

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FLAVONOİDLER VARLIĞINDA ASKORBİK ASİDİN BAKIR (II) – KATALİZLİ
OKSİDASYONU VE BAKIR (II) / ASKORBİK ASİT NEDENLİ LİPİT
PEROKSİDASYONUNUN İNCELENMESİ

BİLGE YILDOĞAN BEKER

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
FİZİKOKİMYA PROGRAMI

DANIŞMAN
PROF. DR. İNCİ SÖNMEZOĞLU

İSTANBUL, 2011

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FLAVONOİDLER VARLIĞINDA ASKORBİK ASİDİN BAKIR (II) – KATALİZLİ
OKSİDASYONU VE BAKIR (II) / ASKORBİK ASİT NEDENLİ LİPİT
PEROKSİDASYONUNUN İNCELENMESİ**

Bilge YILDOĞAN BEKER tarafından hazırlanan tez çalışması 05.10.2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İnci SÖNMEZOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. İnci SÖNMEZOĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi

Prof. Dr. Filiz İMER
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Zekiye ÇINAR
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Birsen DEMİRATA
İstanbul Teknik Üniversitesi

Bu alışma, Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' nün 29-01-02-03 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Bu çalışmayı büyük titizlik ile yöneten, her zaman ve her konuda bilgi ve deneyimleri ile bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. İnci SÖNMEZOĞLU ve Prof. Dr. Filiz İMER'e sonsuz minnet ve şükran duygularımı sunarım.

Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Başkanlığına ve Prof. Dr. Abdürrezzak Bozdoğan'a teşekkürlerimi sunarım.

Deneysel çalışmalarımın yürütülmesinde bana yol gösteren ve büyük yardımlarını gördüğüm İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilim dalı başkanı Prof. Dr. Reşat APAK ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Doktora eğitimim boyunca Yurt İçi Doktora Burs Programı kapsamında bana destek veren TÜBİTAK'a ve tüm çalışanlarına teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

Ayrıca, benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen ve anlayış gösteren aileme ve eşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos, 2011

Bilge YILDOĞAN BEKER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTIMA LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ	xvi
ÖZET.....	xix
ABSTRACT	xxi
BÖLÜM 1	
GİRİŞ	1
1.1 Literatür Özeti	1
1.2 Tezin Amacı	7
1.3 Orjinal Katkı	8
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİ	9
2.1 Oksidasyon.....	9
2.1.1 Reaktif Oksijen Türleri	10
2.1.1.1 Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet}$)	10
2.1.1.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	10
2.1.1.3 Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)	11
2.2 Gıda Emülsiyonları.....	12
2.2.1 Yağ-Su Emülsiyonlarında Lipit Oksidasyonu	14
2.2.2 Emülsiyonlarda Lipit Oksidasyonunu Etkileyen Faktörler	17
2.2.2.1 Lipitlerin Kimyasal Yapısı	17
2.2.2.2 Oksijen Konsantrasyonu.....	18
2.2.2.3 Antioksidanlar.....	19
2.2.2.4 Arayüzey Özellikleri.....	25
2.2.2.5 Damlacık Özellikleri.....	28

2.2.2.6	Sulu Faz Bileşenleri ile Etkileşimler	31
2.2.2.7	Malzeme Kalitesi	36
2.2.3	Lipit Oksidasyonunu Geciktirici Stratejiler	37
2.3	Antioksidanlar	38
2.3.1	Antioksidanların Tarihi	39
2.3.2	Antioksidanların Sınıflandırılması	39
2.3.2.1	Vücuttaki Korumalar	39
2.3.2.2	Vücut Dışından Temin Edilen Korumalar	40
2.3.3	In Vitro Antioksidan Faaliyeti	41
2.3.4	Antioksidanların Sinerjik Etkileri	41
2.3.5	Etki Mekanizmalarına Göre Antioksidanların Sınıflandırılması	42
2.3.5.1	Serbest Radikaller ile Kompleks Oluşturan Antioksidanlar	42
2.3.5.2	İndirgen Özellik Gösteren veya Oksijen Bağlayıcı Antioksidanlar	42
2.3.5.3	Kelat Oluşturucu Ajanlar	42
2.3.5.4	Sekonder Antioksidanlar	43
2.3.5.5	Antioksidan Aktivite Mekanizmaları	43
2.3.6	Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	45
2.3.6.1	ET Temelli Yöntemler	46
2.3.6.2	HAT Temelli Yöntemler	47
2.3.6.3	Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Spesifik Özellikleri	48
2.4	CUPRAC Yöntemi	49
2.4.1	CUPRAC Metodunun Diğer ET-Temelli Tayinlerden Üstünlükleri	50
2.5	Lipit Hidroperoksitlerin Tayini	52
2.6	Askorbik Asit	53
2.6.1	Fizikokimyasal Özellikleri	53
2.6.1.1	Fiziksel Özellikleri ve Molekül Yapısı	53
2.6.1.2	Kimyasal Özellikleri	54
2.7	Linoleik Asit Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	58
2.8	Flavonoidler	58
2.8.1	Flavonoidlerin Genel Özellikleri	58
2.8.2	Flavonoid Yapısı	59
2.8.3	Flavonoidlerin Sınıflandırılması	59
2.8.3.1	Flavonol	60
2.8.3.2	Flavanon	60
2.8.3.3	Flavanol(Flavan)	61
2.8.3.4	Flavon	61
2.8.3.5	İzoflavon	62
2.8.3.6	Antosiyanidin	62
2.8.4	Kelat Yapımı	63
2.8.5	Flavonoidlerin Radikal Sönümleme Kapasitesi	66
2.8.6	Çalışmada Kullanılan Flavonoidler	68
2.8.6.1	Kuersetin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	68
2.8.6.2	Morin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	68
2.8.6.3	Kateşin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	69
2.9	Mor Ötesi (Ultraviyole) Spektroskopisi	70
2.9.1	Lambert-Beer Yasası	73

2.10 Birinci Derece Reaksiyon Kinetiği.....	78
---	----

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM	81
3.1 Kullanılan Maddeler	81
3.1.1 Birinci Bölüm: Cu(II)-Nc Reaktifi ile AA Tayininde Kullanılan Maddeler.....	82
3.1.2 İkinci Bölüm: Fe(III)-SCN Reaktifi ile Lipit Hidroperoksitlerin Tayininde Kullanılan Maddeler	82
3.2 Araç ve Gereçler	83
3.3 Çözeltiler.....	85
3.3.1 Birinci Bölüm: Cu(II)-Nc Reaktifi ile AA Tayininde Kullanılan Çözeltiler.....	85
3.3.2 İkinci Bölüm: Fe(III)-SCN Reaktifi ile Lipit Hidroperoksitlerin Tayininde Kullanılan Çözeltiler	86
3.4 Yöntemler	87
3.4.1 Birinci Bölüm: Modifiye CUPRAC Yöntemle AA Tayini	87
3.4.2 İkinci Bölüm: Ferrik Tiyosiyanat Yöntemle Lipit Hidroperoksit Tayini.....	88
3.5 Örnek Hazırlanması ve Kinetik Ölçümler.....	88
3.5.1 Birinci Bölüm: Cu(II)-Nc Reaktifi ile Kinetik Ölçümlerde AA Tayini.....	88
3.5.2 İkinci Bölüm: Fe(III)-SCN Reaktifi ile Kinetik Ölçümlerde Lipit Hidroperoksitlerin Tayini.....	89
3.5.2.1 Linoleik Asit Emülsiyonunun Hazırlanması.....	90
3.5.2.2 Bakır(II) ve Askorbik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması	90
3.5.2.3 Flavonoid Çözeltilerin Hazırlanması.....	90
3.5.2.4 Lipit Peroksidasyonunun İncelenmesinde Şahit ve Örnek Çözeltilerin Hazırlanması	91
3.6 İstatistiksel Analiz.....	91

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER	92
4.1 Teorik Düşünceler	92
4.1.1 Birinci Bölüm ile İlgili Teorik Düşünceler	92
4.1.2 İkinci Bölüm ile İlgili Teorik Düşünceler	93
4.2 Kinetik Bulgular ve Hız Sabitleri	95
4.2.1 Birinci Bölüm İle İlgili Kinetik Bulgular ve Hız Sabitleri	95
4.2.2 İkinci Bölüm ile İlgili Kinetik Bulgular ve Hız Sabitleri.....	98
4.2.2.1 [LA / Cu(II)] ve [Cu (II) /Askorbik Asit] Oranı	98
4.2.2.2 Linoleik Asit Tek Başına ve (Linoleik Asit + Bakır(II)) Emülsiyonlarında Peroksidasyon Çalışmaları	98
4.2.2.3 {Linoleik Asit+ Askorbik Asit + Bakır(II)} Emülsiyonlarında Peroksidasyon Çalışmaları	99

4.2.2.4 {Linoleik Asit + Askorbik Asit + Bakır(II)+ Flavonoid} Emülsiyonlarında Peroksidasyon Çalışmaları	100
4.3 Cu(II) Katalizli Oksidasyona Karşı Askorbik Asidin Flavonoidler Tarafından Korunması	103
4.4 Olası Flavonoid Biyoyararlanım ve Sonuçların Besin Teknolojisine Yansımaları	104
4.5 Lipit Peroksidasyonunun Flavonoidler Tarafından Engellenmesi.....	105
4.6 Tartışma.....	141
KAYNAKLAR	143
EK-A	
DİFERANSİYEL EŞİTLİK İNTEGRASYONU	152
EK-B	
HESAPLAMALAR	155
ÖZGEÇMİŞ.....	165

SİMGE LİSTESİ

a	Çözeltiden geçen ışık demetinin dalga boyuna bağlı bir sabit
A	Absorbans
A	Dehidroaskorbik asit (Askorbik asitin 2-e oksitlenmiş hali)
A [•]	Antioksidan radikali
AH	Antioksidan
A _{max}	A parametresinin LA oksidasyonunun bitiminde ulaşılabilceği maksimum değeri
Brij35	İyonik olmayan sürfaktan
Brij76	İyonik olmayan sürfaktan
Brij700	İyonik olmayan sürfaktan
c	Konsantrasyon
C _{HL}	Toplam flavonoid konsantrasyonu
C _{H2L}	Toplam flavonoid konsantrasyonu
d _{vs}	Ortalama hacim-yüzey çapı
E _{p,a}	Anodik pik potansiyeli
E _{pH=7}	pH=7'de bir elektron indirgeme potansiyeli
Fl-OH	Flavonoid
Fl-O [•]	Ariloksil radikal
G ⁺	Gallamid
G ⁰	Metil gallat
G ⁻	Gallik asit
GSH	Glutatyon
HA ⁻	Askorbik asidin monoanyonik hali
H ₂ A	Askorbik asidin dissosiyasyon olmayan hali
HL	Monoprotik polifenoller
H ₂ L	Diprotik polifenoller
HO [•]	Hidroksil radikali
HO ₂ [•]	Perhidroksi radikali
I	Çözeltiyi terkeden ışığın şiddeti
I	İyonik kuvvet
I _s	Spesifik inhibisyon
I ₀	Gelen ışın demetinin şiddeti
k	Birinci derece reaksiyonun hız sabiti
k _d	Bakır(II) iyonları varlığında ve yokluğunda birinci mertebe hız sabitleri

	arasındaki fark
K	Bakır(II) konsantrasyonundan bağımsız spesifik hız sabiti
I	Çözeltilerin konduğu hücrenin kalınlığı
$L^\bullet$	Lipit radikali
$LOO^\bullet$	Lipit radikali
LOOH	Hidroperoksit
$NO^\bullet$	Nitrik oksit radikali
$O_2^\bullet$	Süperoksit radikali
OD_{max}	Oksidasyon ürünlerinin maksimum birikimi (yani maksimum optik yoğunluk)
pK_a	Asitlik sabitleri
$R^\bullet$	Organik radikal
$RCOO^\bullet$	Organik peroksit radikali
$RO^\bullet$	Alkoksil radikali
$ROO^\bullet$	Peroksil radikali
ROOH	Hidroperoksit
$RS^\bullet$	Tiyil radikali
S_k	K değerlerinin standart sapması
t	Reaksiyon süresi, inkübasyon süresi
T	Transmitans
V_{max}	Oksidasyonun maksimum hızı
ΔA	Absorbans değişimi
ϵ	Ekstinksiyon katsayısı
λ_{max}	Maksimum absorbans dalga boyu
α_L	L'nin relatif bolluğu
β_n	Toplu kompleks oluşum sabiti
β_n'	Toplu kararlılık sabitleri (koşullu)
σ	Yüzey yük yoğunluğu
ϕ	Damlacık hacim fraksiyonu
φ_o	Yüzey potansiyeli

KISALTMA LİSTESİ

AA	Askorbik asit
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenztiyazolin-6-sülfonik asit) radikali
AIBN	Azoizobutironitril
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Eğri altındaki alan (Area under curve)
BHA	Bütillendirilmiş hidroksianisol
BHT	Bütillendirilmiş hidroksitoluen
CA	Sitrik asit
CDTA	1,2-Sikloheksandiamin-N,N,N',N'-tetraasetik asit
CMC	Kritik misel konsantrasyon
CT	Kateşin
CTAB	Setil trimetilamonyum bromür
CUPRAC	Bakır iyonu indirgeme antioksidan kapasite (Cupric ion reducing antioxidant capacity)
CV	CUPRAC varyasyonu
DCPIP	Diklorofenol-indofenol
DHA	Dehidroaskorbik asit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
DTAB	Katyonik sürfaktan
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ESR	Elektron spin rezonans
ET	Elektron transfer
EtAc	Etilasetat
FCR	Folin-Ciocalteu
FDA	Gıda ve ilaç dairesi (Food drug administration)
FR	Serbest radikal
FRAP	Demir indirgeme antioksidan kapasite (Ferric reducing antioxidant power)
GC	Gaz kromatografisi
HAT	Hidrojen atom transfer
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatograph)
IEP	İzoelektrik nokta
IOU	İnhibe oksijen çevrilmesi

IR	Infrared
L	Ligand
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low density lipoprotein)
M	Metal
MR	Morin
MS	Mössbauer spektroskopisi
nm	Nanometre
NBS	N–bromosüksinimid
Nc	Neokuproin: 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproine: 2,9- dimethyl-1,10-phenanthroline)
NDGA	Nordihidroguayenetasidi
NEM	İşlem görmesi gereken diğer antioksidan mekanizmalar
NHE	Normal hidrojen elektrot
NMR	Nükleer magnetik rezonans
NTA	Nitrilotriasetik asit
ORAC	Oksijen radikal absorban kapasite (Oxygen radical absorbance capacity)
PG	Propil gallat
QR	Kuersetin
ROS	Reaktif oksijen türleri
RS	Raman spektroskopisi
RSD	Bağıl standart sapma (Relative standart deviation)
SDS	Anyonik sürfaktan
SOD	Süperoksit dismutaz
TAC	Toplam antioksidan kapasite (Total antioxidant capacity)
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif maddeleri (Thiobarbituric acid reactive substances)
TEAC	Troloks ekivalent antioksidan kapasite (Trolox equivalent antioxidant capacity)
TBHQ	Tersiyer bütül hidrokinon
TEMPO	Nitroksit 2,2,6,6-tetrametil -piperidin-1-oksil
TRAP	Toplam reaktif antioksidan potansiyel (Total reactive antioxidant potential)
Troloks	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
UV	Ultraviole
UV-VIS	Mor ötesi Görünür (Ultraviole Visible)
VDL	Çok düşük yoğunluklu lipoprotein (Very low density lipoprotein)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1	ROS kaynaklı lipit peroksidasyonu9
Şekil 2. 2	Hidrokarbon su içinde yağ emülsiyonunun fotoğrafı.....12
Şekil 2. 3	Askorbik asidin molekül şekli54
Şekil 2. 4	Askorbik asit-dehidroaskorbik asit redoks reaksiyonu.....56
Şekil 2. 5	Linoleik asidin molekül şekli58
Şekil 2. 6	Temel flavonoid yapısı.....59
Şekil 2. 7	Eser metallerin bağlanma konumları63
Şekil 2. 8	Flavonoidlerle (R [•]) ROS radikallerinin sönmelenmesi.....64
Şekil 2. 9	Kuersetinin molekül şekli.....68
Şekil 2. 10	Morinin molekül şekli.....68
Şekil 2. 11	Kateşinin molekül şekli.....69
Şekil 2. 12	Elektromagnetik spektrum70
Şekil 2. 13	Elektronların geçiş düzeyleri.....71
Şekil 2. 14	UV spektroskopinin spektrum ve kalibrasyon grafiği75
Şekil 2. 15	Birinci dereceden bir reaksiyonda konsantrasyon – zaman grafiği79
Şekil 3. 1	Deney düzeneği.....84
Şekil 3. 2	Bis(Nc)-bakır kelatı87
Şekil 4. 1	Farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28)x10 ⁻⁷ M] varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler116
Şekil 4. 2	{1x10 ⁻⁴ M Kuersetin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28)x10 ⁻⁷ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler116
Şekil 4. 3	{1x10 ⁻⁴ M Morin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28)x10 ⁻⁷ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler117
Şekil 4. 4	{1x10 ⁻⁴ M Kateşin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28)x10 ⁻⁷ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler117
Şekil 4. 5	{2x10 ⁻⁴ M Kuersetin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28)x10 ⁻⁷ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler118
Şekil 4. 6	{2x10 ⁻⁴ M Kateşin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28)x10 ⁻⁷ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler118

Şekil 4. 7	{ 1×10^{-4} M flavonoid karışımı (Kuersetin+Morin) ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler.....	119
Şekil 4. 8	{ 1×10^{-4} M flavonoid karışımı (Kuersetin+Kateşin) ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler.....	119
Şekil 4. 9	{ 1×10^{-4} M flavonoid karışımı (Morin+Kateşin) ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler.....	120
Şekil 4. 10	{ 1×10^{-4} M flavonoid karışımı (Kuersetin+ Morin+Kateşin) ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler.....	120
Şekil 4. 11	Asetat tamponlu flavonoid olmayan çözeltilerde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:0) $\times 10^{-4}$ M Flavonoid], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark.....	121
Şekil 4. 12	Asetat tamponlu kuersetin çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1, B:2) $\times 10^{-4}$ M Kuersetin], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark.....	121
Şekil 4. 13	Asetat tamponlu morin çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) $\times 10^{-4}$ M Morin], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark	122
Şekil 4. 14	Asetat tamponlu kateşin çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1, B:2) $\times 10^{-4}$ M Kateşin], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark.....	122
Şekil 4. 15	Asetat tamponlu kuersetin+morin karışım çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) $\times 10^{-4}$ M Kuersetin+Morin], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark	123
Şekil 4. 16	Asetat tamponlu kuersetin+kateşin karışım çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) $\times 10^{-4}$ M Kuersetin+Kateşin], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark	123
Şekil 4. 17	Asetat tamponlu morin+kateşin karışım çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) $\times 10^{-4}$ M Morin+Kateşin], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark	124
Şekil 4. 18	Asetat tamponlu kuersetin+morin+kateşin karışım çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) $\times 10^{-4}$ M Kuersetin+Morin+Kateşin], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark.....	124
Şekil 4. 19	pH 4,5 asetat ile tamponlanmış $1,0 \times 10^{-4}$ M flavonoid çözeltilisinde [A: Flavonoidsiz, B:Kuersetin, C:Morin, D: Kateşin] Cu(II) konsantrasyonunun	

	fonksiyonu olarak k_d ; k_d : Cu(II) varlığında ve yokluğunda birinci mertebe hız sabitleri arasındaki fark; doğruların eğimi K: spesifik hız sabitleri.....	125
Şekil 4. 20	Örnek sigmoidal eğri (1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA ile oksidasyon çalışması)	137
Şekil 4. 21	Origin 8.0 programında çizilen örnek sigmoidal eğrinin analizi ile hız sabitinin bulunması ($k = 0,02753 \text{ dak.}^{-1}$).	137
Şekil 4. 22	{ 1×10^{-2} M LA+farklı bakır konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları [Cu(II) [(0, 1×10^{-7} , 1×10^{-5} , 1×10^{-3} M] }	138
Şekil 4. 23	{ 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M AA+farklı bakır konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları [Cu(II) 0, 1×10^{-7} , 1×10^{-5} , 1×10^{-3} M] }	138
Şekil 4. 24	{ 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M Cu(II)+ farklı AA konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları [AA 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} M] }	139
Şekil 4. 25	{ 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M Cu(II)+ 5×10^{-5} M AA+ farklı kuersetin konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları, [Kuersetin (0, 1, 2, 3, 4, 6) $\times 10^{-7}$ M] }	139
Şekil 4. 26	{ 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M Cu(II)+ 5×10^{-5} M AA+ farklı morin konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları, [Morin (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8) $\times 10^{-7}$ M] }	140
Şekil 4. 27	{ 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M Cu(II)+ 5×10^{-5} M AA+ farklı kateşin konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları, [Kateşin (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8) $\times 10^{-7}$ M] }	140

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1	Antioksidanların inhibitör mekanizmalarının sınıflandırılması.....45
Çizelge 2. 2	Temel flavonol yapısı ve en yaygın flavonollerin, A ve B halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması.....60
Çizelge 2. 3	Temel flavanon yapısı ve en yaygın flavanonların, A ve B halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması.....60
Çizelge 2. 4	Temel flavanol yapısı ve en yaygın flavanollerin, A, B ve C halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması.....61
Çizelge 2. 5	Temel flavon yapısı ve en yaygın flavonların, A ve B halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması.....61
Çizelge 2. 6	Temel izoflavon yapısı ve en yaygın izoflavonların, A, B ve C halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması.....62
Çizelge 2. 7	Temel antosiyanidin yapısı ve en yaygın antosiyanidinlerin, A, B ve C halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması.....62
Çizelge 2. 8	Seçilmiş radikal çiftlerinin pH 7'de (E7,V) bir-elektron indirgeme potansiyelleri..... 65
Çizelge 2. 9	Seçilmiş flavonoid metabolitleri ve izoflavonların troloksa eşdeğer antioksidan kapasiteleri(mM).....67
Çizelge 4. 1	Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve kuersetin varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi..... 107
Çizelge 4. 2	Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve morin varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi.....108
Çizelge 4. 3	Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve kateşin varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi..... 109
Çizelge 4. 4	Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve ikili flavonoid karışımı (kuersetin ve morin) varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi.....110

Çizelge 4. 5	Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve ikili flavonoid karışımı (kuersetin ve kateşin) varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi.....	111
Çizelge 4. 6	Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve ikili flavonoid karışımı (morin ve kateşin) varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi	112
Çizelge 4. 7	Cu(II) konsantrasyonları ve üçlü flavonol karışımı (kuersetin, kateşin ve morin) varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi.....	113
Çizelge 4. 8	pH 4,5'ta Cu(II) flavonoid kompleksleri ile katalizlenmiş askorbik asit otoksidasyonu için spesifik hız sabitleri(K) ve hız sabitleri (k).....	114
Çizelge 4. 9	Test edilen 1×10^{-4} M flavonoid asitler ve onların karışımı ile pH 4,5'ta bakır(II) katalizli askorbik asit otoksidasyonunun ilgili asitlik ve kararlılık sabitleri ile spesifik inhibisyonları(I_s).....	115
Çizelge 4. 10	{ 1×10^{-2} M LA+ farklı bakır konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları.....	126
Çizelge 4. 11	{ 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M AA+ farklı bakır konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları.....	127
Çizelge 4. 12	{ 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M Cu(II)+ farklı AA konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları.....	128
Çizelge 4. 13	{ 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı kuersetin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20).....	129
Çizelge 4. 14	{ 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı morin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20).....	130
Çizelge 4. 14	(devamı) { 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı morin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20).....	131
Çizelge 4. 15	{ 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı kateşin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20).....	132
Çizelge 4. 15	(devamı) { 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı kateşin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20).....	133
Çizelge 4. 16	Farklı bakır(II) konsantrasyonlarında { 1×10^{-2} M LA, 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} AA ve 1×10^{-2} M LA} ve farklı AA konsantrasyonlarında { 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II)} peroksidasyon çalışmaları.....	134

Çizelge 4. 17	Farklı flavonoid konsantrasyonlarında [LA/Cu (II) =10, Cu(II) /AA =20] { 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA}'nın peroksidasyon çalışmaları.....	135
Çizelge 4. 18	Test edilen flavonoid asitler ile pH 7,0'da bakır(II)-askorbik asit ile indüklenmiş linoleik asit peroksidasyonunun ilgili asitlik ve kararlılık sabitleri ile spesifik inhibisyonları(I_s).....	136

**FLAVONOİDLER VARLIĞINDA ASKORBİK ASİDİN BAKIR (II) – KATALİZLİ
OKSİDASYONU VE BAKIR (II) / ASKORBİK ASİT NEDENLİ LİPİT
PEROKSİDASYONUNUN İNCELENMESİ**

Bilge YILDOĞAN BEKER

Kimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İnci SÖNMEZOĞLU

Antioksidanlar oksidasyonu önleyebilen ya da geciktirebilen bileşiklerdir. Flavonoidler önemli antioksidanlardır. Askorbik asidin (AA: C vitamini) Cu(II) katalizli otoksidasyondan korunması ve linoleik asidin bakır (II)/askorbik asit indüklü lipit peroksidasyonunun önlenmesi antioksidan kimyasında önemlidir.

Bu çalışmanın ilk bölümünde AA'nın, Cu(II) iyon varlığında ve yokluğunda, oksidasyonuna benzer kimyasal yapıdaki farklı flavonoid bileşiklerinin [kuersetin(QR), morin(MR) ve kateşin(CT)] tek başına ve ikili ve üçlü karışımları halinde etkisi, havalandırılmış asetat tamponlu çözeltide (pH = 4,5), 25 °C'de ve I = 0,1 M KNO₃'da, bakır(II)-neokuproin reaktifi ile spektrofotometrik olarak incelendi. Çözeltide oksitlenmeden kalan AA konsantrasyonu, *modifiye CUPRAC* (cupric ion reducing antioxidant capacity) yöntemi kullanılarak tayin edildi. pH 4,5'da AA'nın Cu(II) katalizli oksidasyonu birinci derece kinetik izledi. AA'nın katalitik oksidasyonu, stabil Cu-kuersetin ve morin kompleksleri ile Cu-kateşin kompleksinden daha fazla inhibe edildi. Karışımlar için sıralama, diğer antioksidan testleri ile de doğrulanabilen antioksidanların olası sinerjistik veya antagonistik kombinasyonları hakkında bilgi verir. Flavonoidler besin ve ilaca uyumlu olduğu için ticari ürünlerde C vitamininin stabilitesini arttırmak için kullanılabilirler.

Bu çalışmanın ikinci bölümünde, antioksidan olarak flavonoidlerin 37 °C ve pH 7’de Cu(II) iyon-askorbat kombinasyonu varlığında ve yokluğunda, havalandırılmış ve inkübe edilmiş linoleik asit (LA) emülsiyonlarındaki, peroksidasyona etkileri incelendi. Bakır(II)-askorbik asit sistemi ile indüklenmiş lipit peroksidasyon, hidroperoksit konsantrasyonuna bağlı olarak birinci derece kinetik izledi. Bir LA sistemde ferrik tiyosiyanat metot ile tayin edilen bakır başlatıcılı peroksit ürünlerinin miktarı, eklenen flavonoidlerin olası antioksidan ve prooksidan aktivitelerini saptamak için kullanıldı. Potansiyel antioksidan koruyucu olan benzer yapıdaki farklı flavonoidlerin ([kuersetin(QR), morin(MR) ve kateşin(CT)] etkileri, seçilen peroksidasyon sistemde incelendi. Flavonoidlerin LA peroksidasyonunu korumasında önleyici sırası: morin > kateşin ≥ kuersetin olarak saptandı. Kateşin ve kuersetin, konsantrasyonlarına bağlı olarak antioksidan ve prooksidan etki gösterirken; morin bütün konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterdi. Flavonoidlerin antioksidan ve prooksidan davranışları için, sonuçlar flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: askorbik asit, C vitamini, otoksidasyon, bakır(II) kataliz, flavonoidler, antioksidan koruma, linoleik asit peroksidasyonu, bakır başlatıcılı prooksidan aktivite, hidroperoksitler

**INVESTIGATION OF COPPER(II)-CATALYZED ASCORBIC ACID AUTOXIDATION
AND COPPER(II) / ASCORBIC ACID INDUCED LIPID PEROXIDATION IN THE
PRESENCE OF FLAVONOIDS**

Bilge YILDOĞAN BEKER

Department of Chemistry

PhD Thesis

Advisor: Prof. Dr. İnci SÖNMEZOĞLU

Antioxidants are compounds that can delay or inhibit oxidation. Flavonoids are important antioxidants. Protection of ascorbic acid (AA: vitamin C) from Cu(II)-catalyzed autoxidation and also prevention of linoleic acid from copper(II)/ ascorbic acid induced lipid peroxidation is an important aspect of antioxidant chemistry.

The autoxidation of AA in the absence and presence of Cu(II) ions was investigated in aerated solution at 25 °C and $I=0,1$ ionic strength (KNO_3) in the first part of this study. Also the effects of three different flavonoids of similar structure [quercetin (QR), morin (MR) and catechin (CT)] and their mixtures on the AA system were studied. The concentration of unoxidized AA remaining in solution was measured with the *modified CUPRAC* (cupric ion reducing antioxidant capacity) spectrophotometric method. The Cu(II)-catalyzed oxidation at pH 4,5 followed first-order kinetics with respect to AA concentration. Catalytic autoxidation of AA was inhibited to a greater extent by stable quercetin and morin complexes of Cu(II) than by catechin complex. The inhibitive effectiveness order of mixtures gives information about possible synergistic or antagonistic combinations of flavonoid antioxidants, which should be further confirmed with other antioxidant tests.

The peroxidation of linoleic acid (LA) in the absence and presence of Cu(II) ion–ascorbate combinations was investigated in aerated and incubated emulsions at 37 °C and pH 7 in the second part of this study. LA peroxidation induced by copper(II)–ascorbic acid system followed first order kinetics with respect to hydroperoxides concentration. The extent of copper–initiated peroxide production in a LA system assayed by ferric thiocyanate method was used to determine possible antioxidant and prooxidant activities of the added flavonoids. The effects of three different flavonoids of similar structure, *i.e.* quercetin (QR), morin (MR) and catechin (CT), as potential antioxidant protectors were studied in the selected peroxidation system. The inhibitive order of flavonoids in the protection of LA peroxidation was: morin > catechin ≥ quercetin, *i.e.* morin showed antioxidant effect at all concentrations whereas catechin and quercetin showed both antioxidant and prooxidant effects depending on their concentrations. The results were evaluated in the light of structural requirements for antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids.

Key words: ascorbic acid, vitamin C, autoxidation, copper(II) catalysis, flavonoids, antioxidant protection, linoleic acid peroxidation, copper–initiated prooxidant activity, hydroperoxides

1.1 Literatür Özeti

C vitamini (Askorbik Asit, AA) birçok biyokimyasal reaksiyona katılan önemli bir suda çözünen antioksidan vitamindir. İndirgenmiş (L-askorbik asit) ve yükseltgenmiş (dehidroaskorbik asit) olmak üzere, doğada iki şekilde bulunur. Her ikisinin de biyolojik etkisi vardır. Işığa dayanıksızdırlar, yükseltgenler, alkaliler ve bazı metaller varlığında bozunurlar. Etkili fonksiyonlarından biri oksidasyonun hücre metabolizmasına karşı oluşturduğu zararlı etkileri azaltmasıdır (Packer ve Fuchs [1]). Birçok gıdanın doğal bileşenidir, yiyecek ve içeceklere vitamin desteği ve antioksidan olarak eklenir. Kararlılığı, bu ürünlerin bileşimine ve oksijen içeriğine bağlı olarak geniş ölçüde değişir (Seib ve Tolbert [2]). Cu(II) ve Fe(III) gibi eser miktardaki geçiş metal iyonları askorbik asit otoksidasyonunda katalizör olarak görev yapar. Moleküler oksijen ile Cu(II) katalizli AA oksidasyonu gıda ve ilaç endüstrisindeki biyokimyasal öneminden dolayı, kapsamlı olarak çalışılmıştır (Khan ve Martell [3], [4], Ogata vd. [5]). Cu(II) komplekslerinin katalitik aktiviteleri, ligandın yapısı ve metal iyonunun koordinasyon geometrisine bağlıdır (Davies [6]). Cu(II) ve Fe(III)'ün EDTA, CDTA, NTA, sitrat, asetat, tartarat, ftalat, bishistidin ve glutatyon gibi ligandlarla kompleks oluşturması katalitik aktiviteyi değiştirir (Khan ve Martell [3], [4], Şahbaz ve Somer [7], İmer vd. [8], [9], Scarpa vd. [10], Ohta vd. [11]). Khan ve Martell [4], AA oksidasyonunda bakır ve demir kelatının kararlılığının katalitik aktiflikle lineer olarak değiştiğini göstermiştir. Gıda ve ilaçlarla uyumlu bileşikler olan amino asitler ile Cu(II)'nin oluşturduğu kararlı kompleksler, AA'nın katalitik otoksidasyonunu inhibe etmektedir (İmer vd. [9]). AA'nın katalitik otoksidasyonu, kararlı Cu(II)-organik meyve asiti ikili kompleksleri varlığında inhibe

edilmiştir. Sitrik asitin inhibe etme gücü en yüksek bulunurken, diğerleri; oksalik asit, malonik asit, tartarik asit ve fumarik asit sırasını takip etmiştir (Akbiyık vd. [12]). Flavonoidler bir grup polifenolik bileşikler olup çok sayıda meyve ve sebzelerde bulunur. Birçok çiçek, meyve ve yaprakların güzel renkleri bunlardan ileri gelir. Flavonoidler bitkilerde antioksidan, antimikrobiyal, fotoreseptör, görsel çekici, ışık engelleyici olarak davranırlar. Flavonoidlerin temel gıda kaynakları meyveler, sebzeler, tohumlar, içecekler (çay, kahve, şarap ve bira) ve diğer konservelelerdir (şurup, reçeller gibi). En yaygın flavonol olan kuersetin en çok soğan, elma kabuğu, böğürtlen, siyah üzüm, brokoli ve salatada bulunurken; kateşin gibi flavanoller en çok çay yaprakları, siyah üzüm, kahve çekirdekleri ve kırmızı şarapta bulunur (Passamontil vd. [13], Rice-Evans [14]). Meyve ve sebzelerde bulunan polifenoller insan sağlığına olumlu etkide bulunurlar (Gorinstein vd. [15], [16]). Bunların antialerjik, antimikrobiyal, antienflamatuar ve damar genişletici olarak biyolojik aktiviteleri çeşitli çalışmalarda gözlenmiştir. Bu çalışmaların çoğu bunların serbest radikal oluşumuna indirgenme yeteneği nedeni ile flavonoidlerin antioksidan aktivitesini gösteren çalışmalardır (Pietta [17], Dominguez vd. [18]). Gorinstein vd. [19] soyulmuş tatlı meyvelerin flavonoid içeriklerini ve toplam antioksidan miktarlarını ferrylmyoglobin/ABTS yöntemi ile ölçmüşler ($r^2 \approx 0,93$), fakat Leontowicz vd. [20], soyulmuş elma ve armut flavonoidleri için, DPPH ve β karoten testleri ile daha düşük korelasyon katsayıları ($r^2 \approx 0,60-0,65$) saptamışlardır. Radikal sönmüleyici yeteneğinin yanında, flavonoidler etkili metal iyon kelatörleridir. Geçiş metal iyonları, serbest radikal proseslerini (Fenton reaksiyonu gibi) başlatırken; metal kelatlama flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin diğer bir mekanizması olarak düşünülmüştür. Flavonoidlerin metal iyonları ile etkileşimi, bunların antioksidan özelliklerini ve bazı biyolojik etkilerini değiştirebilir (De Souza ve De Giovani [21], Fernandez vd. [22], Fiorani vd. [23]).

Flavonoidlerin yüksek antioksidan ve antiradikal aktivitesi için, 3- ve 5-OH substitüentlerinin 4-keto grubu ile metal kelatlaşması, 2,3 çift bağının 4-karbonil ile konjugasyonu ve B halkasında 3',4'-dihidroksifenol (*o*-katekol) substitüsyonu gereklidir (Rice-Evans [24], [14]). Bu çalışmada iki flavonol (kuersetin ve morin) ve bir flavan-3-ol (kateşin) olmak üzere üç flavonoid kullanıldı. Kuersetin istenen bu üç yapının hepsine sahipken, morinin B halkasında 3',4'- dihidroksifenol (*o*-katekol) fonksiyonel grubu ve

kateşinin bütün molekül boyunca elektron delokalizasyona neden olan, A ve B halkalarının eşdüzlemliliği için gerekli olan 2,3 çift bağ yoktur. Bakır(II)+askorbat kombinasyonları hidroksil radikalleri de içeren reaktif türler üretir (Chio [25]). Böylece askorbik aside test edilen flavonoidlerin koruyucu etkisinde farklılıkların olacağı beklenmektedir.

Kuersetin (3,3',4',5,7-pentahidroksiflavon) biyolojik ve farmasötik özelliklerinden dolayı birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir (Boots vd. [26], Biesaga ve Pyrzyńska [27]). Kuersetin metal iyonları ile etkileşebilen üç olası kelatlaşma bölgesine sahiptir: 3',4'-dihidroksi grup B halkasına ve 3- veya 5- hidroksi ve 4 keto grubu C halkasına yerleşir (Pekal vd. [28]). Kuersetinin bakır iyonları ile etkileşimi sonucunda metal:ligand oranı 1:1 (Fernandez vd. [22], El-Hajji vd. [29], Brown vd. [30]) veya 2:1 (Fernandez vd. [22], Bukhari vd. [31]) olan kelatlar oluşurken; 1:2 (Bukhari vd. [31]) veya 1:3 (Mira vd. [32]) gibi diğer stokiometrilere de oluşabilecekleri bildirilmiştir. Escander ve Sala [33], kuersetin ile bakır (II) arasındaki denge reaksiyonlarını, sulu çözeltilerde 20 °C ve I=0,10'de potansiyometrik ve spektrofotometrik metodlarla çalışarak kararlılık sabitlerini hesaplamışlardır. Kuersetin temel koşullarda Cu(II) iyonları varlığında incelenmiş ve serbest radikalli ortamda hasarı önlemek için gerekli olan olayların mekanizması açıklanmıştır (Torreggiani vd. [34]). Makris ve Rossiter [35], kuersetinin Cu(II) katalizli degradasyonunu sulu sitrat model sistemde pH 8 ve 97 °C'de ortama askorbik asit ve kateşin ilavesi ile çalışmışlardır. Çözeltiye AA ilavesi kahverengileşmeyi önlerken (flavonolün kinona oksidasyonunun 420 nm'deki absorpsiyonunun ölçümleriyle dedekte edilmesi gibi), kateşin önemli bir renk artışına sebep olmuştur.

Çay kateşinlerinin (3,5,7,3',4' –Flavan-3-ol) antioksidan aktiviteleri, pH ve metal iyonlarından etkilenmektedir (Kumamoto vd. [36]). Kateşinin asitlik sabitleri ve Cu(II) komplekslerinin oluşum sabitleri, potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemlerle çalışılarak hesaplanmıştır (Teixeira vd. [37]). Cu(II) ve morin (3,5, 7,2',4'-pentahidroksiflavon) arasındaki stabil 1:1 kompleksinin oluşumu metanollü ortamda çalışılmıştır (Panhwar vd. [38]). Flavonollerin (kuersetin ve morin) ardışık asitlik sabitleri (pKa), potansiyometrik teknikler kullanılarak bulunmuştur (Herrero-Martinez vd. [39]).

Karmaşık reaksiyonlara kadar giden bir seri radikal zincir reaksiyonlarında lipitler oksijenle reaksiyona girdiğinde lipit oksidasyonu meydana gelir. Gıdalardaki lipitlerin oksidasyonu kalite kaybına neden olur. Canlıda lipit oksidasyonu, kronik kalp hastalığı, arteroskleroz, kanser ve yaşlanma sürecinde rol oynayabilir (Jadhav vd. [40]).

Sıcaklık, oksijen basıncı, metal katalizörler, yağ bileşimi ve yağ şekli gibi oksidasyonu etkileyen birçok faktör, oksidasyon koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Frankel [41]). Antioksidanlar ortamda bulunduğu lipit oksidasyonunu önleyebilir ya da geciktirebilir.

Geçiş metal iyonları (örneğin bakır) ile indüklenmiş lipit peroksidasyonu, Cu(II) ile başlayan redoks döngüsü oluşumunu gerektirir, burada AH bir antioksidanı (askorbik asit gibi) ve LOOH bir lipit hidroperoksiti göstermektedir:



İlerleme basamağı, moleküler oksijen veya Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla devam eder (Burkitt [42]):



Lipit radikalleri ($\text{LO}^{\bullet}$ ve $\text{LOO}^{\bullet}$) etrafındaki diğer yağ molekülleri ile zincir reaksiyonu şeklinde lipit oksidasyonunu devam ettirir (McClements ve Decker [43]). Lipit moleküllerinin kimyasal yapısı, özellikle çifte bağların sayısı ve pozisyonu, lipitlerin oksidasyona yatkınlığını belirler. Lipit oksidasyonuna karşı doymuş lipitler doymamış lipitlerden çok daha fazla stabildir (McClements ve Decker [43]). Kolloidal çözeltelerde, doymamış yağ asitlerindeki çifte bağların pozisyonu, lipit oksidasyonuna yatkınlığı etkiler (Miyashita vd. [44]).

Lipit oksidasyonu doymamış lipitlerle oksijen arasındaki bir reaksiyondur. Oksijen besinlerdeki yağlarda sudan üç kez daha fazla çözünür (Ke ve Ackman [45]) ve böylece yağ fazında lipit oksidasyonu için yeterli oksijen her zaman vardır. Tween 20 ile stabilize

edilmiş linoleik asit yağ-su emülsiyonlarında, oksijen konsantrasyonunun lipit oksidasyon kinetiğine etkisi araştırılmıştır (Marcuse ve Fredricksson [46], [47], [48]). Düşük oksijen konsantrasyonlarında lipit oksidasyonu için hız belirleyici basamak, sulu faz içinden oksijenin difüzyon hızıdır. Yüksek oksijen konsantrasyonlarında ise, bu difüzyon hızı lipit oksidasyon hızından daha fazla olduğu için, mevcut oksijen konsantrasyonunu azaltmakla lipit oksidasyonu geciktirilebilir. Örneğin besinlerin vakum ya da azot atmosferi altında paketlenmesi (McClements ve Decker, [43]). Linoleik asidin Cu(II) kompleksleri ile oksidasyonu da hava ile doyurulmuş çözeltilerde gerçekleştirilmiştir (Ueda vd. [49]).

Lipit oksidasyonunda prooksidatif etki, mikromolar bakır konsantrasyonlarında gözlenmiştir. Böyle davranışlar AA içeren potasyum linoleatın hızlı peroksidasyonunda ilk olarak Haase ve Dunkley [50] tarafından ve daha yakın zamanda da, AA katalizli geçiş metal iyonu ile indüklenmiş peroksidasyon yönünden yorumlanmıştır (Kritharides [51]).

Antioksidanlar besinlere ilave edildiğinde acılaşmayı en aza indirir, toksik oksidasyon ürünlerinin oluşumunu geciktirir, besinde kaliteyi korur ve raf ömrünü artırır (Jadhav vd. [40]). Demir/askorbik asit ile indüklenmiş emülsifiye linoleik asit peroksidasyonu üzerine antioksidanların etkisi, Cuvelier vd. [52] tarafından çalışılmıştır. Torel vd. [53], linoleik asit ve metil linoleatın otoksidasyonunun kateşin, kuersetin ve morin gibi flavonoidler tarafından inhibe edildiğini ve morinin en çok inhibe edici bileşik olduğunu gösterdiler. Yani, linoleik asidin trans-trans hidroperoksit izomerlerinin oluşumu flavonoidler ile engellenmektedir (Torel vd. [53]). Kuersetin ve morin zincir kırıcı antioksidanlar olarak, setil trimetilamonyum bromür (CTAB) misellerinde linoleik asidin otoksidasyonunun araştırılmasında kullanıldı ve her iki flavonolün antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlendi (Wang ve Zheng [54]). Miseler bir sistemde, antioksidanların lipofilitesi karşılaştırıldığında (oktanol-su partiyon katsayısı olarak yansıdığına), *o*-dihidroksi fenolik grupların varlığı gibi yapısal karakteristikler antioksidan aktivitede önemlidir. Çünkü böyle fenoliklerin (yani *orto*-hidroksi fenoksil radikali) ara oksidasyon ürünleri, misel fazında molekül içi hidrojen bağlanması nedeniyle, daha stabildir (Foti vd. [55]) ve fenoksil radikalın stabilizasyonu radikali daha güçlü bir fenolik antioksidan yapar (redoks potansiyelindeki azalma yüzünden).

Ayrılmış düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL)'in Cu(II) indüklü oksidasyonuna, urat varlığında veya yokluğunda, kuersetinin etkisi çalışılmış ve tek başınayken kuersetinin peroksitlenmiş LDL'ye prooksidan olarak davrandığı gözlenmiştir (Filipe vd. [56]). Zhu vd. [57] flavonoidlerin (kuersetin ve morin gibi) antioksidan olarak görev yaptığını ve LDL'de kalan ve tekrar üretilen α -tokoferol mekanizması yoluyla doğrudan veya dolaylı olarak LDL'yi oksidasyondan koruduğunu gösterdiler. Bir flavonoidin LDL'yi oksidasyondan korumadaki etkinliği, flavonoidin kararlılığı ve hidroksil gruplarının sayı ve yerleriyle belirlenir (Zhu vd. [57]). Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma kapasitesi daha önceden birkaç çalışmada in vitro olarak çalışılmış ve önemli yapı-aktivite ilişkisi kurulmuştur (Pekkarinen vd. [58], Pietta [17], Dominguez vd. [18], Akbıyık vd. [12], Yıldıoğan-Beker vd. [59]). Flavonoidler radikal sönümleyici etkilerinin yanında etkili metal iyon kelatörleridir. Geçiş metal iyonları serbest radikal prosesin başlamasında hayati bir rol oynadığı için (mesela Fenton reaksiyonları yoluyla) (Boadi vd. [60]), flavonoidlerin antioksidan aktivitesinin diğer bir mekanizmasının, metal kelatasyon olduğu düşünülür. Metal iyon etkileşimleri, flavonoidlerin antioksidan özelliklerini ve bazı biyolojik etkilerini değiştirebilir (Brown vd. [30]).

Linoleik asit emülsiyonundan (Cu(II) tuzu ilavesiyle) oksijen geçirilirse zamana bağlı olarak kümen hidroperoksitler oluşur (yağların zamanla acılaşma nedeni) ve bunlar, asitli Fe(II)-rodanür çözeltisinden kan kırmızı renkli Fe(III)-rodanür oluştururlar (Lea [61], Mihaljevic vd. [62]). Ortama katılan çeşitli antioksidanların aktivitesi, birim bekletme zamanında Fe(III)-rodanür kompleksinin daha az oluşmasıyla orantılıdır. Metal katalizör başlatıcılı oksidasyonda antioksidan ve prooksidan aktivitelerini tayin için, LA sistemdeki oluşan peroksit demir tiyosiyanat metotla saptanmıştır (Fukumoto ve Mazza [63]).

Bir bileşiğin prooksidan aktivitesinin, metal iyonlarını (mesela Fe(III) ve Cu(II)) daha düşük değerlere indirme yeteneğinden kaynaklandığı kabul edilir. Daha düşük değerdeki metaller O_2 veya H_2O_2 ile reaksiyona girip reaktif türler (mesela Fenton tipi reaksiyonlar yoluyla) oluşturarak istenmeyen oksidasyonların artışına sebep olabilir. Antioksidan potansiyele benzer olarak, flavonoidlerin prooksidan davranışlarının moleküldeki hidroksil gruplarının sayısına bağlı olduğu ve aynı sayıda -OH bağlı flavonoidler için, flavonların flavanonlardan daha yüksek Cu(II) başlatıcılı prooksidan

aktivite gösterdikleri bildirilmiştir (Cao vd. [64]). Genel bir kural olarak, bitki kaynaklı antioksidanların düşük konsantrasyonlarda prooksidan aktivite ve bir kritik değerin üstünde antioksidan aktivite gösterdiği iddia edilmiştir (Yen vd. [65], Wanasundara ve Shahidi [66]).

Peroksidasyonun kinetik profili üç parametreyle karakterize edilir: Hızlı oksidasyona kadar olan yavaş adım (lag), oksidasyonun maksimum hızı (V_{max}) ve oksidasyon ürünlerinin maksimum birikimi (OD_{max}). Antioksidanların eklenmesi bu durumu değiştirir ve oksidasyonun kinetik parametrelerini etkiler. Özellikle, antioksidanlar lag'ı uzatabilir ve/veya V_{max} 'ı ve OD_{max} 'ı azaltabilir (Pinchuk ve Lichtenberg [67]). Bu çalışmada, LA sistemde zamanla oluşan kümen hidroperoksitlerin demir(II) rodanür çözeltisiyle oluşturdukları demir(III) tiyosiyanattan kaynaklanan, absorbans değişimi inkübasyon zamanının fonksiyonu olarak sigmoidal eğriler vermiştir (Özilgen ve Özilgen [68], Watanabe vd. [69]). Eğer oksidasyon ürünlerinin (OD_{max}) maksimum absorbansı 1'e yaklaşırsa (yani $A_{max} = 1$), oksidasyonun maksimum hızı (V_{max}), $\ln((1-A)/A)$ 'nın inkübasyon zamanına (t) karşı çizilen grafiğinden hesaplanabilen birinci derece hız sabiti (k) olarak saptanabilir.

1.2 Tezin Amacı

Bu tezin birinci bölümünde, antioksidan olarak flavonoidlerin askorbik asidin bakır(II) katalizli oksidasyonuna; ikinci bölümünde de yine flavonoidlerin bakır(II)-askorbat sistem ile indüklenmiş lipid peroksidasyonuna etkilerinin araştırılması hedeflenmektedir. Bu amaçla tezin ilk bölümünde AA'nın Cu(II) iyon varlığında ve yokluğunda oksidasyonu, havalandırılmış asetat tamponlu çözeltide (pH = 4,5), 25 °C'de ve $I = 0,1 \text{ M KNO}_3$ 'da incelendi. Gerçek gıda sistemleri çeşitli flavonoidleri içerdiği ve besin hazırlama ve formülasyonunda önemli olduğu için, benzer yapıdaki (kuersetin, morin ve kateşin) farklı flavonoidlerin tek başına ve ikili ve üçlü karışımları halinde etkisi araştırıldı. Tezin ikinci bölümünde, 37 °C ve pH 7'de Cu(II) iyonları varlığında ve yokluğunda havalandırılmış ve inkübe edilmiş linoleik asit (LA) emülsiyonlarında, lipid peroksidasyonu incelendi. Ayrıca, LA peroksidasyonu, Cu(II)+ askorbik asit (AA) başlatıcılığı olarak da tek başına ve AA'nın potansiyel antioksidan koruyucusu olan

flavonoidler (yani omurgada 3-hidroksiflavon taşıyan iki flavanol: kuersetin, morin ve bir flavanol: kateşin), varlığında araştırıldı.

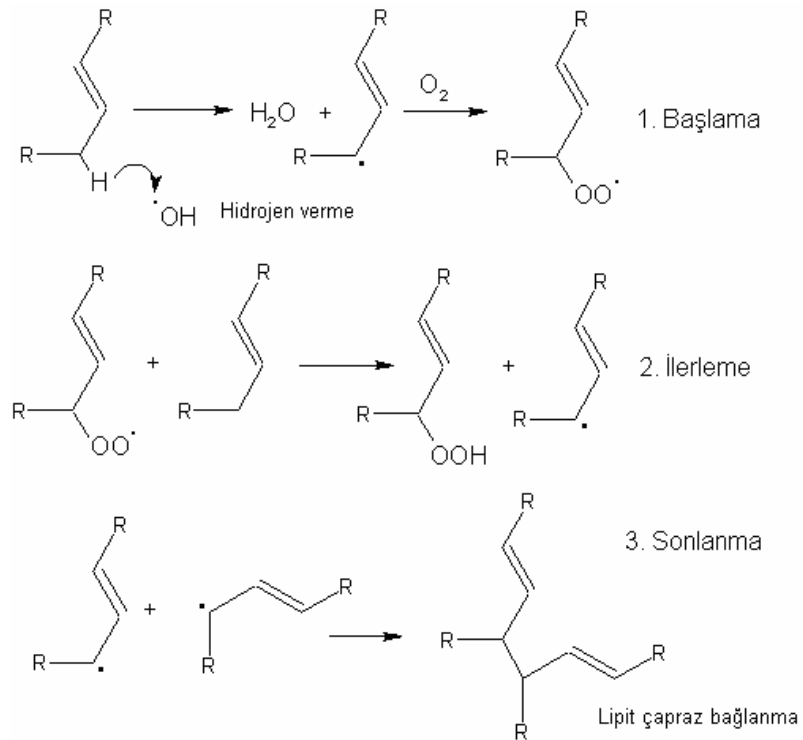
1.3 Orjinal Katkı

Flavonoidler, gıda ve ilaçlara uygun bileşikler olduğu ve ticari ürünlerde C vitamininin stabilitesini arttırmak için kullanılabildiği için, polifenollerce bu zengin desteklerin kullanımını arttırır (Cermak ve Wolfram [70]). Bu çalışmanın sonuçlarından, AA'nın bioflavonoid içerikli besin katkı formülasyonlarının çok stabil olabileceğini ve bu yüzden insan sağlığına, saf C vitamininden daha fazla, yararlı olabileceği sonucunu çıkarabiliriz.

Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi birçok çalışmaya konu olmasına rağmen, prooksidan etkisinin dikkate alındığı çok az literatür çalışması bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın bulgularının, heterojen gıda örneklerinin korunmasında prooksidan olarak hareket edebilen flavonoidlerin bulunduğu gerçek şartların daha iyi anlaşılmasında yardımcı olacağına inanılmaktadır.

2.1 Oksidasyon

Elektronların bir atomdan başka bir atoma transferine oksidasyon denir ve oksijenli solunum da bizim metabolizmamızın önemli bir parçasıdır. Oksijen, elektron taşıma sisteminin esas elektron taşıyıcısıdır ve enerjinin ATP şeklinde üretilmesini sağlar. Fakat elektronlar çiftleşmediği zaman sorunlar ortaya çıkar ve serbest radikallerin oluşmasına sebep olabilir. Oksijen temelli serbest radikallere örnek olarak reaktif oksijen türleri (ROS) verilebilir.



Şekil 2. 1 ROS kaynaklı lipit peroksidasyonu (Pietta [17])

ROS'nin vivo olarak farklı roller üstlendiği kabul edilir. Bunların bazıları olumlu olup enerji üretimi, fagositoz, hücre büyümesinin düzenlenmesi, hücre içi iletişim ve biyolojik olarak önemli olan maddelerin sentezlenmesiyle bağlantılıdır. Fakat ROS aynı zamanda çok zarar verici de olabilir; çünkü hücre membranlarında lipitlere, dokulardaki veya enzimlerin proteinlerine, karbonhidratlara ve DNA'ya saldırarak oksidasyona neden olur ve membranların zarar görmesine, protein modifikasyonlarına sebep olabilir (Şekil 2.1). Bu oksidatif hasar, yaşlanma, kalp rahatsızlıkları, katarakt, zihinsel fonksiyon bozukluğu ve kanser gibi birçok dejeneratif hastalıkla beraber anılmaktadır. İnsanlar serbest radikallere karşı antioksidan sistemler geliştirmişlerdir.

