

Modifiye DMPD Yöntemi ile Süperoksit Radikali Süpürme Aktivitesi ve Toplam Antioksidan Kapasite Tayini

Ferda Dondurmacıoğlu¹

¹İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü, İstanbul, Türkiye

Makale Bilgisi
Gönderim: 27 Ekim 2023
Kabul: 17 Mayıs 2024
Yayın: 30 Eylül 2024
Araştırma Makalesi

Öz – Reaktif oksijen türleri içinde yer alan süperoksit radikalleri lipid peroksidasyonuna neden olan tehlikeli türler üretebilir. Bu nedenle süperoksit radikali tayini, süpürülmesi çok önemlidir. Çalışmamız β -Nicotinamid adenin dinükleotid indirgenmiş disodyum tuz hidrati ve fenazin metosulfat (NADH-PMS) sisteminden üretilen süperoksit radikalının *N, N*-dimetil-*p*-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD) ile etkileşimi sonucu pembe renkli DMPD-yarıkinon (DMPDQ) radikali oluşturmasına dayanmaktadır. Süperoksit radikali giderme aktivitesine sahip süpürücüler (antioksidan, bitki çayları) varlığında daha az DMPDQ radikali üretimi nedeniyle renk yoğunluğu azalır. Renkli referans çözeltisinin ve radikal süpürücü içeren örnek çözeltisinin absorbansı 552 nm’de ölçülmüştür. Referans çözelti ile örnek çözeltisinin absorbans farkı (ΔA) bulunmuştur. ΔA ile süpürücü derişimi orantılıdır. Çalışmada, trolox (TR) ve farklı antioksidanların (AOX) süperoksit radikal süpürücü etkisi araştırılmıştır. Yöntemle üç farklı bitki çayı infüzyon çözeltisinin süperoksit radikal süpürücü etkisi ölçülmüştür. Bitki çayı derişimleri ile yüzde inhibisyon değerleri arasında çizilen grafikten bitki çaylarının %50 inhibisyon (EC50) değerleri bulunmuştur. Bulunan EC50 değerleri nitroblue tetrazolium (NBT) ve 2,2’-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) yöntemi EC50 değerleriyle karşılaştırılmıştır. Ayrıca bitki çayı infüzyonlarının ABTS, bakır(II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite (CUPRAC) yöntemi ve çalışılan yöntemde toplam antioksidan kapasite değerleri (TAC) hesaplanıp, karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler – Antioksidan kapasite, NADH-PMS, *N, N*-dimetil-*p*-fenilendiamin dihidroklorür, süperoksit radikali, yüzde inhibisyon

Determination of Superoxide Radical Scavenging Activity and Total Antioxidant Capacity by Modified DMPD Method

¹Department of Chemistry, Faculty of Engineering, İstanbul University-Cerrahpaşa, İstanbul, Türkiye

Article Info
Received: 27 Oct 2023
Accepted: 17 May 2024
Published: 30 Sep 2024
Research Article

Abstract – Among the reactive oxygen species, Superoxide radicals can produce dangerous species that cause lipid peroxidation. Therefore, the determination and scavenging of superoxide radicals is critical. Our study is based on the interaction of the superoxide radical produced from the β -Nicotinamide adenine dinucleotide reduced disodium salt hydrate and phenazine methosulfate (NADH-PMS) system with *N, N*-dimethyl-*p*-phenylenediamine dihydrochloride (DMPD) to form the pink colored DMPD-quinone (DMPDQ) radical. In the presence of scavengers with superoxide radical scavenging activity (antioxidants, herbal teas) the color intensity decreases due to reduced DMPDQ radical production. The absorbance of the colored reference solution and the sample

solution containing the radical scavenger was measured at 552 nm. The difference in absorbance (ΔA) between the reference solution and the sample solution was found. ΔA is proportional to the scavenger concentration. In the study, the superoxide radical scavenging effect of trolox (TR) and different AOXs was investigated. The superoxide radical scavenging effect of three different herbal tea infusion solutions was measured with this method. From the graph drawn between herbal tea concentrations and percentage inhibition values, 50% inhibition (EC50) values of herbal teas were found. The EC50 values found were compared with the EC50 values of the nitroblue tetrazolium (NBT) and the 2,2 -azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) method. In addition, ABTS, cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC), and this study total antioxidant capacity (TAC) values of herbal tea infusions were calculated and compared.

Keywords – Antioxidant capacity, NADH-PMS, N,N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride, superoxide radical, percentage inhibition

1. Giriş

Eşleşmemiş elektrona sahip olan radikaller hem çok kısa ömürlü hem de çok reaktiflerdir [1]. Moleküler oksijen biyosferdeki en önemli elektron alıcısıdır [2]. Oksijen yaşam için gerekli bir moleküldür [3]. Çift radikal yapısından dolayı eşleşmemiş elektronları kolaylıkla kabul eder ve serbest radikaller oluşur [2].

Serbest radikaller iç etkenler (normal hücre metabolizması) ve çevre kirliliği, sigara içilmesi, radyasyon, ilaç gibi dış etkenler sonucu üretilir. Hüresel redokstan kaynaklanan serbest radikaller çoğunlukla reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türlerinden (RNS) oluşur. Kısmen indirgenmiş oksijen formları, yani $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 ve HO^{\cdot} , moleküler oksijenden kimyasal olarak daha aktiftir ve bu nedenle topluca “reaktif oksijen türleri” (ROS) olarak adlandırılırlar [4]. ROS ve RNS hem toksik hem de faydalı türlerdir. Düşük ve orta seviyelerde ROS ve RNS'nin vücudun bağışıklık sistemi üzerinde önemli etkileri vardır. Yüksek seviyelerde olduğunda tüm hücre yapılarına zarar verebilir [3]. ROS arasında süperoksit ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (HO^{\cdot}), peroksil (ROO^{\cdot}) ve alkoksil (RO^{\cdot}) radikalleri yer alır. Hücreler için oldukça zararlı olabilen ROS'lar serbest radikal zincir reaksiyonlarının başlatılması ve yayılmasında rol oynarlar [2]. Pro-oksidanlar olarak bilinen reaktif oksijen türlerinin oluşumu, aerobik yaşamın bir özelliğidir. Pro-oksidanların oluşumu, enzimatik ve/veya enzimatik olmayan antioksidanlar tarafından dengelenir. ROS'lar vücuttan kademeli olarak yok edilemediğinde oksidatif strese (OS) yol açar. OS, pro-oksidan/antioksidan dengesinin pro-oksidanlar lehine kaymasından kaynaklanır. OS kanser, otoimmün hastalıklar, yaşlanma, katarakt, romatoid artrit, kardiyovasküler ve nörodejenaratif hastalıklar, Alzheimer ve Parkinson gibi birçok hastalık ile ilişkilidir [3].

Yiyecekler ve takviye olarak dışarıdan alınan (eksojen) veya insan vücudunda üretilen (endojen) antioksidanlar (AOX) ile oksidatif strese karşı korunma mekanizmaları vardır. Endojen ve eksojen AOX'lar serbest radikal süpürücü olarak serbest radikallerin sebep olduğu hasarları önlerler veya onarırlar. Dolayısıyla dejenaratif hastalık ve kanser riski azalır [3, 5].

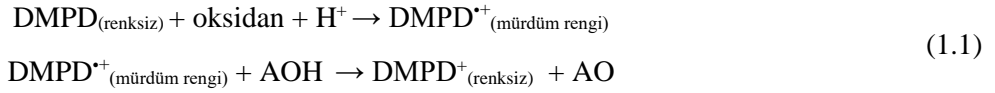
Biyolojik sistemlerde bulunan en reaktif türler Fenton reaksiyonu sonucu oluşan hidroksil ve mitokondride solunum zinciri yan ürünü olarak oluşan süperoksit radikalleridir [6, 7]. Hücrelerdeki mitokondrinin oksijen kullanarak enerji üretiminde ATP (adenozin trifosfat) oluşumu sonucu süperoksit serbest radikalleri meydana gelir [8, 9].

