

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ÜZÜM MEYVESİ VE ÇEKİRDEĞİNDEN ANTIOKSİDAN ELDESİ

Armağan PAYAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Nejdet ŞEN

2007, 66 sayfa

Gelişen teknoloji, UV ışınları, günümüzün stresli yaşamı, alkol ve sigara kullanımı sonucunda oluşan serbest radikaller, pek çok hastalığın ve yaşlanma sürecinin en önemli sebebidir. Son yılların en popüler araştırma konularından biri de, serbest radikallerin temizlenmesinde aktif rol oynayan antioksidanlardır.

Yapılan bu çalışmada, etkili bir antioksidan olan proantosiyanidin, üzüm meyvesi ve üzüm çekirdeğinden ekstraksiyonu üzerinde çalışıldı. Ekstraksiyon için, aseton, etanol, metanol ve etil asetat gibi çözücüler ve bunların sulu karışımları kullanıldı. En yüksek ekstraksiyon verimi, aseton-su (3:7) karışımı ile elde edildi. Elde edilen ekstraktların IR spektrumları ile literatürdekiler karşılaştırıldığında büyük ölçüde benzerlik gösterdiği görüldü. Ekstraktların, gradient HPLC çalışmaları sonucu 55. dakika ve sonrasında polimerik proantosiyanidin pikleri görüldü. Üzüm meyvesi ve üzüm çekirdeği ekstraktlarının antioksidan kapasite tayinleri için, DPPH radikali temizleme ve toplam fenolik madde miktarı belirleme testleri yapıldı. Elde edilen sonuçlara bakıldığında, üzüm çekirdeği ekstresinin, üzümün meyve kısmına göre yaklaşık 15 kat daha fazla antioksidatif etki gösterdiği belirlendi.

Anahtar Kelimeler : Serbest radikal, antioksidan, üzüm çekirdeği, proantosiyanidin

ABSTRACT**MSc Thesis****PRODUCTION OF ANTIOXIDANTS FROM GRAPE AND GRAPESEEDS****Armağan PAYAN**

Selçuk University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Chemical Engineering Main Science Subsection

Supervisor: Asst.Prof.Dr. Nejdet ŞEN

2007, 66 pages

The free radicals, what are results of improving technology, UV rays, stressfull life of our days, taking alcohol and smoking are the most important reason of a lot of illnesses and aging period. Recently, one of the most popular research fields, is the antioxidants which play an important role of scavenging free radicals.

In this research, the extraction from grapeseed and grape fruit by proanthocyanidin which is an effective antioxidant has been studied. Some solvents such as acetone, ethanol, methanol and ethyl acetate and their watery mixtures were used for the extraction. The best efficiency had been observed with acetone-water mixture (3:7). When we compare the extract's IR spectrums with literature, a similarity on a large scale had been seen. As a result of gradient HPLC workings of extracts, the 55th minute and after that, polymeric proanthocyanidin peaks were seen. For the antioxidant capacity determination of grapeseeds and grape fruit extracts, DPPH radical scavenging and defining the total phenolic material were being tested. When we have look at the results, it's defined that grapeseed extract of account showed antioxidative effect approximately 15 times more than the fruit part of grape.

Key Words: Free radical, antioxidant, grapeseed, proanthocyanidin

ÖNSÖZ

“Üzüm meyvesi ve çekirdeğinden antioksidan eldesi” adlı bu çalışma Yrd.Doç.Dr. Nejdet ŞEN danışmanlığında hazırlanmış olup, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı’na yüksek lisans tezi olarak sunulmuştur.

Ayrıca bu çalışma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü tarafından 06201055 no’lu tez projesi ile desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarımın yönlendirilmesinde ve devam etmesinde desteğini benden esirgemeyen değerli danışman hocam sayın Yrd.Doç.Dr. Nejdet ŞEN’e en içten saygı ve teşekkürlerimi arz ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda bana yardımcı olan değerli hocalarım Arş.Gör. Yener Tekeli, Arş.Gör. Yakup Kar, Arş.Gör. Sait Malkondu, Arş.Gör. Arzu Tayaksi ve Fatih Sevgi’ye ayrıca, kromatografi çalışmalarımda engin bilgilerinden yararlandığım S.Ü. Eğitim Fak. öğretim üyesi Doç.Dr. Abdulkadir SIRIT, Arş.Gör. Erdal Kocabaş ve Selahattin Bozkurt’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Hiçbir zaman maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Mustafa Samur, Mustafa Kul, Mustafa Çevik, Ali Türker ve Ümit Yaman’a ayrıca, tüm yaşantım boyunca her zaman yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Armağan PAYAN

Konya, 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
TABLolar DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ	1
1.1. Serbest Radikaller	2
1.1.1. Serbest Radikal Çeşitleri.....	3
1.1.1.1. Süperoksit Anyon Radikali ($O_2^{\cdot -}$).....	5
1.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	6
1.1.1.3. Hidroksil Radikali ($\cdot OH$).....	7
1.1.1.4. Singlet Oksijen (1O_2)	8
1.1.2. Serbest Radikallerin Kaynakları.....	8
1.1.3. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri.....	9
1.2. Antioksidanlar.....	11
1.2.1. Antioksidanların Etki Mekanizması	12
1.2.2. Sentetik Antioksidanlar	17
1.2.2.1. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA).....	17
1.2.2.2. Bütillenmiş HidroksiToluen (BHT).....	18
1.2.2.3. <i>tert</i> -Bütil Hidrokinon (TBHQ)	19
1.2.2.4. Gallatlar.....	20
1.2.3. Doğal Antioksidanlar.....	21
1.2.3.1. Tokoferoller.....	21
1.2.3.2. Karotenoidler.....	23
1.2.3.3. Askorbik Asit	25
1.2.3.4. Flavonoidler	26
1.2.4. Antioksidan Özelliği Araştırılan Bazı Maddeler.....	31
1.2.4.1. Sesamol	31
1.2.4.2. Biberiye.....	32

1.2.5. Antioksidanların Gıdalarda Kullanım Alanları	33
1.2.6. Antioksidanlar ile İlgili Yasal Düzenlemeler.....	33
1.2.7. Üzüm, Üzüm Çekirdeği ve Proantosiyanidinler	34
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI.....	39
3. MATERYAL VE METOT.....	41
3.1. Numune	41
3.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler	41
3.3. Deneysel Kısım.....	42
3.3.1. Üzüm Meyvesi ve Çekirdeklerinin Ekstraksiyonu.....	42
3.3.2. Nem Tayini	43
3.3.3. Ekstraksiyon Verimi	43
3.3.4. Ekstrelerin FTIR Analizi	43
3.3.5. DPPH Serbest Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini.....	44
3.3.6. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini	45
3.3.7. HPLC Analizleri.....	46
4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME.....	47
4.1. Nem Tayini	47
4.2. Ekstraksiyon Verimi.....	47
4.3. FTIR Spektroskopisi	49
4.4. DPPH Serbest Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini.....	52
4.5. Toplam Fenolik Madde Konsantrasyonu	55
4.6. HPLC Analiz sonuçları.....	57
4.6.1. Üzüm Çekirdeği Ekstresi İçin HPLC Raporu	57
4.6.2. Üzüm Meyvesi Ekstresi İçin HPLC Raporu	58
5. TARTIŞMA VE ÖNERİ.....	59
6. KAYNAKLAR.....	62
ÖZGEÇMİŞ.....	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Linoleik asidin otooksidasyon mekanizması.....	14
Şekil 1.2. BHA'nın etki mekanizması.....	16
Şekil 1.3. BHA'nın kimyasal yapısı.....	17
Şekil 1.4. BHT'nin kimyasal yapısı.....	18
Şekil 1.5. THBQ'nun kimyasal yapısı.....	19
Şekil 1.6. Gallatların kimyasal yapısı.....	20
Şekil 1.7. Tokoferolün kimyasal yapısı.....	22
Şekil 1.8. β -Karotenin kimyasal yapısı.....	24
Şekil 1.9. Askorbik asidin kimyasal yapısı.....	25
Şekil 1.10. Flavanoidlerin temel kimyasal yapısı.....	27
Şekil 1.11. Antosiyanidin'in kimyasal yapısı.....	28
Şekil 1.12. Flavonolün kimyasal yapısı.....	29
Şekil 1.13. Flavononun kimyasal yapısı.....	30
Şekil 1.14. Flavanın kimyasal yapısı.....	30
Şekil 1.15. Flavonun kimyasal yapısı.....	30
Şekil 1.16. Sesamolün kimyasal yapısı.....	31
Şekil 1.17. Biberiye ekstraktlarının kimyasal yapısı.....	32
Şekil 1.18. (+)-Kateşinin kimyasal yapısı.....	36
Şekil 1.19. (-)-Epikateşinin kimyasal yapısı.....	36
Şekil 1.20. Prosiyanidin B1 Yapısı.....	37
Şekil 1.21. Prosiyanidin B2 Yapısı.....	37
Şekil 1.22. Prosiyanidin B3 Yapısı.....	37
Şekil 3.1. DPPH serbest radikalinin kimyasal yapısı.....	44
Şekil 4.1. Ekstraksiyon verim grafiği.....	48
Şekil 4.2. Üzüm çekirdeği ekstraktının IR spekturumu.....	49
Şekil 4.3. Üzüm meyvesi ekstraktının IR spekturumu.....	49
Şekil 4.4. (+)-Kateşinin IR spekturumu.....	50
Şekil 4.5. Ticari proantosiyandinin IR spekturumu.....	50
Şekil 4.6. DPPH kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 4.7. Numune ve standartların DPPH temizleme aktiviteleri.....	54
Şekil 4.8. Gallik asit kalibrasyon grafiği.....	55
Şekil 4.9. Numune ve standartların toplam polifenolik madde miktarları.....	56

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. En sık karşılaşılan serbest radikaller, bazı reaktif oksijen türleri ve onların bazı temel özellikleri.....	3
Tablo 1.2. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Tahmini Yarı Ömürleri.....	4
Tablo 1.3. Hücredeki serbest oksijen radikali kaynakları	9
Tablo 1.4. Tokoferolün süstitüentleri.....	22
Tablo 1.5. Antosiyanidinin süstitüentleri	29
Tablo 1.6. Flavonolün süstitüentleri.....	29
Tablo 1.7. Flavononun süstitüentleri.....	30
Tablo 1.8. Flavanın süstitüentleri.....	30
Tablo 1.9. Flavonun süstitüentleri.....	30
Tablo 1.10. CAC, EC, TGKY' ne göre gıdalarda kullanımına izin verilen Antioksidanlar	34
Tablo 3.1. HPLC uygulama şartları	46
Tablo 4.1. Ekstraksiyon çözücüler ve ekstraksiyon verimleri.....	47
Tablo 4.2. IR spekturumlarında cihazdan okunan dalga boyları	51
Tablo 4.3. DPPH konsantrasyon ve absorbans değerleri	52
Tablo 4.4. Gallik asit konsantrasyon ve absobrans değerleri	55
Tablo 4.5. Okunan absorbans değerleri ve doğru denkleminde karşılık gelen gallik asit miktarları.....	56

1. GİRİŞ

Yaşamımız boyunca mükemmel işleyen vücudumuzda, belli bir yaştan sonra serbest radikallerin çoğalması sonucu, cildin kolajen tabakası tahrip olur ve yaşlanma süreci başlar. Bitkilerdeki bazı bileşiklerin, bu sürecin başlamasını geciktirici etkisi vardır. Hakkında uzun süredir araştırmalar yapılan, kongreler düzenlenen söz konusu bu bileşikler, bir başlık altında toplanmış ve antioksidan adını almışlardır.

Antioksidanlara verilen önem, genel sağlığa olumlu katkıları nedeniyle her geçen gün giderek artmaktadır. Son dönemin en popüler takviyelerinden olan antioksidanlar, genel yaşam süresini uzatan, kanser, kalp hastalıkları gibi hastalıklara yakalanma riskini azaltan ve yaşlanmanın etkilerini geciktiren etkileri sayesinde her kesimden insan tarafından bilinir ve kullanılabilir hale gelmiştir. Hava ve su kirliliği, hazır yiyecekler, yaşam tarzı, stres gibi etkenler sürekli olarak insan sağlığı üzerinde tehdit oluşturmaktadır. Bu etkenler sonucunda normal metabolizma faaliyetlerinin yanı sıra serbest radikaller oluşur. Serbest radikaller, hücre içinde yapıları bozan, DNA zararına ve hücredeki biyokimyasal bileşiklerde hasara yol açan maddelerdir (Bagchi 2000).

Dünyada, tıbbi uygulamalarda ve tedavilerde kullanılan ilaçların yaklaşık %80'i bitkisel kaynaklardan elde edilmektedir. Bitkilerde bulunan fenolik yapıdaki bileşikler geniş bir farmakolojik etki alanına sahiptirler ve kolesterolün düşürülmesi başta olmak üzere, birçok hastalığın tedavisinde kullanılırlar. Ayrıca antibakteriyel, antihepatotoksik ve antioksidan özelliklere de sahiptirler (Pirniyazov 2003).

Üzüm yıllık yaklaşık 58 milyon ton ile dünyanın en çok mahsul alınan meyvesidir (fao.org 1997). Ülkemiz de dünya üzüm üretiminde %12'lik paya sahip olup 5. sırada yer almaktadır (TEAE 2003). Bu şartlar göz önünde alındığında bu konuyla ilgili yapılan çalışmalara bir yenisini eklemek kaçınılmaz olmuştur.

İnsan hayatı için faydalı bu bileşiklerin önemli bir grubunu da üzüm ve üzüm çekirdeğinde yoğun olarak bulunan proantosiyanidinler teşkil etmektedir. Üzüm çekirdekleri (+)-kateşinler, (-)-epikateşin, (-)-epikateşin gallat, dimerik, trimerik ve tetramerik prosiyanidinler gibi monomerik fenolik bileşiklerin zengin kaynağıdır ve bu bileşikler antitumör ve antiviral ajanlar olarak görev yaparlar (Saito 1998).

1.1. Serbest Radikaller

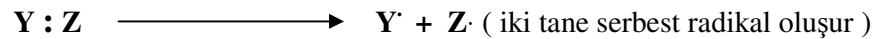
Serbest radikaller, bir veya daha fazla ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküller olarak tanımlanırlar.

Kuantum kimyasına göre ancak iki elektron bir bağ yapısına girebilir. Ayrıca iki elektronun ters dönüş doğrultusunda olması gerekir. Yani yukarıya doğru dönen bir elektronun eşi, aşağıya doğru dönen bir elektrondur. Elektron çiftleri oldukça kararlıdır ve insan vücudunun neredeyse tüm elektronları elektron çifti halinde bulunur. Bir bağ koptuğunda elektronlar ya birlikte kalır (ikisi de bir atoma katılır), ya da ayrılırlar (biri bir atoma, diğeri diğere). Eğer birlikte kalırlarsa oluşan atom bir iyon olur, eğer ayrılırlarsa da serbest radikaller oluşur. Bu eşleşmemiş elektronlar yüksek enerjilidir ve eşleşmiş elektronları ayırıp işlerine engel olurlar. Bu işlem serbest radikalleri hem tehlikeli hem kullanışlı yapar.

Radikaller yüksek enerjili, çok etkin, kısa ömürlü, izole edilemeyen ara ürünlerdir.

Serbest radikaller üç çeşit mekanizma ile oluşurlar;

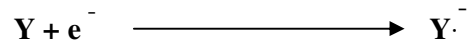
1. Kovalent bağlı olan normal bir molekülün, her bir parçasında ortak elektronlardan birisinin kalarak homolitik bölünmesi,



2. Normal bir molekülden tek bir elektronun kaybı,



3. Normal bir moleküle elektron transferi,



1.1.1. Serbest Radikal Çeşitleri

Radikaller, oksijen içerip içermediğine göre, serbest oksijen radikalleri(SOR) ve oksijen içermeyen radikaller olarak ikiye ayrılır.

Tablo 1.1. En sık karşılaşılan serbest radikaller, bazı reaktif oksijen türleri ve onların bazı temel özellikleri (Dündar ve Aslan 1999).

Adı	Simgesi	Özelliği
Hidrojen Radikali	H·	Bilinen en basit radikal
Süperoksit Radikali	O ₂ · ⁻	Oksijen metabolizmasının ilk ara ürünü
Hidroksil Radikali	·OH	En toksik oksijen metaboliti radikali
Hidrojen Peroksit	H ₂ O ₂	Reaktivitesi düşük, moleküler hasar yeteneği zayıf
Singlet Oksijen	¹ O ₂	Yarılanma ömrü kısa, güçlü oksidatif form
Perhidroksil Radikali	HO ₂ ·	Lipidlerde hızlı çözünerek lipit peroksidasyonunu arttırmaktadır
Peroksil Radikali	ROO· ⁻	Perhidroksile oranla daha zayıf etkili, lipitlere lokalize olma yeteneği güçlü
Triklorometil Radikali	CCl ₃ ·	CCl ₄ metabolizması ürünü, karaciğerde üretilen bir radikal
Tiyil Radikali	RS·	Sülfürlü ve çiftlenmemiş elektron içeren türlerin genel adı
Alkoksil Radikali	RO·	Organik peroksitlerin parçalanması ile oluşan oksijen metaboliti
Azot Monoksit	NO	L-argininden vücut içinde üretilir
Azot Dioksit	NO ₂	NO'in oksijen ile reaksiyonundan üretilir

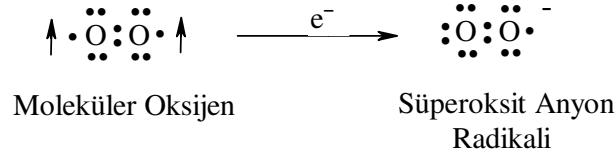
Tablo 1.2. Reaktif Oksijen Ürünlerinin Tahmini Yarı Ömürleri (Tekkes 2006).

Reaktif Oksijen Ürünleri		Yarı Ömrü (saniye)
$O_2^{\cdot-}$	Süperoksit anyon radikali	Enzimatik
H_2O_2	Hidrojen peroksit	Enzimatik
$\cdot OH$	Hidroksil radikali	10^{-9}
1O_2	Singlet oksijen	10^{-6}
$RO\cdot$	Alkoksil radikali	10^{-6}
$ROO\cdot$	Peroksil radikali	7
$Q\cdot$	Semikinon radikali	Günler
$NO\cdot$	Nitrik oksit radikali	1-10 (5,6) kalpte 0,1 sn
$ONOO\cdot$	Peroksinitrit	0,05-1

Radikal metabolitler aslında aerobik organizmaların kaçınılmaz bileşikleri olup hücrelerde kontrollü kullanımları ile bir dizi enzimin sentezi ve birçok organizmanın antibakteriyel savunmasında gereklidirler.

