

**T.C.  
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
ANALİTİK KİMYA BİLİM DALI**

**ZERDEÇAL EKSTRAKTLARININ TOPLAM FENOLİK,  
ANTIÖKSİDAN, RADİKAL GİDERME KAPASİTELERİ VE  
KURKUMİNOİDLERİN VOLTAMMETRİK TAYİNİ**

**Esra ALTUNTAŞ**

**Danışman  
Prof. Dr. Ali ÇELİK**



**MANİSA-2020**

## TEZ ONAYI

**Esra ALTUNTAŞ** tarafından hazırlanan “**Zerdeçal Ekstraktlarının Toplam Fenolik, Antioksidan, Radikal Giderme Kapasiteleri Ve Kurkuminoidlerin Voltammetrik Tayini**” adlı tez çalışması 01/06/2020 tarihinde online katılım ile aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak savunulmuş ve **oyçokluğu / oybirliği** ile başarılı olarak kabul edilmiştir.

<b>Danışman</b>	<b>Prof. Dr. Ali ÇELİK</b> Manisa Celal Bayar Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	<b>Prof. Dr. Kenan DOST</b> Manisa Celal Bayar Üniversitesi	.....
<b>Jüri Üyesi</b>	<b>Doç. Dr. Nur AKSUNER</b> Ege Üniversitesi	.....

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Esra ALTUNTAŞ**



## İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLOLAR DİZİNİ .....	X
TEŞEKKÜR.....	XI
ÖZET.....	XII
ABSTRACT.....	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Zerdeçal.....	3
2.2. Kurkumin Maddesi.....	3
2.2.1. Kurkuminin Kimyasal ve Fiziksel Yapısı.....	4
2.2.2. Kurkuminin Kullanım Alanları.....	6
2.2.3. Kurkuminin Antioksidan, Antienflamatuar ve Diğer Aktiviteleri.....	7
2.2.4. Kurkuminin Kanser ve Diğer Hastalıklar Üzerindeki Etkisi.....	9
2.2.5. Kurkumin Eldesi.....	11
2.3. Serbest Radikaller ve Özellikleri.....	13
2.3.1. Serbest Radikallerin Etkileri.....	15
2.3.2. Serbest Radikal Araştırmalarının Tarihi Süreci.....	16
2.4. Antioksidanlar ve Özellikleri .....	17
2.4.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları.....	21
2.5. Antioksidanların Sınıflandırılması .....	21
2.5.1. Doğal Antioksidanlar.....	23
2.5.1.1. Enzimatik Antioksidanlar .....	23
2.5.1.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar .....	24
2.5.2. Sentetik Antioksidanlar.....	27
2.5.3. Diğer Antioksidanlar.....	30
2.5.3.1. Geçiş Metali Bağlayıcı Proteinler .....	30
2.5.3.2. Protein Olmayan Antioksidanlar.....	30
2.6. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri .....	30
2.7. Deneyde Kullanılan Tayin Yöntemleri .....	33
2.7.1. Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi .....	33
2.7.2. CUPRAC [Cu (II) iyonu indirgeme] Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemi .....	35

2.7.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi.....	37
2.8. Elektrokimyasal Teknikler .....	38
2.8.1. Voltammetri .....	38
2.8.1.1. Döngüsel Voltammetri (CV).....	39
2.8.1.2. Adsorptif Sıyırma Voltammetrisi (AdSV).....	40
2.8.1.3. Kare Dalga Voltammetrisi (SWV).....	41
3. DENEYSEL KISIM .....	44
3.1. Materyal.....	44
3.1.1. Çalışma Materyali.....	44
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	44
3.1.3. Kullanılan Cihazlar .....	45
3.1.4. Çözeltilerin Hazırlanması .....	45
3.2. Yöntemler .....	47
3.2.1. Çalışma Materyalinin Analize Hazırlanması.....	47
3.2.2. Zerdeçal Rizomlarının Ekstraksiyonu .....	48
3.2.3. Zerdeçal Rizomlarının İnfüzyonu (Demlenmesi).....	48
3.2.4. Karbon Nanotüplerin Hazırlanması .....	49
3.2.5. Voltammetri Yöntemi .....	49
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA .....	51
4.1. Rizom Ekstraktlarının Analizi.....	51
4.1.1. Folin-Ciocalteu Reaktifi ile Fenolik Bileşiklerin Tayini .....	51
4.1.2. Zerdeçal Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Tayini.....	53
4.1.3. CUPRAC (Cu-II İyonu İndirgeme) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini .....	55
4.1.4. Zerdeçal Ekstraktlarında Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini .....	58
4.1.5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Radikal Giderme Kapasitesi Tayini .....	60
4.2. Kurkuminin Voltammetrik Analizi .....	65
4.2.1. Kurkuminin Adsorptif Sıyırma Kare Dalga Voltammetrisi ile Tayini .....	66
4.2.2. Destek Elektrolit pH'ının Belirlenmesi ve İyonik Şiddet Çalışmaları .....	66
4.2.3. Karıştırmanın Birikmeye Etkisi .....	68
4.2.4. Kurkuminin MWCNT/GCE'deki Redoks Mekanizması.....	69
4.2.5. Kurkuminin Yalın GCE ve MWCNT/GCE Üzerinde Voltammetrik Davranışı.....	71
4.2.6. Modifiye ve Yalın Elektrotların Yüzey Alanları .....	74
4.2.7. MWCNT/GCE Üzerine İlave Modifikasyonların Etkisi .....	75

4.2.8. Kurkumin Tayini İçin Doğrusallık ve Duyarlık Çalışmaları .....	78
4.2.9. Tekrarlanabilirlik .....	83
4.2.10. Gerçek Numune Analizi ve Ekstraksiyon Yönteminin Geri Kazanımı..	83
4.2.11. Girişim Çalışmaları.....	85
4.3. Diğer Kurkuminoidlerin Voltammetrik Çalışmaları .....	85
4.3.1. DMC ve BDMC'nin MWCNT/GCE Üzerindeki Voltammetrik Davranışları.....	85
4.3.2. Kurkumin, DMC ve BDMC'nin MWCNT/GCE Üzerinde Yanyana Voltammetrik Davranışları .....	87
4.3.3. Kalibrasyon Grafikleri .....	89
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR .....	95



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b><math>\alpha</math></b>	Alfa
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\delta</math></b>	Delta
<b>%</b>	Yüzde
<b>°C</b>	Santigrat derece
<b><math>\mu</math>A</b>	Mikroamper
<b><math>\mu</math>g</b>	Mikrogram
<b><math>\mu</math>L</b>	Mikrolitre
<b><math>\mu</math>M</b>	Mikromolar
<b>cm<sup>2</sup></b>	Santimetre kare
<b>dk.</b>	Dakika
<b>doy.</b>	Doygun
<b>g</b>	Gram
<b>mg</b>	Miligram
<b>mm</b>	Milimetre
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mV</b>	Milivolt
<b>nm</b>	Nanometre
<b>rpm</b>	Revolutions per minute (Dakikadaki devir sayısı)
<b>Rt</b>	Retention time (Alıkonma süresi)
<b>s</b>	Saniye
<b>t</b>	Süre
<b>Ag</b>	Gümüş
<b>AgCl</b>	Gümüş klorür
<b>Au</b>	Altın
<b>HAuCl<sub>4</sub></b>	Kloraurik asit
<b>HCl</b>	Hidroklorik asit
<b>HNO<sub>3</sub></b>	Nitrik asit
<b>HOCl</b>	Hipokloröz asit
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Hidrojen peroksit
<b>H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub></b>	Kloroplatinik asit
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Sülfürik asit

<b>KCl</b>	Potasyum klorür
<b>Mo</b>	Molibden
<b>NO</b>	Azot oksit
<b>NO<sup>+</sup></b>	Nitrosil katyon
<b>NO<sup>-</sup></b>	Nitroksil anyon
<b>NO•</b>	Nitrik oksit
<b>NO<sub>2</sub>•</b>	Nitrojen dioksit
<b>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	Diazot trioksit
<b>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>	Diazot tetroksit
<b>HNO<sub>2</sub></b>	Nitröz asit
<b>NO<sub>2</sub>Cl</b>	Nitril klorid
<b>N<sub>2</sub></b>	Azot gazı
<b>OH•</b>	Hidroksil radikali
<b>ONOO•</b>	Peroksinitrit radikali
<b>ONOOH</b>	Peroksinitrik asit
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	Singlet oksijen
<b>O<sub>2</sub>•</b>	Süperoksit radikali
<b>Pt</b>	Platin
<b>ROO•</b>	Peroksil radikali
<b>AAPH</b>	2,2-azobis-(2-amidinopropan)dihidroklorid
<b>ABTS</b>	2,2-azinobis(3-etilbenzothiazolin-6-sulfonik asit)
<b>AdSV</b>	Adsorptive stripping voltammetry (Adsorptif sıyırma voltammetrisi)
<b>BHA</b>	Bütillenmiş hidroksianisol
<b>CNT</b>	Carbon nanotube (Karbon nanotüp)
<b>CUPRAC</b>	Cu(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite yöntemi
<b>CUR</b>	Kurkumin
<b>CV</b>	Cyclic voltammetry (Döngüsel voltammetri)
<b>C vitamini</b>	Askorbik asit
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>DPPH</b>	2,2-Difenil-1-pikrihidrazil radikal söndürücü kapasite yöntemi
<b>DPV</b>	Differential puls voltammetry (Diferansiyel puls voltammetri)
<b>E</b>	Potansiyel
<b>ET</b>	Elektron transferine dayanan yöntemler
<b>FCR</b>	Folin-Ciocalteu reagent (Folin-Ciocalteu ayıracı)



<b>Ferulik asit</b>	3-metoksi, 4-hidroksisinnamik asit
<b>FRAP</b>	Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü yöntemi
<b>GAE</b>	Gallic acid equivalent (Gallik asit eşdeğeri)
<b>Gallik asit</b>	3, 4, 5-trihidroksibenzoik asit
<b>GCE</b>	Glassy carbon electrode (Camsı karbon elektrot)
<b>HAS</b>	Hidroklorik asit çözeltisi
<b>HAT</b>	Hidrojen atomu transfer reaksiyonlarına dayanan yöntemler
<b>HORAC</b>	Hydroxyl Radical Antioxidant Capacity (Hidroksil radikali antioksidan kapasite) yöntemi
<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography (Yüksek performans sıvı kromatografisi)
<b>I</b>	Akım
<b>IR</b>	Infrared (Kızılötesi)
<b>KCl</b>	Potasyum Klarür
<b>L</b>	Litre
<b>LOD</b>	Limit of detection (Belirtme sınırı)
<b>LOQ</b>	Limit of quantification (Tayin sınırı)
<b>LPIC</b>	Lipid peroxidation inhibition capacity (Lipid peroksidasyon inhibisyon kapasitesi) yöntemi
<b>M</b>	Molarite
<b>Mg</b>	Magnezyum
<b>MWCNT</b>	Multi-walled carbon nanotube (Çok duvarlı karbon nanotüp)
<b>NAS</b>	Nitrik Asit Çözeltisi
<b>Neokuproin</b>	2,9-dimetil-1,10-fenantrolin
<b>NPs</b>	Nanoparticles (Nanoparçacıklar)
<b>ORAC</b>	Oxygen radical absorbance capacity (Oksijen radikal absorbans kapasite yöntemi)
<b>PBS</b>	Fosfat Tampon Çözeltisi
<b>RNS</b>	Reactive nitrogen species (Reaktif azot türleri)
<b>ROS</b>	Reactive oxygen species (Reaktif oksijen türleri)
<b>SAS</b>	Sülfürik Asit Çözeltisi
<b>SD</b>	Standard deviation (Standart sapma)
<b>SOD</b>	Süperoksit dismutaz
<b>SWV</b>	Square wave voltammetry (Kare dalga voltammetrisi)

<b>TAC</b>	Total antioxidant capacity (Toplam antioksidan kapasitesi)
<b>TBHQ</b>	Tersiyer bütül hidrokinon
<b>TE</b>	Trolox equivalent (Troloks eşdeğeri)
<b>TEAC</b>	Troloks eşiti antioksidan kapasite yöntemi
<b>TRAP</b>	Toplam radikal yakalayıcı antioksidan parametre yöntemi
<b>Troloks</b>	6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit
<b>TOSC</b>	Toplam oksiradikal söndürme kapasite yöntemi
<b>UV/Vis</b>	Ultraviolet/visible region (Morötesi/görünür bölge)
<b>V</b>	Volt
<b>W</b>	Watt



## ŞEKİLLER DİZİNİ

<b>Şekil 2.1.</b> Kurkumin, demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkuminin kimyasal yapıları .....	5
<b>Şekil 2.2.</b> Zerdeçal köksapları ve kurkumin maddesi .....	5
<b>Şekil 2.3.</b> Oral ve diğer uygulama yollarıyla kurkumin metabolizması .....	9
<b>Şekil 2.4.</b> Kurkuminin antienflamatuar etkileri için moleküler hedefleri .....	11
<b>Şekil 2.5.</b> Fizyolojik koşullar altında kurkumin tautomerizmi .....	12
<b>Şekil 2.6.</b> Antioksidanlar ve serbest radikallerin etkileşimi .....	17
<b>Şekil 2.7.</b> Antikoksidanların sınıflandırılması .....	22
<b>Şekil 2.8.</b> Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi .....	35
<b>Şekil 2.9.</b> DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali .....	37
<b>Şekil 2.10.</b> Potansiyostat cihazının şematik gösterimi .....	39
<b>Şekil 2.11.</b> a) Dönüşümlü voltammetride elektroda uygulanan gerilim .....	40
<b>Şekil 2.12.</b> Kare dalga uyarı sinyali ve polarogramı .....	42
<b>Şekil 3.1.</b> Toplam antioksidan, fenolik ve radikal giderme kapasitelerinin analizinde kullanılan Uv-vis Spektrofotometre .....	47
<b>Şekil 3.2.</b> Curcuma longa L. rizomları ve %70'lik metanol-su ekstraksiyonu sonrası elde edilen ekstrakt .....	49
<b>Şekil 3.3.</b> Kurkumin analizi için kullanılan Ivium Compactstat marka/model cihaz .....	50
<b>Şekil 4.1.</b> Folin-Ciocalteu yönteminde kalibrasyon grafiği için 5 (beş) farklı konsantrasyonda hazırlanan gallik asit çalışma çözeltilerinin renk skalası .....	51
<b>Şekil 4.2.</b> Folin-Ciocalteu yöntemi için kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiği ....	53
<b>Şekil 4.3.</b> CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan troloks standart çözeltileri renk skalası .....	56
<b>Şekil 4.4.</b> CUPRAC yönteminde kullanılan troloks çalışma çözeltileri için kalibrasyon grafiği .....	57
<b>Şekil 4.5.</b> DPPH yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan standart troloks çalışma çözeltilerinin renk skalası .....	61
<b>Şekil 4.6.</b> DPPH yönteminde kullanılan çalışma çözeltileri için kalibrasyon grafiği .....	62
<b>Şekil 4.7.</b> Kurkumin analizi için önerilen elektrokimyasal algılama platformunun şematik gösterimi .....	66
<b>Şekil 4.8.</b> 14 µM kurkuminin hazırlanan MWCNT/GCE üzerinde farklı destek elektrolitler kullanılarak elde edilen yükseltgenme pik akımlarının maksimum pik akımına göre yüzdeleri. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> . PBS: fosfat tampon çözeltisi; SAS: sülfürik asit çözeltisi; NAS: nitrik asit çözeltisi; HAS: hidroklorik asit çözeltisi.....	67
<b>Şekil 4.9.</b> 14 µM kurkuminin CV ile zamana karşı elde edilen yükseltgenme pik akımları. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> . .....	68
<b>Şekil 4.10.</b> MWCNT/GCE üzerinde döngüsel voltammogramlar (a) kör, (b) 14 µM CUR (ilk tarama), ve (c) 14 µM CUR (ikinci tarama). Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	69
<b>Şekil 4.11.</b> Kurkuminin MWCNT/GCE'deki olası elektrokimyasal redoks mekanizması .....	70
<b>Şekil 4.12.</b> 14 µM kurkuminin 0.1 M HCl içindeki döngüsel voltammogramı. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> . (a) yalın GCE, (b) MWCNT/GCE, (c) MWCNT/GCE ile 1 dk. boyunca karıştırma (d) MWCNT/GCE ile 3 dk. boyunca karıştırma (e) MWCNT/GCE; 5 dk. boyunca karıştırma (f) MWCNT/GCE 7 dk. boyunca karıştırma (g) MWCNT/GCE. 10 dk. boyunca karıştırma (a) GCE, (b) MWCNT/GCE. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> . .....	71

<b>Şekil 4.13.</b> 14 µM kurkuminin yalın GCE ile 0.1 M HCl içindeki döngüsel voltammogramları (a-i, sırasıyla 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mV/s) Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	72
<b>Şekil 4.14.</b> 14 µM kurkuminin MWCNT/GCE ile 0.1 M HCl içindeki döngüsel voltammogramları (a-i, sırasıyla 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mV/s) Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	73
<b>Şekil 4.15.</b> Kurkuminin yükseltgenmesine ait akım-tarama hızı grafikleri: yalın GCE (▲) ve MWCNT/ GCE (■) üzerinde. (a-i): 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mV s <sup>-1</sup> .....	74
<b>Şekil 4.16.</b> MWCNT/GCE yüzeyine EBT monomerlerinin elektropolimerizasyonu	75
<b>Şekil 4.17.</b> Au nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyine kaplanması.....	76
<b>Şekil 4.18.</b> Pt nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyine kaplanması .....	77
<b>Şekil 4.19.</b> Farklı elektrot yüzeylerinde 14 µM kurkuminin anodik pik akımlarının maksimum pik akımına göre yüzdeleri. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	78
<b>Şekil 4.20.</b> Farklı konsantrasyonlardaki kurkuminin 0.1 M HCl içerisinde yalın GCE üzerinde elde edilen kare dalga voltammogramları; (a - e): 3.000, 5.000, 7.000, 10.000 ve 20.000µM. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	79
<b>Şekil 4.21.</b> Farklı konsantrasyonlardaki kurkuminin 0.1 M HCl içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak MWCNT/GCE üzerinde elde edilen kare dalga voltammogramları (a - f): 0, 0.010, 0.050, 0.500, 1.000 ve 5.000 µM. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	80
<b>Şekil 4.22.</b> Kurkuminin yalın GCE üzerinde elde edilen kalibrasyon grafiği .....	81
<b>Şekil 4.23.</b> Kurkuminin MWCNT/GCE üzerinde elde edilen kalibrasyon grafiği....	81
<b>Şekil 4.24.</b> (a) kör, (b) numunenin SWVs ve (c) 0.500 µM, (d) 1.000 µM ve (e) 1.500 µM CUR standardının eklenmesinden sonra. Standart ekleme kalibrasyonu eğrisi sol üst köşede verilmiştir. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	84
<b>Şekil 4.25.</b> 15 µM DMC'nin 0.1 M HCl içerisinde MWCNT/GCE üzerinde zamana karşı elde edilen döngüsel voltammogramları (a) kör, (b) standart ilavesinden hemen sonra, (c) 1 dk. boyunca karıştırma sonrası, (d) 3 dk. boyunca karıştırma sonrası (e) 5 dk. boyunca karıştırma sonrası (f) 7 dk. boyunca karıştırma sonrası (g) 10 dk. boyunca karıştırma sonrası. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	86
<b>Şekil 4.26.</b> 16 µM BDMC'nin 0.1 M HCl içerisinde MWCNT/GCE üzerinde zamana karşı elde edilen döngüsel voltammogramları (a) kör, (b) standart ilavesinden hemen sonra, (c) 1 dk. boyunca karıştırma sonrası, (d) 3 dk. boyunca karıştırma sonrası (e) 5 dk. boyunca karıştırma sonrası (f) 7 dk. boyunca karıştırma sonrası (g) 10 dk. boyunca karıştırma sonrası. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	87
<b>Şekil 4.27.</b> 0.1 M HCl içerisinde, 1 µM (BDMC, DMC ve Cur'nin) 10 dk adsorpsiyon süreleri sonundaki CV'leri (a) MWCNTs/GCE' de kör, (b) MWCNT/GCE ile 1 µM BDMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma (c), MWCNT/GCE ile 1 µM BDMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma + 1 µM DMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma (d) MWCNT/GCE ile 1 µM BDMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma + 1 µM DMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma + 1 µM Cur'in 10 dk. karıştırma. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	88
<b>Şekil 4.28.</b> Türlerin 0.1 M HCl içerisinde MWCNT/GCE kullanılarak elde edilen kare dalga voltammogramları (a) kör, (b) 10 µM BDMC, (c) 10 µM BDMC + 1 µM DMC (d) 10 µM BDMC + 1 µM DMC + 1 µM Cur. Tarama hızı: 100 mV s <sup>-1</sup> .....	89
<b>Şekil 4.29.</b> Kurkuminoidlerin önerilen yöntem ile elde edilen kalibrasyon eğrileri BDMC (◆), DMC (▲), CUR (■). .....	90

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Reaktif oksijen türleri (ROS) .....	14
<b>Tablo 2.2.</b> Reaktif nitrojen türleri (RNS) .....	15
<b>Tablo 2.3.</b> Bazı gıdalardaki antioksidanlar .....	19
<b>Tablo 2.4.</b> Temel olarak bazı antioksidan kapasite tayin yöntemleri .....	31
<b>Tablo 3.1.</b> Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler .....	44
<b>Tablo 3.2.</b> Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar .....	45
<b>Tablo 4.1.</b> Folin-Ciocalteu yönteminde hazırlanan gallik asit standart çalışma çözeltileri .....	52
<b>Tablo 4.2.</b> Gallik asit standart çalışma çözeltilerinin okunan absorbans değerleri ...	52
<b>Tablo 4.3.</b> Metanol-Su ekstraktları için ölçülen absorbanslar .....	54
<b>Tablo 4.4.</b> İnfüzyon ekstraktları için ölçülen absorbanslar .....	54
<b>Tablo 4.5.</b> Zerdeçal ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri .....	55
<b>Tablo 4.6.</b> CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiği için kullanılan troloks çalışma çözeltileri .....	56
<b>Tablo 4.7.</b> CUPRAC kalibrasyon grafiği için kullanılan troloks çalışma çözeltileri absorbans değerleri .....	57
<b>Tablo 4.8.</b> MeOH-H <sub>2</sub> O ekstraktı için ölçülen absorbanslar .....	58
<b>Tablo 4.9.</b> İnfüzyon ekstraktı için ölçülen absorbanslar .....	59
<b>Tablo 4.10.</b> Zerdeçal ekstraktlarının toplam toplam antioksidan kapasiteleri .....	60
<b>Tablo 4.11.</b> DPPH yönteminde troloks standart çözeltilerinin hazırlanışı .....	61
<b>Tablo 4.12.</b> DPPH yöntemi kalibrasyon grafiği çözeltileri absorbans değerleri .....	62
<b>Tablo 4.13.</b> DPPH yöntemi için kontrol çözeltisi absorbans değerleri .....	62
<b>Tablo 4.14.</b> MeOH-H <sub>2</sub> O ekstraktı için ölçülen absorbanslar .....	63
<b>Tablo 4.15.</b> İnfüzyon ekstraktı için ölçülen absorbanslar .....	64
<b>Tablo 4.16.</b> Zerdeçal ekstraktlarının toplam DPPH kapasiteleri .....	65
<b>Tablo 4.17.</b> İyonik şiddet denemeleri için çalışılan kimyasallar .....	67
<b>Tablo 4.18.</b> Kurkumin için daha önce önerilen analitik yöntemlerin karşılaştırılması .....	82
<b>Tablo 4.19.</b> Zerdeçal ekstraktında kurkuminin nicel tayin sonucu ve ultrasonic destekli ekstraksiyon yönteminin geri kazanım değerleri .....	85
<b>Tablo 4.20.</b> Kurkumin ve türlerinin pik akımları .....	88

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım süresince engin bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, üniversite hayatım boyunca sonsuz sabır, inanç, hoşgörü ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ali ÇELİK'e,

Laboratuvar çalıőmalarımda ve analiz süreçlerinde büyük yardım ve katkısı bulunan çok kıymetli hocam Sayın Dr. Mustafa CİTTAN'a,

Her koşulda desteğiyle daima yanımda olan ve varlığıyla beni mutlu eden sevgili eőim Muhammed Eser ALTUNTAŞ'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım.

Esra ALTUNTAŞ

Manisa, 2020

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

## ZERDEÇAL EKSTRAKTLARININ TOPLAM FENOLİK, ANTIOKSİDAN, RADİKAL GİDERME KAPASİTELERİ VE KURKUMİNOİDLERİN VOLTAMMETRİK TAYİNİ

Esra ALTUNTAŞ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ali ÇELİK

Bu tez projesinde öncelikle zerdeçalın toplam antioksidan kapasitesi ve toplam fenolik bileşenlerinin tayini amaçlanmıştır. Buna ek olarak, zerdeçalın aktif maddesi olan kurkuminin duyarlı bir şekilde tayini için voltammetrik bir yöntem önerilmiş, önerilen yöntemin validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada ilk olarak Curcuma Longa L. rizomları havanda toz haline getirilerek iki farklı ekstraksiyon yöntemi ile ekstrakte edilmiştir. Ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı, toplam antioksidan kapasitesi ve radikal giderme kapasitesi sırasıyla Folin-Ciocalteu, CUPRAC ve DPPH yöntemleri kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

Çalışmanın ikinci bölümünde zerdeçal rizomlarındaki kurkumin miktarının tayini için çok duvarlı karbon nanotüp ile modifiye edilmiş camı karbon elektrodun çalışma elektrodu olarak kullanıldığı voltammetrik bir yöntem tarif edilmiştir. Önerilen yöntem bir zerdeçal örneğindeki kurkuminoidlerin kurkumin eşdeğeri cinsinden belirlenmesi için uygulanmıştır.

Çalışmanın üçüncü bölümünde ise kurkumin dışındaki diğer kurkuminoidlerin (demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin), kurkumin için valide edilen yöntem kullanılarak voltammetrik davranışları incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Zerdeçal, Curcuma Longa L., Kurkumin, Antioksidan kapasitesi, Fenolik bileşenler, Voltammetri

2020, 104 sayfa

## ABSTRACT

M.Sc. Thesis

### THE TOTAL PHENOLIC, ANTIOXIDANT, RADICAL SCAVENGING CAPACITIES OF TURMERIC EXTRACTS AND VOLTAMMETRIC DETERMINATION OF CURCUMINOIDS

Esra ALTUNTAŞ

Manisa Celal Bayar University  
Graduate School of Applied and Natural Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Ali ÇELİK

Initially, it was aimed to determine the total antioxidant capacity and the total phenolic compounds of turmeric in this thesis project. In addition, a voltammetric method was proposed for the sensitive determination of curcumin, the active ingredient of turmeric, and the validation studies of the proposed method were carried out.

Firstly, *Curcuma Longa L.* rhizomes were powdered and extracted with two different extraction techniques. The total phenolic compounds, the total antioxidant capacity and the radical scavenging capacity in the extracts were determined spectrophotometrically using Folin-Ciocalteu, CUPRAC and DPPH methods, respectively.

In the second part of the study, a voltammetric method was described to determine the amount of curcumin in turmeric rhizomes, using the glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes as the working electrode. The proposed method was successfully applied to determine the curcumin equivalent in a turmeric sample.

In the third part of the study, the voltammetric behavior of the other curcuminoids (demetoxicurcumin and bisdemetoxicurcumin) was investigated using the validated method for curcumin.

**Keywords:** Turmeric, *Curcuma Longa L.*, Curcumin, Antioxidant capacity, Phenolic components, Voltammetry

**2020, 104 pages**



## 1. GİRİŞ

Serbest radikaller, en dıştaki yörüngelerinde veya moleküler orbitallerinde bir veya daha fazla eşleşmemiş elektron içeren atom ya da moleküller olarak tanımlanabilirler [1]. Serbest radikaller birçok kronik sağlık problemine neden olurlar [2, 3].

Reaktif oksijen türleri (ROS) reaktivliklerine ve oksitlenme yeteneklerine bağlı olarak serbest radikalleri içeren oksijen için kullanılan ortak bir terimdir [2]. Vücutta normal bir fizyolojik fonksiyon için serbest radikaller ile antioksidanlar arasında bir denge gereklidir. Serbest radikaller, antioksidanların düzenleme yeteneğini bastırırsa oksidatif stres olarak bilinen bir durum ortaya çıkar. Bu nedenle serbest radikaller, lipidlerin, proteinlerin ve deoksiribo nükleik asitin (DNA) normal çalışma fonksiyonunu değiştirerek birçok hastalığı tetiklerler [3].

Bu bağlamda serbest radikaller kardiyovasküler, katarakt, ateroskleroz, diyabet, iltihaplı bağırsak hastalıkları, iskemi/reperfüzyon, kanser, nörolojik hastalıklar ve aşırı gerginlik gibi çok çeşitli fizyolojik fonksiyonları etkileyerek dejeneratif hastalıklara neden olurlar [3, 4].

Antioksidanlar ise serbest radikallerin bu tür etkilerini elimine eden maddelerdir [5]. Antioksidanlar, elektron verici, peroksit çözücü, tekli oksijen söndürücü, enzim inhibitörü, sinerjist ve metal şelatlayıcı maddeler olarak görev yaparlar. Hem enzimatik hem de enzimatik olmayan antioksidanlar, ROS'u detoksifiye etmek için hücre içi ve hücre dışı ortamda bulunur. Ayrıca antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu önleyerek, onları temizleyerek veya parçalanmalarını sağlayarak neden oldukları doku hasarını önlerler [3].

Zerdeçalın ana bileşeni olan kurkumin, güçlü bir antioksidandır [2]. En yüksek antioksidan aktiviteye sahip bitkiler arasında gösterilen kurkumin [1], serbest radikal temizleyici ve elektron verici bir bileşendir [6]. Yapılan araştırmalar kurkuminin, oksidatif stresin oluşumunda rol oynayan  $O_2^-$  radikalleri, lipid peroksil radikalleri,  $\cdot OH$  radikalleri ve azot dioksit radikallerini temizleyen etkili bir ROS temizleyici olduğunu göstermiştir [2, 7].

Ayrıca kurkumin, doymamış bir  $\beta$ -diketon ve fenolik gruplara sahip olan bir diferuloil metandır. Antienflamatuar, antikanserojen, antimikrobiyal, nörokoruyucu,

kardiyokoruyucu, trombobastırıcı ve antidiyabetik etkiler gösteren çeşitli farmakolojik özellikleri sergiler. Bu bileşik, güçlü bir antikanser ajanı olarak da kabul edilir ve halen çeşitli kanser türlerine karşı klinik deneylerin farklı aşamalarında değerlendirilmektedir [2].

Bu tez projesinde zerdeçalın toplam antioksidan kapasitesi, toplam fenolik bileşenlerinin tayini ile birlikte zerdeçalın aktif maddesi olan kurkuminin voltammetrik yöntemle duyarlı nicel tayinin yapılması, analizin zerdeçal örneklerinde uygulanması ve validasyonu amaçlanmıştır. Ayrıca kurkumin türevlerinin yan yana tayin edilebilirliği voltammetrik yöntem kullanılarak araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Zerdeçal

Zerdeçal (*Curcuma Longa*), zencefil ailesinin bir üyesidir. Zingiberaceae familyasına ait sarı çiçekleri ve geniş yaprakları olan çok yıllık, otsu, rizomatoz, aromatik bir bitkidir [8, 9]. Kurkuminoid bileşiği olan zerdeçal, Hint safranı olarak da bilinir [10]. Birkaç *curcuma* türüne zerdeçal denir, ancak *Curcuma Longa L.* cinsi ticari öneme sahip zerdeçalı temsil eder ve şu anda Hindistan'da 50'den fazla çeşidi bilinmektedir [11]. Güneydoğu Asya ülkelerinde yaygın şekilde yetiştirilmekte olup üretimi dünyanın tropikal ve subtropikal bölgelerine dağılmıştır [10-12]. *Curcuma Longa L.* bitkisinin menşei olan Hindistan; dünyanın en büyük zerdeçal üreticisi, tüketicisi ve ihracatçısı olarak bilinir [8]. Ayrıca bu bitki İran, Malezya, Endonezya, Vietnam, Çin, Polinezya, Tayland, Jamaika ve Peru gibi ülkelerde yetiştirilir ve önemli bir baharat olarak kullanılmaktadır [7, 8, 13].

Çok yıllık bir bitki olan *Curcuma Longa L.*, İngilizcede *turmeric*, Hintçede *haldi* ve Japoncada *ukon* olarak adlandırılmıştır. Geçmişi çok uzun tarihlere dayanmakta olup M.Ö. 2000 yılından beri Asya tıbbında kullanılmaktadır [14]. Zerdeçalın öğütülmüş köksapları (rizomları), bir baharat olarak özellikle köri tozu ve birçok sos çeşidinin bir bileşeni olarak, gıdalarda uzun bir kullanım geçmişine sahiptir [12]. Aynı zamanda, tabletler ve kapsüllerdeki bir besin takviyesi, merhemler ve enerji içeceklerinin yanı sıra sabunlar ve kozmetikler gibi çeşitli sektörlerde pazarlanmaktadır. Bunun yanında gıda renklendirme ajanı olarak da yaygın şekilde kullanılmaktadır [8].

### 2.2. Kurkumin Maddesi

*Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından ekstrakte edilmiş olan kurkumin, kimyasal olarak karakterize edilen zerdeçalın aktif fenolik bileşenlerinden birisidir [9, 12, 15].

Kurkumin, 1815 yılında önce Vogel ve Pelletier tarafından "sarı rengi veren madde" olarak tanımlanmış ve 1842'de [13] veya 1870'de [16, 17] kristalize edilerek tamamen saf olarak Vogel Jr tarafından elde edilmiştir. 1900'lerin ortalarında, kurkuminin biyolojik olarak aktif bir bileşen ve antibakteriyel özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. 1953 yılında Srinivasan, zerdeçalın kromatografi yoluyla analizi ile

kurkuminin yanı sıra kurkuminoid denilen diğer bileşenlerin varlığını da tespit etmiştir [13]. Ayrıca zerdeçalın temel aktif bileşeni olan kurkumin ferülorometan iskeleti, Lampe ve Milobedzka tarafından 1910'da sentezlenerek doğrulanmıştır [16, 17].

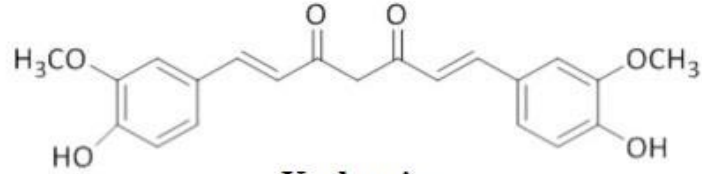
Antik Hindu kutsal kitabı Ayurveda'da kurkuminin yararından bahsedilir [14]. Kurkumin son yıllarda yüzlerce yayınlanmış makaleye konu olmuş ve antioksidan, antienflamatuar, kanser, kemopreventif ve potansiyel kemoterapötik özellikleri çalışılmıştır [14, 15]. Geleneksel Çin tıbbında çeşitli hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için birçok faydası olduğu belirtilen zerdeçalın tıbbi tedavide önemi, öncelikle en aktif bileşen olan sarı-turuncu renkli kurkuminden kaynaklandığı ileri sürülmüştür [10-13].

Asya ülkelerinde zerdeçal tüketiminin yüksek olması ve kanser oranının düşük olması kemoprevensiyondaki rolünü göstermektedir. Ayrıca kurkumin geleneksel bir kan temizleyici olarak da bilinir. Soğuk algınlığı, ateş, karaciğer ve ülser gibi rahatsızlıkların iyileşmesinde faydalı olduğu saptanmıştır [9].

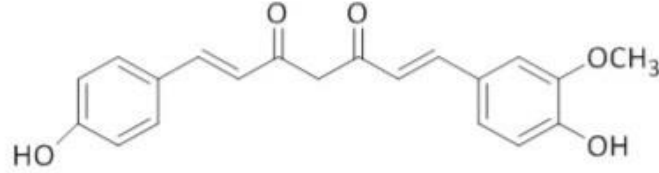
### **2.2.1. Kurkuminin Kimyasal ve Fiziksel Yapısı**

Zerdeçal bileşiği; karbonhidrat (%69,4), protein (%6,3), yağ (%5,1), mineral (%3,5) ve nem (%13,1) içeriklerinden oluşur [13].

