

**BAZI ODUNSU BİTKİLERİN YEŞİL YAPRAKLARINDA
ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ, TAYİN
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE YENİ
YÖNTEM ÖNERİLMESİ**

Azat AKBAL



T.C

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ODUNSU BİTKİLERİN YEŞİL YAPRAKLARINDA ANTIOKSİDAN
KAPASİTE TAYİNİ, TAYİN YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE
YENİ YÖNTEM ÖNERİLMESİ**

Azat AKBAL

Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

BURSA – 2014

Azat AKBAL tarafından hazırlanan “BAZI ODUNSU BİTKİLERİN YEŞİL YAPRAKLARINDA ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ, TAYİN YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE YENİ YÖNTEM ÖNERİLMESİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR

Başkan: Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR
U.Ü. Fen – Edebiyat Fakültesi
Kimya Anabilim Dalı

İmza

Üye: Prof. Dr. Cevdet DEMİR
U.Ü. Fen – Edebiyat Fakültesi
Kimya Anabilim Dalı

İmza

Üye: Yrd. Doç. Dr. Egemen DERE
U.Ü. Fen - Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Anabilim Dalı

İmza

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ali Osman DEMİR
Enstitü Müdürü
26/09/2014

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,

beyan ederim.

26/09/2014
İmza

Azat AKBAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI ODUNSU BİTKİLERİN YEŞİL YAPRAKLARINDA ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİNİ, TAYİN YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI VE YENİ YÖNTEM ÖNERİLMESİ

Azat AKBAL

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Ana Bilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR

Yeşil teknolojiler içerisinde bitkisel reaktiflerin kullanım alanlarının araştırılması ve bu amaçla karakterizasyonu özel bir öneme sahiptir. Bu çalışmada odunsu gövdeye sahip yedi farklı meyve ağacının ekonomik değeri olmayan yeşil yapraklarının sulu özütlerinin antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. Ceviz, Ayva, kestane, incir, nar ile beyaz ve karadut yapraklarının özütlerinin CUPRAC yöntemi ile antioksidan kapasiteleri belirlenirken, bu özütlerin indirgeme güçleri için gümüş nanopartikül oluşum hızı, ORP ölçümleri ve özütlerin voltametrik davranışları arasında paralellikler gösterilmeye çalışılmıştır.

CUPRAC yöntemine göre en yüksek antioksidan kapasite 753,1 mg TE/ kuru bitki ortalama değeri ile nar yaprağı özütünde elde edilmiş, en düşük değer ise 35,8 mg TE/ kuru bitki ile beyaz dut yaprağı özütünde ortaya çıkmıştır. Çalışılan bitkilerin sıralaması nar, ayva, kestane, incir, ceviz, karadut ve beyaz dut şeklinde gerçekleşmiştir.

Bitki özütlerinin AgNP oluşturma hızları incelenirken, sürece ışığın etkisine karşı önlem alınmış, bilinen CUPRAC yöntemiyle oldukça paralel ve umut verici sonuçlar elde edildiği gösterilmiştir. 120 dakikalık AgNP oluşum sürecinde oluşan yüzey plazmon piki yerine, belli dalga boyları arasında spektrum eğrilerinin altında kalan alanların değerlendirilmesinin daha anlamlı olabileceği, antioksidan kapasite parametresinin belirlenmesinde kullanılabileceği önerilmiştir.

Bitki özütlerinin voltametrik davranışı, özellikle anodik potansiyellerdeki yükseltgenme bölgeleri farklı voltametrik tekniklerle karakterize edilmeye çalışılmıştır. GCE üzerinde SWV ile yapılan çalışmalar nicel olarak değerlendirilmiştir. SWV eğrilerinde pik akımları yerine anodik bölgede geçen toplam yükün incelenmesine çalışılmıştır.

Kombine ORP elektrotu ile yaprak özütlerinin farklı pH'larda ölçülen redoks potansiyelleri ile antioksidan davranışlar arasındaki ilişki incelenmiştir. İncelenen tüm yaklaşımların karşılaştırmalı değerlendirilmesi üzerinde durulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Yeşil yaprak özütlerinin karakterizasyonu, antioksidan kapasite belirleme yöntemleri, AgNP oluşum hızı, Kare Dalga Voltametrisi, ORP ölçümü
2014, ix + 86 sayfa

ABSTRACT

Msc Thesis

DETERMINING OF ANTIOXIDANT CAPACITY IN GREEN LEAVES OF SOME WOODY PLANTS, COMPARASION OF DETERMINING METHODS AND PROPOSE NEW METHODS

Azat AKBAL

Uludag University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. M. Haluk TURKDEMIR

Investigation of applications of plant materials and their characterization has a great value in green technology. In this study, aqueous extracts obtain from green leaves of seven fruit trees with woody stems, which has non-economic value, were investigated in terms of antioxidant capacity. Antioxidant capacity of walnut, quince, chestnut, figs and pomegranate leaves extracts determined by CUPRAC have linear correlation with formation rate of silver nanoparticles for reducing power, ORP values and voltammetric behaviors of the extracts.

The highest antioxidant capacity with 753.1 mg TE/ dry plant was obtained by CUPRAC method in pomegranate leaf extract and the lowest value with 35.8 mg TE/ dry plant was measured in white mulberry leaf extract. The antioxidant capacity value order of the studied plants was pomegranates, quince, chestnuts, figs, walnut, black mulberry and white mulberry.

The effect of light was controlled during the investigation of formation rate of AgNP and correlated results were obtained with CUPRAC method. It is proposed that the peak area between specific wavelengths can be more meaningful instead of surface Plasmon peak of AgNP during 120 min period for the evaluation of antioxidant capacity.

Voltammetric behavior of plant extracts, especially in the regions of anodic oxidation potential, was characterized by different voltammetric techniques. Quantitative results were evaluated with the studies on GCE. The total anodic charge of the voltammograms were evaluated instead of peak currents on studied SWV curves.

The relationship between the antioxidant behavior and redox potential measured with combined ORP electrode at different pH values were investigated. Comparative results were obtained for all methods studied in this research.

Key Words: Characterization of green leaf extracts, antioxidant capacity determination methods, the rate of AgNP formation, square wave voltammetry, ORP measurements.
2014, ix + 86 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren, desteğini ve ilgisini her zaman yanımda hissettiğim tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. M. Haluk TÜRKDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaprak örneklerinin temin edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Öğretim Üyelerinden sayın Prof. Dr. Ümran ERTÜRK'e teşekkür ederim.

Tez çalışmasında referans yöntem olarak seçtiğimiz CUPRAC yönteminin standardizasyonu için gerekli olan kimyasalların temin edilmesinde yardımcı olan Uludağ Üniversitesi Fen – Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyelerinden sayın Doç. Dr. Saliha ŞAHİN'e teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince her türlü konuda destek ve yardımcı olan, yaptıklarımın arkasında duran sevgili aileme anlayış ve hoşgörülerinden dolayı sonsuz teşekkür ederim.

Azat AKBAL

26/09/2014

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Bitki Yapraklarının Yapısı ve İşlevi	4
2.2. Bitki Yapraklarının Kimyasal Bileşimi ve Mevsimsel Olarak Değişimi	5
2.3. Antioksidan Maddeler	7
2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması	7
2.3.2. Bitkilerde bulunan antioksidan maddeler	8
2.3.2.1. C vitamini (askorbik asit) ve türevleri	8
2.3.2.2. Tokoferoller	9
2.3.2.3. Karotenoidler	10
2.3.2.4. Fenolik asitler	11
2.3.2.5. Flavonoidler	12
2.3.3. Antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri	15
2.3.3.1. Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi(ORAC)	16
2.3.3.2. Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi(TRAP)	17
2.3.3.3. Karotenoid(Krosin) ağartma yöntemi	17
2.3.3.4. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi(TEAC)	18
2.3.3.5. Fe(III) iyonu indirgeme gücü(FRAP)	19
2.3.3.6. DPPH radikal giderme aktivitesi	20
2.3.3.7. Folin – Ciocalteu yöntemi(FCR)	21
2.3.3.8. Cu(II) iyonu indirgeme gücü(CUPRAC)	22
2.3.4. Antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerinin zorlukları ve çelişkileri	23
2.4. Yeşil Kimya	23
2.5. Metalik Nanopartiküller	24
2.5.1. Yüzey plazmon özellikleri	27
2.5.2. Yüzey plazmon rezonansını etkileyen faktörler	28
2.6. İndirgen Karakterdeki Bileşenlerin Elektrokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi	29
2.7. ORP Ölçüm İlkesi ve Yöntemi	31
2.7.1. ORP tanımı ve kullanım alanı	31
2.7.2. ORP elektrotunun yapısı ve özellikleri	32
2.7.3. ORP elektrotunun kalibrasyonu	33
2.8. Voltametrik Yöntemler	34
2.8.1. Voltametrizde gerekli elektrotlar	35
2.8.1.1. Çalışma elektrotu	35
2.8.1.2. Yardımcı elektrot	35
2.8.1.3. Referans elektrot	36
2.8.2. Potansiyostat çalışma ilkesi	36
2.8.3. Destek elektroliti	37
2.8.4. Voltametrizde akım ölçümü	37

2.8.5. Çevrimsel voltametri(CV)	38
2.8.6. Puls voltametrisi	40
2.8.6.1. Normal puls voltametri(NPV)	40
2.8.6.2. Diferansiyel puls voltametri	41
2.8.6.3. Kare dalga voltametri	42
2.8.7. Sıyırma voltametrisi	43
3. MATERYAL ve YÖNTEM	44
3.1. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar	44
3.2. Örnek Temini	44
3.3. Örneklerin Analize Hazırlanması	44
3.4. Özütleme	45
3.5. Spektroskopik İncelemeler	45
3.5.1. CUPRAC yöntemi	45
3.5.1.1. CUPRAC yönteminin standardizasyonu ve kalibrasyonu	46
3.5.1.2. Örneklerin CUPRAC yöntemiyle antioksidan kapasitelerinin ölçülmesi	47
3.5.2. Nanopartiküllerin spektroskopik incelenmesi ve karakterizasyonu	48
3.5.2.1. Ag – nanopartiküllerin oluşturulması	48
3.5.2.2. AgNP oluşumunun spektroskopik olarak incelenmesi	49
3.5.2.3. Farklı özüt örnekleriyle yapılan çalışmalar ve spektrumların alan hesaplaması	51
3.6. ORP Ölçümleri	53
3.6.1. ORP ölçüm sisteminin kurulması ve kalibrasyonu	53
3.6.2. Örneklerin asidik nötral ve bazik pH koşullarında ORP Ölçümü	54
3.7. Voltametrik Çalışmalar	55
3.7.1. Çevrimsel voltametri çalışmaları	55
3.7.1.1. Platin elektrot ile yapılan CV çalışmaları	56
3.7.1.2. GCE ile yapılan CV çalışmaları	57
3.7.2. Kare dalga voltametri çalışmaları	58
3.7.2.1. Platin elektrot ile yapılan SWV çalışmaları	58
3.7.2.2. GCE ile yapılan SWV çalışmaları	60
3.7.3. Diferansiyel puls voltametri çalışmaları	61
3.7.3.1. Platin elektrot ile yapılan DPV çalışmaları	61
3.7.3.2. GCE ile yapılan DPV çalışmaları	62
3.7.4. Kare dalga sıyırma voltametri çalışmaları	63
3.7.4.1. GCE ile yapılan SWSV çalışmaları	63
3.7.5. Voltamogramların alan hesaplaması	65
4. BULGULAR	70
4.1. Spektroskopi Çalışmaları	70
4.2. Voltametrik Çalışmalar	73
4.3. ORP Ölçümleri	74
4.4. Antioksidan Kapasite Ölçümlerinde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması	75
5. SONUÇ	78
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	86

KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar	Açıklama
AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorit
ABTS	2,2'azinobis(3etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
AgNP	Ag nanopartikül
BHA	Butillendirilmiş hidroksi anisol
BHT	Butillendirilmiş hidroksi toluen
CV	Çevrimsel voltametri
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DPV	Diferansiyel puls voltametri
EC ₅₀	Başlangıç DPPH• derişiminde %50 azalmaya neden olan derişim
GCE	Camsı karbon elektrot
NPV	Normal puls voltametri
ORP	Yükseltgenme indirgenme potansiyeli
SWV	Kare dalga voltametrisi
SWSV	Kare dalga sıyırma voltametrisi
TEAC	Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
TPTZ	2,4,6-tripiridil s-triazin
UV	Ultraviyole
β – PE	β-fikoeritrin

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Yaprağın enine kesiti	5
Şekil 2.2.	Askorbik asitin dehidro askorbik asite yükseltgenmesi	9
Şekil 2.3.	α – tokoferol	9
Şekil 2.4.	β – karoten	10
Şekil 2.5.	Likopen	10
Şekil 2.6.	Benzoik asit ve türevleri	11
Şekil 2.7.	Sinamik asit ve türevleri	12
Şekil 2.8.	Temel flavonoid yapısı	12
Şekil 2.9.	Flavon ve flavonol türevleri	13
Şekil 2.10.	Antosiyanidin türevleri	14
Şekil 2.11.	Flavan 3 – ol türevleri	14
Şekil 2.12.	Flavonon türevleri	15
Şekil 2.13.	Metalik bir nanopartikül ile ışığın etkileşimi sonucu iletim elektronlarının nanopartikülün yüzeyine doğru hareket etmesi	27
Şekil 2.14.	Redoks potansiyelinin ölçüldüğü elektrokimyasal hücre(a) Kombine ORP elektrotu(b)	32
Şekil 2.15.	Voltametri çalışması elektrotu	35
Şekil 2.16.	Bir potansiyostatın şematik gösterimi	37
Şekil 2.17.	Çevrimsel voltametri uygulanan potansiyel programı	38
Şekil 2.18.	Tersinir(a) Tersinmez(b) bir sistemin CV voltamogramı	39
Şekil 2.19.	NPV’de uygulanan potansiyel programı	41
Şekil 2.20.	DPV’de uygulanan potansiyel programı(a) Pulsun yükleme anında meydana gelen akımların zamana bağlı olarak değişimi(b)	42
Şekil 2.21.	SWV’de uygulanan potansiyel programı	43
Şekil 3.1.	Troloks	46
Şekil 3.2.	CUPRAC Yöntemiyle elde edilen kalibrasyon grafiği	47
Şekil 3.3.	AgNP oluşumu üzerine tasarlanan ışık odacığı	49
Şekil 3.4.	Ceviz (a) ve İncir (b) yaprağı özütlerinden AgNP eldesine ilişkin spektrumlar	49
Şekil 3.5.	Ayva (a) Kestane (b) yaprağı özütlerinden AgNP eldesine ilişkin spektrumlar	50
Şekil 3.6.	Kara dut (a) Beyaz dut (b) yaprağı özütlerinden AgNP eldesine ilişkin spektrumlar	50
Şekil 3.7.	Nar yaprağı özütünün(1/10 oranına seyreltilmiş) AgNP eldesine ilişkin spektrumu	51
Şekil 3.8.	a) Kara dut ve Beyaz dut b) Ayva ve İncir yaprağı özütlerinin 15 dakika aralıklarla ölçülmüş maksimum absorbands değerlerinin 120. dakika sonundaki değişimi	51
Şekil 3.9.	a) Ceviz ve İncir b) Ceviz ve Ayva yaprağı özütlerinin 15 dakika aralıklarla ölçülmüş maksimum absorbands değerlerinin 120. dakika sonundaki değişimi	52
Şekil 3.10.	Kestane yaprağı özütü için 120. dakika sonunda elde edilen alan hesaplamasının gösterimi ve diğer yaprak özütleri için elde edilen sonuçlar	53

Şekil 3.11.	Her bir yaprak özütünün pH ~4, pH ~7 ve pH ~ 9 olduğu durumdaki ölçülen ORP değerlerinin değişimi	54
Şekil 3.12.	pH 7 fosfat tamponunda nar, ayva ve ceviz yaprağı özütlerinin platin elektrotla anodik yöndeki CV eğrileri	56
Şekil 3.13.	pH 7 fosfat tamponunda kestane ve incir yaprağı özütlerinin platin elektrotla anodik yöndeki CV eğrileri	57
Şekil 3.14.	pH 7 fosfat tamponunda nar, ceviz ve incir yaprağı özütlerinin GCE’de anodik yöndeki CV eğrileri	57
Şekil 3.15.	pH 7 fosfat tamponunda ceviz, kestane ve ayva yaprağı özütlerinin GCE’de anodik yöndeki CV eğrileri	58
Şekil 3.16.	pH 7 fosfat tamponunda nar, ayva ve ceviz yaprağı özütlerinin platin elektrotla anodik yöndeki SWV eğrileri	59
Şekil 3.17.	pH 7 fosfat tamponunda kestane ve incir yaprağı özütlerinin platin elektrotla anodik yöndeki SWV eğrileri	59
Şekil 3.18.	pH 7 fosfat tamponunda karadut ve beyaz dut yaprağı özütlerinin platin elektrotla anodik yöndeki SWV eğrileri	60
Şekil 3.19.	pH 7 fosfat tamponunda nar ceviz, kestane ve incir yaprağı özütlerinin GCE’de anodik yöndeki SWV eğrileri	60
Şekil 3.20.	pH 7 fosfat tamponunda ayva, karadut ve beyaz dut yaprağı özütlerinin GCE’de anodik yöndeki SWV eğrileri	61
Şekil 3.21.	pH 7 fosfat tamponunda karadut, beyaz dut, incir ve kestane yaprağı özütlerinin platin elektrotla anodik yöndeki DPV eğrileri	62
Şekil 3.22.	pH 7 fosfat tamponunda nar, ceviz ve ayva yaprağı özütlerinin platin elektrotla anodik yöndeki DPV eğrileri	62
Şekil 3.23.	pH 7 fosfat tamponunda nar, ceviz, kestane ve incir yaprağı özütlerinin GCE’ de anodik yöndeki DPV eğrileri	63
Şekil 3.24.	pH 7 fosfat tamponunda ayva, karadut ve beyaz dut yaprağı özütlerinin GCE’de anodik yöndeki DPV eğrileri	63
Şekil 3.25.	Ceviz yaprağı özütü ile farklı biriktirme süresi ile anodik yönde alınan kare dalga sıyırma voltamogramları	64
Şekil 3.26.	Ceviz yaprağı özütünde farklı potansiyel aralıklarında anodik yönde uygulanarak alınan kare dalga sıyırma voltamogramları	65
Şekil 3.27.	Ceviz yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi	66
Şekil 3.28.	Kara dut yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi	67
Şekil 3.29.	Beyaz dut yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi	67
Şekil 3.30.	İncir yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi	68
Şekil 3.31.	Ayva yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi	68
Şekil 3.32.	Kestane yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi	69
Şekil 3.33.	Nar yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi	69
Şekil 4.1.	Her bir yaprak özütünün 15 dakika aralıklarla ölçülen maksimum absorban değerlerinin 120. dakika sonundaki değişimleri	71
Şekil 4.2.	CUPRAC yöntemi ile AgNP oluşum hızının incelendiği yöntemin karşılaştırılması	72
Şekil 4.3.	CUPRAC yöntemi ve SWV tekniği kullanılarak elde edilen antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması	76
Şekil 4.4.	SWV ve AgNP oluşum hızının incelendiği teknikler sonucu elde edilen antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması	77
Şekil 4.5.	Yaralanılan teknikler sonucu elde edilen değerlerin toplu halde karşılaştırılması	77

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Gıdalarda bulunan doğal ve sentetik bazı primer antioksidanlar	7
Çizelge 2.2.	Vücudumuzda antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca bileşikler	8
Çizelge 2.3.	İn vitro koşullarda uygulanan bazı antioksidan aktivite tayin yöntemleri	16
Çizelge 2.4.	Farklı sıcaklıklardaki standart ORP değeri	33
Çizelge 3.1.	CUPRAC yöntemiyle troloks eşdeğeri olarak 0,2 ve 0,3 mL yaprak özütleri için elde edilen sonuçlar ve ortalama CUPRAC _{TEAC} değerleri	48
Çizelge 3.2.	Her bir yaprak özütünün pH~4, pH ~7 ve pH ~9 olduğu durumdaki ORP değerleri	54
Çizelge 3.3.	Yaprak özütlerinin yükseltgenme piklerine karşılık gelen anodik akım yük değerleri ile birlikte toplam yük miktarı	70

1.GİRİŞ

Yeşil yaprakların antioksidan kapasite tayinleri, yaprak özütlerinin indirgen özelliklerinin incelenmesi alanında konuyla ilgili çok sayıda literatür özeti bulunmaktadır. Farklı bitkilerin yeşil yapraklarıyla hazırlanan özütlerde antioksidan kapasite ölçümü için TEAC, FRAP, CUPRAC yöntemleri, antioksidan radikal tarama aktivitesi ölçümleri için ORAC, DPPH, süperoksit radikalini süpürme, peroksi radikalini tarama yöntemleri, toplam fenol içeriğinin belirlenmesi için Folin – Ciocalteu yöntemi (FCR) gibi spektroskopik yöntemler, voltametrik ve potansiyometrik gibi elektrokimyasal yöntemlerin yanı sıra HPLC gibi ayırma yöntemleri de kullanılmıştır. Genel olarak özütlerin ölçülen antioksidan kapasitelerinin, özüt faza geçen fenolik bileşikler, polifenoller, flavonoidler ile ilgili olduğu, bu tür bileşiklerin özüt faza geçen miktarları ve bu fazda kararlılıkları ile ilgili olduğu gösterilmiştir.

Örneklerin hazırlanması, kurutma ve blenderdan geçirerek öğütme, kullanım anına kadar soğukta bekletme şeklindedir. Yapılan çalışmalarda antioksidan kapasitelerinin belirlendiği yeşil yaprakların ve bitkisel kökenli materyallerin bekletilme ve kurutulma şartlarının etkisi de incelenmiştir. *Morus alba L* türü dut ağacının yapraklarının kurutulması için 40 – 110 °C'lar arasında ve farklı kurutma süreleri kullanılarak yapılan işlemlerin antioksidan kapasite üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada; 60 °C'a kadar kurutma sıcaklığının antioksidan kapasite açısından önemli olmadığı, ancak 70 °C'nin üzerindeki kurutma sıcaklıklarının antioksidan kapasite düzeyinde önemli azalmalara yol açabileceği gösterilmiştir. Bunun yanında -30°C'da bile, 3 aylık bekletme durumunda %25'e varan ölçülerde kayıplar olabildiği görülmüştür. Ancak kararlılık sağlayıcı önlemler alınarak, örnek bileşimlerinin ve özelliklerinin korunabildiği de ifade edilmiştir (Katsube ve ark.2009).

Toz edilmiş yaprakların özütlerinin hazırlanmasında tek basamaklı ve çok basamaklı ardarda özütlenme işlemleri denenmiştir. Kullanılan çözücüler su, etanol-su, etanol, metanol, dietil eter veya karışımları şeklindedir. Antioksidan özellik kazandıran bileşiklerin çözücü içine özütlenmelerinin çözücünün cinsine bağlılığı da incelenmiştir (Oliveira ve ark. 2009). Çoğunlukla su ve alkol özütlerinin diğer özütlenme işlemlerinden daha başarılı olduğu gösterilmiştir.

Fındığın çekirdek kısmı ile yeşil yapraklı dış kabuğunun, antioksidan özelliği ve antiradikal etkinliği açısından karşılaştırıldığı bir çalışmada, %80 alkol-su yerine %80 aseton-su çözücü sisteminin daha iyi özütlenme sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada elde edilen özütler; fenolik ve kondanse tannin içeriklerinin yanı sıra fenolik asit dağılımı açısından (serbest ve esterleşmiş türler) karşılaştırılmıştır. Fındığın yeşil yapraklı dış kabuğunun asetonlu ortama özütlenmesiyle elde edilen çözeltinin toplam fenol içeriği ve kondense tannin içeriği (kateşin eşdeğerler), toplam antioksidan kapasitesi (troloks eşdeğeri) açısından daha etkili olduğu gösterilmiştir (Alasalvar ve ark. 2006).

Farklı özütlenme işlemlerinin denendiği diğer bir çalışmada; Hindistan, Nikeragua ve Nijer ülkelerinin farklı tarımsal iklim bölgelerinden elde edilen *Moringa oleifera* türü yaprak örnekleri dondurularak kurutulmuş ve su, metanol ve etanol özütlerinin antioksidan kapasiteleri ve radikal tarama aktiviteleri incelenmiştir. Bütün yaprak özütleri peroksil ve süperoksit radikal tarama aktivitesi göstermiş ve farklı *Moringa oleifera* türü yaprak örneklerinin arasından metanol ve etanol özütlerinin en yüksek antioksidan aktivite sergiledikleri görülmüştür (Siddhuruju ve Becker 2003).

Özütlenme işlemi genellikle oda sıcaklığında denenmiş olsa da, farklı sıcaklıklarda ve pH'de yapılan denemeler de vardır. Dut yaprağı ile yapılan başka bir çalışmada yaprağın metanol, aseton ve su ile yapılan özütlerinin toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivitesi incelenmiştir. Metanol özütünde toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivitesinin en yüksek düzeyde olduğu ifade edilmiştir. Bunun yanında metanol özütüyle yapılan işlemlerde 50 °C ve 100 °C'de sıcaklığın etkisi, pH'nin 3, 5, 7, 9 ve 11 olduğu ve metanol özütünün 5 °C'de muhafaza edilmesi durumlarında antioksidan aktivite üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bir saatlik sürede 50 °C'deki metanol özütünün antioksidan aktivitesinin aynı kaldığı 100 °C'de ise azaldığı, nötral pH'de antioksidan aktivitenin en yüksek olduğu ve 5 °C'de karanlıkta muhafaza edilen metanol özütünün 30 gün içinde antioksidan aktivitesinin stabil olduğu 30 günden sonra yavaş yavaş azalmaya başladığı gözlemlenmiştir (Delouee ve Urooj 2007).

Özütlenme işleminin antioksidan aktivite üzerinde etkili olduğu diğer bir çalışmada; Türkiye'de Karadeniz Bölgesinde yaygın bir şekilde kullanılan *Smilax excelsa L.* türü

yaprak örneklerinin etil asetat, etanol ve sulu özütlerinin antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bütün özütlerin iyi derecede fenol ve flavanoid içeriğine sahip olduğu, lipit peroksidasyonunu inhibe ettikleri, radikal tarama ve demir şelatlama aktivitesi gösterdikleri görülmüştür. Etil asetatla yapılan özütleme verimliliğinin en düşük olduğu ve toplam fenol bileşenlerinin en yüksek değeri, DPPH, süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerine karşı en yüksek tarama aktivitesinin yaprakların sulu özütleriyle elde edildiği ifade edilmiştir (Özsoy ve ark. 2008).

Farklı koşullara maruz bırakılan yaprak türlerinin antioksidan kapasitelerindeki değişimlerin incelendiği denemeler de vardır. Soğuk stres şartlarına ve kuraklığa maruz bırakılan alıç türü yaprakların flavonoid içeriğinin ve antioksidan kapasitenin arttığı görülmüştür. Alıç ağacı yapraklarından elde edilen özütler, stressiz şartlardaki kontrol grubuyla kıyaslanarak, kuraklık ve soğuk kaynaklı stresin polifenolik madde verimine ve antioksidan kapasite yükselmesine neden olduğu gösterilmiştir (Kırakosyan ve ark. 2003).

Farklı koşullar altında yapılan diğer bir çalışmada iki ıspanak türü yaprağının çiğ ve pişirilme sonrası ORAC yöntemiyle antioksidan kapasite ve HPLC ile fenolik içerikleri incelenmiş, birbiri ile orantılı bulunan bu değerlerin kaempferol glikozit ve kuersetin glikozit bileşikleriyle ilişkili olduğu, pişirme işlemiyle bu değerlerin azaldığı gösterilmiştir (Kuti ve Konuru 2004).

Farklı çeşitlerde böğürtlen, çilek, kırmızı ve siyah ahududu meyveleri ve yaprakları ile yapılan bir çalışmada toplam fenol içeriği ve toplam antioksidan kapasiteleri incelenmiştir. ORAC yöntemiyle yapılan çalışmada en yüksek değer büyüme esnasında çilek ve böğürtlen meyvelerinde elde edilmiştir. Oysa olgunlaşmış kırmızı ahududu meyvesinin en yüksek ORAC aktivitesine sahip olduğu görülmüştür. Meyvelerle karşılaştırıldığında yapraklarla yapılan çalışmalarda daha yüksek ORAC değerleri elde edilmiştir. Kuru ağırlıklarla yapılan çalışmalarda daha yüksek ORAC değerleri ve toplam fenol içeriği elde edilmiştir. Yapraklar büyüdükçe ORAC ve toplam fenol içeriği değerleri azaldığı görülmüştür (Wang ve Lin 2000).

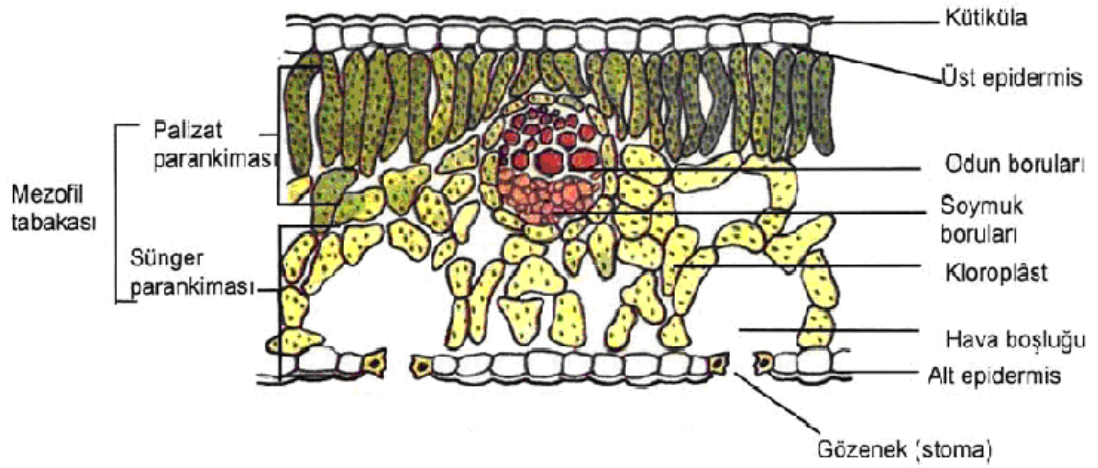
Nara benzeyen meyveleri olan ve Latin Amerika ağacı olan Guava yapraklarından ve kurutulmuş meyvelerinden elde edilen özütlerin serbest radikal tarama etkinliğinin ve antioksidan kapasitesinin incelendiği diğer bir çalışmada; kurutulmuş meyve özütlerinin, yaprak özütlerinden daha zayıf antioksidan etkinlik sergilediği görülmüştür (Chen ve Yen 2007).

Bu çalışmada yaprakları ticari değer taşımayan odunsu gövdeye sahip yedi meyve ağacı yapraklarının sulu özütleri hazırlanarak, bu özütlerin antioksidan kapasiteleri, AgNP oluşturma hızları, ORP değerleri ve voltametrik davranışları arasında paralellikler araştırılmaya çalışılmış, yapılan inceleme ve değerlendirmelerle antioksidan kapasite ölçümü için alternatif yaklaşımların ortaya konması hedeflenmiştir.

2.KURAMSAL TEMELLER

2.1. Bitki Yapraklarının Yapısı ve İşlevi

Gövde ve yan dal üzerinde bulunan, büyüme noktalarının yan tarafındaki çıkıntıların gelişmesiyle meydana gelen, geniş ve yassı şekilde farklılaşan, klorofilce zengin organa yaprak denir. Yaprak gövdenin yanal organlarından biri olup geniş bir dış yüzeye sahiptir. Havalandırma sistemi iyi gelişmiş ve kloroplastça zengin ve gözenekli yapıda olduğundan temel işlevleri; fotosentez, terleme ve gaz alışverişidir. Bu fonksiyonları yerine getirebilmek için yüzeyini genişletmiş, ışıktan yeterince yararlanabilmek için gövdeden dışarı doğru uzamış ve yassılaştırmıştır. Yaprak yapısı bitki türlerine göre farklılık gösterir. Yapraktan enine bir kesit alındığında alt ve üst yüzeylerinde kloroplast bulunmayan tek sıralı epidermis hücreleri bulunur. Epidermis yüzeyi kütikula tabakasıyla örtülüdür. Epidermis katmanları arasında yaprak damarları ve parankima dokusunun bulunduğu mezofil tabakası yer alır. Mezofil tabakasında fotosentezden sorumlu kloroplastlı palizat ve sünger parankimaları bulunur.



