

Bazı Sentetik Antioksidanların 2, 2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Süpürme Kapasitesi Yöntemi ile Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması

Özge BARDAKÇI YILMAZ¹, Murat BOYACIOĞLU*¹

¹ Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Veteriner Fakültesi Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Aydın, Türkiye

Received 16-09-2020 Accepted 04-11-2020

Özet

Serbest radikaller, oksidatif stres ve antioksidanlar güncel olan ve yaygın olarak tartışılan konulardır. Canlı fizyolojisinde oksidatif stresin meydana getirdiği hasar sebebiyle antioksidanlara olan ilgi oldukça artmıştır. Antioksidanların veya tüketilen besin maddelerinin ne derecede antioksidan etkili olduğunu belirlemek ve karşılaştırmak için çeşitli tayin yöntemleri mevcuttur. Bu çalışmanın amacı, bazı sentetik antioksidanların antioksidan aktivitelerini 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidan kapasite tayin yöntemi ile belirlemek ve karşılaştırmaktır.

Bu amaçla 0-400 µg/ml konsantrasyonlarda hazırlanan vitamin C, troloks, kuersetin, ellagik asit, kurkumin, vitamin E, resveratrol ve silimarinin radikal süpürme aktiviteleri DPPH kapasite tayin yöntemi ile belirlendi. Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan DPPH radikalini süpürme aktivitelerinin % inhibisyon değerleri ile çizilen grafiklerden Etkin Konsantrasyon 50 (Efficient Concentration 50, EC50) değerleri hesaplandı.

Çalışmada standart olarak kullanılan vitamin C ve troloksun EC50 değerleri sırası ile 1,697 µg/ml ve 1,729 µg/ml olarak belirlendi. Standart ile karşılaştırıldığında en düşük antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın silimarin (EC50=7,812 µg/ml) ve en yüksek antioksidan süpürücü aktiviteye sahip olan antioksidanın ise kuersetin (EC50=1,722 µg/ml) olduğu görüldü.

Elde edilen sonuçlar ışığında hayvan deneyi çalışmalarında tercih edilen ve sık kullanılan sentetik antioksidanların seçiminde antioksidan kapasitelerinin de göz önünde bulundurulması ve araştırılması yapılan maddeye göre antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin seçilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar kelimeler: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH), antioksidan aktivite, bazı sentetik antioksidanlar.

Investigation of Antioxidant Activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) Radical Scavenging Capacity Method of Some Synthetic Antioxidant Abstract

Nowadays free radicals, oxidative stress and antioxidants have become one of the widely discussed common topics. Due to damage caused by oxidative stress in the live physiology, the interest in antioxidants has also increased considerably in recent years. There are several of methods of identification to determine and compare the antioxidant effectiveness of antioxidants or consumed nutrients. The aim of this study is to identify and compare the antioxidant activities of some synthetic antioxidants with the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) antioxidant capacity determination method.

For this purpose, vitamin C, trolox, quercetin, ellagic acid, curcumin, vitamin E, resveratrol and silymarin were prepared at different concentrations (0-400 µg/ml). Determination of radical scavenging activities used the DPPH capacity determination method.

Efficient Concentration 50 (EC50) values were calculated from the graphs plotted with % inhibition values of DPPH radical scavenging activities against different concentrations of antioxidant.

In the study vitamin C and trolox EC50 values used as standard were determined 1.697 µg/ml and 1.729 µg/ml, respectively. When compared to standards, the lowest antioxidant scavenging activity was found to be silymarin (EC50=7.812 µg/ml) and the highest antioxidant scavenging activity was determined quercetin (EC50=1.722 µg/ml).

In the light of these results obtained, antioxidant capacities should be taken into consideration in the selection of commonly used synthetic antioxidants in animal studies. The antioxidant capacity determination methods should be chosen according to the substance to be investigated.

Keywords: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), antioxidant activity, some synthetic antioxidants.

