

**TC. ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**ATIK LİMON POSALARINDAN SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU
KARAKTERİZASYONU VE BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİNİN
İNCELENMESİ**

Yaşar İPEK

KİMYA ANABİLİ DALI

**ÇANKIRI
2017**

TEZ ONAYI

Yaşar İPEK tarafından hazırlanan “Atık limon posalarından sekonder metabolitlerin izolasyonu karakterizasyonu ve biyokimyasal aktivitelerinin incelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü KİMYA Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : *Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ*

Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Doç. Dr. Tevfik ÖZEN

Ondokuzmayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü

Yrd. Doç. Dr. Muhammed ALTUN

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Doç. Dr. Tamer KEÇELİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

ankırı karatekin niversitesi fen bilimleri enstitüsü lisansüstü eğitim-ğretim ve sınav yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum “Atık Limon Posalarından Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu Karakterizasyonu ve Biyokimyasal Aktivitelerinin İncelenmesi” konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin ankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü’nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın ankırı Karatekin niversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. ankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-ğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (...../...../20.....).

Öğrencinin Adı Soyadı

(imza)

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ATIK LİMON POSALARINDAN SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU KARAKTERİZASYONU VE BİYOKİMYASAL AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

Yaşar İPEK

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Bu tez kapsamında meyve suyu fabrikalarında atık halde bir yan ürün olan limon posasının sekonder metabolitlerinden, kimyasal izolasyon yöntemleriyle ayrılıp, saflaştırılan moleküllerin yapıları NMR teknikleri ile belirlendi. Ayrıca, bazı bileşenlerin biyokimyasal aktiviteleri belirlendi. Bu kapsamda limon suyu üretimi sonucu açığa çıkan posalar, DİMES meyve suyu fabrikasından temin edilerek kurutuldu, suda kaynatma yöntemi ile ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Sulu ekstre tekrar etil asetat ile ekstrakte edilerek etil asetat ekstresi elde edildi. Bu ekstre sefadex LH 20 kolon kromatografisi ile farklı çözücü sistemleri kullanılarak arda arda fraksiyonlandırıldı. İzolasyon işlemleri ile ekstrede var olan ana bileşenlerden; limonin, skopoletin, sitropten, umbelliferon, hesperidin, hesperetin, kateşol, benzenetriol, *p*-kumarik asit, protokateşik asit, glikolik anhidrit, 2-hidroksi-4-metoksi benzenepropanoik asit metil ester, 2-hidroksi-4-metoksi benzenepropanoik asit ve eriodiktiol izole edildi. Limonin ve etil asetat ekstrelerine uygulanan antioksidan, indirgeme gücü, linoleik asit peroksidasyonu önleme, hidrojen peroksit giderme, metal şelatlama aktivite testlerinde yüksek olduğu tespit edildi. İzole edilen bileşenlerden limonin, protokateşik asit, eriodiktiol ve diglikolik anhidrit bileşiklerinin, PC3 kanser hücre hatlarına karşı *in vitro* koşullarda düşük aktivite gösterdikleri belirlendi. Yapılan tez çalışması kapsamında, limon posalarından biyoaktif bileşenlerin ayrıştırılması, saf biyoaktif bileşenlerin izolasyonu, karakterizasyonu ve alternatif bir kaynak olarak kullanımı ve değerlendirilmesi için kromatografik yöntemler geliştirildi.

2017, 119 Sayfa

Anahtar Kelimeler: limon posası, ekstraksiyon, kromatografi, fenolik, flavanoid, antioksidan

ABSTRACT

Master of Science Thesis

STUDY OF BIOCHEMICAL ACTIVITY CHARACTERIZATION AND ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES FROM LEMON PULP

Yaşar İPEK

Cankiri Karatekin University Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

In this thesis, compound structures of secondary metabolites which separated and purified with chemical isolation method from lemon pulp which formed to be a by-product in juice factory were determined by NMR techniques. In addition, biochemical activities of certain components were determined. In this context, the pulp which are the result of the production of lemon juice were obtained from DIMES fruit juice factory and dried, was subjected to extraction by water boiling, the aqueous extract was extracted again with ethyl acetate to give ethyl acetate extract. This extract was fractionated into various fractions using different solvent systems by Sephadex LH 20 column chromatography, and was divided into several subfractions. The main components present in the extract; limonin, scopoletin, citropten, umbelliferon, hesperidin, hesperetin, catechol, benzenetriol, p-coumaric acid, prothocatechuic acid, diglycolic anhydrite, 2-hidroxy-4-metoxy benzenepropanoic acid methyl ester, 2-hidroxi-4-metoxy benzenepropanoic asit and eriodictiol were isolated with isolation processes. Antioxidant, reducing power, linoleic acid peroxidation inhibition, hydrogen peroxide removal and metal chelating activity tests on limonin and ethyl acetate extracts were found to be highly activities. From the isolated components, limonin, protocatechuic acid, eriodictiol and diglycolic anhydrite was tested in vitro against in PC 3 cancer cell lines. Within the scope of thesis study, chromatographic methods were developed that for separation, isolation and characterization of pure bioactive components from lemon pulps to use and evaluation as an alternative source.

2017, 119 pages

Keywords: : lemon pulp, extraction, chromatography, phenolik, flavanoid, antioxidan

TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmamda maddi manevi her türlü yardımını esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ' a, deneysel çalışmalarda her daim yanımda bulunan Uzman Ali Rıza TÜFEKÇİ' ye, Uzman Fatih GÜL'e ve Arş. Gör Serkan KOLDAŞ' a, Kanseri aktivite çalışmalarını yapan Yrd. Doç. Dr. Muhammed ALTUN'a, antioksidant aktivite çalışmalarını gerçekleştiren Doç. Dr. Tefvik ÖZEN' e, eğitim hayatımda desteklerini esirgemeyen aileme ve tüm dostlarıma, deneysel çalışmalar için gerekli olan meyve posalarının temin edildiği DİMES firmasına ve özellikle Gökhan GÖKDEMİR'e teşekkürü bir borç bilir saygılar sunarım.

Yaşar İPEK
Aralık 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜRLER	vi
İÇİNDEKİLER	vii
1.GİRİŞ	1
2.LİTERATUR ÖZETLERİ	3
2.1. Sekonder metabolitler	3
2.3. Kimyasal İzolasyon yöntemleri	9
3.MATERYAL METOD	15
3.1.Materyal.....	15
3.1.1. Kullanılan cihazlar	15
3.2.Metod.....	16
3.2.1.Hammaddenin temini ve kurutulması	16
3.2.2.Ekstraksiyon işlemleri.....	16
3.2.3.İzolasyon işlemleri	17
3.2.4.Spektroskopik işlemler	21
3.2.4.1.HPLC-TOF/MS analizi	21
3.2.4.2.NMR spektroskopisi.....	22
3.2.5. <i>In vitro</i> aktivite testleri	22
3.2.5.1. Antiproliferatif aktivite testi.....	22
3.2.5.2. Amonyumolibdenum yöntemiyle toplam antioksidan	24
3.2.5.3. Serbest radikal giderme aktivite testi	24
3.2.5.4. Linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu testi	25
3.2.5.5. İndirgeme gücü testi	25
3.2.5.6. H ₂ O ₂ giderme aktivite testi.....	26
3.2.5.7. Metal şelatlama aktivite testi	26
4. BULGULAR	28
4.1.NMR VERİLERİ	29
4.1.1. Limonin bileşiğinin NMR spektrumları	29
4.1.2. Skopoletin bileşiğinin NMR spektrumları.....	34
4.1.3. 4-metoksi 2-hidroksi benzenoik asit metil ester bileşiğinin NMR spektrumları	38
4.1.4. Sitropten bileşeninin NMR spektrumları.....	41
4.1.5. Hesperidin bileşiğinin NMR spektrumları.....	45
4.1.6. Kateşol bileşiğinin NMR spektrumları	50
4.1.7. Protokateşik asit bileşiğinin NMR spektrumları	54
4.1.8. Benzenetriol bileşiğinin NMR spektrumları	58
4.1.9. Diglikolik anhidrit bileşiğinin NMR spektrumları	61
4.1.10. Eriodiktol bileşiğinin NMR spektrumları.....	64
4.1.11. p- kumarik asit bileşiğinin NMR spektrumları	68
4.1.12. 2-hidroksi-4-metoksi-benzenopropanoik asit bileşiğinin NMR spektrumları.....	72
4.1.13. Umbelliferon bileşiğinin NMR spektrumları.....	76
4.1.14 . Hesperetin bileşiğinin NMR spektrumları	79
4.2.HPLC-TOF/MS analizi sonuçları	83
4.3.AKTİVİTE VERİLERİ	89
4.3.1. Limonin (LMN) ve limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA)	89
4.3.2. Limonin (LMN) ve limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) indirgeme gücü testi sonuçları.....	90
4.3.3. Limonin (LMN) ve Limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) serbest radikal giderme aktivite sonuçları.....	90
4.3.4. Limonin (LMN) ve limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) metal şelatlama aktivite sonuçları	91
4.3.5. Limonin (LMN) ve Limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) H ₂ O ₂ giderme aktivite sonuçları.....	92

4.3.6. Limonin (LMN) ve limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu aktivite sonuçları	93
4.3.7. Kanser aktivite testi.....	94
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	98
KAYNAKLAR.....	103
ÖZGEÇMİŞ	106



SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simge</u>	<u>Açıklama</u>
MS	: Kütle Spektroskopisi
μL	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mg	: Miligram
RT	: Kolonda tutunma zamanı
%	: Yüzde
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
DPPH	: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
TRX	: Trolox
TBHQ	: Tetrabütilhidrokinon
MS	: Kütle spektrometre
EA	: Etilasetat
M	: Molarite
μg	: Mikrogram
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
CI	: Hücre endeksi
PC3	: Prostat kanseri hücre hattı
DMSO	: Dimetil sülfoksit
CDCl_3	: Dötöro kloroform
Ph	: Proton iyon derişimi logaritması
TBA	: Tiyobarbütirik asit
TCA	: Trikloroasetik asit
Nm	: Nanometre
HCl	: Hidroklorik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 Flavanoidlerin alt grupları.....	4
Şekil 2. 2. Sinnamik asit ve benzoik asit formülleri.....	5
Şekil 2. 3. Kumarinlerin genel iskelet yapısı	6
Şekil 2. 4. Başlıca terpenoidler; limonen (1), geraniol (2) ve limonin (3).....	6
Şekil 3. 1 Ekstraksiyon işlemi ve evaporatörde çözücünün uzaklaştırılması.....	17
Şekil 3. 2 Sefadex 1 kolon kromatografisi ve TLC kromatografisi	18
Şekil 3. 3 Sefadex-1 kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlara ait TLC	18
Şekil 3. 4 Birleştirme işleminden sonra fraksiyonlara ait TLC	19
Şekil 3. 5 Sefadeks 3 sonucunda 3. Fraksiyona ait TLC	20
Şekil 3. 6 Saflaştırılan bazı bileşenlere ait TLC	20
Şekil 3. 7 Limonin molekülüne ait kristalleri.....	20
Şekil 3. 8 HPLC-TOF/MS cihazı	21
Şekil 3. 9 600 MHz NMR cihazı.....	22
Şekil 4. 1 İzole edilen moleküllerin kimyasal formülleri.....	28
Şekil 4. 2. Limonin'in moleküler yapısı.....	29
Şekil 4. 3 Limonin bileşiğine ait C ¹³ NMR spektrumu	30
Şekil 4. 4 Limonin bileşiğine ait H ¹ -NMR spektrumu	30
Şekil 4. 5 Limonin bileşiğine ait COSY NMR spektrumu.....	31
Şekil 4. 6 Limonin bileşiğine ait HMBC spektrumu.....	31
Şekil 4. 7 Limonin bileşiğine ait HSQC NMR spektrumu.....	32
Şekil 4. 8 Skopoletin bileşiğinin kimyasal formülü	34
Şekil 4. 9 Skopoletin C ¹³ NMR spektrumu	34
Şekil 4. 10 Skopoletin HMBC NMR spektrumu.....	35
Şekil 4. 11 Skopoletin COSY NMR spektrumu.....	35
Şekil 4. 12 Skopoletin H ¹ -NMR spektrumu	36
Şekil 4. 13 Skopoletin HSQC NMR spektrumu.....	37
Şekil 4. 14 4-metoksi 2- hidroksi benzopropanoik asit metil ester bileşiğinin molekül yapısı	38
Şekil 4. 15 4-metoksi 2- hidroksi benzenopropanoik asit metil ester C ¹³ NMR spektrumu	38
Şekil 4. 16 4-metoksi 2- hidroksi benzenopropanoik asit metil ester H ¹ -NMR spektrumu.....	39
Şekil 4. 17 4-metoksi 2-hidroksi benzenopropanoik asit metil ester HSQC-NMR spektrumu	39
Şekil 4. 18 4-metoksi 2-hidroksi benzenopropanoik asit metil ester COSY NMR spektrumu	40
Şekil 4. 19 4-metoksi 2-hidroksi benzenopropanoik asit metil ester HMBC NMR spektrumu	40
Şekil 4. 20 Sitropten bileşiğinin kimyasal formülü.....	42
Şekil 4. 21 Sitropten bileşiğinin C ¹³ NMR spektrumu	42
Şekil 4. 22 Sitropten bileşiğinin HMBC NMR spektrumu	43
Şekil 4. 23 Sitropten bileşiğinin COSY NMR spektrumu	43
Şekil 4. 24 Sitropten bileşiğinin H ¹ -NMR spektrumu.....	44
Şekil 4. 25 Sitropten bileşiğinin HSQC NMR spektrumu	44
Şekil 4. 26 Hesperidin bileşiğinin kimyasal formülü	46
Şekil 4. 27 Hesperidin bileşiğinin C ¹³ NMR spektrumu	46
Şekil 4. 28 Hesperidin bileşiğinin HMBC NMR spektrumu	47
Şekil 4. 29 Hesperidin bileşiğinin HSQC NMR spektrumu.....	47
Şekil 4. 30 Hesperidin bileşiğinin COSY NMR spektrumu.....	48
Şekil 4. 31 Hesperidin bileşiğine ait H ¹ -NMR spektrumu	49
Şekil 4. 32 Kateşol bileşiğinin kimyasal formülü	51

Şekil 4. 33 Kateşol H ¹ -NMR spektrumu	51
Şekil 4. 34 Kateşol HSQC NMR spektrumu	52
Şekil 4. 35 Kateşol C ¹³ NMR spektrumu	52
Şekil 4. 36 Kateşol COSY NMR spektrumu	53
Şekil 4. 37 Kateşol HMBC NMR spektrumu	53
Şekil 4.38 Protokateşik asit bileşiğinin kimyasal formülü	54
Şekil 4. 39 Protokateşik asit C ¹³ NMR spektrumu	55
Şekil 4. 40 Protokateşik asit H ¹ -NMR spektrumu	55
Şekil 4. 41 Protokateşik asit HSQC NMR spektrumu	56
Şekil 4. 42 Protokateşik asit COSY NMR spektrumu	56
Şekil 4. 43 Protokateşik asit HMBC NMR spektrumu	57
Şekil 4. 44 Benzenetriol bileşiğinin kimyasal formülü	58
Şekil 4. 45 Benzenetriol C ¹³ NMR spektrumu	58
Şekil 4. 46 Benzenetriol H ¹ -NMR spektrumu	59
Şekil 4. 47 Benzenetriol HSQC NMR spektrumu	59
Şekil 4. 48 Benzenetriol COSY NMR spektrumu	60
Şekil 4. 49 Benzenetriol HMBC NMR spektrumu	60
Şekil 4. 50 Diglikolik anhidrit bileşiğinin kimyasal formülü	61
Şekil 4. 51 Diglikolik anhidrit HSQC NMR spektrumu	62
Şekil 4. 52 Diglikolik anhidrit C ¹³ NMR spektrumu	62
Şekil 4. 53 Diglikolik anhidrit H ¹ -NMR spektrumu	63
Şekil 4. 54 Diglikolik anhidrit HMBC NMR spektrumu	63
Şekil 4. 55 Eriodiktiol bileşiğinin kimyasal formülü	64
Şekil 4. 56 Eriodiktiol bileşiğine ait C ¹³ NMR spektrumu	65
Şekil 4. 57 Eriodiktiol bileşiğine ait H ¹ -NMR spektrumu	65
Şekil 4. 58 Eriodiktiol bileşiğine ait HSQC NMR spektrumu	66
Şekil 4. 59 Eriodiktiol bileşiğine ait COSY NMR spektrumu	66
Şekil 4. 60 Eriodiktiol bileşiğine ait HMBC NMR spektrumu	67
Şekil 4. 61 <i>p</i> -kumarik asit bileşiğinin kimyasal formülü	68
Şekil 4. 62 <i>p</i> -kumarik asit bileşiğine ait C ¹³ NMR spektrumu	69
Şekil 4. 63 <i>p</i> -kumarik asit bileşiğine ait HSQC NMR spektrumu	69
Şekil 4. 64 <i>p</i> -kumarik asit bileşiğine ait H ¹ -NMR spektrumu	70
Şekil 4. 65 <i>p</i> -kumarik asit HMBC NMR spektrumu	70
Şekil 4. 66 <i>p</i> -kumarik asit bileşiğine ait COSY NMR spektrumu	71
Şekil 4. 67 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiğinin kimyasal formülü	72
Şekil 4. 68 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiği C ¹³ NMR spektrumu	72
Şekil 4. 69 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiği H ¹ -NMR spektrumu	73
Şekil 4. 70 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiği HSQC NMR spektrumu	74
Şekil 4. 71 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiği COSY NMR spektrumu	74
Şekil 4. 72 2-hidroksi 4- metoksi, benzenepropanoik asit bileşiği HMBC NMR spektrumu ..	75
Şekil 4. 73 Umbelliferon bileşiğinin kimyasal formülü	76
Şekil 4. 74 Umbelliferon bileşiğinin H ¹ -NMR spektrum	76
Şekil 4. 75 Umbelliferon bileşiğinin C ¹³ NMR spektrumu	77
Şekil 4. 76 Umbelliferon bileşiğinin COSY NMR spektrumu	77
Şekil 4. 77 Umbelliferon bileşiğinin HSQC NMR spektrumu	78
Şekil 4. 78 Umbelliferon bileşiğinin HMBC NMR spektrumu	78
Şekil 4. 79 Hesperetin bileşiğinin kimyasal formülü	80
Şekil 4. 80 Hesperetin bileşiğinin H ¹ NMR spektrumu	80
Şekil 4. 81 Hesperetin bileşiğinin C ¹³ NMR spektrumu	81
Şekil 4. 82 Hesperetin bileşiğinin COSY NMR spektrumu	81

