



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LAHANA ÇEŞİTLERİNİN ANTIOKSİDAN
KAPASİTELERİ VE BİLEŞENLERİ AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Sevinç ENCU
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Esmâ TÜTEM**

Temmuz, 2010

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**LAHANA ÇEŞİTLERİNİN ANTIOKSİDAN
KAPASİTELERİ VE BİLEŞENLERİ AÇISINDAN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Sevinç ENCU
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof.Dr. Esmâ TÜTEM**

Temmuz, 2010

İSTANBUL

Bu çalışma 18/08/2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof. Dr. Esmâ TÜTEM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Yrd. Doç. Dr. Sema DEMİRCİ ÇEKİÇ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 3806 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek, anlayış ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Esmâ TÜTEM' e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN' a ve çalışma arkadaşlarım Türkan VURAL, Nagihan KÖKYAR ve Olcay ÇETİN'e çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen sevgili aileme, arkadaşım S. İlknur ÜNAL'a, çalışmalarım süresince hertürlü laboratuvar imkanı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'na ve bu bölümdeki tüm hocalarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle aynı adı taşıyan 3806 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Temmuz, 2010

SEVİNÇ ENCU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
ŞEKİL LİSTESİ	VI
TABLO LİSTESİ	VIII
SEMBOL LİSTESİ	IX
ÖZET	X
SUMMARY	XII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR.....	3
2.1. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR	3
2.2. DOĞAL ANTİOKSİDANLAR.....	5
2.2.1. C Vitamini.....	5
2.2.2. E Vitamini.....	5
2.2.3. Karotenoidler.....	6
2.2.4. Fenolik Bileşikler	7
2.2.4.1. Flavonoidler	8
2.2.4.2. Fenolik asitler.....	15
2.2.4.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)	17
2.3. TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ.....	18
2.3.1. Elektron Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Yöntemleri	19
2.3.1.1. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi.....	19

2.3.1.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite)/ABTS Yöntemi	20
2.3.1.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi	21
2.3.1.4. Folin Ciocalteu Yöntemi	22
2.3.1.5. DPPH Yöntemi	22
2.3.2. Hidrojen Atomu Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri	22
2.3.2.1. TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter; Toplam Radikal Tutucu Antioksidan Parametre) Yöntemi	22
2.3.2.2. Luminol Yöntemi.....	23
2.3.2.3. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi.....	23
2.3.2.4. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler.....	23
2.3.2.5. Krosin Yöntemi	24
2.3.2.6. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity; Oksijen Radikali Absorplama Kapasitesi) Yöntemi.....	24
2.3.2.7. TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity; Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi) Yöntemi.....	25
2.4. TOPLAM FENOL İÇERİĞİ TAYİN YÖNTEMİ.....	25
2.5. TOPLAM FLAVONOİD İÇERİĞİ TAYİN YÖNTEMLERİ.....	25
2.5.1. Alüminyum Klorür/Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi	25
2.5.2. Alüminyum Klorür/Sodyum Nitrit Yöntemi	26
2.6. TOPLAM ANTOSİYANİN İÇERİĞİ TAYİN YÖNTEMİ.....	26
2.6.1. Farklı pH Yöntemi.....	26
2.7. LAHANA BİTKİLERİ.....	28
2.7.1. Lahana Bitkilerinin İçerikleri ve Sağlık Üzerindeki Etkileri.....	29
2.7.2. Lahana Türlerinde Toplam Antioksidan Kapasite Tayini ve Fenolik Bileşenlerin Belirlenmesi ve Miktarlandırılması Uygulamaları.....	30
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	35
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	35
3.2. KİMYASAL MADDELER	35
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması.....	36

3.3. HİDROLİZ ŞARTLARI	36
3.4. LAHANA ÖRNEKLERİNİN ANALİZE HAZIRLANMASI	37
3.4.1. Lahana Örneklerinin Kurutulması.....	37
3.4.2. Kurutulmuş Lahana Örneklerinin Ekstraksiyonu.....	37
3.4.3. Lahana Örneklerinin Hidrolizi	37
3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER	38
3.5.1. Spektrofotometrik Yöntemler	38
3.5.1.1. CUPRAC Yöntemi.....	38
3.5.1.2. ABTS / HRP Yöntemi	38
3.5.1.3. Folin Ciocalteu Yöntemi	39
3.5.1.4. AlCl ₃ / KAc Yöntemi.....	39
3.5.1.5. AlCl ₃ / NaNO ₂ Yöntemi	39
3.5.1.6. Farklı pH Yöntemi	40
3.5.2. Kromatografik Yöntem	40
3.5.2.1. HPLC Analizi.....	40
3.5.3 Birleştirilmiş HPLC- Spektrofotometrik Yöntemler	42
4. BULGULAR	43
4.1. CUPRAC VE ABTS/HRP YÖNTEMLERİNİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI.....	43
4.2. CUPRAC VE ABTS/HRP YÖNTEMLERİYLE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARININ TEAC KATSAYILARININ BELİRLENMESİ	46
4.3. HPLC YÖNTEMİNİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI.....	47
4.4. ANTOSİYANİN STANDARDININ HİDROLİZ SONUÇLARI.....	49
4.5. LAHANA TÜRLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI.....	50
4.5.1. Karalahana	50
4.5.2. Beyaz Lahana.....	53
4.5.3. Brüksel Lahanası	56
4.5.4. Kırmızı Lahana.....	58
4.5.5. Lahana Örneklerinin Toplam Antioksidan Kapasiteleri	62
4.5.5.1. CUPRAC ve ABTS/HRP Yöntemleri İle.....	62
4.5.6. Lahana Örneklerinin Toplam Flavonoid Derişimleri	63

4.5.6.1. $AlCl_3/CH_3COOK$ ve $AlCl_3/NaNO_2$ Yöntemleri İle.....	63
4.5.7. Kırmızı Lahananın Toplam Antosiyanin Derişimi.....	64
4.5.7.1. Farklı pH Yöntemi İle	64
4.5.8. Lahana Ekstraktlarının Toplam Fenol İçerikleri	65
4.5.9. Lahana Örneklerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Toplam Fenol İçerikleri İle Uyumu.....	66
4.5.10. Lahana Örneklerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Toplam Flavonoid İçerikleri İle Uyumu	67
4.5.11. Birleştirilmiş HPLC-CUPRAC ve HPLC-ABTS Yöntemleri İle Toplam Antioksidan Kapasite.....	71
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	72
KAYNAKLAR.....	78
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1	: C vitamininin kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2	: α - tokoferol'ün kimyasal yapısı	6
Şekil 2.3	: β -karoten, likopen ve lutein'in kimyasal yapıları	7
Şekil 2.4	: Flavonoidlerin genel yapısı	9
Şekil 2.5	: Flavonol, flavon, flavanon, flavanol, izoflavon ve antosiyanidinler'in kimyasal yapıları.....	9
Şekil 2.6	: Apigenin, luteolin ve krisin'in kimyasal yapıları	10
Şekil 2.7	: Kuersetin, kamferol, mirisetin ve izoramnetin'in kimyasal yapıları	10
Şekil 2.8	: Kateşin, epikateşin, epigallokateşin'in kimyasal yapıları	11
Şekil 2.9	: Hesperetin ve naringenin'in kimyasal yapıları.....	11
Şekil 2.10	: Genistein ve daidzein'in kimyasal yapıları	12
Şekil 2.11	: Siyanidin, malvidin, apigenidin ve delfinidin'in kimyasal yapıları.....	13
Şekil 2.12	: p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, klorojenik asit ve sinapik asit'in kimyasal yapıları.....	16
Şekil 2.13	: Gallik, protokateşuik, vanilik asit'in kimyasal yapıları	16
Şekil 2.14	: Prosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı.....	17
Şekil 2.15	: Prosiyanidin B1, B2, B3, B4'ün kimyasal yapıları.....	18
Şekil 2.16	: (A) Cu(II)-Nc, (B) Cu(I)-Nc komplekslerinin spektrumları	19
Şekil 2.17	: ABTS ⁺ radikal katyonunun yapısı.....	20
Şekil 2.18	: Radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu.....	21
Şekil 2.19	: Al(III)'un kuersetin ile oluşturduğu komplekslerin kimyasal yapısı	26
Şekil 2.20	: pH 1.0 ve pH 4.5 tamponlarında saflaştırılmış turp antosiyaninlerinin (açıllanmış pelargonidin-3-soforozit-5-glukozit türevleri) spektral karakteristikleri.....	27
Şekil 2.21	: Farklı pH değerlerinde antosiyaninlerin baskın yapısal türleri.....	27
Şekil 4.1	: Çeşitli antioksidan standartlarını içeren sentetik karışımın 280 nm'deki kromatogramı.....	48
Şekil 4.2	: Siyanidin klorür standardının 520 nm'deki kromatogramı.....	49
Şekil 4.3	: Siyanin klorür standardının hidroliz öncesi ve 2 saat hidrolizi sonucu elde edilen kromatogramlar.....	49
Şekil 4.4	: Karalahana ekstraktlarının spektrumları.....	50
Şekil 4.5	: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş karalahana yaprağı ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı.....	51
Şekil 4.6	: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş karalahana sapı ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı.....	51
Şekil 4.7	: Karalahana yaprak ekstraktı hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı.....	52
Şekil 4.8	: Karalahana sapı ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı.....	52
Şekil 4.9	: Beyaz lahana (iç yapraklar) ekstraktlarının spektrumları.....	53
Şekil 4.10	: Beyaz lahana (dış yapraklar) ekstraktlarının spektrumları.....	54

Şekil 4.11	: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş beyaz lahana (iç yapraklar) ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı.....	55
Şekil 4.12	: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş beyaz lahana (dış yapraklar) ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı.....	55
Şekil 4.13	: Beyaz lahana (iç yapraklar) ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı.....	56
Şekil 4.14	: Beyaz lahana (dış yapraklar) ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı.....	56
Şekil 4.15	: Brüksel lahanası ekstraktlarının spektrumları.....	57
Şekil 4.16	: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş Brüksel lahanası ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı.....	58
Şekil 4.17	: Brüksel lahanası ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı	58
Şekil 4.18	: Kırmızı lahana ekstraktlarının spektrumları.....	59
Şekil 4.19	: %2 HCl içeren %50 metanol ile ekstrakte edilmiş kırmızı lahana ekstraktının 280 ve 520 nm'deki kromatogramları	59
Şekil 4.20	: Kırmızı lahana ekstrakt hidrolizatının 280 ve 520 nm'deki kromatogramları.....	60
Şekil 4.21	: 50 kez %80 metanol ile seyreltilmiş lahana ekstraktlarının spektrumları.....	61
Şekil 4.22	: 200 kez %80 metanol ile seyreltilmiş lahana ekstraktlarının spektrumları.....	61
Şekil 4.23	: Lahana ekstraktlarının Folin-CUPRAC korelasyonu.....	66
Şekil 4.24	: Lahana ekstraktlarının Folin-ABTS korelasyonu.....	66
Şekil 4.25	: Lahana ekstraktlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ -CUPRAC korelasyonu.....	67
Şekil 4.26	: Lahana ekstraktlarının $AlCl_3/NaNO_2$ -CUPRAC korelasyonu.....	67
Şekil 4.27	: Lahana ekstraktlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ -ABTS korelasyonu.....	68
Şekil 4.28	: Lahana ekstraktlarının $AlCl_3/NaNO_2$ -ABTS korelasyonu.....	68
Şekil 4.29	: Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ -CUPRAC korelasyonu.....	69
Şekil 4.30	: Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/NaNO_2$ -CUPRAC korelasyonu.....	69
Şekil 4.31	: Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ -ABTS korelasyonu.....	70
Şekil 4.32	: Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/NaNO_2$ -ABTS korelasyonu.....	70

TABLO LİSTESİ

Tablo 4.1	: Çeşitli antioksidan standartları için normal CUPRAC yöntemi verileri.....	44
Tablo 4.2	: Çeşitli antioksidan standartları için inkübasyonlu CUPRAC yöntemi verileri.....	45
Tablo 4.3	: Çeşitli antioksidan standartları için ABTS / HRP yöntemi verileri	46
Tablo 4.4	: Çeşitli antioksidan standartlarının CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemlerine göre belirlenen TEAC değerleri.....	47
Tablo 4.5	: Çeşitli antioksidan standartlarının 280 nm'deki HPLC verileri.....	48
Tablo 4.6	: Lahana ekstraktlarının CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleri ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g ⁻¹ kuru madde).....	63
Tablo 4.7	: Lahana ekstraktlarının AlCl ₃ /CH ₃ COOK ve AlCl ₃ /NaNO ₂ yöntemleri ile bulunmuş toplam flavonoid derişimleri (mmol kuersetin g ⁻¹ kuru madde)	64
Tablo 4.8	: Kırmızı lahana ekstraktının ve hidrolizatının farklı pH yöntemi ile bulunmuş toplam antosiyanin derişimi (mmol g ⁻¹ siyanidin-3-glukozit)	65
Tablo 4.9	: Lahana ekstraktlarının Folin-Ciocalteu yöntemi ile bulunmuş toplam fenol derişimleri (mmol g ⁻¹ gallik asit).....	65
Tablo 4.10	: Karalahana hidrolizatının birleştirilmiş HPLC-CUPRAC ve HPLC-ABTS yöntemleri ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g ⁻¹) ve HPLC ile belirlenebilen toplam antioksidan kapasite yüzdeleri.....	71
Tablo 5.1	: Lahana ekstraktlarında toplam antioksidan kapasite çalışmalarının karşılaştırılması.....	73
Tablo 5.2	: Lahana ekstraktlarında toplam fenol çalışmalarının karşılaştırılması.	74
Tablo 5.3	: Lahana ekstraktlarında toplam flavonoid çalışmalarının karşılaştırılması.....	75
Tablo 5.4	: Kırmızı lahana ekstraktında toplam antosiyanin çalışmalarının karşılaştırılması.....	77

SEMBOL LİSTESİ

ROS	: reaktif oksijen türleri
RNS	: reaktif azot türleri
CUPRAC	: bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
Cu(II)-Nc	: bakır(II)-neokuproin
Cu(I)-Nc	: bakır(I)-neokuproin
HRP	: horseradish peroksidaz
ABTS	: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat)
ABTS^{•+}	: ABTS radikal katyonu
TEAC	: troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HPLC/DAD-ESI/Qtrap MS	: Fotodiyot dedektör - Elektrosprey İyonizasyon ve İyon Kapanlı Kütle Dedektörü ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi
FRAP	: demir(III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü
TPTZ	: tripridiltiazin
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
TRAP	: toplam radikal tutucu antioksidan parametre
AAPH	: azobis (2-amido propan)dihidroklorür
DCFH-DA	: diklorofloresin-diasetat
DCF	: diklorofloresin
PE	: fikoeritrin
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
ORAC	: oksijen radikali absorplama kapasitesi
AUC	: eğri altında kalan alan
KMBA	: α -keto- γ metiolbutirik asit
CUPRAC_N	: normal CUPRAC yöntemi
CUPRAC_i	: inkübasyonlu CUPRAC yöntemi
TR	: troloks
QR	: kuersetin
LDL	: düşük yoğunluklu lipoprotein

ÖZET

LAHANA ÇEŞİTLERİNİN ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİ VE BİLEŞENLERİ AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Antioksidanlar, hücreleri serbest radikaller olarak bilinen kararsız moleküllerin zararlı etkilerinden koruyabilen maddelerdir. Damar tıkanıklığı, siroz, kanser gibi çeşitli hastalıklar serbest radikallerin neden olduğu oksidatif zararlarla ilişkilidir. Serbest radikal süpürücüleri ve antioksidanlar, lipid peroksidasyonunu ve reaktif oksijen türlerinin oluşumunu azaltırlar. Antioksidatif etki gösteren maddelerin ve antioksidan içeren gıdaların alınmasının oksidatif zararı azaltma ve insan sağlığını koruma açısından etkili bir yol olduğu kabul edilmektedir. İçerdikleri fenolik bileşikler nedeniyle sebze ve meyve tüketilmesinin kalp hastalıkları, kanser ve yaşlanma gibi oksidatif stres kaynaklı hastalıkları engellediği bilinmektedir. Bitkilerde bulunan fenolik maddeler, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini oluşturan, insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir ve flavonoidler, fenolik asitler ve fenolik polimerler (tanninler) olmak üzere başlıca üç gruba ayrılırlar.

Sebzelerdeki flavonoidleri de içeren fenolik fitokimyasalların sağlık üzerindeki olumlu etkilerine ilgi giderek artmaktadır. Lahana (*Brassica oleracea L. var. capitata*), tüm dünyada ve ülkemizde yaygın olarak yetiştirilen sebzelerden biridir. Brüksel lahanası, brokoli, karnabahar ve kıvırcık lahanayı içeren *Cruciferae* (*Turpgiller*) familyasındandır. Çok sayıda araştırma bu sebzelerin antioksidan aktivitelerinin başlıca flavonoidler ve antosiyaninler gibi fenolik bileşiklerden ileri geldiğini göstermiştir.

Çalışmamızda beyaz lahana, kırmızı lahana, karalahana ve Brüksel lahanasından oluşan lahana çeşitlerinin toplam antioksidan kapasiteleri anabilim dalımızda geliştirilen kolay ve ucuz bir yöntem olan CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity, Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite) ve karşılaştırma yöntemi olarak ise troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesinin (TEAC) belirlenmesinde yaygın kullanımı olan ABTS [(2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)]/HRP (horseradish peroksidaz) yöntemi ile belirlenmiştir. Lahana örneklerinin toplam fenol, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin miktarları sırasıyla Folin-Ciocalteu, $AlCl_3/CH_3COOK$ ve $AlCl_3/NaNO_2$ ve farklı pH yöntemleriyle belirlenip bu değerlerin, toplam antioksidan kapasite değerleriyle uyumu incelenmiştir. Antioksidan özellik gösteren başlıca bileşiklerin tek tek tanımlanması ve miktarlandırılması amacıyla ters-faz HPLC yöntemi kullanılmıştır.

Çalışılan lahana türlerinin toplam antioksidan kapasiteleri ($mmol$ troloks g^{-1}) CUPRAC yöntemine göre kırmızı lahana > karalahana yaprakları > Brüksel lahanası > beyaz lahana (dış yapraklar) > karalahana sapı > beyaz lahana (iç yapraklar), ABTS yöntemine göre ise kırmızı lahana > karalahana yaprakları > beyaz lahana (dış yapraklar) > Brüksel lahanası > karalahana sapı > beyaz lahana (iç yapraklar) şeklinde sıralanmıştır.

Tüm örneklerin toplam antioksidan kapasitelerinin toplam fenol, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin içerikleri ile uyumu, yüksek ($AlCl_3/CH_3COOK$ yöntemi ile belirlenen toplam flavonoid içerikleri hariç, çizilen doğruların korelasyon katsayıları 0.9 civarında) bulunmuştur.

Lahana örnekleri ekstraktlarının kromatogramlarından bileşenleri belirlemek mümkün olamamıştır. Hidrolizat kromatogramlarından ise sadece karalahana ekstrakt hidrolizatlarında ferulik asit, kuersetin ve kamferol belirlenebilmiştir.

SUMMARY

EVALUATION OF CABBAGE SPECIES IN RESPECT OF THEIR ANTIOXIDANT CAPACITY AND CONTENTS

Antioxidants are substances that may protect cells from the damage caused by unstable molecules known as free radical. Various diseases including atherosclerosis, cirrhosis, and cancer are believed to be correlated with the oxidative damage induced by free radicals. Free radical scavengers and antioxidants can reduce lipid peroxidation and the generation of reactive oxygen species. The intake of antioxidative supplements or foods containing antioxidants is now widely considered an effective strategy to reduce oxidative damage and preserve human health. It is known that consumption of vegetables and fruits prevent oxidative stress-oriented diseases like coronary disease, cancer and ageing in due to their phenolic contents. Phenolic compounds of plants are one of the widest class of phytochemicals and are necessary for human life. They can be classified into flavonoids, phenolic acids, phenolic polymers (tannins).

The interest of phenolic phytochemicals – also includes flavonoids in vegetables – effect on human health is increasing. Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) is one of the vegetables commonly grown worldwide. It belongs to the family Cruciferae, which includes Brussels sprouts, broccoli, cauliflower and kale. Many researchs represents that the antioxidant activities of these vegetables are resulting from phenolic compounds like flavonoids and anthocyanins.

In our study, total antioxidant capacities (TACs) of white cabbage, red cabbage, black cabbage and Brussels sprouts were determined with CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) method which is a simple and low-cost assay developed in our laboratories. The TAC results obtained with CUPRAC have been compared to those of ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)]/HRP (horseradish peroxidase) method which is commonly used to determine trolox equivalence antioxidant capacity (TEAC). Total phenol, total flavonoid, total anthocyanin contents of cabbage samples were determined by Folin-Ciocalteu, $\text{AlCl}_3/\text{CH}_3\text{COOK}$ and $\text{AlCl}_3/\text{NaNO}_2$ and differential pH methods, respectively, and these values were correlated with the total antioxidant capacity. The individual antioxidant compounds were identified and quantified by RP-HPLC (reversed phase high performance liquid chromatography).

The order of antioxidant capacities of cabbage species ($\text{mmol trolox g}^{-1}$) determined with the CUPRAC method were: red cabbage > black cabbage leaf > Brussels sprouts > white cabbage (outer leaf) > stem of black cabbage > white cabbage (inner leaf), also with the ABTS method: Red cabbage > black cabbage leaf > white cabbage (outer leaf) > Brussels sprouts > stem of black cabbage > white cabbage (inner leaf).

Correlations of total phenols, total flavonoid and total anthocyanin contents with the total antioxidant capacities of all samples were found as high (correlation coefficient is about 0.9, except with the content of total flavonoid which was determined with $\text{AlCl}_3/\text{CH}_3\text{COOK}$).

The compounds could not be determined by the chromatograms of cabbage extracts. Ferulic acid, quercetin and kaempferol could only be determined at the hydrolysates of the black cabbage extract.

1. GİRİŞ

Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan serbest radikal türlerinin, organizmada var olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenememesi durumunda oluşan 'oksidatif stres' DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açarlar. Antioksidanlar, bu serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırırlar [1,2].

Bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin (flavonoidler, fenolik asitler ve tanenler) büyük bir kısmı serbest radikal süpürücü özellikleri, dolayısıyla antioksidan fonksiyonları nedeniyle biyolojik aktif maddeler olarak adlandırılmakta ve pek çok çalışmaya konu olmaktadır [3-8].

Brassica sebzeleri antioksidan aktiviteye sahip olarak bilinen bir çok biyoaktif bileşikleri, özellikle antikarsinojenik aktiviteye sahip bileşikleri içermektedir. Bu sebzelerin antioksidan aktivitelerinin flavonoidler ve antosiyaninler gibi fenolik bileşiklerden ileri geldiği görülmektedir [9].

Bu çalışmada Latince adı *Brassica oleracea* olan lahana bitkisinin beyaz, kara, kırmızı ve Brüksel çeşitlerinin toplam antioksidan kapasiteleri CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleriyle, toplam flavonoid miktarları $AlCl_3/CH_3COOK$ ve $AlCl_3/NaNO_2$, toplam fenol ve toplam antosiyanin miktarları ise sırasıyla, Folin-Ciocalteu ve farklı pH yöntemleri ile belirlenmiştir. Antioksidan özellik gösteren başlıca bileşiklerin tek tek tanımlanmasında ve miktarlandırılmasında ise HPLC yönteminden yararlanılmıştır. HPLC yöntemi ile belirlenen antioksidan bileşenlerin derişimlerinin TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity, troloks eşdeğeri antioksidan kapasite) katsayıları ile (Bir antioksidanın TEAC katsayısı, o antioksidanın 1 mM'lık çözeltisinin indirgeme gücü bakımından eşdeğer olduğu troloks çözeltisinin mM derişimidir) çarpılarak

bulunan toplam antioksidan kapasite, CUPRAC ve ABTS yöntemleri ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri ile karşılaştırılmıştır.

Lahana örneklerinin toplam antioksidan kapasite değerlerinin toplam fenol, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin içerikleri ile uyumu değerlendirilmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllerdir. Bu tip maddeler, eşleşmemiş elektronları sebebiyle genellikle kararsız ve çok reaktiftirler. Hayvanlarda ve insanlarda fizyolojik ve patolojik koşullarda oluşan reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species, ROS), reaktif azot türleri (reactive nitrogen species, RNS) ve reaktif klor türleri (reactive chlorine species) organizmadaki başlıca serbest radikallerdir.

Reaktif oksijen türleri;

- (1) süperoksit anyonu (O_2^-),
- (2) hidrojen peroksit (H_2O_2),
- (3) peroksil radikali (ROO^\cdot),
- (4) hidroksil radikali (OH^\cdot),
- (5) singlet oksijen (O_2),

Reaktif azot türleri;

- (1) Azot oksit (NO)
- (2) Azot dioksit (NO_2)
- (3) Peroksinitrit ($ONOO^-$),

Reaktif klor türü;

- (1) Hipoklorik asit (HOCl)'dir.

Bu türlerin, organizmada var olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenememesi durumunda oluşan 'oksidatif stres' DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açarlar. Antioksidanlar, bu serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırırlar [1,2].

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir [10].

Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan zararlı maddelerdir. Prooksidan terimi, reaktif türler için kullanılan bir terimdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek az zararlı veya zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır [11].

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri) ve fenolik bileşiklerdir. Yapılan pek çok araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [12]. Antioksidanların en önemlileri polifenoller ve bunların türevleridir. Polifenolik bileşikler; kimyasal yapıları basit bileşiklerden yüksek polimerleşmiş maddelere kadar çeşitlenebilen bitkisel maddelerdir [13].

Bu bileşikler oksidatif düzende farklı şekillerde davranırlar. Örneğin, oksijen derişimini düşürebilirler veya singlet oksijeni durdururlar. Hidroksil radikalleri gibi birincil radikalleri yutucu özelliğini kullanarak zincir tepkimelerinin başlamasını önlerler, metal iyon katalizörlerini bağlarlar [14].

Antioksidanlar, gıdalarda doğal olarak buldukları gibi, gıda endüstrisinde ürünlerin kalitesini korumak ve besin değerlerini muhafaza etmek amacıyla sonradan da eklenebilirler. Bu amaçla kullanılan bütillenmiş hidroksi anizol (BHA), bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), propil gallat (PG), tersiyer bütül hidrokinon (TBHQ) gibi yapay antioksidanlar besinlerin acılaşmasını, çürümesini geciktirici özelliğe sahip kimyasal maddelerdir. Özellikle yağlarda, havadaki oksijenin sebep olduğu otoksidasyonu yavaşlatmak için kullanılmaktadırlar. Böylelikle yağların tadını, kokusunu, rengini yani kalitesini ve raf ömrünü uzatırlar. Ortamda pek az miktarlarda bulunsalar bile etkin olan

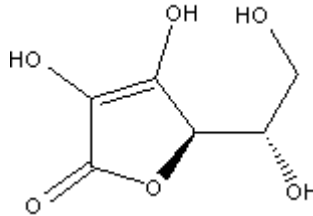
maddelerdir. Bir antioksidanın besin maddelerinde kullanılmadan önce sağlığa zararlı olmadığı kesin olarak saptanmalıdır.

2.2. DOĞAL ANTIOKSİDANLAR

2.2.1. C Vitamini

C vitamini (Şekil 2.1), diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilen ve serbest radikalleri doğrudan söndürebilen güçlü bir antioksidandır [15]. Özellikle çilek, papaya, portakal, kivi, greyfurt, kavun, mango gibi meyvelerde, brokoli, Brüksel lahanası, kırmızı ve yeşil biber, domates, lahana, patates, karnabahar gibi sebzelerde, portakal suyu, domates suyu gibi meyve sularında bol miktarda bulunmaktadır [16].

C vitamini, reaktif oksijen, reaktif azot ve reaktif klor türlerini kolayca süpürür ve bu suretle diğer substratları oksidatif hasardan korur [13].

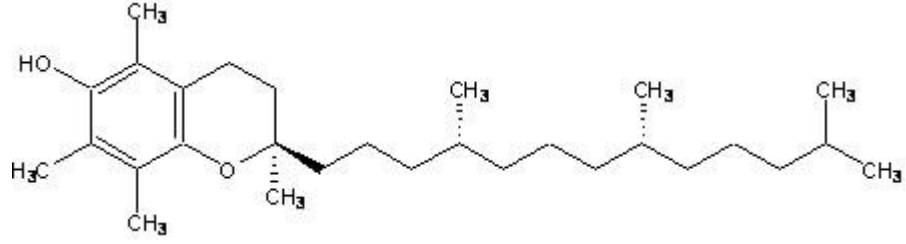


Şekil 2.1: C vitamininin kimyasal yapısı

2.2.2. E Vitamini

E vitamini α -, β -, γ -, δ - tokoferoller ve tokotrienollerini içeren grubu kapsamaktadır. α -tokoferol, özellikle D- α -tokoferol, (Şekil 2.2) en yüksek biyolojik aktiviteye sahip tokoferoldür [17,18]. E vitamini dokularda önemli zincir kırıcı bir antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı savunma etkisinin olduğu, hücre membranlarını serbest radikal saldırısına karşı koruduğu düşünülmektedir [19,20].

E vitamini, özellikle bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı sebzelerde, baklagillerde, ceviz, fındık, süt ve yumurta gibi gıdalarda bulunur [13].



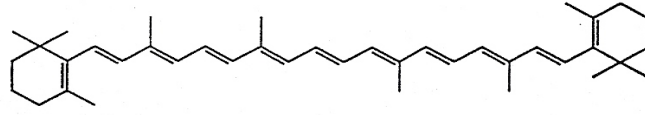
Şekil 2.2 : α -tokoferol'ün kimyasal yapısı

2.2.3. Karotenoidler

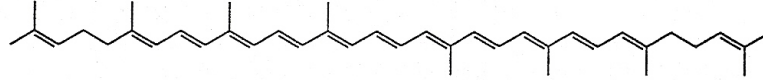
Doğal pigmentler olan karotenoidler bitkilerde sentezlenir, fakat hayvanlar için de önemlidir [13]. Şimdiye kadar doğal kaynaklardan 600'ü aşkın karotenoid izole edilmiştir [21]. Çoğu çiçek ve meyvelerin renkleri gibi birçok kuş, böcek ve deniz hayvanlarının renklerinden de sorumludurlar. Karotenoidler, yağda çözünen poliizoprenoid bileşiklerdir ve 2 ana gruba ayrılırlar.

- Karotenler veya sadece hidrojen ve karbon içeren hidrokarbon karotenoidler
- Hidroksi, keto, epoksi, metoksi veya karboksilik asit grubu gibi en az bir oksijen grubu taşıyan oksijenlenmiş hidrokarbon türevleri olan ksantofiller [22].