* Corresponding author: : Murat BOYACIOĞLU, Tel: +90 256 247 07 00 (6147) e-posta: mboyacioglu@adu.edu.tr

Giriş

Serbest radikaller, oksidatif stres ve antioksidanlar günümüzde yaygın olarak tartışılan konular içerisinde yer almaktadır. Dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunduran ve oldukça reaktif olan atom ya da moleküllere serbest radikal adı verilmektedir.¹ Kararsız olan bu moleküller diğer moleküllerle tepkimeye girerek istenmeyen oksidasyon reaksiyonlarına neden olurlar. Sonuçta canlı organizmada protein, lipid ve nükleik asitlerde hasar, membran bütünlüğünün bozulması ve genetik mutasyonların şekillenmesi gibi etkiler meydana gelir.²

Serbest radikaller, yaşamsal faaliyetler sırasında organizmanın metabolizması veya solunum ve enzim reaksiyonları (ksantin oksidaz, flavoprotein dehidrogenaz) gibi endojen kaynaklar ile hava kirliliği, ultraviyole ışınlar, sigara dumanı, ilaçlar (miktoksinler, pestisidler) gibi ekzojen kaynaklarla da meydana gelmektedirler.¹

Antioksidanlar, gıda ve farmasötik ürünlerde oksidatif bozulmaya karşı, vücutta ve oksidatif stresin aracılık ettiği patolojik süreçlere karşı koruyucu rolleri olan moleküllerdir.³ Antioksidan moleküller vücut tarafından üretilebilirler ya da gıdalar aracılığıyla vücuda alınabilmektedirler.⁴ Vücut tarafından üretilebilen en önemli antioksidanlar ise süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon (GSH), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSSG-R) ve katalaz (CAT)'dır. Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki hücresel veya bireysel seviyedeki dengenin serbest radikaller lehine değişmesi oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır. Oksidatif hasar böyle bir dengesizliğin sonucudur ve hücresel makromoleküllerin oksidatif modifikasyonu, apoptoz veya nekrozla hücre ölümünü ve yapısal doku hasarını içermektedir.⁵

Canlı fizyolojisinde oksidatif stresin meydana getirdiği hasar sebebiyle son yıllarda antioksidanlara ve antioksidan içeren gıdalara olan ilgi oldukça artmıştır. Gıdaların sahip oldukları toplam antioksidan kapasiteyi belirlemek için günümüzde birçok biyokimyasal yöntem mevcuttur. Bu yöntemler, ölçüm için kullanıldıkları radikal özelliğine bağlı olarak farklı sonuçlar verebilmektedirler.⁶ Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) antioksidan kapasite tayin yöntemidir.

C vitamini (askorbik asit, askorbat), insanlar C vitamini biyosentetik yolunda terminal bir enzimi kodlayan gendeki mutasyonlar nedeniyle bunu sentezleme yeteneğini kaybettiğinden, diyetle veya takviye olarak verilmesi gereken temel bir mikro besindir.⁷ C vitamini, antioksidan savunması, transkripsiyon ve gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesi için önemli olan süreçlerde ve etkilerde yer alan enzimler için bir kofaktör olarak rol oynar. Ayrıca bağışıklık sistemi ve iltihaplanma üzerinde yararlı etkiler

yarattığı da bildirilmektedir.⁸

Doğada yaygın bulunan α -tokoferol (E vitamini) antioksidan ve yağda çözünen bir vitamindir. Bir vitaminden çok antioksidan olarak anılmaktadır. Yağlarda, fındıkta ve tahıllarda bulunmakta ve esansiyel olduğu için vücuda dışarıdan alınmaktadır. α -tokoferol lipid peroksidlerinin lipid hidroperoksidlerine dönüşümünü engelleyerek antioksidan etki göstermektedir. Çünkü lipid hidroperoksidleri hücre hasarına, lipid peroksidasyonuna, MDA ve etan oluşumu sonucunda hücre ölümüne yol açarlar.⁹

Kuersetin, flavonoid ailesinin en seçkin bileşiklerinden biridir. Sebze, meyve, kırmızı şarap, çay ve diğer bitki kökenli içeceklerde yaygın olarak bulunmaktadır. Birçok in vitro çalışmada flavonoidlerin reaktif oksijen türlerini doğrudan yakalaması, süperoksit anyon üretiminden sorumlu enzimlerin inhibisyonu, reaksiyona giren geçiş metali iyonlarının şelatlanması, kuersetinin antioksidan olarak hareket edebileceğini göstermektedir.¹⁰

