

Madde

Leonarditten Ekstrakte Edilen Humik Maddelerin Taraması DPPH Metodunu Kullanarak Serbest Radikal Temizleme Aktivitesi

Attila Csicsor 1,2,* ve Etelka Tombác 3



- 1 Doktora Çevre Bilimleri Okulu, Szeged Üniversitesi, Rerrich Béla tér 1., H-6720 Szeged, Macaristan Hymato Products Ltd., Kossuth u 33., H-8225 Szentkirályszabadja, Macaristan Soós Ernő Su Teknolojisi Araştırma ve Geliştirme
- 2 Ltd., Kossuth u 33., H-8225 Szentkirályszabadja, Macaristan Soós Ernő Su Teknolojisi Araştırma ve Geliştirme
- 3 Merkezi, Üniversite / Pannonia, H-8200 Veszprém, Macaristan * Yazışma adresi: csicsor.attila@gmail.com; Telefon: +36-703897852

Özet: Hümik maddeler (HS'ler) uzun süredir araştırılmaktadır ve günümüzde hala insanlığı aşırılmayı başarmaktadır. Yapılan son araştırmalara göre önceden bilinen etkilerinin yanı sıra antioksidan özelliklere de sahiptirler. Ancak bu önceki araştırma, farklı işlemlerde ekstrakte edilen/üretilen fraksiyonların antioksidan etkisindeki farkı incelemeyiz; zaman içindeki renk değişiminin ölçümüne dayalı analiz yanlışılayan hümik maddelerin iş emilimini dikkate almazlar. Mevcut çalışmada, leonarditten H₂S fraksiyonları elde edilmiş olup, ekstraksiyon işlemleri endüstriyel ölçekte de uygulanabilmektedir. Fraksiyonlar, kendi özütlenmiş numunelerimizin Uluslararası Hümik Maddeler Derneği (IHSS) standart numunelerine benzer özelliklere sahip olduğunu kanıtlamak için temel analiz, UV-Vis ve FT-IR spektroskopileri ile karakterize edildi. Farklı H₂S fraksiyonlama yöntemleri, elemental bileşimi ve spektral özellikleri etkiledi. Antioksidan etki, hümik, fulvik ve himatomelanik asitlerin antioksidan etkinliğini taramak için DPPH yöntemi kullanılarak araştırıldı. Ek olarak, DPPH yöntemine göre farklı şekillerde ekstrakte edilen hümik maddelerin antioksidan etkisinin daha kapsamlı bir resmini elde etmek için sonuçlarımızı IHSS standart örnekleriyle karşılaştırdık. Sonuçlarımızı göre, ekstraksiyon yöntemi fraksiyonların sadece fiziko-kimyasal özelliklerini değil, aynı zamanda serbest radikal yakalama aktivitesini de etkiler.

Anahtar Kelimeler: hümik maddeler; antioksidan; hümik asit; fulvik asit; himatomelanik asit; leonardit; radikal süpürme aktivitesi; DPPH; çkarma



Alıntı: Csicsor, A.; Tombacz, E.

Hümik Maddelerin Taranması

Leonardite'den Ücretsiz Olarak Çıkarılmıştır

Radikal Temizleme Etkinliği Kullanarak

DPPH Yöntemi. Moleküller 2022, 27,

6334. <https://doi.org/10.3390/moleküller27196334>

Akademik Editör: Roberto

Mandrioli

Geliş tarihi: 21 Ağustos 2022

Kabul tarihi: 22 Eylül 2022

Yayın tarihi: 26 Eylül 2022

Yayıncının Notu: MDPI, yayınlanan haritalardaki

ve kurumsal bağlantılardaki yetki iddiaları

konusunda tarafsız kalır

ilişkiler.



Telif hakkı: © 2022 yazarlara aittir.

Lisans Sahibi MDPI, Basel, İsviçre.

Bu makale açık erişimli bir makedir

ve artılar altında dağıtılır ve

Creative Commons koşulları

Atıf (CC BY) lisansı ([https://](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)[creativecommons.org/licenses/by/](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

4.0/).

1. Giriş

Uluslararası Hümik Maddeler Derneği (IHSS) tarafından bildirildiği üzere hümik maddeler (HS'ler), farklı dağılımlı malzemelerin karmaşık ve heterojen karışımlarıdır. Bitki ve mikrobiyal kalıntıların çürümesi ve doğal dönüşümü sırasında humifikasyon adı verilen bir süreçte biyokimyasal ve kimyasal reaksiyonlarla toprakta, tortuda ve doğal sularda oluşurlar [1]. Hümik maddeler, toprak ve sudaki doğal organik maddenin (NOM) yanı sıra göl çöktürleri, turbalar, kahverengi kömürler ve leonardit gibi jeolojik organik birikintilerdeki ana bileşenleridir.

IHSS'nin operasyonel tanımına göre, hümik maddeler farklı çözünürlükteki dört fraksiyona bölünebilir. Humin, hümik asitler (HA), fulvik asitler (FA) ve alkolde çözünür himatomelanik asitler (HY) gibi. Her fraksiyonun farklı özellikleri vardır; tekdüze bir moleküler yapıya sahip değildir ve sadece fonksiyonel molekül grupları benzer şekilde davranır [2]. Hümik maddelerin tam bileşiminin kökenlerine (toprak, turba, leonardit, su veya hava), konuma ve ekstraksiyon teknolojisine bağlı olarak farklılık gösterdiğine dikkat etmek önemlidir. Fraksiyonlar, bileşimdeki farklılıklardan dolayı farklı özelliklere sahip olabilir ve farklı oranlarda farklı fonksiyonel gruplar veya benzer fonksiyonel gruplar içerebilir. Hümik maddeler fraksiyonlarının ayrılması için çeşitli yöntemler vardır. IHSS yöntemleri en saf kesirlerden birini verir; ancak, prosedürler karmaşık, çok adımlı,

endüstriyel miktarlarda uygulanması pahalı ve zordur. Araştırmanın amacından biri, daha büyük, endüstriyel ölçekte çıkarılabilecek fraksiyonlar üretmektir. Fraksiyonasyon işlemlerinin iki büyük ekstraksiyon grubu (alkali ve asidik) üzerindeki etkileri, fraksiyonların kompozisyonunu nasıl değiştirdikleri ve hepsinden önemlisi fraksiyonların antioksidan özellikleri ile de ilgilendirilmiştir. Fraksiyonların gıda endüstrisi güvenlik amaçları için incelenmediğine dikkat etmek önemlidir; bu nedenle burada sunulan ekstraksiyon prosedürleri, gıda güvenliği açısından numunelerin ayrılmasını sağlamaz.

Hümkik maddelerin bu geniş çeşitliliğinden dolayı hemen hemen her tarım alanında kullanılmaktadırlar. Araştırmalar hümkik maddelerin kullanmanın bitki büyümesini ve oksijen taşımasını uyarabildiğini, solunumu ve tohum çimlenmesini hızlandırdığını ve besinlerin bitkiler tarafından verimli bir şekilde ekilde kullanılmasını teşvik ettiğini göstermektedir [3]. Hayvancılıkta hümkik maddelerin kullanılmasının birçok avantajı vardır; besin emilimini artırabilir, büyümeyi düzenleyebilen sindirim fonksiyonlarını hızlandırabilir ve antiviral veya antibakteriyel etki ile sonuçlanan metabolizmayı etkileyebilir [4]. Birçok çalışmada hümkik maddelerin inflamasyonu önleyebildiğini, bağışıklık sistemini uyarabildiğini ve toksik maddeleri absorbe edebildiğini göstermiştir [5].

Bildiğimiz kadarıyla hümkik maddeler en az binlerce yıldır insan uygulamaları için kullanılmaktadır. Birçok araştırılmaya dayanarak, hümkik maddelerin antiviral, anti enflamatuar, ağır metal şelatlayıcı, antitümör, antioksidan ve fotokoruyucu özelliklere sahip olduğu bulunmuştur [6]. Bu özellikler, hümkik maddelerin genleri veya iyon değişimini düzenleme, stres reaksiyonlarını modüle etme ve farklı sinyal iletim süreçlerini aktive etme gibi hücrel ve fizyolojik etkileriyle bağlantılıdır [7]. Serbest radikalle ilişkili hastalıklar (örneğin, obezite, kardiyovasküler hastalık ve maligniteler) dünya çapında insan yaşamında hala önemli bir rol oynamaktadır ve hümkik maddeler bu hastalıkları önlemek için iyi bir alternatif olabilir [8].

Bağımsız olarak var olabilen ve eşleşmemiş bir elektron içeren her moleküler türe serbest radikal denir. Antioksidanlar, ana serbest radikal temizleyicilerdir, büyük olasılıkla reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif nitrojen türleri (RNS) temizleyicilerdir. Bu serbest radikal süpürücü moleküller, radikallerin hücrel hasar verme kapasitesini geciktirebilir, azaltabilir veya inhibe edebilir [9]. HS'lerin neden bir antioksidan etkiye sahip olabileceği sorusu ortaya çıkabilir. Birinci neden, çoğunlukla bitki artıklarından oluşmaları ve bitkilerin antioksidan moleküller üretebilmeleridir. Bu moleküller zamanla hümkik maddelerin yapısında kısmen veya tamamen oluşur. İkincisi, hümkik maddelerin kimyasal yapısı bu soruyu cevaplayabilir. Kimyasal yapıları itibarıyla kinon ve semikinon gruplarına sahip polihidroksi karboksilik asitlerdir. Bazı ağaçlardan, flavon iskeleti denilen yapının hidroksi grupları tarafından çoklu ikame edildiği flavonoid fenollere benzerler. Bununla birlikte, antioksidan özelliklerden sorumlu olduğu bilinen bir kinoid yapıya da sahiptirler [10]. Hümkik maddelerin bu özellikleri, hem klasik analitik yöntemlerle (redoks titrasyonları) hem de enstrümantal analitik ölçümlerle (Elektron paramanyetik rezonans, ESR) [11-13] bir dizi bilimsel yayında zaten gösterilmiştir.

