

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

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

**KETEN TOHUMUNDA BULUNAN BAZI FENOLİK
BİLEŞİKLERİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE
BELİRLENMESİ VE BU BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN
ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Derya DOĞMUŞ

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER**



MANİSA-2019

TEZ ONAYI

Derya DOĞMUŞ tarafından hazırlanan " Keten Tohumunda Bulunan Bazı Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Belirlenmesi ve Bu Bileşiklerin Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması "adlı tez çalışması 25/07/2019 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

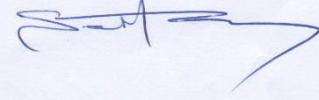
Danışman

Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



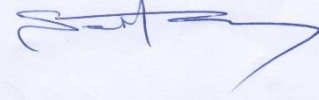
Jüri Üyesi

Prof. Dr. Turgut KILIÇ
Balıkesir Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Şerif TARGAN
Manisa Celal Bayar Üniversitesi



TAAHHÜTNAME

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

Derya DOĞMUŞ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	I
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	III
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	IV
TABLO DİZİNİ	VI
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET	VIII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Serbest Radikaller.....	4
2.2. Serbest Radikallerin Etkileri	5
2.1.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri	6
2.1.1. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri	7
2.1.1. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri.....	7
2.1.1. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi	7
2.3. Serbest Radikallerin Temizlenmesinde Etkili Moleküller	8
2.4. Antioksidanlar ve Etki Mekanizması	9
2.5. Antioksidanların Sağlık Açısından Önemi.....	10
2.6. Antioksidanların Sınıflandırılması	11
2.6.1. Doğal Antioksidanlar	11
2.6.1.1. C vitamini	11
2.6.1.2. E Vitamini	13
2.6.1.3. Karotenoidler.....	13
2.6.1.4. Polifenolik Bileşikler.....	15
2.6.1.4.1. Flavonoidler.....	16
2.6.1.4.2. Fenolik Asitler.....	21
2.6.1.4.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)	23
2.6.2. Yapay Antioksidanlar	23
2.6.2.1. Eritorbik Asit ve Sodyum Eritorbat.....	24
2.6.2.2. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA) ve Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT)	24
2.6.2.3. Tersiyer Bütihidrokinon (TBHQ)	26
2.6.2.4. Gallatlar	26
2.6.2.5. Nordihidroguareyetik asit (NDGA)	27
2.7. Çalışmada Kullanılan Keten Tohumu ve Özellikleri	27
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	30
3.1. Materyal.....	30
3.2. Yöntem	30
3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması	30
3.2.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonu	30
3.2.2. Ekstrelerin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi	31
3.2.2.1. DPPH Radikali Süpürücü Etki Tayini.....	31
3.2.2.2. İndirgeme Gücü Tayini	32
3.2.2.3. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini.....	32
3.2.2.4. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Tayini	33
3.2.3. Lc-Ms/Ms Analizi	34
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	35
4.1. DPPH Radikali Süpürücü Etki Bulguları.....	35

4.2. İndirgeme Gücü Bulguları.....	38
4.3. Toplam Fenolik Bileşik Bulguları.....	39
4.4. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Bulguları.....	41
4.5. Lc-Ms/Ms Analizi Bulguları	42
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
KAYNAKLAR	53
ÖZGEÇMİŞ	60



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ROT	Reaktif Oksijen Türleri
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
TBHQ	t-Bütil Hidrokinon
PG	Propil Gallat
NDGA	Nordihidroguareyetik Asit
DPPH	1-Difenil 2-Pikril Hidrazil
FCR	Folin-Ciocalteu Reaktifi
GAE	Gallik Asit Ekvivalent
H₂O₂	Hidrojen Peroksit
LC-Ms/Ms	Kütle spektrumlu sıvı kromatografisi
LOQ	Belirlenebilirlik sınırı
IC₅₀	Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı
PC-BF	n-Bütanol fraksiyonundaki fenolik bileşenler

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri.....	5
Şekil 2.2. Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları.....	7
Şekil 2.3. Antioksidanların etki mekanizması	9
Şekil 2.4. Askorbik asitte meydana gelen redoks reaksiyonları	12
Şekil 2.5. α - Tokoferol'ün kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.6. β -Karoten, likopen ve lutein'in kimyasal yapıları	14
Şekil 2.7. Polifenolik antioksidanların reaksiyonları.....	15
Şekil 2.8. Flavonoidlerin genel yapısı	16
Şekil 2.9. Flavonol, flavon, flavanon, flavanol, izoflavon ve antosiyanidin'in kimyasal yapıları	17
Şekil 2.10. Kuersetin, rutin, izokuersitrin, kamferol, mirisetin ve izoramnetin'in kimyasal yapıları	17-18
Şekil 2.11. Apigenin, luteolin ve krisin'in kimyasal yapıları	18
Şekil 2.12. Katesin, epikatesin, epigallokatesin, epikatesin gallat ve epigallokatesin gallat'ın kimyasal yapıları	18-19
Şekil 2.13. Naringin, naringenin, eriodiktol, hesperidin ve hesperetin,'in kimyasal yapıları	19
Şekil 2.14. Daidzein ve genistein'in kimyasal yapıları.....	20
Şekil 2.15. Siyanidin, malvidin, apigenidin ve delfinidin'in kimyasal yapıları .	20
Şekil 2.16. Hidroksi sinnamik asitlerin yapıları ve biyosentetik ilişkileri.....	22
Şekil 2.17. Rozmarinik asit'in kimyasal yapısı	22
Şekil 2.18. Gallik, protokateşik, vanilik asit'in kimyasal yapıları.....	22
Şekil 2.19. Fenolik polimerin kimyasal yapısı.....	23
Şekil 2.20. BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları	25
Şekil 2.21. TBHQ'nun kimyasal yapısı	26
Şekil 2.22. Propil gallat (3,4,5-trihidroksi benzoik asit propil ester) kimyasal yapısı	27
Şekil 2.23. NDGA'nin kimyasal yapısı	27
Şekil 2.24. Keten bitkisi.....	29
Şekil 2.25. Keten tohumu	29
Şekil 3.1. Soxhlet düzeneği.....	30
Şekil 4.1. Standart antioksidan BHT' nin DPPH radikali süpürücü aktivitesi	35
Şekil 4.2. Standart antioksidan BHA' ün DPPH radikali süpürücü aktivitesi	36
Şekil 4.3. Sarı-85 keten tohumu ekstresinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi	36
Şekil 4.4. McGregor keten tohumu ekstresinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi	36
Şekil 4.5. Keten tohumu örnekleri ve standartların DPPH Radikali Süpürücü Aktiviteleri	37
Şekil 4.6. Ekstrelerin ve standartların DPPH radikal süpürme miktarlarına göre kıyaslanması.....	38
Şekil 4.7. Keten tohumu ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (50-250 μ g/ml) indirgeme güçlerinin birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırması	39
Şekil 4.8. Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan gallik asitin açık yapısı.....	39
Şekil 4.9. Gallik asit standart grafiği	40
Şekil 4.10. Bitki ekstrelerin gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde konsantrasyonu	41

Şekil 4.11. Sarı-85 ve McGregor ekstralarının 30 µg/ml konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırması	41
Şekil 4.12. Standartlara ait kromatogramlar	43
Şekil 4.13. Standartlara ait spektrumlar	44
Şekil 4.14. Yağı uzaklaştırılmış Sarı-85 ekstresine ait kromatogram.....	45
Şekil 4.15. Sarı-85 elde edilen yağ ekstresinin kromatogramı	46
Şekil 4.16. McGregor ekstresi kromatogramı.....	47
Şekil 4.17. McGregor yağ ekstresi kromatogramı	48



TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 4.1. Keten tohumu ekstralarının ve standart antioksidanların IC ₅₀ değerleri	37
Tablo 4.2. Ekstrelerin absorbanza bağlı GAE' leri	40
Tablo 4.3. Saf fenolik asitlerin retansiyon zamanları ve m/z oranları.....	44-45
Tablo 4.4. Sarı-85 keten tohumu çeşidinde fenolik asit miktarları	46
Tablo 4.5. Sarı-85 yağ ekstresinde bulunan fenolik asit miktarı.....	47
Tablo 4.6. McGregor keten tohumu çeşidinde fenolik asit miktarları	48
Tablo 4.7. McGregor yağ ekstresinde bulunan fenolik asit miktarı	48



TEŞEKKÜR

Öncelikle 2011-016 nolu araştırma projemi destekleyen, çalışmamızı gerçekleştirebilmemiz için bize her türlü olanağı sağlayıp bilim üretimine destek olan Manisa Celal Bayar Üniversitesi Proje Koordinasyon Birimine sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmasına birlikte başladığımız bana her türlü imkan ve desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleri ile bana ışık tutan Sayın Prof. Dr. İnci DURUCASU'ya, tezi tamamlamam için bana destek veren Sayın Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Araştırmamızın materyalleri olan Sarı-85 ve McGregor keten tohumu çeşitlerini bize temin eden Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsüne ve Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsüne teşekkür ederim.

Lc-Ms/Ms analizlerini gerçekleştiren Ege Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümünde uzman Sayın Umut ŞAHAR'a teşekkür ederim.

Derya DOĞMUŞ
Manisa, 2019

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KETEN TOHUMUNDA BULUNAN BAZI FENOLİK BİLEŞİKLERİN KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ VE BU BİLEŞİKLERİN ANTIOKSİDAN ÖZELLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Derya DOĞMUŞ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER

Son yıllarda tüketiciler gıdaları sadece temel beslenme aracı olarak değil, aynı zamanda sağlık üzerinde faydalı etkileri bulunan maddeler olarak da görmeye başladılar. Keten tohumu, sağlık üzerindeki faydaları ve bazı hastalıklarda koruyucu rol oynaması nedeni ile son yıllarda önem kazanmıştır. Keten tohumunun zengin kimyasal içeriği olduğu bilinmektedir. α -linolenik asit ve iyi kaliteli protein açısından zengin olan keten tohumu flavonoid, lignan ve fenolik asitler gibi fitokimyasalların da doğal kaynağıdır. Keten tohumu fenolik bileşiklerin en zengin kaynaklarından biridir. Fenoliklerin zengin içeriği sayesinde yağı uzaklaştırılmış keten tohumu biyoaktivitesi geniş spektrum gösterir.

Keten tohumu çeşitlerinden izole edilen n-bütanol fraksiyonlarının antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikal, indirgeme gücü, toplam fenolik bileşik miktarı ve hidrojen peroksiti giderme gibi çeşitli metodlarla değerlendirildi. Yağları uzaklaştırılmış keten tohumu ekstraktlarındaki ve yağlarındaki fenolik asitler LC-MS/MS ile analiz edildi. Bütillendirilmiş hidroksi anisol (BHA) ve bütillendirilmiş hidroksi toluen (BHT) referans antioksidan bileşikler olarak kullanıldı. Bu çalışmada farklı keten tohumu çeşitlerinin antioksidan aktivitesi incelenmiş, sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilirliği açısından konuya ışık tutulmaya çalışılmıştır. Analiz sonuçlarına göre yağı uzaklaştırılmış keten tohumu ekstraktlarının, yağ ekstraktlarına göre fenolik asitler açısından daha zengin olduğu tespit edilmiştir. Yağları uzaklaştırılmış ekstraktlarda, Sarı-85 keten tohumu çeşidi McGregor keten tohumu çeşidine göre fenolik asitlerce daha zengindir. Yağ ekstraktları fenolik asitlerce zengin değildir.

Anahtar Kelimeler: Keten tohumu, n-bütanol fraksiyonu, antioksidan aktivite, fenolik bileşikler, LC-MS/MS

2019, 60 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF SOME PHENOLIC COMPOUNDS IN FLAXSEED AND INVESTIGATION OF ANTIOXIDANT PROPERTIES

Derya DOĞMUŞ

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

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Sabih ÖZER

In recent years, consumers have begun to look at food not only for basic nutrition, but also for health benefits. Flaxseed, has been gaining popularity, due to the reports on its health benefits and disease preventive properties. It is known that flaxseed contains a variety of constituents. Flaxseed is an important plant source containing beneficial compounds for health besides being rich in α -linolenic acid and good quality protein, flaxseed has potential as a natural source of phytochemicals such as flavonoids, lignans and phenolic acids. Flaxseed is the richest source of phenolic compounds. Owing to high content of phenolics, defatted flaxseed meal exhibits broad spectrum of bioactivities.

Antioxidant activity of isolated n-butanol fractions from different types of flaxseed were evaluated by various methods such as DPPH free radical, reducing power, total phenolic contents and consuming of hydrogen peroxide. Phenolic acids which defatted flaxseed meal extracts and oils were analyzed by Lc-Ms/Ms. Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as the reference antioxidant compounds. In this study, antioxidant activity of different varieties of flaxseed have been investigated and it has been tried to shed some light on the subject in terms of usability. According to analysis results it has founded that oil removed flaxseeds are richer than oil extracts in terms of phenolic acids.. In oil free flaxseeds, Sari-85 flaxseed varieties are rich in phenolic acids compared to McGregor flaxseed extracts. Oil extracts are not rich in phenolic acids.

Key Words: Flaxseed, n-butanol fraction, antioxidant activity, phenolic components, Lc-Ms/Ms

2019, 60 pages

1.GİRİŞ

Vücudumuz, normal fonksiyonları için enerji üretirken, aynı zamanda her saniye milyonlarca serbest radikal oluşmasına neden olur. Organizmadaki kimyasal süreçler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olmaktadır. Çevre kirliliği, kimyasal maddeler, petrokimya ürünleri, sanayi atıkları, güneşin UV ışınları, ozon, kozmik ışınlar, X-ışınları, virüsler, enfeksiyon, ilaçlar, stres, sigara dumanı ve otomobil egzoz gazları gibi pek çok etken vücudumuzdaki serbest radikallerin sayısını tahmin edemeyeceğimiz kadar sürekli olarak artırır [1]. Modern gıdalar, şeker ve yağ miktarı yüksek gıdalar, alkol ve hatta yoğun egzersizler de oksijen kullanımındaki artışla beraber vücudumuzdaki serbest radikallerin miktarının artmasına sebep olmaktadır.

Serbest radikaller, kısa ömürlü, dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron bulduran reaktif moleküllerdir. Radikaller eşleşmemiş elektronları eşleştirme (karşısındaki atom ya da molekülden elektron alma veya verme) özelliklerinden dolayı kararsızdırlar. Bu kararsız özellikleri onların kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar. En önemli serbest radikaller süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$), hidroksilradikali ($\bullet OH$), singlet oksijen (1O_2), radikalik olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) ve peroksinitritdir ($ONOO^{\bullet}$). Bu serbest radikaller “reaktif oksijen türleri (ROT)” olarak bilinirler. ROT’lar, organizmada lipidler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar gibi biyolojik moleküllerle kolayca reaksiyona girebilmektedirler. Bu özelliklerinden dolayı yaşlanma, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, böbrek, immün sistem hastalıkları, diyabet, ve karaciğer hastalıkları gibi pek çok hastalığa sebep olmaktadır [2].

Endüstri ve gıda teknolojisi açısından bakıldığında özellikle birden fazla doymamış bağ içeren yağ asitleri ve yağca zengin ürünler kolayca okside olmaktadır. Bundan dolayı gıdaların korunması ve depolanması sırasında meydana gelen en büyük problemlerden biri lipid peroksidasyonudur. Lipid peroksidasyonu, sıvı ve katı yağlarda acılaşmaya (ransidleşme), yağ ihtiva eden diğer gıdalarda ise renk, aroma, tat, ve kıvamda bozulmalara neden olmaktadır. Bu oksidasyon sonucu besinin kalitesi düşmektedir [3]. Lipit peroksidasyonu yağlarda ve yağlı yiyeceklerde sadece besini bozmakla kalarıp, aynı zamanda kansere, mutasyonlara ve yaşlanmaya sebep

olduğu düşünölen peroksi (ROO•), hidroksi (OH•) radikallerini ve reaktif oksijen türlerini meydana getirir [4]. Bu sebeple oksidasyon kararlılığını arttırmak için yağlara sentetik antioksidanlar ilave edilmektedir. Bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), t-bütül hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) gibi sentetik antioksidanlar gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır.

Antioksidanlar, hücrelere zarar veren serbest radikallerle reaksiyona girip onları etkisiz hale getirerek, kanser ve kalp hastalıkları gibi pek çok hastalığa ve erken yaşlanmaya neden olabilecek zincir reaksiyonları engelleyen veya etkilerini azaltan moleküllerdir. Son yıllarda sentetik antioksidanların yan etkilerinin görölmeye başlamasıyla doğal antioksidanlara yönelme artmıştır. Doğal antioksidanlar bitkisel kaynaklı ve insan organizması için genellikle zararsız olup, yan etkileri bulunmamaktadır. Artan bu ilgi, tüm dünyada bitkisel tedavinin desteklenmesine de zemin oluşturmuştur [5]. Doğal antioksidanlar; flavonoidler başta olmak üzere sinnamik asit türevleri, tokoferoller, organik asitler, kumarinler gibi bitkilerde ikincil metabolit olarak oluşun fenolik maddelerdir [6].

Gıda sanayinde yağların ve yağ ihtiva eden diğer ürünlerin korunması ve raf ömrünün uzatılması için genellikle bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT) ve bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA) kullanılmaktadır. Fakat yapılan araştırmalar bu sentetik antioksidan bileşiklerin toksiditesinden bahsederek, onların karsinojenik olma riskini ortaya çıkarmaktadır [7]. Bu sebeple, tüketiciler doğal tarımsal ürünlere yönelmiş ve işlenmiş gıdalarda da sağlık, kalite arayışlarını ön planda tutmaktadır. Doğal biyoaktif bileşiklerle ilgilenen özellikle farmasötik ve gıda endüstrilerinden gelen talep üzerine, doğal bileşiklerin antioksidan aktiviteleri araştırmacılar tarafından yoğun şekilde araştırılıp bu konuda çalışmalar yapılmaktadır. Geniş bir çeşitlilik ve dağılım gösteren bitkisel kaynaklar hem işlenmiş gıdalarda, hem de vücutta oluşun oksidatif hasara karşı koruma sağlayarak daha güvenilir ve daha sağlıklı antioksidanlar sunabilir. Araştırmacılar, yapılan çalışmalarını göz önünde bulundurarak doğal kaynaklardan elde edilebilen yüksek antioksidan aktiviteli ekstraktları sentetik antioksidanların yerine kullanmayı hedeflemektedirler. Bitkiler doğal antioksidanların en önemli kaynağı olup özellikle insan beslenmesinde bitkisel kaynaklı besinlerin kullanılması özendirilmekte ve tüketim giderek artmaktadır. Moleküler düzeyde çok büyük çeşitlilik gösteren antioksidan maddelerin bitkilerdeki

miktarları ve dağılımları araştırma konusudur. Bu araştırmalar yüksek antioksidan aktivite gösteren molekülleri içeren bitkisel kaynaklı besinlerin tespiti açısından önemlidir. Bu nedenle de antioksidan aktiviteyi ölçmek üzere kullanılan çeşitli tayin yöntemlerinin araştırılıp geliştirilmesi ve karşılaştırılması son yıllarda en önemli çalışma konularından biridir.

Çalışmamızda iki farklı keten tohumunun (Sarı-85 ve McGregor) çeşitli metodlarla antioksidan aktivitelerinin tespiti ve bu tohumlardan elde edilen ekstraktlarının doğal antioksidan kaynağı olarak sentetik antioksidanlara alternatif olması açısından incelenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca günümüzde, geleceğe yönelik sentetik antioksidanların yerini alabilecek doğal antioksidan arayışları hızla sürmektedir. Bu tip çalışmalarla yüksek antioksidan aktiviteye sahip bitki ekstraktları belirlenerek, bunların gıda sistemlerindeki antioksidan etkilerinin incelenmesi ile çalışmaların endüstriyel uygulamaya yönelik devamlılığı sağlanabilir.

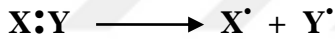
2.GENEL BİLGİLER

2.1 Serbest Radikaller

Atom veya moleküllerdeki elektronlar, çekirdeğin etrafında orbital olarak tanımlanan bölgelerde hareket ederler. Her yörüngede birbirine zıt yönde hareket eden en fazla iki elektron bulunur. Bir atom veya molekül dış orbitallerinde bir veya daha fazla ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektron bulunduyorsa “serbest radikal (SR)” olarak tanımlanır. Serbest radikaller, ortaklanmamış elektronlarından dolayı oldukça reaktiftirler [8]. Hidrojen atomu, 1 elektron ve 1 protonu olan en basit serbest radikaldir. Serbest radikallerdeki eşleşmemiş elektron, atom veya molekülün üst kısmına konulan bir nokta ile belirtilir.