Doğal, polifenolik yapıda ve güçlü bir antioksidan olan ellagik asit ahududu, çilek, yaban mersini, nar ve cevizde yüksek miktarda bulunmaktadır.¹¹ Ellagik asitin gıda ürünlerinde lipid oksidasyonunu en aza indirmek veya önlemek, toksik oksidasyon ürünlerinin (süperoksit anyonu ve hidroksil radikali gibi) oluşumunu geciktirmek veya engellemek, gıdalar ve farmasötiklerin raf ömrünü uzatmak için kullanılabilirliği bildirilmiştir.¹²

Polifenolik bileşiklerden bir diğeri olan resveratrolün trans-resveratrol ve cis-resveratrol olmak üzere başlıca iki formu bulunmaktadır. Asma, dut, yaban mersini, yer fıstığı, kırmızı şarap ve antep fıstığında bulunmaktadır. Resveratrolün demir-ferrozin kompleksinin oluşumuna müdahale ederek şelatlama aktivitesine sahip olduğu ve ferrozinden önce demir iyonunu yakalayabildiği böylece oksidatif stresi önlemede etkili olduğu ifade edilmiştir.¹³

Kurkumin, doğal *Curcuma longa* Linn'den (Zerdeçal) izole edilmiş, uzun süredir biyoaktif bileşenler olduğuna inanılan, doğal olarak oluşan üç curcuminoid arasında bulunan başlıca curcuminoiddir. Kurkumin iyi bir antioksidan olarak kabul edilmektedir ve serbest radikal temizleme aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir.¹⁴

Silimarin *Silybum marianum* (Devedikenin sütü)'ün kompleksinin ana bileşenleri, silimarin kompleksinin yaklaşık % 70'i için taksifolin ile birlikte hesaplanan silinin A ve B, izosilbin A ve B, silydianin, silikristin ve izosilkristindir. Geri kalan kısım, tanımlanmamış ancak potansiyel olarak biyoaktif bir polifenoliktir. Önemli antioksidatif potansiyelinin yanı sıra silimarinin popüleritesi, varsayılan kemopreventif ve hepatoprotektif etkileri nedeniyle giderek artmaktadır.¹⁵

Antioksidan etki aktivitesinin araştırıldığı in vivo ve in vitro çalışmalarda kullanılan antioksidanlar üretici firma-

lar tarafından genellikle sentetik hazırlanan maddelerdir. Dolayısıyla doğal yollarla elde edilen antioksidanların bu tip çalışmalarda kullanımı seyrek. Bu çalışmanın amacı bazı sentetik antioksidanların antioksidan aktivitelerini belirlemek ve karşılaştırmaktır. Elde edilecek sonuçlar ile hayvan deneyi çalışmalarında tercih edilen ve sık kullanılan bazı sentetik antioksidanların antioksidan aktivitelerine ışık tutması, antioksidan kapasitelerinin birbirlerine olan üstünlüklerinin belirlenmesi ve deneysel çalışmalara katkı sağlaması amaçlanmıştır. Bu çalışmada deneysel çalışmalarda sık kullanılan kuersetin, ellagik asit, kurkumin, E vitamini, resveratrol ve silimarinin antioksidan aktivitelerini belirlemek ve karşılaştırmak amacıyla DPPH antioksidan kapasite tayin yöntemi kullanılmıştır.

Materyal ve Metod

Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışma kapsamında metanol (≥ 99.7 , Sigma-Aldrich 24229), DPPH (Sigma-Aldrich D9132), L-(+)-askorbik asit ≥ 98 (Alfa Aesar 11188), 6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilokroman-2-karboksilik asit (troloks) ≥ 97 (Sigma-Aldrich 238813), kuersetin ≥ 97 (Alfa Aesar A15807), ellagik asit ≥ 97 (Alfa Aesar A15722), kurkumin ≥ 65 (Sigma-Aldrich C1386), α -tokoferol ≥ 95.5 (Sigma-Aldrich 258024), resveratrol ≥ 98 (Santa Cruz Biotechnology sc200808) ve silimarin ≥ 30 (Sigma-Aldrich S0292) kullanıldı.

