Toplam Antioksidan Kapasite Tayini için CUPRAC Yöntemi Uygulama Föyü

Hazırlayanlar: Yard. Doç. Dr. Burcu BEKDEŞER

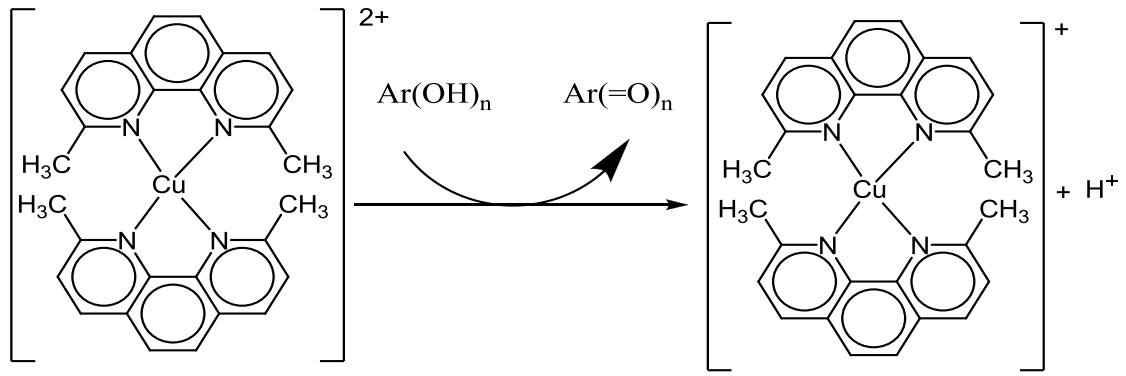
Yard. Doç. Dr. Mustafa BENER

Uzman Yük. Kimyager Ayşe Nur ÖNEM

Prof. Dr. Reşat APAK

CUPRAC (Bakır(II) İyonu İndirgeme Esaslı Antioksidan Kapasite) Ölçüm Yönteminin Temel Prensibi

Apak ve çalışma arkadaşları tarafından kromojenik bir yükseltgen olan Cu(II)-neokuproin (Nc) reaktifi kullanılarak, plazma antioksidanları, flavonoidler, gıda polifenolleri, C vitamini ve E vitamini için basit, geniş alanda uygulanabilen bir antioksidan kapasite tayin yöntemi geliştirilmiştir. Bu reaktif, kararlı, ucuz, kolay ulaşılabilen, hidrofilik ve lipofilik antioksidanlara cevap verebilen bir reaktiftir. Toplam antioksidan kapasite (TAC) tayininde kullanılan bu yöntem dünya literatürüne **CUP**ric **R**educing **A**ntioxidant **C**apacity: CUPRAC (bakır(II) iyonu indirgeme antioksidan kapasite) adıyla 2004 yılında kazandırılmıştır. Uygun konumlanmış fenolik hidroksiller, CUPRAC redoks reaksiyonu ile tekabül eden kinon yapılarına dönüşür ve bu redoks reaksiyonu sonucunda oluşan Cu(I)-Nc kelatı (Şekil 1), 450 nm'de maksimum absorbans verir. Oluşan renk, metal→ligand yönünde bir yük aktarımının sonucudur. Cu(I)-Nc kelat kompleksinin daha düzgün tetraedral yapısı nedeniyle Cu(II)-Nc kompleksine göre moleküler gerginliği azalmış ve stabilize olmuştur. Cu(I) ve Cu(II) iyonlarının Nc ligandıyla verdikleri 1:2 komplekslerin kararlılık sabitleri sırasıyla 10^{19} ve 10^{12} düzeyinde olduğundan Cu(I)'in Cu(II)'ye göre seçimli stabilizasyonu sonucu Cu(II)-Cu(I) standart redüksiyon potansiyeli 0.17 V'dan (Nc varlığında) yaklaşık 0.60 V'a çıkar ve bu da Cu(II)-Nc reaktifinin biyolojik bakımdan önemli antioksidanları ve çoğu polifenolik bileşiği etkinlikle yükseltgemesini sağlar. Yöntem çeşitlemeleri ile birlikte çok sayıda atıf almıştır ve dünyanın önde gelen gıda antioksidanları araştırma laboratuvarlarında kullanılmaktadır.