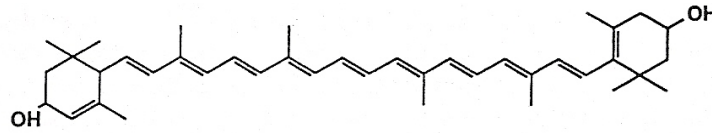
Likopen, β -karoten ve α -karoten, karotenler olarak adlandırılan; β -kriptoksantin, lutein ve zeaksantin, ksantofiller olarak adlandırılan karotenoid sınıfına örnek olarak verilmektedir [16]. Yapılarındaki konjuge çift bağlar, kimyasal, biyokimyasal ve fiziksel özelliklerini etkiler [22].



β-karoten



Likopen



Lutein

Şekil 2.3: β-karoten, likopen ve lutein'in kimyasal yapıları

Karotenoidlerin insan sağlığı üzerinde önemli etkileri vardır [16]. Karotenoidlerin yapısındaki konjuge çifte bağlar yüksek antioksidan aktivite göstermelerine yol açmaktadır [23,24]. Dolayısıyla karotenoidler biyolojik antioksidan gibi davranmaktadırlar [25]. Karotenoidlerin singlet oksijen türleri ve serbest radikalleri süpürücü etkisi vardır [23,24]. Karotenoidlerin karakteristiği olan konjuge çifte bağlar bazı koşullarda prooksidan aktivite de gösterebilmektedir. β-karoten fizyolojik koşullar altında, düşük oksijen basıncında serbest radikal süpürücü etkiye sahiptir ancak yüksek oksijen basıncında prooksidan etki göstermektedir [16].

2.2.4. Fenolik Bileşikler

Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında bulunan, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir.

Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenolleri çok fonksiyonlu olup, indirgeme aracı, hidrojen atomu verici ve singlet oksijen söndürücü olarak davranırlar. Bazı polifenoller ise metal iyonu kelatlama

özelliklerine sahip antioksidanlar olarak etkilidirler [26]. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

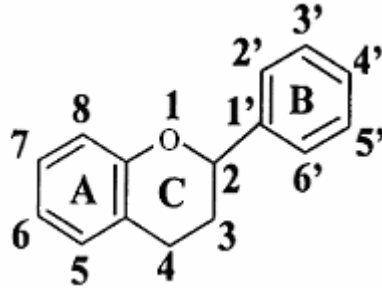
1. Okside olabilen substratlara oranla düşük derişimlerde bulduklarında, otoksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [27].
2. Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [28].

Bitki fenolikleri; flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç sınıfa ayrılır.

2.2.4.1. Flavonoidler

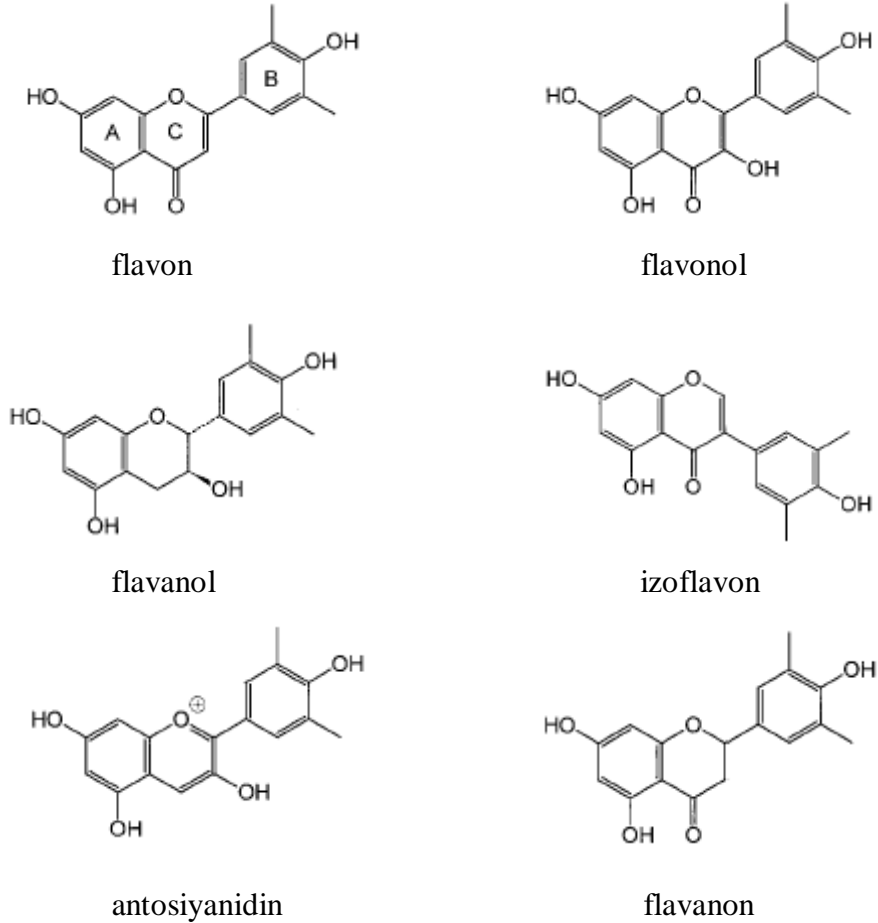
Bitki fenollerinin en geniş sınıfını difenilpropan ($C_6C_3C_6$) iskeletine sahip flavonoidler oluşturmaktadır [16]. Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi vardır. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar.

Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük moleköl ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6'şar karbonlu A, B ve 3 C'lu C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (°) rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.4). Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grubu içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Bitkilerde genellikle 3-O-glikozitleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz ya da daha farklı olabilmektedir. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, konumu ve sayısına göre farklı radikal yutma ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [29]. Bağırsaklarda hidrolizlenerek biyolojik bakımdan aktif aglikonlara dönüşürler [30]. İnsan ve hayvanlarda mide-bağırsak sisteminden emilirler, değişmeden ya da metabolitleri halinde idrar ve dışkı ile atılırlar [31].



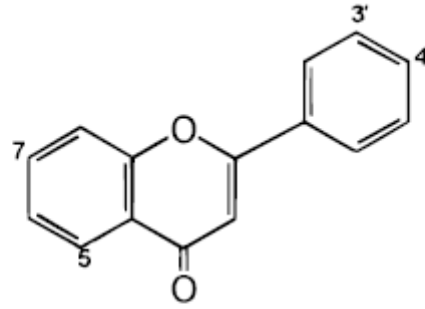
Şekil 2.4: Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidler; antosiyaninler ve antoksaninler şeklinde sınıflandırılır. Antoksaninler, renksiz veya beyazdan sarıya dönük renkte olurlar ve flavon, flavonol, flavanol, flavanon ve izoflavonlar olarak sınıflandırılırlar [16].



Şekil 2.5: Flavon, flavonol, flavanon, flavanol, izoflavon ve antosiyanidinler'in kimyasal yapıları

Flavon sınıfına ait temel bileşikler; apigenin, luteolin ve krisindir. Maydanoz, kereviz ve zeytinde bol miktarda bulunmaktadırlar [29].

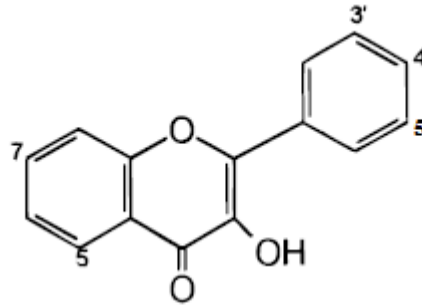


Flavonlar

	5	7	3'	4'
luteolin	OH	OH	OH	OH
apigenin	OH	OH		OH
krisin	OH	OH		

Şekil 2.6: Apigenin, luteolin ve krisin'in kimyasal yapıları

Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3 no'lu C atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller kuersetin, glikozitlenmiş kuersetin (rutin), kamferol, mirisetin, izoramnetindir. Kuersetin, flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir, elmada, soğanda, çayda ve lahanada bol miktarda bulunmaktadır [26,29].



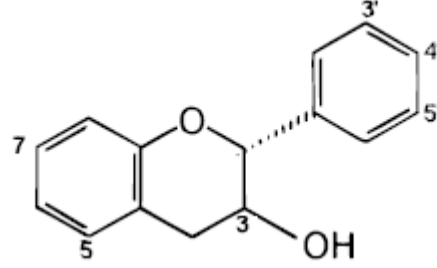
Flavonoller

	5	7	3'	4'	5'
kuersetin	OH	OH	OH	OH	
kamferol	OH	OH		OH	
mirisetin	OH	OH	OH	OH	OH
izoramnetin	OH	OH	OH	OCH ₃	

Şekil 2.7: Kuersetin, kamferol, mirisetin ve izoramnetin'in kimyasal yapıları

Flavonoidlerin C halkasında bulunan C-4'teki karbonil grubunun mevcut olmaması halinde **flavanol** oluşur. Flavanoller flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin'dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu

kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çayda, kırmızı ve beyaz şarapta, şeftalide ve elmada yüksek miktarda bulunur [13,16,26].

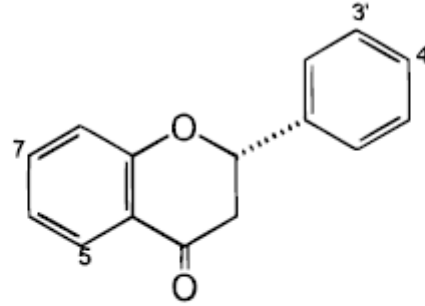


Flavanoller

	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-kateşin	β OH	OH	OH	OH	OH	
(-)-epikateşin	α OH	OH	OH	OH	OH	
(-)-epigallokateşin	α OH	OH	OH	OH	OH	OH

Şekil 2.8: Kateşin, epikateşin, epigallokateşin'in kimyasal yapıları

Flavonun dihidro türevleri ise flavanonlardır. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. Naringin naringenin'in, hesperidin hesperetin'in glikozitidir. Greyfurt ve portakalda bol miktarda bulunurlar.

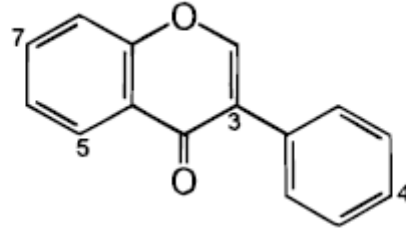


Flavanonlar

	5	7	3'	4'
hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃
naringenin	OH	OH		OH

Şekil 2.9: Hesperetin ve naringenin'in kimyasal yapıları

Flavonların izomeri olan izoflavonlarda B halkası C halkasına 3 konumundan bağlı olup, en bilinen bileşikleri genistein ve daidzeindir. Baklagil ve soya fasülyesinde fazla miktarda bulunmaktadır [32].

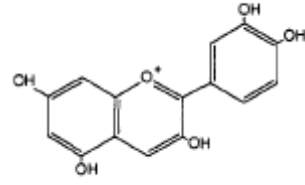


İzoflavonlar

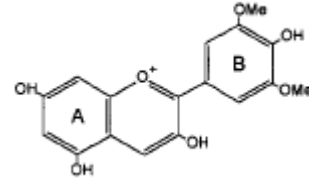
	5	7	4'
genistein	OH	OH	OH
daidzein		OH	OH

Şekil 2.10: Genistein ve daidzein'in kimyasal yapıları

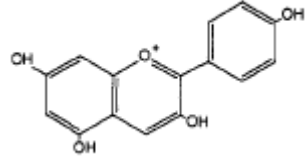
Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleri olup çiçeklere ve meyvelere kırmızı, mavi ve mor renkleri veren, suda çözünebilen en önemli bitki pigment sınıfıdır [16]. Renkleri büyük ölçüde pH'a bağlıdır [33]. Antosiyanidinlerin önemlileri; apigenidin, siyanidin, malvinidin ve delphinidin'dir [13]. Antosiyanidinler, gıdalarda serbest halde bulunmazlar ya glikoz, ksiloz, galaktoz, arabinoz ve fruktoz gibi şekerlerle esterleşmiş ya da şekerlere ilaveten 3. bir bileşen olarak p-kumarik asit, ferulik asit, kafeik asit, malonik asit, vanilik asit ya da asetik asit moleküllerinden biri veya birden fazlasıyla birleşmiş olarak bulunurlar [34]. Kırmızı lahanada sinapik, ferulik, malonik ve p-kumarik asit ile açillenmiş siyanidin-3-soforozit-5-glukozit ve siyanidin-3,5-diglukozit olarak bulunan başlıca aglikon siyanidindir [35].



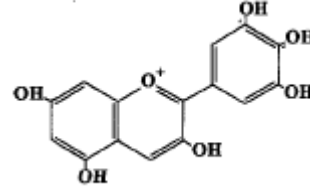
Siyanidin



Malvidin



Apigenidin



Delfinidin

Şekil 2.11: Siyanidin, malvidin, apigenidin ve delfinidin'in kimyasal yapıları

Flavonoidlerin yapılarına bağlı olarak antioksidan kapasitelerinin farklılaşmasında kapasite değerlerini belirleyen birkaç husus vardır:

- B halkasındaki o-dihidroksi yapısı (radikal formun yüksek kararlılığını sağlayan ve elektron delokalizasyonuna katılan)
- 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağ (C halkasında 4. karbon atomunda keto grubu oluşturan ve radikalın B halkasından elektron delokalizasyonunu arttıran)
- C ve A halkalarındaki 3. ve 5. pozisyondaki hidroksil grupları (maksimum radikal-süpürme potansiyeli için gerekli olan) [28]

Bu özelliklerden bir ya da daha fazlasına sahip yapıda olan flavonoidler oldukça yüksek antioksidan etki gösterirler [26].

Lipid peroksidasyonu inhibisyonunda flavonoidlerin yapı-aktivite ilişkisi incelendiğinde [31];

- a) C halkasındaki 3. karbon atomu üzerinde hidroksil grubunun varlığı;

Bu yapıya sahip fisetin, (+)-kateşin (Şekil 2.8), kuersetin, mirisetin (Şekil 2.7) ve morin; lipid peroksidasyonunu, C-3. karbon atomu üzerinde hidroksil grubu

taşımayan diosmetin, apigenin (Şekil 2.6), hesperetin ve naringenine (Şekil 2.9) göre daha kuvvetli inhibe eder.

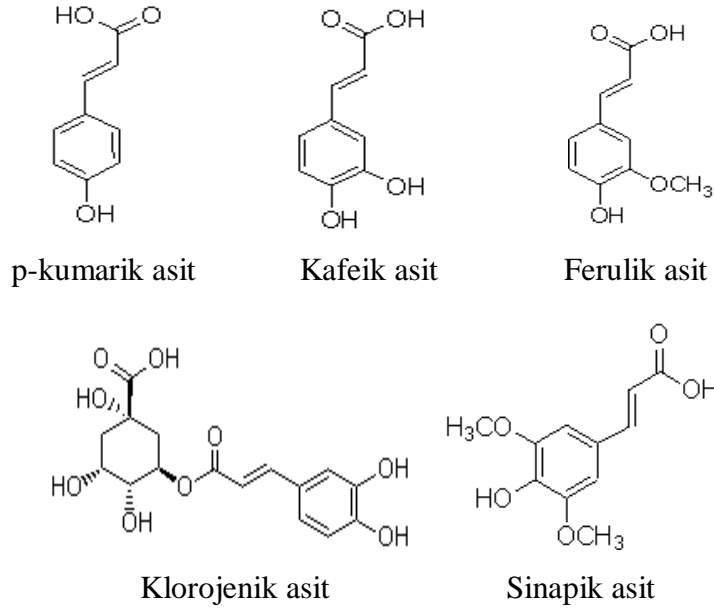
- b) C halkasındaki 2. ve 3. karbon atomları arasındaki çifte bağın varlığı;
Bu bağın hidrojenlenmesi antiperoksidatif etkiyi azaltır.
- c) Hidroksil gruplarının sayısı;
A ve B halkalarında polihidroksillenmiş yapıların önemi, kuersetin, mirisetin, mirisetrin, floretin, (+)-kateşin, morin ve fisetinin, apigenin, hesperetin, hesperidin, naringenin, naringin, krisin ve 3-hidroksiflavona göre karşılaştırılmasıyla belirlenmeye çalışılmıştır. İlk gruptakiler 4-6 arasında, ikinci gruptakiler 1-3 arasında hidroksil taşıyan flavonoidlerdir. Flavonoidlerin hidroksil radikali süpürme aktivitesi, B halkasındaki hidroksil grupları sayısı ile (özellikle C-3' konumunda) artar ve hidroksil grupları sayısının azalmasıyla hızlı bir şekilde azalır. Mirisetinin (Şekil 2.7) (Hidroksil konumları: 3,5,7,3',4',5') hidroksil radikali süpürme aktivitesi kamferolden (Hidroksil konumları: 3,5,7,4') daha kuvvetlidir.
- d) Hidroksil konumları;
A halkasındaki C-5 ve C-7, B halkasındaki C-3' ve C-4' ve C halkasındaki C-3 konumundaki hidroksil gruplarının varlığı lipid peroksidasyonun inhibisyonuna katkıda bulunur. Flavonoller, antiperoksidatif aktivite için C-2' konumunda bir hidroksil grubu ve pirogallol grubuna (C-3', C-4', C-5') gereksinim duyarlar.
- e) Şeker yapısının varlığı;
Genelde flavonoid glikozitleri, karşılığı olan aglikon türlerinden daha az antioksidan aktiftir. Malondialdehit üretiminin inhibisyonunda apigenin, naringenin, hesperetin, diosmetin, kuersetin, floretin ve mirisetin karşılık gelen glikozitlerine göre daha etkilidir. Şeker yapısı, sterik engellemeden ötürü çok yakın konumda bulunan hidroksil gruplarının antiperoksidasyon verimini azaltır.
- f) Metoksi gruplarının varlığı;
Sterik engellemeden dolayı flavonoidlerin antiperoksidatif verimini azaltır. Ancak aynı sayıda hidroksil grubu içeren flavonoidlerde -OH'e göre orto- ve para- konumundaki - OMe grupları, elektron desteğiyle aril oksijen radikallerini kararlılaştıracağından sonuçta antioksidan aktiviteyi artırırlar.
- g) Rutin ve kuersetin gibi (Şekil 2.7) C-4 konumunda karbonil grubu ve C-3 veya C-5 konumunda hidroksil grubu taşıyan flavonoidler, demir iyonlarıyla kelat

oluşturur. Flavanoidler demir iyonlarıyla kompleks oluşturduktan sonra da serbest radikal sypürme aktivitelerini yitirmezler.

2.2.4.2. Fenolik asitler

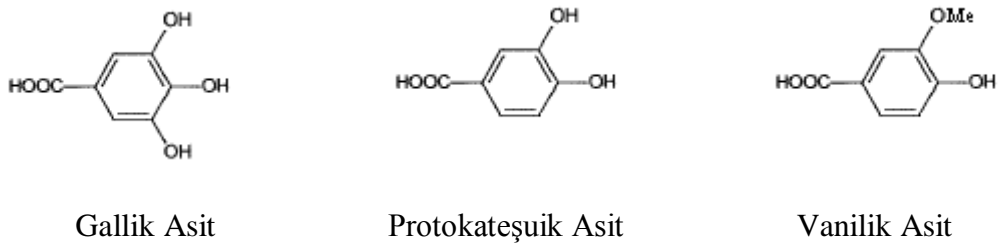
Fenolik asitler, hidroksibenzoik asit ve hidroksisinnamik asit olarak adlandırılan farklı iki sınıftan oluşmaktadır [16].

Hidroksisinnamik asitler, fenil-propanoid türevleridir ve genellikle bitkisel gıdalarda bulunur [36]. Hidroksisinnamik asitler, bitkilerin fenolik metabolizmalarında merkezi rol oynayan ve fenil alaninin biyosentetik türevi olan fenolik bileşenlerdir. Bu bileşikler aynı zamanda flavonoidlerin öncüsüdür ve bitkilerde hücre duvarının yapısına katılırlar [37]. Genellikle bu tür fenolik asitler bitkilerde esterleri halinde veya şekerlerle, organik asitlerle veya yağlarla birleşmiş halde bulunurlar [38]. Hidroksisinnamik asitler trans konumunda daha kararlıdırlar. Ancak UV ışınlarına maruz bırakıldıklarında trans izomerinden cis izomerine dönüşürler [39,40]. Bu bileşenler meyve, sebze, çiçek, fındık, tohum ve şarap, çay, kahve ve zeytinyağı gibi bitki-türevli ürünlerde bulunurlar [16,41]. Kafeik asit, p-kumarik asit ve kafeik asidin kuinik asit esteri olan klorojenik asit, elma, armut ve üzüm gibi meyvelerde ve bitkilerde en çok bulunan hidroksisinnamik asitlerdir [16]. Brassica sebzelerinde en fazla bulunan fenolik asit ise sinapik asittir [42].



Şekil 2.12: p-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit, klorojenik asit ve sinapik asit'in kimyasal yapıları

Hidroksibenzoik asitler. yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik, vanilik ve protokateşuik asit'dir. Monohidroksibenzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye ve hidroksil radikallerine yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasına metilen grubu girmesiyle oluşan fenilasetik asitlerde orto ve meta hidroksi türevleri 1 mM'a yakın antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının konumlarına bağlı olup, o-p konumlarında aktivite yüksek olurken m-p konumlarına sahip olanlarda aktivite düşer [26].

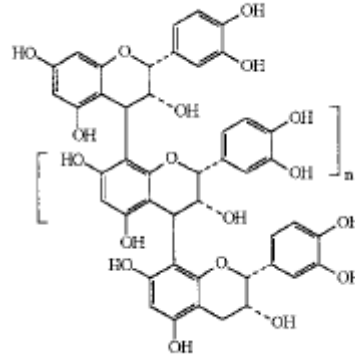


Şekil 2.13: Gallik, protokateşuik, vanilik asit'in kimyasal yapıları

2.2.4.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

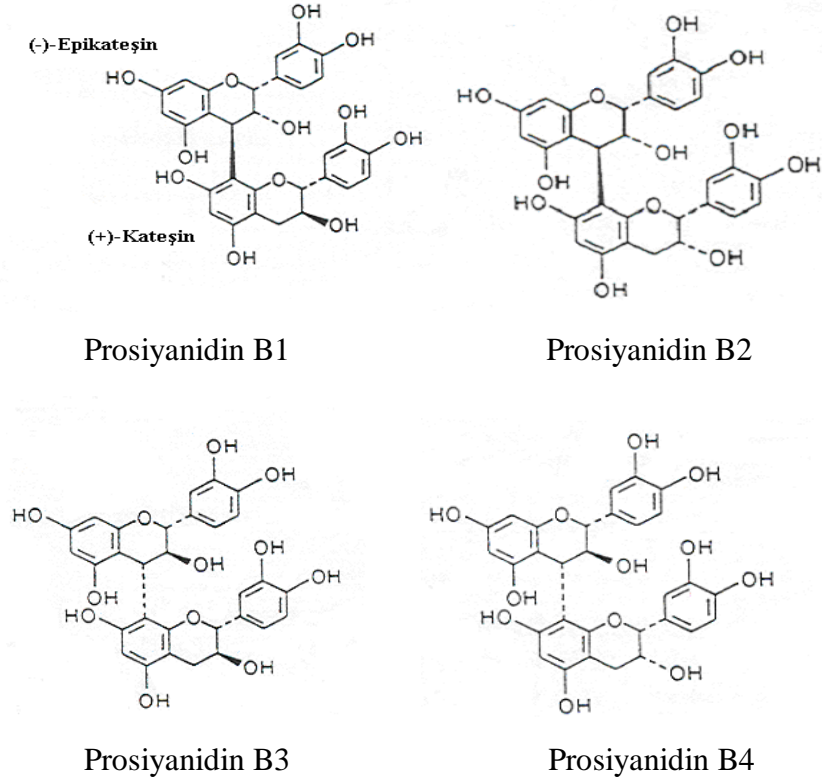
Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Kondanse tanenler bu gruba girerler. Besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşin polimerleri anlaşılmaktadır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir [16].

Prosiyanidinler; (kondanse tanenler) Proantosiyanidin biyosentezinde, nükleofilik zincir sonlandırma birimi olarak flavan-3-oller (kateşinler) ve elektrofilik zincir genişletici birimi olarak flavan-3,4-diol/flavan-4-oller (lökoantosiyanidinler) önemli rol oynamaktadırlar [43]. En çok bulunan prosiyanidin dimerleri Prosiyanidin B1, B2, B3 ve B4'tür. Bu dimerler asit ile ısıtıldığında 1 molekül kateşin ve 1 molekül antosiyanidin (siyanidin) serbest hale geçer [39].



Şekil 2.14: Prosiyanidinlerin genel kimyasal yapısı

$n=0$ epikateşin dimer (prosiyanidin B2); $n=1$ epikateşin trimer; $n=2$ epikateşin tetramer;
 $n=2$ epikateşin oligomer



Şekil 2.15: Prosiyanidin B1, B2, B3, B4'ün kimyasal yapıları

2.3. TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTE TAYİN YÖNTEMLERİ

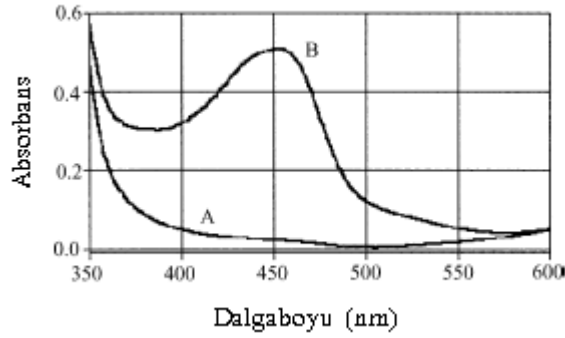
Antioksidan aktivite ve antioksidan kapasite sıklıkla birbirinin yerine kullanılan kavramlardır. Ancak farklı anlamlara sahiptirler. Antioksidan aktivite, spesifik bir antioksidan ile spesifik bir oksidan arasındaki reaksiyona ait hız sabitini işaret eder ve bir antioksidanın aktivitesi; radikal süpürme yeteneği, hidrojen veya elektron donör aracı olarak göstermiş olduğu reaktivite, metal kelatlama potansiyeli ve diğer antioksidanlarla olan etkileşim gibi faktörlere bağlıdır [12,44].

Antioksidan kapasite ise, antioksidan içeren bir örneğin serbest radikal süpürme yeteneğinin mol cinsinden tayin edilmesidir. Her bir bileşenin antioksidan kapasitesi ölçülmez [44].

2.3.1. Elektron Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Yöntemleri

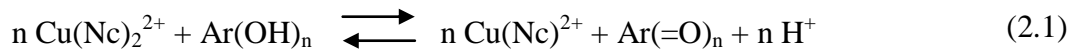
2.3.1.1. CUPRAC (Cupric Reducing Antioxidant Capacity; Cu(II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite) Yöntemi

Apak ve arkadaşlarının [45] geliştirdiği bu yöntemde, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neocuproin-Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu bakır(II)-neocuproin kompleksinin (Cu(II)-Nc), 450 nm' de maksimum absorbans veren bakır(I)-neocuproin [Cu(I)-Nc] kelatına (Şekil 2.16) indirgenme yeteneğinden yararlanarak antioksidan kapasitesi hesaplanmaktadır. Bu özellikten yola çıkarak geliştirilen antioksidan kapasite yöntemine 'bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite yöntemi' denilmiştir ve kısaca CUPRAC metodu olarak adlandırılmıştır.



Şekil 2.16: (A) Cu(II)-Nc, (B) Cu(I)-Nc komplekslerinin spektrumları

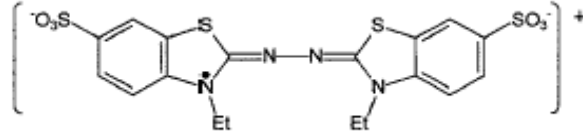
Yöntem; sulu Cu(II) klorür çözeltisi, alkolde hazırlanmış neocuproin çözeltisi ve sulu amonyum asetat (pH 7 tamponu) çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine tayin edilecek herhangi bir antioksidan çözeltisinin ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda, içerisinde antioksidan bulunmayan referansa karşı 450 nm'de absorbanslarının ölçülmesinden ibarettir. Askorbik asit, gallik asit ve kuersetin için renk oluşumu hızlı olurken (CUPRAC_N) naringin, naringenin gibi yavaş reaksiyona giren antioksidanlar için 50 °C'de 20 dakika inkübasyon işlemi (CUPRAC_I) uygulanmaktadır. Flavonoid glikozidlerine % 50 metanol içeren son çözeltide 1.2 M HCl ile hidroliz işlemi uygulanarak, maksimum indirgeme güçlerini daha fazla gösterdikleri aglikon haline dönüşmeleri sağlanarak yöntem uygulanmıştır.



Yöntem, hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara uygulanabilir.

2.3.1.2. TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; Troloks Eşdeğeri Antioksidan Kapasite)/ABTS Yöntemi

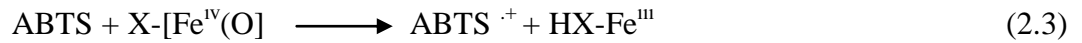
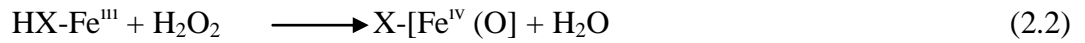
Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite olarak ifade edilen TEAC/ABTS yöntemi, ilk olarak Miller ve arkadaşları [46,47] tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem; 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal kationunun absorbansının, antioksidanlar tarafından inhibisyonunu temel alır. Antioksidanlar varlığında ABTS^{·+} radikal kationunun (Şekil 2.17) absorbansında belirli bir süre içindeki azalmadan yararlanarak toplam antioksidan kapasite troloks cinsinden bulunur. Bu nedenle bu yönteme “troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi” (ABTS/TEAC) adı da verilir.



Şekil 2.17: ABTS^{·+} radikal kationunun yapısı

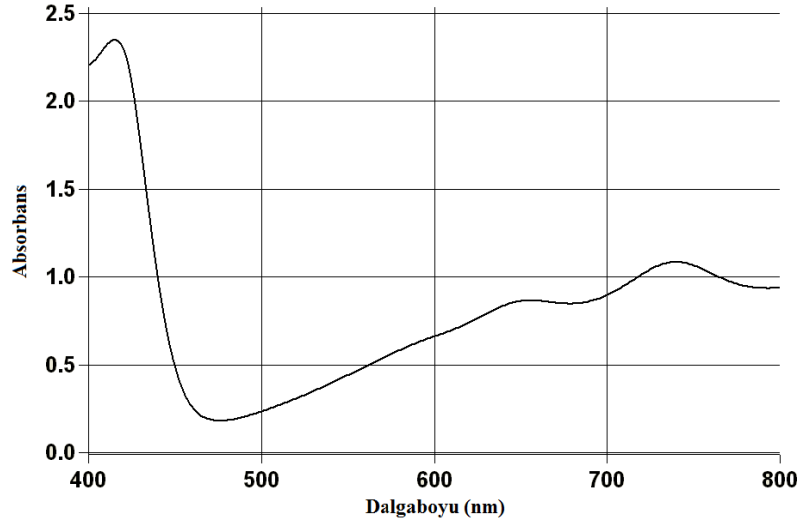
660, 734 ve 820 nm’de maksimum veren ABTS^{·+} radikal kationu, metmiyoglobinin H₂O₂ ile aktivasyonu ile üretilen ferrilmiyoglobin radikal türlerinin ABTS ile etkileşiminden meydana gelmektedir.