Şekil 4. 83 Hesperetin bileşiminin HSQC NMR spektrumu.....	82
Şekil 4. 84 Hesperetin bileşiminin HMBC NMR spektrumu.....	82
Şekil 4. 85 Limon posası etilasetat ekstresine ait HPLC-TOF/MS kromatogramı;	84
Şekil 4. 86 İzole edilen bileşiklerin piklerini gösteren HPLC/TOF-MS kromatogramı	87
Şekil 4. 87 Limonin ve limon posası etil asetat ekstresi antioksidan aktiviteleri.....	89
Şekil 4. 88 Limonin ve etil asetat ekstresinin indirgeme gücü değerleri	90
Şekil 4. 89 Limonin ve etil asetat ekstresi serbest radikal giderme aktiviteleri	91
Şekil 4. 90 Limonin ve etil asetat ekstresinin metal şelatlama aktivite grafiği.....	91
Şekil 4. 91 Limonin ve etil aetat ekstresinin peroksit giderme aktiviteleri.....	92
Şekil 4. 92 Limonin ve etil asetat ekstresinin linoleik asit peroksidasyonu inhibisyonu aktiviteleri.....	93
Şekil 4. 93 Protokateşik asitin PC3 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktiviteleri	94
Şekil 4. 94 Diglikolik anhidrit bileşiminin PC3 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktiviteleri.....	95
Şekil 4. 95 Limonin bileşiminin PC3 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktiviteleri.....	96
Şekil 4. 96 Eriodiktiol bileşiminin PC3 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktivteleri	97



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. 1 DİMES meyve suyu fabrikasında oluşan yıllık atık miktarları	1
Tablo 4. 2 Limonin molekülünün C^{13} ve H^1 NMR değerleri	33
Tablo 4. 3 Scopoletin bileşimine ait H^1 ve C^{13} NMR verileri	37
Tablo 4. 4 4-metoksi 2- hidroksi benzenopropanoik asit metil ester ait H^1 ve C^{13} -NMR verileri	41
Tablo 4. 5 Sitropten bileşimine ait H^1 ve C^{13} NMR değerleri	45
Tablo 4. 6 Hesperidin bileşimine ait H^1 ve C^{13} -NMR değerleri	50
Tablo 4.7 Kateşol bileşimine ait H^1 ve C^{13} -NMR değerleri	54
Tablo 4. 8 Protokateşik asit H^1 ve C^{13} NMR verileri	57
Tablo 4. 9 Benzenetriol molekülüne ait H^1 ve C^{13} NMR verileri	61
Tablo 4. 10 Diglikolik anhidrit bileşimine ait H^1 ve C^{13} NMR değerleri	64
Tablo 4. 11 Eriodiktiol bileşimine ait H^1 ve C^{13} NMR değerleri	67
Tablo 4. 12 <i>p</i> - kumarik asit bileşimine ait H^1 ve C^{13} NMR değerleri	71
Tablo 4. 13 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit H^1 ve C^{13} NMR değerleri	75
Tablo 4. 14 Umbelliferon bileşiminin H^1 ve C^{13} NMR değerleri	79
Tablo 4. 15 Hesperetin bileşiminin NMR değerleri	83
Tablo 4. 17 HPLC-TOF/MS kütüphane taraması sonucu belirlenen bileşikler	84
Tablo 4. 19 HPLC-TOF/MS de standartlara göre belirlenen ana bileşenler ve miktarları	88

1.GİRİŞ

Atık meyve posaları fabrikalarda meyve suyu üretiminden arta kalan, meyvelerin kabuklarını, çekirdeklerini ve liflerini içeren kısımdır ve genel olarak hayvan yemlerine ek katkı olarak kullanımı dışında bilinen bir kullanım alanı bulunmamaktadır (Sarıca 2011). Bu atıklar meyve kabuklarında bulunan farmakolojik olarak değer arz eden birçok kimyasalı içermesi açısından oldukça önemlidir. Türkiye’de iklimin elverişli olmasından dolayı meyve ve meyve suyu sektörleri önemli ölçüde gelişim göstermiştir. Bu gün 14 den fazla türde meyve işlenmekte ve büyük miktarda atık açığa çıkmaktadır (YAMAN 2012). En çok işlenen meyveler üzüm elma nar limon portakal vişne ve portakal olup açığa çıkan atık miktarı aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 1.1).

Tablo 1. 1 DİMES meyve suyu fabrikasında oluşan yıllık atık miktarları

Meyve	Atık miktarı (ton)
Limon	3500
Portakal	14000
Nar	1100
Şeftali	800
Elma	700
Vişne	450
Üzüm	200

Bu atıkların değerli kimyasal içeriğinin endüstriye kazandırılması ülkemiz kimya sektörünü spesifik kimyasalların üretimi konusunda önemli bir konuma getirecektir. Meyve suyu üretimi sonucunda binlerce ton açığa çıkan atıklar o çevrede çürüme sonucu kirliliğe neden olmaktadır. Ancak bu atıkların içerdiği yüzlerce faydalı bileşenin kimya endüstrisinde geniş kullanımları mevcut olup ve birçoğu da ilerde kullanım alanı olabilecek potansiyele sahiptir (Guo et al. 2003). Bu açıdan bu atıkların potansiyel

kullanımlarının belirlenmesi kimyasal içeriğinin tespiti gelecek çalışmalar açısından önem arz etmektedir.

Limon suyunun içeriğinin faydaları yıllardır bilinmektedir, ancak limon kabuklarının içerdiği bileşenlerin farmakolojik aktiviteleri üzerinde yapılan geniş ölçekli çalışmalar sınırlı sayıdadır. Limon atıklarının kimyasal içeriğini yoğun olarak fenolik bileşikler içerir, bu bileşenler içinde fenolik asitler, flavanoidler, kumarinler, limonoidler önemli yer tutar (Justesen et al. 1998). Bu tür fenolik bileşenlerin ve türevlerinin bir bölümünün sağlığa faydalı yüksek farmakolojik aktivite gösterdikleri bilinmektedir. Limon kabuğunun içerdiği fenolik bileşik türevleri ayrıca çeşitli analiz işlemlerinde, biyokimyasal aktivite testlerinde standart olarak kullanılmaktadır, bu standartların fiyatları oldukça yüksek olup bazı bileşenlerin sentezi çok zordur ve temini için çeşitli bitkilerin kültüvasyonundan yararlanılarak üretimi yapılabilmektedir. Potansiyel olarak limon ve diğer meyve atıkları da sayısız standart bileşenin izole edilebileceği hazır durumda son derece değerli bir kaynak teşkil eder. Bu kaynağın yem yerine daha değerli alanlarda potansiyel ilaç aktif maddelerinin veya kimyasal standart bileşenlerin üretimi için kullanılması hiç şüphesiz daha büyük bir getiri sağlayacaktır. Bu araştırma ile bu atıkların kimyasal içeriği, bu bileşenlerin izolasyonu saflaştırılması, yapı analizleri gerçekleştirilerek, bulunabilecek potansiyel ilaç aktif maddelerinin *in vitro* koşullarda biyokimyasal aktiviteleri üzerinde çalışma yapılarak bulunması muhtemel yeni bileşenlerin yerli patentleri alınıp daha ileri klinik çalışmalar için zemin hazırlanacaktır.

Bu çalışma kapsamında limon atıklarından kimyasal işlemlerle ekstrakt hazırlanarak kromatografik yöntemlerle ekstraktın ana bileşenleri izole edildi. Ektraktın içeriği HPLC/TOF-MS kullanılarak ana bileşenler tespit edildi. İzole edilerek saflaştırılan ve yapısı spektroskopik yöntemlerle belirlenen bileşiklerin biyokimyasal aktiviteleri *in vitro* koşullarda incelendi.

2.LİTERATUR ÖZETLERİ

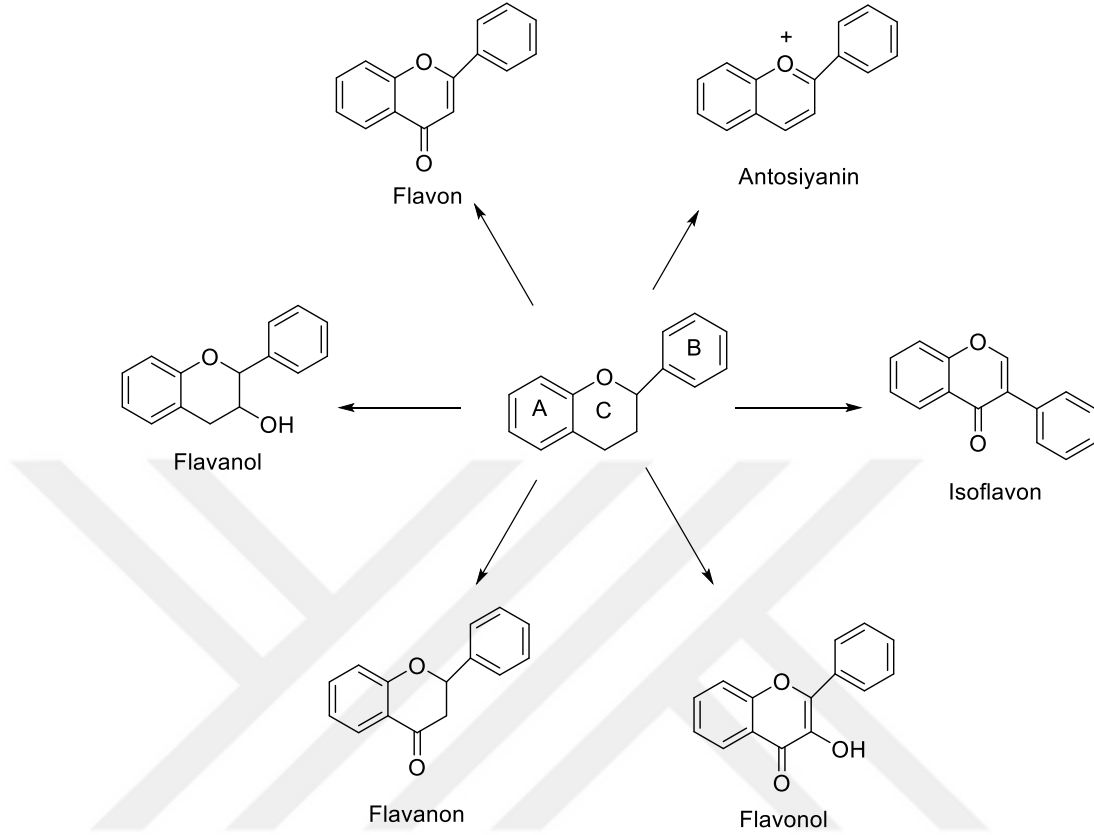
2.1. Sekonder metabolitler

Sekonder metabolitler bitkilerin hayati fonksiyonlarını sürdürmek dışında ürettikleri ikincil metabolik ürünlerdir. Basit bir sınıflama yapılması gerekirse sekonder metabolitler üç temel başlık altında toplanabilir. Bunlar; terpenler, alkoloitler ve fenolik bileşiklerdir.

Yapılarında aromatik fenol grubu barındıran bileşikler fenolik bileşikler olarak adlandırılır. Fenolik bileşikler bitkiler aleminde 10,000 den fazla bilinen bileşiği temsil eden çok geniş bir sekonder metabolit türüdür. Flavaoidler, fenolik asitler, kumarinler, tanninler ve fenoller bu grubun başlıca alt dallarıdır (Balasundram et al. 2006).

Flavanoidler bitkiler aleminde en bilindik sekonder metabolit türünü teşkil eder. Flavanoid türü bileşikler her tür bitkide mevcuttur. Kateşinler siyah ve yeşil çayda ayrıca kırmızı üzümde fazla miktarda bulunur (Wei et al. 2011). Naringin ve taksifolin gibi flavanonlar özellikle narenciye türlerinde yaygındır (Wilcox et al. 1999). Antosiyanin türü bileşikler renkli meyvelerde (kırmızı üzüm böğürtlen gibi) (Niketic-Aleksic and Hrazdina 1972), quersetin türü flavanoller zeytinde, brokolide ve kırmızı üzümde bulunmaktadır (Esti et al. 1998).

Flavanoidler A B ve C olarak adlanan üç halkadan oluşmaktadır. Bu halkalara bağlanan hidroksi, metoksil, glikozit yapılarının farklılaşması sonucu birçok flavanoid türü oluşur. Flavanoidler de kendi arasında içerdiği grupların farklılıklarına göre sınıflanır (Şekil 2.1). Bu gruplar flavanoller, flavonlar, flavanonlar, antosiyaninler flavonoller ve isoflavonlardır (Şekil 2.1). Flavanoidler üzerinde yapılan çalışmalarla 8000 den fazla flavanoid yapısı aydınlatılmıştır.



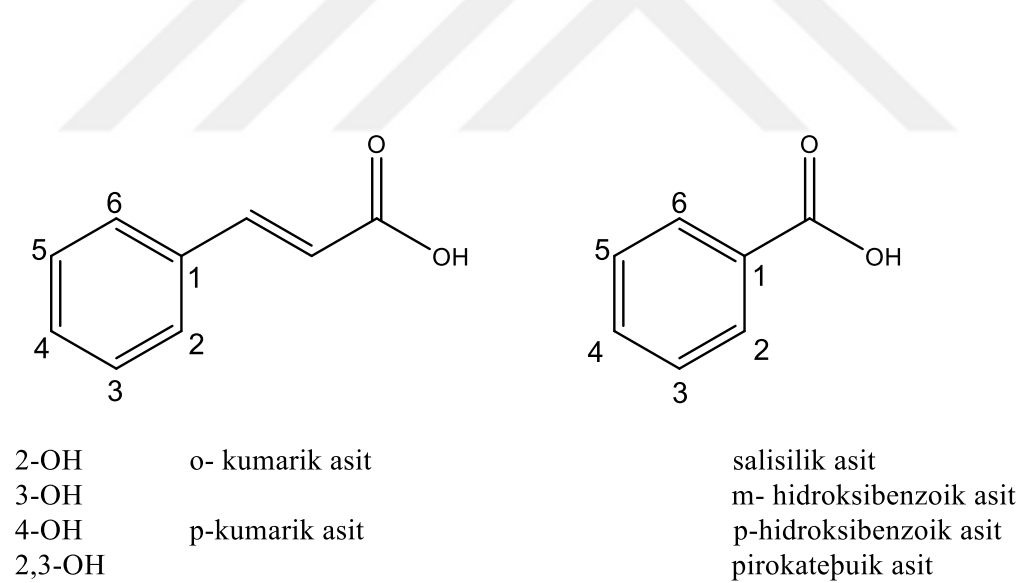
Şekil 2. 1 Flavanoidlerin alt grupları

Yapılan araştırmalar flavanoidlerin güçlü antioksidan özellikler gösterdiğini kanıtlamıştır. Antioksidan özellikleri yanı sıra antiviral, antiallerjenik, damar genişletici ve antienflamotuar aktivitelerinin olduğunu göstermiştir (Pietta 2000).

Flavanoidlerin antioksidan aktivitesi yapısında bulunan hidroksil grupları, C halkasındaki doymuş bağlar ve içerdikleri metoksi gruplarının sayısıyla orantılıdır. Bu grupların uzaklaştırılması ve glikozit bağlı yapılar flavanoidlerde antioksidan potansiyelini azalttığı bildirilmiştir. Flavanoidlerin içerdikleri substituentler antioksidan aktiviteleri üzerinde önemli etkiye sahiptir. Hidroksil grupların varlığı bu grupların asidik özellik göstermeleri ve kolayca uzaklaştırılabilen H bulundurmaları serbest

radikallerin hücrelerden uzaklaştırılmasında etkilidir. Ayrıca flavanoidlerde C halkasındaki $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ bağının bulunması da antioksidan potansiyeli artırmaktadır. C halkasında hidroksil grubunun bulunması ise flavanoidlerde antioksidan özellikleri azalttığı belirlenmiştir. Bu durum hidroksil grubunun karbonil grubuyla etkileşimi sonucu radikal tutma kapasitesindeki azalmadan kaynaklanmaktadır (Rice-Evans et al. 1996).

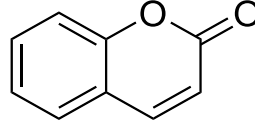
Fenolik asitler fenol yapısı içeren karboksillik asitlerdir. Fenolik asitler iki temel grup altında sınıflandırılır; bunlar hidroksi sinamik asitler ve hidroksi benzoik asitlerdir (Şekil 2.2). Bu ana gruplara bağlanan fonksiyonel hidroksi, metoksi, glikozit gibi gruplara göre fenolik asitler adlandırılır. Fenolik asitlerde güçlü antioksidan potansiyele sahiptir. Fenolik asitlerin içerdikleri hidroksi grupları ve sayısı antioksidan aktiviteyi etkiler. Aromatik halkada ki hidroksi gruplarının konumları ve gösterdikleri asidik özellikler radikal tutma aktivitelerini önemli ölçüde artırır.



