere bitkilerin tüm organlarında rastlanır. Günümüze kadar bitkilerden 6000'den fazla flavonoid özellikli bileşik bulunmuştur.

2.5.4.1. Flavonoidlerin Yapı Özellikleri ve Sınıflandırılması

Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının (A ve B) propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ($C_6 - C_3 - C_6$) yapısı teşkil eder. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması nedeniyle, flavonoidler alt sınıflara ayrılır.

- Fenil gruplarının propan zincirine 1,3- pozisyonunda bağlanmasından oluşan ve 1,3- difenilpropan iskeleti içeren bileşikler **kalkonoidlerdir**. Bunların en basit üyesi kalkondur.
- 1,3- difenilpropan yapısındaki propan zinciri, oksijen atomu üzerinden, fenil halkası ile birleşerek, beş veya altı üyeli heterosiklik üçüncü bir halka oluşturabilir. Böylece trisiklik bir sistem meydana gelir. Beş üyeli hetero halkanın oluşmasıyla meydana gelen trisiklik yapıya auron, türevlerine ise **auronoidler** denir.
- Altı üyeli, hetero halkanın oluşması ile meydana gelen trisiklik sistem ise, hetero halkanın yükseltgenme derecesine bağlı olarak, iki farklı yapıda bulunabilir. Bunlardan birisi **flavon**, diğeri ise **flavandır**. Genellikle flavon türevlerine **flavonoidler**, flavan türevlerine ise **flavanoidler** denir. Flavan ve flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C ile gösterilir. A ve C halkalarındaki karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. B halkasındaki atomlar ise, üssü (') rakamlarla numaralandırılır. Şekil 2.5.'de flavonoidlerin genel yapısı gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Flavonoidlerin genel yapısı

Kalkon, auron, flavan ve flavon türevleri 1,3-difenilpropan iskeleti içeren bileşiklerdir.

- Fenil gruplarının propan zincirine 1,2- pozisyonlarında bağlanmasıyla 1,2 -difenilpropan iskeleti oluşur. 1,2 -difenilpropan iskeletinde, propan zincirinin uçtaki karbon atomunun (C₃) oksijen atomu üzerinden aromatik halka ile siklikleşmesi sonucu oluşan hetero halkalı trisiklik yapıya **izoflavonoidler** denir.

- Fenil gruplarının difenilpropan iskeletine 1,1-pozisyonlarında bağlanmasından oluşan ve 1,1-difenilpropan iskeleti içeren bileşikler sınıfına ise **neoflavonoidler** denir.
- Çeşitli doğal kaynaklardan izole edilerek kimyasal yapıları belirlenen bir diğer flavonoid bileşiğide **antosiyanidinler**dir. Antosiyanidinlerin sınıflandırılmasında, flavilyum katyonunu özellikleri ve yapısındaki substituentlerin pozisyonları gözönünde bulundurulur. Antosiyanidinler doğada yaygın değildir fakat antosiyanidinlerin glikozitleri (antosiyaninler) bitki aleminde çok yaygındır.

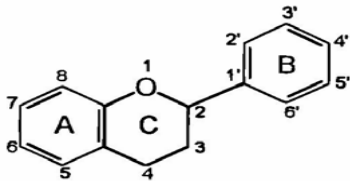
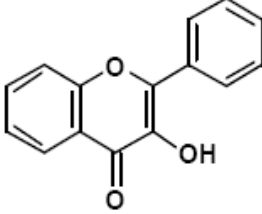
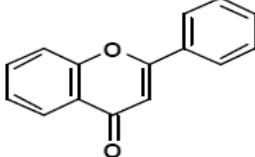
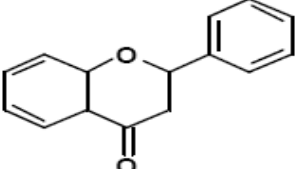
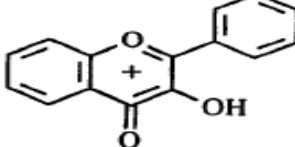
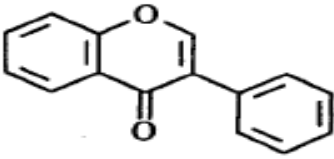
Cyanidin, delphinidin ve pelargonidin glikozitleri bitki aleminde çok yaygın olan türleridir.

Difenilpropan iskeleti içeren doğal bileşikler, fenil gruplarının propan zincirine bağlanma pozisyonlarına göre flavonoid, izoflavonoid ve neoflavonoidler olmak üzere 3 ana grup altında toplanırlar ve bu grupların her biride çeşitli alt sınıflara ayrılırlar. Hetero halkanın yükseltgenme derecesi flavonoidlerin alt sınıflarını belirleyen bir göstergedir. C₃- sisteminin yükseltgenme derecesine bağlı olarak, bilinen flavonoid türleri ve bitkilerde yaygın olan örnekleri tablo 2.1.'de verilmiştir.

Flavonoidlerden; flavanonlar, flavanonoller, flavan-3-oller, flavan-3,4-dioller 2-fenilbenzopiran iskeleti içerirler ve flavan türevleridir. Kalkanoid, dihidrokalkonoid ve auronoidler ise 2-fenilkroman iskeleti içermediklerinden, gerçekte flavonoid değildirler. Ancak bu bileşikler kimyasal yapı ve biyosentetik yönden flavonoidlere benzer olduklarından flavonoidler sınıfına dahil edilirler.

Flavonoidlerin yapı çeşitliği, yalnız difenilpropan iskeletinin farklı yapılarda düzenlenme özelliği ile sınırlı değildir. Molekölün aromatik (A ve B) halkalarına bağlanan substituentlerin (hidroksil grupları, metil grupları ve mono-, di- ve trisakkaritlerle glikozlanmış grupların) sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonları flavonoidlerin yapı çeşitliliğine sebep olur.

Tablo 2.1. Flavonoid Türleri ve onların gıda kaynakları

Flavonoid Türleri	Flavonoidlerin Şekilleri	OH ve Glikoz Gruplarının Pozisyonları	Gıda Kaynakları
Flavanol			
Kateşin		3,5,7,3',4' -OH	Çay
Toxifolin		3,5,7,3',4' -OH	
Flavonol			
Quercetin		3,5,7,3',4' -OH	Soğan,
Kaemferol		3,5,7,4' -OH	Elma,
myricetin		3,5,7,3',4',5' -OH	Çay,
			ısırgan otu
Flavon			
Apigenin		5,7,4' -OH	Elma
Luteolin		5,7,3',4' -OH	kabuğu,
			Kereviz
Flavanon			
Naringenin		5,7,4' -OH	Turunçgiller,
Naringin		5,4' -OH (7-amnoglukozit)	Greyfurt
Hesperidin		5,3' -OH (4' -CH ₃ , 7-ramnoglukozit)	
Antosiyanidin			
Siyanidin		3,5,7,3',4' -OH	Üzümsü meyveler
İsoflavon			
Genistein		5,7,4' -OH	Soya
Daidzein		7,4' -OH	fasülyesi

2.5.4.2. Flavonoidlerin Antioksidatif Etkileri

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda organik bileşiklerin serbest radikal mekanizmalı oksidasyonunu önleyen bileşiklerdir.

Son zamanlarda besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitki kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmaktadır. Bunun nedeni, sentetik antioksidanların (BHA, BHT gibi) kanserojen olarak düşünülmesidir [10]. Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için genellikle zararsız olup yan etki göstermezler. Doğal antioksidanlar gıda sanayinde besinlerin bozulmasını engellemek, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasına, besin rengini korumak için kullanılan önemli katkı maddeleridir. Doğal flavonoidlerin antioksidatif özelliklerinden dolayı onlara karşı ilgi de gittikçe artmaktadır.

Aktif oksijen formları olan süper oksit ($O_2^{\cdot -}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($HO^{\cdot}$) normal metabolizmanın yan ürünleridir ve oksidatif baskı sırasında biyolejik moleküllere hücum ederek, hücre ve dokuların hasar görmesine neden olurlar. Aktif oksijen formları ve diğer serbest radikallerin çeşitli hastalıklarda doku zedelenmelerine neden oldukları tespit edilmiştir [11]. Son zamanlarda yürütülen araştırmalar da, bazı flavonoidlerin superoksit [12], ve hidroksil radikallerini ortadan kaldırdığını [13], lipid peroksil radikallerini indirgediğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır [14, 15].

Javanovic ve arkadaşları, flavonoid radikallerinin indirgenme potansiyalleri alkil peroksil ve superoksit radikallerinin indirgenme potansiyallerine göre daha düşüktür. Bu yüzden flavonoidler bu oksit türlerini deaktive eder ve reaksiyonlarının verebileceği zararlı sonuçları önlerler [14].

Ruch ve arkadaşları, yeşil çayın antioksidan ve antikarsinojenik etkileri ile ilgili olarak, çay bileşenlerinin (kateşinlerin) aktif oksijen formları, hidrojen peroksit ve superoksite karşı antioksidatif aktivite gösterdiği, oksijen radikalleri ve hidrojen peroksitin neden oldukları sitotoksikliği ve hücre kültürlerinde hücreler arası etkilenmeyi önlediği bildirilmiştir [16].

Yen ve Chen, çeşitli çay ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ile antimitojenik etkileri arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çay ekstraktlarının kuvvetli antimitojenik ve antioksidan aktiviteye, indirgeme gücüne (reducing power), aktif oksijen ve

serbest radikalleri ortadan kaldırma (tutma) özelliğine sahip olduklarını kanıtlamışlardır [17].

Haraguchi ve arkadaşları, *polygonum hidropiper* türünden elde edilen flavonoidlerin ferritiyosiyanat yöntemi ile antioksidan aktiviteleri ölçülmüştür. Antioksidan aktivitelerine göre şu şekilde sıralanmıştır :

isoquercetin > 7,4'-O-dimetilquercetin > Quercetin > 3'-O-metilquercetin .

Bu bileşiklerin her birinin doğal antioksidan α – tokoferole göre daha aktif olduğu belirlenmiştir [18].

Peng, Strack ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise kurutulmuş *Polygonum hidropiper* (laksa) bitkisinin yapraklarından kolon kromatografisi ve Prep-HPLC kullanılarak on farklı türde flavonoid bileşiği elde edilmiştir. Bu bileşiklerin antioksidan kapasiteleri (TEAC) ABTS⁺ radikal metodu ve PBN-AI spin trapping metotlarıyla analiz edilmiştir. Analiz yöntemlerinde sırasıyla UV-VİS cihazı ve Elektron spin rezonans (ESR) kullanılmıştır. Analiz edilen flavonoid bileşiklerinden antioksidan kapasitesi en yüksek bileşik galloil quercitrin bulunmuştur (TEAC = 6,14) [19].

Flavonoidlerin yapı özellikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki bağıntı birkaç grup tarafından araştırılmıştır. Flavonoidlerin serbest radikalleri etkili olarak ortadan kaldırması için bazı kimyasal kriterlerin gerekli olduğunu **Bors ve arkadaşları** tarafında açıklanmıştır [20,21].

Flavonoidlerin antioksidan ve metallerle redoks aktiviteye sahip olmaları flavonoidlerin insan sağlığı açısından önemli bir yere getirmektedir. Flavonoidler antioksidan özelliklerinin yanında prooksidan özelliklere de sahiptirler [22]. Flavonoidlerin prooksidan aktiviteleri molekül yapılarındaki hidroksil gruplarının sayısı ile orantılı oldukları düşünülmektedir. Hanasaki ve çalışma arkadaşları mono ve di-hidroksi flavonoidlerin belirlenebilir prooksidan aktivite göstermemelerine karşın özellikle B- halkasında bulunan pek çok sayıdaki hidroksil yapılarının fenton sistemi içinde hidroksil radikal oluşumunu artırmaktadır. Hidroksil (OH) gruplarının glikozitler ve metil moleküllerine dönüşmeleri, flavonoidlerin prooksidan davranışlarını azaltıcı etki gösterir [23]. H₂O₂ ve Fe⁺² arasındaki reaksiyon sonucunda hidroksil radikalleri oluşur. Oluşan bu serbest radikaller ise çevrelerindeki biyomoleküllerin oksidasyonunu sağlar. Bu tip reaksiyonlara fenton reaksiyonları

denir. Canlı metabolizmalarında yüksek reaktivitede hidroksil radikallerinin oluşması, fentom reaksiyonlarının önemli etkenlerindendir. Fentom reaksiyonlarında hidroksil radikal ürünleri, ortamdaki demir(II) ve bakır(II) iyonlarının konsantrasyonlarıyla doğrudan ilişkilidir [11].

Osawa ve Namiki tarafından yapılan çalışmada Okaliptüs yapraklarının antioksidan aktivitesi, tiyosiyanat yöntemiyle spektrofotometrik analizine dayanmaktadır. Linoleik asit emilsiyonu ve 0,2 M Fosfat tamponu içeren etanol karışımı ile antioksidanın 40°C'de inkube edilmesiyle oluşan peroksit iyonları ile FeCl_2 etkileşir. Oluşan Fe^{+3} iyonlarının tiyosiyonatla reaksiyonu sonucu oluşan kompleksin 500 nm'de absorbans değerleri okunur. Bulunan sonuçlara bağlı olarak okaliptüs yapraklarının antioksidan aktivitesi hesaplanmıştır [8].

Cuvelier ve çalışma arkadaşları, biberiye ve adaçayının ticari ekstraktlarının fenolik bileşimleri ve antioksidan aktivitelerini incelemişlerdir. 8 adaçayı ve 24 biberiye ekstraktı metil linoat sisteminde farklı antioksidan aktiviteler göstermiştir. HPLC-MS cihazlarında, ekstraktların bileşimleri incelenmiştir. Fenolik asitleri, karnosol türevleri ve flavonoidleri içeren 22 bileşik bulunmuştur. Ekstraktlar HPLC profillerinde büyük çeşitlikler göstermiştir fakat yapılan çalışmada antioksidan etki ile ilgili bileşim arasında herhangi bir bağlantı bulunamamıştır. En etkili bileşimler karnosol, kafeik asit, rosmanol rosmarinik asitte bulunmuştur [24].

Chang ve arkadaşlarının arı reçinesi içersindeki toplam flavonoid miktarı birbirini tamamlayıcı iki kolorometrik yöntem ile tayin edilmiştir. Bu yöntemlerden aliminyum klorür (AlCl_3) kolorometrik yöntemi ile flavon ve flavonol yapısındaki flavonoidler tayin edilirken 2,4-dinitrofenilhidrazin kolorometrik yönteminde ise flavanon ve flavanol türü flavonoidler tayin edilmiştir. Standart flavonoidlerle kalibrasyon grafikleri çizilip maksimum absorbans yaptığı dalga boyu tespit edilmiştir. Doğal ve ticari arı reçineleri etanol ile ekstrakt edildikten sonra bu ekstraktlara her iki yöntem uygulanarak toplam flavonoid miktarı tayin edilmiştir [25].

2.5.4.3. Literatürdeki Antioksidan Kapasitesi Ölçme Yöntemleri

- **FRAP Yöntemi**

Benzei ve Strain tarafından geliştirilen bu yöntemde düşük pH ortamında Fe^{+3} -tripridilazin (Fe^{+3} –TPTZ) kompleksi antioksidanların etkisi ile Fe^{+2} -tripridilazin

(Fe⁺² –TPTZ) kompleksine indirgenir. Oluşan bu kompleksin 593 nm deki absorbansı ölçülür ve örnekler içindeki toplam antioksidan kapasitesi direkt olarak bulunur. FRAP yönteminde prooksidan moleküller veya yükseltgenebilir substratlar kullanılmamıştır [26].

Canlı metabolizmalarındaki antioksidan kapasitelerinin FRAP yöntemi ile ölçülmesi durumunda, Fe⁺² iyonlarının ortamdaki H₂O₂ iyonları ile etkileşmesi (·OH) hidroksi radikallerinin oluşmasına sebep olur. Bu nedenle örnek numuneler içindeki antioksidanların Fe⁺³-tripridilazin (Fe⁺³ –TPTZ) kompleksini indirgemesi yanında ortamdaki hidroksi radikalleri ile de etkileşmesinden dolayı antioksidan kapasitesi direkt olarak değil indirek olarak ölçülebilir. FRAP yöntemi, prooksidan içermeyen ortamlarda yapılan toplam antioksidan gücünün tayinin de direkt bir yöntem olmasına karşın genel olarak düşünüldüğünde indirekt bir yöntemdir.

Bazı antioksidanlar prooksidan molekülleri etkili bir şekilde indirgemelerine karşılık Fe⁺³ iyonlarını indirgemeyebilirler. Bu nedenle FRAP basit ve ucuz bir yöntem olmasına karşın canlı metabolizmalarındaki bazı antioksidanlar (tiol grubu içeren, GSH gibi) tayin edilemez.

- **TEAC Yöntemi**

TEAC yöntemi ilk olarak **Miller ve arkadaşları** tarafından geliştirilmiş daha sonra **Re ve arkadaşları** tarafından bu yöntem biraz daha geliştirmiştir [27 - 30].

Miller'in geliştirmiş olduğu TEAC yönteminde metilmiyoglobinin H₂O₂ ile reaksiyonu sonucu oluşan ferrilmiyoglobin radikallerinin ABTS ile etkileşimi sonucu oluşan ABTS^{·+} radikallerinin 660 nm, 734 nm ve 820 nm'deki maksimum absorbans değerleri ölçüldü. ABTS^{·+} radikal katyonunun absorbansındaki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasitesi trolox cinsinden bulunur. TEAC; 1 mM deneysel örneğin konsantrasyonuna eşdeğer miktardaki mM trolox konsantrasyonuna denir. Bu yöntemin dezavantajı, numuneler içindeki antioksidan maddelerin ABTS^{·+} radikallerini indirgemesi yanında ferrilmiyoglobin radikallerinide indirgeyebilmesidir.

Re ve arkadaşları tarafından geliştirilen TEAC yönteminde ise ABTS^{·+} radikal katyonu, ABTS'nin potasyum persülfat ile oksidasyonu sonucu oluşmaktadır. Bu şekilde hazırlanan ABTS^{·+} radikali, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda muhafaza edilerek 2 gün boyunca kullanılabilir.

- **Döngülü Voltametrik Yöntem**

Kohen ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu bu yöntem biyolojik sıvı maddelerde düşük moleköl ağırlıklı antioksidanların ortalama indirgeme gücünü bulmaya yarar. Çalışma elektrodu, referans elektrot ve ikincil elektrot olmak üzere üç elektrotlu bir sistem içinde örnekler hazırlanır. Sabit bir hızla çalışma elektroduna pozitif (indirgeme cinsinden) ve negatif (yükseltgeme cinsinden) potansiyeller uygulanır. Örneklerin toplam antioksidan gücü, iki parametrenin ($E_{1/2}$, AC) etkileşimi ile hesaplanır [31,32].

Pik potansiyeli (E_p), akımın yarısı kadar artması için gereken potansiyel yarı dalga potansiyeli ($E_{1/2}$) olarak ölçülür. Antioksidanlar ile doğrudan bir ilişkisi vardır. Yarı elektrot potansiyelinin düşük olması, antioksidanların çalışma elektroduna elektron verme gücünü artırır. Anodik Akım (AC), her bir anodik dalga (y ekseni) ile antioksidanların toplam konsantrasyonları (x ekseni) arasında çizilen grafikden yararlanarak toplam antioksidan miktarı ölçülür.

Bu yöntemin en büyük dezavantajı, canlı metabolizmalarında yaygın olarak bulunan bazı antioksidanların yarı elektrot potansiyellerinin yeteri kadar düşük olmaması, çalışma elektroduna bu antioksidanların çabuk elektron vermesini engeller. Bu bakımdan reaksiyon çok yavaş gerçekleşir veya hiç olmayabilir. Tiol bileşiklerinden, glutation, bu yöntemle tayin edilebilmesi zor antioksidanlardandır.

- **TRAP Yöntemi**

Wayner ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu bu yöntemde AAPH peroksil radikali oluşturmak için kullanılır. Plazma içerisine AAPH eklendikten sonra, yükseltgenebilir substratın oksidasyonu boyunca tüketilen oksijen hesaplanır. Plazma içersinde bulunan antioksidanlar oksidasyon reaksiyonun yavaş gerçekleşmesine neden olur. Reaksiyonun gecikme zamanı ölçülerek toplam antioksidan miktarı, standart trolox ile bulunan sonuçlarla kıyaslanarak trolox cinsinden hesaplanır [33]. Bu yöntemin temel sorunu oksijen elektrodunun son noktasının tam olarak tespit edilememesi ve oksijen elektrodun gereken zaman dilimi içinde kararlılığını koruyamamasıdır.

Wayner ve arkadaşları TRAP yöntemine bazı ilaveler yaparak geliştirmişlerdir. Oksidasyon peroksil radikalleri ile başlatılmadan önce linolenoik asit emilasyonu örnek numuneye katılır orijinal yöntemde olduğu gibi toplam antioksidan kapasitesi hesaplanır [34].

- **Luminol Yöntemi**

Alho ve Leinonen'in geliştirmiş olduğu bu yöntemin temelini kemiluminesans-TRAP yöntemi oluşturmaktadır. AAPH bileşiğinden elde edilen peroksil radikalleri, yükseltgenebilir substrat (luminol) ile oksidasyonu sonucu ışık yayan luminol radikalleri oluşturur. Oluşan bu ışık luminolmetre denilen cihazlarla ölçölür. Örnekteki antioksidanlar kemiluminesans ışımalarının oluşumunu belli bir zaman için engeller(gecikme zamanı). Gecikme zamanı örnekteki toplam antioksidan potansiyeli ile doğrudan orantılıdır. Elde edilen sonuçlar trolox cinsinden hesaplanır [35].

Whitehead ve arkadaşları orijinal luminol yönteminine bazı ilaveler yaparak geliştirmiştir [36]. Luminollün H_2O_2 veya perborat ile yükseltgenmesinden yararlanılır. Reaksiyonun daha hızlı gerçekteşebilmesi için katalizör (HRP;horseradish peroksidase) kullanılmış ve ışık yayılması daha çabuk olmuştur. Normal şartlar altında bu reaksiyon hızla azalan düşük şiddetli bir ışık yayılması olarak gerçekteşir. Reaksiyon ortamına p-iyodofenol ilave edildiği zaman ışık emisyonu daha şiddetli, uzun süreli ve kararlı bir hale gelir. Işığın luminol radikalleri tarafından yayılması için ortamdaki bütün antioksidanların tüketilmesi gerekmektedir. Bu nedenle bu yöntem antioksidan girişimine karşı duyarlıdır.

Bu yöntemin en önemli dezavantajı, incelenen antioksidanların yalnızca AAPH'dan oluşan radikalleri değil luminol radikallerinide indirgeyebilecek olmasıdır.

- **DCFH-DA Yöntemi**

Valkonen ve Kuusi'nin yönteminin temelini de TRAP yöntemi oluşturmaktadır. Bu analiz yönteminde AAPH, peroksil radikali oluşturmak için kullanılmıştır. DCFH-DA ise yükseltgenebilen substrat olarak kullanılmıştır. Peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucu oluşan DCF yüksek floresans özelliğe sahiptir. DCF, 480 nm de uyarılıp 526 nm de emisyon yapmaktadır. Ayrıca 504 nm de maksimum absorbanısa sahiptir. Bu açıdan hem floresans yöntemi hem de spektrofotometrik yöntem kullanılarak DCF miktarı ve buna bağılı olarak toplam antioksidan kapasitesi hesaplanır. Bu yöntemde toplam antioksidan kapasitesi iki aşamada hesaplanmaktadır. İlk aşamada, numune içindeki antioksidanların kapasitesi gecikme zamanı cinsinden hesaplandı. Aynı numune üzerine, miktarı bilinen trolox çözeltisi ilave edilir ve bu trolox çözeltisi serbest radikaller tarafından tüketildikten

sonra ikinci gecikme zamanı hesaplanır. Bu iki gecikme zamanı arasındaki farktan yararlanarak trolox cinsinden toplam antioksidan kapasitesi hesaplanır [37].

- **TOSC Yöntemi**

Winston ve onun çalışma arkadaşlarının geliştirmiş olduğu bu yöntemde AAPH bileşiğinden elde edilen α -keto- γ - metilbutirik asit (KMBA) etilene yükseltgenir. Head space cihazında toplanan etilen gazı, gaz kromatografisi ile ölçülür. Oluşan etilen gazının numunedeki antioksidan miktarına bağlı olarak azalışı ölçülür ve numunenler içindeki toplam antioksidan kapasitesi aşağıdaki formülden yararlanarak hesaplanır [38].

$$TOSC = 100 - (\int SA / \int CA \times 100) \quad (2.1)$$

SA; Örnek reaksiyon alanı, CA; kontrol reaksiyon alanı

Alan integralleri açısından açık bir sistemdir. Çünkü KMBA bu yöntemde sınırlayıcı bir reaktif olarak rol oynar ve KMBA'nın aşırısı kullanılmalıdır ki antioksidanlar tüketildikten sonra doğrusal bir artış gözlemlensin.

- **Krosin Yöntemi**

Tubaro ve arkadaşlarının geliştirmiş olduğu bu yöntemde ise kinetik parametreler kıyaslanarak plazma içindeki antioksidan kapasitesi ölçülür. Bu yöntemin temeli, AAPH bileşiğinden elde edilen peroksil radikalleri ile krosin'in yükseltgenme reaksiyonuna dayanmaktadır [39]. Krosinin, peroksil radikalleri ile oksidasyon reaksiyonunun, antioksidan bileşikler olmadığı durumdaki hızı (V_0) ve antioksidan bileşikler olduğu durumdaki hızı (V) 10 dakikalık reaksiyon süresi içinde ölçülür. Bu ölçülen hızların oranı (V_0 / V) x eksenini, $[A]/[C]$ oranı (antioksidan konsantrasyonu $[A]$, krosin konsantrasyonu $[C]$) y eksenini oluşturacak şekilde bir grafik oluşturulur. Bu lineer grafiğinin eğimi k_a / k_c oranını verir. k_a ; antioksidan ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabiti, k_c ; Krosin ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabitidir. Bulunan k_a / k_c oranı, daha önceden trolox ile hesaplanan k_a / k_c oranına bölünerek sonuçlar trolox cinsinden hesaplanır. Bu yöntemle iki antioksidanın, peroksil radikalleriyle etkileşimleri kıyaslanabilmektedir.

