

DPPH• Antioksidan Analizinin Yeniden Değerlendirilmesi

Serap AYAZ SEYHAN 

Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İstanbul, sayaz@marmara.edu.tr

Geliş Tarihi/Received:
29.05.2019

Kabul Tarihi/Accepted:
16.12.2019

Yayın Tarihi/Published:
25.12.2019

ÖZ

Antioksidanların uygulamaları, oksidatif stresin zararlı etkilerini en aza indirmedeki çeşitli rolleri nedeniyle artmaktadır. DPPH• (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali; C₁₈H₁₂N₅O₆) antioksidan analizi, farklı bileşiklerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir. Ayrıntılı literatür taraması, çeşitli araştırma gruplarının farklı DPPH• derişimlerinde (22,5–400µM), inkübasyon süresinde (5 dk-120 dk), reaksiyon çözücüsünde (etanol, metanol) ve reaksiyon karışım pH'sında (pH= 3 ve 5.5 tampon ortamı) olan oldukça farklı protokoller kullandıklarını göstermektedir. Farklı laboratuvarların sonuçlarının karşılaştırılması ve sonuçların doğrulanması için standart bir analizin gerekliliği çok önemlidir. Bu çalışmada DPPH• antioksidan analizini etkileyen DPPH• derişimi, standart madde derişimi, reaksiyon/inkübasyon süresi gibi önemli faktörler spektrofotometrik yöntem ile incelenerek standart bir DPPH• antioksidan analiz yöntemi oluşturulmuştur. Bu yöntem kapsamında ölçümler, reaksiyon ortamındaki DPPH• derişimi 25-75 µM aralığında, çalkalayıcı inkübatörde 30°C'de, 30dk'da ve karanlık ortamda gerçekleştirilmelidir.

Anahtar Kelimeler: DPPH• radikali, Antioksidan, Antioksidan aktivite, Spektrofotometre, Yöntem

Re-Evaluating of The DPPH• Antioxidant Assay

ABSTRACT

Applications of antioxidants are increasing due to their various roles in minimising harmful effects of oxidative stress. DPPH• (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical) antioxidant assay is a fast, simple, inexpensive method commonly used to evaluate the antioxidant activity of different compounds. A detailed literature survey shows that various research groups have used widely different protocols differed in the concentration of DPPH• (22,5–400µM), incubation time (5 min–120 min), reaction solvent (ethanol, methanol) and pH of the reaction mixture (pH=3 and 5.5 buffer) . The requirement of a standard assay is very

important in order to compare the results of different laboratories and validation of the conclusions. In this study, a standard DPPH• antioxidant analysis procedure was performed by analyzing the important factors such as DPPH• concentration, standard substance concentration, reaction / incubation time by spectrophotometric method. Under this procedure, the measurements should be carried out at DPPH concentration in the reaction medium in the range of 25-75 µM, 30 ° C in a shaker incubator, 30 minutes and dark medium.

Keywords: DPPH• radical, Antioxidant, Antioxidant activity, Spectrophotometer, Method

1. GİRİŞ

Antioksidan, serbest radikallerin neden olduğu oksidasyon reaksiyonlarını durduran ya da yavaşlatan bileşik grubunun genel adıdır. Bu bileşikler serbest radikalleri nötralize ederek vücudun onlardan etkilenmesini önlemekte ve kendini yenilemesini sağlamaktadır. İnsan sağlığı açısından antioksidanların işlevi son yıllarda daha iyi anlaşılmıştır. Yapılan araştırmalar, antioksidan aktivite gösteren maddelerin, oksidatif stres kaynaklı olduğu düşünülen katarakt, kanser, kalp-damar ve daha birçok hastalığın önlenmesinde önemli işlevi olduğunu ortaya çıkarmıştır (Sellappan vd., 2002; Huang vd., 2005; Niki, 2010). Bu nedenle, antioksidanlar, birçok sağlık yararları nedeniyle önemli nutrasötikler olarak kabul edilir ve gıda endüstrisinde lipid peroksidasyonunun potansiyel inhibitörleri olarak yaygın şekilde kullanılırlar (Deng vd., 2011).