ABTS^{·+} kation radikalini oluşturmak için, ABTS; miyoglobin ve H₂O₂ ile inkübe edilir [48].



(HX-Fe^{III} = miyoglobin; X-[Fe^{IV}(O)] = ferrilmiyoglobin)

Orijinal TEAC denemesinin bağlı standart sapma değerleri, gün içi denemeler için %0.54-1.59, günler arası denemeler için % 3.6–6.1 olarak bulunmuştur [47].



Şekil 2.18: Radikal katyonunun absorpsiyon spektrumu

Re ve arkadaşları [49] tarafından modifiye edilmiş ve geliştirilmiş TEAC yönteminde potasyum persülfatla ABTS'in oksidasyonu sonucu üretilen $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonları kullanılır. Üretilen bu ABTS radikalleri oda sıcaklığında karanlıkta beklediği zaman 2 gün kararlıdır. Geliştirilen bu yöntem, hem lipofilik hem de hidrofilik sistemlerde kullanılabilir.

Cano ve arkadaşları [50] tarafından hidrofilik antioksidan aktivitesini ölçmek için $ABTS/H_2O_2/HRP$ (horseradish peroxidase) enzimatik sistemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde ABTS radikal katyonu ($ABTS^{\cdot+}$) enzimatik olarak oluşturulur ve antioksidan veya örnek çözelti bu reaksiyon ortamına ilave edilir. Sonuçlar $ABTS^{\cdot+}$ radikal katyonunun yok olması yani absorbansının düşüşü ile elde edilir. Bu patentli metod kolay, hızlı ve kesindir. Bu yöntemin pek çok avantajları vardır. Çünkü istenmeyen pek çok reaksiyonu önler, yüksek sıcaklık gerektirmez ve geniş pH aralığında çalışabilir. Bu yöntem ayrıca, örneklerin kendi içsel peroksidaz aktivitesinden kaynaklanan girişimi önler. Aynı örnek içindeki hem lipofilik hem hidrofilik antioksidan aktivite, çözelti hazırlama ortamını değiştirerek bu metodla ölçülebilir [51,52].

2.3.1.3. FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power; Demir(III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü) Yöntemi

Benzie ve Strain [53] tarafından geliştirilen bu yöntemde demir(III)'in indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanların toplam miktar tayini yapılmaktadır. Düşük pH'larda oluşan Fe(III)'ün, kısa adı TPTZ olan tripiridiltriiazin ile reaksiyonu sonucu oluşan $[Fe(III)-TPTZ]$ kompleksi antioksidanların etkisiyle Fe(II)-tripiridiltriiazin $[Fe(II)-$

TPTZ] kompleksine indirgenmektedir. Meydana gelen Fe(II)-TPTZ kompleksinin rengi koyu mavidir ve 593 nm'de maksimum absorbanı vermektir.

2.3.1.4. Folin Ciocalteu Yöntemi

Bu yöntem, Singleton ve arkadaşları [54,55] tarafından toplam fenolik içeriği ölçmek için geliştirilmiştir. Yöntemin temeli, fenolik bileşiklerin Folin Ciocalteu ayıracı (FCR) ile sadece bazik ortamda reaksiyon vermesine dayanmaktadır. Toplam fenolik bileşenlerin tayin yöntemi olarak bilinen Folin-Ciocalteu ayıracı (fosfomolibdik fosfotungstik asit) kullanılan bu yöntem, gerçekte örneğin indirgenme kapasitesini tayin etmektedir. FC reaktifi sadece fenolik bileşenlere özgü olmayıp, pek çok fenolik yapıda olmayan bileşenleri de indirgeme yeteneğine sahiptir.

Bu yöntemde, ard arda geri dönüşümlü bir veya iki elektronlu indirgeme reaksiyonları, $P(MoW_{11}O_{40})^{4-}$ olması muhtemel mavi türlerin oluşumunu sağlar.

2.3.1.5. DPPH Yöntemi

Sanchez ve arkadaşları [56] tarafından geliştirilen bu yöntem antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Kırmızı renkli DPPH radikali 515 nm'de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla radikalın rengi kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların radikal süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli bir yöntem olarak bilinmektedir.

2.3.2. Hidrojen Atomu Aktarımına Dayalı Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri

2.3.2.1. TRAP (Total Radical-Trapping Antioksidant Parameter; Toplam Radikal Tutucu Antioksidan Parametre) Yöntemi

Wayner ve arkadaşları [57] tarafından geliştirilen bu yöntem, plazma veya serumdaki toplam antioksidan kapasiteyi ölçmek için kullanılan başlıca yöntemlerden biridir. Bu yöntemde plazma ve diğer biyolojik sıvılarda bulunan peroksitlenebilen maddelerden ve 2,2'-diazobis (2-amido propan) dihidroklorürden (AAPH) meydana gelen peroksil radikalleri kullanılır.

Plazmaya AAPH ilave edilir ve yükseltgenebilen maddelerin oksidasyonu reaksiyon sırasında tüketilen oksijenin ölçülmesiyle belirlenir. Plazma içerisinde bulunan antioksidanlar yükseltgenme tepkimesinin yavaş gerçekleşmesine sebep olur. Reaksiyonun gecikme zamanı ölçülerek plazmadaki toplam antioksidan kapasite, iç standart olarak kullanılan troloks eşdeğeri cinsinden hesaplanmaktadır.

2.3.2.2. Luminol Yöntemi

Metsä-Ketelä ve arkadaşları tarafından 1991'de geliştirilen kemiluminesans esaslı TRAP yöntemi daha sonra Alho ve Leinonen [58] tarafından detaylı şekilde ifade edilmiştir. AAPH'dan üretilen peroksil radikallerinin luminolü yükseltgemesi sonucu ışık yayan luminol radikalleri kullanılmıştır.

Whitehead ve arkadaşlarının [59] 1992 yılında biyolojik sıvılarda antioksidan kapasitenin ölçümü için geliştirdikleri kemiluminesans yönteminde luminol, AAPH yerine, H_2O_2 veya perborat ile yükseltgenerek luminol radikallerini oluşturur. Reaksiyonu daha hızlı gerçekleştirebilmek için katalizör olarak horseradish peroksidaz (HRP) kullanılmış ve böylece ışık yayılması daha çabuk olmuştur.

2.3.2.3. Diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) Yöntemi

TRAP yöntemini temel alan başka bir yöntem ise Valkonen ve Kuusi' nin [60] geliştirdiği diklorofloresin-diasetat (DCFH-DA) yöntemidir. Bu yöntemde AAPH, peroksil radikalini oluşturmak için, DCFH-DA ise yükseltgenebilen substrat olarak kullanılmıştır. Peroksil radikali ile DCFH-DA arasındaki yükseltgenme tepkimesi sonucu oluşan diklorofloresin (DCF) yüksek floresans özelliğine sahip olmaktadır. DCF 480 nm'de uyarılıp 526 nm'de emisyon yapmaktadır. 504 nm'de maksimum absorpsiyon göstermektedir. Bu bakımdan hem floresans yöntemi hem de spektrofotometrik yöntem kullanılarak DCF miktarı ve buna bağlı olarak toplam antioksidan kapasite hesaplanmaktadır.

2.3.2.4. Fikoeritrin (PE) Esaslı Yöntemler

Ghiselli ve arkadaşları [61] tarafından 1994 yılında yayınlanan bu yöntem, peroksil radikallerinin kullanıldığı ve 1990 yılında yayınlanan Glazer çalışmasının [62] temelinde bir benzeridir. Glazer, peroksil radikallerini oluşturmak için AAPH, hidroksil radikallerini oluşturmak için Cu(II)-askorbat, yükseltgenebilir substrat olarak B- veya R-PE kullanmıştır.

B- veya R-PE substratının peroksil veya hidroksil radikalleri varlığında gösterdiği floresansın zamanla lineer olarak azaldığı belirtilmiştir. B- veya R-PE'nin peroksil veya hidroksil radikallerine karşı sağladığı gecikme zamanının uzunluğu troloksun sağladığı gecikme zamanına oranlanarak örneğin antioksidan kapasitesi troloks eşdeğeri cinsinden belirlenir. Ama, PE floresans sönümünün kinetikleri, peroksil veya hidroksil radikalleri varlığında doğrusal değildir.

Yeni bir yöntem olarak yayınlanan Ghiselli' nin yönteminde Glazer' in geliştirmiş olduğu yönteme atıf yapılmamıştır. Ayrıca yapılan çalışmada R-PE fluoresansının yaklaşık % 80' in söndürülmesine kadar R-PE fluoresansının zamanla doğrusal olarak azaldığı belirtilmiştir. Ancak bu çalışma farklı kişiler tarafından tekrarlandığında aynı sonuçlar alınamamıştır [63,64].

2.3.2.5. Krosin Yöntemi

Tubaro ve arkadaşlarının [64] geliştirdiği bu yöntemde kinetik parametreler karşılaştırılarak plazma içindeki antioksidan kapasite ölçülmektedir. Bu yöntem; AAPH tarafından oluşturulan peroksil radikallerinin krosini yükseltmesi (rengini gidermesi) esasına dayanmaktadır. Krosinin peroksil radikalleri ile yükseltme reaksiyonunda antioksidanların olmadığı durumdaki hızı V_0 ve antioksidanların olduğu durumdaki hızı ise V , 10 dakika içinde ölçülmektedir. Bu ölçülen hızların oranı $(V_0/V) \times$ eksenini, antioksidan derişiminin $[A]$ krosin derişimine $[C]$ oranı y eksenini oluşturacak şekilde bir grafik oluşturulmaktadır. Oluşan bu doğrunun eğimi k_a / k_c oranını yani peroksil radikalleri ile etkileşen bileşiğin göreceli kapasitesini belirtir. k_a ; antioksidanlar ile peroksil radikalleri arasındaki tepkime hız sabiti, k_c ; krosin ile peroksil radikalleri arasındaki reaksiyon hız sabitidir. Bulunan k_a/k_c oranı, daha önceden troloks ile hesaplanan k_a/k_c oranına bölünerek sonuçlar troloks cinsinden hesaplanmaktadır.

2.3.2.6. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity; Oksijen Radikali Absorplama Kapasitesi) Yöntemi

ORAC yöntemi [11,63]; büyük oranda Glazer [62] tarafından yayınlanan çalışmayı temel alır. Bu yöntemde, yükseltgenebilen protein substratı olarak PE ve peroksil radikalini oluşturmak için AAPH veya hidroksil radikalini oluşturmak için $Cu(II) - H_2O_2$ kullanılır. Serbest radikal etkisini inceleyen ve miktar tayininde eğri altında kalan alan (area under curve, AUC) tekniğini kullanan bu yöntem, antioksidanların serbest

radikalleri hem inhibe etme yüzdesini ve hem de yok etme süresini tek bir değer olarak ifade edebilen bir yöntemdir [65].

2.3.2.7. TOSC (Total Oxyradical Scavenging Capacity; Toplam Oksiradikal Süpürme Kapasitesi) Yöntemi

Winston ve arkadaşları [66] tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem; AAPH bileşiğinden meydana gelen peroksil radikalleri tarafından α -keto- γ metiolbutirik asitin (KMBA) etilene yükseltgenmesine dayanır. Kısmen antioksidanlar tarafından engellenen etilen oksidasyonu gaz kromatografisi ile ölçülmektedir. Toplam kapasiteyi ölçmek için kullanılan denklem aşağıda verilmiştir:

$$\text{TOSC} = 100 - (\int \text{SA} / \int \text{CA} \times 100) \quad (2.4)$$

SA: Örnek tepkime eğrisi; CA: Kontrol tepkime eğrisi

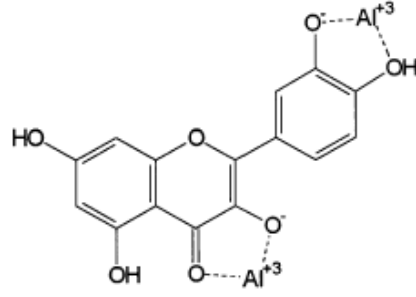
2.4. TOPLAM FENOL İÇERİĞİ TAYİN YÖNTEMİ

Toplam fenol içeriğini tayin etmek için, toplam antioksidan kapasite tayin yöntemlerinde de bahsedilen Folin Ciocalteu yöntemi kullanılmaktadır.

2.5. TOPLAM FLAVONOİD İÇERİĞİ TAYİN YÖNTEMLERİ

2.5.1. Alüminyum Klorür/Potasyum Asetat Spektrofotometrik Yöntemi

AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yönteminde alüminyum klorür, flavon ve flavonol grubu bileşiklerin C-4 keto grubu ve C-3 veya C-5 hidroksil gruplarından biriyle kararlı bir kelat oluşturmaktadır (Al-Flavon veya Al-Flavonol kompleksi). Bununla birlikte alüminyum, flavonoid grubu bileşiklerin A ve B halkalarındaki orto-dihidroksi gruplarıyla da kararsız kompleksler oluşturmaktadır. Şekil 2.19'da Al(III)'ün kuersetin ile oluşturduğu kompleksin kimyasal yapısı verilmiştir. Toplam flavonoid tayininde kullanılan bu spektrofotometrik yöntem; etanol, alüminyum(III) klorür çözeltisi ve potasyum asetat çözeltilerinin karıştırılmasından sonra, üzerine flavonoid çözeltisinin (flavon, flavonol veya isoflavon bileşikleri) ilave edilmesi ve bunu takip eden 30 dakika sonunda referansa karşı 415 nm'de absorban değerlerinin ölçülmesinden ibarettir [67].



Şekil 2.19: Al(III)'un kuersetin ile oluşturduğu komplekslerin kimyasal yapısı

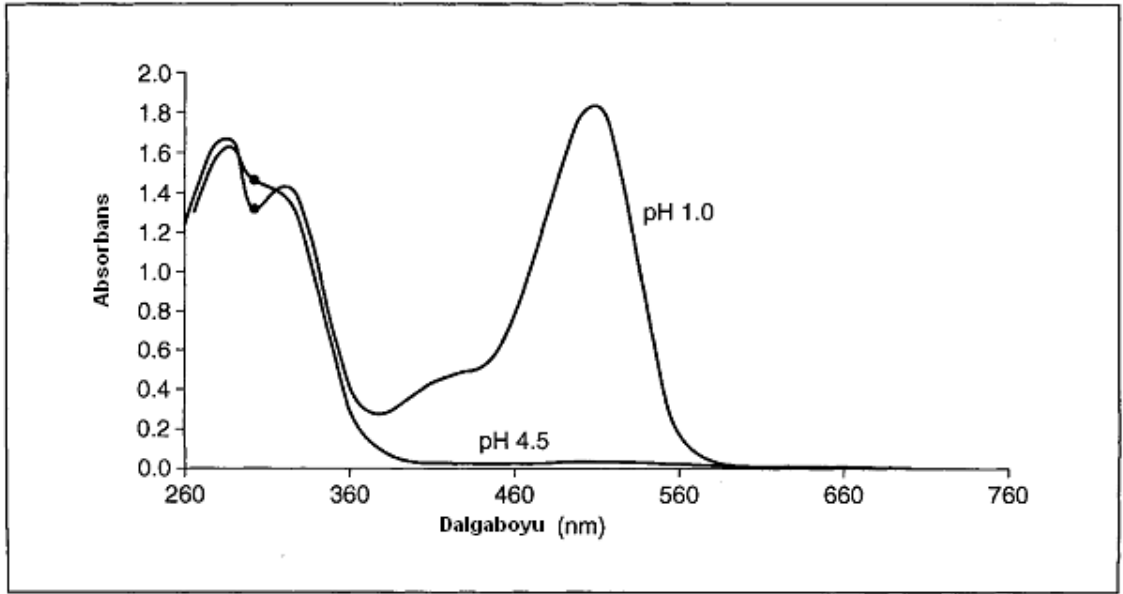
2.5.2. Alüminyum Klorür/Sodyum Nitrit Yöntemi

Jia Zhishen ve diğerleri [68] tarafından rapor edilen $AlCl_3/NaNO_2$ yönteminde toplam flavonoid içeriği, alüminyum klorür ve sodyum nitrit ayıraçları kullanılarak, alkali ortamda pembe renkli flavonoid-alüminyum kompleksinin meydana gelmesiyle belirlenmiştir.

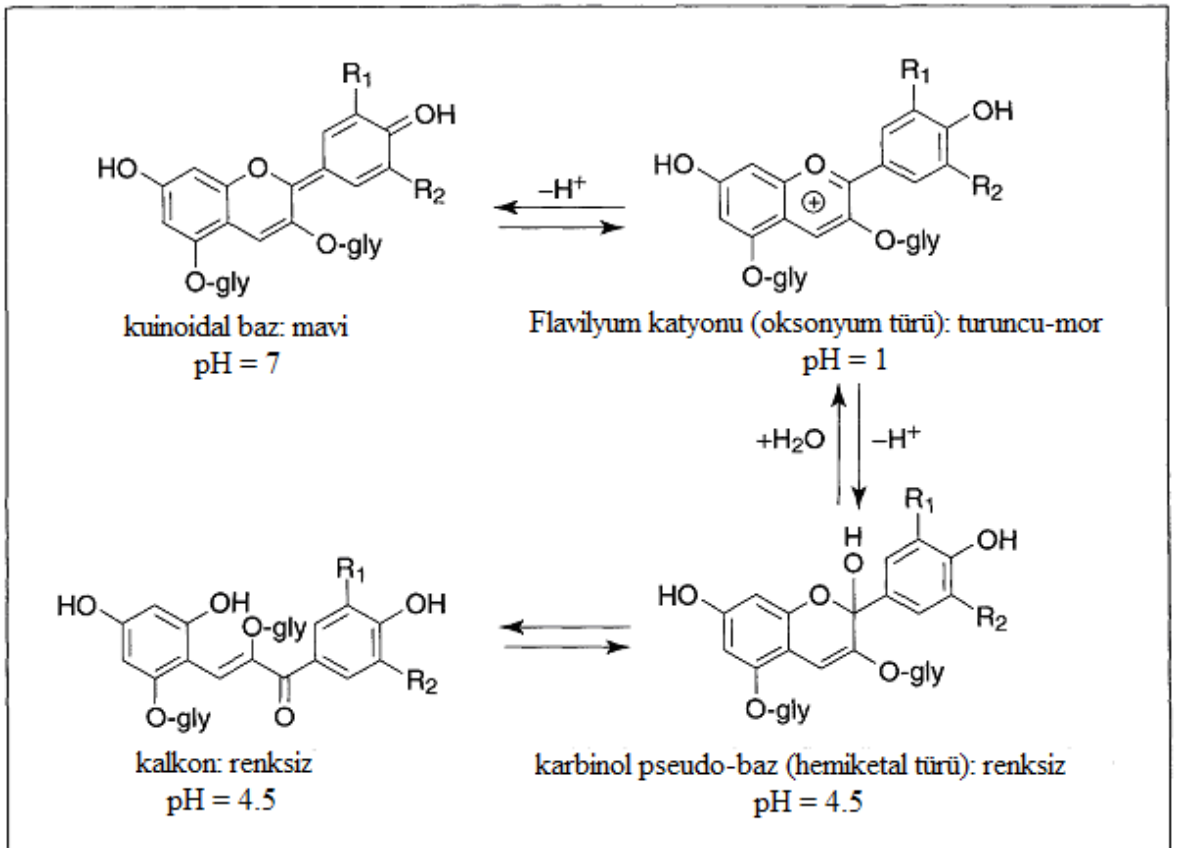
2.6. TOPLAM ANTOSİYANİN İÇERİĞİ TAYİN YÖNTEMİ

2.6.1. Farklı pH Yöntemi

Antosiyanin pigmentleri, pH'daki değişim ile farklı absorbans spektrumlarına sahip tersinir yapısal dönüşümlere uğrarlar. pH 1.0'de renkli oksonyum türü ve pH 4.5'da renksiz hemiketal türü hakimdir. Farklı pH yöntemi bu duruma dayanır ve polimerleşmiş indirgenmiş pigmentlerin ve diğer bozucu bileşiklerin varlığında bile toplam antosiyaninlerin kesin ve hızlı ölçümüne olanak sağlar [69].



Şekil 2.20: pH 1.0 ve pH 4.5 tamponlarında saflaştırılmış turp antosiyaninlerinin (açılmış pelargonidin-3-soforozit-5-glukozit türevleri) spektral karakteristikleri



Şekil 2.21: Farklı pH değerlerinde antosiyaninlerin baskın yapısal türleri

Wrolstad ve arkadaşlarının [70] geliştirdiği bu yöntemde örnekler sulu pH 1.0 ve 4.5 tamponları ile seyreltilir ve absorbans pH 1.0 çözeltisinin maksimum absorbansının dalga boyunda ölçülür.

İki farklı tamponlu çözeltilerin absorbansları arasındaki farklılık monomerik antosiyanin pigmentlerinden kaynaklanmaktadır. Polimerleşmiş antosiyanin pigmentleri ve enzimatik olmayan kahverengileşme pigmentleri pH ile tersinir davranış göstermezler ve bu nedenle absorbans hesaplamasına dahil edilmezler. Örnek matrislerindeki başlıca antosiyaninin (çoğunlukla siyanidin-3-glukozit) molekül ağırlığını ve molar absorplama katsayısını kullanarak toplam antosiyanin içeriği hesaplanır.

2.7. LAHANA BİTKİLERİ

Lahana bitkisi, *Turpgiller (Cruciferae)* familyasının *Brassica oleracea* türüne aittir. Lahana gurubu sebzeler şöyle sınıflandırılmaktadır:

- *Brassica oleracea* var. *Acephala*: Yaprak lahana (Karalahana)
- *Brassica oleracea* var. *Alba*: Beyaz baş lahana
- *Brassica oleracea* var. *Rubra*: Kırmızı baş lahana
- *Brassica oleracea* var. *Gemmifera*: Brüksel lahanası

Ülkemizde her bölgede farklı tipte lahana yetiştiriciliği yapılmaktadır. Örneğin Karadeniz bölgesinde yaprak lahana, Doğu Anadolu'da beyaz baş lahana, batı ve güney bölgelerimizde kırmızı baş lahana yetiştiriciliği yapılmaktadır. Yabanilerine Kuzey Denizi, Batı İrlanda, Fransa, İspanya ve İtalya kıyılarında, Doğu Asya'da rastlanmaktadır.

Lahana grubu sebzeler serin iklim bölgelerinde tüm yıl boyunca, sıcak bölgelerde ise kış aylarında yetiştirilmektedir. İklim koşulları lahana yetiştiriciliğini sınırlandıran faktörlerin başında gelmektedir. Sıcak dönemlerde yetiştirilen lahanalarda başın sıklığı azalır ve bitki çiçeklenme eğilimi gösterir [71].

Beyaz lahana, geniş ve kalınca, açık yeşil/beyaz renkli kat kat yaprakları olan bir lahana çeşididir. Serin iklim sebzesi olan beyaz baş lahana sonbahar (başlangıcı) ile ilkbahar (sonu) arasındaki serin dönemde yetiştirilir. Genel olarak hasatlar Ekim ayında başlayıp erken ilkbahara kadar yapılabilir [72].

Kırmızı lahana güz sebzesi olarak yetiştirilen ve yaprakları koyu kırmızı/bordo olan bir lahana çeşididir.

Yaprak lahana veya halk arasında karalahana olarak bilinen lahana, yaprakları tüketilen ve baş bağlamayan bir sebze türüdür. Koyu yeşil yapraklı bir sebze olan karalahana, kış mevsimini sevmesinden dolayı kalitesi ve tadı sıcak aylara göre soğuk aylarda daha iyidir. En verimli karalahana sonbaharda ekilir ve kış başlangıcındaki hafif soğuk havalarda hasat edilir [73].

Brüksel lahanasının tek gövde boyunca (60-90 cm) yaprak koltuklarından gelişen, çok sayıda küçük minyatür lahanaları yenilen kısmını oluşturur. Brüksel lahanası yetiştiriciliği Avrupa'dan (Belçika, İngiltere, Fransa) Kuzey Amerika'ya (Kaliforniya) kadar yayılmıştır. Ülkemizde yoğun olarak Ege ve Marmara bölgelerinde yetiştiriciliği yapılmaktadır. Brüksel lahanası serin iklim sebzesi olup, don tehlikesi olmayan kış ayları yetiştiricilik için en uygun dönemdir [74].

2.7.1. Lahana Bitkilerinin İçerikleri ve Sağlık Üzerindeki Etkileri

Brassica sebzeleri özellikle antikanserojen aktiviteye sahip organosülfür fitokimyasallarını ve antioksidan aktiviteye sahip oldukları bilinen diğer fitokimyasalları olmak üzere birçok biyoaktif bileşiği içermektedir. Brassica sebzeleri arasında Çin lahanası, brokoli ve kırmızı lahana fenolik bileşikler açısından zengin, karalahana, Brüksel lahanası ve brokoli en zengin antioksidan vitamin ve karotenoid kaynağıdır [75].

Birçok araştırma lahanadaki yararlı fitokimyasallara özellikle de indol-3-karbinol (I3C), sulforafan ve indollere yoğunlaşmıştır. Bu bileşikler, insan vücudundaki kanser oluşturan maddeleri parçalayan ve yok eden antioksidan ve detoksifikasyon mekanizmalarını etkinleştirmeye ve kararlılaştırmaya yardım ederler. Epidemiyolojik

verilerle birlikte in vitro çalışmalar, antioksidan fitokimyasallara sahip sebzelerin en önemli dejeneratif rahatsızlıklar olan kanser ve kardiyovasküler hastalıklara karşı çok güçlü etkilere sahip olduklarını öne sürmektedir. Turpgiller ailesindeki sebzelerin koruyucu etkileri, antioksidan fitokimyasalların özellikle de askorbik asit, α -tokoferol ve β -karoteni içeren antioksidan vitaminlerin varlığına bağlanmaktadır.

Lahana tıbbi olarak baş ağrısı, gut hastalığı, diyare ve mide ülserini tedavi etmesi açısından da değerlidir [9].

Brassica sebzelerinde bulunan fenolik bileşiklerden en karakteristik gruplar flavonoidler ve fenolik asitlerdir. Mirisetin, kuersetin, kamferol, luteolin, delphinidin, siyanidin ve pelargonidini içeren birçok flavonoid lahanada belirlenmiştir. Benzoik, hidroksibenzoik, vanilik ve kafeik gibi fenolik asitler antimikrobiyel ve antifungal özelliklere sahiptirler. Kafeik, klorojenik, sinapik, ferulik ve p-kumarik asit gibi hidroksisinnamik asit türevleri lipid oksidasyonunun inhibisyonu ve reaktif oksijen türlerini süpürmesi nedeniyle güçlü antioksidan aktiviteye sahiptirler [76].

2.7.2. Lahana Türlerinde Toplam Antioksidan Kapasite Tayini ve Fenolik Bileşenlerin Belirlenmesi ve Miktarlandırılması Uygulamaları

Podsdek ve arkadaşlarının [75] yaptığı çalışmada; kırmızı ve beyaz lahana, Savoy lahanası ve Brüksel lahanasında bulunan hem suda hem de yağda çözünen antioksidanların içerikleri ve antioksidan kapasiteleri değerlendirilmiştir. C vitamini, karotenoid, α -tokoferol ve fenolik bileşikler için örnekler ayrı ayrı ekstraksiyon işlemlerine tabi tutularak HPLC ile analizlenmiştir. Çalışmada suda çözünen fenolik ekstraktının antioksidan aktivitesi dört farklı deneme ile değerlendirilmiştir: linoleik asit emülsiyonunda lipid peroksidasyonu, $O_2^{\cdot-}$ radikali ile enzimatik yöntem ve kararlı DPPH $^{\cdot}$ ve ABTS $^{\cdot+}$ radikalleri ile kimyasal yöntemler. Sonuçlar göstermektedir ki, suda çözünebilen fenolik ekstraktı için TEAC ve VCEAC (vitamin C eşdeğeri antioksidan kapasite) değerleri arasındaki ilişki iyidir. Bu değerlere bağlı olarak sıralama, kırmızı lahana > Brüksel lahanası > Savoy lahanası > beyaz lahana şeklindedir. Bütün örnekler için TEAC değerleri VCEAC değerlerinden daha yüksektir. Brassica sebzelerinde çalışılmış tüm fenolikler süperoksit anyon radikalini süpürebilmektedirler. Kullanılan $O_2^{\cdot-}$ radikali enzimatik yöntemine göre, bu sebzelerin süpürme etkisi sıralamadaki gibi

azalmaktadır: Brüksel lahanası > kırmızı lahana > Savoy lahanası > beyaz lahana. Fenolik bileşikler aynı zamanda lipid peroksidasyonu inhibisyonu ile oksidatif stres seviyesini düşürebilmektedirler. Linoleik asit emülsiyonundaki suda çözünebilir fenolik ekstraktlarının antioksidan aktivitesi tiyobarbitürik asit temelli yöntem ile denenmiştir. Kırmızı ve Brüksel lahanası fenolik ekstraktlarını içeren linoleik asit emülsiyonu için T_{inh} değerleri benzerdir. En yüksek farklılık beyaz lahananın farklı çeşitlerinde gözlemlenmiştir. Toplam fenolik ve C vitamini içerikleri sırasıyla 21-171 mg / 100 g ve 18-129 mg / 100 g olarak bulunmuştur. Toplam karotenoid içeriği 0.009-1.16 mg / 100 g bulunurken, α -tokoferol 0.008 - 0.82 mg / 100 g aralığındadır. Sonuçlar bütün B. Oleracea sebzelerindeki temel antioksidan bileşenlerinin suda çözünen antioksidanlar (fenolikler ve askorbik asit) olduğunu göstermiştir ve troloks eşdeğeri cinsinden antioksidan kapasite değerine katkıları yaklaşık %99'dur. Beyaz lahana en düşük antioksidan içeriğe sahipken, kırmızı ve Brüksel lahanası en zengin antioksidan kaynakları olarak bulunmuştur. Yağda çözünen antioksidan (karotenoidler ve α -tokoferol) miktarı en fazla Brüksel lahanasındadır. Yüksek α -tokoferol içeriği ise Savoy lahanası Langedijker'de görülmüştür. Fenolik bileşikler arasında antosiyaninler kırmızı lahanadaki temel bileşenlerdir, fakat diğer sebzelerde ise hidroksisinnamik asitler hakimdir.