Birçok bilim adamı oksijenin toksik etkisinin fazla miktarda süperoksit radikali oluşmasından ileri geldiğine inanmaktadır [1, 10]. Süperoksit radikali diğer ROS türlerine göre daha az aktif olmasına rağmen lipidlerin peroksidasyonuna neden olan daha tehlikeli türler üretebilir. Süperoksit radikali geçiş metallerini indirgeyebilmesi ve hidrojen peroksit kaynağı olmasından dolayı çok önemlidir. Doku hasarına neden olabilen aktif serbest radikallerin öncül bileşenidir [11]. İki molekül süperoksit proton alarak hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşür. Ayrıca süperoksit anyonu azot monoksit (NO) ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^{\cdot-}$) ve azot oksitleri (NO_x) dahil olmak üzere çok toksik ROS üretebilir [7, 12].

Reaktif oksijen türlerinin fazla üretilmesi nedeniyle organizmanın doğal savunması baskı altına alınır. Oksidatif stres durumu oluşur. Hüresel ve hücre dışı proteinler, lipidler, nükleik asitler oksidatif hasara uğrar

ve doku hasarı oluşur. AOX aktivitesi taşıyan gıdaların doğal tüketimi sağlık riskleri ve doku yaralanmalarıyla mücadelede önemli rol oynar. Günümüzde ROS'un insan sağlığı üzerine etkileri ve AOX'lar gittikçe artan ilgi alanı haline gelmiştir. Hastalıkların önlenmesinde AOX takviyelerin kullanımı, radikallerin faydalı biyolojik işlevlerini yerine getirmelerine engel olmadan fazla serbest radikal düzeylerinin düşürülmesine yardımcı olurlar. Bu nedenle bitkisel ekstraktların AOX kapasite düzeyinin ölçülmesi önemlidir [5, 13, 14]. Toplam antioksidan kapasite (TAC) ölçümünde en çok kullanılan yöntemler; 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit (ABTS) [15], CUPric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC) (bakır(II) iyonu indirgeme esaslı antioksidan kapasite) [13], demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan güç yöntemi (FRAP) [16] ve 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürme kapasitesi yöntemi [17] biçimindedir.

Yapılan çalışmalarda çeşitli gıda maddelerinin AOX kapasiteleri ile birlikte radikal süpürme etkinlikleri de incelenmektedir [18, 19]. Bu yöntemler arasında *N, N*-dimetil-*p*-fenilen diamin hidroklorür (DMPD) yöntemi önemlidir. Hirayama ve Unohara [20] ultra eser miktardaki demirin katalitik tayininde DMPD kullanmışlardır. Daha sonra yapılan bir çalışmada DMPD'den oksitlenmiş renkli ürün oluşumunun engellenmesine dayanan şarapta TAC tayini yapılmıştır [18]. Yöntemde ABTS/TEAC (troloks eşdeğer antioksidan kapasite) [15] yöntemindeki ABTS radikale benzer şekilde katyonik DMPD-yarıkinon (DMPDQ) radikali (mürdüm renkli) oluşturularak TAC tayin edilmiştir, bkz. (1.1) [18]. Oksidan ortamında oluşan renkli DMPDQ radikali (DMPD⁺ [sic] in [18]) çözeltilisine antioksidan (AO) eklenmesiyle çözelti renksizleşir [18]. Yiyecek ve içecek örneklerinde DMPD reaktifi ile TAC tayininde örnek çözeltisi içinde bulunan AOX'ların radikal süpürme etkinliği, radikal başlangıçtaki renk şiddetinin azalmasına bağlı olarak toplam antioksidan kapasite (TAC) olarak hesaplanır [18, 21].



OS durumunun değerlendirilmesinde DMPD testinden faydalanılabilir. DMPD testi kullanılarak, eklenen AOX derişiminin bir fonksiyonu olarak OS azalmaları arasında eğrisel bir ilişki kurularak OS değerlendirilebilir. Oksidatif dönüşüm ve antioksidan kapasite arasında ters bir ilişki vardır [22]. Saha vd. [22] DMPD kolorimetrik testi ile şeker hastalığına sahip hastaların plazmasındaki antioksidan savunma seviyelerini tayin etmişlerdir. Serbest radikal hasarı ile birlikte antioksidanların TAC değerleri de ölçülebilir [23]. Diğer ROS türlerine göre daha az aktif olan süperoksit radikali lipidlerin peroksidasyonuna neden olan daha tehlikeli türler üretebilmesi nedeniyle süperoksit anyon radikali süpürme aktivitesi önemlidir [11].

Daha önceki çalışmamızda [24] süperoksit anyon radikali süpürme aktivitesi ve toplam antioksidan kapasite (TAC) tayini aynı anda yapılmıştır. Çalışmada NADH/PMS sistemi ile üretilen süperoksit anyonu DMPD reaktifini pembe renkli DMPDQ katyonik radikale oksitlemiş ve bir katyon değişim Nafyon® membranı tarafından tutulmuştur. Nafyon® membranın kolorimetrik olarak 514 nm'deki renk değişimine bağlı olarak süperoksit anyon radikali tayin edilmiştir. Süperoksit radikali süpürme aktivitesi sergileyen AOX'lar daha az DMPDQ radikali üretimine neden olarak Nafyon® membranında renk yoğunluğunun azalmasına yol açar. Çözeltinin 514 nm'deki absorbans farkı AOX derişimiyle orantılıdır. Membran renginin koyuluğuna bağlı olarak ortamdaki süperoksit anyon radikali ve AOX varlığı çıplak gözle de tespit edilebilmiştir. Çalışmada troloks (TR) ve farklı AOX'ların süperoksit radikali süpürme etkisine dayanarak toplam antioksidan kapasiteleri (TAC) dolaylı yoldan troloks eşdeğer olarak hesaplanmıştır. AOX'ın süperoksit radikali süpürmesinde AOX derişimi ile ΔA arasında çizilen grafikten kalibrasyon denklemleri, lineer derişim aralıkları çıkarılmıştır. Süperoksit radikali içeren örnek çözeltisinde AOX varlığında ölçüm için seçilen dalga boyunda (514 nm) absorbansdaki düşüşe bağlı olarak Nafyon® membran üzerinde tayin yapılmış ve TAC hesaplanmıştır. TR kalibrasyon eğrisinin eğiminin (molar absorplama katsayısı - ε_{TR}) kullanılan antioksidan kalibrasyon eğrisinin eğimine (molar absorplama katsayısı - ε_{AOX}) bölünmesiyle Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite Katsayısı (TEAC katsayısı) hesaplanmıştır. TEAC katsayısı yüksek olan AOX'lar yüksek süperoksit anyon radikali süpürme etkisine sahiptir.

Nafyon® membran tayin yöntemini modifiye ettiğimiz bu çalışmamızda membran yerine sulu çözeltide çalışılmıştır. Nafyon® membran ile yapılan çalışmanın hassasiyeti daha fazla olmasına rağmen Nafyon® membran mevcut olmadığı durumlarda sulu çözeltide çalışma gerekli olmaktadır. DMPD reaktifi ile süperoksit radikali süpürme aktivitesi ve TAC tayini için yöntemin sulu çözelti çalışma şartları modifiye edilmiştir. NADH-PMS sistemi ile üretilen süperoksit radikalının DMPD reaktifi ile etkileşimi sonucu renklene çözeltinin renk şiddeti AOX varlığında AOX derişimiyle ters orantılı olarak azalmıştır. Süperoksit radikali içeren sulu çözeltideki renkli katyonik DMPDQ radikali 505 ve 552 nm’de maksimum absorbans vermiştir (bkz. Şekil 2). Çalışma dalga boyu olarak 552 nm seçilmiştir. Kullanılacak reaktif optimizasyonu sonucu yöntem 5 farklı AOX’a uygulanmıştır. AOX kalibrasyon grafikleri, lineer aralıkları ve TEAC katsayıları belirlenmiştir. Yöntem 3 farklı bitki çayı infüzyonuna uygulanarak siyah çay (*Camellia sinensis*), adaçayı (*Salvia officinalis*) ve kuşburnu çayı (*Rosa canina L.*) TAC tayini yapılmıştır. Radikal süpürücünün (bitki çayı) süperoksit radikaline etkisi için süpürücü derişimi ile yüzde inhibisyon (bkz. (1.2)) arasında çizilen grafikten EC50 değerleri hesaplanmıştır. Süperoksit anyon radikalının yüzde ellisinin giderilmesi için gerekli olan süpürücü miktarı (EC50 değerleri) µg/mL cinsinden hesaplanmış ve sonuçlar referans NBT-formazan ve ABTS yöntemindeki EC50 değerleri ile karşılaştırılmıştır. Bitki çaylarının TAC değerleri mmol TR/g bitki çayı cinsinden hem modifiye yöntemle hem de CUPRAC [13] ve ABTS [15] yöntemleri ile hesaplanmıştır.

$$\text{Yüzde inhibisyon} = (A_{Rf} - A_{Ör}) * 100 / A_{Rf} \quad (1.2)$$

Burada, A_{Rf} , süperoksit radikali içeren radikal süpürücü (AOX, bitki çayı) içermeyen referans çözeltisinin 552 nm’deki suya karşı absorbansını ve $A_{Ör}$, Süperoksit radikali ve radikal süpürücü (AOX, bitki çayı) içeren çözeltinin 552 nm’de suya karşı okunan absorbansını temsil etmektedir.