Bu yöntemde krosin konsantrasyonu sabit miktarda kullanılmasına karşın kalibrasyon grafiği için farklı antioksidan konsantrasyonlarının kullanılması farklı konsantrasyonlarda krosin çözeltileri kullanılmasını gerektirir.

Trolox, askorbik asit gibi bazı antioksidanların varlığında, krosinin peroksil radikalleri ile etkileşim süresi tam olarak hesaplanamamaktadır. Ayrıca bu yöntemde askorbik asit için hesaplanan trolox eşdeğerliği (7,7) diğer yöntemlere göre bulunan sonuçlardan çok yüksektir.

- **PE Yöntemi**

Ghiselli ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada AAPH, peroksil radikali oluşturmak için, Cu^{+2} – askorbat bileşiği de hidroksil radikali oluşturmak için kullanılmaktadır. Bu yöntem de yükseltgenebilir substrat β -PE veya R-PE kullanılmıştır. Bu iki bileşiğin peroksil veya hidroksil radikalinin varlığında gösterdiği floresansın zamanla lineer olarak değiştiği kabul edilmiştir. Bir numunedeki antioksidanların, peroksil veya hidroksil radikallerine karşı sağladığı tam koruma süresi trolox cinsinden sağladığı tam koruma süresi ile kıyaslanarak sonuçlar elde edilmiştir [40].

Ghiselli'nin yapmış olduğu çalışmada R-PE floresansındaki düşmenin, floresansın %80 tamamlanana kadar zamanla lineer olarak azaldığını göstermiştir. Ancak bu yapılan çalışma tekrarlandığında aynı sonuçlar alınamamıştır.

- **ORAC Yöntemi [41, 42]**

ORAC yönteminde AAPH, peroksil radikali oluşturmak için, Cu^{+2} - H_2O_2 hidroksil radikali oluşturmak için ve β -PE (β -Phycoerythrin) yükseltgenebilen substrat yerine kullanılmıştır. Serbet radikaller ile β -PE arasındaki oksidasyon reaksiyonu sonucu phycoerythrin floresansındaki düşüş ölçülerek toplam antioksidan kapasitesi hesaplanır.

Günümüze kadar serbest radikal etkileşimini tamamiyle inceleyen ve eğri altındaki alan (AUC) tekniğini miktarlandırma için kullanan ve bu yöntem sayesinde antioksidanlar tarafından önlenen serbest radikal etkisini hem durdurma yüzdesi hem de durdurma süresi biçiminden tek bir değer şeklinde ifade eden bir yöntemdir. ORAC yönteminde kullanılan AAPH'ın oranı antioksidanlara karşı çok yüksektir. Bu yüzden yöntem doğrudan serbest radikalleri önleyen antioksidanların kapasitelerini ölçmesi bakımından spesifiktir.

Yükseltgenebilir bileşik olarak PE kullanan diğer yöntemlerde gecikme zamanı miktarlandırma için kullanılmıştır ancak ORAC yönteminde ise AUC tekniği kullanılarak, sonuçları gecikme zamanı olarak veren deneysel çalışmalardaki hatalar

giderilmiş olur. ORAC yönteminde, yağda ve suda çözünen antioksidanların analizlerini gerçekleştirmek için değişik ekstraksiyon yöntemleri kullanılır. Yapılan bu ekstraksiyon işlemleri sonucunda yağlı örneklerin emülsiyonlarının yoğun olmaması kantitatif sonuçların uzun bir süre almasına neden olur.

2.6. ENDÜSTRİDE KULLANILAN BİTKİLER

Şifalı bitkilerin, son yıllarda sağlık ve gıda sektöründeki çeşitli faydalarından dolayı endüstri alanında dikkat çekici hale gelmiştir. Bitkilerin kozmetik ve tekstil sanayinde kullanımlarının yanı sıra fitoterapide(şifalı bitkilerle tedavi) de kullanımı sentetik ve doğal bitkisel ürünler olarak gerçekleşmektedir.

2.6.1. Isırgan Otu ve Özellikleri

Isırgan otu, saplarında birbirinin karşısına gelecek şekilde yaprak dizilimine sahip, saplarında ve yapraklarının alt kısmında yakıcı tüyler bulunan, koyu yeşil renkte bir bitkidir [43, 44]. Yapraklarının boyu 10 cm' yi bulurken bitki boyu 100 cm' yi aşmaktadır. Haziran ve eylül ayları arasında yetişen bu bitki, bahçelerde, ormanlarda, bataklık kenarlarında ve çok su bulunan bölgelerde bol miktarda bulunur.

Isırgan otunu yapısında pek çok kimyasal madde bulunmaktadır. Bunları sıralayacak olursak ; asetofenon, alkaloidler, bütirik asid, formik asid, fenil propan tüevleri, histamin, hidrosinamik asidler (kaffeik asid, klorogenik asid, p- kumarik asid) karbonik asid, klorofil, lektinler (Urtica dioica aglutinin), Flavonoidler (kaemferol-3-O-rutinoside, izorhammetin-3-O-glukozit, quercetin-3-O-rutinoside) [45], yağ asitleri (linoleik asid, linolenik asid, oleik asid, palmitik asid), quinic asid, skopoletin, serotonin, β -sitosterol, stigmasterol, süksinik asid, triterpenler.

Isırgan otunun yaprak, tohum ve köklerinde bulunan kimyasal maddeler, ısırgan otunun antiseptik, kan dolaşımı düzenleyici, diüretik, bakterisid, hemostatik ve kas hareketi düzenleyici olarak kullanılmasını sağlar. Isırgan otunun köklerinde bulunan histamin diüretik olup prostat büyümesini önlemektedir [43]. Isırgan otuna dokunulduğunda ciltte beyaz renkte kabarmalar meydana gelir. Bunun nedeni bitkinin saplarında ve yaprak altlarında bulunan tüylere dokunulmasıyla kırılması ve içindeki formik asidin ciltle temasa geçmesidir. Bunun sonucu oluşan kaşıntıyı ve acıyı gidermek için asidi nötralize edici bir baz kullanılmalıdır [44].

2.6.2. Isırgan Otunun Kullanım Alanları

Isırgan otunun kolay bulunur, maliyetinin düşük olması, içerdği maddeler ve bu maddelerin özelliklerinden dolayı tıpta fitoterapik uygulamalarda ve kozmetik sektöründe kullanılmaktadır.

Isırgan otunun kozmetik sektöründe kullanımı özellikle saç dökülmesini önleyici şampuanlarda ısırgan otu ekstraktı şeklinde kullanılmaktadır. Saç dökülmesini önleyici veya azaltıcı etkisinin yanında çeşitli cilt kremlerinde de kullanılmaktadır. Bu cilt kremleri sivilceleri giderici özelliktedir [46].

Isırgan otunun içerdği kimyasal maddelerden dolayı tıpta yaygın bir şekilde kullanım alanına sahiptir. İçerdği maddelerden biri olan β - sitosterol kanser olmayan prostat büyümesine karşı kullanılan bir maddedir[47]. Isırgan otu ekstraktı erkeklerde testosteron salgılanmasını ve prostat büyümesine etki eden enzimi inhibe ederek bu etkiyi sağlar. Bunların dışında ısırgan otu diüretik olarak böbrek ve idrar yolu rahatsızlıklarında, şeker hastalığında, romatizmal hastalıklarda, sivilce, egzama gibi deri hastalıklarında ve yüksek tansiyona karşı kullanılmaktadır [48, 43].

Literatürde ısırgan otu ekstraktları ile yapılan çalışmalar aşağıda özetlenmiştir.

Gülçin ve arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada sulu ısırgan otu ekstraktının antioksidan, antimikrobiyal, antiülser özellikleri incelenmiştir. Sulu ısırgan otu ekstraktlarının antioksidan özelliklerinin belirlenmesi için değişik antioksidan aktivite ölçme yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemleri sıralayacak olursak; İndirgeme gücü (reducing power), serbest radikalleri ortadan kaldırma (tutma), H_2O_2 uzaklaştırma, metal şelasyonu yapabilme, superoksit radikallerinin indirgenmesi, ferro-tiyosiyonat yöntemleri kullanılarak toplam antioksidan aktivitesi ve toplam fenolik bileşikler miktarı indirekt olarak belirlendi.

Sulu ısırgan otu ekstraktının toplam antioksidan aktivitesinin ve indirgeme gücünün α – tokoferole göre daha kuvvetli olduğu ve ısırgan otu miktarının artmasıyla antioksidan aktivitesinin arttığı gözlemlenmiştir.

Metal şelasyonu yapabilme ve superoksit radikallerinin indirgenmesi amacıyla yapılan çalışmada sulu ısırgan otu ekstraktının α – tokoferole, BHA, BHT'ye göre daha kuvvetli antioksidan etkiye sahiptir.

Serbest radikallerin insan vücudunda fazla miktarda bulunması oksidatif strese ve bu durum pek çok hastalığın oluşmasına sebep olur. Serbest radikalleri (DPPH) ortadan kaldırma (tutma) temeline dayanan yöntemde sulu ısırgan otu ekstraktlarının serbest radikalleri uzaklaştırma özelliğinin quercetine göre daha düşük olmasına karşın BHA'dan daha yüksek aktiviteye sahiptir.

Sulu ısırgan otu ekstraktının H₂O₂ uzaklaştırma etkisine bakıldığında, diğer antioksidanlara göre daha düşük aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiştir [49].

Tahri ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, ısırgan otu ekstraktının diüretik, natriüretik ve hipotensive etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada çözücü olarak su kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlardan, sulu ısırgan otu ekstraktının yüksek tansiyonu düşürücü etkiye sahip olmasının yanında ekstraktın yüksek dozlarda kullanımının ölümcül etkiye sahip olduğu görülmüştür [50]

Kraus ve Spiteller tarafından yapılan çalışmada ısırgan otunun köklerinde bulunan fenolik bileşikler tanımlanmıştır. Bu çalışmada ısırgan otu kökleri farklı pH değerlerinde farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş ve gaz kromatografisi- kütle spektrofotometresi sistemi ile 18 farklı fenolik bileşik tanımlanması yapılmıştır [51].

Isırgan otu ekstraktının elde edilmesi ve bunun romatizma hastalığına etkisini **Riehemann ve arkadaşları** incelemiştir. Bu çalışmada ısırgan otu yapraklarının etanol ile ekstraktı elde edilmiş ve bu ekstraktın romatizmal ağrıları önleyici etkisinin olduğu görülmüştür [52].

2.6.3. Diğer Şifalı Bitkilerin Özellikleri ve Kullanım Alanları

- **Yeşil çay (*Camelia Sinensis*)**

Çay "black", "oolong" ve "green" olarak üç kategoriye ayrılabilir. Hepsi "CAMELIA SİNENSİS" adlı bitkinin yapraklarından elde edilir. Çayları farklı kılan hasattan sonraki fermentasyondur. Yeşil çay hiç fermente edilmez. Çayın en tazesini ve vücuda en faydalı olanıdır. Yeşil çayın insan sağlığına olan faydaları bilimsel olarak kanıtlanmıştır. Cilt üzerindeki koruyucu ve tedavi edici özellikleri raporlarla desteklenmektedir.

Yeşil çay anti kanserojendir. Vitamin E, Vitamin C, gibi antioksidanlardan daha güçlüdür. Antioksidanlar hücre zedelenmesini engelleyerek kontrolsüz kötü huylu hücre çoğalmasını önler. Yeşil çayın bu kadar faydalı olmasını sağlayan iki bileşik

"polyphenol" ve "epigallocatechin gallate (EGCG)" dır. EGCG serbest radikalleri nötralleştirmede Vitamin E'den 25 kat, Vitamin C'den 100 kat daha güçlüdür. Kuru bir yeşil çay yaprağı %40 polyphenol içerir ki o da güçlü bir antioksidan ve antibakterioldir. Örneğin; akne etkeni "Bacterium acne" ve sivilce yapan "Staphilococcus aureus" gibi mikroorganizmalar için antibakterioldir. Dolaşımı düzenleme, cildi sakınleştirme, kaşıntılı lezyonları ve böcek ısırıklarını tedavi etme, güneşin ve çevrenin olumsuz etkilerinden cildi koruma gibi etkilerini de unutmamak gerekir [53]. Yeşil çayda son yıllarda yüksek polifenolik içeriği nedeniyle araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Çay yaprağının kimyasal bileşiminin %25-35 'şini oluşturan polifenoller ağırlıklı olarak flavanol içermektedir. Flavanollar da, flavonoidler içersinde en yüksek antioksidan aktivitesine sahip bileşiklerdir [54].

- **Fesleğen (*ocimum basilicum*)**

Spazm giderici, safra söktürücü, antiseptiktir. Gut, baş dönmesi, migrene karşı kullanılır.

- **Kekik (*Thymus vulgaris*)**

Bronş hastalıklarında, anemide, diş çürümelerinde ve mantar enfeksiyonlarında antiseptik olarak kullanılabilir. Ciltteki gözenekleri açar. Yağ bezelerinin faaliyetlerini dengeler. Ağız hijyen ürünlerinde, cilt kremlerinde, şampuanlarda ve saç lasyonlarında kullanılır.

- **Adaçayı (*salvia Officinalis*)**

Şeker hastalığında kan şekerinin düşürülmesinin yanı sıra yara iyileştirici, kan temizleyici, bakteri öldürücü olarak kullanılırlar. Kozmetik sektöründe de kullanılan adaçayı genellikle yağlı ve gözenekleri genişlemiş ciltlerde cilt kremi olarak, koku giderici özelliğiyle ağız sipreylerinde ve diş macunlarında kullanılırlar.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Absorpsiyon ölçümleri için Unicam 8700 model UV/VIS spektrofotometre, Varian CARY IE Model UV-Vis Spektrofotometre, UV-VIS 1601 Shimadzu spektrofotometre, Unicam model yazıcı ve ışık yolu 1 cm olan kuvars küvet kullanıldı.

Perkin Elmer LS 50 luminescence model spektrofluorometre ve Perkin Elmer 204 floresans spektrofotometre.

Örnek alma işlemleri için 5-50 µl arası değişebilen Genex Beta marka mikro pipetler, 200 µl, 500 µl, 1000 µl'ler için sabit hacimli Brand Trasferpette marka mikro pipetler kullanıldı. Mağnetik karıştırıcı ve Isıtıcı.

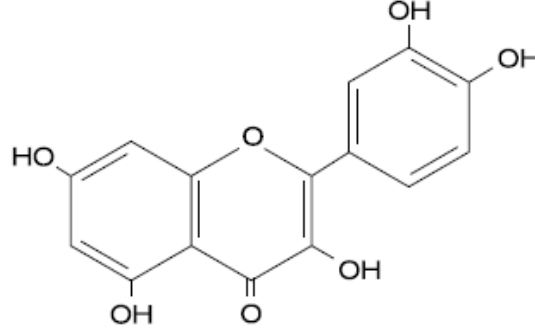
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Bitkiler

Quercetin dihidrat ($C_{15}H_{10}O_7 \cdot 2H_2O$, sigma), cerium(IV) sulfate tetrahydrate ($Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$, Merck), cerium(III)nitrate hexahydrate ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, Merck), etil alkol(riedel), Trolox, Gallik Asid, Catechin, Naringin, Naringenin, Askorbik Asid, benzoik asid, asetil salisilik asit(aspirin), Sodyum tiyosülfat ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$), potasyum iyodür (KI), nişasta, potasyum kromat($K_2Cr_2O_7$), sülfirik asit (H_2SO_4 , %98 Merck), sodyum hidroksit(NaOH).

Karadeniz bölgesinde yetişen kurutulmuş ısırgan otları, Malatya pazarından alınan kurutulmuş kekik, fesleğen, yeşilçay ve adaçaylarının sulu ekstraktları kullanıldı.

Quercetin: Deneysel çalışmalarda standart madde olarak Quercetin kullanıldığı için fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri özellikle ele alınmıştır. Fiziksel özellikleri: molekül ağırlığı 338,3 g/mol, sarı toz halinde bir kimyasal madde olup erime noktası 316°C dir. Etanol ve metanol de çözünür. Saf suda çözünmez. Işığa karşı duyarlıdır (Şekil 3.1.).

Kimyasal yapısı: Quercetin'in IR spectrum değerleri; 3409-3144 cm^{-1} $\nu(\text{O} - \text{H})$, 1664 cm^{-1} $\nu(\text{C}=\text{O})$, 1610 cm^{-1} $\nu(\text{C} = \text{C})$, 1381 cm^{-1} $\nu(\text{C} - \text{OH})$, 1262 cm^{-1} $\nu(\text{C}-\text{O}-\text{C})$, 1570 cm^{-1} , 1520 cm^{-1} $\nu(\text{aromatik halka})$. Quercetin'in, UV spektrum λ_{max} 256 nm, 372 nm [55].



Şekil 3.1. Quercetin'in (3,3',4,5,7 – pentahidroksiflavon) yapısal formülü

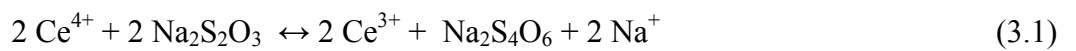
Quercetin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteye sahip bir flavonoldur. Quercetin'in, metalleri kendine bağlaması, radikal moleküllerini uzaklaştırması ve enzim inhibitörü gibi özelliklere sahip olması antioksidatif, antikarsinojenik, antimutajenik ve iltihaba karşı önemli etki göstermesine sebep olmaktadır [56].

3.3. Kullanılan Ana Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. $2 \cdot 10^{-3}$ M Seryum(IV) Sülfat Çözeltisinin Hazırlanması ve Ayarlanması

Yaklaşık 0,0809 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tartılıp, 25 mL destile su ile çözdükten sonra üzerine 17 mL derişik H_2SO_4 ilave edilip tamamen çözününceye kadar mağnetik karıştırıcı ile karıştırıldı. $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ tamamen çözüldükten sonra 100mL'lik balon jodede saf su ile 100mL'ye tamamlandı. İyodometrik yöntem kullanılarak bu çözeltideki $\text{Ce}(\text{IV})$ iyonlarının derişimi belirlendi.

250 mL'lik bir erlen içersine 0,0876 g KI, 0,15g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ve 5 mL %0,2'lik nişasta çözeltisinden, ilave edildikten sonra karışım destile su ile 65 mL'ye seyreltildi. Hazırlanan bu karışım $\text{Ce}(\text{IV})$ çözeltisi ile çözeltinin berrak rengi lacivert olana kadar titre edildi.



$\text{Ce}(\text{IV})$ çözeltisinin derişimi ayrıca spektrofotometrik yöntemle de kontrol edildi. $\text{Ce}(\text{IV})$ çözeltisi, kullanıldığı gün taze hazırlandı.

3.3.2. 2.10^{-3} M Seryum(III) Nitrat Çözeltisinin Hazırlanması

Yaklaşık 0,0868 g seryum (III) nitrat hegzahidrat 25 mL saf su ile çözüldükten sonra 100mL'lik balon jode saf su ile 100mL'ye tamamlandı.

3.4. Bitki Ekstraktlarının Hazırlanması

Karadeniz bölgesinde yetişen kurutulmuş ısırgan otları yaprak ve gövdeleri porselen bir havan yardımıyla toz haline getirilene kadar dövüldü. Çok ince öğütülen ısırgan otundan 1 g tartılarak erlene alındı. Üzerine 20 mL kaynatılmış destile su ilave edilerek, magnetik karıştırıcı ile 15 dakika boyunca karıştırıldı. Çözelti 15 dakika bekletildikten sonra Whatman tipi süzgeç kağıtından süzüldü. Sulu ısırgan otu ekstraktı 25 mL lik balon jeye alınıp saf su ile 25 mL ye tamamlandı.

Malatya pazarından alınan kurutulmuş yeşilçay, adaçayı, kekik ve fesleğen gibi şifalı bitkilerden 1,5 g tartılıp bayan ince çorap içersine konduktan sonra 250 mL taze kaynatılmış saf su içine 3 dakika boyunca daldırılıp çıkartıldı. Daha sonra 2 dakika kaynamış su içersinde bekletildi. Bu şekilde hazırlanan bitki ekstraktları uygun seyreltmelerden sonra spektrofotometrik ölçümler için kullanıldı.

3.5. Toplam Flavonoid Miktarı Analiz Yöntemleri

3.5.1. Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem

Bitki ekstraktlarındaki toplam flavonoid miktarının indirekt spektrofotometrik yöntem ile tayinin temelini, Ce(IV) ile flavonoidler arasındaki redoks reaksiyonu oluşturmaktadır. Başlangıçtaki Ce(IV)'ün maksimum dalga boyundaki (320 nm) absorbans değeri, Ce(IV)'ün flavonoidler ile reaksiyonu sonucu azalmaktadır. Ce(IV)'ün absorpsiyonundaki bu azalmadan yararlanarak dolaylı olarak toplam flavonoid miktarı hesaplanmıştır. Analizde aşağıdaki işlem adımları sırasıyla uygulanmıştır.

2×10^{-3} M Ce(IV) çözeltisinin 1 mL si üzerine son çözelti konsantrasyonu $2,12 \times 10^{-6}$ M – $8,48 \times 10^{-6}$ M olacak şekilde quercetin çözeltileri eklendi. Çözelti karışımları saf su ile 10 mL ye tamamlandı. Çözeltiler biraz karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletildi. Reaksiyon karışımının absorbansı 320 nm de saf suya karşı ölçüldü. Absorbanslar ve quercetin konsantrasyonları arasında kalibrasyon grafiği çizildi.

1 mL ısırgan otu ekstraktı üzerine 1 mL 2×10^{-3} M Ce(IV) çözeltisinden ilave edilerek benzer işlemler uygulandı. Kalibrasyon grafiğinden yararlanarak ısırgan otu ekstraktındaki toplam flavonoid miktarı indirekt olarak hesaplandı.

3.5.2. Spetroflorometrik Yöntem

Flavonoidlerin, Ce(IV) ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan Ce(III)'ün emisyon değerlerinin ölçülmesi bu yöntemin temelini oluşturmaktadır. Ce(IV) iyonları floresans özelliğe sahip değilken Ce(III) iyonları floresans özelliğe sahiptir. Ce(IV) iyonlarının indirgenmesinin bittiği noktada Ce(III) iyonları maksimum emisyon şiddetine ulaşılır. Bu noktadaki flavonoid bileşiğinin konsantrasyonu başlangıçta alınan Ce(IV) iyonlarının konsantrasyonuna eşdeğerdir. Bundan faydalanarak flavonoid konsantrasyonu hesaplanmıştır. Analizde aşağıdaki işlem adımları sırasıyla uygulanmıştır.

2×10^{-3} M Ce(IV) çözeltisinin 1 mL'si üzerine son çözelti konsantrasyonları $2,605 \times 10^{-6}$ M– $2,605 \times 10^{-5}$ M olacak şekilde quercetin çözeltilerinden eklendi. Çözelti karışımları saf su ile 10 mL ye tamamlandı. Çözeltiler biraz karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve 260 nm de uyarılıp 360 nm de emisyon değerleri ölçüldü. 1mL ısırgan otu ekstraktı üzerine 1 mL 2×10^{-3} M Ce(IV) çözeltisinden ilave edildi ve benzer işlemler uygulandı.

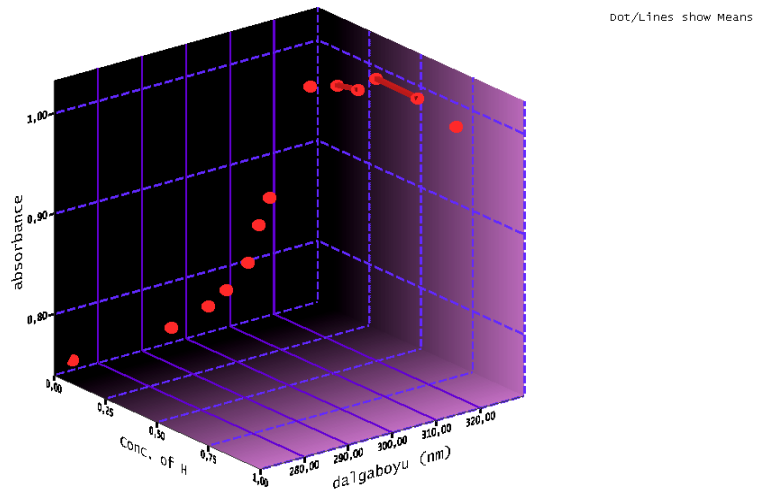
3.6. Absorpsiyon Spektrumlarının Çizimi ve Dalga Boyunun Seçimi

3.6.1. Maksimum Dalga Boyuna Asit Miktarının Etkisi

Maksimum dalga boyunu optimize etmek için, son asit konsantrasyonu 0,01- 0,9 M olacak şekilde sulfat asidi içeren 2×10^{-4} M Ce(IV) çözeltilerinin 200-400 nm dalga boyları arasında absorpsiyon spektrumları suya karşı çizildi. Düşük asit konsantrasyonlarında maksimum dalga boyu daha küçük dalga boylarında gözükürken, asit konsantrasyonu arttıkça büyük dalga boylarına doğru kaymıştır ve 0,3 M sülfirik asit miktarından sonra dalga boyu 320 nm de sabit kalmıştır (Şekil 3.1, Tablo 3.1). Bundan sonraki çalışmalarda maksimum dalga boyu 320 nm ve hidrojen iyonunun konsantrasyonu 0,31 M deneylerde sabit tutulmuştur.

