



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ECZACILIKTA BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**SUBSTRAT KULLANARAK YENİ BİR
ANTİOKSİDAN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ
VE UYGULANMASI**

Ovijet Chandra KURI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Murat KÜÇÜK

TRABZON-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yapıldığını ve yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih
Ovijet Chandra Kuri
(İmza)

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	i
ONAY	ii
BEYAN	iii
İthaf	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xv
ÖZET	xvii
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Oksidasyon	3
2.2. Antioksidan	4
2.3. Antioksidanların Rolü	5
2.3.1. Birincil Enzimatik Antioksidan Sistem	5
2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem	5
2.3.3. Onarım Sistemi	6
2.4. Antioksidan Türleri	6

2.4.1. Oluşumlarına Göre Doğal veya Sentetik Antioksidanlar	6
2.4.1.1. Doğal Antioksidanlar	6
2.4.1.2. Sentetik Antioksidanlar	7
2.4.1.3. Kinetik Olarak Antioksidanların Sınıflandırılması	7
2.5. Antioksidanların Etki Mekanizması	7
2.5.1. Önleyici Mekanizma	7
2.5.2. Serbest Radikal Temizleyiciler	9
2.6. Antioksidan Testler	10
2.7. HPLC Sistemi ve Online HPLC-Antioksidan Yöntemler	11
2.8. DPPH Testi	14
2.9. ABTS Testi	14
2.10. Peroksinitrit Temizleme Testi	15
2.11. Ekstraktı Hazırlanan Bitkiler ve Özellikleri	15
2.11.1. Kına (<i>Lawsonia inermis</i>)	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	18
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	18
3.2. Kullanılan Kimyasallar	19
3.3. Çalışmada Kullanılan Substratlar ve Antioksidanların Molekül Şekilleri	20
3.4. Bitki Ekstraktlarının Toplanması ve Hazırlanışları	21
3.5. HPLC-DAD-UV Koşulları	21
3.6. HPLC Çözelti Sistemi ve Hazırlanışları	22
3.7. Geliştirilen Yeni Yöntem	23

3.7.1.1. Gallik Asit	23
3.7.1.2. Butillenmişhidroksi Toluen (BHT)	25
3.7.1.3. Askorbik Asit	27
3.7.1.4. Kafeik Asit	29
4. BULGULAR	32
4.1. Farklı Antioksidanların Mevcudiyetinde Substratın DPPH'tan Korunması	32
4.1.1. Gallik Asit	32
4.1.2. Butillenmişhidroksi Toluen (BHT)	38
4.1.3. Askorbik Asit	42
4.1.4. Kafeik Asit	48
4.2. Bitki Özlerinin Mevcudiyetinde Substratın DPPH'tan Korunması	53
4.2.1. Kına (<i>Lawsonia inermis</i>)	53
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	58
6. KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	65

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 1. Serbest radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri	4
Tablo 2. Kullanılan cihaz ve malzemelerin listesi	18
Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi	19
Tablo 4. Kullanılan antioksidanların yapısı	20
Tablo 5. HPLC sisteminde kullanılan çözücülerin listesi	22
Tablo 6. DPPH varlığında farklı Gallik Asidi konsantrasyonları ile Kateşin pik alanları	32
Tablo 7. DPPH varlığında farklı Gallik Asidi konsantrasyonları ile Troloks pik alanları	35
Tablo 8. DPPH varlığında farklı Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) konsantrasyonları ile Kateşin pik alanları	38
Tablo 9. DPPH varlığında farklı Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) konsantrasyonları ile Troloks pik alanları	41
Tablo 10. DPPH varlığında Farklı Askorbik Asit konsantrasyonlarına sahip Kateşin pik Alanları	43
Tablo 11. DPPH varlığında farklı Askorbik Asit konsantrasyonlarına sahip Troloks pik alanları	46
Tablo 12. DPPH varlığında farklı Kafeik Asit konsantrasyonlarına sahip Kateşin pik alanları	48
Tablo 13. DPPH varlığında farklı Kafeik Asit konsantrasyonlarına sahip Troloks pik alanları	51
Tablo 14. DPPH varlığında farklı ekstrakt (kına) konsantrasyonlarına sahip Kateşin pik alanları	53
Tablo 15. DPPH varlığında farklı ekstrakt (kına) konsantrasyonlarına sahip Troloks pik alanları	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 1.	Antioksidan enzim sistemi 8
Şekil 2.	Çevrimiçi HPLC kolon sonrası antioksidan ayırma sisteminin şeması 13
Şekil 3.	Standart bir fenolik bileşik karışımının ve Viburnum opulus suyunun on-line HPLC-antioksidan analizleri 14
Şekil 4.	1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Gallik Asit (1 mL, 1 – 500 µM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir 33
Şekil 5.	1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Gallik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan Gallik Asit konsantrasyonlar 1 µM (1), 10 µM (2), 20 µM (3), 50 µM (4), 100 µM (5), 300 µM (6), 500 µM (7), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (8)] 34
Şekil 6.	1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Gallik Asit (1 mL, 10 – 2000 µM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir 36
Şekil 7.	1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Gallik asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Gallik Asit konsantrasyonlar 5 µM (1), 10 µM (2), 20 µM (3), 50 µM (4), 100 µM (5), 300 µM (6), 500 µM (7), 600 µM (8), 800 µM (9), 1000 µM (10), 1200 µM (11), 1500 µM (12), 2000 µM (13), DPPH

- kullanılmayan kontrol karışımı (14)] 37
- Şekil 8.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan BHT (1 mL, 10 – 6000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir 39
- Şekil 9.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan konsantrasyonlar 10 μM (1), 100 μM (2), 500 μM (3), 1000 μM (4), 2000 μM (5), 3000 μM (6), 4000 μM (7), 6000 μM (8), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (9)] 40
- Şekil 10.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan BHT (1 mL, 1 – 3000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir 41
- Şekil 11.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) konsantrasyonlar 1 μM (1), 10 μM (2), 20 μM (3), 50 μM (4), 100 μM (5), 300 μM (6), 500 μM (7), 800 μM (8), 1000 μM (9), 2000 μM (10), 3000 μM (11), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (12)] 42
- Şekil 12.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Askobik Asit (1 mL, 50 – 2000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat

- seviyesini göstermektedir 44
- Şekil 13.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Askorbik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan konsantrasyonlar 50 μM (1), 100 μM (2), 300 μM (3), 500 μM (4), 1000 μM (5), 2000 μM (6), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (7)] 45
- Şekil 14.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Askorbik Asit (1 mL, 1 – 2000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir 46
- Şekil 15.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Askorbik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Askorbik Asit konsantrasyonlar 1 μM (1), 10 μM (2), 100 μM (3), 500 μM (4), 1000 μM (5), 2000 μM (6), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (7)] 47
- Şekil 16.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Kafeik Asit (1 mL, 1 – 500 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir 49
- Şekil 17.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Kafeik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan Kafeik Asit konsantrasyonlar 10 μM (1), 50 μM (2), 100 μM (3), 500 μM (4), 1000 μM (5), 2000 μM (6), 3000 μM (7), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (8)] 50
- Şekil 18.** 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı

konsantrasyonlarda antioksidan Kafeik Asit (1 mL, 50 – 10000 µM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir

51

Şekil 19. 1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Kafeik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Kafeik Asit konsantrasyonlar 50 µM (1), 500 µM (2), 2000 µM (3), 3000 µM (4), 10000 µM (5), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (6)]

52

Şekil 20. 1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Ekstrakt (Kına) (1 mL, 0,001% - 10%) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir

54

Şekil 21. 1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Ekstrakt (Kına) (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan Ekstrakt (Kına) konsantrasyonlar 0.001% (1), 0.005% (2), 0.01% (3), 0.05% (4), 0.1% (5), 0.5% (6), 1% (7), 5% (8), 10% (9), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (10)]

55

Şekil 22. 1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Ekstrakt (Kına) (1 mL, 1% – 50%) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir

56

Şekil 23. 1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Ekstrakt (Kına) (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm

kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Ekstrakt (Kına) konsantrasyonlar 0.005% (1), 0.1% (2), 0.5% (3), 1% (4), 5% (5), 10% (6), 50% (7), 75% (8), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (9)]

57



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

μM	Mikromolar
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
BHA	Butilhidroksianisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksitoluen
CAT	Katalaz
DAD	Çoklu Diyot Serili Dedektör (diode array dedector)
DHA	Dokosaheksaenoik asit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DPPH•	2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil Radikali
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
GPx	Glutasyon peroksidaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	İndirgenmiş glutasyon
GSSG	oksitlenmiş glutasyon
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLC-UV	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Ultraviyole Dedektör
IC₅₀	Maksimum hızı yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonu
mL	Mililitre
mM	Milimolar
MSR	Metiyonin sülfoksit redüktaz
NADPH	Azaltılmış nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NDGA	Nordihidroguaiaretik asit
nm	Nanometre
PG	Propil gallat
ROS	Reaktif oksijen türleri
rpm	Dakikadaki dönüş sayısı (Revolutions per minute)
SOD	Süperoksit dis-mutaz,
TBHQ	Üçüncül bütıl hidrokinon
TEAC	Trolox Eşdeğeri Antioksidan Kapasite

Formüller

CH₃COOH	Asetik asit
H₂O	Su
H₂O₂	hidrojen peroksidin
MeOH	Metanol
O₂	Oksijen
OH•	Hidroksit iyonu



ÖZET

Substrat Kullanarak Yeni Bir Antioksidan Yöntem Geliştirilmesi ve Uygulanması

İlaç bileşenleri, gıda bileşenleri ve birçok endüstriyel ürün oksidasyona maruz kalmakta ve bu nedenle de stabilite için normal ortamda antioksidanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla oksidasyon substratı olarak böyle bileşenlerin kullanılmasıyla onları koruyacak antioksidanların tespitine dönük yeni yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla bu tez çalışmasında DPPH radikal temizleme, ABTS radikal temizleme ve peroksinitrit temizleme yöntemleri üzerinde çalışılarak ve çeşitli substratlar denenerek yeni bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu üç yöntem ve potansiyel substratlar hem klasik spektrofotometrik olarak hem on-line HPLC-kolon sonrası antioksidan aktivite ölçümü kullanılarak, hem de reaksiyon sonrası HPLC ile antioksidan korumanın ölçüldüğü uygulama şeklinde denenmiş, çok sayıda ön çalışma sonrasında uygulanabilirliği olan ve yaygın uygulanma potansiyeli en yüksek olan reaksiyon sonrası HPLC ile antioksidan korumanın ölçüldüğü ve model substrat olarak ta Kateşin'in ve Troloks'un kullanıldığı uygulama yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntem ile ilgili optimizasyon ve validasyon çalışmaları yapılmış, geliştirilmiş yöntem standart antioksidanlar (gallik asit, BHT, Kafeik Asit ve Askorbik Asit) ve gerçek numune olarak kına ekstresi üzerinde uygulanmıştır. Bu tez çalışmasında geliştirilen yeni substrat bazlı DPPH radikaline karşı koruma aktivitesi yöntemi daha sonraki çalışmalara öncülük edecek nitelikte olup literatüre bu yaklaşımla DPPH anti radikal aktivite yöntemi kazandırmıştır.

Anahtar Sözcükler: Antioksidan aktivite, DPPH, HPLC, Kına, Substrat

ABSTRACT

Development and Application of a New Antioxidant Method with Use of a Substrate

Pharmaceutical ingredients, food ingredients, and many industrial products are subject to oxidation and, therefore, need antioxidants for stability in normal environments. Thus, there is a need for new methods for the detection of antioxidants that will protect them by using such components as oxidation substrates. For this purpose, in this thesis, a new determination method was developed by studying DPPH radical scavenging, ABTS radical scavenging, and peroxynitrite scavenging methods and testing various substrates. These three methods and potential substrates have been tested both classically spectrophotometrically, using on-line HPLC-post-column antioxidant activity measurement, and post-reaction HPLC measurement of antioxidant protection. An application method was developed in which antioxidant protection was measured by HPLC after the reaction, and catechin and Trolox were used as model substrates. Optimization and validation studies were carried out on this method, and the developed method was applied to standard antioxidants (Gallic Acid, BHT, Caffeic Acid, and Ascorbic Acid) and Henna extract as a real sample. The new substrate-based DPPH radical protection activity method developed in this thesis study will lead to further studies and this approach has brought the DPPH antiradical activity method to the literature.

Keywords: Antioxidant activity, DPPH, Henna, HPLC, Substrate

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antioksidan olarak bilinen bileşikler, diğer moleküllerin oksidasyonunu durdurma veya geciktirme yeteneğine sahiptir. Reaktif oksijen türleri (ROS), oksidasyon işlemi sırasında elektronların bir molekülden diğerine transferinin bir sonucu olarak üretilir. Son derece reaktif ROS, dokulara ve hücrelere zarar vererek kanser, kalp hastalığı ve Alzheimer gibi bir dizi hastalığa neden olabilir.

Son dönem araştırmalarda, doğal ve sentezlenmiş maddelerin antioksidan aktivitelerini belirleme konusundaki çalışmalara ilgi artmıştır. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testi yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. DPPH testi, antioksidanların mor DPPH radikalini sarı difenilpikrilhidrazine (DPPH-H) dönüştürme yeteneğine dayanır. Numunenin antioksidan kapasitesi, mor rengin azalmasıyla doğru orantılıdır. Karışımlardaki bileşenlerin ayrılıp, yanıtlanabildiği ve miktarlarının belirlenebildiği güçlü bir analitik yöntem, yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC). Doğal ve sentetik maddelerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için seçici ve hassas bir yaklaşım, HPLC ile DPPH testinin birleştirilmesiyle üretilebilir. Bu prosedürde, numunedeki kimyasallar bir HPLC sistemi kullanılarak ayrılır ve ayrılan her bir bileşenin antioksidan aktivitesi daha sonra bir DPPH testi kullanılarak belirlenir.

Bir HPLC-DPPH uygulamasını oluşturmada, HPLC kolonunun, mobil fazın ve algılama dalga boyunun seçilmesi dahil olmak üzere birden çok aşama vardır. HPLC kolonu seçilirken ayrıştırılacak maddelerin polaritesi ve molekül ağırlığı dikkate alınmalıdır. Etkili bileşik ayrımı ve tepe çözünürlüğü elde etmek için mobil fazın ayarlanması gerekir. Kimyasalların ve DPPH radikalinin absorpsiyon spektrumlarına bağlı olarak, tespit dalga boyu seçilmelidir. Yöntem geliştirmede diğer önemli bir aşama da, yeni geliştirilen yöntemin doğrulanmasıdır. Doğrusallık, doğruluk, kesinlik, tespit limiti ve ölçüm limiti doğrulama parametrelerinden bazılarıdır. Prosedürün doğrusallığını belirlemek için birkaç standart konsantrasyonun analizi yapılmalıdır. Eklenmiş numunelerin çeşitli konsantrasyonlarda analiz edilmesi, yöntemin doğruluğunu ve kesinliğini ortaya çıkaracaktır. Düşük konsantrasyonlu numunelerin analiz edilmesi, saptama ve niceleme sınırlarının tanımlanmasına yardımcı olacaktır.

Bitki özleri, gıdalar ve kozmetik formülasyonlar dahil olmak üzere çeşitli materyallerde antioksidan aktiviteyi belirlemek için HPLC-DPPH yaklaşımı etkili bir şekilde kullanılmıştır. Yöntem, zorlu karışımlarda olası antioksidan kimyasalları taramak

ve belirlemek için hızlı, hassas ve doğru bir yöntem sunar. Spesifik maddelerin antioksidan aktivitesinin HPLC-DPPH tekniği kullanılarak belirlenmesi, fonksiyonel gıdaların ve nutrasötiklerin oluşturulmasında da yardımcı olur. Sonuç olarak HPLC-DPPH tekniği, doğal ve sentezlenmiş maddelerin antioksidan aktivitelerini belirlemede umut vadeden bir yöntemdir. Prosedür, HPLC ve DPPH testlerinin güçlerini birleştirerek olası antioksidan bileşiklerin taranması ve tanımlanması için hassas ve seçici bir yaklaşım sunar. Doğru ve güvenilir bulgular sağlamak için, bir HPLC-DPPH sürecinin geliştirilmesi boyunca kapsamlı optimizasyon ve doğrulama gereklidir.



2. GENEL BİLGİLER

Biyokimya alanında ve ilaçlarla yapılan çalışmalarda, substratın kararlılığı bir sorundur. Bu nedenle, kararlılığı artırmak için substrata eklenen maddelere ihtiyaç duyulur. Literatüre göre bu ihtiyaç ile ilgili on-line yöntemlerle çalışmalar yapılmıştır. Geleneksel yöntem, mevcut yöntemlerin çeşitli dezavantajları sebebiyle zaman alıcı olduğu için yeni yöntem geliştirme ihtiyacına sebep olur.

2.1. Oksidasyon

Oksidasyon, belirli bir reaksiyonda bir bileşenin yükseltgenmesi sürecidir. Bu yükseltgeme bir molekül, atom veya iyon ile yapılabilmektedir. Elektropozitif bir atomun, radikalın veya elektronun yapıdan ayrılması, ya da elektronegatif bir atom veya radikalın yapıya ilavesi olarak da tanımlanmaktadır (1). Oksidasyon iki şekilde görülmektedir:

I. Oto-oksidasyon

II. Foto-oksidasyon

Oto-oksidasyon bileşenin havada bulunan oksijen ile kendiliğinden oksidasyonu olarak tanımlanabilmektedir. Oto-oksidasyon, atmosferik yavaş ilerleyen bir süreçtir ve yağlar ve doymamış bileşikler oto-oksidasyona uğrayabilir (2).

Foto-oksidasyon ise oksijen yer almadan elektronun uzaklaştırılmasının yer aldığı oksidasyon türüdür. Bu türden oksidasyonla daha nadir karşılaşılır. Adrenalin, riboflavin ve askorbik asit vb. bileşiklerin oksidasyonu buna örnek gösterilebilir (3).

Biyolojik oksidasyon, aslında bir canlı organizmadaki belirli bir maddenin dönüşümüdür. Bu oksidasyon hem oksidasyonu hem de indirgemeyi içerir (4).

Serbest radikal, bir veya daha fazla eşleşmemiş elektrona sahip, bağımsız olarak var olabilen herhangi bir kimyasal türdür (5). Bu nedenle biyolojik serbest radikaller, çeşitli biyoorganik türlerle kolaylıkla tepkime verebilecek elektronlara sahip oldukça kararsız yapılardır. Serbest radikaller, onlardan türeyen diğer radikaller ve radikal olmayan reaktif türlerin yüksek konsantrasyonlarda varlığı, hücre yapılarındaki organellere ve hücre içi ve hücre dışı bileşenlere zarar verme yeteneklerinden dolayı canlı organizmalar için oldukça tehlikelidir (6).

Tablo 1. Serbest radikal ve radikal olmayan reaktif oksijen türleri (Phaniendra'dan, 7)

Serbest Radikal Reaktif Oksijen Türleri	Radikal Olmayan Reaktif Oksijen Türleri
• Hidroksil • Süperoksit • Nitrik oksit • Thiyl • Peroksil	• Peroksinitrit • Hipokloröz asit • Hidrojen peroksit • Singlet oksijen • Lipid peroksit

2.2. Antioksidan

Antioksidanlar, oksidasyon hedefi olan bileşenlerin oksidasyonunu engelleyen türlerdir. Oksidasyon, biyomoleküllerin yapı ve dolayısıyla fonksiyonlarını bozabilen, canlı sistemlere zarar verebilecek zincirleme reaksiyonlara yol açabilecek serbest radikalleri üretebilen kimyasal bir reaksiyondur (8). Antioksidanlar teknik tiyoller, askorbik asit (C vitamini) ve α -tokoferol gibi reaksiyonlarını engeller ya da sonlandırır. Bitkiler ve hayvanlar, bitkiler oksidatif stresi dengelemek için, dahili olarak üretilen glutatyon ve enzimler (örneğin, katalaz ve süperoksit dismutaz) veya diyet antioksidanları; vitamin C ve vitamin E gibi üst üste binen karmaşık antioksidan sistemlerini kullanırlar (8).

Bu radikal stabilizasyonun bir sonucu olarak, insan vücudundaki oksidatif katkının sağlanmasına yardımcı olarak bir oksidatif genişletilmiş zincirinin önlenmesi veya saptanmasıdır (9). Antioksidanların iki türü vardır: iki ana (çincirleme oranları kıran, serbest radikal temizleyiciler) ve doğal veya antioksidan antioksidanlar. İkincil antioksidanların etki mekanizmaları metallerin deaktivasyonunu, singlet oksijenin uzaklaştırılmasını, birincil antioksidanların rejenerasyonunu ve istenmeyen uçucu oksidanların gelişimini durdurarak lipid hidroperoksit oluşumunun baskılanmasını içerebilir. Bir başka deyişle antioksidanlar, "kolaylıkla oksideolabilen yağ ve diğer

biyomoleküllerin oksidasyonunu önleyen veya geciktiren, ve bunu çok düşük miktarlarda başaran maddeler" olarak tanımlanmaktadır (9).

2.3. Antioksidanların Rolü

Biyolojik sistemler oksijenli ve oksidasyona maruz kalabilecekleri ortamlarda hem canlılıklarını ve fonksiyonlarını yerine getirebilmek için fizyolojik ve biyokimyasal savunma mekanizmalarına sahiptirler (10). Bunların arasında fizyolojik düzeyde dokulardaki O₂ seviyelerinde koruma işlevi olan mikrovasküler bir sistem vardır ve biyokimyasal düzeyde antioksidan savunması enzimatik veya enzimatik olmayan tarzda bulunur. Ayrıca okside olan molekülleri onaran sistem de mevcuttur (12).

2.3.1. Enzimatik Antioksidan Sistem

Aerobik organizmaların enzimatik antioksidan enzimleri arasında katalaz (CAT), süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx) ve DT-diyaforaz gibi enzimler yer alır. Kofaktör olarak demir veya mangan bulunduran CAT, hidrojen peroksidin (H₂O₂) bozunmasını veya indirgenmesini katalizler, su ve moleküler oksijen oluşturarak SOD'un başlattığı detoksifikasyon sürecini tamamlar. SOD, O₂'nin H₂O₂'ye dismutasyon reaksiyonundan sorumludur ve H₂O₂ sonraki reaksiyonlarda katalaz veya GPx kataliziyle H₂O ve O₂'ye dönüştürülür. Kofaktör olarak selenyumla çalışan GPx'in insanlarda en az sekiz izoformu (GPx1 – GPx8) vardır. GPx, lipid peroksidasyonunun baskılanmasında önemli rol vardır. Bu yolla oksidatif hasar önlenmiş olur (15).

2.3.2. Enzimatik Olmayan Antioksidan Sistem

Hücreler, E vitamini, C vitamini, karotenler, ferritin, seruloplazmin, selenyum, indirgenmiş glutatyon (GSH), mangan, ubikinon, çinko, flavonoidler, koenzim Q, melatonin, bilirubin, taurin ve sistein gibi bir dizi antioksidan bileşik veya serbest radikal temizleyici kullanır. Gıdalardan temin edilen bazı flavonoidler, daha az reaktiviteye sahip kararlı kompleksler veya kompleksler üretmek için reaktif radikal oluşturucu türlerle doğrudan etkileşime girerken, diğer bazı flavonoidler ise bazı enzimlerin katalitik eyleminde ko-substrat ya da modölatör (inhibitör, aktivatör) olarak işlevini yerine getirir (16).