Chun ve arkadaşlarının [77] yaptığı çalışmada, lahanaların antioksidan aktivitelerine polifenoliklerin katkısını araştırmak için, ham ve işlenmiş lahanalarda toplam fenolik, toplam flavonoid, toplam antioksidan kapasite ve her fenolik bileşiğin miktarları belirlenmiştir. Askorbik asit analizi için örnekler %5 HPO_3 ile ekstrakte edilmiştir. Fenoliklerin ekstraksiyonu ise %80 metanol ile yapılmıştır. Lahanaların toplam fenolik miktarlarını Folin-Ciocalteu belirteci ile 100 g taze örnekteki mg gallik asit eşdeğeri olarak belirlemişlerdir. Toplam flavonoid miktarları ise, uygun olarak seyreltilmiş ekstraktlara %5 sodyum nitrit eklenmesinden 5 dk sonra %10 $AlCl_3$, 6 dakika sonra da 1 M NaOH çözeltileri ilave edilip karıştırıldıktan sonra karışımın absorbansının 510 nm'de su körüne karşı okunmasıyla 100 g taze örnek başına kateşin eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Toplam antioksidan kapasite ise fostat tamponlu tuz çözeltisindeki ABTS çözeltisine AAPH ilavesi ile oluşturulan ABTS radikalinden yararlanarak C vitamini eşdeğeri olarak ölçülmüştür. Lahana ekstraktlarının HPLC analizi için dizi-diyod dedektör ve üç mobil faz kullanılmıştır: solvent A monobazik 50 mM amonyum

fosfat ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$), o-fosforik asit ile pH 2.6'ya ayarlanmış; solvent B, 80:20 (v/v) asetonitril/solvent A; ve solvent C, amonyum hidroksit ile pH 1.5'ye ayarlanmış 0.2 M o-fosforik asit (H_3PO_4). Akış hızı 1.0 mL/dk'dır. Bilinmeyen flavonların, flavonollerin ve antosiyaninlerin aglikonlarını belirlemek için asit hidrolizi yapılmıştır. Taze ve turşu haline getirilmiş kırmızı lahanalar en yüksek toplam fenolik içeriğini göstermektedir (sırasıyla, 393.1 ± 10.8 mg ve 366.3 ± 3.6 mg gallik asit eşdeğeri/100 g taze örnek). Taze ve turşu haline getirilmiş kırmızı lahanalar aynı zamanda en yüksek flavonoid içeriğine sahiptir (sırasıyla, 108.1 ± 9.3 mg ve 72.4 ± 4.4 mg kateşin eşdeğeri/100 g taze örnek). Ham ve işlenmiş lahanaların antioksidan kapasiteleri polifenolik içerikleri ile büyük ölçüde ilişkilidir. Siyanidin hakim olduğu (73.6 - 117.7 mg/kg) ham ve turşu haline getirilmiş kırmızı lahana dışında kamferol, kuersetin ve apigenin lahanada var olan önemli flavonoidlerdir. Kırmızı lahanada antioksidan kapasitenin yanısıra toplam fenolik ve flavonoid içeriğine de en fazla katkıda bulunan siyanidindir.

Heimler ve arkadaşlarının [78] yaptığı çalışmada, İtalyan lahanası, brokoli, Savoy ve beyaz lahana, karnabahar, yeşil karnabahar ve Brüksel lahanası gibi yedi çeşit yerli Brassica sebzelerinin antiradikal aktiviteleri, polifenol, flavonoid ve toplam kondense tanen içerikleri belirlenmiştir. Serbest radikal süpürme aktivitesi, etanol ile uygun olarak seyreltilmiş örnek çözeltilisine DPPH[·] radikalinin etanoldeki çözeltilisinin ilave edilip karışımın 20 dakika sonra etanol körüne karşı 517 nm'de absorbansının ölçülmesiyle uygulanan DPPH[·] (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali) yöntemi ile belirlenmiştir. Antioksidan aktivite EC_{50} mg antioksidan / mg DPPH[·] olarak ifade edilmiştir. Toplam fenolik içerikleri, uygun olarak seyreltilmiş örnek ekstraktına deiyonize su ve Folin-Ciocalteu reaktifi eklendikten sonra karışımın 6 dakika bekletilmesiyle ve %7'lik sulu Na_2CO_3 çözeltilisinin ilave edilip karışımın 90 dakika bekletilmesinin ardından absorbansının 760 nm'de su körüne karşı ölçülmesiyle belirlenmiştir. Toplam fenol miktarı gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmiştir (GAE, mg gallik asit/g örnek). Toplam flavonoid miktarları ise uygun olarak seyreltilmiş ekstraktlara %5 sodyum nitrit eklenmesinden 5 dk sonra %10 AlCl_3 , 6 dakika sonra da 1 M NaOH çözeltileri ilave edilip karıştırıldıktan sonra karışımın absorbansının 510 nm'de su körüne karşı okunmasıyla g örnek başına mg kateşin(+) eşdeğeri olarak hesaplanmıştır. Toplam kondanse tanen, uygun olarak seyreltilmiş örneğe % 4'lük metanoldeki vanilin çözeltilisi ve derişik hidroklorik asidin ilavesiyle elde edilen

karışımın 15 dakika bekledikten sonra 500 nm'de metanol körüne karşı absorbansının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Toplam kondanse tanen miktarı (+)kateşin eşdeğeri olarak ifade edilmiştir (mg (+)kateşin/g örnek). Brokoli ve İtalyan lahanası en yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriğini göstermiştir. En yüksek tanen içeriği ise karnabaharda bulunmaktadır. EC₅₀ değerlerine göre ise, brokoli ve İtalyan lahanası en düşük değerlere sahiptir. Uygulanan spektrofotometrik yöntemlerden elde edilen sonuçlar, HPLC/DAD ve HPLC/MS ile belirlenen nitel-nicel bilgiler ile karşılaştırılmıştır. Kamferol ve kuersetin glikozitleri ve hidroksisinnamik esterleri belirlenen polifenolik bileşiklerdir.

Arapitsas ve arkadaşlarının [79] yaptığı çalışmada, kırmızı lahanadaki antosiyanin türleri HPLC/DAD-ESI/Qtrap MS kullanılarak deneysel olarak belirlenmiş ve analiz edilmiştir. Ekstraksiyon, basınçlı sıvı tekniği kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve pigmentlerin ayrılması 1.8 µm parçacıklı C-18 kolonu ile yüksek çözünürlüklü sıvı kromatografisi sistemi tarafından başarılmıştır. Fotodiyot dizisi dedeksiyonu, pigmentlerin UV/Vis spektral karakteristiğini belirlemek için kullanılmıştır. HPLC/DAD analizinde mobil faz olarak (A) %5 formik asidin sulu çözeltisi ve (B) asetonytril kullanılmıştır. Elektrosprey iyonizasyon-lineer iyon yakalama kütle spektrometrisi farklı iyon tarama modlarında uygulanarak antosiyaninlerin parçalanma ürünlerinin spesifik belirlenmesini sağlamıştır. 24 antosiyanin ayrılmış ve belirlenmiştir. Aglikon olarak elde edilen siyanidin mono- ve/veya di-glukozit olarak ve aromatik ve alifatik asitlerle açillenmiş olarak gösterilmiştir.

Scalzo ve arkadaşlarının [80] yaptığı çalışmada, mor karnabahar ve kırmızı lahananın termal uygulama öncesi ve sonrasındaki antosiyanin profilleri belirlenmiştir. Spektrofotometrik farklı pH yöntemi kullanılarak örneklerin toplam antosiyanin içerikleri tespit edilmiştir. Bu yöntemde, liyofilize örnekler sırasıyla pH 1 ve pH 4.5 tampon çözeltileri ile muamele edilir. Karışım homojenize edilir ve 15 dk 4 °C'de 5000 g'da iki kere santrifüj edildikten sonra üst faz alınır ve 510 nm'de absorbansı ölçülür. Toplam antosiyanin analizinde kırmızı lahananın 756 mg/kg taze örnek içerdiği, mor karnabaharın ortalama içeriği ise 42.1 mg/kg taze örnek olarak bulunmuştur. Örneklerin katı faz ekstraksiyonu ile hızlı ve etkili bir ön işleminden geçirilmesinin ardından HPLC-MS/MS sistemi kullanılarak bütün bileşenler için seçimli belirleme yapılmıştır. Karnabahar ve kırmızı lahananın antosiyanin profillerinin farklılık gösterdiği

bulunmuştur: siyanidin-3,5-diglukozit karnabaharda yokken kırmızı lahanada Brassica sınıfının karakteristik antosiyanini olan siyanidin-3-soforozit-5-glukozit ile birlikte bulunmaktadır. Karnabaharda siyanidin-3-soforozit-5-glukozitin p-kumaril ve feruloil esterleştirilmiş türleri hakimken kırmızı lahanada en çok sinapil türü bulunmuştur. Ayrıca, karnabaharın antosiyanin profilinin kararlılığı termal ön işlemlerle ilgili olarak değerlendirilmiştir. Mikrodalga ısıtma dışındaki bütün termal işlemler karnabahardaki toplam antosiyanin içeriğini düşürmektedir.

Ciska ve arkadaşlarının [81] yaptığı çalışmada, beyaz lahana ve lahana turşusundan fenolik bileşikler %80 metanol kullanılarak ekstrakte edilmiş ve lahana turşusu ekstraktının toplam fenol içeriğinin (8.25 mg/g) beyaz lahana ekstraktından (5.72 mg/g) daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ekstraktlarda bulunan fenolik bileşiklerin gösterdiği antioksidan ve antiradikal özellikler, Toplam Antioksidan Kapasite (TAC) yöntemi, DPPH radikal süpürme aktivitesi ve indirgeme gücü kullanılarak araştırılmıştır. Lahana turşusunun toplam antioksidan kapasitesi (0.031 mmol Troloks/g), beyaz lahananınkinden (0.025 mmol Troloks/g) daha yüksektir. DPPH radikalini süpürebilmede beyaz lahana ekstraktı lahana turşusuyla kıyaslandığında daha az güçlüdür. Ayrıca indirgeme gücü de daha güçlüdür. HPLC analizi sonuçları, beyaz lahananın fermentasyonu süresince fenolik bileşiklerin metabolizmasını göstermiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada kullanılan cihazlar; kimyasal madde ve lahana örneklerini tartmak için Radwag WAS 220/X analitik terazi, pH ölçümleri için İstek Neo Met pH metre, ekstraksiyon işlemleri ve kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Bransonic 221 ultrasonik banyo, inkübasyon işlemleri için 10 kademeli Clifton su banyosu, hidroliz işlemleri için HB4 basic KIKA-WERKE su banyosu, çözeltileri karıştırmak için Elektro-mag girdap karıştırıcı, lahana örneklerinin dondurularak kurutulmasında Telstar Cryodos freeze-dryer, bidistile su üretimi için Millipore Simpax 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, absorbans ölçümleri ve spektrum çizimleri için Cary 1E UV-Vis spektrofotometre, HPLC ayırımları için Waters 1525 Binary HPLC pompa, 2998 PDA dedektör, In-Line degazerden oluşan HPLC cihazı kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (Aldrich), kuersetin (Aldrich), ferulik asit (Aldrich), kamferol (Sigma), prosiyanidin B2 (Fluka), siyanin klorür (Sigma), siyanidin klorür (Fluka), pelargonidin klorür (Aldrich), malvidin klorür (Sigma), bakır (II) klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck), amonyum asetat (Riedel-de Haën), neocuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Sigma), ABTS (2,2'-azinobis[3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat]) (Fluka), HRP (Horseradish Peroksidaz) (Fluka), hidrojen peroksit (Merck), alüminyum klorür heksahidrat (Fluka), potasyum asetat (Merck), sodyum nitrit (J.T.Baker), sodyum hidroksit (Merck), Folin reaktifi (Sigma), sodyum potasyum tartarat (J.T.Baker), bakır (II) sülfat (Riedel-de Haën), sodyum karbonat (Riedel-de Haën), potasyum klorür (J.T.Baker), CH_3COONa (Merck), % 96'lık etanol (Merck), metanol (Merck), % 37'lik hidroklorik asit (Merck), *o*-fosforik asit (Merck), KH_2PO_4 (Merck), K_2HPO_4 (Merck).

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Kuersetin, ferulik asit, kamferol stok çözeltileri metanolde; Prosiyanidin B2, HPLC analizleri için bidistile suda, spektrofotometrik analizler için metanolde; siyanin klorür (siyanidin-3,5-diglukozit), siyanidin klorür, pelargonidin klorür ve malvidin klorür stok çözeltileri %2 hidroklorik asit içeren %50 metanolde çözüldü. Tüm stok antioksidan çözeltileri -20°C ' de saklanarak kullanıldı.

CUPRAC yönteminde; 1.0×10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi distile suda, 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi % 96'lık etanolde hazırlandı.

ABTS/HRP yönteminde; 4.0×10^{-3} M ABTS çözeltisi, 1.2×10^{-4} M hidrojen peroksit çözeltisi, 2.4×10^{-5} M HRP çözeltisi pH 7.4 fosfat tamponunda hazırlandı.

$\text{AlCl}_3/\text{CH}_3\text{COOK}$ yönteminde; %10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, 1 M CH_3COOK çözeltisi distile suda hazırlandı.

$\text{AlCl}_3/\text{NaNO}_2$ yönteminde; %5'lik NaNO_2 çözeltisi, %10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, 1 M NaOH çözeltisi distile suda hazırlandı.

Farklı pH yönteminde; pH=1 tamponu için 0,2 M KCl çözeltisi ve pH=4,5 tamponu için 1 M CH_3COONa çözeltisi distile suda hazırlandı.

Folin-Ciocalteu yönteminde; Lowry A çözeltisi için 0.1 N NaOH çözeltisi distile suda, %2'lik Na_2CO_3 çözeltisi 0.1 N NaOH çözeltisinde hazırlandı. Lowry B çözeltisi için %1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ çözeltisi distile suda, %0.5'lik CuSO_4 çözeltisi %1'lik $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ çözeltisinde hazırlandı.

3.3. HİDROLİZ ŞARTLARI

Laboratuvarımızda yapılan daha önceki tez çalışmalarında, literatürde verilen % 50 metanol ve 1.2 M HCl ortamında [82,83], gallik asit, kateşin, klorojenik asit, epikateşin,

kafeik asit ve rutin için son derişim 10^{-3} M olacak şekilde ayrı ayrı 30, 60 ve 120 dakika süreyle 90°C 'de hidrolizleri yapılarak en uygun hidroliz süresi belirlenmiştir.

3.4. LAHANA ÖRNEKLERİNİN ANALİZE HAZIRLANMASI

3.4.1. Lahana Örneklerinin Kurutulması

Kasım-Aralık aylarında marketlerden temin edilen beyaz lahana, karalahana, Brüksel lahanası ve kırmızı lahana örnekleri musluk suyu altında iyice yıkandıktan sonra, iki kez distile sudan geçirildi ve el ile parçalanan yaş lahana örnekleri freze-dryer'da -40°C ' de yaklaşık 18 – 24 saat süreyle kurutuldu. Analizleri öncesinde ev tipi mutfak robotunda öğütülerek ince toz haline getirildi.

3.4.2. Kurutulmuş Lahana Örneklerinin Ekstraksiyonu

Dondurularak kurutulmuş lahana örnekleri, %50; 70; 80 metanol-su (v/v) ve %2 hidroklorik asit içeren %50 metanol-su karışımları ile ekstrakte edildi.

Ekstraksiyon uygulaması için; dondurularak kurutulmuş örneklerden 2 g tartılıp, önce çözücünün 10 mL'si ile 40 dakika, ikinci bir 10 mL'si ile 40 dakika ve 5 mL'si ile 30 dakika ultrasonik banyoda ağızları kapalı cam erlenler içinde üç kademede ekstrakte edildi. Bu üç ekstrakt bir araya getirilerek son hacim 25 mL'ye tamamlandı. Tüm ekstraktlar önce süzgeç kağıdından daha sonra GF/PET (Glass fiber/polietilentereftalat) 1.0 / 0.45 μm 'lik enjektör uçlu mikrofiltreden geçirildi ve analiz süresine kadar -20°C 'de saklandı.

3.4.3. Lahana Örneklerinin Hidrolizi

%2 HCl içeren %50 metanollü ve %80 metanollü ekstraktlar, son derişim %50 metanol ve 1.2 M HCl olacak şekilde ayarlanıp 90°C 'de 2 saat hidroliz edildi [83,84].

% 80 metanollü lahana ekstraktlarının hidrolizinde; [15 mL % 80 metanollü ekstrakt + 0.5 mL metanol + 2.5 mL derişik HCl + 7 mL bidistile su] içeren karışım, %2 HCl içeren %50 metanollü lahana ekstraktlarının hidrolizinde; [12.5 mL %2 HCl içeren %50 metanollü ekstrakt + 6.25 mL metanol + 2.25 mL derişik HCl + 4 mL bidistile su] içeren karışım hidroliz edildi.

Hidroliz sonunda hidrolizat hacmi hidroliz balonunu yıkamak suretiyle 25 mL'ye %50 metanol 1.2 M HCl içeren karışım ile tamamlandı, 1.0 / 0.45 µm mikrofiltreden süzülerek analiz edildi.

3.5. UYGULANAN YÖNTEMLER

3.5.1. Spektrofotometrik Yöntemler

3.5.1.1. CUPRAC Yöntemi

- Normal yöntem;

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 1.0×10^{-2} M Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL 7.5×10^{-3} M neokuproin çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH 7.0) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra x mL antioksidan standart çözeltisinden veya lahana örneklerinden ve son olarak (1.0-x) mL distile su ilave edilerek çözeltiler karıştırıldı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı 450 nm'deki absorpsanları ölçüldü [45].

Kalibrasyon doğruları antioksidan standartlarıyla oluşturulup, molar absorpsiyon katsayıları hesaplandı.

- İnkübasyonlu Yöntem;

Normal yöntemine göre hazırlanmış çözeltiler ağızları kapatılarak 50 °C'lik su banyosunda 20 dakika bekletilerek inkübe edildi. Süre sonunda tüpler soğuk su içinde birkaç dakika soğutuldu. Tüplerin ağızları açılıp tekrar karıştırıldıktan sonra içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı 450 nm'deki absorpsanları ölçüldü [45].

Kalibrasyon doğruları antioksidan standartlarıyla oluşturulup, molar absorpsiyon katsayıları hesaplandı.

3.5.1.2. ABTS / HRP Yöntemi

Arnao ve arkadaşlarının geliştirdikleri bu yöntem [51] ayıraç miktarları ve süre değiştirilerek uygulandı. Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL 4×10^{-3} M ABTS, 1 mL 2.4×10^{-5} M HRP ve 1 mL 1.2×10^{-4} M H₂O₂ ilavesinden sonra çözelti karıştırıldı ve oluşan ABTS radikalinin absorpsiyonunun kararlı hale gelebilmesi için 5 dakika

bekletildi. Bu süre sonunda x mL örnek ve (1-x) mL çözücü ilave edildi ve 5 dakika daha bekletildi. 10. dakikada 730 nm'de pH 7.4 tamponuna karşı absorbans okundu. Radikal çözeltilisinin (örnek yerine örnek çözücüsü içeren) absorbansından, örnek içeren çözeltinin absorbansı çıkarılarak ΔA absorbans değerleri hesaplandı.

3.5.1.3. Folin Ciocalteu Yöntemi

Toplam fenolik madde derişimini ölçen Folin Ciocalteu yöntemine göre; bir deney tüpü içerisine sırasıyla x mL örnek çözeltisi, (2-x) mL distile su ve 50 mL Lowry A çözeltisine (0.1 M NaOH içinde % 2 (w/v) Na_2CO_3) 1 ml Lowry B çözeltisinin (% 1 (w/v) $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ içinde % 0.5 (w/v) CuSO_4) ilave edilmesiyle oluşan Lowry C çözeltisinden 2.5 mL ilave edildikten 10 dakika sonra 0.25 mL 1'e 3 oranında su ile seyreltilmiş Folin reaktifi eklendi. Tüpler oda sıcaklığında ağızları kapalı olarak 30 dakika bekletildi ve örnek içermeyen referansa karşı 750 nm'de absorbansları ölçüldü [84].

3.5.1.4. AlCl_3 / KAc Yöntemi

AlCl_3 /potasyum asetat spektrofotometrik yöntemine göre; bir cam tüp içerisinde bulunan x mL örnek çözeltisine sırasıyla 1.5 mL etanol çözeltisi, 0.1 mL %10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi, 0.1 mL 1 M CH_3COOK çözeltisi ilave edilip çalkalandı ve son hacim 5 mL olacak şekilde (3.3-x) mL distile su eklendikten sonra tekrar iyice çalkalandı. Tüpler oda koşullarında ağızı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. Bu süre sonunda örnek içermeyen referansa karşı literatürde bulunan 415 nm yerine kuersetin için maksimum absorbans gösteren 427 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü [85]. Absorbans ile kuersetin bileşiminin derişimi arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak örneklerin toplam flavonoid içerikleri mmol kuersetin/g kuru madde cinsinden hesaplandı.

3.5.1.5. AlCl_3 / NaNO_2 Yöntemi

Jia Zhishen ve diğerleri [68] tarafından rapor edilen $\text{AlCl}_3/\text{NaNO}_2$ yönteminin değiştirilmiş hali şu şekilde uygulanmıştır; x mL örnek çözeltisine (3.4-x) mL distile su ve 0.2 mL %5'lik NaNO_2 çözeltisi ilave edildi. 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 0.4 mL %10'luk $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi eklendi. Yine oda sıcaklığında 20 dakika bekletildikten sonra 1 mL 1 M NaOH eklendi ve hemen 510 nm dalga boyunda örnek içermeyen referansa karşı absorbans değerleri ölçüldü. Absorbans ile kuersetin

bileşiminin derişimi arasındaki kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak örneklerin toplam flavonoid içerikleri mmol kuersetin/g kuru madde cinsinden hesaplandı.

3.5.1.6. Farklı pH Yöntemi

Örnekler, pH 1.0 (125 mL 0.2 M KCl ve 375 mL 0.2 M HCl) ve pH 4.5 (400 mL 1 M CH₃COONa, 240 mL 1 M HCl ve 360 mL H₂O) tamponları ile seyreltildi. Çözeltilerin absorpsansları 510 ve 700 nm'de ölçülüp, antosiyanin derişimi aşağıdaki denklem ile hesaplandı:

$$\text{Toplam Antosiyanin (mg/L)} = \frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\epsilon \times l} \quad (3.1)$$

$$A = (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1.0} - (A_{510\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4.5} \quad (3.2)$$

MW = Molekül Ağırlığı

DF = Seyreltme Faktörü

ϵ = Molar absorpsiyon katsayısı, L x mol⁻¹ x cm⁻¹

l = ışın yolu (1 cm)

Molekül ağırlığı 449.2 ve molar absorpsiyon katsayısı 26900 olan siyanidin-3-glukozit eşdeğeri olarak hesaplandı [70].

3.5.2. Kromatografik Yöntem

3.5.2.1. HPLC Analizi

HPLC analizlerinde üç elüsyon programı kullanıldı.

- Beyaz lahana ve Brüksel lahanasındaki bileşenlerin analizi için geliştirilen HPLC metodu;

Metanol (A) ve beyaz lahana için % 0.002 o-H₃PO₄, Brüksel lahanası için % 0.2 o-H₃PO₄ içeren bidistile su (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın gradient elüsyonu uygulandı.

15 dakika % 1 (A) , eğim (0.0)

5 dakika % 5 (A) , eğim (1.0)

5 dakika % 20 (A) , eğim (1.0)

5 dakika % 27 (A) , eğim (1.0)

5 dakika % 40 (A) , eğim (1.0)

15 dakika % 55 (A) , eğim (1.0)

10 dakika % 80 (A) , eğim (1.0)

15 dakika % 100 (A) , eğim (1.0).

Akış hızı ilk 15 dakika 0.3 mL/dakika, daha sonra 1 mL/dakika'dır. Dedeksiyon (belirleme) dalga boyu 280 nm'dir.

- Karalahanadaki bileşenlerin analizi için geliştirilen HPLC metodu;

Metanol (A) ve % 0.2 *o*-H₃PO₄ içeren bidistile su (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın gradient elüsyonu uygulandı.

5 dakika % 20 (A) , eğim (0.0)

15 dakika % 27 (A) , eğim (1.0)

24 dakika % 55 (A) , eğim (1.0)

10 dakika % 70 (A) , eğim (1.0)

15 dakika % 100 (A) , eğim (1.0).

Akış hızı 1 mL/dakika, dedeksiyon (belirleme) dalga boyu 280 nm'dir.

- Kırmızı lahanadaki bileşenlerin analizi için geliştirilen HPLC metodu;

Metanol (A) ve % 0.2 *o*-H₃PO₄ içeren bidistile su (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın gradient elüsyonu uygulandı.

15 dakika % 1 (A) , eğim (0.0)

5 dakika % 5 (A) , eğim (1.0)

5 dakika % 20 (A) , eğim (1.0)

5 dakika % 27 (A) , eğim (1.0)

5 dakika % 32 (A) , eğim (1.0)

5 dakika % 40 (A) , eğim (1.0)

5 dakika % 45 (A) , eğim (1.0)

15 dakika % 55 (A) , eğim (1.0)

10 dakika % 80 (A) , eğim (1.0).

Akış hızı ilk 15 dakika 0.5 mL/dakika, daha sonra 1 mL/dakika'dır. Dedeksiyon (belirleme) dalga boyu 280 ve antosiyanidinleri belirlemek için 520 nm'dir.

Çalışılan her bir lahana örneği enjekte edilmeden önce kolon, 10 dakika % 100 metanolla yıkandı ve 10 dakika da dengelendi.

3.5.3 Birleştirilmiş HPLC- Spektrofotometrik Yöntemler

HPLC’de pik alanlarıyla madde derişimleri arasında çizilen kalibrasyon doğruları yardımıyla, lahana örneklerinin bireysel antioksidan içerikleri bulunmuştur. Derişimler bileşenlerin TEAC değerleri ile çarpılmış ve örnek içinde bileşenlerin kuramsal olarak göstermesi gereken kapasiteler belirlenmiştir. Bileşenlerin hesaplanan kapasiteleri toplanarak, lahana türlerinin toplam antioksidan kapasitesi hesaplanmıştır. Bu şekilde HPLC verilerinden toplam antioksidan kapasite hesabına geçilmiştir. HPLC-CUPRAC_N, HPLC-CUPRAC_i ve HPLC-ABTS/HRP ifadeleri HPLC’de belirlenen derişimlerin sırasıyla CUPRAC-normal, CUPRAC-inkübasyonlu ve ABTS/HRP yöntemindeki TEAC katsayıları ile çarpılmasıyla hesaplanan kapasiteyi ifade etmektedir. Hesaplanan bu kapasite değerleri hem kromatografik hem de spektrofotometrik verilere dayandığından bunları ifade ederken her iki enstrümental tekniğin sembolleri kullanılmıştır.

$$(\text{Antioksidan Kapasite})_{\text{Toplam}} = \sum_{i=1}^n C_i \text{TEAC}_i \quad (3.3)$$

(c_i : i- bileşenin HPLC yoluyla bulunan derişimini; TEAC_i : i- bileşenin seçilen kapasite ölçüm yöntemine göre TEAC katsayısını ifade etmektedir.)

4. BULGULAR

4.1. CUPRAC VE ABTS/HRP YÖNTEMLERİNİN ÇEŞİTLİ ANTIOKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI

Literatür verilerine göre çalışılan örneklerde bulunma olasılığı olan fenolik bileşiklerin, ferulik asit, kuersetin, kamferol, prosiyanidin B2, siyanin klorür, siyanidin klorür, pelargonidin klorür, malvidin klorür ve troloksun normal ve inkübasyonlu CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleriyle kalibrasyon doğruları çizildi.

Tablo 4.1-4.3'de verilen doğru denklemlerinde x: derişim, y: absorbans ve r: korelasyon katsayısını ifade etmektedir.

Tablo 4.1: Çeşitli antioksidan standartları için normal CUPRAC yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L⁻¹)
Troloks	$y = 1.6 \times 10^4 x + 0.0048$	0.9994	$9.8 \times 10^{-5} - 6.8 \times 10^{-5}$
Ferulik Asit	$y = 2.2 \times 10^4 x + 0.0178$	0.9998	$5.0 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$
Kuersetin	$y = 7.5 \times 10^4 x + 0.0121$	0.9996	$1.2 \times 10^{-6} - 1.1 \times 10^{-5}$
Kamferol	$y = 2.1 \times 10^4 x + 0.0223$	0.9967	$5.0 \times 10^{-6} - 2.0 \times 10^{-5}$
Prosiyanidin B2	$y = 1.2 \times 10^5 x - 0.0383$	0.9999	$1.7 \times 10^{-6} - 8.4 \times 10^{-6}$
Siyanin Klorür	$y = 6.5 \times 10^4 x + 0.0334$	0.9998	$3.1 \times 10^{-6} - 1.2 \times 10^{-5}$
Siyanidin Klorür	$y = 9.4 \times 10^4 x + 0.0114$	0.9994	$1.5 \times 10^{-6} - 7.6 \times 10^{-6}$
Pelargonidin Klorür	$y = 3.3 \times 10^4 x + 0.0354$	0.9990	$3.3 \times 10^{-6} - 1.3 \times 10^{-5}$
Malvidin Klorür	$y = 3.8 \times 10^4 x + 0.06$	0.9997	$2.7 \times 10^{-6} - 1.4 \times 10^{-5}$

Tablo 4.2: Çeşitli antioksidan standartları için inkübasyonlu CUPRAC yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L⁻¹)
Troloks	$y = 1.6 \times 10^4 x - 0.0041$	0.9999	$9.8 \times 10^{-6} - 6.8 \times 10^{-5}$
Ferulik Asit	$y = 2.6 \times 10^4 x + 0.012$	0.9992	$5.0 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$
Kuersetin	$y = 9.7 \times 10^4 x + 0.0021$	0.9992	$1.2 \times 10^{-6} - 9.8 \times 10^{-5}$
Kamferol	$y = 3.0 \times 10^4 x + 0.0448$	0.9978	$5.0 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$
Prosiyanidin B2	$y = 1.5 \times 10^5 x - 0.0131$	0.9998	$1.7 \times 10^{-6} - 6.8 \times 10^{-6}$
Siyanin Klorür	$y = 6.5 \times 10^4 x + 0.0142$	0.9996	$1.6 \times 10^{-6} - 7.7 \times 10^{-6}$
Siyanidin Klorür	$y = 1.1 \times 10^5 x + 0.0125$	0.9988	$1.5 \times 10^{-6} - 7.6 \times 10^{-6}$
Pelargonidin Klorür	$y = 4.8 \times 10^4 x + 0.0666$	0.9981	$3.3 \times 10^{-6} - 1.6 \times 10^{-5}$
Malvidin Klorür	$y = 5.7 \times 10^4 x + 0.0495$	0.9987	$2.7 \times 10^{-6} - 1.1 \times 10^{-5}$

Tablo 4.3: Çeşitli antioksidan standartları için ABTS / HRP yöntemi verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)
Troloks	$y = 2.4 \times 10^4 x + 0.0022$	0.9985	$5.0 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$
Ferulik Asit	$y = 4.2 \times 10^4 x + 0.0499$	0.9993	$5.0 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$
Kuersetin	$y = 1.1 \times 10^5 x + 0.0182$	0.9994	$1.5 \times 10^{-6} - 7.5 \times 10^{-6}$
Kamferol	$y = 2.6 \times 10^4 x + 0.0642$	0.9955	$5.0 \times 10^{-6} - 2.5 \times 10^{-5}$
Prosiyanidin B2	$y = 1.8 \times 10^5 x + 0.0778$	0.9994	$5.8 \times 10^{-7} - 3.5 \times 10^{-6}$
Siyanin Klorür	$y = 6.0 \times 10^4 x + 0.1615$	0.9940	$6.2 \times 10^{-6} - 1.6 \times 10^{-5}$
Siyanidin Klorür	$y = 1.2 \times 10^5 x + 0.1779$	0.9991	$2.6 \times 10^{-6} - 6.5 \times 10^{-6}$
Pelargonidin Klorür	$y = 4.7 \times 10^4 x + 0.0069$	0.9975	$3.3 \times 10^{-6} - 1.6 \times 10^{-5}$
Malvidin Klorür	$y = 2.9 \times 10^4 x - 0.0111$	0.9989	$2.7 \times 10^{-6} - 1.4 \times 10^{-5}$

4.2. CUPRAC VE ABTS/HRP YÖNTEMLERİYLE ÇEŞİTLİ ANTIOKSIDAN STANDARTLARININ TEAC KATSAYILARININ BELİRLENMESİ

Troloks, ferulik asit, kuersetin, kamferol, prosiyanidin B2, siyanin klorür, siyanidin klorür, pelargonidin klorür ve malvidin klorür standart antioksidanlarına uygulanan normal ve inkübasyonlu CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemi sonrasında, absorbans ve molar derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiğinin eğiminden molar absorplama katsayıları (ϵ) bulunarak, bu değerin troloksun molar absorplama katsayısına bölünmesiyle elde edilen troloks eşdeğeri antioksidan kapasiteleri (TEAC) hesaplandı.

