

## **KETEN TOHUMU ÇEŞİTLERİNİN N-BÜTANOL FRAKSİYONLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN ANTIOKSIDAN AKTİVİTESİ**

**Derya DOĞMUŞ<sup>1\*</sup> , İnci DURUCASU<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 45140 Manisa, TÜRKİYE,

**Özet:** 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.  $\alpha$  –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 metotlarla değerlendirildi. 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.

**Anahtar Kelimeler:** *Keten tohumu, n-bütanol fraksiyon, antioksidan aktivite, fenolik bileşenler.*

## **ANTIOXIDANT ACTIVITY OF PHENOLIC COMPONENTS FROM N-BUTANOL FRACTION OF FLAXSEED VARIETIES**

**Abstract:** 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. Flaxseed is known to contain a variety of constituents. Flaxseed is an important plant source containing beneficial compounds for health besides being rich in  $\alpha$ -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-bütanol 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. Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) were used as the reference antioxidant compounds. This study investigated the antioxidant activity of different varieties of flax seed, rather than synthetic antioxidants tried to shed some light on the subject in terms of usability.

**Keywords:** *Flaxseed, n-butanol fraction, antioxidant activity, phenolic components.*

---

\*Derya DOĞMUŞ  
deryadogmus@hotmail.com

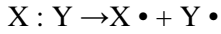
## 1.GİRİŞ

Yüksek aktiviteye sahip bileşikler olan serbest radikaller, yaşamsal faaliyetler sırasında veya solunum, enzim reaksiyonları, otooksidasyon reaksiyonları gibi endojen kaynaklar ile sigara dumanı, hava kirliliği, UV ışınları, iyonize radyasyon ve ksenobiyotikler gibi çeşitli çevresel kaynakların etkisiyle meydana gelebilmektedirler [1].

Radikaller, dış orbitallerinde bir veya daha fazla paylaşılmamış elektron içeren kimyasal yapılardır. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması, söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü arttırdığı için, radikaller reaktivitesi çok yüksek olan kimyasal türlerdir [2].

Serbest radikaller üç yolla meydana gelir.

1. Kovalent bağlı normal bir molekülün her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi,

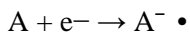


2. Normal bir molekülde tek bir elektronun kaybı veya bir molekülün heterolitik bölünmesi.

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 elektronun eklenmesi



Biyolojik sistemlerde serbest radikaller en fazla elektron transferi sonucu meydana gelirler. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü veya elektriksiz olarak nötral olabilirler. Organik veya inorganik moleküler şeklinde olabilirler. Cu, Fe, Mn ve Mo gibi geçiş metallerinin de ortaklanmamış elektronları olduğu halde serbest radikal olarak kabul edilmezler. Fakat bu iyonlar reaksiyonları katalizlediklerinden dolayı serbest radikal oluşumunda önemli rol oynarlar.

Antioksidanlar, serbest radikallerin oluşumunu engelleyerek veya mevcut radikalleri süpürerek hücrenin zarar görmesini engelleyen ve yapısında genellikle fenolik fonksiyon taşıyan moleküllerdir [3].

Vücutta kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşiklerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize etmeleri ve bu sırada serbest radikal haline gelmemeleridir [4].

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

Ticari olarak mevcut olan ve günümüzde kullanılan sentetik antioksidanlar butillendirilmiş hidroksianisol (BHA), butillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), tersiyerbutil hidrokinon (TBHQ) ve propil gallat (PG) dir. Doğal antioksidanlar, bitki ve hayvan dokularında bulunan ve ekstrakte edilebilen yada gıdanın işlenmesi sırasında açığa çıkan bileşenlerdir. En önemli doğal antioksidanlar, tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler, vitamin C, karotenoidler, polifenoller ve selenyumdur. Son zamanlarda gıda kimyası ve koruyucu tıbbın bitki kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmaktadır. Bunun nedeni sentetik antioksidanların (BHA,BHT, gibi) kanserojen olduklarının düşünülmesidir [5].

