

A4. Gıdalarda Antioksidan Aktivite Analizi

1. Genel Bilgi

Antioksidanlar oksidatif zincir reaksiyonlarının başlamasını veya gelişmesini inhibe ederek; lipitlerin, protein ve DNA gibi biyolojik moleküllerin oksidasyonunu engelleyen veya geciktiren bileşiklerdir (Javanmardi *et al.* 2003). Oksijen tüketen organizmaların tümünde; biyolojik moleküllerin oksidasyonunu önleyen enzimatik veya enzimatik olmayan çeşitli antioksidan bileşikler bulunmaktadır. Süperoksit dismutaz (SOD, **S**uperoxide **d**ismutase), glutatyon peroksidaz (GSHPx, **G**lutathione **p**eroxidase) ve katalaz en önemli antioksidan enzimlerdir. Enzimatik olmayan antioksidan bileşiklerin başında ise; askorbik asit, E vitamini, karotenoidler ve polifenoller gelmektedir. Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri, okside olabilir çift bağ içermeleri veya hidroksil grupları içermeleri ve bu yapıların da elektronca zengin olmalarından kaynaklanmaktadır.

Askorbik asit, E vitamini ve karotenoidler oksijenin reaktif formlarını inaktive etmek suretiyle antioksidan etki göstermektedir. Buna karşın fenolik maddeler ise, serbest radikalleri bağlayarak, demir ve bakır gibi serbest metal katyonlarıyla kelat oluşturarak ve lipoksigenaz enzimini inaktive etmek suretiyle bu etkiyi göstermektedir (Frankel 1999). Reaktif oksijen (RO) formları ya da türleri denildiğinde, oksijen radikalleri ile oksijenin radikal olmayan türevleri anlaşılmaktadır. Bu tanımın kapsamındaki oksijen radikalleri; *süperoksit anyon* (O_2^-), *hidroksi* (HO^*), *peroksi* (ROO^*), *alkoksi* (RO^*) ve *hidroperoksi* (HOO^*) radikalleridir. Radikal olmayan reaktif oksijen türevleri ise; *hidrojen peroksit* (H_2O_2), *ozon* (O_3) ve *singlet oksijen* (1O_2) (Choe and Min 2005).

Gerek vücutta gerekse gıdalarda çeşitli nedenlerle oluşan RO türleri öncelikle buldukları ortamda bulunan antioksidanları okside ederler. Böylece biyolojik moleküller, oksidatif hasardan korunarak yapısal ve fonksiyonel nitelikleri bozulmadan kalır. Antioksidanlar, oksidatif zincir reaksiyonlarının "başlamasını önleyen primer antioksidanlar" ve "gelişimini önleyen ikincil veya koruyucu antioksidanlar" olmak üzere 2 ana başlık altında incelenmektedir (Apak *et al.* 2007). Antioksidanların oksidatif zincir reaksiyonlarını önleme mekanizmaları 1, 2 ve 3 No'lu eşitliklerde gösterilmiştir.



Bu reaksiyonlar sonucunda, antioksidanlar, ya lipit radikali (R^*) ile reaksiyona girerek lipit oksidasyonunun başlamasını (1) ya da peroksi (ROO^*) veya alkoksi (RO^*) radikaller ile reaksiyona girerek oksidasyonunun gelişimini (2 ve 3) önlerler. Antioksidanların bu etkileri nedeniyle; aralarında kalp ve damar hastalıkları ile kanser, katarakt gibi hastalıkların da bulunduğu pek çok hastalığı önleyici etki gösterdikleri ve yaşlanmayı geciktirme gibi olumlu etkiler yarattığı düşünülmektedir.

Gıdaların antioksidan kapasitelerinin belirlenmesinde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin bir bölümü elektron transferi reaksiyonuna (ET, **E**lectron **T**ransfer) dayanmakta, diğer bölümü ise, hidrojen atomu transferi (HAT, **H**ydrogen **A**tom **T**ransfer) reaksiyonuna dayanmaktadır. ET'ne dayalı yöntemler, antioksidan tarafından indirgenen oksidanın renginde meydana gelen değişimleri ölçmektedir. ET'nin esas alındığı yöntemde; renkli oksidan bir bileşik (radikal) ile antioksidan maddenin redoks reaksiyonu söz konusudur. Radikal, antioksidandan elektron alarak indirgenmekte ve rengi değişmektedir. Renkteki değişim ile