Referans NBT formazan yönteminde, NADH-PMS sistemi tarafından üretilen süperoksit radikali NBT reaktifi ile mavi renkli formazan ürünü oluşturur. Süperoksit radikal süpürücülerin (antioksidanların) eklenmesiyle inhibe edilen mavi renkli formazan ürünün rengi açılır. Süperoksit süpürücü antioksidanlar 560 nm’de azalmış absorbans ile daha az formazan oluşumuna neden olarak süperoksit radikal süpürme aktivitesinin ölçümünü mümkün kılar [25].

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyal

Analitik saflıktaki kimyasal maddeler ve kaynakları; troloks ((±)-6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman) (TR) (Fluka), (±)-kateşin hidrat (CAT), 2,2’-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit) diamonyum tuzu (ABTS), *N, N*-dimetil-*p*-fenilendiamin dihidroklorür (DMPD), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin hidroklorür), etanol (EtOH) (HPLC saflıkta), β-Nicotinamid adenin dinükleotid indirgenmiş disodyum tuz hidratı (NADH), fenazin metosulfat (PMS), L-glutasyon (indirgenmiş) (GSH), L-askorbik asit (AA), nitrotetrazolium mavi klorür (NBT), asetik asit (CH₃COOH), sodyum asetat trihidrat (CH₃COONa·3H₂O) (Sigma-Aldrich), disodyum hidrojen fosfat dihidrat (Na₂HPO₄·2H₂O) (Merck), sodyum fosfat mono bazik dihidrat (NaH₂PO₄·2H₂O) (Riedel-de Haen), hidroklorik Asit (HCl) (Sigma-Aldrich), amonyum asetat (NH₄COO) (Riedel de Haen).

2.2. Yöntem

2.2.1. Çözeltiler

2,0×10⁻² M DMPD stok çözeltisi 41,8 mg DMPD reaktifi biraz su ve 0,5 M 0,1 mL HCl ile çözülüp distile su eklenerek son hacim 10 mL olacak şekilde hazırlanmıştır [26]. 25 mL 4,0×10⁻³ M DMPD çalışma çözeltisi hazırlanırken 5 mL 2,0×10⁻² M DMPD ve distile su kullanılmıştır. 0,2 M tampon çözeltisi pH=5,7 asetat tamponu asetik asit ve sodyum asetat ile hazırlanmıştır. 936 µM NADH ve 500 µM PMS stok çözeltisi distile

suda çözülmüştür. 500 µM PMS stok çözeltisi distile su ile 120 µM çalışma çözeltisine seyreltilmiştir. Antioksidan stok çözeltileri $5,0 \times 10^{-3}$ M troluks, $1,0 \times 10^{-2}$ M kateşin ve $1,0 \times 10^{-2}$ M rutin etanolde, $2,0 \times 10^{-3}$ M glutasyon ve $2,0 \times 10^{-2}$ M askorbik asit distile suda çözülmüştür.

2.2.2. Modifiye NADH/PMS/DMPD Yöntemi

Modifiye NADH/PMS/DMPD yönteminde enzimatik olmayan süperoksit radikal üretimi NADH-PMS sistemiyle gerçekleştirilmiştir [25]. Yöntemde kullanılacak DMPD, NADH ve PMS reaktiflerinin optimum derişimlerinin belirlenmesi amacıyla aşağıda belirtilen hacim aralıklarında denemeler yapılmıştır.

Yöntem; 936 µM NADH (0,025 – 0,6) mL, $4,0 \times 10^{-3}$ M DMPD (0,050 – 0,6) mL, 0,2 M pH 5,7 asetat tamponu 0,25 mL üzerine 120 µM PMS (0,025-0,8) mL eklenip distile su ile deney çözelti hacmi 2,0 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışımı 50°C su banyosunda 30 dakika bekletilmiştir [24]. Çözelti absorbansı suya karşı 552 nm’de okunmuştur (Şekil 1).

2.2.3. Yöntem Üzerine Antioksidan Etkisi

Optimizasyon sonrası yöntem; 936 µM NADH 0,2 mL + $4,0 \times 10^{-3}$ M DMPD 0,5 mL + 0,2 M pH 5,7 asetat tamponu 0,25 mL + x mL AOX + 120 µM PMS 0,4 mL eklenip distile su ile çözelti hacmi 2,0 mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Yöntem 5 farklı çeşit AOX’a (TR, GSH, CT, RT ve AA) uygulanmıştır. Süpürücü olarak EtOH’de çözünen AOX’lar kullanıldığında çözelti içindeki toplam EtOH hacmi 0,1 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Toplam 0,1 mL EtOH sonrası çözelti son hacmi distile su ile 2,0 mL’ye tamamlanmıştır. Suda çözünen AOX’lar kullanıldığında EtOH çözeltiye hiç eklenmemiştir. Çözeltideki AOX’ın süperoksit radikali süpürücü etkisi AOX derişimine bağlı olarak incelenmiştir. Deneylede kullanılan her bir AOX derişimi ile ΔA (bkz. (2.1)) arasında çizilen grafiklerden AOX kalibrasyon denklemleri bulunmuştur. Her bir AOX derişimine bağlı olarak radikal süpürme etkinliğinin lineer olduğu aralık belirlenmiştir. Kalibrasyon denklemleri ve lineer aralıklar molarite (M) cinsinden hesaplanmıştır. Antioksidanların troluks eşdeğer antioksidan kapasite (TEAC) katsayıları hesaplanmıştır (bkz. (2.2)).

$$\Delta A = A_{Rf} - A_{ör} \quad (2.1)$$

Burada, A_{Rf} , süperoksit radikali içeren radikal süpürücü (AOX, bitki çayı) içermeyen referans çözeltisinin 552 nm’de suya karşı okunan absorbansını ve $A_{ör}$, süperoksit radikali içeren radikal süpürücü (AOX, bitki çayı) içeren çözeltinin 552 nm’de suya karşı okunan absorbansını temsil etmektedir.

$$TEAC \text{ Katsayısı} = \epsilon_{AOX} / \epsilon_{TR} \quad (2.2)$$

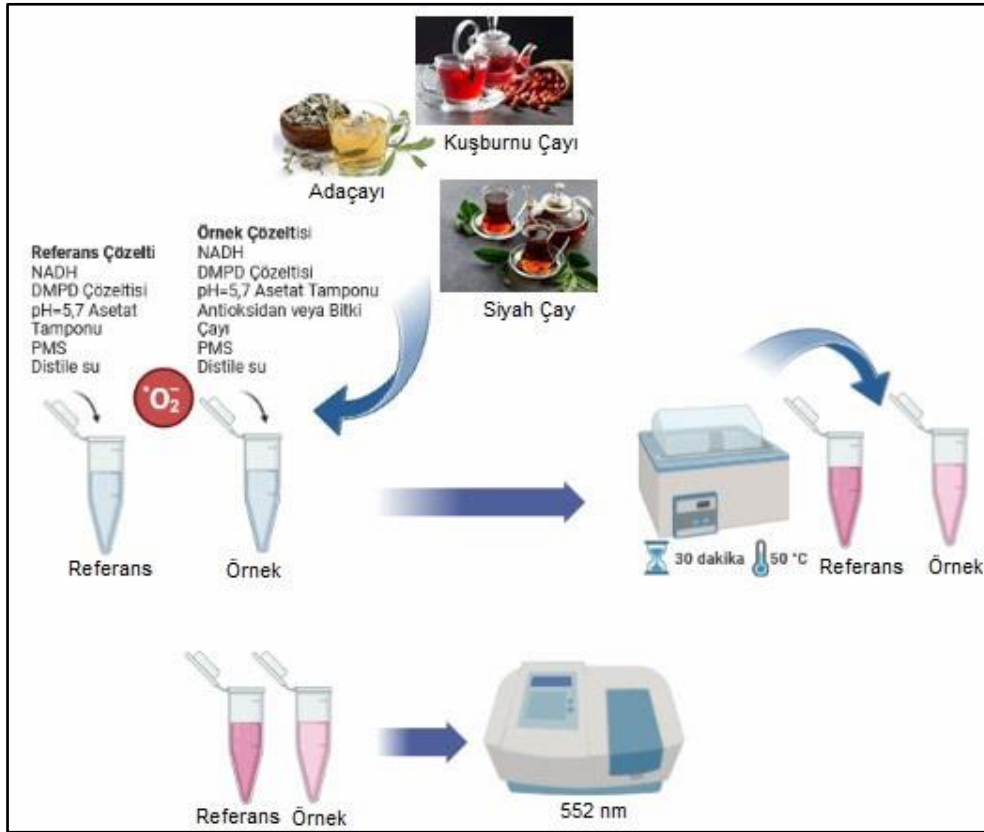
Burada, ϵ_{AOX} , kullanılan antioksidanın molar absorplama katsayısını ve ϵ_{TR} , TR’nin molar absorplama katsayısını temsil etmektedir.