Tablo 4.4'de çeşitli antioksidan standartlarının CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemlerine göre elde edilen TEAC değerleri görülmektedir.

Tablo 4.4: Çeşitli antioksidan standartlarının CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemlerine göre belirlenen TEAC değerleri

ANTIOKSİDAN	TEAC _{CUPRAC}		TEAC _{ABTS}
	TEAC _N	TEAC _i	
Ferulik Asit	1.39	1.63	1.76
Kuersetin	4.64	5.88	4.01
Kamferol	1.33	1.89	1.07
Prosiyanidin B2	7.11	8.89	6.61
Siyanin Klorür	4.03	4.03	2.49
Siyanidin Klorür	5.84	7.03	5.10
Pelargonidin Klorür	2.05	2.98	1.95
Malvidin Klorür	2.37	3.55	1.23

4.3. HPLC YÖNTEMİNİN ÇEŞİTLİ ANTIOKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI

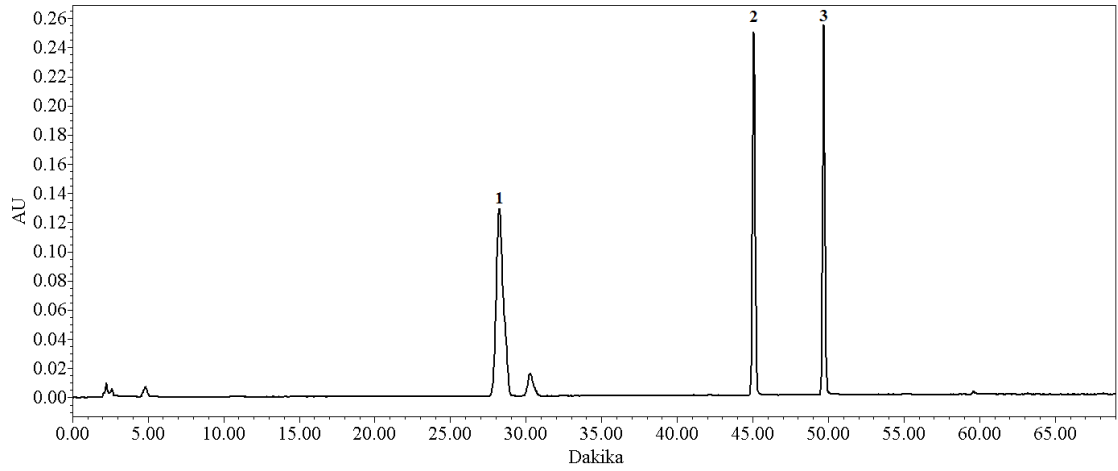
Tablo 4.5’de çalışılan örneklerde varlığı saptanan fenolik bileşiklerin standartlarının HPLC’de geliştirilen metodlarla elde edilen pik alanları ile derişim arasında çizilen doğru denklemleri görülmektedir.

Tablo 4.5’de verilen doğru denklemlerinde y: pik alanı, c: derişim ve r: korelasyon katsayısını ifade etmektedir.

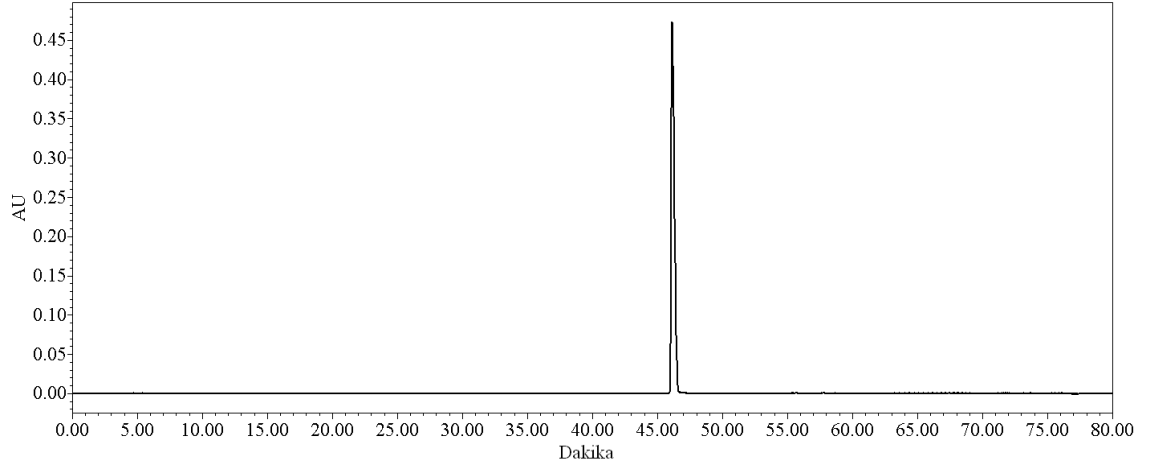
Tablo 4.5: Çeşitli antioksidan standartlarının 280 nm'deki HPLC verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	Doğrusal Aralık (mol L ⁻¹)
Ferulik Asit	$y = 1.00 \times 10^{10} c - 522741$	0.9998	$1.0 \times 10^{-4} - 5.0 \times 10^{-3}$
Kuersetin	$y = 9.00 \times 10^9 c - 71767$	1.0000	$5.0 \times 10^{-4} - 5.0 \times 10^{-3}$
Kamferol	$y = 7.23 \times 10^9 c - 36137$	0.9996	$4.0 \times 10^{-5} - 5.0 \times 10^{-4}$
Prosiyanidin B2	$y = 6.70 \times 10^9 c + 63158$	0.9995	$2.6 \times 10^{-5} - 3.5 \times 10^{-4}$
Siyanidin Klorür	$y = 2.13 \times 10^{10} c + 129000$	0.9992	$1.6 \times 10^{-5} - 1.6 \times 10^{-4}$

Şekil 4.1'de çeşitli antioksidan standartlarını içeren sentetik karışımın 280 nm'deki; Şekil 4.2'de siyanidin klorür standardının 520 nm'deki kromatogramları görülmektedir.

**Şekil 4.1:** Çeşitli antioksidan standartlarını içeren sentetik karışımın 280 nm'deki kromatogramı

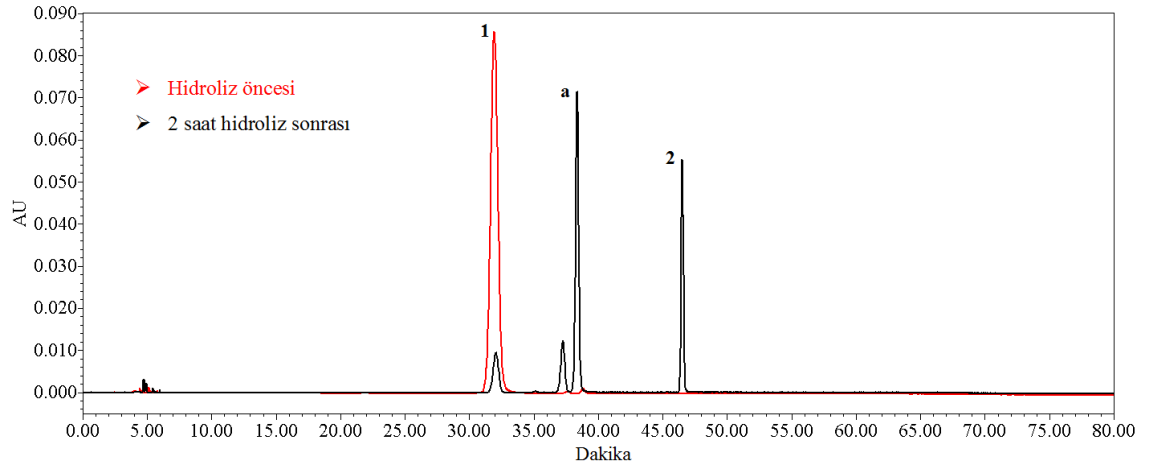
(1: Ferulik asit, 2: Kuersetin, 3: Kamferol)



Şekil 4.2: Siyanidin klorür standardının 520 nm'deki kromatogramı

4.4. ANTOSİYANİN STANDARDININ HİDROLİZ SONUÇLARI

Şekil 4.3'de hidroliz edilmemiş ve 2 saat süreyle hidroliz edilmiş siyanin klorür standardının kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.3: Siyanin klorür standardının hidroliz öncesi ve 2 saat hidrolizi sonucu elde edilen kromatogramlar

(1: Siyanin klorür, 2: Siyanidin klorür, a: Belirlenemeyen parçalanma ürünü)

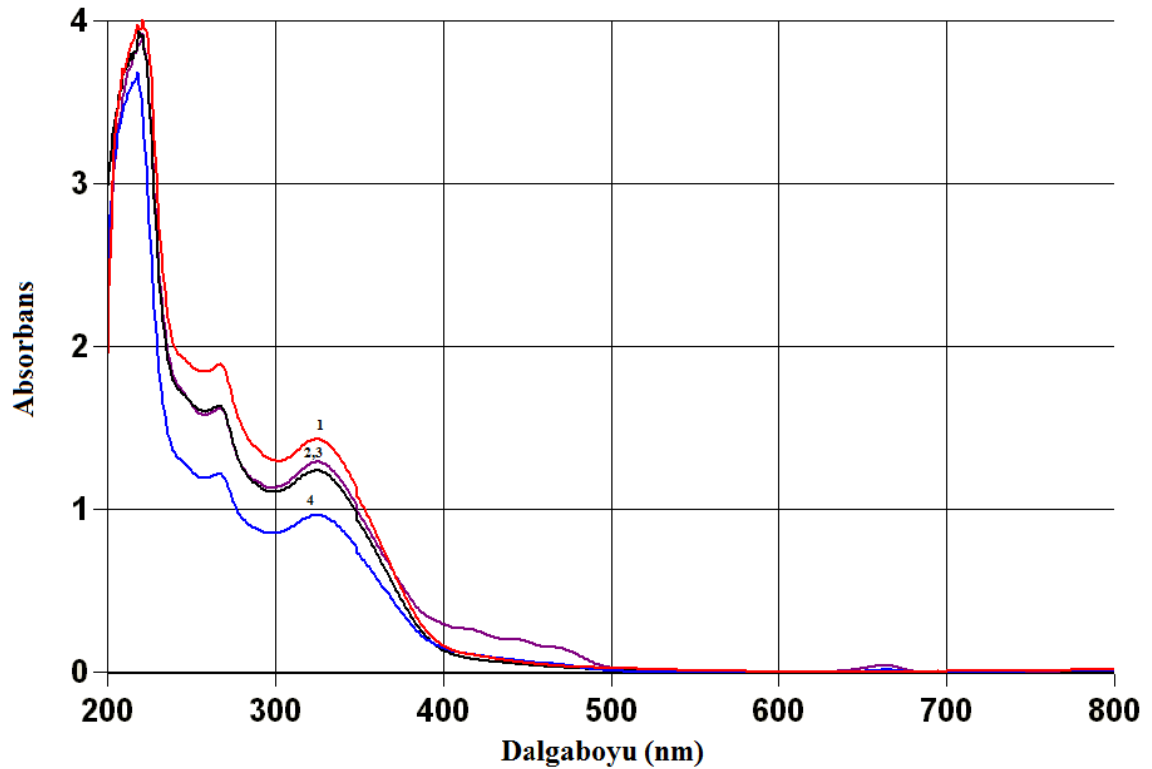
Hidroliz amacımız, yeterli glikozit standardımız olmaması nedeniyle tanımlayamadığımız antosiyenin ve flavonoid glikozitlerini aglikonlarına bozunmadan dönüştürmektir. Bu nedenle laboratuvarımızda yapılan daha önceki tez çalışmalarında, çeşitli glikozit standartları ile farklı sürelerde gerçekleştirilen hidroliz sonucunda elde edilen kromatogramlardan 2 saatlik hidroliz süresinin uygun olduğuna karar verilmiştir.

4.5. LAHANA TÜRLERİNİN ANALİZ SONUÇLARI

Lahana ekstraktları ve ekstrakt hidrolizatlarının toplam antioksidan kapasitesi spektrofotometrik olarak CUPRAC-normal, CUPRAC-inkübasyonlu ve ABTS/HRP yöntemleri ile, toplam flavonoid miktarı $AlCl_3/CH_3COOK$ ve $AlCl_3/NaNO_2$ yöntemleri ile ve lahana ekstraktlarının toplam fenol miktarı Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiştir. Kırmızı lahana ekstraktı ve ekstrakt hidrolizatındaki toplam antosiyanin miktarı ise farklı pH yöntemi ile bulunmuştur. Elde edilen toplam flavonoid ve toplam fenol değerleri, CUPRAC-normal ve ABTS/HRP yöntemleri ile elde edilen toplam antioksidan kapasite değerleri ile karşılaştırılmıştır. Ayrıca, lahana ekstraktları ve ekstrakt hidrolizatlarının antioksidan bileşenleri ise HPLC ile belirlenmiştir.

4.5.1. Karalahana

Şekil 4.4’de farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş karalahana ekstraktlarının spektrumları görülmektedir.

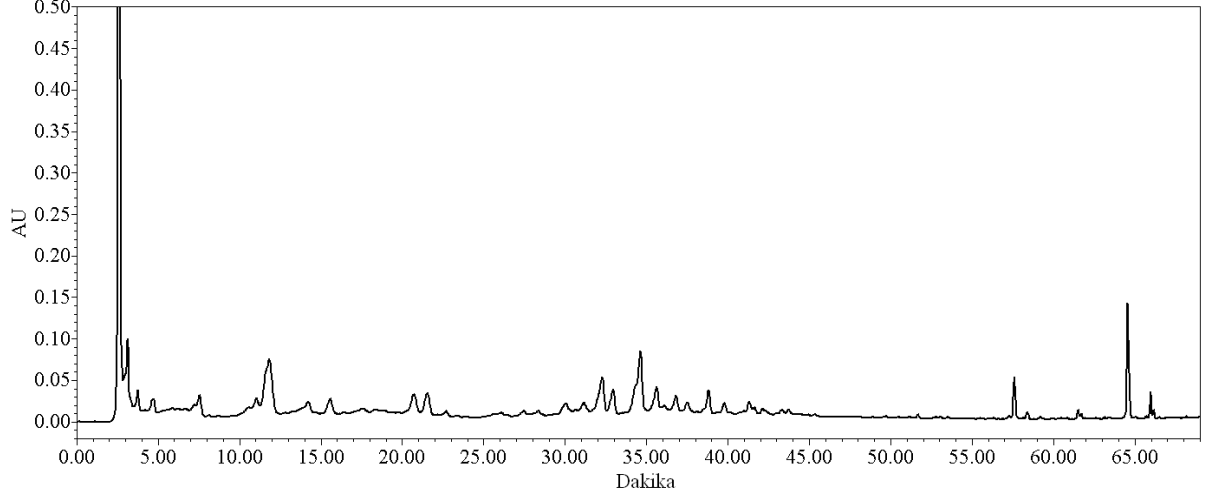


Şekil 4.4: Karalahana ekstraktlarının spektrumları

(1: % 2 hidroklorik asit içeren %50 Metanol, 2: %80 Metanol, 3:%50 Metanol, 4:%70 Metanol)

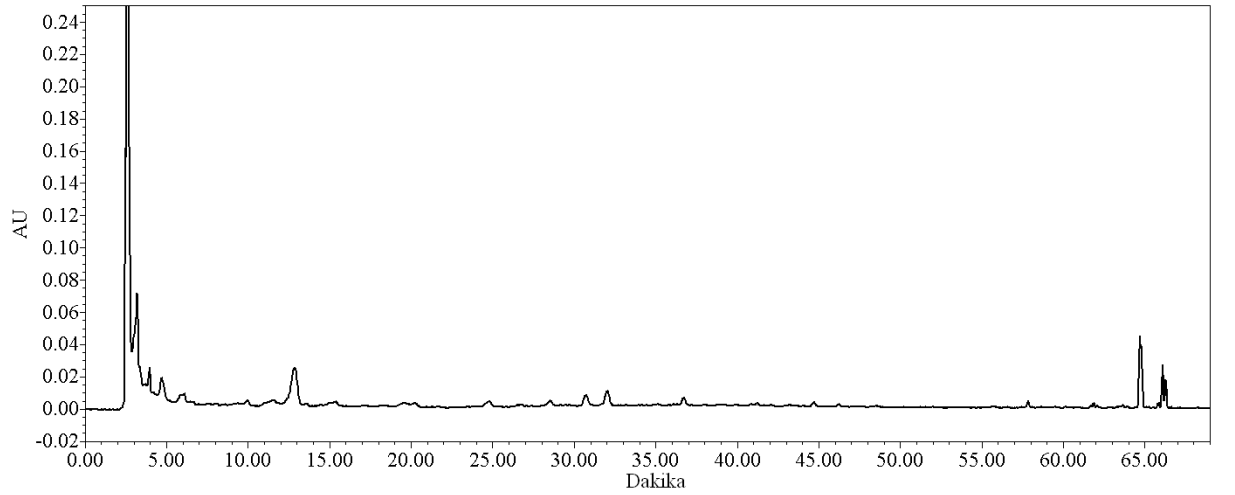
Karalahana ekstraktları için en uygun çözücü oranı, alınan spektrumlarla % 80 metanol olarak belirlendi.

Şekil 4.5’de %80 metanol ile ekstrakte edilmiş karalahana yaprağı ekstraktının kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.5: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş karalahana yaprağı ekstraktının 280 nm’deki kromatogramı

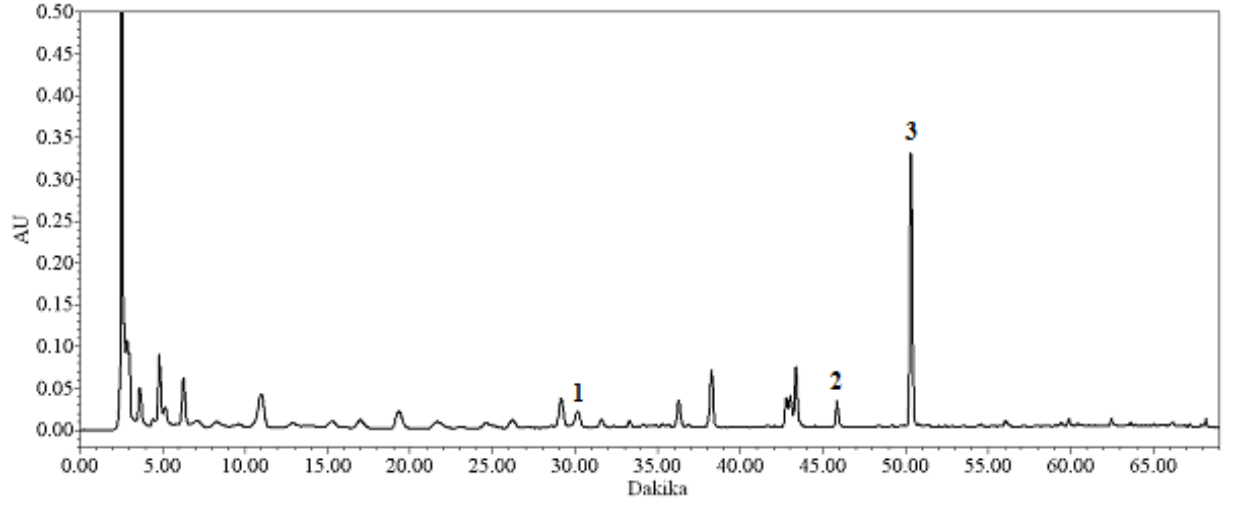
Şekil 4.6’da %80 metanol ile ekstrakte edilmiş karalahana sapı ekstraktının kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.6: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş karalahana sapı ekstraktının 280 nm’deki kromatogramı

Ekstrakt kromatogramlarındaki hiçbir pik elimizdeki standartlarla çakışmadığı için belirlenememiştir.

Şekil 4.7’de karalahana yaprak ekstraktı hidrolizatının kromatogramı görülmektedir.

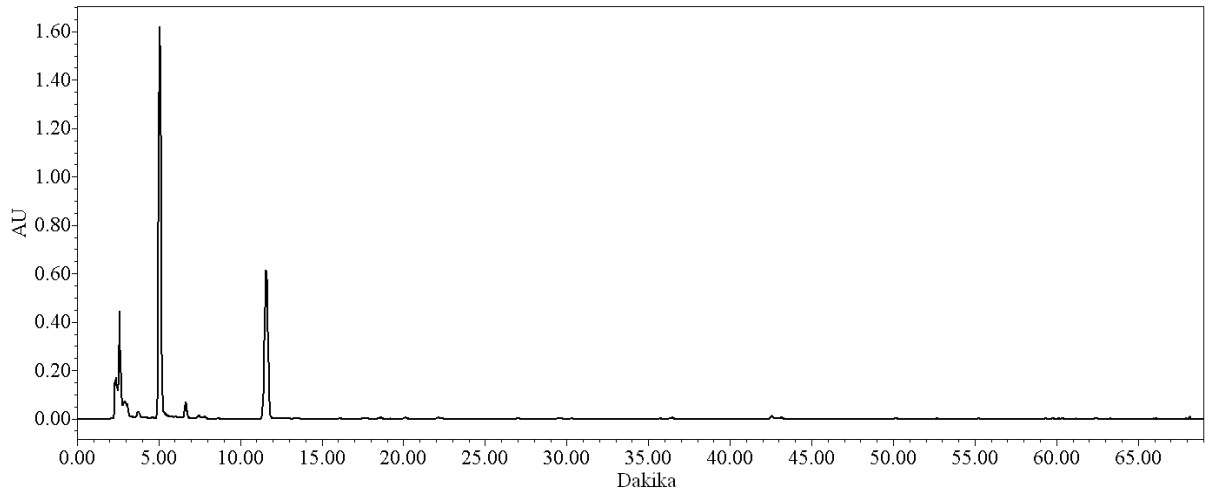


Şekil 4.7: Karalahana yaprak ekstraktı hidrolizatının 280 nm’deki kromatogramı

(1:Ferulik asit, 2:Kuersetin, 3:Kamferol)

Ferulik asit, kuersetin ve kamferol, ekstrakt hidrolizatına yapılan standart eklemeleri ile belirlenmiştir. Tanımlanan piklerin PDA spektrumlarının, bu bileşiklerin literatürde verilen [86] maksimum absorbans gösteren dalgalılarıyla ile karşılaştırılmasıyla da doğrulama yapılmıştır.

Şekil 4.8’de karalahana sapı ekstrakt hidrolizatının kromatogramı görülmektedir.

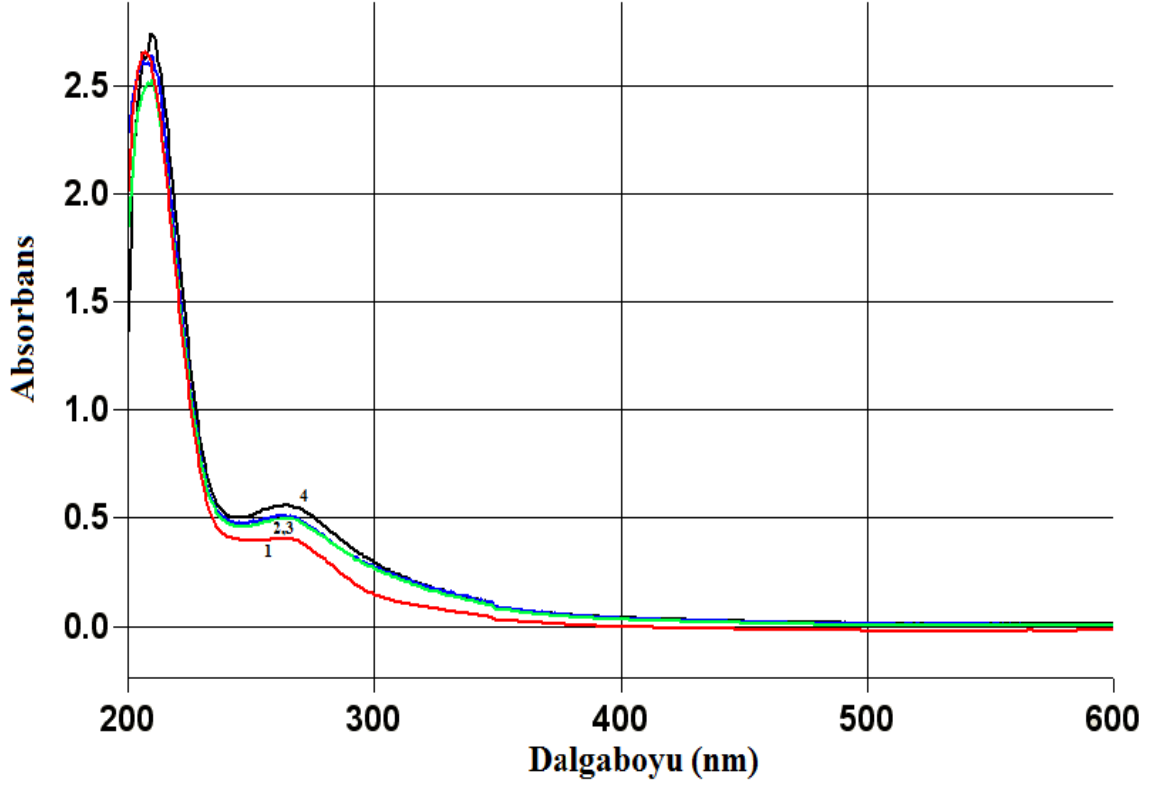


Şekil 4.8: Karalahana sapı ekstrakt hidrolizatının 280 nm’deki kromatogramı

Karalahana sapı ekstrakt hidrolizatı kromatogramındaki hiçbir pik elimizdeki standartlarla çakışmadığı için belirlenememiştir.

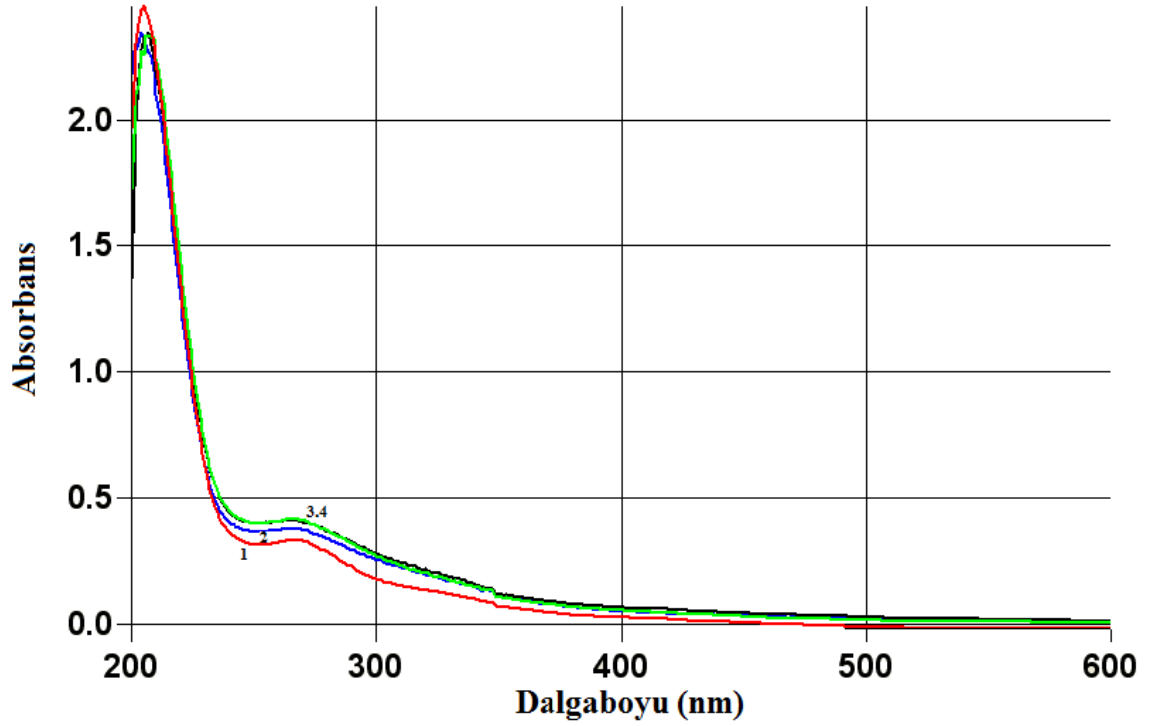
4.5.2. Beyaz Lahana

Şekil 4.9 - 4.10'da farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş beyaz lahana (iç yapraklar) ve beyaz lahana (dış yapraklar) ekstraktlarının spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.9: Beyaz lahana (iç yapraklar) ekstraktlarının spektrumları

(1: %80 Metanol, 2: %70 Metanol, 3: %50 Metanol, 4: %2 hidroklorik asit içeren %50 Metanol)

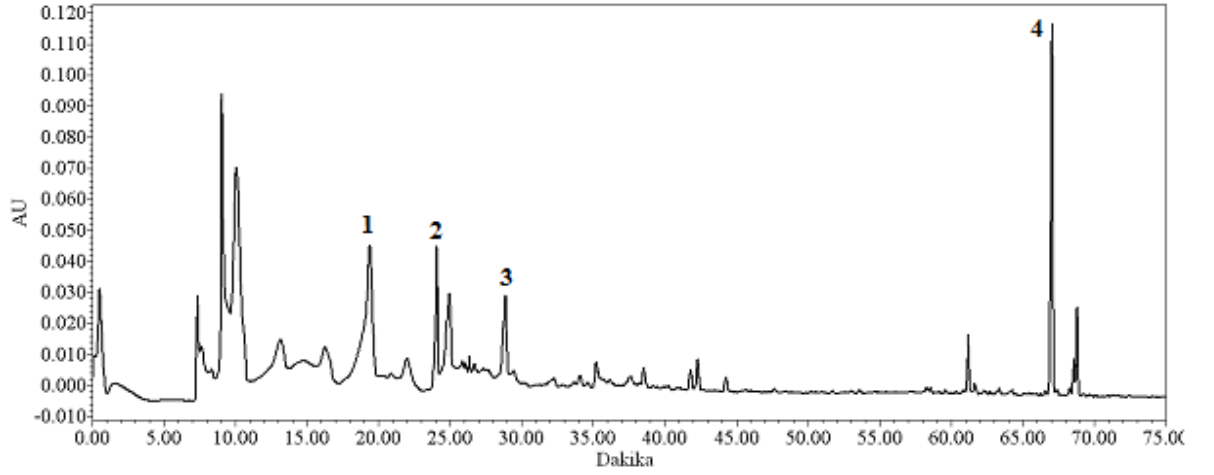


Şekil 4.10: Beyaz lahana (dış yapraklar) ekstaktlarının spektrumları

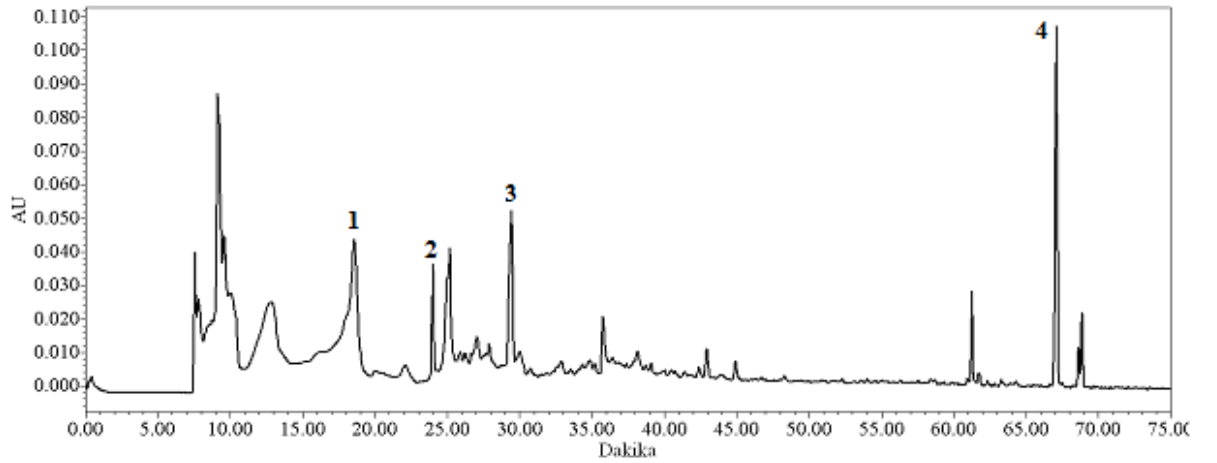
(1: %80 Metanol, 2: %50 Metanol, 3: %70 Metanol, 4: % 2 hidroklorik asit içeren %50 Metanol)

Alınan spektrumlar, beyaz lahana (iç ve dış yapraklar) ekstraktları için en uygun çözücünün %2 hidroklorik asit içeren %50 metanol olduğunu gösteriyorsa da karalahana için en uygun olduğu belirlenen %80 metanol çözücü olarak kullanılmıştır.