Şekil 2. 2. Sinamik asit ve benzoik asit formulleri

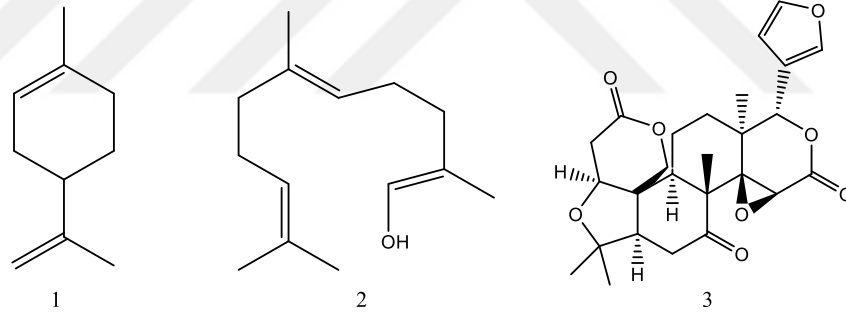
Kumarinler diğer önemli sekonder metabolitlerdir. Genellikle uçucu apolar yapıda olan kumarinler bir lakton halkası içeren moleküllerdir. Meyve kabuklarında narenciye türü meyvelerde limon mandalina ve portakal kabuğunda yüksek miktarlarda kumarin türevi

bulunur. Kumarinlerin temel iskelet yapısı aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.3). Kumarinlerin antikanserojenik, antibakterial ve antitrombotik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir (Srimanth et al. 2002).



Şekil 2. 3. Kumarinlerin genel iskelet yapısı

Terpenoidler beş karbonlu izopren gruplarının birleşmesi sonucu oluşan moleküllerdir. Monoterpenler iki izopren biriminden oluşur, diterpenler 4 izopren biriminden oluşur. Di terpenler 20 karbon atomundan, triterpenler 30 karbon atomundan meydana gelirler (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. Başlıca terpenoidler; limonen (1), geraniol (2) ve limonin (3)

Bitkiler arasında çok yaygın olarak bulunan terpenoidler bitkinin gelişiminde hormon rolüne sahiptir. Birçoğu uçucu olan terpenoidler tüm bitkiler tarafından biyolojik yollarla sentezlenmekte ve bitkinin zararlı böceklere karşı savunmasında toksik etki göstermesi nedeniyle pestisit olarak işlev görmektedir (Ahn et al. 1997). Limonda bulunan limonoidler de triterpenoid sınıfında bileşiklerdir. Limonoidlerin önemli biyolojik aktiviteleri olduğu gösterilmiştir. Bir limonoid olan limonin molekülü göğüs kanseri hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktiviteye sahiptir (Guthri et al. 2000).

2.2.Limon kabuğu ve narenciye türleri

Narenciye türleri dünya genelinde oldukça fazla yetiştirilen meyveler olup genel sağlığa faydaları iyi bilindiğinden her yıl milyonlarca ton tüketilmektedir. Limon, mandalina, ve portakal ticari olarak geniş coğrafyalarda yetiştirilir ve doğrudan tüketim veya meyve suyu fabrikalarında meyve suyu üretiminde kullanılırlar. Meyve suyu üretimi meyveyi mevsiminden daha sonraki dönemlerde de ticari olarak kullanmak için ideal bir yoldur. Meyve suyu üretiminde narenciye türlerinin sulu kısmından basınç uygulama ile suyu alınıp kabuk ve çekirdek gibi diğer atıklar uzaklaştırılır. Bu atıklar sayısız aktif bileşenler içermektedir ancak birçok yönden bu atıkların kullanımı sınırlıdır. Narenciye türleri içinde en yaygın yetiştirilen ve limon suyu üretiminde kullanılan limondan tonlarca kabuk ve çekirdekten oluşan atık meydana gelmektedir.

Limon yoğun C vitamini içeriği açısından sağlığa son derece faydalı bir meyve olup kabukları da aynı şekilde oldukça değerli ve yüksek aktivite gösteren bileşenler mevcuttur. Bunların başlıcaları; limonoidler, flavanoidler, fenolik asitler, kumarinler ve terpenoidlerden oluşmaktadır. Özellikle flavanoidler bakımından limon çok zengin bir kaynaktır. Limon kabuklarında yoğun olarak hesperidin, eriodictiol, diosmin ve bunların glikozitli türevleri mevcuttur (Miyake et al. 1997a). Aynı şekilde limon kabukları gibi limon posasında bolca bulunan limon çekirdekleri de flavanoidler açısından zengindir. Limon çekirdekleri hesperidin ve eriositrin açısından zengindir ve bu flavanoidler yüksek antioksidant aktiviteye sahiptir (Miyake et al. 1998). Eriositrinin diğer flavanoidlerden daha yüksek antioksidant aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Miyake et al. 1997b). Eriositrin, hesperidin ve diosmin limon ve diğer narenciye türlerinde yaygın olarak bulunmaktadır ve bu bileşenlerin çeşitli glikozitli türevlerinde en önemli kaynağıdır (Del Rio et al. 2004). Narenciye türlerinde yaygın olan diğer flavonlar hesperetin ve naringenin östrojenik, antikanser ve yüksek antioksidant aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir. Meyve suyu üretiminde limon ve portakalın en

önemli atığı olan kabukların sağlığa faydalı flavanoidlerden başlıca neoeriositrin, naringin ve neohesperidin içeriği belirlenmiştir (Bocco et al. 1998). Diğer bir çalışmada limon kabuklarında ve bergamotta diosmetin türelerinin varlığı belirlenmiştir (Wang et al. 2008). Narenciye türleri polimeetoksi flavanoidler açısından zengindir, özellikle mandarin kabukları çok büyük miktarda sinensetin içerir (Nogata et al. 2003). Diosmin narenciye türlerinde bulunan çeşitli yüksek farmakolojik biyoaktiviteye sahip bir flavanoittir. Lipit peroksidasyonuna karşı yüksek aktiviteye, antioksidant özelliklere ve antihemoroidal aktiviteye sahiptir. Özellikle polimetoksi flavanoidler olmak üzere birçok flavanoidin antikanser aktivite gösterdiği bilinmektedir (Tripoli et al. 2007). Yapılan bir çalışmada naringenin molekülünün kolon kanser hücre hatlarına karşı aktif olduğu tespit edilmiştir (Erlund et al. 2001). Limon kabuklarının zengin flavanoid, fenolik asit, ve kumarin içeriği nedeniyle limon kabuğu ekstraktının yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir (Dhanavade et al. 2011). Limon flavanoidleri olarak adlandırılan hesperidin ve eriositrin oksidatif strese karşı oldukça etkili birer moleküldür .

Limon kabuklarında ve diğer narenciye türlerinde yaygın olarak bulunan hesperidin üzerinde yoğun araştırmalar yapılan bir flavanoittir. Hesperidin üzerinde yapılan çalışmaların birinde denek olarak kullanılan farelerde akciğer kanserini önemli ölçüde baskıladığı gözlenmiştir. Hem hesperetin hemde glikozitli türevi hesperidin normal bir diyetle toksik etkisinin olmadığı tespit edilmiş ve aşırı dozlarda alınmadığı sürece birçok biyoaktivitesinin olduğu bildirilmiştir. En erken çalışmalarda vitamin benzeri bir bileşik olarak tanımlanan hesperidine P vitamini ismi verilmiştir. Hesperidin ve hesperetin antioksidant ve antikanserojenik aktivitelerinin olduğuna yönelik son yıllarda yapılmış birçok çalışma mevcuttur, hesperidin antienflamatuar ve analjezik etkilere sahiptir. Amerika ve avrupada gıda desteği olarak kullanımı son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarla yaygınlaşmıştır. Hesperidin ve hesperetin yapılan bir çalışmada antibakteriyal aktivitesi olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada *Helicobacter pylori*' ye karşı aktif olduğu ve proliferasyonunu baskıladığı in vitro ortamda gösterilmiştir (Garg et al. 2001). Limon kabuklarının zengin flavanoid içeriği yanı sıra fenolik asitler

açısından da zengindir. Limon kabuğunun en önemli fenolik asitleri, klorojenik asit, sinapik asit, *p*- kumarik asit ve kafeik asit olarak tespit edilmiştir.

Flavanoid ve fenolik asitler dışında limon kabukları kumarinleri de içerir. Özellikle limon kabuğu yağı kumarin türevleri bakımından zengindir. Limon kabuklarında bolça bulunan ana bileşen gruplarından bir diğeri de limonoidlerdir. Limonoidlerin kolesterol seviyesini düşürme etkisi belirlenmiştir (Yu et al. 2007). Limonoid türevlerinin kolon kanserini önleme açısından oldukça etkili olduğunda bildirilmiştir. Limon tüketimiyle kansere yakalanma riskinin azalması arasındaki ilişki yapılan çalışmada belirlenmiş, aynı çalışmada limoninin kanser hücrelerinin oluşumunu baskıladığı tespit edilmiştir (Jacob et al. 2000). Limonoidlerin başta kolon cilt ve meme kanseri ürelerine karşı aktif bileşikler olduğu hayvan ve insan kanser hücre hatlarına karşı yapılan laboratuvar çalışmalarıyla belirlenmiş, bu aktivitenin limonoidlerin içerdiği furan yapısıyla bağlantılı olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada limonoidlerin birçok hücre hattına karşı oldukça etkili olduğu görülmüştür. Bu çalışmalarda limonoidlerin toksisitesinin bulunmadığı belirlenerek limonoid türü terpenoidlerin birden fazla kanser hücresine, özellikle; kolon, meme, deri ve karaciğer kanserine karşı potansiyel bir kemoterapi ilacı olabileceği söylenmiştir (Bayazit and Konar 2010).

2.3. Kimyasal İzolasyon yöntemleri

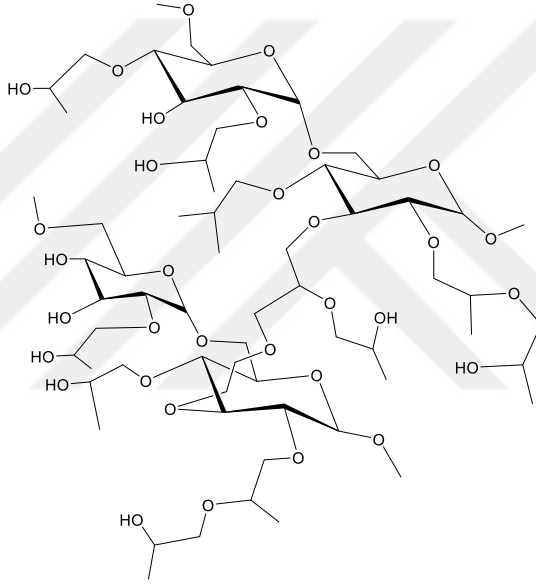
Bitki üzerine yapılan çalışmalar literatürde fitokimyasal çalışmalar olarak bilinmektedir. Bitkilerin bileşimlerini izole etme ve bu bileşenlerin aktivitelerinin incelenmesi fitokimyanın temel ilgi alanını oluşturmaktadır. Fitokimyasal analizleri gerçekleştirebilmek için bitkinin kimyasal ekstraksiyon işlemlerine tabi tutulması gerekmektedir. Ekstraksiyon bitkilerden özütünü çıkarma anlamı taşımakta ve çok eskilerden beri çeşitli şekillerde bilinip kullanılmaktadır. Eski tıp bilginleri bitkilerin sulu veya alkollü ekstrelerini tedavi amaçlı kullanmışlardır. Bu günkü metodlar da farklı çözücülerle bitkilerden ekstre elde etme yöntemleri geliştirilmiştir. Bitkilerden elde

edilen ekstreler sayısız bileşenden oluşmakta ve istenen aktiviteyi gösteren bileşenlerin miktarı ekstre içerisinde çok fazla bir miktarı oluşturmamaktadır. Bu nedenle ekstre nin aktif bileşenin izole edilmesi gerekmektedir. İlk izolasyon yöntemleri asit veya bazla çeşitli bileşenleri safsızlıklarıyla beraber ekstre den ayırma ilkesine dayanmaktaydı daha sonra 19. Yy başlarında geliştirilen kolon kromatografisi ekstrelerin izolasyonunda bileşenlerin farklı polaritelerde olmasından yararlanarak farklı çözücü sistemleri ile ekstre den ana bileşenlerin izolasyonunu kolaylaştırdı. Silika gibi polar bir katı ile yapılan kromatografide polar silika parçacıkları polar molekülleri kolonda tutarken apolar özellik gösteren moleküllerin hareketine izin verir, polaritenin farklı çözücüler kullanılarak kontrollü şekilde artırılması ile daha polar bileşenlerin kolonda hareketi de sağlanarak bileşenlerin farklı fraksiyonlarda toplanması amaçlanır. Oluşan fraksiyonların tekrar tekrar kromatografi işlemine tabi tutulması bileşenlerin ayrılmasını sağlar. Silika yerine birçok farklı maddenin kullanımı da mümkündür.

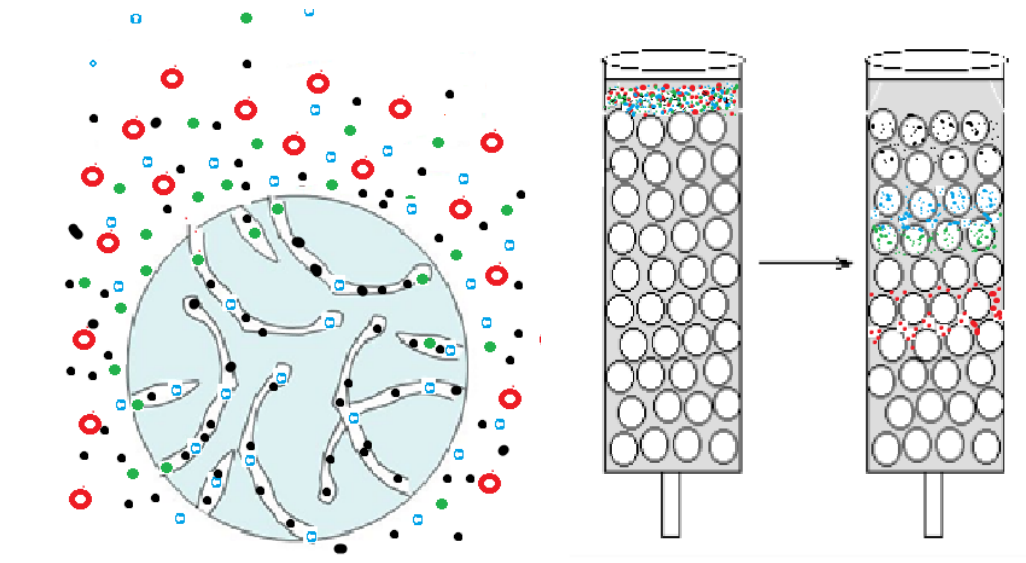
İnce tabaka kromatografisi yüzeyi silika bir katmanla kaplı bir alüminyum tabakada kapiler kuvvet etkisiyle çözücünün hareket etmesi ve beraberinde tabakaya emdirilmiş karışımı taşıması ilkesine göre işleyen, karışımdaki moleküllerin polaritelerine bağlı olarak spotların elde edildiği bir yöntemdir. Bu yöntem sayesinde farklı polariteye sahip moleküllerin bu tabaka üzerinde izlenmesi, polaritelerinin incelemesi ve yapılacak kolon kromatografisi hakkında fikir sahibi olunabilir. Bu yöntemin izolasyon ve saflaştırma için geliştirilmiş şekli olan preparatif ince tabaka kromatografisi daha kalın bir silika katman içerir ve bu katman oluşan spot hatları belirlenerek kazınıp moleküllerin polariteye göre izolasyonu gerçekleştirilir.

Polariteye göre yapılan izolasyon işlemlerinde yakın polarite aralıklarına sahip moleküllerin izolasyonu mümkün olmadığından daha farklı izolasyon yöntemlerinin geliştirilmesi gerek duyulmaktadır. Sephadex LH-20 kolon dolgu maddesi polimerik yapıdaki dextran bileşiğinin belirli aralıklar ile bağlanması ve belirli gözenek büyüklüğünde sentezlenmesi ile elde edilmektedir (Şekil 2.5). Bu gözenekler sefadex polimerinin molekülleri boyutlarına göre izolasyonunda büyük kolaylıklar sağlamıştır

(Johnston et al. 1968). Farklı çözücü sistemlerinde farklı boyutlarda şişen sefadex gözenekleri moleküllerin hareketini sınırlayarak büyük moleküllerin kolondan daha erken ayrılmasını, küçük moleküllerin ise daha fazla süre kolonda kalarak bileşenlerin ayrımını sağlamaktadır. Eksküzyon kromatografisi olarak adlandırılan bu yöntemle hem organik moleküller hem de biyokimyasal büyük molekül ağırlıklı bileşiklerin ayrımı yapılabilmektedir. Aşağıdaki şekillerde bir karışımın sefadex dolgu maddesinde ayrımı basitçe gösterilmiş olup, bu şekillerde farklı molekül boyutlarına sahip bileşiklerin kolon içinde ilerlemesi ve ayrımın temel ilkesi betimlenmiştir (Şekil 2.6).