Antioksidan kapasitenin (AOC) kantitatif tayini için artan bir talep vardır, bu nedenle son yıllarda birçok analitik prosedür ve ölçüm sistemi geliştirilmiştir. AOC ölçüm yöntemleri iki ana gruba ayrılabilir. Birinci grup elektron geçişli (örneğin, 2,2-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikal-tutucu; ferrik indirgeyici antioksidan güç (FRAP); bakır indirgeyici antioksidan aktivite (CUPRAC)) esaslıdır ve ikinci grup içerir hidrojen atomu transferine dayalı yöntemler (örneğin, oksijen radikal absorban kapasitesi (ORAC); foto kemilü minesans (PCL); toplam radikal tutucu antioksidan potansiyeli (TRAP)) [14].

Farklı yöntemlerle ölçülen hümkik maddelerin antioksidan özelliklerinin karakterizasyonu ile ilgili oldukça iyi makaleler vardır; ancak, bildiğimiz kadarıyla, Leonardit fraksiyonları sistematik olarak araştırılmamıştır. Avvakumova ve ark. [15] standart koşullar altında 1,4-dioksanin (I) radikal zincirle başlatılan oksidasyonunu kullanarak hümkik maddelerin fraksiyonlarının antioksidan aktivitesini (AOA) ölçerek peloidlerden ekstrakte edilen hümkik maddeleri inceledi. Khil'ko ve ark. [16], linyit kömüründen HA çıkarmışlar ve dimetil sülfoksit (DMSO) çözeltiliğinde azobisobutironitril (AIBN, reaksiyon başlatıcı) tarafından başlatılan kümen ve etilbenzenin sıvı faz oksidasyonunu incelemiştir.

geniş konsantrasyon aralığı. Zykova ve ark. [17] ayrıca turbadan ekstrakte edilen HA'nın antioksidan özelliklere sahip olduğunu elektrokimyasal ölçümler ve DPPH yöntemi ile kanıtlamaya çalışmışlardır. Karadirek ve ark. [18] farklı çim kaynaklarından elde edilen HA örneğinin toplam AOC'sini farklı yöntemler (CUPRAC; Folin-Ciocalteu yöntemi, FC; QUENCHERCUPRAC; QUENCHER-FC gibi) kullanarak araştırdı. Sonuçlarına göre, her yöntem HS'lerin AOC'ye sahip olduğunu kanıtlayabildi, ancak bu sonucu ilişkilendirmek zor. Klein ve ark. [19], farklı kaynaklardan (toprak, turba, doğal su ve kömür) elde edilen HA ve FA numunelerinin her biri için AOC'yi ölçmek için ORAC yöntemini kullandı. Karasal kaynaklara (turba, toprak) ilişkin verileri, FA'ların aynı kaynaktan izole edilen HA'ya kıyasla çok daha yüksek AOC değerleri ile karakterize edildiğini göstermektedir. HA'nın antioksidan etkisi elektrokimyasal deneylerle de belirlenebilir. Aeschbacher ve ark. [20], hümkik maddelerin AOC'si hakkında bilgi elde etmek için hümkik maddelerdeki elektron veren kısımlardan oluşan elektrotlara elektron transferi sağlamak için aracılı elektrokimyasal oksidasyonu (MEO) kullandı. Verrillo [21], antioksidan içeriği hakkında bazı bilgiler elde etmek için TPC (Toplam Fenolik İçerik) yöntemini kullanmıştır.

Hümkik maddeler örneklerinin TPC'si ile antioksidan kapasiteleri arasında güçlü bir ilişki buldular. Yani hümkik maddeler örneklerinin antioksidan aktiviteleri lignin fragman içeriği ile ilişkilidir. Smirnova ve ark. [22] aktif asidik grupların (-COOH, fenolik -OH) mevcudiyeti ile antioksidan aktiviteyi incelediler. Sonuçları, HA'nın hidrokarbonların radikal oksidasyonunda antioksidan aktivite ve C vitamini oksidasyonunda pro-oksidan özellikler sergilediğini gösterdi. Nikolaev ve ark. [23] standart ve ticari olarak mevcut HA (Suwannee Nehri) ve FA (Suwannee Nehri) örneklerini ölçmüştür. Numunelerin AOC'si, HA varlığında radikal katyon ABTS'nin ((2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin-6-ül fonik asit) diamonyum tuzu) 734 nm'de absorpsiyonundaki azalma olarak ölçüldü ve 4-10 mg/mL konsantrasyon aralığındaki FA numuneleri farklı pH seviyelerinde elde edilen sonuçlar, artan pH ile HA ve FA AOC'de önemli bir artış gösterdi.

3,75'ten 6,80'e.

Serbest radikal yakalama aktivitesini ölçmek için en yaygın yöntemlerden biri, DPPH radikallerinin indirgenmesine dayanan DPPH yöntemidir. Bu nedenle, fraksiyonlarımızın ve bazı referans numunelerimizin serbest radikal yakalama kabiliyeti ve burada ölçülen hümkik maddelerin fizikokimyasal özellikleri ile korelasyonu hakkında bir fikir edinmek için bu yöntem seçtik. Çalışmamızda hümkik maddeler hakkında daha geniş ve derin bir anlayış için hümkik maddeler fraksiyonlarının alkali ve asidik ekstraksiyon yöntemlerini ve fraksiyonların antioksidan etkisini karşılaştırmaya çalışıyoruz. Kullandığımız hammadde, doğal olarak yüksek miktarda H₂S (>%70) içeren Leonardit olarak adlandırılır.

2. Sonuçlar ve Tartışma

2.1. Ekstraksiyonlar

Ekstraksiyonlardan sonra altı farklı numune ayrı ayrı satın alınan üç IHSS numunesi elde ettik. Tüm numune adları Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 1. Örneklerin isimleri, kısa isimleri, ekstraksiyon yöntemi ve ham maddesi.

Kesrin Adı	Kısa Adı (Kod)	Ekstraksiyon Yöntemi	Hammadde
IHSS Hümkik asit	IHSS HAP (1S103H)	IHSS	Turba
IHSS Hümkik asit	IHSS HAL'ı (1S104H)	IHSS	Leonardit
IHSS Fülvik asit	IHSS FAP (2S103F)	IHSS	Turba
Hümkik asit	al-HA	alkali	Leonardit
Fülvik asit	al-FA	alkali	Leonardit
Himatomelanik asit	al-HY	alkali	Leonardit
Hümkik asit	ve-HA	Asitlenmiş	Leonardit
Fülvik asit	ve-FA	Asitlenmiş	Leonardit
Himatomelanik asit	ve-HY	Asitlenmiş	Leonardit

2.2. Element Analizi

Elemental kompozisyon verileri Tablo 2'de özetlenmiştir. HA ve FA numunelerimizde ölçülen C, H, N, S ve O miktarları, IHSS standart numunelerinkine benzer. Sonuçlarımızı, Rice ve MacCarthy [24] tarafından değerlendirilen yüzlerce HA ve FA numunesinin element bileşimi ile karşılaştırdığımızda, numunenin O içeriğinin aralık içinde olduğunu görebiliriz (HA fraksiyonları için: ağırlıkça %7,93–56,6 ve FA için fraksiyonlar: ağırlıkça %16,9–55,88). Tablo 2'deki atomik oran verileri için de aynı şeyi söyleyebiliriz, çünkü HA'nın H/C oranı 0,08 ile 1,85 arasında, FA'nınki 0,77 ile 2,13 arasındadır; HA'nın O/C oranları 0,08 ile 1,2, FA'nınki ise 0,17 ile 1,19 arasındadır.

Tablo 2. Örneklerin elementel analiz sonuçları. C, H, N, O ve S'nin kütle içeriği olduğu ve farklı atomik oranların, kendi kendine karşılaştırılan numuneleri IHSS numuneleriyle karşılaştırmak için gösterildiği yerde.

Örnek	Element Bileşimi (% ağırlık)				Atomik Oranlar				
	C	H	N	S	Odiff	H/C	O/C	C/N	
Leonardit ac-	61,79 ± 0,15	6,95 ± 0,02	1,68 ± 0,04	1,22 ± 0,03	1,65 ±	28,38	1,34	0,34	42,89
HA ac-FA	49,11 ± 1,41	5,61 ± 0,12	0,04	0,85 ± 0,06	2,97 ± 0,01	42,78	1,36	0,65	34,71
	40,19 ± 0,12	5,38 ± 0,09	4,02 ± 0,01			47,44	1,60	0,89	11,66
ve-HY	38,21 ± 1,23	5,20 ± 0,2	0,96 ± 0,06	1,11 ± 0,58		54,52	1,62	1,07	46,42
al-HA	45,03 ± 1,33	6,17 ± 0,19	0,70 ± 0,03	0,38 ± 0,03		47,72	1,63	0,80	75,02
al-FA	40,70 ± 1,17	5,37 ± 0,03	0,98 ± 0,05	1,30 ± 0,56		51,65	1,57	0,95	48,43
al-HY	38,43 ± 0,97	4,2 ± 0,5	1,78 ± 0,09	2,31 ± 1,01		53,28	1,30	1,04	25,18
IHSS HAP	56,37	3,82	3,69	0,71		37,34	0,81	0,50	17,82
IHSS HAL	63,81	3,7	1,23	0,76		31,27	0,69	0,37	60,50
IHSS FAP'ı	51,31	3,53	2,34	0,76		43,32	0,82	0,63	25,57

Sonuçların genel eğilimi, HA, FA ve HY fraksiyonlarının karbon içeriğinin azalması ve oksijen içeriğinin artmasıdır. Bu, IHSS numunelerinde de açıkça görülmektedir. Ancak, kendi özü karşılaştırılan numuneler ile IHSS numuneleri karşılaştırdığımızda farklılıklar görülebilir. Kendi özü karşılaştırılan numuneler için, C biraz daha düşüken, H içeriği yüzde birkaç daha yüksektir. N ve S yüzdeleri kabaca aynıdır.