Table 3.1. Maksimum dalga boyuna $[H^+]$ iyonlarının etkisi

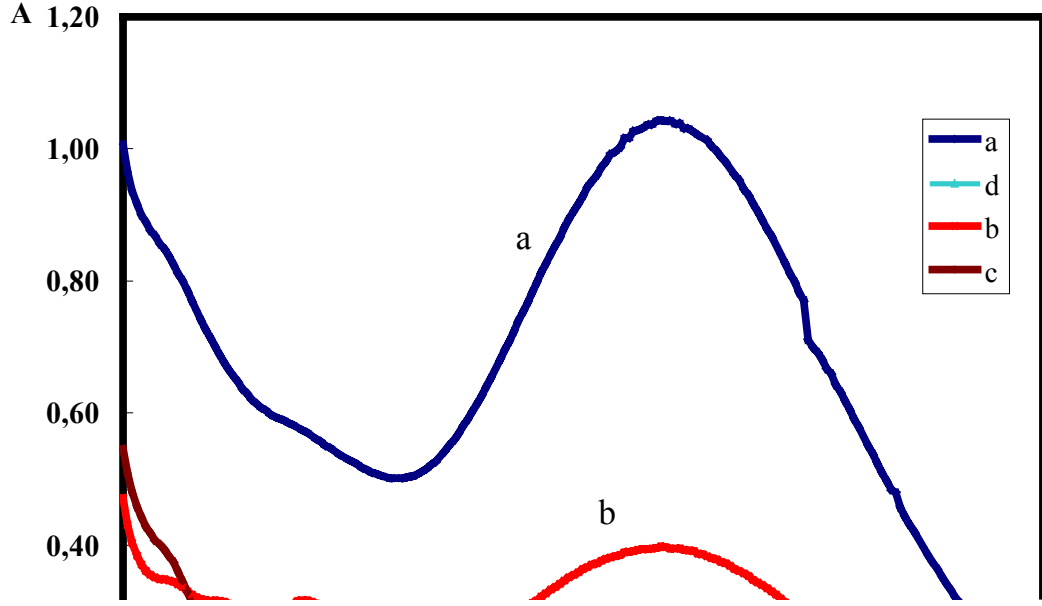
Örnek No	Konsantrasyon $[H^+]$ (mol/L)	Absorbans	Dalga boyu, λ_{max} (nm)
1	0,008	0,750	274,0
2	0,020	0,757	296,0
3	0,031	0,769	304,0
4	0,052	0,784	307,0
5	0,073	0,808	311,0
6	0,093	0,845	312,5
7	0,114	0,873	314,0
8	0,214	0,987	318,5
9	0,314	0,996	320,0
10	0,414	1,001	320,0
11	0,514	1,027	319,5
12	0,714	1,021	319,5
13	0,914	1,012	319,0



Şekil 3.2. Asit konsantrasyonunun Ce(IV) çözeltisinin dalga boyu ve absorbansına etkisi

3.6.2. Absorpsiyon Spektrumları

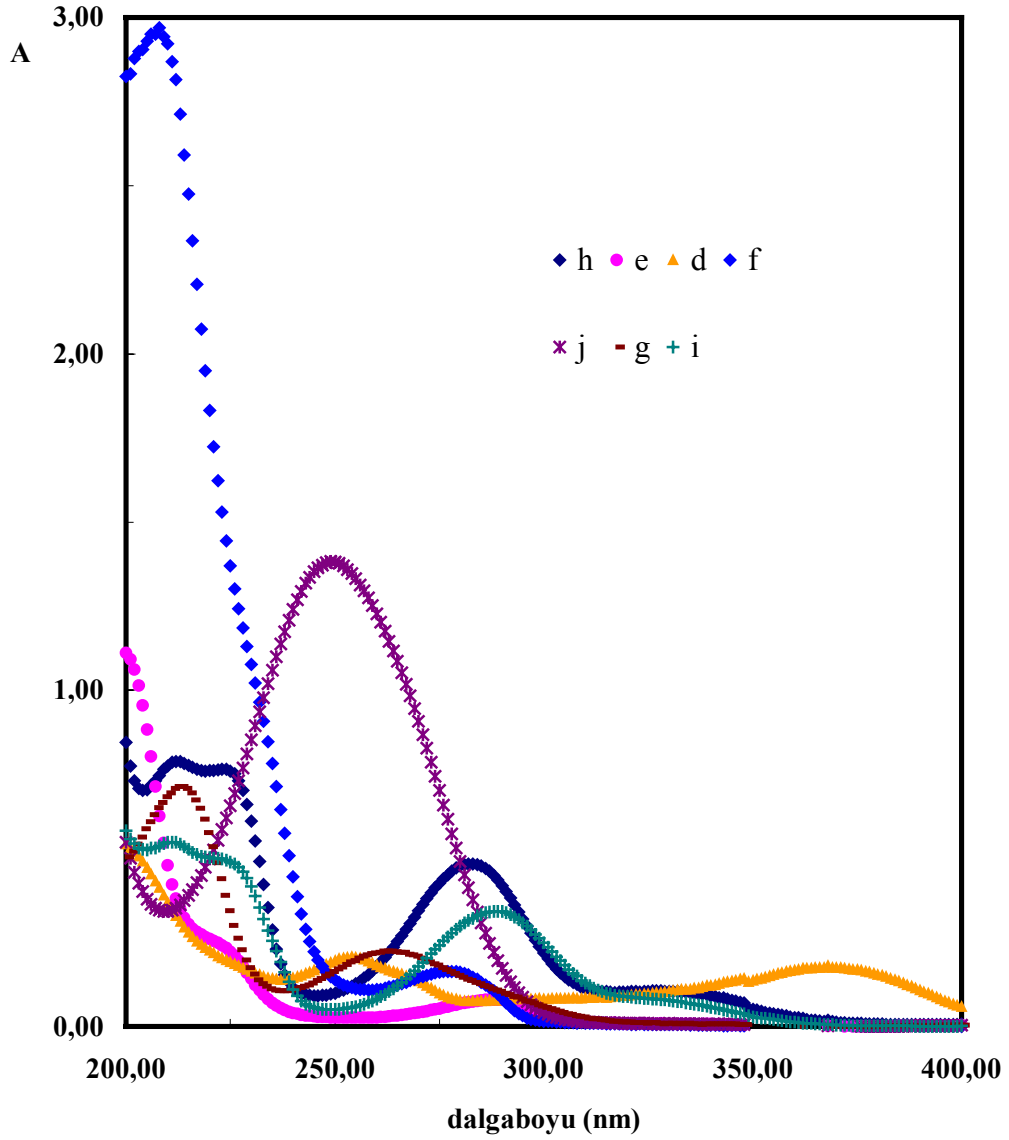
Sülfirik asit konsantrasyonu $0,3 \text{ mol.dm}^{-3}$ olan $2 \times 10^{-4} \text{ M}$ Ce(IV) sülfat çözeltisinin, 200-400 nm dalga boyları arasındaki absorpsiyon spektrumu, 1 cm' lik kuvars küvetlerde, referans saf suya karşı alındı. Şekil 3.3. a'da görüldüğü gibi bu spektrumdan maksimum absorpsiyon dalga boyu 320 nm olarak saptandı. Sülfirik asit konsantrasyonu $0,3 \text{ mol dm}^{-3}$ olan 2 μmol Ce(IV) çözeltileri üzerine son konsantrasyonu $4 \times 10^{-6} \text{ M}$ ve $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ olacak şekilde quercetin çözeltileri ilave edildi ve çözeltiler 10 ml ye saf su ile tamamlandı. Çözelti karışımı oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletildi. 200-400 nm arasında referans saf suya karşı absorpsiyon spektrumu alındı (Şekil 3.3, b-c). Şekil 3.3 de görüldüğü gibi quercetin ilave edildikçe Ce(IV)' ün 320 nm deki absorbans değeri düşerken 230-260 nm dalga boyları arasında Ce(III)'e ait pikler oluşmaktadır. $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ quercetin kullanıldığında ise sadece Ce(III)'e ait pikler gözüküp, 320 nm' de Ce(IV)'e ait pikler kaybolmaktadır. Bu dalga boyunda absorbansın sıfırlanması quercetin bu dalga boyunda kayda değer bir absorpsiyon yapmadığını (Şekil 3.3-d) ve Ce(III)' e ait piklerin dışında piklerin oluşmaması quercetin ile Ce(IV) arasında bir kompleks oluşmadığını gösterir.



Şekil 3.3. Ce(IV), quercetin ve Ce(IV)+quercetin çözeltilerinin referans saf suya karşı absorpsiyon spektrumları

- a) $2 \cdot 10^{-4}$ M Ce(IV)
- b) $2 \cdot 10^{-4}$ M Ce(IV) + $4 \cdot 10^{-6}$ M quercetin;
- c) $2 \cdot 10^{-4}$ M Ce(IV) + $1 \cdot 10^{-5}$ quercetin
- d) $1 \cdot 10^{-5}$ M quercetin

Aynı dalga boyları arasında (200-400 nm) çeşitli flavonoidlerin ve doğal antioksidanların absorpsiyon spektrumları alındı (Şekil 3.4. d-k). Bu spektrumlarda trolox, askorbik asid, kateşin, gallik asid'in 320 nm de absorpsiyon yapmadıkları görülmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda quercetin, naringin ve naringenin ise bir miktar absorpsiyon yaptıkları gözlemlendi. Ancak çalışma konsantrasyonlarına inildiğinde (1×10^{-5} ve daha düşük konsantrasyonlarda) bu absorpsiyon değerleri sıfıra yaklaşmaktadır. Bu nedenle deneylerde referans çözelti olarak saf su kullanılmıştır.



Şekil 3.4. Çeşitli flavonoid ve doğal antioksidanların referans saf suya karşı absorpsiyon spektrumları

- d)** $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Quercetin
- e)** $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Trolox
- f)** $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Catechin
- g)** $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Gallic Acid
- h)** $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Naringin
- i)** $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Naringenin
- j)** $1,63 \cdot 10^{-4}$ M Ascorbic acid

3.7. Kalibrasyon Grafiklerinin Çizimi

3.7.1. Ce (IV)'ün Kalibrasyon Grafiği

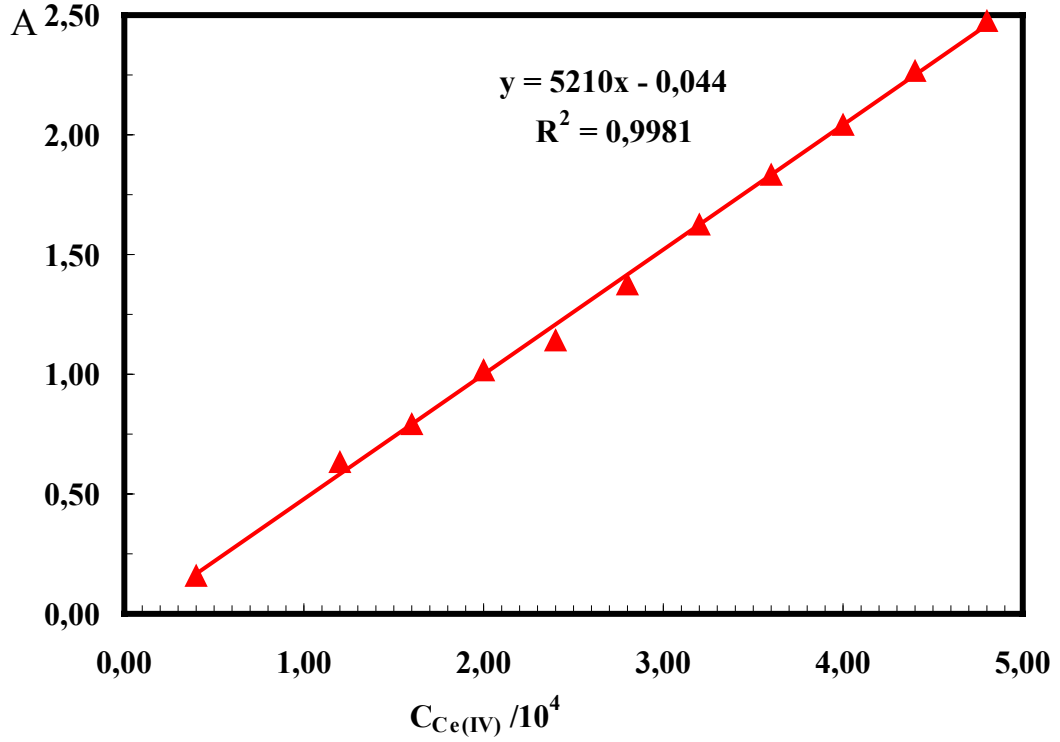
Optimum hidrojen iyon konsantrasyonu 0,31 M ve maksimum dalga boyu 320 nm seçilerek $4,0 \times 10^{-5}$ - $5,0 \times 10^{-4}$ M konsantrasyon aralığındaki Ce(IV) çözeltilerinin absorbansı suya karşı ölçülerek kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.5). Bulunan değerler tablo 3.2'de verilmiştir. Şekil 3.5'de görüldüğü gibi bu konsantrasyon aralığında elde edilen eğri doğru olup denklemi aşağıda verilmiştir:

$$A_{320} = 5,21 \times 10^3 C_{\text{quercetin}} - 0,044 \quad (R^2 = 0,9981) \quad (3.2)$$

Bu doğrunun eğiminden molar absorpsiyon katsayısı $5,21 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

[Ce(IV)] / 10^4 M	Absorbans
0,4	0,158
1,2	0,633
1,6	0,794
2,0	1,019
2,4	1,14
2,8	1,371
3,2	1,628
3,6	1,834
4,0	2,039
4,4	2,265
4,8	2,474

Tablo 3.2. Ce(IV) için absorbans değerleri (referans:su, $\lambda_{\text{max}}=320 \text{ nm}$, $[\text{H}^+]=0,31 \text{ M}$)



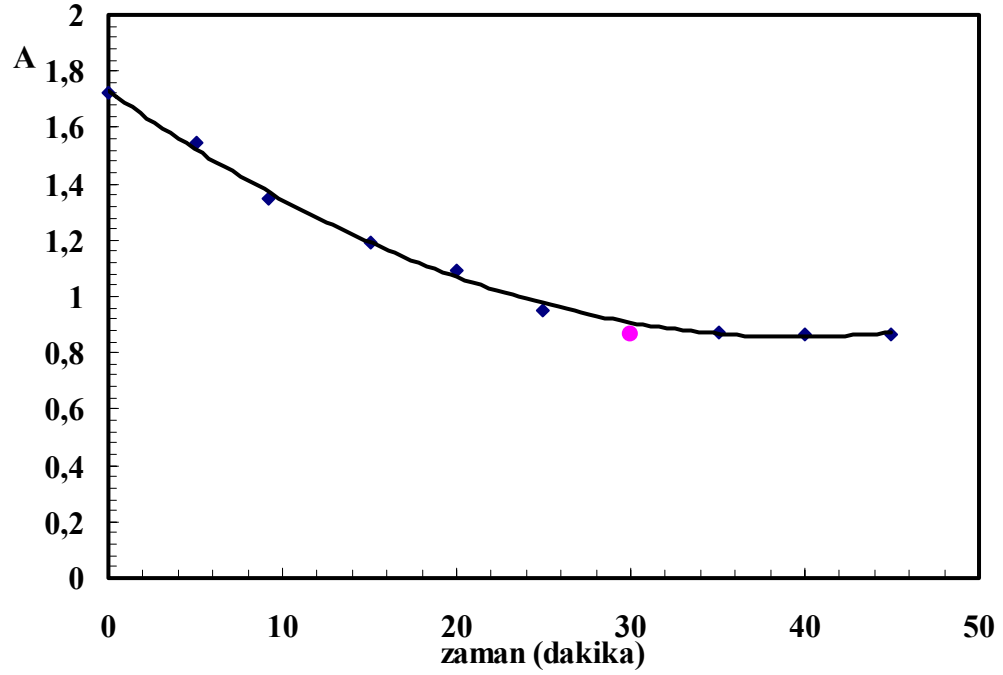
Şekil 3.5. Ce(IV)'ün kalibrasyon grafiği

3.7.2. Ce(IV) ve Quercetin Arasındaki Reaksiyon Süresinin Saptanması

Ce(IV) ve Quercetin arasındaki reaksiyon süresini saptayabilmek için, 1,7 mL $2,0 \times 10^{-3}$ M Ce(IV) çözeltisi 10 mL'lik balon jojelere alındı. Sülfirik asit ile asit konsantrasyonu 0,31 M ayarlandı. Bu çözelti üzerine $8,27 \times 10^{-6}$ M quercetin içerecek şekilde quercetin çözeltisi ilave edildi. Çözelti karışımı saf su ile 10 mL ye tamamlandı. Oda sıcaklığında çözelti karışımları biraz çalkalandıktan sonra 5 dakikalık aralarla 320 nm de absorbansları ölçüldü. Ölçülen absorbans değerleri tablo 3.3'de görülmektedir. Elde edilen değerlerle çizilen şekil 3.6'da görüldüğü gibi reaksiyon 30 dakika gibi kısa bir sürede dengeye gelmektedir. Bu nedenle yapılan çalışmalarda bekleme süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir.

Tablo 3.3. Ce(IV)-Quercetin reaksiyon süresinin saptanması

Zaman (dakika)	0	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Absorbans $\lambda = 320\text{nm}$	1,723	1,547	1,349	1,189	1,094	0,952	0,866	0,87	0,868	0,865



Şekil 3.6. Ce(IV)-Quercetin arasındaki reaksiyon süresinin saptanması

3.7.3. Quercetin'in Kalibrasyon Grafiği

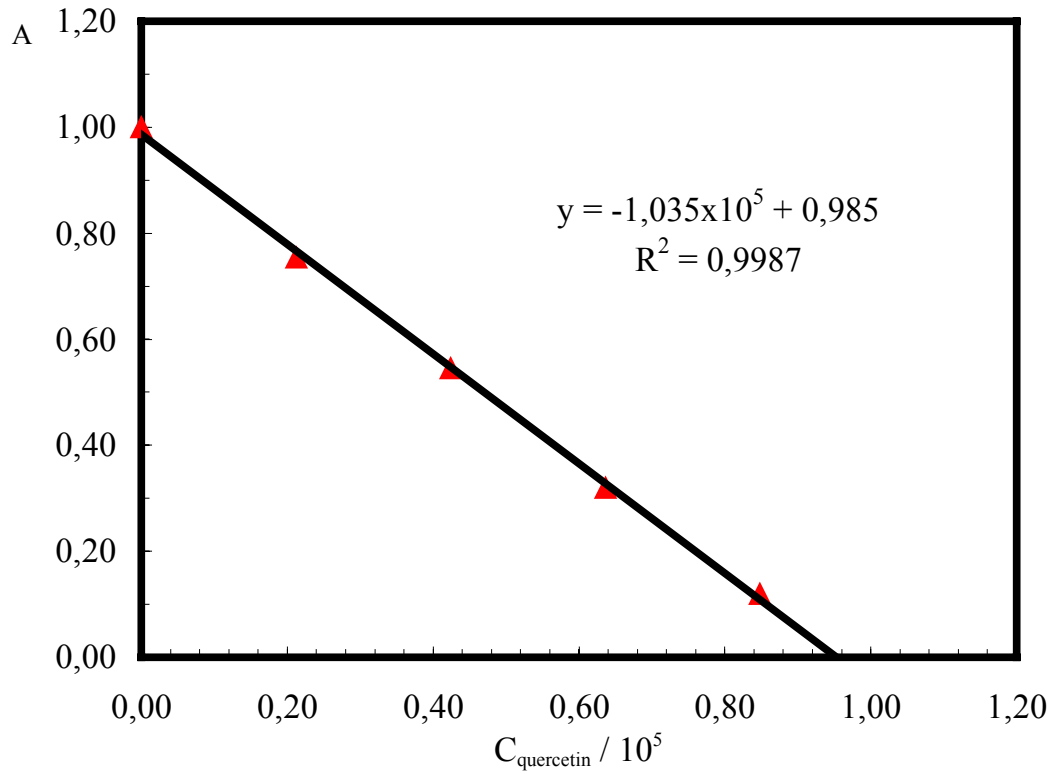
10 mL lik 5 adet balon jojeye 0,3 M sülfürik asit içinde çözülmüş olan $2,0 \times 10^{-3}$ M Ce(IV) çözeltisinden 1'er mL konduktan sonra üzerlerine $2,12 \times 10^{-6}$ M– $8,48 \times 10^{-6}$ M arasında quercetin içerecek şekilde quercetin çözeltileri ilave edildi. Çözelti karışımı saf su ile 10 mL ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra absorbans değerleri 320 nm de referans saf suya karşı ölçüldü. Sonuçlar Tablo 3.4'de verilmiştir. Ölçülen absorbans değerleri ve Quercetin konsantrasyonları arasında kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.7). Şekilde görüldüğü gibi elde edilen eğri; 0 - $8,48 \cdot 10^{-6}$ M quercetin derişimleri arasında doğru olup, denklemi aşağıda verilmiştir :

$$A_{320} = 0,985 - 1,035 \times 10^5 C_{\text{quercetin}} \quad (R^2 = 0,9987) \quad (3.3)$$

Bu doğrunun eğiminden molar absorpsiyon katsayısı $1,035 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Tablo 3.4. Başlangıç derişimi $2 \cdot 10^{-4}$ M olan Ce(IV) çözeltisinin farklı derişimlerdeki quercetin çözeltileri ile reaksiyonu sonucu artan Ce(IV) çözeltilerinin absorbens değeri (kör çözelti:su, $\lambda_{\max}=320$ nm, $[H^+]=0,31$ M)

[Quercetin]/ 10^5 M	A
0,000	1.001
0,212	0.754
0,424	0.545
0,636	0.320
0,848	0.071



Şekil 3.7. Ce(IV)-Quercetin reaksiyonu için kalibrasyon grafiği (referans saf su)

Ayrıca quercetin ve Ce(IV) arasındaki reaksiyonu incelemek amacıyla kalibrasyon denemeleri 6 kez tekrarlanmıştır. Çizilen kalibrasyon eğrilerinin x eksenini kestiği noktadaki quercetin konsantrasyonu başlangıçta konan Ce(IV) konsantrasyonuna ekivalen olacaktır. Grafikten elde edilen değerler Tablo 3.5’de gösterilmiştir. Bu tablodan görüleceği gibi 1 mol quercetin için yaklaşık 20 mol Ce(IV) ile reaksiyona girmektedir. Ayrıca quercetin-Ce(IV) reaksiyonu için elde edilen kalibrasyon eğrilerinin 320 nm deki molar absorpsiyon katsayıları ile Ce(IV)' ün aynı dalga boyunda kalibrasyon grafiğinden hesaplanan molar absorpsiyon değerleri arasındaki oranda aynı tabloda gösterilmiştir. Bu oranlardanda ortalama 19,82 değeri elde edilmiştir.

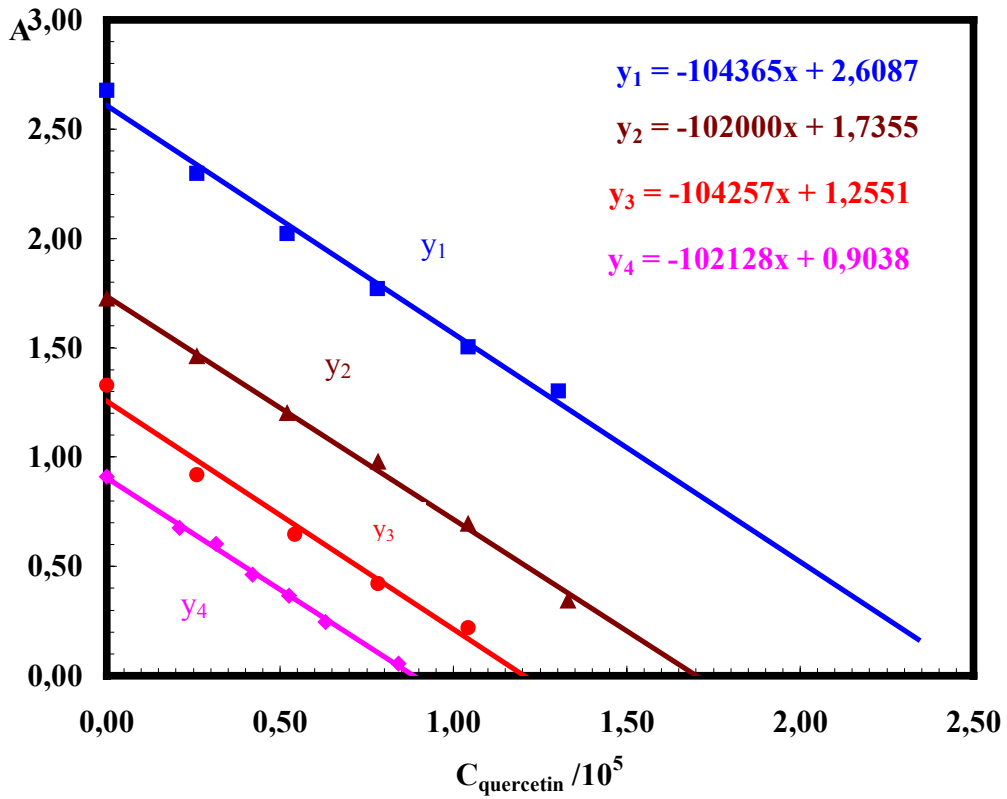
Tablo 3.5. Ce(IV)-quercetin reaksiyonu için çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri, ve mol oranları ($\epsilon_{\text{Ce(IV)}}=5,21 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

Deney No	$\epsilon_{\text{quercetin}}$ $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	başlangıç [Quercetin]	[Ce(IV)]	[Ce(IV)]/ [Quercetin]	$\epsilon_{\text{quercetin}} /$ $\epsilon_{\text{Ce(IV)}}$
1	$1,021 \times 10^5$	$8,85 \times 10^{-6}$	$1,85 \times 10^{-4}$	20,90	19,60
2	$1,042 \times 10^5$	$1,20 \times 10^{-5}$	$2,55 \times 10^{-4}$	21,25	20,00
3	$1,044 \times 10^5$	$2,50 \times 10^{-5}$	$5,00 \times 10^{-4}$	20,00	20,03
4	$1,020 \times 10^5$	$1,72 \times 10^{-5}$	$3,30 \times 10^{-4}$	19,18	19,57
5	$1,034 \times 10^5$	$1,56 \times 10^{-5}$	$3,10 \times 10^{-4}$	19,87	19,85
6	$1,035 \times 10^5$	$9,60 \times 10^{-6}$	$2,00 \times 10^{-4}$	20,83	19,86
Ortalama	$1,033 \times 10^5$			20,34	19,82
ORT [Ce(IV)]/[Quercetin]=					20,08

3.8. Geliştirilen Spektrofotometrik Yöntem ile İlgili Çalışmalar

3.8.1. Ce(IV) ile Quercetin Derişimleri Arasındaki Bağntı

Ce(IV) ile quercetin derişimleri arasındaki bağıntıyı incelemek amacı ile sabit miktardaki 5×10^{-4} M, $3,3 \times 10^{-4}$ M, $2,55 \times 10^{-4}$ M ve $1,85 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine gittikçe artan miktarlarda quercetin çözeltileri katıldı. Elde edilen çözeltilerin 320 nm de absorpsanları ölçüldü ve absorpsanlarla quercetin derişimleri arasında grafikler çizildi (Şekil 3.8). Şekil 3.8’de görüldüğü gibi quercetin derişiminin artması ile absorpsan değerleri lineer olarak azalmakta ve farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki Ce(IV) çözeltileri ile aynı şekilde çizilen quercetin kalibrasyon eğrilerinin birbirine paralel olduğu (eğimlerinin aynı olduğu) görülmektedir. Eğimin aynı olması, farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki Ce(IV)’ün derişimlerindeki değişimin geliştirilen metodun molar absorpsiyon katsayısını etkilemediğini göstermektedir.