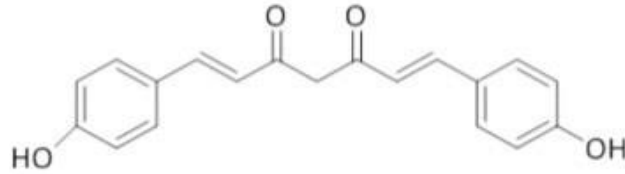
Buna ilaveten zerdeçalda 300'den fazla biyoaktif bileşik tespit edilmiştir, ancak birincil kurkuminoid olan kurkumin, üzerinde en çok araştırma yapılanıdır [8]. Kurkuminoidler ise; kurkumin (%77), demetoksikurkumin (%17) ve bisdemetoksikurkuminden (%3) oluşurlar [17, 18]. Kurkumin, demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkuminin kimyasal yapıları Şekil 2.1.'de gösterilmiştir. Ayrıca kurkuminin diğer iki doğal türevinden çok daha etkili bir antioksidan olduğu ifade edilmektedir [19].



**Kurkumin**



**Demetoksikurkumin**



**Bisdemetoksikurkumin**

**Şekil 2.1.** Kurkumin, demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkuminin kimyasal yapıları [20, 21].

Kurkuminin kimyasal adlandırması [1,7-bis-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-1,6-heptadien-3, 5 -dion] [12-14, 18, 21] olup, kapalı formülü ise  $C_{21}H_{20}O_6$  şeklindedir [13, 16]. Zerdeçal köksaplarından ekstrakte edilen kurkumin maddesi [22], Şekil 2.2.'de gösterilmiştir.



**Şekil 2.2.** Zerdeçal köksapları ve kurkumin maddesi

Kurkumin 368,37 moleküler ağırlığa ve 183°C'lik bir erime noktasına sahiptir [14]. Kurkumin, zerdeçal tozunun yaklaşık %2-5'ini oluşturan lipofilik bir polifenoldür. Ayrıca tıbbi özellikleri ile bilinen önemli bir sarı-turuncu doğal fitokimyasaldır. Kurkumin çoklu fenolik grupları ve eşlenik çift bağları olan hidrofobik bir karaktere sahiptir [23].

Kurkumin bir bis- $\alpha$ ,  $\beta$ -doymamış  $\beta$ -diketondur. Bu haliyle kurkumin, enol totomeri ile dengede bulunmaktadır. Bis-keto formu, asidik ve nötr sulu çözeltilerde ve hücre zarında baskındır. pH 3-7'de kurkumin olağanüstü güçlü bir H atomu donörü olarak görev yapar. Bunun nedeni, keto kurkumin formunda, iki metoksifenol halkası arasındaki heptadienon bağlantısının, yüksek derecede aktif bir karbon atomu içermesi ve bu karbondaki C-H karbon bağlarının, bitişik olmayan oksijenler üzerindeki eşlenmemiş elektronun lokalizasyonu nedeniyle çok zayıf olmasıdır. Buna karşılık, pH 8'in yukarısında, heptadienon zincirinin enolat formu baskındır ve kurkumin esas olarak fenolik antioksidanların temizleyici aktivitesi için daha tipik bir mekanizma olan bir elektron donörü olarak görev yapar [14].

Kurkumin kuru yiyeceklerde kararlıdır. Isıya nispeten kararlı olduğu için ısı işlem görmüş gıdalarda kullanılabilir. Kurkuminin ana renklendirme bileşenleri, klorürlere, fosfatlara ve bikarbonatlara etkisizdir [12].

Kurkumin asidik ve nötr pH'ta suda çözünür değildir. Ancak aseton, dimetilsülfoksit, izopropanol, etil asetat, metanol ve etanolde çözünür. Işığa duyarlılığının bir sonucu olarak, kurkumin içeren biyolojik numuneler ışıktan korunmalıdır. Kurkuminin rengi büyük ölçüde pH'a bağlıdır; pH 2.5-7.0 aralığındayken yoğun bir sarı renge sahiptir fakat pH 7.0'ın üzerinde kırmızıdır [12-14, 17, 19].

### **2.2.2. Kurkuminin Kullanım Alanları**

Kurkumin baharat, lezzet verici ve gıda boyası olarak kullanılır. Biyolojik etkinliği nedeniyle çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır [16]. Süt ürünleri, katı ve sıvı yağlar, katı yağ emülsiyonları, yenilebilir buzlar, meyve ve sebze ürünleri, şekerlemeler, tahıl ürünleri, unlu mamüller, et ve et ürünleri, balık ve balık ürünleri, yumurta ve yumurta ürünleri, baharatlar, çorbalar, soslar ve protein ürünleri, özel

beslenme amaçlı gıdalar, içecekler, hazır yiyecekler ve karma gıdalar gibi alanlarda kullanılması yaygındır.

Aromatik, uyarıcı ve renklendirici özelliklerine ek olarak bazı doğal bileşiklerle karıştırılarak topikal yaralar, iltihaplanma ve tümörler için bir tedavi aracı olarak kullanılır [14].

Kuzey Hindistan'da, kadınlara doğumdan sonra günde iki kez içmeleri için bir bardak ılık sütle kurutulmuş zencefil kökü tozu ve ballı bir tonik taze zerdeçal ezmesi verilir. Doğum kanalındaki oluşan bir laserasyonun iyileşmesine yardımcı olmak için zerdeçal lapası da uygulanmaktadır [6].

### **2.2.3. Kurkuminin Antioksidan, Antienflamatuar ve Diğer Aktiviteleri**

Kurkumin; antioksidan, antienflamatuar, antimutajenik, antimikrobiyal, antizehir, antitümör, antiprotozoal, anti-HIV ve antikanser potansiyeli nedeniyle son yıllarda ilgi odağı olmuştur [21, 24, 25]. Ayrıca hemen hemen hiçbir yan etkisinin olmadığı ifade edilmektedir [26, 27]. Kurkumin, antienflamatuar ve antioksidan bir ajan olarak belirlenmesi, hidroksil ve metoksi grupları nedeniyle bu özelliklere sahip olduğu düşünülmektedir [13]. Buna ilaveten nötr ve asidik pH'ta etkili antioksidan kapasitesine, hücre sinyal yollarının çok çeşitli seviyelerde inhibe edilmesine, hücresel enzimler üzerindeki farklı etkilerine, anjiyogenez ve hücre adezyonuna etkilerine bağlanabilir [14]. Birçok çalışma da kurkuminin biyolojik etkisinin büyük oranda, doğrudan farklı proteinlere (siklooksijenaz, lipoksijenaz) bağlanma veya hücre içi redoks durumunu modüle etme kabiliyetinden geldiğini göstermiştir [18].

Çalışmalarda kurkuminin çok güçlü bir antioksidan etkiye sahip olduğu, süperoksit anyon ve hidroksil radikallerini temizleyebildiği saptanmıştır [14]. Kurkuminin lipid peroksidasyonunu önleme kabiliyetinde diğer baharatlardan önemli ölçüde daha etkili olduğunu kanıtlanmıştır.

Antioksidan etkisi, E vitaminden sekiz kat daha güçlü ve lipid peroksit oluşumunun önlenmesinde sentetik antioksidan BHT'den önemli ölçüde daha etkilidir [12]. Kurkuminin çeşitli moleküler hedefler yoluyla enflamatuar hücre proliferasyonunu, metastazı ve anjiyogenezi inhibe ederek etkinliğini gösterdiği belirtilmektedir [13]. Oksidatif stres ve yerçekimi olmayan bir alanda uyku sırasında

C ve E vitaminlerinin kaybı üzerine yapılan araştırma, kurkuminin bu vitaminlerin kaybını azalttığını göstermiştir [18].

Bununla birlikte diğer diyet fitokimyasallarına bağlı olarak kurkuminin, doza ve kimyasal ortama, örneğin serbest  $\text{Cu}^{2+}$  iyonlarının mevcudiyetine bağlı olarak antioksidan etkilerin yanı sıra pro-oksidan aktiviteye sahip olabileceği belirtilmektedir [14].

Kurkumin bileşiminde linoleik asidin oksidasyonu çok yavaştır ve diyet takviyesi olarak kullanıldığında antioksidan etkisi yaklaşık %80'dir. Serbest radikalleri bağlayacak şekilde çalışır ve ayrıca antioksidan özelliklerinden sorumlu bir hidrojen atomu sağlar [18].

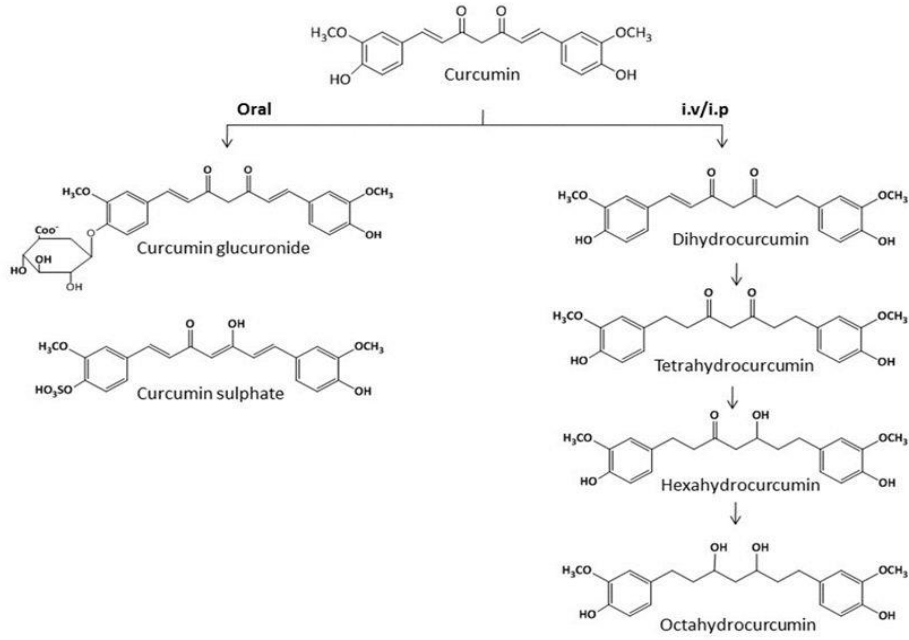
Bu alanda yapılan diğer bir çalışmaya göre kurkuminin total antioksidan aktivitesi, indirgeme kapasitesi, hidrojen peroksit giderme aktivitesi, ferröz iyonları ( $\text{Fe}^{2+}$ ) selatlama aktivitesi, DPPH, ABTS<sup>•+</sup> ve süperoksit anyon radikalleri giderme aktiviteleri belirlenmiştir. Sonuçlar standartlarla kıyaslandığında belirtilen aktivitelerin birer doğal antioksidan olan  $\alpha$ -tokoferol ve onun da suda çözünen analogu olan trolokstan daha yüksek olduğu gözlenmiştir [28].

Diğer taraftan kurkumin, vücut tarafından yetersiz emilimi, yüksek metabolizma hızı ve vücuttan yüksek eliminasyon nedeniyle sınırlı bir biyoyararlanıma sahiptir [13, 29].

Son zamanlarda kurkumin biyoyararlanımını arttırmak için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri, kurkumin ile piperin kullanmaktır. Piperinin, kurkumin glukuronidasyonunu azaltarak, insanlarda ve farelerde kurkumin biyoyararlanımını arttırdığı gözlenmiştir. Lipozomal kurkumin, kurkumin nanoparçacıkları ve fosfolipit komplekslerinin kullanımı ise diğer yöntemler arasındadır. Ayrıca yapısal kurkumin analoglarının kullanımının biyoyararlanımı arttırdığı belirtilmektedir [13].

Daha önce yapılan bir dizi çalışma, kurkuminlerin oral yolla uygulandığında insan vücudunda zayıf biyoyararlanım sergilediğini göstermiştir. Oral alımın yanı sıra deri altı girişinin kurkumini dokularda daha uzun süre tutmada etkili olduğu kanıtlanmıştır ve ilgili görsel Şekil 2.3.'de verilmiştir. [18].





Şekil 2.3. Oral ve diğer uygulama yollarıyla kurkumin metabolizması [20].

#### 2.2.4. Kurkuminin Kanser ve Diğer Hastalıklar Üzerindeki Etkisi

Kurkumin, kanser gelişiminin birçok aşamasında; transformasyonu, başlangıcı, gelişimi ve tümörün invazyonunu, anjiyogenez ve metastazı baskılamasında etkili bulunmuştur. Ayrıca hücre proliferasyon yolu, hücre hayatta kalma yolu ve kaspaz aktivasyon yoluyla tümör hücrelerinin büyümesini baskıladığı belirlenmiştir [6]. Özellikle kurkuminin gen transkripsiyonunu etkileme ve preklini modellerde apoptozu indüklemeye kabiliyeti, kanser kemoprevensiyonu ve kemoterapisindeki potansiyel faydasını ortaya koymaktadır [14].

Kurkuminin obezite, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar ve inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi çeşitli inflamatuvar hastalıkların tedavisinde etkili olduğu belirtilmektedir. Kurkumin bu etkileri sayesinde kolon, meme, pankreas, prostat, ağız, damak, yemek borusu, cilt, mide, karaciğer ve akciğer kanseri gibi çok çeşitli kanser türü için kemo-koruyucu bir aktiviteye sahiptir [9, 13, 14].

Karaciğer enzimlerini azaltarak yüksek kolesterol içeren diyetlerde hepatik oksidativ stres üzerinde önemli bir etki gösterir, ayrıca kalp hastalığı enzimi markörlerini azaltır [18].

Kurkuminin radyoterapinin etkinliğini arttırdığı ve bu nedenle tedaviyi daha fazla hızlandırabileceği belirtilmektedir [13].

Kurkumin, meme kanseri hücrelerinin büyümesini inhibe etmek için çok sayıda laboratuvar çalışmasında incelenmiştir. Androjene bağımlı ve androjenden bağımsız prostat kanseri hücre hatlarının çoğalmasını azaltabilmektedir [9].

Serbest radikallerin üretilmesiyle, etkiyen maddelerin ürettiği iltihabı önler. Kurkuminle tedavi edilen farelerin pençesinde ve karaciğerinde inhibisyon gözlenmiştir; zerdeçal ve kurkumin eklem iltihabı ve kanser tedavisi için önemli bir özellik olan bazı transkripsiyon faktörleri ile etkileşime girerek hareket eder [11].

Kurkuminin protein homeostazını korumaya yardımcı olabileceği ve yaşlanma ile ilişkili hastalıkların önlenmesinde etkili olabileceği belirtilmektedir [13].

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, kurkumin ve kersetin, ayrı ayrı ve insan mide kanseri MGC-803 hücrelerine birlikte uygulanmıştır. Kombine edilmiş tedavinin, mitokondriyal membran potansiyelinin kaybı ile birlikte hücre çoğalmasının önemli ölçüde inhibe edilmesiyle sonuçlandığı tespit edilmiştir [9].

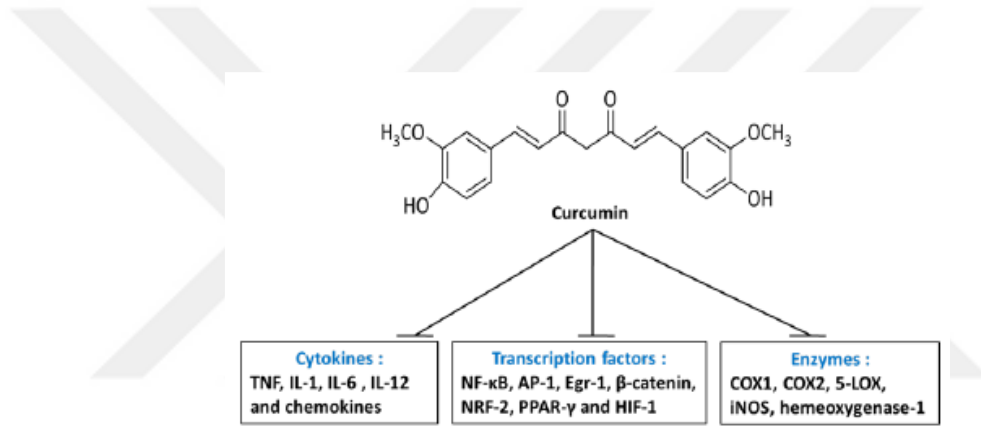
Alzheimer hastalığında  $\beta$ -amiloid plaklarının azalması ve mikroglia oluşumu yoluyla çeşitli terapötik yararlar sağladığı, hastalarda nöronların bozulmasını geciktirdiği belirtilmiştir [13].

Ayrıca kolon adenomlarının ve adenokarsinomların oluşumunu önler. Akciğer tümör nodüllerinin sayısını azaltır, tümör taşıyan hayvanların hayatta kalma oranını artırır. Hücre proliferasyonunu azaltır ve kromozomal sapmaların sayısını azaltır [11].

En sık görülen nörodejeneratif hastalıklardan biri olan Parkinson hastalığı (PD), *substantia nigra*'da dopaminerjik nöronların kaybıyla karakterizedir. Kurkuminin nöroproteksiyon ile ilgili en önemli biyolojik etkisi, antioksidan işlevidir.

Cilt hastalıklarının tedavisinde kurkumin kullanımı eski zamanlara dayanır. Hindistan'da göz enfeksiyonları, ısırıklar, yanıklar, akne tedavisi, kaşıntı ve diğer cilt hastalıklarında kolay bir tedavi yöntemi olarak yaygın şekilde kullanılır. Ayrıca diğer Asya ülkelerinde de alerji ve astım tedavisi için uzun süredir kullanılmaktadır [13].

Diğer bir görüşe göre tek başına bir gıda veya bileşen, faydalı özelliklerine dair kanıtlar olsa bile kanseri tamamen önleyemez. Zerdeçaldaki kurkuminin kemopreventif özelliklere sahip olduğunu gösteren laboratuvar çalışmaları, bu bileşeni tüketmenin kanseri kesinlikle önleyeceği anlamına geldiğini yansıtmamaktadır. Laboratuvar ortamında ve hayvanlar üzerine yapılan çalışmalar, zerdeçalın sağlık yararları ile ilişkili fizyolojik süreçlerde rol oynayabileceğini gösterse de medyadaki kanser önleme ile ilgili bildirilen iddialar gerçek kanıtların çok ötesine geçmektedir [8]. Ayrıca güçlü bir antienflamatuar etki gösteren kurkuminin moleküler hedefleri Şekil 2.4.'de gösterilmiştir. Sonuç olarak, kurkumin gibi benzeri fitokimyasalların bir dereceye kadar kemopreventif aktiviteye sahip olması beklenmektedir [10].



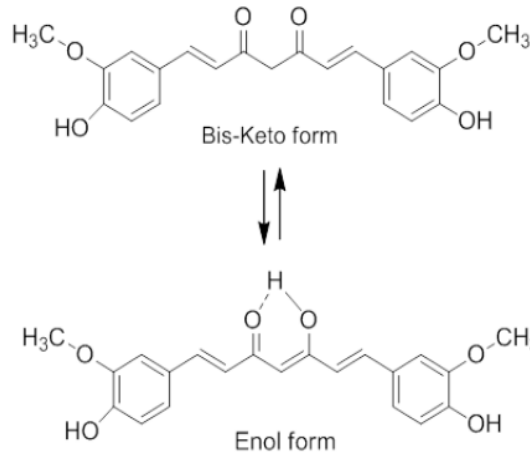
Şekil 2.4. Kurkuminin antienflamatuar etkileri için moleküler hedefleri [20].

### 2.2.5. Kurkumin Eldesi

Kurkumin eldesi için öncelikle kurutulmuş ve öğütülmüş zerdeçal yumrularından uygun bir çözücü kullanılarak kurkumin özütlenir. Ekstraksiyon işlemi, ham maddenin toz haline getirilmesini gerektirir ve renklendirici maddeyi seçici bir şekilde özütleyen uygun bir çözücü ile yıkanır. Solventin damıtılmasından sonraki bu işlem, uçucu yağlar ve diğer reçineli ekstraktörler ile birlikte %25-35 bölgesinde renklendirici madde içeriği olan bir oleoresin verir. Bu şekilde elde edilen oleoresin, kurkumin pigmentini oleoresinden çıkarabilen seçici çözücüler kullanılarak başka yıkamalara tabi tutulur. Bu işlem, kurkumin tozu olarak bilinen %90'ı renklendirici madde içeriği ve çok az uçucu yağ ve diğer doğal kökenli kuru madde ile toz haline

getirilmiş, saflaştırılmış bir gıda rengi verir [12]. Sentetik kurkumin gıda katkı maddesi olarak kullanılmaz [12, 14, 18].

Kurkuminin suda çözünmez, ancak zerdeçal ekstraktlarının suda dağılılabılır formları mevcuttur. Kurkumin, pratik olarak asidik ve nötr pH'ta suda çözünemeyen, alkalilerde ve yağda çözünen bir pigmenttir. Yüksek sıcaklıklarda ve asitlerde kararlıdır, ancak alkali koşullarda ve ışık varlığında kararsızdır. Suda çözünebilir kurkuminin çeşitli yüzey aktif madde misel sistemlerine (örneğin, sodyum dodesil sülfat, setilpiridinyum bromür, jelatin, polisakaritler, polietilenglikol, siklodekstrinler) dahil edilmesiyle hazırlanan preparatlar rapor edilmiştir. Çözeltilerde kurkumin ana renklendirme bileşenleri keto-enol tautomerizm sergiler (Şekil. 2.5.) ve çözücüye bağlı olarak %95'e kadar enol formdadır [12].



**Şekil 2.5.** Fizyolojik koşullar altında kurkumin tautomerizmi [20].

Ayrıca yapılan çalışmalarda *Curcuma longa* cinsinden kurkumini ekstrakte etmek için çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon [30-31], süper kritik karbon dioksit destekli ekstraksiyon [32], ultrason destekli ekstraksiyon [33], katı faz ekstraksiyon [34], dinamik maserasyon [35], soxhlet ekstraksiyon [36], süperkritik sıvı ekstraksiyonu [37], enzim destekli iyonik sıvı ekstraksiyonu [38] ve kritik sıcaklık altında su ekstraksiyonu [39] teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Kurkuminin nicel analizi, genel olarak UV Vis spektrofotometrik [40, 41], fluorimetrik [42], foto dizi diyot [43-45], elektrokimyasal [46], kütle spektrometrik ve sıvı kromatografik teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir [47-50].

Bunlara ek olarak, son yıllar da kurkumini analiz etmek için farklı modifiye çalışma elektrotları kullanılarak gerçekleştirilen voltammetrik teknikler de önerilmiştir [51-57].

### **2.3. Serbest Radikaller ve Özellikleri**

Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir unsurdur. Hücreler enerji üretmek için oksijen kullandıklarında, mitokondri tarafından ATP üretiminin bir sonucu olarak serbest radikaller meydana gelir. Bu ürünlere hücrel redoks işleminden kaynaklanan ve hem toksik hem de faydalı bileşikler olarak ikili rol oynayan reaktif oksijen türleri (ROS) adı verilir [58].

Reaktif oksijen türleri (ROS) terimi, moleküler oksijenden ( $O_2$ ) üretilen bir dizi metabolit anlamına gelir. Reaktif azot türlerinin aşırı üretimine nitrosatif stres denir. Reaktif nitrojen türleri (RNS) enflamatuvar süreçler sırasında bol miktarda üretilir [59].

Serbest radikaller, atomik veya moleküler orbitallerde bir veya daha fazla eşleştirilmemiş elektron içeren moleküller veya moleküler gruplar olarak tanımlanabilir [60].

Diğer bir tanıma göre serbest radikaller, zincir reaksiyonları ile sonuçlanabilecek eşleşmemiş elektronlu atomlar veya atom gruplarıdır. Zincir reaksiyonları, her aşaması bir sonraki adımı tetikleyen serbest bir radikal oluşturan bir dizi adımı içerir.

Serbest radikal türleri, reaktif oksijen türlerini (ROS), reaktif azot türlerini (NOS), karbon merkezli radikalleri ve kükürt merkezli radikalleri içerir. Canlı sistemlerdeki NOS, esas olarak nitrik oksit (NO) ve azot dioksiti içerir. Nitrik oksit, hidroksil radikalleri ve azot dioksit radikallerini de üretebilen, eşleşmemiş elektronu ile serbest bir radikaldir [61].

Serbest radikallerin doğada oluşumu endojen ve eksojen kaynaklıdır. Endojen serbest radikal kaynakları hücre içi olarak oto-oksidasyondan veya küçük moleküllerin etkisizleştirilmesinden üretilir [59].

Hem reaktif oksijen türleri (ROS) hem de reaktif nitrojen türleri (RNS) olan serbest radikallerin oluşum bölgeleri; mitokondri, lizozomlar, peroksizomlar, endoplazmik retikulum, plazma zarı ve fagositik hücreler gibi endojen kaynakların yanı sıra kirlilik, alkol, tütün dumanı, ağır metaller, geçiş metalleri, endüstriyel çözücüler, böcek ilaçları, halotan, parasetamol ve radyasyon gibi eksojen kaynakları kapsar [59, 62]. Bazı Reaktif oksijen türleri (ROS) Tablo 2.1.'de, Reaktif nitrojen türleri (RNS) de Tablo 2.2.'de listelenmiştir.

Orbitallerdeki eşleşmemiş elektronlar genellikle serbest radikallere önemli ölçüde reaktivite kazandırır. Oksijenden türetilen radikaller, canlı sistemlerde üretilen en önemli radikal tür sınıfını temsil eder. Moleküler oksijen (dioksijen) benzersiz bir elektronik konfigürasyona sahip bir radikaldir. Bir elektronun dioksijene eklenmesi, süperoksit anyon ( $O_2^{\cdot-}$ ) radikalini oluşturur. Metabolik süreçlerle ortaya çıkan veya fiziki ışınlama yoluyla oksijenin aktivasyonunu takiben ortaya çıkan süperoksit anyonu, birincil ROS olarak kabul edilir. Doğrudan ya da yaygın olarak enzim veya metal yoluyla ikincil ROS üretmek için diğer moleküllerle etkileşime girebilir [60].

**Tablo 2.1.** Reaktif oksijen türleri (ROS) [62].

<b>Radikaller</b>	<b>Formülü</b>	<b>Yarılanma ömrü</b>
Süperoksit	$O_2^{\cdot-}$	$10^{-6}$ sn.
Hidroksil	$OH^{\cdot}$	$10^{-10}$ sn.
Alkoksil radikal	$RO^{\cdot}$	$10^{-6}$
Peroksil Radikal	$ROO^{\cdot}$	17 sn.
<b>Nonradikaller</b>	<b>Formülü</b>	<b>Yarılanma ömrü</b>
Hidrojen peroksit	$H_2O_2$	stabil
Singlet oksijen	$^1O_2$	$10^{-6}$ sn.
Ozon	$O_3$	sn.
Organik peroksit	$ROOH$	stabil
Hipokloröz asit	$HOCl$	stabil (dk.)
Hipobromöz asit	$HOBr$	stabil (dk.)

**Tablo 2.2.** Reaktif nitrojen türleri (RNS) [62].

<b>Radikaller</b>	<b>Formülü</b>	<b>Yarılanma ömrü</b>
Nitrik oksit	NO <sup>•</sup>	sn. <sup>a</sup>
Nitrojen dioksit	NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	sn.
<b>Nonradikaller</b>	<b>Formülü</b>	<b>Yarılanma ömrü</b>
Peroksinitrit	ONOO <sup>-</sup>	10 <sup>-3</sup> sn.
Nitrosil katyon	NO <sup>+</sup>	sn.
Nitroksil anyon	NO <sup>-</sup>	sn.
Dinitrojen trioksit	N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	sn.
Dinitrojen tetroksit	N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	sn.
Nitröz asit	HNO <sub>2</sub>	sn.
Peroksinitrik asit	ONOOH	tamamen stabil
Nitril klorid	NO <sub>2</sub> Cl	sn.

<sup>a</sup>: Bazı radikallerin yarı ömrü çevre ortamına bağlıdır, örneğin havadaki doymuş bir çözültideki NO<sup>•</sup> yarı ömrü birkaç dakika olabilir.

### 2.3.1. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin eşleşmemiş elektron sayısı onları kararsız, kısa ömürlü ve çok reaktif hale getirir. Yüksek reaktiviteleri nedeniyle, stabilite elde etmek için diğer bileşiklerden elektronları soyutlayabilirler. Böylece saldırıya uğrayan molekül, elektronunu kaybeder ve serbest radikal haline gelir ve sonunda canlı hücreye zarar veren bir zincir reaksiyonu basamağını başlatır [62].

Fakat reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS), yaşam sistemine hem faydalı hem de toksik bileşikler olarak iki yönlü bir rol oynarlar. Orta veya düşük seviyelerde ROS/RNS, faydalı etkilere sahiptir ve immün fonksiyon (örneğin, patojenik mikroorganizmalara karşı savunma), çeşitli hücrel sinyalleşme yollarında, mitojenik cevapta ve redoks düzenlemesinde olduğu gibi çeşitli fizyolojik fonksiyonlarda bulunur. Yüksek konsantrasyonda hem ROS hem de RNS, sırasıyla oksidatif stres ve nitrosatif stres oluşturur, bu da biyomoleküllerde potansiyel hasara neden olur [62].

Dolayısıyla düşük veya orta seviyelerdeki ROS, hücrel tepkiler ve bağışıklık fonksiyonu üzerinde yararlı etkiler gösterir. Yüksek konsantrasyonlarda ise tüm hücrel yapılara zarar verebilecek zararlı bir süreç olan oksidatif stres oluşturur [58].

Yüksek miktarda reaktif oksijen türleri (ROS), antioksidan sistemi tarafından elimine edilmezse, protein, lipid, amino asitler ve deoksiribo nükleik asit (DNA) dahil olmak üzere yaşayan hücrelerde bulunan hemen hemen her molekülle reaksiyona girerek oksidatif zarar verici etkiler gösterir [63].

Oksidatif stres ise serbest radikallerin oluşumu ve nötralizasyonu arasındaki dengesizlikten kaynaklanır. Örneğin, hidroksil radikal ve fazla peroksinitrit, lipid peroksidasyon adı verilen bir işlemle hücre zarlarına ve lipoproteinlere zarar verebilir. Bu reaksiyon malondialdehit, sitotoksik ve mutajenik olan konjüge dien bileşiklerinin oluşumuna yol açar. Lipid peroksidasyonu, radikal bir zincir reaksiyonu ile meydana gelir, yani bir kez başladıktan sonra hızlı bir şekilde yayılır ve çok sayıda lipid molekülünü etkiler [58].

Serbest radikallerin neden olduğu oksidatif stresin; şeker hastalığı, nörodejeneratif hastalıklar (parkinson hastalığı, alzheimer hastalığı ve multiple skleroz), kardiyovasküler hastalıklar (ateroskleroz ve hipertansiyon), solunum yolu hastalıkları (astım), katarakt gelişimi, romatoid artrit ve kanserler (kolorektal, prostat, meme, akciğer, mesane kanserleri) gibi çeşitli hastalıkların oluşmasında rol oynadığı da bilinmektedir [62].

### **2.3.2. Serbest Radikal Araştırmalarının Tarihi Süreci**

Son yıllarda çeşitli fizyolojik şartlardaki önemli rolleri ve birçok hastalıkla ilişkilendirilmeleri sebebiyle serbest radikallerin biyolojideki rolünü incelemek için yapılan çalışmalar giderek artmaktadır. 1900 yılında ilk kez, Michigan Üniversitesi Kimya Profesörü Moses Gomberg, canlı sistemde organik bir serbest radikal, trifenil metil radikalinin ( $Ph_3C^{\bullet}$ ) varlığını ortaya koymuştur. 1954'te daha sonra, Gershman oksijenin toksisitesinin serbest radikal oluşturma kabiliyetinden kaynaklandığı "serbest oksijen toksisitesi teorisi"ni ileri sürmüştür. Aynı yıl, Commoner ve arkadaşları Elektron Paramanyetik Rezonans'ı (EPR) incelemişler ve biyolojik maddelerde serbest radikallerin varlığını doğrulamışlardır. Kısa bir süre sonra,

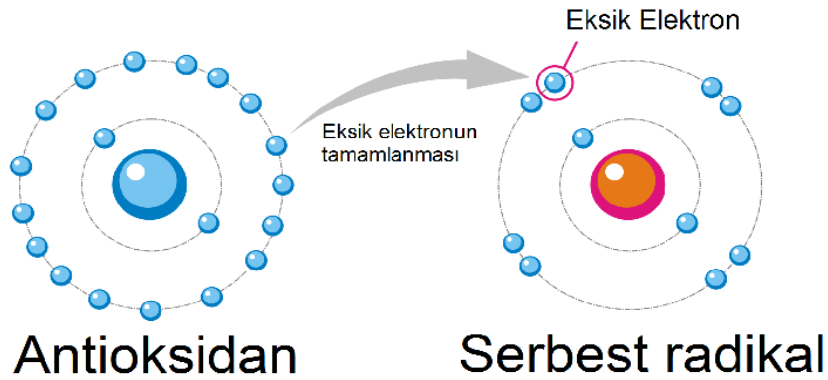


1956'da Denham Harman, serbest radikallerin yaşlanma sürecinde merkezi bir rol oynadığını belirten "serbest yaşlanma teorisi"ni ileri sürmüşlerdir.

Serbest radikal araştırmaların ikinci dönemi, 1969 yılında, süperoksit anyonuna karşı ilk enzimatik savunma sistemi olan süperoksit dismutazı keşfeden McCord ve Fridovich tarafından başlatılmıştır. 1971'de ilk kez, Loschen, reaktif oksijen türlerinin hücresel metabolik solunumda üretildiğini belirtmiştir. 1977'de Mittal ve Murad, hidroksil radikal OH'ın enzim guanilat siklazını aktive ederek ikinci haberci siklik GMP oluşumunu indüklediğini bildirmiştir. 1989'da daha sonra, Halliwell ve Gutteridge, reaktif oksijen türlerinin (ROS) hem serbest hem de nonradikal oksijen türevlerini içerdiğine değinmiştir [62].

#### 2.4. Antioksidanlar ve Özellikleri

Serbest radikaller, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküller olarak adlandırılmaktadır. Bu radikaller kararsız bir yapıya sahip oldukları için organizmadaki diğer kararlı moleküllerin yapılarını bozarlar ve bu moleküllerin kararsız hale geçmesine neden olurlar. Antioksidanlar ise, serbest radikallere uygun elektronlar sağlayarak kararlı hale geçmelerini sağlayan moleküllerdir [64] (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Antioksidanlar ve serbest radikallerin etkileşimi

Antioksidanlar lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi biyolojik substratlardan oksidasyonu önleyebilen veya geciktirebilen moleküller olarak tanımlanabilirler [65].

Antioksidanlar, oksidatif işlemlerin etkilerini engelleyebilen, özellikle reaktif oksijen ve azot türleriyle veya serbest radikallerle reaksiyona girebilen bileşiklerdir. Antioksidan kapasitesi, organizmaların veya bileşiklerin serbest radikallerle etkileşime girme ve zararlı etkilerini önleme yeteneğidir [66].

Antioksidanların fizyolojik görevi, serbest radikal içeren kimyasal reaksiyonların bir sonucu olarak ortaya çıkan hücresel bileşenlerin zarar görmesini engellemektir [67]. Antioksidanlar, serbest radikal hasarına karşı ilk savunma hattımızdır. İdeal sağlık ve refahı sağlamak için kritik öneme sahiptirler. Çalışmalar, bir antioksidan diyetin uzun vadede sağlık üzerinde çok olumlu bir etkisi olduğunu göstermektedir [68].

Antioksidanlar hem gıdalarda hem de gıda alımında yüksek oranda serbest lipit radikalleri nedeniyle insan beslenmesinde en önemli konulardan biri haline gelmiştir. Antioksidanlar, hava kirliliğinin neden olduğu çevresel strese karşı da faydalıdırlar [69-70].

Antioksidanlar serbest radikalleri nötralize etmek için etkileşimli ve sinerjik olarak çalışan, endojen ve eksojen kökenli çeşitli bileşenleri içerir. Askorbik asit (C vitamini), tokoferoller ve tocotrienoller (E vitamini), karotenoidler gibi besin kaynaklı antioksidanlar ve fenolikler (stilbenler, benzoik ve hidrosibenzoik asitler gibi fenolik asitler, sinamik ve hidrosisinamik asit türevleri, flavonoidler, flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanlar, ve anilosiyanillerin antilosiyanilleri, flavosiyanidinleri veya 2-fenilkromenyum iyon iskelet) temel eksojen antioksidanlar olarak kabul edilir.

Serbest radikal söndürme reaksiyonlarını katalize eden süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon redüktaz gibi antioksidan enzimler; oksidatif reaksiyonları katalize edebilen serbest demir ve bakır iyonlarını ayıran ferritin, laktoferrin, albümin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcı proteinler bazı antioksidan bileşenlerini oluşturmaktadır.

$\alpha$ -tokoferol, likopen, lutein, izoflavonlar, yeşil çay ve üzüm çekirdeği ekstresi gibi bitki kaynaklı fitokimyasallar bu alanda büyük ilgi görmektedir. Klinik çalışmalar meyve, sebze, kepekli tahıllar, baklagiller ve omega-3 yağ asitleri yönünden zengin bir diyetin hastalık oluşumunda önleyici ajanlar olarak faydalı olabileceğini kanıtlamaktadır [70-72].

