



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



YÜKSEK LİSANS TEZİ

**POLİFENOLLERİN TİYOLLER ve PROTEİNLERLE
ETKİLEŞİMİNİN BAZI ANTIOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN
YÖNTEMLERİNE ETKİSİ**

Aslı Neslihan AVAN

Kimya Anabilim Dalı

Analitik Kimya Programı

Danışman

Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Aralık, 2014

İSTANBUL

Bu çalışma 18/12/2014 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi:



Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Esmâ TÜTEM
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



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



Doç. Dr. Keşer SOZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliđinin 40700 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca, desteğini esirgemeyen, güler yüzü ve tüm içtenliğiyle bana yardımcı olan bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, birlikte çalışmaktan zevk aldığım, çok değerli danışman hocam *Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ'e*

Tez çalışmam sırasında daima yol gösteren, deneyim ve bilgilerini paylaşan değerli hocalarım *Prof. Dr. Reşat APAK, Prof. Dr. Hayati FİLİK, Prof. Dr. Esma TÜTEM ve Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN'a,*

Çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma,

Hayatım boyunca hep yanımda olan varlıklarıyla bana güç veren, koşulsuz sevgilerini ve başarıma olan inançlarını her zaman hissettiren, en büyük desteğim olan, ömürlerini bizlere adayan, maddi ve manevi desteklerini hiç esirgemeyen annem *Leman AVAN,* babam *Halil AVAN,* kardeşlerim *Şule AVAN ÖNSEL* ve *Asiye Aslıhan AVAN'a*

Yüksek lisans öğrenimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili arkadaşlarım *Seda UZUNBOY, Aydan ÇETİNKAYA, Sevda AYDAR'a* ve çalışmamın HPLC uygulamasında yardımcı olan *Sercan TÜRKOĞLU'na*

Çalışmamın uygulama kısmını destekleyen *İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne* sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Aralık, 2014

Aslı Neslihan AVAN

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	viii
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR	4
2.1.POLİFENOLLER.....	4
2.1.1. Gıdalarda Polifenoller	6
2.1.2. Polifenolik Bileşiklerin Biyoyararlanımı.....	6
2.2. PROTEİNLER.....	8
2.2.1. Protein Moleküllerinin Yapısı ve Konformasyonu	8
2.2.1.1. Birincil (Primer) Yapı	8
2.2.1.2. İkincil Yapı (Sekonder Yapı).....	8
2.2.1.3. Üçüncül (Tersiyer) Yapı.....	9
2.2.1.4.Dördüncül (kuaterner) yapı.....	9
2.3. PROTEİNLERİN POLİFENOLLERLE ETKİLEŞİMİ	9
2.3.1.Protein-Polifenol Komplekslerinin Oluşumu	10
2.4.ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ	12
2.4.1. HAT – Hidrojen Atomu Transferi Esasına Dayanan Yöntemler	12
2.4.1.1. ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi) Yöntemi	12
2.4.1.2. TRAP (Toplam Radikal Tutucu Antioksidan Parametre) Yöntemi	13
2.4.2. ET- Elektron Transferi Esasına Dayanan Yöntemler	13
2.4.2.1. CUPRAC Yöntemi.....	13
2.4.2.2. ABTS Yöntemi	14
2.4.2.3. FRAP Yöntemi	15

2.4.2.4. <i>1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi</i>	15
2.5. TİYOL TAYİN YÖNTEMLERİ.....	15
2.5.1. Ellman Yöntemi	15
2.5.2. Nano-ölçekli TiO ₂ Üzerinde İndofenol Boya Oluşumuna Dayanan Fiber Optik Reflektans Sensörü	16
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	19
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	19
3.2. KİMYASAL MADDELER.....	19
3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER	20
3.3.1. Antioksidan ve Protein Çözeltileri	20
3.3.1.1. <i>Fenolik Antioksidan Çözeltileri</i>	20
3.3.1.2. <i>Sistein Çözeltisi</i>	20
3.3.1.3. <i>Glutasyon Çözeltisi</i>	20
3.3.1.4. <i>N-Asetil-L- Sistein</i>	20
3.3.1.5. <i>Kazein Çözeltisi</i>	20
3.3.1.6. <i>BSA Çözeltisi</i>	20
3.3.2. CUPRAC Reaktif Çözeltileri.....	21
3.3.2.1. <i>CuCl₂.2H₂O Çözeltisi</i>	21
3.3.2.2. <i>Neokuproin Çözeltisi</i>	21
3.3.2.3. <i>pH 7 Üreli Tampon</i>	21
3.3.2.4. <i>Standart Tris Tamponu (pH 8):</i>	21
3.3.3. ABTS Reaktif Çözeltileri	21
3.3.3.1. <i>ABTS / Persülfat Çözeltisi</i>	21
3.3.3.2. <i>PBS (Phosphate Buffered Saline) Tampon Çözeltisi</i>	21
3.3.4. FRAP Reaktif Çözeltileri.....	21
3.3.4.1. <i>pH 3,6 Asetat Tamponu</i>	21
3.3.4.2. <i>TPTZ çözeltisi</i>	21
3.3.4.3. <i>FeCl₃.6H₂O Çözeltisi</i>	21
3.3.5. DPPH Çözeltisi	22
3.3.6. ELLMAN Reaktif Çözeltileri	22
3.3.6.1. <i>Ellman Reaktifi</i>	22
3.3.6.2. <i>Üreli pH 8 Tamponu</i>	22
3.3.7. Fiber Optik Reflektans Sensörü Yönteminde Kullanılan Çözeltiler	22
3.3.7.1. <i>PBHQ (2,2'-(1,4-fenilendivinilen)bis-8-hidroksikinolin) Çözeltisi</i>	22
3.3.7.2. <i>p-aminofenol (PAP) Çözeltisi</i>	22

3.3.7.3. <i>Na₂CO₃ Çözeltisi</i>	22
3.3.8. Protein Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (pH 8.8)	22
3.3.9. TCA (Trikloroasetik Asit) Çözeltisi.....	22
3.4. GERÇEK ÖRNEKLERİN ANALİZE HAZIRLANMASI	23
3.4.1. Salam, Balık ve Et.....	23
3.4.2. Kekik	23
3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER.....	23
3.5.1. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	23
3.5.1.1. <i>CUPRAC Yöntemi</i>	23
3.5.1.2. <i>ABTS/Persülfat Yöntemi</i>	24
3.5.1.3. <i>FRAP Yöntemi</i>	24
3.5.1.4. <i>DPPH Yöntemi</i>	24
3.5.2. Tiyol Tayin Yöntemleri.....	24
3.5.2.1. <i>Ellman Yöntemi</i>	24
3.5.2.2. <i>İndofenol Boya Oluşumuna Dayanan Fiber Optik Reflektans Yöntemi</i>	24
3.5.3. HPLC Analizi.....	25
3.5. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE/AKTİVİTE VE TİYOL TAYİN YÖNTEMLERİNİN UYGULANMASI.....	25
3.5.1. Sentetik Polifenol-Tiyol Karışımları	25
3.5.2. Sentetik Polifenol-Protein Karışımları	26
3.5.3. Protein ve Polifenol İçeren Gerçek Örnek Karışımları	27
4. BULGULAR.....	29
4.1. İNDOFENOL BOYA OLUŞUMUNA DAYANAN FİBER OPTİK REFLEKTANS YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU.....	29
4.1.1. Süre Denemesi	29
4.1.2. Kalibrasyon Denklemleri.....	29
4.2. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE/AKTİVİTE VE TİYOL TAYİN YÖNTEMLERİNİN SONUÇLARI.....	30
4.2.1. Sentetik Polifenol-Tiyol Karışımları	30
4.2.2. Sentetik Polifenol-Protein Karışımları	34
4.2.3. Protein ve Polifenol İçeren Gerçek Örnek Karışımları	38
4.2.4. Protein İçeren Gerçek Örneklerle Standart Katkı Sonuçları.....	40
4.3. HPLC ANALİZ SONUÇLARI	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	46
KAYNAKLAR.....	49

EKLER.....	53
EK-1 KALİBRASYON DENKLEMLERİ.....	53
ÖZGEÇMİŞ	55

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Polifenollerin sınıflandırılması.	5
Şekil 2.2: Protein –polifenol komplekslerinin oluşumu.	10
Şekil 2.3: Flavonoidlerin genel yapısı.	11
Şekil 2.4: ABTS ⁺ radikal katyonunun yapısı.	14
Şekil 2.5: <i>p</i> -aminofenolün çözülmüş O ₂ ile <i>p</i> -kinonimine oto-oksidasyonu ve indofenol mavisi oluşumu.	17
Şekil 4.1: Glutasyon için son konsantrasyon sırasıyla (a) 9,0×10 ⁻⁵ , (b) 1,5×10 ⁻⁴ , (c) 2,1×10 ⁻⁴ ve (d) 2,7×10 ⁻⁴ olacak şekilde hesaplanan ΔAUC 'ler.	30
Şekil 4.2: BSA'nın tek başına ve CAT varlığında CUPRAC kalibrasyon grafiği.	35
Şekil 4.3: CAT'in tek başına ve BSA varlığında CUPRAC kalibrasyon grafiği.	35
Şekil 4.4: BSA'nın tek başına ve CAT varlığında ABTS kalibrasyon grafiği.	36
Şekil 4.5: CAT'in tek başına ve BSA varlığında ABTS kalibrasyon grafiği.	36
Şekil 4.6: QR'in tek başına ve Kazein varlığında CUPRAC kalibrasyon grafiği.	37
Şekil 4.7: Kazein'in tek başına ve QR varlığında CUPRAC kalibrasyon grafiği.	37
Şekil 4.8: Kazein'in tek başına ve QR varlığında ABTS kalibrasyon grafiği.	38
Şekil 4.9: QR' in tek başına ve kazein varlığında ABTS kalibrasyon grafiği.	38
Şekil 4.10: Protein ve polifenol içeren gerçek örnek karışımlarının CUPRAC sonuçları.	39
Şekil 4.11: Protein ve polifenol içeren gerçek örnek karışımlarının ABTS sonuçları.	40
Şekil 4.12: Protein ve polifenol içeren gerçek örnek karışımlarının Ellman sonuçları.	40
Şekil 4.13: 10 ⁻³ M GSH, 10 ⁻⁴ M QR ve bunların karışımına ait kromatogram.	44
Şekil 4.14: 10 ⁻³ M GSH, 10 ⁻⁴ M <i>p</i> - CUM ve bunların karışımına ait kromatogram.	44
Şekil 4.15: %1 BSA, 10 ⁻⁴ M QR ve bunların karışımına ait kromatogram.	45

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Biyoyararlılığı etkileyen faktörler.	7
Tablo 4.1: Referans ve CYS içeren örneğin belirli aralıklarla ölçülen reflektans değerleri.	29
Tablo 4.2: CYS -Polifenol Karışımlarının CUPRAC Sonuçları.	31
Tablo 4.3: GSH- Polifenol Karışımlarının CUPRAC Sonuçları.	31
Tablo 4.4: CYS - Polifenol Karışımlarının ABTS Sonuçları.	32
Tablo 4.5: GSH - Polifenol Karışımlarının ABTS Sonuçları.	32
Tablo 4.6: CYS- Polifenol karışımlarının Ellman sonuçları.	33
Tablo 4.7: GSH - Polifenol karışımlarının Ellman sonuçları.	33
Tablo 4.8: CYS- Polifenol karışımlarının DPPH sonuçları.	33
Tablo 4.9: Fiber optik reflektans sensörü ile bazı ikili karışımlarda tiyol tayini.	34
Tablo 4.10: Protein içeren gerçek örneklerle RA standart katkısının sonuçları.	41
Tablo 4.11: Protein içeren gerçek örneklerle QR standart katkısının sonuçları.	42
Tablo 4.12: Protein içeren gerçek örneğe standart katkısının 10. dakikadaki reflektans değerleri.	43

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
AAPH	: 2,2' azobis(2-amidinopropan) diklorür
ABTS	: 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonat)
AOx	: Antioksidan
BE	: Balık ekstraktı
BSA	: Bovine serum albumin
CAT	: Katesin
CFA	: Kafeik asit
CUPRAC	: Bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite
CYS	: Sistein
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5 'ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
EC	: Epikatesin
ECG	: Epikatesingallat
EE	: Et ekstraktı
EGC	: Epigallokatesin
EGCG	: Epigallokatesingallat
ET	: Elektron transferi
FRAP	: Demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
GA	: Gallik asit
GCG	: Gallokatesingallat
GSH	: Glutatyon
HAT	: Hidrojen atomu transferi
HRP	: Horse Radish Peroksidaz
KE	: Kekik ekstraktı
LUT	: Luteolin
NAC	: N-Asetil-L- Sistein
NGN	: Naringenin
ORAC	: Oksijen radikal absorban kapasitesi
PAP	: <i>p</i> -aminofenol
PBHQ	: 2,2'-(1,4-fenilendivenilen)bis-8-hidroksikinolin
<i>p</i>-CUM	: para kumarik asit
QR	: Kuersetin
RA	: Rozmarinik asit
RT	: Rutin
SE	: Salam ekstraktı
-SH	: Sülfidril
TAC	: Toplam antioksidan kapasite
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
THF	: Tetrahidrofuran
TNB⁻	: 5-tiyo-2-nitro benzoat
TPTZ	: Tripridiltiazin

TR : Troloks
TRAP : Toplam radikal tutucu antioksidan parametresi

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

POLİFENOLLERİN TİYOLLER ve PROTEİNLERLE ETKİLEŞİMİNİN BAZI ANTIOKSİDAN AKTİVİTE TAYİN YÖNTEMLERİNE ETKİSİ

Aslı Neslihan AVAN

İstanbul Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman : Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Polifenollerin toplam antioksidan kapasitelerini (TAC) veya aktivitelerini belirlemeye yönelik laboratuvar çalışmaları bu bileşiklerin biyoyararlılıkları konusunda fikir verse de gıdaların kompleks bileşimleri, birlikte tüketildiği diğer besinlerin yapıları, vücuttaki bir takım metabolik faaliyetler nedeniyle vücuda alınan polifenoller aslında başka bileşikler ile etkileşim halindedir. Özellikle proteinler ile polifenoller arasındaki etkileşim bu açıdan değerlendirilmelidir. Gıdalarda bulunan polifenoller, tükürük proteinleri, bağırsaklarda bulunan proteinler, sindirim enzimleri ile etkileşime girmelerinin yanında vücut içerisinde plazma proteinlerine bağlanarak taşınırlar. Protein yapısı içerisinde yer alan ve antioksidan özellik gösterdiği bilinen tiyoller de yine polifenoller ile etkileşimleri açısından dikkatle değerlendirilmesi gereken bileşiklerdir.

Bu çalışmada sıklıkla kullanılan antioksidan kapasite/aktivite tayin yöntemleri olan CUPRAC yöntemi protein tayini için modifiye edilmiş haliyle, ABTS/Persülfat radikal süpürme yöntemi FRAP ve DPPH yöntemi kullanılarak proteinlerle polifenoller arasındaki etkileşimler incelenmiştir. Antioksidan aktivite/kapasite tayin yöntemlerine ilave olarak tiyol tayin yöntemi olan Ellman ve daha önce kateşin tayininde kullanılan nano boyutta titanyum dioksit üzerinde indofenol boyası oluşumuna dayanan yöntem kullanılmıştır. Seçilen çeşitli polifenoller ve proteinlere ayrı ayrı ve karışım halinde yöntemler uygulanarak toplamsallıklar incelenmiştir. Bunun sonucunda yüzde hata değerlerinin CUPRAC yönteminde -0,40 ila -29,27, ABTS yönteminde -21,06 ila 0,20 arasında değiştiği görülmüştür. Katı faz üzerinde indofenol oluşumuna dayanan tiyol tayininde ve DPPH yönteminde %20'nin üzerinde hatalar gözlenmiştir. FRAP yönteminde ise tiyol içeren karışımlarda sonuçlarda çok büyük pozitif hatalar

belirlenmiştir. Bu da herhangi bir ara bileşik oluşumu ya da kovalent bağlanma olasılığının düşük olduğunu gösterirken sonuçlardaki farklılıkların deneysel koşullar ve kullanılan yöntemlerin uygunluğuna bağlı olduğu ifade edilebilir.

Aralık 2014, 68 sayfa.

Anahtar kelimeler: Tiyol, Polifenol, Antioksidan, CUPRAC, ABTS, Ellman

SUMMARY

M. Sc. THESIS

**THE EFFECTS of INTERACTIONS of POLYPHENOLS with THIOLS and
PROTEINS on CERTAIN METHODS of ANTIOXIDANT ACTIVITY
DETERMINATIONS**

Aslı Neslihan AVAN

İstanbul University

Institute of Graduate Studies in Science and Engineering

Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ

Laboratory studies which aim to determine total antioxidant capacity (TAC) or activity give an idea on the bioavailability of polyphenols, due to complex composition of food, structure, other nutrients consumed together, metabolic activities in the body the reality of ingested polyphenols actually interact with other compounds should be noted. Especially the interaction between proteins and polyphenols must be considered in this respect. Polyphenols found in food not only interact with salivary or alvine proteins and digestive enzymes but also they are transported via binding to plasma proteins in the body. Thiol compounds, contained in the protein structure and known with their antioxidant properties, need to be carefully evaluated in terms of their interaction with polyphenols.

In this study the protein-polyphenol interactions were investigated by common methods used for determination of antioxidant activity/capacity namely modified CUPRAC method, ABTS/Persulfate radical scavenging assay, FRAP assay and DPPH. In addition to antioxidant activity/capacity methods, to determine thiol compounds Ellman and a method based on indophenol dye formation on indophenol dye formation on nano-sized TiO₂ method, which mentioned in our previous study for determination of catechin, were used. These methods were applied to selected various of polyphenol compounds and reaction system which consists of only protein/thiol or their mixture were examined. Observed error% values were ranged between -0,40 and -29,27 ; -21,06 and 0,20 for CUPRAC, ABTS methods respectively. For DPPH and thiol determination method based on formation of indophenol dye on solid phase the observed error%

values were above 20%. Additionally in FRAP method great positive errors were determined for thiol containing mixtures. The results showed that the possibility of formation of intermediate products and covalent binding between thiols and protein or polyphenols were very low. The differences among the results can be expressed as variations in experimental conditions and suitability of the used methods for related samples.

December 2014, 68 pages.

Keywords: Thiol, Polyphenol, Antioxidant, CUPRAC, ABTS, Ellman

1. GİRİŞ

Gıdalarda bulunan polifenoller, antioksidan, anti-kanserojen özelliklere sahip olup bu dikkat çekici biyolojik fonksiyonları nedeniyle sağlık açısından büyük bir potansiyele sahiptirler. Özellikle kardiyovasküler hastalıklar, kanser, osteoporoz, nörodejeneratif bozukluklar ve diyabet gibi çeşitli sağlık problemlerinin önlenmesindeki olası rolü nedeniyle özel bir ilgi alanına sahiptirler. Polifenoller gıda yoluyla en çok alınan antioksidanlardır. Yaklaşık 1 g/gün'lük tüketimleriyle antioksidan olarak kabul edilen tüm diğer fitokimyasallardan fazla tüketilirler [1].