Şekil 1. CUPRAC yönteminin kromojenik oksidasyon aracı olan Cu(II)-Nc reaktifinin antioksidanlarla ($Ar(OH)_n$) reaksiyonu sonucu Cu(I)-Nc renkli kelatının oluşumu

Kaynak: APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins c and e, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7970-7981.

DENEYSEL KISIM

Kullanılan Kimyasallar:

-Bakır(II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$)

- Neokuproin (2,9-dimetil 1,10-fenantrolin)

- Amonyum asetat (NH_4Ac)

- Etil alkol

- Distile Su

- Troloks ((±)-6-Hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit)

- Trikloroasetik asit (TCA)

Kullanılan Cihazlar:

- Hassas terazi

- Girdap karıştırıcı

- UV-görünür alan spektrofotometresi

- 1 cm ışık yollu bir çift küvet

- Santrifüj cihazı

Çözeltilerin hazırlanması

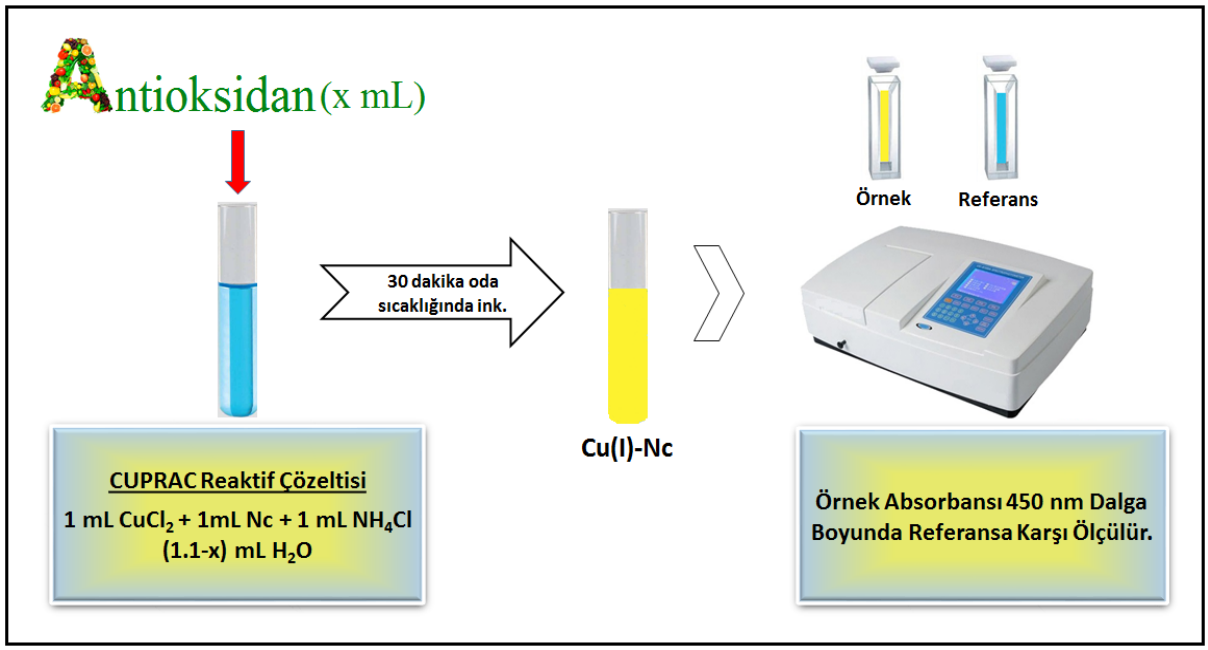
Bakır (II) klorür çözeltisi, 1.0×10^{-2} M olacak şekilde $CuCl_2.2H_2O$'tan 0,4262 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Amonyum asetat tamponu, 1 M (pH=7) olacak şekilde 19.27 g tartım alınıp su ile 250 mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) çözeltisi, 7.5×10^{-3} M olacak şekilde 0.156 g tartım alınıp etanolle 100 mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Troloks (TR) antioksidan bileşiğinin stok çözeltisi 1.0×10^{-3} molar konsantrasyonda olacak şekilde 0.0125 g tartım alınıp etanol ile 50 mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Farklı standart antioksidan bileşikleri uygun çözücü ve derişimlerde hazırlanabilir. %10'luk (w/v) TCA çözeltisi uygun miktarda TCA tartılarak saf etil alkol içerisinde hazırlanmıştır.