2.2.4. Yöntemin Bitki Çaylarına Uygulanışı

Modifiye yöntem ile marketten satın alınan poşet siyah çay (*Camellia sinensis*), adaçayı (*Salvia officinalis*) ve kuşburnu çayı (*Rosa canina L.*) infüzyon (demleme) çözeltilerinin süperoksit anyon radikali süpürme etkinliği incelenmiş ve mmol TR/g bitki çayı cinsinden TAC tayini yapılmıştır. Ayrıca CUPRAC ve ABTS ile de TAC tayini yapıp, sonuçlar karşılaştırılmıştır. Bitki çaylarının µg/mL cinsinden EC50 değerleri modifiye edilen yöntemle, referans NBT-formazan ve ABTS yöntemindeki EC50 değerleri ile karşılaştırılmıştır.

EC50 değerleri ve TAC tayini için poşet bitki çayları tartılmıştır. Ortalama tartımı 1,48 g olan 3 farklı poşet adaçaya, ortalama tartımı 2,48 g olan 3 farklı poşet kuşburnu çaya ve ortalama tartımı 2,091 g olan siyah çaya infüzyon uygulanmıştır. Tartılan poşet çaylar 250 mL 100°C kaynar suda 2 dakika sallanarak 3 dakika

bekletilerek toplam 5 dakika demlenmiştir [27]. Çay infüzyon çözeltileri süzülüp, gerekli seyreltmelerden sonra denemelerde kullanılmıştır (Şekil 1).



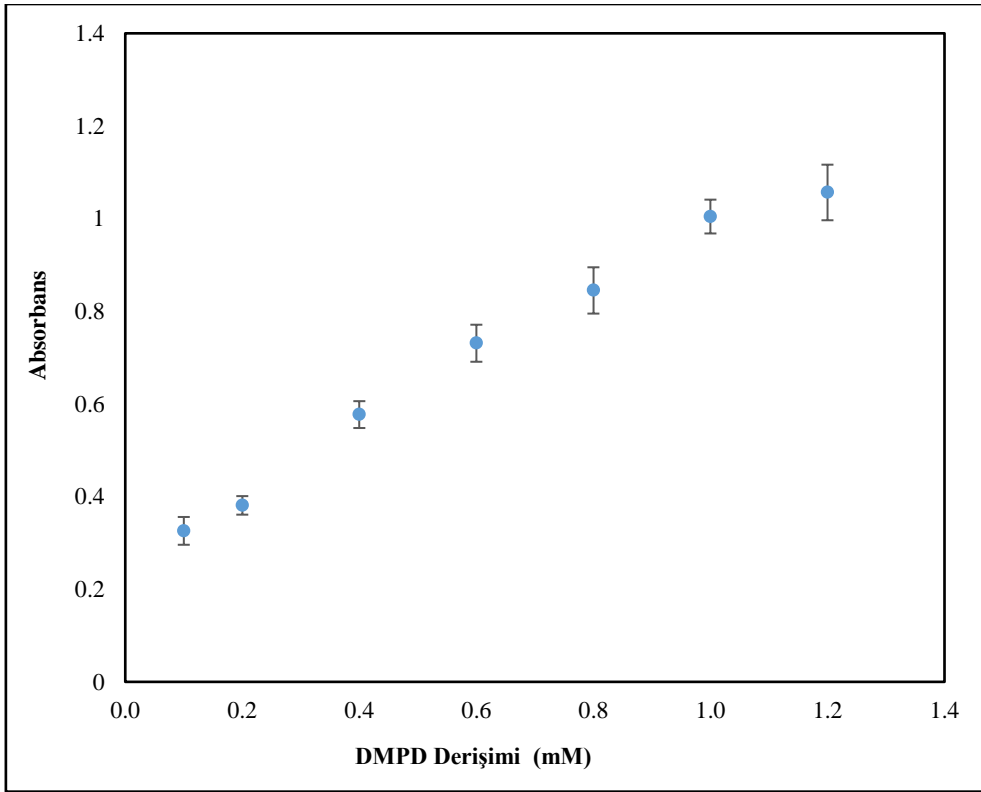
Şekil 1. Modifiye DMPD yöntemi diyagramı

3. Bulgular ve Tartışma

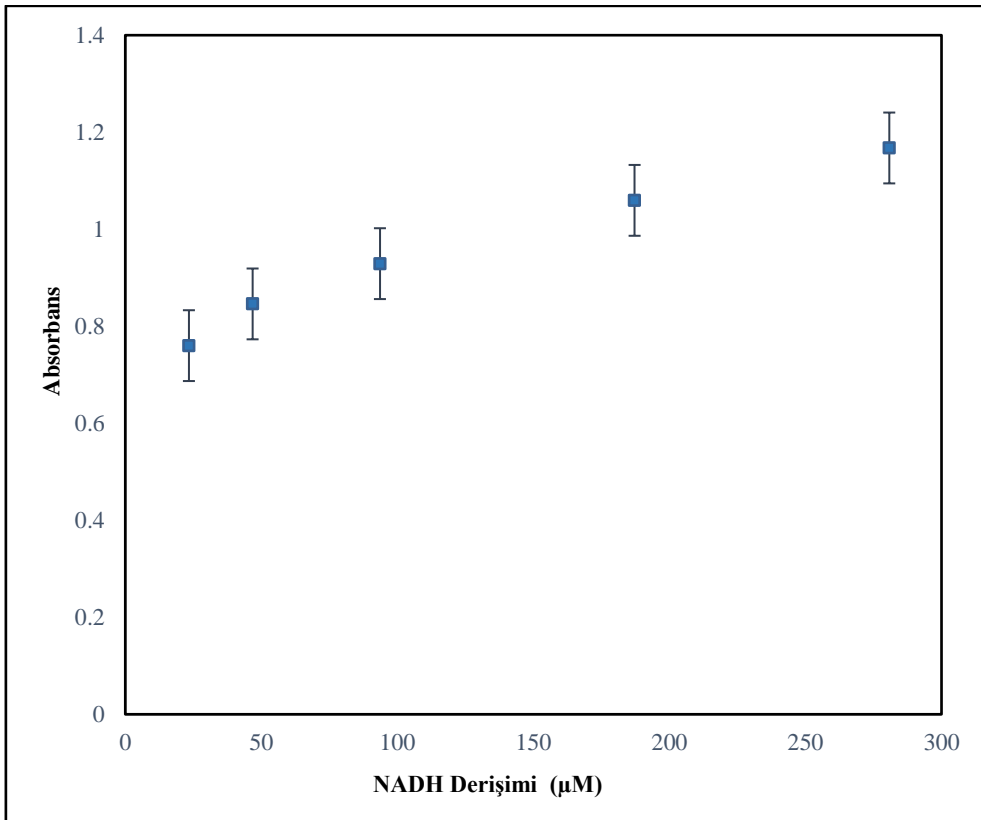
3.1. Modifiye NADH/PMS/DMPD Yöntem Optimizasyon Sonuçları