Biyolojik sistemdeki radikallerin çoğunluğunu serbest oksijen radikalleri oluşturur. Bunların büyük kısmı aerobik solunum sırasında mitokondrielerde indirgenmiş karbon birimlerinden alınan elektronların çeşitli elektron taşıyıcılarından geçerek en son elektron alıcısı olan moleküler oksijene transferi esnasında meydana gelir. Oksijenin kısmi indirgenmesi sonucu serbest oksijen radikalleri oluşur. Oksijenin tam olarak indirgenmediği reaksiyonlarda ise son ürün daima sudur (Ulusoy 2005).

1.1.1.1. Süperoksit Anyon Radikali ($O_2^{\cdot -}$)

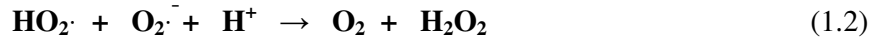


Moleküler oksijen (O_2), iki çiftleşmemiş elektron içerir, bu sebeple kendisi de bir biradikaldir. Bu özelliğinden dolayı diğer serbest radikallerle kolayca reaksiyona girebilir. Moleküler oksijenin bir elektron indirgenmesiyle süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), iki elektron indirgenmesiyle hidrojen peroksit (H_2O_2) ve üç elektron indirgenmesiyle hidroksil radikali ($\cdot OH$) meydana gelir. Hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hipoklorik asit ($HOCl$) gibi bazı oksijen türevleri radikalik özellik göstermemesine rağmen son derece aktif olmaları sebebiyle diğer oksijen radikalleri ile birlikte sınıflandırılırlar. Temel haldeki oksijen triplet oksijendir ve 3O_2 olarak gösterilir.

Süperoksit ($O_2^{\cdot -}$), moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesiyle meydana gelen radikaldir. Daha çok $O_2^{\cdot -}$ veya O_2^- anyonu şeklinde gösterilir. Süperoksit radikali aerobik hücrelerde oldukça sık oluşur. Fakat daha çok elektron transfer sistemlerinde meydana gelir. Bunu yanında pek çok enzimatik ve enzimatik olmayan yollarla da meydana gelebilir.

Hem çevresel etkenler, hem de organizmalardaki enzimatik ve enzimatik olmayan tepkimelerle en çok ve en kolay oluşan oksijen radikali süperoksit radikaldir. Serbest süperoksit radikal anyonu ($O_2^{\cdot -}$) hemen tüm aerobik hücrelerde oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir.

Süperoksit anyonu ve hidroksil radikali diğer moleküllerden elektronları çektiğinden, oksitleyici ajanlar olarak kabul edilirler. Ayrıca süperoksit radikali aldığı elektronu başka bir elektron alıcıya vererek tekrar oksijene oksitlenebilir ve böylece bir indirgeyici (redüktör) olarak da davranabilir (Tekkes 2006).

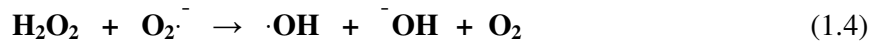


Süperoksit radikalinin esas zararlı etkisi onun protonlanmasıyla meydana gelmektedir. Protonlanma ile çok daha aktif bir radikal olan perhidroksil radikali (HO_2^-) meydana gelir. Süperoksit radikali ile perhidroksil radikali birbirleriyle reaksiyona girdiklerinde biri yükseltgenirken diğeri indirgenir (1.2). Süperoksit radikali oldukça reaktif bir molekül olup iyi bir indirgeyici ve zayıf bir oksitleyici maddedir (Dündar ve Aslan 1999).

1.1.1.2. Hidrojen Peroksit (H_2O_2)

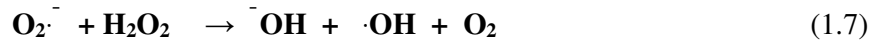
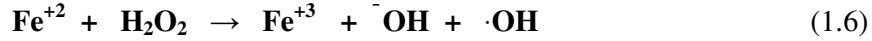
Moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması veya süperoksidin bir elektron alması sonucu peroksit meydana gelir. Peroksit molekülü de iki hidrojen atomu ile birleşerek hidrojen peroksidi (H_2O_2) oluşturur.

H_2O_2 , membranlardan geçebilen uzun ömürlü oksidandır. Kendisi bir serbest radikal olmadığı halde, reaktif oksijen türleri içine girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Geçiş metal iyonları varlığında daha da hızla gerçekleşen bir reaksiyonla süperoksit anyon radikali ile birlikte en reaktif radikal olan hidroksil radikalini oluşturur.



Bu reaksiyona Haber-Weiss reaksiyonu adı verilir. “Haber-Weiss” reaksiyonu katalizörlü veya katalizörsüz oluşabilir. Fakat, katalizörsüz reaksiyon oldukça yavaş ilerler. Katalizör olmayınca ortamdaki H_2O_2 ve O_2^- antioksidanlar tarafından kolayca ortamdaki uzaklaştırılır. Demir gibi geçiş metalleri ile katalizlenen ikinci şekli ise çok hızlıdır.

Bu reaksiyonda önce ferri (Fe^{+3}), süperoksit tarafından ferro'ya (Fe^{+2}) indirgenir. Sonra bu ferro kullanılarak "Fenton Reaksiyonu" ile hidrojen peroksitten OH^- ve $\cdot\text{OH}$ üretilir. Reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir (Akkuş 1995).



1.1.1.3. Hidroksil Radikali ($\cdot\text{OH}$)

Hidroksil radikali, kimyada en aktif radikal olarak bilinir. Bu nedenle vücut içerisinde oluşan bir $\cdot\text{OH}$ radikali hemen her moleküle saldırır ve etkileştiği yerde de büyük hasara neden olur. Nonradikal biyolojik moleküllerle de zincirleme reaksiyonları başlatır.

Hidroksil radikali, hidrojen peroksitin geçiş metalleri varlığında indirgenmesi ile (Fenton reaksiyonu) oluşan son derece reaktif bir radikaldir. Ayrıca hidrojen peroksitin süperoksit radikali ile reaksiyonu sonucunda da (Haber-Weiss reaksiyonu) meydana gelir. Bu reaksiyon katalizörsüz çok yavaş olduğu halde Fe^{+3} katalizörlüğünde çok hızlı oluşur.

Su molekülünün yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda da hidroksil radikali oluşur. Bir hidroksil radikali, yüzlerce yağ asidini ve yan zincirini lipid hidroperoksite çevirebilir. Bu oluşan hidroperoksitler birikerek membran bütünlüğünü bozar ve hücrenin şişmesine neden olur. Ayrıca bu hidroperoksitlerden son ürün olarak toksik ve reaktif olan aldehitler de oluşabilir. Bunlardan en önemlilerden biri de MDA(Malondialdehit)'dir.

Tablo 1.3. Hücredeki serbest oksijen radikali kaynakları (Tekkes 2006).

Endojen Kaynaklar	Eksojen Kaynaklar
Mitokondriyal elektron transport zinciri	İlaç oksidasyonları (Ör.Parasetamol, CCl ₄)
Kloroplast elektron transport zinciri	İyonize radyasyon
Oksidan enzimler; ➤ Ksantin oksidaz ➤ İndolamin dioksijenaz ➤ Triptofan dioksijenaz ➤ Galaktoz oksidaz ➤ Siklooksijenaz ➤ Lipooksijenaz ➤ Mono aminooksidaz	Güneş ışığı
Fagositik hücreler; ➤ Nötrofiller ➤ Monosit ve makrofajlar ➤ Eozinofiller ➤ Endotelyal hücreler	X- ışınları
Otooksidasyon reaksiyonları (Fe ⁺² , epinefrin)	UV- ışınları
	Isı şoku
	Glutasyonu okside eden maddeler
	Ortam havası ➤ Sigara dumanı ➤ Ozon ➤ Kükürtdioksit ➤ Egzos gazları

1.1.3. Serbest Radikallerin Vücuttaki Etkileri

Pek çok hastalığın etyolojisinde serbest radikallerin etkili olduğuna dair ipuçları elde edilmiştir (Yen 1997). Bu hastalıklar arasında ateroskleroz (damar sertleşmesi), koroner kalp rahatsızlıkları, hipertansiyon, osteoporoz, felç, romatizmal hastalıklar, diabetes ve diabetes komplikasyonlarının gelişimi, yaşlılık, çeşitli deri, kas, göz hastalıkları gibi birçok patolojik durum vardır.

Organizmada antioksidanların bulunmasına rağmen, serbest radikallerin neden olduğu hücre hasarı yaşam boyu devam eder. Herhangi bir nedenle serbest radikallerin fazla oluşumu ve buna ek olarak antioksidan korunma veya onarım mekanizmalarının yetersizliği oksidatif strese neden olur. İyonize radyasyon, dış

kaynaklı stresler, UV ışınları, ısı, kemoterapötik ajanlar, kimyasal karsinojenler ve tümör başlatıcıları, nükleik asitlerle, proteinlerle ve membran fosfolipitleri ile reaksiyona girerek radikallerin aracılık ettiği oksidatif hasarı kolaylaştırırlar.

Kronik oksidatif stres mutajenik değişikliklere neden olabiliyorsa, kanser gelişimi başlar. Örneğin kronik inflamasyonda oluşan $O_2^{\cdot-}$, HOCl, $\cdot OH$, NO \cdot , H_2O_2 gibi oksidanların DNA oksidasyonuna, deaminasyona, iplik kırılması ve mutasyona neden oldukları gösterilmiştir. Oksidatif stresin eksojen(dış kaynaklı) kaynakları arasında bulunan sigara, UV ışınları, radyasyon, yiyeceklerdeki yağ asitleri, ağır metal iyonları, alkol, ozon ve bazı kimyasal maddeler kanser nedenleri arasında gösterilmektedir.

Karsinojenezdeki başlama (initiation), gelişme (promotion) ve ilerleme (progression) dönemlerinin her üçünde de serbest radikallerin etkili olduğu bilinmektedir. Ayrıca serbest radikaller prokarsinojenleri aktifleyerek DNA hasarına neden oldukları gibi, hücrel antioksidan savunma sisteminde de değişikliğe yol açmaktadırlar. Kanser oluşumunun ilk basamağında hücre DNA'sında sürekli, geriye dönüşümü olmayan modifikasyonlar oluşmaktadır. DNA'da meydana gelen değişiklikler spesifik olmayan onarım sistemler ile sürekli onarılır.

Akciğerler, diğer organlardan farklı olarak, kirli hava ve sigara kullanımında solunumla direkt olarak oksidanlarla karşılaşmaktadırlar. Bu sebepten dolayı solunum sistemi hastalıklarının büyük çoğunluğunda oksidan-antioksidan dengesindeki değişikliklerin rol aldığı bilinmektedir.

Göz, aşırı miktarda serbest radikallerin etkisinde kalan bir organımızdır. Çünkü, yaşlanma ile birlikte artan oranda UV ışınlarının tesirinde kalır. İndirgeyici maddelerin retinada fotosensitizasyonu sonucu gözde serbest radikal üretimi artar. Göz bu radikallerin etkisine yatkın olduğu gibi yeterli miktarda antioksidan savunma sistemlerine de sahiptir. Gözde yüksek konsantrasyonlarda antioksidan enzimler, serbest radikal tutucuları ve süperoksit üretimi inhibitörleri bulunur.

Deri, UV ışınları ve oksijenle sık teması nedeni ile serbest radikallerin kolaylıkla yıkım oluşturabileceği bir organ özelliğini taşımaktadır. Dermatolojik

hastalıkların bir kısmı direkt olarak reaktif oksijen türleri tarafından oluşturulurken, bir kısmı da infeksiyon, travma, UV ışınları ve termal etki sonucu oluşan oksidatif stresi takiben gelişmektedir. Derinin sık temasta bulunduğu UV ışınlarının oluşturduğu oksidatif stres, derinin foto yaşlanmasından ve bir ölçüde deri kanserlerinin oluşumundan sorumludur.

Radikal hasarının birikimi ve bu radikallere bağlı olarak meydana gelen çeşitli oksidanlar yaşlanma ile artar. Oksidatif hasardan en fazla zararı mitokondrial DNA görmektedir. Yaşlı insanlarda mitokondrial DNA'nın önemli miktarda hasara uğradığı gösterilmiştir. DNA tamiri radyasyon hasarına karşı korunmada etkili bir yoldur. Lipit peroksitlerin parçalanma ürünleri yaşla birlikte artar. Yaşlı dokuların normal dokulardan daha fazla peroksidasyona maruz kaldıkları kaydedilmiştir.

Uygun antioksidan müdahalesi, radikal toksisitesini azaltarak veya inhibe ederek, kronik hastalıkların ve yaşlanmanın semptomlarını geciktirerek veya hafifleterek koruyucu etki gösterir. Bu amaçla antioksidan vitamin ve ilaçların kullanımı gündeme gelmiştir. İnsanlarda farmakolojik ajan olarak antioksidanların kullanımı ile ilgili deneyimler sınırlı olmasına rağmen, deneysel veriler serbest radikalleri yok eden veya azaltan antioksidanların kullanımının, yaşam süresini uzatabileceği ihtimalini göstermektedir (Akkuş 1995, Ünlü 2001).

1.2. Antioksidanlar

Radikallerle oldukça hızlı reaksiyonlara girerek otooksidasyon/peroksidasyonun ilerlemesini önleyen maddeler **antioksidan** olarak tanımlanır (Dündar ve Aslan 1999). Bir başka tanıma göre antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda organik bileşiklerin serbest radikal mekanizmalı oksidasyonunu engelleyen veya yavaşlatan bileşiklerdir (Ulusoy 2005).

Bu maddeler aktif serbest radikaller ile reaksiyona girerek, radikal fonksiyonunun antioksidana transferini sağlarlar. Antioksidanlar özellikle gıda sektöründe geniş uygulama alanı bulmuşlardır. Havadaki oksijen, gıda maddesini oluşturan karbonhidrat, yağ ve proteinlere etki ederek tadının, kokusunun ve renginin bozulmasına neden olur. Antioksidan kullanımı yağ ve yağlı gıdaların oksidasyonunu

geciktirmek için en etkili yöntemlerden biridir. Antioksidanlar gıdaların raf ömrünü uzatırken, besin ögesi kayıplarını da azaltırlar.

Antioksidanlar, sadece gıda katkı maddesi veya besin destek ünitesi olarak vücuda alınmazlar, serbest radikallerin oluşumunu ve yaptıkları hasarı önlemek için de vücutta birçok savunma mekanizması mevcuttur. Antioksidanlar onların zararlı etkilerini inaktive eden maddelerdir (Akkuş 1995).

Soluduğumuz havada tatsız, kokusuz ve renksiz bir molekül olarak bulunan oksijen, ilk kez 1770’li yıllarda Priestley, Lavoisier ve Scheele tarafından dioksijen yani moleküler oksijen olarak tanımlanmıştır. Dünya sistemi içerisinde sürdürülebilir aerobik yaşamın temel esasını, canlının su ya da havadan alınan oksijen yardımıyla, karbon ve hidrojen içeren besin maddelerinin organizma içinde bol miktarda yakılmasıyla elde edilen, kimyasal ve termal enerji oluşturur. Yaşamın sürdürülmesinde büyük önem taşıyan bu kimyasal tepkimelerin bazı basamaklarında oksijen indirgenir ve reaktif oksijen türleri olarak tanımlanan ara ürünler oluşur. Reaktif karakterli bu tür metabolitlerin oluşumuna yol açan faktörlerin tamamına “prooksidan veya oksidan madde” denir. Antioksidanlar bu amaçla reaktif maddeleri ve reaksiyonlarını bir dengede tutabilmek üzere sürekli aktivite gösterirler. Sonuç olarak organizma, doğuştan kazandığı çok hassas bir donanım sayesinde, fizyolojik aktivitenin doğal sonucu olan serbest radikal nitelikli biyokimyasal ürünleri, “oksidan-antioksidan denge” olarak tanımlanabilecek bir çizgide tutmayı başarır. Tehlikeli olan durum, radikallerin varlığından daha çok oksidanlar ve antioksidanlar arasındaki bu dengenin herhangi biri lehine bozulmasıdır (Dündar ve Aslan 1999).

1.2.1. Antioksidanların Etki Mekanizması

Antioksidan ajanlar oksidan moleküllere karşı etkilerini dört yolla gösterirler. Bunlar;

- a. Süpürücü/Temizleyici (scavenger) etki gösterenler; Yeni radikal oluşumunu engellerler ve oluşmuş olan radikali daha az zararlı hale getirirler. Örnek

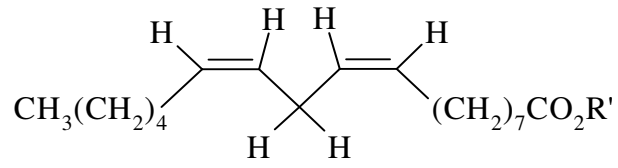
olarak, süperoksit dismutaz (SOD) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi enzimleri ve metal proteinleri verebiliriz

- b.** Giderici (quencher) etki gösterenler; oksidanlarla etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini söndüren ve inaktif hale getiren bileşiklerdir. Örnek olarak, vitaminler (beta karoten, askorbik asit, tokoferol), flavonoidler, ve antosiyanidinler verilebilir.
- c.** Zincir Kırıcı (chain breaker) etki gösterenler; zincirleme olarak devam eden tepkimeleri belli yerlerinden kırarak, oksidan etkiyi durdururlar. Bunlara örnek olarak bazı vitaminler, ürik asit, bilirubin ve albumin gösterilmektedir.
- d.** Tamir Edici (repair) etki gösterenler; bu grupta DNA tamir enzimleri, metionin sülfoksit redüktaz sayılabilir.