Fraksiyonlarımızın oksijen içeriği IHSS numunelerinden daha yüksektir ve alkali ekstraksiyondan elde edilen numunelerin bu değerleri asidik ekstraksiyondan daha yüksektir.

Al-HA ve al-HY benzer miktarlarda C içerir, ancak al-HY'de O daha fazladır. Al-FA daha düşük miktarda C içerir, ancak O içeriği en yüksektir. Ac-HA, ac-FA veya ac-HY'den biraz daha yüksek bir C içeriğine sahiptir, ancak O içeriği önemli ölçüde daha düşüktür. Bu sonuçlar Stevenson ve ark.'nın çalışmasıyla uyumludur. [25]. Ayrıca al-HA, ac-HA'dan daha az O içerir, ancak bu artış ırtıcı değildir, çünkü oksijenli gruplar metal koordinasyonunda önemli bir rol oynar [25,26].

Elemental analizin sonuçları, asitle ekstrakte edilmiş fraksiyonların, alkali ekstraksiyonla elde edilen fraksiyonlardan (%0.7 ile 1.78 arasında) daha yüksek nitrojen içeriğine (%0.96 ile %4.02 arasında) sahip olduğunu göstermektedir. C/N oranlarının değerlerini de karşılaştırabiliriz. Leonarditten ekstrakte edilen HA'nın C/N oranı (her iki ekstraksiyon yöntemi için) turbadan ekstrakte edilen IHSS HAP'inkinden (C/N oranı: 17,82) daha yüksektir (34,71 ile 68,35 arasında). Bu, turbadan karşılaştırılan fraksiyonların genellikle daha yüksek nitrojen içeriğine sahip olduğu anlamına gelir. FA fraksiyonlarına bakıldığında, literatürün çoğu, bu fraksiyonun C/N oranı için HA'dan daha yüksek bir değere sahip olduğunu ileri sürmektedir, bunun nedeni düşük N içeriği ve nispeten yüksek C içeriğidir [27-29]. Bu ilişki, turbadan karşılaştırılan numunelerde (iki IHSS numunesi) gözlemlenebilir; ancak leonarditten karşılaştırılan numuneler için durum böyle değildir; bu oran tersine döndü.

Tüm FA fraksiyonları, ilgili HA'dan daha yüksek bir O/C oranı gösterir ve bu, Stevenson ve diğerleri tarafından gözlemlenen eğilimi doğrular. [25]. Alkali ile ekstrakte edilmiş al-HA'nın O/C oranı, asidik karşılaştırmalarından daha yüksektir. Alkaline ekstraksiyonlu fraksiyonların H/C oranları dikkate alındığında, genellikle asit ekstraksiyonlu numunelerden daha yüksektir. Ancak, her iki ekstraksiyondan alınan numuneler için H/C oranı, IHSS standart numunelerinden daha yüksektir.

HY fraksiyonları genellikle en yüksek O içeriğini ve en düşük C miktarını gösterir. Bu nedenle O/C oranları HA ve FA fraksiyonlarından daha yüksektir. H/C oranlarına bakıldığında bu fraksiyon (her iki ekstraksiyon yöntemi için) en yüksek değere ulaşmaktadır.

2.3. FT-IR Spektroskopisi

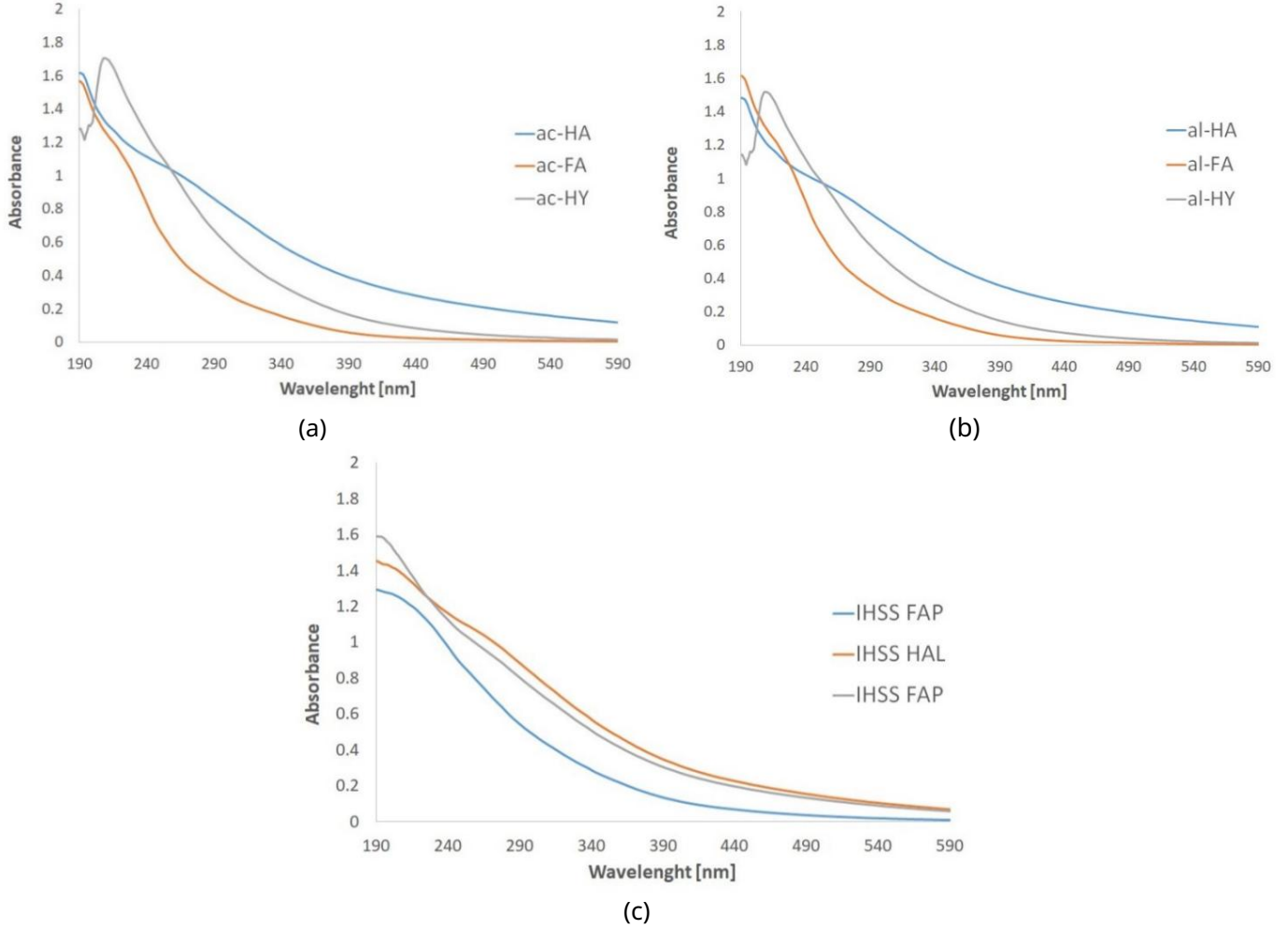
Örneklerin FT-IR spektrumları Şekil 1'de verilmiştir. Literatür verilerine göre yorumlanabilirler [27]. 1040 cm^{-1} civarında ortak keskin ve yoğun bantlar içeren kendi kendine ekstrakte edilmiş tüm numunelerin spektrumları, polisakkaritlerin veya polisakkarit benzeri maddelerin ve/veya silikat safsızlıkların Si-O bağlarının CO gerilmesine atanır. CO'ya atanan 1218 cm^{-1} 'deki bant, aril eterlerin ve fenollerin gerilmesidir. 1420 cm^{-1} 'deki bir zirve, bir OH deformasyon gerilmesidir ve CO, fenolik OH gruplarının gerilmesidir. 1610 cm^{-1} 'deki bir pik, aromatik halkalardaki C=C bağlarının gerilmesine atanabilir, ancak konjuge karbonil gruplarının C=CO titreşimleri 1600 cm^{-1} 'de tamamen göz ardı edilemez. 1710 cm^{-1} 'deki bant, karboksilik grupların C=O gerilmesine karşılık gelir. Üç fraksiyonun diğer ortak bantları, hidrojen bağlı COOH'nin OH gerilme titreşimlerinden kaynaklanan 2850 ve 2930 cm^{-1} civarındadır. FT-IR spektrumları, burada incelenen numunelerin esas olarak inorganik bileşenlerin içeriği açısından farklılık gösterdiğini göstermektedir.