Antioksidan bakımından zengin gıda bileşenleri, hem gıda sistemlerinde hem de insan vücudunda, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi strese bağlı hastalıkları azaltmak için hayati bir rol oynamaktadır. Gıda sistemlerinde geciktirici lipid peroksidasyonu ve ikincil lipid peroksidasyon ürününün oluşumu, besin antioksidanlarının kullanımıyla önlenir. Diyet antioksidanlarının kullanımı, insan sağlığını geliştirmek için potansiyel olarak etkili kabul edilmiştir.

Yaban mersini, çilek, üzüm, erik, kuru erik, kuru fasulye, ıspanak, lahana, brokoli çiçekleri ve yonca filizlerinin yüksek miktarda antioksidan içerdiği ve birçok diyet menüsüne dahil edildiği kanıtlanmıştır [68]. Ve diğer bazı gıdalardaki antioksidanlar Tablo 2.3.'de verilmiştir.

**Tablo 2.3.** Bazı gıdalardaki antioksidanlar [73].

Buğday tohumu, kepekli tahıllar	Selenyum, E vitamini
Siyah veya yeşil çay	Kateşin
Dolmalık biber	Beta karoten, C vitamini
Kahverengi pirinç	Selenyum
Turunçgiller	C Vitamini
Fasulye	Kateşinler, E vitamini
Kayısı, kavun, şeftali	Beta karoten
Brokoli, yeşillik, ıspanak	Beta karoten, lutein, C vitamini
Tavuk	Selenyum
Mısır	Lutein
Pancar	Antosiyaninler
Havuç	Beta karoten
Yumurta	Lutein (sarısında), selenyum
Sarımsak ve soğan	Selenyum
Patlıcan	Antosiyaninler

Greyfurt	Likopen, C vitamini
Mango ve papaya	Beta karoten, C vitamini
Süt	A vitamini
Üzüm, kırmızı şarap	Antosiyaninler (kırmızı ve mor üzümlerde) resveratrol
Somon, ton balığı, deniz ürünleri	Selenyum
Domates (konserve)	Likopen, C vitamini
Elma	Kateşin
Tatlı patatesler	Beta karoten, C vitamini
Kabak	Beta karoten
Çilek, ahududu, yaban mersini	Antosiyaninler, kateşinler, ellagik asit (ahududu ve çileklerde), resveratrol (yaban mersininde), C vitamini
Fındık, fındık ezmesi, yağlar, tohumlar	E vitamini
Yulaf ezmesi	Selenyum
Fıstık	Resveratrol
Kuru erik	Antosiyaninler
Karpuz	Likopen, C vitamini

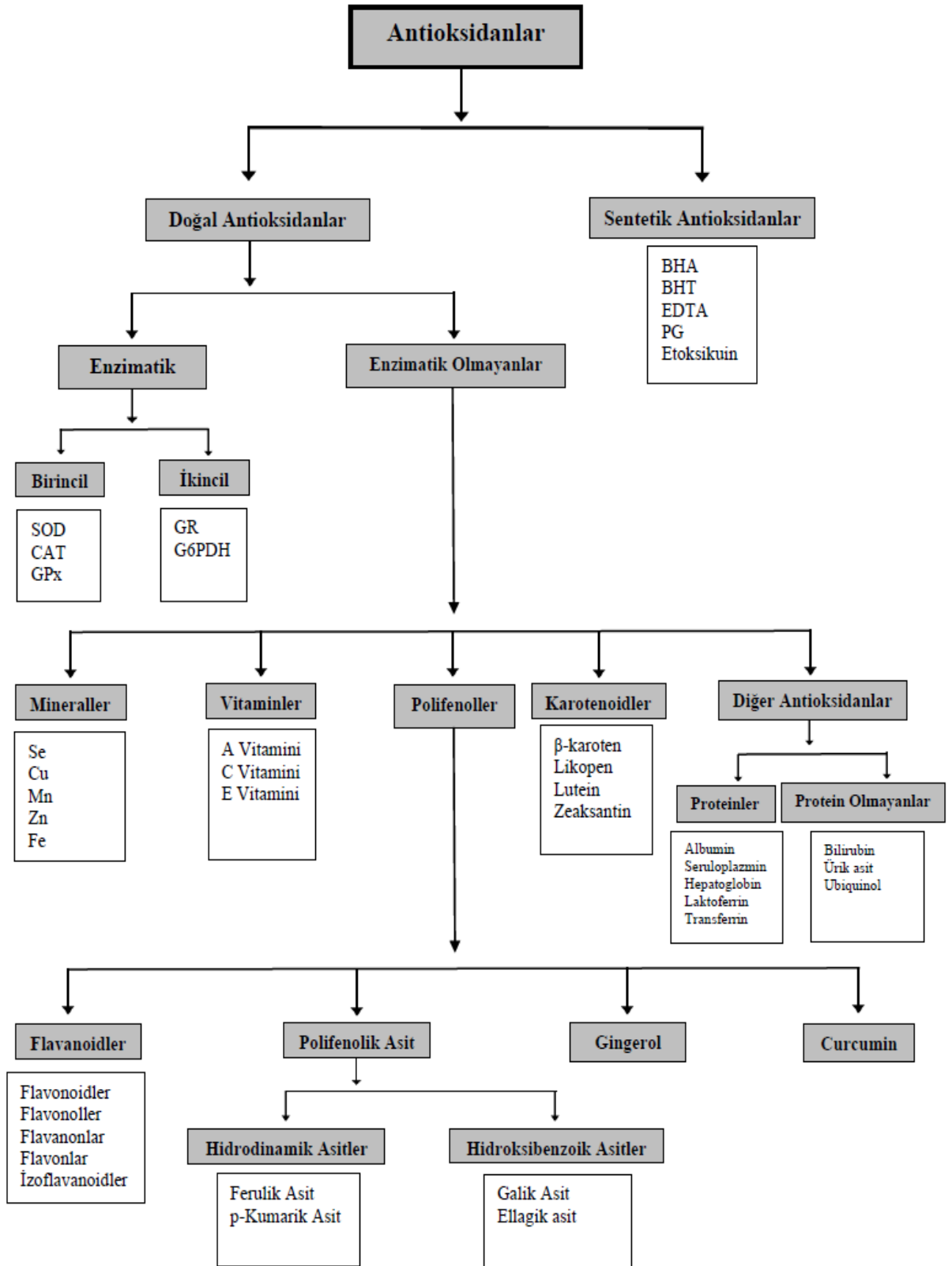
Diyet antioksidanlarına ek olarak vücut, serbest radikal kaynaklı hücre hasarına karşı korunmaya yardımcı olmak için birkaç endojen savunma mekanizmasına güvenir. Glutation, peroksidaz, katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) gibi antioksidan enzimler, oksidatif toksik ara maddelerini metabolize eder ve optimum katalitik aktivite için selenyum, demir, bakır, çinko ve manganez gibi mikrobeseinli kofaktörler gerektirir. Bu mikro minerallerden yetersiz bir diyet alımının, antioksidan savunma mekanizmalarının etkinliğini tehlikeye atabileceği öne sürülmüştür. Araştırmalar, bu önemli mikro minerallerinin tüketiminin ve absorpsiyonunun yaşlanma ile azalabileceğini göstermektedir [71].

### 2.4.1. Antioksidanların Etki Mekanizmaları

- **Toplayıcı etki:** Antioksidan enzimler, serbest oksijen radikallerini tutarak veya daha zayıf moleküllere dönüştürerek etki gösterirler.
- **Bastırıcı etki:** Serbest oksijen radikallerine bir hidrojen ekleyerek aktivitelerini azaltarak veya inaktif hale dönüştürerek etki gösterirler. Vitaminler ve flavanoidler bu özellikteki antioksidanlardır.
- **Zincir kırıcı etki:** Serbest oksijen radikallerinin zincirlerini kırıcı etki gösterirler. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler.
- **Onarıcı etki:** Serbest radikallerin meydana getirdiği hasarı onarıcı etkiye sahiptirler.
- **Hücrel kinaz kayıplarını önleme:** Oksidasyon reaksiyonlarını durdururlar.
- **Enzimatik etki:** SOD gibi antioksidan enzimler ile enzimatik olmayan antioksidanların sentezini arttırarak etkilerini gösterirler [64].

### 2.5. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, kaynaklarına göre doğal ve sentetik antioksidanlar olarak iki ana grupta sınıflandırılabilir. Bu sınıflandırma Şekil 2.7.'deki gibi şematik bir sistemde gösterilebilir [74].



Şekil 2.7. Antikositidlerin sınıflandırılması

### 2.5.1. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar, insan vücudunda metabolik işleme sentezlenir veya diğer doğal kaynaklardan desteklenirler. Aktiviteleri fiziksel, kimyasal özelliklerine ve etki mekanizmalarına bağlıdır. Doğal antioksidanlar enzimatik ve nonenzimatik antioksidanlar olarak iki kategoriye ayrılabilir [74].

Doğal antioksidanların sadece bir kısmı, serbest radikal temizleyiciler olarak emilir ve kullanılır. Doğal antioksidanlar, gıdalarda daha az aktif oldukları için sentetik antioksidanlardan daha büyük miktarlarda eklenmelidir, ancak asıl aktivite, özel şartlara ve gıda kompozisyonuna bağlıdır [69].

Son yıllarda doğal antioksidanlar, güvenilir olması ve yan etkilerinin olmaması nedeniyle sentetik antioksidanlara kıyasla daha fazla tercih edilmektedirler [75].

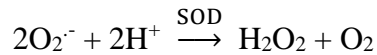
#### 2.5.1.1. Enzimatik Antioksidanlar

Enzimatik antioksidanlar insan vücudunda benzersiz bir şekilde üretilir ve birincil ve ikincil antioksidanlara ayrılabilirler. Birincil antioksidanlar, temel olarak süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutation peroksidaz (GPx) içerir [74].

##### a) Birincil Antioksidanlar

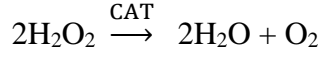
###### Süperoksit Dismutaz

Superoksit dismutaz (SOD) enzimi hem dermiste hem de epidermiste bulunur. Süperoksit radikalini ( $O_2^{\cdot-}$ ) uzaklaştırır ve serbest radikallerin zarar verdiği vücut hücrelerini onarır. SOD, süperoksit anyonlarının hidrojen peroksite indirgenmesini katalize eder. SOD ayrıca, peroksitini oluşturmak için NO'yu inaktive eden süperoksit anyonu için azot oksitle (NO) rekabet ettiği de bilinmektedir. Bu nedenle süperoksit anyonlarını temizleyerek NO aktivitesini artırır.



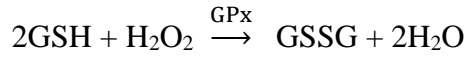
###### Katalaz

Katalaz enzimi (CAT) kanda ve canlı hücrelerin çoğunda bulunur.  $H_2O_2$ 'yi su ve oksijene dönüştürür. Glikoz peroksidaz ile birlikte katalaz, meyve sularının korunmasında kullanılır.



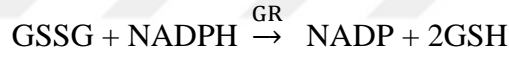
### **Glutasyon Peroksidaz**

Glutasyon peroksidaz (GPx) selenyum bağımlı bir enzim grubudur ve sitozolik, plazma, fosfolipid hidroperoksit ve gastrointestinal glutasyon peroksidazdan oluşur. Glutasyon peroksidaz (GPx), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin reaksiyonunu, indirgenmiş glutation (GSH) ile katalize eder. Sonuç olarak, okside olmuş glutasyon (GSSG) üretilir ve yine glutasyon redüktaz (GR) ve indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ile indirgenmiş formuna geri dönüştürülür.



### **b) İkincil Antioksidanlar**

İkincil antioksidanlar, glutasyon redüktaz (GR) ve glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) içerir. G6PDH ise NADPH üretir. İkincil enzim GR ve NADPH kullanarak indirgenmiş glutasyonun (GSH) geri dönüşümü için GR gereklidir.



### **Glutasyon**

Glutasyon, peptid tipi antioksidan içeren bir sisteindir ve vücut hücrelerinde sentezlenir. GR enzimi tarafından indirgenmiş formda GSH tutulan hücrelerde (~3,100 µg/g doku) yüksek düzeyde glutasyon bulunur, askorbat gibi diğer metabolitleri ve enzim sistemlerini indirger. Yüksek konsantrasyonu ve hücrelerde redoks durumunu korumadaki rolü nedeniyle en önemli hücresel antioksidanlardan biri olarak kabul edilir [74].

#### **2.5.1.2. Non-Enzimatik Antioksidanlar**

Bunlar, vücutta doğal olarak bulunmayan fakat uygun metabolizma için takviye edilmesi gereken bir antioksidan sınıfıdır. Bilinen non-enzimatik antioksidanlardan bazıları, mineraller, vitaminler, karotenoidler, polifenoller ve aşağıda belirtilen diğer antioksidanlardır [74].



### **a) Mineraller**

Vücut hücrelerinde enzimlerin düzgün çalışması için minerallere ihtiyaç duyulur. Minerallerin yokluğunda birçok makromolekül metabolizmasının etkilendiği bilinmektedir. Mineraller enzimatik antioksidanlar için kofaktör olarak görev yaparlar [74].

#### **Demir (Fe)**

Demir, biyolojik sistemde proteinle bağlanmış bulunan en bol eser metaldir. Normal olarak serbest demir konsantrasyonu çok düşüktür ve düşük demir bağlama proteinleri konsantrasyonları ROS üretimini, lipid peroksidasyonunu ve oksidatif stresi artırır. Bu nedenle demir takviyesi, oksidatif stresi azaltmada yardımcı olur.

#### **Magnezyum (Mg)**

Magnezyum, glikoz metabolizması sırasında NADP'den NADPH üretimini katalize eden pentoz döngüsünde yer alan glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PD) ve 6-fosfoglukonat dehidrojenaz (6PGD) için bir kofaktördür. Bu nedenle GSH'nin GSSG'ye normal orantısını ve hücrelerde normal bir redoks durumunu korur. Magnezyum eksikliği GR aktivitesini azaltır ve GSSG GSH'ye indirgenmez, bu nedenle hücrelerde oksidatif hasara neden olur.

#### **Selenyum (Se)**

Selenyum, aynı zamanda enzimatik antioksidanların çok önemli bir bileşenidir. Selenyum (Se) varlığında, glutatyon peroksidaz (GPx), lipidin oksidasyonuna karşı koruyucu bir rol oynar ve hücre zarını korur. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ve lipidlerin hidrosiperoksit metabolizmasında yer alır. Dolayısıyla, Selenyum E vitamini gibi davranır ve E vitaminin yerine geçebilir. Kanser ve kardiyovasküler hastalık riskini önlemek için kullanılır.

Bakır (Cu), Çinko (Zn) ve Manganez (Mn) SOD, Cu-Zn ve Mn gibi metal kofaktörlerine bağlı olarak farklı tipte SOD'lardan oluşan bir enzim sınıfıdır. Bu metaller, SOD'un antioksidan faaliyetlerinden sorumludur.

## **b) Vitaminler**

Vitaminler, A vitamini, C vitamini, E vitamini ve B vitamini gibi, vücudun antioksidan enzim sisteminin düzgün çalışması için gerekli olan mikro besin sınıfını oluştururlar [74].

### **A Vitamini**

A Vitamini gece görüşünde, mukus zarlarında ve ciltte epitel hücrelerinin korunmasında yardımcıdır. Antioksidan özellikleri nedeniyle bağışıklık sistemine de yardımcı olur ve üç ana formda bulunur: Retinol, 3,4-didehidroretinol ve 3-hidroksiretinol. Bunun ana kaynakları tatlı patates, havuç, süt, yumurta sarısı ve bazı peynir çeşitleridir.

### **C vitamini**

C vitamini suda çözünür ve ayrıca askorbik asit olarak da adlandırılır. Meyvelerde özellikle turunçgillerde, sebzelerde, hububatlarda, sığırlarda, kümes hayvanlarında, balıklarda bulunur. Yaşlanma sürecine, kanser, kalp ve artrit gibi hastalıkların gelişmesine sebep olan serbest radikallerin neden olduğu bazı deoksiribonükleik asit (DNA) hasarlarının önlenmesinde yardımcıdır [74]. C vitamini, hücre dışı sıvılarda suda çözünen en önemli antioksidan olarak kabul edilir. Lipit peroksidasyonu başlamadan önce sulu fazda ROS'u nötralize edebilir [71].

### **E vitamini**

E vitamini ( $\alpha$ -tokoferol), yağda çözünen bir vitamindir. Bu,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ -tokoferol ve  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - ve  $\delta$ -tokotrienol gibi sekiz farklı formdan oluşur. En çok badem, aspir yağı, soya fasulyesi yağı, buğday tohumu yağı, fındık, brokoli, üzüm çekirdeği, balık yağı gibi besinlerde bol miktarda bulunur ve en yüksek biyoyararlanıma sahiptir. [74]. E Vitamini, membran yağ asitlerini lipit peroksidasyonundan koruyan hücre zarı içindeki en etkili zincir kırıcı antioksidandır [71].

## **c) Karotenoidler**

Karotenoid  $\beta$ -karoten, likopen, lutein ve zeaksantinden oluşur. Meyve ve sebzelerde bulunan, yağda çözünen renkli bileşiklerdir.

$\beta$ -Karoten, çoğunlukla havuç, tatlı patates, kayısı, balkabağı, mango ve kavun gibi turuncu-yeşil renkli gıda maddelerinde bulunur. Ayrıca, yeşil lahana, ıspanak da dahil olmak üzere bazı yeşil yapraklı sebzelerde bulunur.

Lutein, yeşil lahana, ıspanak ve lahana gibi yeşil yapraklı sebzelerde bol miktarda bulunur. Lutein, retinanın korunmadaki serbest radikallerin zararlı etkisine karşı rolü ile bilinir.

Domates iyi bir likopen kaynağıdır ve ıspanak da iyi bir zeaksantin kaynağıdır. Likopenin singlet oksijenin giderilmesinde en etkili bileşik olduğu gözlenmiştir [74].

#### **d) Polifenoller**

Polifenoller, belirgin antioksidan aktiviteye sahip fitokimyasalların bir sınıfıdır. Antioksidan aktiviteleri, moleküler yapılarına bağlı olarak metabolizmayı düzenleyen kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlıdır. Bunlar fenolik asitler, flavonoidler, gingerol, kurkumin gibi bileşenlerden oluşur.

Flavonoidler, büyük bir polifenolik bileşik sınıfıdır ve çoğunlukla sebzelerde, meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, kabuklarda bulunur.

Flavonoidlerin, anti-enflamatuar, antialerjenik, anti-viral, anti-aging ve anti-kanserojen aktiviteye sahip oldukları bilinmektedir. Flavonoidlerin geniş terapötik etkileri büyük ölçüde antioksidan özelliklerine bağlanabilir. Bu antioksidan etkisine ek olarak, flavonoid bileşikleri trombosit ve makrofajlardaki siklooksijenaz ve lipoksijenaz aktivitelerinin inhibisyonu yoluyla kalp hastalığına karşı koruma sağlayabilir.

Zencefil ve zerdeçal gibi baharatların bazıları çok iyi polifenolik bileşik kaynaklarıdır. Örneğin zencefil rizomlarından gingerol elde edilirken, zerdeçalın ana biyoaktif bileşeni olan kurkuminin (diferuloilmetan) oldukça yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [74].

#### **2.5.2. Sentetik Antioksidanlar**

Gıda üretiminde ve piyasadaki bazı ürünlerde gıdaların raf ömrünün uzatılması amacı ile sentetik antioksidan kullanımı mevcuttur. Gıda maddelerinde peroksidasyon prosesini geciktirmek veya önlemek ancak antioksidan bileşiklerin ilavesiyle mümkün

olmaktadır. Bu uygulama maliyetli bir metottur. Gıda maddelerinin bozulmalarını engellemek için yıllardan beri sentetik antioksidan olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve tersiyer-bütildihidrokinon (TBHQ) kullanılmaktadır. Bu tür sentetik antioksidanların fenolik bileşik olmaları, onların etkili birer antioksidan olmalarını sağlamaktadır.

Maliyet nedeniyle doğal kaynaklı antioksidanlar yerine sentetik antioksidanlar yirminci yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen olabileceğini ortaya koyan çalışmalar sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına dair ciddi sınırlama veya yasaklar getirilmiştir [75].

Son yıllarda elde edilen bulgular sentetik antioksidanların toksisite etki gösterdiğini ortaya koymuştur [76]. Sentetik antioksidanlar, çeşitli teknikler kullanılarak yapay olarak üretilir veya sentezlenir. Temel olarak bunlar serbest radikalleri yakalayan ve zincir reaksiyonlarını durduran polifenolik bileşiklerdir. Polifenolik türevler genellikle birden fazla hidroksil veya metoksi grubu içerir.

Sentetik fenolik antioksidanlar, her zaman yağ ve yağlarda çözünürlüğünü arttırmak ve toksisitelerini azaltmak için alkil gruplarıyla süstitüe edilir. Antioksidan aktiviteye sahip bu sentetik bileşikler, kozmetikler için koruyucu olarak ve gıdalardaki lipidi, sıvı ve iç yağları stabilize etmek için yaygın olarak eczacılıkta kullanılır. Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), 6-etoksi-1,2-dihidro-2,2,4-trimetilkinolin (Etoksikin), propil gallat (PG) ve üçüncül butildihidrokinon (TBHQ) gibi sentetik antioksidanların özellikleri aşağıda açıklanmıştır [74].

### **BHA**

BHA bitkisel yağla kıyasla hayvansal yağdaki lipit oksidasyonu için daha iyi kullanılan bir monofenolik ve lipitte çözünür bir antioksidandır.

### **BHT**

BHT monofenolik ve aynı zamanda yağda çözünen bir antioksidandır, ancak yüksek sıcaklıkta BHA'dan daha karardır ve her ikisi de sinerjistik olarak etki eder. Piyasada satılan birçok antioksidan formülasyonu, bu antioksidanların her ikisini de içerir. BHA, sırayla BHT'nin hidroksil grubundan bir hidrojen atomunu çıkarabilen

bir BHA fenoksi radikalini üretmek için peroksi radikalleriyle etkileşime girer. BHA, BHT tarafından sağlanan hidrojen radikaliyle yeniden üretilir. Bu şekilde oluşturulan BHT radikalleri, bir peroksi radikaliyle reaksiyona girebilir ve bir zincir sonlandırıcı olarak işlev görebilir.

### **EDTA**

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), gıdalarda, vücut bakımı ve ev ürünlerinde kullanılan suda çözünür bir antioksidandır. Gıda ürününde bulunabilecek bakır, demir ve nikel gibi iz minerallere bağlanır. Etkisiz hale getirilmediği takdirde, bu mineraller renk bozulmasına, ekşime ve dokusal bozulmaya neden olabilir. Dolaylı olarak EDTA söz konusu olumsuzlukları giderir.

### **Etoksikuin**

Depolama sırasında hayvan yemlerinde, sebzelerde (patates vb.) ve meyvelerde (elma ve armut) karotenoid oksidasyonunu önlemek için öncelikle kullanılan bir antioksidandır.

### **PG**

Propil gallat (PG), gallik asit ve propanolün yoğunlaşması ile oluşan bir esterdir. Gıda ürünlerinde esas olarak yağları ve yağları korumak için gıda katkı maddesi olarak kullanılan bir antioksidan görevi görür.

### **TBHQ**

Üçüncül butilhidrokinon (TBHQ) oldukça etkili bir difenolik antioksidandır. Gıdalarda, doymamış bitkisel yağlar ve birçok yenilebilir hayvansal yağ için koruyucu olarak kullanılır. Demir varlığında bile renk atmasına neden olmaz ve eklendiği malzemenin lezzetini veya kokusunu değiştirmez. Organik peroksitlerin otomatik polimerleşmesini engellemek için endüstriyel alanda stabilizatör olarak kullanılır. Biyodizelde bir korozyon önleyici olarak kullanılır. Parfümeride buharlaşma oranını düşürmek ve stabiliteyi arttırmak için fiksatif olarak kullanılır. Ayrıca cilalara, verniklere, reçinelere ve yağlara katkı maddesi olarak eklenir. Tek başına kullanılabildiği gibi BHA veya BHT ile birlikte de kullanılabilir [74].

### **2.5.3. Diğer Antioksidanlar**

#### **2.5.3.1. Geçiş Metali Bağlayıcı Proteinler**

Albumin, seruloplazmin, hepatoglobin ve transferrin, insan plazmasında bulunan geçiş metali bağlayıcı proteinlerdir. Bunlar geçiş metali ile bağlanır ve metal katalizli serbest radikallerin üretimini kontrol eder. Albumin ve seruloplazmin bakır iyon dizilimliken, hepatoglobin hemoglobin dizilimidir, transferrin ise serbest demir dizilimli bir görev görür [74].

#### **2.5.3.2. Protein Olmayan Antioksidanlar**

Bilirubin, ürik asitler ve ubiquinol, serbest radikalleri temizleyerek oksidasyon işlemlerini engelleyen protein olmayan antioksidanlardır.

Bilirubin, atılması gereken lipitte çözünebilir bir sitotoksik üründür. Bununla birlikte bilirubin, laboratuvar ortamında peroksil radikalini verimli bir şekilde temizler ve lipid peroksidasyonuna karşı en iyi antioksidan olarak kabul edilir.

Ürik asit, güçlü bir antioksidandır. Tekli oksijen ve radikallerin temizleyicisidir. İnsanlardaki plazma urat seviyeleri 300 µM civarındadır ve bu onu insandaki en büyük antioksidanlardan biri yapar.

Koenzim Q ayrıca ubiquinol (Co Q) olarak da bilinir ve yağda çözünen bir antioksidandır. Vücutta monovalent yolla, kalpte, karaciğerde, böbreklerde, pankreasta üretilir [74].

### **2.6. Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemleri**

Antioksidan analizleri, ölçülen antioksidan tipi (örneğin lipofilik ve hidrofilik, enzimatik ve enzimatik olmayan), test ortamının karakteri (örneğin sulu ve organik çözücü, direkt veya dolaylı) gibi farklı yaklaşımlara göre sınıflandırılabilir. Ayrıca test reaktifinin tipi (örneğin, radikalik ve radikalik olmayan) veya etki mekanizması (hidrojen atom transferi (HAT) ve elektron transfer (ET) bazlı analizler) gibi sınıflandırma yapılabilir.

Fakat antioksidan kapasitesini ölçmek için geliştirilen bu yöntemlerden en temel sınıflandırma şekli; hidrojen atomu transfer (HAT) bazlı ve elektron transfer (ET) bazlı analiz yöntemleridir (Tablo 2.4.).

Doğal olarak, antioksidan kapasitenin güvenilir bir şekilde belirlenmesi için tek bir test yeterli değildir ve genellikle karmaşık bir örneğin antioksidan potansiyelini gerçekçi bir şekilde değerlendirmek için birkaç farklı analiz yöntemi gerekir. Gıda matrislerinde, ekstraksiyon ve antioksidan bileşenlerin ölçüm metodolojisindeki farklılıklar nedeniyle, farklı toplam antioksidan kapasite (TAC) belirleme metotları kullanılarak yapılan iki test veya iki farklı ekstraksiyon aynı sonuçlar vermeyebilir. Bu nedenle, örnek ön işlem ve ölçüm protokollerini standartlaştırmak son derece önemlidir [77].

ET bazlı analizler, reaksiyon bitiş noktasının bir göstergesi olarak yükseltgen ile bir redoks reaksiyonu içerir.

HAT bazlı yöntemler, genel olarak sentetik bir serbest radikal oluşturucu, oksitlenebilir bir moleküler sonda ve bir antioksidandan oluşur.

HAT ve ET bazlı analizler, bir numunenin önleyici antioksidan kapasitesi yerine radikal (veya oksidan) temizleme kapasitesini ölçmeyi amaçlar [78].

HAT temelli yöntemlerin birçoğu, azo bileşiklerin bozulması ile oluşan peroksil radikalleri için antioksidan ve substratın rekabetine dayanan reaksiyonlardır. ET temelli yöntemler antioksidanın oksidantı indirgenme yeteneğini renk değişimi ile ölçen yöntemlerdir. Genel olarak HAT reaksiyonları; çözücü, pH etkisinden kısmi olarak bağımsız ve çok kısa bir sürede gerçekleşirken, ET reaksiyonları; çözücü, pH'a bağlı olarak ve daha yavaş şekilde gerçekleşirler [79].

**Tablo 2.4.** Temel olarak bazı antioksidan kapasite tayin yöntemleri [80].

<b>Hidrojen Atom Transferi (HAT) Yöntemleri</b>	<b>Elektron Transfer (ET) Yöntemleri</b>
Hidroksil Radikali Antioksidan Kapasite (HORAC) Yöntemi	Cu (II) İyonu İndirgeyici Antioksidan Kapasite (CUPRAC) Yöntemi
Oksijen Radikali Absorbans Kapasitesi (ORAC) Yöntemi	Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi

Lipid Peroksidasyon İnhibisyon Kapasitesi (LPIC) Yöntemi	2.2.-Difenil-1-pikrihidrazil (DPPH) Radikal Söndürücü Kapasite Yöntemi
Toplam Radikal Yakalayıcı Antioksidan Parametre (TRAP) Yöntemi	Troloks Eşiti Antioksidan Kapasite (TEAC) Yöntemi
ABTS radikali temizleme aktivite Yöntemi	Demir (III) İyonu İndirgeyici Antioksidan Gücü (FRAP) Yöntemi
Krosin Beyazlatma Yöntemi	N, N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD) Yöntemi

Hidroksil radikali antioksidan kapasite (HORAC) yöntemi fenton benzeri reaksiyon koşullarında, antioksidanların metal şelatlama aktivitesinin ölçülmesine dayanır. Yöntemde bir Co (II) kompleksi kullanır ve bu nedenle hidroksil radikalının oluşumuna karşı koruma yeteneğini değerlendirir. Floresein analiz edilecek numune ile inkübe edilir ve sonra fenton karışımı (üreten hidroksil radikalleri) eklenir. İlk floresan ölçülür, bundan sonra okumalar her çalkalamadan sonra alınır. Gallik asit çözeltileri standart eğri oluşturmak için kullanılır. HORAC tahlili hidrofilik zincir kırma hidroksil radikallerine karşı doğrudan bir antioksidan kapasitenin ölçülmesini sağlar [80].

Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü (FRAP) yönteminde demir (III)'in indirgenme kapasitesi yoluyla antioksidanlarının toplam miktar tayini yapılmaktadır [79]. Bu yöntem antioksidanın ferrik demiri azaltma kabiliyetini ölçer. Ferrik demir ve 2,3,5 trifenil-1, 3,4-triaza-2-azoniasikloplopenta-1,4-dien klorürün (TPTZ) kompleksinin düşük pH'da demir forma indirgenmesine dayanır. Bu indirgenme, bir spektrofotometre kullanılarak 593 nm'de absorbanstaki değişiklik ölçülerek izlenir [80].

Oksijen radikali absorban kapasitesi (ORAC) yöntemi, birçok bitkisel içerikli çalışmada antioksidan kapasitesinin ölçülmesinde kullanılmaktadır [79]. Bu yöntem, kimyasal biyomarkırlar kullanarak maddelerin toplam antioksidan güçlerini ölçen “in vivo” (canlı ortamda) veya “in vitro” (laboratuvar ortamında) kullanılan bir yöntemdir [81].

Toplam radikal yakalayıcı parametre (TRAP) yöntemi, serum ve plazmalardaki antioksidan kapasitesini ölçmede tercih edilir [79]. Bu yöntem, kontrollü bir



peroksidasyon reaksiyonu sırasında R-fikoeritrinin floresan bozulmasını ölçmek için bir lüminesans spektrometresi kullanır. TRAP değerleri, antioksidanın neden olduğu gecikme fazının uzunluğuna kıyasla Trolox'a göre hesaplanır [80].

Toplam oksiradikal söndürme kapasite (TOSC) yöntemi, bitki dokularında antioksidan kapasitesinin belirlenmesinde tercih edilir [79].

Krosin beyazlatma yöntemi, tekli bileşenleri analiz etmenin yanında kompleks yapıları da analiz etmekte kullanılır [79]. Bu yöntemde azo başlatıcının sıcaklıkla bozulması sonucu oluşan peroksil radikalleri tarafından bir karotenoid olan krosinin beyazlama derecesi ölçülmektedir. Yöntem AAPH (2,2-azobis-(2-amidinopropan) dihidroklorid)'in sıcaklıkla bozulması ile oluşan peroksil radikallerinin krosini oksidasyona uğratmasına (beyazlatma) dayanmaktadır. Karışıma eklenen maddedeki antioksidanlar bu beyazlamayı önlemektedir. Deneysel olarak reaksiyon krosin içeren fosfat tamponu ve bilinen miktarda antioksidan ile gerçekleştirilir [81].

Troloks eşiti antioksidan kapasite (TEAC veya ABTS) yönteminde TEAC analizi 2,2-azinobis (3-etil-bezotiazolin 6 sülfonat) (ABTS) radikal katyonunun antioksidanlar tarafından absorpsiyonunun engellenmesi temeline dayanır. Radikal katyon formunda üretilen ABTS, temel spektrofotometrik olarak çeşitli maddelerin toplam antioksidan aktivitesini ölçmede uygulanır [79].

Bu yöntemler genel olarak onaylanmış olsa da oldukça karmaşık ve zaman alıcıdır. Yüksek fiyatlı kimyasallar veya test kitleri ile birlikte kullanır. Ayrıca, özellikle biyolojik numuneleri analiz ederken, spektrofotometrik yöntemlerin bir başka sınırlaması, sonuçların kesinliği ve kesinliğinde zorluklara yol açan, ana reaktifle aynı dalga boyunda emilen biyokimyasal bileşiklerin etkileşimidir. Son on yılda, tamamlayıcı analizler olarak birçok elektrokimyasal yöntem geliştirilmiştir. Böylece net elektrik yükü ölçümlerine dayanarak antioksidanların değerlendirilmesi sağlanmıştır [66].

## **2.7. Deneyde Kullanılan Tayin Yöntemleri**

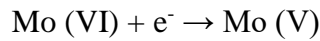
### **2.7.1. Folin-Ciocalteu Ayırıcı (FCR) ile Toplam Fenolik Yöntemi**

Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) ile toplam fenolik yöntemin temeli kısaca fenolik bileşikler ve diğer indirgeyici bileşiklerden molibdenyuma elektron transfer

edilmesine dayanmaktadır. Bu yöntem; Singleton ve arkadaşları tarafından antioksidanların toplam fenolik madde miktarını ölçmek için geliştirilmiştir. Mavi renkli kompleks oluşumu 750-765 nm'de spektrofotometrik olarak belirlenir. Standart bileşik olarak genellikle gallik asit kullanılırsa, sonuçlar gallik asit eşiti olarak verilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda gallik asit yerine tannik asit, klorojenik asit, kaffeik asit, protokateşik asit vanilik asit ve ferrulik asit de kullanılmaktadır [79].

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

Bu yöntem orijinal olarak protein analizi için tasarlanmıştır. Daha sonra Singleton ve arkadaşları şaraptaki toplam fenollerini ölçmek için bu yöntemi geliştirmişlerdir. Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) temelli yöntem toplam fenolik (ya da fenol) yöntem olarak bilinir. Fakat gerçekte örneğin indirgeyici kapasitesini ölçer. Fenolik bileşikler sadece bazik koşullarda (pH = 10) FCR ile reaksiyona girer [82].



Bu yöntem hassas, kantitatif ve fenollerin polimerizasyon derecesinden göreceli olarak bağımsızdır, ancak proteinler, nükleik asitler ve askorbik asit için düzeltme müdahalesi gerekli olabilir [83].

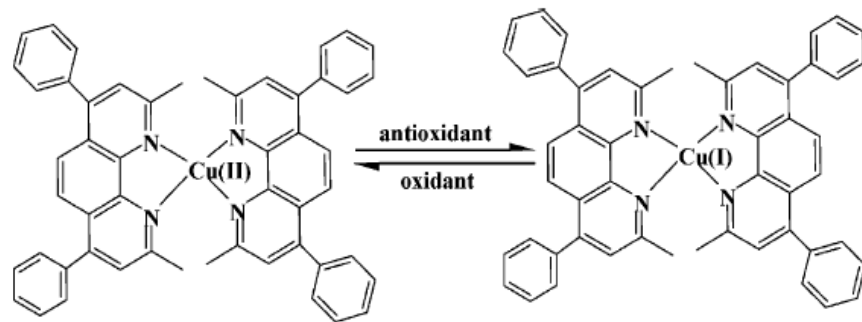
FCR, fenolik olmayan pek çok bileşik tarafından (Örneğin vitamin C, aromatik aminler, Cu(I) gibi) indirgenebileceği için, fenolik bileşiklere spesifik değildir. FC metodu gerçekte bir örneğin indirgeme kapasitesini ölçer. Fenolik bileşikler FCR ile yalnız bazik koşullar altında reaksiyona girerler. FC yöntemi ile diğer elektron transferine dayanan TEAC ve DPPH metotlarıyla arasında doğrusal korelasyon olduğu belirlenmiştir. FCR'nin tanımlanmamış kimyasal yapısına rağmen, FC yöntemi ile toplam fenol tayini güvenilir, basit ve tekrarlanabilir [82].