Çeşitli fiziksel faktörler ve kimyasal olaylar nedeniyle çevrede ve hücrel koşullarda devamlı bir radikal oluşumu vardır. Serbest radikaller üç temel yolla oluşur [9].

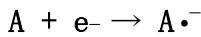
1) Kovalent bağların homolitik kırılması ile: Kovalent bağın kopması sırasında bağ yapısındaki iki elektronun her biri ayrı ayrı atomlar üzerinde kalır.



2) Normal bir molekülde tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi ile: Heterolitik bölünmede kovalent bağ oluşturan her iki elektron oluşturan atomların birinde kalır böylece serbest radikaller değil iyonlar meydana gelir.



3) Normal bir moleküle tek bir elektron transferi ile: Radikal özelliği taşımayan bir moleküle tek elektron transferi ile dış orbitalinde eşleşmemiş elektron oluşuyorsa bu tür indirgenme radikal oluşumuna sebep olabilir.



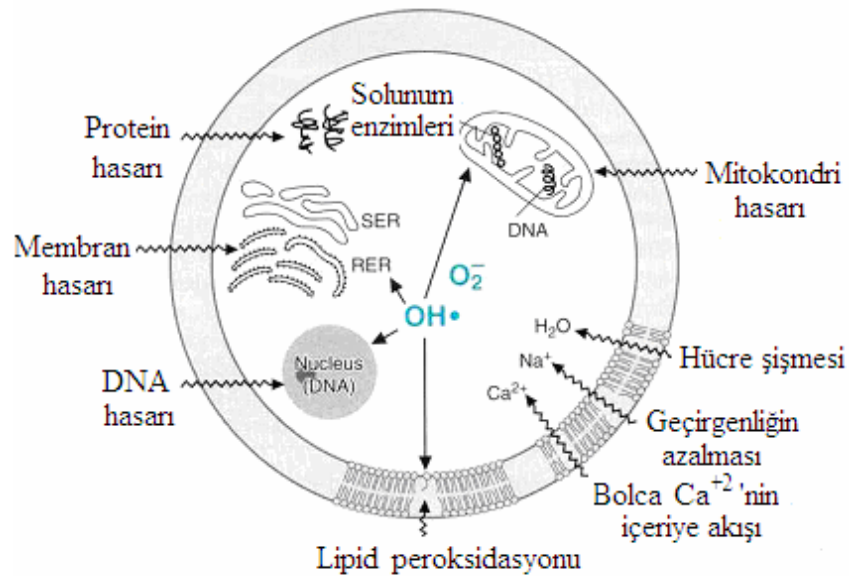
Serbest radikaller, biyolojik sistemlerde en fazla elektron transferi sonucu oluşmaktadır. Serbest radikaller negatif yüklü, pozitif yüklü veya nötral olabilirler. Serbest oksijen radikalleri (SOR), C, N, S türevi olan radikaller ve inorganik moleküller biyolojik sistemlerdeki en önemli radikallerdir. Ortaklanmamış elektronları olduğu halde Cu^{2+} , Fe^{3+} , Mn^{2+} , Mo^{5+} gibi geçiş metalleri serbest radikal

olarak kabul edilmezler. Fakat bu geçiş metalleri reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar [10].

Serbest radikaller, elektron transferi, enerji üretimi gibi pek çok metabolik işlevde temel oluşturduklarından dolayı yaşam için gereklidirler. Ancak zincir reaksiyonları kontrolsüz olarak ilerlerse serbest radikallerin varlığından dolayı hücrede hasarlar meydana gelmektedir. Nitekim, serbest radikallerin biyomoleküllerle reaksiyona girerek oluşturdukları bileşikler çoğu kez toksik özellik taşımaktadır. Bilim adamları tarafından serbest radikallerin yaşlanma ve dejeneratif hastalıklara neden olduğu 1954'lerden beri bilinmektedir. Serbest radikaller oldukça reaktif moleküller olduklarından dolayı eğer nötralize edilmezlerse vücutta ciddi hasarlara neden olabilirler. Lipit peroksidasyonu, DNA hasarları ve proteinler arasında disülfid bağı oluşumu serbest radikallerin vücutta meydana getirdiği en önemli olumsuz etkilerdir.

2.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikaller yüksek reaktif özelliğe sahip olduklarından dolayı tüm hücre bileşenleriyle kolayca etkileşim kurabilirler. Eğer hücrenin savunma mekanizmaları tarafından yok edilemez iseler, biyolojik moleküllerle reaksiyona girerek yeni serbest radikallerin oluştuğu zincirleme bir reaksiyon meydana getirirler (Şekil 2.1).



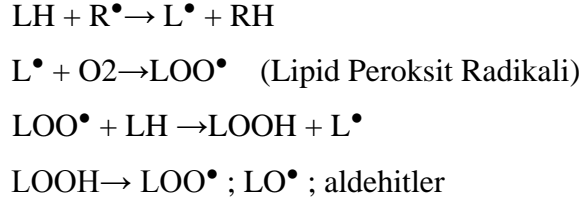
Şekil 2.1. Serbest radikallerin hücresel hedefleri

2.2.1. Serbest Radikallerin Lipidlere Etkileri

Lipidler serbest radikallerin etkilerinden en çok etkilenen biyomoleküllerdir. Hücre membranlarında ve gıdalarda bulunan kolesterol ve yağ asitleri serbest radikallerle kolaylıkla reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile reaksiyonu sonucu oluşan oksidatif yıkım nonenzimatik lipid peroksidasyonu olup, zincir reaksiyonu şeklinde ilerler.

Lipid peroksidasyonu organizmada oluşan serbest radikallerin özellikle $\bullet\text{OH}$ 'in, membran yapısında bulunan çoklu doymamış yağ asitlerindeki (PUFA) konjuge çift bağlardan bir H atomu çıkarmasıyla başlar. Bu basamak radikalik reaksiyonun başlama aşamasıdır. Bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali ($\text{L}\bullet$) niteliği kazanır. Daha kararlı yapıya dönmek isteyeceğinden molekül içi bir düzenlenme ile konjuge dienler oluşur. Aerobik ortamda, konjuge dienin moleküler oksijenle birleşmesi sonucu lipid peroksil radikalleri ($\text{LOO}\bullet$) oluşur. Membran yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek, yeni lipid radikallerinin ($\text{L}\bullet$) oluşumuna yol açtığından dolayı lipid peroksil radikali oluşumu önemlidir. $\text{LOO}\bullet$ kendisi de açığa çıkan hidrojen atomlarını alarak lipid peroksitlere (LOOH) dönüşür. Ayrıca membran proteinlerine de saldırdığından dolayı reaksiyon otokatalitik olarak devam eder. Bu lipid peroksidasyonunun ilerleme aşamasıdır [11].

Lipid peroksidlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri oluşturması sonrası lipid peroksidasyonu sonlanır. (sonlanma basamağı). Lipid peroksidasyonu sonrası çoğu biyolojik olarak aktif olan aldehitler oluşur. Aktif olan bu bileşikler ya hücre düzeyinde metabolize edilir yada ilk atak bölgesinden hücreye difüze olup hücrenin diğer bölümlerini hasara uğrattırır. Malondialdehit (MDA) üç veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitlerinin peroksidasyonu sonucu oluşur. MDA lipid peroksidasyon seviyesinin indikatörü olarak kabul edilir. Lipid peroksidasyonu geri dönüşümsüz bir olay olup, membran yapısına direk ve oluşturduğu reaktif aldehitlerle diğer hücre bileşenlerine indirek olarak zarar verir [12].



Şekil 2.2. Lipid peroksidasyonunun temel reaksiyonları

2.2.2. Serbest Radikallerin Proteinlere Etkileri

Proteinlerin, radikalik hasardan etkilenme dereci aminoasit içeriğine göre değişir. Çoklu doymamış yağ asitlerine göre proteinler serbest radikallere karşı daha az hassastır. Ancak triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin gibi doymamış bağ içeren ve metiyonin, sistein gibi kükürt bulduran aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenir [13]. Etkilenme sonrası karbon merkezli organik radikaller ve sülfür radikalleri oluşur. Bu reaksiyonlar sonucu albümin ve immunoglobulin G (IgG) gibi fazla sayıda disülfid bağı bulduran proteinlerin tersiyer yapısı bozulur. Hemoglobinin ferro demiri (Fe^{+2}) süperoksit ve diğer oksitleyici ajanlarla oksitlenmeye duyarlı olup, bunun sonucunda oksijen taşımayan methemoglobin oluşur [14].

2.2.3. Serbest Radikallerin Nükleik Asitlere ve DNA'ya Etkileri

DNA serbest haldeki radikallerden kolay etkilenir. Radyasyonun etkisiyle iyonlarına ayrılarak oluşan radikaller, DNA'yı etkileyerek hücre mutasyonuna ve ölümüne yol açabilirler. Aktive olmuş nötrofillerden salınan H_2O_2 membranlardan kolayca geçebildiği için hücre çekirdeğine kadar ulaşır. Burada oluşan hidroksil radikali dört DNA bazıyla kolayca reaksiyona girerek baz modifikasyonlarına yol açar [15]. DNA hasarı onarılmazsa hücrede anormalliklere, bozukluklara hatta hücre ölümlerine kadar yol açabilir.

2.2.4. Serbest Radikallerin Karbonhidratlara Etkisi

Serbest radikallerin karbonhidratlara etkileri, polisakkarit depolimerizasyonu ve özellikle monosakkarit otooksidasyonu şeklindedir. Süperoksitler ve okzalaldehitler monosakkaritlerin otooksidasyonu sonucu meydana gelip, diyabet ve sigara içimi ile ilgili patolojik olaylarda rol oynarlar. Okzalaldehitler antimitotik etki gösterirler. Bu etkiyi DNA, RNA ve proteinlere kolaylıkla bağlanabilme

özelliklerinden dolayı göstermiş olup, kanser ve yaşlanma olaylarında da rol oynarlar.

Bağ dokunun önemli bir mukopolisakkaridi olan hiyalüronik asit bol miktarda sinoviyal sıvıda bulunmaktadır. Romatoid artrit gibi enflamatuvar eklem hastalıklarında hiyalüronik asidin oluşan serbest radikal tarafından parçalandığı gösterilmiştir [16].

Organizmada normal şekilde metabolizmanın işleyişi sırasında ve patolojik reaksiyonlarda serbest radikaller üretilir. Bu serbest radikaller hücrel savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırıldığı için, ROT üretimi antioksidan savunma sistemleri tarafından dengelenmektedir. Ancak bazen toksinler serbest radikallere metabolize olup, aşırı oksijen konsantrasyonuna maruz kalma, fagositik aktivasyondaki düzensizlikler, malnütrisyon sonucu diyetle antioksidan etkili bileşiklerin yetersiz alımı gibi sebeplerle hücrede daha fazla reaktif oksijen türleri oluşabilir. Oksidatif stres, hücrel savunma mekanizmaları ile ortadan kaldırıldan daha fazla ROT oluştuğunda ortaya çıkar. Oksidatif stres “oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki dengenin oksidanlar yönüne kayması ve hücre hasarına yol açması” olarak tanımlanır [17]. Oksidatif stresin, ROT’ların hücreye zarar vermesi sonucu birçok hastalığa katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Yapılan pek çok çalışmada ülseratif kolit [18], iskemi/reperfüzyon hasarı [19], ateroskleroz [20], yaşlanma [21], diabetes mellitus [22], alzheimer hastalığı, parkinson hastalığı [23, 24], sigara kullanımı [25] ve hava kirliliğinin [26] neden olduğu rahatsızlıklar ve KOAH [27] gibi akciğer hastalıkları, çeşitli kanser türleri, felç, hipertansiyon, romatoid artrit ve multiple sklerosis gibi otoimmün hastalıklar, alerji, astım, septik şok, inflamasyon, akut pankreatit, yaşlanmaya bağlı maküler hastalıklar ve katarakt [28, 29, 30] gibi klinik durumlara serbest oksijen radikallerinin katıldığı belirtilmiştir. Ancak serbest radikallerin hastalıklara etkisi araştırılırken, serbest radikal oluşumunun hastalığın nedeni mi, yoksa sonucu mu olduğunun ayırımına varılmasının önemine dikkat çekilmektedir.

2.3. Serbest Radikallerin Temizlenmesinde Etkili Moleküller

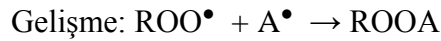
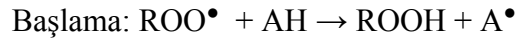
Antioksidanlar, kendileri elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize edip, serbest radikallerin oluşumunu engeller ve bu sırada serbest radikal haline

gelmezler. Aynı zamanda mevcut radikalleride süpürerek hücrenin zarar görmemesini sağlarlar. Yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan, vücutta kalkan görevi gören moleküllerdir [31, 32].

Geleneksel tanım olarak antioksidan oksidasyona karşı koyan, oksijen yada peroksitlerle ilerleyen reaksiyonları engelleyen maddedir. Antioksidan maddelerin çoğu çeşitli ürünlerde koruyucu olarak kullanılmaktadır. Biyolojik bir tanım olarak ise antioksidan madde, havanın oksijeni ile okside olan bozulan ürünlere ilave edilerek bu bozulmayı engelleyen veya geciktiren sentetik veya doğal maddelerdir.

2.4. Antioksidanlar ve Etki Mekanizması

Antioksidanlar hidrojen atomu verme özelliğine sahip kimyasal bileşenlerdir. Bu özellikleri ile birincil radikalleri radikal olmayan kimyasal türlere çevirerek, okside olmuş antioksidan radikallere dönüşürler. Antioksidanların molekül yapısı sadece hidrojen atomu verme açısından değil, aynı zamanda radikalleri düşük reaktiviteli hale getirip lipidler ile reaksiyona girmesini engellemesi açısından da oldukça önemlidir [33]. Antioksidan etki mekanizması basitçe aşağıda gösterildiği gibidir.



Şekil 2.3. Antioksidan etki mekanizması

Sistemdeki etkin mekanizma antioksidan yapısı, özellikleri ile çözünürlük partiyon katsayısı ve sistemde kullanılan çözügen gibi etkenlerle belirlenir. Bağ disosiyasyon enerjisi (BDE) ve iyonizasyon potansiyeli (IP) mekanizmayı ve antioksidan etkinliğini belirleyen en önemli iki faktördür [34].

Her bir oksidan ve antioksidan farklı kimyasal ve fiziksel karaktere sahiptir. Antioksidanların reaksiyonları tek basamakta yada çoklu basamakta meydana gelir. Antioksidanlar, farklı radikal yada oksidan kaynağına karşı farklı etkiye gösterirler. Örneğin; Karotenoidler ile fenollerin radikal yakalayıcılıkları kıyaslandığında,

karotenoidler, fenollere göre peroksil radikallerine karşı iyi radikal yakalayıcısı değildirler. Aynı durumun tersi olarak singlet oksijen düşünüldüğünde karotenoidler iyi bir radikal giderici özellik gösterirken, fenolik ve diğer antioksidanlar zayıf etki gösterirler [35].

Antioksidanların aktiviteleri dışarıdan gelen etkilere bağlı olarak değişmektedir. Fiziksel faktörler, substrat faktörleri, gıda maddesinin fizikokimyasal durumu gibi çeşitli etkenler antioksidan aktivitesini etkilemektedir. Oksijen, sıcaklık ve konsantrasyon fiziksel faktörlerdir. Zincir reaksiyonunun başlama ve ilerleme adımlarını hızlandıran antioksidan aktiviteyi azaltan, yüksek oksijen basıncı, oksijenle temas yüzeyinin genişliği, ısıtma ve ışınlama gibi durumlardır. Sıcaklık değiştiğinde antioksidan aktivitesi değişkenlik gösterir. Konsantrasyon yükseldikçe antioksidan aktivitesi artar. Oksidasyonun belirli bir derecede engellenebilmesi için konsantrasyon yeterli kritik değerin üzerinde olmalıdır [36].

2.5. Antioksidanların Sağlık Açısından Önemi

Antioksidanların önemi, sağlığa olumlu etkilerinden dolayı gün geçtikçe artmaktadır. Antioksidanlar, yaşam süresini uzatıp kaliteli bir hayat sürmeye katkı sağladığından, kanser, kalp hastalıkları gibi hastalıklara yakalanma riskini azalttığından ve yaşlanmanın etkilerini geciktirdiğinden dolayı son dönemin en popüler takviyelerindedir.

Hava ve su kirliliği, yaşam tarzı, hazır yiyecekler, stres gibi etkenler sağlığı olumsuz etkilemektedir. Normal metabolizma faaliyetleri oluşurken belirtilen etkenler sonucunda normal metabolizma faaliyetlerinin yanı sıra serbest radikaller oluşur. Serbest radikallerin vücutta 80 farklı hastalığa sebep olabileceği hakkında bilgi verilmektedir. Serbest radikallerin sebep olduğu hastalıkların başında kalp ve beyin damarlarının tıkanmasına bağlı hastalıklar, kanserler ve artirit gelmektedir. Serbest radikaller, hücre içindeki yapıları bozarak, DNA' nın hasarına sebep olmaktadır.

Sigara kullanımı ile birlikte, sigarada bulunan serbest radikaller vücuda zarar vermektedir. Sigara dumanındaki serbest radikaller, vücudun antioksidan savunma sistemini bozarlar. Sigara kullananlar üzerine yapılan çalışmalarda antioksidan etkili

vitamin ve mineral seviyelerinde sigaradaki serbest radikallerden dolayı azalmalar gözlenmiştir.

Antioksidanlar, serbest radikallere karşı savunma gösterebilecek en etkin takviyelerdir. Antioksidan aktiviteleri en yüksek olan maddeler vitamin A, C, E, selenyum, pycnogenol gibi maddelerdir. Uzmanlara göre düzenli olarak vitamin C alımı yaşam süresini uzatmaktadır. Enstrom'un çalışmasının sonuçlarına göre günde en az 300 mg vitamin C alımı yaşam süresini 6 yıl uzatabilmektedir [37].

Yapılan araştırmalar, özellikle ileri yaşlardaki bireylerde antioksidanların sağlığa etkisinin daha fazla olduğunu göstermektedir. İtalya'da yapılan bir çalışmada, 70-99 yaş arası sağlıklı bireylerde plazmadaki vitamin C ve E seviyelerinin aynı yaşlardaki sağlıklı bireylerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan kullanımı ile birlikte ilerleyen yaşlarda vücudun savunma sisteminin güçlendiği, yaşlanmaya bağlı açığa çıkan sağlık sorunlarının azaldığı ve bunun yanında cildi ve saçları da beslediği yapılan araştırmalarla açığa çıkmaktadır [38].

2.6. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, doğal ve yapay antioksidanlar olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar.

2.6.1 Doğal Antioksidanlar

2.6.1.1. C vitamini

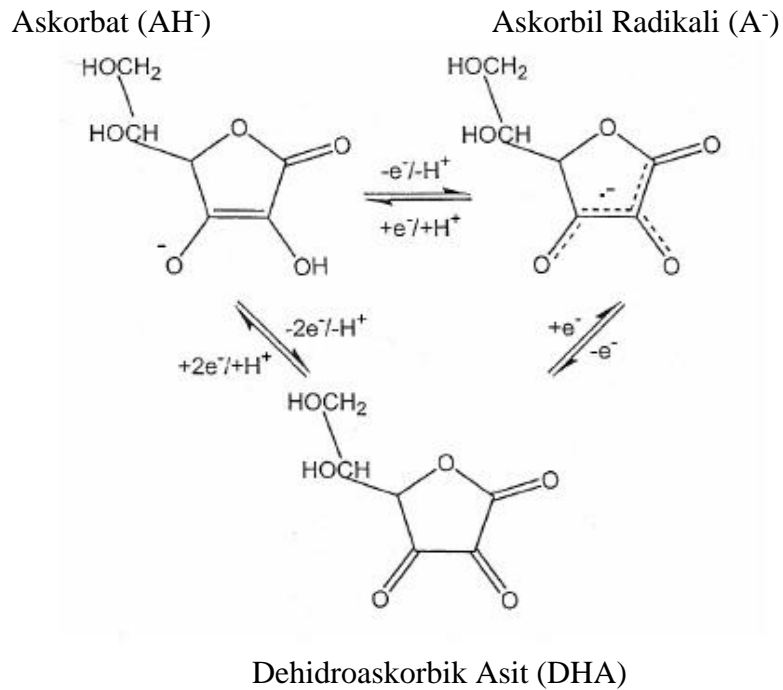
C vitamini (askorbik asit, askorbat) bitkilerde yaygın olarak bulunmakla birlikte suda çözünen bir vitamindir. Altı karbonlu lakton yapısına sahiptir [39]. C vitamini, doğal olarak meyvelerde ve sebzelerde bulunmaktadır. L-askorbik asit (3-keto-L-gulofuranolakton), (C₆H₈O₆)₅ beyaz veya hafif sarı renkte, kokusuz kristalimsi yapıdadır. Erime noktası 190 °C civarında olan C vitamini, etanolde az miktarda, dietil eter çözeltisi içinde ise hiç çözünmemektedir.