Gıdalardaki vitamin olmayan, yararlı kimyasallar olarak tanımlanan nutrasötiklerden bitkisel kaynaklı olanlarına fitokimyasal adı verilmektedir. Gıdaların bileşiminde 900'den fazla fitokimyasal bulunmuştur. Bitkisel ürünlere dayalı beslenmenin kronik hastalık, özellikle kanser riskini azaltabildiğine dair çok sayıda in vivo, in vitro ve klinik deneme verileri vardır. Ketan tohumu bu açıdan incelendiğinde,  $\alpha$ -linolenik asit ve iyi kaliteli protein bakımından zengin olmasının yanı sıra, flavonoid, lignan ve fenolik asitler gibi fitokimyasalların da doğal kaynağı durumundadır. [6,7,8]

Keten (*Linum usitatissimum*), 30-100 cm boyunda, mavi çiçekli ve tek yıllık bir kültür bitkisidir. Keten, Mısırlılardan beri tarımı yapılan ve çok değişik amaçlarla kullanılan bir bitkidir. 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 [9]. Bu ürünlerde bulunan başlıca fenolik asitler trans-ferulik (%46), trans-sinapik (%36), p-kumarik (%7,5) ve trans-kafeik (%6,5) asittir. Fenolik asit içeriğindeki varyasyon mevsimsel etkilerden kaynaklanmaktadır [10]. 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 [8,11]. Keten tohumunun biyoaktif fonksiyonlardan antioksidant, antimikrobiyal ve anti-kanser etkileri yapısında bulunan fenolik asitlerden kaynaklanmaktadır. 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. Bu çalışmada da farklı keten tohumu çeşitlerinin antioksidan aktivitesi incelenmiş, sentetik antioksidanlar yerine kullanabilirliği açısından konuya ışık tutulmaya çalışılmıştır. 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.

## **1. MATERYAL VE METOT**

### **1.1 Materyal**

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

### **1.2 Metot**

#### **1.2.1 Bitki Ekstrelerinin Hazırlanması**

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

Yağı uzaklaştırılmış kuru keten tohumu tozları 60 °C' de metanol (1:10, w/v) ile çözelti renksiz oluncaya kadar soxhlet düzeneğinde ekstraksiyona tabi tutuldu. Metanol ekstraktı, vakum altında evaporatörde konsantre edildi. Daha sonra kuru kalıntı n-bütanol: su (1:1, v/v) karışımı ile ayrıldı. N- bütanol fraksiyonu sulu fraksiyondan ayrılıp vakum altında evaporatörde konsantre edildi. Kuru n-bütanol kalıntısı metanol ile çözülüp, eter (1:5, v/v) ile çöktürüldü. Yağı uzaklaştırılmış keten tohumu tozundan elde edilen n-bütanol fraksiyonu antioksidan aktivite denemelerinde kullanıldı [12].

## 1.2.2 Ekstrelerin Antioksidan Özelliklerinin Belirlenmesi

### 1.2.2.1 DPPH Radikali Süpürücü Etki Tayini

DPPH radikal süpürücü etkinin tayini Çakır ve arkadaşlarına göre yapıldı [13].

Reaksiyon ortamındaki konsantrasyonu 50-250 µg/ml olacak şekilde metanolde hazırlanan örnek çözeltilerinin 3 ml' lik çözeltisine 1 ml  $1 \times 10^{-3}$  M DPPH çözeltisi (metanolde) ilave edilip vortekste 30 saniye karıştırılarak oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletildi.

Süre sonunda UV Spektrofotometresinde 517 nm de absorbands okundu. Pozitif kontrol olarak BHT ve BHA kullanıldı. 30 dakika sonucunda DPPH radikalini süpürme aktivitesi reaksiyonu inhibe etme yüzdesi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır:

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

$A_K$ : Kontrol (antioksidan içermeyen) örneğin absorbandsı

$A_Ö$ : Örneğin (antioksidan içeren) absorbandsı  
Maksimum absorbandsın yarısına karşılık gelen yani absorbandsı yarıya düşüren konsantrasyon miktarı  $IC_{50}$  (etkin konsantrasyon) değerini vermektedir.

Antioksidan derişimlerine karşı hesaplanan % inhibisyon değerleri ile çizilen grafikten % 50 inhibisyona neden olan antioksidan derişimleri ( $IC_{50}$ ) okundu.

