

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**





**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünce**

**Unvanı Verilmesi İçin Kabul Edilen Tezdir.**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : / /**

**Tezin Savunma Tarihi : / /**

**Tez Danışmanı :**

**Trabzon**

**KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

başlıklı bu çalışma, Enstitü Yönetim Kurulunun / / gün ve sayılı  
kararıyla oluşturulan jüri tarafından yapılan sınavda  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**  
olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Üyeleri**

**Başkan :** .....

**Üye :** .....

**Üye :** .....

**Prof. Dr. Asim KADIOĞLU**  
**Enstitü Müdürü**

## ÖNSÖZ

Yüksek lisansım boyunca danışmanlığımı yapan, danışmandan öte bütün samimiyeti ile yaklaşan, koruyan, akademik bilgi ve disiplini aşıl原因an, her şeyden önce özel ve akademik hayatımda örnek bir insan olabilmem için çaba harcayan, tez çalışmam boyunca bana yol gösteren sayın Prof. Dr. Murat KÜÇÜK' e teşekkürlerimi sunarım.

Öğrencisi olduğum K.T.Ü. Fen Fakültesi, Kimya Bölümü'ne çalışmalarım boyunca bana sağladıkları imkanlardan dolayı teşekkür ederim. Laboratuvara ilk geldiğimde beni gülyüzü ve samimiyeti ile karşılayan Dr. Öğr. Üyesi Semra ALKAN TÜRKUÇAR' a, kısa sürede çok iyi anlaşım güzel işler yaptığımız Ecz. Berna Senem KEFELİ' ye, Öğr. Gör. Uğur KARDİL' e, her türlü desteği sağlayan ve yol gösteren örnek alabildiğim bir güzel insan Dr. Öğr. Üyesi Ayça AKTAŞ KARAÇELİK' e ve her anımda desteğini esirgemeyen varlığı ile uzakta olsa bile işlerimi kolaylaştıran Öğr. Gör. Hacer DOĞAN' a teşekkür ederim.

Bilgi birikimi ve tecrübelerinden faydalandığım, psikolojik yardımlarından dolayı Doç. Dr. Zehra CAN ve Arş. Gör. Yakup KARA' ya teşekkür ederim.

Her an moral veren Öğr. Gör. Fulya ÖZ TUNCAY ve Ümmühan ÇAKMAK' a teşekkür ederim.

Lisansa başladığım ilk günden itibaren her adımımız birlikte olan, beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, birlikte ağlayıp birlikte güldüğümüz ve birlikte başardığımız yüksek lisans öğrencisi Kader TEKİNTAŞ' a, yüksek lisans boyunca güler yüzü ile yanımda olan yüksek lisans öğrencisi Büşra KURNAZ' a teşekkür ederim.

Bu zorlu yolda her zaman bana destek olan annem Fatma KAYA, babam Coşkun KAYA' ya teşekkür ederim. Kardeşlerim, her işime koşan, geceleri benimle birlikte çalışın, beraber üzülmüş beraber eğlendiğimiz İç Mimar Meltem KAYA ve Hasan KAYA' ya teşekkür ederim.

Melek KAYA

Trabzon, 2020



## TEZ ETİK BEYANNAMESİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Bazı Parametrelerin DPPH• Giderim Testine ve pH’ nın Biyoaktif Bileşen Ekstraksiyonu ve İnkübasyonunda Bileşim ve Aktiviteye Etkileri” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Murat KÜÇÜK’ ün sorumluluğunda tamamladığımı, verileri/örnekleri kendim topladığımı, deneyleri/analizleri ilgili laboratuarlarda yaptığımı/yaptırdığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 09/01/2020

Melek KAYA

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ.....	III
TEZ ETİK BEYANNAMESİ.....	IV
İÇİNDEKİLER.....	V
ÖZET.....	IX
SUMMARY.....	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
TABLolar DİZİNİ.....	XIX
SEMBOLLER DİZİNİ.....	XX
1. GENEL BİLGİLER.....	1
1.1. Giriş .....	1
1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar .....	3
1.3. Doğal ve Yapay Antioksidanlar .....	5
1.4. Biyoaktif Fenolik Bileşikler.....	9
1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri .....	10
1.5.1. Hidrojen Atom Transfer (HAT) Reaksiyonlarına Dayalı Yöntemler .....	10
1.5.2. Tek Elektron Transfer (SET) Reaksiyonlarına Dayalı Yöntemler .....	11
1.5.3. Çalışmada Kullanılacak Spektrometrik Antioksidan Testler ....	11
1.5.3.1. DPPH• Giderim Testi .....	11
1.5.3.1.1. DPPH•'nin Kararlılığına pH' nın Etkisi .....	13
1.5.3.1.2. DPPH•' nin Kararlılığına Çözücünün Etkisi .....	13
1.5.3.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini .....	13
1.5.3.3. Toplam Fenolik Madde Tayini (TP).....	14
1.6. pH .....	14
1.7. Farklı pH' larda Antioksidanların Özellikleri .....	14
1.8. pH' nın Biyomoleküllere Etkisi .....	15
1.9. Enzim .....	16
1.9.1. Karbonik Anhidraz Enzimi .....	16

1.9.2.	Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri .....	17
1.10.	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	19
1.10.1.	HPLC' nin Temel Prensipleri ve Temel Kavramlar .....	19
1.10.2.	Yaygın Kullanılan HPLC Dedektörleri .....	20
1.11.	On-line HPLC-Biyoaktivite Yöntemleri .....	22
1.11.1.	On-line HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi .....	22
1.12.	Kullanılan Bitkiler .....	23
1.13.	Kullanılan Standartlar .....	25
2.	YAPILAN ÇALIŞMALAR.....	27
2.1.	Kullanılan Cihazlar.....	27
2.2.	Kullanılan Kimyasallar.....	28
2.3.	DPPH•' nin Kararlılığına Çeşitli Faktörlerin Etkisi .....	29
2.3.1.	Işık ve Çözücünün DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi .....	29
2.3.2.	Sıcaklık ve pH' nın DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi .....	30
2.4.	Antioksidan - DPPH• Reaksiyonuna Çeşitli Faktörlerin Etkisi .	31
2.4.1.	Antioksidanların Metanoldeki SC <sub>50</sub> Değerleri .....	31
2.4.2.	DPPH• Çözeltisinin Tazeliğinin SC <sub>50</sub> Değerine Etkisi .....	32
2.4.3.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Çözücülerin Etkisi .....	32
2.4.4.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon ve pH' nın Etkisi ...	34
2.4.4.1.	Antioksidanların Su Varlığındaki SC <sub>50</sub> Değerleri .....	34
2.4.4.2.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon pH' sının Etkisi .....	34
2.4.4.3.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi .....	35
2.4.4.4.	Antioksidan-DPPH• -Tampon Karışımlarında pH' nın Takibi ...	36
2.5.	Antioksidanların Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi .....	37
2.5.1.	Beş Antioksidan Standardın HPLC Analizi .....	37
2.5.2.	Antioksidanların Farklı pH' larda Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi .....	37
2.6.	Yeşil Çay ile Farklı pH' larda Çalışmalar .....	38
2.6.1.	Yeşil Çaydan Ekstraktların Hazırlanması .....	38
2.6.2.	Yeşil Çay Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri .....	40
2.6.2.1.	DPPH• Giderim Testi .....	40
2.6.2.2.	Toplam Fenolik Madde Miktarı .....	40

2.6.2.3.	Demir İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP) .....	41
2.6.2.4.	On-line HPLC-FRAP Analiz .....	42
2.6.3.	Yeşil Çay Ekstraktlarının bCA Enzim İnhibisyonu .....	43
3.	BULGULAR .....	45
3.1.	DPPH•' nin Kararlılığına Çeşitli Faktörlerin Etkisi .....	45
3.1.1.	Işık ve Çözücünün DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi .....	45
3.1.2.	Sıcaklık ve pH' nın DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi .....	46
3.2.	Antioksidan - DPPH• Reaksiyonuna Çeşitli Faktörlerin Etkisi .	55
3.2.1.	Antioksidanların Metanoldeki SC <sub>50</sub> Değerleri .....	55
3.2.2.	DPPH• Çözeltisinin Tazeliğinin SC <sub>50</sub> Değerine Etkisi .....	58
3.2.3.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Çözücülerin Etkisi .....	59
3.2.4.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon ve pH' nın Etkisi ....	68
3.2.4.1.	Antioksidanların Su Varlığındaki SC <sub>50</sub> Değerleri .....	68
3.2.4.2.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon pH' sının Etkisi .....	71
3.2.4.3.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi .....	75
3.2.4.4.	Antioksidan-DPPH• -Tampon Karışımlarında pH' nın Takibi ...	78
3.3.	Antioksidanların Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi .....	79
3.3.1.	Beş Antioksidan Standardın HPLC Analizi .....	79
3.3.2.	Antioksidanların Farklı pH' larda Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi .....	79
3.4.	Yeşil Çay ile Farklı pH' larda Çalışmalar .....	81
3.4.1.	Yeşil Çay Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri .....	81
3.4.1.1.	DPPH• Giderim Testi .....	81
3.4.1.2.	Toplam Fenolik Madde Miktarı .....	83
3.4.1.3.	Demir İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP) .....	85
3.4.1.4.	On-line HPLC-FRAP Analizi .....	86
3.4.2.	Yeşil Çay Ekstraktlarının bCA Enzim İnhibisyonu .....	103
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	104
4.1.	DPPH•' nin Kararlılığına Çeşitli Faktörlerin Etkisi.....	104
4.1.1.	Işık ve Çözücünün DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi.....	104
4.1.2.	Sıcaklık ve pH' nın DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi.....	104
4.2.	Antioksidan - DPPH• Reaksiyonuna Çeşitli Faktörlerin Etkisi .	116

4.2.1.	Antioksidanların Metanoldeki SC <sub>50</sub> Değerleri .....	116
4.2.2.	DPPH• Çözeltilisinin Tazeliğinin SC <sub>50</sub> Değerine Etkisi .....	117
4.2.3.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Çözücülerin Etkisi .....	118
4.2.4.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon ve pH' nın Etkisi ....	118
4.2.4.1.	Antioksidanların Su Varlığında SC <sub>50</sub> Değerleri .....	119
4.2.4.2.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon pH' sının Etkisi .....	120
4.2.4.3.	Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi.....	120
4.2.4.4.	Antioksidan-DPPH• -Tampon Karışımlarında pH' nın Takibi....	122
4.3.	Antioksidanların Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi .....	122
4.3.1.	Beş Antioksidan Standardın HPLC Analizi .....	122
4.3.2.	Antioksidanların Farklı pH' larda Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi.....	122
4.4.	Yeşil Çay ile Farklı pH' larda Çalışmalar.....	123
4.4.1.	Yeşil Çay Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri.....	123
4.4.1.1.	DPPH• Giderim Testi.....	123
4.4.1.2.	Toplam Fenolik Madde Miktarı.....	126
4.4.1.3.	Demir İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP).....	127
4.4.1.4.	On-line HPLC-FRAP Analizi.....	127
4.4.1.5.	Antioksidan Aktivite Korelasyonları .....	131
4.4.2.	Yeşil Çay Ekstraktlarının bCA Enzim İnhibisyonu .....	133
5.	ÖNERİLER .....	135
6.	KAYNAKLAR .....	137
	ÖZGEÇMİŞ.....	144

Yüksek Lisans Tezi

ÖZET

BAZI PARAMETRELERİN DPPH• GİDERİM TESTİNE VE pH' NİN BİYOAKTİF  
BİLEŞEN EKSTRAKSİYONU VE İNKÜBASYONUNDA BİLEŞİM VE AKTİVİTEYE  
ETKİLERİ

Melek KAYA

Karadeniz Teknik Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı  
Danışman: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK  
2020, 143 Sayfa

Çalışmada DPPH•'nin kararlılığı, ortamın ışık, sıcaklık, çözücü ve pH şartları açısından 517 nm absorbansları ve UV-Vis spektrumları ile değerlendirildi. Çözücünün DPPH•'nin kararlılığını etkilediği, 10 - 20 °C de bozunmanın yavaş, 30 - 40 °C de yüksek olduğu görüldü. Spektrumlarda 470-620 nm arası absorbans değerlerinden türetilmiş absorbanslar üretilerek DPPH• bozunma süreçleri daha iyi gösterildi. Bu yöntem su ve pH 7'de DPPH•'nin daha kararlı, 20 – 30 °C aralığında bozunmada ciddi artış olduğunu gösterdi. Bekleme sürecinde absorbans farklarıyla elde edilen spektrumlarda, 510-520 nm bölgesinde önemli düşüşler, 390-400 nm bölgesinde ise önemli artışlar tespit edildi. Fark grafikleri su ve pH 7'de düşük sıcaklıklarda DPPH•'nin daha kararlı olduğunu gösterdi. Antioksidan-DPPH• etkileşimine çözücü, tampon konsantrasyonu ve ortam pH'sının etkisi araştırıldı. Beş antioksidan (gallik asit, Troloks, BHT, kateşin, C vitamini), beş çözücü (metanol, su, DMSO, aseton, etil asetat) ve üç pH (2, 7, 10) ile yapılan çalışmalar, çözücü, tampon konsantrasyonu ve pH farklılıklarının, aktivitede artışa veya azalmaya sebep olabileceğini gösterdi. Ekstraksiyonda ve depolamada antioksidanların kararlılığının tespiti için standart antioksidanlar ve yeşil çay ekstraktları klasik DPPH•, FRAP, toplam fenolik miktarı ve karbonik anhidraz inhibisyonu ve on-line HPLC-DAD-FRAP antioksidan yöntemiyle incelendi. pH'nın bileşen kararlılığını ve biyoaktiviteyi etkilediği, etkinin bileşik bazlı olarak farklılık gösterdiği, ekstraktlarda pH 2'de yüksek, pH 10'da düşük aktiviteyle sonuçlandığı gözlemlendi. DPPH• çalışmalarında reaktif ve numune tazeliği, ışık, sıcaklık, pH, tampon konsantrasyonu ve çözücü aktiviteyi etkilemektedir. Numuneler arası aktivite kıyaslaması ancak aynı şartlarda elde edilen sonuçlarla yapılabilir.

**Anahtar Kelimeler:** DPPH•, Antioksidan, pH, Çözücü, Sıcaklık, on-line HPLC-DAD-FRAP, CA İnhibisyonu

Master Thesis

SUMMARY

EFFECTS OF SOME PARAMETERS ON DPPH• SCAVENGING TEST AND pH ON COMPOSITION AND ACTIVITY IN BIOACTIVE COMPONENT EXTRACTION AND INCUBATION

Melek KAYA

Karadeniz Technical University  
The Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Chemistry Graduate Program  
Supervisor: Prof. Dr. Murat KÜÇÜK  
2020, 143 Pages

DPPH stability was evaluated based on light, temperature, solvent and pH of medium with absorbance at 517 nm and UV-Vis spectra. Solvent affects DPPH• stability; degradation was slow at 10-20 °C and fast at 30-40 °C. DPPH degradation was better expressed by producing derived absorbances using absorbances between 470-620 nm in spectra. Method showed DPPH as stable in water and pH 7 and significant increase in degradation in 20-30 °C. In spectra obtained by absorbance changes during waiting, significant decreases in 510-520 nm and increases in 390-400 nm region were detected. Difference graphs showed DPPH was more stable at low temperatures in water and pH 7. Effect of solvent, buffer concentration and pH on antioxidant-DPPH• interaction was investigated. Studies with 5 antioxidants (gallic acid, Trolox, BHT, catechin, vitamin C), 5 solvents (methanol, water, DMSO, acetone, ethyl acetate) and 3 pHs (2, 7, 10) showed solvent, buffer concentration and pH differences may cause activity increase or decrease. Standard antioxidants and green tea extracts were examined by conventional DPPH, FRAP, Folin, carbonic anhydrase inhibition and on-line HPLC-DAD-FRAP methods to determine antioxidants stability in extraction and storage. pH affected component stability and bioactivity, effect differed on compound basis, and pH 2 resulted in high activity and pH 10 low activity in extracts. Reagent and sample freshness, light, temperature, pH, buffer concentration and solvent affect activity in DPPH• tests. Activity comparison between samples can only be made with results obtained under same conditions.

**Key Words:** DPPH•, Antioxidant, pH, Solvent, Temperature, on-line HPLC-DAD-FRAP, CA inhibition

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa No</u></b>
Şekil 1. Bir antioksidanın serbest radikale saldırması (R: Radikal).....	4
Şekil 2. C vitamini .....	5
Şekil 3. E vitamini .....	6
Şekil 4. A vitamini .....	6
Şekil 5. Likopen .....	6
Şekil 6. BHT .....	7
Şekil 7. BHA .....	7
Şekil 8. TBHQ .....	8
Şekil 9. Propilgallat .....	8
Şekil 10. Bazı fenolik bileşikler .....	9
Şekil 11. DPPH Radikali .....	12
Şekil 12. Fe <sup>3+</sup> ün Fe <sup>2+</sup> ye indirgemesi .....	13
Şekil 13. <i>p</i> -nitrofenolün hidrolizi .....	17
Şekil 14. HPLC cihazının şematik gösterimi .....	20
Şekil 15. UV dedektörün çalışma prensibi .....	21
Şekil 16. On-line HPLC-FRAP yönteminin şematik gösterimi .....	23
Şekil 17. Çaydaki bazı kateşinler .....	24
Şekil 18. Yeşil çay .....	24
Şekil 19. Troloks .....	25
Şekil 20. Kateşin.....	25
Şekil 21. Gallik asit .....	26
Şekil 22. DPPH• kararlılığına çözücünün etkisi çalışmasının pipetleme tablosu .....	29
Şekil 23. Wisecircu sirkülatör sistemiyle oluşturulan havuz ve reaksiyon karışımları .....	30
Şekil 24. DPPH• giderme testinde SC <sub>50</sub> belirlemek için pipetleme şekli ...	31
Şekil 25. Artan antioksidan konsantrasyonuna karşı artan tampon konsantrasyonunun pipetleme prosedürü .....	36
Şekil 26. Ekstraktların seyrelme işlemleri .....	39
Şekil 27. On-line HPLC-FRAP sistemi (RP-HPLC-DAD-UV) .....	43



Şekil 28.	Işıklı ve ışısız ortamda 6 farklı çözücünün DPPH• kararlılığına etkisi .....	45
Şekil 29.	Sıcaklık ve pH' nin DPPH• kararlılığına etkisi grafikleri (%Absorbans, başlangıçta ölçülen absorbasın yüzdesi olarak hesaplanmıştır) .....	46
Şekil 30.	40 °C' de başlangıçtan 8. saate kadar farklı pH şartlarında DPPH• bozunmasına ait 200 - 650 nm arası UV-Vis spektrumlar	47
Şekil 31.	30 °C' de başlangıçtan 8. saate kadar farklı pH şartlarında DPPH• bozunmasına ait 200 - 650 nm arası UV-Vis spektrumlar	48
Şekil 32.	20 °C' de başlangıçtan 8. saate kadar farklı pH şartlarında DPPH• bozunmasına ait 200 - 650 nm arası UV-Vis spektrumlar	49
Şekil 33.	10 °C' de başlangıçtan 8. saate kadar farklı pH şartlarında DPPH• bozunmasına ait 200 - 650 nm arası UV-Vis spektrumlar	50
Şekil 34.	Farklı pH' larda sıcaklık ile DPPH•' nin kararlılığının takibi amaçlı başlangıç ve 8. saatte spektrumlar .....	51
Şekil 35.	40 °C' de farklı pH' ların DPPH• kararlılığına etkisini gösteren başlangıç ve 8. saatte spektrumlar .....	52
Şekil 36.	30 °C' de farklı pH' ların DPPH• kararlılığına etkisini gösteren başlangıç ve 8. saatte spektrumlar .....	53
Şekil 37.	20 °C' de farklı pH' ların DPPH• kararlılığına etkisini gösteren başlangıç ve 8. saatte spektrumlar .....	54
Şekil 38.	10 °C' de farklı pH' ların DPPH• kararlılığına etkisini gösteren başlangıç ve 8. saatte spektrumlar .....	55
Şekil 39.	BHT' nin metanoldeki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	56
Şekil 40.	C Vitaminin metanoldeki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	56
Şekil 41.	Troloks'un metanoldeki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	57
Şekil 42.	Gallik asitin metanoldeki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	57
Şekil 43.	Kateşinin metanoldeki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	58
Şekil 44.	Troloks'un taze ve beklemiş DPPH• çözeltisi ile SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	59
Şekil 45.	Gallik asitin taze ve beklemiş DPPH• çözeltisi ile SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	59
Şekil 46.	DMSO' lu ve MeOH' lü ortamda gallik asit-DPPH• etkileşiminin zamana bağlı takibi .....	60
Şekil 47.	BHT' nin farklı çözücülerde DPPH• giderim testi grafiği .....	61
Şekil 48.	C vitamini farklı çözücülerde DPPH• giderim testi grafiği .....	61
Şekil 49.	Troloksun farklı çözücülerde DPPH• giderim testi .....	62
Şekil 50.	Gallik asitin farklı çözücülerde DPPH• giderim testi .....	62

Şekil 51.	Kateşinin farklı çözücülerde DPPH• giderim testi .....	63
Şekil 52.	%43,3 Aseton içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları .....	64
Şekil 53.	%43,3 DMSO içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları .....	65
Şekil 54.	%43,3 Etil asetat içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları .....	66
Şekil 55.	%43,3 MeOH içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları .....	67
Şekil 56.	%43,3 H <sub>2</sub> O içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları .....	68
Şekil 57.	BHT' nin su varlığındaki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	69
Şekil 58.	Troloks'un su varlığındaki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	69
Şekil 59.	Gallik asitin su varlığındaki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	70
Şekil 60.	Kateşinin su varlığındaki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	70
Şekil 61.	C vitamininin su varlığındaki SC <sub>50</sub> belirleme grafiği .....	71
Şekil 62.	Gallik asitin DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi) .....	72
Şekil 63.	Troloks'un DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi) .....	73
Şekil 64.	BHT' nin DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi) .....	73
Şekil 65.	Kateşinin DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi) .....	74
Şekil 66.	C Vitamininin DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi) .....	74
Şekil 67.	pH 10' da tampon konsantrasyonu - BHT konsantrasyonu – absorbans grafiği .....	75
Şekil 68.	pH 7' de da tampon konsantrasyonu - BHT konsantrasyonu – absorbans grafiği .....	76
Şekil 69.	pH 2' de da tampon konsantrasyonu - BHT konsantrasyonu – absorbans grafiği .....	76
Şekil 70.	pH 10' da tampon konsantrasyonu - Troloks konsantrasyonu – absorbans grafiği .....	77

Şekil 71.	pH 7' de tampon konsantrasyonu - Troloks konsantrasyonu – absorbans grafiği .....	77
Şekil 72.	pH 2' de tampon konsantrasyonu - Troloks konsantrasyonu – absorbans grafiği .....	78
Şekil 73.	5'li antioksidan karışımın HPLC kromatogramı (280 nm) .....	79
Şekil 74.	pH' sı 2 olan çözeltideki 5' li antioksidan karışımın 280 nm de HPLC kromatogramları .....	80
Şekil 75.	pH' sı 7 olan çözeltideki 5' li antioksidan karışımın 280 nm de HPLC kromatogramları .....	80
Şekil 76.	pH' sı 10 olan çözeltideki 5' li antioksidan karışımın 280 nm de HPLC kromatogramları .....	81
Şekil 77.	Yeşil çaydan su ve 3 farklı pH' da tamponlu ortamda elde edilen ekstraktlardan pH' ları 2, 7 ve 10' a ayarlanarak hazırlanan karışımların seyrelme oranı - absorbans (517 nm) grafikleri (Göstergedeki eğrilere ait ilk pH ekstraksiyon ikincisi ise inkübasyon pH'sını belirtmektedir.) .....	82
Şekil 78.	Toplam fenolik madde miktarı belirlenmesinde kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiği .....	83
Şekil 79.	Toplam fenolik madde miktarı belirlenmesinde kullanılan kateşin kalibrasyon grafiği .....	84
Şekil 80.	Yeşil çay ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak toplam fenolik madde miktarı .....	84
Şekil 81.	Yeşil çay ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE) olarak toplam fenolik madde miktarı .....	85
Şekil 82.	Troloksun FRAP aktivitesi .....	86
Şekil 83.	Yeşil çay ekstraktlarının TEAC eşdeğeri olarak antioksidan güçleri .....	86
Şekil 84.	pH 2 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	87
Şekil 85.	pH 2 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat].....	88
Şekil 86.	pH 2 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	89
Şekil 87.	pH 2 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit,	

	2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	89
Şekil 88.	pH 2 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	90
Şekil 89.	pH 2 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat].....	90
Şekil 90.	pH 7 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	91
Şekil 91.	pH 7 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	92
Şekil 92.	pH 7 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	92
Şekil 93.	pH 7 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	93
Şekil 94.	pH 7 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	93
Şekil 95.	pH 7 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	94
Şekil 96.	pH 10 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	94
Şekil 97.	pH 10 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit,	

	2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	95
Şekil 98.	pH 10 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	96
Şekil 99.	pH 10 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	96
Şekil 100.	pH 10 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	97
Şekil 101.	pH 10 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	97
Şekil 102.	Su ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	98
Şekil 103.	Su ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	99
Şekil 104.	Su ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	100
Şekil 105.	Su ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	100
Şekil 106.	Su ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat) .....	101
Şekil 107.	Su ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit,	

2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat] .....	101
Şekil 108. Yeşilçay numunelerindeki majör bileşenlerin spektrumları. 1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat	102
Şekil 109. Yeşilçay ekstraktlarının karbonik anhidraz enzimi üzerine %inhibisyon değerleri .....	103
Şekil 110. Başlangıçta (a) ve 8. (b) saatte elde edilen spektrumlar kullanılarak 470-620 nm arası çizgi çekilerek 517 nm'de türetilmiş absorbans belirleme yöntemi .....	105
Şekil 111. pH 2' de farklı sıcaklıklarda 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın % absorbans değişim grafiği .....	106
Şekil 112. pH 7' de farklı sıcaklıklarda 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın % absorbans değişim grafiği .....	106
Şekil 113. Sulu ortamda farklı sıcaklıklarda 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın % absorbans değişim grafiği .....	107
Şekil 114. pH 10' da farklı sıcaklıklarda 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın % absorbans değişim grafiği .....	107
Şekil 115. 40 °C' de 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın farklı pH' lar için % absorbans değişim grafiği .....	108
Şekil 116. 40 °C' de başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı pH' lar için DPPH• türetilmiş spektrumları .....	108
Şekil 117. 30 °C' de 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın farklı pH' lar için % absorbans değişim grafiği .....	109
Şekil 118. 30 °C' de başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı pH' lar için DPPH• türetilmiş spektrumları .....	110
Şekil 119. 20 °C' de 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın farklı pH' lar için % absorbans değişim grafiği .....	110
Şekil 120. 20 °C' de başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı pH' lar için DPPH• türetilmiş spektrumları .....	111

Şekil 121. 10 °C’ de 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanlar kullanılarak belirlenen bozunmanın farklı pH’ lar için % absorban değişim grafiği .....	111
Şekil 122. 10 °C’ de başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı pH’ lar için DPPH• türetilmiş spektrumları .....	112
Şekil 123. pH 2’ de farklı sıcaklıklarda başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı sıcaklıklar için DPPH• türetilmiş spektrumları .....	113
Şekil 124. pH 7’ de farklı sıcaklıklarda başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı sıcaklıklar için DPPH• türetilmiş spektrumları .....	114
Şekil 125. Sulu ortamda farklı sıcaklıklardabaşlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı sıcaklıklar için DPPH• türetilmiş spektrumları .....	114
Şekil 126. pH 10’ da farklı sıcaklıklarda başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı sıcaklıklar için DPPH• türetilmiş spektrumları .....	115
Şekil 127. Antioksidanların metanoldeki SC <sub>50</sub> değerleri .....	116
Şekil 128. Taze ve beklemiş DPPH• çözeltisi ile belirlenen SC <sub>50</sub> değerleri	117
Şekil 129. Antioksidanların ortamda %43,3 su bulunması durumunda SC <sub>50</sub> değerleri.....	119
Şekil 130. Standartların DPPH• testi ile bulunan SC <sub>50</sub> (µM) değerleri .....	124
Şekil 131. Yeşil çay ekstraktlarının bekletilmeden DPPH• giderim testi ile bulunan SC <sub>50</sub> değerleri (seyrelme oranı) .....	124
Şekil 132. Yeşil çay ekstraktlarının 10 gün bekletildikten sonra DPPH• giderim testi ile bulunan SC <sub>50</sub> değerleri (seyrelme oranı) .....	125
Şekil 133. Ekstraktların ilk günden 10. güne DPPH• testi ile %SC <sub>50</sub> değişimleri .....	125
Şekil 134. 280 nm de yeşil çay ekstraktlarının pik alanları .....	129
Şekil 135. 595 nm de yeşil çay ekstraktlarının pik alanları.....	130
Şekil 136. Yeşilçay ekstraktlarında FRAP ile toplam fenolik madde miktarının(TP) korelasyonu .....	131
Şekil 137. Yeşilçay ekstraktlarında FRAP ile pSC <sub>50</sub> korelasyonu. pSC <sub>50</sub> değerleri DPPH• testinde SC <sub>50</sub> değerlerinin –log’u alınarak elde edilmiştir.....	132
Şekil 138. Yeşilçay ekstraktlarında TP (toplam fenolik madde miktarı) ile pSC <sub>50</sub> korelasyonu.....	132
Şekil 139. Yeşilçay ekstraktlarında FRAP ile on-line FRAP korelasyonu.....	133

## TABLULAR DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Serbest radikaller ve etkileri .....	3
Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve malzemeler .....	27
Tablo 3. Kullanılan kimyasallar .....	28
Tablo 4. Antioksidan-DPPH• etkileşimi deneyi için pipetleme prosedürü	33
Tablo 5. HPLC için mobil faz ve gradient şartları .....	37
Tablo 6. On-line HPLC-DAD-FRAP gradient uygulama şartları .....	42
Tablo 7. bCA İnhibisyonu çalışmasında kullanılan pipetlemeler .....	44
Tablo 8. Tampon konsantrasyonunun bozucu etkisini belirleme ön çalışmasında görünüm .....	72
Tablo 9. Antioksidan – DPPH• karışımlarında ölçülen pH .....	78
Tablo 10. Antioksidan-DPPH• etkileşimi için farklı tampon konsantrasyonlarında elde edilen SC <sub>50</sub> değerlerinin % bağıl standart sapmaları .....	121
Tablo 11. Yeşilçay ekstraktlarının karbonik anhidraz enzimi üzerine %inhibisyon değerleri .....	134



## SEMBOLLER DİZİNİ

ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
bCA	Sığır Karbonik Anhidraz
BHA	Bütillenmiş Hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
C (+)	Kateşin
C18	Oktadesil
CA	Karbonik Anhidraz
DAD	Çoklu Diyot Serili Dedektör (diode array dedector)
DPPH•	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil Radikali
EC	(-)-Epikateşin
ECG	(-)-Epikateşin gallat
EGC	(-)-Epigallokateşin
EGCG	(-)-Epigallokateşin gallat
FRAP	Demir (III) İndirgeme / Antioksidan Kuvvet
GAE	Gallik Asit Eşdeğeri
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-UV	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör
IC <sub>50</sub>	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
KE	Kateşin Eşdeğeri
MeOH	Metanol
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum bi karbonat
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
pH	Hidrojenin gücü
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per minute)
RT	Alıkonma Zamanı (Retention time)
SC <sub>50</sub>	%50 Giderme Konsantrasyonu
TEAC	Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite
TF	Toplam Fenolik
TPTZ	(2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazin
Tris	Trihidroksimetil amino metan

## 1.GENEL BİLGİLER

### 1.1. Giriş

Bitkilerden elde edilen ham ekstraktlar ve bu ekstraktlardan saflaştırılarak elde edilen bileşikler çeşitli biyoaktiviteleriyle birçok uygulama alanında değerlendirilmektedirler. Bu alanlarda yapılan çalışmalar arasında en ön sırada gıda katkısı ve ilaç etken maddesi arayışları gelmektedir.

Günümüzde kronik hastalıkların yaygınlaşması ile modern tıp tedavilerinin yetersiz kaldığı durumlarda insanlar alternatif tıpa yönelmektedir. Alternatif tıp, bilimsel olarak etkinliği tam kanıtlanmamış bitkisel kaynaklı tedavileri içermektedir. Diğer bir deyişle tamamlayıcı tıp olarak da tanımlanabilir. Alternatif tıp somatik ve psikiyatrik bozuklukların tedavisinde de kullanılır. Alternatif tıbbın temelini bitkiler oluşturduğu için son yıllarda bilimsel araştırmalar bu yöne doğru kaymaktadır. Bu amaçla tıbbi ve aromatik bitkiler adı altında araştırma alanları açılmaktadır.

Bitkilerin bir diğer kullanım alanı da gıda katkı maddesi olarak kullanılmalarıdır. İçerdikleri sekonder metabolitler özellikle antioksidan açıdan etkilidirler. Gıda katkı maddelerinin E300 kodlu olanları antioksidan grubu katkı maddeleridir. Bu grup katkı maddeleri bitkisel ve hayvansal yağların kullanıldığı çoğu gıdalara ilave edilmektedir. Gıda bileşenlerinde oksijen varlığında kendiliğinden meydana gelen oksidasyonlara "otooksidasyon" denilmektedir. Antioksidanlar, otooksidasyon olayını yavaşlatarak gıdaların raf ömrünü uzatmaktadırlar.

Serbest radikaller, üzerinde eşleşmemiş elektron bulunduran ve kimyasal reaksiyonlara karşı oldukça kararsız olan atom, molekül veya iyonlardır. Serbest radikaller vücudun somatik hücrelerindeki biyomoleküllere saldırarak zincir radikalik reaksiyonlara sebep olurlar. Serbest radikaller, antioksidanlar ve diğer bazı faktörler yaşlanma süresinde etkin rol oynarlar [1].

Antioksidanlar, serbest radikal temizleyiciler olarak görev yapar ve çeşitli hastalıklara yol açan oksidatif reaksiyonları önleyici etkiye sahiptirler. Ekzojen antioksidanların çoğu, bitkilerden elde edilen fitokimyasallardır. Eşsiz yapısal düzenlemelerine dayanan antioksidan potansiyeli olan birçok fitokimyasal sınıf vardır.

Bitkilerdeki fenolik bileşikler antioksidan özellik göstermenin yanı sıra bitki açısından yapısal, koruyucu olarak ve büyüme kontrolünde önemli bir yere sahiptir [2]. Fenolik asitler, flavonoidler, stilbenoidler, ellagitanninler ve taninler gibi bitki fenolik bileşiklerinin, hücrenin ROS (reaktif oksijen türleri) seviyelerini doğrudan temizleyerek veya oluşumunu engelleyerek azalttığı bilinmektedir. Fenolik bileşikler ayrıca oksijen metabolizmasında ve ksenobiyotik detoksifikasyonunda yer alan enzimlerin ekspresyonunu uyararak hücrelerin antioksidan kapasitelerini de artırabilir. Ayrıca, enflamatuar reaksiyonlarla bağlantılı çoklu sinyal yollarını bastırdıkları gösterilmiştir [3].

Bitki bileşenlerinin bir diğer aktivitesi de enzimler üzerinedir. Enzimler biyolojik reaksiyonları katalizleyen moleküllerdir. Karbonik anhidraz enzimi, karbondioksitin bikarbonata dönüşümü için çok etkili bir biyokatalizördür. Karbon, biyoinorganik bileşiklerin temelini oluşturan bir element olduğu için karbonik anhidraz enziminin önem derecesi artmaktadır. En yaygın olarak bilinen karbonik anhidraz inhibitörleri sülfanilamid grubu bileşiklerdir. Sentetik olarak üretilen inhibitörlerin doğal kaynaktan elde edilme çalışmaları son yıllarda artmaktadır. Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda CA inhibitörlerinin bitki kaynaklı araştırmaları yapılmaktadır. LC-ESI-MS ve on-line HPLC-ABTS yöntemleriyle belirlenen gilaburu, kıvılcık, kokulu üzüm ve karayemiş meyvelerinin biyoaktif fenolik bileşimi yüksek lisans tez çalışması [4], bitkisel çay bileşenlerinin ve gıda katkılarının karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkileri doktora tezi [5], yeni bir on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yönteminin geliştirilmesi ve biyoaktif bitki ekstraktlarına uygulanması [6] laboratuvarımızda yapılan çalışmalara örnek verilebilir.

Fenoliklerin bitki dokularından ekstraksiyon verimleri, çeşitli ekstraksiyon koşullarına bağlıdır. Bitki dokularında bulunan fenoliklerin çoğu polar çözücüler içinde çözünür ve az miktarda hidroklorik veya formik asit içeren metanol kullanılarak ekstrakte edilebilir. Ekstraksiyon çözeltisinin düşük pH değeri fenoliklerin oksidasyonunu önleyebilir. Bu nedenle, fenoliklerin verimli bir şekilde ekstraksiyonunun araştırılması, çeşitli sıcaklıklarda ve farklı çözücü pH değerlerinde değerlendirme yapılmasını gerektirir [7].

Günümüzde gelişen kromatografi yöntemleri ile biyoaktivite çalışmalarında yeni metotlar geliştirilmeye başlanmıştır. HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) cihazıyla yapılan çalışmalar ise oldukça geniş ve güvenilir bir yer kaplamaktadır ve bu teknolojinin yerini alan çok az sayıda teknolojik gelişme vardır. Bu çalışmalara örnek olarak on-line HPLC uygulamaları verilebilir.

Bu tez çalışmasında DPPH radikal giderim testinde ortam şartlarının (ışık, sıcaklık, çözücü, pH ve tampon konsantrasyonu) etkisi incelenmiştir. Aynı zamanda biyoaktif doğal bileşiklerin ekstraksiyonunda ortam pH' sının bileşim ve aktiviteye etkisi araştırılmıştır.

## 1.2. Serbest Radikaller ve Antioksidanlar

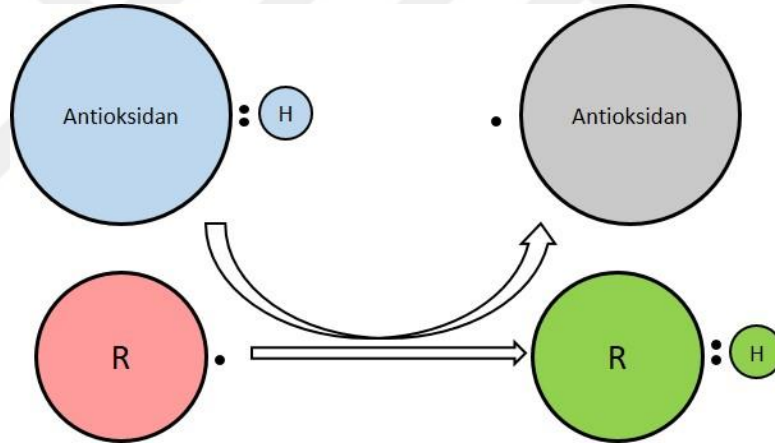
Serbest radikaller (Tablo 1), eşleşmemiş elektrona sahip aşırı reaktif, diğer moleküllerle etkileşime girerek onları da kararsız hale getirerek daha fazla radikal oluşumunu sağlayan hızlı zincir reaksiyonu verme yeteneği bulunan atom veya moleküllerdir. Reaktif oksijen türleri (ROS), reaktif oksijen iyonları ve peroksitleri içerirler ve yüksek derişimlerde DNA, RNA, protein ve lipidler gibi biyomoleküller üzerinde yıkıcı etkilere sebep olurlar. ROS aynı zamanda insanlarda patolojik koşullara yol açan türlerdir. Normal şartlarda, ROS gerekli ara ürünler olarak üretilir ve pikomolar düzeydeki derişimlerde hücre sinyalleşmesinde ikincil haberciler olarak bulunurlar. Aşırı ROS üretimi ve kontrolsüz düzenlemesi zararlı etkilere sebep olmaktadır [8]. ROS' un ortak hedeflerinden bazıları, nükleik asitler, karbohidratlar, proteinler ve lipidlerdir. Oksidatif stresin bir biyolojik işareti olarak kabul edilen toksik bir molekül olan malondialdehit, lipidleri içeren oksidasyon reaksiyonlarında oluşan son ürünlerden biridir [9].

Tablo 1. Serbest radikaller ve etkileri

Serbest Radikal	Etkinliği
Süperoksit radikali ( $O_2^{\cdot-}$ )	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünüdür.
Hidroksil radikali ( $OH^{\cdot}$ )	En reaktif radikaldir.
Hidrojen radikali ( $H^{\cdot}$ )	En basit radikaldir.
Peroksil radikali ( $ROO^{\cdot}$ )	Lipidlerde lokalize olma yeteneğine sahiptir.
Alkoksil radikali ( $RO^{\cdot}$ )	Organik peroksitlerin yıkımı ile üretilen metabolittir.
Hidroperoksil radikali ( $HO_2^{\cdot}$ )	Lipid peroksidasyonunu artırmaktır.
Nitrik oksit radikali ( $NO^{\cdot}$ )	Bir nörotransmitterdir.

Pro-oksidan bileşiklerin yanında sigara içilmesi, fiziksel aktivitenin fazla olması, stres gibi risk faktörlerinin varlığından dolayı oksidatif stres oluşmaktadır. Bu sürecin tanımlanmış üç adımı vardır. Radikallerin oluştuğu başlangıç süreci, diğer moleküller ile

reaksiyona girdikleri yayılım süreci ve son olarak diğer ürünlere dönüştüğü sonlanmadır [10]. Antioksidanlar, oksidatif strese neden olan bu reaktif türlerin temizlenmesini sağlayan moleküllerdir. Substratın oksidasyonunu düşük derişimlerde önleyebilecek maddeler olarak da tanımlanmaktadır. Oksidatif stres ve zararlı etkileri, doğal olarak oluşan antioksidanların alınmasıyla önlenmektedir. Antioksidanlar, serbest radikal temizleyiciler olarak işlev görür (Şekil 1) ve çeşitli hastalıklara yol açan oksidatif reaksiyonları önler. Ekzojen antioksidanların çoğu, bitki kaynaklı fitokimyasallardır. Eşsiz yapısal düzenlemelerine dayanan antioksidan potansiyeli olan birçok fitokimyasal sınıf vardır. Organizmada oluşan antioksidanlar farklı fizyolojik durumlarda oksidatif strese karşı savaşmaktadır. Bunlar, katalaz, süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimleri içermektedir. Ayrıca özellikle GSH oksidatif strese karşı savunmada önemli rol almaktadır. A, C ve E vitaminleri gibi antioksidanlar diyetle dışarıdan alınmaktadır [11].



Şekil 1. Bir antioksidanın serbest radikale saldırması (R: Radikal)

Antioksidanların biyolojik sistem için yararı ve gıdaların antioksidan içerikleri, gıda hammaddelerinin cinsine, mahsulün hasat zamanı ve hasat yöntemlerine, depolama ve depolandığı ortamının ışığına, ısısına, iklime, nemine, hatta kişi ve toplumun tüketim alışkanlıklarına göre değişebilmektedir.

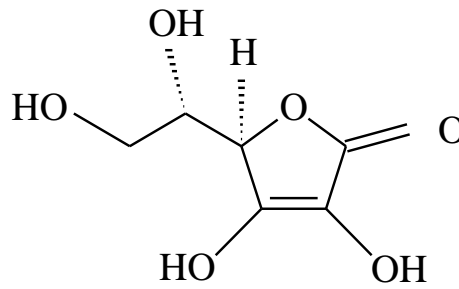
Antioksidan maddelerin önemli kaynaklar bitkiler olduğu için diyetle alınan antioksidanlar genellikle fitokimyasal antioksidanlar olarak adlandırılmaktadırlar. Gıdalardaki doğal antioksidan maddeler; indirgen ajan, serbest radikal giderici, singlet

oksijen tutucu mekanizmalardan bir veya birkaçı ile antioksidan etkilerini göstermektedirler [12].

### 1.3. Doğal ve Yapay Antioksidanlar

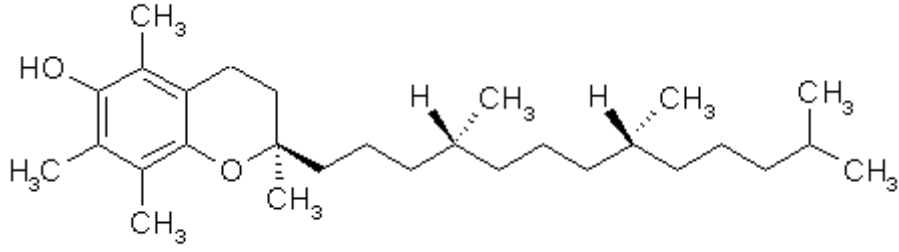
Gıdada acılaşma ve bozulma reaksiyonlarını önlemek ve oksidasyonu durdurmak veya yavaşlatmak için gıdalara antioksidanlar ilave edilmektedir. Bu ilave antioksidanlar aynı zamanda gıdanın raf ömrünü uzatmaktadır. Antioksidanlar doğal ve yapay olmak üzere iki grupta sınıflandırılabilirler. Bitkilerin sekonder metabolitleri doğal antioksidanlardır. Doğal antioksidanların en yaygın olanları askorbik asit ( C vitamini), tokoferoller,  $\beta$ -karoten, likopen, fenolik asitler, flavonoidlerdir. Günümüzde gıda raf ömrünü uzatmak ve ürün maliyetini düşürmek adına doğal antioksidanlar yerine daha çok yapay antioksidanlar kullanılmaktadır. Endüstriyel olarak kullanılan yaygın yapay antioksidanlar arasında bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), *tert*-bütül hidrokinon (TBHQ), propilgallat (PG) en önemlileridir.

C vitamini (Şekil 2) çeşitli gıdalarda bulunan, besin takviyesi olarak kullanılan askorbik asit ve askorbat olarak ta bilinmektedir. Skorbüt hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır. Güçlü bir antioksidan olmasının yanında doku tamirinde ve nörotransmitterlerin enzimatik üretiminde rol oynamaktadır [13].



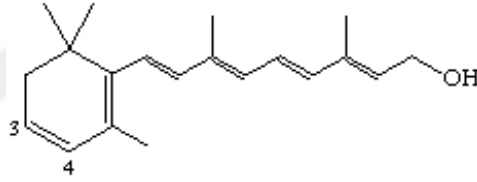
Şekil 2. C vitamini

E vitamini (Şekil 3) yağda çözünen önemli bir vitamin olup antioksidan özellik göstermektedir. E vitamini bileşenleri değişik türlerde tokotrienoller ve tokoferoller içermektedir. Kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde, tedavi edici olarak kullanılmaktadırlar [14].



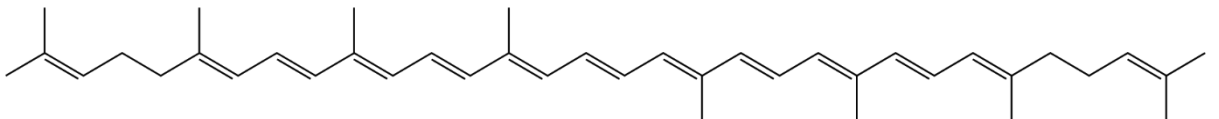
Şekil 3. E vitamini

Karotenoidler lipofilik fitokimyasallar olup organizmaya alımları ile tip-2 diyabette, kardiyovasküler ve kronik hastalıklarda azalmaya sebep olmaktadır [15]. A vitamini (Şekil 4) olarak da yaygın olarak kullanılmaktadır. Göz hastalıklarının tedavisinde ve bağışıklık sistemini güçlendirerek cilt hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır.



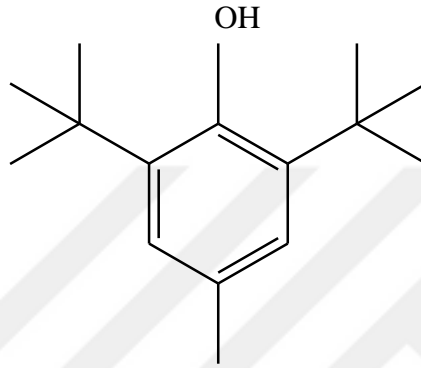
Şekil 4. A vitamini

Likopen (Şekil 5), kırmızı havuç, kavun, karpuz gibi sebze ve meyvelerde bulunan parlak kırmızı karotenoid hidrokarbondur. Kırmızı olmayan bitkiler örneğin olarak kuşkonmaz ve maydonoz likopen içermektedir. Bu bileşik karotenoid olmasına rağmen A vitamini aktivitesine sahip değildir [16].



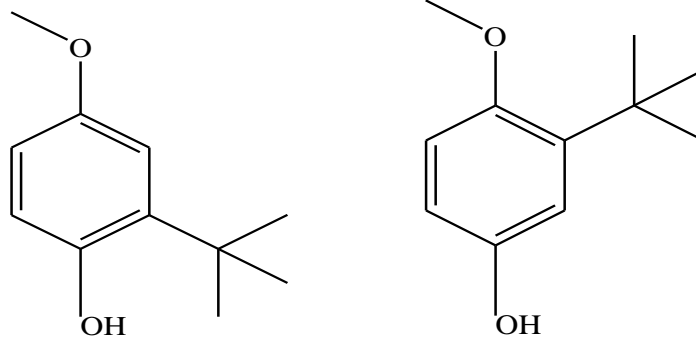
Şekil 5. Likopen

BHT (Şekil 6) aynı zamanda dibutilhidroksitoluen olarak da bilinmektedir. Fenolün türevlendirilerek kimyasal olarak üretilen lipofilik bir organik bileşiktir ve en yaygın olarak kullanılan sentetik antioksidandır. Avrupa ve ABD’ de, gıda katkı maddesi olarak küçük miktarlarda kullanılmasına izin verilmektedir. BHT, serbest radikallerin kontrol edilmesi gereken sıvılarda ve diğer malzemelerde oksidasyonu önlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [17].



Şekil 6. BHT

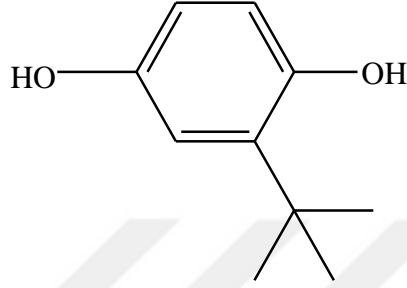
BHA (Şekil 7), iki izomerik organik bileşik olan 3-tert-butil-4-hidroksianisol ve 2-tert-butil-4-hidroksianisol karışımından oluşan bir antioksidan molekül olarak bilinmektedir. 4-metoksifenol ve izobütilden elde edilmektedir. E320 ile gıda katkı maddesi olarak kullanılan bir maddedir. BHA, gıda, gıda ambalajı, hayvan yemi, kozmetik, kauçuk ve petrol ürünlerinde antioksidan ve koruyucu özellik göstermektedir. BHA ayrıca, izotretinoin, lovastatin ve simvastatin gibi ilaçlarda da yaygın olarak kullanılmaktadır [18].



Şekil 7. BHA

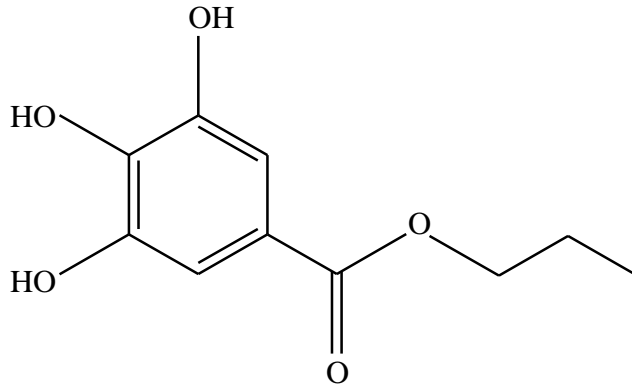


TBHQ (Şekil 8), gıdalarda, doymamış bitkisel yağlar ve birçok yenilebilir hayvansal yağ için koruyucu olarak kullanılmaktadır. Bilinen avantajı gıdaların raf ömrünü uzatmaktır. Gıda katkı maddesi olarak E319 koduyla kullanılmaktadır. Eklendiği besinin kokusunu ve tadını değiştirmemektedir. BHA gibi diğer koruyucu maddelerle karıştırılabilme özelliğine sahiptir [19].



Şekil 8. TBHQ

Propilgallat (Şekil 9), gallik asit ve propanolün kondenzasyonu ile oluşan bir ester olmak ile birlikte 1948'den beri, bu antioksidan, oksidasyonu önlemek için yağ ve yağ içeren yiyeceklere eklenmektedir. E310 koduyla gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır [20].

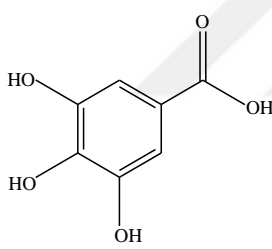


Şekil 9. Propilgallat

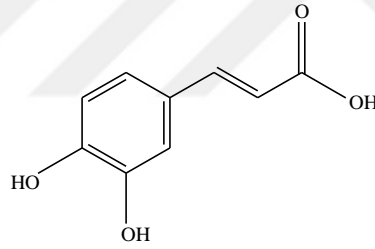
#### 1.4. Biyoaktif Fenolik Bileşikler

20. yüzyılın sonlarına doğru bitkisel kaynaklı çalışmalarda bir artış gözlenmektedir. Sağlık alanında yapılan çalışmalar da bu konuya doğru yönelmektedir. Meyve, sebze, antioksidan etki göstermektedir. Bu fitokimyasallar hipertansiyon, kardiyovasküler hastalıklar ve diyabet ile mücadelede ön plana çıkmaktadır [21]. Fitokimyasalların bu etkileri doğal kaynakların önemini artırmakta ve bu alandaki çalışmaları arttırmaktadır.

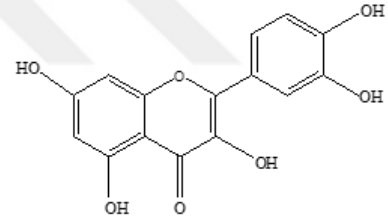
Gıda katkı maddeleri, gıdanın raf ömrünü uzatmak, bozulmasını geciktirmek, gıdanın duyuusal özelliklerini geliştirmek, gıdaların karakteristik özelliklerini korumak için gıdaların hazırlanmasında kullanılan besleyici özelliği olmayan koruyucu maddelerdir [22]. Endüstride sentetik olarak kullanılan bu gıda maddelerinin insan sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri de düşünüldüğünden son yıllarda yapay katkı maddelerinden daha çok bitkisel kaynaklı gıda katkı maddelerine yoğunlaşmaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde yine bitkilerden elde edilen fitokimyasallar kendilerini göstermektedirler [21].



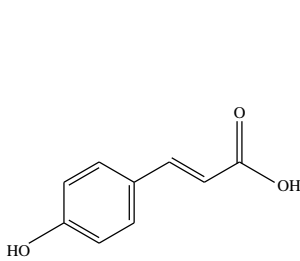
Gallik asit



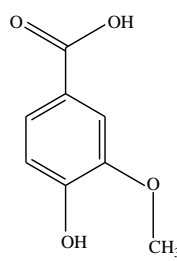
Kafeik asit



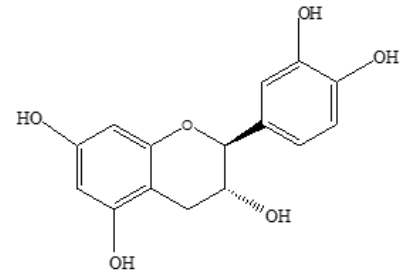
Kateşin



*p*-Kumarik asit



Vanilik asit



Kuersetin

Şekil 10. Bazı fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler (Şekil 10), meyve ve sebzelerde çok az bulunmalarına rağmen çok yüksek etkiye sahip bitkilere buruk bir tat veren, renginden sorumlu olan ve bitkiyi dış etkilere karşı koruyan moleküller olarak bilinmektedirler. Aromatik halkasında bir veya birden fazla hidroksil grubuna sahip bileşiklerdir. Polifenoller ve basit fenolik asitler olarak iki ana sınıfa ayrılmaktadırlar. Meyve ve sebzelerde bolca bulunan fenolik bileşikler ise hidroksisinnamik asit türevleri, hidroksibenzoik asit türevleri ve flavonoidler olmak üzere üç sınıfa ayrılmaktadırlar. Flavonoidler de kendi aralarında antosiyanidinler, flavanoller, kateşinler, fovanonlar, proantosiyanidinler olarak 5'e ayrılmaktadırlar [23]. Fenolik bileşikler çok geniş etkilere sahip oldukları için çok daha farklı sınıflandırmalara da sahiptirler.

Yapısal modifikasyonlar ve temel olarak gastrointestinal kanalın farklı bölümlerindeki pH değişikliklerinin neden olduğu fonksiyonel özelliklerde meydana gelen değişiklikler fenoliklerin etkilerine müdahale edebilir ve bu nedenle biyo-verimi etkileyebilir. Birçok çalışma, bağırsak koşullarının, fitokimyasalların biyolojik olarak erişilebilirliği üzerindeki önemli etkilerine işaret etmektedir. Bununla birlikte, pH değişikliklerinin fenolik bileşikler üzerindeki etkileri üzerine yapılan çalışmaların sonuçları tutarlı olmamıştır [24].

### **1.5. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri**

Oksidatif stres ile mücadelede kullanılan antioksidan molekülleri tayin etmek için birçok metot geliştirilmiştir. Bu metotların temeli hidrojen atomu transferi ve tek elektron transferine dayanmak üzere iki şekilde değerlendirilmektedir [25,26]

#### **1.5.1. Hidrojen Atom Transfer (HAT) Reaksiyonlarına Dayalı Yöntemler**

HAT (Hidrojen Atom Transfer) esasına dayanan yöntemler genellikle oksitlenebilir moleküler antioksidanlar ile sentetik serbest radikal üreticilerin karıştırılmasını içermektedir. 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH•) radikal giderme, ORAC (oksijen radikali absorban kapasitesi), TRAP (toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametresi) ve krosin beyazlatma yöntemi ile antioksidan aktivite tayin testleri HAT temelli reaksiyonlara dayanmaktadır [25,26].

### 1.5.2. Tek Elektron Transfer (SET) Reaksiyonlarına Dayalı Yöntemler

Antioksidan maddenin indirgenğinde renk değiştiren bir oksidan maddeyi indirgeme kapasitesinin ölçümüne dayanır. Renk değişiminin derecesine göre numunedeki antioksidan konsantrasyonu ile kıyaslama yapılır. DPPH• giderme testi, CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite), FRAP (Demir (III) indirgeme), TEAC (trolloks eşdeğeri antioksidan kapasite), ABTS radikal giderme aktivitesi, toplam fenolik madde tayini testleri SET reaksiyonlarına dayanmaktadır [25,26].

### 1.5.3. Çalışmada Kullanılacak Spektrometrik Antioksidan Testler

Bu tez çalışmasında kapsamlı bir şekilde literatür taraması yapılarak en yaygın kullanılan antioksidan tayin yöntemleri belirlenerek ekstrakte edilen numunelere uygulanmıştır. Ayrıca yaygın bilinen antioksidanlar DPPH• giderim testi ile çalışılmıştır. Kullanılan yöntemler:

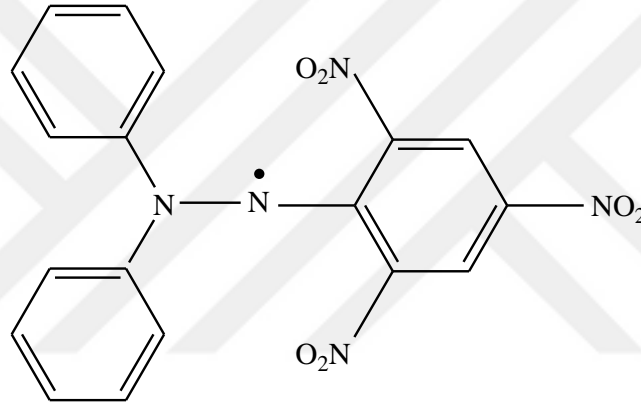
1. DPPH• giderim testi
2. Demir (III) indirgeme/antioksidan güç (FRAP) tayini
3. Toplam fenolik madde tayini ( TP)

#### 1.5.3.1. DPPH• Giderim Testi

11.11.2019 tarihinde “DPPH•” ve “antioxidant” kelimeleri ile yapılan web of science daki literatür taramasında 27,824 adet bu konu ile makale yayımlanmıştır. Bu sayı da diğer yöntemlerle kıyaslandığında DPPH• giderim yönteminin açık ara önde olduğunu göstermektedir. Bu yöntem kolay uygulanabilmesi ve kısa sürmesi nedeniyle oldukça fazla kullanılmaktadır. DPPH• (Şekil 11) kimyasal ticari olarak kolay ulaşılabilen ve çözeltisi kolay hazırlanabilen bir madde olması nedeniyle tercih edilmektedir. Bu metodun dezavantajı ise molekülün yapısı ve boyutunun test sonuçlarını etkilemesidir. Sterik engellemeden dolayı inaktif olarak test edilmektedirler. DPPH• yöntemi oldukça fazla ilgi görmekte ve bu yöntemin yenilikçi yaklaşımlarla geliştirilmesine yönelik çalışmalar hızla devam etmektedir. Son yıllarda bu yeni metodlardan biri olan on-line HPLC-antioksidan aktivite uygulamalarının artması ile on-line HPLC-DPPH• yöntemleri geliştirilmiştir. Bunun

yanı sıra bir başka yeni metod da laboratuvarımızda geliştirilmiş olan damlatma yöntemi ile DPPH• antioksidan aktivite metodudur. [27]. Yapılan diğer çalışmalara bakıldığında DPPH• ışık, sıcaklık ve çözücünden etkilendiği ve bu etkilenmenin aktivite sonuçlarını da etkilediği görülmektedir.

DPPH• radikali, tek elektronun molekül üzerinde dimerizasyonunu önleyen yapısı sayesinde stabil bir serbest radikal olarak sınıflandırılmaktadır. DPPH• çözeltilisine antioksidan çözeltilisinin ilave edilmesiyle antioksidanlar radikallere proton vererek onları indirger ve indirgenme sonucunda çözeltinin rengi mor menekşe renginden sarıya doğru değişim gösterir ve ölçülen dalga boyunda absorbansta düşüş meydana gelir [28]. Bu renk değişimi genellikle spektrofotometrik olarak 517 nm' de ölçülmektedir.



Şekil 11. DPPH Radikali

DPPH• yöntemi sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Temelde hidrojen transfer yöntemine dayanmaktadır. Son zamanlardaki çalışmalarda farklı mekanizmaları olduğu gözlemlenmiştir. DPPH• yöntemi ile farklı reaksiyon zamanları, çözücüler, pH ve antioksidan olarak kullanılan farklı bileşenlerin takibi yapılmıştır [29]. Metal iyon tipi ve konsantrasyonu, su içeriğinin ve ölçüm sistemi pH' sının ABTS testini önemli ölçüde etkilediği ve böylece bitki ve besin özütlerinin doğru antioksidan aktivitelerinin tahmin edilmesini zorlaştırdığı yapılan çalışmalarda bulunmuştur [30]. Dawidowicz ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmadakine benzer şekilde DPPH• giderim testine pH' nın etkisi yanında çözücünün etkisi de bu tez çalışmasında incelenmiştir.

