



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AMİGDALİNİN EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU VE
MEYVE ÇEKİRDEKLERİNDEKİ MİKTARININ YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİYLE TAYİNİ**

BUŞRA NAGİHAN ÖZTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. DİLEK BİLGİÇ ALKAYA
II. Danışman Dr. Öğr. Üyesi SERAP AYAZ SEYHAN

İSTANBUL, 2019



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**AMİGDALİNİN EKSTRAKSİYON OPTİMİZASYONU VE
MEYVE ÇEKİRDEKLERİNDEKİ MİKTARININ YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİYLE TAYİNİ**

BUŞRA NAGİHAN ÖZTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. DİLEK BİLGİÇ ALKAYA
II. Danışman Dr. Öğr. Üyesi SERAP AYAZ SEYHAN

İSTANBUL, 2019

TEZ ONAY

TEZ ONAY FORMU

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program türü : Yüksek Lisans

Anabilim Dalı : Analitik Kimya

Tez Sahibi : Buşra Nagihan ÖZTÜRK

Sınav Tarihi ve Saati : 14.01.2020

Tez Başlığı : Amigdalinin Ekstraksiyon Optimizasyonu ve Meyve Çekirdeklerindeki Miktarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisiyle Tayini

Bu çalışma, içerik ve kalite bakımından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Ünvan, Adı-Soyadı (Kurum adı)	İmza
Danışman	Doç Dr. Dilek BİLGİÇ ALKAYA (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Dr.Öğretim Üyesi Serap KARADERİ (Marmara Üniversitesi)	
Üye	Dr.Öğretim Üyesi Duygu TAŞKIN (Sağlık Bilimleri Üniversitesi)	

ONAY

Bu tez, yukarıda isimleri bulunan jüri üyeleri tarafından "Marmara Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Öğretim ve Sınav Yönetmeliği" nin ilgili maddeleri uyarınca kabul edilmiş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun 24.01.2020 tarih ve 52 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

BUŞRA NAGİHAN ÖZTÜRK
İSTANBUL, 2019

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı gerçekleştirirken, değerli bilgilerimi benimle paylaşan, kendisine her zaman danışabildiğim ve bana zamanını ayırıp büyük bir ilgiyle elinden gelenin fazlasını sunan, bir sorun yaşadığımda yanına tereddüt etmeden gidebildiğim, güler yüzünü ve samimiyetini her zaman hissettiğim kıymetli danışman hocalarım Doç. Dr. Dilek BİLGİÇ ALKAYA ve Öğretim Görevlisi Dr. Serap AYAZ SEYHAN' a, ayrıca yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan, emeği geçen tüm değerli hocalarıma teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Laboratuvar çalışmalarımı gerçekleştirmemde bana gerekli imkanları sağlayan ve bünyesinde çalışmaktan mutluluk duyduğum Formül Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı ailesine ve çalışmam esnasında desteklerini esirgemeyen başta Soner HAYIRLI ve Tevfik EROL olmak üzere tüm laboratuvar ekibindeki arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

Beni sevgi ve saygı ile yetiştirerek bugünlere getiren ve benden hiçbir zaman hem maddi hem de manevi desteğini esirgemeyen, bu hayattaki en büyük şansım olan başta annem Şengül ÖZTÜRK olmak üzere canım aileme sonsuz teşekkürler.

Yüksek Lisans çalışması Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı (SAG-C-YLP-120418-0156) tarafından projelendirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	xiv
RESİM LİSTESİ	xv
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. Siyanojenik Glikozitler.....	5
4.2. Amıgdalin	5
4.3. Amıgdalinin Farmakolojik Aktivitesi.....	6
4.3.1. Amıgdalinin Astım ve Öksürük Karşıtı Etkisi	6
4.3.2. Amıgdalinin Sindirim Sistemi Üzerindeki Etkileri	7
4.3.3. Amıgdalinin Analjezik Etkisi.....	7
4.3.4. Amıgdalinin Organizmanın Bağışıklık Sistemini Attırıcı Etkisi.....	7
4.3.5. Amıgdalinin Toksik Etkisi	7
4.3.6. Amıgdalinin Antitümör Etkisi.....	8
4.4. Amıgdalin İçeren Meyveler	8
4.5. Çalışmada Kullanılan Meyve Çekirdekleri	8
4.5.1. Kayısı.....	9
4.5.2. Kiraz	10
4.5.3. Elma.....	11
4.5.4. Armut.....	12
4.5.5. Nektarin.....	13
4.5.6. Erik.....	14

4.5.7 Acıbadem	15
4.5.8. Ayva	16
4.5.9. Karpuz	17
4.5.10. Limon	18
4.5.11. Nar	19
4.5.12. Rambutan	20
4.5.13. Longan	21
4.5.14. Papaya	22
4.5.15. Guava	23
4.6. Validasyon	24
4.6.1. Validasyon Parametrelerinin Belirlenmesi	24
4.6.2. Validasyon Çalışması Yapılacak Matriks Seçimi	24
4.6.3. Çalışmada Kullanılacak Olan Materyaller	24
4.6.3.1. Kör Örnek Seçimi	24
4.6.3.2. Kirletilmiş Örnekler	24
4.6.3.3. Referans Standart Maddeler	25
4.6.4. Validasyon Parametreleri	25
4.6.4.1. Seçicilik	25
4.6.4.2. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)	25
4.6.4.3. Doğrusallık	26
4.6.4.4. Doğruluk	26
4.6.4.4.1. Kesinlik	26
4.6.4.4.1.1. Tekrarlanabilirlik	26
4.6.4.4.1.1.1. Tekrarlanabilirlik Limiti	27
4.6.4.4.1.1.2. Tekrarlanabilirliğin Değerlendirilmesi	27
4.6.4.4.1.2. Tekrarüretilebilirlik	28
4.6.4.4.1.2.1. Tekrarüretilebilirlik Limiti	28
4.6.4.4.1.2.2. Tekrarüretilebilirliğin Değerlendirilmesi	28
4.6.4.4.2. Gerçeklik	29
4.6.4.4.2.1. Geri Kazanım	29
4.6.4.5. Sağlamlık	30
4.6.5. Sistem Uygunluk Parametreleri	30

4.6.5.1. Alıkonma Zamanı.....	30
4.6.5.2. Kapasite Faktörü	31
4.6.5.3. Ayırma Faktörü	31
4.6.5.4. Teorik Plaka Sayısı	31
4.6.5.5. Kuyruklanma Faktörü	31
4.6.5.6. Ayırma Gücü.....	32
4.6.6. Kullanılan İstatistiksel Yöntemler	32
4.6.6.1. Standart Sapma.....	32
4.6.6.2. Bağıl Standart Sapma.....	33
4.6.6.3. Güven Aralığı.....	33
4.6.6.4. En Küçük Kareler Yöntemi.....	33
4.6.7. Kullanılan Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yöntemi.....	34
4.6.8. Kullanılan Ekstraksiyon Yöntemleri.....	35
4.6.8.1. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	36
4.6.8.2. Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu.....	36
4.6.8.3. Orbital Çalkalamalı Ekstraksiyon.....	37
4.6.8.4. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon.....	37
5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	39
5.1. Çalışılan Örnekler	39
5.2. Kimyasal Maddeler	40
5.3. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler.....	40
5.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisine ait Kromatografik Koşullar	40
5.5. Çözeltilerin Hazırlanması.....	40
5.5.1. Mobil Fazın Hazırlanması.....	40
5.5.2. Ekstraksiyon Solventlerinin Hazırlanması.....	41
5.5.2.1. %2 Sitrik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	41
5.5.2.2. %50 Metanol Çözeltisinin Hazırlanması	41
5.5.2.3. %50 Etanol Çözeltisinin Hazırlanması	41
5.5.3. 1000 mg/kg Ana Stok Standart Çözeltisinin Hazırlanması.....	41
5.5.4. Kalibrasyon Eğrisi İçin Kullanılacak Çözeltilerin Hazırlanması.....	42
5.5.4.1. 250 mg/kg Standart Çözeltisi	42
5.5.4.2. 100 mg/kg Standart Çözeltisi	42

5.5.4.3. 50 mg/kg Standart Çözeltisi	42
5.5.4.4. 25 mg/kg Standart Çözeltisi	42
5.5.4.5. 10 mg/kg Standart Çözeltisi	42
5.5.4.6. 5 mg/kg Standart Çözeltisi	42
5.5.4.7. 1 mg/kg Standart Çözeltisi	42
5.5.5. Teşhis Limiti Çalışması İçin Çözeltilerin Hazırlanması	43
5.5.6. Geri Kazanım Çalışmaları İçin Kullanılacak Standart Çözeltilerin Hazırlanması	43
5.5.6.1. 200 mg/kg Standart Çözeltisi	43
5.5.6.2. 500 mg/kg Standart Çözeltisi	43
5.6. Amigdalın Kalibrasyon Eğrisi	43
5.7. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)	43
5.8. Yöntemin Geri Kazanım Oranları	43
5.8.1. 200 mg/kg Seviyesinde Geri Kazanım Çalışması	44
5.8.2. 500 mg/kg Seviyesinde Geri Kazanım Çalışması	44
5.9. Örnek Hazırlığı	44
5.9.1. Soxhlet Ekstraksiyonu	44
5.9.2. Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu	45
5.9.3. Orbital Çalkalamalı Ekstraksiyon	45
5.9.4. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon	45
6. BULGULAR	47
6.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Metot Validasyonu	47
6.1.1. Seçicilik	47
6.1.2. LOD ve LOQ Çalışması	48
6.1.3. Doğrusallık	49
6.1.4. Çalışma Aralığı	51
6.1.5. Doğruluk	51
6.1.5.1. Kesinlik	51
6.1.5.2. Gerçeklik (Geri Kazanım)	53
6.1.6. Sağlamlık	55
6.1.6.1. Standart Çözeltisi Stabilesi	55
6.1.6.2. Metot Parametreleri Üzerindeki Değişiklikler	55

6.2. Amigdalin Ekstraksiyonu Optimizasyonu	57
6.2.1. Soxhlet Ekstraksiyonu.....	57
6.2.2. Ultrasonik Banyo Ekstraksiyonu.....	62
6.2.3. Orbital alkalamalı Ekstraksiyon	66
6.2.4. Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon.....	70
7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	91
8. KAYNAKLAR	101
9. EKLER.....	108
Ek 1. Kongre Bildirisi	108
10. ZGEMIŐ.....	109



KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

ACN	: Asetonitril
DAD	: Diode Array Dedector
EtOH	: Etanol
HCN	: Hidrojensiyanür
H₂O	: Su
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
MeOH	: Metanol
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
SIMS	: İkincil iyon kütle spektroskopisi
UV	: Ultraviyole

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Amigdalinin hidrojen siyanüre dönüşümü	3
Şekil 2. Amigdalinin kimyasal yapısı	5
Şekil 3. Amigdalinin hidroliz aşamaları	6
Şekil 4. Blank kromatogramı	48
Şekil 5. Amigdalin standardına ait kromatogram.....	48
Şekil 6. Amigdalin için LOQ kromatogramı.....	49
Şekil 7. Amigdalin için dedektör sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği.....	50
Şekil 8. Normal şartlarda amigdalin standardına ait kromatogram.....	56
Şekil 9. 0,8 mL/dk akış hızında amigdalin standardına ait kromatogram.....	56
Şekil 10. 40 °C kolon fırını sıcaklığında amigdalin standardına ait kromatogram.....	57
Şekil 11. Metanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	58
Şekil 12. % 50 Metanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	58
Şekil 13. Etanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	59
Şekil 14. % 50 Etanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	59
Şekil 15. Asetonitril ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	60
Şekil 16. Hekzan ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	60
Şekil 17. % 2 Sitrik asit ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	61

Şekil 18. Su ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	61
Şekil 19. % 2 Sitrik asit ile ultrasonik banyo ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	62
Şekil 20. Metanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	63
Şekil 21. % 50 Metanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	63
Şekil 22. Etanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	64
Şekil 23. % 50 Etanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	64
Şekil 24. Asetonitril ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	65
Şekil 25. Su ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	65
Şekil 26. % 2 Sitrik asit ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	66
Şekil 27. Metanol ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	67
Şekil 28. % 50 Metanol ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	67
Şekil 29. Etanol ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	68
Şekil 30. % 50 Etanol ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	68

Şekil 31. Asetonitril ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	69
Şekil 32. Su ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	69
Şekil 33. % 2 Sitrik asit ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	70
Şekil 34. % 50 Metanol ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	71
Şekil 35. % 50 Etanol ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	71
Şekil 36. Su ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.....	72
Şekil 37. Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak HPLC tayini sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdalin miktarları.....	74
Şekil 38. Blank kromatogramı.....	75
Şekil 39. 250 mg/kg konsantrasyonundaki amigdalin standardına ait kromatogram.....	75
Şekil 40. Acıbadem çekirdeğine ait kromatogram.....	76
Şekil 41. Acıbadem çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	76
Şekil 42. Armut çekirdeğine ait kromatogram.....	77
Şekil 43. Armut çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	77
Şekil 44. Ayva çekirdeğine ait kromatogram.....	78
Şekil 45. Ayva çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	78

Şekil 46. Elma çekirdeğine ait kromatogram.....	79
Şekil 47. Elma çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	79
Şekil 48. Erik çekirdeğine ait kromatogram.....	80
Şekil 49. Erik çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	80
Şekil 50. Karpuz çekirdeğine ait kromatogram.....	81
Şekil 51. Karpuz çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	81
Şekil 52. Kayısı çekirdeğine ait kromatogram.....	82
Şekil 53. Kayısı çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	82
Şekil 54. Kiraz çekirdeğine ait kromatogram.....	89
Şekil 55. Kiraz çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	83
Şekil 56. Limon çekirdeğine ait kromatogram.....	84
Şekil 57. Limon çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	84
Şekil 58. Nar çekirdeğine ait kromatogram.....	85
Şekil 59. Nar çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	85
Şekil 60. Nektarin çekirdeğine ait kromatogram.....	86
Şekil 61. Nektarin çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	86
Şekil 62. Guava çekirdeğine ait kromatogram.....	87

Şekil 63. Guava çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	87
Şekil 64. Longan çekirdeğine ait kromatogram.....	88
Şekil 65. Longan çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	88
Şekil 66. Papaya çekirdeğine ait kromatogram.....	89
Şekil 67. Papaya çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	89
Şekil 68. Rambutan çekirdeğine ait kromatogram.....	90
Şekil 69. Rambutan çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram.....	90

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tekrarlanabilirlik %RSD _r ve Horwitz Eşitliğinden Hesaplanan Rölatif Standart Sapma Tablosu.....	28
Tablo 2. Tekrarüretilebilirlik %RSD _R ve Horwitz Eşitliğinden Hesaplanan Rölatif Standart Sapma Tablosu.....	29
Tablo 3. LOD ve LOQ çalışmasından elde edilen veriler.....	49
Tablo 4. Amigdalin için doğrusallık çalışması değerleri.....	50
Tablo 5. 200 mg/kg düzeyinde tekrarlanabilirlik sonuçları.....	51
Tablo 6. 500 mg/kg düzeyinde tekrarlanabilirlik sonuçları.....	52
Tablo 7. 200 mg/kg düzeyinde tekrarüretilebilirlik sonuçları.....	52
Tablo 8. 500 mg/kg düzeyinde tekrarüretilebilirlik sonuçları.....	53
Tablo 9. 200 mg/kg düzeyinde geri kazanım sonuçları.....	54
Tablo 10. 500 mg/kg düzeyinde geri kazanım sonuçları.....	54
Tablo 11. Elde Edilen Geri Kazanım Oranları.....	55
Tablo 12. Çözelti stabilitesi çalışmasından elde edilen pik alanları.....	55
Tablo 13. Metot parametrelerinin değiştirilmesi ile elde edilen sonuçlar.....	56
Tablo 14. Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak HPLC tayini sonucunda diğer meyve çekirdeklerinden elde edilen amigdalin miktarları.....	72
Tablo 15. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak HPLC tayini sonucunda diğer meyve çekirdeklerinden elde edilen amigdalin miktarları.....	73
Tablo 16. Çalışmamızda Elde Edilen Veriler ile Literatürdeki Diğer Çalışmalardan Elde Edilen Verilerin Karşılaştırması.....	99

RESİM LİSTESİ

Resim 1. Kayısı (<i>Prunus armeniaca</i>).....	9
Resim 2.Kiraz (<i>Prunus avium</i>).....	10
Resim 3.Elma (<i>Malus pumila</i>).....	11
Resim 4.Armut (<i>Pyrus communis</i>).....	12
Resim 5.Nektarin (<i>Prunus persica</i>).....	13
Resim 6.Erik (<i>Prunus domestica</i>).....	14
Resim 7 Acıbadem (<i>Semen amygdali amarum</i>).....	15
Resim 8.Ayva (<i>Cydonia oblonga</i>).....	16
Resim 9.Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>).....	17
Resim 10.Limon (<i>Citrus limon</i>).....	18
Resim 11.Nar (<i>Punica granatum</i>).....	19
Resim 12.Rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i>).....	20
Resim 13.Longan (<i>Dimocarpus longan</i>).....	21
Resim 14.Papaya (<i>Carica papaya</i>).....	22
Resim 15.Guava (<i>Psidium guajava</i>).....	23
Resim 16.Soxhlet Ekstraktör Cihazı.....	35
Resim 17.Ultrasonik Su Banyosu.....	36
Resim 18 Orbital Çalkalayıcı.....	37
Resim 19.Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon.....	38

Amigdalinin Ekstraksiyon Optimizasyonu Ve Meyve Çekirdeklerindeki Miktarının Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisiyle Tayini

Öğrencinin Adı: Buşra Nagihan ÖZTÜRK

I. Danışman: Doç.Dr. Dilek BİLGİÇ ALKAYA

II.Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Serap AYZAZ SEYHAN

Anabilim Dalı: Analitik Kimya Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Günümüzde kanser hücrelerini tahrip etmek için antikanser ilaçlar içeren kemoterapi tedavisi uygulanmaktadır. Ancak kemoterapi sonucu kanserli hücrelerin yanında sağlıklı hücreler de zarar görmektedir. Bu olumsuz etkileri en aza indirmek için kanserin doğal yollarla tedavi edilmesi amaçlanmaktadır. Tıbben kanser üzerinde aktivitesi tam olarak kanıtlanmamış ancak araştırmaları süren bu doğal kaynaklardan biri olan amigdalin, siyanojenik bitkilerde bulunan bir glikozittir. Oral yolla belirli miktarlarda alındığında, kansere karşı rol oynadığı bildirilmiştir. Bu çalışmada farklı ekstraksiyon solventleri ve metotları kullanılarak amigdalinin en yüksek verimde elde edileceği yöntemin tayin edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Amigdalin, farklı ekstraksiyon solventleri ve metotları kullanılarak acıbadem çekirdeğinden ekstrakte edilmiştir. Verimi en yüksek olan yöntem Türkiye ve Tayland yerel pazarlarından temin edilen diğer meyve çekirdeklerine uygulanmıştır. Elde edile ekstraktların amigdalin içeriği yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak kantitatif olarak tayin edilmiştir.

Bulgular: %2' lik sitrik asit solventi kullanılarak gerçekleştirilen mikrodalga destekli ekstraksiyon yönteminden en yüksek verim elde edilmiştir. En yüksek miktarda amigdalin, acı badem çekirdeğinden elde edilmiştir.

Sonuç: Bu çalışma ile acıbadem çekirdeğinden amigdalinin kısa sürede ve yüksek verimde elde edileceği gösterilmiştir. Ayrıca diğer meyve çekirdeklerinde de amigdalin varlığı gösterilmiştir. Gelecekte amigdalinin, kanser tedavisinde kullanılacak doğal bir ürün olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle konuyla ilgili çalışmalar arttırılmalıdır.

Anahtar sözcükler: Amigdalin , HPLC , ekstraksiyon, meyve, çekirdek

Extraction Optimization of Amygdalin and Determination of Amount of Fruit Kernel by High Performance Liquid Chromatography

Name of Student: Buşra Nagihan ÖZTÜRK

I.Advisor: Assoc. Dr. Dilek BILGIC ALKAYA

II.Advisor: Assist. Prof. Serap AYAZ SEYHAN

Department: Department of Analytical Chemistry

2. SUMMARY

Objective: Nowadays, chemotherapy treatment which includes anticancer drugs is applied to destroy cancer cells. However, as a result of chemotherapy, healthy cells as well as cancerous cells are damaged. It is aimed to treat cancer with natural ways to minimize these negative effects. Amygdaline, one of the natural sources of cancer that have not been fully proven in medically, is a glycoside commonly found in cyanogenic plants. When it is taken at certain rates by oral route, it plays a role against carcinoma. In this study, it is aimed to determine the method in which amygdaline will be obtained in the highest yield by using different extraction solvents and methods.

Materials and methods: Amygdalin was extracted from bitter almonds by using different extraction solvents and methods. The highest yield method has been applied to other fruit kernels obtained from the local market in Turkey and Thailand. The amygdalin content of the extracts obtained was quantitatively determined using high performance liquid chromatography (HPLC).

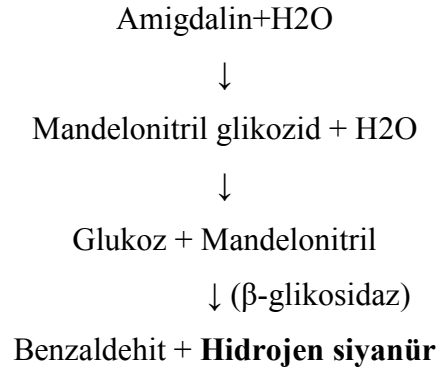
Results: The highest yield was obtained from microwave assisted extraction method using 2% citric acid solvent. The highest amount of amygdalin was obtained from bitter almond kernel.

Conclusion: It has been shown that amygdalin from bitter almond kernel will be obtained in a short time and with high efficiency. In addition, the presence of amygdalin in other fruit seeds has been shown. In the future, amygdalin can be used as a natural product for the treatment of cancer. Therefore, related studies should be increased.

Keywords: Amygdalin, HPLC, extraction, fruit, kernel

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Amigdalın (D-mandelonitril- β -Dglukozido-6- β -D-glukozit), anti-kanser aktivitesi olduğu yönünde iddialar bulunan siyanojenik bir glikozittir (Dursun, 2010). Glikozit, bir şeker molekülünün glikozit bağıyla başka bir maddenin oksijen atomuna bağlanmasıyla oluşan bileşik anlamına gelir (Taumpan Mestan, 2015). Siyanojenik bitkiler, yapılarında hidrojen siyanür (HCN) bulunduran ve bunu asidik veya enzimatik hidrolizle açığa çıkaran bitkilerdir (Poyraz, 2013). HCN, doğada amigdalın adı verilen glikozit şeklinde, Rosaceae familyasındaki bazı meyvelerin çekirdeklerinde bulunur. Bu glikozit bitkide bulunan emülsin enziminin katalitik etkisi ile hidroliz olarak zehirlenmelere yol açar (Vural, 2005). Bunun yanında amigdalının geniş kaynaklı ve nispeten daha düşük fiyatlı bir doğal ürün olması amigdalini, sinerjik etki üretebilen koşullu kemoterapi ilaçlarıyla kombine edildiğinde, umut verici bir antitümör ilaç yapmaktadır. (Song ve Xu 2014). Amigdalının antitümör etkisi yanında, terapötik, analjezik, bağışıklık arttırıcı, astım ve öksürük karşıtı olması gibi etkileri de bulunmaktadır.



Şekil 1. Amigdalın'ın hidrojen siyanüre dönüşümü (Çabuk ve Kolankaya,2012)
Amigdalın meyvelerin acı bir tat almasına neden olur. Başlıca acıbadem olmak üzere birçok meyve çekirdeğinde bulunur.

Günümüzde genellikle Rosaceae türlerinde amigdalin miktarları araştırılmış diğer familyalar üzerinde çalışmalar yoğunlaştırılmamıştır. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Türkiye ve Tayland meyvelerindeki amigdalin miktarının HPLC ile tayini üzerine bir çalışma olmadığından, bu çalışmanın sonucunda; bundan sonra yapılacak olan bilimsel araştırmaların; amigdalin miktarı belirlenmiş bu meyve çekirdekleri üzerinde yoğunlaştırılacağı ve bu meyve çekirdeklerinin tüketilmesi uygun olan seviyeleri belirlendiğinde kansere karşı doğal destek sağlayabileceği düşünülmektedir.



4. GENEL BİLGİLER

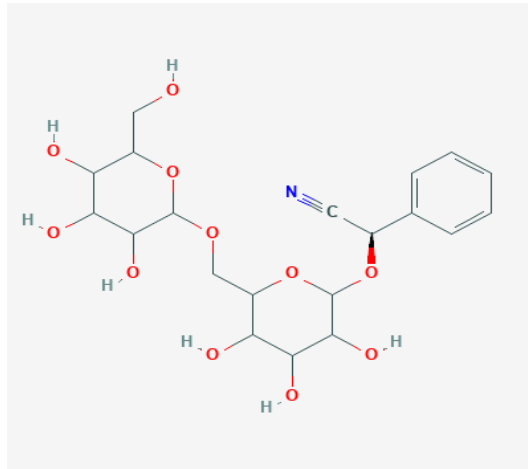
4.1. Siyanojenik Glikozitler

Birçok bitki ve bitki bazlı yiyecekler doğal siyanojenik glikozitler içermektedir. Tabiatta 2000' in üzerinde siyanojenik bitki bulunmaktadır. Bilinen yaklaşık 25 siyanojenik glikozit vardır. Bitkilerin yenilebilir kısımlarında bulunan başlıca siyanojenik glikozitler; amigdalin, dhurrin, linamarin, lotaustralin, prunasin ve taksifilindir. (Poyraz, 2013)

Siyanojenik glikozitlerin temel yapısı, bir -CN kısmına ve iki fonksiyonel gruba (R_1 ve R_2) eklenmiş ve bir monosakarit (glikoz) veya disakarit (gentiobioz) yapısındaki şekere glikosidik bağ ile bağlanmış bir çekirdek karbon içerir. R_1 bir metil, fenil veya p-hidroksifenil grubu; R_2 ise yaygın olarak hidrojen dir aynı zamanda bir metil veya etil grubu olabilir.

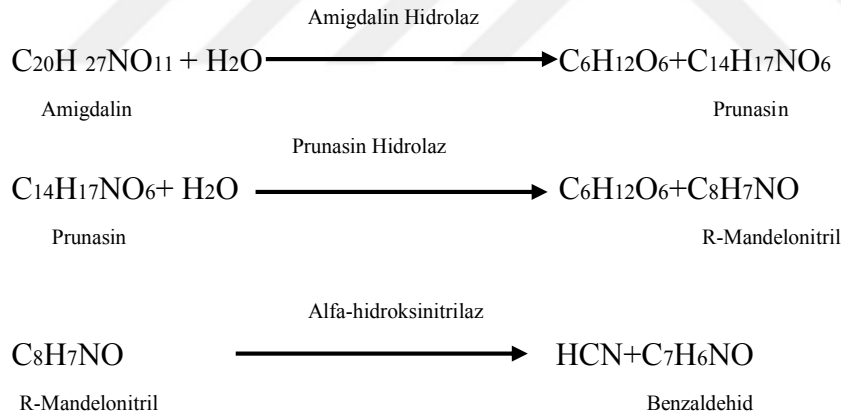
Siyanojenik glikozitler enzimatik degradasyon sonucunda ürettikleri hidrojen siyanürden dolayı potansiyel toksisiteye sahiptir, bu da akut siyanür zehirlenmesine yol açmaktadır. Akut siyanür zehirlenmesinin klinik semptomları arasında hızlı solunum, kan basıncında düşme, hızlı nabız, baş ağrısı, baş dönmesi, kusma, ishal, zihinsel karışıklık, oksijen eksikliği ve kasılmalar görülmektedir. (Cressey ve Reeve, 2019)

4.2. Amigdalin



Şekil 2. Amigdalinin kimyasal yapısı (Pubchem)

Amigdalin (D-mandelonitril-β-Dglukozido-6-β-D-glukozit), Rosaceae familyasının özellikle Prunus cinsine ait bitkilerde bulunan en sık karşılaşılan siyanojenik di-glikozittir (Yıldırım, 2017). 1830 yılında, Fransız kimyacılar Robiquet ve Boutron-Charlard, acı badem tohumundan amigdalin izole etmiştir. Detaylı kimyasal yapısı ise, 1923 yılında Haworth ve Wylam tarafından açıklanmıştır (Poyraz, 2013). Siyanojenik glikozitlerin yapısında tek şeker bulunurken, ilk belirlenen glikozit olan amigdalin, yapısında 2 şeker bulundurmasıyla diğerlerinden farklıdır. Siyanojenik glikozitler doğal halde olduklarında zehirli değildirler ancak oral yoldan alındıktan sonra emülsin enzimi etkisi ile enzimatik hidroliz sonucunda HCN açığa çıkarak zehirlenmelere sebep olurlar (Şekil 3). Emülsin, iki adet β-glikozidaz ve bir adet alfa-hidroksinitrilaz enzimini içerir (Poyraz, 2013). Amigdalin (C₂₀H₂₇NO₁₁), Rosaceae familyası dışında Caprifoliaceae, Mimosaceae, Oleaceae familyalarında da bulunabileceği ileri sürülmektedir (Bolarinwa ve ark., 2014). Molekül ağırlığı 457,43 g/mol' dür.



Şekil 3. Amigdalin hidroliz aşamaları (Poyraz, 2013)

4.3. Amigdalinin Farmakolojik Aktivitesi

4.3.1. Amigdalinin astım ve öksürük karşıtı etkisi

Oral uygulamadan sonra amigdalin, hidrosiyamik asit ve benzaldehite ayrışır. Hidrosiyamik asit, solunum merkezini belli bir seviyeye kadar inhibe eder. Bu da

solunum hareketlerini sakinleştirirerek antiastimatik etki göstermesini sağlar (Song ve Xu 2014).

4.3.2. Amigdalinin sindirim sistemi üzerindeki etkileri

Amigdalinin ayrışmasıyla oluşan bir diğer bileşik olan benzaldehit; pepsin enzimini inhibe ederek sindirim fonksiyonunu etkiler. Ayrıca sıçanlarla yapılan çalışmalarda amigdalin'in kronik gastrit ve kronik atrofik gastrit üzerinde iyi bir terapötik etkisi olduğu bildirilmiştir (Song ve Xu 2014).

4.3.3. Amigdalinin analjezik etkisi

Amigdalin'in sıçanlarda formalin kaynaklı ağrıyı 1 mg/kg' ın altındaki doza bağlı olarak hafifletebileceği gösterilmiştir. Ayrıca, prostaglandinler E2 ve nitrik oksit sentezinin mRNA üzerinde inhibe edilmesiyle, amigdalinin farelerdeki mikrogliyal hücrelerinde antienflamatuar ve analjezik etki oluşturduğu gösterilmiştir (Song ve Xu 2014).

4.3.4. Amigdalinin organizmanın bağışıklık sistemini arttırıcı etkisi

Amigdalinin, polihidroksialkanoatlar (PHA) kaynaklı insan periferik kan T lenfosit proliferasyonunu önemli ölçüde arttırması ve PHA tarafından uyarılan periferik kan lenfositlerini teşvik etmesi sonucunda bağışıklık fonksiyonunu arttırabileceği gösterilmiştir (Song ve Xu 2014).

4.3.5. Amigdalinin toksik etkisi

Amigdalinin oral uygulama yolunun toksik etkisinin intravenöz yoldan çok daha fazla olduğunu kanıtlamıştır. Sıçanlarda, amigdalinin ortalama öldürücü dozu (LD50), oral uygulama yoluyla 880 mg/kg vücut ağırlığı (BW) olarak bildirilmiştir. Araştırmalar, asıl nedenin amigdalinin, oral uygulamadan sonra daha fazla hidrosiyamik asit ürettiğini göstermektedir. İnsanda, günde 4 g amigdalin oral yolla uygulandıktan yarım ay sonra veya intravenöz enjeksiyon yoluyla uygulandıktan 1 ay sonra sistemik toksisite görülebileceği, bu toksik etkinin ilacın geri çekilmesinden sonra kaybolabileceği, ayrıca doz 0.6 ~ 1g günlük oral dozlara düşürülürse, toksisitenin engellenebileceği bildirilmiştir (Song ve Xu 2014).

4.3.6. Amigdalinin antitümör etkisi

Amigdalin, son 40 yılda tümör tedavisinde en sık kullanılan alternatif ilaçlardan biri haline gelmiştir. Yapılan birçok çalışma, amigdalin'in antitümör aktivitesine sahip olduğunu desteklemiştir. Bunlardan; Kwon ve arkadaşları, amigdalinin insan promyelositik lösemi (HL-60) hücrelerinde apoptozu indükleyebildiğini doğrulamıştır; Park ve arkadaşları, amigdalinin insan kolon kanseri SNU- C4 hücresinin proliferasyonunu inhibe ettiğini ve mekanizmanın, hücre döngüsü ile ilgili genlerin ekspresyonunun inhibisyonu olduğunu göstermiştir; Chang ve arkadaşları, amigdalinin, Bax ve Bcl-2 ekspresyonunu düzenleyerek prostat kanseri DU145 ve LNCaP hücrelerinde apoptozu indükleyebileceğini belirlemiştir. Chen, Y. ve arkadaşları, amigdalinin HeLa hücrelerinin hayatta kalma oranını konsantrasyona bağlı bir şekilde engelleyebildiğini göstermiştir. Bununla birlikte amigdalin, kanser hastalarında, özellikle geç evre hastalığı olanlarda, tümörün gelişimini geriletemeyebilir. Ayrıca amigdalin tedavisi sırasında tümör belirteçleri ölçülmemiştir. Bu konularda çalışma yapılmadığı sürece, amigdalinin antitümör etkiye sahip olup olmadığı sorusu tatmin edici bir şekilde cevaplanamaz. Kesin olarak söylenebilecek şey, amigdalinin antitümör aktivitesinin gözardı edilemeyeceğidir (Blaheta ve ark., 2016). Ancak konuyla ilgili daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

4.4. Amigdalin İçeren Meyveler

En fazla miktarda amigdalin içeriğine sahip olan meyveler Rosaceae familyasından; Acıbadem (*Semen Amygdali amarum*), elma (*Malus pumila*), kayısı (*Prunus armeniaca*), vişne (*Prunus cerasus*), kiraz (*Prunus avium*), nektarin (*Prunus persica var. Nucipersica*), şeftali (*Prunus persica*), armut (*Pyrus communis*), erik (*Prunus domestica*), karayemiş (*Lauroserasus officinalis*) tir.