Deneyin Yapılışı

Bir cam tüp içerisine bakır(II) çözeltisi, neokuproin çözeltisi ve amonyum asetat tamponundan sırasıyla 1'er mL eklenir. Üzerine (x) mL antioksidan çözeltisi ve (1.1-x) mL distile su ilave edilip tüpler iyice çalkalanır. Toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde hazırlanan çözeltiler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletilir. Bu süre sonunda içinde örnek bulunmayan referans çözeltiye karşı 450 nm'de absorbans değerleri ölçülür.

Referans Çözelti: 1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH_4Ac + 1.1 mL H_2O

Örnek Çözelti: 1 mL Cu(II) + 1 mL Nc + 1 mL NH_4Ac + x mL antioksidan + (1.1-x) mL H_2O



Şekil 2. CUPRAC yöntemi uygulamasının şematik gösterimi

Not: Referans çözeltisinin distile suya karşı 450 nm dalgaboyunda absorbans değeri 0.0309 olarak ölçülmüştür.

ÖRNEK UYGULAMALAR

CUPRAC Yönteminin Standart Antioksidan Bileşiklere Uygulanması

CUPRAC yöntemi standart antioksidan bileşikler arasından troloksa uygulanmıştır. Farklı hacimlerde alınan troloksun kalibrasyon grafiği ve CUPRAC reaktifi ilavesinden sonra bu antioksidan varlığında elde edilen Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumları aşağıda verilmiştir. Lineer kalibrasyon doğrusundaki sembollerden *c*: molar konsantrasyon, A: absorbans ve r: korelasyon katsayısı karşılığıdır .

Son konsantrasyonun hesabı (M):

$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$

C_1: Troloksun başlangıç konsantrasyonu

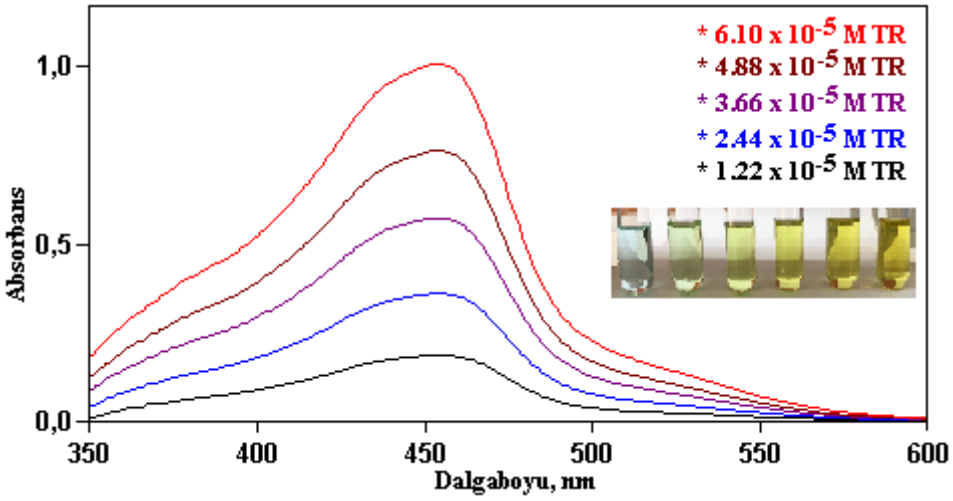
V_1: Alınan Troloks hacmi

C_2: Troloksun son konsantrasyonu:

V_2: CUPRAC yönteminin toplam hacmi (4.1 mL)

Tablo 1. Troloksun (TR) hacim-konsantrasyon-absorbans değerleri ve doğru denklemi

Alınan Hacim (µL)	Son Konsantrasyon (M)	Absorbans
50	1.22×10^{-5}	0.1957
100	2.44×10^{-5}	0.3995
150	3.66×10^{-5}	0.6032
200	4.88×10^{-5}	0.8069
250	6.10×10^{-5}	1.0107
Doğru denklemi: A = 16700 *c* + 0.008 r= 0.9999		