C vitamini çoğu hayvanın karaciğer veya böbreklerinde glikozdan, bitkilerde ise özellikle yaprak kısımlarında kloroplastlarında sentezlenir [40]. İnsan vücudunda C vitamini sentezlenemez [41]. Bu sebeple insanlar, C vitamini ihtiyacını taze meyve

ve sebzelerden karşılarlar [42]. Özellikle çilek, papaya, portakal, kivi, greyfurt, kavun, mango gibi meyvelerde, brokoli, brüksel lahanası, kırmızı veya yeşil biber, domates, lahana, patates, karnıbahar gibi sebzelerde, portakal suyu, domates suyu gibi meyve sularında bol miktarda C vitamini bulunmaktadır [43].

C vitamini, reaktif oksijen (süperoksit, peroksil radikalleri, singlet oksijen, ozon), reaktif azot (peroksinitrit, azot dioksit) ve reaktif klor (hipoklorik asit) türlerini kolayca süpürmektedir. Ve bu sayede diğer substratları oksidatif hasarlardan korumaktadır [44].

Askorbik asit ve askorbik asitin bir elektron yükseltgenmiş hali olan askorbil radikali eşleşmemiş elektronun rezonans kararlılığı nedeniyle düşük indirgenme potansiyeline sahiptir [45]. Bu özelliği sayesinde askorbil radikali ilgili radikal ve oksidanlarla reaksiyona girebilir. Askorbil radikali, düşük indirgenme potansiyeli özelliğine sahip olduğundan dolayı kolayca askorbat ve dehidroaskorbik asite dönüşür [46]. Askorbik asit, enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla askorbil radikalinden ve dehidroaskorbik asitten kolayca üretilir. Askorbik asit düşük indirgenme potansiyeli ve kolay elde edilme özelliklerinden dolayı etkili bir antioksidandır [47].

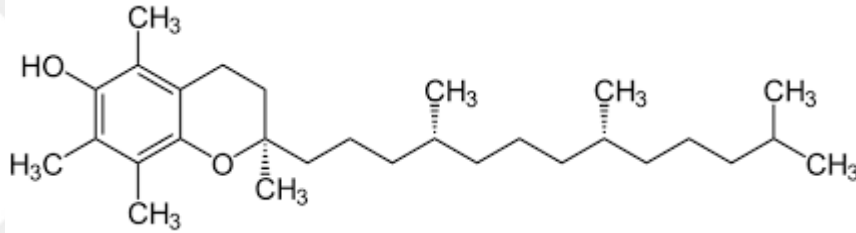


Şekil 2. 4. Askorbik asitte meydana gelen redoks reaksiyonları

2.6.1.2. E Vitamini

E vitamininin içeriği α -, β -, γ -, δ - tokoferoller ve tokotrienollerden oluşmaktadır. En yüksek biyolojik aktiviteye sahip tokoferol α - tokoferoldür [48,49]. E vitamininin zincir kırıcı özelliğinden dolayı lipid peroksidasyonuna engel olarak savunma mekanizması geliştirmekte ve serbest radikal saldırılarına karşı hücre membranlarını korumaktadır [50,51].

Doğal olarak E vitaminince zengin olan bitkiler yağca zengin olan bitkilerdir. Tokotrienoller, yüksek miktarda palm yağında ve pirinç kepeğinde bulunmaktadır. Hindistan cevizi yağı, kakao yağı, soya fasülyesi, arpa, buğday, kırmızı et ve yumurtada da tokotrienoller bulunmaktadır. Ayçiçeği, yer fıstığı, susam, ceviz, ve zeytin yağı ise sadece tokoferol içermektedir [52,53].



Şekil 2.5. α - Tokoferol'ün kimyasal yapısı

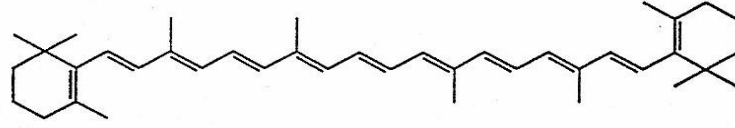
2.6.1.3. Karotenoidler

Karotenoidler, doğal pigmentlerdir. Bitkilerde ve pek çok mikroorganizmalarda sentezlenirler. Günümüze kadar doğal kaynaklardan 600'ün üzerinde karotenoid ayrılmıştır [54]. Karotenoidler, çoğu çiçek ve meyvelerin renkleri gibi birçok kuş, böcek ve deniz hayvanlarının renklerinden de sorumludurlar. Karotenoidler, yağda çözünen poliizoprenoid bileşiklerdir ve 2 ana gruba ayrılırlar.

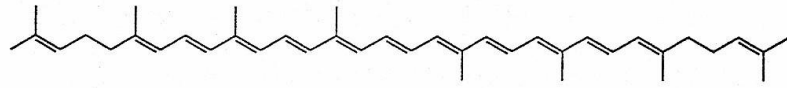
1. Karotenler veya sadece hidrojen ve karbon içeren hidrokarbon karotenoidler
2. Hidroksi, keto, epoksi, metoksi veya karboksilik asit grubu gibi en az bir oksijen grubu taşıyan oksijenlenmiş hidrokarbon türevleri olan ksantofiller [55].

Likopen, β -karoten ve α -karoten, karotenler olarak adlandırılan sınıfa örnektir. β -kriptoksantin, lutein ve zeaksantin, ksantofiller olarak adlandırılan

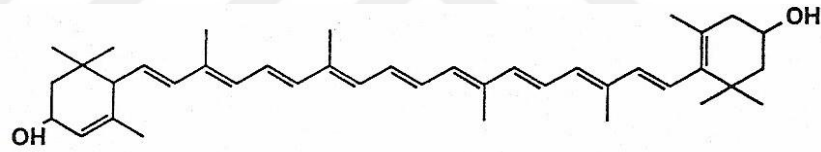
karotenoid sınıfına örnek olarak verilmektedir [56]. Karotenoidlerin yapılarında bulunan konjuge çift bağlar, onların kimyasal, biyokimyasal ve fiziksel özelliklerini etkiler [57].



β -Karoten



Likopen



Lutein

Şekil 2.6. β -Karoten, Likopen ve Lutein'in kimyasal yapıları

Konjuge çift bağ yapısı polien zinciri boyunca etkili bir elektron delokalizasyonuna yol açar. Likopenin yapısı, açık zincir veya asiklik polien yapısı şeklindedir. β -karotenin yapısı, β -karoten molekülün her iki ucunda β -iyonon halkasına sahip disiklik yapı şeklindedir [58].

Hidroksil grubu taşıyan karotenoidler ksantofillerdir. Ksantofiller doğal olarak genellikle glikozidleri veya esterleşmiş halde uzun zincirli yağ asitleri şeklinde bulunurlar ve suda çözünmezler [59]. Sahip oldukları konjuge çift bağlar sebebiyle yüksek antioksidan aktivite gösterirler. Bu konjuge yapıları sebebiyle bazı molekülleri süpürür veya etkisiz hale getirirler. Karotenoidler singlet oksijen türlerini

yok etme ve serbest radikalleri süpürme etkisine sahiptirler [60,61]. Konjuge çifte bağ sistemine sahip karotenoidlerin bazı koşullar altında pro-oksidan (lipid ve benzeri substratların oksidasyonunu hızlandırıcı) aktivite de gösterdiği düşünülmektedir [62]. β -karotenler farklı koşullarda farklı özellikler göstermektedir. Örneğin düşük oksijen basıncında serbest radikalleri süpürme özelliği gösterirken, yüksek oksijen basıncında ve özellikle yüksek konsantrasyonlarda prooksidan etki göstermektedir [63].

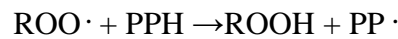
2.6.1.4. Polifenolik Bileşikler

Polifenoller sahip oldukları kimyasal yapılarından dolayı güçlü antioksidanlar olup bitki familyasında geniş çapta yer alan fitokimyasalların en geniş sınıflarındandır [64,65]. Bitkilerde bulunan polifenoller hidrojen atomu verici, singlet oksijeni süpürücü ve indirgeyici olarak davranırlar [66]. Bazı polifenoller ise metal iyonlarını kelatlama özelliklerinden dolayı antioksidan özellik gösterirler [67].

Polifenoller sahip oldukları 2 farklı özellikleri sayesinde antioksidan özellik gösterebilmektedirler [68]. Sahip oldukları özellikler aşağıdaki gibidir;

- a) Düşük derişimli halleri ile, okside olabilen substratlara göre otooksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya oluşumuna engel olmalıdır.
- b) Süpürme işlemi sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu sonlandırmakta kararlı olmalıdır.

Polifenolik antioksidanlar (PPH), hızlı gerçekleşen bir reaksiyon ile sahip oldukları hidrojen atomunu peroksil radikale ($ROO\cdot$) verirler. Peroksil radikali alkil hidroperoksit ($ROOH$) yapısına dönüşür ve reaksiyon sonucunda lipid peroksidasyonunu inhibe edilir.



Şekil 2.7. Polifenolik antioksidanların reaksiyonları

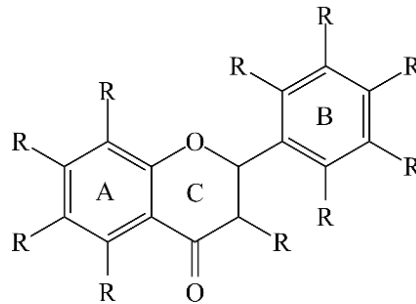
Polifenolik antioksidanların reaksiyonları sonucunda oluşan polifenol fenoksil radikali hidrojen atomu vererek kinonları oluşturur ve daha kararlı hale

gelir. Başka fenoksil radikali gibi bir radikal ile reaksiyona girerek yeni bir zincir reaksiyonu oluşmadan reaksiyon sonlanır. Besinlerdeki fenolik bileşikler flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üçe ayrılır.

2.6.1.4.1. Flavonoidler

Bitkilerdeki fenolik bileşiklerin en geniş çeşidini flavonoidler oluşturur. Flavonoidler difenilpropan ($C_6C_3C_6$) iskeletine sahiptirler. Günümüze kadar bitkilerin yaprak, tohum, kabuk ve çiçek kısımlarında 4000'in üzerinde flavonoid sınıflandırılmıştır. Flavonoidlerin kimyasal yapısı aromatik bir A halkasına bağlı, heterosiklik C halkası ve bu halkaya bağlı ikinci aromatik B halkasından oluşmaktadır. Molekül yapısında çeşitli yerlere bağlanan fenolik hidroksil grupları sebebiyle antioksidan özellik gösterirler. Bitkinin farklı türlerinde veya aynı bitkinin farklı yerlerinde bulunan flavonoidlerin yapısal özellikleri değişkenlik gösterir [69].

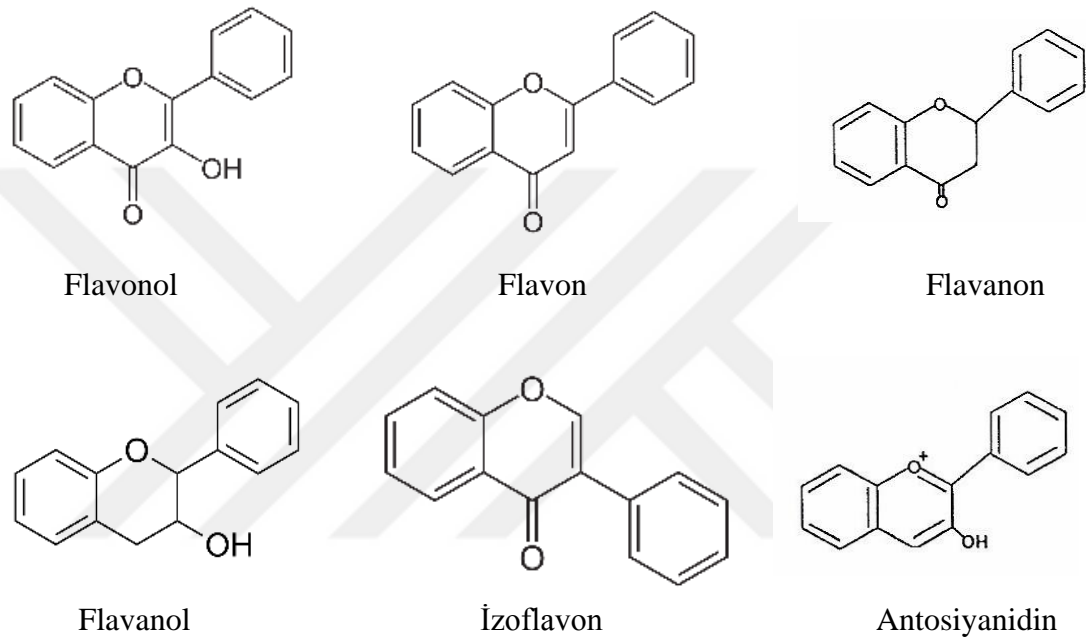
Flavonoidlerin büyük kısmı doğada D-glikoz, L-ramnoz, glukoramnoz, galaktoz, lignin ve arabinoz gibi şekerli bileşikleri (glikozidleri) yapısında bulunur [70]. Flavonoidlerin bağırsaklarda hidrolizlenmesi sonucunda biyolojik aktivitesi yüksek olan aglikonlar oluşur [71]. Flavonoidler insan ve hayvanlarda mide ve bağırsak sisteminde emilirler veya yapısal değişime uğramadan ya da metabolitleri halinde idrar ve dışkı ile atılırlar. Flavonoidler güçlü bir antioksidan, serbest radikal süpürücü, metal kelatlayıcıdır. Bu özellikleri sayesinde lipid peroksidasyonuna engel olurlar [72].



R=H, OH, OMe

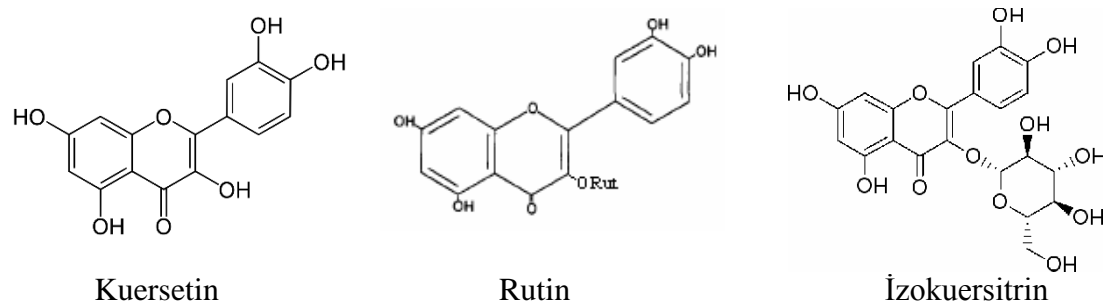
2.8. Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidler, antosiyaninler ve antoksaninler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Antoksaninler renksiz veya beyazdan sarıya dönük renktedirler. Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozidleri şeklinde olup çiçeklere ve meyvelere kırmızı, mavi ve mor renkleri veren, suda çözülebilen bileşiklerdir [73]. Antoksaninler, flavonol, flavanol, flavon, flavanon ve izoflavonlar olarak sınıflara ayrılırlar. Çoğu bitki türü çeşidi içinde flavonlar ve flavonoller arasında karşılıklı bir dışlama söz konusu olup, flavanonca zengin bitkilerde antosiyaninler neredeyse hiç yoktur [74].



Şekil 2.9. Flavonol, Flavon, Flavanon, Flavanol, İzoflavon ve Antosiyanidin'in kimyasal yapıları

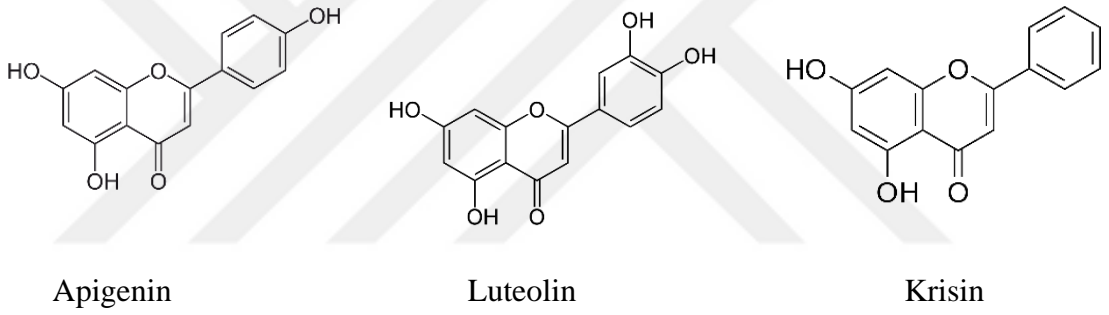
Kuersetin, kuersetin glikoziti rutin, mirisetin, kamferol, izoramnetin en önemli flavonoller olup, flavonoidlerin en çok rastlanan türüdür. Bitkilerde bulunan en temel flavonol kuersetindir. Kuersetin en çok elma, lahana, çay ve soğanda bulunur.





Şekil 2.10. Kuersetin, Rutin, İzokuersitrin, Kamferol, Mirisetin ve İzoramnetin'in Kimyasal Yapıları

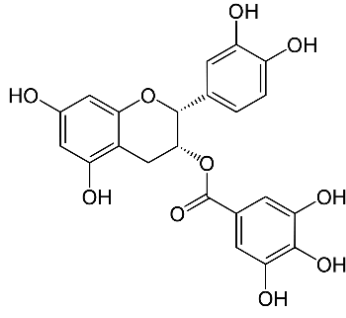
Apigenin, luteolin ve krisin en çok rastlanan flavon çeşitleri olup maydanoz, kereviz ve zeytinde çok miktarlarda bulunmaktadır.



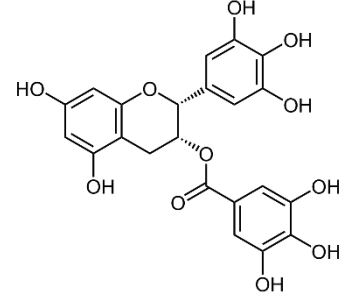
Şekil 2.11. Apigenin, Luteolin ve Krisin'in kimyasal yapıları

Kateşin ve epikateşin flavanollerin en önemli çeşidi olup, flavonların indirgenme reaksiyonları sonucu oluşurlar. Kateşin ve epikateşinin gallik asit ile tepkimeleri sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar oluşur. Oluşan gallat türevleri yeşil çay, kırmızı şarap, şeftalide daha fazla miktarda olup, beyaz şarap ve elmada da bulunurlar.





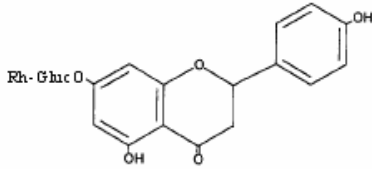
Epikateşin Gallat



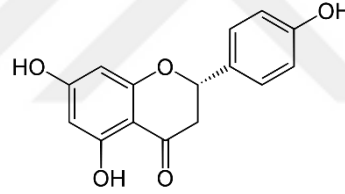
Epigallokateşin Gallat

Şekil 2.12. Kateşin, Epikateşin, Epigallokateşin, Epikateşin Gallat ve Epigallokateşin Gallat'ın kimyasal yapıları

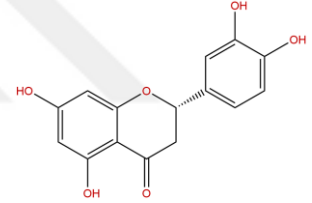
Naringin, naringenin, eriodiktol, hesperidin ve hesperetin en önemli flavanonlardır. Flavanonlar, flavonların dihidro türevleri olup, grefurt ve portakalda çok miktarda bulunurlar.