## 2.7.2. CUPRAC [Cu (II) iyonu indirgeme] Toplam Antioksidan Kapasite Tayin Yöntemi

CUPRAC yöntemi, antioksidan çözeltisinin (doğrudan veya asit hidrolizinden sonra) bir bakır (II) klorür çözeltisi, bir neo-perozin (2,9-dimetil-1,10-fenantrol) alkollü çözeltisi ve bir amonyum asetat sulu tampon çözeltisi ile pH 7'de karıştırılmasıyla geliştirilen absorbansın yaklaşık 30 dakika sonra 450 nm'de ölçülmesiyle hesaplanır [84].

CUPRAC, elektron transferi (ET) bazlı toplam antioksidan kapasite (TAC) tayinidir ve her türlü antioksidanın genel ölçümü için kullanılır. ET-bazlı spektrofotometrik analizler, bir antioksidanın kapasitesini azaldığında renk değiştiren bir kromojenik oksidanın (prob) azaltılmasıyla ölçmektedir. Renk değişiminin derecesi (verilen bir dalga boyunda absorbans artışı veya azalması), numunedeki antioksidanların konsantrasyonu ile ilişkilidir.

CUPRAC yöntemi, fenolik asitler, hidroksisünamik asitler, flavonoidler, karotenoidler, antosiyaninler ve ayrıca tiyoller, sentetik antioksidanlar ve C ve E vitaminleri dahil olmak üzere çok çeşitli polifenoller için faydalı basit ve çok yönlü bir antioksidan kapasite deneyidir. 2004 yılında Apak ve arkadaşları tarafından "Cu (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasite Tayini" olarak adlandırılmış ve CUPRAC yöntemi olarak kısaltılmıştır [77]. Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesine dayanan bu yöntemin reaksiyon mekanizması Şekil 2.8.'de verilmiştir.



Şekil 2.8. Cu (II)'nin Cu (I)'e indirgenmesi [78].

Geliştirilen CUPRAC yönteminin kromojenik oksitleyici reaktifi, yani bis (neocuproine) bakır (II) klorür (Cu(II)-Nc), aşağıdaki şekilde n-elektron indirgeyici antioksidanlarla (AO) reaksiyona girer:

$$n \text{ Cu (Nc)}_2^{2+} + n\text{-elektron indirgeyici (AO)} \leftrightarrow n \text{ Cu (Nc)}_2^+ + n\text{-elektron oksitlenmiş ürün} + n \text{ H}^+ [77].$$

Bu yöntem, diğer ET bazlı yöntemlere göre daha avantajlıdır. Çünkü CUPRAC analizinde çalışma pH aralığı, Folin yönteminde kullanılan alkali pH veya FRAP yönteminde kullanılan asidik pH'ın aksine fizyolojik pH 7'dir. Folin ve DPPH yöntemlerinin aksine hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlar için uygulanabilir. Gıda maddelerinde yaygın olarak bulunan şekerleri ve sitrik asidi etkilemeden antioksidan bileşikler üzerinde seçici bir etkiye sahiptir.

CUPRAC reaktifi, herhangi bir radikal reaktif içermez, bu nedenle sıcaklık, güneş ışığı, pH, nem vb. fiziksel parametrelere karşı duyarsızdır. Reaktif, düşük maliyetli, lineer tepkili antioksidan sensörü oluşturmak için katyon değiştirici bir zar üzerine adsorbe edilebilir. CUPRAC metodolojisi en iyi şekilde yararlı bir antioksidan ve antiradikal test paketi sağlayan kendi kendine yeten ve entegre bir ölçüm sistemi olarak tanımlanabilir [83].

CUPRAC, standart kolorimetreler kullanan geleneksel laboratuvarlarda kolayca ve çeşitlilikle uygulanabilir. Yöntem, hem hidrofilik hem de lipofilik antioksidanlara eşit derecede iyi yanıt verir.

Reaktif, kromojenik radikal reaktiflerden (ABTS, DPPH, vb.) çok daha stabil ve kolayca erişilebilirdir.

CUPRAC reaktifi, düşük maliyetli, lineer tepkili bir optik antioksidan sensörü oluşturmak için bir katyon değiştirme membranı üzerine adsorbe edilebilir [77].

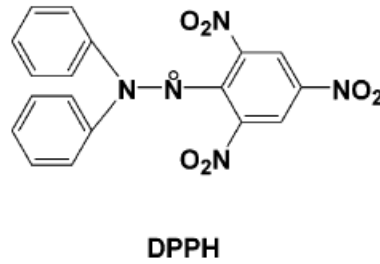
CUPRAC reaktifi, tiyol tipi antioksidanları oksitlemek için yeterince hızlıdır, oysa FRAP yöntemine göre negatif hatayla glutatyon gibi bazı tiol tipi antioksidanları ölçülebilir. CUPRAC deneyi ayrıca bazı hidroksisülfonik asitlere FRAP'tan çok daha hızlı tepki verir.

Konsantrasyon eğrilerine karşı CUPRAC absorbansı, polinom eğrileri veren diğer metotların aksine, geniş konsantrasyon aralığında mükemmel bir şekilde doğrusaldır. Seyreltilmiş ekstraktların konsantrasyon eğrilerine karşı absorbansı

başlangıç noktasından geçerken metot seyreltme ile mükemmel şekilde uyumludur [84].

### 2.7.3. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Radikal Giderme Yöntemi

Bu metot DPPH radikalının antioksidanlar tarafından bir redoks reaksiyonuna bağlı olarak süpürülmesi temeline dayanır. DPPH radikali (Şekil 2.9.), birkaç kararlı organik azot radikalinden birisidir [82].



Şekil 2.9. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali

DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) ticari olarak elde edilebilen stabil organik nitrojen radikalidir. DPPH radikal süpürme kapasitesi analiz yöntemleri doğal ekstraktların antioksidan kapasitesini ölçmede çok sık kullanılan bir metottur [79].

DPPH diğer radikalleri kolayca tutabilir, ancak dimerleşmez. Güçlü bir absorban bandı yaklaşık 515 nm’de görülür. DPPH radikali koyu mor renktedir. Hidrojen donörü ile reaksiyona girdikten sonra azaldığında açık sarı renge dönüşür. Absorbanstaki azalma, doğrusal olarak antioksidan konsantrasyonuna bağlıdır [83].

DPPH metodu ilk olarak Brand-Williams ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem basit ve hızlıdır. Doğru ve tekrarlanabilir sonuçlar verir. Yalnızca UV-GB spektrofotometresine ihtiyaç duyar. Çok sayıda örnek analizi mikropilaka kullanılarak yapılabilir [82]. Ayrıca oksijen, ışık ve kirlilik gibi etkenler, bu metodun kullanımında birtakım sınırlamalara neden olmaktadır [79].

## 2.8. Elektrokimyasal Teknikler

Elektrokimya, kimyasal ve elektriksel etkilerin birleşiminden kaynaklanan olayları inceleyen kimya biliminin bir dalı olarak tanımlanmaktadır [85]. Kimyasal bileşiklerin çoğunun elektrokimyasal olarak aktif olduğu bulunmuştur [86].

En kullanışlı elektroanalitik tekniklerden bazıları, uygulanan potansiyellerin elektrot-çözelti arayüzüne sürekli olarak değiştirilmesi ve sonuçta ölçülen akım kavramına dayanır. Elektrokimyasal analiz ise ilaç endüstrisi, metal endüstrisi ve çevre uygulamalarında faydalı olan güçlü bir analitik tekniktir.

Elektrokimyasal teknikler, nispeten düşük maliyetli enstrümantasyon ile yüksek hassasiyet, doğruluk ve hassasiyetin yanı sıra geniş doğrusal dinamik aralık sunan güçlü ve çok yönlü analitik tekniklerdir. Daha hassas ölçüm yöntemleri geliştirildikten sonra elektroanalitik çalışmalar, dozaj formlarında, özellikle biyolojik numunelerde endüstriyel, çevresel uygulamalar ve ilaç analizlerinde düzenli olarak kullanılırlar [86].

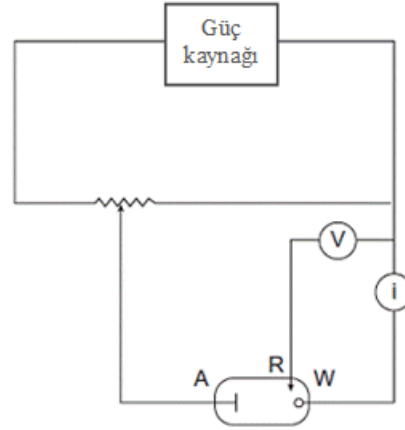
### 2.8.1. Voltammetri

Voltammetri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlar altındaki akımın, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik sisteme verilen isimdir [87].

İlk voltammetrik teknik, 1922 yılında Jaroslav Heyrovsky tarafından geliştirilen ve kimya alanında 1959 Nobel Ödülünü aldığı polarografi yöntemidir. Polarografi ise sabit bir civa damlası akışına sahip civa elektrotu kullanılarak elde edilen akım-gerilim ölçümüne dayanan özel bir voltammetri çeşididir [86].

Voltammetri terimi, bir elektroanalitik yöntem olarak verilen bir elektrotta elde edilen akım-gerilim ölçümünü belirtmek için kullanılır. Voltammetri, üç elektrotlu bir hücrede ortaya çıkan gerilim-akım-zaman ilişkisine dayanır; çalışma elektrotu, referans elektrotu ve yardımcı veya karşı elektrottan oluşan potansiyostat cihazıyla ölçümler yapılır (Şekil 2.10.). Bu ilişki çalışma elektroduna potansiyel (E) uygulandığında ve elektrokimyasal hücreden ortaya çıkan akım (i) kaydedildiğinde açıklanabilir. Uygulanan potansiyel değiştirilebilir veya ortaya çıkan akım belli bir

süre boyunca (t) kaydedilecektir. Çalışma elektroduna uygulanan potansiyel, reaksiyon için itici güç görevi görür, elektrot yüzeyinde çözelti içinde bulunan kimyasal türlerin elektrolize edilmesine (indirgenmesine veya yükseltgenmesine) neden olan parametreyi kontrol eder [86].



**Şekil 2.10.** Potansiyostat cihazının şematik gösterimi

A: Yardımcı elektrot      R: Referans elektrot      i: Galvanometre  
W: Çalışma elektrodu      V: Voltmetre

Son yıllarda voltammetrik yöntemler, elektrokimyasal reaksiyonların incelenmesi, elektrokimyasal olarak üretilen serbest radikallerin incelenmesi, enzimatik katalizin model çalışmaları, koordinasyon kimyası, güneş enerjisi dönüşümü, çevresel izleme gibi alanlarda popüler bir araç haline gelmiştir [88].

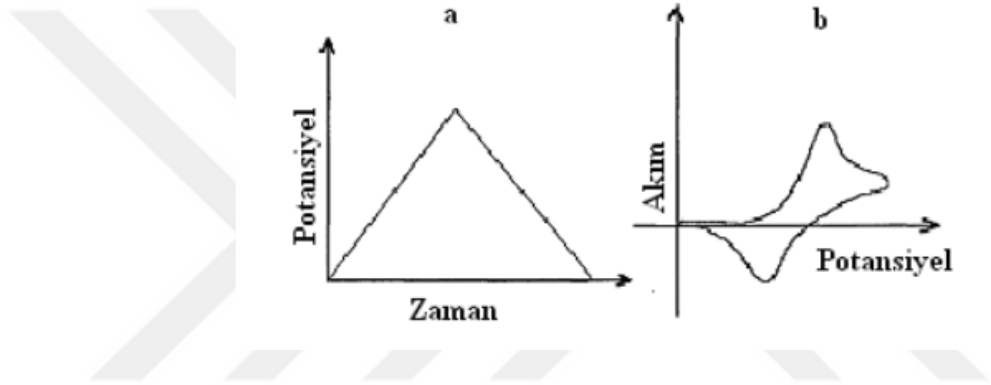
Voltammetri yöntemleri arasında Polarografi, Döngüsel Voltammetri (CV), Normal Puls Voltammetrisi (NPV), Diferansiyel Puls Voltammetrisi (DPV), Kare Dalga Voltammetrisi (SWV), Diferansiyel Sıyırma Voltammetrisi, Adsorptiv Sıyırma Voltammetrisi (AdSV), Katodik Sıyırma Voltammetrisi gibi çeşitli voltammetri türleri vardır [85].

### 2.8.1.1. Döngüsel Voltammetri (CV)

Döngüsel voltammetri (CV), kimyanın birçok alanında önemli ve yaygın olarak kullanılan bir elektroanalitik teknik haline gelmiştir. Genel olarak redoks

işlemlerinin çalışmasında, iyonların elektrot yüzeyinde elektrokimyasal davranışları, elektrot reaksiyon mekanizmaları, elektrolit iyonları ile elektrotlar arasındaki yük transfer reaksiyonlarını incelemek için güçlü bir tekniktir.

Üç elektrotlu bir elektrokimyasal hücre olan döngüsel voltammetri, çalışan bir elektroda uygulanan potansiyelin akımının hem ileri hem de geri yönde (bazı tarama hızlarında) değiştirilmesine dayanır (Şekil 2.11.). Bu teknik, çalışma ve referans elektrotları arasında akan akımı ölçerek, potansiyel bir pencere içindeki çalışma ve referans elektrotlar arasında elektrot potansiyelinin doğrusal ve döngüsel bir varyasyonunu içerir [85].



**Şekil 2.11.** a) Dönüşümlü voltammetride elektroda uygulanan gerilim  
b) Elde edilen akım-gerilim eğrisi

Döngüsel voltammetri (CV) önemli bir hale gelmiştir ve elektroanalitik kimyanın birçok alanında yaygın olarak kullanılmaktadır. Kantitatif tayin için nadiren kullanılır, ancak redoks reaksiyonlarının incelenmesi ve yaygın olarak meydana gelen kimyasal reaksiyonlar hakkında çok fazla bilgi edinmek için kullanılır. Döngüsel voltammetri, voltaj tarama yönünün tersine çevrildiği hızlı bir voltaj tarama tekniğidir. Çalışma elektrotunda uygulanan potansiyel hem ileri hem de geri yönlerde iken elde edilen akım kaydedilir. İleri ve geri yönde tarama hızı normalde aynıdır. Döngüsel voltammetri (CV), tek çevrim veya çoklu çevrim modlarında kullanılabilir [86].

### 2.8.1.2. Adsorptif Sıyırma Voltammetrisi (AdSV)

Adsorptif sıyırma voltammetrisi (AdSV), çok çeşitli organik ve inorganik analitin iz analizinde kullanılabilir. Metal iyonları halinde elektrot yüzeyinde adsorbe



olan bir kompleks oluşturmak için uygun ligand ile reaksiyona girdiğinde AdSV tarafından kolayca belirlenebilir.

Adsorpsiyon süreci, birikim sürecinde önemli rol oynar. Organik bileşik elektrokimyasal olarak indirgenebilir ya da yükseltgenebilir işlevsel grupları içerdiğinde, yükseltgenmiş elektrot ile tepkimeye girer ve oluşan bileşik adsorbe edilir [86].

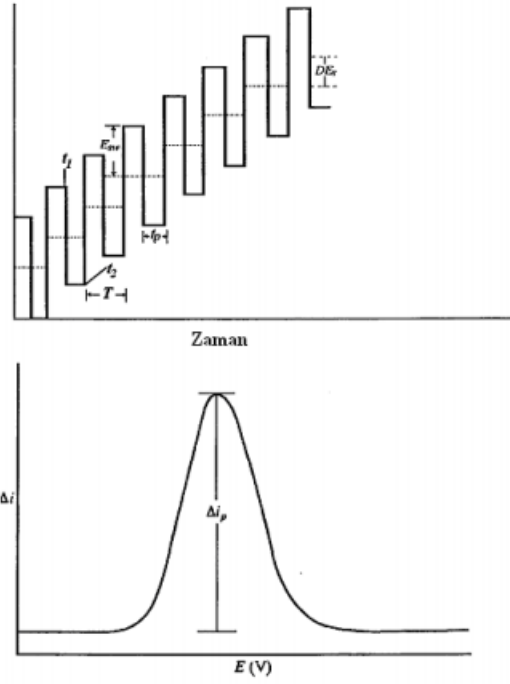
Adsorptif sıyırma voltammetrisi (AdSV), diğer voltammetrik tekniklere kıyasla daha yüksek hassasiyet ve daha iyi seçicilik özelliğine sahiptir. Adsorptif sıyırma voltammetrik yönteminin temel avantajı, hızı ve basitliğidir. Her voltammetrik çalışma birkaç saniye sürer.

Adsorptif sıyırma voltammetrisi (AdSV), bir elektrolitik ön-konsantrasyon aşamasını içeren en iyi bilinen analitik yöntemdir. AdSV tekniği, farmasötik ve biyolojik bileşiklerin analizinde birçok olası uygulamaya sahip, sağlam ve hızlı büyüyen bir alandır [88].

### **2.8.1.3. Kare Dalga Voltammetrisi (SWV)**

Kare dalga voltammetrisi (SWV), ilk önce Barker tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntem Şekil 2.12.'de gösterilen dalga formunda, merdiven potansiyeli temelinde üst üste binen düzenli kare dalgadan oluşur ve çalışma elektroduna uygulanır. Akım her kare dalga döngüsü boyunca, bir kez ileri pulsun sonunda ve diğeri ters pulsun sonunda iki katına çıkar. İki ölçüm arasındaki fark, baz potansiyele karşı çizilir [86].

Kare dalga voltammetrisi (SWV), mükemmel hassasiyet, net akımın ileri veya geri akımla karşılaştırıldığında büyük olmasından ve şarj akımına karşı etkili bir ayırım yapılmasından kaynaklanır. Elde edilen tepe akımları, diferansiyel darbe yanıtından yaklaşık dört kat daha yüksektir.



**Şekil 2.12.** Kare dalga uyarı sinyali ve polarogramı

En gelişmiş voltammetrik tekniklerden biri olan kare dalga voltammetrisi analitik uygulamalar için kullanıldığında, diğer voltammetrik tekniklere göre daha yüksek hassasiyet ve kısa analiz süresi gibi çeşitli avantajlar gösterir.

Kare dalga voltammetrisinin en büyük avantajı hızıdır. Etkili tarama hızı  $500 \text{ mV s}^{-1}$  düzeyindedir. Sonuç olarak, analiz süresi büyük ölçüde azalır. Diferansiyel puls voltammetrisine göre 2-3 dakikaya kıyasla tam bir voltammogram birkaç saniye içinde kaydedilebilir. Böylece, tüm voltammogram tek bir civa damlası ile kaydedilebilir. Kare dalga voltammetrisi (SWV), Diferansiyel puls voltammetrisi (DPV)'den daha hassastır, çünkü hem ileri hem de geri akımlar başta ölçülürken, yalnızca ileri akımlar sonda ölçülür. Saniyede 1 ila 100 kare dalga çevrimli frekanslar, aşırı hızlı potansiyel tarama hızlarının kullanılmasına izin verir [88].

Son yıllarda kare dalga voltammetrisi (SWV), inorganik ve biyolojik olarak önemli bileşiklerin belirlenmesi için pahalı ve zaman alıcı tekniklere göre (örneğin kromatografi veya spektrofotometri gibi) uygulanabilir ve ucuz bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Basit çalışma kurulumu, ölçümlerin hızlı bir şekilde yapılması, uygulanabilecek farklı modlar, hassasiyeti ile birlikte, SWV'yi proteinler, vitaminler,

fenoller, benzokinonlar, pestisitler, herbisitler ve fungusitler, alkaloitler, terpenoitler, ağır metaller ve ilaçlar gibi önemli bileşik sınıflarının nicelleştirilmesinde tercih edilen bir teknik haline getirmiştir [89].



### 3. DENEYSEL KISIM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Çalışma Materyali

Deneyde yapılan çalışmalar üç bölümden oluşmaktadır. Çalışmanın ilk bölümünde zerdeçal (*Curcuma longa* L.) rizomlarında bulunan toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu, toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC ve radikal giderme kapasitesi DPPH yöntemi ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.

*Curcuma longa* L. rizomları, Mayıs 2019'da İzmir-Gazimur ilçesindeki bir aktardan taze olarak satın alınmıştır. Rizomlar saf su ile yıkanmış, plastik rende ile rendelenerek tartıma gelmesi için 70°C'de 24 saat sabit etüvde bekletilmiştir. Kuruyan rizomlar ekstraksiyon işleminde kullanılmıştır. Kalan kısım ise +4°C'deki buzdolabında karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.

##### 3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

**Tablo 3.1.** Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Madde Adı	Satın Alınan Firma
Gallik asit	Sigma Aldrich
Neokuproin	Sigma Aldrich
Troloks	Sigma Aldrich
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Merck
CuCl <sub>2</sub>	Merck
Folin-Ciocalteu reaktifi	Merck
CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	Panreac
Metanol	Riedel-de Haën

### 3.1.3. Kullanılan Cihazlar

**Tablo 3.2.** Çalışmada kullanılan alet ve cihazlar

Adı	Satın alınan firma
UV/VIS Spektrofotometre	Lambda 365
Voltammetre	Ivium Compactstat
Ultrasonik banyo	Elma Transsonic Digitals
Su banyosu	Memmert
Etüv	Nüve EN 400
Analitik terazi	Sartorius
pH metre	Hanna Instruments pH 211 Microprocessor
Otomatik mikro pipetler	Brand transferpette
Buzdolabı	Altus al 366

### 3.1.4. Çözeltilerin Hazırlanması

**Gallik asit stok çözeltisi:** 0,0025 g gallik asit ( $m_a = 188,1$  g/mol) 25 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu 100 µg/mL (100 ppm) olarak hesaplanmıştır.

**Folin-Ciocalteu reaktifi:** Ticari olarak satın alındı.

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi:** 3,10 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ( $m_a = 105,99$  g/mol) 100 mL saf suda çözünerek %3,1 (a/h)'lık Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi hazırlanmıştır.

**Troloks çözeltisi:** 0,0025 g troloks ( $m_a = 250,29$  g/mol) 25 mL saf suda çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu  $3,9 \times 10^{-4}$  M olarak hesaplanmıştır.

**Neokuproin çözeltisi:** 0,0407 g neokuproin ( $m_a = 217,27$  g/mol) 25 mL metanolde çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu  $7,5 \times 10^{-3}$  M olarak hesaplanmıştır.

**DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) çözeltisi: 0,005 g DPPH** ( $m_a=394,32$  g/mol) **25 mL metanolde** çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu  $5,00 \times 10^{-4}$  M olarak hesaplanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiye 3 kat seyreltme işlemi uygulanmıştır.

**Bakır (II) klorür (CuCl<sub>2</sub>) çözeltisi: 0,0336 g CuCl<sub>2</sub>** ( $m_a= 134,45$  g/mol) **25 mL saf suda** çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu  $1,0 \times 10^{-2}$  M olarak hesaplanmıştır.

**Amonyum asetat tampon (NH<sub>4</sub>Ac) çözeltisi: 1,927 g amonyum asetat** ( $m_a= 77,08$  g/mol) **25 mL saf suda** çözünerek hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu 1,0 M olarak hesaplanmıştır.

**%70'lik MeOH-su çözeltisi: 175 mL MeOH üzerine 75 mL saf su** eklenerek %70 (h/h)'lik MeOH-su çözeltisi hazırlanmıştır.

**Kurkumin ana stok çözeltisi:** 3 mg kurkumin 6 mL etanolde çözülerek konsantrasyonu  $500 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1,4 \times 10^{-3}$  M) olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Demetoksikurkumin ana stok çözeltisi:** 3 mg demetoksikurkumin 6 mL etanolde çözülerek konsantrasyonu  $500 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1,5 \times 10^{-3}$  M) olacak şekilde hazırlanmıştır.

**Bisdemetoksikurkumin ana stok çözeltisi:** 3 mg bisdemetoksikurkumin 6 mL etanolde çözülerek konsantrasyonu  $500 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1,6 \times 10^{-3}$  M) olacak şekilde hazırlanmıştır.

**3 M NaOH çözeltisi:** 6 g NaOH tartılmış 50 mL saf suda çözülmüştür.

**Fosfat tampon çözeltileri:** 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinin (%85'lik d:1,69 g/mL olan H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>'ten 0,68 mL alınıp 100 mL saf suda çözülerek hazırlanmıştır.) pH'ı 2, 4, 6, 8, 10 ve 12 olacak şekilde 3 M NaOH kullanılarak ayarlanmıştır.

**Au çözeltisi:** 0,1 M Au stok çözeltisi hazırlamak için 0,1005 g HAuCl<sub>4</sub>.xH<sub>2</sub>O tartılıp 2,5 mL 0,1 M HCl içerisinde çözülmüştür. Yüzeyin kaplanması için kullanılan Au çözeltisi, stok çözeltilerden 100 µL alınıp 10 mL 0,1 M HCl içerisinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltinin konsantrasyonu  $1 \times 10^{-3}$  M olarak hesaplanmıştır.

**Pt çözeltilisi:** 0,025 M Pt stok çözeltilisi hazırlamak için 0,122 g  $H_2PtCl_6 \cdot xH_2O$  tartılıp 10 mL 0,1 M HCl içerisinde çözülmüştür. Yüzey kaplanma için kullanılan Pt çözeltilisi, stok çözeltiden 400  $\mu$ L alınıp 10 mL 0,1 M HCl içerisinde çözünmesi ile hazırlanmıştır. Elde edilen bu çözeltilinin konsantrasyonu  $1 \times 10^{-3}$  M olarak hesaplanmıştır.

**EBT çözeltilisi:** Konsantrasyonu  $5 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde 0,1 M NaOH çözeltilisi içerisinde hazırlanmıştır.

## 3.2. Yöntemler

### 3.2.1. Çalışma Materyalinin Analize Hazırlanması

Curcuma Longa L. rizomları havanda toz haline getirildikten sonra  $0,5000 \pm 0,0002$  g alınıp ekstraksiyon ve infüzyon işlemleri uygulanmıştır. Ekstraktlardaki toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu, toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC ve radikal giderme aktivitesi ise DPPH yöntemleri kullanılarak spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir.



**Şekil 3.1.** Toplam antioksidan, fenolik ve radikal giderme kapasitelerinin analizinde kullanılan Uv-vis Spektrofotometre

### 3.2.2. Zerdeçal Rizomlarının Ekstraksiyonu

#### Zerdeçal Rizomlarının %70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş zerdeçal örnekleri (0,5 g)

Ultrasonik banyoda; % 70 Metanol / H<sub>2</sub>O (v/v)

20 mL 60'

↓ Süzgeç kağıdı

20 mL 45'

↓ Süzgeç kağıdı

10 mL 15'

↓ Süzgeç kağıdı

Ekstrakt (50 mL)

↓ Süzgeç kağıdı

Süzüntü

Mikrofiltrasyon ↓ (VALUPREP, 0.45 µm mikrofiltre)

Örnek (Analize kadar +4 °C'de saklama)

### 3.2.3. Zerdeçal Rizomlarının İnfüzyonu (Demlenmesi)

#### Zerdeçal Rizomlarının İnfüzyonu

Kurutulmuş ve toz haline getirilmiş zerdeçal örnekleri (0,5 g)

Su Banyosu (95 °C) ↓ 50 mL destile su, 1 saat

Ekstrakt (50 mL)

↓ Süzgeç kağıdı

Süzüntü

Mikrofiltrasyon ↓ (VALUPREP, 0.45 µm mikrofiltre)

Örnek (Analize kadar +4 °C'de saklama)





**Şekil 3.2.** Curcuma longa L. rizomları ve %70'lik metanol-su ekstraksiyonu sonrası elde edilen ekstrakt

#### **3.2.4. Karbon Nanotüplerin Hazırlanması**

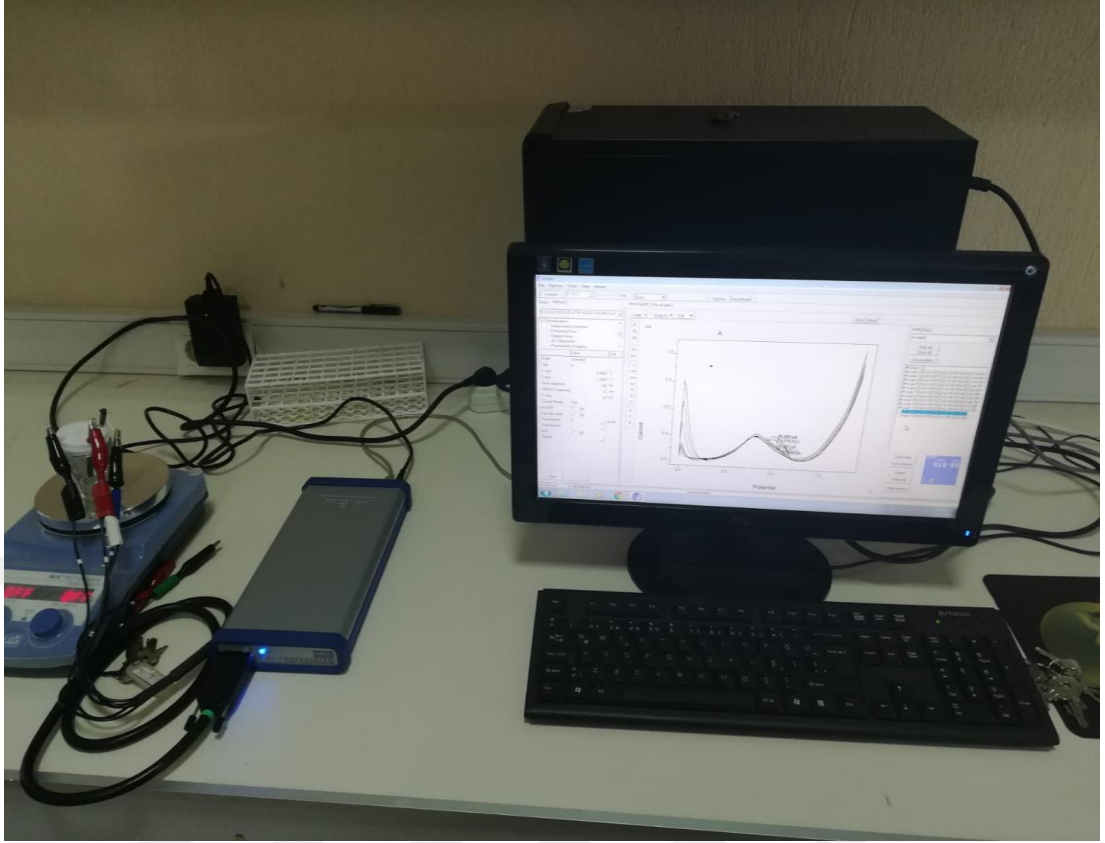
150-250°C'de ısıtmak suretiyle 0,04 g olarak tartılan MWCNT üzerine 4 kez her seferinde 2 mL derişik HNO<sub>3</sub> eklenmiştir. Son buharlaşmadan kalan yaklaşık 0,5 mL'lik çözelti soğutulmuş, 5 mL saf su ile en az 7-8 defa yıkanarak asitten uzaklaştırılmıştır. Bir gün boyunca 60-70°C'de kurutularak hazırlanan kalıntıdan tartılan 0,037 g karbon nanotüp, 3,7 mL dimetilformamid (DMF) içerisinde dağıtılmıştır.

#### **3.2.5. Voltammetri Yöntemi**

Voltammetrik ölçümler;

- Çalışma elektrodu (3 mm çap, 0.0707 cm<sup>2</sup> geometrik alana sahip yalın camsı karbon elektrot),
- Yardımcı elektrot (platin tel)
- Ag/AgCl (doymuş KCl) referans elektrodunu içeren üçlü elektrot sistemi kullanılarak Ivium Compactstat (Şekil 3.3.) analizöründe gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada tüm voltammetrik ölçümler, 100 mV s<sup>-1</sup> tarama hızında -500 ile 1300 mV arasında gerçekleştirilmiştir.



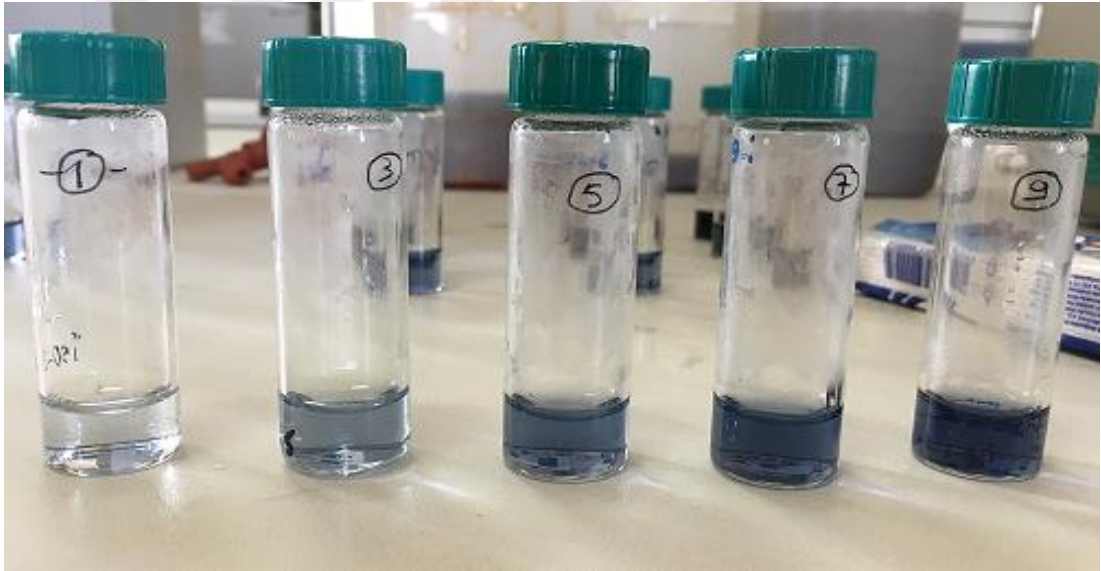
Şekil 3.3. Kurkumin analizi için kullanılan Ivium Compactstat marka/model cihaz

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

### 4.1. Rizom Ekstraktlarının Analizi

#### 4.1.1. Folin-Ciocalteu Reaktifi ile Fenolik Bileşiklerin Tayini

Yöntem fenolik bileşiklerin bazik ortamda Folin-Ciocalteu reaktifini indirgeyip kendilerinin oksitlendiği redoks reaksiyonu sonucunda oluşan mavi rengin spektrofotometrik ölçümüne dayanmaktadır. Folin-Ciocalteu yöntemi ile toplam fenolik madde içeriğinin tespit edilmesinde standart madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Standart grafiğinin hazırlanmasında kullanılmak üzere stok gallik asit çözeltisi (100 mg/L) hazırlanmıştır. Standart kalibrasyon grafiği için 5 (beş) farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) gallik asit çalışma çözeltileri hazırlanmıştır (Şekil 4.1.).