Şekil 3. Troloks varlığında oluşan Cu(I)-Nc kelatının görünür bölge spektrumu

CUPRAC Yöntemi ile Katı Örneklerin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin (TAC) Belirlenmesi

Katı örneklerde troloks eşdeğeri toplam antioksidan kapasite değeri hesaplanması aşağıdaki formül kullanılarak yapılmaktadır. Toplam antioksidan kapasite değeri farklı bir antioksidan eşdeğeri olarak hesaplanmak istendiğinde ilgili antioksidan bileşiğin molar absorplama katsayısı formülde kullanılmalıdır.

$$\mathbf{TAC}\ (\boldsymbol{mmol\ TR/g} - \text{ö}\boldsymbol{rnek}) = \frac{\mathbf{A}}{\varepsilon} \times \frac{\mathbf{V}\boldsymbol{t}}{\mathbf{V}\text{ö}} \times \mathbf{S.f.} \times \frac{\mathbf{V}\boldsymbol{e}}{\mathbf{m}}$$

A: 450 nm'de ölçülen örnek absorbansı

ε: TR bileşiğinin CUPRAC yöntemindeki molar absorplama katsayısı (16700 L $mol^{-1}.cm^{-1}$)

V*t*: CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (4.1 mL)

V*ö*: Örnek hacmi (mL)

S.f.: Seyreltme faktörü (seyreltme yapılmayacak ise bu faktör "**1**" alınır)

V*e*: Hazırlanan ekstrenin hacmi (mL)

m: Ekstraksiyon işleminde alınan örnek miktarı (g)

<u>Örnek hesaplama için kullanılan katı örnek:</u> Poşet Siyah Çay

Siyah Çay Ekstresinin Hazırlanması:

Poşet siyah çay (2 g), beher içerisinde bulunan 250 mL'lik kaynatılmış suya 2 dakika süre ile batırılıp çıkarılır, ardından 3 dakika süre ile üstü kapatılmış beherde demlenmeye bırakılır. Poşet çay çıkarıldıktan sonra elde edilen çözelti 0.45 µm'lik membran filtreden süzülerek oda sıcaklığında soğumaya bırakılır.

Not: Katı örneklerin türüne göre ekstraksiyon yöntemi (soxhlet, ultrasonik, mikrodalga esaslı vb.) ve koşulları (süre, çözücü tipi ve oranı, sıcaklık vb.) değişiklik göstermektedir.

Yöntemin Uygulanması:

Elde edilen siyah çay ekstresi (özütü) ekstraksiyon çözücüsü (distile su) ile 10 kat seyreltildikten sonra seyreltik çözeltiden 0.5 mL alınarak CUPRAC yöntemi uygulanır. Oda koşullarında 30 dakikalık inkübasyon sonunda 450 nm dalga boyunda örneğin (referans çözeltiye karşı) absorbans değeri 0.2604 ölçüldü.

Not: Siyah çay ekstresinden 0.5 mL alınarak CUPRAC yöntemi uygulandığında, absorbans değeri 2'nin üzerinde ölçüldüğünden Lambert-Beer kanunundan sapmaları engellemek için ekstre 10 kat seyreltilerek yöntem uygulanmıştır.

$$\mathbf{TAC}\ (\boldsymbol{mmol\,TR/g} - \text{ö}\boldsymbol{rnek}) = \frac{\mathbf{0.2604}}{\mathbf{16700}} \times \frac{\mathbf{4.1}}{\mathbf{0.5}} \times \mathbf{10} \times \frac{\mathbf{250}}{\mathbf{2}}$$

$$\mathbf{TAC} = \mathbf{0.16}\ \boldsymbol{mmol\,TR/g} - \text{ö}\boldsymbol{rnek}$$

CUPRAC Yöntemi ile Sıvı Örneklerin Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Sıvı örneklerde troloks eşdeğeri toplam antioksidan kapasite değeri hesaplanması aşağıdaki formül kullanılarak yapılmaktadır. Toplam antioksidan kapasite değeri farklı bir antioksidan eşdeğeri olarak hesaplanmak istendiğinde ilgili antioksidan bileşiğin molar absorplama katsayısı formülde kullanılmalıdır.