Şekil 3.8. Farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki Ce(IV) çözeltileri ile çizilen quercetin kalibrasyon grafikleri

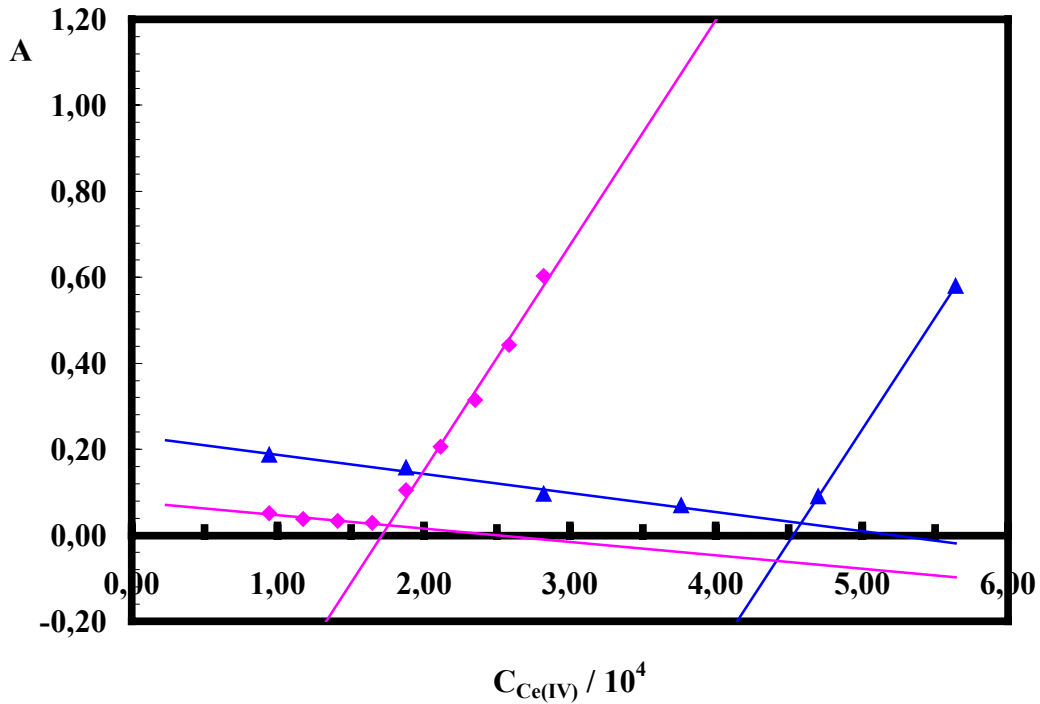
3.8.2. Spektrofotometrik Titrasyon

Quercetin ve seryum arasındaki bağıntıyı incelemek amacı ile spektrofotometrik titrasyon yöntemine de başvurulmuştur. Bu deneyler iki şekilde yapılmıştır.

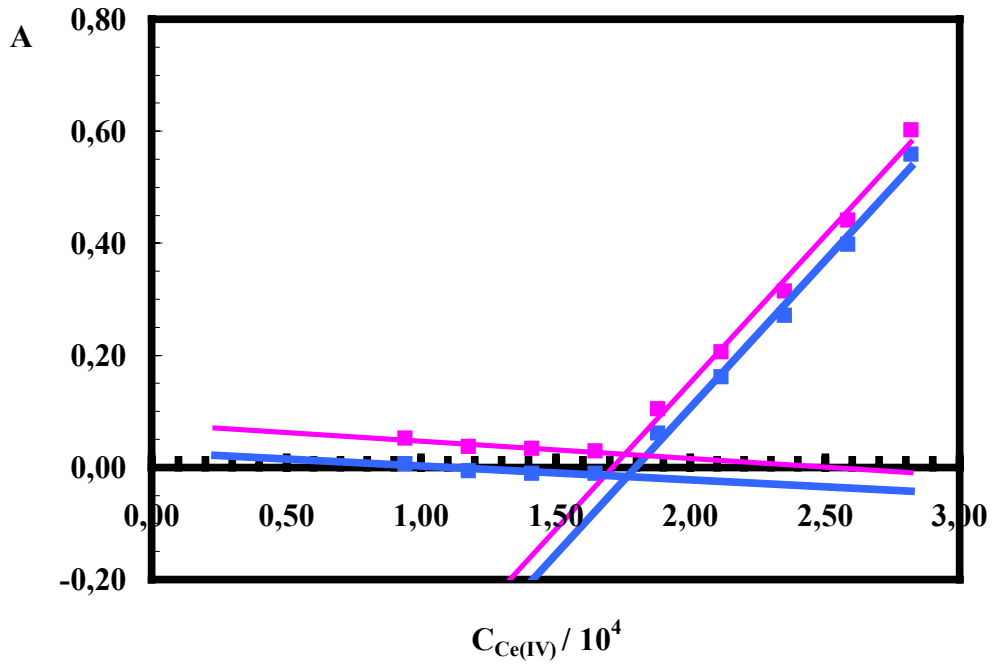
3.8.2.1. Titrant Olarak Ce(IV) Çözeltisinin Kullanılması

Sabit miktarda $8,61 \times 10^{-6}$ M ve $2,15 \times 10^{-5}$ M quercetin çözeltileri üzerine gittikçe artan miktarlardaki Ce(IV) çözeltileri katıldı. Elde edilen çözeltilerin 320 nm' de absorbansları ölçüldü ve absorbanslarla seryum derişimleri arasında grafik çizildi. Şekil 3.9' de görüldüğü gibi quercetine eşdeğer miktarda seryum ilavesinden sonra absorbans (seryumdan dolayı) doğrusal olarak artmaktadır. Eğrinin dönüm noktasından quercetine eşdeğer miktardaki Ce(IV) miktarları sırasıyla $1,76 \times 10^{-4}$ M ve $4,6 \times 10^{-4}$ M olarak bulundu. Bu değerlerden quercetin ve seryum reaksiyonun stokiometrik katsayıları hesaplandı. Sonuçlar Tablo 3.6'da gösterilmiştir.

$8,61 \times 10^{-6}$ M sabit quercetin ile yapılan deney referans çözeltinin etkisini incelemek amacıyla aynı miktarda quercetin içeren kör çözeltiliye karşıda yapılmış ve dönüm noktasının sapmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.10.). Bu yapılan çalışmada referans olarak su kullanılmasını doğrulamıştır.



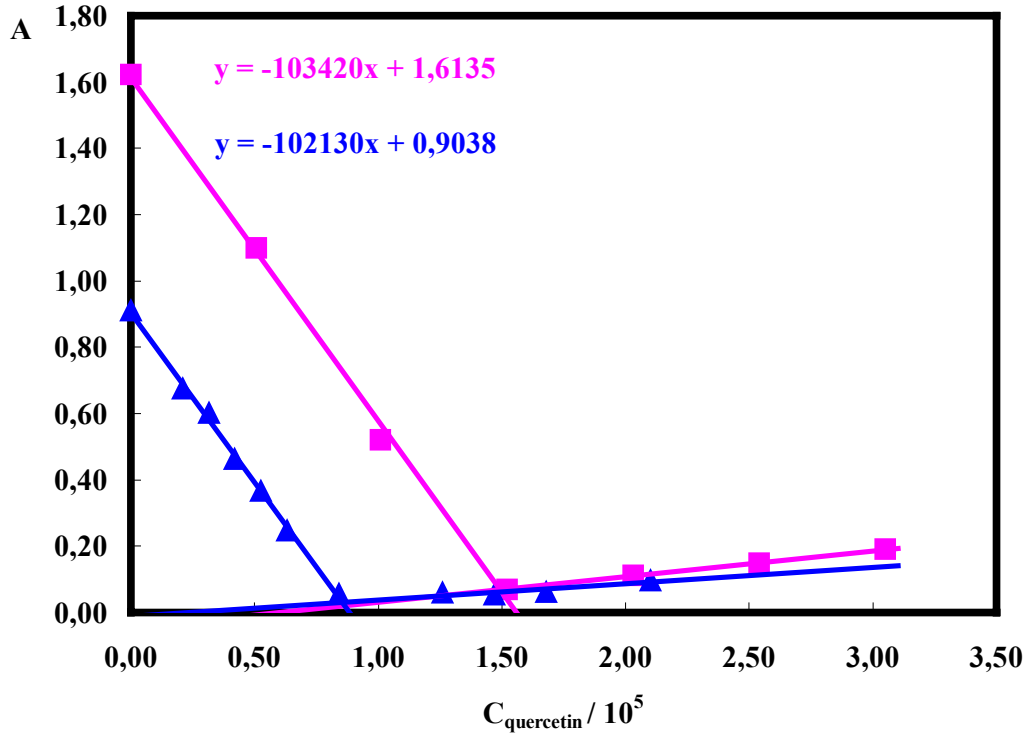
Şekil 3.9. $8,61 \times 10^{-6}$ M (■) ve $2,152 \times 10^{-5}$ M (▲) quercetin çözeltilerinin standart Ce(IV) çözeltisi ile titrasyonu (referans: saf su)



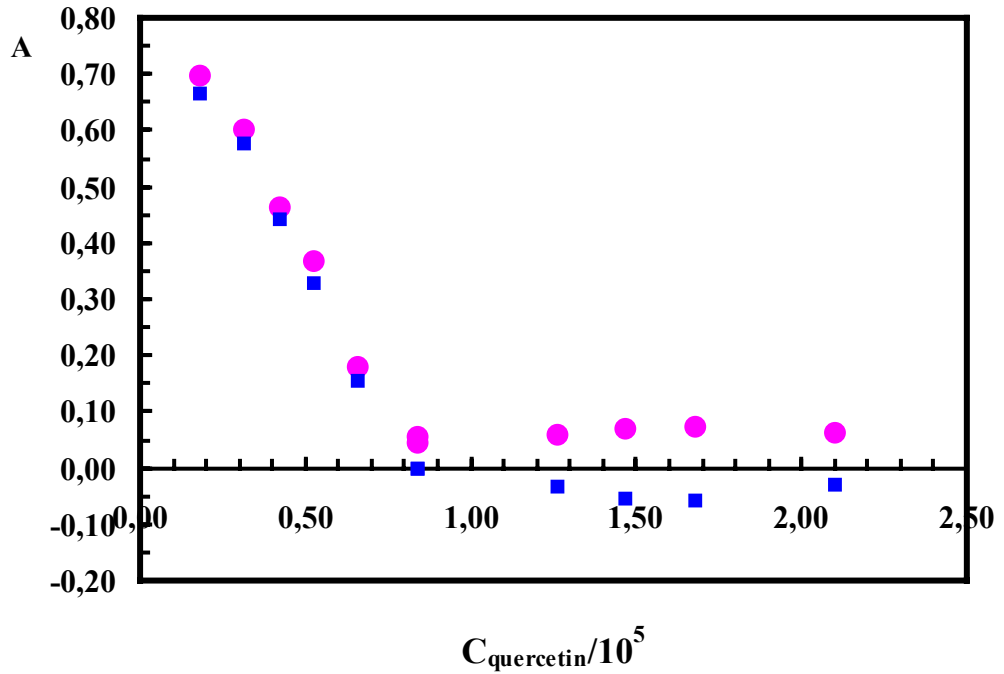
Şekil 3.10. $8,61 \times 10^{-6}$ M quercetin standart Ce(IV) çözeltisi ile titrasyonu
 (■)Referans çözelti: su;
 (■)Referans çözelti: $8,61 \times 10^{-6}$ M quercetin çözeltisi

3.8.2.2. Titrant Olarak Standart Quercetin Çözeltisinin Kullanılması

Sabit miktardaki $3,1 \times 10^{-4}$ M ve $1,85 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine gittikçe artan miktarlarda quercetin çözeltileri katıldı. Elde edilen çözeltilerin 320 nm' de absorbansları ölçüldü ve absorbanslarla quercetin derişimleri arasında grafik çizildi. Şekil 3.11.'da görüldüğü gibi başlangıçta alınan sabit miktardaki Ce(IV) çözeltisine eşdeğer miktarda quercetin ilavesinden sonra, quercetin bu dalga boyunda kayda değer absorpsiyonu olmadığı için, absorbans eğrisi x eksenine paralel olarak devam etmiştir. Eğrinin dönüm noktasından Ce(IV)'e eşdeğer miktardaki quercetin miktarı $1,49 \times 10^{-5}$ ve $8,6 \times 10^{-6}$ M olarak hesaplandı. Bu değerlerden de quercetin seryumla 20:1 oranında reaksiyona girdiği görülmektedir. Aynı deney sabit tutulan quercetin miktarını içeren kör çözeltiliye karşıda yapılmış ve dönüm noktasının sapmadığı belirlenmiştir (Şekil 3.12). Bu yapılan çalışmalar da referans olarak su kullanılmasını doğrulamıştır.



Şekil 3.11. $3,1 \times 10^{-4}$ M (■) ve $1,85 \times 10^{-4}$ M (▲) Ce(IV) çözeltilerinin değişen konsantrasyonda quercetin çözeltisi ile titrasyonu (referans: saf su)



Şekil 3.12. $1,85 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisi ile değişen konsantrasyonda quercetin titrasyonu

- (●)Referans çözelti: su;
- (■)Referans çözelti: quercetin çözeltisi

Tablo 3.6. Ce(IV) ile quercetin arasındaki spektrofotometrik titrasyon

	[Quercetin]	[Seryum(IV)]	[Ce(IV)]/[quercetin]
Quercetin'in Seryum(IV) ile titrasyonu	2.152×10^{-5} M	4.6×10^{-4} M	21,37
	8.61×10^{-6} M	1.76×10^{-4} M	20,44
	* 8.61×10^{-6} M	1.73×10^{-4} M	20,1
Seryum(IV)'un quercetin ile titrasyonu	1.49×10^{-5} M	3.1×10^{-4} M	20,8
	8.6×10^{-6} M	1.85×10^{-4} M	21,51
	8.5×10^{-6} M	* 1.85×10^{-4} M	21,76

(*referans = quercetin çözeltisi)

3.9. Çeşitli Flavonoidlerin ve Doğal Antioksidanların Geliştirilen Yöntemle Analizi ve Trolox Eş Değerlerinin (TEAC) Hesaplanması

Geliştirilen spektrofotometrik yöntem için verilen işlem basamakları sırasıyla takip edilerek trolox, gallik asid, askorbik asid, kateşin, naringin ve narigenin'lerin kalibrasyon grafikleri çizildi ve molar absorpsiyon katsayıları hesaplandı. Diğer yöntemlerle karşılaştırmak için her bileşiğin trolox eşdeğerliklerinin hesaplanması gerekmektedir. Bu nedenle trolox'un Ce(IV) ile reaksiyonu ayrıntılı olarak incelenmiştir.

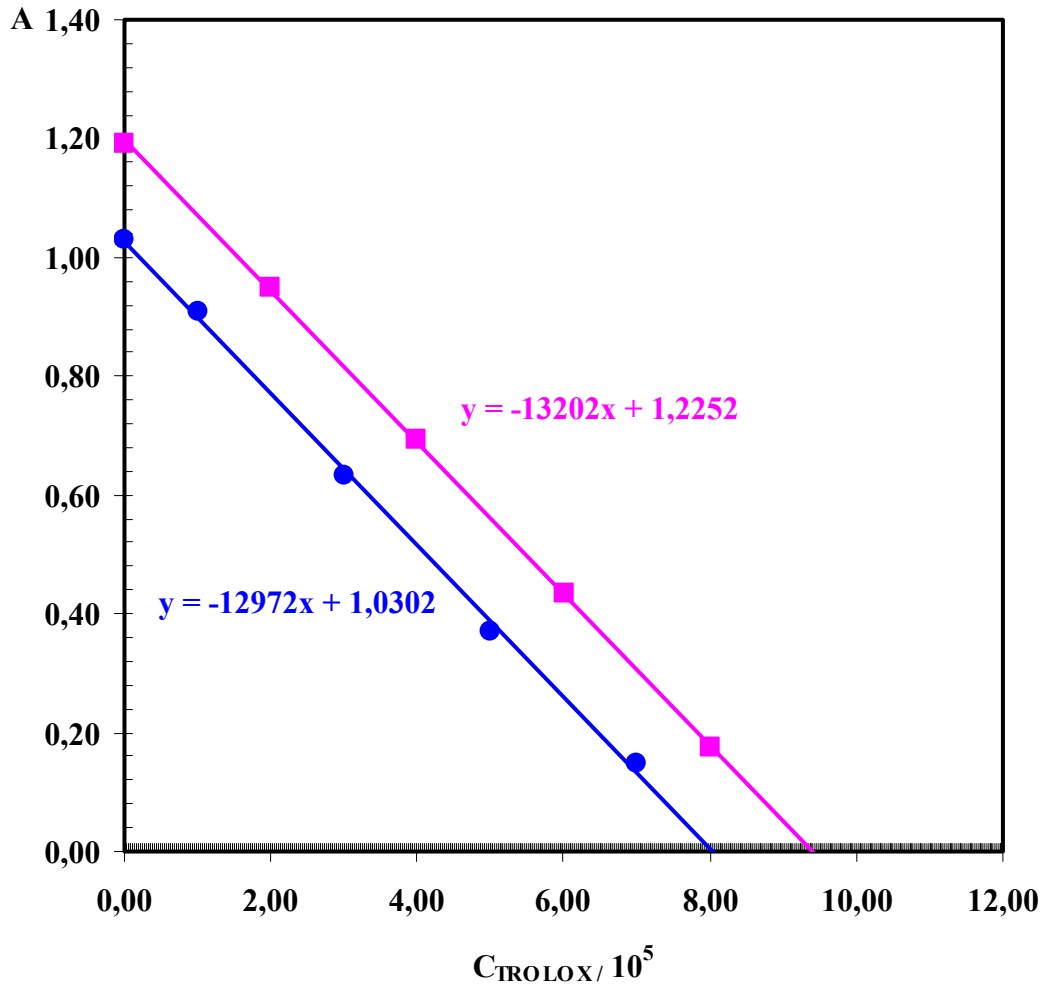
3.9.1. Ce(IV) ve Trolox Reaksiyonunun İncelenmesi

3.9.1.1. Trolox Kalibrasyon Grafiğinin Çizimi

Quercetinde olduğu gibi trolox – Ce(IV) reaksiyonu trolox'un 320 nm'deki Ce(IV)'ün absorbansını söndürmesinden yararlanılarak incelenmiştir. Bunun için $2,3 \times 10^{-4}$ M ve $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine son konsantrasyonu $2,0 \times 10^{-5}$ M - $1,0 \times 10^{-4}$ M arasında değişen trolox çözeltileri katıldı ve reaksiyon sonucu oluşan çözeltilerin absorbansı 320 nm de suya karşı ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri ve trolox konsantrasyonları arasında çizilen kalibrasyon grafikleri şekil 3.13'de gösterilmiştir. Bu grafiklerden hesaplanan molar absorptivite katsayıları ve stokiyometrik mol oranları tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7. Ce(IV)- trolox reaksiyonu için çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ve mol oranları ($\epsilon_{\text{Ce(IV)}} = 5,21 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

[Ce(IV)]	[Trolox]	[Ce(IV)]/ [Trolox]	ϵ_{trolox} $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{trolox}} / \epsilon_{\text{Ce(IV)}}$
$2,3 \times 10^{-4}$	$9,2 \times 10^{-5}$	2,5	$1,32 \times 10^4$	2,53
$2,0 \times 10^{-4}$	$8,0 \times 10^{-5}$	2,5	$1,29 \times 10^4$	2,49



Şekil 3.13. Farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki Ce(IV) çözeltileri ile çizilen trolox kalibrasyon grafikleri

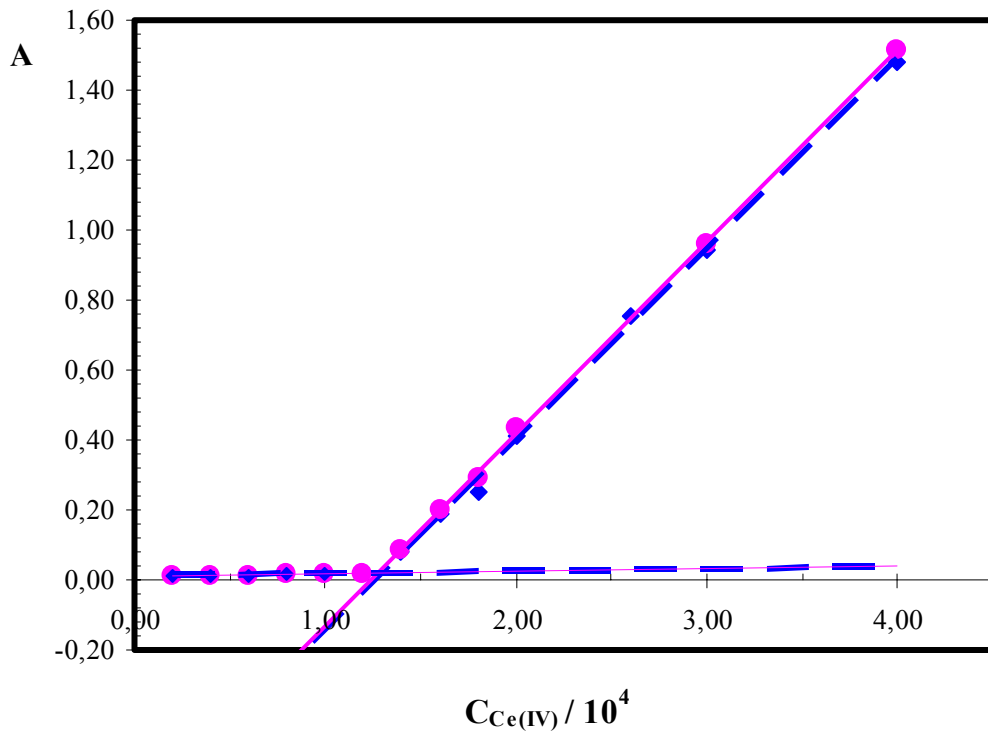
- (■) $2,3 \times 10^{-4} \text{ M Ce(IV)}$
- (●) $2,0 \times 10^{-4} \text{ M Ce(IV)}$

3.9.1.2. Spektrofotometrik Titrasyon

Trolox ve seryum arasındaki bağıntıyı incelemek amacı ile spektrofotometrik titrasyon yöntemine başvurulmuştur. Spektrofotometrik titrasyon deneyleri iki şekilde yapılmıştır.

3.9.1.2.1. Titrant Olarak Ce(IV) Çözeltisinin Kullanılması

0,5 mL $1,0 \times 10^{-3}$ M trolox çözeltileri üzerine son konsantrasyonları $2,0 \times 10^{-5}$ M - $4,0 \times 10^{-4}$ M arasında değişen Ce(IV) çözeltileri katıldı. Elde edilen çözeltilerin son sülfürik asit konsantrasyonu 0,3 M olacak şekilde ayarlandıktan sonra saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. 320 nm'de absorbansları referans çözeltileri örnek ve saf suya karşı ölçüldü ve absorbanslarla seryum derişimleri arasında grafik çizildi. Şekil 3.14.'de görüldüğü gibi trolox'a eşdeğer miktarda seryum ilavesinden sonra absorbans Ce(IV)'ün absorbansından dolayı doğrusal olarak artmaktadır. Eğrinin dönüm noktasından trolox miktarına eşdeğer miktardaki Ce(IV) miktarları her iki referans çözeltisine karşı $1,25 \times 10^{-4}$ M olarak bulundu. Bu değerden trolox ve Ce(IV) reaksiyonun stokiyometrik katsayıları 2,5 olarak hesaplandı.