2.1.1 Reaktif Oksijen Türleri

2.1.1.1 Süperoksit Radikali ($O_2^{\bullet}$)

Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir. Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, oksidan perhidroksi radikali ($HO_2^{\bullet}$) oluşturmak üzere protonlanır.

2.1.1.2 Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksidin iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.

Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin ($O_2^{\bullet}$) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dolayı dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir, ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir.

Spontan dismutasyon pH 4,8'de en hızlıdır, enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe(II) veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının ($O_2^{\bullet-}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) oluşturur.

2.1.1.3 Hidroksil Radikali ($OH^{\bullet}$)

Hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir, yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri ($RS^{\bullet}$), karbon merkezli organik radikaller ($R^{\bullet}$), organik peroksitler ($RCOO^{\bullet}$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur. Canlıda hidroksil radikallerinin temel kaynağı muhtemelen Haber-Weiss reaksiyonudur. Burada süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet-}$) hücrel Fe(III)'ü Fe(II)'ye indirger ve bu yolla Fe(II) ve hidrojen peroksit arasındaki Fenton reaksiyonunu başlatır.

Haber-Weiss Reaksiyonu

Hidrojen peroksit (H_2O_2) $O_2^{\bullet-}$ ile reaksiyona girerek hidroksil radikali oluşur.



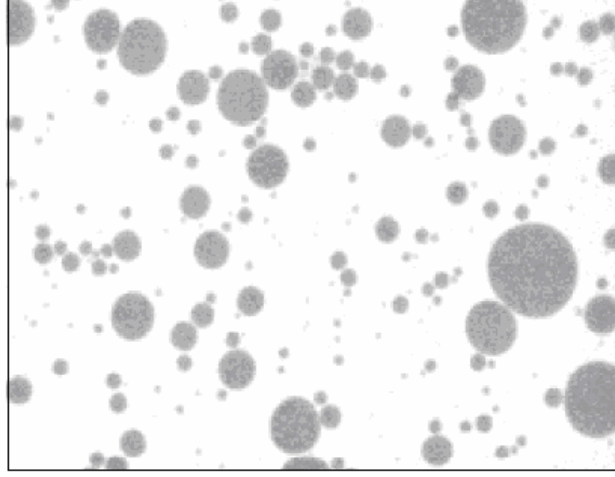
Fenton Reaksiyonu

Hidrojen peroksit Fe^{2+} ve diğer geçiş elementleri (Cu, Zn, Mn, Cr, Co, Ni) varlığında indirgenerek hidroksil radikali oluşur (Özyürek vd. [71]).



2.2 Gıda Emülsiyonları

Bir emülsiyon, biri diğeri içinde küçük küresel damlacıklar halinde yayılan birbiriyle karışmayan iki sıvıdan (genellikle yağ ve su) oluşur (Şekil 2.2).



Şekil 2. 2 Hidrokarbon su içinde yağ emülsiyonunun fotoğrafı. Koyu kısımlar emülsiyon damlacıkları ve açık kısımlar sulu fazdır

Çoğu besin, çapı 0,1 ve 100 μm arasında olan farklı boyutta damlacıklar içerir. Emülsiyonlar, yağ ve su fazlarının sistem içinde relatif yerleşmesine göre sınıflandırılır. Yağ damlacıklarının bir su fazda dağılmasıyla oluşan sistem, **su içinde yağ (oil-in-water) veya O/W** emülsiyonu olarak isimlendirilir. Su damlacıklarının bir yağ fazda dağılmasıyla oluşan sistem, **yağ içinde su (water-in-oil) veya W/O** emülsiyonu olarak isimlendirilir. W/O emülsiyonlarındaki lipit oksidasyonunun hızı yağlardaki ile benzer olacaktır, çünkü lipit fazın yüzeyi direkt olarak havaya maruz kalacaktır. Bununla birlikte prooksidanlar veya antioksidanların su damlacıklarına veya yağ içinde su ara yüzeyine yerleşmesi, W/O emülsiyonlarında lipit oksidasyonuna etki edebilir.

Emülsiyonlar, yağ ve su fazları arasındaki yüzey alanını arttırmak için gerekli olan pozitif serbest enerjiden ve yağ ve suyun farklı yoğunluklarda olmasından dolayı termodinamik olarak kararsız sistemlerdir. Bu sebepten emülsiyon, su (daha yüksek yoğunluklu) tabakası üstündeki yağ (daha düşük yoğunluklu) tabakasından oluşan bir sistemde, yağ ve su arasındaki teması mümkün olduğunca küçültmek için ayrılmaya meyillidir. Belli bir zaman periyodunda (birkaç hafta, ay veya yıllar) emülsiyonları kinetik olarak sabit tutabilmek için, homojenizasyondan önce kimyasal maddeler olarak

bilinen emülsifierler katılmalıdır. Emülsifierler, homojenizasyon boyunca yeni oluşan damlacıkların yüzeyinde adsorplanan yüzey aktif maddelerdir. Damlacık yüzeyinde bulunduğu eklenen damlacıkların çökmesine ve damlacıkların toplanmasını önleyen koruyucu membran oluşturmaya yardımcı olur. Besin endüstrisinde en yaygın olarak kullanılan emülsifierler; amfifilik proteinler, fosfolipitler ve küçük moleküllü yüzey aktif maddelerdir. Bu emülsifierler ile oluşan ara yüzey membranların doğası, emülsiyonlarda lipit oksidasyonunun hızı üzerine büyük etki yapabilir. Yani, farklı emülsifierler kullanılıp yüzey karakteristikleri değiştirilerek emülsiyonların oksidatif stabilitesi arttırılabilir.

Emülsiyonu üç ayrı bölgeye ayırmak mümkündür: Damlacıkların içi, devamlı faz ve ara yüzey bölge. Ara yüzey, bütün emülsiyon damlacıkları ile çevrili olan dar bölgedir ve genel olarak yüzey aktif moleküllerden oluşur; ayrıca diğer molekülerde olduğu gibi yağ ve su moleküllerini de içerebilirler. Ara yüzey karakteristiği, mevcut moleküllerin çeşit ve konsantrasyonuna bağlıdır. Ara yüzey genellikle yalnızca birkaç nanometre kalınlıktadır ve özellikleri emülsifier moleküllerin hidrofobik kısmından hidrofilik kısmına gittikçe farklılık gösterir. Kalın ara yüzey tabakaları toplam damlacık hacminin önemli bir kısmını kapsar. Emülsiyon içinde düşük konsantrasyonlarda bulunan moleküllerin bazı türlerinin büyük bir kısmı, bu ara yüzeyde bölünebilir. Birçok hidroperoksitler, prooksidanlar ve antioksidanlar emülsiyonlarda birkaç μM 'den birkaç mM 'ye konsantrasyon aralığında bulunabilir. Mesela 0,2 mM tipik antioksidan konsantrasyonu, % 0,02'den daha az emülsiyonun toplam hacmine ekivalenttir ve bu yüzden tümüyle ara yüzey bölge içine yerleşebilecektir. Emülsiyonları stabil kılmak için yüzey aktif maddeler (sürfaktan) kullanıldığında bunlardan yalnızca bir kısmı gerçekten damlacıkları kuşatır, kalanı sürfaktan miselleri olarak sulu fazda kalır. Amfifilik ve polar olmayan moleküller, sürfaktan misel varlığında olduğu gibi, sürfaktan moleküllerle birleşerek emülsiyon damlacıklarını kuşatır. Böylece sürfaktanların toplam konsantrasyonu artmış olur, damlacıklar ve miseller arasında dağılımında olduğu gibi, emülsiyon içinde moleküllerin dağılımı üzerine önemli etkisi olabilir.

Emülsiyonun bazı bölgelerindeki çeşitli moleküller, polaritelerine ve yüzey aktivitelerine göre kendi aralarında üç farklı bölgede bulunur. Polar olmayan moleküller çoğunlukla yağ fazında, polar moleküller su fazında ve amfifilik moleküller

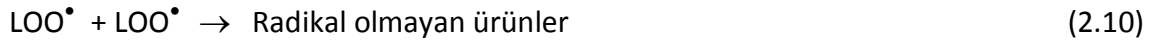
ara yüzeyde bulunur. Emülsiyondaki molekülün moleküler çevresinin, kimyasal reaktivite üzerine önemli etkisi vardır. Besin emülsiyonlarındaki lipit oksidasyonu için diğer bir önemli faktör, lipit moleküllerinin ara yüzeye paralel veya dikey yönelmesidir, çünkü bu faktör, suda çözünen prooksidanlara veya antioksidanlara erişebilirliği etkiler. Oksidasyon ilerledikçe, emülsiyonda yerleşme ve yönelmeyi değiştiren farklı reaksiyon ürünlerinin karışımı üretilir ve sonuç olarak oluşan bu ürünler, yeni çevrelerinde bulunan diğer moleküllerin çeşitliliğine bağlı olarak lipit oksidasyonuna etki ederler.

Emülsiyon sistemlerin fiziksel karakteristikleri; besin emülsiyonlarındaki lipit oksidasyonuna etki eden boyut dağılımı, emülsiyon damlacıklarının konsantrasyon ve fiziksel durumu, ara yüzey membranının karakteristiği, bazı damlacık-damlacık etkileşimlerinin aralık ve büyüklüğü gibi faktörler hakkında bilgi verir (McClements ve Decker [43]).

2.2.1 Yağ-Su Emülsiyonlarında Lipit Oksidasyonu

“Lipit oksidasyonu” oksijen ile lipitlerin etkileşimi sonucu oluşan bir dizi karmaşık kimyasal değişikliği tanımlamak için kullanılan genel bir terimdir. Belli bir besindeki lipit oksidasyonunun kesin mekanizması mevcut reaktif türlerin tabiatına ve fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Lipit oksidasyonu üç farklı aşamaya ayrılabilir: başlama, ilerleme ve sonlanma. Lipit peroksidasyonu çalışmaları su içinde yağ emülsiyonları ve sulu kolloidal sistemlerde, damlacık yüzeyindeki lipit hidroperoksidasyonlar ile geçiş metallerin etkileşimlerini ileri sürer. Geçiş metalleri doymamış yağları alkil radikallerine (örneğin, $Fe^{2+} + RH \rightarrow Fe^{3+} + R + H^+$) doğrudan parçalama yeteneğine sahiptir, fakat bu tepkime son derece yavaş meydana gelir ve bu nedenle lipit oksidasyonunun ilerletmede önemi yoktur. Emülsiyonlarda lipit oksidasyonunun hızlanması için en olası mekanizma; lipit hidroperoksitlerin (ROOH) geçiş metalleri ile ya da diğer prooksidanlarla oldukça reaktif peroksil ($ROO^{\bullet}$) ve alkoksil ($RO^{\bullet}$) radikallerine bozunmasıdır (2.4) ve (2.5). Bu radikaller doymamış yağlar ile damlacıklar içinde veya yağ-su ara yüzeyinde lipit radikallerinin oluşumuna yol açar ($L^{\bullet}$ ve $LOO^{\bullet}$) (2.6), (2.7), (2.8). Lipit oksidasyonu lipit radikalleri ile onların yakın çevresindeki başka lipitler

arasındaki zincir reaksiyonunu iletir (2.9). Oluşan bazı lipit radikalleri diğer radikaller ile reaksiyona girdiğinde sonlanabilir (2.10).



Alkoksil radikallerinin oluşumu (2.5), ayrıca β -bölünmesi reaksiyonlarına yol açar. Bunun sonucunda aldehytler, ketonlar, alkoller dahil olmak üzere farklı içerikte birçok çeşit molekül oluşur. Bu moleküller okside yağların karakteristik fizikokimyasal ve tat-koku gibi özelliklerinden sorumludurlar.

Yukarıdaki reaksiyon mekanizması sistemi içinde çeşitli reaktif türlerin fiziksel konumunu göstermenin pek önemi yoktur. Emülsiyon damlacıklarındaki hidroperoksitler genellikle yüzey aktiftir ve bu nedenle damlacıkların yüzeyinde birikirler. Lipit oksidasyonunu hızlandırmaktan sorumlu birçok moleküler türler ise, sulu faz orijinlidir. Örneğin, geçiş metalleri ya da enzimler. Hızlandırılmış lipit oksidasyonu için, damlacık yüzeyindeki çeşitli reaktif türlerin özelliklerine bağlı olarak, lipit ile prooksidanların yakın temasta olması gerekir. Bir defa serbest radikaller damlacık yüzeyinde oluşturulduğunda, onların yakın çevresindeki lipitleri ya da damlacıkları kendi içinde etkileştirebilirler. Emülsiyonlarda lipit oksidasyon hızı serbest radikallerin, hidroperoksitler ya da yağların damlacık içinde bir bölgeden bir başka bölgeye difüzyonu ile sınırlanır. Bir damlacık içindeki moleküllerin hareketi için geçen zaman, kabaca belli tür moleküllerin yarısının damlacık dışına tamamen difüzyonu için geçen sürenin tayini ile saptanabilir. Besin emülsiyonlarında bulunan tipik damlacık boyutu

için bu zaman skalası, lipit oksidasyon prosesi için normal olarak gözlenen zaman skalasından çok kısıdır.

Lipit oksidasyonunun mekanizmasını bilmek ve lipit oksidasyonunun ilerlemesini geciktirmek için etkili stratejilerin geliştirilmesi yiyecek imalatçılarına yarar sağlar. En ideali kimyasal reaksiyonların detaylarını ve onların çevresel koşullarında nasıl davranacağını bilmektir. Bu bilgi ile bütün reaktan ve ürünlerin kesin yerleri, hareketleri ve fizikokimyasal özellikleri tüm reaksiyon boyunca izlenebilir. Pratikte lipit oksidasyonunun büyük bir çoğunluğunda farklı oksidasyon ürünleri için reaksiyon mekanizmasını tam kurmak mümkün değildir. Buna rağmen bütün reaksiyon tepkimelerinden bir basamağı tanımak mümkün olur. Örneğin, başlama basamağı ya da erken ilerleme basamaklarından biri. Bu adımı kontrol ederek, lipit oksidasyonunun ilerlemesini geciktirmek etkin bir şekilde mümkün olur.

Besin emülsiyonlarının oksidatif kararlılığını etkileyen faktörlerden analitik kullanılabilirliği olan yöntemler, bizim için lipit oksidasyonunun izlenmesi için güvenilirdir. Analitik metotların büyük bir kısmı, lipit oksidasyonunun yağlarda ve araştırılması için geliştirilmiştir. Analiz öncesinde yağ fazını ekstre etmek zorunlu olmasına rağmen, bu tekniklerin bir çoğu lipit oksidasyonunu izlemek için kullanılır.

Bu teknikler çeşitli moleküllerde konsantrasyon değişikliğini ölçer ve bu da lipit oksidasyonunun ilerlediğinin göstergesidir. Bazı teknikler reaktanların azalmasını ölçer, (oksijen, lipit, hidroperoksitler ve antioksidanlar gibi), diğerleri ise ara ürünlerin oluşumunu (hidroperoksitler ve konjuge dienler gibi) ve ürünlerin oluşumunu (alkoller, aldehitler, hidrokarbonlar ve ketonlar gibi) ler. Lipit oksidasyonunun kimyasal karışıklığından dolayı ilerlemeyi tanımlamak için uygun teknik seçerken dikkatli olunmalıdır. Sürecin yeterli açıklamasını elde etmek için, en az iki ya da daha çok farklı analitik teknik kullanılması her zaman tavsiye edilir.

2.2.2 Emülsiyonlarda Lipit Oksidasyonunu Etkileyen Faktörler (McClements ve Decker [43])

2.2.2.1 Lipitlerin Kimyasal Yapısı

Lipit molekülünün kimyasal yapısı özellikle çifte bağların sayısı ve yeri, oksidasyona yatkınlığı belirler. Lipit oksidasyonunda doymuş yağlar doymamış yağlardan çok daha fazla kararlıdır. Bu yüzden gıda emülsiyonlarında lipit oksidasyonunu geciktirmenin en açık yolu, az yağ içeren ya da hiç doymamış yağ içermeyen yağ kaynağı kullanmaktır. Pratikte bunun olması mümkün değildir, çünkü doymamış yağlar fiziksel, tat ve koku gibi özelliklere sahiptir. Doymuş yağlar tek başına kullanılamaz. Örneğin doymuş lipitlerin kristal yapıya sahip olmaları, aynı zincir uzunluğundaki doymamış lipitlerden daha olasıdır. Ayrıca, doymuş yağların çeşitli sağlık problemlerine yol açtığı bilinir ve bundan dolayı yiyeceklerde onların içeriğini arttırmak, beslenmeyle ilgili tavsiyelerin aksine olacaktır. Gıda imalatçıları bu yüzden, lipitli yiyeceklerde oksidasyonu kontrol etmenin alternatif yollarını bulmalıdırlar.

Yağlarda, yağ asitlerinin oksidasyon hızı onların doymamışlık derecelerine bağlı olarak artar. Böylece yüksek konsantrasyonda çoklu doymamış yağ asidi içeren yağlar, lipit oksidasyonuna özellikle eğilimli olurlar. Bazı çalışmalarla sulu kolloidal dispersiyondaki yağ asitleri şaşırtıcı şekilde ters eğilim gösterir; doymamışlık derecesi arttığında oksidasyona yatkınlıklar da artar. Bu deneylerle doymamış yağ asitlerinin iyonik olmayan yüzey miselleri içinde çözülmesi sağlanır (Tween 20). Misellerin içinde yağ asitlerinin moleküler düzenlemelerindeki farklar yüzünden olduğu akla gelmesine rağmen, şu anda bu gözlemin sebebi bilinmiyor. Mümkün olan şudur ki; doymamış yağ asitleri, misellerin hidrofobik kısmına iyice gömüldükleri için sulu prooksidanlara daha az duyarlı olmuştur. Buna rağmen, bu hipotezin desteklemesi için güncel olarak hiçbir direkt deneysel kanıt yoktur. Su içinde yağ emülsiyonları kullanarak benzer denemeler yapılmadığından, bu sistemlerde lipitlerin oksidatif stabilitesinin doymamışlıkla arttığını veya azaldığını söylemek mümkün değildir.

Doymamış bir yağ asidinde çifte bağın pozisyonu, keza kolloidal dispersiyonlarda lipit oksidasyonuna yatkınlığı gösterir. Doymamış yağ asitlerindeki geometriksel ve pozisyonel izomerler, iyonik olmayan yüzey aktif misellerde pH 7,4'de çözülür (Tween

20) ve oksidasyon Fe(II)/askorbik asit sistemi ile katalizlenir. Bu ölçümlerden görülmüştür ki; bir yağ asidinin metil ucu çifte bağa yaklaştıkça oksidasyona dayanıklılığı artmaktadır. Bu durum muhtemelen yağ asitlerinin misellere yönelmesiyle olur. Böylece hidrokarbon kuyrukları iç tarafta yer edinirken, karboksil grubu sulu faz içine girer. Fe(II)/askorbik asit sistemi sulu fazda çalışır ve bu yüzden misellerin içinde bulunan doymamış yağ asitlerinde iç kısımlara gömülmüş olan çifte bağlarda oksidasyon olma olasılığı çok fazlalaşır. Deneylerle onaylanması gerekmesine rağmen, bu etkinin ayrıca suyun içinde yağ emülsiyonlarında önemli olması beklenir.

Lipit moleküllerinin polaritesi onların damlacık emülsiyonundaki yerini ve oksidasyona olan hassasiyetini belirler. Yüzey aktif etil linoleat içeren su içindeki yağ emülsiyonları ile yapılan denemelerde yağ, damlacık içi yerine yağ yüzeyinde bulunduğunda oksidasyona daha yatkın olduğunu göstermiştir. Bir oksidasyonun belirlenmesi için bazı çalışmaların gerekliliğine rağmen, yine de yüksek derecede polar olmayan lipit ya da antioksidanların, daha polar ve amfifilik yapıda olanlardan, daha az lipit oksidasyonuna yatkın olması beklenir.

2.2.2.2 Oksijen Konsantrasyonu

Lipit oksidasyonu doymamış yağ ile oksijen arasında olan reaksiyondur. Oksijen besinlerdeki yağlarda sudakinden yaklaşık üç kat daha fazla çözünür. Oksijeni engellemek için bazı önlemler alınmadıkça, yağ fazında her zaman için lipit oksidasyonuna neden olacak oksijen mutlaka bulunur.

Düşük oksijen konsantrasyonlarında, lipit oksidasyonunun hız sınırlayıcı basamağında oksijenin sulu faza doğru difüzlendiği gözlenmiştir. Oksijen miktarının sınırlı olduğu koşullarda lipit oksidasyon hızı, mekanik karıştırma ve soğutma işlemleri ile artar. Çünkü bu işlemler oksijen konsantrasyonunu arttırır. Yüksek oksijen konsantrasyonlarında oksijenin difüzlenme hızı, lipit oksidasyon hızından daha yüksektir. Lipit oksidasyonunu geciktirmek için en etkili yol oksijen konsantrasyonunu azaltmaktır. Örneğin; gıdaları vakum ya da azot atmosferi altında paketlemek gibi. Buna rağmen proseslerde gıdaları oksijenden uzak tutarak depolamak kolay değildir. Çünkü ürün atmosfere açıldığı an oksidasyona maruz kalır.

2.2.2.3 Antioksidanlar

Yağ asitlerinde oksidasyonu geciktirmenin en etkin yollarından biri, bunları antioksidanlar ile birlikte bulundurmaktır. Antioksidanlar, oksidasyona neden olan maddelerinin kontrol edilmesi (örneğin, oksijen ve lipitler), prooksidanların kontrol edilmesi (reaktif oksijen türleri ve prooksidan metalleri) ve serbest radikalleri yok etmek gibi farklı görevlerde bulunurlar. Antioksidanlar dikkatlice kullanılmalıdır, çünkü bu maddeler bir seri koşullar altında lipit oksidasyonunu geciktirirken, farklı bir seri koşullarda oksidasyonu ilerletirler. Antioksidanları mekanizmalarına göre birincil veya ikincil antioksidanlar olarak sınıflandırmak mümkündür. Buna rağmen unutulmaması gereken, maddelerin antioksidan aktivitelerinin birden çok mekanizmaya sahip olduğudur.

Birincil Antioksidanlar

Chain breaking - zincir kıran antioksidanlar olarak bilinen antioksidanlar, serbest radikalleri tutma yeteneğine sahip maddelerdir. Bunlar oksidasyonun başlama basamağını erteleyebilir ya da ilerleme basamağını kesebilirler. Zincir kıran antioksidanlar lipit ve peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek onları daha kararlı radikal ve radikal olmayan ürünlere dönüştürler (Eşitlik 2.11–2.13). Bu işlem ile meydana gelen antioksidan radikalleri ($A^\bullet$), lipit ve peroksil radikallerinden daha az reaktiftir ve oksidasyonu ilerletmede daha az etkindir. Zincir kıran antioksidanlar, peroksil radikallerinde yağlara nazaran daha yüksek bir affiniteye sahiptir. Bu yüzden başlama ve ilerleme basamakları boyunca meydana gelen serbest radikalleri temizlemeye uğraşırlar.



Zincir kıran antioksidanlar ayrıca, peroksil radikalleri, alkoksil radikalleri ve diğer antioksidan radikalleri ile reaksiyona girerek lipit oksidasyonunu engelleme yeteneğine sahiptirler (Eşitlik 2.14-2.16).



Zincir kıran antioksidanların lipit oksidasyonunu inhibe etme etkinlikleri farklıdır. Bu durum onların kısmen kimyasal özelliklerine, kısmen de sistemdeki fiziksel konumlarına bağlıdır. Lipit oksidasyonunu yağlarda geciktirmekte etkili olan antioksidanlar, emülsiyonlarda aynı etkiyi göstermeyebilirler. Örneğin, hidrofilik antioksidanlar su içinde yağ emülsiyonlarında lipofilik antioksidanlardan daha az etkilili iken, lipofilik antioksidanlar yağların içinde hidrofilik antioksidanlardan daha az etkilidirler. Bu gözlem (yağlarda mısır yağı ve su içinde yağ emülsiyonlarındaki polar ve polar olmayan antioksidanların oksidasyona etkileri incelenerek) yakın zamanda yapılan bazı çalışmalarla desteklenmiştir. Çoğunlukla polar olmayan antioksidanlar (alfa tokoferol, askorbil palmitat ve karnosol) su içinde yağ emülsiyonlarında yağlara göre daha etkilidir. Bunun tersi ise, çoğunlukla polar antioksidanlarda (trolloks, askorbik asit, karnosik asit ve rosmarinik asit) gözlenir. Antioksidanların yağlarda ve emülsiyonlardaki etkilerinin farklı olması genelde yağ-hava ve yağ-su sistemlerinde ara yüzeydeki affinitelerinin farklılıklarından dolayıdır. Polar antioksidanlar yağlar içinde çok etkilidirler, çünkü bunlar hava–yağ ara yüzeylerinde birikirler. Oksijen, genellikle yağın tüm hacmi içinde dağıtılmıştır; fakat oksidasyon ilerledikçe yağ içinde tüketilmiş olabilir. Yine de yağın üzerinde yüksek bir oksijen konsantrasyonu görülür, bundan dolayı lipit oksidasyonu daha hızlı meydana gelir. Buna ilaveten hidroperoksitler lipit oksidasyonunun ilk basamaklarını ilerletmekten sorumludurlar, çoğunlukla da polar olup ve bundan dolayı hava–yağ ara yüzeyinde birikmeleri olasıdır. Sonuç olarak lipit oksidasyonu bir yağ–hava ara yüzeyinde yağdakinden daha hızlı gerçekleşir. Bu yüzden oksidasyonu geciktirmede tercihen ara yüzeylerde yerleşmiş olan antioksidanlar, yağ yüzeyi boyunca eşit şekilde dağıtılmış olan antioksidanlardan daha fazla etkilidirler. Yağların tersine, ağırlıklı olarak polar olmayan antioksidanlar emülsiyonlarda daha etkindir. Çünkü onlar yağ damlacığının içinde muhafaza edilir veya yağ-su ara yüzeyinde birikirler. Bunların yerleri ise, hidroperoksitlerin damlacık yüzeyinde kendi

aralarında etkileştikleri ve sulu fazda prooksidanların meydana geldiği yerdir. Aynı sebepten dolayı zincir kıran antioksidanların lipid oksidasyonunu geciktirici etkileri onların polaritelerinin azalmasıyla veya yüzey aktivitelerinin artmasıyla artar. Çünkü bunların oksidasyonun meydana geldiği yağ-su arayüzeyinde yerleşmeleri daha muhtemeldir. Bu çalışmalar amfifilik antioksidanların emülsiyonlarda lipid oksidasyonunu geciktirmede çok etkili olduklarını gösterirler. Çünkü bunlar oksidasyon reaksiyonlarının ilerlediği ara yüzey sınırlarında olmaya eğilimlidirler. Yine de bu alanda başarılı olmak için iyi karakterize edilmiş emülsiyon-prooksidan-antioksidan sistemlerinde daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır. Özellikle, bir emülsiyon içindeki farklı tip moleküllerin kesin yeri hakkında nicel bilgiye sahip olmamız, lipid oksidasyonu üzerine fiziksel konumun etkisini daha iyi anlamamızı sağlar.

Zincir kıran antioksidanların elektrik yükleri damla yüzeyindeki ile bağıntılıdır. Antioksidanların emülsiyonlardaki konumunu ve bu nedenle de oksidasyonu geciktirme etkinliklerini saptamak önemlidir. Somon balığının su içinde yağ emülsiyonunda, negatif (SDS) ya da yüksüz damlacık (Brij 35) içeren emülsiyonda, antioksidanların pH 7'de negatif yüklü damlacıkların olduğu emülsiyonlarda, lipid oksidasyonunu G^+ (gallamid), G^0 (metil gallat) > G^- (gallik asit) sırasına göre inhibe ettiği ve emülsiyonlarda damlacıkların yüzeyine elektrostatik olarak saldırı yapan antioksidanlar lipid oksidasyonunu ertelemeye diğerlerinden daha fazla etkin olduğu görülmüştür. Ayrıca yüksüz antioksidanlar suda en az çözünen oldukları için etkileri fazladır ve bu nedenle ara yüzeyde olma ihtimalleri yüksek polar yüklere sahip olan antioksidanlardan daha fazladır. Diğer taraftan pH 3 iken antioksidanların negatif yüklü damlacıklarda lipid oksidasyonunu inhibe etme etkileri: $G^0 > G^- > G^+$ şeklindedir, bu bazı durumlarda prooksidanların aktivitelerinde de gözlenir. Bu bariz çelişkinin en olası sebebi düşük pH'larda Fe^{3+} 'ün suda çözünürlüğünün çok fazla olması ve demiri en aktif şekline dönüştürme gücüne sahip antioksidanların olmasıdır (örneğin, $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$). pH 3'de damlacık yüzeyinde hidroperoksitlere yakın bir yerde kayda değer miktarda Fe^{3+} ve G^+ bulunur, bu yüzden demiri oksidasyon reaksiyonlarında yeniden kullanılacak şekle getirebilen antioksidanlar kullanılır. Ayrıca belirtmek gerekir ki; düşük pH'da G^- 'ler bazı elektriksel yüklerini (karboksil grupları için normal pK'sı yaklaşık pH 4-5 civarında

olanlar için) kaybedebilirler ve bu nedenle antioksidan ve damlacık yüzeyleri arasında elektrostatik itme daha az olacaktır.

Burada, farklı tipte moleköl türlerinden dolayı kolay anlaşılmayan reaksiyonlarda lokasyonun önemini dikkatle vurgulamaktadır. Örneğin; substrat, prooksidanlar ve antioksidanlar. Yüksüz (Brij) damlalarda antioksidanların pH 3 ve 7'de görünen etkinlikleri: $G^0 > G^+ > G^-$ şeklindedir. Yüksüz antioksidanlar muhtemelen en etkili olanlarıdır. Çünkü suda en düşük çözünübilirliğe sahiptirler ve bu nedenle yüklü antioksidanlara göre daha çok su-yağ ara yüzeyinde bulunmayı isterler.

Antioksidanların lokasyonlarının, lipit oksidasyonunu inhibe etmeleri üzerine etkisi araştırmacılara yol göstermiştir. Bunun sayesinde çeşitli antioksidanları su yağ katmanları içinde bölümlere ayırmışlardır; bunların bazıları, yüzey aktif madde-yağ tabakaları, sürfaktan misel çözeltileri ve su içinde yağ emülsiyonlarıdır. Bir antioksidanın içerdiği kimyasal grupların tipi, sayısı ve pozisyonu antioksidanların polaritesini belirler; bununla yağ, su ve ara yüzey bölgeleri arasındaki katılımların oranı saptanır. Antioksidanların polariteleri ile oksitlenebilir lesitin membranlarının sulu çözeltilerinin içindeki oksidasyonu inhibe etme etkileri arasında doğrudan bir ilişki kurulur, en yüksek polariteli antioksidan lipit oksidasyonunu inhibe etmede en düşük etki gösterir. Bu ilişkinin nedeni yüksek polariteye sahip antioksidanların lipit oksidasyonunun meydana geldiği yerden uzaklaşıp sulu fazlara yakın yerde bulunmalarıdır. Buna rağmen hidrofilik antioksidanların aslında sürfaktanların polar baş gruplarına, özellikle iyonik olmayan büyük polar gruplu sürfaktanlar veya antioksidan ile zıt yüklü iyonik sürfaktanlara ayrılabilirdiği vurgulanmalıdır. Bir sistemdeki moleküller olumlu etkileri maksimum düzeye çıkaran ve olumsuz etkileri en aza indiren bir biçimi benimsemeye yönelir. Sürfaktanların hidrofilik kuyruğu ile polar olmayan parçalar etkileşirken amfifilik antioksidanlar bir ara yüzeyde birikebilir, çünkü polar olmayan kısımlar sürfaktanların hidrofobik kuyruğu ile etkileşim gösterirken, polar kısımlar su veya sürfaktanların polar baş grupları ile dipol-dipol, iyon-dipol veya iyon-iyon bağları oluşturabilirler.

Pek çok antioksidan iyonlaşabilir gruplara sahiptir, bundan dolayı polarite sulu fazın çevresindeki pH'dan çok fazla etkilenir. Bir antioksidanın iyonik şekli iyonik olmayan

şeklinden çok daha polardır ve bu yüzden sulu çözeltiler için büyük ilgi odağıdır. İyonlaşma etkisi antioksidan molekülünün gerisindeki polaritenin bölümlerine bağlıdır. Eğer durgun halde molekül polar ise, hem iyonize olan hem iyonize olmayan şekilleri ağırlıklı olarak suda çözülür olacaktır. Su içinde yağ emülsiyonlarında, bu tür davranışlar gallik asit tarafından sergilenmektedir. pH 7’de asit grubu tamamen iyonlaşırken sulu faza katılım yaklaşık % 94, pH 3’te kısmen iyonlaşırken katılım oranı % 86’dır.

Diğer taraftan, eğer antioksidan molekülünün kalan kısmı polar değilse, iyonize şekil çoğunlukla suda çözülebilir, fakat iyonize olmayan form yağda veya ara yüzey bölgelerinde ayrılmak için kuvvetli bir eğilim gösterebilir. Bu tür davranışlar su içinde yağ emülsiyonlarda trolaks tarafından sergilenir. pH 7’de asit grubu tamamen iyonlaşırken sulu fazdaki parçalar yaklaşık olarak % 90 ayrışır. pH 3’te asit kısmen iyonlaşırken yaklaşık olarak sadece % 30 ayrışma olur. Bu tipteki antioksidanların lipit oksidasyonunu geciktirme etkisi kuvvetli bir şekilde pH’a bağlıdır.

Hidrofilik ve lipofilik antioksidanların ayrılmaları mayonez içinde ölçüldüğünde, polar antioksidanların genellikle sulu fazda ve ara yüzey bölgelerde yerleştiği ve antioksidanların polaritesinin arttığında, bunların sulu fazdaki kesrinin de arttığı görülür. Polar olmayan antioksidanlar genelde yağ fazında ve ara yüzey bölgede yerleşirler ve antioksidan polaritesi azalırken, yağ fazdaki kesri artmaktadır. Buradan, bir antioksidanın lipit oksidasyonunu engellemedeki etkinliğinin onun moleküler yapısına bağlı olarak, bir besin emülsiyonu içindeki lokasyonu ile önemli ölçüde değiştiği görülür.

BHA, BHT veya TBHQ gibi sentetik gıda katkıları, zincir kıran antioksidanlardır ve besin sistemlerinde kullanılırlar. Bu sentetik antioksidanlar sürekli yüksek etki göstererek lipit oksidasyonunu kontrol ederler. Yine de tüketici tamamen doğal ürünleri tercih eder, bu da gıda endüstrisini uyumlu, yandaş alternatifleri aramaya teşvik eder. Bu sebepten dolayı zincir kıran antioksidanların tokoferol ve meyve özlerini (böğürtlen, yabanmersini, kiraz, üzüm, ahududu, çilek) ve bitki özlerini (kedinanesi, kasımpatı, çördük, limon tesellisi, mercanköşk, biberiye, adaçayı, kekik) içeren emülsiyonlarda ve yağlarda etkinliklerini değerlendirmek için bir seri çalışma yürütülür. Bu doğal antioksidanların birkaçı gıda emülsiyonlarında lipit oksidasyonunu geciktirmede yüksek

etkinlik göstermesine rağmen, diğerleri sadece sınırlı derecede bir etkinlik gösterirler. Su içinde yağ emülsiyonlarında çok etkin olan bu doğal özler, damlacık içinde ve yağ-su ara yüzeyinde biriken antioksidan bileşenlerini içine alır. Örneğin görünürde polar olmayanlar gibi. Bunların kullanımı fiyatların yüksek oluşu, tatları ve renkleri dolayısıyla hala sınırlı olabilmektedir. Ayrıca zincir kıran antioksidanlar oksidasyon sırasında tüketilecektir, yani en sonunda bozulma meydana gelecektir (ransidite ya da acıma meydana gelmesi). Bu sebepten dolayı emülsiyonlarda lipit oksidasyonunu geciktirmek için alternatif stratejiler araştırılmaktadır.

İkincil Antioksidanlar

İkincil antioksidanlar geçiş metallerinin kelatlaşması, birincil antioksidanlara hidrojen sağlama, oksijen sönmüleme ve reaktif türlerin deaktivasyonu gibi çeşitli mekanizmalarla lipit oksidasyonunu geciktirebilir. Bu mekanizmalardan hiçbirinin serbest radikal türlerini daha kararlı ürünlere dönüşümünü gerektirmediği not edilmelidir. Su içinde yağ emülsiyonları açısından ikincil antioksidanların en önemli türü geçiş metal iyonlarının kelatlarıdır. Demir ve bakır gibi geçiş metallerinin varlığı, sulu fazdaki yağ emülsiyonlarında lipit oksidasyonunu ilerletmede önemli bir rol oynar. Geçiş metallerinin lipit oksidasyonunu önemli derecede arttırma etkinliği damlacık yüzeyinde yer aldıklarında olur, çünkü bu durumda lipit substratlarına daha yakın olurlar. Sonuç olarak, herhangi bir geçiş metali ile sulu faz bileşeninin bulunduğu sulu fazda damlacık yüzeyi civarında olanların lipit oksidasyonunu geciktirmesi beklenir.

EDTA ile fosfatın ikisi de geçiş metali kelat yapıcılarıdır ve içinde somon balığının bulunduğu su içinde yağ emülsiyonlarında lipit oksidasyonunu geciktirebilir. Bu durum anyonik ve iyonik olmayan sürfaktanlar tarafından sağlanır, çünkü bunlar damlacık yüzeyindeki demiri uzaklaştırırlar. EDTA ve apotransferrin özellikle demir bağlı bir proteindir ve somon balığı yağının su içindeki emülsiyonlarında lipit oksidasyonu oranında büyük bir azalma gösterir. Ayrıca soya yağının su içindeki emülsiyonlarında EDTA'nın demir kelatı yapma yeteneği otooksidasyonun azaldığını gösterir, bu kararlılık siklodekstrin ve fosfolipit kabarcıklarının oksidasyonu ile olur. Buradan, eser metallerin gıda emülsiyonlarında safsızlık olarak bulunduğu ve lipit oksidasyonunun ilerlemesinde büyük ölçüde sorumluluğu olduğunu söyleyebiliriz.

Antioksidan görevi gören kelat yapıcılar, metal katalizli reaksiyonları inhibe edebilir, bu olay farklı türdeki mekanizmalar tarafından katalizlenir. Bu da metal redoks döngüsünü önleme, çözünmeyen metal komplekslerin oluşumu, metal koordinasyon sitelerinin işgali, metal ve lipit substratları arasında sterik engellenmeyi içerir. Unutulmamalı ki, bazı kelat ajanları geçiş metallerinin prooksidan aktivitelerini arttırabilir. Bu olay, onların yağda veya suda çözünürlüğünün arttırılması ya da redoks potansiyellerinin değiştirilmesiyle mümkündür.

Günümüzde kelat ajanların çoğu gıdada katkı maddeleri olarak lipit oksidasyonunu engellemek için kullanılır. Bunlardan sentetik olanlar; örneğin EDTA, fosforik asit ve polifosfatlardır. Fakat bunların kullanımlarıyla ilgili bazı sorunlar vardır. Çünkü minerallerin çok güçlü bağlanması nedeni ile biyokullanımı ve tüketicilerin tercih nedeni olmayabilir. Bunun yerine sitrik asit gibi doğal kelat ajanları kullanılabilir, fakat bunlar da geçiş metal ajanlarında daha az etkili olmaya eğilimlidirler. Bunların tatları, çözünabilirlikleri ve asit ortam ihtiyaçları gibi özelliklerinden dolayı pek çok gıdada kullanımları sınırlıdır.

Gıda uygulamalarında daha geniş bir sahada kullanılabilen alternatif doğal kelat ajanları tespit etmek için çalışmalar yapılmaktadır. Bazı çeşit proteinlerin, protein hidroksoalat ve polisakkaritlerin geçiş metallerini kelatlamada ve bunların emülsiyonlarda lipit oksidasyonunu azaltmada etkin olduğu görülür. Bu bileşenlerden bazıları gıda emülsiyonlarında başka amaçlardan dolayı kullanılırlar ve bu nedenle iki işlev görebilirler. Örneğin; kıvamlaştırıcı olarak kullanılan polisakkaritler aynı zamanda antioksidan aktiviteye sahiptirler.

2.2.2.4 Arayüzey Özellikleri

Elektrik Yüğü

Gıdalardaki pek çok yüzey aktif madde elektrik yüklüdür. Örneğin; proteinler, fosfolipitler ve sürfaktanlar. Damlacıkları çevreleyen ara yüzey membranları ayrıca belirli bir büyüklük ve işaretteki elektriksel yüğe sahip olabilir. Bu özellikler yüklü yüzey aktif türlerin konsantrasyonuna ve cinsine bağlıdır. Bir yüzeyin elektriksel özellikleri, *yüzey yük yoğunluğu* (σ) ve *yüzey potansiyeli* (ϕ_0) yönünden karakterize edilir. Yüzey

yük yoğunluğu, birim yüzey alanı başına düşen yük sayısıdır. Yüzey potansiyeli ise, yüzeyi yüklemek için gereken enerji miktarıdır. Elektriksel olarak yüklü bir yüzey, çevresindeki su fazında zıt yüklü iyonları çeker. Bu 'zıt iyonlar' basit mineral iyonları (örneğin, Na^+ , Ca^{2+} , Cl^-) veya bunlar lipit oksidasyonunu hızlandırıcı yeteneği olan iyonlar (örneğin, Cu^+ , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+}) veya lipit oksidasyonunu geciktirici olabilir (örneğin, iyonik antioksidanlar). Bir emülsiyon damlacığı üzerindeki yük yoğunluğu arttıkça, karşıt yüklü zıt iyonları çekme yeteneği o kadar artar. Bundan dolayı emülsiyonlarda damla yüzeyindeki yükün işaretini ve genliğini ayarlayarak lipit oksidasyon hızını kontrol etmek mümkündür.

Su içinde yağ emülsiyonlarında damlacık yükünün lipit oksidasyon hızını kontrol etmedeki önemi, bir dizi çalışma ile kanıtlanmıştır. Mısır yağının su içindeki emülsiyonlarında lipit oksidasyon hızı negatif yük içeren, pozitif yük içeren ve yüksüz damlacıklarda ölçüldüğünde, emülsiyonları kararlı hale getirmek için anyonik (SDS), katyonik (DTAB) veya iyonik olmayan (Brij 35) sürfaktanlar kullanılarak farklı yüklere sahip damlacıklar oluşturulur.

Lipit oksidasyonu emülsiyonların sulu fazına demir eklenerek katalizlenir. Lipit oksidasyon hızı, negatif yüklü damlacıklarda en yüksektir. Yüksüz damlacık ve pozitif yüklü damlacıklarda da oldukça benzerdir. Aynı sonuçlar, ilave metallerin bulunmadığı, anyonik (SDS), katyonik (DTAB) veya iyonik olmayan (Tween 20) sürfaktanlar ile kararlı hale getirilmiş olan, somon balığının su içinde yağ emülsiyonlarındaki oksidasyonunda da bulunmuştur.

Bu sonuçlar, pozitif yüklü demir iyonları negatif yüklü emülsiyon damlacıklarının yüzeyine çekildiğinde lipit oksidasyonunun ilerleyeceği gerçeğine bağlanır. Çünkü lipit substratı ve prooksidan birbirine çok yakındır. Varsayımlardan biri şudur; demir iyonları elektrostatik olarak pozitif yüklü damlacık yüzeylerinden itildiği zaman lipit oksidasyonunu geciktirebilir ve bu yüzden katyonik bir sürfaktan, iyonik olmayan bir sürfaktana göre daha yavaş oksidasyon hızına sahip olacaktır. Gerçekte, lipit oksidasyon hızı ölçülürken, katyonik ve iyonik olmayan sürfaktanlar ile stabilize edilmiş emülsiyonlarda küçük farklılıklar gözlemlenmiştir. Bunun nedeni çalışmalarda

oksidasyonun önemli bir miktarının meydana gelmesi için yeteri kadar beklenmemesidir.

Lipit oksidasyonunda yüzeydeki yüklerin rolü, demir iyonları içeren sulu çözeltelerde dağılmış hekzadekan emülsiyon damlacıklarının ϵ -potansiyelinin ölçülmesiyle desteklenmiştir. Demir(II) ve demir(III) iyonlarının ikisi de negatif yüklü damlacıklar ile birlikte bulunurken, pozitif yüklü veya yüksüz olan damlacıklar ile birlikte bulunmazlar. Bu hipotez deneylerle desteklenmiştir: Negatif yüklü damlacıklar ile demir iyonları arasında elektrostatik etkileşimlerin azalmasının, lipit oksidasyon hızını düşürdüğü görülmüştür; örneğin, demir kelatlarının (EDTA ve fosfat) ya da NaCl'in ilavesi. Prooksidanların oksidasyonu iletmedeki etkinliği kadar, elektrostatik etkileşimler de antioksidanların lipit oksidasyonunu geciktirme etkinliğini belirlemede önemli bir rol oynar.

Damlacık yüklerinin rolü, keza proteinlerin kararlı emülsiyonlardaki lipit oksidasyonu çalışmalarında da görülür. Tween 20 ya da izole edilmiş peynir altı suyu proteinlerini ile kararlı hale getirilmiş ringa balığı yağının su içindeki emülsiyonlarında lipit oksidasyon hızı, pH değerlerinin üstünde (pH 7) ve altında (pH 3) proteinlerin izoelektrik noktasında ölçüldüğünde (IEP pH 5), iyonik olmayan sürfaktanlar tarafından kararlı hale getirilmiş emülsiyonlarda, pH 3'de lipit oksidasyon hızı pH 7'ye göre daha hızlı olduğu görülür. İyonik olmayan sürfaktanlar tarafından kararlı hale gelmiş damlacıkların elektriksel yükü pH ile çok fazla değişmez. Oksidasyon hızında gözlemlenen farklılıklar, demirin düşük pH'da suda fazla çözünebilir olması gerçeğine bağlıdır. Bunun tersi bir etki ise peynir altı suyu proteinleri tarafından kararlı hale gelmiş emülsiyonlarda gözlemlenmiştir. Demirin çözünürlüğünün yüksek pH'da daha düşük olmasına rağmen, lipit oksidasyon hızı yüksek pH'larda daha fazladır. pH 3'de emülsiyon damlacıkları pozitif yüklüdür ve bu yüzden demir iyonları geri püskürtülür, fakat pH 7'de bunlar negatif yüklüdür ve bu yüzden demir iyonlarını çekerler. Pozitif yüklenmiş peynir altı suyu proteini içeren emülsiyonlara Tween 20 eklendiği zaman (pH 3) bunların okside olma kararlılığı azalır, çünkü sürfaktanlar proteini damlacık yüzeyinden uzaklaştırır. Bunlar, proteinlerin kararlılığının kararlı emülsiyonlardaki lipit oksidasyonunu tespit etmede pH'ın önemli bir rol oynadığını açıkça gösteriyor.

Fiziksel Engel (Bariyer)

Yeni yapılmış çalışmalar, ara yüzey membranlarının fiziksel bir bariyer gibi görev yaparak, lipit substratlarını sulu fazdaki prooksidanlardan ayırdığını ileri sürer. Lipit oksidasyonu, iki farklı iyonik olmayan sürfaktan (Brij 76 ve Brij 700) tarafından kararlı hale getirilmiş somon balığı yağının su içindeki emülsiyonlarında izlenmiştir. Bu sürfaktanlar polar olmayan aynı uzun zincirli kuyruk gruplara ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}$), fakat polar olan farklı uzunluktaki baş gruplara (10 veya 100 oksietilen gurupları) sahiplerdir. Bütün emülsiyonlarda damlacıklar benzer dağılırlar, öyle ki su fazında açığa çıkan lipit yüzey alanları benzerdir. En uzun polar baş gruplu sürfaktanlar tarafından kararlı hale getirilmiş damlacık içeren emülsiyonlarda lipit oksidasyon hızı en düşüktür. Bu sürfaktanların kalınlaştırıcı ara yüzeyi, sulu fazda lipit substratın katalizörden ayrıldığı fiziksel bir engel olarak davranmıştır. Bazı araştırmalara göre proteinlerin (yeteneklerinden dolayı), lipit damlalarının etrafında yer alan nispeten kalın ve viskoelastik biçimdeki membranları oluşturarak emülsiyonlarda lipit oksidasyonunu geciktirdiği ileri sürülmüştür.

Kimyasal Bariyer

Emülgatör moleküllerin belirli türleri, lipit oksidasyonunda kimyasal bir bariyer gibi davranır. Şeker ve amino asitlerin sulu çözeltileri serbest radikalleri temizleyecek güce sahiptirler ve bu yüzden lipit oksidasyonunu geciktirirler. Birçok emülgatör molekülleri ya şeker ya da amino asit fonksiyonel grupları içerir (örneğin, arap sakızı, modifiye nişasta ve proteinler) ve bunlar radikal temizleyici olarak görev alır. Proteinler ayrıca sistein gibi amino asitler içerir ve sistein lipitlere oranla daha kolayca oksitlenebilir. Adsorbe emülgatörler, yüksek yerel konsantrasyonu ve oksidasyon substratına yakın olmaları nedeniyle, özellikle lipit oksidasyonunu geciktirmede etkili olurlar.

2.2.2.5 Damlacık Özellikleri

Damlacıkların gıda emülsiyonlarındaki fiziksel karakterleri oldukça değişken olabilir; örneğin konsantrasyon, büyüklük ve fiziksel durumları. Damlacık konsantrasyonu kesri %1 ile (örneğin, meyve meşrubatlarında) %80'in üstünde (örneğin mayonez) değişebilir. Sükroz içeren aspir yağının su içindeki emülsiyonlarında, damlacık

konsantrasyonunun lipit oksidasyonu üzerine etkisi araştırıldığında, emülsiyonlardaki yağ damlacıkları konsantrasyonu %43,75'den %6,25'e azaldığında, oksitlenmiş yağ kısımlarında artış gözlenmiştir. Bu artışın olası sebeplerinden biri, damlacık başına üretilen radikal sayısının damlacık konsantrasyonu azaldıkça artmasındandır. Ancak emülsiyonlardaki toplam sükroz konsantrasyonu %37,5'da sabit tutulur ve damlacık konsantrasyonu arttırılırsa, su fazındaki sükroz konsantrasyonu da artar. Damlacık konsantrasyonunun artmasıyla, okside olmuş yağ fraksiyonunda gözlenen azalma, sükrozun oksidasyonunu geciktirme yeteneğinden dolayı olabilir.

İyonik olmayan sürfaktan miselleri (Tween 20) içinde çözülmüş lipit substrat (linoleik asit) içeren model sistemlerde, inert yağ damlalarının düşük ve yüksek konsantrasyonları için oksidasyon izlendiğinde (0-3 wt % n-heksadekan veya triolein), inert yağ damlacıklarının konsantrasyonu arttıkça, linoleik asidin oksidasyon hızının azaldığını görürüz. Bu muhtemelen linoleik asidin bir kısmının yüzey misellerinden emülsiyon damlacıklarının içine taşınmasından dolayı olur. Bu nedenle sulu fazdaki prooksidanlarla doğrudan etkileşim olması zorlaşır. Bu çalışmalarda kullanılan model sistem, özellikle gerçek gıda sistemlerinde lipit oksidasyonunu iyi temsil edemez; çünkü damlacık konsantrasyonu değişirken, doymamış yağların konsantrasyonu sabit tutulmuştur. Pratikte doymamış yağlar normal olarak yağ içeren damlacıklarda bulunur. Bu yüzden damlacık konsantrasyonun artışı ayrıca doymamış lipit konsantrasyonunu da arttıracaktır. Yine de bu sonuçlar; doymamış yağların emülsiyon damlacıkları içinde kaynaşmasının, onları oksidasyona karşı korumada yağların miseller içinde çözünmesinden daha fazla etkili olduğunu ileri sürer. Bu durum sürfaktanlar tarafından kararlı hale getirilmiş gıda emülsiyonlarında önemli bir sonuç oluşturur. Bu sürfaktanların önemli bir kısmı miseller gibi sulu fazda mevcut olur.

Yağ fazı, su fazı ve üst katmanlar arasında, bozuk lipit ürünleri gıda emülsiyonların lezzet ve koku gibi özelliklerini etkileyebilir. Örneğin, lezzet bileşenleri suda yağa göre çok daha kuvvetli algılanır. Buna ek olarak, bir emülsiyondaki aroma üst katmandaki uçucu moleküllerin tipi ve konsantrasyonuyla belirlenir. Lipit oksidasyonunda reaksiyon ürünleri yağ fazda su fazından daha çok çözünme eğilimi gösterir. Bunun anlamı, uçucu komponentlerin sabit bir konsantrasyonu için damlacık konsantrasyonu arttıkça, emülsiyonların üst katmanındaki uçucu konsantrasyonun azalmasıdır. Sonuç olarak,

uçucu reaksiyon ürünlerinin her iki durum için genelde aynı konsantrasyonda olmasına rağmen; yağ oranı düşük gıdalar, yağ oranı yüksek gıdalardan daha fazla okside olur diye algılanabilir. Bu da doymamış yağlar içeren yağı azaltılmış gıdaların geliştirilmesinde problem yaratır.

Gıda emülsiyonları içinde damlacıkların ortalama çapı ürüne bağlı olarak, 0,2 mikrometreden daha az (krem likrler için) ve 100 mikrometreden daha çok (salata sosları için) olabilecek şekilde değişebilir. Damlacık boyutunun, su içinde yağ emülsiyonlarında oksidatif kararlılığa etkisi için birkaç sistematik çalışma yapılmıştır. Yine de damlacık yüzeylerinde yer alan reaksiyonlarla hızlandırılmış lipit oksidasyonu iyi saptanmıştır. Birim emülsiyon hacmi başına sulu fazın gösterdiği damlacıkların yüzey alanı, $A_s = 6\phi/d_{vs}$ bağıntısı ile verilir; burada ϕ : damlacık hacim fraksiyonu ve d_{vs} ortalama hacim-yüzey çapıdır. Sabit bir damlacık konsantrasyon için, damlacık boyutu azaldıkça, damlacık yüzey alanı artar. Bunun nedeni, damlacık büyüklüğü azaldıkça lipit oksidasyonu hızının artmasıdır; çünkü lipitlerin büyük bir bölümü su fazında etkileşime maruz kalacaktır. Emlsiyonlaştırılmış dokosahegzaenoik asidin (DHA) oksidasyonunda yapılan çalışmalarda, damlacık büyüklüğünde azalma oldukça, bu emülsiyonlardaki oksidasyon hızında artış gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, lipit oksidasyonu damlacık büyüklüğüne ayrıca reaktif türlerin mevcut konsantrasyonuna da bağlıdır. Eğer bir sistemde reaktan fazlalılığı varsa, bunun sonucunda iki misline çıkmış yüzey alanı, damlacık yüzeyindeki reaktanların konsantrasyonunu da iki katına çıkarır. Bunlar damlacık yüzeyi küçüldükçe lipit oksidasyonunda beklenen artışa sebep olur. Diğer taraftan, eğer sistemde reaktan miktarı sınırlı bir sayıda ise (rneğin, hidroperoksitler) bunların tamamı damlacık yüzeyinde bulunabilir ve böylece damlacık büyüklüğündeki değişim oksidasyon hızında bir etki yaratmayabilir. Buradan, lipit oksidasyonu hızının damlacık büyüklüğüne bağlı olmadığını ortaya çıkarabiliriz.