$$\mathbf{TAC}\ (\mathbf{mM\ TR}) = \frac{\mathbf{A}}{\varepsilon} \times \frac{\mathbf{V}\boldsymbol{t}}{\mathbf{V}\text{ö}} \times \mathbf{S.f.} \times \mathbf{1000}$$

A: 450 nm'de ölçülen örnek absorbansı

Ɛ: TR bileşiğinin CUPRAC yöntemindeki molar absorplama katsayısı (16700 L $mol^{-1}.cm^{-1}$)

V*t*: CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (4.1 mL)

V*ö*: Örnek hacmi (mL)

S.f.: Seyreltme faktörü (seyreltme yapılmayacak ise bu faktör "**1**" alınır)

<u>Örnek hesaplama için kullanılan sıvı örnek:</u> Portakal suyu

Portakal Suyu Örneğinin Hazırlanması:

Kutu şeklinde temin edilen hazır meyve suyu analiz öncesinde 0.45 µm'lik membran filtreden geçirilerek berrak çözelti elde edilir ve analize hazır hale getirilir.

Not: CUPRAC yönteminin sıvı örneklere uygulanmasında örneğin berrak olmasına ve katı partikül içermemesine dikkat edilmelidir.

Yöntemin Uygulanması:

Elde edilen meyve suyu distile su ile 10 kat seyreltildikten sonra seyreltik çözeltiden 0.3 mL alınarak CUPRAC yöntemi uygulanır. Oda koşullarında 30 dakikalık inkübasyon sonunda 450 nm dalga boyunda örneğin (referans çözeltiye karşı) absorbans değeri 0.2760 ölçüldü.

Not: Portakal suyu çözeltisinden 0.3 mL alınarak CUPRAC yöntemi uygulandığında örnek absorbansı 2'nin üzerinde bir değer çıktığından Lambert-Beer kanunundan sapmalar olacağı düşünülerek ekstre 10 kat seyreltilerek yöntem uygulanmıştır.

$$\mathbf{TAC\ (mM\ TR)} = \frac{\mathbf{0.2760}}{\mathbf{16700}} \times \frac{\mathbf{4.1}}{\mathbf{0.3}} \times \mathbf{10} \times \mathbf{1000}$$

$$\mathbf{TAC = 2.26\ mM\ TR}$$

CUPRAC Yöntemi ile Biyolojik Sıvılarda Toplam Antioksidan Kapasitelerinin Belirlenmesi

Biyolojik sıvı örneklerinde troloks eşdeğeri toplam antioksidan kapasite hesaplaması aşağıdaki formül kullanılarak yapılmaktadır. Toplam antioksidan kapasite değeri farklı bir antioksidan eşdeğeri olarak hesaplanmak istendiğinde ilgili antioksidan bileşiğin (örneğin ürik asit, askorbik asit veya α-tokoferol) molar absorplama katsayısı formülde kullanılmalıdır.

$$\mathbf{TAC\ (mM\ TR)} = \frac{\mathbf{A}}{\varepsilon} \times \frac{\mathbf{V}\boldsymbol{t}}{\mathbf{V}ö} \times \mathbf{S.f.} \times \mathbf{1000}$$

A: 450 nm'de ölçülen örnek absorbansı

Ɛ: TR bileşiğinin CUPRAC yöntemindeki molar absorplama katsayısı (16700 L $mol^{-1}.cm^{-1}$)

V*t*: CUPRAC ölçüm çözeltisinin toplam hacmi (4.1 mL)

V*ö*: Örnek hacmi (mL)

S.f.: Seyreltme faktörü (seyreltme yapılmayacak ise bu faktör "**1**" alınır)

Örnek hesaplama için kullanılan biyolojik sıvı örneği: İnsan Serumu

İnsan serumunda ürik asit, bilirubin, askorbik asit, α-tokoferol, glutatyon, sistein vb. küçük moleküllü antioksidanlar ölçülen TAC değerine katkıda bulunmaktadır. Serumun içerisine muhafaza amaçlı konan antikoagülan heparin, sitrat veya EDTA, kullanılan derişimlerde tayini bozmaz.