Gıdaların içeriğinde bulunan toplam fenolik madde miktarının belirlenmesi, antioksidan aktiviteyi sağlayan hidroksil grupları hakkında fikir vermesi açısından önemlidir. Genellikle toplam fenol içeriği ve antioksidan aktivitesi arasında oldukça iyi doğrusal bir korelasyon görülür (Prior vd., 2005). Günümüzde antioksidan içerikli gıda, kozmetik ve besin destek ürünlerinin sayısı da hızla artmaktadır. Bununla birlikte, vücutta sentetik antioksidanların birikebildiği ve karaciğer hasarı ve karsinojeniz ile sonuçlanabileceği gösterilmiştir (Deng vd., 2011). FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü), ORAC (Oksijen Radikal Absorbans Kapasitesi), CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite), ABTS ve DPPH• (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali) gibi saf bileşiklerin ve bitki ekstraktlarının antioksidan aktivitesini ölçmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (Scherer ve Godoy, 2009).

DPPH• yöntemi antioksidan aktivite ölçümünde en çok kullanılan spektrofotometrik yöntemlerden biridir (Sharma ve Bhat, 2009). DPPH• testi, radikal bileşiğin sabit olması ve üretilmesinin gerekmemesi nedeniyle, antioksidanların aktivitesini değerlendirmek için geçerli, ucuz, hızlı, doğru, kolay ve ekonomik bir yöntem olarak kabul edilir (Deng vd., 2011; Kedare ve Singh, 2011; Benzie ve Strain, 1999; Prior ve Cao, 1999; Çıkla Yılmaz ve Ayaz Seyhan, 2017). Bu yöntemin avantajı, DPPH• reaktifi en zayıf antioksidanlar da dahil olmak üzere karışımdaki tüm maddelerle etkileşebilmesi ve hem lipofilik, hem de hidrofilik antioksidanlarla reaksiyona girebilmesidir (Kedare ve Singh, 2011). DPPH•

testinin sonuçları birçok şekilde sunulmuştur. Çalışmaların çoğu, sonuçları ilk DPPH• derişimini % 50 oranında azaltmak için gerekli olan antioksidan miktarı olarak tanımlanan IC₅₀ değeri olarak ifade edilmektedir (Deng vd., 2011; Scherer ve Godoy, 2009).

Dünya çapında DPPH• yönteminin kullanılmasına rağmen, sonuçların standardizasyonunun olmaması, farklı bitki ekstraktlarının ve aynı zamanda saf bileşiklerin antioksidan gücünü karşılaştırmayı zorlaştırmaktadır (Deng vd., 2011; Scherer ve Godoy, 2009). Ayrıca; Beer yasasına göre, spektrofotometrik ölçümler için doğruluk aralığı % 20-60'lık bir geçirgenliğe eşit olan 0.221-0.698'lik bir absorbans aralığına girmektedir. Bu yaklaşık olarak reaksiyon ortamında 25-75µM'lik bir DPPH• derişimine karşılık gelir. Bu absorbans değerleri dışında olan spektrofotometrik ölçümler doğruluk aralığının dışında kaldığından, bunların verileri sorgulanmalıdır (Deng vd., 2011).

Farklı laboratuvarların sonuçlarının karşılaştırılması ve sonuçların doğrulanması için standart bir analizin gerekliliği çok önemlidir. 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil radikali (DPPH•), bir atom azot köprüsünde eşlenmemiş bir değerlik elektronuna sahip olan kararlı serbest bir radikaldir (Sharma ve Bhat, 2009). DPPH•'in absorbansı, ışık, hava oksijeni, rutubet ve pH'ya fazlaca duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçların eldesi güçtür. Yakın geçmişte yapılan yayınlar incelendiğinde, ölçümlerin çeşitli araştırma grupları tarafından farklı DPPH• derişimi (22.5–400µM), inkübasyon süresi (5dk-120dk), reaksiyon çözücüsü olarak çok farklı protokoller kullandıklarını göstermektedir (Tablo1) (Sharma ve Bhat, 2009). Reaksiyon koşullarındaki bu farklılıkların bir sonucu olarak, askorbik asit ve bütillenmiş hidroksitolüen (BHT) gibi standart antioksidanlar için IC₅₀ değerleri çok değişmektedir. Örneğin, askorbik asitin IC₅₀'si 11.85 ila 629 µM aralığında bildirilmiştir (Sharma ve Bhat, 2009; Mishra vd., 2012). Böylece farklı laboratuvarların sonuçlarını karşılaştırmanın mümkün olmadığı görülmektedir.