örnek içinde bulunan antioksidan miktarı arasında ilişki bulunmaktadır. Absorbanstaki değişim, antioksidan konsantrasyonuna karşı grafiğe aktarılmakta, elde edilen kurvenin eğimi antioksidanın indirgeme kapasitesini göstermektedir. Gıdanın antioksidan kapasitesi, Troloks veya gallik asit eşdeğeri olarak ifade edilmektedir. ET'ne dayalı yöntemler arasında; troloks eşdeğer antioksidan kapasitesi (ABTS/TEAC), difenil-1-pikrilhidrazil radikal tutma kapasitesi (DPPH, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay), ferrik iyon indirgeme antioksidan parametresi (FRAP, Ferric ion Reducing Antioxidant Parameter) ve N,N-dimetil-*p*-fenilendiamin analizi (DMPD, N,N-dimethyl-*p*-phenylenediamine assay) yöntemleri bulunmaktadır.

HAT'ne dayalı antioksidan aktivite ölçüm yöntemlerinde; antioksidan (AH, Antioxidant) ve substrat, yani lipit (LH, Lipid), azo bileşiklerinin parçalanması ile oluşan peroksi radikalleri için yarışmaktadır. Bu reaksiyonlar 4 ve 5 No'lu eşitliklerde verilmiştir. Antioksidanlar peroksi radikali (ROO*) ile reaksiyona girerek okside olmakta ve bu sırada da lipitlerin peroksidasyonunu önlemektedirler.



HAT'ne dayalı yöntemler arasında; oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC, Oxygen Radical Absorbance Capacity) ile toplam radikal tutma antioksidan parametresi (TRAP, Total Radical trapping Antioxidant Parameter) yöntemleri bulunmaktadır. Gerek ET'ne gerekse HAT'ne dayalı yöntemlerle ilgili ayrıntılı bilgiler bölümümüzde yapılan tez çalışmalarında verilmiştir (Erge-Burdurlu 2007, Apaydın 2008).

Bu uygulamada, DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) yöntemi kullanılarak nar sularının antioksidan aktivitesi belirlenecektir. DPPH yöntemi, kolay uygulanabilir olmasından dolayı özellikle meyve ve sebze sularının antioksidan aktivitelerinin ölçülmesinde sıklıkla kullanılmaktadır.

2. İlke

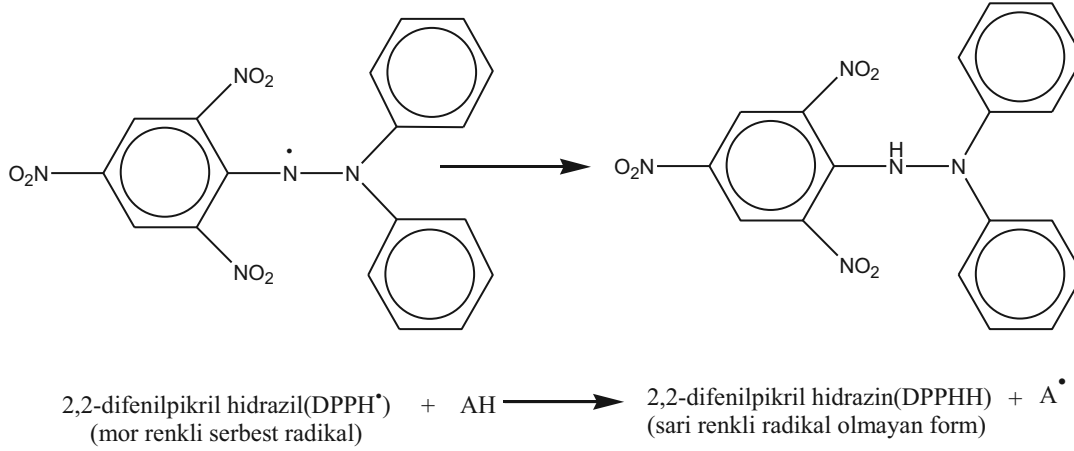
Mor renkli stabil bir bileşik olan DPPH* radikalinin, test bileşiği ile reaksiyonundan sonra indirgenmesi sonucu, renkte meydana gelen azalmanın (mordan sarıya dönüşüm) spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda ölçülmesine dayanmaktadır. Yoğun mor renkli DPPH* radikal çözeltisi, antioksidan aktiviteye sahip ekstrakt ile karıştırılınca, antioksidan bileşen ortama bir hidrojen atomu vermekte ve stabil, radikal olmayan DPPH formuna dönüşmektedir. Bu dönüşüm sırasında eş zamanlı olarak yoğun mor renk (DPPH*) kaybolmakta ve indirgeme sonucu sarı renk (DPPHH) oluşmaktadır. Bu reaksiyon kısaca Şekil 2'de özetlenmiştir (Molyneux 2004).