4.5. Çalışmada Kullanılan Meyve Çekirdekleri

- **Rosaceae familyası;** kayısı, kiraz, elma (Barceloux, 2009), armut, nektarin, erik, acıbadem (Çelik ve Yıldırım, 2017) ve ayva (Oliveira ve ark., 2012)
- **Cucurbitaceae familyası;** karpuz (Paris, 2015)
- **Rutaceae familyası;** limon (Chaturvedi ve Shrivastava, 2016)

- **Lythraceae familyası;** nar (Teixeira da Silva ve ark., 2013)
- **Sapindaceae familyası;** rambutan (Akhtar ve ark., 2017) ve longan (Yang ve ark., 2011)
- **Caricaceae familyası;** papaya (Nguyen ve ark., 2013)
- **Myrtaceae familyası;** guava (Begum ve ark., 2002)

4.5.1. Kayısı

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Prunus*

Tür: *Prunus armeniaca*



Resim 1. Kayısı (*Prunus armeniaca*)

Kayısı, mineraller ve diğer besin maddeleri içermesi sebebiyle önemli bir gıda maddesidir. Potasyum ve β -karoten tarafından zengin olduğu bilinmektedir (Karataş ve Kamışlı, 2007). Kayısının tohumu, çok çeşitli amaçlar için kullanılmaktadır. Bunların içinde; benzaldehit, amigdalin ve hidrosiyamik asit yapımı da yer almaktadır. Acı kayısı tohumu ayrıca ilaç endüstrisinde hammadde olarak da kullanılmaktadır (Poyraz, 2013).

4.5.2. Kiraz

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Prunus*

Tür: *Prunus avium*



Resim 2. Kiraz (*Prunus avium*)

Tatlı kiraz (*Prunus avium*), fenolikler, diyet lifi, melatonin gibi çeşitli biyoaktif bileşen içeren bir meyvedir. Bu bileşenlerden fenoliklerin, insanlarda antitümör ve antioksidan özellikler açısından faydalı olduğu bulunmuştur (Cao ve ark., 2018)

4.5.3. Elma

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Malus Mill.*

Tür: *Malus pumila*



Resim 3. Elma (*Malus pumila*)

Elmalar fenolik bileşikler, şeker, pektin, makro ve mikro elementler bakımından zengindir. Pek çok çalışma, elma bileşenlerinin antikanser, antioksidan, antimikrobiyal gibi birçok yararlı etkisinin gıda, ilaç ve kozmetik endüstrisinde uygulama alanı bulabileceğini göstermektedir (Kalinowska ve ark., 2014)

Elma, insanlara önemli sağlık yararları sağlayabilecek bileşikler içermesine rağmen, elma tohumları, potansiyel olarak toksijenik bir bileşik olan amigdalin içerir. (Bolarinwa ve ark., 2015)

4.5.4. Armut

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Pyrus L.*

Tür: *Pyrus communis*



Resim 4. Armut (*Pyrus communis*)

Armutlar, hafif aromalı tatlı tatlarından ve karakteristik kokularından dolayı çok tercih edilen meyvelerdendir. Vitaminler, karotenoidler, organik asitler, mineraller, lifler, polifenoller, flavonoidler gibi besinler gibi açısından zengindir (Li ve ark., 2015)

4.5.5. Nektarin

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Prunus L.*

Tür: *Prunus persica*



Resim 5. Nektarin (*Prunus persica*)

Nektarin, çok önemli bir terapötik ve besinsel değere sahiptir. Bu meyvenin tüketimi, insan plazmasında ROS (reaktif oksijen türleri) üretimini azaltabilir ve fenolik bileşiklerin varlığından dolayı çeşitli hastalıklara karşı koruma sağlar (Belhadj ve ark., 2016).

4.5.6. Erik

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Prunus L.*

Tür: *Prunus domestica*



Resim 6. Erik (*Prunus domestica*)

Erik, besin değerleri ve tedavi edici özellikleri ile bilinir. Zengin bir polifenol, karotenoid ve antosiyanin kaynağıdır. Bunun yanında, yaprakların fenolik yapısı yeterince bilinmemektedir ancak bitkisel ilaçların ve besin takviyelerinin geliştirilmesi için elverişli fenolik bileşik ve antioksidan kaynağı olabileceği düşünölmektedir (Mocan ve ark., 2018)

4.5.7. Acıbadem

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Prunus L.*

Tür: *Prunus dulcis var. amara (Semen amygdali amarum)*



Resim 7. Acıbadem (*Semen amygdali amarum*)

Acıbademler siyanojenik glikozitleri nedeniyle toksiktir. Bununla birlikte, acıbademlerin uçucu yağı ilaç ve kozmetik endüstrisinde kullanılabilir. Ayrıca, acı bir badem 4-9 mg yüksek derecede toksik hidrojen siyanür içerir ve büyük miktarlarda tüketim ölüme neden olabilir (Nasirahmadi ve Miraei, 2017). Bu nedenle toksik etkileri giderilerek veya azaltılarak kontrollü şekilde tüketilebileceği öngörülmektedir.

4.5.8. Ayva

Takım: *Rosales*

Familya: *Rosaceae*

Cins: *Cydonia*

Tür: *Cydonia oblonga*



Resim 8. Ayva (*Cydonia oblonga*)

Ayva, dünya çapında önemli bir şifalı bitki olarak kabul edilir. Antidiyabetik, antioksidan, antimikrobiyal, antialerjik, antihemolitik ve UV koruyucu aktivitesi ile bilinir. Doğal metabolit kaynağıdır. Özellikle, ayva yapraklarının, umut verici bir doğal biyoaktif fitokimyasal kaynak olduğu düşünülmektedir (Sabir ve ark., 2015)

4.5.9. Karpuz

Takım: *Cucurbitales*

Familya: *Cucurbitaceae*

Cins: *Citrullus*

Tür: *Citrullus lanatus*



Resim 9. Karpuz (*Citrullus lanatus*)

Karpuz, tropik bölgelerde yetişen en önemli meyvelerden biridir ve oldukça besleyicidir. Kanseri ve diğer hastalıkları önleyici etki gösteren likopen gibi doğal antioksidan içerir. Ayrıca potasyum, kalsiyum, demir, A vitamini, C vitamini bakımından zengin içeriğe sahiptir (Chogou ve ark., 2019).

4.5.10. Limon

Takım: *Sapindales*

Familya: *Rutaceae*

Cins: *Citrus L.*

Tür: *Citrus limon*



Resim 10. Limon (*Citrus limon*)

Narenciye meyveleri birçok antioksidan, antimutajen, antikarsinojen ve antialerjik maddeler içermektedir. Bunların arasında limon; ilaç, parfümeri ve gıda endüstrisi gibi çeşitli alanlarda kullanılmasının yanında içecek ve pişirme uygulamalarında aroma verici olarak da kullanılmaktadır (Matsumoto ve ark., 2018).

4.5.11. Nar

Takım: *Myrtales*

Familya: *Lythraceae*

Cins: *Punica L.*

Tür: *Punica granatum*



Resim 11. Nar (*Punica granatum*)

Nar, Orta Asya'da yetişen bilinen en eski meyve ağacı türlerinden biridir. İklim koşullarına adaptasyonu nedeniyle geniş bir coğrafi küresel dağılıma sahiptir. Beslenme, tıbbi ve süs özellikleri, yüksek tüketimi ve endüstriyel değeri için önemlidir (Teixeira ve ark., 2013).

4.5.12. Rambutan

Takım: *Sapindales*

Familya: *Sapindaceae*

Cins: *Nephelium L.*

Tür: *Nephelium lappaceum*



Resim 12. Rambutan (*Nephelium lappaceum*)

Rambutan, Güneydoğu Asya'ya özgü egzotik bir meyvedir. Rambutan meyvesi önemli biyoaktif bileşikler içerir, esas olarak kabuğu, gıda, kozmetik ve ilaç endüstrilerinde ilgi çeken yüksek miktarda antioksidan içerir. Yapılan çalışmalarda, soyulmadan elde edilen rambutan meyvesinin özlerinin; antimikrobiyal, antidiyabetik, antiviral, antienflamatuar, antihipoglisemik ve antiproliferatif etkiler gösteren fitokimyasal bileşiklere sahip olduğu gösterilmiştir (Hernandez ve ark., 2019)

4.5.13. Longan

Takım: *Sapindales*

Familya: *Sapindaceae*

Cins: *Dimocarpus L.*

Tür: *Dimocarpus longan*



Resim 13. Longan (*Dimocarpus longan*)

Longan meyvesi, etli, yenilebilir ve beyaz bir meyveye sahiptir. Longan meyvesi, corilagin, ellagik asit ve konjugatları gibi önemli miktarda biyoaktif bileşikler içerir. Son yıllarda, longanın anti-tirozinaz ve antikanser gibi bazı farmakolojik aktivitelerinin ve hafıza arttırıcı etkilerinin, insan sağlığına önemli ölçüde katkı sağlayacağı düşünülmektedir (Yang ve ark., 2011).

4.5.14. Papaya

Takım: *Brassicales*

Familya: *Caricaceae*

Cins: *Carica L.*

Tür: *Carica papaya*



Resim 14. Papaya (*Carica papaya*)

Papaya, sağlam dokusu, tatlı tadı ve çekici renkleriyle hem taze hem de konserve meyve pazarlarına hizmet veren, dünyanın özellikle Tayland'ın en önemli ve popüler tropik meyvelerinden biridir. Ayrıca, antioksidan ve provitamin A içeriği bakımından zengin olması nedeniyle tavsiye edilen sağlıklı bir gıdadır (Sangsoy ve ark., 2017)

4.5.15. Guava

Takım: *Myrtales*

Familya: *Myrtaceae*

Cins: *Psidium L.*

Tür: *Psidium guajava*



Resim 15. Guava (*Psidium guajava*)

Guava, tropik ve subtropikal bölgelerde yaygın olarak yetişen bir meyvedir. Bu bitkinin meyveleri lezzetli ve beslenme açısından zengindir (Feng ve ark., 2015). Meyvelerin yanı sıra, bitkinin farklı kısımları, çeşitli insan hastalıklarının tedavisi için yerli ilaç sisteminde kullanılmaktadır (Shu ve ark., 2012). Örneğin Çin'de, yapraklar uzun süredir ishal ve hipergliseminin tedavisi için halk ilacı olarak kullanılmıştır (Feng ve ark., 2015).

4.6. Validasyon

Validasyon, geliştirilen metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunu belirlemek için belirlenen metot parametrelerinin incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Analitik laboratuvarlarda kullanılan metodun valide edilmiş olması, laboratuvarın bu metot üzerinde yetkinlik kazandığı anlamına gelmektedir.

4.6.1. Validasyon parametrelerinin belirlenmesi

Validasyon çalışması yapılacak metot için hangi matrislerle, hangi konsantrasyon seviyelerinde hangi validasyon parametrelerinin çalışacağı belirlenmelidir. Parametrelerin seçimi, metot kapsamı ve yasal mevzuatlar dikkate alınarak yapılır.

4.6.2. Validasyon çalışması yapılacak matris seçimi

Validasyon çalışması yapılacak metot için hangi matrislerle çalışacağı önceden belirlenmelidir. Metotta yer alan matris göz önünde bulundurularak çalışılmak istenen matrisler seçilir. Matrislerin seçimi; metot kapsamı, çalışılacak analiti temsil edecek olan ürün ve ürün grupları dikkate alınarak yapılır.

Bu çalışmada ön denemelerin acıbadem çekirdeği üzerinde yapılmasının sebebi; amigdalin miktarının acıbadem çekirdeğinde çok yüksek miktarda bulunmasıdır.

4.6.3. Çalışmada kullanılacak materyaller

4.6.3.1. Kör örnek seçimi

Validasyon işlemlerinde belirli konsantrasyonda standart ilave etmek (spike yapmak) için kör numune gereklidir. Aranılan analiti içermeyen kör numunenin homojenizasyonu yapıp analiz edilir ve bu matristeki analit konsantrasyonunun LOD seviyesi altında olduğu gösterilir.

4.6.3.2. Kirlenmiş örnekler

Analiz edilmek istenen analitin ilave edildiği numunedir. Kirlenme (spike) işlemi, metodun çalışma aralığı dışına çıkılmadan gerçekleştirilmelidir.

4.6.3.3. Referans standart maddeler

Validasyon çalışması yapılacak metot için; saflığı bilinen kimyasal maddeler (referans standartlar) ve ilgili analiti içerdiği bilinen sertifikalı referans maddeler kullanılır.

4.6.4. Validasyon parametreleri

Validasyon çalışması yapılmadan önce aşağıda belirtilen aşamaları içerecek şekilde planlanmalıdır.

- Seçicilik(Selectivity)/ Spesifiklik(Specificity)
- Tespit Limiti (Limit of Detection)
- Tayin Limiti (Limit of Quantification)
- Çalışma Aralığı/ Doğrusallık (Range/Linearity)
- Doğruluk
 - Kesinlik (Presicion)
 - Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
 - Tekrar Üretilebilirlik (Laboratuvar içi) (Reproducibility-With in Laboratory)
 - Gerçeklik (Trueness)
 - Geri Kazanım
- Sağlamlık (Robustness/Ruggedness)
 - Çözelti Stabilitesi
 - Metot Parametreleri Üzerindeki Değişiklikler

4.6.4.1. Seçicilik

Seçicilik; analiti, safsızlıklar, indirgeyiciler gibi bulunması beklenen bileşenlerin varlığında kesin olarak tespit edip değerlendirme yeteneğidir.

4.6.4.2. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Tespit limiti (LOD), metodun laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit edebildiği ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük analit konsantrasyonu; tayin limiti (LOQ) ise miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır.

$$LOD = X_{k\ddot{o}r} + 3 * sr$$

$$LOQ = X_{ort} + 10 * sr$$

4.6.4.3. Doğrusallık (Çalışma aralığı)

Çalışma aralığı, metodun kabul edilebilir bir belirsizlikle verdiği tüm sonuçların aralığını ifade eder. Çalışma aralığının alt sınırı LOQ, üst sınırı ise analitik hassasiyette önemli farklılıkların gözlemlendiği konsantrasyon seviyesidir. Validasyon çalışması sırasında metodun bu çalışma aralığında kullanılabilir olduğunun doğrulanması gerekir. Bu test için, seri dilüsyonlar halinde hazırlanan standart çözeltiler en az ikişer kere cihazda okutulur ve dedektör cevabına karşılık bir konsantrasyon grafiği oluşturulur. Grafiğin korelasyon katsayısı 1'e ne kadar yakınsa lineerlik o kadar iyi kabul edilir.

4.6.4.4. Doğruluk

Doğruluk, bir ölçüm sonucunun referans (gerçek) değere yakınlığını ifade eder. Doğruluğun kesinlik ve gerçeklik olmak üzere iki bileşeni vardır.

4.6.4.4.1. Kesinlik

Kesinlik ölçüm sonuçlarının birbirlerine yakınlığının ölçüsüdür. 3 bileşeni vardır.

- 1) Gün içi tekrarlanabilirlik (Tekrarlanabilirlik)
- 2) Günler arası tekrarlanabilirlik (Tekrarüretilebilirlik)
- 3) Laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik (Seyhan, 2013)

Bu çalışmada kesinlik, tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik ile gerçekleştirilmiştir.

Kesinlik; standart sapma (SD) veya rölatif standart sapma ile (RSD) ile ifade edilir.

4.6.4.4.1.1. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, bir metodun aynı laboratuvarda, aynı cihazla, aynı koşullar altında ve aynı kişi tarafından kısa zaman aralığında elde edilen ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Standart sapma (sr), rölatif standart sapma (RSDr) veya % rölatif standart sapma (%RSDr) ile ifade edilir.

Bu çalışmada; tekrarlanabilirlik için aynı günde 10 çalışma yapılmıştır.

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_i (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

\bar{X} : Ölçüm sonuçlarının ortalaması

X_i : Her bir ölçüm sonucu

n: Yapılan çalışma sayısı

$$RSD_r (CV_r) = \frac{s}{\bar{X}} \quad \% RSD_r (CV_r) = \frac{s}{\bar{X}} \times 100$$

4.6.4.4.1.1.1. Tekrarlanabilirlik limiti

Tekrarlanabilirlik koşulları altında % 95 güven aralığında, 2 paralel analiz sonucu arasındaki maksimum farktır. Tekrarlanabilirlik limiti aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$r = 2.8 \times s_r$$

Burada;

r: Tekrarlanabilirlik Limiti

s_r: Tekrarlanabilirlik standart sapması

4.6.4.4.1.1.2. Tekrarlanabilirliğin değerlendirilmesi

Tekrarlanabilirlik standart sapması konsantrasyona bağlı olarak değişir. Kabul edilebilir değerler aşağıdaki Horwitz eşitliği ile hesaplanarak bulunur.

$$PRSD_r = C^{-0.15}$$

Burada;

PRSD_r (%): Horwitz eşitliğinden hesaplanan rölatif standart sapma

C: Çalışılan konsantrasyon seviyesi kütle fraksiyonu

Bazı konsantrasyon seviyeleri için yaklaşık olarak hesaplanan değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Tablo 1: Tekrarlanabilirlik %RSD_r ve Horwitz Eşitliğinden Hesaplanan Rölatif Standart Sapma Tablosu (AOAC Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals)

Konsantrasyon	Tekrarlanabilirlik (% PRSD _r)
100 %	1 %
10 %	1,5 %
1 %	2 %
0,1 %	3 %
0,01 %	4 %
10 ppm	6 %
1 ppm	8 %
10 ppb	15 %

4.6.4.4.1.2. Tekrar üretilebilirlik

Tekrar üretilebilirlik, bir metodun aynı laboratuvarında aynı/farklı cihazlarla, farklı kişiler tarafından, geniş zaman aralığında elde ettiği ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının ölçüsüdür. Her bir analit için seçilen konsantrasyon seviyelerinde, elde edilen verilerin standart sapması hesaplanarak tekrar üretilebilirlik için S_R ve % RSD_r hesaplanır. Tekrarüretilebilirlik standart sapması S_R , tekrarlanabilirlik standart sapmasından s_r her zaman büyük olmalıdır.

4.6.4.4.1.2.1. Tekrarüretilebilirlik limiti

Tekrar üretilebilirlik koşulları altında gerçekleştirilen iki deney arasında olabilecek maksimum farktır (%95 güven aralığında). Tekrarüretilebilirlik limiti aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$R = 2.8 \times S_R$$

Burada;

R: Tekrar üretilebilirlik limiti

S_R = Tekrar üretilebilirlik standart sapması

4.6.4.4.1.2.2. Tekrarüretilebilirliliğin değerlendirilmesi

Horwitz eşitliği aşağıdaki gibi hesaplanır;

$$PRSD_R = 2C^{-0.15}$$

Burada;

$PRSD_R$ (%) : Hesaplanan rölatif standart sapma

C: Çalışılan konsantrasyon seviyesi kütle fraksiyonu

Bazı konsantrasyon seviyeleri için yaklaşık olarak hesaplanan değerler aşağıdaki tabloda verilmiştir:

Tablo 2: Tekrarüretilebilirlik $\%RSD_R$ ve Horwitz Eşitliğinden Hesaplanan Rölatif Standart Sapma Tablosu (AOAC Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals)

Konsantrasyon	Tekrarüretilebilirlik ($\%PRSD_R$)
100 %	2 %
10 %	3 %
1 %	4 %
0,1 %	6 %
0,01 %	8 %
10 ppm	11 %
1 ppm	16 %
10 ppb	32 %

4.6.4.4.2. Gerçeklik

Gerçeklik, belli sayıda analiz sonuçlarının ortalamasının referans (gerçek) değere ne kadar yakın olduğunun göstergesidir. Gerçeklik, matriks ve konsantrasyon seviyesine bağlı olarak değişebilir. Bu yüzden validasyon planında hangi matriks ve hangi konsantrasyon seviyelerinde gerçeklik çalışmasının yapılacağı belirtilmelidir.

4.6.4.4.2.1. Geri kazanım

Kirletilmiş materyal ile gerçeklik çalışması için kör örneklere ihtiyaç vardır. Kör örnekler, istenen seviyede analitle kirletilmiş örneklerle birlikte çalışılır. Validasyon çalışmasına katılan personel tarafından, kör örnek ve kirletilmiş örnekle tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilirlik koşullarında 10 bağımsız çalışma yapılır, sonuçlar geri kazanım olarak hesaplanır ve değerlendirilir. Eğer uygunsa kesinlik çalışmasından elde edilen veriler kullanılabilir. Kirletme yoluyla geri kazanım çalışmasının en büyük avantajı orijinal matrikste çalışma yapılabilmesidir. Çalışma

için orijinal matris, aranan analit ile zenginleştirilir. Her konsantrasyon için, geri kazanım oranı aşağıdaki formülle hesaplanır:

$$\% \text{ GK} = \frac{X'_{ort} - X_{ort}}{X_{kirletilmiş}} \times 100$$

Burada;

% GK: Geri kazanım oranı

X_{ort}: Kirletilmemiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

X'_{ort}: Kirletilmiş örneklerle yapılan analiz sonuçları ortalaması

X_{kirletilmiş}: Kirletmek için kullanılan analit miktarı

Bu çalışmada gerçeklik için; 2 farklı konsantrasyonda kirletilmiş kör örneklerle çalışılmıştır.

4.6.4.5. Sağlamlık

Bir metodun sağlamlığı, analiz sonuçlarının, analiz koşullarındaki küçük değişiklikler karşısında etkilenmeden kalma kapasitesidir. Bu çalışmanın yapılabilmesi için analize etki eden faktörlerin belirlenmesi gerekir. Bu faktörler; örnek miktarı, pH, kolon sıcaklığı, akış hızı vb. olabilir. Tanımlanan faktörler üzerinde birtakım değişiklikler yapılır ve sonuçlar değerlendirilir.

4.6.5. Sistem uygunluk parametreleri

4.6.5.1. Alıkonma zamanı

Örneğin enjeksiyonundan sonra dedektöre ulaşması için geçen zamandır. “t_R” ile gösterilir. (Yalçın, 1999)

$$t_R = \frac{V_R}{u}$$

Burada;

V_R= Bileşenin duran fazdan elue olması için gerekli olan hareketli faz hacmi

u= Hareketli fazın akış hızı

4.6.5.2. Kapasite faktörü

Bileşenin kolondaki göç hızını tanımlar. “k’ ” ile gösterilir. Kapasite faktörü 1’ den küçük ise elüsyon; alıkonma zamanını saptayamayacak kadar hızda kısa sürede, 20-30 gibi bir değerden daha büyük ise çok uzun sürede gerçekleşir. Normal bir ayırma koşulunda kapasite faktörü 1 ila 5 arasında olmalıdır. (Yalçın, 1999)

$$k' = \frac{t_r - t_m}{t_m}$$

Burada;

t_r = Tutulma zamanı (dk)

t_m = Ölü zaman (dk)

4.6.5.3. Ayırma faktörü

Bağıl alıkonma olarak da adlandırılır. İki türün kapasite faktörleri oranıdır. “ α ” ile gösterilir. (Yalçın, 1999)

$$\alpha = \frac{K_b}{K_a}$$

Burada;

K_b = Daha büyük kuvvetle alıkonulan türün kapasite faktörü

K_a = Daha zayıf kuvvetle alıkonulan türün kapasite faktörü

4.6.5.4. Teorik plaka sayısı

Kromatografik kolon, çok sayıda birbirinden ayrı tabakalardan oluşmuş dar plakalardır. Bunlara teorik plaka adı verilmiştir. “N” ile gösterilir. Kolonun yararlılığı teorik plaka sayısı arttıkça artar. (Yalçın, 1999)

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Burada;

t_R = Alıkonma zamanı

W= Pik genişliği

4.6.5.5. Kuyruklanma faktörü

Kuyruklanma faktörü pikin simetrik olması ile ilgilidir. “T” ile gösterilir. Çalışmalarda daima simetrik pikler seçilmelidir (Al-Bazı, 2018).

$$T = \frac{W_{5,0}}{2 t_w}$$

Burada;

$W_{5,0}$ = Ölçülen pik yüksekliğinin %5 indeki pik genişliği (dk)

t_w = Pik başlangıç zamanı ile alıkonma zamanı arasındaki fark (Seyhan, 2013)

4.6.5.6. Ayırma gücü

İki türün ayrılmasının kantitatif bir ölçüsüdür. "R" ile gösterilir. (Yaçın, 1999)

$T_1 < T_2$ olmak üzere;

$$R = \frac{2 (T_2 - T_1)}{W_1 + W_2}$$

Burada;

T_1 = 1. Pike ait alıkonma zamanı

T_2 = 2. Pike ait alıkonma zamanı

W_1 = 1. Pike ait pik genişliği (dk)

W_2 = 2. Pike ait pik genişliği (dk) (Seyhan,2013)

4.6.6. Kullanılan istatistiksel yöntemlerdeki terimler

4.6.6.1. Standart sapma

Standart sapma, verilerin aritmetik ortalamadan uzaklıklarına bağlı bir değerdir. "S" ile gösterilir.

$$S = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

Burada;

X_i = Her bir veri sayısı

\bar{x} =Aritmetik ortalama

N = Veri sayısı

4.6.6.2. Bağıl standart sapma

Standart sapmanın verilerin ortalamasına bölümüyle elde edilir. “RSD” ile gösterilir.

$$RSD = \frac{100 \cdot SD}{\bar{X}}$$

Burada;

SD= Standart sapma

\bar{x} = Verilerin ortalaması

4.6.6.3. Güven aralığı

Bir aralık belirleyip anakütle ortalamasının bu aralık içinde bulunma ihtimali söylenebilir. Bu aralığa güven aralığı denir. “ μ ” ile gösterilir. Olasılık seviyesi ise güven düzeyini verir. Güven düzeyi $1-\alpha$ ile gösterilir.

$$\mu = \bar{X} \pm Z \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

Burada;

\bar{x} = Verilerin ortalaması

z= Kritik değer

σ = Standart sapma

n= Değer sayısı

4.6.6.4. En küçük kareler yöntemi

En küçük kareler yöntemi veri noktalarına en iyi uyan doğruyu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. İspatı için doğrusal matematik kullanılır. Ölçülen sinyal büyüklüğü y ile standarttaki analit derişimi x arasında doğrusal bir ilişkinin gerçekten var olduğu kabul edilir. Bu kabulü gösteren matematik denkleme regresyon modeli denir.

$$y=mx+b$$

Burada;

b= y için başlangıç ordinatı

m= doğrunun eğimi

Doğrunun eğimi;

$$m = \frac{\Sigma\{(xi-x)(yi-y)\}}{\Sigma(xi-x)^2}$$

Doğrunun kesim noktası;

$y = mx + b$ denkleminde m eğimi ve b de y eksenini kesim noktasını gösterir. Yani $x = 0$ iken $y = b$ dir.

Korelasyon katsayı;

Korelasyon, iki değişken arasındaki doğrusal ilişkinin derecesini belirleme işlemidir. Doğrusal korelasyonda bağımsız X ve bağımlı Y değişkenleri arasındaki ilişkiyi gösteren sayıya korelasyon katsayısı denir. “ r ” ile gösterilir ve aşağıdaki denklemden hesaplanır.

$$r = \frac{\sum_i \left\{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \right\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x}) \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y}) \right] \right\}^{\frac{1}{2}}}$$

4.6.7. Kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi

Kromatografinin genel prensibi, çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla sabit bir faz arasından farklı hızlarla hareket etmeleri esasına dayanır. HPLC, uçucu olmayan biyolojik ve kimyasal bileşenlerin ayrımında kullanılır. İzokratik ve gradient çalışmaya olanak sağlar. İzokratik çalışmada çözücü bileşimi sabittir ve basit ayırmalar için tercih edilir. Gradient çalışmada; hareketli faz bileşimi zamanla değişim gösterir ve kompleks karışımların ayrımı için kullanılır. Ayrım şekilleri olarak normal ve ters faz kullanılır. Ters faz; apolar, polar, iyonlaşabilen veya iyonik bileşenler için kullanılabilir. Kolon apolar özellik gösterirken (C18, C8, C3) hareketli faz polar özellik gösterir. Mevcut bileşenlerin 90% ından fazlası için kullanılabilir. Normal faz; suya karşı hassas bileşikler, izomerler ve kiral analizler için kullanılabilir. Kolon polar (silika jel vb.) özellik gösterirken hareketli faz apolar olmalıdır (hekzan vb.). 10% kadar bileşik için tercih edilebilecek bir yöntemdir. Normal-faz kromatografide, polarlığı en az olan bileşen kolondan ilk önce çıkar; hareketli fazın polarlığı arttıkça elüsyon zamanı azalır.

Ters-faz tekniğinde ise, aksine, polarlığı en çok olan bileşik kolondan ilk önce çıkar ve hareketli fazın polarlığı arttıkça elusyon zamanı artar.

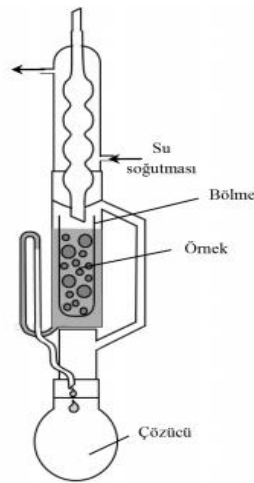
Bu çalışmada; ters faz kromatografisi ile izokratik elüsyon yöntemi kullanılmıştır.

4.6.8. Kullanılan ekstraksiyon yöntemleri

Ekstraksiyon, bir çözelti ya da süspansiyon içindeki organik maddeyi çözen fakat çözelti ya da süspansiyondaki çözen ile karışmayan bir başka organik çözen yardımıyla ayırmaktır. Kimyada bir saflaştırma yöntemi değil ayırma yöntemi olarak kullanılır.

4.6.8.1. Soxhlet ekstraksiyonu

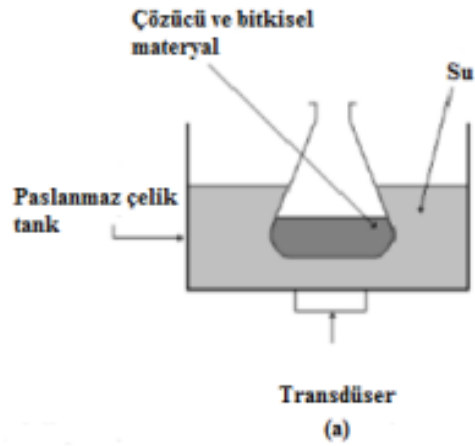
Katı-sıvı ekstraksiyon olarak da bilinen soxhlet ekstraksiyon, bir katı maddenin kısmen çözülebilir bileşenlerinin bir soxhlet ekstraktör kullanarak sıvı faza transfer işlemidir. Önceden kurutulan katı numune bir ekstraksiyon kartuşu içine yerleştirildikten sonra bu kartuş soxhlet ekstraktörün ana bölmesine alınır. Cam balon içine konulan solvent ısıtıcı yardımıyla buharlaşarak ana bölme içinden geçer ve geri soğutucuya ulaşır. Böylece kısmen çözülebilir bileşenler yavaş yavaş bu solvante transfer olur. Bu döngünün sürekli olarak tekrarlanmasıyla örnek tekrar tekrar transfer bölümlerinin yer değiştirmesini kolaylaştıran taze özütleme çözücüsüyle temas ettirilir. Ek olarak, süzülmeden sonra filtrasyona gerek duyulmaz ve paralel olarak birkaç eşzamanlı ekstraksiyon yapılarak numune verimi artırılabilir. (Luque de Castro ve Priego- Capote, 2010)



Resim 16. Soxhlet Ekstraktör Cihazı

4.6.8.2. Ultrasonik banyo ekstraksiyonu

Ultrasonik ekstraksiyon; ses dalgaları-destekli sıvı ekstraksiyonu olarak da adlandırılır. Bu yöntemde örneğe 20 kHz üstündeki frekanslarla akustik titreşimler uygulanır. Bu titreşimler sıvının içinden geçtiğinde kavitasyon (boşluk oluşumu) meydana gelir. Bu etki sıvı ortamda çok sayıda ufacık kabarcıklar üretir ve katıların mekanik olarak sarsılmasına neden olarak partiküllerin kopmasını sağlar. Ses dalgaları, hem katı hem de sıvı örnek hazırlamada kullanılır. En çok tercih edilen ultrasonik radyasyon kaynağı ultrasonik banyodur çünkü; ekipmanı ucuz, kullanım kolay, minimum bozulma ile hedefiyle bileşenin ekstraksiyonu maksimum düzeyde, daha az çözücü kullanılır ve yüksek verim sağlar (Yağcıoğlu, 2015).



Resim 17. Ultrasonik su banyosu

4.6.8.3. Orbital çalkalamalı ekstraksiyon

Laboratuvar deneylerinde, cam kaplar içindeki sıvıların homojen olarak çalkalanması için kullanılır. Sallayıcı tabla üzerine konan erlen, balon ve benzer kaplar özel bağlama çubukları ile sabitlenir. Cihaz belirli salınım hareketleriyle kaplar içindeki sıvıları dairesel hareketle sallama işlemini gerçekleştirir. Bu işlemle analizi istenen analit, çözücüye geçer ve ekstraksiyon işlemi tamamlanmış olur.

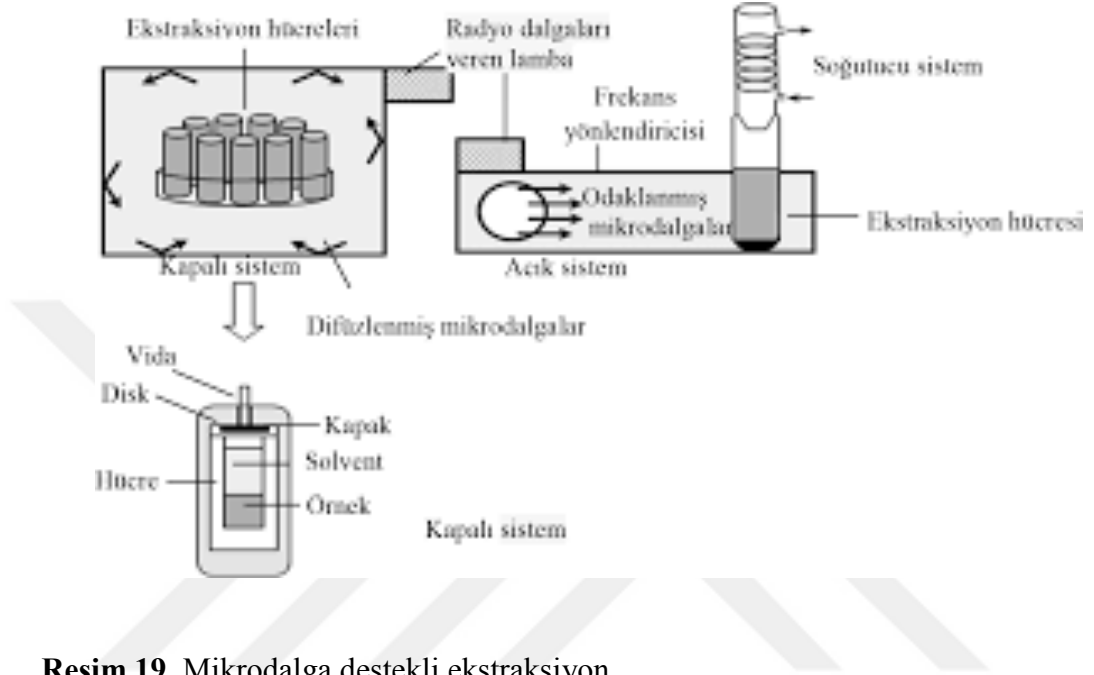


Resim 18. Orbital çalkalayıcı

4.6.8.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Mikrodalgalar yüksek frekanslı elektromanyetik dalgalardır (300-300000 MHz). Mikrodalga enerji kullanılarak ısıtmanın prensibi, iyonların iletimi ve dipol rotasyonu (dönme) yoluyla molekül üzerine mikrodalganın direkt etkisi temeline dayanır. Mikrodalga ısıtması klasik ısıtmaya göre daha avantajlıdır. Çünkü örneğin tamamı aynı anda, homojen ve hızlı bir şekilde ısıtılır. Hücreler, mikrodalga ışınları sayesinde ısınır ve buharlaşma gerçekleşir. Buharlaşma sonucunda hücre duvarına basınç uygulanır ve hücre duvarı yüksek basınç nedeniyle parçalanır böylece bileşenler çözücüye geçmiş olur (Yağcıoğlu, 2015). İyonik iletim gerçekleştiğinde çözeltinin bu iyon akışına direnç göstermesi friksiyon (sürtünme) ile sonuçlanır ve böylece çözelti ısınır. Başarılı bir ekstraksiyon gerçekleştirmek için uygun solvent seçimi çok önemlidir. Seçilen solventlerde mikrodalga ışımasını absorplaması, solventin matriksle etkileşimi ve analitin solventteki çözünürlüğü göz önüne alınmalıdır. Mikrodalga destekli ekstraksiyonun tercih edilmesinin sebepleri;

ekstraksiyonun daha kısa sürede gerçekleşmesi, daha az çözücü kullanılması, ekstraksiyon verimini arttırdığından daha yüksek geri kazanım oranlarının elde edilmesi, kullanım kolaylığı sağlaması, düşük maliyetli olması, geniş solvent ve solvent karışımları seçimine olanak sağlamasıdır (Yağcıoğlu, 2015).