Antioksidan konularının karmaşıklığı ve sorgulanabilir yöntemlerin uygun olmayan kullanımları antioksidan araştırmaları yapan araştırmacı ve endüstri çalışanlarını zor durumda bırakabilmektedir. Standart bir yöntemin eksikliği farklı araştırma gruplarının sonuçlarının karşılaştırılmasını olanaksız kılarken, besin ve bitki kaynaklı ilaç endüstrisinin antioksidan ürünlerde sıkı kalite kontrolün yapabilmesini de sınırlamaktadır (Huang vd., 2005).

Bu test için bir dizi protokol izlenmiş ve farklı laboratuvarların sonuçlarında farklılık ortaya çıkmıştır (Sharma ve Bhat, 2009). Bu amaçla, DPPH• antioksidan analiz sonuçlarını etkileyen DPPH• derişimi, standart madde derişimi, reaksiyon / inkübasyon süresi gibi önemli faktörler incelenerek spektrofotometrik ölçümlerin hassasiyet aralığı içinde standart bir DPPH• antioksidan analiz yöntemi geliştirmek için yapılmıştır.

2. YÖNTEM

Bu çalışmada, DPPH• (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radikali; D9132) , Trolox (\pm -6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid; 238813), metanol (34860), etanol (24102), askorbik asit (795437) Sigma-Aldrich firmasından (Steinheim, Almanya) temin edilmiştir. Çift distile su Milli-Q System (Millipore, Billerica, MA, USA) tarafından üretilmiştir.

2.1. DPPH• derişimi

Ölçümler için en uygun DPPH• radikal derişiminin belirlenmesinde; DPPH• radikalinin farklı derişimlerdeki (50, 100, 150, 250 ve 500 μ M) metanollü çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan DPPH çözeltilerinden 2 ml alınarak 50 ml'lik cam amber beherlere konulmuştur. Daha sonra üzerine 2 ml metanol eklenmiştir (Tablo 2). Her bir cam amber beherin içindeki en son hacim 4 ml olacak şekilde eşit hacimde reaktif ve standart/numune eklenmiştir. Karışımlar vortekslendikten sonra oda sıcaklığında (21 ± 2 °C) karanlıkta 5, 15, 30 ve 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen karışımların maksimum absorpsiyon değerleri UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu 1601) ile referans çözeltilere karşı 515-528nm aralığında maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunda çalışılmıştır. Kullanılan DPPH• reaktiflerinin maksimum absorpsiyon değerleri belirlenmiştir.

2.2. Standart madde/antioksidan madde derişimi

Antioksidan madde olarak seçilen askorbik asitin farklı derişimlerdeki (20, 40, 60, 80, 100 μ M) sulu çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan antioksidan madde çözeltilerinden 2 ml alınarak 50 ml'lik cam amber beherlere konulmuştur. Daha sonra üzerine 2 ml 150 μ M DPPH• reaktif eklenmiştir. Karışımlar vortekslendikten sonra oda sıcaklığında karanlıkta 5, 15, 30 ve 60 dk inkübasyona bırakılmıştır. Elde edilen karışımların maksimum absorpsiyon değerleri UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu 1601) ile referans çözeltilere karşı 515-528 nm aralığında maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunda çalışılmıştır.

2.3. Sürenin ve karıştırmanın etkisi

Ölçümler için en uygun sürenin ve karıştırmanın belirlenmesinde; farklı sürelerde (5, 15, 30, 60 dk) oda sıcaklığında, çalkalama olmadan ve farklı sürelerde (5, 15, 30, 60 dk), 30°C sıcaklıkta, çalkalayıcı inkübatörde (200rpm) reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir.