Metot

DPPH radikal süpürücü aktivite tayini Brand-Williams ve ark.16 tarafından bildirilen yöntem kullanılarak gerçekleştirildi. Buna göre 10^{-4} M DPPH'ın metanoldeki çözeltisinden 1 ml alındı ve alüminyum folyo kaplı cam tüpe aktarılarak analiz öncesi taze olarak hazırlandı. DPPH çözeltisi üzerine 3 ml metanolde hazırlanmış 0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 ve 400 $\mu\text{g/ml}$ antioksidan örnek çözeltileri ilave edilerek vorteksledi. Kontrol tüplerine ise 3 ml antioksidan çözeltisi yerine saf metanol eklendi. 30 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletildikten sonra spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda metanole karşı okundu. Standart olarak askorbik asit ve troloks kullanıldı. Analizler ilgili antioksidanların 3 ayrı tartımı yapılarak 3 kere tekrar edildi ve ortalamaları alındı. Aşağıdaki formül kullanılarak DPPH radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi hesaplandı;

$$\% \text{ inhibisyon} = \left(\frac{\text{kontrol absorbanansı} - \text{örnek absorbanansı}}{\text{kontrol absorbanansı}} \right) \times 100$$

Antioksidanların farklı konsantrasyonlarına karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten linear regresyon ile % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri elde edildi ve sonuçlar EC50 ($\mu\text{g/ml}$) olarak ifade edildi.

İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel analizi SPSS (Statistical Packag for Social Sciences) 22.00 paket programı kullanılarak yapıldı. Normal dağılım gösteren gruplar arası farklılık tek yönlü varyans analizi ile normal dağılım göstermeyen gruplar arası farklılık ise Kruskall Wallis ölçüldü. Farkların öneminde post hoc Duncan testi uygulandı. Farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi yapıldı. Elde edilen sonuçlardan $p < 0.05$ olanlar önemli kabul edildi ve tüm veriler ortalama ve \pm standart hata olarak verildi.

Sonuçlar

Kararlı bir serbest radikal olan DPPH bir elektron veya hidrojen radikalini almaktadır. DPPH yönteminde 517 nm'de okunan absorbanans değerleri ne kadar düşük ise serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek olmaktadır. DPPH miktarındaki azalma ile antioksidan miktarın belli bir konsantrasyona kadar azalan absorbanans değerleri doğru orantılıdır.17 Hesaplanan EC50 değerleri ne kadar düşükse DPPH radikalini süpürme aktivitesi o kadar yüksek olmaktadır. Buna göre çalışma kapsamında kullanılan antioksidanların EC50 değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. DPPH yöntemi ile radikal süpürücü aktiviteleri araştırılan antioksidan bileşiklerin EC50 değerleri.

Antioksidan	EC50 ($\mu\text{g/ml}$)
Vitamin C (Standart)	1,697
Troloks (Standart)	1,729
Kuersetin	1,722
Ellagik asit	1,881
Kurkumin	2,800
Vitamin E	3,123
Resveratrol	3,970
Silimarin	7,812

Çalışmada standart antioksidan olarak vitamin C ve troloks kullanılmıştır. EC50 değerleri sırası ile 1,697 $\mu\text{g/ml}$ ve 1,729 $\mu\text{g/ml}$ bulunmuştur. Antioksidanların DPPH radikalini süpürme aktivitesi sıralaması ise kuersetin (1,722 $\mu\text{g/ml}$) > ellagik asit (1,881 $\mu\text{g/ml}$) > kurkumin (2,800 $\mu\text{g/ml}$) > vitamin E (3,123 $\mu\text{g/ml}$) > resveratrol (3,970 $\mu\text{g/ml}$) > silmarin (7,812 $\mu\text{g/ml}$) olarak belirlenmiştir.

Tablo 2. Çalışma kapsamında kullanılan sentetik antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonunu inhibe etme yüzdesi.