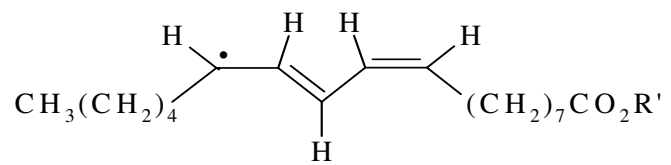
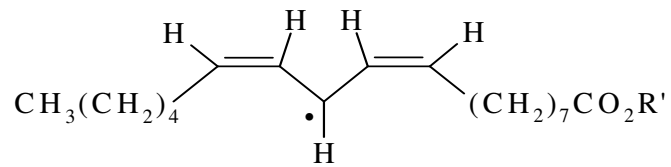
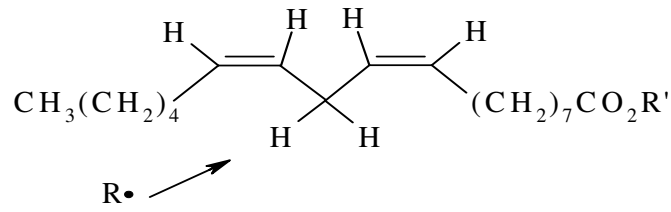
Genel anlamda iki tür antioksidan madde tanımlanır; birincil antioksidan maddeler, zincir kırma tepkimeleri oluşturan veya serbest radikal temizleyen türlerdir. İkincil antioksidan maddeler veya koruyucu maddeler ise; metallerin aktivitesini azaltıcı lipit hidroperoksitlerin istenmeyen uçucu türlere parçalanmasını engelleyen, tekli oksijen yakalayan ya da birincil antioksidanların yeniden üretimini sağlayan türlerdir. Mekanizmalardaki bu çok çeşitlilik pek çok maddenin araştırılmasına katkı sağlamıştır. Otoksidasyon zincir reaksiyonunu ve antioksidanların etki mekanizmasını örnek üzerinde inceleyecek olursak;

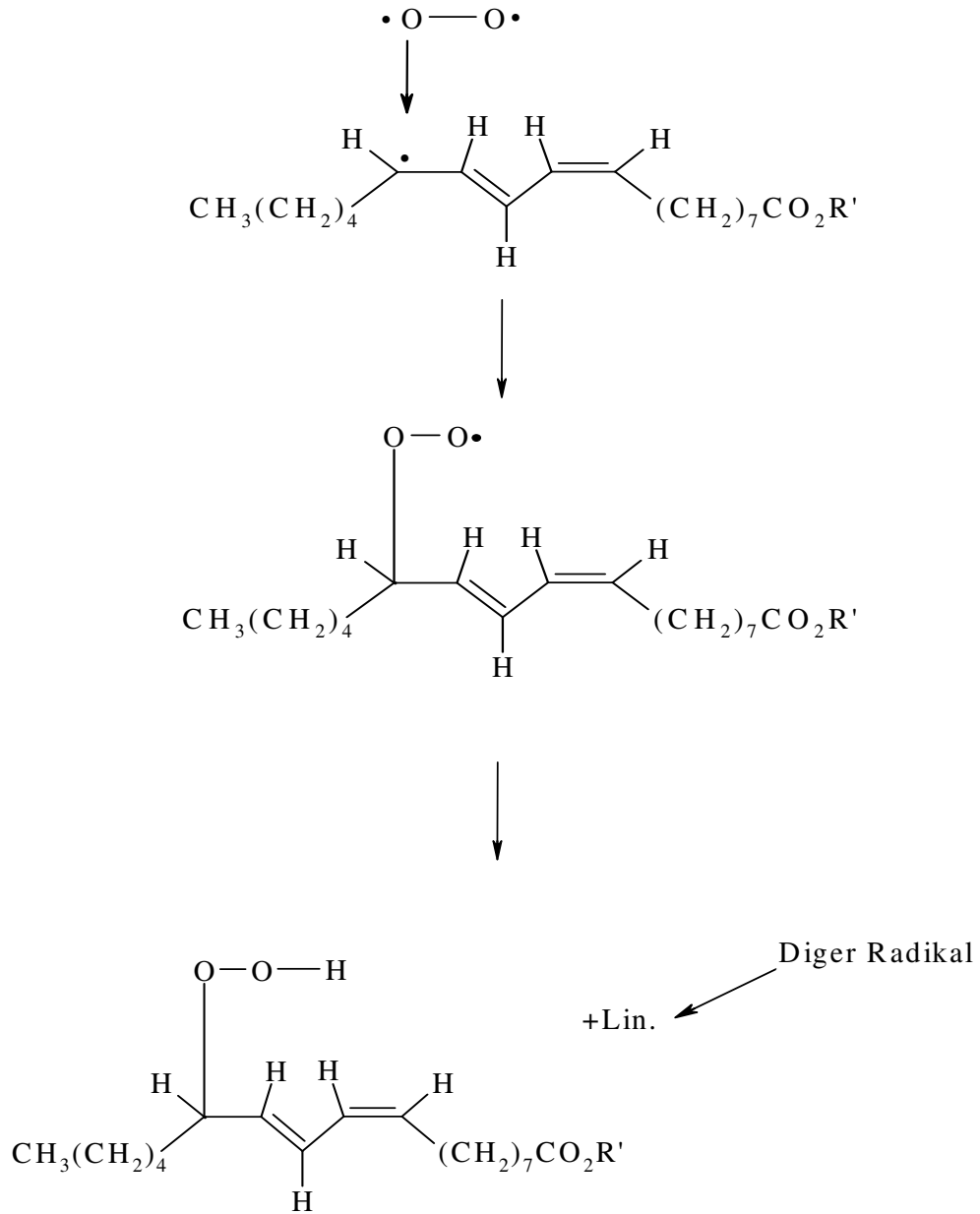
Linoleik asit bir çoklu doymamış yağ asididir ve çoklu doymamış yağlar, günlük besinlerimizin bir bileşeni olarak, sıvı ve katı yağlarda bol miktarda bulunurlar. Ayrıca bedendeki yaşamsal fonksiyonları yürüten dokularda da yaygın bir şekilde yer alırlar.

Linoleik asitin iki ikili bağı arasında bulunan $-CH_2-$ grubundaki hidrojen atomları (Lin—H), radikaller tarafından koparılmaya karşı özel bir duyarlılığa sahiptir. Bu hidrojen atomlarından birinin koparılması sonucu yeni bir radikal (Lin·) oluşur. Bu radikal otoksidasyon adı verilen genel bir tepkime içerisinde, oksijenle bir zincir tepkimesi verebilmektedir.



Linoleik Asit



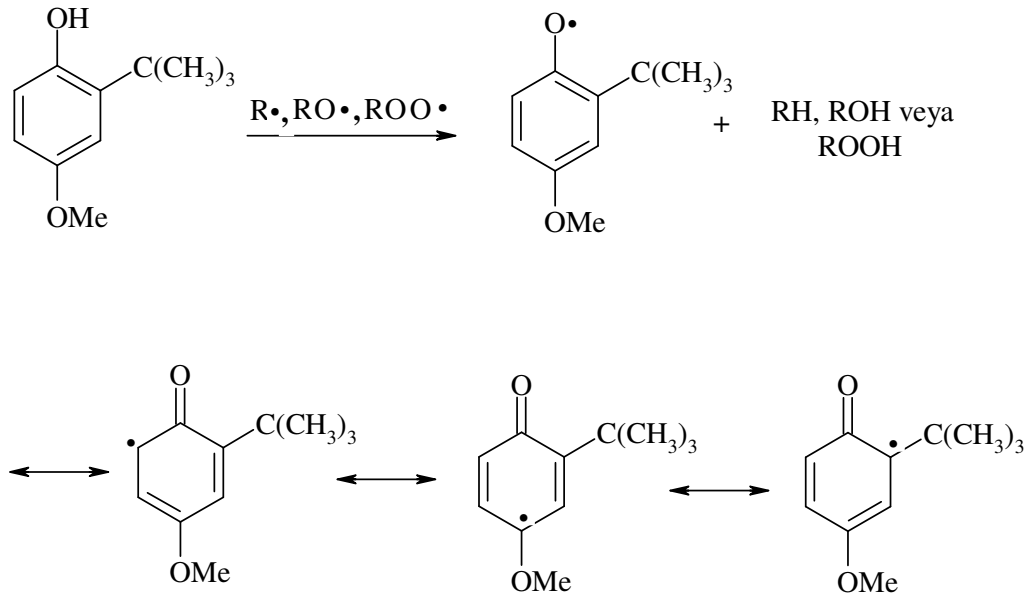


Şekil 1.1. Linoleik asidin otooksidasyon mekanizması

Otooksidasyon sonucu bir hidroperoksit oluşur. Otooksidasyon pek çok maddede oluşan bir süreçtir. Örneğin, sıvı ve katı yağlar bozunduğunda ortaya çıkan küflenme ve ekşimenin sorumlusu otooksidasyondur. Otooksidasyon beden içinde de gerçekleşir ve geri dönüşümsüz tahribatlara yol açar.

Fakat ortama antioksidanlar ilave edildiği zaman otooksidasyon önlenir. Çünkü antioksidanlar, radikallerle tepkimeye girerek onları, zinciri sürdüremeyecek olan yeni ve kararlı radikallere dönüştürür.

Antioksidanların temelini oluşturan fenolik yapılar, rezonans hibritleri vasıtası ile düşük enerjili serbest radikaller oluşturmalarına imkan tanımaktadır. Aşağıdaki örnek reaksiyon fenolik yapıdaki sentetik bir antioksidan olan BHA'nın antioksidatif etkisini ve rezonans kararlılığını göstermektedir.



Şekil 1.2. BHA'nın etki mekanizması

Antioksidanları birçok kategoride sınıflandırmak mümkündür. Yapılarına göre, enzimatik ve nonenzimatik; çözünürlüklerine göre, suda çözünenler ve yağda çözünenler; yerleşimlerine göre, intrasellüler(hücre içi) ve ekstrasellüler(hücre dışı), kaynaklarına göre endojen ve eksojen olarak sınıflandırılabilirler (Akkuş 1999).

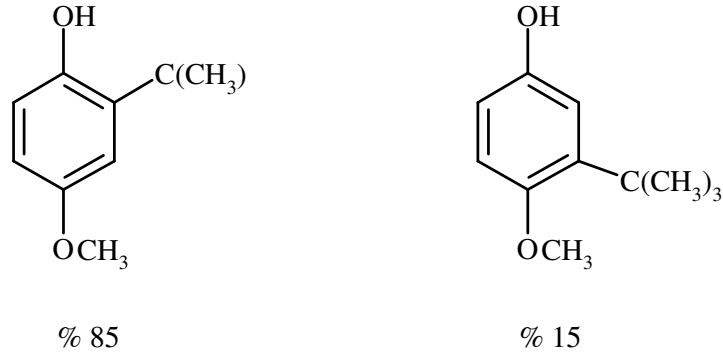
Ayrıca, antioksidanları **sentetik ve doğal antioksidanlar** olmak üzere iki temel grupta da inceleyebiliriz.

1.2.2. Sentetik Antioksidanlar

Kimyasal prosesler sonucu üretilen sentetik antioksidanların başlıcaları; Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA), Bütillenmiş Hidroksitoluen (BHT) ve *tert*-Bütül Hidrokinon (TBHQ) ve Gallatlar'dır.

1.2.2.1. Bütillenmiş Hidroksianisol (BHA)

Bu antioksidan, ticari olarak 3-tertiyerbutül-4-hidroksianisol (%85) ile 2-*tert*-butül-4-hidroksianisol (%15) izomerlerinin karışımı halindedir.



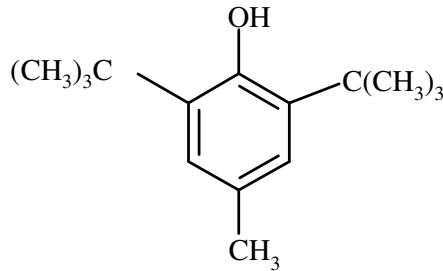
Şekil 1.3. BHA'nın kimyasal yapısı

BHA beyaz, mumsu katı bir yapıya sahip, erime noktası yaklaşık 48-63°C olan ve hem hayvansal hem de bitkisel yağlarda çözünebilir ancak suda çözünemeyen bir antioksidandır. Gıdalarda kullanımına ilk olarak 1948 yılında ABD'de izin verilmiş ve günümüzde de pekçok ülkede gıda olarak tüketilen katı ve sıvı yağlarda kullanılmaktadır. Bazı durumlarda tertiyer bütül grubunun, fenolik hidroksil (-OH) grubu üzerinde koruma meydana getirdiği ileri sürülmektedir. Bu durum molekül dış reaksiyonlardan korumakta ve daha az uçucu ve daha çok yağda çözünür forma dönüştürmektedir. Yapısındaki hidroksil gruba karşı orto veya meta pozisyonunda yer alan tertiyer butül grup nedeni ile BHA'ya "engelleyici fenol" adı verilmektedir. Bu sterik engelleme, tertiyer butül grubun fenolik yapının antioksidatif aktivitesi ile girişim meydana getirmesi ve bu neden ile BHA'nın bitkisel yağlarda etkisinin az olmasına neden olduğu söylenmektedir.

BHA, bitkisel yağlarda etkin bir antioksidan olmamasına karşın, genellikle diğer antioksidanlar ile (gallatlar) beraber kullanıldığında hem fenolik yapıda bulunan antioksidanların bir arada kullanılması ile elde edilen sinerjistik etkidir, hem de BHA'nın yağın kullanıldığı ürünü koruyucu etkisinden faydalanılmaktadır. BHA fırınlama veya kızartma gibi yüksek sıcaklık işlemleri uygulanan yağlarda kullanıldığında, kolaylıkla algılanabilen keskin bir fenolik koku oluşturmaktadır (kimyaevi.org). Kullanımı %0,02 olarak kısıtlanmıştır. BHA'nın dezavantajı ise kızartma sıcaklıklarındaki uçuculuğudur ve bu kayıp bazen son ürünü etkileyebilecek kadar çok olabilir.

1.2.2.2. Bütillenmiş HidroksiToluen (BHT)

Bütillendirilmiş hidroksitoluen (BHT), ($C_{15}H_{24}O$); 2,6-ditert-bütil-4-metil fenol'un, 1954 yılında gliseridler üzerinde etkili ve koruyucu bir antioksidan olduğunun belirlenmesi sonucunda gıda olarak tüketilen yağlarda ve diğer bazı gıdalarda kullanılmaya başlanmıştır. BHT, yağlarda iyi çözünebilir ancak suda çözünmeyen, beyaz renkli ve kristal yapıda bir madde olup, 760 mmHg basıncında kaynama noktası $265^{\circ}C$ 'dir. Erime noktası $69,7^{\circ}C$ 'dir. Bu madde BHA gibi bitkisel yağlarda düşük aktiviteye sahip olmasına karşın diğer antioksidanlar ile beraber kullanıldığında yağın ilave edildiği gıdayı koruma özelliğinden yararlanılmaktadır. BHT, BHA ile sinerjistik etki gösterirken, gallatlar ile sinerjistik etki meydana getirmemektedir.



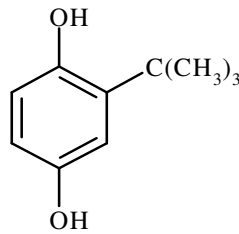
Şekil 1.4. BHT'nin kimyasal yapısı

BHT'nin gösterdiği özellikler büyük ölçüde BHA'e benzemektedir. FAO/WHO Birleşik Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Ekspertler Komitesi'nin görüşüne göre, günlük alınabilir miktar vücut ağırlığı üzerinden 0,5 mg/kg olup, bu değer insan sağlığı açısından herhangi bir zarar yaratmamaktadır.

BHA ve BHT, uçucu olmasından dolayı, ambalajlama materyallerine katılarak da kullanılabilir. Buradan gıdaya nüfuz ederler. BHA, hayvansal yağlara nazaran, bitkisel yağların oksidasyonunu önlemede daha etkilidir. BHA, özellikle uçucu yağların renk ve tat-kokularının korunmasında, bilhassa kısa zincirli yağ asitlerinin oksidasyonunu kontrol etmede etkilidir. Genellikle tahıl ve şekerli ürünlerde de kullanılır. BHA ve BHT birlikte kullanıldığında, sinerjistik etkiden bahsedilmektedir.

1.2.2.3. *tert*-Bütil Hidrokinon (TBHQ)

ABD Gıda ve İlaç İdaresinin (FDA) yaptığı çalışmalar sonucunda etkili bir antioksidan olduğu belirlenen *tert*-butilhidrokinon (TBHQ)'un kullanımına ilk kez 1972 yılında izin verilmiştir. Mono-*tert*-butilhidrokinon (C₁₀H₁₄O₂) yapısında olan bu antioksidan, beyaz, kristalimsi ve karakteristik kokusu olan bir maddedir. Son yıllarda özellikle gıdaların işlenmesinde ve insan beslenmesinde yer alan bitkisel yağlar oksidasyona karşı oldukça duyarlı oldukları için kuvvetli antioksidanlara olan gereksinimleri arttırmıştır. Günümüzde *tert*-butilhidrokinon (TBHQ)'un bitkisel yağlarda stabiliteyi arttırmak amacı ile kullanımına bir çok ülke tarafından izin verilmektedir. TBHQ'un bitkisel yağlardaki antioksidatif etkisi diğer antioksidanlara göre daha fazladır.

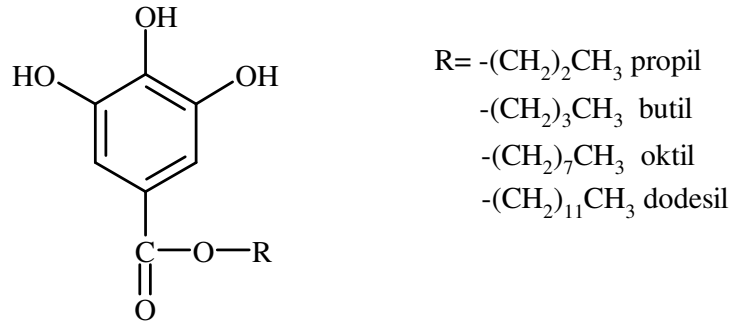


Şekil 1.5. TBHQ'nun kimyasal yapısı

Tek başına veya BHA ve/veya BHT ile kombine olarak kullanım daha uygundur. Kullanım sınırı, 1 yağ miktarı üzerinden en fazla %0,02'dir (200 ppm). PG ile birlikte kullanımı, etkiyi azalttığından tavsiye edilemez. Sitrik asit gibi bir şelat ile karıştırıldığında, stabilize edici özellik kazanmaktadır. TBHQ ve sitrik asit kombinasyonu, genellikle bitkisel yağlar, şorteningler ve bir ölçüde de hayvansal yağlarda kullanılmaktadır. Fındık ürünleri ve şekerleme imalatçıları tarafından da fazlaca kullanılmaktadır.

1.2.2.4. Gallatlar

Bu antioksidanlar kimyasal olarak 3,4,5-trihidroksibenzoik asidin propanol esteri olarak ifade edilmektedir.



Şekil 1.6. Gallatların kimyasal yapısı

Gallatlar, trihidroksi yapılarına bağlı olarak yüksek antioksidan potansiyeline sahiptirler. Oktil gallat ($C_{15}H_{22}O_5$) ve dodesil gallat ($C_{19}H_{30}O_5$) katı ve sıvı yağlarda yüksek çözünürlüğe sahip iken, propil gallat ($C_{10}H_{12}O_5$) suda daha iyi çözünürlük göstermektedir. Bütün gallatlar, özellikle alkali ortamlarda ısıya karşı oldukça dirençli olup ateş, fırında pişirme ve kızartma sırasında gallatlarda farkedilebilir derecede kayıplar olmaktadır. Gallatlar antioksidan olarak oldukça etkili maddelerdir. Ancak bunların metal iyonları ile özellikle demir iyonları ile koyu renk kompleksler oluşturma özellikleri, yağda ve substratta istenmeyen renk değişikliklerine neden olmakta ve bu yüzden de kullanılmaları sınırlandırılmaktadır.

