



## Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler

**Sevil ALBAYRAK<sup>1</sup>, Osman SAĞDİCİ<sup>2</sup>, Ahmet AKSOY<sup>1</sup>**

*Erciyes Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, KAYSERİ*

*Erciyes Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, KAYSERİ*

### ÖZET

Bu çalışmada bitkisel ürünler ve gıdaların antioksidan kapasitesini belirlemek için kullanılan yöntemler birbirleri ile karşılaştırmalı olarak tanımlanmıştır. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitesini değerlendirmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler elektron transfer (ET) ve hidrojen atom transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler olmak üzere iki grup altında incelenebilir. HAT temelli yöntemler oksijen radikal absorban kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemlerini içermektedir. ET temelli yöntemler ise Folin-Ciocalteu ayırıcı ile toplam Fenolik yöntemi (FCR), Trolox eşiti antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH yöntemini içermektedir. Elektron transfer yöntemleri substratın (antioksidan) indirgeyici yeteneğini ölçerken, hidrojen atom transfer yöntemleri substratın hidrojen verebilme yeteneğini ölçer. Hidrojen atom vermenin lipid peroksidasyonunun radikal zincir reaksiyon evresinde önemli olduğu açıktır. Bu nedenle hidrojen transfer yöntemleri zincir-kırma antioksidan kapasitesinin ölçülmesi ile ilişkilidir. Birçok durumda bir bileşiğin antioksidan kapasitesi veya radikal yakalama yeteneği hidrojen atom verebilme kolaylığı ile alakalıdır, bileşiğin redoks potansiyeli gerekli değildir. Genellikle hidrojen atom transferi ölçen yöntemler elektron transfer reaksiyonlarını ölçen yöntemlere göre daha çok tercih edilmektedir. Çalışmada çok sayıda elektron transfer yönteminin kullanılması gereksizdir. Bu yöntemler benzer redoks reaksiyonlarına dayandığı için yöntemler arasında ilişki vardır. İndirgeyici kapasiteyi ölçen yöntemler kullanılacağı zaman yaygın olarak kullanılan ve geçerliliği yüksek olan yöntemi tercih etmek önemlidir. Benzer olarak, hidrojen atom transferi ölçen yöntemler arasında ORAC yöntemi büyük oranda geçerlilik kazanmıştır, güvenilir ve örneğin radikal zincir kırma kapasitesi hakkında kullanışlı bilgi vermektedir.

### Anahtar Kelimeler

Antioksidan kapasite, DPPH, FRAP, ORAC, TEAC,

## The assays used for assessing antioxidant capacities of herbal products and foods

### ABSTRACT

In this study, the assays used for antioxidant capacity of herbal products and foods were described comparatively each other. Various assays have been used to evaluation of antioxidant capacity of herbal products and foods. These assays should be classified into two types: assays based on hydrogen atom transfer (HAT) reactions and assays based on electron transfer (ET). HAT based assays include oxygen radical absorbance capacity (ORAC), total radical trapping antioxidant parameter (TRAP), and crocin bleaching assays. ET-based assays include the total phenols assay by Folin-Ciocalteu reagent (FCR), Trolox equivalence antioxidant capacity (TEAC), ferric ion reducing antioxidant power (FRAP), "total antioxidant potential" assay using a Cu (II) complex as an oxidant, and DPPH assay. Electron transfer assays measure the reducing ability of the substrate (antioxidant) while hydrogen atom transfer assays measure the hydrogen donating ability of the substrate. It is clear that hydrogen atom donation is essential in the radical chain reaction stage of lipid peroxidation, therefore hydrogen transfer assays are relevant to the measurement of chain-breaking antioxidant capacity. In many cases, the antioxidant capacity or the ability to trap radicals, of a compound is related to the ease of hydrogen atom donation, not necessarily the redox potential of the compound. In general, assays that measure hydrogen atom transfer would be preferable to assays that measure electron transfer reactions. In the study, the use of multiple electron transfer assays is redundant. There are correlations between them, because these assays rely on the same redox reactions. When the assays measure reducing ability were used it is important to choose one that is widely reported and validated. Similarly, the ORAC assay between assays that measure hydrogen atom transfer has been extensively validated, reliable and provides useful information about the radical chain-breaking capacity of the sample.

### Keywords

Antioxidant capacity, DPPH, FRAP, ORAC, TEAC

\* Sorumlu yazar (Corresponding author) e-posta: [salbayrak@erciyes.edu.tr](mailto:salbayrak@erciyes.edu.tr)