### 1.5.3.1.1. DPPH• ‘nin Kararlılığına pH’ nın Etkisi

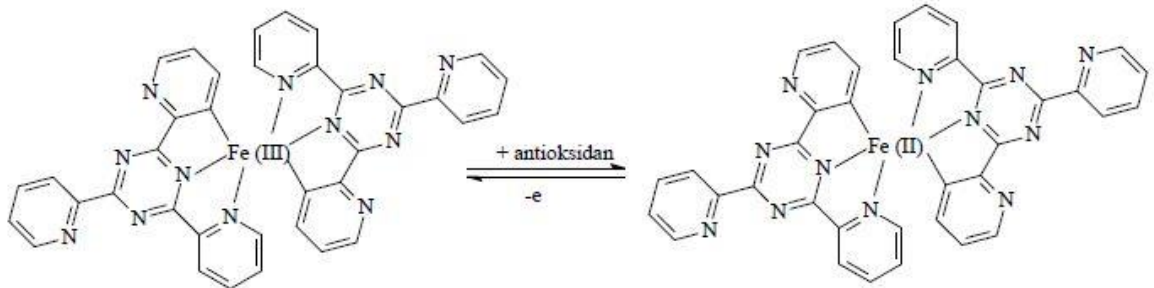
Literatürde mevcut çalışmalara bakıldığında ortam pH' sı, özellikle karbonil bileşikleri (şekerler) ve amino grubu içeren bileşiklerin (aminoasitler) reaksiyonuyla yeni biyoaktif bileşiklerin oluşmasında önemlidir [31]. pH, antioksidan testlerin sonuçlarında verilen aktivite değerlerinde de değişikliklere sebep olmaktadır. DPPH•' nın pH tampon çözeltisindeki stabilitesi temel olarak kullanılan tampon ve çözücü türlerine bağlıdır [32].

### 1.5.3.1.2. DPPH• ‘nin Kararlılığına Çözücünün Etkisi

Daha önce yapılan çalışmada DPPH• nin reaktivitesi *tert*-butil alkol sisteminde önemli derecede arttığı gösterilmiştir [32]. DPPH• sadece organik çözücülerde çözünebilmektedir ve numune bileşiklerden absorbans girişimleri kantitatif analiz için bir problem olabilmektedir [32].

### 1.5.3.2. Demir (III) İndirgeme/ Antioksidan Güç (FRAP) Tayini

FRAP testi, asidik şartlarda (pH 3.6) antioksidanlar tarafından ferrik iyonun TPTZ (2,4,6-tripiridil-*s*-triazin) varlığında demir(II)-TPTZ kompleksine indirgenmesini ölçer (Şekil 12). FRAP birimi, bir mol Fe (III) 'nin Fe (II)' ye indirgenmesidir [28]. Bu test yapılırken mavi renk 595 nm' de spektrofotometrik olarak ölçülmektedir.



Şekil 12. Fe<sup>3+</sup> ün Fe<sup>2+</sup> ye indirgenmesi

### 1.5.3.3. Toplam Fenolik Madde Tayini (TP)

Fenolik asitler, benzoik ve sinamik asitlerden türetilen fenolik yapılar olmakla birlikte hidrobenzoik asit esas olarak gıdalarda glukozitler formunda bulunurken, *p*-kumarik, kafeik ve ferrulik asit gibi hidroksisinamik asit, çoğunlukla gıdalarda basit esterler olarak bulunmaktadır. Folin-Ciocalteu reaktifi ile yapılan bu yöntem ile toplam fenolik bileşikler belirlenebilmektedir. Bu yöntem, suda ve organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin Folin-Ciocalteu reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Mor-menekşe renkli bu kompleks 765 nm’ de maksimum absorbands vermektedir.

### 1.6. pH

Kimyada pH, sulu bir çözeltinin ne kadar asidik veya bazik olduğunu belirlemeye yarayan ölçü birimidir. Asidik çözeltiler düşük pH’ ya sahipken, bazik çözeltiler yüksek pH ya sahiptir. Oda sıcaklığında su ise ne bazik ne de asidik özellik gösterir pH’ sı 7 civarındadır. pH, çözeltideki hidrojen iyonlarının konsantrasyonunu logaritmik olarak belirtmektedir. Düşük pH yüksek hidrojen iyonu konsantrasyonunu belirtmektedir. Daha doğru bir tanım olarak pH, hidrojen iyonu aktivitesinin 10 tabanında eksi logaritmasıdır [34].

$$\text{pH} = -\log_{10}(a_{\text{H}^+}) = \log_{10}\left(\frac{1}{a_{\text{H}^+}}\right) \quad (1)$$

### 1.7. Farklı pH’ larda Antioksidanların Özellikleri

Sulu ortamın pH’ sına ve iyonik şiddetine bağlı olarak antosiyaninler yapısal değişikliğe uğramaktadır. Antosiyaninlerin ekstraksiyon verimi pH değerine bağlıdır ve güçlü asit ortamına sahip asitleştirilmiş çözücünün yüksek ekstraksiyon verimi vardır. Çünkü asitler antosiyaninin doğal formunu değiştirebilmektedir. Antioksidan aktivitesi pH’

2 den 7' ye yükseldikçe azalmaktadır [35]. Sabit bir pH' da toplam fenol içeriğinde ve antioksidan aktivitesinde bir azalma görülmektedir [36]. pH' nın antosiyanin molekülleri üzerine etkisi, benzoik ve sorbik asitler, fenol ve nitrofenoller, vanilin ve etilvanilin veya gallik asit gibi diğer fenolik asitlerdeki gibi iyi kanıtlanmıştır [37].

### **1.8. pH' nın Biyomoleküllere Etkisi**

Biyokimyada çok önemli ve sıklıkla kullanılan bir işlem pH ölçümüdür. Biyomoleküllerin yapıları ve aktiviteleri pH' dan etkilenmektedir. Protein yapısında olan enzimlerin katalitik etkileri pH' ya bağlıdır. Bu yüzden tıbbi tanılar için kan ve idrarda pH ölçülmesi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu duruma örnek verecek olursak ileri derecede diyabet hastası olan kişilerde kan plazma pH' sı genellikle olması gereken 7,4 değerinin altındadır. Kan plazma değerinin 7,35' in altında olması asidoz, 7,45' in üzerinde olması ise alkaloz olarak bilinmektedir. Proteinler sabit bir yapıda değildir. Yüksek sıcaklık ve asidik pH' da, organik çözücüler ve oksidatif atmosfer varlığında kolayca denatüre olabilmektedir.

Antosiyaninlerin ve polifenollerin ekstraksiyon oranları; ekstraksiyon yöntemi, çözücü, sıcaklık, zaman ve pH gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. En yaygın kullanılan ekstraksiyon çözücüsü ise asitlendirilmiş etanoldür [38]. Antosiyaninlerin stabilitesinin sağlanmasında pH' nın büyük ölçüde etkisi olduğu bilinmektedir. [39]. Antosiyaninlerin korunması için pH 3,5' de mikrokapsüllemenin uygun olduğu bulunmuştur [40]. pH değişikliklerinin özellikle asitleştirilmesinin gıda matrikslerine bağlı fenoliklerin serbest bırakılmasına, potansiyel olarak absorpsiyon için mevcut fenolik miktarını artırarak biyoyararlanımı artırmaktadır [24]. Ortama asit eklenmesi, fitokimyasallarda, cis-trans izomerazyonuna veya radikal giderme potansiyelinde değişikliklere sebep olmaktadır [41]. Diyetimizin bir parçası olan doğal polifenolik bileşikler, pH değişikliklerine maruz kaldıklarında zarar görürler ve pH' a duyarlılıkları da fenolün yapısına bağlıdır [41]. pH değişikliğine (3-11) maruz kalan çözeltilerdeki saf polifenollere ilişkin raporlar, fenoksit iyonlarının ve kinon oksidasyon ara maddelerinin kısmi rezonans stabilizasyonunu ortaya çıkarmıştır [41]. Bitkilerden fenolik bileşenler arasında özellikle antosiyaninlerin ekstraksiyonunda düşük pH' da çalışılırken asitin türünün önemli olduğu, bu anlamda formik asitin üstün performans gösterildiği bildirilmiştir [42].



## 1.9. Enzim

Enzimler, metabolizmada hücrenin fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için büyük bir kısmı protein yapılı olan biyomoleküllerdir. Biyokimyasal süreçlerin merkezindedirler. Enzimler aktivasyon enerjisini düşürerek reaksiyonları hızlandırırlar, diğer bir deyişle katalizör görevi gördükleri için biyokatalizör olarak tanımlanmaktadır. Enzimler proteinlerin önemli bir sınıfını oluşturmaktadır. Amino asitlerin peptid bağı ile bağlanarak kendilerine özgü üç boyutlu yapılara sahiptirler. Üç boyutlu yapılarının oluşmasında H-bağı, elektrostatik etkileşimler, Van der Waals etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimler gibi zayıf etkileşimler önemli rol oynamaktadır. Üç boyutlu yapıları sayesinde substrat ile etkileşerek katalitik görevlerini yerine getirmektedirler. Enzimlerin katalitik güçlerini gösteren turnover sayısı, bir mol enzim tarafından birim zamanda ürüne dönüştürülen substratın mol sayısıdır [43]. En yüksek turnover sayısına sahip enzimler arasında karbonik anhidraz enzimi yer almaktadır. Enzim aktivitesi, substratın ürüne dönüşmesi olarak ifade edilmektedir. Enzim aktivitesi, enzimin üç boyutlu yapısı, substratın konsantrasyonu, sıcaklık ve pH gibi dış faktörlerden etkilenmektedir.

### 1.9.1. Karbonik Anhidraz Enzimi

Karbonik anhidraz (E.C.4.2.1.1) enzimi aktif bölgesinde çinko iyonu bulunduran metaloenzim ailesine mensup, karbondioksitin bikarbonata dönüşümünü tersinir katalizleyen bir enzimdir. Aynı zamanda biyolojik sistemin asit baz dengesini korumaktadır [44]. Karbonik anhidraz 16 tane izoenzime sahiptir.



Ortamın değişmesi göz önüne alınarak karbonik anhidraz enziminin yaklaşık  $\text{pK}_a$  değeri 6,36' dır. Bu bilgiye dayanarak pH 7' de bikarbonat çok az bir yüzde protonlanmaktadır.

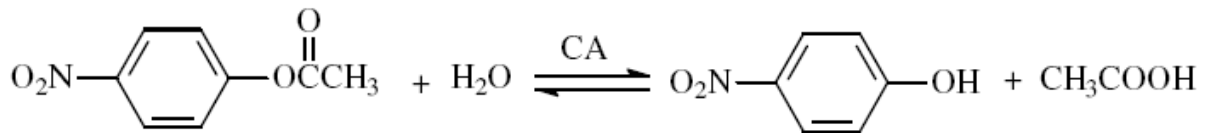
Karbonik anhidraz enziminin farklı izoformları düşünülduğünde 2 nolu reaksiyonun katalitik hızları saniyede  $10^4$  ile  $10^6$  arasında değişmektedir[45]. Enzimdeki çinko prostetik grubu histidin aminoasiti tarafından üç pozisyonda koordine edilmektedir. Dördüncü koordinasyon su molekülü tarafından oluşturulmaktadır [46].

Karbonik anhidraz enzimi ilk olarak sığırların kırmızı kan hücrelerinden izole edilmiştir [47]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda karbonik anhidrazın altı farklı familyadan ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\zeta$ ,  $\eta$ ) oluştuğu bulunmuştur.

### 1.9.2. Karbonik Anhidraz İnhibitörleri ve Aktivatörleri

Literatür taraması yapıldığında karbonik anhidraz (CA) enziminin esteraz ve hidrataz olmak üzere iki aktivitesi mevcuttur. CA aktivite ölçümleri bu iki aktivite üzerinden yapılır [48].

Esteraz aktivitesi belirlenirken substratı olan *p*-nitrofenil asetatı karbonik anhidraz enzimi hidroliz ederek oluşturduğu ürünün (*p*-nitrofenol/*p*-nitrofenolat) 348 nm' de spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır (Şekil 13). Bu absorbans ölçümlerinden aktivite hesaplanmaktadır [49].



Şekil 13. *p*-nitrofenolün hidrolizi

Hidrataz aktivitesi metodu ise Maren ve arkadaşları tarafından bulunmuş ve günümüze kadar geliştirilmiştir. Bu metot substrat olan  $\text{CO}_2$ ' in hidrasyonu sonucu açığa çıkan  $\text{H}^+$  iyonlarının konsantrasyonunun ortamın pH' sı 10 iken bu pH' nın 7,4' e düşerken geçen sürenin ölçülmesi temeline dayanmaktadır [50]. Aşağıdaki formül ile enzim ünitesi hesaplanmaktadır:

$$E\ddot{U} = (t_0 - t_n) / t_n \quad (3)$$

EÜ: Enzim ünitesi

t<sub>0</sub>: Enzimsiz denemede ölçülen süre

t<sub>n</sub>: Numune koyulduktan sonra geçen süre



Karbonik anhidraz enzimini inhibe eden ilaçlar diüretik grubu oluşturduğu için klinisyenlerin dikkatini çekmiştir. Asetazolamid, cıva olmayan ilk diüretik olarak 1956 yılında klinik uygulamaya sokulmuştur. Hidroklorotiyazid, indapamid, klortalidon ve furosemid gibi diüretikler dahil olmak üzere FDA ( Food and Drug Administration) tarafından onaylı karbonik anhidrazı inhibe eden ilaçlar sülfanoamidlerdir [51]. Konjektif kalp yetmeliği tedavisinde klasik karbonik anhidraz inhibitörleri olarak metazolamid, etokzolamid, diklorfenamid uygulanmıştır. Günümüzde daha çok tercih edilenler tiyazid, tiyazid benzeri diüretikler ve aldosteron antagonistleri gibi yeni nesil diüretiklerdir, fakat çoğu farklı enzim inhibisyonu sergilemektedirler. Asetazolamid hipertansiyon, uyku kalitesini iyileştirme ve dağ hastalığı riskini azaltma durumunda yararlı bir ilaç olarak kullanılmaktadır [51]. Topikal dorzolamid ve brinzolamid ve bazı durumlarda sistemik asetazolamid, glokomda göz içi basıncının azaltılması için yaygın kullanılmaktadır. Topiramamat ve zonisamid, karbonik anhidraz inhibisyonu olan çoklu etki mekanizmasına sahip antikonvülsan moleküllerdir [52].

Karbonik anhidraz inhibitörleri ile ilgili literatürde oldukça fazla çalışma mevcut olmasına rağmen, aktivatörleri ile ilgili yaygın çalışma bulunmamaktadır. İnsanda fizyolojik olarak bulunan potansiyel CA II aktivatörleri histamin, serotonin gibi biyojenik aminler, fenilalanin ve histidin gibi amino asitler olarak bilinmektedirler [53].

## 1.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Kromatografinin ilk uygulaması Mikhail Tswett tarafından bitkiden renkli bileşenlerin ayrımında kullanılmıştır. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi), karışımdaki bileşenleri ayıran, hem nicel hem de nitel olarak ölçüm yapabilen bir tekniktir. Pompalar kullanılarak sabit faz madde ile doldurulmuş kolondan numune karışımının hareketli faz ile yüksek basınçta geçirilmesine dayanmaktadır. Numunedeki her bir bileşen sabit faz madde ile farklı etkileşimlere girerek farklı bileşenler için farklı akış hızlarına neden olmaktadır ve bileşenlerin kolondan çıkarken ayrılmalarına sebep olmaktadır [54]. HPLC üretimde, araştırmada, yasal analizlerde ve tıbbi alanlarda kullanılmaktadır. HPLC' nin kromatografik yöntemler arasında en çok kullanılmasının sebebi çok hızlı analiz yapılabilmesine olanak sağlamasıdır. HPLC' nin avantajları arasında yüksek çözünürlük sağlaması, yüksek duyarlılığa sahip olması, tekrarlanabilirlik, yüksek oranda geri kazanım sağlaması, doğruluk, otomasyon ve paslanmaz çelik kolonların uzun süre tekrar tekrar kullanılabilmesi sayılabilmektedir.

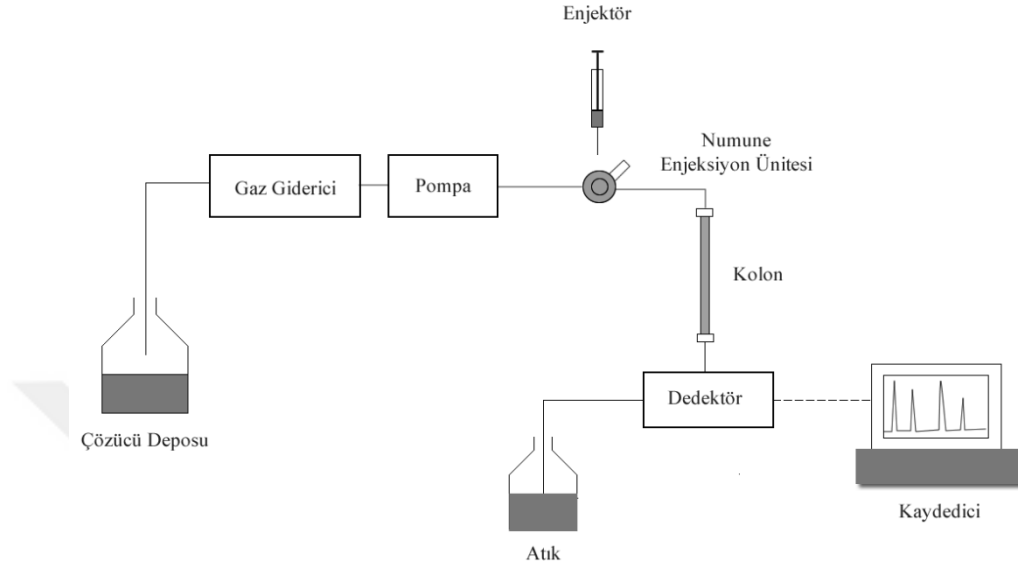
### 1.10.1 HPLC' nin Temel Prensipleri ve Temel Kavramlar

HPLC temel olarak numunenin mobil faz içinde çözünmesi ve sabit faz diye adlandırılan dolgu maddesi ile doldurulmuş kolondan yüksek basınç altında geçirilmesine dayanmaktadır. Çözünen bileşenler polaritelerindeki farklılıklarından dolayı kolonu farklı zamanda terk etmektedirler. Bu fark sayesinde bileşenler birbirlerinden ayrılmaktadırlar [55]. Kolondan çıkan faz dedektöre gelir ve sinyallerin oluşturduğu zamana bağlı kromatogramlar ekranda bize bileşenler hakkında bilgi vermektedir. Bu zaman ise bileşenlerin alıkonma zamanlarıdır. Aynı zamanda kromatogramlardaki pik alanlarının hesaplanması bize numunenin miktarı hakkında bilgi vermektedir. HPLC cihazı beş ana bölümden oluşmaktadır:

- Mobil faz kabı
- Gaz giderici (degasser)
- Yüksek basınç için pompa
- Enjeksiyon sistemi
- Kolon

- Dedektör

Şekil 14' de şematik olarak cihazın bölümleri gösterilmektedir.

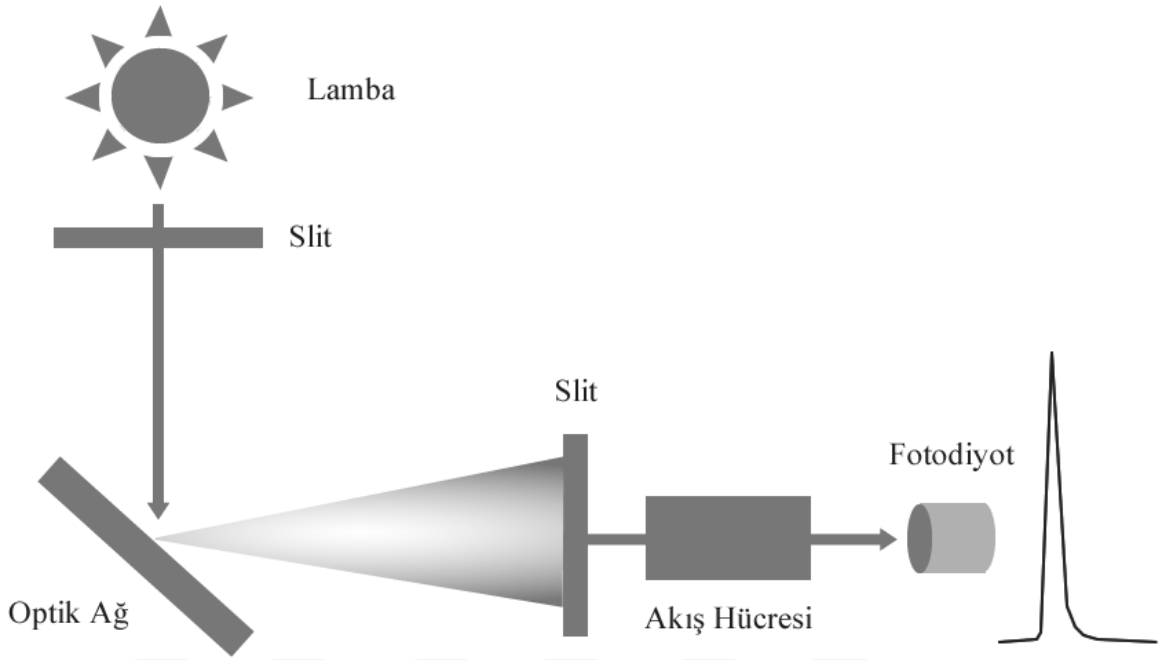


Şekil 14. HPLC cihazının şematik gösterimi

### 1.10.2. Yaygın Kullanılan HPLC Dedektörleri

HPLC sisteminde dedektör çok önemli bir yere sahiptir. Kolondan çıkan bileşenin tayini için çok hassas ve tahmini olarak bileşenin yapısına uygun bir dedektör seçilmelidir. İyi bir dedektörde gürültü seviyesi çok az olmalı ve çok az miktarlardaki numunelerde ölçüm yapabilmelidir. Bunun yanı sıra sıcaklık ve basınç farklarından etkilenmemelidir [56].

UV-Vis dedektör ile ışığı absorblayan bileşenlerin tayinini yapmak mümkündür (Şekil 15). Bu dedektörü 200-800 nm arasında istediğimiz dalga boyuna ayarlanabilmektedir. Bu dedektör ile analiz yaparken kullanılan çözücü sisteminin UV ışınları absorbe ettiği dalga boyları analizde çalışılan dalga boyundan düşük olmalıdır [57].



Şekil 15. UV dedektörün çalışma prensibi [6]

DAD veya PDA dedektörü ( foto diyot dizili dedektör) UV-Vis dedektörün geliştirilmesiyle üretilen bir modeldir. UV-Vis dedektörden farkı ise bileşenin verdiği sinyalleri farklı dalga boylarında eş zamanlı olarak ölçme yeteneğinin olmasıdır. Bu sebepten dolayı dedektöre olan güven artmaktadır [57].

Bileşenlerine ayrılan numunelerin her bir bileşeni iyon haline getirildikten sonra kütle/yük oranına göre ayırımına dayanan sistemde kullanılan MS dedektördür. İyonlaşma işlemi için ESI (Electrospray Ionization) tekniği kullanılmaktadır. Bu dedektör yapı aydınlatması ve miktar tayininde yaygın kullanılmaktadır [57].

Floresans dedektörler ise UV dedektörlere oranla 1000 kat daha yüksek hassasiyete sahip olmakla birlikte floresans özellik gösteren bileşenlerin tayini için kullanılmaktadırlar. Bu dedektör ksenon yüksek basınç lambası veya cıva buhar lambasına sahiptir, uyarma ve emisyon monokromatörü, kare akış hücresi ve fotoçoğaltıcı parçalardan oluşmaktadır[57]. İletkenlik dedektörü daha çok anyon ve katyon analizlerinde kullanılmaktadır. Mobil fazın iletkenliğinin düşük olmasına dikkat edilmektedir [57].

RID (Kırılma İndisi Dedektörleri), diğer dedektörler ile kıyaslandıklarında hassasiyetleri oldukça düşük dedektörler olmakla birlikte sıcaklıktan oldukça fazla etkilenmektedirler. Neredeyse bütün maddelere cevap vermektedirler [57].

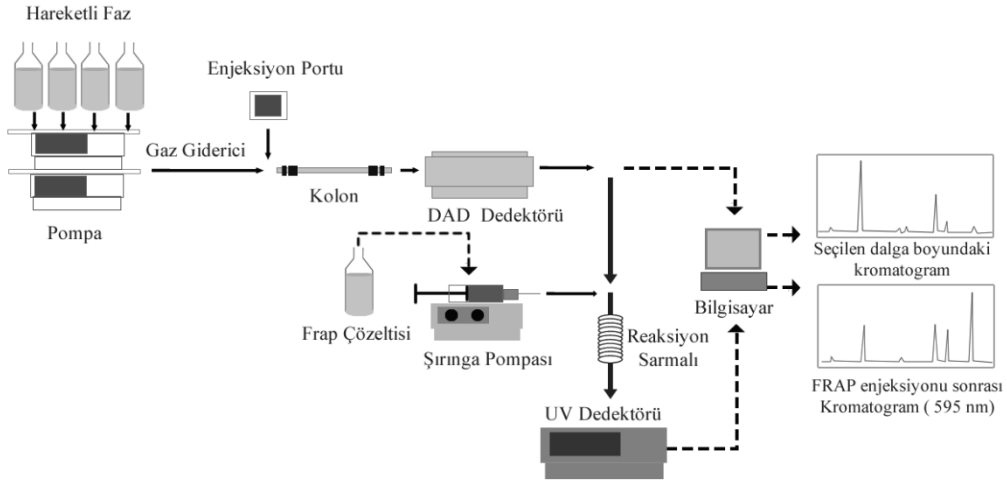
Elektrokimyasal dedektörler, elektroliz sonrası akımın ölçülmesine dayanan en hassas detektörlerden bir tanesidir. Bu dedektörler de dikkat edilmesi gereken nokta kullanılan çözücü elektrik akımını iletmemelidir [57].

### **1.11. On-line HPLC-Biyoaktivite Yöntemleri**

Son yıllarda biyoaktif bileşenleri belirleme yöntemlerine bakıldığında karmaşık bileşenlerin ayırımında kullanılan teknikler ön plana çıkmaya başlamıştır. Kombine teknikler bu karmaşık bileşenleri ayırma işlemlerinde biyoaktif bileşiklerin daha hızlı ve güvenilir bir şekilde analizini sağlamaktadır. Bu yöntemlerde öncelikle HPLC ile bileşenler ayrılırlar ve daha sonra kolon sonrası geliştirilen ek ilaveler ile bu ayrılan bileşenlerin biyoaktivite ölçümleri yapılmaktadır. Başka bir bakış açısı da bu ayrılan bileşenlerin kimliklerinin tespit edilebilmesidir [58].

#### **1.11.1. On-line HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemi**

Laboratuvarımızda geliştirilen on-line biyoaktivite tayin yöntemlerinden biri de on-line HPLC-FRAP yöntemidir (Şekil 16). Numunelerdeki antioksidan bileşenlerin ve 15 tane standart bileşiğin aktivitelerin tek uygulamada belirlenmesi hedeflenmiştir ve bu yöntemin optimizasyonu yapılarak bitki numunelerine uygulanmıştır. İlk defa geliştirilen bu yöntemin gürültü ve antioksidan cevap açısından literatürdeki ABTS ve DPPH• giderim yöntemlerine göre üstünlük sağladığı belirlenmiştir. Bunun sonucunda literatüre yeni bir on-line HPLC yöntemi kazandırılarak bitki ve gıda numunelerinin antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi için uygun görülmüştür. Bu yöntemin şematik gösterimi Şekil 17 de gösterilmiştir [59].



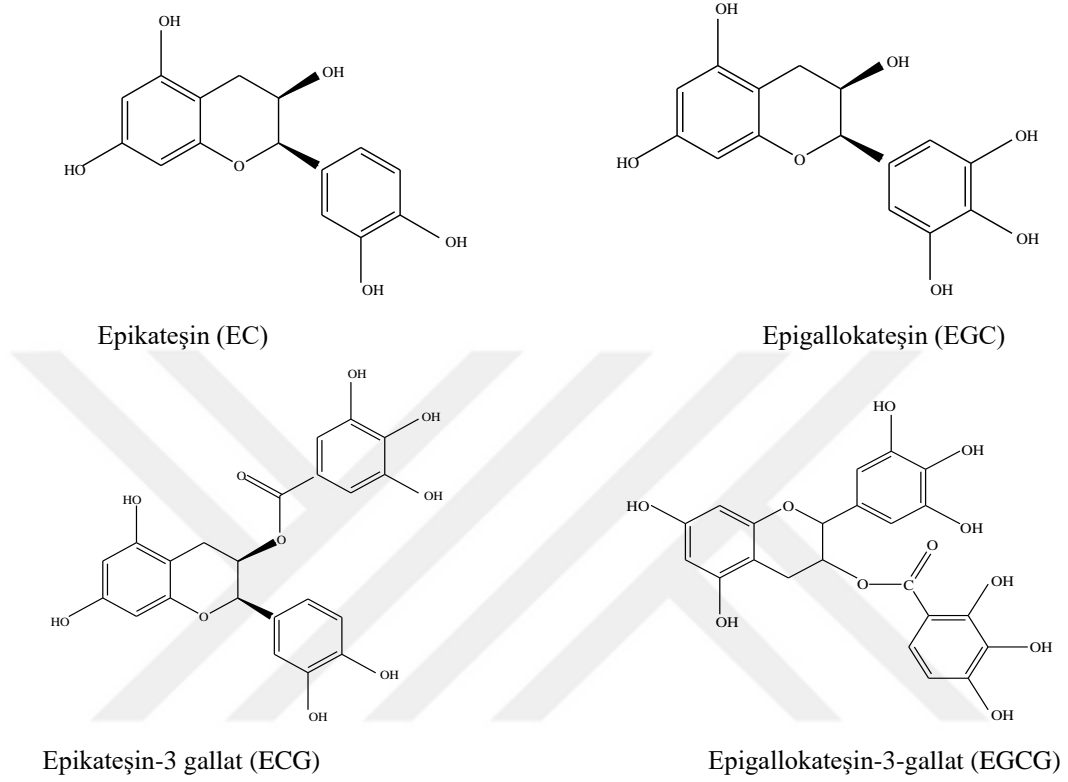
Şekil 16. On-line HPLC-FRAP yönteminin şematik gösterimi [59]

### 1.12. Kullanılan Bitkiler

Yeşil çay (*Camellia sinensis*) yapraklarından elde edilmektedir. Yeşil çayın anavatanı Çin olmak üzere üretimi ve pazarı bütün Asya ülkelerine yayılmıştır. Türkiye çay üretiminde dünyada ön sıralarda gelmektedir: Çay tarım alanlarının genişliği bakımından 8 inci, kuru çay üretimi açısından 6' ncı, çay tüketimi yönünden ise 3. sırada yer almaktadır. Çayın Türkiye'ye ilk gelişi ve geçirdiği süreç Osmanlı İmparatorluğunun yayılış alanı olan Avrupa'ya yayıldığı yıllarla paralellik arz etmektedir [60]. Çoğunlukla *Camellia sinensis* den üretilen yeşil çay üretim zamanına, üretim yerine, yetiştirme koşullarına, bahçecilik yöntemlerine ve hasat zamanına bağlı olarak çeşitlilik göstermektedir. Düzenli olarak yeşil çay tüketmenin sağlığa faydaları üzerine çok fazla çalışma yapılmıştır. Yeşil çay antioksidan, antimikrobiyal, tansiyon dengeleyici, kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu olma özellikleri bilinmektedir. Siyah çay ile yeşil çay aynı bitkiden elde edilmesine rağmen oldukça farklıdır. Bu farklılığın sebebi yeşil çayın işlenmesi sırasında yaş çay yapraklarının yüksek sıcaklık şokuna tutulup polifenol oksidaz enzimi dahil tüm oksidasyon enzimlerinin etkisiz hale getirilmeleri sağlanmaktadır. Yeşil çay kuru ağırlığının yaklaşık % 30' unu oluşturan antioksidanlar tarafından zengin bir polifenol kaynağıdır [61]. Fermantasyon yapılmadığı için çay yeşil olmaktadır. Yeşil çaydaki polifenoller kateşinler adı altında toplanmaktadır. Bunlar ; (-)-epikateşin (EC), (-)-epigallokateşin gallat (EGCG),



(-)-epigallokateşin ( EGC), (-)-epikateşingallat ( ECG), (+)-gallokteşin ve (+)-kateşindir (Şekil 17) [62].



Şekil 17. Çaydaki bazı kateşinler

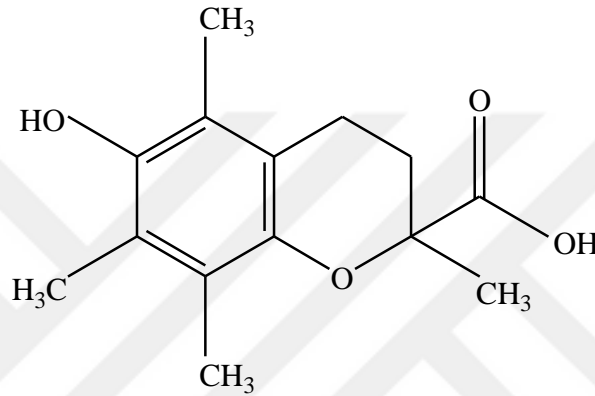


Şekil 18. Yeşil çay

### 1.13. Kullanılan Standartlar

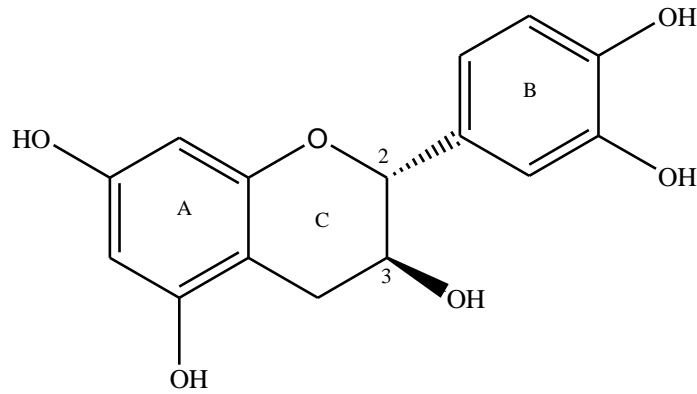
Bu tez çalışmasında bitki numunesi ile birlikte yöntemleri oturtmak için BHT, C vitamini, troloks, kateşin ve gallik asit standart antioksidan bileşikler ile çalışmalar yapıldı.

BHT, yapay ve doğal antioksidanlar başlığında detaylı bir şekilde anlatılmış olan yapay bir antioksidan maddedir. Aynı başlık altında doğal antioksidan maddelerde de C vitamini anlatılmaktadır.



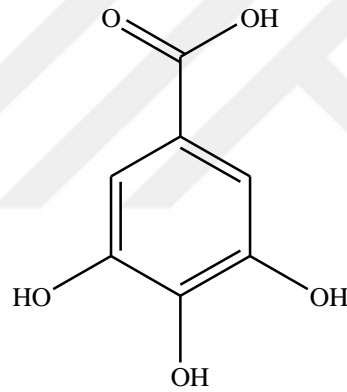
Şekil 19. Troloks

Troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (Şekil 19), oksidatif hasar veya stresi azaltmak için biyokimyasal uygulamalarda kullanılan E vitamini benzeri sentetik bir antioksidan maddedir. Huang et al. Troloks ve alfa tokoferol gibi antioksidanların bağırsak pH koşullarında daha kararlı hale geldiğini dolayısıyla aktivitelerini muhafaza etme yeteneklerini anlatmıştır [24].



Şekil 20. Kateşin

Kateşin (Şekil 20), karbon 3 üzerindeki hidroksil grubu olan iki benzen halkasına (A- ve B-halkaları) ve bir dihidropiran heterosikle (C-halkası) sahiptir. A halkası bir rezorsinol parçasına benzerken B halkası katekol parçasına benzemektedir. 2 ve 3 numaralı karbonlardaki molekül üzerinde iki kiral merkez vardır. Bu nedenle dört diastereoizomeri vardır. İzomerlerin ikisi trans konfigürasyonundadır ve kateşin olarak adlandırılırken diğer ikisi cis konfigürasyonundadır ve epikateşin olarak adlandırılmaktadır. Farklı epimerler kiral kolon kromatografisi kullanılarak elde edilmektedirler [63]. Flavonoid sınıfına ait olan kateşinler, *in vitro* yüksek konsantrasyondaiken antioksidan gibi davranabilmektedirler ancak diğer flavonoidler ile karşılaştırıldıklarında antioksidan kapasiteleri düşüktür [64]. Tekli oksijeni söndürme kabiliyeti kateşinin kimyasal yapısı ile ilgilidir. Şekil 20’ de görüldüğü üzere B halkası üzerindeki katekol parçası ve C halkası üzerinde çift bağı aktive eden bir hidroksil grubunun varlığı ile açıklanmaktadır [65].



Şekil 21. Gallik asit

Gallik asit (3,4,5-trihidroksibenzoik asit) (Şekil 21), serbest ve hidrolize edilebilen tanenlerin bir parçasıdır. Gallik asit, farmasötik endüstrisinde Folin-Ciocalteu reaktifi ile çeşitli analitlerin fenol içeriğini belirlemek için standart olarak kullanılır; sonuçlar gallik asit eşdeğerlerinde rapor edilir [66]. Aynı zamanda zayıf bir karbonik anhidraz inhibitörüdür [67].

## 2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

### 2.1. Kullanılan Cihazlar

Bu tez K.T.Ü Fen Fakültesi Kimya bölümünün Biyoaktivite Araştırma Laboratuvarı'nda (BAL) hazırlanmıştır. Laboratuvarda kullanılan cihazlar ve malzemeler Tablo 2' de verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihazlar ve malzemeler

<b>Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler</b>	<b>Marka</b>
Çeker ocak	TEZ-SAN
Derin dondurucu (-18°C)	Vestel
Etüv	Binder ve Nüve FN 120
Hassas Terazi	Mettler Toledo MS204
HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)	Agilent 1100 Series Degasser (Gaz giderici) Agilent 1100 Series Quad Pump (Dörtlü Pompa) Agilent 1100 Series VWD (Ultra Viyole dedektör) Agilent 1200 Series DAD (Diyot serili dedektör)
Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı	Heidolph/MR 3001 K Hei-standard
Mikro filtre	RC
Kolon	C18, Hichrom (250 mm * 4,6 mm i.d., 5 µm partikül)
Otomatik pipet	Gilson (10-100 µL) & (100-1000 µL) & (1000-5000 µL)
Öğütücü (Blender)	Arzum Clipper Model AR1034 Made in China
Pastör pipet	ISOLAB
Plastik küvet	LP ITALIANA SPA Via C. Reale 15/4 20157 Milano/ ITALIA
pH metre	HANNA Instruments pH 211
PTFE (Poly Tetra Fluoro Ethylene) Tubing	Supelco
Santrifüj	Universal 320 R Hettich/Zentrifugen
Süzgeç kağıdı	Whatman™ Cat No 1093 125
Isı sirkülatörü	WiseCircu WCR P8
Şırınga	Hsw Norm-Ject 2-Part (20 mL) & (50 mL)
Şırınga pompası	Goldman syringe pump

Tablo 2'nin devamı

Termometre	ISOLAB
Ultrasonik banyo	Bandelin
UV-Vis Spektrofotometre	ATI Unicam UV2
Vorteks karıştırıcı	IKA® Vortex Genius 3

## 2.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar, çözücüler ve temin edildikleri firmalar Tablo 3'de listelenmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasallar

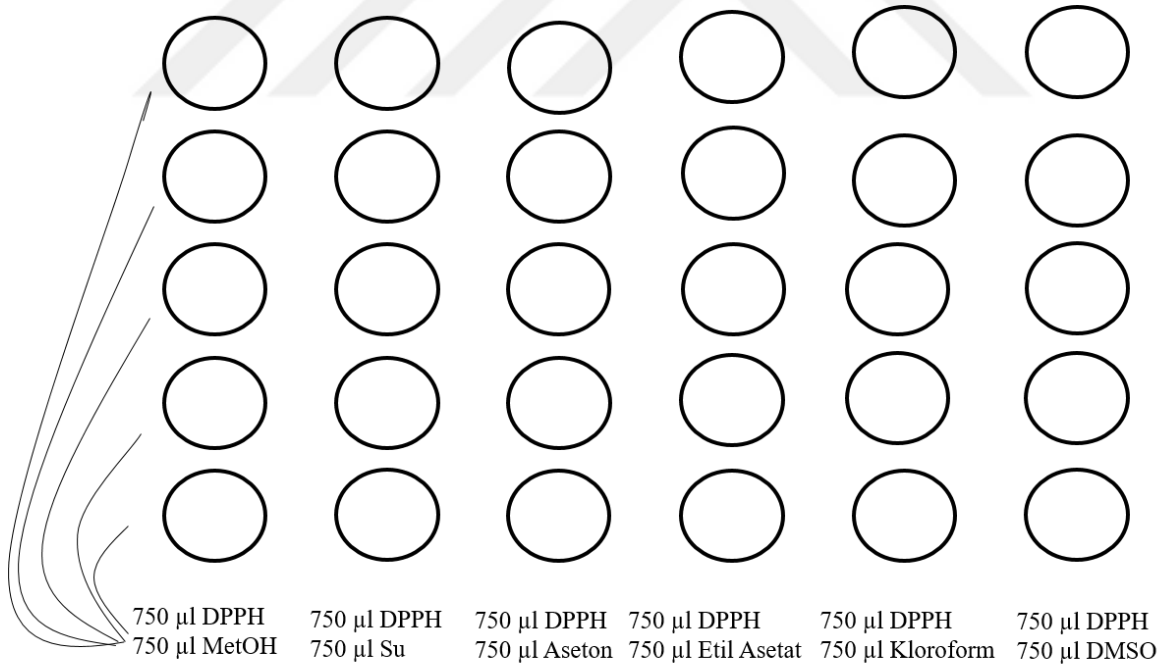
Kimyasal adı	Üretici firma
Asetazolamid	Sigma-Aldrich
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma-Aldrich
Asetik asit (CH <sub>3</sub> COOH)	Carlo Erba
Askorbik asit	Sigma-Aldrich
BHT	Sigma-Aldrich
Disodyum Hidrojen Fosfat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
DPPH•	Sigma-Aldrich
Gallik asit	Sigma- Aldrich
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck
Kateşin	Sigma- Aldrich
Kloroform	Merck
Metanol (HPLC grade)	Merck
Sodyum bikarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Emsure®, Merck
Sodyum hidroksit (NaOH)	Merck
Sodyum karbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Emsure®, Merck
Sülfanilamid	Sigma- Aldrich
Sülfürik asit (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carlo Erba
<i>p</i> -nitrofenil asetat	Sigma-Aldrich
TPTZ(2,4,6-Tris(2-pyridyl)- <i>s</i> -triazine)	Fluka
Troloks	Sigma-Aldrich

### 2.3. DPPH• Kararlılığına Çeşitli Faktörlerin Etkisi

Bu çalışmadaki amaç DPPH• çözeltisi ile yapılan testlerdeki sonuçların değerlendirilmesinde reaksiyon ortamındaki faktörlerin etkisini ortaya koymak ve optimum şartları tespit etmektir.

#### 2.3.1. Işık ve Çözücünün DPPH• Kararlılığına Etkisi

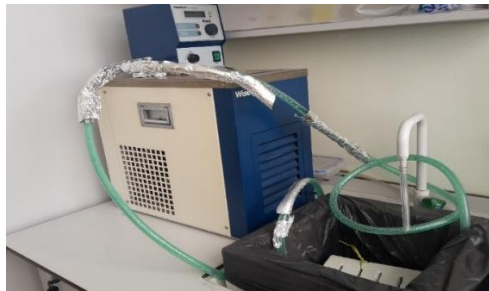
Çalışmada kullanılmak üzere 100  $\mu$ M DPPH• çözeltisi hazırlandı. 6 farklı deney tüpüne 5 paralel çalışma olacak şekilde 750  $\mu$ L hazırlanan DPPH• çözeltisinden ve 750  $\mu$ L metanol, su, aseton, etil asetat, kloroform ve DMSO çözücülerini pipetlendi (Şekil 22 ). Bu pipetlemeler 2 seri halinde yapıldı. 1. Seri oksijene açık ışıklı ortamda, 2. seri oksijene açık karanlık ortamda 60 dakika bekletildi. Bu bekleme boyunca 0, 20, 40 ve 60. dakikada absorban ölçülerek zamana karşı absorban grafikleri çizildi.



Şekil 22. DPPH• kararlılığına çözücünün etkisi çalışmasının pipetleme tablosu

### 2.3.2. Sıcaklık ve pH' nın DPPH• Kararlılığına Etkisi

Bu çalışma için 100  $\mu$ M DPPH• çözeltisi (metanol), 0,125 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ile pH 2, pH 7, pH 10 tampon çözeltileri hazırlandı. Tampon çözeltiler hazırlanırken pH ayarlamaları yapmak için seyreltik HCl çözeltisi ile seyreltik NaOH çözeltisi kullanıldı. Antioksidan numune olmadan DPPH•' nin test şartlarından etkilenmesi takip edildiği için numuneyi temsilen numune çözücüsü olarak metanol kullanıldı. Sıcaklığın etkisini görmek için dört farklı (40 °C, 30 °C, 20 °C, 10 °C) sıcaklıkta çalışma yapıldı. Sıcaklık ayarlamalarını yapmak için su havuzu oluşturuldu. Bu su havuzunun sıcaklığı Wisecircu sirkülötör sistemi ile sağlandı (Şekil 23.). Bu sirkülötör sistemi ile sıcaklık 10 °C'ye ayarlandı. 20 °C'deki çalışma ortamı ise klimalar ile tüm laboratuvar sıcaklığı olarak sağlandı. 40 °C ve 30 °C'deki sıcaklık ortamı ise ısıtıcıli manyetik karıştırıcılar ile ayarlandı. Tüm sıcaklıklar çalışmalar boyunca termometre ile kontrol edildi. Çalışmalar iki paralel şekilde ve direk güneş ışığından korunarak çözeltilerin ağızları parafilm ile kapatılarak yapıldı. 750  $\mu$ L DPPH• çözeltisi, 650  $\mu$ L tampon/su, 100  $\mu$ L metanol olacak şekildeki pipetlemeyi temsilen büyük deney tüplerine 10 mL DPPH• çözeltisi, 8,6 mL tampon/su, 1,4 mL metanol içerecek şekilde reaksiyon karışımı hazırlanıp istenilen sıcaklıkta bekletilmeye başlandı. Bu karışımdan alınıp pipetleme yapılan andan itibaren 8. saate kadar absorbanslar 517 nm' de ölçüldü ve aynı zamanda 200 ile 650 nm arasında spektrumları alındı. Sadece 10 °C' de 22 saat boyunca değişim takip edildi.

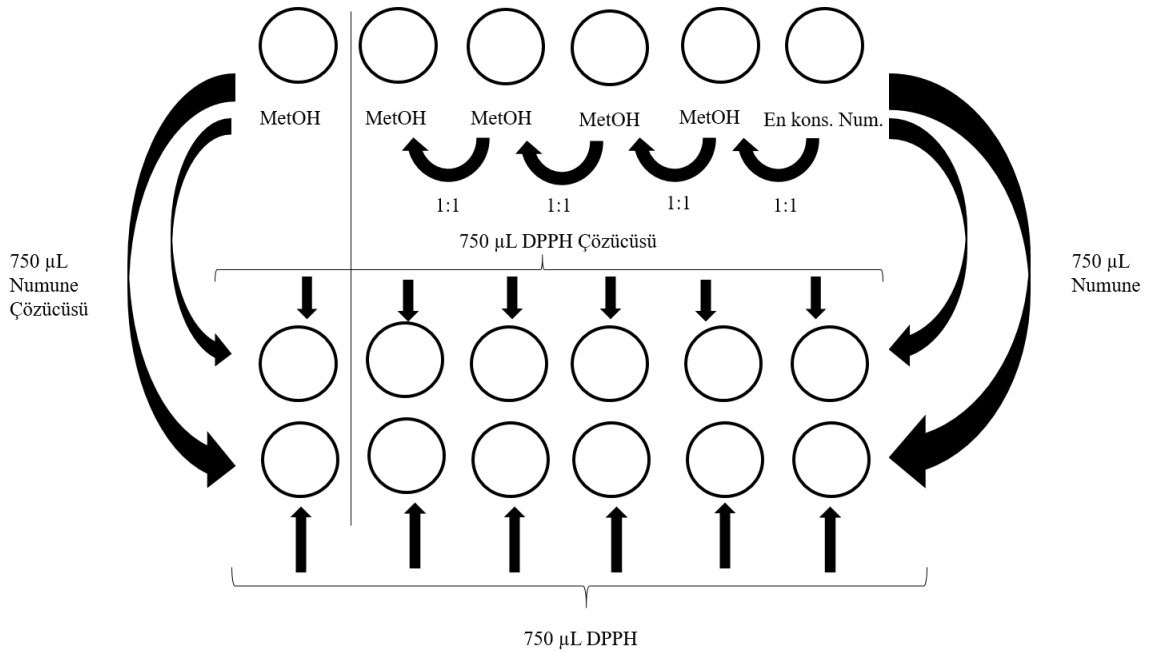


Şekil 23. Wisecircu sirkülötör sistemiyle oluşturulan havuz ve reaksiyon karışımları

## 2.4. Antioksidan - DPPH• Reaksiyonuna Çeşitli Faktörlerin Etkisi

### 2.4.1. Antioksidanların Metanoldeki SC<sub>50</sub> Değerleri

SC<sub>50</sub>, çözeltilde mevcut radikal miktarını yarıya indiren numune konsantrasyonudur. SC<sub>50</sub> değerinin bulunması için antioksidanların farklı konsantrasyonlarında çalışmak gerekir. Her bir standarttan kalibrasyon grafiği elde etmek için, standartların konsantre çözeltileri hazırlandı. En yüksek son konsantrasyonlar BHT için 125 µM, C vitamini için 30 µM, Troloks için 15 µM, gallik asit için 7,8 µM ve kateşin için 15,6 µM olacak şekilde ön denemeler yapılarak belirlendi. Bunlardan 1:1 seyreltmeler yapılarak 5 farklı konsantrasyonda çalışıldı. 750 µL DPPH• çözeltisi ve 750 µL antioksidan çözeltilerinden deney tüplerine pipetleme yapıldı. İki paralel olarak çalışma yapıldı. Kontrol körü [DPPH• çözeltisi + standart çözücüsü (metanol)] ve standart körü [standart çözelti + DPPH• çözücüsü (metanol)] tüplerine de pipetleme yapıldı (Şekil 24). 50 dakika bekledikten sonra 517 nm de absorbanlar ölçüldü. Numune absorbanından numune körünün absorbanının çıkarılmasıyla elde edilen absorbanlar konsantrasyona karşı grafiğe geçirildi.



Şekil 24. DPPH• giderme testinde SC<sub>50</sub> belirlemek için pipetleme şekli



### 2.4.2. DPPH• Çözeltisinin Tazeliğinin SC<sub>50</sub> Değerine Etkisi

2.4.1 deki çalışmadaki yöntem ile yapılan bu çalışmadaki fark ise hazırlanan DPPH• çözeltilerinin bekleme süreleridir. Bir seride taze hazırlanmış DPPH• çözeltisi ile SC<sub>50</sub> değeri belirlenirken diğer seride DPPH• çözeltisi hazırlandıktan sonra oda şartlarında 4 saat bekletildikten sonra SC<sub>50</sub> değerleri belirlendi. Bu deneyde kullanılan standart antioksidanların en yüksek konsantrasyonları Troloks için 3,75 µM ve gallik asit için 7,5 µM'dir.

### 2.4.3. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Çözücülerin Etkisi

DPPH• testinde çözücünün antioksidan aktivite üzerindeki etkisini araştırmak için bu çalışma yapıldı. Çalışmada kullanılmak üzere beş farklı çözücü belirlendi. Çözücüler metanol, su, aseton, etil asetat ve DMSO' dur. Bu çözücülerin ise beş farklı antioksidan üzerindeki etkileri çalışıldı. Çalışılan antioksidanlar ise BHT, Troloks, C vitamini, gallik asit ve kateşindir. Metanolün etkisine bakılırken antioksidanlar ve DPPH• çözeltisi DMSO'da hazırlandı. Bu durumda DMSO' nun ortamı nasıl etkilediğini görmek için gallik asitin son konsantrasyonu 32,85 µM olacak şekilde ve 100 µM DPPH• DMSO da hazırlandı. 750 µL DPPH• çözeltisi, 650 µL DMSO ve 100 µL gallik asit çözeltisi deney tüpüne pipetlendi. Spektrofotometreden küveti çıkarmadan ilk 5 dakika 30 saniyede bir olacak şekilde 18. dakikadan sonra 2 dakikada bir, 40. dakikadan sonra 5 dakikada bir olacak şekilde toplam 120 dakika absorbans ölçüldü. Aynı çalışma gallik asitin son konsantrasyonu 2,2 µM olacak şekilde, DPPH• çözeltisi ve gallik asit çözeltisi metanolde hazırlanarak ortam tamamen metanollü olacak şekilde yapıldı. Metanollü çalışmada 40 dakika boyunca absorbanslar ilk 5 dakika 15 saniyede bir, 5 dakikadan sonra 20. dakikaya kadar dakikada bir ve sonra 40. dakikada absorbans ölçüldü. Zamana karşı absorbans grafikleri çizildi.

Antioksidan DPPH• etkileşimine çözücünün etkisi çalışmasında 100 µM DPPH• çözeltisi, antioksidanların son konsantrasyonları daha önceden belirlenen SC<sub>50</sub> konsantrasyonları olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. Bu reaksiyona çözücünün etkisini görebilmek için çalışılan çözücü konsantrasyonu %43,3, %15, %7, %3 ve %0 olacak şekilde pipetlemeler yapıldı. Her bir numune için üç paralel çalışma yapıldı. Aynı zamanda numune körü ve kontrol körü de çalışıldı. Bu deneyin pipetleme prosedürü aşağıdaki Tablo 4'deki gibidir.

Tablo 4. Antioksidan-DPPH• etkileşimi deneyi için pipetleme prosedürü  
%43,33 Test çözücüsü konsantrasyonu

	Numune	Numune Körü	Kontrol Körü
Standart AO çözeltisi	100 µL	100 µL	
AO Çözücüsü			100 µL
Test çözücüsü	650 µL	650 µL	650 µL
MetOH			
DPPH• çözeltisi	750 µL		750 µL
DPPH• Çözücüsü		750 µL	
Toplam Hacim	1500 µL	1500 µL	1500 µL

%15 Test çözücüsü konsantrasyonu

	Numune	Numune Körü	Kontrol Körü
Standart AO çözeltisi	100 µL	100 µL	
AO Çözücüsü			100 µL
Test çözücüsü	225 µL	225 µL	225 µL
MetOH	425 µL	425 µL	425 µL
DPPH• çözeltisi	750 µL		750 µL
DPPH• Çözücüsü		750 µL	
Toplam Hacim	1500 µL	1500 µL	1500 µL

%7 Test çözücüsü konsantrasyonu

	Numune	Numune Körü	Kontrol Körü
Standart AO çözeltisi	100 µL	100 µL	
AO Çözücüsü			100 µL
Test çözücüsü	105 µL	105 µL	105 µL
MetOH	545 µL	545 µL	545 µL
DPPH• çözeltisi	750 µL		750 µL
DPPH• Çözücüsü		750 µL	
Toplam Hacim	1500 µL	1500 µL	1500 µL

%3 Test çözücüsü konsantrasyonu

	Numune	Numune Körü	Kontrol Körü
Standart AO çözeltisi	100 µL	100 µL	
AO Çözücüsü			100 µL
Test çözücüsü	45 µL	45 µL	45 µL
MetOH	605 µL	605 µL	605 µL
DPPH• çözeltisi	750 µL		750 µL
DPPH• Çözücüsü		750 µL	
Toplam Hacim	1500 µL	1500 µL	1500 µL

Tablo 4'ün devamı

%0 Test çözücüsü konsantrasyonu

	Numune	Numune Körü	Kontrol Körü
Standart AO çözücüsü	100 µL	100 µL	
AO Çözücüsü			100 µL
Test çözücüsü	0	0	0
MetOH	650 µL	650 µL	650 µL
DPPH• çözücüsü	750 µL		750 µL
DPPH• çözücüsü		750 µL	
Toplam Hacim	1500 µL	1500 µL	1500 µL

Pipetlemeler yapıldıktan sonra başlangıçta ve 60. dakikada 517 nm' de absorbanları ölçüldü ve 200 ile 650 nm arasında spektrum alındı.

#### 2.4.4. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon ve pH' nın Etkisi

##### 2.4.4.1. Antioksidanların Su Varlığındaki SC<sub>50</sub> Değerleri

Çalışmada tampon pH' sı ve konsantrasyonunun aktiviteye etkisi incelendiğinden önce SC<sub>50</sub> belirleme işlemi ortama su eklenerek gerçekleştirildi. 100 µM DPPH• çözücüsü metanolde hazırlandı. 750 µL DPPH• çözücüsü, 650 µL saf su ve 100 µL antioksidan çözücüsünün 1:1 oranında seyrelmiş 5 farklı konsantrasyonu pipetlendi. BHT ve Trolox 15 µM, gallik asit 5 µM, kateşin 12,5 µM ve C vitamini 8,33 µM son konsantrasyonu en yüksek konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı. İki paralel olarak çalışma yapıldı. Kontrol körü [DPPH• çözücüsü + standart çözücüsü (metanol)] ve standart körü [standart çözücüsü + DPPH• çözücüsü (metanol)] tüplerine de pipetleme yapıldı. 50 dakika bekledikten sonra 517 nm' de absorban ölçüldü.

##### 2.4.4.2. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon pH' sının Etkisi

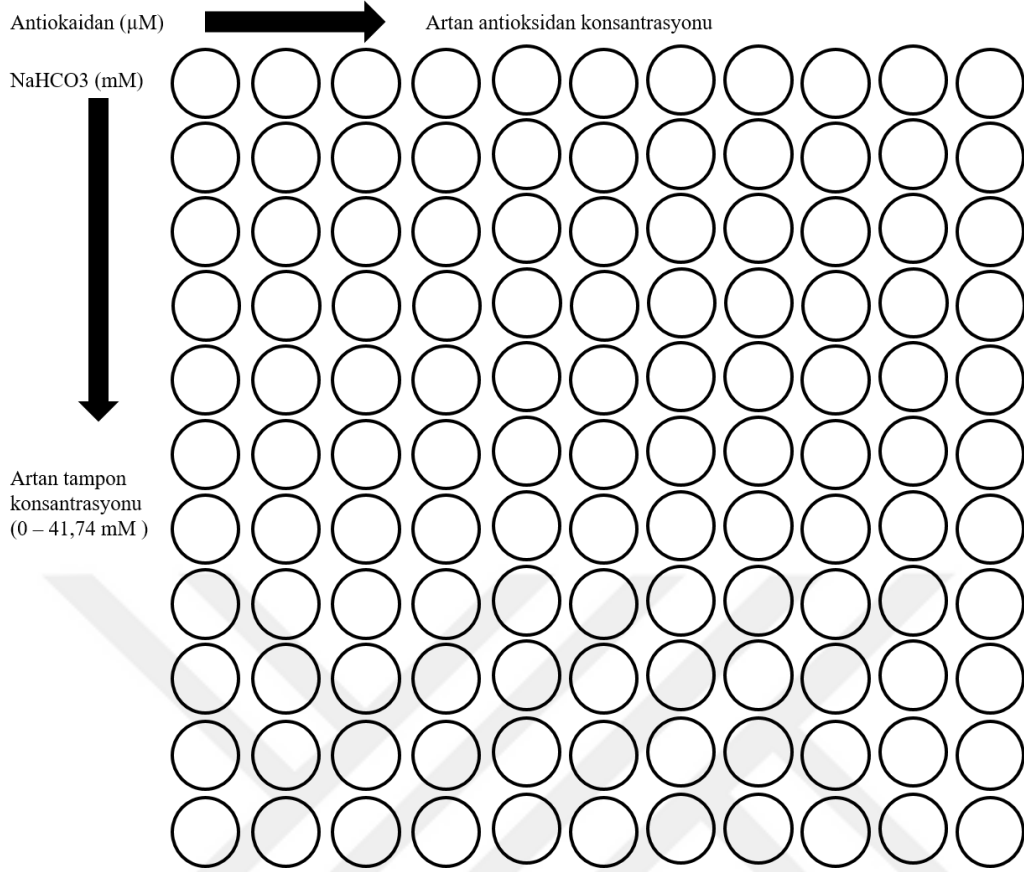
Bu çalışma için öncelikle hangi konsantrasyonda tampon ile çalışacağımız belirlendi. Bu belirlemeyi yapmak için spektrofotometre kullanılmadan görsel olarak deney yapıldı. 100 µM DPPH• çözücüsü hazırlandı. 0,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tampon çözücüsü hazırlandı ve bu

çözelti seyreltik HCl ve seyreltik NaOH ile pH 2, pH 7 ve pH 10'a ayarlandı. Daha sonra seri dilüsyon ile 1:1 oranında seyreltme yapıldı ve her seyreltmede pH metre ile pH kontrolü yapıldı. Seyrelen konsantrasyondaki tamponlar ile pipetleme 750 µL DPPH• çözeltisi, 650 µL tampon ve 100 µL numune çözücüsü (MeOH) olacak şekilde pipetleme yapıldı. Bu işleme bulanıklığın ve renk değişiminin olmadığı konsantrasyon teyit edilene kadar devam edildi.

Tampon konsantrasyonu belirlendikten sonra antioksidan DPPH• etkileşimini pH' nın ve suyun nasıl etkilediği çalışması yapıldı. Bunun için pipetleme yapıldıktan sonra son konsantrasyonu 54,34 µM olacak şekilde Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tampon çözeltisi, son konsantrasyonu 50 µM olacak şekilde DPPH• çözeltisi ve son konsantrasyonları sulu ortamdaki SC<sub>50</sub> değerleri olacak şekilde BHT, Troloks, C vitamini, gallik asit ve kateşin hazırlandı. 750 µL DPPH• çözeltisi, 650 µL farklı pH' daki tampon çözelti ve 100 µL antioksidan çözeltisinden pipetlendi. Numuneler üç paralel olarak çalışıldı. Bu pipetlemelerin kontrol tüpleri de hazırlandı. Kontrol tüplerinde numune yerine numune çözücüsü olan metanol kullanıldı. Deney başladığı dakikadan itibaren BHT için 60 dakika, Troloks ve C vitamini için 20 dakika, gallik asit ve kateşin için 30 dakika boyunca zamana karşı absorbans ölçümleri yapıldı ve bu ölçümler grafiğe geçirildi.