### 1.2.2.2 İndirgeme Gücü Tayini

İndirgeme gücü tayini Oyaizu metoduna göre yapıldı [14].Konsantrasyonu 1mg/ml olan metanolde hazırlanmış stok bütanol fraksiyonundan değişik konsantrasyonlarda hazırlandı (50-250 µg/ml). Değişik konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerden 0,5 ml alınıp deney tüplerine aktarıldı ve hacim destile suyla 1 ml' ye tamamlandı. Daha sonra her bir tüpe 2,5 ml 0,2 M fosfat tamponu (pH: 6,6) ve 2,5 ml %1'lik potasyum ferrisiyanür  $[K_3Fe(CN)_6]$  ilave edildikten sonra karışım  $50^\circ C$ 'de 20 dakika

inkübe edildi. Bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımına 2,5 ml %10'luk triklorasetik asit (TCA) ilave edildi. 10 dakika boyunca 3000 rpm'de santrifüj edildi ve tüplerdeki karışımların üst kısmından 2.5 ml alınarak başka tüplere aktarıldı. Yeni tüplere aktarılan çözeltilerin her birinin üzerine 2,5 ml destile su ve %0,1'lik 0,5 ml  $FeCl_3$  ilave edildikten sonra absorbands 700 nm'de köre karşı okundu. Köre olarak destile su kullanıldı. Kontrol için ise numune yerine su kullanıldı.

### 1.2.2.3 Toplam Fenolik Bileşik Miktarı Tayini

Toplam fenolik bileşik miktarı tayini Singleton ve arkadaşlarına göre yapıldı [15]. Standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı. Önce standart grafik çizmek amacıyla 1mg/ml konsantrasyonda stok gallik asit çözeltisi hazırlandı. Çözücü olarak metanol kullanıldı. Son gallik asit konsantrasyonu 1,3,5,7 ,10,15 ve 20 µg/ml olacak şekilde stok gallik asit çözeltisinden tüplere 1ml kondu ve hacimler 4 ml'ye saf suyla tamamlandı. Daha sonra tüplere 0,25 ml Folin-Ciocalteu Reaktif (FCR) ve 3 dk. sonra da % 20'lik  $Na_2CO_3$  çözeltisinden 0,75 ml ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı. Sonra numunelerin absorbandsı 760 nm'de köre karşı okundu. Bu işlemler üçer defa yapıldı. Köre olarak, numune yerine destile su içeren test çözeltisi kullanıldı.

Ekstrelerdeki toplam fenolik bileşik miktarını belirlemek amacıyla 2 mg/ml stok ekstre çözeltileri hazırlandı. Her bir stok çözeltilerden son ekstre konsantrasyonu 100 µg/ml olacak şekilde stok çözeltilerden tüplere 1 ml konuldu ve hacimleri 4 ml'ye saf suyla tamamlandı. Daha sonra tüplere 0,25 ml Folin-Ciocalteu Reaktif ve 3 dk. sonra da %20'lik  $Na_2CO_3$  çözeltisinden 0,75 ml ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı. Sonra numunelerin absorbandsı 760 nm'de köre karşı okundu.

Numunelerin absorban değerlerine karşılık gelen gallik asit miktarı standart grafik yardımıyla tespit edildi ve sonuçlar gallik asit eşdeğeri (GAE) şeklinde ifade edildi.

#### 1.2.2.4 Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Tayini

Hidrojen peroksit giderme aktivitesi Ruch ve arkadaşlarının belirledikleri metoda göre yapıldı [16].

Bunun için pH'sı 7,4 olan fosfat tamponunda 43 mM'lik hidrojen peroksit çözeltisi hazırlandı. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> konsantrasyonu spektrofotometrik olarak, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'in 230 nm'de absorban göstermesiyle belirlendi. 30 µg/ml konsantrasyonunda hazırlanan ekstraların ve standart antioksidan olarak kullanılan BHT ve BHA' ün hacmi 4 ml'ye kadar tampon çözelti ile tamamlandı. Daha sonra 0,6 ml hidrojen peroksit (43 mM) çözeltisi ilave edildi. 10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra hidrojen peroksidin azalan miktarı 230 nm'de azalan absorban olarak kaydedildi. Kör olarak tampon çözelti kullanıldı. Kontrol olarak 4 ml tampon çözelti ve 0,6 ml hidrojen peroksit çözeltisi kullanıldı.