Bir su içinde yağ emülsiyonunda, damlacıkların fiziksel durumlarının ayrıca lipit oksidasyon hızını etkilemesi beklenir. Birçok gıda emülsiyonunda damlacıklar oda sıcaklığında sıvı olarak bulunur. Ancak, soğuk havada kısmen veya tamamen katılaşmış olabilirler. Yağlarla yapılan çalışmalara göre, katı kristallenmiş yağlarda lipit oksidasyonu sıvı yağlara göre daha yavaş gerçekleşir. Fakat aynı çalışmalar su içinde yağ emülsiyonlarında henüz gerçekleştirilmemiştir.

2.2.2.6 Sulu Faz Bileşenleri ile Etkileşimler

Pek çok gıda emülsiyonunda lipit oksidasyonunu etkileyen bileşenler vardır. Bunlar; proteinler, yağlar, asitler, bazlar, tamponlar, tuzlar, sürfaktanlar ve polisakkarit gibi bileşenlerdir. Bu bileşenler kimyasal özelliklerine bağlı olarak, prooksidan veya antioksidan olarak görev alırlar. Yaygın çevresel koşullarda, bunların diğer molekül türleriyle etkileşimleri lipit oksidasyonu reaksiyonları için gereklidir. Genelde gıda emülsiyonlarında bulunan ve lipit oksidasyonuna duyarlılığı belirten bileşenlerin rolünü anlamak bu yüzden önemlidir.

Tuzlar

Negatif yüklü sürfaktanlar (SDS) tarafından kararlı hale getirilmiş mısır yağının su içindeki emülsiyonlarına NaCl (0–173 mM) eklenmesiyle, demir yokluğunda lipit oksidasyon hızında biraz azalma gözlenir, ama demir varlığında hafif bir artış olur. NaCl'ün antioksidan etkisi muhtemelen yüklü türler arasındaki elektrostatik etkileşimlerin önüne perde çekme yeteneğinden dolayıdır ve bu yüzden damlacık ara yüzeyinde demir iyonlarının biriktirme eğilimi azalır. NaCl'ün prooksidan etkisi ise, muhtemelen demirin katalitik aktivitesini arttırma yeteneğinden dolayıdır. Bu gözlemler, sistemin gereken doğasına bağlı kalarak, tuzların prooksidan veya antioksidan gibi görev aldığını düşündürür.

Şekerler

Sükroz gibi indirgenmemiş şekerler lipit oksidasyonunu inhibe eder. % 0-67 oranında sükroz ve şeker alkollerinin bir anyonik sürfaktan tarafından stabilize edilmiş aspir yağının su içindeki emülsiyonlarının sulu fazına ilavesi, lipit oksidasyon hızında azalmaya neden olur. Sükroz keza iyonik olmayan sürfaktanlarla (Tween 20) stabilize edilmiş linoleik asidin su içindeki emülsiyonlarında da lipit oksidasyon hızını azaltmıştır. Sükrozun emülsiyonlardaki lipit oksidasyonunu geciktirebilme sebebini göstermek için bazı mekanizmalar önerilir. Sükroz, su fazındaki çözülmüş oksijen konsantrasyonunu azaltır, su fazında viskoziteyi arttırır (böylece damlacık yüzeyindeki reaktif türlerin difüzyonunu azaltır) ve serbest radikal tutucu olarak görev yapar. İndirgenmiş şekerlerin, sulu kolloidal dispersiyonlarda lipit oksidasyonunu ilerlettiği gösterilmiştir.

Bu prooksidatif etkinin kaynağı indirgenmiş şekerlerin, geçiş metal iyonlarını, en aktif haline indirgemesi yeteneğidir (örneğin, Fe^{3+} ve Fe^{2+}). Gıda bileşenlerinin diğer türleri, lipit oksidasyonunu ilerletmede etkili olabilen geçiş metallerini azaltıcı ajan olarak görev alır; örneğin, gulutasyon, askorbat ve tokoferol.

Polisakkaritler

Polisakkaritler, su fazında viskoziteyi arttırmak için besinlerde su içinde yağ emülsiyonlarına ilave edilir. Bunlar, istenilen yapısal özelliklere ulaşılması ve kremalaşmaya karşı damlacıkların kararlı hale getirilmesini sağlar. Yapılan çalışmalar polisakkaritlerin su içindeki yağ emülsiyonlarında lipit oksidasyonunu geciktirme yeteneğinin olduğunu gösterir. Polisakkaritlerin lipit oksidasyonunu engelleme yeteneği için birkaç mekanizma sayılabilir. Sezgisel olarak bunlardan biri, polisakkaritler sulu fazda viskoziteyi arttırdığı için lipit oksidasyonunu geciktirebilirler ve bu yüzden reaktanların bu yöndeki hareketini yavaşlatabilirler. Gerçekte bu doğru değildir; çünkü moleküler düzeydeki küçük yapılar, kıvamlaştırıcı ajan olarak kullanılan polisakkarit molekülleri ağlarından engellenmeksizin geçebilme yeteneğine sahiptirler. Önerilen diğer iki mekanizma ise; metal iyon kelatlaştırma ve hidrojen verme mekanizmalarıdır. Ksantin, (metal iyonlarının negatif yüklü privat sitlerinde kelatlaşma kabiliyetinden dolayı) lipit oksidasyonunu inhibe etmede büyük etkinlik göstermiştir. Kitre zamkı ve metil selülozlar, geçiş metalleri ile daha az kelatlaşma yeteneğine sahip olduklarından, etkisi az olan antioksidanlardır. Buna rağmen, kitre zamkı (tragacanth) hidrojen verebilme yeteneği ve bundan dolayı zincir kıran radikali gibi görev yapması nedeniyle antioksidan aktivitesine sahiptir. Bu deneylere göre, polisakkaritler eklenerek su içinde yağ emülsiyonlarını kremalaşmaya karşı stabilize etmek veya tat ve koku özellikleri kazandırıp ayrıca oksidasyona karşı lipitleri stabilize etmek mümkün olur.

Amino Asitler

Çok sayıda amino asit, emülsiyon ve misel sistemlerde antioksidan aktivitesi gösterir. Örneğin, histidin, fenilalanin, triptofan, sistein, prolin ve lizin. Bu antioksidanlar için ilk mekanizmanın metal kelatları ve serbest radikalleri inaktif duruma getirmek olduğuna inanılır. Bazı amino asitler, görünürde yüksek konsantrasyonda oldukları zaman,

prooksidanlar gibi görev alırlar. Bütün bu çalışmalara göre amino asitlerin lipit oksidasyonunu geciktirme yeteneği onların kimyasal yapısına ve konsantrasyonuna bağlıdır.

Proteinler

Proteinler, yiyecek emülsiyonlarında çoğunlukla flokülasyon veya bütünleşmeye karşı damlacıkları kararlı kılmak için kullanılır. Bu adsorplanmış proteinlerin emülsiyonlardaki lipit oksidasyonuna etkisinin ara yüzey karakteristikleri içinde yer aldığı düşünülmüştür. Birçok yiyecek emülsiyonunda su fazında dağılmış adsorplanmamış proteinlerin hissedilir miktarları vardır. Örneğin; süt, meşrubatlar, bebek formülasyonları ve sporcular için içecekler. Bu adsorplanmamış proteinler, enzimatik veya enzimatik olmayan mekanizmalarla emülsiyonlarda oksidatif kararlılığı artırır veya azaltırlar. Proteinlerin prooksidan ya da antioksidan aktivitelerine katkı olarak, çok çeşitli fizikokimyasal mekanizmalar tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar; spesifik (tercihen oksidasyon) reaksiyonlarının katalizörlüğü, geçiş metalleri ya da diğer reaktif türlerin kelatlaşması ve serbest radikal tutulmasını kapsar. Enzimler de lipit oksidasyonunu inhibe edebilirler (örneğin, oksidan ve prooksidan reaktanlarıyla inaktive ederek) veya lipit oksidasyonu için teşvik ederler (örneğin, prooksidan oluşturan kataliz reaksiyonlarıyla). Örneğin, glikoz oksidaz/katalaz enzim sisteminin balık yağı içeren mayonezlerde lipit oksidasyonunu geciktirdiği kanıtlanmıştır. Bunu sağlayan ise glikoz oksidasyonunda oksijen kullanılmasıdır, aksi takdirde oksijen lipit oksidasyon reaksiyonlarına katılmış olacaktır. Süperoksit anyonu temizleyebilen fosfolipit tarafından stabilize olan süperoksit dismutaz, trilinolein yağının su içindeki emülsiyonlarında antioksidan gibi davranır. Ayrıca, laktoperoksidaz ve ksantin oksidazın, reaktif oksijen türlerinin üretimini kataliz edebilmelerinden dolayı, lipit oksidasyonunu ilerlettiği görülmüştür. Unutulmamalıdır ki; enzimlerin katalitik aktivitesi sistemin ısıtılmasıyla azalabilir (örneğin; protein denatürasyon sıcaklığının üzerindeki sıcaklıklarda). Bu termal işlem, enzimlerin emülsiyonlardaki oksidan veya prooksidan aktivitelerini kontrol etmekte kullanılabilir.

Proteinler keza, enzimatik olmayan mekanizmalar aracılığıyla lipit oksidasyonunu inhibe veya aktive edebilir. Süt proteinlerinin bazı çeşitleri kazein, peynir altı suyu ve

laktoferrin içerenler, su içinde yağ emülsiyonlarına katıldığı zaman önemli antioksidan özellikleri gösterirler. Kazein ve laktoferrin demiri kelatlaştırma kabiliyetinden dolayı güçlü antioksidatif etki gösterir. Peyniraltı suyu proteinlerinin antioksidan aktivitesinin kökeni muhtemelen, sülfidril ve nonsülfidril amino asitleri tarafından serbest radikallerin temizlenmesi ve sınırlı sayıda geçiş metalleri kelatları yüzündendir. İyonik olmayan bir sürfaktan (Tween 20) tarafından stabilize edilmiş somon balığı yağının su içindeki emülsiyonlarında, peyniraltı suyu proteinlerinin, lipit oksidasyonunu geciktirmesinde artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Bu durum, protein moleküllerinin kıvrımlarının açıldığı sıcaklığın üstündeki bir sıcaklığa getirildiğinde, indirgenmiş sülfidril gruplarına maruz kalmalarına bağlanılır. Buna rağmen, sülfidril gurupları NEM tarafından bloke edildiğinde, proteinlerde önemli miktarda antioksidan aktivitesi kalır. NEM'ler işlem görmesi gereken diğer antioksidan mekanizmalarını gösterir; örneğin; nonsülfidril grupları tarafından temizlenen serbest radikaller veya geçiş metalleri kelatları. Benzer sonuçlar iyonik olmayan sürfaktanlar ile stabilize olmuş metil linoleat içinde kaymaksız süt emülsiyonlarında antioksidan aktivitesinin sıcaklıkla değişiminde görülmüştür. Belirli koşullar altında, katalitik olmayan proteinler prooksidan özelliklerine sahip olur. Örneğin, toz halde izole edilmiş peynir altı suyu proteinleri izolatu (0–1 wt%) eklenerek, Tween 20 tarafından stabilize edilmiş su içindeki ringa yağının emülsiyonlarında, lipit oksidasyonu önemli ölçüde artmaktadır. Bu da muhtemelen prooksidanlardaki safsızlıklar (örneğin, hidroperoksitler veya geçiş metalleri) veya proteinin içeriğinden kaynaklanmaktadır.

Sürfaktanlar

Sürfaktanlar normalde damlacık etrafında koruyucu bir zar oluşturarak, bulanıklaşma (köpük oluşumu) ve kaynaştırmaya (topaklaşmaya) karşı, su içinde yağ emülsiyonlarını kararlı hale getirmek için kullanılırlar. Yine de homojenizasyondan sonra sık sık önemli miktarda adsorplanmamış sürfaktan molekülleri emülsiyonların sulu fazında mevcut olur. CMC olarak bilinen kritik misel konsantrasyonunda (belirli bir konsantrasyonun üzerinde), adsorplanmamış sürfaktan molekülleri, miselleri oluşturur. Miseller, polar olmayan kuyruklar iç tarafta, polar baş grupları dış tarafta olacak şekilde yüzey moleküllerinde topaklanırlar. Sürfaktan miseller, sürfaktanların baş grupları tarafından

duvar tabakası şekline getirilmiş, hidrofobik merkez (çekirdek) ve polar veya amfifilik moleküller içinde polar olmayan molekülleri birleştirme yeteneğine sahiptirler. Miseller belki de bir sistemin oksidatif stabilitesini değiştirebildikleri için lipitleri, antioksidanları veya prooksidanları çözebilirler.

Aspir yağı emülsiyonunun hemoglobin tarafından katalizlendiği bir oksidasyon çalışmasında, oksidatif kararlılığı arttıran emülsiyonların su fazında bulunan aşırı anyonik sürfaktan varlığında olduğu gözlemlenmiştir. Bunun sebebi, anyonik sürfaktanların, negatif yüklü misellere şekil vermesinden dolayı olabilir. Negatif yüklü miseller damlacık yüzeyinde prooksidan konsantrasyonunu düşürerek, geçiş metallerini yüzeylerine çekebilme yeteneğine sahiptirler. Alternatif olarak şu şekilde olmuş olabilir; yüksek sürfaktan konsantrasyonunda yağ-su ara yüzeyinde paketlenmiş sürfaktan molekülleri daha sıkıdır ve bu yüzden ara yüzey tabakada çok etkili bir fiziksel engel gibi görev alabilirler veya sürfaktanlar proteinlerin enzimatik aktivitelerini azaltarak onları denatüre edebilirler.

Su fazındaki sürfaktanların, emülsiyonlardaki lipit oksidasyonu üzerine etkisi ayrıca su fazındaki diğer bileşenlerle etkileşimleriyle olabilir. Tween 20 ile stabilize edilmiş, su içinde ringa balığı yağı emülsiyonundaki oksidasyona, ilave edilen iyonik olmayan sürfaktanlar, peyniraltı proteinleri, ya da her ikisinin karışımının etkisi çalışıldığında; sadece Tween 20 (0–2 wt %) veya sadece peynir altı suyu proteinleri (0–1 wt %) emülsiyonlara eklendiği zaman lipit oksidasyonunda hissedilir bir artış meydana gelir. Bu muhtemelen protein veya sürfaktanlar içindeki prooksidanlarda safsızlıkların mevcut olmasındandır. Ancak, Tween 20 ve peynir altı suyu proteinleri birlikte konulduğu zaman önemli antioksidan etki gösterirler. Bu etkinin kaynağı, sürfaktanların proteinlerin konformasyonunu değiştirebilme yeteneklerinden dolayı olabilir. Bunlar daha fazla serbest radikali açığa çıkararak onları temizler veya amino asitleri kelatlaştırırlar. Yukardaki tartışma, karmaşık ve daha fazla çalışılma gerektiren emülsiyonlarda, sürfaktanların lipit oksidasyonunu inhibe etme veya ilerletmedeki rolünü göstermektedir.

Asitler, Bazlar ve Tampon Çözeltiler

Asitler, bazlar ve tampon çözeltiler gıda emülsiyonlarında pH'ı kontrol etmek için kullanılırlar. Bunlar ürünün kararlılık, reoloji ve lezzetini belirlerler. Bir sulu fazın pH'ı, pH'ın reaktiviteye, çözünürlüğe ve içerdiği reaktif türlerin katılımına etkisi yüzünden, suda yağ emülsiyonlarının oksidatif kararlılığına çeşitli yollarla etki yapar. Su içinde yağ emülsiyonlarında pH'ın lipit oksidasyonu üzerine etkisi bulunmuştur, bu belki de çelişkili sonuçları açıklayabilir. Bazı araştırmacılar lipit oksidasyonu hızının pH'ın artmasıyla arttığını bulmuştur, oysa başkaları benzer sistemlerde tam tersi sonucu bulmuşlardır. Bu çalışmaların hepsi, iyonik olmayan sürfaktanlar tarafından stabilize olmuş su içinde gıda yağının emülsiyonlarında gerçekleştirilmiştir. Yine de kullanılan tamponların tipi, yağ ve sürfaktanın yapısı, oksidasyon koşulları, prooksidanların varlığı, yokluğu ve oksidasyonun izlenmesi için kullanılan analitik yöntemlerde değişiklikler gösterir.

2.2.2.7 Malzeme Kalitesi

Gıda emülsiyonları imalatında kullanılan malzemelerin kalitesi, onların oksidatif kararlıklarında bariz bir etkiye sahip olabilir. Bir emülsiyonda geçiş metallerinin küçük bir miktarı bile, hidroperoksitlerin bozunmasını hızlandırma yeteneği ile, lipit oksidasyonunu fazlaca hızlandırabilir. Geçiş metallerindeki safsızlıkların önemi bazı çalışmalarla gösterilmiştir. Bu çalışmalarda, EDTA, fosfat ya da transferin gibi geçiş metal iyonlarının spesifik kelatlarının ilavesi ile lipit oksidasyon hızının su içinde yağ emülsiyonlarında çok azaldığı görülmüştür. Bu kelat ve inaktif geçiş metallerine katkı maddesi eklemek için düşük geçiş metal konsantrasyonuna sahip malzemeler (örneğin, yağlar, su, emülsiyonlaştırıcılar, lezzetler, renkler, koyulaştırıcı ajanlar) kullanmak, bu yüzden son derece önemlidir.

Pek çok yağ ve emülsiyonlaştırıcı, ticari olarak satın alınarak, yüksek konsantrasyonda lipit peroksitleri içerenlere veya bunların depolama sırasında korunmaları için eklenir. Bu peroksitler özellikle UV ışık, sıcaklık veya geçiş metali varlığında, lipit oksidasyonunu ilerleten serbest radikalleri bozmada yüksek duyarlılık gösterir. Bunlar, lipit ya da emülsiyonlaştırıcı varlığında hidroperoksit safsızlıklarının taşınması, kolloidal sistemlerin oksidatif kararlılığını gösterir. Bu yüzden lipit oksidasyonu meydana

gelmeden önce peroksitlerin önemli bir konsantrasyonu sistemde mevcut olmalıdır. Yapılan son çalışmalara göre, sürfaktanlarda mevcut olan peroksitlerin, safsızlıkların artmasıyla, Tween 20 misellerindeki α -tokoferol oksidasyon hızı artar. Bu ilginç noktalar düşük peroksit içerikleriyle sürfaktan veya yağları kullanmanın önemine dikkat çeker.

2.2.3 Lipit Oksidasyonunu Geciktirici Stratejiler

Oksijen sistemin dışında tutularak emülsiyonların oksidatif kararlılığı büyük oranda artırılabilir. Örneğin paketlenme vakum veya azot atmosferi altında yapılabilir. Bu teknik, mayonez ve salata soslarının depolaması esnasında lipit oksidasyonunu minimum değere indirmek için ticari olarak kullanılır. Buna rağmen, ürün açıldığı anda oksijen içeri girer ve lipit oksidasyonu başlar, bu da ürünün tüketilmeden önce depolanma ömrünü azaltır.

Gıda emülsiyonlarının lipit oksidasyonuna yatkınlığı, onların imalatında kullanılan katkı maddelerinin, hidroperoksitler, geçiş metalleri veya diğer prooksidanların, düşük miktarlarda olmasını sağlayarak artabilir. Bu durum, yüksek saf katkı malzemeleri satın alınarak veya kullanımdan önce malzemeleri saflaştırma işlemine tabi tutan bir adımı kullanarak başarılabılır. Önce saf maddeler elde edilir. Hidroperoksit formundan kaçınarak (örneğin, sıcaklıkları düşürmek, oksijeni azaltmak, ışığı azaltmak) veya prooksidan safsızlıklarından kaçınmak (mesela saf malzemeler ve temiz kaplar) için dikkatlice kontrol edilen şartlar altında depolamak gerekebilir. Pratikte baktığımızda, yüksek saflıkta malzemeleri satın almak veya kullanmadan önce iyi bir şekilde temizlemek ekonomik olarak mümkün olmayabilir. Pek çok gıda bileşeni önemli miktarda safsızlık içerir ve bunlar da lipit oksidasyonunu ilerlettiği için, gıda imalatçıları alternatif metotları bulmak zorunda olabilirler.

Saf olmayan bu gıda bileşenleri, gıda emülsiyonlarını formüle etmek için kullanılan bileşenlerde safsızlık gibi duracaktır. Hidroperoksitleri prooksidanlardan uzak tutmak veya prooksidanları inaktive etmelerini önleyerek lipit oksidasyonu etkin bir şekilde geciktirilebilir. Bu birkaç yol ile başarılabılır. **İlk yol**, katkı maddeleri ilave ederek hidroperoksitleri oksidasyondan korumaktır. Bu malzemelerden geçiş metal katatları kullanılarak bunlar etkisiz hale getirilirler; EDTA, fosfat, proteinler ve polisakkaritler

gibi. **İkinci yol**, emülsiyonlaştırıcı kullanılmasıdır. Bu damlacıklara pozitif bir yük verir, bu yüzden geçiş metalleri elektriksel olarak defedilirler. Böylece, ara yüzeyde geçiş metallerinin hidroperoksitler ile yakın temas kurmaları önlenabilir. **Üçüncü yol**, geçiş metallerini azaltacak malzemeler kullanılarak, bu metallerin en aktif yapılarından korunmaktır. **Dördüncü yol**, bir emülsiyonlaştırıcı kullanılarak, hidroperoksitleri bir kenarda ve prooksidanları da başka bir kenarda tutan kalın bir ara yüzey duvarı oluşturarak, hidroperoksitler prooksidandan ayrılabilir. **Beşinci yol**, prooksidatif enzimleri deaktive edilebilir; örneğin ısıtmak, denatüre eden madde eklemek veya pH'ı ayarlamak.

Serbest radikallerde zincir kıran antioksidanlar kullanılarak, lipit oksidasyonuna karşı ekstra bir koruma sağlanabilir. Bu antioksidanların zincir kıranlarda en etkin oldukları bölgede yerleşmeleri önemlidir. Bu normalde şu anlama gelir; lipit peroksitleri, serbest radikalleri bozunmaya uğrattığı yağ-su ara-yüzeyine yakın bir yerde yer almalıdırlar.

Pratikte lipit oksidasyonunu geciktirmenin en etkin yolu, bu stratejilerden birkaçını bir arada kullanmaktır. Her besin emülsiyonunun kendine özgü düzenlemesi ve yapısı vardır. Bu yüzden, her yeni sistem için ayrıntıları kesin bilinen antioksidanlar ayarlamak zorunludur.

2.3 Antioksidanlar

Antioksidan veya yükseltgeme önleyici, yağların otoksidasyonunu yavaşlatan maddedir. Canlılardaki kimyasal proseslerde özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller, farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere, dolayısıyla canlıya zarar verebilir. Antioksidanlar, serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) bunların hücrelere zarar vermelerini önler. Bu özellikleriyle antioksidanlar hücrelerin anomalileşmesi ve sonuç olarak tümör oluşturma risklerini azalttıkları gibi, hücre yıkımını da azaltırlar ve daha sağlıklı (yaşlılık etkilerinin minimum olduğu) bir yaşam şansı sağlarlar (Pietta [17]).

2.3.1 Antioksidanların Tarihi

Sentetik antioksidanların gıdalardaki kullanımı 1940'lı yıllarda BHA ve gallik asidin esterlerinin oksidasyonu önlediklerinin anlaşılmasıyla başlamıştır. Demir ve bakır gibi geçiş metallerinin zararlı etkileri sitrik asit (CA), etilendiamintetraasetik asit (EDTA) veya onların türevlerine metal deaktivatör veya kelat ajanı olarak etki ettikleri, daha sonra bulunmuştur. 1954'te ABD'de BHT'nin gıdalarda kullanılmasına izin verilmiştir. Tersiyer Bütıl Hidrokinon (TBHQ) 1972'de ticari amaçla kullanılmaya başlanmıştır. Sentetik antioksidanların muhtemel karsinogenik etkileri büyüyen bir tepkiye neden olmaktadır. Böylece Japonya ve çok sayıdaki diğer ülke BHA'nın gıdalarda kullanılmasına izin vermemektedir. TBHQ'nun da Kanada, Japonya ve Avrupa ülkelerinde kullanımına izin verilmemektedir. Bu yüzden sentetik antioksidanların yerine doğal antioksidanların kullanımı için genel bir eğilim mevcuttur.

2.3.2 Antioksidanların Sınıflandırılması

Oksidasyona karşı bazı antioksidanlar vücutta üretilirken bazıları da dışarıdan temin edilir.

2.3.2.1 Vücuttaki Korumalar

Vücuttaki oksidasyona karşı koruma, *enzimatik* ve *enzimatik olmayan* koruma şeklinde sınıflandırılabilir:

Enzimatik Korumalar

Katalaz, superoksit, glutatyon peroksidaz, hidrojen peroksit ve lipid peroksitlerin metabolizlenmesini sağlayarak hidroksil radikalının oluşmasını engelleyen, süperoksit dismutazdır (SOD).



Enzimatik Olmayan Korumalar

Glutatyon, histidin-peptifaz, demir bağlayan proteinler transferin ve ferritin,

dihidrolipoik asit, indirgenmiş CoQ10, melatonin, ürat ve plazma proteini tioller radikallerin sönümünü sağlayan plazmaya yardım ederler.

2.3.2.2 Vücut Dışından Temin Edilen Korumalar

Savunma antioksidanları, bazı reaktif oksijen türlerinin kaçarak sebep oldukları hasarları tamir etmek amacı ile üretilirler. Vücut içindeki koruma sistemlerinin etkinliğinin eksikliği ve fizyopatolojik durumların (sigara dumanı, hava kirliliği, UV-radyasyonu, dışarıdan alınan doymamış yağ asitleri, iltihap vb.) sebebi ile reaktif oksijen türlerinin yanlış zaman ve yanlış yerde aşırı üretilmesi sonucu yaşam sürecinde oksidatif zararın kümülatif olarak azaltılması için, dışarıdan alınan antioksidanlara ihtiyaç duyulur.

C, E, A vitaminleri ve karotenoidler antioksidanlar olarak yoğun bir şekilde araştırılmıştır. Bu vitamin antioksidanlarının yanı sıra bitkilerde bulunan başka maddeler de, meyve ve sebze tüketimi sonucu özümленerek, sağlığa yararlı olabilir. Son 10 yılda bitki polifenollerinin önemli savunma antioksidanları olduğuna dair kanıtlar elde edilmiştir. Bu bileşenler fazlaca, hemen hemen tüm bitki besinlerinde fenoller, fenolik asitler, flavonoidler, tanninler ve lignanlar olarak ortaya çıkarlar. Flavonoidler, bitkilerdeki aromatik amino asitler, fenilalanin tirozin ve malonat gibi bileşiklerdir.

C Vitamini

C vitamini, askorbik asit olarak da bilinir, suda eritilebilen ve birçok görevi olan bir vitamindir. İnsan ve benzeri primatlar, C vitamini üretemediklerinden bunu besinlerden almak zorundadırlar.

E Vitamini

E vitamini içinde alfa, beta, gama ve delta tokoferollerini bulunur. Bunların içinden özellikle α -tokoferol önemli bir antioksidandır.

A Vitamini

Retinol, A vitaminin besin olarak kullanılan şeklidir.

Karotenoid

Bitkilerde ve bazı diğer fotosentetik mikroorganizmalarda (yosunlar, bazı mantarlar ve bazı bakterilerde) bulunan pigmenttir. Altıyüz üzerinde bilinen karotenoid vardır,

ksantofiller ve karotenler olarak iki sınıfa ayrılır. En yaygın karotenoidler likopen ve A vitamininin öncülü olan β -karotendir. Bitkilerde ksantofil lutein en bol karotenoiddir. Bitkilerin yapraklarında bulunan lutein ve diğer karotenoidler bariz değildir, çünkü klorofil gibi diğer pigmentler tarafından maskelenir.

2.3.3 In Vitro Antioksidan Faaliyeti

"In vitro" kavram olarak, belli bir deneyin, kontrollü bir ortamda, yaşayan bir organizma dışında, örneğin bir test tüpü içerisinde uygulanmasına dayanır. In vitro fertilizasyon (aşılama), bunun iyi bilinen bir örneğidir. In vitro olarak birçok çalışma yapılmıştır. Bunların bir tanesi in vitro olarak lipoproteinlerin oksidasyonu ile ilgilidir. Bu yaklaşım, in vitro olarak izole edilmiş LDL'nin bakır oksidasyonunda direncinin artmasına dayanır. Bu yaklaşım aterojenik oksidasyon teorisinden çıkmıştır ve aterojenik olanın LDL veya VDL değil, bu lipoproteinlerin oksitlenmiş formları olduğunu belirtir. Aslında birçok çalışma besin ile alınan flavonoidlerin, in vitro LDL'nin oksidatif modifikasyonuna karşı etkili olduğunu göstermektedir. Bu yaklaşım in vitro olarak flavonoidlerin antioksidan potansiyellerinin değerlendirilmesi için kullanılmıştır.

Halliwell ve Gutteridge'e göre in vitro çalışmalarda antioksidan savunma mekanizmaları, enzimlerin inhibisyonu veya serbest radikal oluşturan metallerin kelat oluşturarak reaktif oksijen türlerinin indirgenmesi ile gerçekleşir (Halliwell ve Gutteridge [72]).

2.3.4 Antioksidanların Sinerjik Etkileri

Antioksidanların etkisini arttırmak veya tamamlamak için, çoğu kez, 'sinerjist' adı verilen maddeler de kullanılmaktadır. Farklı etki mekanizmalarına sahip antioksidanlar birlikte kullanıldıkları zaman yalnız kullanılmalarına göre daha etkili olabilirler. Bu sinerjik etki, antioksidanların kullanım dozlarını düşürdükleri gibi olası yan etkilerinin de azalmasına sebep olmaktadır. Sinerjik etki, fenolik gruba giren antioksidanlarla, asidik gruba giren antioksidanlar, fosfolipitler ve amino asitler arasında bulunmaktadır. Ayrıca BHA ve BHT arasında da bir sinerji vardır (Pinchuk ve Lichtenberg [67]).

2.3.5 Etki Mekanizmalarına Göre Antioksidanların Sınıflandırılması

2.3.5.1 Serbest Radikaller ile Kompleks Oluşturan Antioksidanlar

Bu tip antioksidanlar fenolik yapılarından veya moleküler yapılarındaki fenolik konfigürasyondan dolayı fenolik hidroksit gruplarından hidrojen verip, başlangıçtaki serbest yağ asidi radikal oluşumunu engelleyici oksidasyonu inhibe ederler. Bu şekilde etki gösteren antioksidanların en yaygın kullanılanları bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG), tersiyer bütıl hidrokinon (TBHQ), nordihidroguayenetasidi (NDGA) ve tokoferollerdir.

2.3.5.2 İndirgen Özellik Gösteren veya Oksijen Bağlayıcı Antioksidanlar

Bu antioksidanlar hidrojen atomlarını oksijene transfer ederek oksijenin oksitleyici etkisini ortadan kaldırırlar ve ransiditeyi geciktirirler. Aşağıda bu tip etki gösteren antioksidanlardan yaygın kullanım alanı olanların özellikleri hakkında bilgi verilmiştir.

Bunlardan askorbil palmitat oksijen bağlayıcı aktivitesini gösterebilmesi için 2 pozisyon substitüe olmamış olmalıdır. Beyaz kristal bir toz olan askorbik asit, tek başına gerçek bir antioksidan değildir. Ancak diğer antioksidanlarla kullanıldığında onların etkisini artırır. Daha çok antimikrobiyal aktivitelerinden dolayı yaygın bir kullanım buldukları bilinen sülfidler, antioksidan özellikleri olan bir diğer bileşik grubunu oluştururlar. Topluca sülfidler olarak adlandırılan kükürt dioksit, sodyum sülfid, sodyum ve potasyum bisülfid ve metabisülfid gibi bileşikler çeşitli gıdalarda zayıf antioksidanlar olarak kullanılırlar.

Erithorbik asit ve sodyum tuzu, oksijen bağlayıcı olarak rol oynayan ve moleküller oksijeni indirgeyen güçlü indirgeyici maddelerdir. Asidik koşullarda nötral koşullarda olduklarından daha etkindirler.

2.3.5.3 Kelat Oluşturucu Ajanlar

Kelat oluşturucu ajanlar antioksidan olmamakla birlikte gıdaların stabilize edilmelerinde önemli rol oynarlar. Sinerjistler olarak da sınıflandırılan kelat oluşturucu ajanlar lipid oksidasyonunu katalize eden demir ve bakır gibi metal iyonları ile kompleks

oluşturarak onların katalitik etkisini engellerler. Kompleks oluşturucu etkileri molekül yapılarındaki paylaşılmamış elektron çiftinden kaynaklanır.

Sitrik asit, çok etkili bir kelat oluşturucu ajandır. Antioksidanlarla birlikte kullanıldığında onların etkisini arttırır.

Fosforik asidin türevleri olan polifosfatlar, özellikle sodyum asit pirofosfat ve sodyum tripolifosfat olup etkinlikleri pH arttıkça azalır.

Kalsiyum disodyum EDTA ve disodyum EDTA kimyasal koruyucu olarak kullanılan diğer kelat oluşturucu ajanlardır. EDTA; demir, bakır ve kalsiyum bağlayan stabil bileşikler oluşturur. Karboksilli grupların dissosiyasyonu olduğu yüksek pH değerlerinde maksimum kelat oluşturucu etkinlik meydana getirir.

2.3.5.4 Sekonder Antioksidanlar

Bunlar lipit oksidasyonu sırasında ortaya çıkan hidrojen peroksittir, stabil son ürünlere parçalanarak etki gösterirler. Etki mekanizmaları; yağların oksidasyonunu katalize eden metal iyonlarını bağlama, oksijene saldırma ve UV ışınlarını absorbe etme tarzındadır. Bunlara tiyodipropiyonik asit ve dilauril tiyodipropiyonat örnek olarak verilebilir (Pinchuk ve Lichtenberg [67]).

2.3.5.5 Antioksidan Aktivite Mekanizmaları

Antioksidanlar kendi etkilerini farklı mekanizmalar yoluyla kullanırlar. Her bir mekanizma üç temel faktör üzerinden (lag , V_{max} ve OD_{max}) tanımlanır.

Bir antioksidan, peroksidasyonu aşağıdaki mekanizmalardan biri ile fazlasıyla inhibe edebilir. Örneğin; verilen bir antioksidan indirgeyici ajan olarak hareket ederek, serbest radikalleri ve ilaveten geçiş metal iyonları ile redoks-inaktif kelatlar oluşturarak etkileyebilir. Ayrıca iki antioksidanın aktiviteleri sadece toplamsal değil, fakat sinerjistik bile olabilir. Antioksidanların davranış şekli düşünüldüğünde bütün bu etkenler dikkate alınmalıdır. Öncelikle Çizelge 2.1’de listelenmiş olan antioksidanların antioksidatif mekanizmalarından her biri verilmiştir.

A-Serbest radikallerin geçiş metal- indüklenmiş üretimini inhibisyonu

Bakır iyonları tarafından indüklenmiş peroksidasyonda bakır iyonları, diğer geçiş metallerinin iyonları kadar, lipid oksidasyonunu lipoprotein-su ara yüzeyinde serbest radikal oluşturarak başlatır. Bu yüzden hem oksidasyonun ilerlemesinin geri bırakılması (lag), hem de peroksidasyonun maksimum hızı (OD_{max}), bakır/lipoprotein oranına bağlıdır. Bu, sırasıyla bakır ve lipoproteinlerin konsantrasyonlarının bir fonksiyonudur ve lipoprotein-bakır bağlanması sabittir. Bunlar keza, hem çözeltideki diğer bakır bağlayıcıların konsantrasyonlarına, hem de kompleksleşmiş bakırın redoks aktivitesine bağlıdır. Biyolojik sıvılar, klorür gibi bakır bağlayıcı çeşitli iyonları içerir. Bunlar bakıra redoks aktif kelat oluşturmak üzere bağlanırlar. Albumin gibi proteinler de çok düşük aktiviteli kelatlar oluşturarak bakırla bağlanırlar (Pinchuk ve Lichtenberg [67]). Serbest radikal ürünlerinin inhibitörleri şöyle özetlenebilir:

A1- Redoks-inaktif kompleks oluşturan bağlayıcı ajanlar (reaktifler).

A2- Metal iyonlarının apolipoproteinlere bağlanma inhibitörleri.

A3- Geçiş metalleri veya enzimatik kataliz üzerinden onların bozunmasının artmasıyla hidroperoksit konsantrasyonunun azalmasını sağlayan ajanlar.

A4- Reaktif ara ürünlerinin partikül içi ya da dışı transferini etkileyen inhibitörler.

B- Serbest radikal zincir reaksiyonlarının inhibisyonu

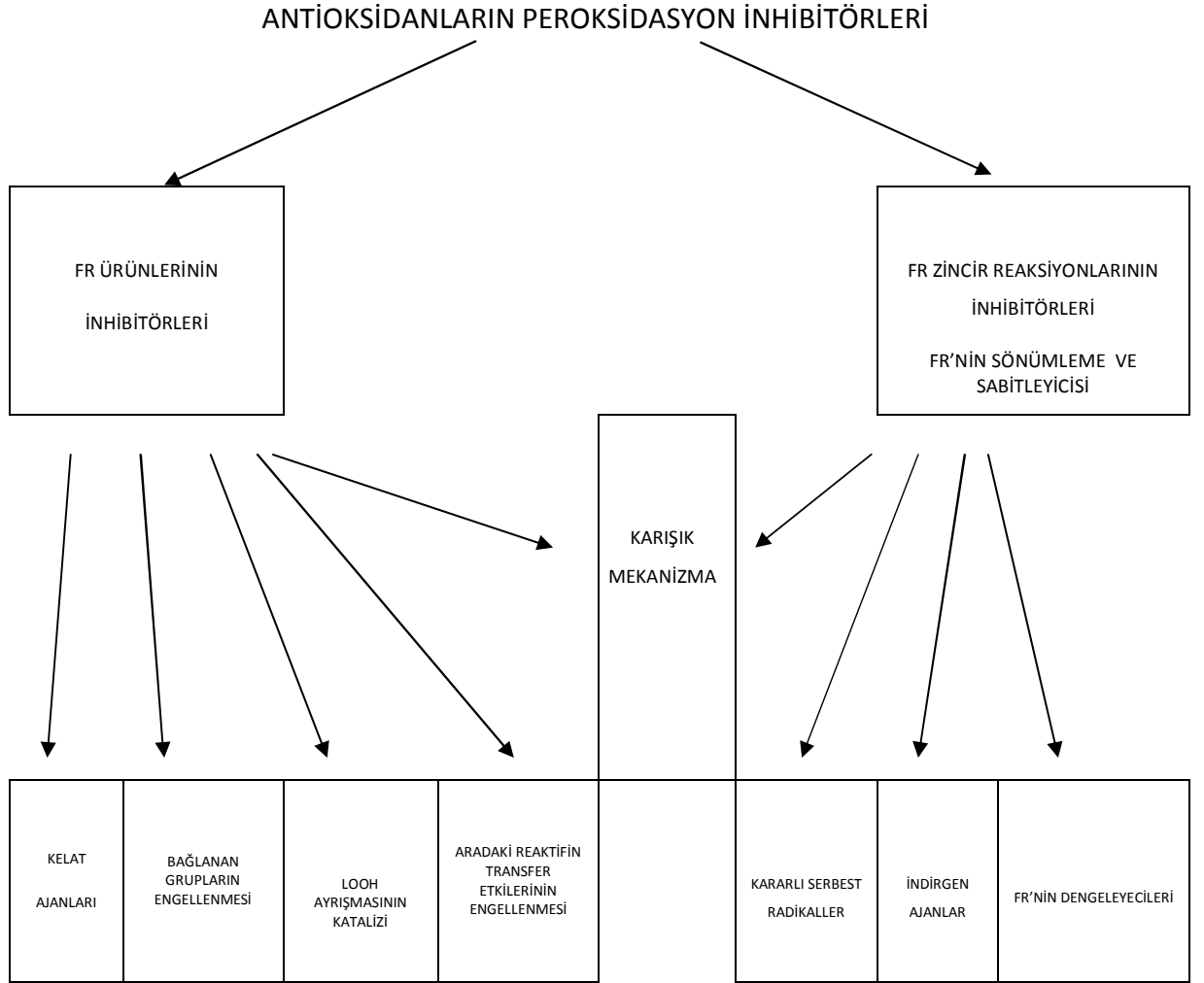
Serbest radikal zincir reaksiyon inhibisyonu aşağıdaki yollarla sağlanır:

B1- $NO^{\bullet}$ ve TEMPO içeren kararlı serbest radikallerin radikal temizleyici ajanları gibi davranması ile.

B2- Molekül başına iki serbest radikal temizleyebilen C ve E vitamini gibi indirgen ajanlarla.

B3- Daha az reaktif serbest radikaller oluşturmak için, serbest radikaller ile etkileşen dengeleyici serbest radikaller ve çift radikal temizleyici tarafından serbest radikal zincir reaksiyonunun engellenmesi ile.

Çizelge 2. 1 Antioksidanların inhibitör mekanizmalarının sınıflandırılması



2.3.6 Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

Eğer antioksidan kapasite tayinleri hakkında bilimsel makaleler dikkatle okunacak olursa farklı araştırmacılar tarafından tanımlanmış birçok antioksidan kapasite kavramları bulunacaktır. Kavramlar, toplam antioksidan kapasitesini (verimini, gücünü, parametresini, potansiyelini ve aktivitesini) içerir. Bir kimyasalın ‘aktivitesi’ basınç, sıcaklık, reaksiyon ortamı, diğer reaktifler gibi spesifik reaksiyon koşulları belirtilmedikçe anlamsızdır. Tek bir analiz yöntemi ile ölçülen ‘antioksidan aktivite’ o yöntemde uygulanan spesifik koşullardaki kimyasal reaktiviteyi yansıttığından verileri ‘toplam antioksidan aktivitenin’ göstergesi olarak genellemek uygun olmayabilir ve

yanıltıcıdır. Bu nedenle 'aktivite' terimi yerine farklı deneylerde elde edilen sonuçları 'kapasite' olarak sunmak önerilmektedir. 'Kapasite' tanımlaması içine örneğin; *peroksil radikali absorplama kapasitesi, süper oksit absorplama kapasitesi, ferrik iyon indirgeme kapasitesi* gibi daha birçok uygun tanımlama dahil edilebilir. Tanımlanmış antioksidan kapasite kavramı da yerleşmemiştir. Temel kimyasal reaksiyonlar içeren bütün antioksidan kapasite tayinleri, kabaca kendi içinde iki gruba ayrılabilir (Huang vd. [73]):

1) Singlet elektron transferi (ET) reaksiyonu temelli yöntemler

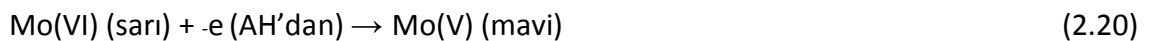
2) Hidrojen atom transfer (HAT) reaksiyonu temelli yöntemler

2.3.6.1 ET Temelli Yöntemler

ET-temelli tayinler, redüklendiği zaman renk değiştiren bir oksidanın redüksiyonunda bir antioksidan kapasitesini ölçer. Renk değişim derecesi, örnek içindeki konsantrasyonla orantılıdır. Bu tayinler genellikle redoks reaksiyonunun dahil olduğu sabit zamanda gerçekleşir ve bu periyot boyunca termodinamik dönüşüm ölçülür. ET-temelli tayinler farklı standart potansiyelli farklı kromojenik redoks reaktifleri kullanılarak yapılan ABTS/TEAC, DPPH, Folin-Ciocalteu (FCR) ve FRAP ölçümlerini içerir. Bir örneğin redüklenme kapasitesi, onun radikal sönmeme yeteneğine bağlı olmamasına rağmen, antioksidanlar için çok önemli bir parametredir (Apak vd. [74]).

Folin-Ciocalteu Ajanı ile Toplam Fenol Yöntemi

Yöntem adını kullanılan belirteçten almıştır. FC belirteci sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), konsantre hidroklorik asit, % 85'lik fosforik asit ve su karışımı 10 saat süreyle kaynatıldıktan sonra lityum sülfat ($\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) eklenmesiyle oluşan sarı renkli belirteçtir. Ortamdaki oksidan bulaşmasına bağlı olarak renk değişimiyle antioksidan kapasite ölçümü gerçekleştirilir (Huang vd. [73]).



TEAC Trolox Equivalent Antioxidant Capacity (Troluks Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi)

Yöntemde antioksidan kapasitesi Troluks eşdeğer parametresine bağlı olarak ölçülmektedir. Troluks eşdeğer parametresi ortamdaki antioksidan miktarı ile eşdeğer

miktarda bulunan askorbik asit, α -tokoferol, glutatyon ve $\ddot{u}$ rik asit miktarına bağlı olarak belirlenir (Apak vd. [74]).

FRAP Ferric Reducing Antioxidant Power (Demir İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)

FRAP yöntemi elektron transfer reaksiyonuna göre çalışır. FRAP yöntemiyle TEAC yöntemi arasındaki tek fark; TEAC yönteminde nötral pH'da, FRAP yönteminde pH 3,6'nın altında çalışma yapılmasıdır. Burada bir Fe(III) tuzu, Fe(III)(TPTZ)₂Cl₃ (TPTZ = 2, 4, 6-tripridil-*s*-triazin) oksidan olarak kullanılır. Fe(III) indirgenmesi gerçekleşerek oksidan tutulur ve böylece ölçüm yapılır (Huang vd. [73]).

2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical Scavenging Capacity Assay (DPPH Radikal Sönümleme Kapasitesi Yöntemi)

Antioksidan molekülünün taşıdığı azot radikali sayesinde UV-VIS absorpsiyonunda ölçüm yapılabilmesine olanak vermektedir. Teknik açıdan uygulanabilirliği kolay bir yöntemdir. Kinetik temelli analiz yöntemlerinde kullanılan elektron transfer temelli çalışan yöntemdir (Apak vd. [74]).

Oksidan olarak Cu(II) Kullanılarak Toplam Antioksidan Tayini (CUPRAC Yöntemi)

Cu(II)'nin Cu(I)'e indirgenmesiyle ölçüm gerçekleşmektedir. Bitkisel ürünlerin antioksidan kapasitesinin ölçümünde kullanılmaktadır (Apak vd. [74]).

2.3.6.2 HAT Temelli Yöntemler

HAT temelli tayinlerin çoğunluğu, azo bileşiklerinin dekompozisyonu boyunca peroksil radikallerini termal olarak üretmek için antioksidan ve substrat yarışının olduğu bir reaksiyon şemasını içerir. Bu tayinler indüklenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein otoksidasyonu, oksijen radikal absorbands kapasite (oxygen radical absorbance capacity ORAC), toplam radikal koparan antioksidan parametre (total radical trapping antioxidant parameter TRAP) ve crocin ağartma denemelerini kapsar. Bu tayinlerin çoğu kinetik temellidir, radikal reaksiyonların antioksidan ile termodinamik dönüşüm etkileşiminden çok, hız ile ilgilidir. ORAC reaksiyonlarının kinetik ve termodinamik durumları ikisiyle ilgilidir ve antioksidan varlığında ve yokluğunda floresans bozunma/probun zaman eğrisinin altındaki alanı (net area under curve, AUC) baz alan sonuçlar bildirilir (Apak vd. [74]).

2.3.6.3 Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemlerinin Spesifik Özellikleri

Otooksidasyon Kinetiği ve İnhibisyon (Yavaşlatma)

Tipik bir otooksidasyon azo bileşiğiyle başlayabilir ve hareket mekanizması aşağıda birbirini takip eden yavaşlatma adımlarından oluşur.

Başlama



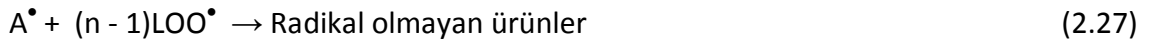
Gelişim (İlerleme)



Yavaşlama



Sonlanma



IOU Inhibited Oxygen Uptake (İnhibe Oksijen Yakalanması)

Deneyisel olarak, yakalanmış oksijen miktarına ya da konjuge dien peroksit ölçülmesine dayanır. Substrat olarak stiren, radikal pasifleştirici olarak da AIBN (Azoizobutironitril) kullanılır.

Otooksidasyonla İndüklenmiş Lipit İnhibisyon

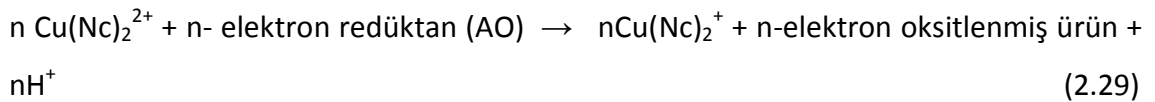
Bu metotta yapay olarak Cu(II) ve azo başlatıcılar, linoleik asit ve LDL nedeniyle otooksidasyona uğramaktadır. Daha duyarlı bir metottur. IOU metoduna göre on kat

daha az başlatıcı ve substrat kullanılmaktadır. Bu reaksiyon misellere ve organik solventlere uygulanmaktadır.

2.4 CUPRAC Yöntemi

Kromojenik oksidan olarak CUPRAC adını verdiğimiz bakır(II) neokuproin (Cu(II)-Nc) reaktifi kullanılarak, yiyecek polifenoller, C vitamini ve E vitamini için basit ve çok yönlü antioksidan kapasite tayinleri yapılabilir. CUPRAC; CuCl₂, neokuproin ve pH 7'de amonyum asetat çözeltileri ile antioksidan çözelti karışımlarını (direkt veya asit hidrolizi sonrası) içerir. CUPRAC tayininde kullanılan kromojenik redoks reaktifi bis(neokuproin)bakır(II) kelatıdır. Bu reaktif pH 7'de kullanışlıdır ve 450 nm'de ölçülen absorbans, redüklenen polifenoller ile redoks reaksiyonu sonucu oluşan Cu(I) kelatına aittir. Renk, Cu(I)-Nc kelat oluşumundan kaynaklanır. Reaktif konsantrasyonu, pH, oksidasyon zamanı ve yükselen sıcaklıklar gibi reaksiyon koşulları optimize edilir.

Geliştirilmiş CUPRAC metodun kromojenik oksitleyici reaktifi, bis(neokuproin)bakır(II)klorür (Cu(II)-Nc), n-elektron redüktan antioksidanlarla aşağıdaki gibi reaksiyona girer:



Bu reaksiyonda polifenolik antioksidanların reaktif Ar-OH grupları karşılık gelen kinonlara oksitlenir (askorbik asitin dehidroaskorbik aside oksitlenmesi) ve Cu(II)-Nc, 450 nm'de maksimum absorbans veren, renkli Cu(I)-Nc'e redüklenir. CUPRAC reaktifi içerisindeki Cu²⁺ iyonları, neokuproinden stokiometrik olarak aşırı fazla bulunduğundan redoks dengesi sağa kayar (gerçek oksidan yalnızca Cu²⁺ değil, Cu(Nc)₂²⁺ idi), çünkü Cu(II/I)-neokuproinin standart redoks potansiyeli 0,6 V'dur ve Cu²⁺/Cu⁺ çiftininkinden çok yüksektir (0,17 V). Sonuç olarak polifenoller Cu²⁺'dan çok daha hızlı ve etkili olarak Cu(II)-Nc ile oksitlenir ve redoks reaksiyonu sonunda meydana gelen kromojen(Cu(Nc)₂⁺), reaksiyona giren Cu(II)-Nc'e ekivalenttir. Serbest kalan protonlar NH₄Ac'li ortamda tamponlanır. Normal CUPRAC metotta oksidasyon reaksiyonları 30 dakikada tamamlanır. Antioksidan özelliklerinin tümünü gösterebilmek için flavonoid glikozidlerin aglikonlara hidrolizlenmeye ihtiyaçları vardır. Yavaş

tepkimeye giren antioksidanların CUPRAC reaktifi ile oksidasyonunu tamamlamak için inkübasyon sıcaklığını yükseltmek gerekir. Taze hazırlanmış analiz edilecek saf antioksidan çözeltileri oksijenden korumak için özel önlemler almak gereksizdir, çünkü CUPRAC reaktifi ile oksidasyon reaksiyonları, çözünmüş oksijen ile olandan çok daha hızlıdır (uygun katalizörler olmadıkça meydana gelmez). Bununla birlikte bitki ekstraktlarından O_2 'i uzaklaştırmak için N_2 geçirilmeli ve aynı gün içinde analiz edilmeyecekse buzdolabında muhafaza edilmelidir (gerçek sistemlerde kompleks katalizli reaksiyonlar yer alır). Karışım bileşenlerinin CUPRAC absorbansları toplanabilir, Beer kanunundan kimyasal sapma gösterir. CUPRAC metoduna göre test edilen antioksidanların absorbansa karşı konsantrasyon eğrilerinin lineer kalibrasyonunun, 0,1- 1,2 konsantrasyon aralığında, genellikle korelasyon katsayısı $r \geq 0,999$ 'a yakındır.

Başlı başına tek antioksidanların (çift bileşikler, glikozitler, polimerler ve birçok izomerler) bitki matrislerinden dağılımı ve nitel tayini, antioksidanların kimyasal farklılığından dolayı zorlaşır. Antioksidanların kooperatif etkilerinden dolayı sağlığa yararlı etkilerini değerlendirmek, toplam antioksidan gücünü de daha anlamlı kılar. Bu yüzden bu metodun, direkt bitki ekstraktlarından toplam antioksidan kapasite değerini ölçebildiği onaylanmıştır (Apak vd. [74]).

2.4.1 CUPRAC Metodunun Diğer ET-Temelli Tayinlerden Üstünlükleri

CUPRAC metodun diğer benzer tayinlerden avantajları aşağıda özetlenmiştir:

- 1) CUPRAC reaktifi tiyol tipli antioksidanları yeterli hızla oksitler, oysa FRAP metot, glutatyon gibi tiyol tipli antioksidanları ölçmez. Bunun nedeni, $Cu(II)$ 'nin elektronik yapısı hızlı kinetiğe uygunken, $Fe(III)$ 'ün yüksek spininin yarı dolu d orbitalinin kimyasal inertlik vermesi olabilir. Sisteinin demir(III) ile redoks reaksiyonu 1,10-fenantrolin varlığında yavaş gerçekleştirildiği bildirilmiştir, fakat bakır(II) katalizör varlığında reaksiyon hızlanmıştır.
- 2) CUPRAC reaktif seçicidir, çünkü fenantrolin veya benzer ligandlar varlığında $Fe(II)$ - $Fe(III)$ çiftinin daha düşük redoks potansiyeli vardır. $Cu(II,I)$ -Nc redoks çiftinin standart potansiyeli yaklaşık 0,6 V'tur, $ABTS^+/ABTS$ 'ninkine yakındır.

Gerçek antioksidan olmayan basit şekerler ve sitrik asit CUPRAC reaktifinde oksitlenmemiştir.