#### **2.4.4.3. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi**

Bu çalışmada değişen antioksidan konsantrasyonunun değişen tampon konsantrasyonu varlığında nasıl aktivite gösterdiği incelendi. 100 µM DPPH• çözeltisi hazırlandı. Son konsantrasyonu en yüksek 41,74 mM olacak şekilde NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlandı ve bu çözültiden 1:1 oranında seyreltilerek 11 farklı konsantrasyon hazırlandı. Antioksidan olarak BHT ve Troloks kullanıldı. Bu antioksidanların SC<sub>50</sub> değerleri ortaya gelecek şekilde seri seyreltme ile 11 farklı konsantrasyon hazırlanarak çalışıldı. Bu oluşturulan metot pH 2, pH 7 ve pH 10 için ayrı ayrı çalışıldı. BHT için pH 10 çalışılırken son konsantrasyon 26,7 µM olacak şekilde seyreltme yapıldı. Diğer durumlarda antioksidanların son konsantrasyonu 66,66 µM olacak şekilde seyreltme yapılarak çalışıldı. 750 µL DPPH• çözeltisi, 650 µL tampon ve 100 µL antioksidan çözeltisi olacak şekilde pipetlemeler yapıldı. 50 dakika sonra 517 nm de absorbansları ölçüldü (Şekil 25).



Şekil 25. Artan antioksidan konsantrasyonuna karşı artan tampon konsantrasyonunun pipetleme prosedürü

#### 2.4.4.4. Antioksidan-DPPH•-Tampon Karışımlarında pH' nın Takibi

Antioksidan, DPPH• ile farklı tampon konsantrasyonlarında etkileşime girince pH' daki değişikliğin takibi yapıldı. Bu deneydeki amaç ayarladığımız pH ile deney şartlarında ki pH' da değişiklik meydana gelip gelmediğini incelemektir. 1,5 mM NaHCO<sub>3</sub> tampon çözeltisi hazırlandı ve seyreltik HCl ve seyreltik NaOH ile pH 2, pH 7 ve pH 10 ayarlandı. BHT, Troloks, C vitamini, gallik asit ve kateşin son konsantrasyonları SC<sub>50</sub> değeri olacak şekilde hazırlandı. 750 µL DPPH• çözeltisi, 650 µL tampon çözelti ve 100 µL antioksidan çözeltisinden pipetlendi ve pipetlemelerden sonra pH metre ile ölçüm yapıldı.

## 2.5. Antioksidanların Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi

### 2.5.1. Beş Antioksidan Standardın HPLC Analizi

BHT, Troloks, C vitamini, gallik asit ve kateşinin her birinin 10 mM çözeltisi hazırlandı. Hazırlanan standartların son konsantrasyonu 2 mM olacak şekilde 5'li karışım hazırlandı. Bu karışımın HPLC ile ayrılması için metot yazıldı. Karışım ultra saf su ile 1:1 oranında seyreltikten sonra HPLC de yürütüldü. Yürütme yapılan HPLC şartları ise çözücü sisteminde A şişesinde ultra saf su içinde %2 asetik asit, B şişesinde %50 asetonitril- %50 ultra saf su karışımını asitlendirmek için % 0,5 asetik asit, C şişesinde %100 metanol ve D şişesinde %100 asetonitril olacak şekilde hareketli faz çözücülerini hazırlandı. Bu çözeltiler ile hareketli faz gradienti içeren bir metod oluşturuldu (Tablo 5). 20 µL enjekte edilen numune 0,7 mL/dk akış hızında C18 kolondan (Ace 5 250 mm × 4,6 mm i.d., 5 µm partikül; UK) geçirildi.

Tablo 5. HPLC için mobil faz ve gradient şartları

Çözücü Şişesi	Kimyasal Karışım
A	%2 CH <sub>3</sub> COOH – H <sub>2</sub> O
B	%50 ACN- %50 H <sub>2</sub> O - %0,5 CH <sub>3</sub> COOH
C	%100 MetOH
D	%100 ACN

Zaman (dk)	% A	% B	% C	% D	Akış Hızı (mL/dk)	Maks. Basınç (bar)
0	90	10	0	0	0,700	275
6	80	20	0	0	0,700	275
8	50	50	0	0	0,700	275
11	0	20	0	80	0,700	275
20	0	20	0	80	0,700	275
23	90	10	0	0	0,700	275
25	90	10	0	0	0,700	275

### 2.5.2. Antioksidanların Farklı pH' larda Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi

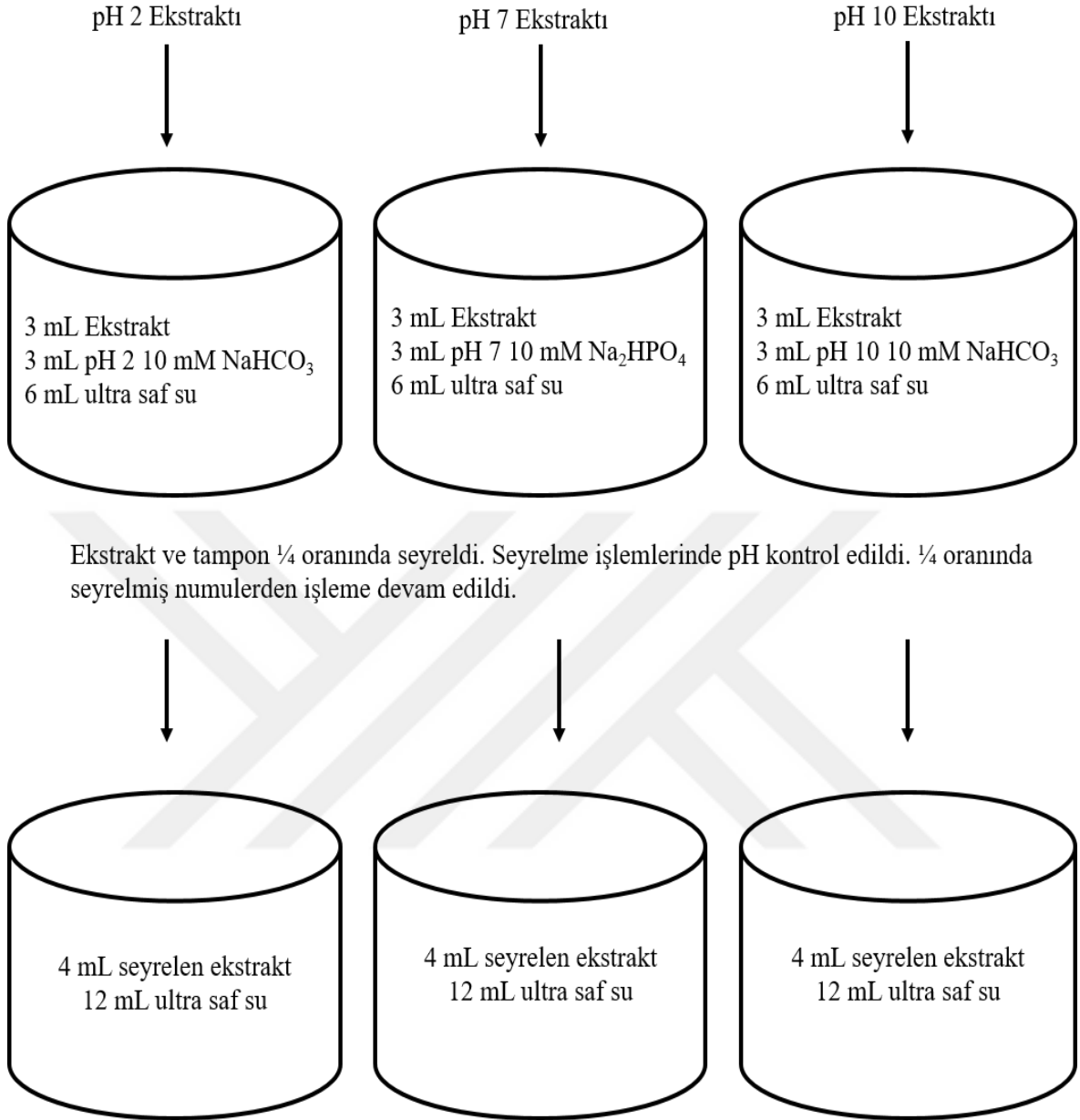
HPLC ile analizini yaptığımız antioksidanların tezin odak noktası olan pH' dan nasıl etkilendiğini belirlemek için bu çalışma yapıldı. 2 mM NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlanarak pH 2,

pH 7 ve pH 10' a seyreltik HCl ve seyreltik NaOH çözeltisi ile ayarlandı. Son konsantrasyonu 2 mM olan karışım 1:1 oranında metanol ile seyreltilerek 1 mM çözelti hazırlandı. Hazırlanan 1 mM çözelti 1:1 oranında farklı pH' lara ayarlanan tampon çözelti ile son konsantrasyonu 500 µM olacak şekilde seyreltildi. Hemen sonra HPLC sistemine enjekte edildi. Her bir yürütmeden önce 10 dakikalık yıkama programı ile enjeksiyon portuna metanol-su karışımı verilerek yıkama yapıldı. Farklı pH' lardaki numuneler ile 24 saat bekletildikten sonra tekrar yürütme yapıldı. HPLC analizinde pH' nın antioksidanların bozunma sürecini nasıl etkilediği incelendi.

## **2.6. Yeşil Çay ile Farklı pH' larda Çalışmalar**

### **2.6.1. Yeşil Çaydan Ekstraktların Hazırlanması**

Ekstraksiyon işlemleri tampon çözeltiler ile yapılacağı için öncelikle 10 mM NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlandı ve pH 2 ve pH 10'a seyreltik HCl ve seyreltik NaOH çözeltileri ile ayarlandı. pH 7 için ise 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tampon çözeltisi hazırlandı. 10 g yeşil çay 100 mL tampon çözeltisi ile 400 rpm'de karıştırıldı. Ekstraksiyon başladıktan sonra 15 dakikada bir pH metre ile sürekli pH kontrolü yapıldı. 2 saat sonra ekstraksiyon tamamlandı. Ekstrakt 15 dakika 6800 rpm' de santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra süzgeç kağıdından süzülüp 2 kez 0,45 µm filtreden geçirildi. Bu işlemlerden sonra ekstraktlar depolama ve test pH' larına aşağıdaki şekildeki gibi ayarlandılar. Ayrıca tampon yerine su kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapılarak ekstraktlar pH 2, pH 7 ve pH 10' a ayarlandı (Şekil 26).



Ekstrakt ve tampon 1/16 oranında seyrelti. Seyrelme işlemlerinde pH kontrol edildi.  
Tamponun son konsantrasyonu 1,25 mM,

Şekil 26. Ekstraktların seyrelme işlemleri



## 2.6.2. Yeşil Çay Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri

### 2.6.2.1. DPPH• Giderim Testi

Deney için öncelikle 100 µM DPPH• çözeltisi hazırlandı. Bu deney çalışmasında ekstraktlar hazırlanınca hemen DPPH radikal giderim testi çalışıldı, daha sonra aynı numuneler +4 °C de buzdolabında 10 gün bekletildikten sonra DPPH radikal giderim testleri tekrar yapıldı. Bekleme süresinin aktiviteyi nasıl etkilediği incelendi.

Standartlardan BHT' nin en konsantre hali 500 µM, gallik asitin 10 µM ve Troloksun en konsantre hali 5 µM olacak şekilde her bir standarttan kalibrasyon grafiği elde etmek üzere seyreltmeler yapılarak 5 farklı konsantrasyonda çalışıldı. Ekstraktlarda ise en konsantre hali pH 2' den ekstrakte edilip tekrar pH' ları ayarlanan numuneler için 1/800, pH 7'den ekstrakte edilip tekrar pH' ları ayarlanan numuneler için 1/800, pH 10' dan ekstrakte edilip tekrar pH' ları ayarlanan numuneler için 1/480, su ile ekstrakte edilip tekrar pH' ları ayarlanan numuneler için 1/576 oranında seyreltilmiş olacak şekilde her bir numune 5 farklı konsantrasyonda çalışıldı. Eşit hacimde (750 µL) DPPH• çözeltisi, standart/numune çözeltileri üzerine eklenerek vortekslendi ve oda sıcaklığında 50 dakika inkübasyona bırakıldı. Her bir numune ve standart konsantrasyonu için üç paralel çalışıldı. Ayrıca numune/standartın her bir konsantrasyonu için birer numune/standart körü [numune/standart+DPPH• çözücüsü (metanol)] ve her bir numune/standart çözücüsü (metanol) için de reaktif körü (DPPH çözeltisi+numune/standart çözücüsü) paralel çalışıldı. İnkübasyon süresi sonunda DPPH• radikalinin maksimum absorbans verdiği 517 nm'de absorbanslar okundu. Hesaplamalarda üç paralelin ortalaması alınarak kör değerleri toplamı bu ortalamadan çıkarıldı. Bulunan absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar grafiğe geçirilerek SC<sub>50</sub> değerleri belirlendi.

### 2.6.2.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Bu deneyde öncelikle iki standarttan (gallik asit ve kateşin) 500 µM konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı, bu çözeltilerden kalibrasyon grafiklerini elde etmek üzere 1:1 oranında seyreltilerek 5 farklı konsantrasyon (1000 – 500 – 250 – 125 – 62,5 µM) kullanıldı. Analiz için, 50 µL' lik her bir numune/standart çözeltilisine sırasıyla; 2,5 mL saf su ve 250 µL 0,2 N Folin-Ciocalteu reaktifi eklendi, vortekslendi, oda sıcaklığında 3 dakika inkübasyona

bırakıldı. Daha sonra, 750 µL %7,5'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> eklenerek tekrar vortekslendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. Her bir numune ve standart konsantrasyonu için üç paralel çalışıldı. Tüm numuneler ¼ oranında seyreltilerek çalışıldı. Ayrıca numune ve standartın her bir konsantrasyonu için birer numune/standart körü [numune/standart + Folin-Ciocaltaeu reaktifi çözücüsü (saf su)] ve reaktif körü [numune/standart çözücüsü (saf su/metanol) + Folin-Ciocaltaeu reaktifi] çalışıldı. İnkübasyon süresi sonunda spektrofotometrede 765 nm'de absorbanslar okundu. Hesaplamalarda üç paralelin ortalaması alınarak kör değerleri toplamı bu ortalamaдан çıkarılıp, elde edilen verilerle grafik çizildi. Numunelere ait toplam fenolik madde miktarları bu grafikler kullanılarak gallik asit eşdeğeri (GAE) ve kateşin eşdeğeri (KE) olarak hesaplandı.

### 2.6.2.3. Demir İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP)

Deney için öncelikle FRAP reaktifi hazırlandı. Bu reaktifin hazırlanmasında A, B ve C çözeltileri kullanıldı. A çözeltisi (pH 3,6 300 mM asetat tamponu): 2,586 mL der. (%99,5) asetik asit alınıp hacim suyla 40 mL'ye tamamlanıp üzerine 90 mL metanol ilave edilmiştir. Sonra 0,5 M NaOH (0,100 g/25 mL) ile pH=3,6'ya ayarlanıp son olarak hacim 150 mL'ye su ile tamamlanmıştır. B çözeltisi (10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ)' nin 40 mM HCl'deki çözeltisi): 0,0468 g TPTZ, 6 mL 100 mM HCl ile çözülüp üzerine 9 mL metanol ilave edilerek hazırlanmıştır. C çözeltisi (20 mM FeCl<sub>3</sub> çözeltisi): 0,0486 g FeCl<sub>3</sub>, 6 mL saf suda çözülüp üzerine 9 mL metanol ilave edilerek hazırlanmıştır. FRAP reaktifi A çözeltisi manyetik karıştırıcıda karıştırırken üzerine B ve C çözeltileri eklenerek hazırlanmıştır (sırasıyla 10:1:1 oranında). FRAP çözeltisi taze hazırlanmalı ve kullanılmaya başlanana kadar düşük hızda karıştırılmaya devam edilmelidir.

Kalibrasyon grafiğini elde etmek için, Troloks ve C vitaminin standartlarından 3 mg/mL konsantrasyonda çözelti hazırlanıp bu çözeltilerden seyreltilerek 5 farklı konsantrasyon (500– 250 – 125 – 62,5 – 31,25 µg/mL) hazırlanmış ve kullanılmıştır. Bitki numuneleri ise ekstraktlar 1/32 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Her bir numune ve standart konsantrasyonu için üç paralel çalışılmıştır. Ayrıca numuneler ve standartların farklı konsantrasyonları için birer numune/standart körü ve reaktif körü çalışılmıştır. Numuneler ve farklı konsantrasyonlardaki standart ve numune/standart körü tüplerine 50 µL numune/standart çözeltileri pipetlenmiştir. Reaktif köre de numune/standartların çözücüleri pipetlenmiştir. Ardından numune/standart ve reaktif körelerine tek tek ve 20 saniye

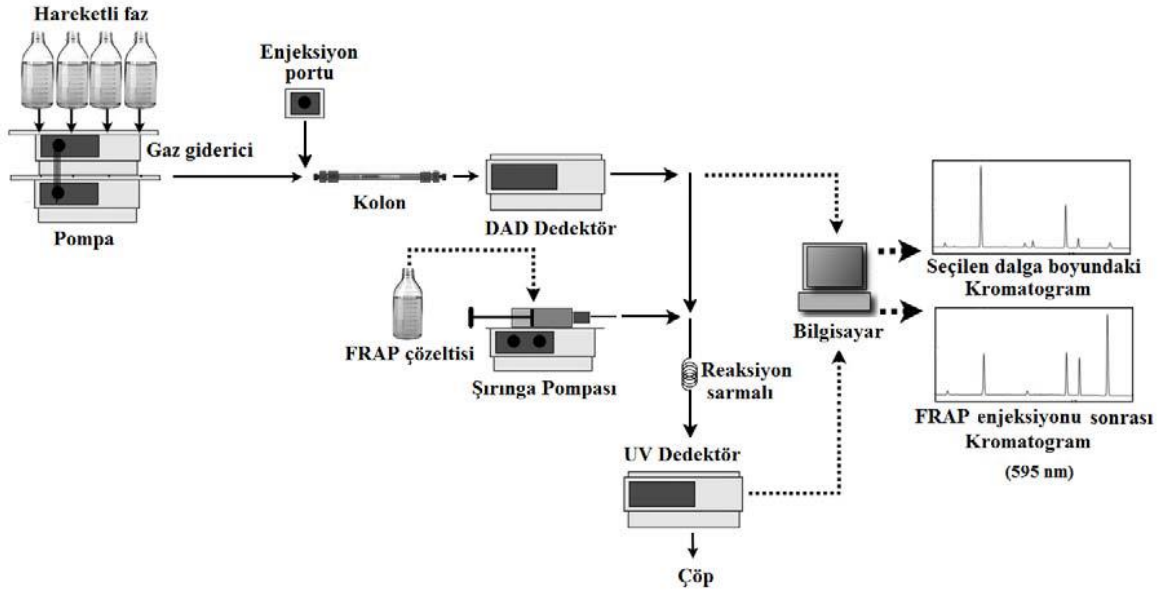
arayla 1,5 mL FRAP reaktifi pipetlenip vortekslenmiştir. Numune/standart körlerine ise 20 saniye arayla 1,5 mL su-metanol (2:3) karışımı pipetlenip vortekslenmiştir. Oda sıcaklığında 20 dakika bekletilmiştir. Sonra ilk pipetlenen tüpten başlayarak 20. dakikası dolan tüp alınıp absorbands 595 nm' de spektrofotometrede okunmuştur. Absorbans okumak için tüpler arası süre 20 saniyeye ayarlanmıştır. Hesaplamalarda Troloks'un üç paralelinin ortalaması alınarak kör değerleri toplamı bu ortalamadan çıkarılmış, elde edilen verilerle Microsoft Excel programında grafik çizilmiştir. Bu yöntemde, artan absorbands değeri artan antioksidan gücünü göstermektedir. FRAP değerleri, numune absorbandsının karşılık geldiği Troloks konsantrasyonu ( $\mu\text{M}$  TEAC, Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) olarak gösterilmiştir.

#### 2.6.2.4. On-line HPLC-FRAP Analizi

Bu çalışmada Arslan Burnaz ve diğ. (2013) tarafından geliştirilen On-line HPLC-DAD-UV-FRAP antioksidan aktivite tayin yöntemi uygulanmıştır [59]. Ekstraktların direkt ve her bir pH' ya ayarlanmış hali ile ilk gün, 2. gün ve 10. günde analizleri 280'de ve hareketli fazın 0,7 mL/dk akış hızında ortama eklenen FRAP çözeltisiyle (akış hızı 0,3 mL/dk) reaksiyonu sonrası 595 nm'de kromatogramları elde edilerek bileşen bakımından ve bu bileşenlerin FRAP aktiviteleri açısından değerlendirmeleri yapıldı. Yürütme yapılan HPLC şartları ise çözücü sisteminde A şişesinde ultra saf su içinde %2 asetik asit, B şişesinde %50 asetonitril-%50 ultra saf su karışımını asitlendirmek için % 0,5 asetik asit, C şişesinde %100 metanol ve D şişesinde %100 asetonitril olacak şekilde hazırlandı (Tablo 6). On-line HPLC-FRAP analiz şeması Şekil 27'de verilmiştir.

Tablo 6. On-line HPLC-DAD-FRAP gradient uygulama şartları

Zaman (dk)	% A	% B	% C	% D	Akış Hızı (mL/dk)	Maks. Basınç (bar)
0	90	10	0	0	0,700	275
28	50	50	0	0	0,700	275
32	10	90	0	0	0,700	275
35	0	20	0	80	0,700	275
42	0	20	0	80	0,700	275
44	90	10	0	0	0,700	275
45	90	10	0	0	0,700	275



Şekil 27. On-line HPLC-FRAP sistemi (RP-HPLC-DAD-UV) [59]

### 2.6.3. Yeşil Çay Ekstraktlarının bCA Enzim İnhibisyonu

Çalışmada kullanılan reaktiflerin/çözeltilerin hazırlanması aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

3 mM *p*-nitrofenil asetat (substrat): 5 mL aseton içinde 135 mg *p*-nitrofenil asetat çözülüp, 245 mL saf suya manyetik karıştırıcıda hızlıca karıştırılırken yavaşça damla damla ilave edilerek hazırlanmıştır.

0.05 M Tris-SO<sub>4</sub> Tamponu (pH:7,4): 900 mL saf suda 6,05 g tris(hidroksimetil)-aminometan çözülüp, çözeltinin pH'sı 7,4'e 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> kullanılarak ayarlandıktan sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanmıştır.

bCA enzim çözeltisi (0,1 mg/mL): 10 mL saf suda 1 mg bCA çözülerek hazırlanmıştır.

Stok sülfanilamid (0.025 M) çözeltisi: 50 mL asetonitrilde 215 mg sülfanilamid çözülerek hazırlanmıştır.

1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>: 40 mL saf suda 2,72 mL %98'lik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (d:1,84g/mL) çözülüp toplam hacim 50 mL'ye tamamlanmıştır.

Çözeltiler hazırlandıktan sonra ayarlanan ekstraktların ¼ oranında seyrelmiş halleri ile esteraz aktivitesi tayini yapıldı ve % inhibisyon değerleri hesaplandı. Her bir numune ve

standart için iki paralel şekilde; numune/standart + numune/standart körü + kontrol + kontrol körü çalışılmıştır. Numune/standart ve numune/standart körü tüplerine 50 µL numune/standart; kontrol ve kontrol körü tüplerine 50 µL numune/standart çözücüsü pipetlenmiştir. Sonra bütün tüplere 750 µL substrat pipetlenip vortekslenmiştir. Daha sonra bütün tüplere 550 µL tampon 15 saniye arayla pipetlenip vortekslenmiştir. Ardından numune/standart ve kontrol tüplerine 15 saniye arayla 150 µL enzim çözeltisi, numune/standart körü ve kontrol körü tüplerine 15 saniye arayla 150 µL saf su pipetlenip vortekslenmiştir (Tablo 7) ve 15. saniyede absorbans 348 nm’de spektrofotometrede okunmuştur. Aynı karışımların absorbansları 20. dakikada tekrar okunmuştur.

Hesaplamalarda iki paralelin ortalaması alınıp zamana bağlı absorbans farklarından faydalanılarak % inhibisyon değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 7. bCA İnhibisyonu çalışmasında kullanılan pipetlemeler

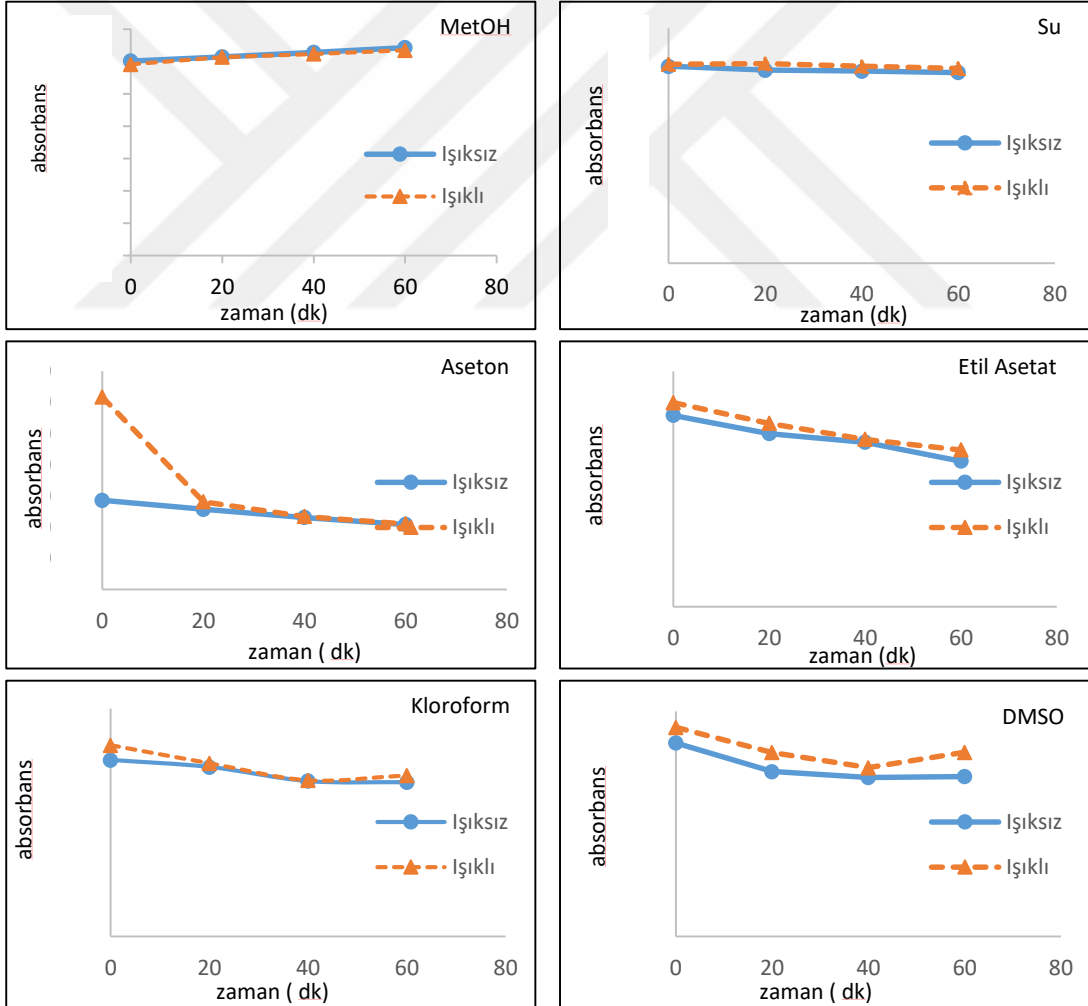
<b>Numune</b>	<b>Numune Körü</b>	<b>Kontrol</b>	<b>Kontrol Körü</b>
550 µL tampon	550 µL tampon	550 µL tampon	550 µL tampon
50 µL inhibitör	50 µL inhibitör	50 µL inhibitör çözücüsü	50 µL inhibitör çözücüsü
150 µL enzim	150 µL saf su	150 µL enzim	150 µL saf su
750 µL substrat	750 µL substrat	750 µL substrat	750 µL substrat

### 3. BULGULAR

#### 3.1. DPPH• Kararlılığına Çeşitli Faktörlerin Etkisi

##### 3.1.1. Işık ve Çözücünün DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi

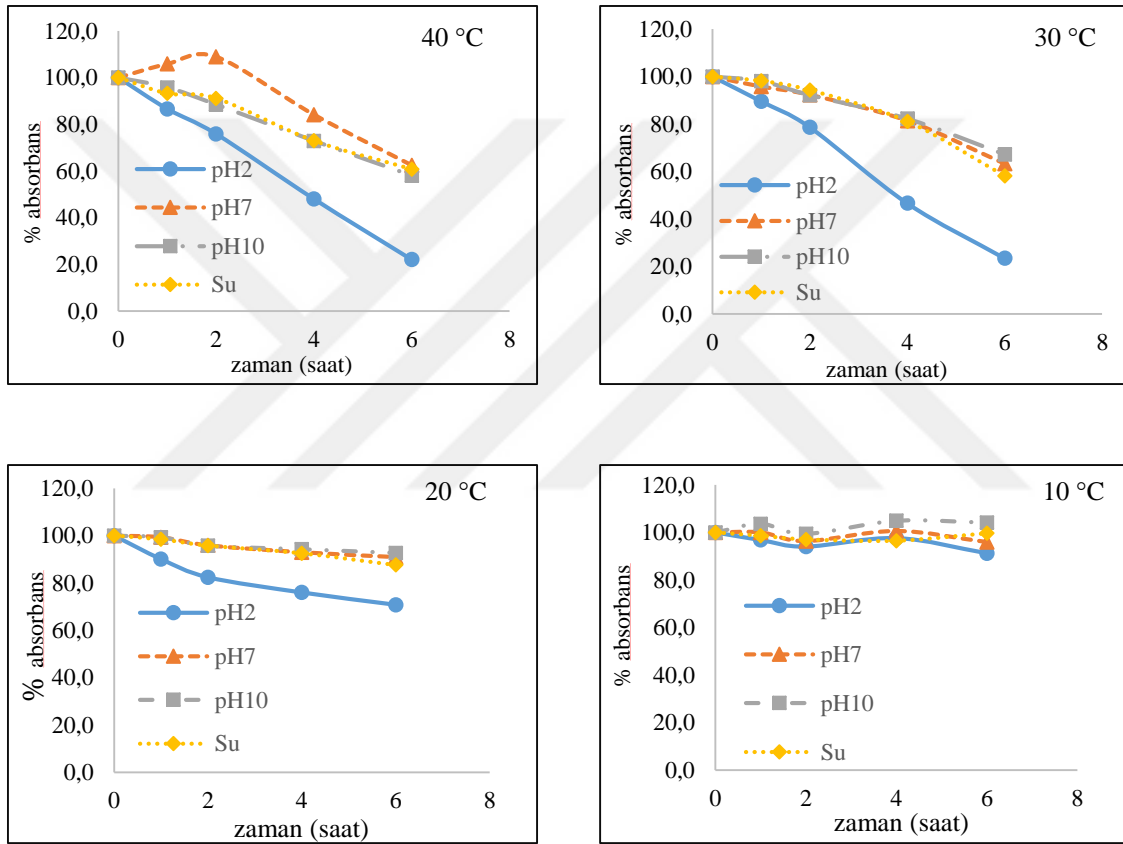
Işık ve çözücünün DPPH• radikalinin çözeltideki kararlılığına etkisinin belirlenmesi için çözeltiler 60 dakika boyunca 517 nm' de absorbans ölçülerek takip edildi. 5 paralel şeklinde yapılan çalışmanın absorbans değerlerinin ortalaması alınarak zamana karşı absorbans grafikleri çizildi (Şekil 28).



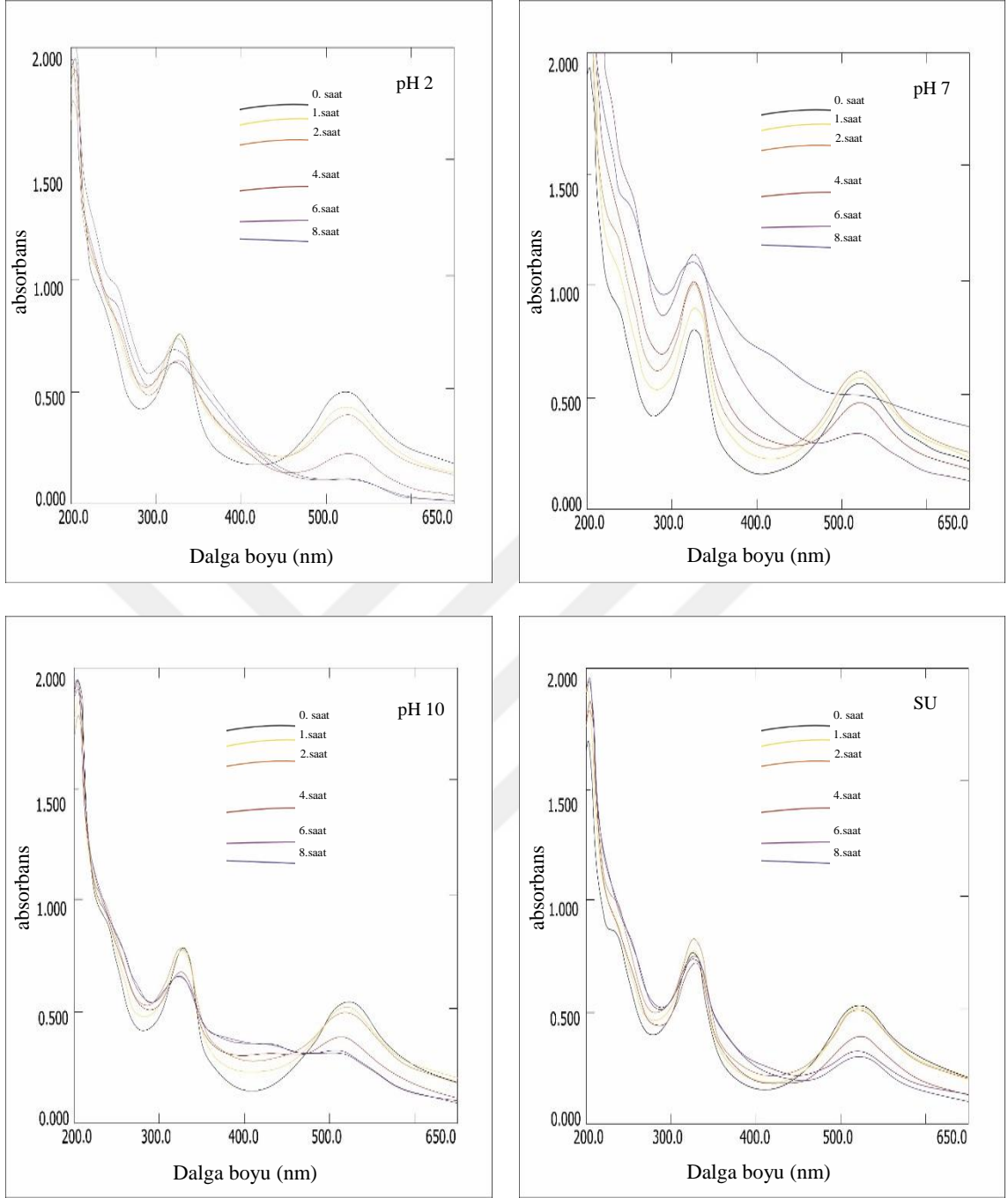
Şekil 28. Işıklı ve ışısız ortamda 6 farklı çözücünün DPPH• kararlılığına etkisi

### 3.1.2. Sıcaklık ve pH' nin DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi

Sıcaklık ve pH' nin DPPH•'nin kararlılığına etkisi çalışmasında farklı sıcaklıklar ve farklı pH' larda DPPH• molekülünün bozulması spektrofotometrik olarak 517 nm' de absorban ölçümü yapılarak takip edildi (Şekil 29) ve aynı zamanda farklı dalga boylarındaki değişikliği belirlemek amacıyla çözeltilerin 200 ile 650 nm arasında spektrumları alındı (Şekil 30-38).

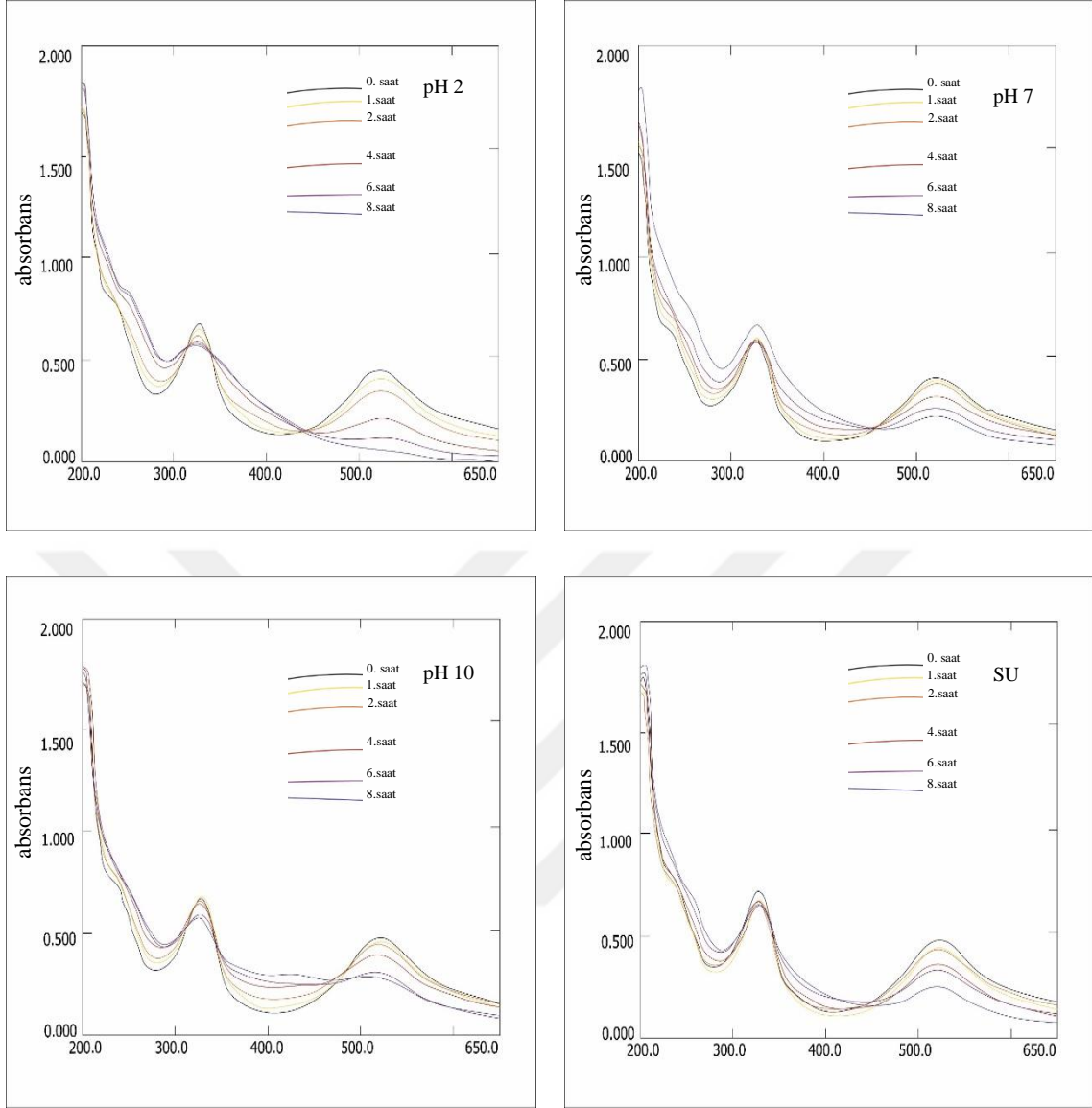


Şekil 29. Sıcaklık ve pH' nin DPPH• kararlılığına etkisi grafikleri (%Absorbans, başlangıçta ölçülen absorbanın yüzdesi olarak hesaplanmıştır)

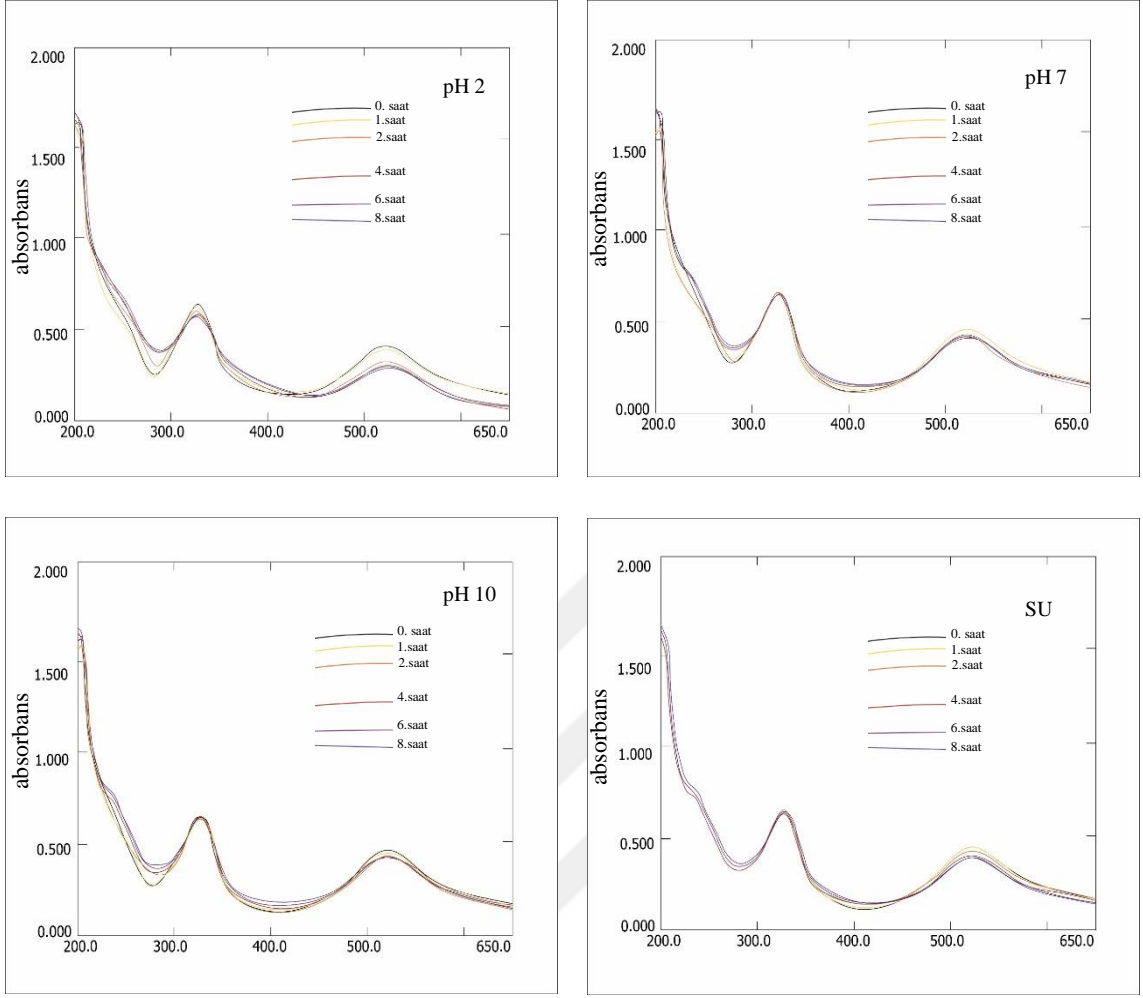


Şekil 30. 40 °C de başlangıçtan 8. saate kadar farklı pH şartlarında DPPH• bozunmasına ait 200 - 650 nm arası UV-Vis spektrumlar

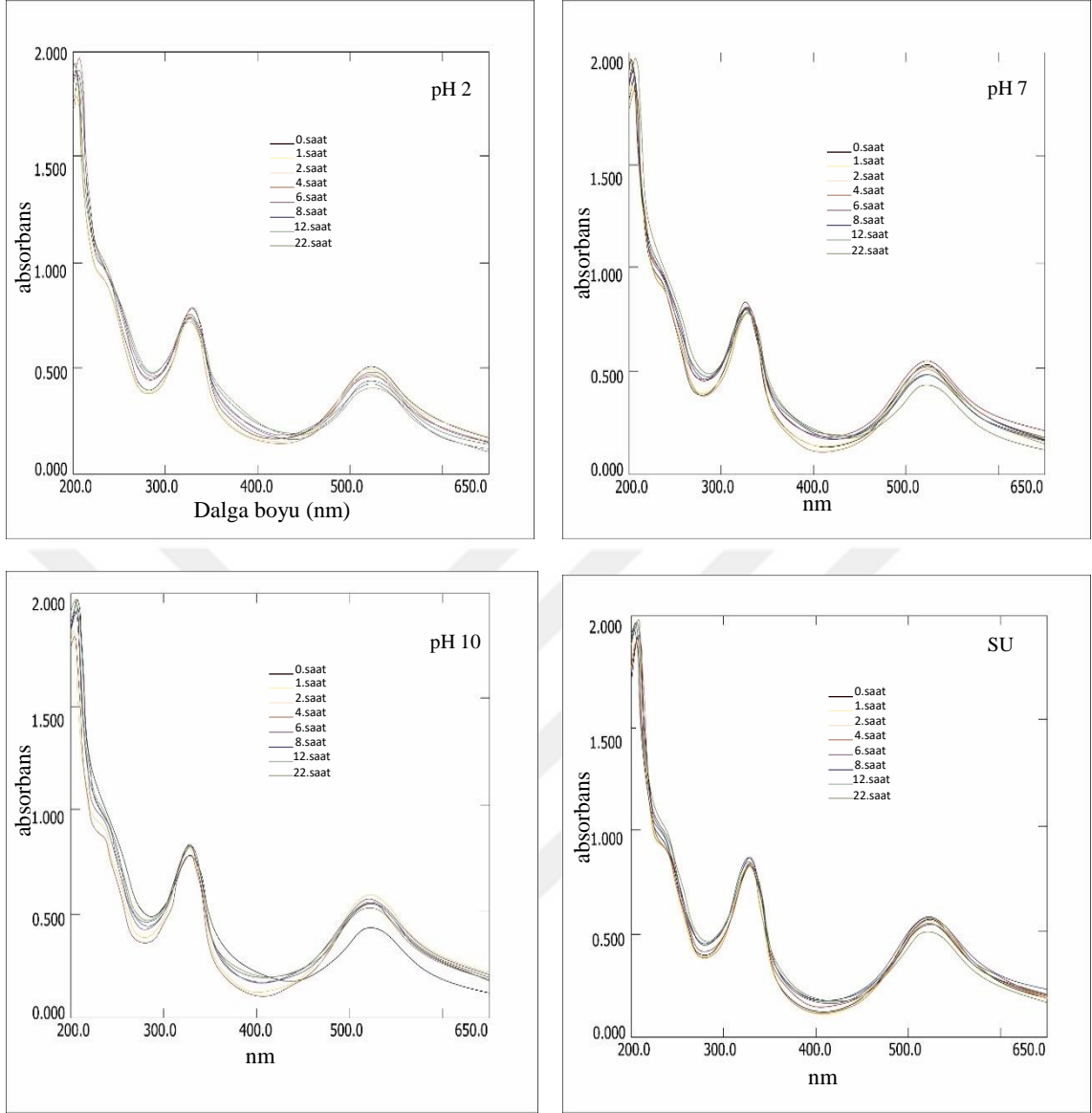




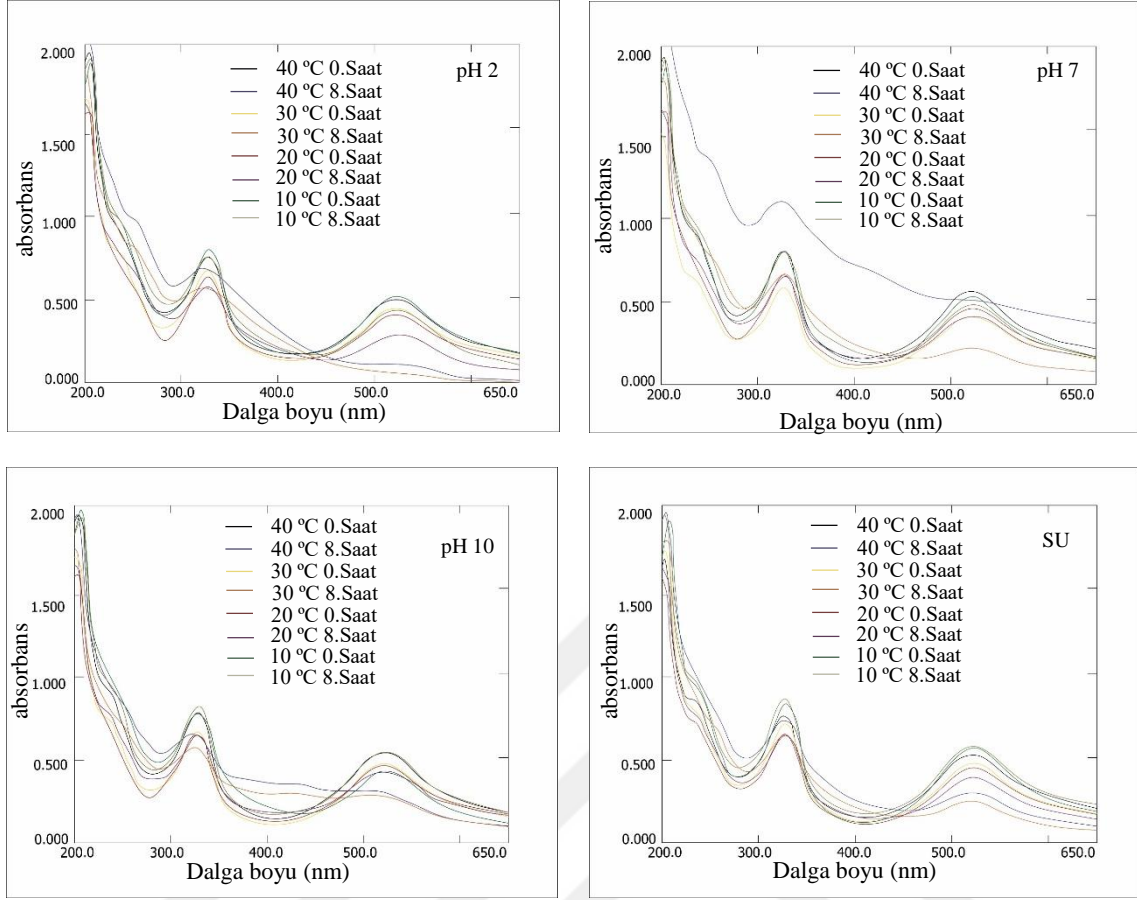
Şekil 31. 30 °C de başlangıçtan 8. saate kadar farklı pH şartlarında DPPH• bozunmasına ait 200 - 650 nm arası UV-Vis spektrumlar



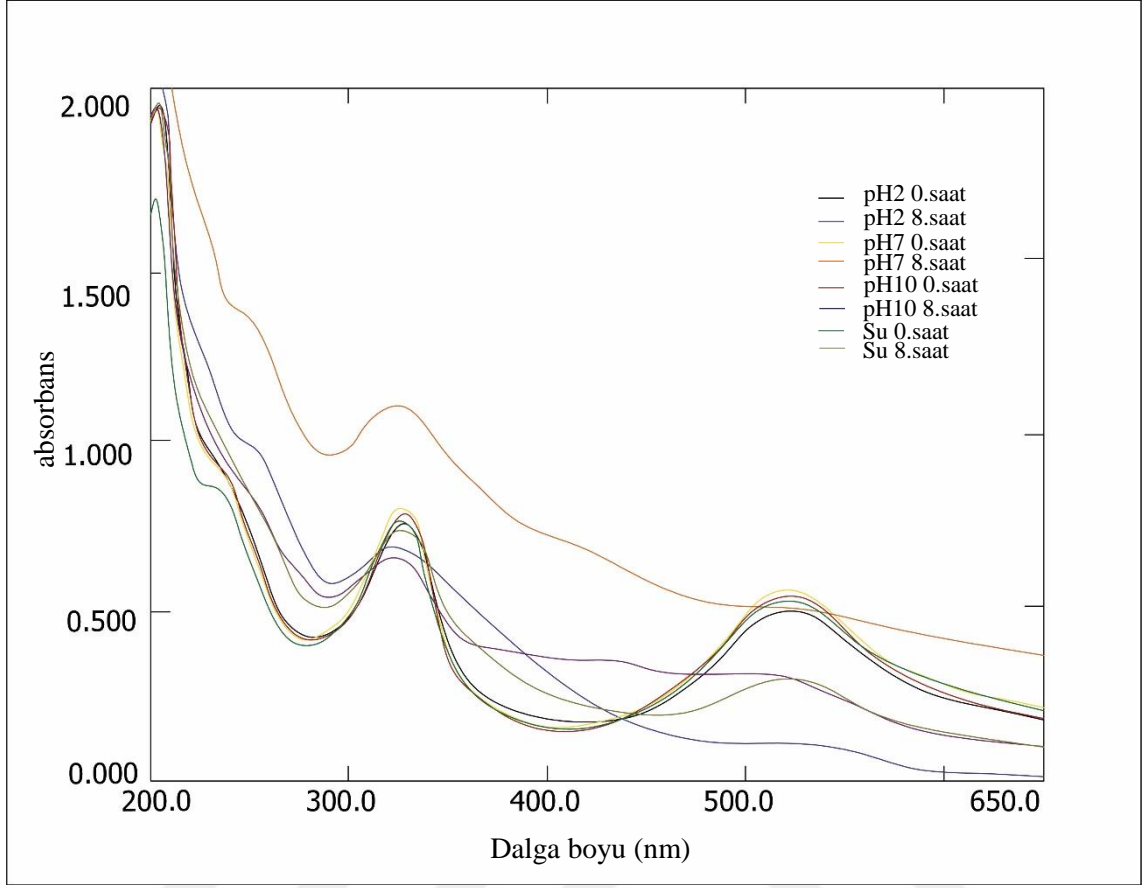
Şekil 32. 20 °C de başlangıçtan 8. saate kadar farklı pH şartlarında DPPH• bozunmasına ait 200 - 650 nm arası UV-Vis spektrumlar.



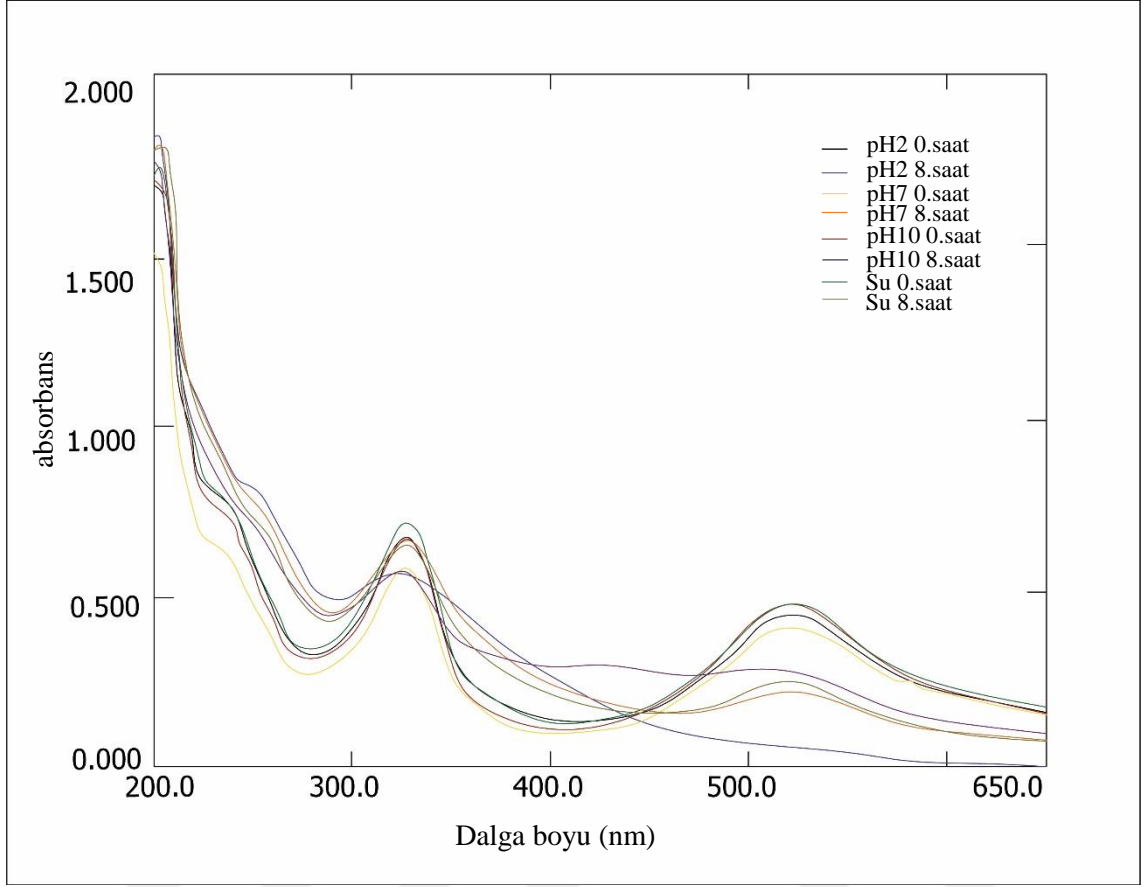
Şekil 33. 10 °C de başlangıçtan 8. saate kadar farklı pH şartlarında DPPH• bozunmasına ait 200 - 650 nm arası UV-Vis spektrumlar



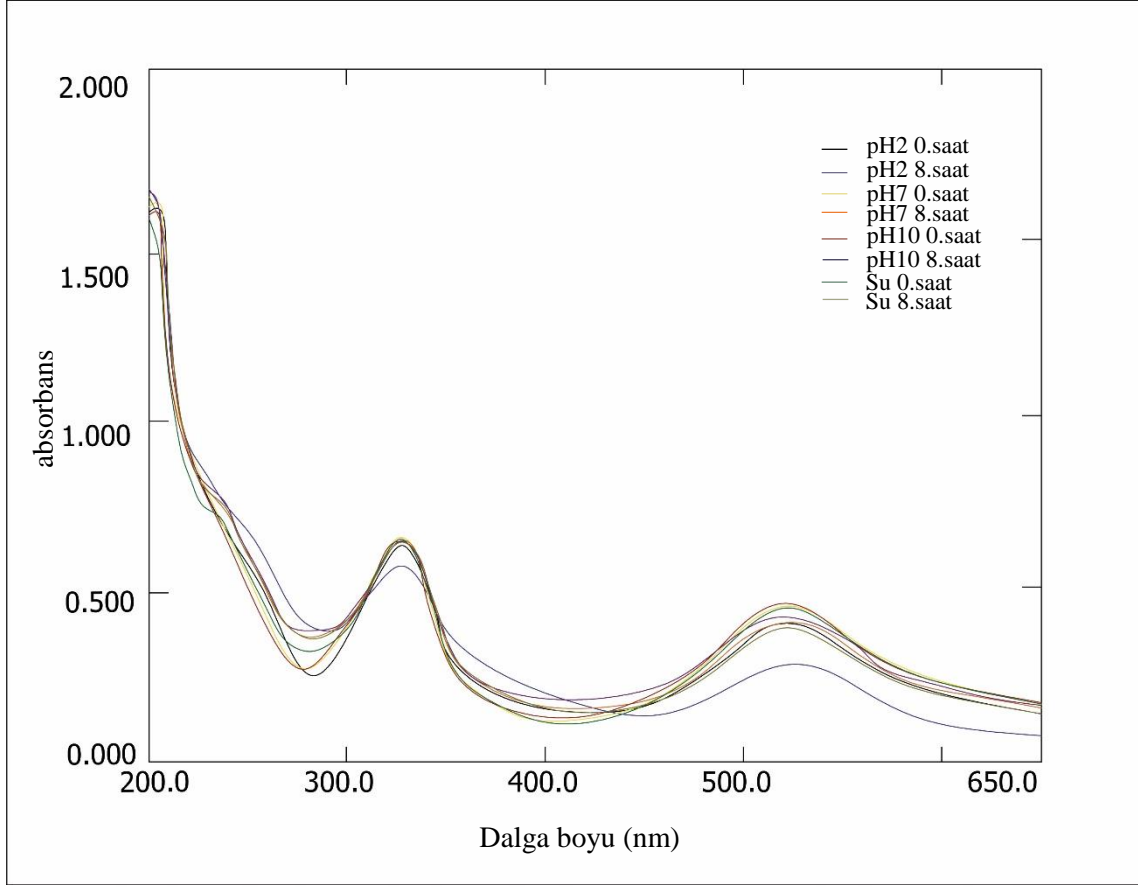
Şekil 34. Farklı pH' larda sıcaklık ile DPPH•' nin kararlılığının takibi amaçlı başlangıç ve 8. saatte spektrumlar



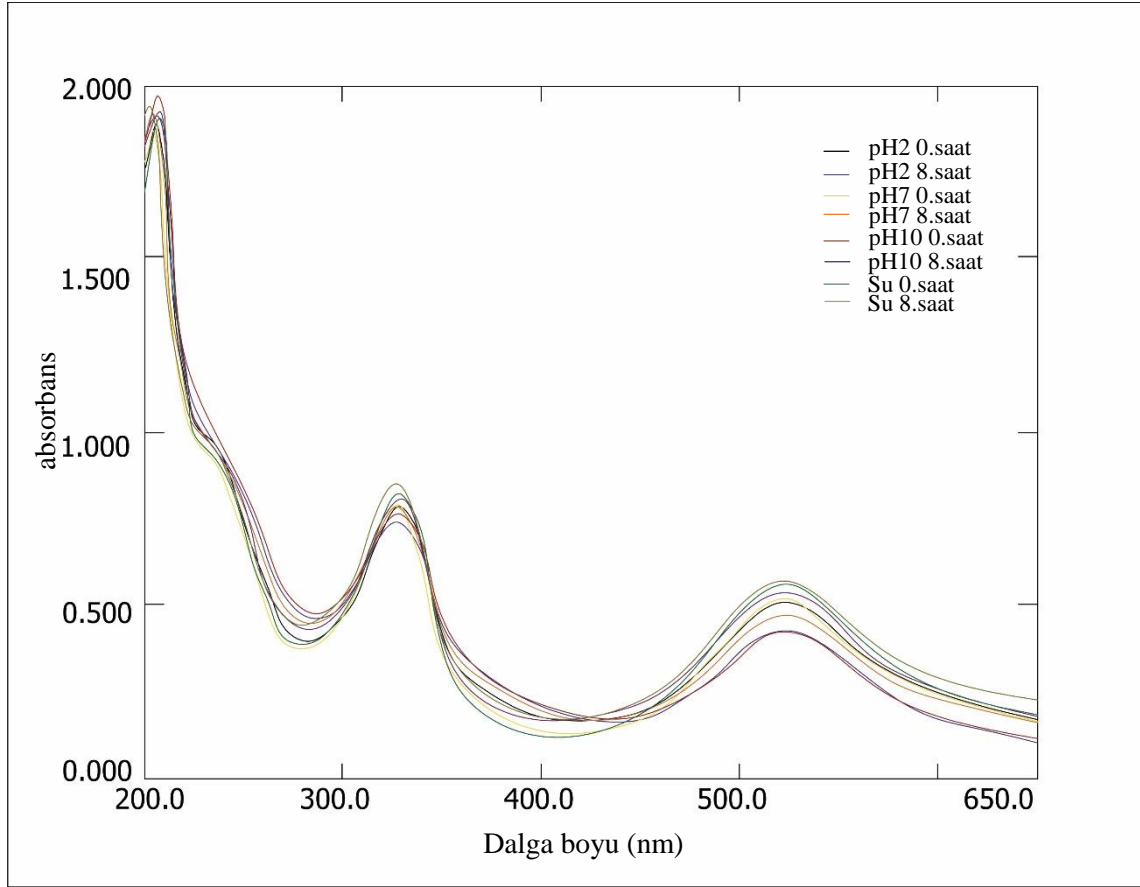
Şekil 35. 40 °C’de farklı pH’ ların DPPH• kararlılığına etkisini gösteren başlangıç ve 8. saatte spektrumlar.