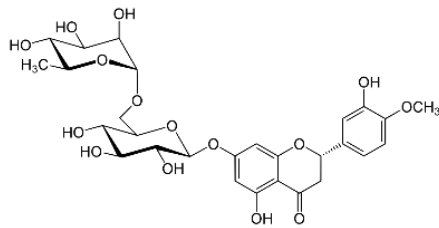
Naringin



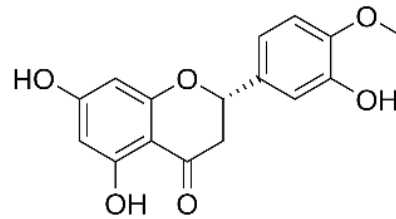
Naringenin



Eriodiktol



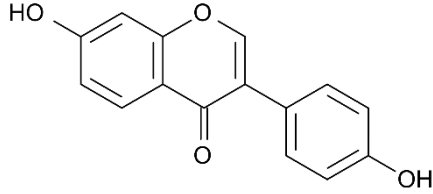
Hesperidin



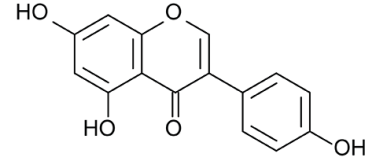
Hesperetin

Şekil 2.13. Naringin, Naringenin, Eriodiktol, Hesperidin ve Hesperetin,'in kimyasal yapıları

Flavonların izomer yapıları izoflavonlardır. Daidzein ve genistein izoflavonların en bilinen çeşitleri olup baklagil ve soya fasülyesinde çok miktarda bulunmaktadır.



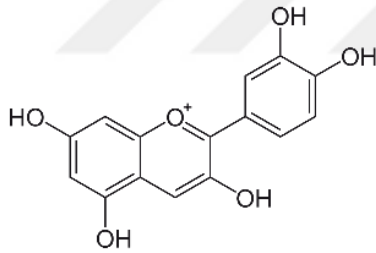
Daidzein



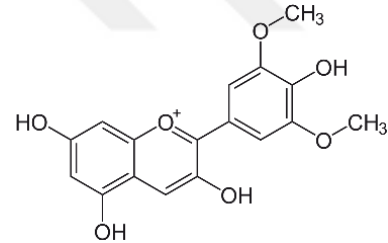
Genistein

Şekil 2.14. Daidzein ve Genistein'in Kimyasal Yapıları

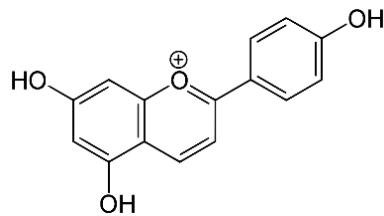
Siyanidin, malvidin, apigenidin ve delfinidin antosiyaninlerin en önemli bileşikleri olup çiçeklere ve meyvelere kırmızı, mavi ve mor renkleri veren pigmentlerdir. Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozidleri olup suda çözülebilen bileşiklerdir.



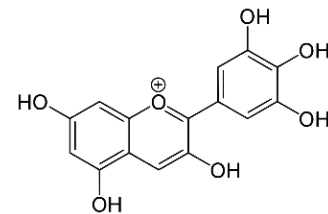
Siyanidin



Malvidin



Apigenidin



Delfinidin

Şekil 2.15. Siyanidin, Malvidin, Apigenidin ve Delfinidin'in kimyasal yapıları

2.6.1.4.2. Fenolik Asitler

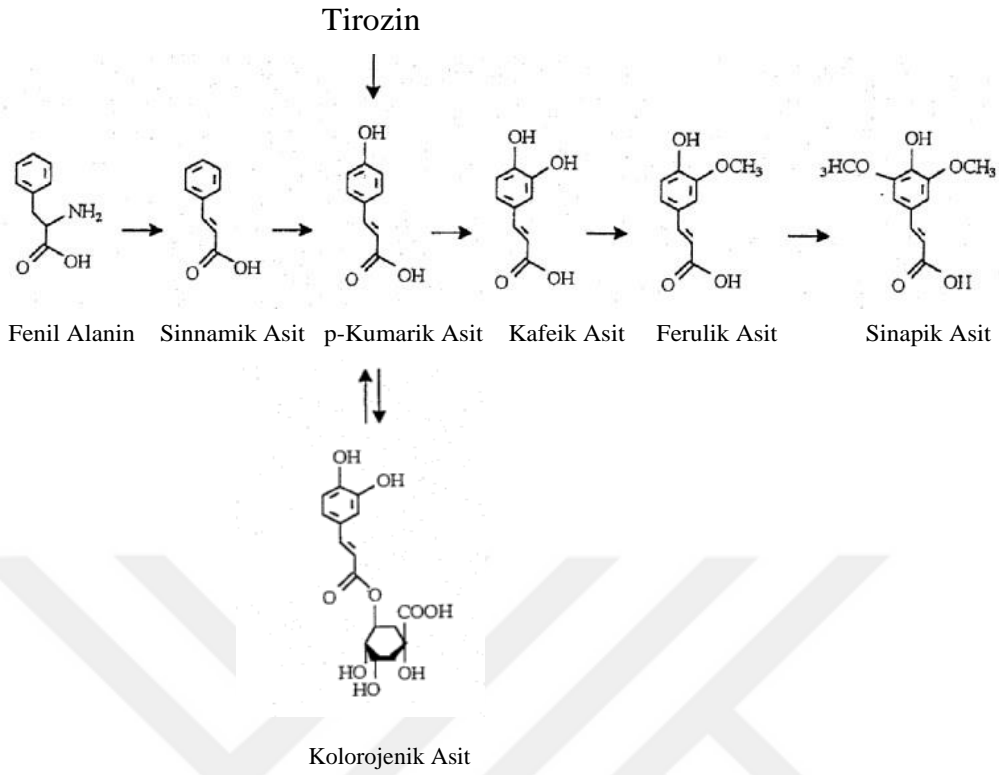
Fenolik asitlerin ve esterlerinin sahip oldukları hidroksil gruplarının sayısı ile birlikte molekülde sterik engellemeyi sağlayan bir yapı oluşmaktadır. Bu yapıya göre antioksidan aktivite değişmektedir [75]. Fenolik asitler hidroksi benzoik asit ve hidroksi sinnamik asit olmak üzere iki çeşide ayrılır [76].

Benzoik asitlerin sahip olduğu karboksilat grubunun elektron çekme özelliği, hidroksi benzoatların hidrojen atomu verme yeteneklerini olumsuz etkiler. Hidroksi sinnamik asitler eşdeğer benzoatlarından daha etkili rol oynar [77]. Hidroksi sinnamik asitler (fenilpropanoidler), bitkilerin hücre duvarı yapısına katılarak, onların fenolik metabolizmasında yer alan, şeker, organik asit veya yağlarla birleşmiş veya esterleri halinde bulunan, fenil alaninden türeyen fenolik bileşiklerdir [78,79,80] (Şekil 2.16.). Hidroksi sinnamik asitler bitkilerin çiçek, tohum ve meyve kısımlarında bulunurlar [81].

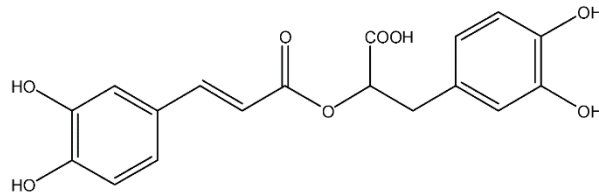
Bitkilerde en yaygın olarak bulunan hidroksi sinnamik asit türevleri kafeik asit, kafeik asitin kuinik ester türevi klorojenik asit ve p-kumarik asitdir. Kafeik asidin oluşumu, kuinik asitin tersinir reaksiyonu ile olmasından dolayı, klorojenik asitin kafeik asitin depolanması sonucu oluştuğu düşünülmektedir [82].

Rozmarinik asit iki aromatik halkasında iki hidroksil grubu bulunduran kafeik asit ve 3,4-dihidroksifenillaktik asitin esteridir (Şekil 2.17.).

Hidroksi sinnamik asitler doğal hallerinde trans konumunda olduklarından dolayı daha kararlı bir yapıya sahiptir. Fakat ultraviyole ve görünür ışığa maruz kaldıklarında cis- konumuna izomerize olurlar [83].

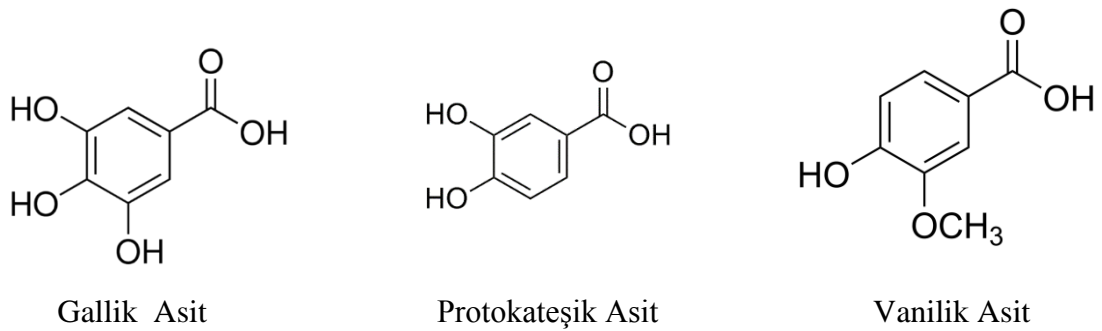


Şekil 2.16. Hidroksi Sinamik asitlerin yapıları ve biosentetik ilişkileri



Şekil 2.17. Rozmarinik asit'in kimyasal yapısı

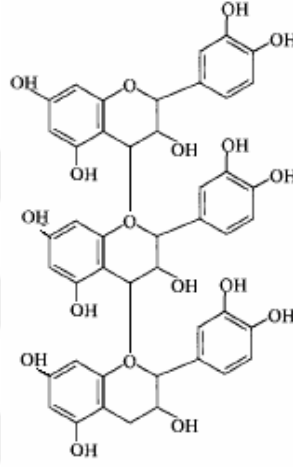
Gallik asit, yapısında üç hidroksil grubu bulunduğundan dolayı aktivitesi yüksek bir hidroksi benzoik asittir. Gallik asitin sahip olduğu karboksilat grubu esterleştiğinde aktivite düşer [84].



Şekil 2.18. Gallik, Protokateşik, Vanilik asit'in kimyasal yapıları

2.6.1.4.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

Yüksek molekül ağırlığına sahip fenolik polimerler (tanenler) kondanse ve hidrolizlenebilir olmak üzere iki çeşide ayrılırlar [85]. Kondanse fenolik polimerler flavonoidlerin polimer yapılarıdır [86]. Hidrolizlenebilir fenolik polimerler, gallik asit ve benzer moleküllerin karbonhidratlara esterlenmiş yapılarıdır [87]. Hidrolizlenebilir fenolik polimerler açısından çay, meyve, kırmızı şarap, baklagil ve tahıllar zengindir [88].



Şekil 2.19. Fenolik polimerin kimyasal yapısı

2.6.2. Yapay Antioksidanlar

Gıda endüstrisinde, gıdaların kalitesi açısından lipid oksidasyonu istenmeyen bir durumdur. Lipid oksidasyonu, yağlarda acılaşmaya (ransidleşme), yağ içeren diğer gıdalarda ise renk, tat, aroma, tekstür, kıvamda bozulmalara ve besinsel kalitenin azalmasına sebep olmaktadır. Bu lipid oksidasyonunu en az seviyeye indirmek veya tamamen ortadan kaldırmak için antioksidan kullanımı gereklidir. Antioksidan kullanımı ile birlikte gıdanın besinsel kalitesi sürdürülebilir olmakta, raf ömrü uzamaktadır [89].

Laboratuvar ortamlarında tokoferoller ve askorbik asidin doğala özdeş formları veya türevleri sentezlendiği gibi doğal yapı ile ilişkisi olmayan yapay antioksidanlar da üretilmiştir. 1940'lı yıllardan beri yapay antioksidan sentezleme

çalışmaları yapılmıştır. Fakat sentezlenen yapılardan çok az bir kısmı günümüzde kullanılmaktadır.

Gıdaların ömrünü uzatmak amacıyla, yağlarda ve yağca zengin diğer gıdalarda bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), bütillendirilmiş hidroksianisol (BHA), eritorbik asit ve sodyum eritorbat, propil gallatlar (PG), tert-bütül hidroksikinon (TBHQ), nordihidroguareyetik asit (NDGA) gibi sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır.

2.6.2.1. Eritorbik Asit ve Sodyum Eritorbat

Eritorbik asit (izoaskorbik asit) ($C_6H_8O_6$) ve tuzu olan sodyum eritorbat ($C_6H_7O_6Na.H_2O$) oksijen tutucu özelliğe sahiptirler. Bu sahip oldukları özellik, onların antioksidan etki göstermelerini sağlar. Eritorbik asit oksijen tutucu özelliğinin yanında, güçlü bir indirgen ajandır. Eritorbik asit, asidik ortamlarda nötr ortamlara göre daha stabildir. Sitrik asitin bulunduğu ortamlarda, eritorbik asit sülfütlere karşı koruyucu özellik gösterir. Bu özelliği sebebiyle, donmuş deniz ürünleri, salatalar ve elmalarda meydana gelen renk kaybı ve acılaşmayı engellemek için katkı maddesi olarak kullanılır. Ayrıca eritorbik asit ve sodyum eritorbat donmuş meyvelerde bozulmayı engellemek için kullanılır.

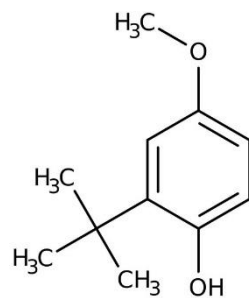
2.6.2.2. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA) ve Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT)

Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT) ($C_{15}H_{24}O$) (2,6-ditersiyeer bütül-4-metil fenol), 1954 yılında gliseridler ile yapılan çalışmada koruyucu özellik göstermesinden dolayı farkedilmiştir. Bunun üzerine aynı koruyucu etkiyi gıda olarak tüketilen yağlarda ve diğer bazı gıdalarda da göstereceğinden, gıda katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. BHT, yağlarda iyi çözünebilen ancak suda çözünmeyen, beyaz renkli kristal yapıda bir madde olup 760 mm Hg basıncında, kaynama noktası $265\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. Erime noktası $69.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir. BHT, bitkisel yağlarda BHA gibi düşük aktivite göstermektedir. Düşük aktivite göstermesine rağmen, diğer antioksidanlar ile birlikte kullanıldığında yağın ilave edildiği gıdayı koruyabilmektedir. BHT, BHA ile kullanıldığında sinerjik etki gösterirken, gallatlar ile kullanıldığında sinerjik etki göstermemektedir.

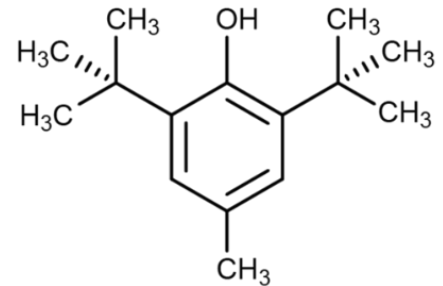
Bütillenmiş hidrokşianisol (BHA) ($C_{11}H_{16}O_2$), 3-terşiyer-bütıl-4-hidrokşianisol'ün %85'i ile 2-terşiyer-bütıl-4-hidrokşianisol'ün %15 izomerlerinin karışımından oluşur. BHA'ün gıdalarda katkı maddesi olarak kullanımına 1948 yılında ABD tarafından izin verilmiştir. Günümüzde de yağlarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. BHA bitkisel ve hayvansal yağlarda çözünmekte ancak suda çözünmemektedir. Beyaz, mumsu katı bir yapıya sahip, erime noktası yaklaşık 48-63 °C olan bir antioksidandır.

BHA yapısındaki terşiyer bütıl grubu nedeni ile 'engelleyici fenol' olarak adlandırılır. Bu terşiyer grubu yapısındaki hidrokşil gruba karşı orto veya meta pozisyonunda bulunur. Bu sterik engelleme dolayısıyla BHA'ün bitkisel yağlarda etkinliği zayıftır. Bu sterik engellemenin, terşiyer bütıl grubun fenolik yapının antioksidatif aktivitesi ile girişim meydana getirmesi ve bu neden ile BHA'nın bitkisel yağlarda etkisinin az olmasına neden olduğu öne sürülmektedir.

BHA'ün bitkisel yağlarda etkisinin az olmasına karşın gallatlar gibi diğer antioksidanlar ile birleştiğinde sinerjistik etki göstermektedir. BHA yüksek sıcaklık uygulanarak tüketilen yağlarda koruyucu olarak kullanıldığında, kolaylıkla farkedilen keskin bir kokuya sahiptir. BHA ve BHT birlikte kullanıldığında sinerjistik etki göstermektedir. BHA ve BHT'nin karserojenik etkileri üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu antioksidanların fazla tüketimi, vücutta aşırı hassasiyete ve alerjiye yol açabilmektedir. Günümüzde 23 büyük gıda kategorisinde en fazla kullanılan antioksidanlar olduğu bilinmektedirler [90].



Bütillenmiş Hidrokşianisol (BHA)



Bütillenmiş Hidrokşitoluen (BHT)

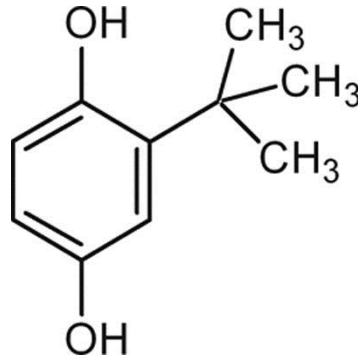
Şekil 2.20. BHA ve BHT'nin kimyasal yapıları

2.6.2.3. Tersiyer Bütildidrokinon (TBHQ)

TBHQ, bitkisel yağlar için diğer sentetik antioksidanların aksine en koruyucu antioksidan olup yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklıdır. TBHQ'nun yağlardaki çözünürlüğü orta derecede olup, sudaki çözünürlüğü çok azdır. Beyaz ile sarımsı kahverengi arası renkte, kristal yapıda bir bileşik olup erime noktası 127 °C dir [91].

TBHQ'un bitkisel yağlardaki antioksidan özelliği diğer sentetik antioksidanlara göre fazla olduğundan dolayı kullanımına birçok ülke tarafından izin verilmektedir. Günümüzde kullanmakta olduğumuz bitkisel yağlar kolaylıkla oksidasyona uğradıklarından dolayı, katkı maddesi olarak kullanılacak kuvvetli antioksidanlara ihtiyaç artmıştır.

TBHQ, yüksek sıcaklıklara karşı dayanıklı olup, yağın ilave edildiği gıdalarda yüksek antioksidan etki göstermekte, BHT ve BHA den daha az uçucu bir antioksidandır. TBHQ'nun gallatlardan farklı olarak ortamda demir varlığında renk bozulmasına neden olmaz. Yapılan çalışmalar TBHQ'un diğer sentetik antioksidanlar arasında en yüksek antioksidan etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

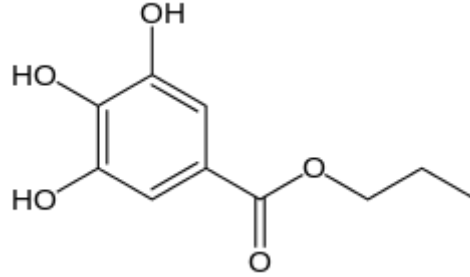


Şekil 2.21. TBHQ'nun kimyasal yapısı

2.6.2.4. Gallatlar

Propil gallat (PG), oktil gallat, dodesil gallat ve lauril gallat gallik asitin en yaygın olarak kullanılan esterleridir. PG, suda çok az çözünen beyaz kristal bir madde olup, erime noktası 148°C dir. Gallik asitin esterlerinden, sadece oktil ve dodesil gallatlar yağda iyi çözünür. Gallatların kullanımı ile ilgili negatif bir etki

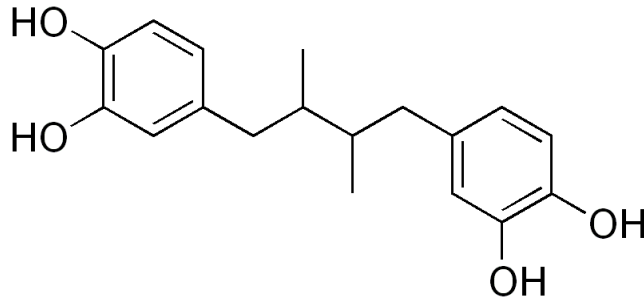
gösterdiğine dair bilgi bildirilmemiş olup, 1947 den beri kullanımı giderek artan sentetik antioksidanlardır [92].