## 1. GİRİŞ

Reaktif oksijen türleri (ROS) aerobik organizmaların elektron taşıma zinciri ve aktif fagositoz gibi metabolik yollarında devamlı olarak oluşmaktadır [1]. Bu süreçlerde oluşan başlıca ROS'lar süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), hidroksil radikal ( $HO^\cdot$ ), peroksil radikal ( $ROO^\cdot$ ), alkoksil radikal ( $RO^\cdot$ ), hidroklorikasit ( $OHCl$ ) ve peroksinitrit ( $ONOO^\cdot$ )'tir [2, 3]. ROS'lar DNA, protein ve lipid gibi makromolekülleri etkileyerek oksidatif hasara neden olurlar. Normal olarak ROS'lar spesifik enzim sistemleri (süperoksit dismutaz ve katalaz), suda ve lipitte çözünebilir bazı protein yapısında olmayan bileşikler (ürik asit ve tokoferol) tarafından engellenmektedir [1]. Bu ROS'ların antagonistleri vücudun ROS temizleyici antioksidanlarıdır. Antioksidanlar küçük miktarlarda, kolayca okside olabilen materyallerin oksidasyonunu büyük ölçüde geciktiren ya da engelleyen maddeler olarak tanımlanmaktadır [4]. Antioksidanlar tarafından sunulan koruma sınırlıdır. Eğer ROS oluşumu biyolojik sistemlerin antioksidan kapasitesini aşarsa oksidatif stres oluşur. Bu nedenle gıdalarla antioksidanların vücuda alınımı kanser, kardiovasküler hastalıklar gibi çeşitli hastalıkları önlemede ve yaşlanma sürecini geciktirmede önemli rol oynamaktadır [1, 5]. Epidemiyolojik çalışmalar gıdaların besleyici değerleri yanında insan sağlığı için faydalı etkilere sahip olduğunu göstermektedir. Son yıllarda, bu alandaki araştırmalar gıdalardaki antioksidanları belirlemeye yoğunlaşmıştır. Özellikle meyveler vitamin C, vitamin E,  $\beta$ -karoten gibi yüksek miktarda antioksidan içerdikleri için özel bir ilgi çekmektedir [6]. Bu nedenle gıda ve biyolojik sistemlerde doğal olarak bulunan birçok molekülün antioksidan kapasitesinin çalışılması önem kazanmıştır [4, 5].

Antioksidan kapasiteyi ölçmek için bu güne kadar çok sayıda yöntem geliştirilmiştir [7- 11]. Toplam antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlayan yöntemler, hidrojen atomu transfer (HAT) reaksiyonlarına dayanan yöntemler ve elektron transferine (ET) dayanan yöntemler olmak üzere ikiye ayrılabilir. HAT temelli yöntemlerin birçoğu azo-bileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan yarışmacı reaksiyonları kullanmaktadır. Bu yöntemler oksijen radikal absorbands kapasite (ORAC), toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre (TRAP) ve krosin beyazlatma yöntemlerini içermektedir. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgeme yeteneğini renk değişimi ile ölçer. Renk değişiminin derecesi örneklerin antioksidan konsantrasyonu ile alakalıdır. ET temelli yöntemler toplam Folin-

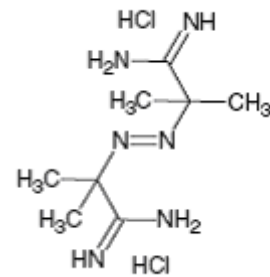
Ciocalteu ayırıcı ile toplam Fenolik yöntemi (FCR), Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC), demir iyonu indirgeyici antioksidan güç (FRAP), oksidan olarak bakır (II) kullanan toplam antioksidan potansiyel yöntemi (CUPRAC) ve DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) yöntemini içermektedir [8].

Bu çalışmada bitkisel gıda örneklerinin toplam antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler tanımlanmış, yöntemlerin birbirleri ile karşılaştırmalı olarak etkinlik ve sınırlılıklarından bahsedilmiştir.

## Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi

Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC) yöntemi kimyasal biyomarkırlar kullanarak maddelerin toplam antioksidan güçlerini ölçen *in vitro* veya *in vivo* bir yöntemdir [12]. Fitokimyasalların, bitkisel maddelerin, diğer biyolojik örneklerin ve gıdaların antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde çok fazla kullanılan bir yöntemdir [4, 13, 14].

Bu yöntem başlangıçta Cao ve Prior [15] tarafından geliştirilmiştir. Plazma ve doku homojenatlarında bulunan çeşitli doğal antioksidanların etkinliğini ölçen bu yöntem peroksil radikalının neden olduğu oksidasyonun antioksidan tarafından inhibisyonunu temel almaktadır. Bu da flüoresans yoğunluğundaki azalma ile belirlenebilir. Bu nedenle bu yöntem sadece tek bir antioksidanın ölçülmesi için yeterli değildir. 2,2-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH) gibi azo-bileşiklerin sıcaklıkla bozulması (Şekil 1) sonucu peroksil radikalleri oluşmaktadır [8].



Şekil 1. 2,2-azobis (2-amidinopropan) dihidroklorid (AAPH)'in moleküler yapısı

Antioksidan potansiyeli ölçmek için başka yöntemler geliştirilmesine rağmen ORAC yöntemi biyoloji ile daha çok ilgilidir. Çünkü yöntemde bir peroksil radikal üretici kullanır. Peroksil radikal sadece en yaygın reaktif oksijen türlerinden biri değildir. Aynı

zamanda su ve lipitte çözünebilir maddeler ile reaksiyon verir [12].

Orjinal yöntemde prob olarak *Porphyridium cruentum*'dan izole edilen flüoresan bir protein olan B-fikoeritrin (B-PE) kullanılmaktadır. B-PE'nin flüoresan bozulması onun peroksil radikalleri ile reaksiyonunun göstergesidir. B-PE, yüksek flüoresans verimi, ROS'a hassasiyeti ve suda çözünürlüğü nedeniyle tercih edilmektedir [4]. Ancak çok fazla çeşitliliğe sahiptir, oda koşullarında ışık ile rengi değişmektedir. Aynı zamanda spesifik olmayan proteinik bağlardan dolayı polifenoller ile ilişkiye girmektedir ve böylece radikal üretici eklenmeden bile flüoresans kayıpları olmaktadır. Bu nedenle sonuçlar tekrarlanabilir değildir [4, 10, 16]. Bu dezavantajlarından dolayı prob olarak B-PE yerine florescein (FL) (3,6'-dihidroksi-spiro [isobenzofuran-1 [3H], 9'[9H]-xanthen]-3-one) kullanılmaktadır [17]. FL sentetik protein yapıda olmayan bir probtur ve B-PE'nin sınırlamalarını gidermektedir. FL kesin, sağlam ve doğru sonuçlar vermektedir. Fakat FL probu pahalı ve pH duyarlıdır. Bu nedenle reaksiyon pH'ı dikkatlice izlenmelidir [4]. ORAC yöntemi peroksil radikallerine karşı hidrofilik ve lipofilik zincir kırma antioksidan kapasitesinin direk ölçülmesini sağlar [18].