Resim 19. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Çalışılan Örnekler

Bu çalışmada analiz edilen meyve çekirdekleri, Türkiye ve Tayland'daki yerel pazarlardan elde edilmiştir. Armut (*Pyrus communis*), ayva (*Cydonia oblonga*), kayısı (*Prunus armeniaca*), elma (*Malus domestica*), kiraz (*Prunus avium*), nektarin (*Prunus persica* var. *Nucipersica*), erik (*Prunus domestica*), karpuz (*Citrullus lanatus*), limon (*Citrus limon*), nar (*Punica granatum*) ve acı badem (*Semen Amygdali amarum*) Türkiye, İstanbul, Maltepe yerel pazarlarından; rambutan (*Nephelium lappaceum*), papaya (*Carica papaya*), longan (*Dimocarpus longan*) ve guava (*Psidium guajava*) Tayland, Nonthaburi, Bang Yai yerel pazarlarından elde edildi.

Meyve kısımlarından ayrılan çekirdekler, 1 gece boyunca 40 °C' de hava dolaşımli etüvde kurutuldu. Kurutma işleminden sonra havanda küçük parçalara ayrılacak şekilde dövüldü.

Çekirdekler tamamen toz haline getirilmemiştir çünkü Koo ve ark. (2005)' nin yaptığı çalışmaya göre küçük parçalara ayrılan acı badem çekirdeklerinden, toz haline göre daha fazla miktarda amigdalin elde edilmiştir.

5.2. Kimyasal Maddeler

- Amigdalin standardı (Sigma-Aldrich, BioXtra, ≥97% saflıkta)
- Metanol (J.T Baker)
- Etanol (J.T Baker)
- Asetonitril (J.T Baker)
- Hekzan (Merck)
- Su
- Sitrik asit (Merck)

Tüm kimyasallar ve solventler reaktif veya HPLC derecesindedir. Amigdalin standardı Sigma-Aldrich Co.'dan (St. Louis, MO, ABD) satın alınmış, diğer kimyasal maddeler ve organik çözücüler Merck'ten (Darmstadt, Almanya) ve J.T Baker'dan

(Çin) satın alınmıştır. Çalışma esnasında kullanılan ultra saf su NTS, Delicate R.O. su arıtma sisteminden sağlanmıştır.

5.3. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

- Genel laboratuvar cam malzemeleri
- 100 µL, 1000 µL ve 5000 µL hacminde otomatik mikropipetler (Brand, Transferpette)
- Ultrasonik banyo (EFLAB, KUDOS-SK 3310NP)
- Orbital çalkalayıcı (EFLAB, EFSH)
- Soxhlet ekstraksiyon cihazı (EFLAB, EFYG-4)
- Mikrodalga destekli ekstraksiyon cihazı (Terra, Mars 240-50)
- HPLC- DAD (Shimadzu series LC- 20A)
 - DGU-20A₅ Degazör
 - LC-20AT Pompa
 - SIL-20A_{HT} Auto sampler
 - CTO-10AS_{VP} Kolon fırını
 - SPD-M20A Diode Array Dedektör

5.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisine ait Kromatografik Koşullar

Mobil faz	: Metanol: Su karışımı (30:70) (h:h)
Kolon	: Thermo C18 (3µm, 4.6×250 mm)
Kolon fırını sıcaklığı	: 35 °C
Detektör	: Diode Array Dedector (DAD)
Dalgaboyu	: 207 nm (Bant genişliği 4nm)
Akış hızı	: 0,9 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	: 20 µL
Elüsyon	: İzokratik

5.5. Çözeltilerin Hazırlanması

5.5.1. Mobil fazın hazırlanması

Çalışmada kullanılan mobil faz, (30:70) oranlarında metanol ve su bileşenlerinden oluşmaktadır. 2 L' lik mobil faz hazırlamak için 600 mL metanol ve 1400 mL su

kullanılmıştır. Mobil faz hazırlandıktan sonra içerisindeki gaz kabarcıklarını uzaklaştırmak amacıyla ultrasonik banyoda 10 dakika boyunca degaze edilmiştir.

Literatürdeki çalışmalarda mobil faz olarak genellikle asetonitril: su veya metanol:su karışımları kullanılmıştır. Wang ve ark. (2015), mobil faz olarak 13:87 oranında asetonitril ve su karışımı kullanmışlardır ancak etkin bir ayrılma elde edememişlerdir. Metanol asetonitrilden daha iyi ayırma özelliğine sahip bir çözücü olduğundan çalışmamızda metanol tercih edilmiştir. Lv ve ark. (2005), mobil faz olarak 15:80 oranında metanol ve su karışımı kullanmışlardır, etkin bir pik ayrımı elde etmişlerdir ancak amigdalinin alıkonma zamanı 20 dakikadan fazla sürmüştür. Bu validasyonda çalışma süresini kısaltma amacıyla metanol oranı artırılmış ve 30:70 oranında metanol ve su karışımı kullanılmıştır.

5.5.2. Ekstraksiyon solventlerinin hazırlanması

Ekstraksiyonda metanol, etanol, asetonitril, hekzan, su, %50 metanol, %50 etanol ve %2 sitrik asit solventleri kullanılmıştır.

5.5.2.1. %2 Sitrik asit çözeltisinin hazırlanması

20 g sitrik asit tartılarak 1000 mL' lik ölçülü balona aktarılır ve üzeri su ile hacme tamamlanır.

5.5.2.2. %50 Metanol çözeltisinin hazırlanması

500 mL metanol mezürle ölçülerek 1000 mL' lik ölçülü balona aktarılır ve üzeri su ile hacme tamamlanır.

5.5.2.3. %50 Etanol çözeltisinin hazırlanması

500 mL etanol mezürle ölçülerek 1000 mL' lik ölçülü balona aktarılır ve üzeri su ile hacme tamamlanır.

Bunların dışında kullanılan diğer solventler saf halleriyle kullanılmıştır.

5.5.3. 1000 mg/kg Ana stok standart çözeltisinin hazırlanması

50 mg amigdalin standardı tartılıp 50 mL'lik ölçülü balona aktarıldı üzerine bir miktar saf su eklenerek çözünmesi sağlandı ardından yine saf su ile hacme tamamlandı.

5.5.4. Kalibrasyon eğrisi için kullanılacak çözeltilerinin hazırlanması

5.5.4.1. 250 mg/kg standart çözeltisi

1,5 mL' lik HPLC vialine 375 µL 1000 mg/kg' lık ana stok çözeltisi ve 625 µL saf su konularak vortakslenir.

5.5.4.2. 100 mg/kg standart çözeltisi

1,5 mL' lik HPLC vialine 150 µL 1000 mg/kg' lık ana stok çözeltisi ve 1350 µL saf su konularak vortakslenir.

5.5.4.3. 50 mg/kg standart çözeltisi

1,5 mL' lik HPLC vialine 75 µL 1000 mg/kg' lık ana stok çözeltisi ve 1425 µL saf su konularak vortakslenir.

5.5.4.4. 25 mg/kg standart çözeltisi

1,5 mL' lik HPLC vialine 150 µL 250 mg/kg' lık ara stok çözeltisi ve 1350 µL saf su konularak vortakslenir.

5.5.4.5. 10 mg/kg standart çözeltisi

1,5 mL' lik HPLC vialine 60 µL 250 mg/kg' lık ara stok çözeltisi ve 1440 µL saf su konularak vortakslenir.

5.5.4.6. 5 mg/kg standart çözeltisi

1,5 mL' lik HPLC vialine 30 µL 250 mg/kg' lık ara stok çözeltisi ve 1470 µL saf su konularak vortakslenir.

5.5.4.7. 1 mg/kg standart çözeltisi

1,5 mL' lik HPLC vialine 150 µL 10 mg/kg' lık ara stok çözeltisi ve 1350 µL saf su konularak vortakslenir.

5.5.5. Teşhis limiti çalışması için çözeltilerin hazırlanması

100 mL' lik ölçülü balona 1,5 mL 1000 ppm' lik ana stoktan ilave edilir üzeri saf su ile hacme tamamlanır. 15 mg/kg' lık ara stok elde edilmiş olur. Amigdalın içermediği bilinen 10 farklı karpuz çekirdeği numunesine 15 mg/kg düzeyinde spike yapılır. Numunelere uygulanan ekstraksiyon işlemlerinden sonra elde edilen ekstraktlar HPLC viallerine alınır ve HPLC' ye 1'er kez enjeksiyon yapılır. Toplamda 10 enjeksiyon verisi elde edilmiş olur.

5.5.6. Geri kazanım çalışmaları için kullanılacak standart çözeltilerin hazırlanması

5.5.6.1. 200 mg/kg standart çözeltisi

100 mL' lik ölçülü balona 1000 mg/kg' lık ana stoktan 20 mL ilave edilir ve üzeri saf su ile hacme tamamlanır.

5.5.6.2. 500 mg/kg standart çözeltisi

100 mL' lik ölçülü balona 1000 mg/kg' lık ana stoktan 50 mL ilave edilir ve üzeri saf su ile hacme tamamlanır.

5.6. Amigdalın Kalibrasyon Eğrisi

Kalibrasyon eğrisi; 1, 5, 10, 25, 50, 100 ve 250 mg/kg olmak üzere 7 farklı konsantrasyon seviyesinde oluşturulmuştur.

5.7. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

Amigdalın için LOD değeri 0.015 mg/g ve LOQ değeri 0.018 mg/g olarak bulunmuştur.

5.8. Yöntemin Geri Kazanım Oranları

Geri kazanım çalışması için amigdalın içermediği bilinen karpuz çekirdeği numunesine 200 mg/kg ve 500 mg/kg olmak üzere iki düzeyde spike yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları için ayrı ayrı geri kazanım çalışması yapılmıştır. Bunun için tekrarlanabilirlik çalışmasında kısa zaman zarfında

10 paralel çalışma yapılmıştır. Tekrarüretilebilirlik çalışmasında 10 farklı günde 2 paralel çalışma yapılarak toplamda 20 veri elde edilmiştir. Sonuçların ortalaması alınıp metodun geri kazanım oranı tespit edilmiştir.

5.8.1. 200 mg/kg seviyesinde geri kazanım çalışması

Amigdalın içermediği bilinen 10 farklı karpuz çekirdeği numunesine 200 mg/kg düzeyinde spike yapılır. Numuelere uygulanan ekstraksiyon işlemlerinden sonra elde edilen ekstraktlar HPLC viallerine alınır ve HPLC' ye 1'er kez enjeksiyon yapılır. Toplamda 10 enjeksiyon verisi elde edilmiş olur.

5.8.2. 500 mg/kg seviyesinde geri kazanım çalışması

Amigdalın içermediği bilinen 10 farklı karpuz çekirdeği numunesine 500 mg/kg düzeyinde spike yapılır. Numuelere uygulanan ekstraksiyon işlemlerinden sonra elde edilen ekstraktlar HPLC viallerine alınır ve HPLC' ye 1'er kez enjeksiyon yapılır. Toplamda 10 enjeksiyon verisi elde edilmiş olur.

5.9. Örnek Hazırlığı

5.9.1. Soxhlet ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu, acı badem çekirdeklerinden amigdalın ekstrakte etmek için kullanılmıştır. Bunun için 2,5 gram kuru acı badem çekirdeği tartılmış ve bir ekstraksiyon kartuşuna yerleştirilmiştir. Ekstraksiyon balonlarına 250 mL çözücü ilave edilmiştir. Bunun için sekiz farklı ekstraksiyon solventi kullanılmıştır. Bu çözücüler sırasıyla; % 2 sitrik asit, metanol,% 50 metanol, etanol,% 50 etanol, hekzan, asetoniril, ve sudur. Balon içerikleri 4 saat boyunca kaynatılıp ekstraksiyondan sonra çözücü, 60 °C' de tutulan termostatik banyo ve vakum kontrollü döner bir buharlaştırıcı kullanılarak balondan uzaklaştırılmıştır. Kalıntı 5 ml sıcak su ile çözündürülmüştür. Elde edilen ekstraktlar, HPLC sistemine enjekte edilmeden önce 0.45 um'lik bir membran filtreden süzölmüştür.

5.9.2. Ultrasonik banyo ekstraksiyonu

Ultrasonik banyo ekstraksiyonu, acı badem çekirdeklerinden amigdalin ekstrakte etmek için kullanılmıştır. Bunun için 2,5 gram kuru acıbadem çekirdeği tartılmış ve 50 mL' lik balon jodelere aktarılmıştır. Üzerlerine 25 mL çözücü eklenmiştir. Bunun için yedi farklı çözücü kullanılmıştır. Bu çözücüler sırasıyla; % 2 sitrik asit, metanol,% 50 metanol, etanol,% 50 etanol, asetoniril ve sudur. Numuneler 40 °C' de 30 dakika boyunca ekstrakte edilmiştir. Balon içerikleri, çözücülerle 50 ml hacme tamamlanıp önce kaba filtre kağıdından ardından 0.45 um'lik membran filtreden süzölmüştür. Enjeksiyon için HPLC viallerine alınmıştır.

5.9.3. Orbital çalkalamalı ekstraksiyon

Orbital çalkalama ekstraksiyonu, acı badem çekirdeklerinden amigdalin ekstrakte etmek için kullanılmıştır. Bunun için 2,5 gram kuru acıbadem çekirdeği tartılıp 250 mL' lik erlenlere konulmuştur. Üzerlerine 50 mL çözücü eklenmiştir. Bunun için yedi farklı çözücü kullanılmıştır. Bu çözücüler sırasıyla; % 2 sitrik asit, metanol, % 50 metanol, etanol,% 50 etanol, asetoniril ve sudur. Numuneler 2 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Erlen içerikleri önce kaba filtre kağıdından ardından 0.45 um'lik membran filtreden süzölmüştür. Enjeksiyon için HPLC viallerine alınmıştır.

5.9.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

Mikrodalga destekli ekstraksiyon, acı badem çekirdeklerinden amigdalin ekstrakte etmek için kullanılmıştır. Bunun için 0,25 gram kuru acıbadem çekirdeği tartılıp ekstraksiyon tüplerine yerleştirilmiştir. Üzerlerine 10 mL çözücü eklenmiştir. Bunun için dört farklı çözücü kullanılmıştır. Bu çözücüler sırasıyla; % 50 metanol, % 50 etanol, su ve % 2 sitrik asittir. Numuneler 40°C' de 800 W gücünde, 1 saat boyunca ekstrakte edilmiştir. Tüp içerikleri önce kaba filtre kağıdından ardından 0.45 um'lik membran filtreden süzölmüştür. Enjeksiyon için HPLC viallerine alınmıştır.

Mikrodalga ekstraksiyonunda saf halde metanol, etanol, asetonitril ve hekzan kullanılmamasının sebebi bu solventlerin saf hallerinin basınçlı kaplarda tehlike oluşturabileceğidir. Bu nedenle sulu çözeltilerinin hazırlanması daha güvenlidir. Ayrıca non polar bir çözücü olan hekzan (dipol moment<0,1) mikrodalga içerisinde

ısınmaz. Bu gibi durumlarda non polar çözücünün polar çözücü ile karıştırılarak kullanılması önerilmektedir (Yağcıoğlu, 2015). Ancak hekzan en az dipol momente sahip olduğundan bitkisel kaynaklardan yapılan ekstraksiyonlarda çok fazla tercih edilmemektedir.



6. BULGULAR

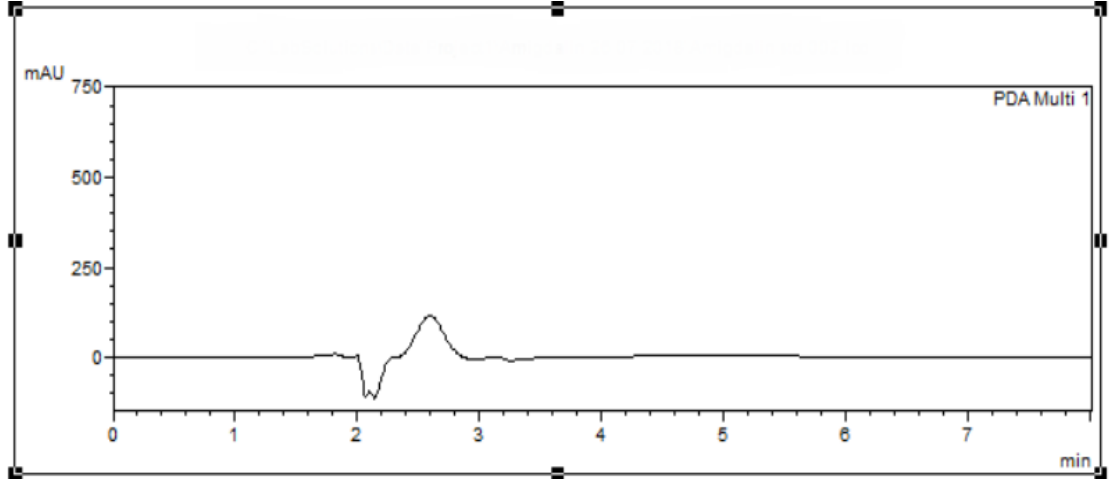
6.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Metot Validasyonu

Bu çalışma için planlanan validasyonda aşağıdaki parametreler incelenmiştir;

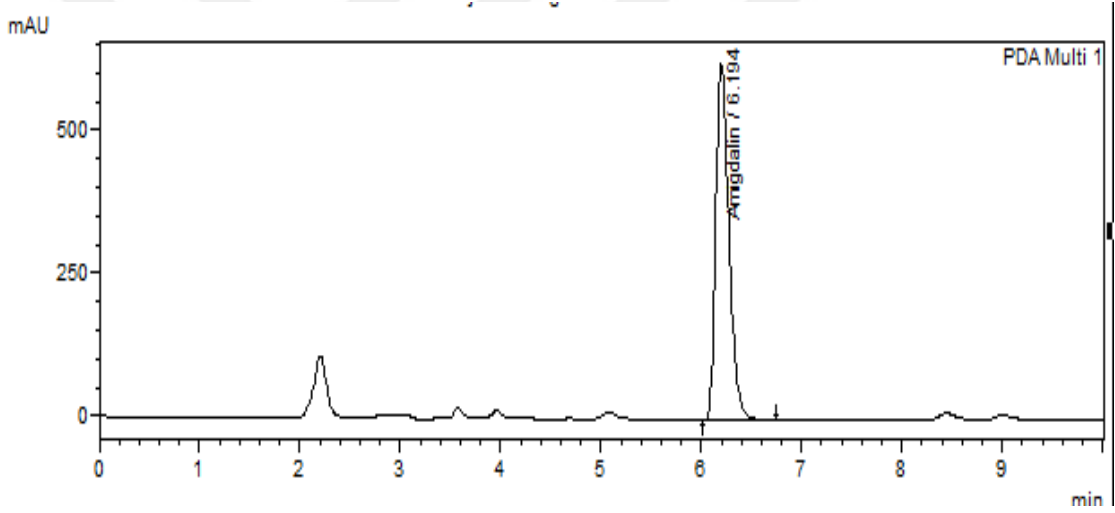
- Seçicilik(Selectivity)/ Spesifiklik(Specificity)
- Tespit Limiti (Limit of Detection)
- Tayin Limiti (Limit of Quantification)
- Çalışma Aralığı/ Doğrusallık (Range/Linearity)
- Doğruluk
 - Kesinlik (Presicion)
 - Tekrarlanabilirlik (Repeatability)
 - Tekrar Üretilirlik (Laboratuvar içi) (Reproducibility)
 - Gerçeklik (Trueness)
 - Geri Kazanım
 - Sağlamlık (Robustness/Ruggedness)
 - Çözelti Stabilitesi
 - Metot Parametreleri Üzerindeki Değişiklikler

6.1.1. Seçicilik

Amigdalin standartları su ile hazırlanmıştır. Blank numune olarak sisteme su enjeksiyonu yaptırılmıştır. Numune olarak da 250 mg/kg seviyesinde amigdalin standardı kullanılmıştır. Kromatogramda herhangi bir girişim gözlenmemiştir.



Şekil 4. Blank kromatogramı



Şekil 5. Amigdalın standardına ait kromatogram

Pikin saflık derecesi	1.000000
------------------------------	----------

6.1.2. LOD ve LOQ çalışması

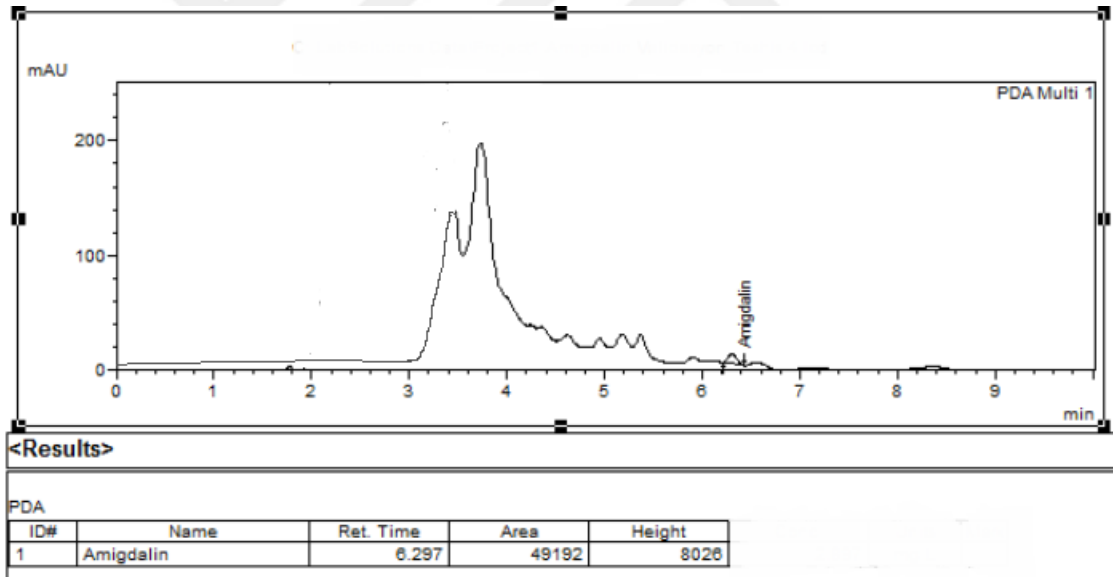
LOD ve LOQ değerleri için karpuz çekirdeğine 10 adet spike çalışması yapılmıştır. Elde edilen veriler aşağıdaki formüller yardımıyla hesaplanmıştır.

$$LOD = X_{k\ddot{o}r} + 3 * sr$$

$$LOQ = X_{ort} + 10 * sr$$

Tablo 3. LOD ve LOQ çalışmasından elde edilen veriler

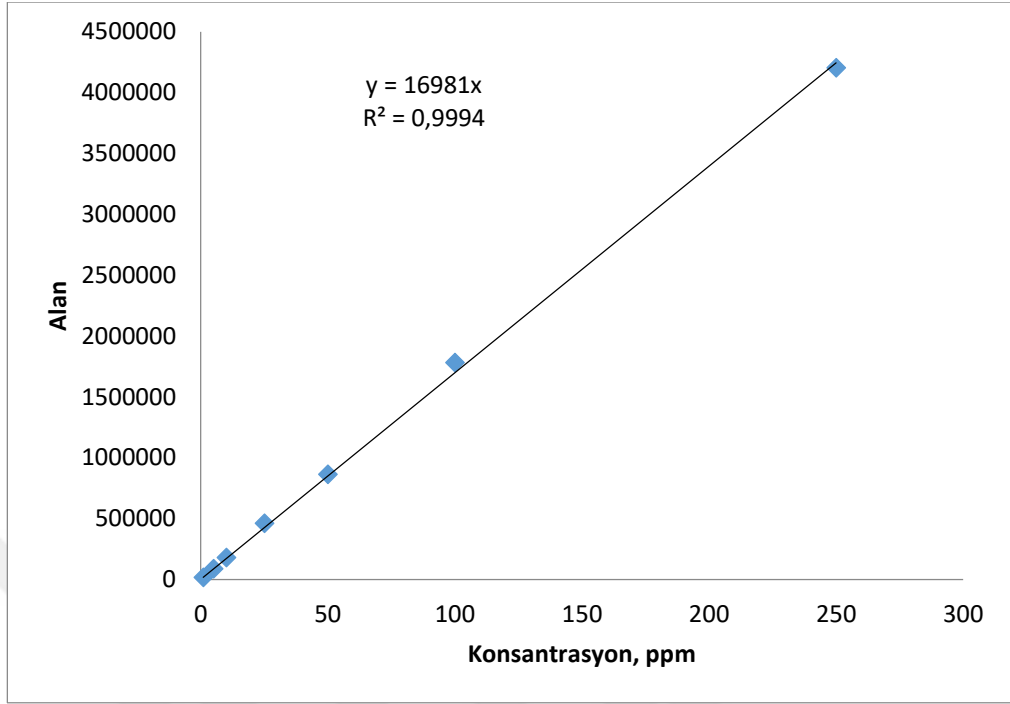
TEKRAR SAYISI	Amigdalin (mg/kg)	Alan
1	13,77	46761
2	14,01	47588
3	14,21	48246
4	14,48	49192
5	13,85	47028
6	14,44	49050
7	13,26	45034
8	14,18	48170
9	13,91	47242
10	14,08	47830
ORT	14,02	
STD.SAPMA	0,3563	
LOD	15,09	
LOQ	17,58	



Şekil 6. Amigdalin için LOQ kromatogramı

6.1.3. Doğrusallık

5.5.4. Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması bölümünde anlatıldığı şekilde 7 farklı konsantrasyon seviyesinde standartlar hazırlanmıştır ve 2' şer enjeksiyondan toplamda 14 veri elde edilmiştir. Verilerden elde edilen alana karşı konsantrasyon grafiği aşağıdaki gibidir.



Şekil 7. Amigdalin için dedektör sinyalinin konsantrasyona karşı grafiği

Tablo 4: Amigdalin için doğrusallık çalışması değerleri

Amigdalin mg/kg	Derişim	Alan	Ci	Ci ort	Ci-Cort	(Ci-Cort) ²
1	1	18147	1,0687	1,0716	-61,9313	3835,4921
2	1	18247	1,0745		-61,9255	3834,7627
3	5	88998	5,2410	5,2704	-57,7590	3336,1063
4	5	89998	5,2999		-57,7001	3329,3071
5	10	178357	10,5032	10,6768	-52,4968	2755,9156
6	10	184252	10,8503		-52,1497	2719,5878
7	25	463392	27,2885	27,28	-35,7115	1275,3125
8	25	463149	27,2742		-35,7258	1276,3347
9	50	864596	50,9148	50,8866	-12,0852	146,0520
10	50	863639	50,8584		-12,1416	147,4173
11	100	1782792	104,9860	104,9858	41,9860	1762,8271
12	100	1782785	104,9856		41,9856	1762,7925
13	250	4202009	247,4502	247,5680	184,4502	34021,8815
14	250	4206011	247,6859		184,6859	34108,8765
Cort	63				sxx	94312,6656

Doğru denklemi= $y=mx+b$

Kesim noktası (b)= 0

Eğim(m)= 16981,23

Korelasyon katsayısı (R²) = 0,9994 (Beklenen değer en az 0,999)

Relatif standart sapma (RSD)= 3,61

6.1.4. Çalışma aralığı

Bu validasyonda amigdalinin çalışma aralığı; 1,0716 mg/kg ila 247,5680 mg/kg olarak belirlenmiştir.

6.1.5. Doğruluk

6.1.5.1. Kesinlik

Kesinlik çalışması için tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik çalışmaları yapılmıştır. Bunun için 2 düzeyde amigdalin içermediği bilinen karpuz çekirdeklerine spike yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki gibidir;

Tablo 5. 200 mg/kg düzeyinde tekrarlanabilirlik sonuçları

TEKRAR SAYISI	Konsantrasyon mg/kg	Pik Alanı
1	186,20	158096
2	190,33	161602
3	189,16	160612
4	188,98	160457
5	187,34	159066
6	186,61	158442
7	186,96	158744
8	191,19	162331
9	187,80	159458
10	188,02	159645
ORT	188,26	
STD.SAPMA	1,63	
%RSD	0,87	

Tablo 6. 500 mg/kg düzeyinde tekrarlanabilirlik sonuçları

TEKRAR SAYISI	Konsantrasyon mg/kg	Pik Alanı
1	482,52	409693
2	474,67	403023
3	479,50	407121
4	475,71	403910
5	475,07	403362
6	474,59	402958
7	476,75	404788
8	473,49	402020
9	472,99	401600
10	476,42	404509
ORT	476,17	
STD.SAPMA	2,89	
%RSD	0,61	

Tablo 7. 200 mg/kg düzeyinde tekrarüretilebilirlik sonuçları

TEKRAR SAYISI	Konsantrasyon mg/kg	Pik Alanı
1	187,85	158442
2	188,10	161320
3	187,42	159313
4	188,04	160372
5	188,34	161053
6	188,60	160609
7	191,94	162444
8	190,65	161819
9	189,30	160367
10	187,94	160013
ORT	188,82	
STD.SAPMA	1,69	
%RSD	0,90	

Tablo 8. 500 mg/kg düzeyinde tekrarüretilebilirlik sonuçları

TEKRAR SAYISI	Konsantrasyon mg/kg	Pik Alanı
1	476,45	403252
2	476,17	402590
3	480,66	409923
4	472,23	400995
5	477,08	404934
6	483,39	409441
7	485,84	413484
8	480,28	405363
9	484,85	413239
10	476,22	403096
ORT	479,32	
STD.SAPMA	4,41	
%RSD	0,96	

Değerlendirme

Tekrarlanabilirlik performans kriterlerinde $\%RSD \leq \%4$ olması istenmektedir. Elde edilen tekrarlanabilirlik verilerinde 200 mg/kg seviyesinde $\%RSD= \%0,87$ ve 500 mg/kg seviyesinde $\%RSD= \%0,61$ olarak tayin edilmiştir. Buna göre tekrarlanabilirlik çalışmasına ait değerler uygundur.

Tekrarüretilebilirlik performans kriterlerinde $\%RSD \leq \%8$ olması istenmektedir. Elde edilen tekrarlanabilirlik verilerinde 200 mg/kg seviyesinde $\%RSD= \%0,90$ ve 500 mg/kg seviyesinde $\%RSD= \%0,96$ olarak tayin edilmiştir. Buna göre tekrarüretilebilirlik çalışmasına ait değerler uygundur.

6.1.5.2. Gerçeklik (Geri Kazanım)

Geri kazanım çalışması 200 mg/kg ve 500 mg/kg olmak üzere iki düzeyde yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki gibidir;

Tablo 9. 200 mg/kg düzeyinde geri kazanım sonuçları

TEKRAR SAYISI	Blank	Spike Yapılan Konsantrasyon (mg/kg)	Bulunan Konsantrasyon (mg/kg)	Geri Kazanım (%)
1	0,00	200	186,20	93,10
2	0,00	200	190,33	95,16
3	0,00	200	189,16	94,58
4	0,00	200	188,98	94,49
5	0,00	200	187,34	93,67
6	0,00	200	186,61	93,30
7	0,00	200	186,96	93,48
8	0,00	200	191,19	95,59
9	0,00	200	187,80	93,90
10	0,00	200	188,02	94,01
			ORT	94,13
			STD.SAPMA	0,816
			%RSD	0,866

Tablo 10. 500 mg/kg düzeyinde geri kazanım sonuçları

TEKRAR SAYISI	Blank	Spike Yapılan Konsantrasyon (mg/kg)	Bulunan Konsantrasyon (mg/kg)	Geri Kazanım (%)
1	0,00	500	482,52	96,51
2	0,00	500	474,67	94,93
3	0,00	500	479,50	95,90
4	0,00	500	475,71	95,14
5	0,00	500	475,07	95,01
6	0,00	500	474,59	94,92
7	0,00	500	476,75	95,35
8	0,00	500	473,49	94,70
9	0,00	500	472,99	94,60
10	0,00	500	476,42	95,28
			ORT	95,23
			STD.SAPMA	0,579
			%RSD	0,607

Tablo 11. Elde edilen geri kazanım oranları

Konsantrasyon	Tekrarlanabilirlik	Tekrarüretilebilirlik
200 mg/kg	%94,13	%94,41
500 mg/kg	%95,23	%96,11
Ortalama	%94,68	%95,26

Değerlendirme

Beklenen geri kazanım oranları %90- %107 arasındadır. Sonuçlar uygundur.

6.1.6. Sağlık

6.1.6.1. Standart çözelti stabilitesi

Çözelti stabilitesi için amigdalin standardının başlangıçtan itibaren 12 saat aralıklarla HPLC tayini yapıp pik alanları karşılaştırılmıştır.

Tablo 12. Çözelti stabilitesi çalışmasından elde edilen pik alanları

Amigdalin		
Zaman	Pik Alanı	Değişim %
Başlangıç	4228032	-
12. saat	4217104	%0,3
24. saat	4213011	%0,4
36. saat	4209009	%0,4
48. saat	4200258	%0,7

Değerlendirme

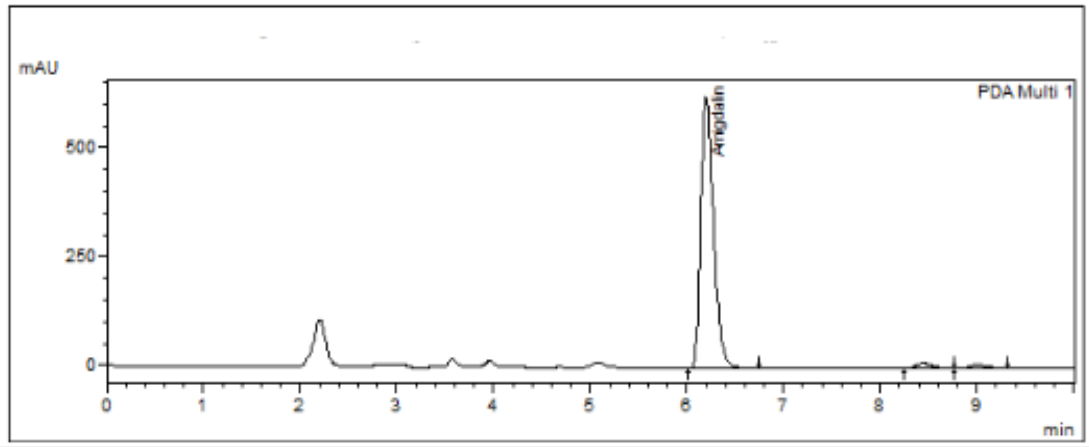
Yapılan stabilite çalışması sonucunda amigdalin standart çözeltisinin 48 saat boyunca stabilitesini koruduğu belirlenmiştir.