**Şekil 4.1.** Folin-Ciocalteu yönteminde kalibrasyon grafiği için 5 (beş) farklı konsantrasyonda hazırlanan gallik asit çalışma çözeltilerinin renk skalası

Tablo 4.1.'de hazırlanışı ayrıntılı olarak verilen standart çalışma çözeltilerinden her bir derişim için tablodaki miktarlarda alındıktan sonra 250 µL'ye tamamlayacak şekilde saf su eklenmiş, üzerlerine (1:5) oranında seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifinden 250 µL ve 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden eklenerek su banyosunda 50°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda absorbands değerleri 750 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçülmüştür (Tablo 4.2.). Sıfırlama işlemi (250 µL

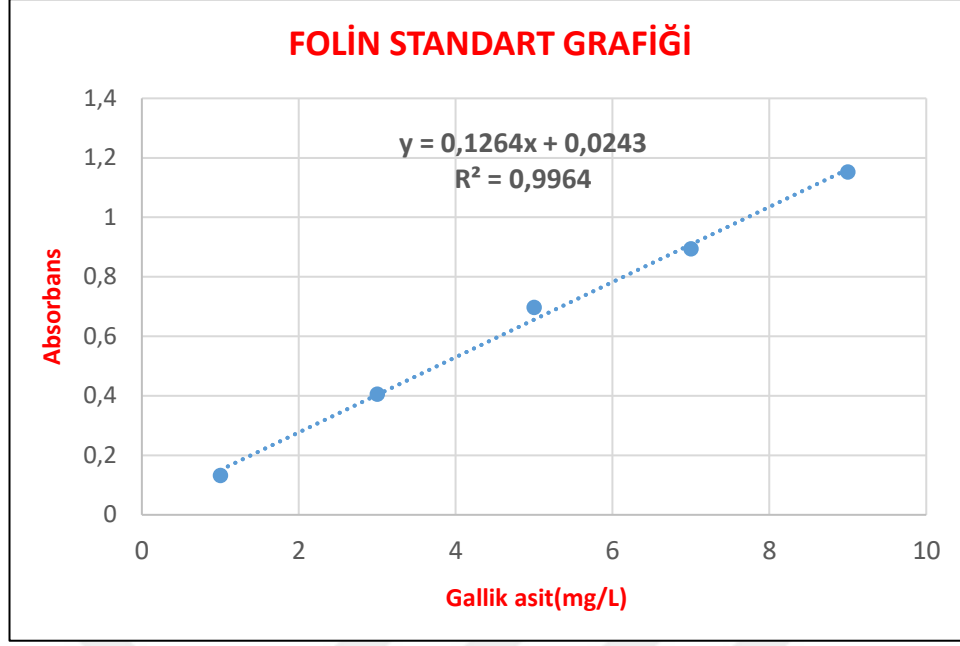
su+ 250 µL Folin Ciocalteu reaktifi+ 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ile yapılmıştır. Folin-Ciocalteu yöntemi için gallik asit ile elde edilen kalibrasyon grafiği Şekil 4.2.'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Folin-Ciocalteu yönteminde hazırlanan gallik asit standart çalışma çözeltileri

Gallik Asit Çalışma Çözeltileri (mg/L)	100 mg/L Gallik Asit Stok Çözeltilerinden Alınan Miktar(µL)	Eklenen Saf Su Miktarı (µL)	Folin-Ciocalteu Reaktifi (µL)	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (mL)	Toplam Hacim (mL)
1	25	225	250	2	2,5
3	75	175	250	2	2,5
5	125	125	250	2	2,5
7	175	75	250	2	2,5
9	225	25	250	2	2,5

**Tablo 4.2.** Gallik asit standart çalışma çözeltilerinin okunan absorban değerleri

Gallik Asit Çalışma Çözeltileri (mg/L)	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1.0	0,1344-0,1321-0,1309	0,1325
3.0	0,4132-0,4020-0,4010	0,4054
5.0	0,6983-0,6960-0,6959	0,6957
7.0	0,8949-0,8941-0,8928	0,8939
9.0	1,1521-1,1523-1,1509	1,1518



**Şekil 4.2.** Folin-Ciocalteu yöntemi için kullanılan gallik asit kalibrasyon grafiği

#### 4.1.2. Zerdeçal Ekstraktlarında Toplam Fenolik Madde Tayini

Zerdeçal ekstraktlarındaki toplam fenolik madde içeriği Singleton ve arkadaşları tarafından önerilen şekilde Folin-Ciocalteu yöntemi kullanılarak saptanmış ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri olacak şekilde ifade edilmiştir.

0,500 g zerdeçal üstte açıklandığı şekilde toplam hacim 50 ml olacak şekilde hem MeOH-H<sub>2</sub>O hem de H<sub>2</sub>O da (infüzyon) ekstrakte edildikten sonra ölçüm öncesi MeOH-H<sub>2</sub>O beş (5) kat, H<sub>2</sub>O (infüzyon) ekstraktı ise seyreltilmeden kullanılmıştır. MeOH-H<sub>2</sub>O ekstraktından 50 µL, H<sub>2</sub>O ile yapılan (infüzyon) ekstraktan ise 100 µL alındıktan sonra (her biri iki paralel çalışılmıştır) hacimdeki örnek üzerine 250 µL Folin-Ciocalteu reaktifi, 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisi ve son hacim 2,5 mL olacak şekilde çözücüsü (rizomların ekstraksiyonunda kullanılan çözücü) ile tamamlandıktan sonra su banyosunda 50°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Belirlenen süre sonunda örnek absorbansı 750 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede okunmuştur (Tablo 4.3. ve 4.4.). Spektrofotometrede sıfırlama işlemi (250 µL su+ 250 µL Folin-Ciocalteu reaktifi+ 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) ile yapılmıştır. Örneklerin toplam fenolik madde içerikleri mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g örnek) olarak ifade edilmiştir (Tablo 4.5.).

**Tablo 4.3.** Metanol-Su ekstraktları için ölçülen absorbanlar

Metanol-Su Ekstraktından alınan hacim 50 µL	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1. Tüp	0,2005-0,2006-0,2008	0,2006
2. Tüp	0,1910-0,1907-0,1908	0,1908
3. Tüp	0,1913-0,1907-0,1900	0,1908
Üç tüp için ortalama absorban		<b>0,1941</b>

**Örnek hesaplama:**

**%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu için;**

Alınan örnek hacmi= 50 µL

Ortalama absorban= 0,1941

Kullanılan doğru denklemi:  $Y = 0,1264 X + 0,0243$  ;

$Y = 0,1941$  alınarak X yani mg gallik asit hesaplandı.

Doğru denklemden hesaplanan mg GAE=  $(0,1941 - 0,0243) / 0,1264 = 1,343$  mg gallik asit/L

$$\frac{\text{mg gallik asit eşdeğer}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{\text{Ekstrakt hacmi (mL)}}{\text{Ekstrakt miktarı (g)}} \times \frac{\text{Seyrelme Faktörü}}{5} \times \frac{\text{Toplam hacim (mL)}}{\text{Örnek hacmi (mL)}}$$

$$\frac{1,343 \text{ mg GAE}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{50 \text{ ml}}{0,5 \text{ g örnek}} \times 5 \times \frac{2,5 \text{ ml}}{0,05 \text{ ml}} = 33,58 \text{ mg GAE / g zerdeçal olarak}$$

**bulunur.**

**Tablo 4.4.** İnfüzyon ekstraktları için ölçülen absorbanlar

İnfüzyon (demleme) Ekstraktından alınan hacim 100 µL	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1. Tüp	0,9488-0,9472-0,9467	0,9477
2. Tüp	0,9511-0,9508-0,9080	0,9495
3. Tüp	0,9492-0,9470-0,9496	0,9486
Üç tüp için ortalama absorban		<b>0,9486</b>

Ortalama Absorbans= 0,9486

Kullanılan doğru denklemi:  $Y = 0,1264 X + 0,0243$  ;

$Y = 0,9486$  alınarak  $X$  yani mg gallik asit hesaplandı.

Doğru denklemden hesaplanan mg GAE=  $(0,9486 - 0,0243) / 0,1264 = 7,3125$  mg gallik asit/L

$$\frac{7,3125 \text{ mg GAE}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{50 \text{ ml}}{0,5 \text{ g örnek}} \times \frac{2,5 \text{ ml}}{0,1 \text{ ml}} = 18,28 \text{ mg GAE / g zerdeçal olarak bulundu.}$$

**Tablo 4.5.** Zerdeçal ekstraktlarının toplam fenolik madde içerikleri

Zerdeçal Örnekleri	Toplam Fenolik Madde İçeriği (mg GAE/g örnek); n=3
Metanol-Su Ekstraksiyonu	33,58±0,91
İnfüzyon (Demleme) Ekstraksiyonu	18,28±0,02

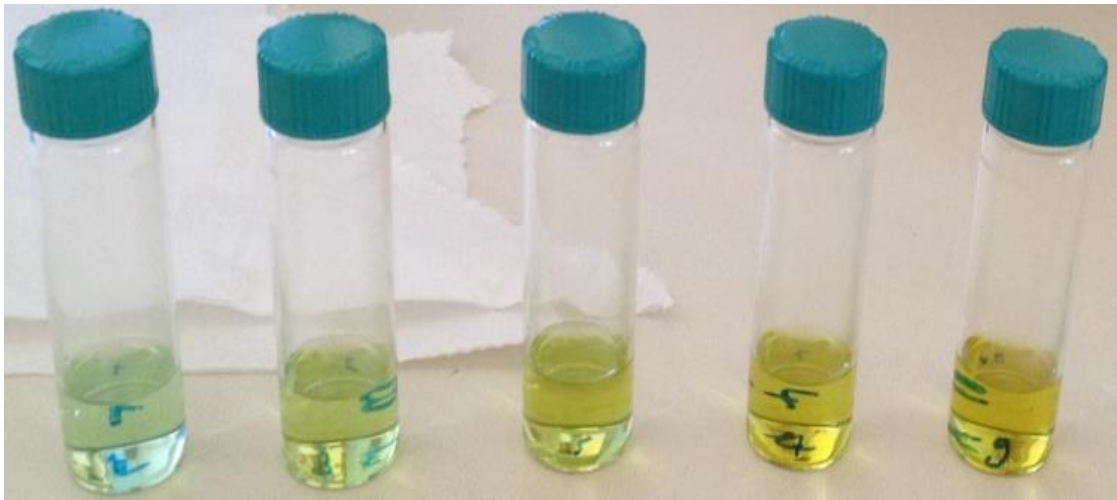
#### 4.1.3. CUPRAC (Cu-II İyonu İndirgeme) Yöntemiyle Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini

CUPRAC yöntemi ile antioksidan kapasitesi tayin edilmesinde standart madde olarak troloks kullanılmıştır. Standart grafiğinin hazırlanmasında kullanılmak üzere stok troloks çözeltisi (100 mg/L) hazırlanmıştır. Standart kalibrasyon grafiği için 5 (beş) farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) troloks çalışma çözeltileri hazırlanmıştır (Şekil 4.3.).

Tablo 4.6.'da hazırlanışı ayrıntılı olarak verilen standart çalışma çözeltilerinden her bir derişim için tablodaki miktarlarda alındıktan sonra 1 mL  $\text{CuCl}_2$  çözeltisi, 1 mL neokuproin çözeltisi, 1 mL amonyum asetat tamponu (pH=7) eklenerek son hacim metanol ile 4 mL'ye tamamlanarak oda sıcaklığında, karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda absorbans değerleri 450 nm dalga boyunda UV spektrofotometrede ölçülmüştür (Tablo 4.7.). Sıfırlama işlemi (1 mL  $\text{CuCl}_2$ + 1 mL  $\text{NH}_4\text{Ac}$  tamponu+ 1 mL neokuproin+ 1 mL MeOH ) ile yapılmıştır. Derişime karşı ortalama absorbans değerleri kullanılarak ilgili kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 4.4.).

**Tablo 4.6.** CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiği için kullanılan troloks çalışma çözeltileri

Troloks Çalışma Çözeltileri (mg/L)	100 mg/L Troloks Stok Çözeltilisinden Alınan Miktar( $\mu$ L)	Eklenen Metanol Miktar ( $\mu$ L)	Eklenen $\text{CuCl}_2$ Miktarı(mL)	Eklenen Neokuproin Miktarı(mL)	Eklenen Amonyum Asetat Tamponu (pH=7) Miktarı(mL)	Toplam Hacim (mL)
1	40	960	1	1	1	4
3	120	880	1	1	1	4
5	200	800	1	1	1	4
7	280	720	1	1	1	4
9	360	640	1	1	1	4

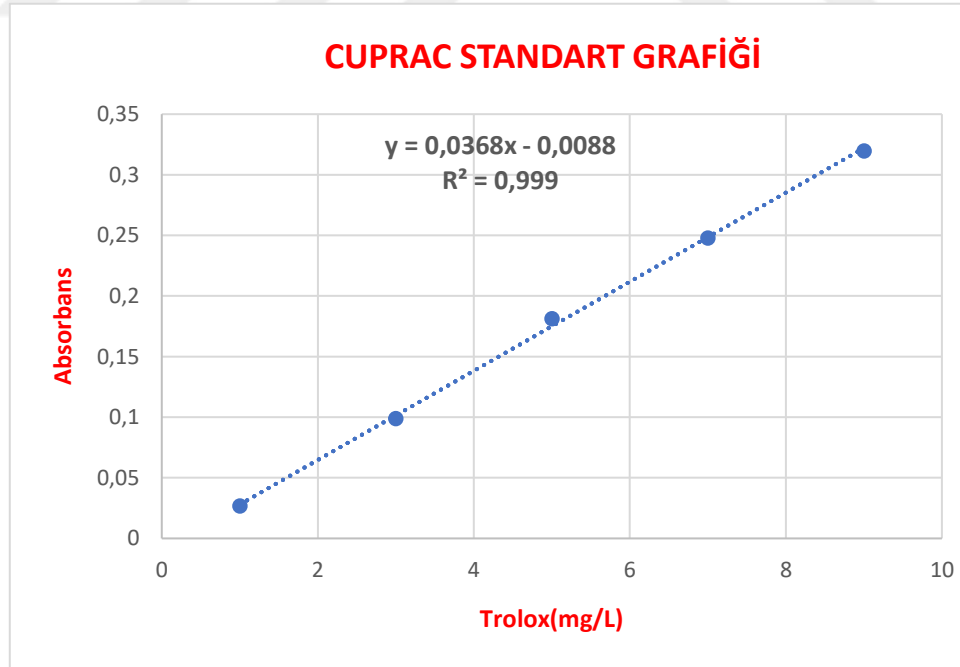


**Şekil 4.3.** CUPRAC yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan troloks standart çözeltileri renk skalası



**Tablo 4.7.** CUPRAC kalibrasyon grafiği için kullanılan troloks çalışma çözeltileri absorbens değerleri

Troloks alışma çözeltileri (mg/L)	Troloks alışma çözeltileri $\mu\text{M}$	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1.0	3,99	0,0267-0,0259-0,0279	0,0268
3.0	11,98	0,0987-0,0992-0,0990	0,0989
5.0	19,97	0,1817-0,1815-0,1811	0,1814
7.0	27,97	0,2477-0,2480-0,2484	0,2480
9.0	35,96	0,3199-0,3191-0,3204	0,3198



**Şekil 4.4.** CUPRAC yönteminde kullanılan troloks çalışma çözeltileri için kalibrasyon grafiği

#### 4.1.4. Zerdeçal Ekstraktlarında Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini

0,500 g zerdeçal ekstraksiyon akış şemasında açıklandığı üzere toplam hacim 50 mL olacak şekilde hem MeOH-H<sub>2</sub>O hem de H<sub>2</sub>O da (infüzyon) ekstrakte edildikten sonra ölçüm öncesi MeOH-H<sub>2</sub>O ekstraktı 2 kat seyreltilmiş, H<sub>2</sub>O (infüzyon) ekstraktı ise seyreltilmeden kullanılmıştır. MeOH-H<sub>2</sub>O ekstraktı ve H<sub>2</sub>O ile yapılan (infüzyon) ekstraktan 50 µL alınmıştır (her biri üç paralel olacak şekilde çalışılmıştır). 50 µL örnek üzerine 1 mL (1,0x10<sup>-2</sup> M) Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL (7,5x10<sup>-3</sup> M) neokuproin çözeltisi ve 1 mL (1 M) amonyum asetat tampon (pH=7,0) çözeltisi ilave edildikten sonra son hacim 4 mL olacak şekilde çözücüsü (rizomların ekstraksiyonunda kullanılan çözücü) ile tamamlanıp oda sıcaklığında karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda örnek absorbansı 450 nm dalga boyunda UV spektrofotometre de okunmuştur (Tablo 4.8. ve 4.9.). Numuneler için ölçülen absorbans değerleri ve troloks için elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak her bir numunenin antioksidan kapasitesi (mg TEAK/g örnek) olarak ifade edilmiştir (Tablo 4.10.).

**Tablo 4.8.** MeOH-H<sub>2</sub>O ekstraktı için ölçülen absorbanslar

MeOH-H <sub>2</sub> O Ekstraktından alınan hacim 50 µL	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1. Tüp	0,1840-0,1834-0,1829	0,1834
2. Tüp	0,1869-0,1864-0,1872	0,1868
3. Tüp	0,1846-0,1856-0,1851	0,1851
Üç tüp için ortalama absorbans		<b>0,1851</b>

#### Örnek hesaplama:

#### %70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu için;

Alınan örnek hacmi= 50 µL

Ortalama Absorbans= 0,1851

Kullanılan doğru denklemi: Y= 0,0368 X – 0,0088 ;

Doğru denkleminden hesaplanan mg Trolox Eşdeğeri= (0,1851+0,0088)/0,0368= 5,269 mg trolox eşdeğeri / L

(mg Troloks eşdeğeri / g örnek) = (mg trolox eşdeğeri / 1000 mL) x (V<sub>toplam</sub> / V<sub>eklenen örnek</sub>) x SF x (V<sub>ekstrakt</sub>/m<sub>ekstrakt</sub>)

$$(mg Troloks eşdeğeri / g örnek) = \frac{5,269 \text{ mg trolox}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{50 \text{ ml}}{0,5 \text{ g örnek}} \times 2 \times \frac{4,0 \text{ ml}}{0,05 \text{ ml}}$$

= **84,30 mg Troloks eşdeğeri / g zerdeçal**

**Tablo 4.9.** İnfüzyon ekstraktı için ölçülen absorbanslar

İnfüzyon (demleme) Ekstraktından alınan hacim 50 µL	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1. Tüp	0,2309-0,2309-0,2313	0,2310
2. Tüp	0,2393-0,2386-0,2386	0,2388
3. Tüp	0,2467-0,2424-0,2422	0,2438
Üç tüp için ortalama absorbans		<b>0,2378</b>

**Örnek hesaplama:**  
**infüzyon Ekstraksiyonu için;**

Alınan örnek hacmi= 50 µL

Ortalama Absorbans= 0,2378

Kullanılan doğru denklemi: Y= 0,0368 X – 0,0088 ;

Doğru denkleminden hesaplanan mg Trolox Eşdeğeri= (0,2368+0,0088)/0,0368= 6,6739 mg trolox eşdeğeri / L

(mg Troloks eşdeğeri / g örnek) = (mg trolox eşdeğeri / 1000 mL) x (V<sub>toplam</sub> / V<sub>eklenen örnek</sub>) x SF x (V<sub>ekstrakt</sub>/m<sub>ekstrakt</sub>)

$$(mg Troloks eşdeğeri / g örnek) = \frac{6,6739 \text{ mg trolox}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{50 \text{ ml}}{0,5 \text{ g örnek}} \times \frac{4,0 \text{ ml}}{0,05 \text{ ml}}$$

= **53,39 mg Troloks eşdeğeri / g zerdeçal**

**Tablo 4.10.** Zerdeçal ekstraktlarının toplam toplam antioksidan kapasiteleri

Zerdeçal örnekleri	mg Troloks eşdeğeri / g örnek; n=3
Metanol-Su Ekstraksiyonu	84,30±0,80
İnfüzyon (Demleme) Ekstraksiyonu	53,39±3,84

#### **4.1.5. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) Yöntemiyle Radikal Giderme Kapasitesi Tayini**

DPPH radikal giderme ya da temizleme yöntemi basit, hızlı ve kolay uygulanabilir bir yöntem olarak sıklıkla tercih edilmektedir. Antioksidan maddelerin antioksidan özelliklerinden bir tanesi de ortamda oluşan radikalleri süpürmeleridir. Numunelerimizin anti-radikal özelliklerinin olup olmadığını anlamak için 517 nm’de maksimum absorptans veren DPPH radikali kullanılmıştır. DPPH kararlı bir serbest radikaldir. Kararlı bir diamanyetik molekül oluşturmak için bir elektron veya hidrojen radikalini bünyesine kabul eder. Antioksidan ile DPPH’ın oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği absorptans ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek demektir. DPPH radikalinin ortamdaki miktarının azalması ile absorptansın azalması belli bir antioksidan derişimine kadar doğru orantılıdır. Absorptansın düşmesinin sebebi radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu hidrojen bağlanması ile radikalın giderilmesidir.

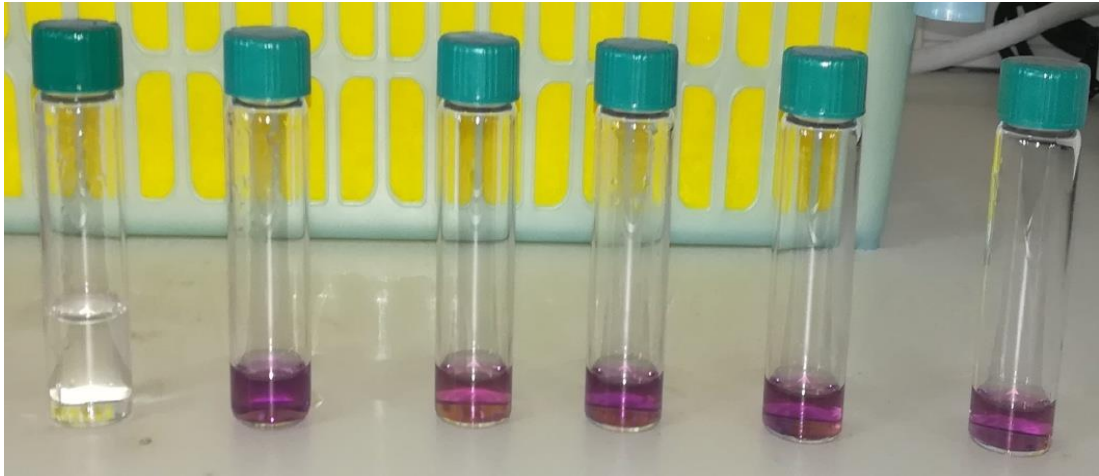
DPPH yöntemi ile radikal giderme kapasitesi tayininde troloks standart maddesi kullanılmıştır. Standart kalibrasyon grafiği için 5 farklı konsantrasyonda (1, 3, 5, 7, 9 mg/L) troloks çözeltileri hazırlanmıştır. Çalışma çözeltileri 100 mg/L troloks stok çözeltisinden (0,0025 g troloks/25 mL metanol) hazırlanmıştır.

Tablo 4.11.’de görüldüğü gibi standart troloks çözeltileri için tablodaki miktarlar alınarak, metanol ile 1000 µL’ye tamamlanmış ve üzerlerine 1 mL (1:3) oranında seyreltilmiş DPPH çözeltisi ilave edilerek son hacim 2.0 mL’ye tamamlanmış ve 20 dakika inkübe edildikten sonra (Şekil 4.5.) absorptansları 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur (Tablo 4.12.). Spektrofotometrede sıfırlama işlemi metanol ile yapılmıştır. Tablo 4.13.’de DPPH yöntemine ait kontrol çözeltisi absorptans değerleri verilmiştir.

Numuneler için ölçülen absorbans değerleri ve DPPH için elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak her bir numunenin radikal giderme kapasitesi (mg TEAK/g örnek) olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.6.).

**Tablo 4.11.** DPPH yönteminde troloks standart çözeltilerinin hazırlanışı

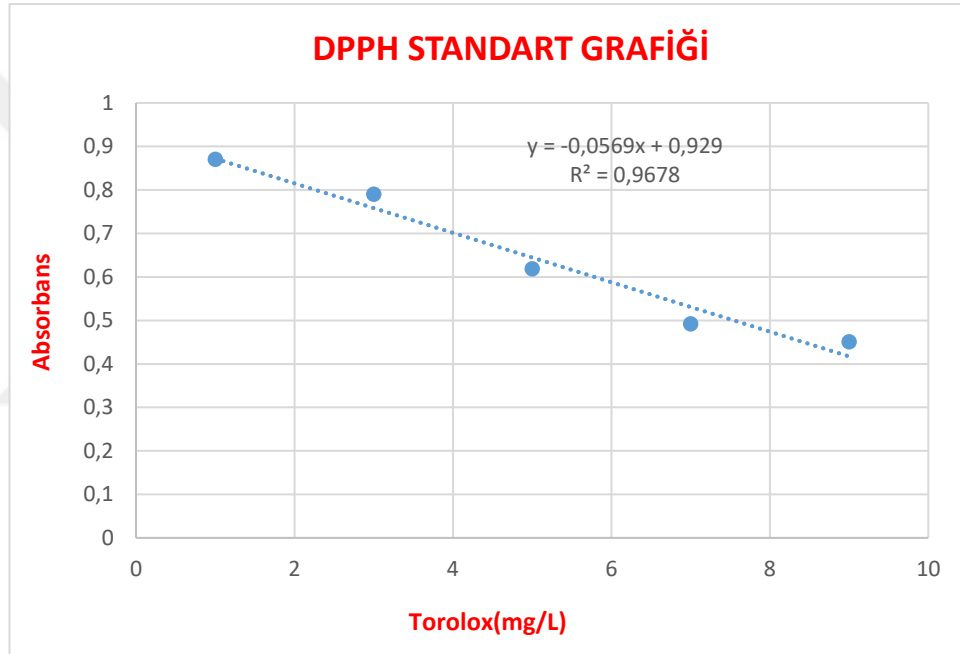
Troloks Çalışma Çözeltileri (mg/L)	100 mg/L Troloks Stok Çözeltilisinden Alınan Miktar( $\mu$ L)	Eklenen Metanol Miktar ( $\mu$ L)	Eklenen DPPH Miktarı(mL)	Toplam Hacim (mL)
1	20	980	1	2
3	60	940	1	2
5	100	900	1	2
7	140	860	1	2
9	180	820	1	2



**Şekil 4.5.** DPPH yönteminde kalibrasyon grafiği için hazırlanan standart troloks çalışma çözeltilerinin renk skalası

**Tablo 4.12.** DPPH yöntemi kalibrasyon grafiği çözeltileri absorbans değerleri

Troloks Çalışma Çözeltileri (mg/L)	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1.0	0,8708-0,8707-0,8706	0,8707
3.0	0,7904-0,7902-0,7902	0,7903
5.0	0,6196-0,6190-0,6188	0,6191
7.0	0,4924-0,4928-0,4924	0,4925
9.0	0,4511-0,4211-0,4512	0,4511



**Şekil 4.6.** DPPH yönteminde kullanılan çalışma çözeltileri için kalibrasyon grafiği

**Tablo 4.13.** DPPH yöntemi için kontrol çözeltisi absorbans değerleri

Kontrol Çözeltisi	Absorbans	Ortalama absorbans
(1 mL MeOH+ 1 mL DPPH)	0,9029-0,9035-0,9040	<b>0,9035</b>

Örneklerin radikal giderme kapasiteleri mg Troloks eşdeğeri/g örnek olarak ifade edilmiştir.

Yapılan ön denemelerde elde edilen sonuçlar doğrultusunda radikal giderme kapasitesi tayini için örnek ekstraktlarından 10 µL (üç paralel) örnek üzerine 1 mL (1:3) oranında seyreltilmiş stok DPPH (5,00x10<sup>-4</sup> M konsantrasyonda %99,9'luk metanolde hazırlanmış stok DPPH çözeltisi) çözeltisi eklendikten sonra son hacim 2 mL olacak şekilde çözücüsü (rizomların ekstraksiyonunda kullanılan çözücü) ilave edilerek karanlık ortamda 20 dakika inkübe edilerek kullanılmıştır. Bu süre sonunda örnek absorbansı 517 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunmuştur (Tablo 4.14. ve 4.15.).

**Tablo 4.14.** MeOH-H<sub>2</sub>O ekstraktı için ölçülen absorbanslar

MeOH-H <sub>2</sub> O Ekstraktından alınan hacim 10 µL	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1. Tüp	0,7628-0,7628-0,8073	0,7759
2. Tüp	0,7652-0,7649-0,7646	0,7649
3. Tüp	0,7734-0,7725-0,7728	0,7729
Üç tüp için ortalama absorbans		<b>0,7712</b>

**% inhibisyon aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.**

$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}) / \text{Abs}_{\text{kontrol}} \times 100$$

Abs<sub>kontrol</sub> : 1 mL MeOH+ 1 mL DPPH çözeltisi absorbansı

Abs<sub>örnek</sub> : 20. Dakikalık inkübasyon sonrası örnek absorbansı

**Örnek hesaplama:**

**%70'lik Metanol-Su Ekstraksiyonu için;**

Alınan örnek hacmi= 10 µL

Ortalama Absorbans= **0,7712**

% inhibisyon aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ inhibisyon} = (\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{örnek}}) / \text{Abs}_{\text{kontrol}} \times 100$$

Abskontrol : 1 mL MeOH+ 1 mL DPPH çözeltisi absorbansı

Absörnek : 20. Dakikalık inkübasyon sonrası örnek absorbansı

$$\% \text{ inhibisyon} = (0,9035 - 0,7712) / 0,9035 \times 100$$

$$\% \text{ inhibisyon} = 14,64$$

$$\text{Ortalama Absorbans} = 0,7712$$

Kullanılan doğru denklemi:  $Y = -0,0569X + 0,9290$  ;

Doğru denkleminden hesaplanan örnek miktarı (mg TE)=  $(0,7712 - 0,9290) / (-0,0569) = 2,77 \text{ mg TE / L}$

$$(\text{mg Troloks eşdeğeri / g örnek}) = (\text{mg trolox eşdeğeri / 1000 mL}) \times (\text{Vekstrakt/mekstrakt}) \times \text{SF} \times \text{V}_{\text{toplam}} / \text{Veklenen örnek}$$

$$(\text{mg Troloks eşdeğeri / g örnek}) = \frac{2,77 \text{ mg trolox}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{50 \text{ ml}}{0,5 \text{ g örnek}} \times \frac{2,0 \text{ ml}}{0,01 \text{ ml}} = 55,4 \text{ mg}$$

Troloks eşdeğeri / g zerdaçal

**Tablo 4.15.** İnfüzyon ekstraktı için ölçülen absorbanslar

İnfüzyon ekstraktından alınan hacim 40 µL	Absorbans, A n=3	Ortalama Absorbans A
1. Tüp	0,8032-0,8022-0,8018	0,8024
2. Tüp	0,8062-0,8056-0,8053	0,8057
3. Tüp	0,8055-0,8051-0,8051	0,8052
Üç tüp için ortalama absorbans		<b>0,8044</b>

**Örnek hesaplama:**

**İnfüzyon (Su) Ekstraksiyonu için;**

Alınan örnek hacmi= 40 µL

Ortalama Absorbans= **0,8044**



$$\% \text{ inhibisyon} = (0,9035 - 0,8044) / 0,9035 \times 100$$

$$\% \text{ inhibisyon} = 10,97$$

#### İnfüzyon (Su) Ekstraksiyonu için;

Alınan örnek hacmi= 40 µL

Ortalama Absorbans = 0,8044

Kullanılan doğru denklemi:  $Y = -0,0569X + 0,9290$  ;

Doğru denklemden hesaplanan örnek miktarı (mg TE)=  $(0,8044 - 0,9290) / (-0,0569) = 2,1898 \text{ mg TE / L}$

$$\text{(mg Troloks eşdeğeri / g örnek)} = \frac{2,1898 \text{ mg trolox}}{1000 \text{ mL}} \times \frac{50 \text{ ml}}{0,5 \text{ g örnek}} \times \frac{2,0 \text{ ml}}{0,04 \text{ ml}} = 10,95$$

mg Troloks eşdeğeri / g zerdaçal

**Tablo 4.16.** Zerdaçal ekstraktlarının toplam DPPH kapasiteleri

Zerdaçal örnekleri	mg troloks eşdeğeri / g örnek); n=3
Metanol-Su Ekstraksiyonu	55,40±2,01
İnfüzyon (Demleme) Ekstraksiyonu	10,95±0,16

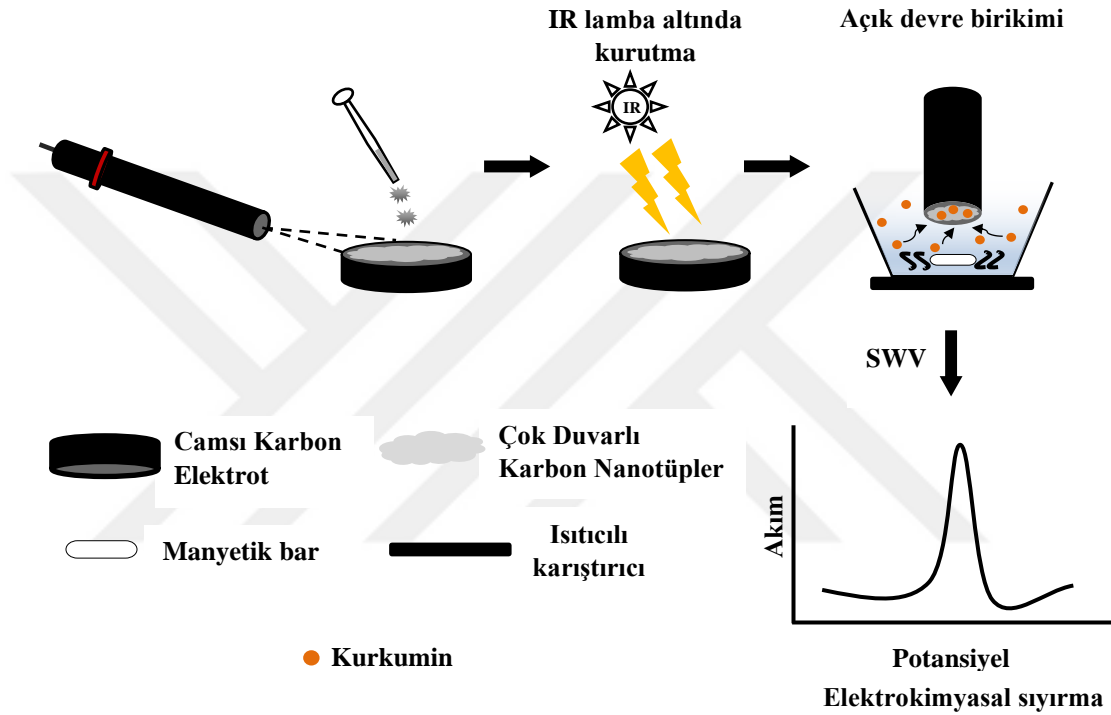
Alınan ekstrakt hacmi dikkate alınarak her iki ekstraksiyon için % inhibisyon infüzyon ekstraktlarında  $10,97/4 = 2,74$  olarak ifade edilebilir. Dolayısıyla Me-H<sub>2</sub>O ekstraktlarının inhibisyonu infüzyon ekstraktlarına göre  $14,64/ 2,74 = 5,34$  kat fazla bulunmuştur.

#### 4.2. Kurkuminin Voltammetrik Analizi

Çalışmanın ikinci bölümünde zerdaçal rizomlarındaki kurkumin miktarının voltammetrik analizi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma elektrotu olarak MWCNT ile modifiye edilmiş yalın camsı karbon elektrot kullanılmıştır.

#### 4.2.1. Kurkuminin Adsorptif Sıyırma Kare Dalga Voltammetrisi ile Tayini

Zerdeçal rizom ekstraktlarında bulunan kurkuminin duyarlı bir şekilde tayin edilebilmesi için MWCNT ile modifiye edilmiş GCE kullanılmıştır (Şekil 4.7.). Kullanılan voltammetrik yöntem, MWCNT/GCE yüzeyine kendiliğinden biriken kurkuminin Adsorptif sıyırma kare dalga voltammetrik tayini ilkesine dayanmaktadır.



**Şekil 4.7.** Kurkumin analizi için önerilen elektrokimyasal algılama platformunun şematik gösterimi

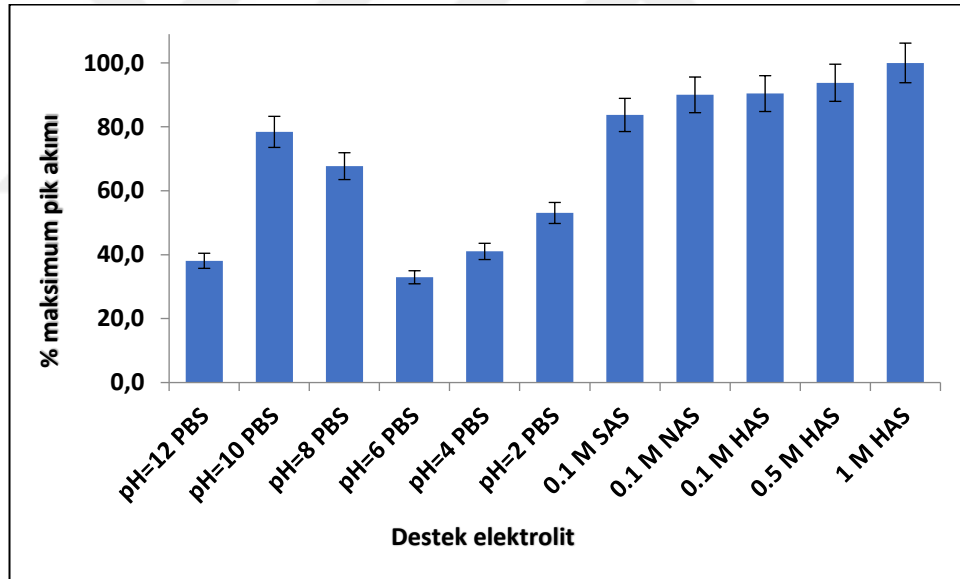
#### 4.2.2. Destek Elektrolit pH'ının Belirlenmesi ve İyonik Şiddet Çalışmaları

Tüm çalışmalarda Tablo 4.17.'deki elektrolit çözeltilerden sırası ile hücreye 3 mL eklenmiştir. Her bir elektrolit çözelti yaklaşık 2 dk. azot gazından geçirilmiştir. Hücreye konsantrasyonu 14  $\mu$ M olacak şekilde ana stok kurkumin standartından 30  $\mu$ L eklenerek kurkuminin yükseltgenme pik akımları gözlenmiştir.