Şekil 36. 30 °C’de farklı pH’ ların DPPH• kararlılığına etkisini gösteren başlangıç ve 8. saatte spektrumlar



Şekil 37. 20 °C’de farklı pH’ ların DPPH• kararlılığına etkisini gösteren başlangıç ve 8. saatte spektrumlar



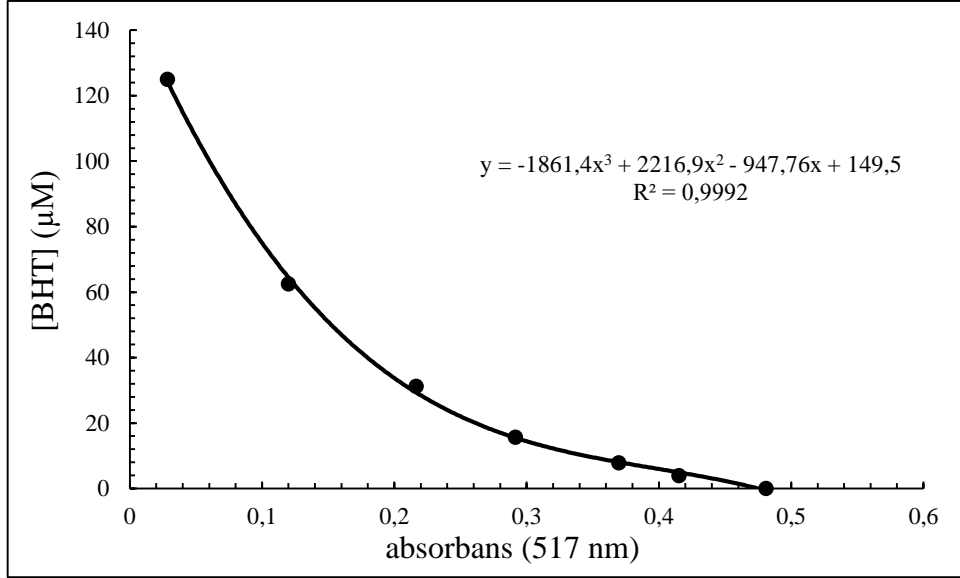
Şekil 38. 10 °C’de farklı pH’ ların DPPH• kararlılığına etkisini gösteren başlangıç ve 8. saatte spektrumlar

### 3.2. Antioksidan - DPPH• Reaksiyonuna Çeşitli Faktörlerin Etkisi

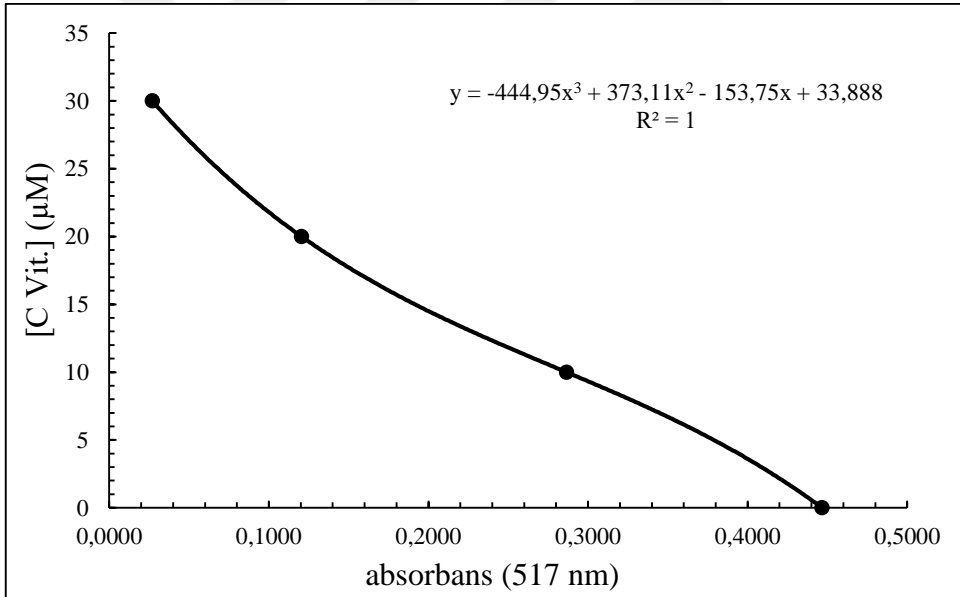
#### 3.2.1. Antioksidanların Metanoldeki SC<sub>50</sub> Değerleri

Standart antioksidanlar metanolde en yüksek son konsantrasyonları BHT 125 µM, C vitamini 30 µM, troloks 5 µM, gallik asit 7,5 µM ve kateşin 15 µM olacak şekilde hazırlandı. 1:1 oranında seri seyreltme yapılarak konsantrasyon-absorbans (517 nm) grafiğinden (Şekil 39 - 43) SC<sub>50</sub> değerleri belirlendi. SC<sub>50</sub> değeri absorbansı yarıya düşüren değer olarak grafik denklemlerinden elde edildi.

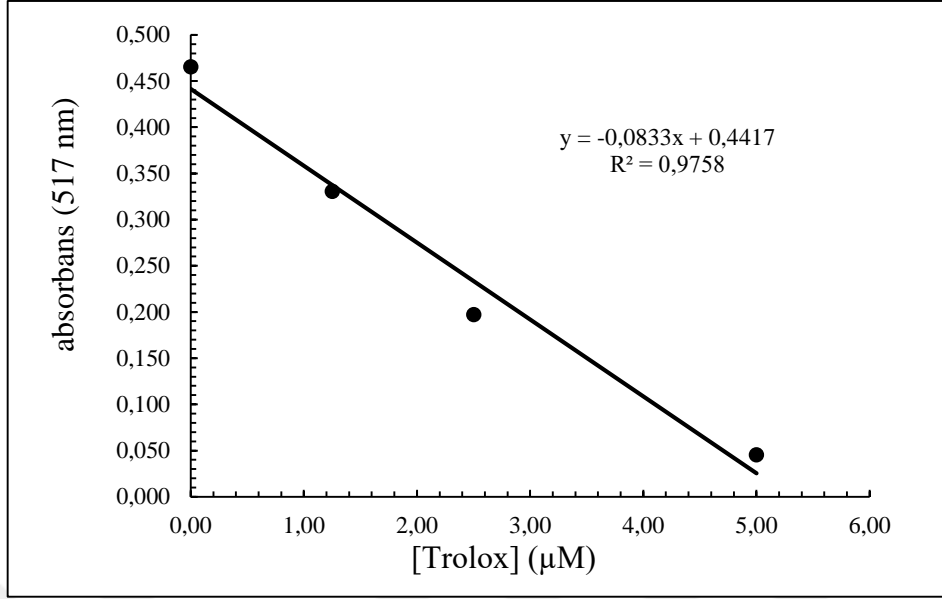




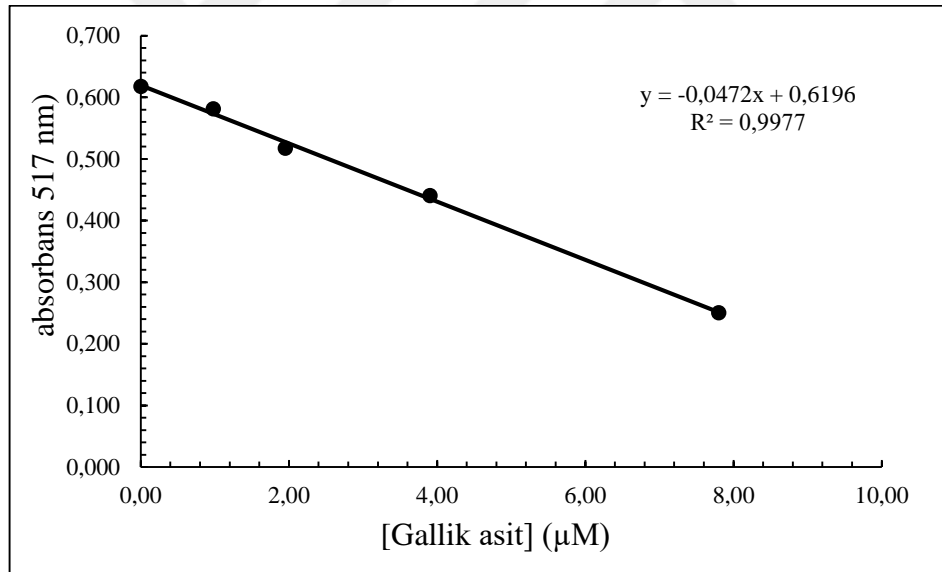
Şekil 39. BHT' nin metanoldeki SC<sub>50</sub> belirleme grafiği



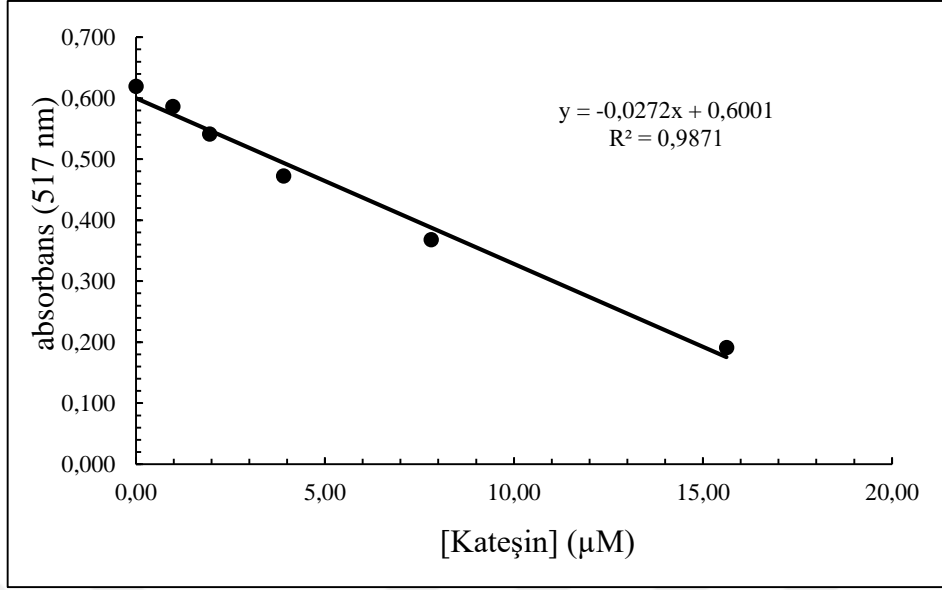
Şekil 40. C Vitaminin metanoldeki SC<sub>50</sub> belirleme grafiği



Şekil 41. Troloks'un metanoldeki  $SC_{50}$  belirleme grafiği



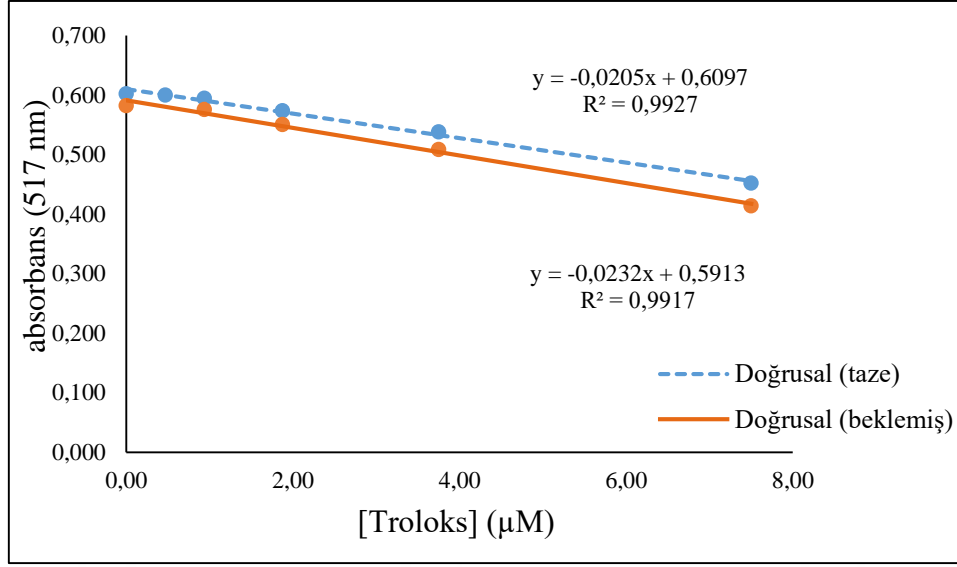
Şekil 42. Gallik asitin metanoldeki  $SC_{50}$  belirleme grafiği



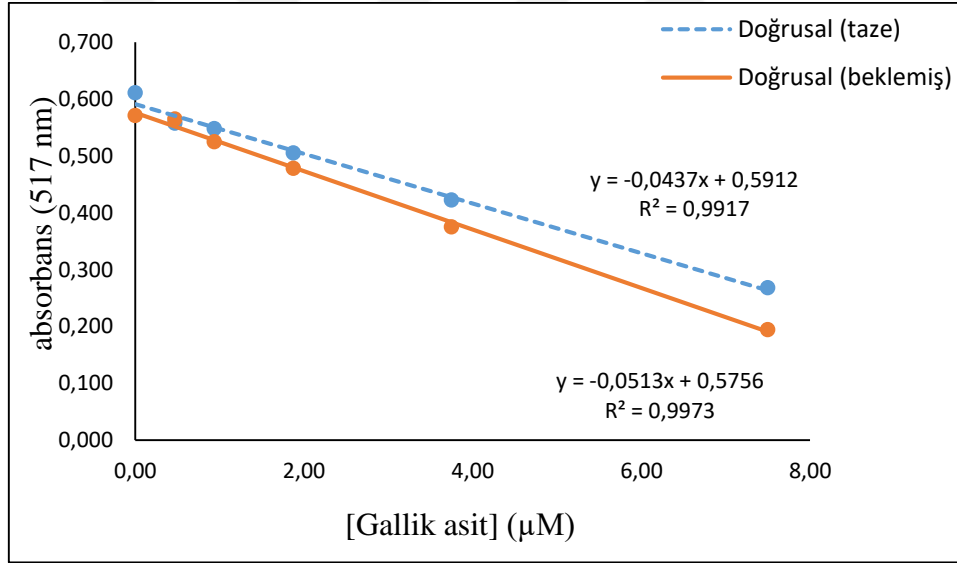
Şekil 43. Kateşinin metanoldeki SC<sub>50</sub> belirleme grafiği

### 3.2.2. DPPH• Çözeltisinin Tazeliğinin SC<sub>50</sub> Değerine Etkisi

100 µM DPPH• çözeltisi metanolde hazırlandıktan sonra gallik asit ve Troloksun en yüksek son konsantrasyonları 7,5 µM olacak şekilde 1:1 seri seyreltme yapılarak 517 nm’de absorbanları ölçüldü ve SC<sub>50</sub> değerleri konsantrasyon-absorbans grafiklerinin (Şekil 44 - 45) denkleminde hesaplandı. Aynı çalışma hazırlanan DPPH• çözeltisi 4 saat bekletildikten sonra tekrar yapıldı ve SC<sub>50</sub> değerleri karşılaştırıldı.



Şekil 44. Troloks'un taze ve beklemiş DPPH• çözeltisi ile SC<sub>50</sub> belirleme grafiği

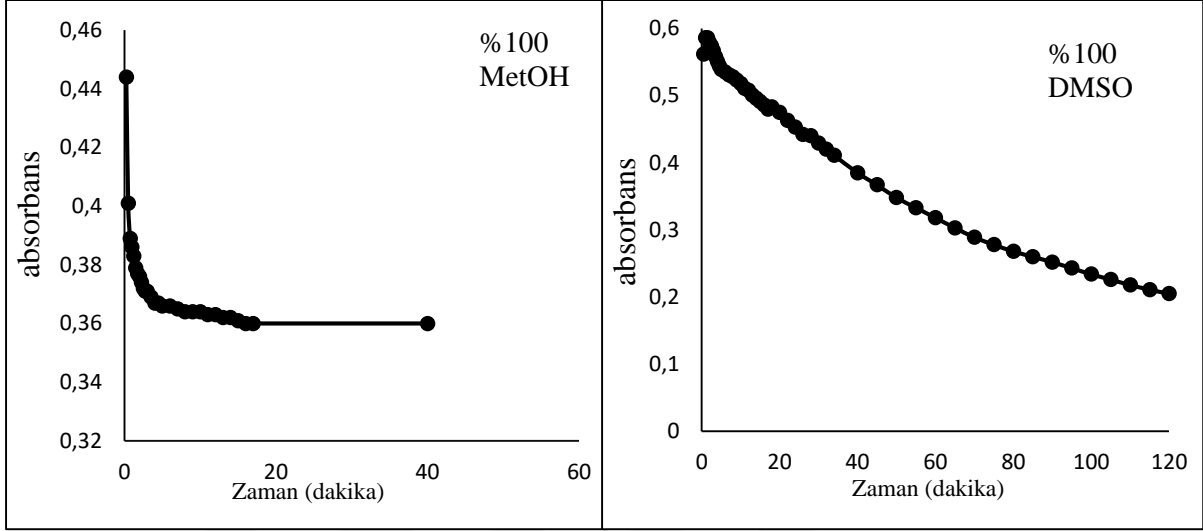


Şekil 45. Gallik asitin taze ve beklemiş DPPH• çözeltisi ile SC<sub>50</sub> belirleme grafiği

### 3.2.3. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Çözücülerin Etkisi

DMSO' nun antioksidan-DPPH• etkileşimini nasıl etkilediğini görmek için gallik asitin son konsantrasyonu 32,85 µM olacak şekilde ve 100 µM DPPH• çözeltisi DMSO ve metanolde hazırlandı. 750 µL DPPH• çözeltisi, 650 µL DMSO ve 100 µL gallik asit deney tüpüne pipetlendi. Spektrofotometreden küveti çıkarmadan 517 nm'de sürekli absorbans

ölçüldü ve zamana karşı absorbanans grafiği çizildi (Şekil 46). Aynı prosedür gallik asitin son konsantrasyonu 2,2 µM olacak şekilde kullanılarak metanol ortamı çalışmasında uygulandı.

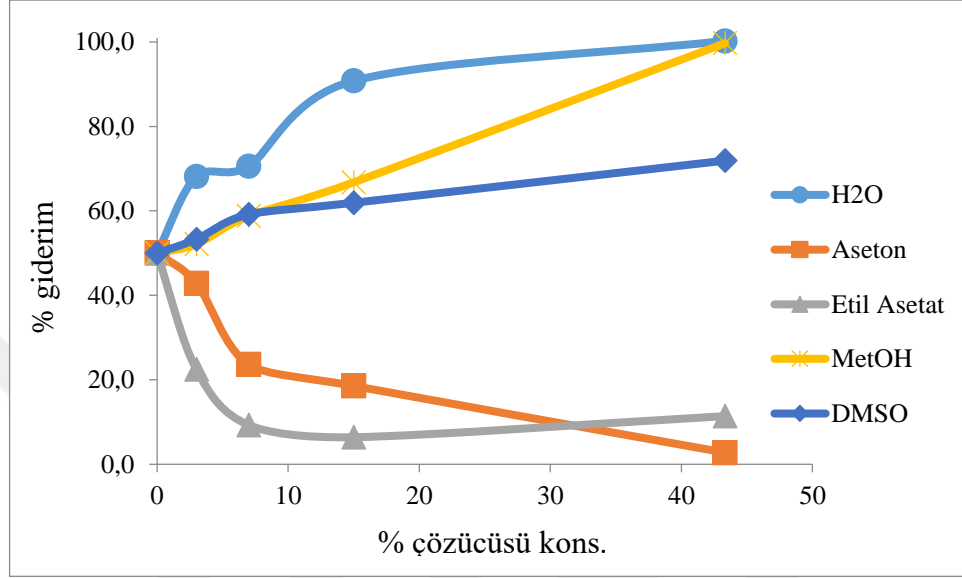


Şekil 46. DMSO'lu ve MeOH'lü ortamda gallik asit-DPPH• etkileşiminin zamana bağlı takibi

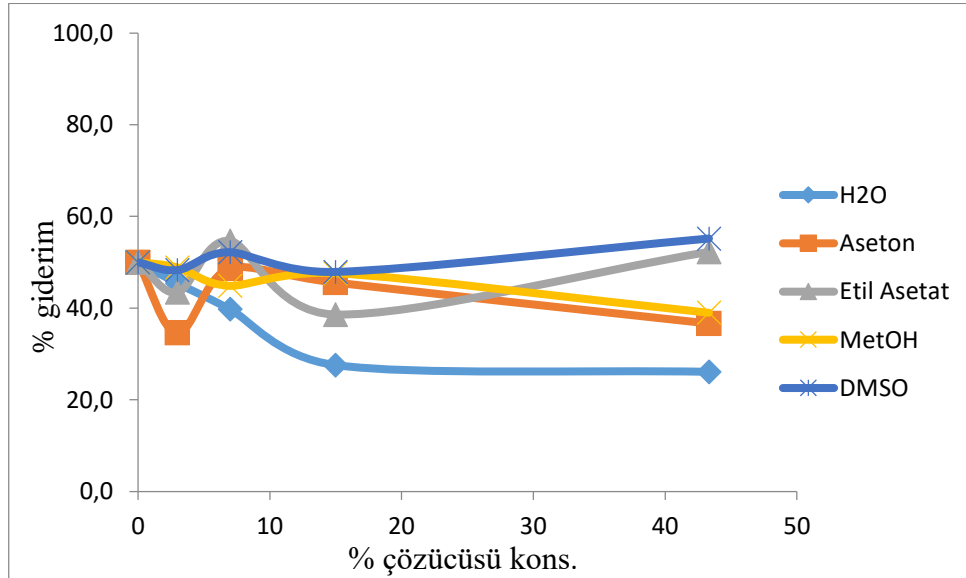
Antioksidan DPPH• etkileşimine çözücünün etkisi çalışmasında 100 µM DPPH• çözültisi, antioksidanların son konsantrasyonları daha önceden belirlenen SC<sub>50</sub> konsantrasyonları olacak şekilde çözülteleri metanolde hazırlandı. Metanolün etkisinin belirlendiği çalışmada DPPH• ve antioksidanlar DMSO' da hazırlandı. Bu reaksiyona çözücünün etkisini görebilmek için çalışılan çözücü konsantrasyonu %43,3, %15, %7, %3 ve %0 olacak şekilde pipetlemeler yapıldı. 60. dakikada 517 nm' de absorbanans ölçüldü. % çözücü konsantrasyonuna karşı % giderim grafiği çizildi (Şekil 47 - 51). % giderim hesabı;  $\{100 - [(numune\ absorbanansı - numune\ körü\ absorbanansı) / kontrol\ absorbanansı] * 100\}$  formülü ile hesaplandı.

$$\% \text{ Giderim} = 100 - [(A_N - A_{NK}) / A_{KK}] * 100 \quad (4)$$

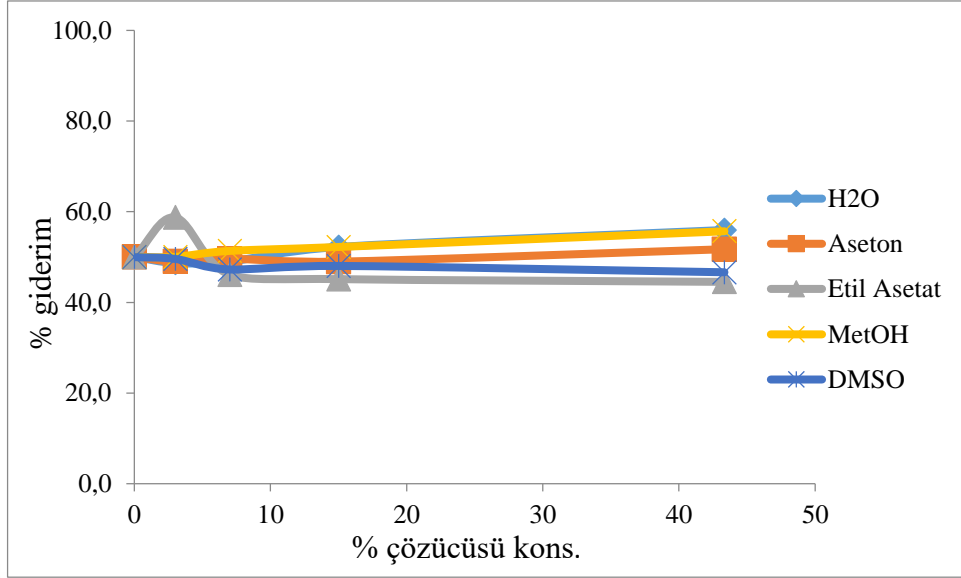
Aynı zamanda çözücünün en yüksek konsantrasyonda (%43,3) bulunduğu ortamda BHT ile DPPH• etkileşiminin değişimini göstermek amacıyla başlangıçta ve 60. dakikada kaydedilen spektrumlar karşılaştırıldı (Şekil 52 - 56).



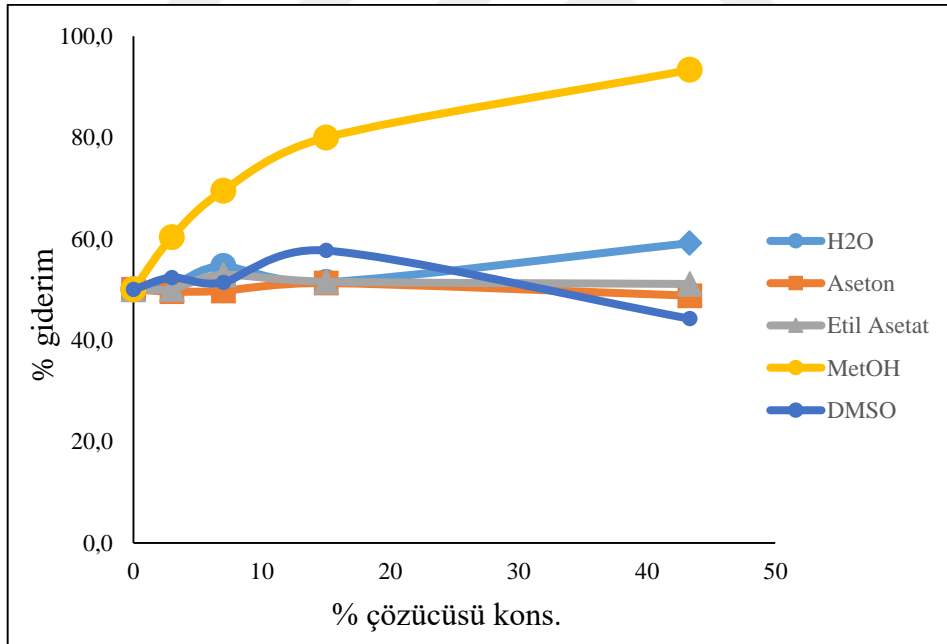
Şekil 47. BHT' nin farklı çözücülerde DPPH• giderim testi grafiği



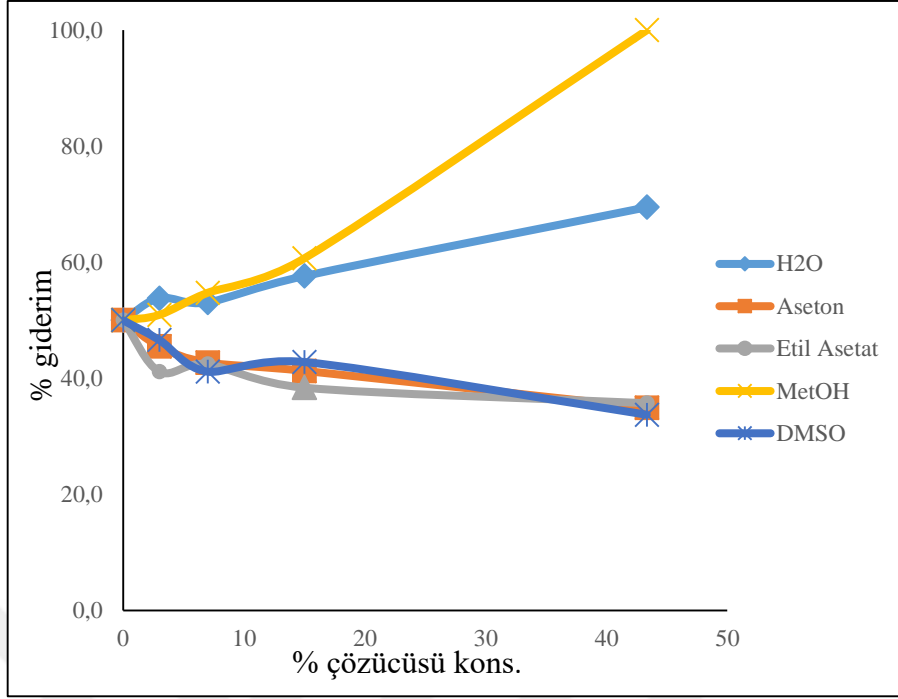
Şekil 48. C vitamini farklı çözücülerde DPPH• giderim testi grafiği



Şekil 49. Troloxun farklı çözücülerde DPPH• giderim testi

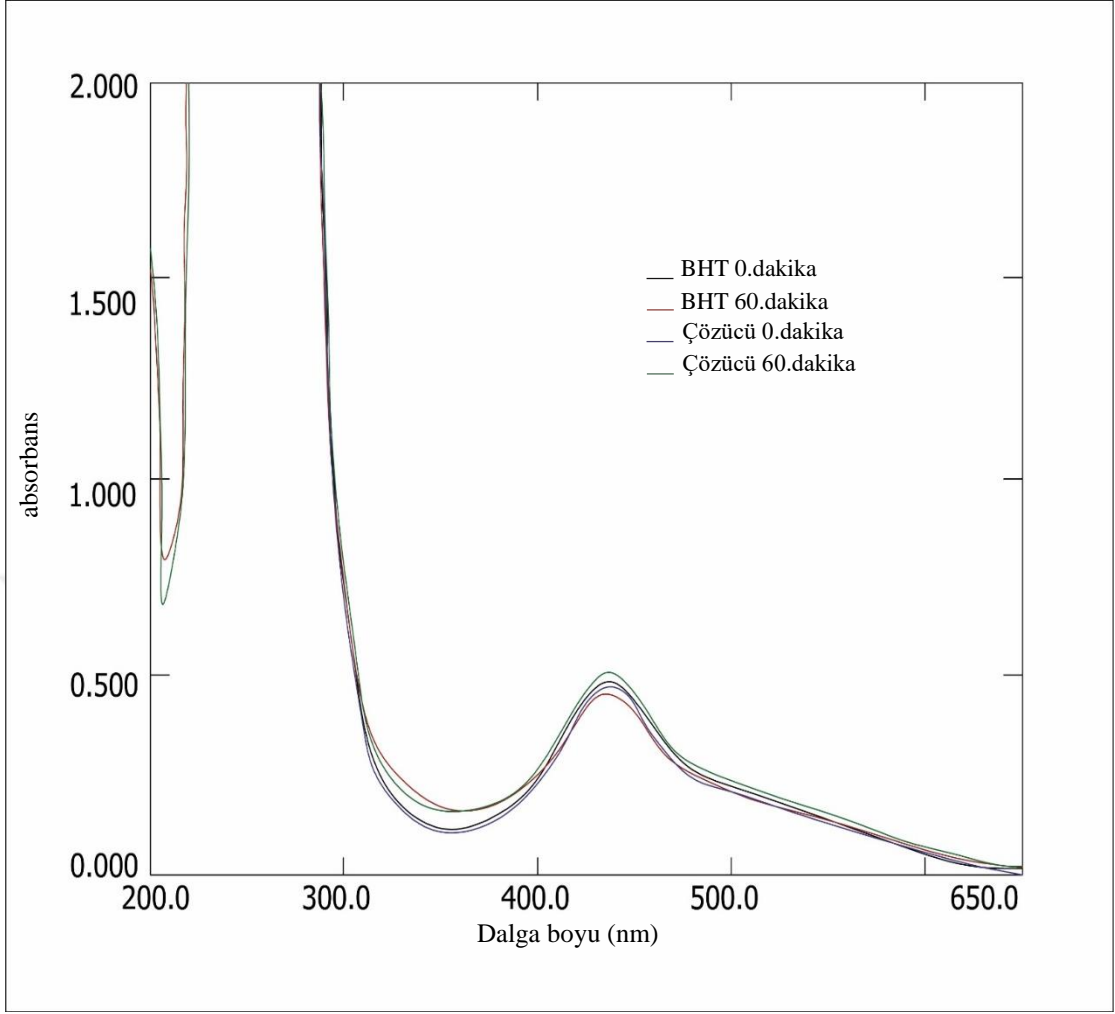


Şekil 50. Gallik asit'in farklı çözücülerde DPPH• giderim testi

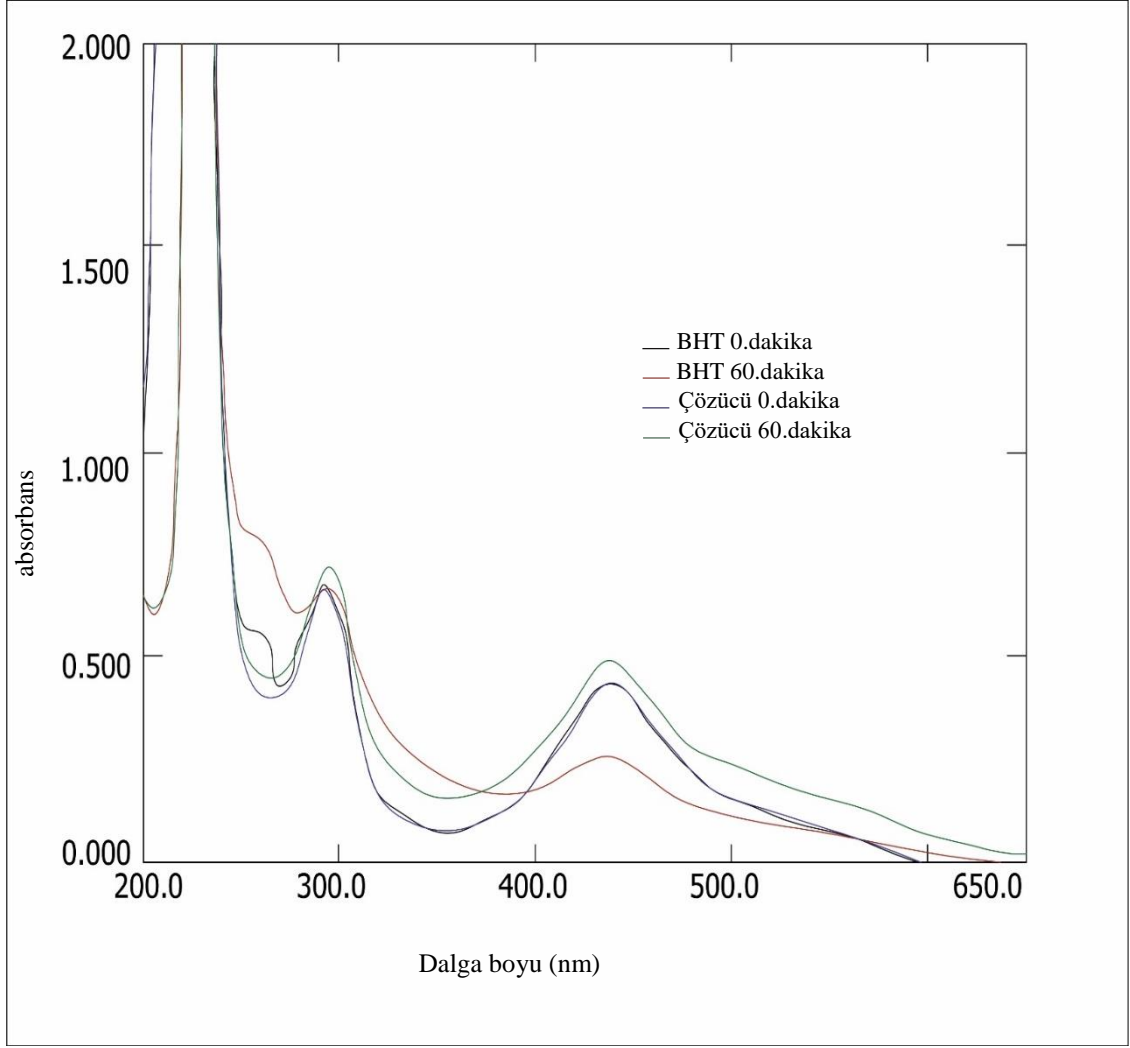


Şekil 51. Kateşinin farklı çözücülerde DPPH• giderim testi

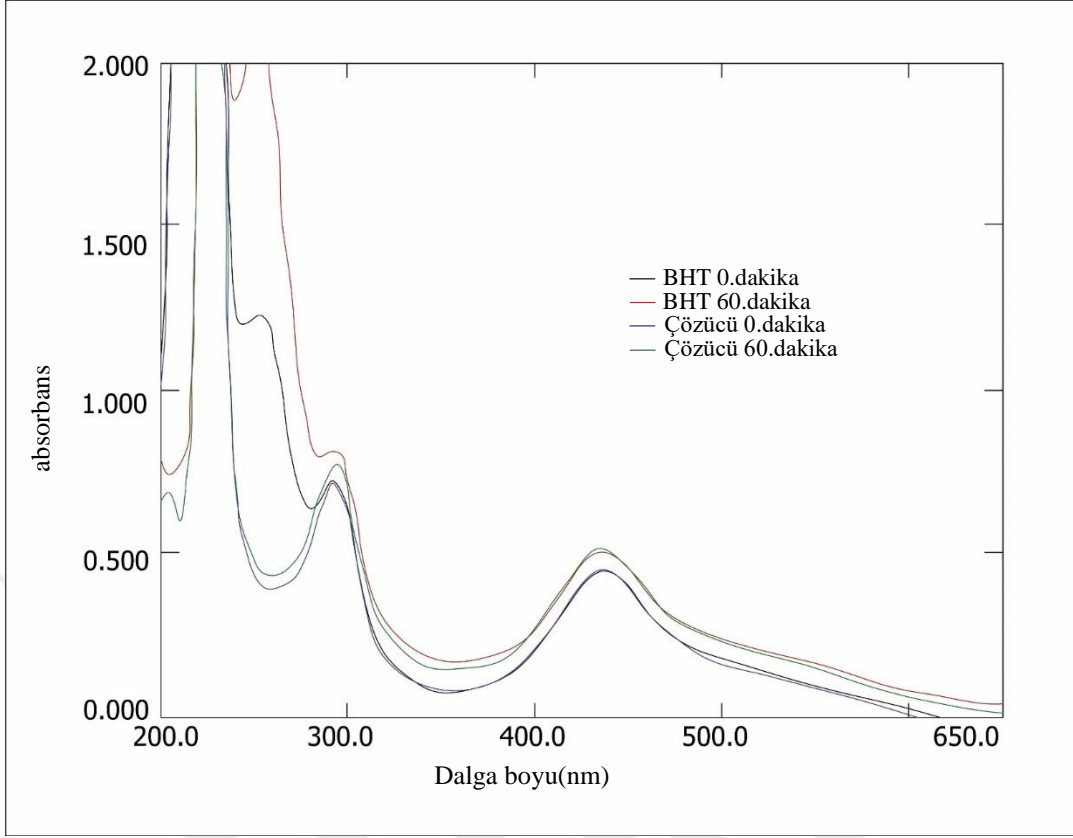




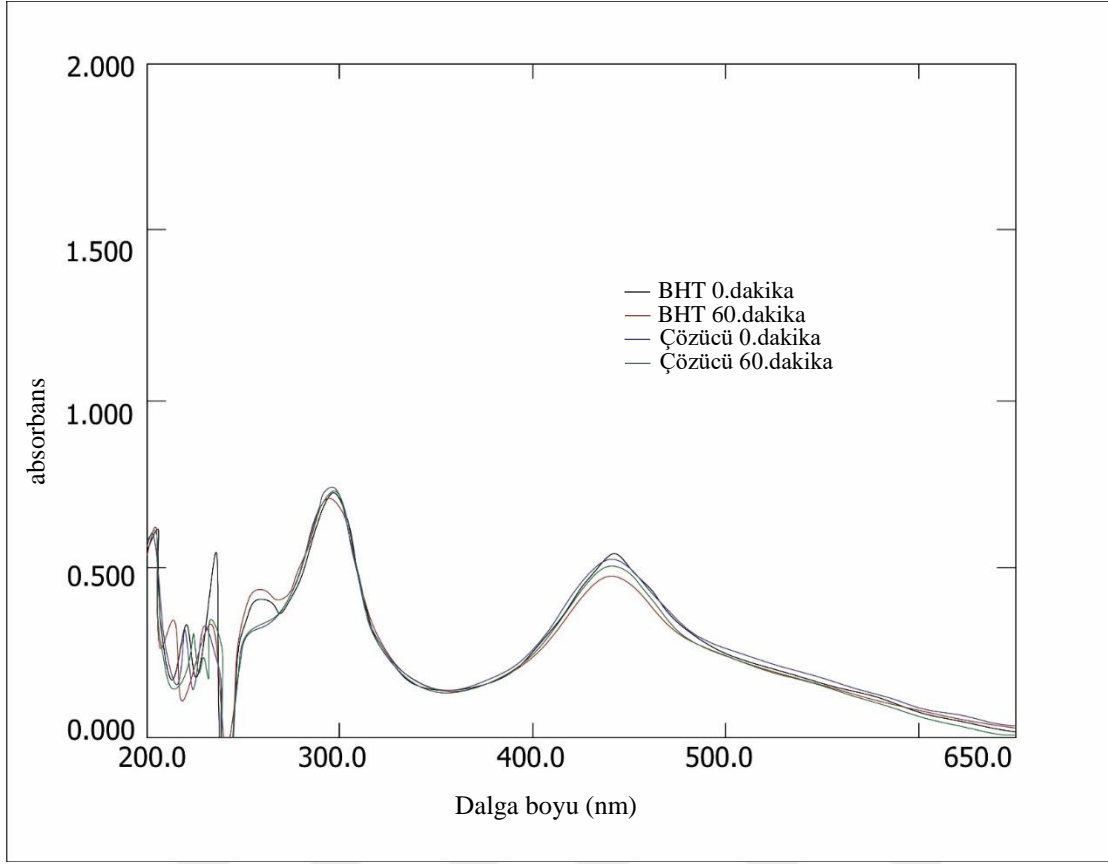
Şekil 52. %43,3 Aseton içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları



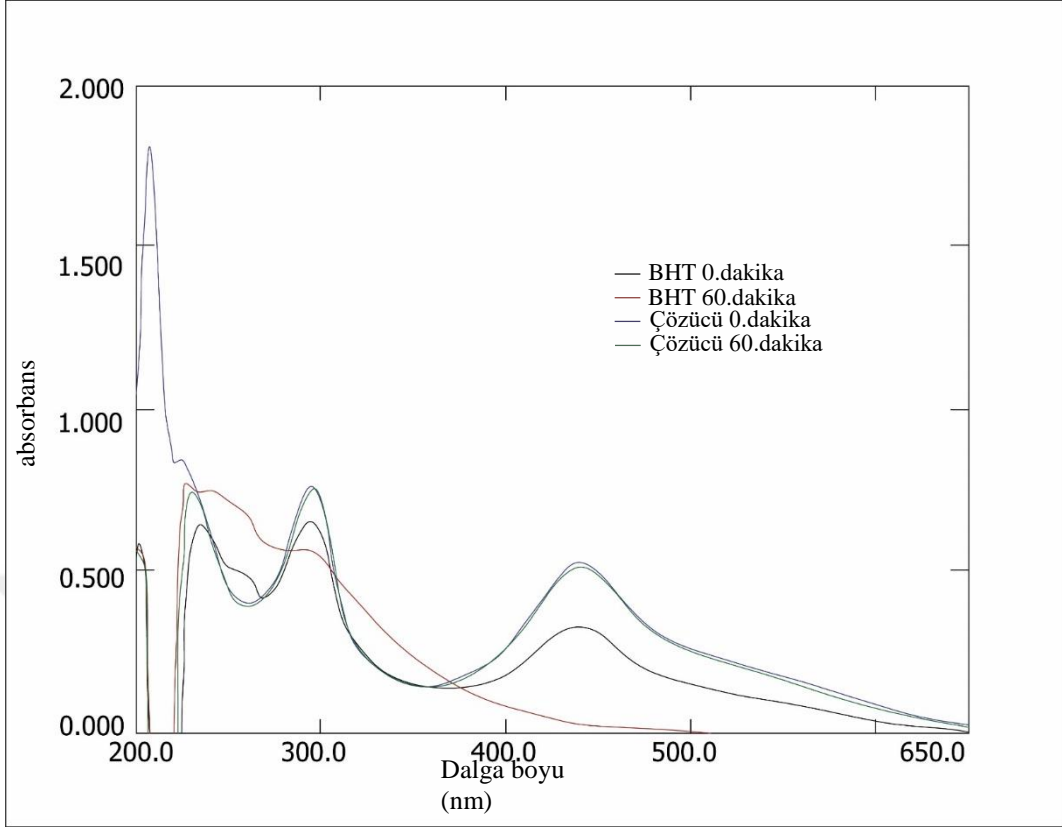
Şekil 53. %43,3 DMSO içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları



Şekil 54. %43,3 Etil asetat içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları



Şekil 55. %43,3 MetOH içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları

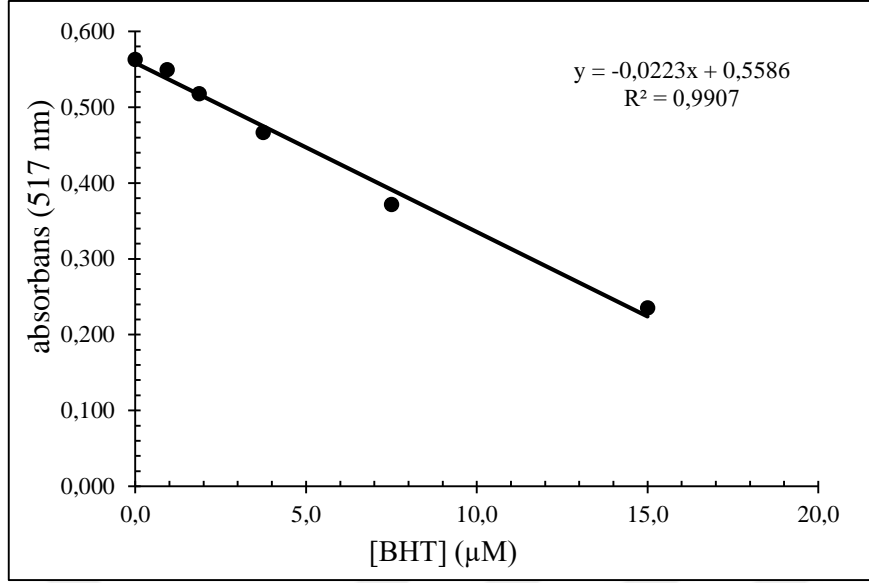


Şekil 56. %43,3 H<sub>2</sub>O içeren ortamda BHT – DPPH• karışımının başlangıçta ve 60. dakikada spektrumları

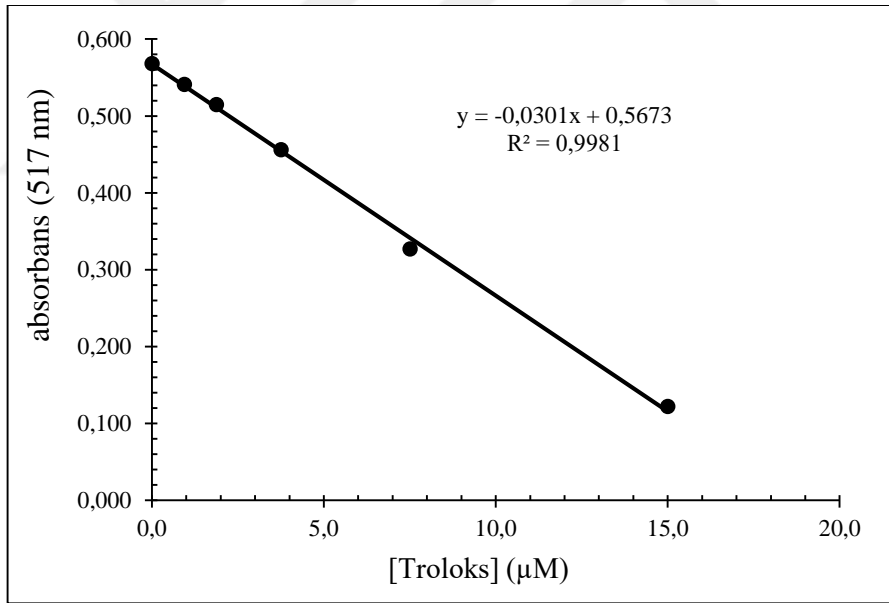
### 3.2.4. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon ve pH' nın Etkisi

#### 3.2.4.1. Antioksidanların Su Varlığındaki SC<sub>50</sub> Değerleri

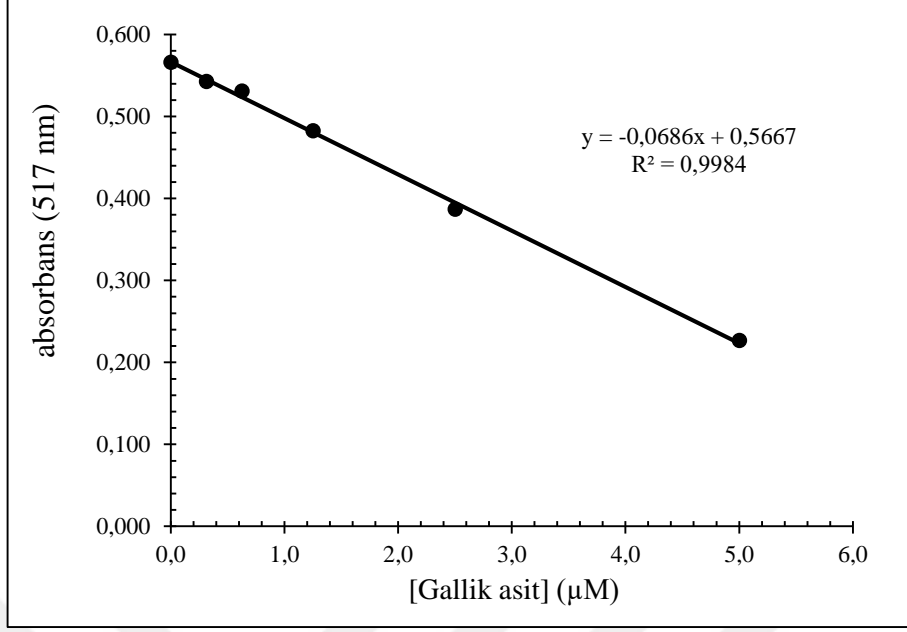
100 µM DPPH• çözeltisi metanol ile hazırlandı. 750 µL DPPH• çözeltisi, 650 µL saf su ve 100 µL antioksidan çözeltisinin 1:1 oranında seyrelmiş 5 farklı konsantrasyonu pipetlendi. BHT ve Troloks 15 µM, gallik asit 5 µM, kateşin 12,5 µM ve C vitamini 8,33 µM son konsantrasyonu en yüksek konsantrasyonda olacak şekilde kullanıldı. 50 dakika bekleme sonrası 517 nm' de absorbans ölçüldü. Ölçülen absorbanslar antioksidan konsantrasyonuna karşı grafiğe geçirilerek SC<sub>50</sub> değeri belirleme grafikleri elde edildi (Şekil 57 - 61).



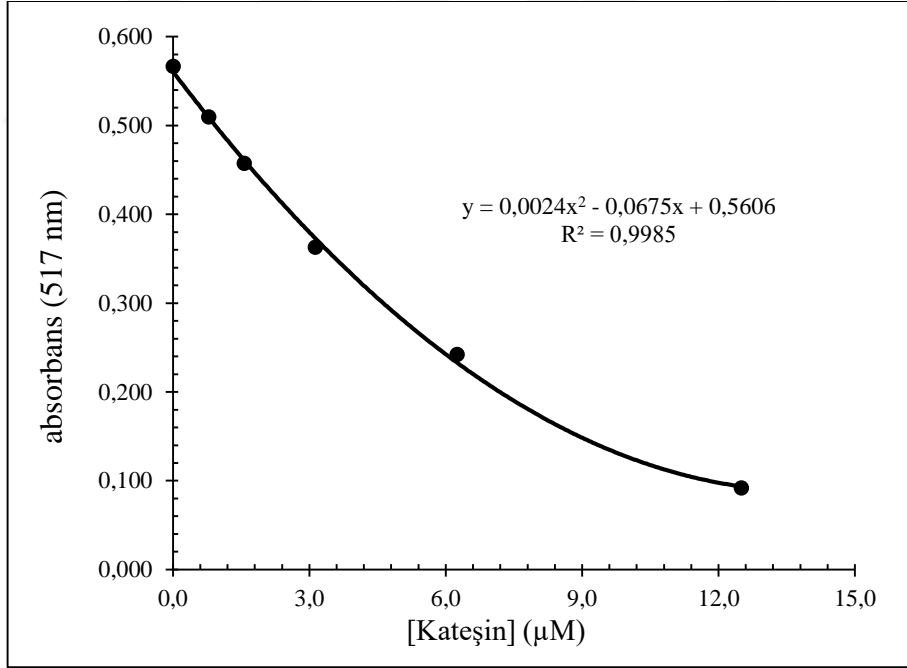
Şekil 57. BHT' nin su varlığındaki SC<sub>50</sub> belirleme grafiği



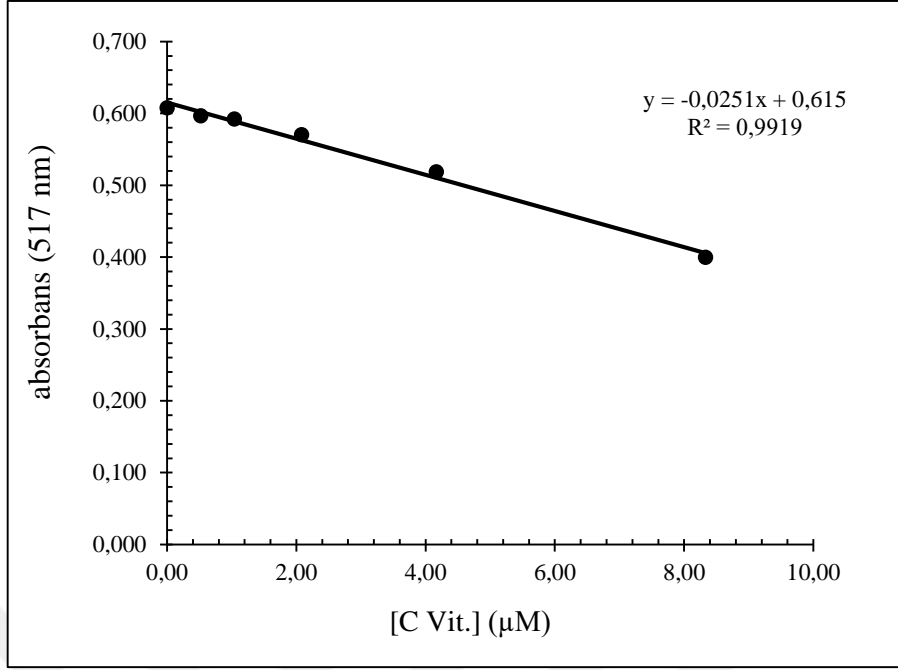
Şekil 58. Troloks'un su varlığındaki SC<sub>50</sub> belirleme grafiği



Şekil 59. Gallik asitin su varlığındaki SC<sub>50</sub> belirleme grafiği



Şekil 60. Kateshinin su varlığındaki SC<sub>50</sub> belirleme grafiği



Şekil 61. C vitamininin su varlığındaki SC<sub>50</sub> belirleme grafiği

### 3.2.4.2. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon pH' sının Etkisi

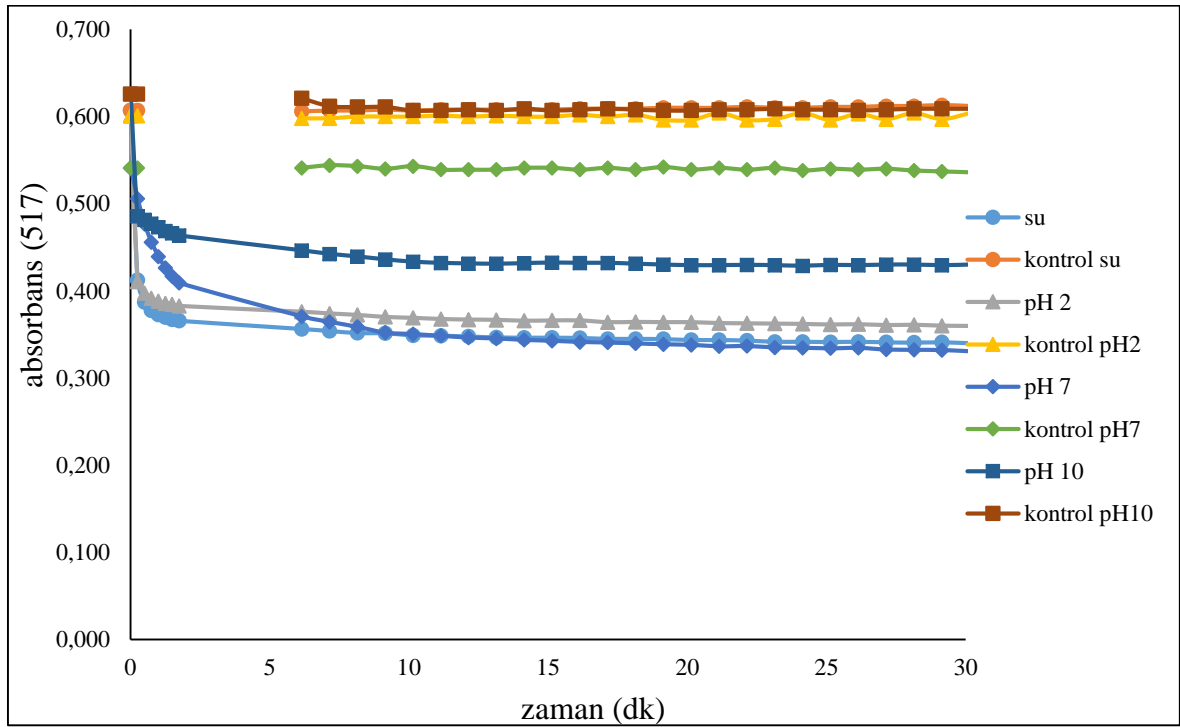
100 µM DPPH• çözeltisi hazırlandı. 0,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> tampon çözeltisi hazırlandı ve bu çözelti seyreltik HCl ve seyreltik NaOH ile pH 2, pH 7 ve pH 10'a ayarlandı. Daha sonra seri dilüsyon ile 1:1 oranında seyreltme yapıldı ve her seyreltmede pH-metre ile pH kontrolü yapıldı. Seyrelen konsantrasyondaki tamponlar ile pipetleme 750 µL DPPH• çözeltisi, 650 µL tampon ve 100 µL numune çözücüsü (MeOH) olacak şekilde pipetleme yapıldı. Bulanıklık ve renk değişimleri tablo şeklinde raporlandı (Tablo 8) ve bu işleme bulanıklığın ve renk değişiminin olmadığı konsantrasyon teyit edilene kadar devam edildi. Negatif, bulanıklık yok anlamına gelmektedir.