Şekil 2. 5. Sefadex LH-20 kolon dolgu maddesinin kimyasal yapısı



Şekil 2. 6. Sefadex LH- 20 kolon kromatografisinin şematik gösterimi

2.4. Biyokimyasal aktivite

Kimyasal bileşiklerin biyolojik yapılarıdaki aktivitelerinin incelenmesi farmakolojinin en önemli konu alanıdır. Biyokimyasal aktivite çalışmaları ilaç etken maddelerinin geliştirilmesi süreci olarak tanımlanabilir. Antiproliferatif aktivite, total antioksidan aktivite, serbest radikal tutma kapasitesi, metal şelatlama kapasitesi, linoleik asit peroksidasyonu inhibisyonu, hidrojen peroksit giderme, antibakterial ve antifungal aktivite çalışmaları laboratuvar koşullarında en çok uygulanan aktivite çalışmalarıdır. Çağın getirdiği birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçların geliştirilmesinde bu tür *in vitro* aktivite çalışmaları başlangıç basamağını teşkil eder. Sentezlenen veya bitkilerden çeşitli izolasyon yöntemleriyle izole edilen bileşiklerin biyokimyasal aktiviteleri ilk olarak laboratuvar koşullarında *in vitro* olarak test edilmekte, daha sonra *in vitro* koşullarda aktivitesi yüksek olan bileşenlerin hayvan deneyleri ile hayvanlar üzerindeki etkisi belirlenmektedir. Bu aşamaya kadar aktif olarak tespit edilen bileşenler insan denekler üzerinde test edilip etkileri ve yan etkileri belirlendikten sonra kullanıma sunulur.

Kanser çağımızın en önemli hastalıklarından biridir. Kısaca canlı hücrelerin normalden fazla bir şekilde çoğalarak doku içinde oluşturduğu bir yapı olarak tanımlanan kanser, hücre DNA'sında meydana gelen bozunumalar sonucu oluşur ve birçok durumda diğer dokulara da sıçrayarak ölümcül sonuçlar doğurur. Dünya üzerinde her yıl milyonlarca insan kanser hastalıkları sebebiyle hayatını kaybetmektedir. Çevresel radyasyon, hava kirliliği, sigara kullanımı, maruz kalınan çeşitli kimyasallar kanserin en önemli nedenlerini oluşturmaktadır. Kanser tedavisi üzerinde yürütülen çalışmalar sadece doku içerisindeki kanserli dokuyu hedef alan moleküller geliştirmek üzerine kurulmuştur. Kemoterapi uygulanan en bilindik kanser tedavi yöntemi olmakla beraber birçok yan etkiyi de beraberinde getirmektedir. Kemoterapide zerk edilen kimyasalların aktifleştirilmesi için kanserli bölge dışardan x ışını kaynaklarıyla ışınlanmakta ve kanserli hücrelerin ölmesi sağlanmaktadır (Leventhal et al. 1986). Bu yöntemin kanser hücreleri dışında diğer canlı hücrelere de belli ölçüde zarar verdiği bilinmektedir. Bu nedenle sadece kanser hücrelerine karşı toksisite gösteren kimyasalların geliştirilmesi gerekmekte ve laboratuvar koşullarında kanser hücrelerine karşı aktivite gösteren bileşenlerin canlı normal hücrelere karşı toksik olup olmadığı da incelenmektedir.

Antioksidan aktivite testleri hücre içinde meydana gelen oksidasyonu veya kimyasal bozunmayı önleyen maddelerin tespitinde kullanılmaktadır. Oksidasyon maddelerin radikalik oksijen atomlarıyla reaksiyona girerek normal yapılarının değişime uğraması olarak tanımlanır. Hücre içinde meydana gelen veya çevresel koşullardan kaynaklanan reaksiyonlarla oluşan oksidasyon ve diğer zararlı radikalik yapıdaki moleküller hücre mekanizmasında çeşitli yollardan zararlara neden olur. Serbest radikallerin hücreden yeterince uzaklaştırılmaması sonucu hücrede işlevsel bozukluklar meydana gelebilir, hatta radikallerin DNA da değişime neden olması dahi söz konusudur ve bu durum kanserin en önemli etkenlerinden birini oluşturur. Oksidan moleküllerin ve serbest radikallerin hücre içinde çeşitli yollarla etkisizleştirilmesi gerekmektedir, bunu gerçekleştiren moleküller antioksidan olarak adlandırılır. Oksidasyonu önleme aktivitesinin belirlenmesi için moleküllerin laboratuvar koşullarında çeşitli kimyasal iyonları indirgemesi referans alınarak deneyler gerçekleştirilir. Serbest radikallerin tutulması hücre içinde aynı şekilde istenmeyen reaksiyonları önler, serbest radikaller

aşırı aktif eşleşmemiş elektron içerdiklerinden son derece tehlikelidirler. Radikal giderme aktivitesi laboratuvar koşullarında DDPH' radikaline karşı moleküllerin gösterdiği tutma kabiliyeti türünden belirlenir. Bir diğer önemli aktivite çalışması da bileşiklerin bakteriler ve mantarlar üzerindeki etkisinin incelenmesidir. Bakteriler canlı vücudunda enfeksiyonlarla veya çevreden bulaşarak çeşitli hastalılara neden olmaktadır. Bakterilerin oluşturduğu hastalıkları önlemek için geliştirilen antibakterial kimyasallar zaman içerisinde bakterilerin bu kimyasallara karşı direnç oluşturmalarından dolayı etkisini kaybetmekte ve daha dirençli bakteriler oluşmaktadır. Bu nedenle bakterilerin direnç oluşturamayacağı kimyasalların geliştirilmesi önem arz etmektedir. Antibakteriyal çalışmalarda yapay besi yerlerinde yetiştirilen bakterilerin çoğalmasını engelleyen bileşenlerin emdirildiği kâğıtların oluşturduğu inhibisyon çapı ve çeşitli konsantrasyonlarda bileşenlerin minimum inhibisyon etkisi incelenir. Bu yöntemin benzeri antifungal aktivite çalışmalarında da yapılmaktadır.

3.MATERYAL METOD

3.1.Materyal

Etil asetat, metanol, eter, hekzan (merck), silica jel, TLC tabakalar, anisaldehit belirteci, sefadeks LH-20 (sigma aldrich), kromatografik izolasyon işlemlerinde kullanıldı. HPLC/TOF-MS analizleri için % 0.1 formik asit ve asetonitril çözeltileri kullanıldı. Antioksidan ve diğer indirgeme testleri için, TBHQ, BHT, troloks, DPPH, linoleik asit, fosfat tamponu, α -tokoferol, TCA, TBA, EDTA, $K_3Fe(CN)_6$, $Na_2 PO_4$, $(NH_4)_6 Mo_7O_2$, $Fe(III)Cl_3$, $Na_2S_2O_3$ kullanıldı. NMR analizleri için çözücü olarak döteryumlu DMSO ve $CDCl_3$ kullanıldı. Antiproliferatif aktivite çalışmaları için DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), PC3 kanser hücre hattı ve 96 lık e-plate kullanıldı.

3.1.1. Kullanılan cihazlar

Yapılan deneysel çalışmalarda Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC/TOF-MS cihazı, 600 MHz agillent NMR cihazı, xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre Analiz cihazı, UV-Vis spektrofotometre, incubator, döner buharlaştırıcı, steril kabin, otoklav, santrifüj, etüv, hassas terazi, vortex ve ultrasonic banyo cihazları kullanıldı.

3.2. Metod

3.2.1. Hammaddenin temini ve kurutulması

Limon posası 2015 Eylül ayında DİMES tokat meyve suyu fabrikasından temim edildi. Güneş görmeyen gölge bir alana serilerek kurumaya bırakıldı ve 5 kg ağırlığında kuru madde tartılarak ekstraksiyon işlemi için hazırlandı.

3.2.2. Ekstraksiyon işlemleri

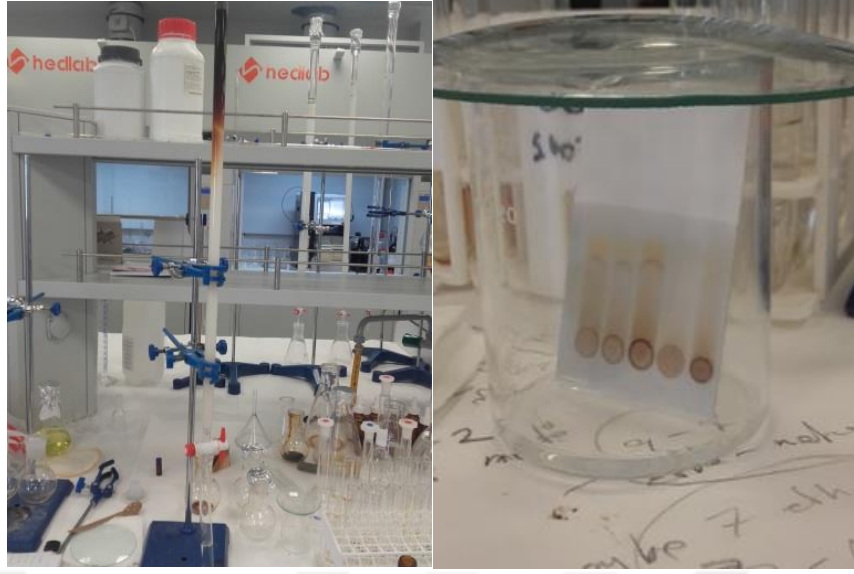
Limon posası ekstraksiyon işlemleri için yeterli düzeyde su ile üç saat boyunca geri soğutucu sistemde kaynatıldı ve su süzülerek alındı, bu işlem limon posası içindeki bileşenlerin çok büyük bir bölümü suya geçene kadar üç defa tekrarlandı. Sulu ekstresi iyice soğuduktan sonra etil asetat ile ekstraksiyon hunisinde sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu (Demirtas et al. 2013). Yeterli düzeyde etil asetat ekstraktı elde edebilmek için sulu ekstreden ekstraksiyon işlemi etilasetat fazında renk görülmeyinceye kadar (3 tekrarlı) tekrar edildi ve etil asetat ekstresi süzgeç kâğıtlarından süzülerek elde edildi (Şekil 3.1). Etil asetat ekstresi döner buharlaştırıcıda çözücü etil asetatatan uzaklaştırılarak etil asetat ekstraktı elde edilmiş oldu (Şekil 3.1). Bu işlemler sonunda toplam etil asetat ekstrakt miktarı 13,2 g olarak tartıldı.



Şekil 3. 1 Ekstraksiyon işlemi ve evaporatörde çözücünün uzaklaştırılması

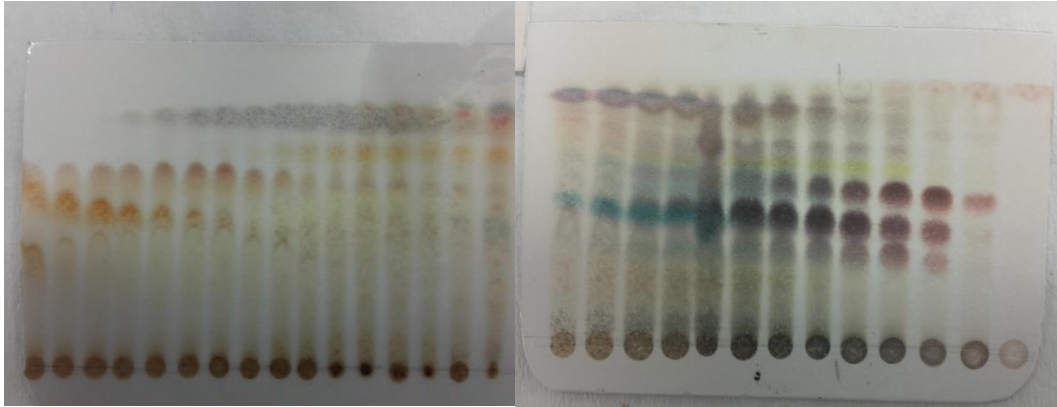
3.2.3.İzolasyon işlemleri

Ekstraksiyon işlemi sonucu elde edilen etil asetat ekstresi izolasyon işlemleri için uygun miktarda sefadeks kolon kromatografisi çözücü sisteminde çözülerek kromatografi için hazırlandı. Sefadeks kolon kromatografisi belirlenen 3 farklı çözücü sisteminde ard arda gerçekleştirildi. İlk sefadeks çözücü sisteminde sırasıyla (50:50:10) etilasetat, metanol, hekzan, çözücü sistemi uygulandı (Şekil 3.2).

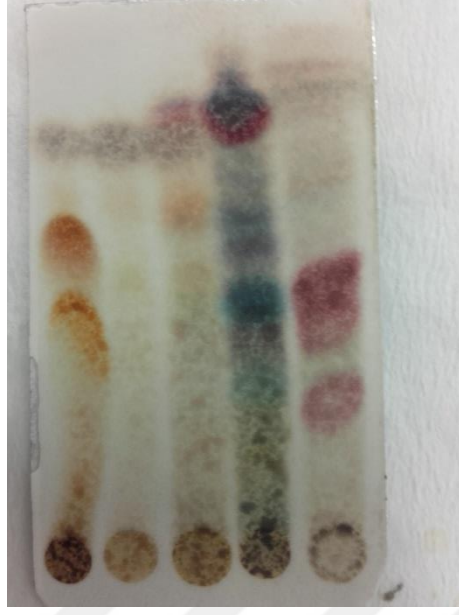


Şekil 3. 2 Sefadex 1 kolon kromatografisi ve TLC kromatografisi

Bu kromatografik işlemde alınan fraksiyonlar TLC ile benzer fraksiyonlar belirlenerek 7 ana fraksiyona ayrıldı (Şekil 3.3 ve Şekil 3.4). TLC işlemi için yürütme çözütüsünde 60:40 etil asetat–hekzan çözütü sistemi kullanıldı. TLC belirteci olarak anisaldehit kullanıldı.

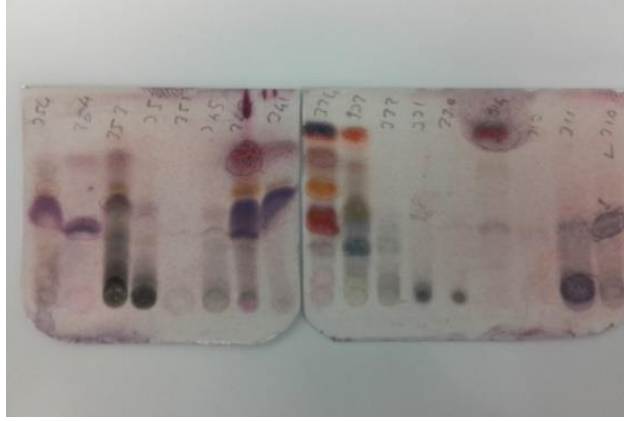


Şekil 3. 3 Sefadex-1 kolon kromatografisinden elde edilen farklı fraksiyonlara ait TLC

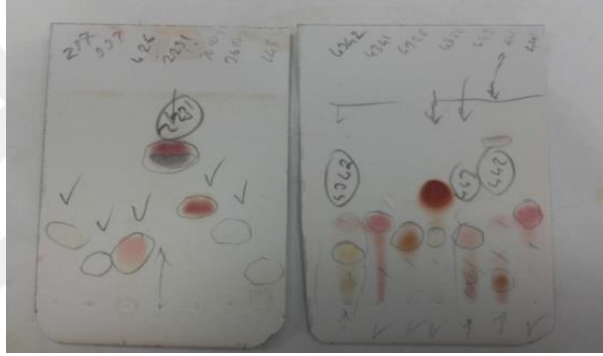


Şekil 3. 4 Birleştirme işleminden sonra fraksiyonlara ait TLC

Bu 7 fraksiyondan polariteleri sefadeks ile izolasyona uygun olan ilk dört fraksiyon ikinci sefadeks çözücü sisteminde (50:50:5 metanol, eter, hekzan) kromatografi işlemine tabi tutuldu. Her bir fraksiyonun alt fraksiyonları TLC ile benzer olanlarla birleştirilerek ayrıldı. Tekrar elde edilen bu fraksiyonlar sadece metanol kullanılan çözücü sisteminde sefadeks ile kromatografi işlemine tabi tutuldu. Elde edilen tüm bu alt fraksiyonlar sonucunda bazı bileşenler saf olarak elde edildi (Şekil 3.69). TLC sonuçlarına göre saflaştırılması mümkün olan fraksiyonlara ise silika kolon kromatografi işlemi uygulandı.



Şekil 3. 5 Sefadex 3 sonucunda 3. Fraksiyona ait TLC



Şekil 3. 6 Saflaştırılan bazı bileşenlere ait TLC



Şekil 3. 7 Limonin molekülüne ait kristalleri

3.2.4.Spektroskopik işlemler

3.2.4.1.HPLC-TOF/MS analizi

Bitki ekstralarının fenolik içeriği, Agilent Poroshell 120 EC-C18 (2.7 mm, 4,0 x 50 mm) kolon, 6210 (TOF) LC/MS dedektör ile birlikte Agilent Technologies 1260 Infinity HPLC Sistemi kullanılarak belirlendi (Şekil 3.8). Mobil faz A ve B, sırasıyla, ultra saf su çözeltisi ile % 0.1 formik asit ve asetonytril kullanıldı. Akış hızı 0.4 ml/dk., kolon sıcaklığı 35°C ve enjeksiyon hacmi 5 µL dir. Çözücü programı: B; 0-1. dakikada % 10 B; 1-19. dakikada % 80 B; 19-29, 1. dakikada % 10 B olarak uygulandı. Tayin basamağında standart bileşiklerin tutunma süreleri ve m/z değerleri kullanıldı. TOF-MS cihazının iyonizasyon modu 325 °C gaz sıcaklığı ile negatif, gaz akışı 11.0 L/dk ve nebulizör 45 (psi) dir.



Şekil 3. 8 HPLC-TOF/MS cihazı

3.2.4.2.NMR spektroskopisi

İzole edilen ve saflaştırılan bileşenlerin yapıları Çankırı Karatekin Üniversitesi Araştırma laboratuvarında bulunan 600 MHz NMR cihazı (Şekil 3.9) kullanılarak H^1 , C^{13} , COSY, HMBC, HSQC NMR spektrumları döteryumlu çözücüler DMSO ve $CDCl_3$ ’ de alınarak yapıları belirlendi.