**Tablo 4.17.** İyonik şiddet denemeleri için çalışılan kimyasallar

Kullanılan fosfat tamponları	Kullanılan asit çözeltileri
pH=2 fosfat tamponu	0,1 M Sülfirik Asit
pH=4 fosfat tamponu	0,1 M Nitrik Asit
pH=6 fosfat tamponu	0,1 M Hidroklorik Asit
pH=8 fosfat tamponu	0,5 M Hidroklorik Asit
pH=10 fosfat tamponu	1 M Hidroklorik Asit
pH=12 fosfat tamponu	

14  $\mu$ M kurkuminin hazırlanan MWCNT/GCE üzerinde farklı destek elektrolitler kullanılarak elde edilen yükseltgenme pik akımlarının maksimum pik akımına göre yüzdeleri Şekil 4.8.'de gösterilmektedir.



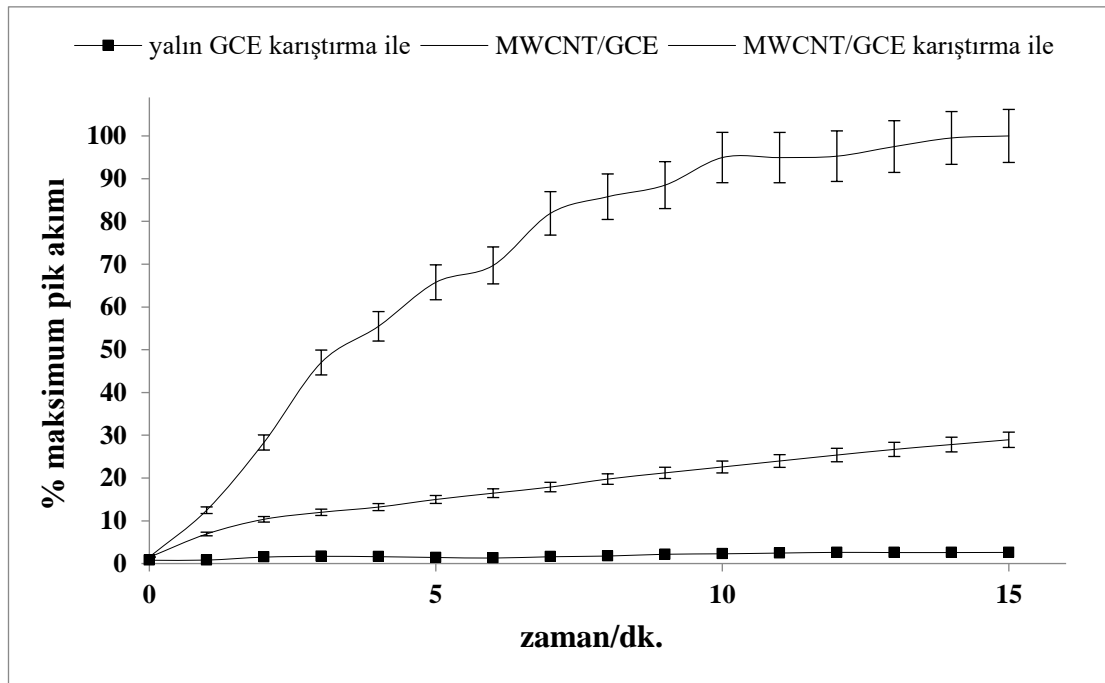
**Şekil 4.8.** 14  $\mu$ M kurkuminin hazırlanan MWCNT/GCE üzerinde farklı destek elektrolitler kullanılarak elde edilen yükseltgenme pik akımlarının maksimum pik akımına göre yüzdeleri. Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ . PBS: fosfat tampon çözeltisi; SAS: sülfirik asit çözeltisi; NAS: nitrik asit çözeltisi; HAS: hidroklorik asit çözeltisi.

Yapılan çalışmalar asidik ortamın daha yüksek anodik pik akımları sağladığını göstermektedir. Bu amaçla elektrolit çözelti 0,1 M HCl olarak seçilmiştir.

### 4.2.3. Karıştırmanın Birikmeye Etkisi

Hücrede 14  $\mu\text{M}$  kurkumin olacak şekilde, 30  $\mu\text{L}$  ana stok çözeltiden elektrolit çözelti (0,1 M HCl) üzerine ilave edilmiştir. Kurkuminin yükseltgenme pik akımı, artan birikme sürelerine karşı hem yalın elektrot hem de MWCNT/GCE ile CV tekniği kullanılarak gözlenmiştir. Yalın elektrotta kayda değer bir değişiklik gözlenmezken, kurkuminin anodik pik akımı artan zamana karşı MWCNT/GCE’de yükselmiştir. Ayrıca elektrolit çözeltisinin karıştırılmasının (200 rpm), kurkuminin anodik pik akımı üzerine etkisi de incelenmiştir. Yapılan çalışmada elektrolit çözeltisinin karıştırılması ile hem kurkuminin MWCNT/GCE’de elde edilen anodik pik akımında önemli bir artış sağlanmış, hem de maksimum yükseltgenme pik akımına ulaşmak için gereken süre kısalmıştır.

Şekil 4.9.’da elektrolit çözeltisinin karıştırılmasının, önerilen elektrokimyasal hücredeki kurkuminin analizi için hassasiyeti arttırdığı açıkça kanıtlanmıştır (kurkuminin önerilen yüzeye kendiliğinden adsorpsiyonu ile ön deriştirilmesi ilkesine dayanarak). Elde edilen sonuçlara göre, karıştırma süresinin 10 dakika olduğu bulunmuştur.

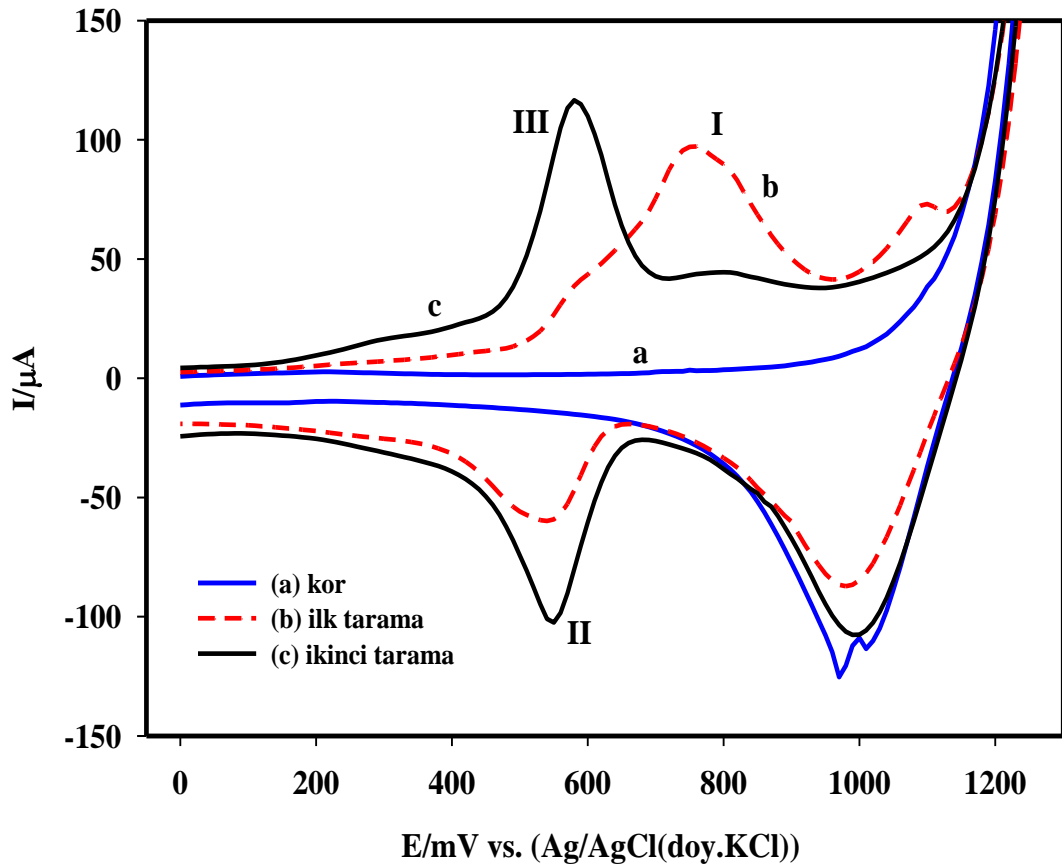


Şekil 4.9. 14  $\mu\text{M}$  kurkuminin CV ile zamana karşı elde edilen yükseltgenme pik akımları. Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

#### 4.2.4. Kurkuminin MWCNT/GCE'deki Redoks Mekanizması

Kurkuminin önerilen elektrottaki redoks davranışını belirlemek üzere hücreye 3 mL 0,1 M HCl çözeltisinden eklenmiştir. Elektrolit çözelti yaklaşık 2 dk. azot gazından geçirildikten sonra hücredeki derişimi 14  $\mu\text{M}$  olacak şekilde kurkumin standardından 30  $\mu\text{L}$  eklenmiştir. Elektrot yüzeyinde birikme prosesi tamamlandıktan sonra elde edilen kurkuminin döngüsel voltammogramları Şekil 4.10.'da gösterilmiştir.

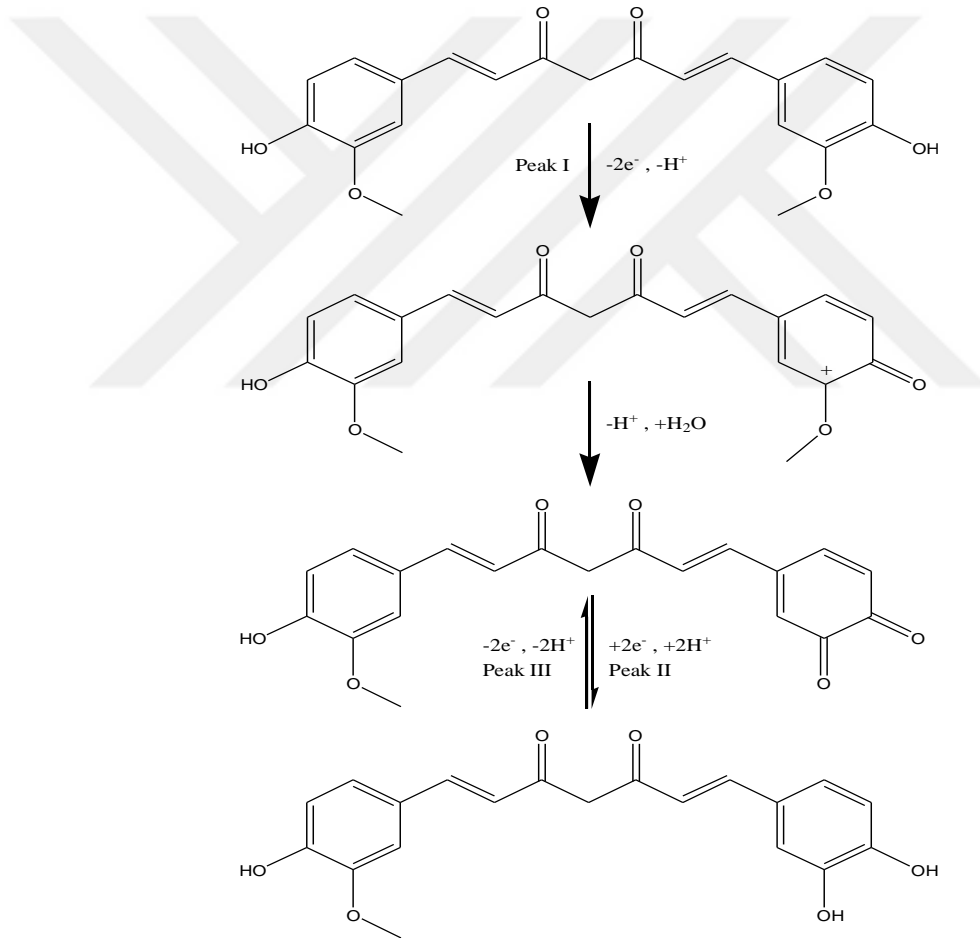
İlk döngüsel taramada, yaklaşık 760 mV'de kurkumine ait bir anodik pik (pik I) gözlemlenirken, katodik pik (pik II) yaklaşık 560 mV'de ölçülmüştür. Ancak, anodik pik I sonraki taramaların hiçbirinde gözlenmemiş ve anodik pik III ile yer değiştirerek yaklaşık 580 mV'de ölçülmüştür. Anodik pik III, çalışmada analitik sinyal olarak kullanılmıştır.



Şekil 4.10. MWCNT/GCE üzerinde döngüsel voltammogramlar (a) kör, (b) 14  $\mu\text{M}$  CUR (ilk tarama), ve (c) 14  $\mu\text{M}$  CUR (ikinci tarama). Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

Kurkumin için olası elektrot mekanizması daha önce başka bir çalışmada önerilmiştir [90].

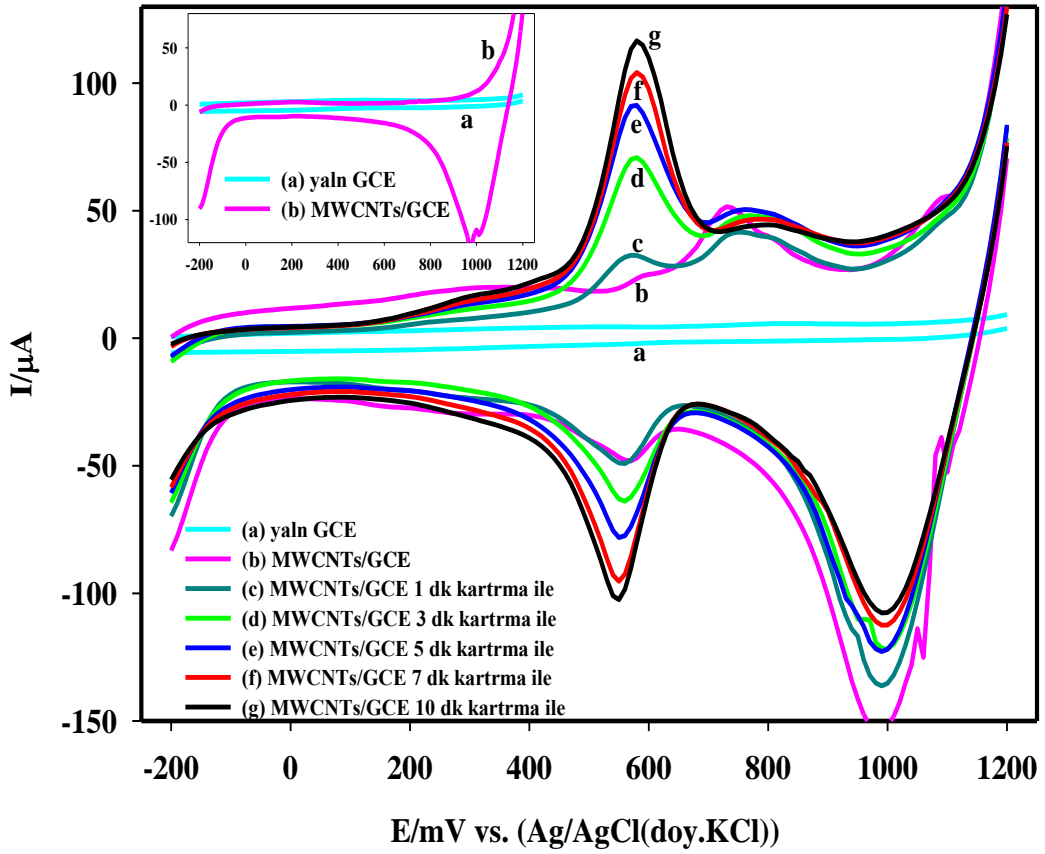
İlk taramadaki oksidatif pik, bir orto-benzokinin oluşturmak için iki proton, iki elektron oksidasyonuna aittir. Taramanın tersine çevrilmesi üzerine orto-benzokininun azalması, bir orto-hidrokinon oluşumuna yol açmaktadır. Son olarak, voltametik cevaplar, sonraki taramalarda orto-hidrokinon / orto-benzokinin çiftinin geri dönüşümlü redoks davranışına karşılık gelmektedir. Şekil 4.11.'de gösterildiği gibi, kurkuminin toplam katkısı, bir birim 2-metoksifenol başına iki elektrona maruz kalması nedeniyle, net dört elektron transferine dayanmaktadır.



**Şekil 4.11.** Kurkuminin MWCNT/GCE'deki olası elektrokimyasal redoks mekanizması [90].

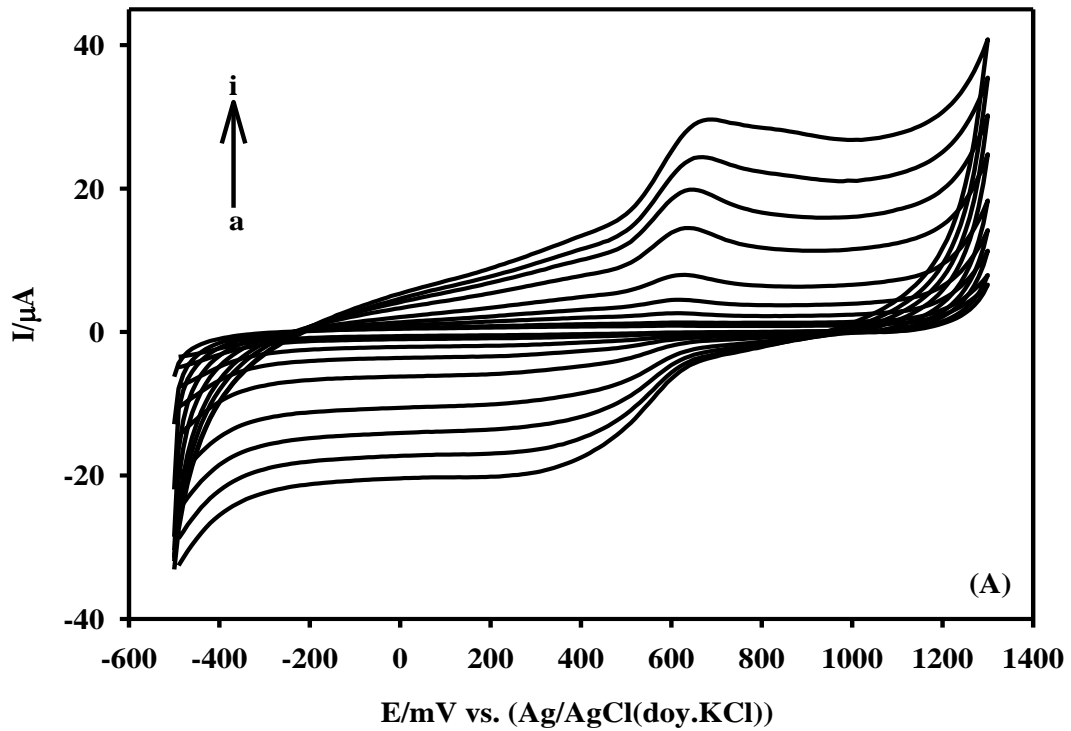
#### 4.2.5. Kurkuminin Yalın GCE ve MWCNT/GCE Üzerinde Voltammetrik Davranışı

Şekil 4.12.'de yalın GCE ve MWCNT/ GCE'de optimize edilmiş koşullarda 14  $\mu\text{M}$  kurkuminin CV'lerini karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Yalın GCE ile karşılaştırıldığında, kurkumin MWCNT/GCE'deki anodik ve katodik pik akımları, kurkuminin önerilen yüzeye kendiliğinden adsorpsiyonu nedeniyle önemli ölçüde artmıştır. Kurkuminin bu adsorpsiyon özelliği, önerilen elektrokimyasal yöntemin oldukça hassas bir kurkumin sensörü olarak kullanılmasını sağlamıştır.



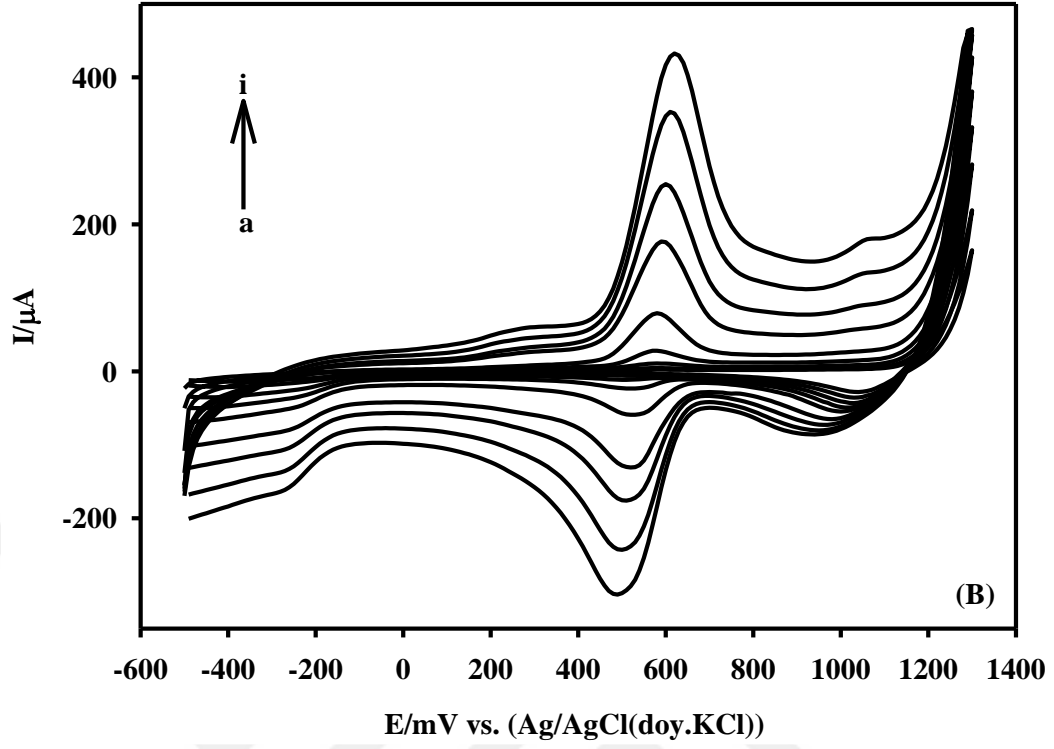
**Şekil 4.12.** 14  $\mu\text{M}$  kurkuminin 0.1 M HCl içindeki döngüsel voltammogramı. Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ . (a) yalın GCE, (b) MWCNT/GCE, (c) MWCNT/GCE ile 1 dk. boyunca karıştırma (d) MWCNT/GCE ile 3 dk. boyunca karıştırma (e) MWCNT/GCE; 5 dk. boyunca karıştırma (f) MWCNT/GCE 7 dk. boyunca karıştırma (g) MWCNT/GCE. 10 dk. boyunca karıştırma (a) GCE, (b) MWCNT/GCE. Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

Ardından hücredeki derişimi yine 14  $\mu\text{M}$  olacak şekilde kurkumin standardından 30  $\mu\text{L}$  eklenerek elde edilen çözeltinin yalın elektrot ve MWCNT/GCE için farklı tarama hızlarındaki döngüsel voltammogramları sırasıyla Şekil 4.13. ve 4.14.'de gösterilmiştir. Sonuçlar anodik pik akımlarının, 5-500  $\text{mV s}^{-1}$  arasındaki tarama hızlarıyla orantılı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.15.). Bu nedenle, yalın elektrot ve MWCNT/GCE üzerindeki indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarının adsorpsiyon kontrollü prosesler olduğu tespit edilmiştir.

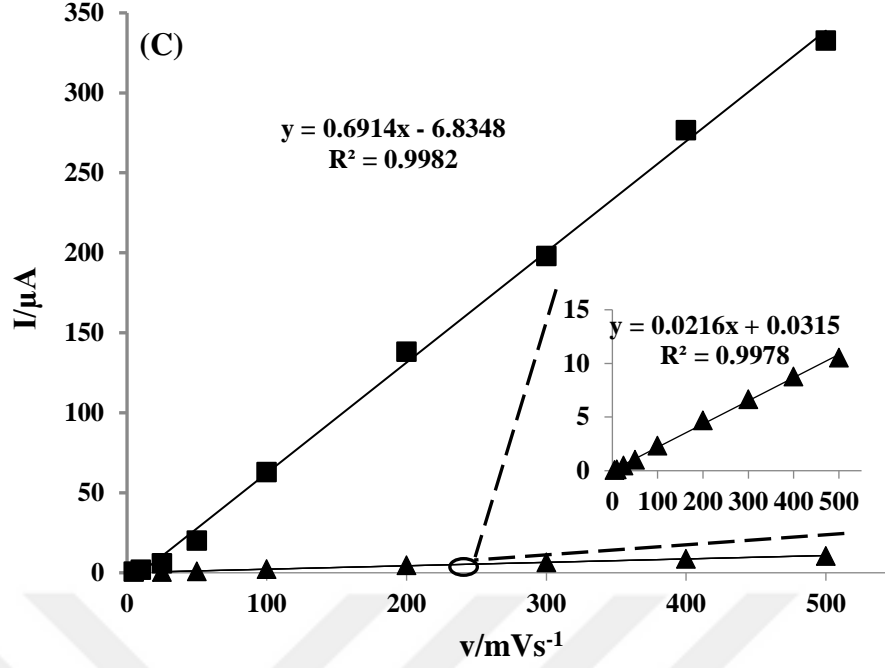


**Şekil 4.13.** 14  $\mu\text{M}$  kurkuminin yalın GCE ile 0.1 M HCl içindeki döngüsel voltammogramları (a-i, sırasıyla 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500  $\text{mV/s}$ ) Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .





**Şekil 4.14.** 14 μM kurkuminin MWCNT/GCE ile 0.1 M HCl içindeki döngüsel voltammogramları (a-i, sırasıyla 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mV/s) Tarama hızı: 100 mV s<sup>-1</sup>.



**Şekil 4.15.** Kurkuminin yükseltgenmesine ait akım-tarama hızı grafikleri: yalnız GCE (▲) ve MWCNT/ GCE (■) üzerinde. (a-i): 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300, 400 ve 500 mV s<sup>-1</sup>.

#### 4.2.6. Modifiye ve Yalın Elektrotların Yüzey Alanları

Elektrotların elektroaktif yüzey alanlarını hesaplamak için Randles-Sevcik Eşitliği (1) kullanılmıştır. Yüzey alanları, elektrolit çözeltisi olarak 0.1 M KCl içerisinde hazırlanan 0.001 M K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> kullanılarak farklı tarama hızlarında CV yöntemi ile hesaplanmıştır. T = 298 K sıcaklık değerinde ve tersinir bir işlem için pik akımı (I<sub>p</sub>) aşağıdaki gibidir [91]:

$$I_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_0^{1/2} \nu^{1/2} C_0^* \quad (1)$$

I<sub>p</sub>= pik akımı,

n= aktarılan elektronların sayısı,

A=elektrot yüzeyi,

D<sub>0</sub>= difüzyon katsayısı (7.6×10<sup>-6</sup> cm<sup>2</sup> s<sup>-1</sup>),

ν= tarama hızı,

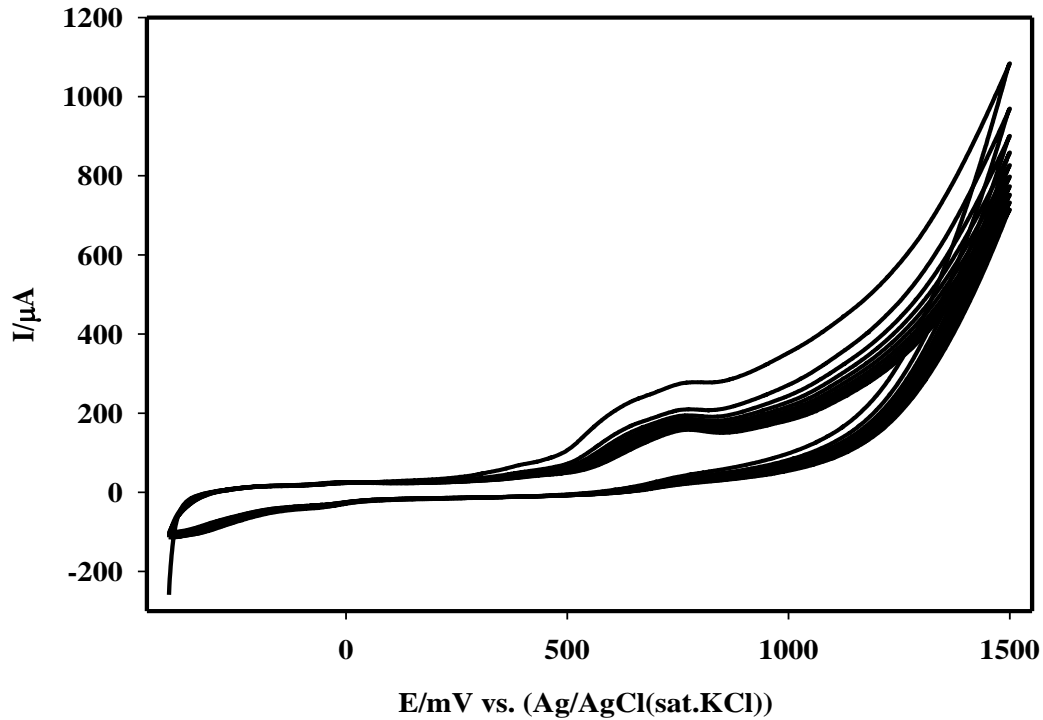
C<sub>0</sub>\*= K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> konsantrasyonu ifade etmektedir.

Randles-Sevcik denkleminde göre, yalnız GCE ve MWCNT/GCE'nin yüzey alanları sırasıyla 0,0352 ve 0,1741 cm<sup>2</sup> olarak hesaplanmıştır. Sonuçlar yalnız GCE'nin elektro-aktif alanının, MWCNT modifikasyonu ile yaklaşık 5 kat arttığını göstermiştir.

#### 4.2.7. MWCNT/GCE Üzerine İlave Modifikasyonların Etkisi

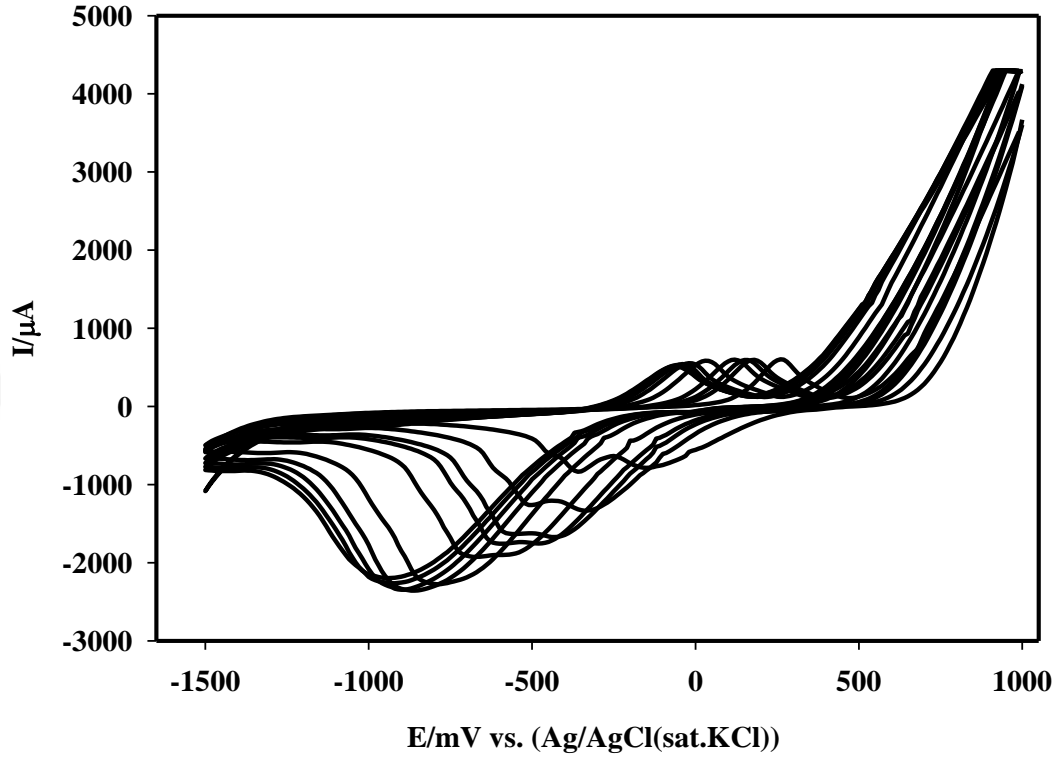
Metal nanoparçacık ve iletken ince film polimer modifikasyonlarının katalitik etkiyi artırarak GCE duyarlılığını arttırdığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu amaçla, önerilen yüzeyin üzerine ince film iletken polimer (poli-EBT) ve metal nanoparçacık (Au ve PtNPs) gibi bazı modifikasyonların kurkuminin anodik pik akımına etkisi araştırılmıştır. Araştırmaya ait görseller (Şekil 4.16. ve 4.17. ve 4.18.'de verilmiştir.)

Eriokrom siyahı T (EBT) monomerleri maddenin NaOH içerisinde hazırlanmış 5 mM çözeltisi kullanılarak MWCNT/GCE yüzeyine 100 mV s<sup>-1</sup> tarama hızı ile -0.4 V ile 1.5 V [92] potansiyel aralığında 10 döngü olarak elektrokimyasal yöntemle polimerleştirilmiştir.



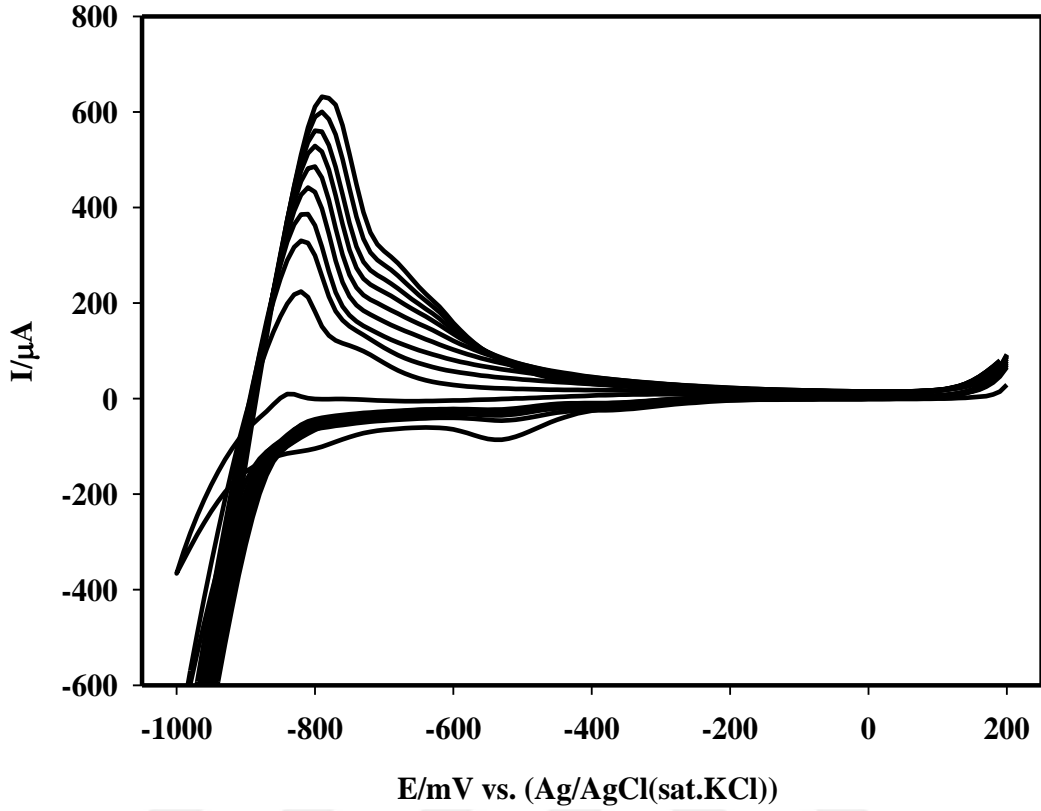
Şekil 4.16. MWCNT/GCE yüzeyine EBT monomerlerinin elektropolimerizasyonu

Au nanoparçacıkların CV ile MWCNT/GCE yüzeyinde oluşumu 1.0 V ile -1.5 V potansiyel aralığında 10 döngü olarak  $100 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızında  $1 \times 10^{-3} \text{ M HAuCl}_4$  çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [93].