Esneleme titreşimi açısından kendinden ekstrakte edilmiş numunelerin spektrumlarında çok fazla fark yoktur. Temel farklılıklar parmak izi bölgesindedir. Tamamen örtüşmedikleri varsayılabilir, ancak aynı veya çok benzer bir esnemeye ait olabilirler. Örneğin, 1034 cm^{-1} 'deki bant alkali numuneler için görünür, ancak asit numuneler için 1044 cm^{-1} 'e kayar. CO gerilmesine atanan her bant, polisakkaritlere veya polisakkarit benzeri maddelere ve/veya silikat safsızlıklarının Si-O'suna aittir. Aynı durum 1400–1420 cm^{-1} , 1608–1622 cm^{-1} ve 1706–1720 cm^{-1} bantları için de geçerlidir; asidik ve alkali fraksiyonlar için farklıdır.

Farklılıklar bir veya iki ayrı spektrumda bulunabilir. 920 cm^{-1} 'deki bant sadece al-HA'da görülebilmektedir; polisakkaritlerin CO gerilmesine atanır. 1128 cm^{-1} 'deki bant, yalnızca asitle ekstrakte edilmiş numunelerin özelliği olan ikincil alkollerin ve/veya eterlerin CO gerilmesi olan al-FA fraksiyonunun spektrumunda görülebilir. 1214 cm^{-1} 'deki bant sadece al-HY ve al-FA fraksiyonlarında gözlemlendi. 2850 ve 2930 cm^{-1} 'deki zirveler FA'lara özgü değil, diğer fraksiyonlar içindir. HA'lar, 3620 cm^{-1} 'de kaolinitin varlığını gösteren benzersiz bir banda sahiptir. 700 cm^{-1} 'in altındaki dalga sayılarındaki bantlar ve omuzlar mineral maddeye atfedilir.

IHSS ve bizim numunelerimiz arasındaki temel fark, IHSS numunelerinin spektrumlarının, esas olarak daha hassas ve karmaşık ekstraksiyon süreci nedeniyle daha temiz fraksiyonlar nedeniyle daha temiz olmasıdır. Parmak izi aralığı o kadar karakteristik değildir, bu da kendi kendine çıkarılan numuneler kadar çok mineral içermediği anlamına gelir. Diğer fark, OH bağları ve atanan 2850 cm^{-1} ve 2930 cm^{-1} civarındaki bantlardır. Ana benzerlikler, 1230 cm^{-1} 1400 cm^{-1} civarındaki bantlar, 2600 cm^{-1} 'deki büküm (1620 cm^{-1} için), 1710 cm^{-1} (1710 cm^{-1} için), 2850 cm^{-1} , ve 2930 cm^{-1} [30,31].

URI oranı değerlendirildiğinde en küçük değerler (1,2-1,4) HA fraksiyonlarına aittir. HA fraksiyonları, en az miktarda UV emici fonksiyonel gruba ve/veya doymamış olanlara sahiptir. tüm fraksiyonların karbon bağları. Dolayısıyla, fonksiyonel grupların ve/veya doymamış bağların yoğunluğu HA^{7/15} fraksiyonunda en küçüktür, çünkü URI oranı UV soğuran fonksiyonel gruplar ve bağlar (ve bunların yoğunluğu) ile doğru orantılıdır. 1.6 ve 1.7 değerleri ile HY fraksiyonları yine HA ve FA arasındadır. Ayrıca yine FA, HA ve HY fraksiyonlarından daha küçük moleküllere sahiptir. HY örneklerinin E4/E6 oranları, HS'nin üçfraksiyonu için 1.5 ile 2.1 arasındaki en yüksek orandır. Bu ölçülen değerler 10.7 ve 10.2'yi kabul eder, bu da HY fraksiyonu moleküler boyutunun HA ve FA arasında olduğunu söylememize izin verir. literatürde bulunanlarla [25,29,33-36].



Ş ekil 2. IHSS numuneleriyle karşı laş tırma için leonarditten elde edilen farklı HS fraksiyonlarının UV-Vis spektrumları: (a) asitle ekstrakte edilmiş fraksiyonlar, (b) alkali ekstraksiyondan elde edilen fraksiyonlar, (c) IHSS standart numuneleri.

Tablo 3. IHSS numuneleri ile karşı laş tırma için leonarditten H2S fraksiyonlarının farklı dalga boylarındaki absorpsiyon değerlerinin oranı olarak hesaplanan spektrofotometrik göstergeler .

	E4/E6 Oranı ¹	E2/E3 Oranı ¹	URI Sistemi ¹
ac-HA	3,1	2,3	1,3
ac-FA	12,0	6,8	2,0
ac-HY al-	10,7	4,7	1,6
HA al-	4,2	2,5	1,2
FA al-	13,3	5,4	2,1
HY	10,2	4,8	1,7
IHSS HAP	5,5	2,7	1,4
IHSS HAL	5,3	2,5	1,3
IHSS FAP'ı	15,5	4,4	1,5

¹ E4/E6 = Abs465 nm/Abs665 nm; E2/E3 = Abs250 nm/Abs365 nm; URI = Abs210 nm/Abs254 nm.

E2/E3 oranlarından da benzer sonuçlar çıkarılabilir. HA numunelerinin E2/E3 oranları 2,3–2,7 idi ve bu karakteristik parametre , E4/E6 oranı ile aynı şekilde molekül boyutu ile ters orantılı olduğundan, bu, HA numunelerinin büyük moleküllerden oluştuğunu doğrular. FA numunelerinin E2/E3 oranları 4.4-5.4 idi ve bu, FA numunelerinin HA numunelerinden daha küçük moleküllerden oluştuğunu doğruladı. HY numunelerinin E2/E3 oranları 4.7-4.8 idi, bir şekilde HA ve FA'ninkiler arasındaydı, bu nedenle HY'nin molekül boyutu , E4/E6 oranından elde edilen bulgu ile tutarlı olan HA ve FA numuneleri arasında yer almaktadır. .

URI oranı değerlendirildiğinde en küçük değerler (1,2–1,4) HA fraksiyonlarına aittir. HA fraksiyonları, tüm fraksiyonlar arasında en az miktarda UV emici fonksiyonel grup ve/veya doymamış karbon bağına sahiptir. Dolayısıyla, fonksiyonel grupların ve/veya doymamış bağların yoğunluğu HA fraksiyonunda en küçüktür, çünkü URI oranı UV soğuran fonksiyonel gruplar ve bağlar (ve bunların yoğunluğu) ile doğru orantılıdır . 1.6 ve 1.7 değerleri ile HY fraksiyonları yine HA ve FA arasındadır. Ayrıca, yine FA, HS'nin üçfraksiyonu için 1,5 ile 2,1 arasında en yüksek orana sahiptir. Bu ölçülen değerler literatürde [25,29,33-36] bulunanlarla uyumludur.

2.5. DPPH Metodu ile Test Edilen Serbest Radikal Süpürme

Aktivitesi Farklı H2S fraksiyonlarının DPPH radikal ayrışması üzerindeki inhibitör etkisine ilişkin deneysel veriler Tablo 4'te gösterilmektedir. DPPH testlerinin verileri , hazırlanan materyallerin radikal süpürme aktivitesine sahip olduğunu açıkça göstermektedir, çünkü DPPH radikalinin ayrışmasını etkili bir şekilde engellediler.

Tablo 4. IC50 değerleri olarak ifade edilen farklı hümitik maddeler fraksiyonlarının DPPH serbest radikal yakalama aktivitesi .

	IC50 Değerleri ² µg/mL
ac-HA	260
ac-FA	400
ac-HY al-	200
HA al-	180
FA al-HY	310
	190
IHSS HAL	57
IHSS HAP	53
IHSS FAP'ı	326

² IC50 , DPPH radikallerinin %50 oranında temizlendiği etkili H2S konsantrasyonudur.

Daha önce de belirttiğimiz gibi , mor DPPH radikalinin absorpsiyonunun ölçüldüğü 517 nm'de (bkz . bu nedenle Celiz ve ark.'nın önerdiği şekilde bir düzeltme yapmak zorunda kaldık . [37]. Teste göre sadece numuneleri değil, aynı zamanda test karışımlarında bulunan aynı konsantrasyonlarda 517 nm'de H2S çözeltilerinin ışık absorpsiyonunu da ölçtük. Self-absorpsiyon değerleri, ölçülen absorpsiyonun ortadan kaldırılması için DPPH testi. İnhibisyon % değerleri, düzeltilmiş absorpsiyon verileri için Denklem (4)'e göre hesaplandı. Bu sayede daha gerçekçi değerler elde edebiliriz. IC50 değerleri, yani farklı fraksiyonlar için %50 inhibisyona karşılık gelen H2S konsantrasyonları Tablo 4'te özetlenmiştir.

renk numunesi solüsyonlarının rahatsız edici etkisini ortadan kaldırmak için DPPH testi. İnhibisyon % değerleri, düzeltilmiş absorpsiyon verileri için Denklem (4)'e göre hesaplandı. Bu sayede daha gerçekçi değerler elde edebiliriz. IC50 değerleri, yani farklı fraksiyonlar için %50 inhibisyona karşılık gelen H2S konsantrasyonları Tablo 4'te özetlenmiştir.