Gıdalarda bulunan çeşitli polifenollerin biyoyararlılıklarına ait pek çok çalışma mevcuttur. Gıdalarda bulunan polifenoller, tükürük proteinleri, bağırsaklarda bulunan proteinler, sindirim enzimleri ile etkileşime girmelerinin yanında vücut içerisinde plazma proteinlerine bağlanarak taşınırlar. Polifenollerin proteinler ile çözünebilen ya da çözünemeyen çeşitli kompleksler oluşturdukları da yine literatürde yer alan bir gerçektir [2].

Fenolik ve protein yapıdaki antioksidanlar buldukları gıdalarda yapılarını koruyabilirken, vücuda alındıklarında sindirim yolunda birtakım yapısal değişikliklere, etkileşimlere maruz kalabilmektedirler. Bu durum, etkileşmenin nasıl olduğu ve antioksidan aktivitelerinin ne durumda olduğu sorusunu gündeme getirmektedir. Literatürde bu etkileşimlerle ilgili çeşitli araştırmalar mevcuttur.

Arts ve ark. . α -, β -, ve κ -kazein veya albümin ile yeşil ve siyah çayın çeşitli bileşenlerinin antioksidan kapasitesini % 20'ye kadar maskeleydiğini göstermiştir. Bu maskeleme miktarı hem kullanılan proteine hem de flavonoide bağlı olarak değiştiğini en fazla maskeleme etkisinin β -kazein ile siyah ve yeşil çay bileşenlerinden epigallokateşin galat ve gallik asit kombinasyonu halinde oluştuğunu belirtmişlerdir [3].

Lorenz ve ark. tarafından benzer şekilde siyah çaya inek ya da soya sütü ilave edildiğinde damar basıncını azaltıcı etkisinde azalma görülmüş. Her iki durumda da, maskeleye etkileri prolince zengin kazein ve soya proteinleri ile flavan-3-ol'lerin doğrudan kompleksleşmesiyle ilgili olduğu gösterilmiştir[4].

Arts ve ark., Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite tayin yöntemini kullanarak, kuersetin, rutin ve (+)-kateşinin antioksidan kapasitesinin kan plazmasında toplamsal olmadığını göstermiştir. Bu durum, antioksidan ve plazma proteinleri arasındaki etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Proteine bağlanan α -tokoferol'ün antioksidan kapasitesinin etkileşim sonucu değişmediği belirtilmiştir [5].

Gallo ve ark. tarafından süt proteinleri ve kakao polifenollerinin etkileşimi incelenmiş. Polifenol / protein etkileşimi ile toplam antioksidan kapasitesindeki değişimi ölçmek için, polifenoller ve kakao ekstraktı ile kazein, peyniraltı suyu proteinleri ya da β -Lg'e inkübasyondan sonra ABTS yöntemi uygulanmış, Kazein/polifenol karışımının, 24 saat inkübasyondan sonra antioksidan aktivitesinin önemli miktarda düşüş gösterdiği belirtilmiştir[6].

Yapılan çalışmada antioksidanların toplam antioksidan kapasiteleri, bakır(II)-neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) reaktifi (Cu(II)-Nc) kullanılarak genel adı 'bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite' olan CUPRAC yöntemi proteinlerin antioksidan özelliklerinin incelenmesinde kullanılmak üzere modifiye edilmiş şekliyle, antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak yararlanılan potasyum persülfatla 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin- 6-sülfonat) (ABTS)'in oksidasyonu sonucu üretilen ABTS⁺ radikal katyonlarının kullanıldığı ABTS/Persülfat radikal süpürme yöntemi, DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) ve FRAP (Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) yöntemi ile belirlendi.

Bu çalışmada yukarıda belirtilen sıklıkla yararlanılan antioksidan tayin yöntemleri kullanılarak polifenollerin tiyoller ve proteinlerle etkileşimi araştırılmıştır. Seçilen antioksidan tayin yöntemleri polifenollere tek başlarına, protein ve/veya tiyol bileşikleri varlığında uygulanarak aradaki farklar incelendi. Yapılan çalışma ile kullanılan

yöntemlerin kompleks matrikslerde antioksidan tayininde ne derecede duyarlı olduğu ortaya konmuştur.

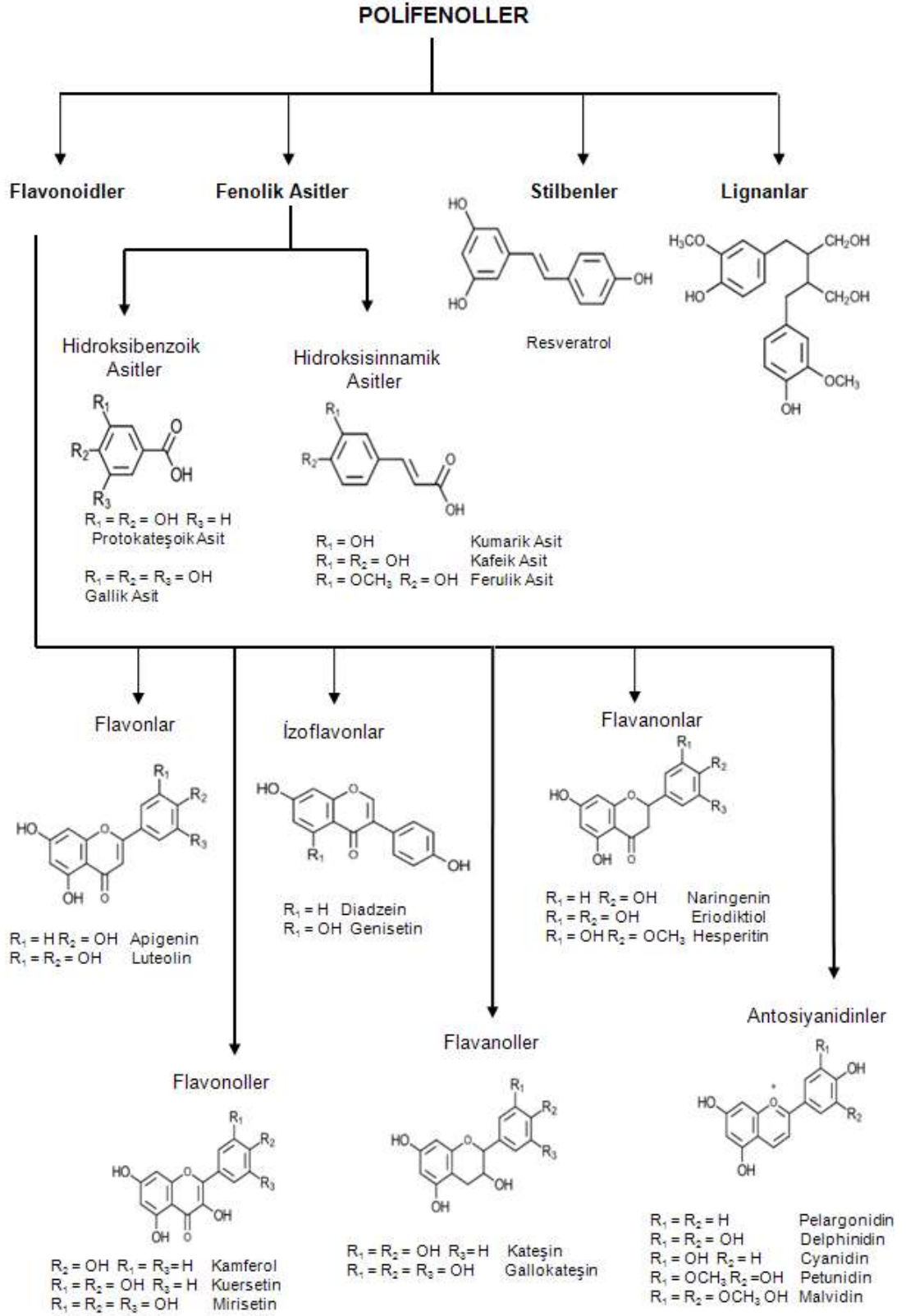
2. GENEL KISIMLAR

2.1.POLİFENOLLER

Polifenoller doğal olarak 8000'den fazla çeşidiyle büyük ölçüde meyve, sebze, tahıl ve içeceklerde bulunmaktadır. Üzüm, elma, armut, kiraz ve çilek gibi meyvelerin 100 gramı 200-300 mg'a kadar polifenol içerir. Bu meyvelerden elde edilen ürünler de önemli miktarda polifenol içermektedirler. Genellikle bir bardak kırmızı şarap veya bir fincan çay veya kahve yaklaşık 100 mg polifenol içerir.

Polifenoller bitkilerin sekonder metabolitleridir ve genellikle ultraviyole radyasyona veya patojenlere karşı savunucu rol oynarlar[7,8].

Son 10 yıl içinde, araştırmacılar ve gıda üreticileri polifenollerle giderek daha fazla ilgilenmeye başlamışlardır. Bu ilginin başlıca nedeni, besinlerde bol miktarda bulunması, kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalıklar gibi oksidatif stres ile ilişkili çeşitli hastalıkların önlenmesindeki rolü, polifenollerin antioksidan özelliklerinin anlaşılmasıdır. Yapılarında bulunan fenol halkalarının yapısal elemanlarına ve birbirlerine bağlanma şekillerine göre farklı gruplarda sınıflandırılabilirler. Fenolik asitler, flavonoidler, stilbenler ve lignanlar. Fenolik asitler hidroksi benzoik ve hidroksi sinamik asitler olarak ikiye ayrılır. İki aromatik halkanın (A ve B) 3 karbon atomu ve bir oksijenden oluşan hetrociklik bir başka halka tarafından bağlanmasıyla oluşan flavonoidler ayrıca altı alt sınıfa ayrılır: flavonoller, flavonlar, izoflavonlar, flavanonlar, antosiyanidinler ve flavanoller [9].



Şekil 2.1: Polifenollerin sınıflandırılması.

Doğal polifenoller fenolik asitler gibi basit moleküllerin yanı sıra tanenler gibi son derece polimerize bileşikler de olabilirler. Bağlı şekerler monosakkarit, disakkarit ya da oligosakkarit olabilir. Glikoz en sık şeker kalıntısıdır ancak galaktoz, ramnoz, ksiloz ve arabinoz'un yanı sıra, glukuronik ve galakturonik asit de bulunmaktadır. Karboksilik asit, organik asitler, aminler ve lipidler gibi diğer bileşikler ve diğer fenoller ile bağlantılar da yaygındır [7].

2.1.1. Gıdalarda Polifenoller

Polifenoller bitkisel gıdalar (sebzeler, tahıllar, baklagiller, meyve, fındık, vb) ve içeceklerde (şarap, bira, çay, kakao, vb) hemen hemen her yerde vardır. Polifenol seviyeleri aynı türün çeşitleri arasında bile büyük ölçüde değişir. Örneğin, flavon ve flavonol glikozitlerin oluşumu büyük ölçüde ışığa bağlıdır; bu nedenle, bu bileşikler yüksek konsantrasyonlarda yaprak ve bitki dış kısmında yer alırlarken bitkilerin yer altında bulunan kısımlarında ise eser miktarda bulunur. Bitkisel gıdalarda polifenollerin varlığı büyük ölçüde genetik faktörler ve çevre koşullarından etkilenir. Aynı zamanda çimlenme, olgunluk derecesi, işleme ve depolama gibi diğer faktörler de bitkilerin fenolik içeriğini etkiler.

Gıdalardaki polifenoller acılık, burukluk, renk, tat, koku ve oksidatif stabiliteye katkıda bulunabilir. İşleme ya da depolama sırasında polifenollerin oksidasyonu gıda ürünlerinde yararlı ya da istenmeyen özelliklere neden olur. Örneğin, kakaonun işleme aşamasında esmerleşmesi ya da siyah çay imalatı sırasında çay polifenollerinin polimerizasyonu gibi oksidatif değişimler arzu edilen organoleptik özelliklerin geliştirilmesine neden olurlar. Aksine, (polifenol oksidaz ile katalize edilen) fenolik bileşiklerin enzimatik ve enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonları sebzelerde istenmeyen renk ve lezzet oluşumuna neden olurlar[7,8].

2.1.2. Polifenolik Bileşiklerin Biyoyararlanımı

Kişinin yalnız günlük ne kadar polifenol aldığını değil aynı zamanda tüketilen bu polifenollerin biyoyararlanımı bilmek de önemlidir. Polifenollerin besinsel önemi ve olası sistemik etkileri büyük ölçüde sindirim sistemindeki davranışlarına bağlıdır. Farklı kimyasal yapıya ve çözünürlüğe sahip olan polifenolik bileşikler kullanılarak yapılan in

vivo ve in vitro çalışmalarda bu polifenolik bileşiklerin sindirimi, fermantasyonu ve mide-bağırsak yolu içinde emiliminin farklı olduğu görülmüştür.

Gıda fenoliklerinin emilimini ve metabolizmasını öncelikle kimyasal yapısı belirler. Glikozilasyon / açılasyonu derecesine, temel yapıya (örneğin, benzen ya da flavon türevleri), diğer fenoliklerin konjugasyonu, moleküler boyutu, polimerizasyonun derecesi ve çözünürlük gibi faktörlere bağlıdır[9].

Bu ve bunun gibi biyoyararlanımı etkileyen çeşitli faktörler aşağıdaki tabloda gösterildiği gibidir[10].

Tablo 2.1: Biyoyararlılığı etkileyen faktörler.

<p>Biyoyararlılığı Etkileyen Faktörler</p> <p>Antioksidana Bağlı Faktörler</p> <ul style="list-style-type: none"> -Kimyasal yapısı, bağlı bulunduğu sınıf -Türü veya formu -Gıdadaki konsantrasyonu -Vücuda alınan miktar -Diğer maddelerle etkileşimi <p>Gıdaya/Hazırlama Şekline Bağlı Faktörler</p> <ul style="list-style-type: none"> -Gıda matriksinin özellikleri -Gıda işleme yöntemi -Yağ, protein, lesitin gibi emilimi olumlu yönde etkileyen maddelerin varlığı -Lif, kelatlama ajanları gibi emilimi olumsuz yönde etkileyen maddelerin varlığı -Depolama süresi <p>Kişinin Özelliklerine Bağlı Faktörler</p> <ul style="list-style-type: none"> -Kişinin geçirmiş olduğu rahatsızlıklar -Yaşı ve cinsiyeti -Genetik ve hormonal özellikleri -Beslenme ve antioksidan durumu -Bağırsağın mikroflorası ve HCl ve enzim salgılanması -Bağırsaktaki enzim aktivitesi <p>Dış Faktörler</p> <ul style="list-style-type: none"> -Farklı ortamlara maruz kalma -Gıdanın temin edilebilirliği
--

2.2. PROTEİNLER

Proteinler canlı organizmanın çok önemli bir parçasını oluştururlar. Yapılarında karbon hidrojen, oksijen yanında azot da bulunur. Proteinler, amino asitlerin belirli türde, belirli sayıda ve belirli diziliş sırasında karakteristik düz zincirde birbirlerine kovalent bağlanmasıyla oluşmuş polipeptitlerdir. Proteinler, amino asitlerin polimerleridirler.

Proteinler büyük moleküllü maddelerdir. Molekül ağırlıkları birkaç bin ile milyon Dalton arasında değişir, şekilleri lifsel, oval, veya küresel olabilir. Yapıları esas itibariyle homojen ve basittir. Genel olarak amorf maddelerdir, fakat bazı hormon ve enzimlerde görüldüğü gibi kristal halde de olabilirler.

2.2.1. Protein Moleküllerinin Yapısı ve Konformasyonu

Proteinlerde birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuarterner) yapı diye dört yapı tanımlanır:

2.2.1.1. Birincil (Primer) Yapı

Primer yapı amino asitlerin bir araya gelerek peptid zincirleri meydana getirmeleriyle oluşur. Primer yapıyı meydana getiren peptid zincirleri, içlerinde yer alan amino asitlerin cinsleri, sayıları ve sıralanışlarına göre değişik özellikler gösterirler.

2.2.1.2. İkincil Yapı (Sekonder Yapı)

Primer yapının meydana getirdiği polipeptid zincirleri değişik konfigürasyonlar gösterebilir. Bir konfigürasyonun yeterince dayanıklı olması ve belirli şeklini muhafaza etmesi hidrojen bağları ile mümkün olur. Hidrojen bağları, peptid bağlarının — NH grupları ile diğer peptid bağlarının C = O grupları arasında meydana gelen bağlardır. İkincil yapının belli başlı iki örneği vardır. Bunlardan birisi alfa-heliks denen aynı peptid zincirinin bir eksen etrafında helezoni bir şekilde kıvrılması ile meydana gelen yapı şekli diğeri ise ayrı iki veya daha fazla sayıda polipeptid zincirinin hidrojen bağları ile birbirleri ile birleşmesi suretiyle meydana gelen tabaka şeklindeki beta konfigürasyonudur. Her iki yapıda da konfigürasyonun biçim ve dayanıklılığı hidrojen bağları ile sağlanır. Ancak tabaka şeklinde söz konusu olan hidrojen bağları zincirler arası bağlar (inter chain), alfa - heliks konfigürasyonunda söz konusu olan bağlar ise zincir içi (intra chain) hidrojen bağlarından ibarettir.

2.2.1.3. Üçüncül (Tersiyer)Yapı

Protein molekülünün yuvarlak veya elipsoid bir şekil alabilmesi için ikinci yapıyı meydana getiren alfa veya beta konfigürasyonlarının uzayda daha ileri katlanması veya yumak şeklinde sarılması gerekmektedir.

Bir proteinin tersiyer yapısının oluşmasına ve bu yapının sürdürülmesine, primer ve sekonder yapının oluşmasına katılan bağlardan başka Van der Waals çekim kuvvetleri ve iyon bağları da katılır. Böylece, üç boyutlu, tam konformasyonlu ve yoğunlaşmış protein molekülü meydana gelir.

Üçüncü yapı, globuler veya oval bir protein molekülünde olduğu kadar, saç gibi lifsel yapı gösteren bir proteinde de görülebilir.

2.2.1.4.Dördüncül (kuaterner) yapı

Bu yapı daha çok proteinin polimerizasyonunu yansıtır. Bir proteinin kuarterner yapısı, primer, sekonder ve tersiyer yapıya sahip polipeptit zincirlerinin daha büyük yapıli agregatlar halinde biraraya gelmesiyle oluşun yapıdır.