Şekil 3. 9 600 MHz NMR cihazı

3.2.5. *In vitro* aktivite testleri

3.2.5.1. Antiproliferatif aktivite testi

Elde edilen bileşenler için antikanser aktivite testi yapıldı. Antikanser aktivite testleri insan prostat kanseri (PC3) hücre hattına karşı xCELLigence Gerçek Zamanlı Hücre

Analiz cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler E-Plate 96 kuyucuklarının tabanlarına yerleşen hücrelerden kaynaklanan impedans farklılığı baz alınarak gerçekleştirildi. Zamana karşı hücre sayısı ile orantılı olarak değişen CI (Cell Index) değerine ait grafik elde edildi.

Besi yeri olarak % 10 fetalbovin serum ve % 2 streptomisin-penisilin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanıldı ve analizler inkübatör içinde (% 5 CO₂, % 100 nem) 37 °C' da yapıldı. İlk olarak kuyucuklara 50 µL besi yeri konulan E-Plate 96 15 dk. steril kabinde ve 15 dk. inkübatörde bekletildi, sonrasında inkübatör içindeki istasyona yerleştirildi ve arka plan okuması yapıldı. Sonrasında kuyucuklara her bir kuyucukta $2,5 \times 10^4$ adet PC3 hücresi olacak şekilde 100 µL hücre süspansiyonu koyuldu. Bundan sonra plaka yarım saat steril kabinde ve oda koşullarında bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanına yerleşmesi beklendi. Bu plaka istasyona yerleştirilerek 80 dk. boyunca 10 dakika aralıklarla ölçüm yapıldı.

Bu sürede hücreler kuyucuk tabanına yerleşerek normal büyüme periyoduna girdi. Bundan sonra istasyondan çıkarılan plakanın kuyucuklarına steril DMSO ve besi yeri kullanılarak hazırlanan saf bileşenlerin çözeltilerinden kuyucuklarda ki son derişimler saf maddeler için 100, 50 ve 10 µg/mL, olacak şekilde çözeltiler eklendi ve sonrasında besi yeri ile kuyucuklarda ki son hacim 200 µL'ye tamamlandı. Eklemelerden sonra plaka derhal istasyona yerleştirilerek 50 saat boyunca 10 dakika aralıklarla analiz gerçekleştirildi. Testler üçer tekrarlı yapıldı ve grafikler standart sapma çubukları ile verildi. Bulunan kanser sonuçlarına göre dört grafik elde edildi bu grafiklerde 3 farklı dozaj (100, 50, 10 µg/mL) için prostat kanseri hücre kültürüne karşı saf moleküllerin aktiviteleri tespit edildi.

3.2.5.2. Amonyummolibdenum yöntemiyle toplam antioksidan aktivite testi;

Ekstraktların (veya standartların; TBHQ, BHT ve troloks) antioksidan kapasitesi örnek karışımının Mo(VI)'in Mo(V)'e indirgenme ve 695 nm de yeşil fosfat/Mo(V) bileşiğinin oluşumu esasına bağlı amonyummolibdenum yöntemiyle spektroskopik olarak tayin edildi (Prieto et al. 1999). 0,3 mL örnek (ekstrakt veya standart maddeler), 2,7 mL reaktif çözeltisi ile (0,6 M sülfirik asit + 28 mM sodyum fosfat + 4 mM amonyum molibdat) karıştırıldı ve 90 dakika, 95 °C de su banyosunda kapaklı tüp içerisinde inkübe edildi. Karışım oda sıcaklığına soğutuldu. Daha sonra karışımın berrak olması için 2500 x g de 20-25 dk. plastik tüpte santrifüjlendi. Daha sonra her bir karışımın absorbansı 695 nm de köre karşı absorbans değeri kaydedildi. Ölçülen yüksek absorbans değeri yüksek toplam antioksidant aktiviteyi göstermektedir. Aktivite µmol α-tokoferol eşdeğeri/g olarak hesaplandı.

3.2.5.3. Serbest radikal giderme aktivite testi

Ekstraktların (veya standartların; TBHQ, BHT, troloks) serbest radikal giderme aktivitesi Blois Metoduna göre tayin edildi (Blois 1958). 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH[·], 0.1 mM) çözeltisinin 1 mL si ile 3 mL farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ekstrakt ve standart antioksidant maddelerin çözeltileri ile iyice karıştırıldı. 30 dakika 25 °C de karanlıkta sallantılı su banyosunda inkübe edildi. Her bir karışım için 517 nm deki absorbans değerleri kaydedildi. Örneklerin radikal giderme aktivitesi aşağıda yazılı olan formüle göre hesaplandı.

$$\text{DPPH}^{\cdot} \text{ giderme aktivitesi (\%)} = [(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$$

A₀: kontrol absorbansı **A₁**: örnek absorbansı

3.2.5.4. Linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu testi

Linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu tayini Choi ve arkadaşları tarafından (Choi et al. 2002) geliştirilen yöntemine göre yapıldı. 1 mL (10, 25, 50 ve 100 µg/mL) ekstrakt çözeltileri (veya standart çözeltileri), 550 mL linoleik asit (0,02 M), 500 mL fosfat tamponu (100 mM, pH 7,4) ve 150 ml askorbik asit (10 mM) homojen karışması için vorteksle karıştırıldı. 1 mL ekstrakt çözeltileri (veya standartların; TBHQ, BHT, troloks) yerine kontrol (çözücü) karışımı hazırlandı. Kontrol, ekstrakt ve standart hangi çözücüde hazırlanmış ise o çözücü kullanıldı. Linoleik asit peroksidasyonu 0,1 mL FeSO₄ (10 mM) ün eklenmesiyle başlatıldı. Reaksiyon karışım vortekslendi ve 37 °C de 60 dakika sallantılı su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyon 1,5 mL, % 0,5 HCl de hazırlanmış soğuk % 10 luk TCA çözeltisi ilave edildi ve reaksiyon durduruldu. Daha sonra 3 ml % 1 lik TBA çözeltisi ilave edildi. TBA/örnek (veya standart) karışımı 95 °C de 60 dk. sallantılı su banyosunda inkübe edildi ve karışım 20-25 °C ye soğutuldu. Daha sonra karışım 3 mL ayrı deney tüplerine alındı ve 3 ml *n*-bütanol ilave edildi. Homojen karışım 3000 x g de 10 dakika santrifüjlenerek renkli üst faz spektrofotometre küvetine aktarıldı. Karışımın absorpsiyonu 532 nm de okundu ve linoleik asit peroksidasyon inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

Linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu (%)= $1 - (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$

A₀: kontrol absorbansı A₁: örnek absorbansı

3.2.5.5. İndirgeme gücü testi

1 mL farklı konsantrasyonda hazırlanmış ekstraktlar (veya standartların; TBHQ, BHT), 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH 6,6) ve 2,5 mL % 1 lik K₃Fe(CN)₆ ile karıştırıldı. Karışım 50 °C deki su banyosunda 20 dakika inkübe edildi. 2,5 mL % 10 luk trikloroasetik asit (TCA) eklendi ve karışım 2500 x g de 10 dakika santrifüjlendi. Elde

edilen üst fazın 2,5 mL si ile 2,5 mL dd H₂O ve % 0,1 lik 0,5 mL FeCl₃ karıştırıldı. Ekstraktların ve standart antioksidant maddelerin indirgeme gücü 700 nm de absorbans ölçülerek tayin edildi. Reaksiyon karışımında ekstrakt ve standartların farklı konsantrasyonlarındaki absorpsiyonlarındaki artış, indirgeme gücü kapasitesinin konsantrasyona bağlı artışını göstermektedir (Oyaizu 1986).

3.2.5.6. H₂O₂ giderme aktivite testi

H₂O₂ giderme aktivitesi Zhao, Xiang, Ye, Yuan, Guo, 2006 tarafından geliştirilen yöntemle göre modifiye edilerek tayin edildi. H₂O₂ (1.0 mL, 0.1 mM) ve 1.0 mL bitki ekstraktından hazırlanmış (veya standartların; BHA, TBHQ, BHT) çözeltileri ilave edilerek iyice karıştırıldı ve daha sonra sırayla 0.1 mL %3 amonyum molibdat, 10 ml H₂SO₄ (2M) ve 7.0 mL KI (1.8 M) ilave edildi. Karışım Na₂S₂O₃ (5 mM) ile sarı renk yok olana kadar titre edildi. Yüzde H₂O₂ giderme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Oktay et al. 2003).

$$\text{H}_2\text{O}_2 \text{ giderme aktivitesi (\%)} = [(V_o - V_1)/V_o] \times 100$$

V_o: kontrol için harcanan hacim (mL) V₁: örnek için harcanan hacim (mL)

3.2.5.7. Metal şelatlama aktivite testi

Farklı konsantrasyonda hazırlanmış örneklerin Fe²⁺-ile kompleksleşme özelliği 562 nm de Fe²⁺-ferrozin kompleksinin absorbansı ölçülerek değerlendirildi. 0,5 mL örnek (EDTA) 2 mL 0,1 M sodyum asetat tamponu (pH 4,9) ve 0,05 mL, 2 mM FeCl₂ iyice vorteks ile karıştırıldı. Karışıma 0,2 ml 5 mM ferrozin eklenerek reaksiyon başlatıldı. Tekrar karışım vorteksle iyice karıştırıldı ve 25 °C de 30 dakika inkübe edildi.

Karışımın absorbanısı 562 nm de okundu. Fe²⁺-ferrozın kompleks oluşumunun % inhibisyonu aşağıda verilen bağıntıya göre hesaplandı (Haber and Weiss 1934).

Metal şelat etkisi aktivitesi (%)= [(A_o-A₁)/A_o] x 100

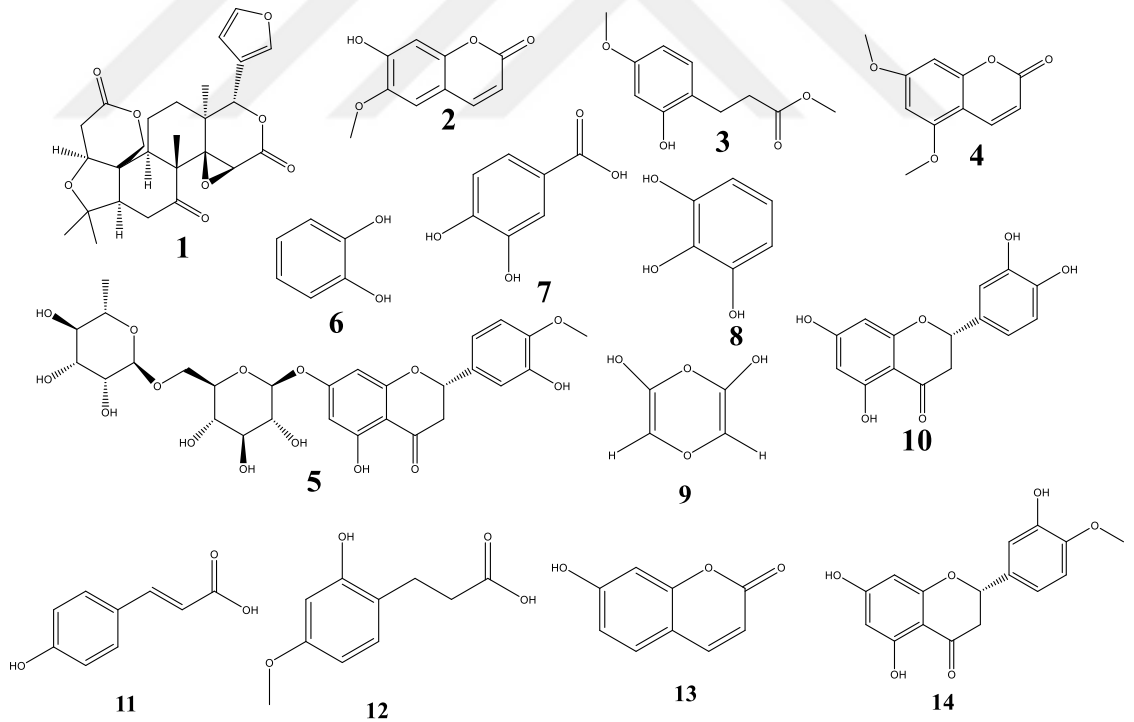
A_o: kontrol absorbanısı A₁: örnek absorbanısız



4. BULGULAR

Tez çalışmasında yapılan izolasyon işlemleri ile 14 sekonder metabolit (Şekil 4.1) izole edildi ve bileşiklerin yapıları 1D ve 2D NMR teknikleri kullanılarak belirlendi. Ham ekstre HPLC/TOF-MS kullanılarak fenolik bileşenler açısından incelendi. İzole edilen ve moleküler yapıları belirlenen bileşiklerin antiproliferatif, indirgeme gücü, serbest radikal tutma, hidrojen peroksit inhibisyonu, metal şelatma, linoleik asit peroksidasyonu inhibisyonu ve total antioksidan aktiviteleri incelendi.

İzole edilen ve yapıları NMR spektroskopisi ile aydınlatılan bileşenlerin molekül formülleri aşağıda belirtilmiştir (Şekil 4.1).

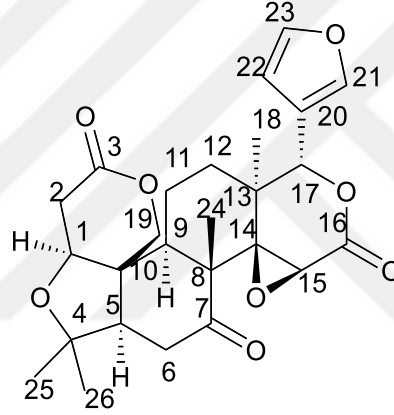


Şekil 4. 1 İzole edilen moleküllerin kimyasal formülleri

4.1.NMR VERİLERİ

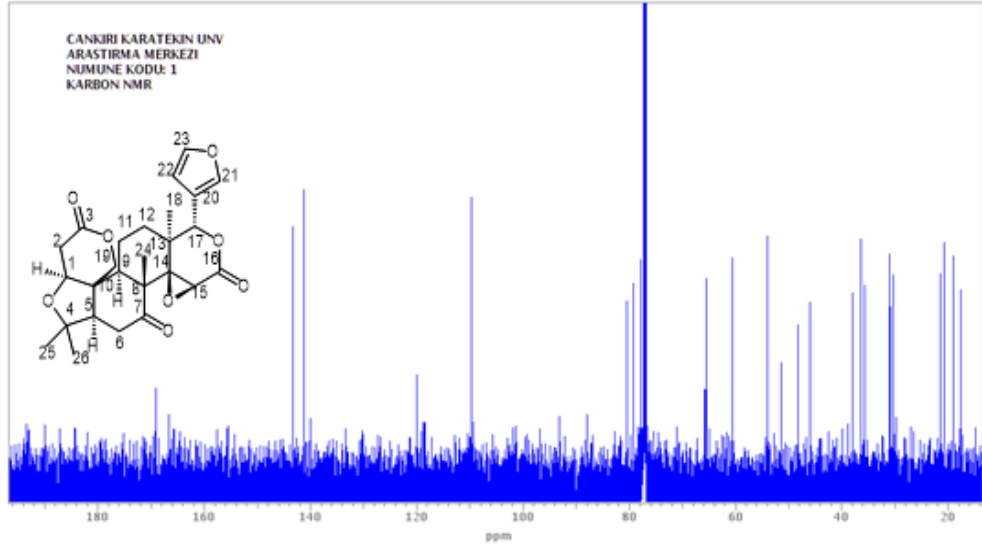
4.1.1. Limonin bileşiğinin NMR spektrumları

Limonin bileşiği sefadeks-1 kolon kromatografisi sonucu elde edilen ilk fraksiyondan kristallendirilerek elde edildi. Bir limonoid olan molekülün yapısı $CDCl_3$ çözücüsü kullanılarak 600 MHz lik NMR cihazında alınan NMR spektrumları ile çözüldü (Şekil 4. 2).



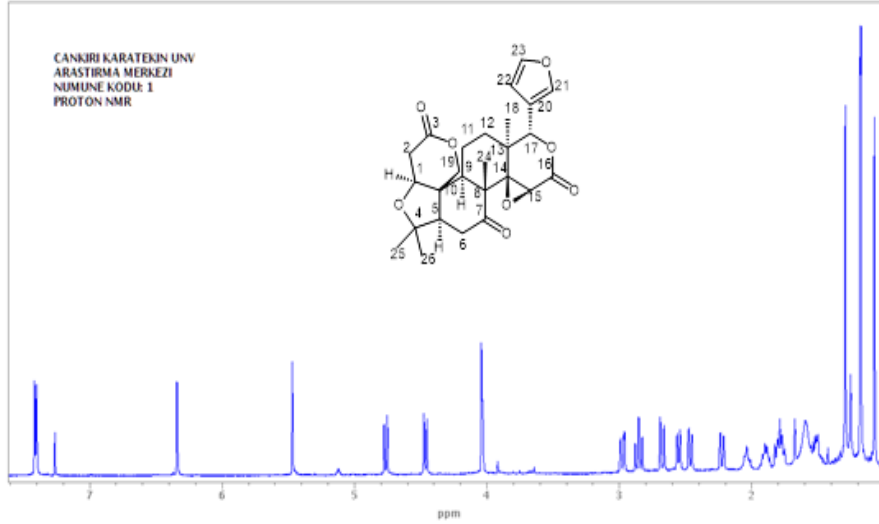
Şekil 4. 2. Limonin'in moleküler yapısı

C^{13} NMR spektrumunda keton yapısı olduğuna dair 7. karbondan 206 ppm gibi bir düşük alanda sinyal gözlemlendi (Şekil 4.3), bu sinyalle etkileşen 6 numaralı karbondan bağlı diastrotopik protonların varlığı (2,85-2,46 ppm) HSQC spektrumlarından tespit edildi (Şekil 4.4).