IHSS örneklerini leonarditten ekstrakte edilen fraksiyonlarımız ile karşılaştırsak, her fraksiyonun antioksidan etkiye sahip olduğunu söyleyebiliriz ancak gerçekten temiz IHSS HA fraksiyonları en etkili olanlardır. IHSS ekstraksiyon protokolündeki zor ve kesin saf tırma adımlarının , DPPH radikal ayrışmasının inhibisyonunda antioksidan etkinliğini azaltabilecek diğer birçok maddenin uzaklaştırılmasını garanti ettiği varsayılabilir. Temiz IHSS fraksiyonları çok daha reaktiftir ve DPPH radikali için erişilebilir. DPPH testine göre bizim çıkardığımız fraksiyonlara göre daha iyi indirgeme yeteneği.

IHSS fraksiyonlarının sonuçlarından, en güçlü antioksidan etkinin HA fraksiyonlarına ait olduğunu ve ekstrakte edilen fraksiyonlar arasında çok az fark olduğunu görebiliriz.

ikincisinden ekstrakte edilen HA lehine turba ve leonarditten. IHSS FAP ayrıca bir antioksidan etki gösterir, ancak HA fraksiyonları kadar güçlü değildir.

Numunelerimiz ayrıca radikal süpürme aktivitesine sahiptir. HY fraksiyonları en güçlü antioksidan eğilimine sahiptir, ardından HA fraksiyonları ve ardından FA fraksiyonları gelir. Genel olarak alkali ekstraksiyonlu numunelerin asit ekstraksiyonlu fraksiyonlara göre daha yüksek antioksidan etkinlik gösterdiğini söyleyebiliriz.

Sonuçlarımızı Phongpaichit ve ark. [38], IC50 değerlerinin 50 ile 100 µg/mL arasında olması nedeniyle IHSS HA fraksiyonlarının orta düzeyde serbest radikal yakalama aktivitesi gösterdiğini söyleyebiliriz. Phongpaichit ve arkadaşlarına göre IC50 değerleri 100 ile 350 arasında olan diğer numuneler [38] zayıf antioksidanlar olarak kabul edilir.

Son zamanlarda, [39] tarafından FA ekstraktının askorbik aside benzer bir DPPH radikali süpürme kabiliyetine sahip olduğu ve 1000 µg/mL'lik bir konsantrasyonda ~%50'lik inhibisyona ulaşmış turba. Kretase şeylerinden ekstrakte edilen doğal organik madde (FA ve HA fraksiyonları) durumunda, 25–1000 µg/mL konsantrasyon aralığında da askorbik asitinkine benzer bir antioksidan etkinlik gözlenmiştir [40]. Bununla birlikte, DPPH radikal ayrışmasının ~%50 inhibisyonu, yukarıdakinden çok daha düşük bir konsantrasyonda (~250 µg/mL) zaten elde edildi. İkinci, Tablo 4'teki HS numunelerimiz için düzeltilmiş LC50 değerlerinin ortalaması ile neredeyse aynıdır. Ancak, bu IC50 değerlerini yaban mersini, ahududu veya böğürtlen gibi iyi bilinen antioksidanların diğer literatür verileriyle karşılaştırırsak [41], numunelerimizin bu antioksidanlar kadar iyi hatta onlardan daha iyi olduğunu söyleyebiliriz. Bununla birlikte hümkik maddeler içeren numuneler genellikle askorbik asit, mor pitanga ve çilek guavasının antioksidan etkinliğine ulaşmaz [42,43].

Yukarıdaki sonuçlara dayanarak, leonarditten ekstrakte edilen fraksiyonlarımızın bir dizisini hazırlayabiliriz, yani HY en güçlü radikal süpürme aktivitesine sahiptir, ardından HA ve son olarak FA fraksiyonları gelir.

3. Malzemeler ve Yöntemler

Turba ve leonardit gibi farklı ham maddelerden Hümkik Maddelerin ekstraksiyonu için farklı yöntemler vardır [44,45]. Yukarıda belirttiğimiz gibi, daha büyük, endüstriyel ölçekte çıkarılabilecek fraksiyonlar üretmek istedik. Ayrıca DPPH yöntemi açısından alkalın ve asidik ekstrakte edilmiş HSS fraksiyonları arasındaki farkları görmek isteriz. IHSS standart numuneleri, HS'lerin gerçekten temiz bir kısımdır, ancak bunları üretmek gerçekten zor ve maliyetli bir süreçtir. Kendi çıkardığımız numunelerimizi karşılaştırmak için fraksiyonlarımıza en yakın olan IHSS numunelerini de satın aldık. Ne yazık ki, IHSS'de leonarditin tüm fraksiyonları mevcut değildir, ayrıca HY fraksiyonu da IHSS'de mevcut değildir.

Bu nedenle, turba (IHSS HAP, 1S103H) ve leonarditten (IHSS HAL, 1S104H) elde edilen IHSS HA'yı satın aldık. Ayrıca turbadan çıkarılan IHSS FA'yı (IHSS FAP, 2S103F) satın aldık.

3.1. Leonarditten Çıkarılan Hümkik Madde

Örnekleri 3.1.1. Leonardit Numunesinin Fiziksel Hazırlanması

Macaristan'daki Dudar kömür madeninde toplu bir leonardit örneği toplandı. Deneysel çalışma için her numuneden yaklaşık 5 kg elde edilmiştir. Önce leonardit numuneleri kurutulur, öğütülür ve elekten geçirilerek 0,5 ile 3 mm arasında fraksiyonlar elde edilir. Hazırlanan numuneler kullanılıncaya kadar plastik poşetlerde ağzı kapalı olarak muhafaza edilmiştir.

Stok çözeltiler taze olarak hazırlandı. Laboratuvar dereceli konsantre HCl (Merck, Kenilworth, NJ, ABD), %20 (ağırlık/ağırlık) oranında bir HCl çözeltisi için kullanıldı. KOH çözeltileri, %2.5 (%w/w) konsantrasyonda %98 analitik dereceli KOH'den (Merck, Kenilworth, NJ, ABD) hazırlandı. Ayrıca %96 (h/h) konsantrasyonda etanol kullandık (Merck, Kenilworth, NJ, ABD). H₂SO₄'ün %10'luk (% ağırlık/ağırlık) çözeltisi için bir solüsyonunu yapmak için laboratuvar dereceli konsantre H₂SO₄ (Merck, Kenilworth, NJ, ABD) kullanıldı. H₂O₂ solüsyonu, Merck, Kenilworth, NJ, ABD'den 35 (%w/w) konsantrasyonda satın alınmıştır.

HA, FA ve HY'nin ekstraksiyonu için ham leonardit kimyasal olarak ön işleme tabi tutuldu.

3.1.2. HCl ile Asidik Ön İş Lem

Leonardit önce Ca-bağlı organik maddeleri serbest bırakmak için HCl ile sindirildi. 100 g, yuvarlak bir şişede 500 mL %20 HCl çözeltisi ile karıştırıldı. Şişenin içeriği, bir geri akış kondansatörü ile 30–40 °C'de 2 saat dikkatlice karıştırıldı. İçerik daha sonra süzüldü ve reaksiyona girmemiş asidi uzaklaştırmak için yıkandı, 40 °C'de bir fırında kurutuldu ve sonraki adımlardan önce saklandı.

3.1.3. Asitle Ön İş Lem Görmüş Leonarditin Fraksiyonlanması

Asitle ön işleme tabi tutulmuş numune, hidrojen peroksit ile oksitlenmiş tir. 40 gr kuru numunedan %10'luk süspansiyon hazırladık ve ardından H₂O₂ solüsyonu (%35 w/w) ile 1:1 oranında (40 gr) karıştırıldı. Tüm H₂O₂'yi ekledikten sonra, solüsyonda daha fazla H₂O₂ kalmadığından emin olmak için süspansiyonu köpürme durana kadar kaynatıldı. Bir sonraki adım, santrifüjlemeler (5 dakika için 4000 rpm) ve 8–12 µm filtre kağıdı ile süzme idi. Ac-FA fraksiyonu süzüntüden elde edildi.

Süzüldükten sonra çamur, ac-HA ve ac-HY fraksiyonlarını elde etmek için %96 etanol ile alkollü ekstraksiyona tabi tutuldu. Daha sonra 10 g çamur, 90 g etanol (%96 w/w) ile bir saat süreyle özümlemedi. Ekstraksiyonu, sedimentasyon ve 8-12 µm filtre kağıdı ile süzme izledi. ac-HA çamurdan ve ac-HY filtrattan elde edildi. Son olarak tüm fraksiyonlar etüvde 40 °C'de kurutuldu ve sonraki deneyler için saklandı.

3.1.4. KOH ile Alkali Ön İş Lem

Leonardite %2.5 KOH solüsyonu ile muamele edildi, daha sonra 500 g leonardit bir cam reaktörde 1500 mL %2.5 KOH solüsyonu ile karıştırıldı. Süspansiyon 2 saat 30–40 °C'de karıştırıldı, sıvı kaybını önlemek için bir geri akış kondansatörü kullanıldı. Daha sonra içerik, çamuru çözüldüğüden ayırmak için santrifüjlendi (4000 rpm, 5 dakika).

3.1.5. Alkali Fraksiyonlama

İlk önce süpernatant, al-FA ve al-HA fraksiyonlarını ayırmak için asitleştirildi. Daha sonra 500 g süpernatant alınmış ve 100 g %10 w/w H₂SO₄ ile karıştırılmış tir. pH'daki önemli düşüş nedeniyle, al-HA çöktü. Asitleştirilmiş süspansiyon süzüldü. Al-FA fraksiyonu süzüntüden ve al-HA fraksiyonu alkollü ekstraksiyondan sonra çamurdan elde edildi.