Peroksil radikalleri organik molekül AAPH tarafından üretilir. Bu radikaller B-PE ya da FL gibi bileşiklerin flüoresansını azaltır. Antioksidanlar AAPH radikallerini yakalar ve flüoresan bozulmayı azaltır [14, 16, 19]. Trolox (Vitamin E'nin suda çözünebilir analogu) antioksidan aktivite için yaygın olarak kabul edilen bir standarttır ve ORAC sonuçları mikromol Trolox eşiti (TE) olarak belirtilir [12, 16].

Bu yöntem hem lipofilik hem de hidrofilik ekstrelerin antioksidan kapasitesinin ölçülmesini mümkün kılar. Aynı zamanda farklı radikal kaynaklar kullanılabilir [12, 20]. ORAC yöntemi farklı laboratuarlarda uygulanmış; melatonin, dopamin ve flavonoid gibi saf bileşikler ile çay, meyve, sebze ve hayvan dokuları gibi çeşitli kompleks biyolojik örneklerin antioksidan kapasitesine ilişkin önemli bilgi sağlamıştır [7].

ORAC yönteminde pro-oksidan olarak peroksil ya da hidroksil radikallerinin kullanılması bu yöntemi pro-oksidan gerektirmeyen diğer yöntemlerden farklı kılmaktadır. Ayrıca substrat olarak protein (PE) kullanılması bu yöntemi, oksidasyon için substrat olarak luminol ya da krosin kullanılan diğer yöntemlerden farklı kılmaktadır. Bu yöntemde antioksidanlar için çok yüksek oranda (>2000 molar) AAPH kullanılmaktadır [7]. Yaygın olarak kullanılan ORAC yönteminin FRAP yönteminden daha duyarlı olduğu belirtilmiştir [5]. Dondurularak kurutulmuş

927 adet sebze örneği için FRAP ve ORAC teknikleri arasında bir uyum olmadığı, fakat bu yöntemlerin yabancısını meyvesi için uyum gösterdiği belirtilmiştir. Benzer olarak darı ve ürünleri için ORAC, DPPH ve TEAC yöntemleri arasında uyum olduğu kaydedilmiştir [21].

### Toplam Radikal Yakalayıcı Parametre (TRAP) Yöntemi

Toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) yöntemi ilk defa Wayner ve ark. [8] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem bir azo bileşiğin sıcaklıkla bozulması ile oluşturulan kontrollü lipit peroksidasyonu boyunca oksijen tüketiminin ölçülmesini temel almaktadır. Bu yöntemde serbest radikal üretimini başlatıcı olarak AAPH tarafından üretilen peroksil radikalleri kullanılmaktadır [8]. Plazmaya AAPH eklendikten sonra okside olabilen materyalin oksidasyonu, reaksiyon süresince tüketilen oksijen yoluyla izlenir. Bu oksidasyon plazmada bulunan antioksidan tarafından engellenir. Sonuçlar Troloks C (6-hidroksil-2,5,7,8,-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)'nin sonuçları ile kıyaslanır [4, 7, 8]. Bu yöntemde karşılaşılan problemlerden biri oksijen elektrotunun gereken zaman boyunca boyunca stabilitesinin sağlanamamasıdır [7]. TRAP yönteminin geçmişi ve bugün ki durumu ile ilgili detaylı bilgi Ghiselli ve arkadaşlarının [22] çalışmasından elde edilebilmektedir. Yöntemde flüoresan prob olarak R-fikoeritrin (R-PE) kullanılmaktadır ve plazmanın, AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinden R-PE'yi koruyabilme özelliğini ölçmektedir. Antioksidanlar bozulmayı önler ve flüoresansı geciktirir [8].

TRAP yöntemi suda çözünebilir peroksil radikallerinin üretimi ve lipit peroksidasyonunun başlatılması ile alkalıdır ve bilinen tüm zincir kırıcı antioksidanlara hassastır. Fakat yöntem zaman gerektiren oldukça kompleks bir yöntem olup; oldukça fazla tecrübe gerektirmektedir [23].

### Krosin Beyazlatma Yöntemi

Lussignoli ve ark. [24] tarafından geliştirilen kolorimetrik bir yöntemdir. Bu yöntemde azo başlatıcının sıcaklıkla bozulması sonucu oluşan peroksil radikalleri tarafından bir karotenoid olan krosinin beyazlama derecesi ölçülmektedir. Yöntem AAPH'nin sıcaklıkla bozulması ile oluşan peroksil radikallerinin krosini oksidasyona uğratmasına (beyazlatma) dayanmaktadır [7, 8, 10]. Karışıma eklenen maddedeki antioksidanlar bu beyazlamayı önlemektedir. Deneysel olarak reaksiyon krosin içeren fosfat tamponu ve bilinen miktarda antioksidan ile gerçekleştirilir. Reaksiyon AAPH eklenmesi ile

başlatılır ve krosin beyazlaması 443 nm dalga boyunda spektrofotometre ile izlenmektedir. Beyazlama oranı AAPH ilavesinden sonra 10 dak boyunca izlenir [4, 10].