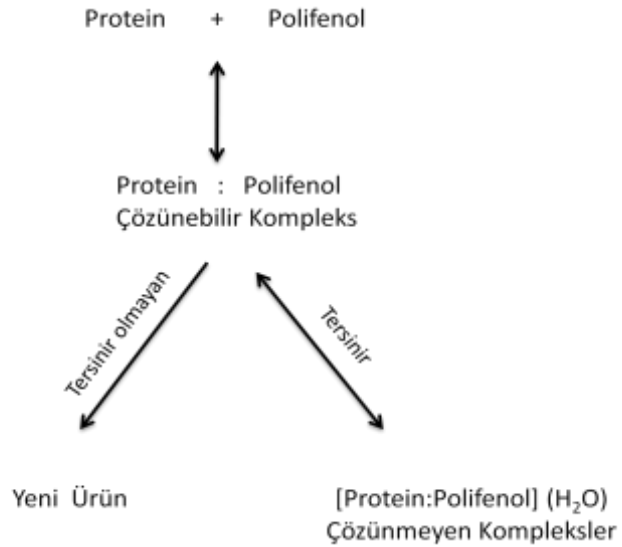
Her proteinin kuaterner yapısı olmayabilir, fakat molekül ağırlığı 100.000'nin üzerinde olan bir protein genellikle kuaterner yapıya sahiptir. Bir proteinin kuaterner yapısını oluşturan polipeptit zincirlerinin her birine alt birim veya monomer denir; bu monomerler, hidrojen bağları, Van der Waals çekim kuvvetleri ve iyon bağları etkisiyle polimerize olmuşlardır[11].

2.3. PROTEİNLERİN POLİFENOLLERLE ETKİLEŞİMİ

Polifenoller proteinlerle karakteristik çözünebilen veya çözünemeyen protein-polifenol komplekslerinin oluşumuna yol açan önemli bir bağlanma eğilimine sahiptirler[12]. Bir aromatik halka üzerindeki hidroksil gruplarının sayısı ve konumu proteinlere bağlanabilecek olan polifenollerin sayısını ortaya koymaktadır. Monofenoller proteinlere neredeyse hiç bağlanmazken difenoller zayıf veya orta kuvvetteki bağlarla, trifenoller ise güçlü bağlarla bağlanır [13].

2.3.1. Protein-Polifenol Komplekslerinin Oluşumu

Protein-polifenol kombinasyonları ilk aşamalarında aslında çözünebilir yetenektedirler. Ancak zamanla bu kombinasyonlar büyük kompleks yapılar oluşturarak çözünebilme yeteneklerini kaybederler. Polifenoller ve proteinler arasındaki etkileşim tersinir veya tersinir olmayan şeklinde olabilmektedir. Tersinir olmayan kompleksler genellikle, oksijen veya polifenoloksidazların (enzimler) varlığında otokatalitik olarak polifenol ve diğer substratlar arasında yeni kovalent bağlar oluşturarak net bir şekilde tanımlanan yeni ürünler oluşmasına neden olmaktadır. Tersinir kompleksleşme sonucunda ise çözelti içinde çözünmeyen kompleksler oluşur [13].



Şekil 2.2: Protein –polifenol komplekslerinin oluşumu.

Protein ve polifenollerin tersinir ve tersinir olmayan etkileşimleri, pH, sıcaklık, protein ve flavonoid konsantrasyonlarına bağlıdır.

Proteinlerle fenoller arasındaki etkileşimin temelinde farklı mekanizmalar etkili olmaktadır. 5 farklı potansiyel etkileşim vardır. Bunlar;

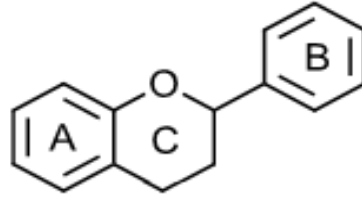
- H-bağı,
- π -bağı,
- hidrofobik etkileşim,
- iyonik etkileşim
- kovalent bağlardır.

Protein polifenol etkileşiminin temel mekanizması orta pH'larda π -bağlarından kaynaklanmaktadır. Tersinir kompleksleşme çeşitli hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı gibi kovalent olmayan güçler aracılığı ile gerçekleşir [14,15].

Protein ve polifenollerin yapılarındaki bazı değişiklikler bağlanma ilgisini etkilemektedir. Sıkıca sarılmış, küresel proteinler rastgele sarılmış proteinler ile karşılaştırıldığında fenolik bileşiklere ilgisi daha azdır. Aromatik halkadaki hidroksil grupları protein-polifenol kompleksleşmesi için temel bağlanma yeri sağlamaktadır.

Polifenollerin plazma proteinlerine bağlanmalarını etkileyen yapısal unsurların bir kısmı aşağıdaki gibidir:

- 1) flavonoidlerin B-halkasında bir veya daha fazla hidroksil grubu proteinlere bağlanma eğilimini arttırmaktadır. Ancak C halkasındaki hidroksil grubu bağlanma etkileşimini zayıflatmaktadır. A halkasındaki hidroksil grupları plazma proteinlerine bağlanmayı belli bir şekilde etkilememektedir.



Şekil 2.3: Flavonoidlerin genel yapısı.

- 2) Flavanol yapısının karakteristik 4-karbonil grubu ile 2,3 konumundaki doymamış bağı konjugasyonu plazma proteinleri ile güçlü bir bağlanma ilgisiyle ilişkilendirilmiştir.
- 3) Gallollü kateşinler, gallol grubu içermeyen kateşinler ve pirogallol tipi kateşinlerden bunlar da kateşol tipi kateşinlere göre plazma proteinlerine bağlanma eğilimi daha yüksektir. (EGCG \approx GCG>ECG>>EC \approx EGC \approx C)
- 4) Flavonoidlerin metilasyonu ve metoksilasyonundaki küçük bir değişim plazma proteinlerine bağlanmayı 2-16 kat arttırmaktadır. Flavonoidlerin metoksilasyonu ve metilasyonu hidrofobikliği ve hidrofobik etkileşimi artırarak flavonların

proteinlere bağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Flavonların metilasyonunun biyoyararlanımı ve kanser hücresi çoğalmasının inhibisyonunu arttırdığı görülmüştür.

- 5) Flavonoidlerin glikolizasyonu plazma proteinlerine ilgiyi konjugasyonun yeri ve şeker kısmının türüne bağlı olarak azaltır. Glikolizasyon sonrası plazma proteinlerine olan ilginin azalması moleküler boyutun ve polaritenin artmasından kaynaklanmaktadır.
- 6) Gallotanenler daha fazla gallol grupları ile plazma proteinlerine çok daha yüksek oranda bağlanırlar [14].

2.4.ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

Önemli antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin kimyasal reaksiyonlarının temeli iki kategoriye ayrılabilir.

2.4.1. HAT – Hidrojen Atomu Transferi Esasına Dayanan Yöntemler

HAT-esaslı yöntemler antioksidanların hidrojen vererek serbest radikalleri süpürme yeteneğini ölçerler. HAT-bazlı yöntemlerin çoğunda yarışmalı reaksiyon kinetiği izlenir. Bu yöntemler genellikle sentetik bir radikal üretici, yükseltgenebilen bir prob ve antioksidandan oluşmaktadır.

2.4.1.1. ORAC (*Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi*) Yöntemi

Cao ve Prior tarafından geliştirilen bu yöntemde peroksil radikalinin neden olduğu oksidasyonun antioksidan tarafından inhibisyonu temel alınmaktadır [16].

Temel yöntemde, yeterli oksijen varlığında ısıtıldığı zaman peroksil radikalleri oluşturmak için AAPH [2,2'-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorür] gibi bir radikal başlatıcı ve floresans özellik gösteren bir protein olan β -fikoeritrin (β -PE) kullanılmaktadır. Ancak β -PE'nin tutarsızlığı, ışık hassasiyeti ve polifenollerle etkileşime girmesi gibi bazı dezavantajları nedeniyle β -PE'nin yerini floresein (FL) (3,6'-dihidroksi-spiro [izobenzofuran-1 [3H], 9'[9H]-ksanten]-3-on) almıştır. Floresans maddeler peroksil radikalleri tarafından yükseltgenerek floresans özellik göstermeyen bir ürüne dönüşür. Ortama bir antioksidan eklenmesi floresans bozunmasını geciktirir. ORAC yönteminde antioksidan kapasitesi eğri altında kalan alan (area under the curve,

AUC) tekniği kullanılarak belirlenir. Blank ve örnek arasındaki floresans Őiddeti farkından (net alandan) yararlanarak hesaplanmaktadır[17, 18].

2.4.1.2. TRAP (Toplam Radikal Tutucu Antioksidan Parametre) Yöntemi

Plazma ve serumun “total antioksidan kapasitesi”ni ölçmek için geliştirilmiştir. Bu metotta plazma antioksidanlarını okside etmek için radikal başlatıcı olarak AAPH kullanılır. Bu radikal başlatıcısı tarafından peroksil radikallerinin üretilmesi ve meydana gelen oksidasyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülerek izlenmesine dayanır[19]. Oksidasyon antioksidanlar tarafından yavaşlatılır. Reaksiyonun gecikme zamanı ölçülerek toplam antioksidan miktarı, troloks cinsinden hesaplanmaktadır. Antioksidan aktivitesi; zamanla antioksidanların tükenmesi yani okside olmuş prob maddenin görülme süresinin uzaması ile belirlenir[20].

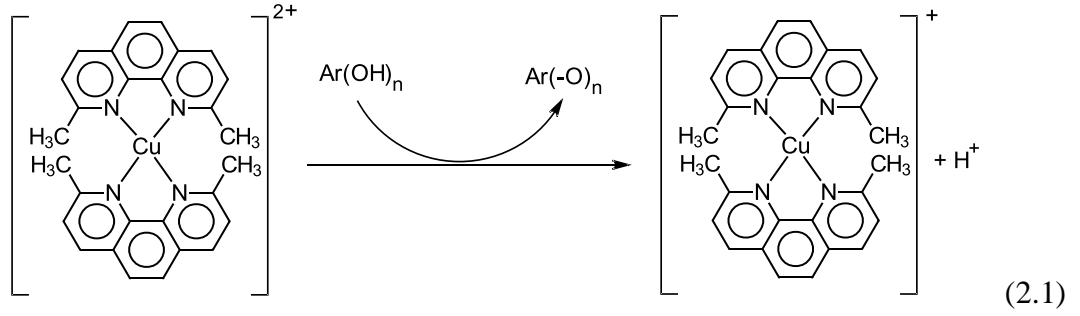
2.4.2. ET- Elektron Transferi Esasına Dayanan Yöntemler

Spektrofotometrik ET-esaslı yöntemlerde bir oksidanın indirgenmesiyle meydana gelen renk değişimi ile antioksidan kapasitesi ölçülür. Renk değişim derecesi, örneğin antioksidan konsantrasyonu ile orantılıdır [21].

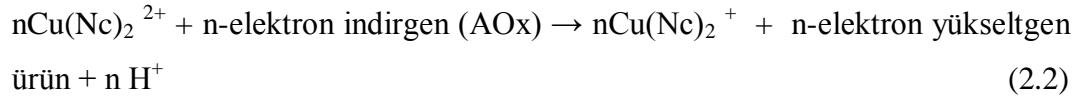
2.4.2.1. CUPRAC Yöntemi

Bu yöntemde, kromojenik reaktif olarak kullanılan, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin-Nc)’in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksi (CUPRAC reaktifi)’nin antioksidan varlığında Cu(I)-neokuproin kelatına indirgenmesi ve bu kelatın maksimum ışığı absorbladığı dalgaboyu olan 450 nm'deki absorbansının ölçümünden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır [22, 23].

CUPRAC yöntemi öncelikle gıda maddelerinde bulunan polifenoller, C ve E vitamini gibi antioksidanların tayininde, insan serumunda TAC belirlenmesinde, hidroksil radikal süpürücü maddeler üzerinde kullanılmıştır [24, 25]. Daha sonra proteinlerin, kolay yükseltgenebilen bazı amino asit gruplarının, özellikle tiyol içeren proteinlerin de TAC üzerine katkısının belirlenmesi amacıyla modifiye edilmiştir [26].



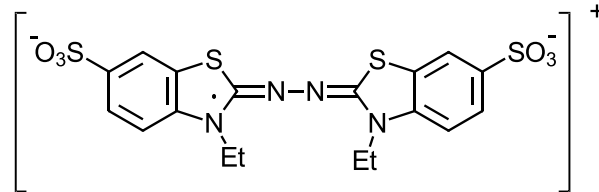
CUPRAC reaksiyonu birçok gıda/ biyolojik antioksidan için 30 dakika içinde tamamlanır. CUPRAC yönteminin kromojenik oksitleyici reaktifi, yani, Cu (II)-Nc, aşağıdaki şekilde n-elektron indirgeyici antioksidanla (AOx) ile reaksiyona girer:



Bu reaksiyonda polifenolik antioksidanların reaktif Ar-OH grupları kinonlarına (Ar=O) yükseltgenir ve Cu (II)-Nc, Cu(I)Nc kelatına indirgenir [27].

2.4.2.2. ABTS Yöntemi

Yöntem ilk defa Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. TEAC yönteminde antioksidanların radikal süpürme yeteneğini ölçmek için ABTS'nin yoğun renkli radikal kationları kullanılır. 2,2'-azino-bis(3-etilenbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) radikali, hidrojen peroksit ve HRP (Horse Radish Peroksidaz) ile oluşturulan enzimatik sistemle üretilebilir[27, 24].



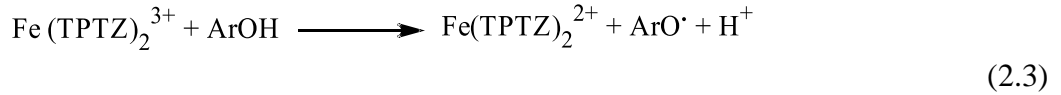
Şekil 2.4: ABTS⁺ radikal kationunun yapısı.

Re ve arkadaşları tarafından modifiye edilen yöntemde ABTS'nin (ABTS⁺) mono kation radikali potasyum persülfat ile ABTS'nin oksidasyonu ile önceden üretilir ve bu radikal hidrojen-verici antioksidan varlığında azalır. Üretilen ABTS radikalleri oda

sıcaklığında karanlıkta beklediği zaman 2 gün kararlıdır. Bu yöntem flavonoidler, hidroksisinnamatlar, karotenoidler ve plazma antioksidanları gibi hem lipofilik hem de hidrofilik antioksidanlar, için geçerli olan bir renk giderme yöntemidir [28].

2.4.2.3. FRAP Yöntemi

FRAP yöntemi plazmanın ferrik indirgeme yeteneğinden yararlanarak antioksidan gücünü değerlendirmek için geliştirilmiş bir yöntemdir. Düşük pH'larda demir (III)-tripridiltriazin ($\text{Fe}^{\text{III}}\text{-TPTZ}$) kompleksi demir (II) tripridiltriazin ($\text{Fe}^{\text{II}}\text{-TPTZ}$) kompleksine indirgenir, oluşan yoğun mavi renkli bu kompleks 593 nm'de maksimum absorpsiyona sahiptir[29].



FRAP yönteminin sonuçları tekrarlanabilir, prosedürü basit ve hızlıdır. Ancak yöntem, serum proteinlerine, aynı zamanda lipoik asit ve bazı amino asitler gibi $-\text{SH}$ grubu içeren düşük molekül ağırlıklı antioksidanlara cevap vermez [29, 30].

2.4.2.4. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) Yöntemi

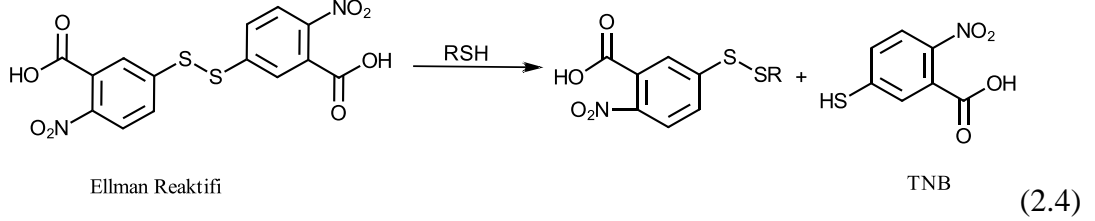
Bu yöntemde, antioksidanların serbest radikalleri süpürme kabiliyetini belirlemek için kararlı bir serbest radikal olan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil kullanılmaktadır. Moleküldeki serbest elektronun delokalizasyonu 515 nm'de maksimum absorpsiyona sahip mor renge neden olmaktadır. Bu yoğun mor renkli DPPH radikali antioksidanlar ile reaksiyonu sonucu renksiz hidrazine indirgenir ve bu renkteki azalma antioksidan varlığının bir ölçüsü olarak kullanılır [31, 32].

2.5. TİYOL TAYİN YÖNTEMLERİ

2.5.1. Ellman Yöntemi

İlk olarak G.L. Ellman tarafından 1959'da serbest SH miktarının belirlenmesi için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bunun için, 5,5'-ditiyobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB/Ellman reaktifi) kullanılmaktadır[33]. DTNB, disülfid bağı ile bağlanmış iki elektron eksikliği olan fenil gruplarından oluşmaktadır[34]. Ellman reaktifi hızlı ve spesifik olarak serbest $-\text{SH}$ gruplarıyla reaksiyona girerek, bu tiyol gruplarına eşdeğer sulu çözeltilerde

çözünebilen 412 nm'de maximum absorbansa sahip sarı renkli kromojenik 5-tiyo-2-nitro benzoat (TNB⁻) anyonunu oluşturur.



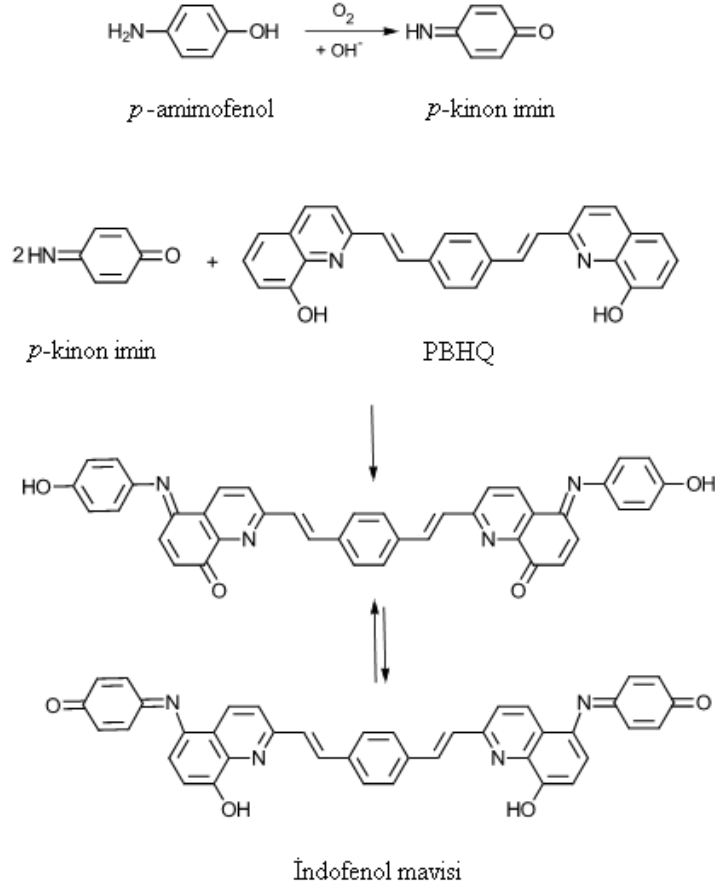
Ellman metodu tiyol bileşiklerine iyi cevap verdiği halde, fenolik antioksidanlara cevap vermemektedir. Bu nedenle, tiyol içeren antioksidanlar seçimli olarak diğer fenolik antioksidanlardan DTNB reaktifi ile ayırt edilebilirler [26].