2.3.3. Onarım Sistemi

Onarım sistemi bileşenlerini ROS tarafından zarar görmüş lipid, protein ve DNA moleküllerini onaran veya parçalanmasına aracılık eden enzimler oluşturur. Memeli hücrelerinin sitoplazma ve mitokondrisinde bulunan DNA onarım enzimleri (polimerazlar, glikosidazlar ve nükleazlar) ve proteolitik enzimler (proteinazlar, proteazlar ve peptidazlar) bunlara örnek verilebilir. Daha spesifik örnekler ise, GPx, glutatyon redüktaz (GR) ve metiyonin sülfoksit redüktazdır (MSR). Bu enzimler, ROS seviyesinin yüksekliği nedeniyle oluşan oksidatif hasarın giderilmesinde aracı görev görür. Canlı sistemde düzenli bir biyomoleküler aktiviteyi engelleyen veya artıran herhangi bir faktör, oksidatif stresin oluşmasına veya güçlenmesine yardımcı olan bir faktör haline gelebilir (16).

2.4. Antioksidan Türleri

2.4.1. Oluşumlarına Göre Doğal veya Sentetik Antioksidanlar

2.4.1.1. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar çoğunlukla radikallerle reaksiyon verip onları kararlı reaktif olmayan ürünlere dönüştürürler ve genellikle zincir kıran antioksidanlar sınıfındadırlar (15). Çoğunluğu fenolik olan bu grup antioksidanlar şunları içerir:

- a. Antioksidan mineraller: antioksidan enzimlerin kofaktörleridirler. Bakır, demir, çinko, manganez ve selenyum bunlara örnek gösterilebilir. Kofaktörlerin eksikliği veya yokluğu, karbonhidrat ve lipidler gibi birçok makromolekülün metabolizmasını etkileyecektir (15).
- b. Antioksidan vitaminler: metabolizma için önemlidirler ve C, E ve B vitaminleri gibi çoğu vücut metabolizmasında koenzim olarak işlev görürler (15). Bu dolaylı etkilerinin yanında doğrudan antioksidan etkiye de sahiptirler.
- c. Fitokimyasallar: Bunlar mineral ya da vitaminler arasında olmayan, çoğunluğu fenolik ve terpenoid yapıda olan bileşiklerdir. Örnek bileşikler arasında flavonoidler, kateşinler, karotenoidler (karoten, likopen), kurkumin ve türevleri, bunları içeren örnek bitkiler arasında da biberiye, kekik, hindistan cevizi, karanfil, karabiber, zencefil, sarımsak vb otlar ve baharatlar sayılabilir (15).

2.4.1.2. Sentetik Antioksidanlar

Bunlar, sentetik olarak üretilen ve serbest radikalleri yakalama ve zincirleme reaksiyonu durdurma aktivitesine sahip çok çeşitli yapıda olabilen, piyasada bulunanların bazıları fenolik olan bileşiklerdir. Yaygın kullanılan sentetik antioksidanlar bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), propil galat (PG), tersiyer bütıl hidrokinon (TBHQ), metal kelatlayıcı EDTA ve nordihidroguaiaretik asit (NDGA) olarak örneklenebilir (16).

2.4.1.3. Kinetik Olarak Antioksidanların Sınıflandırılması

- Peroksil radikalleri ile reaksiyona girerek zincir reaksiyonları kırabilen zayıf O-H veya N-H bağları, fenol, naftol, hidrokinon, aromatik aminler ve aminofenoller içeren antioksidanlar (15).
- Alkil radikalleriyle reaksiyona girerek zincir reaksiyonları kırabilen kininler, nitronlar ve iminokinonlar gibi antioksidanlar (15).
- Aromatik aminler, nitroksil radikalleri ve yapısındaki metal iyonunun yük değiştirebildiği bileşikler gibi döngüsel süreçleri sonlandıran antioksidanlar (15).
- Sülfür, fosfit ve tiyofosfat benzeri hidroperoksit dönüştüren antioksidanlar (15).
- Metali deaktive edici diaminler, hidroksil asitler ve iki işlevli bileşikler gibi antioksidanlar (15).
- Fenolik grubun hidroperoksit ile peroksil radikalleri, sülfür grubu ile reaksiyona girdiği fenolik sülfidler dahil birçok antioksidanın sinerjistik etkisi (15).

2.5. Antioksidanların Etki Mekanizması

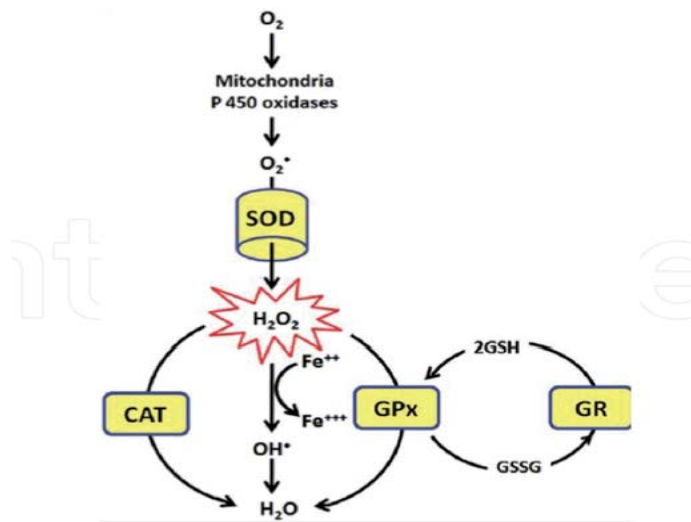
2.5.1. Önleyici Mekanizma

Metabolizmanın ürünleri olan H_2O_2 , $O_2^{\bullet}$ ve $OH^{\bullet}$ gibi ROSların yüksek seviyeleri oksidatif strese neden olur. Organizmalar oksidatif stresin meydana getirdiği hasarı önlemek ve azaltmak için çeşitli antioksidan sistemlere sahiptirler. Protein yapıdaki hücre içi antioksidan enzimler, serbest radikal oluşumunu veya artmasını engeller. SOD, CAT, GPx, GR, GST, tioredoksin redüktaz ve hemeoksijenaz en işlevsel olan antioksidan enzimlerdir. SOD enzimleri süperoksit ($O_2^{\bullet}$) radikalini H_2O_2 'ye dönüştürür. H_2O_2 da CAT ve GPx enziminin katalizlediği reaksiyonlarla ve Fenton reaksiyonu ile suya dönüştürülür. Bu sayede reaktif olan $O_2^{\bullet}$ ve H_2O_2 zararsız suya dönüştürülmüş olur (17).

Metabolizma sırasında oluşan peroksitler GST ve GPx aracılığıyla elimine edilir. Glutasyon (GSH) / okside glutasyon (GSSG) oranı, bilinen bir oksidatif stres indeksidir. GRd (Glutasyon redüktaz), GSH ve GSSG eşdeğerini düzenler. GRd'nin aktivitesi sayesinde organizmadaki oksidasyon durumunu koruyan GSH konsantrasyonu ihtiyaç duyulan seviyelerde tutulmuş olur. Oksidatif stresin birçok hastalığın ilerlemesinde ve klinik semptomların artmasında rol oynadığı bilinmektedir. Örnek olarak yakın zamanda yapılan otistik ve kontrol grupları ile yapılan karşılaştırma çalışmalarında, kontrol hücrelerine kıyasla GSH / GSSG oranında bir düşüş ve otizmde serbest radikal oluşumunda bir artış olduğu gösterilmiştir (17,18).

GPx hücre sitolazmasında bulunurken, CAT genellikle peroksizomlarla sınırlıdır. Serbest radikal hasarına karşı oldukça hassas olan beyinde GPx aktivitesi CAT aktivitesine göre yedi kat daha fazla bulunmuştur. Ayrıca, CAT'ın en yüksek seviyeleri, H_2O_2 'nin çoğunun parçalandığı karaciğer, böbrek ve eritrositlerde gözlemlenmektedir (17).

Çeşitli yollarla oluşan H_2O_2 CAT ve GPx kataliziyle suya dönüştürülür. GPx iki GSH molekülünden hidrojen alarak H_2O_2 'yi nötralize eder ve okside GSSG oluşturur. Ürün olan GSSG'den GR kataliziyle antioksidan iki GSH yeniden oluşturulur. Enzimatik antioksidan savunmanın temel bileşenlerinden CAT, H_2O_2 'yi suya dönüştürerek zararsız hale getirir. Fenton reaksiyonu ile H_2O_2 ayrıca ileri derecede reaktif olan $OH^\bullet$ radikale ve sonrasında Fe^{2+} 'nin Fe^{3+} 'e oksidasyonu üzerinden suya dönüştürülür (17, 18).



Şekil 1. Antioksidan enzim sistemi (17)

2.5.2. Serbest Radikal Temizleyiciler

Baskın bir hücrel serbest radikal olan süperoksit ($O_2^{\bullet -}$), genellikle düşük konsantrasyonda antioksidanlarla bağlantılı olan ve peroksidatif süreçlerdeki artışla ilişkilendirilen çok sayıda zararlı değişikliğe katkıda bulunur. $O_2^{\bullet -}$ 'in kendisi biyomoleküllere karşı çok reaktif olmasa da, en reaktif radikaller arasında yer alan $OH^{\bullet}$ üretimine aracılık eder. Ayrıca patojen öldürme işlemi sırasında NADPH oksidaz enzimi aracılığıyla fagositlerde büyük miktarlarda H_2O_2 , $ONOO^-$ ve $O_2^{\bullet -}$ oluşur. Bu türler ayrıca mitokondriyal solunumun bir yan ürünüdür (17).

Yenilebilir yağların bozulmasının temel nedeni lipid oksidasyonudur. Oluşan lipid oksidasyon ürünleri, yağın duyu özelliklerini değiştirerek ve besin değerlerini düşürerek yağın içeriğinde bulunduğu gıda ürününün kalitesini olumsuz etkiler. Oksidasyonla bozulmuş gıdalar toksik bileşenler içerebilir ve sağlığı olumsuz yönde etkileyebilirler. Potansiyel olarak kalp-damar hastalıkları, kanser gibi çeşitli hastalıklara ve erken yaşlanmaya neden olabilirler (18).

Çoğu bitkisel yağlar içinde bulunan ω -3 ve diğer doymamış yağ asitleri, sağlıklı bir diyetin temel bileşenleridir. Ancak, aynı zamanda yapılarındaki reaktif çifte bağlar nedeniyle peroksidasyona duyarlıdır. Gıda işleme endüstrisinde BHA (butilhidroksianisol), BHT (butilhidroksitoluen), TBHQ (tert-butilhidrokinon) gibi sentetik antioksidanlar, doğal antioksidanlar, yağlı bitki tohumlarından ekstraktlar, bitkisel yağlar biberiye, kekik, zeytin gibi sentetik antioksidanların kullanılması yaygın bir uygulama olmasına rağmen atık kek özü, karanfil (*Syzygium aromaticum*) ve tarçın (*Cinnamomum zeylanicum*) gibi bitki özleri giderek daha popüler hale gelmektedir. Sentetik antioksidanlar, toksik veya kanserojen, tahriş edici ve enzim sentezi ve aktivitesi üzerinde olumsuz bir sağlık etkisine sahip olabilir. Ayrıca ticari kullanılan BHA gibi sentetik antioksidanlar nükleik asitlere bağlanabilir, DNA'ya zarar verebilir ve sitotoksik veya mutajenik aktivite gösterebilirler (17).

Gıdalardaki lipitleri, oksidasyonun neden olduğu değişikliklerden korumak için meyve işleme atıklarının uygulanabilirliğine ilişkin önceki raporlar vardır. Meyve özlerinin yüksek antioksidan aktivite göstermeleri, çoğunluğu fenolik olan antioksidan bileşenlerinin seviyesine ve yapılarına bağlıdır. Örneğin bir gıda işleme atığı olan elma özünün birçok değerli doğal antioksidan ve biyoaktif bileşik içerdiği bilinmektedir. Meyve suyu üretiminde presleme sonucu oluşan atıklar, genellikle hayvan yemi veya gübre olarak

kullanılmaktadır. Bazı atıklar da et ürünlerinin ve pirinç bazlı krakerlerin kararlılığını artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Meyveler fenolik antioksidan bileşikler açısından zengin değerli bir kaynaktır. Belirli bitkisel yağlar veya balık yağları hayvan beslenmesi için kullanıldığında et veya sütteki yağ asidi profilinde değişiklikler kolaylaşabilir. Son yıllarda, CLA veya ω -3 asitleri artırma potansiyeline sahip yağlı katkı maddelerinin kullanımına özellikle ilgi artmıştır. Yapılan çalışmalar, elma hamurunun oksijensiz şartlarda depolanan numunelerdeki yağların kararlılığını önemli ölçüde artırdığını göstermiştir. Bir araştırmada elma posasının antioksidan aktivitesi, keten tohumu ve balık yağlarının oksijensiz koşullarda depolanmasında doğal bir antioksidan olarak değerlendirilebileceği ortaya konmuştur (17, 18).

Çeşitli çalışmalarda, antioksidanların farmasötikler, gıda ürünleri, kozmetikler ve diğer biyokimyasallar gibi ürünlerin stabilitesini ve raf ömrünü artırabildiği gösterilmiştir. Bu amaçlar için antioksidanlar, ilaçların üretimlerinde ve formülasyonlarının geliştirilmesinde gün geçtikçe daha popüler hale gelmektedir. Fotoduyarlı ilaçlar, son ürüne kadar kullanımdan hafif koruma gerektirir. Fotokoruma, harici veya dahili koruma yoluyla elde edilebilir. Dış koruma, radyasyonun, kapsül ve tabletlerde olduğu gibi, uygun ambalajlama veya kaplama kullanımı yoluyla formülasyona ulaşmasını engeller. Stabilizatörlerin eklenmesi ile dahili koruma sağlanabilir. Bu maddeler radyasyonu ilaca göre daha hızlı absorbe edebilmeli veya fotoreaksiyonu baskılayarak etki edebilmelidir. Bazen antioksidanlar hem stabilize edici etkileri hem de bazı biyolojik aktiviteleri aynı anda veriyor. Bu nedenle birden fazla etkili bileşenlerin üretilmesi ve bileşenlerin hedef ürün ortamında gösterdiği biyoaktiviteyi belirleyen yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır (17, 18).

2.6. Antioksidan Testler

İyonların transferine, çalışma tekniklerine ve substrata bağlı olarak antioksidan yöntemler farklı şekillerde kategorize edilirler (18).

a. Hidrojen Atom Transferi yöntemleri (HAT) (18, 19, 20)

- i. Oksijen radikal absorbans kapasitesi (ORAC)
- ii. Lipid peroksidasyon inhibisyon kapasitesi (LPIC)
- iii. Toplam radikal yakalama antioksidan parametresi (TRAP)
- iv. Engellenen oksijen alımı (IOC)

- v. Krosin ağartma nitrik oksit radikal inhibisyon aktivitesi
- vi. P-NDA (p-butrisidunethyl anilin) ile hidroksil radikal temizleme aktivitesi
- vii. H_2O_2 radikal süpürme
- viii. ABTS radikal süpürme
- ix. Alkali (SASA) ile süper oksit radikal oluşumunun temizlenmesi

b. Elektron Transfer yöntemleri (ET) (19, 20).

- i. Troloks eşdeğeri antioksidan kapasitesi (TEAC)
- ii. Renksizleştirme
- iii. Ferrik azaltıcı antioksidan güç (FRAP)
- iv. DPPH serbest radikal süpürme
- v. Bakır (II) azaltma kapasitesi
- vi. Folin-Ciocalteu yöntemiyle toplam fenolik içerik
- vii. N, N-dimetil-p-fenilendiamin (DMPD)

c. Elektrokimyasal Teknikler (19)

- i. Döngüsel voltametri
- ii. Amperometri
- iii. Biyamperometri

d. Kromatografi (19)

- i. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC Sistemi)

2.7. HPLC Sistemi ve On-line HPLC-Antioksidan Yöntemler

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC), klasik kolon kromatografisinden sabit faz partikül boyutunun küçültülmesi sayesinde türetilmiştir ve bugün analitik kimyanın en önemli araçları arasında yer almaktadır. HPLC’de amaç, numunenin bir çözeltisinin gözenekli sabit faz içeren bir kolona enjekte edilmesi ve hareketli fazın kolondan yüksek basınçta pompalanmasıyla bileşenlerin birbirinden ayrılmasıdır. Numunenin ayrılması, bileşenlerin sabit ve hareketli fazlar arasındaki etkileşim

farklılığından kaynaklanan göç oranlarındaki farklılıklara dayanmaktadır. Farklı bileşenler etkileşim farklılığına bağlı olarak, farklı zamanlarda kolondan çıkarlar (21).

Kromatografi, ilk olarak 1903 yılında Rus botanikçi M.S. Tswett tarafından uygulanmıştır. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, sadece uçucu ve termal dayanıklı bileşenlerle sınırlı olmayıp çeşitli boyutta ve polaritede bileşiklerin ayrılmasında kullanılabilir ve hareketli ve sabit fazların çeşitliliği sayesinde gaz kromatografisinden (GC) daha çok yönlüdür (21). Klasik sıvı kromatografisi (LC) tekniğine kıyasla HPLC, aşağıdaki özellikleriyle karakterize edilir (21).

- Yüksek çözünürlük.
- Küçük çaplı (4,6 mm) kolonlar.
- Çok küçük (3, 5 ve 10 µm çaplı) sabit faz partikülleri.
- Yüksek giriş basıncıyla sağlanan kontrollü hareketli faz akışı.
- Düşük akış hızlarında çalışabilen, çok düşük analit seviyelerinde sinyal oluşturan sürekli akış dedektörleri.
- Hızlı analiz

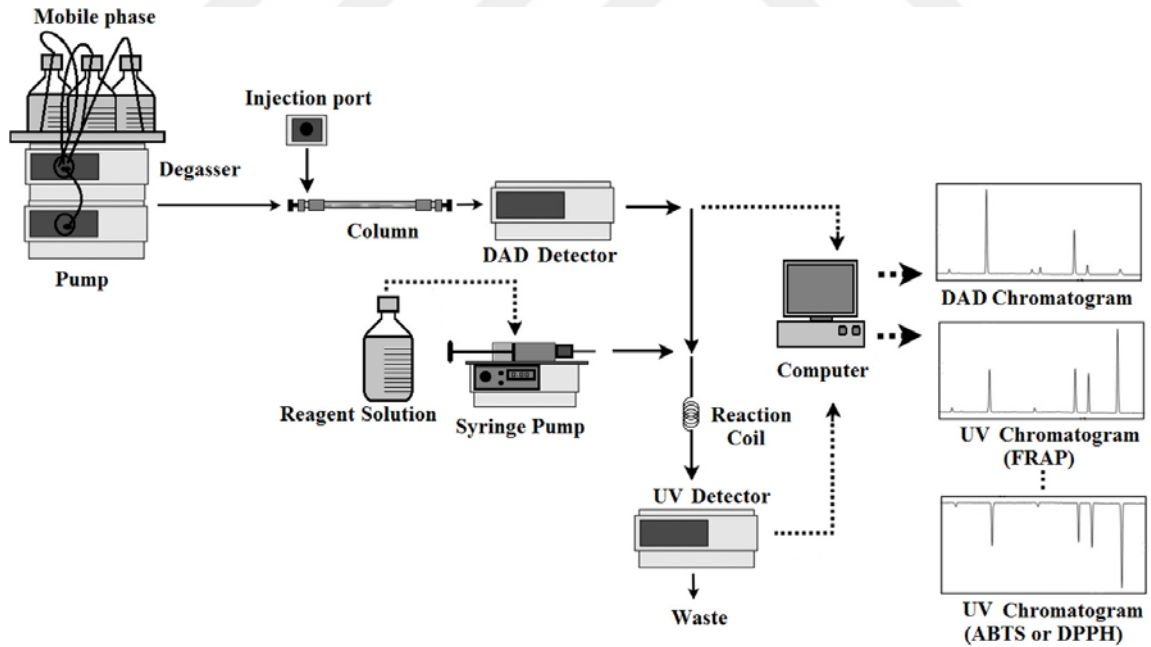
HPLC analitik yöntem geliştirme ve doğrulama işlemleriyle, ilaçların keşfi, geliştirme ve üretiminde yaygın karşılaşılar. HPLC yöntemleri ilaç bileşenlerinin kimliğini, saflığını ve etkinliğini belirlemede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (22). Yöntem geliştirme sürecinde dikkate alınması gereken çok sayıda faktör vardır. İlk olarak analitin fizikokimyasal özellikleri (pKa, log P, çözünürlük) hakkında bilgi toplanır ve hangi tayin yönteminin analiz için uygun olacağı (örneğin, UV kullanılması durumunda uygun dalga boyu) belirlenir. Analitik geliştirme çabalarının çoğu, kararlılığı gösteren bir HPLC yönteminin doğrulanmasına gider. HPLC yöntemi ana ilaç aktif bileşenini, herhangi bir reaksiyon karışımındaki bileşenleri, mevcut tüm sentetik ara maddeleri ve herhangi bir bozucu maddeyi ayırma sonrası ölçme amacıyla kullanılır (22).

Yöntem geliştirmede yer alan adımlar genellikle şunlardır (22):

1. Analitin fizikokimyasal özelliklerinin tespiti
2. Uygun HPLC şartlarının belirlenmesi
3. Uygun örnek çözündürme işleminin belirlenmesi

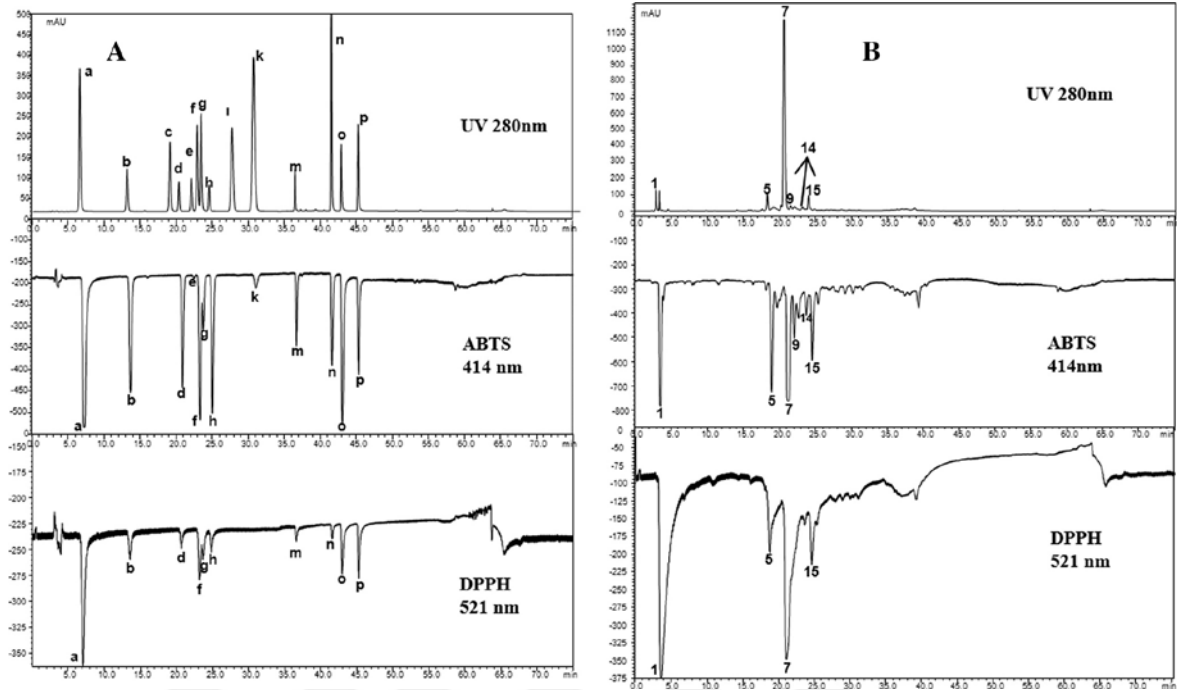
4. Çeşitli parametreler (polarite, akış hızı vs) açısından yöntem optimizasyonu
5. Yöntemin geçerliliğinin (validasyon) yapılması

Çevrimiçi (on-line) analitik kromatografi, farklı türler için sunduğu benzersiz sağlamlığı, yüksek çözünürlüğü ve özgülüğü nedeniyle çevrimdışı HPLC sisteminde bulunan bu sınırlamaların üstesinden gelir. Çevrimiçi HPLC, bileşen üretim aşamasında ürün saflığını gerçek zamanlı olarak ölçmeye imkan sağlar. Bu da operasyonel verimliliğin önemli ölçüde artmasını, ürün kalitesinde değişkenliğin azalmasını, dolayısıyla da otomasyon ve kontrol sağlar. Çevrimiçi uygulamaların farmasötikler, kimyasallar ve elektronikler dahil endüstriyel süreçlerde geniş çapta kullanıldığı görülmektedir. Literatürde farklı kromatografi modaliteleri için çevrimiçi HPLC kullanımını araştıran çok sayıda vaka çalışması da bulunmaktadır. Ek olarak, sürekli üretim durumunda, kritik kalite özneliliğinin (CQA) çevrimiçi olarak izlenmesi bir ön koşul olarak ürün kalitesini ve tutarlılığını sağlamak amacıyla karşımıza çıkmaktadır (23).