Antioksidanlar	Konsantrasyonlar (µg/ml)							
	3.125	6.25	12.5	25	50	100	200	400
Vitamin C (standart)	92.05 ± 0.51 ^a	94.30 ± 0.25 ^a	94.55 ± 0.18 ^a	94.94 ± 0.16 ^a	94.97 ± 0.07 ^a	95.08 ± 0.04 ^a	94.78 ± 0.38 ^a	94.94 ± 0.16 ^a
Troloks (standart)	90.32 ± 0.47 ^b	93.07 ± 0.34 ^b	94.25 ± 0.26 ^a	94.64 ± 0.26 ^{ab}	94.51 ± 0.22 ^a	94.25 ± 0.13 ^b	94.38 ± 0.26 ^a	94.64 ± 0.34 ^a
Kuersetin	90.70 ± 0.32 ^b	91.92 ± 0.31 ^c	92.44 ± 0.30 ^b	92.56 ± 0.40 ^{b,c}	92.32 ± 0.23 ^b	92.17 ± 0.22 ^c	92.42 ± 0.41 ^b	92.18 ± 0.40 ^b
Ellagik asit	83.03 ± 0.14 ^c	83.62 ± 0.14 ^c	84.50 ± 0.29 ^c	85.38 ± 0.14 ^c	84.79 ± 0.14 ^c	84.94 ± 0.29 ^f	85.09 ± 0.25 ^d	85.67 ± 0.77 ^d
Kurkumin	55.78 ± 0.34 ^d	77.44 ± 0.39 ^f	83.22 ± 4.60 ^c	85.45 ± 0.40 ^d	85.90 ± 0.55 ^c	86.05 ± 0.37 ^f	86.20 ± 0.49 ^{d,c}	87.39 ± 0.51 ^{d,c}
Vitamin E	50.02 ± 0.54 ^e	89.44 ± 0.58 ^d	91.13 ± 0.34 ^b	91.13 ± 0.22 ^c	91.10 ± 0.36 ^c	91.74 ± 0.08 ^c	91.72 ± 0.34 ^b	92.36 ± 0.19 ^b
Resveratrol	39.35 ± 0.38 ^f	59.61 ± 0.38 ^g	76.50 ± 0.14 ^{c,d}	86.05 ± 0.89 ^d	90.16 ± 0.14 ^d	91.33 ± 0.14 ^d	92.07 ± 0.25 ^b	92.07 ± 0.25 ^b
Silimarin	18.89 ± 0.36 ^g	30.67 ± 0.96 ^h	47.00 ± 1.49 ^e	74.00 ± 0.13 ^e	89.62 ± 0.31 ^d	89.63 ± 0.12 ^e	89.34 ± 0.49 ^c	89.77 ± 0.49 ^c
p	0,002	0,002	0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003

Antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki DPPH radikalini süpürme aktivitesi istatistiksel yönden karşılaştırıldığında, 3.125-25 µg/ml aralığında olan konsantrasyonlarda % inhibisyon değerinin en düşük silimarinde ve en yüksek vitamin C'de olduğu belirlendi. Diğer antioksidanlarla karşılaştırıldığında 50 ve 100 µg/ml'de ise kurkumin ve ellagik asitin anlamlı olarak en düşük % inhibisyon değerine sahip olduğu görüldü. Benzer şekilde 200 ve 400 µg/ml'de de en düşük % inhibisyon değerine sahip antioksidanın ellagik asit olduğu belirlendi. İstatistiksel yönden karşılaştırıldığında, tüm konsantrasyonlarda % inhibisyon değerinin en yüksek vitamin C ve bazı konsantrasyonlarda (12.5, 50, 200 ve 400 µg/ml) troloksa olduğu görüldü.

Tartışma ve Sonuç

Antioksidanlar, serbest radikal temizleyiciler olarak hareket ederek oksidatif hücre hasarını önleyen düzenli diyetimizin önemli bir parçasıdır. ¹⁸ Antioksidanlar bu etkileri, halen çeşitli klinik ve laboratuvar çalışmalarında araştırılmaktadır. Bu kapsamda bileşiklerin içerdiği antioksidan miktarının belirlenmesi amacıyla çok sayıda antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir.