6.1.6.2. Metot parametreleri üzerindeki değişiklikler

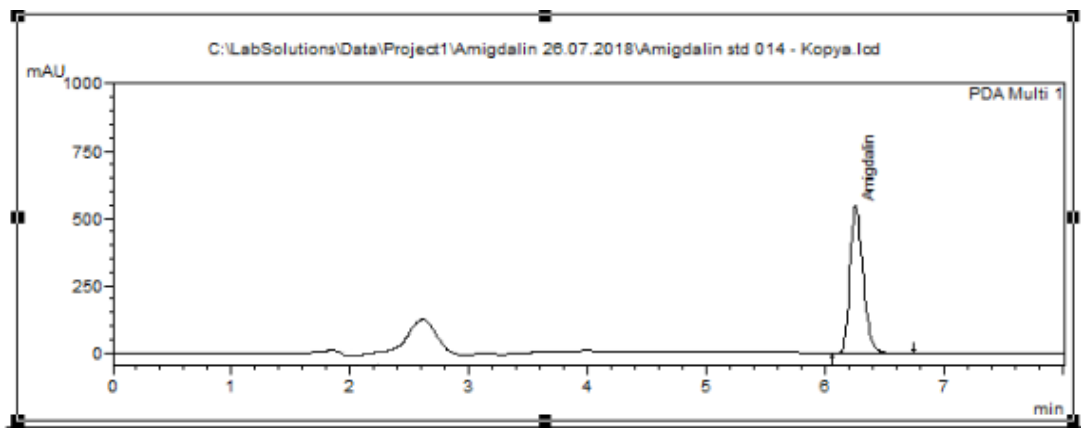
Sağlık çalışması için metot parametrelerinde akış hızı ve kolon fırını sıcaklığı üzerinde değişiklikler yapılmıştır. Sonuçlar aşağıdaki tablodaki gibidir;

Tablo 13. Metot parametrelerinin değiştirilmesi ile elde edilen sonuçlar

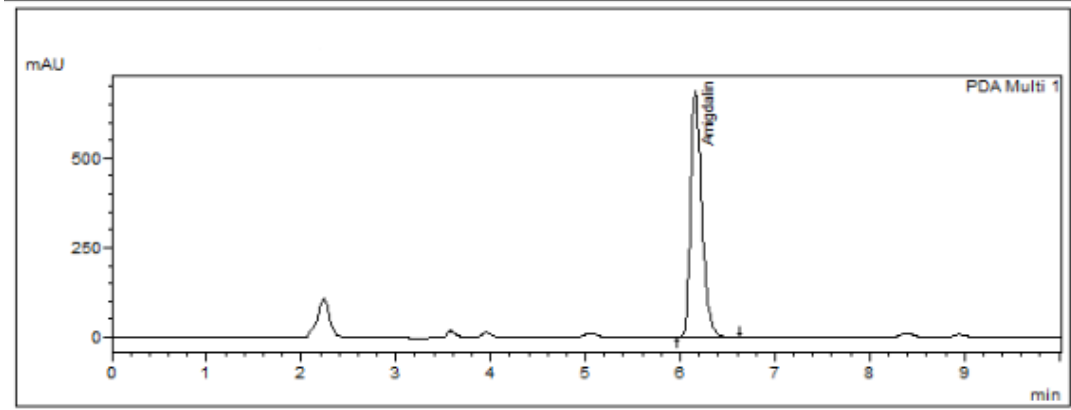
şartlar	Pik Alanı	Kuyruklanma Faktörü	Teorik Plaka Sayısı
Normal şartlarda (35 °C kolon sıcaklığı, 0,9 ml/dk akış hızı)	5674935	1.444	9675.623
0,8 ml/dk akış hızı	5723468	1.301	11862.376
40 °C kolon sıcaklığı	5670931	1.455	11658.696



şekil 8. Normal şartlarda amigdalın standardına ait kromatogram Rt= 6,194



şekil 9. 0,8 ml/dk akış hızında standardına ait kromatogram Rt= 6,255



Şekil 10. 40⁰C kolon fırını sıcaklığında amigdalin standardına ait kromatogram
Rt=6,155

Değerlendirme

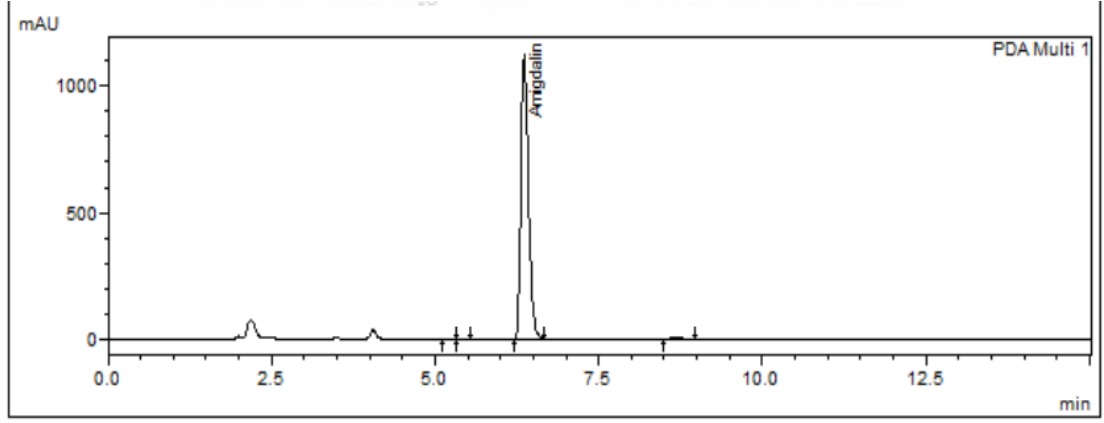
Sağlamlık sonuçlarına göre metot, ufak değişimlerden etkilenmemektedir.

6.2. Amigdalin Ekstraksiyonu Optimizasyonu

Metot optimizasyonu için, 4 farklı ekstraksiyon yöntemi denenerek acı badem çekirdeğinden amigdalin ekstrakte edilmiştir. Sonuçlar Tablo 7' de verilmiştir.

6.2.1. Soxhlet ekstraksiyonu

En yüksek ekstraksiyon verimi metanol ile sağlanmıştır. Acıbadem çekirdeklerindeki amigdalin içerikleri 0,025 ila 44,08 mg/g arasında değişmektedir. Analiz sonuçları sırasıyla; su ile 0,025±0,001 mg/g; %2 sitrik asit ile 0,14±0,01 mg/g; asetonitril ile 4,29±0,17 mg/g; %50 etanol ile 9,43±0,38 mg/g; etanol ile 23,41±0,94 mg/g; %50 metanol ile 39,64±1,59 mg/g ve metanol ile 44,38±1,78 mg/g olarak tayin edilmiştir. Hekzan ile olan ekstraksiyonda analite ait bir pik elde edilememiştir. Sonuçlara göre en yüksek verim metanol ile elde edilmiş olsa da metanolün toksik, insan ve çevre sağlığına zararlı etkilerinden dolayı tercih edilmesi sakıncalıdır. Acı badem çekirdeğindeki amigdalin içerikleri Şekil 5.a' da verilmiştir.

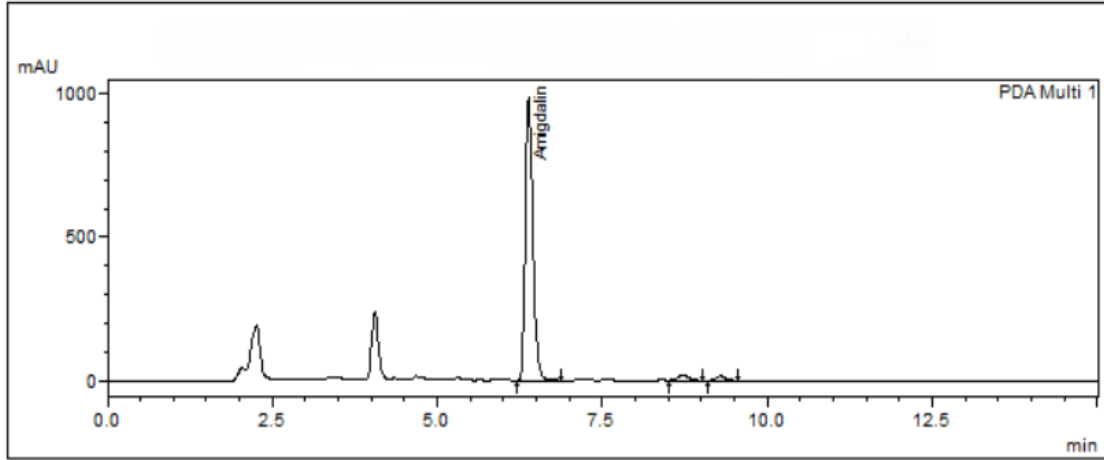


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdaline	6.355	8939520	1125350

Şekil 11. Metanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

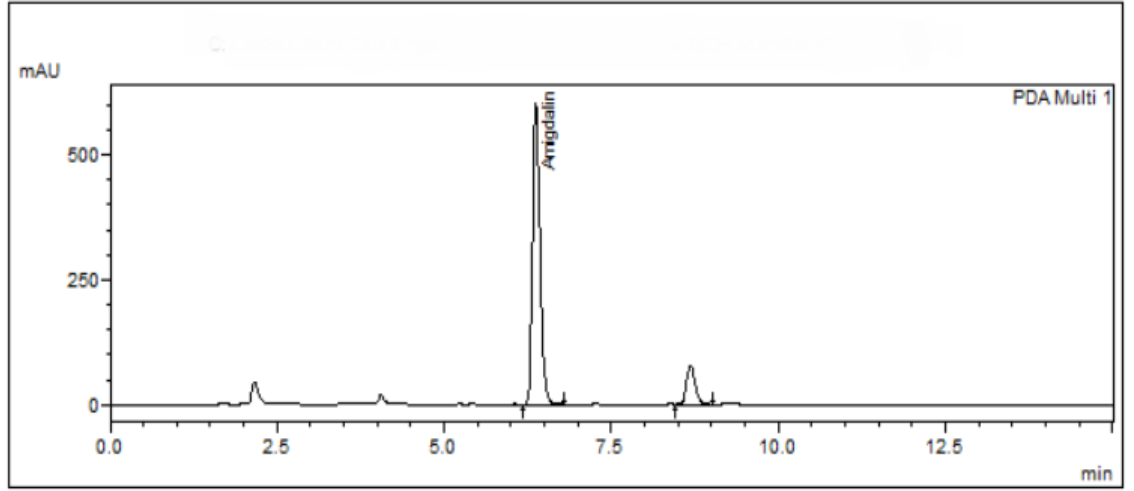


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdaline	6.375	7971110	989098

Şekil 12. % 50 Metanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

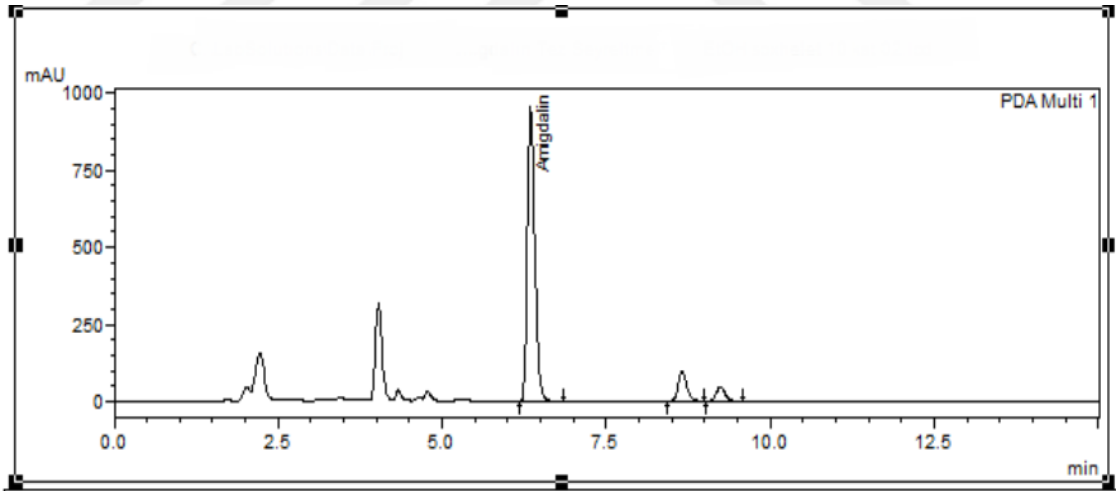


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdalın	6.385	4705816	603576

Şekil 13. Etanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

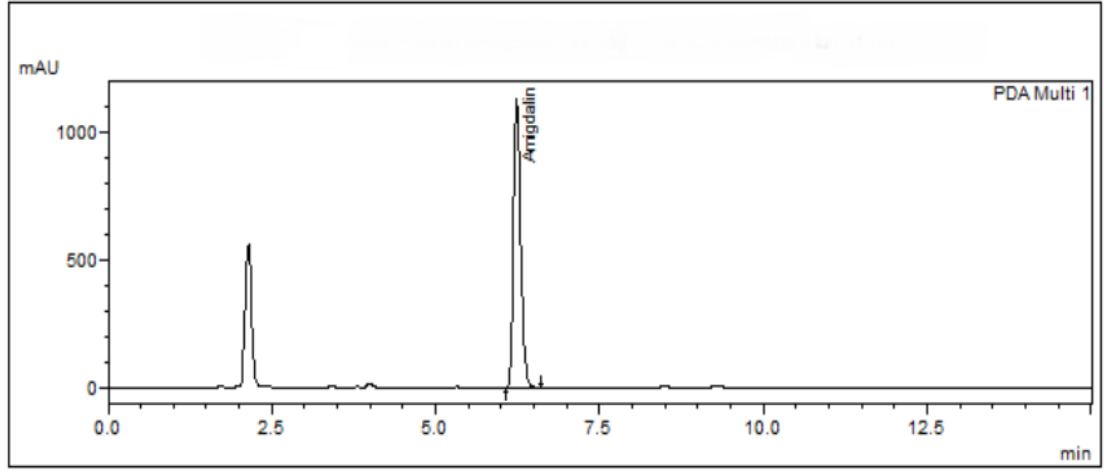


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdalın	6.340	7576487	958151

Şekil 14. % 50 Etanol ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

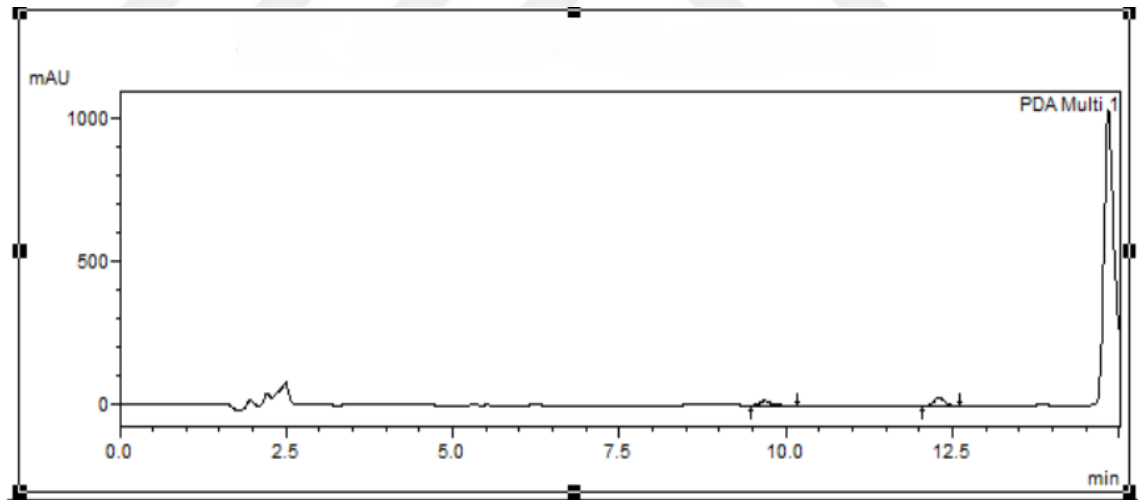


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdalın	6.228	8673285	1136098

Şekil 15. Asetonitril ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

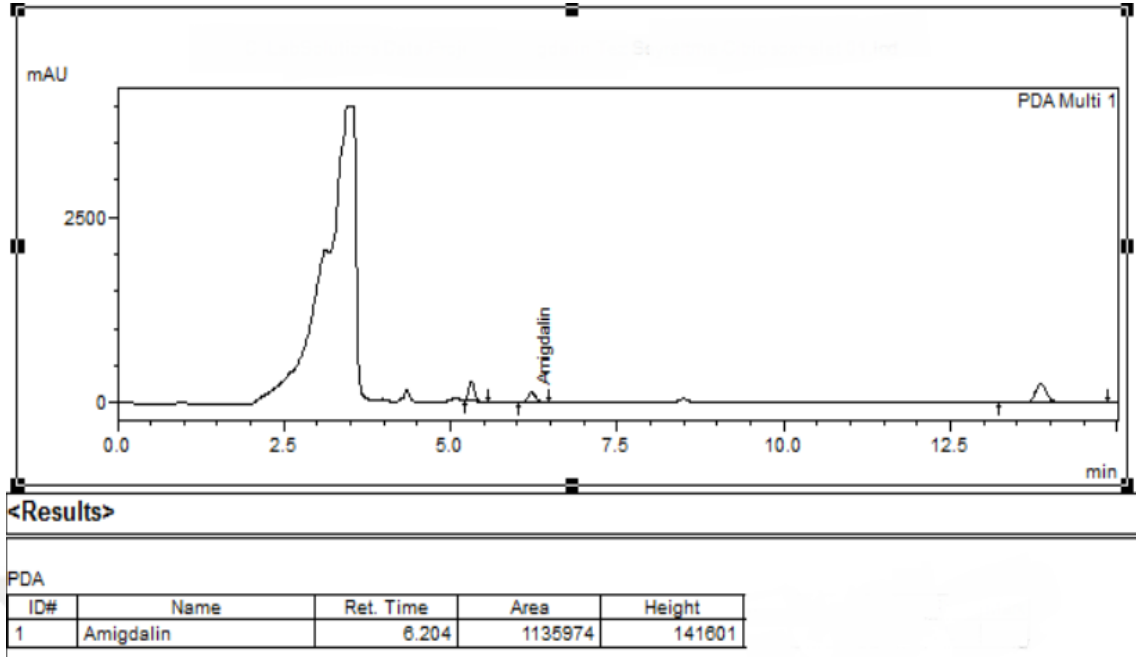


<Results>

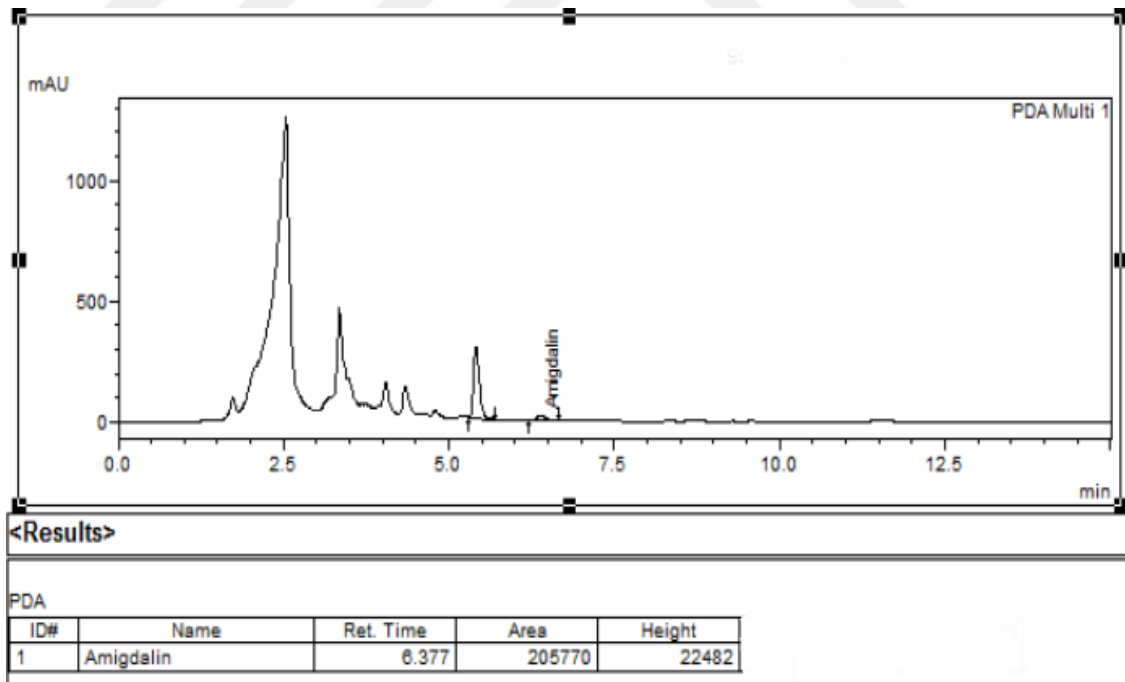
PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height	Conc.	Units	Mark
1	Amigdalın	0.000	0	0	0.000	mg/L	V

Şekil 16. Hekzan ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acı badem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



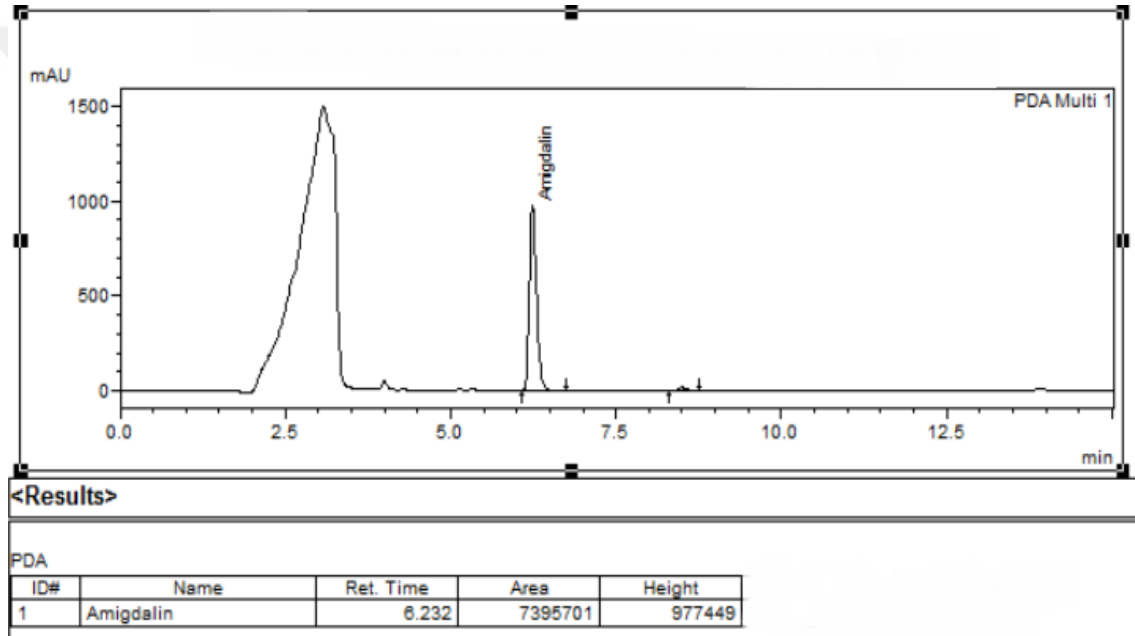
Şekil 17. %2 Sitrik asit ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



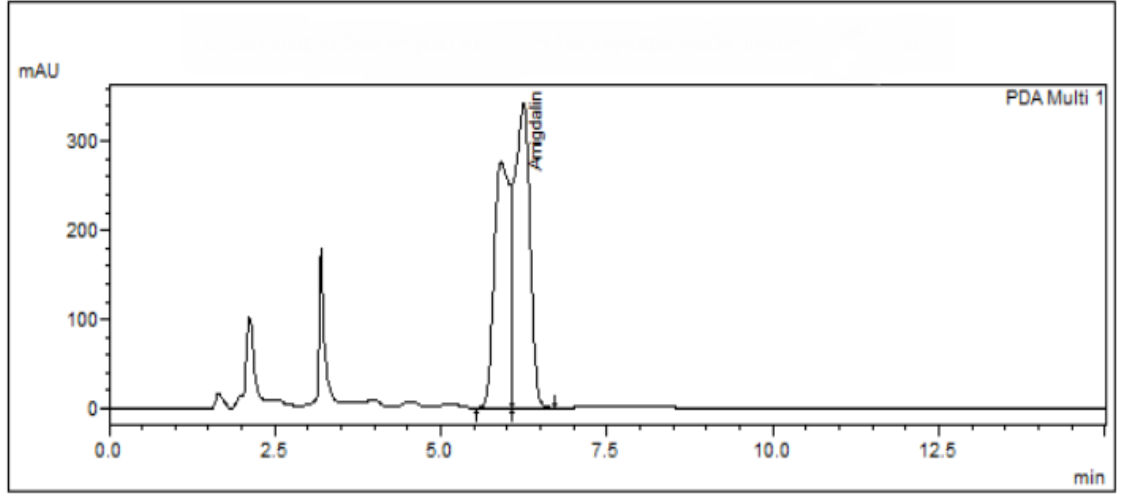
Şekil 18. Su ile soxhlet ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

6.2.2. Ultrasonik banyo ekstraksiyonu

En yüksek ekstraksiyon verimi %2 sitrik asit sağlandı. Acıbademdeki amigdalin içerikleri 10,63 ila 34,84 mg/g arasında değişmektedir. Analiz sonuçları sırasıyla; %50 metanol ile $10,63 \pm 0,43$ mg/g; %2 sitrik asit ile $36,79 \pm 1,47$ mg/g olarak tayin edilmiştir. Asetonitril ve su ile yapılan ekstraksiyonda analite ait pik tespit edilememiştir. Ayrıca metanol, etanol ve %50 etanol ile yapılan ekstraksiyonlarda anlamlı pikler elde edilememiştir. Sonuçlara göre en uygun çözücü %2 sitrik asit olarak belirlenmiştir. Acıbademdeki amigdalin içerikleri Şekil 5.b' de verilmiştir.



Şekil 19. %2 Sitrik asit ile ultrasonik banyo ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

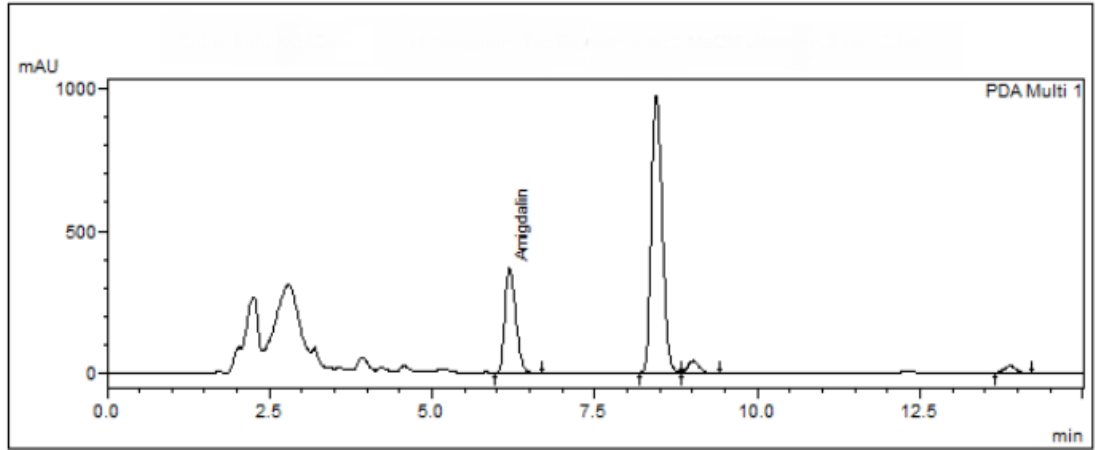


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdaline	6.242	5537800	342286

Şekil 20. Metanol ile ultasonik banyo ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

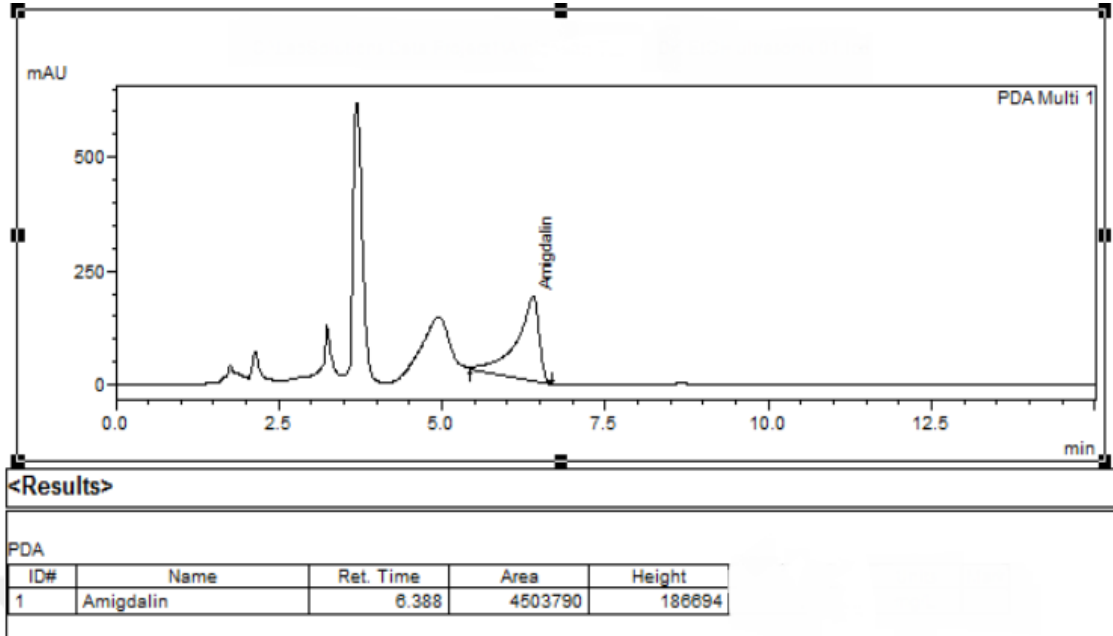


<Results>

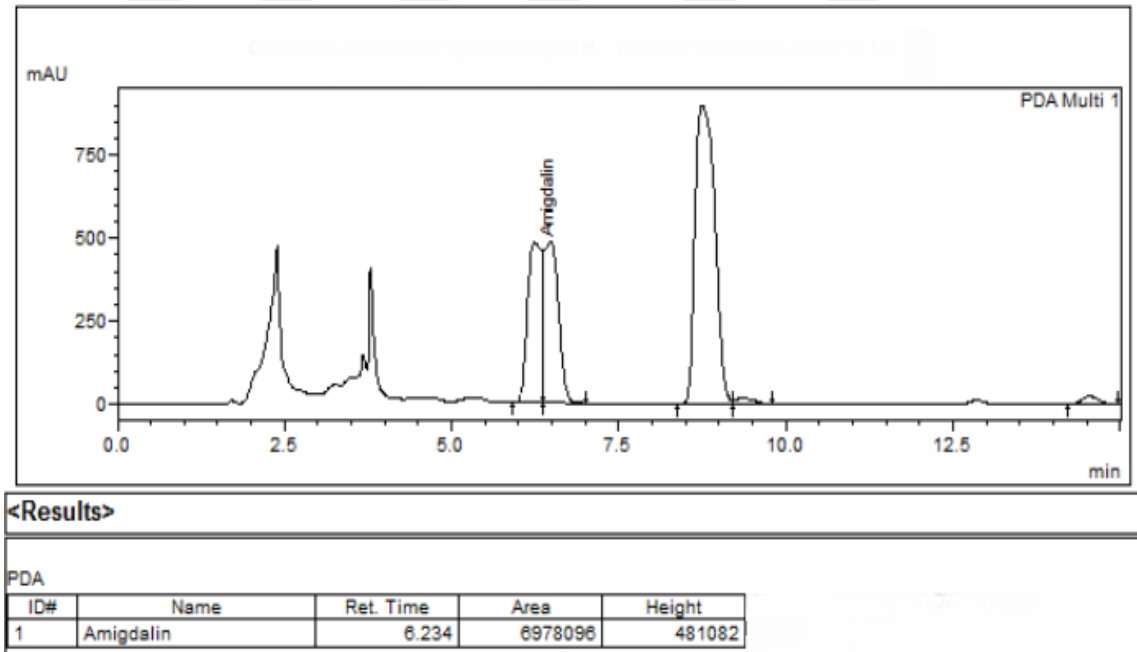
PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdaline	6.183	4271908	365722

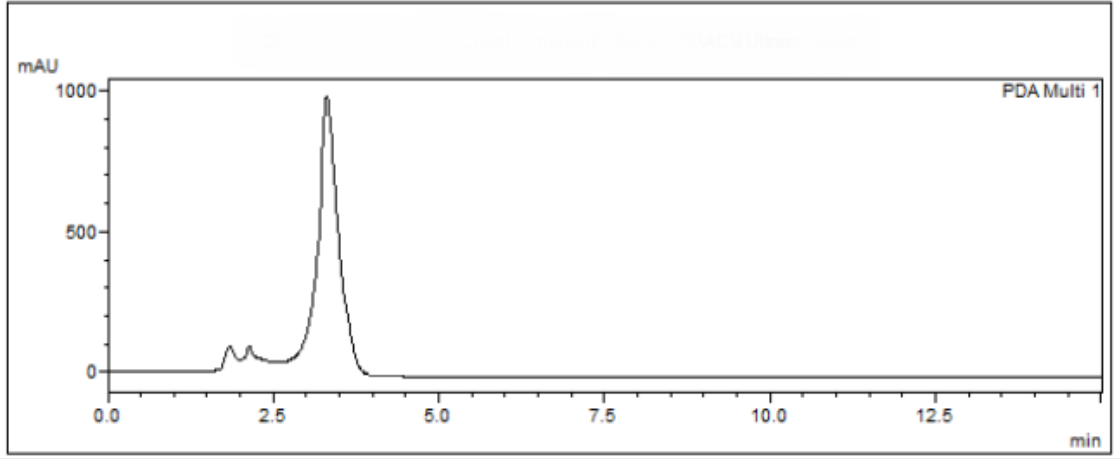
Şekil 21. %50 Metanol ile ultasonik banyo ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



Şekil 22. Etanol ile ultasonik banyo ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