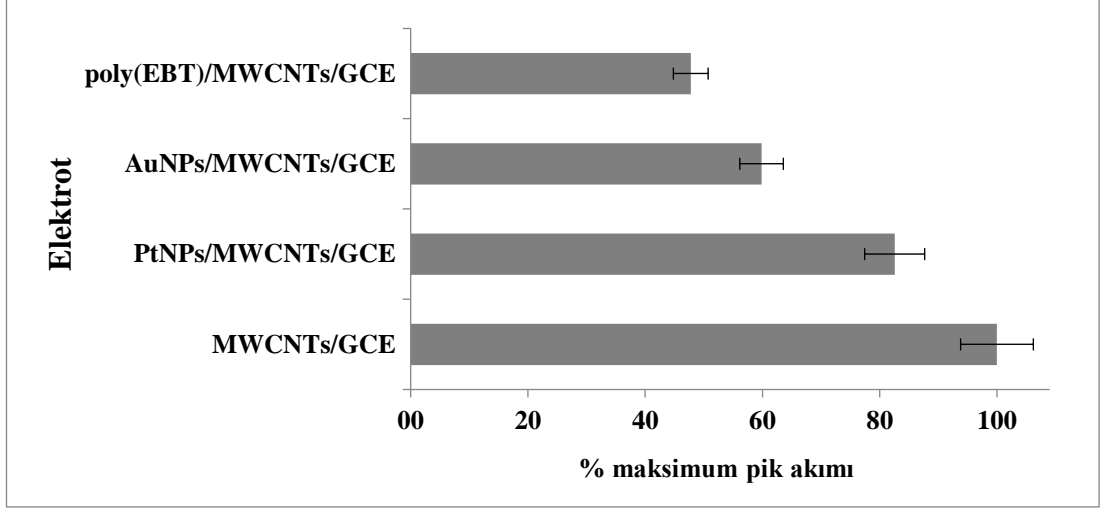
Şekil 4.17. Au nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyine kaplanması

Pt nanoparçacıkların CV ile MWCNT/GCE yüzeyinde oluşumu 0.2 V ile -1.0 V potansiyel aralığında 10 döngü olarak  $100 \text{ mV s}^{-1}$  tarama hızında  $1 \times 10^{-3} \text{ M H}_2\text{PtCl}_6$  M çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilmiştir [93].



Şekil 4.18. Pt nanoparçacıkların MWCNT/GCE yüzeyine kaplanması

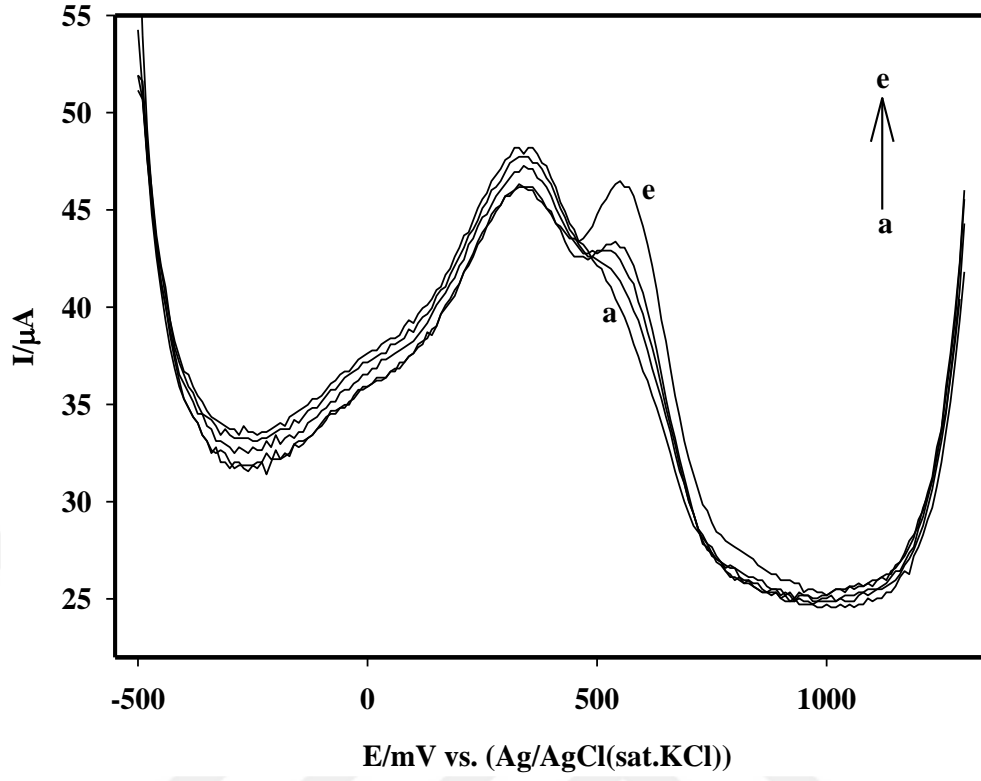
Şekil 4.19.'da MWCNT/GCE, poli(EBT)/MWCNT/GCE, AuNPs/MWCNT/GCE ve PtNPs/MWCNT/GCE üzerindeki kurkuminin anodik yanıtını gösteren bir çubuk grafiği verilmiştir. 14  $\mu\text{M}$  kurkumin için en yüksek anodik sinyal MWCNT/GCE'de elde edilmiştir. Elde edilen sonuç, iletken polimer ve metal nanoparçacıklarının, kurkumin ve MWCNT arasındaki adsorpsiyon etkileşimini azalttığını göstermiştir.



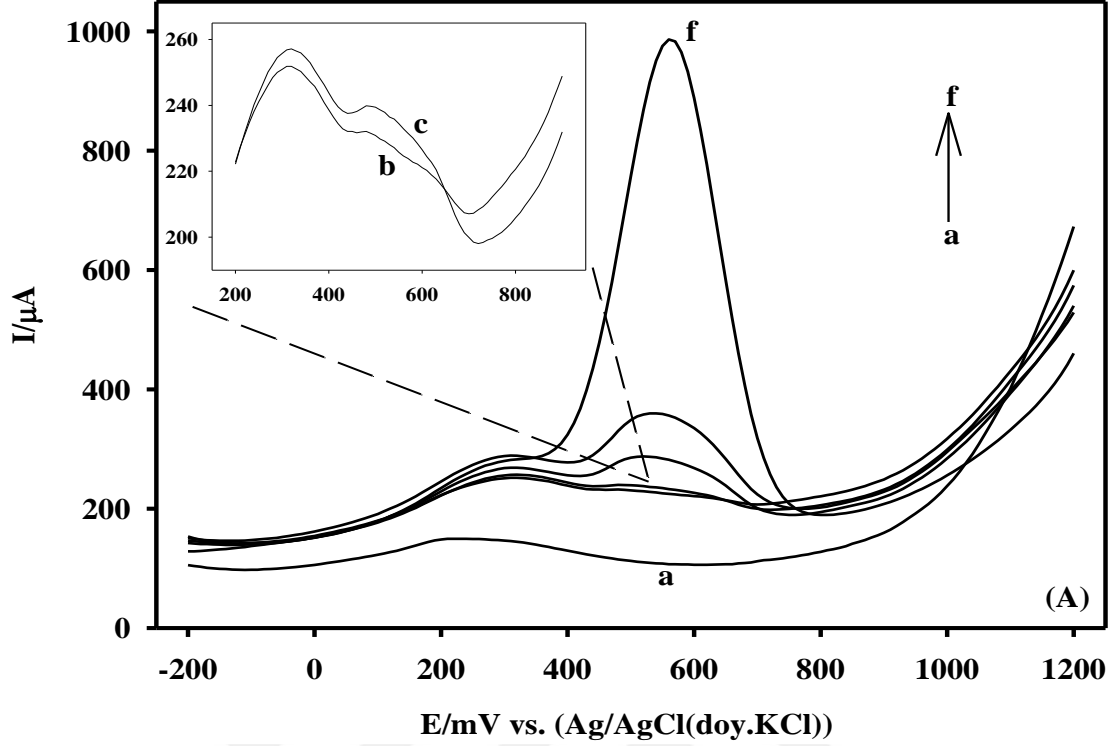
**Şekil 4.19.** Farklı elektrot yüzeylerinde 14 µM kurkuminin anodik pik akımlarının maksimum pik akımına göre yüzdeleri. Tarama hızı: 100 mV s<sup>-1</sup>.

#### 4.2.8. Kurkumin Tayini İçin Doğrusallık ve Duyarlık Çalışmaları

Kurkuminin yalnız GCE ve önerilen MWCNT/GCE üzerindeki doğrusallık çalışmaları için SWV tekniği kullanılmıştır. Bu amaçla 5 farklı konsantrasyon değerleri belirlenmiş, yalnız GCE için  $3,0 \times 10^{-6}$  ile  $2,0 \times 10^{-5}$  M; MWCNT/GCE için ise  $1,0 \times 10^{-8}$  ile  $5,0 \times 10^{-6}$  M konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Anodik pikler, yalnız GCE için Şekil 4.20.'de ve MWCNT/GCE için Şekil 4.21.'de sırasıyla gösterilmiştir. Diğer taraftan elde edilen kalibrasyon grafikleri yalnız GCE ve MWCNT/GCE için sırasıyla Şekil 4.22.'de ve Şekil 4.23.'de verilmiştir.



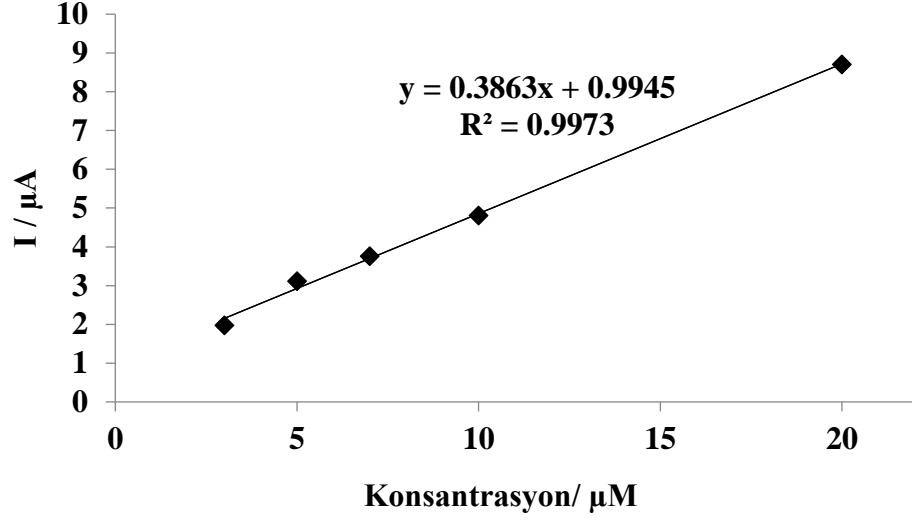
**Şekil 4.20.** Farklı konsantrasyonlardaki kurkuminin 0.1 M HCl içerisinde yalnız GCE üzerinde elde edilen kare dalga voltammogramları; (a - e): 3.000, 5.000, 7.000, 10.000 ve 20.000  $\mu\text{M}$ . Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .



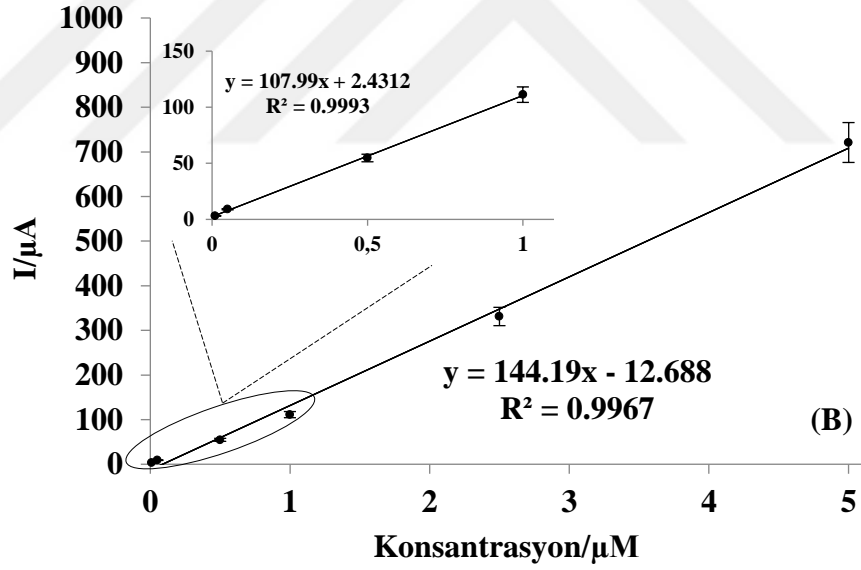
**Şekil 4.21.** Farklı konsantrasyonlardaki kurkuminin 0.1 M HCl içerisinde 10 dakika boyunca karıştırılarak MWCNT/GCE üzerinde elde edilen kare dalga voltammogramları (a - f): 0, 0.010, 0.050, 0.500, 1.000 ve 5.000  $\mu\text{M}$ . Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

Yalnız GCE ve MWCNT/GCE’de elde edilen kalibrasyon grafikleri doğrusaldır ve sırasıyla 0.9973 ve 0.9967’lik yüksek korelasyon katsayılarına sahiptir (Şekil 4.22. ve 4.23.).





Şekil 4.22. Kurkuminin yalnız GCE üzerinde elde edilen kalibrasyon grafiği



Şekil 4.23. Kurkuminin MWCNT/GCE üzerinde elde edilen kalibrasyon grafiği

Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerinden kurkumin için yalnız GCE ve MWCNT/GCE'nin duyarlılıkları belirlenmiştir.  $\text{LOD} = \frac{3 \text{SD}}{b}$  ve  $\text{LOQ} = \frac{10 \text{SD}}{b}$  formülleri sırasıyla algılama limitini (LOD) ve miktar limitini (LOQ) hesaplamak için kullanılmıştır. Kurkumin için yalnız GCE de  $\text{LOD} = 0.764 \mu\text{M}$  ve  $\text{LOQ} = 2.546 \mu\text{M}$

olarak belirlenirken, MWCNT/GCE için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.005 ve 0.014  $\mu\text{M}$  olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre, önerilen yöntemin klasik yalın elektrotlu yöntemle göre yaklaşık 150 kat kadar duyarlı olduğunu (LOQ değerleri karşılaştırıldığında yaklaşık olarak 150 kat) göstermektedir.

Tablo 4.18.'de kurkumin tayini için daha önceden önerilen bazı yöntemler ve bu yöntemlerin duyarlık özellikleri birlikte verilmiştir. Yapılan çalışmalar kurkumin tayini için kullanılan bu yöntemin mevcut sıvı kromatografi-kütle spektrometrik teknikleri kadar hassas olduğunu göstermektedir.

**Tablo 4.18.** Kurkumin için daha önce önerilen analitik yöntemlerin karşılaştırılması

Metot	LR/ $\mu\text{M}$	LOD/ $\mu\text{M}$	Referans
UV-Visible	13.57-67.86	1.09	[94]
HPLC-DAD	20.36-47.51	9.50	[95]
HPLC-ECD	0.208-41.6	0.0416	[96]
LC-MS/MS	0.01-5.43	-	[97]
DPV (Çalışma elektrotu olarak poly-ACBK/GCE)	0.1-70	0.04	[98]
SWV (Çalışma elektrotu olarak CdO/IL/MCPE)	0.2-320.0	0.08	[99]
Ad-SV (Çalışma elektrotu olarak MWCNTs/BPPG)	2-100	0.45	[90]
SWV (Çalışma elektrotu olarak MWCNTs/GCE)	1.09-5.43	0.89	[100]
DPV (Çalışma elektrotu olarak ERGO/GCE)	0.2-60.0	0.1	[101]
Ad-SSWV (Çalışma elektrotu olarak MWCNTs/GCE)	0.010-5.000	0.005	Bu çalışma

UV ultraviyole, HPLC yüksek performanslı sıvı kromatografisi, DAD diyot dizi dedektörü, ECD elektrokimyasal dedektör, LC sıvı kromatografisi, MS kütle spektrometrisi, DPV diferansiyel puls voltammetrisi, ACBK asit krom mavisi k, GCE camısı karbon elektrot, SWV kare dalga voltammetrisi, IL iyonik sıvı, MCPE modifiye karbon pasta elektrodu, Ad-SV adsorptif sıyırma voltammetrisi, BPPG bazal düzlem pirolitik grafit, MWCNT çok duvarlı karbon nanotüpler, ERGO elektrokimyasal olarak indirgenmiş grafen oksit, Ad-SSWV adsorptif sıyırma kare dalga voltammetrisi.

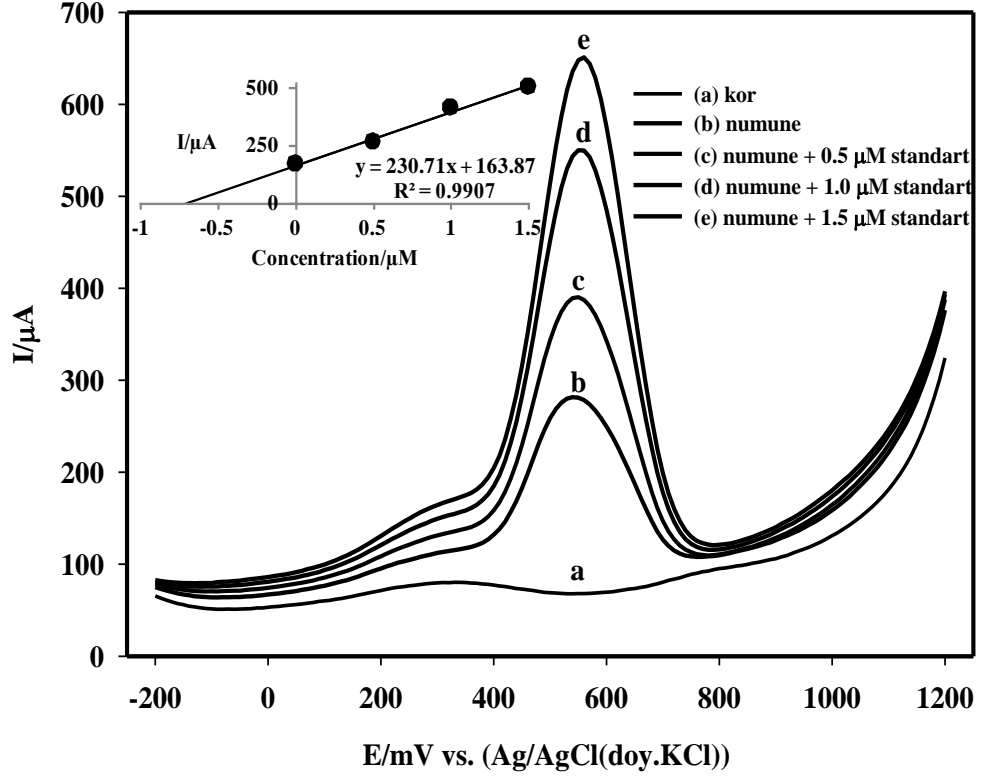
#### **4.2.9. Tekrarlanabilirlik**

Önerilen yöntemin tekrarlanabilirliğini belirlemek için 0.100 (düşük seviye), 0.500 (orta seviye) ve 2.500  $\mu$ M (yüksek seviye) üç farklı konsantrasyondaki (her bir konsantrasyonun üç tekrarı) yanıtlarının göreceli standart sapmaları (RSDs) incelenmiştir.

Göreceli standart sapmalarının düşük, orta ve yüksek seviye için sırasıyla %6.2, %5.4 ve %1.2'den daha düşük olduğu saptanmıştır. Sonuçlardan da görüldüğü gibi, önerilen yöntem kurkumin analizi için oldukça tekrarlanabilirdir.

#### **4.2.10. Gerçek Numune Analizi ve Ekstraksiyon Yönteminin Geri Kazanımı**

Ultrasonik destekli ekstraksiyon tekniğiyle elde edilen zerdeçal ekstraktındaki kurkuminin eşdeğerini belirlemek için önerilen algılama platformu kullanıldı. Ekstraktlara ait standart ekleme SWV'leri ve standart ekleme kalibrasyon grafiği, Şekil 4.24.'de verilmiştir.



**Şekil 4.24.** (a) kör, (b) numunenin SWVs ve (c) 0.500  $\mu\text{M}$ , (d) 1.000  $\mu\text{M}$  ve (e) 1.500  $\mu\text{M}$  CUR standardının eklenmesinden sonra. Standart ekleme kalibrasyonu eğrisi sol üst köşede verilmiştir. Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

Ekstraksiyon geri kazanım çalışmaları, zerdeçalın iki farklı kurkumin miktarında (düşük ve yüksek seviyede)  $5 \times 10^{-7} \text{ M}$  ve  $1,5 \times 10^{-6} \text{ M}$  konstrasyonlarında gerçekleştirildi. İlk olarak, zerdeçal numunesinin kurkumin eşdeğeri yukarıda açıklandığı gibi hesaplandı. Daha sonra, kurkumin standardı numunenin bir kısmına farklı miktarlarda doğru bir şekilde tartılarak ilave edildi. Sonuç olarak, iki farklı seviyede standart katılmış numuneler ultrasonik destekli ekstraksiyon prosedürü ile ekstrakte edildi ve ekstraksiyon işlemi sonucu geri kazanılan analit miktarını hesaplandı. Her iki durumda da kabul edilebilir geri kazanım değerleri elde edildi (Tablo 4.19.).

**Tablo 4.19.** Zerdeçal ekstraktında kurkuminin nicel tayin sonucu ve ultrasonic destekli ekstraksiyon yönteminin geri kazanım değerleri

İçerik (mg g <sup>-1</sup> )	Düşük konsantrasyon			Yüksek konsantrasyon		
	Eklenen (mg g <sup>-1</sup> )	Bulunan (mg g <sup>-1</sup> )	Geri kazanım (%)	Eklenen (mg g <sup>-1</sup> )	Bulunan (mg g <sup>-1</sup> )	Geri kazanım (%)
39.779±0.751	2.579	42.513±0.170	106.0±6.6	10.315	50.454±0.520	103.5±5.0

#### 4.2.11. Girişim Çalışmaları

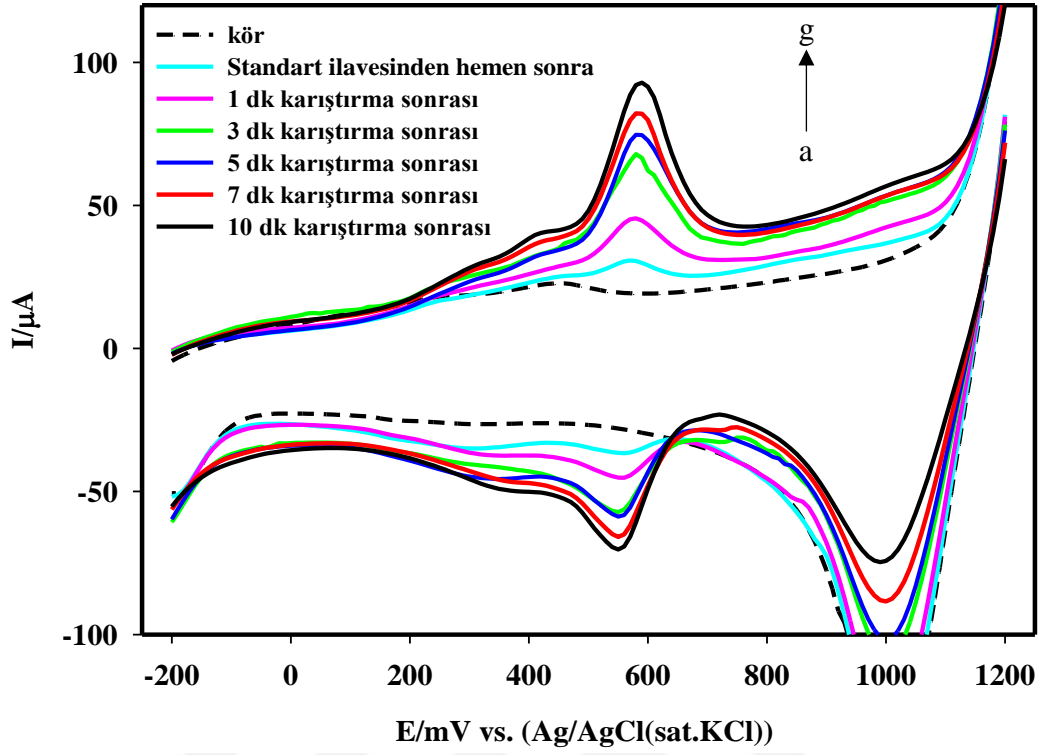
Kurkumin tayini sırasında, kurkuminden 100 kat daha konsantre olan Na<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>, Al<sup>3+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, ve glikozun önerilen modifiye elektrota karşı davranışları incelenmiştir. Bu çalışmada elektrolit çözelti ortamında 0.100 µM kurkumin konsantrasyonunda, ortama eklenen maddelerin herhangi bir girişimde bulunmadığı tespit edilmiştir.

#### 4.3. Diğer Kurkuminoidlerin Voltammetrik Çalışmaları

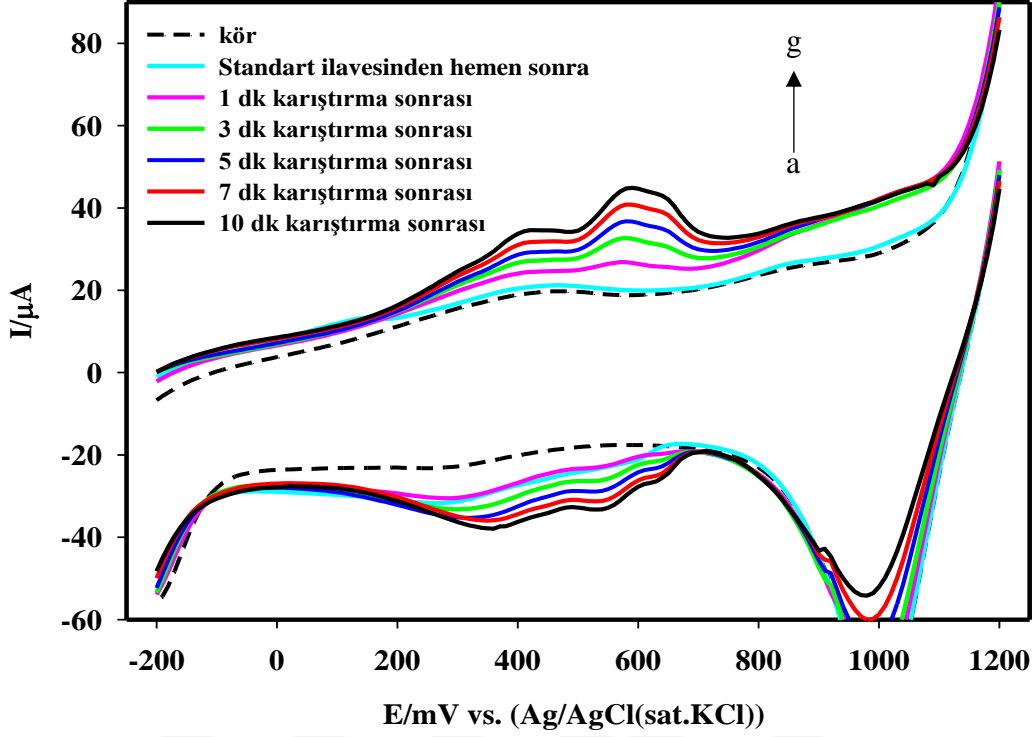
Çalışmanın üçüncü bölümünde kurkumin dışındaki diğer kurkuminoidlerin (demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin), kurkumin için valide edilen çalışma koşulları altında ve önerilen modifiye elektrot üzerinde voltammetrik davranışları incelenmiştir.

##### 4.3.1. DMC ve BDMC'nin MWCNT/GCE Üzerindeki Voltammetrik Davranışları

Kurkumin için optimize edilmiş koşullarda 15 µM DMC ve 16 µM BDMC için elde edilen döngüsel voltammogramlar sırasıyla Şekil 4.25. ve Şekil 4.26.'da verilmiştir. Sonuçlar diğer kurkuminoid türevlerinin de önerilen MWCNT/GCE elektrot üzerinde kurkumin gibi zamanla kendiliğinden adsorbe olarak biriktiğini göstermektedir. Ancak söz konusu adsorpsiyon, BDMC türevi için diğerlerine kıyasla kayda değer miktarda düşüktür.



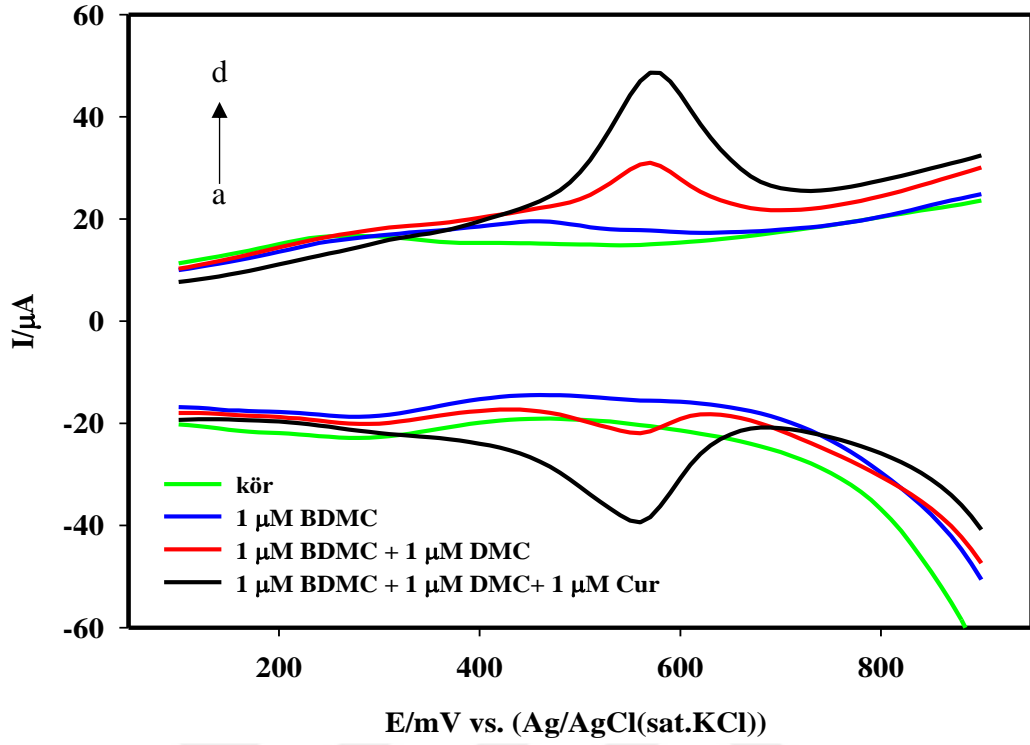
**Şekil 4.25.** 15  $\mu\text{M}$  DMC'nin 0.1 M HCl içerisinde MWCNT/GCE üzerinde zamana karşı elde edilen döngüsel voltammogramları (a) kör, (b) standart ilavesinden hemen sonra, (c) 1 dk. boyunca karıştırma sonrası, (d) 3 dk. boyunca karıştırma sonrası (e) 5 dk. boyunca karıştırma sonrası (f) 7 dk. boyunca karıştırma sonrası (g) 10 dk. boyunca karıştırma sonrası. Tarama hızı:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Şekil 4.26.** 16  $\mu\text{M}$  BDMC'nin 0.1 M HCl içerisinde MWCNT/GCE üzerinde zamana karşı elde edilen döngüsel voltammogramları (a) kör, (b) standart ilavesinden hemen sonra, (c) 1 dk. boyunca karıştırma sonrası, (d) 3 dk. boyunca karıştırma sonrası (e) 5 dk. boyunca karıştırma sonrası (f) 7 dk. boyunca karıştırma sonrası (g) 10 dk. boyunca karıştırma sonrası. Tarama hızı:  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .

#### 4.3.2. Kurkumin, DMC ve BDMC'nin MWCNT/GCE Üzerinde Yanyana Voltammetrik Davranışları

Optimize edilen koşullarda hücreye hücredeki derişimi  $1 \mu\text{M}$  olacak şekilde BDMC standardından eklenmiştir. Optimize edildiği gibi 10 dk adsorpsiyon süresinde karıştırma işlemi yapıp önerilen modifiye elektrot ile BDMC için döngüsel voltammogram alınmıştır. Ardından içerisinde BDMC bulunan hücrenin üzerine hücredeki derişimi  $1 \mu\text{M}$  olacak şekilde DMC standardından eklenmiştir. 10 dk süre ile karıştırma işlemi yapıp yeni bir döngüsel voltammogram alınmıştır. Son olarak hücreye hücredeki derişimi  $1 \mu\text{M}$  olacak şekilde kurkumin standardından eklenmiştir. Optimize edildiği gibi 10 dk adsorpsiyon süresinde karıştırma işlemi yapıp son bir döngüsel voltammogram daha alınmıştır (Şekil 4.27.).



**Şekil 4.27.** 0.1 M HCl içerisinde, 1  $\mu\text{M}$  (BDMC, DMC ve Cur'nin) 10 dk adsorpsiyon süreleri sonundaki CV'leri (a) MWCNTs/GCE' de kör, (b) MWCNT/GCE ile 1  $\mu\text{M}$  BDMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma (c), MWCNT/GCE ile 1  $\mu\text{M}$  BDMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma + 1  $\mu\text{M}$  DMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma (d) MWCNT/GCE ile 1  $\mu\text{M}$  BDMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma + 1  $\mu\text{M}$  DMC'nin 10 dk. boyunca karıştırma + 1  $\mu\text{M}$  Cur'in 10 dk. karıştırma. Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

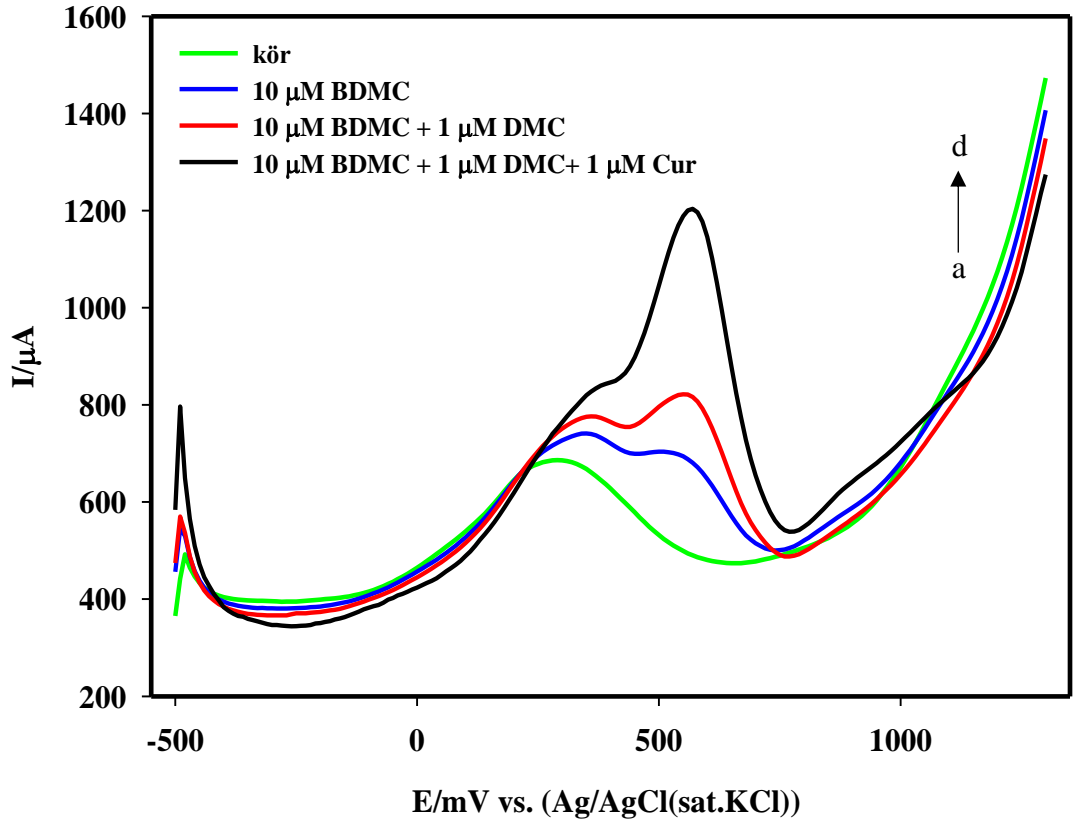
Yapılan çalışmalar üç türün (BDMC, DMC ve kurkumin) aynı potansiyelerde yükseltgenip indirgendiğini göstermiştir. Bu nedenle önerilen yöntem ile üç türün birbiri yanında tayin edilebilirliği mümkün değildir. Diğer taraftan, kurkumin ve türlerinin bir mikromolar derişimleri için elde edilen pik akımları Tablo 4.20.'de verilmiştir. Sonuçlar, kurkuminoid iskelet yapısında bulunan metoksi gruplarının sayısının azalması ile yükseltgenme pik akımının azaldığını göstermektedir.