Bu çalışmada DPPH antioksidan kapasite tayin yöntemi ile deneysel çalışmalarda sık kullanılan bazı sentetik antioksidanların antioksidan aktivitesinin belirlenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Nitekim bitkilerin ekstraksiyonu ile elde edilen doğal antioksidanların antioksidan kapasitesi farklı yöntemlerle ölçülmesine rağmen, sentetik olarak üretici firmalar tarafından piyasaya sunulan ve özellikle deneysel çalışmalarda kullanılan sentetik antioksidanların, antioksidan kapasitesinin belirlenmesi ve karşılaştırılması ile ilgili çalışmaya rastlanamamıştır.

Mehta ve ark.¹⁹ tarafından yapılan in vitro çalışmada kuersetin, askorbik asit, kafein, ellagik asit, gallik asit, rosiglitazon, metformin ve glimepiridinin diyabetle ilişkili nörolojik komplikasyonların gelişimine yol açan yolaklara müdahale etmede daha etkili olduğunu bildirmişler ve antioksidan etkilerini karşılaştırmak için DPPH yöntemini kullanmışlardır. 6,25 µM konsantrasyonda askorbik asit, kuersetin ve ellagik asit için % inhibisyon değerleri sırasıyla %94.09, %92.00 ve %88.71 olarak belirlenmiştir. EC50 değerleri ise

ellagik asit için 0,03 µM, askorbik asit için 0,02 µM ve kuersetin için 0,006 µM bulunmuştur.¹⁹ Çalışmamızda 6,25 µg/ml'lik konsantrasyonlarda askorbik asit, kuersetin ve ellagik asitin inhibisyon değerleri sırası ile %94.30, %91.93 ve %83.63, EC50 değerleri ise sırası ile 1,697 µg/ml, 2,800 µg/ml ve 1,881 µg/ml bulunmuştur. EC50 değerlerinin sıralamasındaki bu tutarsızlığın nedeni, DPPH solüsyonlarının hazırlanmasında metanol kullanılmasına rağmen molarite farklılıklarına bağlı olabilir. Çalışmamızda 0,1 mM DPPH kullanılmış iken, Mehta ve ark.¹⁹ tarafından bildirilen yöntemde ise 0,4 mM DPPH kullanmıştır.

Somparn ve ark.²⁰ kurkumin ile demetoksi ve hidrojen türevlerinin karşılaştırmalı olarak antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. EC50 değerleri standart olarak kullanılan troloksun 31,1 µM ve kurkuminin ise 35,1 µM olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler çalışmamızın sonuçları ile uyumlu olup, troloksun kurkuminden daha yüksek DPPH radikalini süpürme aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir.

Jadhav ve ark.²¹ kırmızı şarap ve silimarinin antioksidan potansiyelini DPPH yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Resveratrol içeren kırmızı şarap ve silimarin, standart olarak kullanılan vitamin C ile karşılaştırılmıştır. 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda C vitamini %94.45, resveratrol %87.69 ve silimarin %88.84 inhibisyon göstermiştir. Bu çalışmada resveratrol ve silimarinin EC50 değerleri sırasıyla 30 µg/ml ve 22 µg/ml olarak bulunmuştur. Bizim çalışmamızda 100 µg/ml'lik konsantrasyonlarda resveratrolün ve silimarinin inhibisyon değerleri sırası ile %91.34 ve %89.63, EC50 değerleri ise sırası ile 3,970 µg/ml ve 7,812 µg/ml bulunmuştur. EC50 değerleri açısından kaynaklanan bu farklılık, Jadhav ve arkadaşlarının²¹ kırmızı şarapta bulunan resveratrolü kullanmalarına, silimarin farklı üretici firmadan temin etmelerine bağlı saflığına veya laboratuvar şartlarına (sıcaklık, ışık vb.) bağlı olabilir. Nitekim Bondet ve ark.²² DPPH radikal süpürücü aktivite tayininde antioksidan etkinliğin ortam sıcaklığında ölçülmesi gerektiğini ve bu nedenle test edilen moleküllerin termal bozunma riskinin göz önünde bulundurulması gerektiğini bildirmişlerdir. Calil ve ark.²³ resveratrol analoglarının antioksidan kapasitesini, standart olarak resveratrol kullanarak ölçmüşlerdir.