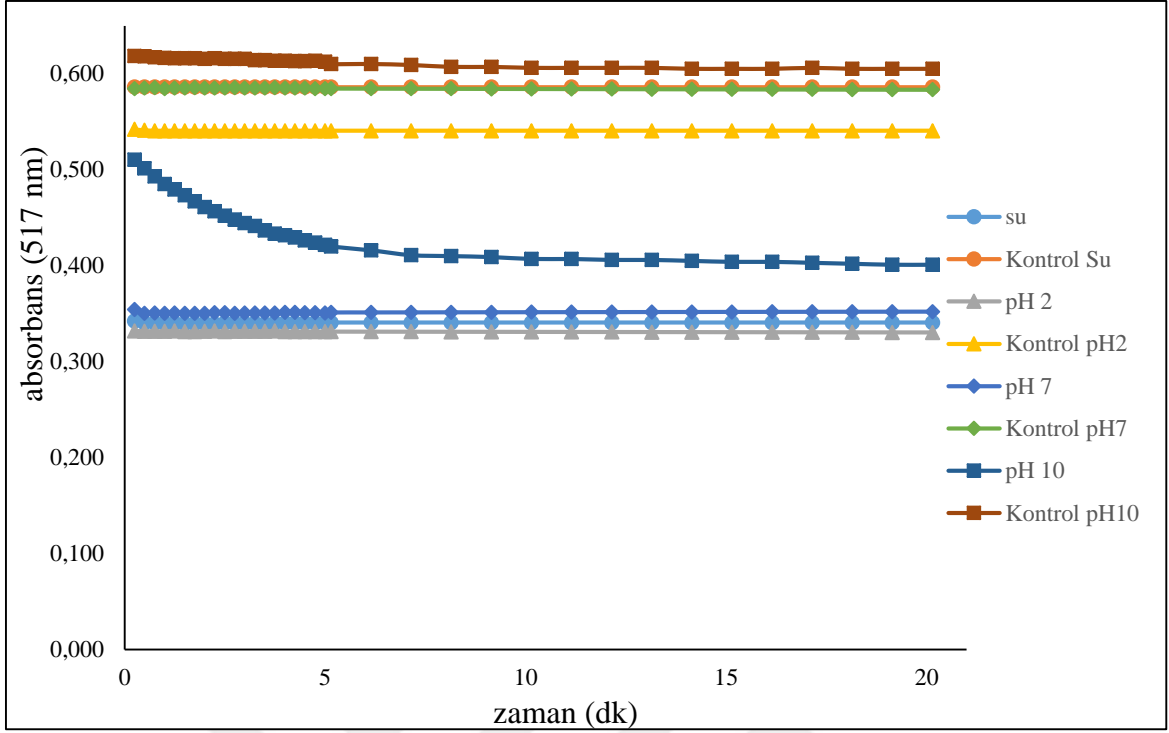
Tablo 8. Tampon konsantrasyonunun bozucu etkisini belirleme ön çalışmasında görünüm

Tampon pH'sı	Tampon konst. →	2 mM	1 mM	0,5 mM	0,25 mM	0,125 mM
	Tüpteki son kons. →	0,87 mM	0,43 mM	0,215 mM	0,107 mM	0,053 mM
pH 2		negatif, mor	negatif, mor	negatif, mor	negatif, mor	negatif, mor
pH 7		negatif, mor	negatif, mor	negatif, mor	negatif, mor	negatif, mor
pH 10		negatif, kahverengi	negatif, kahverengi	negatif, kahverengi	negatif, kahverengi	negatif, mor

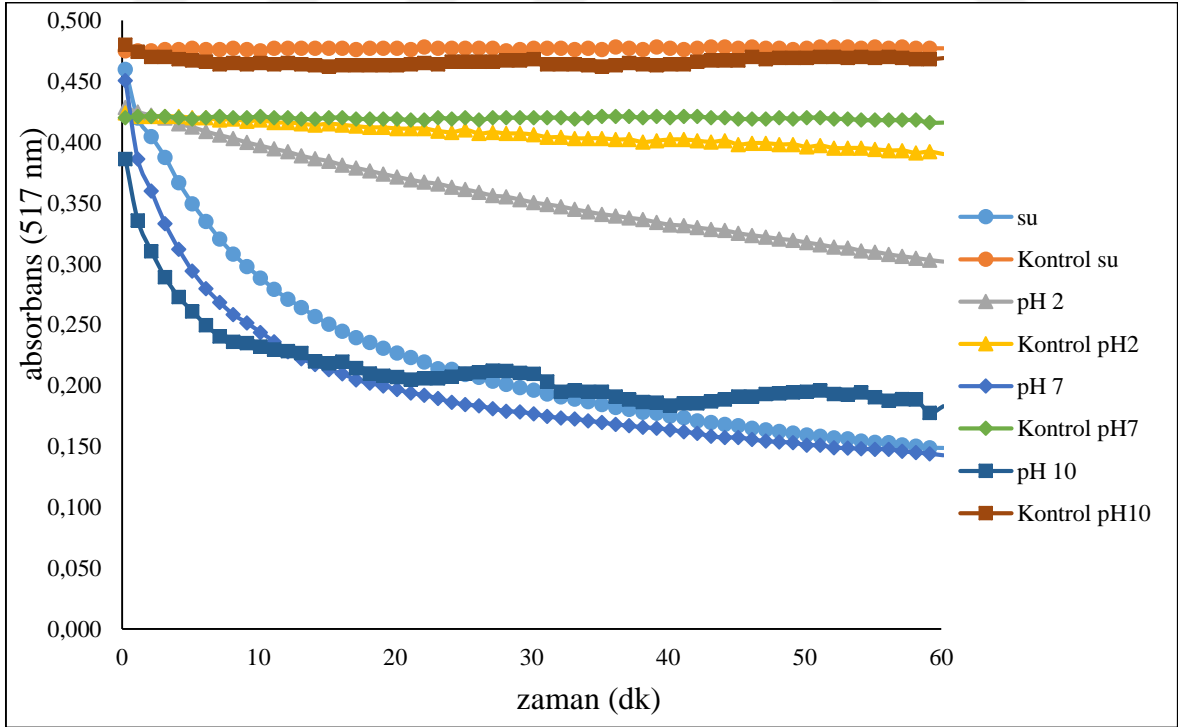
Son konsantrasyonu 54,34  $\mu\text{M}$  olacak şekilde  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tampon çözeltisi, son konsantrasyonu 50  $\mu\text{M}$  olacak şekilde DPPH• çözeltisi ve son konsantrasyonları sulu ortamdaki  $\text{SC}_{50}$  değerleri olacak şekilde BHT, Troloks, C vitamini, gallik asit ve kateşin çözeltileri hazırlandı. 750  $\mu\text{L}$  DPPH• çözeltisi, 650  $\mu\text{L}$  farklı pH' daki tampon çözelti ve 100  $\mu\text{L}$  antioksidan çözeltisinden pipetlendi. Başlangıçtan itibaren BHT için 60 dakika, Troloks ve C vitamini için 20 dakika, gallik asit ve kateşin için 30 dakika boyunca zamana karşı 517 nm'de absorbans ölçümleri yapıldı ve bu ölçümler grafiğe geçirildi (Şekil 62 - 66).



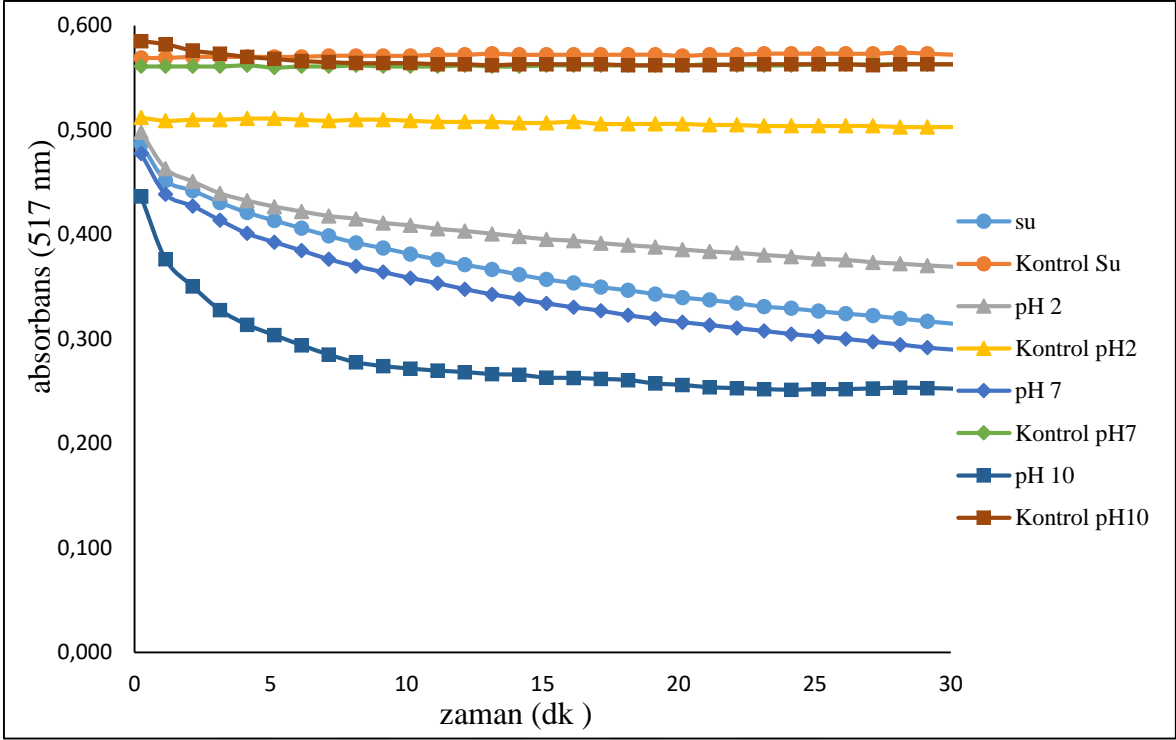
Şekil 62. Gallik asitin DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi).



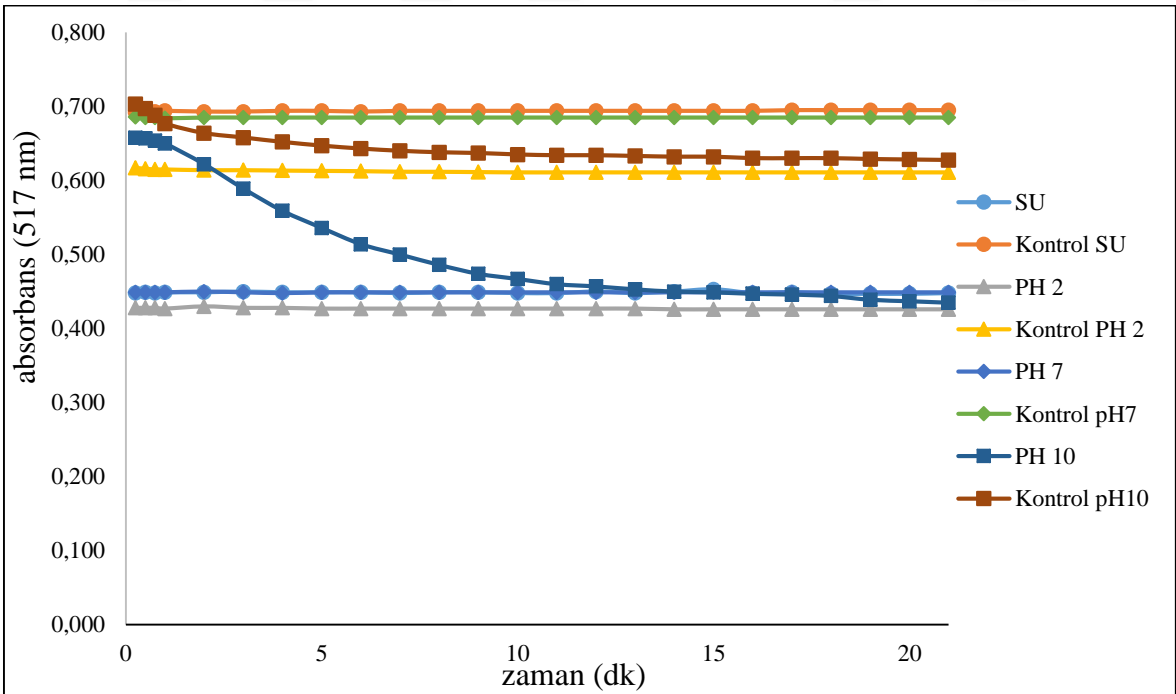
Şekil 63. Troloks'un DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi).



Şekil 64. BHT' nin DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi).



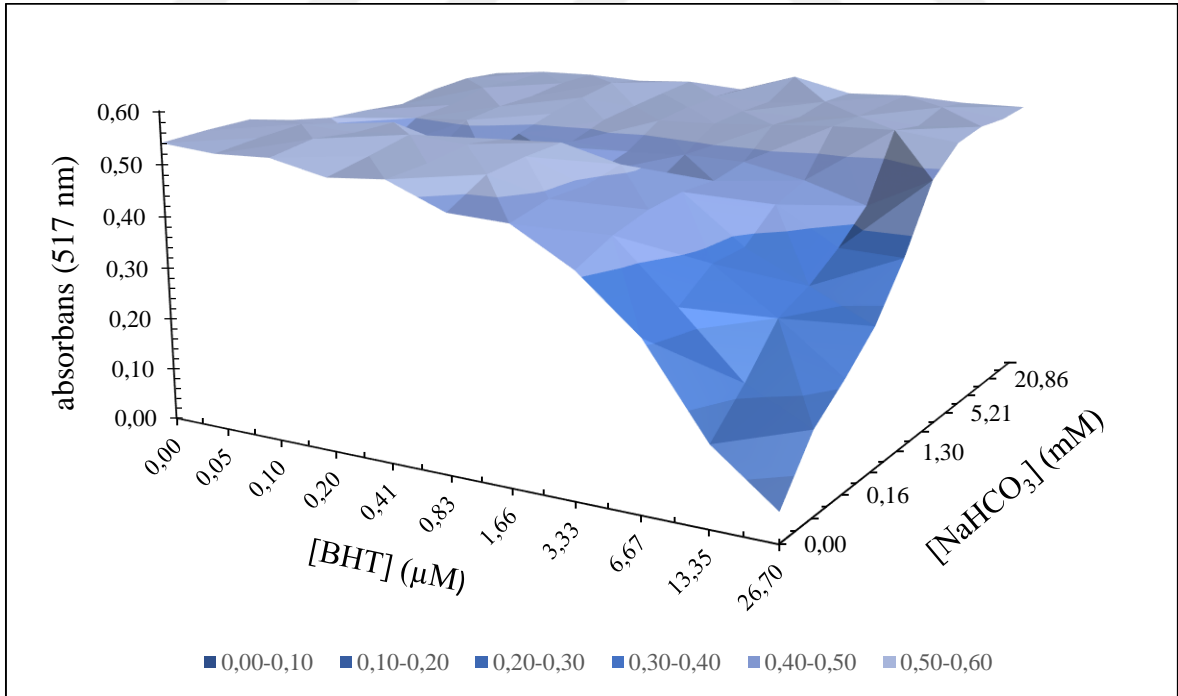
Şekil 65. Kateşinin DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi).



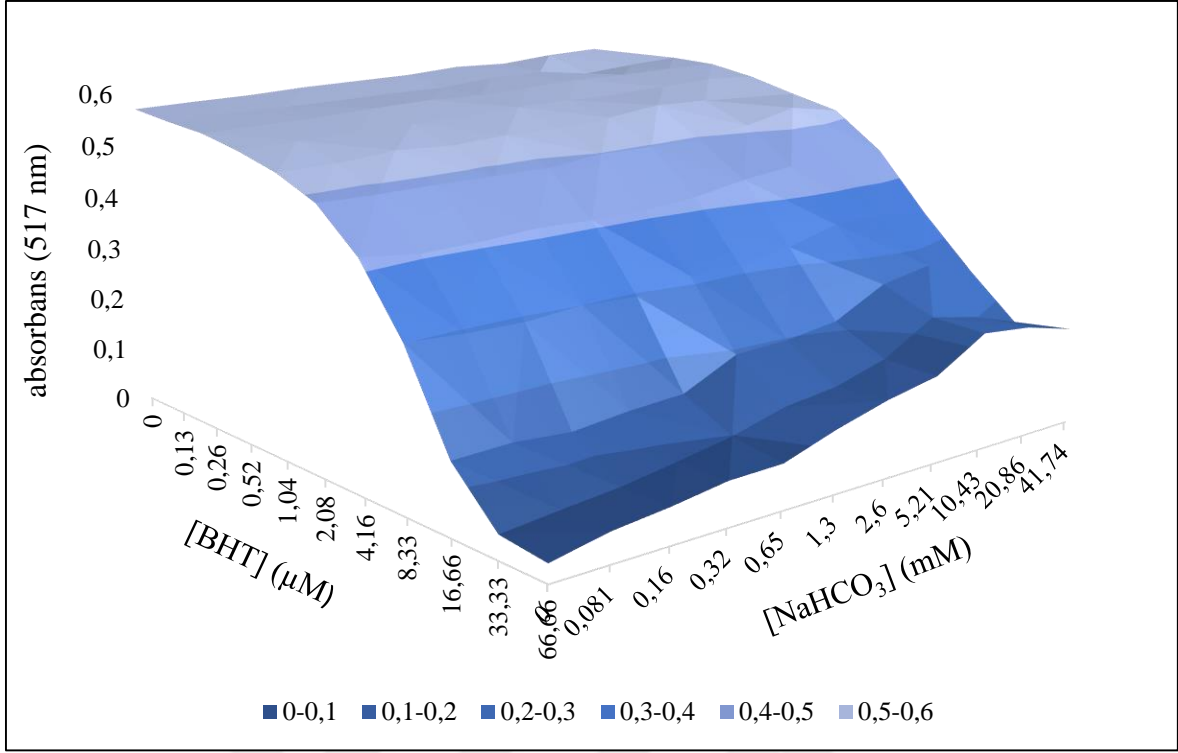
Şekil 66. C Vitamininin DPPH• ile reaksiyonunun farklı pH' da zamana bağlı takibi (kontrol eğrileri antioksidan yerine çözücüsü kullanılarak elde edildi).

### 3.2.4.3. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

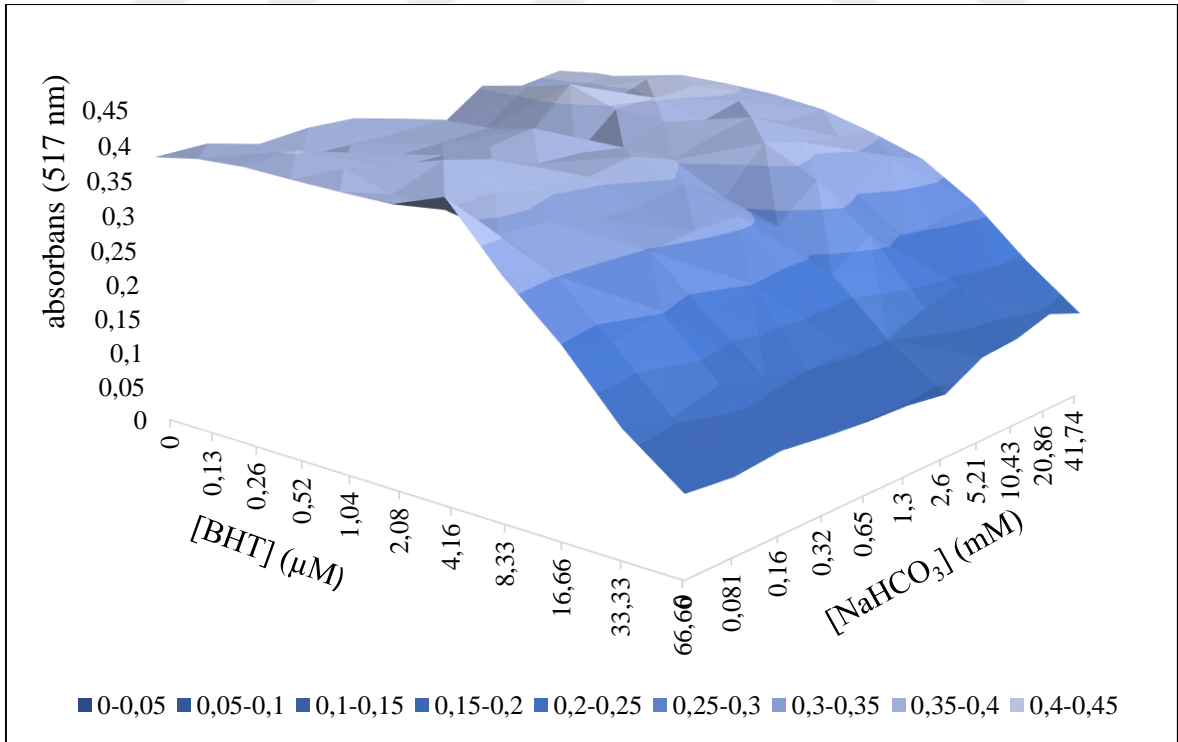
100  $\mu\text{M}$  DPPH• çözeltisi metanolde hazırlandı. Son konsantrasyonu en yüksek 41,74 mM olacak şekilde  $\text{NaHCO}_3$  çözeltisi hazırlandı ve bu çözülden 1:1 oranında seyreltilerek on bir farklı konsantrasyon hazırlandı. Antioksidan olarak BHT ve Troloks kullanıldı. Tampon konsantrasyonunun antioksidan-DPPH• etkileşimine etkisi farklı antioksidan konsantrasyonlarında farklılık gösterebileceğinden bu antioksidanların  $\text{SC}_{50}$  değerleri ortaya gelecek şekilde seri seyreltme ile on bir farklı konsantrasyonu hazırlanarak çalışıldı. Bu oluşturulan yöntem pH 2, pH 7 ve pH 10 için tek tek uygulandı. BHT için pH 10'da çalışılırken BHT en yüksek son konsantrasyonu 26,7  $\mu\text{M}$  olacak şekilde seyreltme yapıldı. Diğer durumlarda antioksidanların en yüksek son konsantrasyonu 66,66  $\mu\text{M}$  olacak şekilde seyreltme yapılarak çalışıldı. 750  $\mu\text{L}$  DPPH•, 650  $\mu\text{L}$  tampon ve 100  $\mu\text{L}$  antioksidan olacak şekilde pipetlemeler yapıldı. 50 dakika sonra 517 nm de absorbanslar ölçülerek absorbans – antioksidan konsantrasyonu – tampon konsantrasyonu 3 boyutlu grafikleri elde edildi (Şekil 67 - 72).



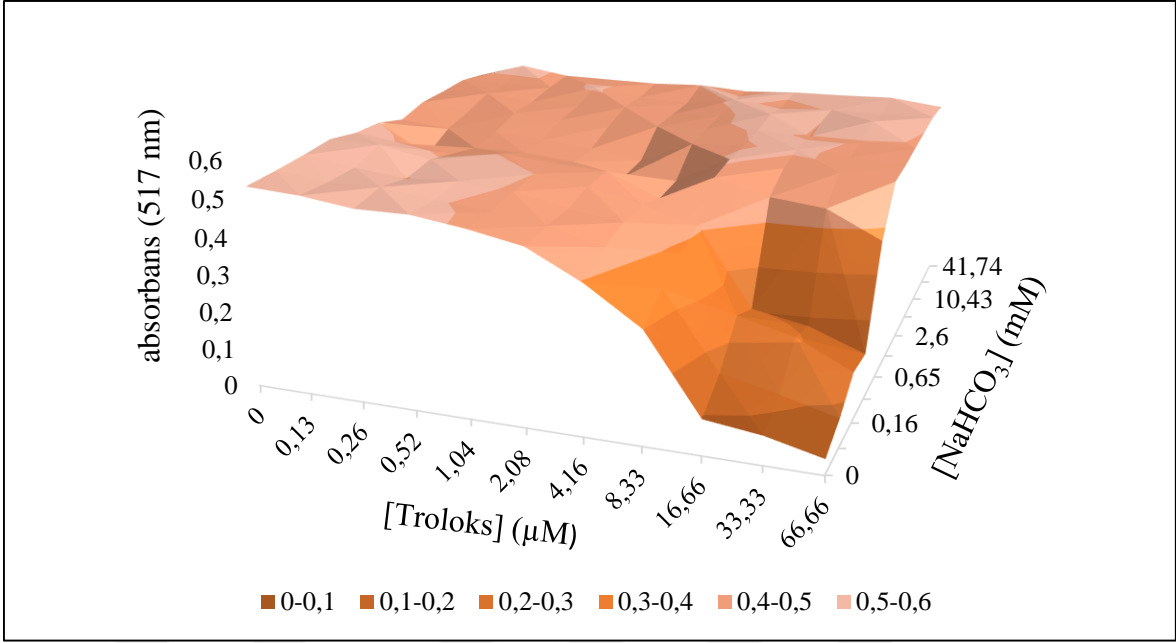
Şekil 67. pH 10' da tampon konsantrasyonu - BHT konsantrasyonu – absorbans grafiği



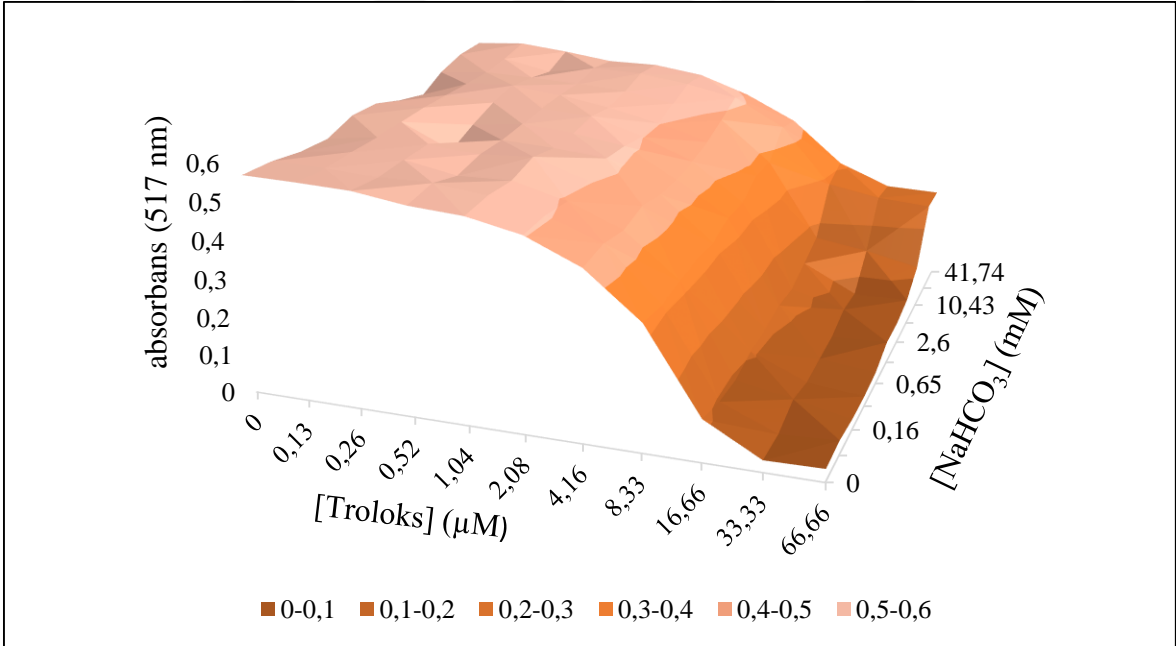
Şekil 68. pH 7' de da tampon konsantrasyonu - BHT konsantrasyonu – absorbans grafiği



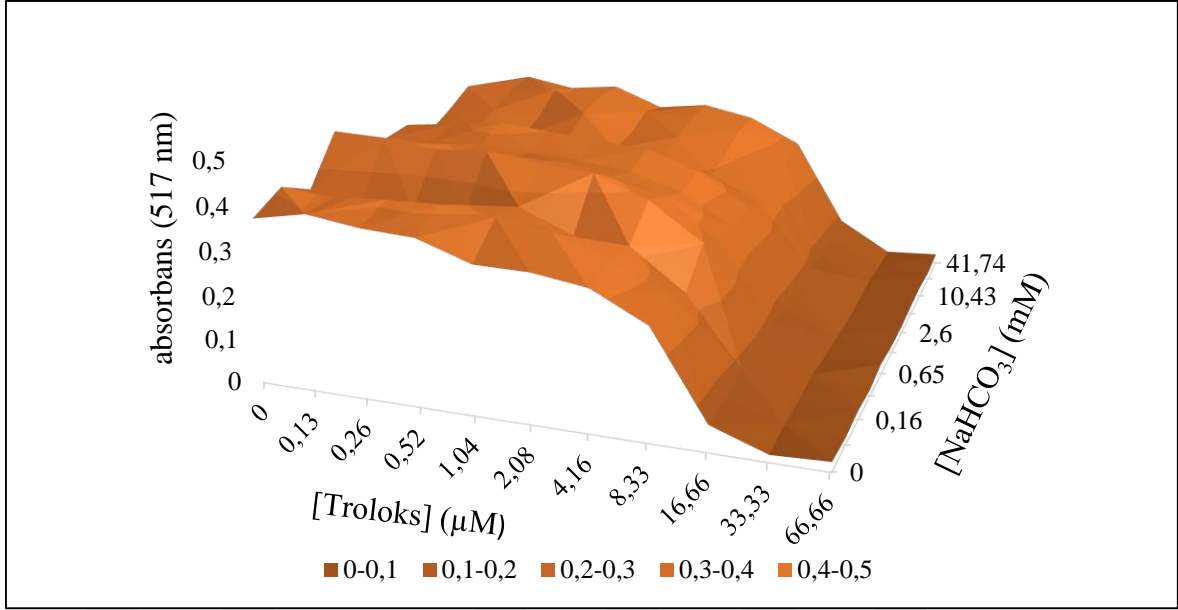
Şekil 69. pH' 2 de da tampon konsantrasyonu - BHT konsantrasyonu – absorbans grafiği



Şekil 70. pH 10' da tampon konsantrasyonu - Troloks konsantrasyonu – absorbans grafiği



Şekil 71. pH 7' de tampon konsantrasyonu - Troloks konsantrasyonu – absorbans grafiği



Şekil 72. pH 2’ de tampon konsantrasyonu - Troloks konsantrasyonu – absorbans grafiği

#### 3.2.4.4. Antioksidan-DPPH•-Tampon Karışımlarında pH’ nın Takibi

Antioksidan - DPPH• - tampon etkileşimi ortamında pH’ daki değişikliğin takibi yapıldı. Ortama eklenen tamponların pH’ sı ve ölçülen pH tablo 9’deki gibidir.

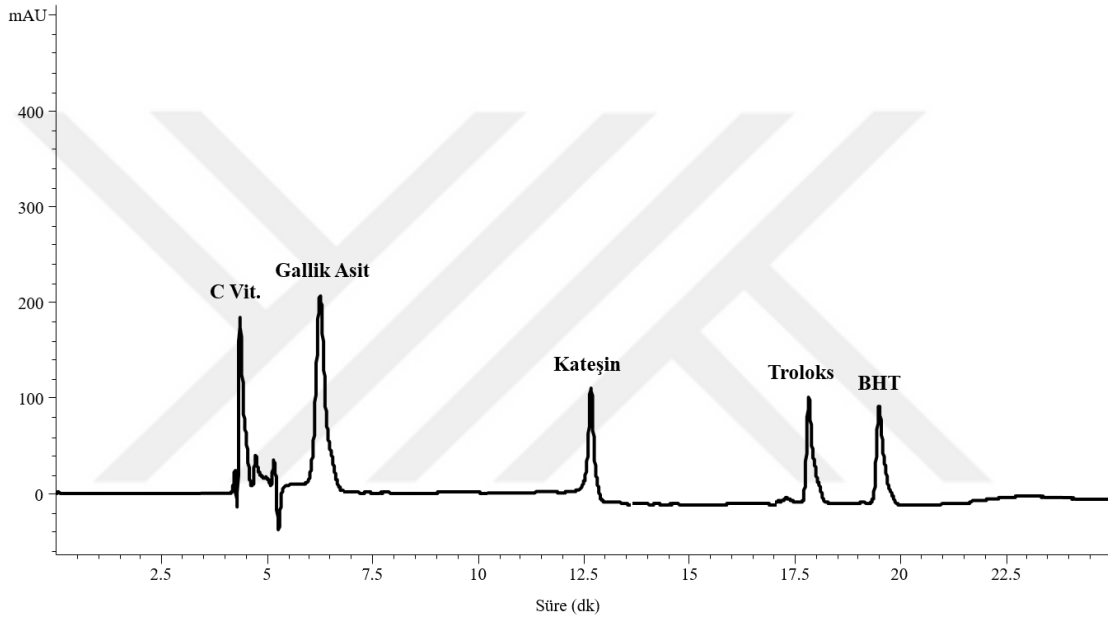
Tablo 9. Antioksidan – DPPH• karışımlarında ölçülen pH

Tampon pH’sı →	2.00	7.00	10.00
Antioksidan	Ölçülen pH		
BHT	2,80	8,10	10,00
Troloks	2,80	8,00	10,00
C Vitamini	2,80	8,00	9,80
Gallik asit	2,80	8,10	10,04
Kateşin	2,70	8,20	10,00
Metanol (kör)	3,00	8,00	10,00

### 3.3. Antioksidanların Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi

#### 3.3.1. Beş Antioksidan Standardın HPLC Analizi

BHT, Troloks, C vitamini, gallik asit ve kateşinin her birinin son konsantrasyonu 500  $\mu$ M olacak şekilde 5'li karışım hazırlandı ve HPLC şartlarında yürütme yapıldı ve alıkonma zamanları belirlendi (Şekil 73).

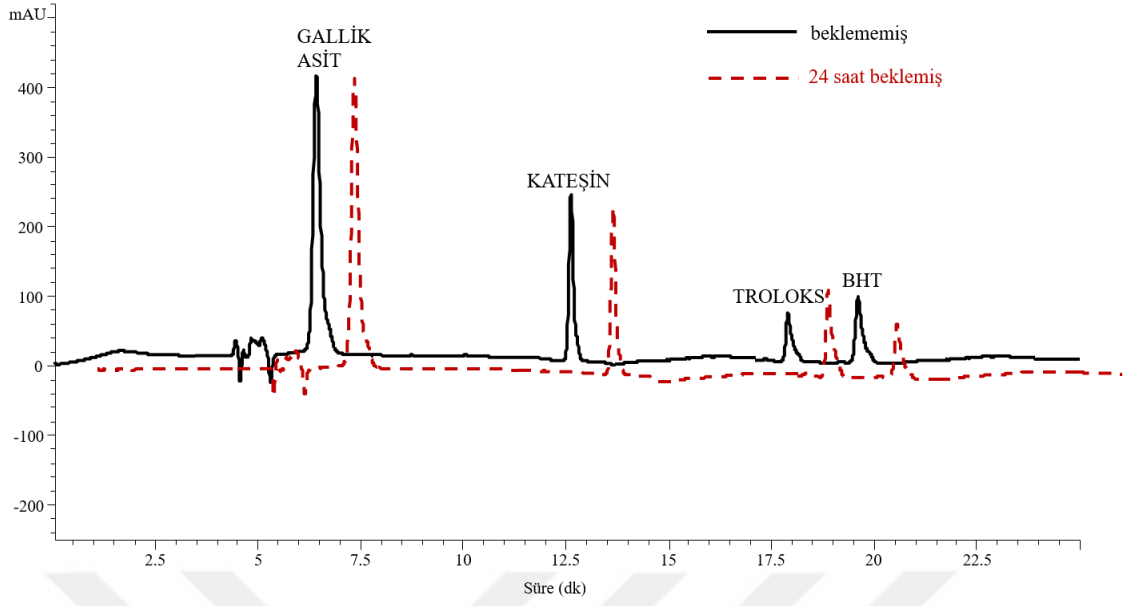


Şekil 73. 5'li antioksidan karışımının HPLC kromatogramı (280 nm)

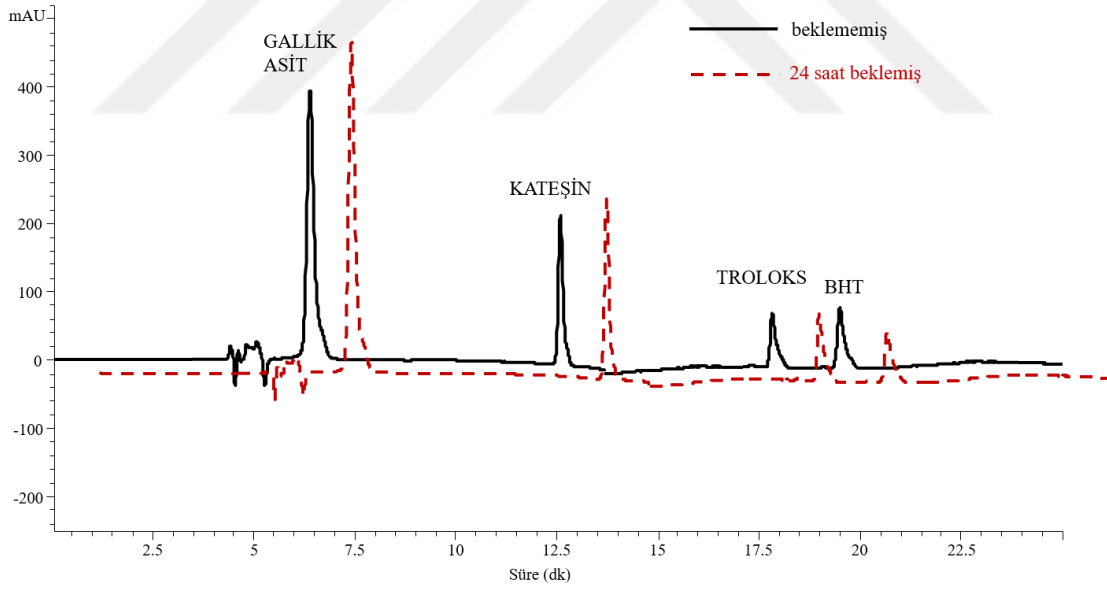
#### 3.3.2. Antioksidanların Farklı pH' larda Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi

2 mM NaHCO<sub>3</sub> çözeltisi pH 2, 7 ve 10'a ayarlandı. 5'li standart antioksidan karışımı farklı pH' lardaki tamponlarla karıştırıldı. Beklemeden ve 24 saat bekletilerek son konsantrasyonları 500  $\mu$ M olacak şekilde HPLC analizleri yapılarak 280 nm' deki kromatogramları elde edildi (Şekil 74 - 76). Kromatogramlardan elde edilen pik alanı verileri beklemeyle meydana gelen değişikliklerin tespitinde kullanıldı.

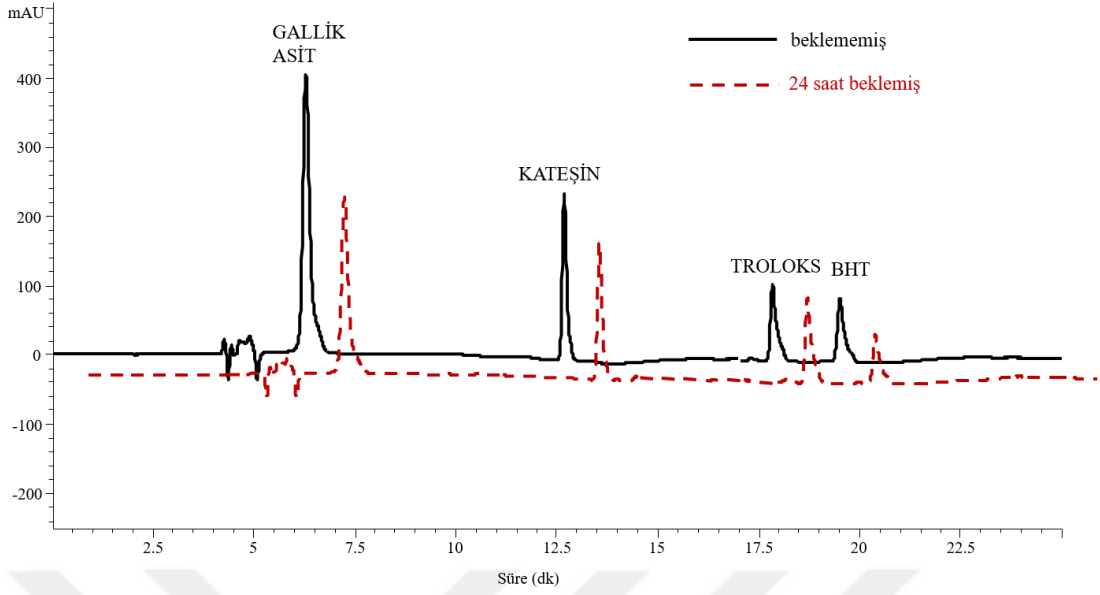




Şekil 74. pH'sı 2 olan çözeltideki 5' li antioksidan karışımın 280 nm de HPLC kromatogramları



Şekil 75. pH'sı 7 olan çözeltideki 5' li antioksidan karışımın 280 nm de HPLC kromatogramları



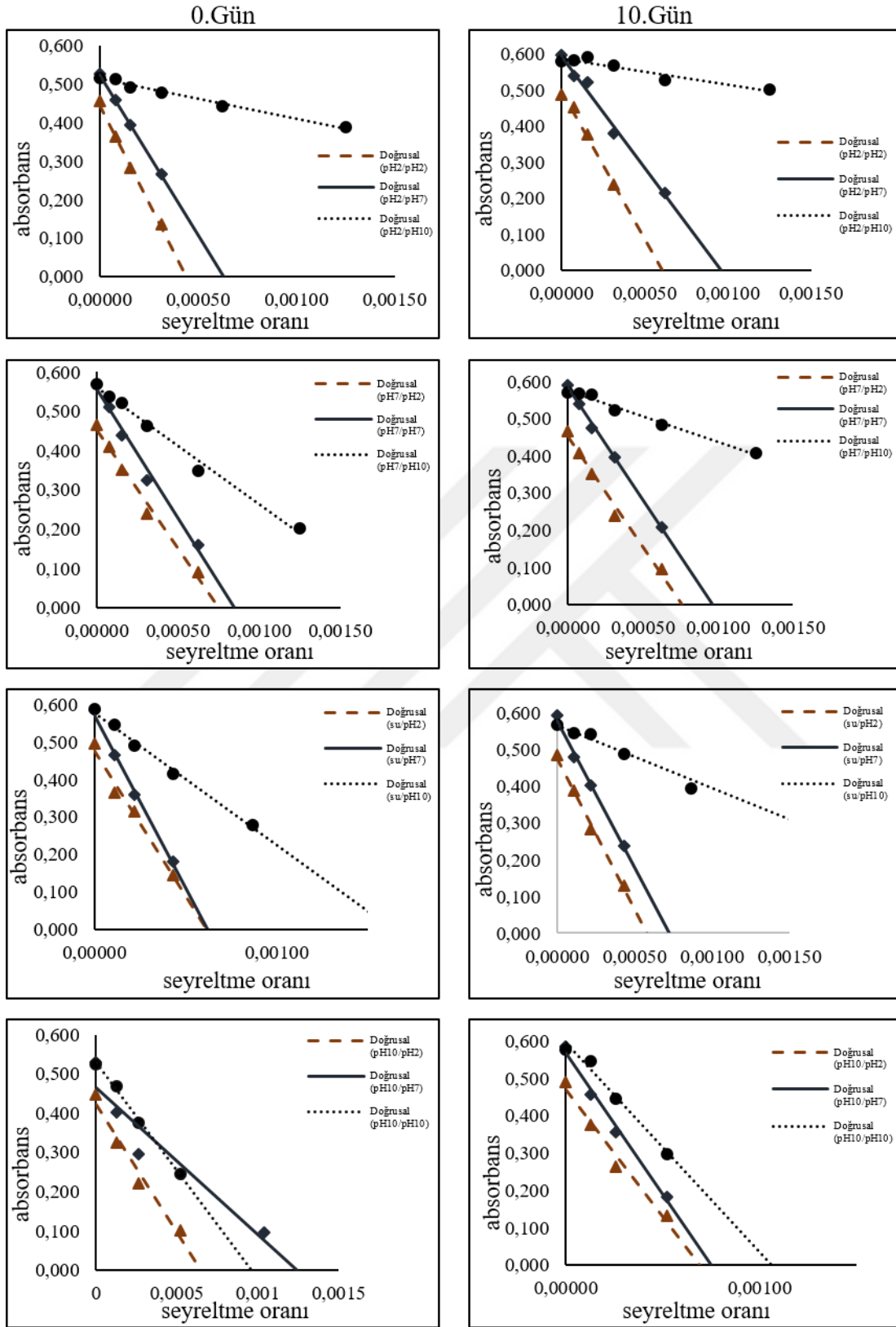
Şekil 76. pH' sı 10 olan çözeltideki 5' li antioksidan karışımın 280 nm de HPLC kromatogramları

### 3.4. Yeşil Çay ile Farklı pH' larda Çalışmalar

#### 3.4.1. Yeşil Çay Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri

##### 3.4.1.1. DPPH• Giderim Testi

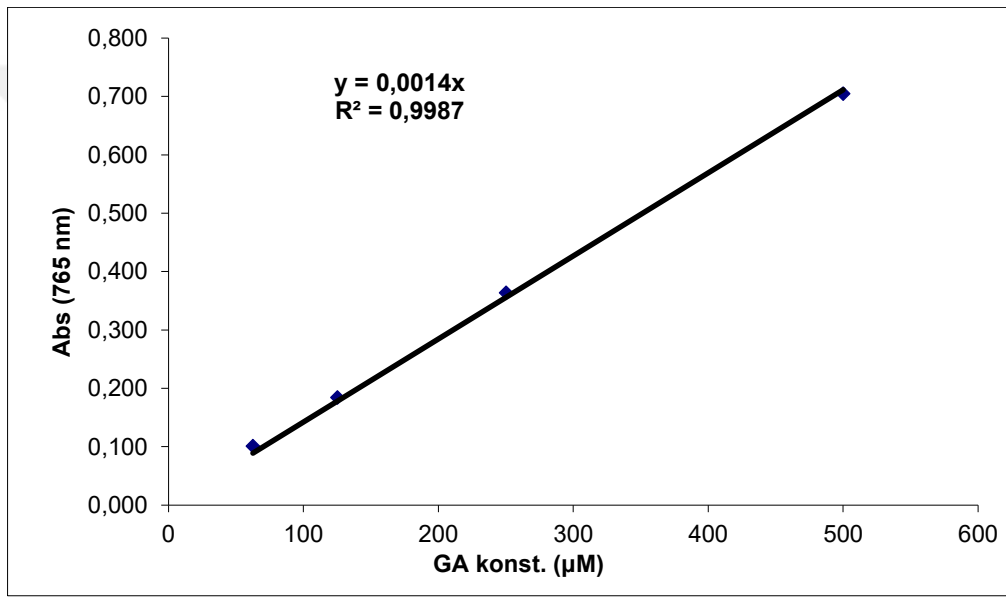
Tez çalışmalarının yeşil çayla yapılan bu kısmında farklı pH' larda elde edilen ekstraktlar hazırlandığı gibi DPPH• giderim testi ile çalışıldı. Her bir pH' da elde edilen ekstrakt pH' sı 2, 7 ve 10' a ayarlandıktan sonra DPPH• giderim testi yapıldı. Daha sonra ekstraktlar +4 °C de buzdolabında 10 gün bekletildikten sonra DPPH• giderim testleri tekrar yapıldı. Böylece dört farklı ekstraktan hazırlanan 12 karışımda bekleme sürecinde aktivitenin nasıl etkilendiği incelendi. Hesaplamalarda üç paralelin ortalaması alınarak kör değerleri toplamı bu ortalamadan çıkarıldı. SC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi amacıyla ölçülen absorbanlar seyrelme oranlarına karşı grafiğe geçirildi (Şekil 77).



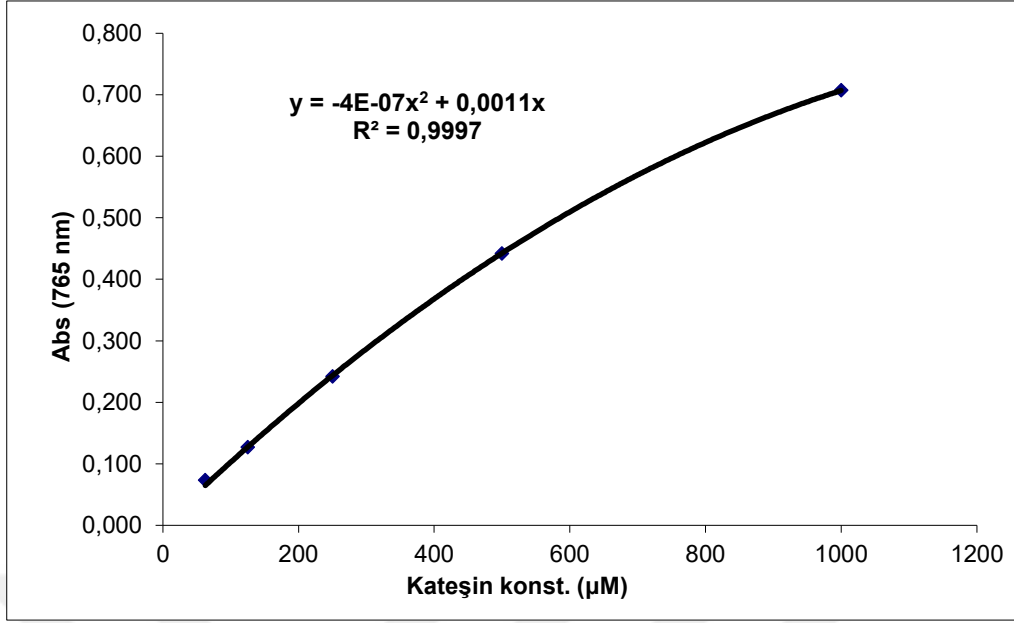
Şekil 77. Yeşil çaydan su ve 3 farklı pH' da tamponlu ortamda elde edilen ekstraktlardan pH' ları 2, 7 ve 10'a ayarlanarak hazırlanan karışımların seyrelme oranı - absorbans (517 nm) grafikleri (Göstergedeki eğrilere ait ilk pH ekstraksiyon, ikincisi ise inkübasyon pH'sını belirtmektedir).

### 3.4.1.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı

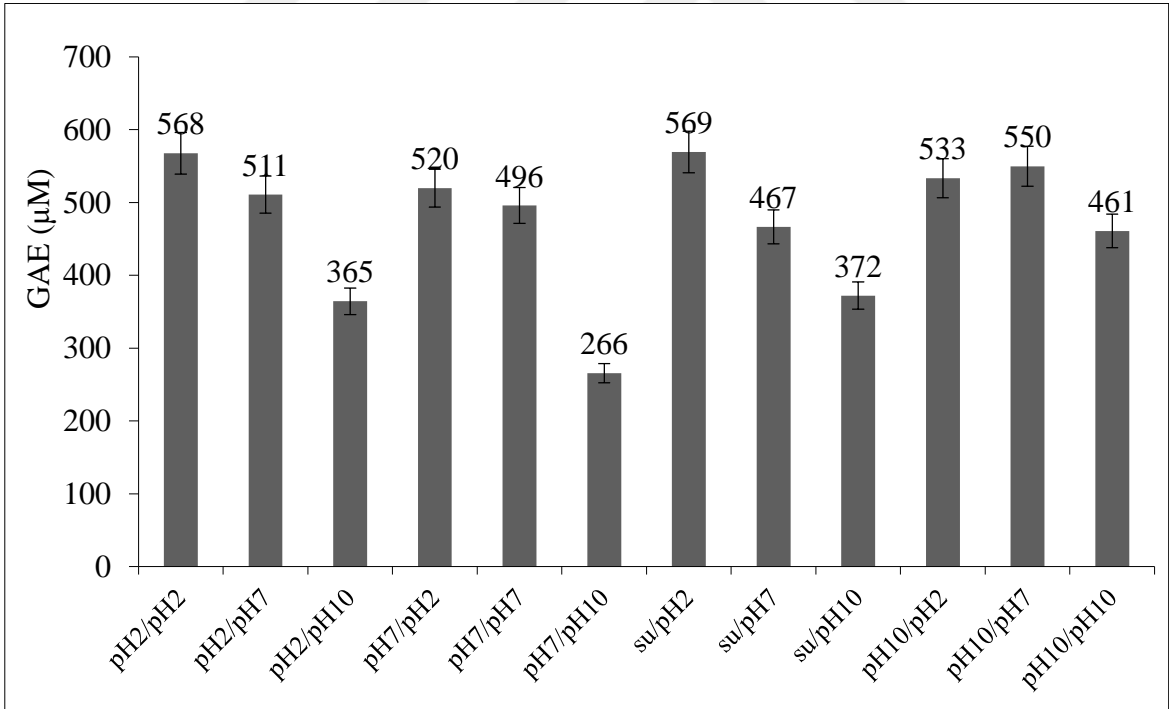
Tüm numuneler  $\frac{1}{4}$  oranında seyrettilerek çalışıldı. Hesaplamalarda üç paralelin ortalaması alınarak kör değerleri toplamı bu ortalamadan çıkarılıp, elde edilen verilerle değerlendirme yapıldı. Toplam fenolik madde miktarlarının hesaplanmasında gallik asit ve kateşin standartları ile hazırlanan kalibrasyon grafikleri kullanıldı (Şekil 78 - 79). Ekstraktların toplam fenolik miktarları gallik asit eşdeğeri (GAE) ve kateşin eşdeğeri (KE) olarak ifade edilmiştir (Şekil 80 - 81).



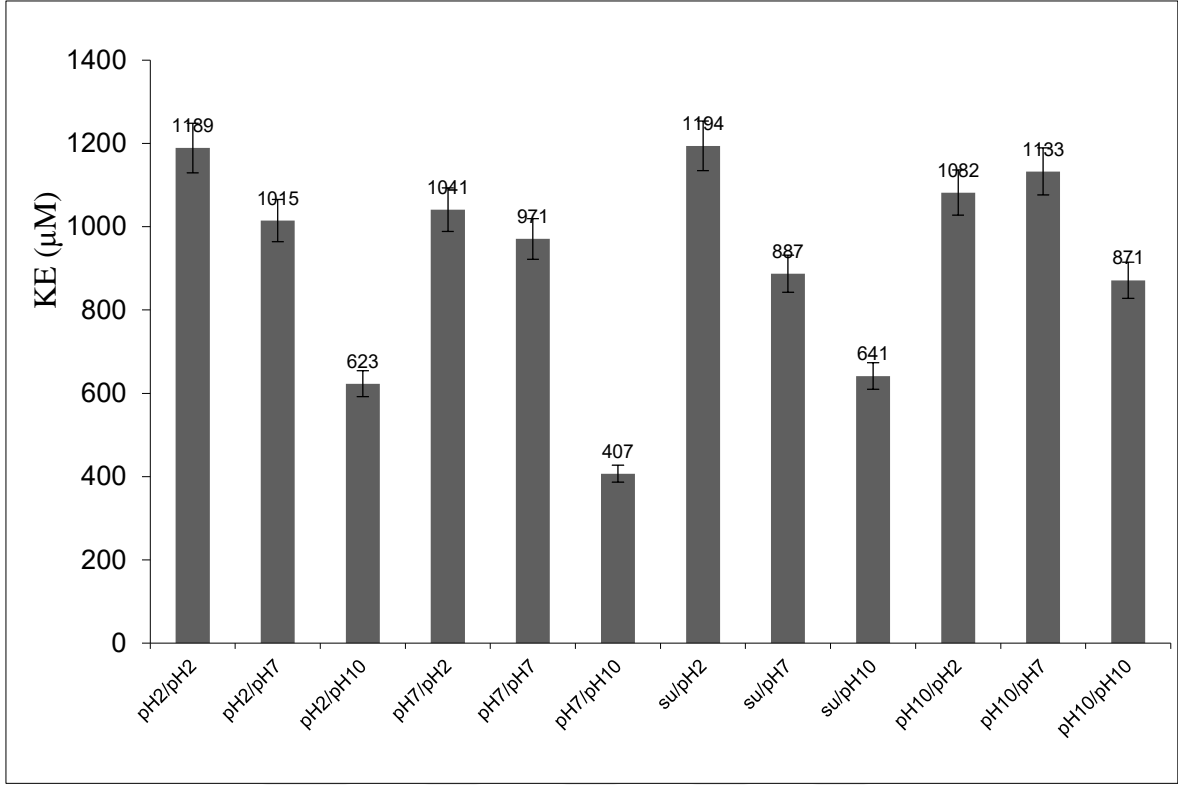
Şekil 78. Toplam fenolik madde miktarı belirlenmesinde kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiği



Şekil 79. Toplam fenolik madde miktarı belirlenmesinde kullanılan kateşin kalibrasyon grafiği



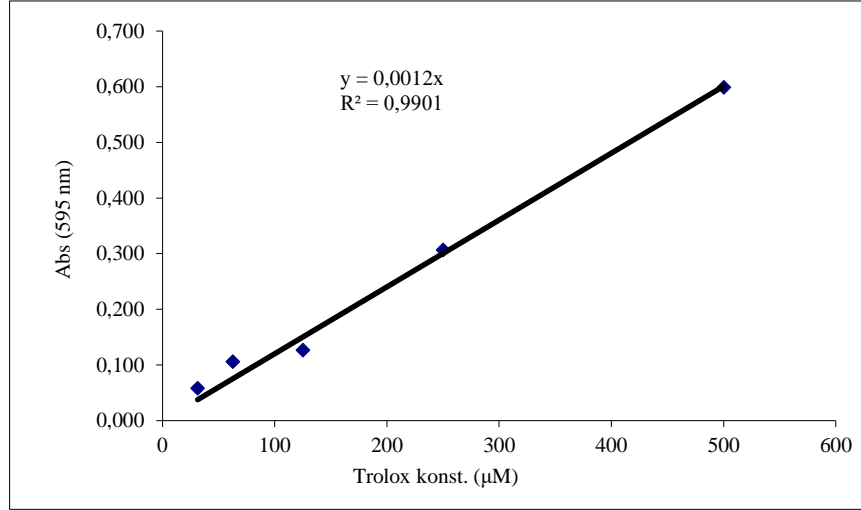
Şekil 80. Yeşil çay ekstraktlarının gallik asit eşdeğeri (GAE) olarak toplam fenolik madde miktarı



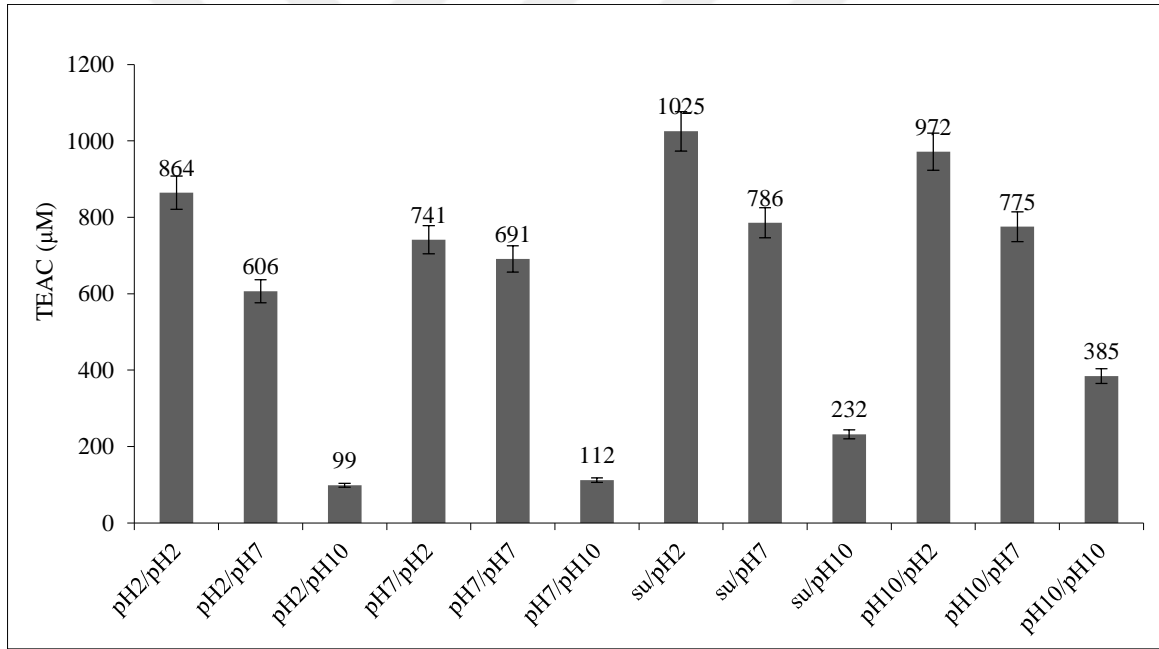
Şekil 81. Yeşil çay ekstraktlarının kateşin eşdeğeri (KE) olarak toplam fenolik madde miktarı

### 3.4.1.3. Demir İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP)

Yeşil çay numuneleri 1/32 oranında seyreltilerek kullanılmıştır. Her bir numune ve standart konsantrasyonu için üç paralel çalışılmıştır. Hesaplamalarda Troloks' un üç paralelinin ortalaması alınarak kör değerleri toplamı bu ortalamadan çıkarılmış, elde edilen verilerle Microsoft Excel programında grafik çizilmiştir. Bu yöntemde, artan absorbans değeri artan antioksidan gücünü göstermektedir. FRAP değeri, numune absorbansının karşılık geldiği µM Troloks eşdeğer konsantrasyonu (µM TEAC) olarak gösterilmiştir.