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

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

A<sub>0</sub>: kontrolün 230 nm' deki absorbanı

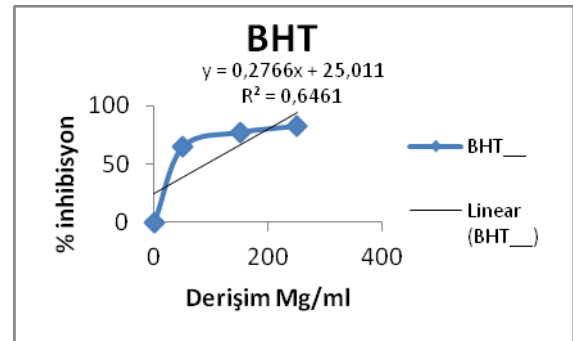
A<sub>1</sub>: bitki ekstraktlarının ve standart maddelerin 230 nm' deki absorbanı

## 2. BULGULAR

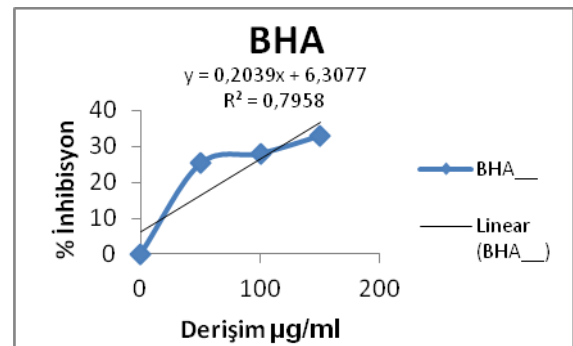
### 2.1 DPPH Radikali Süpürücü Etki Bulguları

Antioksidan maddelerin antioksidan özelliklerinden bir tanesi de, ortamda oluşan radikalleri süpürmeleridir. Numunelerimizin anti-radikal özelliklerinin olup olmadığını anlamak için, 517 nm'de maksimum absorban veren DPPH radikali kullanılmıştır. DPPH kararlı bir serbest

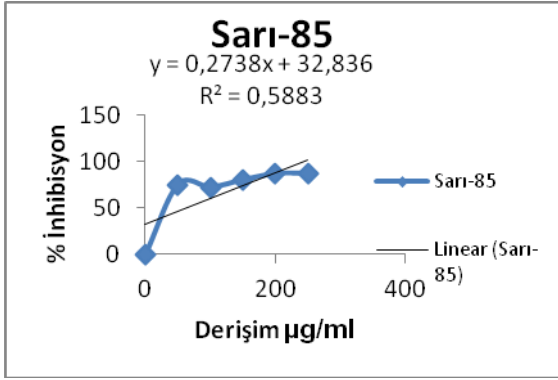
radikaldir. Kararlı bir diamanyetik molekül oluşturmak için bir elektron veya hidrojen radikalini bünyesine kabul eder. Antioksidan ile DPPH' in oluşturduğu reaksiyon karışımının gösterdiği absorban ne kadar düşük ise antioksidanın serbest radikal giderme aktivitesi o kadar yüksek demektir. DPPH radikalinin ortamdaki miktarının azalması ile absorbanın azalması belli bir antioksidan derişimine kadar doğru orantılıdır. Absorbanın 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 ekstraların % inhibisyon cinsinden hesaplanan lineer regresyon grafikleri şekil 3.1- 3.2- 3.3- 3.4 te verilmiştir.



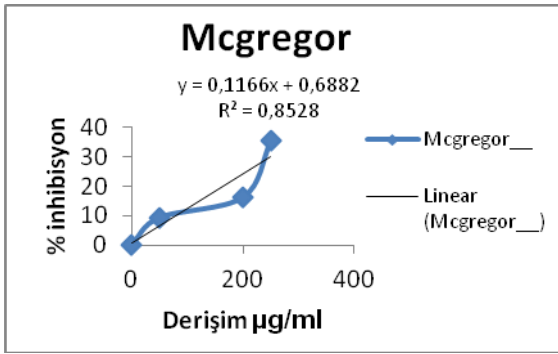
Şekil 3.1 Standart antioksidan BHT' nin DPPH radikali süpürücü aktivitesi



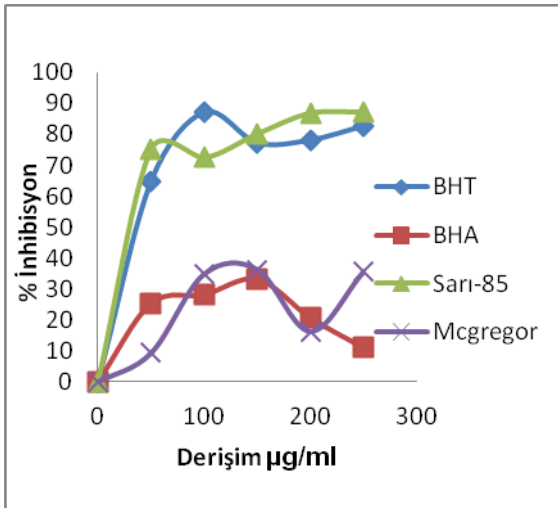
Şekil 3.2 Standart antioksidan BHA' ün DPPH radikali süpürücü aktivitesi