Yöntemde DMPD reaktifi ve süperoksit radikali içeren ortamda absorbandaki düşüşe göre tayin yapılacağından referans (radikal süpürücü içermeyen) çözelti absoransı 0,9-1,1 olabilecek reaktif derişimleri seçilmiştir. $4,0 \times 10^{-3}$ M DMPD reaktifinden 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 ve 0,6 mL alınıp 2,0 mL deney çözeltisi toplam hacmine bölünerek deney çözeltisi toplam hacmindeki DMPD derişimleri hesaplanmıştır. (Deney çözeltisindeki DMPD derişimleri: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 ve 1,2 mM DMPD'dir.) Deney çözeltisindeki DMPD derişimleri ile absorbanda optimizasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 2). Aynı şekilde 936 μ M NADH reaktifinden 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 ve 0,6 mL alınıp 2,0 mL deney çözeltisi toplam hacmine bölünerek deney çözeltisi toplam hacmindeki NADH derişimleri ve 120 μ M PMS reaktifinden 0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 ve 0,8 mL alınıp 2,0 mL deney çözeltisi toplam hacmine bölünerek deney çözeltisi toplam hacmindeki PMS derişimleri hesaplanmıştır (Deney çözeltisindeki NADH derişimleri: 27,4; 46,8; 93,6; 187,2 ve 280,8 μ M NADH'dir. Deney çözeltisindeki PMS derişimleri: 1,5; 3; 6; 12; 24; 36 ve 48 μ M PMS'dir). Deney çözeltisindeki NADH derişimleri ile absorbanda (Şekil 3) ve PMS derişimleri ile absorbanda (Şekil 4) arasında optimizasyon grafikleri çizilmiştir.

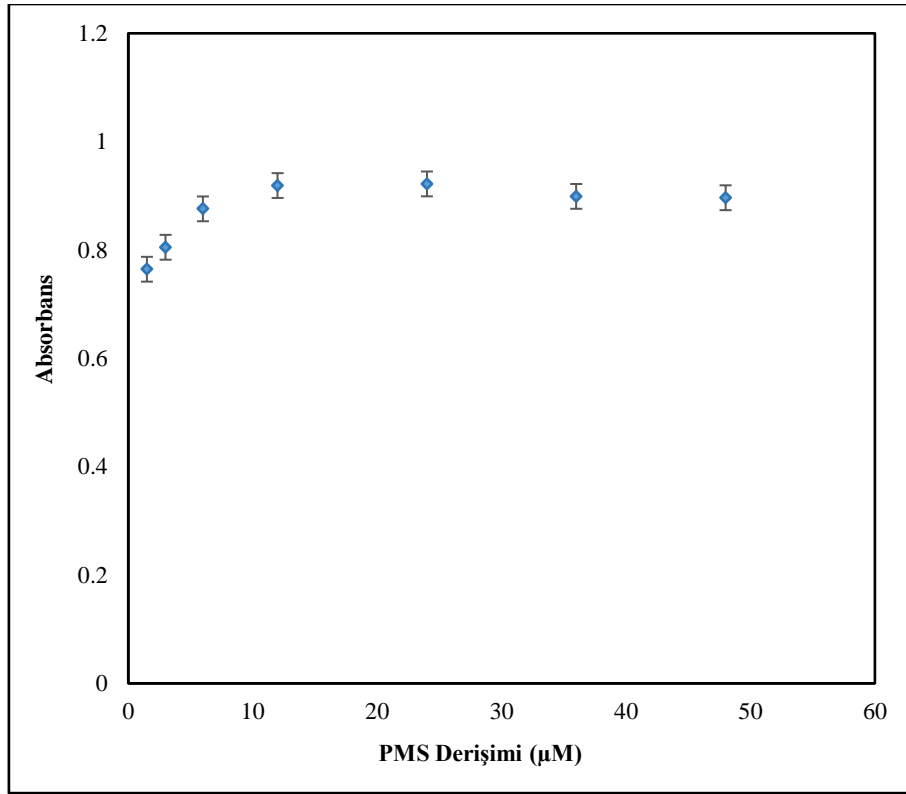
Yöntemde referans absorbandındaki düşüşe göre tayin yapılacağından DMPD, NADH ve PMS optimizasyon grafiklerinden referans (radikal süpürücü içermeyen) çözelti absoransı 0,9-1,1 arasında olan DMPD, NADH ve PMS derişimleri en uygun derişim olarak seçilmiştir. En uygun derişimler DMPD için, 1,0 mM DMPD; NADH için, 93,6 μ M NADH ve PMS için, 24 μ M PMS'dir. Süperoksit radikali içeren ortamda renklenen deney çözeltisinin süpürücü (AOX veya bitki çayı) ilavesiyle DMPD radikali süpürüldükçe çözelti renginde azalma meydana gelir. Dolayısıyla, absorbanda düşüş oluşur.



Şekil 2. DMPD optimizasyonu (Ölçüm dalga boyu 552 nm)



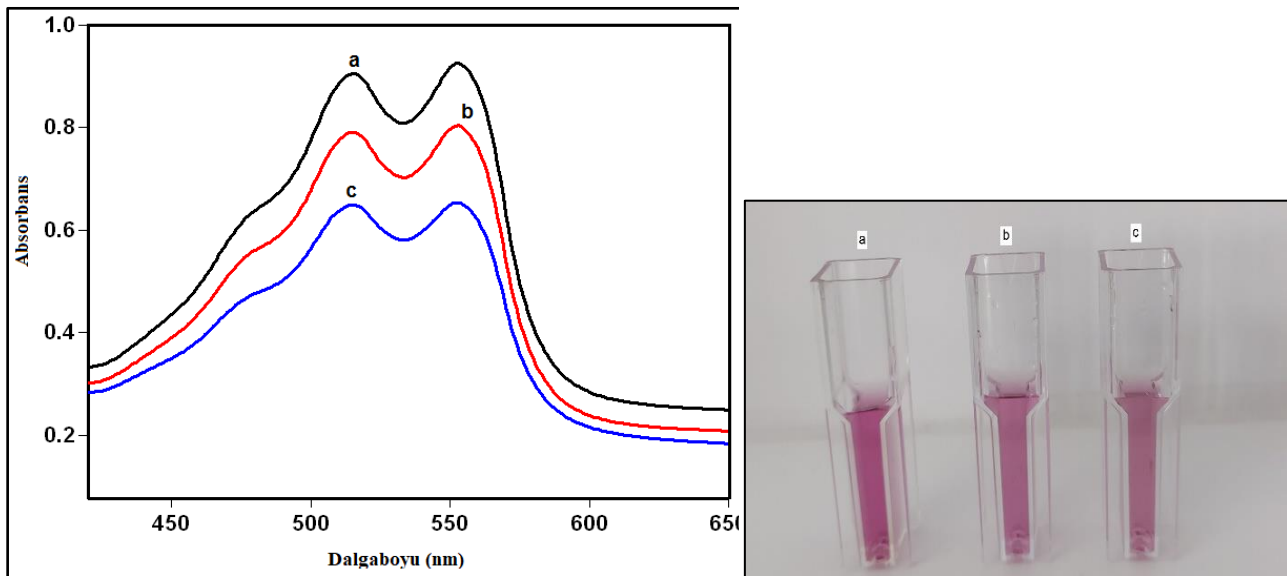
Şekil 3. NADH optimizasyonu (Ölçüm dalga boyu 552 nm)



Şekil 4. PMS optimizasyonu (Ölçüm dalga boyu 552 nm)

3.2. Antioksidan ve Bitki Çaylarının Yöntem Üzerindeki Etkisi

Yöntem optimizasyonu sonrası süperoksit anyon radikali üzerine 5 farklı AOX'ın (troloks, glutatyon, kateşin, rutin ve askorbik asit) ve 3 farklı bitki çayı infüzyonunun etkisi incelenmiştir. AOX kalibrasyon grafikleri, lineer aralıkları ve TEAC katsayıları belirlenmiştir (Tablo 1 ve Şekil 5). Yöntem 3 farklı bitki çayı infüzyonuna uygulanarak siyah çay (*Camellia sinensis*), adaçayı (*Salvia officinalis*) ve kuşburnu çayı (*Rosa canina L.*) TAC değerleri mmol TR/g bitki çayı cinsinden hem modifiye yöntemle hem de CUPRAC ve ABTS yöntemi ile hesaplanmıştır. Bitki çayların süperoksit radikali süpürme aktivitesi modifiye edilen yöntemle EC50 değerleri µg/mL cinsinden hesaplanmıştır. Sonuçlar referans NBT-formazan ve ABTS yöntemindeki EC50 değerleri ile karşılaştırılmıştır (Tablo 2 ve Şekil 6).