Resveratrolün EC50 değeri 8,5 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu değerin bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuçtan biraz daha yüksek bir değer olduğunu söyleyebiliriz. Bunun nedeni, DPPH yönteminde kullanılan DPPH veya araştırılan antioksidanların konsantrasyonlarındaki farklılıklara, kullanılan çözücülere, DPPH'nin ya da antioksidanların ışığa veya havaya maruziyetine bağlı olabilir. Mishra ve ark.²⁴ bu nedenlere bağlı olarak farklı sonuçların elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Kaldı ki Calil ve ark.²³ çalışmalarında DPPH solüsyonunu 0,05 mM olarak hazırlamışlar ve etanolde çözdürmüşlerdir. Çalışmamızda ise DPPH 0,1 mM konsantrasyonda ve metanolde hazırlanmıştır. Bu durumun sonuçlar arasındaki farklılığı açıkladığını söyleyebiliriz.

Hayvan deneyleri farmakodinami ve farmakoterapi açısından önemli bir yere sahiptir. Elde edilen sonuçlar ışığında gerek in vitro ve gerekse in vivo çalışmalarda tercih edilen ve sık kullanılan sentetik antioksidanların seçiminde antioksidan kapasitelerinin de göz önünde bulundurulması ve araştırılması yapılan maddeye göre antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin farklı olabileceği ve buna göre seçilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

Antioksidan kapasite tayin yöntemleri genel olarak Hidrojen Atom Transferi'ni (HAT) temel alan analizler ve Elektron Transferi'ni (ET) temel alan analizler olmak üzere iki ana başlık altında incelenmektedir. DPPH ET'ni temel alan analizler altında incelenmektedir. Yeni yapılan çalışmalara göre DPPH, oranı antioksidanla değişen karışık hem ET ve hem de HAT mekanizmalarıyla reaksiyona girebilir; ayrıca, DPPH reaksiyon mekanizmaları ve kantitatif tepkiler, reaksiyon ortamının çeşitli çevresel faktörleri (pH, polarite, sterik etkiler, sıcaklık, vb.) tarafından değiştirilebilir. DPPH testi gerçekleştirilirken kullanılan çözücülerin ve antioksidanların sonuçları etkilediği bildirilmiştir. Bazı ikame edilmiş fenolik antioksidanların, metanol ve etanoldeki oran sabitleri, heptan, asetonitril, tetrahidrofuran veya asitleştirilmiş alkollerdekinden daha büyük oldukları bildirilmiştir.²⁵DPPH testinin faydalarına rağmen, ekstraktlarda bir arada bulunan pigmentler ve renkler, kolorimetrik hesaplamada sonuçların doğruluğunu olumsuz etkileyebilir.²⁶

Antioksidan özelliği araştırılan maddenin DPPH ile reaksiyon hızı da farklı olmaktadır. Bunun nedeni kimyasal yapısındaki hidroksil grubu ve molekül büyüklüğü ile ilgilidir.⁶Antioksidan kapasitenin belirlenmesinde örneklerdeki antioksidan maddelerin moleküler çeşitliliğinin, bahsedilen yöntemler arasında her zaman doğrusal bir ilişki oluşmasını engelleyebildiği ifade edilmiştir. Bu nedenle antioksidan kapasite hakkında karar verirken birden çok yöntemi birlikte kullanmanın daha uygun olduğu ifade