Ellman reaktifinin kullanılması, indirgemenin kolaylıkla spektrofotometrik olarak izlenebilmesi, suda çözünebilmesi ve ticari olarak temin edilebilmesi gibi çeşitli nedenlerle uygundur[33]. Hızlı bir metot olmasına karşılık metodun çeşitli kısıtlamaları vardır. DTNB reaktifi tiyol bileşiklerinden yalnızca –SH içerenleriyle reaksiyon verebilir, reaksiyon hızı tiyol grubunun pKa ve pH değerleri ile yakından ilişkilidir. Bunun anlamı reaksiyonun normal olarak en az pH 7 de olması demektir. Ancak bu pH değerinde tiyolat anyonu alkilasyon ya da oksidasyon gibi istenmeyen yan reaksiyonlar verebilir. Ellman metodu suda çözünebilir küçük tiyol grupları için oldukça iyi sonuç vermekle beraber protein sülfhidrilleri ile reaksiyon sıklıkla yüksek polarite ve Ellman reaktifinin eksi yükü nedeniyle engellenmektedir. Bu nedenle Ellman metodunun tiyol içerdiği bilinen protein örneklerine uygulanmasında metotta bir takım modifikasyonlar yapılmıştır. Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için hacimli ve hidrofilik bir reaktif olan DTNB molekülü tiyol grubuna atakta bulunabilmelidir. Proteinin sarmal yapısının açılmasını sağlayacak olan denatüre edici bir maddenin yokluğunda tiyol grubu nadiren reaktiftir [35].

2.5.2. Nano-ölçekli TiO₂ Üzerinde İndofenol Boya Oluşumuna Dayanan Fiber Optik Reflektans Sensörü

Kateşinler için geliştirilen optik sensör TiO₂ nano partikülleri (NP) üzerine PBHQ'nun tutturulmasıyla elde edilmiştir. Sensörün çalışması TiO₂ üzerine önceden tutturulmuş

PBHQ ile alkali çözeltisi içinde çözünmüş O_2 ile p-aminofenol'ün oto-oksidasyonu sonucu ortaya çıkan p-kinon imin arasındaki indofenol mavisi boya oluşum reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon oluşum şeması, şekil 2.5'deki gibidir.



Şekil 2.5: p-aminofenolün çözünmüş O_2 ile p-kinonimine oto-oksidasyonu ve indofenol mavisi oluşumu.

PAP'ün hava oksidasyonu yüksek pH değerlerinde (9,0-10,0) hızlı olduğundan % 1'lik Na_2CO_3 çözeltisi kullanılarak reaksiyon pH 10'da gerçekleştirilmektedir [36]. Fenolik antioksidan bileşiklerinden yalnızca kateşin için gerçekleştiği bildirilen şekilde tiyol bileşiklerinin indofenol mavisi oluşumunu geciktirdiği belirlenmiştir. Bu özellikten yararlanılarak kantitatif tiyol tayini yapmak amacıyla seçilen tiyol bileşikleri varlığında ve yokluğunda süreye bağlı olarak oluşan indofenol mavisinin reflektansı PAP içermeyen referansa karşı ölçülerek zaman – reflektans eğrileri çizilir ve eğri altında kalan alan (AUC) matematiksel olarak hesaplanır. Yapılan denemelerde refrans ve

örnekler arasındaki eğri altı alan farkının (ΔAUC) tiyol konsantrasyonu ile doğru orantılı olduğu görülmüştür.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Kimyasal madde ve örnekleri tartmak için Radwag AS 220/C/2 hassas terazi, pH ölçümleri için HANNA HI 221 pH metre, kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Elmasonic marka ultrasonik banyo, hazırlanan çözeltilerin karıştırılmasında Wisemix VM-10 girdap karıştırıcı, deistile su üretimi için GFL 2008 su sistemi, Varian Cary 100 Bio model UV-görünür alan spektrofotometresi ve ölçüm yapmak için 10 mm ışık yollu bir çift kuartz küvet, reflektans ölçümleri için Ocean Optics Inc., HG4000CG-UV-NIR fiber optik spektrofotometre, santrifüj işlemleri için Elektromag (M 4812 P) marka santrifüj cihazı, HPLC analizleri için Perkin Elmer Series 200 UV- Vis dedektör, Perkin Elmer Series 200 pompa, Perkin Elmer Series 200 vakum degazer, Perkin Elmer 600 Series Link Chromatography arayüz ve Hamilton marka 250×4,6 mm H×Sil 5µm C18 HPLC kolonu kullanıldı.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; bakır(II) klorür dihidrat, neokuproin (Nc), demir (III) klorür heksahidrat, asetik asit, sodyum asetat, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, trikloroasetik asit (TCA), etanol (EtOH), 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) diamonyum tuzu (ABTS), potasyum persülfat, üre, sodyum sitrat, glisin, 2,4,6-tris-(2-piridil)-1,3,5-triazine (TPTZ), 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), 5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), hekzan, dietileter, 1,4-ditiyoeritritol, gliserol, sodyumdodesilsülfat (SDS), tris, kazein, BSA, kuersetin (QR), kafeik asit (CFA), rosmarinik asit (RA), gallik asit (GA), ferulik asit (FA), *p*-kumarik asit (*p*-CUM) naringenin (NGN), luteolin (LUT), glutatyon (GSH), L-sistein (CYS), N-asetil-L-sistein (NAC), DL-Homosistein (H-CYS), TiO₂ P-25 (Aeroxide TiO₂ P25, fumed metal oxide), *p*-aminofenol (PAP), (2,2'-(1,4-fenilendivenilen)bis-8-hidroksikinolin (PBHQ), sodyum karbonat.

3.3. KULLANILAN ÇÖZELTİLER

3.3.1. Antioksidan ve Protein Çözeltileri

3.3.1.1. Fenolik Antioksidan Çözeltileri

Fenolik antioksidanların TR, RA, QR, CAT, CFA, GA, NGN, FA, *p*-CUM, LUT konsantrasyonları $1,0 \times 10^{-2}$ M olacak şekilde etil alkolde stok çözeltileri hazırlandı. Kullanılan uygun konsantrasyonlar, stok çözeltiden alınıp etil alkolle seyreltilerek hazırlandı.

HPLC uygulamalarında fenolik antioksidanlar MeOH ile hazırlandı.

3.3.1.2. Sistein Çözeltisi

$1,0 \times 10^{-2}$ M lık stok çözeltisi, uygun miktarda tartılan CYS'nin 0,5 mL 1 M HCl ile çözülüp 25 mL'ye saf suyla tamamlanmasıyla hazırlandı. Çalışma çözeltilerini hazırlamak için stok çözeltiden uygun oranda alınan hacim destile su ile seyreltildi.

3.3.1.3. Glutasyon Çözeltisi

Saf su ile çözülerek $1,0 \times 10^{-2}$ M konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Çalışma çözeltilerini hazırlamak için stok çözeltiden alınan hacim uygun oranda destile su ile seyreltildi.

3.3.1.4. N-Asetil-L- Sistein

Saf su ile çözülerek $1,0 \times 10^{-2}$ M konsantrasyonunda stok çözeltisi hazırlandı. Çalışma çözeltilerini hazırlamak için stok çözeltiden alınan hacim uygun oranda destile su ile seyreltildi.

3.3.1.5. Kazein Çözeltisi

% 1' lik (w/v) kazein çözeltisi, 0,25g kazein'in 1mL 1M NaOH ile çözülüp pH 8 'e ayarlanmasının ardından destile suyla 25 mL'ye tamamlanmasıyla hazırlandı.

3.3.1.6. BSA Çözeltisi

Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinde %1'lik (w/v) çözeltisi uygun miktarda tartıldıktan sonra destile suyla hazırlandı.

HPLC uygulamalarında %1'lik (w/v) çözeltisi 1:1 metanol (MeOH): su olacak şekilde hazırlandı.

3.3.2. CUPRAC Reaktif Çözeltileri

3.3.2.1. *CuCl₂.2H₂O Çözeltisi*

Saf su ile çözülerek $1,0 \times 10^{-2}$ M konsantrasyonunda çözelti hazırlandı.

3.3.2.2. *Neokuproin Çözeltisi*

Neokuproin (Nc) EtOH ile çözülerek $7,5 \times 10^{-3}$ M konsantrasyonda çözeltisi hazırlandı.

3.3.2.3. *pH 7 Üreli Tampon*

0,086 M Tris (hidroksimetil)aminometan, 0,09 M glisin, ve 4 mM sodyum sitrat'tan oluşan karışım 8 M üre çözeltisi içinde çözüldü ve pH'ı 6M HCl ile 7'ye ayarlandı.

3.3.2.4. *Standart Tris Tamponu (pH 8):*

0.086 M Tris(hidroksimetil)aminometan, 0.09 M glisin ve 4mM sodyum sitrat'tan oluşan karışım'ın son pH'ı 6M HCl ile 8 ' e ayarlandı.

3.3.3. ABTS Reaktif Çözeltileri

3.3.3.1. *ABTS / Persülfat Çözeltisi*

7,0 mM ABTS sulu çözeltisi 2,45 mM K₂S₂O₈ ile karıştırılarak karanlıkta 12-16 saat bekletildi. Süre sonunda elde edilen ABTS çözeltisi 5mM PBS pH 7,4 tamponu ile seyreltildi.

3.3.3.2. *PBS (Phosphate Buffered Saline) Tampon Çözeltisi*

100 mM 50 mL K₂HPO₄ çözeltisi üzerine 100 mM KH₂PO₄ çözeltisinden damla damla ekleyerek pH 7,4 e ayarlanıp içerisinden uygun miktarda alınıp 0,5 g NaCl ilave edilerek 5 mM' a destile suyla seyreltildi.

3.3.4. FRAP Reaktif Çözeltileri

3.3.4.1. *pH 3,6 Asetat Tamponu*

0,31 g NaAc ve 1,6 mL HAc son hacmi 100 mL olacak şekilde destile suyla tamamlandı.

3.3.4.2. *TPTZ çözeltisi*

0,0780g TPTZ, EtOH ile çözülerek $1,0 \times 10^{-2}$ M'lık çözeltisi hazırlandı.

3.3.4.3. *FeCl₃.6H₂O Çözeltisi*

$2,0 \times 10^{-2}$ M'lık çözeltisi, 0,1352 g FeCl₃.6H₂O 0,5mL 1,0 M HCl ile çözüldü ve son hacim saf su ile 25 mL ye tamamlandı.

Hazırlanan çözeltiler sırasıyla 10:1:1 oranında karıştırılarak FRAP reaktifi elde edildi.

3.3.5. DPPH Çözeltisi

0,025 g L⁻¹ olacak şekilde 2,2-Difenil-1-pirilhidrazil etanol ile çözülerek hazırlandı.

3.3.6. ELLMAN Reaktif Çözeltileri

3.3.6.1. Ellman Reaktifi

4,0 mg DTNB, 1 mL standart tris tamponunda (pH 8) çözülerek hazırlandı.

3.3.6.2. Üreli pH 8 Tamponu

0,086 M Tris(hidroksimetil)aminometan, 0,09 M Glisin, 4mM sodyum sitrat'tan oluşan karışım 8M üre çözeltisi içerisinde çözüldü ve son pH'ı 6M HCl ile 8 'e ayarlandı.

3.3.7. Fiber Optik Reflektans Sensörü Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

3.3.7.1. PBHQ (2,2'-(1,4-fenilendivinilen)bis-8-hidroksikinolin) Çözeltisi

Tetrahidrofur (THF) içinde çözülerek 1×10⁻³ M'lık çözeltisi hazırlandı.

3.3.7.2. p-aminofenol (PAP) Çözeltisi

1,0×10⁻² M p-aminofenol (PAP) çözeltisi etanolde hazırlandı ve 1,0×10⁻³ M'a etanolle seyreltilerek kullanıldı.

3.3.7.3. Na₂CO₃ Çözeltisi

%1 (w/v) olacak şekilde destile su ile hazırlandı.

3.3.8. Protein Ekstraksiyon Tampon Çözeltisi (pH 8.8)

% 5 SDS (w/v) , % 15 gliserol (w/v), 0,175 M tris, 0,1 M 1,4-ditiyoeritritol içeren karışımın pH'ı 8,8'e ayarlandı.

3.3.9. TCA (Trikloroasetik Asit) Çözeltisi

Ağırlıkça (w/v) % 50'lik çözeltisi hazırlandı.

3.4.GERÇEK ÖRNEKLERİN ANALİZE HAZIRLANMASI

3.4.1. Salam, Balık ve Et

Ticari olarak ambalajlanmış et ve et ürünlerinden alınan 1,5 g'lık örnekler yağ giderimi için 5'er mL'lik iki kısım halinde dietileter koyulup 15'er dakika ultrasonik banyoda bekletildikten sonra eterli kısım dekante edildi. Daha sonra 3 mL ve 2 mL olmak üzere iki aşamada toplam 5 mL protein ekstraksiyon tamponu koyularak 20'şer dakika ultrasonik banyoda ekstrakte edildi.

Protein ekstraktının 1mL'lik kısmına 1 mL %50 TCA ilave edildi. 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernetant dekante edildi. Çökelti suyla yıkandıktan sonra 1 mL 1M NaOH ile çözüldü [37]. Salam, balık ve et ekstraktları (sırasıyla SE, BE ve EE) pH'ı 1M HCl ile 8'e ayarlanarak kullanıldı.

3.4.2. Kekik

Denemelerde ticari olarak ambalajlanmış kurutulmuş kekik örneği kullanıldı. 1g kekik [38]'de anlatıldığı şekilde %70 metanol'ün 15 mL'si ile 45 dakika, daha sonra 5 mL daha ilave edilerek ikinci bir 45 dakika ve en son 5 mL daha çözücü ilavesi ile 15 dakika ultrasonik banyoda ekstrakte edildi. Elde edilen ekstrakt önce süzgeç kağıdından daha sonra mikrofiltreden geçirildi. Klorofillerin uzaklaştırılması için ekstraktın 5 mL'si kapaklı bir tüpe alındı ve üzerine 5 mL hekzan ilave edilerek çalkalandı. Kekik ekstraktı (KE) hekzan fazı uzaklaştırıldıktan sonra kullanıldı.

3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.5.1. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

3.5.1.1. CUPRAC Yöntemi

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M Cu (II) klorür çözeltisi, 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi ve 2 mL pH 7 üreli tampon çözeltisi ilave edildi. Daha sonra x mL antioksidan standart çözeltilerinden veya örneklerden eklenip son olarak (1-x) mL standart tris pH 8 ilave edilerek son hacmi 5mL'ye tamamlandı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı 450 nm'deki absorbanları ölçüldü.

3.5.1.2. *ABTS/Persülfat Yöntemi*

Deney tüpü içerisine x mL antioksidan çözeltisinden konulup hacim PBS pH 7,4 tamponu ile 1 mL'ye tamamlandı. Üzerine PBS ile seyreltilmiş ABTS/persülfat çözeltisinden 2 mL ilave edilerek karıştırıldı. Karışım 6 dakika oda sıcaklığında bekletildi ve absorbans PBS'ye karşı 734 nm'de ölçüldü.

3.5.1.3. *FRAP Yöntemi*

3 mL FRAP reaktifi + (0,4-x) mL destile su + (x) mL örnek karıştırıldı; son hacim 3,4 mL'dir. Oda sıcaklığında 6 dakika bekletildikten sonra 595 nm de referansa karşı okundu.

3.5.1.4. *DPPH Yöntemi*

x µL örnek üzerine hacmi 0,1 mL'ye tamamlayacak şekilde EtOH ilave edildikten sonra 3,9 mL 0,025 g L⁻¹ DPPH çözeltisi ilave edilip 30 dakika sonra EtOH'a karşı 515 nm'de absorbansları okundu [39].

3.5.2. Tiyol Tayin Yöntemleri

3.5.2.1. *Ellman Yöntemi*

x mL örnek + (2,0-x) mL 8 M üreli tampon (pH 8) + 30 µL Ellman reaktifi karıştırıldı; son hacim 2,03 mL. Karışım oda sıcaklığında 2 dakika bekletildikten sonra 412 nm' de referansa karşı okundu.

3.5.2.2. *İndofenol Boya Oluşumuna Dayanan Fiber Optik Reflektans Yöntemi*

PBHQ, nano boyutlu TiO₂ üzerine tutturulmuştur (immobilize edilmiş). Bu amaçla THF içinde hazırlanmış PBQH çözeltisinin 5 mL'si 1g TiO₂ üzerine ilave edilerek karıştırıldı ve çözücü buharlaşınca kadar oda sıcaklığında bekletildi. 0,2 g PBHQ-tutturulmuş TiO₂ NP üzerine 2 mL Na₂CO₃ ilave edilip 5 dk çalkalandıktan sonra 0,5 ml 10⁻³ M PAP ve örnek ilave edilerek son hacmi destile suyla 5 ml'ye tamamlandı.

Farklı çalkalama sürelerinin ardından, tüpler 5 dk 4000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra üstte kalan sıvı kısım dekante edildi. 710 nm'de referans ve örneklere ilişkin reflektans değeri blanka karşı okundu. Örnek varlığında ve yokluğundaki reflektans değerleri zamana karşı grafiğe geçirildi ve eğri altı alan (AUC) hesaplandı.

Kateşinler için geliştirilen bu optik sensör tiyol içeren bileşikler ile de reaksiyon verdiğiinden yöntem optimize edilerek tiyol tayininde kullanılmıştır.

Süre Denemesi

Referans ve $1,5 \times 10^{-3}$ M CYS'den 0,3 mL alınarak 2, 5, 10, 20, 40, 60, 90 ve 120 dk sonunda reflektans değerleri ölçülerek optimum süre belirlendi.