Şekil 4.11–4.12’de %80 metanol ile ekstrakte edilmiş beyaz lahana (iç yapraklar) ve beyaz lahana (dış yapraklar) ekstraktlarının kromatogramları gösterilmektedir.



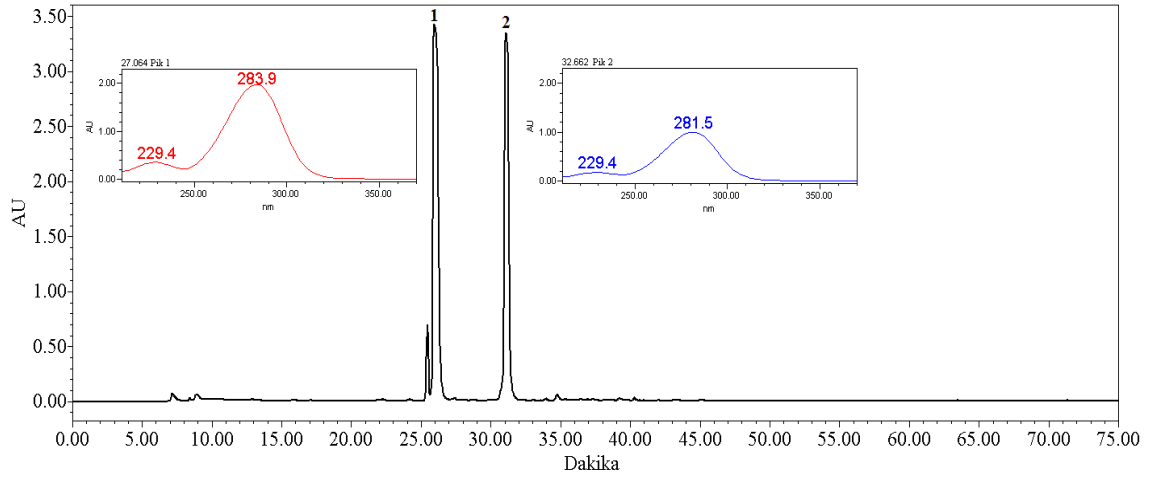
Şekil 4.11: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş beyaz lahana (iç yapraklar) ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı



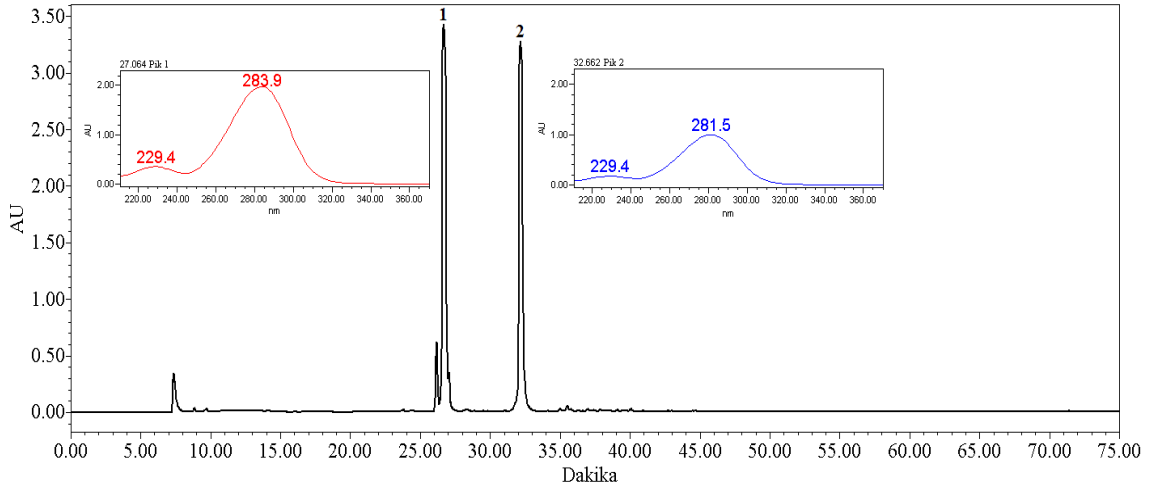
Şekil 4.12: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş beyaz lahana (dış yapraklar) ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı

Ekstrakt kromatogramlarındaki hiçbir pik elimizdeki standartlarla çakışmadığı için belirlenememiştir. Sadece, kromatogramlardaki 1 ve 2 numaralı piklerin izoflavon veya benzoik asit, 3 ve 4 numaralı piklerin ise sırasıyla flavanol ve flavanon grubuna ait bileşikler olduğu PDA spektrumlarından yararlanılarak tahmin edilmektedir.

Şekil 4.13 – 4.14'de beyaz lahana (iç yapraklar) ve beyaz lahana (dış yapraklar) ekstrakt hidrolizatlarının kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.13: Beyaz lahana (iç yapraklar) ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı

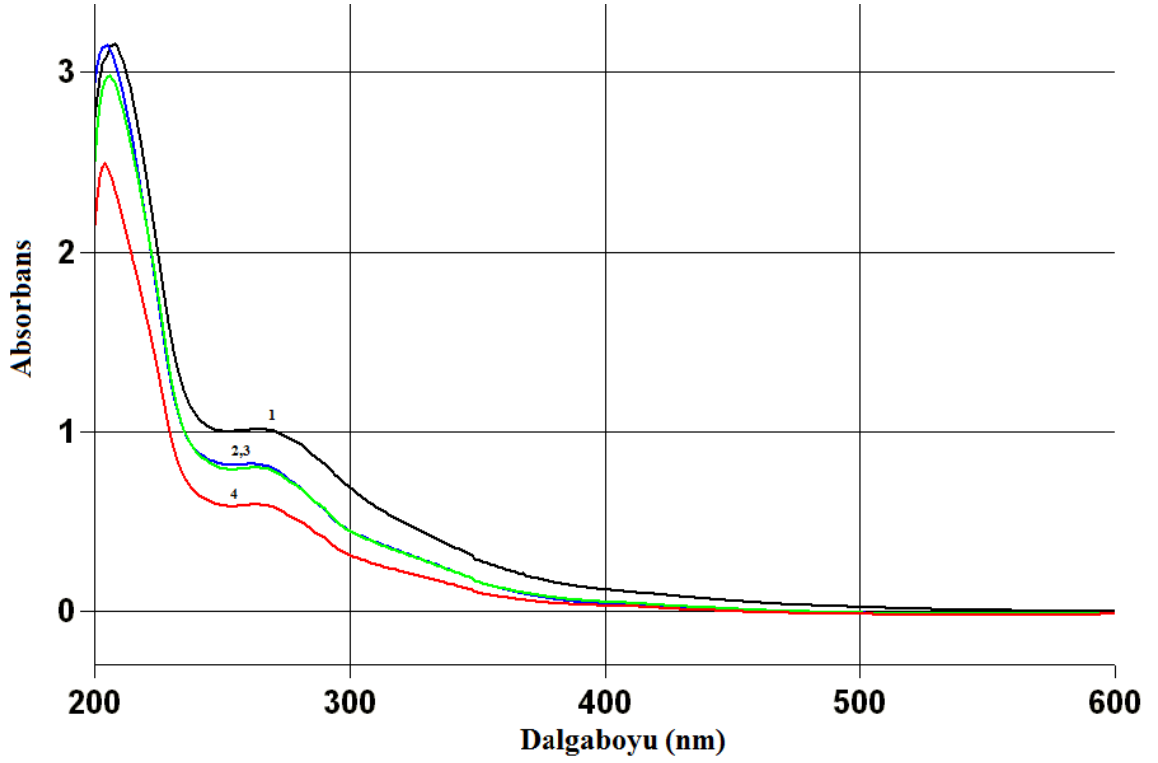


Şekil 4.14: Beyaz lahana (dış yapraklar) ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı

Hidrolizatlara varılması beklenen antioksidan standartlarının eklenmesiyle elde edilen kromatogramlarda pikler çakışmadığı için bu antioksidanların varlığı kanıtlanamadı. Sadece, ekstrakt hidrolizatları kromatogramlarındaki 1 ve 2 numaralı piklerin PDA spektrumlarından yararlanılarak flavanol grubuna ait bileşikler oldukları tahmin edilmektedir.

4.5.3. Brüksel Lahanası

Şekil 4.15'de farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş Brüksel lahanası ekstraktlarının spektrumları görülmektedir.

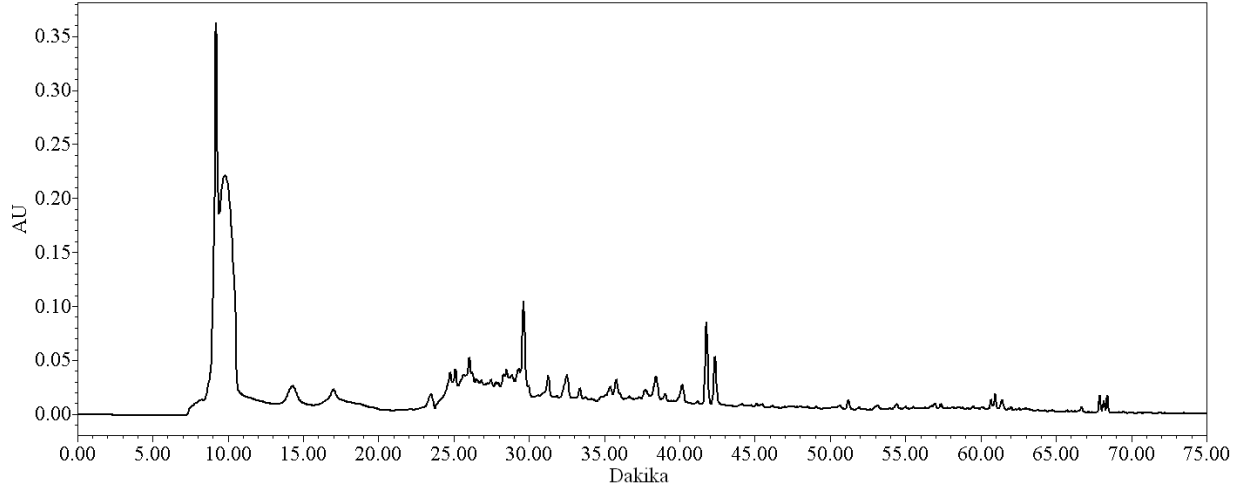


Şekil 4.15: Brüksel lahanası ekstraktlarının spektrumları

(1: % 2 hidroklorik asit içeren %50 Metanol, 2: %50 Metanol, 3: %70 Metanol, 4: %80 Metanol)

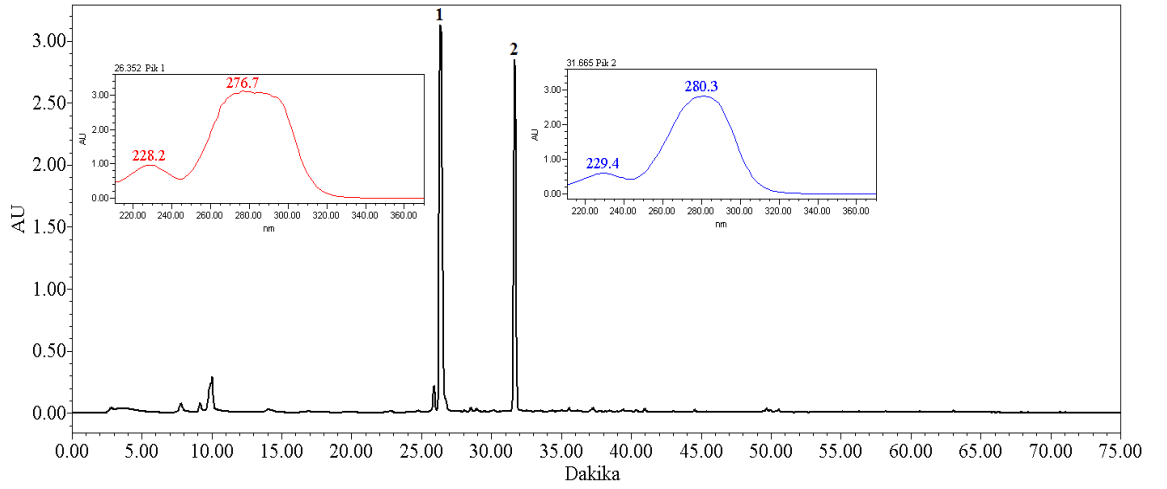
Alınan spektrumlar, Brüksel lahanası ekstraktları için en uygun çözücünün %2 hidroklorik asit içeren %50 metanol olduğunu gösteriyorsa da karalahana için en uygun olduğu belirlenen %80 metanol çözücü olarak kullanılmıştır.

Şekil 4.16'da %80 metanol ile ekstrakte edilmiş Brüksel lahanası ekstraktının kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.16: %80 metanol ile ekstrakte edilmiş Brüksel lahanası ekstraktının 280 nm'deki kromatogramı

Şekil 4.17'de Brüksel lahanası ekstrakt hidrolizatının kromatogramı görülmektedir.

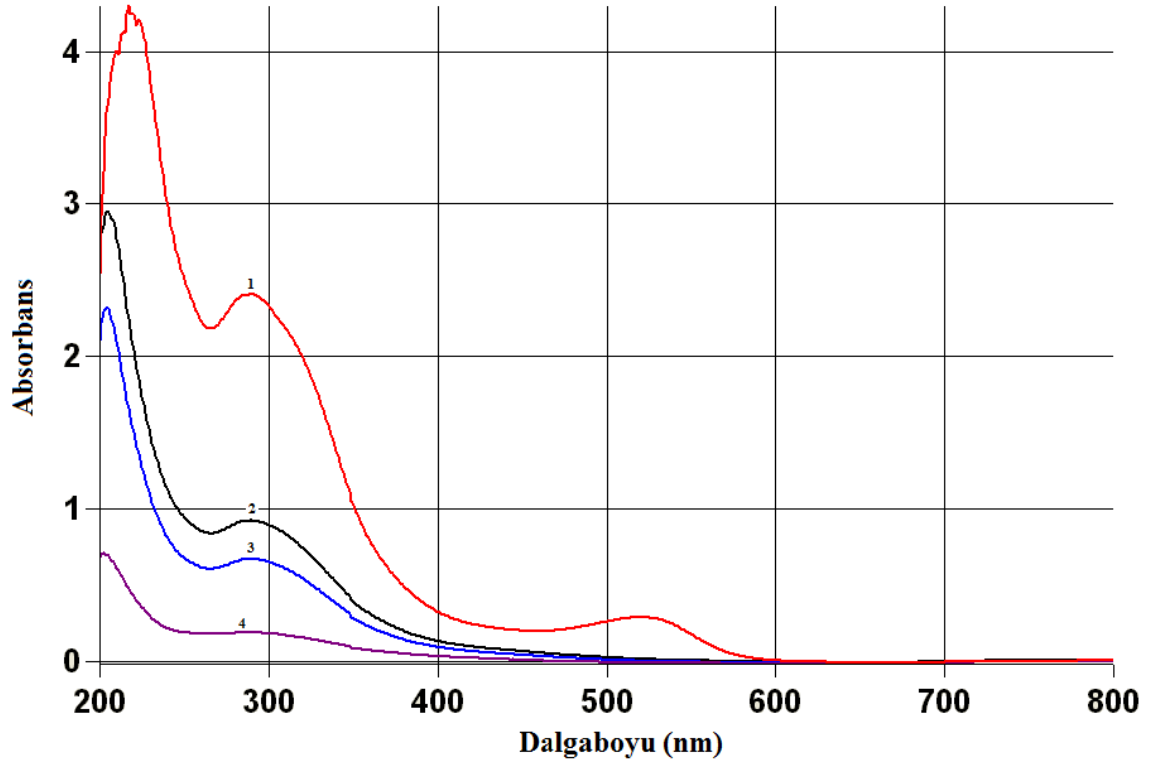


Şekil 4.17: Brüksel lahanası ekstrakt hidrolizatının 280 nm'deki kromatogramı

Ekstrakt ve ekstrakt hidrolizatı kromatogramlarındaki hiçbir pik elimizdeki standartlarla çakışmadığı için belirlenememiştir. Sadece, ekstrakt hidrolizatı kromatogramındaki 1 ve 2 numaralı piklerin PDA spektrumlarından yararlanılarak flavanol grubuna ait bileşikler olduğu tahmin edilmektedir.

4.5.4. Kırmızı Lahana

Şekil 4.18'de farklı çözücülerde ekstrakte edilmiş kırmızı lahanası ekstraktlarının spektrumları görülmektedir.

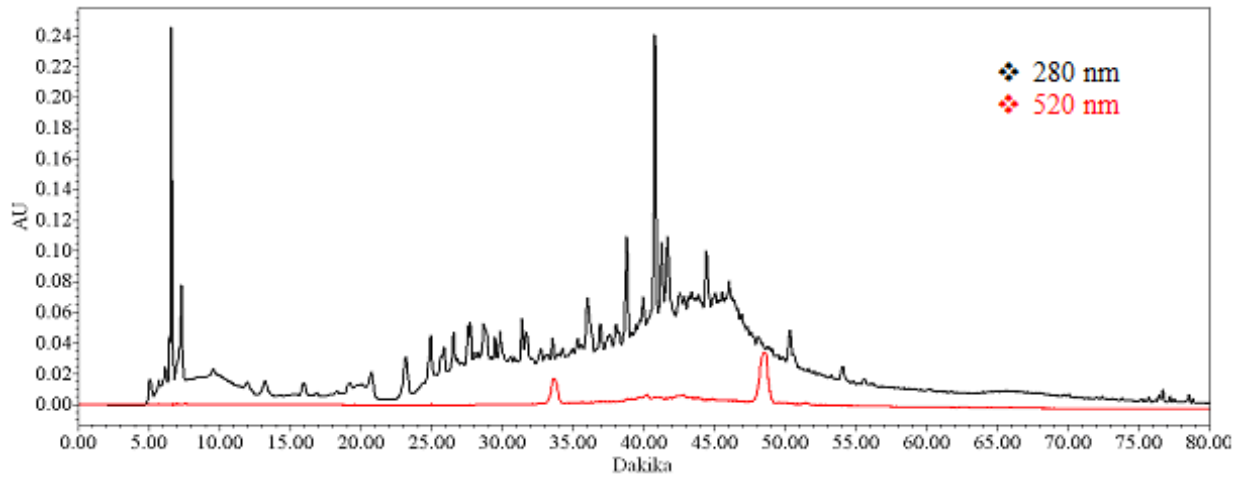


Şekil 4.18: Kırmızı lahana ekstraktlarının spektrumları

(1: % 2 hidroklorik asit içeren %50 Metanol, 2:%50 Metanol, 3:%70 Metanol, 4: %80 Metanol)

Kırmızı lahana ekstraktları için en uygun çözücü oranı, alınan spektrumlarla %2 HCl içeren % 50 metanol olarak belirlendi.

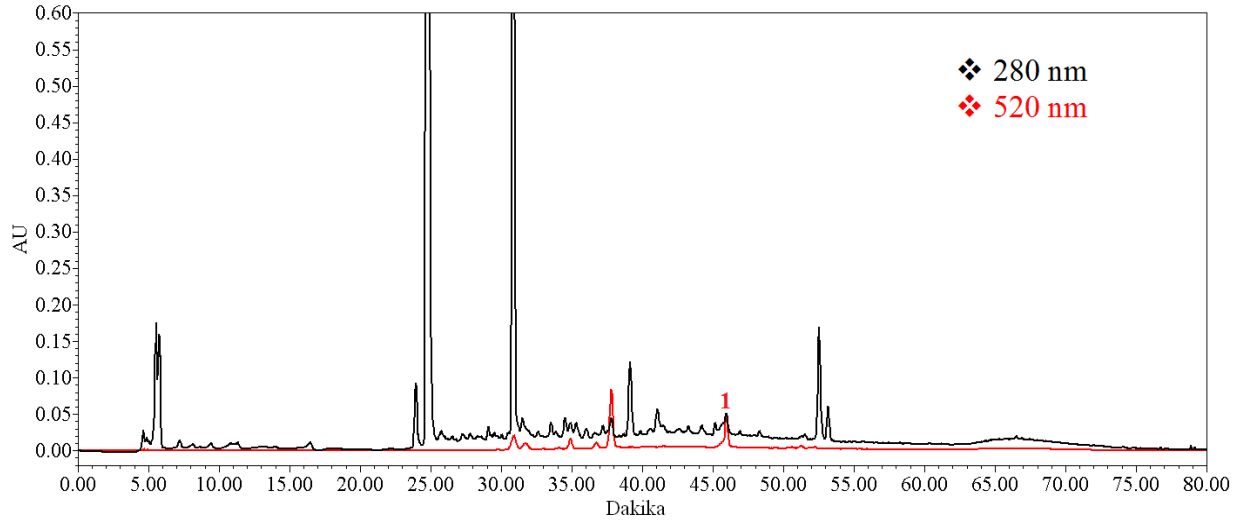
Şekil 4.19’da %2 HCl içeren % 50 metanol ile ekstrakte edilmiş kırmızı lahana ekstraktının 280 ve 520 nm’deki kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.19: %2 HCl içeren % 50 metanol ile ekstrakte edilmiş kırmızı lahana ekstraktının 280 ve 520 nm’deki kromatogramları

Ekstrakt kromatogramlarındaki hiçbir pik elimizdeki standartlarla çakışmadığı için belirlenememiştir.

Şekil 4.20’de kırmızı lahana ekstrakt hidrolizatının 280 ve 520 nm’deki kromatogramları görülmektedir.

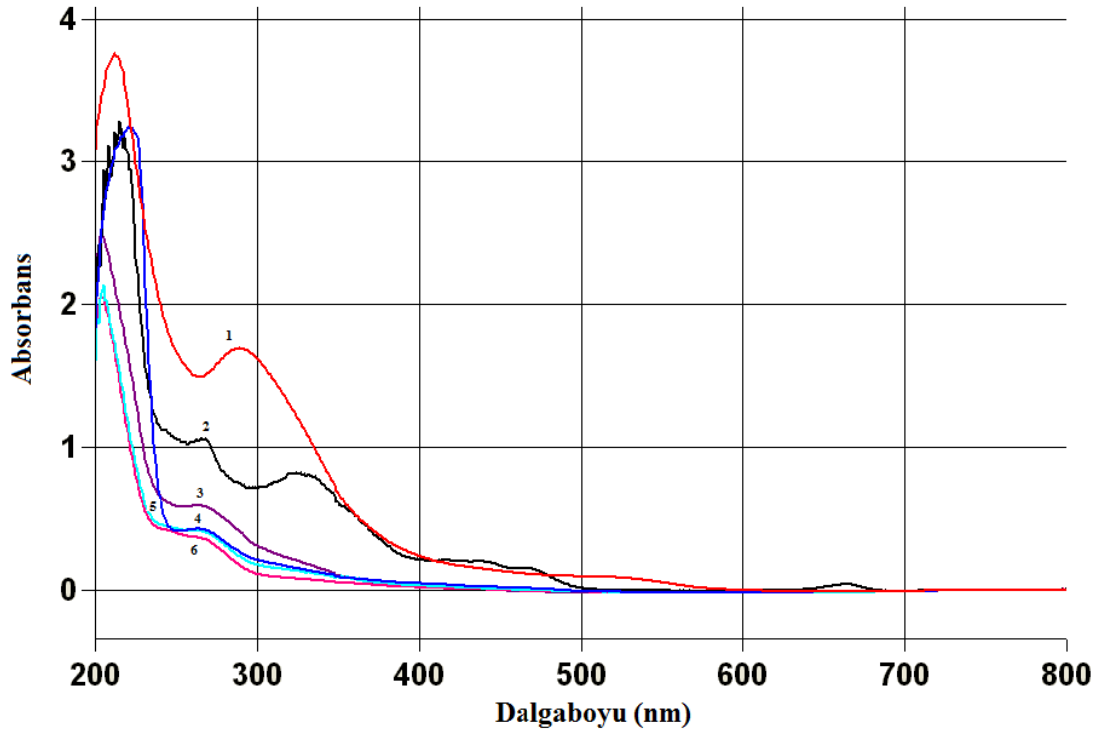


Şekil 4.20: Kırmızı lahana ekstrakt hidrolizatının 280 ve 520 nm’deki kromatogramları

(1: Siyanidin klorür)

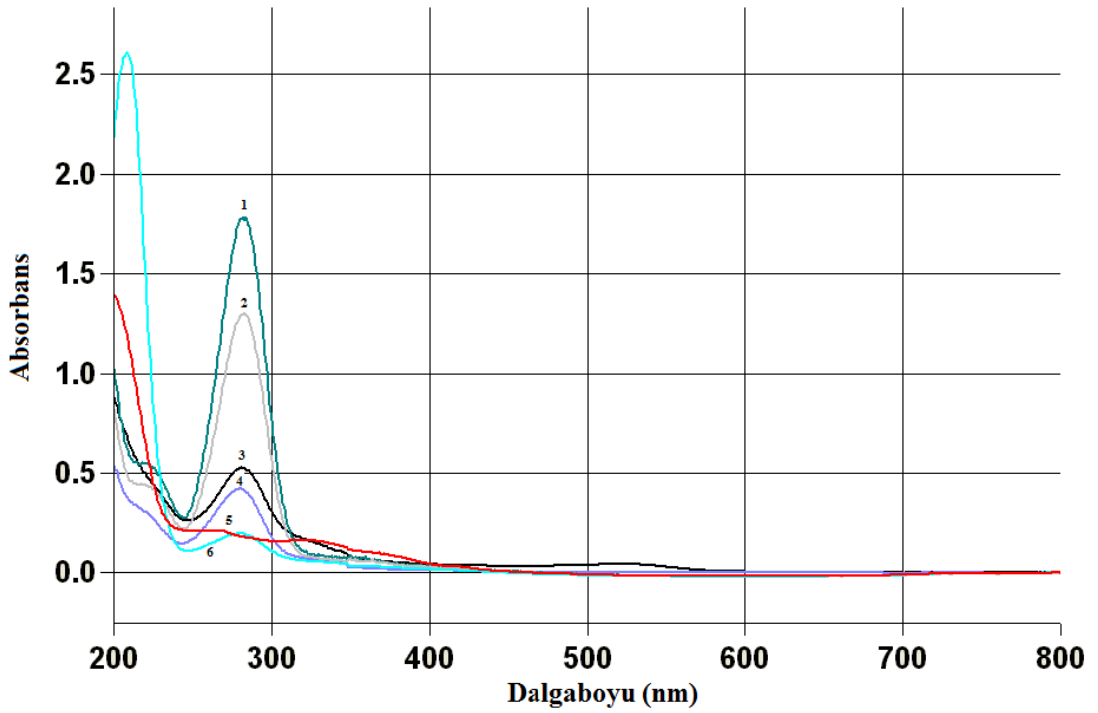
Siyanidin klorür, ekstrakt hidrolizatına yapılan standart ekleme ile belirlenmiştir.

Tüm lahana örneklerinin ekstraktları %80 metanol ile 50 kez, hidrolizatları ise %50 metanol ile 200 kez seyreltilerek spektrumları çizildi.