Filtrelenen çamurun özü, al-HA'yı al-HY'den ayırmak için %96 etanol ile çıkarıldı. Daha sonra çamurdan 10 gr alınarak 90 gr etanol (%96 w/w) ilave edildi ve süspansiyon bir saat ekstrakte edildi. Ekstraksiyonu, sedimentasyon ve filtrasyon takip etti. Katı kısım al-HA idi ve süzüntü al-HY idi. Son olarak tüm fraksiyonlar etüvde 40 °C'de kurutuldu ve sonraki deneyler için saklandı.

3.2. Element Analizi

Hüyük maddelerin element bileşimleri, Napoli Federico II Üniversitesi'nde bir Fisons EA-1108 CHNS O Element Analiz Cihazı (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılarak belirlendi. Toplam karbon, azot ve kükürt miktarları belirlendi.

Kabaca 2-5 mg numune, hassas bir terazide ölçüldü ve bir kalay kapsül içinde bir oksitleyici (vanadyum pentoksit [V₂O₅]) ile karıştırıldı. Kap ve numune bir reaktörde 1000 °C'de yakıldı ve eritildikten sonra kalay kap oksijenle zenginleştirilmiş atmosferde şiddetli bir reaksiyonu teşvik etti. Bu reaksiyonun ürünleri (CO₂, SO₂, NO₂) taşıyıcı gaz (helyum) ile dolgu kolonlara taşınır. Ölçülen sinyal, bir termal iletkenlik detektörü (önceden analiz edilmiş standartlara göre kalibre edilmiş) ile ölçüldü ve numunenin element içeriği, ağırlık yüzdesi olarak hesaplandı. Nem ve kül içeriği için ölçülen verileri düzelttik ve oksijen içeriğini hesapladık [30].

3.3. UV-Vis Spektroskopisi

UV-Vis spektrumları , 190 ve 800 nm arasındaki absorpsiyon spektrumlarını kaydeden bir SP-UV1100, DLAB spektrofotometrede (DLAB Scientific Co., Ltd., Pekin, Çin) elde edildi .

Örneklerin seyreltik çözeltileri 1 cm kuvars küvette ölçüldü. Hüyük bileş enler , aromatik kromoforların ve/veya organik bileş enlerin varlığı nedeniyle genellikle UV-VIS aralığında (190-800 nm), özellikle UV aralığında güçlü absorpsiyon gösterir [46].

UV-Vis spektrumları , kalitenin farklı ampirik parametrelerini ve organik maddenin aromatik içeriğini belirlemek için yaygın olarak kullanılır [46]. Bunlardan biri E4/E6 oranıdır ("renk oranı" olarak da bilinir). E4/E6 oranı, humus kalitesi ile karakteristik olarak değiş en , uluslararası kabul görmüş bir parametredir. 465 ve 665 nm dalga boyunda ölçülen sönme oranıdır (E4/E6) . E4/E6 yüksekse (7-8 veya daha yüksek), nispeten küçük moleküler, daha az kararlı FA ve HA baskındır, ancak oran 3 ile 5 arasındaysa, daha büyük moleküler, daha kaliteli HA baskındır [47] . E4/E6 değeri, hüyük maddelerin moleküler boyutu ile iliş kilidir [48].

Bu oran, numune konsantrasyonundan bağımsızdır, ancak organik madde fraksiyonları ile farklı orijinli humus bileş enleri arasındaki farkı iyi karakterize eder.

Yoğunlaş ma zincirinin uzunluğu ve moleküler boyut arttıkça, absorpsiyon sinyali daha yüksek dalga boylarına doğru kayar (batokromik kayma) [49,50]. HA ve FA'nın E4/E6 oranı ş u ş ekilde hesaplanabilir:

$$E4/E6 \text{ oranı} = \frac{\text{Abs } 465 \text{ nm}}{\text{Abs } 665 \text{ nm}} \quad (1)$$

E2/E3 oranını da belirledik. Orana bağılı olarak, çözünmüş organik maddenin (DOM) moleküler boyutunu ve polimerizasyon derecesini anlayabiliriz . E2/E3 değeri, polimerizasyon ve molekül ağırlığı ile ters orantılıdır.

$$E2/E3 \text{ oranı} = \frac{\text{Abs } 250 \text{ nm}}{\text{Abs } 365 \text{ nm}} \quad (2)$$

Üçüncü oran, UV absorpsiyon oranı indeksi (URI/UV absorpsiyon oranı) oranıdır ve UV absorbe eden fonksiyonel gruplar ile doymamış kısımların oranını gösterir. Bundan fonksiyonel grupların yoğunluğunu anlayabiliriz; yoğunluk arttıkça, URI'nin değeri de artar. Daha kesin olarak, HA en düşük URI değerine sahiptir (HA için 1,59, en yüksek aromatiklik), FA orta bir değere sahiptir (FA için 1,88, orta aromatiklik) ve en düşük aromatikliğe sahip bileş ikler (örneğin, proteinler) maksimum değere sahiptir (BSA için 13.50, en düşük aromatiklik) [51].

$$\text{URI sistemi} = \frac{\text{Abs } 210 \text{ nm}}{\text{Abs } 254 \text{ deniz mili}} \quad (3)$$

UV-Vis absorpsiyon verileri , HS fraksiyonlarının kendi ış ık absorpsiyonu ile 517 nm'de ölçülen (daha sonra bakınız) mor DPPH radikalinin absorpsiyonunu düzeltmek için de kullanıldı .

3.4. FT-IR Spektroskopisi

FT-IR spektrumları , bir Perkin Elmer Frontier FT-IR/NIR spektrometresi (Perkin Elmer, Waltham, MA, ABD) aracılığıyla Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform (DRIFT) tekniği kullanılarak kaydedildi.

Yaklaş ık 2 mg toz tartılarak 200 mg KBr ile agat havanda öğütüldü ve numune tutucu kaba aktarıldı. KBr ve numuneler tamamen kuru olmalıdır (çünkü su IR ile de ölçülebilir ve bu durumda diğer fonksiyonel grupların piklerini maskeleyebilecek yanlış pikler elde ederiz), dolayısıyla 105

C'de kurutulmalıdır. Homojen soluk gri numuneler ve saf KBr, numune tutucuya yerleş tirildi ve ardından cihaza yerleş tirildi. Önce KBr spektrumu ölçüldü ve ardından verilen numune tarandı.

Tüm spektrumlar, 1 cm⁻¹ çözünürlükte 4000–600 cm⁻¹ aralığında kaydedildi .

3.5. DPPH Metodu ile Serbest Radikal Süpürme Aktivitesi Tayini

Antioksidan aktiviteyi ölçmek için en eski yöntemlerden biri, kararlı DPPH molekülünün (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil, Merck, Kenilworth, NJ, ABD) radikal yakalama yeteneğine dayanmaktadır. Reaksiyon sırasında reaksiyon karışımında oluşan koyu mor serbest radikal, bir antioksidan molekül ile karşılaşıldığında rengini kaybeder. Bu renk değişimi kolayca takip edilebilir. Bu popüler bir yöntemdir çünkü DPPH, radikal oluşturucu bir molekül olarak kararludur, kolaylıkla elde edilebilir ve daha az reaktiftir. Bununla birlikte, en büyük dezavantajı, canlı bir organizmanın normal metabolik süreçlerinde üretilmeyen kararlı bir radikal kullanmasıdır. Bu nedenle, bu yöntem numunenin etkinliğini biyolojik radikallerin bir antioksidanı olarak tanımlayamaz [52]. Ölçüm sırasında 1 mL örneğe 6 mL DPPH çalıştırma çözümü (0,1 mg/mL) ilave edilerek vortekslenir ve renk reaksiyonunun gelişmesini sağlamak için 30 dakika tamamen karanlıkta saklanır. 30 dakika geçtikten sonra absorbans 517 nm'de ölçüldü. Her örneğin 517 nm'de kendi ışık absorpsiyonunu ölçerek ve bu değeri metoda göre ölçülen absorbans değerinden çıkarak yaptığımız arka plan düzeltmesinden sonra, bu şekilde düzeltilmiş absorbans değeri ile hesaplamaya devam ettik [37]. İnhibisyon %'si (% İnhibisyon) ve IC50 değeri (%50 inhibisyona karşılık gelen değer) düzeltilmiş absorbans verilerinden hesaplandı. Konsantrasyonun bir fonksiyonu olarak, hesaplanan Engelleme eğrisi grafiksel olarak ve Microsoft Excel'in eğri uydurma seçeneği kullanılarak, elde edilen eğrinin denkleminde %50 inhibisyona karşılık gelen konsantrasyon değeri hesaplandı.

$$\text{engelleme \%} = \frac{\text{Abskontrol} - \text{Absample}}{\text{mutlak kontrol}} \cdot 100 \quad (4)$$

Abscontrol = DPPH kör çözümü tek başına

absorbansı Absample = DPPH test çözeltilerinin farklı konsantrasyonlardaki ekstraktlarla birlikte absorbansı, kendi absorpsiyonları ile düzeltilmiş tir.

Referans olarak gallik asit (Perkin Elmer, Waltham, MA, ABD) kullandık. %96 EtOH içindeki gallik asit stok çözümü, 1.0 mg/mL'lik bir konsantrasyonda hazırlandı. Stok çözeltilerden bir seyreltme serisi (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0 mg/mL gallik asit konsantrasyonu) hazırlandı ve daha sonra yukarıda tarif edildiği gibi ölçüldü.