1.2.3. Doğal Antioksidanlar

Doğal antioksidanlar hemen hemen tüm bitkilerde, meyvelerde, sebzelerde, mikroorganizmalarda, mantarlarda ve hatta hayvansal dokularda dahi bulunmakta olup çoğunlukla polifenolik yapıdaki maddelerdir. Bu antioksidanların en önemlileri; tokoferoller, sesamol, sesamolin, karnosik asit, rosmarinik asit, flavonoidler, karotenoidler ve askorbik asittir.

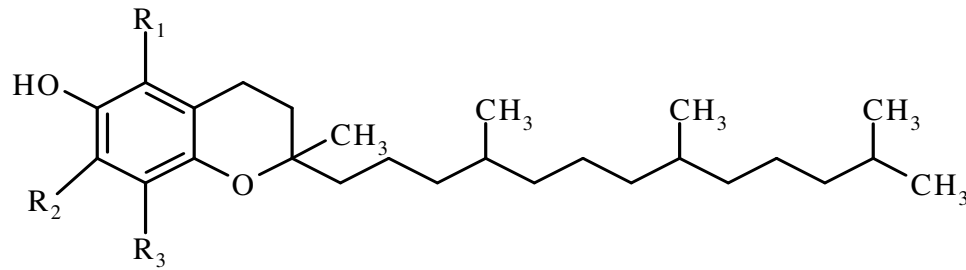
Son yıllarda sentetik antioksidanların kendilerinin yada bulundurdıkları ortamda oluşturdukları yan ürünlerinin kanserojen olduğu veya negatif sağlık etkilerine neden olduğu pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir. Bunun doğal sonucu olarak da doğal kaynaklı antioksidanlara olan eğilim gittikçe artmaktadır. Ülkemizin bitki florası yönünden önemli bir potansiyele sahip olması ve özellikle de endemik türlerin çokluğu bu talebe paralellik arz etmektedir.

1.2.3.1. Tokoferoller

Doğada en yaygın bulunan antioksidanlardandır ve bitkisel yağlardaki başlıca antioksidanları oluşturur. Hayvansal yağlarda daha az miktarda tokoferol bulunur. Bu tokoferoller de hayvanlara bitkisel bazlı beslenmeleri sonucu bitkilerden geçer (Nawar 1996). Soğukta preslenmiş bitkisel yağlar, kuru fasulye, soya fasulyesi, ayçiçeği çekirdeği, badem, yerfıstığı, ceviz, fındık, mısır yağı, kabuklu yemiş, kepekli tahıllarda çok fazla miktarda ve değişik oranlarda bulunur.

1925 yılında Evans ve Bishop isimli araştırmacılar bazı lipidlerin eksikliğine bağlı olarak üreme yetersizliği olduğunu keşfetmişler ve bu eksik olan maddeye de D vitamininden sonra alfabetik sıraya göre E vitamini adını vermişlerdir. 1936 yılında ise Evans tarafından buğday tohum yağından ekstrakte edildikten sonra tokoferol olarak tanımlanmıştır. Laboratuvar denemelerinde E vitamini ile beslenmeyen fareler dünyaya canlı yavru getiremediklerinden dolayı tocopherol kelimesi tocos:çocuk, phero:doğurtan, ol:alkol (molekülün alkol yapısını belirtmek için) sözcüklerinden türetilmiştir (Tekkes 2006).

E vitamini ‘‘Tokoferoller’’ ve ‘‘Tokotrienoller’’ olarak iki ana grupta toplanabilen, 6 kromonal türevleri olan 8 doğal bileşigi içerir. Bu bileşikler molekülün kromonal halkasındaki metil gruplarının sayısı ve pozisyonuna göre α , β , γ ve δ tokoferoller olarak adlandırılır.



Şekil 1.7. Tokoferolün kimyasal yapısı

Tablo 1.4. Tokoferolün süstitüentleri

	R₁	R₂	R₃
α	CH ₃	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H	CH ₃
γ	H	CH ₃	CH ₃
δ	H	H	CH ₃

Tokoferollerin vitamin E aktivitesini $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ -tokoferol şeklinde sıralamak mümkündür. Tokotrienollerin E vitamini aktivitesi ise tokoferollere kıyasla daha azdır (Shaidi 2000). Konsantrasyona bağlı olarak bu sıralamalar değişebilmektedir. Hatta α -tokoferol yüksek konsantrasyonlarda prooksidan etki göstermektedir. Tokotrienoller düşük E vitamini aktivitesi göstermelerine karşın yüksek oranda antioksidatif etki göstermektedir ve tokoferollere kıyasla antioksidan aktiviteleri daha yüksektir. Örneğin α -tokotrienolün antioksidan aktivitesi α -tokoferole kıyasla 6,5-60 kat daha fazladır.

Tokoferoller ve askorbik asit arasında bir sinerjizm vardır. Askorbik asit α -tokoferolü rejenere ederek tokoferolün antioksidan etkisini arttırmaktadır. Bunun yanısıra tokoferoller ve fosfolipitler arasında da güçlü bir sinerjizm mevcuttur. Fosfolipitler, tokoferollerin parçalanmasını önlemek suretiyle antioksidan etkilerini arttırmaktadırlar (Shaidi 2000).

E vitamini, hücre membran fosfolipitlerindeki, poliansatüre yağ asitlerini (pufa) serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur (Ünlü 2001). Bir molekül α -tokoferol 100 molekül poliansatüre yağ asidinin peroksidasyonunu engelleyebilir (Akkuş 1995).

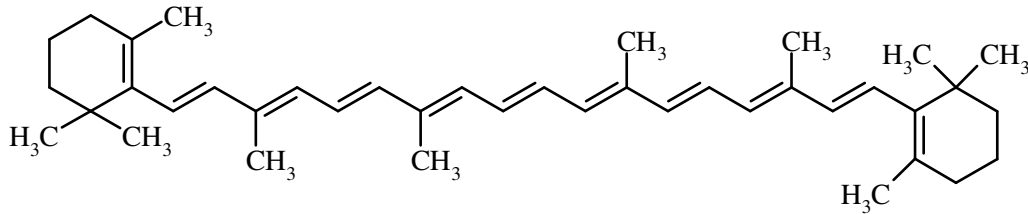
Yapısında bulunan fenolik hidroksil grubuna ait aromatik halka, vitaminin kimyasal olarak aktif kısmını oluşturur ve antioksidan özelliği bu gruptan kaynaklanır. α -Tokoferol, dokularda değişik konsantrasyonlarda bulunur. En yüksek vitamin E konsantrasyonları, mitokondri ve mikrozoamlar gibi membrandan zengin hücre fraksiyonlarında bulunur. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipid peroksi radikallerini ve diğer radikal örneklerini indirger. E vitamini dokularda en önemli zincir kırıcı antioksidandır ve lipid peroksidasyonuna karşı ilk sıradaki korunma mekanizmasıdır (Tekkes 2006).

Bugüne kadar tokoferollerin toksik açıdan sakınca yarattıkları konusunda herhangi bir kayda rastlanmamıştır. FAO/WHO Birleşik Gıda Kodeksi Gıda Katkı Maddeleri Ekspertler Komitesi, tokoferol ve preparatlar için günlük alınabilir miktarı 2 mg/kg olarak belirlemiştir (www.kimyaevi.org).

1.2.3.2. Karotenoidler

Doğada en yaygın olarak bulunan pigment maddeleri karotenoidlerdir. Karotenoidler isimlerini ilk kez izole edildikleri havucun Latince isminden (Dautus Carrota)'dan almışlardır. Günümüzde bilinen karotenoid madde sayısı yaklaşık 600 kadardır. Karotenoidler, metil grupları eklenmiş, konjuge çift bağları bulunan doymamış, alifatik zincir yapısındadır (Çalıklı 2003). Başlıca 4 gruba ayrılmaktadır;

- a) Hidrokarbon karotenoidler (karotenler): α -, β -, γ -karotenler (sarı-turuncu), likopen (kırmızı), fitofluen (renksiz) ve fitoen (renksiz) gibi $C_{40}H_{56}$ yapısındaki bileşiklerdir.
- b) Ksantofiller (Karotenlerin oksijen ve hidroksijen türevleri): Kriptoksantin $C_{40}H_{55}OH$, zeaksantin ve lutein $C_{40}H_{54}(OH)_2$ başlıca örnekleridir.
- c) Ksantofil esterleri: Ksantofillerin yağ asitleriyle yaptıkları esterlerdir.
- d) Karotenoid asitleri: Karotenlerin karboksil türevleridir.



Şekil 1.8. β -Karotenin kimyasal yapısı

Karotenoidler; bitkisel pigmentlerdir. Havuç, maydanoz, dereotu, biber, balkabağı, patates gibi daha bir çok sebze ve meyveler karotenoidler için doğal kaynaklar olup bu besinlerin ekstraktları %1-26 arasında β -karoten içerirler.

Karotenoidler ailesinin başlıca üyesi olan β -karoten, A vitaminin metabolik ön maddesidir. Suda çözünmeyen ancak yağda çözünen β -karoten, LDL yapısında yer aldığından, LDL'yi oksidasyona karşı korur. Böylece hücre membranlarının ve dokuların yıkımında başlatıcı görev alan zararlı radikalleri inaktive edebilmektedir (Ünlü 2001).

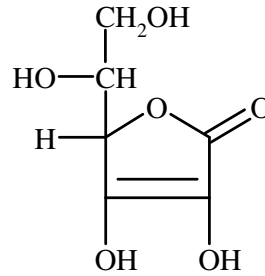
Karotenoidler ayrıca, gıda endüstrisinde sıkça kullanım alanı bulan önemli bir doğal pigment grubudur. Turuncu renkli bir lipit ve A vitaminin öncüsü olan β -karoten, eşit renklendirme sağlamak için gıda maddelerine katılır.

Karotenoid ailesinin önemli bir üyesi olan likopen, başta domates olmak üzere, kavun, karpuz, greyfurt ve portakalda diğer sebze ve meyvelere oranla fazla miktarda bulunmaktadır. Şu ana kadar domatesin içerisindeki likopen maddesiyle

ilgili olarak yapılan çalışmalar sonucu likopenin, prostat, akciğer, mide, pankreas, kolon, rektum, yemek borusu, ağız boşluğu, göğüs ve rahim kanserleriyle ilgili koruyucu etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

1.2.3.3. Askorbik Asit

C vitamini kapalı formülü $C_6H_8O_6$ olan ketolaktondur. Suda çözünen vitaminlerdendir. L-Askorbik asit yeşil sebzelerde, meyvelerde ve turunçgillerde bol miktarda bulunur. L-Askorbik asitin hastalıklara karşı organizmanın savunma mekanizmasını güçlendirdiği 1970'li yıllarda ortaya atılmıştır (Özen 2001).



Şekil 1.9. Askorbik asidin kimyasal yapısı

Askorbik asit bitkisel ve hayvansal dokularda bulunur, mikroorganizmalarda bulunmaz. İnsanlarda askorbik asit sentezlenemez, dışarıdan alınması gerekir. Bu nedenle vitamindir. C vitamininin koenzim şekli yoktur ve vitamin şekliyle etkisini gösterir, oldukça güçlü bir asittir ve güçlü bir indirgeciyidir, anyon halinde indirgenme gücü kat kat artar. Bu nedenle metabolizmada ‘ antioksidan’ olarak etkindir.

C vitamininin diğer bir özelliği, antioksidan etkisinin yanında oksidan etki de göstermesidir.. Çünkü, vitamin C ferri (Fe^{+3})’yi, ferro (Fe^{+2})’ya indirgeyen süperoksit dışındaki tek sellüler ajandır. Bu yolla askorbat proteine bağlı ferriyi uzaklaştırarak ya da doğrudan ferriyi indirgeyerek Fenton reaksiyonunda H_2O_2 ile etkileşmeye uygun olan ferröz’e dönüştürür. Yani süperoksit üretimine katkıda

bulunur. Bu özelliğinden dolayı C vitamini serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalisti veya pro-oksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu özelliği düşük konsantrasyonlarda görülmektedir, yüksek konsantrasyonlarda ise antioksidan özelliği göstermektedir.

Askorbik asit, beyaz veya hafif sarı renkte, kokusuz kristalimsi yapıda bir maddedir. Erime noktası 190°C civarında olan askorbik asit, suda tamamen çözülürken, etanolde biraz, dietil eter çözeltisi içinde ise hiç çözünmemektedir. Askorbik asit, özellikle konserve veya şişelenmiş ürünler gibi tepe boşluğu olan gıdalarda oksijen tutucu olarak kullanılmaktadır. 1 cm tepe boşluğunda bulunan oksijeni tutabilmek için yaklaşık olarak 3,5 mg askorbik asit kullanılması gerekmektedir. Havadan veya gıdadan oksijenin uzaklaştırılması sırasında askorbik asit, dehidroaskorbik asit formuna dönüşmekte ve böylece antioksidatif etkisini göstermektedir (www.kimyaevi.org).

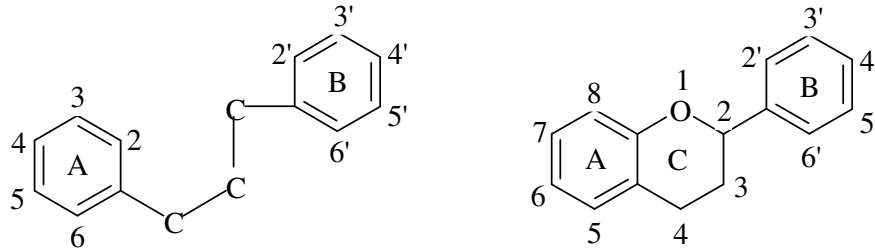
C vitamininin vücuttaki en önemli görevi protein kolajen sentezidir. Aynı zamanda bu diş, kemik, kıkırdak, derideki fiberlerin oluşumunu sağlar. Eksikliği ikincil enfeksiyonlar, deri kuruması, diş dökülmesi, kanama, kramplar, kas yorgunluğu gibi pek çok sayıda soruna neden olur.

Ayrıca vitamin C, lipid peroksidasyonunun inhibisyonu esnasında tokoferol radikalının α -tokoferole dönüşmesine yardım eder, doğrudan doğruya karsinojen oluşumunu baskılar ve bağışıklık yeterliliğini artırır (Eryılmaz 2001).

1.2.3.4. Flavonoidler

Temel polifenol sınıflarından biri olan flavonoidler, en önemli antioksidan özelliğe sahip grup olmakla beraber insanlar için mutlak gerekli besinler arasındadır. Flavonoidler kendi içinde 13 alt gruba ayrılırlar. Bunlar kalkonlar, dehidrokalkonlar, flavanonlar, flavanoller, auronlar, flavonlar, flavandioller, flavonoller, dehidroflavanoller, antosiyaninler, izoflavonoidler, proantosiyanidinler ve bioflavonoidlerdir.

Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 C atomu içeren difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısı oluşturur.



Şekil 1.10. Flavonoidlerin temel kimyasal yapısı

İlk olarak, 1936 yılında limon kabuklarından elde edilen flavonoidli bir preparatın P vitamini aktivitesi göstermesi, kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini azaltmada kullanılması flavonoidlere önem verilmesini sağlamıştır. Böylece, flavonoidlere olan ilgi 1940'lı yıllardan itibaren artmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Ünlü 2001).

Flavonoidlerin antioksidan olarak davranma yetenekleri, yapıları ile yakından ilişkilidir. Flavonoidlerin antioksidan potansiyelleri, hidroksil gruplarının sayısına ve dizilişine, şekilsel konjugasyonuna ve aynı zamanda elektron veren ve elektron alan grupların halkalı yapıda bulunmasına bağlıdır (Yücel 2002). Flavonoid yapısında C-4' pozisyonunda hidroksil grubunun bulunması antioksidan aktiviteyi artırırken, serbest 4'-OH grubunun metoksi grubu ile süstitüye olması aktiviteyi önemli ölçüde azaltmaktadır. B halkasındaki hidroksil konfigürasyonu serbest oksijen ve serbest nitrojen radikalleri temizleme aktivitesinde en önemli belirleyicidir. B halkasındaki hidroksil grupları, hidroksil, peroksil ve peroksinitrit radikallerine hidrojen vererek onları daha kararlı hale getirirler ve bu radikallere oranla daha kararlı flavonoid radikallerinin oluşmasını sağlarlar.

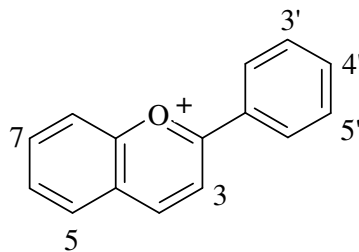
A halkasındaki substitüsyon antioksidan aktiviteye nispeten daha az etki gösterir, fakat 5-OH'ın antioksidan aktiviteye katkısı bulunmaktadır. 3-OH ve 3',4'-katekol yapısı içeren flavonoidlerin 10 kata kadar daha fazla antioksidatif etki gösterdikleri belirtilmiştir. 3-OH grubunun metil grubu ile yer değiştirmesi aktiviteyi düşürmektedir (Ulusoy 2005).

Son yıllarda flavonoidlerin endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılması için yürütülen çalışmalar hız kazanmıştır. Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri, çeşitli ürün ve maddeleri boyama özellikleri, metallerle tepkimeye girme ve tabaklama maddelerinin bileşenlerine katılmalarından dolayı, besin, tekstil, deri, metalurji, tıp, ziraat ve benzer alanlarda kullanılma olasılıklarını arttırmaktadır.

Bazı flavonoidler, UV ışınlarından koruma özelliklerine sahip olduklarından kozmetik ürünlerde, özellikle kremlerde önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar. Metal iyonları ile reaksiyon verebilme yeteneklerinden dolayı analitik amaçla, uranyum, zirkonyum, titan ve diğer metallerin tayininde önemlidirler.

Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip olan flavonoidlerin sentetik üretimi günümüzde gerçekleşmediğinden elde edilmeleri için yegane kaynak flavonoidli bitkilerdir. Bu nedenle yeni flavonoid kaynaklarının açığa çıkarılması, flavonoidlerin elde edilmesi, özelliklerinin belirlenmesi ve kullanım alanlarının genişletilmesi güncel ve önemli problemlerdendir (Ünlü 2001).