Şekil 2.22. Propil Gallat (3,4,5-Trihidroksi Benzoik Asit Propil Ester) kimyasal yapısı

2.6.2.5. Nordihidroguareyetik asit (NDGA)

Nordihidroguairatik asit (NDGA), gallatlarda olduğu gibi ısıya karşı duyarlı olup, toksik etkisi yüksektir [93]. NDGA'nin yağdaki çözünürlüğü az olup, demir varlığında gıdanın renk değişmesine sebep olmaktadır. Ülkemizde dahil olmak üzere NDGA'in gıdalarda kullanımına izin verilmemektedir [94].



Şekil 2.23. NDGA'nin kimyasal yapısı

2.7. Çalışmada Kullanılan Keten Tohumu ve Özellikleri

Yararlı kimyasallar olarak tanımlanan vitamin olmayan nutrasötiklerden bitkisel kaynaklı olanlarına fitokimyasal adı verilmektedir. Gıdaların bileşiminde 900'den fazla fitokimyasal bulunmuştur. Ağır olarak bitkisel kaynaklı ürünlere bağlı beslenmenin kronik hastalıkları , özellikle kanser riskini azaltabildiğine dair çok sayıda in vivo, in vitro ve klinik deneme çalışmaları bulunmaktadır. Keten

tohumu bu açıdan incelendiğinde, flavonoid, lignan ve fenolik asitler gibi fitokimyasalların da doğal kaynağı olup α -linolenik asit ve iyi kaliteli protein bakımından zengindir [95].

Keten (*Linum usitatissimum*), 30-100 cm boyunda, mavi çiçekli ve tek yıllık bir kültür bitkisi olup, Mısırlılardan beri tarımı yapılmış ve çok değişik amaçlarla kullanılmıştır. Tohumları, 4-6 mm uzunlukta, yumurta biçiminde, yassı, parlak, kırmızımtırak esmer renkli, kokusuz, yağlı ve lezzetlidir. Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü, kanser önleyici gıdalar arasına aldığı ve üzerinde çalışılmasını öngördüğü 6 bitkisel materyalden birisi olarak keteni belirlemiştir. Keten tohumunda 8-10 g/kg toplam fenolik asit, 5 g/kg esterleşmiş fenolik asit ve 3-5 g/kg eterleşmiş fenolik asit bulunmaktadır. Toplam ve esterleşmiş fenolik asitlerin düzeyi kabuksuz ve yağsız keten tohumunda ise 81 ve 73,9 mg/100 g'dır [96]. Bu ürünlerde bulunan başlıca fenolik asitler trans-ferulik (%46), trans-sinapik (%36), p-kumarik (%7,5) ve trans-kaffeik (%6,5) asittir. Fenolik asit içeriğindeki varyasyon mevsimsel olarak değişiklik göstermektedir [97]. Yağsız keten tohumu tozunda belirlenen fenolik asitler ferulik asit (10.9 mg/kg), klorojenik asit (7,5 mg/g), gallik asit (2,8 mg/g) ve 4-hidroksibenzoik asit (iz miktarda)'tir [98]. Keten tohumunun biyoaktif fonksiyonlardan antioksidant, antimikrobiyal ve anti-kanser özellik göstermeleri yapısında bulunan fenolik asitlerden kaynaklanmaktadır.

Keten ve keten tohumu, geçmişten günümüze tedavi amacı ile kullanılmaktadır. Ekonomik önemi olan bir bitki olup dünyada yıllık üretimi 4 milyon tondan fazladır. Taşıdığı birçok etken madde grubuna bağlı olarak, deneysel çalışmalarla ispatlanan farmakolojik etkileri vardır. Bunlar içinde antikanserojen etki kanserin, kalp hastalıklarından sonra dünyadaki ikinci sıradaki ölüm nedeni olmasından dolayı önemlidir. Keten tohumunda bulunan yüksek orandaki sekoizolarisirezinoldiglukozit (%3-3.5) kolon ve meme kanserinde koruyucu rol oynamaktadır. Keten tohumu sekoizolarisirezinoldiglukozit yanında lif ve mineraller bakımından da zengin olduğu için diyetde tavsiye edilmektedir.

Sentetik antioksidanların insan sağlığı açısından potansiyel toksik olabileceğinin öne sürülmesi, özellikle günümüzde tüketici tercihlerini doğal tarımsal ürünlere yöneltmiş ve işlenmiş gıdalarda da sağlık, kalite ve güvenlik arayışlarını ön

plana çıkarmıştır. Araştırmacılar ve gıda bilimcileri sentetik antioksidanların yerine geçebilecek “doğal antioksidanlar” araştırma gayreti içine girmişlerdir. Bu amaçla yeryüzünde geniş dağılım gösteren bitkisel kaynaklara yönelinmekte ve bu kaynaklardan elde edilecek doğal antioksidanların gıdaların işlenmesi sırasında sentetik antioksidanlar yerine gıdalara ilave edilmesi hedeflenmektedir.



şekil 2.24. Keten bitkisi



şekil 2.25. Keten tohumu

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

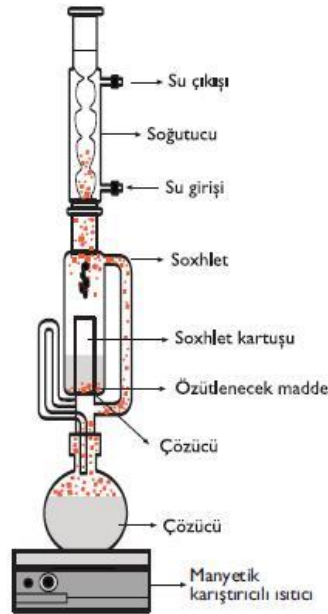
Bu araştırmanın materyali olan Sarı-85 keten tohumu çeşidi Trakya Tarımsal Araştırma Enstitüsünden, McGregor keten tohumu çeşidi Karadeniz Tarımsal Araştırma Enstitüsünden temin edilmiştir.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması

3.2.1.1. Soxhlet Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon yöntemi, karışımlardan istemediğimiz çözücü ve safsızlıkları uzaklaştırmak, çözeltilerden veya katı karışımlardan bir maddeyi ayırmak üzere kullanılır. Katı maddelerin bir çözücüyle sürekli ekstraksiyonunun sağlanması için en uygun düzenek Soxhlet düzeneğidir. Soxhlet ekstraktör 1879'da Franz von Soxhlet tarafından icat edilmiş olup, orijinalde katı materyallerden sıvıların ekstraksiyonu için tasarlanmıştır. Fakat katı numunelerden bileşiklerin ekstraksiyonlarının zor olduğu zamanlarda da kullanılabilir [99].



Şekil 3.1. Soxhlet düzeneği

Bir soxhlet ekstraksiyon düzeneği, kaynama balonu, magnetik karıştırıcı çubuk, soxhlet aparatı, geri soğutucu ve bir ısıtıcıdan oluşur (Şekil 3.1.). Kaynama balonuna çözücü yerleştirilip, balon içerisine magnetik karıştırıcılı çubuk konur ve bir ısıtıcı ile kaynama balonu ısıtılır. Kaynama balonu ısıtıldıkça balon içindeki çözücü buharları soğutucuya doğru yükselir ve orada soğudukça yoğunlaşmaya başlayıp numunenin üzerine damlar. Numuneyi içeren soxhlet aparatındaki kartuş bölümü yoğunlaşan çözücü ile yavaşça dolar, ardından sifon hareketi ile balona geri boşalır. Numunenin ayrıntılı ekstraksiyonu için bu çevrim pek çok kez tekrar eder.

Keten tohumları toz haline getirildikten sonra yağlarını uzaklaştırmak için soxhlet aparatında n-hekzan (1:4 w/v) ile ekstraksiyon yapılmıştır.

Yağı uzaklaştırılmış kuru keten tohumu tozları 60 °C' de metanol (1:10 w/v) ile çözelti renksiz oluncaya kadar soxhlet düzeneğinde ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Metanol ekstraktı, vakum altında evaporatörde konsantre edilmiştir. Daha sonra kuru kalıntı n-bütanol: su (1:1 v/v) karışımı ile ayrılmıştır. N- bütanol fraksiyonu sulu fraksiyondan ayrılıp vakum altında evaporatörde konsantre edilip, kuru n- bütanol kalıntısı metanol ile çözümlenip, eter (1:5 v/v) ile çöktürülmüştür. Yağı uzaklaştırılmış keten tohumu tozundan elde edilen n-bütanol fraksiyonu antioksidan aktiviteyi tayin etmek üzere antioksidan aktivite denemelerinde kullanılmıştır [100].

Yağı uzaklaştırılmış n-bütanol fraksiyonlarında ve tohumlardan elde edilen yağlarda Lc-Ms-Ms yöntemiyle fenolik asitler tayin edilmiştir.

3.2.2. Ekstrelerin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

3.2.2.1. DPPH Radikali Süpürücü Etki Tayini

DPPH radikal süpürücü etkinin tayini Çakır ve arkadaşlarına göre yapılmıştır [101]. Reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 50-250 µg/ml olacak şekilde metanolde hazırlanan örnek çözeltilerinin, 3 ml' lik çözeltilisine 1 ml 1×10^{-3} M DPPH çözeltilisi (metanolde) ilave edilip vortekste 30 saniye karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda UV Spektrofotometresinde 517 nm de absorbans okunmuş, pozitif kontrol olarak da BHT ve BHA kullanılmıştır.

30 dakika sonucunda DPPH radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır;

$$\% \text{ İnhibisyon} = [A_K - A_0 / A_K] \times 100$$

A_K: Kontrol (antioksidan içermeyen) örneğin absorbansı

A₀: Örneğin (antioksidan içeren) absorbansı

Maksimum absorbansın yarısına karşılık gelen yani absorbansı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı IC₅₀ (etkin konsantrasyon) değerini vermektedir. Antioksidan derişimlerine karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri (IC₅₀) okunmuştur.

3.2.2.2. İndirgeme Gücü Tayini

İndirgeme gücü tayini Oyaizu metoduna göre yapılmıştır [102]. Konsantrasyonu 1 mg/ml olan metanolde hazırlanmış stok bütanol fraksiyonundan değişik konsantrasyonlarda hazırlanmıştır (50-250 µg/ml). Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerden 0,5 ml alınıp deney tüplerine aktarılmış ve hacim destile suyla 1 ml' ye tamamlanmıştır. Daha sonra her bir tüpe 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür [K₃Fe(CN)₆] ilave edildikten sonra karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edilmiştir. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edilmiştir. 10 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edilip ve tüplerdeki karışımların üst kısmından 2.5 ml alınarak başka tüplere aktarılmıştır. Yeni tüplere aktarılan çözeltilerin her birinin üzerine 2,5 ml destile su ve %0,1'lik 0,5 ml FeCl₃ ilave edildikten sonra absorbans 700 nm'de köre karşı okunmuştur. Kör olarak destile su kullanılmış, kontrol için ise numune yerine su kullanılmıştır.

3.2.2.3. Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

Toplam fenolik bileşik miktarı tayini Singleton ve arkadaşlarına göre yapılmıştır [103]. Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Önce standart grafik çizmek amacıyla 1 mg/ml konsantrasyonunda stok gallik asit çözeltisi hazırlanmıştır. Çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Son gallik asit konsantrasyonu 1, 3, 5, 7, 10, 15 ve 20 µg/ml olacak şekilde stok gallik asit çözeltisinden tüplere 1ml konup ve hacimler 4 ml'ye saf suyla tamamlanmıştır. Daha sonra tüplere 0,25 ml Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ve 3 dk. sonra da % 20'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 0,75 ml ilave edilmiştir. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalanmıştır. Sonra

numunelerin absorbansı 760 nm’de köre karşı okunmuştur. Bu işlemler üçer defa yapılmıştır. Kör olarak, numune yerine destile su içeren test çözeltisi kullanılmıştır.

Ekstrelerdeki toplam fenolik bileşik miktarını belirlemek amacıyla 2 mg/ml stok ekstre çözeltileri hazırlanmıştır. Her bir stok çözeltilerden tüplere 1 ml konulup, hacimleri 4 ml’ye saf suyla tamamlanmıştır. Daha sonra tüplere 0,25 ml Folin-Ciocalteu Reaktifi ve 3 dk. sonra da %20’lik Na₂CO₃ çözeltisinden 0,75 ml ilave edilmiştir. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandıktan, sonra numunelerin absorbansı 760 nm’de köre karşı okunmuştur. Numunelerin absorbans değerlerine karşılık gelen gallik asit miktarı standart grafik yardımıyla tespit edilip sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) şeklinde ifade edilmiştir.

3.2.2.4. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Tayini

Hidrojen peroksit giderme aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapılmıştır [104]. Bunun için pH’sı 7,4 olan fosfat tamponunda 43 mM’lik hidrojen peroksit çözeltisi hazırlanmıştır. H₂O₂ konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, H₂O₂’in 230 nm’de absorbans göstermesiyle belirlenmiştir. 30 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan ekstrelerin ve standart antioksidan olarak kullanılan BHT ve BHA’ ün hacmi 4 ml’ye kadar tampon çözelti ile tamamlanmıştır. Daha sonra 0,6 ml hidrojen peroksit (43 mM) çözeltisi ilave edilip, 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hidrojen peroksidin azalan miktarı 230 nm’de azalan absorbans olarak kaydedilmiştir. Kör olarak tampon çözeltisi, kontrol olarak 4 ml tampon çözeltisi ve 0,6 ml hidrojen peroksit çözeltisi kullanılmıştır.

Bitki ekstraktları ve standart antioksidant maddelerin hidrojen peroksit giderme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{H}_2\text{O}_2 \text{ giderme} = [A_0 - A_1 / A_0] \times 100$$

A₀: kontrolün 230 nm’ deki absorbansı

A₁: bitki ekstraktlarının ve standart maddelerin 230 nm’ deki absorbansı

3.2.3. Lc-Ms/Ms Analizi

Lc-Ms/Ms (high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry) tekniğinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Birinci kuadrupol filtrede m/z (kütle/yük) oranına göre ayrılan moleküller collision gaz adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile parçalanmaya tabi tutulmaktadır. İkinci kuadrupol filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonların (daughter veya product ion) üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10000 dir. Bu nedenle Lc-Ms/Ms tekniği neredeyse babalık testi kadar özgün bir test olmasının yanı sıra çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır.

Yağı uzaklaştırılan Sarı-85 ve McGregor keten tohumu ekstralarında ve tohumlardan uzaklaştırılan yağlarda bulunan gallik, 4-hidroksibenzoik, gentisik, sinapic, vanilik, kafeik, şiringik, p-kumarik, o-kumarik ve ferulik asit miktarları tayini Lc-Ms/Ms yöntemi ile yapılmıştır.

Lc-Ms/Ms Cihazının çalışma şartları aşağıda verilmiştir.

Kolon: C18

Enjeksiyon Hacmi: 0,5 uL

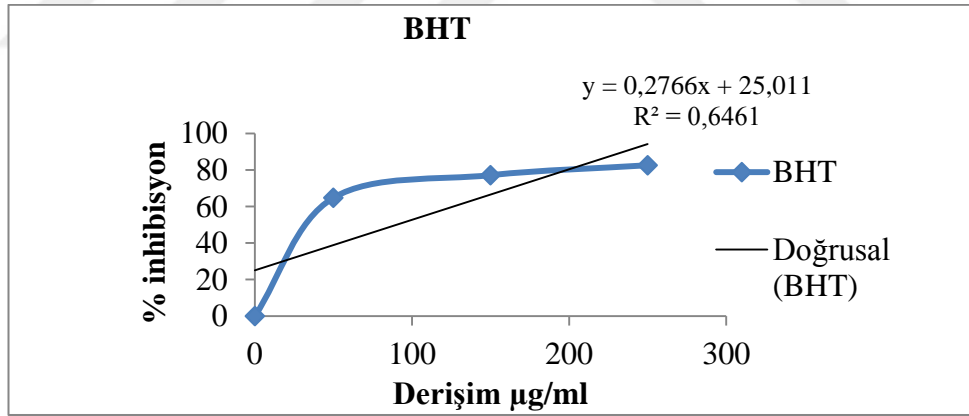
Mobil Faz A: %0,1 Formik asit

Mobil Faz B: MeOH

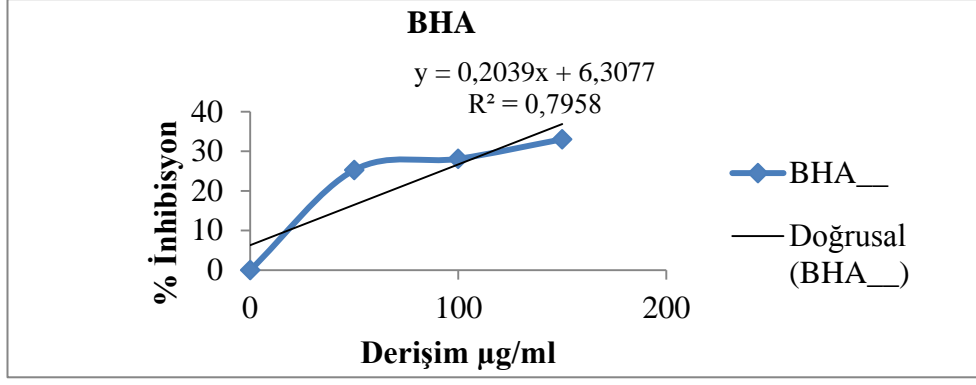
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. DPPH Radikali Süpürücü Etki Bulguları

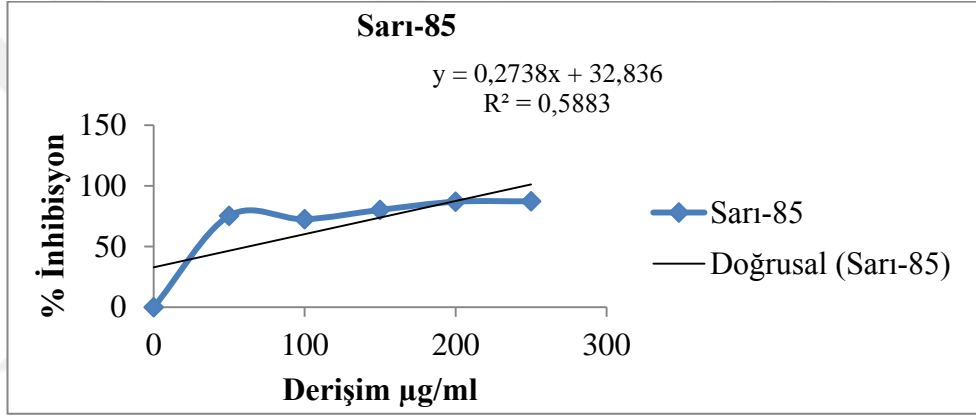
Antioksidan maddelerin antioksidan özelliklerinden bir tanesi de, ortamda oluşan radikalleri süpürmeleridir. Numunelerimizin anti-radikal özelliklerinin olup olmadığını anlamak için, 517 nm’de maksimum absorbans veren DPPH radikali kullanılmıştır. DPPH kararlı bir serbest radikaldir. Kararlı bir diamanyetik molekül oluşturmak için bir elektron veya hidrojen radikalini bünyesine kabul eder. Antioksidan ile DPPH’ in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği absorbans ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek demektir. DPPH radikalinin ortamdaki miktarının azalması ile absorbansın azalması belli bir antioksidan derişimine kadar doğru orantılıdır. Absorbansın düşmesinin sebebi radikal ile antioksidan moleküllerin reaksiyonu sonucu hidrojen bağlanması ile radikalın giderilmesidir. Farklı derişimlerdeki (50-250 µg/ml) standart antioksidan olan BHT, BHA’ ün ve ekstrelerin % inhibisyon cinsinden hesaplanan lineer regresyon grafikleri şekil 4.1. - 4.2. - 4.3. - 4.4. de verilmiştir.