Şekil 2.1. Yaprığın Enine Kesiti

2.2. Bitki Yapraklarının Kimyasal Bileşimi ve Mevsimsel Olarak Değişimi

Yaprığın yapısında bulunan bileşikler; yaprağın yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmesi için gerekli olan karbonhidrat ve protein gibi birincil metabolitlerin yanında; fenilpropanoid, fenolik ve flavonoid bileşikler ve türevlerinden oluşan ikincil metabolitlerdir. Bu bileşenler, farklı çevresel uyarıların etkisi altında, büyüme esnasında farklı bitki dokularında ve hücrelerde birikirler. Fenilpropanoid ve flavanoid bileşikler genellikle yaprakların epidermal hücrelerinde ve vokullarda birikir. Bunun yanında bazı bileşikler hücre duvarlarına bağlı olarak bulunur. Bu bileşiklerin birikimi dokuya özgüdür ve yaprak organının gelişme aşamalarına bağlıdır (Hutzler ve ark. 1998). Flavonoidler UV bölgedeki ışığı güçlü bir şekilde soğurarak hücreleri aşırı UV radyasyonundan koruma işlevi görürler. Ayrıca daha fazla UV radyasyonuna maruz kalan bitkilerde flavon ve flavonol sentezlerinde artış görülür.

Yaprakların mevsimsel olarak değişimi ve toplanma zamanının bu bileşiklerin yoğunlaşması açısından büyük önemi bulunmaktadır. Bu konuda yapılan bir çalışmadanar yapraklarındaki toplam fenol, flavonoid, alkaloid ve antioksidan aktivitelerindeki değişimler Nisan - Eylül ayları arasında incelenmiş, toplam fenol ve flavonoid seviyesinin yaprak büyümesinin erken dönemlerinde azaldığı Eylül ayının sonlarına kadar artış gözlemlendiği belirtilmiştir, ancak toplam alkaloid derişiminin yaprağın büyümesi ve gelişmesi sırasında arttığı gözlemlenmiştir. Aynı çalışmada; nar yapraklarındaki antioksidan aktivitenin toplam fenol ve flavonoid miktarıyla uyumlu bir

değişim gösterdiği görülmüştür. Flavonoidlerin ve fenoliklerin ekstrakte edilmesi için ham materyaller olarak nar yapraklarının en uygun toplanma zamanı, nar ağaçlarının büyümesi üzerinde toplama zamanını etkisi, yapraklardaki aktif bileşenlerin birikimi/içeriği ve biyolojik verimlilik dikkate alındığında Ağustosun sonraki ay olduğu ifade edilmiştir. Bunun yanında iklim değişimi, coğrafik bölgelerdeki varyasyonlar, örnek boyutunun sınırları gibi faktörlerin nar yaprağındaki ikincil metabolitlerin oluşumunu etkileyebileceği ifade edilmiştir (Zhang ve ark. 2010).

Mayıs ayından Eylül ayına kadar aynı coğrafya ve iklim şartlarında altı çeşit farklı ceviz yaprağı üzerinde fenolik bileşenlerin nitel ve nicel incelemesinin gerçekleştirildiği çalışmada fenolik asitler, flavonoidler ve toplam fenol içeriğinin ortalama değerlerinin Mayıs ayından Haziran'a kadar azaldığı, Temmuz'da artış ve Eylül ayına kadar yeniden azalma şeklinde bir değişim profili gösterdiği belirtilmektedir. İlk azalma Haziran'da meyvelerin hızlı olgunlaşması sırasında nütrient ve fotosentez ürünlerinin büyük oranda bu sürece harcanması ile ilişkilendirilmiştir (Amaral ve ark. 2004).

Huş ağacı yapraklarının Haziran ayının başlarından Eylül'ün sonuna kadar bazı kimyasal ve fiziksel davranışları izlenerek yaprakların büyümesi ve savunma amaçlı olarak paylaşılan bileşiklerin mevsimsel değişimi üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Serbest aminoasit ve proteinlerin derişimi büyüme dönemi boyunca azalmış, aksine karbonhidrat miktarı dönem boyunca çeşitlilik göstermiştir. Fenolik bileşenlerin mevsimsel dağılımı farklılık göstermiştir. Çözülebilir proantosiyanidinlerin derişimi Ağustos'un erken dönemlerine kadar artmış, hücre duvarına bağlı proantosiyanidinlerin derişimi Temmuz'un ortalarında en yüksek seviyeye ulaştıktan sonra azalmaya başlamıştır. Gallotanninlerin derişimi başlangıçtaki artıştan sonra yazın erken dönemlerinde hızlı bir şekilde azalmış ve düşük seviyelerde kalmıştır. Kateşinlerin derişimi tüm mevsim boyunca düşük seviyede kalmıştır. Flavonoid glikozitlerin toplam derişimi Temmuz'da artmış sonra mevsimin büyük bir bölümünde azalmış ve yaprağın sararma döneminde tekrar artmıştır. Flavonoid glikozitlerin farklı grupları da benzer mevsimsel değişim göstermiştir (Riipi ve ark. 2002).

2.3. Antioksidan Maddeler

Antioksidanlar, okside olabilen karbohidrat, protein, DNA ve lipit gibi substratlarla karşılaştırıldığında düşük derişimlerde bulunan ve substratların yükseltgenmesini önleyen veya geciktiren maddelerdir. Biyolojik antioksidanlar, aşırı oksidasyona neden olan tepkime veya süreçlerin zararlı etkilerine karşı biyolojik sistemleri koruyan bileşikler olarak tanımlanır (Awaad ve Al-Jaber 2010). Antioksidanlar, reaktif oksijen ve azot türleri tarafından oluşan serbest radikalleri etkisizleştiren sistemlerdir. Bu süreçte karşılıklı etkileşim halinde olan endergonik ve egzergonik kaynaklı antioksidanlar çok çeşitli bileşiklerdir.

2.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar davranış mekanizmalarına göre primer veya zincir kırıcı antioksidanlar ve sekonder veya koruyucu antioksidanlar olarak sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırmaya göre bazı antioksidanlar birden fazla etki mekanizmasına sahip oldukları için çoklu fonksiyonel antioksidanlar olarak değerlendirilir. Primer antioksidanlar, otooksidasyonun başlangıç ve yayılma basamağını inhibe eden veya geciktiren serbest radikal tarayıcılarıdır. Sekonder antioksidanlar ise oksidasyon tepkimelerinin hızını yavaşlatan çeşitli mekanizmalar boyunca antioksidan aktiviteye katkı sağlayan, primer antioksidanlardan farklı olarak kararlı serbest radikallere dönüşmeyen enzimatik ve şelatlayıcı antioksidanlar sınıfını oluşturur (Wanasundaral ve Shahidi 2005). Gıdalarda bulunan doğal ve sentetik bazı primer antioksidanlar tabloda gösterildiği gibidir.

Çizelge 2.1. Gıdalarda bulunan doğal ve sentetik bazı primer antioksidanlar

Doğal	Sentetik
Karetenoidler	Bütillendirilmiş hidroksi toluen (BHT)
Flavanoidler	Bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA)
Fenolik asitler	Propil gallatlar (PG)
Tokoferoller	Tert-bütül hidroksikininon (TBHQ)

Sekonder antioksidanlar olarak sitrik, malik, suksinik ve tartarik asitler, etilendiamintetraasetikasit (EDTA) gibi metal şelatlayıcı antioksidanlar ve askorbik asit örnek verilebilir (Wanasundaral ve Shahidi 2005).

Antioksidanlar endojen ve ekzojen kaynaklı olarak sınıflandırılabilen gibi enzim ve enzim olmayan antioksidanlar şeklinde iki grupta da ele alınabilir. Vücudumuzdaki antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca bileşikler ise; enzimler, metal iyonlarını bağlayan proteinler, suda ve yağda çözünen radikal tutucularıdır.

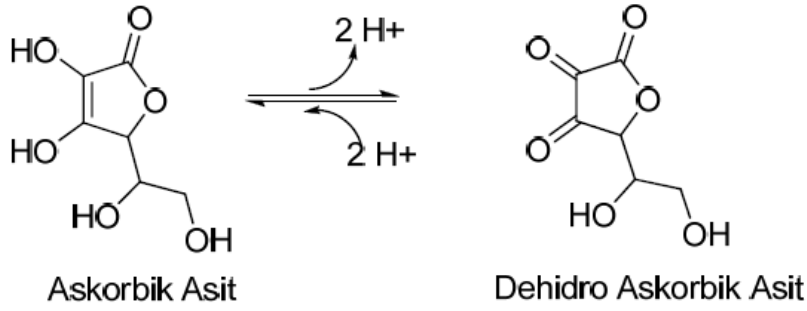
Çizelge 2.2. Vücudumuzda antioksidan savunma sisteminde yer alan başlıca bileşikler (İşbilir 2008)

Enzimler	Radikal Tutucular		Metal İyonlarını Bağlayan Proteinler
	Yağda çözünenler	Suda çözünenler	
Süperoksit dismutaz	E vitamini	C vitamini	Ferritin (Fe)
Katalaz	β - karoten	Glutasyon	Transferin (Fe)
Glutasyon peroksidaz	Bilirubin	Ürik asit	Laktoferrin (Fe)
Glutasyon redüktaz	Ubikinon	Sistein	Albumin (Cu)
Glutasyon S transferaz	Flavonoidler	Mannitol	Seruloplazmin (Cu)
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz	Melatonin		Miyogloblin (Fe)
	Lipoik asit		

2.3.2. Bitkilerde bulunan antioksidan maddeler

2.3.2.1. C vitamini (askorbik asit) ve türevleri

C vitamini vücuda alınan vitaminler ve antioksidanlar arasında suda en fazla çözünenlerden birisidir. Organizmada birçok bileşik için indirgeyici bileşen olarak görev yapar. Öncelikli olarak hücresel sıvılarda işlev görür (Niki 1987). Serbest formda bulunabilen askorbik asit, sodyum ve kalsiyum tuzları veya palmitik ve stearik esterleri şeklinde gıdalarda bulunabilir. Askorbik asit in vivo koşullarda etkin bir şekilde oksidatif hücre zararının önlenmesi için hidrojen peroksit ile tepkimeye girerek ortamdaki temizler (Foyer ve ark 1993). Askorbik asit bir veya iki elektron transfer ederek dehidro askorbik asite yükseltgenir. Bu redoks döngüsü dehidro askorbik asitin askorbik asite enzimatik indirgenmesiyle canlı dokuların içinde tamamlanır.

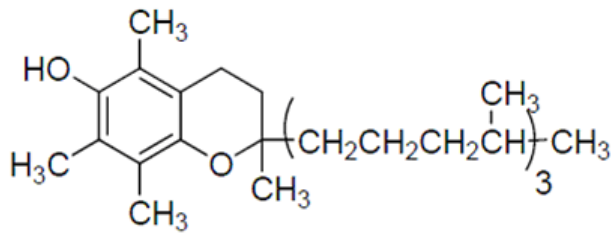


Şekil 2.2. Askorbik asitin dehidro askorbik asite yükseltgenmesi

C vitamini, membranlarda oluşan α -tokoferol radikali ile reaksiyona girerek α -tokoferolünrejenerasyonunu sağlar. Askorbik asit yüksek konsantrasyonlarda antioksidan aktivitesinin yanında, düşük konsantrasyonlarda prooksidan aktivite gösterir ve geçiş metalleri varlığında demiri indirgeyerek Fenton reaksiyonu ile hidroksit radikali oluşumuna katkı sağlar (Wanasundaral ve Shahidi 2005).

2.3.2.2. Tokoferoller

E vitamini ailesinin ana bileşenidir. Bitkilerde sentezlenen alfa(α), beta(β), gama(γ) ve delta(δ) gibi çeşitleri olan yan zincirleri doymuş bileşiklerdir. Antioksidan aktivitesi $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ sırasıyla azalır. En büyük biyolojik aktiviteyi gösteren α – tokoferoldür. Vücutta yağlı dokuda en fazla çözünen antioksidan bileşiktir ve zincir tepkimelerini önleyen etkili antioksidanlardan biridir. Antioksidan aktivitesi yapısındaki fenolik hidroksil grubuna sahip aromatik halkadan kaynaklanır. Lipofilik özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonuna karşı hücre membranlarının ve plazma lipoproteinlerinin en önemli zincir kırıcı antioksidanıdır.

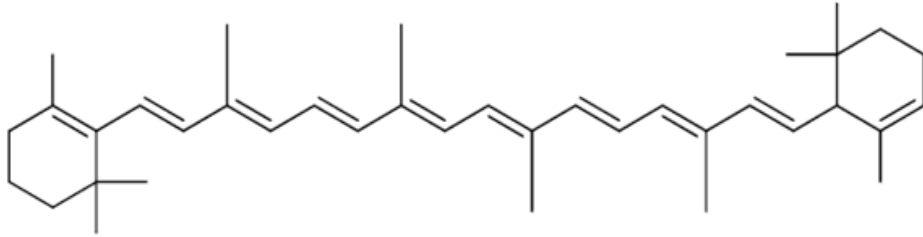


Şekil 2.3. α – tokoferol

α -tokoferol radikali nispeten stabil ve reaktivitesi az olan bir radikaldir. Okside olduktan sonra veya atılmadan önce askorbik asit ve glutatyon tarafından yeniden indirgenebilir. Böylece rejenere edilmiş olur. α -tokoferol lipid peroksidasyonunu yayılma basamağında engeller (Wanasundaral ve Shahidi 2005).

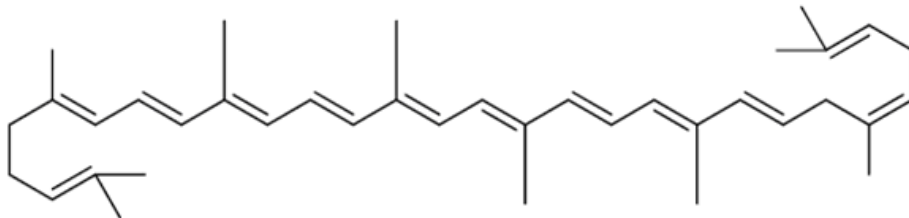
2.3.2.3. Karotenoidler

Karotenoidler yeşil bitkilerde, meyve ve sebzelerde bulunan yağda çözünebilen doğal renk pigmentleridir. Fotooksidatif süreçlere karşı bitkileri korur. Karotenler ve ksantofiller şeklinde iki sınıfta bulunurlar. Çeşitli kimyasal özellikleri ile 40 karbonlu izoprenoid veya tetraterpenlerden oluşurlar. Ksantofiller, hidroksilasyon ve epoksidasyonla karotenlerden türetilir (Wanasundaral ve Shahidi 2005). Bazı karotenoidler A vitamininin biyolojik olarak aktif kısmını oluştururlar ve bu yüzden provitamin A öncüsü şeklinde kategorize edilirler. β - karoten A vitamini öncüsü olarak bilinir ve bitki kaynaklarının çoğu β - karoten içerir.



Şekil 2.4. β – karoten

Karotenoidler özellikle singlet oksijeni ve peroksil radikallerini gideren etkili antioksidanlardır. Karotenoidler arasında en etkin singlet oksijen tutucu; β -karotenin açık zincirli analogu olan likopenidir.

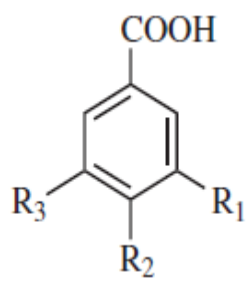


Şekil 2.5. Likopen

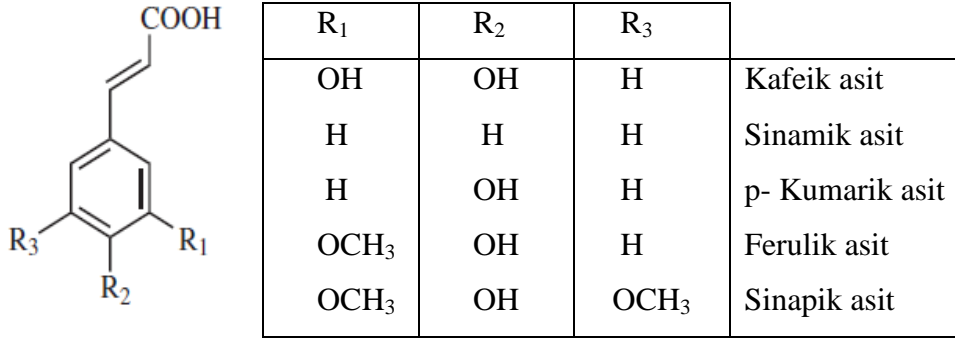
Yüksek oksijen derişimlerinde β - karotenin antioksidan aktivitesi azalmaya başlar. Artan oksijen derişimi karatenoidlerin konjuge çift bağlarından dolayı peroksi radikalleri tarafından saldırıya elverişli durumdadır ve bu durum karotenoid peroksi radikallerinin oluşumuna yol açar (Burton ve Ingold 1984).

2.3.2.4. Fenolik asitler

Fenolik bileşikler sekonder metabolitler olarak bitkilerde bulunur. Fenolik asitler ve polifenolik türevleri, doğal olarak bulunan hidrofilik ve hidrofobik antioksidatif bileşiklerin en önemli serisini oluşturur. Bu fenolik bileşikler radikal tarayıcısı veya metal şelatörleri olarak aktivite gösterirler. Bitkilerde bulunan fenolik asitler, süstitüe benzoik asit veya süstitüe sinamik asit türevleri yapısındadırlar. Molekül yapısındaki fenolik halkanın ve buna bağlı yan zincirlerin varlığı radikal bağlama gücünü artırır. Sinamik asitteki $CH = CH - COOH$ grubu, benzoik asitin $- COOH$ grubuna oranla antioksidan aktiviteye daha fazla katkı sağlar. Çünkü, $C=C$ çift bağı rezonans yoluyla antioksidan radikalının stabil halde kalmasını destekler (Pokorny ve Chan 1988).

	R ₁	R ₂	R ₃	
	H	H	H	Benzoik asit
	H	OH	H	p-Hidroksibenzoik asit
	OH	OH	OH	Gallik asit
	OCH ₃	OH	OCH ₃	Siringik asit
	OCH ₃	OH	H	Vanilik asit

Şekil 2.6. Benzoik asit ve türevleri

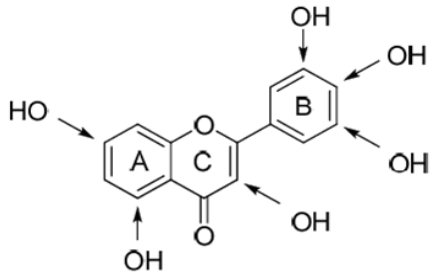


Şekil 2.7. Sinamik asit ve türevleri

Orto ve para pozisyonunda ikinci bir hidroksil grubunun bulunması fenolik asitin antioksidan aktivitesini artırır. Üç hidroksil gruplu gallik asit protokateşik asitten daha aktiftir. Metoksillenmiş bazı hidroksil grupları antioksidan aktiviteyi artırır. Sinapik asit, orto pozisyonundaki metoksi grupları sayesinde ferulik asitten daha aktiftir (Wanasundaral ve Shahidi 2005).

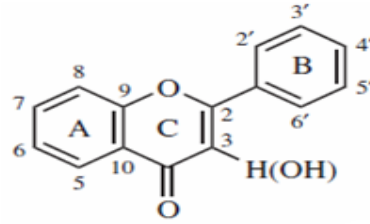
2.3.2.5. Flavonoidler

Flavonoidler, molekül yapıları içinde bir benzo- γ - piron halka yapısı içeren fenolik bileşiklerdir. Flavonoidlerin yaklaşık olarak % 90'ı glikozit flavonoidleri şeklinde bitkilerde meydana gelir (Wiseman ve ark. 1997). Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi lipit oksidasyonuna karşı çok etkilidir. Düşük redoks potansiyelleri sayesinde ($230 \text{ mV} < E^0 < 750 \text{ mV}$) alkoksi, hidroksil, peroksi ve süperoksit gibi yüksek redoks potansiyeline sahip ($2310 \text{ mV} - 1000 \text{ mV}$) serbest radikalleri indirgeyebilme gücüne sahiptirler(Jovanoviç ve ark. 1994). Halka yapılarına göre flavonoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyaninler ve izoflavonoidler olarak sınıflandırılır.



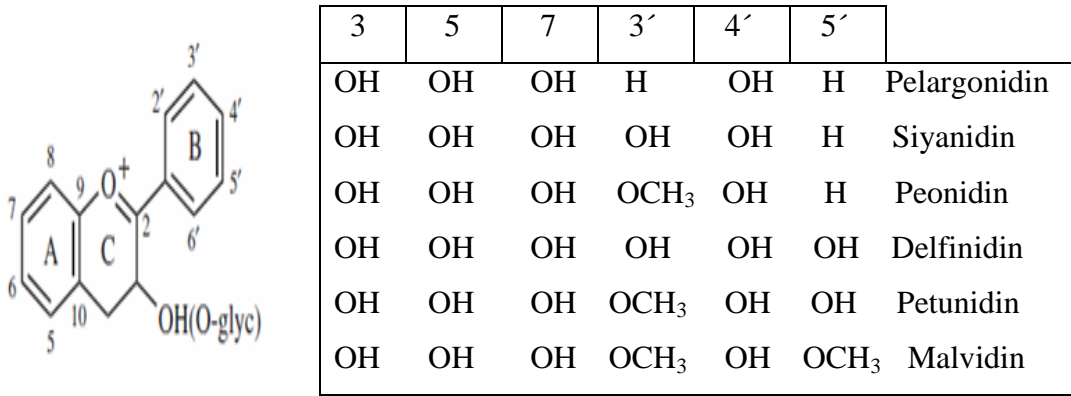
Şekil 2.8. Temel flavonoid yapısı

Flavonoidler aynı zamanda metal katalizli oksidasyon başlangıcını inhibe etmek için kullanılabilen iyi bir metal şelatörleridir. Flavonoidlerin metal şelatlama gücü A ve B halkalarındaki orto – difenol yapısı ve C halkasındaki ketol yapısından kaynaklanır. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin incelenmesinde birinci dereceden önemli olan özellikle A ve B halkalarındaki hidroksil gruplarının sayısı ve konumudur. B halkasının orto pozisyonundaki dihidroksilasyon, antioksidan aktiviteye katkı sağlar (Pratt ve ark. 1990).

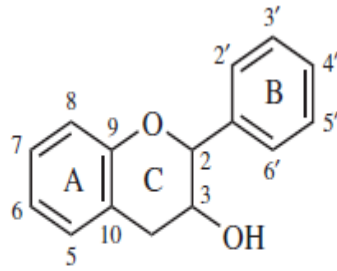


3	5	7	3'	4'	5'	
Flavon						
H	OH	OH	H	H	H	Krisin
H	OH	OH	H	OH	H	Apigenin
H	OH	OH	OH	OH	H	Luteolin
Flavonol						
OH	OH	OH	OH	OH	H	Kuersetin
OH	OH	OH	OH	OH	OH	Mirisetin
OH	OH	OH	H	OH	H	Kaempferol
O- rutinose	OH	OH	OH	OH	H	Rutin

Şekil 2.9. Flavon ve flavonol türevleri



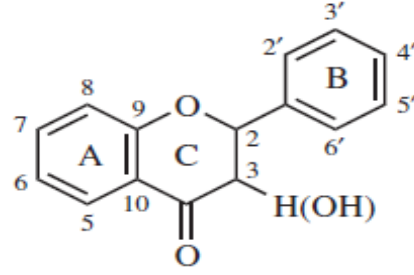
Şekil 2.10. Antosiyanidin türevleri



Flavan-3-ols

3	5	7	3'	4'	5'	konfigürasyon	
OH	OH	OH	OH	OH	H	2R:2S	(+) - Kateshin
OH	OH	OH	OH	OH	H	2R:3R	(-) - Epikateshin
OH	OH	OH	OH	OH	OH	2R:3S	(+) - Gallokateshin
OH	OH	OH	OH	OH	OH	2R:3R	(-) - Epigallokateshin
Gallik asit	OH	OH	OH	OH	H	2R:3R	(-) - Epikateshin gallat
Gallik asit	OH	OH	OH	OH	OH	2R:3R	(-) - Epigallokateshin gallat

Şekil 2.11. Flavan 3 – ol türevleri



Flavonone (Flavanonol)

3	5	7	3'	4'	5'	
Flavonon						
H	OH	OH	H	OCH ₃	H	Hesperidin
H	OH	OH	H	OH	H	Naringenin
Flavononol						
OH	OH	OH	OH	OH	H	Taksifolin

Şekil 2.12. Flavonon türevleri

2.3.3. Antioksidan kapasite ölçüm yöntemleri

Tepkime mekanizmalarına göre antioksidan kapasite tayinleri başlıca iki gruba ayrılabilir:

- 1) Hidrojen atomu transferine dayalı metotlar (HAT)
- 2) Tek elektron transferine dayalı metotlar (ET)

HAT mekanizmasına dayanan metotların çoğunda yarışmalı tepkime kinetiği izlenir. HAT' a dayalı metotlar genellikle sentetik bir radikal üreticiden, radikal üreticinin etki ettiği yükseltgenbilir moleküler bir bileşik(substrat) ve bir antioksidan bileşikten oluşur. HAT-temelli metotlarda peroksil radikali (ROO•) üretmek üzere bir radikal başlatıcı kullanılır. Eklenen antioksidan radikaller ortamdaki substrat ile yarışır. ROO• tercihen antioksidandan bir hidrojen atomu alır (Huang ve ark. 2005).

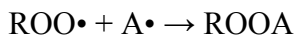
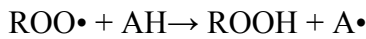
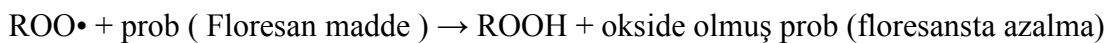
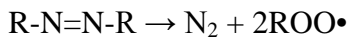
ET' e dayanan metotlar; bir karışımda antioksidan ve oksidan olmak üzere iki bileşen içerir. Oksidan antioksidandan bir elektron alır ve bu oksidanda renk değişimine neden olur. Renk değişiminin derecesi, antioksidan derişimiyle orantılıdır. Absorbanstaki değişim antioksidan derişimine karşı grafiğe geçirilir ve elde edilen doğrunun eğimi antioksidan indirgeme gücünü yansıtır (Huang ve ark. 2005).

Çizelge 2.3. In vitro koşullarda uygulanan bazı antioksidan aktivite tayin yöntemleri (İşbilir 2008)

<p>HAT- temelli metotlar</p> <p>$ROO\bullet + AH(\text{antioksidan}) \rightarrow ROOH + A\bullet$</p> <p>$ROO\bullet + LH \rightarrow LOOH + L\bullet$</p>	<p>Oksijen Radikalini Absorplama Kapasitesi (ORAC)</p> <p>Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP)</p> <p>Karotenoid(Krosin) ağartma yöntemi</p>
<p>ET- temelli metotlar</p> <p>$M^n + e^-(AH\text{'den}) \rightarrow AH\bullet + M^{(n-1)}$</p>	<p>Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite(TEAC)</p> <p>Fe(III) iyonu indirgeme gücü (FRAP)</p> <p>DPPH radikal giderme aktivitesi</p> <p>Folin – Ciocalteu yöntemi (FCR)</p> <p>Cu(II) iyonu indirgeme gücü (CUPRAC)</p>

2.3.3.1. Oksijen radikal absorpsiyon kapasitesi yöntemi (ORAC)

ORAC yöntemi başlangıçta Ghiselli ve ark.(1995) tarafından çalışılmıştır. Daha sonra Cao ve ark.(1993) tarafından geliştirilmiştir. ORAC peroksil radikalinin antioksidan inhibisyonunu ölçer. Bu yöntemde peroksil radikali floresans özellik gösteren bir molekülle (prob) floresans olmayan bir ürün oluşturmak üzere reaksiyona girer.



Antioksidanın koruyucu etkisinin hesaplanması, floresans bozunma eğrisinin altındaki integrale edilmiş net alandan yapılır.

Metodun ilk halinde prob olarak floresan bir protein olan β -fikoeritrin (β -PE) ile ve peroksil radikal başlatıcısı olarak AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)dihidroklorit) bileşiği ile çalışılmıştır. Ancak β -PE'nin fotostabil olmaması, polifenolik maddelerle etkileşimi ve radikal başlatıcı eklenmediğinde bile floresansının azalması dezavantajlarıyla karşılaşılmış ve sonraları ORAC metodu, yükseltgenabilir bir bileşik olarak β -PE yerine protein olmayan sentetik bir bileşik olan floressein kullanılarak geliştirilmiştir.

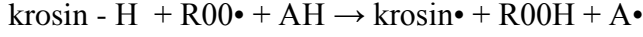
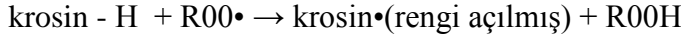
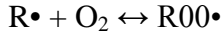
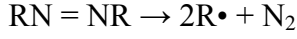
2.3.3.2. Toplam radikal tuzaklayıcı antioksidan parametre yöntemi (TRAP)

Orijinal TRAP yöntemi Wayner ve ark. (1985) tarafından geliştirilmiştir ve çoğunlukla plazmanın antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır. Bu yöntem, bir azo bileşiğinin termal bozunmasıyla indüklenen kontrollü bir lipid peroksidasyon reaksiyonu esnasında oksijen tüketiminin ölçülmesi temeline dayanır. Wayner metodunda, çözünmüş oksijen tüketimi, lipid peroksidasyon hızının bir göstergesidir ve bundan dolayı plazmanın bu reaksiyonu engelleme kabiliyetinin dolaylı olarak ölçülmesidir. Plazmanın oksijen tüketimi üzerine geciktirme etkisi, bilinen miktarda troloksun geciktirme etkisiyle karşılaştırılır.

Yöntemin avantajı: Serum veya plazma gibi biyolojik materyallerde antioksidan kapasite ölçümleri için kullanılır. Glutatyon, bilirubin, ürik asit ve askorbik asit gibi enzimatik olmayan antioksidanların süpürücü aktivitesini ölçer (Huang ve ark. 2005). Bunun yanında karışık ve zaman alıcı bir yöntemdir.

2.3.3.3. Karotenoid(Krosin) ağartma yöntemi

Bu çalışmada, AAPH gibi serbest bir radikal üreticinin varlığında karotenoidlerin doğal bir türevi olarak bulunan krosinin ağartmasının önlenmesi antioksidanların inhibisyon kapasitelerinin ölçülmesiyle gerçekleşir.



Ursini ve ark.(1998) bu metodu plazma antioksidan kapasitesinin tayininde uygulamışlardır. Renk açılması krosinin maksimum absorpsiyon yaptığı 443 nm dalgaboyunda 10 dakika boyunca spektrofotometrik olarak izlenmiştir. Antioksidanlar ağarmaya engel olur. Başlangıç krosin ağarma hızları antioksidan varlığında ve yokluğundaki kinetik eğrilerden elde edilir.

Yöntemin olumsuz yönleri: Krosin ağartma tekniğinin, gıda örneklerinde uygulamaları sınırlıdır. ROO• ve fitokimyasallar arasındaki reaksiyon hız sabitleri büyük ölçüde değişebilir. Bazı fitokimyasalların reaksiyon hızları krosine benzerdir. Bu durumda, inhibe edilmiş ağartma hızları çok küçüktür ve metot antioksidanlardaki konsantrasyon değişimine duyarlı değildir. Krosin 450 nm'de absorbans yapar ve karotenoid gibi pek çok meyve pigmenti ışığı aynı dalga boyunda absorplar. Her bir örneğe girişimi önlemek için, yalnızca gıda örneği ve AAPH içeren bir karışım aynı zamanda denenmelidir (Huang ve ark. 2005).