Kalibrasyon Denklemlerinin Belirlenmesi

$1,5 \times 10^{-3}$ M CYS, GSH, NAC ve $2,0 \times 10^{-3}$ M H-CYS'in değişen miktarlarıyla farklı çalkalama süreleri sonucunda okunan reflektans değerlerinden elde edilen AUC'lar ile konsantrasyon arasında çizilen grafikten kalibrasyon denklemleri elde edildi.

3.5.3. HPLC Analizi

Mobil faz değişen oranlarda metanol ve 10 mM pH 2,5 fosfat tamponundan oluşmaktadır.

Mobil faz olarak, ilk bileşimi % 40 MeOH ve % 60 fosfat tamponu doğrusal 20 dakikalık program süresi içinde % 60 MeOH ve % 40 fosfat tamponu karışımına dönüşecek şekilde gradient elüsyon programı ile çalışıldı. UV dedeksiyon dalgaboyu 215 nm ve 1 mL dk^{-1} akış hızı kullanıldı [40].

Seçilen bazı polifenol, tiyol ve protein standartlarının tek başlarına ve karışım halinde enjeksiyonları yapıldı. Tek başlarına $1,0 \times 10^{-3}$ M GSH, %1 BSA, $1,0 \times 10^{-4}$ M QR ile *p*-CUM ve bunların konsantrasyonları aynı kalacak şekilde karışımları oluşturuldu.

3.5.TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE/AKTİVİTE VE TİYOL TAYİN YÖNTEMLERİNİN UYGULANMASI

3.5.1. Sentetik Polifenol-Tiyol Karışımları

Polifenoller ve tiyoller arasındaki olası etkileşimi antioksidan kapasite tayin yöntemleriyle incelemek amacıyla yöntemler bir dizi polifenol – tiyol karışımına uygulandı. Bu amaçla tiyol miktarları sabit tutulup çeşitli polifenolik antioksidanlar ortama ilave edilerek ikili karışımlar oluşturuldu. Bu karışımları hazırlamak için Beer yasasına uygun olarak optimum absorbans aralığında kalması amacıyla antioksidan çözeltilerinin konsantrasyon ve hacimleri aşağıdaki şekilde belirlendi:

CUPRAC yöntemi için: $1,0 \times 10^{-4}$ M QR (0,2 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M CAT (0,3 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M CFA (0,2 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M TR (0,2 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M *p*-CUM (0,4 mL), $1,0 \times 10^{-3}$ M NGN (0,3 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M RT (0,3 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M FA (0,2 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M GA (0,3 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M LUT (0,3 mL), $5,0 \times 10^{-5}$ M RA (0,2 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M CYS (0,4 mL) ve $1,0 \times 10^{-3}$ M GSH (0,2 mL).

ABTS yöntemi için; $1,0 \times 10^{-5}$ M QR (0,4 mL), $1,0 \times 10^{-5}$ M CAT (0,6 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M CFA (0,1 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M TR (0,2 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M *p*-CUM (0,1 mL), $5,0 \times 10^{-5}$ M NGN (0,1 mL), $5,0 \times 10^{-5}$ M RT (0,1 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M FA (0,1 mL), $5,0 \times 10^{-5}$ M GA (0,1 mL), $5,0 \times 10^{-5}$ M LUT (0,1 mL), $5,0 \times 10^{-5}$ M RA (0,1 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M CYS (0,2 mL) ve $1,0 \times 10^{-4}$ M GSH (0,2 mL).

DPPH yöntemi için; $2,0 \times 10^{-3}$ M CYS (0,05 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M QR (0,05 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M CAT (0,05 mL), $1,0 \times 10^{-3}$ M CFA (0,05 mL), $1,0 \times 10^{-4}$ M TR (0,05 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M RT (0,05 mL), $1,0 \times 10^{-3}$ M FA (0,05 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M GA (0,05 mL), $5,0 \times 10^{-4}$ M LUT (0,05 mL).

Ellman yöntemi için; Bütün polifenol ve tiyoller $1,0 \times 10^{-4}$ M olacak şekilde hazırlanıp 0,5'er mL kullanıldı.

İndofenol boya oluşumuna dayanan fiber optik reflektans sensörüyle seçilen çeşitli polifenoller, QR, RT, MR, NGN, LUT, CFA, FA, GA, *p*-CUM, TR, ve CYS, GSH'un $1,5 \times 10^{-3}$ M'lık çözeltilerinden alınan eşit miktarların reaksiyon ortamına eklenmesiyle oluşturulan karışımların deneysel ve teorik Δ AUC değerleri hesaplanarak % hatalar bulundu.

3.5.2. Sentetik Polifenol-Protein Karışımları

Polifenoller ve proteinler arasındaki olası etkileşimi antioksidan kapasite tayin yöntemleriyle incelemek amacıyla çeşitli protein polifenol karışımları hazırlandı ve seçilen toplam antioksidan kapasite/aktivite ve tiyol tayin yöntemleri bu karışımlara uygulandı. Bu amaçla örnek protein olarak BSA ve Kazein seçildi. Polifenol olarak ise QR ve CAT kullanıldı. Oluşturulan protein-polifenol karışımlarına CUPRAC, ABTS,

FRAP ve Ellman yöntemleri uygulandı. CUPRAC yönteminde %2'lik BSA, %1'lik kazein, $1,0 \times 10^{-4}$ M CAT ve QR'i farklı konsantrasyonlarda içeren karışımlar oluşturuldu. ABTS yöntemi için % 0,25'lik BSA, 1:40 seyreltilmiş %1'lik kazein, $5,0 \times 10^{-5}$ M CAT, $1,0 \times 10^{-5}$ M QR'in çeşitli karışımları hazırlandı. FRAP ve Ellman yönteminde ise %2'lik BSA, %2 Kazein, $1,0 \times 10^{-4}$ M CAT ve QR kullanıldı.

3.5.3. Protein ve Polifenol İçeren Gerçek Örnek Karışımları

Polifenollerce zengin bir bitki olan ve özellikle et ürünleri ile sıkça kullanılan kekikte bulunan polifenoller ekstrakte edilerek protein ekstraktları üzerine eklendi.

CUPRAC yöntemi için kekik ekstraktı %70 MeOH ile 1:50 seyreltilerek 0,3 mL, et, balık, salam protein ekstraktları 0,1;0,2 ve 0,4 mL, ABTS yöntemi için kekik ekstraktı %70 MeOH ile 1:200 seyreltilerek 0,5 mL, protein ekstraktları destile suyla 1:10 seyreltilerek 0,2 mL et ve, 0,4'er mL salam ve balık ekstraktı, Ellman yönteminde kekik ekstraktı % 70 MeOH ile 1:50 seyreltilerek 0,5 mL, et ekstraktı 1:5 seyreltilerek 0,5 mL, balık ve salam ekstraktları seyreltilmeden 0,2 ve 0,4 mL kullanıldı.

Seçilen polifenollerin tek başlarına ve protein (salam, balık, et) örneği varlığında bir etkileşimin olup olmadığının en önemli belirteçlerinden biri olan toplamsallıkları standart katkısı yapılarak incelendi. RA ve QR'in hem tek başlarına hem de protein örneği ile standart katkı yapılarak toplam antioksidan kapasite yöntemleri ve tiyol tayin yöntemi olan Ellman uygulandı. Protein örnekleri çeşidine ve kullanılan yöntemlere göre farklı oranlarda seyreltilerek reaksiyon ortamına eklendi. CUPRAC yöntemi için; Et, balık ve salam protein ekstraktı seyreltilmeden sırasıyla 0,1;0,2 ve 0,4 mL, 10^{-4} M QR'den 0,2 - 0,6 mL, $5,0 \times 10^{-5}$ M RA'dan 0,1-0,5 mL kullanıldı. ABTS yöntemi için; Et, balık ve salam protein ekstraktı destile suyla 1:10 seyreltilip et ve balık ekstraktlarından 0,2 mL, salam ekstaktından 0,3'er mL, 10^{-5} M QR'den 0,2 - 0,7 mL ve $5,0 \times 10^{-5}$ M RA'dan 0,1-0,5 mL kullanıldı. Ellman yöntemi için; et ekstraktı 1:5 destile suyla seyreltilerek 0,3 mL, balık ve salam ekstraktı seyreltilmeden sırasıyla 0,2 ve 0,4 mL, 1×10^{-4} M QR ve RA'dan 0,5 ve 1 mL kullanıldı.

İndofenol boya oluşumuna dayanan fiber optik reflektans sensörü yönteminde SE üzerine $1,5 \times 10^{-3} \text{M}$ GSH ve yönteme cevap verdiği bilinen bir polifenol olan CAT ($1,0 \times 10^{-3} \text{M}$) katkısı yapıldı ve 10. dakikadaki reflektans değerleri okundu.

4. BULGULAR

4.1. İNDOFENOL BOYA OLUŞUMUNA DAYANAN FİBER OPTİK REFLEKTANS YÖNTEMİNİN OPTİMİZASYONU

4.1.1. Süre Denemesi

CYS içeren örneğin reflektans değerinin 60. dk' dan sonra değişmediği görüldüğünden optimum çalkalama süresi 60 dk olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1: Referans ve CYS içeren örneğin belirli aralıklarla ölçülen reflektans değerleri.

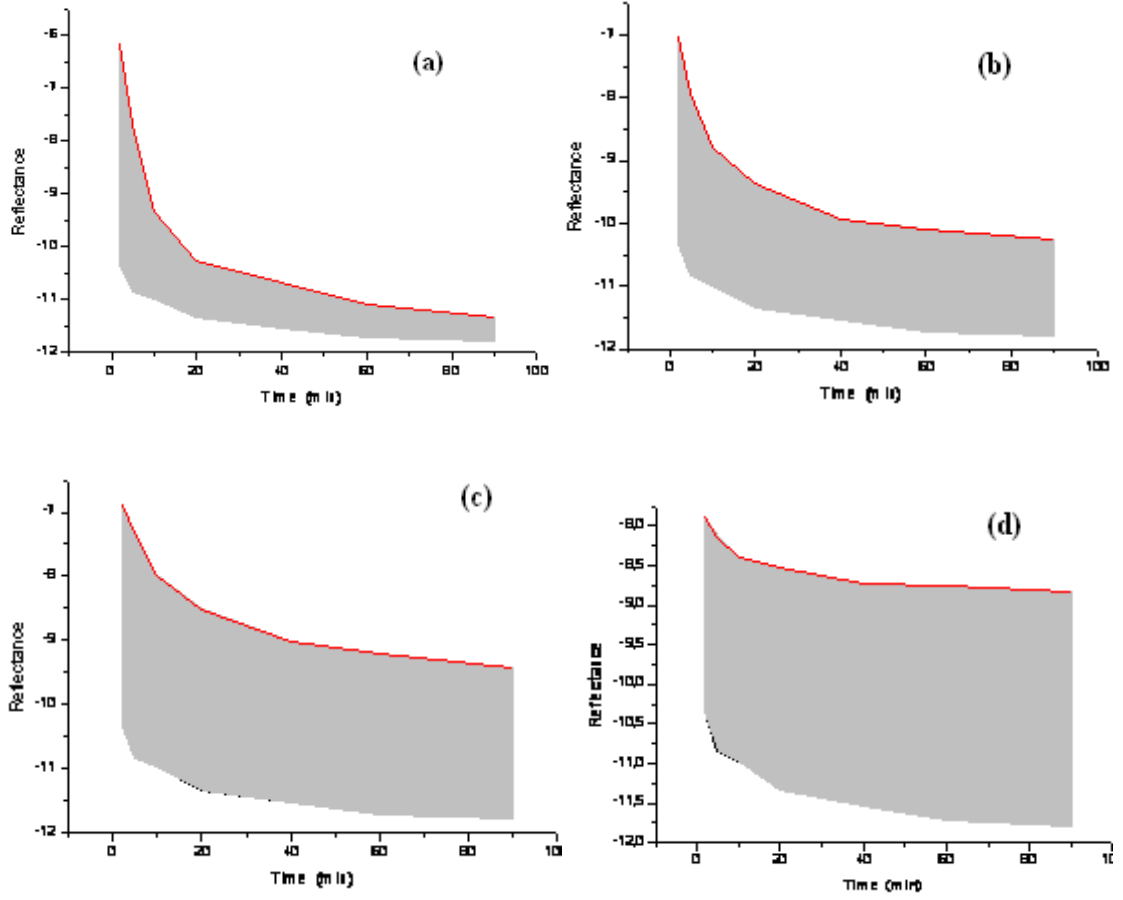
Süre(dk)	Referans	0,3 mL 1,5×10 ⁻³ M CYS
2	-9,554	-5,4
5	-10,027	-5,63
10	-10,196	-7,159
20	-10,481	-8,492
40	-10,594	-8,977
60	-10,831	-9,833
90	-10,909	-10,046
120	-10,992	-10,055

4.1.2. Kalibrasyon Denklemleri

1,5×10⁻³M CYS, GSH, NAC ve 2,0×10⁻³M H-CYS kullanılarak elde edilen kalibrasyon denklemleri tablo 4.11'de gösterildiği gibidir.

Tablo 4.2: Fiber optik reflektans sensörü ile çeşitli tiyol bileşiklerinin kalibrasyon denklemleri.

AOx	Kalibrasyon Denklemleri	
N-Ac	$\Delta AUC = 1,34 \times 10^6 C - 8,32$	$R^2 = 0,9751$
CYS	$\Delta AUC = 2,28 \times 10^6 C - 52,292$	$R^2 = 0,9320$
GSH	$\Delta AUC = 1,52 \times 10^6 C - 74,995$	$R^2 = 0,9954$
H-CYS	$\Delta AUC = 5,63 \times 10^5 C + 10,65$	$R^2 = 0,9805$



Şekil 4.1: Glutasyon için son konsantrasyon sırasıyla (a) $9,0 \times 10^{-5}$, (b) $1,5 \times 10^{-4}$, (c) $2,1 \times 10^{-4}$ ve (d) $2,7 \times 10^{-4}$ olacak şekilde hesaplanan ΔAUC 'ler.

4.2.TOPLAM ANTIÖKSİDAN KAPASİTE/AKTİVİTE VE TIYOL TAYİN YÖNTEMLERİNİN SONUÇLARI

4.2.1. Sentetik Polifenol-Tiyol Karışımları

Malzeme ve Yöntem kısmında belirtilen konsantrasyonlar kullanılarak yapılan denemelerin sonuçları Tablo 4.2- 4.8' de verilmiştir. Bir karışımı oluşturan bileşenlerin tek tek absorbanslarından, absorbansların toplanabilirliği prensibi kullanılarak, karışımın teorik (beklenen) absorbans değerleri hesaplandı ve deneysel sonuçlar ile birlikte verildi. Tablodaki verilerden birkaç karışım dışında CUPRAC ve ABTS yöntemi iyi bir toplamsallık gösterirken DPPH yönteminde yüksek negatif yüzde hatalar gözlenmiştir. DPPH yönteminde $1,0 \times 10^{-2}$ M konsantrasyonda GSH, NGN, *p*-CUM denenmiş ancak reaksiyon gözlenmemiştir. FRAP metodunda elde edilen absorbans

değerleri tiyoller ve polifenollerin tek başlarına verdiği değerlerin toplamından oldukça yüksek sonuçlar vererek % 100'ün üzerinde hatalar oluşmasına neden olmuştur.

Tablo 4.2: CYS-Polifenol Karışımlarının CUPRAC Sonuçları.

Örnek	A _{deneysel}	A _{beklenen}	% Hata
CYS	0,3227		
CYS+RA	0,5553	0,5411	2,62
CYS+QR	0,5846	0,6016	-2,83
CYS+GA	0,5838	0,6048	-3,47
CYS+CAT	0,8002	0,8313	-3,74
CYS +RT	0,6274	0,6670	-5,94
CYS+LUT	0,5824	0,6225	-6,44
CYS+FA	0,7209	0,7916	-8,93
CYS+TR	0,6186	0,7296	-15,21
CYS + NGN	0,3347	0,4506	-25,72
CYS+p-CUM	0,4738	0,6699	-29,27

Tablo 4.3: GSH-Polifenol Karışımlarının CUPRAC Sonuçları.

Örnek	A _{deneysel}	A _{beklenen}	% Hata
GSH	0,3264		
GSH + QR	0,6051	0,6075	-0,40
GSH + LUT	0,6343	0,6453	-1,70
GSH + TR	0,6574	0,6707	-1,98
GSH + RA	0,5313	0,5448	-2,48
GSH+ CFA	0,5434	0,5288	2,76
GSH + FA	0,7458	0,7678	-2,87
GSH + GA	0,5660	0,5949	-4,86
GSH + CAT	0,8112	0,7687	5,53
GSH + RT	0,6274	0,6707	-6,46
GSH +NGN	0,3674	0,4498	-18,32
GSH + p-CUM	0,3736	0,4982	-25,01

Tablo 4.4: CYS - Polifenol Karışımlarının ABTS Sonuçları.

Örnek	$\Delta A_{\text{deneysel}}$	$\Delta A_{\text{beklenen}}$	% Hata
CYS	0,3319		
CYS + TR	0,5231	0,5274	-0,82
CYS + LUT	0,6181	0,6254	-1,17
CYS + QR	0,6032	0,5892	2,38
CYS + RT	0,6095	0,5905	3,22
CYS + GA	0,5140	0,5339	-3,73
CYS + FA	0,5267	0,5600	-5,95
CYS + <i>p</i> -CUM	0,5681	0,6232	-8,84
CYS + NGN	0,5180	0,5903	-12,25
CYS + CAT	0,6679	0,5947	12,31
CYS + RA	0,6153	0,5295	16,20

Tablo 4.5: GSH - Polifenol Karışımlarının ABTS Sonuçları.

Örnek	$\Delta A_{\text{deneysel}}$	$\Delta A_{\text{beklenen}}$	% Hata
GSH	0,3582		
GSH + QR	0,6078	0,6066	0,20
GSH + CFA	0,5350	0,5092	5,07
GSH + TR	0,5206	0,5741	-9,32
GSH + GA	0,6557	0,5961	10,00
GSH + RA	0,4871	0,5443	-10,51
GSH + FA	0,5302	0,6138	-13,62
GSH + LUT	0,5617	0,6555	-14,31
GSH + NGN	0,4982	0,6006	-17,05
GSH + RT	0,5195	0,6402	-18,85
GSH + <i>p</i> -CUM	0,5383	0,6819	-21,06

Tablo 4.6: CYS- Polifenol karışımlarının Ellman sonuçları.