Şekil 5. a) DMPD ve süperoksit radikali içeren sulu çözelti b) DMPD, süperoksit radikali ve $1,0 \times 10^{-5}$ M troloks içeren çözelti c) DMPD, süperoksit radikali ve $4,0 \times 10^{-5}$ M troloks içeren çözelti

Tablo 1. Antioksidanların kalibrasyon denklemleri, lineer aralık ve TEAC sayıları

Antioksidan (AOX)	Kalibrasyon Denklemi	Lineer Aralık	TEAC Sayısı
Troloks (TR)	$\Delta A = 3002,4C + 0,053$ $R^2 = 0,9856$	$1,0 \times 10^{-5} - 1,0 \times 10^{-4} M$	1
Glutasyon (GSH)	$\Delta A = 9198,9C + 0,0991$ $R^2 = 0,9913$	$1,0 \times 10^{-5} - 5,0 \times 10^{-5} M$	3,06
Kateşin (CT)	$\Delta A = 10177C + 0,0211$ $R^2 = 0,9958$	$1,0 \times 10^{-5} - 6,0 \times 10^{-5} M$	3,39
Askorbik Asit (AA)	$\Delta A = 1980,5C - 0,159$ $R^2 = 0,9860$	$1,25 \times 10^{-4} - 5,0 \times 10^{-4} M$	0,66
Rutin (RT)	$\Delta A = 361,6C + 0,136$ $R^2 = 0,9669$	$1,0 \times 10^{-4} - 8,0 \times 10^{-4} M$	0,12

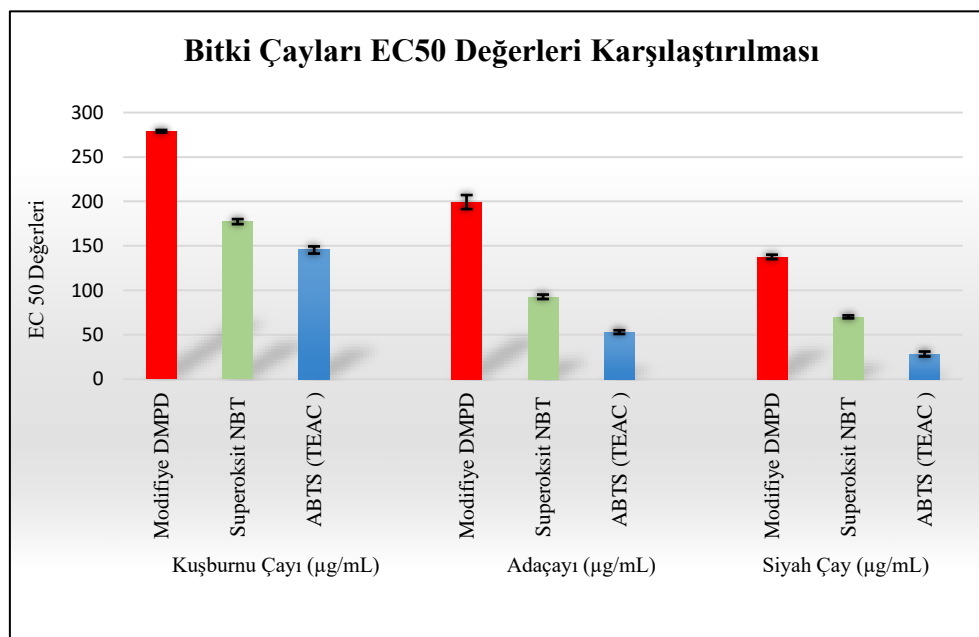
Tablo 1’de görüldüğü üzere AOX’ların NADH/PMS sistemi ile üretilen süperoksit anyon radikali süpürme aktivitesi TEAC katsayılarına göre $CT > GSH > TR > AA > RT$ şeklinde sıralanabilir. Süperoksit radikali süpürmesine bağlı olarak ΔA ile antioksidan derişimi arasında çizilen grafikten AOX’ların kalibrasyon denklemleri çıkarılıp, lineer aralıkları bulunmuştur (bkz. Tablo 1).

Tablo 2. Bitki çayı infüzyonlarının önerilen yöntem, CUPRAC ve ABTS TAC değerleri

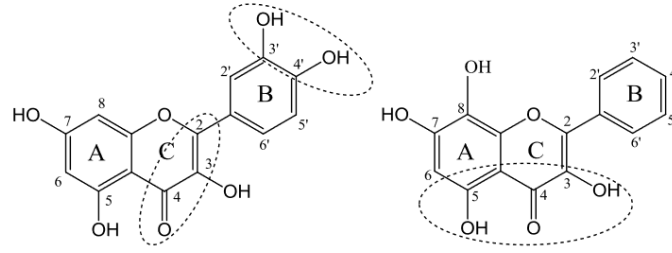
Bitki Çayı	Önerilen DMPD Yöntemi	CUPRAC Yöntemi	ABTS Yöntemi
Kuşburnu Çayı TAC değeri (mmol TR /g Bitki Çayı) ^a	$0,32 \pm 0,015$	$0,29 \pm 0,010$	$0,22 \pm 0,006$
Adaçayı (mmol TR/g Bitki Çayı) ^a	$0,59 \pm 0,064$	$0,47 \pm 0,043$	$0,36 \pm 0,047$
Siyah Çay (mmol TR /g Bitki Çayı) ^a	$1,86 \pm 0,099$	$1,02 \pm 0,049$	$0,73 \pm 0,044$

^a Sonuçlar TR ekivalent olarak hesaplanmıştır. $\bar{x} \pm$ standart sapma; $N = 3$

Bitki çaylarının süperoksit radikali %50 inhibisyon değerleri (EC₅₀) modifiye yöntem, NBT-formazan ve ABTS yöntemine göre $\mu\text{g/mL}$ cinsinden Şekil 6’da gösterilmiştir. Şekil 6 incelendiğinde bitki çaylarının modifiye edilen yöntemde EC₅₀ değerleri; kuşburnu çayı, 279 $\mu\text{g/mL}$, 199,3 $\mu\text{g/mL}$ adaçayı ve siyah çay 137,6 $\mu\text{g/mL}$ ’dir. NBT-formazan yönteminde EC₅₀ değerleri; kuşburnu çayı 177,3 $\mu\text{g/mL}$, adaçayı 92,7 $\mu\text{g/mL}$ ve siyah çay 70,1 $\mu\text{g/mL}$ ’dir. ABTS yöntemindeki EC₅₀ değerleri; kuşburnu çayı 145,4 $\mu\text{g/mL}$, adaçayı 52,9 $\mu\text{g/mL}$ ve siyah çay 28,3 $\mu\text{g/mL}$ ’dir. Tablo 2’de görüldüğü üzere üç farklı antioksidan kapasite tayin yöntemi uygulanan bitki çayı infüzyonlarının üç yöntemde de (önerilen modifiye DMPD, CUPRAC ve ABTS) TAC değerleri yüksekten düşüğe doğru siyah çay, kuşburnu çayı ve adaçayı şeklinde sıralanabilir. Yani süperoksit radikalının yüzde elli oranında süpürülmesi için en az miktarda kullanılan siyah çay infüzyon çözeltisi en yüksek TAC değerine sahiptir.

**Şekil 6.** Bitki çayları EC₅₀ değerleri karşılaştırılması

Yöntemde uygulanan beş farklı antioksidan çözeltisinin ve siyah çay, adaçayı, kuşburnu çayı bitki çayı infüzyonlarının süperoksit radikali süpürme aktiviteleri içerdikleri fenolik bileşiklerin yapısı ile ilişkilidir. Bitkilerde bol miktarda bulunan flavonoidler fenolik bileşiklerdir.