4. Sonuçlar

Ekstraksiyon yönteminin fraksiyonların sadece fiziko-kimyasal özelliklerini değil aynı zamanda serbest radikal yakalama yeteneğini de etkilediği varsayımımız kanıtlanmış tir. Deneysel veriler, farklı fraksiyonlama yöntemlerinin, örneğin, fraksiyonların fonksiyonel grubunun içeriği, bunların kalitesi ve miktarı ve FT-IR spektral özellikleri ile ilgili olan element bileşimini etkilediğini göstermiştir tir. kendi UV-Vis ışık emiliminin özellikleri ve mor DPPH radikalinin renk değişimi yoluyla ölçülen serbest radikal yakalama aktivitesi üzerindeki etkisi. Ayrıca, bu fiziko-kimyasal farklılıklar, DPPH yöntemini kullanan fraksiyonların serbest radikal yakalama aktivitesini nasıl etkiler? DPPH protokolü kullanılarak yapılan antioksidan testinden elde edilen temel gözlemimiz, hammaddeleri ister leonardit ister turba olsun, IHSS HA fraksiyonlarının en güçlü antioksidan etkiye sahip olduğudur. IHSS örneklerinin kapsamlı bir şekilde temizlenmesinin bu sonuca büyük olasılıkla katkıda bulunduğunu not etmeliyiz. Leonardit ve turbadan ekstrakte edilen numunelerin antioksidan etkisi arasında bir fark olduğu doğrudur, ancak asidik ve alkaline ekstrakte edilmiş numunelerimizde deneyimlediğimiz farklı ekstraksiyon yöntemlerinin etkisi kadar büyük değildir. Bir fraksiyonun moleküllerinin başka bir antioksidan test molekülü ile nasıl reaksiyona girdiği ve birbirleriyle nasıl reaksiyona girdiği konusunda stereokimyasal kısıtlamalar ve farklılıklar vardır ve H2S fraksiyonlarının antioksidan potansiyelini ortaya çıkarmak için farklı tipte antioksidan ölçüm yöntemleri uygulanmalıdır. Bu şekilde humik maddelerin antioksidan etkisinin daha kapsamlı bir resmini elde edebiliriz.

Belki de en ilginç bulgumuz, tüm HA örneklerinin FA örneklerinden daha yüksek antioksidan potansiyeline sahip olmasıydı. Bu, Klein ve ark. [19] farklı kaynaklardan ekstrakte edilen hümitik maddeler için, HA'nın bir antioksidan olarak gelecekteki kullanımı için ekonomik bir avantaja sahiptir, çünkü genellikle ham maddelerden FA'dan daha yüksek miktarlarda HA ekstrakte edilebilir. Ne yazık ki hümitik maddeler fraksiyonlarının endüstriyel ölçekli üretim yöntemi, IHSS HA numuneleri gibi daha yüksek antioksidan potansiyeli olan saf numuneler sağlayamaz.

Yazar Katkıları: Kavramsallaştırma, AC ve ET; metodoloji, AC; soruşturma, AC; kaynaklar, AC; veri iyileştirme, AC; yazma—orijinal taslak hazırlama, AC; yazma—inceleme ve düzenleme, ET ve AC; görselleştirme, AC; denetim, ET
Tüm yazarlar, makalenin yayınlanan sürümünü okudu ve kabul etti.

Finansman: Bu araştırma herhangi bir dış finansman almamıştır.

Hasta Onamı Beyanı: Uygulanamaz.

Veri Kullanılabilirlik Beyanı: Uygulanamaz.

Teşekkür: Yazarlar, ilham verici ve değerli tavsiyeleri için János Csicsor'a minnettardır.
Yazarlar ayrıca Hymato Products Kft. mali ve teknik destekleri için.

Çıkar Çatışmaları: Yazarlar herhangi bir çıkar çatışması beyan etmemektedir.

Referanslar

- Zavarzina AG; Dançenko, N.; Demin, VV; Artemyeva, Z.; Kogut, B. Hümitik Maddeler: Hipotezler ve Gerçeklik (Bir İnceleme). *Avrasya Toprak Bilimi* 2021, 54, 1826–1854. [[ÇaprazRef](#)]
- Waksman, SA Humus Origin, Chemical Bileşimi ve Doğadaki Önemi, 1. baskı; The Williams & Wilkins Company: Baltimore, MA, ABD, 1936; s. 100-1 21–62.
- Trevisan, S.; Francioso, O.; Quaggiotti, S.; Nardi, S. Bitki-toprak arayüzünde hümitik maddeler biyolojik aktivite. *Bitki Sinyali Davranış* 2010, 5, 635–643. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huck, TA; Porter, N.; Bushell, ME Pozitif Antibiyotik üreten toprak izolatlarının seçimi. *J. Gen. Microbiol.* 1991, 137, 2321–2329. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
- İslam, KMS; Schumacher, A.; Gropp, Hayvan Tarımında JM Hümitik Asit Maddeleri. *Pak. J. Nutr.* 2005, 4, 126–134.
- Pant, K.; Singh, B.; Thakur, N. Shilajit: Kansere Karşı Hümitik Madde Her Derde Deva. *Int. J. Toksikol. Eczane. Res.* 2012, 4, 17–25.
- Steinberg, CEW; Meinelt, T.; Timofeyev, MA; Bittner, M.; Menzel, R. Hümitik maddeler. *çevre. bilim kirlilik. Res.* 2008, 15, 128–135. [[ÇaprazRef](#)]
- Florence, TM Serbest radikallerin hastalığındaki rolü. *Avusturya NZ] Oftalmol.* 1995, 23, 3–7. [[ÇaprazRef](#)]
- Brainina, K.; Stozhko, N.; Vidrevich, M. Antioksidanlar: Terminoloji, Yöntemler ve Gelecekteki Hususlar. *Antioksidanlar* 2019, 8, 297–305. [[ÇaprazRef](#)]
- Schnitzer, M. Hümitik Maddeler: Kimya ve Reaksiyonlar. *Toprak Organik Maddesinde*; Elsevier: Amsterdam, Hollanda, 1978; s. 1–64.
- Helburn, RS; MacCarthy, P. Hümitik asidin bazı redoks özelliklerinin alkalik ferrisiyanid titrasyonu ile belirlenmesi. *Anal. Chim. Acta* 1994, 295, 263–272. [[ÇaprazRef](#)]
- Kotzias, D.; Beyerle-Pfnür, R. Hümitik maddelerin ESR spektroskopisi ile karakterizasyonu. *Int. J. Rad. Uygulama Ögr.* 1989, 40, 897–899. [[ÇaprazRef](#)]
- Machado, W.; Franchini, JC; Guimaraes, MF; Filho, JT Toprak yığınlarında hümitik ve fulvik asitlerin spektroskopik karakterizasyonu, Brezilya. *Heliyon* 2020, 6, 1–8. [[ÇaprazRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yusuf, AA; Moharram, HA Antioksidan Aktiviteyi Belirleme Yöntemleri: Bir Gözden Geçirme. *Alex. J. Gıda Bilimi Teknoloji* 2014, 11, 31–42.
- Avvakumova, NP; Gerchikov, AY; Khairullina, VR Peloidlerden izole edilen hümitik maddelerin antioksidan özellikleri. *eczane kimya J.* 2011, 45, 50–51. [[ÇaprazRef](#)]
- Khil'ko, SL; Efimova, IV; Smirnova, Kahverengi Kömürden Hümitik Asitlerin OV Antioksidan Özellikleri. *Katı Yakıt Kimyası* 2011, 45, 367–371. [[ÇaprazRef](#)]
- Zikova, MV; Schepetkin, IA; Belousov, MV; Krivoshchekov, SV; Logvinova, Los Angeles; Bratishko, KA; Yusubov MS; Romanenko, SV; Quinn, MT Çeşitli Kökenlere Sahip Turbadan İzole Edilen Hümitik Asitlerin Fizikokimyasal Karakterizasyonu ve Antioksidan Aktivitesi. *Moleküller* 2018, 23, 753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Karadirek, S.; Kanmaz, N.; Balta, Z.; Demirci, P.; Üzer, A.; Hızal, J.; Apak, R. Hümitik asitlerin toplam antioksidan kapasitesinin CUPRAC, Folin-Ciocalteu, asil metal nanoparçacık ve katı-sıvı ekstraksiyon bazlı yöntemler kullanılarak belirlenmesi. *Talanta* 2016, 153, 120–129. [[ÇaprazRef](#)]