Şekil 2. On-line HPLC kolon sonrası antioksidan ayırma sisteminin şeması (24)

Aşağıda bir online-HPLC-Antioksidan çalışmanın sonuçlarının nasıl olacağına dair grubumuzda elde edilmiş kromatogram örnekleri vardır.



Şekil 3. Standart fenolik bileşik karışımının ve *Viburnum opulus* suyunun on-line HPLC-antioksidan analizleri (25)

2.8. DPPH Testi

Kararlı bir serbest radikal olan DPPH $\cdot$ (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) koyu mor renkli kristal bir toz şeklinde bulunur. DPPH' nin laboratuvar araştırmalarında karşılaşılan iki ana uygulaması vardır. Bunlardan biri radikalleri içeren kimyasal reaksiyonların izlenmesidir, diğeri ve en önemlisi de, alkolde mor renkli çözeltinin renginin elektron transferiyle sarı renge döndüğü yaygın bir antioksidan yöntemdir. Oda sıcaklığında katı halde oldukça kararlı olan bu serbest radikal, çözelti ortamında antioksidan varlığında onunla reaksiyona girerek indirgenme ürünleri oluşturarak renksiz veya açık sarı renkli çözeltiye yol açar. DPPH testi ile antioksidanların potansiyeli spektrofotometrik olarak kolay ve hızlı bir yolla belirlenir, bu yöntemle kısa sürede çok sayıda örneğin aktivitesi belirlenebilir (26, 27, 28).

2.9. ABTS Testi

ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) enzimatik reaksiyon kinetiğinin araştırıldığı bazı biyokimyasal araştırmalarda kullanılan bir kimyasaldır. Bunun yaygın bir kullanımı, moleküllerin birbirine bağlanıp bağlanmadığını tespit etmek için enzime bağlı immünosorbent testinde (ELISA) kullanılır. Genellikle hidrojen peroksitle birlikte (yaban turpu peroksidazı gibi enzimler için) veya tek başına (lakkaz veya bilirubin oksidaz gibi mavi çok noktalı oksidaz enzimleriyle) substrat olarak kullanılmaktadır.

ABTS kullanımıyla peroksidazların reaksiyon kinetiklerinin izlenmesi mümkün olmaktadır. Bu sayede, H₂O₂ üreten herhangi bir enzimatik reaksiyonun kinetiğini dolaylı olarak incelemek ya da bir örnekteki H₂O₂ seviyesini ölçmek amacıyla da kullanılabilir (29, 30).

ABTS testi, oluşan serbest radikallerin kendine özgü kimyasal özelliklerine dayanarak, gıda ürünlerinin antioksidan kapasitesini belirlemek için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, bitkilerde yaygın olarak bulunan fenolik bileşikler, insan vücudunda oluşan serbest radikalleri bertaraf edebilir ve bu sayede serbest radikallerin oksidatif zararını önleyebilir. Bitki antioksidanlarının bu kapasitesi ABTS yöntemiyle belirlenebilmektedir. Bitki özütü veya gıda ürününden elde edilen ekstrakt veya süzütünün antioksidan gücü ABTS testi ile spektrofotometrik olarak belirlenmektedir. Bu yöntemin uygulandığı bir örnek hibisküs içeren ürünlerin antioksidan aktivite analizi üzerine yapılan çalışmadır (30, 31).

2.10. Peroksinitrit Temizleme Testi

Peroksinitrit, biyolojik ortamlarda nitrik oksit ve süperoksit radikalleri arasındaki hızlı reaksiyonla oluşan ve radikal olmayan güçlü bir oksidandır. Peroksinitrit anyonu nispeten kararlı olmasına rağmen pH 7.4'te yaklaşık bir saniye yarı ömürle ayrılan kararsız bir tür olan peroksinitröz aside hızla protonlanmakta. Peroksinitrit, azot dioksit, nitronyum iyonu ve çeşitli biyolojik moleküllere karşı hidroksil radikal benzeri reaktiviteye sahip bir ara ürün dahil olmak üzere güçlü reaktif türlerin oluşmasına öncülük yapmakta, dolayısıyla da biyomoleküllerde önemli hasara sebep olabilmektedir (32, 33, 34).

Daha önceki ilgili çalışmalarda çok sayıda komplikasyon vardır ve uygulanması daha zor olan birkaç adım görülmüştür ve bu yöntem uygulanırken en iyi sonucu almak için çok fazla önlem alınması gerekmektedir. Boşluğu doldurmak için, daha güvenilir ve daha etkili bir çevrimiçi yöntem içeren yeni geliştirilmiş bir yönteme ihtiyaç vardır (35, 36, 37).

2.11. Ekstraktı Hazırlanan Bitki ve Özellikleri

2.11.1. Kına (*Lawsonia inermis*)

Kına, *Lawsonia inermis* adı verilen bitkinin yaprağından elde edilen ve doğal boya olarak kullanılan bir bitkidir. Bu yaprak özü, bir sanat formu olarak cilt üzerinde leke

retmek için kullanılır. Ekstraktın kalitesi iyiye, leke birkaç gün kalabilir ve bu da deriden pul dökülme ile yıpranabilir.

Bitki zellikle Afrika, güney Asya ve kuzey Avustralya'nın tropik, subtropik ve yarı kurak bölgelerinde görülmektedir. Kınadan, naftokinon türevlerini (baş bileşen olan lawsone) içeren çok çeşitli kimyasal bileşenler izole edilmiştir ve yapraklardaki renklendirici maddeler, fenolik türevler, kumarinler, ksantonlar, tanenler, flavonoidler, alifatik bileşenler, triterpenler, steroller ve glikoz, gallik asit, amino asitler, mannitol, eser elementler ve mineraller gibi diğerkimyasal bileşenlerin tespiti yapılmıştır.

Tıbbi bir bitki olarak kına, halk ilacı olarak büzücü, hipotansif, yatıştırıcı olarak ve baş ağrısı, sarılık ve cüzam hastalığına karşı etkisi nedeniyle kullanılmaktadır. Kına yapraklarının ayrıca bazı cilt hastalıkları, zührevi hastalıklar, iek hastalığı ve spermatorrhea tedavisinde de kullanıldığı bildirilmiştir. Güçlendirilmiş tohumların dizanteri ve karaciğerk rahatsızlıklarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir. Kabuk, yanıklar, sarılık, dalak büyümesi, diş taşı, cüzzam ve cilt bozuklukları gibi çeşitli durumlarda kullanılır. Kök, bel soğukluğu, uçuk enfeksiyonu, ağrılı gözler, düşük yapma ve bazı sinir bozukluklarının tedavisinde güçlü bir ilaç olarak kabul edildi. Tohumlar karaciğerk rahatsızlıklarını hafifletebildiğinden, diğerk bitkilerin kısımlarının yan etkilerinden koruyucu etkileri araştırma konusudur.

190 derecelik bir erime noktasına sahip bir 2-hidroksi-1,4 naftakinon olan lawsone, kınadaki ana renkli ajandır. Gallik asit, glukoz, mannitol, lipidler, reçine, müsilaj ve eser miktarda alkaloid, lawson'a ek olarak bulunan diğerk bileşenler arasındadır. Yapraklardan eterde ve alkolde zneabilen kınatanik asit ve zeytinyağı yeşili reçine üretilmektedir. Glikozitler, fitosterol, tanenler, steroidal bileşikler ve flavonoidlere ek olarak, *L. inermis* yaprak özütü ayrıca birkaç fitokimyasal içerir. Alkollü ve sulu ekstraktlarda alkaloidler, lipidler, sabit yağlar, saponinler, fitosteroller, proteinler, uçucu yağlar ve amino asitler eksikti, ancak sakızlar, glikozitler, fenolik bileşikler, tanenler, müsilaj ve karbonhidratlar önemli miktarlarda bulunmaktadır. *L. inermis*'in topraküstü kısmının kimyasal yapısı nicel olarak analiz edilmektedir ve değerlendirilmektedir. Kına etil asetat ekstraktı diğerk fitokimyasallarla karşılaştırıldığında, toplam flavonoid seviyesinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bitki özünün antioksidan özellikleri, flavonoidlerin varlığı ile açıklanmaktadır. Etanol ekstraktında daha fazla antosiyanin bildirilmiştir. Etanol, sıcak su ve etil asetat zleri dahil olmak üzere her özde tanenler bulunan *L. inermis* bitkisi,

geleneksel tıpta romatizma, bronşit, hemoroid, ödem, adet düzensizlikleri ve hatta sarılık, cüzzam, rahatsızlık, dalak büyümesi, dizanteri, cilt sorunları dahil olmak üzere çok çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır.

Ek olarak, kına büzücü ve hemostatik özelliklerin yanı sıra hipotansif, kardiy engelleyici ve yatıştırıcı özelliklere sahiptir. Kınanın ayrıca hipoglisemik, iltihap önleyici, kanser önleyici ve antioksidan özellikler de dahil olmak üzere başka niteliklere sahip olduğu söylenir. Ayrıca hepatoprotektif ve tüberkülostatik etkileri vardır. *L. inermis* bitkisi geleneksel tıpta romatizma, adet düzensizlikleri, ödem, bronşit ve hatta hemoroid, cilt rahatsızlıkları, sarılık, cüzzam, dizanteri ve dalak büyümesi gibi çok çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Kına ayrıca yatıştırıcı özelliklere sahiptir. Ek olarak, kına antioksidanlar, bağışıklık uyarıcılar, tüberkülostatik, hipoglisemik, kanser önleyici, hepatoprotektif ve anti-enflamatuar olanlar gibi bir dizi başka niteliğe sahip bileşenlere sahiptir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Bu tezde kullanılan deney aletlerinin tümü, proje için araştırmada kullanıldıkları Karadeniz Teknik Üniversitesi laboratuvarlarından alınmıştır. Kullanılan cihazlar ve elde edildikleri firmaların isimleri aşağıdaki belgenin Tablo 2' inde belirtilmiştir:

Tablo 2. Kullanılan cihaz ve malzemelerin listesi

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Marka
HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)	Agilent 1100 Series Degasser (Gaz giderici) Agilent 1100 Series Quad Pump (Dörtlü Pompa) Agilent 1100 Series VWD (Ultra Viyole dedektör) Agilent 1200 Series DAD (Diyot serili dedektör)
Kolon	C18, Hichrom (250 mm * 4,6 mm i.d., 5 µm partikül)
Mikro filtre	RC
Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı	Heidolph/MR 3001 K Hei-standard
Otomatik pipet	Gilson (10-100 µL) & (100-1000 µL) & (1000-5000 µL)
Santrifüj	Universal 320 R Hettich/Zentrifugen
Plastik küvet	LP ITALIANA SPA Via C. Reale 15/4 20157 Milano/ ITALIA
Süzgeç kâğıdı	Whatman™ Cat No 1093 125
Şırınga	Hsw Norm-Ject 2-Part (20 mL) & (50 mL)
Şırınga pompası	Goldman syringe pump
Termometre	ISOLAB
UV-Vis Spektrofotometre	ATI Unicam UV2
Ultrasonik banyo	Bandelin
Vorteks karıştırıcı	IKA® Vortex Genius 3
Hassas Terazî	Mettler Toledo MS204
Derin dondurucu (-18°C)	Vestel
Çeker ocak	TEZ-SAN
Pastör pipet	ISOLAB

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Tablo 3, çalışmada kullanılan bileşiklerin ve çözücülerin yanı sıra bunları araştırmacılara sağlayan firmaların bir listesini içermektedir.

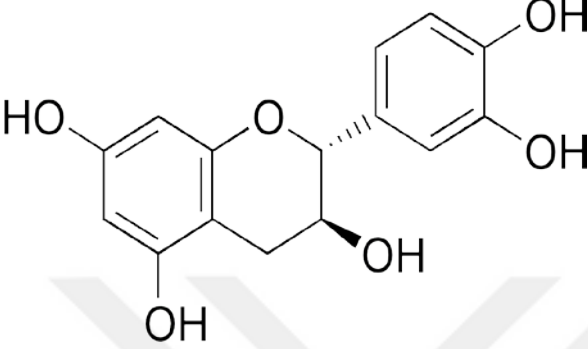
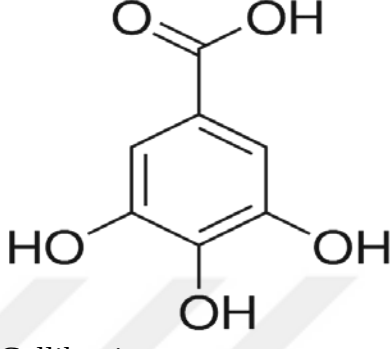
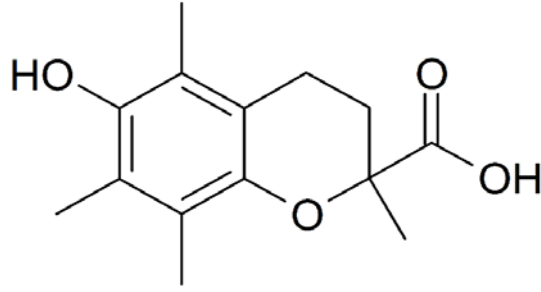
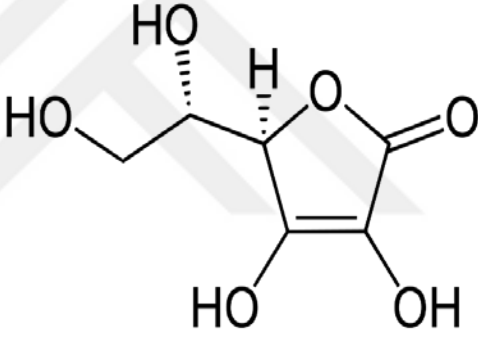
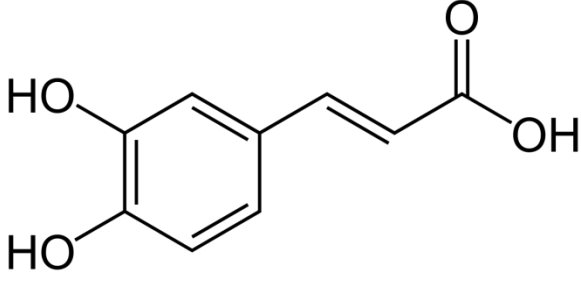
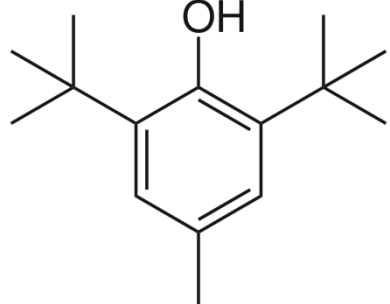
Tablo 3. Kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasal adı	Üretici firma
Asetonitril (HPLC grade)	Sigma-Aldrich
Asetik Asit (HPLC grade)	Carlo Erba
Gallik Asit	Sigma- Aldrich
Askorbik Asit	Sigma- Aldrich
Dibütilhidroksitoluen (BHT)	Sigma- Aldrich
2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH)	Sigma- Aldrich
Metanol (HPLC grade)	Merck
Kafeik Asit	Sigma- Aldrich
Kateşin	Sigma- Aldrich
Troloks	Sigma-Aldrich
Su (HPLC grade)	Millipore

3.3. Çalışmada Kullanılan Substratlar ve Antioksidanların Molekül Şekilleri

Substratın moleküler yapısı ve antioksidanlar aşağıdaki Tablo 4'te gösterilmektedir.

Tablo 4. Kullanılan antioksidanların yapısı

Substratlar	Antioksidanlar
 Kateşin	 Gallik asit
 Troloks	 Askorbik asit
	 Kafeik asit
	 Butillenmiş hidroksitoluen (BHT)

3.4. Bitki Toplanması ve Ekstraktının Hazırlanışı

Bu çalışmada kullanılan numunenin seçimi literatür taramasına ve potansiyel antioksidan aktiviteye göre yapılmıştır. Numune öncelikle yerel manavdan alındı ve numunede antioksidanlar zaten mevcut olduğu için numune doğrudan kullanıldı. İlk önce 5 g numune tartıldı ve daha sonra numune, konik bir şişede 50 mL saf su içinde çözüldü. Daha sonra balon alüminyum folyo ile kaplandı ve bir sonraki adım için parafilm ile kapatıldı. Daha sonra karışım manyetik karıştırıcıya yerleştirildi. 3 saat boyunca karıştırıldıktan sonra karışım 5200 rpm'de 30 dakika santrifüjlendi. Santrifüjleme sırasında katı faz, santrifüj tüpünün içindeki sıvı fazın altında çöktürüldü. Sıvı faz, çöken numunenin sıvıya geri dönmemesi için çok dikkatli bir şekilde toplandı. Sıvı çözelti toplandıktan sonra filtre kağıdından süzüldü ve birincil süzme işleminden sonra süzülen çözeltinin şeffaflığı çıplak gözle kontrol edildi. Numune yeterince şeffaf olmadığı için, solüsyon daha sonraki deneyler için HPLC makinesinde kullanıldığından istenmeyen çözünmeyen bileşenleri çıkarmak için solüsyon 0,45 ve 0,20 mikronluk şırınga ucu filtrelerden geçirildi. Süzme işleminden sonra numune mikro tüpte toplandı ve daha sonraki deneyler için buzdolabının dondurucu kısmında -18 °C'de saklandı.

3.5. HPLC-DAD-UV Koşulları

Bu çalışmada, dört farklı çözücü sistem pompasına sahip Agilent 1100 Serisi pompa, bir ultraviyole dedektörü (1100 Serisi) ve 1200 Serisi Diyot Dizi Dedektörü (DAD) içeren HPLC sistemi ile tüm deney ve analizler yapılmıştır. Makinenin performansını kontrol etmek ve verileri elde etmek için kullanılan uygulama sistemi "Chem Station"dır. Bu program Agilent Technologies Ltd. tarafından sağlanmıştır. Tüm HPLC analizlerinde ters faz Hichrom C18 kolonu (250 mm x 4.6 mm; 5 µm partikül; UK) kullanılmış, analizler 25 °C'de yapılmıştır. Numune enjeksiyonu için Hamilton şırınga kullanılmıştır. Şırınganın hacmi 25 µL idi. Analiz sırasında enjekte edilen toplam numune miktarı analiz için yeterli olan 20 µL'dir.

Deneylere başlamak için, tüm parçaların düzgün çalışıp çalışmadığı uygulama ile tüm süreç kontrol edildi. Onayın ardından sistem uygulama ile çalıştırıldı. Daha sonra çözücüler tüm sistemden geçirilmiş ve HPLC-UV-DAD sistemine uygun olacak uygun pikin elde edilmesi için tüm süreç için bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntem 30 dakikalık çözücü sistemi ile geliştirilmiştir. Bu geliştirilmiş çözücü sistemi, mümkün olan en iyi sonuçları elde etmek için hem standart numuneler hem de ekstraktlar için kullanıldı.

Her numune enjeksiyonu ve analizinden sonra, bir önceki numunenin temizlenebilmesi için 10 dakikalık bir temizleme işlemi uygulanmıştır.

3.6. HPLC Çözelti Sistemi ve Hazırlanışları

Bu tezin deneylerinde kullanılan solüsyonlar hazırlanışı Tablo 5'te verilmiştir.

Tablo 5. HPLC sisteminde kullanılan çözücülerin listesi

Çözelti	Çözelti İçeriği	Hazırlanışı
A	%2'lik CH ₃ COOH-Saf Su	2 mL CH ₃ COOH (%99.5'lik), 98 mL saf su ile karıştırılarak 100 mL çözelti hazırlandı.
B	%0.5 CH ₃ COOH-Asetonitril-Saf Su (1:1)	0.5 mL CH ₃ COOH (%99.5'lik), 49.75 mL Asetonitril ve 49.75 mL Saf Su ile karıştırılarak 100 mL çözelti hazırlandı.
C	%100 Asetonitril	Hazırlık için sadece Asetonitril çekilmiştir.

Analiz sırasında, solvent A'nın %90'ı, solvent B'nin %10'u çalıştırıldı ve solvent C, başlangıçta %0 olarak kaldı ve 10. dakikaya kadar devam etti. 11. dakikada karışım oranı, %30 solvent A ve %70 solvent B olacak şekilde değiştirildi. Solvent C, %0 olarak kaldı. Karışım 20. dakikada tekrar %20 solvent A ve %80 solvent B ile değiştirildi ve sonraki %10 solvent A ve %90 solvent B 25. dakikada değiştirildi. Bu zamana kadar Solvent C %0 olarak kaldı. 27. ila 29. dakikada karışım, %20 Çözücü B ve %80 çözücü C olarak değiştirildi. Bu süre boyunca çözücü A'nın oranı %0 olarak kaldı. 30. dakikada çözücü karışımının oranı %90 çözücü A, %10 çözücü B ve %0 çözücü C olarak değiştirildi.

Analizden sonra, önceki numunenin bir sonraki numuneyle kesintiye uğramaması için kolonu başka bir analiz yapmak üzere 10 dakikalık temizleme prosedürü geliştirildi. Temizleme işlemi sırasında, başlangıçta %90 solvent A ve %10 solvent B. 2. dakikada karışım %20 solvent A ve %80 solvent C olarak değiştirildi. Bu karışım 6. dakikaya kadar

devam ettirildi. Daha sonra 7. dakikada karışım %10 solvent A ve %90 solvent C ile değiştirildi ve 9. dakikaya kadar devam edildi. Bu süre boyunca solvent B %0 olarak kaldı. Sonunda karışım tekrar başlangıçtaki bileşim olan %90 solvent A, %10 solvent B ve %0 solvent C'ye döndürüldü.