Şekil 3.3 Sarı-85 keten tohumu ekstresinin DPPH radikal süpürücü aktivitesi



Şekil 3.4 Mcgregor keten tohumu ekstresinin DPPH radikal süpürücü aktivitesi



Şekil 3.5 Keten tohumu örnekleri ve standartların DPPH radikal süpürücü aktiviteleri

Yukarıda verilen grafiklerden lineer regresyon ile hesaplanan  $IC_{50}$  (etkin

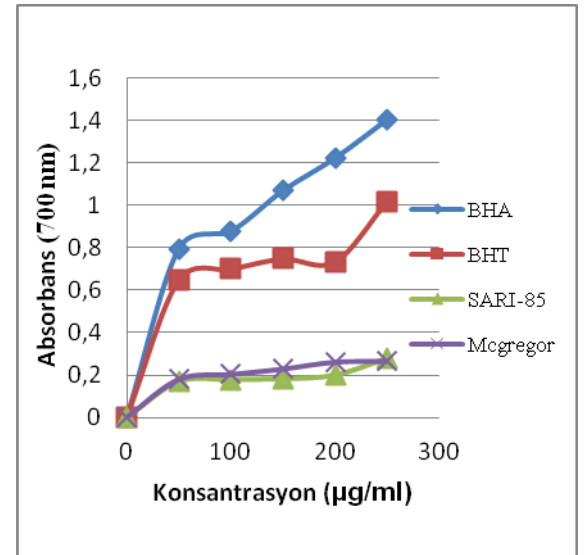
konsantrasyon) değerleri tablo 3.1'de görülmektedir.

**Tablo 3.1** Keten tohumu ekstrelerinin ve standart antioksidanların  $IC_{50}$  değerleri

Antioksidan	BHT	BHA	Sarı-85	Mcgregor
$IC_{50}(\text{mg/ml})$	0,07	0,21	0,06	0,37

## 2.2 İndirgeme Gücü Bulguları

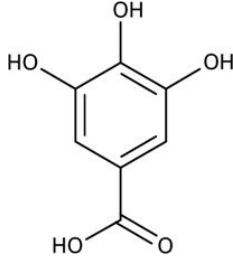
Antioksidan çalışmalarında kullanılan bu biyoanalitik metotta, test çözeltisinin sarı rengi ortamda bulunan antioksidan maddelerin indirgeme aktivitelerinden dolayı farklı tonlardaki yeşil rengine dönüşmektedir [17]. Çalışılan keten tohumu ekstrelerinin ve standart antioksidan olarak kullanılan BHT ve 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  $\mu\text{g/ml}$ ) çözeltilerinin 700 nm'deki absorpsanları ölçülerek belirlenmiştir (şekil 3.6).



Şekil 3.6 Keten tohumu ekstrelerinin farklı konsantrasyonlardaki (50-250 $\mu\text{g/ml}$ ) indirgeme güçlerinin birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırması

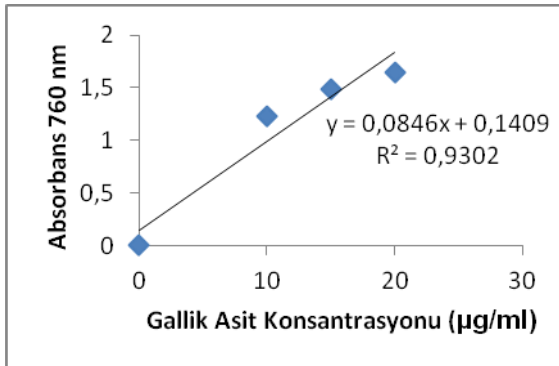
### 2.3 Toplam Fenolik Bileşik Bulguları

İki farklı keten tohumu çeşidinden elde edilen ekstrelerde bulunan toplam fenolik bileşik miktarı için standart fenolik bileşik olarak kullanılan gallik asitin açık yapısı Şekil 3.7’de görülmektedir.