Bu kinetik yöntem kullanılarak analiz edilen askorbik asitin antioksidan kapasitesi 7.7 troloks eşiti olarak kaydedilmiştir ki diğer yöntemlerden elde edilen değerlerden çok daha yüksektir (ORAC değeri 0.95'dir) [7, 10]. Bu yönteminin gıda örnekleri için uygulanması sınırlıdır. Yöntem antioksidanlarda konsantrasyon değişimine duyarlı değildir. Ayrıca krosin safrandan ekstrakte edilen doğal pigmentler karışımı olduğu ve çok fazla çeşitlilik gösterdiği için sayısal değerlendirmelerde yöntemin endüstriyel alanda kullanımını sınırlandırmaktadır [4, 10].

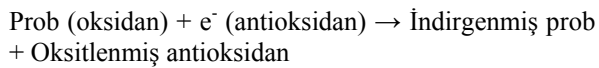
### **Toplam Oksiradikal Söndürme Kapasite (TOSC) Yöntemi**

Toplam oksiradikal söndürme kapasite yönteminde 2,2'-azobis (2-metil-propionamidin) (ABAP) diklorid'in sıcaklıkla bozulması sonucunda peroksil radikalleri oluşur. Bunlar  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -(methylthio) butirik asit sodyum tuzu (KMBA)'na oksitlenerek etilen gazı oluşur. Oluşan etilen gazı, gaz kromatografisi (GC) tarafından ölçülür. Eğer ortamda antioksidanlar varsa peroksil radikallerini söndürür ve etilen oluşumunu önler [7, 14].

Bu yöntemde biyolojik dokularda hasara neden olan önemli üç farklı ROS kullanılmaktadır: peroksil radikalleri, hidroksil radikalleri ve peroksinitrit. Bu yöntemin hem suda hem de yağda çözünebilen antioksidanları belirleyebildiği belirtilmiştir. Aynı zamanda mikromolardan daha küçük miktarlarda bileşikler ile çalışılabilmektedir. TOSC yönteminin sakıncaları elle GC enjeksiyonlarına ihtiyaç duyulması ve test çözeltilerinin kısa ömürlü olmasıdır [1].

### **Elektron Transfer (ET) Yöntemleri**

Elektron transfer yöntemleri; FCR, TEAC, FRAP ve CUPRAC yöntemlerini içermektedir. Bu yöntemler reaksiyon karışımındaki iki bileşenle ilişkilidir, antioksidanlar ve oksidan (prob). Aşağıdaki reaksiyon elektron transferini temel almaktadır;

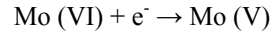


Prob bir oksidandır, antioksidandan elektron alır ve prob'da renk değişimine neden olur. Renk değişiminin derecesi antioksidan kapasitesi için oransaldır. Sonuçlar Troloks eşiti (TE) ya da gallik asit eşiti (GAE) olarak ifade edilir. Bu yöntemlerin avantajları reaksiyon hızı ve yöntemin kolaylığıdır [4, 10].

### **Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi**

FC yöntemi fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyum'a elektron transfer edilmesine dayanmaktadır. Mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılır ve sonuçlar gallik asit eşiti (mg/L) olarak verilir. FC ayırıcı fenolik bileşikler için spesifik değildir. Fenolik olmayan bir çok bileşik (aromatik aminler, sülfür dioksit, askorbik asit, Cu (I) ve Fe (II) gibi) tarafından indirgenebilir. Bu nedenle "toplam fenolik madde" belirlenmesi için uygun değildir. Son zamanlarda FC yöntemi toplam indirgeyici kapasitenin ölçülmesinde kullanılmaktadır. FC yöntemi ile diğer yöntemler (TEAC ve DPPH) arasında ilişki bulunmaktadır [25].

Bu yöntem orijinal olarak protein analizi için tasarlanmıştır. Daha sonra Singleton ve arkadaşları [26] şaraptaki toplam fenollerini ölçmek için bu yöntemi geliştirmişlerdir. Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) temelli yöntem toplam fenolik (ya da fenol) yöntem olarak bilinir. Fakat gerçekte örneğin indirgeyici kapasitesini ölçer. Fenolik bileşikler sadece bazik koşullarda (pH = 10) FCR ile reaksiyona girer.



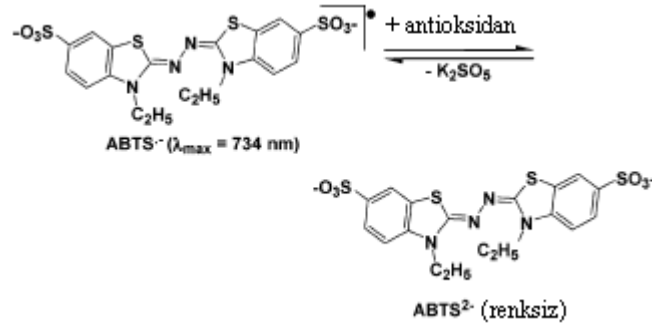
FC yöntemi, gıdaların antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde basit, tekrarlanabilir ve güvenilir bir yöntemdir. Antioksidan çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. FC ayırıcı ticari olarak satılmaktadır. Fakat yöntemin uzun zaman alması (2 saat) rutin analizler için uygulanmasını zorlaştırmaktadır. Aynı zamanda sulu fazda gerçekleştirildiği için lipofilik bileşikler için uygulanamamaktadır [4, 10, 25].