19. Klein, OI; Kulikova, NA; Konstantinov, AI; Zikova, MV; Perminova, IV Antioksidan Kapasitesinin Sistematik Bir Çalışması Peroksil Radikallerine Karşı Hüyük Maddeler: Yapı İlişki. Polimerler 2021, 13, 3262. [CrossRef]
20. Aeschbacher, M.; Graf, C.; Schwarzenbach, RP; Sander, M. Humik Maddelerin Antioksidan Özellikleri. çevre. bilim Teknoloji 2012, 46, 4916–4925. [ÇaprazRef]
21. Verrillo, M.; Salzano, M.; Savy, D.; Di Meo, V.; Valentini, M.; Cozzolino, V.; Piccolo, A. Kompostlanmış tarımsal biyokütlelerden hüyük maddelerin antibakteriyel ve antioksidan özellikleri. kimya Biol. Teknoloji Agric. 2022, 9, 28. [CrossRef]
22. Smirnova, AV; Efimova, IV; Khil'ko, SL Radikal Zincirde Askorbik ve Humik Asitlerin Antioksidan ve Pro-oksidan Aktivitesi Oksidasyon Prosesleri. Rus. J. Uygulama kimya 2012, 85, 252–255. [ÇaprazRef]
23. Nikolayev, I.; Klein, O.; Kulikova, N.; Stepanova, E.; Koroleva, O. Humik ve Hüyük Benzeri Maddeler için Antioksidan Kapasite Değerlendirme Protokolünün Geliştirilmesi ve Doğrulanması. Hüyük Maddelerin Moleküler Anlayışından Yenilikçi Uygulamalarına; Perminova, IV, Kulikova, NA, Eds.; MGUMUS Yayınları: Moskova, Rusya, 2008; sayfa 441–444.
24. Piriç JA; MacCarthy, P. Hüyük maddelerin temel bileşiminin istatistiksel değerlendirmesi. Org. Jeokimya. 1991, 17, 635–648. [ÇaprazRef]
25. Stevenson, FJ Humus Chemistry: Genesis, Bileşim, Reaksiyonlar, 2. baskı; John Wiley & Sons: New York, NY, ABD, 1994; p. 496.
26. Ephraim, JH Hüyük Maddeler Tarafından Metal İyon Bağlanması Yorumlanmasında Bir Kavram Olarak Heterojenlik — Çinkonun Bağlanması Sucul Fulvik Asit tarafından. Anal. Chim. Acta 1992, 267, 39–45. [ÇaprazRef]
27. Lobartini, JC; Tan, KH; Asmussen, LE; Leonard, RA; Himmelsbach, D.; Gingle, AR XAD-8 reçnesi ve geleneksel NaOH yöntemleriyle topraktan ve sudan izole edilen hüyük madde. Toprak Bilimi Bitki Analizi 1989, 20, 13–14. [ÇaprazRef]
28. Tan, KH; Lobartini, JC; Himmelsbach, DS; Asmussen, LE Hava ve nitrojen altında ekstrakte edilen hüyük asitlerin bileşimi atmosfer. Toprak Bilimi Bitki Analizi 1991, 22, 9–10. [ÇaprazRef]
29. Campanella, L.; Kosma, B.; Deglino, N.; Ferri, T.; Petronio, BM; Pupella, A. Deniz Suyundaki Humik Bileşikler ve Antarktika'dan Deniz Sedimentleri. Int. J. Çevre. Anal. kimya 1994, 55, 1–4. [ÇaprazRef]
30. Doskocil, L.; Burdóková-Szewieczková, J.; Enev, V.; Kalina, L.; Wasserbauer, J. Bazı Avrupa linyitlerinden izole edilen hüyük asitlerin spektral karakterizasyonu ve karşılaştırılması. Yakıt 2018, 213, 123–132. [ÇaprazRef]
31. Fuentes, M.; Gonzalez-Gaitano, G.; García-Mina, JM Topraklardan ve kompostlardan hüyük maddelerin kimyasal doğasını incelemek için UV-görünür ve floresan spektroskopilerinin kullanılması. Org. Jeokimya. 2006, 37, 1949–1959. [ÇaprazRef]
32. FT-IR, 13C NMR ve Floresan Spektrumları/IHSS. Çevrimiçi olarak mevcuttur: <https://humic-substances.org/ftir-13c-nmr-and-fluorescence-spektrum/> (9 Eylül 2022'de erişildi).
33. Zou, J.; Zhang, H.; Yue, D.; Huang, J. Geleneksel alkali ekstraksiyon yöntemi, kimyasal olarak farklı hüyük asit izole edilmesinde geçerli midir? Av. kimya Müh. 2021, 6, 1–5. [ÇaprazRef]
34. Şenel, N.; D'Orazio, V.; Ricca, G. Eurosoils'in ilk neslindeki hüyük asitler. Geoderma 2003, 116, 325–344. [ÇaprazRef]
35. Ağren, A.; Buffam, I.; Berggren, M.; Piskopos, K.; Jansson, M.; Laudon, H. Kış ve yaz arasındaki geçiş sırasında orman-sulak alan gradyanındaki boreal akıntılarda çözülmüş organik karbon özellikleri. J. Geophys. Res. 2008, 113, 1–11. [ÇaprazRef]
36. De Haan, H. Turbalı göl suyunda hüyük maddelerin solar UV ışığı penetrasyonu ve fotodegradasyonu. Limnol. okyanus bilimcisi 1993, 38, 1072–1076. [ÇaprazRef]
37. Celiz, G.; Renfige, M.; Finetti, M. Spektral analiz, DPPH* UV-Vis testinin antioksidan aktivitesini tahmin etmek için kullanılmasına izin verir. renkli bileşikler. kimya Baba. 2020, 74, 3101–3109. [ÇaprazRef]
38. Phongpaichit, S.; Nikom, J.; Rungjindamai, N.; Sakayaroj, J.; Hutadilok-Towatana, N.; Rukachaisirikul, V.; Kirtikara, K. Garcinia bitkilerinden izole edilen endofitik mantarlardan elde edilen özlerin biyolojik aktiviteleri. FEMS İmmunol. Med. Mikrobiyoloji. 2007, 51, 517–525. [ÇaprazRef] [PubMed]
39. Sen, SH; Yoon, MY; Moon, JS Fulvik Asidin Antioksidan ve Antiinflamatuvar Aktivite Çalışması. J. Nat. bilim Biol. Med. 2021, 12, 285–289.
40. Huda, F.; Ancüm, M.; Han, S.; Han, H.; Sahibzade, MUK; Hüsrev, A.; Jan, A.; Ullah, N.; Şah, Y.; Abbas, M.; et al. Nowshera-Pakistan bölgesindeki kretase şeyllerinden ekstrakte edilen doğal organik maddenin antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antioksidan aktiviteleri. Arap. J. Chem. 2022, 15, 1–11. [ÇaprazRef]
41. Hangun-Balkir, Y.; McKenney, ML Meyvelerin ve resveratrolün antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi. Yeşil Kimya Letonya Rev. 2012, 5, 147–153. [ÇaprazRef]
42. Denardin, CC; Hirsch, GE; Da Rocha, RF; Vizzotto, M.; Henriques, AT; Moreira, JCF; Guma, FCR; Emanuelli, T. Dört Brezilya yerli meyvesinin antioksidan kapasitesi ve biyoaktif bileşikleri. J. Gıda İlaç Anal. 2015, 23, 387–398. [ÇaprazRef]
43. Nariya, PB; Bhalodia, NR; Şukla, VJ; Acharya, R.; Nariya, MB Cordia dichotoma'nın antioksidan aktivitesinin in vitro değerlendirilmesi (Forst f.) havlama. Ayu 2013, 34, 124–128. [ÇaprazRef]
44. Kuwatsuka, S.; Watanabe, A.; Itoh, K.; Arai, S. Humik ve Fulvik Asitlerin Hazırlanmasına İlişkin İki Yöntemin Karşılaştırılması, IHSS Yöntem ve NAGOYA Yöntemi. Toprak Bilimi Bitki Bes. 1992, 38, 23–30. [ÇaprazRef]
45. Janos, P. Hüyük maddelerin kimyasında ayırma yöntemleri. J. Kromatr. 2003, 983, 1–18. [ÇaprazRef]
46. Chen, J.; Gü, B.; Le Boeuf, EJ; Pan, H.; Dai, S. Doğal yapısal ve işlevsel özelliklerinin spektroskopik karakterizasyonu organik madde fraksiyonları. Chemosphere 2002, 48, 59–68. [ÇaprazRef]
47. Saab, SC; Martin-Neto, L. Yoğun aromatik halkalar ve E4/E6 oranı: NMR CP/MAS13C tarafından incelenen gleysoils'teki hüyük asitler, ve dipol defazı. kimya Nova 2007, 30, 260–263. [ÇaprazRef]

48. Avagyan, A.; Runkle, BRK; Kutzbach, L. Belirlemek için yüksek çözünürlüklü spektral absorpsiyon ölçümlerinin uygulanması uzak bölgelerde çözünmüş organik karbon konsantrasyonu. *J. Hidrol.* 2014, 517, 435–446. [\[ÇaprazRef\]](#)
49. Földenyi, R.; Czinkota, I.; Sebők, A.; Marton, A. Humik Malzemelerin UV-VIS Spektrumu ve Weibull Tipi Yoğunluk Fonksiyonu. 6'da. Çevre Kimyası Sempozyumu, 1. baskı; Salma, İ., Ed.; Macar Bilimler Akademisi: Bakonybél, Macaristan, 2017.
50. Chen, Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M. Hümik maddeler hakkında E4/E6 oranlarına göre verilen bilgiler. *Toprak Bilimi Am. J.* 1977, 41, 352–358. [\[ÇaprazRef\]](#)
51. Her, N.; Amy, G.; Sohn, J.; Gunten, NOM olarak boyut dış lama kromatografisi (URI-SEC) ile UV UV absorpsiyon oranı indeksi özellik göstergesi. *J. Su Temini Res. Teknoloji* 2008, 57, 35–44. [\[ÇaprazRef\]](#)
52. Vatter, DA; Shetty, K. Kızılcık posasında (*Vaccinium macrocarpon*) Ellagik asit üretimi ve fenolik antioksidan aktivite bir katı hal sistemi kullanan *Lentinus edodes*'in aracılık ettiği. *Proses Biyokimyası* 2003, 39, 367–379. [\[ÇaprazRef\]](#)