- 3) Reaktif, diğer kromojenik reaktiflerden (ABTS, DPPH) daha kararlıdır ve daha kolay bulunur. Bir biyolojik molekül için bakır redükleme yeteneği dolaylı olarak ölçölürken, hiç radikal türü içermeyen örneğın toplam antioksidan gücünü etkili olarak yansıtır.
- 4) Metot kolaydır ve laboratuvarlarda aletler ve kalifiye operatörler gerekmeden standart kolorimetreler kullanılarak çeşitli uygulamalar yapılabilir.
- 5) Cu(I)-Nc kelatının renginde artış veren redoks reaksiyonuna hava, güneş ışığı, nem ve pH gibi birtakım parametrelerin olumsuz etkileri olur.
- 6) CUPRAC metodunda geniş bir aralıkta absorbans-kalibrasyon eğrileri, polinomial eğriler veren diğer metotlardan farklı olarak, lineerdir. Metodun molar absorptivitesi, n-e redükten için $7,5-9,5 \times 10^3 \text{ n L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, biyolojik önemi olan antioksidanları duyarlı bir şekilde tayin için yeterli büyüklüktedir.
- 7) CUPRAC ile bulunan toplam antioksidan kapasite, TAC, değeri toplamsaldır. Bir karışımın TAC değeri, onun bileşenlerinin TAC değeri toplamına eşittir.
- 8) Metot otomasyon için uygundur.
- 9) Metot, bitki ve kayısı ekstrakt örneklerinde, ABTS veya Folin- Ciocalteu tayinleri ile ilişkiyi ispatlar.
- 10) FRAP tayininin asidik koşulları (pH 3,6) tersine veya Folin-Ciocalteu tayininin bazik koşullarına karşın renkli türler üreten redoks reaksiyonu pH 7'deki tamponda yapılmıştır. Fizyolojik koşullardan daha asidik ortamlarda redükleme kapasitesi, antioksidan bileşiklerine protonasyondan dolayı, azaltılabilir; oysa daha bazik durumlarda fenoliklerden proton ayrılmasıyla, örneğın redüklenme kapasitesi arttırılabilir.
- 11) Metot, hidrofilik ve lipofilik antioksidanları (β -karoten, α -tokoferol) aynı zamanda ölçebilir. Serumun lipofilik antioksidanları, serumdan hekzan ekstraksiyonuyla, hidrofiliklerden ayrılarak tayin edilebilir ve bunu diklorometanda renk gelişimi izler. Yaygın olarak kullanılan Folin- Ciocalteu

reaktifinden avantaj olarak, FCR biyolojik sıvıların TAC tayini için kullanılmazken, CUPRAC lipofilik antioksidanları ölçebilir.

- 12) İnsan serumu için CUPRAC metodun varyasyonunun (CV) iç ve dış tayin katsayıları, yaygın olarak kullanılan birçok toplam antioksidan tayininden daha düşüktür. CUPRAC'ın CV(RSD) bilgisi, kinetik temelli tayinlerden daha kesindir.
- 13) Kelat durumunda (Cu(I)-Nc) CUPRAC redoks reaksiyonunun bir ürünü olarak Cu(I) meydana geldiği zaman prooksidan olarak görev yapmaz, vücut sıvılarında biyolojik makromoleküllere oksidatif zarara neden olabilir. Ferrik iyon temelli tayinler, Fe(II) ürettiği için eleştirilebilir. H_2O_2 ile reaksiyonun sonucu olarak, OH radikalleri üretmek için prooksidan olarak görev yapabilir. Stabil Cu(I) kelat hidrojen peroksit ile reaksiyona girmez, fakat Cu(II)-Nc ile H_2O_2 'nin oksidasyonu mümkündür. Böylece Nc ile kelat oluşturan Cu(I), H_2O_2 olmadan Fenton tipi reaksiyonda test edilen antioksidanlara karşı prooksidan olarak davranmayabilir.

2.5 Lipit Hidroperoksitlerin Tayini

Yağlarda otoksidasyon sonucu oluşan acılaşıma ürünlerinin tat ve kokuda yarattığı değişiklikler, bunların oksitlenmesi ile ilişkilidir. Önce yavaş başlayan oksitlenme daha sonra hızlanır. Bir süre sonra tekrar yavaşlar. Her periyodun uzunluğu birçok etkene bağlıdır, bunlar sıcaklık, nem, yağ ile temastaki hava miktarı, ışık, özellikle ultraviyole ve yakın ultraviyole ışık, ve antioksidanlardır. Bozulmuş yağların kokusunu veren, bozunma ürünleri olarak oluşan kısa zincirli aldehit, asit, hidroksi asit ve keto asitlerdir.

Yağlarda oksidasyon esnasında meydana gelen hidroperoksitler çeşitli yöntemlerle saptanır. Bu yöntemlerden biri **iyodometrik** olarak **peroksit indeksi** tayinidir. Bu tayin iyodür asidinin peroksit ile yükseltgenmesinden açığa çıkan iyodun tiyosülfat ile titrasyonuna dayanır (Keskin [75]).



Yukarıdaki reaksiyona göre; 1 mol peroksit, iyodür asidinden iki iyod atomunu açığa çıkarır. Açığa çıkan bu iyot, tiyosülfat ile titre edilir ve Lea [61]'ya göre 1 g yağ için 0,002 N tiyosülfattan harcanan mL sayısı '**peroksit indeksi**'ni verir.

Lipit hidroperoksitlerin **spektrofotometrik** olarak tayininde en duyarlı yöntem **Fe(III) tiyosiyanat** yöntemidir. Bu yöntem, oksidasyon boyunca oluşan peroksitlerin, Fe(II)'nin Fe(III)'e oksidasyonuna ve daha sonra tiyosiyanat ile, absorbansı 500 nm de ölçülen, renkli bir kompleks vermesine dayanır.

2.6 Askorbik Asit

2.6.1 Fizikokimyasal Özellikleri

2.6.1.1 Fiziksel Özellikleri ve Molekül Yapısı

Askorbik asit, çok hafif ve özel bir kokulu ve beyaz bir kimyasal maddedir. Ekşi tatta olup, asit reaksiyonu verir. 189-192 °C'de bozunmaya uğrar ve erir.

Askorbik asit molekülünde C-4 ve C-5'de iki asimetrik karbon atomu bulunur. Optikçe aktiftir, polarize ışığı sağa çevirir. L-askorbik asit dışında üç tane daha stereoizomer vardır. Bunlar; D-askorbik asit, D-izoaskorbik asit, L-izoaskorbik asittir. Bu üç izomerin antiskorbutik aktiviteleri yoktur.

Çevirme açısı;

Sulu çözeltileri için $[\alpha]^{25}_D = +20,5^\circ - +21,5^\circ (c=1)$

Metanoldeki çözeltileri için $[\alpha]^{23}_D = +48^\circ (c=1)$ (The Merck Index [76])

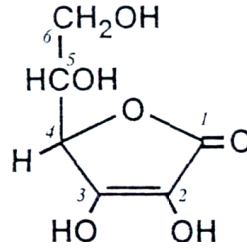
Sudaki çözünürlüğü oldukça yüksektir. Bir gram askorbik asit 3 mL suda, 30 mL alkolde, 50 mL mutlak alkolde ve 100 mL gliserinde çözünür. Eter, kloroform, benzen, petrol eteri, yağlar ve yağ çözücülerinde çözünmez.

Askorbik asit bir monosakkarit türevi olup yapıca glikoza ve diğer altı karbonlu monosakkaritlere benzer. Kapalı formül $C_6H_8O_6$ şeklinde olup;

% 40,91 Karbon (C)

% 4,48 Hidrojen (H)

% 54,5 Oksijen (O) içerir.



Şekil 2. 3 Askorbik asidin molekül şekli

Şekil 2.3’de molekül şekli gösterilen L-askorbik asit 5 üyeli heterosiklik halka içinde bir endiol grubu bulunan dibazik asittir. Bu yapı asit-baz davranışı sergiler ve ilk olarak 3. hidroksil grubu iyonlaşır. Askorbik asit, konjuge olmuş karbonil ve endiol sistemi üzerinden π elektronlarının delokalizasyonu ile stabilleşir (Davies [6]).

Lakton halkası genellikle planar kabul edilir. Askorbik asidin kimyasal ve fiziksel özellikleri bu yapıya bağlıdır. Askorbik asidin oksidasyon ürünü olan dehidroaskorbik asit x-ışını analizi ile dimer olarak belirlenmiştir. Elektrokimyasal incelemeler, askorbik asit ve dehidroaskorbik asidin bir redoks çift oluşturduğunu göstermiştir (Packer ve Fuchs [1]).

2.6.1.2 Kimyasal Özellikleri

L(+) askorbik asit oldukça kuvvetli bir asittir, %1 derişimdeki çözeltisinin pH’ı 2,8, %10’luk çözeltisinininki yaklaşık 2’dir. Asit niteliği 3. karbondaki enol hidroksilinden ileri gelir.

L(+) askorbik asit karbonat ve bikarbonatlardan karbondioksidi açığa çıkarır; birçok metal katyonları, örneğin sodyum ve kalsiyum iyonları ile nötral, suda çözünen kristalsi monometal tuzları verir ve bu tuzlarda da lakton halkası bozulmamıştır (Keskin [75]).

	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı
Askorbik asit	$C_6H_8O_6$	$176,13 \text{ g.mol}^{-1}$
Sodyum tuzu	$C_6H_7O_6Na$	$198,10 \text{ g.mol}^{-1}$
Kalsiyum tuzu	$C_{12}H_{14}CaO_{12} \cdot 2H_2O$	$426,35 \text{ g.mol}^{-1}$

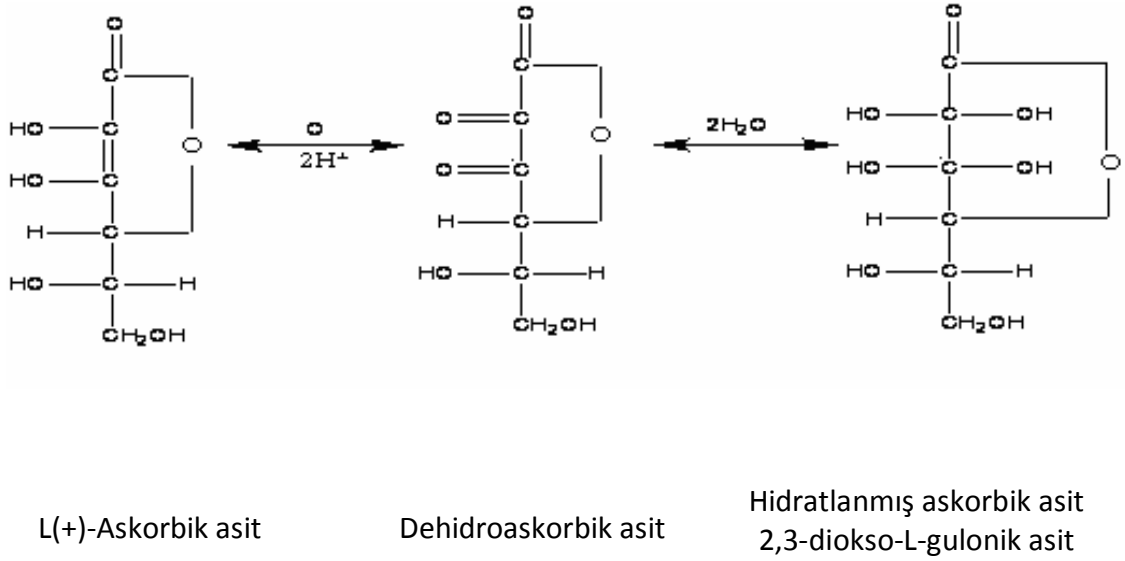
Sodyum askorbat, $C_6H_7O_6Na$ ve kalsiyum askorbat, $(C_6H_7O_6)_2Ca$, askorbik asit gibi terapatik amaçla kullanılmaktadır. Askorbik asidin diğer önemli bir türevi ise askorbil palmitat, $C_{22}H_{38}O_7$, askorbik asidin 6. karbon atomundaki hidroksil grubunun palmitik asitle esterleşmesi sonucu oluşur. Bu da diğer tuzlarda olduğu gibi askorbik asit yetmezliği durumunda kullanılır.

Askorbik asit güçlü bir indirgendir ve reversibl olarak dehidroaskorbik aside oksitlenir. Biyolojik sistemlerin yükseltgenme–indirgenme reaksiyonlarında da etkilidir. Askorbik asit ile dehidroaskorbik asidin her ikisi de antiskorbutik aktiviteye ve vitaminin diğer fizyolojik etkilerine de sahiptir. Askorbik asidin aerobik oksidasyon hızı pH'ye bağlıdır, pH 5 ila 11,5 arasında maksimum hız gösterir. Alkali çözeltilerde reaksiyon daha hızlı olup, bozunmada daha da etkindir. Anaerobik koşullarda ise bozunma yavaştır. Aerobik veya anaerobik koşullardaki askorbik asidin sulu çözeltisinin, ultraviyole, x veya γ -radyasyon ışınlarına maruz kalması fotokimyasal oksidasyonuna sebep olur (Seib ve Tolbert [2], Packer ve Fuchs [1]).

Sulu çözeltide bulunan askorbik asidin dehidroaskorbik aside oksidasyonu iki elektronlu bir redoks reaksiyonudur. Askorbik asit birinci H^+ iyonunu kaybettiğinde kısmen zayıf asittir ($pK_1= 4,25$) ve ikinci H^+ iyonunu kaybettiğinde çok zayıf asittir ($pK_2= 11,79$). Bir elektronun verilmesiyle oluşan ara ürün, mineral asitlerle karşılaştırıldığında kuvvetli bir asittir ($pK_a= -0,45$). Askorbat radikalinin UV spektrumu, pH'ı $-0,3$ ile 11 aralığında ölçüldüğünde bu aralıkta tek ürün olduğu ve bu ürünün çiftleşmemiş elektron yoğunluğunun üç nolu karbonil grubu üzerine yayıldığı belirtilmiştir (Packer ve Fuchs [1]).

11,2 mg askorbik asit 1,0 mg O_2 ile yükseltgenebilir. Eser miktarda ortamda var olan ağır metaller, askorbik asidin oksidasyonunda katalizör olarak etkili olmaktadır.

Askorbik asidin bozunması pH'a bağlıdır ve maksimum bozunma pH 4'te gerçekleşir. Aynı zamanda bozunma buzlu ortamda, sulu ortama göre daha fazladır (Ottaway [77]).



Şekil 2. 4 Askorbik asit-dehidroaskorbik asit redoks reaksiyonu

2. ve 3. karbon atomlarındaki endiol grupları oksidasyona uğrar, 2 H atomunu vererek diketo haline dönüşüp dehidroaskorbik aside yükseltgenir ve dehidroaskorbik asit de askorbik aside indirgenebilir. Buna göre dehidroaskorbik asit ile askorbik asit bir redoks sistemi oluşturur. Dehidroaskorbik asit kolayca askorbik aside çevrildiğinden C vitamini gibi etki eder. Dehidroaskorbik asit alkali çözeltilerde dayanıksız olup lakton halkasının açılmasıyla hidrolize uğrar ve biyolojik olarak etkisiz olan 2,3-diokso-L-gulonik asit oluşur. Vücutta bu tekrar laktona dönüştürülemez, parçalanmasıyla oksalik asit meydana gelir.

Askorbik asidin oksijenle reaksiyonu katalizör yokken yavaştır ve hızı pH'a bağlıdır. Asidik çözeltilerde yavaş, alkali çözeltilerde daha hızlıdır. Askorbat, sulu çözeltide pH 6,6–9,6 aralığında oksijenle reaksiyona girdiğinde, askorbat radikalinin kararlı hal konsantrasyonu olduğu elektron spin çalışmalarıyla gösterilmiştir. Bazı enzimlerle reaksiyonun inhibe edilmesi bilgilerinden, hidrojen peroksit olduğu belirtilmiştir (Packer ve Fuchs [1]).

Metal iyonları, askorbik asidin dehidroaskorbik aside veya dehidroaskorbik asidin 2,3-diketogulonik aside ve diğer oksidasyon ürünlerine oksidasyonunu arttırır. Burada Cu(II) iyonu çok etkilidir. Askorbik asidin Cu(II) iyonu ile oksidasyonundan oluşan bir ara

kompleks spektrofotometrik olarak kanıtlanmıştır. Reaksiyon için askorbik asit, bakır ve oksijen arasında üçlü bir kompleks içeren bir mekanizma önerilmiştir. Askorbik asidin oksidasyon hızı; askorbik aside, moleküler oksijene ve metal iyonuna göre birinci derecedendir. Askorbik asidin geçiş metali ve kompleksleriyle birinci oksidasyon adımı, askorbat radikalini oluşturur. Bu askorbat serbest radikali, diğer metal iyonu ile gerekli stokiometrik karakteri vermek için reaksiyona girebilir. Oksidasyon esnasında geçiş metal iyonu da hızla kendi kendine indirgenir (Packer ve Fuchs [1]).

Askorbik asidin enzimatik olmayan esmerleşme reaksiyonu birçok bozunma ürünü oluşmasına sebep olur. Askorbik asidin bozunma hızı; askorbik asit konsantrasyonu, sıcaklık, pH, ışık ve metal iyonları varlığına bağlıdır. Askorbik asidin sulu çözeltisi ısıtıldığı zaman oluşan başlıca ürünler; dehidroaskorbik asit, 2,3-diketogulonik asit, threonik asit ve oksalik asittir (Packer ve Fuchs [1]).

Askorbik asit, metal iyonları ve metal kompleksler tarafından oksitlenir ve metal iyonları indirgenir (Seib ve Tolbert [2]). Örneğin; Cu(II), Cu(I)'e; Fe (III), Fe(II)'e indirgenir. Cr(VI) askorbik asitle; Cr(V), Cr(IV) ve karbona dayanan radikal ürünler verir.

Askorbik asit 2- ve 3- hidroksil gruplarının iki oksijen atomları koordinasyonu ile kompleksler oluşturabilir.

Askorbik asit indirgenebilen birçok metal iyonları ile, örneğin Cu(II) ve Fe(III) gibi, kompleksler oluşturur. Metal ve askorbik asit molekülleri arasındaki bağlar, benzer kelat ligandlarıyla karşılaştırıldığında, beklenilenden daha zayıftır.

Bazı askorbik asit komplekslerinin kristalleri tamamen anaerobik koşullarda elde edilmiştir, fakat bu komplekslerin yapıları tam olarak bilinmemektedir.

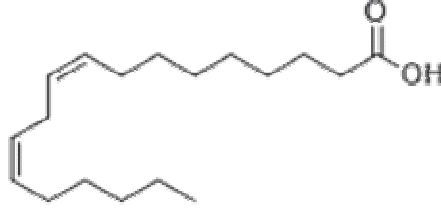
AA'nın ultraviyole absorpsiyonu pH ve çözücüye bağlıdır. Kuvvetli asit çözeltide askorbik asit, UV ışıkta yaklaşık 245 nm'de ($\epsilon = 11000$) absorpsiyon gösterir. Bu değer nötral çözeltide 265 nm'ye ($\epsilon = 17000$) kayar ve pH = 14'te yaklaşık 300 nm'dir (Fung ve Luk [78]).

AA metanolde 244 nm, etanolde 245 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir.

AA'nın IR spektrumunda (KBr disk ile) 3510, 3405, 3306 cm^{-1} alt bandı; 1755, 1670 cm^{-1} 'de C = O; 110,1025 cm^{-1} 'de C – O – C bandları görülür.

AA'nın oksidoredüksiyon potansiyeli; pH = 5 'te $E_0 = 0,127$ voltur (The Merck Index [76]).

2.7 Linoleik Asit Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2. 5 Linoleik asidin molekül şekli

Kimyasal Formül: $C_{18}H_{32}O_2$

Molekül Ağırlığı: 280,45 g/mol

Erime Noktası: $-5^{\circ}C$

Yoğunluğu: 0,902 g/mL ($25^{\circ}C$ 'de)

Linoleik asit (LA), doymamış n-6 yağ asididir. Ayrıca, 18-karbon zincir ve iki cis çifte bağı ile bir karboksilik asittir. Kararlılığı sabittir, fakat hava ve ışığa karşı duyarlıdır. Yanıcıdır. Oda sıcaklığında renksiz bir sıvıdır. Suda pratik olarak çözünmez, etanolde çözünür. Haşhaş tohumu, aspir, ayçiçeği ve mısır yağları gibi pek çok bitkisel yağlarda bol miktarda bulunmaktadır. Linoleik asit sabunlar, emülgatörler ve hızlı kuruyan yağların yapımında kullanılır. Cilt üzerinde antienflamatuar, akne giderici ve nem tutucu özellikleri vardır. Linoleik asit cilt üzerindeki yararlı özellikleri nedeniyle güzellik ürünleri sektöründe giderek daha popüler hale gelmiştir (The Merck Index [76]).

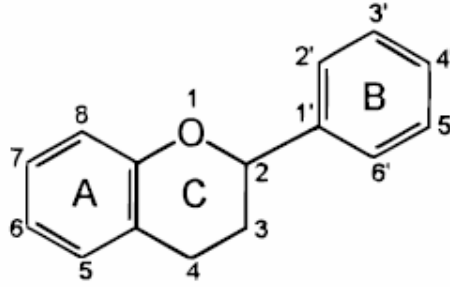
2.8 Flavonoidler

2.8.1 Flavonoidlerin Genel Özellikleri

Flavonidler, bir grup polifenolik bileşikler olup çok sayıda meyve ve sebze bulunabilir. Bunlar bitkilerde antioksidan, antimikrobiyal, fotoreseptör, görsel çekici ve ışık perdeleyici olarak davranırlar. Birçok çalışma flavonoidlerin antialerjik,

antimikrobiyal, antienflamatuar ve damar genişletici olarak biyolojik aktivite gösterdiğini bildirmiştir.

Flavonoidlerin, serbest radikal oluşumunu azaltma ve sönmölendirme yeteneği, bunların antioksidan işlevini önemli kılmaktadır. Flavonoidlerin antioksidan olarak davranabilme kapasitesi geçmiş yıllarda birçok çalışmaya kaynak olmuştur ve antioksidan aktifliğinin yapı-aktiflik ilişkisi kurulmuştur (Farkas vd. [79]).



Şekil 2. 6 Temel flavonoid yapısı

2.8.2 Flavonoid Yapısı

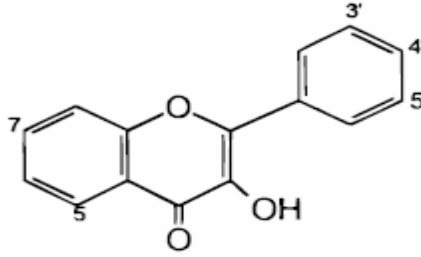
En basit flavonoid yapısı flavan çekirdeğidir ve 15 karbonlu olup şekilde görüldüğü üzere **A**, **B** ve **C** olmak üzere 3 halka şeklinde düzenlenmiştir (Şekil 2.6). Değişik tür flavonoidler, oksidasyon seviyesinde ve **C** halkasının substitüsyon düzenlerinde farklılık gösterir. Aynı zamanda **A** ve **B** halkalarının substitüsyon düzenleri farklı türleri belirtir. Birçok flavonoid türü içinde en önemlileri flavon, flavanon, izoflavon, flavonol, flavanonol, flavan-3-ol ve antosiyanidinlerdir. Başka flavonoid türlerine biflavonlar, chalconelar, auronelar, kumarinler dahildir. Hidrolizlenebilen taninler, proantosiyanidinler, caffeatelar ve lignanlar bitki fenolleri olup ayrı olarak sınıflandırılırlar.

2.8.3 Flavonoidlerin Sınıflandırılması

Flavonoidler 6 sınıfa ayrılır:

2.8.3.1 Flavonol

Çizelge 2. 2 Temel flavonol yapısı ve en yaygın flavonollerin, A ve B halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması

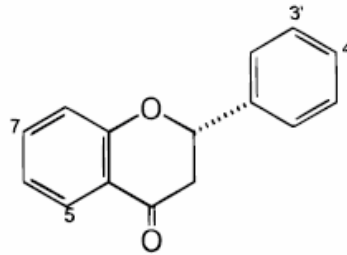


Flavonoller

	5	7	3'	4'	5'
Kuersetin	OH	OH	OH	OH	
Kaempferol	OH	OH		OH	
Galangin	OH	OH			
Fisetin		OH	OH	OH	
Mirisetin	OH	OH	OH	OH	OH

2.8.3.2 Flavanon

Çizelge 2. 3 Temel flavanon yapısı ve en yaygın flavanonların, A ve B halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması

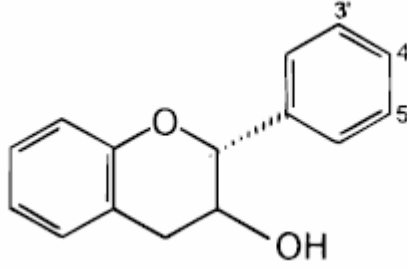


Flavanonlar

	5	7	3'	4'
Hesperetin	OH	OH	OH	OH
Naringenin	OH	OH		OH

2.8.3.3 Flavanol(Flavan)

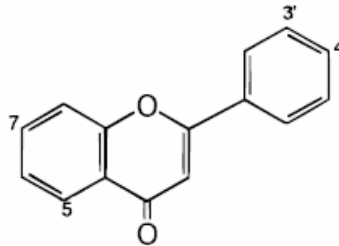
Çizelge 2. 4 Temel flavanol yapısı ve en yaygın flavanollerin, A, B ve C halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması



Flavan-3-oller						
	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-Kateşin	β OH	OH	OH	OH	OH	
(-)-Epikateşin	α OH	OH	OH	OH	OH	
(-)-Epigallokateşin	α OH	OH	OH	OH	OH	OH

2.8.3.4 Flavon

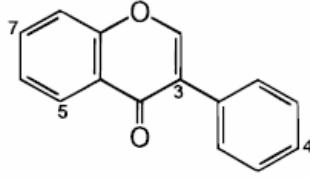
Çizelge 2. 5 Temel flavon yapısı ve en yaygın flavonların, A ve B halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması



Flavonlar				
	5	7	3'	4'
Luteolin	OH	OH	OH	OH
Apigenin	OH	OH		OH
Chrysin	OH	OH		

2.8.3.5 İzoflavon

Çizelge 2. 6 Temel izoflavon yapısı ve en yaygın izoflavonların, A, B ve C halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması

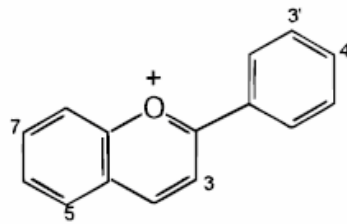


İzoflavonlar

	5	7	4'
Genistein	OH	OH	OH
Genistin	OH	Oglc	OH
Daidzein		OH	OH
Daidzin		Oglc	OH
Biochain A	OH	OH	OCH ₃

2.8.3.6 Antosiyanidin

Çizelge 2. 7 Temel antosiyanidin yapısı ve en yaygın antosiyanidinlerin, A, B ve C halkalarına bağlı substitüe grupların karşılaştırılması



Flavylium Tuzları

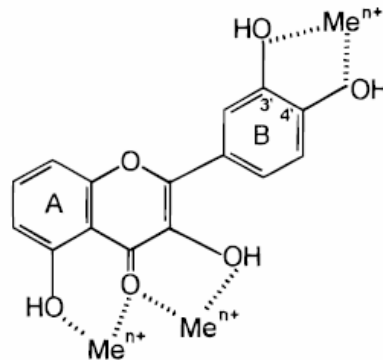
	3	5	7	3'	4'
Siyanidin	OH	OH	OH	OH	OH
Siyanin	Oglc	OH	OH	OH	OH
Pelargonidin	OH	OH	OH		OH

2.8.4 Kelat Yapımı

Bir takım flavonoidler oksijen metabolizmasının önemli bir parçası olarak, metallerle etkin bir şekilde kelat oluşturulmasını sağlar. Serbest demir ve bakır, reaktif oksijen türleri yapısında potansiyel yükseltgeyicilerdir. Örnek olarak, hidrojen peroksitin indirgenmesi sonucu yüksek saldırgan özelliğine sahip hidroksil radikalının oluşumu verilebilir.



Yine de bu metal iyonları antioksidan savunmasıyla ilişkili olan enzimlerin hemoproteinleri ve kofaktörleri gibi öğelerinin fizyolojik fonksiyonları için gereklidir. Eser metallerinin flavonoidlerde önerilen bağlanma yerleri **B** halkasındaki katekol fonksiyonel grup, heteroksiklik halkasındaki 3-hidroksi,4-okso grupları, heterosiklik ve **A** halkası arasındaki 4-okso,5-hidroksi gruplarıdır (Şekil 2.7).



Şekil 2. 7 Eser metallerin bağlanma konumları

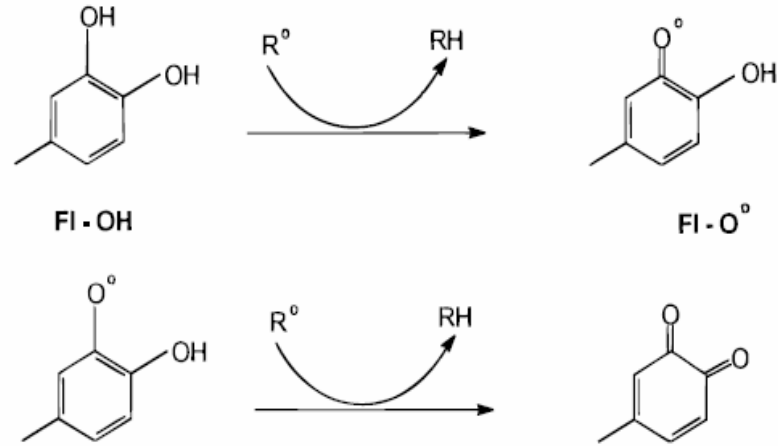
Bununla birlikte metal kelatının oluşmasına en büyük katkı katekol fonksiyonel grubudur ve buna örnek olarak en belirgin kaempferolle (yapısal olarak kuersetine benzer fakat B halkasındaki katekol grup yoktur) kıyaslandığında bakırdan kuersetin kelatasyonu sonucu oluşan batokromik değişimi verilebilir.

Düşük redoks potansiyelleri sebebi ile flavonoidler termodinamik olarak 2,13 – 1,0 V aralığında redoks potansiyeline sahip süperoksit, peroksil, alkoksil ve hidroksil gibi yüksek oksitleyici serbest radikallerini hidrojen atomu vererek indirgeyebilirler:



$R^\bullet$, superoksit anyon, peroksil, alkoksil, ve hidroksil radikalleri yerine geçer (Eşitlik 2.32).

Ariloksil radikali ($FI-O^\bullet$) 2. bir radikal ile tepkimeye girerek stabil kinon yapısı elde edilebilir (Şekil 2.8).



Şekil 2. 8 Flavonoidlerle ($R^\bullet$) ROS radikallerinin sönmülmesi

Ariloksil radikali oksijen ile tepkime vererek zincir reaksiyonlarını sonlandırmak yerine kinonlar ve süperoksit anyonların oluşmasını sağlar. Son reaksiyon yüksek seviyede geçiş metal iyonları varlığında gerçekleşebilir ve flavonoidlerin istenmeyen prooksidan etkisine sebep olur. Bundan ötürü flavonoidlerin ayrıntılı şekilde antioksidan kapasitesi sadece $FI-O^\bullet/FIOH$ çiftinin redoks potansiyeline bağlı değil aynı zamanda ariloksil radikalinin yan reaksiyonlarına bağlıdır. İndirgeyici superoksit özellikle önemlidir, çünkü orta seviyede reaktif olsa da aerobik hücrelerde gözlenir ve Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonlarında hidroksil radikalinin potansiyel göstericisidir. İndirgeme yanı sıra flavonoidler, oksidatif işlemlerde ilişkili olan serbest radikalleri kompleks oluşturarak onları stabilize edebilir.

Birçok çalışma flavonoid yapısı ve radikal sönmülme aktifliği arasındaki ilişkiyi kurmuştur ve en uygun olanları kısaca açıklanmıştır. Rice-Evans vd., flavonoidlerin (ve ilgili fenolik asitlerin) radikal sönmülme (yakalama) kapasitesini belirleyen değerli bir yöntem bulmuştur (Rice-Evans vd. [24]).

Bu yöntem, bir antioksidanın önceden hazırlanmış katyon kromofor olan 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonik asit ($ABTS^+$) radikali ile ilişkide olan suda

çözülebilir E vitaminin analogu olan, 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asidinin (**troloks**) (pH 7,4'te) sönümlemesine dayanır.

Antioksidanların, antioksidan kapasitelerini belirtmek için kabul edilen Troloksa Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity, TEAC), antioksidanların çalışma şartlarındaki 1mM derişimine eşdeğer troloks derişimi olarak tanımlanır.

Jovanovic [80], radikal çiftlerinin önceliğinin (pH 7'de bir elektron indirgeme potansiyellerinin sıralaması, Çizelge 2.8) belirlenmesinde aynı yaklaşımı benimser ve flavonoidlerin pH 7'de **FI-O[•]/FI-OH** çiftinin bir elektronunun indirgenmesine dayanan in vitro antioksidan potansiyelini değerlendirir. Buna karşıt olarak, flavonoidlerin oksidasyon pik potansiyelinin orta noktası ($E_p/2$), sönümleme aktivitelerinin uygun parametresi olarak önerilmiştir. Bu da hem elektrokimyasal oksidasyon **FI-OH $\rightarrow$ FI-O[•] + e⁻ + H⁺**, hem de hidrojen atomu veren reaksiyonun **FI-OH $\rightarrow$ FI-O[•] + H[•]** aynı O-H bağının kırılması ile ilişkili olduğunu varsayıyor. $E_p/2 < 0,2$, olduğu durumlardaki flavonoidlerin, hazır oksitlenebilir, yani iyi sönümleyici oldukları tanımlanmıştır.

Çizelge 2. 8 Seçilmiş radikal çiftlerinin pH 7'de (E_7 ,V) bir-elektron indirgeme potansiyelleri

HO [•] , H ⁺ /HO	2,310
RO [•] , H ⁺ /ROH (alkoksil)	1,600
ROO [•] , H ⁺ /ROOH (peroksil)	1,000
PUFA [•] , H ⁺ /PUFA-H	0,600
HU [•] , H ⁺ /UH ₂ (urat)	0,590
TO [•] , H ⁺ /TOH	0,480
Askorbat [•] , H ⁺ / askorbat ⁻	0,282

2.8.5 Flavonoidlerin Radikal Sönümlleme Kapasitesi

Radikal sönümlleme kapasitelerinin başlıca belirleyicileri:

- **B** halkasında, elektron verici özelliğine sahip ve radikaller için hedef teşkil eden, katekol grubu varlığı ve,
- Elektron delokalizasyonundan sorumlu olan, bir 2,3- çifte bağlı 4-okso grubunun varlığıdır.

Heterosiklik halkasındaki 3-hidroksil grubu radikal-yakalama aktifliğini arttırırken, **A** ve **C** halkalarında 3,5 ve 7 pozisyonlarında hidroksil veya metoksil gruplarının daha az önemli olduğu görülür.

Bu yapısal özellikler, esas flavonoidin antioksidan kapasitesi olan ariloksil radikalinin kararlılığının arttırılmasına katkıda bulunur. Bunun için **B** halkalarında katekol grup içeren flavonoller ve flavonlar oldukça aktiftir ve flavonoller flavonlara göre 3-hidroksil grubu varlığı sebebi ile daha aktiftir. Bu grubun glikozilasyonu, rutinde olduğu gibi, radikal-sönümlleme kapasitesinin düşmesine sebep olur. **B** halkasına eklenen hidroksil grubu (pirogallol grubu) antioksidan kapasitesini arttırır ve buna örnek olarak mirisetin verilebilir. Diğer yandan **B** halkasında sadece 1 hidroksil grubun olması bu aktifliğin azalmasına sebep olur. Flavononoller ve flavononlar 4-okso gruplarındaki 2,3-çifte bağlarının olmaması sebebi ile zayıf antioksidanlardır. Flavan monomerleri ile flavononollerin aktiviteleri karşılaştırılabilir (kateşin ve taksifolin). Fakat **B** halkasındaki pirogallol grubu (epigallokateşin) veya 3 hidroksil grubunun gallolitasyonu (epigallokateşin gallat ve epikateşin gallatetta olduğu gibi) antioksidan kapasitesini arttırır.

Antosiyanidinler ve onların glikozidleri (antosiyeninler) **B** halkalarındaki katekol yapısı (siyanidindeki gibi) bulunması şartı ile kuersetin ve kateşin gallatları ile eş güçtedir. **B** halkasından 3 hidroksi gruplarının çıkarılması, pelargonidinde olduğu gibi, antioksidan kapasitelerinin kaempferolün seviyesine düşmesine sebep olur. Bu bilgiler **B** halkasındaki katekol yapısının flavonoidlerin radikal – sönümlleme kapasitesi üzerinde başlıca etken olduğunu doğrular.

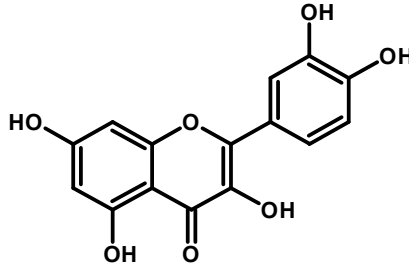
İzoflavonlarda ise heterosiklik halkasının 3-pozisyonundaki **B** halkasının konumu, TEAC denemesi ile belirlenen radikal-sönümlene kapasitesini büyük ölçüde etkiler. Bunun için genistein, flavon ile akraba olan, apigenine göre 2 kat daha fazla güçlüdür. Sönümlene için yalnız 4-hidroksi grubu gereklidir ve biochanin A'da olduğu gibi metoksilasyon, sönümlene etkisini azaltır. Keza **A** halkasındaki 5,7- dihidroksi yapısı da önemlidir ve bu da genistein/daidzein ve biochanin A/formononetin çiftleri karşılaştırılarak kanıtlanmıştır. Diğer flavonoid sınıfları için glikolizasyon, radikal-sönümlene kapasitesini olumsuz şekilde etkiler (Çizelge 2.9).

Çizelge 2. 9 Seçilmiş flavonoid metabolitleri ve izoflavonların troloksa eşdeğer antioksidan kapasiteleri(mM)

İzoflavonlar	
Genistein (5, 7, 4')	2,90
Biochain A (5, 7, 4'OCH ₃)	1,16
Daidzein (7, 4')	1,25
Formononetin (7, 4'OCH ₃)	0,11
Genistein 7-glukozit	1,24
Seçilmiş Flavonoid Metabolitleri	
3', 4'-dihidroksifenilasetik asit (I)	2,16
3-metoksi-4-hidroksifenilasetik asit (II)	1,63
3-metoksi-4-hidroksibenzoik asit (III)	1,19
3, 4-dihidroksibenzoik asit (IV)	1,01
3-metoksi-4-hidroksihippurik asit(V)	1,29

2.8.6 Çalışmada Kullanılan Flavonoidler

2.8.6.1 Kuersetin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2. 9 Kuersetinin molekül şekli

Kimyasal Formül: $C_{15}H_{10}O_7$, 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-1-benzopiran-4-on; 3,3',4', 5, 7-pentahidroksiflavon; meletin; soforetin.

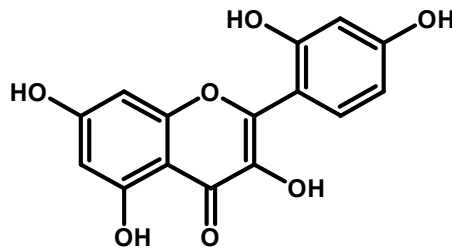
Molekül Ağırlığı: 302,23 g/mol

Erime Noktası: 123-125 °C

Bileşimi: C % 59,61, H % 3,34, O % 37,06

Bitki örtüsünde yaygın olarak bulunmaktadır. Kuersetin dihidrat, alkolden elde edilen sarı iğnemsı yapıdadır. 95-97 °C'de anhidrite dönüşür. Bir gram kuersetin 290 mL saf alkolde veya 23 mL kaynayan alkolde çözünür. Buzlu asetik asit ve sulu alkali içinde sarı renkte çözünür. Suda pratik olarak çözünmez (The Merck Index [76]).

2.8.6.2 Morin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2. 10 Morinin molekül şekli

Kimyasal Formül: $C_{15}H_{10}O_7$; 2-(2,4dihidroksifenil)-3,5,7-trihidroksi-4H-1-benzopiran-4-on; 2',3,4',5,7-pentahidroksiflavon

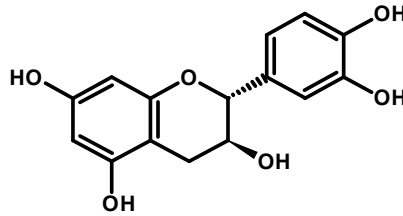
Molekül Ağırlığı: 302,23 g/mol

Küba ağacı (odunu) veya sarı Brezilya ağacı olarak isimlendirilir. 1 mol veya 2 mol su ile kristalleşir. Susuz iğneleri mutlak alkolde 285-290 °C'de bozunur.

Bir gramı 20 °C'de 4 litre suda, 1060 mL kaynayan suda çözünür. Alkolde kuvvetli şekilde çözünürken eter ve asetik asitte az çözünür. Sulu alkali içinde keskin sarı renktedir ve hava ortamında bırakılırsa rengi kahverengiye döner.

Al, Be, Zn, Ga, İn ve Sc tuzları için spot test reaktifi olarak kullanılır. Tekstil boyası olarak morin, değişik renkli yün mordanlama işlemlerinde kullanılır (The Merck Index [76]).

2.8.6.3 Kateşin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri



Şekil 2. 11 Kateşinin molekül şekli

Kimyasal Formül: $C_{15}H_{14}O_6$ 2-(3,4-dihidroksifenil)-3,4-dihidro-2H-1-benzopiran-3,5,7-triol; 3,3',4',5,7-flavan-pentol

Molekül Ağırlığı: 290,28 g/mol

Erime Noktası: 212-216 °C

Bileşimi: C % 62,06; H % 4,86; O % 33,07

Başlıca odunsu bitkilerde (+) kateşin olarak bulunur.

D-formu olan (+)-siyanidanol-3, deksiyanidanol, katergen absorpsiyon ve insan metabolizmasında yararlıdır. DL-formları, su+asetik asit karışımında iğnemsiz şekilde bulunur. Hidrate D-formlarında, su+asetik asit karışımında iğnemsiz şekildedir. D-formunun erime noktası 93-96 °C, anhidrit halinde erime noktası 175-177 °C'dir.

Soğuk su ve eterde çözünürlüğü azdır. Sıcak su, alkol, glacial asetik asit ve asetonda çözünür. Pratik olarak benzen, kloroform, petrol eterinde çözünmez.

Kateşinler, flavon çekirdeğinin üç karbon köprüsünün tüm hidrojenlenmesiyle meydana gelen tetrahidroflavon(flavan) türevleri, flavonol veya antosiyanidinlerin

indirgenmiş şekilleridir. Boyama ve tabaklamada kullanılır. D-formu tedavi edici olarak hepatik hastalıklarda kullanılır. Çay, kateşin ve epikateşin bileşiklerini içermektedir. En bol bulunanları 3-galloil ve 3-galloil epigalokataşindir. Çay kateşini gallokateşindir (trihidrodelefinidin) (The Merck Index [76]).

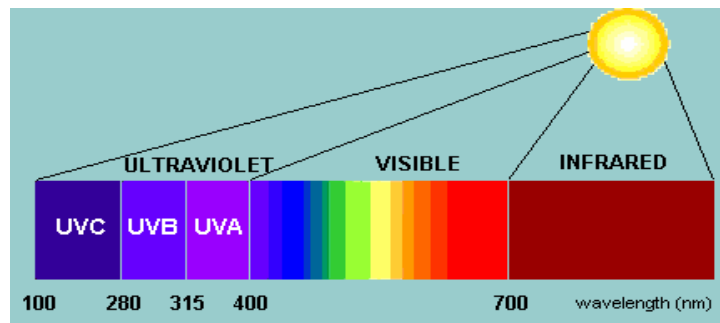
2.9 Mor Ötesi (Ultraviyole) Spektroskopisi

Elektromagnetik spektrumdaki ışınların madde ile etkileşmesinin incelenmesine spektroskop denir. Elektromagnetik ışıma ile madde arasındaki farklı etkileşmelere dayanılarak geliştirilen spektroskopilerden bazılarını aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

Kızılötesi Spektroskopisi (IR), Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-VIS), Raman Spektroskopisi (RS), Mössbauer Spektroskopisi (MS), Nükleer Magnetik Rezonans Spektroskopisi (NMR), Elektron Spin Rezonans Spektroskopisi (ESR),...

Spektroskopinin temelleri 1665–1666 yıllarında ışığı bir prizmadan geçirerek kırmızıdan mora doğru yedi renge ayıran Newton tarafından atılmıştır (Şekil 2.12). Einstein ışınların birer kütesiz parçacık olan fotonlar şeklinde yayıldığını ileri sürmüştür. Isıtılarak ya da ışınlanarak yani fotonlarla bombardıman edilerek uyarılan bir maddenin yaydığı ışınların analiz edilmesinden **yayma (emission)** spektrumu, madde üzerine sürekli gönderilen ışınlardan maddeyi geçebilenlerin analiz edilmesinden ise **soğurma (absorption)** spektrumu elde edilmektedir. Buna göre bir maddenin yayma spektrumundaki beyaz görünen çizgiler soğurma spektrumunda siyah görünür.

Mor ötesi ışıma, dalga boyu 10–400 nm olan ışımadır ve elektromagnetik spektrumda x-ışınları ile görünür bölge arasında bulunur. 10–200 nm bölgesinde uzak mor ötesi, 200–400 nm mor ötesi veya yakın mor ötesi, 400–800 nm bölgesi görünür bölgedir. Mor ötesi ve görünür bölge spektroskopisi elektronik spektroskopisi olarak adlandırılır.

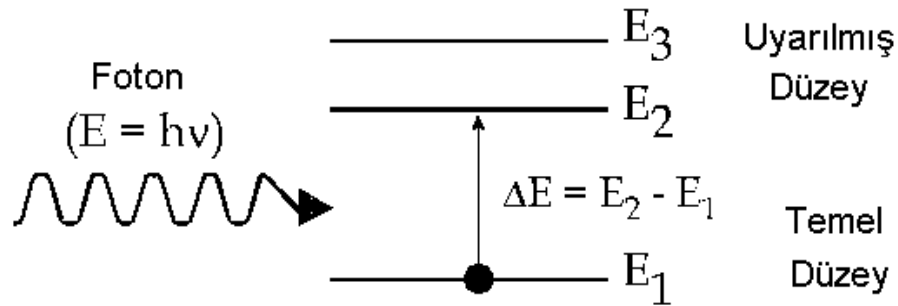


Şekil 2. 12 Elektromagnetik spektrum

Bütün organik bileşikler mor ötesi ışınmasını soğururlar, bununla beraber bir kısmı çok kısa dalga boylarında ışınma yaptıklarından sadece 200 nm'den yukarı soğurma yapan organik bileşiklerin mor ötesi analizinin pratik değeri vardır.

Elektronik spektroskopi, organik molekülde konjugasyonun derecesi ve aromatiklik hakkında bilgi verir. Mor ötesi analizi ile konjuge dienler, izole dienlerden ayrıldığı gibi çift bağların sayısı da bulunabilir. α,β - konjuge karbonil bileşikler, α,γ -konjuge karbonil bileşiklerinden ayrılabilir. Çok halkalı bileşiklerde aromatik konjugasyonun derecesi de yine mor ötesi analizlerle anlaşılabilir.

Mor ötesi spektroskopisinden elde edilen bilgi, organik yapı hakkında kırmızı ötesi ve NMR spektroskopisinden elde edilen bilgi kadar belirtici ve güvenilir olmakla beraber tamamlayıcıdır.



Şekil 2. 13 Elektronların geçiş düzeyleri

Bir molekül tarafından mor ötesi ışınmanın soğurulması, elektronik uyarıya yol açar ve bir elektron düşük enerjili bir elektronik düzeyden (E_1) daha yüksek enerjili bir düzeye (E_2) geçer. En olası uyarı, yani temel düzeyden uyarılmış düzeye geçiş, basitçe en düşük enerjili boş bir molekül yörüngesinden en yüksek enerji dolu bir molekül yörüngesine geçişe karşılık gelir. Fakat her bir elektronik düzeye titreşme düzeyleri ve her bir titreşme düzeyine dönme düzeyleri karşılık geldiğinden, elektronik uyarıya dönme ve titreşim uyarmasına da yol açar ve sonuçta ince bir mor ötesi soğurma çizgisi yerine geniş bir mor ötesi soğurma bandı elde edilir.

Soğurma bandının yeri, özellikle soğurmanın en yüksek değerine karşılık gelen dalga boyu ve soğurmanın şiddeti, soğurmaya yol açan elektronik geçişin türü hakkında bilgi verir.

Ultraviyole spektroskopisinden çeşitli yönlerden yararlanılır. Bunlar başlıca şunlardır:

- Kalitatif analizde
- Kantitatif analizde
- Titrasyonda
- Molekül ağırlığı tayininde
- Yük aktarma kompleksi teşekkülünde
- Asit ve bazlık sabitleri tayininde
- Kompleks stokiyo metrisinin ve sabitinin bulunmasında

Spektrofotometrik ve fotometrik yöntemlerin önemli özellikleri şu hususları içerir:

- Hem organik, hem de inorganik sistemlere yaygın uygulanabilirlik
- 10^{-4} M'dan 10^{-5} M'a kadar değişen tipik duyarlılık değerleri
- Orta derecede seçimlilik
- İyi bir doğruluk
- Veri toplama kolaylığı ve elverişliliği

Mor ötesi spektrometresinde ışıma kaynağı olarak mor ötesi veya görünür bölge için sırasıyla hidrojen veya döteryum lambası (185–390 nm) ve tungsten lambası (350–800 nm) kullanılır. Monokromatör olarak bir prizma veya kırınım ızgarası kullanılır. Görünür bölge için cam prizma yeterlidir, fakat mor ötesi için kuvars (silika) gereklidir. Doğal kuvars 210 nm'nin altında soğurgan olduğu halde, bunun yerine kullanılan saf sentetik erimiş kuvars 185 nm'nin altında soğurgandır. Mor ötesi bölgede dedektör olarak fotoelektrik tüp veya fotoçoğaltıcı tüp kullanılır. Birincisinde, havası boşaltılmış bir kabın kuvars penceresinden giren mor ötesi ışıma toprak alkali metal oksit ile kaplanmış bir katot üzerine düşer ve fırlayan elektronlar anot olarak kullanılan bir metal tele akarak bir elektrik akımı oluştururlar (fotoelektrik olay), ikincisinde ise

akımın şiddeti arttırılır.

2.9.1 Lambert-Beer Yasası

İki temel absorpsiyon kanunu vardır:

Lambert Kanunu: Bu kanun ilk defa 1729'da Bouger tarafından ortaya atılmış olmasına karşın, 1768'de onu yeniden ifade eden Lambert'in adıyla anılmaktadır. Bu kanuna göre bir çözeltiden geçen monokromatik bir ışık demetinin şiddeti, ışının çözelti içinde aldığı yola bağlı olarak logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır.

Logaritmik olarak,

$$I = I_0 \cdot e^{-b \cdot l} \quad \text{veya} \quad (2.33)$$

$$I = I_0 \cdot 10^{-a \cdot l} \quad \left(a = b / 2,303 \right) \quad (2.34)$$

şeklinde gösterilir.

I_0 = Gelen ışın demetinin şiddeti

I = Çözeltiyi terkeden ışının şiddeti

l = Çözeltinin konduğu hücrenin kalınlığı

a = Çözeltiden geçen ışık demetinin dalga boyuna bağlı bir sabit

Beer Kanunu: Beer'a göre (1852) aynı derinlikte ya da aynı kalınlıkta bir çözeltiden geçen ve çözelti tarafından absorplanan monokromatik bir ışımaya demetinin şiddeti çözeltinin konsantrasyonuyla logaritmik, üstel veya geometrik olarak azalır.

Logaritmik olarak,

$$I = I_0 \cdot e^{-b \cdot c} \quad \text{veya} \quad (2.35)$$

$$I = I_0 \cdot 10^{-a \cdot c} \quad \left(a = b / 2,303 \right) \quad (2.36)$$

şeklinde gösterilir.

I_0 = Gelen ışın demetinin şiddeti

I = Çözeltiyi terkeden ışının şiddeti

a = Çözeltinin türüne ve monokromatik ışının dalga boyuna bağlı bir sabit

c = Çözeltinin konsantrasyonu

Çözeltiyi terkeden ışının şiddetini biri konsantrasyon, diğeri ışının çözelti içinde katettiği yola bağlayan bu iki kanun birleştirilerek Lambert-Beer olarak adlandırılan şu temel bağıntı elde edilir:

$$I = I_0 \cdot 10^{-a \cdot l \cdot c} \quad (2.37)$$

I_0 = Gelen ışın demetinin şiddeti

I = Çözeltiyi terkeden ışının şiddeti

l = Çözeltinin konduğu hücrenin kalınlığı

a = Çözeltinin absorptivitesi

c = Konsantrasyon

Eşitlik düzenlenip eksi logaritması alınırsa,

$$\log \frac{I_0}{I} = a \cdot l \cdot c = A \quad (2.38)$$

eşitliği elde edilir.

A = Absorbans

(2.38) eşitliğinden anlaşılabacağı gibi a sabiti, çözelti konsantrasyonu ve hücre kalınlığının birimine göre değişir. Konsantrasyon molarite, hücre kalınlığı cm olarak alındığında a yerine ϵ kullanılır ve bu **molar absorpsiyon katsayısı** veya **molar absorbtivite** olarak adlandırılır. Birimi de $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$ 'dir.

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c \quad (2.39)$$

ϵ çözeltideki maddenin bir özelliği, a ise herhangi bir örneğin özelliğidir. Dolayısıyla absorbans örneğin konsantrasyonu ve ölçümün yapıldığı kabın ışın yoluyla değişir, ϵ ise belli bir dalga boyunda örnekteki belirli bir madde için konsantrasyon ve ölçüm yapılan kabın ışın yoluna bağlı olmaksızın sabittir.

Optik yöntemlerde kullanılan diğer bir kavram transmittans (geçirgenlik)tır. Bir ışın demetinin çözeltiden geçen kısmının, çözeltiliye gelen kısmına oranına denir ve T ile gösterilir.

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.40)$$

Dolayısıyla absorbans ile transmittans arasında,

$$\log T = \log \frac{I}{I_0} = -\log \frac{I_0}{I} \quad (2.41)$$

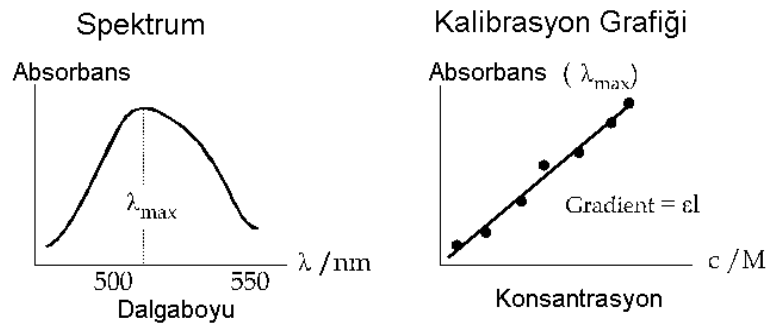
$$A = -\log T \quad (2.42)$$

bağıntısı vardır.