### **Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC)Yöntemi**

TEAC yöntemi ilk defa Miller ve ark. [27] tarafından geliştirilmiştir. Daha sonra, Re ve ark. [28] tarafından değiştirilmiş olan bu yöntem gıda örneklerinin antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi için yaygın bir şekilde kullanılmıştır [4, 7, 10]. 660, 734 ve 820 nm'de maksimum olan karakteristik uzun dalga boylu absorpsiyon spektrumu gösteren ABST radikal katyonun absorpsiyonunun antioksidan tarafından inhibisyonuna dayanmaktadır [7]. Orijinal yöntemde hidrojen peroksit ile metmiyoglobinin aktivasyonu sonucu ferrilmiyoglobin oluşur. Bu bileşik daha sonra 2,2-azinobis(3-etilbenzothiazollin-6-sulfonik asit) (ABTS) (Şekil 2)'den ABTS<sup>•-</sup> radikal katyonunun oluşmasına neden olmaktadır. Bu yöntemde test

edilecek örnek ABTS<sup>•-</sup> radikalleri oluşumundan önce eklenir. Test bileşiği/örneği ABTS<sup>•-</sup> radikallerinin oluşumunu azaltır [25]. Bu yöntemin olumsuz yönü hızlı reaksiyona giren antioksidanların

ferrilmiyoglobin radikalini de indirgeyebilmeleridir. İyileştirilmiş şekilde ABTS<sup>•-</sup>, oksidan ABTS<sup>2-</sup> nin potasyum persülfat oksidasyonu ile oluşturulur [4, 10].



Şekil 2. Potasyum persülfat oksidasyonu ile ABTS<sup>2-</sup>'den oksidan ABTS<sup>•-</sup> nin oluşması [10].

Uygulama kolaylığından dolayı TEAC yöntemi antioksidan kapasiteyi araştırmak için sıklıkla kullanılmış, birçok bileşik ve gıda örneklerinin TEAC değerleri kaydedilmiştir. ABTS<sup>•-</sup>'nin biyolojik sistemlerde bulunmaması ve bu sistemlerdeki radikallere benzememesi de bir problemdir. Olumlu yanı ise hem sulu hem de lipit fazlarda kullanılabilir olmasıdır. Bu nedenle her ikisinde de antioksidan kapasiteyi belirlemede kullanılabilir [4]. Ayrıca ticari TEAC yöntem kitleri elde edilebilir ve yöntem nispeten hızlıdır. Orijinal TEAC yöntemi, bazı eksikliklerine rağmen fitokimyasalların antioksidan aktivitesi ile ilgili kullanışlı bilgi sağlamaktadır [7].

Bu spektrofotometrik yöntem teknik olarak basit bir yöntemdir. Yöntem geniş pH aralığında kullanılabilir ki antioksidan mekanizmasında pH'nin etkisini çalışmayı sağlar. Böylece antioksidan mekanizmasında pH'nin etkisinin çalışılması için kullanılabilir. Lipofilik ve hidrofilik bileşiklerin antioksidan kapasitesini belirlemek için kullanılabilir [23, 25].

### Demir İyon İndirgeyici Antioksidan Güç (FRAP) Yöntemi

Düşük pH'da Fe<sup>+3</sup>'ün Fe<sup>+2</sup>'ye indirgenmesi renkli ferrous- tripyridyltriazine [Fe (III) (TPTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub> (TPTZ = 2,4,6-tripyridyl-s-triazine) = Herein] kompleksinin oluşmasına neden olur. Oluşan bu demir tuzu oksidan olarak kullanılır [29].

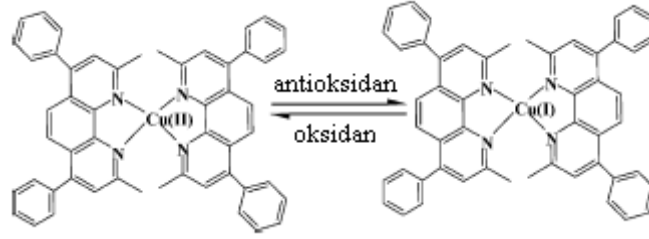
Fe<sup>+3</sup> tuzunun (yaklaşık 0.70 V) redoks potansiyeli ABTS<sup>•-</sup>'nin ki ile (0.68 V) birbirine yakındır. Bu nedenle FRAP ve TEAC yöntemleri arasında çok fazla fark yoktur. Yalnız TEAC nőtür pH'da FRAP ise

asidik koşullarda (pH = 3.6) gerçekleştirilir [4, 10]. Asidik ortamda, antioksidanların varlığında ferric-tripyridyltriazine kompleksi Fe<sup>+2</sup>'ye indirgenir ve oluşan renkli çözelti 595 nm'de absorbanda artışa neden olur. Sonuçlar troloks eşiti olarak ifade edilir. Orijinal yöntemde absorbanda 4 dak izlenir. Fakat bu zamanda reaksiyon tamamlanmaz. Bu nedenle izleme zamanının 30 dakikaya uzatılması tavsiye edilmektedir [16].

Fe<sup>+3</sup> / Fe<sup>+2</sup> redoks çiftinin redoks potansiyelinden daha düşük potansiyelli birçok bileşik teorik olarak Fe<sup>+3</sup>'ü Fe<sup>+2</sup>'ye indirgeyebilir. Bu nedenle FRAP değerleri daha yüksek çıkabilir. FRAP sonuçları analiz zamanına bağlı olarak değişebilir. Bazı polifenoller (kafeik asit, ferulik asit, kersetin ve tannik asit gibi) daha yavaş hareket eder ve belirlemek için daha uzun reaksiyon zamanı gerekmektedir. Yöntem sadece demir iyonunu temel almaktadır. Bu nedenle mekanik ve fizyolojik olarak antioksidan aktivitesi için uygun değildir. Ancak diğer yöntemlerin aksine FRAP yöntemi basit, hızlı ve ucuzdur, özel aletler gerektirmemektedir [23, 25].