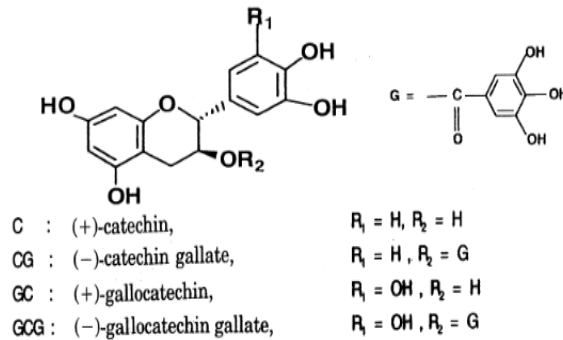
Şekil 7. Flavonoidlerin antioksidan aktivite yapı ilişkisi [28]

Şekil 7’de de gösterildiği gibi flavonoidler (antioksidanlar) aşağıdaki özelliklerin birine veya birkaçına sahip olduklarında daha yüksek antioksidan aktivite gösterirler [28]:

- Elektron delokalizasyonuna katkı sağlayan B halkasındaki o-dihidroksi (kateşol- iki komşu hidroksil grubu taşıyan benzen halkası) yapısına sahip olması,
- C halkasındaki ikinci ve üçüncü karbonlar arası çifte bağ ve C halkasının dördüncü karbonundaki keto grubunun B halkasından elektron delokalizasyonunu arttırması (Aromatik bileşiğin elektron delokalizasyonu antioksidan güç ile doğru orantılıdır),
- Antioksidanların maksimum radikal süpürme etkisine sahip olabilmesi için A ve C halkalarının üçüncü ve beşinci pozisyonunda hidroksil gruplarının olması gerekmektedir. Ayrıca 5-hidroksi-4-keto grubu güçlü bir metal kelatlayıcıdır ve antioksidan etkinliğini artırır [29, 30].

Literatürde süperoksit radikali üzerine antioksidan aktivitesi ve bitki çayları (siyah çay, adaçayı ve kuşburnu çayı) üzerine yapılan çalışmalarda Şekil 7’de üzerinde anlatıldığı gibi flavonoidlerin yapısının antioksidan aktivitesi üzerine etkili olduğu gösterilmiştir.

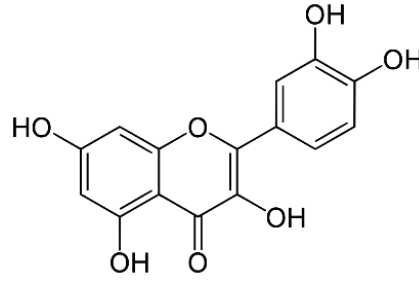
Çayın (*Camellia sinensis*) ana bileşeni kateşinlerdir (Şekil 8). Flavonoidlerin flavan-3-ol alt grubuna [31] ait kateşinlerin süperoksit radikali süpürme etkisi B halkasındaki kateşol ve pirogallol grubuna bağlıdır [32-34].



Şekil 8. Kateşin yapısı [35]

Çay büyük ölçüde kateşinleri içerdiği için çayın antioksidan özellikleri önemli oranda kateşinlerden kaynaklanmaktadır. Yıldırım vd. [36]’nin çalışmasında Türk çayının antioksidan aktivitesinin adaçayı antioksidan aktivitesinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Farklı bir çalışmada çay kateşinlerinin süperoksit radikali süpürme etkisi incelenmiştir [37].

Yapılan diğer bir çalışmada [38] hem enzimatik (ksantin/ksantin oksidaz) hem de enzimatik olmayan (NADH/PMS) sistemiyle oluşturulan süperoksit radikalının süpürülmesinde kateşinler dışındaki flavonoidlerin etkisi araştırılmıştır. Çalışmada flavonoid alt grubu flavonollere [31] ait kuersetin (Şekil 9), mirisetin ve rutin antioksidanları en fazla süperoksit radikali süpürme aktivitesi göstermiştir.



Şekil 9. Kuersetin

Karakaya vd. [39] tarafından yapılan çalışmada siyah çay, adaçayı, kuşburnu çayının kuersetin, luteolin, apigenin, kaemferol içerikleri ve miktarları karşılaştırılmış en fazla içeriğe siyah çayın daha sonra adaçayının ve son olarak kuşburnu çayının sahip olduğu görülmüştür.

Modifiye DMPD yönteminin uygulandığı siyah çay, adaçayı ve kuşburnu çayının süperoksit radikali süpürme aktivitesi hem literatürler dikkate alındığında hem de sonuçlarımıza göre büyükten küçüğe doğru siyah çay, adaçayı ve kuşburnu çayı şeklinde sıralanmaktadır. Siyah çayın aktivitesinin adaçayı ve kuşburnu aktivitesinden yüksek olması; çayın içerdiği kateşinler, kuersetin, luteolin, apigenin, kaemferol antioksidanlarının miktarı ve etkisinden kaynaklanmaktadır [40].

Modifiye DMPD yöntemi, CUPRAC ve ABTS yöntem sonuçlarına göre bitki çaylarının TAC değerleri (bkz. Tablo 2) ve Şekil 6'daki EC50 değerleri incelendiğinde sonuçların literatürlerdeki antioksidan yapı aktivite ilişkisi ile uyumlu olduğu gözlenmektedir.

4. Sonuçlar

Çalışmada NADH/PMS sistemi ile üretilen süperoksit radikali tarafından DMPD reaktifi pembe renkli DMPDQ radikaline oksitlenir. Süperoksit süpürme aktivitesi sergileyen radikal süpürücü varlığında daha az DMPDQ radikali oluşumu nedeniyle çözeltinin renk yoğunluğu azalır. 552 nm dalga boyundaki absorpsiyon ölçümü sonrası radikal süpürücü içermeyen referans çözeltisi ile süpürücü içeren örnek çözeltisi arasında ΔA hesaplanmıştır. ΔA ile AOX derişimi arasında çizilen grafikten AOX'ların molarite cinsinden kalibrasyon eğrileri, lineer aralıkları ve TEAC katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 1). TEAC katsayılarına göre AOX'lar sıralandığında CT'nin en yüksek RT'nin en düşük süperoksit radikali süpürme aktivitesine sahip olduğu görülür. Süpürücü olarak kuşburnu çayı, adaçayı ve siyah çay infüzyon çözeltilerine çalışılan modifiye yöntem, NBT-formazan ve ABTS yöntemi uygulanıp, EC50 değerleri hesaplanmıştır. Tüm yöntemlerdeki EC50 değerleri karşılaştırılıp düşükten yükseğe doğru sıralandığında tüm yöntemlerde en düşük EC50 değerinin siyah çaya ait olduğu görülmüştür. Siyah çaydan sonra adaçayı ve kuşburnu çayı gelmektedir. EC50 değeri en düşük olan siyah çay en yüksek radikal süpürme aktivitesine sahiptir (bkz. Şekil 6). Ayrıca bitki çayları infüzyonlarının süperoksit radikali süpürme etkisine bağlı olarak çalışılan modifiye yöntem, CUPRAC ve ABTS yöntemleri ile TAC değerleri hesaplanmıştır (bkz. Tablo 2). Tablo 2'de görüldüğü üzere önerilen DMPD, CUPRAC ve ABTS yöntemi uygulanan bitki çayı infüzyonlarının üç yöntemde de TAC değerleri yüksekten düşüğe doğru siyah çay, adaçayı ve kuşburnu çayı olarak sıralanmaktadır. Yani süperoksit radikalinin yüzde elli oranında süpürülmesi için kullanılan siyah çay infüzyon çözeltisi en yüksek TAC değerine sahiptir. Tablo 2'deki bitki çayı infüzyonlarının TAC değerleri incelendiğinde EC50 değerleri ile TAC değerlerinin tutarlı olduğu görülmektedir. Modifiye edilen yöntemle 552 nm'de absorpsiyon ölçümü yapılmadan da çıplak gözle çözeltinin rengindeki değişime bakılarak ortamdaki hem süperoksit radikali hem de antioksidan varlığı tespit edilebilir.

Yazar Katkıları

Yazar makalenin son halini okuyup onaylamıştır.

Çıkar Çatışması

Yazar hiçbir çıkar çatışması olmadığını beyan etmektedir.

Etik İnceleme ve Onay

Etik Kurulu'ndan onay alınmasına gerek yoktur.