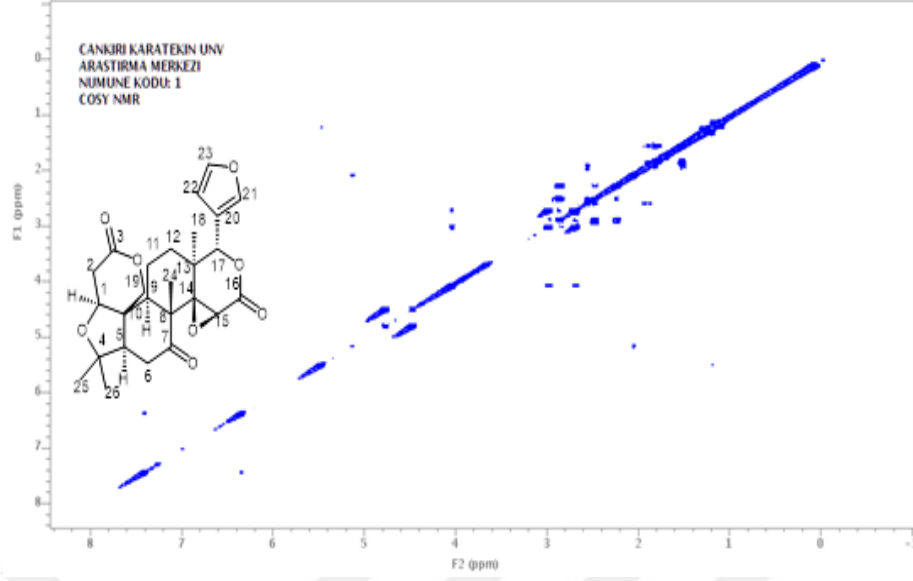


Şekil 4. 3 Limonin bileşiğine ait C¹³ NMR spektrumu

5 nolu karbona bağlı H (2,20 ppm) ile bu diastereotopik protonların etkileşimleri COSY spektrumunda belirlendi (Şekil 4.5).

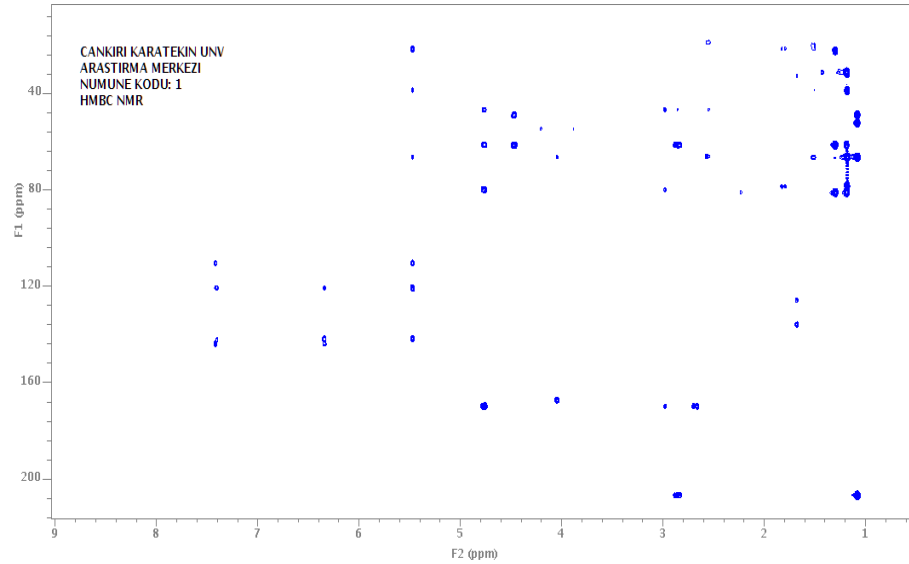


Şekil 4. 4 Limonin bileşiğine ait H¹-NMR spektrumu



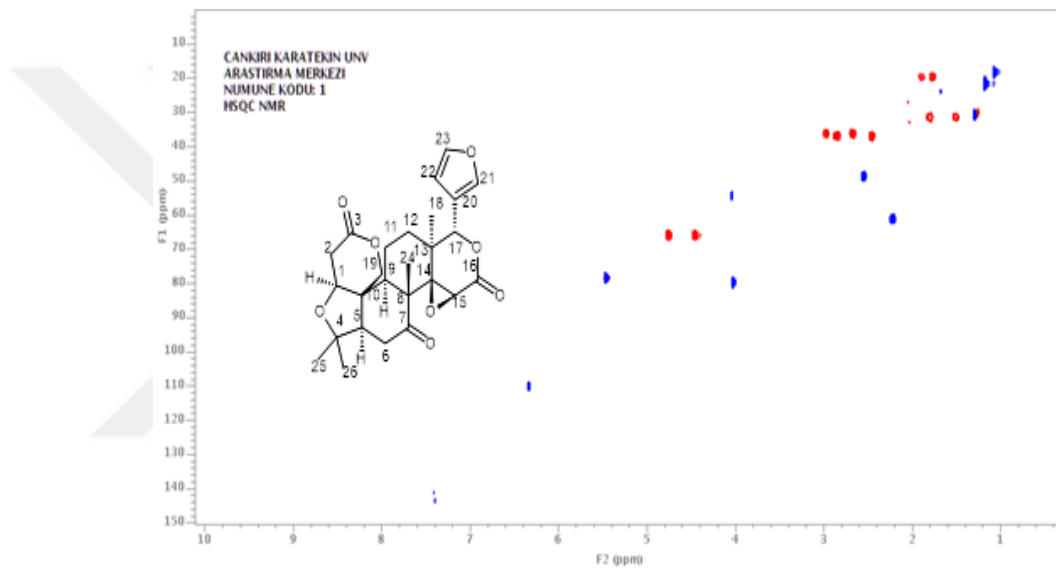
Şekil 4. 5 Limonin bileşiğine ait COSY NMR spektrumu

4 nolu karbon (80 ppm) ile 5 nolu karbona bağlı protonların etkileşimi HMBC spektrumun da belirlendi (Şekil 4.6). 25 ve 26 nolu metil gruplarının 4 nolu karbonla etkileştiği HMBC kullanılarak bulundu. 24 nolu karbondaki metil grubu (1,07 ppm) ile 7 nolu karbondaki karbonil grubunu etkileşimi HMBC den tespit edildi.



Şekil 4. 6 Limonin bileşiğine ait HMBC spektrumu

11 ve 12 numaralı CH₂ diastrotopik gruplarının varlığı ve birbirleriyle etkileşimleri COSY kullanılarak belirlendi (Şekil 4.5). 9, 11, 12, nolu karbonların ve bağlı protonların etkileşimleri ve sıralı oldukları HMBC spektrumunda tespit edildi. 1 ve 2 nolu karbonlardaki protonların 3 nolu karbonla (169 ppm) etkileşimleri HMBC spektrumunda tespit edildi. 3 nolu karbondaki karbonil grubunun 4,75 ppm deki protonla etkileştiği HMBC den tespit edildi ve bu protonun diastrotopik bir proton olduğu HSQC spektrumu kullanılarak belirlendi.



Şekil 4. 7 Limonin bileşiğine ait HSQC NMR spektrumu

Elde edilen HMBC verileri ve kayma değerleri ile 1-19 nolu karbonlar arasında bir lakton halkasının olduğu kesinleştirildi. Bu halkanın HMBC de uzak etkileşmeler yaparak 206 ppm deki karbonil grubu halkasına bağlı olduğu belirlendi. Spektrumlardaki diğer karbonil grubunun (16 nolu karbon) 4,04 ppm deki protonla etkileşimi HMBC de gözlemlendi ve kayma değerlerinden yola çıkılarak ikinci bir lakton halkasının varlığı HMBC etkileşimleri ile doğrulandı. 20, 21, 22 ve 23 nolu karbonların aromatik bölgede yer alması ve aralarındaki HMBC etkileşmelerinin belirlenmesi, yapıda bir furan olduğunu gösterdi, bu furan halkasının 17 nolu karbona bağlı olduğu HMBC spektrumlarından tespit edilerek molekül yapısı teyit edildi. Bileşenin daha önce

limon kabuğundan izole edilmiş bir limonoid türevi olduğu belirlendi. Yapılan literatür taraması ve tahmini değerler veren çizim programlarından edinilen veriler bileşenin limonin olduğunu doğruladı (Min et al. 2007).

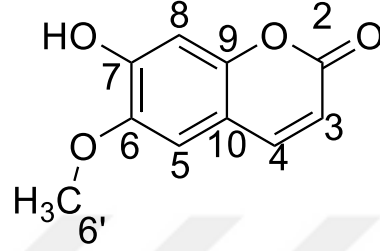
Limonin molekülüne ait C^{13} ve H^1 -NMR değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4. 1 Limonin molekülünün C^{13} ve H^1 NMR değerleri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
1	CH	4,02	79
2	CH ₂	2,97-2,65	35
3	C		169
4	C		80
5	CH	2,20	60,86
6	CH ₂	2,85-2,46	36
7	C		206
8	C		51
9	CH	2,53	48
10	C		46
11	CH ₂	1,49-1,79	30
12	CH ₂	1,79-1,89	19,2
13	C		38,3
14	C		65
15	C	4,04	53
16	C		166
17	CH	5,46	78
18	CH ₃	1,19	21,17
19	CH ₂	4,45-4,75	65,78
20	C		120
21	CH	7,39	140
22	CH	6,33	110,15
23	CH	7,41	143
24	CH ₃	1,07	18,09
25-26	CH ₃	1,3	30

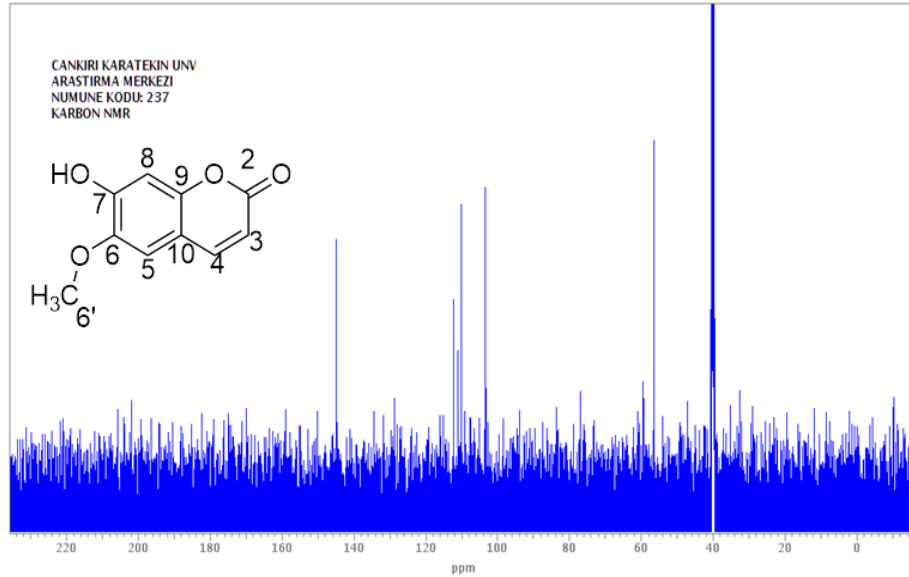
4.1.2. Skopoletin bileşiğinin NMR spektrumları

Scopoletin bileşiği sefadex 2-3-7. fr kristallendirilerek saflaştırıldı, DMSO çözücüsünde çözülerek NMR spektrumları alınarak kimyasal yapısı aydınlatıldı (Şekil 4.89).



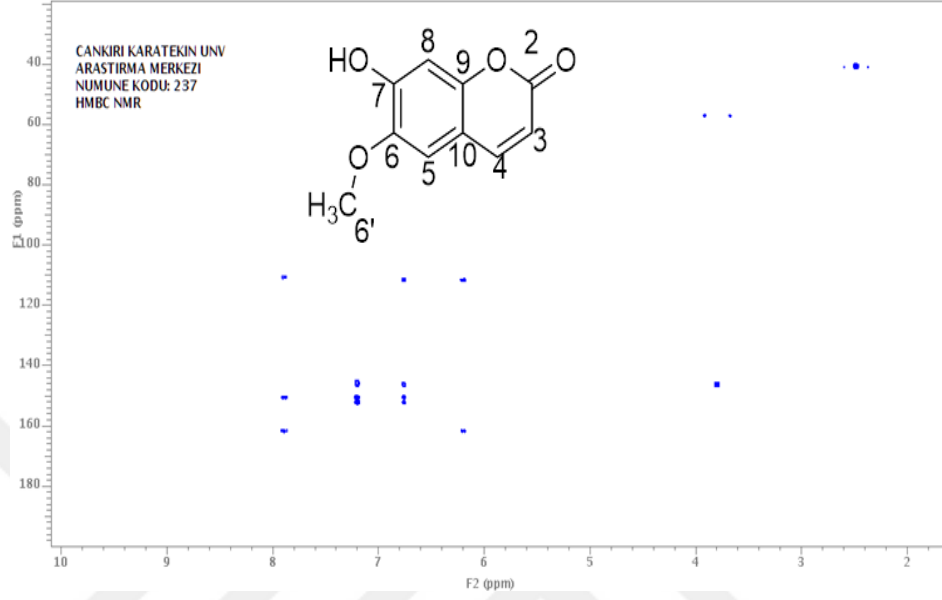
Şekil 4. 8 Skopoletin bileşiğinin kimyasal formülü

C^{13} NMR spektrumunda gözlenen 161 ppm değerli 2 nolu karbon yapıda bir karbonil grubunun olduğunu gösterdi (Şekil 4.9).

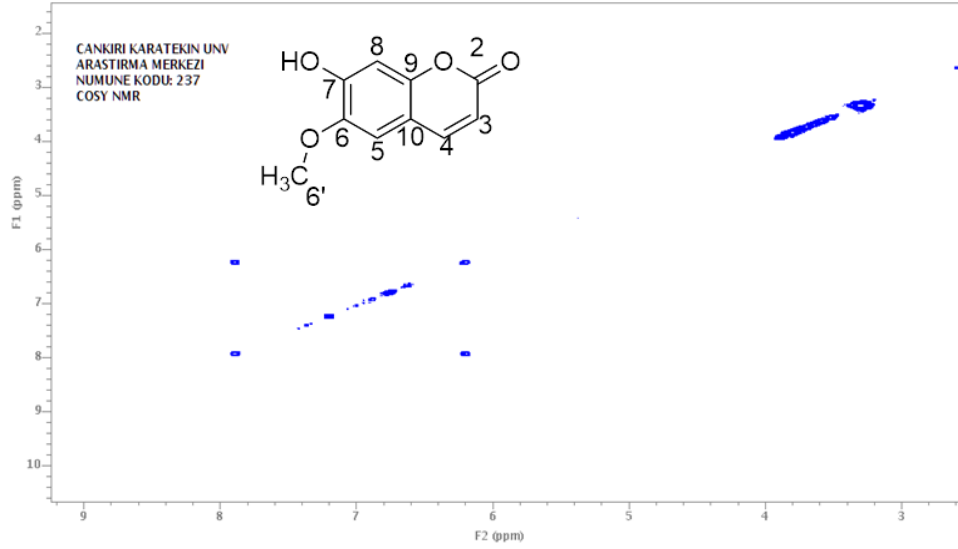


Şekil 4. 9 Skopoletin C^{13} NMR spektrumu

Yapıda HMBC ve COSY etkileşmelerinden bir lakton halkası olduğu tespit edildi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.10).

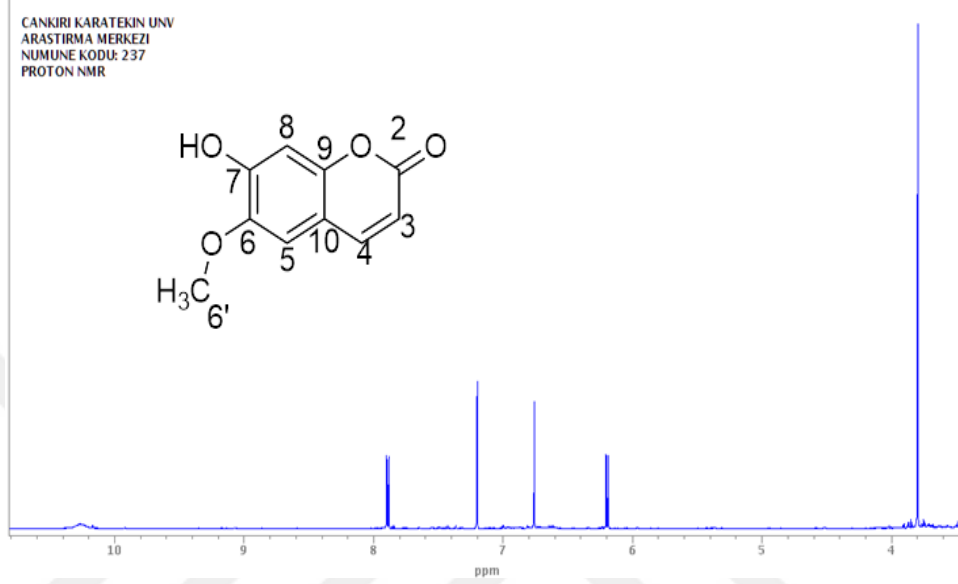


Şekil 4. 10 Skopoletin HMBC NMR spektrumu



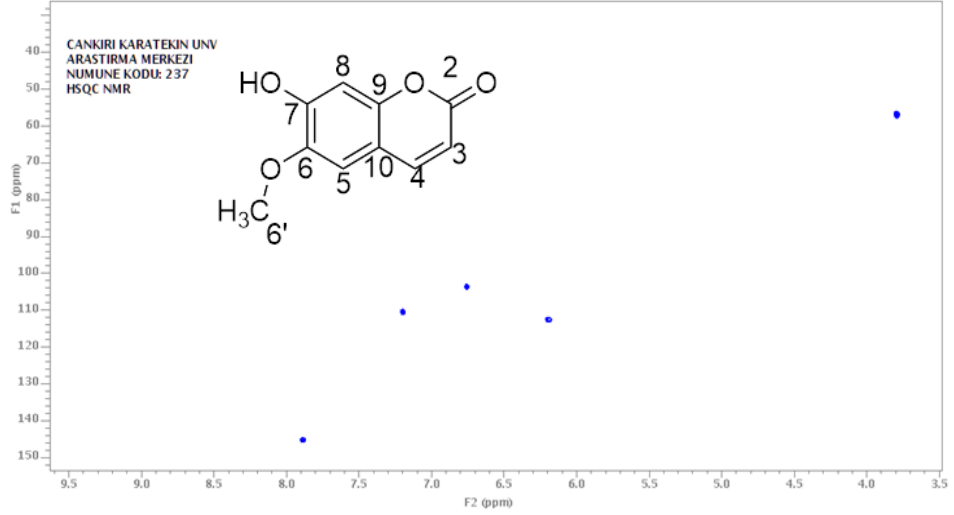
Şekil 4. 11 Skopoletin COSY NMR spektrumu

Başka COSY etkileşmesi olmaması H^1 NMR spektrumundaki yarılmalar iki aromatik proton atomunun (8 ve 5 nolu karbonlara bağlı) (Şekl 4.12) aromatik halkada para konumda olduklarını gösterdi.