Şekil 3.7 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 hazırlandı. Standart grafikten elde edilen formülden de yine her iki ekstrede bulunan toplam fenolik bileşik miktarları galik asit ekivalent (GAE) olarak hesaplandı ( $R^2=0,9302$ ). Bu amaçla hazırlanan standart gallik asit grafiği Şekil 3.8’de verilmiştir.



Şekil 3.8 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 hesaplandı.

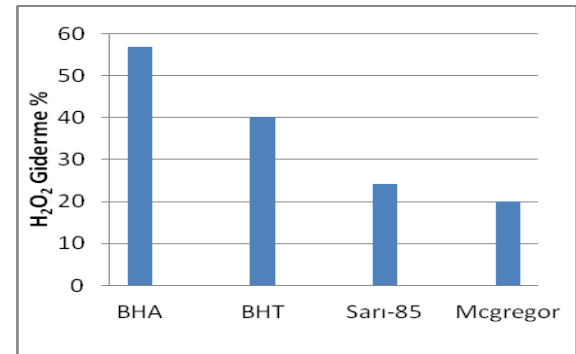
Tablo 3.2’de yukarıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanan toplam fenolik bileşik miktarı değerleri görülmektedir.

Tablo 3.2 Ekstrelerin absorbansa bağlı GAE’ leri

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

### 2.4 Hidrojen Peroksit Giderme Aktivitesi Bulguları

Keten tohumu ekstrelerinin 30 µg/ml konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesi birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırması Şekil 3.9’ da verilmiştir. Sarı-85 ve Mcgregor keten tohumu çeşitlerinden elde edilen ekstrelerin kullanılan konsantrasyonda (30 µg/ml) hidrojen peroksidi sırasıyla %24,3 ve %19,9 giderdiği gözlemlendi. Standart antioksidan olan BHT ve BHA’ ün ise hidrojen peroksidi sırasıyla %40,1 ve %56,8 giderdiği belirlendi.



Şekil 3.9 Sarı-85 ve Mcgregor ekstrelerinin 30 µg/ml konsantrasyonunda hidrojen peroksit giderme aktivitesinin birer standart antioksidan olan BHT ve BHA ile karşılaştırması

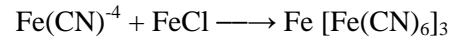
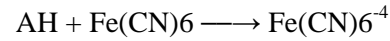
### 3. TARTIŞMA VE SONUÇ

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

Çalışmamızda; keten tohumu ekstraktlarının serbest radikal giderici etkileri stabil bir radikal olan DPPH üzerinden test edilmiştir. DPPH çözeltisi mordur ve antioksidan bir bileşik ile 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 3.5 te görülmektedir. Şekil 3.5'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 çalışmada; 100µg/ml konsantrasyonunda BHA,BHT ve yağı uzaklaştırılmış keten tohumunun bütanol fraksiyonunun % inhibisyon değerleri sırasıyla %93.54, %89.50, %30.10 şeklindedir[12].

Reaksiyon ortamındaki DPPH radikalının % 50'sinin yok edilmesi için gereken etkili antioksidan konsantrasyonu IC<sub>50</sub> (veya EC<sub>50</sub>) değeri olarak tanımlanır ve düşük IC<sub>50</sub> değeri yüksek radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. Çalışmada kullanılan ekstraktların ve standart antioksidan olan BHT ve BHA'ün herbiri için ayrı ayrı çizilen konsantrasyon-% inhibisyon grafiklerinden IC<sub>50</sub>(mg/ml) değerleri belirlendi. Elde edilen bu değerler tablo 3.1'de verildi. Bir antioksidan için ölçülen IC<sub>50</sub> değeri ne kadar küçük ise antioksidan aktivitesi o kadar yüksek demektir. Tablodaki değerlerden de görüleceği üzere DPPH radikalini süpürme kapasitesi Sarı-85 > BHT > BHA > Mcgregor sırasını izlemektedir.

Biyoaktif bileşiklerin indirgeme gücünü yansıtan, elektron verme kapasitesinin antioksidan aktivite ile ilgili olduğu bildirilmiştir [18,19]. Antioksidanlar indirgeyici olabilir ve bir maddenin başka bir maddeyi yükseltgeyerek indirgemesi reaksiyonu olarak tanımlanan redoks reaksiyonlarında, redüktantlarla oksidanların stabilizasyonu şeklinde olabilir. Bir bileşiğin ya da ham ekstraktın indirgeme kapasitesi Fe[(CN)<sub>6</sub>]<sup>+3</sup>'nin Fe[(CN)<sub>6</sub>]<sup>+2</sup>'ye indirgenmesiyle ölçülebilir. İndirgenmiş ürüne Fe<sup>3+</sup>'un ilavesiyle 700 nm'de güçlü absorbanza sahip olan Prussian mavisi renginde bir kompleks olan Fe<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] 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 [20].