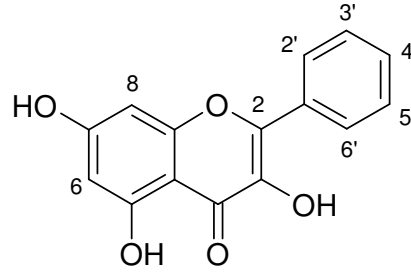
Bazı Flavonoid Yapıları (Hall C. 2001);



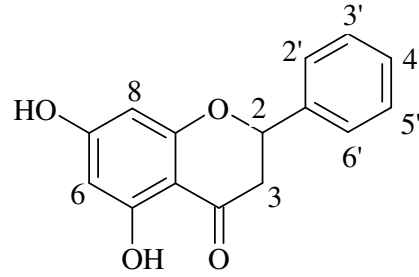
Şekil 1.11. Antosiyanidin kimyasal yapısı

Tablo 1.5. Antosiyanidinün süstitüentleri

	3	3'	4'	5'	5	7
Apigenidin	H	H	OH	H	OH	OH
Siyanidin	OH	OH	OH	H	OH	OH
Delphinidin	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Malvidin	OH	OMe	OMe	OMe	OH	OH
Pelargonidin	OH	H	OH	H	OH	OH

**Şekil 1.12.** Flavonolün kimyasal yapısı**Tablo 1.6.** Flavonolün süstitüentleri

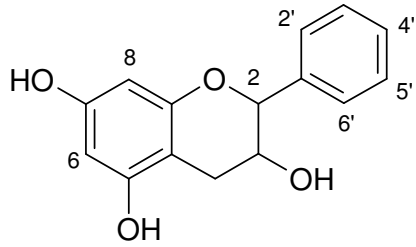
	2'	3'	4'	5'
Kuersetin	H	OH	OH	H
Mrisetin	H	OH	OH	OH
Kampferol	H	H	OH	H
Hesperidin	H	OH	OCH ₃	H



Şekil 1.13. Flavononun kimyasal yapısı

Tablo 1.7. Flavononun süstitüentleri

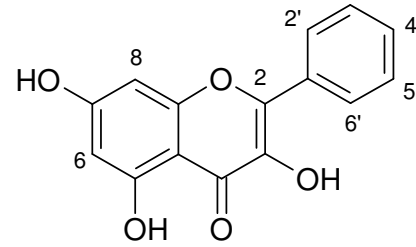
	3	3'	4'
Naringenin	H	H	OH
Naringin	ORh	H	OH
Taksifolin	OH	OH	OH



Şekil 1.14. Flavanın kimyasal yapısı

Tablo 1.8. Flavanın süstitüentleri

	3'	4'
Kateşin	OH	OH



Şekil 1.15. Flavonun kimyasal yapısı

Tablo 1.9. Flavonun süstitüentleri

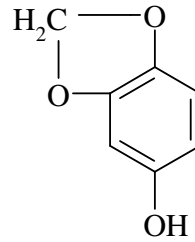
	3'	4'
Apigenin	H	OH
Luteolin	OH	OH

Bir flavonoid alt sınıfı olan antosiyaninler, suda çözünen önemli pigmentlerden olup yüksek yapılı bitkilerin çiçek ve meyve kısımlarında bulunurlar. Flavonoidlerin bir başka alt sınıfı olan kateşinler çoğunlukla yeşil çayda bulunurlar (Ulusoy 2005). Polifenoller, çaydaki bileşiklerden çok hızlı ayrılan gruplardır ve total kuru içeriği yeşil çayda %30-42, siyah çayda ise %3-10 olarak bulunmuştur. Bunlar gallik asit ve kateşin türevleridir. Çay polifenollerinin antioksidatif etkisi sırasıyla epigallokateşingallat(EGCG), epigallokateşin(EGC), epikateşingallat(EGC) ve epikateşin(EC) olarak gösterilebilir.

1.2.4. Antioksidan Özelliği Araştırılan Bazı Maddeler

1.2.4.1. Sesamol

Birçok çeşidi olan susam bitkisinin tohumlarından elde edilen yağlar, yapılarında bulunan tokoferol miktarına göre önemli düzeyde antioksidan etki göstermektedir.

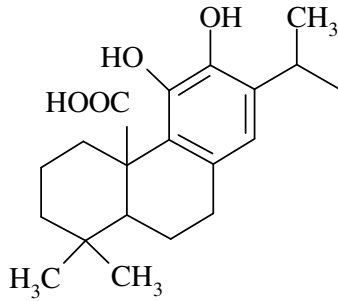


Şekil 1.16. Sesamolün kimyasal yapısı

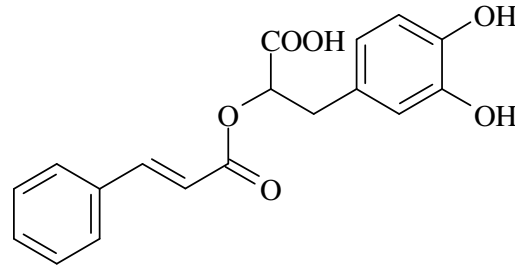
Fenolik tip bir antioksidan olan sesamol, aktif bir ajan olarak bilinmektedir. Susam yağının kullanımına bazı ürünlerde izin verilirken, bazı ürünlerde kullanımı ise hileli bir durum olarak kabul edilmektedir. Sentetik sesamol, antioksidan ve insektisit olarak kullanılabilir.

1.2.4.2. Biberiye

Birçok baharat ekstraktının değişik oranlarda antioksidatif etkileri olduğu bilinmektedir. Bu baharatlar arasında en fazla aktiviteye sahip olanlar biberiye ve adaçayıdır. Aşağıdaki şekilde biberiyeden elde edilen iki farklı fenolik maddenin kimyasal yapıları görülmektedir.



Karnosik Asit



Rozmarinik Asit

Şekil 1.17. Biberiye ekstraktlarının kimyasal yapısı

Yapılan çalışmalarda biberiye ekstraktlarının soya fasülyesi yağında peroksit oluşum hızını yavaşlattığı ve lezzet stabilitesini arttırdığı belirtilmektedir. Biberiye ekstraktının BHA ve BHT'ye göre daha az uçucu olduğu ve yüksek sıcaklıklarda bozulmaya dayanıklılığı fazla olduğu için kızartmalık yağlarda da kullanılabilirdiği ifade edilmektedir (Altuğ 2001).

1.2.5. Antioksidanların Gıdalarda Kullanım Alanları

- Eritilmiş Hayvansal Yağlar
- Bitkisel Yağlar
- Yüksek Oranda Katı Yağ İçeren Yağlar
- Düşük Oranda Katı Yağ İçeren Gıda Ürünleri
- Şekerlemeler
- Et Ürünleri
- Balık ve Balık Ürünleri
- Esansiyel Yağlar
- Kızartma İşlemlerinin Uygulandığı Gıdalar
- Fırında Pişirme İşleminin Uygulandığı Gıdalar
- Hububatlar
- Ham Bitkisel Yağlar
- Gıda Ambalajları

1.2.6. Antioksidanlar ile İlgili Yasal Düzenlemeler

Aşağıdaki tabloda, Uluslararası Gıda Kodeks Komisyonu (CAC, 1992) tarafından antioksidan olarak sınıflandırılmış maddelerden, CAC(1997), EC(1995) ve Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY, 1997)' ne göre kullanımına izin verilenler görülmektedir.

Tablo 1.10. CAC, EC, TGKY' ne göre gıdalarda kullanımına izin verilen antioksidanlar (Altuğ 2001).

Antioksidanlar	CAC	EC	TGKY
Kükürt dioksit	+	+	+
Sodyum sülfat	+	+	+
Sodyum hidrojen sülfat	+	+	+
Askorbik asit	+	+	+
Sodyum askorbat	+	+	+
Kalsiyum askorbat	+	+	+
Potasyum askorbat	+		
Askorbil palmitat	+	+	+
Askorbil stearat	+	+	+
Tokoferol ekstraktları	+	+	+
α - β - γ -Tokoferol	+	+	+
Propil gallat	+	+	+
Oktil gallat	+	+	+
Dodesil gallat	+	+	+
Eritorbik asit	+	+	+
Sodyum eritorbat	+	+	+
THBQ	+		
BHA	+	+	+
BHT	+	+	+
Glukoz oksidaz	+		

1.2.7. Üzüm, Üzüm Çekirdeği ve Proantosiyanidinler

Üzüm, çeşitli değerlendirme yöntemlerinin oluşu, iklim ve toprak yönünden çok seçici olmayışı, çok yıllık olması ve çoğalma yöntemlerinin kolay oluşu gibi nedenlerle dünyada en yaygın yetiştiriciliği yapılan bitkilerden biridir. Dünyada bağcılık, genel olarak Kuzey Yarımkürede 20°-50°, Güney Yarımkürede ise 20°- 40° enlemleri arasında yapılmaktadır. Sıcaklık, bağcılığın kuzeye doğru yayılmasını engelleyen en önemli faktördür.

Bağcılık için yerkürenin en elverişli iklim kuşağı üzerinde bulunan ülkemiz, asmanın gen merkezi olmasının yanısıra son derece eski ve köklü bir bağcılık kültürüne sahiptir. Anadolu'da yapılan arkeolojik kazılardan, bağcılık kültürünün M.Ö. 3500 yılına kadar dayandığı saptanmıştır. Anadolu'da yetiştirilen üzümlerin çoğu kuru ve yaş olarak tüketilmekle birlikte bir kısmı da şarap, pekmez, bulama, pestil, lokum v.s. olarak değerlendirilmektedir.

Dünya üzüm üretimin yarısından fazlası Avrupa Kıtasında gerçekleştirilmektedir. Dünya yaş üzüm üretiminde İtalya, Fransa, ABD, İspanya, Türkiye, başlıca ülkelerdir. 2002 yılı verilerine göre dünyada 7,4 milyon hektar alanda 61 milyon ton üzüm üretilmektedir. Dünya üzüm üretiminde %24 ile İtalya ilk sırada, Türkiye ise %12 ile 5. sırada yer almaktadır.

Ülkemiz 2001 yılında 525 bin hektar bağ alanı ile dünyanın belli başlı üretici ülkeleri arasında yer almaktadır. Yaş üzüm üretimimiz her yıl ortalama yaklaşık 3,5 milyon ton civarındadır. Ülkemizde üretilen üzümlerin yaklaşık %30'u taze sofralık, %37'si kurutmalık, %30'u pekmez, pestil, sucuk, şıra ve %3 kadarı da şaraplık olarak değerlendirilmektedir. 2001 yılı verilerine göre, 3.250.000 ton toplam üzüm üretiminin yaklaşık olarak %63'ü (2.050 bin ton) çekirdekli, %27'si (1.200 bin ton) çekirdeksiz üzümden oluşmaktadır (TEAE-Bakış 2003).

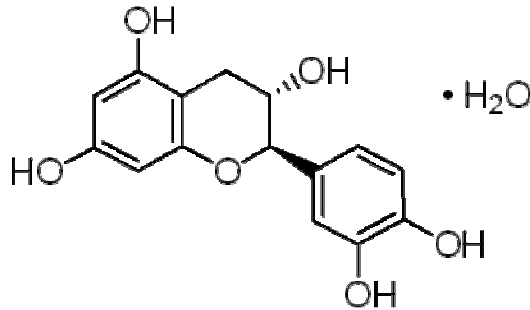
Her geçen gün popüleritesi artmakta olan üzüm çekirdeği, insanların bu konuda daha da bilinçlenmesi ve modern şartlarda hazırlanmış ticari ürünlerin piyasaya girmesi sebebiyle, günümüzün önemli diyet katkı maddelerinden biri haline gelmiştir.

Üzüm çekirdeği birçok polifenol yapıyı ihtiva etmekte olup bunlardan en önemli ve hakkında en çok araştırma yapılanı proantosiyanidinlerdir. Proantosiyanidinler kondanse taninler olarak da bilinen polimerik bileşiklerdir (Peterlongo 2000). Oligomerik proantosiyanidinler 1980'li yıllarda önem kazanmıştır. 1951 yılında bir Fransız araştırmacı, ilk kez çam kabuğundan ekstrakte etmiş ve vitamin C ile birçok biyokimyasal ve fizyolojik etki gösterdiğini bulmuştur.

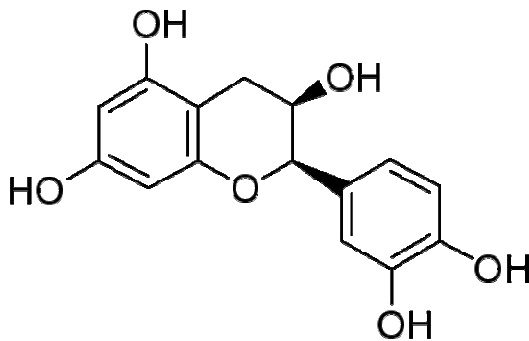
Bilim adamları üzüm çekirdeği ekstresi ile 20 YY'ın sonlarına doğru ciddi manada ilgilenmeye başladılar ve bu araştırmalar “French Paradox” hakkındaki araştırmaların daha çabuk büyümesini ve gelişmesini sağladı.

Proantosiyandinler, polimerik flavan-3-ol' lerdir ve temel yapının C-C ve bazen de C-O-C bağlarıyla bağlanması sonucu oluşurlar. Flavan-3-ol yapısı, C₆-C₃-C₆ flavonoid iskeletine sahiptir. Yiyeceklerdeki proantosiyandinler çoğunlukla B halkasında 3',4' dihidroksi süstitüsüyonu ile prosiyanidin ve 3',4',5' trihidroksi süstitüsüyonu ile prodelfinidin olarak bulunur (Altıok 2003).

Proantosiyandinler (+)-kateşin, (-)-epikateşin ve bunların gallatlarından oluşan, oligomerik ve polimerik flavan-3-ol üniteleridir (Plumb 1998).



Şekil 1.18. (+)-Kateşinin kimyasal yapısı



Şekil 1.19. (-)-Epikateşinin kimyasal yapısı

Yağların peroksidasyonunun inhibe edilme potansiyeli moleküllerin polimerizasyon düzeyine bağlı olarak artmaktadır. Daha fazla kateşin ve epikateşin ünitesine sahip olan proantosiyanidinler daha potansiyel inhibitörlerdir. Ayrıca yapıda bulunan gallat grubu da lipid peroksidasyonu üzerindeki inhibe edici etkinliği arttırmaktadır. 3-hidroksi pozisyonundan gallat grup bağlanmış olan prosiyanidin dimeri çok daha yüksek inhibitör etkinlik göstermektedir (Zhao 1999). Proantosiyanidinlerin, C vitamini ve vitamin E süksinata göre daha güçlü antioksidan etkinliğe sahip olduğu bulunmuştur (solgar.com.tr).

Proantosiyanidinler, fizyolojik aktivite çeşitliliğine sahip olan fonksiyonel gıda bileşenleridir. Bunlar antioksidan, antimikrobiyal, antialerjik ve saç büyümesine yardımcı etkiler gösterirler (Joshi 2000).

Proantosiyanidinler bitki aleminde geniş bir alana yayılmışlardır ve kakao, kahve, elma, ham badem ve yaban mersini, ahududu, çilek gibi yumuşak meyvelerde bulunurlar. Proantosiyanidinlerin kaynağının diğer bir kolunu da, meşe ağacı kabuğu, çam ağacı kabuğu ve üzüm çekirdekleri oluşturur (Altıok 2003).

Üzüm çekirdeğinden elde edilen proantosiyanidinler, kapiler duvarını stabilize eder ve geçirgenlikteki (permeabilite) artıştan koruyarak, ödem oluşumunu baskılar (Robert 1990). Prosiyanidolik oligomerler kolajen liflerinin çapraz bağlanmasını sağlayarak, damar bağ dokusundaki kolajen oluşumunu destekler. Proantosiyanidinlerin kemoprotektif özellikleri, serbest radikaller ve oksidatif hasara karşı aktivitelerinden kaynaklanır (Ye 1999). Bileşiğin güçlü antioksidan etkinliğinden kaynaklanan anti-tümör destekleyici etkisi kantlanmıştır (Zhao 1999).

Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL), serbest radikaller tarafından oksitlenmesi ateroskleroz başlangıcı ile ilişkilendirilir. Proantosiyanidinler, aterosklerotik lezyonlardaki LDL-pozitif hücrelerin sayısını azaltmaktadır. Ayrıca, LDL'deki kolesterol linoleatın oksidasyonunu baskılayarak aorttaki ateroskleroza azaltmayı sağlar (Robert 1990).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Akkuş İ. (1995), “Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri” isimli kitabında; serbest radikaller, oluşumları, reaksiyonları ve fizyolojik etkileri hakkında geniş bilgiye yer vermiştir.

Pirniyazov A.Zh. (2003), “Polyphenols from vitis vinifera seeds” isimli çalışmasında, üzüm çekirdeklerinden izole ettiği polifenollerin kimyasal kompozisyonunu incelemiştir. Polifenolik yapıda, 4 farklı kateşin ve 2 farklı proantosiyanidin yapısı belirlemiştir.

Yamakoshi J. (2002), “Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grapeseeds” isimli çalışmasında, üzüm çekirdeklerinden proantosiyanidinleri ekstrakte etmiş ve bir dizi toksisite testine tabi tutmuştur.

Ulusoy E. (2005), “Türkiyenin bazı yörelerinden kestane ve çiçek ballarının antioksidan aktiviteleri ve mineral içeriklerinin karşılaştırılması” isimli çalışmasında, birçok farklı bal numunesinin antioksidan aktiviteleri üzerinde çalışmıştır ve DPPH radikali temizleme aktivitesi, toplam fenolik madde miktarı gibi parametreler hakkında bilgi vermiştir.

Clifford M.N. (1997), “Isolation, characterisation and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins” isimli çalışmasında, kahveden izole ettiği proantosiyanidinleri, kolon kromatografisi ile saflaştırdıktan sonra IR spektroskopisi ve ¹³C-NMR spektroskopisi ile karakterize etmiştir.

Altıok E. (2003), “Production of proanthocyanidins from grape seeds” isimli çalışmasında, değişik çözücüler ve çözücü karışımları kullanarak, üzüm çekirdeklerinden proantosiyanidinleri ekstrakte etmiş ve değişik metotlar kullanarak saflaştırmıştır. HPLC ile ekstraktın bileşenlerini incelemiş ve ticari ürünlerle karşılaştırmıştır.

Levy M.C. (1998), “Proanthocyanidin microcapsules: preparation, properties and free radical scavenging activity” isimli çalışmasında, kapsüllenmiş proantosiyanidinlerin değişik sıcaklık ve pH'lardaki stabilitelerine, DPPH radikali ve OH radikali temizleme aktivitelerine bakmış ve IR spektrumlarını almıştır.