3. BULGULAR

3.1. DPPH• derişimi

Yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı derişimlerdeki DPPH• radikali (22.5-400 μ M) ile ölçümlerin yapıldığı görülmektedir (Çizelge 1). Ölçümler için en uygun DPPH• derişiminin belirlenmesinde; DPPH• radikalinin farklı derişimlerdeki metanollü çözeltileri Çizelge 2'de verilen

prosedür takip edilerek oda sıcaklığında karanlıkta farklı sürelerde inkübasyona bırakılmış ve 515-528 nm aralığında maksimum absorbans verdiği dalga boyunda ölçümler yapılmıştır. Kullanılan DPPH• reaktiflerinin maksimum absorbans değerleri belirlenmiştir (Şekil 1). Farklı derişimlerde hazırlanan DPPH• reaktiflerinin absorbans ölçümlerinden kaynaklanan derişim ölçümündeki bağıl hatayı azaltmak için optimum geçirgenlik aralığı %20-60 veya buna karşılık olan absorbans aralığı $A= 0.221-0.698$ olacak şekilde antioksidan madde derişimi belirlenmiştir (Şekil 2).

Grafikler incelendiğinde düşük antioksidan özellik gösteren ve/veya düşük derişime sahip maddeler için kullanılacak en uygun DPPH• stok derişimi 50, 100, 150 μM lık çözeltilerdir. Yani maksimum absorbans değeri $A= 0,2$ 'lerde olan antioksidan madde için (20 μM askorbik asitin $\lambda=260\text{nm}$ de $A_{\text{max}}: 0,214$) reaksiyon ortamındaki minimum/maksimum DPPH• derişimi 25, 50 ve 75 μM olmalıdır.

3.2. Standart madde/antioksidan madde derişimi

Yapılan çalışmalar incelendiğinde DPPH• reaktif çözeltilisine uygun standart madde/antioksidan madde derişimine ilişkin bir veriye rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda ise, DPPH• reaktifi ile verdikleri absorbans değerleri üzerinden antioksidan maddenin çalışma derişim aralığı belirlendiği gözlenmiştir. Antioksidan madde olarak seçilen askorbik asitin farklı derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak ölçümler yapılmıştır. Azalan absorbans, geriye kalan DPPH• radikali çözeltilisi miktarını yani serbest radikal giderme aktivitesini vermiştir (Şekil 2).

Antioksidan aktivite başlangıçtaki DPPH• derişiminin % 50'sinin azalması için harcanan antioksidan miktarını (DPPH• radikali süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi) ifade eden IC_{50} (etkin derişim) değeri ile verilir. Bu deneyin sonucu olarak UV-görünür spektrometrede okunan değerler absorbans (A)-derişim grafiği çizilerek IC_{50} değerini bulmak için aşağıdaki eşitlik kullanılmıştır.

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = [(AK-AN)/AK] \times 100$$

AK = Kontrol absorbans değeri

AN = Numune absorbans değeri

Antioksidan derişimlerine karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri (IC_{50}) okunmuştur. Standart olarak Trolox kullanılmıştır (Şekil 3). Absorbanstaki düşüş ne kadar büyükse antioksidan aktivite o kadar yüksek demektir. Deneyler sonucunda trolox için $IC_{50}= 0.0065 \text{ mg/mL}$, 20 μM askorbik asit için $IC_{50}= 0.0034 \text{ mg/mL}$ olarak bulunmuştur.