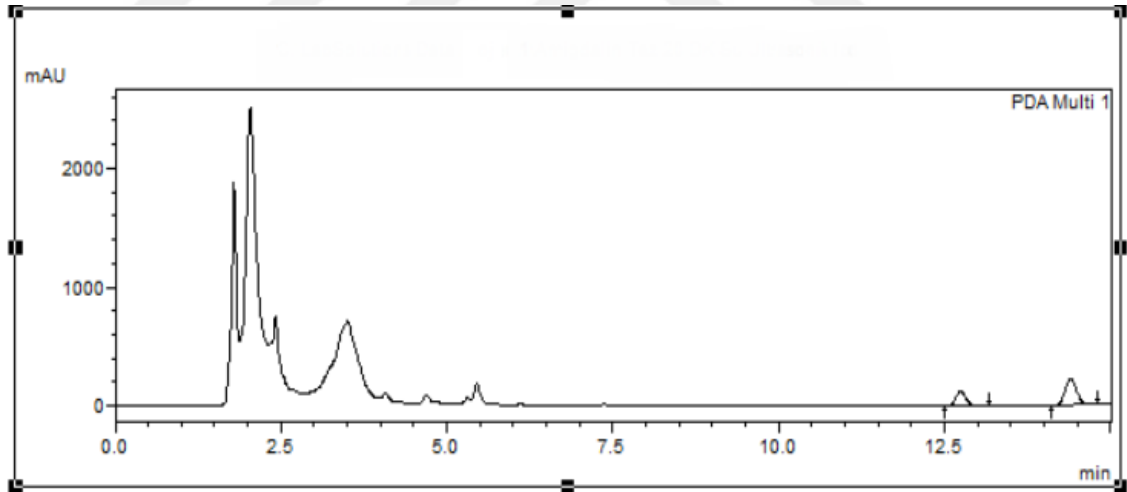
Şekil 23. %50 Etanol ile ultasonik banyo ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



<Results>

PDA				
ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdalın	0.000	0	0

Şekil 24. Asetonitril ile ultasonik banyo ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



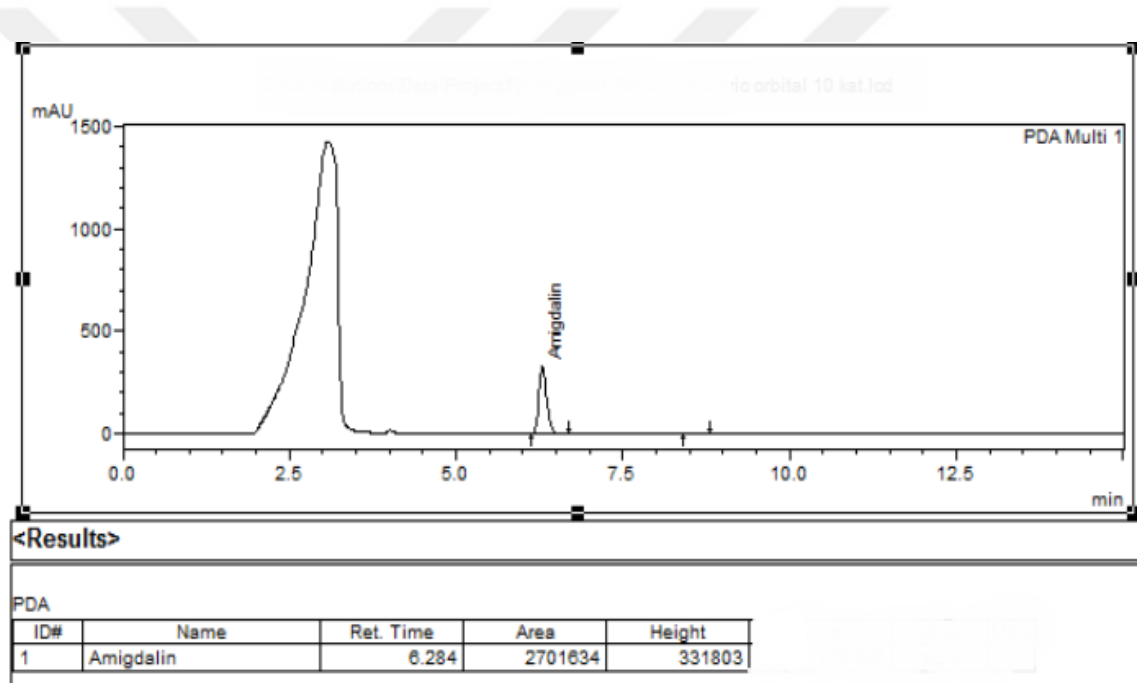
<Results>

PDA				
ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdalın	0.000	0	0

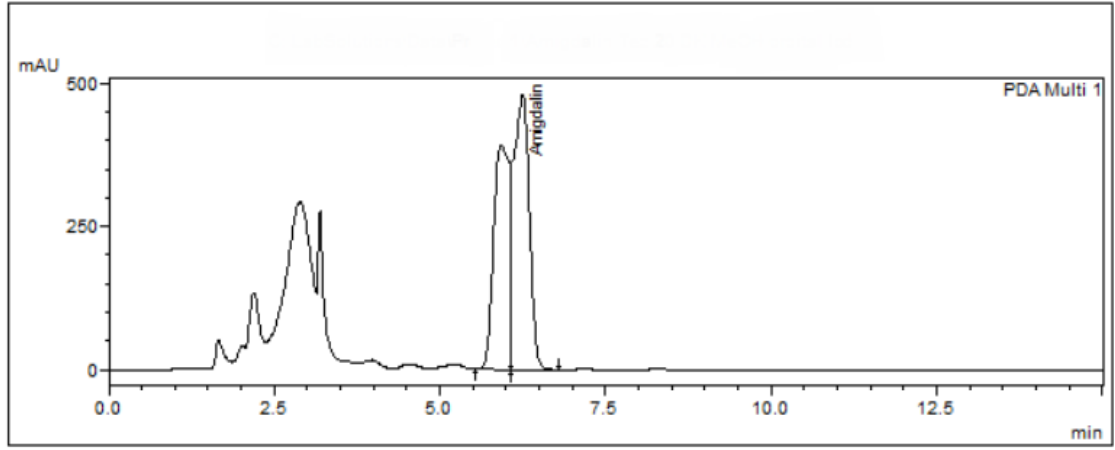
Şekil 25. Su ile ultasonik banyo ekstraksiyonu sonucunda acı badem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

6.2.3. Orbital çalkalamalı ekstraksiyon

En yüksek ekstraksiyon verimi %2 sitrik asit sağlandı. Acıbademdeki amigdalin içerikleri 0,023 to 33,60 mg/g arasında değişmektedir. Analiz sonuçları sırasıyla; asetonitril ile $0,023 \pm 0,001$ mg/g; %50 metanol ile $20,04 \pm 0,80$ mg/g; %2 sitrik asit ile $33,60 \pm 1,34$ mg/g olarak tayin edilmiştir. Su ile yapılan ekstraksiyonda analite ait bir pik tespit edilememiştir. Ayrıca metanol, etanol ve %50 etanol ile yapılan ekstraksiyonlarda anlamlı pikler elde edilememiştir. Bu yöntemden elde edilen sonuçlar, ultrasonik ekstraksiyon yöntemiyle benzerlik göstermektedir. Sonuçlara göre en uygun çözücü %2 sitrik asit olarak belirlenmiştir. Acıbademdeki amigdalin içerikleri Şekil 5.c' de verilmiştir.



Şekil 26. %2 Sitrik asit ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

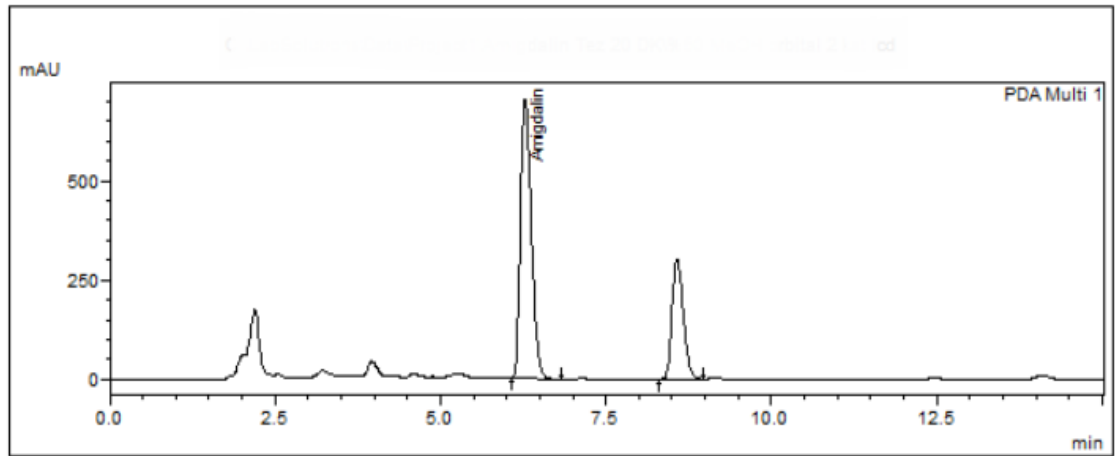


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdaline	6.245	7819054	479333

Şekil 27. Metanol ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdalin kromatogram.

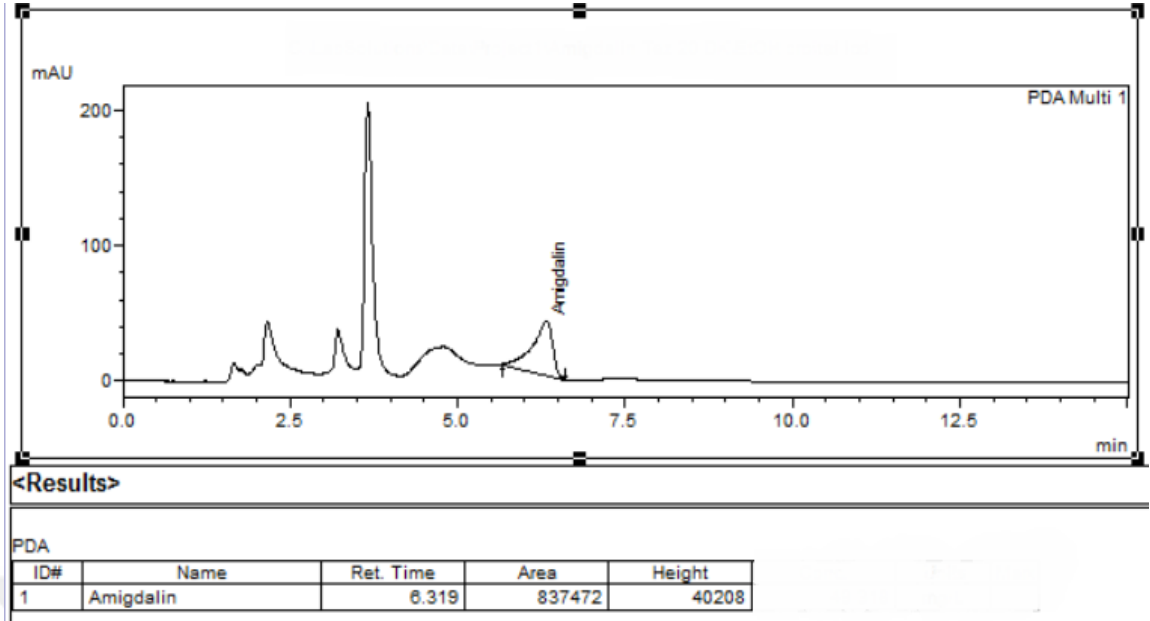


<Results>

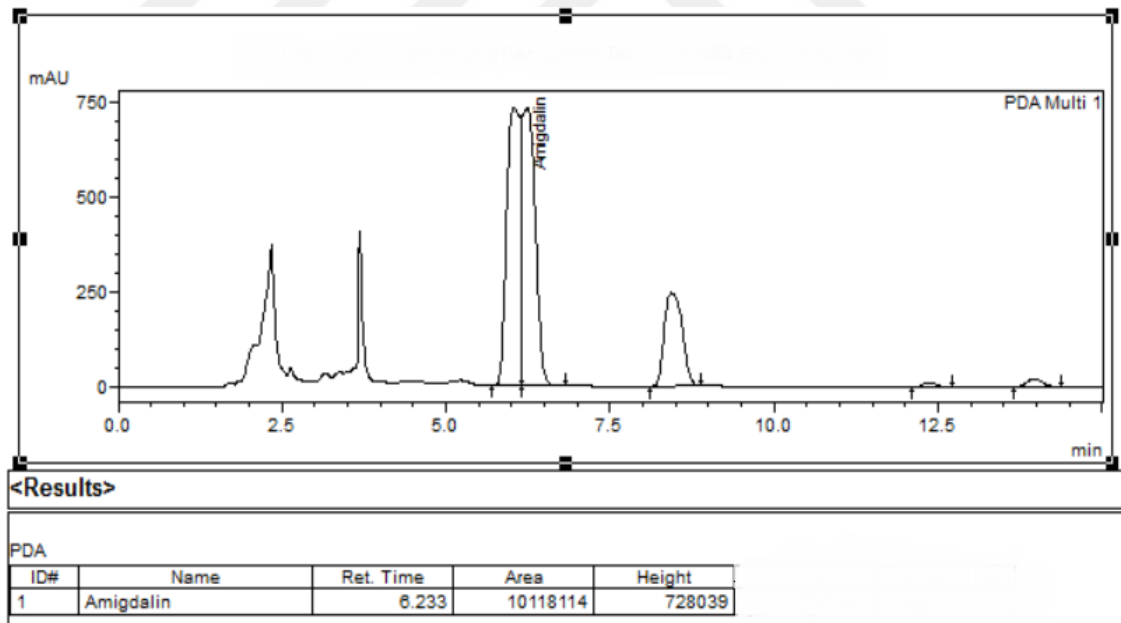
PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdaline	6.273	8057056	703956

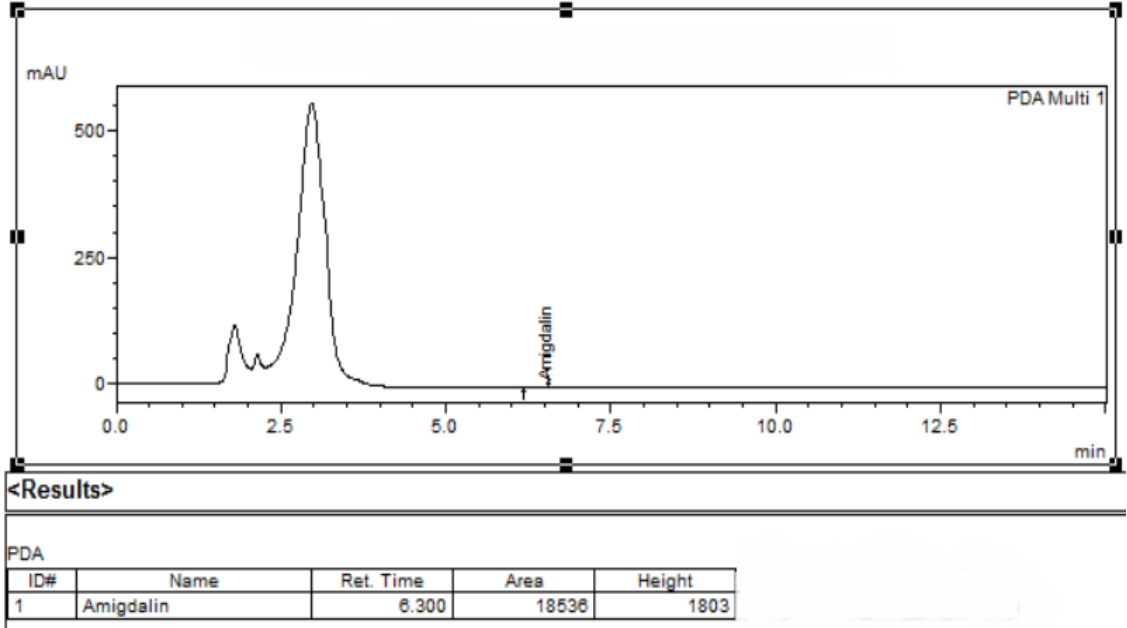
Şekil 28. %50 Metanol ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



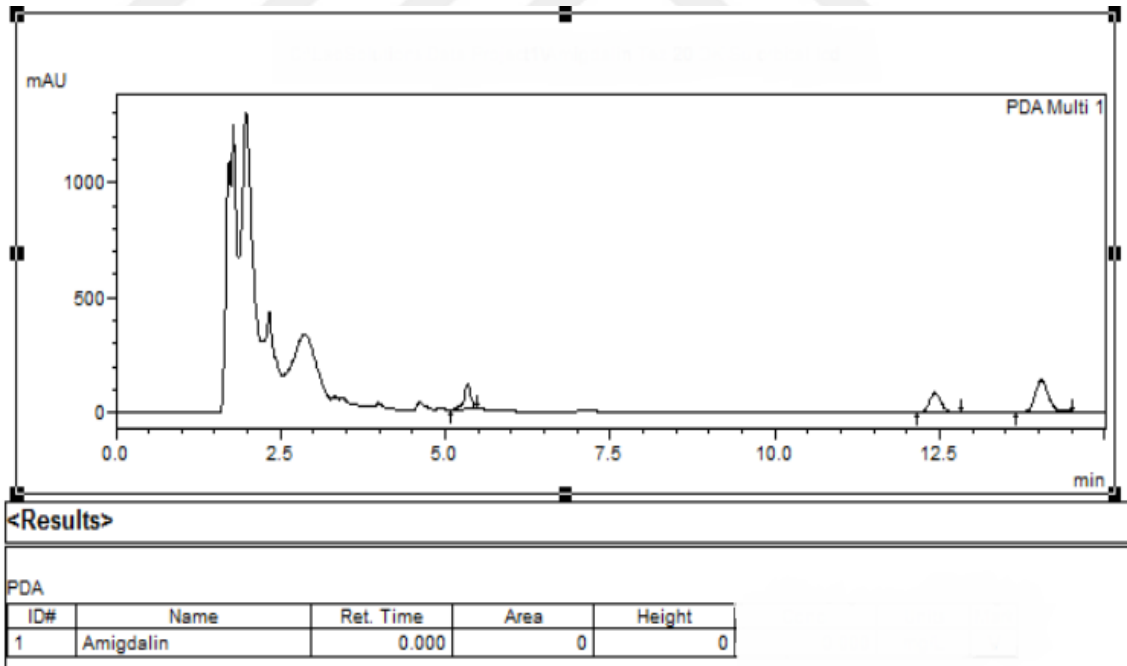
Şekil 29. Etanol ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



Şekil 30. %50 Etanol ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



Şekil 31. Asetonitril ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acı badem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



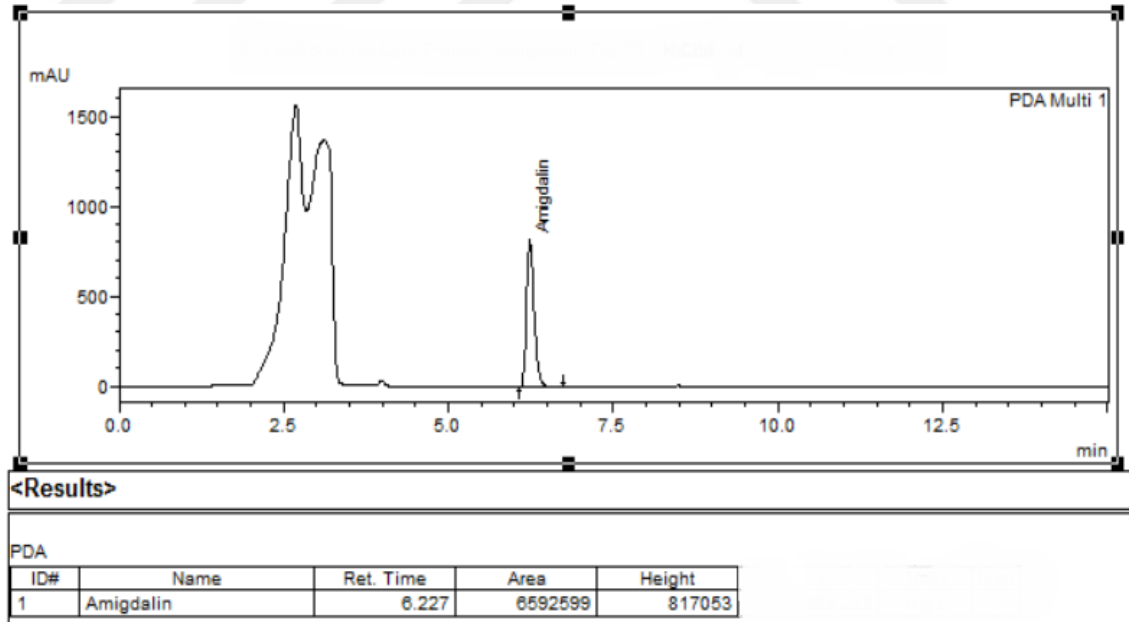
Şekil 32. Su ile orbital çalkalama ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

6.2.4. Mikrodalga destekli ekstraksiyon

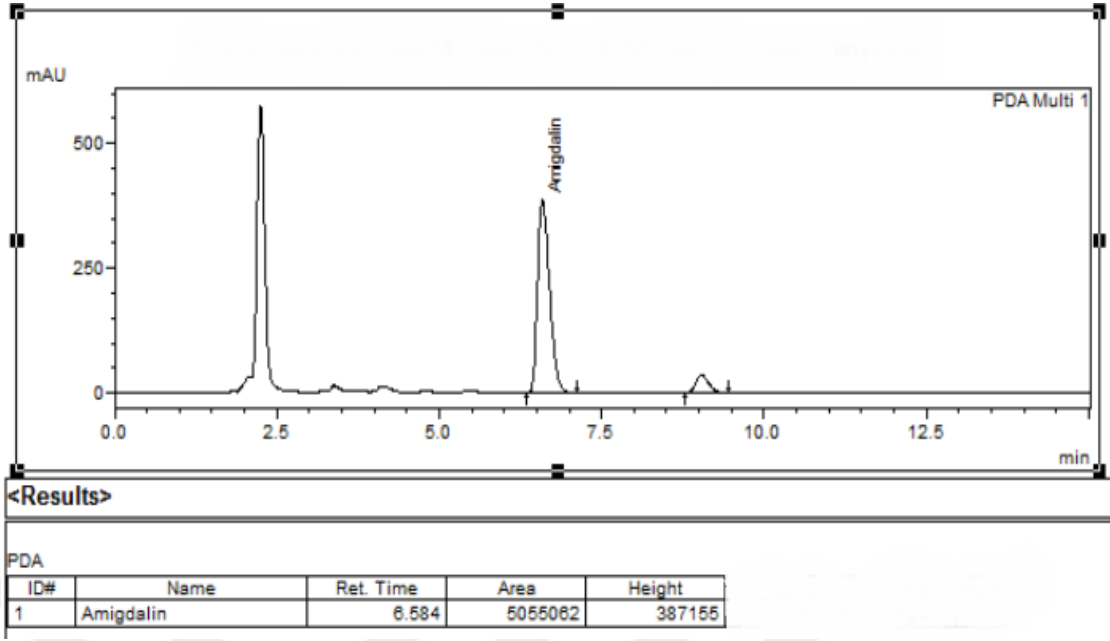
En yüksek ekstraksiyon verimi %2 sitrik asit sağlandı. Acıbademdeki amigdalin içerikleri 24,26 to 65,21 mg/g arasında değişmektedir. Analiz sonuçları sırasıyla; su ile $24,27 \pm 0,97$ mg/g; %50 metanol ile $25,14 \pm 1,01$ mg/g; %2 sitrik asit ile $65,21 \pm 2,61$ mg/g olarak tayin edilmiştir. %50 etanol ile yapılan ekstraksiyonda anlamlı pikler elde edilememiştir.

Bu yöntemin denenen diğer tüm ekstraksiyon yöntemlerinden daha iyi sonuçlar verdiği belirlenmiştir. Hem daha kısa sürede hem de daha yüksek verimde sonuçların alınması bakımından en iyi yöntem olarak seçilmiştir. Sonuçlara göre en uygun çözücü %2 sitrik asit olarak belirlenmiştir. %2 sitrik asit çözeltisinin büyük oranda su içermesi, yapay sitrik asitin gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılabilme özelliği ve herhangi bir toksik etkisinin olmamasından dolayı hem insan hem de çevre sağlığına zarar vermemesi tercih edilme sebebidir. Acıbademdeki amigdalin içerikleri Şekil 5.d' de verilmiştir.

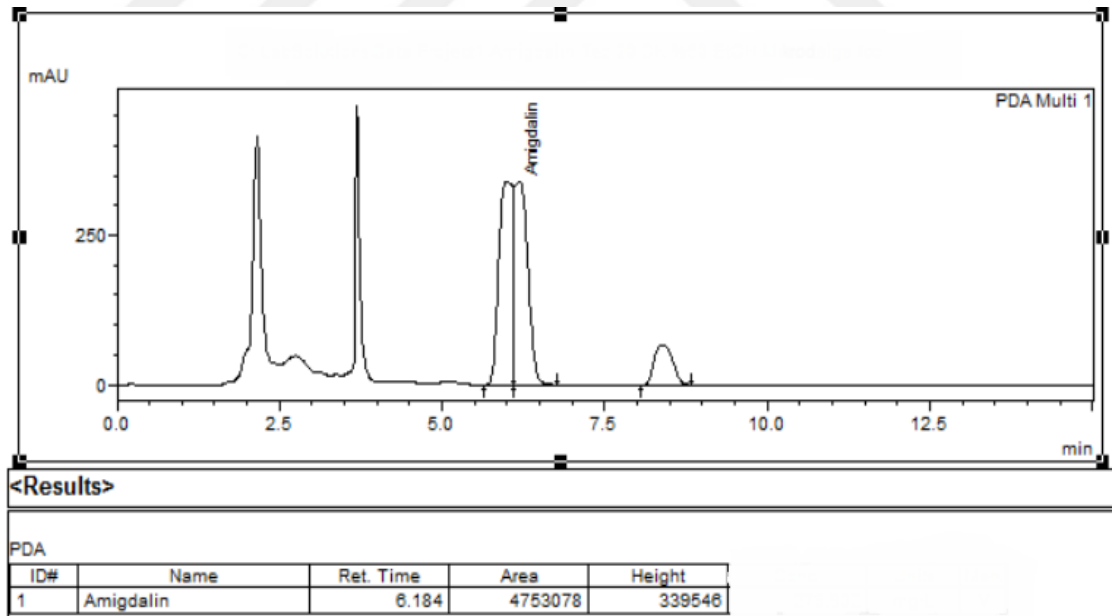
Bu ekstraksiyon yöntemi diğer meyve çekirdeklerine de uygulanmıştır ve sonuçlar Tablo 8' de verilmiştir.



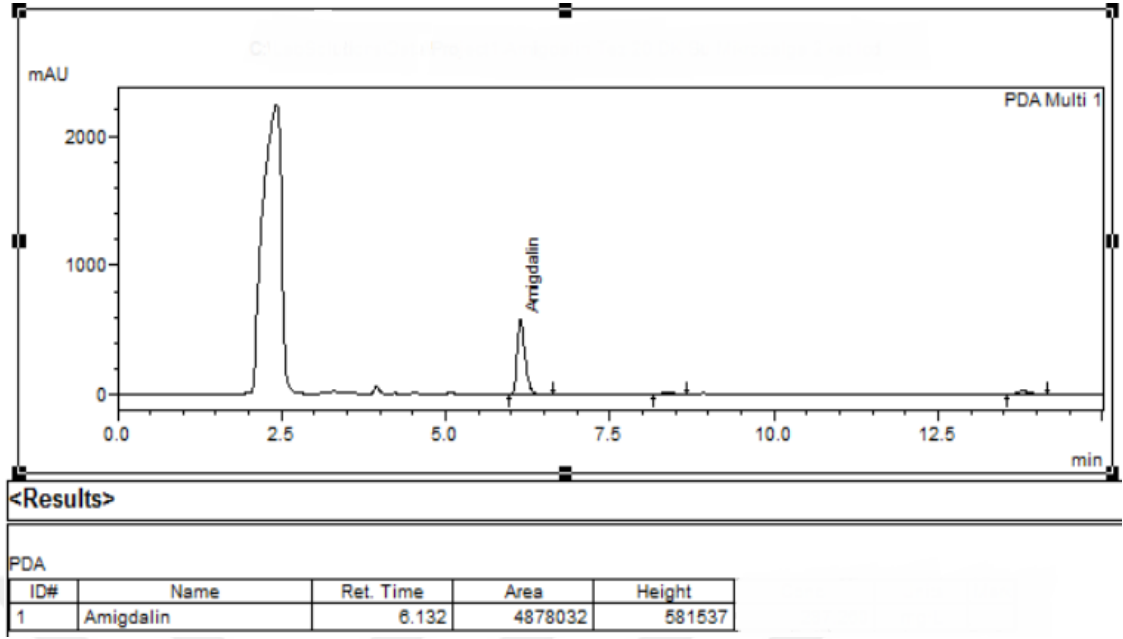
Şekil 33. %2 Sitrik asit ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



Şekil 34. %50 Metanol ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



Şekil 35. %50 Etanol ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.



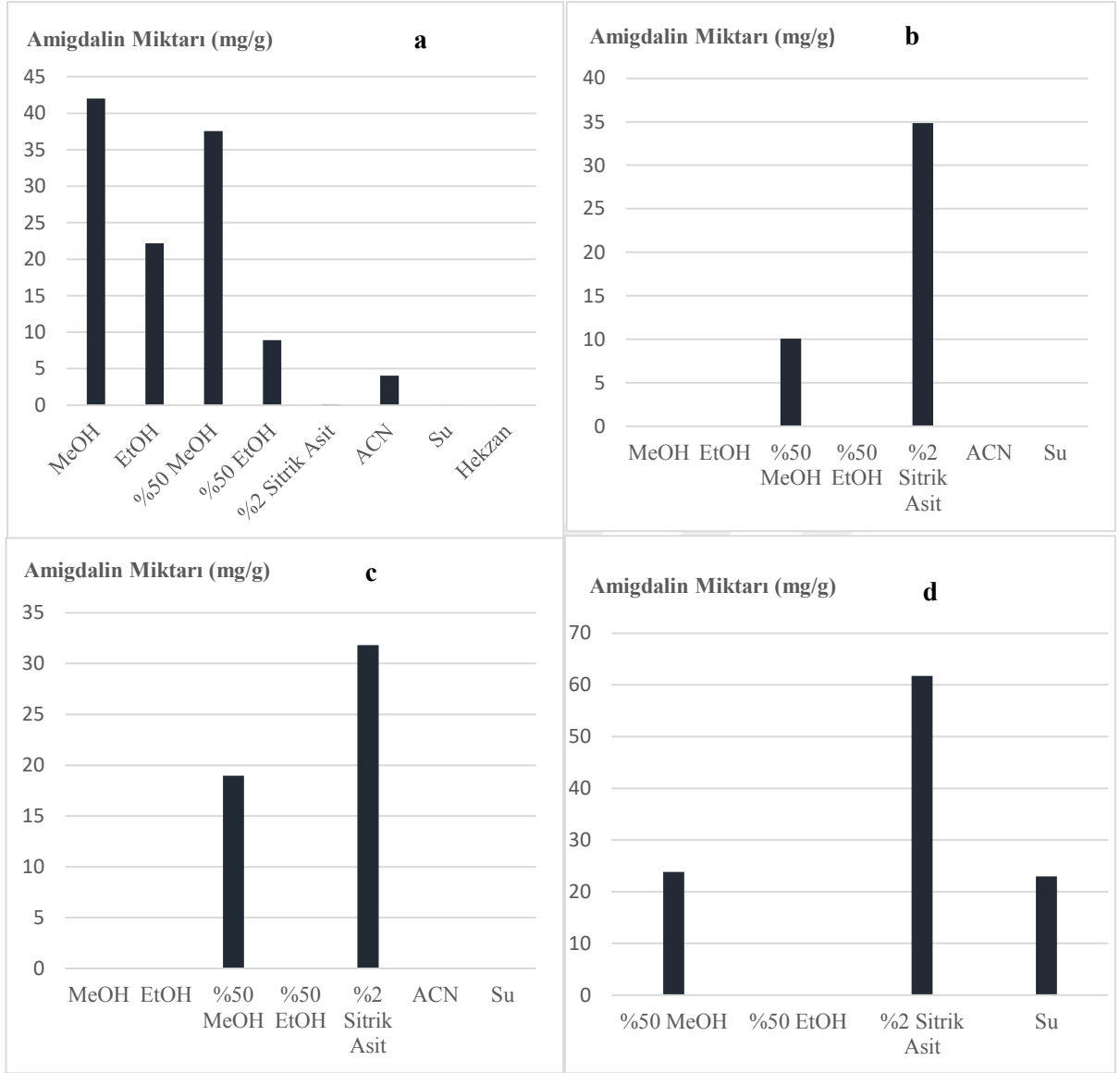
Şekil 36. Su ile mikrodalga ekstraksiyonu sonucunda acı badem çekirdeğinden elde edilen amigdaline ait kromatogram.