3. Kimyasallar

Metanol — 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) — standart antioksidan madde (askorbik asit veya troloks)

*DPPH** radikal çözeltisi, 1 mM:100 mL'lik bir radikal çözeltisi hazırlamak için 0.03943 g DPPH tartılır, bir miktar metanol içinde çözündürülerek kayıpsız şekilde 100 mL'lik bir ölçü balonuna aktarılır ve metanol ile balon hacmine tamamlanır. Böylece, 1 mM'lık 100 mL *DPPH** radikal çözeltisi hazırlanmış olur. Bu çözelti, her gün taze olarak hazırlanmalı ve

ölçüm yapılmadığı anlarda alüminyum folyoya sarılı bir şekilde, karanlık bir ortamda ve +4°C’ de muhafaza edilmelidir.



Şekil 2 DPPH* radikalının indirgenmesi

4. Gereçler

Spektrofotometre

5. İşlem

- Meyve veya sebze gibi doku içeren bir materyalde analiz yapılacaksa, önce örnekteki antioksidan bileşiklerin ekstrakte edilmesi gerekmektedir. Bu amaçla 25 g numune üzerine 50 mL % 80'lik aseton ilave edilerek önce blender daha sonra da homojenizatör ile 3'er dak. homojenize edilir. Meyve suyu veya konsantresi gibi sıvı örneklerde ise, sırasıyla 25 mL veya 5 g örnek alınır ve üzerine 25 mL % 80'lik aseton ilave edilerek homojenizatör ile 1 dak. süreyle homojenize edilir. Daha sonra, karışım Buchner hunisi yardımı ile Whatman 1 No'lu filtre kağıdından filtre edildikten sonra, filtre keki bir kez daha % 80'lik aseton ile ekstrakte edilir. Elde edilen filtrat, döner evaporatör balonuna aktarılarak 45 °C'de ortamdaki asetonun % 90'ı uzaklaştırılır. Kalan sulu ekstrakt 10 mL'ye % 80'lik aseton ile tamamlanıp filtre edilerek tercihen hemen analiz edilir ya da kahverengi şişelerde analize kadar dondurularak muhafaza edilir.
- Analiz için 5 tane test tüpü alınarak, her birine DPPH* radikal çözeltisinden 600 µL (0.6 mL) alınır.
- Örnek ekstraktından, farklı hacimlerde (20–40–60–80–100 µL) alınarak, içlerinde radikal çözeltisi bulunan tüpler üzerine ilave edilir.
- Tüp içeriklerinin toplam hacmi 6 mL'ye metanolle tamamlanır.
- Tüpler karıştırıldıktan sonra, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 15 dak. süreyle inkübasyona bırakılır.
- Şahit ise, 600 µL DPPH* radikal çözeltisi üzerine 5.4 mL metanol eklenerek hazırlanır. Şahit tüpü de, oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 15 dak. süreyle inkübasyona bırakılır.
- Inkübasyon süresi sonunda, spektrofotometrede 517 nm dalga boyunda gerek örnek gerekse şahit tüp içeriklerinin absorbans değerleri okunur. Şahit için elde edilen absorbans değeri dikkate alınarak, "hesaplama" bölümünde verilen eşitliğe göre 5 farklı örnek hacmine karşılık gelen yüzde inhibisyon değerleri hesaplanır.

6. Hesaplama ve değerlendirme

Her bir örnek hacmine karşılık gelen yüzde inhibisyon değerleri, aşağıda verilen eşitliğe göre, hesaplanmaktadır.

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{ekstrakt}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Burada;

A_{DPPH} :DPPH* şahit örneğinin absorbans değeri

A_{ekstrakt} :Örnek ekstraktının absorbans değeri

Yukarıdaki eşitliğe göre belirlenen inhibisyon değerleri, örnek hacimlerine karşı bir grafiğe aktarılıp linear regresyon analizi uygulanmak suretiyle, örneğe ilişkin eğriye ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılır. Bu eşitlik kullanılarak da, örneğe ilişkin EC_{50} değeri hesaplanmaktadır. Eğer örneğe seyreltme uygulandıysa, hesaplamada seyreltme faktörü de dikkate alınmalıdır. EC_{50} değeri, "ortamda bulunan DPPH radikalinin % 50'sini inhibe eden antioksidan madde konsantrasyonu" olarak ifade edilmektedir. Bu değer ne kadar küçük olursa, antioksidan aktivite o kadar yüksek demektir.