Li W. (2002), “Determination of catechins in commercial grape seed extract” isimli çalışmasında, HPLC-UV metodunu kullanarak üzüm çekirdeği ekstraktındaki (+)-kateşin, (-)-epikateşin ve (-)-epikateşin gallat miktarlarını belirlemiştir. İzolasyon, saflaştırma ve karakterizasyon işlemleri için, HPLC, MS ve NMR kullanmıştır.

Jayaprakasha G.K. (2001), “Antioxidant activity of grape seed (vitis vinifera) extracts on peroxidation models in vitro” isimli çalışmasında üzüm çekirdeklerinden antioksidanları, aseton, etil asetat, metanol ve farklı çözücülerin karışımını kullanarak ekstrakte etmiş ve antioksidan aktivitelerini β -karoten-linoleat model metodunu kullanarak değerlendirmiştir.

Bakkalbaşı E. (2005), “Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivars grown in Turkey” isimli çalışmasında, Türkiye’de yetişen 12 farklı üzüm çekirdeği üzerinde çalışmıştır. Üzüm çekirdeği ekstraktlarında, HPLC ve spektrofotometrik metotla gallik asit, kateşin, epikateşin ve toplam flavan-3-ol miktarlarını belirlemiştir.

Gabetta B. (2000), “Characterization of proanthocyanidins from grape seeds” isimli çalışmasında, ticari üzüm çekirdeği proantosiyanidinlerini analiz etmiştir. HPLC-TSP-MS ile monomerik flavan-3-ol’ler ile dimerik proantosiyanidinleri ayırmıştır.

Pekic B. (1998), “Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds” isimli çalışmasında, proantosiyanidinleri etil asetat-su sisteminde çalışmış ve ekstraktı HPLC sistemi ile değerlendirmiştir.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Numune

Deneyleerde ekstraksiyon amacıyla kullanılan üzümleer ve üzüm çekirdekleri, Konya Hadim ilçesi, Keçimen beldesinde yetişmiş olup, piyasada Keçimen üzümü adıyla satılmaktadır.

3.2. Kullanılan Cihazlar ve Kimyasal Maddeler

Çalışmalarda kullanılan cihaz ve kimyasalların bir kısmı 06201055 no'lu Selçuk Üniversitesi BAP tez projesinden karşılanmıştır. Deneyleer S.Ü. Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü araştırma laboratuvarlarında ve S.Ü. Eğitim Fakültesi Kimya Bölümü laboratuvarlarında yapılmıştır.

Cihaz Adı

- Uv-Vis Spektrofotometre (Shimadzu)
- IR Spektrofotometre (Perkin Elmer 1600)
- HPLC (Agilent 1100 series)
- Rotary Evaporatör (Heidolph)
- Etüv (Binder)
- Santrifüj (Nüve)
- Hassas Terazı (Precisa)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph mr3001)
- Vakum Pompası (KIFLAB)
- Su Banyosu (Nüve)
- Vorteks (Heidolph)

Kimyasal Maddeler

Folin-Ciocalteu (Sigma- Aldrich)	Etanol (Merck)
Troloks (Sigma-Aldrich)	Etil Asetat (Merck)
DPPH (Sigma- Aldrich)	Toluen (Merck)
Gallik asit (Sigma- Aldrich)	Benzen (Merck)
Metanol (Merck)	Asetik Asit (Merck)
Kloroform (Merck)	Aseton (Merck)

3.3. Deneysel Kısım

3.3.1. Üzüm Meyvesi ve Çekirdeklerinin Ekstraksiyonu

Üzümlerin meyvesi ve çekirdekleri birbirinden ayrıldıktan sonra toz ve partiküllerden arındırmak amacıyla saf soğuk su ile yıkandı ve açık havada üzeri kapalı vaziyette 24 saat boyunca kurutuldu ve ekstraksiyona hazır hale getirildi.

Üzüm çekirdeklerinden proantosiyanidin Pekic (1997)'in tanımladığı metot esas alınarak ekstrakte edilmiştir. Üzüm çekirdekleri öğütülmeden ekstrakte edilmiştir. Öğütülmüş üzüm çekirdekleri daha kısa ekstraksiyon zamanı sağlamasına rağmen, proantosiyanidin veriminde bir artış sağlamamaktadır. Ayrıca öğütülmüş üzüm çekirdekleri, ekstraksiyon sonucu birçok istenmeyen kontamine bileşik ve safsızlığın ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Bu bilgiler sonucunda ekstraksiyon, bütün ve kırılmamış üzüm çekirdekleri kullanılarak yapıldı.

Ekstraksiyon için hazır hale getirilen üzüm çekirdeklerinden 10 g tartıldı ve bir erlene aktarıldı. Daha sonra bir mezürde hazırlanmış ekstraksiyon çözücüsü (aseton-su, 3:7) ilave edildi. Elde edilen karışım bir manyetik karıştırıcı ile 45°C ve 700 rpm'de 24 saat ekstrakte edildi. Daha sonra elde edilen sulu ekstrakt bir süzgeç kağıdı yardımı ile çekirdeklerinden ayrıldı. Kolloidal halde bulunan istenmeyen safsızlıklardan kurtulmak amacıyla bir santrifüj cihazında 2000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra tüplerdeki kahverengi berrak çözelti, çözücüsünün uçurulması amacıyla, dekante edilerek evaporatör balonuna aktarıldı. Evaporatörde 45°C ve 200

rpm’de vakum altında 30 dk muamele edilmek suretiyle çözücünün büyük bir kısmı uçuruldu. Aynı prosedür üzümün meyve kısmına uygulandı.

Ekstraksiyon sonucunda en yüksek verim, aseton-su (3:7) karışımı ile elde edildi. Bunun yanısıra, aseton, etil asetat, etanol, metanol çözücüleri ve bu çözücülerin değişik oranlardaki sulu karışımları da kullanıldı.

3.3.2. Nem Tayini

2,00 g üzüm çekirdeği ve 10,00 g kuru üzüm meyvesi, hassas terazide tartıldı ve etüvde 105°C’da 1 saat kurutuldu. Desikatöre alınan numuneler tekrar tartıldı ve aşağıdaki şekilde % nem miktarları hesaplandı.

$$\% \text{ Nem} = [(\text{ilk tartım} - \text{son tartım}) / \text{ilk tartım}] \times 100$$

3.3.3. Ekstraksiyon Verimi

Ekstraksiyon için, yukarıda da belirtildiği gibi değişik çözücüler ve çözücü karışımları kullanıldı. Ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen ekstrakt verimi, kuru madde üzerinden hesaplanmak suretiyle, ekstraksiyon çözücüleri arasında kıyaslama yapıldı.

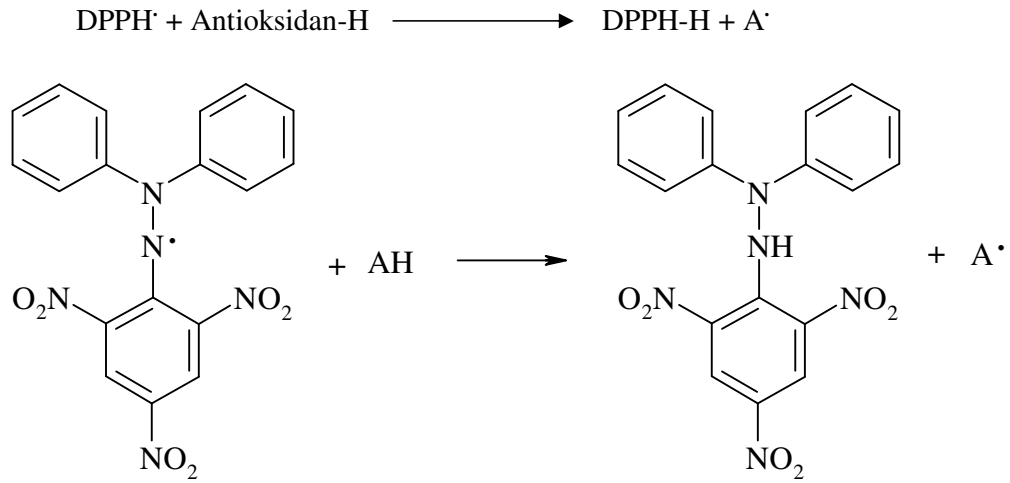
$$\% \text{ Verim} = [\text{g ekstrakt} / (\text{g numune} \times \% \text{ kuru madde})] \times 100$$

3.3.4. Ekstrelerin FTIR Analizi

IR spektroskopisi yöntemi, temel yapıların karşılaştırılması amacıyla sık kullanılan yöntemlerden bir tanesidir. Bu bölümde, polifenolik yapılar içeren üzüm çekirdeği, üzüm meyvesi ekstresi, ticari proantosiyanidin numunesi ve kateşin, KBr ile disk haline getirildi ve IR spektrumları elde edildi. Elde edilen IR spektrumları birbirleri ve de literatürlerdeki (Ramos-Tejada 2002) ile karşılaştırıldı.

3.3.5. DPPH Serbest Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

Ticari bakımdan temin edilebilen ve kararlı bir organik azot radikal bileşiği olan 2,2-difenilpikrilhidrazil radikali(DPPH), tekli bileşenler, bitki özütleri ve yiyecek maddeleri antioksidan aktivitelerinin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yöntem, DPPH'in metanolde hazırlanan çözeltilerinin bir hidrojen verici antioksidan madde varlığında radikal olmayan DPPH-H'a dönüşümünün spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. DPPH'in 517 nm'deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmaya orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel veya nicel olarak belirlenir (Kartal 2003). Tepkime mekanizması aşağıdaki şekilde gösterilebilir;



Şekil 3.1. DPPH serbest radikalinin kimyasal yapısı

Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalının rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal temizleme aktivitesi olarak gösterilir. Yöntem hızlıdır, 30 dakikalık analiz süresi ve insan gücü açısından kolaydır, ayrıca çok özel cihaz ve reaktifler gerektirmediğinden dolayı da tercih edilir. DPPH'nin serbest radikal olması, havadan, ısı ve ışıktan kolayca etkilenebilmesi nedeniyle analizlerin oldukça seri ve en az 3 kez tekrarlanması gerekmektedir. Tekrarlanan denemelerin ortalamaları alınmak suretiyle sonuçlar elde edilir.

%70 metanol içerisinde hazırlanmış örnek çözeltisi (reaksiyon ortamındaki örnek konsantrasyonu 4×10^{-3} mg/mL) üzerine DPPH (2×10^{-2} g/L) çözeltisi ilave edilerek vortekste karıştırıldı ve karanlıkta, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen çözeltilerin 517 nm'de absorbans değerleri okundu. 4.0×10^{-3} ve 2.0×10^{-2} g/L konsantrasyon aralığında DPPH standartı kullanılarak hazırlanmış olan aşağıdaki kalibrasyon grafiği ve denklemi kullanılarak reaksiyon ortamındaki DPPH konsantrasyonu (g/L) hesaplanmıştır.

$$A_{517\text{nm}} = 11,811(\text{DPPH})_t + 4,2 \times 10^{-3} \quad (r= 0,999)$$

30 dakika sonucunda reaksiyon ortamında kalan DPPH miktarı ise aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Öztürk 2002).

$$\% \text{DPPH}_{\text{süpürülen}} = [(\text{DPPH}_{t=0} - \text{DPPH}_{t=30}) / \text{DPPH}_{t=0}] \times 100$$

3.3.6. Toplam Fenolik Madde Miktarı Tayini (Folin-Ciocalteu Metodu)

Metot, suda ve diğer organik çözücülerde çözülmüş olan fenolik bileşiklerin folin reaktifi ile alkali ortamda renkli kompleks oluşturması esasına dayanır. Oluşan mor menekşe renkli kompleks 750 nm'de maksimum absorbans oluşturur. Sonuçların karşılaştırılması amacıyla standart fenolik bileşik olarak gallik asit kullanıldı.

Ekstreler içindeki toplam fenol miktarları Folin-Ciocalteu Metodu kullanılarak kolorimetrik olarak tayin edildi. Bütün örnekler ve standart olarak kullanılan gallik asit, %50'lik metanolde çözüldü. 0,5 mL örnek, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reaktifi (hacimce %10'luk, suda) ve 7,5 mL sodyum karbonat çözeltisi (%20'lik, a/h, suda) deney tüpünde karıştırılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletildi. Çözeltilerin absorbans değerleri 750 nm'de spektrofotometrede okunmuş, toplam fenol miktarı gram ekstrede mg gallik asite eşdeğer olacak şekilde hesaplandı (Öztürk 2002).

3.3.7. HPLC Analizleri

Kromatografi, kimyasal karışımları birbirinden ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Kromatografik ayırmada, maddeler birbiri ile karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Fazlardan biri hareketli diğeri ise sabit fazdır. Kromatografi, doğal bileşiklerin kimyasal uygulamalarında farklı yapıların karakterizasyonu için vazgeçilmez yöntemdir. Fakat, kolon seçimi, çözücü sistemi belirlenmesi ve uygulama şartları dikkat edilmesi gereken en önemli hususlardır.

Üzüm çekirdeği ekstresi ve üzüm meyvesi içerisinde bulunan polimerik proantosiyanidinlerin tespiti ve karşılaştırılması için HPLC yöntemi uygulandı. Agilent 1100 marka sıvı kromatografi sistemi kullanılarak, 70'er dakikalık gradient çalışma uygulandı.

Tablo 3.1. HPLC uygulama şartları

Kolon	Waters C18
Kolon boyu	150 mm
Kolon yıkama çözültisi	Asetik asit/su (1:99)
Akış hızı	0,7 mL
Sıcaklık	40°C
Dedektör	Photo Diode Array
Mobil faz	A: asetik asit/metanol (1:99) B: asetik asit/su (1:99)

Gradient program;

0-15 dk %16 / %84 (A/B)

15-50 dk %25 / %75 (A/B)

50-70 dk %80 / %20 (A/B)

4. SONUÇLAR VE DEĞERLENDİRME

4.1. Nem Tayini

$$\%Nem = [(ilk\ tartım - son\ tartım) / ilk\ tartım] \times 100$$

Cekirdek

İlk Tartım : 2,00 g
 Son Tartım : 1,83 g
 % Nem : %8,5

Üzüm

İlk Tartım : 10,00 g
 Son Tartım : 8,85 g
 %Nem : %11,5

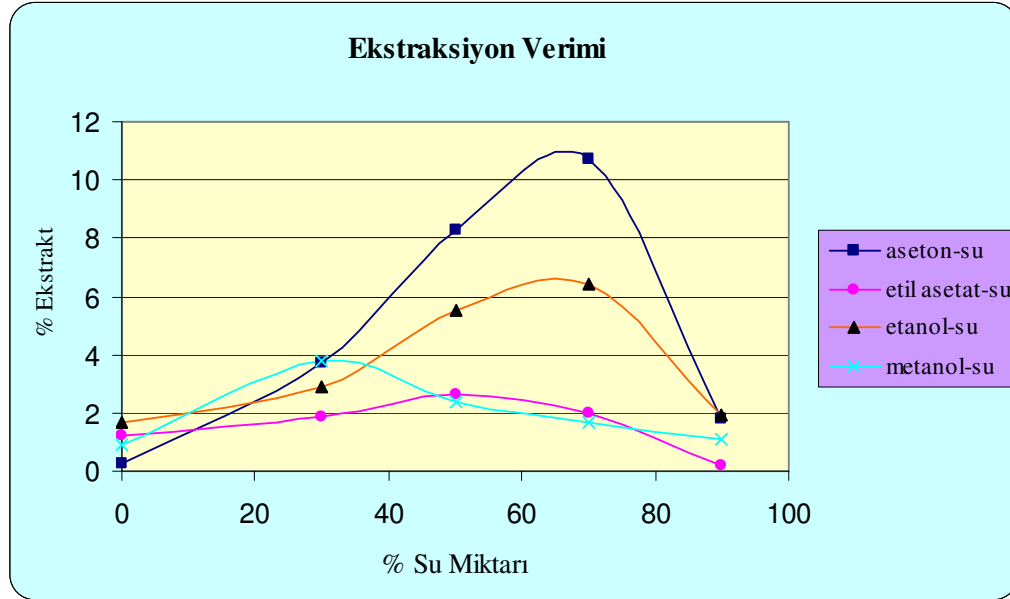
4.2. Ekstraksiyon Verimi

4 farklı organik çözücü ve bu çözücülerin değişik oranlardaki sulu karışımları ile yapılan ekstraksiyonlar sonucu elde edilen ekstrakt verimleri aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Ekstraksiyon çözücüleri ve ekstraksiyon verimleri

Organik Çözücüler	Aseton (% verim)	Etil Asetat (% verim)	Etanol (% verim)	Metanol (% verim)
% 100	0,25	1,20	1,65	0,90
% 70	3,70	1,85	2,90	3,80
% 50	8,30	2,60	5,50	2,40
% 30	10,70	2,00	6,40	1,70
% 10	1,80	0,20	1,90	1,10

%70 sulu asetonla yapılan ekstraksiyon işlemleri sonucu 10 g üzüm çekirdeği için ortalama 0,98 g ekstrakt elde edilmiştir. % 8,5'luk nem hesaba katıldığı zaman, ekstraksiyon verimi kuru madde üzerinden % 10,70 olarak bulunmuştur.



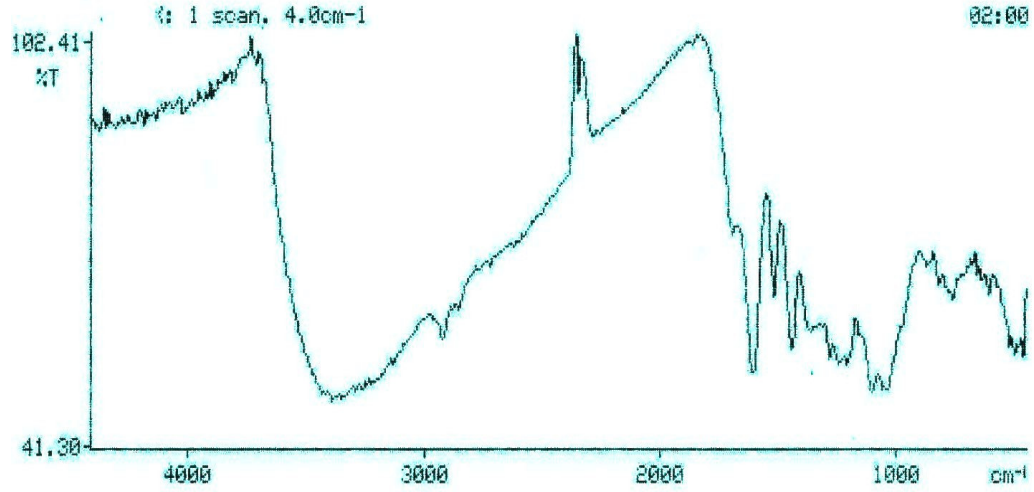
Şekil 4.1. Kuru madde üzerinden ekstraksiyon verim grafiği

Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurulduğunda, en yüksek verimin %10,7 olarak, aseton-su (3:7) çözücü karışımı ile elde edildiği görülmektedir.