Tablo 14. Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak HPLC tayini sonucunda acıbadem çekirdeğinden elde edilen amigdalin miktarları

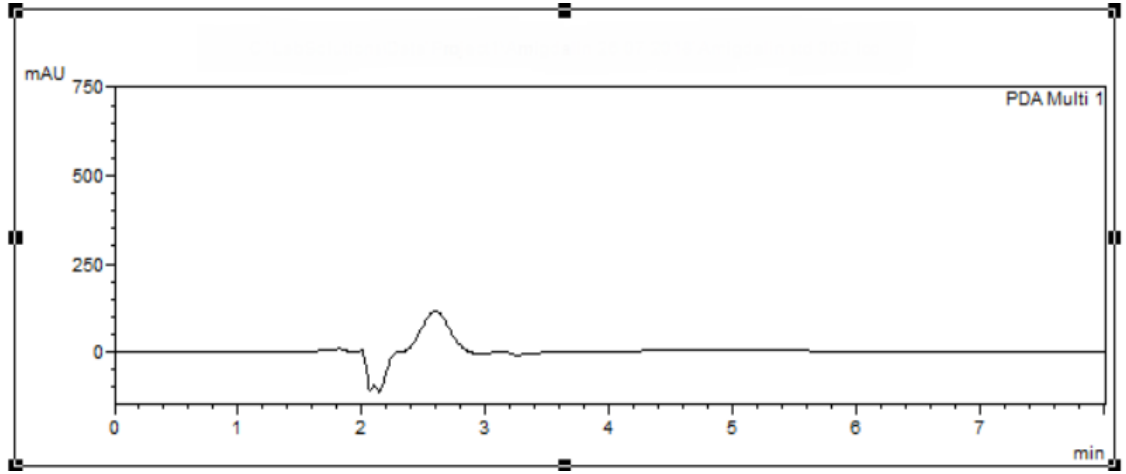
	Soxhlet Ekstraksiyonu (4 saat) (mg/g)	Ultrasonik Ekstraksiyon (30 dakika) (mg/g)	Orbital Çalkalayıcı Ekstraksiyonu (2 saat) (mg/g)	Mikrodalga Ekstraksiyonu (1 saat) (mg/g)
Metanol (MeOH)	44,38± 1,78	Düzenli pik elde edilemedi	Düzenli pik elde edilemedi	-
Etanol (EtOH)	23,41± 0,94	Düzenli pik elde edilemedi	Düzenli pik elde edilemedi	-
%50 Metanol (MeOH)	39,64± 1,59	10,63± 0,43	20,04± 0,80	25,14± 1,01
%50 Etanol (EtOH)	9,43± 0,38	Düzenli pik elde edilemedi	Düzenli pik elde edilemedi	Düzenli pik elde edilemedi
%2 Sitrik Asit	0,14± 0,01	36,79± 1,47	33,60± 1,34	65,21± 2,61
Asetonitril (ACN)	4,29± 0,17	Tespit edilemedi	0,023± 0,001	-
Su	0,025± 0,001	Tespit edilemedi	Tespit edilemedi	24,27± 0,97
Hekzan	Tespit edilemedi	-	-	-

Tablo 15. Mikrodalga destekli ekstraksiyon yöntemi kullanılarak HPLC tayini sonucunda diğer meyve çekirdeklerinden elde edilen amigdalin miktarları

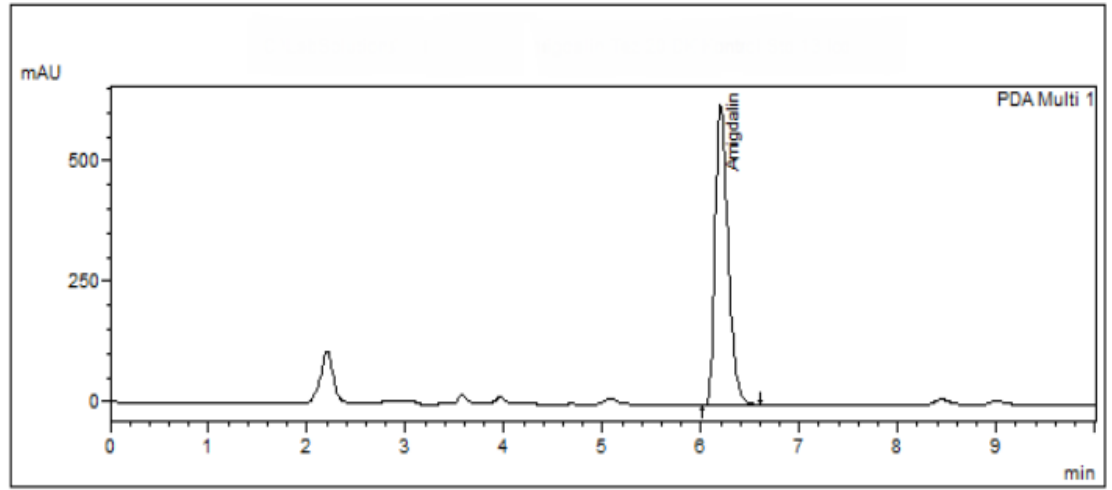
Meyve çekirdekleri	Amigdalin miktarları (mg/g)
Armut (<i>Pyrus communis</i>)	0,16± 0,01
Ayva (<i>Cydonia oblonga</i>)	7,42± 0,30
Kayısı (Yarı acı) (<i>Prunus armeniaca</i>)	1,21± 0,05
Elma (<i>Malus domestica</i>)	13,21± 0,53
Kiraz (<i>Prunus avium</i>)	2,03± 0,08
Nektarin (<i>Prunus persica var. nucipersica</i>)	0,042± 0,002
Erik (<i>Prunus domestica</i>)	40,01± 1,60
Karpuz (<i>Citrullus lanatus</i>)	Tespit edilemedi
Limon (<i>Citrus limon</i>)	Tespit edilemedi
Nar (<i>Punica granatum</i>)	Tespit edilemedi
Acıbadem (<i>Semen Amygdali amarum</i>)	65,21± 2,61
Rambutan (<i>Nephelium lappaceum</i>)	0,15± 0,01
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	Tespit edilemedi
Longan (<i>Dimocarpus longan</i>)	Tespit edilemedi
Guava (<i>Psidium guajava</i>)	0,074± 0,003



Şekil 37. Farklı ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak HPLC tayini sonucunda acı badem çekirdeğinden elde edilen amigdalın miktarları a) Soxhlet ekstraksiyon, b) Ultrasonik ekstraksiyon, c) Orbital çalkalayıcıli ekstraksiyon, d) Mikrodalga ekstraksiyonu



Şekil 38. Blank kromatogramı

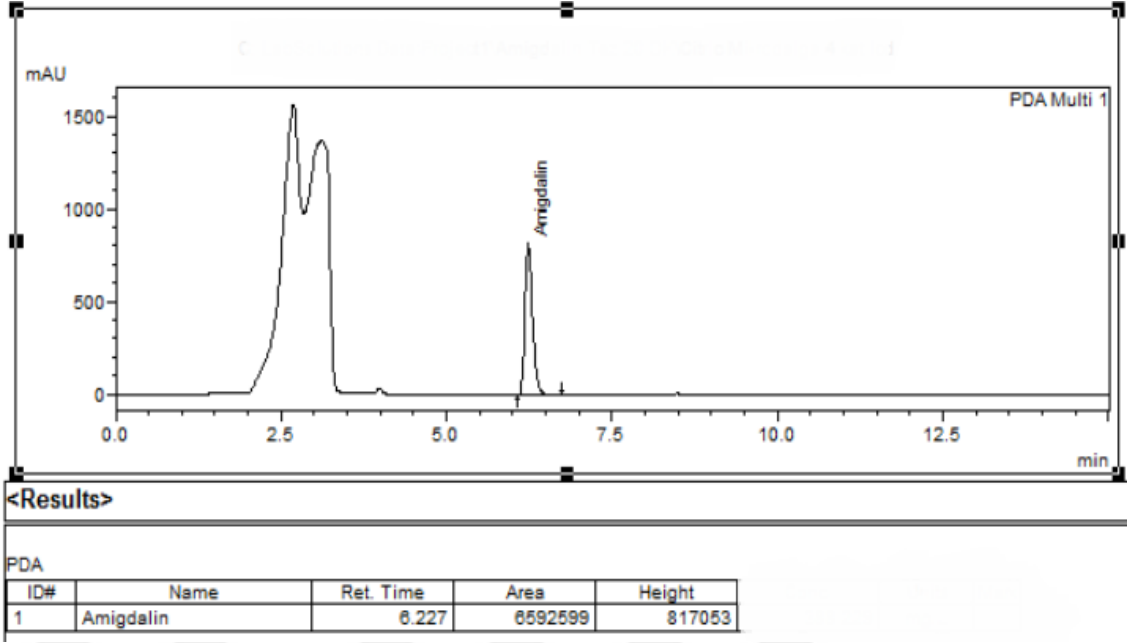


<Results>

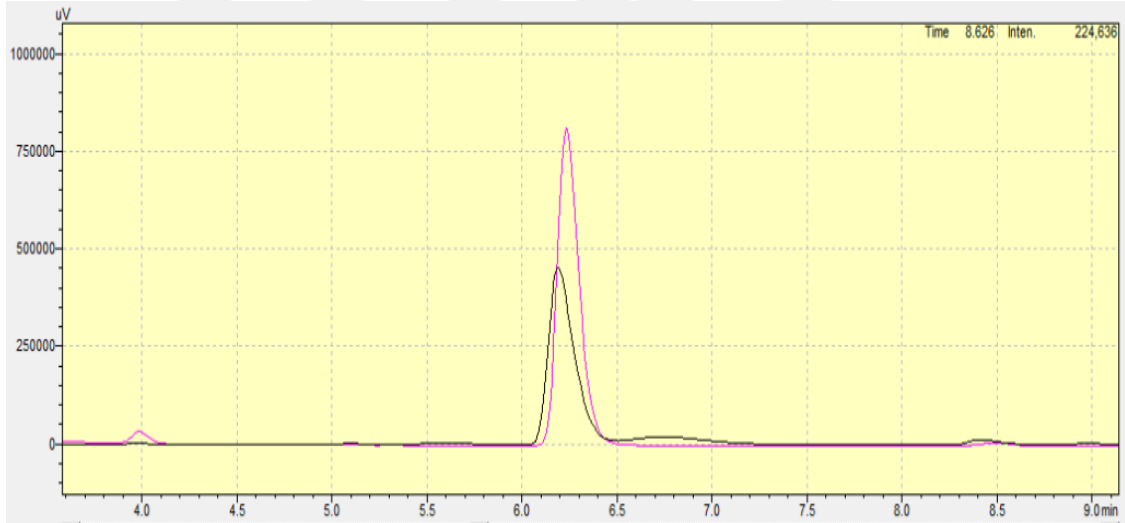
PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdaline	6.194	5657258	622875

Şekil 39. 250 mg/kg konsantrasyonundaki amigdaline standardına ait kromatogram



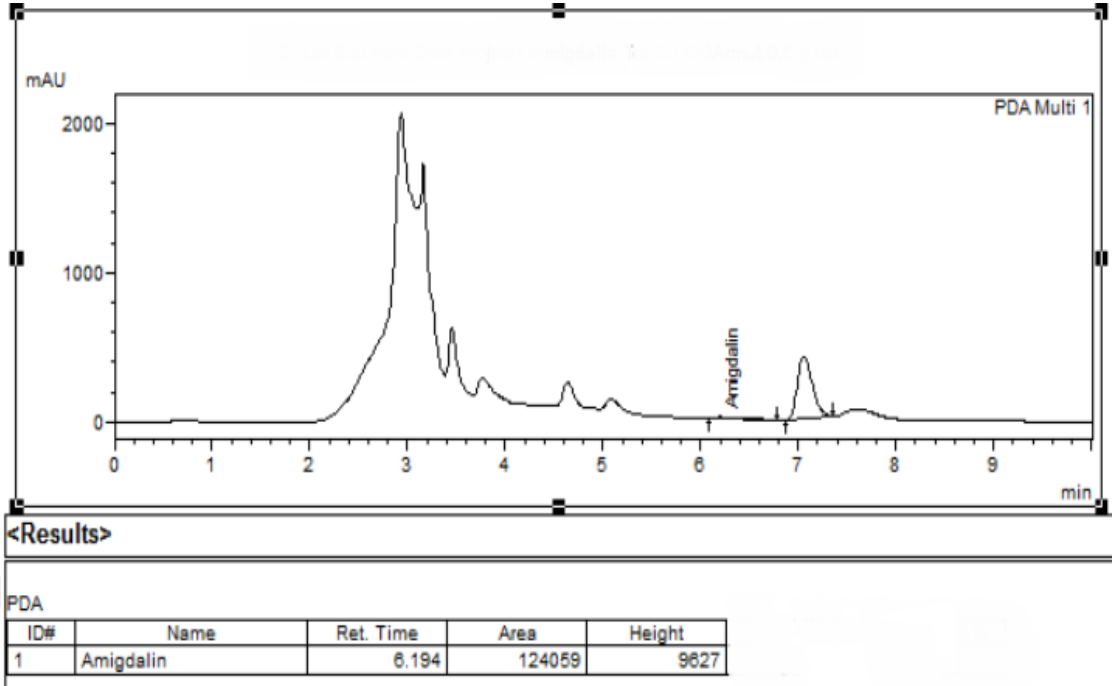
Şekil 40. Acıbadem çekirdeğine ait kromatogram



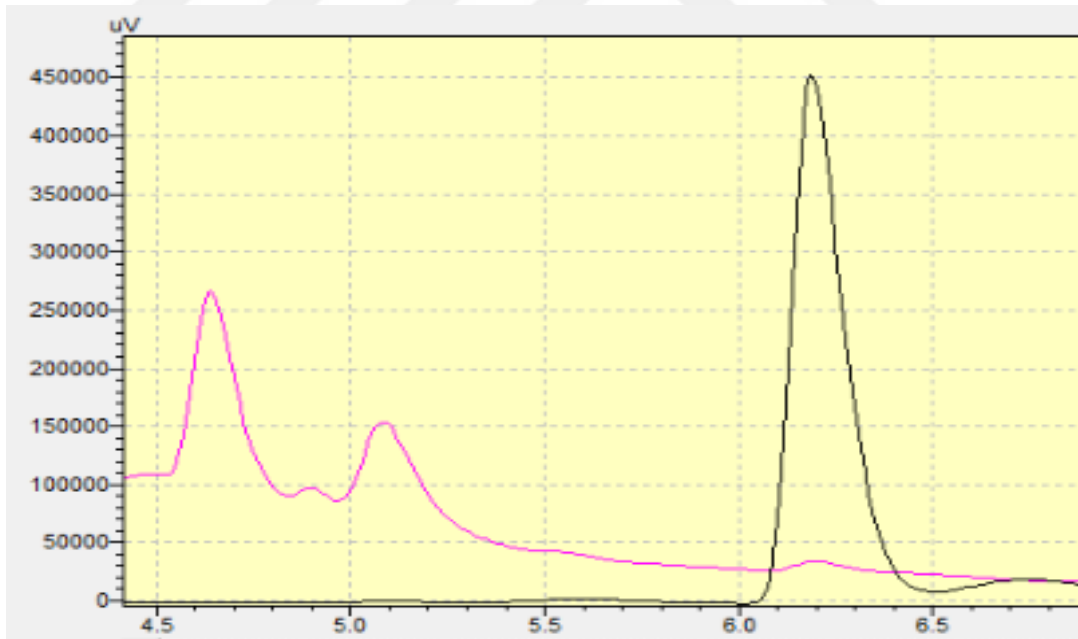
Şekil 41. Acıbadem çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



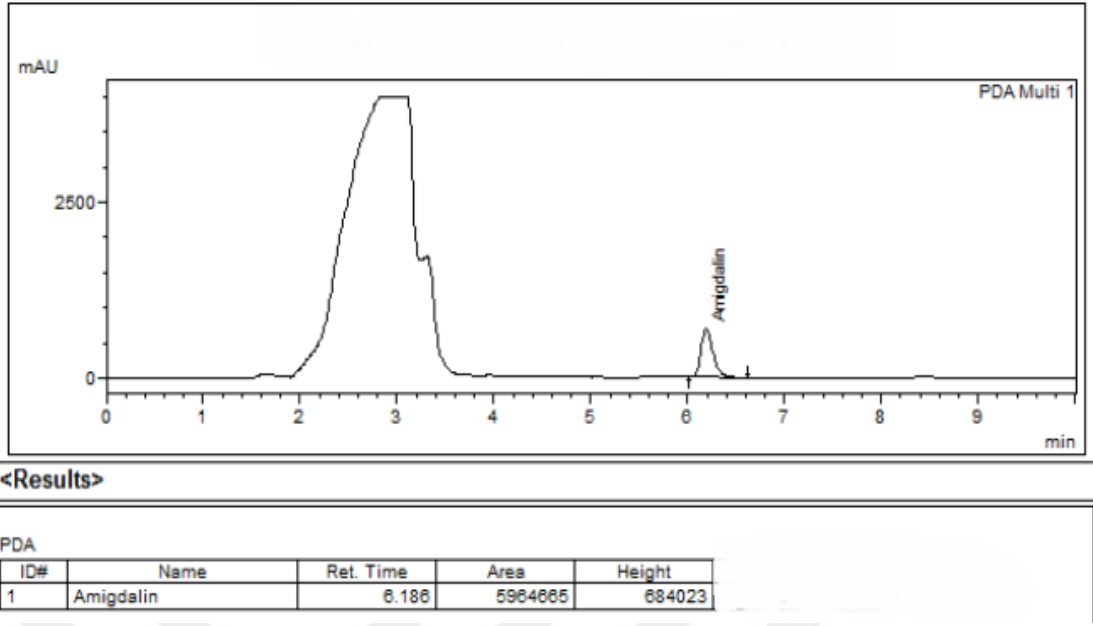
Şekil 42. Armut çekirdeğine ait kromatogram



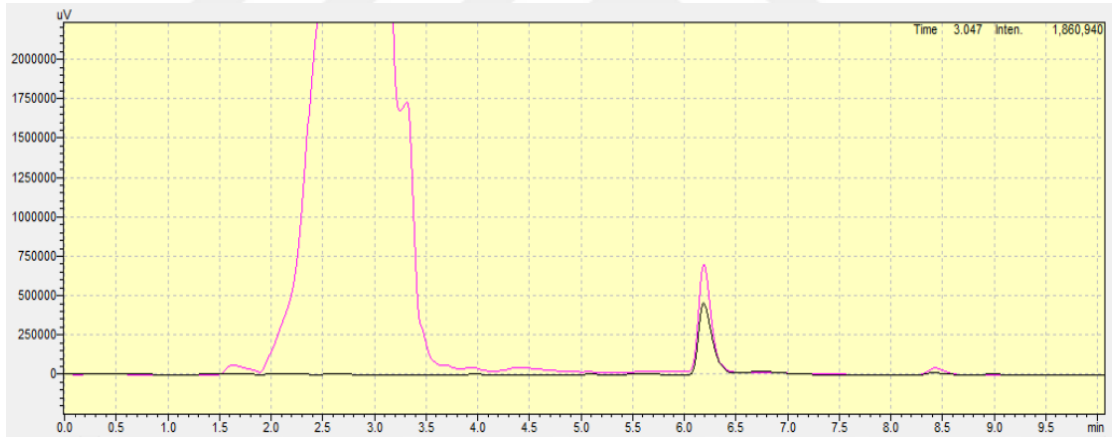
Şekil 43. Armut çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



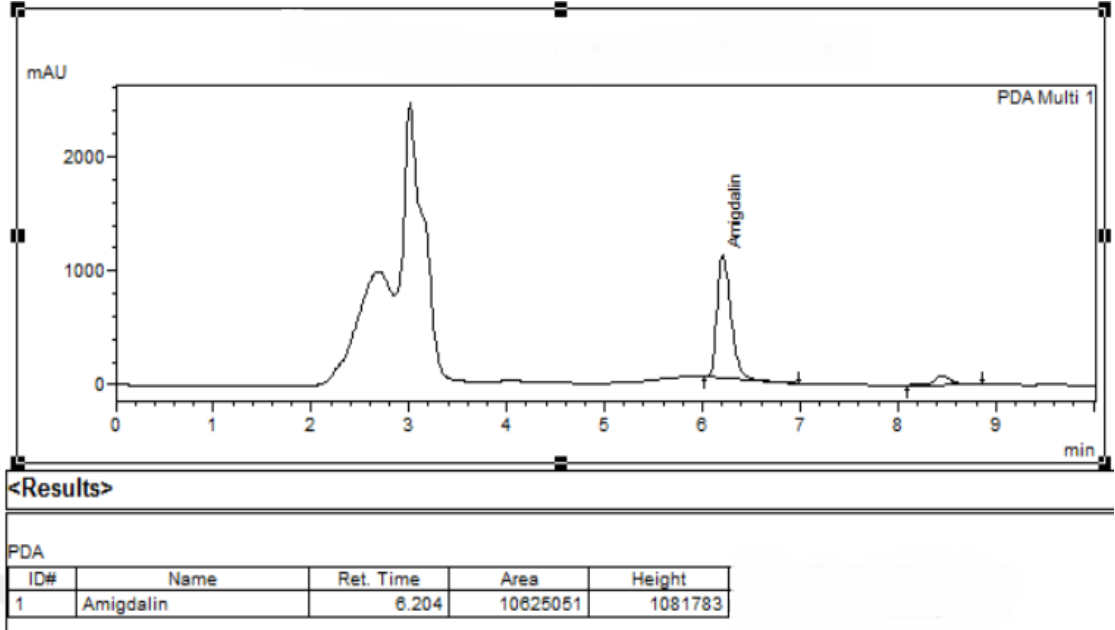
Şekil 44. Ayva çekirdeğine ait kromatogram



Şekil 45. Ayva çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



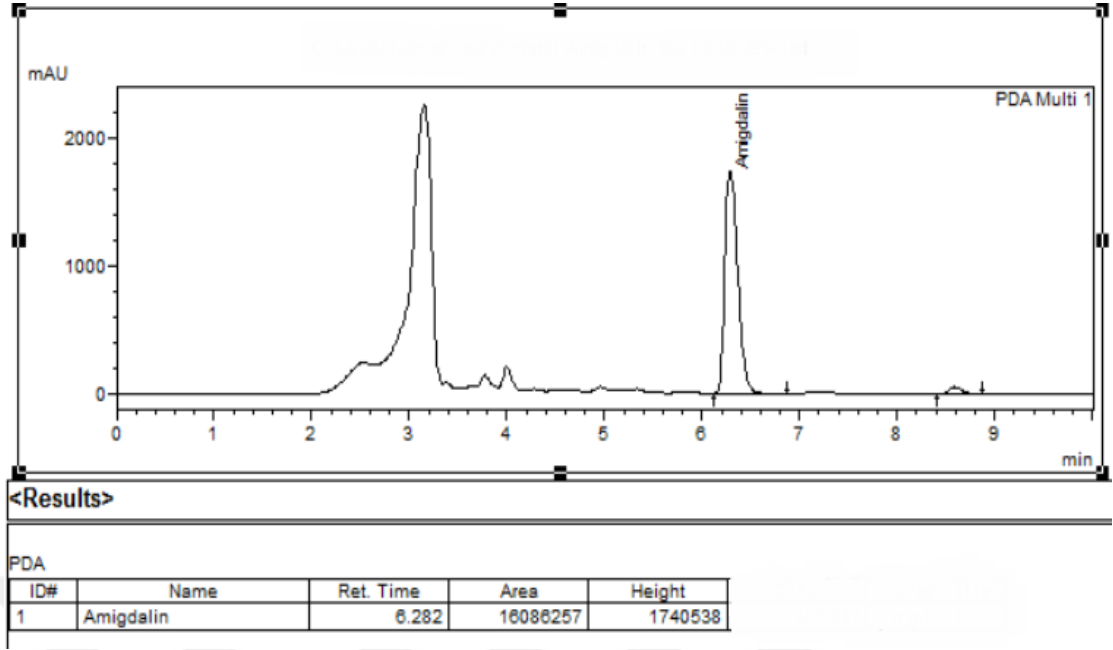
Şekil 46. Elma çekirdeğine ait kromatogram



Şekil 47. Elma çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



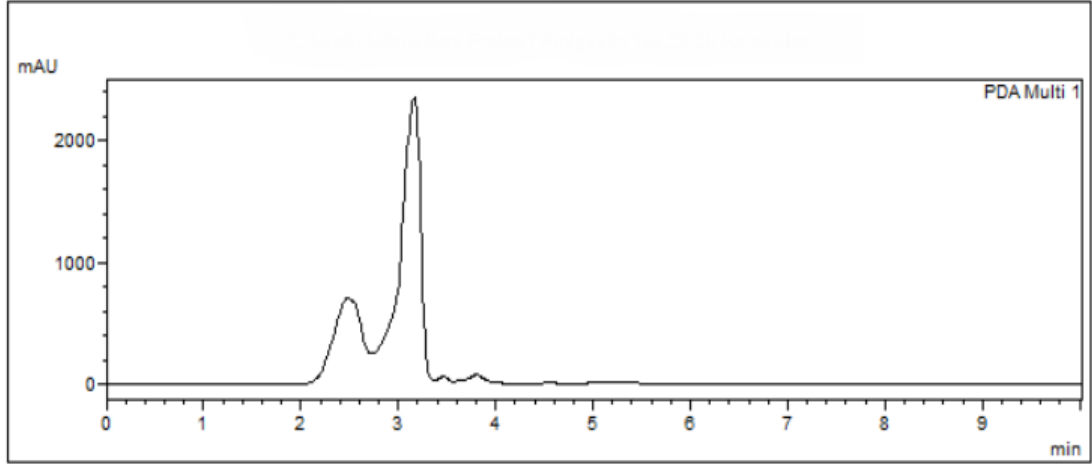
Şekil 48. Erik çekirdeğine ait kromatogram



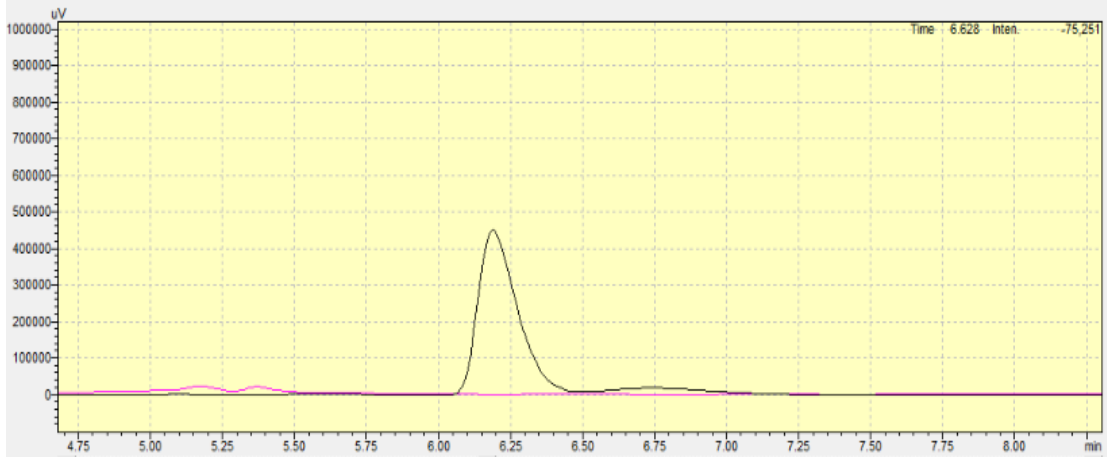
Şekil 49. Erik çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



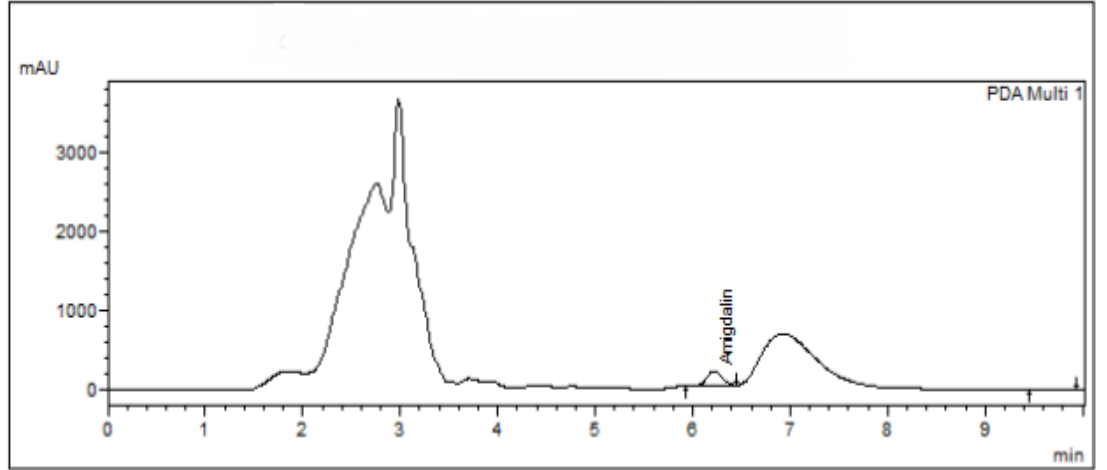
Şekil 50. Karpuz çekirdeğine ait kromatogram (Amigdalin tespit edilemedi)



Şekil 51. Karpuz çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı

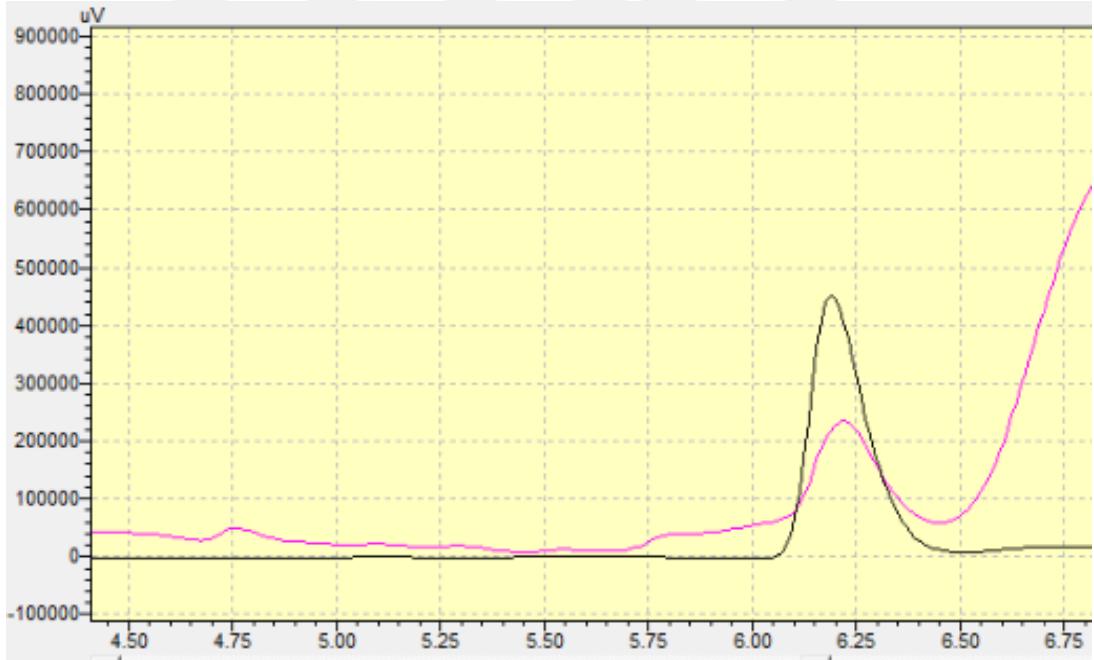


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdalın	6.212	1980735	181308

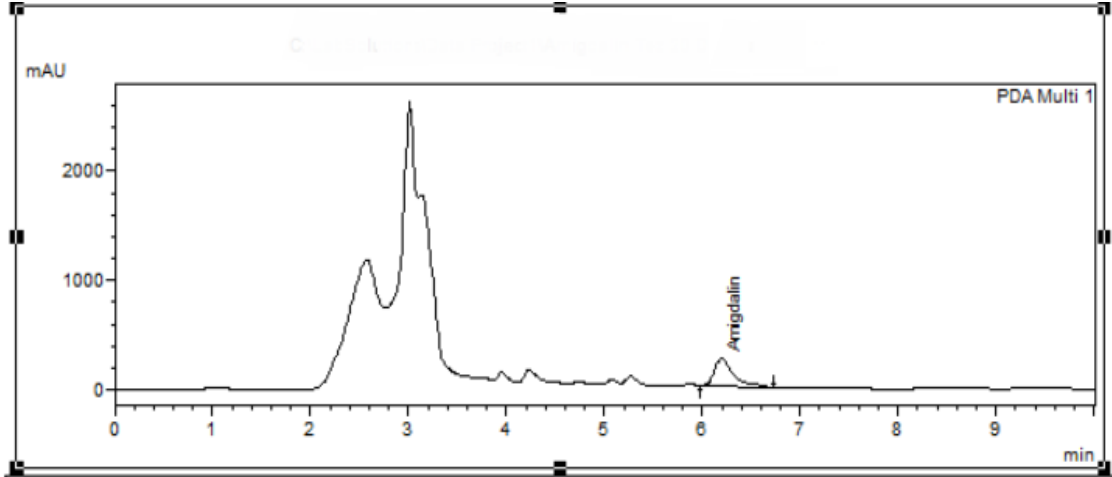
Şekil 52. Kayısı çekirdeğine ait kromatogram



Şekil 53. Kayısı çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı

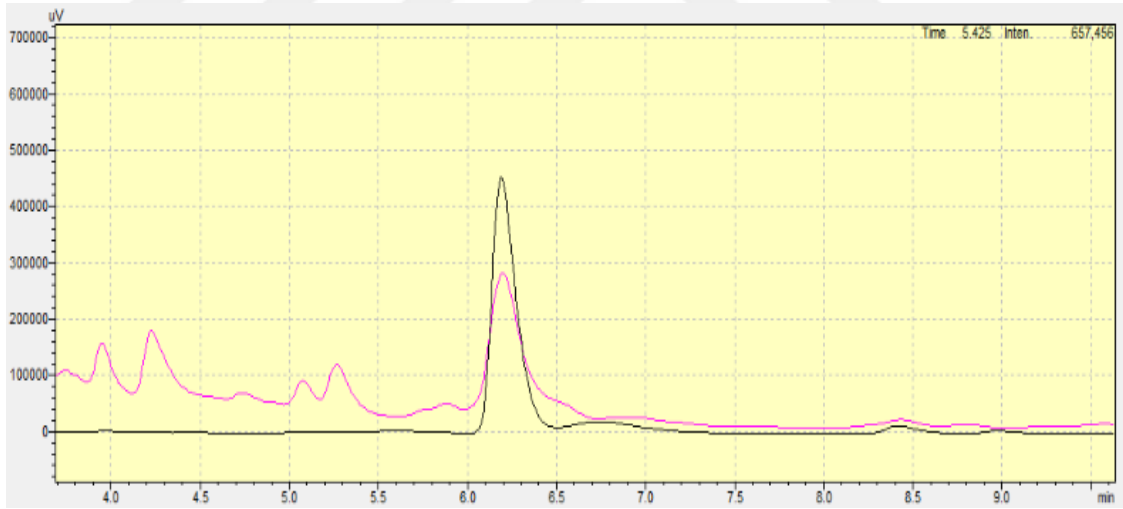


<Results>

PDA

ID#	Name	Ret. Time	Area	Height
1	Amigdalın	6.193	3259821	246701

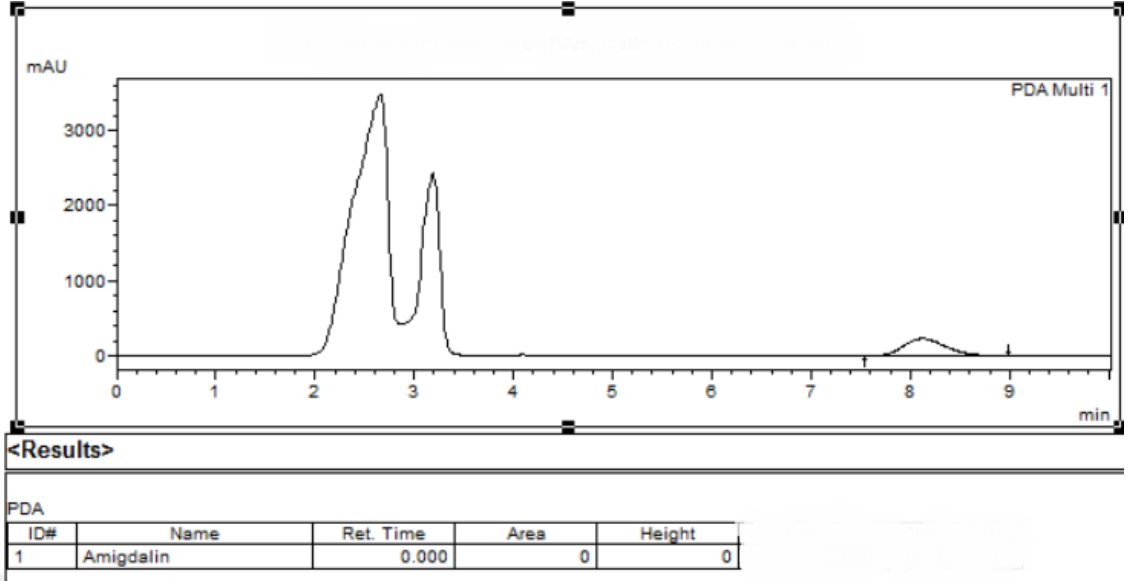
Şekil 54. Kiraz çekirdeğine ait kromatogram