Şekil 82. Troloksun FRAP aktivitesi

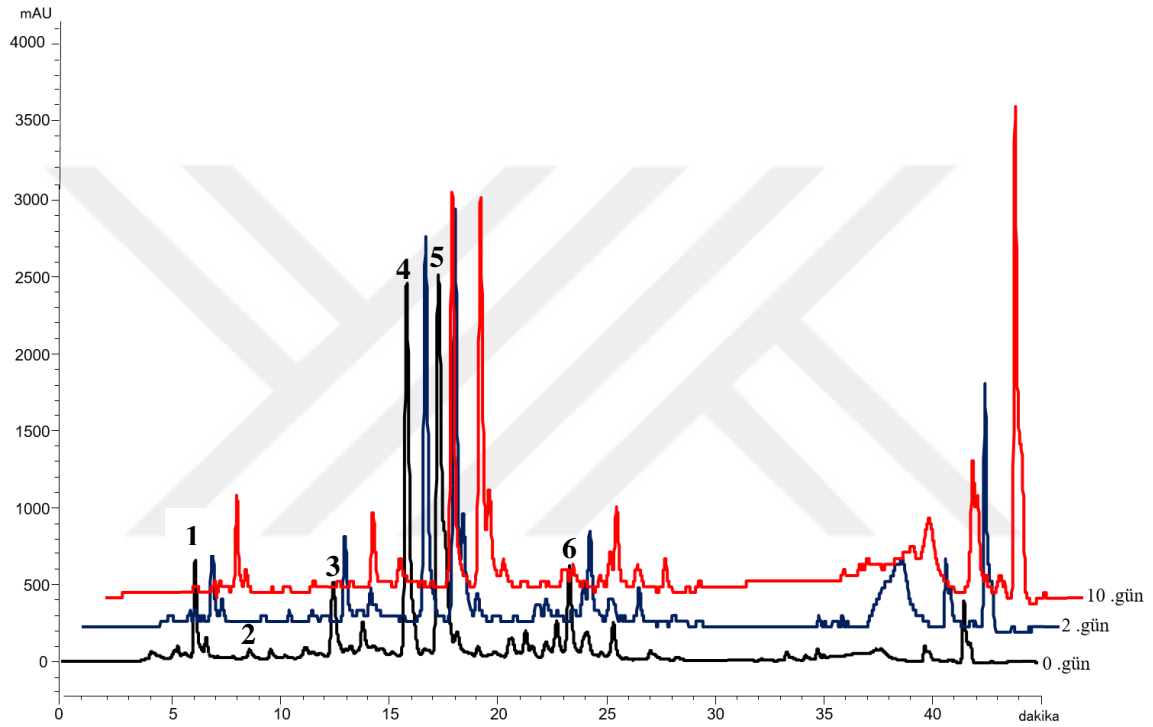


Şekil 83. Yeşil çay ekstraktlarının TEAC eşdeğeri olarak antioksidan güçleri

#### 3.4.1.4. On-line HPLC-FRAP Analizi

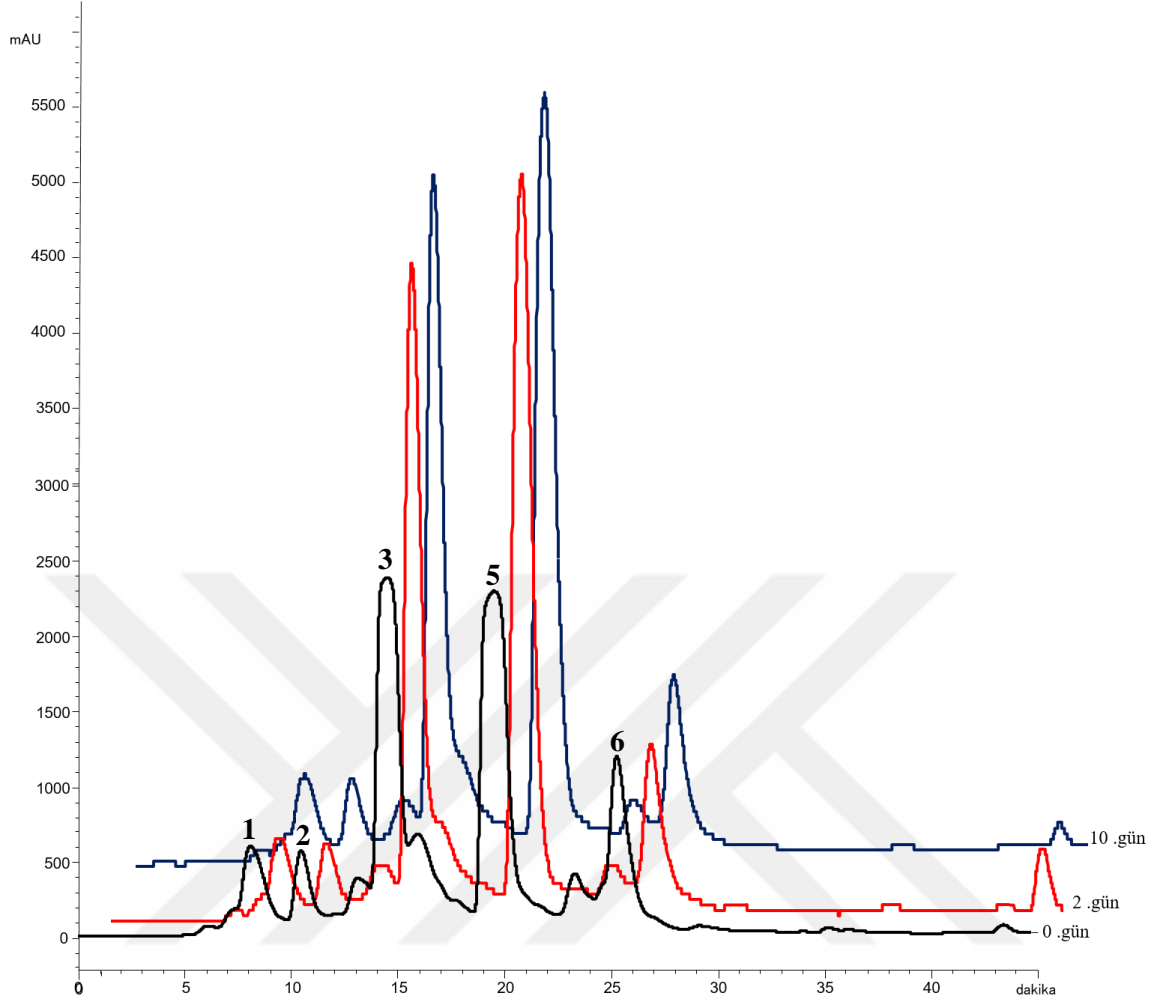
Ekstraktların doğrudan ve her bir pH' ya ayarlanmış hallerinin ilk gün, 2. gün ve 10. günde on-line HPLC-DAD-FRAP yöntemiyle analizleri yapıldı. 280 ve 595 nm'de elde

edilen kromatogramlar bileşen belirlenmesi ve bu bileşenlerin FRAP aktiviteleri açısından değerlendirilmelerini yapmak amacıyla kullanıldı (Şekil 84 -107). HPLC uygulamasında hareketli faz akış hızı 0,7 mL/dk, ortama eklenen FRAP çözeltisinin akış hızı ise 0,3 mL/dk olacak şekilde çalışıldı. 595 nm kromatogramları, kolonda ayırım sonrası FRAP reaktifi eklenmesi ve reaksiyon sarmalında geçen süre sonunda ikinci dedektörde (UV) absorbans ölçülerek elde edildi.

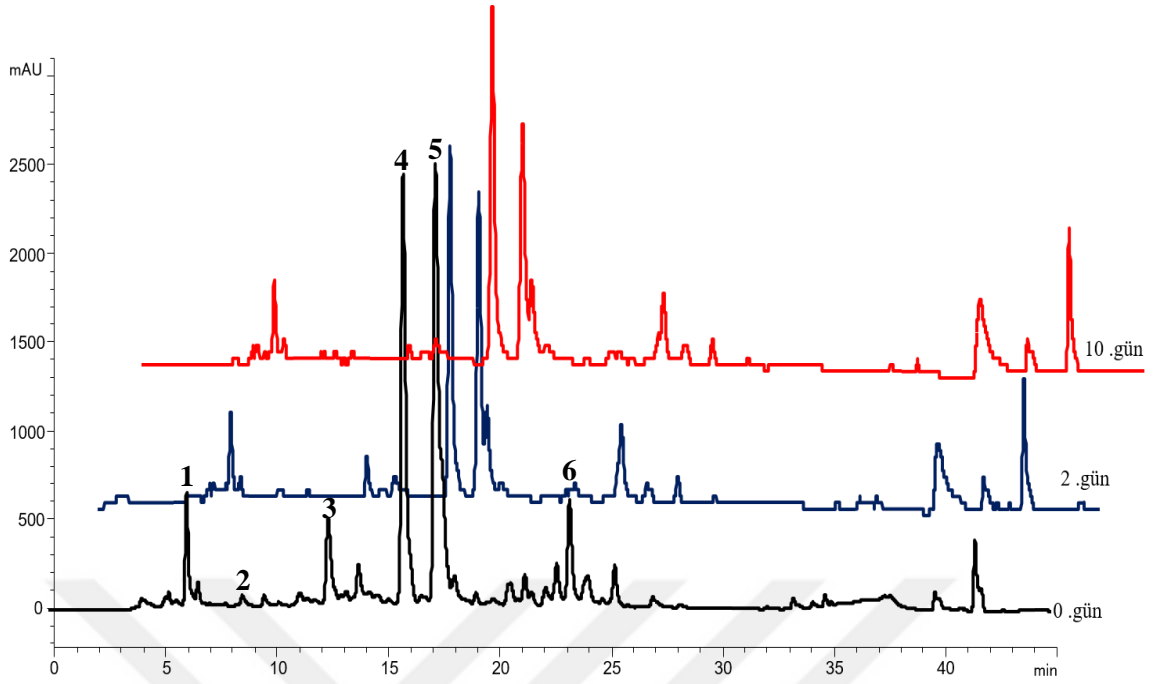


Şekil 84. pH 2 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)

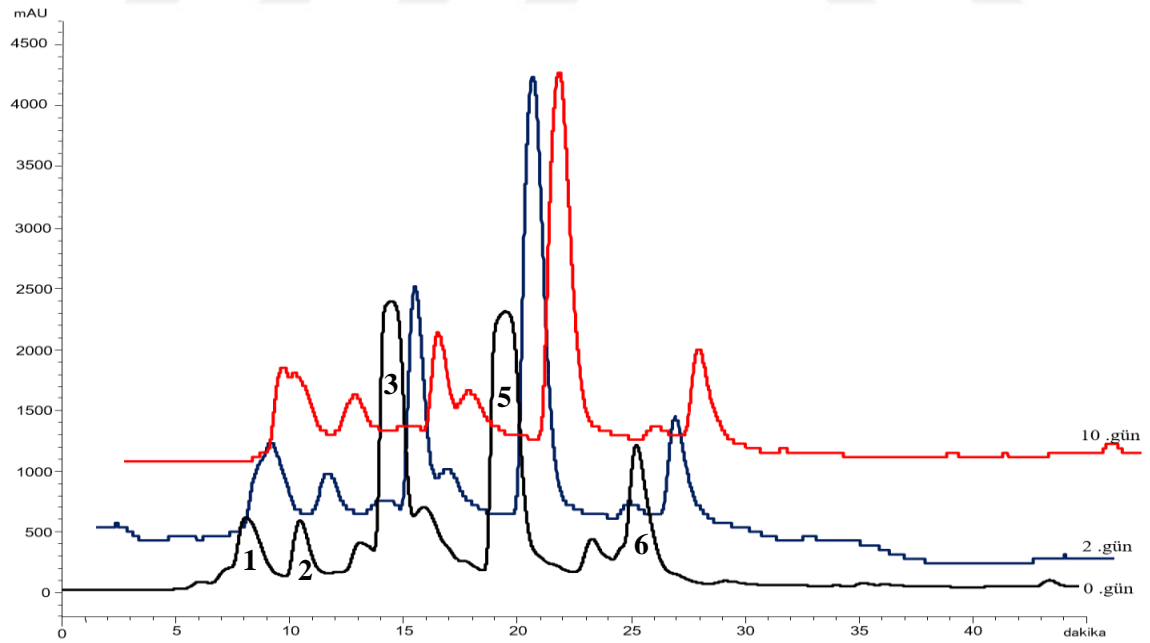




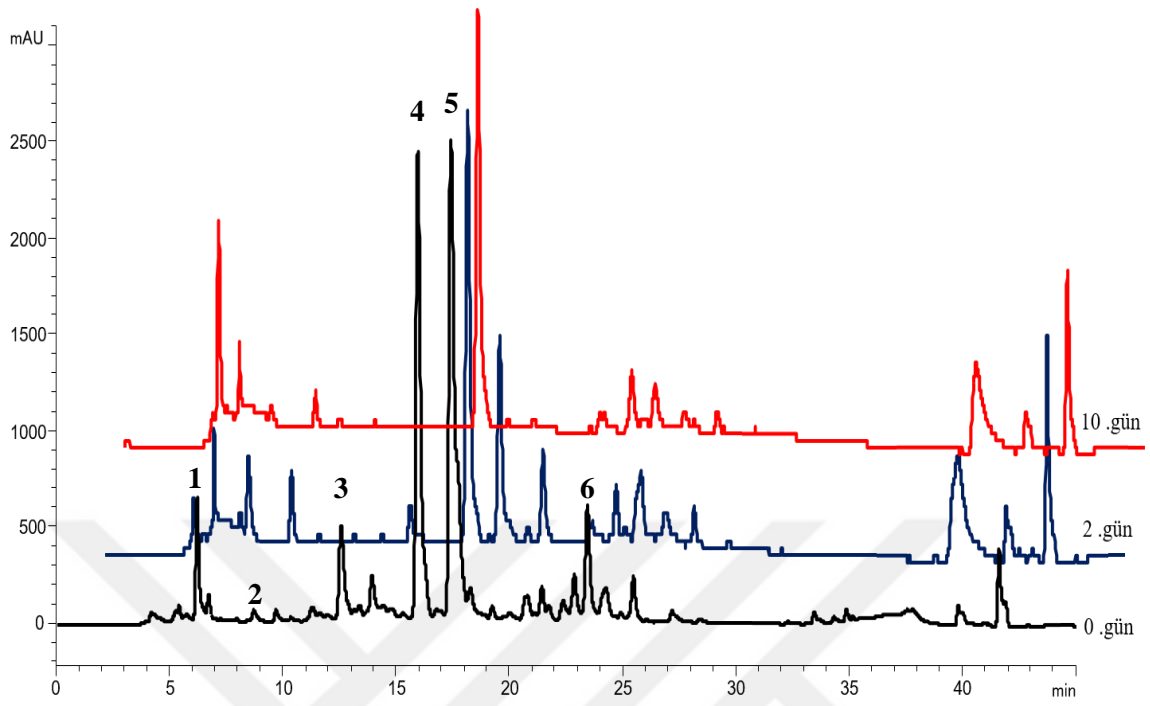
Şekil 85. pH 2 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]



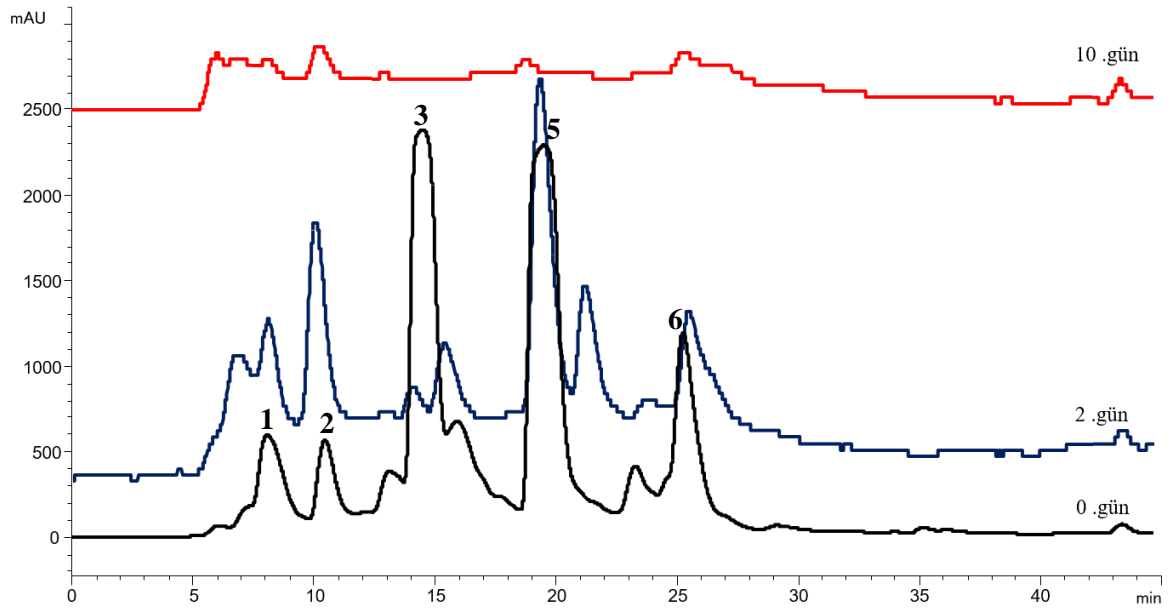
Şekil 86. pH 2 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



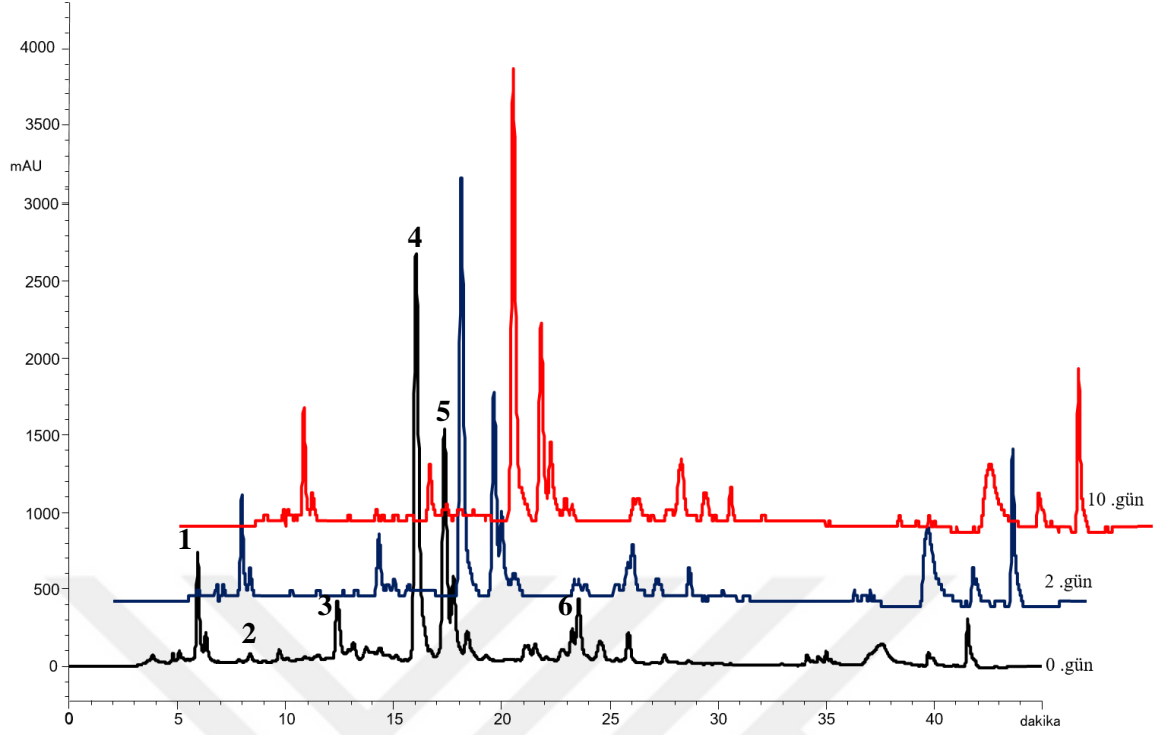
Şekil 87. pH 2 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]



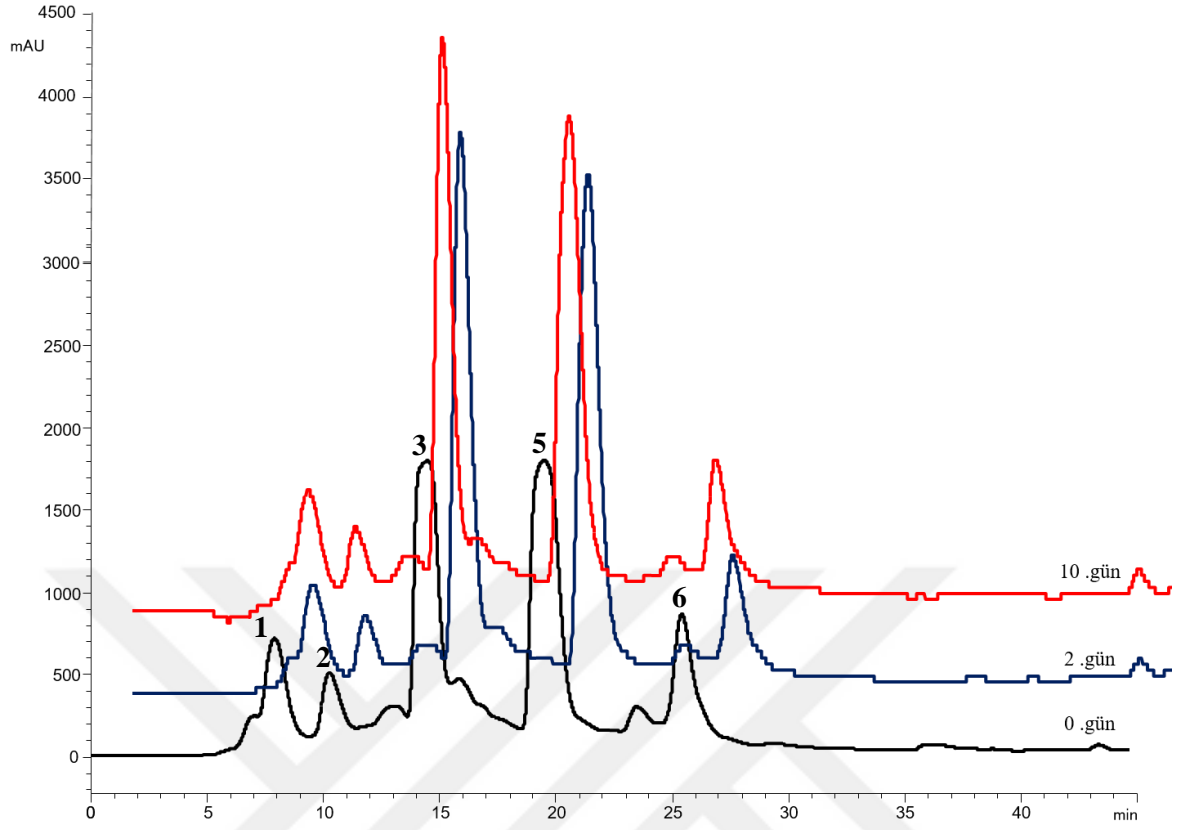
Şekil 88. pH 2 ekstraktının pH 10'a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



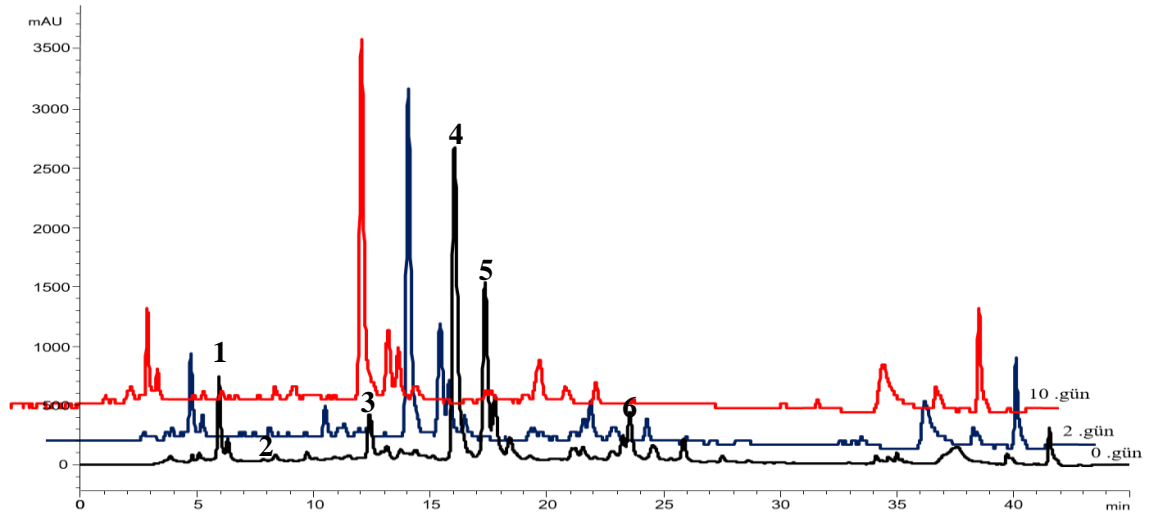
Şekil 89. pH 2 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]



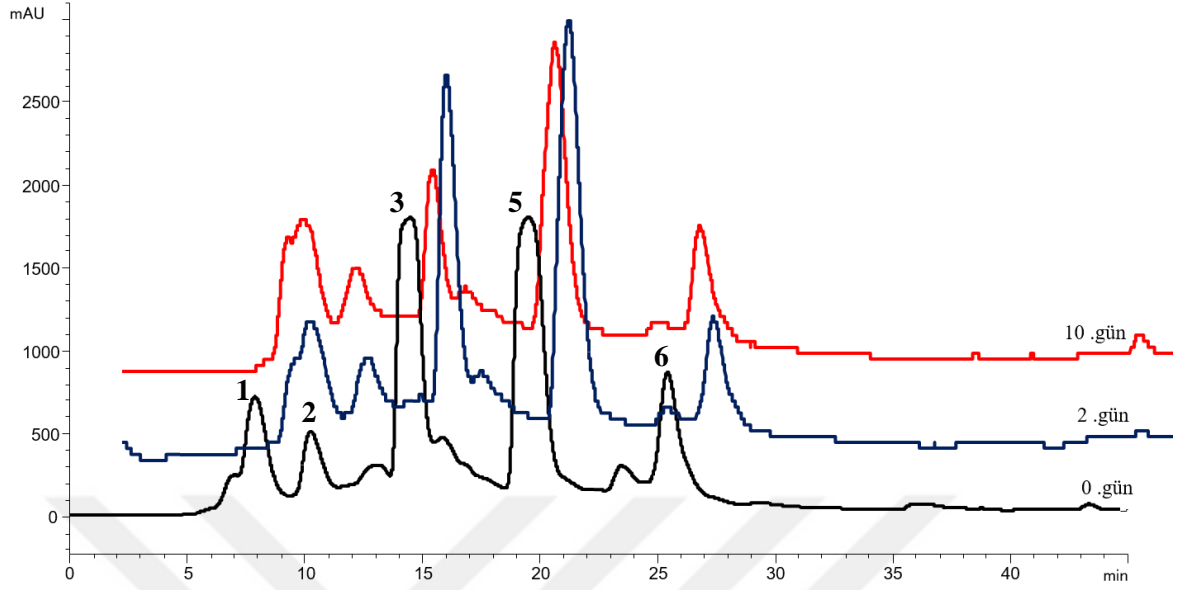
Şekil 90. pH 7 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



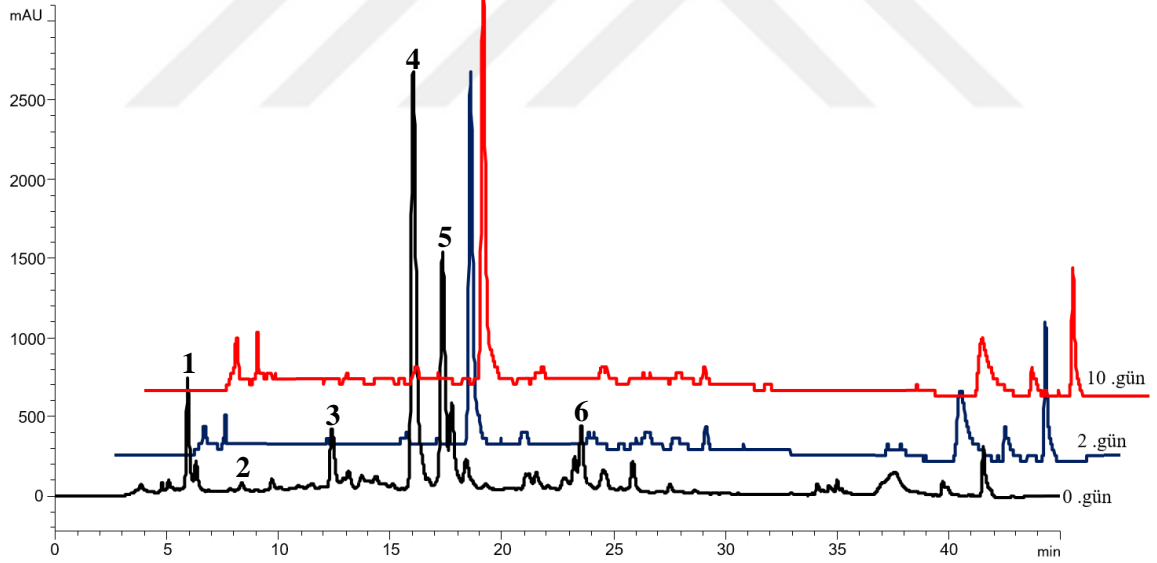
Şekil 91. pH 7 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallocateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallocateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]



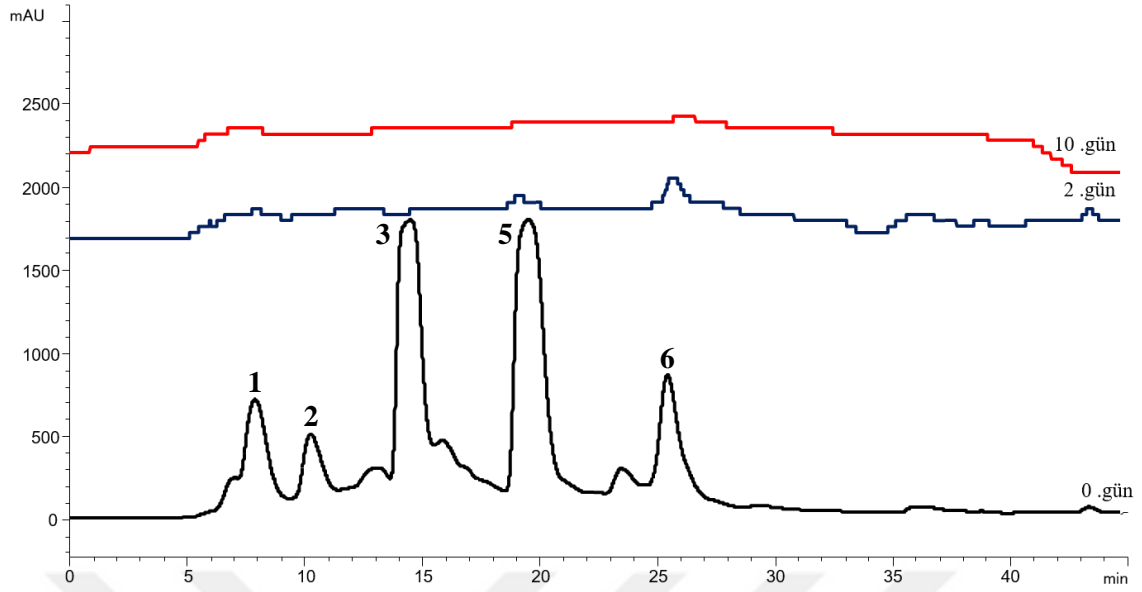
Şekil 92. pH 7 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallocateşin, 4: kafein, 5: epigallocateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



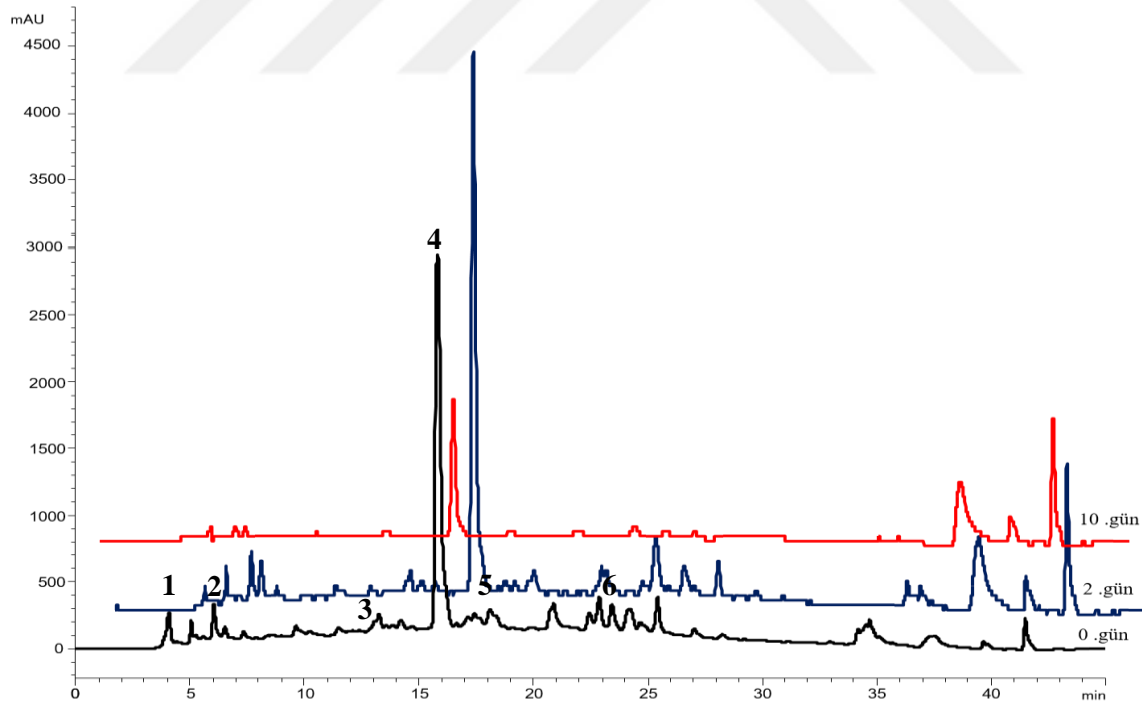
Şekil 93. pH 7 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]



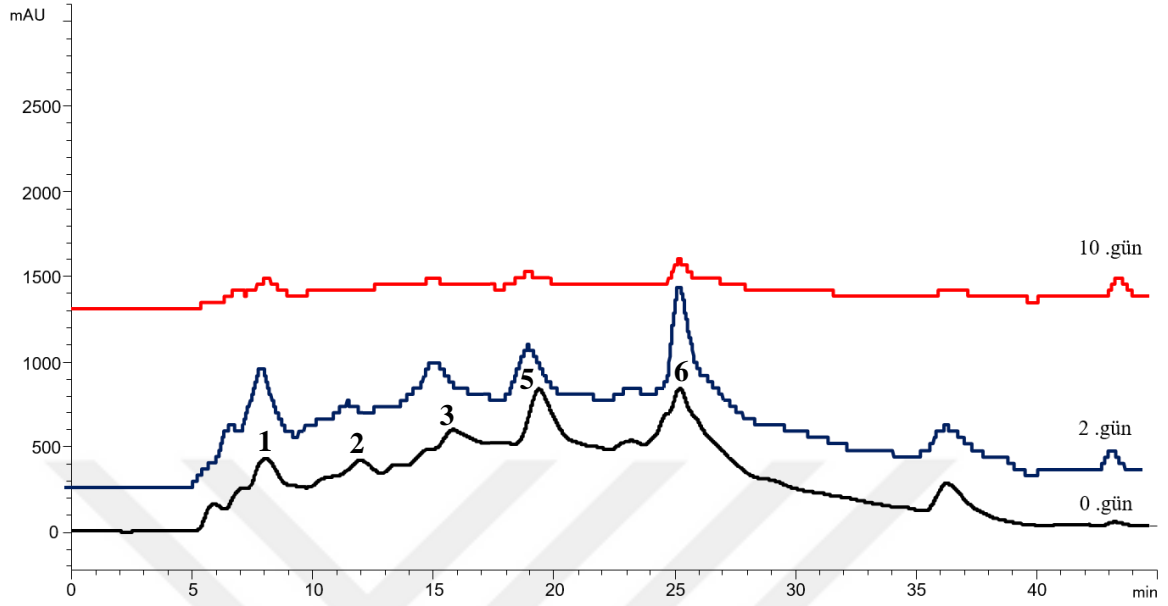
Şekil 94. pH 7 ekstraktının pH 10'a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



Şekil 95. pH 7 ekstraktının pH 10'a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]

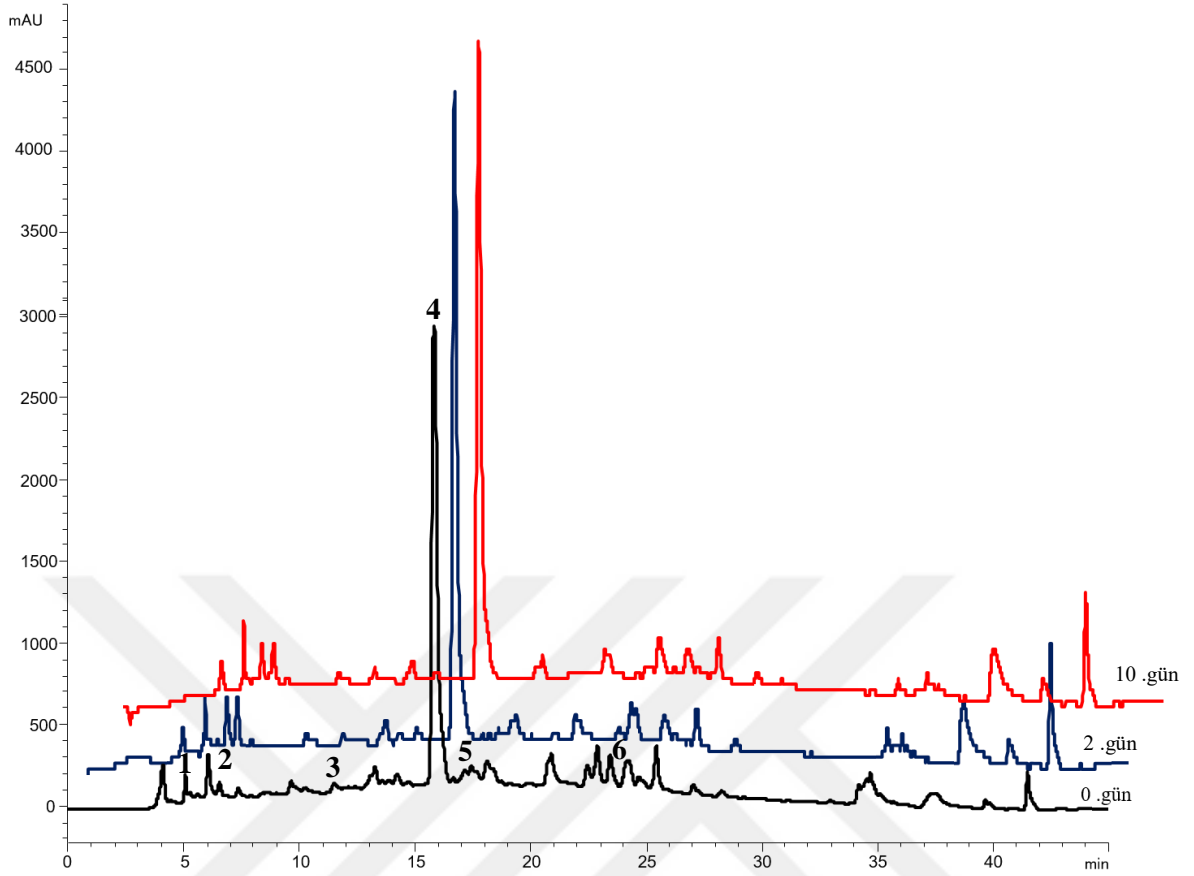


Şekil 96. pH 10 ekstraktının pH 2'ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)

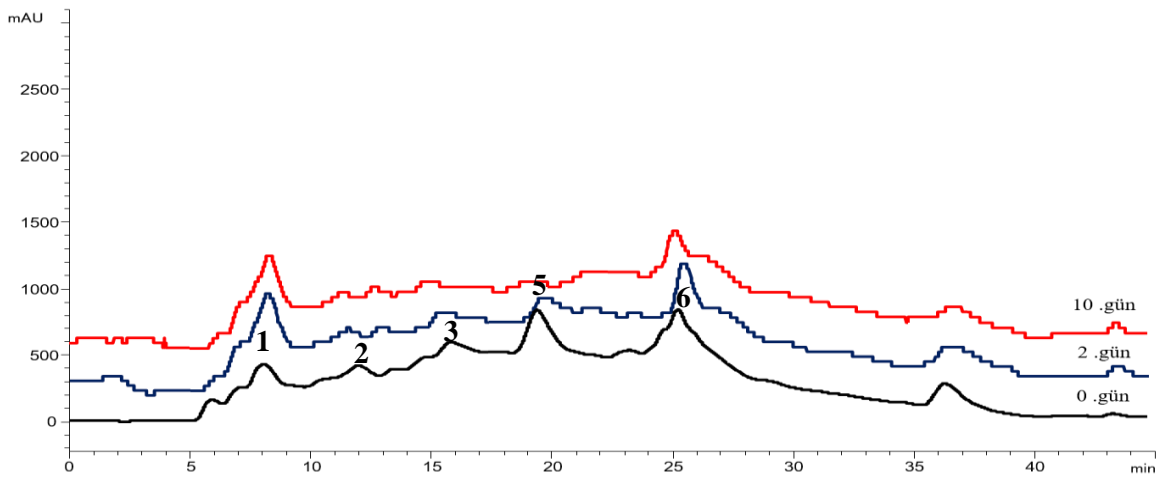


Şekil 97. pH 10 ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]

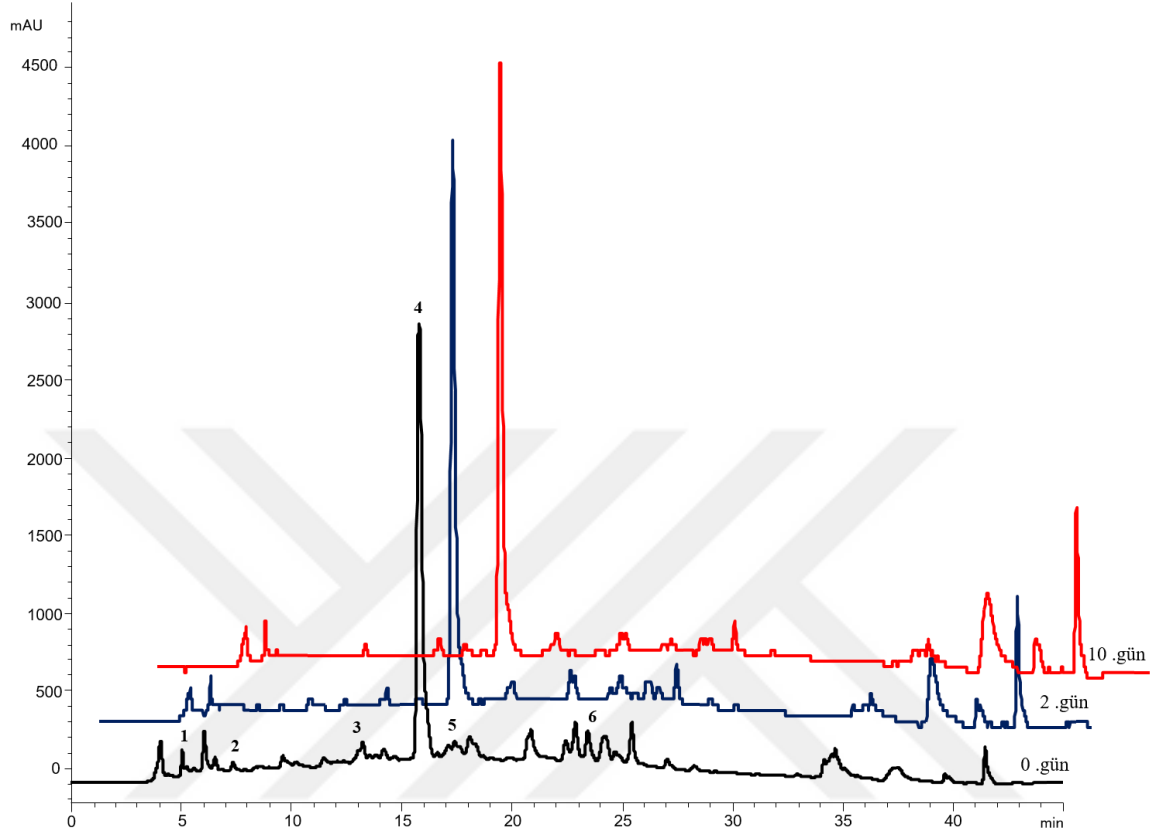




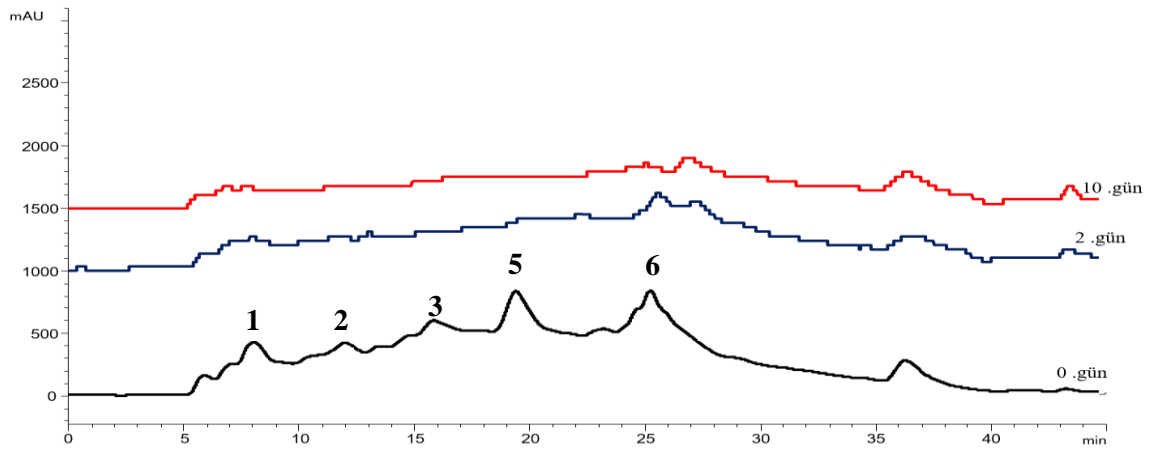
Şekil 98. pH 10 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



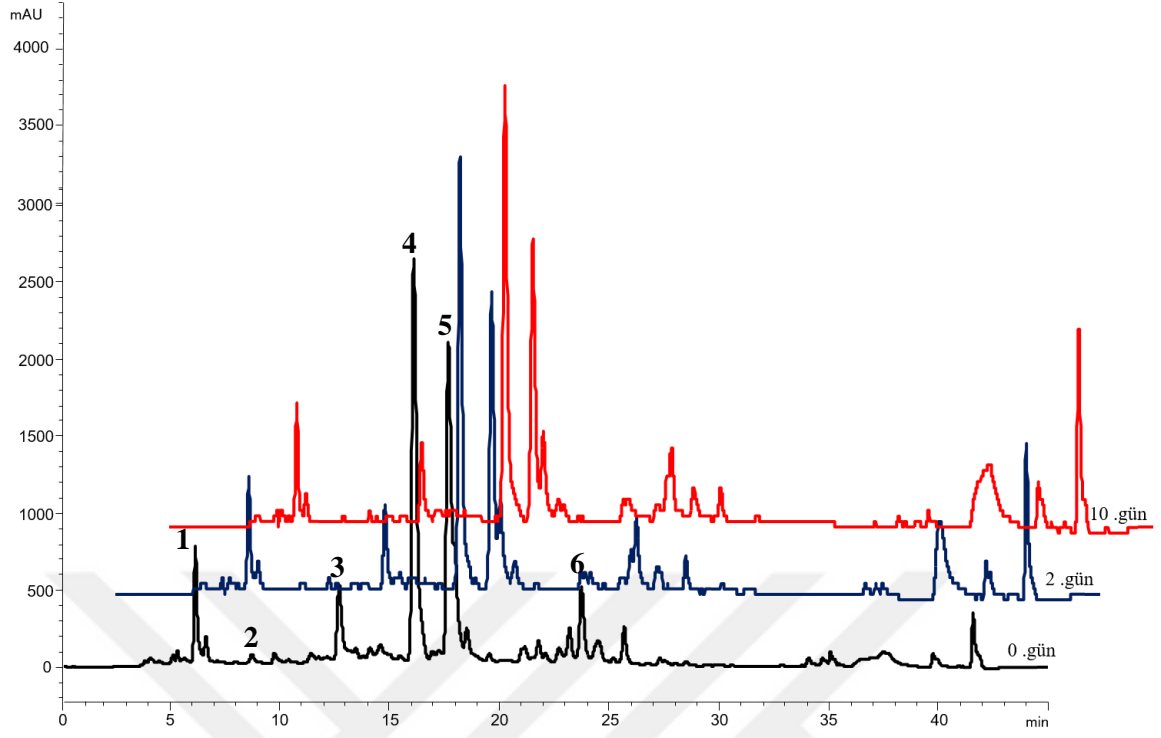
Şekil 99. pH 10 ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]



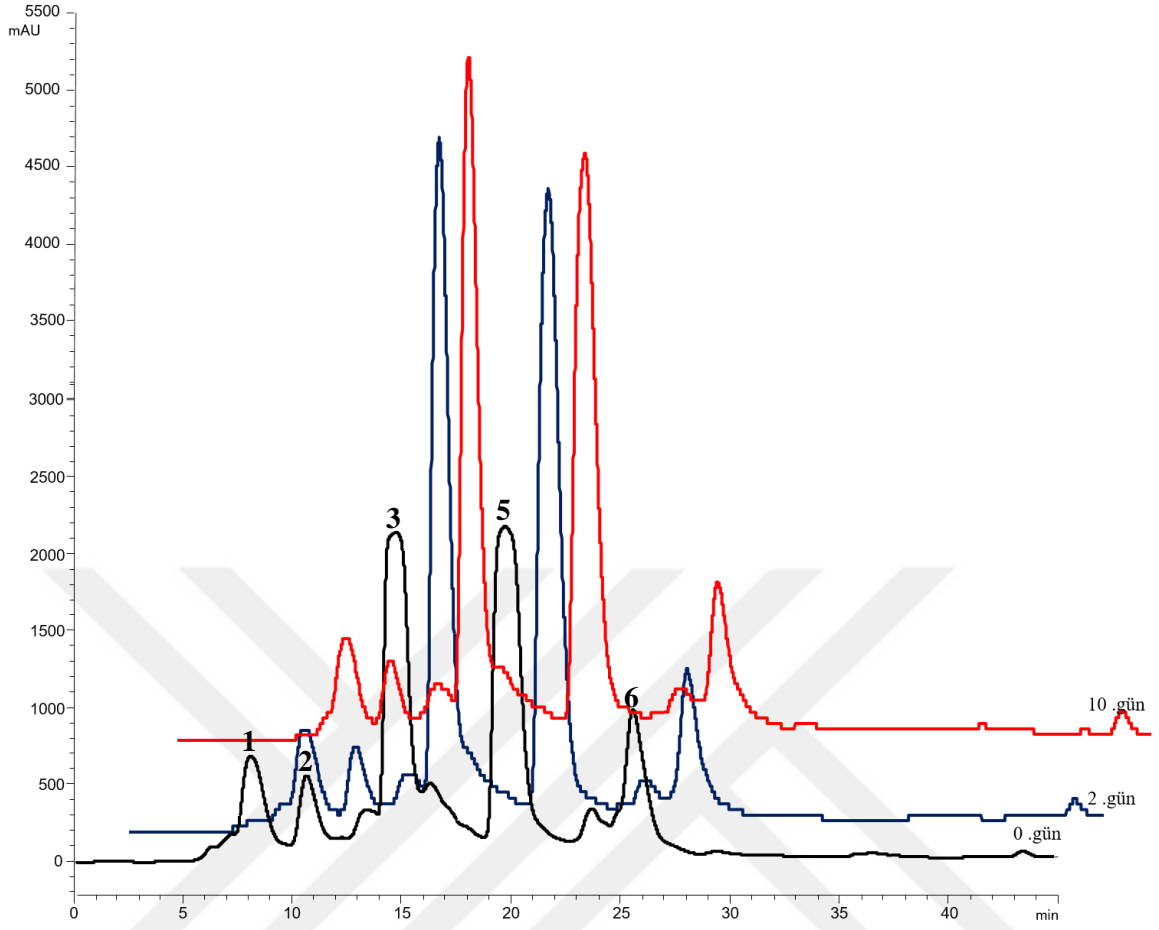
Şekil 100. pH 10 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



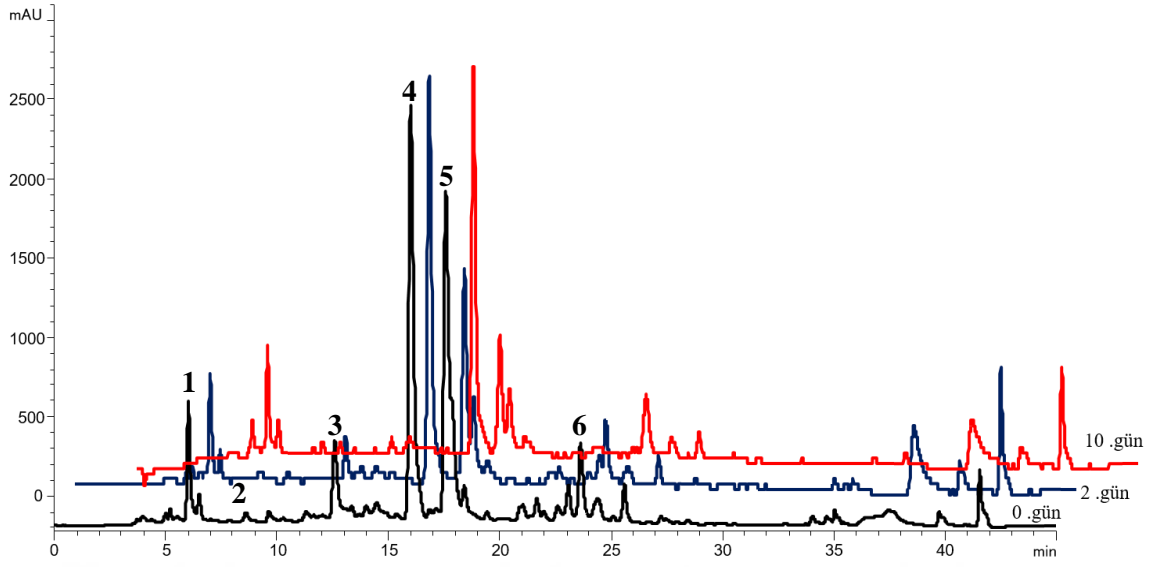
Şekil 101. pH 10 ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]



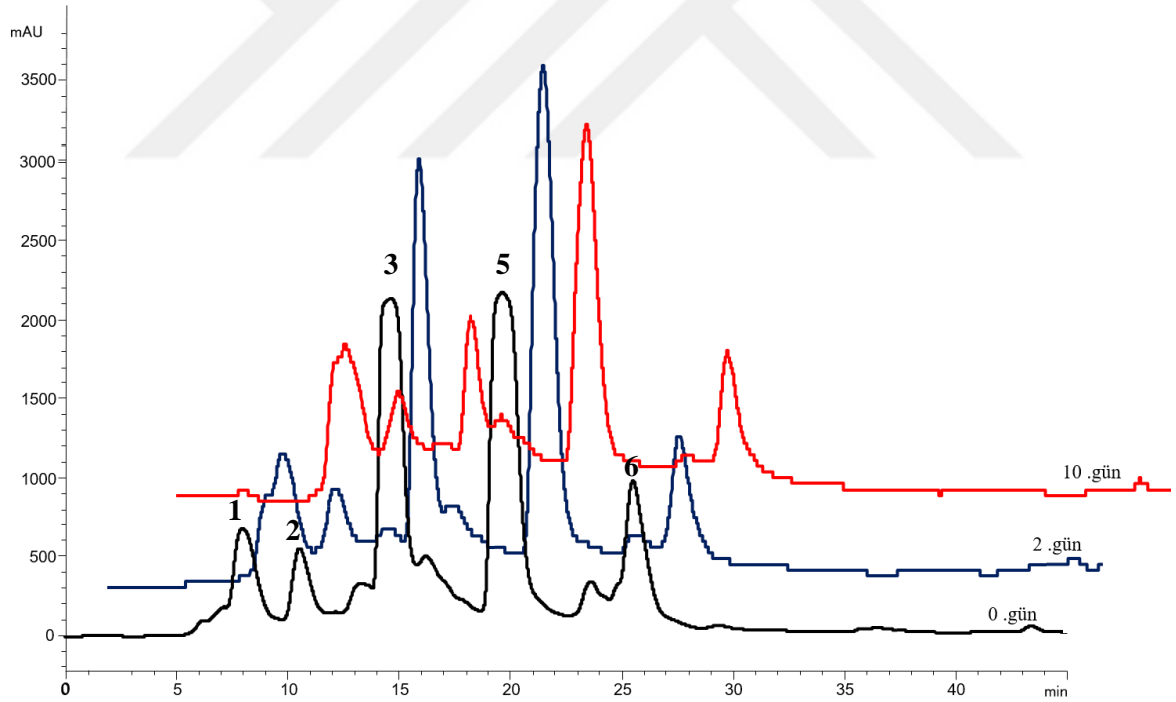
Şekil 102. Su ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



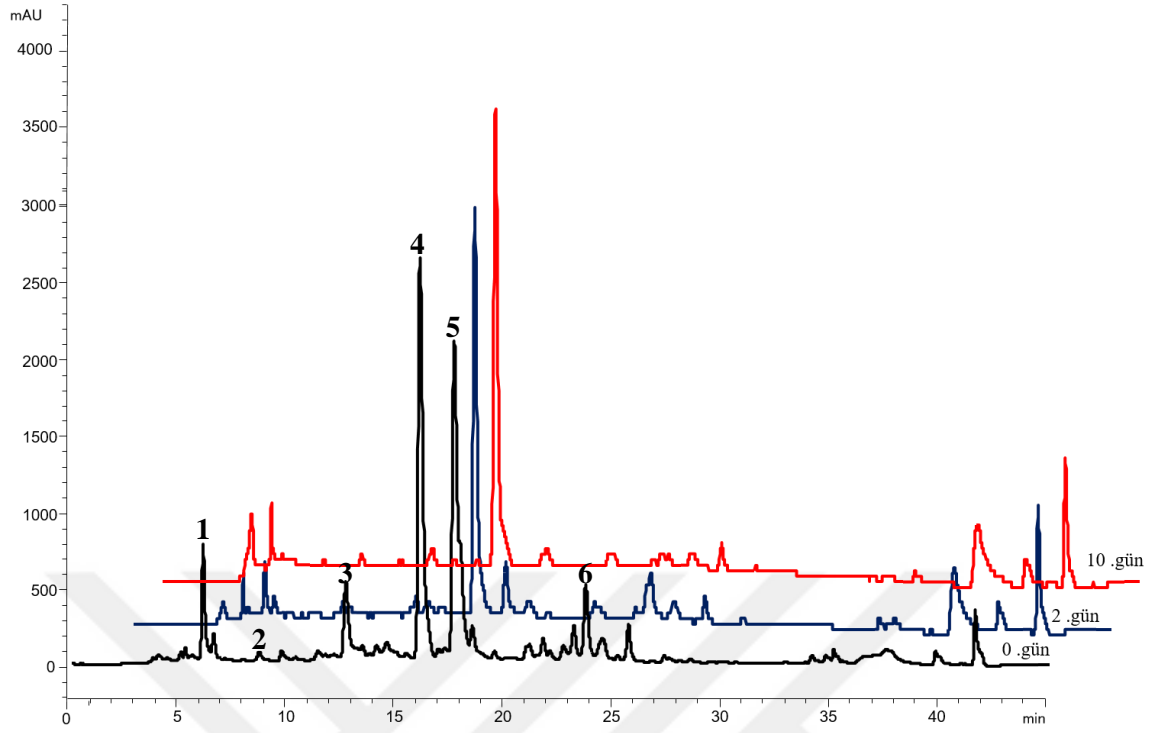
Şekil 103. Su ekstraktının pH 2' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]



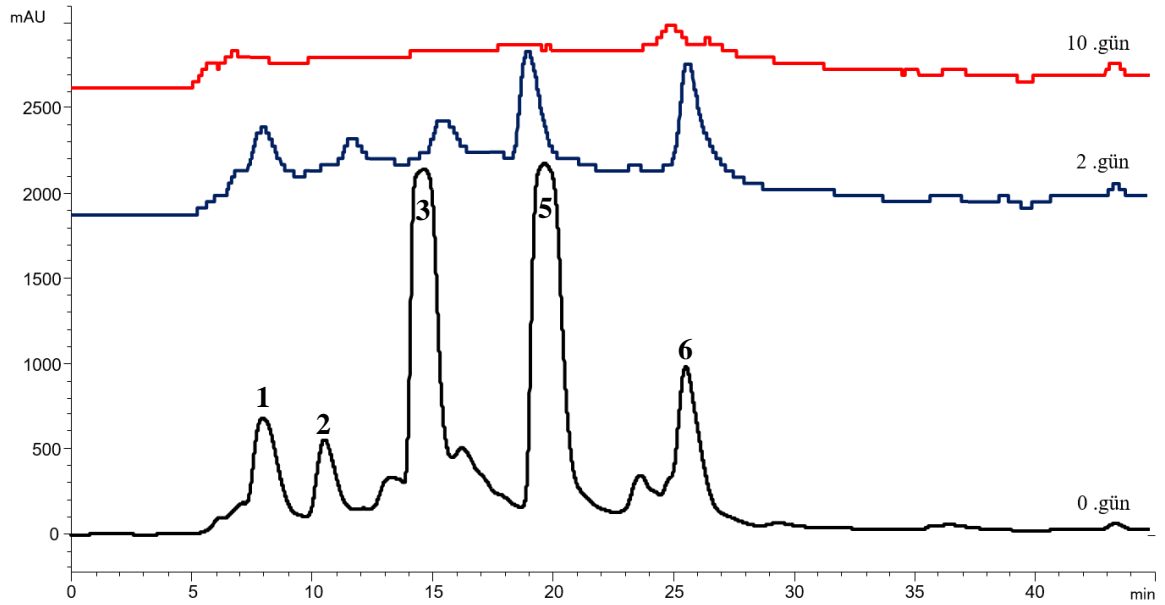
Şekil 104. Su ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



Şekil 105. Su ekstraktının pH 7' ye ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat]

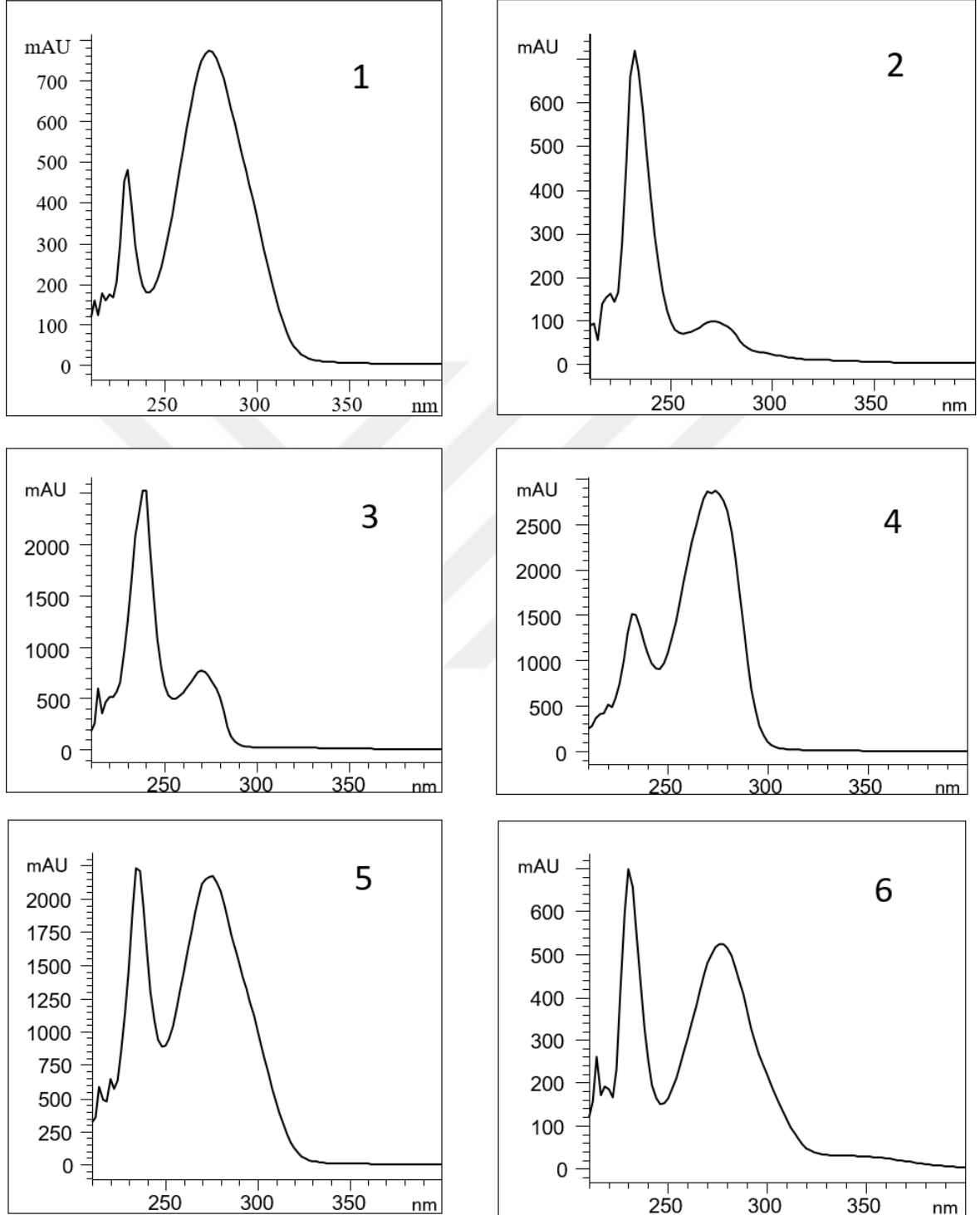


Şekil 106. Su ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 280 nm de HPLC kromatogramları (1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat)



Şekil 107. Su ekstraktının pH 10' a ayarlanarak (1/4 seyrelme oranı) 595 nm de HPLC-FRAP kromatogramları [1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein (inaktif), 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat].