Örnek	A_{deneysel}	A_{beklenen}	% Hata
CYS	0,3695		
CYS+FA	0,3701	0,3695	0,16
CYS+p-CUM	0,3706	0,3695	0,30
CYS+RT	0,3673*	0,3695	-0,60
CYS+ NGN	0,3721	0,3695	0,70
CYS+ CFA	0,3728	0,3695	0,89
CYS+ TR	0,3745	0,3695	1,35
CYS+QR	0,3591*	0,3695	-2,81
CYS+GA	0,3481	0,3695	-5,79
CYS+LUT	0,3424*	0,3695	-7,33

*Düzeltilmiş Absorbans

Tablo 4.7: GSH - Polifenol karışımlarının Ellman sonuçları.

Örnek	A_{deneysel}	A_{beklenen}	% Hata
GSH	0,3517		
GSH+ NGN	0,3612	0,3517	2,70
GSH+FA	0,3521	0,3517	0,11
GSH +QR	0,3618*	0,3517	2,87
GSH+ TR	0,3512	0,3517	-0,14
GSH+RT	0,3339*	0,3517	-5,06
GSH+ CFA	0,3529	0,3517	0,34
GSH+LUT	0,3371*	0,3517	-4,15
GSH+GA	0,3403	0,3517	-3,24
GSH +p-CUM	0,344	0,3517	-2,19

*Düzeltilmiş Absorbans

Tablo 4.8: CYS- Polifenol karışımlarının DPPH sonuçları.

Örnek	$\Delta A_{\text{deneysel}}$	$\Delta A_{\text{beklenen}}$	% Hata
CYS	0,2006		
CYS+ TR	0,4231	0,4639	-8,79
CYS+ FA	0,2886	0,3669	-21,34
CYS+ CFA	0,3345	0,4907	-31,83
CYS+ QR	0,3407	0,4736	-28,06
CYS+ LUT	0,2142	0,3585	-40,25
CYS+GA	0,4202	0,5408	-22,3
CYS+RT	0,2823	0,4662	-39,45

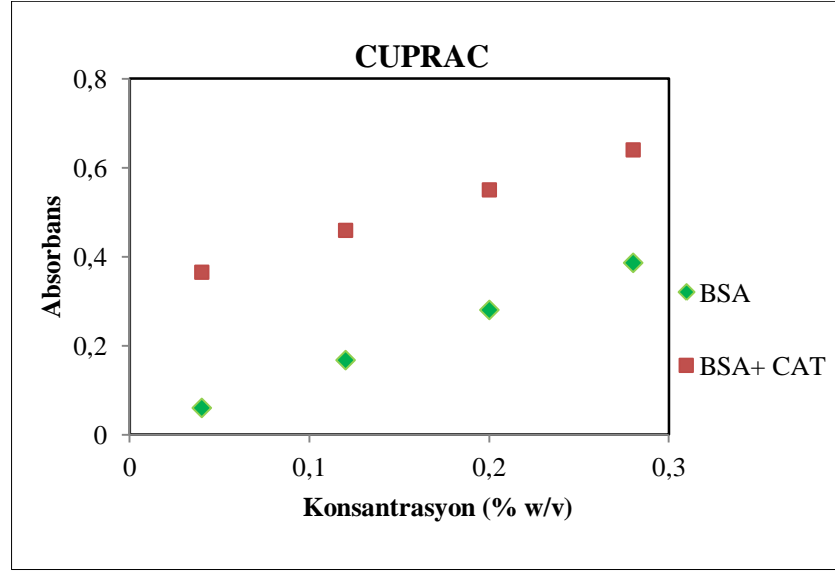
İndofenol boya oluşumuna dayanan fiber optik reflektans sensörüyle seçilen bazı standart tiyol ve polifenol karışımlarında tiyol tayini yapılmıştır. Tablo 4.9’de gösterildiği gibi deneysel ve beklenen ΔAUC ’den hesaplanan yüzde hata değerlerinin yüksek olduğu görülmüştür.

Tablo 4.9: Fiber optik reflektans sensörü ile bazı ikili karışımlarda tiyol tayini.

	$\Delta AUC_{\text{deneysel}}$	$\Delta AUC_{\text{beklenen}}$	% Hata
0,3 CYS + 0,3 GSH	284,65	238,67	19,26
0,3 CYS + 0,3 NAC	512,95	376,71	36,17
0,3 CYS + 0,3 RT	131,1	144,82	-9,47
0,3 CYS + 0,3 NGN	189,86	154,58	22,82
0,3 CYS + 0,3 CFA	109,2	172,64	-36,75
0,3CYS+0,3 FA	209,25	192,79	8,53
0,3CYS+0,3 p-CUM	178,2	192,79	-7,57
0,3CYS+0,3 LUT	169,26	192,79	-12,21
0,3 CYS + 0,3 TR	81,59	84,71	-3,68
0,3 NAC + 0,3 TR	50,83	67,6	-24,8

4.2.2. Sentetik Polifenol-Protein Karışımları

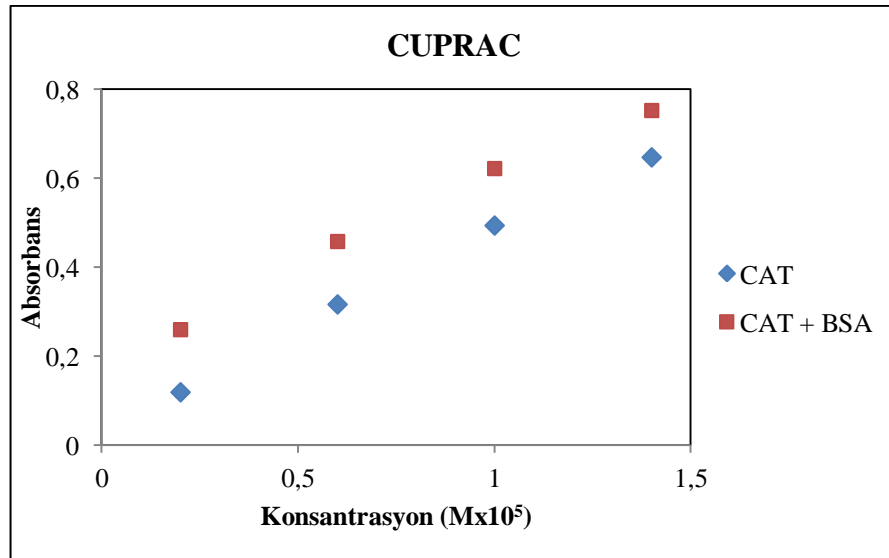
Örnek protein olarak seçilen BSA ve Kazein’e sırayla karışımı oluşturan bileşenlerden birinin miktarı arttırılıp, diğerinin miktarı sabit tutularak QR ve CAT ilave edildi. Elde edilen verilerden bileşenlerin tek başlarına ve karışım halinde CUPRAC, ABTS ve Ellman yöntemlerine ait kalibrasyon grafikleri Şekil 4.2- 4.9’de gösterildiği gibidir.



Şekil 4.2: BSA'nın tek başına ve CAT varlığında CUPRAC kalibrasyon grafiği.

$$\text{BSA: } A = 1,36C(\%) + 0,0057 \quad R^2 = 0,9999$$

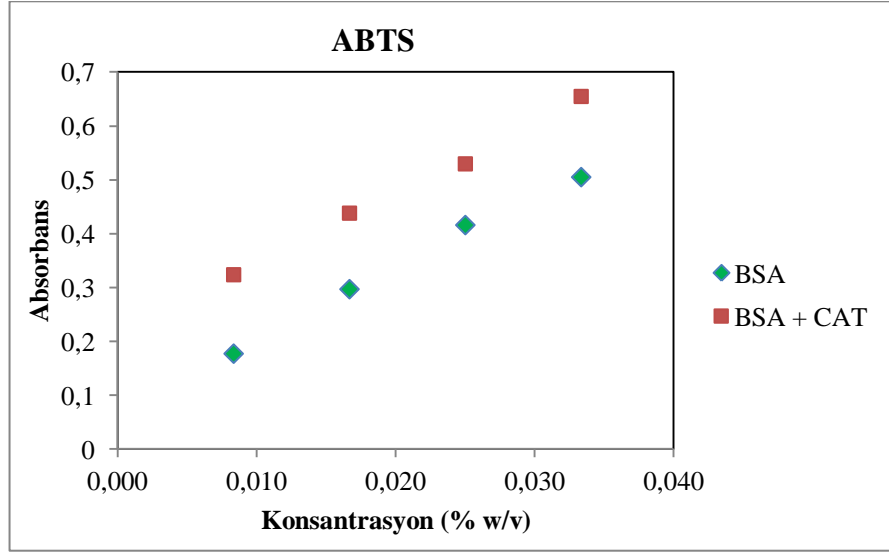
$$\text{BSA+CAT: } A = 1,14C(\%) + 0,3209 \quad R^2 = 0,9999$$



Şekil 4.3: CAT'in tek başına ve BSA varlığında CUPRAC kalibrasyon grafiği.

$$\text{CAT: } A = 4,40 \times 10^4 C + 0,0420 \quad R^2 = 0,9968$$

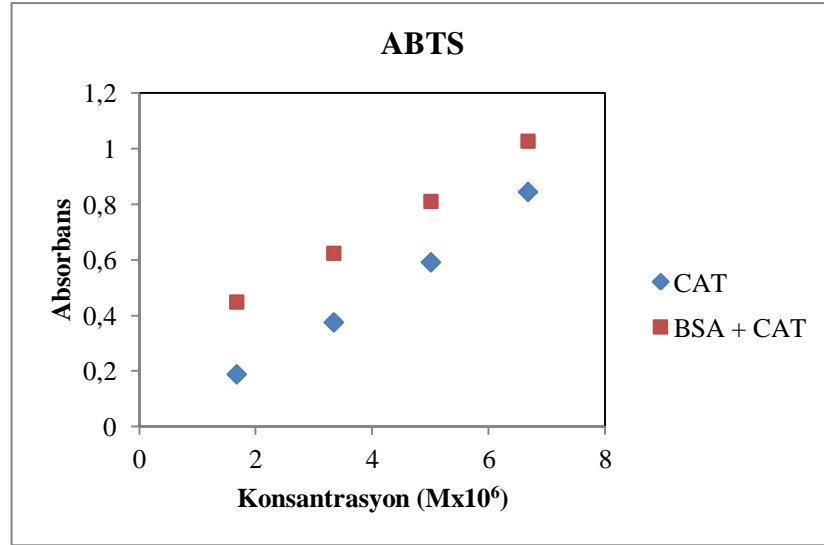
$$\text{CAT+BSA: } A = 4,26 \times 10^4 C + 0,1879 \quad R^2 = 0,9960$$



Şekil 4.4: BSA'nın tek başına ve CAT varlığında ABTS kalibrasyon grafiği.

$$\text{BSA:} \quad \Delta A = 13,22C(\%) + 0,0737 \quad R^2 = 0,9954$$

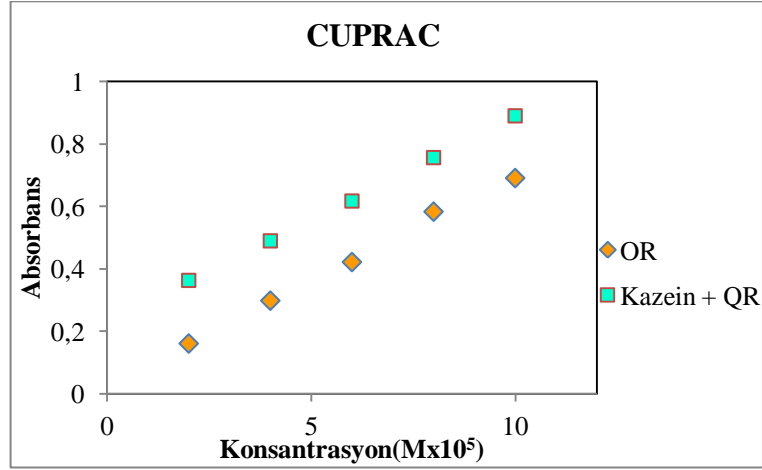
$$\text{BSA+CAT:} \quad \Delta A = 13,01C(\%) + 0,2159 \quad R^2 = 0,9968$$



Şekil 4.5: CAT'in tek başına ve BSA varlığında ABTS kalibrasyon grafiği.

$$\text{CAT:} \quad \Delta A = 1,31 \times 10^5 C - 0,046 \quad R^2 = 0,9954$$

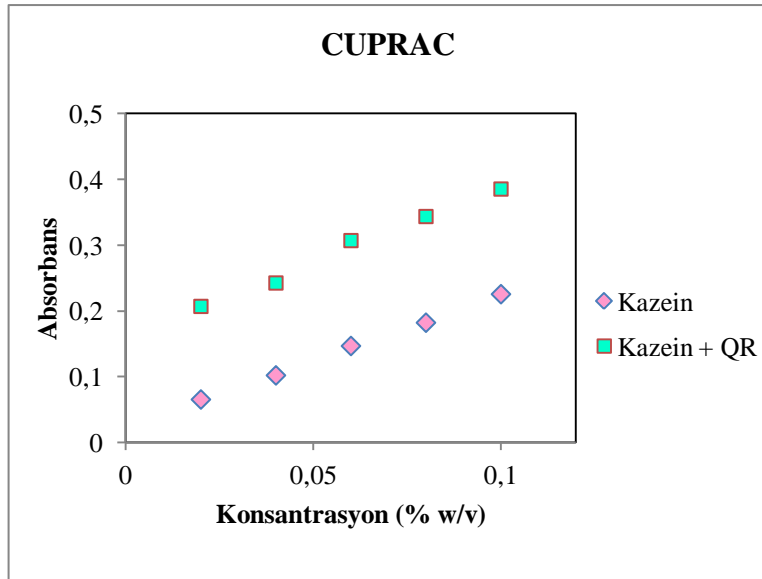
$$\text{CAT+BSA:} \quad \Delta A = 1,11 \times 10^5 C + 0,267 \quad R^2 = 0,9976$$



Şekil 4.6: QR'in tek başına ve Kazein varlığında CUPRAC kalibrasyon grafiği.

$$\text{QR: } A = 6,73 \times 10^4 C + 0,0278 \quad R^2 = 0,9973$$

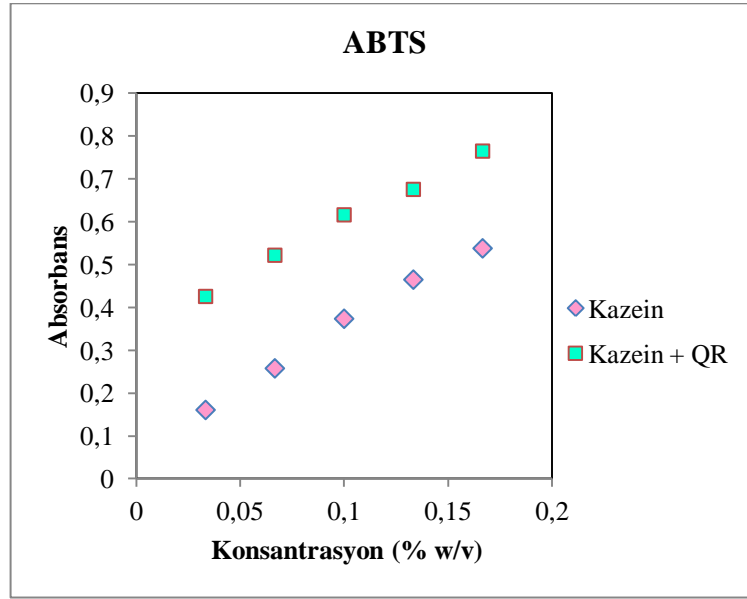
$$\text{Kazein+QR: } A = 6,61 \times 10^4 C + 0,2276 \quad R^2 = 0,9996$$



Şekil 4.7: Kazein'in tek başına ve QR varlığında CUPRAC kalibrasyon grafiği.

$$\text{Kazein: } A = 2,10C(\%) + 0,0205 \quad R^2 = 0,9955$$

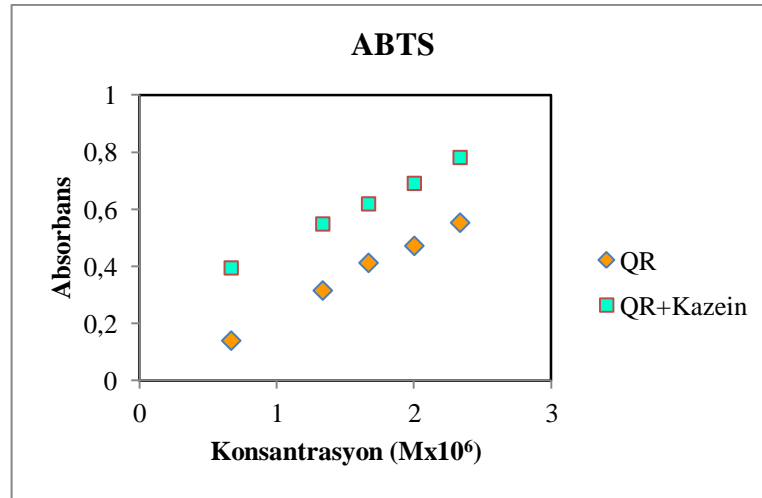
$$\text{Kazein+QR: } A = 2,29C(\%) + 0,16 \quad R^2 = 0,9911$$



Şekil 4.8: Kazein'in tek başına ve QR varlığında ABTS kalibrasyon grafiği.

Kazein: $\Delta A = 2,88C(\%) + 0,0709$ $R^2 = 0,9941$

Kazein+QR: $\Delta A = 2,50C(\%) + 0,3516$ $R^2 = 0,9942$



Şekil 4.9: QR' in tek başına ve kazein varlığında ABTS kalibrasyon grafiği.