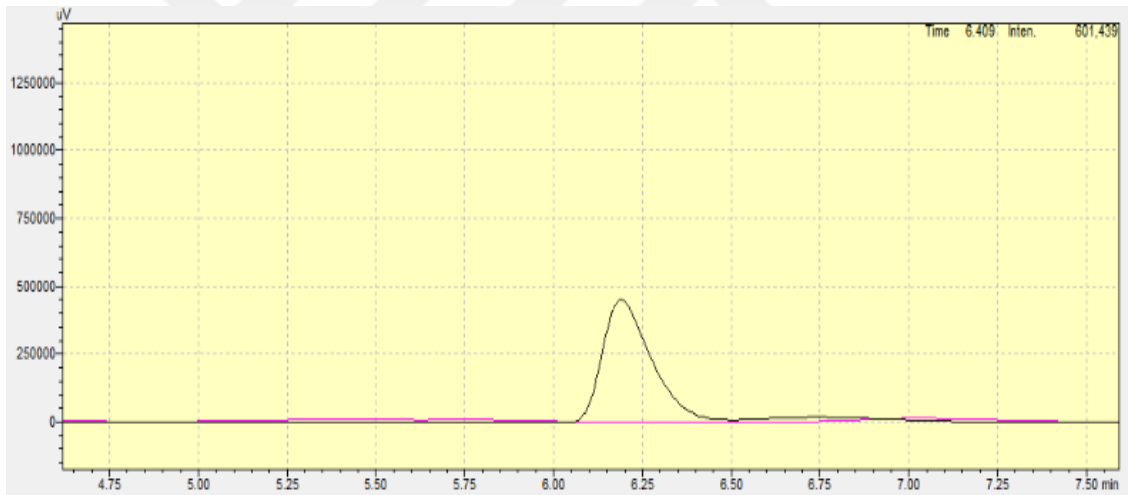
Şekil 55. Kiraz çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



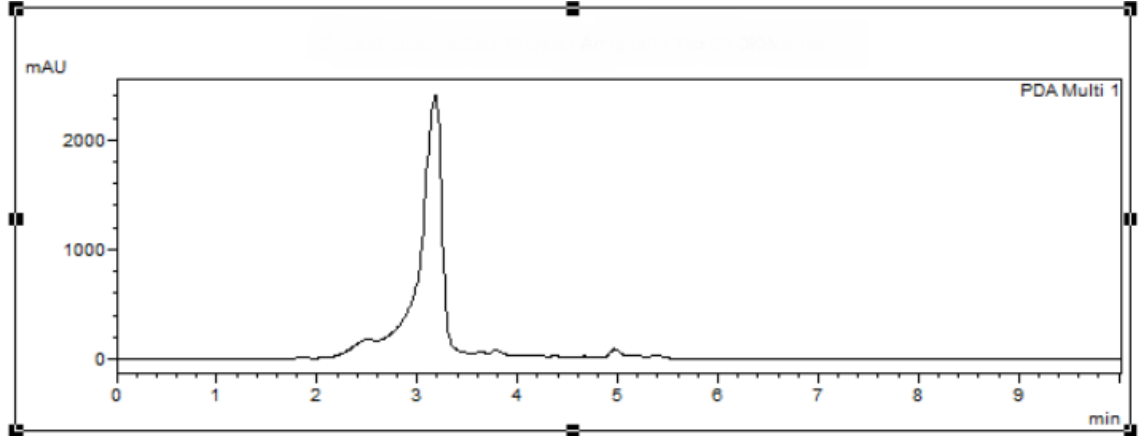
Şekil 56. Limon çekirdeğine ait kromatogram (Amigdalın tespit edilemedi)



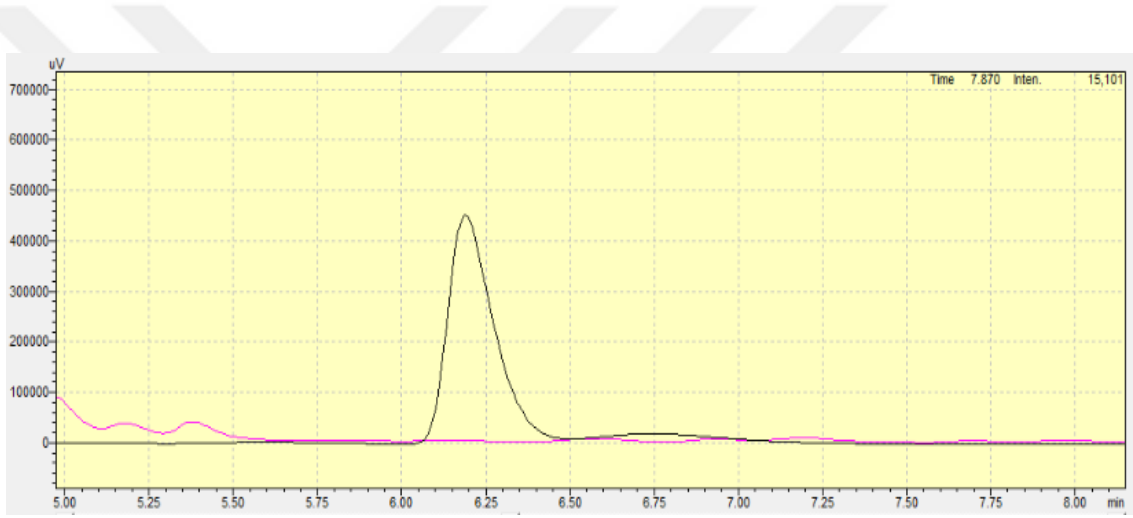
Şekil 57. Limon çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



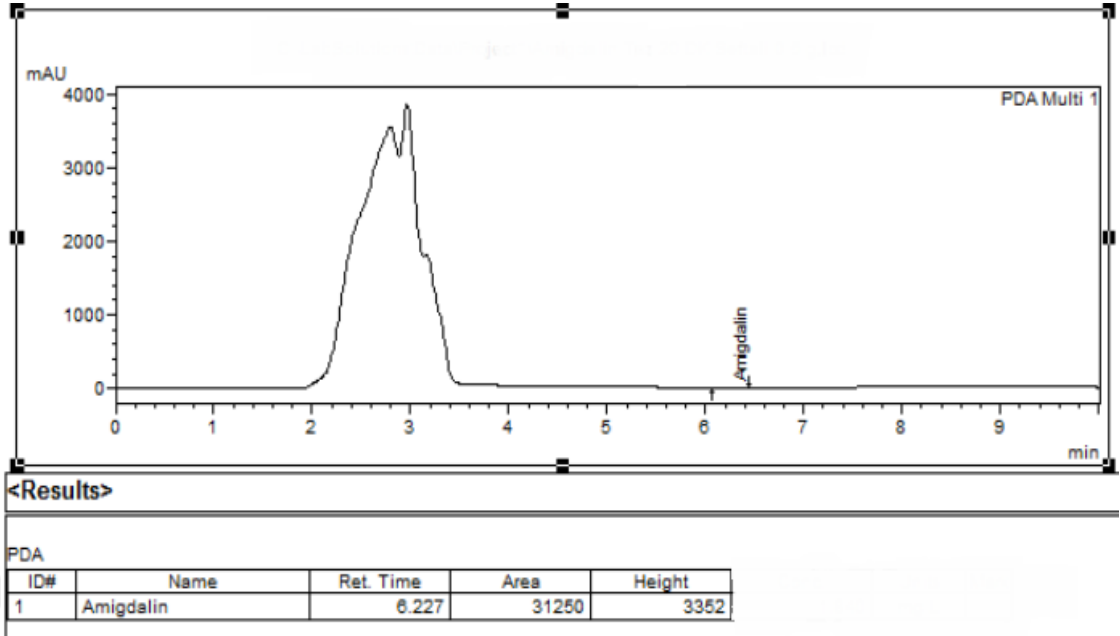
Şekil 58. Nar çekirdeğine ait kromatogram (Amigdalin tespit edilemedi.)



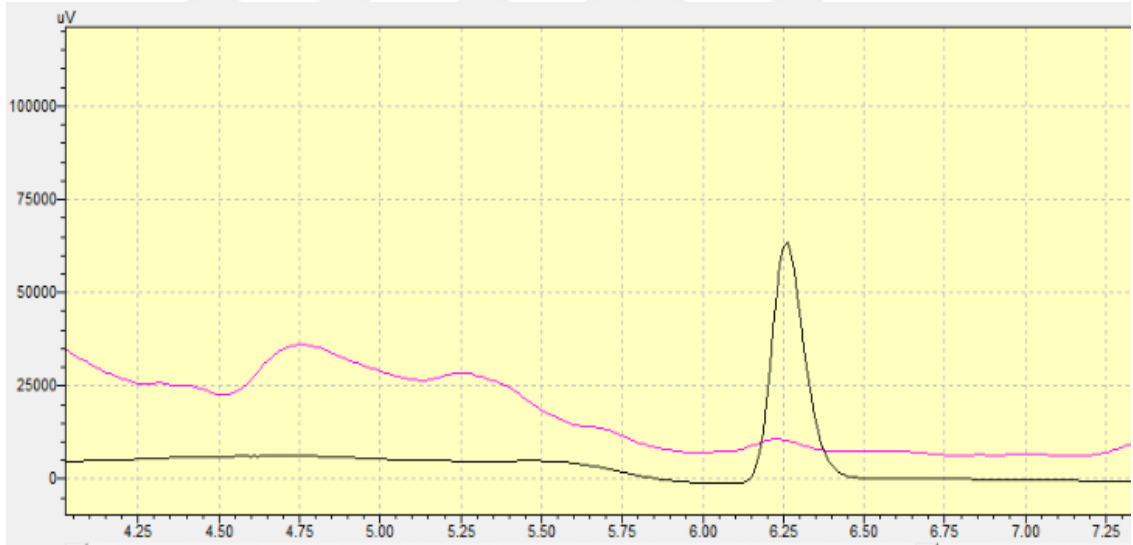
Şekil 59. Nar çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



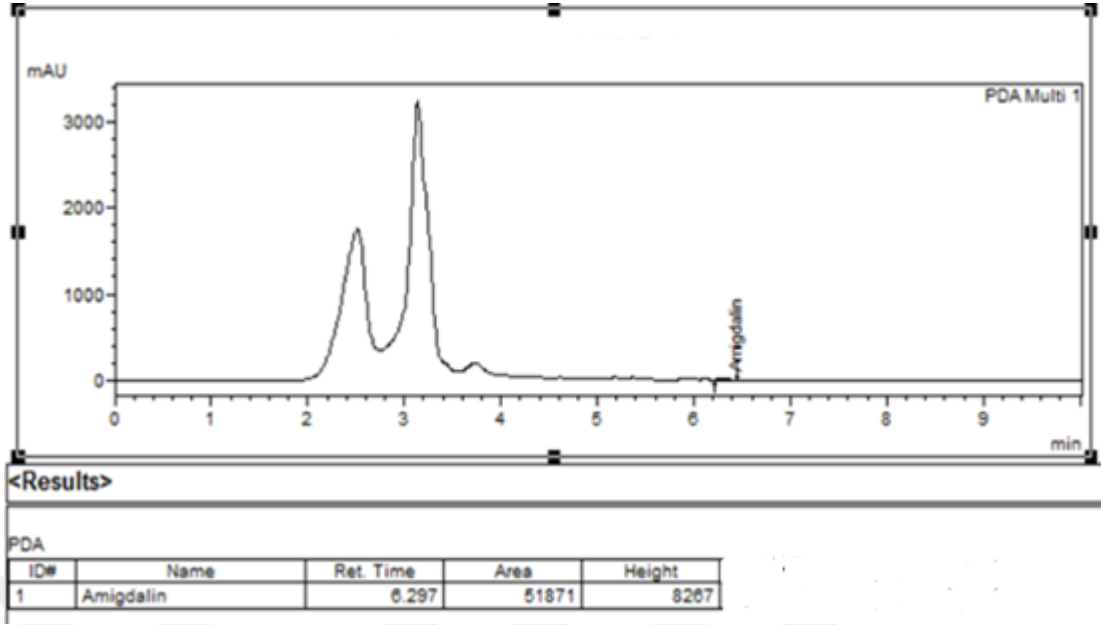
Şekil 60. Nektarin çekirdeğine ait kromatogram



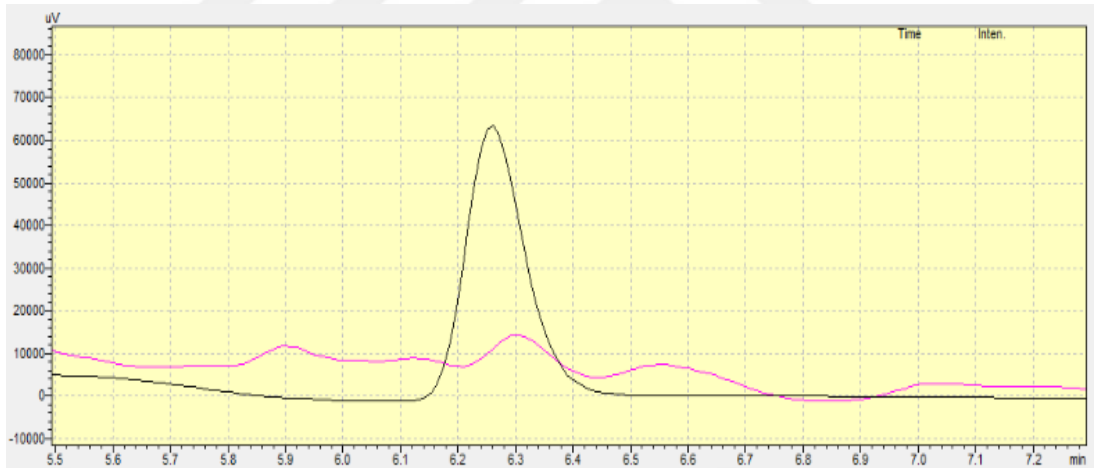
Şekil 61. Nektarin çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



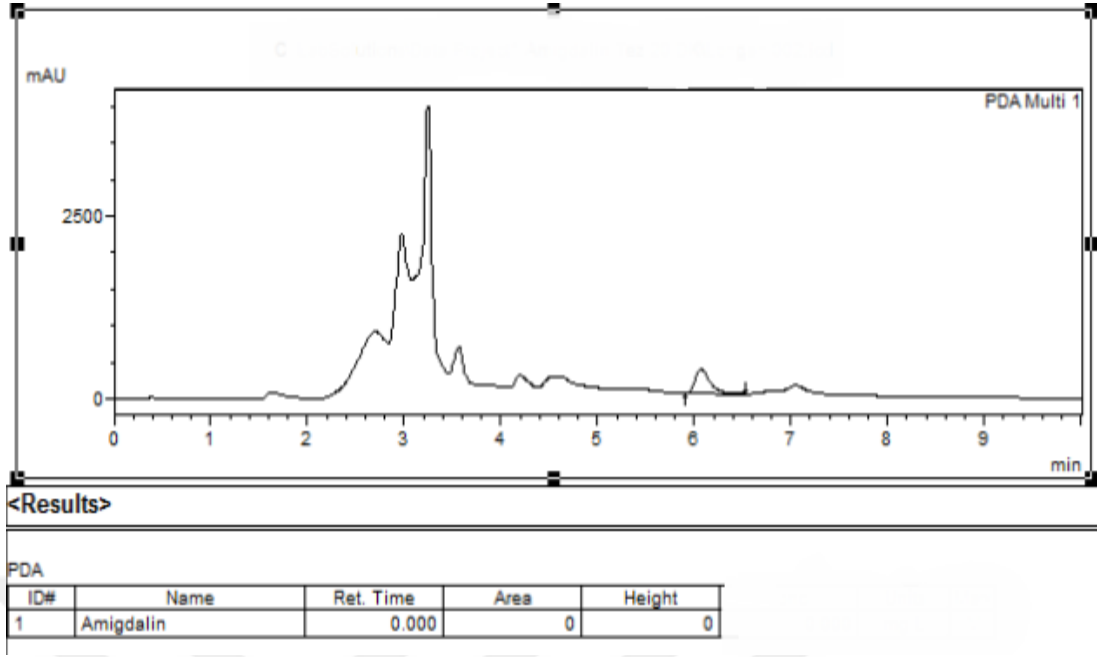
Şekil 62. Guava çekirdeğine ait kromatogram



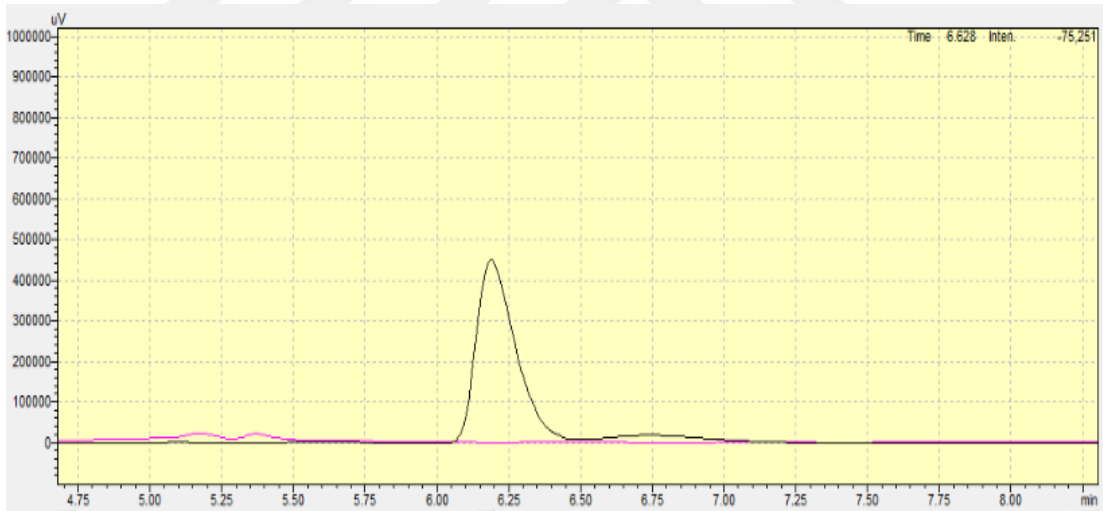
Şekil 63. Guava çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



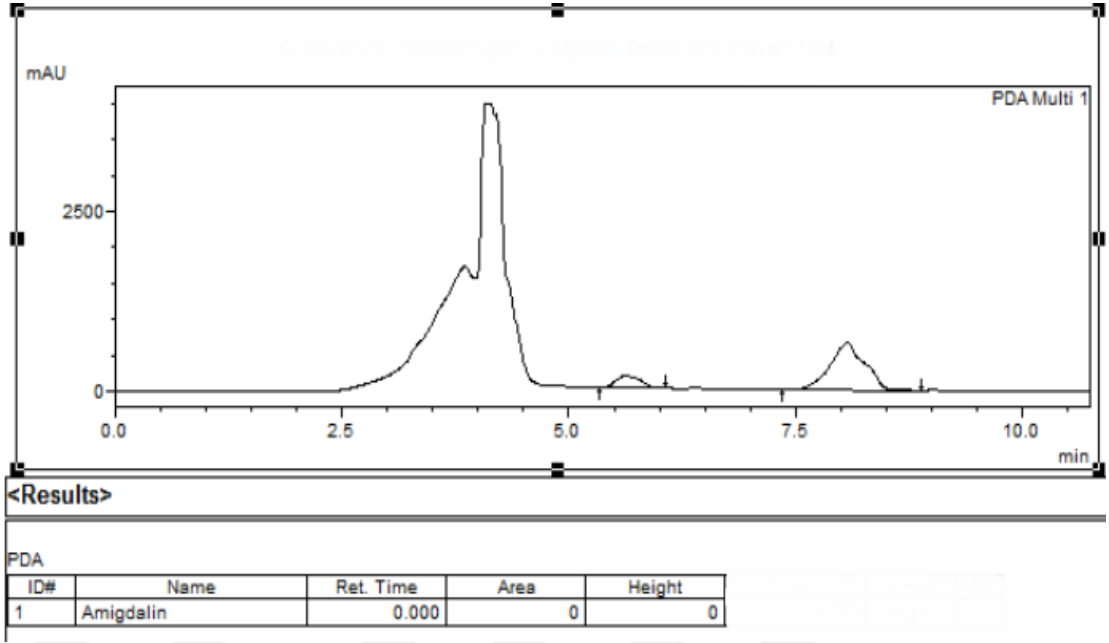
Şekil 64. Longan çekirdeğine ait kromatogram (Amıgdalin tespit edilemedi)



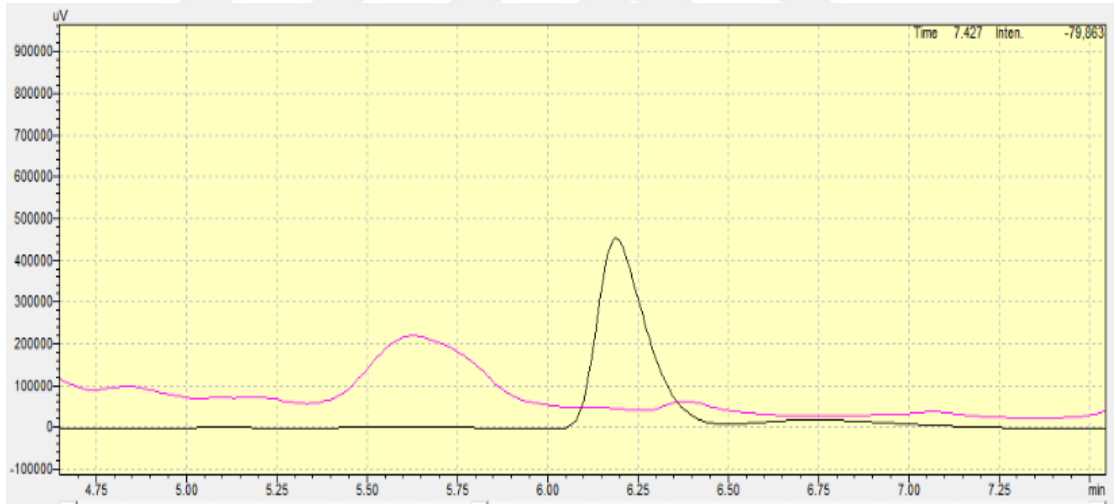
Şekil 65. Longan çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



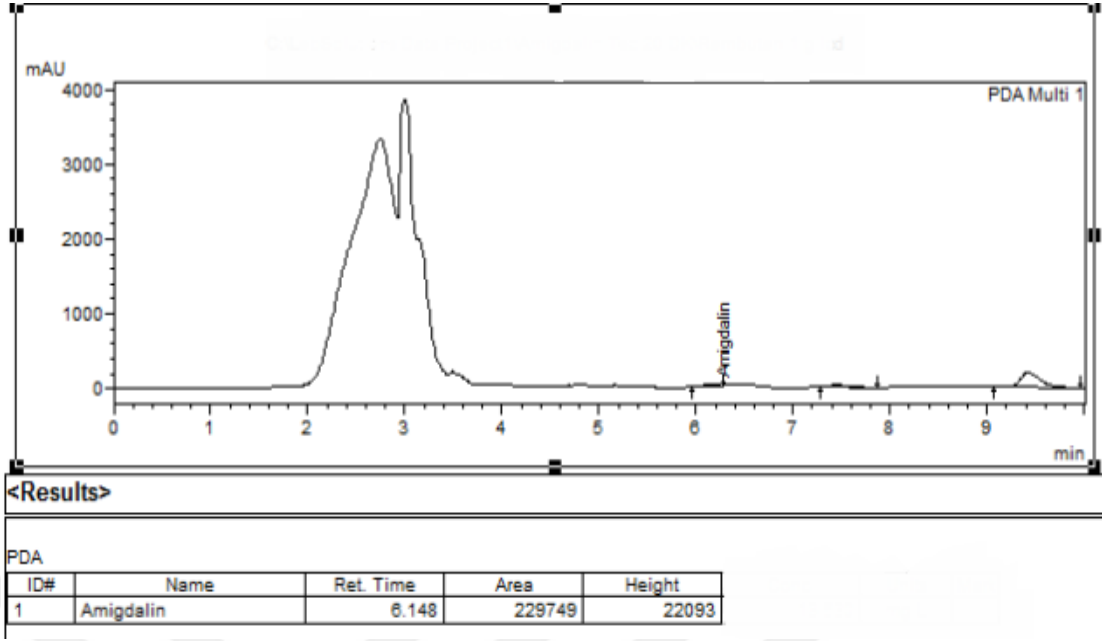
Şekil 66. Papaya çekirdeğine ait kromatogram (Amigdalin tespit edilemedi)



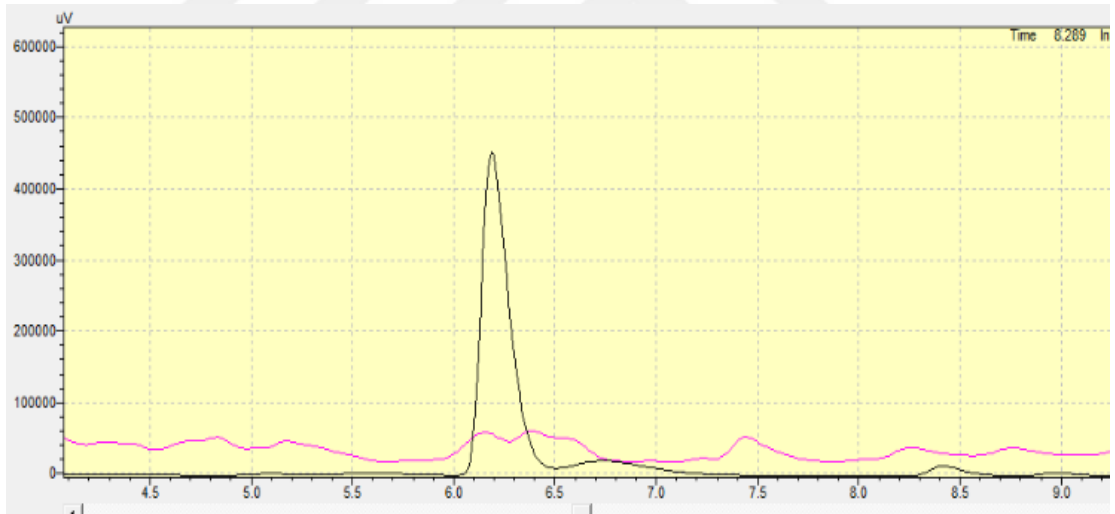
Şekil 67. Papaya çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı



Şekil 68. Rambutan çekirdeğine ait kromatogram



Şekil 69. Rambutan çekirdeği ve kontrol standardı spektrumlarının karşılaştırılmasına ait kromatogram

Pembe pik= Numune

Siyah pik= Kontrol standardı

7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada, Türkiye ve Tayland' da yetişen çeşitli meyvelerin çekirdeklerinde bulunan amigdalin miktarları tayin edilmiştir. Yapılan literatür taraması sonucunda genellikle Rosaceae türlerinden olan örneklerin incelenmiş olduğu ve diğer familyalar üzerinde araştırmaların yoğunlaşmadığı gözlenmiştir. Ayrıca Tayland meyvelerinin amigdalin içeriğine dair yapılan herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışma hem Tayland' da yetişen meyvelerin hem de Cucurbitaceae, Rutaceae, Lythraceae, Sapindaceae, Caricaceae ve Myrtaceae gibi farklı familyaların amigdalin miktarlarının tayini konusundaki ilk çalışmadır.

Amigdalinin, anti-kanser özelliği konusunda kuvvetli kanıtlar bulunmamakla beraber yapılan bir çok çalışmada hem kanser hem de diğer hastalıklar konusunda umut verici olabileceği yönünde iddialar bulunmaktadır. Yapısında hidrojen siyanür bulundurması nedeniyle, oral yolla aşırı miktarda amigdalin alımının tehlikeli olduğu bilinmektedir. Amigdalin, emülsin enziminin etkisi ile hidroliz olarak zehirlenmelere yol açmaktadır. Ancak yapılan bir çok çalışmada amigdalinin kontrollü kullanımı sağlandığında ve kemoterapötik ilaçlarla kombine edildiğinde antitümör etki oluşturabileceği düşünülmektedir. Bunların yanında amigdalinin nispeten daha düşük maliyetli bir doğal ürün olması, tercih edilme olasılığını arttıracaktır.

Bu çalışmada, amigdalinin kanser ve diğer hastalıkların tedavisinde kullanımı hakkında bilgiler toplanmış, acıbadem çekirdeği ile çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılarak ön denemeler yapılmıştır. Belirlenen en uygun yöntem diğer meyve çekirdeklerine de uygulanmış ve amigdalin miktarları HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Ayrıca amigdalin miktar tayini ile ilgili literatürde yer alan diğer çalışmalar da incelenmiştir.

Hwang ve ark. (2002), kaynar suda, D-amigdalin genellikle 3 dakika içinde neoamigdaline dönüşmeye başladığını ve 30 dakika sonra ilk D-amigdalinin % 30' undan fazlasının neoamigdalin olarak bulunduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada mobil faz olarak %6 asetonitril içeren 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 3.8)

kullanmışlardır ve ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle amigdalin ve neoamigdalinin açık bir şekilde ayırmışlardır. Ekstraksiyon solventi olarak %0.1 sitrik asit çözeltisi kullanarak amigdalinin dönüşümünü engelleme konusunda başarılı olmuşlardır.

Kumarasamy ve ark. (2003), *P.spinosa* tohumlarındaki başta amigdalin olmak üzere siyanojenik glikozitleri; sırasıyla metanol, n-hekzan ve diklorometan kullanarak Soxhlet cihazıyla ekstrakte etmişlerdir. Metanol ekstraktının 2 gramını Sep-Pak C18 kartuşundan geçirerek saflaştırmışlardır. Gradient elüsyonda ve mobil faz olarak metanol, su çözeltileri kullanarak preparatif -HPLC' de Luna C18 10 µ, 250 mm x 21.2 mm kolonu ile kantitatif tayinlerini yapmışlardır. Belirlenen tüm siyanojenik glikozitlerin tanımlanması için UV, ,SIMS, 1D ve 2D NMR spektroskopik veri analizlerini kullanmışlardır. Deneysel verileri ilgili literatür verileri ile uyumlu bulmuşlardır.

Koo ve ark. (2005), kayısı çekirdeğindeki D-amigdalin ve onun dönüşüm ürünü olan neoamigdalinin ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle kantitatif tayinini gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz olarak %8.5 asetonitril ya da %25 metanol içeren 10 mM sodyum fosfat tamponu (pH 3.1) kullanmışlardır. Ölçümler UV dedektörde 214 nm dalga boyunda yapılmıştır. HPLC kolonu olarak, Capcell Pak C18 MG (4.6mm×250 mm, 5 µm kullanmışlardır. Akış hızını 1.2 ml/dk olarak belirlemişlerdir. Enjeksiyon hacmi 10 µl' dir. Ekstraksiyon solventi olarak kaynar su kullandıklarından amigdalinin neomigdaline dönüştüğünü ve ekstraksiyon veriminin düştüğünü gözlemlemişlerdir. Bu sorunu kaynar su yerine %4 sitrik asit çözeltisi kullanarak çözmüşlerdir. Elde ettiği amigdalin miktarları bütün, yarım, ufak ve toz kayısı çekirdeğinde sırasıyla; 45,42± 1.21 mg/g, 40,44± 0,68 mg/g, 10,18± 0,24 mg/g, 1,73± 0,14 mg/g' dir.

Lv ve ark. (2005), tıbbi materyalden amigdalinin ekstraksiyonu için üç yöntem karşılaştırmışlardır; metanol ile ultrasonik ekstraksiyon, metanol ile soxhlet ekstraksiyonu ve su ile reflux ekstraksiyonu. Sonuçlar, % 0.1 sitrik asit ihtiva eden reflux ekstraksiyonunun en iyi seçenek olduğunu göstermiştir. Elde edilen amigdalin

miktarının hesaplanması için ters fazlı, yüksek performanslı bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişleridir. Mobil faz olarak; metanol-su (15:80) karışımı, HPLC kolonu olarak; Agilent C18 column (250 × 4.6 mm, 0.45 µm) kullanılmıştır. UV dedektörde 215 nm dalga boyunda çalışmışlardır. Enjeksiyon hacmini 20 µl olarak belirlemişlerdir. Elde ettiği amigdalin miktarları kayısı çekirdeği ve tüylü kiraz için sırasıyla; ultrasonik ekstraksiyonunda; %1,71 ve %1,67, soxhlet ekstraksiyonunda; %2,03 ve %2,11, reflux ekstraksiyonunda; %4,31 ve %4,09' dur.

Genç (2009), prunasin ve amigdalin miktarlarının HPLC ile tayini için taflan çekirdek örneklerini metanol, metanol:kloroform (1:1), metanol:su (1:1) ve su ile ekstrakte etmiş bunun sonucunda metanol:su ve yalnızca su ile yapılan ekstraksiyonlardan amigdalin elde edilememişlerdir. En fazla amigdalin miktarı metanol:kloroform ekstraksiyonu ile 93.06 g/kg olarak belirlenmiştir. (Dursun, 2010).

Dursun (2010), Karayemişte amigdalin ve prunasin miktarını tayin etmek için kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi ve nükleer manyetik rezonans ön denemelerini gerçekleştirdikten sonra HPLC ile gradient programda kantitatif olarak tayin etmiştir. Mobil faz olarak asetonitril ve deiyonize su kullanılmıştır. HPLC kolonu olarak; Dionex C18 (4.6 x 150 mm, 0.5 µm partikül büyüklüğünde) kolon kullanmıştır. Çalışma UV dedektörde 218 nm'de yapılmıştır. Çalışılan örneklerde ortalama amigdalin miktarı 0.277 g/kg olarak tayin edilmiştir.

Arrázola ve ark. (2012), tatlı, hafif acı ve acı badem çekirdeklerindeki amigdalin miktarını tayin etmek istemişlerdir. Ekstraksiyonu, oda sıcaklığında 12 saat boyunca 10 mL metanol ile gerçekleştirmişlerdir ve kantitatif tayini için izokritik elüsyonlu ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisini kullanmışlardır. Mobil faz olarak asetonitril: su karışımı (20:80) kullanarak tayini UV dedektörde 218 nm' de gerçekleştirmişlerdir. Kromatografik koşullar; HPLC kolonu: Waters Symmetry (250 x 4.6 mm), akış hızı: 1.5 mL/dk, enjeksiyon hacmi: 20 µL.

Poyraz (2013), çeşitli kayısı türlerindeki amigdalin miktarını belirlemek için fosfat tamponu (pH 2,8): metanol (75:25 (v/v)) karışımından oluşan hareketli faz kullanmıştır. Ekstraksiyon solventi olarak etanol ve ekstraksiyon metodu olarak ultrasonik banyo kullandıktan sonra tayini; HPLC- UV dedektör çiftiyle 210 nm' de gerçekleştirmiştir. Çalışmada; Inertsil ODS-3 (5 µm, 250 mm x 4,6) boyutlarında C18 kolonu kullanmıştır. Akış hızı 1 ml/dk, enjeksiyon hacmi 20 µL, kolon fırını sıcaklığı 30°C olarak ayarlanmıştır. Çalışma sonucunda; acı kayısı tohumlarının ortalama amigdalin miktarı $26,27 \pm 14,4$ mg/g; tatlı tohumların ortalama amigdalin miktarı $0,16 \pm 0,09$ mg/g olarak bulunmuştur.