### Oksidan Olarak Cu (II) Kullanılan Toplam Antioksidan Kapasite Yöntemi (CUPRAC)

Bu yöntem örnekte bulunan antioksidanlar (redükta) tarafından Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesini temel almaktadır (Şekil 3). Kromojenik ayıraç olan bathocuproin (2,9-dimetil-4,7-difenil-1,10-phenanthrolin), Cu (I) ile 2:1 oranında bir kompleks oluşturur. Bu kompleks 490 nm'de maksimum absorbanda sahiptir. Standart olarak Kersetin kullanılır [4, 10]

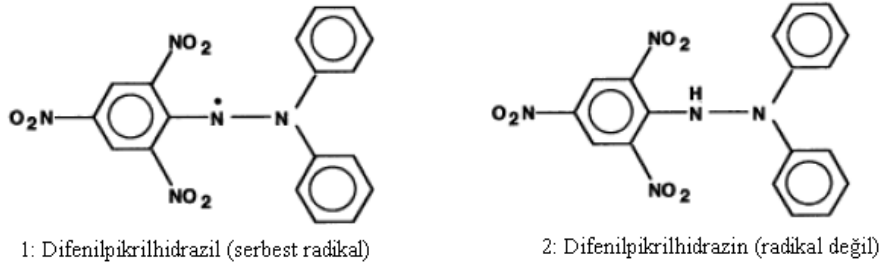


Şekil 3. Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi [10].

Örnek başına sadece 10 dak gereken çok hızlı bir yöntem olması avantajdır. Askorbik asit, ürik asit, gallik asit ve kersetin için CUPRAC yöntemi birkaç dakikada tamamlanırken daha kompleks moleküller için 30-60 dak gerekmektedir [23]. Yöntemde kullanılan ayıraçlar oldukça ucuzdur, yöntem çok fazla uzmanlık gerektirmez. Bakır reaksiyon kinetikleri demirden daha hızlıdır.

### 2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi

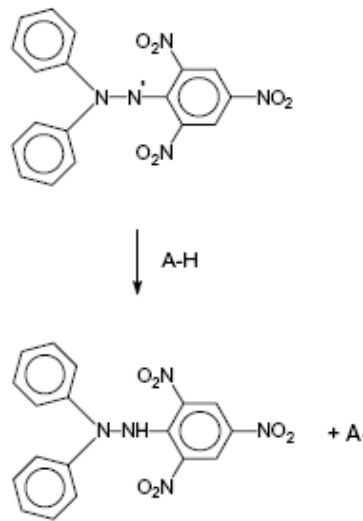
DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. 515 nm'de maksimum absorbansa sahiptir (Şekil 4) [10].



Şekil 4. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH)'in moleküler yapısı [30].

Molekülde bir serbest elektronun yer değiştirmesi menekşe renginin oluşmasına neden olur. DPPH solüsyonu hidrojen atomu verebilen madde (antioksidan) ile karıştırıldığı zaman koyu menekşe rengin kaybı ile indirgenmiş form oluşur.

Antioksidan (A-H) tarafından DPPH serbest radikaline proton transferi reaksiyonu 517 nm'de absorbansın azalmasına neden olur. Bu süreç görünür alanda spektrofotometre ile absorbans sabitlenene kadar takip edilir. (Şekil 5) [4, 32].



Şekil 5. DPPH radikalinin kimyasal yapısı ve A-H ile reaksiyonu [32].

DPPH-H indirgenmiş formdur. A<sup>\*</sup> ise ilk adımda oluşturulan serbest radikaldır. Daha sonra bu radikal daha başka reaksiyonlara girecektir [30, 31].

Bu yöntem bitkiler ve gıdalardan elde edilen ekstratlar ya da bileşiklerdeki serbest radikal söndürücü aktiviteyi belirlemek için araştırmacılar tarafından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir [32]. Teknik olarak basit ve hızlı bir yöntemdir. Fakat uygulamasını sınırlandıran bazı dezavantajlara sahiptir. Uzun ömürlü nitrojen radikali olan DPPH, lipit peroksidasyonu ile ilişkili olan hayli reaktif ve kısa ömürlü peroksil radikallerine benzerlik göstermez. Peroksil radikalleri ile hızla reaksiyona giren birçok antioksidan DPPH ile yavaş reaksiyona girebilir, hatta hiç reaksiyona girmeyebilir [23, 25, 10].

## 2. SONUÇ

### ET Temelli Yöntemler

Antioksidan kapasitenin ölçülmesi için ET temelli yöntemlerin kullanımı giderek artmaktadır. Yöntemler asidik (FRAP), nötr (TEAC) ya da bazik (FCR) koşullarda gerçekleştirilmektedir. pH değeri antioksidanların indirgeyici kapasitesinde önemli bir etkidir. Asidik koşullarda antioksidan bileşiklerde indirgeyici kapasite baskılanabilmektedir. Hâlbuki bazik koşullarda fenolik bileşiklerden proton ayrılması örneğin indirgeyici kapasitesini artıracaktır.