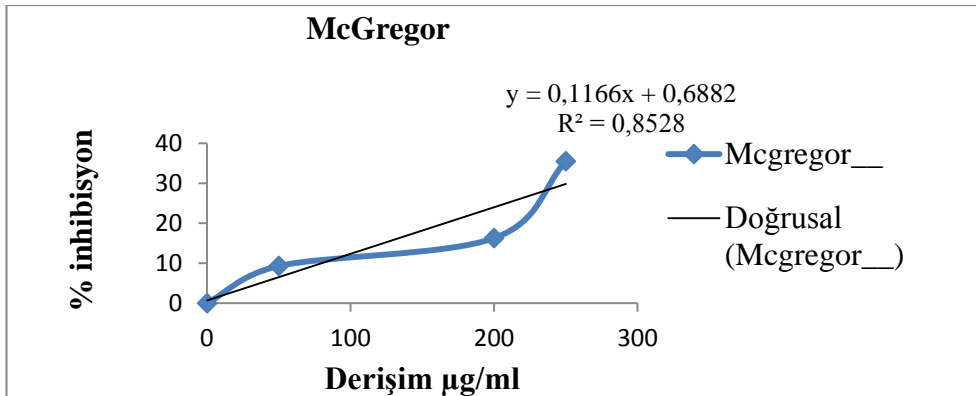
Şekil 4.1. Standart antioksidan BHT’ nin DPPH radikali süpürücü aktivitesi



Şekil 4.2. Standart antioksidan BHA' ın DPPH radikali süpürücü aktivitesi

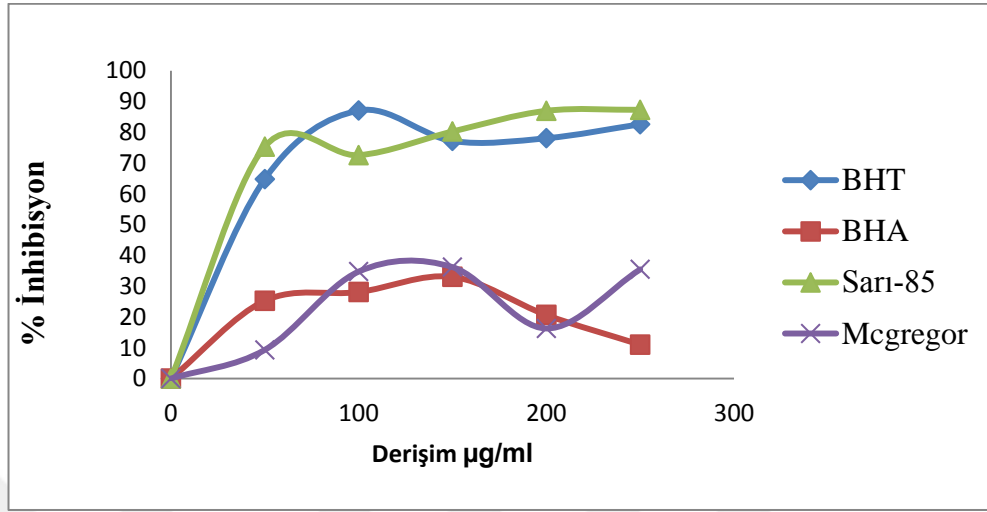


Şekil 4.3. Sarı-85 keten tohumu ekstresinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi



Şekil 4.4. McGregor keten tohumu ekstresinin DPPH radikali süpürücü aktivitesi

50-250 µg/ml konsantrasyonlarındaki Sarı-85, McGregor keten tohumu çeşitleri ve kullanılan standartlara ait % inhibisyon grafiği şekil 4.5.' de verilmiştir.



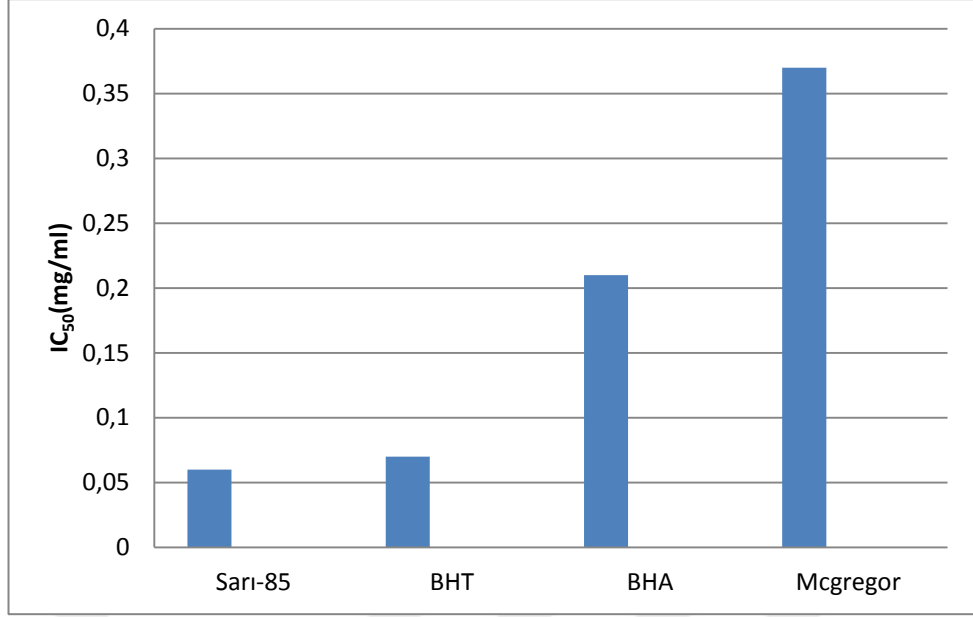
Şekil 4.5. Keten tohumu örnekleri ve standartların DPPH radikali süpürücü aktiviteleri

Yukarıda verilen grafiklerden lineer regresyon ile hesaplanan IC₅₀ (etkin konsantrasyon) değerleri tablo 4.1'de görülmektedir.

Tablo 4.1. Keten tohumu ekstralarının ve standart antioksidanların IC₅₀ değerleri

Antioksidan	BHT	BHA	Sarı-85	McGregor
IC ₅₀ (mg/ml)	0,07	0,21	0,06	0,37

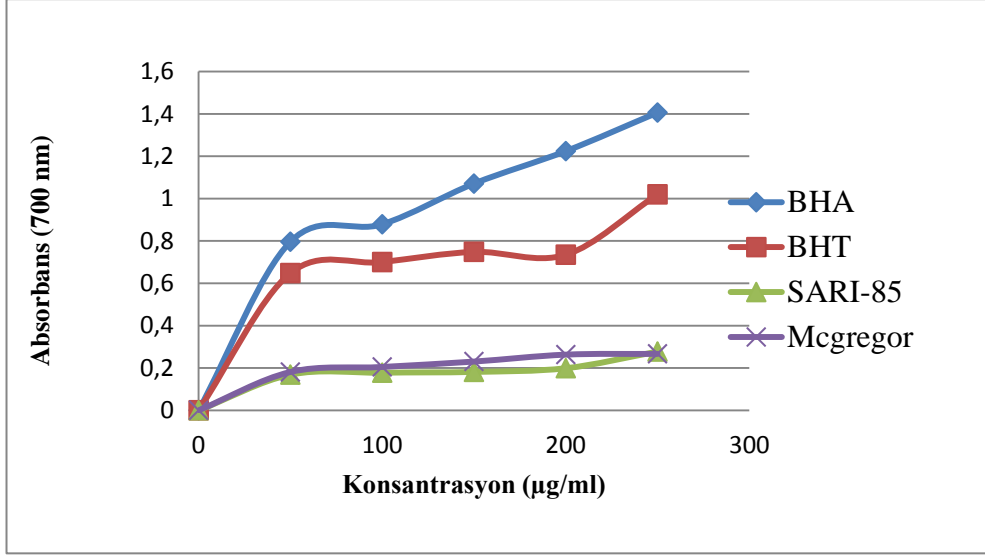
Sarı-85 ve McGregor ekstralarının BHA ve BHT ile kıyaslanması şekil 4.6. da belirtilmiştir.



Şekil 4.6. Ekstrelerin ve standartların DPPH radikal süpürme miktarlarına göre kıyaslanması

4.2. İndirgeme Gücü Bulguları

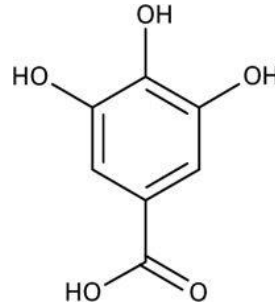
Antioksidan çalışmalarda kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil renge dönüşmektedir [105]. Çalışılan keten tohumu ekstralarının ve standart antioksidan olarak kullanılan BHT ve BHA' ün indirgeme kapasitesi artan ekstre konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak artmaktadır. Her iki ekstrenin ve standart antioksidan maddelerin indirgeme potansiyeli farklı konsantrasyonlardaki (50-250 µg/ml) çözeltilerinin 700 nm'deki absorbanları ölçülerek belirlenmiştir (Şekil 4.7.).



Şekil 4.7. Keten tohumu ekstralarının farklı konsantrasyonlardaki (50-250µg/ml) indirgeme güçlerinin birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırması

4.3. Toplam Fenolik Bileşik Bulguları

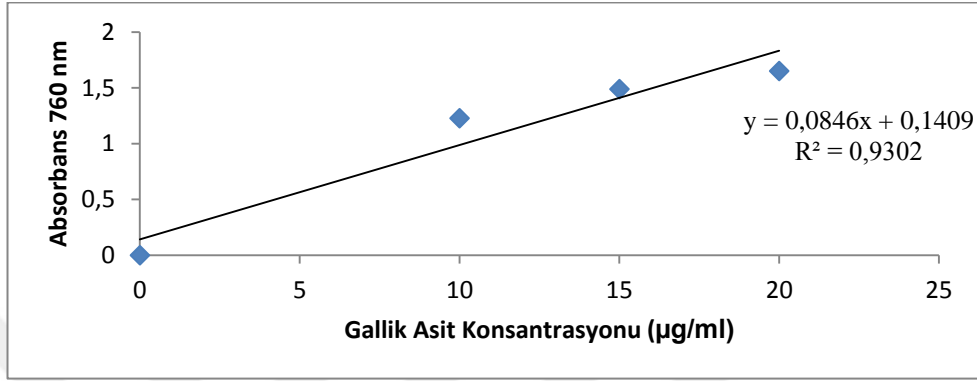
İki farklı keten tohumu çeşidinden elde edilen ekstralarda bulunan toplam fenolik bileşik miktarı için standart fenolik bileşik olarak kullanılan gallik asitin açık yapısı şekil 4.8.'de görülmektedir.



Şekil 4.8. Standart bir fenolik bileşik olan ve aynı zamanda kuvvetli antioksidan olan gallik asitin açık yapısı

Fenolik bileşik miktarı tayini için Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılmıştır. Ortamda fenolik maddenin bulunması durumunda FCR ilavesiyle 760 nm'de maksimum absorbans veren ürünler oluşmaktadır. Absorbanstaki artış fenolik

madde miktarıyla orantılıdır. Gallik asit kullanılarak standart grafik hazırlanmıştır. Standart grafikten elde edilen formülden de yine her iki ekstrede bulunan toplam fenolik bileşik miktarları galik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplanmıştır ($R^2=0,9302$). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4.9. Gallik asit standart grafiği

Gallik asit standart grafiğinden elde edilen doğru denklemi:

$$\text{Absorbans } (\lambda_{760\text{nm}}) = 0,0846 \times \text{Toplam fenolik bileşik (GAE)} + 0,1409$$

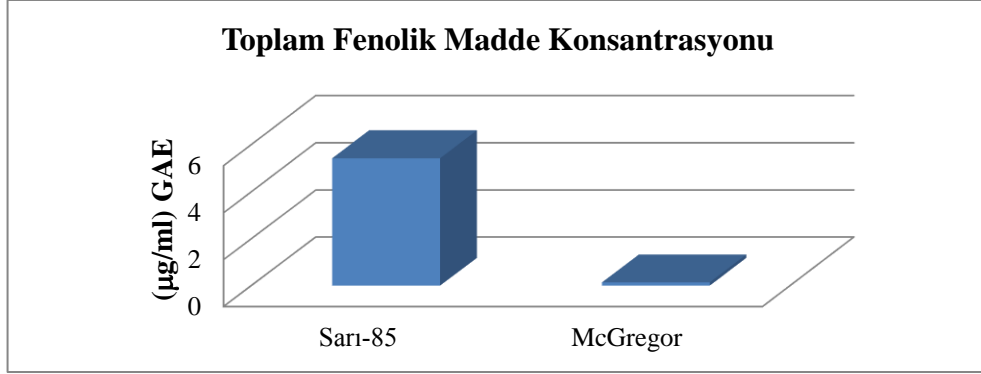
kullanılarak ekstrelerinin 100 µg/ml derişimindeki örneklerindeki GAE değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 4.2'de yukarıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanan toplam fenolik bileşik miktarı değerleri görülmektedir.

Tablo 4.2. Ekstrelerin absorbansa bağlı GAE' leri

	Absorbans	Konsantrasyon (µg/ml) GAE
Sarı-85	0,60	5,42
Mcgregor	0,15	0,14

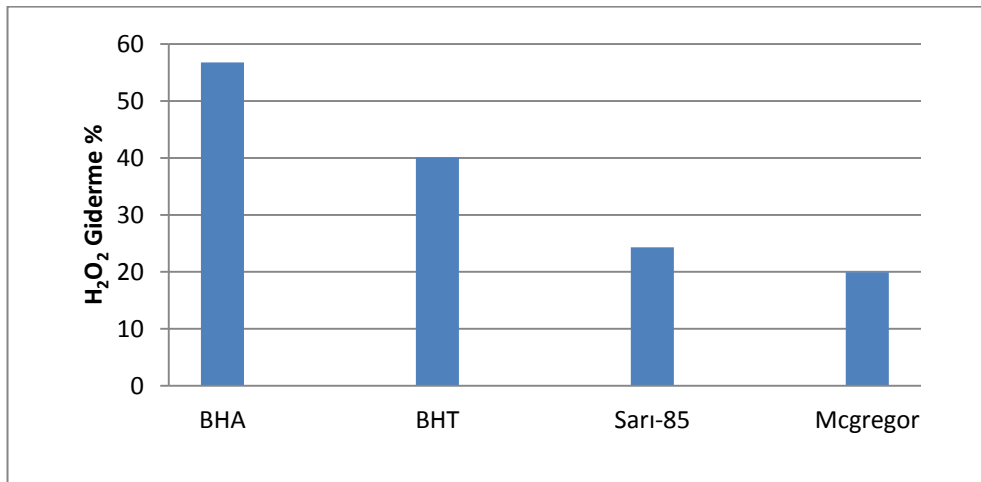
Folin-Ciocalteu yöntemine göre yaptığımız toplam fenolik yapılı madde konsantrasyonları $\mu\text{g/ml}$ gallik aside eşdeğer bazda gallik asidin kalibrasyon grafiğinden hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular Şekil.4.10 da gösterilmiştir.



Şekil 4.10. Bitki ekstrelerin gallik aside eşdeğer toplam fenolik madde konsantrasyonu

4.4. Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Bulguları

Keten tohumu ekstrelerinin $30 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesi birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırması şekil 4.11' de verilmiştir. Sarı-85 ve McGregor keten tohumu çeşitlerinden elde edilen ekstrelerin kullanılan konsantrasyonda ($30 \mu\text{g/ml}$) hidrojen peroksidi sırasıyla %24,3 ve %19,9 giderdiği gözlenmiştir. Standart antioksidan olan BHT ve BHA' ün ise hidrojen peroksidi sırasıyla %40,1 ve %56,8 giderdiği belirlenmiştir.

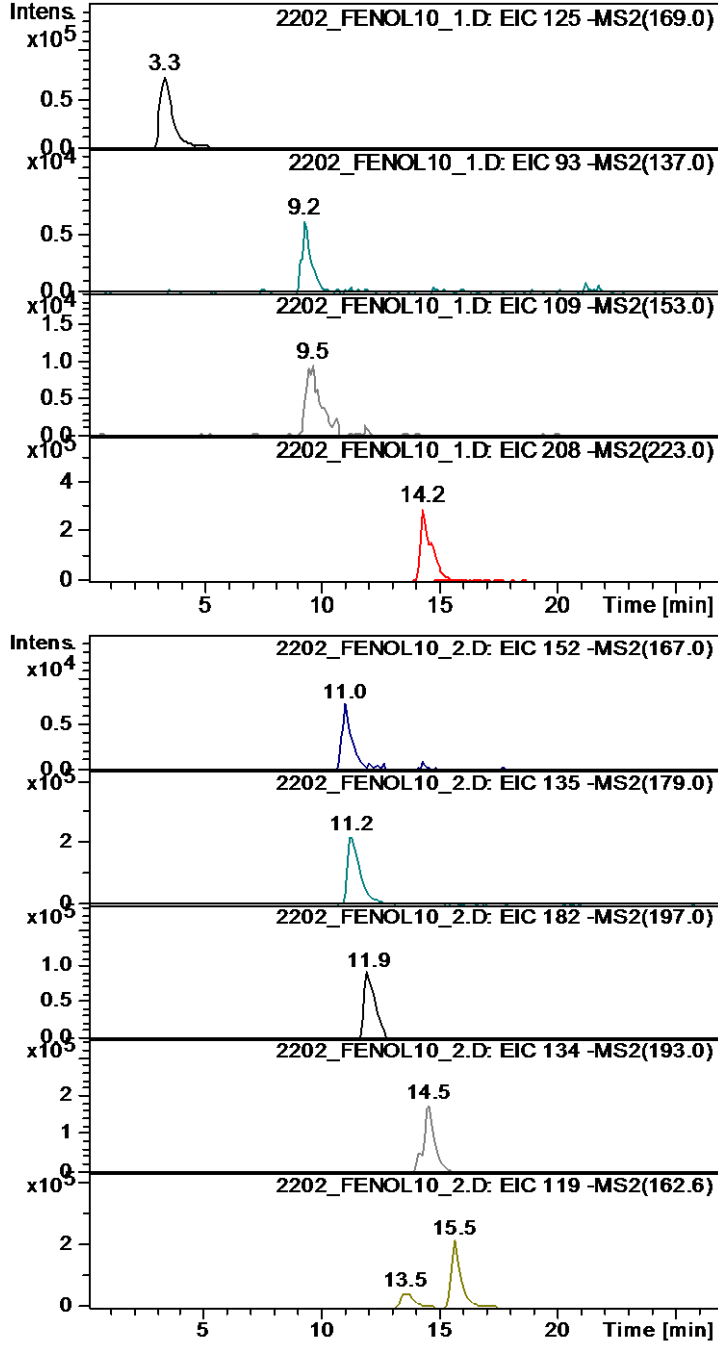


Şekil 4.11. Sarı-85 ve McGregor ekstralarının 30 µg/ml konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırması

4.5. Lc-Ms/Ms Analizi Bulguları

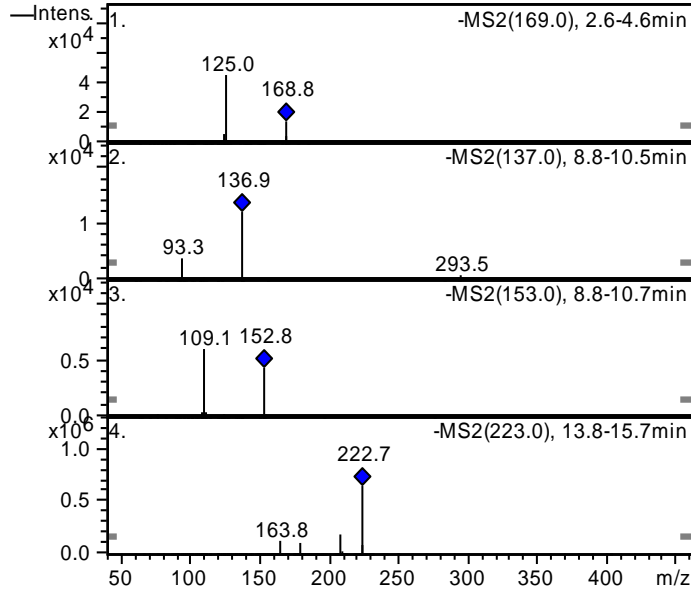
Lc-Ms/Ms ile çok hızlı bir sürede bileşimin molekül ağırlığı belirlenebilir. Lc/Ms analizlerinde karışım halindeki numune mobil faz ile kolondan geçirilerek bileşenlerine ayrılır. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler.