3.7. Geliştirilen Yeni Yöntem

Yeni yöntem, analitin bir substrat varlığında antioksidan (substratı oksidasyondan koruyucu) aktivitesini belirlemek için geliştirilmiştir. Yöntem, substrat (S), antioksidan (A) ve DPPH (D) olmak üzere üç bileşen içerir. Substratın korunmasını sağlamak için antioksidan miktarı da araştırıldı.

Bu çalışma için uygun substratların ve antioksidanların seçimi ilk gereklilikti. Ve aynı anda farklı antioksidanlar ve antioksidan aktivite içerebilecek moleküller kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla, birkaç bileşenle çeşitli testler yapılmış ve birkaç bileşenle analizler yapılmıştır. DPPH mevcudiyetinde kimyasal özellikler ve antioksidan aktiviteler arasında, kateşin ve Troloks daha ileri çalışmalar için substrat olarak seçilmiştir. Substrat seçimi, kimyasal konfigürasyonların sonucuna ve testlerden elde edilen bulgulara göre yapıldı.

3.7.1. DPPH'den Farklı Antioksidanların Varlığında Substrat Korumasının Gözlemlenmesi

Substratların DPPH'den korunmasını gözlemlemek için farklı antioksidanlar kullanılır. Antioksidanlar, DPPH mevcudiyetinde substratlar açısından oldukça güçlüdür. Bu deneylerin odak noktası, DPPH varlığında her iki substrat için belirli bir koruma konsantrasyonu bulmaktır. Bu spesifik konsantrasyonun seçimi aşağıda açıklanmıştır.

3.7.1.1. Gallik Asit

Güçlü antioksidanlardan biri olan Galik Asit bu süreçte birincil antioksidan olarak kullanılmıştır. Bu antioksidan, substratların DPPH'den gerçek korunmasını kontrol etmek için farklı konsantrasyonlarda kullanılır. Bu işlemde kullanılan çözücü, daha önce tartışıldığı gibi metanoldür. Bu antioksidanların Troloks (200 μ M) ve Kateşin (400 μ M) gibi her iki substrat üzerinde kullanımı aynı yöntemle yapılmıştır. Üç reaktanı ekleme sırası şu sıradaydı: birincisi, substrat veya substratın solventi; ikincisi, antioksidan veya antioksidanın çözücüsü; ve üçüncüsü, DPPH veya DPPH'nin çözücüsü. Daha önce tartışıldığı gibi, tüm süreç için ortak çözücü, Metanol kullanıldı. İnkübasyon süresi,

reaktanların eklenmesinden sonra 1 saat veya 60 dakika olmuştur. Oda koşulları 25°C'de tutuldu.

Kateşin için, kateşin 285 nm'de ölçüldüğü için HPLC sisteminin durumu değiştirilir. A, B ve C gibi mobil fazdaki üç çözücü kontrol edildi ve sürekli akış için her zaman muhafaza edildi. Akış hızı 0.7 mL/dk'ya ayarlandı. HPLC makinesi, güvenlik için sürekli olarak kontrol edildi ve kontrol edildi. İlk reaktantlar, reaktan kabına sırayla ilave edildi ve daha sonra reaksiyonu tamamlamak için karanlık bir yerde 1 saat inkübe edildi. Tepkimeye girenlerin eklenmesi için önce kateşin, ardından Galik Asit ve son olarak da her birinin 1 ml miktarında DPPH eklendi. İhtiyaca göre, alt tabakanın tamamen korunduğu ilk alt tabaka numunesi. Bu reaksiyon kabına, 1 mL substrat çözeltisi, 1 mL Galik Asit (metanol) çözücüsü ve 1 mL DPPH (metanol) çözücüsü ilave edildi. İnkübasyon 1 saat süreyle yapılmıştır. İnkübasyondan sonra numuneyi analiz etmek için numuneden 20 µL enjekte edildi. HPLC yöntemi daha önce belirtildiği gibi ve analiz buna göre 30 dakika boyunca yapıldı. Her analizden sonra yaklaşık 10 dakika süren temizleme işlemi yapılmıştır. Analiz edilen numunenin verileri daha fazla analiz için belgelendi. Verilerin kesin ve doğru olduğundan emin olmak için analiz tekrarlandı. İlk numuneden sonuç alındıktan sonra, reaktantlarda değişiklikler yapıldı. Bu analizde, reaktantların dizisindeki ekleme ve miktarlar aynıydı. Ancak substratın DPPH'den korunmasını gözlemlemek için çözücüleri yerine DPPH ve Galik Asit kullanıldı. Galik asit, 1 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 300 µM ve 500 µM gibi farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Kateşin ve DPPH konsantrasyonları buna göre 200 µM ve 1000 µM idi. Her numune analizinden sonra temizleme prosedürü yapılmıştır. Bu temizleme prosedürü, yeni numuneyle etkileşime girebilecek kolondaki önceki numunenin çıkarılmasını doğruladı. Toplanan veriler daha sonra DPPH varlığında Galik Asitli Kateşin için koruma konsantrasyonunu belirlemek üzere daha fazla analiz için kaydedilir.

Troloks için, HPLC sisteminin tespiti, denemelerden Troloks'un zirvesinin gözlemlendiği 290 nm olarak değiştirildi. HPLC sisteminde mobil faz olarak solvent A, B ve C kullanıldı. Mobil faz akış hızı 0.7 mL/dak olarak kullanıldı. Bu, bu tip HPLC sistemi için optimum akış hızıdır. Reaktantlar, substrat, antioksidan ve DPPH sırasına göre reaksiyon kabına ilave edildi. İnkübasyon süresi 1 saat olup reaksiyonun tamamlanması için karanlıkta tutulmuştur. Analizin sürekli ve eş zamanlı olması için numunenin hazırlanması eş zamanlı olarak yapılmıştır. Substratın pik alanını bilmek ve gözlemlemek

için 1 mL Troloks çözeltisi ilave edildi ve Galik Asit ve DPPH'ye göre her iki maddenin çözücüsü, metanol 1 mL'de eklendi. Böylece reaksiyon kabındaki analitin toplam hacmi 3 mL olmuştur. İnkübasyondan sonra pik alanı ölçüldü ve veriler daha fazla analiz için kaydedildi. Deney, tüm numuneler için paralel ve aynı anda yapıldı. Daha önce tartışıldığı gibi, numune etkileşimlerini önlemek için numunenin her analizi ve enjeksiyonundan sonra temizleme işlemi aynı anda yapıldı ve temizleme prosedürü genellikle 10 dakika sürer. Analiz ve temizleme işlemi sırasında akış hızı 0.7 mL/dk olarak aynı kalmıştır. Pik alanı ve bu substratın verileri alındıktan sonra, substratın DPPH'den korunmasını gözlemlemek için farklı antioksidan konsantrasyonları kullanıldı. Galik Asidin farklı konsantrasyonları 10 µM, 20 µM, 50 µM, 100 µM, 300 µM, 500 µM, 600 µM, 800 µM, 1000 µM, 1200 µM, 1500 µM ve 2000 µM idi. Galik Asidin farklı konsantrasyonlarında substratın pik alanları, daha fazla analiz için kaydedildi. Tüm analizler en az çift paralelli olarak yapılmıştır. Tüm analitik süreç boyunca oda sıcaklığı kontrol edildi ve 25 °C'ye ayarlandı. Analizden sonra, numunenin kolondan tamamen çıkarıldığını doğrulamak için temizleme prosedürü tekrarlandı. Temizleme süreci, süreç çok önemli olduğu için bu şekilde tasarlanmıştır.

3.7.1.2. Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT)

Bütillenmiş hidroksitoluen veya BHT, potansiyel antioksidanlardan ve tüm deneylerdeki önemli antioksidanlardan biridir. Bu bütillenmiş hidroksitoluen, kateşin (400 µM) ve Troloks (200 µM) gibi her iki substratın DPPH'ye (1000 µM) karşı korumasını gözlemlemek için farklı konsantrasyonlarda kullanıldı. Tepkime maddelerinin reaksiyon kabına eklenmesi, önce substrat (kateşin veya Troloks), ardından antioksidan (Bütillenmiş hidroksitoluen) ve son olarak DPPH gibi öncekiyle aynıydı. Karıştırma işleminden sonra reaksiyonun tamamlanması için 1 saat karanlıkta inkübasyon yapıldı. Tüm prosedür sırasında oda sıcaklığı 25°C'de sabit tutuldu. Analitik prosedür aşağıda verilmiştir.

Kateşin için HPLC sistemi korunur ve kontrol edilir ve algılama sisteminin dalga boyu 285 nm'de tutulur. Sofistike ve çok hassas bir sistem olması nedeniyle, HPLC makinesi her zaman gözetim altındaydı ve solvent sistemi her zaman kontrol altındaydı. Solvent sistemi, Solvent A, B ve C gibi üç farklı solventten oluşur. Solvent karışımı daha önce tartışılmıştı. Analiz sırasında çözücünün oranı, HPLC sistemindeki program yazılımı tarafından sabitlenen farklı seviyelerde karıştırılır. İlk numune, substratın pik alanını gözlemlemek için analiz edilen substrat, Kateşin'di. İlk numune sadece substrat ile hazırlandı ve BHT ve DPPH'nin çözücüsü, örneğin metanol aynı miktarda kullanıldı.

Numune, 1 mL kateşin ve BHT ve DPPH'nin çözücüsü olan 2 mL metanol ile hazırlandı. Tepkime maddeleri, tepkime kabına sırasıyla önce substrat, ardından antioksidan ve son olarak DPPH gibi sırayla ilave edildi. Reaksiyon kabı daha sonra 1 saat inkübe edildi ve reaksiyonun tamamlanması için karanlık bir yere yerleştirildi. İnkübasyondan sonra, numune çalıştırıldı ve analizde bulunan veriler daha fazla analiz ve yorumlama için kaydedildi. Deney, substratın kesin pik alanını elde etmek için paralel olarak yapıldı. Numunenin her analizinden sonra, numuneler arasındaki etkileşimi önlemek için temizleme prosedürü 10 dakika süreyle çalıştırıldı. Substratın pik alanı gözlemlendikten sonra, diğer numune farklı konsantrasyonlarda Bütillenmiş hidroksitoluen ile hazırlandı. Kullanılan konsantrasyonlar 10 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M, 3000 μ M, 4000 μ M ve 6000 μ M idi. Substratın pik alanlarından elde edilen veriler ileri analizler için kaydedilmiştir. Tüm analizler paralel olarak yapıldı ve daha sonraki analizler için ortalama değer kullanıldı. İşlem sırasında, HPLC sistemindeki çözücülerin akış hızı 0.7 mL/dk idi ve bu hem bol bol analizi hem de temizleme işlemi için sabitti.

Troloks için HPLC sisteminin algılama sistemi 290 nm'ye ayarlandı ve analiz sırasında sistem sürekli olarak kontrol edildi. Üç farklı çözücü karışımından oluşan bu analizde aynı çözücü sistemi kullanılmış ve çözücü karışımının hazırlanışı daha önce ele alınmıştır. Çözücülerin oranı, yazılım sisteminde tanımlandı ve belirli bir zamanda programlanmış bir sıra ile çalıştırıldı. Birinci numunenin hazırlanması için, reaktanların eklenme sırası tartışılanla aynıydı. Substratın pik alanını gözlemlemek için, 1 mL substrat, Troloks'un eklendiği ve 1 mL Bütillenmiş hidroksitoluen solventi ve son olarak 1 mL DPPH solventinin reaksiyon kabına eklendiği anlamına gelir. Bundan sonra reaksiyon kabı, inkübasyon ve reaksiyonun tamamlanması için karanlığa yerleştirildi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra HPLC makinesine 20 μ L numune enjekte edildi ve sonraki 30 dakika beklendi. Analizin ardından 10 dakikada temizlik işlemi yapılacaktır. Bu süre zarfında, tüm analizler paralel olarak yapıldığından bir sonraki numune hazırlanır ve Troloks'un DPPH'ye karşı korumasını gözlemlemek için farklı konsantrasyonlarda Bütillenmiş hidroksitoluen ile işleme devam edilir. Analizde kullanılan Bütillenmiş hidroksitoluenin farklı konsantrasyonları 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 500 μ M, 800 μ M, 1000 μ M, 2000 μ M ve 3000 μ M'dir. Tüm analizler paralel olarak yapılmış ve analizden elde edilen verilerin ortalaması alınmış ve sonraki analizler için kaydedilmiştir. Numunenin her analizinden sonra HPLC sisteminin kolon ve tüplerinde bir

önceki numunenin uzaklaştırılmasını sağlamak için 10 dakikalık bir temizleme işlemi yapılmıştır.

3.7.1.3. Askorbik Asit

Güçlü bir antioksidan olan Askorbik asit, normalde narenciye meyvelerinde bulunan ve doğal olarak oluşan iyi bilinen bir maddedir. Bu deneyde askorbik asit, Kateşin ve Troloks gibi substratların korunması için DPPH'ye karşı farklı konsantrasyonlarda kullanılır. Her iki substratın konsantrasyonu daha önce tartışılan yöntemle göre farklıydı ve konsantrasyonlar Troloks 200 μ M ve Kateşin 400 μ M içindir. Bu deney bölümünde reaksiyon, substrat, antioksidan ve oksitleyici ajan DPPH eklenerek yapılır. Reaktantlar kap içerisine eklendikten sonra reaksiyon kabı parafilm ile kapatılarak karanlık ortamda 1 saat inkübe edildi. Deney sırasında oda sıcaklığı paraya çevrildi ve 25°C'de tutuldu. Deneyin ayrıntılı prosedürü aşağıda tartışılmaktadır.

Kateşin için solvent A, B ve C'nin bakımları yapılarak yerine getirilip getirilmediği kontrol edildi ve tüm sistem herhangi bir kaçak veya hataya karşı kontrol edildi. Hat kontrolü ve diğer güvenlik konularından onay alındıktan sonra, HPLC sistemi yazılım sistemi tarafından izlendi ve çalıştırıldı. Kateşin için HPLC sistemi uygun şekilde kontrol edildi ve tespit sistemi 285 nm'ye kaydırıldı. Deney uzun bir süre devam edeceğinden ve hem fiziksel hem de yazılım için sürekli parasallaştırma gerektireceğinden ve çözücüler (A,B ve C) sürekli kontrol altında tutularak deneyde herhangi bir kesinti ve kabarcık oluşması önlenir. tüpler. Çözücülerin karışımı zaten tartışılmıştı ve temizlemenin yanı sıra analiz amacıyla programlanmış yazılıma kuruldu. Analiz için, minimum antioksidan miktarının randomize edilebilmesi için zirveyi gözlemlemek için önce kontrol edilen ilk numune. Birinci örneğin hazırlanması sırasında sadece substrat (1 mL kateşin solüsyonu) ile birlikte antioksidan çözücü (1 mL metanol) ve DPPH çözücüsü (1 mL metanol) aynı miktarda kullanıldı. Bileşenler ilave edildikten sonra numune vortekslenir ve alüminyum folyo ile kapatılır ve 1 saat inkübe edilir. Reaksiyona giren başka bileşenler olmadığından, numune inkübasyon olmadan analiz edilebilir. İnkübasyon süresinden sonra numune (20 μ L) kolonda analiz edilen sistemdeki spesifik enjektörden enjekte edilerek çalıştırıldı. Analizden sonra, veriler kontrol edildi ve daha sonraki analizler için not edildi. İşlemin hassasiyetleri için işlem paralel olarak yapılmıştır. Substratın kesin pikinin doğrulanmasından sonra, deney bir sonraki adıma geçildi. Bu adımda, substratın korunmasını kontrol etmek için antioksidan farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. Her

numunenin analizinden sonra, bir önceki numune kalıntısının bir sonraki numunenin analizinde kesintiye uğramaması için temizleme işlemi yapılmıştır. Bu temizleme prosedürü daha önce tartışıldığı gibi programlanmıştır ve bu işlem için gereken süre 10 dakikadır. Bu işlem sırasında, tüm numune analiti hem kolondan hem de HPLC sisteminin tüpünden tamamen çıkarıldı. İlk numune verileri toplandıktan sonra, DPPH'ye karşı korumayı gözlemlemek için Askorbik asidin farklı konsantrasyonlarda kullanıldığı bir sonraki numune hazırlandı. Askorbik asidin kullanılan konsantrasyonları 50 μ M, 100 μ M idi. 300 μ M, 500 μ M, 1000 μ M ve 2000 μ M. tüm numuneler daha önce tartışılan yöntemle göre hazırlandı ve tüm analizler kesinlik için paralel olarak yapıldı. Numunelerde istenen pik elde edildikten sonra, veriler kaydedildi ve sonraki analizler için saklandı.

Troloks için HPLC sistemi yeniden yapılandırıldı. Substrat algılama amacı için farklı dalga boyu gerektirdiğinden. Dalga boyu, daha önce tartışılan 290 nm'ye kaydırılır. Sistem çok sofistike olduğundan ve işlemde kullanılan sıcaklığa ve solvente karşı hassas olduğundan, sürekli kontrol altındaydı ve temizleme işlemi düzgün bir şekilde yapıldı. Deneyin bu bölümünde, çözücüler yöntem ile aynıdır. A, B ve C gibi çözücüler zaten tartışılmıştı ve bu çözücülerin kombinasyonu, sürekli sistem çalışması için yazılım sistemine zaten konmuştu. Numune çalıştırmadan önce sistem, tüpleri kontrol etmek için belirli bir süre çalıştırıldı ve sistemdeki analite veya sistemdeki diğer parçalara müdahale edebilecek kabarcık veya başka herhangi bir bileşiğin varlığını kontrol etmek için sonuna kadar çalıştırıldı. Analiz için, 1 mL substrat ve diğer reaktantlara 1 mL antioksidanların çözücüsü (metanol) ve 1 mL DPPH çözücüsü (metanol) eklenerek birinci numune hazırlandı. Bu reaktantları reaksiyon kabına ekledikten sonra, reaksiyon kabı normal olarak karanlık bir yerde inkübe edildi, ancak ilk numune için sadece bir reaktan vardı, bu nedenle substratın pik alanını kontrol etmek için hemen analiz edildi. Substrat zirvesi diğerleri için hemen hemen aynı olmasına rağmen, kesin sonuçlar için her antioksidan için her seferinde kontrol edildi. İnkübasyondan sonra, numune yaklaşık 20 μ L olan enjeksiyon yoluyla toplandı. 30 dakika sonra analiz uygun şekilde yapıldı ve analitin pik yaptığı gözlemlendi. Analiz paralel olarak yapıldığından ve kesin sonucu verecek olan pikin ortalaması alınmaktadır. Ayrıca, veriler önceki veri kümeleriyle karşılaştırmada, farkı ve diğer sonuçları da gözlemlemek için kullanılmıştır. İlk numunenin analizinden sonra, HPLC sistemi 10 dakika boyunca programlanmış temizleme modülü tarafından temizlendi ve önceki analitin karışmaması için kolonun yanı sıra tüplerin toplam temizliği için temizleme işlemi sürekli olarak kontrol edildi. yeni örnek Bu süre zarfında bir sonraki numune

hazırlanır. Numunenin hazırlanması için reaksiyon kabına 1 mL Askorbik asit ile birlikte 1 mL Troloks ve 1 mL DPPH alınmıştır. İlki, 2000 μ M Askorbik asit ile yapıldı ve reaksiyon, tartışıldığı gibi inkübasyonda 1 saat sürdü. Reaksiyon yapıldıktan sonra numune analiz edilmiş ve pik alanı verileri gözlemlenmiştir. Numune girişimini önlemek için paralel numune analizi içinde ve arasında da temizlik yapıldı. Bu yöntem izlenerek farklı konsantrasyonlarda Askorbik asit ile diğer numune hazırlandı ve bu konsantrasyonlar 0.1 μ M, 1 μ M gibi. 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, 500 μ M, 1000 μ M ve 2000 μ M. Tüm numunenin analizinden sonra, veriler sonraki işlemler için saklandı.

3.7.1.4. Kafeik Asit

Kafeik asit, dünya çapında kullanılan yaygın antioksidanlardan biridir ve kimyasal olarak hidroksisinamik asit olarak bilinir. Doğal bir maddedir. Bu deney bölümünde, DPPH (1000 μ M) varlığında Kateşin (400 μ M) ve Troloks (200 μ M) gibi her iki substratın korunması için antioksidan farklı konsantrasyonlarda kullanılmıştır. HPLC sisteminin saptanması da substrata ve antioksidana göre değişir. Tepkime maddelerinin reaksiyon kabına eklenmesi, substrata, antioksidana ve son olarak DPPH'ye uygun olarak yapıldı. Substrat gibi her bir numune analiz edildiğinde, diğer iki reaktan sadece solvent (metanol) idi. Deney süresince oda sıcaklığı (25 °C) ve basınç kontrollü koşullarda tutulmuştur. Aşağıda, kafeik asit ve DPPH varlığında her iki substratın analizi açıklanmaktadır.

Kateşin için numune hazırlanmadan önce HPLC sisteminde herhangi bir sistemik veya fiziksel hata olup olmadığı kontrol edildi. Numunenin ve tüm çözücülerin içinden geçeceği tüpler, kabarcık veya herhangi bir hava damlacıkları açısından dikkatlice kontrol edilir. Damlacık, kolonda sorunlara neden olabileceğinden ve örneğin analizini kesintiye uğratabileceğinden, kapsamlı bir şekilde kontrol edildi. Pompa basıncı ve solvent akışı da güvenlik açısından kontrol edildi çünkü solvent akışı tüm deney için 0.7 mL/dk'da tutuldu ve solventler (A, B & C) hazırlandı ve solvent kaplarına yeniden dolduruldu. Tüm güvenlik sorunlarının onaylanmasının ardından sütun eklendi ve son kontrol için bir test çalıştırması yapıldı. Bu süre zarfında, kolonun her iki tarafında herhangi bir sızıntı olup olmadığı kontrol edildi. Deney biraz zaman aldığından ve sıcaklık, basınç ve çözücülerle çok karmaşık olduğundan, tüm güvenlik önlemleri onaylandı. Deneyin bu bölümünde, substrat kateşindi ve bu nedenle algılama sistemi 285 nm'de sabitlendi. Bu dalga boyunda, substrat üzerindeki etkiler belirlenecektir. Analiz için numune hazırlamaya gelince, numune birbiri ardına zaman periyotlarında hazırlandı. İlk analiz edilecek substrat olduğu

için reaksiyon kabına 1 mL substrat, antioksidan çözücünün 1 mL'si (metanol) ve DPPH'nin çözücüsünün (metanol) 1 mL'si reaksiyon kabına alındı. aynı reaksiyon kabı. Reaktanların eklenmesinden sonra kabın üzeri alüminyum folyo ile kapatılarak reaksiyonun tamamlanması için karanlık bir yerde bekletildi. Bu inkübasyon süresi 1 saat olarak optimize edildi ve inkübasyon sonrasında numunedeki değişim gözlemlendi. Birinci numune substrat dışında başka bir reaktan içermediğinden reaktan karışımından hemen sonra analiz edilmiştir. Numunenin karıştırılması vorteks makinesi yardımıyla yapılmıştır. Her numunenin analizinden sonra HPLC sistemi 10 dakika olarak programlanan temizleme modülü takip edilerek temizlendi. Bu temizleme prosedürü sırasında, daha önce tartışılan A, B ve C çözücülerinin farklı bir kombinasyonu çalıştırıldı. Temizleme işlemi sırasında, paralel olarak analiz edilecek ilk numune olarak ikinci numune hazırlandı. Bu paralel analiz, numuneyle her yapıldığında yöntemin kesinliğini kontrol etmek için yapılmıştır. Numunenin analizinden sonra, numunenin en yüksek pik alanı toplandı ve daha fazla analiz için saklandı. Substratın analizi sırasında diğer numune hazırlandı. Reaktanların eklenme sırası, 1 mL substrat, 1 mL antioksidan solüsyon ve 1 mL DPPH gibi olmuştur. Kafeik asidin hangi kuvvette substratı DPPH'den koruyabildiğini gözlemlemek için farklı konsantrasyonlarda kafeik asit (10 µM, 50 µM, 100 µM, 500 µM, 1000 µM, 2000 µM ve 3000 µM) hazırlandı. Toplanan veriler, substratın en yüksek pik alanıydı. Daha önce de bahsedildiği gibi, analizler paralel olarak yapılmış ve belirtilen zaman çerçevesi içinde her analiz için numuneler hazırlanmıştır. Her analizden sonra, numunenin analizi arasındaki etkileşimi önlemek ve kolonu korumak için temizleme prosedürü yapıldı. Veriler, daha fazla analiz için bir Microsoft Excel sayfasında toplandı.