2.3.3.4. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite(TEAC)

TEAC yöntemi ilk olarak Miller ve ark. (1993) tarafından yılında rapor edilmiştir. Bu yöntemde,2,2'azinobis(3etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit) (ABTS)'in persülfatla oksidasyonu, ABTS•⁺ radikali oluşturulur. Bu radikal, toplam radikal süpürme kapasitesini ölçmek için kullanılır. Bu metot antioksidan bileşikler tarafından ABTS'nin rengini kaybetmesi temeline dayanır. Antioksidan kapasite, suda çözünen E vitamini analogu olan troloks konsantrasyonun (mM) eşdeğeri olarak ifade edilir. Örneğin toplam radikal süpürme kapasitesi, troloksun absorbansı azaltmasıyla ilişkili olarak hesaplanır.

Yöntemin avantajları: Uygulamasının kolay olması nedeniyle, TEAC yöntemi, pek çok araştırma laboratuvarında antioksidan kapasite çalışması için kullanılmıştır. ABTS radikali geniş bir pH aralığında kararlıdır. Bu yüzden antioksidan mekanizma üzerine

pH etkisini çalışmak için kullanılabilir (Lemanska ve ark 2001). ABTS radikali hem sulu hem de organik çözücülerde çözünebilir ve dolayısıyla lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini ölçmek için kullanılabilir. Radikal düşük redoks potansiyeline sahiptir (0,68 V) ve nispeten daha düşük redoks potansiyelleri nedeniyle fenoliklerin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi için uygundur. Çoğu fenolik bileşik bu termodinamik özelliği nedeniyle, ABTS radikaliyle reaksiyona girebilir (Osman ve ark 2006).

2.3.3.5. Fe(III) iyonu indirgeme gücü (FRAP)

FRAP yönteminin avantajı elektron-transfer reaksiyonu olmasıdır. Burada Fe(III) tuzu, Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ=2,4,6-tripiridil s-triazin), oksidan olarak kullanılır. Fe(III) tuzu redoks potansiyeli (0,70 V) ABTS•'nin redoks potansiyeli (0,68V) ile benzerdir. Bu yüzden, TEAC ve FRAP yöntemleri arasında pek fark yoktur. TEAC yöntemi, nötral pH'da, FRAP yöntemi ise demirin çözünürlüğünü sağlamak için asidik koşullarda (pH 3,6) gerçekleştirilir. Düşük pH değerinde, Fe(III)-TPTZ kompleksi, Fe(II) formuna indirgenir. Bu kompleks koyu mavi renklidir ve absorpsiyon maksimumu 593 nm'dir.

Yöntemin avantajları: Bu yöntem hidrofilik ve lipofilik antioksidanların tayini için uygundur. FRAP yönteminin en önemli avantajı, basitliği, hızı, ucuzluğu ve sağlamlığıdır. Özel bir ekipman gerektirmez. Otomatik, yarı-otomatik ve manuel metotlarla gerçekleştirilebilir (Prior ve ark. 2005).

Yöntemin dezavantajları: Bu reaksiyon spesifik değildir ve 0,70 V'dan daha düşük redoks potansiyeline sahip, in vivo olarak antioksidan özellik göstermeyen herhangi bir bileşik bile demiri indirgeyebilir (Nilsson ve ark. 2005). Glutasyon gibi tiyol antioksidanlar FRAP yöntemiyle ölçülemezler. Bunun nedeni Fe(III)'ün, kimyasal olarak inert olmasına neden olan yüksek spinli yarı dolu d orbitalleri olabilir (Apak ve ark. 2004). Ayrıca diğer bir neden FRAP yöntemi ile fizyolojik olmayan pH'da çalışılmasıdır (Jimenez ve ark. 2008). Yöntem orijinal olarak plazmanın antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilmiştir, fakat daha sonra çay ve şarabın antioksidan kapasite tayininde kullanılmıştır. Karışım gıda ekstraktındaki şelatlarla bağlanabilen diğer Fe(III) türlerini içeriyorsa, potansiyel problemler meydana gelir. Bu kompleksler antioksidanlarla reaksiyona girebilir (MacDonald ve ark. 2006).

2.3.3.6. DPPH radikal giderme aktivitesi

Ticari olarak bulunan DPPH• radikali, birkaç kararlı organik azot radikalinden biridir. UV absorpsiyon maksimumu 515 nm'dir. Bu metot DPPH radikalinin antioksidanlar tarafından süpürülmesi temeline dayanır. Antioksidan tarafından indirgenince rengi solduğu için reaksiyonun ilerleyişi spektrofotometre ile izlenir. DPPH'in renginin solması antioksidan derişimi ile orantılıdır. Kalan DPPH yüzdesi, aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır:

$$\%DPPH_{\text{kalan}} = 100 \times [DPPH_{\text{kalan}}] / [DPPH]_{t=0}$$

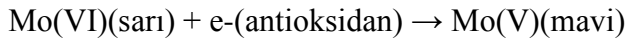
%DPPH_{kalan} antioksidan derişimiyle doğru orantılıdır. Başlangıç DPPH• derişiminde %50 azalmaya neden olan derişim EC₅₀ olarak tanımlanır. EC₅₀ denge derişimine ulaşması için gerekli olan zaman, kinetik eğrilerden hesaplanır ve TEC₅₀ olarak tanımlanır.

Yöntemin avantajları: DPPH yöntemi basit ve hızlıdır. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. Yalnızca UV-GB spektrofotometresine ihtiyaç duyar. Çok sayıda örnek analizi mikropilaya kullanılarak yapılabilir (Jimenez ve ark. 2008).

Yöntemin dezavantajları: DPPH yalnızca organik ortamda çözülebilir, sulu ortamda çözünmez. Bu hidrofilik antioksidanların rolünün yorumlanmasında önemli bir sınırlamadır. Ölçümlerde ışığın etkisi göz ardı edilmemelidir. Metanol ve aseton içindeki DPPH'in 517 nm'deki absorpsiyonu ışık altında, 120 dakikalık süre boyunca %20 ve %35 azalmaktadır. Bazı örnek bileşenleri, örneğin karotenoidler, DPPH'in 515 nm'deki absorpsiyon spektrumuyla çakışabilirler. DPPH, canlı organizmalarda bulunan radikallerin tersine, kararlı, uzun ömürlü bir azot radikalidir ve yüksek reaktivitede, kısa ömürlü, lipid peroksidasyonunda rol alan peroksil radikallerine benzemez. Peroksil radikalleriyle hızlı reaksiyon veren çoğu antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir veya sterik engel nedeniyle DPPH'a karşı inert olabilir (Arneo 2000, Huang ve ark. 2005).

2.3.3.7. Folin – Ciocalteu yöntemi (FCR)

Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) molibdofosfotungstik heteropoliasittir($3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$). Varsayılan aktif merkezi Mo(VI) dır. Metod başlangıçta proteinlerde fenol grubu içeren tirozin kalıntısı ile Folin-Ciocalteu ayırıcının (FCR) etkileşiminden dolayı protein analizi için düşünülmüştür. Singleton ve arkadaşları (1999) bu çalışmayı şaraptaki toplam fenollerin analizi için geliştirmişlerdir. FCR ayırıcı ile yapılan çalışmalar toplam fenol analizi olarak yansıtılmasına rağmen gerçekte örneğin toplam indirgen kapasitesi ölçülür. Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler. Sodyum karbonat çözeltisiyle pH 10'a ayarlanır. Elektron transfer tepkimesi ortamda bulunan indirgen bileşenler ile Mo(VI) arasında meydana gelir.



Mavi renkli kompleks oluşumu 765 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür. Standart olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olarak (mg/L) ifade edilir.

Yöntemin avantajları: FCR yöntemi ile diğer elektron transferine dayanan metotlar arasında mükemmel doğrusal korelasyon olduğu belirlenmiştir (Magalhaes ve ark. 2008). FCR metodu ve ORAC metoduyla elde edilen antioksidan kapasite ölçümleri arasındaki ilişki genellikle iyidir (Prior ve ark. 2005). FCR'nin tanımlanmamış kimyasal yapısına rağmen, FCR yöntemi ile toplam fenol tayini güvenilir, basit ve tekrarlanabilirdir (Huang ve ark. 2005).

Yöntemin dezavantajları: Metotların standardizasyon eksikliği tayin edilen fenollerde farklı değerler elde edilmesine neden olmaktadır. Son absorbans değerleri genellikle reaksiyona giren fenolik hidroksil gruplarının sayısıyla orantılıdır ve molekülün yapısına bağlıdır. Yöntemin zaman alması, rutin analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca süreç sulu fazda gerçekleştirildiğinden, lipofilik bileşikler için uygulanamamaktadır (Magalhaes ve ark. 2008).

2.3.3.8. Cu(II) iyonu indirgeme gücü (CUPRAC)

Bu yöntem, bir numunedeki antioksidanlar tarafından Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesi temeline dayanır. Apak ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin veya Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neokuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm'de maksimum absorpsiyon veren bakır(I) neokuproin [Cu(I)-Nc] kompleksine indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasite hesaplanmaktadır.

Yöntemin avantajları: Reaktif seçici olduğundan, fenantrolin veya tripiridiltriazin türü ligandlarla bağlı demire göre daha düşük redoks potansiyeline sahiptir. FRAP yönteminde girişime neden olan basit şekerler ve sitrik asit, CUPRAC reaktifiyle okside olmaz. CUPRAC reaktifi, tiyol tipi antioksidanları okside etmek için yeterince hızlıdır. Cu(II)'nin elektronik yapısı, hızlı kinetiğe imkan verir. CUPRAC reaktifi, ABTS ve DPPH gibi, kromojenik radikal reaktiflerden daha kararlıdır ve daha kolay temin edilebilir. Renkli Cu(I)-Nc şelatı veren redoks reaksiyonu, hava, güneş ışığı, nem ve pH gibi parametrelerden etkilenmez (Apak ve ark 2004).

Yöntemin dezavantajları: CUPRAC yöntemi askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kesretin için birkaç dakika içinde tamamlanır, fakat daha kompleks moleküller için 30 - 60 dakika gereklidir. CUPRAC yönteminde kompleks antioksidan karışımında uygun reaksiyon zamanını seçme açısından problemlidir (Prior ve ark. 2005).

Son zamanlarda çeşitli redoks çiftlerinden yararlanarak antioksidan kapasite tayin yöntemleri geliştirilmektedir. CHROMAC yöntemi olarak adlandırılan, sadece antioksidanların yükseltgenebileceği ve diğer krom iyonu türlerinin fenolik bileşiklerle tepkimeye girmediği, kompleks bir reaktif oluşturmadığı pH'de, Cr(VI) iyonunun indirgenmesine dayalı yeni bir yöntem önerilmiştir. Çalışma asidik ortamda 1,5 – difenil karbazit ve Cr(VI) iyonunun tepkimesiyle oluşan difenil karbazon ve Cr(III) iyonunun renkli şelatlaşmış kompleksinin spektrofotometrik olarak ölçümü üzerine odaklıdır.

CHROMAC yönteminde, fenolik bileşikler asitli ortamda Cr(VI) iyonunun aşırı miktarıyla fenoksi radikallerine yükseltgenirler ve bu durum Cr(VI) iyonunun Cr(III) iyonuna indirgenmesine neden olur. Kalan Cr(VI) iyonları, pH 2,8'de 1,5 – difenil

karbazit ile 540 nm'de difenil karbazon ve Cr(III) iyonunun şelatlayıcı kompleksini oluşturmak için tepkimeye girer. Çalışmada kullanılan kromojenik reaktif, kolay elde edilebilir, stabil, seçici ve gıdalardaki antioksidanların birçok çeşidine yanıt vermesi bakımından yöntemin avantajlı yönünü oluşturduğu belirtilmiştir (Işık ve ark. 2013).

2.3.4. Antioksidan kapasite ölçüm yöntemlerinin zorlukları ve çelişkileri

Gıda bileşiminin karmaşıklığından dolayı her bir antioksidan bileşenin ayrı ayrı incelenmesi, antioksidan bileşiklerin multifonksiyonel olması ve bileşenler arasındaki sinerjistik etkileşimlerde göz önüne alındığında pahalı ve etkisiz bir yoldur. Multifonksiyonel gıda ve biyolojik sistemlerdeki antioksidanları değerlendirmek için tek boyutlu bir metot kullanımı ve antioksidan kapasiteyi güvenilir bir şekilde ölçülebilir geçerli bir çalışmanın eksikliği en büyük problemdir (Huang ve ark. 2005). Bu yüzden araştırmacılar antioksidan etkinliğin hızlı, güvenilir biçimde ve bir kimyasal reaksiyon ile ölçülmesini sağlayabilecek metot geliştirme arzusundadırlar. İn vitro koşullarda antioksidan etkinliği ölçmeyi amaçlayan birçok metot mevcuttur. Kimyasal bir terim olarak aktiviteyi sıcaklık, basınç, tepkime ortamı gibi spesifik tepkime koşullarını dikkate almadan ifade etmek anlamsız olur. Antioksidan aktivitenin ölçümü spesifik koşullar altındaki kimyasal reaksiyona girme yatkınlığını yansıtır. Spesifik tepkimelerin fazla bağımsız olması ve benzer kimyasal anlamlara sahip olmasından dolayı tek bir çalışmayla elde edilen verileri toplam antioksidan aktivitenin bir göstergesi olarak kullanmak yanıltıcıdır ve uygun değildir (Huang ve ark. 2005). Ancak her bir değerlendirme farklı oksidasyon şartları altında ve farklı oksidasyon ürünlerini ölçmek için birkaç metot kullanılarak yapılmalıdır.

2.4. Yeşil Kimya

Yeşil kimya, kimyasal ürünlerin ve proseslerdeki çevre ve insan sağlığına zararlı maddelerin kullanımını veya üretimini ortadan kaldırmak ve oluşumunu önleyici yöntemlerin bulunması, planlanması ve geliştirilmesi amaçlı bir yaklaşım olarak tanımlanmaktadır (Anastas ve Williamson 1996, Hjeresen ve ark. 2002). Disiplinlerarası bir alana sahip olan yeşilkimya, sürdürülebilir kimya olarak da bilinir ve dünyada sürdürülebilirlik konusunda enerji üretimi ve kullanımı, besin üretimi, küresel iklim

değişikliği, çevredeki toksik maddelerin azaltılması-yok edilmesi ve geri dönüşümsüz kaynak kullanımı hakkında seçenekler sağlar (Karpudewan ve ark. 2011).

2.5. Metalik Nanopartiküller

Metalik nanopartiküller sahip oldukları üstün optik, manyetik ve elektronik özellikleri nedeniyle son yıllarda optoelektronik, kataliz, tıp, kimyasal/biyokimyasal sensörler gibi alanlarda kullanımları yoğun olarak araştırılmaktadır. Farklı tekniklerle başarıyla sentezlenmelerine rağmen tekniklerin pahalı olması ve kullanılan zararlı kimyasalların çevresel ve biyolojik riskleri nedeniyle, son yıllarda çevre dostu, ucuz, biyomedikal ve ilaç uygulamalarına uyumlu teknikler üzerinde ilgi giderek artmaktadır(Filippo ve ark. 2010).

Metalik nanopartiküller belli boyut aralığında hacimsel yapılardan farklı olarak olağandışı özellikler ve işlevsellikler sergilerler. Nanopartikül özelliklerinin çekiciliğinin nedeni; kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının benzersiz karakterleri ve yüksek yüzey/ hacim oranı olarak kendini gösterir.

Nanopartiküller geniş bir kimyasal aralıkta ve morfolojide farklı teknikler kullanarak üretilirler. Ancak sentez yönteminin karmaşık ve çok pahalı olması, toksik madde kullanımı gerektirmesi, farmakolojik ve biyomedikal uygulamalara uygun olmaması gibi dezavantajlar içermektedir. Nanopartiküllerin biyosentez yoluyla elde edilmesi; basit ve ekonomik oluşu, toksik madde kullanımı gerektirmemesi farmakolojik ve biyomedikal uygulamalara uygun olması gibi avantajlarından dolayı biyosentez yoluyla nanopartikül üretimi cazip hale gelmiştir (Filippo ve ark. 2010).

Bitki özütlerinde bulunan biyomoleküller, yeşil sentezleme süreci içerisinde metal iyonlarının nanopartiküllere indirgenmesi için kullanılabilir. Bitki özütü kullanılarak nanopartiküllerin üretiminde özüt, metal tuzunun bir çözeltisiyle karıştırılır ve tepkime dakikalar içerisinde tamamlanır. Gümüş, altın ve diğer metalik nanopartiküller bu yolla üretilmektedir (Li ve ark. 2011). AgNP'lerin biyosentez yoluyla üretiminde sulu ve organik özütlerin kullanımına ilişkin birçok literatür çalışması mevcuttur.

Beş bitki (Çam ağacı, Trabzon hurması, Mabet ağacı, Manolya ve Çınar ağacı) yaprağının sulu özütlerinden AgNP'lerin sentezi gerçekleştirilerek UV – görünür bölge spektroskopisi ile nanopartikül oluşumu izlenmiş, manolya yaprağı özütünün AgNP oluşumu konusunda daha etkin olduğu gösterilmiştir (Song ve Kim 2009).

Bir doğal tatlandırıcı olan kurutulmuş *Stevia rebaudiana* yapraklarının sulu özütleri kullanılarak elde edilen AgNP'ler çeşitli spektroskopik tekniklerle karakterize edilmiştir (Yılmaz ve ark. 2011). *Ocimum sanctum* türü yaprak özütü kullanılarak sentezlenen gümüş nanopartiküller çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiş ve antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir (Singhal ve ark. 2011). Başka bir çalışmada da *Acalypha indica* türü yaprak özütü kullanılarak AgNP'lerin 30 dakika içinde hızlı bir şekilde sentezlendiği gözlemlenmiş ve antibakteriyel aktiviteleri incelenmiştir (Krishnaraj ve ark. 2010).

Başka bir çalışmada da indirgen reaktif olarak Ülkemizde kişniş olarak bilinen ve maydanozgillerden bir tür olan *Coriandrum sativum* yaprak özütü kullanılarak AgNP 'lerin biyosentezi gerçekleştirilmiş ve optik özellikleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır (Sathyavathi ve ark. 2010). Bir çeşit mango meyve ağacı olan *Mangifera indica* yaprak örneğinin sulu özütü kullanılarak AgNP oluşumunun pH ve sıcaklıkla değişimi üzerine sınırlı bir çalışma yapılmıştır (Philip 2011). Tropikal bir ağaç cinsi olan Neem (*Azadirachta indica*) yapraklarının sulu özütleri kullanılarak yüksek derişimde gümüş, altın ve bimetallik Au/Ag çekirdek – kabuk oluşumlu nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Metal iyonlarının indirgenmesiyle saf metalik ve bimetallik nanopartiküllerin oluşumunda yaprak özütünde bulunan indirgen şekerlerin ve terpenoidlerin süreci kolaylaştırdığı ifade edilmiştir (Shankar ve ark. 2004). Buna benzer bir çalışmada kaju olarak bilinen *Anacardium occidentale* yaprağının sulu özütü kullanılarak gümüş, altın ve Au çekirdek – Ag kabuk oluşumlu nanopartiküllerin sentezi gerçekleştirilerek, nanopartikül oluşumu üzerine pH, sıcaklık ve özüt miktarının etkisi incelenmiştir (Sheny ve ark. 2011).

Bir güney Amerika bitkisi olan patlıcangillerden *Capsicum annuum L.* yaprak özütü ile AgNP'lerin sentezi ve oluşumu üzerine proteinlerin etkisi çeşitli spektroskopik

tekniklerle incelenmiştir. Sonuçlar proteinlerin amin gruplarının, AgNP'lerin oluşumu esnasında kontrol edici ve indirgeyici bir rol oynadığını göstermiştir (Li ve ark. 2007).

Kudret helvası bitkisi ve sabun – kökü (*Acanthe phylum bracteatum*) bitkisi kullanılarak elde edilen sulu özütlerden biyoindirgenmeyle AgNP'lerin sentezi incelenmiştir. Çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilen nanopartiküllerin 29 – 68 nm boyut aralığında dağılım gösterdikleri görülmüştür (Forough ve Farhadi 2010).

Meyve özütlerinden yararlanılarak AgNP ve AuNP sentezlendiği, sıcaklığın ve sürenin partikül yapısına etkisinin incelendiği çalışmalar da literatürde yer almaktadır. Üzüm (*Vitis vinifera*) meyve özütü ile sentezlenen AgNP'ler çeşitli spektroskopik yöntemlerle karakterize edilmiş ve bakterilere karşı antimikrobiyal aktiviteleri incelenmiştir (Roy ve ark.2013). Finlandiya'da yaygın olarak bulunan solucan otu meyvesi (*Tanacetum vulgare*) özütü kullanılarak altın ve gümüş nanopartiküller sentezlenmiştir (Dubey ve ark.2010).

Ag nanopartikül biyosentez yoluyla oluşumunun yanı sıra antioksidan kapasiteyle ilişkilendirildiği bazı çalışmalar da literatürde yer almaktadır. *Iresine herbstii* türü çiçeksi bir bitkinin yapraklarının sulu özütlerinden sentezlenen AgNP'lerin antioksidan, antibakteriyel ve sitotoksik aktiviteleri değerlendirilmiştir. Sulu yaprak özütlerinden sentezlenen AgNP'lerin toplam fenol içeriğinin, yaprağın etanolla yapılan özütleme işlemi sonucundaki toplam fenol içeriğinden daha düşük olduğu görülmüştür. DPPH radikal tarama aktivitesinde de benzer durum gözlemlenmiştir (Dipenkar ve Murugan 2012).

Morinda Pubescens türü yaprak örneklerinin sulu özütlerinden sentezlenen gümüş nanopartiküllerin güçlü doğal antioksidanlar oldukları gösterilmiş ve antikanser aktiviteleri incelenmiştir (Inbathamizh ve ark. 2013).

Polifenollerin spektroskopik incelenmesi için, polifenoller tarafından indirgenen ve trisodyum sitratla kararlılık kazandırılan AgNP'lerin 423 nm de çok kuvvetli yüzey plazmon rezonans soğurumu gösterdikleri belirlenmiştir. Geliştirilen kolorimetrik yöntemde parçacık büyüklüğünün kontrol edilmesi için önce zayıf indirgen sitrat etkisiyle homojen dağılımlı partiküller hazırlanmış ve stabilize edilmiştir. Ortama

salınım yapacaklardır. Metalik nanopartiküldeki bu titreşimler için rezonans frekansı spektrumun UV veya görünür bölgelerine karşılık gelir. Sonuç olarak yüzey plazmonda spektrumun UV veya görünür bölgelerinde absorpsiyon bantları ortaya çıkar. Bu durumda yüzey plazmon; elektronların temel halden uyarılmış hale geçmesi için ışığın absorplanması gereken başka bir elektronik proses olarak değerlendirilebilir (Garcia 2011).

2.5.2. Yüzey plazmon rezonansını etkileyen faktörler

Boyut dağılımı: Absorbsiyon pikinin keskinliği sentezlenen nanopartikülün boyutuna bağlıdır. Metalik nanopartiküllerin boyut dağılımı absorpsiyon bandının yayvanlığına neden olur. Büyük boyutlarda dağılım daha geniş absorpsiyon bantlarına neden olur.

Partikül şekli: Yüzey plazmon rezonansı partikülün şeklinden de kuvvetli bir şekilde etkilenir. Yüzey plazmon için geri kuvvet partikül yüzeyindeki yük birikimiyle ilişkili olduğu için yüzey plazmonu partikülün geometrisi tarafından etkilenecektir.

Ortamın dielektrik sabiti: Yüzey plazmonun uyarımı partikülü çevreleyen ortam tarafından önemli derecede modifiye edilir. Yüzey plazmonun uyarılması sırasında yük birikimi nanopartikülün çevresinde bir elektriksel alan oluşturur. Bu alan dielektrik ortamın polarizasyonunu etkiler. Daha büyük dielektrik sabiti, daha büyük polarizasyon yüküne ve bu durum da yüzey rezonansı üzerinde daha büyük bir etkiye neden olacaktır.

pH ve sıcaklık: Metalik nanopartiküllerin sentezlenmesi, pH ve sıcaklığa bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bazı araştırmacılar tarafından yüksek pH değeri ile karşılaştırıldığında düşük pH (2 – 4) değerlerinde daha büyük nanopartiküllerin oluştuğu gözlemlenmiştir (Akhtar ve ark. 2013). Gümüş nanopartiküllerin sentezlenmesi esnasında pH 'nin etkinliği Satishkumar ve arkadaşları (2009) tarafından geniş bir pH aralığında (1- 11) incelenmiş ve gümüş nanopartiküllerin sentezlenmesinden sonra çözeltinin pH sinin düştüğü görülmüştür. Büyük boyutta elipsoidal nanopartiküllerin oluşumu daha düşük pH değerlerinde gözlemlenmiştir. Yüksek alkali pH değerlerinde büyük miktarda disperse olmuş küçük boyutlu küresel nanopartiküllerin oluşma meylinde olduğu görülmüştür. Sıcaklık, nanopartikülün şekli

ve boyutu üzerine önemli bir faktör olarak işlev gösterir. Sıcaklığın artmasıyla tepkime hızı da artar ve bu durum nanopartiküllerin sentezlenmesini arttırır.

2.6. İndirgen Karakterdeki Bileşenlerin Elektrokimyasal Yöntemlerle İncelenmesi

Gıda ve biyolojik örneklerin bileşimindeki karmaşıklıktan ve antioksidan bileşenler arasındaki mümkün olabilecek sinerjistik etkileşimlerden dolayı her bir antioksidan bileşenin ayrı ayrı incelenmesi pahalı ve etkisiz bir yoldur. Bu durum, direkt olarak ölçümlerde kullanılacak elektrokimyasal tekniklerin analitik olanaklarını açık hale getirir. Elektrokimyasal tekniklerle elde edilen sinyaller, özütte bulunan bütün karmaşık yapıların katkısını içerdiğinden elektrokimya çok kullanışlı bir araç olabilir. Elektrokimyasal yaklaşımlarla elde edilen yanıtların, spektroskopik olarak gerçekleştirilen yöntemlerdeki optik yol uzunluğuna, örneğin bulanıklığına ve birçok durumda ön deriştirme işlemlerine bağlı olmaması elektrokimyasal yöntemlerin çekiciliğini arttırır.

Elektrokimyasal yaklaşımlar, reaktif türler kullanmaksızın gıda ve biyolojik örneklerde bulunan antioksidan bileşenlerin indirgen gücünü değerlendirir ve özellikle tüm prosesleri kolaylaştırarak antioksidan bileşenlerin fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerine odaklandığı için toplam antioksidan kapasitenin direkt test edilmesi olarak düşünülebilir (Blasco ve ark. 2007).

Elektrokimya, bazı antioksidan kapasite çalışmalarının kavramsal temelini oluşturur. Elektron transferine dayalı spektroskopik olarak gerçekleştirilen antioksidan kapasite ölçüm çalışmaları doğal özütteki redoks tepkimelerinin gerçekleşmesi üzerine odaklanmıştır. Buradan yola çıkılarak, uygun bir elektrot materyali ile antioksidan aktivite değerlendirilmesinde elektrokimyasal teknikler öngörülebilir(Blasco ve ark. 2007).

Yükseltgenme potansiyeli, antioksidan kapasitenin ölçümü için en uygun şartların bulunmasını ve kontrollü bir seçiciliği mümkün kılar. Bu çok yönlülük, spektrofotometrik olarak gerçekleştirilen yaklaşımlara karşı elektrokimyanın benzersiz bir özelliğidir.

Antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde farklı voltametrik teknikler kullanılarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çevrimsel voltametri tekniği ile, bitki özütlerinde, doku homojenatlarında ve kan plazmasındaki düşük molekül ağırlıklı antioksidanların kapasiteleri incelenmiştir. Antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde; indirgen gücü yansıtan yükseltgenme potansiyeli E_{pa} , anodik akım değerinin yarısına karşılık gelen noktada ölçülen yarı dalga potansiyeli $E_{1/2}$, ortamda bulunan indirgen bileşenlerin derişimiyle orantılı değişim gösteren anodik akım I_a değerleri dikkate alınmıştır. Bunun yanında anodik bölgenin altındaki alan kullanılarak örneğin toplam antioksidan kapasitesini yansıtan daha iyi bir parametrenin kullanılabileceği önerilmiştir (Chevion ve ark. 2000). Bu durum, anodik akım bölgesi tek bir bileşenden daha fazlasını içeriyorsa daha avantajlı bir durum sağlar.

İki farklı kırmızı ve beyaz şarap örneklerinde fenolik antioksidanların indirgeyici güçleri CV tekniği ile incelenmiştir. Camsı karbon elektrotla Ag/AgCl referans elektrotuna karşı yapılan ölçümlerde 0,4 V ve 0,6 V civarında yükseltgenme pikleri elde edilmiştir (Kilmartin ve ark. 2001).

Şarap örnekleriyle yapılan diğer bir çalışmada Hırvatistan'ın üç farklı bölgesinde üretilen kırmızı şarap örneklerinin toplam fenol içeriği DPV, Folin – Ciocalteu ve HPLC metotlarıyla incelenmiştir. Şarap örneklerinin toplam fenol içeriği incelendiğinde DPV tekniğinin çok duyarlı ve seçici bir metot olduğu görülmüş ve DPV tekniği ile HPLC ve FC metotlarıyla yapılan çalışmalar arasında yüksek bir korelasyon elde edilmiştir (Seruga ve ark. 2011).

Başka bir çalışmada Portekiz'in Douru bölgesindeki şarapların polifenol içerikleri ve antioksidan kapasiteleri kimyasal olarak ABTS radikal tarama aktivitesi ve FC metotları, elektrokimyasal olarak CV ve DPV teknikleriyle incelenmiş ve yöntemler karşılaştırılmıştır. CV ile yapılan çalışmalarla FC ve ABTS yöntemleri arasında doğrusal olmayan bir korelasyon elde edilirken, DPV tekniği ile ABTS radikal tarama aktivitesi arasında çok iyi bir korelasyon elde edilmiştir (Rebelo ve ark. 2013).

Polifenolik bileşenlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için kromojenik bir yükseltgen reaktif olan $Cu(Nc)_2^{2+}$ (Cu(II) Neokuproin) kompleksi kullanılarak yeni bir diferansiyel puls voltametri metodu geliştirilmiştir. Bu elektroanalitik metot

antioksidanlar tarafından $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ kompleksinin $\text{Cu}(\text{Nc})_2^+$ kompleksine indirgenmesi ve tepkimeye girmeden kalan $\text{Cu}(\text{Nc})_2^{2+}$ kompleksinin elektrokimyasal olarak detekte edilmesi üzerine odaklıdır. Geliştirilmiş voltametrik metotla bazı bitkisel çay örneklerinin toplam antioksidan kapasite değerleri ile spektrofotometrik olarak gerçekleştirilen CUPRAC yöntemiyle elde edilen sonuçların iyi bir uyum içerisinde olduğu gözlemlenmiştir (Tufan ve ark. 2014).

2.7. ORP ölçüm ilkesi ve yöntemi

Çözelti ortamında bulunan bir kimyasal türün elektrot materyali ile veya çözünmüş haldeki iki kimyasal tür arasında inert bir elektrot yüzeyinde elektron alış verişine bağlı olarak kurulan dengenin ortaya çıkaracağı gerilimin, bir referans elektrot yardımıyla ölçülen büyüklüğüne redoks potansiyeli denir.