Teşekkür

Bu çalışma, 114Z089 proje numarasıyla Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) ve FDP-2017-24832 proje numarasıyla Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Kaynakça

- [1] B. Halliwell, *Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life*, Plant Physiology 141 (2) (2006) 312-322.
- [2] P. A. Riley, *Free radicals in biology: Oxidative stress and the effects of ionizing radiation*, International Journal of Radiation Biology 65 (1) (1994) 27-33.
- [3] L. A. Pham-Huy, H. He, C. Pham-Huy, *Free radicals, antioxidants in disease and health*, International Journal of Biomedical Science 4 (2) (2008) 89-96.
- [4] V. I. Lushchak, O. Lushchak, *Interplay between reactive oxygen and nitrogen species in living organisms*, Chemico-Biological Interactions 349 (2021) 109680 6 pages.
- [5] B. Halliwell, *Free radicals and antioxidants: Updating a personal view*, Nutrition Reviews 70 (5) (2012) 257-265.
- [6] B. Li, S. B. Vik, Y. Tu, *Theaflavins inhibit the ATP synthase and the respiratory chain without increasing superoxide production*, The Journal of Nutritional Biochemistry 23 (8) (2012) 953-960.
- [7] H. Takahashi, A. Nishina, R. H. Fukumoto, H. Kimura, M. Koketsu, H. Ishihara, *Selenocarbamates are effective superoxide anion scavengers in vitro*, European Journal of Pharmaceutical Sciences 24 (4) (2005) 291-295.
- [8] M. D. Brand, *The sites and topology of mitochondrial superoxide production*, Experimental Gerontology 45 (7-8) (2010) 466-472.
- [9] S. Dimauro, E. A. Schon, *Mitochondrial respiratory-chain diseases*, The New England Journal of Medicine 348 (26) (2003) 2656-2668.
- [10] I. Fridovich, *Oxygen toxicity: A radical explanation*, Annual Review of Biochemistry 201 (8) (1995) 1203-1209.
- [11] B. Halliwell, J. M. C. Gutteridge, *Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease*, Biochemical Journal 219 (1) (1984) 1-14.
- [12] G. Martemucci, C. Costagliola, M. Mariano, L. D'andrea, P. Napolitano, A. G. D'Alessandro, *Free radical properties, source and targets, antioxidant consumption and health*, Oxygen 2 (2) (2022) 48-78.
- [13] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S. E. Karademir, *Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (26) (2004) 7970-7981.

- [14] F. Shahidi, P. Ambigaipalan, *Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review*, Journal of Functional Foods 18 (2015) 820–897.
- [15] R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*, Free Radical Biology and Medicine 26 (9–10) (1999) 1231–1237.
- [16] I. F. F. Benzie, J. J. Strain, *Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration*, Analytical Biochemistry 239 (1996) 70–76.
- [17] W. Brand-Williams, M. E. Cuvelier, C. Berset, *Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity*, LWT - Food Science and Technology 28 (1) (1995) 25–30.
- [18] V. Fogliano, V. Verde, G. Randazzo, A. Ritieni, *Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 47 (3) (1999) 1035–1040.
- [19] M. D. Rivero-Pérez, P. Muñoz, M. L. González-Sanjosé, *Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 55 (14) (2007) 5476–5483.
- [20] K. Hirayama, N. Unohara, *Spectrophotometric catalytic determination of an ultratrace amount of iron(III) in water based on the oxidation of N, N-Dimethyl-p-phenylenediamine by hydrogen peroxide*, Analytical Chemistry 60 (23) (1988) 2573–2577.
- [21] M. N. Ashgar, I. U. Khan, M. N. Arshad, L. Sherin, *Evaluation of antioxidant activity using an Improved DMPD radical cation decolorization assay*, Acta Chimica Slovenica 54 (2007) 295–300.
- [22] P. Saha, P. Banerjee, L. Auddya, P. Pal, M. Das, M. Dutta, S. Sen, M. C. Mondal, A. Kumar, U. K. Biswas, *Simple modified colorimetric methods for assay of total oxidative stress and antioxidant defense in plasma: Study in diabetic patients*, Archives of Medicine 7 (5) (2015) 1–7.
- [23] S. D. Çekiç, A. N. Avan, S. Uzunboy, R. Apak, *A colourimetric sensor for the simultaneous determination of oxidative status and antioxidant activity on the same membrane: N, N-Dimethyl-p-phenylene diamine (DMPD) on Nafion*, Analytica Chimica Acta 865 (1) (2015) 60–70.
- [24] F. Dondurmacioğlu, A. N. Avan, R. Apak, *Simultaneous detection of superoxide anion radicals and determination of the superoxide scavenging activity of antioxidants using an N,N- dimethyl-p-phenylene diamine/Nafion colorimetric sensor*, Analytical Methods 9 (43) (2017) 6202–6212.
- [25] M. Nishikimi, N. Appaji Rao, K. Yagi, *The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen*, Biochemical and Biophysical Research Communications 46 (2) (1972) 849–854.
- [26] M. P. Chagas, J. C. C. Santos, E. B. G. N. Santos, T. D. Oliveira, M. Korn, *Exploiting iminoquinone free radical production for thiol based drugs determination in pharmaceutical formulations*, Journal of the Brazilian Chemical Society 20 (9) (2009) 1646–1652.
- [27] R. Apak, K. Güçlü, M. Özyürek, S. Esin Karademir, E. Erçağ, *The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas*, International Journal of Food Sciences and Nutrition 57 (5–6) (2006) 292–304.
- [28] D. Amic, D. Davidovi-Ami, D. Belo, V. Rastija, B. Lui, N. Trinajsti, *SAR and QSAR of the antioxidant activity of flavonoids*, Current Medicinal Chemistry 14 (2007) 827–845.
- [29] A. T. Diplock, J. L. Charuleux, G. Crozier-Willi, F. J. Kok, C. Rice-Evans, M. Roberfroid, W. Stahl, J. Viña-Ribes, *Functional food science and defence against reactive oxidative species*, British Journal of Nutrition 80 (S1) (1998) 77–112.

- [30] C. A. Rice-Evans, N. J. Miller, G. Paganga, *Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids*, Free Radical Biology & Medicine 20 (7) (1996) 933–956.
- [31] M. Atinç, İ. Kalkan, *Flavonoids in food and their health benefits*, Aydın Gastronomy 2 (1) (2018) 31–38.
- [32] K. Furuno, T. Akasako, N. Sugihara, *The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids*, Biological and Pharmaceutical Bulletin 25 (1) (2002) 19–23.
- [33] A. A. Bunaciu, A. F. Danet, Ş. Fleschin, H. Y. Aboul-Enein, *Recent applications for in vitro antioxidant activity assay*, Critical Reviews in Analytical Chemistry 46 (5) (2016) 389–399.
- [34] B. A. Sutherland, R. M. A. Rahman, I. Appleton, *Mechanisms of action of green tea catechins, with a focus on ischemia-induced neurodegeneration*, The Journal of Nutritional Biochemistry 17 (5) (2006) 291–306.
- [35] T. Toyo'oka, T. Kashiwazaki, M. Kato, *On-line screening methods for antioxidants scavenging superoxide anion radical and hydrogen peroxide by liquid chromatography with indirect chemiluminescence detection*, Talanta 60 (2-3) (2003) 467–475.
- [36] A. Yildirim, A. Mavi, M. Oktay, A. A. Kara, O. F. Algur, V. Bilaloglu, *Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (Tilia argentea Desf ex DC), sage (Salvia triloba L.), and Black tea (Camellia sinensis) extracts*, Journal of Agricultural and Food Chemistry 48 (10) (2000) 5030–5034.
- [37] T. Unno, F. Yayabe, T. Hayakawa, H. Tsuge, *Electron spin resonance spectroscopic evaluation of scavenging activity of tea catechins on superoxide radicals generated by a phenazine methosulfate and NADH system*, Food Chemistry 76 (2) (2002) 259–265.
- [38] J. Robak, R. J. Gryglewski, *Flavonoids are scavengers of superoxide anions*, Biochemical Pharmacology 37 (5) (1988) 837–841.
- [39] S. Karakaya, S. Nehir El, *Quercetin, luteolin, apigenin and kaempferol contents of some foods*, Food Chemistry 66 (3) (1999) 289–292.
- [40] S. Salman, G. Öz, R. Felek, A. Haznedar, T. Turna, F. Özdemir, *Effects of fermentation time on phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of green, oolong, and black teas*, Food Bioscience 49 (2022) 101884 9 pages.