Lambert–Beer yasası, pek çok madde için geniş bir derişim aralığında geçerlidir. Mor ötesi spektroskopisi ile kantitatif analiz yaparken, derişimi bilinmeyen maddenin şüpheli derişim aralığında hazırlanan, derişimi bilinen çözeltileri için çizilen Absorbans – Konsantrasyon (çalışma veya kalibrasyon) eğrisi dar bir derişim aralığında genellikle doğrusaldır (Erdik [81], Skoog vd. [82]).

Nicel ölçümler Lambert-Beer yasası ile absorbans x konsantrasyon kalibrasyon grafiğinin kullanımını içerdiğinden doğrusal bir grafik elde edilmelidir.

ϵ maddeden maddeye değiştiği gibi aynı bir madde için dalga boyuyla da değişir. Bu nedenle ϵ absorpsiyonun en yüksek olduğu dalga boyunda ($\lambda_{\max}$) hesaplanır. En yüksek tepe noktası molar absorptivitenin en yüksek olduğu değeri gösterir ve dolayısıyla bu değer de analizin duyarlılığının bir göstergesidir (Şekil 2.14).



Şekil 2. 14 UV spektroskopinin spektrum ve kalibrasyon grafiği

Askorbik asit içeren meyve sularının, sebzelerin, hayvansal ürünlerin çok kullanılması nedeni ile değişik analitik teknikler askorbik asit tayini için geliştirilmiştir. Bunlar; titrasyon, spektrofotometri (renkli reaktif ilave edilmiş veya edilmemiş), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), gaz kromatografisi (GC), çeşitli elektroanalitik teknikler, enzimatik yöntemler ve birkaç tekniğin bir arada kullanıldığı yöntemlerdir (Fung ve Luk [78]).

Spektrofotometrik yöntem ise, aletsel bir metot olarak endüstri laboratuvarlarında askorbik asidin tayini için tercih edilmektedir. Çeşitli renk veren reaktifler kullanılmaktadır. Bunlar, amonyum molibdat, 2,4-dinitrofenil-hidrazin, ortofenilendiamin ferrozin. Ortamda başka renkli madde mevcutsa girişim yapabilir ve oluşabilecek girişimleri bertaraf etmek için bir ön işlem gerekebilir. Direkt UV spektrofotometresi askorbik asit tayini için basit ve hızlı bir yöntemdir (Lau vd. [83]).

Yöntemler dehidroaskorbik asit, hidroaskorbik asit ya da toplam askorbik asit miktarlarının ölçümlerine dayanmaktadır. Analitik tayin yöntemleri vitaminin oksidasyon-redüksiyon özelliğine dayanmaktadır. Burada ya askorbik asidin kendisi ya da askorbik asidin yükseltgenmiş şekli olan dehidroaskorbik asit miktarı saptanır.

Askorbik asidin (AA) dehidroaskorbik aside oksidasyonu bir Cu(II)-2,9 dimetil-1,10 fenantrolin(Nc) reaktifi ile amonyum asetatlı ortamda pH 7'de yapılmış ve oluşan bis(Nc)-bakır(I) kelatının absorbansı 450 nm'de ölçülmüştür. Bu kelat hemen oluşmuş ve AA için görünür molar absorptivite $1,60 \times 10^4 \text{ dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak bulunmuştur. $8,0 \times 10^{-6}$ ve $8,0 \times 10^{-5}$ M konsantrasyon aralığında Beer kanununa uyum sağlanmıştır. 90 µg AA için relatif standart sapma % 3 olarak hesaplanmıştır. Cu(II)-Nc reaktifi aynı tayin için Fe(III) 1,10 fenentrolin reaktifinden daha yavaştır ve bu nedenle daha seçici bir oksidandır. Sitrat, okzalit ve tartarat gibi zayıf redüktanlar içeren meyve suları için önerilen metot avantajlıdır. Geliştirilen metot C vitamini içeren ticari meyve suları, ilaç ve kırmızı şarapta uygulanmıştır. Analizden önce şaraptaki meta-bisüfit pH 3'de bir anyon değiştiriciyle kaldırılmış ve şarapta AA tayini için değişik ekstraktif-spektrofotometrik analizler geliştirilmiştir, böylece şarap antosiyaninleri ve polifenollerinin girişimleri engellenmiştir. Güvenilir bir metot olduğunu kanıtlamak için sonuçlar HPLC ile karşılaştırılmıştır (Güçlü vd. [84]).

AA'nın flavonoid varlığındaki oksidasyonu, flavonoidlerin girişiminden dolayı sadece Cu(II)-Nc reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak izlenememiştir. Bu nedenle öncelikle flavonoid, ortamdan La-kompleksi şeklinde çözücü ekstraksiyonu ile uzaklaştırıldıktan sonra ortamda kalan AA, Cu(II)-Nc reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Özyürek vd. [71]).

Antioksidanların kimyasal çeşitliliği bunların sebzelerden ayrılması ve miktar tayinlerini güçleştirmektedir. Bundan dolayı total antioksidan aktivite seviyesini ölçebilecek yeni bir metot gerekmektedir. Bugünkü literatürde, standart kantitatif metotların tıkanması nedeniyle besinlerde uygun hiçbir total antioksidan beslenme indeksi olmadığı görülmektedir. Sonuç olarak bu çalışma kromojenik oksidasyon ajanı olarak bakır(II)-neokuproin [Cu(II)-Nc] kullanılmasıyla C ve E vitaminleri ile diet polifenollere ait uygulanabilir bir antioksidasyon kapasite indeksi metodu geliştirilmiştir. Bu metot, bakır(II) ya da bakır iyonlarının polifenoller redüklemeye yeteneğini ölçtüğü için, yukarıdaki çalışma grubunca "cupric reducing antioxidant capacity", kısaltılmış CUPRAC metot olarak adlandırılmıştır. Bu metot "ferric reducing antioxidant power" kısaltılmış FRAP metoduna avantaj sağlar. Çünkü bakır redoks kimyası, demirinkinin tersine daha hızlı bir kinetiğe sahiptir. Bu metotta antioksidan çözeltisi doğrudan ya da asit hidrolizden sonra, bir CuCl₂ çözeltisi, bir Nc alkollü çözeltisi ve amonyum asetat sulu tampon çözeltisi pH=7 ile karıştırılır. 30 dakika sonra absorbans 450 nm'de ölçülür. Askorbik asit, gallik asit ve kuersetin için renk oluşumu hızlı iken, narenciyeler için yavaştır. Bu son bileşikler 50 °C'de su banyosunda Cu(II)-Nc reaktifi ilavesinden sonra 20 dakika bekletildikten sonra, oksidasyon reaksiyonunun tamamlanması, için denenmiştir (Apak vd. [85]).

UV spektrofotometre kullanarak alkolsüz içki, meyve suları ve likörlerde askorbik asidi saptamak için bir background düzeltmesi metodu geliştirilmiştir. Örnek blank, bakır(II) ile asidin katalitik oksidasyonu ile oluşturulmuştur. Bakır(II)den gelen absorpsiyonu düzeltmek için oksidasyondan sonra EDTA eklenmiş ve standart çözelti, oda sıcaklığında askorbik asit oksidasyonunu katalizlemeyen, bakır(II)-EDTA kompleksleri ile aynı konsantrasyondadır. Gerçek örneklerde askorbik asit oksidasyonu 50 °C'de gerçekleştirilmiştir, çünkü çalışma sırasında örnekte bulunan sitrik asit bakır(II) katalizli askorbik asit oksidasyonunu yavaşlatmıştır. Absorbans ölçümleri 267 nm'de ve pH 6'da

gerçekleştirilmiştir. 0–20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ askorbik asit kalibrasyon grafiği lineerdir. Önerilen metot seçicidir ve içindeki birçok bileşeni alkolsüz içecekler, meyve suları ve likörlerde girişim yapmaz (Lau vd. [83]).

Alkolsüz içkilerde ve meyve sularında askorbik asidi saptamak için enstrümental metot olarak en çok spektrofotometre kullanılır. UV spektrofotometre hızlı ve basit bir metot olmasına rağmen matris girişimi background absorpsiyonu düzeltilerek çözülebilen bir problem olarak gösterilmiştir. Termal bozulma, katalitik dönüşme, UV ışık bozulması ve baz davranışları gibi background düzelmesi metotları incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Baz davranışı metodu ticari içkilerde karşılaşılan konsantrasyonlar için en iyisidir. Bu nedenle çalışma parametreleri uygun hale getirilmiş ve analiz üzerine etkisi tartışılmıştır (Fung ve Luk [78]).

İlaçlarda askorbik asiti saptamak için basit, hızlı ve kesin bir direkt ultraviyole spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Örnek ve blank oda sıcaklığında asidin bakır(II) katalizli oksidasyonu ile oluşmuştur. Absorbans ölçümleri 267 nm’de ve pH 6’da yapılmıştır. Metot seçicidir ve genel olarak askorbik asit tabletleri ve multivitamin hazırlamada içinde bulunan diğer maddelerle girişim yapmamıştır (Lau vd. [83]).

Lipit hidroperoksitlerin spektrofotometrik olarak tayininde en duyarlı yöntem **Fe(III) tiyosiyanat** yöntemidir. Bu yöntem, oksidasyon boyunca oluşan peroksitlerin, Fe(II)’nin Fe(III)’e oksidasyonuna ve daha sonra tiyosiyanat ile, absorbansı 500 nm de ölçülen, renkli bir kompleks vermesine dayanır (Lea [61]).

2.10 Birinci Derece Reaksiyon Kinetiği



Tek moleküllü olan bu reaksiyonun herhangi bir t anındaki hızı, A’nın bu andaki konsantrasyonu ile orantılıdır. Birinci mertebeden bir reaksiyonun hız sabiti, k, başlangıç konsantrasyonu A_0 ve herhangi bir t anındaki konsantrasyonu da A ile gösterirsek birinci derece reaksiyon hızı aşağıdaki gibi yazılır:

$$\text{Reaksiyon Hızı} = -d[A]/dt = k.[A] \quad (2.44)$$

Düzenlenip integre edilirse;

$$\int d[A] / [A] = \int -k \cdot dt \quad (2.45)$$

$$\ln [A] = -k \cdot t + \text{sabit} \quad (2.46)$$

t=0 iken $[A] = [A]_0$ olduğundan $\text{sabit} = \ln [A]_0$ olur ve

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[A]_0}{[A]} = \frac{2,303}{t} \log \frac{[A]_0}{[A]} \quad (2.47)$$

$$\log [A] = \log [A]_0 - \frac{k \cdot t}{2,303} \quad (2.48)$$

Doğrunun eğimi $-k / 2,303$ değerini, $t=0$ 'a karşılık olan ordinat da $\log [A]_0$ verir. Buna göre bir doğrunun elde edilmesi reaksiyonun birinci mertebeden olduğunun bir kanıtıdır ve eğimden hız sabiti bulunur.

k'nın birimi

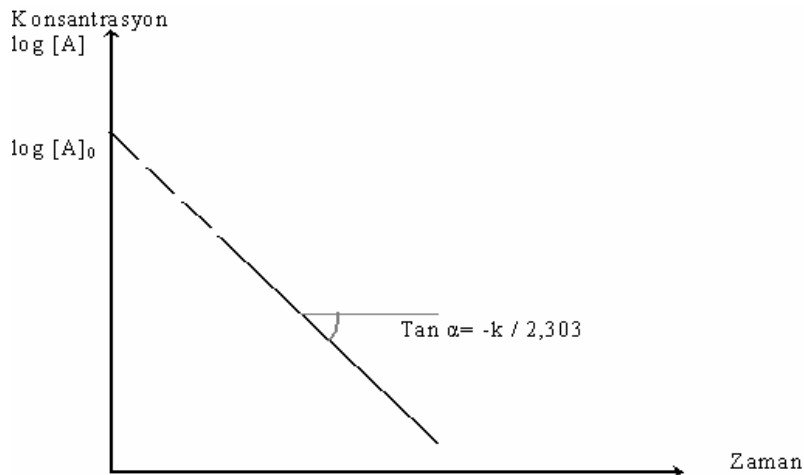
(2.48)'de birimler yerine yazılırsa;

$$\text{mol.L}^{-1}/\text{zaman} = k \cdot (\text{mol.L}^{-1}) \quad (2.49)$$

$$k = (\text{mol.L}^{-1})/\text{zaman}(\text{mol.L}^{-1}) \quad (2.50)$$

$$k = 1/\text{zaman} = \text{zaman}^{-1} \quad (2.51)$$

k sabitinin nümerik değeri kütle ve konsantrasyona bağlı olmayıp sadece zaman birimini fonksiyonudur (Castellan [86]).



Şekil 2. 15 Birinci dereceden bir reaksiyonda konsantrasyon – zaman grafiği

Lipit peroksidasyon kinetiği (EK-A)

$$\text{Ln} \left(\frac{1 - A_t}{A_t} \right) = \text{Ln} \left(\frac{1 - A_0}{A_0} \right) - k \cdot t \quad (2.52)$$

k, Ln ((1-A)/A)'nın inkübasyon zamanına (t) karşı çizilen grafiğinden hesaplanan birinci derece hız sabitidir. Grafik, eğimi (-k) ve kesim noktası Ln ((1-A₀)/A₀) olan düz bir doğru verir.

BÖLÜM 3

DENEYSEL BÖLÜM

Bu çalışmanın birinci bölümünde, antioksidan olarak flavonoidlerin askorbik asidin bakır(II) katalizli oksidasyonuna; ikinci bölümünde de yine flavonoidlerin bakır(II)-askorbat sistem ile indüklenmiş lipit peroksidasyonuna etkileri araştırıldı. Bu amaçla çalışmanın ilk bölümünde AA'nın Cu(II) iyon varlığında ve yokluğunda oksidasyonu, havalandırılmış asetat tamponlu çözeltide (pH = 4,5), 25 °C'de ve I=0,1 M KNO₃'da incelendi. Gerçek gıda sistemleri çeşitli flavonoidleri içerdiği ve besin hazırlama ve formülasyonunda önemli olduğu için, benzer yapıdaki (kuersetin, morin ve kateşin) farklı flavonoidlerin tek başına ve ikili ve üçlü karışımları halinde etkisi araştırıldı. Çalışmanın ikinci bölümünde, 37 °C ve pH 7'de Cu(II) iyonları varlığında ve yokluğunda havalandırılmış ve inkübe edilmiş linoleik asit (LA) emülsiyonlarında, lipit peroksidasyonu incelendi. Ayrıca, LA peroksidasyonu, Cu(II) ve askorbik asit (AA), flavonoidlerin beraberliğinde incelendi.

3.1 Kullanılan Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler analitik saflıktadır, ayrıca bir saflaştırma işlemi yapılmadan kullanıldı. L- askorbik asit saflaştırılmadan ve Cu(II) – Nc reaktifi AA tayini için kullanıldı. Flavonoidler (kuersetin(QR), morin(MR), kateşin (CT)), AA'nın ve LA'nın Cu katalizli otoksidasyonu için bakır kelatör olarak kullanıldı. Modifiye CUPRAC yöntemi ile askorbik asit tayininde, flavonoidlerin ekstraksiyonu için lantanyum tuzu (LaCl₃.7H₂O) ve pH'si 4,5 olan asetat tampon çözeltisi kullanıldı. Asetat tamponu (0,01 M) HSIEH'e göre hazırlandı (Hsieh ve Harris [87]). LA'nın Cu katalizli otoksidasyonu

incelenirken, Cu-flavonoid kelatları pH 7'de 80 mM fosfat tamponunda hazırlandı. Bütün çözeltiler hazırlanırken ve seyreltilirken deiyonize destile su kullanıldı.

3.1.1 Birinci Bölüm: Cu(II)-Nc Reaktifi ile AA Tayininde Kullanılan Maddeler

Askorbik asit ($C_6H_8O_6$)

Bakır nitrat trihidrat ($Cu(NO_3)_2 \cdot 3 H_2O$)

Potasyum nitrat (KNO_3)

Bakır(II) klorür dihidrat ($CuCl_2 \cdot 2H_2O$)

Amonyum asetat (CH_3COONH_4)

Asetik Asit (CH_3COOH)

Sodyum Asetat (CH_3COONa)

Etil Alkol (C_2H_5OH)

Etil Asetat ($CH_3COOC_2H_5$)

Bu kimyasal maddeler analitik saflıkta E. Merck Darmstadt firmasının ürünüdür.

Neokuproin ($C_{14} H_{12}N_2$)

Lantan klorür heptahidrat ($LaCl_3 \cdot 7H_2O$)

Kuersetin ($C_{15} H_{10}O_7$)

Morin ($C_{15}H_{10}O_7$)

Kateşin ($C_{15}H_{14}O_6$)

Bu kimyasal madde analitik saflıkta Sigma Aldrich firmasının ürünüdür.

Standart Tampon Çözeltiler

pH 4,00 Biftalat tamponu ve pH 7,00 Fosfat tamponu Metrohm firması ürünü

3.1.2 İkinci Bölüm: Fe(III)-SCN Reaktifi ile Lipit Hidroperoksitlerin Tayininde Kullanılan Maddeler

Demir(II) klorür tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$)

Tween-20 ($C_{58}H_{114}O_{26}$)

Linoleik asit ($C_{18}H_{32}O_2$)

Amonyum rodanür (NH_4SCN)

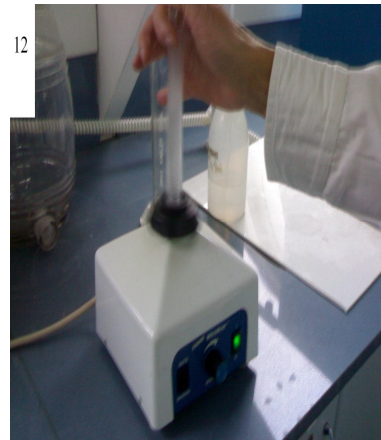
Askorbik asit ($C_6H_8O_6$)

Sodyum primer fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
Sodyum sekonder fosfat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
Hidroklorik asit (HCl)
Mutlak Etil Alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
Kuersetin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$)
Morin ($\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_7$)
Kateşin ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{O}_6$)
Bakır nitrat trihidrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)

3.2 Araç ve Gereçler

Absorbans, SHIMADZU UVmini-1240 UV-Visible spektrofotometre ile kalınlığı 1 cm olan kuartz küvetlerle ölçüldü. pH ölçümleri kombine bir pH elektrot ile yapıldı. Cu(II) – Nc reaktifi ile AA tayininde kinetik işlemlerde aktivite katsayısını sabit tutmak için iyonik şiddet $I=0,1\text{ M}$ olacak şekilde KNO_3 ile ayarlandı ve bu bölümdeki deneyler $25\text{ }^\circ\text{C}$ 'de sıcaklığı kontrol edilen ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) termostat sistemi içinde gerçekleştirildi. LA'nın Cu katalizli otoksidasyonu incelenirken ise; deneyler $37\text{ }^\circ\text{C}$ 'de sıcaklığı kontrol edilen ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) termostat sistemi içinde yapıldı. Cu(II)–Nc reaktifi ile AA tayini ve Fe(III)-SCN reaktifi ile lipid hidroperoksitlerin tayininde aşağıdaki araç ve gereçler kullanılmıştır:

1. Spektrofotometre SHIMADZU UVmini-1240(UV – Visible)
2. 1 cm' lik Kuartz Küvetler 1,000 cm ışık yolu
3. Analitik Terazisi SARTORIUS BASIC (0,0001 g)
4. Yazıcı HP DESKJET 3650
5. Su Arıtma Cihazı KATTERMANN D 3165
6. pH-metre METROHM 632
7. Cam Elektrot METROHM AG CH – 9100
8. Termostat Sistem THERMOMIX 1419 B BRAUN Model
9. Hava Pompası RAMBO EP – 3500 Hi – Tec and Stil / Powerful Air Pump
10. Kronometre
11. Reaksiyon Kabı
12. Ekstraksiyon cihazı VORTEX (Cu(II)-Nc reaktifi ile kinetik AA tayininde)



Şekil 3. 1 Deney düzeneği

3.3 Çözeltiler

3.3.1 Birinci Bölüm: Cu(II)-Nc Reaktifi ile AA Tayininde Kullanılan Çözeltiler

Askorbik Asit Stok çözeltisi ($1000\mu\text{g. mL}^{-1}$; $5,67 \times 10^{-3} \text{ M}$)

Askorbik asitten 100 mg tartılıp 100 mL hacimli balon jojede destile su ile çözülüp, gerekli hacme tamamlanır. Bu çözeltinin 1 mL'si 1 ppm'e karşılık gelmektedir. Askorbik asit stok çözeltisi her gün taze hazırlanarak ışıktan korunmuştur.

Denemelerde çözelti konsantrasyonu; bu ana stok çözeltisinden 10 mL alınıp, seyreltilerek $5,67 \times 10^{-4} \text{ M}$ olarak çalışılmıştır.

Bakır Nitrat Stok Çözeltisi (1 mL = 1 ppm Cu(II) ; $1,57 \times 10^{-4} \text{ M}$)

0,3802 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ tuzundan tartılıp 100 mL hacimli balon jojede suda çözülmüştür. Denemelerde Cu(II) konsantrasyonu bu çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak $1,57 \times 10^{-7} - 6,28 \times 10^{-7} \text{ M}$ olarak çalışılmıştır.

Bakır(II)Klorür Stok Çözeltisi ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$)

0,08524 g CuCl_2 tuzundan tartılıp 50 mL hacimli balon jojede suda çözülmüştür.

Neokuproin Stok Çözeltisi ($7,5 \times 10^{-3} \text{ M}$)

0,039 g neokuproin reaktifinden tartılıp 25 mL hacimli balon jojede % 96'lık etanolde çözülmüştür. Neokuproin stok çözeltisi her gün taze hazırlanarak ışıktan korunmuştur.

Amonyum Asetat Stok Çözeltisi (1 M)

3,854 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ tuzundan tartılıp 50 mL hacimli balon jojede suda çözülmüştür.

Lantan Klorür Stok Çözeltisi ($3 \times 10^{-3} \text{ M}$)

0,11138 g $\text{LaCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tartılıp 100 mL hacimli balon jojede suda çözülmüştür. Denemelerde bu çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak $3 \times 10^{-4} \text{ M}$ olarak çalışılmıştır.

Kuersetin Stok Çözeltisi ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$)

0,033827 g tartılıp 10 mL hacimli balon jojede % 96'lık etanolde çözülmüştür.

Morin Stok Çözeltisi ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$)

0,030224 g tartılıp 10 mL hacimli balon jojede % 96'lık etanolde çözülmüştür.

Kateşin Stok Çözeltisi ($1 \times 10^{-2} \text{ M}$)

0,030828 g tartılıp 10 mL hacimli balon jodede % 96'lık etanolde çözülmüştür.

Tüm flavonoid çözeltileri, her gün taze olarak hazırlanmıştır.

Tampon Çözelti (0,01 M Asetat Tamponu, pH=4,5)

Litresinde 0,3173 g sodyum asetat ve 0,3516 mL glacial asetik asit içeren tampon çözelti hazırlanmıştır.

3.3.2 İkinci Bölüm: Fe(III)-SCN Reaktifi ile Lipit Hidroperoksitlerin Tayininde Kullanılan Çözeltiler

% 75'lik Etil Alkol Çözeltisi

75 mL mutlak etil alkol ve 25 mL destile su karıştırıldı.

% 30'luk NH_4SCN Çözeltisi

30 g NH_4SCN tartılarak 100 mL'ye su ile tamamlandı.

% 3,5'lik HCl Çözeltisi

33,5 mL su üzerine 3,5 mL % 37'lik HCl ilave edilerek hazırlandı.

$2 \times 10^{-2} \text{ M}$ $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ Çözeltisi

$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dan 0,099 g tartım alınıp % 3,5'lik HCl çözeltisi ile 25 mL'ye tamamlandı.

0,2 M pH=7 Fosfat Tamponu

0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ karışımı kullanılarak hazırlandı.

0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'dan 8,89 g tartılıp su ile 250 mL'ye tamamlandı.

0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'dan 3,12 g tartılıp su ile 100 mL'ye tamamlandı.

Tween 20 Stok Çözeltisi

Tween 20'den 7,0 g tartım alınıp 25 mL hacimli balon jodede suda çözülmüştür.

$5 \times 10^{-2} \text{ M}$ $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ Stok Çözeltisi

1,208 g $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ tuzundan tartılıp 100 mL hacimli balon jodede suda çözülmüştür.

Denemelerde Cu(II) konsantrasyonu bu çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 1×10^{-3} M - 1×10^{-7} M olarak çalışılmıştır.

5×10^{-3} M Kuersetin Stok Çözeltisi

Kuersetinden 0,1691 g tartılıp 100 mL hacimli balon jode % 96'lık etanolde çözülmüştür. Denemelerde kuersetin konsantrasyonu bu çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 2×10^{-7} M - 10×10^{-7} M olarak çalışılmıştır.

5×10^{-3} M Kateşin Stok Çözeltisi

Kateşinden 0,1541 g tartılıp 100 mL hacimli balon jode % 96'lık etanolde çözülmüştür. Denemelerde kateşin konsantrasyonu bu çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 1×10^{-7} M - 8×10^{-7} M olarak çalışılmıştır.

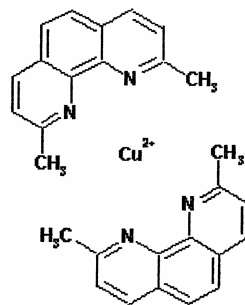
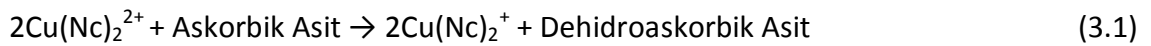
5×10^{-3} M Morin Stok Çözeltisi

Morinden 0,16012 g tartılıp 100 mL hacimli balon jode % 96'lık etanolde çözülmüştür. Denemelerde morin konsantrasyonu bu çözeltiden gerekli seyreltmeler yapılarak 1×10^{-7} M - 8×10^{-7} M olarak çalışılmıştır.

3.4 Yöntemler

3.4.1 Birinci Bölüm: Modifiye CUPRAC Yöntemle AA Tayini

Spektrofotometrik askorbik asit tayin yöntemi; AA'nın bir Cu(II)-2,9 dimetil-1,10-fenantrolin (neokuproin Nc) reaktifi ile pH 7 de amonyum asetatlı ortamda dehidroaskorbik asite oksidasyonuna dayanır. Oluşan bis(Nc)-bakır kelatının (Şekil 3.2) absorbanşı 450 nm'de ölçülür (Güçlü vd. [84]).



Şekil 3. 2 Bis(Nc)-bakır kelatı

AA'nın flavonoid varlığındaki oksidasyonu, flavonoidlerin girişiminden dolayı sadece Cu(II)-Nc reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak izlenememiştir. Bu nedenle öncelikle flavonoid, ortamdan La-kompleksi şeklinde çözücü ekstraksiyonu ile uzaklaştırıldıktan sonra ortamda kalan AA, Cu(II)-Nc reaktifi kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir (Özyürek vd. [71]).

Bir mL Cu(II) çözeltisi bir deney tüpü içine kondu ve sonra 1 mL Nc, son pH'ı 7'ye getirmek için 1 mL amonyum asetat, 2 mL AA çözeltisi bu sırayla eklendi. İki dakika sonra 450 nm'de blanke karşı absorpsiyon okundu. Flavonoid varlığında ve yokken geçiş metal katalizli AA otoksidasyonu bu yolla izlendi.

3.4.2 İkinci Bölüm: Ferrik Tiyosiyanat Yöntemle Lipit Hidroperoksit Tayini

Linoleik asit emülsiyon sisteminde peroksit oluşumu, tiyosiyanat yöntemle tayin edildi (Lea [61], Mihaljevic vd. [62]). Linoleik asit emülsiyonlarında, oksidasyon sonucunda zamanla kümen hidroperoksitler oluşur. Oksidasyonun derecesi, yani peroksit değeri, ferrik tiyosiyanat yöntemi (Yen ve Hsieh [88]) kullanılarak spektrofotometrik olarak 500 nm'de ölçümler yapılarak saptandı. Bir tüpe sırasıyla % 75'lik 4,7 mL etanol, %30'luk 0,1 mL amonyum tiyosiyanat, 0,1 mL inkübasyon örnek çözeltisi ve 0,1 mL % 3,5 HCl içinde hazırlanan 0,02 M demir(II)-klorür çözeltileri konuldu. Toplam 5 mL'lik karışım 3 dakika bekletildikten sonra, 500 nm'deki absorpsiyon yine içinde LA dışındaki tüm bileşenleri aynı oranda içeren 0,1 mL blank ile hazırlanmış ve 3 dakika bekletilmiş çözeltiliye karşı okundu.

3.5 Örnek Hazırlanması ve Kinetik Ölçümler

3.5.1 Birinci Bölüm: Cu(II)-Nc Reaktifi ile Kinetik Ölçümlerde AA Tayini

Deney tüpleri içerisine sırasıyla 1×10^{-2} M'lık CuCl_2 'den 1 mL, $7,5 \times 10^{-3}$ M Nc çözeltisinden 1 mL, 1 M amonyum asetat çözeltisinden 1 mL konuldu ve tüplerin ağzıları kapatılarak ölçümler için hazır hale getirildi. 100 mL'lik balonjoje içerisine 0,1 M KNO_3 , $1,5 \times 10^{-3}$ M pH 4,5 asetat tamponu, çalışılacak bakır(II) konsantrasyon aralığını, $1,57 \times 10^{-7}$ - $6,28 \times 10^{-7}$ M, elde edecek şekilde $1,57 \times 10^{-5}$ M'lık stok bakır nitrat çözeltisi, çalışılacak flavonoid konsantrasyonunu, 1×10^{-4} M, elde edecek şekilde 1×10^{-2} M'lık

flavonoid çözeltisi ilave edildi. Sonra karışıma hızla $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asit ilave edildikten sonra kronometreye basıldı ve örnek çözelti, sıcaklığı 25 °C'de bulunan erlenmayere aktarıldı. Reaksiyon süresince çözeltiden akış hızı 60 L/saat olan hava oksijeni geçirildi. Hava akımı önce bir su dolu yıkama şişesinden geçirilerek su buharıyla doyuruldu. Reaksiyon hızı, oksijenin çözünme hızına göre düşük olduğu için reaksiyon çözeltisinin oksijenle doyurulmuş olduğu kabul edildi. AA ilavesinden sonra, belli zaman aralıklarında reaksiyon kabından 1 ml örnek çözelti çekildi. İçinde 2 mL 3×10^{-4} M LaCl_3 bulunan bir tüpe kondu. Üzerine 2 mL saf su ilave edilerek 5 mL hacme tamamlandı. Daha sonra bu karışıma iki kez 5 mL etil asetat ilave edilerek ortamdaki flavonoid-La kompleksi ekstraksiyonla uzaklaştırıldı. Oksidasyondan geride kalan AA'nın tayini için, sulu çözeltiden 2 mL çekilerek, içinde 1mL CuCl_2 , 1mL NH_4Ac ve 1mL Nc bulunan tüpe, toplam 5 mL olacak şekilde, ilave edildi. Tüp içindeki çözelti iyice çalkalandı ve bis(Nc)-bakır kompleksi oluşumu için 2 dakika bekletildi (Özyürek vd. [71]). Küvetler çözeltiyle yıkandıktan sonra, modifiye CUPRAC spektrofotometri yöntemi ile örneklerin 450 nm'de askorbik asit içermeyen blanke karşı absorbanları okundu. Elde edilen pikler spektrofotometrede üst üste çakıştırıldı. Reaksiyon hızı, oksidasyon sırasında kalan AA'nın, Cu(II)-Nc ile vermiş olduğu Cu(I)-Nc kompleksinin absorpsiyon piklerinin, izlenmesiyle tayin edildi. İzlenen her reaksiyon periyodu (45 dak.) sonunda, çalışma çözeltisinin pH'si kontrol edildi. Deneyler üçer kez tekrarlandı.

3.5.2 İkinci Bölüm: Fe(III)-SCN Reaktifi ile Kinetik Ölçümlerde Lipit Hidroperoksitlerin Tayini

Stok, % 75'lik etanol, %30'luk amonyum tiyosiyanat (NH_4SCN) ve % 3,5 HCl içinde hazırlanan 0,02 M demir(II)-klorür, sulu çözeltileri kullanıldı. Stok linoleik asit emülsiyonu 0,02 M fosfat tamponunda hazırlandı. Bakır nitrat stok çözeltisi 0,05 M Cu(II) konsantrasyonunda ve stok flavonoid çözeltileri 5×10^{-3} M konsantrasyonunda hazırlandı. $2,5 \times 10^{-3}$ M C vitamini içeren stok askorbik asit (AA) çözeltisi ve 0,2 M fosfat tamponu (pH 7) 50 mL reaksiyon karışımında bulunur. 0,01 M linoleik asit, 80 mM fosfat tamponu, 1 mM Cu(II) , 0,1-1,0 μM konsantrasyon aralığında flavonoid ve 5×10^{-5} M AA içeren 50 mL çalışma çözeltisi 250 mL'lik erlenmayer içerisinde hazırlandı ve 37 °C'deki su banyosuna yerleştirildi. Örnek çözeltisinin pH'ı ölçüldü. İnkübasyon boyunca

çözeltilerden akış hızı 60 L/saat olan hava oksijeni geçirildi. Hava akımı önce bir su dolu yıkama şişesinden geçirilerek su buharıyla doyuruldu. Reaksiyon hızı, oksijenin çözünme hızına göre düşük olduğu için reaksiyon çözeltisinin oksijenle doyurulmuş olduğu kabul edildi (Ke ve Ackman [45], Ueda vd. [49]). Spektrofotometrik ölçümler için, inkübasyon boyunca farklı zaman aralıklarında 0,1 mL örnek alındı. Bu 0,1 mL örnek; 4,7 mL % 75'lik etanol, 0,1 mL %30 lik amonyum tiyosiyanat ve 0,1 mL, % 3,5 HCl içinde hazırlanan 0,02 M demir(II)-klorür çözeltileri içeren tüpe ilave edildi. Linoleik asit oksidasyonu boyunca oluşan peroksitler, Fe^{2+} 'yı Fe^{3+} 'ya yükseltgemek için, asidik Fe(II) reaktifi ile reaksiyona girer. Oluşan Fe^{3+} iyonları SCN^- ile, maksimum absorbanası 500 nm olan, kırmızı renkli bir kompleks (*yani* $Fe(SCN)^{2+}$) oluşturur (Harvey ve Manning, [89]). Böylece, zamana karşı absorbanas kaydedilip oksidasyon izlenir. İki deneme aynı anda yapıldı, yani (linoleik asit+bakır(II)+AA) içeren şahit çözeltisinin oksidasyonu ve aynı çözeltiye ayrıca flavonoid ilave edilerek hazırlanan örnek çözeltinin oksidasyonu eş zamanlı izlendi.

3.5.2.1 Linoleik Asit Emülsiyonunun Hazırlanması

0,02 M stok linoleik asit emülsiyonu hazırlamak için, 50 mL'lik bir balonjoje içine 0,2804 g linoleik asit tartıldı. Üzerine, emülsifier olarak 0,2804 g Tween 20 stok çözeltisinden (stok çözeltinin 1 mL si = 0,2804 g olacak şekilde hazırlandı) 1 mL ilave edildi. Üzerine 50 mL 0,2 M pH= 7 tampon çözeltisi yavaş yavaş ilave edilerek, bir magnetik karıştırıcı vasıtasıyla karıştırmak suretiyle emülsifiye edildi (Yen ve Hsieh [88]).

3.5.2.2 Bakır(II) ve Askorbik Asit Çözeltilerinin Hazırlanması

1×10^{-7} , 1×10^{-5} ve 1×10^{-3} M Cu(II) çözeltileri; deney esnasında 0,05 M stok çözeltisinden uygun bir şekilde seyreltilerek hazırlandı. 1×10^{-3} , 1×10^{-5} , 5×10^{-5} ve 1×10^{-4} M AA çözeltileri de stok; $2,5 \times 10^{-3}$ M AA'dan taze olarak hazırlandı.

3.5.2.3 Flavonoid Çözeltilerin Hazırlanması

Kuersetin, kateşin ve morinden alınan tartımlar % 96'lık alkolde çözülerek önce **Stok 1** (5×10^{-3} M) çözeltisi, daha sonra Stok 1'den **Stok 2** (5×10^{-5} M) çözeltisi hazırlandı. **Stok 3** (5×10^{-6} M), **Stok 4** (1×10^{-5} M), **Stok 5** (2×10^{-5} M) çözeltileri de Stok 2'den hazırlandılar.

3.5.2.4 Lipit Peroksidasyonunun İncelenmesinde Şahit ve Örnek Çözeltilerin Hazırlanması

Şahit (LA + Cu(II)-Askorbik Asit Sistemi) Çözeltisi

Bu çözelti şu şekilde hazırlandı: 25 mL (stok 0,02 M) LA + 20 mL (stok 0,2 M) fosfat tamponu (pH: 7) + x mL (stok 0,05 M) Cu(II) + y mL (stok 0,0025 M) AA + [5-(x+y)] mL mutlak etanol; toplam hacim= 50 mL reaksiyon karışımı.

Örnek (LA + Cu (II)- Askorbik Asit Sistemi + Flavonoid Sistemi) Çözeltisi

Bu çözelti şu şekilde hazırlandı: 25 mL (stok 0,02 M) LA + 20 mL (stok 0,2 M) fosfat tamponu (pH: 7) + x mL (stok 0,05 M) Cu(II) + y mL (stok 0,0025 M) AA + z mL (z=1, 1,5 veya 2) (stok 5×10^{-6} M veya 1×10^{-5} M veya 2×10^{-5} M) flavonoid + [5-(x+y+z)] mL mutlak etanol; toplam hacim= 50 mL reaksiyon karışımı.

3.6 İstatistiksel Analiz

Tanımlayıcı istatistiksel analizler, ortalama ve standart sapma hesaplamak için MICROCAL ORIGIN 8.0 (Origin Lab Corp., Northampton, MA, USA) kullanılarak gerçekleştirildi. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma olarak belirtildi. Veriler, windows version 13 için SPSS software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) kullanılarak değerlendirildi (Miller ve Miller [90]).

SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Teorik Düşünceler

4.1.1 Birinci Bölüm ile İlgili Teorik Düşünceler

Askorbik asidin pKa değerleri 4,1 ve 11,79'dur (Weast [91]). Askorbik asidin dissosiyasyon olmamış (H_2A) ve monoanyonik (HA^-) şekilleri pH 4,5'teki çözeltide bulunan başlıca türlerdir. $Cu(NO_3)_2$ katalizör olarak kullanılmıştır, çünkü bakır inorganik anyonlar arasında nitrat ile daha az stabil kompleks verir. Sülfat ve klorür bakır ile daha stabil kompleksler oluşturur, bunların hepsi de nispeten zayıftır.

H_2A 'nın oldukça fazla miktarda oksijen ile (doygunluk hali) bakır katalizli oksidasyonu birinci derece kinetiğini izler (Khan ve Martell [3], [4], Ogata vd. [5]).

Reaksiyon hızı şöyle ifade edilir;

$$-\frac{d[H_2A]}{dt} = k.[H_2A] \quad (450 \text{ nm'deki } Cu(I)\text{-Nc absorbanansı ile orantılıdır}) \quad (4.1)$$

Burada;

$[H_2A]$ = Otooksidasyon sırasında kalan askorbik asit konsantrasyonu (mol.L^{-1})

t = Reaksiyon süresi (dak.)

k = Birinci dereceden hız sabiti (dak^{-1})

dir.

Askorbik asidin Cu(II)-Neokuproin(Nc) reaktifi ile oluşturduğu bis(Nc)-bakır kelatinin, 450 nm dalga boyunda yapılan absorbans ölçümlerinden k, Log(A)'nın zamana (t) karşı çizilen grafiğindeki doğrunun eğiminden $(-k/2,303)$ hesaplanır.

K, Şahbaz ve Somer [7] tarafından tanımlanmış olan, konsantrasyondan bağımsız spesifik hız sabiti ($M^{-1}.dak^{-1}$ biriminde) olup;

$$K = k_d / [Cu(II)] \quad (4.2)$$

bağıntısı ile verilmiştir.

Burada k_d = Khan ve Martell [4], tarafından tanımlanmış olan, metal iyonu varlığında ve yokluğundaki birinci derece hız sabitleri (k) arasındaki farktır.

Askorbik asit oksidasyonunun yüzde inhibisyonu aşağıdaki eşitlikten hesaplandı:

$$(\%) I = [(K_{Cu(tek\ başına)} - K_{(Kompleks)}) / K_{Cu(tek\ başına)}] \times 100 \quad (4.3)$$

Burada $K_{Cu(tek\ başına)}$; flavonoid yokken spesifik hız sabiti, $K_{(Kompleks)}$; Cu-flavonoid kompleksi varlığında spesifik hız sabitidir.

Spesifik inhibisyon yüzdesi (I_s), flavonoidlerin birim konsantrasyonu başına yüzde inhibisyon olarak tanımlanabilir, H_2L' , yani $I_s = 100 I/C_{H_2L'}$ 'dir (İmer vd. [9]). I_s parametresi askorbik asidin geçiş metal iyon katalizli oksidasyonu üzerine seçilmiş bakır ligand asitlerinin çeşitli engelleyici etkilerini anlatmak için daha önce araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (İmer vd. [9], Akbıyık vd. [12], Yıldoğan-Beker vd. [59]).

4.1.2 İkinci Bölüm ile İlgili Teorik Düşünceler

Özilgen [68] ve Watanabe [69] hayvansal besinlerin, başlama, ilerleme ve sonlanma basamaklarını içeren, serbest radikal zincir temelli lipid oksidasyonunu açıklamak için, lojistik eşitlik ile ilişkilendirilmiş genel bir matematik model ileri sürer. Bu model ardışık otokatalitik lipid oksidasyon reaksiyonuna benzetilebilir ve ilgili lojistik diferansiyel eşitlik şu şekilde ifade edilir:

$$\frac{dC}{dt} = kC \left(1 - \frac{1}{C_{max}} \cdot C \right) \quad (4.4)$$

C, otoksidasyon boyunca oluşan oksidasyon ürünlerinin toplam konsantrasyonu (Fe(III)-tiyosiyanat spektrofotometrik denemede kaydedilen A_{500nm} ile orantılı); C_{max} , lipit otoksidasyonun bitiminde C parametresinin ulaşılacağı maksimum değer; k, reaksiyon hız sabiti ve t, oksidasyon (yani inkübasyon) zamanı. t = 0'da C = C_0 ve t = T'de C = C_T sınır koşulları altında eşitliğin integrasyonu (EK-A):

$$\ln \frac{1 - \frac{C_T}{C_{max}}}{1 - \frac{C_0}{C_{max}}} = \ln \frac{1 - \frac{C_0}{C_{max}}}{1 - \frac{C_T}{C_{max}}} - k \cdot t \quad (4.5)$$

verir.

C_0 , oksidasyon ürünlerinin (hidroperoksitlerin) toplam başlangıç konsantrasyonudur. Absorbans, hidroperoksitlerden kaynaklandığından, toplam hidroperoksit konsantrasyonlarıyla orantılıdır. Eşitlik (4.5) integre edilmiş formu tekrardan yazılabilir:

$$\ln \frac{1 - \frac{A_T}{A_{max}}}{1 - \frac{A_0}{A_{max}}} = \ln \frac{1 - \frac{A_0}{A_{max}}}{1 - \frac{A_T}{A_{max}}} - k \cdot t \quad (4.6)$$

Burada A_0 , başlangıç absorbansı; A_T , T zamanında hidroperoksitlerin toplam konsantrasyonuyla orantılı absorbans (yani A_{500nm}) ve A_{max} , A parametresinin LA oksidasyonunun bitiminde ulaşılacağı maksimum değerdir. Inkübasyon zamanının bir fonksiyonu olarak ferrik tiyosianattan kaynaklanan absorbans değişimine ait örnek sigmoidal eğri Şekil 4.20'de gösterildi. Eğer maksimum absorbans 1'e yaklaşırsa ($A_{max} = 1$), Eşitlik (4.6) tekrardan yazılabilir:

$$\ln \left(\frac{1 - A_T}{A_T} \right) = \ln \left(\frac{1 - A_0}{A_0} \right) - k \cdot t \quad (4.7)$$

Eşitlik (4.7) birinci mertebe hız eşitliğidir. k, $\ln ((1-A)/A)$ 'nın inkübasyon zamanına (t) karşı çizilen grafiğinden hesaplanan birinci derece hız sabitidir. Grafik, eğimi (-k) ve kesim noktası $\ln ((1-A_0)/A_0)$ olan düz bir doğru verir.

Lipit peroksidasyonun yüzde inhibisyonu aşağıdaki eşitlikten hesaplandı:

$$\text{Yüzde İnhibisyon} = \left[\frac{(k_0 - k_1)}{k_0} \right] \times 100 \quad (4.8)$$

Burada k_0 , kontrol reaksiyonun birinci derece hız sabiti (yani bakır(II), askorbik asit veya flavonoid yokluğunda); k_1 , örnek varlığında hız sabitidir (yani bakır(II), askorbik asit veya flavonoid varlığında).

Spesifik inhibisyon yüzdesi (I_s), flavonoidin birim konsantrasyonu başına yüzde inhibisyon olarak tanımlanabilir, H_2L' , yani $I_s = 100 I/C_{H_2L}$ (İmer vd. [9]). I_s parametresi, askorbik asidin geçiş metal iyon katalizli oksidasyonu üzerine seçilmiş bakır ligand asitlerinin çeşitli engelleyici etkilerini anlatmak için, daha önce araştırmacılar tarafından kullanılmıştır (İmer vd. [9], Akbıyık [12], Yıldıoğan-Beker vd. [59]).

4.2 Kinetik Bulgular ve Hız Sabitleri

4.2.1 Birinci Bölüm İle İlgili Kinetik Bulgular ve Hız Sabitleri

Asetat tamponlu çözeltide katalizsiz ve bakır-flavonoid kelat katalizli AA oksidasyonu için, (4.1) eşitliğine dayanılarak Log absorbans-zaman grafiğindeki doğrunun eğimi -k hız sabitini vermektedir (Şekil 4.1). Sabit konsantrasyonda (1×10^{-4} veya 2×10^{-4} M) benzer yapıdaki (kuersetin, morin ve kateşin) farklı flavonoidlerin tek başına ve ikili ve üçlü karışımları ve farklı bakır Cu(II) konsantrasyonları ($1,57, 3,14, 4,71$ ve $6,28$) $\times 10^{-7}$ M kullanılarak Cu(II)-flavonoid-askorbik asit sistemleri için doğrular Şekil 4.2-4.10'da çizildi ve hesaplanan k hız sabitleri de Çizelge 4.8'de verildi. AA'nın otoksidasyon hız sabiti, sabit flavonoid konsantrasyonunda, Cu(II) konsantrasyonunun artmasıyla arttı. (4.2) eşitliği kullanılarak Cu(II) konsantrasyondan bağımsız spesifik hız sabitlerini (K) hesaplayabilmek için, $k_d - [Cu(II)]$ grafikleri çizilerek, regresyon doğrularının eğimleri bulundu (Şekil 4.11-4.18, Çizelge 4.8). Şekil 4.19'da flavonoidsiz ve 1×10^{-4} M flavonoid çözeltilerinin askorbik asidin bakır(II) katalizli oksidasyonuna inhibisyon etkileri topluca görülmektedir. AA'nın Cu(II) iyon katalizli oksidasyonu için K spesifik hız sabitleri asetat tamponlu kuersetin, morin ve kateşin çözeltilerde, sadece asetat tamponlu çözeltilerdekinden daha düşük bulunmuştur. Genel olarak bütün flavonoidler için, flavonoid konsantrasyonunun artmasıyla K değerleri azaldı. Sonuç olarak, AA'nın

katalitik otooksidasyonunun kararlı Cu-flavonoid kompleksleri tarafından inhibe edildiği gösterilmiştir.

Khan ve Martell [4], askorbik asidin (H_2A) Cu(II) kelat (ML^{n+})-katalizli oksidasyonu için aşağıdaki mekanizmayı önermiştir:



ML^{n+} katalizör, $ML^{(n-1)+}$ 'nin çözünmüş O_2 ile oksidasyonu ile, tekrar üretilebilir (H_2A , askorbik asit ve A , 2-e ile oksitlenmiş ürün, yani dehidroaskorbik asit). Bu çok basamaklı prosesinde yavaş (hız belirleyici) basamak, monohidrojen askorbat (HA^-) ve Cu(II)-kelattan, $MHLA^{(n-1)+}$, üçlü geçiş kompleksinin oluşumunun gerçekleştiği basamaktır. Eğer ikili M-L kelat çok kararlıysa, üçlü geçiş kompleks oluşmayabilir. Geçiş komplekslerindeki zayıf bağlar, elektron transferi boyunca bu kompleksin kolay deformasyonuna neden olabilir. Khan ve Martell [4], bakır kelatlar varlığında AA'nın otooksidasyon hızının, metal komplekslerinin kararlılığının artmasıyla azaldığını ifade etmiş ve kelatın katalitik aktivitesi ile kompleksin logaritmik kararlılık sabitinin fonksiyonu arasında lineer bir ilişki bulmuştur.

Fenolik asitler, yeterince iyonize olduğu pH değerlerinde, bakır için iki dişli ligand olarak görev yaptığı için; 1:1 (ML) kompleksleri ile birlikte 1:2 metal (M)-ligand (L) kompleksleri (ML_2) oluşabilir ve bu yüzden bağıntıda birinci toplu kararlılık sabitini ($\log \beta_1$) düşünmek daha uygun olacaktır. Bu düşüncüyü kısaltan teorik analiz aşağıda verilmiştir:

1:1 kompleksler için,



$$\beta_1 = [\text{ML}] / ([\text{M}] [\text{L}]) \quad (4.15)$$

1:2 kompleksler için



$$\beta_2 = [\text{ML}_2] / ([\text{M}] [\text{L}]^2) \quad (4.17)$$

$$[\text{L}] = \text{C}_{\text{HL}} \alpha_{\text{L}} \quad (\text{C}_{\text{HL}}: \text{toplam fenolik asit kons. ; } \alpha_{\text{L}}: \text{L'nin relatif bolluğu}) \quad (4.18)$$

$$\text{Monoprotik polifenoller için (HL), } \alpha_{\text{L}} = K_{\text{a1}} / ([\text{H}^+] + K_{\text{a1}}) \quad (4.19)$$

$$\text{Diprotik fenolik asitler için (H}_2\text{L), } \alpha_{\text{L}} = K_{\text{a1}}K_{\text{a2}} / ([\text{H}^+]^2 + K_{\text{a1}} [\text{H}^+] + K_{\text{a1}}K_{\text{a2}}) \quad (4.20)$$

Böylece,

$$\beta_1 = [\text{ML}] / ([\text{M}] \text{C}_{\text{HL}} \alpha_{\text{L}}) \text{ ve } \beta_1' = \beta_1 \alpha_{\text{L}} \quad (4.21)$$

$$\beta_2 = [\text{ML}_2] / ([\text{M}] \text{C}_{\text{H}_2\text{L}}^2 \alpha_{\text{L}}^2) \text{ ve } \beta_2' = \beta_2 \alpha_{\text{L}}^2 \quad (4.22)$$

β_1' ve β_2' , çalışma pH'si 4,5 için, hesaplanan ML ve ML_2 komplekslerinin koşullu birinci ve ikinci toplu kararlılık sabitleridir (Test edilen flavonoidlerin pH 4,5'da Cu(II) ile iki dişli kompleks vermek için normalde iki asitlik sabiti göstereceği beklenir). Test edilen flavonoidler ile askorbik asidin bakır(II)-katalizli otoksidasyonunda (4.3) eşitliği kullanılarak yüzde inhibisyon ve spesifik inhibisyon (I_s) hesaplandı. Hesaplamaya örnek olarak; Çizelge 4.8'den Kuersetin için; $K_{\text{Cu(tek başına)}} = 11,0 \times 10^4$ ve $K_{\text{(QR Kompleks)}} = 3,56 \times 10^4$ alınarak, (%) $I = 67,6$ ve $1,0 \times 10^{-4}$ M Kuersetin için, $I_s = 6,76 \times 10^5$ verilebilir. Toplu sonuçlar Çizelge 4.9'da ve toplu hesaplamalar EK-B'de verilmiştir.

İstatistiksel analiz (% 95 düzeyinde t-test (Miller ve Miller [90])) Log β_1' ile log I_s arasında (4.23 eşitliği) ve Log β_1' ile I_s arasında da (4.24) eşitliği ile verilen bir ilişki olduğunu doğrulamıştır.

$$\text{Log } \beta_1' = 10,2 \log I_s - 58,1 ; r = 0,936 \quad (4.23)$$

$$\text{Log } \beta_1' = 9 \times 10^{-6} I_s - 4,55 ; r = 0,948 \quad (4.24)$$

4.2.2 İkinci Bölüm ile İlgili Kinetik Bulgular ve Hız Sabitleri

Bu bölümde flavonoidlerin, Cu(II)-askorbat sistemle indüklenmiş linoleik asit peroksidasyonuna etkileri incelenmiş ve aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir:

4.2.2.1 [LA / Cu(II)] ve [Cu (II) /Askorbik Asit] Oranı

LA peroksidasyonunda reaksiyon hız sabitleri, Şekil 4.20 ve 4.21’de görüldüğü gibi, sigmoidal eğrilerden Eşitlik (4.7) kullanılarak hesaplandı ve lipid oksidasyonun yüzde inhibisyonu Eşitlik (4.8) yardımıyla hesaplandı. Farklı [LA/Cu(II)] molar oranları denendi (Çizelge 4.16) ve en kuvvetli prooksidan etki gösterdiğinden dolayı çalışmalarda 1×10^{-3} M Cu(II) konsantrasyonu seçildi (yani [LA]: 1×10^{-2} M ve [Cu(II)]: 1×10^{-3} M ile LA/Cu(II) molar oranı=10). Diğer araştırmacılar flavonoidlerin antioksidan etkilerini değerlendirmek için, genellikle AA’yı geçiş metal iyonlarının 5-20 kat fazlası olarak kullandığı için (Bondet vd. [92]), farklı Cu(II)/AA molar oranları denendi (Çizelge 4.16) ve en kuvvetli prooksidan etkisinden dolayı Cu (II) /askorbik asit molar oranı 20 olarak seçildi (yani [Cu(II)]: 1×10^{-3} M ve [AA]: 5×10^{-5} M). İlk 2 saatte hidroperoksitlerin oluşum hızı bozulma hızından daha yüksekti (Bondet vd. [92]).

4.2.2.2 Linoleik Asit Tek Başına ve (Linoleik Asit + Bakır(II)) Emülsiyonlarında Peroksidasyon Çalışmaları

Tek başına 1×10^{-2} M LA’nın ve 1×10^{-2} M LA’nın farklı Cu(II) konsantrasyonları ile birlikte oksidasyon çalışmaları için, reaksiyon hız sabitleri Şekil 4.22’de görülen sigmoidal eğrilerden Eşitlik (4.7) yardımı ile hesaplandı ve Çizelge 4.16’da verildi. 1×10^{-7} – 1×10^{-5} M Cu(II) ile bulunan sonuçlara göre, LA oksidasyon hızı azaldı (olası antioksidan etki) ve 10^{-3} M Cu(II) ile LA oksidasyon hızı arttı (prooksidan etki). Bu da, ileriki çalışmalar için potansiyel prooksidan etkilerin 1×10^{-3} M Cu(II), yani ([LA]/[Cu(II)]) =10 molar oran ile en iyi incelenebileceğini göstermiştir.