Miao ve ark., (2013), yabani kayısı çekirdeğindeki amigdalin miktarlarını hızlı ve verimli bir şekilde belirlemek için, ikinci türev UV spektrofotometrisi ve yüksek performanslı ters fazlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemlerini karşılaştırmışlardır. İkinci türev spektrofotometri yönteminin, arka plandaki gürültüyü etkili bir şekilde ortadan kaldırdığını ve HPLC yönteminin doğruluğunu muhafaza ederken uygulamasının da kolay olduğunu ve yabani kayısı çekirdeğindeki amigdalin konsantrasyonlarının büyük ölçekte belirlenmesi için yararlı bir araç olmasının muhtemel olduğunu bildirmişlerdir. HPLC yöntemi için; analizler 25 ° C'de bir C18 ters faz kolonu (250 mm x 4.6 mm, 5.0 µm) kullanılarak yapılmıştır. Kromatografik koşullar: 0.8 ml/dk akış hızı, mobil faz; (15:85) asetonitril: su karışımı, 20 µl enjeksiyon hacmi ve DAD dedektör dalga boyu 214 nm' dir. Sonuçlar; ikinci türev UV spektrofotometrisi için 0.21 ± 0.10 mg/mL, HPLC için 0.18 ± 0.09 mg/mL bulunmuştur.

Bolarinwa ve ark. (2014), amigdalin kantifikasyonu için, ekstraksiyon verimliliğini araştırmak ve piyasada bulunan çeşitli gıdalardaki seviyeleri ilk kez tespit etmek için yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi prosedürü geliştirip uygulamışlardır. Kromatografik koşullar: Kolon özellikleri; Phenomenex C18, Nucleosile 3, (150 mm x4.60 mm, 3 µm), kolon fırını sıcaklığı 40 °C. 1 ml/dk akış hızı, mobil faz; (25:75) metanol: su karışımı, 5 µl enjeksiyon hacmi ve DAD dedektör dalga boyu 214 nm' dir. Sonuçlar, Rosaceae türlerinden olan tohumların (kayısı için 14.37 mg/g, kiraz için 3.89 mg/g, nektarin için 0.12 mg/g, şeftali için 6.81 mg/g, erik için 17.49 mg/g,

elma için 2.96 mg/g ve armut için 1.29 mg/g) Rosaceae olmayan türlere (0.01-0.2 mg/g aralığında) göre nispeten yüksek miktarlarda amigdalin içerdiğini göstermektedir. İşlenmiş gıda ürünlerinin amigdalin içeriğini çok düşük seviyelerde bulmuşlardır.

Bolarinwa ve ark. (2015), elma tohumları, taze elma ve işlenmiş elma sularındaki amigdalinin tayinini ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisi- DAD çiftiyle 214 nm' de gerçekleştirmiştir. Mobil faz olarak metanol: su karışımı (25: 75, v:v) kullanmışlardır. Kromatografik koşullar: Kolon özellikleri; Phenomenex C18, Nucleosile 3, (150 mm x4.60 mm, 3 µm), kolon fırını sıcaklığı 40 °C, akış hızı 1 ml/dk, enjeksiyon hacmi 5 µl' dir. Ekstraksiyon solventi olarak etanol kullanıp reflux altında kaynatmışlardır. Etanolü uçurduktan sonra dietileter ilave etmişlerdir ve dietileterin uçurulmasından sonra da su ilave ederek numuneyi enjeksiyona hazır hale getirmişlerdir. 15 elma çeşidinden elde ettiği sonuçlar; 1 ila 4 mg/g arasında değişmektedir.

Çelik ve Yıldırım (2017), amigdalinin analizinde spektrofotometre, ince tabaka kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz kromatografisi-kütle spektrometresi, enzim bağlı immünosorbent analizi (ELISA), miktarsal proton nükleer manyetik rezonans (q1H-NMR) tekniği kullanılabileceğini bildirmişlerdir. HPLC tekniğinin, çoğunlukla ters fazlı kolon ve 215 nm dalga boyunda belirleme şeklinde uygulanmakta olduğunu belirtmişlerdir. Amigdalinin parçalanması sonucu açığa çıkan hidrojen siyanür miktarının titrimetrik, spektrofotometrik, elektrokimyasal, kromatografik ve elektroforetik (kılcal elektroforez) teknikler kullanılarak belirlenebileceğini söylemişlerdir.

Lee ve ark. (2013), 20 çeşit acısız, yarı acı ve acı bademlerin amigdalin içeriğini katı faz ekstraksiyonu ve ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografi elektrosprey üçlü dörtlü kütle spektrometresi (UHPLC- (ESI) QqQ MS / MS kullanılarak belirlemiştir. Acısız, yarı acı ve acıbademlerdeki amigdalin miktarlarını sırasıyla: 63.13± 57.54, 992.24± 513.04 ve 40060.34± 7855.26 mg/kg olarak bulmuşlardır. Amigdalin

seviyeleri, acısızlarda 2.16 ila 157.44 mg/kg, yarı acılarda 523.50 ila 1772.75 mg/kg ve acıbademlerde 33006.60 ila 53998.30 mg/kg arasında değişmiştir.

Wang ve ark. (2015), atık bayberry çekirdeklerini kullanmak için, amigdalinin TBK' lardan ayırıştırılması ve saflaştırılması için makraporoz adsorpsiyon reçineleri (MAR) kullanmışlardır. Ekstraksiyon için; bayberry çekirdeklerini, 105 ° C'de kurutup ve 20 hacim petrol eteri (60-90 ° C'de 2 saat kaynama) ile üç kez çalkalamışlardır. Daha sonra çekirdekleri toz haline getirip 60 gözenek açıklığına sahip bir elekten geçirmişlerdir. Bayberry çekirdek tozunu, bir erlende (30 dakika boyunca 45 °C' de) 20 hacim metanol çözeltisi ile özümleyip bu işlem üç kez tekrarlamışlardır. Özüt çözeltilerini birleştirilip bir Buchner hunisi kullanılarak bir Whatman No. 1 filtre kağıdından vakumla süzmüşlerdir. Süzüntüyü, evaporatörde metanolü uzaklaştırmak için 45 °C' de düşük basınç altında buharlaştırmışlardır. Kalıntı, kromatografi kolonuna yüklenmeden önce ham TBK çözeltisini vermek üzere damıtılmış su ile seyreltilmiştir. HPLC kromatografik koşulları: Mobil faz olarak asetonitril: su karışımı (13: 87, v:v) kullanmışlardır. Kromatografik koşullar: Kolon özellikleri; Symmetry C18 MG kolon (250 mm x4.60 mm, 5 µm), kolon fırını sıcaklığı 25 °C, akış hızı 1 ml/dk, dedektör; DAD dedektör, dalga boyu; 214 nm' dir. Karakterizasyon ve yöntem gelişimi için D101 kullanmışlardır. Bir dinamik adsorpsiyon/ desorpsiyon döngüsü boyunca, HPLC ile saptanan ekstrakttaki amigdalin saflığı, %77.9 geri kazanımla, %4.8'den %82.0'a kadar yaklaşık 17 kat arttığını belirlemişlerdir.

Senica ve ark. (2016), kiraz ve kayısı tohumlarının ayrıntılı fenolik ve siyanojenik profillerinin yanı sıra ezilmiş çekirdeklerden hazırlanan içeceklerin amigdalin miktarını tayin etmişlerdir. Ekstraksiyon işlemi; çekirdekler bir havanda toz haline getirilmiş ve 2 g kayısı veya kiraz çekirdeği tozu hemen 6 ml metanol-su (70:30, v/v) ile ekstrakte edilmiştir. Karışım 30 °C de 30 dakika boyunca 25 mL %70' lik metanolle ultrasonik banyoda ekstrakte etmişlerdir (Oomah ve ark., 1992). Süspansiyonu 4 ° C' de 10,000 rpm'de 7 dakika santrifüjleyip ve süpernatantı Macherey-Nagel tarafından üretilen bir Chromafil AO-20/25 poliamid filtreden filtre etmişlerdir. Tayin için yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kütle

spektrofotometrisi (MS) kullanmışlardır. Gradient elüsyonda, mobil faz A: çift damıtılmış su içerisinde %0,1 formik asit ile %3 asetonitril; mobil faz B: asetonitril içerisinde %0,1 formik asit ve %3 çift damıtılmış su kullanmışlardır. Kromatografik koşullar: Kolon özellikleri; Gemini C18 kolon (150 mm x4.60 mm, 3 µm), kolon fırını sıcaklığı 25 °C, akış hızı 0,6 ml/dk, dedektör; DAD dedektör, dalga boyu; 280 ve 350 nm, enjeksiyon hacmi 10 µl' dir. Kayısı çekirdeğinde 1024,04± 50,75 µg/g, kiraz çekirdeğinde 732,79± 36,93 µg/mL amigdalin tayin etmişlerdir.

Mazza ve Cottrell (2008), Kanada' nın 4 farklı bölgesinden, 4 mevsimde toplanan, 5 çeşit saskatoon üzümündeki prunasın ve amigdalin miktarlarını HPLC yöntemiyle tayin etmişlerdir. Ekstraksiyon işlemi; dört ila sekiz donmuş taze saskatoon meyvesi tartılmış, dövülmüş ve tohumlar ince uçlu bir neşter kullanılarak ayrılmıştır. Tohumları bir tüp içerisine tartıp üzerine 5 mL% 60 metanol ilave etmişlerdir ve tüp gece boyunca (16 saat) bir karıştırıcıda karıştırılmıştır. Tüp, 5 dakika boyunca 2000 rpm'de santrifüjlenip ve 4.0 mL süpernatant çekilmiş ve 10 mL'lik bir polietilen santrifüj tüpüne aktarılmış ve 43 °C' de kuruyana kadar bırakmışlardır. Kurutulmuş özütü, 1.0 mL %15 metanol içerisinde yeniden çözündürüp, 0.45 µm filtreden süzmüşlerdir. HPLC kromatografik koşulları: Gradient elüsyonda mobil faz A; metanol ve mobil faz B; *tert*-butyl methyl ether (TBME) kullanmışlardır. Kromatografik koşullar: Kolon özellikleri; YMC S-3 (150 mm x2 mm, 3 µm), kolon fırını sıcaklığı 30 °C, dedektör; DAD dedektör, dalga boyu; 450 nm' dir. Her iki siyanojenik glikozitin seviyeleri meyvelerin yeşil aşamasında çok düşükken, olgunluk aşamasında aynı seviyede olduklarını tespit etmişlerdir. Olgun (mor) meyvelerde, amigdalin içeriği 43 ila 129 mg/kg arasında ve prunasın içeriği, 5-19 mg/kg arasında değiştiğini tayin etmişlerdir.

Senica ve ark., (2019), Azerbaycan, Rusya, Sırbistan ve Slovenya' dan alınan elma tohumlarındaki amigdalin seviyelerinin 8 aylık depolama süresince değişimlerini araştırmışlardır. Ekstraksiyon işlemi; elma tohumları çekirdekleri el ile çıkarılıp ve içerisinde sıvı azot olan bir havanda ezilmiştir ve 0.5 ml tohum hamuru 10 ml'lik bir vidalı kapaklı tüpe alınmıştır. Numuneler 2,5 ml metanol / su (70:30, v/v) ile ekstrakte edildi. Amigdalin miktarlarını HPLC- MS yöntemiyle tayin etmişlerdir.

Fenolik bileşikler ilk önce bir kütle spektrometresi üzerinde tanımlanmıştır. MS negatif iyon modunda çalıştırılmıştır. Başlıca özellikleri şunlardır: kılcal sıcaklık 250 °C, kaynak gerilimi; 4 kV, akış hızı; 0,6 mL/dk, enjeksiyon hacmi; 10 µL' dir. HPLC kromatografik koşullar: Gradient elüsyonda mobil faz A: % 0.1 formik asit, % 3 asetonitril (ACN) ve % 96.9 çift damıtılmış su (v / v / v); mobil faz B: % 0.1 formik asit, % 3 çift distile su ve % 96.9 ACN (v / v / v). Kolon özellikleri; Phenomenex C18 (150 mmx 4,6 mm, 3 µm), kolon fırını sıcaklığı 25 °C, dedektör; DAD dedektör, dalga boyu; 280 ve 350 nm, akış hızı; 0,6 ml/dk, enjeksiyon hacmi; 10 µl' dir. Amigdalin miktarları Azerbaycan için; 852.59 ± 27.12 ila 1466.15 ± 31.23 µg/g arasında, Rusya için; 577,34 ± 12,67 ila 745,28 ± 58,25 µg/g arasında, Sırbistan için 521,66 ± 27,03 ila 834,13 ± 18,94 µg/g arasında ve Slovenya için 499,66 ± 27,47 ila 996,14 ± 74,07 µg/g arasında bulunmuştur.

Kiprovski ve ark. (2018), 9 çeşit tatlı kirazda fenolik bileşiklerin tayinini gerçekleştirmiştir. Ekstraksiyon işlemi; 0,15 g liyofilize edilmiş ve öğütülmüş tatlı kirazlar, bir ultrasonik banyoda %3 formik asit ve %1 2.6-di-tert-butil-4-metilfenol içeren 3 mL metanol ile 1 saat ekstrakte edildi. Meyve özleri 10 dakika santrifüjlendi, Macherey-Nagel tarafından üretilen Chromafil AO-20/25 poliamid filtresinden süzüldü ve bir şişeye aktarıldı. HPLC kromatografik koşulları: Mobil faz A; çift damıtılmış su içerisinde % 0,1' lik formik asit çözeltisi, mobil faz B; asetonitril içerisinde % 0,1' lik formik asit çözeltisi. Kolon özellikleri; Gemini C18 (150 mm × 4,6 mm, 3µm, Phenomenex), kolon fırını sıcaklığı 25 °C, dedektör; akış hızı; 0,6 mL/dk, dalga boyu; 280, 350 ve 530 nm, enjeksiyon hacmi; 20 µL. Tatlı kirazlarda tayin edilen amigdalin miktarları; 38,4± 4,8 ila 8927,9± 3434,1 mg/kg olarak bulunmuştur.

Ghiulai ve ark. (2006), erik ve kayısı gibi meyve çekirdeklerinin HPLC ile amigdalin tayinini yapmışlardır. Bunun için ekstraksiyon yöntemi olarak petrol eteri ile soxhlet ekstraksiyonu tercih etmişlerdir. Kolon olarak Supelcosil LC-18 kullanmışlardır. Mobil faz için, metanol:su (15:85 v/v) karışımı kullanılmışlardır. Sonuç olarak meyve çekirdeklerinde 7 ila 24 mg/kg arasında amigdalin miktarlarına ulaşmışlardır.

Zhao (2012), kayısı, şeftali ve erik gibi meyve çekirdeklerinde amigdalin tayini için ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemini kullanmışlardır. Toz haline getirdikleri örnekleri önce 5 mL metanol ile özümledikten sonra 55 °C' de sıcak suyla 30 dakika ekstrakte etmişleridir. Elde edilen amigdalin miktarları; kayısı için % 0.11- % 3.26, şeftali için % 0.13- % 3.73, erik için % 0.28- % 4.91 ve acı kayısı için % 0.39 -% 5.1 olarak bulmuşlardır.

Tablo 16. Çalışmamızda Elde Edilen Veriler ile Literatürdeki Diğer Çalışmalardan Elde Edilen Verilerin Karşılaştırması

Meyve Çekirdekleri	Amigdalin	Ekstraksiyon Solventi	Ekstraksiyon Metodu	Analiz Metodu	Referans	Çalışmamızdan Elde Edilen Amigdalin Miktarı (%2 Sitrik Asit ile Mikrodalga Destekli Ekstraksiyon)
Kayısı	0,18 mg/g	Metanol	Soxhlet	HPLC	Miao ve ark., (2013)	1,21 mg/g
Kayısı	10,18 mg/g	%4 Sitrik Asit,	Reflux	HPLC	Koo ve ark., (2005)	1,21 mg/g
Kayısı	14,37 mg/g	% 78,5 Etanol	Reflux	HPLC	Bolarinwa ve ark., (2014)	1,21 mg/g
Kiraz	3,89 mg/g					2,03 mg/g
Nektarin	0,12 mg/g					0,042 mg/g
Erik	17,49 mg/g					40,01 mg/g
Elma	2,96 mg/g					13,21 mg/g
Armut	1,29 mg/g					0,16 mg/g
Kayısı	1,1 mg/g ila 32,6 mg/g arası					Metanol
Erik	2,8 mg/g ila 49,1 mg/g arası	40,01 mg/g				
Acıbadem	24 mg/g ila 60 mg/g arası	Metanol	12 saat oda sıcaklığında bekletilerek	HPLC	Arrázola ve ark., (2012)	65,21 mg/g
Acıbadem	40,1 mg/g	-	Katı Faz Ekstraksiyonu	UHPLC-(ESI)Qq Q MS/MS	Lee ve ark., (2013)	65,21 mg/g
Kayısı	0,003 mg/g ila	Petrol eteri	Soxhlet	HPLC	Ghiulai ve ark.,	1,21 mg/g

	0,024 mg/g arası				(2006)	
Erik	0,003 mg/g ila 0,24 mg/g arası					40,01 mg/g
Acıbadem	26,27 mg/g	Etanol	Ultrasonik Banyo	HPLC	Poyraz (2013)	65,21 mg/g
Kayısı	1,02 mg/g	%70 Metanol	Ultrasonik Banyo	HPLC	Senica ve ark. (2016)	1,21 mg/g
Kiraz	0,73 mg/g					2,03 mg/g
Elma	0,52 mg/g ila 1,47 mg/g arası	%70 Metanol	Ultrasonik Banyo	HPLC	Senica ve ark. (2019)	13,21 mg/g
Kiraz	0,04 mg/g ila 8,93 mg/g arası	Metanol	Ultrasonik Banyo	HPLC	Kiprovski ve ark. (2018)	2,03 mg/g

Yapılan literatür karşılaştırılmasına göre; Bolarinwa ve ark., (2014) reflux yöntemi ile kayısı ve armut çekirdeklerinde daha iyi sonuçlar elde etmiştir. Kiraz için reflux ve ultrasonik banyo ekstraksiyonları denenmiş olup elde edilen sonuçların mikrodalga destekli ekstraksiyondan elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür. Elma için reflux ve ultrasonik banyo ekstraksiyonları denenmiş ancak en iyi sonuçların mikrodalga destekli ekstraksiyon ile çalışmamızdan elde edildiği gözlemlenmiştir. Erik için reflux ve soxhlet ekstraksiyonları denenmiş olup yine mikrodalga destekli ekstraksiyonundan daha yüksek verim elde edildiği görülmüştür. Acıbadem için klasik ekstraksiyon, soxhlet ve ultrasonik banyo ekstraksiyonları denenmiş olup mikrodalga destekli ekstraksiyondan elde edilen sonuçların daha iyi olduğu belirlenmiştir. Sonuç olarak, bu çalışmaya göre; acıbadem çekirdeğine uygulanan çeşitli ekstraksiyonlar sonucunda % 2 sitrik asit ile mikrodalga ekstraksiyonu en iyi sonuçları vermiş olup bu yöntem diğer meyve çekirdeklerine de uygulanmıştır. Öte yandan, metanol kullanılarak gerçekleştirilen soxhlet ekstraksiyonundan da yüksek sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen soxhlet ekstraksiyonunun hem süresinin çok uzun hem de metanolün toksik bir çözücü olmasından dolayı mikrodalga ekstraksiyonunun tercih edilmesi avantaj sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR

Al-Bazı AAM. Bazı İlaç Numunelerindeki Losartan ve Hidroklorotiyazid' in Farklı Analitik Yöntemlerle Belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2018, Isparta (Danışman Prof. Dr. AH Aktaş).

Akhtar MT, Ismail SN, and Shaari K. Rambutan (*nephelium lappaceum* L.). In *Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry and Human Health: Second Edition*, (Wiley Blackwell), 2017; 1227–1234.

AOAC Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, Appendix K, 2013; 9

Arrázola G, Sánchez-Pérez R, Dicenta F, Grané N. Content of the cyanogenic glucoside amygdalin in almond seeds related to the bitterness genotype. *Agronomía Colombiana*, 2012; 30: 260–265.

Barceloux DG. Cyanogenic Foods (Cassava, Fruit Kernels, and Cycad Seeds). *Disease-a-Month*, 2009; 55: 336–352.

Begum S, Hassan SI, Siddiqui BS. Two new triterpenoids from the fresh leaves of *Psidium guajava*. *Planta Medica*, 2002; 68: 1149–1152.

Belhadj F, Somrani I, Aissaoui N, Messaoud C, Boussaid M, and Marzouki MN. Bioactive compounds contents, antioxidant and antimicrobial activities during ripening of *Prunus persica* L. varieties from the North West of Tunisia. *Food Chemistry* 2016; 204: 29–36.

Blaheta RA, Nelson K, Haferkamp A, and Juengel E. Amygdalin, quackery or cure? *Phytomedicine* 2016; 23: 367–376.

Bolarinwa IF, Orfila C, and Morgan MRA. "Amygdalin Content of Seeds, Kernels and Food Products Commercially- Available in the UK." *Food Chemistry* 2014; 152: 133–139.

Bolarinwa IF, Orfila C, and Morgan, MRA. Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry* 2015; 170: 437–442.

Cao J, Tang D, Wang Y, Li X, Hong L, and Sun C. Characteristics and immune-enhancing activity of pectic polysaccharides from sweet cherry (*Prunus avium*). *Food Chemistry* 2018; 254: 47–54.

Chogou SK, Assogba R, Degbey H, Abokini E, and Achigan-Dako EG. Market structure and performance of watermelon (*Citrullus lanatus*) in Benin. *Scientific African* 3, 2019.

Celik M, Yildirim M. Amigdalın ve özellikleri/Amygdalin and its properties, 2017; 6: 28–37.

Chaturvedi D, Shrivastava Suhane, RRN. Basketful benefit of citrus limon. *International Research Journal of Pharmacy*, 2016; 7: 1–4.

Cressey P, and Reeve J. Metabolism of cyanogenic glycosides: A review. *Food and Chemical Toxicology* 2019; 125: 225–232.

Çabuk A, Kolankaya N. Toxicity and Biological Treatment of Cyanide. *Journal of Engineering and Natural Sciences Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, Sigma 30, 2012; 20-38.

Dursun S. Karayemişte (*Prunus Laurocerasus L.*) Siyanür İçerikli Amigdalın ve Prunasın Miktarlarının Belirlenmesi. Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2010, Ordu (Danışman Doç. Dr. A İslam).

Femenia A, Rosselló C, Mulet A, Cañellas J. Chemical Composition of Bitter and Sweet Apricot Kernels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1995; 43: 356–361.

Feng XH, Wang ZH, Meng DL, and Li X. Cytotoxic and antioxidant constituents from the leaves of *Psidium guajava*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2015; 25: 2193–2198.

Ghiulai VM, Carmen S, Jianu I, Ranga F, Fetea F. Identification and Quantitative Evaluation of Amygdalin from Apricot, Plum and Peach Oils and Kernels, 2006; 246-253

Hernández-Hernández C, Aguilar CN, Rodríguez-Herrera R, Flores-Gallegos AC, Morlett-Chávez J, Govea-Salas M, and Ascacio-Valdés JA. Rambutan (*Nephelium lappaceum L.*): Nutritional and functional properties. *Trends in Food Science and Technology* 2019; 85: 201–210.

Hwang EY, Lee JH, Lee, YM, and Hong SP. Reverse-phase HPLC Separation of D-Amygdalin and Neoamygdalin and Optimum Conditions for Inhibition of Racemization of Amygdalin. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2002; 50: 1373–1375.

Kalinowska M, Bielawska A, Lewandowska-Siwkiewicz H, Priebe W, and Lewandowski W. Apples: Content of phenolic compounds vs. variety, part of apple and cultivation model, extraction of phenolic compounds, biological properties. *Plant Physiology and Biochemistry* 2014; 84: 169e188- 188.

Karatas F, and Kamişli F. Variations of vitamins (A, C and E) and MDA in apricots dried in IR and microwave. *Journal of Food Engineering* 2007; 78: 662–668.

Kimyasal ve Fiziksel Analizlerde Metot Validasyonu/Verifikasyonu Rehberi, Tarım ve Orman Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü, 2018.

Kiproviski B, Borković B, Malenčić Đ, Veberič R, Štampar F, and Mikulič-Petkovšek M. Postharvest changes in primary and secondary metabolites of sweet cherry cultivars induced by *Monilinia laxa*. *Postharvest Biology and Technology* 2018; 144: 46–54.

Koo JY, Hwang EY, Cho S, Lee JH, Lee YM, Hong SP. Quantitative determination of amygdalin epimers from armeniacaee semen by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2005; 814: 69–73.

Kumarasamy Y, Cox PJ, Jaspars M, Nahar L, and Sarker SD. Cyanogenic glycosids from *Prunus spinosa* (Rosaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 2003; 31: 1063–1065.

Lee J, Zhang G, Wood E, Rogel Castillo C, and Mitchell AE. Quantification of amygdalin in nonbitter, semibitter, and bitter almonds (*prunus dulcis*) by UHPLC-(ESI)QqQ MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2013; 61: 7754–7759.

Li X, Li X, Wang T, and Gao W. Nutritional Composition of Pear Cultivars (*Pyrus* spp.). In *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*, (Elsevier Inc.) 2015; 573–608.

Luque de Castro MD, and Priego-Capote F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. *Journal of Chromatography A* 2010; 1217: 2383–2389.

Lv WF, Ding MY, Zheng R. Isolation and quantitation of amygdalin in Apricot-kernel and *Prunus Tomentosa* Thunb. by HPLC with solid-phase extraction. *Journal of Chromatographic Science*, 2005; 43: 383–387.

Matsumoto T, Koike M, Arai C, Kitagawa T, Inoue E, Imahori D, and Watanabe T. Chemical structures and antimutagenic effects of unusual oximes from the peels of Citrus limon. *Phytochemistry Letters* 2018; 25: 118–121.

Mazza G, and Cottrell T. Carotenoids and cyanogenic glucosides in saskatoon berries (*Amelanchier alnifolia* Nutt.). *Journal of Food Composition and Analysis* 2008; 21: 249–254.

Miao X, Zhao Z, Zhu H, Li M, Zhao Q. Comparison of second-derivative spectrophotometry and HPLC for determination of amygdalin in wild apricot kernels. *ScienceAsia*, 2013; 39: 444–447.

Mocan A, Diuzheva A, Carradori S, Andruch V, Massafra C, Moldovan C, Sisea C, Petzer JP, Petzer A, Zara S, et al. Development of novel techniques to extract phenolic compounds from Romanian cultivars of *Prunus domestica* L. and their biological properties. *Food and Chemical Toxicology* 2018; 119: 189–198.

Nasirahmadi A, and Miraei Ashtiani SH. Bag-of-Feature model for sweet and bitter almond classification. *Biosystems Engineering* 2017; 56: 51–60.

Nguyen TTT, Shaw PN, Parat MO, and Hewavitharana AK. Anticancer activity of *Carica papaya*: A review. *Molecular Nutrition and Food Research* 2013; 57: 153–164.

Oliveira AP, Costa RM, Magalhães AS, Pereira JA, Carvalho M, Valentão P, Andrade PB, and Silva BM. Targeted metabolites and biological activities of *Cydonia oblonga* Miller leaves. *Food Research International* 2012; 46: 496–504.

Oomah BD, Mazza G, and Kenaschuk EO. Cyanogenic Compounds in Flaxseed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 1992; 40: 1346–1348.

Paris HS. Origin and emergence of the sweet dessert watermelon, *Citrullus lanatus*. *Annals of Botany* 205; 116: 133–148.

Poyraz N. Malatya Yöresinde Yetişen Kayısı Türlerinin Tohumlarında Amigdalın Miktarının Hplc Yöntemiyle Belirlenmesi. İnönü Üniversitesi. Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, 2013, Malatya (Danışman Prof. Dr. M. C Yakıncı).

Sabir S, Qureshi R, Arshad M, Amjad MS, Fatima S, Masood M, Saboon and Chaudhari SK. Pharmacognostic and clinical aspects of *Cydonia oblonga*: A review. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2015; 5: 850–855.

Sangsoy K, Mongkolporn O, Imsabai W, and Luengwilai K. Papaya carotenoids increased in Oxisols soils. *Agriculture and Natural Resources* 2017; 51: 253–261.

Senica M, Stampar F, Veberic R, and Mikulic-Petkovsek M. Transition of phenolics and cyanogenic glycosides from apricot and cherry fruit kernels into liqueur. *Food Chemistry* 2016; 203: 483–490.

Senica M, Stampar F, Veberic R, and Mikulic-Petkovsek M. Cyanogenic glycosides and phenolics in apple seeds and their changes during long term storage. *Scientia Horticulturae* 2019; 255: 30–36.

Seyhan S. Türkiye’ de Yetiştirilen Maviyemiş Türlerinde Ellajik Asit ve Resveratrol Miktarlarının HPLC Yöntemi ile. M. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2013, İstanbul (Danışman Prof. Dr. Güler Yalçın).

Taumpan Mestan E. Bitki ve Meyvelerde Bulunan Amigdalın Üzerine Yapılmış Analiz Çalışmaları. M.Ü. Eczacılık Fakültesi, Yüksek Lisans Tezi, 2015, İstanbul (Danışman Öğr.Gör.Dr. S Ayaz Seyhan).

Teixeira da Silva JA, Rana TS, Narzary D, Verma N, Meshram DT, Ranade SA. Pomegranate Biology and Biotechnology: A Review. *Scientia Horticulturae*, 2013.

Vural N, Toksikoloji. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları No:73
Ankara, 2005.

Wang T, Lu S, Xia Q, Fang Z, and Johnson S. Separation and purification of amygdalin from thinned bayberry kernels by macroporous adsorption resins. Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 2015; 975: 52–58.

Song Z, Xu X. “Advanced Research on Anti-Tumor Effects of Amygdalin.” Journal of Cancer Research and Therapeutics 2014; 10: C3-C7

Yağcıoğlu P. Farklı Ekstraksiyon Metotları İle Adaçayı (*Salvia Officinalis L.*) Bitkisinden Antioksidan Ekstraksiyonunun Optimizasyonu. İ.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015, İstanbul (Danışman Yrd. Doç. Dr. FE Fıratlıgil

Yalçın, G. Kromatografik Analizin Temel İlkeleri ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi Uygulamaları. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İstanbul, 1999.

Yang B, Jiang Y, Shi J, Chen F, Ashraf M. Extraction and pharmacological properties of bioactive compounds from longan (*Dimocarpus longan Lour.*) fruit - A review. Food Research International 2011; 44:1837-1842.

Yildirim AN, San B, Koyuncu F, Yildirim F. Variability of phenolics, α -tocopherol and amygdalin contents of selected almond (*Prunus amygdalus Batsch.*) genotypes. Journal of Food, Agriculture and Environment, 2010; 8: 76–79.

Zhao YY. Amygdalin content in four stone fruit species at different developmental stages. ScienceAsia, 2012; 38: 218–222.

Ek 1: Kongre Bildirisi

Poster sunumu: 1. International Balkan Chemistry Congress Eylül 2018, Edirne



1st INTERNATIONAL BALKAN CHEMISTRY CONGRESS
17-20 September 2018, Edirne, TURKIYE

ANALYTICAL CHEMISTRY POSTER SESSION

(M27-PS6-20340) Extraction optimization of amygdalin and determination of amount of fruit kernel by high performance liquid chromatography

Büsra Nagihan Öztürk, Dilek Bilgiç Alkaya, Serap Ayaz Seyhan

Marmara University

busra.n.ozturk@hotmail.com

The healthy cells in our body (except muscle and nerve cells) have the skill of divisibility. But their abilities are limited. They can not be divided endless. However, the cancer cells lose this consciousness, begin to divide uncontrollably and increase. Cancer cells form tumors (masses) by accumulating and tumors destroy normal tissues. Chemotherapy treatment which includes anti-cancer drugs is applied to destroy cancer cells or get under control of these cells that are growing up. However, as a result of chemotherapy, healthy cells as well as cancerous cells are damaged and other side effects also occur. It is aimed to treat cancer with natural ways to minimize all of these negative effects. Amygdalin ($C_{20}H_{27}NO_{11}$) is the most commonly encountered cyanogenic di-glycoside found in plants belonging to the genus *Prunus* of the Rosaceae family. Amygdalin is one of the natural sources against cancer that has not been fully proven in medically, is a glycoside commonly found in cyanogenic plants, especially in fruit kernels such as apricot, bitter almond, cherry, apple, plum, pear. It has been reported that amygdaline, which gives bitter taste to fruits, may cause lethal poisoning when it is taken in excessive amount by oral route, besides it plays a role against carcinoma in the body when taken at certain rates. In this study, the most appropriate extraction solvent and method will be determined in bitter almond (*Semen Amygdali amarum*) kernel by using different extraction solvents and methods for determination of amygdalin and conditions will be optimized. For this purpose, extraction methods will be used such as orbital shaker, ultrasonic and soxhlet extraction at the same time extraction solvents such as methanol, ethanol, acetonitrile and ether. The amygdalin in the various fruit kernels will be extracted by the determined extraction method and quantitatively determined by using high performance liquid chromatography (HPLC). The best chromatographic conditions such as column properties, dedector, column temperature, wavelenght, flow rate and injection volume will be determined. As a result of this study; it is thought that these fruit kernels may provide natural support for cancer when appropriate levels of consumption are determined.

Keywords: Amygdalin, HPLC, extraction, fruit, kernel

References

- [1] Xu, X., and Song, Z. (2014). Advanced research on anti-tumor effects of amygdalin. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* 10, 3.
- [2] Bolarinwa, I.F., Orfila, C., and Morgan, M.R.A. (2014). Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially- available in the UK. *Food Chemistry* 152, 133–139.
- [3] Bolarinwa, I.F., Orfila, C., and Morgan, M.R.A. (2015). Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices. *Food Chemistry* 170, 437–442.
- [4] Poyraz, N. (2013). Malatya Yöresinde Yetişen Kayısı Türlerinin Tohumlarında Amigdalin Miktarının HPLC Yöntemiyle Belirlenmesi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi.
- [5] Çelik, M., Yıldırım, M. (2016). Amigdalin ve Özellikleri. Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi, Cilt 6, Sayı 1, (2017), 28-37.

10 ÖZGEÇMİŞ

Adı	Buşra Nagihan	Soyadı	ÖZTÜRK
Doğum Yeri	İSTANBUL	Doğum Tarihi	09-02-1989
Uyruğu	TC	Tel	05542462450
E-mail	busra.n.ozturk@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu ve Halen Okuduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ /SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ/ ANALİTİK KİMYA	
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ /FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ/ KİMYA	2013
Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ /FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ/ BİYOLOJİ (ÇİFT ANADAL)	2013
Lise	HASAN ŞADOĞLU SÜPER LİSESİ (YDA)	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Fiziksel Analiz Laboratuvarı Birim Sorumlusu	Formül Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı	6 yıl
Biyogenetik Analiz Laboratuvarı Birim Sorumlusu	Formül Özel Gıda Kontrol Laboratuvarı	Halen

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	YÖKDİL	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	55							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	69,98785	66,79863	58,29230