Bu çalışmada analizler Capillary HPLC-Ion Trap MS ile yapılmıştır. Sonuçlar ana iyonların parçalanması ile yani Ms/Ms ile elde edilmiştir. Standart katım metoduyla nicel değerlere ulaşılmıştır. Yağı uzaklaştırılmış keten tohumu ekstralarında ve yağlarında bulunan fenolik asitlerin Lc-Ms/Ms ile tayininde, standart olarak gallik asit, 4-hidroksibenzoik asit, gentisik asit, sinapik asit, vanilik asit, kafeik asit, şiringik asit, p-kumarik asit, o-kumarik asit ve ferulik asit kullanılmıştır. Standartlara ait kromatogramlar şekil 4.12 de verilmiştir.



Şekil 4.12. Standartlara ait kromatogramlar

Standartlara ait spektrumlar şekil 4.13 de verilmiştir.



Şekil 4.13. Standartlara ait spektrumlar

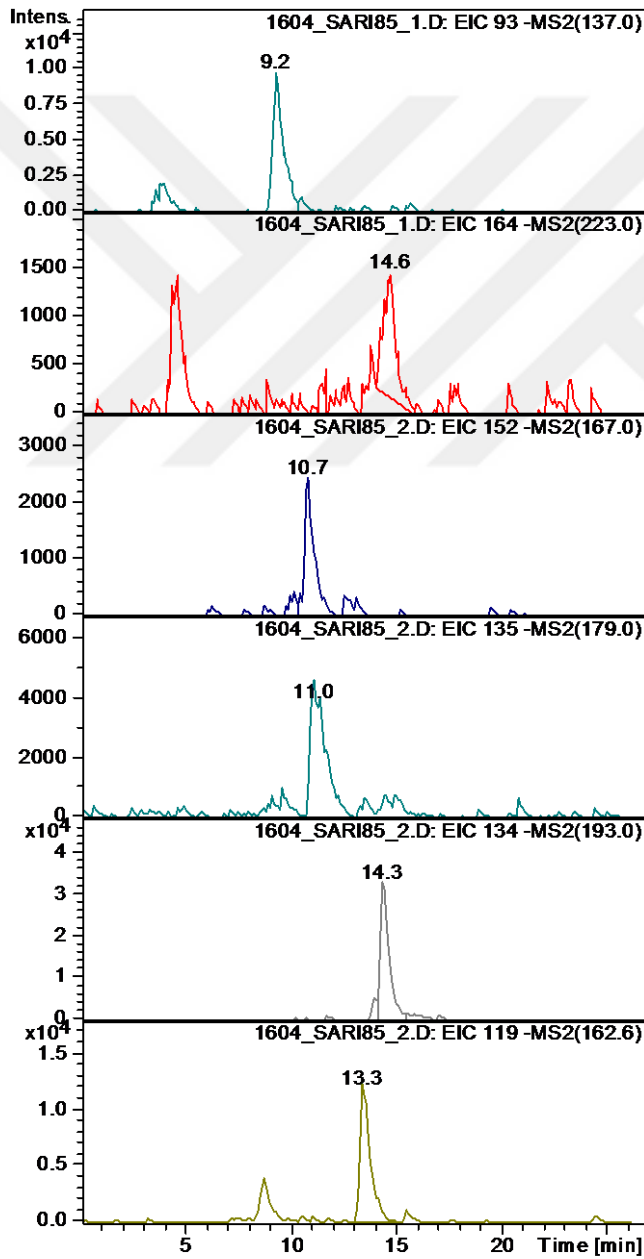
Standart katım metodunda kullanılan saf fenolik asitlerin retansiyon zamanları ve m/z oranları tablo 4.3’de verilmiştir. Tabloda verilen LOQ belirlenebilirlik sınırır.

Tablo 4.3. Saf fenolik asitlerin retansiyon zamanları ve m/z oranları

Fenolik Asitler	RT [min]	m/z [M - H]	LOQ
Gallik Asit	3,3	169>125	0,5
4 hidroksibenzoik Asit	9,2	137>93	2
Gentisik Asit	9,5	153>109	2
Sinapik Asit	14,2	223>208	0,1
Vanilik Asit	11	167>152	2
Kafeik Asit	11,2	179>135	0,2
Şiringik Asit	11,9	197>182	0,1

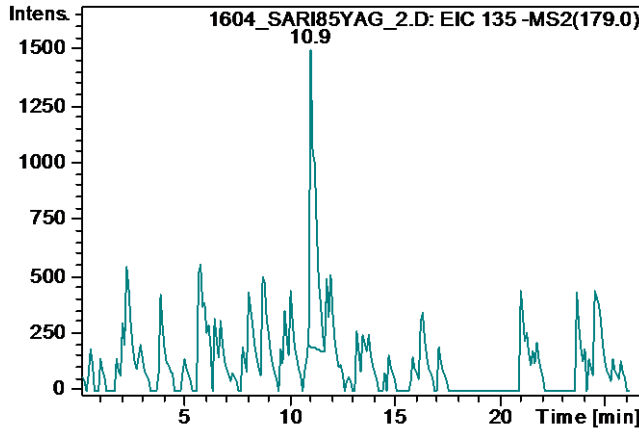
P-kumarik Asit	13,5	162.6>119	0,5
O-kumarik Asit	14,5	193>134	0,1
Ferulik Asit	15,5	162.6>119	0,1

Yağı uzaklaştırılmış Sarı-85 ekstresine ait kromatogramlar Şekil 4.14' de aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.14. Yağı uzaklaştırılmış Sarı-85 ekstresine ait kromatogram

Sarı-85' den elde edilen yağ ekstresine ait kromatogram Şekil 4.15' de verilmiştir.



Şekil 4.15. Sarı-85 elde edilen yağ ekstresinin kromatogramı

Yağı uzaklaştırılmış Sarı-85 keten tohumu çeşidinde bulunan fenolik asit miktarları tablo 4.4' de verilmiştir.

Tablo 4.4. Sarı-85 keten tohumu çeşidinde fenolik asit miktarları

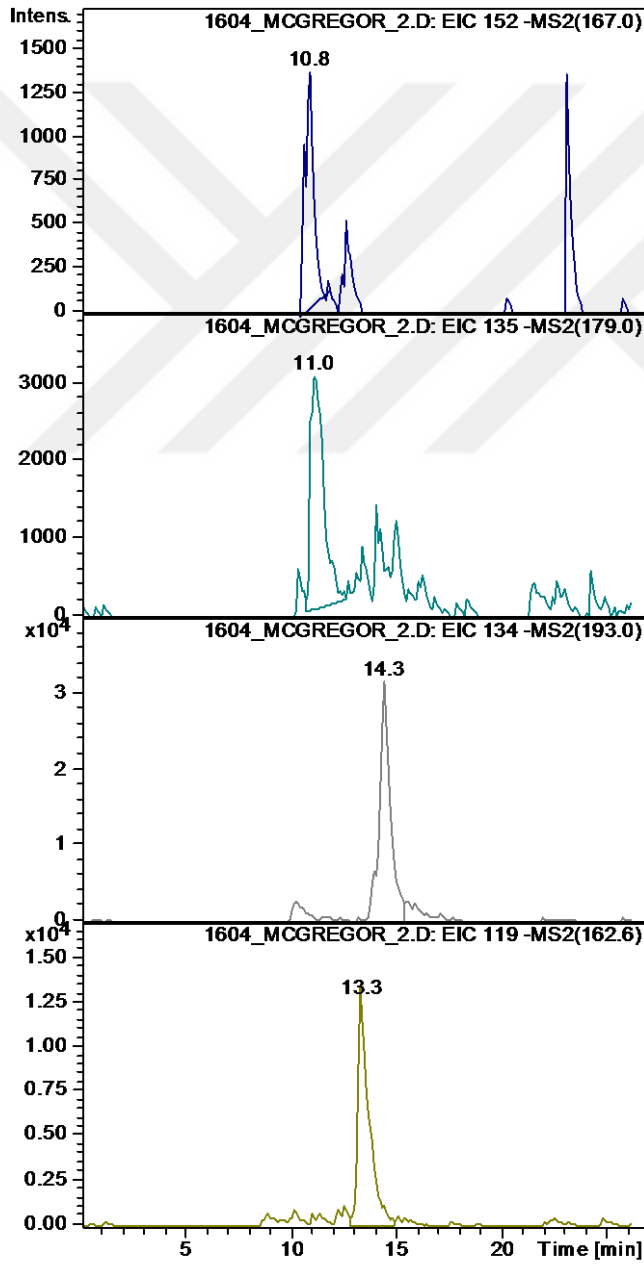
Fenolik Asit	Miktarı (µg/mg)
Gallik Asit	<LOQ
4-hidroksibenzoik Asit	0,563
Gentisik Asit	<LOQ
Sinapik Asit	0,049
Vanillik Asit	0,362
Caffeik Asit	0,008
Şiringik Asit	<LOQ
p-kumarik Asit	0,093
Ferulik Ait	0,642
o-kumarik Asit	<LOQ

Tablo 4.5' de Sarı-85 den elde edilen yağ ekstresindeki fenolik asit miktarları verilmiştir.

Tablo 4.5. Sarı-85 yağ ekstresinde bulunan fenolik asit miktarı

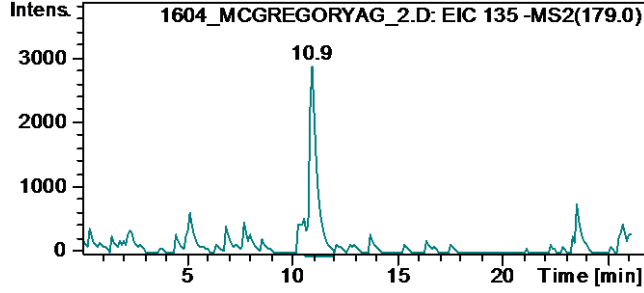
Fenolik Asit	Miktarı ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Kafeik Asit	0,0005

Yağı uzaklaştırılmış McGregor ekstresine ait kromatogram Şekil 4.16 da verilmiştir.



Şekil 4.16. McGregor ekstresi kromatogramı

Şekil 4.17 de McGregor yağ ekstresine ait kromatogram verilmiştir.



Şekil 4.17. McGregor yağ ekstresi kromatogramı

Yağı uzaklaştırılmış McGregor keten tohumu çeşidinde bulunan fenolik asit miktarları tablo 4.6’ da verilmiştir.

Tablo 4.6. McGregor keten tohumu çeşidinde fenolik asit miktarları

Fenolik Asit	Miktarı (µg/mg)
Gallic	<LOQ
4-hydroxybenzoic	<LOQ
Gentisic	<LOQ
Sinapic	<LOQ
Vanillic	0,184
Caffeic	0,005
Syringic	<LOQ
p-coumaric	0,099
Ferulic	0,350
o-coumaric	<LOQ

Tablo 4.7’ de McGregor’ dan elde edilen yağ ekstresindeki fenolik asit miktarı verilmiştir.

Tablo 4.7. McGregor yağ ekstresinde bulunan fenolik asit miktarı

Fenolik Asit	Miktarı (µg/mg)
Kafeik Asit	0,0017

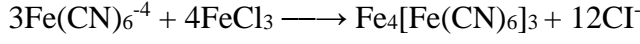
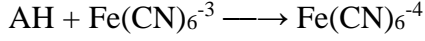
5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Sarı-85 ve McGregor keten tohumu ekstralarının DPPH radikal süpürücü, indirgeme gücü, toplam fenolik bileşik ve hidrojen peroksiti giderme aktiviteleri ayrı ayrı belirlendi.

Çalışmamızda; keten tohumu ekstralarının serbest radikal giderici etkileri stabil bir radikal olan DPPH üzerinden test edilmiştir. DPPH çözeltisi mor renktedir ve antioksidan bir bileşikle etkileştiğinde yapısı değişerek sarı renkli yeni bir bileşik haline gelir. Bu renk değişikliğinin derecesi, antioksidanın konsantrasyonu ile orantılıdır. Çalışmadaki ekstraktlarının radikal giderme kapasitelerine ait grafik şekil 4.5 te görülmektedir. Şekil 4.5'te görüldüğü üzere, standart antioksidan olan BHT'nin DPPH radikali süpürücü aktivitesi Sarı-85 keten tohumu ile hemen hemen aynı olup, BHA ve McGregor keten tohumu çeşidinden daha yüksektir. 2011 yılında yayınlanan Hindistandan temin edilen keten tohumunda yapılan bir çalışmada, 100 µg/ml konsantrasyonunda BHA, BHT ve yağı uzaklaştırılmış keten tohumunun bütanol fraksiyonunun % inhibisyon değerleri sırasıyla %93.54, %89.50, %30.10 şeklindedir [106]. Reaksiyon ortamındaki DPPH radikalinin % 50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu IC₅₀ (veya EC₅₀) değeri olarak tanımlanır ve düşük IC₅₀ değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Çalışmada kullanılan ekstraktların ve standart antioksidan olan BHT ve BHA'nın herbiri için ayrı ayrı çizilen şekil 4.1., 4.2., 4.3. ve 4.4. de verilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiklerinden IC₅₀ (mg/ml) değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerler tablo 4.1.'de verilmektedir. Bir antioksidan için ölçülen IC₅₀ değeri ne kadar küçük ise antioksidan aktivitesi o kadar yüksek demektir. Tablodaki değerlerden de görüleceği üzere DPPH radikali süpürme kapasitesi Sarı-85 > BHT > BHA > McGregor sırasını izlemektedir.

Biyoaktif bileşiklerin indirgeme gücünü yansıtan, elektron verme kapasitesinin antioksidan aktivite ile ilgili olduğu bildirilmiştir [107]. Antioksidanlar indirgeyici olabilir ve bir maddenin başka bir maddeyi yükseltgeyerek indirgenmesi reaksiyonu olarak tanımlanan redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilizasyonu şeklinde olabilir. Bir bileşiğin ya da ham ekstraktın indirgeme kapasitesi Fe(CN)₆⁻³'nin Fe(CN)₆⁻⁴'ye indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne

Fe³⁺'un ilavesiyle 700 nm'de güçlü absorbansa sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan Fe₄[Fe(CN)₆] meydana gelir.



Absorbanstaki artış, kompleksin oluşumundan kaynaklanan artışı ve dolayısıyla artan indirgeme kapasitesini göstermektedir. Bu analizde test çözeltisinin sarı rengi, antioksidan örneklerin indirgeme kapasitesine bağlı olarak farklı yeşil-mavi tonlarına dönüşür. Bir bileşiğin indirgeme kapasitesi, potansiyel antioksidan aktivitesinin önemli bir göstergesidir [108]. İndirgeme kapasitesi tayininde yüksek absorbans değerinin yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir. Şekil 4.7. incelendiğinde çalışılan keten tohumu ekstralarının ve standart antioksidan maddelerinin indirgeme gücü yetenekleri genel olarak BHA > BHT > McGregor > Sarı-85 şeklinde sıralanmaktadır. Keten tohumu ekstralarının 50-250 µg/ml konsantrasyon aralığında absorbans değerleri sırasıyla McGregor için; 0,1810±0,0005, 0,2048±0,0003, 0,2303±0,0001, 0,2630, 0,2666 Sarı-85 için; 0,1685±0,0004, 0,1778±0,0005, 0,1814±0,0002, 0,1988±0,0005, 0,2773±0,0005 şeklinde hesaplanmıştır. Ekstrelerin indirgeme gücü artan konsantrasyona paralel olarak artmıştır. McGregor ekstraktının 50 µg/ml (0,1810±0,0005) konsantrasyonu Sarı-85 ekstraktının 150 µg/ml (0,1814±0,0002) yakın indirgeyici değer göstermiştir. 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada Hindistandan temin edilen keten tohumu için indirgeme kapasitesi tayini Oktay ve arkadaşlarının geliştirdiği metoda göre yapılmış olup indirgeme kapasitesi BHA> BHT> PC-BF şeklindedir. İndirgeme güçleri artan konsantrasyonla birlikte artan değer göstermiştir [109].

Bu çalışmada standart madde olarak gallik asit kullanılmıştır. Dolayısıyla ekstraların ve standart antioksidan olarak kullanılan BHT ve BHA'nın içerdiği toplam fenolik madde konsantrasyonu gallik aside eşdeğer olarak (µg/ml GAE) hesaplanmıştır. Tablo 4.2 incelendiğinde 100 µg/ml konsantrasyonundaki ekstralardan Sarı-85 (5,4279 µg/ml GAE), McGregor dan (0,1407 µg/ml GAE) daha yüksek fenolik madde miktarına sahiptir.

Canlı organizmalarda hidrojen peroksit, süperoksit dismutaz gibi birçok enzim tarafından oluşturulabilir. Hidrojen peroksit çok reaktif değildir, fakat hücrede

serbest radikallerin artmasına sebep olduğundan dolayı zamanla hücre için toksik olabilir. Hidrojen peroksit, hücre kültürüne ilave edildiğinde geçiş metal iyonları varlığında oksidatif DNA hasarlarına sebep olan hidroksi iyonlarının oluşmasına sebep olur. Hidrojen peroksit, bir çok hücre tipinde 20-50 mg'ın üzerinde olduğunda toksisiteye sebep olabilir. Bütün bunlardan dolayı farmasötik ve gıda sistemlerini oksidatif hasardan korumak için bu sistemlerden hidrojen peroksidi uzaklaştırmak oldukça önemlidir. Sarı-85 ve McGregor keten tohumundan elde edilen her iki ekstre de kullanılan konsantrasyonda (30 µg/ml) hidrojen peroksiti sırasıyla %24,3 ve %19,9 giderdiği gözlenmiştir. Şekil 4.11 incelendiğinde ekstrelerin ve standart antioksidanların hidrojen peroksiti giderme aktiviteleri BHA > BHT > Sarı-85 > Mcgregor şeklindedir.

Yağı uzaklaştırılmış Sarı-85 ve McGregor keten tohumu ekstrelerinde ve yağlarında bulunan fenolik asitler Lc-Ms/Ms analiziyle tespit edilmiştir. Sonuçlar kütle spektrometresi ile ana iyonların parçalanmasıyla elde edilmiştir. Yağı uzaklaştırılmış keten tohumu ekstrelerinde ve yağlarında bulunan fenolik asitlerin Lc-Ms/Ms ile tayininde, standart olarak gallik asit, 4-hidroksibenzoik asit, gentisik asit, sinapik asit, vanilik asit, kafeik asit, şiringik asit, p-kumarik asit, o-kumarik asit ve ferulik asit kullanılmıştır. Ekstrelerde ve yağlarda bulunan fenolik asitlere ait kromatogramlar şekil 4.14., 4.15., 4.16., 4.17., de verilmiştir. Kromatogramlar incelendiğinde yağı uzaklaştırılmış keten tohumu ekstrelerinin yağlarına göre çok daha fazla fenolik asit içerdiği görülmektedir. Tablo 4.4. ve 4.6. da yağı uzaklaştırılmış keten tohumu ekstrelerinde bulunan fenolik asitler (µg/mg) cinsinden verilmiştir. Tablo 4.4. de incelendiğinde yağı uzaklaştırılmış Sarı-85 ekstresinde yüksek miktarda ferulik asit bulunmaktadır. Yağı uzaklaştırılmış Sarı-85 ekstresi yağı uzaklaştırılmış McGregor ekstresine göre daha yüksek miktarda ve daha fazla fenolik asit içermektedir. Sonuç olarak yağı uzaklaştırılmış Sarı-85 keten tohumu ekstresi yağı uzaklaştırılmış McGregor keten tohumu ekstresine göre fenolik asitlerce daha zengindir. Tablo 4.5. ve 4.7. de ekstraksiyon yöntemiyle elde edilen yağ ekstrelerinde bulunan fenolik asit miktarları görülmektedir. Her iki yağ ekstresinde de kafeik asit bulunmaktadır. McGregor yağ ekstresi daha yüksek miktarda kafeik asit içermektedir. Sonuç olarak yağ ekstreleri fenolik asitlerce zengin değildir.

Bu çalışmayla farklı keten tohumu çeşitlerinin antioksidan aktivitesi incelenmiş, sentetik antioksidanlar yerine kullanılabilirliği açısından konuya ışık tutulmaya çalışılmıştır.