Bakır indüklü lipoprotein peroksidasyon kinetiğinin, bakırın lipoproteine bağlanma molar oranı ile kontrol edildiği ve bakır konsantrasyonunun belirli bir düzeyin üzerine çıkmasının peroksidasyonu arttırdığı; fakat bakır düzeyinin daha da arttırılmasının, lipoprotein yüzeyinde bakır bağlanma sitlerinin doyurulmuş olduğu zaman, beklenildiği

gibi (Pinchuk vd. [93]) peroksidasyona etki etmediği bildirilmiştir. Bizim sonuçlarımıza göre, sabit bir linoleik asit konsantrasyonunda bakır(II) konsantrasyonunun azalması, belirgin bir peroksidasyon inhibisyonuna neden oldu. Bakır(II), diğer geçiş metal iyonları yanında, lipoprotein-su arayüzeyinde serbest radikallerin oluşumu ile lipid oksidasyonunu başlatır. Bu yüzden oksidasyon öncesi lag faz ve peroksidasyonun maksimum hızı, bağlı bakır/lipoprotein oranına bağlıdır (Pinchuk ve Lichtenberg [67]). Bu parametreler, hem çözeltide bulunan diğer bakır bağlı ajanların bulunmasına ve bu ajanların konsantrasyonuna, hem de kompleksleşen bakırın redoks aktivitesine bağlıdır. Örneğin, bakır-indüklü LDL oksidasyonuna albuminin etkisinin araştırılmasında, bakır-indüklü peroksidasyonda gözlenen çoğu etkinin Cu bağından kaynaklandığı bildirilmiştir, çünkü Cu-albumin kompleksinin redoks aktivitesi (olası prooksidan etki) Cu(II) iyonları tek başınayken olan redoks aktivitesinden çok daha düşüktür.

4.2.2.3 {Linoleik Asit+ Askorbik Asit + Bakır(II)} Emülsiyonlarında Peroksidasyon Çalışmaları

C vitaminin (AA) in vitro olarak yapılan çalışmalarda, geçiş metal iyonları varlığında prooksidan olarak görev yaptığı (Imer vd. [9]) ve Cu(II) iyonlarının AA veya diğer redükleyici ajanlarla kombinasyonunun, proteinlerin metal katalizli oksidasyon çalışmalarında kullanıldığı iyi bilinir. LDL'nin Cu(II) indüklü oksidatif modifikasyonuna karşı, AA'nın beklenen prooksidan etkisinin tersine antioksidatif etkisi gözlemlenmiştir (Retsky vd. [94]).

Farklı Cu(II) konsantrasyonları içeren (1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M AA) emülsiyonlarının oksidasyon çalışmaları için, reaksiyon hız sabitleri Şekil 4.23'de görülen sigmoidal eğrilerden Eşitlik (4.7) yardımı ile hesaplandı ve Çizelge 4.16'da verildi. Düşük Cu(II) konsantrasyonları (örneğin, 1×10^{-7} M) daha yüksek Cu(II) konsantrasyonlarından (1×10^{-5} M) daha kuvvetli prooksidan etki gösterirken; 1×10^{-3} M Cu(II) prooksidan etki göstermedi (Şekil 4.23). Aslında, bakır indüklü peroksidasyona Cu(II) konsantrasyonunun bağlılığı beklenenden daha karışıktır ve yüksek bakır konsantrasyonlarında (mesela, 1×10^{-3} M Cu(II) ve $[\text{Cu(II)}]/[\text{AA}]$ oran=1) (Şekil 4.23 ve Çizelge 4.16) lipid peroksidasyonun yeterince arttırılmaması, bir limit konsantrasyon

üstünde lipoprotein yüzeyindeki bakır bağlanma sitelerinin doyurulduğu için peroksidasyonun artmadığını düşündürür (Pinchuk ve Lichtenberg [67]). Bakır-AA molar oranı 1 olduğunda oksidasyonun yeterince artmaması, pH 7’de Cu(II) ile askorbat arasındaki oluşan 1:1 zayıf kompleksleşmeden dolayıdır. 1×10^{-2} M LA ve 1×10^{-3} M Cu(II) konsantrasyonunda (yani, $[LA]/[Cu(II)] = 10$) ve 1×10^{-4} ve 1×10^{-5} M aralığında çalışılan AA konsantrasyonlarında prooksidan etki gösterdi, en kuvvetli etki 5×10^{-5} M AA’da gözlemlendi (Çizelge 4.16). Bu yüzden 5×10^{-5} M AA, 1×10^{-3} M Cu(II) varlığında flavonoidlerin etkisini incelemek için kullanıldı.

AA’nın prooksidan etkisi, Eşitlik (4.25)’de örneklediği gibi Fenton tipi reaksiyon yoluyla hidroksil radikaller gibi reaktif türleri üreterek, AA’nın Cu(II) redüklemeye yeteneğine bağlanabilir:



Benzer şekilde, 37 °C’de pH 7 tamponlu sulu dispersiyonda linoleatın oksidasyonunda, askorbik asit ve bakırın her ikisinin de kuvvetli prooksidan olarak davrandığı bildirilmiştir ve katalitik aktivitedeki minimum konsantrasyon bakır(II) için 1×10^{-7} M ve askorbik asit için 1×10^{-6} M olarak bulunmuştur (Haase ve Dunkley [50]). 1×10^{-3} M AA maksimum katalitik aktiviteye sahip idi ve düşük AA konsantrasyonunda, linoleat oksidasyonu meydana geldikten sonra, reaksiyon otokatalitik idi (Haase ve Dunkley [50]).

4.2.2.4 {Linoleik Asit + Askorbik Asit + Bakır(II)+ Flavonoid} Emülsiyonlarında Peroksidasyon Çalışmaları

Önceki denemelerde saptadığımız, reaktanların en kuvvetli prooksidan etkilerinin bulunduğu, kombinasyon (1×10^{-2} M LA, 1×10^{-3} M Cu(II) ve 5×10^{-5} M AA) seçilen flavonoidler varlığında ve yokluğunda, LA peroksidasyonuna flavonoidlerin olası inhibe edici veya artıcı etkisini gözlemlemek için kullanıldı.

Kuersetin (QR) LA oksidasyonda çoğunlukla antioksidandı; $(2 - 8) \times 10^{-7}$ M konsantrasyon aralığında peroksidasyon inhibisyonu gösterirken, çalışılan en yüksek konsantrasyon olan 10×10^{-7} M’da koruyucu değildi (prooksidan) (Şekil 4.25 ve Çizelge 4.17). Morin $(1 - 8) \times 10^{-7}$ M olan bütün çalışma konsantrasyonlarında antioksidan etki

gösterdi (Şekil 4.26 ve Çizelge 4.17). Daha önceki çalışmalarda, linoleik asit otoksidasyonuna karşı morinin en inhibitör bileşik olduğu bildirilmiştir (Torel vd. [53]). Kateşin, prooksidan olarak davrandığı 4×10^{-7} M haricinde çalışılan konsantrasyon aralığında esasen antioksidan etki gösterdi (Şekil 4.27 ve Çizelge 4.17).

Cu başlatıcılı prooksidan aktivitenin hemen hemen bütün flavonoid konsantrasyonuyla arttığını söyleyen Cao'nun çalışmasında [64], H_2O_2 'siz bakır(II)+flavonoid kombinasyonları antioksidandan daha ziyade prooksidan olarak rol almıştır. Bu durum flavonoidler düşük konsantrasyonlarda Cu(II) kelatörler ve serbest radikal sönmüleyiciler olarak görev yaparken (antioksidan etki), daha yüksek konsantrasyonlarda Cu(II)'ye karşı Cu(I) üretilip redükleyici ajan olarak davranarak reaktif türlerde artış verip lipid peroksidasyonunu artırır (prooksidan etki) şeklinde açıklanabilir. Sugihara vd. [95], bir demir indüklü lipid peroksidasyon sistemde [hepatoksit (mikrobu kültürü) ile] çeşitli flavonoid bileşiklerin antioksidan ve prooksidan aktivitelerinin konsantrasyona bağlılığını gösterdi. Bununla birlikte aynı koşullarda, onlar kateşinin tüm konsantrasyonlarda antioksidan olduğunu buldular ve antioksidan davranışı demir kelatlaşmaya atfettiler (Sugihara vd. [96]). Flavonollerin lipid oksidasyonuna baskıcı etkileri, morin dışında, bir flavonoid-konsantrasyon bağımlılığı durumunda, arttı ve metal iyon konsantrasyonunun artmasıyla azaldı (Sugihara vd. [96]). Flavonoidlerin konsantrasyon ile hem antioksidan hem de prooksidan aktivite ilişkisi oldukça karışıktır ve kuvvetli şekilde, reaktif türlerin üretiminde kullanılan, geçiş metal iyonu ile, etkilenir.

Khan ve Martell [3], [4] bakır kelatlar varlığında ve yokluğunda, metal komplekslerin stabilitesinin artmasıyla AA'nın otoksidasyon hızının azalacağını ileri sürdü. Bakır (10 mM) ile ekimolar olan kuersetin ve kateşinin bakıra bağlı LDL'yi sırasıyla % 56 ve % 20 azalttığı bildirilmiştir (Roland vd. [97]). Böylece, test edilen flavonoidlerin antioksidan aktivite sırasının, bakır-kelatasyon yeteneğiyle ilişkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Flavonoidlerin pH 7'de bakır iyonları ile ardışık olarak tek dişli ve iki dişli kompleks oluşturmak için, kümülatif kararlılık sabitleri β_1 ve β_2 ile ardışık iki asitlik sabiti vereceği beklenir Eşitlik (4.15), (4.17).

β_1 've β_2 ', çalışma pH değeri 7,0'da hesaplanan ML ve ML₂ komplekslerinin koşullu birinci ve ikinci toplu kararlılık sabitleridir Eşitlik (4.21), (4.22). Test edilen flavonoidler ile LA peroksidasyonunun ortalama yüzde inhibisyonu, (4.8) Eşitliğinden hesaplanırken, spesifik inhibisyonlar (I_s) da Çizelge 4.18'de verildi. Flavonoidlerin LA peroksidasyonunu korumasındaki sırası: morin > kateşin $\geq$ kuersetin olarak saptandı. İstatistiksel analiz (% 95 düzeyinde t-test (Miller ve Miller [90])) Log β_2 ile Log I_s arasında bir ilişki bulunduğunu doğruladı (Eşitlik (4.26)). Toplu hesaplamalar için bakınız (EK-B).

$$\text{Log } \beta_2' = 19,2 \log I_s - 147,6 \quad \{r^2 = 0,828\} \quad (4.26)$$

Başka bir deyişle, pH 7'de (yani bu çalışmanın pH'ı) bir flavonoidin Cu(II) ile oluşturduğu güçlü iki dişli kelat, Cu(II)'nin redoks aktivitesini daha kuvvetli inhibe eder, böylece reaktif türlerin oluşumundan ve bunu izleyen LA peroksidasyonundan koruyabilir. Bununla birlikte Cu başlatıcılı peroksidasyondaki antioksidan potansiyeli etkilemede sorumlu parametre, sadece flavonoidlerin kelat oluşum yeteneğidir.

Cu(II)-askorbat ile indüklenmiş LA peroksidasyonunu korumada flavonoidlerin ortalama spesifik inhibisyonları şu sırayı izledi: morin > kateşin > kuersetin (Çizelge 4.18). Bu sıralama, pH 7'de formal redüksiyon potansiyellerine karşı NHE ile ilişkilendirildi, yani MR, CT ve QR için sırasıyla 0,60, 0,57 ve 0,33 V (Jovanovic ve Simic [98]). Düşük redoks potansiyellerinden (0,23 V < $E_{pH=7}$ < 0,75 V) dolayı flavonoidler termodinamik olarak 2,13 - 1,0 V aralıktaki redoks potansiyelleri ile oksitlenen serbest radikalleri indirgeyebilir (Pietta [17]). Diğer fizikokimyasal faktörleri ihmal ederek, antioksidan olarak davranan flavonoidlerin (FI-OH) bütün yeteneği FI-O[•]/FI-OH redoks çiftinin redoks potansiyeline bağlıdır. Burada FI-O[•] bir ariloksil radikalini ifade eder (Yıldığan-Beker vd. [59]). Fenolik bileşiklerin prooksidan aktivitesi, geçiş metal iyon redüksiyonu veya yüksek konsantrasyonlarda radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilen fenoksil radikal oluşumundan kaynaklanmıştır (Shahidi ve Zhong [99]). İncelemelere göre, aynı sayıda -OH bağlı flavonoidler için, flavonların flavanonlardan daha yüksek Cu(II) başlatıcılı prooksidan aktivite gösterildiği bildirilmiştir (Cao vd. [64]), bu çalışmada QR, LA peroksidasyonunu CT'den daha az korurken, her iki bileşik, az sıklıkta, konsantrasyonlarına bağlı olarak prooksidan aktivite göstermiştir.

4.3 Cu(II) Katalizli Oksidasyona Karşı Askorbik Asidin Flavonoidler Tarafından Korunması

Askorbik asidin Cu(II) katalizli oksidasyonu, flavonoid varlığında ve yokluğunda çalışılmış ve spesifik hız sabitleri (K), Şekil 4.19'daki eğrilerinden regresyon analizi yardımı ile hesaplanmıştır (İmer vd. [9], Miller ve Miller [90]). Test edilen flavonoidlerin varlığında AA'nın Cu(II) katalizli oksidasyonu için bulunan spesifik hız sabiti, K, değerleri, flavonoid yokkenki K değerinden daha düşük bulunmuştur (Flavonoidlerin antioksidan etkisi). Genellikle bütün flavonoidler için, flavonoid konsantrasyonunun artmasıyla K değeri önemli miktarda azalmıştır. pH 4,5 asetat tamponda çalışılan flavonoidler için K değerlerinin sıralaması: tek bileşenler için; kuersetin (QR) < morin (MR) < kateşin (CT) ve karışımlar için; (QR+CT) < (MR+CT) < (QR+MR) < (QR+MR+CT) şeklindedir.

Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi sadece otoksidasyon katalizörlerinin, yani Cu(II)-flavonoid kelatın, relatif kararlılığına bağlı değildir; ayrıca flavonoidin yapısal özelliklerine de bağlıdır. Yüksek antioksidan aktivite için, kateşin B halkasında metal kelatlaştırıcı *o*-katekol fonksiyonel grubunu taşır; fakat konjugasyon için gerekli olan 2,3 çifte bağı eksiktir. Kateşin tek başınayken görülen daha düşük koruma, kateşindeki 2,3 çifte bağının (normalde flavonollerde 4-okso fonksiyonu ile konjugasyon) eksikliğinin elektron delokalizasyonu boyunca elektron transfer ve ROS sönmleme yeteneğinin artmasına neden olmasından kaynaklanabilir (Apak vd. [100]). Kuersetinin olağanüstü antioksidan yeteneği ve AA koruması (kateşinle kıyaslandığında), kararlı ariloksil radikalinin oluşumundan kaynaklanır. Bu, kateşinde A ve B halkaları birbirine dikey iken (Fukuhara vd. [101]), bütün molekül boyunca radikali delokalize eden C₂-C₃ çifte bağ ve düzlemsel geometri vermesinden kaynaklanır (Rice-Evans vd. [24]). Flavonoidin 1-e oksidasyonundan üretilen ariloksil radikali konjugasyon ile stabilize edildiğinde flavonoidin redoks potansiyeli düşer, radikal sönmleme ve antioksidan aktivite artar. Flavanonol ve flavanonlar, konjugasyonun eksikliğinden dolayı zayıf antioksidanlardır (Pietta [17]). Kuersetinin, ABTS yöntemiyle bulunan, troloks ekivalent antioksidan kapasitesi (TEAC) (4,7), kateşinin (2,4) hemen hemen iki katıdır. Bu da, 4 pozisyonunda 2-3 doymamışlığın ve bir karbonil varlığının önemini anlatır (Heim vd. [102]). Benzer durumda morinin B halkasında geçiş metal iyon kelatlaşmasından sorumlu *o*-katekol fonksiyonel grubu yoktur ve bu sebepten morin kuersetinden daha az koruma gösterir. Kuersetin, kateşin ve morinden farklı olarak yüksek antioksidan

aktivite için gerekli olan üç şartı sağlar: 3- ve 5-OH substitüentlerinin 4-keto grubu ile metal kelatlaşması, 2,3 çift bağının 4-karbonil ile konjugasyonu ve B halkasında 3',4'-dihidroksifenol (*o*-katekol) substitüsyonu. Kuersetin esasen Cu(II) ile 1:1 kelat oluşturur ve oluşan kompleks serbest flavonolden daha yüksek radikal sönmüleme aktivite gösterir. Bu değerlendirme DPPH ve siklik voltametri yöntemleriyle yapılmıştır (Pekal vd. [28]). Test edilen flavonoidlerin NHE (pH 7,4 fosfat tamponunda $I=0,16$ iyonik kuvvette) karşı redoks potansiyelleri kuersetin (0,29 V) < morin (0,34 V) < kateşin (0,36 V) sırasını izlerken (Jorgansen vd. [103]); kateşinin $E_{pH=7'}$ 'de çok daha yüksek potansiyel gösterdiği başka kaynaklarca bildirilmiştir (Pietta [17]). Kilmartin vd. [104] 0,5 mM antioksidanın birinci anodik pikinin potansiyelini ($E_{p,a}$) camı karbon elektrotta pH 3,6 için tartarik asidin etanol-sulu çözeltisinde ölçtüler ve kuersetin (0,376) < morin (0,419) < kateşin (0,455) sıralamasını elde ettiler. Bu çalışmada görüldüğü gibi, askorbik asidin bakır(II) katalizli otoksidasyonuna test edilen flavonoidlerin inhibisyon etkisi, redoks potansiyellerine uygun olarak kuersetin > morin > kateşin şeklindedir. Böylece tek tek flavonoidlerin AA oksidasyonunu korumasındaki sıralaması, yapı-antioksidan aktivite ilişkisiyle açıklanabilir.

4.4 Olası Flavonoid Biyoyararlanım ve Sonuçların Besin Teknolojisine Yansımaları

Besin kaynaklarındaki flavonoidler, antioksidan etkiyi arttıracak şekilde mide ve bağırsaklarda absorbe edilir. Absorpsiyon yüzdesi normalde yenilen dozun yüzde birkaçını geçmez. Bu değer, bozulmamış flavonoidler ve flavonoid konjugelerinin kan seviyesindeki değerinin ölçülmesiyle saptanır (Pietta [17]). Birçok kompleks yan reaksiyonlar, tüketilen flavonoidlerin biyoyararlanımından etkilenir. Bu reaksiyonlar bakteriyel enzim katalizli hidroliz, heterosiklik O içeren halkanın ayrılması, dehidroksilasyon ve dekarboksilasyon gibi olayları içerir. Çay kateşinlerinde olduğu gibi, uzun süre yeşil çay tüketilmesi yeşil çay bileşiklerini ve metabolitlerini ölçmek için gerekli olan plazma konsantrasyonunu sağlar. Hatta yeşil çay kateşinleri, plazma askorbat ve toplam glutatyon seviyelerinde geçici bir azalmaya neden olabilir. Çünkü 0,282 V askorbat^{•-}, H^+ /askorbat⁻ çiftinden daha yüksek bir potansiyele sahip kateşinden üretilen ariloksil radikalleri, glutatyondan türeyen askorbatı oksitleyebilir (Pietta vd. [105]).

Askorbik asidin oksijen, ısı, ışık ve geçiş metal iyonlarına duyarlılık göstermesi, C vitamininin besin ve farmasötik formülasyonlarını stabil kılmada problem oluşturur. AA korunmasında, kuru besin ürünleri ile oksijen absorpsiyonuna ilaveten (Waterman ve Roy [106]) sinerjistik antioksidan olarak amla (*embelia officinalis*) meyve ekstraktı kullanılır. Bu meyve ekstraktı ilaç, besin ve kozmetik sanayiinde, zeolit veya reaktif oksijen türlerinin sönmüleyicisi olan maddelerle geçiş metal iyon kompleksleri oluşturur (Ghosal [107]).

C vitamini korunmasının benzer sonuçları ile antioksidan stabilizasyonu için AA, sitrik asidin etkisiz olduğu nötral fosfat tamponda yeşil çay kateşinlerini korumasında olduğu gibi, (Chen vd. [108]) diğer besin ürünlerine ilave edilmiştir. Flavonoidler, gıda ve ilaçlara uygun bileşikler olduğu ve ticari ürünlerde C vitamininin stabilitesini arttırmak için kullanılabildiği için, polifenollerce bu zengin desteklerin kullanımını artırır (Cermak ve Wolfram [70]). Bu çalışmanın sonuçlarından, AA'nın bioflavonoid içerikli besin katkılı formülasyonlarının çok stabil olabileceğini ve bu yüzden sağlığa, saf C vitamininden daha fazla, yararlı olabileceği sonucunu çıkarabiliriz.

4.5 Lipit Peroksidasyonunun Flavonoidler Tarafından Engellenmesi

Bakır(II)-askorbik asit sistemi ile indüklenmiş lipit peroksidasyonu, hidroperoksit konsantrasyonuna bağlı olarak birinci derece reaksiyon kinetiği izledi. Potansiyel antioksidan koruyucu olan aynı sayıda –OH grubuna sahip benzer yapıdaki farklı flavonoidlerin (kuersetin, morin ve kateşin) etkileri, seçilen peroksidasyon sistemde incelendi. Flavonoidlerin LA peroksidasyonunu korumasında önleyici sırası: morin > kateşin ≥ kuersetin olarak saptandı, yani kateşin ve kuersetin konsantrasyonlarına bağlı olarak antioksidan ve prooksidan etki gösterirken; morin bütün konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterdi. Bir antioksidan bileşik ile sağlanan lipit peroksidasyonunun onun yokluğuna göre relatif hız yükselme değişikliği (yani hız sabiti artması) bu çalışmada, prooksidan aktivitenin hesaplanabilir bir ölçümünü tanıtmaktadır. Test edilen flavonoidlerin genel antioksidan davranışları, pH 7'de flavonoidlerin koşullu bakır kelatlama kabiliyetine göredir. Kuersetinin olağanüstü antioksidan yeteneği, kararlı ariloksil radikalinin oluşumundan kaynaklanır. Bu, kateşinde A ve B halkaları birbirine dikey iken (Fukuhara vd. [101]), bütün molekül boyunca radikali delokalize

eden C₂-C₃ çifte bağ ve düzlemsel geometri vermesinden kaynaklanır (Rice-Evans vd. [24]). Flavonoidin 1-e oksidasyonundan üretilen ariloksil radikali konjugasyon ile stabilize edildiğinde, flavonoidin redoks potansiyeli düşer (mesela test edilen flavonoidler arasında QR en düşük), radikal sönümlene ve antioksidan aktivite artar. Flavanonol ve flavanonlar, konjugasyonun eksikliğinden dolayı zayıf antioksidanlardır (Pietta [17]). Bununla birlikte, flavonoidlerde antioksidan aktivite için olması gereken yapı, şaşırtıcı olarak, Cu(II) indüklü prooksidan aktivite için de gereklidir ve böylece kateşin gibi kuersetin de bu çalışmada LA oksidasyonuna karşı konsantrasyona bağlı olarak antioksidan ve prooksidan (daha çok antioksidan) olarak davrandı. Flavonoidlerin antioksidan aktivitesi birçok çalışma konusu olmasına rağmen, prooksidan etkisinin dikkate alındığı çok az literatür çalışması bulunmaktadır. Bu nedenle bu çalışmanın bulgularının, heterojen gıda örneklerinin korunmasında prooksidan olarak hareket edebilen flavonoidlerin bulunduğu gerçek şartların daha iyi anlaşılmasında yardımcı olacağına inanılmaktadır. Besinlerin gelişmiş kalite ile dizaynı bu sistemlerde lipit oksidasyonunun fizikokimyasal mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına bağlıdır (Coupland ve McClements [109]). Bu bakımdan flavonoidlerin prooksidan davranışlarını indükleyebilen eser geçiş metal iyonlarını (tıpkı sitrik asidin besinlerdeki eser elementlerle oluşturduğu doğal kelatasyon gibi) ortamdan uzaklaştırmak gerekir (lipit oksidasyonunu hızlandıran Fenton tipi reaksiyonlara sebep olmayacak şekilde). Tüm geçiş metal iyonları için geniş bir konsantrasyon aralığında antioksidatif kalan flavonoidlerce zengin besinler, uzun bir raf ömrü gerekli ise tercih edilmelidir. Diğer taraftan; konsantrasyona ve diğer faktörlere bağlı olarak hem antioksidan hem de prooksidan olabilen flavonoidleri içeren besinler, uzun raf ömürlü olamaz ve daha ziyade taze tüketilmelidir.

Çizelge 4. 1 Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve kuersetin varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi

[QR] (M)	[Cu(II)] (M)	t _{zaman} (dak.)	Abs	Log Abs	k (dak ⁻¹)	r ²
1x10 ⁻⁴	1,57x10 ⁻⁷	2	0,50425	-0,29735	7,60x10 ⁻³	0,968
		12,5	0,49194	-0,30809		
		20	0,46411	-0,33338		
		31,5	0,40141	-0,39641		
		41,5	0,38122	-0,41882		
		50	0,37313	-0,42814		
	3,14x10 ⁻⁷	60,5	0,32409	-0,48933	9,44x10 ⁻³	0,891
		2	0,49057	-0,30930		
		8	0,48875	-0,31091		
		13	0,48287	-0,31617		
		18	0,41598	-0,38093		
		25	0,36494	-0,43778		
		30	0,38304	-0,41676		
		35	0,38204	-0,41789		
	4,71x10 ⁻⁷	40	0,35038	-0,45546	15,0x10 ⁻³	0,888
		45	0,33843	-0,47053		
		2	0,49057	-0,30930		
		8	0,48875	-0,31091		
		13	0,48287	-0,31617		
	6,28x10 ⁻⁷	18	0,41598	-0,38093	24,4x10 ⁻³	0,982
		25	0,36494	-0,43778		
		30	0,38304	-0,41676		
		2,5	0,36366	-0,43930		
		7,5	0,28716	-0,54188		
		13	0,26860	-0,57089		
		18	0,22906	-0,64005		
		23	0,19239	-0,71582		
2x10 ⁻⁴	1,57x10 ⁻⁷	28	0,18390	-0,73542	4,84x10 ⁻³	0,907
		34	0,15385	-0,81290		
		45	0,12656	-0,89770		
		9	0,50245	-0,29891		
		20	0,45436	-0,34260		
	3,14x10 ⁻⁷	25	0,45513	-0,34186	7,60x10 ⁻³	0,925
		35	0,44270	-0,35389		
		48	0,40368	-0,39396		
		2	0,52640	-0,27868		
		8	0,50861	-0,29362		
		14	0,49225	-0,30781		
		20	0,49663	-0,30397		
		25	0,43384	-0,36267		
	4,71x10 ⁻⁷	30	0,41649	-0,3804	8,75x10 ⁻³	0,925
		35	0,41939	-0,37738		
		45	0,38511	-0,41442		
		2	0,51188	-0,29083		
		5	0,49747	-0,30323		
		15	0,44264	-0,35395		
		21	0,38669	-0,41264		
	6,28x10 ⁻⁷	33	0,36848	-0,43359	9,90x10 ⁻³	0,923
		41	0,36131	-0,44212		
		45	0,35192	-0,45356		
		5	0,51228	-0,29049		
		11	0,50727	-0,29476		
		15	0,46805	-0,32971		
		20	0,41227	-0,38482		
		28	0,39921	-0,39880		
		45	0,35371	-0,45135		

Çizelge 4. 2 Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve morin varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi

[MR] (M)	[Cu(II)] (M)	t _{zaman} (dak.)	Abs	Log Abs	k (dak ⁻¹)	r ²
1×10^{-4}	$1,57 \times 10^{-7}$	5	0,48639	-0,31302	$1,38 \times 10^{-3}$	0,772
		10	0,47425	-0,32399		
		18	0,46951	-0,32836		
		35	0,46914	-0,32870		
		40	0,45719	-0,33990		
	$3,14 \times 10^{-7}$	2	0,38338	-0,41637	$7,34 \times 10^{-3}$	0,958
		6	0,37116	-0,43044		
		11	0,35797	-0,44615		
		16	0,34077	-0,46754		
		30	0,32360	-0,48999		
	$4,71 \times 10^{-7}$	37	0,28871	-0,53954	$10,4 \times 10^{-3}$	0,889
		2	0,25377	-0,59556		
		6	0,26122	-0,58299		
		11	0,24751	-0,60641		
		16	0,22383	-0,65008		
		21	0,19866	-0,70189		
		28	0,18003	-0,74466		
		35	0,18688	-0,72844		
	$6,28 \times 10^{-7}$	40	0,17062	-0,76797	$22,3 \times 10^{-3}$	0,845
		46	0,17688	-0,75232		
		1,5	0,33728	-0,47201		
		5	0,27041	-0,56798		
		10	0,20695	-0,68413		
		15	0,19778	-0,70382		
		25	0,18415	-0,73483		
		30	0,15997	-0,79596		

Çizelge 4. 3 Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve kateşin varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbands değerlerinin, zamanla değişimi

[CT] (M)	[Cu(II)] (M)	t _{zaman} (dak.)	Abs	Log Abs	k (dak ⁻¹)	r ²
1x10 ⁻⁴	1,57x10 ⁻⁷	4	0,22446	-0,64886	27,4x10 ⁻³	0,925
		6	0,21433	-0,66892		
		12	0,19887	-0,70143		
		15	0,16179	-0,79105		
		18	0,14640	-0,83446		
		21	0,14805	-0,82959		
	3,14x10 ⁻⁷	1	0,26500	-0,57675	30,2x10 ⁻³	0,955
		3	0,24787	-0,60578		
		6	0,24277	-0,61480		
		9	0,22228	-0,65310		
		12	0,19441	-0,71128		
		15	0,17146	-0,76584		
		18	0,17566	-0,75533		
		21	0,16098	-0,79323		
	4,71x10 ⁻⁷	1	0,26500	-0,57675	48,4x10 ⁻³	0,859
		3	0,24787	-0,60578		
		6	0,24277	-0,61480		
		9	0,22228	-0,65310		
		12	0,19441	-0,71128		
		15	0,17146	-0,76584		
		18	0,17566	-0,75533		
		21	0,16098	-0,79323		
	6,28x10 ⁻⁷	3	0,24610	-0,60889	57,8x10 ⁻³	0,913
		6	0,18706	-0,72802		
		9	0,14278	-0,84533		
		11	0,12862	-0,89069		
		17	0,10904	-0,96241		
2x10 ⁻⁴	1,57x10 ⁻⁷	2	0,21836	-0,66083	24,4x10 ⁻³	0,954
		4	0,23227	-0,63401		
		6	0,22137	-0,65488		
		9	0,20163	-0,69544		
		12	0,18813	-0,72554		
		15	0,17058	-0,76807		
		18	0,15929	-0,79781		
		21	0,14493	-0,83884		
	3,14x10 ⁻⁷	1	0,23021	-0,63788	28,8x10 ⁻³	0,869
		3	0,24820	-0,60520		
		6	0,21718	-0,66318		
		9	0,19218	-0,71629		
		12	0,17518	-0,75652		
		15	0,13836	-0,85899		
		18	0,14869	-0,82772		
		21	0,15000	-0,82391		
	4,71x10 ⁻⁷	1	0,22153	-0,65457	45,8x10 ⁻³	0,900
		3	0,19579	-0,70821		
		6	0,16214	-0,79011		
		9	0,12076	-0,91808		
		12	0,10221	-0,99051		
		15	0,10454	-0,98072		
		18	0,09473	-1,02353		
		21	0,09196	-1,0364		
	6,28x10 ⁻⁷	1,5	0,17764	-0,75046	56,6x10 ⁻³	0,781
		3	0,14233	-0,84670		
		6	0,09491	-1,02269		
		9	0,068828	-1,16223		
		15	0,068899	-1,16179		
		18	0,065663	-1,18268		

Çizelge 4. 4 Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve ikili flavonoid karışımı (kuersetin ve morin) varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbens değerlerinin, zamanla değişimi

[QR+MR] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs	Log Abs	k (dak ⁻¹)	r ²
1×10^{-4}	$1,57 \times 10^{-7}$	1,5	0,43152	-0,365	$3,68 \times 10^{-3}$	0,966
		4	0,41611	-0,38079		
		15	0,41522	-0,38172		
		30	0,38652	-0,41283		
		40	0,37001	-0,43179		
		45	0,36272	-0,44043		
	$3,14 \times 10^{-7}$	1	0,47194	-0,32611	$12,2 \times 10^{-3}$	0,947
		11	0,36298	-0,44012		
		17	0,35823	-0,44584		
		24	0,32653	-0,48608		
		30	0,31513	-0,50151		
		38	0,29146	-0,53542		
		46	0,25479	-0,59382		
	$4,71 \times 10^{-7}$	1	0,31897	-0,49625	$19,6 \times 10^{-3}$	0,966
		11	0,25168	-0,59915		
		15	0,24258	-0,61515		
		22	0,19932	-0,70045		
		30	0,16406	-0,78500		
		38	0,16086	-0,79355		
	$6,28 \times 10^{-7}$	1,5	0,32157	-0,49272	$19,8 \times 10^{-3}$	0,756
		5	0,23691	-0,62542		
		10	0,19703	-0,70547		
		16	0,16960	-0,77057		
		35	0,14912	-0,82646		

Çizelge 4. 5 Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve ikili flavonoid karışımı (kuersetin ve kateşin) varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbens değerlerinin, zamanla değişimi

[QR+CT] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs	Log Abs	k (dak ⁻¹)	r ²
1×10^{-4}	$1,57 \times 10^{-7}$	1	0,50856	-0,29366	$8,75 \times 10^{-3}$	0,941
		10	0,46377	-0,3337		
		23	0,45656	-0,3405		
		30	0,39205	-0,40666		
		38	0,36855	-0,4335		
		45	0,34562	-0,46140		
	$3,14 \times 10^{-7}$	1	0,40447	-0,39311	$16,1 \times 10^{-3}$	0,915
		5	0,33717	-0,47215		
		10	0,31947	-0,49557		
		18	0,27465	-0,56122		
		23	0,21867	-0,66021		
		30	0,22895	-0,64026		
		38	0,20673	-0,68460		
		45	0,19343	-0,71348		
	$4,71 \times 10^{-7}$	10	0,22910	-0,63997	$17,7 \times 10^{-3}$	0,971
		15	0,19781	-0,70375		
		20	0,18385	-0,73554		
		25	0,17430	-0,75870		
		30	0,15705	-0,80396		
	$6,28 \times 10^{-7}$	1	0,26247	-0,58092	$19,3 \times 10^{-3}$	0,918
		5	0,24464	-0,61147		
		10	0,19289	-0,71469		
		15	0,18768	-0,72658		
		20	0,17134	-0,76614		
		25	0,15062	-0,82212		
		30	0,15562	-0,80793		

Çizelge 4. 6 Farklı Cu(II) konsantrasyonları ve ikili flavonoid karışımı (morin ve kateşin) varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbens değerlerinin, zamanla değişimi

[MR+CT] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs	Log Abs	k (dak ⁻¹)	r ²
1×10^{-4}	$1,57 \times 10^{-7}$	1,5	0,53569	-0,27109	$11,3 \times 10^{-3}$	0,894
		5	0,44273	-0,35386		
		11	0,44476	-0,35187		
		15	0,43871	-0,35782		
		25	0,35204	-0,45341		
		30	0,35194	-0,45353		
		45	0,3183	-0,49716		
	$3,14 \times 10^{-7}$	1	0,34606	-0,46085	$16,1 \times 10^{-3}$	0,957
		5	0,31842	-0,49700		
		10	0,28686	-0,54233		
		15	0,23336	-0,63197		
		30	0,20619	-0,68573		
		35	0,18826	-0,72524		
		45	0,16898	-0,77216		
	$4,71 \times 10^{-7}$	1,5	0,34393	-0,46353	$17,3 \times 10^{-3}$	0,795
		5	0,24160	-0,61690		
		10	0,19248	-0,71561		
		15	0,18831	-0,72513		
		30	0,15474	-0,8104		
		35	0,14685	-0,83313		
		45	0,13987	-0,85428		
	$6,28 \times 10^{-7}$	2	0,28435	-0,54615	$26,5 \times 10^{-3}$	0,855
		4	0,25062	-0,60098		
		8	0,19822	-0,70285		
		13	0,18873	-0,72416		
		17	0,16032	-0,79501		
		23	0,16421	-0,78460		

Çizelge 4. 7 Cu(II) konsantrasyonları ve üçlü flavonol karışımı (kuersetin, kateşin ve morin) varlığında pH=4,5'ta $5,67 \times 10^{-4}$ M askorbik asidin oksidasyonundan geriye kalan miktarının, Cu(II)-Nc reaktifi ile oluşturduğu Cu(I)-Nc kompleksine ait absorbens değerlerinin, zamanla değişimi

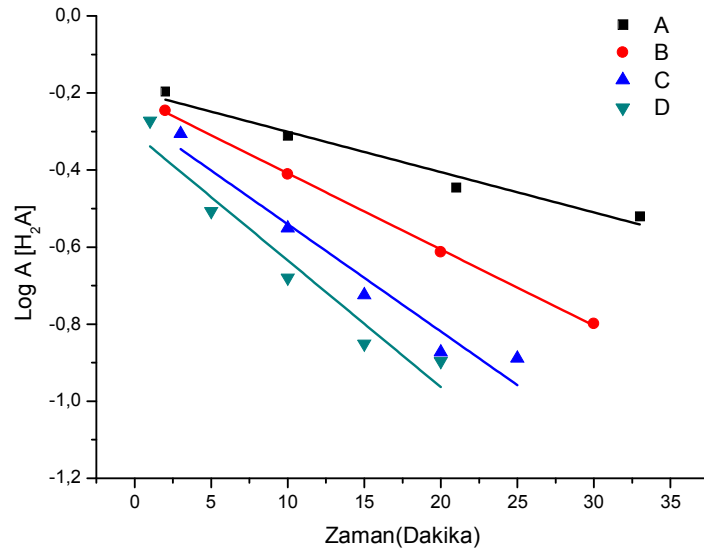
[QR+MR+CT] (M)	[Cu(II)] (M)	t _{zaman} (dak.)	Abs	Log Abs	k (dak ⁻¹)	r ²
1x10 ⁻⁴	1,57x10 ⁻⁷	1	0,48953	-0,31022	5,07x10 ⁻³	0,958
		5	0,48685	-0,3126		
		10	0,48543	-0,31387		
		25	0,43026	-0,36627		
		30	0,42675	-0,36983		
		40	0,41175	-0,38537		
	3,14x10 ⁻⁷	1	0,36624	-0,43623	11,3x10 ⁻³	0,842
		10	0,31917	-0,49598		
		15	0,28304	-0,54815		
		20	0,25271	-0,59738		
		25	0,23952	-0,62066		
		45	0,22441	-0,64896		
	4,71x10 ⁻⁷	1	0,31323	-0,50414	23,7x10 ⁻³	0,880
		5	0,25512	-0,59326		
		10	0,20190	-0,69486		
		15	0,19844	-0,70237		
		20	0,17808	-0,74938		
		25	0,17227	-0,76379		
	6,28x10 ⁻⁷	1	0,26553	-0,57589	24,4x10 ⁻³	0,866
		5	0,24398	-0,61265		
		10	0,18273	-0,73819		
		15	0,16037	-0,79488		
		20	0,15726	-0,80338		
		25	0,15400	-0,81248		

Çizelge 4. 8 pH 4,5'ta Cu(II) flavonoid kompleksleri ile katalizlenmiş askorbik asit otoksidasyonu için spesifik hız sabitleri(K) ve hız sabitleri (k)

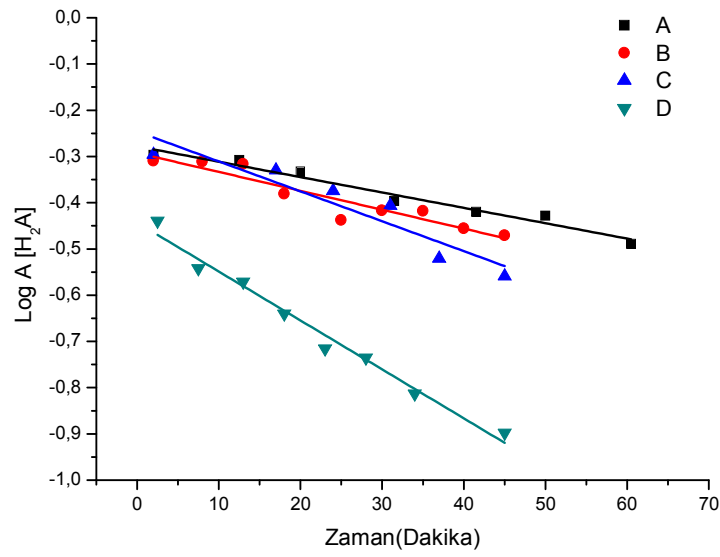
		Bakır(II) konsantrasyonu (μM)			
		0,157	0,314	0,471	0,628
Flavonoid	$K \pm S_k$ ($M^{-1} \text{ dak}^{-1}$)	k (dak^{-1})			
0	$(11,0 \pm 0,57) \times 10^4$ $r^2=0,992$	$24,2 \times 10^{-3}$ $r^2=0,969$	$45,6 \times 10^{-3}$ $r^2=0,999$	$64,0 \times 10^{-3}$ $r^2=0,953$	$75,0 \times 10^{-3}$ $r^2=0,943$
1×10^{-4} M QR	$(3,56 \pm 0,44) \times 10^4$ $r^2=0,956$	$7,60 \times 10^{-3}$ $r^2=0,968$	$9,44 \times 10^{-3}$ $r^2=0,891$	$15,0 \times 10^{-3}$ $r^2=0,888$	$24,4 \times 10^{-3}$ $r^2=0,982$
2×10^{-4} M QR	$(1,04 \pm 0,10) \times 10^4$ $r^2=0,972$	$4,84 \times 10^{-3}$ $r^2=0,907$	$7,60 \times 10^{-3}$ $r^2=0,925$	$8,75 \times 10^{-3}$ $r^2=0,925$	$9,90 \times 10^{-3}$ $r^2=0,923$
1×10^{-4} M MR	$(4,19 \pm 0,46) \times 10^4$ $r^2=0,965$	$1,38 \times 10^{-3}$ $r^2=0,772$	$7,34 \times 10^{-3}$ $r^2=0,958$	$10,4 \times 10^{-3}$ $r^2=0,889$	$22,3 \times 10^{-3}$ $r^2=0,845$
1×10^{-4} M CT	$(6,99 \pm 0,75) \times 10^4$ $r^2=0,966$	$27,4 \times 10^{-3}$ $r^2=0,925$	$30,2 \times 10^{-3}$ $r^2=0,955$	$48,4 \times 10^{-3}$ $r^2=0,859$	$57,8 \times 10^{-3}$ $r^2=0,913$
2×10^{-4} M CT	$(7,01 \pm 0,63) \times 10^4$ $r^2=0,976$	$24,4 \times 10^{-3}$ $r^2=0,954$	$28,8 \times 10^{-3}$ $r^2=0,869$	$45,8 \times 10^{-3}$ $r^2=0,900$	$56,6 \times 10^{-3}$ $r^2=0,781$
1×10^{-4} M (QR+MR)	$(3,55 \pm 0,51) \times 10^4$ $r^2=0,942$	$3,68 \times 10^{-3}$ $r^2=0,966$	$12,2 \times 10^{-3}$ $r^2=0,947$	$19,6 \times 10^{-3}$ $r^2=0,966$	$19,8 \times 10^{-3}$ $r^2=0,756$
1×10^{-4} M (QR+CT)	$(2,12 \pm 0,37) \times 10^4$ $r^2=0,918$	$8,75 \times 10^{-3}$ $r^2=0,941$	$16,1 \times 10^{-3}$ $r^2=0,915$	$17,7 \times 10^{-3}$ $r^2=0,971$	$19,3 \times 10^{-3}$ $r^2=0,918$
1×10^{-4} M (MR+ CT)	$(2,98 \pm 0,39) \times 10^4$ $r^2=0,950$	$11,3 \times 10^{-3}$ $r^2=0,894$	$16,1 \times 10^{-3}$ $r^2=0,957$	$17,3 \times 10^{-3}$ $r^2=0,795$	$26,5 \times 10^{-3}$ $r^2=0,855$
1×10^{-4} M (QR+MR+CT)	$(4,48 \pm 0,56) \times 10^4$ $r^2=0,954$	$5,07 \times 10^{-3}$ $r^2=0,958$	$11,3 \times 10^{-3}$ $r^2=0,842$	$23,7 \times 10^{-3}$ $r^2=0,880$	$24,4 \times 10^{-3}$ $r^2=0,866$
S_k = K değerlerinin standart sapması , r^2 = regresyon katsayısı (karesi) K = Konsantrasyondan bağımsız spesifik hız sabiti, $K = \frac{k_d}{[Cu(II)]}$					

Çizelge 4. 9 Test edilen 1×10^{-4} M flavonoid asitler ve onların karışımı ile pH 4,5'ta bakır(II) katalizli askorbik asit otoksidasyonunun ilgili asitlik ve kararlılık sabitleri ile spesifik inhibisyonları(I_s)

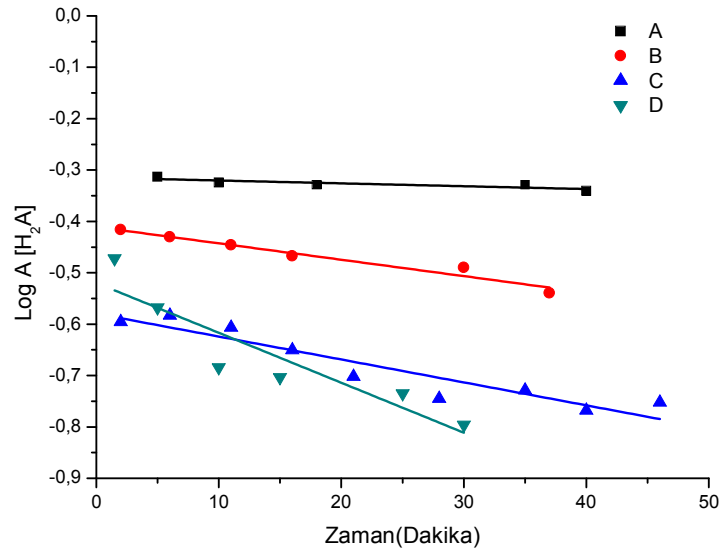
Flavonoidler	pK_{a1}	pK_{a2}	$\text{Log } \beta_1$	$\text{Log } \beta_2$	α_L	β_1'	$\text{Log } \beta_1'$	I_s
QR	5,7 ^a	7,1 ^a	5,87 ^a	7,37 ^a	$1,49 \times 10^{-4}$	110	2,0414	$6,76 \times 10^5$
MR	5,0 ^b	8,29 ^b	4,94 ^c	13,42 ^d	$3,90 \times 10^{-5}$	3,39	0,530	$6,19 \times 10^5$
CT	8,64 ^e	9,41 ^e	7,91 ^f	15,88 ^f	$8,91 \times 10^{-10}$	0,0724	-1,140	$3,64 \times 10^5$
QR+CT								$8,07 \times 10^5$
MR+CT								$7,29 \times 10^5$
QR+MR								$6,77 \times 10^5$
QR+MR+CT								$5,93 \times 10^5$
^a Escander ve Sala [33] ^b Herrero-Martinez [39] ^c Malesev ve Kuntic [110] ^d Panhwar [38] ^e Kennedy vd. [111] ^f Teixeira vd. [37]								



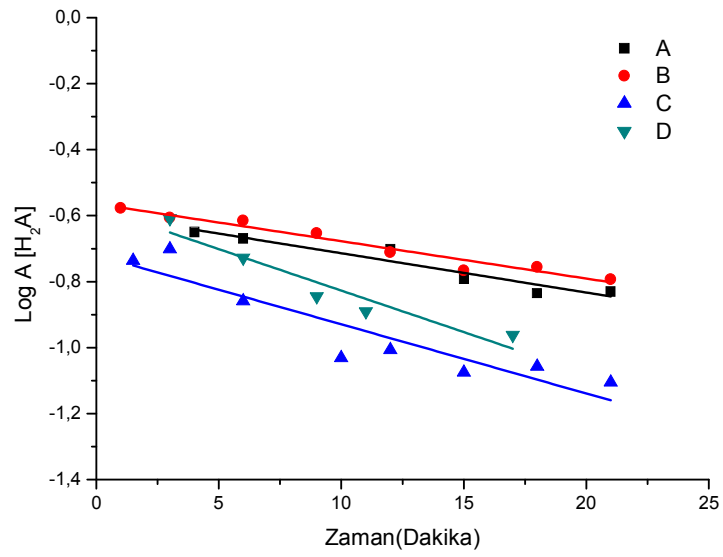
Şekil 4. 1 Farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



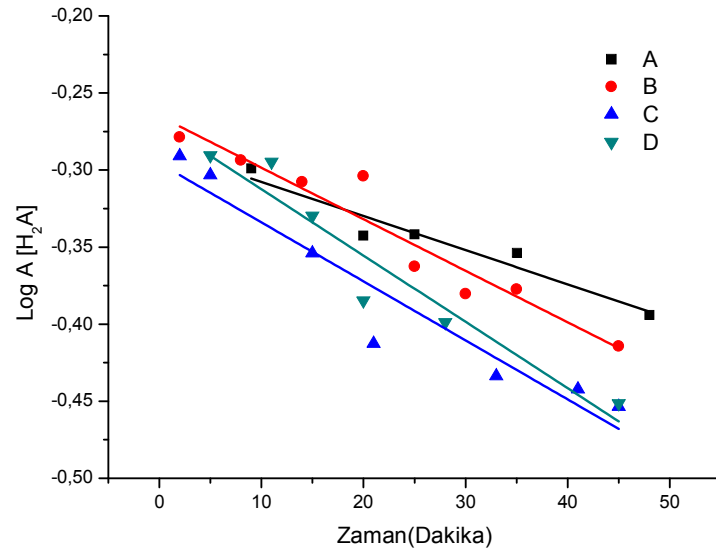
Şekil 4. 2 1×10^{-4} M Kuersetin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



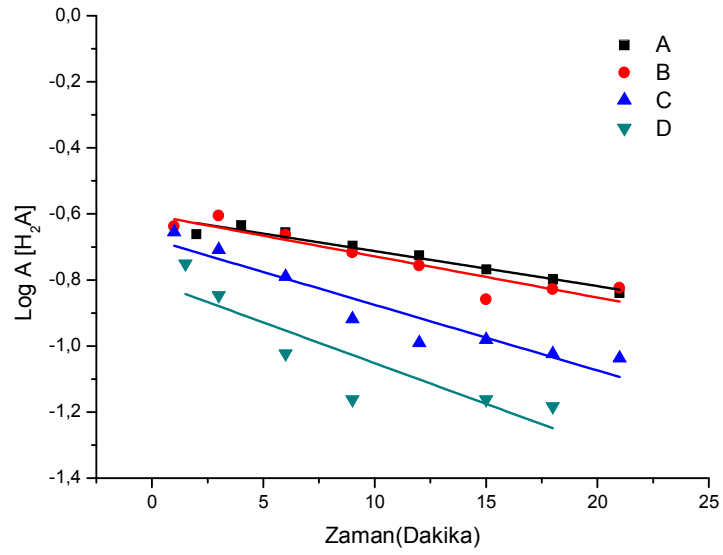
Şekil 4. 3 $\{1 \times 10^{-4}$ M Morin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



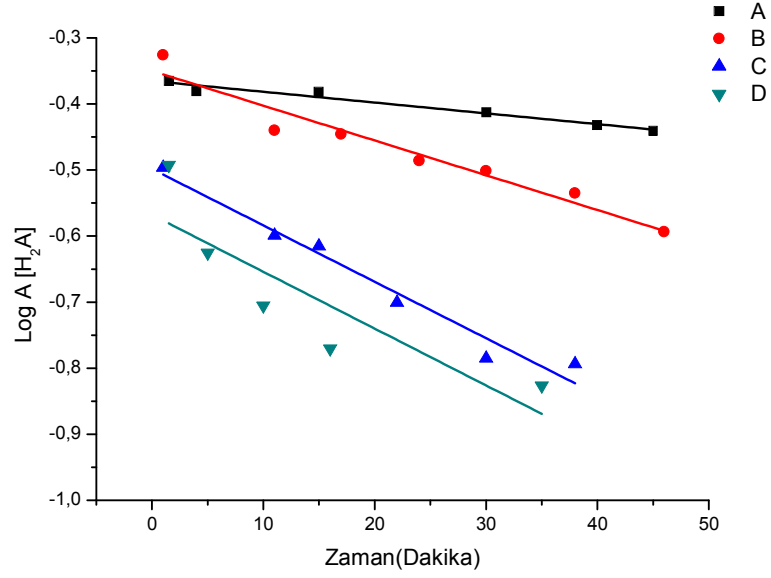
Şekil 4. 4 $\{1 \times 10^{-4}$ M Kateşin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



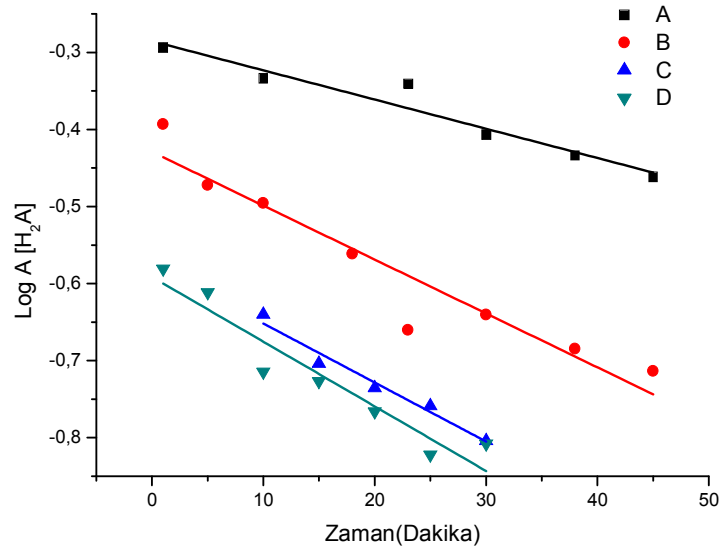
Şekil 4. 5 $\{2 \times 10^{-4}$ M Kueretin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