Şekil 4.21: 50 kez %80 metanol ile seyreltilmiş lahanalar ekstrelerinin spektrumları

(1: Kırmızı lahanalar, 2: Karalahana, 3: Brüksel lahanası, 4: Karalahana sapı, 5: Beyaz lahanalar dış yapraklar, 6: Beyaz lahanalar iç yapraklar)



Şekil 4.22: 200 kez %50 metanol ile seyreltilmiş lahanalar ekstreleri hidrolizatlarının spektrumları

(1: Beyaz lahanalar iç yapraklar, 2: Beyaz lahanalar dış yapraklar, 3: Kırmızı lahanalar, 4: Brüksel lahanası, 5: Karalahana, 6: Karalahana sapı)

Spektrumlardaki pik ve omuzlardan çalışılan lahana türlerinin hangi tür fenolik bileşikleri daha çok içerdiği yorumu yapılabilir. Şöyle ki; beyaz lahana (iç ve dış yaprakların ikiside) 280 nm'de maksimum absorbans gösterdiği için, keza Brüksel lahanası, kırmızı lahana ve karalahana sapı ekstraktları da 280 nm'de maksimum absorbans gösterdiği için flavanol ve flavanon grubu bileşiklerin varlığı düşünülmektedir. Kırmızı lahananın 520 nm civarındaki omuzu antosiyaninlerin varlığını göstermektedir. Karalahana yaprak ekstraktında daha belirgin ama sap ve Brüksel lahanası ekstraktlarında da gözlenen 330 nm civarındaki omuz (karalahana ekstraktı için pik) hidrokisisinnamik asitlerin ve flavon grubu bileşiklerin varlığını göstermektedir. Karalahana yaprak ekstraktında 440 ve 470 nm'deki omuzlar karotenoidlerin varlığını, 670 nm'deki geniş pik ise klorofillerin varlığını düşündürmektedir.

4.5.5. Lahana Örneklerinin Toplam Antioksidan Kapasiteleri

4.5.5.1. CUPRAC ve ABTS/HRP Yöntemleri İle

Tablo 4.6' da lahana ekstraktlarının ve hidrolizatlarının CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleri ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri görülmektedir.

Tablo 4.6: Lahana ekstraktlarının CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleri ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g⁻¹ kuru madde)

Lahana Örnekleri	CUPRAC _N	CUPRAC _i	ABTS/HRP
Beyaz Lahana (İç yapraklar)	0.021±0.0004	0.061±0.0019	0.017±0.0002
Beyaz Lahana (Dış yapraklar)	0.032±0.0004	0.098±0.0005	0.030±0.0001
Beyaz Lahana (İç) Hidrolizati	0.043±0.0013	0.102±0.0014	0.044±0.0035
Beyaz Lahana (Dış) Hidrolizati	0.042±0.0013	0.101±0.0027	0.039±0.0033
Karalahana Yapağı	0.058±0.0013	0.084±0.0018	0.078±0.0040
Karalahana Sapı	0.022±0.0001	0.045±0.0005	0.022±0.0014
Karalahana Yaprak Hidrolizati	0.082±0.0030	0.128±0.0065	0.078±0.0033
Karalahana Sapı Hidrolizati	0.017±0.0001	0.035±0.0015	0.010±0.0005
Kırmızı Lahana	0.168±0.0007	0.342±0.0021	0.189±0.0003
Kırmızı Lahana Hidrolizati	0.201±0.0072	0.348±0.0212	0.171±0.0032
Brüksel Lahanası	0.034±0.0004	0.063±0.0020	0.028±0.0012
Brüksel Lahanası Hidrolizati	0.049±0.0017	0.109±0.0033	0.045±0.0021

4.5.6. Lahana Örneklerinin Toplam Flavonoid Derişimleri

4.5.6.1. AlCl₃/CH₃COOK ve AlCl₃/NaNO₂ Yöntemleri İle

Tablo 4.7' de lahana ekstraktlarının ve hidrolizatlarının AlCl₃/CH₃COOK ve AlCl₃/NaNO₂ yöntemleri ile bulunmuş kuersetin eşdeğeri cinsinden toplam flavonoid derişimleri görülmektedir.

Tablo 4.7: Lahana ekstraktlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ ve $AlCl_3/NaNO_2$ yöntemleri ile bulunmuş toplam flavonoid derişimleri (mmol kuersetin g^{-1} kuru madde)

Lahana Örnekleri	$AlCl_3/CH_3COOK$	$AlCl_3/NaNO_2$
Beyaz Lahana (İç yapraklar)	0.00066±0.00010	0.00070±0.00007
Beyaz Lahana (Dış yapraklar)	0.00058±0.00004	0.00085±0.00010
Beyaz Lahana (İç) Hidrolizati	0.00219±0.00001	0.00473±0.00059
Beyaz Lahana (Dış) Hidrolizati	0.00196±0.00001	0.00554±0.00046
Karalahana Yaprığı	0.0068±0.00026	0.01147±0.00309
Karalahana Sapı	0.00102±0.00002	*
Karalahana Yaprak Hidrolizati	0.00453±0.00035	0.00856±0.00003
Karalahana Sapı Hidrolizati	0.00104±0.00011	0.00176±0.00050
Kırmızı Lahana	0.00507±0.00053	0.03202±0.00085
Kırmızı Lahana Hidrolizati	0.00839±0.00007	0.02779±0.00058
Brüksel Lahanası	0.00181±0.00015	0.00328±0.00049
Brüksel Lahanası Hidrolizati	0.00254±0.00004	0.00700±0.00071

* Bulanıklık oluşması nedeniyle belirlenemedi.

$AlCl_3/NaNO_2$ yöntemi ile bulunan sonuçlar, diğer yonteme göre daha yüksektir. Çünkü $AlCl_3/CH_3COOK$ yöntemi tüm flavonoidlere değil, sadece flavon ve flavonol gurubu bileşiklere yanıt verirken $AlCl_3/NaNO_2$ yöntemi, flavonoid olmayan fenolik bileşiklere (örneğin, klorojenik asit ve kafeik asit) de yanıt vermektedir [87].

4.5.7. Kırmızı Lahananın Toplam Antosiyenin Derişimi

4.5.7.1. Farklı pH Yöntemi İle

Tablo 4.8' de kırmızı lahana ekstraktının ve hidrolizatının farklı pH yöntemi ile bulunmuş siyanidin-3-glukozit eşdeğeri cinsinden toplam antosiyenin derişimleri görülmektedir.

Tablo 4.8: Kırmızı lahana ekstraktının ve hidrolizatının farklı pH yöntemi ile bulunmuş toplam antosiyanin derişimi (mmol g^{-1} siyanidin-3-glukozit)

Lahana Örnekleri	Farklı pH Yöntemi
Kırmızı Lahana	0.003
Kırmızı Lahana Hidrolizatı	0.006

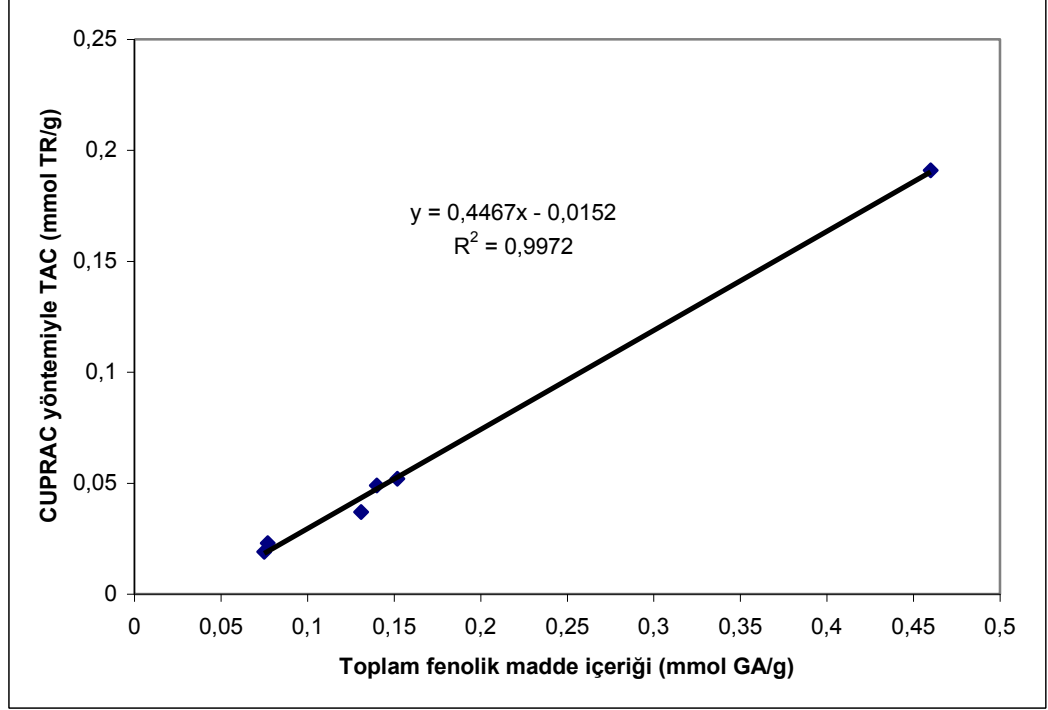
4.5.8. Lahana Ekstraktlarının Toplam Fenol İçerikleri

Tablo 4.9’da lahana ekstraktlarının Folin-Ciocalteu yöntemi ile bulunmuş gallik asit eşdeğeri cinsinden toplam fenol derişimleri görölmektedir.

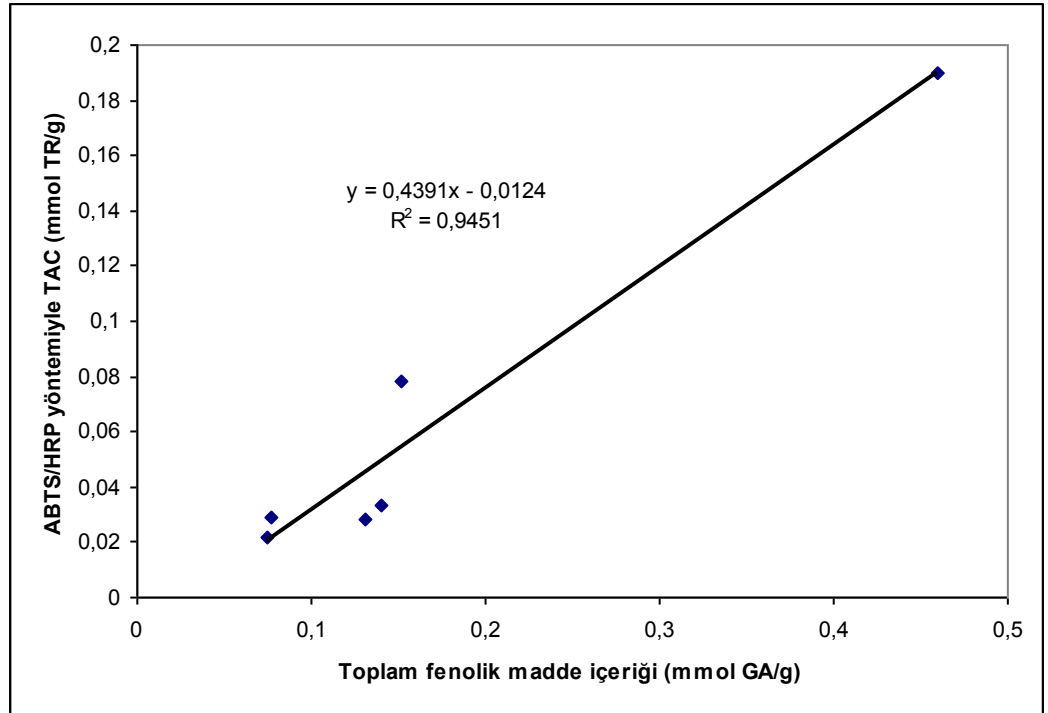
Tablo 4.9: Lahana ekstraktlarının Folin-Ciocalteu yöntemi ile bulunmuş toplam fenol derişimleri (mmol g^{-1} gallik asit)

Lahana Örnekleri	Folin-Ciocalteu Yöntemi
Beyaz lahana (iç yapraklar)	0.141±0.0011
Beyaz lahana (dış yapraklar)	0.077±0.0029
Karalahana	0.152±0.0138
Karalahana sapı	0.076±0.0011
Kırmızı lahana	0.461±0.0254
Brüksel lahanası	0.131±0.0022

4.5.9. Lahana Örneklerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Toplam Fenol İçerikleri İle Uyumu

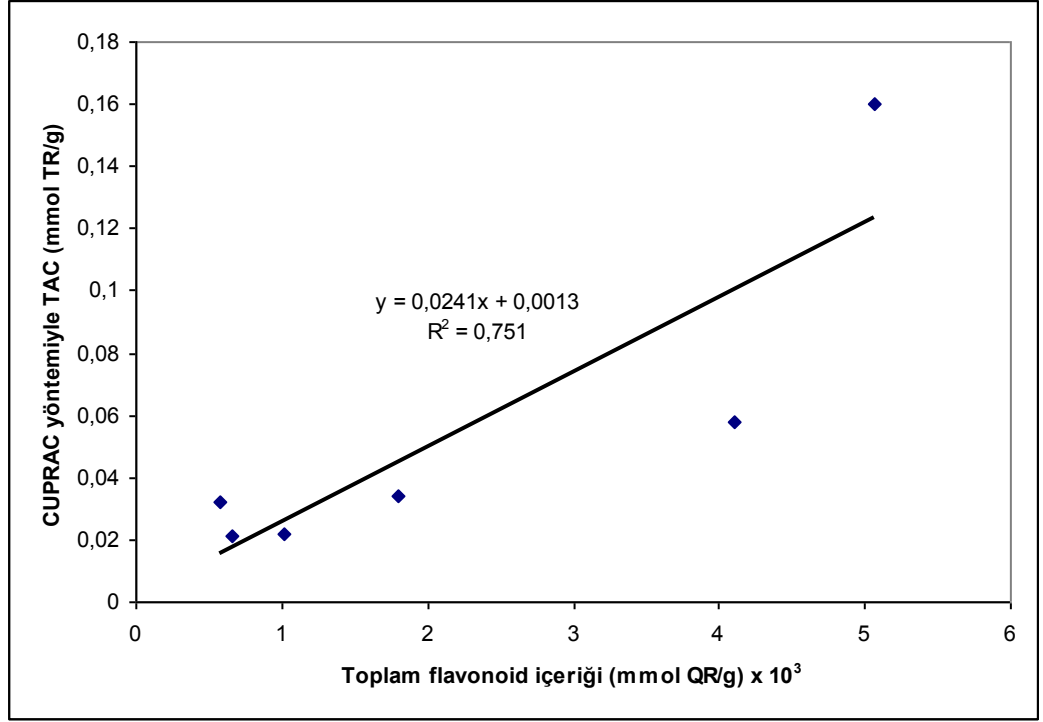


Şekil 4.23: Lahana ekstraktlarının Folin-CUPRAC korelasyonu

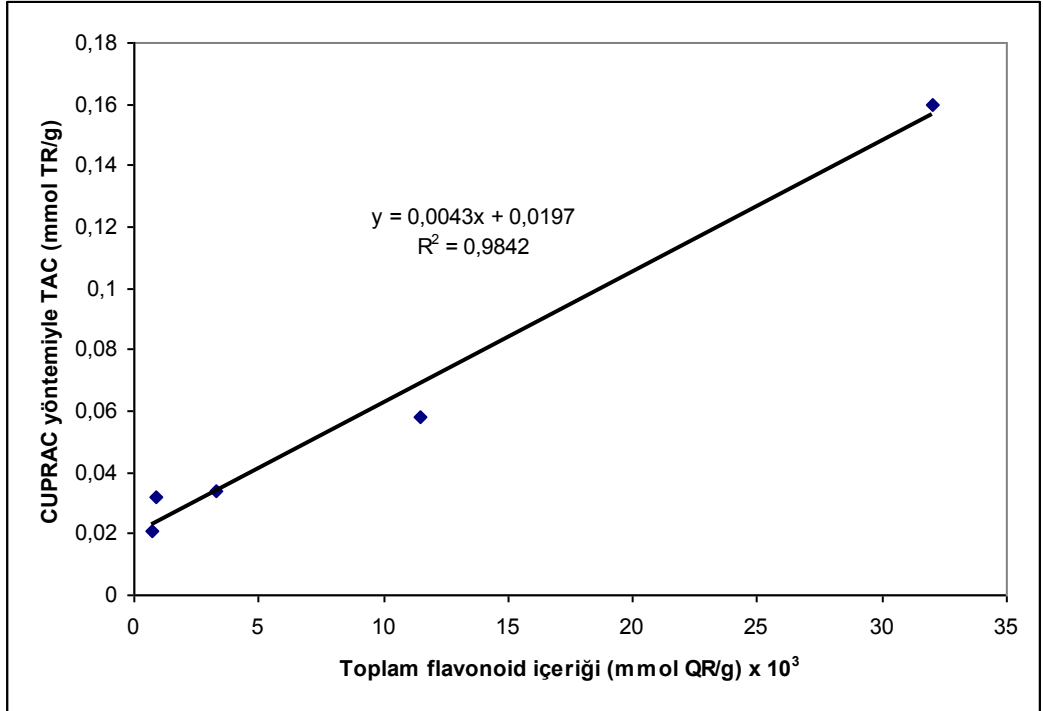


Şekil 4.24: Lahana ekstraktlarının Folin-ABTS korelasyonu

4.5.10. Lahana Örneklerinin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Toplam Flavonoid İçerikleri İle Uyumu

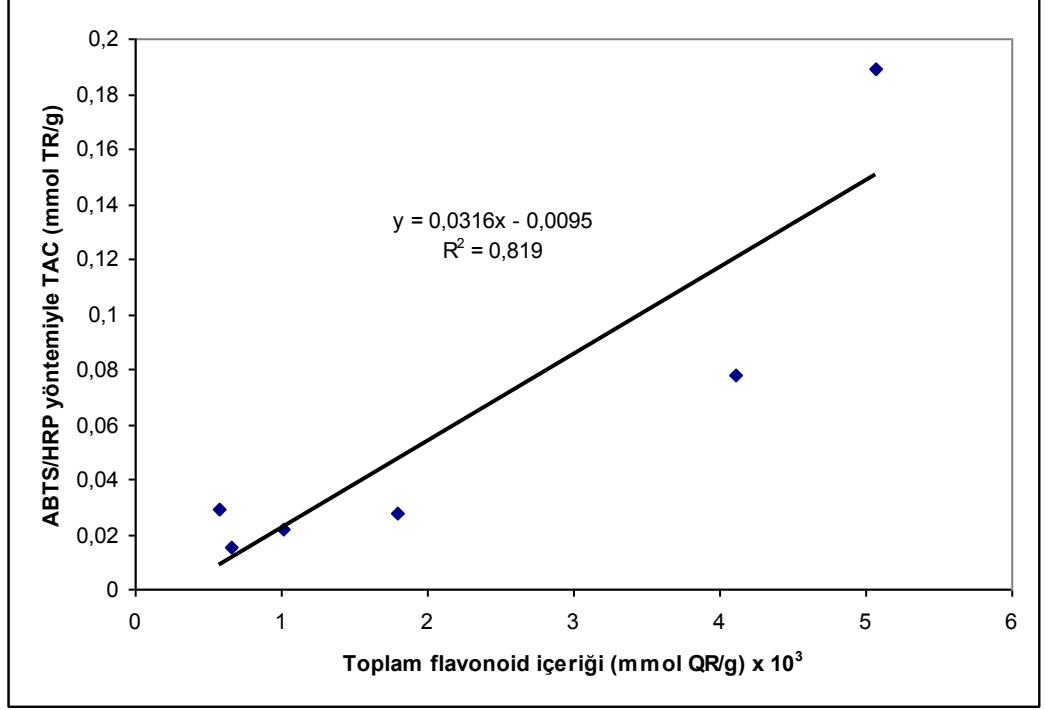


Şekil 4.25: Lahana ekstraktlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ -CUPRAC korelasyonu

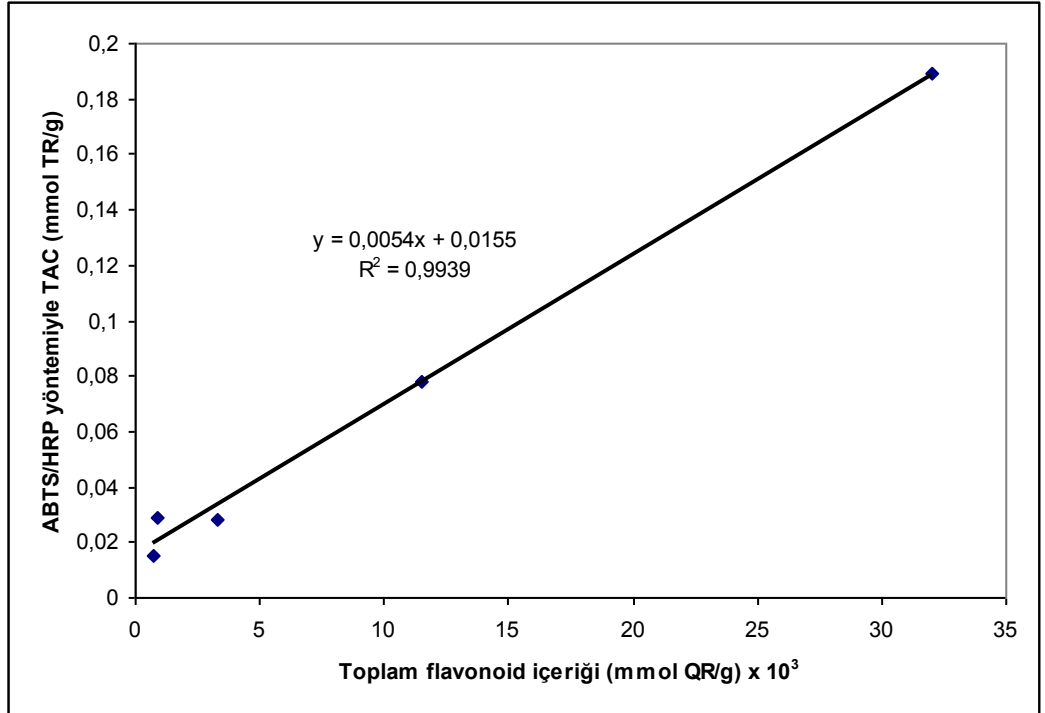


Şekil 4.26: Lahana ekstraktlarının $AlCl_3/NaNO_2$ -CUPRAC korelasyonu

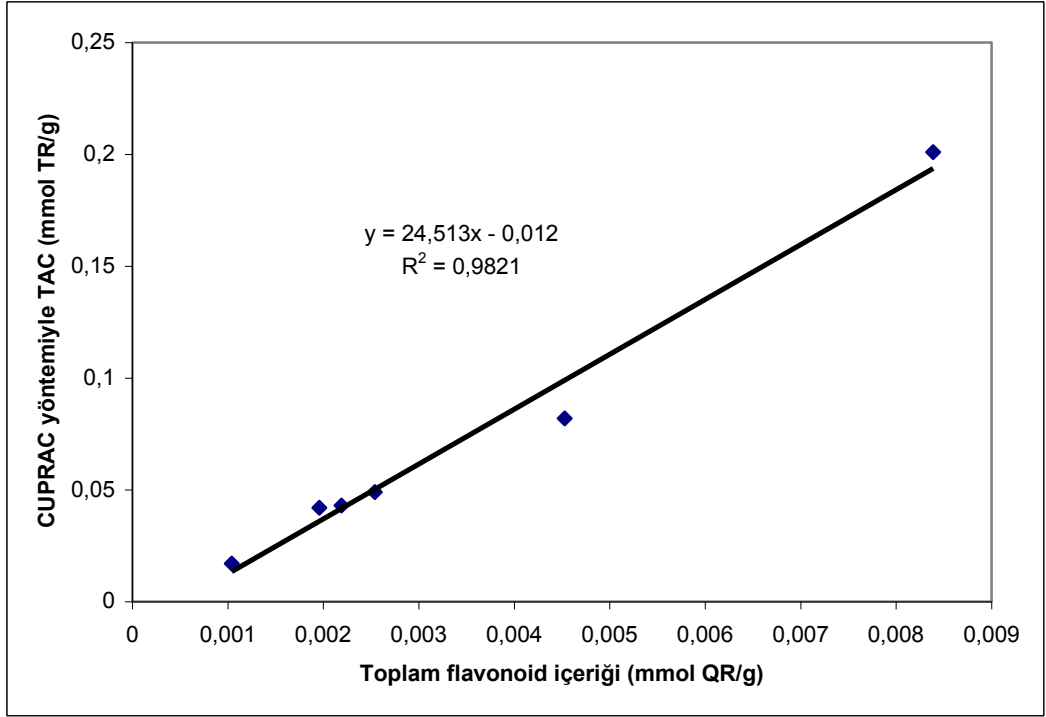
TAC ile toplam flavonoid korelasyonunun $\text{AlCl}_3/\text{CH}_3\text{COOK}$ yöntemi ile daha düşük bulunması daha önce bahsedildiği gibi yöntemin tüm flavonoidleri yansıtmamasına atfedilebilir.



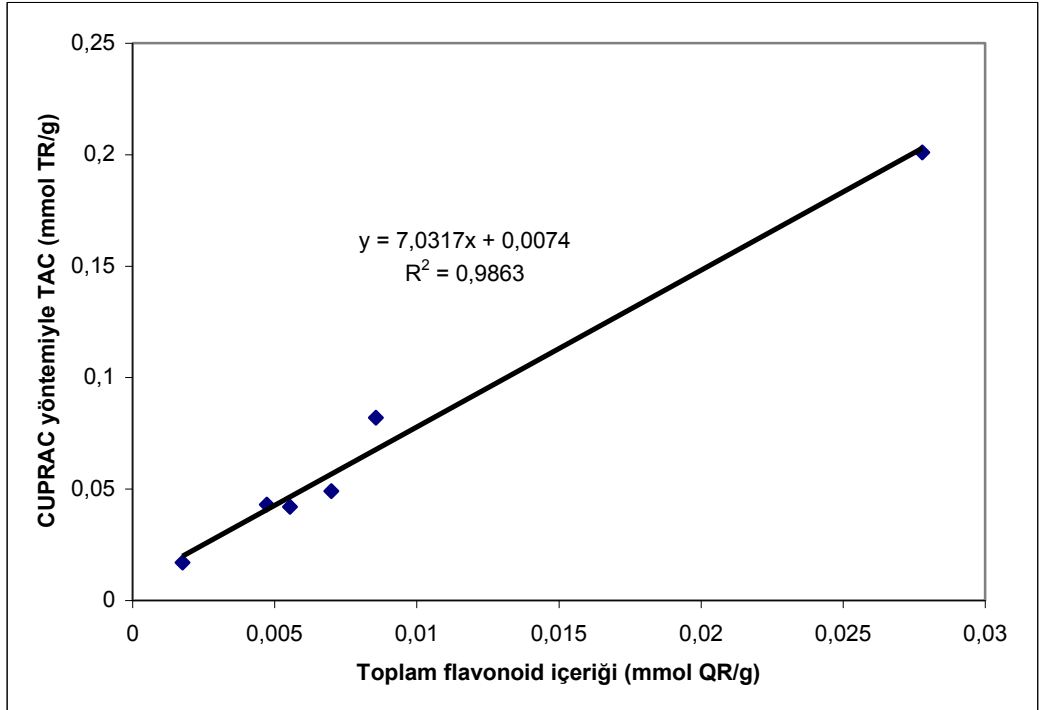
Şekil 4.27: Lahana ekstraktlarının $\text{AlCl}_3/\text{CH}_3\text{COOK}$ -ABTS korelasyonu



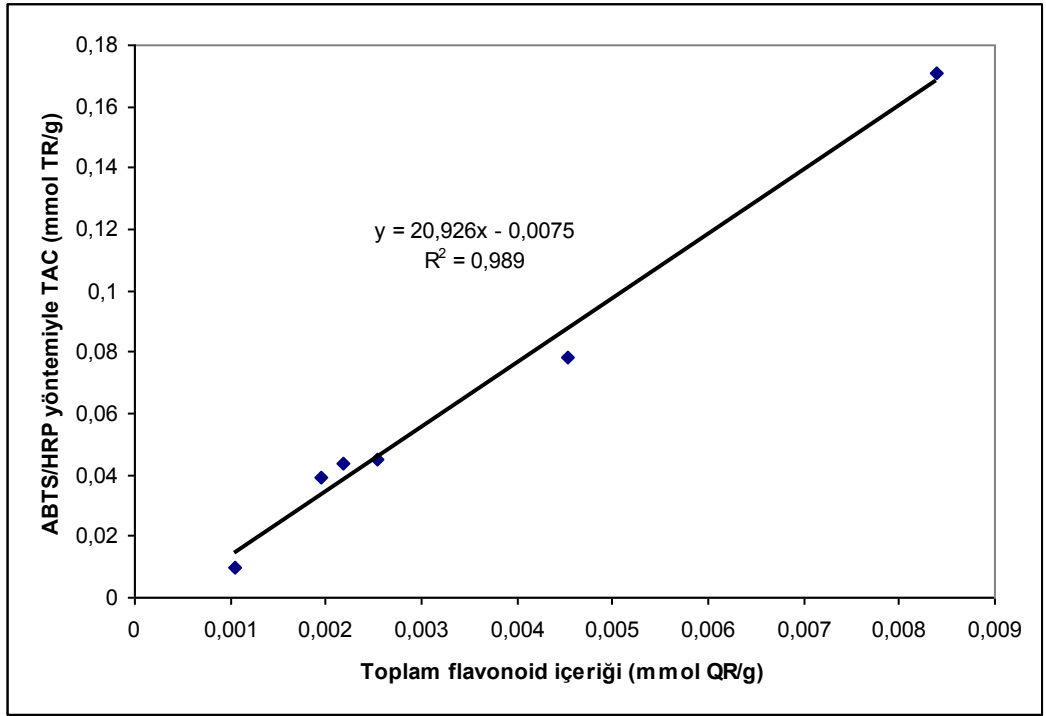
Şekil 4.28: Lahana ekstraktlarının $\text{AlCl}_3/\text{NaNO}_2$ -ABTS korelasyonu



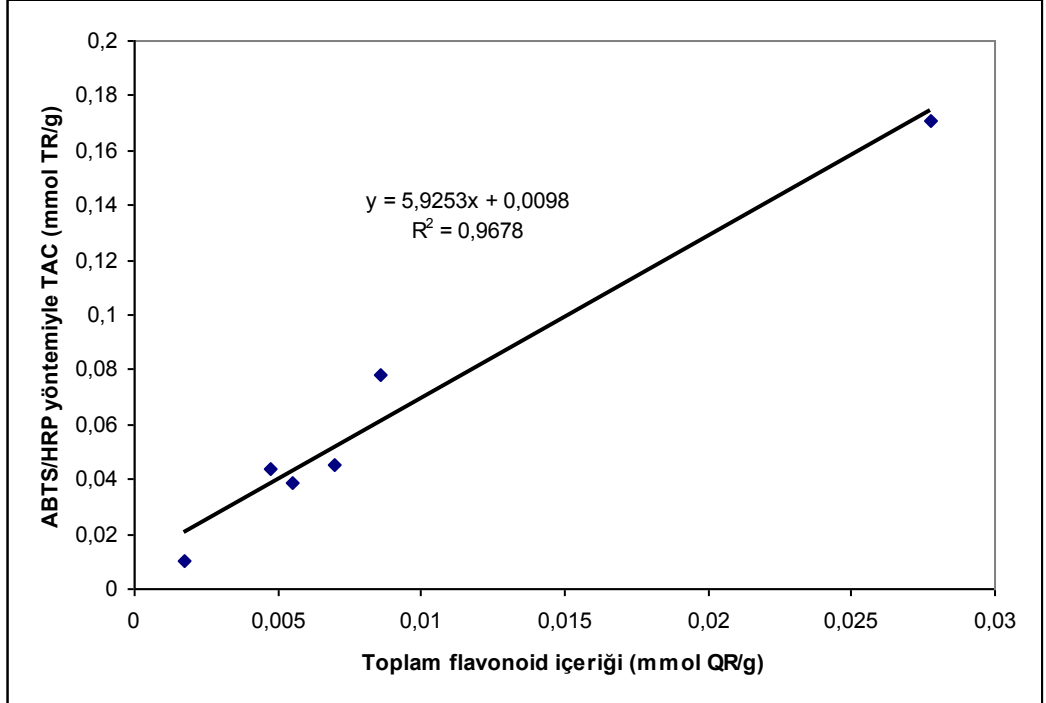
Şekil 4.29: Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ -CUPRAC korelasyonu



Şekil 4.30: Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/NaNO_2$ -CUPRAC korelasyonu



Şekil 4.31: Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ -ABTS korelasyonu



Şekil 4.32: Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/NaNO_2$ -ABTS korelasyonu

4.5.11. Birleştirilmiş HPLC-CUPRAC ve HPLC-ABTS Yöntemleri İle Toplam Antioksidan Kapasite

Birleştirilmiş HPLC-CUPRAC ve HPLC-ABTS yöntemleri sadece karalahana hidrolizatına uygulanabilmektedir. Çünkü diğer kromatogramlardaki pikler standart yetersizliği nedeniyle belirlenememiştir. Tablo 4.10'da karalahana hidrolizatının birleştirilmiş HPLC-CUPRAC ve HPLC-ABTS yöntemleri ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri görülmektedir.