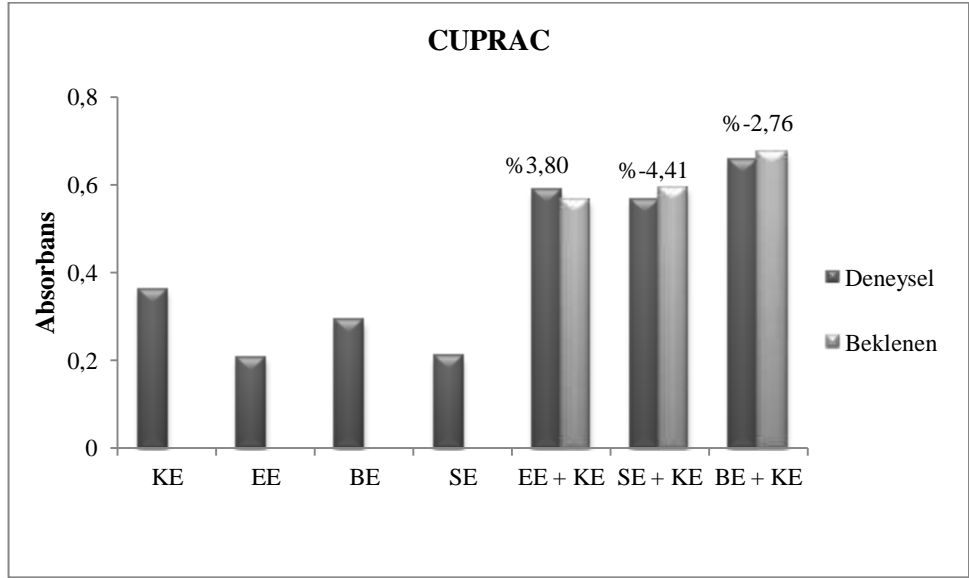
QR: $\Delta A = 2,47 \times 10^5 C - 0,0179$ $R^2 = 0,9956$

QR+Kazein: $\Delta A = 2,29 \times 10^5 C + 0,2408$ $R^2 = 0,9986$

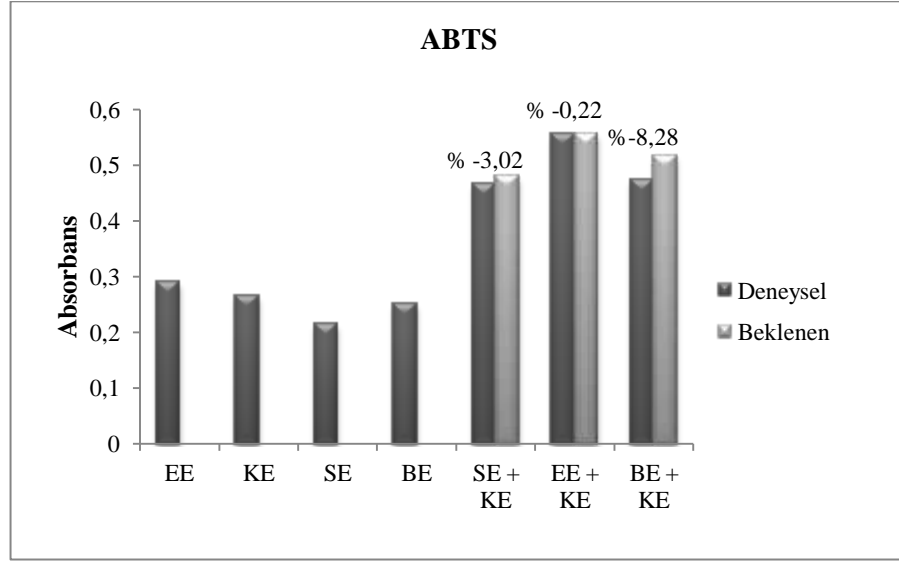
4.2.3. Protein ve Polifenol İçeren Gerçek Örnek Karışımları

Malzeme ve Yöntem kısmında belirtilen şekilde ekstraksiyonları gerçekleştirilen salam, balık, et ve kekik örneklerine CUPRAC, ABTS, FRAP ve Ellman yöntemleri

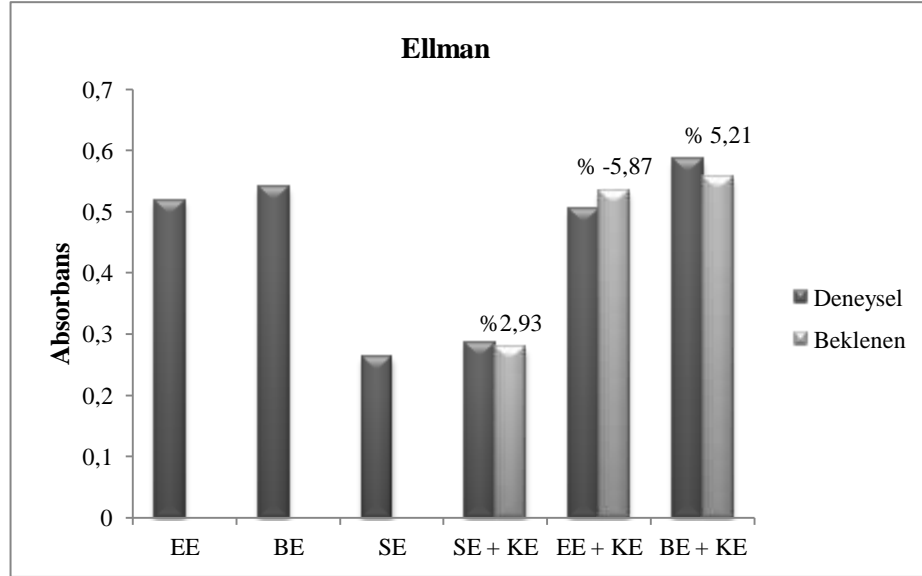
uygulanmış, elde edilen sonuçlar deneysel ve beklenen absorpsanlar ile % hata değerleri Şekil 4.9- 4.11 arasında gösterilmiştir. FRAP yönteminde protein içeren örneklerde çökme gözleendiğinden yöntem uygulanamamıştır. DPPH yönteminde ise protein içeren örneklerin absorpsansı referansın absorpsansından daha yüksek olduğundan karışımlara uygulanamamıştır. CUPRAC, ABTS ve Ellman yöntemleri için toplamsallıklarının oldukça iyi olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.10: Protein ve polifenol içeren gerçek örnek karışımlarının CUPRAC sonuçları.



Şekil 4.11: Protein ve polifenol içeren gerçek örnek karışımlarının ABTS sonuçları.



Şekil 4.12: Protein ve polifenol içeren gerçek örnek karışımlarının Ellman sonuçları.

4.2.4. Protein İçeren Gerçek Örneklerle Standart Katkı Sonuçları

RA ve QR'in hem tek başlarına hem de protein örneğine standart katkı yapılarak toplam antioksidan kapasite/aktivite yöntemleri ve tiyol tayin yöntemi olan Ellman yöntemi uygulandı.

Tablo 4.10: Protein içeren gerçek örneklere RA standart katkısının sonuçları.

CUPRAC			
	$A_{deneysel}$	$A_{belenen}$	% Hata
0,1 RA	0,1318		
0,3 RA	0,3357		
0,5 RA	0,5657		
0,2 BE	0,2801		
0,4 SE	0,2143		
0,1 EE	0,2053		
0,1 RA + SE	0,319	0,3461	-7,83
0,3 RA + SE	0,5169	0,5500	-6,02
0,5 RA + SE	0,7888	0,7800	1,13
0,1 RA + BE	0,3688	0,4119	-10,46
0,3 RA + BE	0,5972	0,6158	-3,02
0,5 RA + BE	0,8501	0,8458	0,51
0,1 RA + EE	0,2992	0,3371	-11,24
0,3 RA + EE	0,5128	0,5410	-5,21
0,5 RA + EE	0,7341	0,7710	-4,79
ABTS			
	$\Delta A_{deneysel}$	$\Delta A_{belenen}$	% Hata
0,1 RA	0,0968		
0,3 RA	0,3498		
0,5 RA	0,6015		
0,3 SE	0,2214		
0,3 BE	0,4019		
0,2 EE	0,2409		
0,1 RA + SE	0,3576	0,3182	12,38
0,3 RA + SE	0,5617	0,5712	-1,66
0,5 RA + SE	0,7985	0,8229	-2,97
0,1 RA + BE	0,5753	0,4987	15,36
0,3 RA + BE	0,7487	0,7517	-0,40
0,5 RA + BE	0,9877	1,0034	-1,56
0,1 RA + EE	0,3700	0,3377	9,56
0,3 RA + EE	0,5614	0,5907	-4,96
0,5 RA + EE	0,8139	0,8424	-3,38
ELLMAN			
	$A_{deneysel}$	$A_{belenen}$	% Hata
0,5 RA	0,0031		
1,0 RA	0,0042		
0,2 BE	0,5307		
0,4 SE	0,2712		
0,3 EE	0,2614		
0,5 RA + BE	0,5797	0,5307	9,23
1,0 RA + BE	0,6138	0,5307	15,66
0,5 RA + SE	0,2985	0,2712	10,07
1,0 RA + SE	0,3099	0,2712	14,27
0,5 RA + EE	0,2634	0,2614	0,77
1,0 RA + EE	0,2593	0,2614	-0,80

Tablo 4.11: Protein içeren gerçek örneklere QR standart katkısının sonuçları

CUPRAC			
	A_{deneysel}	A_{beklenen}	% Hata
0,2 QR	0,2895		
0,4 QR	0,5379		
0,6 QR	0,7407		
0,2 SE	0,2801		
0,4 BE	0,2143		
0,1 EE	0,2053		
0,2 QR + SE	0,4749	0,5038	-5,74
0,4 QR + SE	0,6654	0,7522	-11,54
0,6 QR + SE	0,9059	0,955	-5,14
0,2 QR + BE	0,5326	0,5696	-6,50
0,4 QR + BE	0,8249	0,818	0,84
0,6 QR + BE	1,0951	1,0208	7,28
0,2 QR + EE	0,4512	0,4948	-8,81
0,4 QR + EE	0,7012	0,7432	-5,65
0,6 QR + EE	0,9047	0,946	-4,37

ABTS			
	$\Delta A_{deneysel}$	$\Delta A_{beklenen}$	% Hata
0,2 QR	0,1926		
0,5 QR	0,4352		
0,7 QR	0,601		
0,3 SE	0,2261		
0,3 BE	0,4226		
0,2 EE	0,2409		
0,2 QR + BE	0,556	0,6152	-9,62
0,5 QR + BE	0,7987	0,8578	-6,89
0,7 QR + BE	0,9008	1,0236	-12,00
0,2 QR + SE	0,3944	0,4187	-5,80
0,5 QR + SE	0,6663	0,6613	0,76
0,7 QR + SE	0,7806	0,8271	-5,62
0,2 QR + EE	0,3992	0,4335	-7,91
0,5 QR + EE	0,6414	0,6761	-5,13
0,7 QR + EE	0,8136	0,8419	-3,36

ELLMAN			
	A_{deneysel}	A_{beklenen}	% Hata
0,5 QR	-		
1,0 QR	-		
0,2 BE	0,5307		
0,4 SE	0,2712		
0,3 EE	0,2614		
0,5 QR + BE	0,5740*	0,5307	8,15
1,0 QR + BE	0,7259*	0,5307	36,78
0,5 QR + SE	0,3390*	0,2712	25,00
1,0 QR + SE	0,3627*	0,2712	33,74
0,5 QR + EE	0,2524*	0,2614	-3,44
1,0 QR + EE	0,2655*	0,2614	1,57

*Düzeltilmiş Absorbans

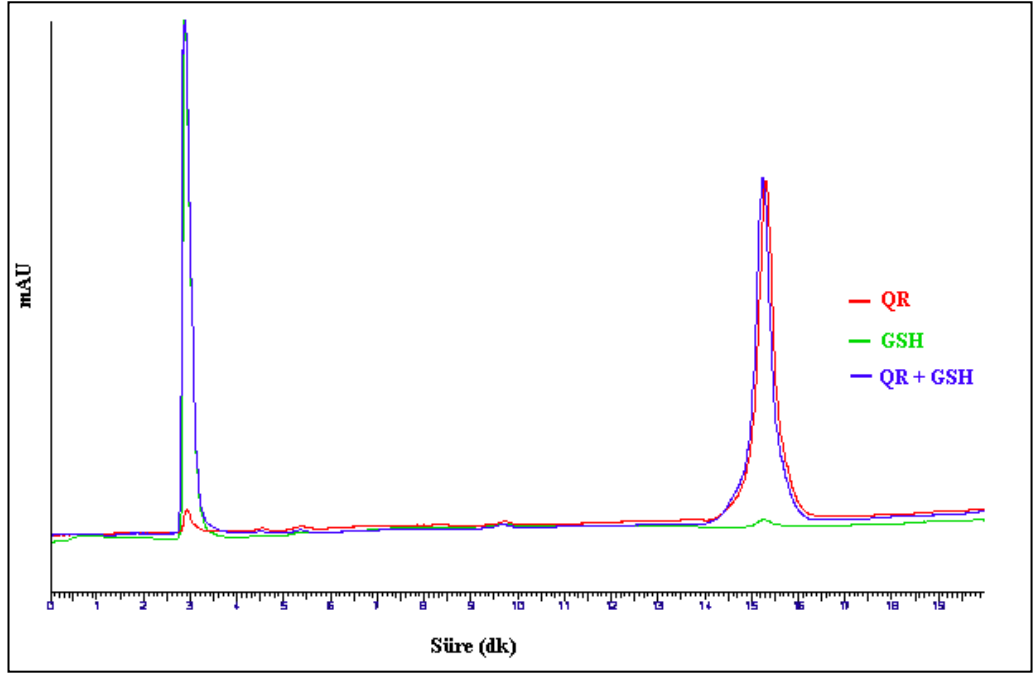
Farklı miktarlarda protein örneğine katı faz üzerinde indofenol oluşumuna dayanan tiyol tayin yöntemi uygulanmış ancak reaksiyon gözlenmemiştir. Protein içeren gerçek örneğe GSH ve CAT katkısı yapılarak 10. dakikadaki reflektans değerleri okunmuştur. Bunun sonucunda karışımın elde edilen reflektans değerleri tek tek CAT ve GSH'ın reflektans değerine yakındır. Bu sonuçlar fenolik antioksidan örneği olarak seçilen CAT ve tiyol bileşiklerine örnek olarak seçilen GSH'ın salam ekstraktında bulunan proteinler ile güçlü bir bağlanma yapmadığı şeklinde yorumlanabilir.

Tablo 4.12: Protein içeren gerçek örneğe standart katkısının 10. dakikadaki reflektans değerleri.

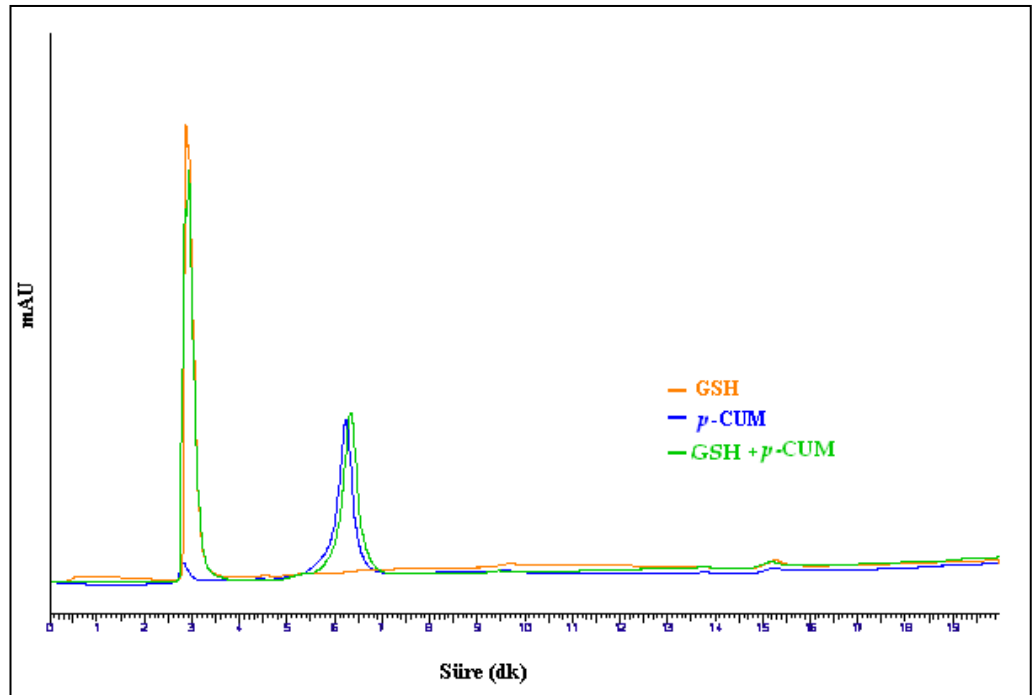
Örnek	Reflektans
R	-10,883
0,5 mL SE	-10,734
1 mL GSH	-4,525
1mL CAT	-6,884
SE + GSH	-4,136
SE + CAT	-6,029

4.3. HPLC ANALİZ SONUÇLARI

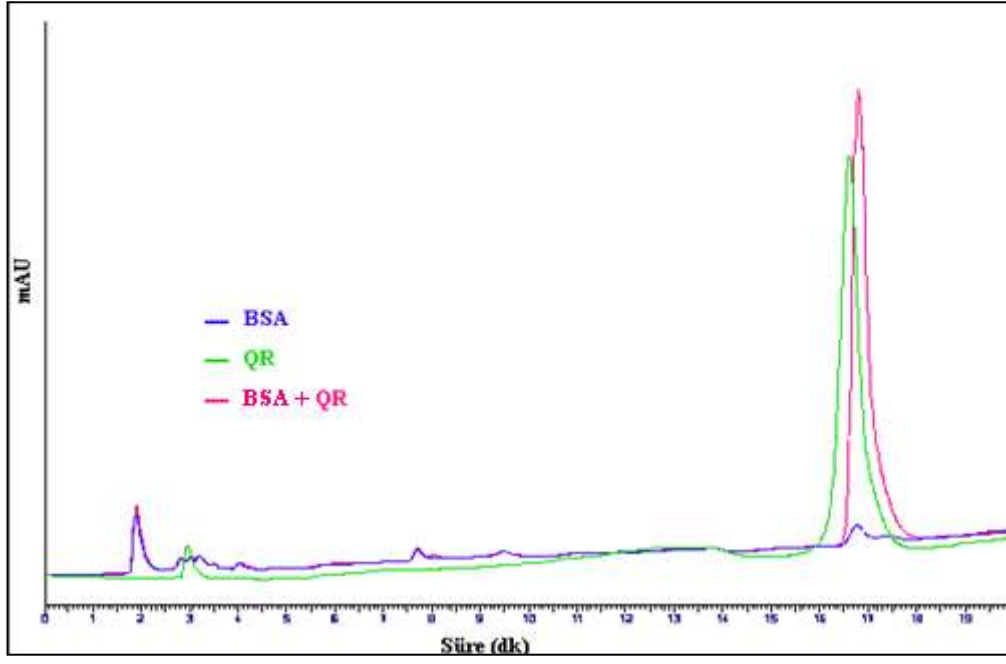
Seçilen bazı tiyol/protein ve polifenollerin önce ayrı ayrı sonra karışım halinde enjeksiyonları gerçekleştirilmiş ve elde edilen kromatogramlarda görülen piklerde herhangi bir değişim veya karışımı oluşturan bileşenlere ait pikler haricinde bir pik gözlenmemiştir.



Şekil 4.13: 10^{-3} M GSH, 10^{-4} M QR ve bunların karışımına ait kromatogram.



Şekil 4.14: 10^{-3} M GSH, 10^{-4} M p-CUM ve bunların karışımına ait kromatogram.