Yeşil çay ekstraktlarından elde edilen kromatogramlarda tespit edilen majör bileşenlere ait spektrumlar Şekil 108.'de verilmiştir.

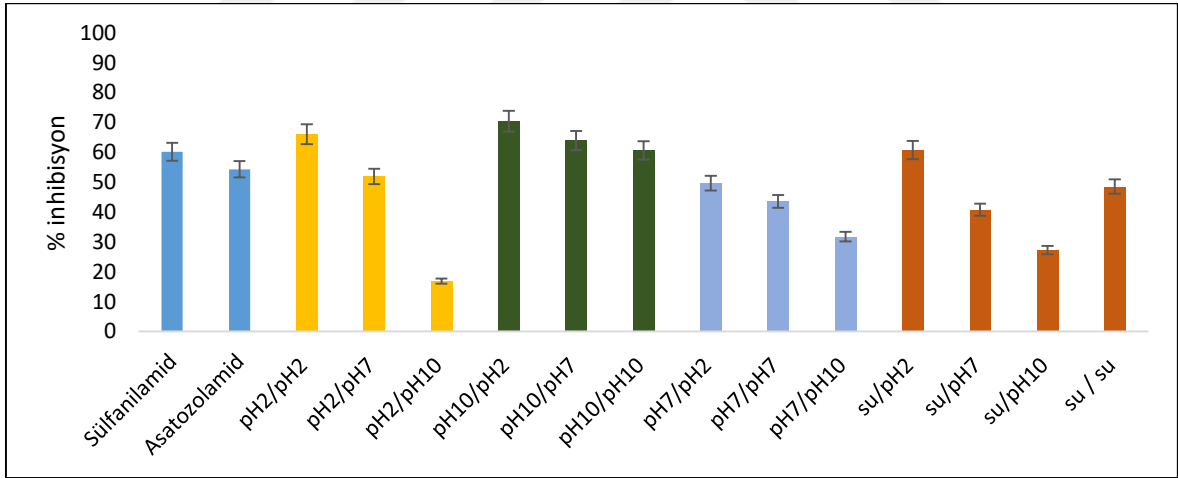


Şekil 108. Yeşilçay numunelerindeki majör bileşenlerin spektrumları. 1: gallik asit, 2: bilinmiyor, 3: epigallokateşin, 4: kafein, 5: epigallokateşingallat ve epikateşin karışımı, 6: epikateşin gallat

### 3.4.2. Yeşil Çay Ekstraktlarının bCA Enzim İnhibisyonu

Çözeltiler hazırlandıktan sonra ayarlanan ekstraktların ¼ oranında seyrelmiş halleri ile sığır karbonik anhidraz enzimi kullanılarak inhibisyon etkilerinin belirlenmesi amacıyla esteraz aktivitesi tayini yapıldı ve 20. dakikada belirlenen absorbanslardan % inhibisyon değerleri hesaplandı (Şekil 109). % inhibisyon hesabı; [(numune – kontrol)/ (numune körü – kontrol)]\*100 şeklinde yapılmaktadır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_N - A_K) / (A_{NK} - A_K)] * 100 \quad (5)$$



Şekil 109. Yeşilçay ekstraktlarının karbonik anhidraz enzimi üzerine %inhibisyon değerleri



## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

### 4.1. DPPH• Kararlılığına Çeşitli Faktörlerin Etkisi

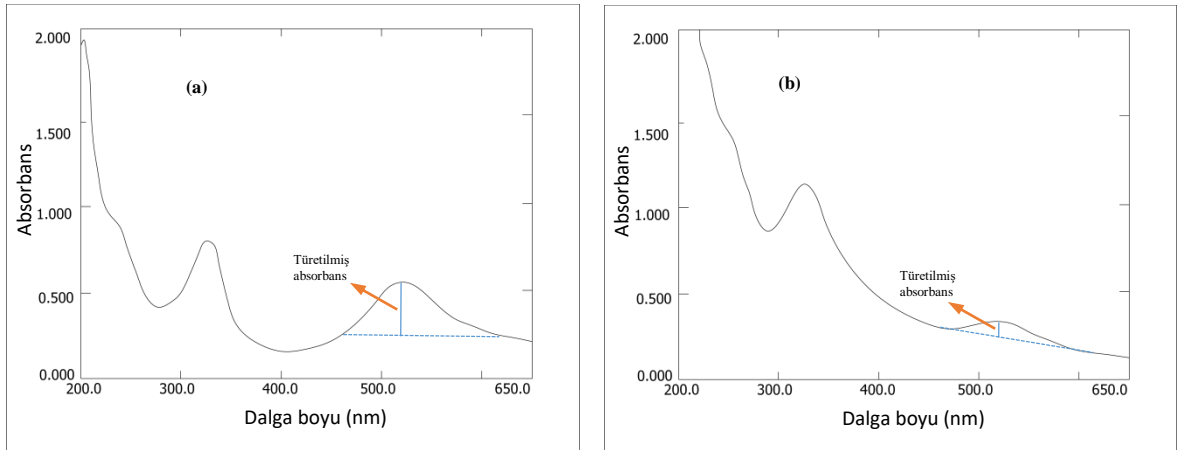
#### 4.1.1. Işık ve Çözücünün DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi

Literatürde aseton ve metanol ile çözülen DPPH•'nin karanlık ve aydınlık ortamda kararlılığı çalışılarak karanlık ortamda iki çözücü arasında fark bulunamamış ancak aydınlık ortamda 517 nm deki %absorbans değişiminin iki çözücüde oldukça farklı olduğu bulunmuştur [32]. Işığın ve çözücünün DPPH• çözeltilisine etkisi çalışmasında ışığın molekül üzerinde bozucu etkisinin az olduğu sonucuna varılmıştır. Diğer bir çalışma konusu olan çözücünün ise kararlılık üzerinde etkisi çok fazladır. Yapılan bu tez çalışmasında MetOH' lü ortamda zaman ile absorbansın artışı gözlemlendi (Şekil 28). Bunun sebebi olarak metanollü ortamda DPPH•' nin yanında oluşan yeni maddelerin absorbansı artırdığı düşünüldü. Sulu ortamda DPPH•' in daha kararlı olduğu görülürken, diğer çözücülerde test süresi olan 60 dakika içinde bozunma gözlemlendi. Aseton ile yapılan çalışmada ise çarpıcı şekilde bir absorbans azalması görüldü, yani çözeltilide aseton bulunması durumunda özellikle ışıklı ortamda DPPH•'nin herhangi bir antioksidan olmadan belli ölçüde bozunduğu sonucuna varıldı. Bu çalışmalarda DPPH• çözücüsü metanol olup, ortama yarıya yakın oranda çalışılan çözücü eklenmiştir. Dolayısıyla başta %100 metanollü ve aseton-metanol karışımları olmak üzere, farklı çözücülerin bulunması durumlarında DPPH• giderim testi yapılırken kör ve kontrol çalışmaların hassasiyetle yapılarak absorbans değişim hesaplamalarında kullanılmalıdır.

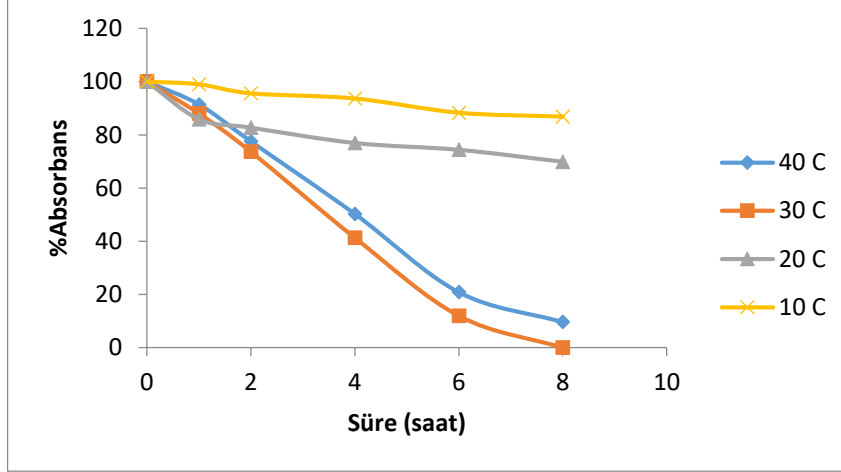
#### 4.1.2. Sıcaklık ve pH' nın DPPH•' nin Kararlılığına Etkisi

Farklı pH' larda sıcaklık değişimi ve 517 nm'de yapılan absorbanslara dayalı deneylerin sonucu incelendiğinde (Şekil 29) 40 ve 30 °C de DPPH•'nin bozulması tüm pH'larda hızlı bir şekilde olmaktadırken 20 ve 10 °C'de DPPH•'nin bozulması yavaş olmaktadır. pH 2'de yapılan denemeler bozunmanın daha hızlı olduğunu ortaya koymaktadır.

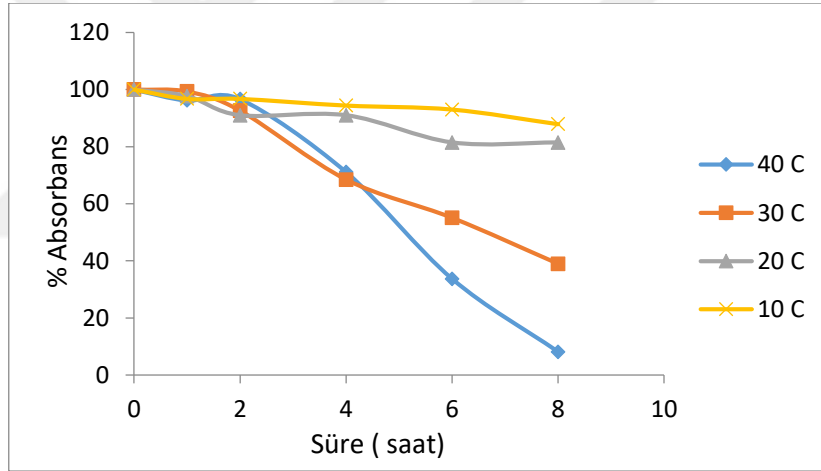
Sıcaklık ve pH'nın DPPH• kararlılığına etkisini ortaya koymak üzere yapılan çalışmalarda, zamana bağlı olarak hem farklı pH hem de farklı sıcaklık değerlerinde absorbans değişimi ölçülmüş, spektrumlar alınmış ve 200-650 nm aralığında absorbanslarda meydana gelen değişiklikler değerlendirilmiştir. Zamana bağlı değişimlerin gözlemlenebilmesi açısından farklı pH ve farklı sıcaklık değerleri ayrı ayrı değerlendirilmek üzere 0, 1, 2, 4, 6 ve 8. saatte elde edilen spektrumlar karşılaştırılmıştır (Şekil 30 - 33). Değerlendirmenin daha kolay yapılabilmesi için aynı zamanda farklı sıcaklıklarda başlangıçta ve 8. saatte elde edilen spektrumların karşılaştırması (Şekil 34) ve farklı pH' larda başlangıçta ve 8. saatte elde edilen spektrumların karşılaştırması (Şekil 35 - 38) yapılmıştır. Özellikle 30 ve 40 °C de farklı pH' larda zamanla değişen spektrumlar değerlendirildiğinde sadece 517 nm' de yapılan ölçümlerle elde edilen sonuçların değişimi doğru şekilde yansıtmayacağı anlaşılmaktadır. Hatta 4. saatten sonra absorbans artışı bile görülebilmektedir. Dolayısıyla spektrumların değerlendirilmesi neticesinde 470 ile 620 nm' lerdeki absorbansları arasına bir çizgi çekilerek tam 517 nm' de bu çizgi ile spektrumdaki absorbans arasındaki fark alınarak yeni türetilmiş absorbans değerleri belirlenmiştir (Şekil 110). Bu absorbans değerleri kullanılarak farklı pH' lardaki çalışmalar için ayrı ayrı olmak üzere dört farklı sıcaklıkta elde edilen %absorbans değişim değerleri grafiğe geçirilmiştir (Şekil 111 - 114).



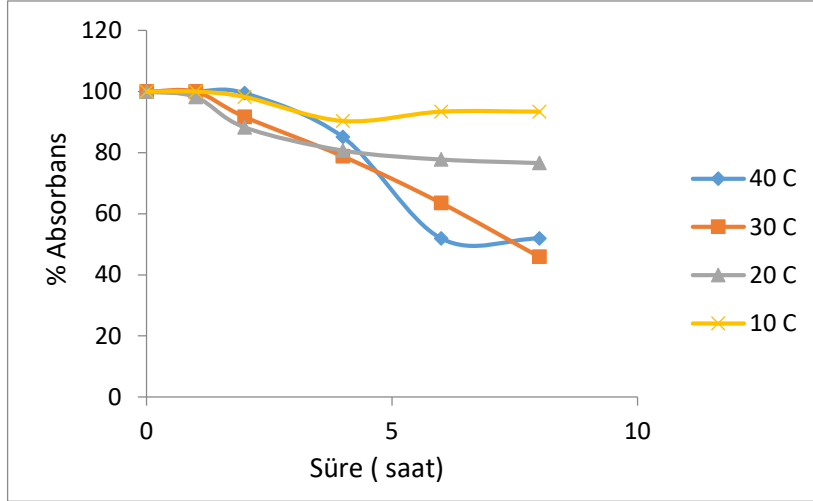
Şekil 110. Başlangıçta (a) ve 8. (b) saatte elde edilen spektrumlar kullanılarak 470-620 nm arası çizgi çekilerek 517 nm' de türetilmiş absorbans belirleme yöntemi



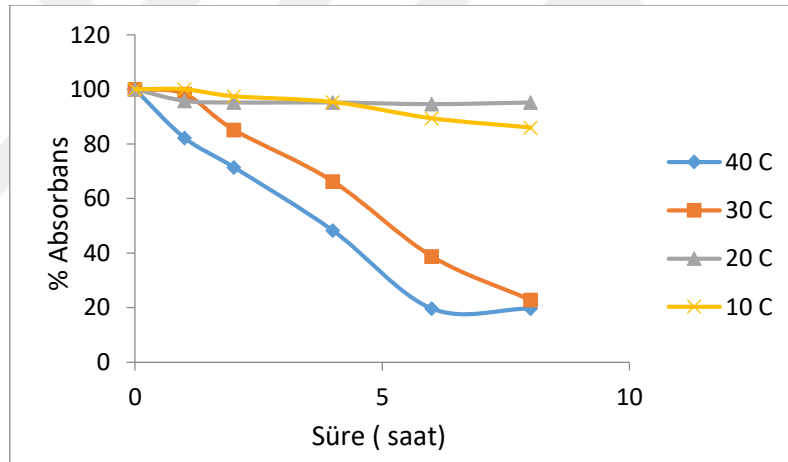
Şekil 111. pH 2’de farklı sıcaklıklarda 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanlar kullanılarak belirlenen bozunmanın % absorban değişim grafiği



Şekil 112. pH 7’de farklı sıcaklıklarda 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanlar kullanılarak belirlenen bozunmanın % absorban değişim grafiği



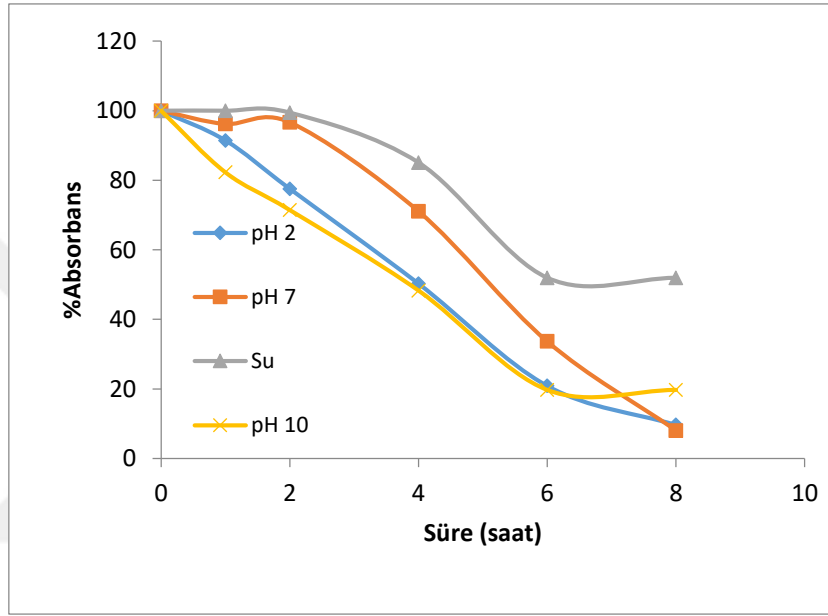
Şekil 113. Sulu ortamda farklı sıcaklıklarda 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanlar kullanılarak belirlenen bozunmanın % absorban değişim grafiği



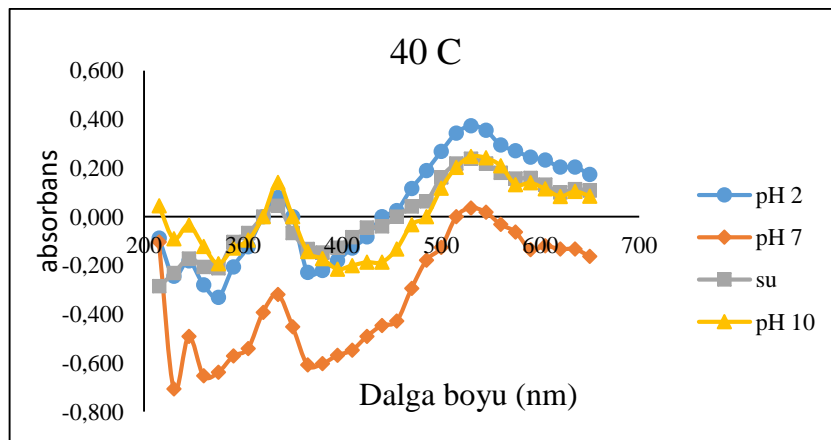
Şekil 114. pH 10'da farklı sıcaklıklarda 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanlar kullanılarak belirlenen bozunmanın % absorban değişim grafiği

Çakıştırılan %absorbans değişim grafikleri incelendiğinde, 20 ile 30 °C arasında DPPH• bozunması açısından bir sıçramanın olduğu gözlemlenmektedir. Bu sıcaklık aralığındaki hızlı bozunmaya bağlı olarak o bölgede sıcaklık hassasiyeti olduğu sonucuna varmaktayız. Başka bir açıdan değerlendirirsek, laboratuvarlarda çoğu kez çalışma ortam sıcaklığı 22 °C ile 27 °C arasında olmaktadır ve bu nedenle yapılan çalışmaların sonuçlarında önemli farklar gözlenebilecektir. Birbirleriyle kıyas yapılması istenen numunelerle çalışılırken aynı ortam sıcaklığının sağlanması önem arz etmektedir.

470 – 620 nm arası hesaplama yöntemi ile elde edilen veriler kullanılarak zamana bağlı %absorbans değişimleriyle elde edilen eğriler farklı pH' lar için karşılaştırılmış, çalışılan sıcaklıklar için ayrı ayrı gösterilmiştir (Şekil 115, 117, 119 ve 121). Farklı pH' larda elde edilen verilerle benzer bir karşılaştırma işlemi başlangıçta ve 8. saatlerde elde edilen spektrumlarda her 20 nm' de bir absorbans farkları belirlenip grafiğe geçirilerek türetilmiş spektrumların elde edilmesi şeklinde yapılmıştır (Şekil 116, 118, 120 ve 122).

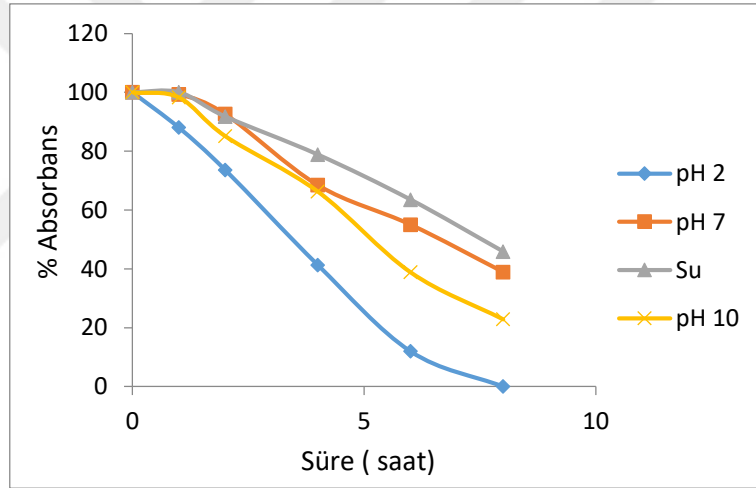


Şekil 115. 40 °C de 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın farklı pH'lar için % absorbans değişim grafiği

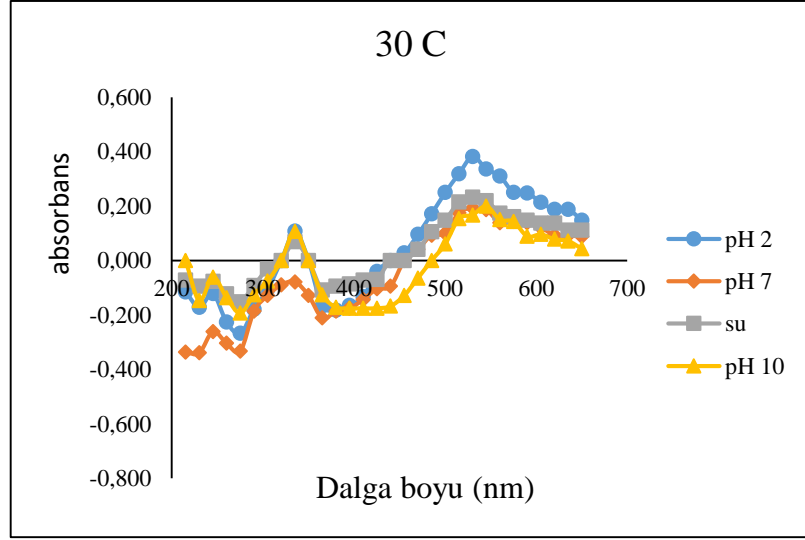


Şekil 116. 40 °C de başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı pH'lar için DPPH• türetilmiş spektrumları

Literatürdeki yapılan çalışmalarda 120 dakika sonunda asetonda çözülmüş DPPH•'ne pH'ın etkisine bakıldığında en az bozulma pH 7 de en çok bozulma pH 10 da gözlemlenmiş aynı çalışma metanolde çözülen DPPH•'nin kararlılığına bakıldığında en az bozunma pH 10' da en çok bozunma pH 4' de gözlemlenmiştir [32]. Çalışmada her bir sıcaklık için spektrum taramasında 470 ile 620 nm arasındaki bölgede geniş bir şekilde bozunmanın nasıl olduğu takip edildi. 40 °C'de bu bölgedeki değişim incelendiğinde pH 2, pH 7 ve pH 10 da % absorban değişiminin %90'lar civarında olduğu gözlemlenmiştir, ancak sulu ortamda ise bu değişim %50 civarındadır (Şekil 115). Aynı çalışmanın sadece 517 nm' deki değişimine baktığımızda ise pH 2 ve pH 10'da 0,200 birimlik bir absorban değişimi gözlemlenirken sulu ortamda bu değişim 0,300 birime çıkmış, pH 7'de ise yok denecek kadar az bir değişim görülmüştür (Şekil 116).

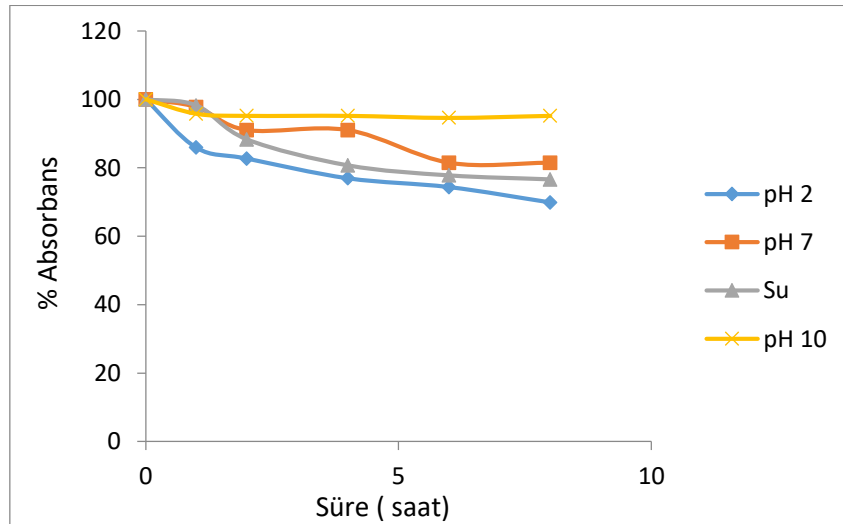


Şekil 117. 30 °C de 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorbanlar kullanılarak belirlenen bozunmanın farklı pH'lar için % absorban değişim grafiği

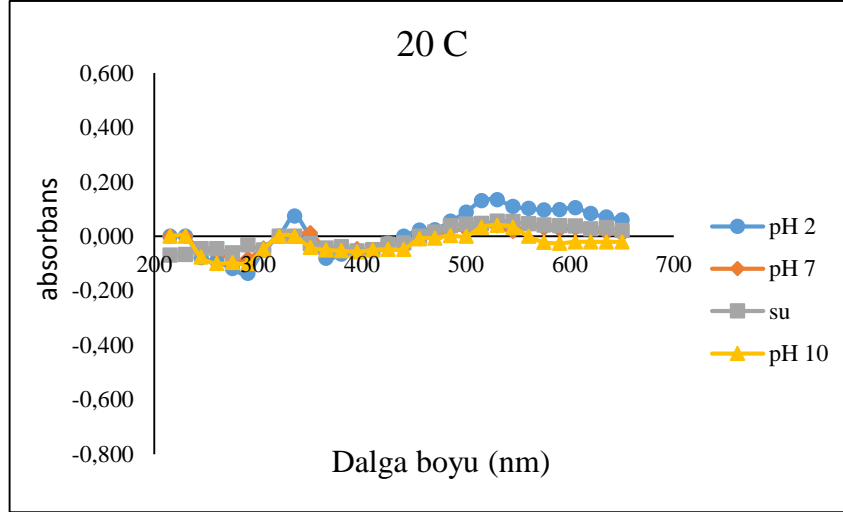


Şekil 118. 30 °C de başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı pH'lar için DPPH• türetilmiş spektrumları

30 °C'de 470 – 620 nm bölgesindeki değişim incelendiğinde pH 2'de %100 absorptans değişimi, pH 7 ve sulu ortamda %50 civarında, pH 10 da %80 absorptans değişimi gözlemlendi (Şekil 117). Aynı çalışmanın sadece 517 nm'deki değişimine baktığımızda ise pH 2'de 0,300 birimlik, pH 7, pH 10 ve sulu ortamda 0,200 birimlik bir absorptans değişimi gözlemlendi (Şekil 118).

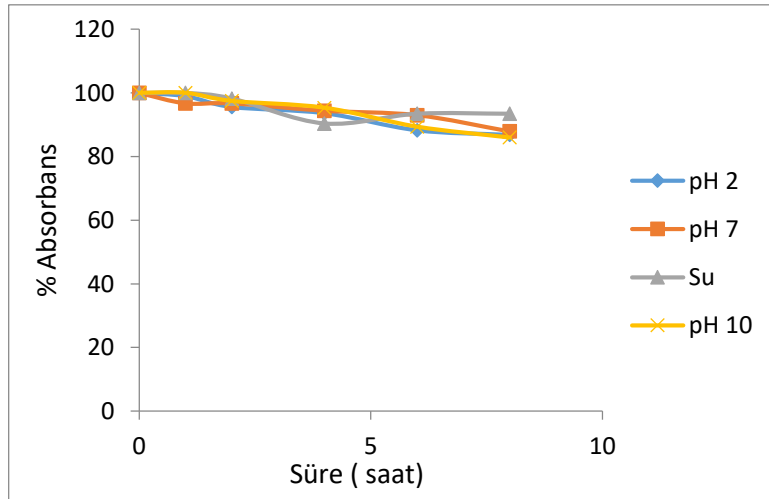


Şekil 119. 20 °C de 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorptanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın farklı pH'lar için % absorptans değişim grafiği



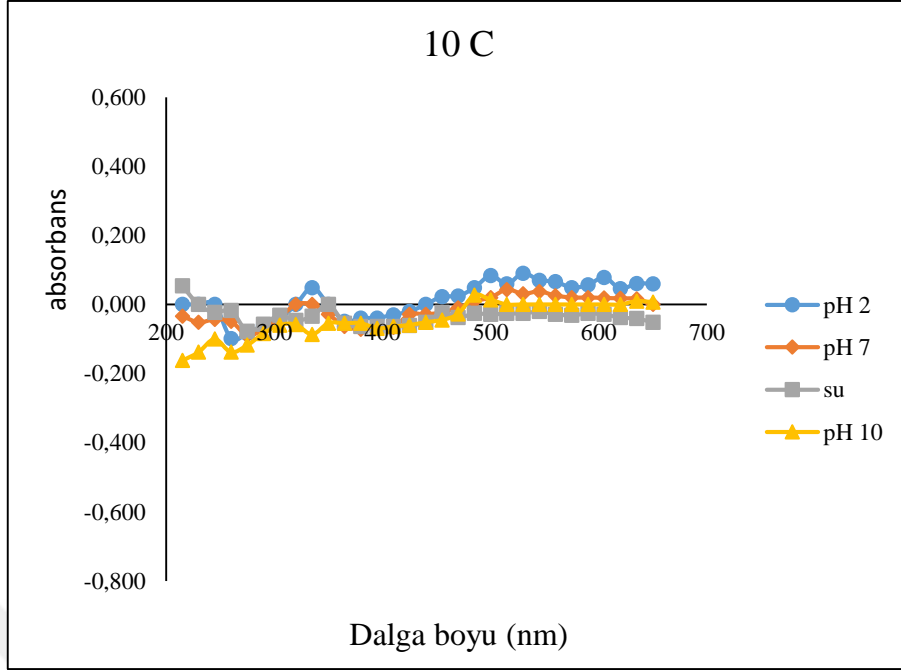
Şekil 120. 20 °C de başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı pH'lar için DPPH• türetilmiş spektrumları

20 °C'de 470 – 620 nm bölgesindeki değişim incelendiğinde pH 2'de %30 absorptans değişimi, pH 7 ve sulu ortamda %20 civarında absorptans değişimi gözlemlendi (Şekil 119). pH 10'da ise absorptans değişimi %10'un altında kaldı. Aynı çalışmanın sadece 517 nm'deki değişimine baktığımızda ise pH 2'de 0,100 birimlik, pH 7, pH 10 ve sulu ortamda çok az bir absorptans değişimi gözlemlendi (Şekil 120).



Şekil 121. 10 °C de 470 ile 620 nm arası türetilmiş absorptanslar kullanılarak belirlenen bozunmanın farklı pH'lar için % absorptans değişim grafiği





Şekil 122. 10 °C de başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı pH' lar için DPPH• türetilmiş spektrumları

10 °C'de 470 – 620 nm bölgesindeki değişim incelendiğinde tüm ortam şartlarında değişimin %10'un altında olduğu gözlemlendi (Şekil 121). Aynı çalışmanın sadece 517 nm' deki değişimine baktığımızda ise yine tüm ortam şartlarında değişim yok denecek kadar az olarak bulundu (Şekil 122).

470 – 620 nm arası hesaplama yöntemi ile elde edilen şekillerden DPPH•'ın farklı sıcaklıklarda ortam pH'sı açısından kararlılık sırası aşağıdaki gibidir:

40 °C de: su > pH 7 > pH 2 = pH 10

30 °C de: su > pH 7 > pH 10 > pH 2

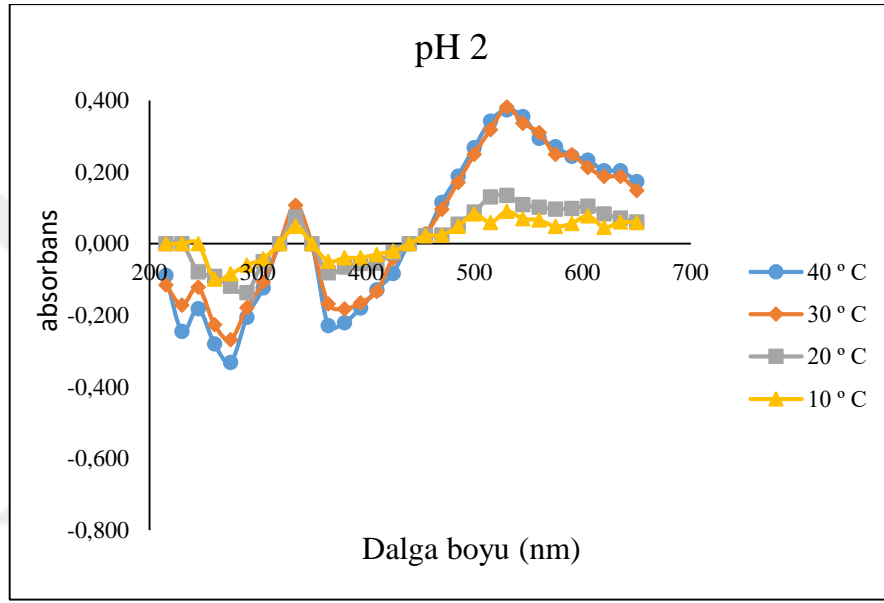
20 °C de: pH 10 > pH 7 > su > pH 2

10 °C de: önemli bir fark yok

Başlangıçta ve 8. saatte elde edilen spektrumlarda her 20 nm'de bir absorbands farkları belirlenip grafiğe geçilerek elde edilen türetilmiş spektrumlarla oluşturulan grafikler değerlendirildiğinde önemli bilgiler ortaya çıkmaktadır. Spektrumlarda 510-520 nm bölgesinde beklemeye önemli absorbands düşüşlerinin görülmesi yanında 390-400 nm bölgesinde ise önemli artışların olduğu görülmektedir. Bu davranış bütün pH' larda gözlemlenmektedir. Ortam sıcaklıkları açısından bu davranış 40 ve 30 °C' lerde daha baskındır. 20 ve 10 °C' lerde yapılan çalışmalarda değişimde ciddi azalma görülmektedir.

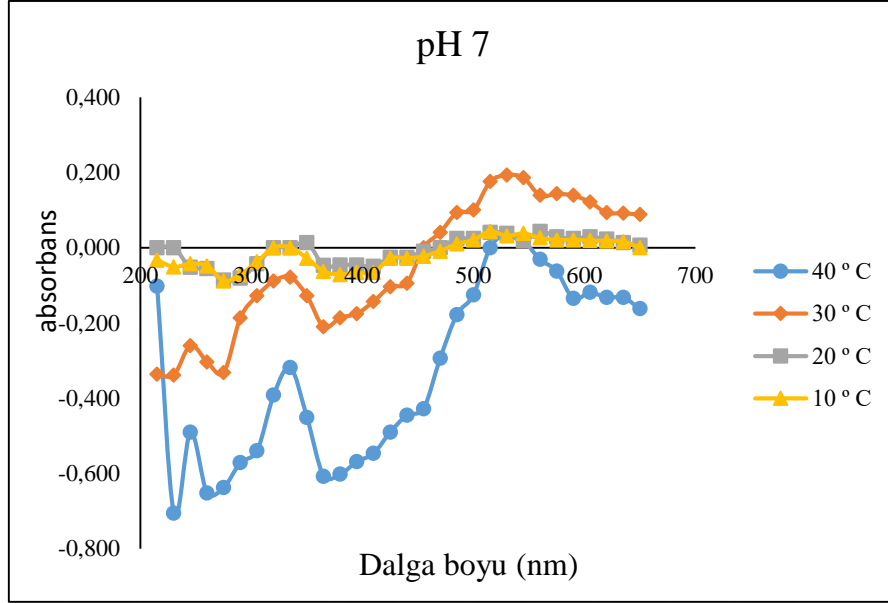
Spektrum değişim grafikleri DPPH• testlerinde 517 nm'deki absorbans azalmasının takip edilmesinin yanında 400 nm ve 517 nm' deki değişimlerin mutlak değerlerinin toplamının da kullanılabilceğini göstermektedir.

Elde edilmiş türetilmiş spektrumlar kullanılarak aynı zamanda her bir pH' daki çalışma için ayrı ayrı dört farklı sıcaklık verileri çakıştırılarak sıcaklığa bağlı değişim takip edilmiştir (Şekil 123 - 126).



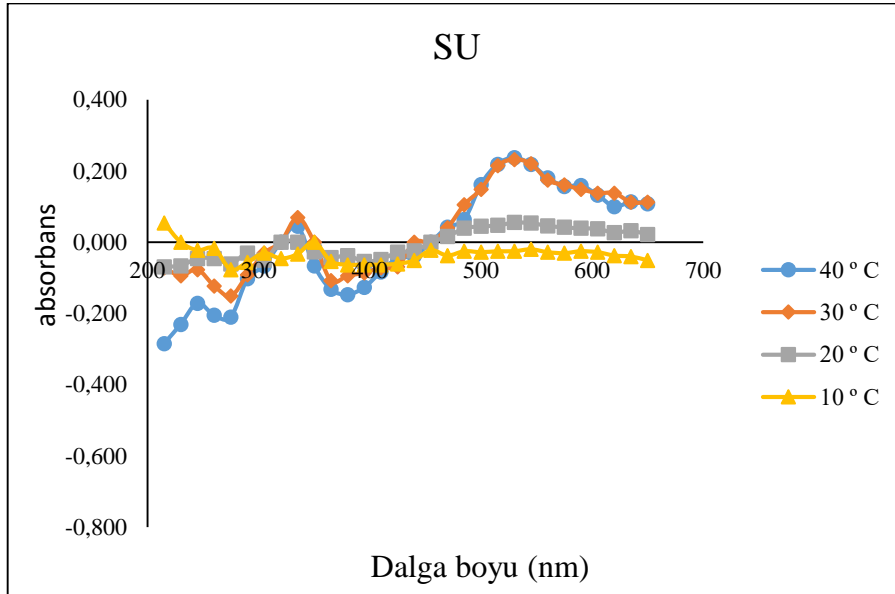
Şekil 123. pH 2'de farklı sıcaklıklarda başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı sıcaklıklar için DPPH• türetilmiş spektrumları

pH 2'de 517 nm'deki absorbans değişimi incelendiği zaman 30 ile 20 °C arasındaki sıçrama bölgesi dikkat çekmektedir.



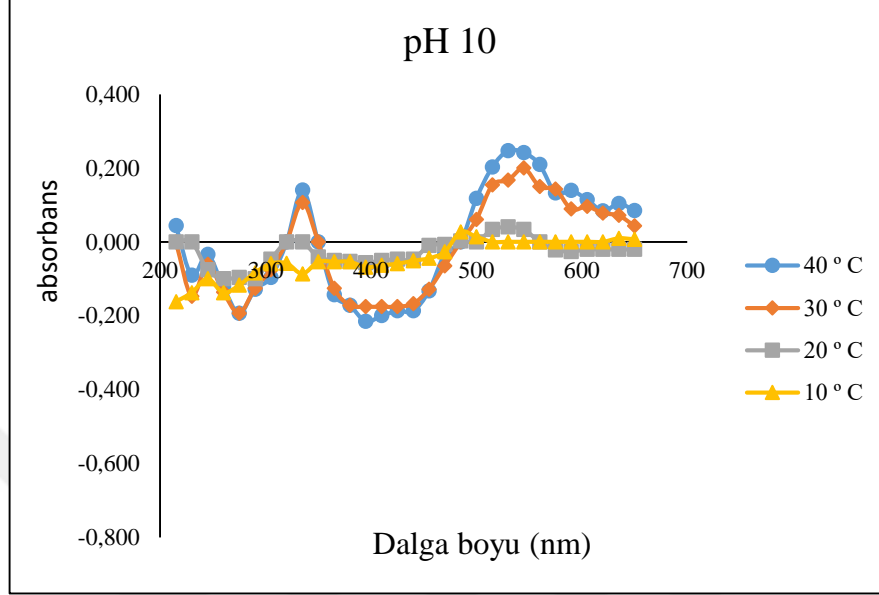
Şekil 124. pH 7'de farklı sıcaklıklarda başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı sıcaklıklar için DPPH• türetilmiş spektrumları

pH 7 de ise 30 °C bozunmanın en fazla olduğu sıcaklık olarak değerlendirildi.



Şekil 125. Sulu ortamda farklı sıcaklıklarda başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı sıcaklıklar için DPPH• türetilmiş spektrumları

pH 2'deki gibi sulu ortamda ve pH 10'da da 30 ile 20 °C arasındaki sıcaklık bölgesi gözlemlenmektedir.



Şekil 126. pH 10'da farklı sıcaklıklarda başlangıçta ve 8. saatteki spektrumların farkları alınarak elde edilen farklı sıcaklıklar için DPPH• türetilmiş spektrumları

Bu grafikler de değerlendirildiğinde 390-400 nm ve 510-520 nm bölgelerinde önemli absorpsiyon değişiminin olduğu ve değişimin 40 ve 30 °C'de oldukça belirgin, 20 ve 10 °C'de daha zayıf olduğu sonucu teyit edilmiştir. 20 – 30 °C arasında DPPH•'ın bozunması bakımından önemli bir artış gözlemlenmektedir. Bu türetilmiş spektrum verilerinden 517 nm'deki DPPH•'ın kararlılığının aşağıdaki sırada olduğu görülmüştür.

40 °C de: pH 7 > pH 10 = su > pH 2

30 °C de: pH 7 ≈ pH 10 ≥ su > pH 2

20 °C de: pH 7 ≈ pH 10 ≥ su > pH 2

10 °C de: su > pH 10 > pH 7 > pH 2

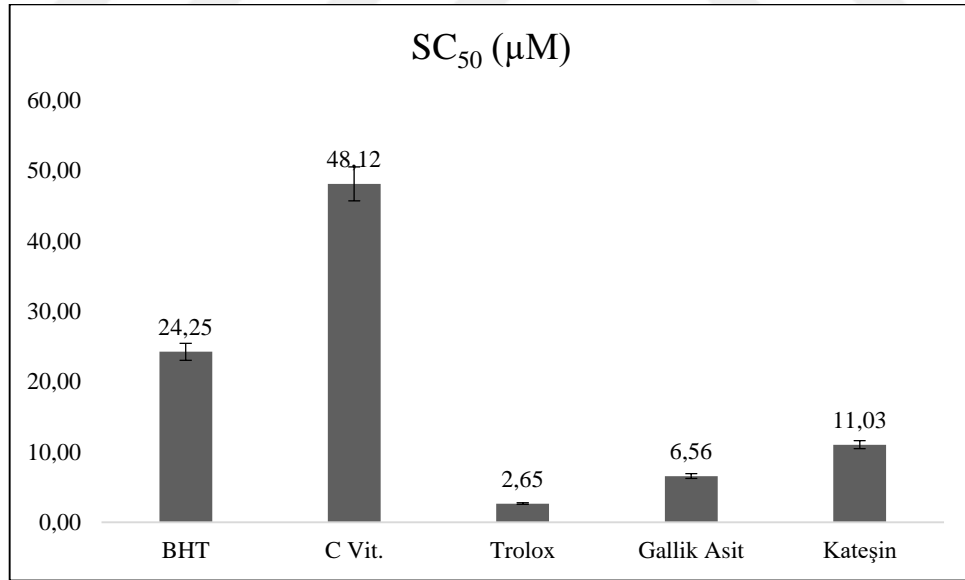
Yapılan çalışmalar DPPH• çözeltisinin genel olarak pH 7 ve sulu ortamda daha kararlı olduğunu, pH 2'de ise en fazla bozunmanın olduğunu göstermektedir. 30 ve 40 °C'lerde de kararlılık oldukça azalmaktadır. Bu tespitler hazırlanan DPPH• çözeltilerinin test yapılana kadar bekletilmeleri yanında antioksidanlarla aktivite ölçümleri sırasında da ortam sıcaklık ve pH değerlerine dikkat edilmesi gerektiğini göstermektedir. Test ortamında farklı sıcaklık,

pH, ışık, oksijen ve çözücü şartlarıyla yapılan DPPH radikal giderim testi ölçüm sonuçlarının karşılaştırılmayacağı anlaşılmaktadır.

## 4.2. Antioksidan - DPPH• Reaksiyonuna Çeşitli Faktörlerin Etkisi

### 4.2.1. Antioksidanların Metanoldeki SC<sub>50</sub> Değerleri

Çalışmada kullanılan antioksidanların DPPH• radikali ile reaksiyonuna ortamda bulunan çözücülerin etkisinin takibinde deneyler antioksidanların SC<sub>50</sub> konsantrasyonlarında gerçekleştirilerek %50'nin hem üzerinde hem de altında giderim gözlemlenebilmesi sağlandı. Bu amaçla öncelikli olarak test çözücüsünün %100 metanol olduğu şartlarda her bir standardın değişen konsantrasyonlarıyla yapılan çalışmada konsantrasyona karşı absorbans grafikleri hazırlandı (Şekil 39 - 43) ve bu grafiklerden absorbansı yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonlarını gösteren SC<sub>50</sub> değerleri belirlendi (Şekil 127.).



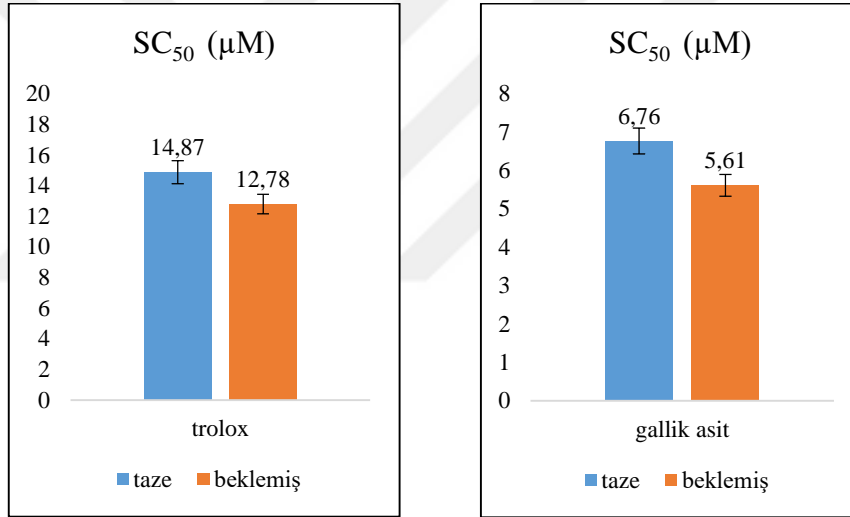
Şekil 127. Antioksidanların metanoldeki SC<sub>50</sub> değerleri

Antioksidanların metanoldeki SC<sub>50</sub> değerleri grafikte de görüldüğü üzere BHT için 24,25 µM, C vitamini için 48,12 µM, Troloks için 2,65 µM, gallik asit için 6,56 µM ve

kateşin için 11,03  $\mu\text{M}$  olarak bulundu.  $\text{SC}_{50}$  değerinin küçük olması antioksidan aktivitenin yüksek olduğunu göstermektedir.

#### 4.2.2. DPPH• Çözeltisinin Tazeliğinin $\text{SC}_{50}$ Değerine Etkisi

DPPH• radikali çözeltisinin ilk hazırlandığında ve 4 saat bekletildikten sonra antioksidanlarla aktivite belirlemek için kullanılması yoluyla antioksidan konsantrasyonu – absorbans grafikleri hazırlandı (Şekil 44 - 45) ve bu grafiklerden absorbansı yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonlarını gösteren  $\text{SC}_{50}$  değerleri belirlendi (Şekil 128.). Bu çalışmada Troloks ve gallik asit ile çalışıldı.



Şekil 128. Taze ve beklemiş DPPH• çözeltisi ile belirlenen  $\text{SC}_{50}$  değerleri

Taze ve beklemiş DPPH• çözeltisi ile belirlenen  $\text{SC}_{50}$  değerleri Troloks için taze çözelti ile 14,87  $\mu\text{M}$ , beklemiş DPPH• çözeltisi ile 12,78  $\mu\text{M}$ ; gallik asit için taze DPPH• çözeltisi ile 6,76  $\mu\text{M}$ , beklemiş DPPH• çözeltisi ile 5,61  $\mu\text{M}$ ' dır. DPPH• çözeltisi beklerken kendi kendine de bozunduğu için antioksidanlarla test sırasında beklemiş DPPH• çözeltisinde daha düşük konsantrasyonda radikal bulunmaktadır. Bu yüzden  $\text{SC}_{50}$  değeri düşük çıkmaktadır. Yani beklemiş DPPH• çözeltisi ile yapılan çalışmada  $\text{SC}_{50}$  değerinin düşük yani aktivitenin yüksek bulunması aslında DPPH• çözeltisinin bozunmasından kaynaklı yetersiz kaldığının göstergesidir.

#### 4.2.3. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Çözücülerin Etkisi

Ortamda bulunan çözücünün antioksidan – DPPH• reaksiyonuna, dolayısıyla da %radikal giderim aktivitesine etkisini belirlemek amacıyla önce ön çalışma olarak %100 DMSO ve %100 metanollü ortam çalışmaları yapılarak gallik asit konsantrasyonu - absorbans grafikleri çizildi (Şekil 46.). Bu çalışmada metanollü ortamda literatürle uyumlu olarak reaksiyonun nisbeten daha hızlı olduğu ve ilk 5 dakikada %100'e yaklaştığı görüldü [46]. Ancak DMSO'lu ortamda yapılan çalışmada reaksiyonun yavaş olduğu, hatta 2. saatin sonunda bile hala reaksiyonun devam ettiği, absorbansın düşmeye devam ettiği görüldü. Daha sonra çözücü etkisini belirlemek amacıyla antioksidanların (BHT, Troloks, C vitamini, gallik asit, kateşin) DPPH• radikali ile reaksiyonu üzerine ortamda değişik yüzdelerde bulunan 5 farklı çözücünün etkisi çalışıldı. BHT' nin kullanıldığı çalışmada % giderim etil asetat ve asetonda azalırken su, metanol ve DMSO' da artmaktadır. C vitamini ve Troloks'un üzerine değişen konsantrasyonlarda çözücünün önemli miktarda etkisi gözlenmemektedir. Gallik asitte % giderim metanollü ortamda artarken diğer çözücülerde değişmemektedir. Kateşinde su ve metanolde % giderim artarken diğer çözücülerde azalma gözlemlenmiştir. Bu çalışma BHT nin başlangıçta ve 60. dakikada %43,3 çözücü konsantrasyonunda spektrumları alınarak desteklendi (Şekil 52 – 56). Bu deneyde su ve metanolde % giderimin arttığı ve bunun da yapılarında bulunan protik gruplardan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

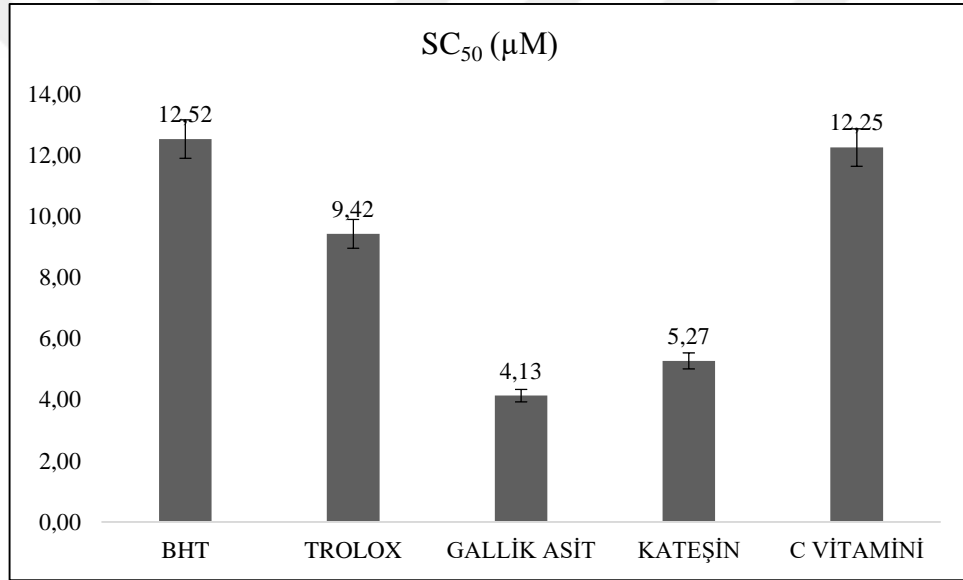
#### 4.2.4. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon ve pH' nın Etkisi

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında hidrojen iyonu konsantrasyonunun düşmesinin DPPH• ile standart flovanoidler arasındaki reaksiyon hızının artmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır [68, 69]. Başka bir DPPH•'a pH'nın etkisi çalışmasında DPPH• çözeltisini tampon-metanol karışımı ile hazırlayıp BHT, propilgallat ve askorbik asitte % giderim değerleri karşılaştırılmıştır. Bu karşılaştırmanın sonucunda BHT de tamponlu olan DPPH• ile yapılan teste düşük BHT konsantrasyonunda yüksek % giderim görülmüştür [68]. Diğer bir çalışmada pH aralığı 2 ile 9 arasında yapılarak farklı pH' ların antioksidan etki üzerine etkisinin az olduğu sonucuna varmışlardır [70]. Bu tez çalışmasında antioksidan – DPPH• reaksiyonu üzerine ortam pH' sı ve kullanılan tamponun konsantrasyonunun etkisini belirlemek amacıyla önce sulu ortamdaki SC<sub>50</sub> değerleri tespit edildi. Daha sonra

tamponlu çalışmalarda sabit konsantrasyonda antioksidan kullanılması durumunda bu değerler uygulandı.

#### 4.2.4.1. Antioksidanların Su Varlığında SC<sub>50</sub> Değerleri

Antioksidanların ortamda su bulunduğu durumda SC<sub>50</sub> değerlerinin belirlenmesi amacıyla her bir standardın değişen konsantrasyonlarıyla yapılan çalışmada konsantrasyona karşı absorbans grafikleri hazırlandı (Şekil 57 – 61) ve bu grafiklerden absorbansı yarıya düşüren antioksidan konsantrasyonlarını gösteren SC<sub>50</sub> değerleri belirlendi (Şekil 129.).



Şekil 129. Antioksidanların ortamda %43,3 su bulunması durumunda SC<sub>50</sub> değerleri

Antioksidanların sulu ortamda SC<sub>50</sub> değerleri grafikteki gibi bulundu: BHT 12,52 µM, Troloks 9,42 µM, gallik asit 4,13 µM, katesin 5,27 µM, C vitamini 12,25 µM. SC<sub>50</sub> değeri ne kadar küçükse antioksidan aktivite o kadar yüksektir.



#### 4.2.4.2. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon pH' sının Etkisi

Gallik asitin DPPH• ile reaksiyonunda pH' nın etkisine pH 2, pH 7, sulu ve pH 10' da bakıldığında, reaksiyonların ilk 10 dakika da büyük ölçüde tamamlandığı ve absorbansın düşüş sırasınının pH 7, su, pH 2 ve pH 10 olduğu görüldü. DPPH• giderim performansı pH 7 ve sulu çalışmada benzer şekilde yüksek çıkmıştır. Troloks pH 10 hariç diğer pH' larda reaksiyonu ilk dakika içerisinde tamamladı, pH 10' da ise reaksiyon 5 dakika sonunda tamamlandı. Troloks pH 2, pH 7 ve suda aynı davranışı göstermiş olup, pH 10' da absorbans düşüşü daha azdır. BHT ile yapılan testlerde absorbans yavaş düşmüş, reaksiyon süresi 60 dakika ya da daha fazla sürmüştür. BHT pH 10, pH 7 ve suda 30. dakikada absorbansı yarıya indirdi, pH 2' de ise lineer bir şekilde reaksiyon ortamına koyulduğu gibi bozulma başlayıp 60. dakikaya kadar devam etti. Kateşinin DPPH• ile reaksiyonu 30 dakika da tamamlandı ve kateşin BHT ile benzer davranış gösterdi. C vitaminin de DPPH• ile reaksiyonu çok hızlı gerçekleşti, Troloks'a benzer davranış gösterdi.

Çalışmada kullanılan beş antioksidanın farklı pH' larda DPPH• ile reaksiyonunun takibinde antioksidan aktivite açısından pH bazlı farklılıklar gözlenmiştir. Antioksidanların pH bazlı aktivite sıralaması aşağıdaki şekildedir.

Gallik asit	:	su > pH 7 > pH 2 > pH 10
Troloks	:	su > pH 7 > pH 2 > pH 10
BHT	:	pH 7 > su > pH 10 > pH 2
Kateşin	:	pH 10 > pH 7 > su > pH 2
C Vitamini	:	pH 2 > su > pH 7 > pH 10

Sulu ve pH 7 tamponlu ortamlarda aktivitenin genelde daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Özellikle C vitaminindeki sıralama her bir antioksidanın aktivitesinin pH' dan farklı şekilde etkileneceğini göstermektedir.

#### 4.2.4.3. Antioksidan-DPPH• Etkileşimine Tampon Konsantrasyonunun Etkisi

BHT ve Troloksun DPPH• ile reaksiyonunda pH 2, pH 7 ve pH 10' da antioksidan ve tampon konsantrasyonu ile absorbans değişimi incelendi. Bu incelemede BHT için pH 10' da tampon konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivite düşmektedir. pH 7' de 1,3 mM konsantrasyona kadar tampon konsantrasyonundan antioksidan aktivite etkilenmemektedir, ancak 1,3 mM' dan yüksek konsantrasyonlara doğru gidildikçe aktivite azalmaktadır. pH

2’de ise tampon konsantrasyonundan aktivite etkilenmemektedir. Troloks için ise pH 10’da 1,3 mM konsantrasyona kadar farklılık gözükmemekte, tampon konsantrasyonu arttıkça antioksidan aktivite düşmektedir, pH 7’de ise 5,21 mM konsantrasyona kadar tampon konsantrasyonundan antioksidan aktivite etkilenmemektedir. Ancak 5,21 mM’ dan yüksek konsantrasyonlara doğru gidildikçe aktivite azalmaktadır. pH 2’ de ise tampon konsantrasyonundan aktivite etkilenmemektedir. Antioksidan aktiviteyi tampon konsantrasyonundan bağımsız olarak düşündüğümüzde ise pH 7 ve pH 2 nin aktivite üzerine etkisi önemli değildir, ancak pH 10’ nun aktiviteyi düşürdüğü görülmüştür. Bunun muhtemel sebebi de DPPH• molekülünün pH 10’da bozunmasıdır. Bu değerlendirilmeler yapılırken aşağıdaki tablodaki gibi % bağıl standart sapma değerleri hesaplandı. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda tampon kullanılmasıyla üretilen grafiklerden elde edilen SC<sub>50</sub> değerleri kullanıldı.

Tablo 10. Antioksidan-DPPH• etkileşimi için farklı tampon konsantrasyonlarında elde edilen SC<sub>50</sub> değerlerinin % bağıl standart sapmaları

Antioksidan	pH	% Bağıl Standart Sapma
BHT	2	8,53
	7	13,76
	10	62,25
Troloks	2	3,76
	7	21,87
	10	17,63

Hesaplanan %bağıl standart sapmanın büyük olması, antioksidan aktivitenin tampon konsantrasyonundan fazla etkilendiğini göstermektedir. Ölçülen SC<sub>50</sub> değerinin farklı pH’lar için tampon konsantrasyonundan etkilenme sıralamasında pH 2 en iyi performansı gösterirken, pH 10’da en kötü performans görülmektedir.

#### 4.2.4.4. Antioksidan-DPPH•-Tampon Karışımlarında pH' nın Takibi

Bu çalışmada reaksiyon ortam pH'sını tampon çözeltiler ile istediğimiz değere ayarladığımızda test ortamının pH' sının takibi BHT, troloks, gallik asit, c vitamini ve kateşin kullanılarak yapıldı (Tablo 9). Bu takip sonucunda pH 2'nin 3'e, pH 7'nin 8'e çıktığı bulundu ve pH 10'nun ise test ortamında önemli ölçüde değişmediği görüldü.

### 4.3. Antioksidanların Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi

#### 4.3.1. Beş Antioksidan Standardın HPLC Analizi

5 standart antioksidanın HPLC analizi yapıldı ve alıkonma süreleri belirlendi. C vitamini 4,5. dakikada, gallik asit 6,5. dakikada, kateşin 13. dakikada, Troloks 18. dakikada ve BHT 19,5. Dakikadaki pikler olarak kromatogramda görüldü.

#### 4.3.2. Antioksidanların Farklı pH' larda Kararlılığının HPLC ile Belirlenmesi

Beş standart antioksidanın karışımının kromatografik analizi yapıлып standartların alıkonma süreleri belirlendikten sonra farklı pH' larda bekletme neticesinde herhangi bir değişimin olup olmadığı araştırıldı. Aynı karışım farklı pH' larda bekletilmeden ve 24 saat bekletilerek yapılan analizlerin sonucunda C vitamininin tampon ile karıştığı an itibari ile bozulduğu sonucuna varıldı. Tamponlu HPLC analizinde C vitamini piki gözlemlenemedi. Diğer antioksidanlar değerlendirilirse, gallik asitin alıkonma süresi ve pik alanına bakarak yapılan karşılaştırmada pH 2'den etkilenmediği, pH 7'de pik boyutunun arttığı ve pH 10'da pik boyutunun azaldığı gözlemlendi. Kateşinin pH 2 ve pH 10'da pik boyutunun azaldığı, pH 7'de ise arttığı gözlemlendi. Troloksun pH 2 ve pH 7'de pik boyutunun arttığı sonucu bulundu, pH 10'da ise bir değişme gözlemlenmedi. BHT' nin ise her üç pH daki çalışmada pik boyutunun azaldığı görüldü. Çalışma sonuçları bitkilerden elde edilen ekstraktların farklı pH'larda olması durumunda bileşenlerinin miktarlarında değişiklik olacağını göstermektedir.