Tablo 4.10: Karalahana hidrolizatının birleştirilmiş HPLC-CUPRAC ve HPLC-ABTS yöntemleri ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri (mmol troloks g⁻¹) ve HPLC ile belirlenebilen toplam antioksidan kapasite yüzdeleri

Örnek	HPLC-CUPRAC _N	HPLC-CUPRAC _I	HPLC-ABTS
Karalahana Hidrolizatı	0.00095 (%6)	0.00129 (%1)	0.00084 (%1)

Lahana örneklerinde, aslında pek çok sebze, flavonoidlerin glikozitleri ve glikozitlerinin de çeşitli fenolik esterlerle esterleşmiş halleri bulunduğu için [75] ekstraktlarda da hidrolizatlarda da bu bileşenleri belirlemek zordur. Bu sorun çalışmamızda da yaşanmış olup sadece karalahana hidrolizatındaki üç bileşen belirlenebildiğinden birleştirilmiş HPLC-spektrofotometrik yöntemler, sadece bu örneğe ve çok düşük bir TAC yüzdesiyle uygulanabilmektedir. Kromatogramlar, sadece PDA dedektörle elde edilen spektrumlardan yararlanılarak en fazla bulunan bileşenlerin hangi fenolik bileşik grubundan olabileceğini önermek amacıyla kullanılmıştır.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kış aylarında marketlerden temin edilen kırmızı lahana, Brüksel lahanası, karalahana (yaprakları ve sapı) ve beyaz lahana (iç ve dış yaprakları) örneklerinin toplam antioksidan kapasitelerinin, toplam fenol, toplam flavonoid ve toplam antosiyanin içeriklerinin ve antioksidan özelliğe sahip temel bileşiklerinin araştırıldığı bu çalışmada, değişik yöntemlerle elde edilen sonuçlar mevcut ve sınırlı sayıdaki standart antioksidan maddelerle karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada toplam antioksidan kapasite tayini için, spektrofotometrik olarak CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleri seçilmiştir.

Çeşitli metanol-su yüzdeleri ile yapılan ön denemeler sonucunda karalahana, beyaz lahana ve Brüksel lahanası örnekleri için %80 metanol çözeltisi ile, kırmızı lahana için ise % 2 HCl içeren % 50 metanol çözeltisi ile 110 dakika ekstraksiyon işlemi uygulamanın uygun olduğuna karar verilmiştir. Literatürde metanolün koruyucu rolü olduğu ve fenolik bileşiklerin fenoloksidaz gibi enzimlerle yükseltgenmesini engellediği de belirtilmektedir [88]. Hazırlanan bütün örnekler 0.45 µm'lik filtrelerden süzöldükten sonra ve gerektiği durumlarda seyreltme yapılarak kullanılmıştır.

Tablo 4.6'da görüldüğü gibi çalışılan lahana örnekleri ekstraktlarında CUPRAC yöntemi ile belirlenmiş olan toplam antioksidan kapasite sıralaması;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Brüksel lahanası > Beyaz lahana (dış yapraklar) > Karalahana sapı > Beyaz lahana (iç yapraklar) olarak ;

ABTS/HRP yöntemine göre belirlenmiş olan antioksidan kapasite sıralaması ise;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Beyaz lahana (dış yapraklar) > Brüksel lahanası > Karalahana sapı > Beyaz lahana (iç yapraklar) olarak elde edilmiştir.

Lahana ekstraktlarında belirlediğimiz toplam antioksidan kapasite değerleriyle literatürdeki değerlerin karşılaştırılması tablo 5.1’de gösterilmiştir.

Tablo 5.1: Lahana ekstraktlarında toplam antioksidan kapasite çalışmalarının karşılaştırılması

Referans	77 ABTS/AAPH (VCEAC) (mg/100 g taze örnek)	78 DPPH (EC ₅₀ ,mg kuru ağırlık/mg)	81 ABTS/TEAC (mmol TR/g kuru madde)	Çalışmamız (mmol TR/g kuru madde)	
				CUPRAC	ABTS/HRP
Toplam Antioksidan Kapasite (TAC)	695.6±30.5 (Kırmızı lahana)	370.67±13.576 (Beyaz lahana)	0.015 (Beyaz lahana)	0.021±0.0004 (Beyaz lahana iç yapraklar)	0.017±0.0002 (Beyaz lahana iç yapraklar)
	111.3±3.0 (Yeşil lahana)			0.032±0.0004 (Beyaz lahana dış yapraklar)	0.030±0.0001 (Beyaz lahana dış yapraklar)
	93.4±1.5 (Napa lahanası)	339.57±22.848 (Brüksel lahanası)		0.168±0.0007 (Kırmızı lahana)	0.189±0.0003 (Kırmızı lahana)
	210.0±8.9 (Savoy lahanası)			0.034±0.0004 (Brüksel lahanası)	0.028±0.0012 (Brüksel lahanası)
				0.058±0.0013 (Karalahana)	0.078±0.0040 (Karalahana)

Çalışmamızda bulunan değer Ciska ve arkadaşlarının beyaz lahanada belirledikleri değer ile yaklaşıktır. Diğer iki çalışmadaki değerler farklı birimlerle verildiği için sağlıklı bir karşılaştırma yapabilmek mümkün değildir.

Tablo 4.9’da görüldüğü gibi çalışılan lahana örnekleri ekstraktlarında Folin-Ciocalteu yöntemi ile belirlenmiş olan toplam fenol derişimleri sıralaması;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Beyaz lahana (iç yapraklar) > Brüksel lahanası > Beyaz lahana (dış yapraklar) > Karalahana sapı olarak belirtilebilir.

Lahana ekstraktlarında belirlediğimiz toplam fenol değerleriyle literatürdeki değerlerin karşılaştırılması tablo 5.2’de gösterilmiştir.

Tablo 5.2: Lahana ekstraktlarında toplam fenol çalışmalarının karşılaştırılması

Referans	77	78	Çalışmamız
	Folin (mg gallik asit/100 g taze örnek)	Folin-Ciocalteu (mg gallik asit/g kuru ağırlık)	(mg gallik asit /g kuru ağırlık)
			Folin-Ciocalteu
Toplam Fenol	393.1±10.8(Kırmızı lahana)		23.99±0.18 (Beyaz lahana iç yapraklar)
	97.8±0.8(Yeşil lahana)	5.31±0.906 (Beyaz lahana)	13.10±0.49 (Beyaz lahana dış yapraklar)
	75.1±2.2(Napa lahanası)	8.10±0.219 (Brüksel lahanası)	22.29±0.39(Brüksel lahanası)
	178.7±3.2(Savoy lahanası)		78.43±4.33(Kırmızı lahana)
			25.86±2.55(Karalahana)

Sonuçlarımız Heimler ve arkadaşlarının verdiği değerlerle karşılaştırıldığında daha yüksektir.

Lahana örneklerinin toplam antioksidan kapasitelerinin toplam fenolik içerikleri ile uyumu, beklendiği gibi çok yüksektir (korelasyon katsayıları, CUPRAC ve ABTS yöntemleri için sırasıyla 0.9972 ve 0.9451’dir).

Tablo 4.7’de görüldüğü gibi çalışılan lahana örnekleri ekstraktlarında $AlCl_3/CH_3COOK$ yöntemi ile belirlenmiş olan toplam flavonoid derişimleri sıralaması;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Brüksel lahanası > Karalahana sapı > Beyaz lahana (iç yapraklar) > Beyaz lahana (dış yapraklar) olarak ;

$AlCl_3/NaNO_2$ yöntemine göre belirlenmiş olan toplam flavonoid sıralaması ise;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Brüksel lahanası > Beyaz lahana (dış yapraklar) > Beyaz lahana (iç yapraklar) olarak belirtilebilir.

Lahana ekstraktlarında belirlediğimiz toplam flavonoid değerleriyle literatürdeki değerlerin karşılaştırılması tablo 5.3’de gösterilmiştir.

Tablo 5.3: Lahana ekstraktlarında toplam flavonoid çalışmalarının karşılaştırılması

Referans	77	78	Çalışmamız		
	AlCl ₃ /NaNO ₂ (mg kateşin/100 g taze örnek)	AlCl ₃ /NaNO ₂ (mg kateşin/g kuru ağırlık)	AlCl ₃ /NaNO ₂ (mg kateşin/g kuru ağırlık)	AlCl ₃ /NaNO ₂ (mg QR/g kuru ağırlık)	AlCl ₃ /KAc (mg QR/g kuru ağırlık)
Toplam Flavonoid	108.1±9.3 (Kırmızı lahana)	1.98±0.067 (Beyaz lahana)	0.20±0.005 (Beyaz lahana iç yapraklar)	0.21±0.01 (Beyaz lahana iç yapraklar)	0.19±0.03 (Beyaz lahana iç yapraklar)
	3.9±0.4 (Yeşil lahana)		0.21±0.007 (Beyaz lahana dış yapraklar)	0.26±0.03 (Beyaz lahana dış yapraklar)	0.174±0.01 (Beyaz lahana dış yapraklar)
	4.5±0.3 (Napa lahanası)	3.07±0.262 (Brüksel lahanası)	0.56±0.003 (Brüksel lahanası)	1.00±0.01 (Brüksel lahanası)	0.54±0.04 (Brüksel lahanası)
	8.2±0.4 (Savoy lahanası)		2.74±0.22 (Kırmızı lahana)	9.67±0.26 (Kırmızı lahana)	1.40±0.15 (Kırmızı lahana)
			1.44±0.08 (Karalahana)	3.47±0.30 (Karalahana)	2.16±0.08 (Karalahana)

AlCl₃/NaNO₂ yöntemiyle bulunan değerlerin yüksek olması toplam flavonoid yöntemlerinin yetersizliğinden kaynaklanmaktadır. AlCl₃/CH₃COOK yöntemi, tüm flavonoidlere değil, flavon ve flavonollere yanıt verirken AlCl₃/NaNO₂ yöntemi flavonoid olmayan fenolik bileşiklerin bazılarında (örneğin klorojenik asit ve kafeik asit) da yanıt vermektedir [87].

Sonuçlarımız, Heimler ve arkadaşlarının verdiği değerlerle karşılaştırıldığında, daha düşüktür.

Lahana örneklerinin toplam antioksidan kapasitelerinin toplam flavonoid içerikleri ile uyumu da yüksektir. AlCl₃/NaNO₂ yöntemi ile bulunan toplam flavonoid içerikleri ile CUPRAC yöntemi ile bulunan toplam antioksidan kapasiteler arasında korelasyon

katsayısı 0.9842 olup ABTS yöntemi ile bulunan toplam antioksidan kapasiteler için bulunan değer de buna çok yakındır (0.9939). $AlCl_3/CH_3COOK$ yöntemi ile bulunan korelasyon katsayıları ise daha düşüktür (sırasıyla 0.751 ve 0.819). Bu sonuç, daha önce bahsettiğimiz gibi yöntemin tüm flavonoidlere duyarlı olmaması nedeniyle beklenen bir durumdur.

Lahana ekstraktlarında bulunan flavonoid sınıfı bileşikler, genellikle glikozitleri halinde hatta glikozitleri de çeşitli fenolik asitlerle açılmış halde bulunmaktadır [75] ve bu nedenle belirlenmeleri, her biri için ayrı bir standart madde ya da MS dedektörü gerektirdiğinden dolayı zordur. Bu sorunu ortadan kaldırmak için lahana örnekleri hidroliz edilmiş ve aglikon türevlerine dönüştürülerek belirlenmeye ve miktarlandırılmaya çalışılmıştır. Lahana örnekleri, 1.2 M HCl ve % 50 metanol içeren ortamda 90 °C' de 2 saat süre ile hidroliz edilmiştir [83,84]. Bu koşullarda sadece karalahana hidrolizatında ferulik asit, kuersetin ve kamferol tanımlanabilmiştir. Beyaz (iç ve dış yapraklar) lahana, kırmızı lahana ve Brüksel lahanası ekstrakt hidrolizatlarında 280 nm'de görülen 26 ve 32. dakika civarındaki iki büyük pik tanımlanamamıştır. Sadece PDA dedektörle elde edilen spektrumlarından yararlanılarak flavanol grubuna ait bileşikler oldukları tahmin edilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre çalışılan lahana ekstrakt hidrolizatlarının CUPRAC yöntemi ile belirlenmiş olan toplam antioksidan kapasite (Tablo 4.6) sıralaması;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Brüksel lahanası > Beyaz lahana (iç yapraklar) > Beyaz lahana (dış yapraklar) > Karalahana sapı olarak;

ABTS/HRP yöntemine göre ise;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Brüksel lahanası > Beyaz lahana (iç yapraklar) > Beyaz lahana (dış yapraklar) > Karalahana sapı olarak bulunmuştur.

Lahana ekstrakt hidrolizatlarının $AlCl_3/CH_3COOK$ yöntemi ile belirlenmiş olan toplam flavonoid derişimleri (Tablo 4.7) sıralaması;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Brüksel lahanası > Beyaz lahana (iç yapraklar) > Beyaz lahana (dış yapraklar) > Karalahana sapı olarak ;

$AlCl_3/NaNO_2$ yöntemine göre ise;

- ✓ Kırmızı lahana > Karalahana yaprakları > Brüksel lahanası > Beyaz lahana (dış yapraklar) > Beyaz lahana (iç yapraklar) > Karalahana sapı olarak belirtilebilir.

Kırmızı lahana ekstraktında ve ekstrakt hidrolizatında farklı pH yöntemi ile belirlediğimiz toplam antosiyanin değerleriyle literatürdeki değerlerin karşılaştırılması tablo 5.4’de gösterilmiştir.

Tablo 5.4: Kırmızı lahana ekstraktında toplam antosiyanin çalışmalarının karşılaştırılması

Referans	80 Farklı pH (mg siyanidin-3- glukozit /kg taze örnek)	Çalışmamız (mg siyanidin-3-glukozit /kg kuru madde)
		Farklı pH
Toplam Antosiyanin	756 (Kırmızı lahana)	1348 (Kırmızı lahana)

Sonuçlarımızın, Scalzo ve arkadaşlarının taze örnek cinsinden verdiği değerle karşılaştırıldığında kuru madde cinsinden olduğu için daha yüksek olması doğaldır.

HPLC ile belirlenen bileşenlerden birleştirilmiş HPLC-CUPRAC yöntemi ile (sayfa 42’de gösterilen formül ile hesaplanan) bulunan toplam antioksidan kapasite değerleri, spektrofotometrik CUPRAC ve ABTS/HRP yöntemleriyle bulunan değerlerin ancak çok küçük bir yüzdesine karşılık gelmektedir. Bunun başlıca nedeni, kromatogramlarda görülen piklerin tamamının standart yetersizliği nedeniyle tanımlanamamasıdır.

KAYNAKLAR

1. FANG, Y.Z., YANG, S., WU, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18 (10), 872-879.
2. HALLIWELL, B., ARUOMA, O.I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species: its mechanisms and measurement in mammalian systems, *FEBS Lett*, 281 (1-2), 9-19.
3. NICHENAMETLA, S.N., TARUSCIO, T.G., BARNEY, D.L., EXON, J.H., 2006, A review of the effects and mechanisms of the polyphenolics in cancer, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 46 (2), 161-183.
4. CARDENAS, M., MARDER, M., BLANK, V.C., ROGUIN, L.P., Antitumor activity of some natural flavonoids and synthetic derivatives on various human and murine cancer cell lines, *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (9), 2966-2971.
5. SROKA, Z., 2005, Antioxidative and antiradical properties of plant phenolics, *Z. Naturforsch*, 60 (11-12), 833-843.
6. BOYER, J., LIU, R.H., 2004, Apple phytochemicals and their health benefits, *Nutrition Journal*, 3, 1-15.
7. ALONSO-SALCES, R.M., KORTA, E., BARRANCO, A., BERRUETA, L.A., GALLO, B., VÍCENTE, F., 2001, Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple, *Journal of Chromatography A*, 933 (1-2), 37-43.
8. WACH, A., PYRZYNSKA, K., BIESAGA, M., 2007, Quercetin content in some food and herbal samples, *Food Chemistry*, 100 (2), 699-704.
9. SINGH, J., UPADHYAY, A.K., BAHADUR, A., SINGH, B., SINGH, K.P., RAI, M., 2006, Antioxidant phytochemicals in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata), *Scientia Horticulturae*, 108 (3) , 233-237.
10. HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J., ARUOMA, O.I., 1995, The characterization of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 33 (7), 601-617.
11. CAO, G., PRIOR, R.L., 1999, The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods in Enzymology*, 299, 50-62.

12. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2 (4), 152-159.
13. KESKİN, H., ERKMEN, G., 1987, *Besin Kimyası*, Güryay Matbaacılık, Beşinci Basım, İstanbul.
14. SHAHIDI, F., 1996, *Natural Antioxidants, Chemistry, Health Effects and Applications*, AOCS Press, United States of America, 0-935315-77-2.
15. GÜÇLÜ, K., SÖZGEN, K., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M., APAK, R., 2005, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical, *Talanta*, 65 (5), 1226-1232.
16. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
17. BJORNEBOE, A., BJORNEBOE, G.E., DREVON, C.A., 1990, Absorption, transport and distribution of vitamin E, *The Journal of Nutrition*, 120 (3), 233-242.
18. BRIGELIUS-FLOHE, R., TRABER, M.G., 1999, Vitamin E: function and metabolism, *FASEB Journal*, 13, 1145-1155.
19. HORWITT, M.K., 1986, Interpretations of requirements for thiamin, riboflavin, niacin tryptophan, and vitamin E plus comments on balance studies and vitamin B-6, *American Journal of Clinical Nutrition*, 44, 973-985.
20. VAN GOSSUM, A., SHARIFF, R., LEMOYNE, M., KURIAN, R., JEEJEBHOY, K., 1988, Increased lipid peroxidation after lipid infusion as measured by breath pentane output, *American Journal of Clinical Nutrition*, 48, 1394-1399.
21. PFANDER, H., 1987, *Key to Carotenoids*, Birkhäuser Verlag, Basel, 0817618600.
22. QUIRÓS, A. R.B., COSTA, H.S., 2006, Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review, *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 97-111.
23. KRINSKY, N.I., 1993, Actions of carotenoids in biological systems, *Annual Review of Nutrition*, 13, 561-587.
24. SIES, H., STAHL, W., 1995, Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants, *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1315-1321.

25. PALOZZA, P., KRINSKY, N., 1992, Methods in Enzymology (Packer, L., ed.), Academic Press, New York, 213, 403-420.
26. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.
27. HALLIWEL, B., 1990, How to characterise a biological antioxidant, *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32.
28. SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.D., JANITHA P.K., 1992, Phenolic antioxidants, *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32 (1), 67-103.
29. HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (10), 572-584.
30. KUHNAU, J., 1976, The Flavonoids. A class of semi-essential food components: Their role in human nutrition, *World. Rev. Nutr. Diet*, 24, 117-191.
31. COOK, N.C., SAMMAN, S., 1996, Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7 (2), 66-76.
32. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., BOLWELL, P.G., BRAMLEY, P.M., PRIDHAM, J.B., 1995, The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 22 (4), 375-383.
33. CLIFFORD, M.N., 2000, Anthocyanins- nature-occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, 80 (7), 1063-1072.
34. KOCA, İ., KARADENİZ, B., TURAL, S., 2006, Antosiyaninlerin Antioksidan Aktivitesi, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, 24-26 Mayıs 2006 Bolu. 133-136.
35. WALKOWIAK-TOMCZAK, D., CZAPSKI, J., 2007, Colour changes of a preparation from red cabbage during storage in a model system, *Food Chemistry*, 104 (2), 709–714.
36. ABU-AMSHA, R., CROFT, K.D., PUDDEY, I.B., PROUDFOOT, J.M., BEILIN, L.J., 1996, Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine, *Clinical Science*, 91, 449-458.

37. HELLER, W., FORKMANN, G., 1993, Biosynthesis of flavonoids, The flavonoids: Advances in Research since 1986, Chapman & Hall, London, 499-535.
38. WALLACE, G., FRY, S.C., 1994, Phenolic components of the plant cell wall, *International Review of Cytology*, 151, 229-267.
39. SPANOS, G.A., WROLSTAD, R.E., 1992, Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (9), 1478-1487.
40. KAHNT, G., 1967, Trans-cis-equilibrium of hydroxycinnamic acids during irradiation of aqueous solutions at different pH, *Phytochemistry*, 6 (5), 755-758.
41. HERRMANN, K., 1989, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, *Critical Review Food Science and Nutrition*, 28 (4), 315-347.
42. MATILLA P., HELLSTRÖM, J., 2007, Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20 (3-4), 152-160.
43. FERREIRA, D., SLADE, D., 2002, Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles, *The Royal Society of Chemistry*, 19, 517-541.
44. K MACDONALD-WICKS, L., WOOD, L.G., GARG, M.L., 2006, Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056.
45. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., 2004, 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), 7970-7981.
46. MILLER, N.J., DIPLOCK, A.T., RICE-EVANS, C., DAVIES, M.J., GOPINATHAN, V., MILNER, A., 1993, A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates, *Clin. Sci.*, 84, 407-412.
47. MILLER, N.J., RICE-EVANS, C., 1994, Total antioxidant status in plasma and body fluids, *Methods in Enzymology*, 234, 279-293.
48. GIROTTI, S., FERRI, E., MACCAGNANI, L., BUDINI, R., BIANCHI, G., 2002, Plasma Antioxidant Capacity Determination: Comparative Evaluation of Chemiluminescent and Spectrophotometric Assays, *Talanta*, 56 (3), 407-414.

49. RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., RICE-EVANS, C., 1999, Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Biol. Med.*, 26, 1231-1237.
50. CANO, A., HERNÁNDEZ-RUIZ, J., GARCÍA-CÁNOVAS, F., ACOSTA, M., ARNAO, M.B., 1998, An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material, *Phytochemical Analysis*, 9 (4), 196-202.
51. ARNAO, M.B., CANO, A., ACOSTA, M., 2001, The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity, *Food Chem.*, 73 (2), 239-244.
52. ARNAO, M.B., CANO, A., ACOSTA, M., 1998, Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology, *Recent Res. Devel. in Agricultural and Food Chemistry*, 2, 893-905.
53. BENZIE, I.F.F., STRAIN, J.J., 1996, Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power'; the FRAP assay, *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
54. SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A., 1965, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
55. SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTOS, R.M., 1999, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, 299, 152-178.
56. SANCHEZ, M.C., LARRAURI, J.A., SAURA, C.F., 1998, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76 (2), 270-276.
57. WAYNER, D.D.M., BURTON G.W., INGOLD, K.U, LOCKE, S., 1985, Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation, *FEBS Letters*, 187 (1), 33-37.
58. ALHO, H., LEINONEN, J., 1999, Total antioxidant activity measured by chemiluminescence methods, *Methods in Enzymology*, 299, 3-15.
59. WHITEHEAD, T.P., THORPE, G.H.G., MAXWELL, S.R.J., 1992, Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids, *Analytica Chimica Acta*, 266, 265-277.

60. VALKONEN, M., KUUSI, T., 1997, Spectrophotometric assay for total radical-trapping antioxidant potential in human serum, *Journal of Lipid Research*, 38, 823-833.
61. GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E., FERRO-LUZZI, A., 1995, A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability, *Free Radical Biology & Medicine*, 18 (1), 29-36.
62. GLAZER, A.N., 1990, Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species, *Methods in Enzymology*, 186, 161-168.
63. CAO, G., VERDON, C.P., WU, A.H., WANG, H., PRIOR, R.L., 1995, Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II, *Clinical Chemistry*, 41, 1738-1744.
64. TUBARO, F., GHISELLI, A., RAPUZZI, P., MAIORINO, M., URSINI, F., 1998, Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics, *Free Radical Biology Medicine*, 24 (7-8), 1228-1234.
65. CAO, G., PRIOR, R.L., 1999, In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27 (11-12), 1173-1181.
66. WINSTON, G.W., REGOLI, F., DUGAS, A.J.Jr., FONG, J.H., BLANCHARD, K.A., 1998, A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids, *Free Radical Biology & Medicine*, 24 (3), 480-493.
67. R. WOISKY, A., SALATINO, 1998, Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control, *J. Apic. Res.*, 37, 99-105.
68. ZHISHEN, J., MENGCHENG, T., JIANMING, W., 1999, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals, *Food Chem.*, 64, 555-559.
69. WROLSTAD, R.E., ACREE, T.E., DECKER, E.A., PENNER, M.H., REID, D.S., SCHWARTZ, S.J., SHOEMAKER, C.F., SMITH, D., SPORNS, P., 2005, *Handbook of Food Analytical Chemistry: Water, Proteins, Enzymes, Lipids, and Carbohydrates*, A John Wiley&Sons, Inc., New Jersey, 0-471-71817-3.
70. WROLSTAD, R.E., DURST, R.W., LEE, J., 2005, Tracking color and pigment changes in anthocyanin products, *Food Science and Technology*, 16, 423-428.
71. CAN, G., 1995, *Sebzecilik*, Anadolu Üniversitesi, 975-492-567-4.
72. KAR, H., KARAAĞAÇ, O., KİBAR, B., 2009, Beyaz Baş Lahana Tarımı www.ktae.gov.tr [Ziyaret Tarihi: 4 Ocak 2010].

73. GÜNDOĞDU, A., 2005, *Doğu Karadeniz Bölgesinde Yetiştirilen Karalahanalarda (Brassica oleracea var. acephala) Bazı Element Tayinleri*, Yüksek Lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi.
74. SÖNMEZ, U., 2007, *Farklı Dikim Zamanlarının Brüksel Lahanası (Brassica oleracea var. gemmifera) Çeşitlerinde Gelişme ve Verime Etkisi*, Yüksek Lisans Tezi, Atatürk Üniversitesi.
75. PODSEDEK, A., SOSNOWSKA, D., REDZYNIA, M., ANDERS, B., 2006, Antioxidant capacity and content of Brassica oleracea dietary antioxidants, *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 49-58.
76. HOUNSOME, N., HOUNSOME, B., TOMOS, D., EDWARDS-JONES, G., 2009, Changes in antioxidant compounds in white cabbage during winter storage, *Postharvest Biology and Technology*, 52, 173–179.
77. CHUN, O.K., SMITH, N., SAKAGAWA, A., LEE, C.Y., 2004, Antioxidant properties of raw and processed cabbage, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 55 (3), 191-199.
78. HEIMLER, D., VIGNOLINI, P., DINI, M.G., VINCIERI, F.F., ROMANI, A., 2006, Antiradical activity and polyphenol composition of local Brassicaceae edible varieties, *Food Chemistry*, 99, 464–469.
79. ARAPITSAS, P., SJOBERG, P.J.R., TURNER, C., 2008, Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry, *Food Chemistry*, 109, 219–226.
80. SCALZO, R.L., GENNA, A., BRANCA, F., CHEDIN, M., CHASSAIGNE, H., 2008, Anthocyanin composition of cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis) and cabbage (*B. oleracea* L. var. capitata) and its stability in relation to thermal treatments, *Food Chemistry*, 107, 136–144.
81. CISKA, E., KARAMAC, M., KOSINSKA, A., 2005, Antioxidant Activity of Extracts of White Cabbage and Sauerkraut, *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 14/55 (4), 367-373.
82. HERTOĞ, M.G.L., HOLLMAN P.C.H., VENEMA, D.P., 1992, Optimization of quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1591-1598.
83. HERTOĞ, M.G.L., HOLLMAN P.C.H., KATAN, M.B., 1992, Content of anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly in the Netherlands, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 2379-2383.

84. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., ERÇAĞ, E., 2006, The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57 (5), 292-304.
85. CHANG, C.C., YANG, M.H., WEN, H.M., CHERN, J.C., 2002, Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods, *Journal of Food and Drug Analysis*, 10 (3), 178-182.
86. SAKAKIBARA, H., HONDA, Y., NAKAGAWA, S., ASHIDA, H., KANAZAWA, K., 2003, Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas, *J. Agric. Food Chem.*, 51, 571-581.
87. ENCU, S., VURAL, T., ÇETİN, O., KÖKYAR, N., BAŞKAN, K.S., TÜTEM, E., APAK, R., 2010, Comparison Of Two Common Assays For Quantifying Total Flavonoids, *Workshop On Antioxidant Measurement Assay Methods*, 21 Nisan 2010 İstanbul.
88. HARBORNE, J.B., 1998, *Phytochemical methods; a guide to modern techniques of plant analysis*, Chapman and Hall, London, 0-412-57260-5.

ÖZGEÇMİŞ

16.06.1985 İstanbul doğumluyum. 1991 yılında başladığım ilköğrenimimi Kaptanpaşa İlköğretim ve Ziyapaşa İlköğretim okullarında tamamladıktan sonra 1999 yılında Arnavutköy Korkmaz Yiğit Lisesi'nde öğrenim gördüm. 2003 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından düzenlenen üniversite giriş sınavı sonucunda İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü'ne girmeye hak kazandım ve 4 yıllık üniversite öğrenimimi tamamlayıp 2007 yılında mezun oldum. 2008 yılında İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.