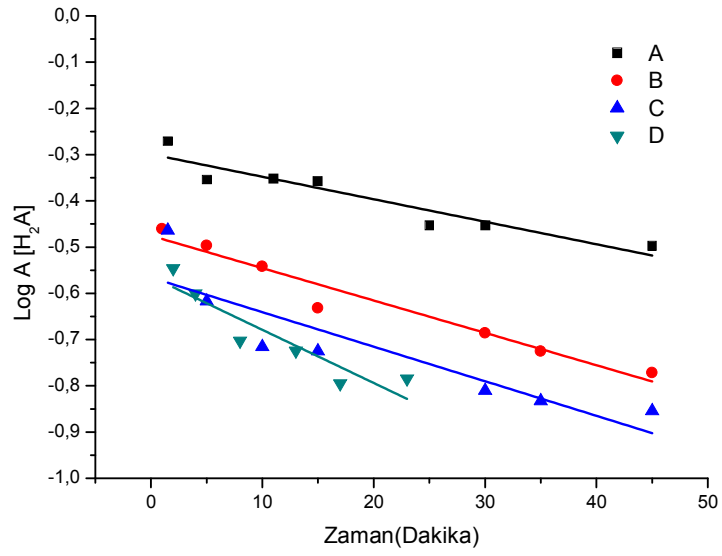
Şekil 4. 6 $\{2 \times 10^{-4}$ M Kateşin ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



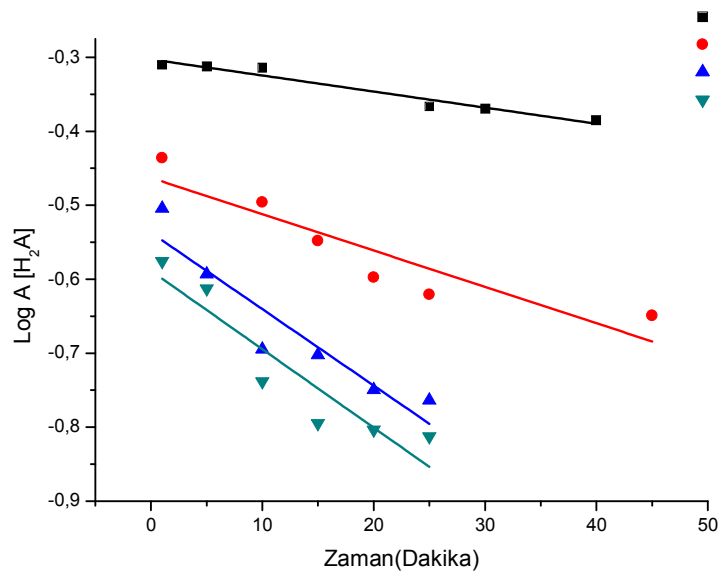
Şekil 4. 7 $\{1 \times 10^{-4}$ M flavonoid karışımı (Kuersetin+Morin) ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



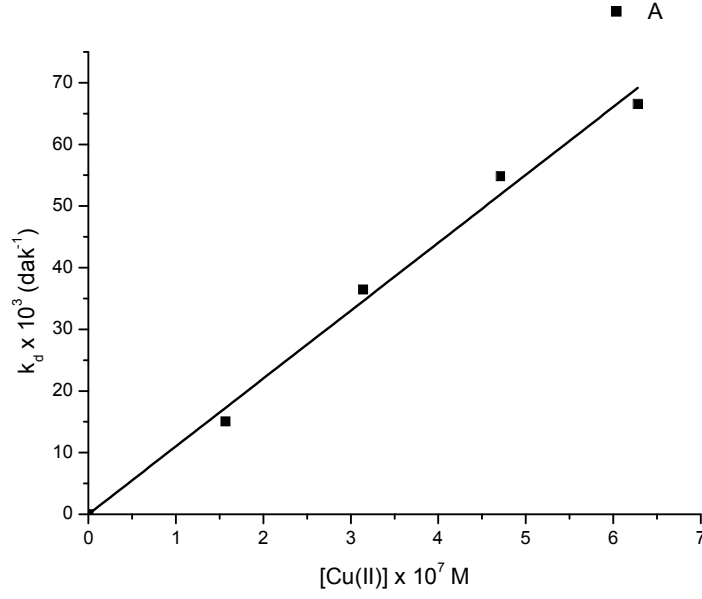
Şekil 4. 8 $\{1 \times 10^{-4}$ M flavonoid karışımı (Kuersetin+Kateşin) ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



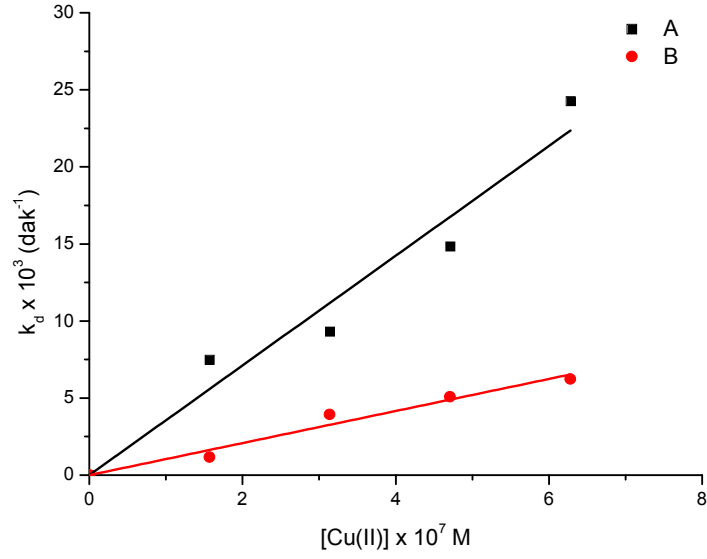
Şekil 4. 9 $\{1 \times 10^{-4}$ M flavonoid karışımı(Morin+Kateşin) ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



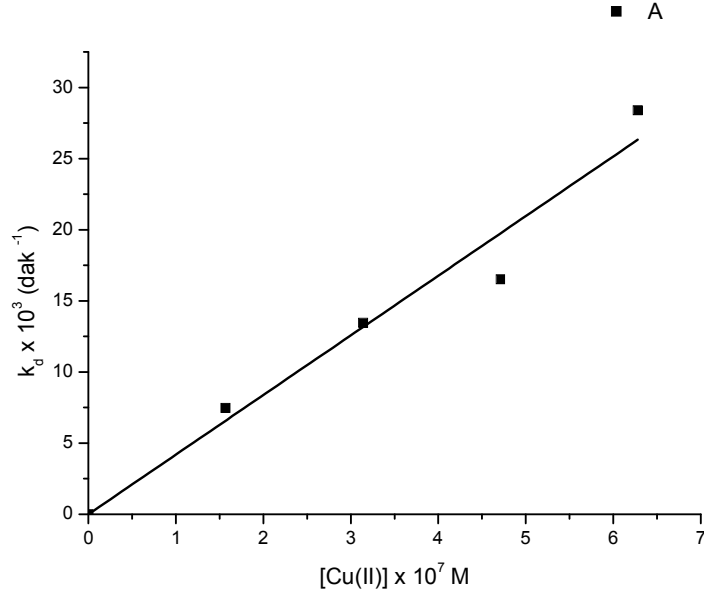
Şekil 4. 10 $\{1 \times 10^{-4}$ M flavonoid karışımı (Kuersetin+ Morin+Kateşin) ve farklı Cu(II) miktarları [(A:1,57; B:3,14; C:4,71; D:6,28) $\times 10^{-7}$ M] } varlığında askorbik asit oksidasyonu için elde edilen kinetik veriler



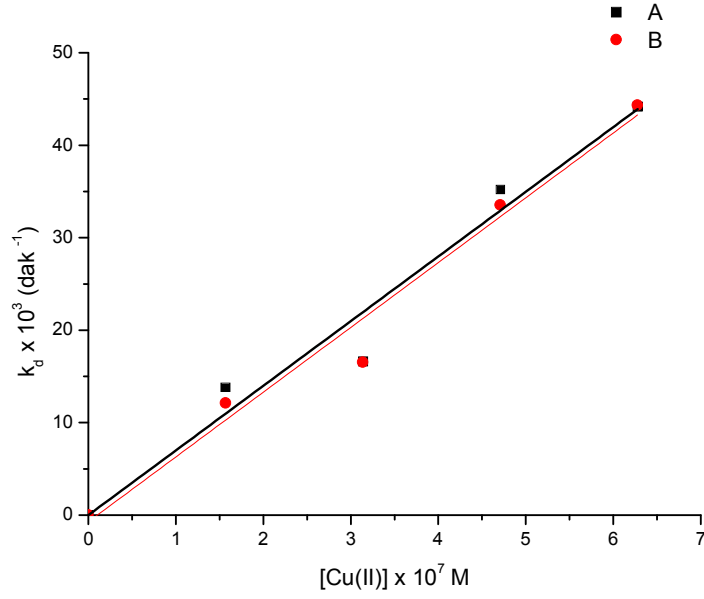
Şekil 4. 11 Asetat tamponlu flavonoid olmayan çözeltilerde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:0) $\times 10^{-4}$ M Flavonoid], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark



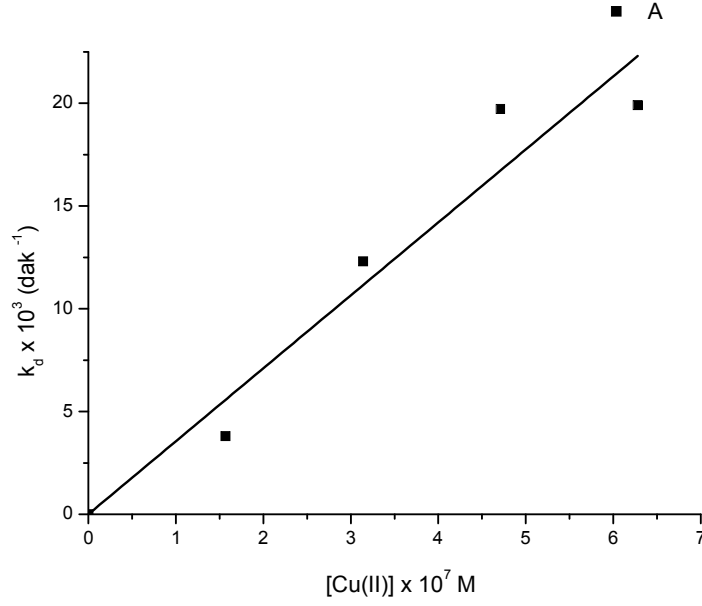
Şekil 4. 12 Asetat tamponlu kuersetin çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1, B:2) $\times 10^{-4}$ M Kuersetin], $k_d = \text{pH } 4,5'$ 'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark



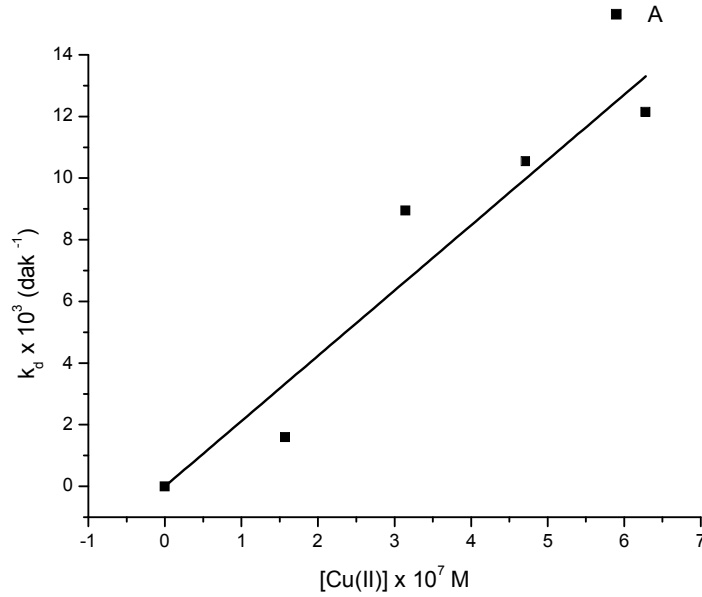
Şekil 4. 13 Asetat tamponlu morin çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) x 10⁻⁴ M Morin], k_d = pH 4,5'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark



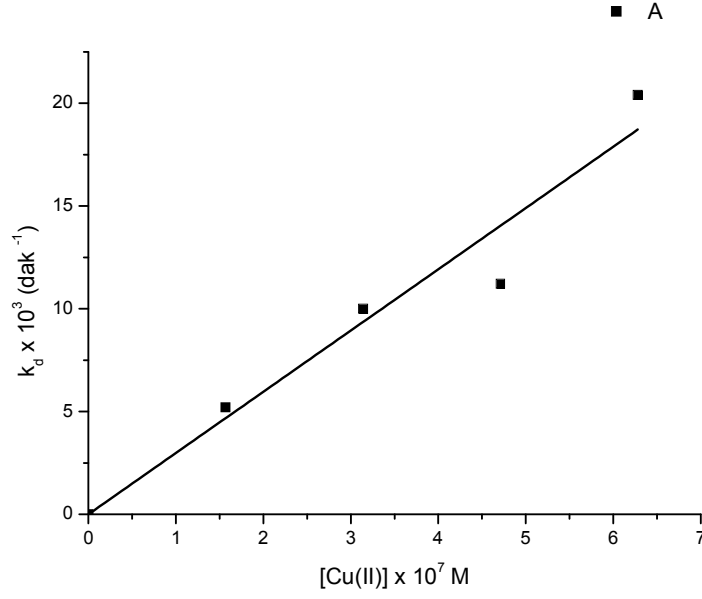
Şekil 4. 14 Asetat tamponlu kateşin çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1, B:2) x 10⁻⁴ M Kateşin], k_d = pH 4,5'de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark



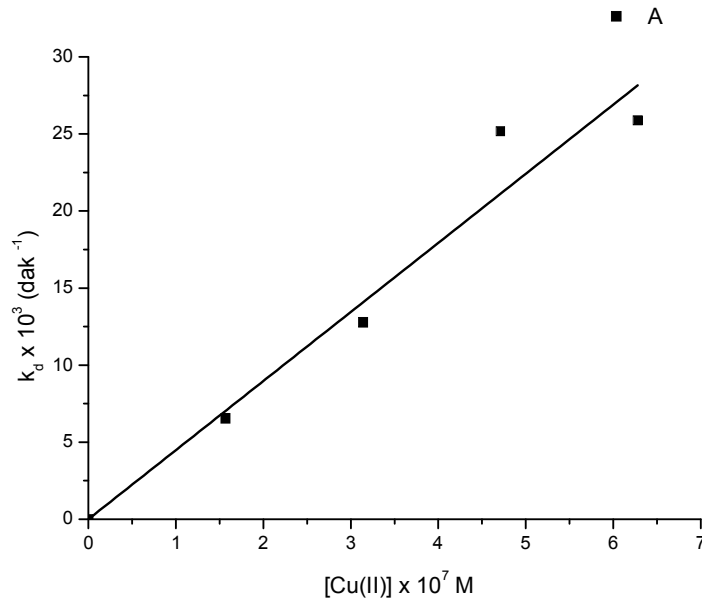
Şekil 4. 15 Asetat tamponlu kuersetin+morin karışım çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) x 10⁻⁴ M Kuersetin+Morin], k_d = pH 4,5’de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark



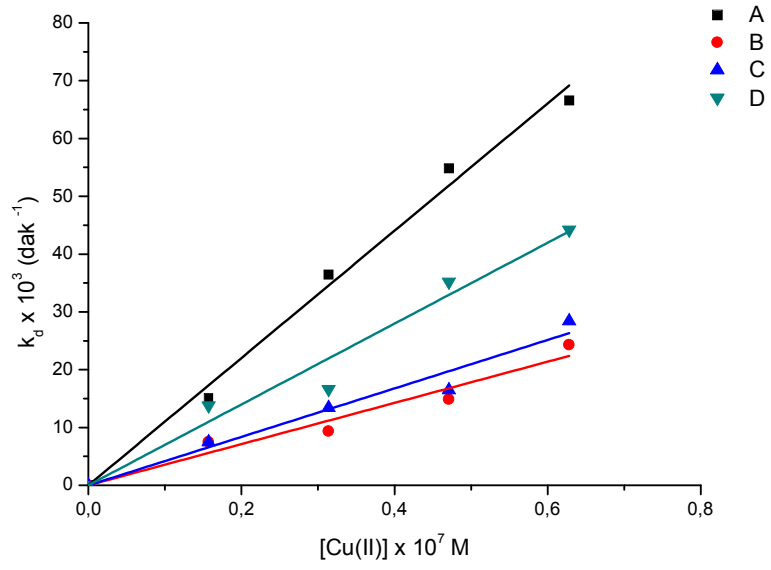
Şekil 4. 16 Asetat tamponlu kuersetin+kateşin karışım çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) x 10⁻⁴ M Kuersetin+Kateşin], k_d = pH 4,5’de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark



Şekil 4. 17 Asetat tamponlu morin+kateşin karışım çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) x 10⁻⁴ M Morin+Kateşin], k_d = pH 4,5’de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark



Şekil 4. 18 Asetat tamponlu kuersetin+morin+kateşin karışım çözeltilerinde Cu(II) iyonunun askorbik asit oksidasyonu üzerine katalitik etkisi [(A:1) x 10⁻⁴ M Kuersetin+Morin+Kateşin], k_d = pH 4,5’de bakır varlığında ve yokluğunda birinci dereceden hız sabitleri arasındaki fark



Şekil 4. 19 pH 4,5 asetat ile tamponlanmış $1,0 \times 10^{-4}$ M flavonoid çözeltisinde [A: Flavonoidsız, B:Kuersetin, C:Morin, D: Kateşin] Cu(II) konsantrasyonunun fonksiyonu olarak k_d ; k_d : Cu(II) varlığında ve yokluğunda birinci mertebe hız sabitleri arasındaki fark; doğruların eğimi K: spesifik hız sabitleri

Çizelge 4. 10 { 1×10^{-2} M LA+ farklı bakır konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları

[AA] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (saat)	Abs(A)	$\ln((1-A)/A)$	k (dak ⁻¹)	r^2
0	0	0,9	0,01776	4,01312	$0,302 \times 10^{-2}$	0,860
		2,17	0,08144	2,42297		
		3	0,08821	2,33564		
		22	0,45203	0,19247		
		22,5	0,45948	0,16244		
		23	0,57730	-0,31170		
		23,5	0,70814	-0,88637		
		24	0,59763	-0,39560		
		24,5	0,71185	-0,90439		
		25	0,79064	-1,32879		
		25,5	0,54783	-0,19191		
		26,5	0,82875	-1,57679		
		27	0,79140	-1,33338		
		27,5	0,93766	-2,71078		
		28	0,93455	-2,65878		
0	1×10^{-7}	1	0,02977	3,48403	$0,164 \times 10^{-2}$	0,791
		2	0,06535	2,66037		
		3	0,03134	3,43108		
		4	0,00500	5,29296		
		22	0,18023	1,51479		
		23	0,13376	1,86812		
		24	0,23090	1,20324		
		25	0,17162	1,57419		
		26	0,26663	1,01179		
		27	0,31487	0,77745		
		28	0,39470	0,42759		
		46	0,55125	-0,20572		
		47	0,89771	-2,17204		
		48	0,35981	0,57619		
		50	0,76999	-1,20825		
0	1×10^{-5}	1	0,05655	2,81439	$0,190 \times 10^{-2}$	0,781
		2	0,12964	1,90415		
		3	0,10404	2,15312		
		4	0,17643	1,54072		
		22	0,27438	0,97251		
		23	0,44757	0,21049		
		24	0,51055	-0,04221		
		25	0,62947	-0,52994		
		26	0,84383	-1,68701		
0	1×10^{-3}	4	0,15360	1,70664	$1,010 \times 10^{-2}$	0,863
		20	0,19728	1,40338		
		30	0,24118	1,14622		
		45	0,30986	0,80077		
		75	0,39899	0,40968		
		90	0,42876	0,28691		
		105	0,42811	0,28957		
		135	0,45902	0,16429		
		195	0,52940	-0,11774		
		225	0,57123	-0,28687		
		255	0,84091	-0,66501		

Çizelge 4. 11 { 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M AA+ farklı bakır konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları

[AA] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs(A)	$\ln((1-A)/A)$	k (dak ⁻¹)	r ²
1×10^{-3}	0	5	0,03747	3,24591	$2,29 \times 10^{-2}$	0,762
		30	0,01438	4,22722		
		60	0,01431	4,23217		
		120	0,06590	2,65145		
		165	0,05175	2,90815		
		195	0,09285	2,27937		
		225	0,44608	0,21652		
		235	0,59016	-0,36463		
		247	0,78848	-1,31579		
		253	0,81488	-1,48204		
1×10^{-3}	1×10^{-7}	6	0,02809	3,54363	$3,01 \times 10^{-2}$	0,771
		30	0,06223	2,71263		
		65	0,01772	4,01524		
		95	0,05299	2,88303		
		158	0,08115	2,42689		
		218	0,80110	-1,39318		
		232	0,93444	-2,65698		
		242	0,98515	-4,19479		
1×10^{-3}	1×10^{-5}	30	0,04549	3,04373	$2,40 \times 10^{-2}$	0,716
		60	0,036921	3,26136		
		90	0,058727	2,77433		
		120	0,06489	2,66805		
		150	0,03859	3,21538		
		165	0,03859	3,21552		
		195	0,11682	2,02289		
		225	0,40360	0,39047		
		240	0,61194	-0,45547		
		255	0,73401	-1,01506		
		270	0,84697	-1,71103		
		285	0,97655	-3,72916		
1×10^{-3}	1×10^{-3}	6	0,02809	3,54363	-	-
		30	0,06223	2,71263		
		65	0,01772	4,01524		
		95	0,05299	2,88303		
		158	0,08115	2,42689		
		218	0,80110	-1,39318		
		232	0,93444	-2,65698		
		242	0,98515	-4,19479		

Çizelge 4. 12 { 1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M Cu(II)+ farklı AA konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları

[AA] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs(A)	$\ln((1-A)/A)$	k (dak ⁻¹)	r^2
1×10^{-5}	1×10^{-3}	30	0,43976	0,24214	$1,85 \times 10^{-2}$	0,841
		60	0,64036	-0,57693		
		90	0,65749	-0,65213		
		120	0,66240	-0,67401		
		150	0,87796	-1,97325		
		210	0,98178	-3,98685		
		240	0,95325	-3,01506		
5×10^{-5}	1×10^{-3}	5	0,16578	1,61583	$2,75 \times 10^{-2}$	0,956
		18	0,23428	1,18429		
		25	0,19552	1,41453		
		32	0,24045	1,15021		
		45	0,35988	0,57589		
		54	0,44637	0,21535		
		63	0,48095	0,07623		
		68	0,58657	-0,34980		
		74	0,62341	-0,50405		
		79	0,62966	-0,53076		
		84	0,69390	-0,81842		
		90	0,78104	-1,27174		
		95	0,73829	-1,03710		
		105	0,80077	-1,39111		
		127	0,88614	-2,05191		
		143	0,94018	-2,75473		
		152	0,90367	-2,23868		
		165	0,91022	-2,31632		
		180	0,94647	-2,87249		
1×10^{-4}	1×10^{-3}	3	0,15705	1,68034	$1,90 \times 10^{-2}$	0,812
		10	0,06673	2,63802		
		18	0,11541	2,03663		
		31	0,15690	1,68148		
		44	0,19864	1,39482		
		58	0,29880	0,85302		
		72	0,37645	0,50464		
		79	0,61849	-0,48314		
		85	0,60917	-0,44382		
		95	0,52755	-0,11031		
		113	0,58915	-0,36045		
		130	0,43837	0,24778		
		148	0,55079	-0,20386		
		163	0,79782	-1,37272		
		183	0,87870	-1,98018		
		208	0,77035	-1,21029		

Çizelge 4. 13 { 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı kuersetin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20)

[QR] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs(A)	$\ln((1-A)/A)$	k (dak ⁻¹)	r ²
2×10^{-7}	1×10^{-3}	3	0,18774	1,46476	$1,53 \times 10^{-2}$	0,797
		14	0,12690	1,92865		
		24	0,18168	1,50501		
		33	0,26066	1,04254		
		61	0,28466	0,92146		
		74	0,52274	-0,09102		
		85	0,56035	-0,24258		
		98	0,45578	0,17734		
		108	0,60329	-0,41919		
		118	0,64933	-0,61610		
		129	0,56513	-0,26201		
		145	0,64715	-0,60654		
		164	0,49290	0,02840		
		185	0,79371	-1,34744		
4×10^{-7}	1×10^{-3}	3	0,18934	1,45430	$2,26 \times 10^{-2}$	0,896
		14	0,24837	1,10733		
		24	0,24712	1,11403		
		33	0,30708	0,81381		
		47	0,27070	0,99107		
		61	0,24160	1,14393		
		74	0,40845	0,37038		
		85	0,40388	0,38932		
		98	0,61973	-0,48840		
		108	0,58238	-0,33255		
		118	0,82562	-1,55490		
		129	0,80428	-1,41326		
		145	0,89392	-2,13142		
		164	0,87736	-1,96766		
8×10^{-7}	1×10^{-3}	185	0,88637	-2,05419	$1,83 \times 10^{-2}$	0,799
		4	0,15167	1,72156		
		13	0,00890	4,71276		
		22	0,08890	2,32714		
		34	0,04805	2,98627		
		45	0,11303	2,06016		
		55	0,09411	2,26445		
		67	0,17352	1,56088		
		80	0,21710	1,282648		
		93	0,27818	0,95351		
		108	0,26802	1,004692		
		138	0,42341	0,30879		
		155	0,50927	-0,03708		
		175	0,53990	-0,15994		
10×10^{-7}	1×10^{-3}	195	0,59796	-0,39697	$3,07 \times 10^{-2}$	0,901
		213	0,60612	-0,43103		
		225	0,73625	-1,02657		
		4	0,31194	0,79107		
		13	0,18325	1,49448		
		22	0,13632	1,84619		
		34	0,37445	0,51317		
		45	0,45850	0,16638		
		55	0,49669	0,01324		
		67	0,60864	-0,44160		
		80	0,75652	-1,13369		
		93	0,76186	-1,16290		
		108	0,74822	-1,08914		
		138	0,9636	-3,27611		
		155	0,94152	-2,77881		

Çizelge 4. 14 { 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı morin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20)

[MR] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs(A)	$\ln((1- A)/A)$	k (dak ⁻¹)	r^2
1×10^{-7}	1×10^{-3}	4	0,11818	2,00978	$2,01 \times 10^{-2}$	0,912
		15	0,17679	1,53825		
		25	0,22995	1,20859		
		35	0,12722	1,92577		
		48	0,13408	1,86536		
		59	0,32476	0,73198		
		71	0,45581	0,17722		
		87	0,51991	-0,07968		
		98	0,53178	-0,12729		
		114	0,53352	-0,13428		
		125	0,41480	0,34416		
		142	0,59204	-0,37241		
		160	0,82269	-1,53468		
		174	0,74472	-1,07065		
		185	0,86178	-1,83015		
2×10^{-7}	1×10^{-3}	197	0,85197	-1,75014	$2,13 \times 10^{-2}$	0,856
		222	0,93314	-2,63595		
		5	0,091223	2,29879		
		15	0,25879	1,05227		
		25	0,23668	1,17097		
		35	0,27888	0,95002		
		48	0,24265	1,13821		
		59	0,20900	1,33096		
		71	0,42782	0,29075		
		87	0,61106	-0,4518		
		98	0,68204	-0,76316		
		114	0,70928	-0,89189		
		125	0,73139	-1,00169		
		142	0,88247	-2,01603		
		160	0,92492	-2,51115		
3×10^{-7}	1×10^{-3}	174	0,74726	-1,08405	$1,19 \times 10^{-2}$	0,843
		185	0,74149	-1,05373		
		197	0,88986	-2,08931		
		222	0,96221	-3,23719		
		4	0,073188	2,538719		
		12	0,22423	1,241184		
		20	0,22976	1,209667		
		30	0,19473	1,419564		
		37	0,19152	1,440164		
		48	0,28507	0,91945		
		65	0,18001	1,51628		
		98	0,3989	0,410051		
		112	0,5103	-0,04121		
		125	0,51664	-0,06658		
		147	0,45889	0,16481		
3×10^{-7}	1×10^{-3}	165	0,63541	-0,55550	$1,19 \times 10^{-2}$	0,843
		192	0,58841	-0,35740		
		220	0,72453	-0,96704		
		235	0,64302	-0,58850		

Çizelge 4. 14 (devamı) $\{1 \times 10^{-2}$ M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı morin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20)

[MR] (M)	[Cu(II)] (M)	t _{zaman} (dak.)	Abs(A)	Ln((1- A)/A)	k (dak ⁻¹)	r ²
4×10^{-7}	1×10^{-3}	5	0,09909	2,20739	$1,07 \times 10^{-2}$	0,734
		13	0,14400	1,78246		
		20	0,22505	1,23648		
		30	0,15794	1,67364		
		38	0,21859	1,27390		
		48	0,24571	1,12163		
		65	0,14492	1,77501		
		98	0,37670	0,50358		
		113	0,43424	0,26457		
		125	0,44941	0,20306		
		147	0,60760	-0,43724		
		165	0,66946	-0,70574		
		192	0,65587	-0,64494		
		220	0,52873	-0,11505		
		235	0,46278	0,14916		
6×10^{-7}	1×10^{-3}	4	0,080295	2,43835	$0,99 \times 10^{-2}$	0,838
		15	0,081622	2,42051		
		70	0,12908	1,90912		
		83	0,14145	1,80329		
		93	0,14585	1,76753		
		107	0,16495	1,62185		
		120	0,15571	1,69050		
		140	0,17591	1,54431		
		152	0,24660	1,11683		
		165	0,16870	1,59487		
		179	0,38729	0,45872		
		190	0,33561	0,68292		
		203	0,42813	0,28949		
8×10^{-7}	1×10^{-3}	4	0,26828	1,00337	$0,61 \times 10^{-2}$	0,796
		15	0,26398	1,02538		
		70	0,38209	0,48069		
		83	0,43279	0,27048		
		93	0,37184	0,52433		
		107	0,32236	0,74295		
		120	0,34766	0,62934		
		140	0,46950	0,12215		
		152	0,49632	0,01472		
		165	0,52334	-0,09343		
		179	0,45448	0,18259		
		190	0,5412	-0,16517		
		203	0,5702	-0,28267		

Çizelge 4. 15 { 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ farklı kateşin konsantrasyonları} ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20)

[CT] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs(A)	$\ln((1-A)/A)$	k (dak ⁻¹)	r^2
1×10^{-7}	1×10^{-3}	5	0,12163	1,97708	$1,86 \times 10^{-2}$	0,910
		14	0,08095	2,42951		
		20	0,14367	1,78514		
		29	0,12748	1,92343		
		39	0,15856	1,66898		
		54	0,12249	1,96906		
		68	0,23322	1,19022		
		82	0,22563	1,23315		
		105	0,19050	1,44677		
		130	0,33983	0,66405		
		144	0,68311	-0,76810		
		158	0,46364	0,14569		
		175	0,72392	-0,96399		
		192	0,77008	-1,20876		
		205	0,78430	-1,29090		
		225	0,88014	-1,99376		
2×10^{-7}	1×10^{-3}	4	0,04493	3,05673	$2,39 \times 10^{-2}$	0,839
		11	0,25551	1,06944		
		17	0,19226	1,43539		
		26	0,19509	1,41727		
		35	0,15509	1,69523		
		59	0,42162	0,31613		
		70	0,44140	0,23548		
		85	0,50554	-0,02216		
		95	0,60467	-0,42496		
		110	0,68998	-0,80003		
		122	0,65671	-0,64867		
		132	0,61811	-0,48153		
		143	0,67622	-0,73645		
		155	0,73580	-1,0243		
		167	0,94685	-2,88002		
3×10^{-7}	1×10^{-3}	13	0,11702	2,02096	$1,80 \times 10^{-2}$	0,893
		20	0,17406	1,55712		
		28	0,081677	2,41978		
		38	0,23634	1,17285		
		53	0,27718	0,95849		
		68	0,31828	0,76169		
		82	0,45729	0,17126		
		105	0,54484	-0,17984		
		130	0,5329	-0,13179		
		144	0,62076	-0,49278		
		158	0,62129	-0,49503		
		175	0,53397	-0,13609		
		192	0,78105	-1,2718		
		205	0,80603	-1,42442		
		225	0,93172	-2,61342		

Çizelge 4. 15 (devamı) $\{1 \times 10^{-2} \text{ M LA} + 1 \times 10^{-3} \text{ M Cu(II)} + 5 \times 10^{-5} \text{ M AA} + \text{farklı kateşin konsantrasyonları}\}$ ile oksidasyon çalışmaları (LA/Cu(II) =10, Cu(II)/AA=20)

[CT] (M)	[Cu(II)] (M)	t_{zaman} (dak.)	Abs(A)	$\ln((1-A)/A)$	k (dak ⁻¹)	r ²
4×10^{-7}	1×10^{-3}	11	0,18498	1,48296	$2,97 \times 10^{-2}$	0,940
		17	0,23641	1,17246		
		26	0,14539	1,77123		
		35	0,27161	0,98647		
		47	0,40047	0,40351		
		59	0,43810	0,24888		
		70	0,53452	-0,13830		
		85	0,63598	-0,55796		
		95	0,70044	-0,84939		
		110	0,84222	-1,67484		
		122	0,90865	-2,29726		
		132	0,8272	-1,56591		
6×10^{-7}	1×10^{-3}	143	0,87897	-1,98271	$1,47 \times 10^{-2}$	0,894
		6	0,28124	0,93832		
		15	0,20773	1,33866		
		20	0,16790	1,60058		
		28	0,16895	1,59309		
		40	0,27475	0,97066		
		51	0,29223	0,88458		
		60	0,39527	0,42521		
		70	0,33306	0,69438		
		84	0,44954	0,20253		
		110	0,47697	0,09219		
		124	0,53169	-0,12693		
		140	0,54766	-0,19122		
		156	0,76946	-1,20526		
		168	0,63191	-0,54042		
8×10^{-7}	1×10^{-3}	195	0,81350	-1,47291	$1,88 \times 10^{-2}$	0,852
		6	0,35124	0,61359		
		15	0,18475	1,48449		
		20	0,23051	1,205434		
		28	0,20705	1,34280		
		40	0,18752	1,46621		
		52	0,39053	0,44509		
		60	0,43313	0,26909		
		71	0,51762	-0,07051		
		85	0,50097	-0,00388		
		110	0,59371	-0,37932		
		124	0,72160	-0,95241		
		141	0,78165	-1,27531		
		157	0,90599	-2,26563		
		168	0,87236	-1,92199		
		195	0,78747	-1,30974		

Çizelge 4. 16 Farklı bakır(II) konsantrasyonlarında { 1×10^{-2} M LA, 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} AA ve 1×10^{-2} M LA} ve farklı AA konsantrasyonlarında { 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II)} peroksidasyon çalışmaları

	[Cu(II)]M	LA/Cu(II)	Cu(II)/A A	$k \pm S_k$ (dakika ⁻¹) ^a	r^2	% İnhibisyon	% I _s
1×10^{-2} M LA	0	0	0	$(0,302 \pm 0,032) \times 10^{-2}$	0,860	-	-
	1×10^{-7}	10^5	0	$(0,164 \pm 0,022) \times 10^{-2}$	0,791	45,58	$4,5 \times 10^8$
	1×10^{-5}	10^3	0	$(0,190 \pm 0,035) \times 10^{-2}$	0,781	37,13	$3,7 \times 10^6$
	1×10^{-3}	10	0	$(1,010 \pm 0,130) \times 10^{-2}$	0,863	-233,7	$-2,3 \times 10^5$
	[Cu(II)]M						
1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M AA	0	0	0	$(2,29 \pm 0,39) \times 10^{-2}$	0,762	-	-
	1×10^{-7}	10^5	10^{-4}	$(3,01 \pm 0,61) \times 10^{-2}$	0,771	-31,4	$-3,1 \times 10^8$
	1×10^{-5}	10^3	10^{-2}	$(2,40 \pm 0,45) \times 10^{-2}$	0,716	-4,80	$-4,8 \times 10^5$
	1×10^{-3}	10	1	Oksidasyon gerçekleşmedi	-	-	-
	[AA] M						
1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II)	0	10	0	$(1,01 \pm 0,13) \times 10^{-2}$	0,863	-	-
	1×10^{-5}	10	100	$(1,85 \pm 0,32) \times 10^{-2}$	0,841	-83,17	$-8,3 \times 10^6$
	5×10^{-5}	10	20	$(2,75 \pm 0,14) \times 10^{-2}$	0,956	-172,3	$-3,4 \times 10^6$
	1×10^{-4}	10	10	$(1,90 \pm 0,24) \times 10^{-2}$	0,812	-88,12	$-8,8 \times 10^5$

^a Lineer regresyon analizinde kullanılan deneysel noktaların sayısı N=19 idi.

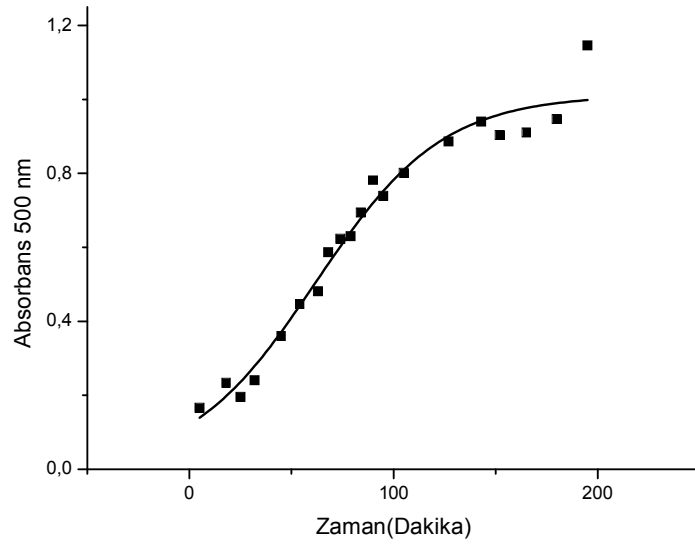
Çizelge 4. 17 Farklı flavonoid konsantrasyonlarında [LA/Cu (II) =10, Cu(II) /AA =20]
{ 1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA}'nın peroksidasyon çalışmaları

[QR] (M)	$k \pm S_k$ (dakika ⁻¹)	r^2	% İnhibisyon	% I _s
0	$(2,75 \pm 0,14) \times 10^{-2}$	0,956	-	-
2×10^{-7}	$(1,53 \pm 0,21) \times 10^{-2}$	0,797	44,5	$2,2 \times 10^8$
4×10^{-7}	$(2,26 \pm 0,21) \times 10^{-2}$	0,896	17,9	$4,5 \times 10^7$
8×10^{-7}	$(1,83 \pm 0,23) \times 10^{-2}$	0,799	33,5	$4,2 \times 10^7$
10×10^{-7}	$(3,07 \pm 0,31) \times 10^{-2}$	0,901	-11,7	$-1,2 \times 10^7$
[MR] (M)				
0	$(2,75 \pm 0,14) \times 10^{-2}$	0,956	-	-
1×10^{-7}	$(2,01 \pm 0,16) \times 10^{-2}$	0,912	26,9	$2,6 \times 10^8$
2×10^{-7}	$(2,13 \pm 0,22) \times 10^{-2}$	0,856	22,5	$1,1 \times 10^8$
3×10^{-7}	$(1,19 \pm 0,14) \times 10^{-2}$	0,843	56,7	$1,9 \times 10^8$
4×10^{-7}	$(1,07 \pm 0,17) \times 10^{-2}$	0,734	61,1	$1,5 \times 10^8$
6×10^{-7}	$(0,99 \pm 0,12) \times 10^{-2}$	0,838	64,0	$1,1 \times 10^8$
8×10^{-7}	$(0,61 \pm 0,09) \times 10^{-2}$	0,796	77,8	$9,7 \times 10^7$
[CT] (M)				
0	$(2,75 \pm 0,14) \times 10^{-2}$	0,956	-	-
1×10^{-7}	$(1,86 \pm 0,15) \times 10^{-2}$	0,910	32,4	$3,2 \times 10^8$
2×10^{-7}	$(2,39 \pm 0,28) \times 10^{-2}$	0,839	13,1	$6,5 \times 10^7$
3×10^{-7}	$(1,80 \pm 0,17) \times 10^{-2}$	0,893	34,5	$1,2 \times 10^8$
4×10^{-7}	$(2,97 \pm 0,22) \times 10^{-2}$	0,940	-8,0	$-2,0 \times 10^7$
6×10^{-7}	$(1,47 \pm 0,13) \times 10^{-2}$	0,894	46,5	$7,8 \times 10^7$
8×10^{-7}	$(1,88 \pm 0,21) \times 10^{-2}$	0,852	31,6	$3,9 \times 10^7$

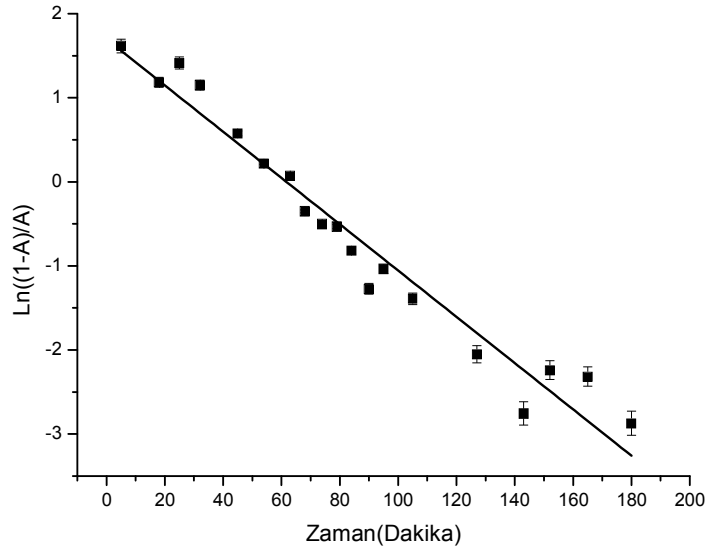
^a Lineer regrasyon analizinde kullanılan deneysel noktaların sayısı N=19 idi.

Çizelge 4. 18 Test edilen flavonoid asitler ile pH 7,0'da bakır(II)-askorbik asit ile indüklenmiş linoleik asit peroksidasyonunun ilgili asitlik ve kararlılık sabitleri ile spesifik inhibisyonları(I_s)

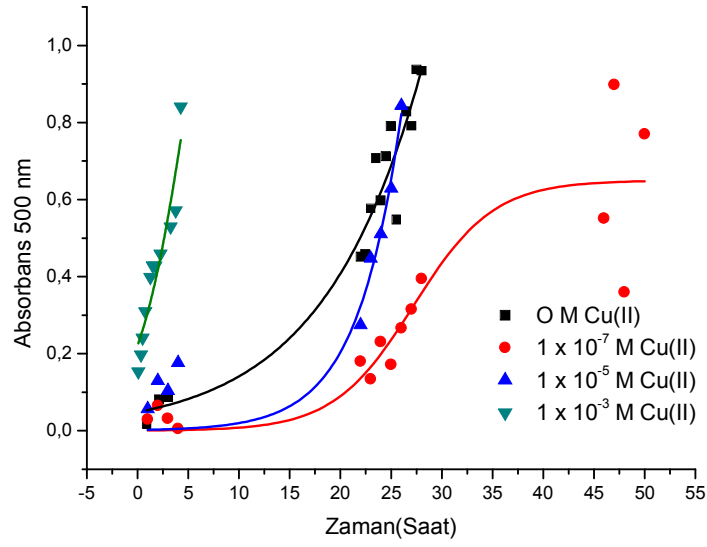
Flavonoid	pK_{a1}	pK_{a2}	$\text{Log } \beta_1$	$\text{Log } \beta_2$	α_L	β_2'	$\text{Log } \beta_2'$	I_s (ortalama)
QR	5,7 ^a	7,1 ^a	5,87 ^a	7,37 ^a	$4,30 \times 10^{-1}$	$4,33 \times 10^6$	6,64	$1,02 \times 10^8$
MR	5,0 ^b	8,29 ^b	4,94 ^c	13,42 ^d	$4,80 \times 10^{-2}$	$6,06 \times 10^{10}$	10,78	$1,61 \times 10^8$
CT	8,64 ^e	9,41 ^e	7,91 ^f	15,88 ^f	$8,91 \times 10^{-5}$	$5,95 \times 10^7$	7,77	$1,39 \times 10^8$
^a Escander ve Sala [33] ^b Herrero-Martinez [39] ^c Malesev ve Kuntic [110] ^d Panhwar [38] ^e Kennedy vd. [111] ^f Teixeira vd. [37]								



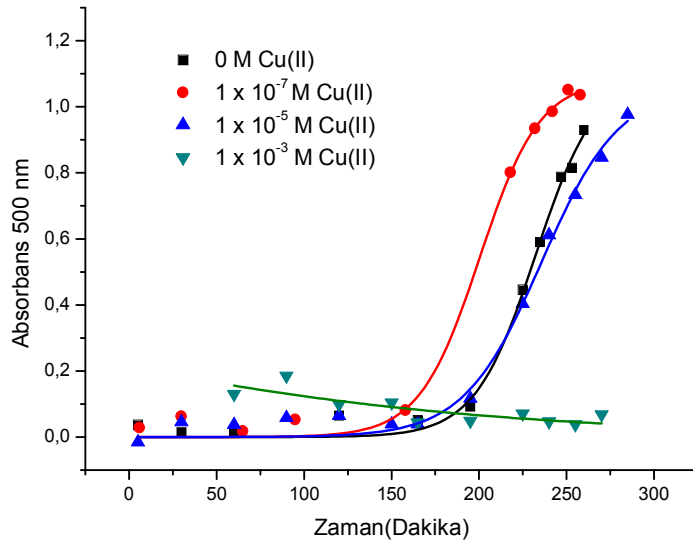
Şekil 4. 20 Örnek sigmoidal eğri (1×10^{-2} M LA+ 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA ile oksidasyon çalışması)



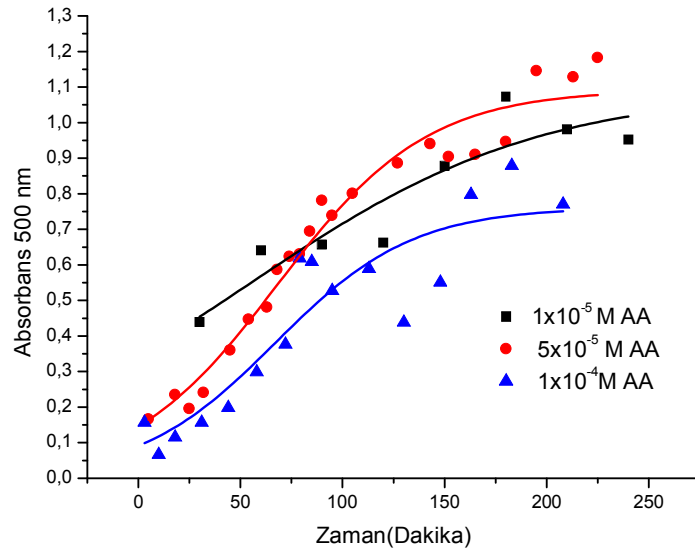
Şekil 4. 21 Origin 8.0 programında çizilen örnek sigmoidal eğrinin analizi ile hız sabitinin bulunması ($k = 0,02753 \text{ dak.}^{-1}$).



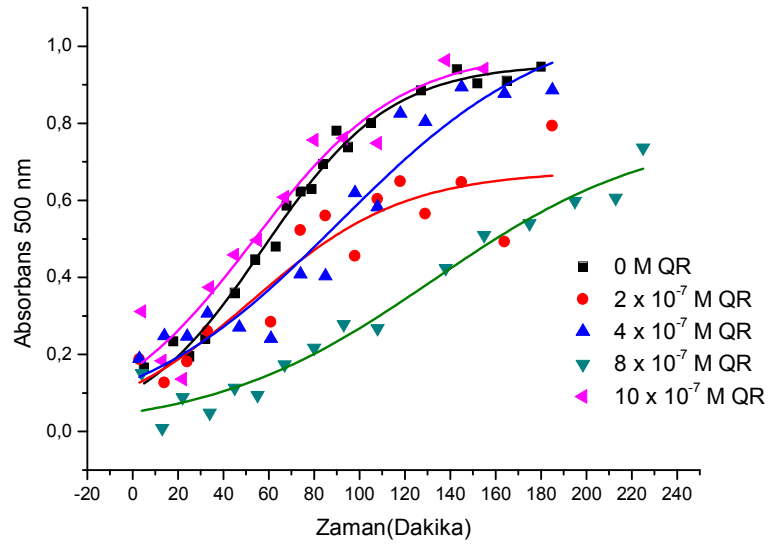
Şekil 4. 22 $\{1 \times 10^{-2} \text{ M LA} + \text{farklı bakır konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları}$
 $[\text{Cu(II)} \text{ } 0, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-3} \text{ M}] \}$.



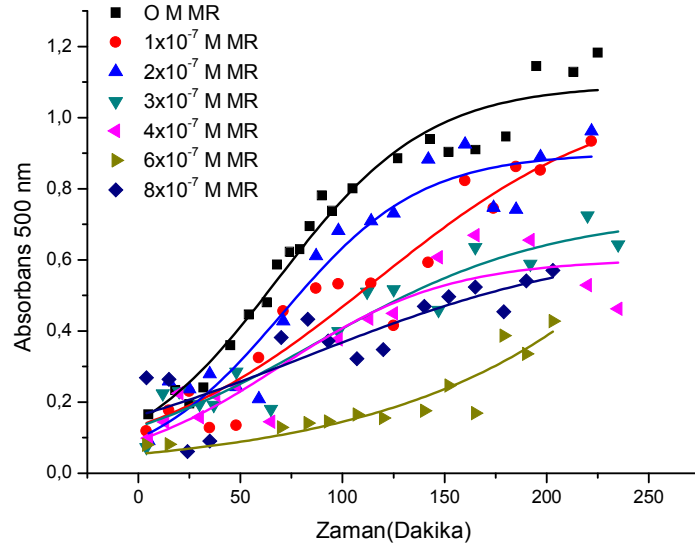
Şekil 4. 23 $\{1 \times 10^{-2} \text{ M LA} + 1 \times 10^{-3} \text{ M AA} + \text{farklı bakır konsantrasyonlarındaki oksidasyon}$
 $\text{çalışmaları } [\text{Cu(II)} \text{ } 0, 1 \times 10^{-7}, 1 \times 10^{-5}, 1 \times 10^{-3} \text{ M}] \}$.



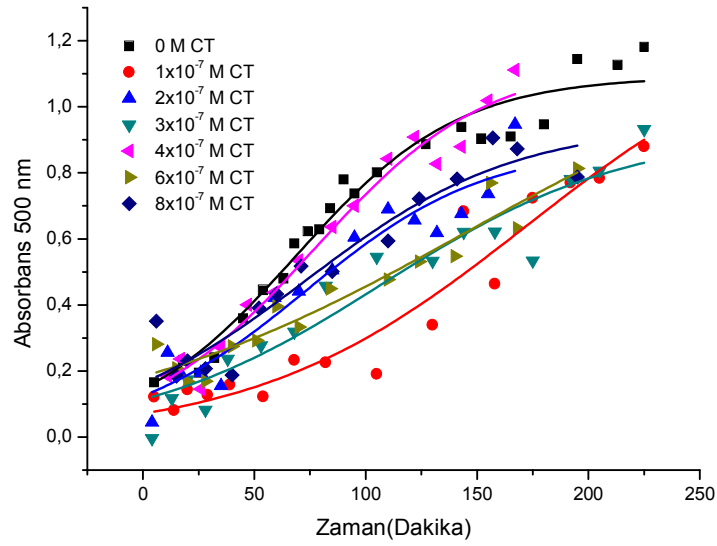
Şekil 4. 24 $\{1 \times 10^{-2}$ M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + farklı AA konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları [AA 1×10^{-5} , 5×10^{-5} , 1×10^{-4} M] }.



Şekil 4. 25 $\{1 \times 10^{-2}$ M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA + farklı kuersetin konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları, [Kuersetin (0, 1, 2, 3, 4, 6) $\times 10^{-7}$ M] }.



Şekil 4. 26 $\{1 \times 10^{-2} \text{ M LA} + 1 \times 10^{-3} \text{ M Cu(II)} + 5 \times 10^{-5} \text{ M AA} + \text{farklı morin konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları, [Morin (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8) } \times 10^{-7} \text{ M}] \}$.



Şekil 4. 27 $\{1 \times 10^{-2} \text{ M LA} + 1 \times 10^{-3} \text{ M Cu(II)} + 5 \times 10^{-5} \text{ M AA} + \text{farklı kateşin konsantrasyonlarındaki oksidasyon çalışmaları, [Kateşin (0, 1, 2, 3, 4, 6, 8) } \times 10^{-7} \text{ M}] \}$.

4.6 Tartışma

Bu çalışmanın ilk bölümünde AA'nın, Cu(II) iyon varlığında ve yokluğunda, oksidasyonuna benzer kimyasal yapıdaki farklı flavonoid bileşiklerinin [kuersetin(QR), morin(MR) ve kateşin(CT)] tek başına ve ikili ve üçlü karışımları halinde etkisi, havalandırılmış asetat tamponlu çözeltide (pH = 4,5), 25 °C'de ve I = 0,1 M KNO₃'da, bakır(II)-neokuproin reaktifi ile spektrofotometrik olarak incelendi. Çözeltide oksitlenmeden kalan AA konsantrasyonu, modifiye CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) yöntemi kullanılarak tayin edildi. pH 4,5'da AA'nın Cu(II) katalizli oksidasyonu birinci derece kinetik izledi. AA'nın katalitik oksidasyonu, stabil Cu-kuersetin ve morin kompleksleri ile Cu-kateşin kompleksinden daha fazla inhibe edildi. Bu sonuçlar kuersetin ve morin için, Khan ve Martell'in [4] (bakır kelatları varlığında AA'nın otoksidasyon hızının metal kompleks stabilitesinin artmasıyla azaldığı çalışması) sonuçlarıyla uyumludur. Bununla birlikte kateşinin tuhaf davranışı henüz yorumlanamadı. Flavonoidlerin ve flavonoid karışımlarının AA'nın bakır katalizli oksidasyonuna inhibisyon etkilerinin tek bileşenler için kuersetin > morin > kateşin, karışımlar için kuersetin + kateşin > morin + kateşin > kuersetin + morin > kuersetin + morin + kateşin sıralaması şeklinde olduğu görülmektedir. Karışımlar için sıralama, diğer antioksidan testleri ile de doğrulanabilen antioksidanların olası sinerjistik veya antagonistik kombinasyonları hakkında bilgi verir. Flavonoidler besin ve ilaca uyumlu olduğu için ticari ürünlerde C vitamininin stabilitesini arttırmak için kullanılabilirler.

Bu çalışmanın ikinci bölümünde, antioksidan olarak flavonoidlerin 37 °C ve pH 7'de Cu(II) iyon-askorbat kombinasyonu varlığında ve yokluğunda, havalandırılmış ve inkübe edilmiş linoleik asit (LA) emülsiyonlarındaki, peroksidasyona etkileri incelendi. Bakır(II)-askorbik asit sistemi ile indüklenmiş lipit peroksidasyon, hidroperoksit konsantrasyonuna bağlı olarak birinci derece kinetik izledi. Bir LA sistemde ferrik tiyosiyanat metot ile tayin edilen bakır başlatıcılı peroksit ürünlerinin miktarı, eklenen flavonoidlerin olası antioksidan ve prooksidan aktivitelerini saptamak için kullanıldı. AA'nın potansiyel antioksidan koruyucusu olan benzer yapıdaki farklı flavonoidlerin ([kuersetin(QR), morin(MR) ve kateşin(CT)] etkileri, seçilen peroksidasyon sistemde incelendi. Flavonoidlerin LA peroksidasyonunu korumasında önleyici sırası: morin > kateşin ≥ kuersetin olarak saptandı. Kateşin ve kuersetin, konsantrasyonlarına bağlı

olarak antioksidan ve prooksidan etki gösterirken; morin bütün konsantrasyonlarda antioksidan etki gösterdi. Flavonoidlerin antioksidan ve prooksidan davranışları için, sonuçlar flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak değerlendirildi.