Redoks çiftine ait potansiyel ölçülürken elektrot yüzeyinde net akımın sıfır olduğu, net bir tepkime veya değişimin gözlenmediği ölçüm durumu söz konusudur. Redoks potansiyeli, çözelti içerisindeki redoks çiftinin, oranları ve derişimleriyle orantılı olduğu ölçüm elektrotu ile bir referans elektrot arasındaki potansiyel farkın incelendiği bir elektrokimyasal hücreyle ölçülür.

2.7.1. ORP tanımı ve kullanım alanı

Açılımı yükseltgenme indirgenme potansiyeli olan ORP, referans elektrot olarak standart hidrojen elektrotun (SHE) kullanılarak çözeltinin inert bir elektrot yüzeyinde ölçülen dengelenme potansiyelidir. ORP, redoks tepkimelerinde yer alan kimyasal türlere, bunların çözeltideki derişimlerine, sıcaklığa ve ortamın toplam iyonik şiddetine (iyonik iletkenliğine) bağlıdır.

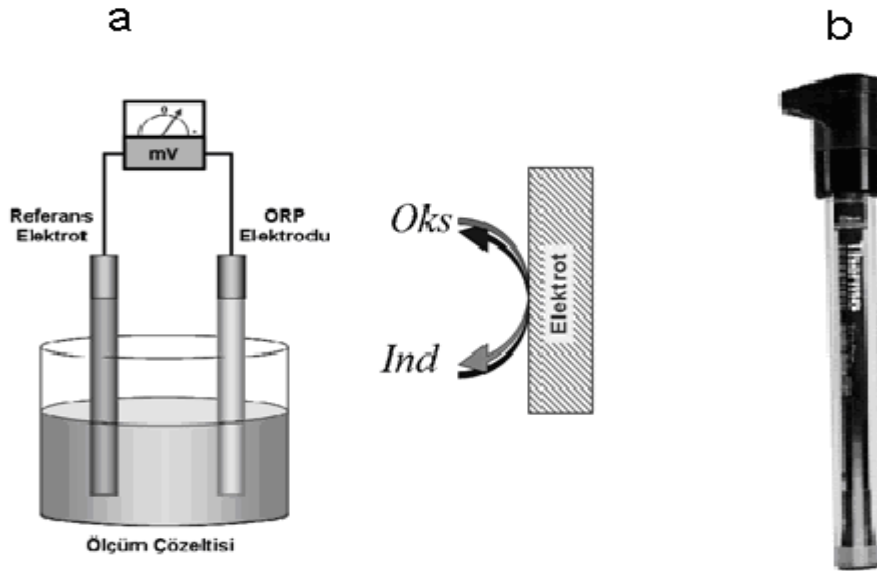
ORP ölçümü, endüstriyel süreçlerin kontrolünde kullanılabilir pH kadar önemli ve kolay ölçülebilir bir parametre olmasına karşın, çok iyi bilinmemekte ve yeterince yararlanılmamaktadır. Endüstriyel süreçlerde;

- Kimyasal proseslerde tepkime ortamında eksilen kimyasal maddelerin izlenmesi ve verim/üretim kaybına yol açmadan eklenmesinin sağlanması,
- Üretim kalitesinin sürekliliğinin izlenmesi,

- İşletme donanımında korozyon ve tabakalaşma gibi sorunların erken farkına varılması, buna bağlı olarak ürün kirlenmesi veya iş kazalarının önlenmesi,
- Atık su niteliklerinin belirlenmesi ve boşaltma (deşarj) sınırlarına uygunluğunun denetlenmesi gibiamaçlarla çok yararlı uygulamaları olabilmektedir.

2.7.2. ORP elektrotunun yapısı ve özellikleri

ORP için; Pt gibi inert bir elektrot ile, elektrot yüzeyinde oluşan arayüzün potansiyeli ölçülür. Ölçüm elektrotu üzerinde, yükseltgen ve indirgen türler arasında meydana gelen elektron geçişine bağlı olarak elektrot yüzeyinde bir gerilim farklılığı oluşacaktır. Redoks potansiyeli ölçümü, pH ölçümünün yapıldığı gibi ölçüm elektrotu ve referans elektrottan oluşan bir hücre yardımıyla gerçekleştirilir.



Şekil 2.14. Redoks potansiyelinin ölçüldüğü elektrokimyasal hücre(a) Kombine ORP elektrotu(b)

ORP ölçümünde; pH metre olarak da kullanılabilen bir potansiyometrik mV ölçer ve çoğunlukla ölçüm elektrotu ile referans elektrotun aynı gövdede birleştirilmiş hali olan kombine redoks elektrotundan yararlanır. Bir ORP ölçüm elektrotunun hem çözelti bileşenleriyle tepkime vermemesi, hem de çözeltide denge üzerinde katalitik bir etkiye sahip olmaması gerekir. Bu özelliklere uygun olarak ORP elektrotları çoğunlukla altın ve platin elementlerinden hazırlanır.

2.7.3. ORP elektrotunun kalibrasyonu

ORP ölçüm elektrotunun kalibrasyonunda elektrot, katalog numarası bilinen standart ORP çözeltilerine daldırılır ve ölçümün yapıldığı sıcaklık dikkate alınarak mutlak değer veya standart hidrojen elektrotuna (E_H) karşılık gelen değer ayarlanarak kalibrasyon işlemi gerçekleştirilir. ORP elektrotunun kalibrasyonu için birkaç redoks tamponu kullanılabilir. Referans elektrotun doldurma çözeltisinin bileşimine göre de, ölçülen büyüklükler değişebilmektedir. Bu kalibrasyon çözeltileri içindeki redoks elektrotunun denge akım yoğunluğu yüksektir ve redoks potansiyel yanıtı hızlı ve tekrarlanabilir.

Çizelge 2.4. Farklı sıcaklıklardaki standart ORP değerleri

Sıcaklık ($^{\circ}C$)	E_H Değeri (mV)	Katalog numarası 900011 olan doldurma çözeltisiyle mutlak değer (mV)	Katalog numarası 900001 olan doldurma çözeltisiyle mutlak değer (mV)
0	438	218	176
5	435	218	176
10	431	219	175
15	428	219	175
20	424	219	174
25	420	220	173
30	415	220	172
35	411	220	171
40	406	220	170
45	401	220	169
50	396	220	167

SHE, kullanımı çok zahmetli bir elektrot olduğu için, ORP ölçümünde çoğunlukla Ag/AgCl gibi kolay kullanılabilir referans elektrotlar kullanılmaktadır. Ancak ölçülen değerler düzeltilerek veya doğrudan ölçüm sisteminin kalibrasyonu, sanki SHE ile ölçüm yapılmışçasına potansiyel değerleri kaydedilerek yapılır.

2.8. Voltametrik Yöntemler

Elektroanalitik kimya, elektrokimyasal yöntemlerin ve düzeneklerin, analiz amacıyla kullanılması konularını ve tekniklerini kapsar. Bu teknikler çoğunlukla nicel analiz amaçlı olup nitel analiz amaçlı kullanımları çok nadirdir. Çünkü ölçüm sistemlerinden alınan sinyaller elektriksel büyüklükler olup, çoğunlukla kimyasal türe özgü değildir.

Elektroanalitik yöntemler, pH ölçümü kadar basit ve sıradan olabildiği gibi, özel uzmanlık bilgisi isteyen karmaşık yöntemlere kadar çok değişik ve spektroeletrokimya gibi birleştirilmiş tekniklere kadar geniş bir yelpazeye sahiptir. Bu tekniklerden doğrudan analiz amacıyla yararlanılabileceği gibi, diğer analiz cihazlarında ölçüm basamağı (dedeksiyon) amaçlı olarak da kullanılabilir. Özellikle sıvı kromatografi cihazının en duyarlı dedektörlerinden birisi amperometrik/voltametrik temelde çalışmaktadır.

Voltametri, potansiyeli programlı ve düzenli bir şekilde değiştirilen, çalışma elektrotundan geçen akımın potansiyele karşı grafiğe geçirildiği bir tekniktir. Üç elektrotlu elektrokimyasal hücrelerde uygulanır. Elde edilen eğrilere voltamogram denir.

Voltametrde;

- Çalışma elektrotunun potansiyelini kontrol üzere bir potansiyostat,
- Potansiyelin programlı bir şekilde değiştirilmesini sağlayan bir elektriksel gerilim ve/veya sinyal üretici (günümüzde çoğu elektrokimyasal sistemde bu ünite bilgisayar yazılımı ve/veya potansiyostat ile kombine edilmiş ve tek bir ünite haline getirilmiştir),
- Üç elektrotlu elektrokimyasal hücre, WE, RE ve YE
- Kısa sürede geçen akımların neden olduğu polarizasyonu önlemek ve çözelti direncini düşürmek amacıyla destek elektroliti kullanılır.

2.8.1. Voltametrizde gerekli elektrotlar

2.8.1.1. Çalışma elektrotu

n-tipi veya p-n tipi iletkenlik gösteren elektrotlardır. Çalışma elektrotları üzerinde uygun potansiyel değişim programı uygulanarak ön görülen tepkime için yeterli potansiyel büyüklüğüne erişildiğinde tepkimeye giren maddenin miktarına ilişkin akım büyüklüğünün ölçüldüğü elektrotur. Çalışılan potansiyel aralığında yüzeyinin oksitlenmemesi, akım karakteristiklerinin değişmemesi istenir. Değişen her potansiyel değerinde akım okuması yapılırken, çalışma elektrotu yüzeyinin temiz olmasının sağlayacağı üstünlük göz önüne alınarak bir kapiler ucundan düzenli aralıklarla sürekli damlayan bir civa elektrot geliştirilmiştir. Damlayan civa elektrot (DME) kullanılarak uygulanan voltametrik tekniğe polarografi adı verilir. Civa damlalarının saf ve temiz olması, damlamanın aynı hızda ve aynı büyüklüğe ulaştıktan sonra kopması önemlidir. Voltametrizde DME dışında; Pt, Au, Ag, Pd ve civa gibi metalik, grafit, GCE gibi karbon temelli veya modifiye yüzeyli çalışma elektrotları kullanılabilir.



Şekil 2.15. Voltametri çalışma elektrotu.

2.8.1.2. Yardımcı elektrot

Referans elektrot üzerinden geçen akımın yol açtığı sorunlardan kurtulmak amacıyla üç elektrotlu hücrede çalışma elektrotunun zıt yönünde akım geçirilmesi için yararlanılan, tamamlayıcı tepkimenin yürüdüğü elektrotur. Yardımcı elektrot ortamın bozucu kimyasal bileşenlerinin herhangi bir etkisi olmayacak şekilde Pt gibi inert bir malzemedir, çalışma elektroduna göre çok daha büyük yüzey gösterecek şekilde yapılmıştır. Genel olarak çalışma elektrotu ile arasında düzgün bir elektriksel alan

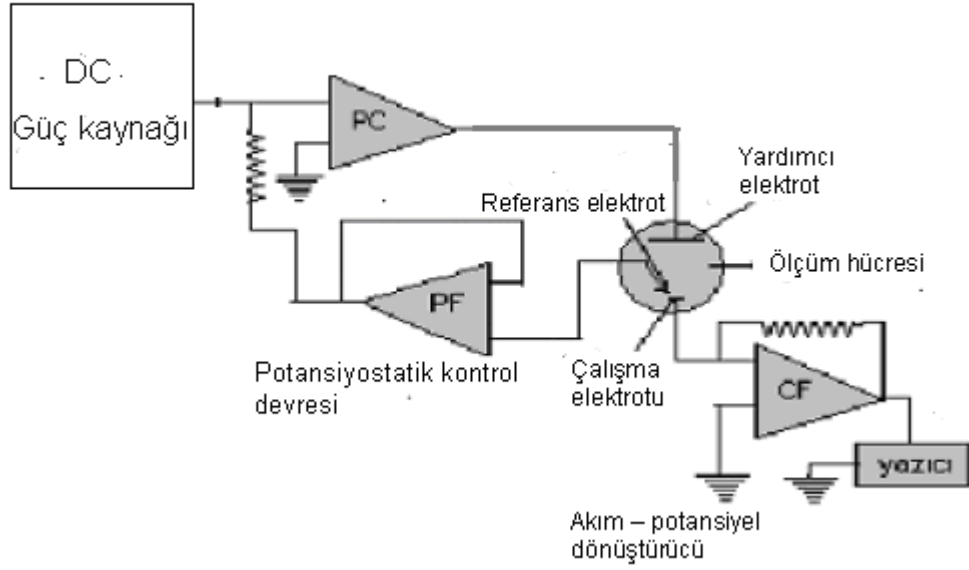
oluşması istendiğinden düz yüzeyli olması, önemli olan durumlarda çalışma elektrotunun yüzeyine paralel olarak yerleşmesi istenir.

2.8.1.3. Referans elektrot

Referans elektrotlar, potansiyeli daldırıldığı ortamın bileşiminden bağımsız olarak sabit olan, temas potansiyeli küçük ve sızdırma özelliği az olan, ideal polarize olmayan, yani üzerinden akım geçse bile potansiyeli değişmeyen karşılaştırma elektrotudur. Çalışma sıcaklığındaki potansiyeli biliniyor olmalıdır. En çok kullanılan referans elektrotlar standart hidrojen elektrotu (SHE), gümüş/gümüş klorür elektrotu (Ag/AgCl) ve doymun kalomel elektrottur (DKE).

2.8.2. Potansiyostat çalışma ilkesi

Potansiyostat, çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot arasında akım geçişini sağlayarak, kontrollü bir şekilde referans elektrot ile çalışma elektrotu arasındaki potansiyel farkını ölçen elektronik aygıttır. Şekil 2.16'da görüldüğü gibi işlem yükselteçler üç elektrotlu potansiyostat yapımında kullanılır. Akım – ölçme devresi, hücrenin çalışma elektrotuna bağlanmıştır. Çalışma elektrotunun potansiyeli referans elektrota karşı kontrol edilirken, bu potansiyeli sağlamak üzere çalışma elektrotu ile yardımcı elektrot arasından geçirilen akım büyüklüğü ölçülür. İşlem yükselticide, çalışma elektrotunun potansiyelinde istenen değer ile ölçülen değer arasındaki fark büyütülerek, gerekli akım değişikliği bir PC kontrol sistemi sayesinde sağlanır. Referans elektrottan akım geçmemesi için giriş kısmında seri bağlı büyük bir empedans bulunur. Modern potansiyostatlarda otomatik IR kompanzasyon seçeneği de bulunmaktadır.



Şekil 2.16. Bir potansiyostatın şematik gösterimi

2.8.3. Destek elektroliti

Destek elektroliti, elektroaktif maddeye oranla daha derişik olan ve elektrotla tepkimeye girmeyen, yeterli çözünürlüğe sahip tuzlar olabildiği gibi istenen pH koşullarını da sağlamak üzere asitler, bazlar ve tampon çözeltiler de bu amaçla kullanılabilirler. Destek elektrolitinin iki temel işlevinden birisi çalışma çözeltilisinin iletkenliğini arttırarak direncini düşürmek, diğer ise derişim polarizasyonunu önleyerek, elektrotlarda yürüyecek tepkimelerin oluşmasına veya potansiyel kaymalarına neden oluşturmasını engel olmaktır. Yüksek akım çekilen veya susuz ortam gibi direnci yüksek çözeltilerde, hızlı potansiyel tarama hızlarında önemi artar.

2.8.4. Voltametricde akım ölçümü

Uygulanan potansiyelde çalışma elektrotundan geçen toplam akım büyüklüğünün iki farklı bileşeni vardır:

Faradayik akım: Elektrot – çözelti ara yüzeyinde elektron aktarımı sonucu oluşan akımdır. İlk anda elektrot yüzeyinde tepkime verecek iyon fazla olduğunda akım hızla artar. Sonra difüzyonla yüklü tanecikler geleceği için akım değeri küçülür. Elektrot

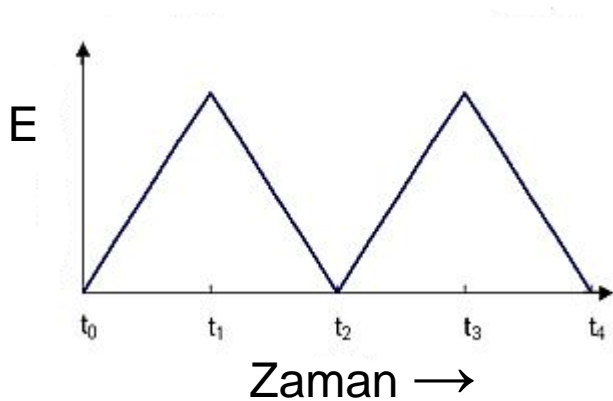
yakınındaki bölgede iyonlar azaldığı için faradayik akım küçülür. Sistemle ilgili termodinamik veya kinetik bilgilerin elde edildiği akımdır.

Kapasitif akım: Uygulanan potansiyel sonucunda elektrot – çözelti ara yüzeyinde yük birikmesi sonucunda ortaya çıkan yüklenme akımıdır. Hızlıdır ama sürekli değildir. Uygulanan gerilim faradayik akımın geçmesi için yetersiz büyüklükte bile olsa kapasitif akım oluşur. Elektrot yüzey alanının büyüklüğü, çözelti direncinin artması, potansiyel değiştirme hızı veya puls yüksekliğinin artması kapasitif akımı büyültür. Ölçülen akım içerisinde kapasitif akımın ihmal edilebilir düzeyde olması istenir.

Tez kapsamında yararlanılan, voltametriye yaygın olarak kullanılan uyarma sinyallerinden ve bu uyarma sinyallerinin sonucunda sisteme özgü akım cevabının olduğu çeşitli elektrokimyasal yöntemlerden aşağıda kısaca değinilmiştir.

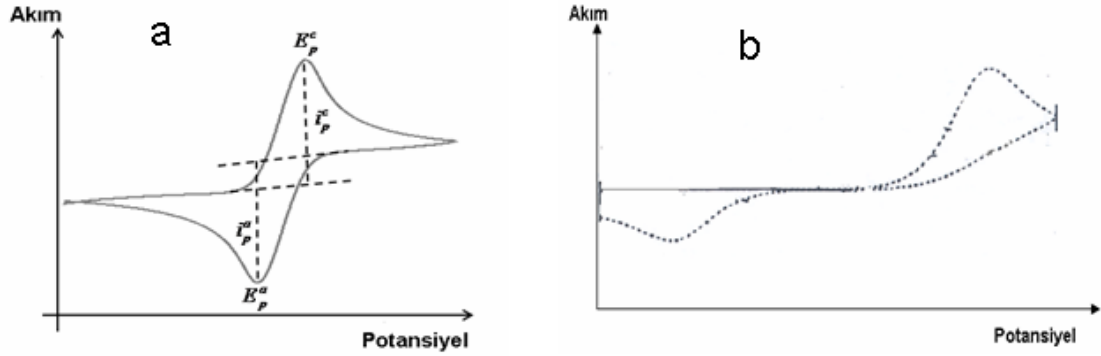
2.8.5. Çevrimsel voltametri (CV)

Çalışma elektrotunun potansiyeli bir referans elektrota karşı, belirlenen iki potansiyel sınırı arasında anodik ve katodik yönlerde ardı ardına aynı potansiyel tarama hızıyla değiştirilirken, potansiyele karşı üzerinden geçen akımın incelendiği tekniğe çevrimsel voltametri denir. Potansiyel taramasına sınır değerlerden veya dengeleme potansiyelinden başlanabilir. E_{ilk} genel olarak akım geçmeyen bir potansiyel olarak seçilmelidir. Katodik veya anodik yönde potansiyel taraması yapılması deneycinin yaklaşımına ve beklentisine göre değişir.



Şekil 2.17. Çevrimsel voltametriye uygulanan potansiyel programı

Tersinirliğe karar verebilmek için geniş bir potansiyel hızı değiştirme aralığında çalışılmalıdır. Çevrimsel voltametri tersinirlik tanısal testlerinde $\Delta E_p = |E_{Pa} - E_{Pc}| = 59/n$ mV, anodik ve katodik pik akımlarının büyüklükleri eşittir. Akım büyüklüğü tarama hızının karekökü ile doğru orantılı olarak artar. E_p değeri tarama hızından bağımsızdır.



Şekil 2.18. Tersinir(a) Tersinmez(b) bir sistemin CV voltamogramı

Tersinmez sistemlerde elektron aktarım tepkimesi yüzeyde yeterince hızlı olmadığı için tepkimeye girme hızı yavaşlar. Derişim profili daha az diktir ya da tepkime ters yönde yürümüyordur. Potansiyel taramasının ters yönünde pik olma zorunluluğu yoktur. Eğer varsa da $\Delta E_p = |E_{Pa} - E_{Pc}| > 59/n$ mV olur. Tersinmez sistemlerde elektron aktarım tepkimesine eşlik eden hızlı bir kimyasal tepkime varsa bu tepkimeye ilişkin kinetik veriler elde edilebilir.

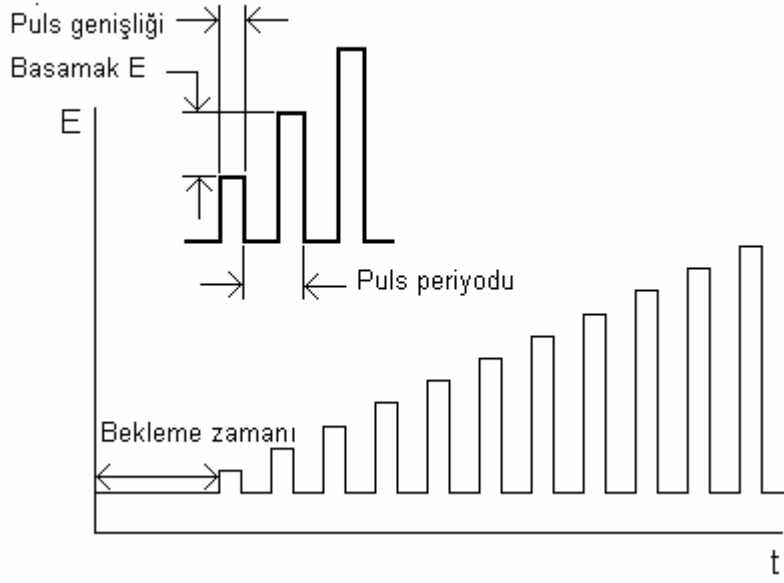
Çevrimsel voltametri tekniği ile elektrokimyasal tepkimelerin tersinirliği gibi özelliklerin incelenmesinin yanı sıra elde edilen voltamogramlarla karasız türlerin termodinamik ve kinetik özellikleri belirlenebilir. Çevrimsel voltametri tekniğinin nicel amaçlarla kullanımı seyrek olmasına rağmen elektrokimyasal tepkimeler hakkında nitel bilgiler elde edilmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Elektrot mekanizmalarının incelenmesinde, adsorpsiyon olaylarının araştırılmasında ve kinetik çalışmalarda CV tekniği çok kullanışlıdır (Bard ve Faulkner 2001).

2.8.6. Puls voltametri

Doğrusal taramalı potansiyel tekniklerindeki en önemli sınırlama kapasitif akımların sürekliliği ve ölçülen akımla içerisindeki paylarının ihmal edilebilir seviyeye düşmemesidir. Bu nedenle duyarlık genellikle $10^{-5}M$ ile sınırlıdır. Kapasitif akımlar tarama hızının birinci kuvvetiyle arttığı için çok yüksek potansiyel tarama hızlarıyla çalışmamızı da kısıtlar. Kapasitif akımların neden olduğu sınırlamalar ve belirsizliği azaltmak için; daha düşük tarama hızları ile çalışılır, destek elektroliti kullanılır, doğrusal taramalı potansiyel yerine puls teknikleri kullanılarak kapasitif akımların toplam ölçülen akım içindeki payı küçültülür. Doğrusal taramalı voltametrimin uygulanmasındaki pek çok sınırlama, puls yöntemlerinin gelişmesiyle ortadan kalkmıştır. Pulsu voltametrik yöntemlerin hepsinin temelinde uygulanan potansiyelin sonrasında kapasitif akımların hızla düşeceği periyot sonrası akım okunarak ölçülen akım içerisinde kapasitif akım payının çok küçük olmasını sağlamak yatar (Bard ve Faulkner 2001). Böylece voltamogram üzerinden okunan toplam akım büyük ölçüde faradayik akımdan oluşacak, dolayısıyla elektroaktif türün derişimi ile doğru orantılı olacaktır. Puls teknikleri üç temel çeşide ayrılır.

2.8.6.1. Normal puls voltametri (NPV)

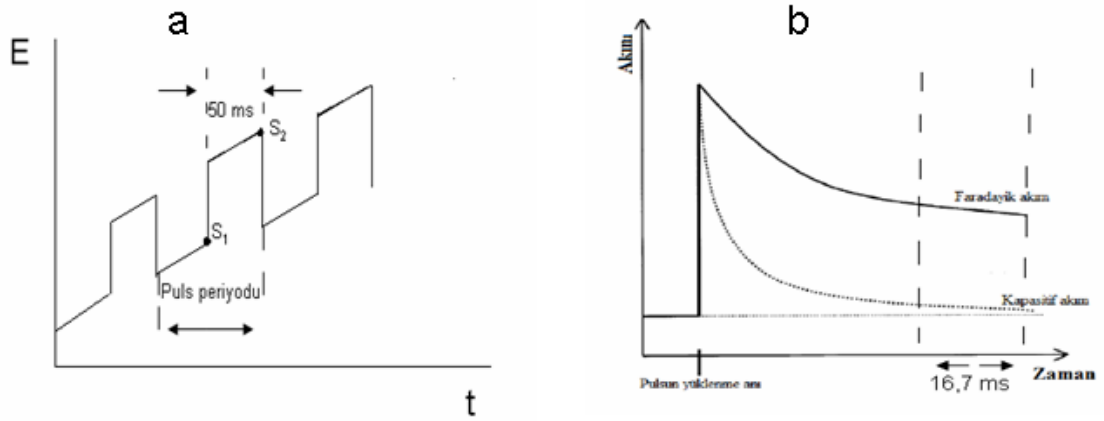
NPV tekniğinde çalışma elektrotuna giderek artan puls basamakları uygulanır. NPV’de potansiyel basamakları sistemin dengede kalmasını zorlaştıracak şekilde giderek büyümekte ve artan puls basamakları uygulanırken; tarama hızını, puls periyodu ve puls basamağı belirler. Bu teknik elektrot üzerinde kalıcı hasarlar bırakabilir. Yüksek potansiyel uygulanması tekrarlanabilirliği engeller. Bu sorunlardan kaçınmak için diferansiyel puls tekniği geliştirilmiştir.



Şekil 2.19. NPV’ de uygulanan potansiyel programı

2.8.6.2. Diferansiyel puls voltametri (DPV)

Sinyal, doğrusal bir potansiyel artışı üzerine sabit büyüklükteki periyodik pulslar eklenerek oluşturulur. Uyarma sinyali periyodunun son 50 ms’si içinde küçük bir puls uygulanır. Dönüşümlü olarak iki akım ölçümü yapılır. Bunlardan birincisi, pulsun uygulanmasından 16,7 ms önce (S_1); diğeri pulsun bitiminden 16,7 ms önce (S_2) yapılır. Kapasitif akımın en düşük değerde olduğu bu süre boyunca akımlar arasındaki fark alınır. Bu iki akım arasındaki fark, ΔI_{puls} olarak verilir. Sonunda uygulanan potansiyele karşı bu akım farklarının grafiğe geçirilmesiyle diferansiyel puls voltamogramları elde edilir. Elde edilen diferansiyel eğri, pik şeklinde olup pikin yüksekliği derişimle doğru orantılıdır. NPV tekniğine göre her bir analitin piki bir birinden kolayca ayrılabilirdiği için tek bir voltamogramla pek çok analit belirlenebilir. Diğeri bir üstün tarafı gözlenebilme sınırı, klasik voltametrimin sınırlarından 100 – 1000 kat daha düşük olup $10^{-7} - 10^{-8}$ M aralığındadır (Bard ve Faulkner 2001).

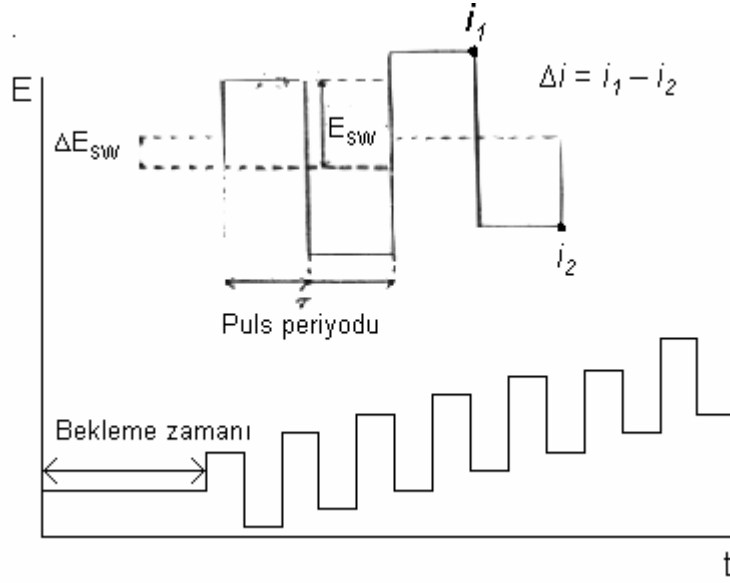


Şekil 2.20. DPV’de uygulanan potansiyel program(a) Pulsun yükleme anında meydana gelen akımların zamana bağlı olarak değişimi(b)

2.8.6.3. Kare dalga voltametri (SWV)

Çalışma elektrotuna uygulanan potansiyel, basamak tipi sinyal programıyla sabit büyüklükteki periyodik pulsların toplanmasıyla elde edilir ve simetrik kare dalgaları şeklindedir. Diferansiyel puls tekniğidir ve küçük basamaklar şeklinde potansiyel artışı söz konusudur. Her bir kare dalga döngüsü boyunca, ileri yöndeki pulsun sonunda ve geri yöndeki pulsun sonunda olmak üzere akım iki kez ölçülür. Voltamogramları elde etmek için derişimle doğru orantılı olan bu akımların farkı (Δi) grafiğe geçirilir. Pik potansiyeli voltametrik yarı – dalga potansiyeline karşılık gelir.

SWV, diğer puls tekniklerine oranla 100 kata kadar hızlı ve daha kısa sürede sonuç veren bir tekniktir. Uygulanan potansiyel programıyla toplam akım içindeki kapasitif akım değeri minimuma indirilerek 1 V/s veya daha hızlı potansiyel tarama hızları kullanılabilir. Tarama hızını kare puls frekansı(f) ve basamak yüksekliği(ΔE_{SW}) belirler. Kullanılan kare puls frekansı 1 – 120 Hz kadardır. Frekansın artması periyodun kısılması ve tarama hızının artması demektir. Ancak frekansın artırılması tepkime hızı ile sınırlıdır (Bard ve Faulkner 2001).



Şekil 2.21. SWV’de uygulanan potansiyel programı

2.8.7. Sıyırma voltametrisi

Tayin sınırı ve duyarlık açısından elektroanalitik tekniklerin en duyarlı olanıdır. Bu tekniğin uygulanması sırasında ilk aşama olan elektrot yüzeyinde; fiziksel, kimyasal veya elektrokimyasal yöntemle biriktirme basamağı, bir ön deriştirme basamağı olarak işlev kazanır, çok eser bileşenlerin analizinde bu basamak daha uzun tutulabilir. Biriktirme sürecinden önce elektrotun koşullandırılması süreci sonrasında ise dengelenme süreci vardır. Daha sonra uygun bir elektriksel alan veya kimyasal etki ile biriken bileşenin yüzeyden uzaklaştırılması sırasında geçen akım veya süre ölçülür. Toplama (biriktirme) potansiyelinden başlanarak anodik yönde potansiyel değiştirilerek elektrot yüzeyindeki birikimin yükseltgenmesine ilişkin akım değerleri ölçülecek olurda anodik sıyırma voltametrisi (ASV), katodik yönde potansiyel değişimi ile indirgenme akım değerleri ölçülecek olursa katodik sıyırma voltametrisi (CSV) adını alır. Sıyırma potansiyel programı pulslu veya doğrusal olabilmektedir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Kimyasal Maddeler ve Ekipmanlar

Analitik saflıkta kimyasal maddeler çalışmada kullanılmıştır. Kullanılan ekipmanlar; potansiyostat(Epsilon model BAS marka) , hücre standı (BAS C3 marka), 2 mm çaplı platin elektrot (CHI 102 kodlu Inc marka) , 3,5 mm çaplı camlı karbon elektrot (CHI 104 kodlu Inc marka) , 3 M NaCl içeren Ag/AgCl referans elektrot(BAS MF 2052 model) , platin tel yardımcı elektrot, jel elektroliti ile doldurulmuş platin redoks elektrodu (Orion 9179BNMD marka), pH – mv ölçer (Thermo Scientific Orion 4 Star marka pH – ISE metre) , spektrofotometre (HITACHI I – 3900 H model), kuartz UV küvetleri (Hellma Qs model) , hassas terazi (SHIMADZU A4W220 model) , dijital kronometre (TOPPA marka), ultra saf su üretme cihazı (Human copration marka, Zeneer Power 1 model) , ısıtıcı ve manyetik karıştırıcı (Wise Stir MSH-20D) ve mikro pipetler(Eppendorf) kullanılan başlıca ekipmanlardır.