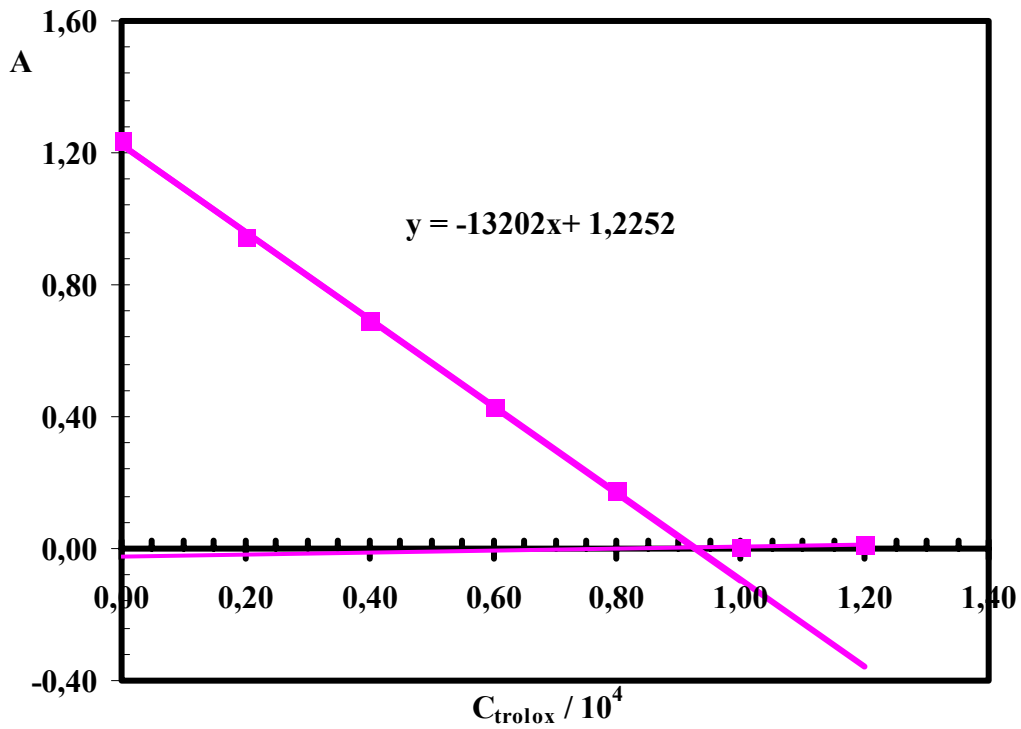
Şekil 3.14. $5,0 \times 10^{-5}$ M trolox çözeltisinin standart Ce(IV) çözeltisi ile spektrofotometrik tirasyonu

(●)Referans çözelti: su;

(■)Referans çözelti: $5,0 \times 10^{-5}$ M trolox çözeltisi

3.9.1.2.2. Titrant Olarak Standart Trolox Çözeltisinin Kullanılması

1,15 mL $2,0 \times 10^{-3}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine gittikçe artan miktarlarda trolox çözeltileri katıldı. Bir üsteki deneyde trolox ve su referanslarına karşı çizilen grafiklerden aynı sonuç elde edildiği için örneklerin sadece suya karşı 320 nm' de absorbansları ölçüldü ve absorbanslarla trolox derişimleri arasında grafik çizildi. Şekil 3.15.'de görüldüğü gibi başlangıçta alınan sabit miktardaki Ce(IV) çözeltisine eşdeğer miktardaki trolox miktarı eğrinin x eksenini kestiği noktadan $9,2 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplandı. Bu değerlerden de trolox'un Ce(IV) ile 2,5:1 oranında reaksiyona girdiği görülmektedir.



Şekil 3.15. $2,3 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisinin 320 nm'de trolox çözeltisi ile spektrofotometrik tirasyonu

3.9.2. Ce(IV) ve Askorbik Asit Reaksiyonunun İncelenmesi

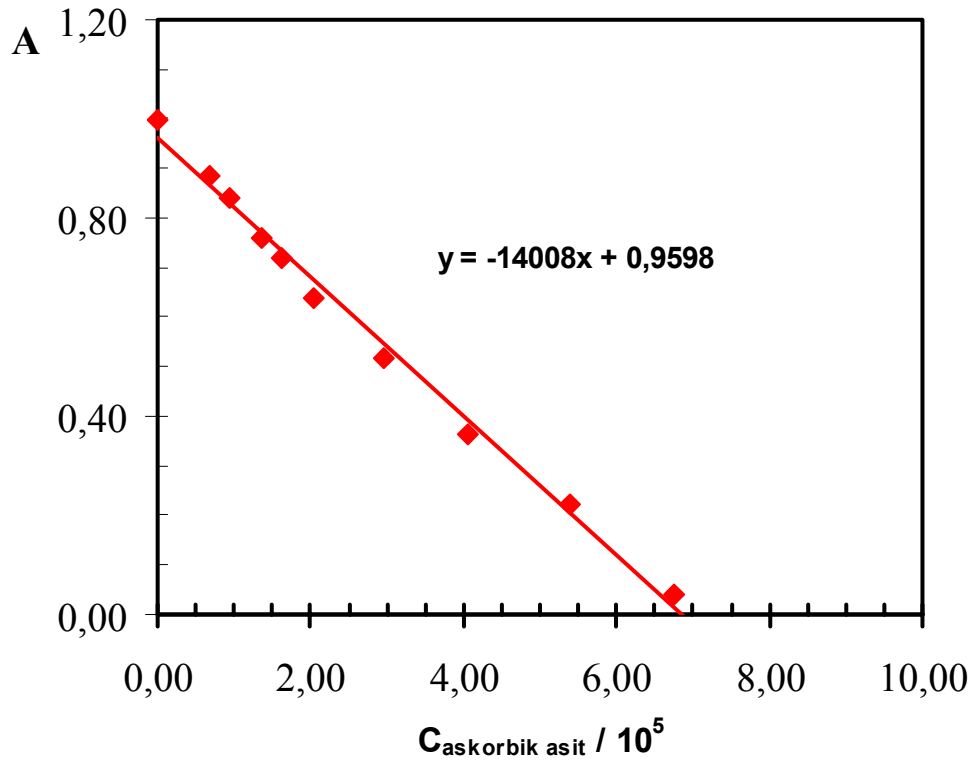
3.9.2.1. Askorbik Asit İçin Kalibrasyon Grafiğinin Çizimi

Quercetin ve trolox da olduğu gibi askorbik asit – Ce(IV) reaksiyonu 320 nm'deki askorbik asitin Ce(IV)'ün absorbansını söndürmesinden yararlanılarak incelenmiştir. Bunun için $1,98 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisi üzerine son konsantrasyonu $6,75 \times 10^{-6}$ M - $6,75 \times 10^{-5}$ M arasında değişen askorbik asit çözeltileri katıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra reaksiyon sonucu oluşan çözeltilerin absorbansı 320 nm

de suya karşı ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri ve askorbik asit konsantrasyonları ile çizilen kalibrasyon grafiği şekil 3.16’da gösterilmiştir. Bu grafiğin eğiminden hesaplanan molar absortivite katsayısı ve eğrinin x eksenini kestiği noktadan hesaplanan stokiometrik mol oranı tablo 3.8.A’da verilmiştir.

Tablo 3.8. Ce(IV)- askorbik asit reaksiyon için **A:** kalibrasyon grafiği sonuçları ($\epsilon_{\text{Ce(IV)}} = 5,21 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) **B:** Askorbik asit ile titrasyon sonuçları **C:** Ce(IV) ile titrasyon sonuçları

	[Ce(IV)]	[Askorbik Asit]	[Ce(IV)]/ [Askorbik Asit]	$\epsilon_{\text{askorbik asit}}$ $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	$\epsilon_{\text{askorbik asit}} /$ $\epsilon_{\text{Ce(IV)}}$
A	$1,98 \times 10^{-4}$	$6,80 \times 10^{-5}$	2,91	$1,40 \times 10^4$	2,69
B	$2,0 \times 10^{-4}$	$6,75 \times 10^{-5}$	2,96	$1,43 \times 10^4$	2,75
C	$7,59 \times 10^{-5}$	$2,7 \times 10^{-5}$	2,81	-	-



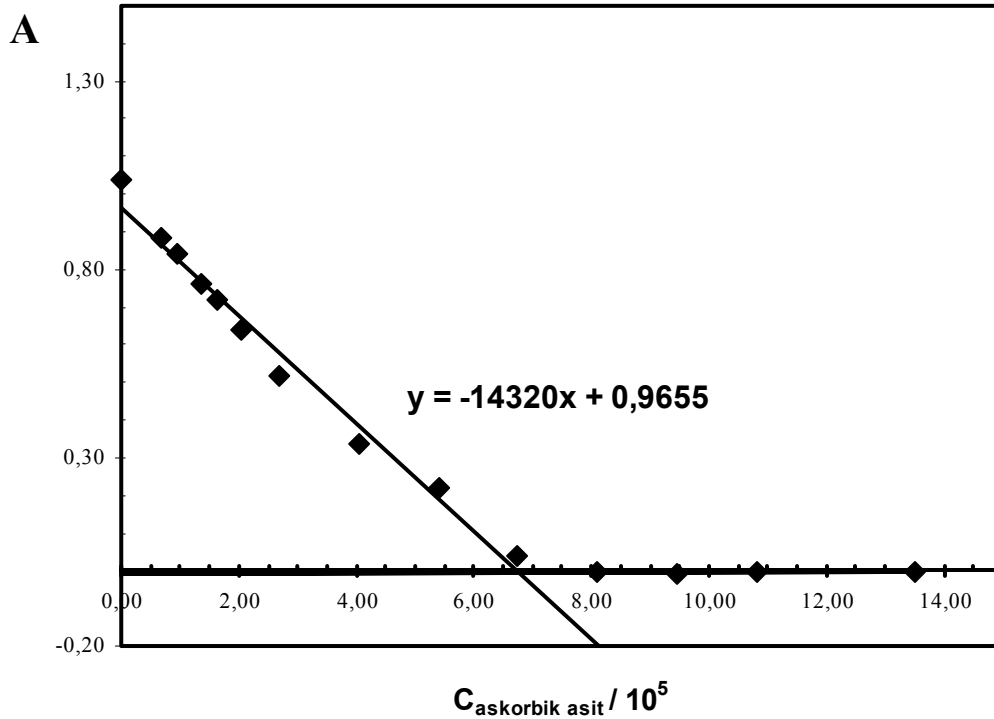
Şekil 3.16. Askorbik asit’in kalibrasyon grafiği

3.9.2.2. Spektrofotometrik Titrasyon

Askorbik asit ve Ce(IV) arasındaki stokiyometrik oranı belirlemek amacı ile spektrofotometrik titrasyon yönteminde başvurulmuştur. Spektrofotometrik titrasyon Ce(IV) iyonlarının askorbik asit ile askorbik asit çözeltisinin Ce(IV) iyonları ile titre edilmesi şeklinde iki yoldan yapılmıştır.

3.9.2.2.1. Titrant Olarak Standart Askorbik Asit Çözeltisinin Kullanılması

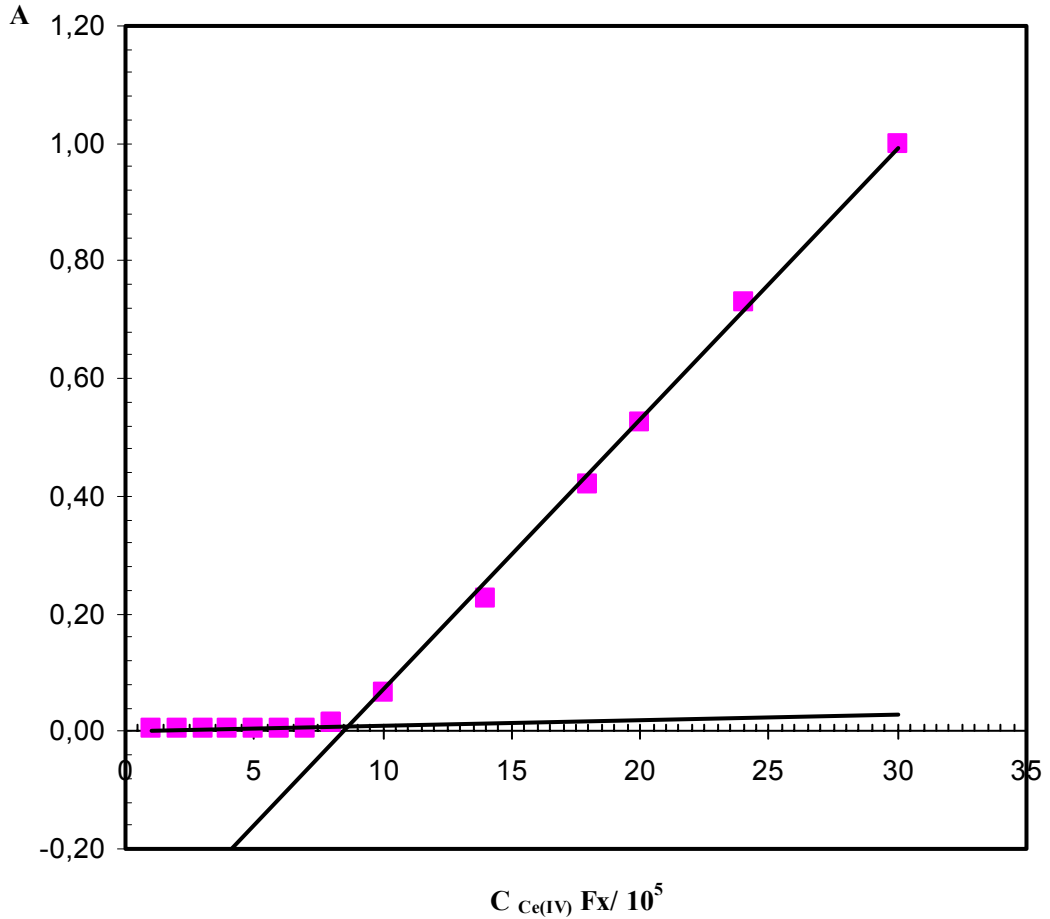
1,0 mL $2,0 \times 10^{-3}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine son $6,75 \times 10^{-6}$ M - $1,35 \times 10^{-4}$ M arasında değişen askorbik asit çözeltileri katıldı. Örneklerin suya karşı 320 nm' de absorbansları ölçüldü ve absorbanslarla askorbik asit derişimleri arasında grafik çizildi. Şekil 3.17.'de görüldüğü gibi başlangıçta alınan sabit miktardaki Ce(IV) çözeltisine eşdeğer miktardaki askorbik asit miktarı eğrinin x eksenini kestiği noktadan $6,75 \times 10^{-5}$ M olarak hesaplandı. Bu değerlerden de askorbik asit'in seryumla 2,96:1 oranında reaksiyona girdiği görülmektedir (Tablo 3.8.B).



Şekil 3.17. $2,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltileri üzerine değişen konsantrasyonlardaki askorbik asit çözeltisi ile spektrofotometrik titrasyonu ($S= 6,75 \times 10^{-5}$ M)

3.9.2.2.2. Titrant Olarak Ce(IV) Çözeltisinin Kullanılması

0,2 mL $1,35 \times 10^{-3}$ M sabit askorbik asit çözeltileri üzerine son konsantrasyonları $F \times 1,0 \times 10^{-5}$ M ve $F \times 3,0 \times 10^{-4}$ M aralığında olacak şekilde Ce(IV) çözeltileri katıldı (Faktör=0,893). Elde edilen çözeltilerin son sülfirik asit konsantrasyonu 0,3 M olacak şekilde ayarlandıktan sonra saf su ile 10 mL'ye tamamlandı. 320 nm' de absorbansları referans saf suya karşı ölçüldü ve absorbanslarla seryum derişimleri arasında grafik çizildi. Şekil 3.18.'de görüldüğü gibi askorbik asite eşdeğer miktarda seryum ilavesinden sonra absorbans seryum'un absorbansından dolayı doğrusal olarak artmaktadır. Eğrinin dönüm noktasından askorbik asit miktarına eşdeğer miktardaki Ce(IV) miktarı $7,59 \times 10^{-5}$ M ($8,5 \times 10^{-5} \times F$) olarak bulundu (Tablo 3.8.C).



Şekil 3.18. $2,7 \times 10^{-5}$ M askorbik asit çözeltisinin standart Ce(IV) çözeltisi ile spektrofotometrik tirasyonu ($F_{Ce(IV)} = 0,893$) $S = 0,893 \times 8,5 = 7,59$

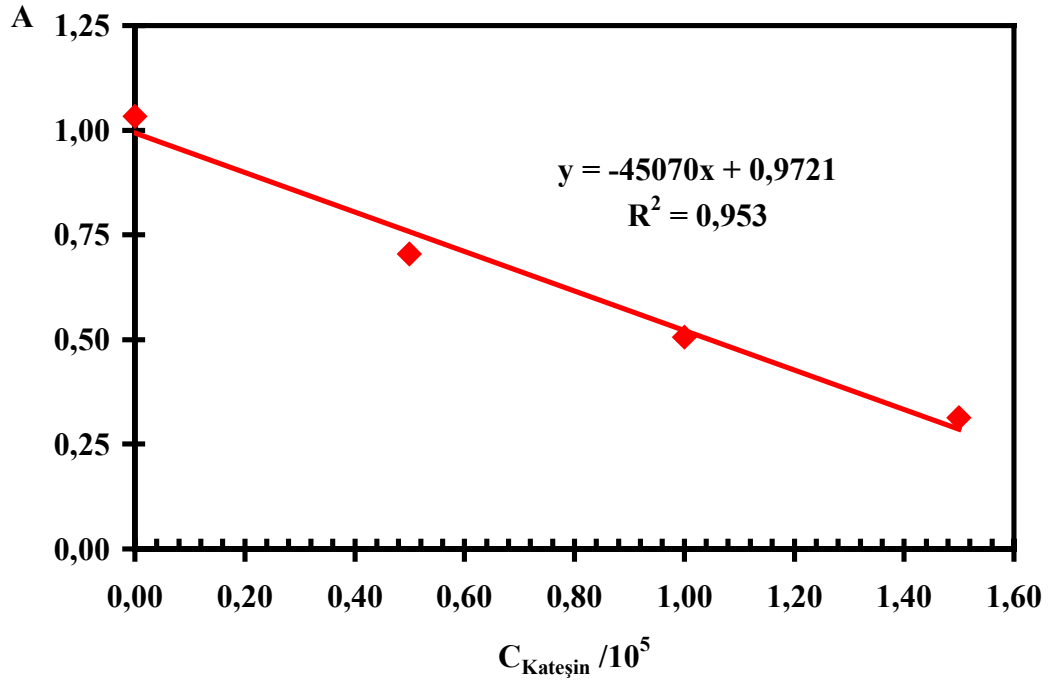
3.10. Diğer Flavonoidlerin Ce(IV) İle Reaksiyonu

Geliştirilen yöntem naringin, naringenin, kateşin ve gallik asit içinde uygulanmıştır. Bulunan sonuçlar tablo 3.9’da ve kalibrasyon grafikleri şekil 3.19, 3.20, 3.21, 3.22’de gösterilmiştir.

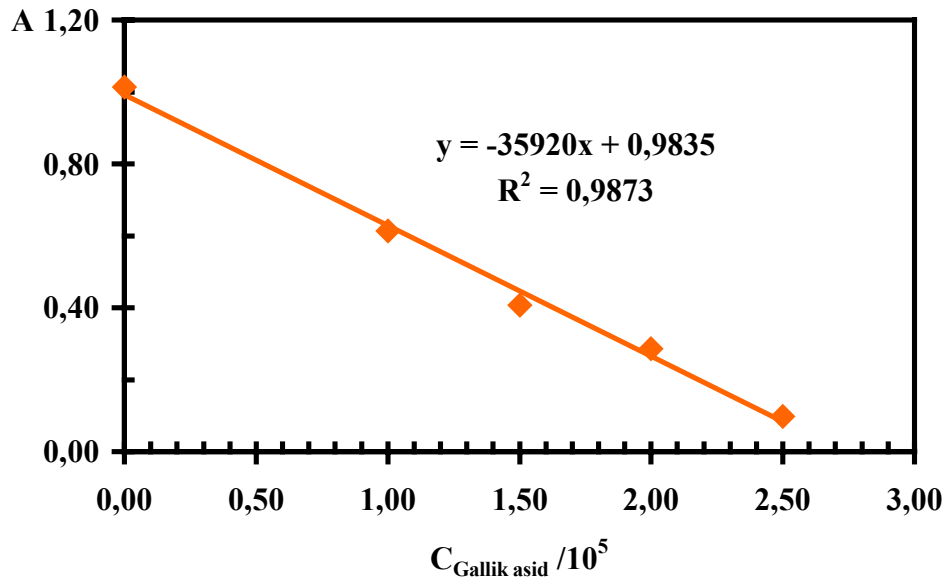
Tablo 3.9. Ce(IV)- flavonoidler arasındaki reaksiyon için çizilen kalibrasyon grafiklerinin eğimleri ve mol oranları ($\epsilon_{\text{Ce(IV)}} = 5,21 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

Flavonoidler	$\epsilon_{\text{Flavonoid}} / \epsilon_{\text{Ce(IV)}}$	$\epsilon_{\text{Flavonoid}} \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	$[\text{Ce(IV)}] / [\text{Flavonoid}]$
Naringenin	16,48	$8,59 \times 10^4$	17,38
Naringin	13,35	$6,96 \times 10^4$	13,83
Kateşin	8,64	$4,50 \times 10^4$	9,44
*Gallik asit	6,33	$3,30 \times 10^4$	7,48

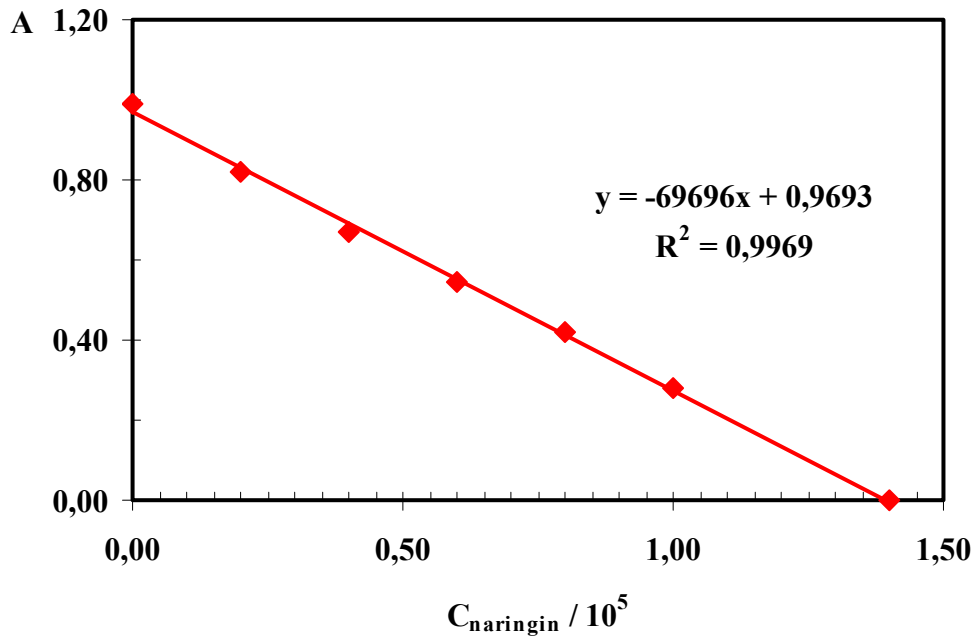
* Doğal antioksidan



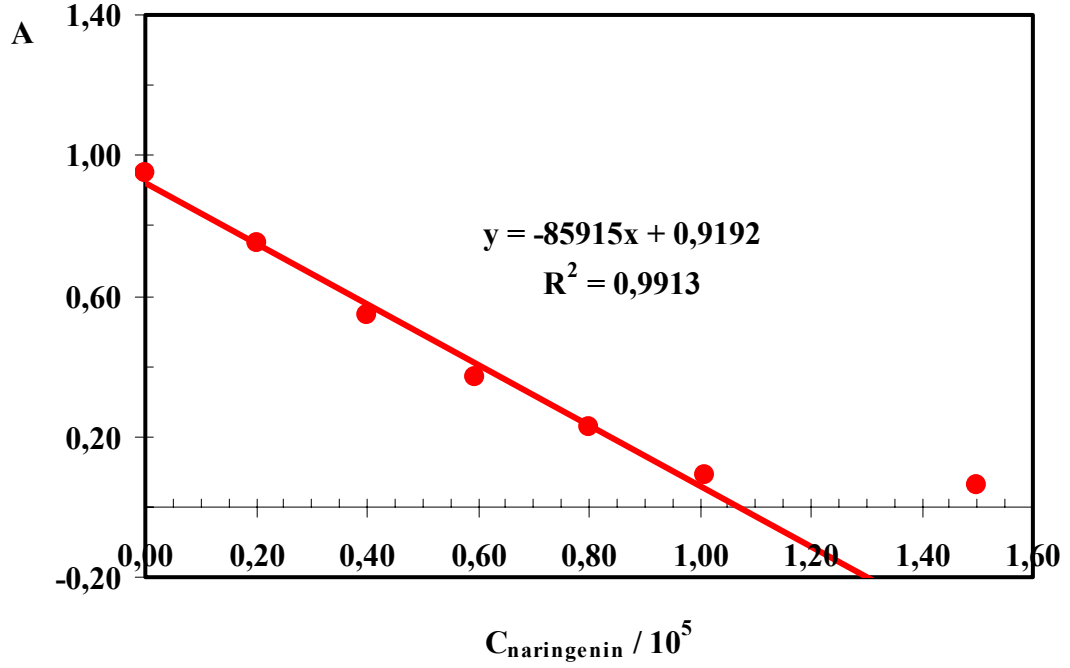
Şekil 3.19. Kateşinin Kalibrasyon Grafiği, referans: su $\lambda_{\text{max}}=320 \text{ nm}$, $[\text{H}^+]=0,31 \text{ M}$



Şekil 3.20. Gallik Asitin Kalibrasyon Grafiği, referans:su, $\lambda_{\text{max}}=320\text{nm}$, $[\text{H}^+]=0,31\text{ M}$



Şekil 3.21. Naringin Kalibrasyon Grafiği, referans:su, $\lambda_{\text{max}}=320\text{nm}$, $[\text{H}^+]=0,31\text{ M}$



Şekil 3.22. Naringenin Kalibrasyon Grafiği, referans:su, $\lambda_{\text{max}}=320\text{nm}$, $[\text{H}^+]=0,31\text{ M}$

Bulunan bu sonuçlardan her flavonoidin trolox eşdeğerleri hesaplandı. Elde edilen değerler Tablo 3.10' da verilmiştir.