Şekil 4.15: %1 BSA, 10^{-4} M QR ve bunların karışımına ait kromatogram.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gıda kaynaklı en önemli biyoaktif maddelerden olan polifenoller yaygın antioksidanlardır. Toplam polifenol tayininde kullanılan çok çeşitli aktivite ve/veya kapasite tayin yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler ortamda yalnızca polifenollerin bulunduğu durumlarda ve laboratuvar şartlarında oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Ancak bu maddelerin genellikle ortamda tek başlarına olmadıkları göz ardı edilmemelidir. Polifenollerin etkileşebilecekleri muhtemel maddeler arasında tiyoller ve proteinler önemli yer tutmaktadır. Polifenoller gibi önemli bir antioksidan sınıfı olan tiyoller (basit ya da protein yapısında) vücudun önemli savunma mekanizmalarındandır. Tiyoller vücutta doğal olarak bulunabildiği gibi gıda yoluyla da alınabilmektedir. Önceki yıllarda genellikle antioksidan etkileri göz ardı edilen proteinlerin antioksidan kapasiteye katkıları son dönemlerde yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır[25]. Bu anlamda polifenollerin tayininde yaygın olarak kullanılan antioksidan aktivite/kapasite tayin yöntemlerinin söz konusu bileşiklerin varlığında incelenmesi önemlidir. Gıdalarda bulunan polifenoller, tükürük proteinleri, bağırsaklarda bulunan proteinler, sindirim enzimleri ile etkileşime girmelerinin yanında vücut içerisinde plazma proteinlerine bağlanarak taşınırlar [2]. Ayrıca beslenme alışkanlıklarımızdan dolayı proteince zengin gıda maddeleri ile polifenolce zengin gıda maddelerinin birlikte tüketimi yaygındır (et ile kekik tüketilmesi, et ya da balıkların çeşitli bitkisel baharat ve taze otlarla marine edilmesi ve tüketilmesi vb.). Yaptığımız çalışmada öncelikle sentetik karışımlar ile sonrasında da polifenol açısından zengin gıda örnekleri ile proteince zengin gıda örnekleri kullanılarak bu muhtemel etkileşimler ve yaygın olarak kullanılan toplam antioksidan kapasite/aktivite tayin yöntemlerine yansımaları araştırılmıştır. Hazırlanan karışımlara CUPRAC, ABTS, FRAP, DPPH ve Ellman Yöntemleri uygulanmıştır. Ayrıca Ellman yöntemine ek olarak daha önce seçimli kateşin tayininde kullanılan nano boyutta titanyum dioksit üzerinde indofenol boyası oluşumuna dayanan yöntem de tiyol tayini için uygulanmıştır. Önce karışımı oluşturan bileşenlere ardından da karışıma ilgili yöntemler uygulanarak sonuçların toplamsallığı incelenmiştir. CUPRAC yönteminde yüzde hata değerleri -0,40 ila -29,27 arasında değiştiği görülmüştür.

Yüksek hata değerlerinin CUPRAC ile yavaş reaksiyon verdikleri bilinen NGN ve *p*-CUM içeren karışımlara ait olması bu hataların tiyoller ile NGN ve *p*-CUM'in arasındaki etkileşimden değil reaksiyonlarının yavaş gerçekleşmesinden ileri geldiğini düşündürmüştür. ABTS yönteminde elde edilen yüzde hata değerleri -21,06 ila 0,20 arasında değişmektedir. ABTS yönteminde tiyol gruplarının karşılık gelen disülfürlere değil sülfenik asitler üzerinden sülfenik ve sulfonik asitlere kadar yükseltgindikleri daha önce ifade edilmiştir [40]. Özellikle tiyol içeren karışımlarda görülen yüksek hata değerlerinin tiyollerin bu farklı oksidasyon özelliklerinden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır. FRAP yönteminin tiyollere duyarlı olmadığı ve tiyol içeriği yüksek olan maddelerin toplam antioksidan kapasitesini ölçmekte yetersiz olduğu bilinen bir gerçektir [26,30]. Yaptığımız denemelerde ise FRAP yöntemi ile fenolik antioksidanların toplam kapasite tayininde ortamda tiyol bileşiklerinin bulunması durumunda sonuçlarda çok büyük pozitif sapmaların olduğu belirlenmiştir. DPPH yönteminde ise DPPH radikalleri organik çözücüde hazırlandığından hidrofilik antioksidanların tayininde sınırlama getirdiği gibi kompleks yapıları polifenollerle de yavaş reaksiyon vermektedir. Yöntemin pH ve çözücünün türünden etkilendiği de bilinmektedir [22]. Yapılan denemelerde de ikili karışımlara ait hata değerlerinin % 20'nin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmada CUPRAC, ABTS ve Ellman Yöntemlerinde toplamsallığın genel olarak oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Katı faz üzerinde indofenol oluşumuna dayanan tiyol tayininde uygulanan ikili karışımlarda da %20'nin üzerinde hatalar belirlenmiştir. Son olarak HPLC denemeleri gerçekleştirilmiştir. Karışımı oluşturan maddeler önce ayrı ayrı sonra karışım halinde sisteme enjekte edilmiştir. Yapılan denemelerde enjeksiyon öncesi hazırlanan karışımların içeriğini oluşturan bileşiklerin piklerinde bir değişme ya da ekstra pik olmadığı görülmüştür. Bu da herhangi bir ara bileşik oluşumu ya da kovalent bağlanma olasılığının düşük olduğunu göstermiştir. Proteinler ile polifenoller arasındaki etkileşimlerin incelendiği çeşitli çalışmalar literatürde mevcuttur. Bu çalışmalarda polifenoller ile proteinler arasındaki etkileşimlerin konsantrasyon, pH, protein ve polifenolün yapısına bağlı olduğuna değinilmekle birlikte genel olarak iki tür arasındaki bağlanmaların hidrojen bağı, π -bağı, hidrofobik etkileşim, iyonik etkileşim ve kovalent bağlar yoluyla gerçekleştiğine değinilmiştir. Bu durum ve yapılan denemelerin sonuçları incelendiğinde bu bağlanmalar sonucunda oluşması muhtemel komplekslerin stabilitelerinin çok yüksek olmadığı ve toplam antioksidan aktivite/kapasite tayini

reaksiyonları sırasında kolaylıkla bozuldukları düşünölmüştür. Deneysel sonuçlardaki sapmaların ise deneysel koşulların ve kullanılan yöntemin özelliklerine bağılı olduğı ifade edilebilir. Özellikle polifenolik antioksidanlar ile proteinler ve/veya tiyollerin bir arada olduğı gerçek örnek matrislerinde toplam antioksidan aktivite/kapasite yöntemleri seçilirken yöntemin iyi belirlenmesi ve optimize edilmesinin önemli olduğı açıkça görölmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Scalbert, A.; Johnson, I. T.; Saltmar, M., 2005, Polyphenols: antioxidants and beyond, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81(suppl), 215S–7S.
- [2]. Ferruzi, M.G.; Bordenave N.; Hamaker B.R., 2012, Does flavor impact function? Potential consequences of polyphenol–protein interactions in delivery and bioactivity of flavan-3-ols from foods, *Physiology and Behavior*, 107, 591-597
- [3]. Arts, M.J.T.J.; Haenen, G.R.M.M.; Wilms, L.C.; Beetstra, S.A.J.N.; Heijnen, C.G.M.; Voss, H.-P; Bast, A., 2002, Interactions between Flavonoids and Proteins: Effect on the Total Antioxidant Capacity, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1184-1187.
- [4]. Lorenz, M.; Jochmann, N.; von Krosigk, A.; Martus, P.; Baumann, G.; Stangl, K.; Stangl, V., 2007, Addition of milk prevents vascular protective effects of tea, *European Heart Journal*, 28, 219-23.
- [5]. Arts, M.J.T.J.; Haenen, G.R.M.M.; Voss, H.-P.; Bast, A., 2001, Masking of antioxidant capacity by the interaction of flavonoids with protein, *Food and Chemical Toxicology*, 39, 787–791.
- [6]. Gallo, M.; Vinci, G.; Graziani, G., 2013, The interaction of cocoa polyphenols with milk proteins studied by proteomic technique, *Food Research International*, 54, 406–415.
- [7]. Bravo, L., 1998, *Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance*, *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- [8]. Pandey, K.B.; Rizvi, S.I., 2009, Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2, 270-278.
- [9]. Manach, C.; Scalbert, A.; Morand, C.; Rémésy, C.; Jiménez, L., 2004, Polyphenols: food sources and bioavailability, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- [10]. Çapanoğlu Güven, E.; Toydemir Otkun, G.; Boyacıoğlu, D., 2010, Flavonoidlerin Biyoyararlılığını Etkileyen Faktörler, *Gıda Dergisi*, 35, 387-394.
- [11]. Bingöl, G., 1974, *Proteinler*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara.
- [12]. Papadopoulou, A.; Frazier, R. A. , 2004, Characterization of protein–polyphenol interactions, *Trends in Food Science and Technology*, 15, 186–190.

- [13]. Haslam, E.; Williamson, M.P.; Baxter, N.J.; Charlton, A.J., 1999, Astringency and Polyphenol Protein Interactions, *Recent Advances in Phytochemistry*, 33, 289-318.
- [14]. Xiao, J.; Kai, G., 2012, A Review of Dietary Polyphenol-Plasma Protein Interactions: Characterization, Influence on the Bioactivity, and Structure-Affinity Relationship, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 52, 85-101.
- [15]. Kroll, J.; Rawel, H.M., 2001, Reactions of Plant Phenols with Myoglobin: Influence of Chemical Structure of the Phenolic Compounds, *Food Chemistry and Toxicology*, 66, 48-58.
- [16]. Albayrak, S.; Sağdıç, O.; Aksoy, A., 2010, Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 26(4), 401-409.
- [17]. Bentayeb, K.; Vera, P.; Rubio, C.; Nerin, C. , 2014, The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils, *Food Chemistry*, 148, 204-208.
- [18]. Ou, B.; Hampsch-Woodill, M.; Prior, R.L., 2001, Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- [19]. Frankel, E. N.; Meyer, A. S., 2000, The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941.
- [20]. Çetinkaya, A., 2013, *Antioksidan kapasite ile reaktif oksijen türleri tüketimi arasındaki ilişki*, Yüksek lisans tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [21]. Huang, D.; Ou, B.; Prior, R.L., 2005, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- [22]. Özyürek, M.; Güçlü, K.; Apak, R., 2011, The main and modified CUPRAC methods of antioxidant measurement, *Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), 652-664.
- [23]. Apak, R.; Güçlü, K.; Özyürek, M.; Karademir, S. E., 2004, Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols and Vitamins C and E, Using Their Cupric Ion Reducing Capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.
- [24]. Apak, R.; Gorinstein, S.; Böhm, V.; Schaich, K.M.; Özyürek, M.; Güçlü, K. , 2013, Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity, *Pure and Applied Chemistry*, 85(5), 957-998.

- [25]. Bektaşoğlu, B.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Apak, R., 2008, Hydroxyl radical detection with a salicylate probe using modified CUPRAC spectrophotometry and HPLC, *Talanta*, 77, 90-97.
- [26]. Demirci Çekiç, S.; Sözgen Başkan, K.; Tütem, E.; Apak, R., 2009, Modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay for measuring the antioxidant capacities of thiol-containing proteins in admixture with polyphenols, *Talanta*, 79, 344-351.
- [27]. Cano, A.; Hernandez-Ruiz, J.; Garcia-Canovas, F.; Acosta, M.; Arnao, M.B. , 1998, An End-point Method for Estimation of the Total Antioxidant Activity in Plant Material, *Phytochemical Analysis*, 9, 196–202.
- [28]. Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231-1237.
- [29]. Benzie, I.F.F.; Strain, J.J., 1996, The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70–76.
- [30]. Cao, G; Prior, R.L., 1998, Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, *Clinical Chemistry*, 44(6),1309-1315.
- [31]. Kedare, S. B.; Singh, R. P. , 2011, Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay, *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412–422.
- [32]. Pariello, G. J.; Janish, M. A. M., 1966, Diphenylpicrylhydrazyl as an Organic Analytical Reagent in the Spectrophotometric Analysis of Phenols, *Analytical Chemistry*, 38, 211-214.
- [33]. Rakita, S.; Pojic, M.; Tomic, J.; Torbica, A. , 2014, Determination of free sulphhydryl groups in wheat gluten under the influence of different time and temperature of incubation: Method validation, *Food Chemistry*, 150, 166-173.
- [34]. Peng, H.; Chen, W.; Cheng, Y.; Hakuna, L.; Strongin, R.; Wang, B. , 2012, Thiol Reactive Probes and Chemosensors, *Sensors*, 12, 15907-15946.
- [35]. Kara, N., 2011, *Serumda toplam antioksidan kapasitenin modifiye CUPRAC (bakır(II) indirgeme esaslı antioksidan kapasite) metoduyla belirlenmesi*, Yüksek lisans tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [36]. Apak, R.; Demirci Çekiç, S.; Çetinkaya, A.; Filik, H.; Hayvalı, M.; Kılıç, E. , 2012, Selective Determination of Catechin among Phenolic Antioxidants with the Use of a Novel Optical Fiber Reflectance Sensor Based on Indophenol Dye Formation on Nano-sized TiO₂, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 2769–2777.

- [37]. Sözgen, K.; Demirci Çekiç, S.; Tütem, E.; Apak, R., 2006, Spectrophotometric total protein assay with copper(II)–neocuproine reagent in alkaline medium, *Talanta*, 68, 1601–1609.
- [38]. Yıldız, L., 2007, *Bazı Bitki Örneklerinde Antioksidan Kapasitesinin Spektrofotometrik ve Kromatografik Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
- [39]. Sanchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A.; Saura-Calixto, F., 1998, A Procedure to Measure the Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76, 270-276.
- [40]. Güngör, N.; Özyürek, M.; Güçlü, K.; Demirci Çekiç, S.; Apak, R., 2011, Comparative evaluation of antioxidant capacities of thiol-based antioxidants measured by different in vitro methods, *Talanta*, 83, 1650–1658.

EKLER

EK-1 KALİBRASYON DENKLEMLERİ

Kullanılan polifenol ve tiyollerin, her yöntem için uygun konsantrasyonlar kullanılarak belirlenmiş yöntemlere ait kalibrasyon denklemleri

AOx	CUPRAC	ABTS	FRAP	DPPH	ELLMAN
TR	A= 1,59 x10 ⁴ C + 0,0146 R ² = 0,9930	$\Delta A = 2,94 \times 10^4 C + 0,023$ R ² = 0,9995	A = 4,32x10 ⁴ C - 0,0454 R ² = 0,9979	$\Delta A = 2,0 \times 10^4 C + 0,0276$ R ² = 0,9934	-
QR	A = 6,73x10 ⁴ C + 0,0278 R ² = 0,9973	$\Delta A = 2,47 \times 10^5 C - 0,0179$ R ² = 0,9956	A = 1,08 x 10 ⁵ C - 0,0515 R ² = 0,9972	$\Delta A = 5,1 \times 10^4 C + 0,0311$ R ² = 0,9972	-
RT	A = 5,40x10 ⁴ C + 0,0195 R ² = 0,9981	$\Delta A = 8,91 \times 10^5 C + 0,1748$ R ² = 0,9921	A = 5,73x10 ⁴ C - 0,0148 R ² = 0,9992	$\Delta A = 4,1 \times 10^4 C + 0,0228$ R ² = 0,9964	-
CAT	A = 4,40x10 ⁴ C + 0,0420 R ² = 0,9968	$\Delta A = 1,31 \times 10^5 C - 0,046$ R ² = 0,9954	A = 3,94 x10 ⁴ C + 0,0299 R ² = 0,9993	$\Delta A = 3,09 \times 10^4 C - 0,0032$ R ² = 0,9923	-
LUT	A = 4,66x10 ⁴ - 0,0011 R ² = 0,9971	$\Delta A = 8,28 \times 10^4 C + 0,1452$ R ² = 0,9918	A = 7,50x10 ⁴ C + 0,0156 R ² = 0,9922	$\Delta A = 5,46 \times 10^4 C - 0,0163$ R ² = 0,9981	-
CFA	A = 6,26x10 ⁴ C - 0,0474 R ² = 0,9967	$\Delta A = 3,14 \times 10^4 C + 0,0249$ R ² = 0,9983	A = 5,00 x10 ⁴ C - 0,0468 R ² = 0,9977	$\Delta A = 2,81 \times 10^4 C + 0,0091$ R ² = 0,9961	-
FA	A = 1,95x10 ⁴ C + 0,0983 R ² = 0,9969	$\Delta A = 5,73 \times 10^4 C + 0,0564$ R ² = 0,9978	A = 4,57x10 ⁴ C + 0,0535 R ² = 0,9961	$\Delta A = 1,13 \times 10^4 C + 0,0048$ R ² = 0,9968	-
GA	A = 4,73x10 ⁴ C + 0,0196 R ² = 0,999	$\Delta A = 1,09 \times 10^5 C + 0,0986$ R ² = 0,9941	A = 9,90x10 ⁴ C + 0,0547 R ² = 0,9955	$\Delta A = 4,88 \times 10^4 C + 0,0571$ R ² = 0,9929	-
p-CUM	A = 6,09x10 ³ C + 0,0971 R ² = 0,9956	$\Delta A = 4,07 \times 10^4 C + 0,2393$ R ² = 0,9949	A = 0,84x10 ³ C + 0,329 R ² = 0,9940	-	-
NGN	-	$\Delta A = 9,90 \times 10^4 C + 0,0846$ R ² = 0,9925	A = 0,15x10 ³ C + 0,0069 R ² = 0,9956	-	-
GSH	A = 0,76x10 ⁴ C + 0,0720 R ² = 0,998	$\Delta A = 3,64 \times 10^4 C + 0,0422$ R ² = 0,9975	A = 2,13 x 10 ³ C - 0,0586 R ² = 0,9945	-	A = 1,40x10 ⁴ C + 0,0619 R ² = 0,9998
CYS	A = 0,73x10 ⁴ C + 0,0129 R ² = 0,9994	$\Delta A = 2,06 \times 10^4 C - 0,045$ R ² = 0,9990	A = 3,6x10 ³ C + 0,0044 R ² = 0,9991	$\Delta A = 8,9 \times 10^3 C + 0,0727$ R ² = 0,9923	A = 1,4x10 ⁴ C - 0,0023 R ² = 0,9995

ÖZGEÇMİŞ



Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	Aslı Neslihan AVAN
Uyruğu	T.C.
Doğum tarihi, Yeri	27/05/1985, Fatih
Telefon	0537 821 4852
E-mail	neslihanavan@hotmail.com

Eğitim

Derece	Kurum/Anabilim Dalı/Programı	Yılı
Yüksek Lisans	İ.Ü. İşletme İktisadi Enstitüsü/ İşletme Yöneticiliği /	2009
Lisans	İstanbul Üniversitesi/Kimya	2007
Lise	Büyükçekmece Y.D.A. Lisesi	2002