Şekil 4. 12 Skopoletin H^1 -NMR spektrumu

4 nolu karbona bağlı protonun 10 nolu karbonla etkileşimi HMBC de belirlendi (Şekil 4.10). 145 ve 149 ppm deki 6 ve 7 nolu quarterner karbonları benzen halkasına elektron çekici grupların bağlı olduğunu göstermektedir. Bu grupların metoksi ve -OH grupları olduğu HMBC ve HSQC verilerinden tespit edilmiş ve konumları etkileşimlerinden yararlanılarak belirlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4. 13 Skopoletin HSQC NMR spektrumu

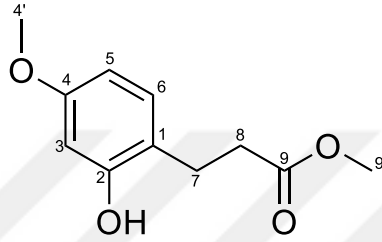
Literatür taraması ve tahmini program çizimleri yapıyı doğrulamaktadır. Yapının daha önce de limon kabuklarından izole edilen bir kumarin türevidir olan skopoletin olduğu belirlenmiştir (Tsukamoto et al. 1985). Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri tabloda verilmiştir (Tablo 4.3).

Tablo 4. 2 Scopoletin bileşiğine ait H^1 ve C^{13} NMR verileri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
2	C		161
3	CH	6,19	112
4	CH	7,89	144
5	CH	7,19	109,98
6	C		149,9
7	C		145
8	CH	6,75	103,16
9	C		151
10	C		110,7
6'	CH ₃	3,79	56

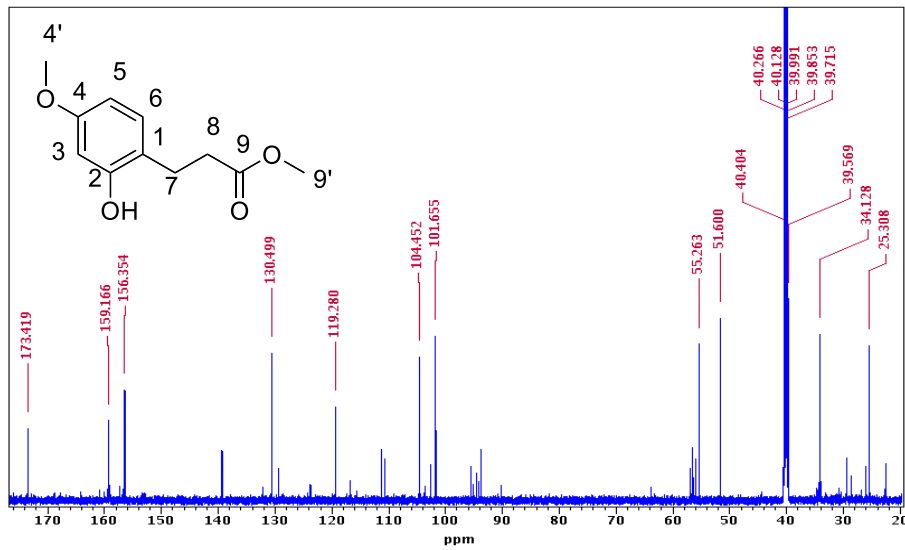
4.1.3. 4-metoksi 2-hidroksi benzeno propanoik asit metil ester bileşiminin NMR spektrumları

4-metoksi 2- hidroksi benzenopropanoik asit metil ester türevi sefadex 1-2-1. fraksiyonundan kristallendirilerek saflaştırıldı (Şekil 4.14).



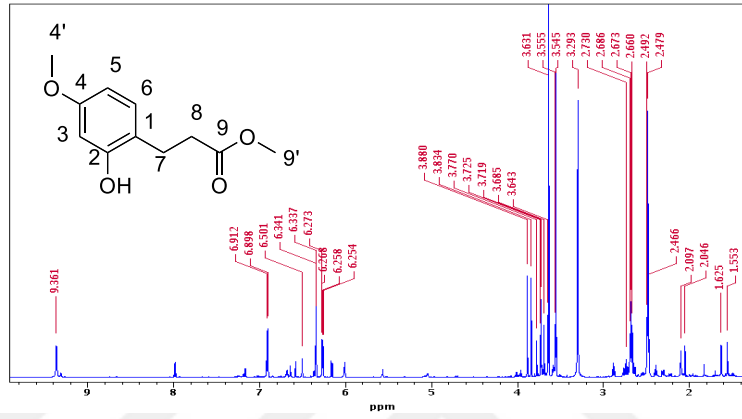
Şekil 4. 14 4-metoksi 2- hidroksi benzenopropanoik asit metil ester bileşiminin molekül yapısı

C^{13} NMR spektrumunda belirlenen 176 ppm lik sinyaller yapıda karbonil grubunun varlığını göstermektedir (Şekil 4.15).

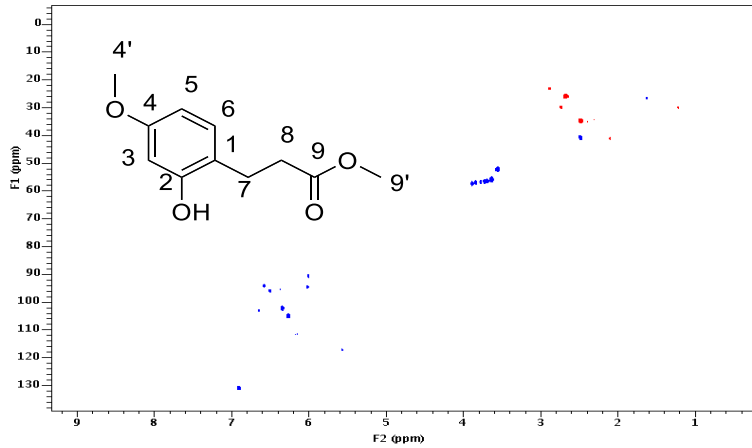


Şekil 4. 15 4-metoksi 2-hidroksi benzenopropanoik asit metil ester C^{13} NMR spektrumu

C^{13} NMR spektrumundan belirlenen karbonile konşu iki CH_2 grubu (8 ve 7 nolu karbonlara bağlı protonlar) 2,66 ve 2,82 ppm de H sinyalleri vermektedir (Şekil 4.16). Bu H sinyallerinin CH_2 olduğu HSQC NMR spektrumundan belirlenmiştir (Şekil 4.17).

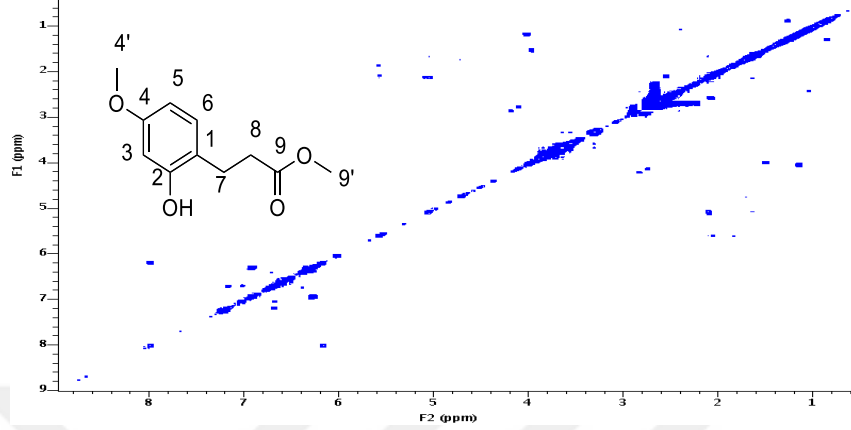


Şekil 4. 16 4-metoksi 2- hidroksi benzenopropanoik asit metil ester H^1 -NMR spektrumu



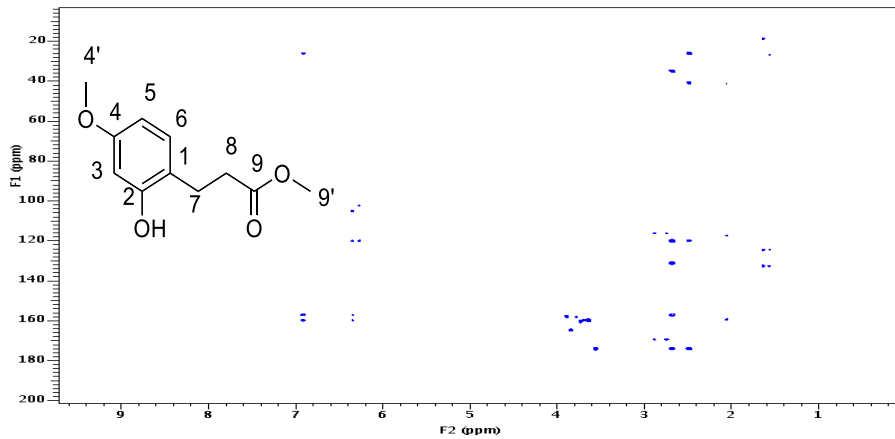
Şekil 4. 17 4-metoksi 2-hidroksi benzenopropanoik asit metil ester HSQC-NMR spektrumu

Bu iki CH₂ grubunun etkileşimi H¹ ve COSY NMR spektrumlarından tespit edilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4. 18 4-metoksi 2-hidroksi benzenopropanoik asit metil ester COSY NMR spektrumu

Aromatik bölgedeki H¹ sinyalleri ve C¹³ spektrumunda gözlenen 159,51 ve 155,09 ppm deki sinyaller aromatik halkaya iki grubun bağlı olduğunu desteklemektedir, bu grupların birinin metoksi olduğu H ve HMBC spektrumlarından belirlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4. 19 4-metoksi 2-hidroksi benzenopropanoik asit metil ester HMBC NMR spektrumu

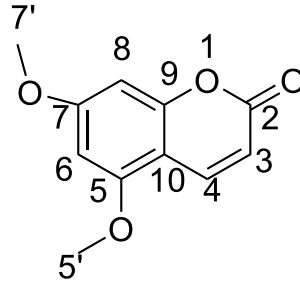
Diğer metoksi grubunun ester olduğu HMBC etkileşimleriyle gösterilmiş, yapının doğruluğu tahmini program çizimi ile bileşiğin daha önce başka bitki türlerinden izole edilen 4-metoksi 2-hidroksi benzenopropanoik asit metil ester olduğu belirlendi. Bileşiğin limondan izole edildiğine dair literatürde bir çalışmaya rastlanmadı. Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.4).

Tablo 4. 3 4-metoksi 2- hidroksi benzenopropanoik asit metil ester ait H^1 ve C^{13} -NMR verileri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
1	C		119
2	C		155,09
3	CH	6,45	103,03
4	C		159,51
5	CH	6,41	106,78
6	CH	6,96	131,07
7	CH ₂	2,82	28,34
8	CH ₂	2,66	35,06
9	C		176
9'	CH ₃	3,67	52,9
4'	CH ₃	3,73	55,41

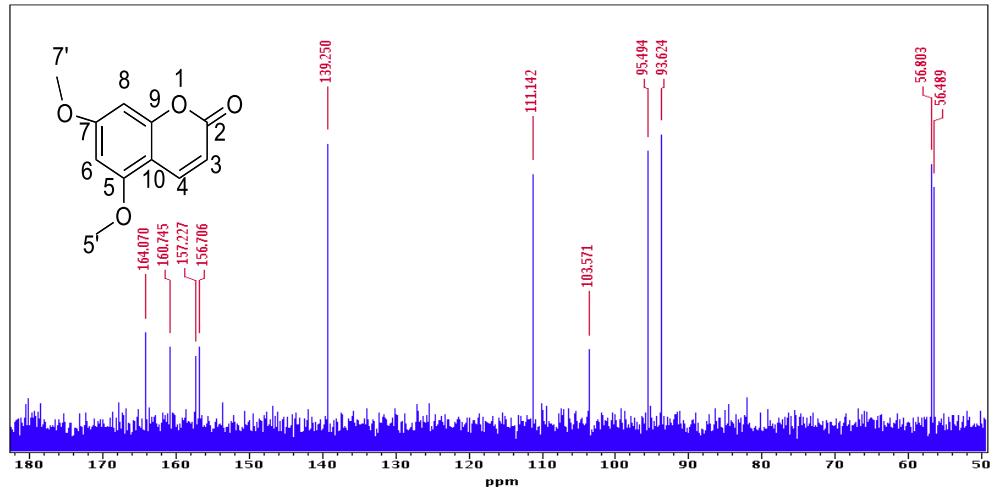
4.1.4. Sitropten bileşeninin NMR spektrumları

Sitropten bileşiği sefadex 2-2-3. ve silika 1. Fraksiyondan izole edildi (Şekil 4.20).

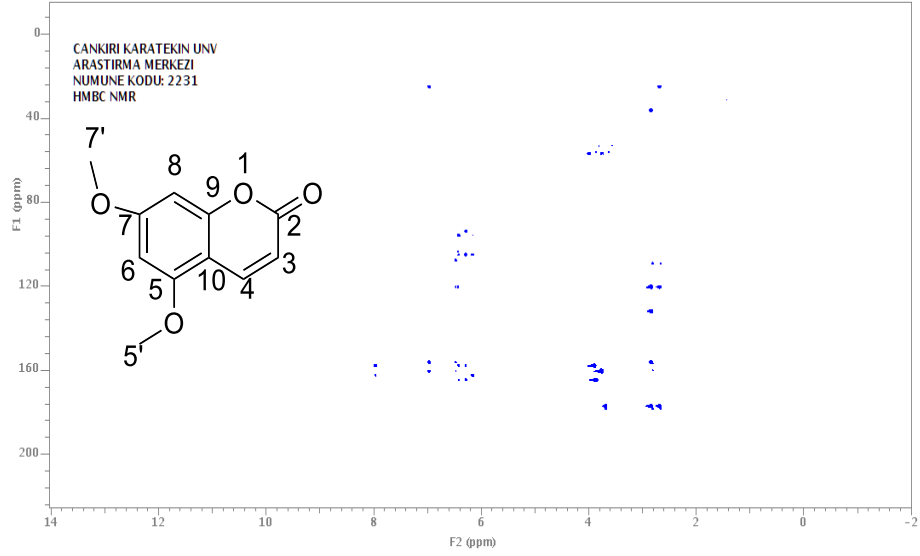


Şekil 4. 20 Sitropten bileşiğinin kimyasal formülü

C^{13} NMR spektrumunda (Şekil 4.21) belirlenen 2 nolu karbonil karbonu (161 ppm) ile 3 ve 4 nolu karbonlara bağlı protonlar arasındaki HMBC etkileşimleri (Şekil 4.22) yapıda bir lakton grubu olduğunu göstermiştir.