Tablo 3.10. Flavonoidlerin geliştirilen yöntemle hesaplanan molar absorpsiyon katsayıları ve trolox eşdeğerleri (TEAC)

Flavonoidler ve $\varepsilon \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ doğal antioksidanlar		Trolox eşdeğerlikleri TEAC(mM)		
		Geliştirilen Yöntem		*ABST radikal yöntemi
		$\varepsilon_{\text{Flavonoid}} / \varepsilon_{\text{Trolox}}$	Mol oranları	
Trolox	$1,310 \times 10^4$	-	-	-
Quercetin	$1,035 \times 10^5$	7,9	8,0	4.7
Gallik asid	$3,30 \times 10^4$	2.74	2,99	
Askorbik asid	$1,42 \times 10^4$	1,08	1,13	1.0
Kateşin	$4,50 \times 10^4$	3,44	3,77	2.4
Naringenin	$8,59 \times 10^4$	6,56	6,95	1.5
Naringin	$6,97 \times 10^4$	5,32	5,53	0.3

*[57]

3.11. İnterfere Edici Maddelerin Etkisi

Ortamda bulunabilecek diğer organik bileşiklerin Ce(IV) ile reaksiyon verip vermediğini incelemek için sülfirik asit konsantrasyonu 0,3 M olan sabit miktardaki 1,5 mL 2×10^{-3} M Ce(IV) çözeltileri üzerine 0,1; 0,5; 1 mL $3,35 \times 10^{-4}$ M Asetil salisilik asit çözeltileri ve 1; 1,5; 2; 2,5 mL $4,72 \times 10^{-3}$ M Benzoik asit çözeltileri sırasıyla katıldı. Çözelti karışımları saf su ile 10 mL ye tamamlandı. Çözeltiler biraz karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 30 dakika boyunca bekletildi. Reaksiyon karışımlarının absorbansı 320 nm de saf suya karşı ölçüldü. Elde edilen sonuçlar tablo 3.11 – 3.12 de verilmiştir

Tablo 3.11. 3×10^{-4} M Ce(IV) çözeltisine asetil salisilik asit çözeltilerinin etkisi

[Asetil Salisilik Asit]	0	$3,35 \times 10^{-6}$	$1,68 \times 10^{-5}$	$9,44 \times 10^{-5}$
Absorbans				
($\lambda = 320$ nm)	1,575	1,661	1,548	1,503

Tablo 3.12. 3×10^{-4} M Ce(IV) çözeltilerine benzoik asit çözeltilerinin etkisi

[Benzoik Asit]	0	$4,72 \times 10^{-4}$	$7,08 \times 10^{-4}$	$9,44 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^{-3}$
Absorbans					
($\lambda = 320$ nm)	1,575	1,547	1,565	1,505	1,478

3.12. Analiz Yönteminin İstatiksel Değerlendirilmesi

Analiz yönteminin istatiksel değerlendirilmesi için, $4,24 \times 10^{-6}$ M quercetin içeren 10 ayrı örneğin, analiz yönteminde anlatıldığı gibi 2×10^{-4} M Ce(IV) içeren çözeltiler üzerine ilave edildikten 30 dakika sonra 320 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Her örnekteki quercetin miktarı aşağıda verilen denklem yardımıyla hesaplandı.

$$A_{320} = 0,985 - 1,035 \times 10^5 C_{\text{quercetin}} \quad (3.4)$$

Sonuçlar Tablo 3.13.'de görülmektedir. Bu değerlerden ortalama değer, standart sapma, bağıl standart sapma ve %95 güvenirlilik düzeyinde güven aralığı hesaplandı (Tablo 3.14).

Tablo 3.13. Analiz yönteminin istatistiksel değerlendirilmesi için yapılan deney sonuçları (Ce(IV)'ün başlangıç konsantrasyonu 2×10^{-4} M)

Ölçülen absorbens değerleri ($\lambda = 320 \text{ nm}$)	Bulunan Quercetin / 10^6 (mol/L)
0,544	4,26
0,543	4,27
0,545	4,25
0,546	4,24
0,543	4,27
0,545	4,25
0,543	4,27
0,546	4,24
0,544	4,26
0,547	4,23

Tablo 3.14. Geliştirilen Yöntemin İstatiksel değerlendirilmesi

Ortalama değeri	4,25 x 10⁻⁶
Standart sapma	1,4 x 10⁻⁸
% Bağıl standart sapma	0,35
Minimum değeri	4,23 x 10⁻⁶
Maksimum değeri	4,27 x 10⁻⁶
Varyans	1,96 x 10⁻¹⁶
Ölçüm sayısı (N)	10
Güven aralığı (% 95 güvenirlilik seviyesi)	4,25 x 10⁻⁶ ± 0,01 x 10⁻⁶

3.13. Yöntemin Tayin Sınırlarının Saptanması

Yapılan analizin alt tayin sınırı, spektrofotometre de 0,01 absorbansın okunabileceği esas alınarak aşağıdaki gibi hesaplandı.

$$A = \epsilon_{\text{quercetin}} \times C_{\text{quercetin}} \quad (3.5)$$

$$0,01 = 1,03 \times 10^5 \times C_{\text{quercetin}}$$

$$C_{\text{quercetin}} = 9,6 \times 10^{-8} \text{ M} ; 3,27 \times 10^{-5} \text{ g.L}^{-1} ; 32,74 \text{ ppb}$$

Analizin alt tayin sınırı istatistiksel olarak da hesaplandı. Bunun için 10 tane, 10 mL'lik deney tüplerine $2,0 \times 10^{-3} \text{ M}$ $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 1 mL konulduktan sonra üzerlerine 9 mL saf su ilave edip birbirinin aynı 10 örnek hazırlandı. Quercetin içermeyen bu çözeltilerin absorbansı 320 nm dalga boyunda ölçüldü. Sonuçların standart sapması hesaplandı. IUPAC komisyonuna göre, hesaplanan bu standart sapmanın 3 katı, molar absorpsiyon katsayısına bölünerek yöntemin alt tayin sınırı 0,134 ppm olarak hesaplandı. Elde edilen sonuçlar tablo 3.15'de gösterilmiştir.

Tablo 3.15. Geliştirilen spektrofotometrik yöntemin alt tayin sınırının hesaplanması

Örnek sayısı	Absorbans ($\lambda_{\max.}$)	İstatiksel Veriler
1	1,0253	
2	0,9932	
3	1,0040	$X_{\text{ort}} = 1,0142$
4	1,0050	$S_t = 1,36 \times 10^{-2}$
5	1,0090	$3 \times S_t = 4,09 \times 10^{-2}$
6	1,0110	$C_L = 3 \times S_t / \epsilon_{\text{quercetin}} \text{ (IUPAC)}$
7	1,0140	$C_L = 4,09 \times 10^{-2} / 1,03 \times 10^5$
8	1,0350	$C_L = 3,96 \times 10^{-7} \text{ M}$
9	1,0320	$C_L = 1,34 \times 10^{-4} \text{ g.L}^{-1}$
10	1,0130	$C_L = 0,134 \text{ ppm}$

Üst tayin sınırının hesaplanmasında Lambert Beer kanunu dikkate alınmıştır. Bu yasaya göre 1 absorbans biriminin üzerine çıkılmayacak şekilde çalışılmalıdır. Quercetin içermeyen Ce(IV) çözeltileri için bu değer $2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ 'dir. Başlangıç olarak bu Ce(IV) çözeltisi alındığında en fazla ölçebileceğimiz quercetin miktarı Ce(IV)'ün quercetin ile 20:1 oranında reaksiyona girdiği göz önüne alınarak

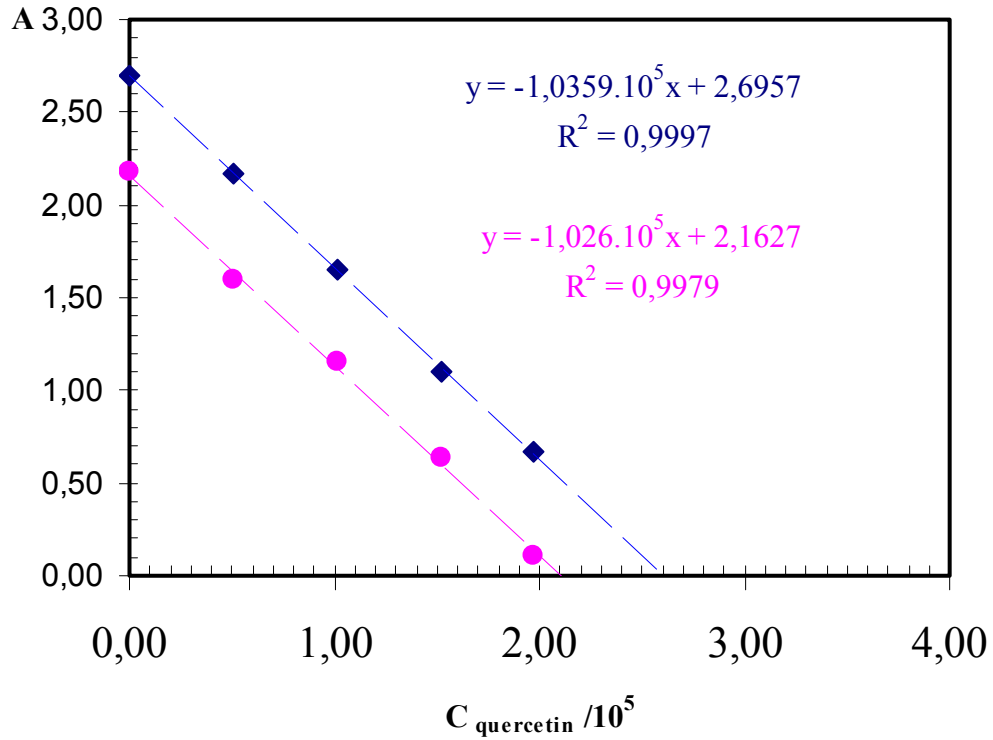
$1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ Quercetin; $3,38 \times 10^{-3} \text{ g.L}^{-1}$; 3,38 ppm olarak hesaplanır.

Geliştirilen yöntem Ce(IV) ile quercetin arasındaki reaksiyonun sonucunda ortamda kalan Ce(IV)'ün absorbansının ölçülmesine dayandığından, Ce(IV)'ün derişimi yükseldikçe, Quercetin'in derişimide buna bağlı olarak yükselebilir. Ancak quercetin'in yüksek konsantrasyonlarında ($1,0 \times 10^{-5} \text{ M}$ 'dan daha büyük) 320 nm'de saf suya karşı absorbans değerleri arttığından bu konsantrasyonlardaki örneklerin absorbans ölçümlerinde referans çözeltisi olarak örnek çözeltisi kullanılmalıdır. Böylece analiz yöntemin üst tayin sınırı yüksek değerlere çekilebilir.

3.14. Geliştirilen Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

3.14.1. Lineerlik Testleri

Sülfirik asit konsantrasyonu 0,3 M ve son konsantrasyonu $5,18 \times 10^{-4}$ M olan Ce(IV) çözeltilerine son konsantrasyonları $5,08 \times 10^{-6}$ - $1,971 \times 10^{-5}$ M arasında değişen quercetin çözeltileri ilave edildi. Çözelti karışımı oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra çözelti karışımlarının absorbans değerleri 320 nm de referans saf suya karşı ölçüldü ve quercetin konsantrasyonları ile absorbanslar arasında grafik çizildi (Şekil 3.23.A). Aynı şekilde hazırlanan 2. seri çözeltilere 1g ısırgan/25 mL su olarak hazırlanan ekstraktan 0,1 mL eklendikten sonra aynı işlemler yapıldı ve karışımlarının absorbans değerleri 320 nm de referans saf suya karşı ölçüldü ve quercetin konsantrasyonları ile absorbanslar arasında grafik çizildi (Şekil 3.23.B). Şekil 3.23’de görüldüğü gibi bu doğruların eğimlerinin birbirine yakın olması ısırgan otu içersindeki fenolik yapıdaki bileşiklerin reaksiyon mekanizmasına fazla bir etkisinin olmadığı sonucunu verdi.



Şekil 3. 23. Sulu Isırgan otu ekstraktı ile Quercetin çözeltisinin etkileşimi

A (■) ; Başlangıç çözeltisi: $5,3 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)+ Quercetin çözeltileri ($5,08 \times 10^{-6}$ - $1,971 \times 10^{-5}$ M)

B (●) ; Başlangıç çözeltisi: $5,3 \times 10^{-4}$ M Ce(IV)+ 0,1 mL ısırgan otu ekstraktı)+ Quercetin çözeltileri ($5,08 \times 10^{-6}$ - $1,971 \times 10^{-5}$ M) (sulu ısırgan otu ekstraktı :1g /25mL)

3.14.2. ısırgan Otunun Geliştirilen Yöntemle Analizi

Karadeniz bölgesinden toplanan ısırgan otunun geliştirilen yöntemle analizi yapıldı. Bunun için 1 g kurutulmuş ısırgan otundan elde edilen 250 mL'lik sulu ekstraktlardan 0,3 - 4,0 mL alınarak 4×10^{-4} M Ce(IV) çözeltileri üzerine ilave edildikten sonra analiz yönteminde anlatıldığı gibi 320 nm dalga boyunda absorbansları ölçüldü. Hesaplar iki yoldan yapılabilir. 1. yöntemde ısırgan otu miktarları ve absorbanslar arasında grafik çizilerek, elde edilen eğrinin dönüm noktasındaki ısırgan otu miktarı belirlendi. Yapılan deneyde başlangıçta alınan 4×10^{-4} M Ce(IV)'e eşdeğer ısırgan ekstraktı miktarı 2,7 mL olarak bulundu (Şekil 3.24). Ce(IV) ve quercetin arasındaki 1:20 stokiometrik oranından yararlanarak ısırgan otu içindeki flavonoidlerin toplam miktarı quercetin cinsinden 0,0185 mmol, trolox cinsinden 0,148 mmol olarak hesaplandı.

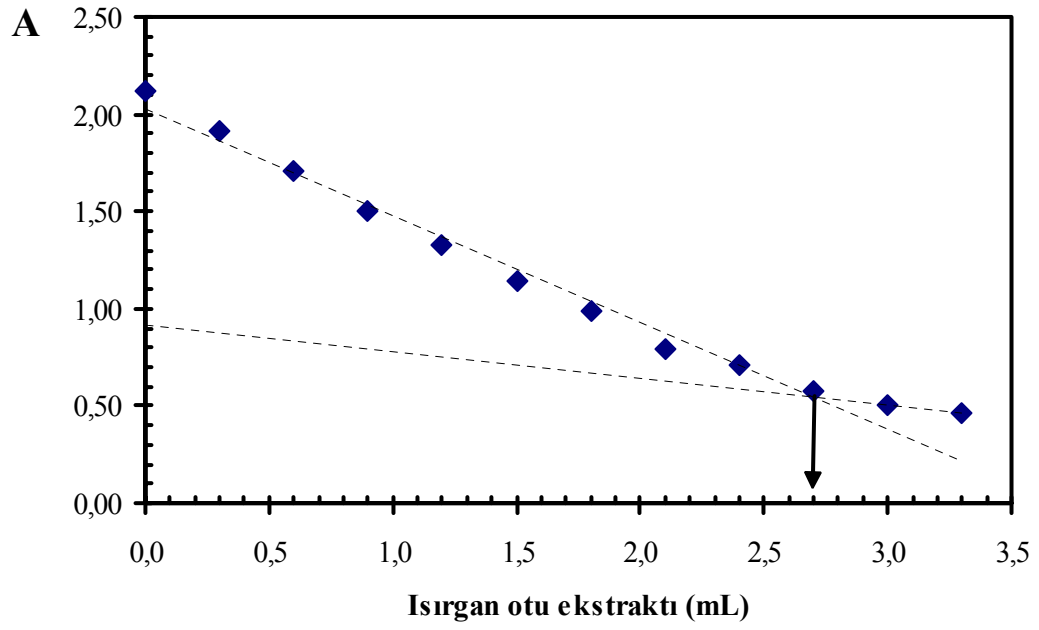
Diğer yöntemde ise hazırlanan çözeltilerin ölçülen absorbansları ve quercetin'in molar absorpsiyon katsayısı kullanılarak aşağıda verilen denklem yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar tablo 3.16'da gösterilmiştir.

$$A_0 = \text{Ce(IV)'ün başlangıçtaki absorbansı } (\lambda = 320 \text{ nm})$$

$$A_1 = \text{Ce (IV)'ün quercetin ilave edildikten sonraki absorbansı } (\lambda = 320 \text{ nm})$$

$$\epsilon_{\text{quercetin}} = \text{Quercetinin molar absorpsiyon katsayısı } (\text{mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L})$$

$$\text{Toplam Flavonoid Miktarı} = \frac{A_0 - A_1}{\epsilon_{\text{quercetin}}} \times \frac{\text{sulu ekstrakt toplam hacmi (L)}}{\text{örnek ağırlığı (g)}} \quad (3.6)$$



Şekil 3.24. Sulu Isırgan otu ekstraktının $4,0 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltisi ile tayini

Tablo 3.16. Isırgan otu ekstraktlarına geliştirilen analiz yönteminin uygulanması
($\epsilon_{\text{quercetin}} = 1,035 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$)

Örnek	Isırgan ekstraktı (mL)	A_{320}	mmol quercetin/g ısırgan
X ₁	0,3	1,913	0,0164
X ₂	0,6	1,707	0,0165
X ₃	0,9	1,505	0,0164
X ₄	1,2	1,324	0,0160
X ₅	1,5	1,140	0,0158
X ₆	1,8	0,985	0,0153
X ₇	2,1	0,790	0,0153
Ortalama			0,0160

3.14.3. Değişik Çay Örneklerinin Geliştirilen Yöntemle Analizi

Isırgan otunda çalışıldığı gibi yeşil çay, ada çayı, kekik ve fesleğenin de sulu ekstraktlarındaki toplam flavonoid miktarları geliştirilen spektrofotometrik yöntemle hesaplandı. Bulunan sonuçların quercetin eşdeğerleri tablo 3.17. ve trolox eşdeğerleri tablo 3.18’de görülmektedir.

Tablo 3.17. Çeşitli Bitki ekstraktlarına geliştirilen analiz yönteminin uygulanması ve quercetin eşdeğerliklerinin hesaplanması ($\epsilon_{\text{quercetin}}=1,035 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$)

	Yeşil çay	Ada çayı	Kekik	Fesleğen
	Quercetin eşdeğerliği	Quercetin eşdeğerliği	Quercetin eşdeğerliği	Quercetin eşdeğerliği
Örnek	(mmol/g)	(mmol/g)	(mmol/g)	(mmol/g)
X ₁	0,1194	0,0120	0,1201	0,1393
X ₂	0,1174	0,0121	0,1155	0,1297
X ₃	0,1084	0,0118	0,1166	0,1300
X ₄	0,1061	0,0115	0,1155	0,1239
X ₅	0,1060	0,0115	0,1207	0,1325
— X	0,1115	0,0118	0,1177	0,1310

Tablo 3.18. Çeşitli Bitki ekstraktlarına geliştirilen analiz yönteminin uygulanması ve trolox eşdeğerlerinin hesaplanması (mol quercetin/mol trolox: 8/1)

Örnek	Yeşil çay	Ada çayı	Kekik	Fesleğen
	Trolox eşdeğerliği (mmol/g)	Trolox eşdeğerliği (mmol/g)	Trolox eşdeğerliği (mmol/g)	Trolox eşdeğerliği (mmol/g)
X ₁	0,9552	0,0960	0,9608	1,1144
X ₂	0,9392	0,0968	0,9240	1,0376
X ₃	0,8368	0,0944	0,9328	1,0400
X ₄	0,8488	0,0920	0,9240	0,9912
X ₅	0,8480	0,0920	0,9656	1,0600
— X	0,8856	0,0944	0,9416	1,048

3.14.4. Geliştirilen Yöntemin Standart bir Yöntemle Karşılaştırılması

Geliştirilen yöntemin standart bir yöntemle karşılaştırılması için Isırgan otu ekstraktları örnek olarak alınmıştır. Bu örneklerdeki toplam flavonoid miktarları quercetin cinsinden geliştirilen yöntem ve standart yöntem olarak seçilen ABTS^{•+} radikal yöntemi ile bulundu. Geliştirilen yöntem ile toplam flavonoid miktarları quercetin cinsinden ortalama 0,0166 mmol/ g ısırgan otu ve standart yöntem ile toplam flavonoid miktarları quercetin cinsinden ortalama 0,0154 mmol/ g ısırgan otu bulundu. Gerçek örneğin her iki metode ile bulunan analiz sonuçlarına t- ve F- testleri uygulandı. Bulunan sonuçlar tablo 3.19.'de verilmiştir. Geliştirilen metot da sistematik hata olmadığı ve geliştirilen metodun %95 güvenilirlik seviyesinde önemli bir fark olmaksızın kıyaslanabilir kesinlikte olduğu görüldü (Tablo 3.19).

Tablo 3.19. Geliştirilen yöntemin ısırgan otu ekstraktlarına uygulanması ve aynı örneğin klasik bir yöntem ile analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Örnek	Geliştirilen Yöntem (mmol Quercetin/ g ısırgan)	ABTS ⁺ Radikal Yöntemi (mmol Quercetin/ g ısırgan)
X ₁	0,0165	0,0150
X ₂	0,0158	0,0154
X ₃	0,0160	0,0149
X ₄	0,0162	0,0155
X ₅	0,0185	0,0161
Ortalama Değer $\bar{x}$	0,0166	0,0154
Standart sapma s	0,0011	0,0005
% bağıl standart sapma	6,62	3,24
Varyans s^2	$1,21 \times 10^{-6}$	$2,5 \times 10^{-7}$
t testi	$t_d < t_t$ $2,25 < 2,31$ null hipotezi	
F testi	$F_d < F_t$ $(s_1^2/s_2^2)F_d 4,84 < 6,39$	

İstanbul Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümünde geliştirilen CUPRAC yöntemi ve ABTS standart yöntemiyle toplam antioksidan kapasiteleri belirlenen bitki çayları, karşılaştırılmak üzere bu tez kapsamında geliştirilen yöntemlede analiz edilmek istenmiştir. Bu nedenle aynı marketten alınan aynı özellikteki bitki çaylarından kekik, fesleğen ve yeşil çaya geliştirilen

spektrofotometrik yöntem uygulanmış ve Tablo 3.20 daki sonuçlar elde edilmiştir. Sonuçlar karşılaştırıldığında fesleğen, kekik ve yeşil çay'da diğer yöntemlerle uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak ada çayı, aynı marketten alınan yaş örneklerle analiz edilmiş ve bu nedenle diğer yöntemlerle yapılan poşet ve kuru örneklerle göre daha düşük antioksidan kapasitesi belirlenmiştir.

Tablo 3.20. Geliştirilen yöntemin bitki çaylarına uygulanması ve aynı örneğin klasik bir yöntem ile analizi yapılarak sonuçların karşılaştırılması

Bitki Çayları	Toplam flavonoid miktarı (mmol Trolox eşdeğeri/ g bitki)		
	Geliştirilen Yöntem	^a ABTS ⁺ Radikal Yöntemi	^a CUPRAC Yöntemi
Fesleğen	1,05	0,77	1,18
Kekik	0,94	0,52	0,54
Yeşil çay	0,88	0,76	1,07
Ada çayı	0,09*	0,41**	0,56**

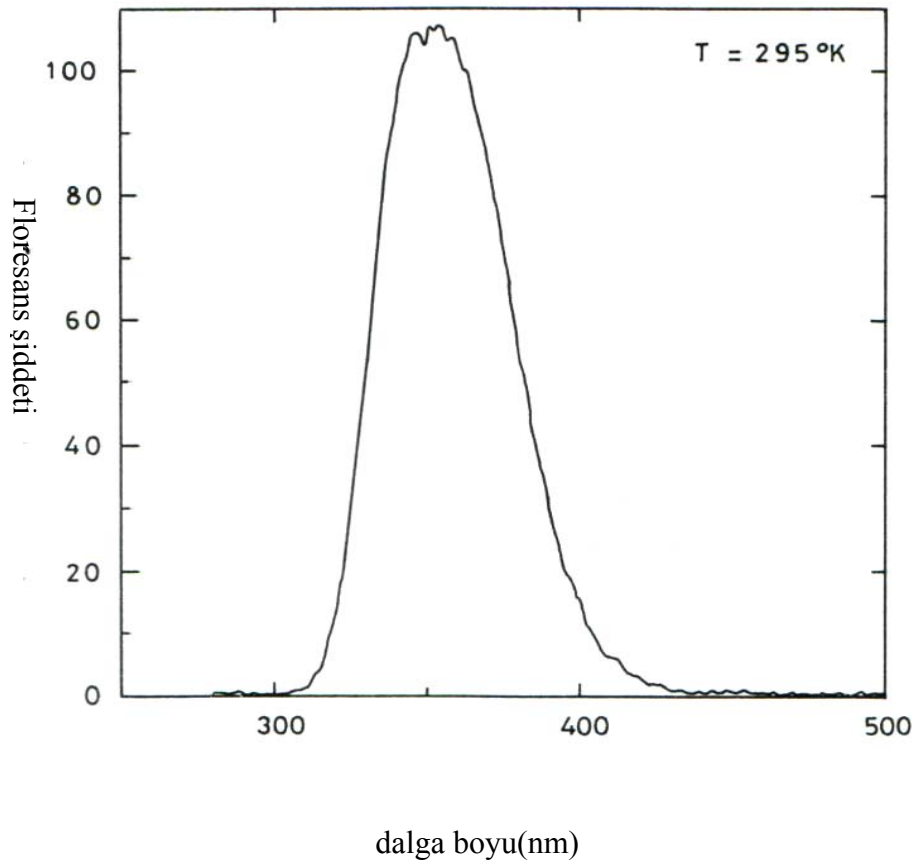
*yaş örnek; **kuru örnek

a = [58]

3.15. Spektroflorometrik Yöntem

3.15.1. Floresans spektrumları

1×10^{-4} M Ce(III) çözeltisi 260 nm de uyarıldıktan sonra 250-500 nm dalga boyları arasında emisyon spektrumu alındı (şekil 25). Şekilde görüldüğü gibi 360 nm de maksimum emisyon yaptığı belirlendi. Yapılan deneylerde Ce(IV) iyonlarının floresansının olmadığı gözlemlendi.