3.2. Örnek Temini

Deneylerde kullanılan bitkisel materyaller; karadut(*Morus nigra L.*), beyaz dut(*Morus alba L.*), incir(*Ficus carica L.*), ceviz(*Juglans regia L.*), ayva(*Cydonia oblonga Mill.*), kestane(*Castanea sativa Mill.*) ve nar (*Punica granatum L.*) yaprak örnekleri, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü araştırma serası ve meyve bahçesinden, Bahçe Bitkileri Bölümünün yetkilileri tarafından gösterilen ağaçlardan, farklı ağaçların güneş alma açısından farklı yönlerinden ve dallarından temiz ve hasarsız yapraklar, örneğin tamamını temsil edecek şekilde seçilerek, elle teker teker toplanarak paketlenmiştir. Bu şekilde yabani türler ile örnekleme olumsuz etkilerden kaçınılmış ve ağaç türünü en iyi temsil edecek örnekleme yapmaya özen gösterilmiş oldu.

3.3.Örneklerin Analize Hazırlanması

Temin edilen yapraklar saplarından ayıklandıktan sonra oda koşullarında güneş ışığını doğrudan görmeyecek şekilde bir haftalık süreyle kurutuldu. Yüzeyleri dikkatle incelenerek çürüyen veya kararmış-yaralı kısımları özenle temizlendikten sonra mutfak

tipi öğütücü (blender) kullanılarak orta hızlara karşı gelecek şekilde 7 ayarında yaklaşık 2,5 dakika boyunca öğütülerek ince toz haline getirildi. Daha sonra örnekler 30 dakika boyunca elek açıklıkları 600 µm, 355 µm ve 150 µm olan bir dizi elekten geçirilerek üç elekli bir boyutlandırma sisteminde elendi. 150 µm`lik elek üzerinde kalan öğütülmüş yaprak örnekleri tartıldı ve kap içerisine alınarak ağzı parafilm ile kapatılarak buzdolabında +5 °C`de muhafaza edildi.

3.4. Özütleme

Çalışılan bitki türlerinin özütlenmesine ilişkin işlemlerin aynı şartlar altında yapılması karşılaştırmalar yapılması açısından büyük önem taşımaktadır. Bundan dolayı taneciklerin miktarı ve tanecik boyutu, dolayısıyla etkin yüzey alanına dikkat edilmelidir.

İstenen elek aralığından alınmış 0,300 g kurutulmuş yaprak örneği tozu 75 mL ultra saf su ile 1 saat boyunca magnetik karıştırıcıda 500 rpm`de oda sıcaklığında karıştırılarak özütlendi. Bitki özütleri daha sonra Millipore millex AP 20 tipi enjektör uçlu mikro filtreden süzülerek analize hazır hale getirildi.

3.5. Spektroskopik İncelemeler

UV-VIS Spektroskopisi ile antioksidan kapasite tayininde kullanılan referans bir yöntem olan Cuprac yöntemi ve gümüş nanopartikül (AgNP) oluşumunu karakterize etmek için yaklaşık 430 nm dalga boyunda ortaya çıkan yüzey plazmon pikinin zamanla değişimine ilişkin çalışmalar yapıldı.

3.5.1. CUPRAC yöntemi

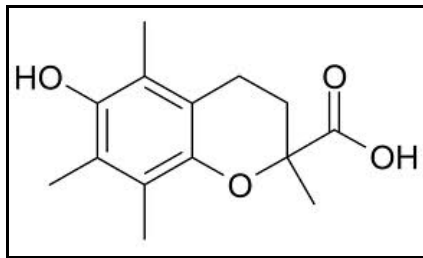
CUPRAC yöntemi bitki özütleri, insan serumu gibi doğal biyolojik örneklerde toplam antioksidan kapasite tayini için geliştirilmiş, antioksidanlar tarafından Cu^{2+} iyonunun Cu^+ iyonuna indirgenmesi ve 2,9-dimetil-1,10- fenantrolin (Neokuproin \equiv Nc) ile verdiği komplekse ilişkin soğurum pikinin zamanla değişiminin belirlenmesi ve sonucun troloks eşdeğeri (TEAC) olarak verilmesine dayanır (Apak ve ark. .2004). Bu yöntem için bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL $1,0 \times 10^{-2} M$ Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL 1 M

amonyum asetat tamponu (pH 7), 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi ilave edildi. Yaprak özütünün iki ayrı derişimi ile çalışılması hedeflendiği için 3 mL olan bu çözeltinin üzerine ayrı ayrı 0,2 mL özüt + 0,9 mL saf su, diğer çalışmada ise 0,3 mL özüt + 0,8 mL saf su eklenerek son hacimleri 4,1 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda, aynı şekilde hazırlanmış ama yaprak özütü yerine doğrudan 1,1 mL saf su kullanılmış referans çözeltiliye karşı 450 nm dalga boyundaki absorbansları ölçüldü.

Çalışmamızda kullanılan iki ayrı seyreltme oranı için bulunan değerlerin sonuçları ayrı ayrı hesaplanarak bulunan antioksidan kapasite değerlerinin ortalamaları değerlendirildi. Absorbans ölçümlerinden önce, her iki ışın yoluna saf su konularak zemin düzeltmesi (baseline) alımına özen gösterildi.

3.5.1.1 CUPRAC yönteminin standardizasyonu ve kalibrasyonu

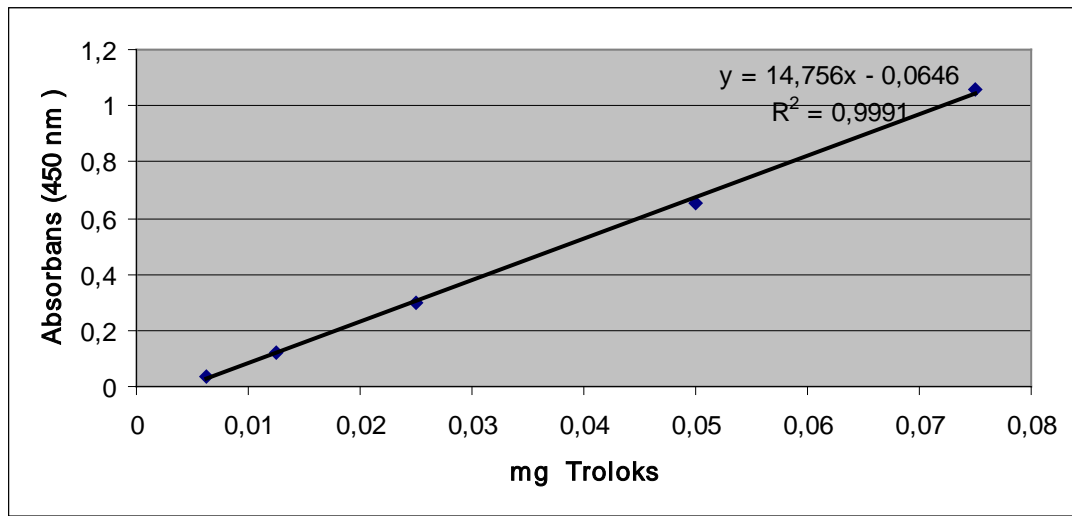
Kullanılan yöntemin uygulaması sırasında istenen doğruluğun sağlandığını görmek için kalibrasyon grafiği hazırlanarak sonuçlar troloks ($C_{14}H_{18}O_4$) eşdeğeri olarak belirtildi. Troloks E vitamininin suda çözülebilir bir analogudur. Oksidatif stresi azaltmak için biyolojik uygulamalarda kullanılır ve E vitamini gibi bir antioksidandır. CUPRAC, ORAC ve FRAP gibi antioksidan kapasite ölçümü yöntemlerinde standart olarak kullanılır ve sonuçlar troloks eşdeğeri olarak ifade edilir.



Şekil 3.1. Troloks

Yöntemin standardizasyonu ve kalibrasyonu için 1×10^{-3} M standart troloks çözeltisi hazırlanıp bir seri seyreltilmesi yardımıyla, ölçümlerin derişimle doğrusal orantılı ve

literatürle uyumluluğu, dolayısıyla ölçüm şartlarının ve deney prosedürü uygulamasının uygunluğu gösterilmiştir. Standart troloks çözeltisinden sırasıyla 25 µL, 50 µL, 100µL, 200µL ve 300µL alınarak yöntem için belirlenen diğer reaktiflerle birlikte son hacim 4,1 mL olacak şekilde karıştırılarak 30 dakika sonra referans çözeltiye karşı 450 nm` deki absorbans değerleri ölçüldü. Troloks çözeltisinden alınan hacimlere eşdeğer mg troloks değerleri hesaplandı ve bu değerlere karşı ölçülen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizildi. Yüksek bir korelasyon katsayısı ile doğrusal bir çalışma grafiği elde edildiği Şekil 3.2`de gösterildi.



Şekil 3.2. CUPRAC yöntemi ile elde edilen kalibrasyon grafiği

3.5.1.2 Örneklerin CUPRAC yöntemiyle antioksidan kapasitelerinin ölçülmesi

Kalibrasyon grafiği yardımıyla her bir bitki özütü, okunan A^{450} değerine karşılık gelen mg troloks / gr kuru yaprak kütlesi birimiyle troloks eşdeğeri olarak ifade edildi. Aşağıdaki Çizelge 3.1` de elde edilen ortalama sonuçlar toplu halde sunulmaktadır.

Çizelge 3.1. CUPRAC Yöntemiyle Troloks eşdeğeri olarak 0,2 mL ve 0,3 mL yaprak özütleri için elde edilen sonuçlar ve ortalama CUPRAC_{TEAC} değerleri

	0,2 mL özüt →1,1 mL için mg TE/gr kuru bitki	0,3 mL özüt →1,1 mL içinmg TE/gr kuru bitki	Ortalama CUPRAC _{TEAC} değerleri mg TE/gr kuru bitki
Nar	770,0	736,3	753,1
Ayva	183,7	185,8	184,8
Kestane	148,5	148,3	148,4
İncir	78,7	74,2	76,4
Ceviz	66,2	65,0	65,6
Karadut	37,0	39,2	38,1
Beyaz dut	36,5	35,0	35,8

3.5.2. Nanopartiküllerin spektroskopik incelenmesi ve karakterizasyonu

3.5.2.1. Ag – nano partiküllerin oluşturulması

İndirgen maddelerin sulu çözeltilerinden Ag⁺ iyonlarını indirgeyerek biyosentez yoluyla Ag nano partiküllerin (AgNP) oluşumuna yol açtıkları ve yaklaşık olarak 430 nm de absorbandsayol açtıkları bilinmektedir (Filippo ve ark. 2009, Dipenkar ve Murugan 2012). Tepkime ortamının ışık alma derecesinin AgNP oluşumu ve hızı üzerine etkili olduğu öndenemelerle belirlenmiş olduğu için, nano partiküllerin oluşturulduğu tepkime kabının standart ışık alan koşullarda bekletilerek gerçekleştirilmesi, kontrol edilemeyen çevre ışıklarının engellenmesi amacıyla bir ışık odacığı tasarlandı. Bunun için Şekil 3.3'de gösterildiği gibi 12x12x20 cm boyutlarında kare prizma şeklinde tasarlanan ve iç yüzeyi yansıma gibi belirsizlik etkilerinin oluşmaması için tamamen siyah kaplanan bir kutunun üst kısmına megaman(4U107İ) model 7 W gücünde ve 295 lümenlik ışık şiddetine sahip ekonomik beyaz flüoresans ışığı olan bir ampul ve açma kapama anahtarı yerleştirilmiştir. Tasarlanan kutu tabanına kuvartz küvetin aynı şekilde ve dik olarak yerleştirilebilmesi için örnek kabı koyma bölmesi yapılmıştır. Örnek kabı üst yüzeyi ile ışık kaynağı arasındaki mesafe 11 cm olarak ölçülmüştür. Yavaş AgNP oluşum hızlarının söz konusu olduğu çalışmalarda, örneğin ışık kaynağına daha yakın olarak yerleştirilerek hızlandırma amacıyla ~ 5 cm yüksekliğinde siyah zeminli bir

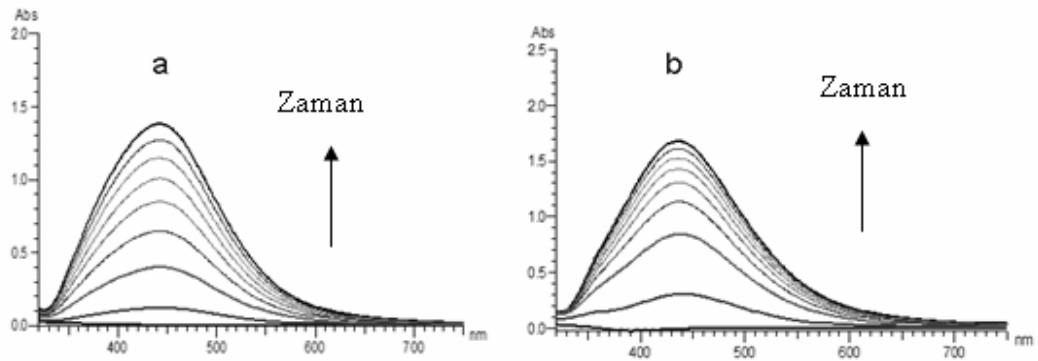
yükselti basamağı da hazırlandı ve gerekli durumlarda üzerine örnek yerleştirmek amacıyla kullanıldı.



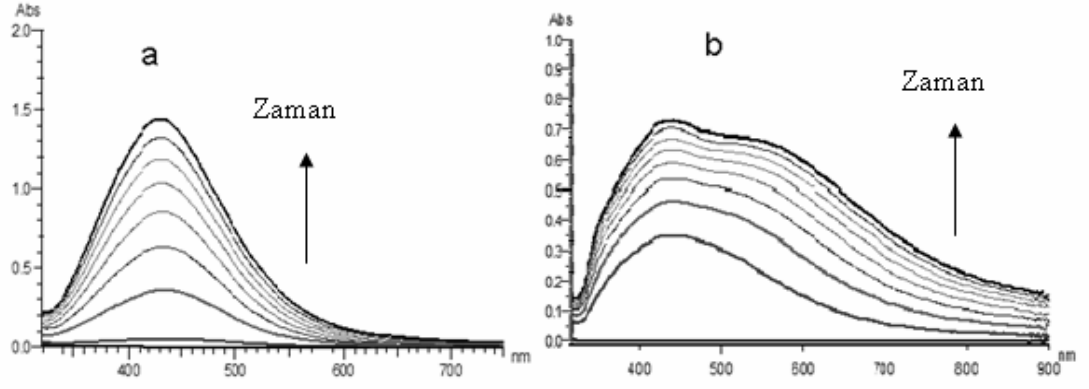
Şekil 3.3. AgNP oluşumu üzerine tasarlanan ışık odacığı

3.5.2.2. AgNP oluşumunun spektroskopik olarak izlenmesi

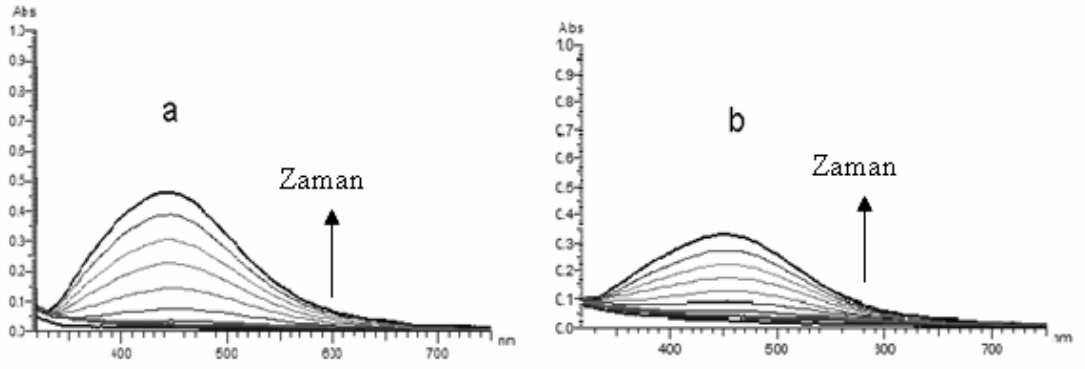
Deneyde 0,5 mL $5,0 \times 10^{-3}$ M AgNO_3 çözeltisinin üzerine hazırlanan yaprak özütünden 0,5 mL ve saf sudan 1 mL alınarak doğrudan kuvartz spektrofotometre küveti içinde hazırlanan karışımın Ag-nanotanecek oluşum kinetiğini incelemek amacıyla 15 dakikalık sürelerle ışık odacığında bekletilip bu sürelerin sonunda önceden baseline alınmış koşullarda 900 ile 200 nm' ler arasında spektrumları alındı.



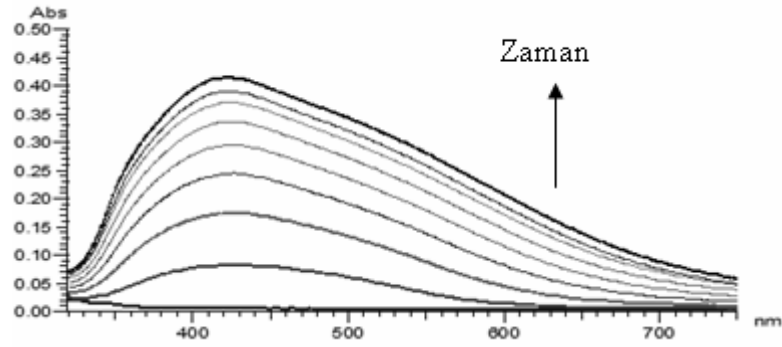
Şekil 3.4. Ceviz (a) ve İncir (b) yaprağı özütlerinden AgNP eldesine ilişkin spektrumlar (Spektrumlar 15 dakika aralıklarla 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120. dakika sonunda alınmıştır)



Şekil 3.5. Ayva (a) Kestane (b) yaprağı özütlerinden AgNP eldesine ilişkin spektrumlar (Spektrumlar 15 dakika aralıklarla 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120. dakika sonunda alınmıştır)



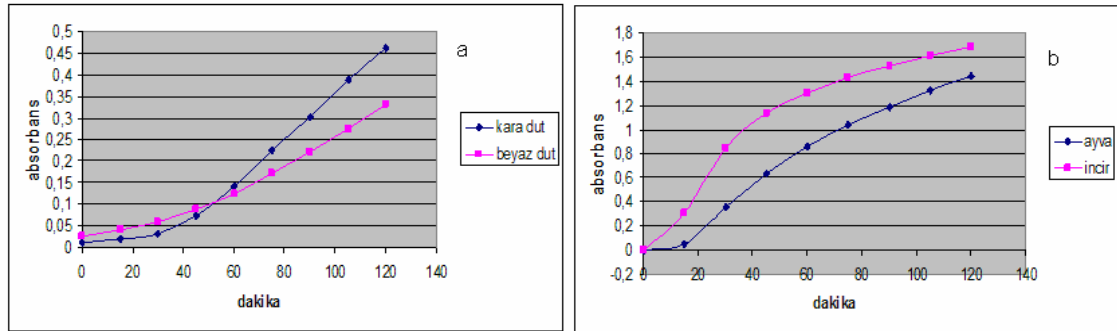
Şekil 3.6. Karadut (a) Beyaz dut (b) yaprağı özütlerinden AgNP eldesine ilişkin spektrumlar (Spektrumlar 15 dakika aralıklarla 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120. dakika sonunda alınmıştır)



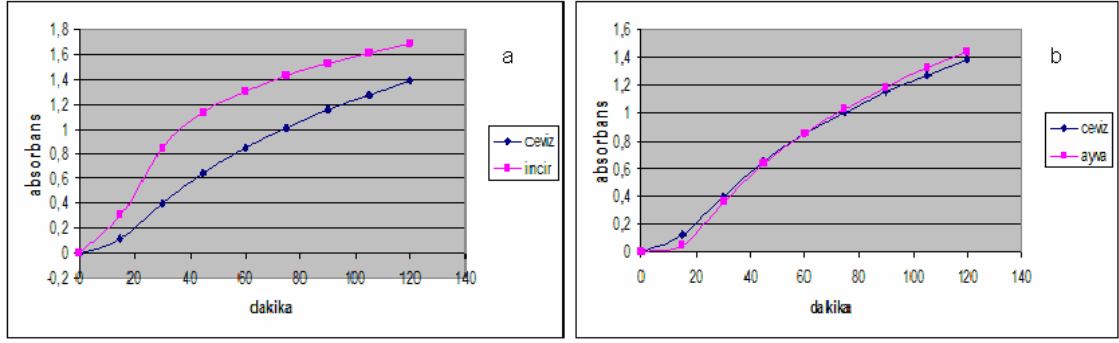
Şekil 3.7. Nar yaprağı özütünden (1/10 oranında seyreltilmiş) AgNP eldesine ilişkin spektrum (Spektrum 15 dakika aralıklarla 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 ve 120. dakika sonunda alınmıştır)

3.5.2.3. Farklı özüt örnekleriyle yapılan çalışmalar ve spektrumların alan hesabı

Özüt örnekleriyle yapılan çalışmalarda, 120 dakika boyunca oluşan nanopartiküllerin yüzey plazmon rezonans enerjileri, oluşan optik etkileşimlerinin spektrumları yardımıyla, UV-VIS spektrofotometre ile maksimum soğurum (absorbans) değerleri (yaklaşık 430 nm de) ölçülerek ışınlama süresine karşı grafiğe geçirildi.



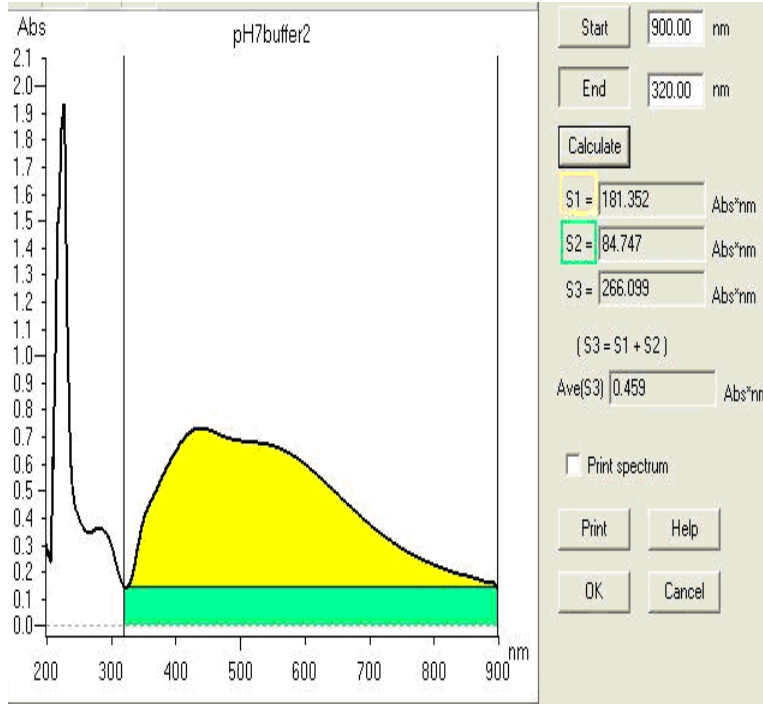
Şekil 3.8. a) Karadut ve beyaz dut b) Ayva ve incir yaprağı özütlerinin 15 dakika aralıklarla ölçülen maksimum absorbans değerlerinin 120. dakika sonundaki değişimi



Şekil 3.9. a) Ceviz ve incir b) Ceviz ve ayva yaprağı özütlerinin 15 dakika aralıklarla ölçülen maksimum absorbans değerlerinin 120. dakika sonundaki değişimi

Yaprak özütleri kullanılarak biyosentez yoluyla Ag nanopartiküllerin oluşumunun incelendiği literatür çalışmalarında taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edilen sonuçlarda Ag nanopartiküllerin farklı boyutlarda oluştuğu ve spektrumların, farklı boyutlarda oluşan nanopartiküllerin bir Gauss eğrisiyle dağılım gösterdikleri görülmüştür (Song ve Kim 2009).

Yapmış olduğumuz çalışmada 120 dakika sonunda elde edilen spektrumların maksimum absorbans değeri, sentezlenen aynı boyuttaki nanopartiküllerin miktarıyla orantılı olduğu için karşılaştırmalarda kullanılmıştır. Bunun yanında 750 – 320 nm dalga boyu aralığında farklı boyutlarda nanopartikül oluşumu göz önüne alındığında spektrumların alanlarının hesaplanmasıyla elde edilen sonuçların antioksidan kapasiteyle ilişkilendirilebileceği öngörülmüştür.



Yaprak Özütü	A x nm
Nar	1041,900
Ayva	215,363
Kestane	266,099
İncir	261,119
Ceviz	214,532
Karadut	79,196
Beyaz dut	62,455

Şekil 3.10. Kestane yaprağı özütü için 120. dakika sonunda elde edilen spektrumun alan hesaplamasının gösterimi ve diğer yaprak özütleri için elde edilen sonuçlar

Kestane yaprağı özütü için yapılan alan hesaplaması diğer yaprak özütleri içinde hesaplanarak sonuçlar A x nm birimiyle ifade edildi.

3.6. ORP Ölçümleri

3.6.1. ORP ölçüm sisteminin kurulması ve kalibrasyonu

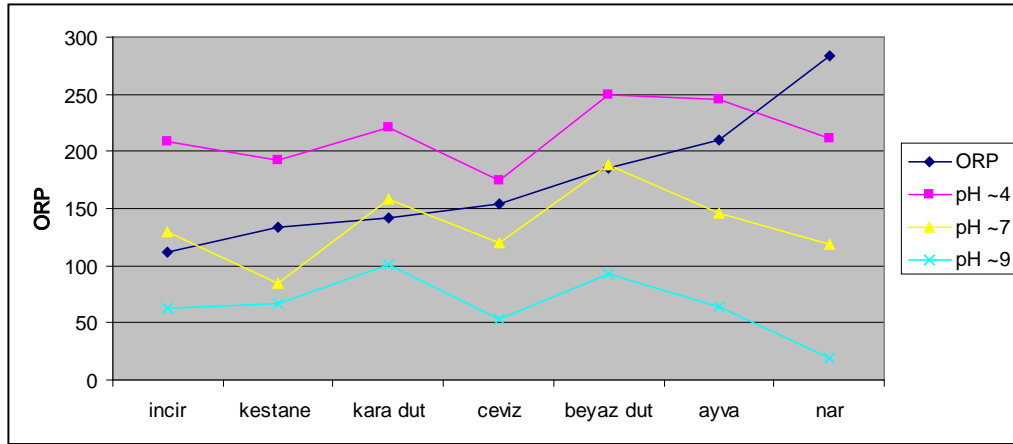
Bitki özütlerinin redoks potansiyellerinin ölçümü için Orion(Thermo) marka 9179BNMD model jel elektrolitli kombine platin redoks elektrotu kullanıldı. Redoks potansiyelleri ölçümü için mevcut pH metre mV skalasına alınarak kullanıldı. Ölçümler, Orion 967901 standart ORP kalibrasyon çözeltisi kullanılarak standardize edildi. Bu amaçla; elektrot standart kalibrasyon çözeltisine daldırılarak, ölçüm sıcaklığına karşılık gelen E_H (mV) değeri ayarlandı, ORP ölçümleri öncesi, her seferinde bu kalibrasyon tekrarlanarak kontrol edildi. Kalibrasyon işleminden sonra elektrot yüzeyi ultra saf su ile temizlendikten sonra temiz bir havlu kağıt ile kurularak ayrı ayrı bitki özütlerine daldırılarak ORP değerleri ölçüldü.

3.6.2. Örneklerin asidik nötral ve bazik pH koşullarında ORP ölçümleri

Hazırlanan çözeltilerin istenen pH değerlerinde ORP değerlerinin ölçülmesi amacıyla, önceden pH 4,1 ve 7,00 tamponları ile kalibrasyonu yapılmış pH metre kullanıldı. Örnek çözeltilerin pH değerlerini yaklaşık 4,0 yapmak için 0,1 M HCl çözeltisi, pH 7,0 yapmak için 0,4 M $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ tamponu, pH değerini yaklaşık 9,0 yapmak için 0,1 M NaOH çözeltilerinden yararlandı. Yapılan eklemelerin matris bozucu veya belirgin seyreltici etkilerinden kaçınmak düşüncesiyle, istenen pH değerine $\pm 0,05$ olması yeterli sayıldı. Her bir yaprak özütünden 2 mL alınarak asidik, nötral ve bazik koşullardaki ORP değerleri mV olarak ölçüldü.

Çizelge 3.2. Her bir yaprak özütünün pH ~4, pH ~7 ve pH ~9 olduğu durumdaki ölçülen ORP değerleri

	ORP(mV)	pH ~4(mV)	pH ~7(mV)	pH ~9(mV)
incir	111,2	209,2	129,2	63,3
kestane	133,1	192,5	84,7	66,2
kara dut	142,1	220,8	157,6	100,3
ceviz	154,3	174,6	120,0	53,3
beyaz dut	186,1	249,4	188,4	93,2
ayva	209,5	245,9	145,6	64,7
nar	284,2	212,0	118,1	18,8



Şekil 3.11. Her bir yaprak özütünün pH ~4, pH ~7 ve pH ~9 olduğu durumdaki ölçülen ORP değerlerinin değişimi

3.7. Voltametrik Çalışmalar

Voltametri çalışmalarımızda yaklaşık 25 mL çözelti alabilen BASi MR-1208 tipi orijinal pyreks hücreler kullanılmıştır. Kullanılmış olan hücrelerin temizlenmesine özen gösterilmiş, 1:1 oranında seyreltilmiş HNO_3 'te bir gece bekletildikten sonra saf su ile çalkalanmış ve etüvde kurutulmuşlardır. Yardımcı elektrot olarak kullanılan Pt tel (BAS MW-1032) çalışma sonlarında aynı çözeltide 10 saniye kadar tutularak temizlenmesi sağlanmıştır.

Referans elektrot olarak BAS RE-5B model 3 M NaCl elektroliti içeren tek bir Ag/AgCl elektrot çalışma boyunca kullanılmış, zaman zaman elektrot potansiyeli standart testlerle kontrol edilmiştir.

Çalışma elektrotu olarak CH Instruments CHI104 camı karbon elektrot ve CHI102 platin elektrot kullanılmıştır. Elektrot yüzeyleri voltametrik çalışmalar öncesinde BASi PK4 ve CH Instrument CHI120 Polishing Kit içindeki parlatma pedi ve CHI Gamma Alumina tozu ($0,05 \mu\text{m Al}_2\text{O}_3$) ile aşındırılarak parlatılmış, ultra saf su ile çalkalanarak hava bırakmayan bir kağıt yardımıyla kurulanmıştır. Tüm voltametrik denemeler boyunca tek bir GCE ve Pt elektrottan yararlanılmıştır. Bu durum özellikle GCE elektrotların tekrarlanır ve karşılaştırılabilir sonuçlar vermesi açısından önemsenmiştir.