3.2. Sürenin ve karıştırmanın etkisi

Yapılan çalışmalar incelendiğinde farklı reaksiyon sürelerinde DPPH• radikali ile ölçümlerin yapıldığı görülmektedir (Çizelge 1). Farklı sürelerde, oda sıcaklığında, çalkalama olmadan ve farklı sürelerde, sabit sıcaklıkta (30°C), çalkalayıcı inkübatörde (200rpm) reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Grafikler incelendiğinde (Şekil 4) 5dk içinde inkübatörlü ve inkübatörsüz değerlerin birbirine çok yakın/aynı olduğu fakat reaksiyon süresi arttıkça inkübatörsüz ortamda reaksiyonun 60dk da sabitlendiği, inkübatörlü ortamda ise 30 dk da sabitlendiği gözlenmiştir. Ayrıca inkübatörsüz ortamda sıcaklığın reaksiyon üzerinde etkisi olmasından dolayı farklı günlerde yapılan deneyler arasında sapmaların meydana geldiği gözlenmiş fakat inkübatörlü ortamda yapılan deneyler sabit sıcaklıkta (30°C) gerçekleştiği için sonuçlar tutarlı bulunmuştur.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Spektrofotometrik yöntemlerin duyarlılık aralığında, DPPH• antioksidan analiz yöntemi ile ilgili standart bir protokol geliştirmek için yapılan yayınlar incelendiğinde (Sharma ve Bhat, 2009; Mishra vd., 2012), bu çalışmalarda sadece çözücü ortamı ve reaksiyon süresi incelenmiş olup DPPH• antioksidan analiz sonuçlarına etki eden tüm faktörlerin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Yapılan çalışmada, grafikler incelendiğinde yüksek derişimlere sahip antioksidan maddenin DPPH• reaktifi ile reaksiyonu sonucu çok düşük absorbans değerleri vermesi (absorbans değeri $A=0,2$ 'nin altında) ve düşük derişime sahip antioksidan maddenin DPPH• reaktifi ile reaksiyonu sonucu çok yüksek absorbans değerleri vermesi (absorbans değeri $A=0,7$ 'nin üstünde) nedeniyle Lambert-Beer'den sapmalara neden olmakta ve bağıl hatayı arttırmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, standart bir analizin gerekliliği açısından reaksiyon ortamındaki minimum/maksimum DPPH• derişimi 25, 50 ve 75 μM olmalı, bağıl hatayı azaltmak için reaksiyonun absorbans aralığı $A=0.221-0.698$ olacak şekilde ayarlanmalı ve çalkalayıcı inkübatörde sabit sıcaklıkta (30°C), 30dk'da ölçümler gerçekleştirilmelidir. Böylece farklı laboratuvarlar sonuçlarını karşılaştırmanın mümkün olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Alma, M. H., Mavi, A., Yildirim, A., Digrak, M., & Hirata, T. (2003). Screening chemical composition and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growing in Turkey. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26: 1725–1729.
- Avalos-Llano, K. R., Martín-Belloso, O., Soliva-Fortuny, R. (2018). Effect of pulsed light treatments on quality and antioxidant properties of fresh-cut strawberries. *Food Chemistry*, 264: 393–400.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1999). 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. *Methods in Enzymology*, 299: 15-27.

- Budaraju, S., Mallikarjunan, K., Annor, C., Schoenfuss, T., Raun, R. (2018). Effect of pre-treatments on the antioxidant potential of phenolic extracts from barley malt rootlets. *Food Chemistry*, 266: 31-37.
- Chen, Y. C., Sugiyama, Y., Abe, N., Kuruto-Nima, R., Nozawa, R., Hirota, A. (2005). DPPH radical scavenging compounds from Dou-Chi, a soybean fermented food. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69, 999–1006.
- Chen, G. L., Chen, S. G., Xiao, Y., Fu, N. L. (2018). Antioxidant capacities and total phenolic contents of 30 flowers. *Industrial Crops and Products*, 111: 430–445.
- Çıkla Yılmaz, D., Ayaz Seyhan, S. (2017). Antioxidant potential of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Istanbul J Pharm*, 47 (1): 9-12.
- Da Silva Andrade, L. B., da Silva Julião, M. S., Vera Cruz, R. C., Soares Rodrigues, T. H., dos Santos Fontenelle, R. O., Coelhoda Silva, A. L. (2018). Antioxidant and antifungal activity of carnauba wax powder extracts. *Industrial Crops and Products*, 125: 220-227.
- Deng, J., Cheng, W., Yang, G. (2011). A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. *Food Chemistry*, 125(4): 1430–1435.
- Eklund, P. C., Langvik, O. K., Warna, J. P., Salmi, T. O., Willfor, S. M., & Sjöholm, R. E. (2005). Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 21: 3336–3347.
- Govindarajan, R., Rastogi, S., Vijayakumar, M., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S. (2003). Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26: 1424–1427.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6): 1841-1856.
- Kanmaz, E. Ö., Saral, Ö. (2017). The effect of extraction parameters on antioxidant activity of subcritical water extracts obtained from mandarin peel. *The Journal of Food*, 42 (4): 405-412.
- Kano, M., Takayanagi, T., Harada, K., Makino, K., & Ishikawa, F. (2005). Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69: 979–988.
- Karioti, A., Hadjipavlou-Litina, D., Mensah, M. L., Fleischer, T. C., & Skaltsa, H. (2004). Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopiya aethiopyca* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 8094–8098.
- Kedare, S.B., Singh, R.P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48 (4): 412-422.
- Kim, H. J., Chen, F., Wu, C., Wang, X., Chung, H. Y., & Jin, Z. (2004). Evaluation of antioxidant activity of Australian tea tree (*Melaleuca alternifolia*) oil and its components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2849–2854.
- Ko, C. H., Lee, J. Y., Jang, M. G., Song, H., Kim, S. (2018). Seasonal variations in the phenolic compounds and antioxidant activity of *Sasa quelpaertensis*. *Industrial Crops and Products*, 122: 506-512.