**Tablo 4.20.** Kurkumin ve türlerinin pik akımları

Kurkuminoid (1 $\mu\text{M}$ )	I ( $\mu\text{A}$ )
BDMC	1.872
DMC	7.153
Cur	16.784



Benzer çalışma BDMC konsantrasyonunun diğer iki türe göre 10 kat artırılması yoluyla kare dalga voltametri yöntemi kullanılarak tekrarlanmıştır (Şekil 4.28.). Elde edilen yükseltgenme pikleri söz konusu türlerin birbiri yanında tayin edilemeyeceğini destekler niteliktedir. Bu nedenle önerilen analitik yöntem toplam kurkuminoidlerin kurkumin eşdeğeri cinsinden tayini için yararlıdır.

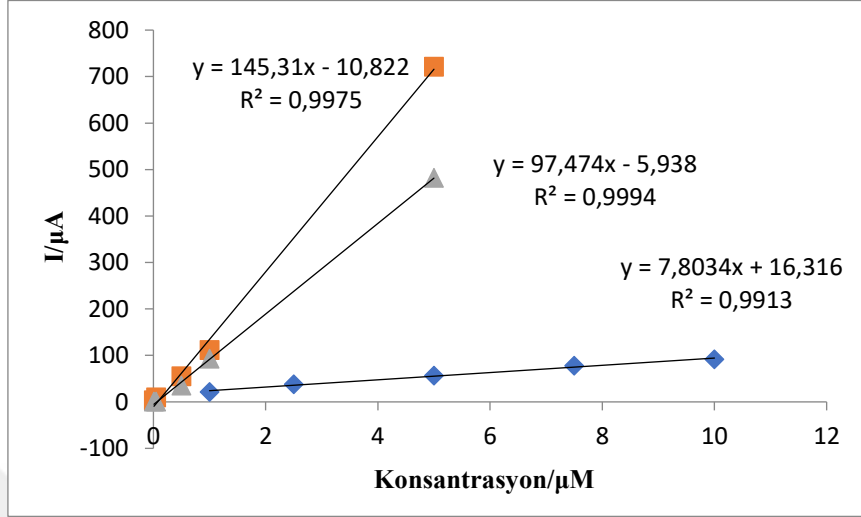


**Şekil 4.28.** Türlerin 0.1 M HCl içerisinde MWCNT/GCE kullanılarak elde edilen kare dalga voltammogramları (a) kör, (b) 10  $\mu\text{M}$  BDMC, (c) 10  $\mu\text{M}$  BDMC + 1  $\mu\text{M}$  DMC (d) 10  $\mu\text{M}$  BDMC + 1  $\mu\text{M}$  DMC + 1  $\mu\text{M}$  Cur. Tarama hızı: 100  $\text{mV s}^{-1}$ .

### 4.3.3. Kalibrasyon Grafikleri

Her bir türün doğrusallığını belirlemek amacıyla hücreye 3 mL 0,1 M HCl çözeltisinden eklenmiştir. Elektrolit çözelti yaklaşık 2 dk. azot gazından geçirildikten sonra hücredeki derişimleri  $1,0 \times 10^{-6}$  -  $1,0 \times 10^{-5}$  M arasında olacak şekilde BDMC standardından ve hücredeki derişimleri  $1,0 \times 10^{-8}$  -  $5,0 \times 10^{-6}$  M arasında olacak şekilde DMC ve kurkumin standartlarından her bir tür yeni bir hücreye olacak şekilde eklenmiştir. Optimize edildiği gibi her bir konsantrasyon ilavesinden sonra 10 dk

adsorpsiyon süresinde karıştırma işlemi yapıp elde edilen kalibrasyon grafikleri Şekil 4.29.'da birlikte verilmiştir.



Şekil 4.29. Kurkuminoidlerin önerilen yöntem ile elde edilen kalibrasyon eğrileri BDMC (◆), DMC (▲), CUR (■).

Üç türe ait kalibrasyon grafiğinden de anlaşıldığı gibi önerilen MWCNT/GCE'nin duyarlılığı iskelet yapıdaki metoksi gruplarının sayısı ile orantılı olarak, kurkumin, DMC ve BDMC sırasıyla azalmaktadır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Zerdeçal (*Curcuma Longa*), zencefil ailesinin bir üyesidir. Geçmiş çok uzun tarihlere dayanmaktadır. Asya tıbbında tedavi edici, yiyeceklerde ise gıda maddesi olarak kullanılan bir baharat çeşididir. Aynı zamanda, tabletler ve kapsüllerdeki bir besin takviyesi, merhemler ve enerji içeceklerinin yanı sıra sabunlar ve kozmetikler gibi çeşitli sektörlerde pazarlanmaktadır.

*Curcuma longa* bitkisinin rizomlarından ekstrakte edilmiş olan kurkumin, kimyasal olarak karakterize edilen zerdeçalın aktif fenolik bileşenlerinden birisidir. 1900'lerin ortalarında, kurkuminin biyolojik olarak aktif bir bileşen ve antibakteriyel özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Daha sonra zerdeçalın kromatografi yoluyla analizi ile kurkuminin yanı sıra kurkuminoid denilen diğer bileşenlerin varlığını da tespit etmiştir. Zerdeçalın bu kadar geniş kullanım alanına sahip olması ve son yıllarda alternatif tıpta sıkça tercih edilmesi antioksidan bakımından oldukça zengin olan *Curcuma Longa L.* rizomlarının önemini arttırmıştır.

Bu bilgiler ışığında, bu tez projesinde taze olarak satın alınan zerdeçal numunesinin toplam fenolik madde miktarı, toplam antioksidan kapasitesi ve radikal süpürme kapasitesi sırasıyla Folin-Ciocalteu, CUPRAC ve DPPH yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. Bununla birlikte zerdeçalın aktif maddesi olan kurkuminin voltammetrik nicel tayini için MWCNT ile modifiye edilmiş GCE çalışma elektrodu olarak kullanılmış ve önerilen elektrokimyasal yöntemin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kurkumin dışındaki diğer kurkuminoidlerin önerilen elektrot üzerindeki voltammetrik davranışları incelenmiştir.

Çalışmanın ilk bölümünde zerdeçal rizomlarında bulunan toplam fenolik madde miktarı Folin-Ciocalteu, toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC ve radikal giderme kapasitesi DPPH yöntemleri ile spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bu amaçla numunelere metanol-su kullanılarak gerçekleştirilen ultrasonik destekli ekstraksiyon ve ultra saf su kullanılarak gerçekleştirilen infüzyon yöntemleri eş zamanlı olarak uygulanmıştır. Sonuçlara göre metanol-su ekstraktlarında infüzyon örneklerine göre toplam fenolik madde miktarı, toplam antioksidan kapasitesi ve radikal giderme kapasitesi daha yüksek bulunmuştur.

Zerdeçal rizomlarındaki metanol-su ekstraktlarında bulunan toplam fenolik madde miktarı (metanol-su ekstraksiyonu için  $33,58 \pm 0,91$ , infüzyon ekstraksiyonu için  $18,28 \pm 0,02$  mg GAE/g örnek) yaklaşık 1,8 kat yüksek çıkarken toplam antioksidan kapasitesi (metanol-su ekstraksiyonu için  $84,30 \pm 0,80$ , infüzyon ekstraksiyonu için  $53,39 \pm 3,84$  mg troloks eşdeğeri/g örnek) yaklaşık 1,6 kat yüksek bulunmuştur. Radikal giderme kapasitesi (metanol-su ekstraksiyonu için  $55,40 \pm 2,01$ , infüzyon ekstraksiyonu için  $10,95 \pm 0,16$  mg troloks eşdeğeri/g örnek), alınan ekstrakt hacmi dikkate alınarak her iki ekstraksiyon için % inhibisyon infüzyon ekstraktlarında  $10,97/4 = 2,74$  olarak ifade edilebilir. Dolayısıyla metanol-su ekstraktlarının inhibisyonu infüzyon ekstraktlarına göre  $14,64/2,74 = 5,34$  kat fazla bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci bölümünde zerdeçal rizomlarındaki kurkumin miktarının voltammetrik analizi amaçlanmıştır. Bu amaçla çalışma elektrotu olarak MWCNT ile modifiye edilmiş yalın elektrot kullanılmıştır. Kullanılan yöntem, MWCNT/GCE yüzeyine kendiliğinden biriken kurkuminin adsorptif sıyırma kare dalga voltammetrik tayini ilkesine dayanmaktadır.

Destek elektrolit çözeltileri kullanılarak elde edilen yükseltgenme pik akımlarının maksimum pik akımına göre yüzdeleri belirlenerek en iyi zemin sinyalinin asidik ortamda (0.1 M HCl) sağlandığı gözlemlenmiştir. Ayrıca elektrolit çözeltisinin karıştırılmasının, kurkuminin MWCNT/GCE'de elde edilen anodik pik akımında önemli bir artış sağladığı ve maksimum pik akımına ulaşma süresini kısalttığı belirlenmiştir. Optimum karıştırma süresinin 10 dakika olduğu tespit edilmiştir.

Yalın GCE ve MWCNT/GCE'de optimize edilmiş koşullarda  $14 \mu\text{M}$  kurkuminin CV'leri karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Yalın GCE ile karşılaştırıldığında, kurkumin MWCNT/GCE'deki anodik ve katodik pik akımları, kurkuminin önerilen yüzeye kendiliğinden adsorpsiyonu nedeniyle önemli ölçüde artmıştır. Kurkuminin bu adsorpsiyon özelliği, önerilen elektrokimyasal yöntemin oldukça hassas bir kurkumin sensörü olarak kullanılmasını sağlamıştır.

Önerilen elektrot üzerinde kurkuminin anodik pik akımlarının,  $5-500 \text{ mV s}^{-1}$  arasındaki tarama hızlarıyla doğru orantılı olduğunu göstermiştir. Bu durum, MWCNT/GCE üzerindeki indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonlarının adsorpsiyon kontrollü prosesler olduğunu kanıtlar niteliktedir.

Diğer taraftan, CV yöntemi kullanılarak elektrotların elektroaktif yüzey alanları Randles-Sevcik Eşitliği ile hesaplanmıştır. Bu eşitliğe göre yalın GCE ve MWCNTs/GCE'nin yüzey alanları sırasıyla 0.0352 ve 0.1741 cm<sup>2</sup> olarak bulunmuştur. Sonuçlar, yalın GCE'nin elektro-aktif alanının, MWCNT modifikasyonu ile yaklaşık 5 kat arttığını göstermiştir.

Metal nanoparçacık ve iletken ince film polimer modifikasyonlarının katalitik etkiyi artırarak GCE duyarlılığını arttırdığını gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu amaçla, önerilen yüzeyin üzerine ince film iletken polimer (poli-EBT) ve metal nanoparçacık (Au ve PtNPs) gibi bazı modifikasyonlar, kurkuminin anodik pik akımına etkisini araştırmak için uygulanmıştır. Elde edilen sonuç, iletken polimer ve metal nanoparçacıklarının, kurkumin ve MWCNT arasındaki adsorpsiyon etkileşimini azalttığını göstermiştir.

Doğrusallık parametresinde çalışma aralığının belirlenebilmesi adına birçok konsantrasyonda çalışma yapılmış olup yalın GCE için 3,0x10<sup>-6</sup> ile 2,0x10<sup>-5</sup> M; MWCNT/GCE için 1,0x10<sup>-8</sup> ile 5,0x10<sup>-6</sup> M konsantrasyon aralığında çalışılmıştır. Yalın GCE ve MWCNT/GCE'de elde edilen kalibrasyon grafikleri doğrusaldır ve sırasıyla 0.9973 ve 0.9967'lik yüksek korelasyon katsayılarına sahiptir. Ayrıca elde edilen kalibrasyon grafiklerinden kurkumin için yalın GCE ve MWCNT/GCE'nin duyarlıkları belirlenmiştir. Kurkumin için yalın GCE de LOD=0.764 µM ve LOQ=2.546 µM olarak belirlenirken, MWCNT/GCE için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.005 ve 0.014 µM olarak belirlenmiştir. Sonuçlara göre, önerilen yöntemin klasik yalın elektrotlu yöntemle göre yaklaşık 180 kat kadar duyarlı olduğunu göstermektedir.

Ultrasonik destekli ekstraksiyonun geri kazanım çalışmaları, zerdeçalın iki farklı kurkumin miktarında (düşük ve yüksek seviyede) 5x10<sup>-7</sup> M ve 1,5x10<sup>-6</sup> M konsantrasyonlarında gerçekleştirilmiştir. İki farklı konsantrasyon seviyesindeki numuneler ultrasonik destekli ekstraksiyon prosedürü ile ekstrakte edilmiş ve ekstraksiyon işlemi sonucu geri kazanılan analit miktarını hesaplanmıştır. Her iki durumda da kabul edilebilir geri kazanım değerleri elde edilmiştir.

Sonuç olarak önerilen yöntemin kurkumin eşdeğeri analizi için kolay, hassas ve tekrarlanabilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Yöntemin uygulanabilirliği, zerdeçal tozunun ultrasonik destekli ekstraksiyonu ile elde edilen zerdeçal ekstraktı

üzerinde denenmiştir. Yapılan çalışmalar kurkumin tayini için kullanılan bu yöntemin mevcut sıvı kromatografi-kütle spektrometrik teknikleri kadar hassas olduğunu göstermiştir.

Çalışmanın üçüncü bölümünde ise kurkumin dışındaki diğer kurkuminoidlerin (demetoksikurkumin ve bisdemetoksikurkumin), kurkumin için valide edilen çalışma koşulları altında ve önerilen modifiye elektrot üzerinde voltammetrik davranışları incelenmiştir. Sonuçlar diğer kurkuminoid türevlerinin de önerilen MWCNT/GCE elektrot üzerinde kurkumin gibi zamanla kendiliğinden adsorbe olarak biriktiğini göstermektedir. Ancak söz konusu adsorpsiyon, özellikle BDMC türevi için diğerlerine kıyasla kayda değer miktarda düşüktür.

Optimize edilen koşullarda kurkumin, DMC ve BDMC'nin modifiye elektrot üzerinde yanyana voltammetrik davranışları incelenmiş ancak yapılan çalışmalar söz konusu üç türün aynı potansiyellerde yükseltgenip indirgenmediğini göstermiştir. Bu nedenle önerilen yöntem ile üç türün birbiri yanında tayin edilebilirliği mümkün değildir.

Her bir türün doğrusallığını belirlemek amacıyla optimizasyon şartlarında kalibrasyon çalışması yapılmıştır. Üç türe ait kalibrasyon grafiğinden elde edilen sonuçlara göre MWCNT/GCE'nin duyarlılığı iskelet yapıdaki metoksi gruplarının sayısı ile orantılı olarak, (Kurkumin, DMC ve BDMC sırasıyla) azaldığını göstermektedir.

Sonuçta önerilen voltammetrik tekniğin ultrasonik destekli ekstraksiyon yöntemi ile kombine edilmesi ile birlikte zerdeçal rizomlarında bulunan kurkuminoid eşdeğerinin belirlenmesi için basit ve etkin bir yöntem olduğu gösterilmiştir. Önerilen voltammetrik yöntem, zerdeçal rizomlarında bulunan kurkuminoidlerin kurkumin eşdeğeri cinsinden belirlenmesi için oldukça faydalıdır.

## KAYNAKLAR

1. Qazi, M.A., Molvi, K.I. Free Radicals and their Management. American Journal of Pharmacy&Health Research. 2018, 6, 4, ISSN: 2321-3647.
2. Kunwar A., Priyadarsini, K.I. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. Journal of Medical & Allied Sciences. 2011, 1, 2, 53-60.
3. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews. 2010, 4, 8, 118-127.
4. Kumar, S. Free Radicals and Antioxidants: Human and Food System. Advances in Applied Science Research. 2011, 2, 1, 129-135.
5. Devasagayam T.P.A., Tilak J.C., Bloor K.K., Sane K.S., Ghaskadbi S.S., Lele, R.D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. The Journal of the Association of Physicians of India. 2004, 52, 794-804.
6. Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F.M., Torti, S.V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. Cellular and Molecular Life Sciences. 2008 65(11):1631-1652.
7. Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L., Sakariah, K.K. Chemistry and biological activities of *C. Longa*. Trends in Food Science & Technology. 2005, 16, 533-548.
8. Gibson-Moore, H., Spiro, A. Can turmeric really prevent cancer? Nutrition Bulletin. 2017, 42, 141-147.
9. Allegra, A., Innao, V., Russo, S., Gerace, D., Alonci, A., Musolino, C. Anticancer Activity of Curcumin and Its Analogues: Preclinical and Clinical Studies. Cancer Investigation. 2017, 35, 1, 1-22.
10. Jurenka, J.S. Anti-inflammatory Properties of Kurkumin, a Major Constituent of *Curcuma longa*: A Review of Preclinical and Clinical Research. Alternative Medicine Review. 2009, 14(2), 141-153.
11. Delgado-Vargas, F., Paredes-López, O. Natural Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRC Press LLC. Boca Raton, Florida, 2003, 327 s.
12. FAO, Curcumin. Chemical and Technical Assessment (CTA) First draft prepared by Ivan Stankovic. 2004, 1-8.

13. Kocaadam, B., Şanlıer, N. Curcumin, an active component of turmeric (*Curcuma longa*), and its effects on health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2017, 57:13, 2889-2895.
14. Sharma, R.A., Gescher, A.J., Steward, W.P. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*. 2005, 41, 1955-1968.
15. Tayyem, R.F., Heath, D.D., Al-Delaimy, W.K., Rock, C.L. Curcumin Content of Turmeric And Curry Powders. *Nutrition And Cancer*. 2006, 55(2), 126-131.
16. Pari, L., Tewas, D., Eckel, J. Role of curcumin in health and disease. *Archives of Physiology & Biochemistry*. 2008, 114, 127-149.
17. Kunnumakkara, A.B., Anand, P., Aggarwal, B.B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Letters*. 2008, 269, 199-225.
18. Jovičić, D., Jozinović, A., Grčević, M., Emilija, Aleksovska, S., Šubarić, D. Nutritional And Health Benefits Of Curcumin. *Food in Health and Disease, scientific-professional journal of nutrition and dietetics*. 2017, 6 (1), 22-27.
19. Jayaprakasha, G.K., Jaganmohan Rao, L., Sakariah, K.K. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry*. 2006, 98, 720-724.
20. Her, C., Venier-Julienne M.C., Roger, E. Improvement of Curcumin Bioavailability for Medical Applications, *Med Aromat Plants (Los Angeles)* 2018, 7:6, 1-15.
21. Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., Srimal, R.C. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sciences*. 2006, 78, 2081-2087.
22. Barchitta, M., Maugeri, A., Favara, G., San Lio, R.M., Evola, G., Agodi, A., Basile, G. Nutrition and Wound Healing: An Overview Focusing on the Beneficial Effects of Curcumin. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20, 1119, 1-14.
23. Bhawana, R.K., Basniwal, H.S., Buttar, V.K., Jain, N. Curcumin Nanoparticles: Preparation, Characterization, and Antimicrobial Study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011, 59, 2056-2061.
24. Aggarwal, B.B., Harikumar, K.B. Potential therapeutic effects of curcumin, the anti-inflammatory agent, against neurodegenerative, cardiovascular,



- pulmonary, metabolic, autoimmune and neoplastic diseases. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 2009, 41(1):40-59.
25. Anand, P., Sundaram, C., Jhurani, S., Kunnumakkara, A.B., Aggarwal, B.B. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Letters*. 2008, 267, 133-164.
  26. Srinivasan, K. Role of Spices Beyond Food Flavoring: Nutraceuticals with Multiple Health Effects. *Food Reviews International*. 2005, 21, 167-188.
  27. Ahuja, K.D.K., Kunde, D.A., Ball, M.J., Geraghty, D.P. Effects of Capsaicin, Dihydrocapsaicin, and Curcumin on Copper-Induced Oxidation of Human Serum Lipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006, 54, 6436-6439.
  28. Ak, T. Kurkuminin Antioksidan ve Antiradikal Özelliklerinin İncelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum, 2006, 98 s. (Yüksek Lisans Tezi).
  29. Slavova-Kazakova, A.K., Angelova, S. E., Veprintsev, T.L., Denev, P., Fabbri, D., Dettori, M.A., Kratchanova, M., Naumov, V.V., Trofimov, A.V., Vasil'ev, R.F., Delogu, G., Kancheva, V.D. Antioxidant potential of Curcumin-related compounds studied by chemiluminescence kinetics, chain-breaking efficiencies, scavenging activity (ORAC) and DFT calculations. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. 2015, 11, 1398-1411.
  30. Dandekar, D. V., Gaikar, V.G. Microwave assisted extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*. *Separation Science & Technology*. 2002, 37, 2669-2690.
  31. Mandal, V., Mohan, Y., Hemalatha, S. Microwave assisted extraction of curcumin by sample-solvent dual heating mechanism using Taguchi L9 orthogonal design. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008, 46, 322-327.
  32. Wakte, P.S., Sachin, B.S., Patil, A.A., Mohato, D.M., Band, T.H., Shinde, D.B. Optimization of microwave, ultra-sonic and supercritical carbon dioxide assisted extraction techniques for curcumin from *Curcuma longa*. *Separation and Purification Technology*. 2011, 79, 50-55.
  33. Hadi, B., Sanagi, M.M., Wan Ibrahim, W.A., Jamil, S., Abdullahi Mu'azu, M., Aboul-Enein, H.Y. Ultrasonic-Assisted Extraction of Curcumin Complexed with Methyl- $\beta$ -Cyclodextrin. *Food Analytical Methods*. 2015, 8, 1373-1381.

34. Sun, X., Gao, C., Cao, W., Yang, X., Wang, E. Capillary electrophoresis with amperometric detection of curcumin in Chinese herbal medicine pretreated by solid-phase extraction. *Journal of chromatography. A.* 2002, 962, 117-125.
35. Paulucci, V.P., Couto, R.O., Teixeira, C.C.C., Freitas, L.A.P. Optimization of the extraction of curcumin from *Curcuma longa* rhizomes. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2013, 23, 94-100.
36. Kulkarni, S.J., Maske, K., Budre, M.P., Mahajan, R.P. Extraction and purification of curcuminoids from Turmeric (*curcuma longa* L.). *International Journal of Pharmacology and Pharmaceutical Technology.* 2017, 1, 81-84.
37. Sanagi, M.M., Ahmad, U.K., Smith, R.M. Application of Supercritical Fluid Extraction and Chromatography to the Analysis of Turmeric. *J Journal of Chromatographic Science.* 1993, 31, 20-25.
38. Sahne, F., Mohammadi, M., Najafpour, G.D., Moghadamnia, A.A. Enzyme-assisted ionic liquid extraction of bioactive compound from turmeric (*Curcuma longa* L.): Isolation, purification and analysis of curcumin. *Industrial Crops & Products.* 2017, 95, 686-694.
39. Euterpio, M.A., Cavaliere, C., Capriotti, A.L., Crescenzi, C. Extending the applicability of pressurized hot water extraction to compounds exhibiting limited water solubility by pH control: curcumin from the turmeric rhizome. *Analytical and Bioanalytical Chemistry.* 2011, 401, 2977-2985.
40. Hazra, K., Kumar, R., Kumar Sarkar, B., Chowdary, Y.A., Devgan, M., Ramaiah, M., Educational, R.P. Uv-Visible Spectrophotometric Estimation Of Curcumin In Nano-Formulation. *International Journal of Pharmacognosy.* 2015, 2, 127-130.
41. Da Silva-Buzanello, R.A., Ferro, A.C., Bona, E., Cardozo-Filho, L., De Araújo, P.H.H., Leimann, F.V., Gonçalves, O.H. Validation of an Ultraviolet-visible (UV-Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(l-lactic acid) nanoparticles. *Food Chemistry.* 2015, 172, 99-104.
42. Wang, F., Wu, X., Wang, F., Liu, S., Jia, Z., Yang, J. The Sensitive Fluorimetric Method for the Determination of Curcumin Using the Enhancement of Mixed Micelle. *Journal of fluorescence.* 2006, 16, 53-59.
43. Ma, Z., Shayeganpour, A., Brocks, D.R., Lavasanifar, A., Samuel, J. High-performance liquid chromatography analysis of curcumin in rat plasma:

- application to pharmacokinetics of polymeric micellar formulation of kurkumin. *Biomedical Chromatography*. 2007, 21, 546-552.
44. Kim, Y.,J., Lee, H.J., Shin, Y. Optimization and Validation of High-Performance Liquid Chromatography Method for Individual Curcuminoids in Turmeric by Heat-Refluxed Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2013, 61, 10911-10918.
  45. Wichitnithad, W., Jongaroonngamsang, N., Pummangura, S., Rojsitthisak, P. A simple isocratic HPLC method for the simultaneous determination of curcuminoids in commercial turmeric extracts. *Phytochemical analysis*. 2009, 20, 314-319.
  46. Long, Y., Zhang, W., Wang, F., Chen, Z. Simultaneous determination of three curcuminoids in *Curcuma longa* L. by high performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014, 4, 325-330.
  47. He, X.-G., Lin, L.-Z., Lian, L.-Z. Lindenmaier M. Liquid chromatography-electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*). *Journal of Chromatography A*. 1998, 818, 127-132.
  48. Liu, A., Lou, H., Zhao, L., Fan, P. Validated LC/MS/MS assay for curcumin and tetrahydrokurkumin in rat plasma and application to pharmacokinetic study of phospholipid complex of curcumin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 40, 720-727.
  49. Yang, K.-Y., Lin, L.-C., Tseng, T.-Y., Wang, S.-C., Tsai, T.-H. Oral bioavailability of curcumin in rat and the herbal analysis from *Curcuma longa* by LC–MS/MS. *Journal of chromatography. B*. 2007, 853, 183-189.
  50. Ma, W., Wang, J., Guo, Q., Tu, P. Simultaneous determination of doxorubicin and curcumin in rat plasma by LC–MS/MS and its application to pharmacokinetic study. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015, 111, 215-221.
  51. Peng, J., Nong, K., Cen, L. Electropolymerization of Acid Chrome Blue K on Glassy Carbon Electrode for the Determination of Curcumin. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2012, 59, 1415-1420.

52. Li, K., Li, Y., Yang, L., Wang, L., Ye, B. The electrochemical characterization of curcumin and its selective detection in Curcuma using a graphene-modified electrode. *Analytical Methods*. 2014, 6, 7801-7808.
53. Zhu, W., Huang, H., Gao, X., Ma, H. Electrochemical behavior and voltammetric determination of acetaminophen based on glassy carbon electrodes modified with poly(4-aminobenzoic acid)/electrochemically reduced graphene oxide composite films. *Materials Science and Engineering C*. 2014, 45, 21-28.
54. Cheraghi, S., Taher, M.A., Karimi-Maleh, H. Fabrication of Fast and Sensitive Nanostructure Voltammetric Sensor for Determination of Curcumin in the Presence of Vitamin B 9 in Food Samples. *Electroanalysis*. 2016, 28, 2590-2597.
55. Dey, N., Devasena, T., Sivalingam, T. A Comparative evaluation of Graphene oxide based materials for Electrochemical non-enzymatic sensing of Curcumin. *Materials Research Express*. 2018, 5, 2, 5406.
56. Shereema, R.M., Rao, T.P., Sameer Kumar, V.B., Sruthi, T.V., Vishnu, R., Prabhu, G.R.D., Sharath Shankar, S. Individual and simultaneous electrochemical determination of metanil yellow and curcumin on carbon quantum dots based glassy carbon electrode. *Materials Science and Engineering C*. 2018, 93, 21-27.
57. Zokhtareh, R., Rahimnejad, M. A Novel Sensitive Electrochemical Sensor Based on Nickel Chloride Solution Modified Glassy Carbon Electrode for Curcumin Determination. *Electroanalysis*. 2018, 30, 921-927.
58. Kabel, A. M. Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*. 2014, 2, 3, 35-38.
59. Rao P, S., Kalva, S., Yerramilli, A., Mamidi, S. Free Radicals and Tissue Damage: Role of Antioxidants. *Free Radicals and Antioxidants*. 2011, 1, 4, 2-7.
60. Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Mark T.D., Milan Mazura, C., Telser, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry&Cell Biology*. 2007, 39, 44-84.

61. Wu, J., Q., Kosten, T., R., Zhang, X., Y. Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 2013, 46, 200-206.
62. Phaniendra, A., Jestadi, D., B., Periyasamy, L. Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. 2015), 30(1):11-26.
63. Lavanya, V., Ganapathy, D., Visalakshi, R., M. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Ocimum basilicum* - An in vitro study. *Drug Invention*. 2019, 12, 5, 1004-1007.
64. Aydemir, B., Karadağ Sarı, E. Antioksidanlar ve Büyüme Faktörleri ile İlişkisi. *Kocatepe Veteriner Dergisi*. 2009, 2 (2): 56-60.
65. Pérez, J., A., M., Aguilar, T., A., F. Chemistry of Natural Antioxidants and Studies Performed with Different Plants Collected in Mexico. *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases-A Role for Antioxidants*. Chapter-3, 2013, 59-85, doi: 10.5772/52247.
66. Trofin, A., E., Trincă, L. C., Ungureanu, E., Ariton, A., M. Cuprac Voltammetric Determination of Antioxidant Capacity in Tea Samples by Using Screen-Printed Microelectrodes. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2019, 1-10, doi: 10.1155/2019/8012758.
67. Young, I., S., Woodside, J., V. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology*. 2001, 54 (3), 176-186.
68. Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J., P., Srivatva, S., Prabha, S., Antioxidants and its functions in human body - A Review. *Research in Environment and Life Sciences*. 2016, 9 (11): 1328-1331.
69. Pokorny, J. Are natural antioxidants better -and safer- than synthetic antioxidants? *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2007, 109, 629-642.
70. Sardarodiyani, M., Sani, A., M. Natural antioxidants: sources, extraction and application in food systems. *Nutrition & Food Science*. 2016, 46 (3): 363-373.
71. Percival, M. Antioxidants. *Clinical Nutrition Insights*. 1998, 10, 1-4.
72. Aksay, S., Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Various Extracts of Myrtle (*Myrtus communis* L.) Berries. *Çukurova Tarım ve Gıda Bilimleri Dergisi*. 2016, 31(2): 43-50.

73. Antioxidants, American Dietetic Association. 2010  
[https://www.womenfirst.net/pdf/ADA/ADA\\_Antioxidants.pdf](https://www.womenfirst.net/pdf/ADA/ADA_Antioxidants.pdf) (21.11.2019).
74. Pal, M., Misra, K., Dhillon, G., Verma, M., Brar, S., K. Antioxidants. Exploitation of Agro-Industrial Wastes to Produce Low-Cost Microbial Surfactants. 2004, 117-138.
75. Öğüt, S. Doğal Antioksidanların Önemi. Adnan Menderes Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi. 2014, 11(1): 25-30.
76. Yavaşer, R. Doğal Ve Sentetik Antioksidan Bileşiklerin Antioksidan Kapasitelerinin Karşılaştırılması. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, Aydın, 2011, 124 s. (Yüksek Lisans Tezi).
77. Özyürek M., Güçlü K., Tütem, E., Sözgen Başkan, K., Erçağ, E., et al. A comprehensive review of CUPRAC methodology. Analytical methods. 2011, 3 (11), 2439-2453.
78. Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, 53, 1841-1856.
79. Okan, O.T., Varlıbaş, H., Öz, M., Deniz, İ. Antioksidan Analiz Yöntemleri ve Doğu Karadeniz Bölgesinde Antioksidan Kaynağı Olarak Kullanılabilecek Odun Dışı Bazı Bitkisel Ürünler, Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi, 2013, 13 (1): 48-59.
80. Moharram, H.A., Youssef, M.M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. Alexandria Journal of Food Science and Technology. 2014, 11, 1, 31-42.
81. Albayrak, S., Sağdıç, O., Aksoy, A. Bitkisel ürünlerin ve gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemler. Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2010, 26(4): 401-409.
82. Büyüktuncel, E. Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler. Marmara Pharmaceutical Journal. 2013, 17: 93-103.
83. Gupta, D. Methods For Determination of Antioxidant Capacity: A Review. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2015, 6(2): 546-566.
84. Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., et al. Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay. Molecules. 2007, 12, 1496-1547.

85. Joshi P.S., Sutrave D.S. A Brief Study of Cyclic Voltammetry and Electrochemical Analysis. *International Journal of ChemTech Research*. 2018, 11(09): 77-88.
86. Farghaly, O.A., Abdel Hameed, R. S., Abu-Nawwas, A.A.H. Analytical Application Using Modern Electrochemical Techniques. *International Journal of Electrochemical Science*. 2014, 9, 3287-3318.
87. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J. *Analitik Kimya Temelleri* (E. Kılıç, F. Köseoğlu, Çev.). Bilim Yayınları. Ankara, 1996. s. 496.
88. Gupta, V.K., Jain, R., Radhapyari, K., Jadon, N., Agarwal, S. Voltammetric techniques for the assay of pharmaceuticals-A review. *Analytical Biochemistry*. 2011, 408, 179-196.
89. Mirceski, V., Gulaboski, R., Lovric, M., Bogeski, I., et al. Square-Wave Voltammetry: A Review on the Recent Progress. *Electroanalysis*. 2013, 25, 11, 2411-2422.
90. Chaisiwamongkhon K., Ngamchuea K., Batchelor-McAuley C., Compton R.G. Multiwalled Carbon Nanotube Modified Electrodes for the Adsorptive Stripping Voltammetric Determination and Quantification of Curcumin in Turmeric. *Electroanalysis*. 2017, Vol. 29, Issue 4, 1049-1055.
91. Shetti, N.P., Nayak, D.S., Kuchinad, G.T. Electrochemical oxidation of erythrosine at TiO<sub>2</sub> nanoparticles modified gold electrode - An environmental application. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2017, 5, 2083-2089.
92. Yao, H., Sun, Y., Lin, X., Tang, Y., Huang, L. Electrochemical characterization of poly (eriochrome black T) modified glassy carbon electrode and its application to simultaneous determination of dopamine, ascorbic acid and uric acid. *Electrochimica Acta*. 2007, 52, 6165-6171.
93. Cittan, M., Koçak S., Çelik, A., Dost, K. Determination of oleuropein using multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon electrode by adsorptive stripping square wave voltammetry. *Talanta*. 2016, 159, 148-154.
94. Hazra K., Kumar R., Sarkar B.K, Chowdary Y.A., Devgan M., Ramaiah M. Uv-Visible Spectrophotometric Estimation Of Curcumin in Nanoformulation. *International Journal of Pharmacognosy*. 2015, Vol. 2(3): 127-130.

95. Korany M.A, Haggag R.S., Ragab M.A.A., Elmallah O.A. A validated stability-indicating HPLC method for simultaneous determination of Silymarin and Curcumin in various dosage forms. *Arabian Journal of Chemistry*. 2017/5/1. Vol. 10. 1711-1725
96. Long Y., Zhang W., Wang F., Chen Z. Simultaneous Determination of Three Curcuminoids in Curcuma Longa L. By High Performance Liquid Chromatography Coupled With Electrochemical Detection. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014, 4(5):325-330.
97. Ma W., Wang J., Guo Q., Tu P. Simultaneous Determination of Doxorubicin and Curcumin in Rat Plasma by LC-MS/MS and Its Application to Pharmacokinetic Study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;111:215-221.
98. Peng J., Nong K., Cen L. Electropolymerization of Acid Chrome Blue K on Glassy Carbon Electrode for the Determination of Curcumin. *Journal of the Chinese Chemical Society*. 2012, Vol. 59, Issue 11, 1415-1420.
99. Cheraghi S., Taher M.A., Karimi-Maleh H. Fabrication of Fast and Sensitive Nanostructure Voltammetric Sensor for Determination of Curcumin in the Presence of Vitamin B9 in Food Samples. *Electroanalysis*. 2016, Vol. 28, Issue 10, 2590-2597.
100. Jain R., Haque A., Verma A. Voltammetric quantification of surfactant stabilized curcumin at MWCNT/GCE sensor. *Journal of Molecular Liquids*. 2017, 230:600-607.
101. Zhang D., Ouyang X., Ma J, Li L., Zhang Y. Electrochemical Behavior and Voltammetric Determination of Curcumin at Electrochemically Reduced Graphene Oxide Modified Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*. 2016, Vol. 28, Issue 4, 749-756.