Voltametrik çalışmalarda destek elektroliti ve pH kararlılığı sağlayıcı olarak önce 1 M Mamonyum asetat (pH 7) tamponu, daha sonra 0,1 M asetat tamponu (pH 4,5) ve son olarak 0,4 M fosfat ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) tamponu (pH 7) kullanılmıştır. Ceviz özütü ile yapılan kapsamlı incelemelerde, asitlendirilmiş örnekler yerine fosfat tamponunun daha uygun koşullar sağladığı görüldüğü için diğer yaprak özütleri ile yapılan voltametrik çalışmalarda yalnızca 0,4 M fosfat (pH 7) tamponu kullanılarak, sonuçların karşılaştırılabilir olmasına özen gösterilmiştir.

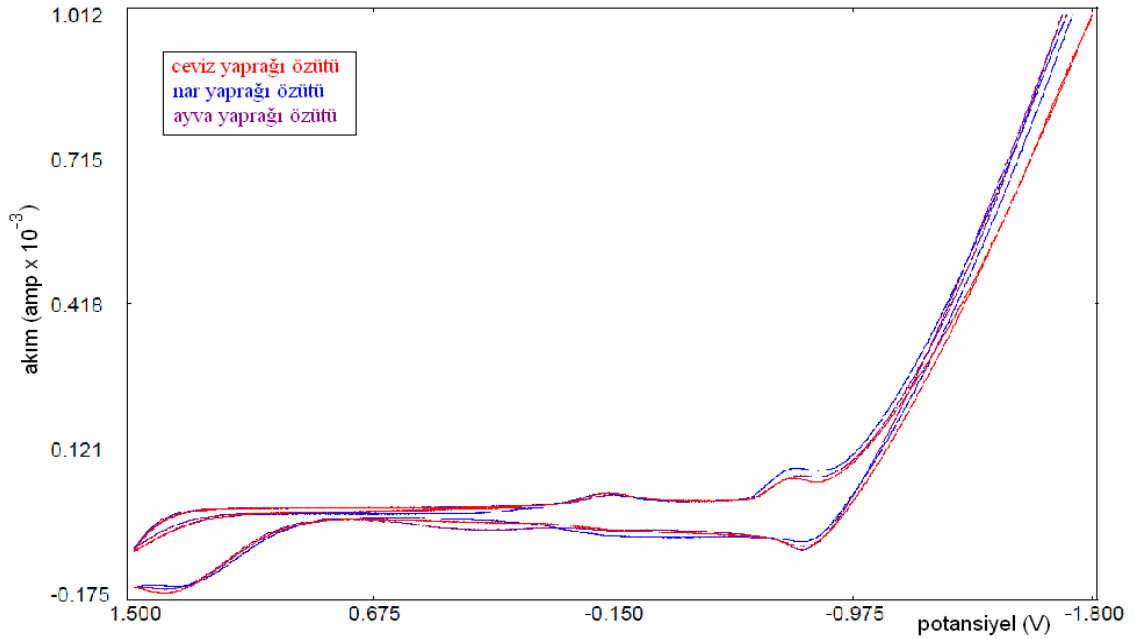
3.7.1. Çevrimsel voltametri çalışmaları

Çevrimsel Voltametri için destek elektrolitinin kararlı olduğu potansiyel sınırları içerisinde kalmaya özen gösterilerek; önce $E_{\text{rest}} / -1,8 \text{ V}$ aralığında, sonra $+1,5/ -1,8 \text{ V}$ aralığında olmak üzere ve katodik yönde başlanarak çevrimsel voltamogramlar alındı.

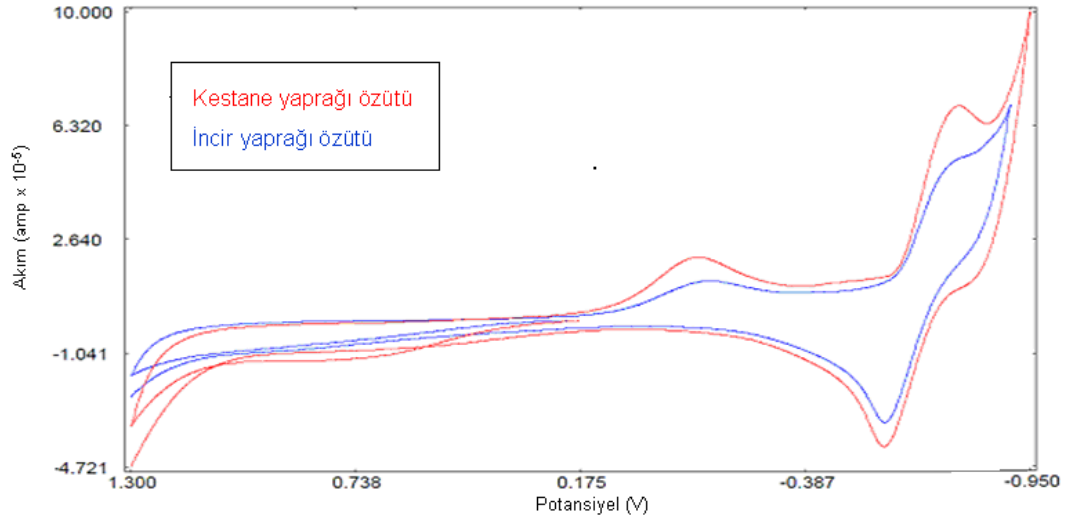
Anodik yönde başlanarak yapılan çevrimsel voltametri çalışmalarında önce $E_{rest} / + 1,5$ V aralığı, sonra $-1,8$ V / $+1,5$ aralığı denendi. Böylelikle, ilk tarama yönünün ve başlangıç potansiyelinin voltamogram üzerinde etkisi olup olmadığı belirlenmeye çalışıldı. Örneğin yapısında bulunan maddelerin indirgen davranışları, yükseltgenme piklerinin tersinir veya yarı tersinir olup olmadıkları belirlenmeye çalışıldı.

3.7.1.1. Platin elektrot ile yapılan çevrimsel voltametri çalışmaları

Destek elektroliti ve platin elektrotun izin verdiği sınırlar içerisinde uygun potansiyel programıyla her bir yaprak özütü için 14 mL ve 1 mL 0,4 M pH 7 fosfat ($H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}$) tamponuyla 100 mV/s tarama hızıyla çevrimsel voltamogramlar alındı. Çalışma, iyi tekrarlanabilirliğin elde edilebilmesi için en az iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 3.12. ve 3.13' te gösterilmiştir.



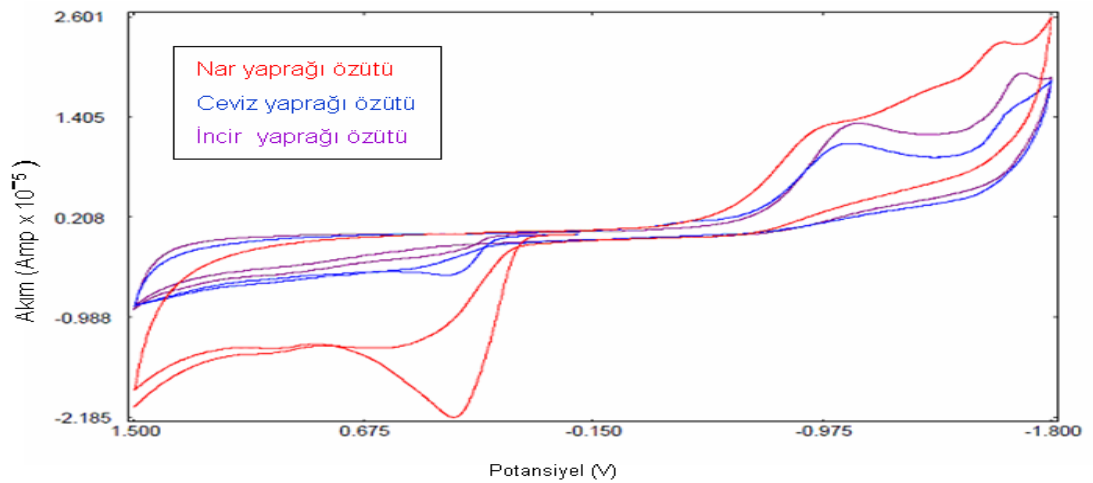
Şekil 3.12. pH 7 fosfat tamponunda platin elektrotta nar ayva ve ceviz yaprağı özütlerinin anodik yöndeki CV eğrileri



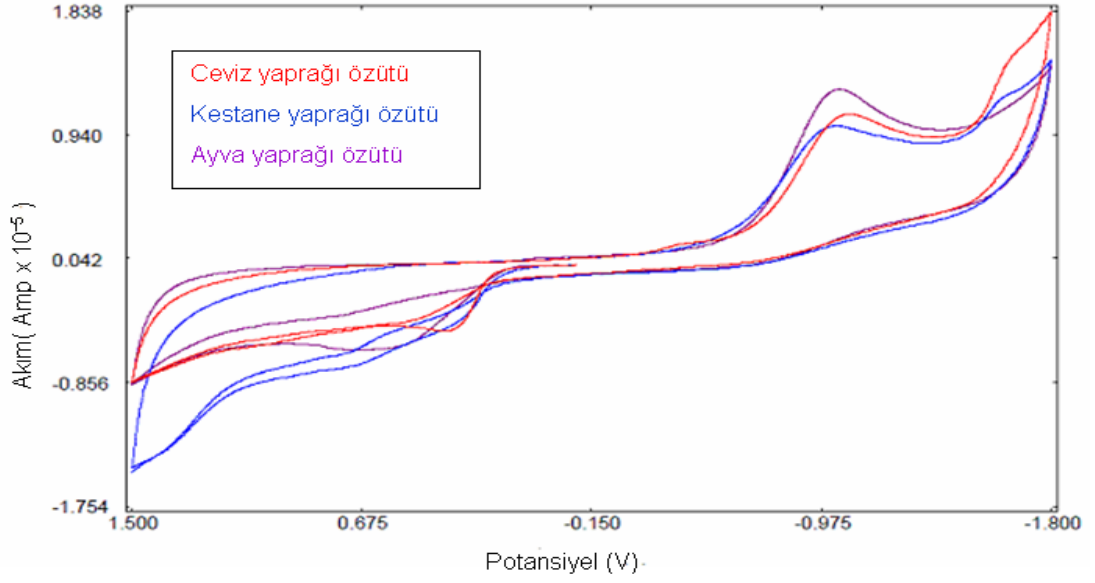
Şekil 3.13. pH 7 fosfat tamponunda platin elektrotta kestane ve incir yaprağı özütlerinin anodik yöndeki CV eğrileri

3.7.1.2. GCE ile yapılan çevrimsel voltametri çalışmaları

Destek elektroliti ve camsi karbon elektrotun izin verdiği sınırlar içerisinde uygun potansiyel programıyla her bir yaprak özütü için 14 mL ve 1 mL 0,4 M pH 7 fosfat ($\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$) tamponuyla 100 mV/s tarama hızıyla çevrimsel voltamogramlar alındı. Çalışma, iyi tekrarlanabilirliğin elde edilebilmesi için en az iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen voltamogramlar şekil 3.14. ve 3.15' de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.14. pH 7 fosfat tamponunda GCE'de nar, ceviz ve incir yaprağı özütlerinin anodik yöndeki CV eğrileri



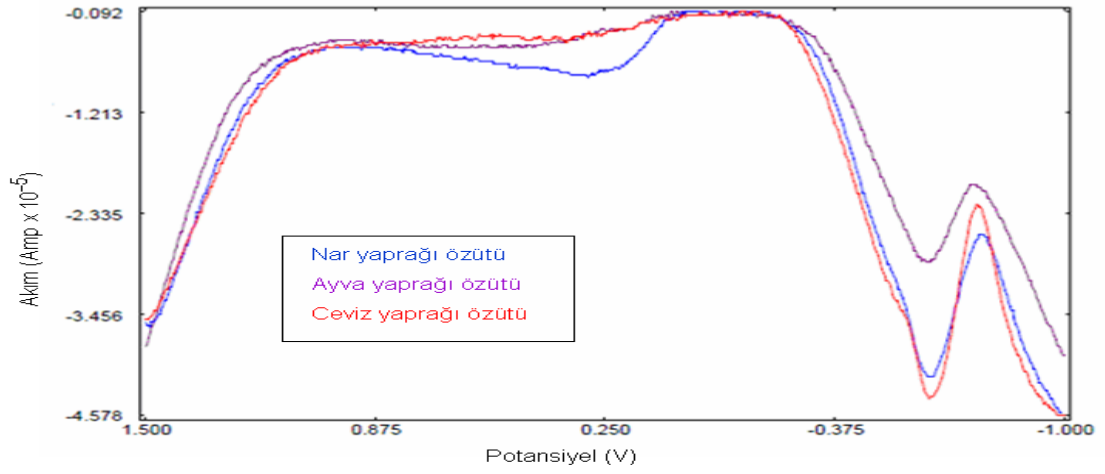
Şekil 3.15. pH 7 fosfat tamponunda GCE’deceviz, kestane ve ayva yaprağıözütlerinin anodik yöndeki CV eğrileri

3.7.2. Kare dalga voltametri çalışmaları

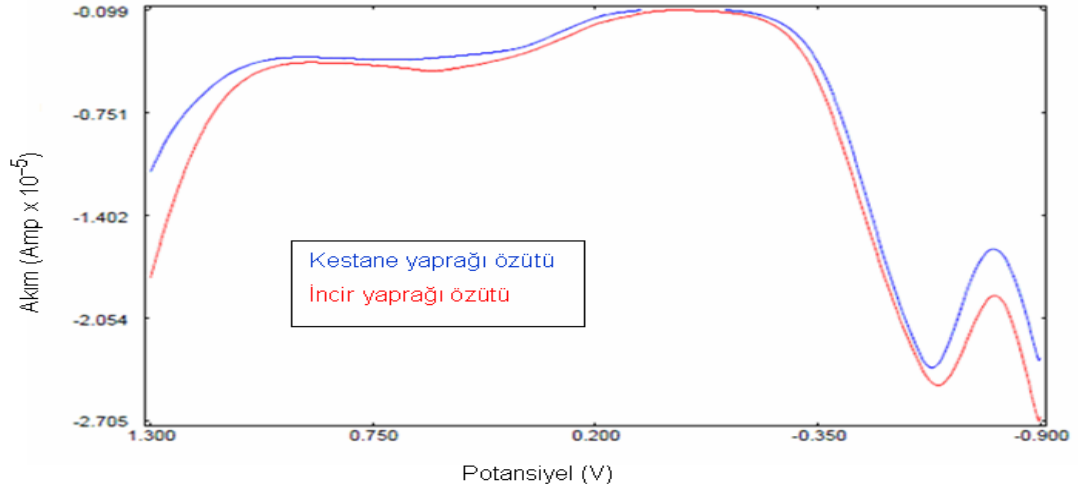
Yaprak özütlerinden 14 mL ve 0,4 M pH 7 fosfat ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) tamponundan 1 mL alınarak oda sıcaklığında ölçümler gerçekleştirildi. Voltamogramların alınmasında uygulanan potansiyel programında; Basamaklı adım yüksekliği E_{step} 4 mV, kare puls frekansı 15 Hz, kare dalga genliği E_{sw} 25 mV olacak şekilde ayarlanarak anodik yönde 0 V/ 1,5 V, - 0,5 V/ 1,5 V ve - 1 V/ 1,5 V aralıklarında; katodik yönde 0 V/- 1,8 V, 0,5 V/- 1,8 V ve 1 V/- 1,8 V aralıklarında olmak üzere kare dalga voltamogramları alındı.

3.7.2.1 Platin elektrot ile yapılan kare dalga voltametri çalışmaları

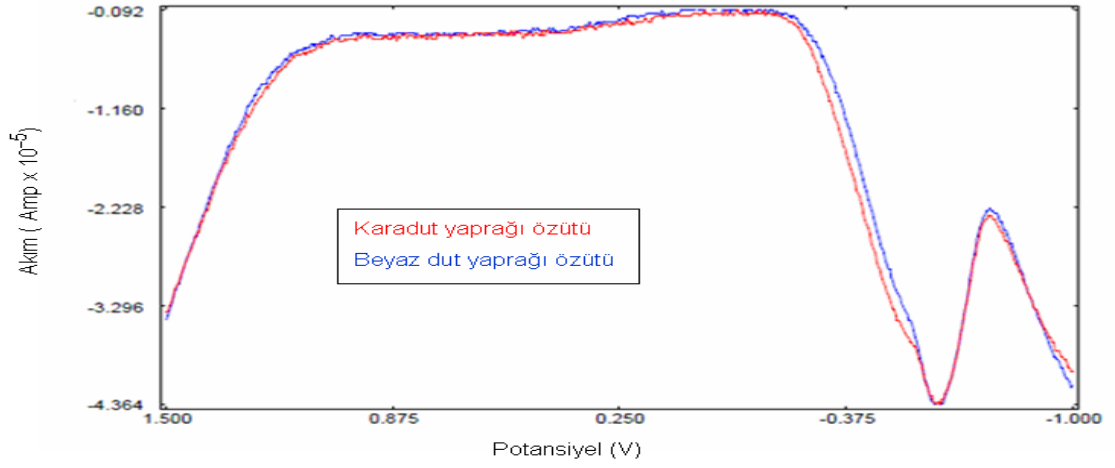
Destek elektroliti ve platin elektrotun izin verdiği sınırlar içerisinde uygun potansiyel programıyla her bir yaprak özütü için yapılan çalışmalarda basamaklı adım yüksekliği E_{step} , kare puls frekansı ve dalga genliği aynı olacak şekilde voltamogramlar alınmıştır. Çalışma, iyi tekrarlanabilirliğin elde edilebilmesi için en az iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen voltamogramlar şekil 3.16. 3.17. ve 3.18’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.16. pH 7 fosfat tamponunda platin elektrotla nar, ayva ve ceviz yaprağıözütlerinin anodik yöndeki SWV eğrileri



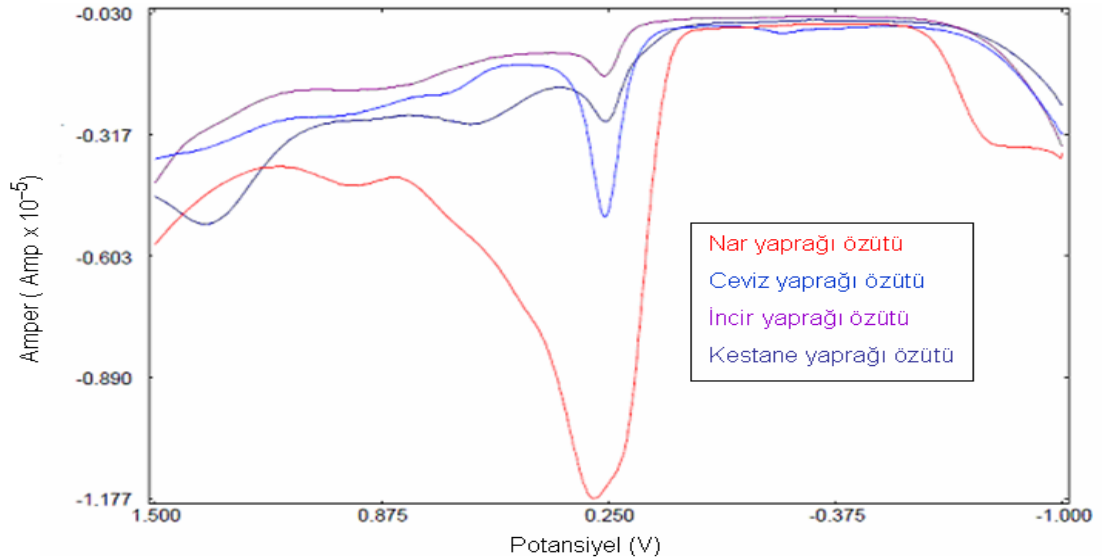
Şekil 3.17. pH 7 fosfat tamponunda platin elektrotla kestane ve incir yaprağı özütlerinin anodik yöndeki SWV eğrileri



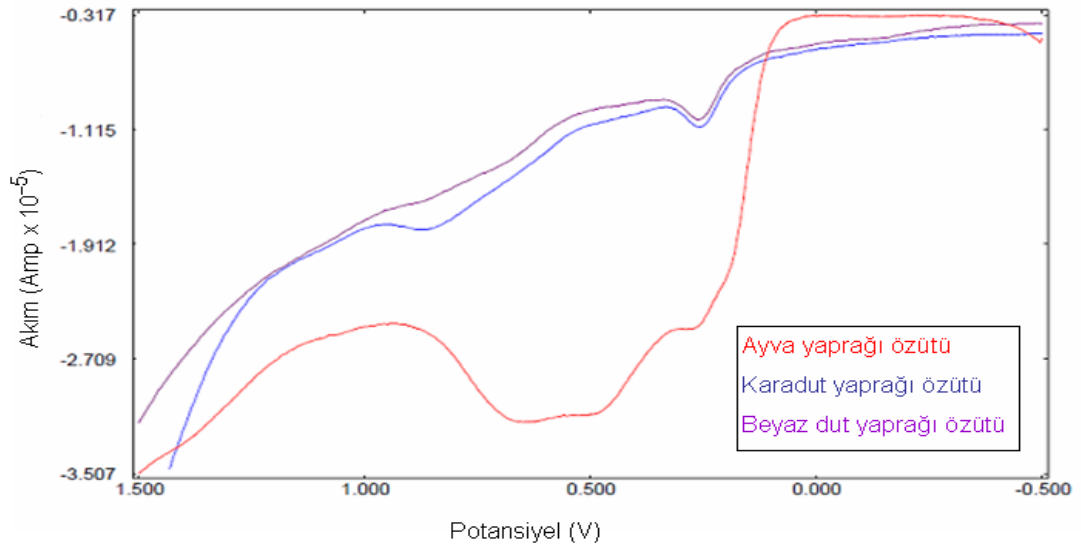
Şekil 3.18. pH 7 fosfat tamponunda platin elektrotla karadut ve beyaz dut yaprağı özütlüğü için anodik yöndeki SWV eğrileri

3.7.2.2. GCE ile yapılan kare dalga voltametri çalışmaları

Destek elektroliti ve camsi karbon elektrotun izin verdiği sınırlar içerisinde uygun potansiyel programıyla her bir yaprak özütlüğü için yapılan çalışmalarda basamaklı adım yüksekliği E_{step} kare puls frekansı ve dalga genliği aynı olacak şekilde voltamogramlar alınmıştır. Çalışma, iyi tekrarlanabilirliğin elde edilebilmesi için en az iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 3.19 ve 3.20’de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.19. pH 7 fosfat tamponunda nar, ceviz, kestane ve incir yaprağı özütlüğü için GCE’de anodik yöndeki SWV eğrileri



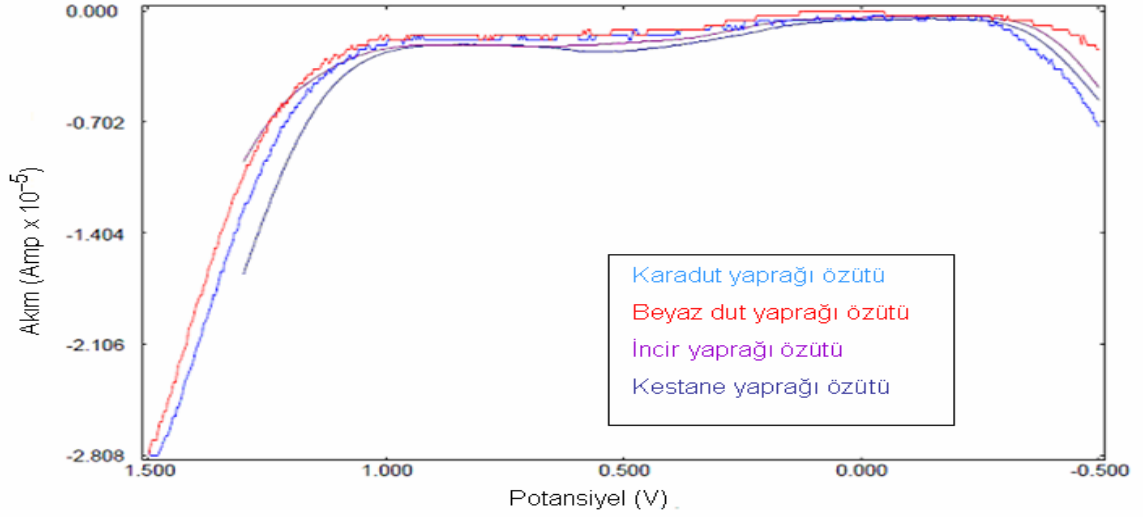
Şekil 3.20. pH 7 fosfat tamponunda ayva, karadut ve beyaz dut yaprağı özütlerinin GCE’de anodik yöndeki SWV eğrileri

3.7.3. Diferansiyel puls voltametri çalışmaları

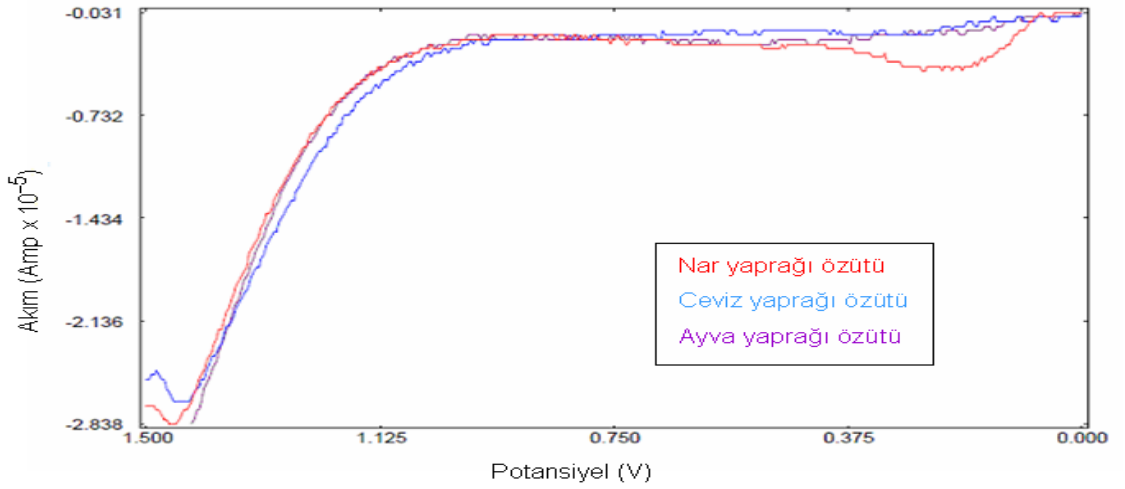
Her bir yaprak özütü için 14 mL ve 0,4 M pH 7 fosfat ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) tamponundan 1 mL alınarak oda sıcaklığında ölçümler gerçekleştirildi. Uygulanan potansiyel programında tarama hızı 20 mV/s ve puls genliği 50 mV olacak şekilde ayarlanarak anodik yönde 0 V/ 1,5 V, - 0,5 V/ 1,5 V ve - 1 V/ 1,5 V aralıklarında; katodik yönde 0 V/- 1,8 V, 0,5 V/- 1,8 V ve 1 V/- 1,8 V aralıklarında olmak üzere diferansiyel puls voltamogramları alındı.

3.7.3.1. Platin elektrot ile yapılan diferansiyel puls voltametri çalışmaları

Destek elektroliti ve platin elektrotun izin verdiği sınırlar içerisinde uygun potansiyel programıyla her bir yaprak özütü için yapılan çalışmalarda tek bir tarama hızı ve puls genliği kullanılmıştır. Çalışma, iyi tekrarlanabilirliğin elde edilebilmesi için en az iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 3.21. ve 3.22’de gösterildiği gibidir.