Troluks için, substrat değişikliğinde olduğu gibi, HPLC sistemi, substrata göre kontrol edildi ve yapılandırıldı. Değişiklikler esas olarak algılama sisteminde yapıldı. Algılama sistemindeki dalga boyu, daha önce tartışılan 290 nm olarak değiştirildi. İşlem zaman alıcı ve sürekli bir işlem olduğundan, numunenin analizine başlamadan önce HPLC sisteminin kontrol edilmesi gerekir. Sürekli analitik proses için solvent seviyesinin korunması gerektiği için solventlerin miktarı (A, B ve C) kontrol edildi. HPLC sofistike olduğundan ve sıcaklığa karşı çok hassas olduğundan, oda sıcaklığı ve nem her zaman kontrol altındaydı. Deneyin ikinci kısmı olması ve eş zamanlı olarak HPLC sisteminin kullanılması nedeniyle asıl mesele solventlerin ve numunenin geçtiği tüpün tamamının temizlenmesiydi. Bu nedenle, temizleme işlemi önceki substrat kullanıldıktan sonra yapıldı ve temizleme modülü, tüm tüpün temiz olduğundan ve mevcut numuneyi etkileyebilecek n

adet başka element izi bulunmadığından emin olmak için birkaç kez çalıştırıldı. Numune hazırlamaya gelince, numune daha önce tarif edildiği gibi hazırlandı ve analiz edilen ilk numune sadece substrattı. Antioksidan, kafeik asit konsantrasyonu ile substratın daha kesin olan ilk numune olacağı tartışıldı. İlk numune 1mL Troloks solüsyonu, 1 mL antioksidan solventi ve 1 mL DPPH solventi karışımı içerir. Modül gereği reaktanların karıştırılması vorteks ile yapıp alüminyum folyoya sarılarak, reaksiyonun tamamlanması için 1 saat karanlık bir yerde inkübe edildi. İlk başta 1 saat sonra, numunenin kolona veya analize enjekte edilmeden önce şeffaf olması gerektiğinden, reaksiyon kabı herhangi bir çökelti veya başka herhangi bir anormallik açısından kontrol edildi. Metanol ve substrattan başka herhangi bir bileşen bulunmadığından, numune hazırlandıktan hemen sonra analiz edildi. Analizden sonra, veriler korundu ve kolonların yanı sıra tüplerde kalan mevcut numuneyi temizlemek için temizleme prosedürü çalıştırıldı. Temizleme modülü zaten tartışılmıştı ve işlem 10 dakika sürüyor. İlk numunenin analizi ve hazırlanması sırasında, bir sonraki numune de proses zamanlamasını koruyacak ve kullanacak şekilde hazırlanmıştır. İlk analiz ve temizleme işleminden sonra, analiz edilen tüm numuneler paralel olarak yapıldığından ve kesin verileri elde etmek için paralel analiz yapıldığından, ikinci numune enjekte edilerek HPLC sisteminde analiz edildi. Substratın analizinden sonra, antioksidan ve DPPH, reaksiyon kabına dahil edildi. Numunenin hazırlanması sırasında farklı konsantrasyonlarda antioksidan olan kafeik asit kullanılmıştır. Kullanılan kafeik asit konsantrasyonları 50 µM, 500 µM, 2000 µM, 3000 µM ve 10000 µM idi. Analizden elde edilen veriler, daha fazla analiz için Microsoft Spread Sheet'e kaydedildi.

4. BULGULAR

Tüm deneylerden sonra, HPLC sisteminden toplanan veriler, gözlem ve başka bir işlem için analiz edilir. Veriler Microsoft Excel dosyasında kaydırıldı. Burada toplanan veriler, belirli bir dalga boyundaki substrat pik alanlarının değerleridir ve dalga boyu belirli bir substrat için sabitlenmiştir. Farklı antioksidanlar yer aldı ve üstelik DPPH hep sabit kaldı. Sonuçlar, deneylerde kullanılan antioksidanlar sırasına göre verildi.

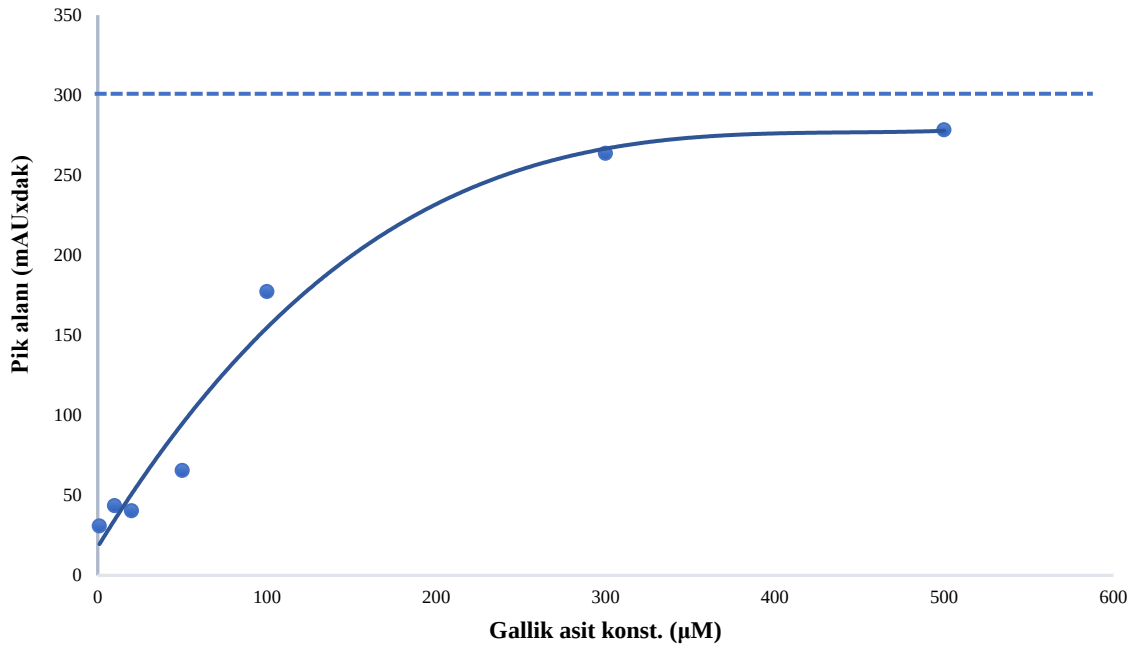
4.1. Farklı Antioksidanların Mevcudiyetinde Substratın DPPH'tann Korunması

4.1.1. Gallik Asit

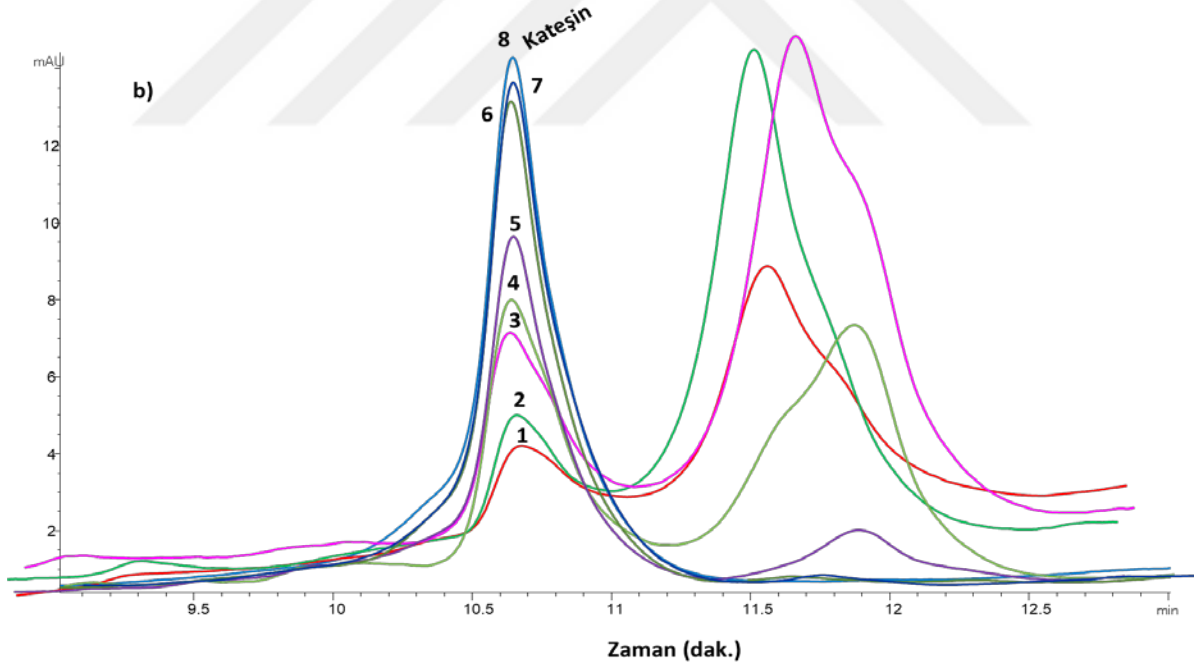
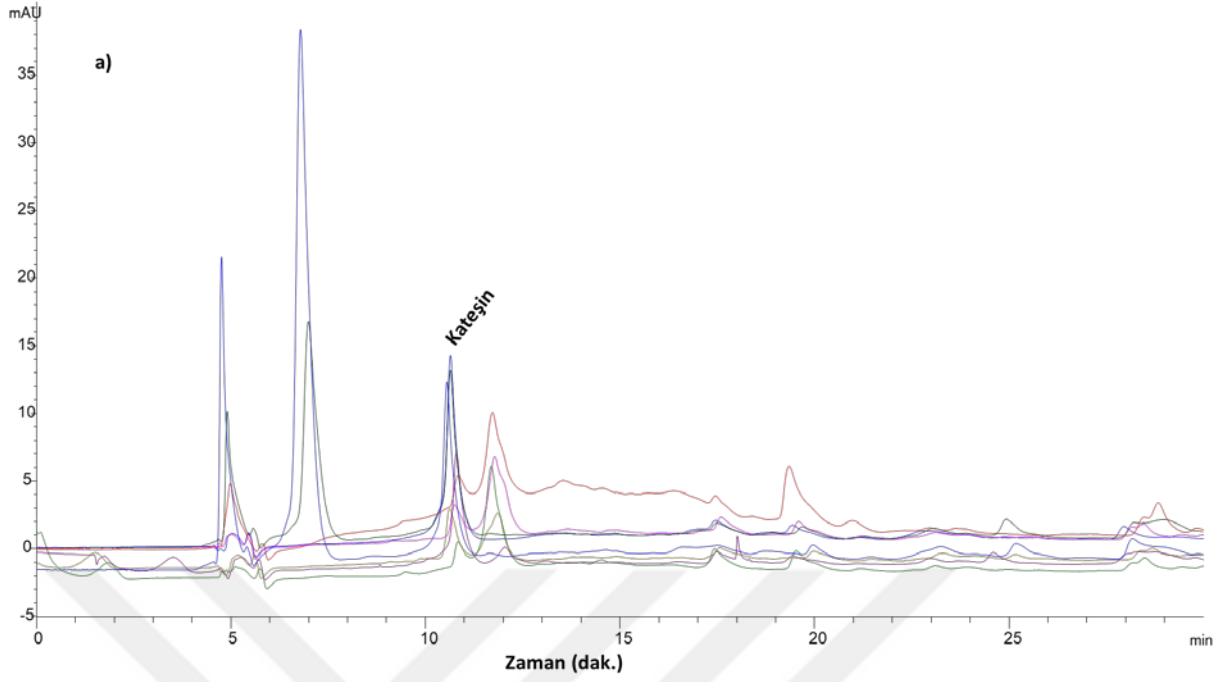
Bir antioksidan olarak Gallik asidin HPLC sisteminden elde edilen veriler aşağıda verilmiştir:

Tablo 6. Farklı konsantrasyonlarda Gallik asit varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Kateşin pik alanları

Gallik Asit Konsantrasyonu (μM)	Kateşin Pik Alan (mAUxdak.)
1	30.80
10	43.50
20	40,25
50	65.45
100	177.25
300	263.55
500	278.25
0	303.35



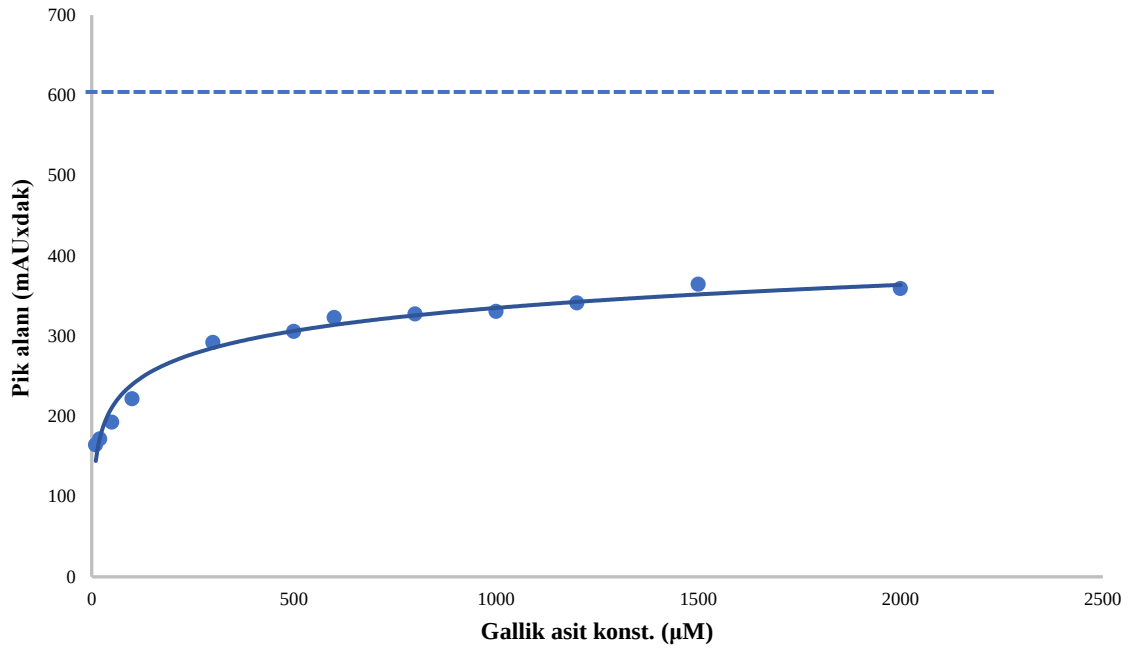
Şekil 4. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Gallik Asit (1 mL, 1 – 500 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir.



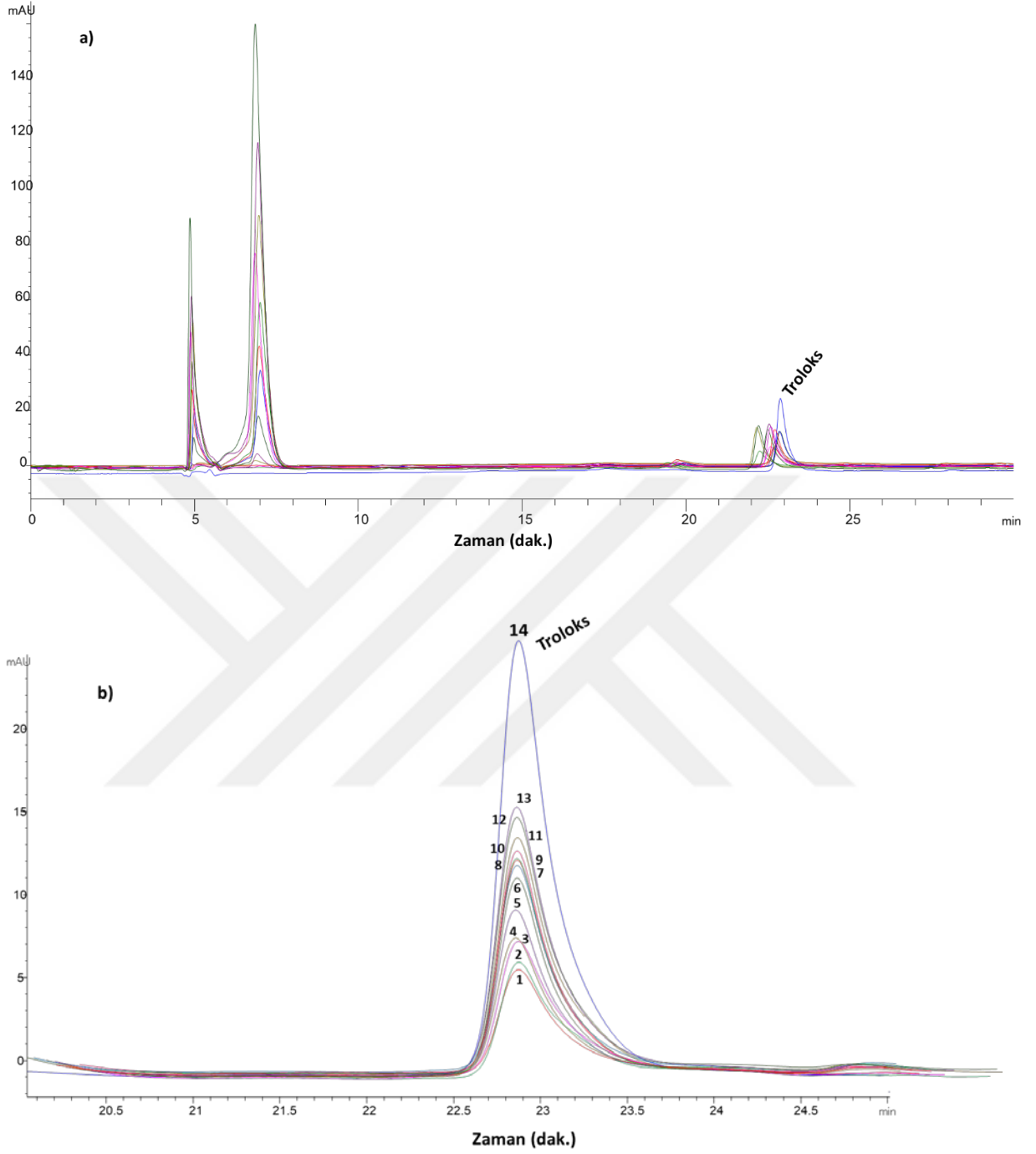
Şekil 5: 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Gallik asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan Gallik Asit konsantrasyonlar 1 μM (1), 10 μM (2), 20 μM (3), 50 μM (4), 100 μM (5), 300 μM (6), 500 μM (7), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (8)]

Tablo 7. Farklı konsantrasyonlarda Gallik Asit varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Troloks pik alanları

Gallik Asit Konsantrasyonu (μM)	Troloks Pik Alanı (mAUxdak.)
10	164.20
20	171.65
50	192.70
100	221.65
300	291.90
500	305.75
600	322.95
800	327.35
1000	330.50
1200	341.10
1500	364.55
2000	359.05
0	612.60



Şekil 6. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Gallik asit (1 mL, 10 – 2000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir



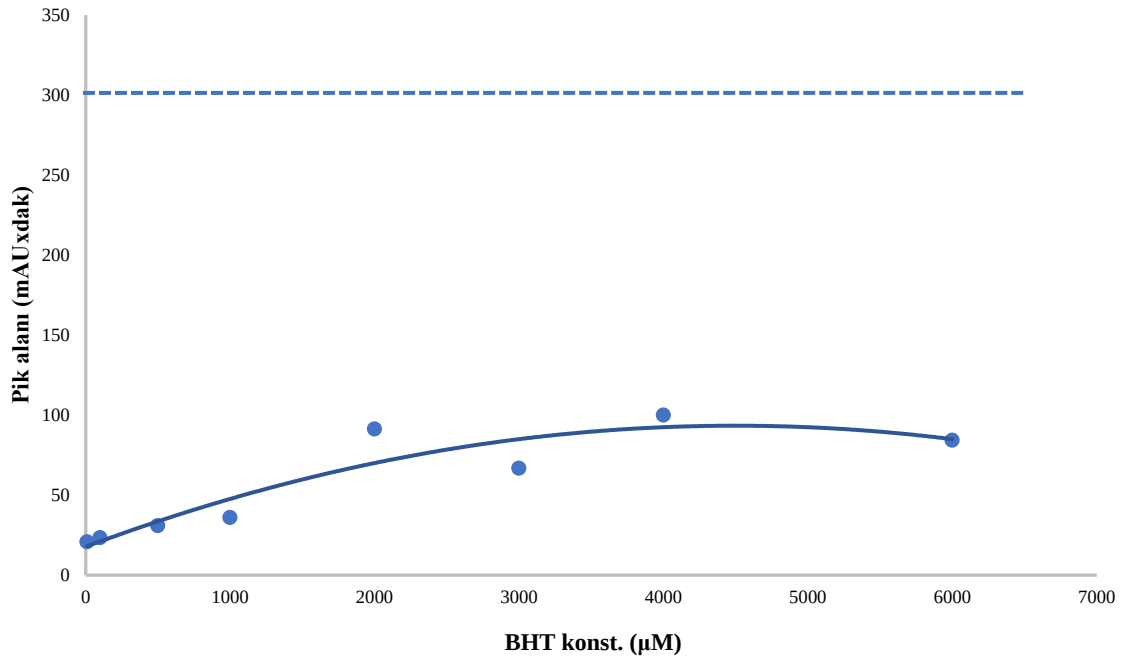
Şekil 7. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Gallik asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Gallik Asit konsantrasyonlar 5 μM (1), 10 μM (2), 20 μM (3), 50 μM (4), 100 μM (5), 300 μM (6), 500 μM (7), 600 μM (8), 800 μM (9), 1000 μM (10), 1200 μM (11), 1500 μM (12), 2000 μM (13), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (14)]

4.1.2. Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT)