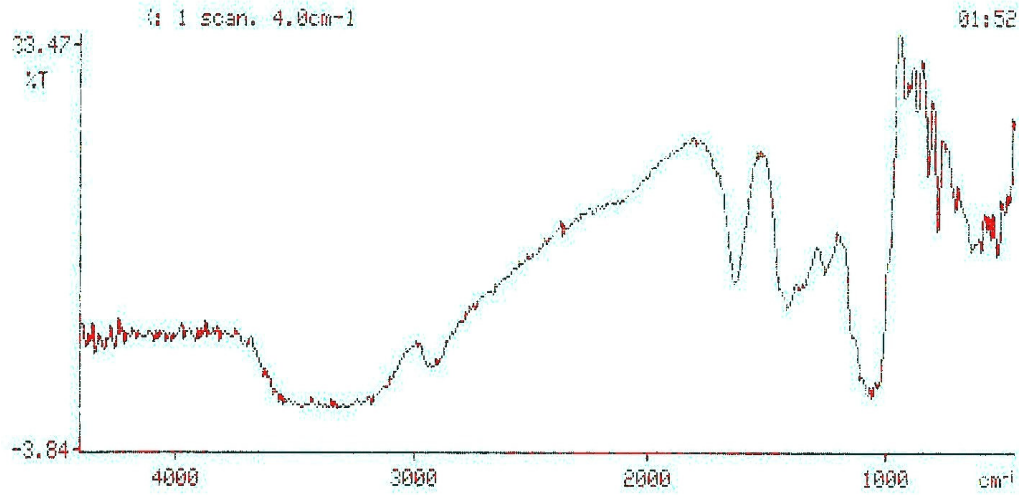
Bunun yanısıra, %70 sulu etanol ile %6,4 ve %30 sulu metanol ile %3,8 verim sağlanmıştır. Fakat aseton-su karışımına göre verim oldukça düşük kalmaktadır. Buna göre üzüm çekirdeklerinden proantosiyamidlerin ekstraksiyonu için aseton-su (3:7) karışımının en iyi çözücü olduğu söylenebilir.

Yapılan denemeler sonucu, sadece organik çözücüler veya suyun, tek başlarına iyi bir ekstraksiyon sağlamadığı, fakat su karışıklı organik çözücülerin daha iyi ekstraksiyon gerçekleştirdiği görülmektedir.

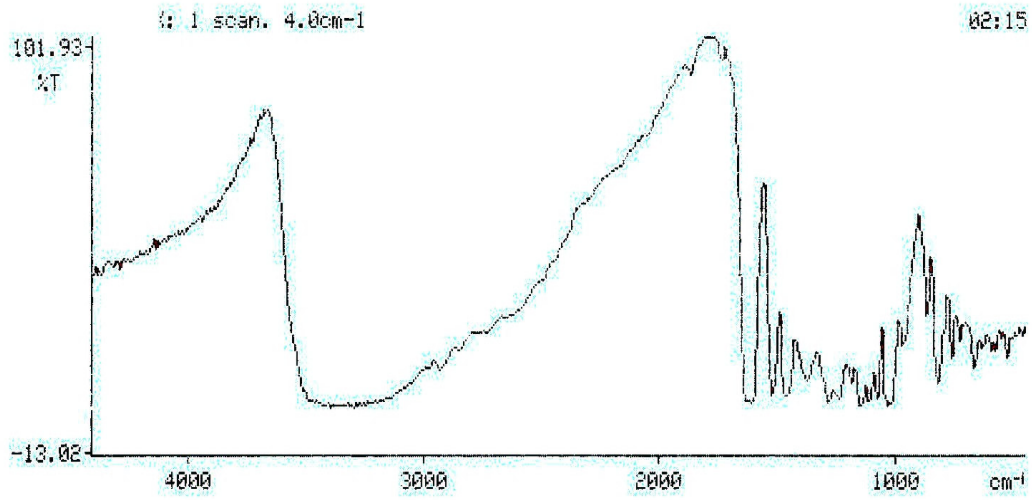
4.3. FTIR Spektroskopisi



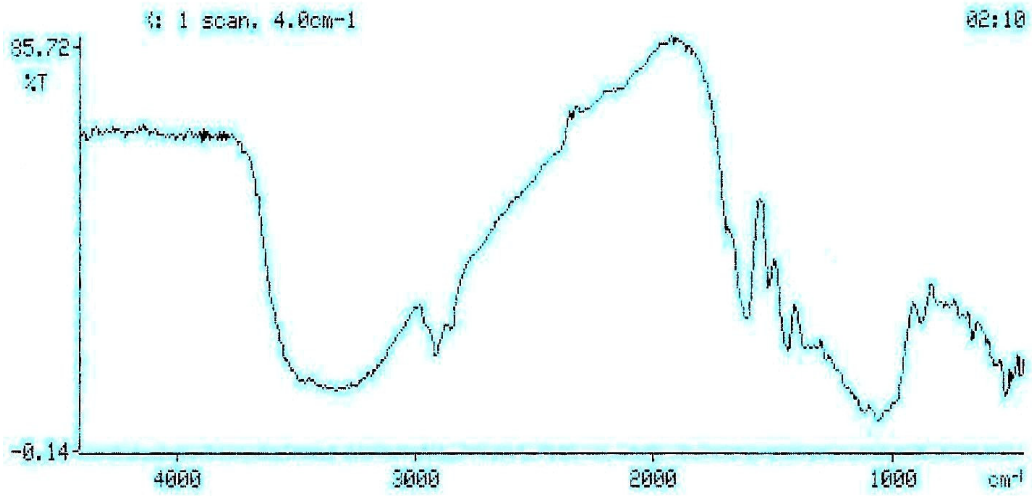
Şekil 4.2. Üzüm çekirdeği ekstraktının IR spekturumu



Şekil 4.3. Üzüm meyvesi ekstraktının IR spekturumu



Şekil 4.4. (+)-Katesinin IR spekturumu



Şekil 4.5. Ticari proantosiyanidinin IR spekturumu

Tablo 4.2. IR spektrumlarında cihazdan okunan dalga sayıları

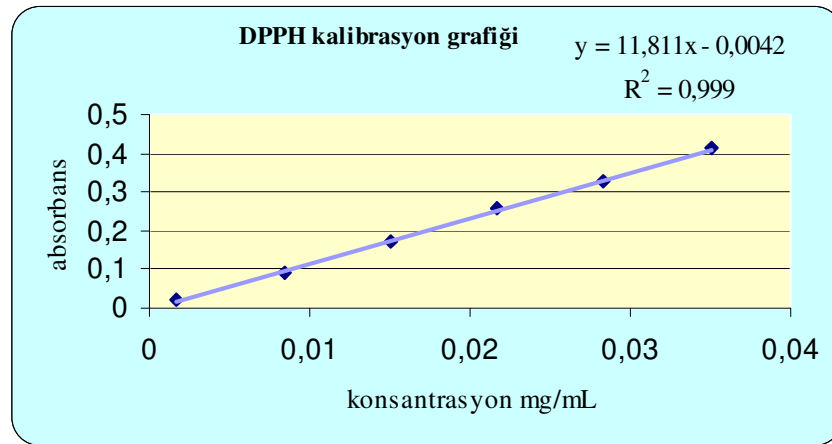
Üzüm Çekirdeği	Üzüm Meyvesi	Ticari Proantosiyanidin	Kateşin
3395	3385	3390	3377
2923	2914	2906	2931
2855	-	2847	2847
2340	2357	2349	-
1690	1640	1690	1634
1606	-	1606	-
1513	-	1513	1518
1437	1412	1429	1454
1370	1353	1370	1358
1277	1251	1277	1278
1099	-	1116	1100
1040	1049	1057	1023

4.4. DPPH Serbest Radikali Süpürme Aktivitesi Tayini

Farklı konsantrasyonlardaki DPPH serbest radikali zltisinin, ölçülen absorbens değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4.3. DPPH konsantrasyon ve absorbens değerleri

Konsantrasyon(mg/mL)	Absorbans
$1,75 \times 10^{-3}$	0,021
$8,40 \times 10^{-3}$	0,090
$1,50 \times 10^{-2}$	0,171
$2,17 \times 10^{-2}$	0,257
$2,83 \times 10^{-2}$	0,326
$3,50 \times 10^{-2}$	0,412



Şekil 4.6. DPPH kalibrasyon grafiği

Grafikten elde edilen doğru denklemi:

$$y = 11,811x - 0,0042 \text{ ve } R^2=0,999$$

Üzüm çekirdeği için;

t_0 anındaki absorbans değeri : 0,156

t_{30} anındaki absorbans değeri : 0,109

Öncelikle doğru denklemden t_0 ve t_{30} zamanlarındaki, DPPH'nin konsantrasyonları hesaplandı.

$$C_0 = 0,013564 \text{ mg/L} \quad \text{ve} \quad C_{30} = 0,009584 \text{ mg/L}$$

Daha sonra hesaplanan konsantrasyonlar arasındaki farktan yararlanarak, %inhibisyon yani, ortamdaki etkisiz hale getirilen serbest radikal yüzdesi hesaplandı.

$$\% \text{İnhibisyon} = [(C_0 - C_{30}) / C_0] \times 100$$

$$\% \text{İnhibisyon} = 29,34$$

Üzüm çekirdeği için DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi **%29,34**

Üzüm meyvesi için;

t_0 anındaki absorbans değeri : 0,151

t_{30} anındaki absorbans değeri : 0,146

t_0 ve t_{30} zamanlarındaki DPPH konsantrasyonları;

$$C_0 = 0,013140 \text{ mg/L} \quad \text{ve} \quad C_{30} = 0,012717 \text{ mg/L}$$

$$\% \text{İnhibisyon} = [(C_0 - C_{30}) / C_0] \times 100$$

$$\% \text{İnhibisyon} = 3,22$$

Üzüm meyvesi için DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi **%3,22**

BHA için;

t_0 anındaki absorbans değeri : 0,154

t_{30} anındaki absorbans değeri : 0,103

t_0 ve t_{30} zamanlarındaki DPPH konsantrasyonları;

$$C_0 = 0,013310 \text{ mg/L} \text{ ve } C_{30} = 0,009076 \text{ mg/L}$$

$$\% \text{İnhibisyon} = [(C_0 - C_{30}) / C_0] \times 100$$

$$\% \text{İnhibisyon} = 31,81$$

BHA için DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi **%31,81**

BHT için;

t_0 anındaki absorbans değeri : 0,159

t_{30} anındaki absorbans değeri : 0,141

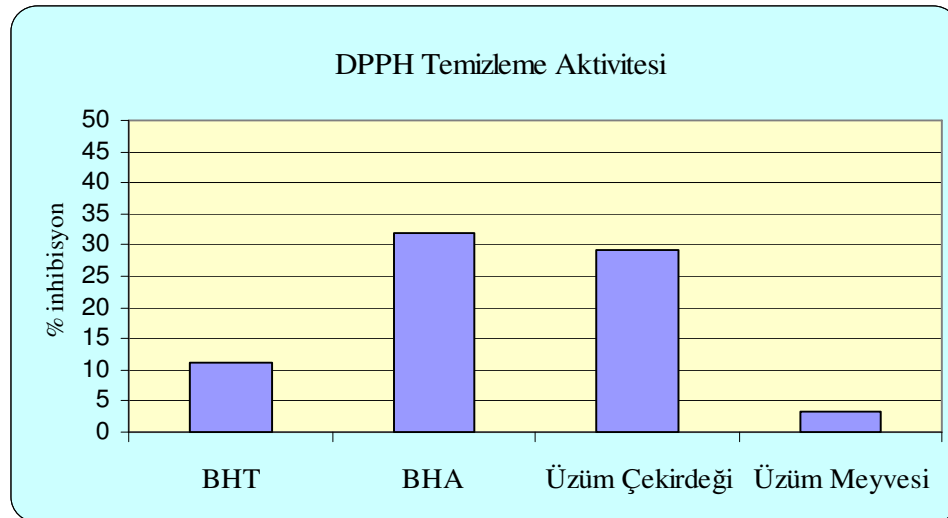
t_0 ve t_{30} zamanlarındaki DPPH konsantrasyonları;

$$C_0 = 0,013818 \text{ mg/L} \text{ ve } C_{30} = 0,012294 \text{ mg/L}$$

$$\% \text{İnhibisyon} = [(C_0 - C_{30}) / C_0] \times 100$$

$$\% \text{İnhibisyon} = 11,03$$

BHT için DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi **%11,03**



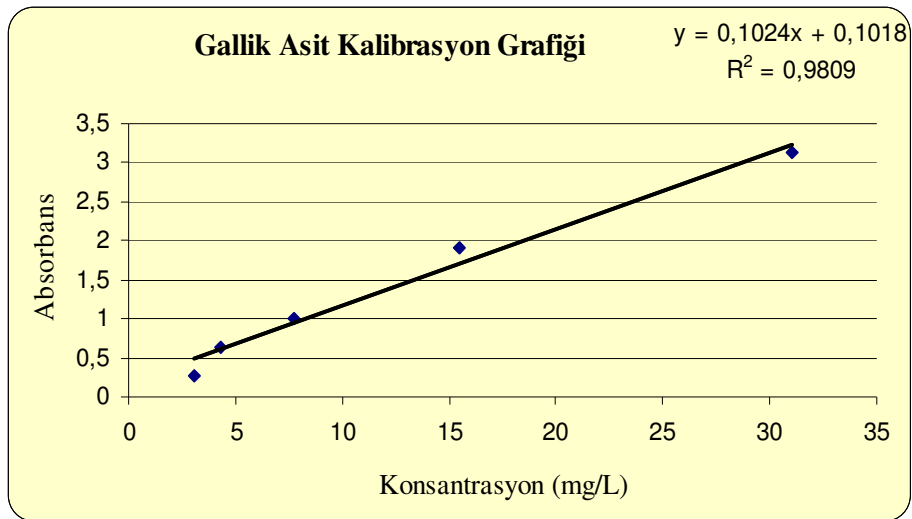
Şekil 4.7. Numune ve standartların DPPH temizleme aktiviteleri

4.5. Toplam Fenolik Madde Konsantrasyonu

Farklı konsantrasyonlardaki gallik asit çözeltisinin, ölçülen absorbans değerleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Gallik asit konsantrasyon ve absobrans değerleri

Konsantrasyon mg/L	Absorbans
3,10	0,280
4,35	0,640
7,75	1,010
15,50	1,910
31,00	3,140



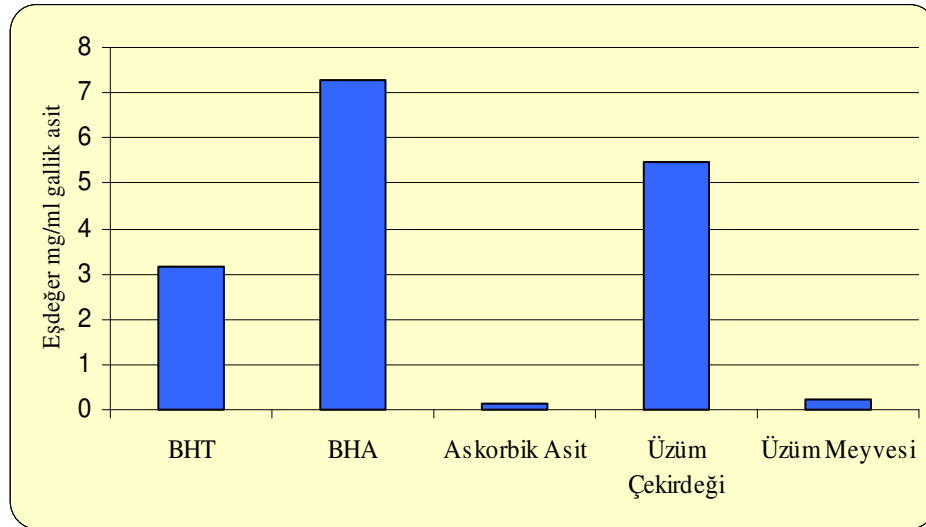
Şekil 4.8. Gallik asit kalibrasyon grafiği

Grafikten elde edilen doğru denklemi:

$$y = 0,1024x + 0,1018 \text{ ve } R^2 = 0,9809$$

Tablo 4.5. Okunan absorbans değerleri ve doğru denklemden karşılık gelen gallik asit miktarları

Numune	Absorbans	Eşdeğer mg/mL gallik asit
BHT	0,4280	3,1855
BHA	0,8420	7,2850
Askorbik asit	0,1160	0,1387
Ü. ekirdeęi	0,6610	5,4610
Ü. Meyvesi	0,1263	0,2400



şekil 4.9. Numune ve standartların toplam polifenolik madde miktarları

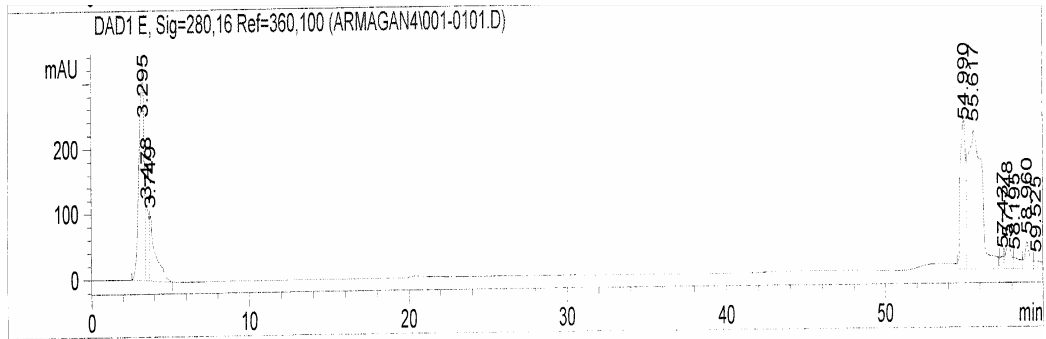
4.6. HPLC Analiz sonuçları

4.6.1. Üzüm Çekirdeği Ekstresi İçin HPLC Raporu

```

=====
Injection Date   : 05.01.2007 13:48:12          Seq. Line   :    1
Sample Name     : ekstrakt0401                 Location    : Vial 1
Acq. Operator   : erdal                       Inj         :    1
Acq. Instrument : AS GRUP                     Inj Volume  : 1 µl
Different Inj Volume from Sequence !          Actual Inj Volume : 5 µl
Acq. Method     : C:\CHEM32\1\METHODS\ARMAGAN.M
Last changed    : 05.01.2007 13:47:27 by erdal
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ARMAGAN.M
Last changed    : 26.12.2006 15:08:40 by erdal
Asetik asit in MeOH (%1)[A]/asetik asit in H2O(%1)[B];
0-15 dak arası 16/84 A/B
15-50 dak arası 25/75 A/B
50-60 dak arası 80/20 A/B
fr 0.7; standart enj 1; 254 nm; kolon sic 40; waters kolon
=====