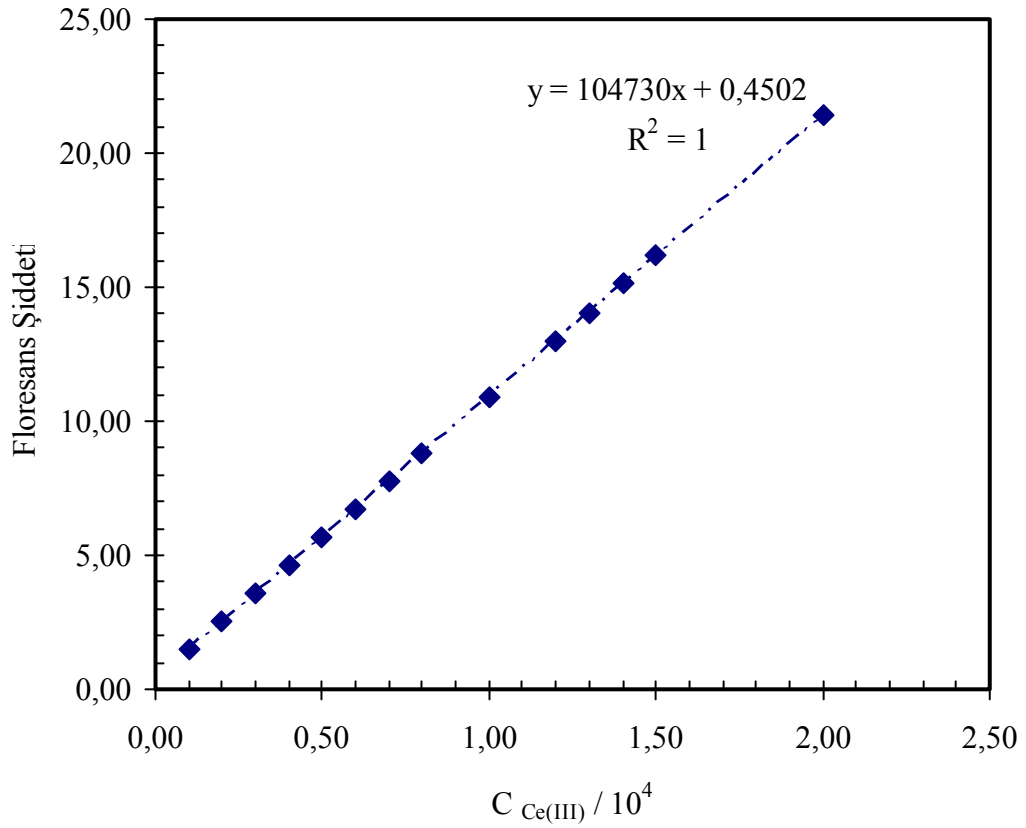
Şekil 3. 25. 1×10^{-4} M Ce(III) çözeltisinin floresans (emisyon) spektrumu

3.15.2. Ce(III)' ün Kalibrasyon Grafiği

Son konsantrasyonu 1×10^{-5} - 2×10^{-4} M arasında değişen Ce(III) çözeltilerinin 260 nm de uyarılıp 360 nm deki emisyon değerleri ölçüldü (Tablo 3.21). Emisyon değerleri ve konsantrasyonlar arasında kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.26.) Şekilde görüldüğü gibi bu konsantrasyon aralığında elde edilen eğri doğru olup Ce(III)'ün bu konsantrasyonlar arasında florometrik olarak tayin edilebileceği belirlendi.

Tablo 3.21. Ce(III) için 360 nm deki emisyon değerleri

[Ce(III)] / 10 ⁴ M	Floresans řiddeti
0,1	1,2073
0,2	2,4184
0,3	3,2852
0,4	4,1576
0,5	5,7453
0,6	6,8308
0,7	8,0357
0,8	9,0562
1,0	11,3710
1,2	13,7702
1,3	14,3610
1,4	15,0906
1,5	16,1629
2,0	20,4879



Şekil 3.26. $1,0 \times 10^{-5} \text{ M} - 2,0 \times 10^{-4} \text{ M}$ arasında değişen lineer aralıktaki Ce(III) kalibrasyon grafiği

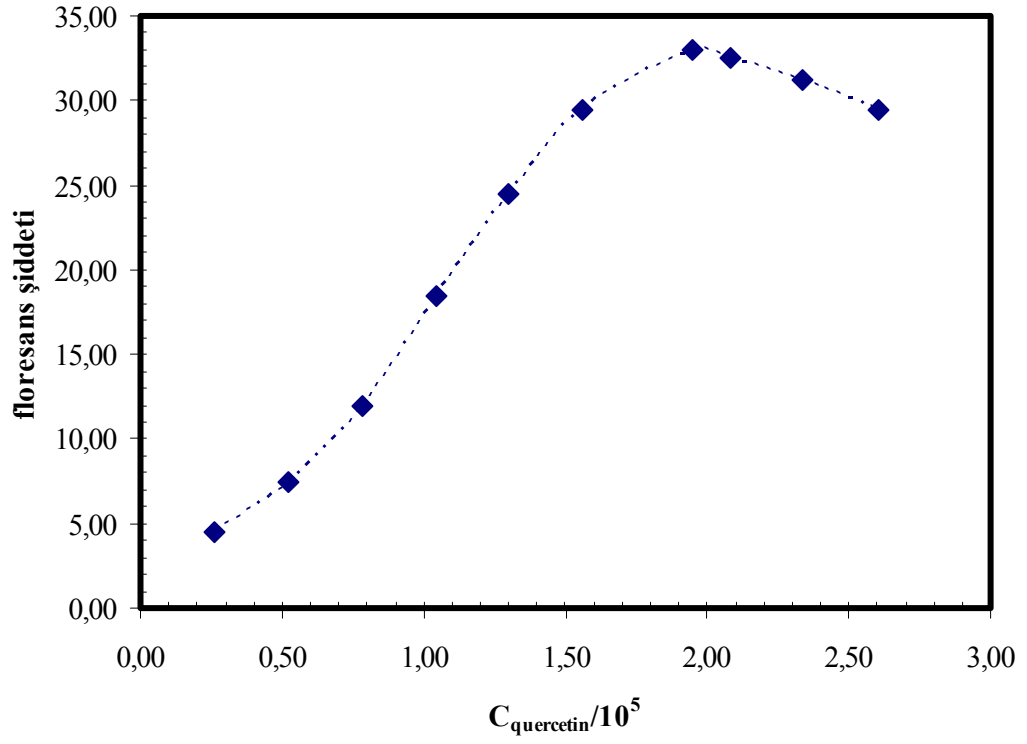
3.15.3. Quercetin'in Spektroflorometrik Kalibrasyon Grafiği

Toplam flavonoid miktarının hesaplanabilmesi için geliştirilen spektroflorometrik metodun temeli, Ce(IV) çözeltisi ile flavonoidler arasındaki redoks reaksiyonu sonucu oluşan, Ce(III)'ün emisyon değerlerinin ölçülmesine dayanmaktadır. Spektrofotometrik yöntemde olduğu gibi Quercetin örnek flavonid olarak seçilmiş ve yöntemin kalibrasyon grafiğini oluşturmak üzere kullanılmıştır.

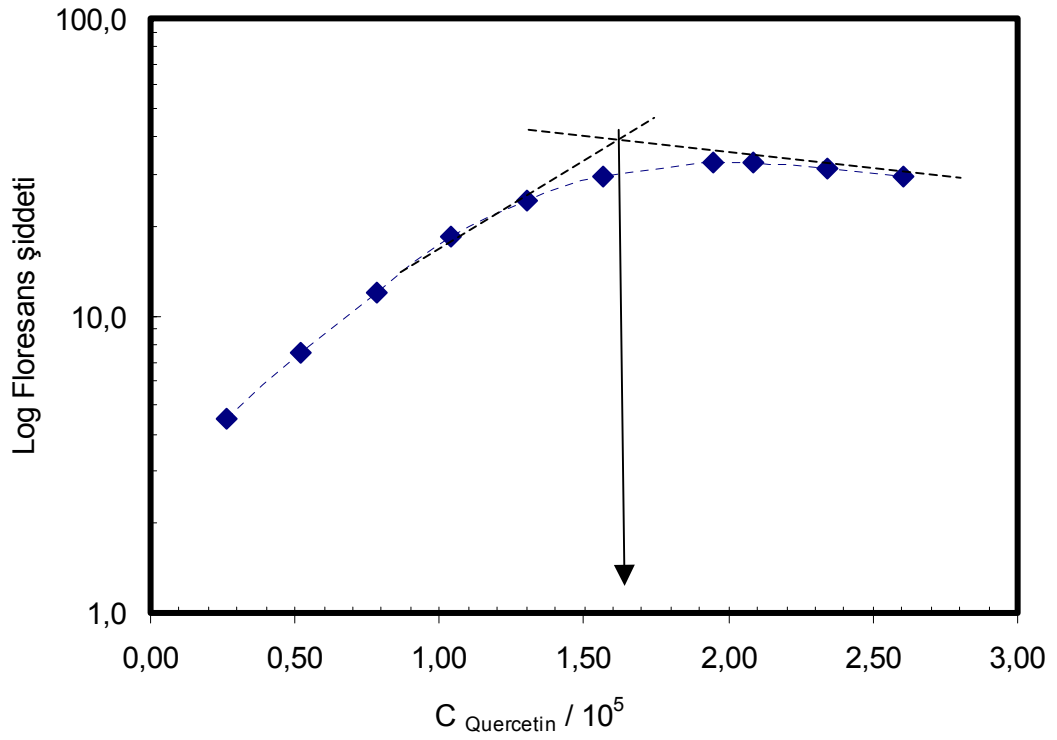
10 mL lik balon jojelere sülfirik asit konsantrasyonu 0,3 M, Ce(IV) konsantrasyonu $3,3 \times 10^{-4} \text{ M}$ ve quercetin çözeltileri $2,06 \times 10^{-6} \text{ M} - 2,605 \times 10^{-5} \text{ M}$ arasında olacak şekilde alındıktan sonra çözelti karışımları saf su ile 10 mL ye tamamlandı. Hazırlanan çözeltiler oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 260 nm de uyarılıp 360 nm deki emisyon değerleri ölçüldü. Değerler Tablo 3.22'de verilmiştir. Quercetin konsantrasyonları ile emisyon değerleri arasında grafik çizildi (Şekil 3.27). Şekil 3.27.'de görüldüğü gibi elde edilen quercetin'in kalibrasyon grafiği lineer değildir.

Tablo 3.22. Başlangıç konsantrasyonu $3,3 \times 10^{-4}$ M olan Ce(IV) çözeltisinin farklı konsantrasyonlardaki quercetin çözeltileri ile reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III)'ün emisyon değeri (260 nm de uyarılıp, 360 nm de emisyon değeri, $[H^+] = 0,31$ M)

[Quercetin] / 10^5 M	Emisyon
0,206	4,50
0,521	7,50
0,782	12,0
1,042	18,5
1,302	24,5
1,563	29,5
1,690	33,0
1,820	32,5
1,950	32,0
2,084	31,2
2,340	29,5
2,605	28,0



Şekil 3.27. Quercetin'in spektrofotometrik kalibrasyon grafiği



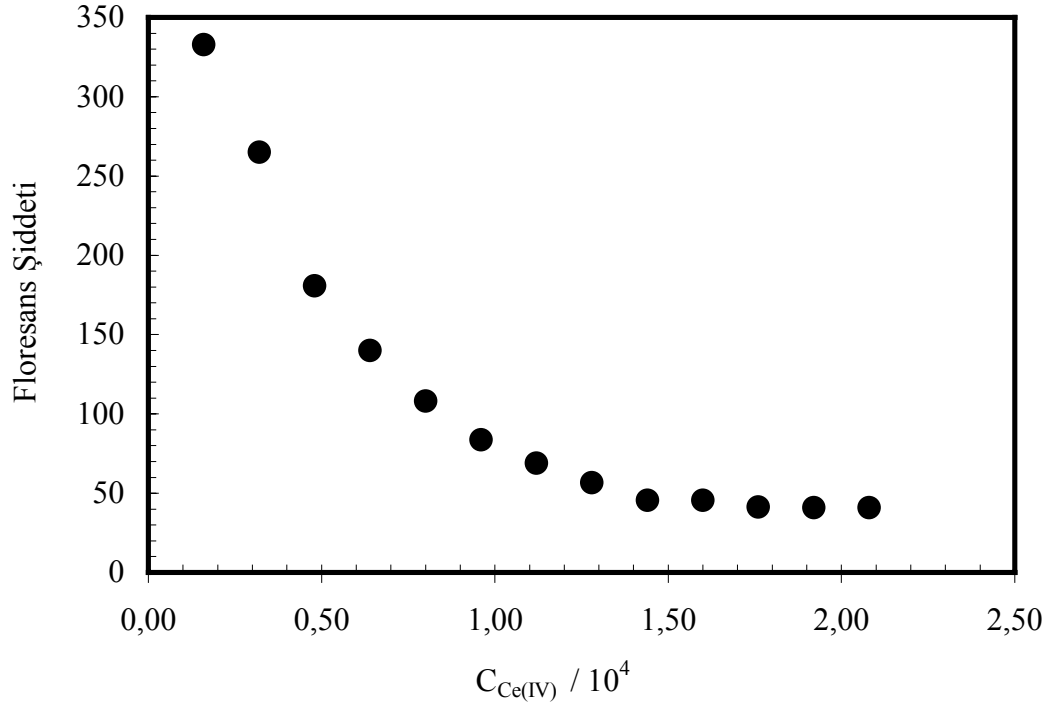
Şekil 3.28. Quercetin'in logaritmik kalibrasyon grafiği

Şekil 3.27’da çizilen quercetin kalibrasyon grafiğinin lineer olmaması nedeniyle y eksenini değerlerinin logaritması alınarak yeniden çizildi (Şekil 3.28.). Bu şekilde $1,3 \times 10^{-5}$ M quercetin konsantrasyonuna kadar olan bölgenin lineer olduğu görüldü. Bu noktadan sonra ortamdaki Ce(IV) miktarı tükendiğinden fluoresans değerleri sabit kalmalıdır. Ancak ortamda gittikçe artan quercetin bu dalga boyundaki absorpsiyonundan dolayı bir azalış görülmektedir.

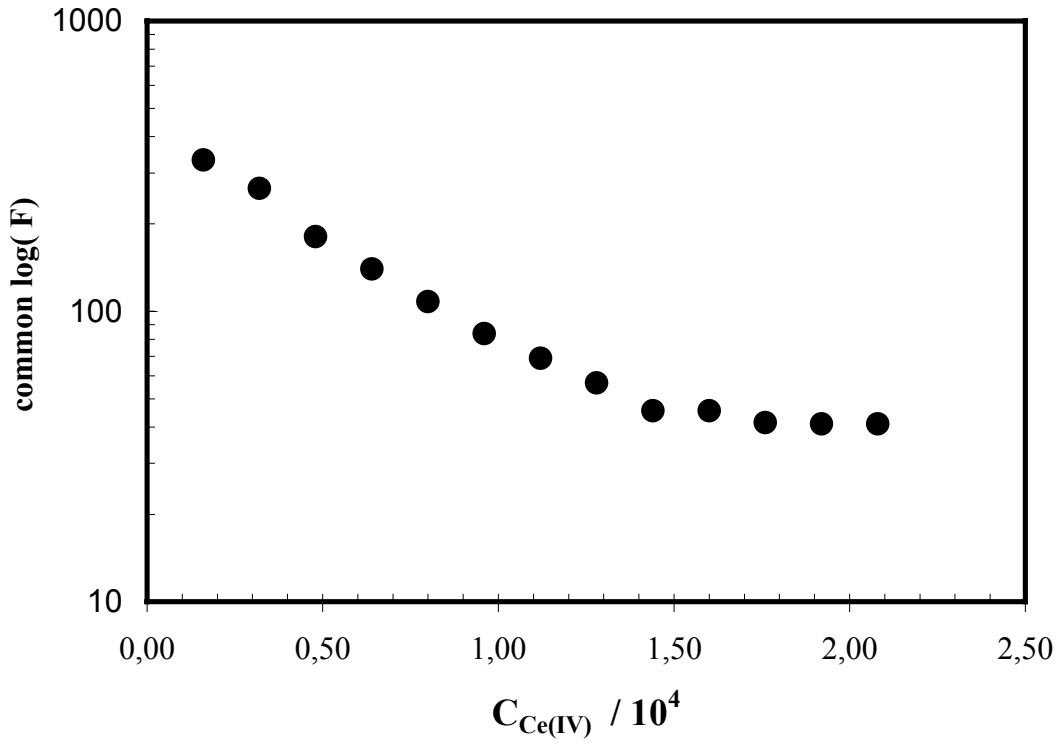
Çizilen kalibrasyon eğrisinden emisyon değerlerinin artışı ve azalmaya başladığı noktalardan çizilen lineer doğruların kesiştiği noktadan x eksenine çizilen doğrunun kestiği noktadaki $1,62 \times 10^{-5}$ M quercetin konsantrasyonu başlangıçta konan $3,3 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) konsantrasyonuna ekivalen olacaktır. Bulunan bu değerler ile hesaplandığında 1 mol quercetin yaklaşık 20,4 mol Ce(IV) ile reaksiyona girdiği bulundu.

3.15.4. Ce(III)’ün Emisyonuna Etki Eden Faktörler

Şekil 3.26’te görüldüğü gibi Ce(III)’ün emisyonları ile çizilen Ce(III) kalibrasyon grafiği lineer iken, Ce(IV)-quercetin reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III) iyonlarının emisyonları ile çizilen kalibrasyon grafiği lineer bulunmamıştır (şekil 3.27). Bunun başlangıçta fazla miktarda alınan Ce(IV) iyonlarının Ce(III) iyonlarının yanında kaldığı ve Ce(III) iyonlarının emisyonunu söndürmesinden ileri geleceği düşünüldü. Bu amaçla 10 mL lik 13 adet balon jöjeye sülfirik asit konsantrasyonu 0,3 M olan $1,2 \times 10^{-3}$ M Ce(III) çözeltilerinden 1’er mL konduktan sonra üzerlerine 0.16, 0.32, 0.48, 0.64, 0.80, 0.96, 1.12, 1.28, 1.44, 1.6, 1.76, 1.92, $2,08 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) içerecek şekilde Ce(IV) çözeltileri ilave edildi. Çözelti karışımı saf su ile 10 mL ye tamamlandı. Oda sıcaklığında çözelti karışımları 260 nm de uyarılıp 360 nm deki emisyon değerleri ölçüldü. Ce(IV)’ün konsantrasyonları ile emisyon değerleri arasında grafik çizildi. Şekil 3.29’de görüldüğü gibi Ce(IV) konsantrasyonu arttıkça Ce(III)’ün emisyon değerleri azalmakla beraber elde edilen eğri lineer değildir. Aynı grafik, y eksenini değerlerinin logaritması ile çizildiğinde lineer bağıntı elde edilmiştir (şekil 3.30).

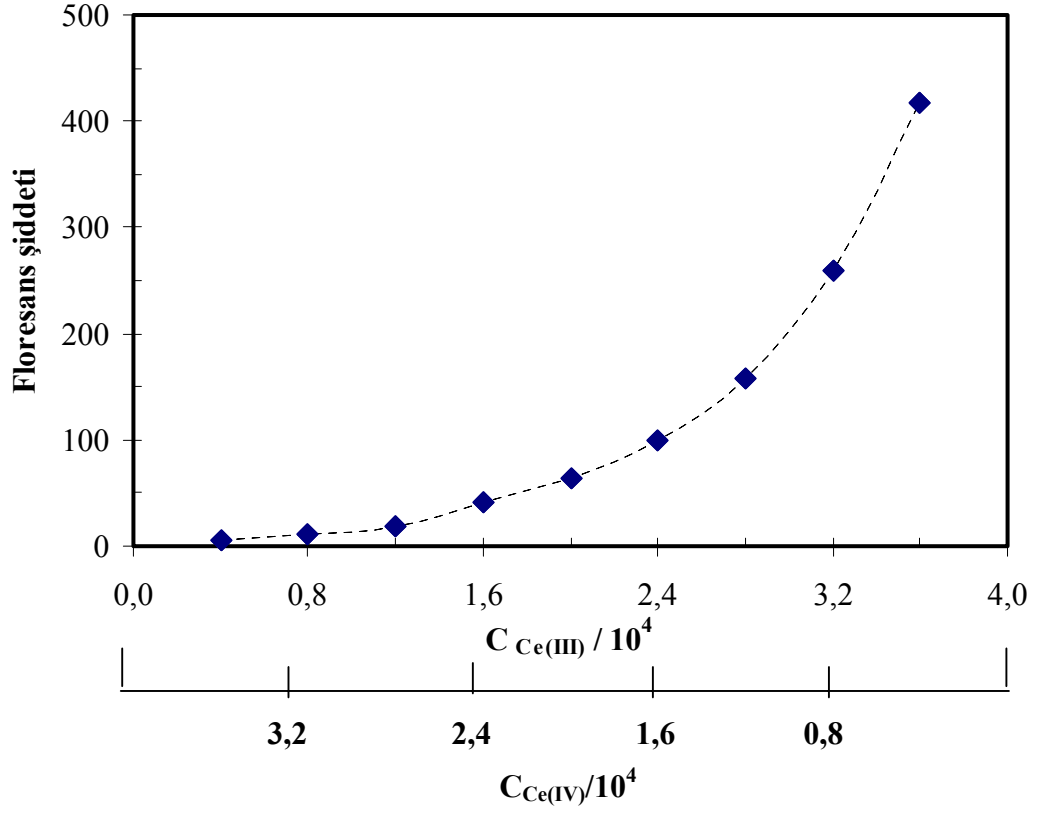


Şekil 3.29. $1,2 \times 10^{-3}$ M Ce(III) çözeltilerine $0,16 \times 10^{-4}$ - $2,08 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltilerinin ilavesi ile emisyon değerlerinin değişimi

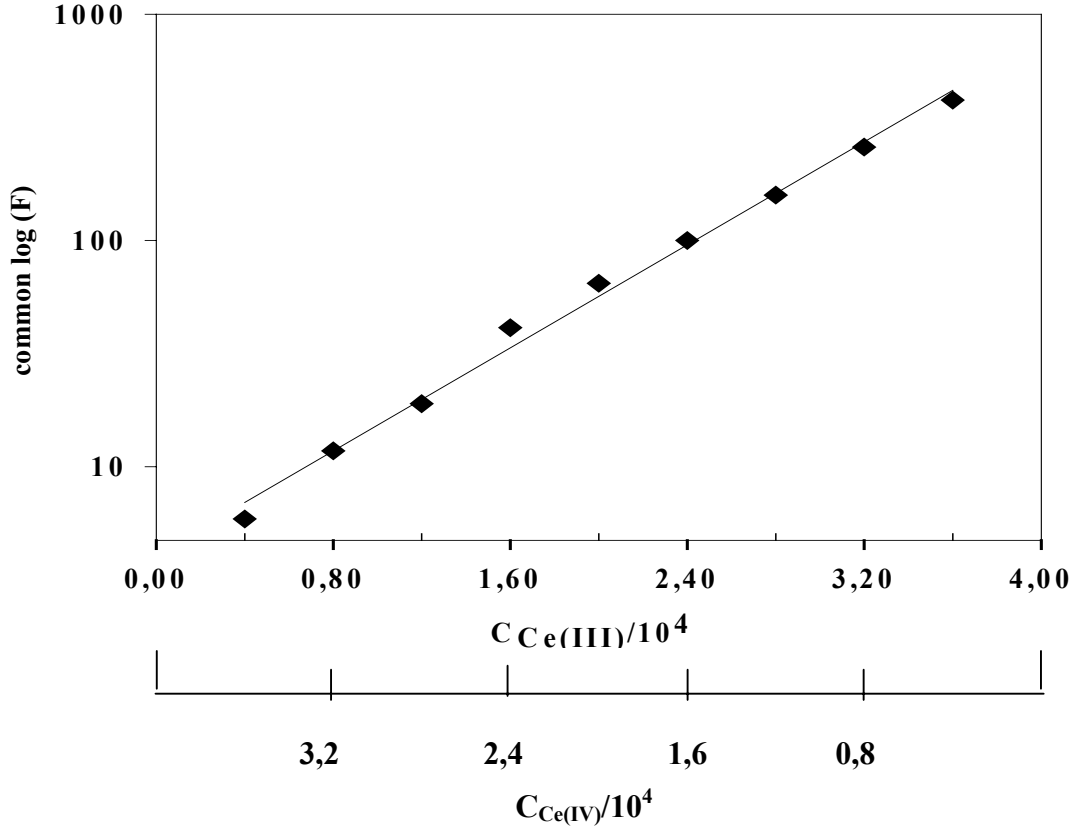


Şekil 3.30. $1,2 \times 10^{-3}$ M Ce(III) çözeltilerine $0,16 \times 10^{-4}$ - $2,08 \times 10^{-4}$ M Ce(IV) çözeltilerinin ilavesi ile emisyon değerlerinin logaritmik değişimi

Ce(IV) ile Ce(III) arasındaki etkileşimi incelemek için yapılan bir başka deney de geliştirdiğimiz yöntemin reaksiyon ortamına benzetmek için Ce(IV) konsantrasyonu azalırken Ce(III) konsantrasyonu artan çözeltiler hazırlandı ve floresans değerleri ölçüldü. Bunun için son Ce(III) konsantrasyonu $4,0 \times 10^{-5}$ - $4,0 \times 10^{-4}$ M arasında artarak değişen çözeltiler üzerine son Ce(IV) konsantrasyonu $4,0 \times 10^{-4}$ - $4,0 \times 10^{-5}$ M arasında değişen çözeltiler ilave edildi. Çözelti karışımı saf su ile 10 mL ye tamamlandı. Oda sıcaklığında çözelti karışımlarını 260 nm de uyarılıp 360 nm deki emisyon değerleri ölçüldü. Şekil 3.31’de görüldüğü gibi Ce(IV) konsantrasyonu azaldıkça ve Ce(III)’ün konsantrasyonu artıkça emisyon değerlerinin artışı gözlemlendi. Bir önceki deney de olduğu gibi Ce(III)’ün 360 nm de yaydığı ışınları Ce(IV)’ün absorplaması (söndürmesi) sonucu grafik linerlikten sapmaktadır. Ce(III) konsantrasyonu ile logaritmik emisyon değerleri arasında çizilen grafik ise lineerdir (Şekil 3.32). Bu deneylerden anlaşıldığı gibi ortamda sadece Ce(III) iyonları olduğunda Ce(III) konsantrasyonu ile emisyon değerleri arasındaki değişim lineer iken Ce(IV)’ün bulunması ile lineerlik bozulmaktadır.