Antioksidanların indirgeyici kapasitelerini ölçmek için birden çok ET temelli yöntemlerin kullanılması sonuçlar arasında lineer ilişki oluşturacaktır. Yapılan araştırmalarda gerçekten toplam fenolik içerik (FCR) ve antioksidan aktivite (FRAP, TEAC ya da DPPH) arasında ilişki ( $R^2 > 0.99$ ) bulunduğu belirtilmiştir. Bu yöntemler benzer redoks reaksiyonlarını temel aldığı için indirgeyici antioksidan kapasiteyi ölçmek için çok sayıda yöntem kullanmak gereksizdir. Fakat yaygın olarak kabul edilen ve geçerli bir yöntem kullanmak

önemlidir. Bu açıdan FCR ile toplam fenolik yöntem diğer ET temelli yöntemlere göre avantajlara sahiptir. FCR ile toplam fenolik yöntem şu avantajlara sahiptir: 1. FCR ticari olarak elde edilebilir ve prosedür oldukça standarttır, 2. Yaygın olarak kabul edilen bir yöntemdir ve tüm dünyada gıda antioksidan araştırma laboratuvarlarında rutin olarak uygulanabilir, 3. Çok sayıda karşılaştırılabilir veri mevcuttur [10]. Fakat FCR ile toplam fenolik yöntem sulu fazda gerçekleştirilmektedir. Lipofilik antioksidanlar için bu yöntem bu haliyle uygulanamaz. Bu nedenle lipofilik örnekler için değişiklik yapılmalıdır [10].

### HAT Temelli yöntemler

HAT temelli yöntemler genellikle sentetik serbest radikal üretici, oksitlenebilir moleküler prob ve antioksidanların karışımını içermektedir. HAT temelli olan ORAC yöntemi radikal zincir kırma reaksiyonu ile ilgili kullanışlı bilgi sağlamaktadır. ORAC yöntemi, suda çözünmeyi artırıcı siklodekstrin kullanılarak lipofilik antioksidanları ölçmek için değiştirilmiştir. Bu yöntem son zamanlarda örneğin peroksil radikal söndürücü kapasitesini ölçmek için tercih edilen bir yöntem olmuştur. Eğer antioksidanların indirgeyici kapasitesi FCR ve ORAC ile ölçülürse; gerçek gıda sistemlerinde yağ asiti otoksidasyonunu engelleme kapasitesi daha doğru değerlendirilecektir. FCR ve ORAC kontrollü koşullarda başlangıç reaksiyonuna eklenen oksidan ile homojen çözeltilerde gerçekleştirilmektedir. Hâlbuki gerçek gıda sistemlerinde reaksiyon oksidan eklenmeden gerçekleşir. Reaksiyon, gıdanın depolama veya işlenmesi sürecinde ışık, metal iyonları veya sıcaklık ile başlatılır. Aynı zamanda gıdalar sıklıkla heterojen karışımlardır. Bu nedenle antioksidanlar, *in vitro* antioksidan kapasite yöntemlerindeki farklı davranabilir. Dolayısıyla eğer ORAC ve /veya FCR indirgeyici kapasite gerçek gıda sistemlerine uygulanacaksa daha fazla çalışma gerekmektedir [10].

Gıdaların antioksidan kapasitesini değerlendirmek için kullanılan çeşitli yöntemler Tablo 1’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Antioksidan kapasiteyi değerlendirme yöntemlerinin karşılaştırılması için kullanılan bazı kriterler.

	ROS/RNS söndürücü	Hidrojen Atom Transfer	Elektron Transfer
Örnekler	Süperoksit Hidrojen peroksit Hidroksil Singlet oksijen, Peroksinitrit	ORAC TRAP Krosin LDL oksidasyon	Toplam fenoller TEAC FRAP Cu (II) redüksiyon DPPH
Biyolojik uygunluk?	Hayır	Evet	Hayır
Ölçmenin basitliği?	Hayır	Hayır (ORAC hariç)	Evet
Aletler kolaylıkla elde edilebilir mi?	Hayır	Evet (TRAP ve ORAC hariç)	Evet
Tekrarlanabilirlik?	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş	Belirlenmemiş
Hidrofilik ve lipofilik antioksidanlar için uygunluk?	Hayır	Hayır (ORAC hariç)	Hayır (TEAC hariç)

LDL: Düşük moleküler ağırlıklı lipoprotein.

Deneysel olarak hidrojen transfer ile elektron transferi arasındaki farkı ayırmak zordur. Sıklıkla ikisi karıştırılır. Çözelti pH'ı özellikle elektron transfer yönteminde önemlidir. Asidik koşullar altında indirgeyici kapasite baskılanabilirken bazik koşullar altında fenolik bileşikten proton ayrılması bileşiğin indirgeyici kapasitesini artıracaktır. Bu nedenle yöntem koşullarının tüm yönleriyle dikkatlice izlenmesi kullanılan yöntemin başarısı için önemlidir. *In vitro* antioksidan kapasite ölçme yöntemlerinin sonuçlarından *in vivo*'daki durumu tahmin etmek zordur. Ayrıca fizyolojik olarak uygun konsantrasyonlarda oksidan, antioksidan ve örnek kullanılması önemlidir. Flüoresan probalar kullanılan hidrojen atom transfer yöntemlerinde süreç lipit peroksidasyonuna benzer. Fakat substrat (prob) konsantrasyonu sıklıkla antioksidan konsantrasyonundan daha düşüktür. Bu gıda ve biyolojik sistemlerdeki bir durum değildir. Gıdalarda antioksidanlar okside edilebilir substrattan çok daha düşük konsantrasyondadır. Bu çalışmada tanımlanan yöntemler *in vitro* kimyasal reaksiyonları temel almaktadır. Bu nedenle bu yöntemlerden elde edilen sonuçlarla biyolojik sistemlerdeki durumu tahmin etmek zordur. Bu yöntemler antioksidan bileşiklerin biyoyararlanımı, *in vivo* stabilitesi ve dokularda *in vivo* depolanmasını dikkate almaz ve antioksidanların sinerjistik etkilerini yansıtmaz. Çalışmalarda geçerli, standardize edilmiş ve yaygın olan yöntemlerin kullanılması sonuçların güvenilirliği ve karşılaştırılması açısından avantajdır.