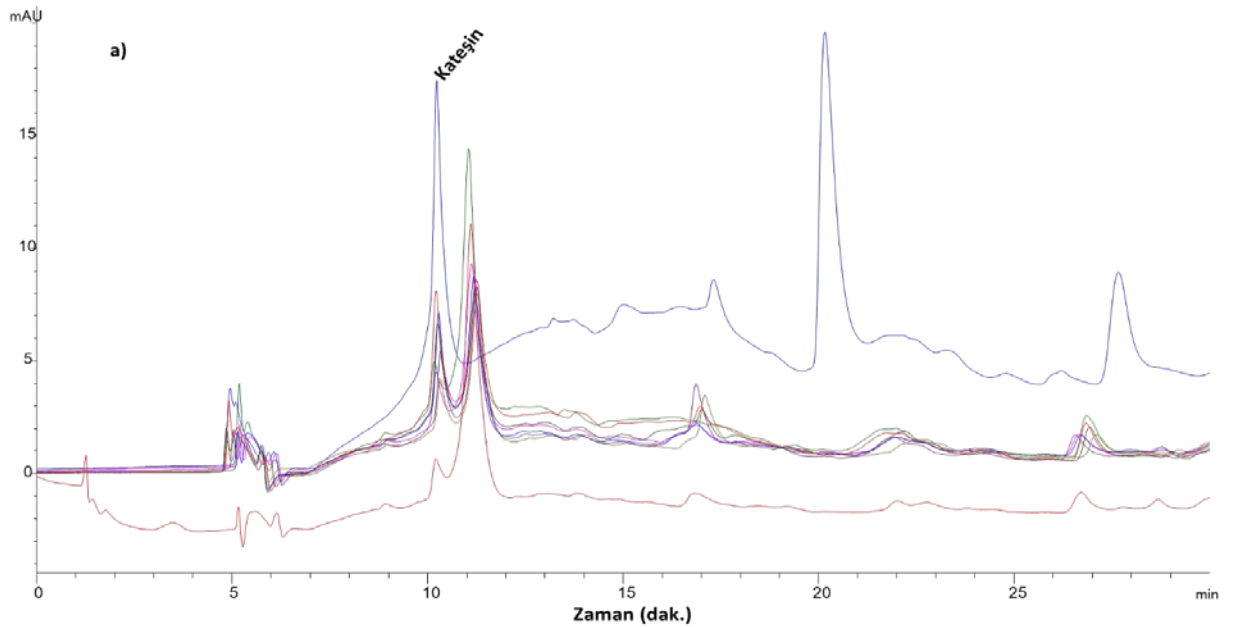
Bir antioksidan olarak Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) HPLC sisteminden bulunan veriler aşağıda verilmiştir:

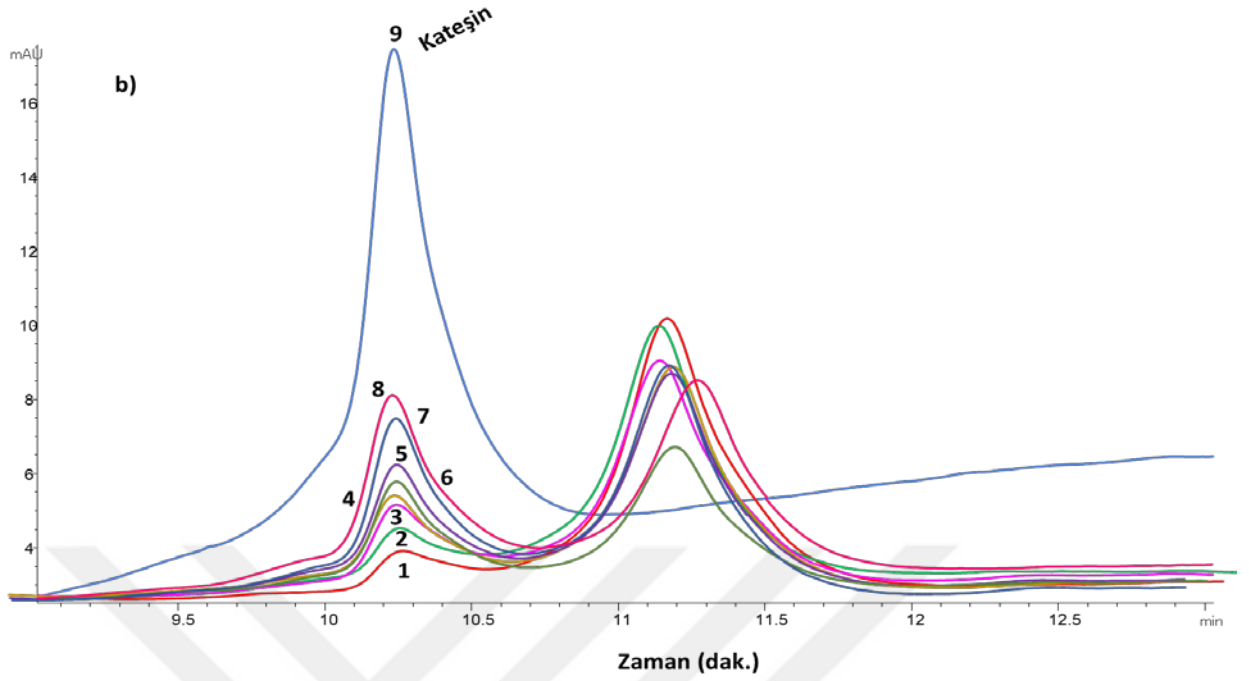
Tablo 8. Farklı konsantrasyonlarda Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Kateşin pik alanları

BHT konsantrasyonu (μM)	Kateşin Pik Alan (mAUxdak.)
10	20.70
100	23.30
500	30.80
1000	35.95
2000	91.20
3000	66.75
4000	99.90
6000	84.20
0	300.90



Şekil 8. 1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan BHT (1 mL, 10 – 6000 µM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir

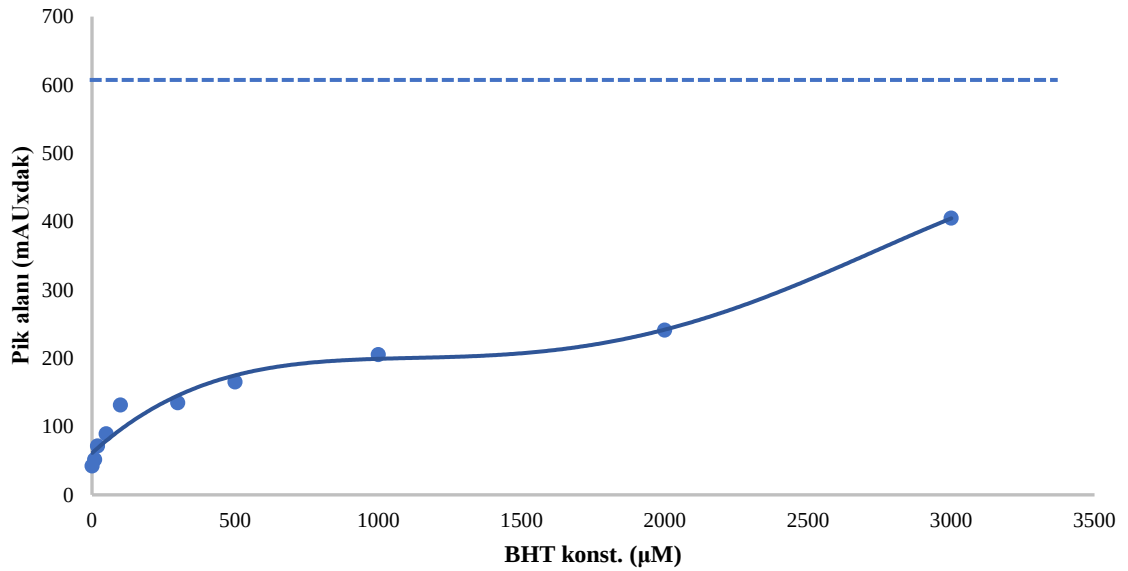




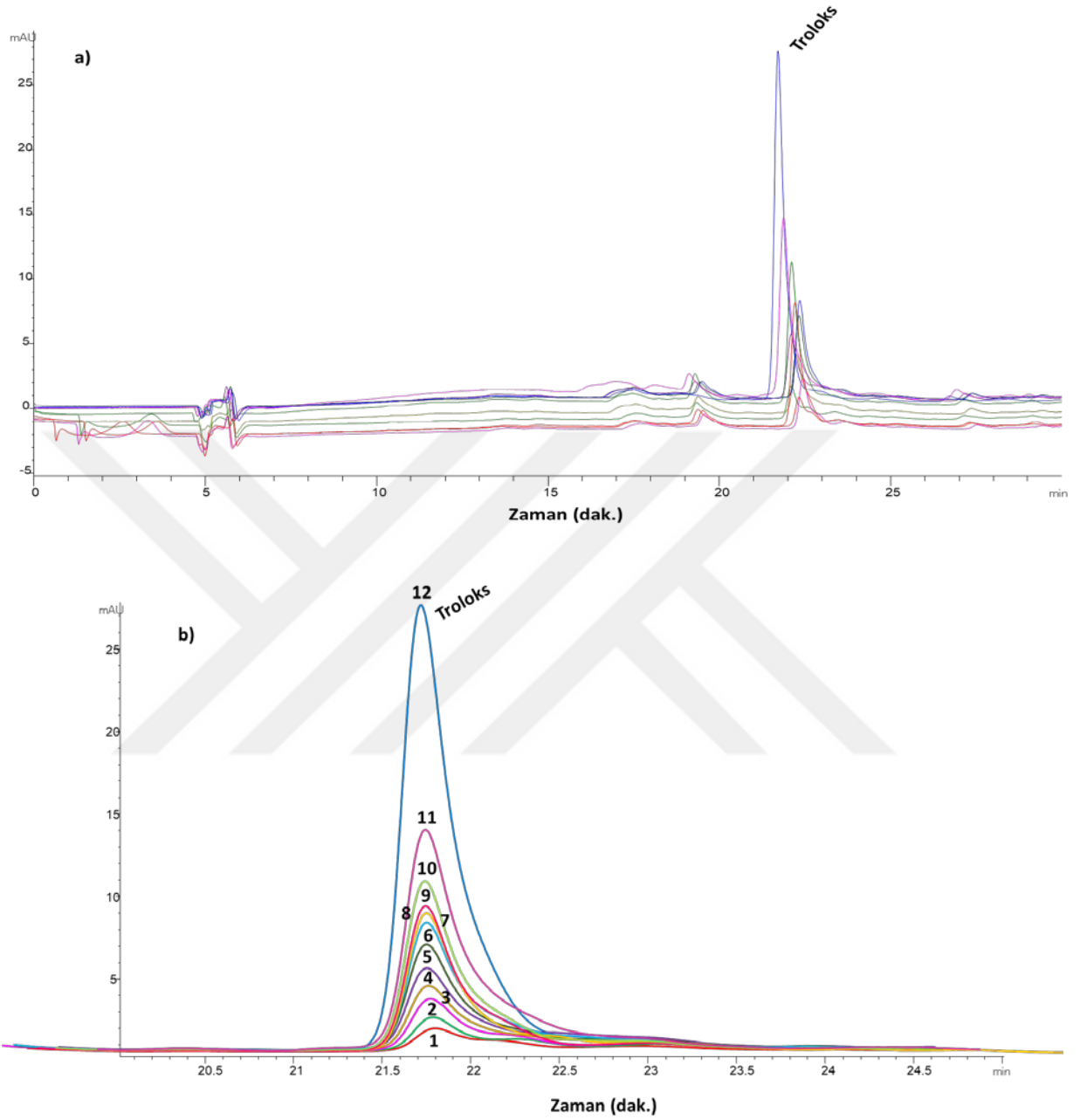
Şekil 9. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan konsantrasyonlar 10 μM (1), 100 μM (2), 500 μM (3), 1000 μM (4), 2000 μM (5), 3000 μM (6), 4000 μM (7), 6000 μM (8), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (9)]

Tablo 9. Farklı konsantrasyonlarda Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Troloks pik alanları

BHT konsantrasyonu (μM)	Troloks Pik Alan (mAUxdak.)
1	42.10
10	51.50
20	71.40
50	89.25
100	131.35
300	134.50
500	164.95
800	175.10
1000	205.00
2000	240.90
3000	404.85
0	612.60



Şekil 10. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan BHT (1 mL, 1 – 3000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir



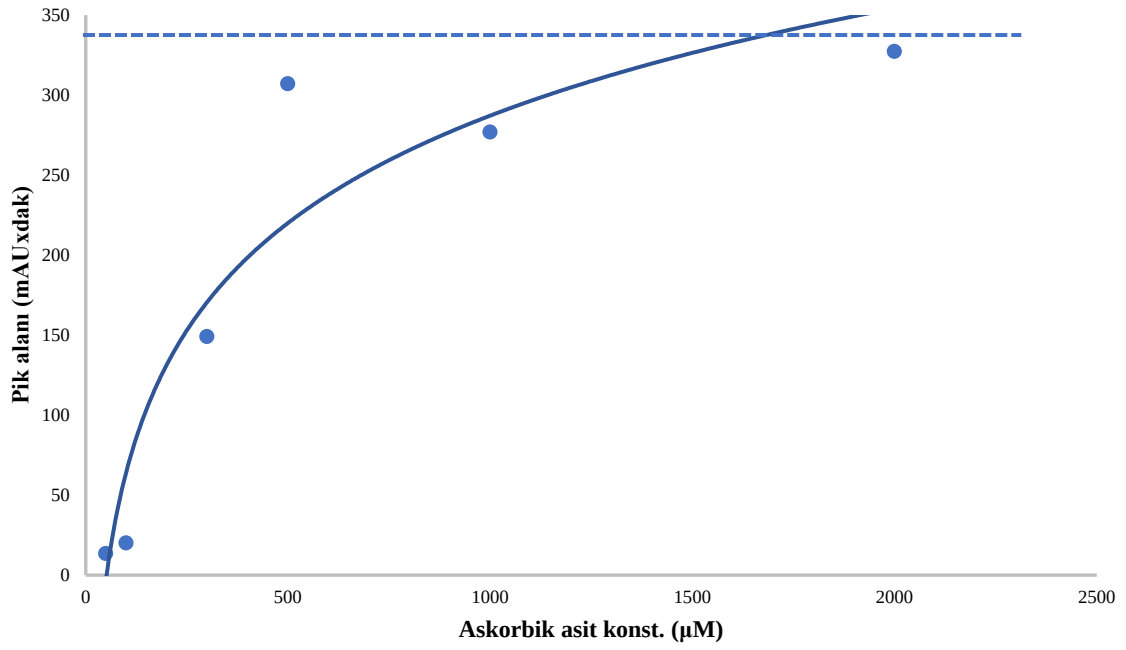
Şekil 11. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Bütillenmiş hidroksitoluenin (BHT) konsantrasyonlar 1 μM (1), 10 μM (2), 20 μM (3), 50 μM (4), 100 μM (5), 300 μM (6), 500 μM (7), 800 μM (8), 1000 μM (9), 2000 μM (10), 3000 μM (11), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (12)]

4.1.3. Askorbik Asit

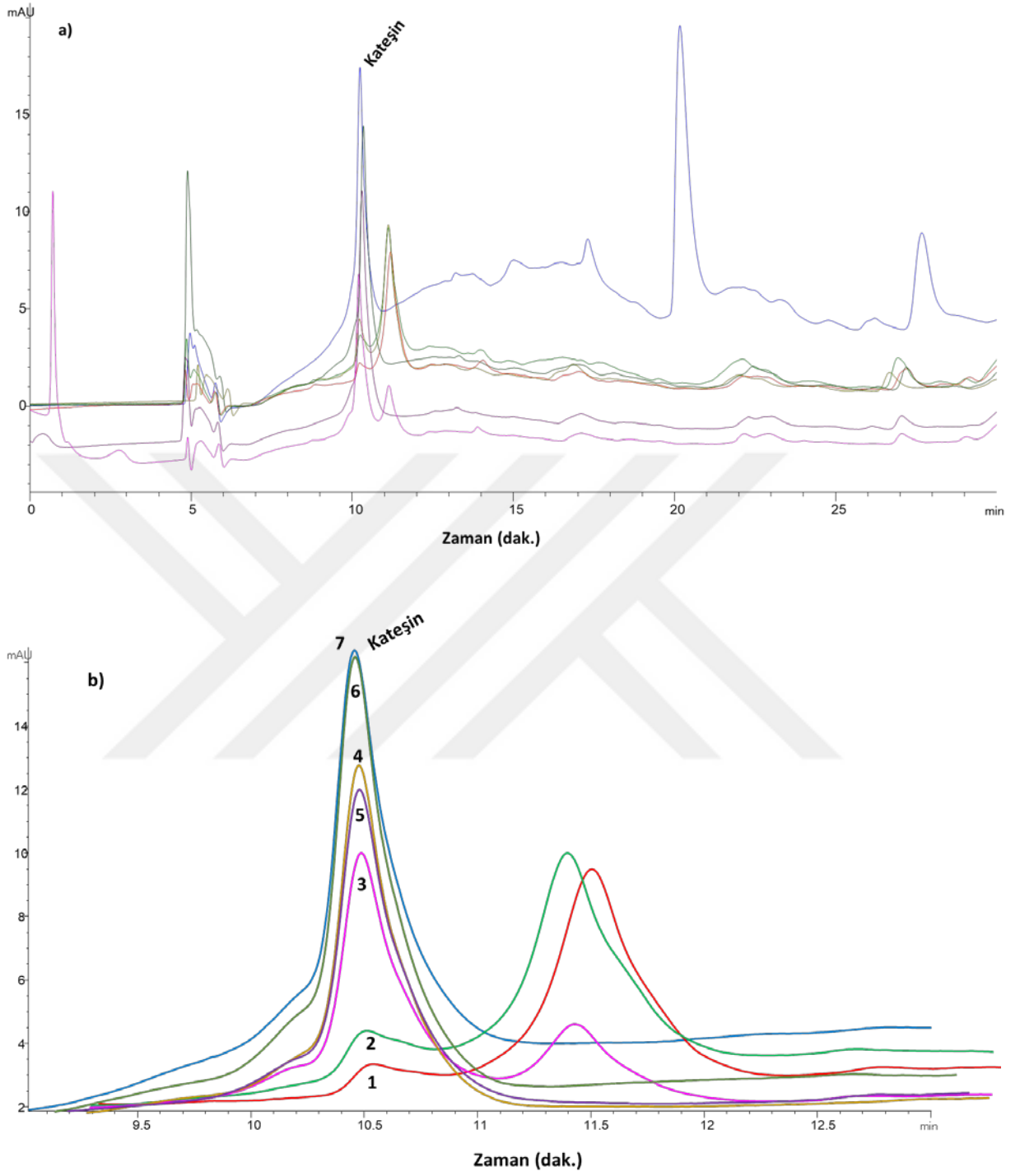
Aşağıdakiler, bir antioksidan olarak Askorbik Asit ile ilgili HPLC sisteminden elde edilen bulgulardır:

Tablo 10. Farklı konsantrasyonlarda Askorbik Asit varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Kateşin pik alanları

Askorbik Asit Konsantrasyonu (μM)	Kateşin Pik Alan (mAUxdak.)
50	13.40
100	20.00
300	149.00
500	307.00
1000	276.80
2000	327.20
0	327.55



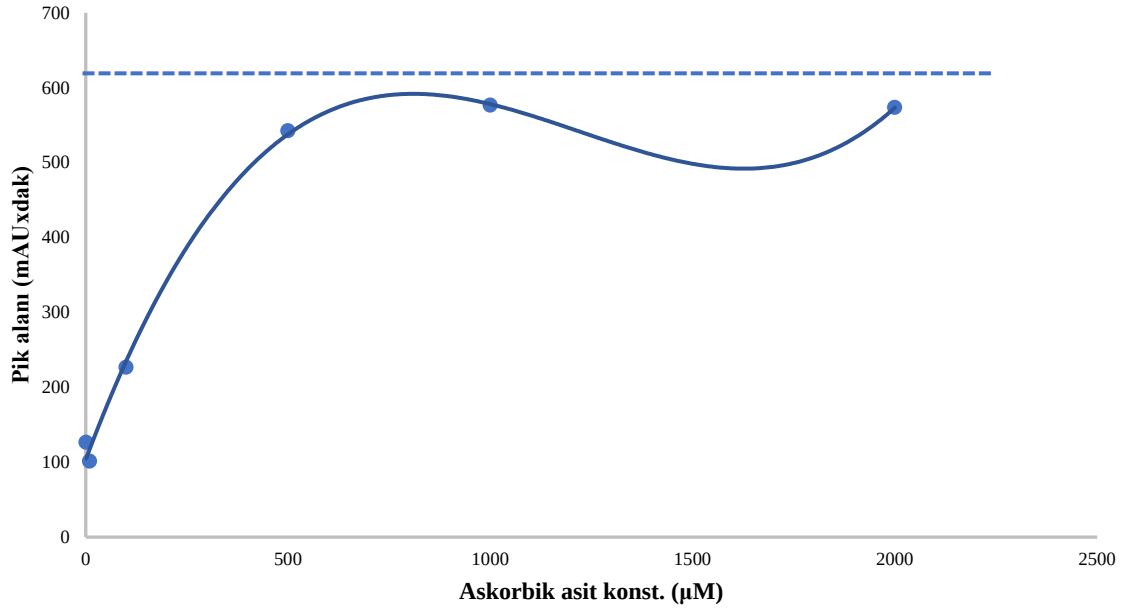
Şekil 12. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Askorbik Asit (1 mL, 50 – 2000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir



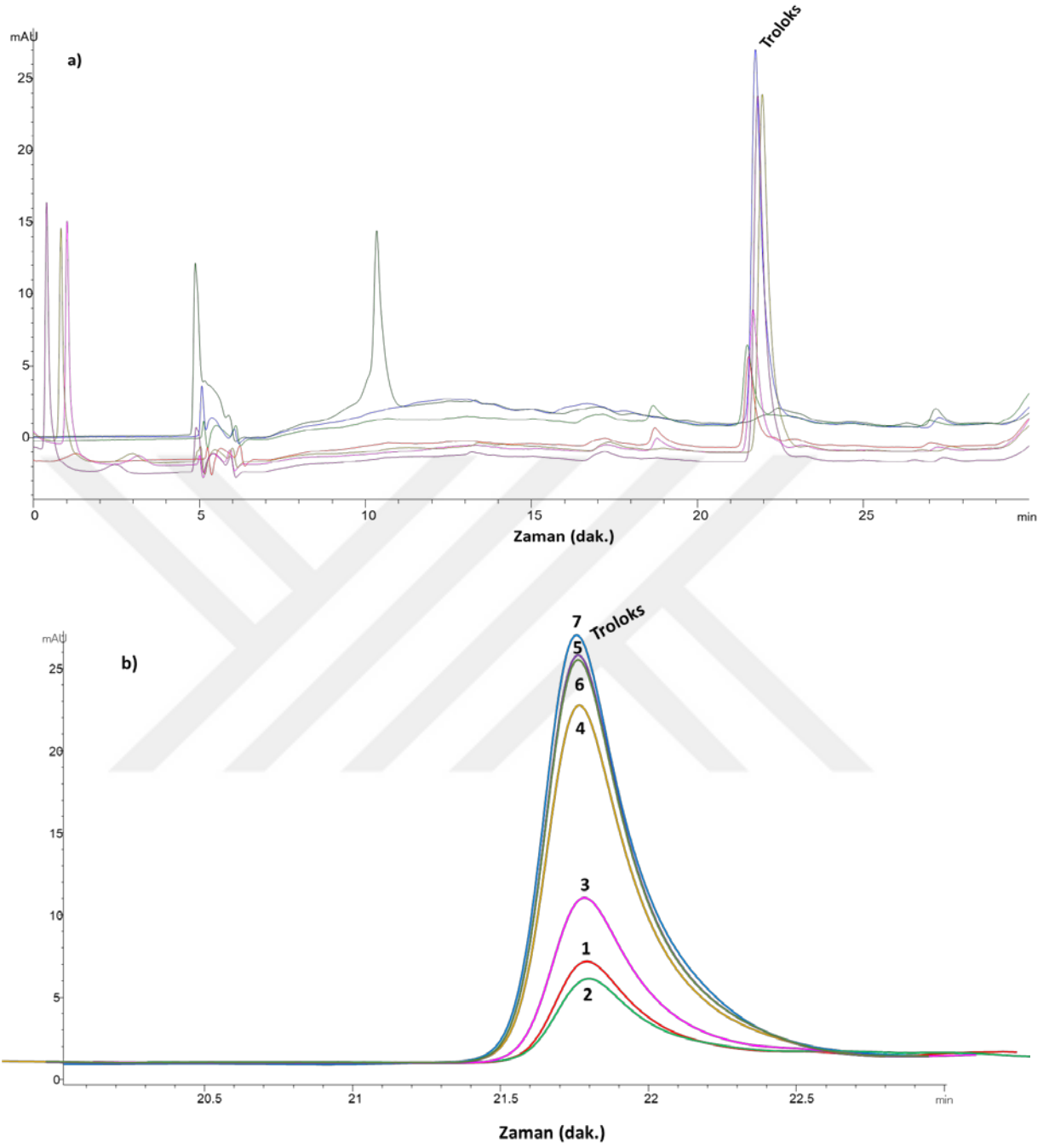
Şekil 13. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Askorbik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan konsantrasyonlar 50 μM (1), 100 μM (2), 300 μM (3), 500 μM (4), 1000 μM (5), 2000 μM (6), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (7)]