edilmektedir²⁷

Teşekkür

Bu çalışma Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VFT-15084 proje numarası ile desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1. Ed, Mimoza Basım Yayım ve Dağıtım, Konya, 1995.
2. Memişoğulları R. Diyabette serbest radikallerin rolü ve antioksidanların etkisi. Düzce Tıp Fak Dergisi. 2005; 3: 30-39.
3. Gulcin İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. Arch Toxicol. 2020; 94, 651-715.
4. Yavaşer R. Doğal ve sentetik antioksidan bileşiklerin antioksidan kapasitelerinin karşılaştırılması. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2011.
5. Burnaz N. On-line HPLC-FRAP antioksidan aktivite tayin yönteminin geliştirilmesi ve bazı doğal ürünlere uygulanması. Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, 2013.
6. Prakash A, Rigelhof F, Miller E. Antioxidant activity. Medallion Laboratories Analytical Progress. 2001; 19(2): 1-4.
7. Pawlowska Elzbieta, Joanna Szczepanska, Janusz Blasiak. Pro-And antioxidant effects of Vitamin C in cancer in correspondence to its dietary and pharmacological concentrations. Oxidative Medicine and Cellular Longevity 2019. doi:10.1155/2019/7286737
8. Granger M, Eck P. Dietary vitamin C in human health. Advances in food and nutrition research. 2018; 83: 281-310.
9. Çaylak E. Hayvan ve bitkilerde oksidatif stres ile antioksidanlar. Tıp Araştırmaları Dergisi 2011; 9(1): 73-83.
10. An D, Zhang Q, Wu S, Wei J, Yang J, Dong F, Yan X, Guo C. Changes of metabolic profiles in urine after oral administration of quercetin in rats. Food Chem Toxicol. 2010; 48: 1521-1527.
11. Padma VV, Selvi PK, Sravani S. Protective effect of ellagic acid against TCDD-induced renal oxidative stress: Modulation of CYP1A1 activity and antioxidant defense mechanisms. Mol Biol Rep. 2014; 41: 4223-4232.
12. Kılıç İ, Yeşiloğlu Y, Bayrak Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2014; 130: 447-452.

13. Gülçin İ. Antioxidant properties of resveratrol: A structure–activity insight. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2010; 11(1): 210-218.
14. Choudhury AK, Raja S, Mahapatra S, Nagabhushanam K. Synthesis and evaluation of the anti-oxidant capacity of curcumin glucuronides, the major curcumin metabolites. *Antioxidants.* . 2015; 4: 750-767.
15. Viktorova J, Stranska-Zachariasova M, Fenclova M, Vitek L, Hajslova J. Complex evaluation of antioxidant capacity of milk thistle dietary supplements. *Antioxidants.* 2019; 8(8): 317.
16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology.* 1995; 28: 25-30.
17. Ndhkala AR, Moyo M, Van Staden J. Natural Antioxidants: Fascinating or mythical biomolecules? *Molecules.* 2010; 15: 6905-6930.
18. A. Godic, B. Poljšak, M. Adamic, R. Dahmane. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2014; 2014: 860479.
19. Mehta V, Verma P, Sharma N, Sharma A, Thakur A, Malairaman U. Quercetin, ascorbic acid, caffeine and ellagic acid are more efficient than rosiglitazone, metformin and glimepiride in interfering with pathways leading to the development of neurological complications associated with diabetes: A comparative in-vitro study. *Bull Fac Pharm Cairo Univ.* 2017; 55: 115–121.
20. Somparn P, Phisalaphong C, Nakornchai S, Unchern S, Morales NP. Comparative antioxidant activities of curcumin and its demethoxy and hydrogenated derivatives. *Biol Pharm Bull.* 2007; 30(1): 74-78.
21. Jadhav GB, Upasani CD, Pingale AP. Antioxidant potential of red wine and silymarin: in-vitro evaluation. *J Pharm Res.* 2009; 2(4): 636-639.
22. Bondet V, Brand-Williams W, Berset C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Science and Technology.* 1997; 30: 609-615.
23. Calil NO, Carvalho GSG, Franco DCZ, Silva AD, Raposo NDB. Antioxidant activity of resveratrol analogs. *Lett Drug Des Discov.* 2012; 9: 8-11.
24. Mishra K, Ojha H, Chaudhury NK. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chem.* 2012; 130: 1036–1043.
25. Goujot D, Cuvelier M E, Soto P, Courtois F. A stoichiometric model for a DPPH–ferulic acid reaction. *Talanta.* 2019; 196: 284-292.
26. Yeo J, Shahidi F. Critical re-evaluation of DPPH assay: presence of pigments affects the results. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2019; 67(26): 7526-7529.
27. Ardağ A. Antioksidan kapasite tayin yöntemlerinin analitik açıdan karşılaştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü, Aydın 2008.