İndirgeme kapasitesi tayininde yüksek absorban değerinin yüksek indirgeme kapasitesinin göstergesi olduğu kabul edilmektedir. Şekil 3.6 incelendiğinde çalışılan keten tohumu ekstraktlarının ve standart antioksidan maddelerinin indirgeme gücü yetenekleri genel olarak BHA > BHT > Mcgregor > Sarı-85 şeklinde sıralanmaktadır. Keten tohumu ekstraktlarının 50-250 µg/ml konsantrasyon aralığında absorban 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 gösterdi. 2011 yılında yayınlanan 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[12].

Bu çalışmada standart madde olarak gallik asit kullandı. Dolayısıyla ekstrelerin ve standart antioksidan olarak kullanılan BHT ve BHA'ün içerdiği toplam fenolik madde konsantrasyonu gallik aside eşdeğer olarak (µg/ml GAE) hesaplandı. Tablo 3.2 incelendiğinde 100 µg/ml konsantrasyonundaki ekstrelerden 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 gözlemlendi. Şekil 3.9 incelendiğinde ekstrelerin ve standart antioksidanların

hidrojen peroksiti giderme aktiviteleri BHA > BHT > Sarı-85 > Mcgregor şeklindedir.

**Bilgi:** Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

### **Kaynaklar**

- [1] Young, I. S. and Woodside, J. V., 'Antioxidants in Health and Disease.' Journal of Clinical Pathology, 54: 176-186 (2001).
- [2] Kılınç, K. ve Kılınç, A., 'Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri', Hacettepe Tıp Dergisi, 33(2): 110-118 (2002).
- [3] 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).
- [4] 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).
- [5] Madhavi, D.L., Deshpande, S.S. and Salunkhe, D.K., 'Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives', Markel Dekker, Newyork, 41-50 (1996).
- [6] Berner, L. A. and O'Donnell, J. A., 'Functional Foods And Health Claims Legislation: Applications To Dairy Foods', International Dairy Journal, 8, 355-362 (1998).
- [7] 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).
- [8] Mazza, G., 'Flaxseed Products For Disease Prevention. In: Functional Foods, Biochemical and Processing Aspects', Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Company, 91-127 (1998).
- [9] Oomah, B. D., Kenaschuk E. O., and Mazza, G., 'Phenolic Acids In Flaxseed', Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 2016-2019 (1995).
- [10] Haris, R. K. and Haggerty, W. J., 'Assays For Potentially Anticarcinogenic Phytochemicals In Flaxseed', Cereal Foods World, 38, 147-151 (1993).

- [11] Fiuza, M. S., Gomes, C., Teixeira, L. J., Girao da Cruz, M. T., Cordeiro, M. N. D. S., Milhazes, N., Borges and Marques, M. P.M., 'Phenolic Acid Derivatives With Potential Anticancer Properties-A Structure-Activity Relationship Study. Part 1: Methy, Propyl And Octyl Esters Of Caffeic And Gallic Acids', *Bioorganic&Medicinal Chemistry*, 12, 3581-3589 (2004).
- [12] 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).
- [13] Çakır, A., 'Hypericum hyssopifolium chax subsp. Elongatum (Ledeb.) woron var. Elongatum' un Toprak Üstü Kısımlarının Fitokimyasal Olarak Araştırılması', (2000).
- [14] 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).
- [15] Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 'Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent', *Methods in Enzymology* 299, 152-178 (1998).
- [16] 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).
- [17] Gülçin, İ., 'Antioxidant and antiradical activities of L-Carnitine', *Life Sciences*, 78, 803–811 (2006).
- [18] Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R., 'Antioxidant activity of a triterpenoid glycoside isolated from the berries of *Hedera colchica*: 3-O-( $\beta$ -Dglucopyranosyl)- hederagenin', *Phytotherapy Research*, 20, 130–134 (2006).
- [19] Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A., 'Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves', *Food Chemistry*, 102, 1233-1240 (2007).
- [20] 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).

**Geliş Tarihi:25.01.2013**

**Kabul Tarihi:25.06.2013**