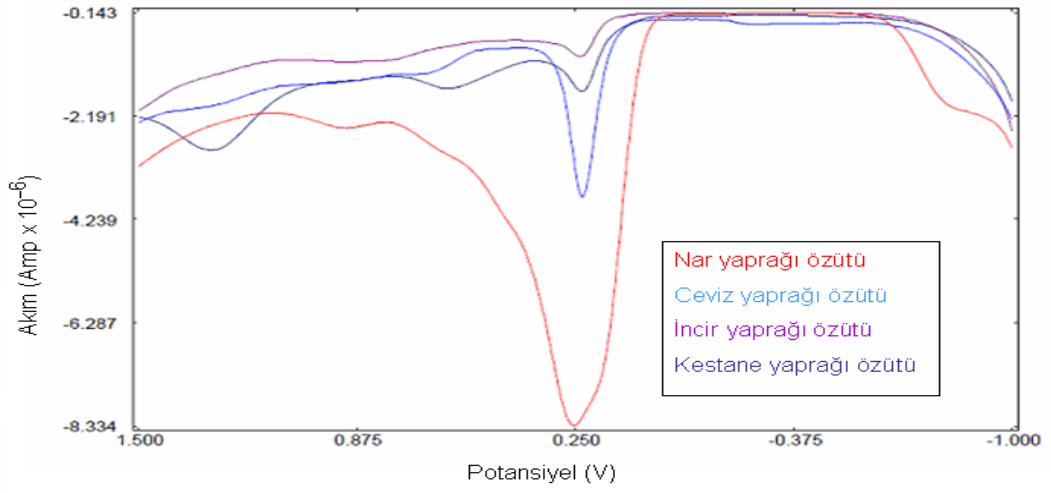
Şekil 3.21. pH 7 fosfat tamponunda platin elektrotla karadut, beyaz dut, incir ve kestane yaprağı özütlerinin anodik yöndeki DPV eğrileri



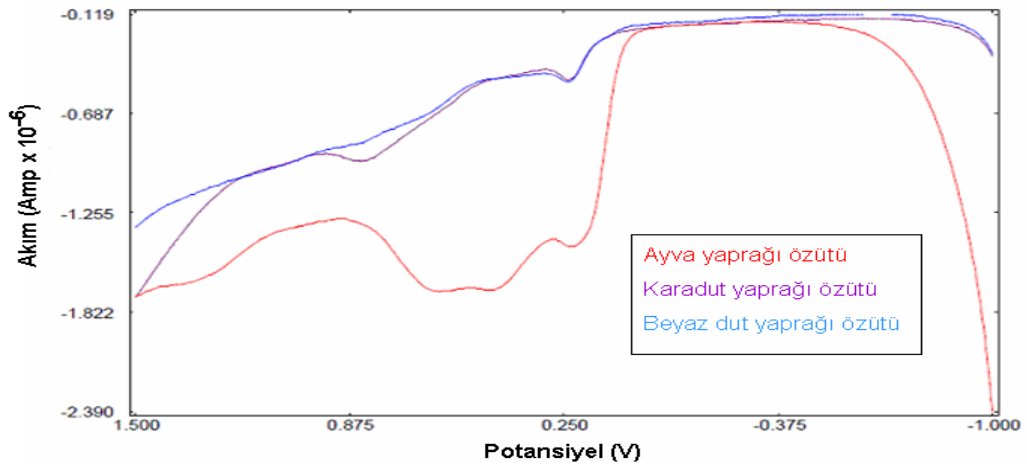
Şekil 3.22. pH 7 fosfat tamponunda platin elektrotla nar, ceviz ve ayva yaprağı özütlerinin anodik yöndeki DPV eğrileri

3.7.3.2. GCE ile yapılan diferansiyel puls voltametri çalışmaları

Destek elektroliti ve camısı karbon elektrotun izin verdiği sınırlar içerisinde uygun potansiyel programıyla her bir yaprak özütü için yapılan çalışmalarda tek bir tarama hızı ve puls genliği kullanılmıştır. Çalışma, iyi tekrarlanabilirliğin elde edilebilmesi için en az iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen voltamogramlar Şekil 3.23. ve 3.24'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.23. pH 7 fosfat tamponunda nar, ceviz, incir ve kestane yaprağı özütlerinin GCE’de anodik yöndeki DPV eğrileri



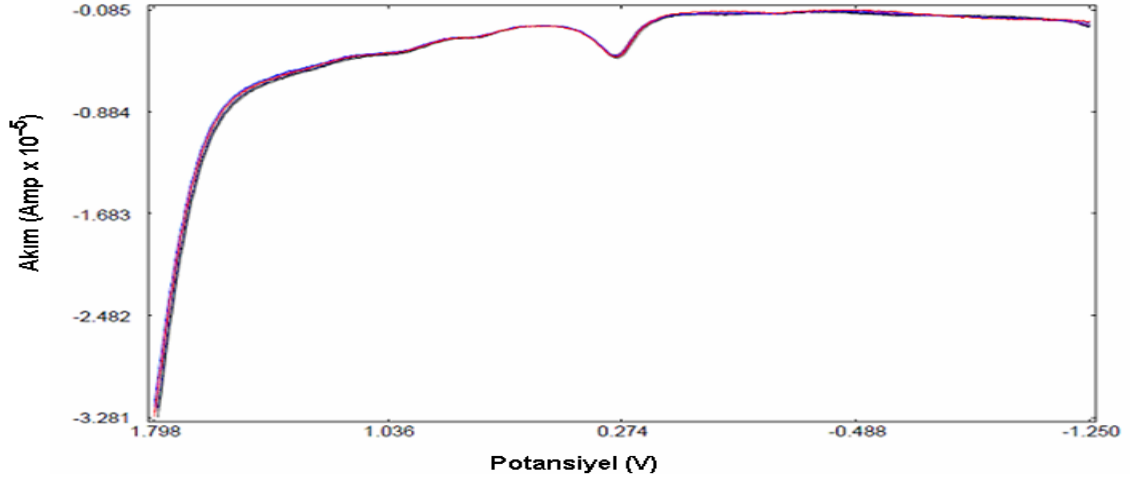
Şekil 3.24. pH 7 fosfat tamponunda ayva, karadut ve beyaz dut yaprağı özütlerinin GCE’ de anodik yöndeki DPV eğrileri

3.7.4. Kare dalga sıyrma voltametri çalışmaları

3.7.4.1. GCE ile yapılan kare dalga sıyrma voltametri çalışmaları

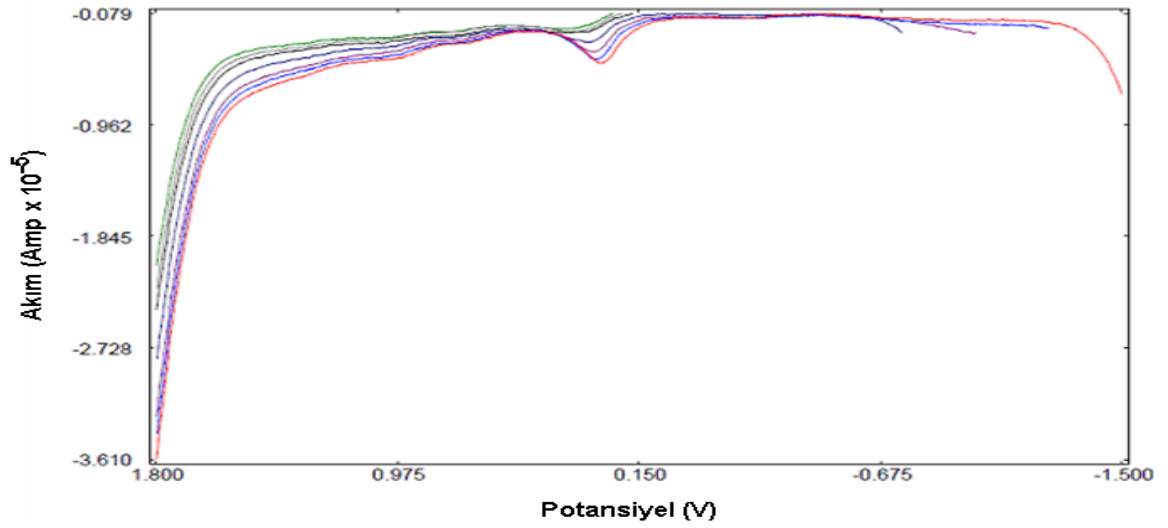
Kare dalga sıyrma voltametri tekniği kullanılarak GCE yüzeyinde madde birikiminin gerçekleşip gerçekleşmediği gözlemlenmeye çalışılmıştır. Ceviz yaprağı özütü ile yapılan çalışmada elektrot yüzeyinde 0, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 saniye biriktirme süresi uygulandı ve bu süreler sonucunda anodik yönde uygulana potansiyel programı

ile yükseltgenme pikinin büyümediği ve elektrot yüzeyinde madde birikiminin gerçekleşmediği gözlemlenmiştir.



Şekil 3.25. Ceviz yaprağı özütü ile 0, 20, 40, 60, 80, 100 ve 120 saniye biriktirme süresi ile anodik yönde alınan kare dalga sıyrma voltamogramları

Aynı potansiyel aralığında biriktirme süresine bağlı olarak madde birikimi gerçekleşmemesine rağmen artan potansiyel aralığı ile yükseltgenme pikinin büyüdüğü gözlemlenmiştir. Ceviz yaprağı özütü ile yapılan çalışmada 60 saniye biriktirme süresi ile 0, - 250, - 500, - 750, - 1000,- 1250 ve - 1500 mV' dan 1800 mV' a doğru ayrı ayrı anodik yönde uygulanan potansiyel programı ile yükseltgenme pikinin büyüdüğü gözlemlenmiştir.



Şekil 3.26. Ceviz yaprağı özütünde 60 saniye biriktirme süresi ile 0, - 250, - 500, - 750, - 1000,- 1250 ve - 1500 mV’ dan 1800 mV’ a doğru ayrı ayrı anodik yönde uygulanarak alınan kare dalga sıyırma voltamogramları

3.7.5. Voltamogramların alan hesaplaması

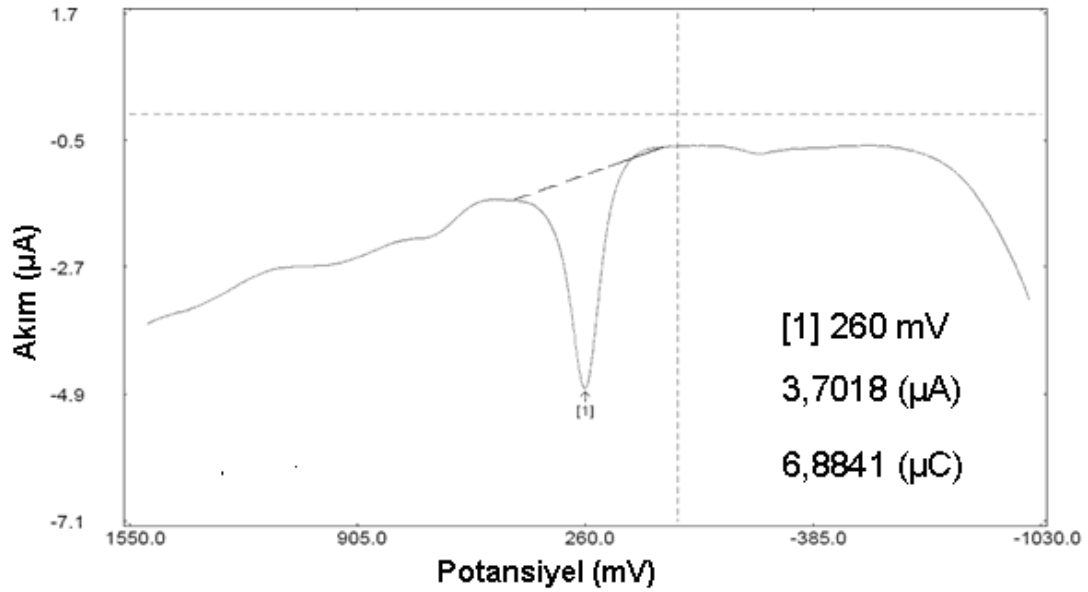
Bir örneğin antioksidan kapasitesi voltametrik tekniklerle iki parametreyle ifade edilir. Bunlardan ilki bir bileşenin ya da benzer potansiyele sahip bileşenlerin indirgen gücünü yansıtan yükseltgenme potansiyeli, ikincisi bileşenlerin derişimini yansıtan anodik akım yoğunluğu.

Bu iki parametrenin yanında anodik akım dalgasının altındaki alan kullanılarak örneğin toplam antioksidan kapasitesini yansıtan daha iyi bir parametrenin kullanılabileceği önerilmiştir (Chevion ve ark 2000). Bu durum, anodik akım dalgası tek bir bileşenden daha fazlasını içeriyorsa daha avantajlı bir durum sağlar. Yaklaşık olarak aynı yükseltgenme potansiyeline sahip bileşenlerin incelenmesinde, anodik dalganın altındaki alan, anodik akımdan daha fazla yarar sağlar.

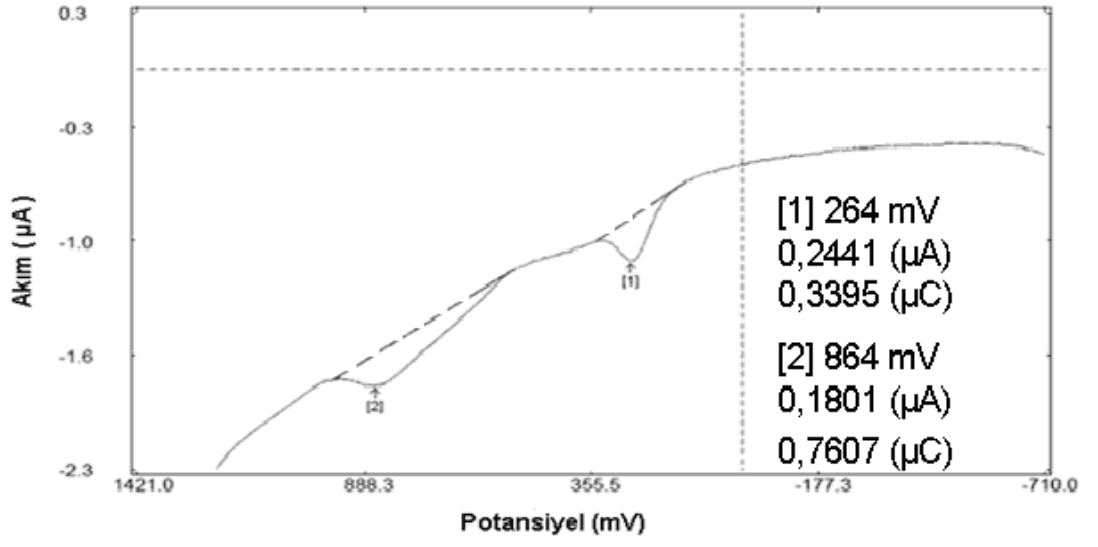
İndirgen reaktifler olarak antioksidanlar, camısı karbon elektrot ve platin elektrot yüzeyinde kolayca yükseltgenebilme eğilimindedirler. Genel olarak antioksidan kapasitenin değerlendirilmesinde örneklerde bulunan antioksidanların yükseltgenme sürecine bağlı olarak yüklerinin ölçülmesiyle antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesi mümkün olabilmektedir.

Yaprak özütleri ile yapılan çalışmalarda GCE ile daha karakteristik ve tekrarlanır çalışmaların yapılabildiği görülmüştür. Kare dalga voltametrisinde elde edilen eğrilerin anodik bölgelerine karşılık gelen toplam yükseltgenme yükleri, potansiyostat yazılımındaki seçenekler kullanılarak ölçülmüştür. Elde edilen birden fazla yükseltgenme piki ayrı ayrı antioksidan kapasiteye katkı sağlayacağından anodik yükseltgenme piklerinin toplam yükü antioksidan kapasitesinin bir göstergesi olarak kullanılabilir.

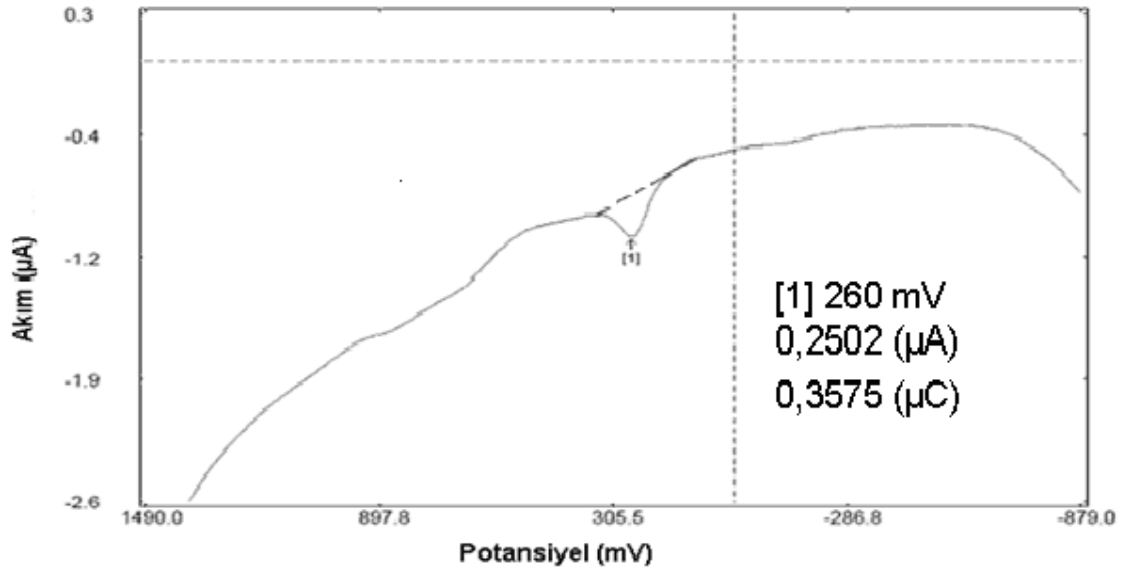
Her bir yaprak özütü için birinci yükseltgenme pikleri yaklaşık olarak aynı potansiyelde elde edilmiştir. Karadut ve İncir yaprağı özütleri için ikinci bir yükseltgenme piki ve Kestane yaprağı özütü için üçüncü bir yükseltgenme piki gözlemlenmiştir.



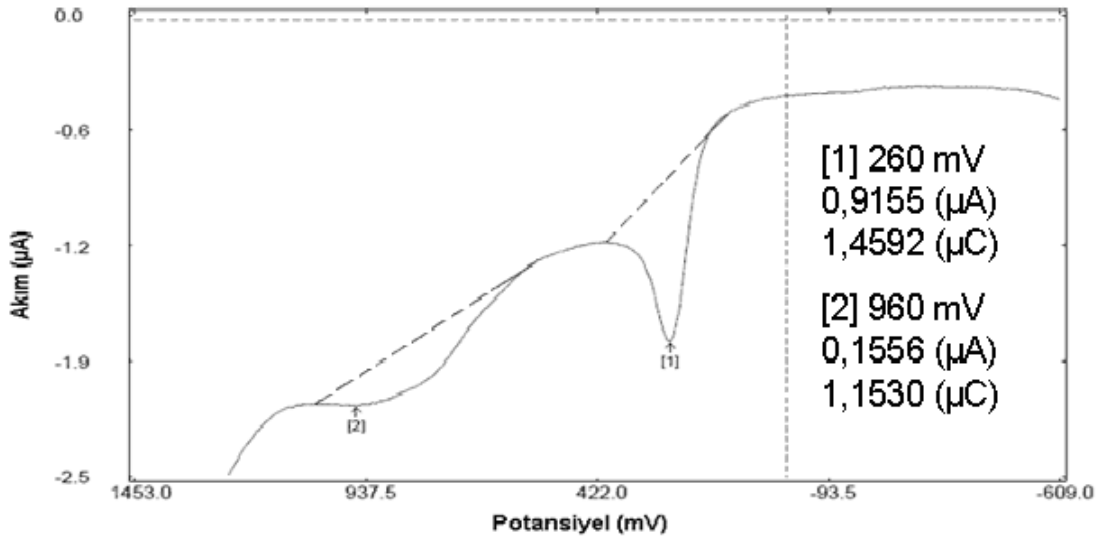
Şekil 3.27.Ceviz yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi



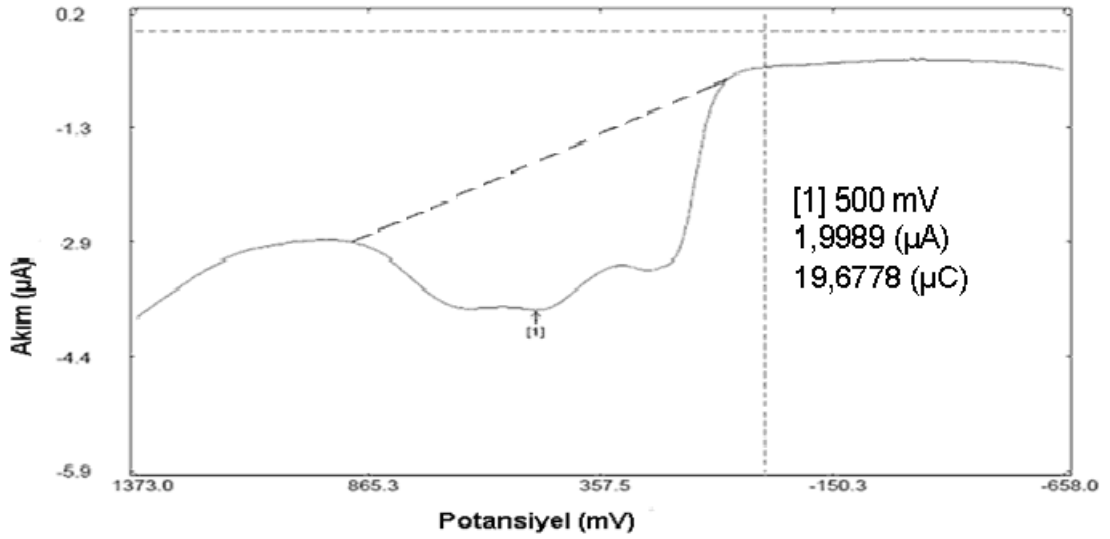
Şekil 3.28. Karadut yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi



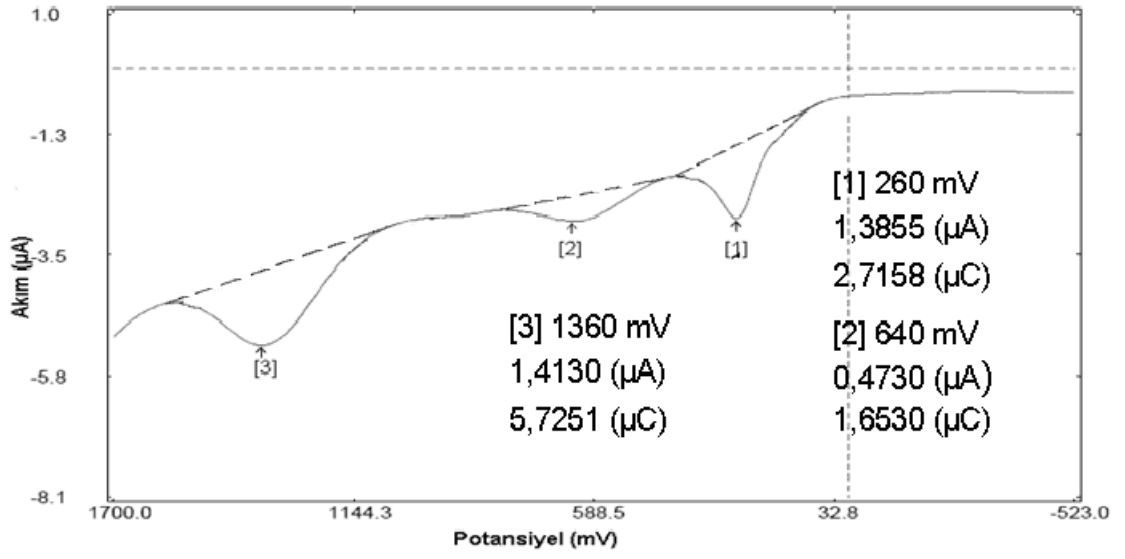
Şekil 3.29. Beyazdut yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi



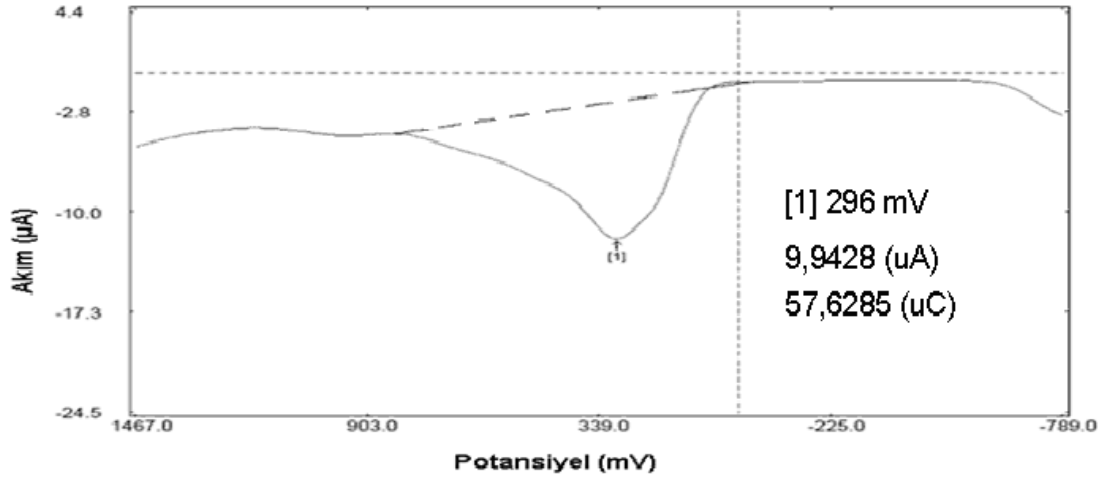
Şekil 3.30.İncir yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi



Şekil 3.31.Ayva yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi



Şekil 3.32. Kestane yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi



Şekil 3.33. Nar yaprağı özütünün anodik SWV eğrisi

Yaprak örneklerine ait yükseltgenme piklerine karşılık gelen anodik akım ve yük değerleri ile birlikte toplam yük miktarı Çizelge 3.3'de gösterildiği gibidir.

Çizelge 3.3. Yaprak özütlerinin yükseltgenme piklerine karşılık gelen anodik akım ve yük değerleri ile birlikte toplam yük miktarı.

	I _{a1} (μ A)	I _{a2} (μ A)	I _{a3} (μ A)	Q ₁ (μ C)	Q ₂ (μ C)	Q ₃ (μ C)	Q _T (μ C)
Nar	9,9428	-	-	57,6285	-	-	57,6285
Ayva	1,9989			19,6778	-	-	19,6778
Kestane	1,3855	0,4730	1,4130	2,7158	1,6530	5,7251	10,0939
İncir	0,9155	0,1556	-	1,4592	1,1530	-	2,6122
Ceviz	3,7018	-	-	6,8841	-	-	6,8841
Karadut	0,2441	0,1801	-	0,3395	0,7607	-	1,1002
Beyazdut	0,2502	-	-	0,3575	-	-	0,3575

4. BULGULAR

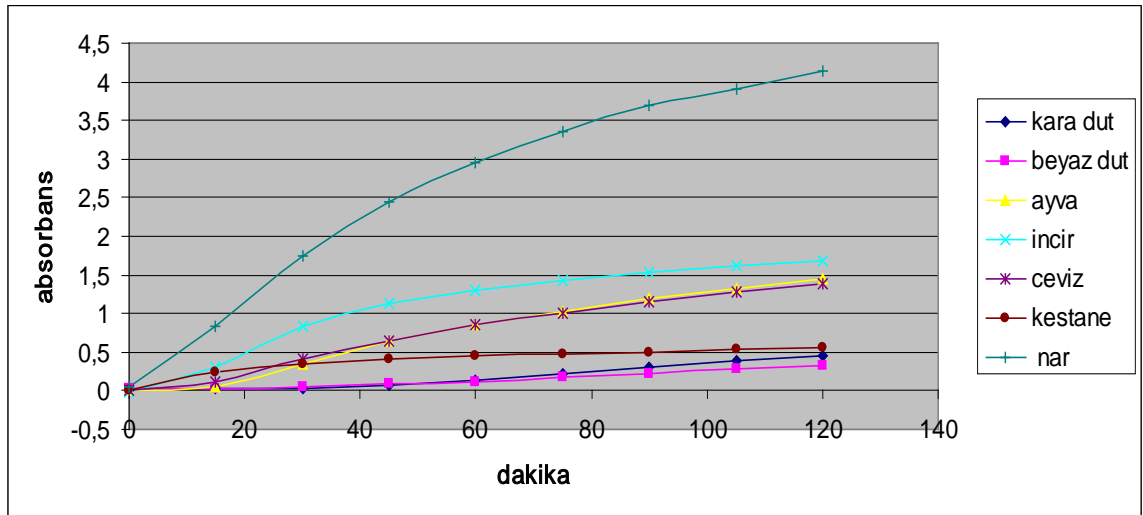
4.1. Spektroskopi Çalışmaları

Antioksidan kapasite ile paralelliği gösterilmeye çalışılan diğer yöntemlerin değerlendirilmesi için temel karşılaştırma yöntemi olarak seçilen CUPRAC yöntemi, literatür bilgilerine uygun olarak ele alınan tüm yaprak özütlerine uygulandı. Bu kapsamdaki UV-VIS spektrofotometrik çalışmalarla her bir yaprak özütünün mg TE / g kuru yaprak birimi ile ifade edilen troloks eşdeğerleri ölçüldü. Bunun yanında UV-VIS Spektroskopik ölçümlerle, AgNP oluşum hızlarına yönelik ölçümler gerçekleştirilerek her iki yöntem ile elde edilen sonuçlar arasındaki paralellikler ve varsa aykırılıklar gösterilmeye çalışıldı. AgNP oluşumu üzerine ışığın etkisi, özellikle son dönemde yapılan çalışmalarda gösterilmiş olduğu için (Uluğ ve ark. 2014), bu çalışmalar sabit aydınlatmalı bir odacık içerisinde gerçekleştirildi.

CUPRAC yöntemi, yaprak özütlerinin iki ayrı seyrelme oranıyla çalışılarak hesaplanan mg TE / g değerlerinin ortalaması değerlendirildi. Bu çalışmalar ışığında incelenen materyaller arasında nar yaprağı özütünün 753,1 mg TE/g kuru bitki değeri ile diğerlerinin yaklaşık iki katı antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülürken, bunu ayva, kestane, incir, ceviz, karadut ve beyaz dut yaprak özütlerinin sıra ile izlediği, her iki dut yaprağı çeşidi ile oldukça küçük (sırasıyla 38,1 ve 35,8 mg TE/ g) değerler

belirlendiği için, bu özütlerin diğer materyallere oranla oldukça küçük antioksidan kapasite gösterdikleri belirlendi.

Çalışılan yaprak özütlerinin $AgNO_3$ çözeltisinden sabit bir ışık kaynağı odacığı içerisinde AgNP indirgeme hızları, 120 dakikalık periyotlar boyunca 15 dakikalık aralıklarla UV-VIS spektrumları alınarak incelendi. Oluşan AgNP nedeniyle 430 nm’ de ölçülen yüzey plazmon rezonans pikindeki büyümeler değerlendirildiğinde, CUPRAC yönteminin sonuçlarına benzer şekilde nar yaprağı özütünün diğer materyallere oranla çok daha önemli bir indirgen özelliğe sahip olduğu, bunu incir yaprağı özütü ile yapılan çalışmanın takip ettiği, ceviz ve ayva yaprağı özütleri ile yapılan çalışmalarda nanopartikül oluşumunun yaklaşık olarak aynı hızda gerçekleştiği, kestane yaprağı özütü ile yapılan çalışmada diğer yaprak özütlerinden farklı olarak daha kısa zamanda nanopartikül oluşum hızının yavaşlayıp sabit bir değere doğru yaklaştığı, karadut ve beyaz dut yaprak özütleri ile yapılan çalışmalarda nanopartikül oluşumunun yavaş ve sabit bir hızda gerçekleştiği belirlendi. Dut özütlerinin diğer örneklerden farklı olarak AgNP oluşturma hızlarının çok küçük kaldığı ve 120 dakikalık periyot süresinde tamamlanma sürecine yaklaşmadığı gözlemlendi. AgNP oluşum hızlarına karşılık gelmek üzere 120 dak boyunca 7 örnekle yapılan spektroskopik ölçümler Şekil 4.1’de gösterilmiştir.

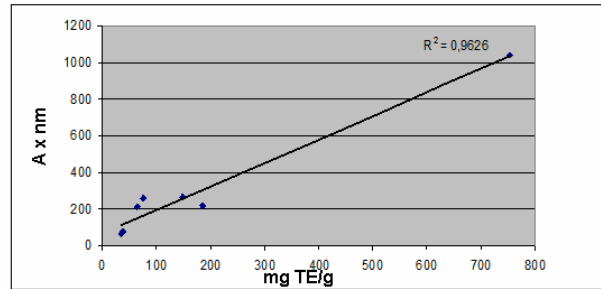
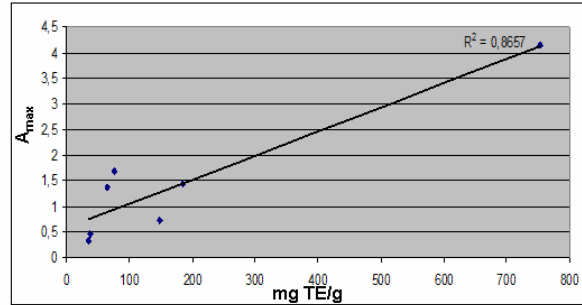


Şekil 4.1. Her bir yaprak özütünün 15 dakika aralıklarla ölçülen maksimum absorbans değerlerinin 120 dakika sonundaki değişiminin toplu halde gösterimi

120 dakika boyunca oluşan AgNP'lerin boyut dağılımına bağlı olarak, ölçülen maksimum yüzey plazmon rezonans pikinin birkaç nm kayması dışında, bazı özütlerin soğurum spektrumunda genişlemeler (yayılmalar) olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, maksimum dalga boyundaki absorbans değerleri yerine farklı boyutlarda AgNP'lerin oluşumu ile ortaya çıktığı düşünülen bu durumu da göz önüne alabilmek ve daha gerçekçi karşılaştırmalar yapabilmek amacıyla 320 – 750 nm ler arasında spektrum eğrisinin altında kalan toplam alanın karşılaştırmalarda kullanılmasının daha doğru olacağı öngörülmüştür. Her bir yaprak özütü örneğinin 120. dakika sonunda elde edilen spektrumların 320 – 750 nm dalga boyu aralığındaki alanları, spektrofotometrenin yazılımı yardımıyla hesaplanarak sonuçlar A x nm birimi cinsinden ifade edildi.

Yaprak özütlerinin, CUPRAC yöntemiyle troloks eşdeğeri olarak elde edilen antioksidan kapasite değerleri ile 120 dakika sonunda elde edilen spektrumların maksimum absorbans ve hesaplanan alan değerleri karşılaştırıldığında; alan değeri hesaplanarak yapılan karşılaştırmayla doğrusallıktan sapmanın daha az olduğu iyi bir korelasyon ($R^2 = 0,9626$) elde edilmiştir.

Yaprak Özütü	mg TE/g	A_{max}	A x nm
Nar	753,1	4,15	1041,900
Ayva	184,8	1,442	215,363
Kestane	148,4	0,731	266,099
İncir	76,4	1,68	261,119
Ceviz	65,6	1,383	214,532
Karadut	38,1	0,463	79,196
Beyaz dut	35,8	0,331	62,455



Şekil 4.2. CUPRAC yöntemi ile Ag nanopartikül oluşum hızının incelendiği yöntemin karşılaştırılması

4.2. Voltametrik Çalışmalar

Özüt örneklerde bulunan antioksidan bileşenlerin temelde bir indirgen özellik göstererek uygun potansiyellerde yükseltgenecekleri düşüncesiyle voltametrik çalışmalarda, özellikle anodik yönde yapılan potansiyel taramaları ile yükseltgenme bölgesinde oluşan pik akımlarının değerlendirileceği düşünüldü. Bu yaklaşımla farklı potansiyel tarama teknikleri (CV, DPV ve SWV) ile çalışma elektrotu olarak Pt ve GCE üzerinde elde edilen voltamogramlar incelendi.