Tablo 11. Farklı konsantrasyonlarda Askorbik Asit varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Troloks pik alanları

Askorbik Asit Konsantrasyonu (μM)	Troloks Pik Alan (mAUxdak.)
1	126.50
10	101.30
100	226.70
500	542.50
1000	576.60
2000	573.55
0	622.50



Şekil 14. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Askorbik Asit (1 mL, 1 – 2000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir



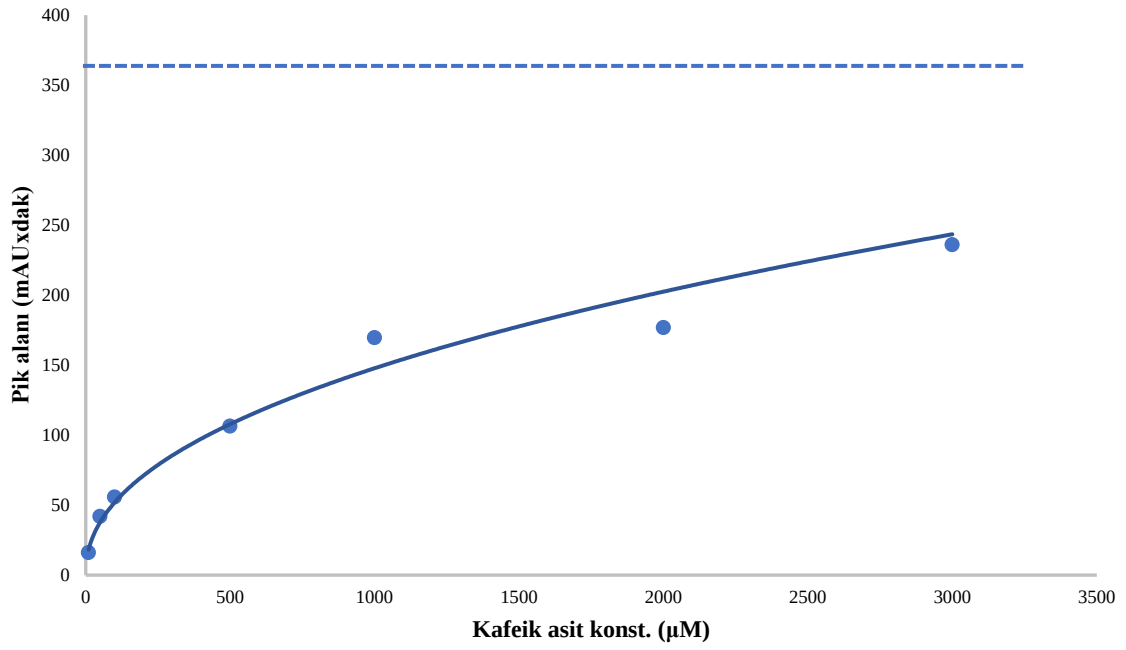
Şekil 15. 1000 μ M DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Askorbik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Askorbik Asit konsantrasyonlar 1 μ M (1), 10 μ M (2), 100 μ M (3), 500 μ M (4), 1000 μ M (5), 2000 μ M (6), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (7)]

4.1.4. Kafeik Asit

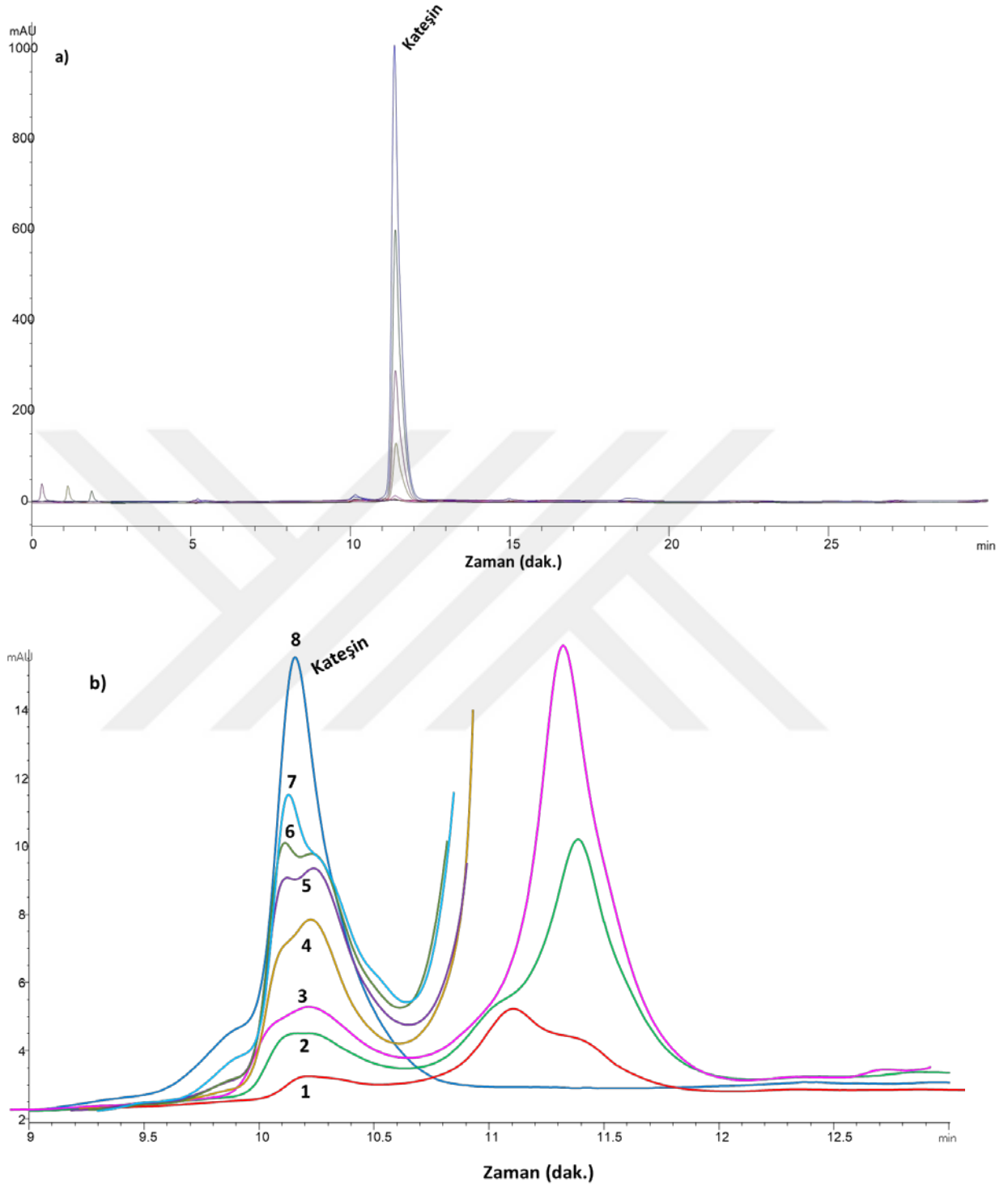
Kafeik Asidin antioksidan özelliklerini değerlendiren HPLC tekniğinden elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

Tablo 12. Farklı konsantrasyonlarda Kafeik Asit varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Kateşin pik alanları

Kafeik Asit Konsantrasyon (μM)	Kateşin Pik Alan (mAUxdak.)
10	16.05
50	41.90
100	55.70
500	106.30
1000	169.50
2000	176.70
3000	235.90
0	367.90



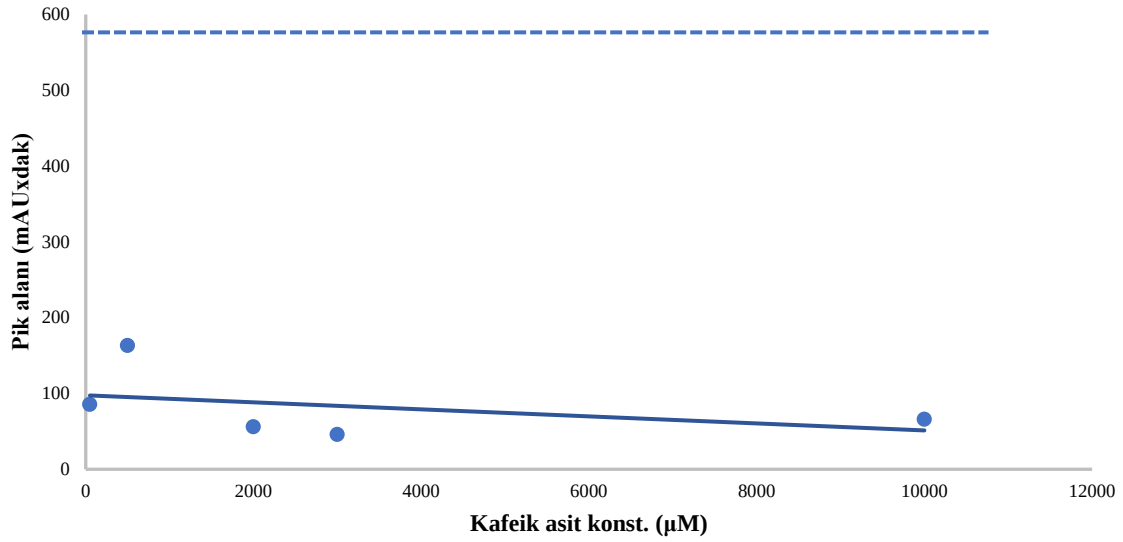
Şekil 16. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Kafeik Asit (1 mL, 1 – 500 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir



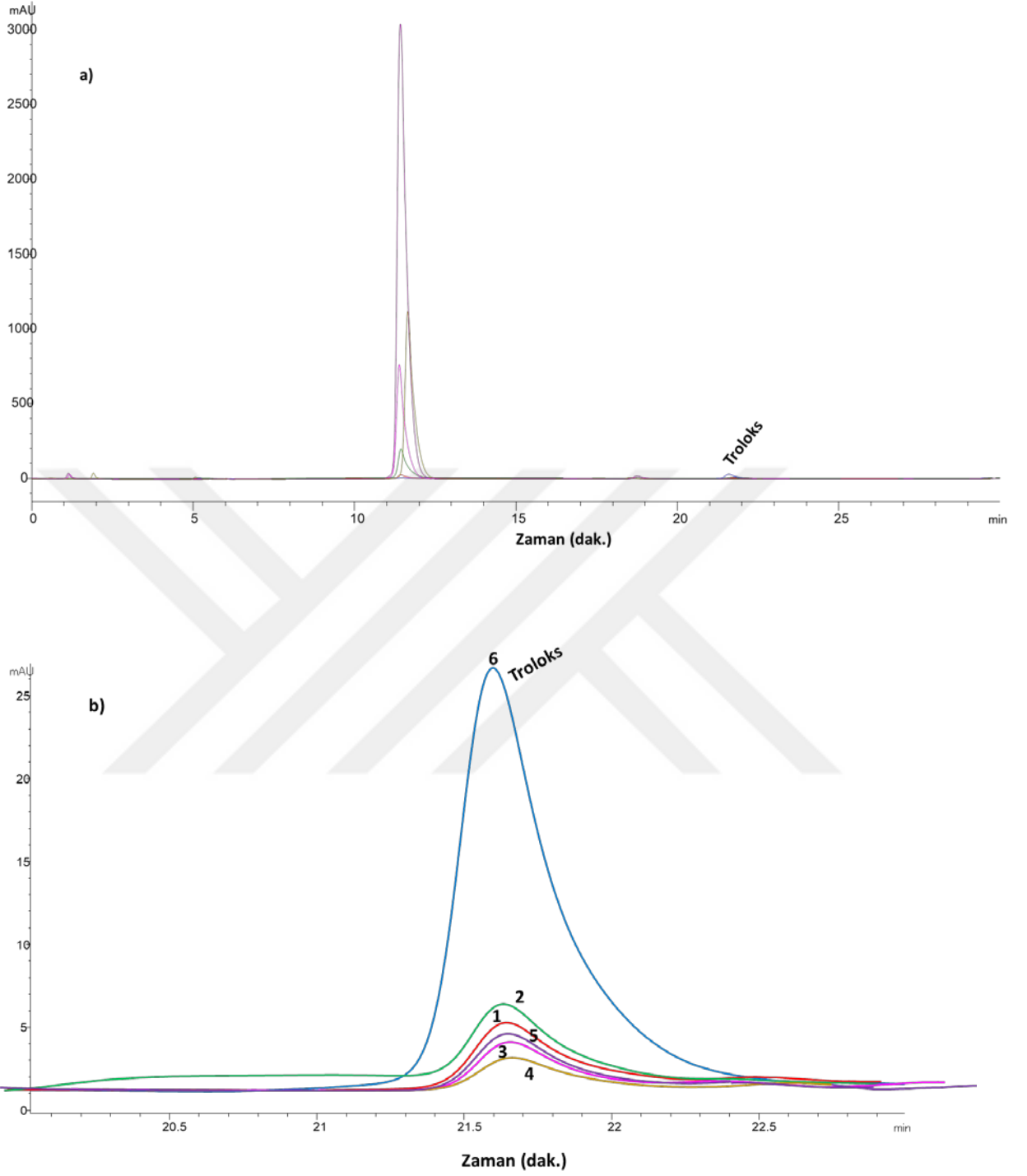
Şekil 17. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Kafeik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan Kafeik Asit konsantrasyonlar 10 μM (1), 50 μM (2), 100 μM (3), 500 μM (4), 1000 μM (5), 2000 μM (6), 3000 μM (7), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (8)]

Tablo 13. Farklı konsantrasyonlarda Kafeik Asit varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Troloks pik alanları

Kafeik Asit Konsantrasyon (μM)	Troloks Pik (mAUxdak.)
50	85.35
500	163.10
2000	55.80
3000	45.80
10000	65.75
0	586.60



Şekil 18. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Kafeik Asit (1 mL, 50 – 10000 μM) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir



Şekil 19. 1000 μM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Kafeik Asit (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Kafeik Asit konsantrasyonlar 50 μM (1), 500 μM (2), 2000 μM (3), 3000 μM (4), 10000 μM (5), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (6)]

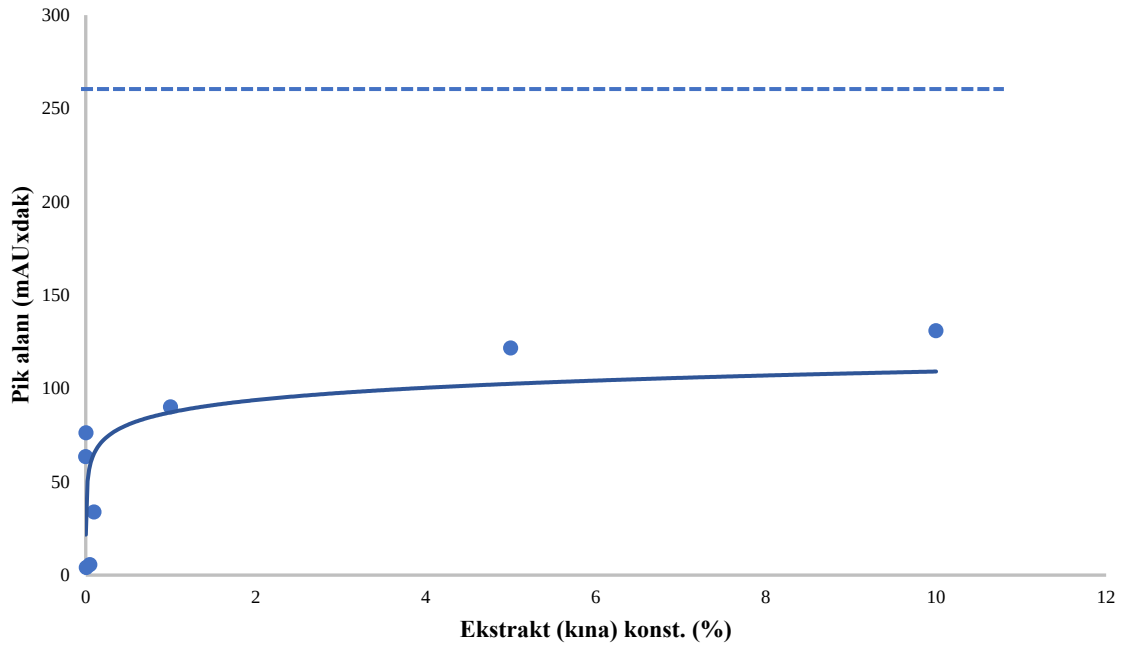
4.2. Bitki Özlerinin Mevcudiyetinde Substratın DPPH'tan Korunması

4.2.1. Kına

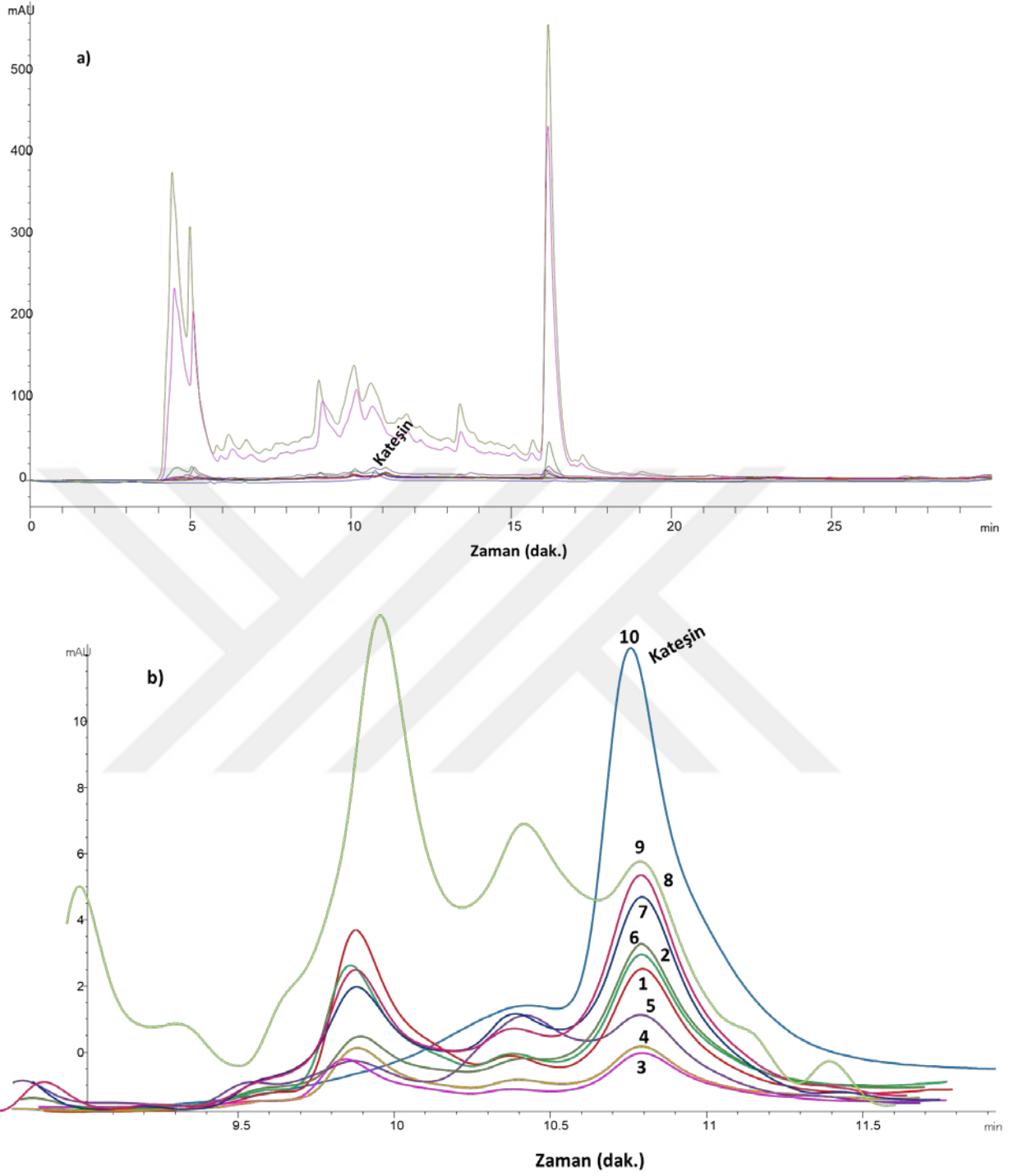
Kınanın antioksidan özelliklerini değerlendiren HPLC tekniğinden elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir:

Tablo 14. Farklı konsantrasyonlarda Ekstrakt (Kına) varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Kateşin pik alanları

Ekstrakt (Kına) konsantrasyonu (%)	Kateşin Pik Alan (mAUxdak.)
0.001	63.40
0.005	76.10
0.01	03.95
0.05	05.50
0.10	33.70
1	90.05
5	121.60
10	130.80
0	260.70