```



Signal 3: DAD1 E, Sig=280,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	3.295	BV	0.2858	7240.03369	330.15982	22.3255
2	3.478	VV	0.1713	1496.90002	112.44614	4.6159
3	3.749	VB	0.3472	2631.31421	98.63777	8.1140
4	54.990	BV	0.3391	5212.23730	234.70679	16.0726
5	55.617	VB	0.7211	1.29105e4	213.01547	39.8111
6	57.437	BV	0.2423	323.68359	18.30822	0.9981
7	57.748	VV	0.3808	895.31055	34.95467	2.7608
8	58.195	VV	0.3843	482.85797	16.36365	1.4890
9	58.960	VB	0.3054	860.83582	39.62582	2.6545
10	59.525	BBA	0.4464	375.72290	11.34567	1.1586

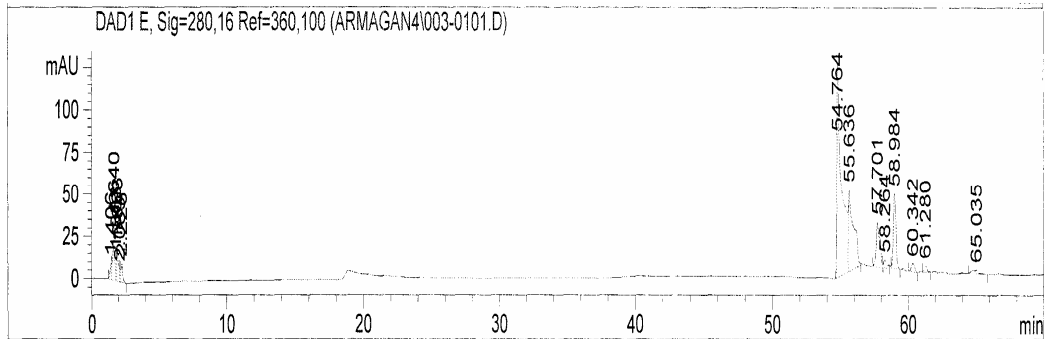
Totals : 3.24294e4 1109.56401

4.6.2. Üzüm Meyvesi Ekstresi İçin HPLC Raporu

```

=====
Injection Date   : 05.01.2007 16:29:42           Seq. Line   :    1
Sample Name     : üzüm                           Location    : Vial 3
Acq. Operator   : erdal                           Inj         :    1
Acq. Instrument : AS GRUP                         Inj Volume  : 1 µl
Different Inj Volume from Sequence !      Actual Inj Volume : 5 µl
Sequence File   : C:\CHEM32\1\SEQUENCE\CALIX_ILK.S
Method          : C:\CHEM32\1\METHODS\ARMAGAN.M
Last changed    : 05.01.2007 16:30:26 by erdal
                  (modified after loading)
Asetik asit in MeOH (%1)[A]/asetik asit in H2O(%1)[B];
0-15 dak arası 16/84 A/B
15-50 dak arası 25/75 A/B
50-60 dak arası 80/20 A/B
fr 0.7; standart eni 1; 254 nm; kolon sic 40; waters kolon

```



Signal 3: DAD1 E, Sig=280,16 Ref=360,100

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	1.406	BV	0.1103	71.30652	9.64055	1.1245
2	1.640	VV	0.1134	286.07462	34.27351	4.5113
3	1.803	VV	0.0894	92.17870	13.89764	1.4536
4	1.903	VV	0.1084	155.36390	19.20381	2.4501
5	2.083	VV	0.0736	40.42796	7.92019	0.6375
6	2.226	VB	0.1261	98.88193	10.87148	1.5593
7	54.764	BV	0.3044	2969.11621	127.16946	46.8224
8	55.636	VB	0.3176	1249.04639	48.31776	19.6972
9	57.701	BV	0.2545	496.37143	26.26018	7.8277
10	58.264	VB	0.2542	81.80930	4.54143	1.2901
11	58.984	BB	0.2125	594.94763	44.35319	9.3822
12	60.342	BV	0.3021	89.10455	4.85595	1.4052
13	61.280	BB	0.2040	47.11009	3.56969	0.7429
14	65.035	BB	0.4325	69.49134	2.11982	1.0959

Totals : 6341.23557 356.99464

5. TARTIŞMA VE ÖNERİ

Daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi üzüm, çeşitli değerlendirme yöntemlerinin oluşu, iklim ve toprak yönünden çok seçici olmayışı, uzun ömürlü olması ve çoğalma yöntemlerinin kolay oluşu gibi nedenlerle, dünyada en yaygın yetiştiriciliği yapılan bitkilerden biridir. Ülkemiz dünya üzüm üretiminin %12'lik payına sahip olup 5. sırada yer almaktadır. Ayrıca dünya kuru üzüm üretiminin %26'sı ile bu alanda ilk sıradadır. Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, üzümün, ülkemiz ve dünya açısından ne denli öneme sahip olduğu daha net anlaşılmaktadır.

Üzüm ve üzüm çekirdeğinin, bu çalışma ile ilgili olan asıl önemli özelliği ise, antioksidatif özellik göstermeleridir. Üzüm ve bilhassa üzüm çekirdekleri, (+)-kateşinler, (-)-epikateşin, (-)-epikateşin gallat, dimerik, trimerik, tetramerik ve özellikle polimerik proantosiyanidinlerin başlıca kaynağıdır.

Yapılan araştırmalar sonucu, proantosiyanidinlerin, güçlü antioksidatif özellik göstermelerinden dolayı, kalp hastalıkları, kanser, yüksek tansiyon ve kolesterol gibi günümüzün önemli rahatsızlıklarına karşı önemli ölçüde önleyici etkiye sahip oldukları belirlenmiştir. Ayrıca yaşlanma etkilerini (anti-aging) geciktirmeleri, proantosiyanidinlerin, önemli günlük diyet katkı maddeleri arasına girmesini sağlamıştır.

Yapılan bu çalışmada, üzüm çekirdekleri ve üzüm meyvesinin çeşitli organik çözücüler ile ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. İçerdiği antioksidan madde miktarları, kromatografik ve spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve değerlendirilmiştir.

Doğal bileşiklerin kimyasal çalışmalarında, ekstraksiyon basamağı önemli yer tutmaktadır. İyi bir ekstraksiyon gerçekleştirebilmek için, uygun çözücü sistemi seçimi şarttır. Yapmış olduğumuz bu yüksek lisans çalışmasında, üzüm meyvesi ve üzüm çekirdeğinden proantosiyanidin ekstraksiyonu için, 4 farklı organik çözücü ve bu çözücülerin su ile farklı oranlardaki karışımları kullanılmıştır. Yapılan deneyler sonucunda en iyi ekstraksiyonun aseton-su (3:7) karışımı ile gerçekleştirildiği

görülmüştür. Ekstraksiyon verim grafiğinden (şekil 4.1.) de görüldüğü gibi, su oranı ekstraksiyon verimini belli bir noktaya kadar arttırmaktadır.

IR spektroskopi çalışmaları sonucunda elde edilen spekturumlar birbirleriyle ve literatürdekiler ile karşılaştırıldığında büyük ölçüde uyumluluk gösterdiği görülmüştür. Spekturumlardaki bu benzerlik yapılan çalışmanın seyri açısından olumlu bir fikir yaratmıştır.

Kromatografi, doğal bileşiklerin kimyasal uygulamalarında farklı yapıların karakterizasyonu için vazgeçilmez yöntemdir. Yapılan çalışmada kromatografik analizler için HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) cihazı kullanıldı. Üzüm çekirdeği ve üzüm meyvesi ekstrelerinde bulunan kateşin, epikateşin ve bunların gallat formlarının yüksek molekül ağırlıklı oligomerik ve polimerik yapılarını (proantosiyanidin) tanımlamak analizlerde karşılaşılan en büyük güçlük olarak göze çarpmıştır. Ayrıca yapıda az miktarda bulunan kateşin ve epikateşin monomerlerinin de enjeksiyon esnasında hızla polimerleşmeleri monomerlerin tanımlanmasını mümkün kılmamıştır.

Bir maddenin antioksidan özelliklerinin ölçülmesi ve değerlendirilmesi için farklı metotlar uygulanabilmektedir. Bu metotlardan bir tanesi de DPPH serbest radikali temizleme aktivitesi tayinidir. Yöntem, ortamdaki radikal konsantrasyonundaki azalmanın spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Yapılan deneyler sonucunda üzüm meyvesi ve üzüm çekirdeğinin DPPH temizleme aktiviteleri hesaplanmıştır. Üzüm çekirdeği ekstresi, 30 dakikalık süre zarfında %29,34 oranında aktivite gösterirken, üzüm meyvesi ekstraktı %3,22 oranında DPPH serbest radikalini ortamda etkisiz hale getirmiştir. Bu durumda, üzüm çekirdeği ve üzüm meyvesi arasında, radikal temizleme aktivitesi açısından yaklaşık 9 kat fark olduğu görülmektedir.

Bir diğer antioksidan kapasite belirleme yöntemi ise, toplam fenolik madde miktarlarının belirlenmesidir. Yapılan deneyler neticesinde elde edilen sonuçların karşılaştırılması amacıyla standart bileşik olarak gallik asit kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığında BHT, en yüksek toplam fenolik madde miktarına sahipken, üzüm çekirdeği ekstresi, 5,461 eşdeğer mg gallik asit miktarı ile ikinci sırada

görülmektedir. Üzüm çekirdeği ekstresi, üzüm meyvesi ekstresinden, yaklaşık 22 kat daha fazla fenolik yapı bulundururken, bu fark üzüm çekirdeği ekstresi ve askorbik asit arasında 40 kat olarak görülmektedir.

Üzüm meyvesi ve üzüm çekirdeği ekstralarının, DPPH radikal temizleme ve toplam fenolik madde miktarları birlikte değerlendirildiğinde üzüm çekirdeği ekstresinin, üzüm meyvesi ekstresine göre ortalama yaklaşık 15 kat daha fazla antioksidan gücüne sahip olduğu söylenebilir.

Yapılan bütün çalışmalar, kuru siyah üzüm meyvesi ve siyah üzüm çekirdekleri ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucu, beyaz üzümün siyah üzüme nazaran çok daha az miktarda polifenol içerdiği ve çok düşük antioksidan etki gösterdiği belirtilmektedir.

Bütün bu veriler göstermektedir ki üzüm ile birlikte çekirdeklerinin de tüketilmesi, ve de özellikle siyah üzüm tercih edilmesi, insan sağlığı açısından önem arz etmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Akkuş İ., 1995 “Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri” Mimoza Yayınları, Konya.
- Altıok E., 2003 “Production of proanthocyanidins from grape seeds” Y.Lisans Tezi, İzmir.
- Altuğ T., 2001 “Gıda Katkı Maddeleri” İzmir.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S.J., Das D.K., Ray S.D., Kuszynski C.A., Joshi S.S., Pruess H.G. 2000 “Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention” *Toxicology* 148, 187-197.
- Bakkalbaşı E., Yemiş O., Aslanova D., Artık N. 2005 “Major flavan-3-ol composition and antioxidant activity of seeds from different grape cultivars grown in Turkey” *Eur. Food Res. Technol.* 221: 792-797.
- Clifford M.N., Colmenares N.G., Ramirez-Martinez J.R., Aldana J.O., Ramos-Nino M.E., Mendez B. 1998 “Isolation, characterisation and determination of biological activity of coffee proanthocyanidins” *J. Sci. Food Agric.*, 77, 368-372.
- Çalıklı A. 2003 “Kayısı ve vişne suyu üretimindeki atıkların değerlendirilmesi” Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri, Ankara.
- Dündar Y., Aslan R. a) 1999 “Hücre moleküler statüsünün anlaşılması ve fizyolojik önem açısından radikaller-antioksidanlar” *Cerrahi Tıp Bilim Dergisi* 134-142 İnsizyon 2(2).
- Dündar Y., Aslan R. b) 1999 “Oksidan-Antioksidan denge ve korunmasında vitaminlerin rolü” *Hayvancılık Araştırma Dergisi* 9, 1-2: 32-39.
- Eryılmaz B. 2001 “Capsicum Annuum L. Solanaceae meyvelerinin antioksidan aktivite açısından değerlendirilmesi” Y.Lisans Tezi, Ankara.

- Hall C. 2001 “Sources of natural antioxidants: oilseeds, nuts, cereals, legumes, animal products and microbial sources” Prof. Clifford Hall III, North Dakota State University. Book: “Antioxidants in Food” Jan Pokorny Woodhead Publishing Limited Cambridge, England.
- Joshi S.S., Kuszynski C.A., Bagchi M., Bagchi D. 2000 “Chemopreventive effects of grape seed proanthocyanidins extract on Chang liver cells” *Toxicology*, 155, 83-90.
- Kartal N. 2003 “Farklı işlemlerle izole edilen bitki özütlerinin antioksidan özelliği ve kromatografik analizleri” Y.Lisans Tezi, Sivas.
- Levy M.C., Andry M.C., Vezin H., Dumistracel I., Bernier J.L. 1998 “Proanthocyanidin microcapsules: preparation, properties and free radical scavenging activity” *International Journal of Pharmaceutics* 171, 217-226.
- Li W., Fong H.H.S., Singletary K.W., Fitzloff J.F. 2002 “Determination of catechins in commercial grape seed extract” *J.Liq.Chrom.& Rel. Technol.*, 25(3), 397-407.
- Özen T. 2003 “Bazı bitkilerin antioksidan aktivitesinin in vitro ve in vivo Araştırılması” Doktora Tezi, Samsun.
- Öztürk N., Tunalier Z., Koşar M., Başer K.H.C. 29-31 Mayıs 2002 “Petroselinum Crispum, Anethum Graveolens Ve Eruca Sativa'nın Antioksidan Etki Ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi” 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler, Eskişehir.
- Pekic B., Kovac V., Alonso E., Revilla E. 1998 “Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds” *Food Chemistry*, Vol.61, No.1/2, 201-206.
- Peterlongo F., Gabetta B., Fuzzati N., Griffini A., Lolla E., Pace R., Rufilli T., 2000 “Characterization of proanthocyanidins from grape seeds” *Fitoterapia* 71, 162-175.

- Pirniyazov A.Zh., Abdulladhanova N.G., Mavlyanov S.M., Kamaev F.G., Dalimov F.G. 2003 "Polyphenols from vitis vinifera seeds" Chemistry of Natural Compounds, Vol.39, No.4.
- Plumb G.W., Pascual-Teresa S.D., Santos-Buelga C., Cheynier V., Williamson G. 1998 "Antioxidant properties of catechins and proanthocyanidins: Effect of polymerisation, galloylation and glycosylation" Taylor & Francis, volume 29, number 4.
- Ramos-Tejada M.M., Duran J.D.G., Ontiveros-Ortega A., Espinosa-Jimenez M., Perea-Carpio R., Chibowski E. 2002 "Investigation of alumina/(+)catechin system properties.Part I: a study of the system by FTIR-UV-VisSpectroscopy" Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 24, 297-308.
- Robert L., Godeau G., Gavignet C. 1990 Jun;38 "The effect of proanthocyanidolic oligomers on vascular permeability" A study using quantitative morphology. Pathol Biol (Paris) (6):608-16.
- Saito M., Hosoyama H., Ariga T., Kataoka S., Yamaji N. 1998 "Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins" J. Agric. Food Chem., 46 (4), 1460-1464.
- Sakariah K.K., Jayaprakasha G.K., Singh R.P., 2001 "Antioxidant activity of grape seed (vitis vinifera) extracts on peroxidation models in vitro" Food Chemistry" 73, 285-290.
- Shaidi F. 2000 "Natural antioxidants, sources, effects and applications" Memorial University of Newfoundland, Canada.
- TEAE-Bakış, Haziran, 2003, Tarımsal Ekonomi ve Araştırma Enstitüsü, sayı:3, nüsha:7.
- Tekkes Y. 2006 "Streptozotosin ile diabet oluşturulmuş farelerde aspirin ve E vitamininin dokularda lipit peroksidasyonu ve antioksidan sisteme etkisinin araştırılması" Y.Lisans Tezi, Kahramanmaraş.

Ulusoy E. 2005 “Türkiyenin bazı yörelerinden kestane ve çiçek ballarının antioksidan aktiviteleri ve mineral içeriklerinin karşılaştırılması” Y.Lisans Tezi, Trabzon.

Ünlü M.C. 2001 “Çeşitli İçeceklerdeki Antioksidan Kapasitenin Araştırılması” Y.Lisans Tezi, Konya.

www.aist.go.jp (Spectral Database of Organic Compounds-SDBS)

www.fao.org

www.kimyaevi.org “Gıda Katkı Maddeleri”.

www.sigmaaldrich.com

www.solgar.com.tr

Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S., Kikuchi M. 2002 “Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grapeseeds” Food and Chemical Toxicology 40, 599-607.

Ye X., Krohn RL., Liu W. 1999 “The cytotoxic effects of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract on cultured human cancer cells” Mol Cell Biochem, Jun:196(1-2):99-108.

Yen G.C., Chen H.Y., Peng H.H. 1997 “Antioxidant and pro-oxidant effects of various tea extracts” J. Agric. Food Chem., 45 (1), 30 -34.

Yücel E.S. 2002 “Taze sıkılmış ve ticari domates ve portakal sularının antioksidan aktivitelerinin saptanması ve toplam fenolik madde ve askorbik asit içeriklerinin antioksidan aktivitelerine olan etkileri” Y. Lisans Tezi, Ankara.

Zhao J., Wang J., Chen Y., Agarwal R. 1999 “Anti-Tumor promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two-stage initiation-promotion protocol and identification of procyanidin B5-3'-Gallate as the most effective antioxidant constituent” Carcinogenesis Vol.20, No.9, PP.1737-1745.

ÖZGEÇMİŞ

22.07.1982 tarihinde Samsun'da doğdu. 2000 yılında Konya Erbil Kuru Lisesi'nden, 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Fen. Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nden mezun oldu. 2004 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Konya İli, Hadim İlçesi nüfusuna kayıtlıdır, yabancı dili ingilizcedir, bekarıdır.