- [1] Packer, L. ve Fuchs, J., (1997), Vitamin C in Health and Disease, Marcel Dekker, Inc., New York.
- [2] Seib, P.A. ve Tolbert, B.N., (1989), Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism and Uses: Advances in Chemistry Series 200, American Chemical: Washington D.C.
- [3] Khan, M.M.T. ve Martell, A.E., (1967a), "Metal Ion and Metal Chelate Catalyzed Oxidation of Ascorbic Acid by Molecular Oxygen. I. Cupric and Ferric Ion Catalyzed Oxidation", J Am Chem Soc, 89: 4176–4185.
- [4] Khan, M.M.T. ve Martell, A.E., (1967b), "Metal Ion and Metal Chelate Catalyzed Oxidation of Ascorbic Acid by Molecular Oxygen. II. Cupric and Ferric Chelate Catalyzed oxidation", J Am Chem Soc, 89: 7104–7111.
- [5] Ogata, Y., Kosugi, Y. ve Morimoto, T., (1968), "Kinetics of the Cupric Salt-Catalyzed Autoxidation of L- Ascorbic Acid in Aqueous Solutions", Tetrahedron, 24: 4057-4066.
- [6] Davies, M.B., (1992), "Reactions of L- Ascorbic Acid with Transition Metal Complexes", Polyhedron, 11: 285-321.
- [7] Şahbaz, F. ve Somer, G., (1993), "The Effect of Citrate Anions on the Kinetics of Cupric Ion-Catalysed Oxidation of Ascorbic Acid", Food Chem, 47: 345-349.
- [8] Imer, F., Sonmezoglu, I.C. ve Kozcaz, M., (2003), "The Role of Buffers on the Kinetics of L- Ascorbic Acid Oxidation Catalyzed by Copper (II)", Ital J Food Sci, 15: 521–529.
- [9] Imer, F., Sonmezoglu, I., Aldemir, E., Kılıç, H. ve Apak, R., (2008), "The Protective Effect of Amino Acids on the Copper(II)-Catalyzed Autoxidation of Ascorbic Acid", J Food Drug Anal, 16: 46-53.
- [10] Scarpa, M., Vianello, F., Signor, L., Zennaro, L. ve Rigo, A., (1996), "Ascorbate Oxidation Catalyzed by Bis (Histidine) Copper (II)", Inorg Chem, 35: 5201- 5206.
- [11] Ohta, Y., Shiraishi, N., Nishikawa, T. ve Nishikimi, M., (2000) "Copper-Catalyzed Autoxidations of GSH and L – Ascorbic Acid: Mutual Inhibition of the Respective Oxidations by Their Coexistence", Biochim Biophys Acta, 1474:378–382.

- [12] Akbıyık, T., Sönmezoğlu, İ., Güçlü, K., Tor, İ. ve Apak, R., (2011), "Protection of Ascorbic Acid from Copper(II)-Catalyzed Oxidative Degradation in the Presence of Fruit Acids: Citric, Oxalic, Tartaric, Malic, Malonic and Fumaric Acids", *Int J Food Prop*, in press, DOI: 10.1080/10942912.2010.487630 .
- [13] Passamontil, S., Terdoslavich, M., Franca R., Vanzo, A., Tramer, F., Braidot, E., Petrusa, E. ve Vianell, A., (2009), "Bioavailability of Flavonoids: A Review of Their Membrane Transport and the Function of Bilirubin Translocase in Animal and Plant Organisms", *Curr Drug Metab*, 10: 369-394.
- [14] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. ve Paganga, G., (1997), "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds", *Trends Plant Sci*, 2: 152-159.
- [15] Gorinstein, S., Martin-Belloso, O., Park, Y.S., Haruenkit, R., Lojek, A., Ciz, M. , Caspi, A., Libman, I. ve Trakhtenberg, S., (2001), "Comparison of Some Biochemical Characteristics of Different Citrus Fruits", *Food Chem*, 74: 309-315.
- [16] Gorinstein, S., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Krzeminski, R., Gralak, M., Delgado-Licon, E., Ayala, A.L.M., Katrich, E. ve Trakhtenberg, S., (2005), "Changes in Plasma Lipid and Antioxidant Activity in Rats as a Result of Naringin and Red Grapefruit Supplementation", *J Agric Food Chem*, 53: 3223-3228.
- [17] Pietta, P., (2000), "Flavonoids As Antioxidants", *J Nat Prod*, 63: 1035–1042.
- [18] Dominguez, S., Torres, J., Morales, P., Heinzen, H., Bertucci, A. ve Kremer, C., (2008), "Complexation and Antioxidant Activity of Flavonoids with Biologically Relevant Metal Ions. In: Coordination Chemistry Research Progress, Editors : T.W. Cartere, K.S. Verley, pp 305 – 328., chapt. 10, Nova Science Publishers, Inc., ISBN: 978-1-60456-047-3.
- [19] Gorinstein, S., Caspi, A., Libman, I., Katrich, E., Lerner, H.T. ve Trakhtenberg, S., (2004), "Preventive Effects of Diets Supplemented with Sweetie Fruits in Hypercholesterolemic Patients Suffering from Coronary Artery Disease", *Preventive Medicine*, 28: 841-847.
- [20] Leontowicz, M., Gorinstein, S., Leontowicz, H., Krzeminski, R., Lojek, A., Katrich, E., Ciz, M., Martin-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R., Haruenkit, R. ve Trakhtenberg, S., (2003), "Apple and Pear Peel and Pulp and Their Influence on Plasma Lipids and Antioxidant Potentials in Rats Fed Cholesterol-Containing Diets", *J Agric Food Chem*, 51: 5780-5785.
- [21] De Souza, R.F. ve De Giovani, W.F., (2004), "Antioxidant Properties of Complexes of Flavonoids with Metal Ions", *Redox Report*, 9 (1): 97-104.
- [22] Fernandez, M.T., Mira, M.L., Florêncio, M.H. ve Jennings, K.R., (2002), "Iron and Copper Chelation by Flavonoids: An Electrospray Mass Spectrometry Study", *J Inorg Biochem*, 92: 105–111.
- [23] Fiorani, M.T., De Sancitis, R., De Bellis, R. ve Dacha, M., (2002), "Intracellular Flavonoids as Electron Donors for Extracellular Ferricyanide Reduction in Human Erythrocytes", *Free Radic Biol Med*, 32: 64–72.

- [24] Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. ve Paganga, G., (1996), "Structure–Antioxidant Activity Relationships of Flavonoids and Phenolic Acids", *Free Radic Biol Med*, 20: 933–956.
- [25] Chio, S.- H., (1983), "DNA- and Protein-Scission Activities of Ascorbate in the Presence of Copper Ion and a Copper-Peptide Complex", *J Biochem*, 94: 1259–1267.
- [26] Boots, A., Haenen, G.R.M. ve Bast, A., (2008), "Health Effects of Quercetin: from Antioxidant to Nutraceutical", *Eur J Pharmacol*, 583: 325–337.
- [27] Biesaga, M. ve Pyrzynska, K., (2009), "Analytical Procedures for Determination of Quercetin and its Glycosides in Plant Material Using Separation Techniques", *Crit Rev Anal Chem*, 39: 95–107.
- [28] Pekal, A., Biesaga, M. ve Pyrzynska, K., (2010), "Interaction of Quercetin with Copper Ions: Complexation, Oxidation and Reactivity Towards Radicals", *Biometals*, online publication, DOI 10.1007/s10534-010-9372-7.
- [29] El-Hajji, H., Nkhili, E., Tomao, V.O. ve Dangles, O., (2006), "Interactions of Quercetin with Iron and Copper Ions: Complexation and Autooxidation", *Free Radic Res*, 40: 303–320.
- [30] Brown, J.E., Khodr, H., Hider, R.C. ve Rice-Evans, C.A., (1998), "Structural Dependence of Flavonoid Interactions with Cu²⁺ Ions: Implications for Their Antioxidant Properties", *Biochem J*, 330: 1173–1178.
- [31] Bukhari, S.B., Memon, S., Mahroof-Tahir, M. ve Bhanger, M.I., (2009), "Synthesis, Characterization and Antioxidant Activity Copper–Quercetin Complex", *Spectrochim Acta Part A*, 71: 1901–1906.
- [32] Mira, L., Fernandez, M.T., Santos, M., Rocha, R., Florencio, M.H. ve Jennings, K.R., (2002), "Interactions of Flavonoids with Iron and Copper Ions: a Mechanism for Their Antioxidant Activity", *Free Radic Res*, 36: 1199–1208.
- [33] Escander, G.M. ve Sala, L.F., (1991), "Complexing Behavior of Rutin and Quercetin", *Can J Chem*, 69: 1994-2001.
- [34] Torregiani, A, Tamba, M., Trincherro, A. ve Bonara, S., (2005), "Copper(II)–Quercetin Complexes in Aqueous Solutions: Spectroscopic and Kinetic Properties", *Mol Struct*, 744: 759–766.
- [35] Makris, D.P. ve Rossiter, J.T., (2002), "Effect of Natural Antioxidants on Heat-Induced, Copper(II)-Catalysed, Oxidative Degradation of Quercetin and Rutin (Quercetin 3- *O*-Rutinoside) in Aqueous Model Systems", *J Sci Food Agric*, 82: 1147- 1153.
- [36] Kumamoto, M., Sonda, T., Nagayama, K. ve Tabata, M., (2001), "Effects of pH and Metal Ions on Antioxidative Activities of Catechin", *Biosci Biotechnol Biochem*, 65 (1): 126– 132.
- [37] Teixeira, S., Siquet, C., Alves, C., Boal, I., Marques, M.P., Borges, F., Lima, J.L.F.C. ve Reis, S., (2005), "Structure- Property Studies on the Antioxidant Activity of Flavonoids Present in Diet", *Free Radic Biol Med*, 39: 1099-1108.

- [38] Panhwar, Q.K., Memon, S. ve Bhanger, M.I., (2010), "Synthesis, Characterization, Spectroscopic and Antioxidation Studies of Cu(II)-Morin Complex", *J Mol Struct*, 967: 47-53.
- [39] Herrero- Martinez, J.M., Repolles, C., Bosch, E., Roses, M. ve Rafols, C., (2008), "Potentiometric Determination of Aqueous Dissociation Constants of Flavonols Sparingly Soluble in Water", *Talanta*, 74: 1008–1013.
- [40] Jadhav, S.J., Nimbalkar, S.S., Kulkarni, A.D. ve Madhavi, D.L., (1996), "Lipid Oxidation in Biological and Food Systems. In Food Antioxidants", Madhavi, D.L., Deshpande, S.S., Salunkhe, D. K., Eds.; Dekker: New York, 5-63.
- [41] Frankel, E.N., (1993), "In Search of Better Methods to Evaluate Natural Antioxidants and Oxidative Stability in Food Lipids", *Trends Food Sci Technol*, 4: 220-225.
- [42] Burkitt, M.J., (2001), "A Critical Overview of the Chemistry of Copper-Dependent Low Density Lipoprotein Oxidation: Roles of Lipid Hydroperoxides, α -tocopherol, and Cu(II)", *Arch Biochem Biophys*, 394: 117-135.
- [43] McClements, D.J., Decker E.A., (2000), "Lipid Oxidation in Oil-in-water Emulsions: Impact of Molecular Environment on Chemical Reactions in Heterogeneous Food Systems", *J Food Sci*, 65 (8): 1270- 1282.
- [44] Miyashita, K., Azuma, G. ve Ota, T., (1995), "Oxidative Stability of Geometric and Positional Isomers of Unsaturated Fatty Acids an Aqueous Solution", *J Jap Oil Chem Soc*, 44: 425-430.
- [45] Ke, Pj., Ackman, Rg., (1973), "Bunsen Coefficient for Oxygen in Marin Oils at Various Temperatures Determined by Exponentials Dilution Method with a Polarographic Oxygen Electrode", *J Am Oil Chem Soc*, 50: 429-435.
- [46] Marcuse, R. ve Fredriksson, P.O., (1968), "Fat Oxidation at Low Oxygen Pressure. I. Kinetic Studies on the Rate of Fat Oxidation in Emulsions", *J Am Oil Chem Soc*, 45: 400–407.
- [47] Marcuse, R., Fredriksson, P.O. (1969), "Fat Oxidation at Low Oxygen Pressure: II. Kinetic Studies on Linoleic Acid Oxidation in Emulsions in the Presence of Antioxidants", *J Am Oil Chem Soc*, 46: 262–268.
- [48] Marcuse, R., Fredricksson. P.O., (1971), "Fat Oxidation at Low Oxygen Pressure: III. Kinetic Studies on Linoleic Acid Oxidation in Emulsions in the Presence of Added Metal Salts", *J Am Oil Chem Soc*, 48(9): 448-451.
- [49] Ueda, J., Anzai K., Miura Y. ve Ozawa, T., (1999), "Oxidation of Linoleic Acid by Copper Complexes: Effects of Ligand ", *J Inorg Biochem*, 76: 55-62.
- [50] Haase, G. ve Dunkley, W.L., (1969), "Ascorbic Acid and Copper in Linoleate Oxidation. II. Ascorbic Acid and Copper as Oxidation Catalysts", *J Lipid Res*, 10: 561–567.
- [51] Kritharides, L., (1999), "Ascorbic Acid and Copper in Linoleate Oxidation—Dunkley revisited", *Redox Report*, 4: 259–262.

- [52] Cuvelier, M.E., Bondet, V., ve Berset, C., (2000), "Behavior of Phenolic Antioxidants in a Partitioned Medium: Structure-Activity Relationship", *JAOCS*, 77: 819-823.
- [53] Torel, J., Cillard, J. ve Cillard, P., (1986), "Antioxidant Activity of Flavonoids and Reactivity with Peroxy Radical", *Phytochem*, 25: 383–385.
- [54] Wang, P.F. ve Zheng, R.L., (1992), "Inhibitions of the Autooxidation of Linoleic Acid by Flavonoids in Micelles", *Chem Phys Lipids*, 63: 37–40.
- [55] Foti, M., Piattelli, M., Baratta, M.T. ve Ruberto, G., (1996), "Flavonoids, Coumarins, Cinnamic Acids as Antioxidants in a Micellar System. Structure-Activity Relationship", *J Agric Food Chem*, 44: 497-501.
- [56] Filipe, P., Haigle, J., Silva, J.N., Freitas, J., Fernandes, A., Maziere, J.-C., Maziere, C., Santus, R. ve Morliere, P., (2004), "Anti- and Pro-oxidant Effects of Quercetin in Copper-Induced Low Density Lipoprotein Oxidation", *Eur J Biochem*, 271: 1991- 1999.
- [57] Zhu, Q.Y., Huang, Y., Chen ve Z.-Y., (2000), "Interaction Between Flavonoids and α -Tocopherol in Human Low Density Lipoprotein", *J Nutr Biochem*, 11: 14 –21.
- [58] Pekkarinen, S.S., Stockmann, H., Schwarz, K., Heinonen, I.M. ve Hopia, A.I., (1999), "Antioxidant Activity and Partitioning of Phenolic Acids in Bulk and Emulsified Methyl Linoleate", *J Agr Food Chem*, 47: 3036–3043.
- [59] Yıldığan-Beker, B., Sönmezoğlu, İ., İmer, F. ve Apak, R., (2011), "Protection of Ascorbic Acid from Copper (II)–Catalyzed Oxidative Degradation in the Presence of Flavonoids: Quercetin, Catechin and Morin", *Int J Food Sci Nutr*, 62(5): 504-512.
- [60] Boadi, W.Y., Iyere, P.A. ve Adunyah, S.E., (2003), "Effect of Quercetin and Genistein on Copper- and Iron- Induced Lipid Peroxidation in Methyl Linoleate", *J App Toxicol*, 23: 363-369.
- [61] Lea, C.H., (1952), "Methods for Determining Peroxide in Lipids", *J Sci Food Agric*, 12(3): 586-594.
- [62] Mihaljevic, B., Katusin-Razem ve B., Razem, D., (1996), "The Reevaluation of the Ferric Thiocyanate Assay for Lipid Hydroperoxides with Special Considerations of the Mechanistic Aspects of the Response", *Free Radical Bio Med*, 21(1): 53-63.
- [63] Fukumoto, L.R. ve Mazza, G., (2000), "Assesing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds", *J Agr Food Chem*, 48: 3597-3604.
- [64] Cao, G., Sofic, E. ve Prior, R.L., (1997), "Antioxidant and Prooxidant Behavior of Flavonoids: Structure-Activity Relationships", *Free Radic Bio Med*, 22(5): 749-760.
- [65] Yen, G.-C., Chen, H.-Y. ve Peng, H.-H., (1997), "Antioxidant and Prooxidant Effects of Various Tea Extracts", *J Agric Food Chem*, 45: 30-34.

- [66] Wanasundara, U.N. ve Shahidi, F., (1998), "Antioxidant and Pro-oxidant Activity of Green Tea Extracts in Marine Oils", *Food Chem*, 63: 335-342.
- [67] Pinchuk, I. ve Lichtenberg D., (2002), "The Mechanism of Action of Antioxidants Against Lipoprotein Peroxidation, Evaluation Based on Kinetic Experiments", *Progress Lipid Res*, 41: 279–314.
- [68] Özilgen, S. ve Özilgen M., (1990), "Kinetic Model of Lipid Oxidation in Foods", *J Food Sci*, 55: 498–536.
- [69] Watanabe, Y., Ishido, E., Fang, X., Adachi, S. ve Matsuno, R., (2005), "Oxidation Kinetics of Linoleic Acid in the Presence of Saturated Acyl L-Ascorbate", *JAOCS*, 82: 389-392.
- [70] Cermak, R. ve Wolfram, S., (2006), "The Potential of Flavonoids to Influence Drug Metabolism and Pharmacokinetics by Local Gastrointestinal Mechanisms", *Curr Drug Metab*, 7: 729-744.
- [71] Özyürek, M., Güçlü, K., Bektasoğlu, B. ve Apak, R., (2007), "Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid by the Modified CUPRAC Method With Extractive Separation of Flavonoids–La(III) Complexes", *Anal Chim Acta*, 588: 88-95.
- [72] Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., (1998), *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press: Oxford.
- [73] Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., (2005), "The Chemistry Behind Antioxidant Capacity Assays", *J Agric Food Chem*, 53 (6):1841–1856.
- [74] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Çelik, S.E., (2008), "Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay", *Microchim Acta*, 160: 413-419.
- [75] Keskin, H., (1987), *Besin Kimyası*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, 3450, İstanbul.
- [76] *The Merck Index*, (1989), (11th Ed.), Merck and Co., Inc. Rahway, New York.
- [77] Ottoway, P.B., (1993), *The Tecnology of Vitamins in Food*, Hardnolls Ltd.,Glasgow.
- [78] Fung, Y-S., Luk, S-F., (1985), "Determination of Ascorbic Acid in Soft Drinks and Fruit Juices.Part 1. Background Correction for Direct Ultraviolet Spectrophotometry", *Analyst*, 110: 201-204.
- [79] Farkas, O., Jakus, J., Heberger, K., (2004), "Quantitative Structure- Antioxidant Activity Relationships of Flavonoid Compounds", *Molecules*, 9:1079-1088.
- [80] Jovanovic, S.V., Steenken, S., Tosic, M., Marjanovic, B. ve Simic, M., (1994), "Flavonoids as Antioxidants", *J Am Chem Soc*, 116: 4846-4851.
- [81] Erdik, E., (1993), *Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler*, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.
- [82] Skoog, A.D., Holler, J.F. ve Nieman, T.A., (1998), *Principals of Instrumental Analysis*, Itarcourd Brace & Company, Florida.

- [83] Lau, O.-W., Luk S.-F. ve Wong K.-S.(1986), "Background Correction Method for the Determination of Ascorbic Acid in Soft Drinks, Fruit Juices and Cordials Using Direct Ultraviolet Spectrophotometry", *Analyst*, 111:665-670.
- [84] Güçlü, K., Sözgen, K., Tütem, E., Özyürek, M. ve Apak, R., (2005), "Spectrophotometric Determination of Ascorbic Acid Using Copper(II)-Neocuproine Reagent in Beverages and Pharmaceuticals", *Talanta*, 65:1226-1232.
- [85] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S.E., (2004), "A Novel Total Antioxidant Capacity Index for Dietary Polyphenols, Vitamins C and E, Using Their Cupric ion reducing capability in the Presence of Neocuproine: CUPRAC Method", *J Agric Food Chem*, 52: 7970-7981.
- [86] Castellan, G.W., (1971), *Physical Chemistry*, Second Edition, London.
- [87] Hsieh, Y.- H.P. ve Harris, N.D., (1993)," Effect of Sucrose on Oxygen Uptake of Ascorbic Acid in a Closed Aqueous System", *J Agric Food Chem*, 41: 259-262.
- [88] Yen, G.-C. ve Hsieh C.-L., (1998), "Antioxidant Activity of Extracts from *Du-zhong (Eucommia ulmoides)* Toward Various Lipid Peroxidation Models in Vitro", *J Agr Food Chem*, 46: 3952- 3957.
- [89] Harvey, A.E. ve Manning, D.L., (1950), "Spectrophotometric Methods of Establishing Empirical Formulas of Colored Complexes in Solution", *J Am Chem Soc*, 72: 4488–4493.
- [90] Miller, J.C. ve Miller, J.N., (1993), *Statistics for Analytical Chemistry*, 3rd. Ed. Ellis Horwood, Prentice
- [91] Weast, R.C., (1982), *CRC Handbook of Chemistry and Physics* ; 62 nd ed. Chemical Rubber Co. Florida.
- [92] Bondet, V., Cuvelier, M.E. ve Berset, C., (2000), "Behavior of Phenolic Antioxidants in a Partitioned Medium: Focus on Linoleic Acid Peroxidation Induced by Iron/Ascorbic Acid System", *JAACS*, 77: 813-819.
- [93] Pinchuk, I., Schnitzer, E. ve Lichtenberg, D., (1998), "Kinetic Analysis of Copper-Induced Peroxidation of LDL", *Biochim Biophys Acta*, 1389: 155–172.
- [94] Retsky, K.L., Chen, K., Zeind , J. ve Frei, B., (1999), "Inhibition of Copper-Induced LDL Oxidation by Vitamin C is Associated With Decreased Copper-binding to LDL and 2-Oxohistidine Formation", *Free Radic Biol Med*, 26: 90–98.
- [95] Sugihara, N., Arakawa, T., Ohnishi, M. ve Furuno, K., (1999), "Anti- and Pro-oxidative Effects of Flavonoids on Metal-Induced Lipid Hydroperoxide-Dependent Lipid Peroxidation in Cultured Hepatocytes Loaded with α -Linolenic Acid", *Free Radical Biol Med*, 27: 1313–1323.
- [96] Sugihara, N., Ohnishi, M., Imamura, M. ve Furuno, K., (2001), "Differences in Antioxidative Efficiency of Catechins in Various Metal-Induced Lipid Peroxidations in Cultured Hepatocytes", *J Health Sci*, 47: 99–106.

- [97] Roland, A., Patterson, R.A ve Leake D.S., (2001), "Measurement of Copper Binding Sites on Low Density Lipoprotein", *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 21: 594–602.
- [98] Jovanovic, S.V. ve Simic, M.G., (2006), "Reactive Oxygen Species: From Radiation to Molecular Biology": A festschrift in honor of Daniel L. Gilbert. p. 326-334 (in: *Annals of the New York Academy of Sciences*, Wiley, 2006, Vol. 899).
- [99] Shahidi, F. ve Zhong, Y., (2011), "Revisiting the Polar Paradox Theory: A Critical Overview", *J Agric Food Chem*, 59(8): 3499-3504.
- [100] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I. ve Özyurt, D., (2007), "Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay", *Molecules*, 12: 1496-1547.
- [101] Fukuhara, K., Nakanishi, I., Kansui, H., Sugiyama, E., Kimura, M., Shimada, T., Urano, S., Yamaguchii, K. ve Miyata, N., (2002), "Enhanced Radical-Scavenging Activity of a Planar Catechin Analogue", *J Am Chem Soc*, 124: 5952-5953.
- [102] Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. ve Bobilya, D.J., (2002), "Flavonoid Antioxidants: Chemistry, Metabolism, and Structure–Activity Relationships", *J Nutr Biochem*, 13: 572–584.
- [103] Jorgensen, L.V. ve Skibsted, L.H., (1998), "Flavonoid Deactivation of Ferrylmyoglobin in Relation to Ease of Oxidation as Determined by Cyclic Voltammetry", *Free Rad Res*, 28: 335-351.
- [104] Kilmartin, P.A., Zou, H. ve 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.
- [105] Pietta, P., Simonetti, P., Gardana, C., Brusamolino, A., Morazzoni, P. ve Bombardelli, E., (1998), "Relationship Between Rate and Extent of Catechin Absorption and Plasma Antioxidant Status", *Biochem Mol Biol Int*, 46: 895-903.
- [106] Waterman, K.C. ve Roy, M.C., (2002), "Use of Oxygen Scavengers to Stabilize Solid Pharmaceutical Dosage Forms: A Case Study", *Pharm Dev Technol*, 7: 227-234.
- [107] Ghosal, S., (2001), Stabilization of Vitamin C. US Patent 6, 235, 721 B1.
- [108] Chen, Z.-Y., Zhu, Q.Y., Wong, Y.F., Zhang, Z. ve Chung, H.Y., (1998), "Stabilizing Effect of Ascorbic Acid on Green Tea Catechins", *J Agric Food Chem*, 46: 2512-2516.
- [109] Coupland, J.N., McClements, D.J., (1996), "Lipid Oxidation in Food Emulsions", *Trends Food Sci Technol*, 7: 83-91.
- [110] Malesev, D. ve Kuntic, V., (2007), "Investigation of Metal-Flavonoid Chelates and the Determination of Flavonoids via Metal-Flavonoid Complexing Reactions", *J Serbian Chem Soc*, 72(10): 921-940.

- [111] Kennedy, J.A., Munro, M.H. G., Powell, H.K.J., Porter, L.J. ve Foo, L.Y., (1984), "The Protonation Reactions of Catechin, Epicatechin and Related Compounds", Australian J Chem, 37(4): 885-892.

DİFERANSİYEL EŞİTLİK İNTEGRASYONU

$$\int \frac{dC}{C \left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C \right)} = k \int dt \quad (\text{A.1})$$

$$\frac{1}{C \left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C \right)} = \frac{A}{C} + \frac{B}{\left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C \right)} = \frac{A - \frac{A}{C_{\max}} \cdot C + B C}{C \left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C \right)} = \frac{A + \left(B - \frac{A}{C_{\max}} \right) \cdot C}{C \left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C \right)} \quad (\text{A.2})$$

$$A + \left(B - \frac{A}{C_{\max}} \right) \cdot C = 1 \quad (\text{A.3})$$

$$A=1 \quad (\text{A.4})$$

$$B - \frac{A}{C_{\max}} = 0 \quad B = \frac{1}{C_{\max}} \quad (\text{A.5})$$

$$\int \frac{1}{C \left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C \right)} \cdot dC = \int \frac{1}{C} \cdot dC + \int \frac{\frac{1}{C_{\max}}}{\left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C \right)} \cdot dC \quad (\text{A.6})$$

$$\ln C \Big|_{C_0}^{CT} + \left[-\frac{1}{C_{\max}} \ln \left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C \right) \right] \Big|_{C_0}^{CT} = k \cdot t \quad (\text{A.7})$$

$$LnC_T - LnC_0 + \left(-\frac{1}{C_{\max}}\right) \left[Ln\left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C_T\right) - Ln\left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C_0\right) \right] = k \cdot t \quad (A.8)$$

$$Ln\frac{C_T}{C_0} - \frac{1}{C_{\max}} \cdot Ln\left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C_T\right) + \frac{1}{C_{\max}} \cdot Ln\left(1 - \frac{1}{C_{\max}} \cdot C_0\right) = k \cdot t \quad (A.9)$$

$$Ln\frac{C_T}{C_0} + \frac{1/C_{\max}}{1/C_{\max}} \cdot Ln\left[\frac{\left(1 - \frac{C_0}{C_{\max}}\right)}{\left(1 - \frac{C_T}{C_{\max}}\right)}\right] = Ln\left[\frac{C_T}{C_0} \cdot \frac{\left(1 - \frac{C_0}{C_{\max}}\right)}{\left(1 - \frac{C_T}{C_{\max}}\right)}\right] = k \cdot t \quad (A.10)$$

$$Ln\frac{C_T}{1 - \frac{C_T}{C_{\max}}} = Ln\frac{C_0}{1 - \frac{C_0}{C_{\max}}} + k \cdot t \quad (A.11)$$

$$Ln\frac{1 - \frac{C_T}{C_{\max}}}{C_T} = Ln\frac{1 - \frac{C_0}{C_{\max}}}{C_0} - k \cdot t \quad (A.12)$$

$$A_T = \varepsilon \cdot C_T \quad (l=1 \text{ için}) \quad (A.13)$$

$$C_T = \frac{A_T}{\varepsilon} \quad C_{\max} = \frac{A_{\max}}{\varepsilon} \quad (A.14)$$

$$Ln\frac{1 - \frac{A_T/\varepsilon}{A_{\max}/\varepsilon}}{A_T/\varepsilon} = Ln\frac{1 - \frac{A_0/\varepsilon}{A_{\max}/\varepsilon}}{A_0/\varepsilon} - k \cdot t \quad (A.15)$$

$$Ln\frac{1 - \frac{A_T}{A_{\max}}}{A_T/\varepsilon} = Ln\frac{1 - \frac{A_0}{A_{\max}}}{A_0/\varepsilon} - k \cdot t \quad (A.16)$$

$$A_{\max} = 1 \quad (A.17)$$

$$Ln \frac{1-A_T}{A_T/\varepsilon} = Ln \frac{1-A_0}{A_0/\varepsilon} - k \cdot t \quad (\text{A.18})$$

$$\frac{\varepsilon(1-A_T)}{A_T} = \frac{\varepsilon(1-A_0)}{A_0} \cdot e^{-k \cdot t} \quad (\text{A.19})$$

$$Ln \left(\frac{1-A_T}{A_T} \right) = Ln \left(\frac{1-A_0}{A_0} \right) - k \cdot t \quad (\text{A.20})$$

HESAPLAMALAR

pH 4,5 (Çizelge 4.9)

QR için hesap

$$\text{pH}=4,5 \text{ için } [H^+] = 3,16 \times 10^{-7} \quad (\text{B.1})$$

$$\text{QR için } \text{pK}_{a1}=5,7 \quad K_{a1}=1,99 \times 10^{-6} \quad (\text{B.2})$$

$$\text{pK}_{a2}=7,1 \quad K_{a2}=7,94 \times 10^{-8} \quad (\text{B.3})$$

$$\log \beta_1 = 5,87 \text{ ise } \beta_1 = 7,4 \times 10^5 \quad (\text{B.4})$$

$$\log \beta_2 = 7,37 \text{ ise } \beta_2 = 2,34 \times 10^7 \quad (\text{B.5})$$

$$\alpha_L = \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2 + K_{a1} \cdot [H^+] + K_{a1} \cdot K_{a2}} \quad (\text{B.6})$$

$$\alpha_L = \frac{(1,99 \times 10^{-6}) \cdot (7,94 \times 10^{-8})}{(3,16 \times 10^{-5})^2 + (1,99 \times 10^{-6}) \times (3,16 \times 10^{-5}) + (1,99 \times 10^{-6}) \cdot (7,94 \times 10^{-8})} \quad (\text{B.7})$$

$$\alpha_L = \frac{15,80 \times 10^{-14}}{9,98 \times 10^{-10} + 0,6288 \times 10^{-10} + 1,58 \times 10^{-13}} = \frac{1,58 \times 10^{-13}}{1,061 \times 10^{-9} + 1,58 \times 10^{-13}} \quad (\text{B.8})$$

$$\alpha_L = \frac{1,58 \times 10^{-13}}{1,061 \times 10^{-9}} = 1,49 \times 10^{-4} \quad (\text{B.9})$$

$$\beta_1' = \beta_1 \cdot \alpha_L = 7,4 \times 10^5 \times (1,49 \times 10^{-4}) = 110,26 \text{ ise } \text{Log } \beta_1' = 2,0414 \quad (\text{B.10})$$

MR için hesap

$$\text{pH}=4,5 \text{ için } [H^+] = 3,16 \times 10^{-7} \quad (\text{B.11})$$

$$\text{MR için } \text{pKa}_1=5,0 \quad \text{Ka}_1=1,0 \times 10^{-5} \quad (\text{B.12})$$

$$\text{pKa}_2=8,29 \quad \text{Ka}_2=5,13 \times 10^{-9} \quad (\text{B.13})$$

$$\log \beta_1 = 4,94 \text{ ise } \beta_1 = 8,7 \times 10^4 \quad (\text{B.14})$$

$$\log \beta_2 = 13,42 \text{ ise } \beta_2 = 2,63 \times 10^{13} \quad (\text{B.15})$$

$$\alpha_L = \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2 + K_{a1} \cdot [H^+] + K_{a1} \cdot K_{a2}} \quad (\text{B.16})$$

$$\alpha_L = \frac{(1,02 \times 10^{-5}) \cdot (5,12 \times 10^{-9})}{(3,16 \times 10^{-5})^2 + (1,02 \times 10^{-6}) \times (3,16 \times 10^{-5}) + (1,02 \times 10^{-5}) \cdot (5,12 \times 10^{-9})} \quad (\text{B.17})$$

$$\alpha_L = \frac{5,12 \times 10^{-14}}{9,98 \times 10^{-10} + 3,16 \times 10^{-10} + 5,12 \times 10^{-14}} = \frac{5,12 \times 10^{-14}}{1,314 \times 10^{-9} + 5,12 \times 10^{-14}} \quad (\text{B.18})$$

$$\alpha_L = \frac{5,12 \times 10^{-14}}{1,314 \times 10^{-9}} = 3,90 \times 10^{-5} \quad (\text{B.19})$$

$$\beta_1' = \beta_1 \cdot \alpha_L = 8,7 \times 10^4 \times (3,90 \times 10^{-5}) = 3,39 \text{ ise } \text{Log } \beta_1' = 0,530 \quad (\text{B.20})$$

CT için hesap

$$\text{pH}=4,5 \text{ için } [H^+] = 3,16 \times 10^{-7} \quad (\text{B.21})$$

$$\text{CT için } \text{pKa}_1=8,64 \quad \text{Ka}_1=2,29 \times 10^{-9} \quad (\text{B.22})$$

$$\text{pKa}_2=9,41 \quad \text{Ka}_2=3,89 \times 10^{-10} \quad (\text{B.23})$$

$$\log \beta_1 = 7,91 \text{ ise } \beta_1 = 8,12 \times 10^7 \quad (\text{B.24})$$

$$\log \beta_2 = 15,88 \text{ ise } \beta_2 = 7,59 \times 10^{15} \quad (\text{B.25})$$

$$\alpha_L = \frac{(2,29 \times 10^{-9}) \cdot (3,89 \times 10^{-10})}{(3,16 \times 10^{-5})^2 + (2,29 \times 10^{-9}) \times (3,16 \times 10^{-5}) + (2,29 \times 10^{-9}) \cdot (3,89 \times 10^{-10})} \quad (\text{B.26})$$

$$\alpha_L = \frac{8,91 \times 10^{-19}}{9,98 \times 10^{-10} + 7,236 \times 10^{-14} + 8,91 \times 10^{-19}} = \frac{8,91 \times 10^{-19}}{9,981 \times 10^{-10}} = 8,91 \times 10^{-10} \quad (\text{B.27})$$

$$\beta_1' = \beta_1 \cdot \alpha_L = 8,12 \times 10^7 \times (8,91 \times 10^{-10}) = 0,07234 \text{ ise } \text{Log } \beta_2' = -1,140 \quad (\text{B.28})$$

Yüzde İnhibisyon ve ortalama yüzde spesifik inhibisyon (I_s)

$$\text{Yüzde İnhibisyon (\% I)} = \left[\frac{(k_0 - k_1)}{k_0} \right] \times 100 \quad I_s = \frac{I}{C} \quad (\text{B.29})$$

1 x 10⁻⁴ M QR için

$$\% I = \left[\frac{(11,0 - 3,56)}{11,0} \right] \times 100 = 67,64 \quad \% I_s = \frac{67,64}{1 \times 10^{-4}} = 6,76 \times 10^5 \quad (\text{B.30})$$

1 x 10⁻⁴ M MR için

$$\% I = \left[\frac{(11,0 - 4,19)}{11,0} \right] \times 100 = 61,91 \quad \% I_s = \frac{61,91}{1 \times 10^{-4}} = 6,19 \times 10^5 \quad (\text{B.31})$$

1 x 10⁻⁴ M CT için

$$\% I = \left[\frac{(11,0 - 6,99)}{11,0} \right] \times 100 = 36,45 \quad \% I_s = \frac{36,45}{1 \times 10^{-4}} = 3,65 \times 10^5 \quad (\text{B.32})$$

1 x 10⁻⁴ M (QR+MR) için

$$\% I = \left[\frac{(11,0 - 3,55)}{11,0} \right] \times 100 = 67,73 \quad \% I_s = \frac{67,73}{1 \times 10^{-4}} = 6,77 \times 10^5 \quad (\text{B.33})$$

$1 \times 10^{-4} \text{ M (QR+CT) için}$

$$\% I = \left[\frac{(11,0 - 2,12)}{11,0} \right] \times 100 = 80,73 \quad \% I_s = \frac{80,73}{1 \times 10^{-4}} = 8,07 \times 10^5 \quad (\text{B.34})$$

$1 \times 10^{-4} \text{ M (MR+CT) için}$

$$\% I = \left[\frac{(11,0 - 2,98)}{11,0} \right] \times 100 = 72,91 \quad \% I_s = \frac{72,91}{1 \times 10^{-4}} = 7,29 \times 10^5 \quad (\text{B.35})$$

$1 \times 10^{-4} \text{ M (QR+MR+CT) için}$

$$\% I = \left[\frac{(11,0 - 4,48)}{11,0} \right] \times 100 = 59,27 \quad \% I_s = \frac{59,27}{1 \times 10^{-4}} = 5,93 \times 10^5 \quad (\text{B.36})$$

pH 7 (Çizelge 4.18)

QR için hesap

$$\text{pH}=7 \text{ için } [H^+] = 10^{-7} \quad (\text{B.37})$$

$$\text{QR için } \text{pK}_{a1}=5,7 \quad K_{a1}=1,99 \times 10^{-6} \quad (\text{B.38})$$

$$\text{pK}_{a2}=7,1 \quad K_{a2}=7,94 \times 10^{-8} \quad (\text{B.39})$$

$$\log \beta_1 = 5,87 \text{ ise } \beta_1 = 7,4 \times 10^5 \quad (\text{B.40})$$

$$\log \beta_2 = 7,37 \text{ ise } \beta_2 = 2,34 \times 10^7 \quad (\text{B.41})$$

$$\alpha_L = \frac{K_{a1} \cdot K_{a2}}{[H^+]^2 + K_{a1} \cdot [H^+] + K_{a1} \cdot K_{a2}} \quad (\text{B.42})$$

$$\alpha_L = \frac{(1,99 \times 10^{-6}) \cdot (7,94 \times 10^{-8})}{(10^{-7})^2 + (1,99 \times 10^{-6}) \times 10^{-7} + (1,99 \times 10^{-6}) \cdot (7,94 \times 10^{-8})} \quad (\text{B.43})$$

$$\alpha_L = \frac{15,80 \times 10^{-14}}{10^{-14} + 1,99 \times 10^{-13} + 1,58 \times 10^{-13}} = \frac{1,58 \times 10^{-13}}{(0,1 + 1,99 + 1,58) \times 10^{-13}} = \frac{1,58}{3,67} = 0,430 \quad (\text{B.44})$$

$$\beta_2' = \beta_2 \cdot \alpha^2_L = 2,34 \times 10^7 \times (0,43)^2 = 4,33 \times 10^6 \text{ ise } \text{Log } B_2' = 6,64 \quad (\text{B.45})$$

MR için hesap

$$\text{pH}=7 \text{ için } [H^+] = 10^{-7} \quad (\text{B.46})$$

$$\text{MR için } \text{pK}_{a1}=5,0 \quad K_{a1}=1,0 \times 10^{-5} \quad (\text{B.47})$$

$$\text{pK}_{a2}=8,29 \quad K_{a2}=5,13 \times 10^{-9} \quad (\text{B.48})$$

$$\log \beta_1 = 4,94 \text{ ise } \beta_1 = 8,7 \times 10^4 \quad (\text{B.49})$$

$$\log \beta_2 = 13,42 \text{ ise } \beta_2 = 2,63 \times 10^{13} \quad (\text{B.50})$$

$$\alpha_L = \frac{(1,0 \times 10^{-5}) \cdot (5,13 \times 10^{-9})}{(10^{-7})^2 + (1,0 \times 10^{-5}) \times 10^{-7} + (1,0 \times 10^{-5}) \cdot (5,13 \times 10^{-9})} \quad (\text{B.51})$$

$$\alpha_L = \frac{5,13 \times 10^{-14}}{10^{-14} + 1,0 \times 10^{-12} + 5,13 \times 10^{-14}} = \frac{5,13 \times 10^{-14}}{(1 + 100 + 5,13) \times 10^{-14}} = \frac{5,13}{106,13} = 0,048 \quad (\text{B.52})$$

$$\beta_2' = \beta_2 \cdot \alpha^2_L = 2,63 \times 10^{13} \times (0,048)^2 = 6,06 \times 10^{10} \text{ ise } \text{Log } B_2' = 10,78 \quad (\text{B.53})$$

CT için hesap

$$\text{pH}=7 \text{ için } [H^+] = 10^{-7} \quad (\text{B.54})$$

$$\text{CT için } \text{pK}_{a1}=8,64 \quad K_{a1}=2,29 \times 10^{-9} \quad (\text{B.55})$$

$$\text{pK}_{a2}=9,41 \quad K_{a2}=3,89 \times 10^{-10} \quad (\text{B.56})$$

$$\log \beta_1 = 7,91 \text{ ise } \beta_1 = 8,12 \times 10^7 \quad (\text{B.57})$$

$$\log \beta_2 = 15,88 \text{ ise } \beta_2 = 7,59 \times 10^{15} \quad (\text{B.58})$$

$$\alpha_L = \frac{(2,29 \times 10^{-9}) \cdot (3,89 \times 10^{-10})}{(10^{-7})^2 + (2,29 \times 10^{-9}) \times 10^{-7} + (2,29 \times 10^{-9}) \cdot (3,89 \times 10^{-10})} \quad (\text{B.59})$$

$$\alpha_L = \frac{8,91 \times 10^{-19}}{10^{-14} + 2,29 \times 10^{-16} + 8,91 \times 10^{-19}} = \frac{8,91 \times 10^{-19}}{10^{-14}} = 8,91 \times 10^{-5} \quad (\text{B.60})$$

$$\beta_2' = \beta_2 \cdot \alpha^2_L = 7,59 \times 10^{15} \times (8,91 \times 10^{-5})^2 = 5,95 \times 10^7 \text{ ise } \text{Log } \beta_2' = 7,77 \quad (\text{B.61})$$

Yüzde İnhibisyon ve ortalama yüzde spesifik inhibisyon (I_s) (Çizelge 4.16, 4.17 ve 4.18)

1×10^{-2} M LA + Farklı Bakır Konsantrasyonları (Çizelge 4.16)

$$\text{Yüzde İnhibisyon (\% I)} = \left[\frac{(k_0 - k_1)}{k_0} \right] \times 100 \quad I_s = \frac{I}{C} \quad (\text{B.62})$$

1×10^{-7} M Cu(II) için

$$\% I = \left[\frac{(0,302 - 0,164)}{0,302} \right] \times 100 = 45,58 \quad \% I_s = \frac{45,58}{1 \times 10^{-7}} = 4,5 \times 10^8 \quad (\text{B.63})$$

1×10^{-5} M Cu(II) için

$$\% I = \left[\frac{(0,302 - 0,190)}{0,302} \right] \times 100 = 37,13 \quad \% I_s = \frac{37,13}{1 \times 10^{-5}} = 3,7 \times 10^6 \quad (\text{B.64})$$

1×10^{-3} M Cu(II) için

$$\% I = \left[\frac{(0,302 - 1,010)}{0,302} \right] \times 100 = -233,70 \quad \% I_s = \frac{-203,70}{1 \times 10^{-3}} = -2,3 \times 10^5 \quad (\text{B.65})$$

1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M AA + Farklı Bakır Konsantrasyonları (Çizelge 4.16)

1×10^{-7} M Cu(II) için

$$\% I = \left[\frac{(2,29 - 3,01)}{2,29} \right] \times 100 = -31,4 \quad \% I_s = \frac{-31,4}{1 \times 10^{-7}} = -3,1 \times 10^8 \quad (\text{B.66})$$

1×10^{-5} M Cu(II) için

$$\% I = \left[\frac{(2,29 - 2,40)}{2,29} \right] \times 100 = -4,80$$

$$\% Is = \frac{-4,80}{1 \times 10^{-5}} = 4,8 \times 10^5 \quad (\text{B.67})$$

1×10^{-3} M Cu(II) için

Oksidasyon gerçekleşmedi.

1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu + Farklı AA Konsantrasyonları (Çizelge 4.16)

1×10^{-5} M AA için

$$\% I = \left[\frac{(1,01 - 1,85)}{1,01} \right] \times 100 = -83,17$$

$$\% Is = \frac{-83,17}{1 \times 10^{-5}} = -8,3 \times 10^6 \quad (\text{B.68})$$

5×10^{-5} M AA için

$$\% I = \left[\frac{(1,01 - 2,75)}{1,01} \right] \times 100 = -172,3$$

$$\% Is = \frac{-172,3}{5 \times 10^{-5}} = -3,4 \times 10^6 \quad (\text{B.69})$$

1×10^{-4} M AA için

$$\% I = \left[\frac{(1,01 - 1,90)}{1,01} \right] \times 100 = -88,12$$

$$\% Is = \frac{88,12}{1 \times 10^{-4}} = 8,8 \times 10^5 \quad (\text{B.70})$$

1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ Farklı Kuersetin Konsantrasyonları (Çizelge 4.17)

2×10^{-7} M QR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 1,53)}{2,75} \right] \times 100 = 44,5$$

$$\% Is = \frac{44,5}{2 \times 10^{-7}} = 2,2 \times 10^8 \quad (\text{B.71})$$

4×10^{-7} M QR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 2,26)}{2,75} \right] \times 100 = 17,9$$

$$\% Is = \frac{17,9}{4 \times 10^{-7}} = 4,5 \times 10^7 \quad (\text{B.72})$$

8×10^{-7} M QR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 1,83)}{2,75} \right] \times 100 = 33,5$$

$$\% Is = \frac{33,5}{8 \times 10^{-7}} = 4,2 \times 10^7 \quad (\text{B.73})$$

10×10^{-7} M QR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 3,07)}{2,75} \right] \times 100 = -11,7$$

$$\% Is = \frac{-11,7}{10 \times 10^{-7}} = -1,2 \times 10^7 \quad (\text{B.74})$$

1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ Farklı Morin Konsantrasyonları (Çizelge 4.17)

1×10^{-7} M MR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 2,01)}{2,75} \right] \times 100 = 26,9$$

$$\% Is = \frac{26,9}{1 \times 10^{-7}} = 2,6 \times 10^8 \quad (\text{B.75})$$

2×10^{-7} M MR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 2,13)}{2,75} \right] \times 100 = 22,5$$

$$\% Is = \frac{22,5}{2 \times 10^{-7}} = 1,1 \times 10^8 \quad (\text{B.76})$$

3×10^{-7} M MR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 1,19)}{2,75} \right] \times 100 = 56,7$$

$$\% Is = \frac{56,7}{3 \times 10^{-7}} = 1,9 \times 10^8 \quad (\text{B.77})$$

4×10^{-7} M MR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 1,07)}{2,75} \right] \times 100 = 61,1$$

$$\% Is = \frac{61,1}{4 \times 10^{-7}} = 1,5 \times 10^8 \quad (\text{B.78})$$

6×10^{-7} M MR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 0,99)}{2,75} \right] \times 100 = 64,0$$

$$\% Is = \frac{64,0}{6 \times 10^{-7}} = 1,1 \times 10^8 \quad (\text{B.79})$$

8×10^{-7} M MR için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 0,61)}{2,75} \right] \times 100 = 77,8 \quad \% Is = \frac{77,8}{8 \times 10^{-7}} = 9,7 \times 10^7 \quad (\text{B.80})$$

1×10^{-2} M LA + 1×10^{-3} M Cu(II) + 5×10^{-5} M AA+ Farklı Kateşin Konsantrasyonları (Çizelge 4.17)

1×10^{-7} M CT için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 1,86)}{2,75} \right] \times 100 = 32,4 \quad \% Is = \frac{32,4}{1 \times 10^{-7}} = 3,2 \times 10^8 \quad (\text{B.81})$$

2×10^{-7} M CT için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 2,39)}{2,75} \right] \times 100 = 13,1 \quad \% Is = \frac{13,1}{2 \times 10^{-7}} = 6,5 \times 10^7 \quad (\text{B.82})$$

3×10^{-7} M CT için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 1,80)}{2,75} \right] \times 100 = 34,5 \quad \% Is = \frac{34,5}{3 \times 10^{-7}} = 1,2 \times 10^8 \quad (\text{B.83})$$

4×10^{-7} M CT için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 2,97)}{2,75} \right] \times 100 = -8,0 \quad \% Is = \frac{-8,0}{4 \times 10^{-7}} = -2,0 \times 10^7 \quad (\text{B.84})$$

6×10^{-7} M CT için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 1,47)}{2,75} \right] \times 100 = 46,5 \quad \% Is = \frac{46,5}{6 \times 10^{-7}} = 7,8 \times 10^7 \quad (\text{B.85})$$

8×10^{-7} M CT için

$$\% I = \left[\frac{(2,75 - 1,88)}{2,75} \right] \times 100 = 31,6 \quad \% Is = \frac{31,6}{8 \times 10^{-7}} = 3,9 \times 10^7 \quad (\text{B.86})$$

Ortalama % I_s hesaplaması (Çizelge 4.18)

QR için:

$$\text{Ort \% I} = [(2,2 \times 10^8) + (4,5 \times 10^7) + (4,2 \times 10^7)] / 3 = 1,02 \times 10^8 \quad (\text{B.87})$$

MR için:

$$\text{Ort \% I} = [(2,6 \times 10^8) + (1,9 \times 10^8) + (1,5 \times 10^8) + (1,1 \times 10^8) + (9,7 \times 10^7)] / 5 = 1,61 \times 10^8 \quad (\text{B.88})$$

CT için:

$$\text{Ort \% I} = [(3,2 \times 10^8) + (1,2 \times 10^8) + (7,8 \times 10^7) + (3,9 \times 10^7)] / 4 = 1,39 \times 10^8 \quad (\text{B.89})$$

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Bilge YILDOĞAN BEKER
Doğum Tarihi ve Yeri : 23.01.1980/ Yahyalı
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : bilge_yildogan@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Kimya/Fizikokimya	Yıldız Teknik Üniversitesi	2006
Lisans	Kimya	İstanbul Üniversitesi	2004
Lise	Sayısal	Ataköy Hasan Polatkan Lisesi	1998

YAYINLARI

Makale

1. İmer F., Sönmezoğlu İ., **Yıldıoğan B.**, Kılıç H. ve Apak R., “Kinetic Study of Copper(II)- and Iron(II)-Catalyzed Oxidation of L-Ascorbic Acid in Aspartame-Containing Aerated Solution: Protection of Ascorbic Acid”, Italian Journal of Food Science, 20:1, 5-21, (2008).
2. **Yıldıoğan-Beker B.**, Sönmezoğlu İ., İmer F. ve Apak R., “Protection of Ascorbic Acid from Copper(II)-Catalyzed Oxidative Degradation in the Presence of Flavonoids: Quercetin, Catechin and Morin”, International Journal of Food Sciences and Nutrition, 62(5): 504-512, (2011).
3. **Yıldıoğan-Beker B.**, Bakır T., Sönmezoğlu İ., İmer F. ve Apak R., “Antioxidant Protective Effect of Flavonoids on Linoleic Acid Peroxidation Induced by Copper(II)/Ascorbic Acid System”, Chemistry and Physics of Lipids, 164: 732-739, (2011).

Bildiri

1. **Yıldıoğan B.**, İmer F., Sönmezoğlu İ., Kılıç H. ve Apak R., “Study of Ascorbic Acid Oxidation Using a Transition Metal- Catalyzed Aspartame System” Chemical Physics VII, Isparta, Turkey, (2006).
2. **Yıldıoğan B.**, İmer F., Sönmezoğlu İ., Kılıç H. ve Apak R., “The Effect of pH on Metal Catalyzed Oxidation of L-Ascorbic Acid in Presence of Aspartame Investigated by Copper(II)-Neocuproine Spectrophotometry” 5th Aegean Analytical Chemistry Days, Thessaloniki, Greece (2006).
3. **Yıldıoğan B.**, Sönmezoğlu İ., İmer F., Kılıç H. ve Apak R., “Aspartam İçeren Havalandırılmış Çözeltilerde Askorbik Asidin Cu(II) Katalizli Oksidasyonu ve İlaç Tabletlerinde Askorbik Asidin Korunması”, XX Ulusal Kimya Kongresi, İnönü Üniversitesi, Malatya, ANL054P (2007).
4. **Yıldıoğan B.**, Sönmezoğlu İ., İmer F., Apak R., “L-Askorbik Asidin Bakır-Katalizli Oksidasyonuna Flavonoidlerin Etkisinin Modifiye edilmiş CUPRAC Yöntemi ile Araştırılması”, XXII. Ulusal Kimya Kongresi, Doğu Akdeniz Üniversitesi, Kuzey Kıbrıs, AKP049, pp.56 (2008).
5. **Yıldıoğan B.**, Sönmezoğlu İ., İmer F. ve Apak R., “Antioxidant Protective Effect of Flavonoids on the Copper(II)-Catalyzed Autoxidation of Ascorbic Acid” AACD 2008, 6th Aegean Analytical Chemistry Days, Pamukkale Üniversitesi, Denizli-Türkiye,

pp.383 (2008).

6. **Yıldıoğan B.**, Sönmezoğlu İ., İmer F. ve Apak R., “Antioxidant Protective Effect of Flavonoids on the Lipid Peroxidation Induced By Copper / Ascorbic Acid System” Workshop on Antioxidant Measurement Assay Methods, İstanbul, Türkiye, pp. 12 (2010).
7. **Yıldıoğan B.**, Bakır T, Sönmezoğlu İ., İmer F. ve Apak R., “Antioxidant Protective Effect of α -Tocopherol on the Lipid Peroxidation Induced by Copper/Ascorbic Acid System” Chemical Physics Congress IX, Çeşme, İzmir/Türkiye, (14-16 Ekim 2010).

Proje

1. Askorbik Asidin Antioksidan Ve Prooksidan Özelliklerinin Ve Diğer Antioksidanlarla Etkileşimlerinin Araştırılması, 2009-2011, BAP tarafından desteklenmiştir.