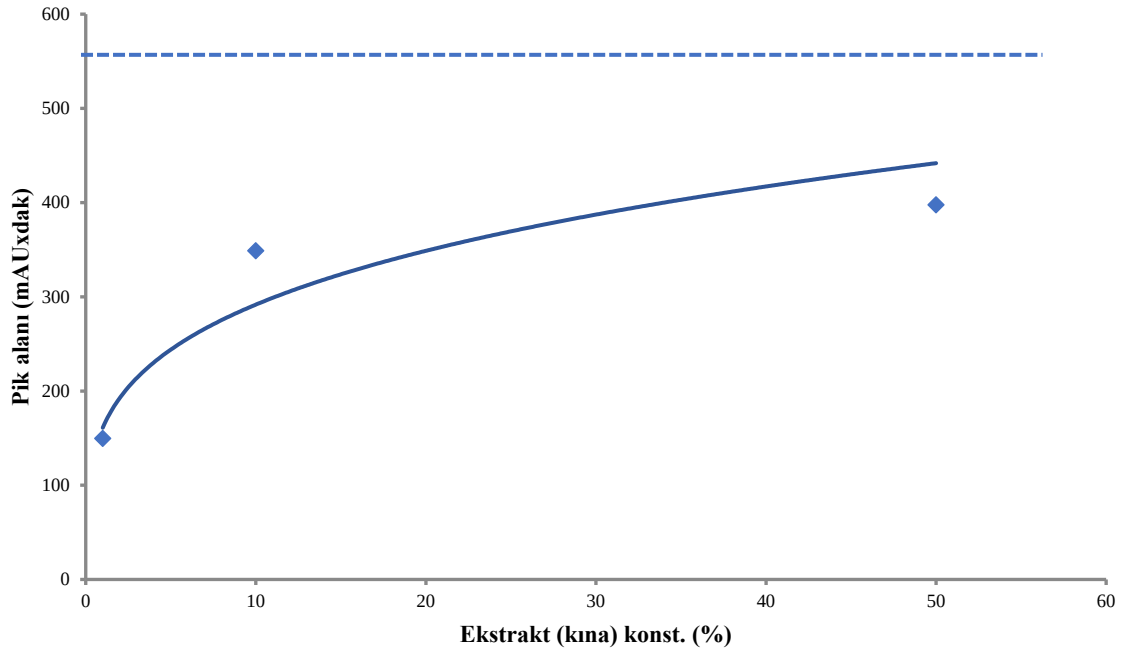
Şekil 20. 1000 μ M DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Ekstrakt (Kına) (1 mL, 0,001% - 10%) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Kateşin pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir



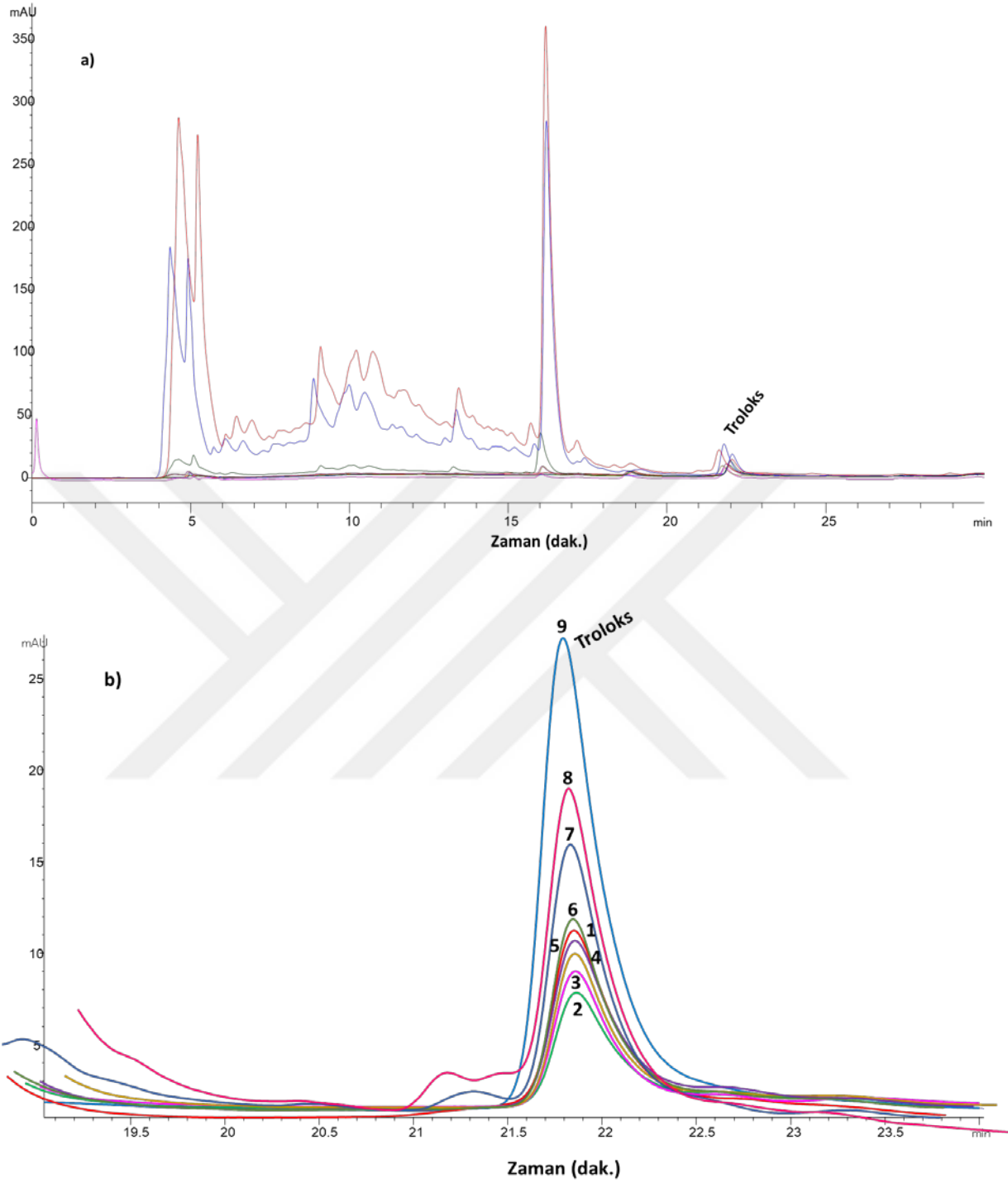
Şekil 21. 1000 μ M DPPH radikali (1 mL) ile substrat Kateşin (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Ekstrakt (Kına) (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Kateşin pikleri [testte kullanılan Ekstrakt (Kına) konsantrasyonlar 0.001% (1), 0.005% (2), 0.01% (3), 0.05% (4), 0.1% (5), 0.5% (6), 1% (7), 5% (8), 10% (9), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (10)]

Tablo 15. Farklı konsantrasyonlarda Ekstrakt (Kına) varlığında DPPH ile reaksiyon sonrası Troloks pik alanları

Ekstrakt (Kına) konsantrasyonu (%)	Troloks Pik Alan (mAUxdak.)
1%	149.60
10%	348.90
50%	397.60
0%	556.70



Şekil 22. 1000 μ M DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Ekstrakt (Kına) (1 mL, 1% – 50%) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC Troloks pik alanları grafiği. Grafikte kullanılan kesikli çizgi DPPH radikali kullanılmaması durumunda elde edilecek maksimum substrat seviyesini göstermektedir



Şekil 23. 1000 µM DPPH radikali (1 mL) ile substrat Troloks (1 mL), farklı konsantrasyonlarda antioksidan Ekstrakt (Kına) (1 mL) varlığında reaksiyona sokulduğunda elde edilen HPLC kromatogramları. a) tüm kromatogram; b) Troloks pikleri [testte kullanılan Ekstrakt (Kına) konsantrasyonlar 0.005% (1), 0.1% (2), 0.5% (3), 1% (4), 5% (5), 10% (6), 50% (7), 75% (8), DPPH kullanılmayan kontrol karışımı (9)]

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu araştırma, gıda ve ilaç kalitesinin belirteçleri olarak kullanılabilen antioksidanların aktivitelerinin belirlenmesinde DPPH (18-20, 26) ve diğer yöntemleri kullanan bir HPLC yöntemi geliştirmeye odaklandı. Bu çalışmada kullanılan HPLC yöntemi, oksidasyondan korunmasına odaklanılan önemli bileşenlerin varlığına özeldi. Antioksidan bileşikler analiz etmek için güvenilir ve tekrarlanabilir bir HPLC yöntemi sağlamak üzere mobil faz bileşimi de dahil olmak üzere çeşitli değişkenler optimize edildi.

Bu çalışmada geliştirilen HPLC yöntemi, doğruluğu ve kesinliği sağlamak için doğrulanmıştır. Doğrulama (validasyon) çalışması sonuçları, yeni geliştirilen yöntemin tatmin edici doğrusalığa, tekrarlanabilirliğe ve yeniden üretilebilirliğe sahip olduğunu göstermiştir. Yöntemin doğruluğu ve kesinliği, HPLC analizi sonuçları referans standartlarla karşılaştırılarak belirlendi. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar HPLC yönteminin gıdalardaki DPPH ve diğer antioksidan belirteçlerin belirlenmesinde uygun olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada geliştirilen HPLC yöntemi, bir bitki numunesindeki antioksidan aktivite tayinine başarıyla uygulanmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, numunenin antioksidan içeriğinin belirlenmesinde HPLC yönteminin oldukça etkili olduğunu göstermiştir. Ayrıca, elde edilen sonuçların literatürde bildirilenlerle uyumlu olduğu görülmüştür (9, 24-25). Bu, geliştirilen HPLC yönteminin yüksek doğruluğunu ve kesinliğini göstermektedir.

Sonuç olarak, gıda ya da ilaç etken bileşenin korunmasına dönük çeşitli antioksidanların DPPH radikalinin etkisini azaltmasını belirlemek için bu çalışmada hassas ve tekrarlanabilir bir HPLC yöntemi geliştirildi ve doğrulandı. HPLC yöntemi, bir bitki numunesinde antioksidan aktivitenin belirlenmesinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır ve elde edilen sonuçlar literatürde bildirilenlerle uyum içindedir (9, 24-25). Bu araştırma, gıdave ilaçları oksidasyondan korumada seçilecek Substratlar üzerinden antioksidan bileşiklerin etkinliğinin belirlenmesi için güvenilir bir yöntem sunmaktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), belirli bir bileşiğin mevcudiyetini veya konsantrasyonunu belirlemeye yönelik kantitatif bir yöntem olduğundan, farmasötiklerin ve diğer ürünlerin geliştirilmesinde önemli bir araçtır (22). Bu çalışmada DPPH ve diğer antioksidanların antioksidan kapasitesini belirlemek için HPLC kullanılmış ve sonuçlar ümit verici olmuştur.

HPLC analizinden elde edilen veriler, DPPH'nin diğer antioksidan tayin yöntemlerinden daha verimli bir şekilde kullanılabildiğini göstermiştir. Bunun nedeni muhtemelen antioksidan numunelerde serbest radikal temizleyiciler olarak hareket edebilen çoklu fenolik bileşiklerin varlığından kaynaklanmaktadır (5, 9, 18-20, 24-26). Ek olarak, DPPH'nin orta polaritede olması, HPLC sisteminde kullanılabilmesi ve çeşitli çözücü ekstraktlarının aktivitesinin belirlenebilmesinde faydalıydı ve daha çeşitli antioksidan bileşiklerin yakalanmasına izin verdi.

Bu çalışmanın sonuçları, geliştirilen HPLC-DPPH yönteminin Gallik asit, BHT, Askorbik asit ve diğer antioksidanların antioksidan kapasitesini belirlemek için güvenilir ve doğru bir yöntem olduğunu göstermektedir. Ayrıca, HPLC analizi, Gallik asitin diğer antioksidanlardan daha yüksek bir antioksidan kapasiteye sahip olduğunu da ortaya koydu. Bu çalışma, geliştirilen HPLC-DPPH yönteminin ilaç, kozmetik ve diğer ürünlerin geliştirilmesinde etkili bir antioksidan tayin yöntemi olarak kullanılabileceğine dair kanıt sağlamaktadır.

HPLC, karmaşık molekül karışımlarını analiz etmek için çok yönlü ve güvenilir bir tekniktir ve çeşitli bileşiklerin varlığını ve konsantrasyonunu belirlemek için kullanılabilir (5, 22, 24-25). Ek olarak, birçok ön işlem gerektiren diğer alternatiflerle kıyaslandığında, HPLC düşük maliyetli bir tekniktir ve kısa sürede büyük miktarlarda numuneyi analiz etmek için kullanılabilir. Bu avantajlar, HPLC'yi antioksidan içerikli farmasötiklerin ve diğer ürünlerin geliştirilmesi için çekici bir seçenek haline getirmektedir.

Özetle, bu çalışma geliştirilen HPLC-DPPH yaklaşımlı yöntemin gallik asit, askorbik asit, BHT ve diğer antioksidanların substrat varlığında antioksidan kapasitesini belirlemek için güvenilir ve doğru bir yöntem olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, geliştirilen yeni DPPH yönteminin ilaç, kozmetik ve diğer ürünlerin geliştirilmesi için uygun bir antioksidan aktivite tayin yöntemi seçeneği olduğunu göstermektedir. Yeni ürünlerin geliştirilmesinde diğer antioksidanların ve antioksidan içeren karışımların potansiyel uygulamalarını araştırmak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. KAYNAKLAR

1. Jung MY, Choi DS, Oh CH, Yoon SH (2015). Autoxidation and photooxidation of triacylglycerols containing conjugated linoleic acids. Food Science and Biotechnology 24(6): 1987-1994.
2. Marchand D, Rontani JF (2001). Characterisation of photo-oxidation and autoxidation products of phytoplanktonic monounsaturated fatty acids in marine particulate matter and recent sediments. Organic Geochemistry 32(2): 287-304.
3. ThoughtCo is part of the Dotdash publishing family. Available from: <https://www.thoughtco.com/definition-of-oxidation-in-chemistry-605456> [Accessed on 4th September, 2020]
4. Mrs. BHAGYALAKSHMI.M. Introduction, Biological Oxidation 02-10. [Available on: http://tumkuruniversity.ac.in/oc_ug/chem/Biological%20oxidation.pdf]
5. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. Pharmacognosy Reviews, 4(8): 118.
6. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y (2012). Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. Cellular Signalling 24(5): 981-990.
7. Phaniendra A, Jestadi DB, Periyasamy L (2015). Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. Indian Journal of Clinical Biochemistry 30(1): 11-26.
8. Wikipedia – The Free Encyclopedia. Antioxidant Available from: [https://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant#:~:text=Antioxidants%20are%20compounds%20that%20inhibit,C\)%20terminate%20these%20chain%20reactions](https://en.wikipedia.org/wiki/Antioxidant#:~:text=Antioxidants%20are%20compounds%20that%20inhibit,C)%20terminate%20these%20chain%20reactions). [Accessed on 6th September, 2020].
9. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C, Hernández-Carlos B (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. in antioxidants IntechOpen.
10. Jaleel CA, Riadh K, Gopi R, Manivannan P, Ines J, Al-Juburi H J., ... Panneerselvam R. (2009). Antioxidant defense responses: physiological plasticity in higher plants under abiotic constraints. Acta Physiologiae Plantarum 31(3): 427-436.

11. War AR, Paulraj MG, Ahmad T, Buhroo AA, Hussain B, Ignacimuthu S, Sharma HC (2012). Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *plant signaling & behavior* 7(10): 1306-1320.
12. Sardesai VM (1995). Role of antioxidants in health maintenance. *Nutrition in Clinical Practice* 10(1): 19-25.
13. Shim SY, Kim HS (2013). Oxidative stress and the antioxidant enzyme system in the developing brain. *Korean Journal of Pediatrics* 56(3): 107.
14. Matés JM, Sánchez-Jiménez F (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Front Biosci* 4(4): D339-D345.
15. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Villanueva-Cañongo C & Hernández-Carlos B (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*, 10, 1-29.
16. Emad S (2019). *Antioxidants Series Physiology Volume-5* London, United Kingdom Sayfa: 28-30.
17. Aziz MA, Diab AS, Mohammed AA (2019). Antioxidant Categories and Mode of Action. *Antioxidants*.
18. Gupta D (2015). Methods for determination of antioxidant capacity: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 6(2): 546.
19. Badarinath AV, Rao KM, Chetty CMS, Ramkanth STVSR, Rajan TVS, Gnanaprakash K (2010). A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research* 2(2): 1276-1285.
20. Pisoschi AM, Negulescu GP (2011). Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochem Anal Biochem* 1(1): 106.
21. Chapter-4, Chromatographic Methods [online]. Available on-
<https://web.njit.edu/~kebbekus/analysis/4CHROMAT.htm>
22. Shabir GA (2004). HPLC method development and validation for pharmaceutical analysis [online]. Available on: <https://www.pharmtech.com/view/hplc-method-development-and-validation-pharmaceutical-analysis>.

23. Wagner K, Miliotis T, Marko-Varga G, Bischoff R, Unger KK (2002). An automated on-line multidimensional HPLC system for protein and peptide mapping with integrated sample preparation. *Analytical Chemistry* 74(4): 809-820.
24. Burnaz NA, Küçük M, Akar Z (2017). An on-line HPLC system for detection of antioxidant compounds in some plant extracts by comparing three different methods. *Journal of Chromatography B* 1052: 66-72.
25. Karaçelik AA, Küçük M, Iskefiyeli Z, Aydemir S, De Smet S, Miserez B, Sandra P (2015). Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC–UV–ABTS radical scavenging and LC–UV–ESI-MS methods. *Food Chemistry* 175: 106-114.
26. Kedare SB, Singh RP (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology* 48(4): 412-422.
27. Garcia EJ, Oldoni TLC, Alencar SMD, Reis A, Loguercio AD, Grande, RHM (2012). Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian Dental Journal* 23(1): 22-27.
28. Cano A, Alcaraz O, Acosta M, Arnao MB (2002). On-line antioxidant activity determination: comparison of hydrophilic and lipophilic antioxidant activity using the ABTS•+ assay. *Redox Report* 7(2): 103-109.
29. Li F, Zhang LD, Li BC, Yang J, Yu H, Wan JB, Li P (2012). Screening of free radical scavengers from *Erigeron breviscapus* using on-line HPLC-ABTS/DPPH based assay and mass spectrometer detection. *Free Radical Research* 46(3): 286-294.
30. Li SY, Yu Y, Li SP (2007). Identification of antioxidants in essential oil of *radix Angelicae sinensis* using HPLC coupled with DAD-MS and ABTS-based assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(9): 3358-3362.
31. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews Drug discovery* 6(8): 662-680.
32. Amoateng P, Koffuor GA, Sarpong K, Agyapong KO (2011). Free radical scavenging and anti-lipid peroxidative effects of a hydro-ethanolic extract of the whole plant of

- Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn (Asteraceae). Free Radicals and Antioxidants 1(3): 70-78.
33. Alam MB, Hossain MS, Asadujjaman M, Islam MM, Mazumder MEH, Haque ME (2010). Peroxynitrite scavenging and toxicity potential of different fractions of the aerial parts of *Bacopa monniera* Linn. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research 1(10): 78.
 34. Nakagawa H, Sumiki E, Takusagawa M, IKOTA N, MATSUSHIMA Y, Ozawa T (2000). Scavengers for peroxynitrite: Inhibition of tyrosine nitration and oxidation with tryptamine derivatives, α -lipoic acid and synthetic compounds. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 48(2): 261-265.
 35. Amoateng P, Koffuor GA, Sarpong K, Agyapong KO (2011). Free radical scavenging and anti-lipid peroxidative effects of a hydro-ethanolic extract of the whole plant of *Synedrella nodiflora* (L.) Gaertn (Asteraceae). Free Radicals and Antioxidants 1(3): 70-78.
 36. Balavoine GG, Geletii YV (1999). Peroxynitrite scavenging by different antioxidants. Part I: convenient assay. Nitric oxide 3(1): 40-54.
 37. Akar Z, Küçük M, Doğan H (2017). A new colorimetric DPPH_• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry 32 (1): 640-647.
 38. Akar Z, Arslan Burnaz N (2020). Can an abts antioxidant test be performed without a spectrophotometer? Cumhuriyet Science Journal 41 (1): 185-192.
 39. Küçük M, Kolaylı S, Karaoğlu Ş, Ulusoy E, Baltacı C, Candan F (2007). Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia. Food Chemistry 100: 526-534.
 40. Hamdy A, El-Gendy NS (2013). Thermodynamic, adsorption and electrochemical studies for corrosion inhibition of carbon steel by henna extract in acid medium. Egyptian Journal of Petroleum 22(1): 17-25.
 41. Habbal O, Hasson SS, El-Hag AH, Al-Mahrooqi Z, Al-Hashmi N, Al-Bimani Z, Al-Jabri AA (2011). Antibacterial activity of *Lawsonia inermis* Linn (Henna) against

- Pseudomonas aeruginosa*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 1(3): 173-176.
42. Rahmoun N, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K, Benabdallah M, Choukchou-Braham N (2013). Antifungal activity of the Algerian *Lawsonia inermis* (henna). Pharmaceutical Biology 51(1): 131-135.
 43. Jridi M, Sellimi S, Lassoued KB, Beltaief S, Souissi N, Mora L, Nasri R (2017). Wound healing activity of cuttlefish gelatin gels and films enriched by henna (*Lawsonia inermis*) extract. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 512: 71-79.
 44. Hosein HKM, Zinab D (2007). Phenolic compounds and antioxidant activity of henna leaves extracts (*Lawsonia inermis*). World Journal of Dairy & Food Sciences 2(1): 38-41.
 45. Mikhaeil BR, Badria FA, Maatooq GT, Amer MM (2004). Antioxidant and immunomodulatory constituents of henna leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C* 59(7-8): 468-476.
 46. Pasandi Pour A, Farahbakhsh H (2020). *Lawsonia inermis* L. leaves aqueous extract as a natural antioxidant and antibacterial product. Natural Product Research 34(23): 3399-3403.
 47. Hosseiny Z, Meftahizadeh H, Ghorbanpour M, Gholamnejad J, Zareshahi R (2023). Influence of harvesting dates and genotypes on secondary metabolites status and antioxidant activity in *Lawsonia inermis* L. (Henna). Acta Ecologica Sinica.

Supervisor: MD. Al-Faruk, Assistant Professor, Dept. of Pharmacy, Daffodil International University

YAYINLAR

1. Mahmud, D. F., Ahmed Mahedi, M. R., Afrin, S., Haque, R., Hasan, M. S. , Sum, F. A. , Bary, M. A. , Syrmos, N. , & Kuri, O. C. . (2022). Biological & Insecticidal Effect of Citronella Oil: A Short Review. Clinical Medicine And Health Research Journal, 2(6), 261–265. <https://doi.org/10.18535/cmhrj.v2i6.108>
2. Shimanta Paul, Tausif Ahmed, Alok Kumer, Md. Rezwan Ahmed Mahedi, Sadia Afrin, Md. Shanzid Hasan, Saraf Nawar Moumita, Mustafa mudhafar, Ovijet Chandra Kuri, Nikolaos Syrmos (2023), A survey-based study on seasonal diseases & treatment pattern during Winter in Narayanganj City; IJB, V22, N1, January, P132-138
<https://innspub.net/a-survey-based-study-on-seasonal-diseases-treatment-pattern-during-winter-in-narayanganj-city/>

BİLDİRİLER

1. "Possible Risk Threats of Marburg Virus"
6th International "Başkent" Congress On Physical, Social And Health Sciences, Turkiye. 2022
- 2 "Conjunctivitis: Epidemiology, Pathology, Diagnosis and Treatment Strategies in Bangladesh – A Comprehensive Review"
8th International Congress On Medicine, Nursing, And Health Sciences In A Changing World, Turkiye, 2023
- 3.. "In-Vitro Comparative Study on Different Brands of Esomeprazole-Mg Tablet Marketed in Bangladesh"
Supervisor: MD. Al-Faruk, Assistant Professor, Dept. of Pharmacy, Daffodil International University

ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR

1. Türk Hükümeti Bursu

HOBİLER

Kitap okuma

Seyahat

Yemek pişirmek

Müzik

Yeni Dil Öğrenmek

Yeni Beceriler Öğrenmek