Şekil 3.31. $4,0 \times 10^{-5}$ - $4,0 \times 10^{-4}$ M arasındaki $Ce(III)$ çözeltileri üzerine $4,0 \times 10^{-4}$ - $4,0 \times 10^{-5}$ M $Ce(IV)$ çözeltilerinin ilavesi ile emisyon değerlerinin değişimi



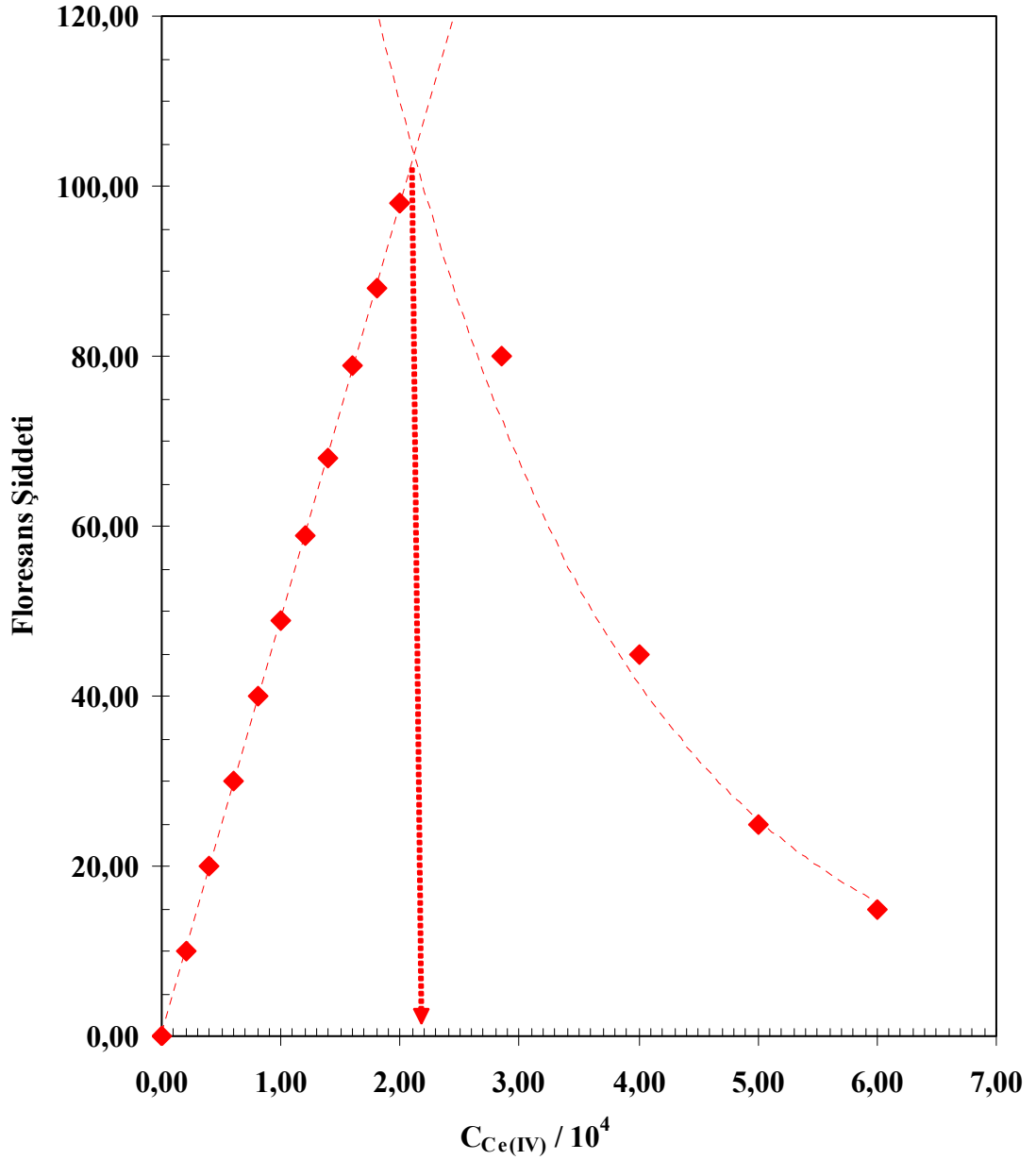
Şekil 3.32. 4×10^{-5} - 4×10^{-4} M arasındaki $Ce(III)$ çözeltileri üzerine 4×10^{-4} - 4×10^{-5} M $Ce(IV)$ çözeltilerinin ilavesi ile emisyon değerlerinin logaritmik değişimi

3.15.5. Spektrofotometrik Titrasyon

Quercetin ve seryum arasındaki bağıntıyı incelemek amacı ile spektrofotometrik titrasyon yöntemine de başvurulmuştur. Bölüm 3.15.3 ve 3.15.4'te yapılan deneyler sonucu ortamda Ce(IV) iyonlarının bulunması lineerliği bozduğu için quercetin miktarı sabit tutulup Ce(IV) iyonları ile titrasyon deneyleri yapılmıştır.

3.15.5.1. Titrant olarak Ce(IV) çözeltisinin kullanılması

Sabit miktarda alınan $1,05 \times 10^{-5}$ M quercetin çözeltileri üzerine $2,0 \times 10^{-5}$ M– $6,0 \times 10^{-4}$ M arasında değişen konsantrasyonlarda Ce(IV) çözeltileri ilave edildikten sonra oluşan Ce(III)'ün 260nm de uyarılıp 360 nm de emisyon değerleri ölçüldü. Ce(IV) konsantrasyonları ile emisyon değerleri arasında grafik çizildi. Şekil 3.33.'de görüldüğü gibi quercetine eşdeğer miktarda Ce(IV) ilavesine kadar değişim lineer olup, bu noktadan sonra ortamda fazla miktarda bulunan Ce(IV)'ün Ce(III)'ün yaydığı ışını absorplaması nedeniyle emisyon değerleri hızlı bir şekilde azaldı. Eğrinin dönüm noktasından quercetine eşdeğer miktardaki Ce(IV) miktarları $2,15 \times 10^{-4}$ M olarak bulundu. Bu değerlerden quercetin ve Ce(IV) arasındaki reaksiyonun stokiyometrik katsayıları hesaplandı. Bulunan bu değerler ile 1 mol quercetinin 20,5 mol Ce(IV) ile reaksiyona girdiği bulunmuştur.



Şekil 3.33. 1×10^{-5} M quercetin'in standart Ce(IV) çözeltisi ile titrasyonu

3.15.6. Geliştirilen Florometrik Yöntemin Gerçek Örneklerle uygulanması ve Standart bir Yöntemle Karşılaştırılması

Geliştirilen yöntemin hem gerçek örneğe uygulanması, hemde standart bir yöntemle karşılaştırılması için Isırgan otu ekstraktları örnek olarak alınmıştır. Bölüm 13.14.4 'te aynı örneklerin geliştirilen ve standart ABST yöntemleri ile analizleri yapılmış ve bu örneklerdeki toplam flavonoid miktarları quercetin cinsinden bulunmuştur. Geliştirilen florometrik yöntem ile bulunan sonuçlar tablo 3.23'de verilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi geliştirilen florometrik metodun %95 güvenilirlik seviyesinde önemli bir fark olmaksızın kıyaslanabilir kesinliktir.

Tablo 3.23. Geliştirilen yöntemin ısırgan otu ekstraktlarına uygulanması ve aynı örneğin klasik bir yöntem ile analizi yapılarak sonuçların karşılaştırılması

Örnek	Geliştirilen Spektrofluorometrik Yöntem (mmol Quercetin/gr ısırgan)	ABTS ⁺ Radikal Yöntemi (mmol Quercetin /gr ısırgan)
X ₁	0,0168	0,0150
X ₂	0,0164	0,0154
X ₃	0,0158	0,0149
X ₄	0,0167	0,0155
X ₅	0,0163	0,0161
Ortalama Değer	0,0164	0,0154
Standart sapma	0,0004	0,0005
%bağıl standart	2,44	3,25
Varyans	1,6 x 10 ⁻⁷	2,5 x 10 ⁻⁷
t – testi	t _d < t _t 2,28 < 2,31 null hipotezi	
F - testi	F _d < F _t (s ₁ ² /s ₂ ²)F _d 1,56 « 6,39	

4. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmanın amacı insan sağlığı ve gıda maddeleri için önemli olan doğal antioksidanlardan flavonoidlerin analizi için basit, tekrarlanabilirliği yüksek, reaksiyon basamakları az, ucuz ve spesifik olmayan cihazlarla yapılan bir yöntem geliştirildi.

Bu araştırma sonunda ortaya çıkarılan metodun temelini sülfat asitli ortamda Ce(IV)'ün maksimum dalga boyundaki (320 nm) absorbans değerinin, Ce(IV)'ün flavonoidler ile reaksiyonu sonucu azalmasına dayanmaktadır. Ce(IV)'ün maksimum dalga boyundaki bu azalmadan yararlanarak indirekt olarak toplam flavonoid miktarını hesaplayabilmekteyiz. Ayrıca bulunan sonuçların doğruluğunu daha iyi bir şekilde göstermek için daha hassas bir yöntem olan spektrofotometrik yöntemde geliştirildi. Ce(IV) floresans özelliğe sahip değilken Ce(IV)'ün flavonoidlerle reaksiyonu sonucu oluşan Ce(III) floresans özelliğe sahiptir. Flavonoidler ile Ce(IV)'ün reaksiyon sonucu oluşan Ce(III)'ün floresansı ölçülerek toplam flavonoid miktarı bu şekilde de hesaplanabilmektedir.

Yapılan deneysel çalışmalarda ilk olarak Ce(IV)'ün maksimum dalga boyu verdiği asit konsantrasyonu ve quercetin ile reaksiyona girme süresi hesaplandı. Yapılan çalışmalarda maksimum dalga boyu 320 nm, hidrojen iyon konsantrasyonu 0,31 M ve bekleme süresi 30 dakika olarak tespit edildi.

Quercetin, naringin, naringenin spektrumlarına bakıldığında 320 nm de az da olsa bir absorbans verdiği gözlemlendi. Bu nedenle bu bileşikler için yapılan çalışmalar da referans çözelti olarak su ve örnek çözeltileri kullanıldı. Ölçümler sonunda çizilen titrasyon grafiklerindeki dönüm noktasında ve eğimlerindeki paralellikten dolayı yapılan bütün çalışmalarda referans çözeltisi olarak saf su kullanıldı.

Quercetinin, $2,0 \times 10^{-4}$ M sabit Ce(IV) çözeltisi kullanılarak çizilen kalibrasyon eğrisi aşağıdaki eşitlikle ifade edilmiştir.

$$A_{320} = 0,985 - 1,03 \times 10^5 C_{\text{quercetin}} \quad (R^2 = 0,9987)$$

Ayrıca quercetin'in farklı başlangıç konsantrasyonlarındaki Ce(IV) çözeltileri ile oluşturulan kalibrasyon eğrilerinin birbirine paralel ve ortalama eğimleri (molar absorptivitesi) $1,03 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ L}$ olarak bulunmuştur. Bu incelemeler geliştirilen metodun molar absorptivitesinin Ce(IV)'ün başlangıç konsantrasyonuna bağlı olmadığını göstermiştir.

Çizilen kalibrasyon eğrilerinin x eksenini kestiği noktadaki quercetin konsantrasyonu ile titrasyon deneyleri sonucu 1 mol quercetin'in yaklaşık 20 mol Ce(IV) ile reaksiyona girdiği bulunmuştur.

Geliştirilen spektrofotometrik yönetim için verilen işlem basamakları sırasıyla takip edilerek **trolox**, **askorbik asid**, **kateşin**, **gallik asid**, **naringin** ve **narigenin** içinde uygulandı. Her bir bileşiğin molar absorptivitesi hesaplandıktan sonra quercetin ve trolox eşdeğerliği hesaplandı. Bulunan sonuçlar, literatürde yer alan ABTS⁺ radikali yöntemiyle bulunan TEAC değerleriyle karşılaştırıldı. Literatürde verilen Askorbik asit ve trolox arasındaki 1: 1 oranı bu çalışmada bulundu. Ancak diğer flavonoidler den naringin(glukoz grubu içerir) ve naringenin TEAC değerleri literatüre göre daha büyük bulundu. Bu ortamın asitliğinin yüksek olması ve naringenin glukoz yaisının hidrolize uğramış olabilmesi ile açıklanabilir.

Bu çalışmanın ikinci kısmında ise, flavonoidlerin, Ce(IV) ile reaksiyona girmesi ve Ce(IV)'ün indirgenmesi sonucu oluşan Ce(III)'ün 260 nm uyarılıp, 360 nm de emisyon değerlerinin ölçülmesine dayanan yeni bir spektrofotometrik yöntem kullanıldı. Ce(IV) iyonlarının floresans özelliği olmadığından toplam flavonoid miktarı direkt Ce(III)'ün emisyon değerleri ölçülerek bulundu. Bu yöntemde 1 mol quercetin'in 20 mol Ce(IV) ile reaksiyona girdiği bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemler gerçek örneklerle uygulandı. Bunun için karadeniz bölgesinden toplanan ısırgan otuna, geliştirilen analiz yöntemlerinde belirtilen prosedürler ve standart ABTS⁺ radikal yöntemi uygulandı. Geliştirilen metotlarla ve standart yöntem ile elde edilen sonuçlara t- testleri uygulandı. İstatistiksel değerlendirmeler, her iki yöntemde ortalamalar ve standart sapmalar açısından anlamlı bir fark olmadığını gösterdi.

Sonuç olarak sağlığımız için önemli olan antioksidan bileşiklerin tayini için uygulaması kolay, deney süresi kısa, hassasiyeti yüksek, masrafsız, uçucu organik çözücüler ve ekstraksiyon gibi işlemler ve gelişmiş aletler gerektirmeyen indirek bir

yöntem geliştirilmiştir. Ayrıca reaksiyon sonucu oluşan ürünün floresans özelliğinden yararlanarak daha hassas olan florimetrik bir yöntemde önerilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] **Floyd, R.**, 1990. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis nadbrainischemia, FASEB Journal, 4 , 2587-2597.
- [2] **McCord, J.**, 1985. Oxgen derived free radicals in postischemic tissue injury, N. Eng. Journal Med., 312, 159-163.
- [3] **Harborne, J.B., Mabry, T.J.**, 1982. The Flavonoids: Advances in Research, Chapman and Hall, London.
- [4] **Dündar, Y., Aslan, R.**, 2000. Hekimlikte Oksidatif Streess ve Antioksidanlar, Afyon Kocatepe Üniversitesi Yayınlar, Afyon.
- [5] **Fleming, J. , Miguel, J., Econimos, A.**, 1982. Is cell aging caused by respiration dependent injury to the mitochondrial genome?, Gerontol, 28-44.
- [6] **Şengül, E. ,** Haziran 1998. Türkiye Kökenli Çörekotu Tohumlarının Antioksidan Kaynağı Olarak Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, İTÜ Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul.
- [7] **Richheimer, S.L., Bernart, M.**, 1993. Antioksidant Activity of Lipid Soluble Phenolic Diterpenes from Rosemary, JAOCS, 73(4), 507-514.
- [8] **Hudson, B.J. ,** 1990. Food Antioksidants, Elsevier Science, USA, pp. 1-65.
- [9] **Bilaloğlu, G.V., Harmandar, M.**, Flavonoidler, Aktif Yayınevi, İstanbul.
- [10] **Wichi, H.B.**, 1988. Enhanced tumour development by butylated hydroxyanisole (BHA) from the prospective of effect on forestomach and oesophageal squamous epithelium. Food chemistry and toxicology 26, 717-723.
- [11] **Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J.** 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13, 572-584.
- [12] **Bors, W., Heller, W., Michel, C. and Saran, M.**, 1990. Flavonoids as antioxidants: determination of radical-scavenging efficiencies. Methods Enzymol., 186, 343-355.

- [13] **Yuting, C., Rongliang, Z., Zhongjian. J. and Yong, J.,** 1990. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants, *Free Radical Biology and Medicine*, 9(1), 19-21.
- [14] **Javanovic, S.V., Steenken, S., tosic, M., Marjonovic, B. and Simic, M.G.,** 1994. Flavonoids as antioksidants, *Journal American Chemical Soc.* 116(11), 4846-4851.
- [15] **Negre-Salvayre, A., Alomar, Y., Troly, M., and Salvayre, R.** 1991. Ultraviolet- treated lipoproteins as a model syatem for the study of the biological effects of lipid peroxides on cultrued cells III. The protective effect of antioxidants (probucol, catechin, vitamin against the cytotoxicity of oxicidized LDL occurs in two different ways, *Biochim. Biophys. Acta.* 1096(4), 291-300.
- [16] **Ruch, R.J., Cheng, S.J. and Klaunig, J.E.,** 1989. Prevention of cytotoxciity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catecins isolated from chinese gren tea, *Carcinogenesis*, 10, 1003-1008
- [17] **Yen, G.C. and Chen, H.Y.,** 1995. Antioxidant Activity of Various Tea extreacts in Relation to Their Antimutagenicity, *Journal Agric Food Chem* 43(1), 27-32.
- [18] **Haraguchi, H., Hashimota, K., Yagi, A.,** 1992. Antioxsidative Substances In Leaves Of Polygonum Hydropiper, *Journal of Agricultrial and Food Chemistry*, 40(8), 1349- 1351.
- [19] **Peng, Z.F., Strack, D., Baumert, A., Goh, Z.F., Chia, T.F.,** 2002. Antioksidant flavonoids from leaves of polygonum hydropiper L., *Phytochemistry*, 62(2003), 219-228.
- [20] **Bors, W., Michel, C., Slettmaier, K.,** 1997. Antioxidant Effects of Flavonoids, *Biofactors*, 6(4), 399-402.
- [21] **Bors, W., Heller, W., Michel, C., Saran, M.,** 1990. Radical Chemistry of Flavonoid Antioxidants, *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 264, 165-170.
- [22] **Cao, G., Sofic, E. And Prior, R.,** 1997. Antioxidant and Prooxidant Behavior of flavonoids: stucture-activity relationships, *Free Radical Biology & Medicine.* 22, 749-760
- [23] **Hanasaki, Y., Ogawa, S., Fukui, S.,** 1994. The correlation between active oxygen scavenging and antioxidative effects of flavonoids, *Free Radical Biology & Medicine.* 16, 845-850

- [24] **Cuvelier, M.E., Richard, H., Berset, C.,** 1996. Antioksidative Activity and Phenolic Composition of pilot Plant and Commercial Extracts of Sage and Rosemary. *Journal of American Oil Chemistry Society*, 73, Vol.5, pp.645-669
- [25] **Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M., and Chern, J.C.,** 2002. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *Journal of food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182.
- [26] **Benzei, I.F.F., Strain, J.J.,** 1999. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Meth. Enzymol*, 299, 15-27.
- [27] **Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A.,** 1993. A novel method for measuring antioksidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates., *Clin. Science*, 84, 407-412.
- [28] **Rice-Evans, C., Miller, N.J.,** 1994. Total antioksidant status in plasma and body fluids. *Meth. Enzymol*, 234, 279-293.
- [29] **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.,** 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medical*, 26, 1231-1237.
- [30] **Labrinea, E.P., Georgiou, C.A.,** 2004. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay, *Anal. Chim. Acta* 526 (1): 63-68
- [31] **Chevion, S., Berry, E.M., Kitrossky, N.K., Kohen, R.,** 1997. Evaluation of plasma low molecular weight antioxidant capacity by cyclic voltammetry, *Free Radical Biology Medical*, 22, 411-421.
- [32] **Kohen, R., Beit-Yannai, E.M., Berry, E.M., Triosh, O.,** 1995. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry, *Meth. Enzymol*, 300, 285-296.
- [33] **Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S.,** 1985. Quantitative measurement of the total, peroxy radical-trapping antioxidant capacity of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Lett.*, 187, 33-37.

- [34] **Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U., 1986.** The antioxidant efficiency of vitamin C is concentration-dependent. *Biochem. Biophys. Acta*, 884, 119-123.
- [35] **Alho, H., Leinonen, J., 1999.** Total antioxidant ctivity measures by chemiluminescence methods, *Meth. Enzymol*, 299, 3-14.
- [36] **Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G., Maxwell, S.R.J., 1992.** Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Anal. Chim. Acta* 266, 265-277
- [37] **Volkonen, M., Kuusi, T., 1997.** Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum, *Journal Lipid Res.*, 38, 823-833.
- [38] **Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J.H., Blanchard, K.A., 1998.** A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology Medical*, 24, 480-493.
- [39] **Tubaro, F., Ghiselli, A., Papuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F., 1998,** Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology Medical*, 24, 1228-1234.
- [40] **Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Asini, E., Ferro-Luzi, A., 1994.** A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capacity, *Free Radical Biology Medical*, 18, 29-36.
- [41] **Glazer, A.N., 1990.** Phycoerythrin fluorescence- based assay for reactive oxygen species. *Meth. Enzymol*, 186,161-168.
- [42] **Cao, G., Prior, R.L., 1999.** The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples. *Meth. Enzymol*, 299, 50-62.
- [43] www.rain-tree.com/nettles.htm
- [44] www.naturepark.com/snettle.htm
- [45] **Akbay, P., Basaran, A.A, Undeger, Ü., and Basaran, N., 2003.** In vitro Immunomodulatory Activity of Flavonoid Glycosides from *Urtica dioica* L., *Phytotherapy Research*, 17, 34-37
- [46] www.hekimce.com

- [47] Konrd, L., Mler, H.H., Lenz, C., Laubinger, H., Aumuller, G., Lichius, J.J., 2000. Antiproliferative Effect on Human Prostate Cancer Cells by a Extract of Stinging Netle Root(*Urtica dioica*), *Planta Media*,66,44-47
- [48] www.fulser.com.tr
- [49] Glin, İ., Kfreviolu, İ., Oktay, M., ve Bykokurolu, M.E., 2004. Antioksidant, Antimicrobial, Antiulcer and Analgesic Activities of Netle (*Urtica Dioica* L.), *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 205-215
- [50] Tahri, A., Yamani, S., Legssyer, A., Aziz, M., 1999. Acute Diuretic, Natriuretic and Hypotensive Effects of a Continous Oerfusion of Aqueous Extract of *Urtica dioica* in the Rat
- [51] Kraus, R., Spitteller, G., 1990. Phenolic Compounds from Roots of *Urtica Dioica*, *Lehrstuhl Organnische Chemie I, Univarsitat Bayreuth, Phytochemistry*, Vol.29, Issue5, p.1653-1659
- [52] Riechemann, K., Behnke, B., Schulze-Osthoff, K., 1999. Plant Extracts from stining Netle(*Urtica dioica*), an Antirheumatic Remedy, ;Inhibit the Proinflammantory Transcription Factor , *FEBS Letters*, Vol.22, Issue 1, p. 89-94
- [53] www.divalazer.com/greentea.html
- [54] Vinson, J.A., Dabbagh,Y.A., Sery, M.M., Jang, J., 1995. Plant flavonoids especially tea flavonols are powerful antioxidant modal for heart disease, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 42, 2802.
- [55] Zhou, J., Wang, L., Wang, J. and Tang, N., 2001. Antioxidative and anti-tumour activities of solid quercetin metal(II) complexes, *Transition Metal Chemistry* 26: 57-63.
- [56] Erlund, I., 2002. Chemical Analysis and Pharmacokinetics of The Flavonoids Quercetin, Hesperetin and Naringenin in Humans, PhD Thesis, Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki.
- [57] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G., 1997. Antioksidant Properties Of Fenolic Compounds,Trends İn Plant Science, 2(4), 152-159.
- [58] Apak, R. ve arkadaşları, 2004. Yayınlanmamış deney sonuçları

ÖZGEÇMİŞ

Dilek Özyurt 1980 yılında Trabzon’da doğdu. 2001 yılında Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen-edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü’nden mezun oldu. Aynı sene İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilimdalı Kimyagerlik pragramında yüksek lisans öğrenimine başladı.