Serum Örneğinin Hazırlanması:

Serum örneğinden 0.5 mL santrifüj tüpüne aktarılarak proteinlerin çöktürülmesi için üzerine %10 (w/v, saf etanol içerisinde) trikloroasetik asit (TCA) çözeltisinden 1 mL eklenip girdap karıştırıcıda iyice karıştırılır. Çözelti 5000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj edilir. Süpernatant (üst berrak) fazdan 0.5 mL'lik kısım alınarak 2 mL amonyum asetat tampon çözeltisi ile nötralize edilir.

(Not-1: Amonyum asetat da bir protein çöktürücü olduğundan, proteinlerin ayrılmasından sonra (verilen işlem sırasına göre) ortama eklenmelidir.

Not-2: Ortamdan çöktürülerek ayrılan proteinlerin de özellikle tiyol ve çeşitli aminoasit bileşenleri antioksidan özellik gösterebilmektedir ve dolayısıyla proteinlerin TAC değeri ayrı bir prosedür yardımıyla dolaylı CUPRAC yöntemiyle ölçülebilirse de konuyu karmaşıklaştırmamak için burada anlatılmamıştır).

Yöntemin Uygulanması:

Elde edilen serum ekstresinden 0.2 mL alınarak CUPRAC yöntemi uygulanır. Oda koşullarında 30 dakikalık inkübasyon sonunda 450 nm dalga boyunda örneğin (referans çözeltiye karşı) absorbans değeri 0.2851 ölçüldü (Not: Kullanılan sayısal değer, bu ölçüme özgü örnek bir değerdir).

Not: Serum ekstresinden 0.2 mL alınarak CUPRAC yöntemi uygulandığında örnek absorbansı 0.2851 ölçüldüğünden ekstreyi seyreltmeye gerek duyulmamıştır ve hesap işleminde seyreltme faktörü (S.f.) "**1**" olarak alınmıştır.

$$\mathbf{TAC\ (mM\ TR)} = \frac{\mathbf{0.2851}}{\mathbf{16700}} \times \frac{\mathbf{4.1}}{\mathbf{0.20}} \times \mathbf{1} \times \mathbf{1000}$$

$$\mathbf{TAC = 0.35\ mM\ TR}$$

CUPRAC Yöntemi ile Saf Bir Antioksidan Bileşiğin TEAC (Troloks Eşdeğer Antioksidan Kapasite) Değerinin Bulunması

Çeşitli polifenolik bileşiklerin ve antioksidan vitaminlerin TEAC (troloks eşdeğer antioksidan kapasite) değerleri literatürde verilmişse de (a) yeni bir antioksidan denendiğinde veya (b) TEAC değeri bilinen bir antioksidan farklı bir çözücü sisteminde denendiğinde bu testin yapılma zorunluluğu ortaya çıkar. TEAC katsayısı, test edilen antioksidanın 1.0 mM'lık çözeltisinin indirgeme gücünün mM troloks cinsinden ifadesidir ve birimsizdir. Örneğin, kaynağı verilen Apak vd. (*J. Agric. Food Chem.*; 2004) literatürüne göre askorbik asit, gallik asit, kateşin ve kuersetinin TEAC katsayılarının sırasıyla 1.0, 2.6, 3.1 ve 4.4 olarak verilmiş olması bunların trolokstan ne denli güçlü antioksidan olduklarının ölçüsüdür ve formül başına transfer edebildikleri elektron sayıları ile orantılıdır. Bir diğer deyişle kuersetin, aynı molar konsantrasyonda trolokstan 4.4 kez daha güçlü bir antioksidan demektir veya 1.0 mM kuersetin elektron-transfer reaksiyonlarında 4.4 mM troloks gibi davranır. Buna karşılık askorbik asidin (vitamin C) TEAC katsayısı 1'e yakın olduğundan antioksidan gücü eşit molaritedeki troloksunkine yaklaşık eşittir. Saf bir antioksidan bileşiğin sınanan çözücü sistemindeki TEAC katsayısını bulmak için o çözücü sisteminde bahse konu antioksidanın ve troloksun kalibrasyon doğruları ayrı ayrı çizilir ve eğimleri birbirine oranlanır (Eğim= $\Delta A/\Delta C$). Bir diğer deyişle kuersetinin CUPRAC absorbans/konsantrasyon (A/C) doğrusunun eğimi, troloksun aynı koşullar altında çizilen kalibrasyon doğrusunun eğiminin 4.4 katıdır.