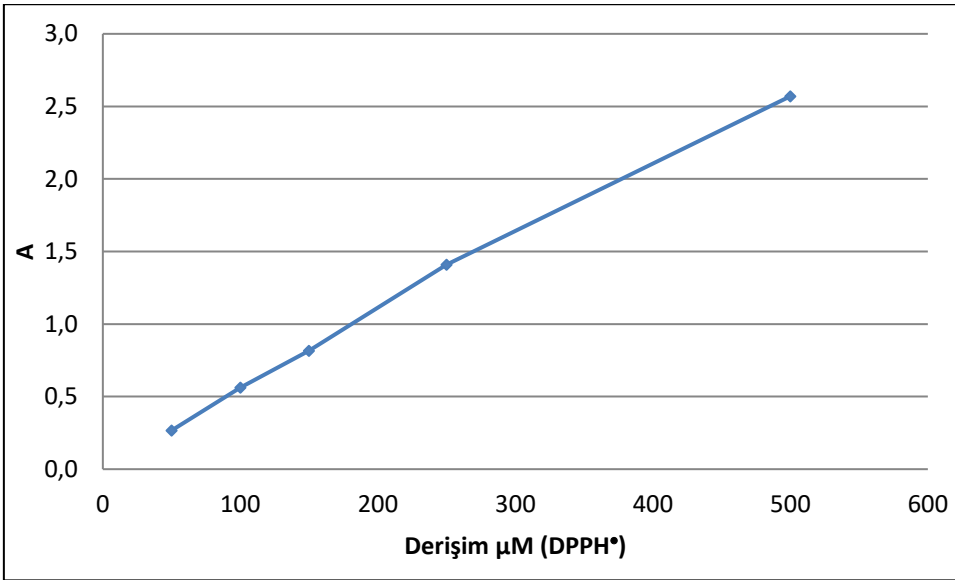
- Köse, Ş., Ocak, E. (2018). Antimicrobial and antioxidant properties of sirmo (*allium vineale* l.), mendi (*chaerophyllum macropodium* boiss.) and sıyabo (*ferula rigidula* dc.). *The Journal of Food*, 43 (2): 294-302.
- Mimica-Dukic, N., Bozin, B., Sokovic, M., Simin, N. (2004). Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 2485–2489.
- Mimura, T., Yazaki, K., Sawaki, K., Ozawa, T., Kawaguchi, M. (2005). Hydroxyl radical scavenging effects of guaiacol used in traditional dental pulp sedation: Reaction kinetic study. *Biomedical Research*, 26: 139–145.
- Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130 (4): 1036–1043.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 49 (4): 503–515.
- Prior, R.L., Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*. 27(11-12):1173-81.
- Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K. (2005). Standardized methods for the determination antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8): 4290-4302.
- Sarker, U., Oba, S. (2018). Response of nutrients, minerals, antioxidant leaf pigments, vitamins, polyphenol, flavonoid and antioxidant activity in selected vegetable amaranth under four soil water content. *Food Chemistry*, 30: 72-83.
- Scherer, R., Godoy, H.T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3): 654–658.
- Sellappan, S., Akoh, C.C., Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (8): 2432-2438.
- Sharma, OP., Bhat, T.K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4): 1202–1205.
- Takebayashi, J., Tai, A., Gohda, E., & Yamamoto, I. (2006). Characterization of the radical-scavenging reaction of 2-O-substituted ascorbic acid derivatives, AA-2G, AA-2P, and AA-2S: A kinetic and stoichiometric study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29: 766–771.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H. A., & Sokmen, A. (2005). In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of four *Helichrysum* species from Turkey. *Food Chemistry*, 90: 685–689.
- Türker, İ., İşleroğlu H. (2017). Mahlep püresinin kızılötesi ışınım ile kurutulması işleminde antosiyanin, fenolik madde ve antioksidan kapasite değişim kinetiği. *The Journal of Food*, 42 (4): 422-430.
- Wang, Q., Rehman, M., Peng, D., Liu, L.(2018). Antioxidant capacity and α -glucosidase inhibitory activity of leaf extracts from ten ramie cultivars. *Industrial Crops and Products*, 122: 430-437.