Son olarak antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için birçok yöntem kullanılmaktadır. Ancak reaktif oksijen türlerine karşı antioksidan kapasiteyi değerlendirmek için kullanılan *in vitro* yöntemler şu gereksinimleri karşılamalıdır; yöntem koşulları fizyolojik koşullara mümkün olduğu kadar yakın olmalıdır ve kullanılan ROS biyolojik sisteme uygun olmalıdır. Yukarıda bahsedilen gereksinimler yaygın olarak kullanılan birçok yöntemde tamamen karşılanmaz. Daha çok sadece bir ROS temel alınır. Bu nedenle farklı yöntemlerin kullanılması ve sonuçların birlikte değerlendirilmesi daha uygun olacaktır [33].

#### KAYNAKLAR

1. Lichtenhaler, R., Marx, F. and Kind, O.M., Determination of antioxidative capacities using an enhanced total oxidant scavenging capacity (TOSC) assay, *Eur. Food Res. Technol.*, 216,166–173, 2003.
2. Schoneich, C., Reactive oxygen species and biological aging: a mechanistic approach, *Experimental Gerontology*, 34(1), 19-34, 1999.
3. Aruoma, O.I., Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 75(2), 199–212, 1998.
4. MacDonald-Wicks, L.K., Wood L.G and Garg, M.L., Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review, *J. Sci. Food Agric.*, 86, 2046–2056, 2006.
5. Price, J.A., Sanny, C.G., Shevlin, D., Application of manual assessment of oxygen radical absorbent capacity (ORAC) for use in high throughput assay of “total” antioxidant, activity of drugs and natural products, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 54, 56 – 61, 2006.
6. Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., “Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90, 7915-7922, 1993.
7. Prior, R.L. and Cao, G., *In vivo* Total Antioxidant Capacity: Comparison of Different Analytical Methods, *Free Radical Bio. Med.*, 27, 1173–1181, 1999.
8. Somogyi, A., Rosta, K., Pusztai, P., Tulassay Z. and Nagy, G., Antioxidant measurements, *Physiol. Meas.*, 28, R41–R55, 2007.
9. Pellegrini, N., Serafini, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M. and Brighenti, F., Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays, *J. Nutr.*, 133, 2812–2819, 2003.
10. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 1841-1856, 2005.
11. Decker, E.A., K. Wagner, Richards, M.P. and Shahidi, F., Measuring Antioxidant Effectiveness in Food, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4303-4310, 2005.
12. Ellefson, W., Lilla Z. and Crowley, R., Quantification and Evaluation of Antioxidants in Food and Botanical Products, International Conference on Nutraceuticals and Functional Foods, November 5-8, Reno, Nevada, 2006.
13. Gillespie, K.M., Chae, J.M. and Ainsworth, E.A., Rapid measurement of total antioxidant capacity in plants, *Nat. Protoc.*, 2 (4), 867-870, 2007.
14. Tomer, P.D., McLeman, L.D., Ohmine, S., Scherer, P.M., Murray, B.K., O'Neill, K.L., Comparison of the Total Oxyradical scavenging capacity and oxygen radical absorbance capacity antioxidant assays, *J. Med. Food*, 10 (2), 337-344, 2007.
15. Cao, G. and Prior, R.L., Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum, *Clin. Chem.*, 44, 1309–1315, 1998.



16. Pérez-Jiménez, J. and Saura-Calixto, F., Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays, *Food Res. Int.*, 39, 791–800, 2006.
17. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L., Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity using fluorescein as the fluorescent probe, *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619–4626, 2001.
18. Wu, X., Beecher, G.R., Holden, J.M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S.E., Prior, R.L., Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States, *J. Agric. Food Chem.*, 52, 4026–4037, 2004.
19. Bonanni, A., Campanella, L., Gatta, T., Gregori, E., Tomassetti M., Evaluation of the antioxidant and prooxidant properties of several commercial dry spices by different analytical methods, *Food Chem.*, 102, 751–758, 2007.
20. Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K., Prior, R.L., Huang, D., Novel fluorometric assay for hydroxyl radical prevention capacity using fluorescein as the probe, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2772–2777, 2002.
21. Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D.H., Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts, *J. Food Compos. Anal.*, 19, 669–675, 2006.
22. Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., Scaccini, C., Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biol. Med.*, 29, 1106- 1114, 2000.
23. Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K., Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements, *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4290–4302, 2005.
24. Lussignoli, S., Fraccaroli, M., Andrioli, G., Brocco, G. and Bellavite, P., A microplate-based colorimetric assay of the total peroxyl radical trapping capability of human plasma, *Anal. Biochem.*, 269, 38–44. 1999.
25. Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., Lima, J.L.F.C., Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties, *Anal. Chim. Acta*, 613, 1–19, 2008.
26. Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Methods Enzymol.*, 299, 152-178, 1999.
27. Miller, N.J., Rice-Evans, C., Davies, M.J., Gopinathan, V., Milner, A., A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.*, 84, 407–412, 1993.
28. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 1231–1237, 1999.
29. Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay, *Anal. Biochem.*, 239 (1), 70-76, 1996.
30. Molyneux, P., The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26 (2), 211- 219, 2004.
31. Frankel, E.N. and Meyer, A.S., The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants, *J. Sci. Food Agr.*, 80, 1925-1941, 2000.
32. Scalzo, R.L., Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid, *Food Chem.*, 107, 40–43, 2008.
33. Aruoma, O.I., Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods, *Mutat. Res. Fundam. Mol.*, 523, 9-20, 2003.