Camsı karbon elektrot ile yapılan çevrimsel voltametrik çalışmalarda; anodik yöndeki potansiyel taraması sırasında nar ve ceviz yaprağı özütlerinin yaklaşık olarak aynı potansiyellerde yükseltgenme bölgesine sahip oldukları, indirgen bileşenlerin derişimi ile orantılı değişim gösteren anodik akım değerinin nar yaprağı özütünde daha yüksek olduğu, ayva yaprağı özütünün ise yükseltgenme bölgesinin geniş bir potansiyel aralığına yayılmış olduğu gözlemlendi. Kestane yaprağı özütünün belirgin olmayan iki yükseltgenme piki oluşturduğu, incir, karadut ve beyaz dut yaprak özütleri ile yapılan çalışmalarda belirgin yükseltgenme bölgelerinin elde edilemediği saptandı. Anodik yöndeki potansiyel taramasını izleyen katodik yöndeki tarama ile, oluşan yükseltgenme ürünlerinin tersinir veya yarı tersinir olarak indirgenmediği, özüt materyallerin - 1 V civarında karakteristik olmayan indirgenme piki verdiği gözlemlendi.

GCE ile yapılan çalışmada, örnekler arasında karakteristik farklılıklar ve nispeten büyük akım değerleri belirlenirken, Pt elektrot üzerindeki çalışmalarda aynı belirginlikte eğriler elde edilemedi.

Her ikisi de diferensiyel (akım farkı alma) birer puls tekniği olan DPV ve SWV teknikleri de hem Pt, hem de GCE elektrotlarla denendi ve beklenileceği gibi GCE elektrot üzerindeki özellikle SWV tekniğinde çok daha belirgin ve karşılaştırılabilir yükseltgenme bölgelerinin elde edileceği gösterildi. Bu çalışmada, anodik yönde potansiyel taraması yaparken, her yaprak özütünün yaklaşık olarak 260 mV' da birinci yükseltgenme bölgesine, incir, kestane ve karadut yaprak özütlerinin 960 mV, 640 mV ve 860 mV 'da ikinci bir yükseltgenme bölgesine, kestane yaprağı özütünün 1360 mV' da üçüncü bir yükseltgenme bölgesine sahip oldukları gözlemlendi. Ayva yaprağı

özütünü ile yapılan çalışmada diğer yaprak özütlerinden farklı olarak yaklaşık olarak 500 mV' da düzgün olmayan geniş bir yükseltgenme bölgesi olduğu ortaya kondu. Anodik potansiyel bölgesinde, çalışılan özüt örneklerin doğası gereği çok sayıda bileşen içermeleri, bunun sonucu olarak saf bir madde gibi belli bir potansiyelde yükseltgenme (ve/veya indirgenme) piki vermek yerine geniş bir yükseltgenme bölgesi oluşturdukları gözlemlendi.

Anodik bölgede oluşan pik akım değerleri, pik potansiyelleri gibi genel büyüklükler, pek çok benzer etkiye sahip bileşenin bir arada bulunduğu, dolayısıyla izole yükseltgenme piklerinin oluşması yerine genel bir yükseltgenme eğrisinin olduğu voltamogramlarda, anodik bölgenin oluşumuna yol açan yükseltgenme bölgesi için elektrot üzerinden geçen toplam elektriksel yükün anlamlı bir büyüklük olabileceği değerlendirildi. Ancak kullanılan elektrokimyasal tekniklerde, kronokulometrik çalışmalarda olduğu gibi toplam yükü belirleme seçeneği bulunmamaktadır.

Özellikle daha karakteristik ve tekrarlanır voltametrik çalışmaların yapılabildiği camı karbon çalışma elektrotu (GCE) ile kare dalga voltametrisinde elde edilen eğrilerin anodik bölgelerindeki pik yapısına sahip kısımlarının altında kalan alanlar ölçülerek belirlenmeye çalışılan toplam yükseltgenme yükleri ile karşılaştırma yapılması düşünüldü. Elde edilen birden fazla yükseltgenme piki ayrı ayrı antioksidan kapasiteye katkı sağlayacağı için, anodik yükseltgenme piklerinin toplam yükü antioksidan kapasitesinin bir göstergesi olarak kullanılabileceği, diğer yöntemlerle bu şekilde paralellikler kurulabileceği belirlendi. Bu karşılaştırma Bölüm 4.4'deki Şekil 4.3'de gösterilmiştir.

4.3. ORP Ölçümleri

Yaprak özütlerinde bulunan indirgen bileşenlerin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde, ortamın yükseltgeme / indirgeme gücünün ölçüsü olabileceği öngörülerek Yükseltgenme/indirgenme potansiyeli (ORP) ölçümlerinin de yeterli bir kriter olabileceği öngörüldü. Kısaca akımsız koşullarda bir redoks elektrotu ile bir karşılaştırma (referans) elektrot arasındaki gerilim farkının ölçülmesi esasına dayanan potansiyometrik bir teknik olan ORP ölçümleri, asidik, nötral ve bazik pH koşullarında

gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar spektroskopik yöntemlerle karşılaştırılarak yöntemlerin ne derecede uyumlu oldukları görülmeye çalışıldı.

Kombine ORP elektrotu ile her bir yaprak özütünün kendi pH'lerinde ve pH' nin kabaca 4, 7 ve 9 olarak ayarlandığı asidik, nötral ve bazik koşullarda, kararlı bir değer gözlenene kadar beklenerek, değerler okundu. Yapılan ölçümlerin diğer yöntemlerle belirlenen antioksidan kapasite değerleriyle uyumu, hangi pH'de daha iyi paralellik elde edilebileceği incelendi.

ORP ölçümlerinin büyüklüğü, temelde katot olarak ölçüm sistemine bağlanan elektrot üzerinde kurulan indirgenme tepkimesine ilişkin dengelenme potansiyelini göstereceği için, antioksidan kapasitesi büyük olan örneklerde ORP değerinin “ – “ yönde büyük olmasını beklemek gerekecektir. Çünkü antioksidan kapasite, etkin bileşenlerin yükseltgenme tepkimesinin istemliliğine bağlı olacaktır.

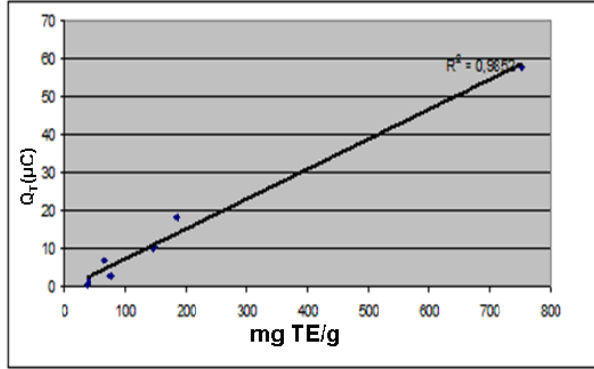
Özütlerde bulunan bitkisel proteinlerin ve diğer etkin olabilecek bileşenlerin elektrot üzerinde dengelenmeleri, yüklerine ve dolayısıyla ortam pH'sine bağlı olarak değişebilecektir. Sonuçlar değerlendirildiğinde pH'nin yaklaşık olarak 9 olduğu koşullarda yapılan ölçümlerde, nar yaprağı özütünün ORP değerinin 18,8 mV ile en düşük değere sahip olduğu yani en yüksek antioksidan kapasiteye, karadut ve beyaz dut yaprağı özütlerinin ise 100,3 mV ve 93,2 mV ile en yüksek değerlere yani en düşük antioksidan kapasiteye sahip olduğu ve elde edilen sonuçların diğer yöntemlerdeki sıralamaya yakın olduğu görülmüştür.

Bitki özütlerinin kendi pH değerlerinde, asidik ve nötral pH çalışmalarında ise, olasılıkla etkin maddelerin moleküler (yüksüz) formda olup, Pt redoks yüzeyinde denge tepkimesi vermemesine bağlı olarak anlamlı büyüklükler veya farklılıklar ölçülemez.

4.4. Antioksidan Kapasitesi Ölçümünde Kullanılan Yöntemlerin Karşılaştırılması

Yaprak özütlerinin, CUPRAC yöntemiyle troloks eşdeğeri olarak elde edilen antioksidan kapasite değerleri ile elektrokimyasal olarak kare dalga voltametri

teknikinde alan hesabı kullanılarak elde edilen antioksidan kapasite değerleri arasında iyi bir korelasyon ($R^2 = 0,9852$) olduğu gözlemlenmiştir.

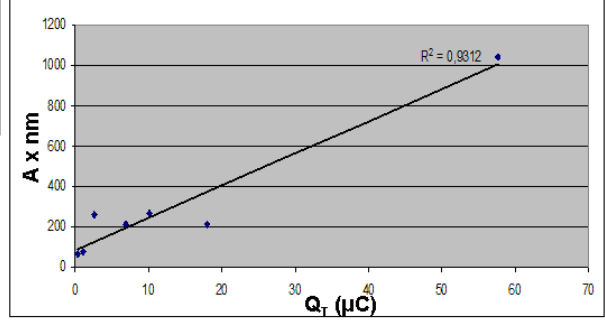
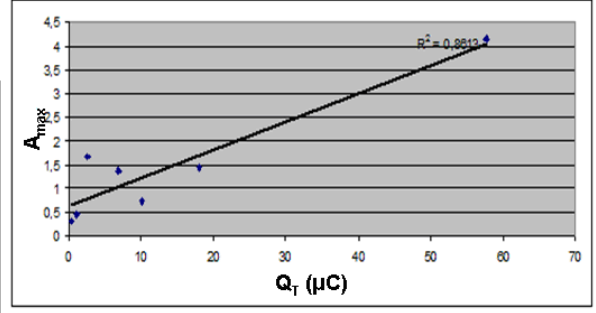


	mg TE/g	Q _T (µC)
Nar	753,1	57,6285
Ayva	184,8	18,0099
Kestane	148,4	10,0939
İncir	76,4	2,6122
Ceviz	65,6	6,8841
Kara dut	38,1	1,1002
Beyaz dut	35,8	0,3575

Şekil 4.3. CUPRAC yöntemi ve SWV tekniği kullanılarak elde edilen antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması

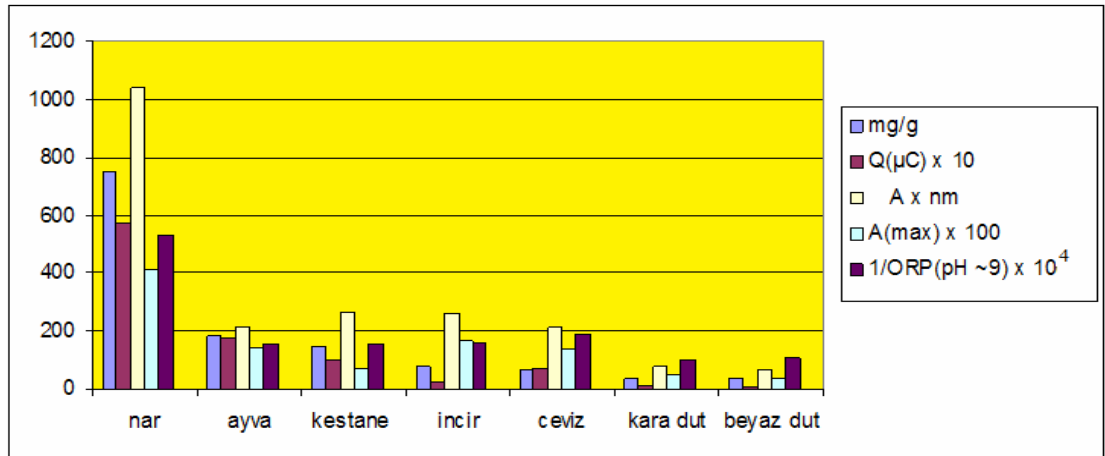
Gümüş nanopartikül oluşturma hızı yöntemi ile nanotaneciklerin yüzey plazmon özelliklerine bağlı olarak her bir yaprak özütü için 120 dakika sonunda elde edilen spektrumların maksimum absorbans değerleri ile hesaplanan alan değerleri ve kare dalga voltametri tekniği kullanılarak elde edilen antioksidan kapasite değerleri karşılaştırılmıştır. Maksimum absorbans değeri ile yapılan karşılaştırmaya göre hesaplanan alan değerleri ile daha iyi bir korelasyon ($R^2 = 0,9312$) elde edilmiştir.

Yaprak Özütlü	Q_T (μC)	A_{max}	$A \times \text{nm}$
Nar	57,6285	4,15	1041,900
Ayva	18,0099	1,442	215,363
Kestane	10,0939	0,731	266,099
İncir	2,6122	1,68	261,119
Ceviz	6,8841	1,383	214,532
Kara dut	1,1002	0,463	79,196
Beyaz dut	0,3575	0,331	62,455



Şekil 4.4. SWV ve Ag nanopartiküllerin oluşum hızının incelendiği teknikler sonucu elde edilen antioksidan kapasite değerlerinin karşılaştırılması

Yararlanılan tekniklerin tümü bir arada değerlendirildiği zaman, aşağıdaki diyagram elde edilmiştir. Bu diyagram, referans yöntem olarak ele alınan CUPRAC yöntemiyle tez kapsamında ele alınan teknikler arasında büyük oranda bir paralellik olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. Yararlanılan teknikler sonucunda elde edilen değerlerin toplu halde karşılaştırılması

5. SONUÇ

Bu çalışmada; insanların diyet listesinde yer almayan ve ekonomik değeri olmayan odunsu bitki yapraklarından basit ve pratik yollarla elde edilen sulu özütlerin bitkisel reaktif olarak ele alınarak, doğa dostu yeşil teknolojiler kapsamında ekonomik değer kazandırılması düşüncesi ile hareket edilmiştir. Yeşil yapraklardaki antioksidan özellik gösteren indirgen nitelikteki bileşiklerin güç ve kullanım potansiyellerini belirlemek açısından antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinin ilginç olacağı değerlendirilmiştir. Antioksidan kapasite ölçümünde kullanılan çoğunlukla spektroskopik yöntemlerin, tekrarlanırlık açısından sorunlar ve zahmetli deneysel prosedürler içeriyor olması göz önüne alınarak, bu parametrenin belirlenmesi için daha pratik yöntemler geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Yeşil yaprak özütlerinin standart olarak belirli bir ışık altında tutulurken Ag^+ iyonlarından AgNP oluşumuna yol açtığı, bu nanopartiküllerin oluşum hızının antioksidan kapasite ölçüsü olarak değerlendirilebileceği öngörülmüştür. AgNP oluşumuna dayalı yüzey plazmon gözlenen maksimum dalga boyundaki soğurum yerine, oluşan nanopartiküllerin çaplarının geniş bir aralıkta olması da göz önüne alınarak belli dalga boyları arasında spektrum eğrisinin altında kalan alanın, referans yöntem olarak ele alınan CUPRAC yöntemine göre daha anlamlı sonuçlar verdiği, görülmüştür. İncelenen yedi farklı odunsu bitki yaprağından elde edilen sulu özüt örneklerinin, referans yöntemle büyük ölçüde paralellik gösterdiği gözlenmiş, AgNP oluşum hızının antioksidan kapasite ölçümünde alternatif bir yöntem olarak önerilmeden önce, meyve ve diğer doğal örneklerde de incelenmesinin yerinde olacağı değerlendirilmiştir. $Ag^+ + e^- \rightleftharpoons Ag_{(k)}$ için standart indirgenme potansiyeli +0,799 V olduğundan CUPRAC yöntemindeki $Cu(Nc)_2^{2+} + e^- \rightleftharpoons Cu(Nc)_2^+$ komplekslerinin standart indirgenme potansiyeli +0,6 V potansiyeli ile karşılaştırıldığında, indirgen özelliği çok daha zayıf olan kimyasal türlerin de sürece katılacağını öngörmek gerekir.

Voltametik olarak yapılan incelemelerde, GCE üzerinde çok daha karakteristik eğriler elde edilmesi organik maddelerin karbon yüzeyinde adsorpsiyon özelliğinin daha fazla olması ve bu elektrotun daha büyük çalışma yüzey alanına sahip olması ile ilişkilendirilebilir. Çevrimsel voltamogramlar, ortaya çıkan yükseltgenme piklerinin

tersinir olmadığını ortaya koymuştur. Denenen puls teknikleri içersinde özellikle SWV nin çok daha karakteristik ve belirgin voltamogramlar sağladığını ve karşılaştırmaların daha sağlıklı yapılabileceğini ortaya koymuştur. SWV ile GCE üzerinde bitki özütleriyle elde edilen voltametrik çalışmalarda, saf madde gibi tek bir potansiyelde belirgin bir yükseltgenme potansiyeli vermeyen, geniş bir potansiyel aralığında pek çok bileşene ait etkilerin yan yana gözlenmesi nedeniyle, pik akımları yerine anodik bölgedeki toplam yükseltgenme yük değerlerinin daha anlamlı olacağı öngörölmüş, hesaplanan yük miktarı büyüklüklerinin referans alınan yöntem ile daha uyumlu sonuçlar verdiği belirlenmiştir.

Çok pratik bir ölçüt oluşturabileceği umuduyla denenen ORP ölçümlerinin ancak pH 9 için nispeten karşılaştırılabilir ve CUPRAC yöntemiyle elde edilen sıralamaya oldukça uyumlu bir sıralama verdiği gösterilmiş olsa da, ölçüm pH gibi koşullarının, ortam iletkenliğinin optimize edilmesi gerektiği, ancak sistematik bir inceleme ve değerlendirme sonrasında daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceği düşünölmüştür.

KAYNAKLAR

- Akhtar, M.S., Panwar, J., Yun, Y.S. 2013.** Biogenic Synthesis of Metallic Nanoparticles by Plant Extracts. *ACS Sustainable Chem. Eng.*,1: 591–602.
- Alasalvar, C., Karamac, M., Amarowicz, R., Shadidi, F. 2006.** Antioxidant and Antiradical Activities in Extracts of Hazelnut Kernel (*Corylus avellana* L.) and Hazelnut Green Leafy Cover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,54: 4826–4832.
- Amaral, S.A., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentao, P., Pereira, J.A., Ferreres, F. 2004.** Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chemistry*, 88: 373–379.
- Anastas, P.T., Williamson, T.C. 1996.** Green Chemistry: An Overview, AcsSymposium Series; *American Chemical Society*: Washington.
- 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. *J. Agric. Food Chem.*,52: 7970-7981.
- Arneo, B.A. 2000.** Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, 11: 419–421.
- Awaad, A.S., Al-Jaber, N.A. 2010.** Antioxidant Natural Plant. *Ethnomedicine: Source & Mechanism I*, RPMP Vol. 27.
- Bard, A. J. and Faulkner L.R. 2001.** Electrochemical Methods Fundamentals and Applications Copyright John Wiley & Sons, Inc.
- Blasco, A.J., Crevillen, A.G., Gonzalez, M.A., Escarpa A. 2007.** Direct Electrochemical Sensing and Detection of Natural Antioxidants and Antioxidant Capacity in Vitro Systems. *Electroanalysis*, 19: 2275 – 2286.
- Burton, G.W., Ingold, K.U. 1984.** Beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, 224(4649):569–573.
- Chen, H.Y., Yen, G.C. 2007.** Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves. *Food Chemistry*, 101: 686–694.
- Chevion, S., Roberts, M.A., Chevion, M. 2000.** The Use of Cyclic Voltammetry for The Evaluation of Antioxidant Capacity. *Free Radical Biology & Medicine*, 28: 860-870.
- Delouee, S.A., Urooj, A. 2007.** Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*,102: 1233–1240.
- Dubey, S.P., Lahtinen, M., Sillanpaa, M. 2010.** Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles, *Proc. Biochem.*, 45 (7): 1065–1071.
- Dipenkar, C., Murugan, S. 2012.** The green synthesis, characterization and evaluation of the biological activities of silver nanoparticles synthesized from *Iresine herbstii* leaf aqueous extracts. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98: 112– 119.

- Filippo, E., Serra, A., Buccolieri, A., Mano, D. 2010.** Green synthesis of silver nanoparticles with sucrose and maltose: Morphological and structural characterization. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 356: 344–350.
- Forough, M., Farhadi, K. 2010.** Biological and green synthesis of silver nanoparticles. *Turkish J. Eng. Env. Sci.*, 34: 284 – 287.
- Foyer, C.H., Alscher, R.G., Hess, J.L. 1993.** Antioxidants in Higher Plants, CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 31.
- Garcia, M.A. 2011.** Surface Plasmons in metallic nanoparticles: Fundamentals and applications. *Journal of Physics D: Applied Physics*, p.44.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferroluzzi, A. 1995.** A Fluorescence-Based Method for Measuring Total Plasma Antioxidant Capability. *Free Radic Bio Med*, 18:29-36.
- Hjeresen, D. L., Kirchhoff, M.M., Lankey, R.L. 2002.** Green Chemistry: Environment, Economics, And Competitiveness, *Corporate Environmental Strategy*, 9 (3): 259-265.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. 2005.** The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53:1841–1856.
- Hutzler, P., Fischbach, R., Heler, W., Jungblut, T.P., Reuber, S., Schmitz, R., Veit, M., Weissenböck, G., Schnitzler, J.P. 1998.** Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Experimental Botany*, 49: 953–965.
- Inbathamizh, L., Ponnu, T.M., Mary, E.J. 2013.** In vitro evaluation of antioxidant and anticancer potential of *Morinda pubescens* synthesized silver nanoparticles. *Journal of Pharmacy Research*, 6: 32 – 38.
- Işık, E., Şahin, S., Demir, C. 2013.** Development of a new chromium reducing antioxidant capacity (CHROMAC) assay for plants and fruits. *Talanta*, 111: 119 – 124.
- İşbilir, Ş.S. 2008.** Yaprakları salata- baharat olarak tüketilen bazı bitkilerin antioksidan aktivitelerinin incelenmesi. *Doktora tezi*, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Edirne.
- Jimenez, J.P., Arranz, S., Taberner, M., Diaz - Rubio, M.E., Serrano, J., Goni, I., Saura- Calixto, F. 2008.** Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41: 274–285.
- Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B., Simic, M.G. 1994.** Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, 116: 4846.
- Karpudewan, M., Ismail, Z. H., Mohamed, N. 2011.** Green Chemistry: Educating Prospective Science Teachers Ğn Education For Sustainable Development At School Of Educational Studies, Usm, *Journal Of Social Sciences*, 7 (1): 42-50.

- Katsube, T., Tsurunaga, Y., Sugiyama, M., Furuno, T., Yamasaki, Y. 2009.**Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chemistry*, 113: 964–969.
- Kirakosyan, A., Seymour, E., Kaufman, P.B., Warber, S., Bolling, S., Chang, S.C. 2003.**Antioxidant Capacity of Polyphenolic Extracts from Leaves of *Crataegus laevigata* and *Crataegus monogyna*(Hawthorn) Subjected to Drought and Cold Stress. *J. Agric. Food Chem.*,51: 3973-3976.
- Kilmartin, P.A., Zou, H., Waterhouse, A.L. 2001.**A Cyclic Voltammetry Method Suitable for Characterizing Antioxidant Properties of Wine and Wine Phenolics. *J. Agric. Food Chem.*,49: 1957-1965.
- Krishnaraj, C., Jagan, E., Rajasekar, S., Selvakumar, P., Kalaichelvan, P., Mohan, N. 2010.** Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens. *Coll. Surf. B: Biointerf.*, 76 (1): 50–56.
- Kuti, J.O., Konuru, H.B. 2004.**Antioxidant Capacity and Phenolic Content in Leaf Extracts of Tree Spinach (*Cnidoscolus* spp.). *J. Agric. Food Chem.*,52:117-121.
- Lemanska, K., Szymusiak, H., Tyrakowska, B., Zielinski, R., Soffers, A.E.M.F., Rietjens, I.M.C.M. 2001.**The influence of pH on antioxidant properties and the mechanism of antioxidant action of hydroxyflavones. *Free Radical Bio Med*31:869-881.
- Li, S., Shen, Y., Xie, A., Yu, X., Qiu, L., Zhang, L., Zhang, Q. 2007.** Green synthesis of silver nanoparticles using *Capsicum annuum* l. extract. *Green Chem.*, 9 (8) : 852–858.
- Li, X., Xu, H., Chen, Z.S., Chen, G. 2011.** Biosynthesis of nanoparticles by microorganisms and their applications. *Journal of Nanomaterials*, Volume 2011, Article ID 270974, 16 pages.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. 2006.**Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*,86:2046–2056.
- Magalhaes, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C. 2008.**Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica chimica acta* 613: 1–19.
- Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A. 1993.** A Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci.*,84:407-412.
- Nilsson, J., Pillai, D., Önning, G., Persson, C., Nilsson, A., Akesson, B. 2005.**Comparison of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol. Nutr. Food Res.*, 49: 239 – 246.

- Niki, E. 1987.** Lipid antioxidants: how they may act in biological systems. *Br J Cancer Suppl.*, 8: 153–157.
- Oliveira, I., Coelho, V., Baltasar, R., Pereira, J.A., Baptista, P. 2009.** Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals. *Food and Chemical Toxicology* 47: 1507–1511.
- Osman, A.M., Wong, K.K.Y., Hill, S.J., Fernyhough, A. 2006.** Isolation and the characterization of the degradation products of the mediator ABTS-derived radicals formed upon reaction with polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 340: 597–603.
- Ozçelik, B., Lee, J.H., Min, D.B. 2003.** Effects of Light, Oxygen, and pH on the Absorbance of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl. *Food Chemistry and Toxicology*, 68: 487-490.
- Özsoy, N., Can, A., Yanardağ, R., Akev, N. 2008.** Antioxidant activity of *Smilax excelsa* L. leaf extracts. *Food Chemistry*, 110: 571–583.
- Özyürek, M., Güngör, N., Baki, S., Güçlü, K., Apak, R. 2012.** Development of a Silver Nanoparticle-Based Method for the Antioxidant Capacity Measurement of Polyphenols. *Anal. Chem.*, 84: 8052–8059.
- Philip, D. 2011.** *Mangifera indica* leaf-assisted biosynthesis of well-dispersed silver nanoparticles, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 78 (1): 327–331.
- Pokorny, J., Chan, H.W.S. 1988.** *Autoxidation of Unsaturated Lipids*, Academic Press, London, p. 141.
- Pratt, D.E., Hudson, B.J.F. 1990.** *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, New York, 1, p. 171.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. 2005.** Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 4290-4302.
- Rebelo, M.J., Rego, R., Ferreira, M., Oliveira, M.C. 2013.** Comparative study of the antioxidant capacity and polyphenol content of Douro wines by chemical and electrochemical methods. *Food Chemistry*, 141: 566–573.
- Riipi, M., Ossipov, V., Lempa, K., Haukioja, E., Koricheva, J., Ossipova, S., Pihlaja, K. 2002.** Seasonal changes in birch leaf chemistry: are there trade-offs between leaf growth and accumulation of phenolics. *Oecologia*, 130: 380–390.
- Roy, K., Biswas, S., Banerjee, P.C. 2013.** Green synthesis of silver nanoparticles by using grape (*Vitis vinifera*) fruit extract: characterization of the particles and study of antibacterial activity. *Res. J. Pharma., Biol. Chem. Sci.*, 4 (1) :1271–1278.
- Sathishkumar, M., Sneha, K., Won, S.W., Cho, C.W., Kim, S., Yun, Y.S. 2009.** Cinnamon *zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. *Colloids Surf.*, 73 (2): 332–338.

- Sathyavathi, R., Krishna, M.B., Rao, S.V., Saritha, R., Rao, D.N. 2010.** Biosynthesis of silver nanoparticles using *Coriandrum sativum* leaf extract and their application in nonlinear optics. *Advan. Sci. Lett.*, 3 (2):138–143.
- Seruga, M., Novak, I., Jakobek, L. 2011.** Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124: 1208–1216.
- Shankar, S.S., Rai, A., Ahmad, A., Sastry, M. 2004.** Rapid synthesis of Au, Ag, and bimetallic Au core-Ag shell nanoparticles using neem (*Azadirachta indica*) leaf broth, *J. Coll. Interf. Sci.*, 275 (2) : 496–502.
- Sheny, D.S., Mathew, J., Philip, D. 2011.** Phytosynthesis of Au, Ag and Au–Ag bimetallic nanoparticles using aqueous extract and dried leaf of *Anacardium occidentale*, *Spectrochim. Acta Part A: Mol. Biomol. Spectrosc.*, 79 (1) : 254–262.
- Siddhuraju, P., Becker, K. 2003.** Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Total Phenolic Constituents from Three Different Agroclimatic Origins of Drumstick Tree (*Moringa oleifera* Lam.) Leaves. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 2144–2155.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. 1999.** Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol.* 299: 152–178.
- Singhal, G., Bhavesh, R., Kasariya, K., Sharma, A.R., Singh, R.P. 2011.** Biosynthesis of silver nanoparticles using *Ocimum sanctum* (Tulsi) leaf extract and screening its antimicrobial activity. *J. Nanopart. Res.* 13 (7) : 2981–2988.
- Song, J.Y., Kim, B.S. 2009.** Rapid biological synthesis of silver nanoparticles using plant leaf extracts. *Bioprocess Biosyst Eng.*, 32:79–84.
- Tufan, A.N., Baki, S., Güçlü, K., Özyürek, M., Apak, R. 2014.** A Novel Differential Pulse Voltammetric (DPV) Method for Measuring the Antioxidant Capacity of Polyphenols-Reducing Cupric Neocuproine Complex. *J. Agric. Food Chem.*, 62: 7111–7117.
- Turaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F. 1998.** Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biol. Med.*, 24:1228–1234.
- Uluğ, B., Turkdemir, M.H., Cicek, A. Mete, A. 2014.** Role of irradiation in the green synthesis of silver nanoparticles mediated by fig (*Ficus carica*) leaf extract. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 135: 153–161.
- Ursini, F., Zamburlini, A., Cazzolato, G., Maiorino, M., Bon, G.B., Sevanian, A. 1998.** Postprandial plasma lipid hydroperoxides: A possible link between diet and atherosclerosis. *Free Radical Bio Med.*, 25: 250–2.
- Wanasundara, P.K.J.P.D., Shahidi, F. 2005.** Antioxidants: Science, Technology, and Applications. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products*, Sixth Edition, Six Volume Set. Agriculture and Agri-Food Canada Saskatoon Research Center, p. 60.

Wang, S.Y., Lin, H.S. 2000. Antioxidant activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *J. Agric. Food Chem.*, 48: 140-146.

Wayner, D.D., Burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S. 1985. Quantitative Measurement of the Total, Peroxyl Radical-Trapping Antioxidant Capability of Human-Blood Plasma by Controlled Peroxidation - the Important Contribution Made by Plasma-Proteins. *Febs Lett*, 187:33-7.

Wiseman, S.A., Balentine, D.A., Frei, B. 1997. Antioxidants in tea. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37: 705-718.

Yilmaz, M., Turkdemir, M., Kilic, M.A., Bayram, E., Cicek A., Mete, A., Ulug, B. 2011. Biosynthesis of silver nanoparticles using leaves of *Stevia rebaudiana*. *Materials Chemistry and Physics* 130: 1195– 1202.

Zhang, L., Gao Y., Zhang Y., Liu J., Yu J. 2010. Changes in bioactive compounds and antioxidant activities in pomegranate leaves. *Scientia Horticulturae* 123: 543–546.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Azat AKBAL
Doğum Yeri ve Tarihi : Diyarbakır - 1987
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)
Lise : Cumhuriyet Lisesi (2001 – 2004)
Lisans : Kocaeli Üniversitesi Kimya Bölümü
(2006 – 2010)
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı
(2011 – 2014)
İletişim (e-posta) : kimger558@hotmail.com