Örnek: Nar suyunun antioksidan kapasitesinin belirlendiği bir çalışmada, 2 mL nar suyu 10 mL'lik ölçü balonunda metanol ile seyreltilmiştir ($S_f = 5$). Daha sonra yukarıda anlatıldığı şekilde analiz yürütülerek farklı örnek hacimlerine karşılık gelen yüzde inhibisyon oranları hesaplanmıştır (Çizelge 3). Örnek hacimlerine karşı belirlenen yüzde inhibisyon değerleri, linear regresyon analizi uygulanarak bir grafiğe aktarılınca örneğe ilişkin eğriye (Şekil 3) ve bu eğriyi tanımlayan eşitliğe ulaşılmıştır. Buna göre nar suyu örneğinin antioksidan kapasitesini belirleyiniz.

Hesaplama

Şekil 3'de verilen inhibisyon eğrisinin denklemini kullanılarak EC_{50} değeri (radikalın %50'sinin inhibisyonunu sağlayan konsantrasyon) hesaplanır. Hesaplama, örneğe uygulanan seyreltme işlemi de ($S_f = 5$) dikkate alınmalıdır.

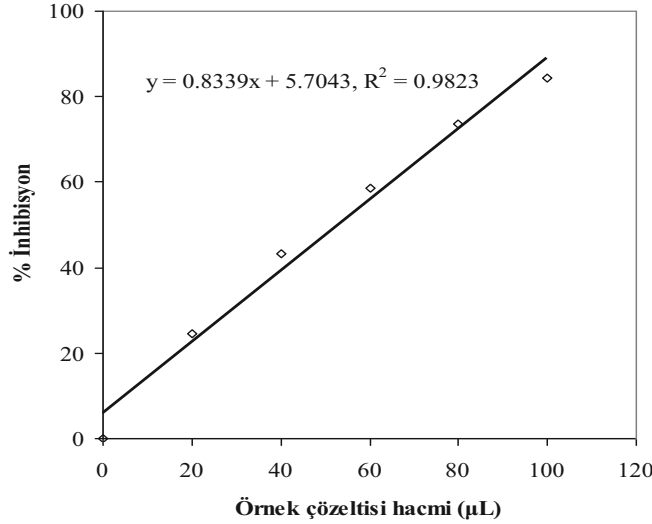
$$\% \text{ inhibisyon} = (0.8339 \times \text{örnek hacmi}) + 5.7043$$

Yukarıdaki eşitlikte "% inhibisyon" değeri yerine, % 50 değeri konularak radikalın % 50'sinin inhibisyonunu sağlayan örnek hacmi, yani nar suyunun antioksidan kapasitesi hesaplanır.

$$\begin{aligned} \% 50 &= (0.8339 \times \text{örnek hacmi}) + 5.7043 \\ \text{Örnek hacmi} &= [(50 - 5.7043) / 0.8339] / 5 \\ &= 10.62 \mu\text{L ya da } 0.0106 \text{ mL nar suyu} \end{aligned}$$

Çizelge 3 Seyreltilmiş nar suyu hacmine karşılık sağlanan inhibisyon değerleri

Örnek hacmi (μL)	%İnhibisyon
20	24.64
40	43.20
60	58.71
80	73.55
100	84.30



Şekil 3 Seyreltilmiş nar suyundaki antioksidan bileşiklerin konsantrasyonunun, DPPH* radikalinin inhibisyonu üzerine etkisi

Kaynaklar

- Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S.E., Bektaşoğlu, B., Berker, K.I. and Özyurt, D. 2007. Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay. *Molecules*, 12, 1496-1547.
- Apaydın E. 2008. Nar suyu konsantresi üretim ve depolama sürecinde antioksidan aktivitedeki değişimler. Yüksek lisans tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 64 s, Ankara.
- Choe, E. and Min, D.B. 2005. Chemistry and reactions of reactive oxygen species in foods. *Journal of Food Science*, 70(9), R142-R159.
- Erge-Burdurlu, H.S. 2007. Domateste (*Lycopersicum esculentum*) karotenoid madde dağılımı ve antioksidan aktivite. Doktora tezi (basılmamış), Ankara Üniversitesi, 91 s, Ankara.
- Frankel, E.N. 1999. Natural phenolic antioxidants and their impact on health. *Antioxidant Food Supplements in Human Health*, 385-392.
- Javanmardi, J., Stushnoff, C., Locke, E. and Vivanco, J.M. 2003. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian *Ocimum* accessions. *Food Chemistry*, 83, 547-550.
- Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarın Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.