TABLolar ve ŐEKİLLER**Tablo 1.** DPPH• radikali ile yapılmış olan çalışmalar

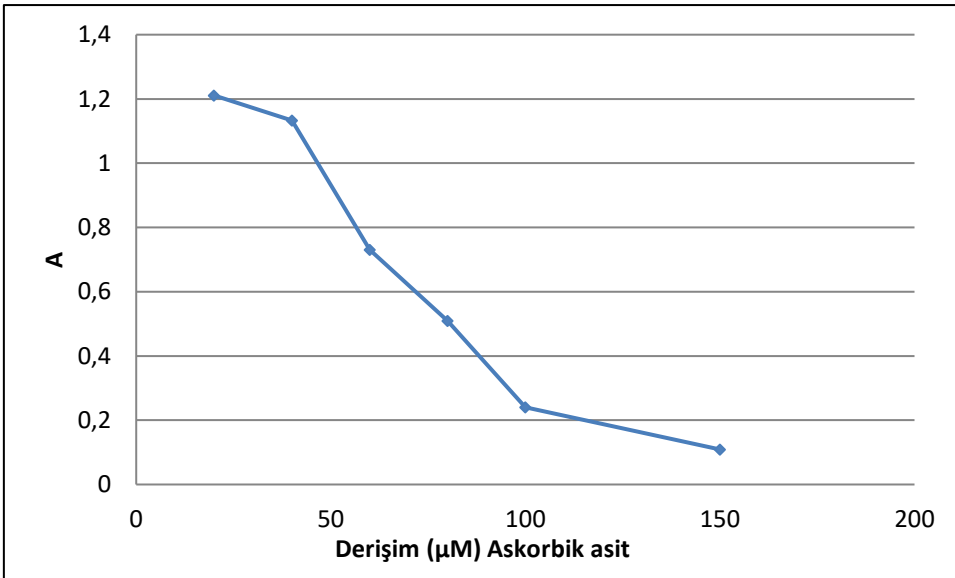
DPPH• (μM)	Kaynaklar
22.5	Mimica-Dukicvd., 2004
50.0	Karioti vd., 2004
60.0	Budaraju vd., 2018; Chen vd., 2018
63.4	Köse ve Ocak, 2018; Avalos-Llano vd., 2018
65.0	Wang vd., 2018
80.0	Eklund vd., 2005
100.0	ıkla Yılmaz ve Ayaz Seyhan, 2017; Kano vd., 2005; Tepe vd., 2005; Kanmaz ve Saral, 2017; Türker ve İşleröğlu, 2017
250	Alma vd., 2003; Kim vd., 2004; Sarker ve Oba, 2018
400	Ko vd., 2018
Reaksiyon Ortamı	
Etanol	Karioti vd., 2004; Chen vd., 2018; Kano vd., 2005; Mimura vd., 2005; Da Silva Andrade vd., 2018
Metanol	ıkla Yılmaz ve Ayaz Seyhan, 2017; Mimica-Dukicvd., 2004; Köse ve Ocak, 2018; Avalos-Llano vd., 2018; Wang vd., 2018; Eklund vd., 2005; Kanmaz ve Saral, 2017; Türker ve İşleröğlu, 2017; Alma vd., 2003
Etanol Tampon (pH=3)	Takebayashi vd., 2006
Metanol Tampon (pH=5.5)	Chen vd., 2005
İnkübasyon süresi (dk)	
5	Govindarajan vd., 2003
10	Ko vd., 2018
20	Karioti vd., 2004; Mimura vd., 2005
30	ıkla Yılmaz ve Ayaz Seyhan, 2017; Köse ve Ocak, 2018; Avalos-Llano vd., 2018; Wang vd., 2018; Türker ve İşleröğlu, 2017; Alma vd., 2003; Kim vd., 2004; Sarker ve Oba, 2018
50	Kanmaz ve Saral, 2017
60	Mimica-Dukicvd., 2004; Karioti vd., 2004; Budaraju vd., 2018
120	Chen vd., 2018