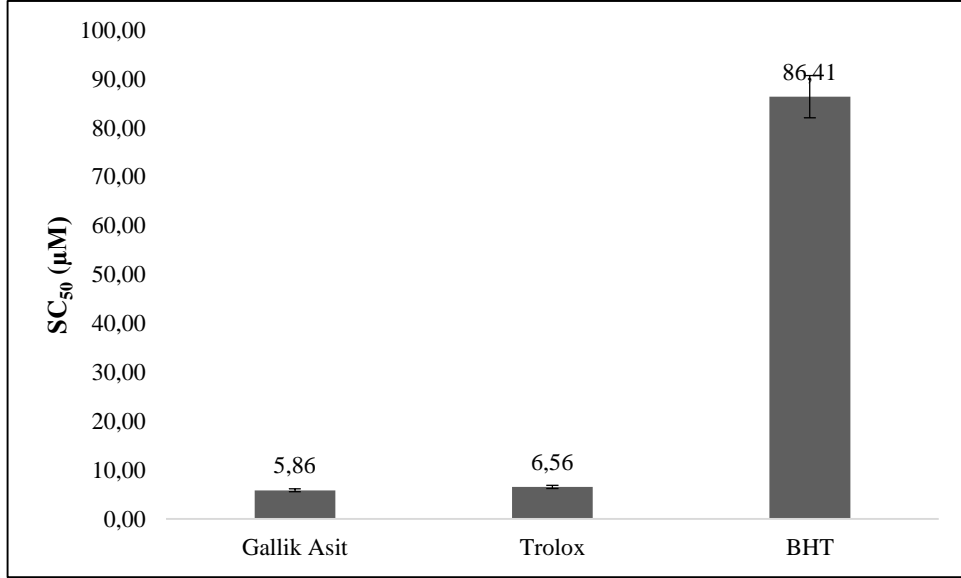
#### 4.4. Yeşil Çay ile Farklı pH' larda Çalışmalar

##### 4.4.1. Yeşil Çay Ekstraktlarının Antioksidan Aktiviteleri

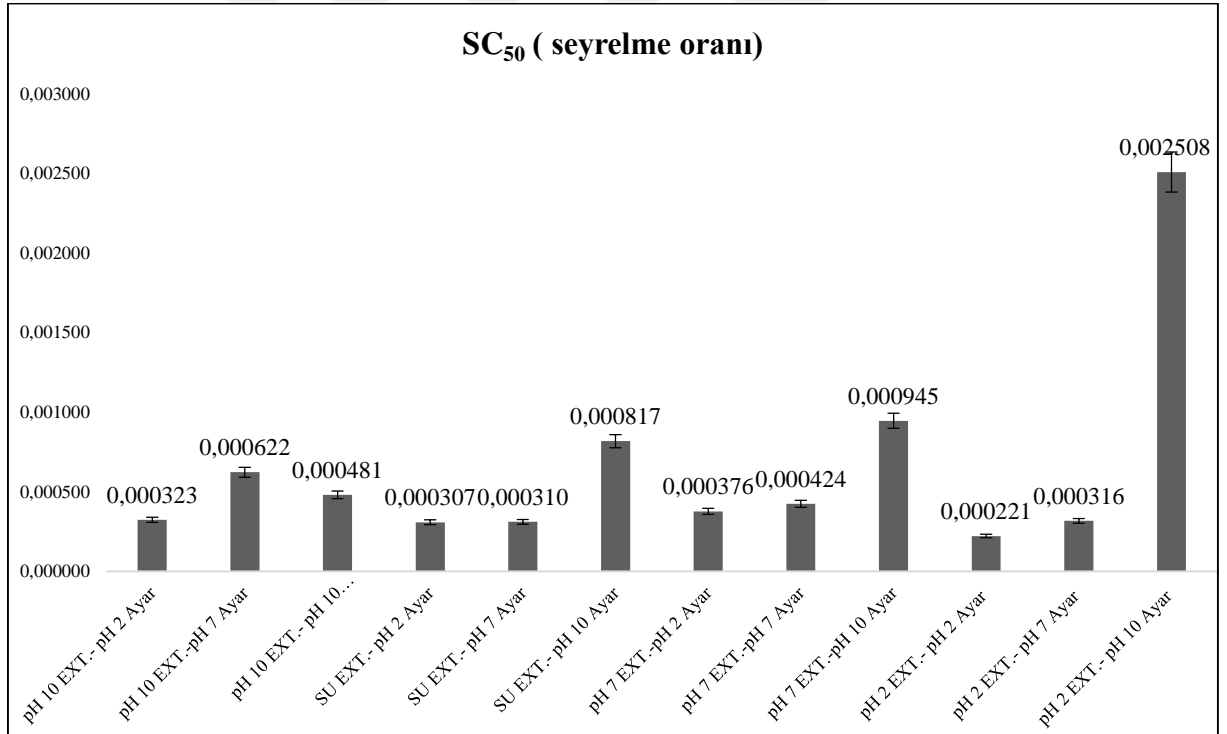
###### 4.4.1.1. DPPH• Giderim Testi

Çaylarda yapılan çalışmalar yüksek antioksidan aktivitenin daha az asitli ortamda gözlemlendiğini göstermektedir [29]. Bitki üzerinde yapılan bir çalışmada ise alkali pH' nın antioksidan aktiviteyi artırdığı bulunmuştur [71]. Literatürdeki diğer bir çalışmada HCl konsantrasyonunun olumsuz bir etkisi olduğu gösterilmiştir. Çalışmada asidik ortamda ekstrakte edilen bitkinin DPPH• ve ABTS yöntemi ile antioksidan aktivitesine bakılmış ve çözücü içindeki HCl konsantrasyonunun daha düşük aktiviteye sebep olduğu sonucuna varılmıştır [38]. Diğer bir çalışmada ise *n*-bütanol ve etil asetat ekstraktlarının DPPH• giderim testi sonuçları karşılaştırmalı olarak incelenmiş, çözücü tipinin giderim performansı üzerinde önemli etkisi olduğu bulunmuştur [72]. Literatürdeki diğer bir çalışmada sıcaklıktan bağımsız olarak pH 2 ile 4 aralığında depolamanın kararlılığa olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir [73]. Literatürde bir diğer çalışma pH 4.5' te elde edilen fenolik ekstrakt, toplam ve bireysel fenollerin daha yüksek bir oranına ve pH 2.5' te elde edilen ekstraktan daha fazla *in vitro* antioksidan kapasiteye sahip olduğu gösterildi [74].

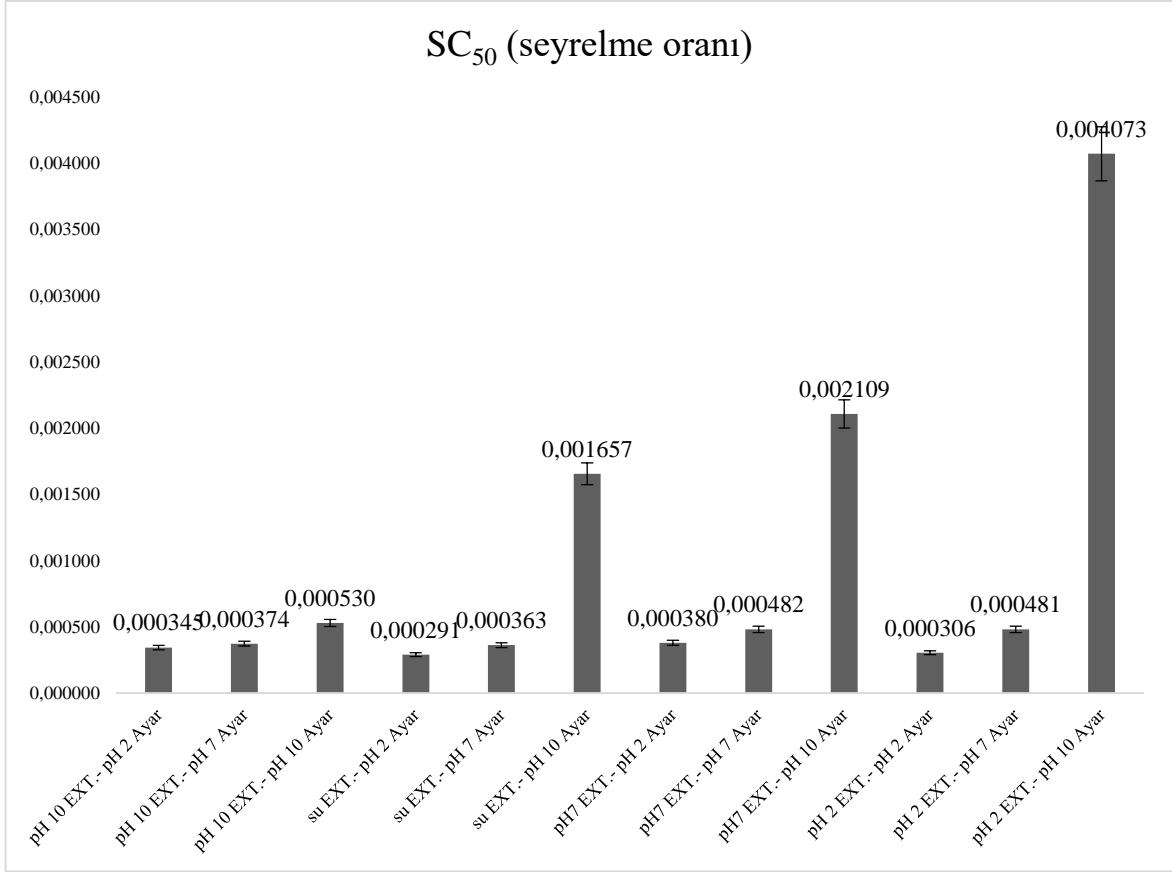
Tez çalışmasında yeşil çaydan su ve pH'sı 2, 7 ve 10 olan tamponlar kullanılarak ekstraktlar hazırlanmış, bu ekstraktlar üçer kısıma ayrılarak her birinin pH'sı 2, 7 ve 10'a ayarlanmıştır. Daha sonra bu karışımların DPPH• giderim testi ilk gün (Şekil 131.) ve 10 gün bekletildikten sonra (Şekil 132) çalışmıştır. Çalışma sonuçlarının kıyaslanabilmesi için de gallik asit, Troloks ve BHT standart antioksidan olarak kullanılmıştır (Şekil 130). Böylece hem çaydan farklı pH'larda ekstrakte edilen bileşenlerin aktiviteleri, hem de bu bileşenlerin farklı bekletme pH'larında kararlılıkları incelenmiştir.



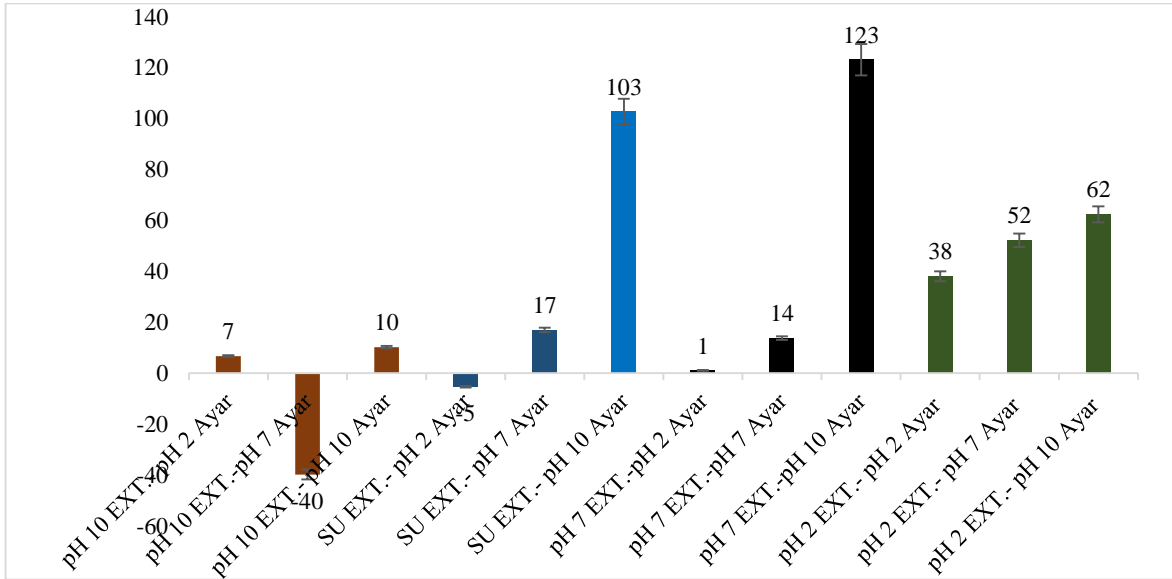
Şekil 130. Standartların DPPH• giderim testi ile bulunan SC<sub>50</sub> (µM) değerleri



Şekil 131. Yeşil çay ekstraktlarının bekletilmeden DPPH• giderim testi ile bulunan SC<sub>50</sub> değerleri (seyrelme oranı)



Şekil 132. Yeşil çay ekstraktlarının 10 gün bekletildikten sonra DPPH• giderim testi ile bulunan SC<sub>50</sub> değerleri (seyrelme oranı)



Şekil 133. Ekstraktların ilk günden 10. güne DPPH• giderim testi ile %SC<sub>50</sub> değişimleri

Farklı pH' larda elde edilen ekstraktların depolama pH' larına ayarlanıp DPPH• giderim testi yapılması sonucunda bekleme ile pH 10 ekstraktının pH 7'ye ayarlanması ile oluşturulan karışımın aktivitesi 10 gün sonunda artmıştır. Çok az bir aktivite artışı da su ekstraktının pH 2'ye ayarlanması ile elde edilen karışımda gözlenmiştir. pH 2 ekstraktının pH 2'ye ayarlanması ile 10 gün sonunda aktivitede %120 oranında bir azalma görüldü. pH 7 ekstraktının da pH 2'ye ayarlanması ile aktivitede 10 gün sonunda %100 azalma görüldü. Şekil incelendiğinde varılan sonuç hemen hemen bütün pH' larda bekletmeyle aktivitenin azaldığı, dolayısıyla da kompozisyonun değiştiğidir. Antioksidan aktivitede oluşan farktan dolayı farklı pH'larda farklı süreler bekletilen numuneler arasında aktivite kıyaslaması yapılamayacaktır.

#### 4.4.1.2. Toplam Fenolik Madde Miktarı

Literatürdeki çalışmalara bakıldığında farklı pH'da ekstrakte edilen deniz yosununun toplam fenolik madde miktarı çalışmasının sonuçlarında düşük pH' nın fenolik bileşenlerin oksidasyonunu önleyebileceği sonucuna varılmıştır [75].

Tatlı patates unu ile yapılan çalışmada mide bağırsak pH'sında yapılan ekstraksiyon sonucunda toplam fenolik madde içeriği anlamlı derecede yüksek çıktığı bulunmuştur [24].

Şeftali püresinin depolama şartlarına pH'nın etkisi çalışmasında depolama süresi, antioksidan aktivite azalması üzerinde önemli bir etki göstermiştir, çünkü daha uzun depolama periyotları düşük antioksidan etki ile ilişkilendirilmiştir [41].

Tez çalışmasında yeşil çaydan su ve pH' sı 2, 7 ve 10 olan tamponlar kullanılarak hazırlanan ekstraktların pH' sı 2, 7 ve 10'a ayarlanmış hallerindeki toplam fenolik madde miktarları Folin-Ciocalteu testi ile çalışılmıştır. Fenolik madde miktarının hesaplanmasında gallik asit (Şekil 78.) ve kateşin (Şekil 79.) kalibrasyon grafikleri kullanılmış, sonuçlar gallik asit eşdeğeri ( $\mu\text{M}$  GAE, Şekil 80) ve kateşin eşdeğeri ( $\mu\text{M}$  KE, Şekil 81) cinsinden değerlendirilmiştir.

Toplam fenolik madde cinsinden antioksidan aktivite değerlendirildiğinde pH 10'a ayarlanan ekstraktların GAE (gallik asit eşdeğeri) ve KE (kateşin eşdeğeri) değerleri düşük çıkmıştır. Hem pH 2 ekstraktları hem de diğer pH'larda elde edilen ekstraktların pH 2'ye ayarlanmış halleri genel olarak yüksek fenolik madde miktarı göstermiştir

#### 4.4.1.3. Demir İndirgeme / Antioksidan Güç (FRAP)

Demir indirgeme antioksidan güç deneyleri numunenin potansiyel antioksidan kapasitesinin belirlenmesi için yapıldı. Literatürdeki yeşil çayın FRAP çalışmaları tarandığında Troloks eşdeğeri olarak  $1899.19 \pm 315.79$   $\mu\text{mol}$  Trolox/g kuru ağırlık bulunmuştur [76]. Bu tez çalışmasında ise sonuçlar Troloks eşdeğeri olarak  $\mu\text{M}$  cinsinden hesaplandı (Şekil 82).

Sonuçlar değerlendirildiğinde toplam fenolik madde testi sonuçlarıyla paralellik görülmüştür, pH 10'na ayarlanan ekstraktların aktivitesinin düşük, en yüksek aktivitenin ise pH 2 ekstraktlarında ve pH 2'ye ayarlanmış ekstraktlarda olduğu bulunmuştur (Şekil 83).

#### 4.4.1.4. On-line HPLC-FRAP Analizi

Literatürdeki çalışmada araştırmacılar yeşilçayı ekstrakte ederken pH'yı 1'den 9'a kadar HCl ve NaOH ile ayarlayıp her bir pH'da ekstrakte etmiş ve ekstraksiyona pH'nın etkisini çalışmışlardır [61]. Sonuç olarak kateşinleri daha iyi izole etmek için pH 5 den küçük şartlarda çalışması gerektiği ifade edilmiştir.

Çay polifenollerinin düşük sıcaklık ve asidik koşullarda kararlılığını koruduğu, pH ne kadar yüksekse yani nötr pH ve bazik pH ya doğru yükseldikçe çay polifenollerinin o kadar kararsız hale geldiği, pH 7 de ve 100 °C'de geçirgenlik, bozulma, renk parametrelerinin önemli ölçüde etkilendiği literatürdeki çalışmada bildirilmiştir [77].

Epigallokateşingallat ile yapılan bir başka çalışmada işleme veya depolama sırasındaki kayıpları tahmin etmek amaçlanmış, sonuçta pH arttıkça bozunmanın da arttığı gözlemlenmiştir [78]. Yeşil çay kateşinlerinin stabilitesi çalışmasında HPLC analizleri ile de pH'nın 7,4 de kateşinleri bozduğu ve asidik pH'larda bozulmanın daha az olduğu gözlemlenmiştir [79].

EGC, EGCG ve ECG'nin saf çay ve katkı maddeli çaylarda karşılaştırılması, askorbik asit içeren tüm katkı maddeleri, sitrik ve askorbik asitli EGC hariç, önemli ölçüde daha yüksek konsantrasyonlara neden olmaz. Tamponlar ve sitrik asit, önemli ölçüde daha yüksek EGC, EGCG ve ECG konsantrasyonlarına neden olur. pH 4.8 veya 3.0 olan tüm katkı maddeleri için flavanol konsantrasyonları, birbirleri arasında önemli ölçüde farklı değildir. Bu, mevcut asitten bağımsız olarak pH'ın etkisini gösterir [80].

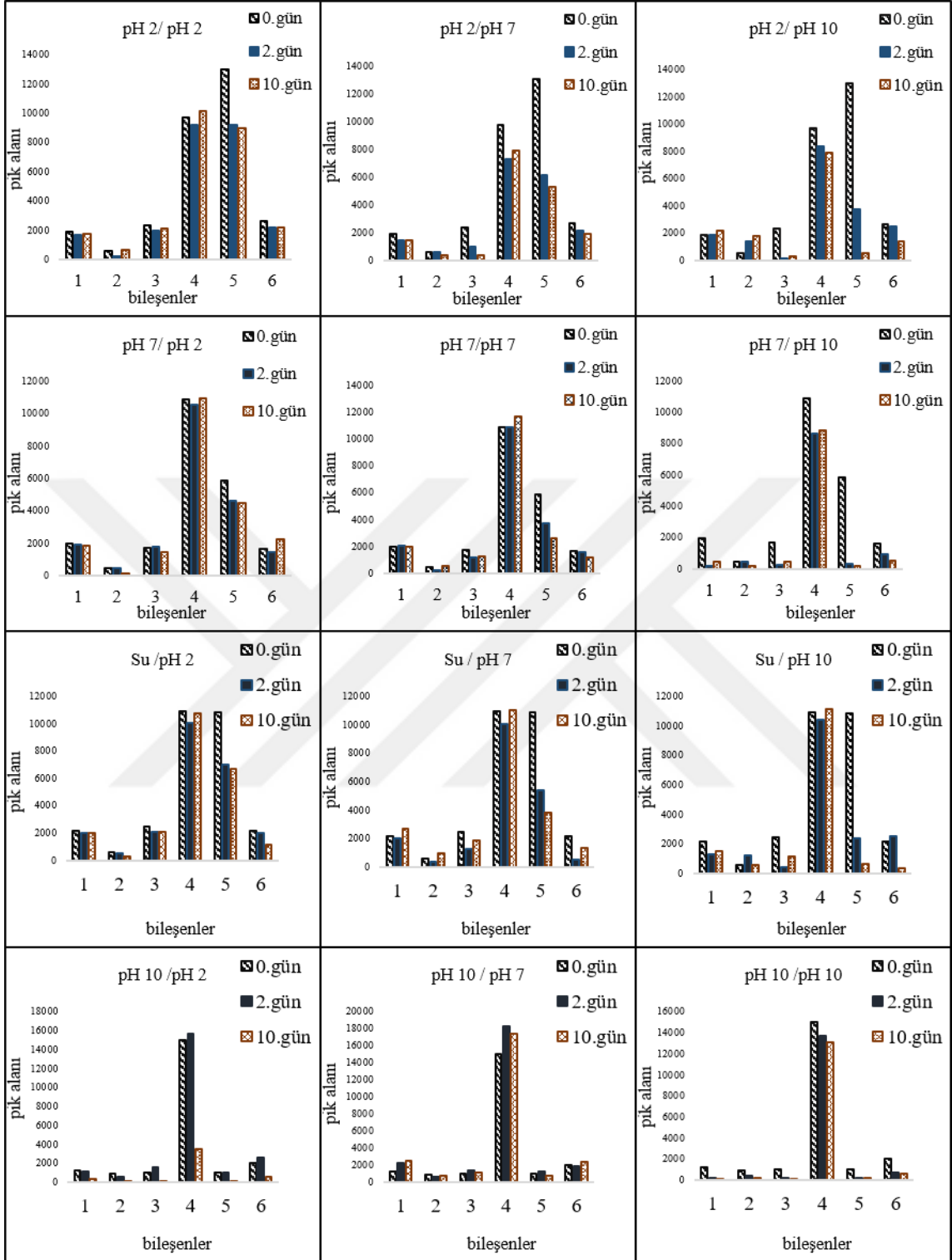


Sulu ortam ekstraksiyon etkinliği için pH, ana faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Bu, flavanollerin pH'ın 5'in altındaki yüksek stabilitesi ile açıklanabilir. Flavanollerin suya difüzyonunun pH'dan etkilenmediği, ancak flavanollerin yapısal değişikliklerinin, azalan pH ile yavaşladığı varsayılmaktadır. Spiro & Price (1987a) ve Spiro ve diğ. (1987) ayrıca düşük pH'da theaflavin ve thearubigin konsantrasyonlarının arttığını bulmuşlardır. Bu, yaprağın normal olarak erişilemeyen parçalarının açılmasına yol açan yapısal bir bozulma ile açıklanmaktadır. Bu durum kesinlikle yeşil çay için de geçerlidir [80].

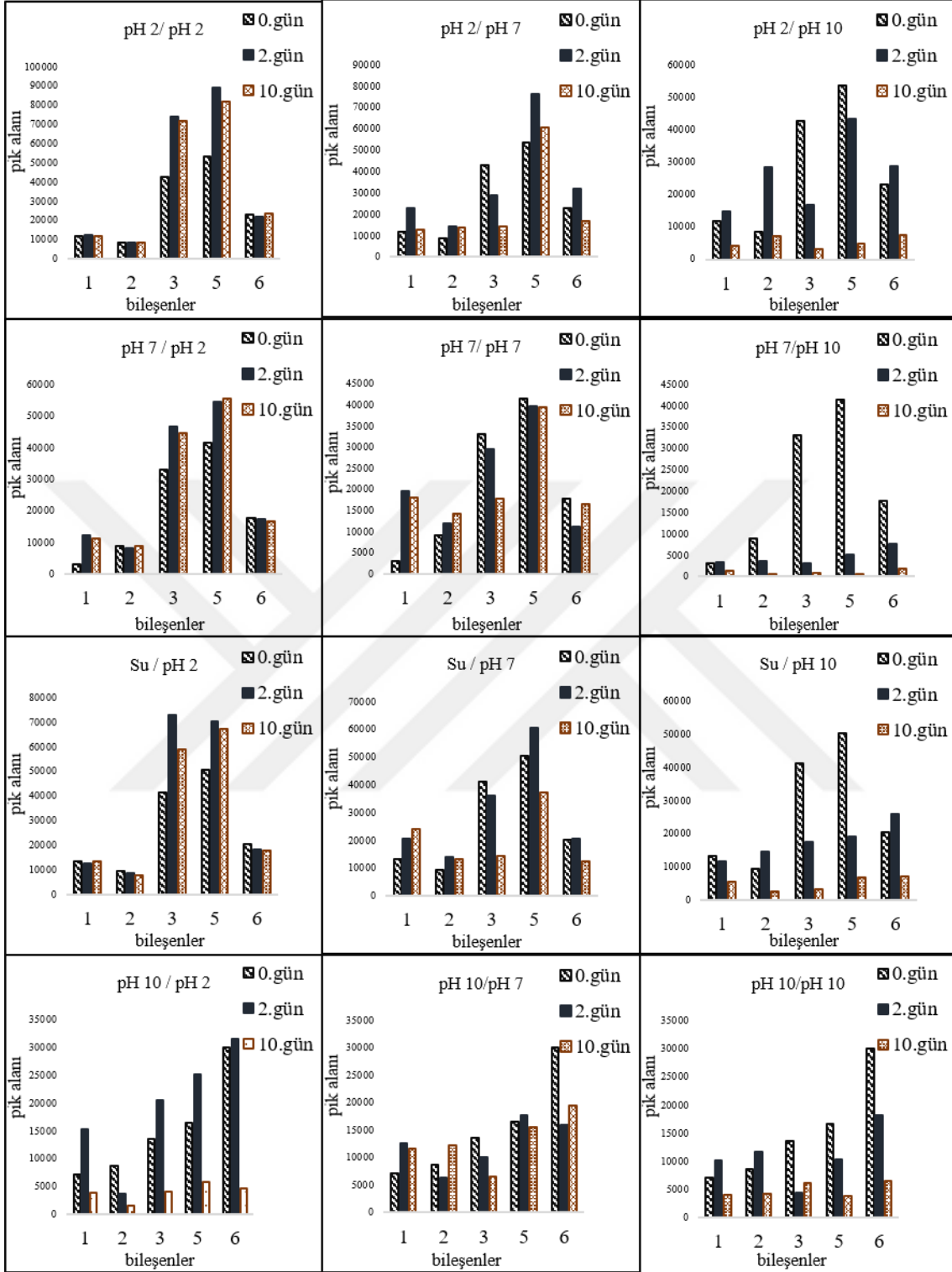
Tez çalışmasında yeşil çay ekstraktlarında 6 majör bileşik belirlendi. Bu bileşikler:

1. Gallik asit
2. Bilinmiyor
3. Epigallokateşin
4. Kafein
5. Epigallokateşingallat- Epikateşin karışımı
6. Epikateşin gallat

Her bir bileşen için 0., 2. ve 10. günde elde edilen kromatogramlardan 280 ve 595 nm de pik alanları hesaplandı ve pik alanı sütun grafikleri 280 nm (bileşen belirleme, Şekil 137.) ve 595 nm (FRAP aktivitesi belirleme, Şekil 138.) için oluşturuldu. Bileşiklerin 280 nm'deki verileri değerlendirildiğinde pH 2 ekstraktı pH 2, pH 7, pH 10'a ayarlanıp analiz yapıldığında pH 2'den pH 10'a doğru gidildikçe pik alanında azalma olduğu bulundu. 5 nolu bileşikte pik alanında azalma gün geçtikçe daha hızlı olmaktadır. pH 7 ekstraktları pH 2'den pH 7 ve pH 10'a ayarladığında asidik pH'dan bazik pH'ya doğru pik alanında azalma görölmektedir. 4 nolu bileşik hariç diğer bileşiklerde pH 10'a ayarlandığında pik alanındaki azalma fazladır. Su ekstraktları pH ayarlamalarından çok fazla etkilenmemesine rağmen en fazla etkilenme pH 10'a ayarlanan bileşiklerdedir. pH'10 da ekstraksiyon sonucunda belirlenen majör bileşiklerin miktarları çok düşüktür. pH 2'ye ayarlandığı zaman 4 nolu bileşikte pik alanı azalması çok fazladır.



Şekil 134. 280 nm de yeşil çay ekstraktlarının pik alanları



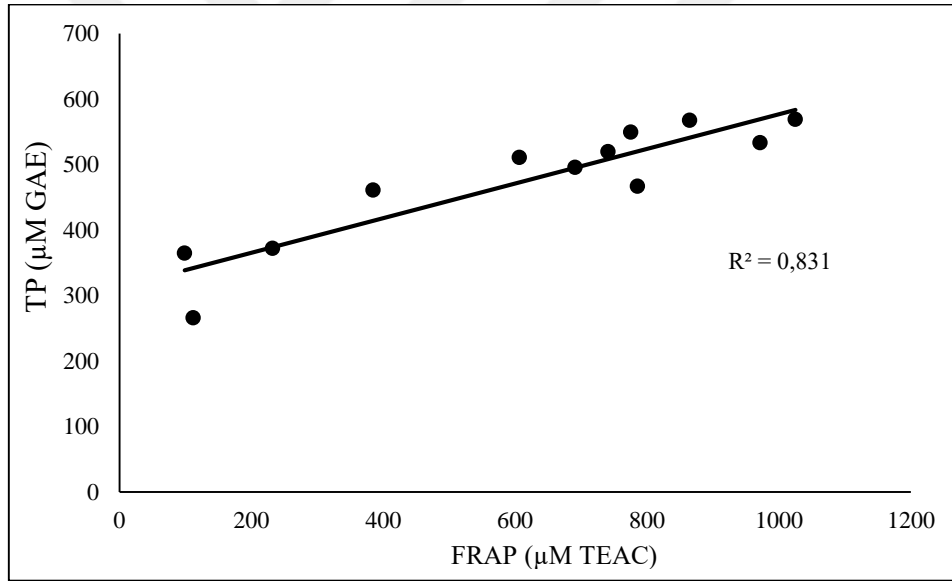
Şekil 135. 595 nm de yeşil çay ekstraktlarının pik alanları

On-line HPLC-FRAP analizleri 595 nm'de şekil 138'de verilen grafikler incelendiğinde pH 2 ekstraktları diğer pH'lara ayarlandığında asidik pH'dan bazik pH'ya

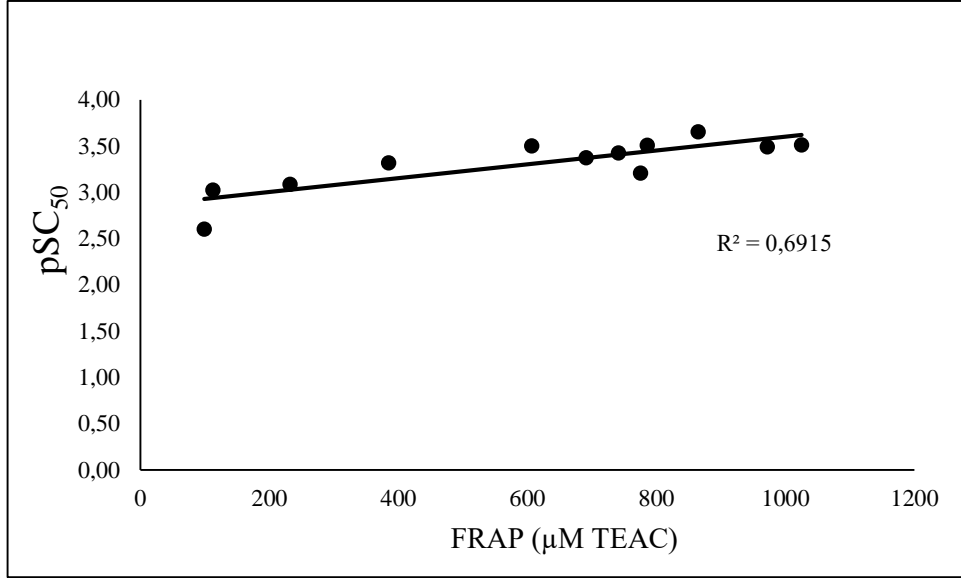
gidildikçe aktivite düşmektedir. pH 2 ye ayarlandığında 3 ve 5 nolu bileşiklerde 2. günde aktivite artıp 10. günde düşmektedir. pH 7 ekstraktlarında da aynı işlem uygulandığında sonuçlar benzerdir, ancak pH 10'a ayar yapıldığında aktivite yok denecek kadar azalmaktadır. Su ve pH 10 ekstraktlarında da sonuçlar benzerdir. Tüm ekstraktların pH 2'ye ayarlandıkları sonuçlara baktığımızda 2. günde bir aktivite artışı gözlemlendi.

#### 4.4.1.5. Antioksidan Aktivite Korelasyonları

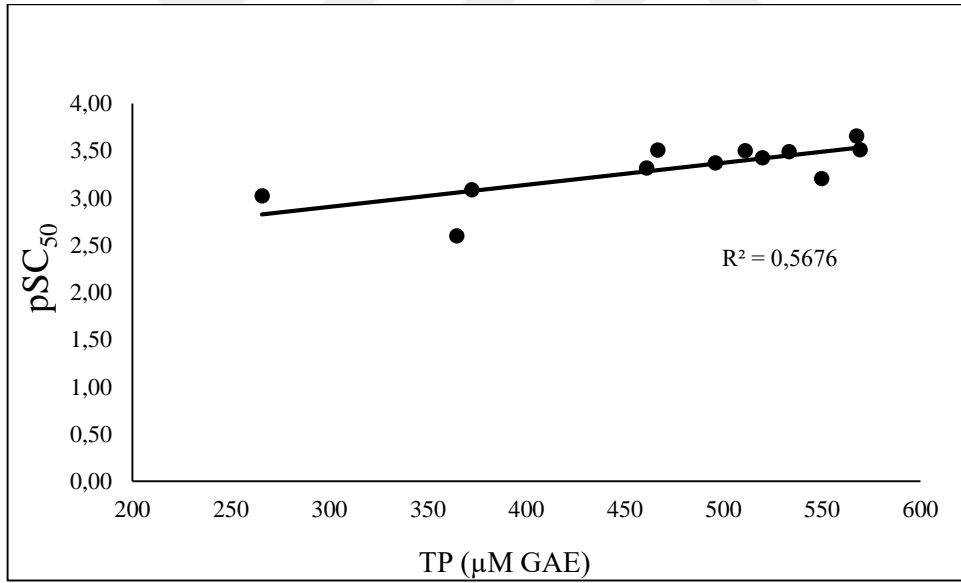
Yapılan antioksidan çalışmalarının sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi için korelasyon grafikleri çizildi (Şekil 139 - 142). Bu korelasyon grafiklerine göre antioksidan sonuçlar arasında iyi bir ilişki olduğu görüldü. Sonuçlar birbirlerini desteklemektedirler.



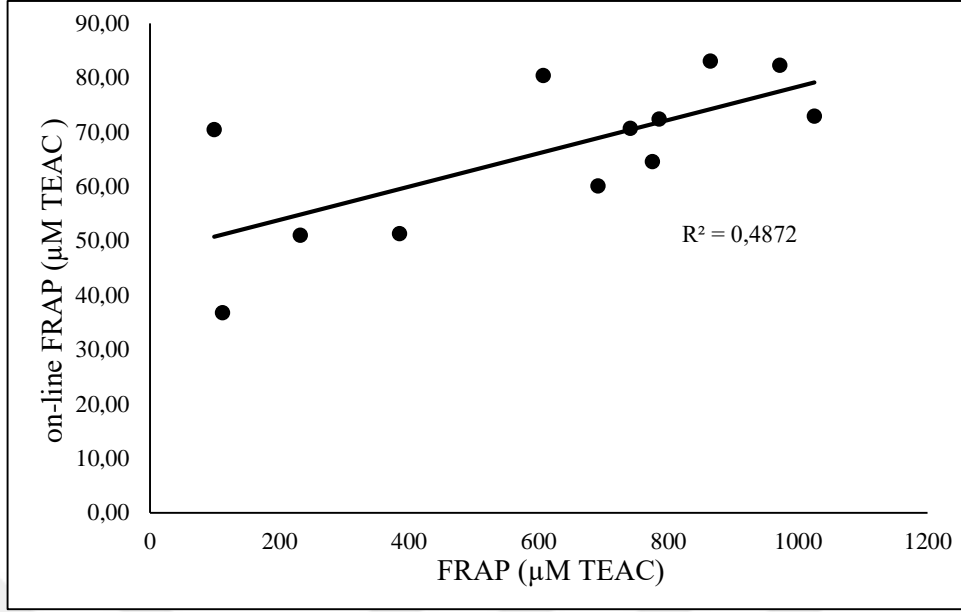
Şekil 136. Yeşilçay ekstraktlarında FRAP ile toplam fenolik madde miktarının (TP) korelasyonu



Şekil 137. Yeşilçay ekstraktlarında FRAP ile pSC<sub>50</sub> korelasyonu. pSC<sub>50</sub> değerleri DPPH• testinde SC<sub>50</sub> değerlerinin -log'u alınarak elde edilmiştir.



Şekil 138. Yeşilçay ekstraktlarında TP (toplam fenolik madde miktarı) ile pSC<sub>50</sub> korelasyonu



Şekil 139. Yeşilçay ekstraktlarında FRAP ile on-line FRAP korelasyonu

On line yöntemler ile klasik yöntemler arasında farklılıklar olabilmektedir. Bunun sebebi de sinerjiden ya da tersi etkilerden kaynaklanmaktadır. Klasik yöntemde bileşenler bir aradayken etkileşim içinde olmakta, on-line HPLC-FRAP yönteminde ise ayrılmış olarak tek tek FRAP reaktifiyle reaksiyona girmektedir.

#### 4.4.2. Yeşil Çay Ekstraktlarının bCA Enzim İnhibisyonu

Ayça Aktaş Karaçelik'in doktora tezinde bu tez çalışmasında da kullanılan organik zümrüt yeşil çayın sığır karbonik anhidraz (bCA) enzimini %71 oranında inhibe ettiğini bulmuştur [5]. Yapılan mevcut çalışmada ise ekstraksiyon sırasında ve sonrasında pH farklılıklarının etkisi araştırılmış, yeşil çayın bCA inhibisyon sonuçları Tablo 10'da verilmiştir. Bu sonuçlara göre en yüksek inhibisyona pH 10'da ekstraksiyon yapıldıktan sonra pH 2 ile yapılan ayarlama işleminde ulaşıldı. En düşük inhibisyon değerleri ise pH 10 ile yapılan ayarlamalarda gözlemlendi.

Tablo 11. Yeşilçay ekstraktlarının karbonik anhidraz enzimi üzerine %inhibisyon değerleri

Numune	% İnhibisyon
Sülfanilamid	60
Asatozolamid	54
pH2/pH2 1/4sey	66
pH2/pH7 1/4 sey.	52
pH2/pH10 1/4 sey.	17
pH10/pH2 1/4 sey.	70
pH10/pH7 1/4 sey.	64
pH10/pH10 1/4 sey.	61
pH7/pH2 1/4 sey.	50
pH7/pH7 1/4 sey.	44
pH7/pH10 1/4 sey.	32
su/pH2 1/4 sey.	61
su/pH7 1/4 sey.	41
su/pH10 1/4 sey.	27
su / su 1/4 sey.	48

## 5. ÖNERİLER

Son yıllarda bitkilerden elde edilen maddeler üzerine yapılan çalışmaların ve bu çalışmalardan elde edilen verilerin karşılaştırılmaları oldukça artmıştır. Ancak farklı çalışmalarda ekstraksiyon ve biyoaktivite ölçümünde kullanılan yöntemler arasında pH, sıcaklık, organik çözücü içeriği gibi birçok faktör açısından farklılıklar vardır. Bu farklılıkların bilinmesi değerlendirmenin doğru şekilde yapılmasını sağlayacaktır. Bu tez çalışmasının hedeflerinden bir tanesi bitkilerden bileşenlerin ekstraksiyonu üzerine pH' nın etkisini incelemek, ekstrakte edilen bileşiklerin bekletme sırasında ortam pH' sından nasıl etkilendiklerini araştırmaktır. Bu amaçla yapılan literatür taramalarının ortaya koyduğu en yaygın kullanılan antioksidan aktivite ölçüm testleri araştırıldı. Bu testlerden DPPH• testinde tampon uygulaması olmadığı için DPPH• testinin tampon ve pH değişimlerine karşı stabilite çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalar planlanırken yine literatür taramasında ABTS yöntemi ile BHT' nin etkileşimine pH' nın, metal iyonu ve su konsantrasyonunun etkisi çalışması [30], ışığın, oksijenin, pH' nın DPPH• molekülü üzerine etkisi çalışmaları yapıldığı bulundu [32]. Tez çalışmasında ekstraksiyon aşamasına geçmeden literatür taraması ile edindiğimiz bilgiler ile DPPH• molekülü üzerine ışığın, çözücünün, pH' nın, sıcaklığın etkisi çalışmaları yapıldıktan sonra belirlediğimiz 5 standart antioksidan ile DPPH• etkileşimine çözücünün, tampon konsantrasyonunun, tampon pH'sının, etkisi çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalardan sonra farklı pH' larda yeşil çayın ekstraksiyon işlemleri yapılarak DPPH• giderim testi, FRAP testi ve toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi çalışmaları ile bu ekstraktların BCA enzimi üzerine inhibisyon çalışması yapıldı. DPPH• giderim testi üzerinde yapılan çalışma ortam sıcaklığının, pH' nın, tampon konsantrasyonunun ve organik çözücü seviyesinin test sonuçlarını çarpıcı şekilde değiştirdiğini göstermiştir.

Bu çalışmada ortam şartları sadece DPPH• giderim ölçüm yöntemi üzerine yapıldı. Ancak bilimsel araştırmalarda kullanılan çok sayıda antioksidan yöntem mevcuttur ve bu yöntemlerin bazılarında ortam tamponlanmakta (FRAP), bazılarında ise tampon ilavesi olmadan ölçüm gerçekleştirilmektedir. Özellikle tampon kullanılmayan testler bu çalışmadaki gibi pH ve çözücü etkisi açısından değerlendirilmelidir. Bazı antioksidan testlerin tamponları olsa da ekstraksiyondan gelen pH farkına nasıl cevap verecekleri çalışılmalıdır. Bu çalışmalara ek olarak değişen konsantrasyonda tamponun etkisi çalışmaları da yapılmalıdır.



Çözücünün etkisi çalışması daha kapsamlı hale getirilmelidir. Reaktiflerin ve numune bileşenlerinin çözünme probleminden kaynaklı ortama eklenen organik çözücülerin çalışmalara etkisi araştırılmalıdır. HPLC uygulamalarında yaygın kullanılan çözücü asetonitril olduğu için on-line HPLC-DPPH• uygulamalarını değerlendirme açısından asetonitril çözücüsünün hem DPPH• molekülüne hem de DPPH• antioksidan etkileşimine nasıl bir etki yaptığı incelenmelidir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar bu konuya kısmen ışık tutmaktadır. HPLC ile bileşen ayrılmasında kullanılan asetonitril, metanol, asetik asit, tampon gibi bileşenler, özellikle de gradient uygulamalar için sonuçları önemli ölçüde etkileyecektir.

Yaygın kullanılan antioksidan aktivite belirleme yöntemlerinden biri olan demir indirgeme / antioksidan güç (FRAP) testinde normalde ortam sulu ve tampon içermektedir. Ancak hem reaktif hazırlama sırasında hem de polaritesi düşük bileşiklerin ya da karışımların aktivitesinin ölçülmesinde karşılaşılan çözünürlük problemlerinin üstesinden gelmek amacıyla BAL (Biyoaktivite Araştırma Laboratuvarı) grubu tarafından yöntem modifiye edilmiş ve FRAP çözeltisini hazırlarken 3:2 oranında metanol:su karışımının kullanıldığı yöntem geliştirilmiştir. Ancak FRAP testinde ölçülen aktivitenin ortama ilave edilen metanolden nasıl etkilendiği de araştırılmalıdır. Bu anlamda grubumuz tarafından ön değerlendirmeler yapılmış, gerekli çalışmalar planlanmıştır.

Çalışmada elde edilen sonuçlar farklı sıcaklık, pH, ışık, oksijen ve çözücü ortamlarında yapılan DPPH radikal giderim ölçüm sonuçlarının karşılaştırılamayacağını göstermektedir. Dolayısıyla birbirleriyle kıyaslanmak istenen DPPH• giderim testi verileri tamamen aynı şartlarda yapılmalıdır.

Ayrıca bu tez çalışmasında DPPH•'nin bozunması takip edilerek elde edilen sonuçlar DPPH testlerinde 517 nm' de absorban ölçümünün yanında 400 nm ve 517 nm'deki değişimlerin mutlak değerlerinin toplamının da kullanılabilceğini göstermiştir, dolayısıyla da ortamda antioksidanlar bulunması durumunda absorbanların nasıl değişeceği ayrı bir çalışmada değerlendirilecektir.

Hedefimiz yaygın kullanılan antioksidan testlere ortam şartlarının ve çözücülerin etkilerini araştırıp bu testlerin karşılaştırılabilmesi için yeni yaklaşımların geliştirilmesi çalışmalarına devam etmektir. Bunlara ek olarak devam eden enzim çalışmalarımızda ekstraksiyon verimini artırmak, düşük miktarlarda yüksek inhibisyon gösteren bileşiklerin izolasyonunu yapmaktır.

## 6.KAYNAKLAR

1. Carocho, M., and Ferreira, I. C., A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and chemical toxicology*, 51 (2013), 15-25.
2. Babenko, L. M., Smirnov, O. E., Romanenko, K.O., Trunova, O. K., Kosakivska I. V., Phenolic compounds in plants: biogenesis and functions. *Ukr. Biochem. J.*, 91(2019), 3.
3. Boo, Y. C., Can Plant Phenolic Compounds Protect the Skin from Airborne Particulate Matter?. *Antioxidants*, 8(9)(2019), 379.
4. Aktaş, A., LC-ESI-MS ve On-Line HPLC-ABTS yöntemleriyle belirlenen gilaburu, kızılıcak, kokulu üzüm ve karayemiş meyvelerinin biyoaktif fenolik bileşimi, Yüksek Lisans Tezi, K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2012.
5. Aktaş Karaçelik, A., Bitkisel çay bileşenlerinin ve gıda katkılarının karbonik anhidraz aktivitesi üzerine etkileri, Doktora Tezi, , K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2018.
6. Alkan Türkuçar, S., Yeni bir on-line HPLC-CA inhibitör belirleme yönteminin geliştirilmesi ve biyoaktif bitki ekstraktların uygulanması, Doktora Tezi, , K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2018.
7. Ruenroengklin, N., Zhong, J., Duan, X., Yang, B., Li, J., and Jiang, Y., Effects of various temperatures and pH values on the extraction yield of phenolics from litchi fruit pericarp tissue and the antioxidant activity of the extracted anthocyanins. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(7) (2008) 1333-1341.
8. Sarangarajan, R., Meera, S., Rukkumani, R., Sankar, P., and Anuradha, G., Antioxidants: Friend or foe?. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(12) (2017) 1111-1116.
9. Del Rio, D., Stewart, A. J., and Pellegrini, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases*, 15(4) (2005) 316-328.
10. Carocho, M., Morales, P., and Ferreira, I. C., Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives. *Trends in food science & technology*, 71 (2018) 107-120.
11. Jochmann, N., Baumann, G., and Stangl, V., Green tea and cardiovascular disease: from molecular targets towards human health. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 11(6) (2008) 758-765.

12. Güleşçi, N., ve Aygül, İ., Beslenmede yer alan antioksidan ve fenolik madde içerikli çerezler. *Gümüşhane Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 5(1) (2016) 109-129.
13. Padh, H., Vitamins for optimal health in Functional Foods, 261-293, Springer, Boston, 1994, MA.
14. Di Vincenzo, A., Tana, C., El Hadi, H., Pagano, C., Vettor, R., and Rossato, M., Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Metabolic Properties of Tocopherols and Tocotrienols: Clinical Implications for Vitamin E Supplementation in Diabetic Kidney Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20) (2019) 5101.
15. Iddir, M., Degerli, C., Dingeo, G., Desmarchelier, C., Schlee, T., Borel, P., and Bohn, T., Whey protein isolate modulates beta-carotene bioaccessibility depending on gastro-intestinal digestion conditions. *Food chemistry*, 291 (2019) 157-166.
16. Higdon, J., Drake, V. J., Delage, B., Johnson, E. J., and Mayer, J. Carotenoids.  $\alpha$ -Carotene,  $\beta$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin, lycopene, lutein, and zeaxanthin. Internet: <http://lpi.oregonstate.edu/mic/dietary-factors/phytochemicals/carotenoids> 12 Kasım 2019.
17. Yehye, W. A., Rahman, N. A., Ariffin, A., Hamid, S. B. A., Alhadi, A. A., Kadir, F. A., and Yaeghoobi, M., Understanding the chemistry behind the antioxidant activities of butylated hydroxytoluene (BHT): A review. *European journal of medicinal chemistry*, 101 (2015) 295-312.
18. Lam, L. K., Pai, R. P., and Wattenberg, L. W., Synthesis and chemical carcinogen inhibitory activity of 2-tert-butyl-4-hydroxyanisole. *Journal of medicinal chemistry*, 22(5) (1979) 569-571.
19. O'brien, R. D., Fats and oils: formulating and processing for applications. CRC press, (2008).
20. Becker, L., Final report on the amended safety assessment of propyl gallate. *International Journal of Toxicology*, 26(2007) 89-118.
21. Dundar, Y., Fitokimyasallar ve Sağlıklı Yaşam. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 2(2).
22. Boğa, A., ve Binokay, S., Gıda katkı maddeleri ve sağlığımıza etkileri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 19(3) (2010) 141-154.
23. Baysal, T., ve Yıldız, H., Bitkisel fenoliklerin kullanım olanakları ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Gıda Mühendisliği Dergisi*, 7(14) (2003) 29-35.
24. Chan, K. W., Khong, N. M., Iqbal, S., Umar, I. M., and Ismail, M., Antioxidant property enhancement of sweet potato flour under simulated gastrointestinal pH. *International journal of molecular sciences*, 13(7) (2012) 8987-8997.

25. Albayrak, S., Sağdıç, O., ve Aksoy, A., Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 26(4) (2010) 401-409.
26. Ardağ, A., Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 2008.
27. İskefiyeli, Z., Damlatma ile Yeni DPPH ve Frap Antioksidan Tayin Yöntemlerinin Geliştirilmesi ve Uygulanması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2014.
28. Haida, Z., and Hakimian, M., A comprehensive review on the determination of enzymatic assay and nonenzymatic antioxidant activities. *Food science & nutrition*, 7(5) (2019) 1555-1563.
29. Peđal, A., and Pyrzyńska, K., Effect of pH and metal ions on DPPH radical scavenging activity of tea. *International journal of food sciences and nutrition*, 66(1) (2015) 58-62.
30. Dawidowicz, A. L., and Olszowy, M., Antioxidant properties of BHT estimated by ABTS assay in systems differing in pH or metal ion or water concentration. *European Food Research and Technology*, 232(5) (2011) 837-842.
31. Yu, X., Zhao, M., Hu, J., Zeng, S., and Bai, X., Influence of pH on the formation and radical scavenging activity of volatile compounds produced by heating glucose with histidine/tyrosine. *European Food Research and Technology*, 234(2) (2012) 333-343.
32. Ozcelik, B., Lee, J. H., and Min, D. B., Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Journal of Food Science*, 68(2) (2003) 487-490.
33. Bates, R. G., and Vijh, A. K., Determination of pH: theory and practice. *Journal of The Electrochemical Society*, 120(8) (1973) 263C-263C.
34. Sun, B. T., Kongbangkerd, T., Rojsuntornkitti, K., and Jittrepotch, N., Influence of pH and extraction conditions on antioxidant properties from purple sticky rice (*Oryza Sativa*. L. *Glutinosa*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 9(2) (2019) 847-852.
35. Chumsri, P., Sirichote, A., and Itharat, A., Studies on the optimum conditions for the extraction and concentration of roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) extract. *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 30(2008).

36. Mateos, R., García-Ortíz Civantos, C., Castro, J., and Garcia-Mesa, J. A., Direct spectrophotometric determination of bitterness in virgin olive oil without prior isolation by pH gradient. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(24) (2005) 9615-9619.
37. Keha, E.E. ve Küfrevioğlu, Ö. İ., *Biyokimya, Aktif Yayınevi, Erzurum*, 2012
38. Li, F., Zhao, H., Xu, R., Zhang, X., Zhang, W., Du, M., and Fan, L., Simultaneous optimization of the acidified water extraction for total anthocyanin content, total phenolic content, and antioxidant activity of blue honeysuckle berries (*Lonicera caerulea* L.) using response surface methodology. *Food Science & Nutrition*, (2019).
39. Jusoh, Y. M. M., Idris, A. A., Khairuddin, N., Zaidel, D. N. A., Hashim, Z., Mahmooda, N. A. N., and Muhamad, I. I., Effect of solvent pH, microwave power and extraction time on microwave-assisted extraction of *Hibiscus rosa-sinensis*. *Chemical Engineering Transactions*, 63(2018) 541-546.
40. Rodrigues, L. M., Dos Santos, S. S., Bergamasco, R. C., and Madrona, G. S., Jaboticaba byproduct encapsulation by lyophilization: pH and food application stability. *Journal of Food Process Engineering*, 41(1) (2018) e12639.
41. Oliveira, A., Gomes, M. H., Alexandre, E. M., Almeida, D. P., and Pintado, M., Impact of pH on the phytochemical profile of pasteurized peach puree during storage. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62(50) (2014) 12075-12081.
42. Barros, H. D., Baseggio, A. M., Angolini, C. F., Pastore, G. M., Cazarin, C. B., and Marostica-Junior, M. R., Influence of different types of acids and pH in the recovery of bioactive compounds in Jaboticaba peel (*Plinia cauliflora*). *Food Research International*, (2019).
43. Badger, M. R., & Price, G. D., The role of carbonic anhydrase in photosynthesis. *Annual review of plant biology*, 45(1) (1994) 369-392.
44. Lindskog, S., Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics*, 74(1) (1997) 1-20.
45. Parkin, G., Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. *Chemical Reviews*, 104(2) (2004) 699-768.
46. Wang, F., Lothrop, A. P., James, N. G., Griffiths, T. A., Lambert, L. A., Leverence, R., and Mason, A. B., A novel murine protein with no effect on iron homeostasis is homologous with transferrin and is the putative inhibitor of carbonic anhydrase. *Biochemical Journal*, 406(1) (2007) 85-95.

47. İskefiyeli, Z., Ormangülü (Rhododendron) Uçucu Yağ Ve Ekstraktlarının Kimyasal Bileşimleri Ve Biyolojik Aktiviteleri, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2010.
48. Supuran, C. T., How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist?, *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 31(3) (2016) 345-360.
49. Jakubowski, M., Szahidewicz-Krupska, E., and Doroszko, A., The Human Carbonic Anhydrase II in Platelets: An Underestimated Field of Its Activity. *BioMed research international*, 2018.
50. Supuran, C. T., Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. *Nature reviews Drug discovery*, 7(2) (2008) 168.
51. Liu, H. M., Chiang, I. J., Kuo, K. N., Liou, C. M., and Chen, C., The effect of acetazolamide on sleep apnea at high altitude: a systematic review and meta-analysis. *Therapeutic advances in respiratory disease*, 11(1) (2017) 20-29.
52. Schmidl, D., Schmetterer, L., Garhöfer, G., and Popa-Cherecheanu, A., Pharmacotherapy of glaucoma. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 31(2) (2015) 63-77.
53. Scozzafava, A., and Supuran, C. T., Carbonic anhydrase activators: high affinity isozymes I, II, and IV activators, incorporating a  $\beta$ -alanyl-histidine scaffold. *Journal of medicinal chemistry*, 45(2) (2002) 284-291.
54. Gerber, F., Krummen, M., Potgeter, H., Roth, A., Siffrin, C., and Spoendlin, C., Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3  $\mu$ m particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice. *Journal of Chromatography A*, 1036(2) (2004) 127-133.
55. Kupiec, T., Quality-control analytical methods: High-performance liquid chromatography. *International journal of pharmaceutical compounding*, 8(2004) 223-227.
56. Kafalı, H., Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kolon sonrası türevlendirme ile 7 adet sulfonamid tespitinin metot validasyonu, Doktora Tezi, SDÜ Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta, 2008.
57. Swartz, M., HPLC detectors: a brief review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 33(9-12) (2010) 1130-1150.

58. Schenk, T., Breel, G. J., Koevoets, P., van Den Berg, S., Hogenboom, A. C., Irth, H., and van Der Greef, J., Screening of natural products extracts for the presence of phosphodiesterase inhibitors using liquid chromatography coupled online to parallel biochemical detection and chemical characterization. *Journal of biomolecular screening*, 8(4) (2003) 421-429.
59. Arslan Burnaz, N., On-Line HPLC-FRAP Antioksidan Aktivite Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Bazı Doğal Ürünlere Uygulanması, Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon, 2013.
60. “Anonim”, Çay sektörü raporu, ÇAYKUR, 2015
61. Vuong, Q. V., Golding, J. B., Stathopoulos, C. E., Nguyen, M. H., and Roach, P. D., Optimizing conditions for the extraction of catechins from green tea using hot water. *Journal of separation science*, 34(21) (2011) 3099-3106.
62. da Silva Pinto, M., Tea: A new perspective on health benefits. *Food research international*, 53(2) (2013) 558-567.
63. Rinaldo, D., Batista Jr, J. M., Rodrigues, J., Benfatti, A. C., Rodrigues, C. M., Dos Santos, L. C., and Vilegas, W., Determination of catechin diastereomers from the leaves of *Byrsonima* species using chiral HPLC-PAD-CD. *Chirality*, 22(8) (2010) 726-733.
64. Pietta, P. G., Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7) (2000) 1035-1042.
65. Tournaire, C., Croux, S., Maurette, M. T., Beck, I., Hocquaux, M., Braun, A. M., and Oliveros, E., Antioxidant activity of flavonoids: efficiency of singlet oxygen ( $^1\Delta_g$ ) quenching. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 19(3) (1993) 205-215.
66. Fiuza, S. M., Gomes, C., Teixeira, L. J., Da Cruz, M. G., Cordeiro, M. N. D. S., Milhazes, N., and Marques, M. P. M., Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties—a structure–activity relationship study. Part 1: Methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 12(13) (2004) 3581-3589.
67. Satomi, H., Umemura, K., Ueno, A., Hatano, T., Okuda, T., and Noro, T., Carbonic anhydrase inhibitors from the pericarps of *Punica granatum* L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 16(8) (1993) 787-790.
68. Sharma, O. P., and Bhat, T. K., DPPH antioxidant assay revisited. *Food chemistry*, 113(4) (2009) 1202-1205.

69. Dawidowicz, A. L., and Olszowy, M., Mechanism change in estimating of antioxidant activity of phenolic compounds. *Talanta*, 97(2012) 312-317.
70. Cristea, E., Sturza, R., Jauregi, P., Niculaua, M., Ghendov-Moşanu, A., and Patras, A., Influence of pH and ionic strength on the color parameters and antioxidant properties of an ethanolic red grape marc extract. *Journal of Food Biochemistry*, 43(4) (2019) e12788.
71. Trivedi, A., Ahmad, R., and Misra, A., Effect of alkaline pH on cytotoxicity profile of neem (*Azadirachta indica*) ethanolic extract against human breast cancer cell line MDA-MB-231. *European Journal of Integrative Medicine*, 24 (2018) 1-7.
72. Xia, G., Liu, W., Song, J., Zuo, J., Zhang, Q., Xue, C., and Le, Y., Effective Composition Extraction and Antioxidant Activity of *Dioscorea nipponica*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 20(10) (2018) 2251-2256.
73. Albuquerque, B. R., Prieto, M. A., Barros, L., and Ferreira, I. C., Assessment of the stability of catechin-enriched extracts obtained from *Arbutus unedo* L. fruits: Kinetic mathematical modeling of pH and temperature properties on powder and solution systems. *Industrial crops and products*, 99(2017) 150-162.
74. Rubio-Senent, F., Fernández-Bolaños, J., García-Borrego, A., Lama-Muñoz, A., and Rodríguez-Gutiérrez, G., Influence of pH on the antioxidant phenols solubilised from hydrothermally treated olive oil by-product (alperujo). *Food chemistry*, 219(2017) 339-345.
75. Godlewska, K., Michalak, I., Tuhy, Ł., and Chojnacka, K., The Influence of pH of Extracting Water on the Composition of Seaweed Extracts and Their Beneficial Properties on *Lepidium sativum*. *BioMed research international*, 2017.
76. Zhao, C. N., Tang, G. Y., Cao, S. Y., Xu, X. Y., Gan, R. Y., Liu, Q., and Li, H. B., Phenolic profiles and antioxidant activities of 30 tea infusions from green, black, oolong, white, yellow and dark teas. *Antioxidants*, 8(7) (2019) 215.
77. Zeng, L., Ma, M., Li, C., and Luo, L., Stability of tea polyphenols solution with different pH at different temperatures, *International Journal of Food Properties*, 20:1(2017) 1-18.
78. Zimeri, J., and Tong, C. H., Degradation Kinetics of (–)-Epigallocatechin Gallate as a Function of pH and Dissolved Oxygen in a Liquid Model System. *Journal of Food Science*, 64(5) (1999) 753-758.
79. Zhu, Q. Y., Zhang, A., Tsang, D., Huang, Y., and Chen, Z. Y., Stability of green tea catechins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(12) (1997) 4624-4628.
80. Zimmermann, B. F., and Gleichenhagen, M., The effect of ascorbic acid, citric acid and low pH on the extraction of green tea: how to get most out of it. *Food chemistry*, 124(4) (2011) 1543-1548.



## ÖZGEÇMİŞ

17.08.1993 tarihinde Trabzon' da doğdu. Lise öğrenimi boyunca devlet bursu aldı. 2011 yılında Arsin Lisesi'nden mezun oldu. Aynı yıl Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans eğitimine başladı. 2017 yılında Kimya bölümünden onur öğrencisi olarak mezun oldu. 2017 yılında KTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Biyokimya Bilim Dalında Yüksek Lisans programına başladı. 2018 yılından itibaren lisansüstü öğrenci olarak Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde biyokimya laboratuvarında kısmi zamanlı olarak araştırma görevlisi statüsünde görev yaptı. KCST dergisinin mizampaj editörüdür. Yabancı dili İngilizce' dir.