KAYNAKLAR

- 1) Shelef, L. A., 1983. Antimicrobial Effects of Spices. *J. Food Safety*, 6, 29-44.
- 2) Halliwell B., Gutteridge JMC., (1990) "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." In: *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- 3) Şenköylü N.,(2001): Yemlik Yağlar, Trakya Üniv. Ziraat Fak. Tekirdağ.
- 4) Yagi, K., 1987. Lipid peroxides and human disease. *Chem. Phys. Lipids*, 45, 337-341.
- 5) Rice-Evans, C. A., Miller N. J. ve Paganga G., 1997. Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, *Trends Plant Sci.*, 2 , 152-159.
- 6) Bilaloğlu, G.V. ve Harmandar, M., 1999. Flavonoidler, Bakanlar Matbaacılık Ltd.Şti., İstanbul, 336 s.
- 7) Ito N., Hirose M., Fukushima S., Tsuda H., Shirai T., Tatematsu M., (1986): "Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis". *Food and Chemical Toxicology*, 24(10/11), 1071-1082.
- 8) Halliwell B., Gutteridge JMC., (1990) "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." In: *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- 9) Akkuş,İ, (1995), Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- 10) Akkuş İ, (1995), Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- 11) Halliwell B., Gutteridge JMC., (1990) "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." In: *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- 12) Onat T., Emerk K., Sözmen EY. (Ed.), (2002), İnsan Biyokimyası, Palme Yayıncılık, Ankara.
- 13) Van Der VLIET A., O'neill C.A., Halliwell B., Cross C., Kaur H., (1994): "Aromatic hydroxylation and nitration of phenylalanine and tyrosine by peroxynitrite". *FEBS Letters*, 339, 89-92
- 14) Murray RK., Granner DK., Mayes Pa, Rodwell VW, (1996), Harper'ın Biyokimyası 24. baskı, (Çev: Dikmen N., Özgünen T.), Barış Kitabevi, İstanbul.
- 15) Halliwell B., (1994): "Free radicals and antioxidants:A personal view." *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.
- 16) Hawkins CL., Davies MJ., (1998): "Degradation of hyaluronic acid, poly- and mono-saccharides, and model compounds by hypochlorite: Evidence for radical intermediates and fragmentation." *Free Radical Biology and Medicine*, 24(9), 1396-1410.
- 17) Halliwell B., (1994): "Free radicals and antioxidants:A personal view." *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.
- 18) Dağlı Ü., Balk M., Yücel D., Ülker A., Över H., vd., (1997): "The role of reactive oxygen metabolites in ulcerative colitis." *Inflammatory Bowel Diseases*, 3(4), 260-264.
- 19) Cruthirds DL., Novak L., Akhı KM., Sanders PW., Thompson JA., vd., (2003): "Mitochondrial targets of oxidative stress during renal ischemia/reperfusion." *Archives Biochemistry and Biophysics*, 412, 27-33.
- 20) Halliwell B., Gutteridge JMC., (1990) "Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview." In: *Methods in Enzymology*, 186, 1-85.
- 21) Hıpkıss AR., (2007): "Biological aspects of ageing." *Psychiatry*, 6(12), 476-479.
- 22) Akkuş İ, (1995), Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri, Mimoza Yayınları, Konya.
- 23) Dauer W., Przedborski S., (2003): "Parkinson's disease: Mechanism and models." *Neuron*, 39, 889-909.

- 24) Mosley Rl., Benner Ej., Kadiu I., Thomas M., Boska Md., Vd., (2006): "Neuroinflammation, oxidative stres, and the pathogenesis of Parkinson's disease." *Clinical Neuroscience Research*, 6(5), 261-281.
- 25) Zalata A., Yahia S., El-Bakary A., Elsheikha Hm., (2007): "Increased Dna Damage İn Children Caused By Passive Smoking As Assessed By Comet Assay And Oxidative Stress." *Mutation Research/ Genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis*, 629(2), 140-147.
- 26) Tao F., Gonzales-Flecha B., Kobzik L., (2003): "Reactive Oxygen Species İn Pulmonary İnflammation By Ambient Particulates." *Free Radical Biology And Medicine*, 35(4), 327-340.
- 27) Bowler Rp., Barnes Pj., Crapo Jd., (2004). "The Role Of Oxidative Stres İn Chronic Obstructive Pulmonary Disease." *Journal Of Chronic Obstructive Pulmonary Disease*, 1(2), 255-277
- 28) Anderson Ra., (2007): "Prescribing Antioxidants."Chapter 103, P.1083-1094, In: *Rakel: Integrative Medicine*, 2nd Ed., Saunders.
- 29) Halliwell B., (1994): "Free Radicals And Antioxidants:A Personal View." *Nutrition Reviews*, 52(8), 253-265.
- 30) Halliwell B., Gutteridge Jmc., (1990) "Role Of Free Radicals And Catalytic Metal İons İn Human Disease: An Overview." In: *Methods İn Enzymology*, 186, 1-85.
- 31) Kahkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S. And Heinonen, M., 'Antioxidant Activity Of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds', *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 47: 3954-3962 (1999).
- 32) Prior, R. L. And Cao, G. H., 'Analysis Of Botanicals And Dietary Supplements For Antioxidant Capacity', A Review. *Journal Of Aoac International*, 83 (4): 950-956 (2000).
- 33) Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. And Salunkhe, D.K., 1996. *Food Antioxidants: Technological, Toxicological And Health Perspectives*. Markel Dekker, Newyork, Pp 41-50.
- 34) Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K., 2005. Standardized Methods For The Determination Antioxidant Capacity And Phenolics İn Foods And Dieatry Supplements. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 53(8), 3110-3113.
- 35) Prior, R.L., Wu, X., Scaich, K., 2005. Standardized Methods For The Determination Antioxidant Capacity And Phenolics İn Foods And Dieatry Supplements. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **53(8)**, 3110-3113.
- 36) Pokorny, J., Yanishlieva, N. And Gordon, M. 2001. *Antioxidants İn Food*, Crc Press, Usa.
- 37) Erozturk, N., "Bir Yudum Sağlık", Anahtar Yayınları,Đstanbul, (2000).
- 38) Erozturk, N., "Bir Yudum Sağlık", Anahtar Yayınları,Đstanbul, (2000).
- 39) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 40) Wheeler, G. L., Jones, M. A., Smirnoff, N., 1998, *The Biosynthetic Pathway Of Vitamin C İn Higher Plants*, *Nature*, 393, 365-369.
- 41) Woodall, A.A., Ames, B. N., 1997, *Diet And Oxidative Damage To Dna: The İmportance Of Ascorbate As An Antioxidant, Vitamin C İn Health And Disease*, Markel Dekker, New York, 193-203.
- 42) Bendich, A., 1997, *Vitamin C Safety İn Humans, Vitamin C İn Health And Disease*, Markel Dekker, New York, 367-379.

- 43) Cadenas, E., Packer, L., 2002, Handbook Of Antioxidants, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 44) Halliwell, B., 1996, Vitamin C: Antioxidant Or Pro-Oxidant In Vivo?, Free Radical Research, 25, 439-454
- 45) Buettner, G. R., 1993, The Pecking Order Of Free Radicals And Antioxidants: Lipid Peroxidation, α -Tocopherol, And Ascorbate, Archives Biochemistry And Biophysics, 300, 535-543.
- 46) Buettner, G. R., Jurkiewicz, B. A., 1996, Catalytic Metals, Ascorbate And Free Radicals: Combinations To Avoid, Radiation Research, 145, 532-541.
- 47) Cadenas, E., Packer, L., 2002, Handbook Of Antioxidants, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 48) Bjorneboe, A., Bjorneboe, G. E., Drevon, C. A., 1990, Absorption, Transport And Distribution Of Vitamin E, The Journal Of Nutrition, 120, 233-242.
- 49) Bjorneboe, A., Bjorneboe, G. E., Drevon, C. A., 1990, Absorption, Transport And Distribution Of Vitamin E, The Journal Of Nutrition, 120, 233-242.
- 50) Horwitt, M. K., 1986, Interpretations Of Requirements For Thiamin, Riboflavin, Niacin-Tryptophan, And Vitamin E Plus Comments On Balance Studies And Vitamin B-6, American Journal Of Clinical Nutrition, 44, 973-985.
- 51) Horwitt, M. K., 1986, Interpretations Of Requirements For Thiamin, Riboflavin, Niacin-Tryptophan, And Vitamin E Plus Comments On Balance Studies And Vitamin B-6, American Journal Of Clinical Nutrition, 44, 973-985.
- 52) Sheppard, A. J., Pennington, J. A. T., Weihrauch, J. L., 1993, Analysis And Distribution Of Vitamin E In Vegetable Oils And Foods, Vitamin E In Health And Disease, Marcel Dekker, New York.
- 53) Sheppard, A. J., Pennington, J. A. T., Weihrauch, J. L., 1993, Analysis And Distribution Of Vitamin E In Vegetable Oils And Foods, Vitamin E In Health And Disease, Marcel Dekker, New York.
- Ong, A. S.H., 1993, Natural Sources Of Tocotrienols, Vitamin E In Health And Disease, Marcel Dekker, New York, 3-8.
- 54) Pfander, H., 1987, Key To Carotenoids, Birkhäuser Verlag, Basel, 0817618600.
- 55) Quirós, A. R.B., Costa, H. S., 2006, Analysis Of Carotenoids In Vegetable And Plasma Samples: A Review, Journal Of Food Composition And Analysis, 19, 97-111.
- 56) Cadenas, E., Packer, L., 2002, Handbook Of Antioxidants, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 57) Quirós, A. R.B., Costa, H. S., 2006, Analysis Of Carotenoids In Vegetable And Plasma Samples: A Review, Journal Of Food Composition And Analysis, 19, 97-111.
- 58) Cadenas, E., Packer, L., 2002, Handbook Of Antioxidants, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 59) Olson, J.A., 1999, Carotenoids, Modern Nutrition In Health And Disease, Williams & Wilkins, Baltimore, 0781741335.
- 60) Krinsky, N. I., 1993, Actions Of Carotenoids In Biological Systems, Annual Review Of Nutrition, 13, 561-587.
- Krinsky, N. I., 1993, Actions Of Carotenoids In Biological Systems, Annual Review Of Nutrition, 13, 561-587.
- 61) Krinsky, N. I., 1993, Actions Of Carotenoids In Biological Systems, Annual Review Of Nutrition, 13, 561-587.
- Krinsky, N. I., 1993, Actions Of Carotenoids In Biological Systems, Annual Review Of Nutrition, 13, 561-587.

- 62) Burton, G. W., Ingold, K. U., 1984, B-Carotene: An Unusual Type Of Lipid Antioxidant, *Science*, 224, 569-573.
- 63) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 64) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 65) Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996, Structureantioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic Acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N. J., Bolwell, P.G., Bramley, P. M., Pridham, J. B., 1995, The Relative Antioxidant Activities Of Plant-Derived Polyphenolic Flavonoids, *Free Radical Research*, 22, 375-383.
- Van Acker, S., Van-Den Berg, D. J., Tromp, M.N., Griffioen, D. H., Van Bebbekom, W.P., Van Der, W.J.F., Bast, A., 1996, Structural Aspects Of Antioxidants Activity Of Flavonoids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 331-342.
- 66) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 67) Brown, J. A., Khodr, H., Hider, R. C., Rice-Evans, C., 1998, Structural Dependence Of Flavonoid Interactions With Cu²⁺ Ions: Implications For Their Antioxidant Properties, *Biochemical Journal*, 330, 1173-1178.
- 68) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 69) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 70) Havsteen, B., 1983, Flavonoids, A Class Of Natural Products Of High Pharmacological Potency, *Biochemical Pharmacology*, 32, 1141-1148.
- 71) Kuhnau, J., 1976, The Flavonoids. A Class Of Semi-Essential Food Components: Their Role In Human Nutrition, *Wld. Rev. Nutr. Diet.*, 24, 117-191.
- 72) Cook, N. C., Samman, S., 1996, Flavonoids –Chemistry, Metabolism, Cardioprotective Effects, And Dietary Sources, *Nutritional Biochemistry*, 7, 66-76.
- 73) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 74) Harborne, J. B., 1967, *Comparative Biochemistry Of The Flavonoids*, Academic Press, London.
- 75) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 76) Dziejczak, S. Z., Hudson, B. J. F., 1983, Polyhydroxychalcones And Flavanones As Antioxidants For Edible Foods, *Food Chemistry*, 12, 205-212
- 77) Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996, Structureantioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic Acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- 78) Abu-Amsha, R., Croft, K. D., Puddey, I. B., Proudfoot, J. M., Beilin, L. J., 1996, Phenolic Content Of Various Beverages Determines The Extent Of Inhibition Of Human Serum And Low Density Lipoprotein Oxidation In Vitro: Identification And Mechanism Of Action Of Some Cinnamic Acid Derivatives From Red Wine, *Clinical Science*, 91, 449-458.
- Heller, W., Forkmann, G., 1993, *Biosynthesis Of Flavonoids, The Flavonoids: Advances In Research Since 1986*, Chapman & Hall, London, 499535.
- 79) Heller, W., Forkmann, G., 1993, *Biosynthesis Of Flavonoids, The Flavonoids: Advances In Research Since 1986*, Chapman & Hall, London, 499535.

- 80) Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L., 1989, Iron Absorption And Phenolic Compound: Importance Of Different Phenolic Structures, *European Journal Of Clinical Nutrition*, 43, 547-558.
- Wallace, G., Fry, S. C., 1994, Phenolic Components Of The Plant Cell Wall, *International Review Of Cytology*, 151, 229-267.
- 81) Shahidi, F., Naczk, M., 1995, Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects And Applications, Technomic Publ. Co., Lancaster-Basel, 1566762790.
- Herrmann, K., 1989, Occurrence And Content Of Hydroxycinnamic And Hydroxybenzoic Acid Compounds In Foods, *Critical Review Food Science And Nutrition*, 28, 315-347.
- 82) Rhodes, M., Woollorton, L., 1976, The Enzymic Conversion Of Hydroxycinnamic Acids To P-Coumarylquinic And Chlorogenic Acids In Tomato Fruits, *Phytochemistry*, 18, 929-933.
- Ulbrich, B., Zenk, M., 1979, Partial Purification And Properties Of Hydroxycinnamoyl-Coa: Quinate Hydroxycinnamoyl Transferase From Higher Plants, *Phytochemistry*, 18, 929-933.
- 83) Kahnt, G., 1967, Trans-Cis Equilibrium Of Hydroxy Cinnamic Acids During Irradiation Of Aqueous Solutions At Different Ph, *Phytochemistry*, 6, 755-758.
- 84) Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G., 1996, Structure-antioxidant Activity Relationships Of Flavonoids And Phenolic Acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- 85) Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L., 1989, Iron Absorption And Phenolic Compound: Importance Of Different Phenolic Structures, *European Journal Of Clinical Nutrition*, 43, 547-558
- 86) Middleton, E., Kandaswami, C., 1993, The Impact Of Plant Flavonoids On Mammalian Biology: Implications For Immunity, In *Inflammation And Cancer, The Flavonoids: Advances In Research Since 1986*, Chapman And Hall, London, 0-412-48070-0.
- 87) Brune, M., Rossander, L., Hallberg, L., 1989, Iron Absorption And Phenolic Compound: Importance Of Different Phenolic Structures, *European Journal Of Clinical Nutrition*, 43, 547-558.
- 88) Cadenas, E., Packer, L., 2002, *Handbook Of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
- 89) Finley Jw., Given Pjr, (1986): "Technological Necessity Of Antioxidants In The Food Endustry". *Food And Chemical Toxicology*, 24(10/11), 999-1006.
- 90) Çakmakçı, S. Ve Çelik, I. 2000. Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Notu, 249 S., Erzurum. Dafni, A., Yaniv, Z. And Palevitch D. 1984. *Ethnobotanical*
- 91) Keskin, H. Ve Erkmen G. 1987. *Besin Kimyası. Güryay Matbaacılık İstanbul, Beşinci Basım:25-35.*
- 92) Çakmakçı, S. Ve Çelik, I. 2000. Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Notu, 249 S., Erzurum.
- 93) Keskin, H. Ve Erkmen G. 1987. *Besin Kimyası. Güryay Matbaacılık İstanbul, Beşinci Basım:25-35.*
- 94) Gur, E. Ve Altuğ, T., "Gıda Katkı Maddeleri", Ege Üniversitesi Muh. Fak. Gıda Muh. Bolumu, İzmir, (2001).
- 95) Korthals, M., 'The Struggle Over Functional Foods: Justice And The Social Meaning Of Functional Foods', *Journal Of Agricultural And Environmental Ethics*, 15, 315-324 (2002).

Mazza, G., 'Flaxseed Products For Disease Prevention. In: Functional Foods, Biochemical And Processing Aspects', Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Company, 91-127 (1998).

Oomah, B. D., Kenaschulk, E. O., And Mazza, G., 'Phenolic Acids In Flaxseed', Journal Of Agricultural And Food Chemistry, 43, 2016-2019 (1995).

96) Dillard, C.J., German, J.B. Phytochemicals: Nutraceuticals And Human Health. J. Sci. Food Agric. 2000, 80, 1744-1756.

97) Haris, R. K. and Haggerty, W. J., 'Assays for Potentially Anticarcinogenic Phytochemicals In Flaxseed', Cereal Foods World, 38, 147-151 (1993).

98) Oomah, B. D., Kenaschulk, E. O., and Mazza, G., 'Phenolic Acids In Flaxseed', Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2016-2019 (1995).

Kasote, D. M., Hegde, M. V. and Deshmukh, K. K., 'Antioxidant Activity of Phenolic Components from n-Butanol Fraction (PC-BF) of Defatted Flaxseed Meal', American Journal of Food Technology, 6(7): 604-612 (2011).

99) URL-2, http://www.genetikbilimi.com/gen/serbest_radikaller.htm, 21.05.2007.

100) Çakır, A., 'Hypericum hyssopifolium chax subsp. Elongatum (ledeb.) woron var. Elongatum' un Toprak Üstü Kısımlarının Fitokimyasal Olarak Arastırılması', (2000).

101) Yen, G.C., Chen, H.Y., 'Antioxidant Activity of Various Tea Extracts In Relation to Their Antimutagenicity', Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 27-32 (1995).

102) Yen, G.C., Chen, H.Y., 'Antioxidant Activity of Various Tea Extracts In Relation to Their Antimutagenicity', Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 27-32 (1995).

103) Çakmakçı, S. ve Çelik, I. 2000. Gıda Katkı Maddeleri. Atatürk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Ders Notu, 249 s., Erzurum.

104) Ruch, R.J., Cheng, S.J., Klaunig, J.E., 'Prevention of Cytotoxicity and Inhibition of Intracellular Communication by Antioxidant Catechins Isolated from Chinese Green Tea', Carcinogenesis, 10, 1003-1008 (1989).

105) Gülçin, İ., 'Antioxidant and Antiradical Activities of L-Carnitine', Life Sciences, 78, 803-811 (2006).

106) Kılınç, K. ve Kılınç, A., 'Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri', Hacettepe Tıp Dergisi, 33(2): 110-118 (2002).

107) Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 'Antioxidant Activity of a Triterpenoid Glycoside Isolated from The Berries of Hedera Colchica: 3-O-(β-D-glucopyranosyl)- Hederagenin', Phytotherapy Research, 20, 130-134 (2006).

Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., 'Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Mulberry (Morus indica L.) Leaves', Food Chemistry, 102, 1233-1240 (2007).

108) Benzie, I.F.F., Strain, J.J., 'The Ferric Reducing Ability of Plasma as a Measure of Antioxidant Power: The FRAP Assay', Analytical Biochemistry, 239, 70-76 (1996).

109) Kasote, D. M., Hegde, M. V. and Deshmukh, K. K., 'Antioxidant Activity of Phenolic Components from n-Butanol Fraction (PC-BF) of Defatted Flaxseed Meal', *American Journal of Food Technology*, 6(7): 604-612 (2011).



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Derya DOĞMUŞ
Doğum Yeri ve Yılı : Manisa, 1986
Medeni Hali : Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : deryadogmus@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Manisa Anadolu Lisesi, 2000-2004
Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2006-2010

Yayınları

Doğmuş D., Durucasu İ., Keten tohumu çeşitlerinin n-bütanol fraksiyonlarının fenolik bileşenlerinin antioksidan aktivitesi. Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi.2013, 9.1, 47-56

Doğmuş D., Durucasu İ., İki Farklı Keten Tohumunda Bulunan Bazı Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Yöntemlerle Belirlenmesi ve Bu Bileşiklerin Antioksidan Özelliklerinin Araştırılması, 27.Ulusal Kimya Kongresi,23-28 Ağustos,2015,Çanakkale,(Bildiri Özetleri Kitabı,132.)