Tablo 2. DPPH• radikali temizleme aktivitesi deney prosedürü

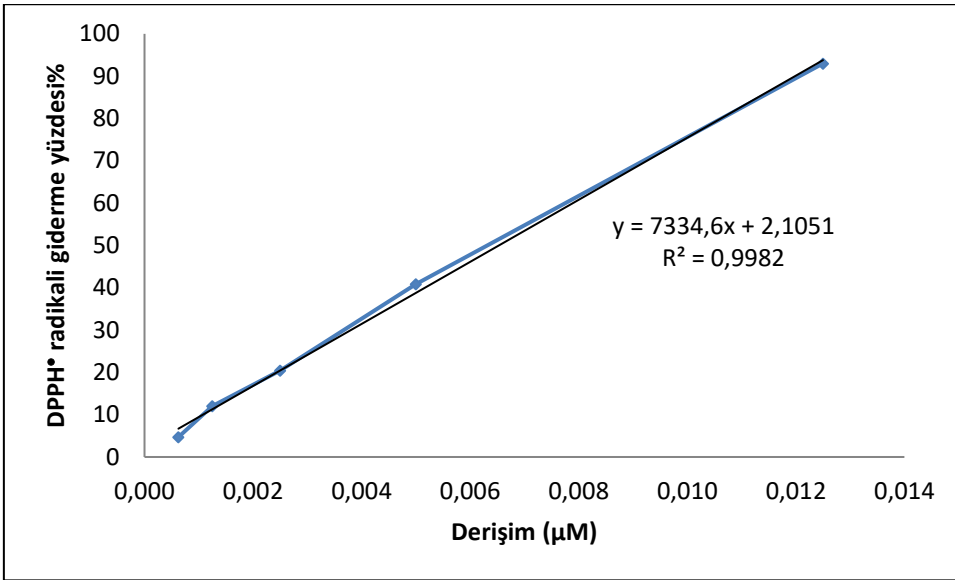
	Standart	Deney	Kontrol
Standart (deđiřik derişimlerde)(Trolox)	2 ml		
Numune (Askorbik Asit)		2 ml	
DPPH reaktifi	2 ml	2 ml	2 ml
Metanol			2 ml
Karanlıkta, 30°C'de, bekletildikten sonra absorbans okuması (515-528nm maksimum dalgaboyunda) yapılmıştır.			



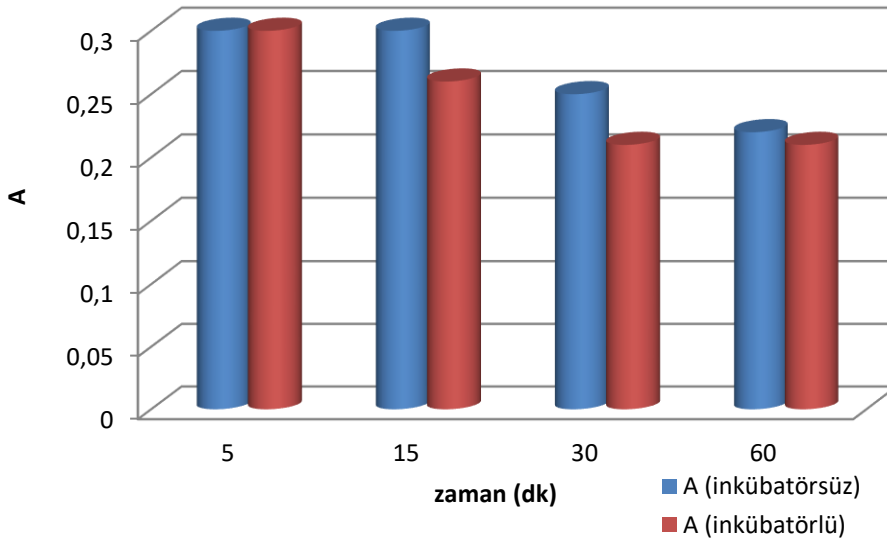
Şekil 1. Farklı derişimlerdeki DPPH* reaktifinin maksimum absorbans değeri (517nm)



Şekil 2. Farklı derişimlerdeki askorbik asitin DPPH* radikal temizleme aktivitesi grafiği (inkübasyon süresi: 60dk)



Şekil 3. Trolox'un %DPPH• giderme aktivitesi grafiği



Şekil 4. Zamana göre inkübatörlü/inkübatörsüz DPPH• radikal temizleme aktivitesi