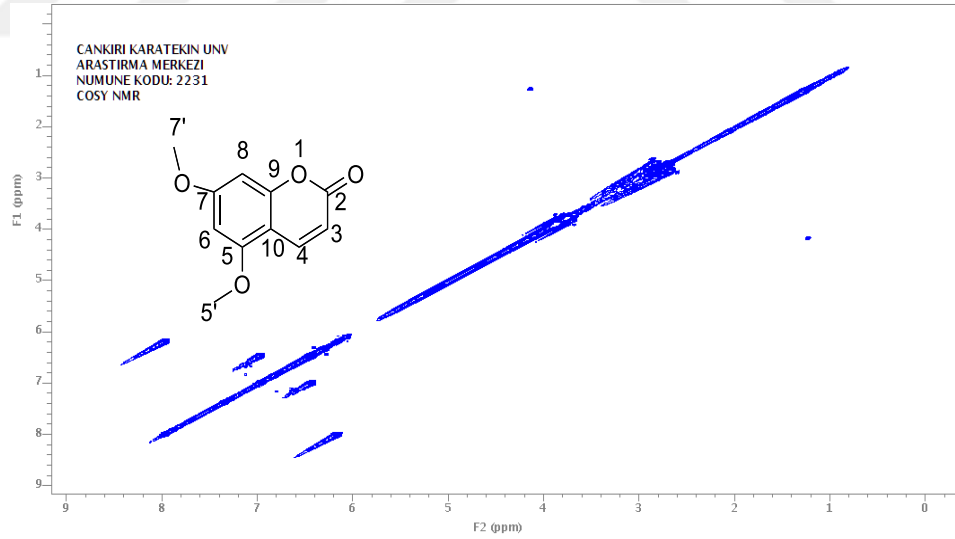


Şekil 4. 21 Sitropten bileşiğinin C^{13} NMR spektrumu



Şekil 4. 22 Sitropten bileşiğinin HMBC NMR spektrumu

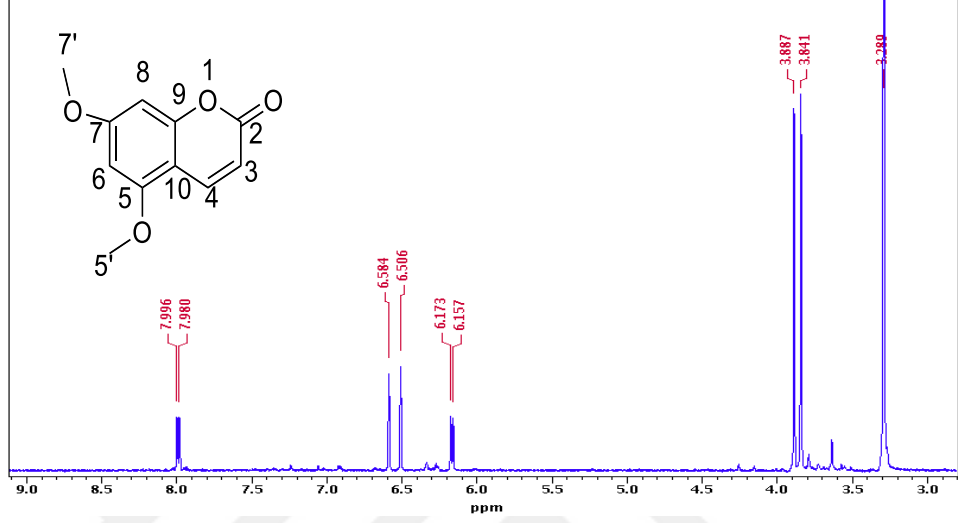
3 ve 4 nolu karbona bağlı protonların etkileşimi COSY de belirlendi (Şekil 4.23).



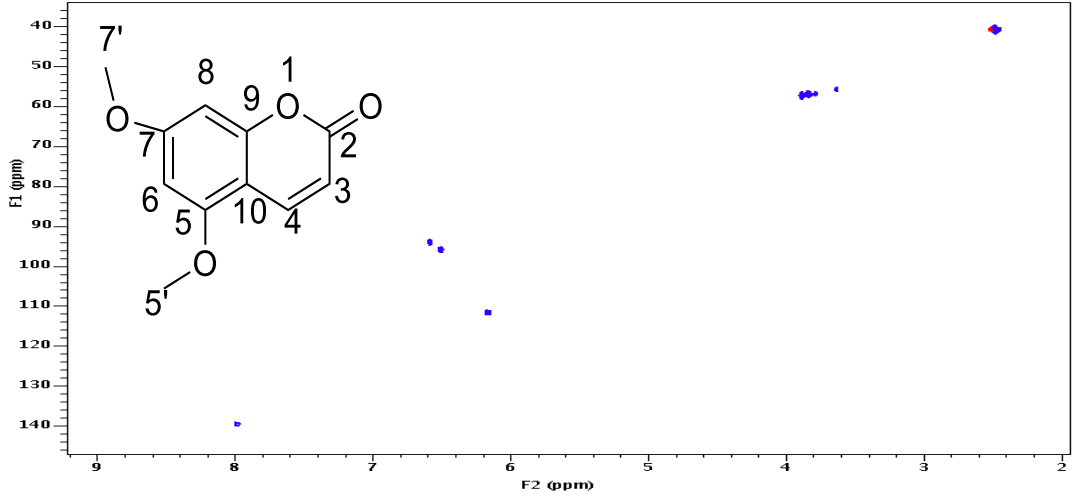
Şekil 4. 23 Sitropten bileşiğinin COSY NMR spektrumu

Bu protonların 9, 10, ve 5 nolu karbonlarla etkileşimi HMBC spektrumundan belirlendi. 7 ve 5 nolu quarterner karbonların varlığı HSQC de belirlendi (Şekil 4.25) ve aşağı

alana kaymaları H^1 -NMR (Şekil 4.24) spektrumundan tespit edilen 7' ve 5' nolu metoksi gruplarının etkileşimi HMBC de belirlenerek aromatik halkaya bağlı metoksi grupları olduğu tespit edildi.



Şekil 4. 24 Sitropten bileşiğinin H^1 -NMR spektrumu



Şekil 4. 25 Sitropten bileşiğinin HSQC NMR spektrumu

Bu durumda yapının daha önce limon kabuğunda izole edilmiş bir kumarin türevi olan sitropten olduğu belirlenmiş ve molekülün doğruluğu literatür taraması ile doğrulanmıştır(de Menezes et al. 2014).

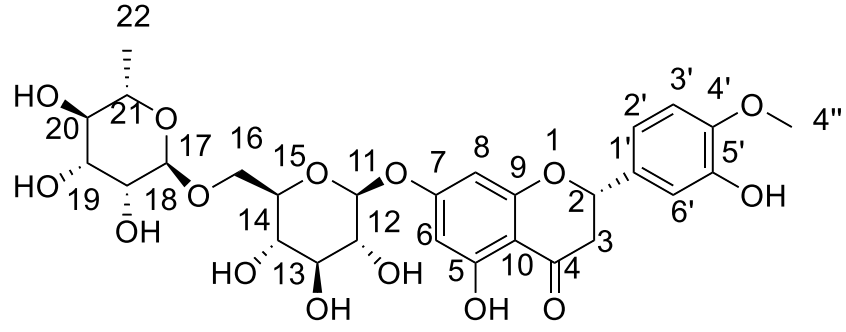
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.5).

Tablo 4. 4 Sitropten bileşiğine ait H^1 ve C^{13} NMR değerleri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
2	C		161,63
3	CH	6,13	110,81
4	CH	7,94	138,79
5	C		157,03
6	CH	6,26	94
7	C		163
8	CH	6,39	92,94
9	C		156,91
10	C		104,07
5'	CH ₃	3,87	55,87
7'	CH ₃	3,83	55,72

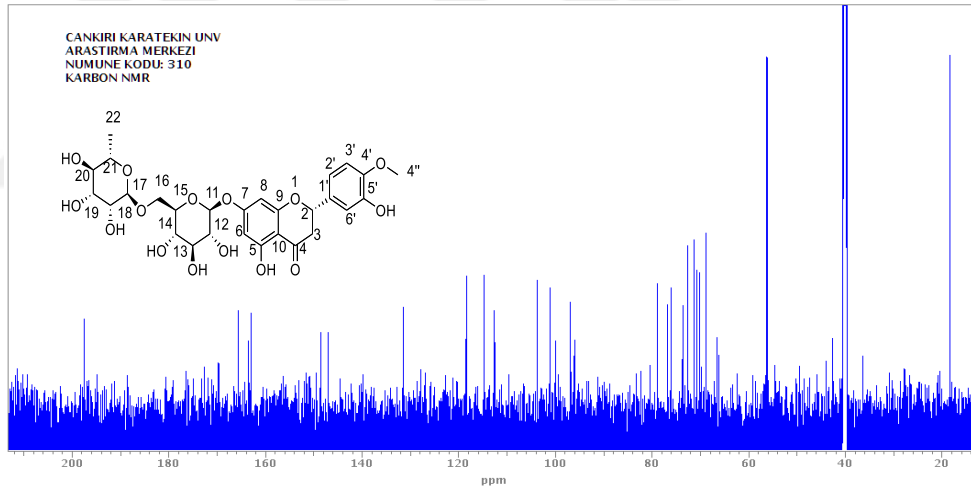
4.1.5. Hesperidin bileşiğinin NMR spektrumları

Hesperidin bileşiği sefadex 3-10. fr dan kristallendirilerek saflaştırıldı. Yüksek saflıkta izole edilen molekülün yapısı DMSO çözücüsünde NMR spektrumları alınarak belirlendi (Şekil 4.26).



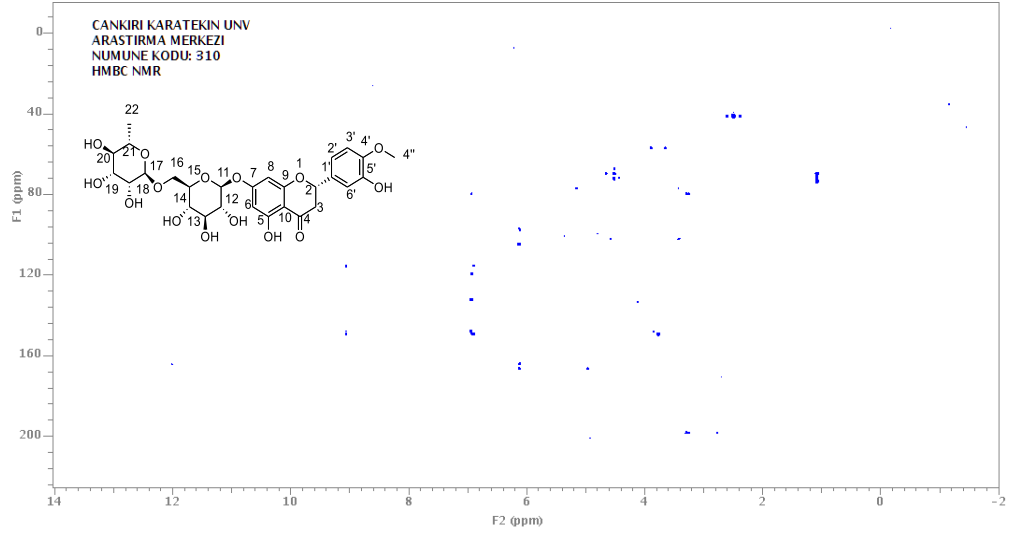
Şekil 4. 26 Hesperidin bileşiğinin kimyasal formülü

Hesperidin bileşiğinin yapısı C^{13} NMR da gözlenen 197 ppm deki 4 nolu karbon yapıda bir karbonil grubunun varlığını göstermektedir (Şekil 4.27).

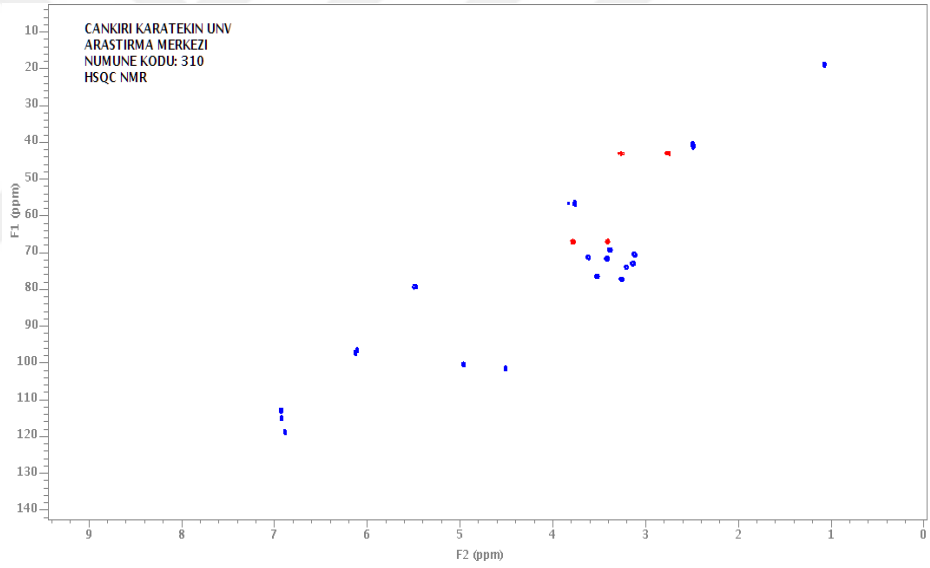


Şekil 4. 27 Hesperidin bileşiğinin C^{13} NMR spektrumu

Bu karbonil grubuyla etkileşen 3 nolu diastrotopik $-CH_2$ protonlarının varlığı HMBC (Şekil 4.28) ve HSQC kullanılarak belirlendi (Şekil 4.29).

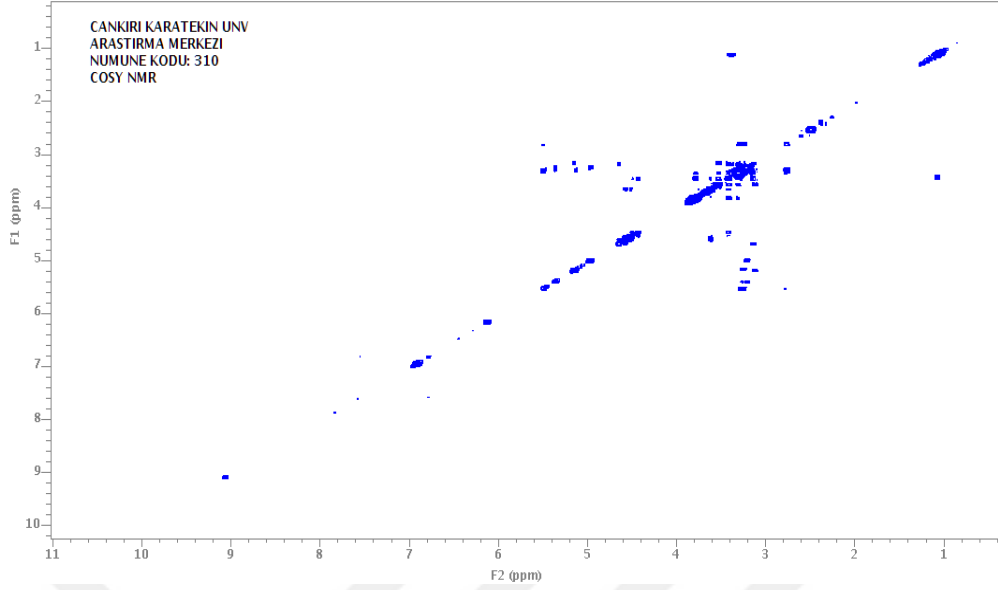


Şekil 4. 28 Hesperidin bileşiğinin HMBC NMR spektrumu



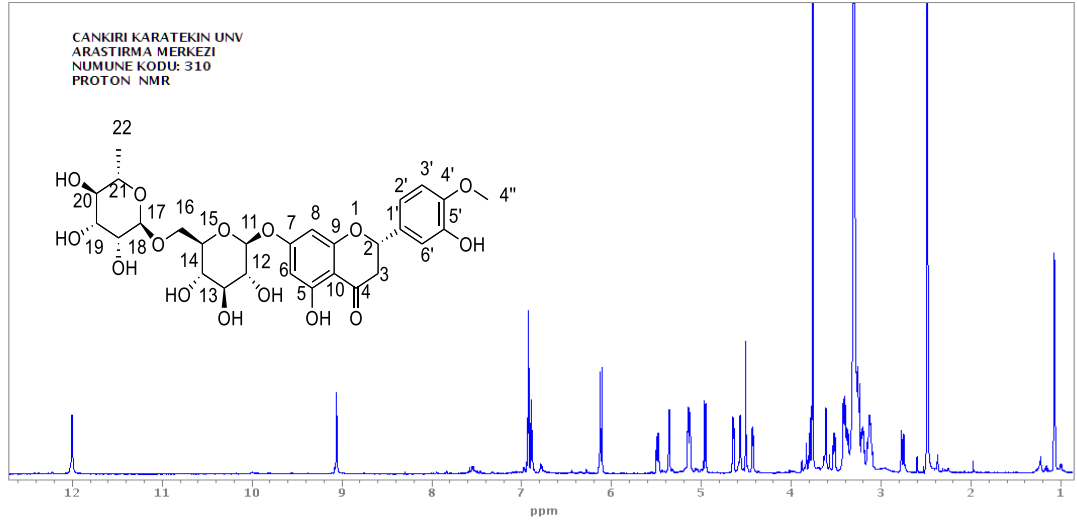
Şekil 4. 29 Hesperidin bileşiğinin HSQC NMR spektrumu

2 ve 3 nolu karbonlara bağlı protonların etkileşimleri COSY spektrumundan (Şekil 4.30) belirlenmiştir.



Şekil 4. 30 Hesperidin bileşiğinin COSY NMR spektrumu

2 nolu karbona bağlı 5,48 ppm deki protonun HMBC de 1'6' ve 2' karbonlarıyla etkileştikleri tespit edilerek halkaların bağlı oldukları teyit edildi. 2' ve 3' nolu karbonlara bağlı protonların etileşimleri COSY NMR spektrumu kullanılarak tespit edildi. H¹- NMR spektrumunda (Şekil 4.13) gözlenen 3,75 ppm deki metoksi grubunun 4' karbonuna bağlı olduğu HMBC de belirlenerek yapıdaki B halkası oluşturuldu.



Şekil 4. 31 Hesperidin bileşiğine ait H^1 -NMR spektrumu

5' nolu karbonun etkileşimlerinin yalnız aromatik protonlarla olması bu quaterner karbonun 146 ppm deki kayma değeri 5' karbonuna bir elektron çekici grup olan OH grubunun bağlı olduğunu göstermektedir. 12 ppm de H^1 -NMR spektrumunda gözlemlenen sinyal bir karbonil OH etkileşiminin var olduğuna işaret eder. Bu durumda yapıda var olan 197 ppm değerli 4 nolu karbon atomu ile bu OH grubu etkileşmektedir. 5 nolu karbonun 163 ppm e kayması bu OH grubunun 5 nolu karbona bağlı olduğunun delilidir. Bu durum yapının bir flavanoit olduğunu göstermektedir. 11 nolu anomerik karbonun C^{13} -NMR daki 100,07 ppm değeri birden fazla elektronegatif oksijene bağlı olduğunu göstermektedir. 2 ve 4 ppm H^1 -NMR arasındaki yoğun çoklu pikler yapıda bir glikozit olduğunu göstermektedir. 16 nolu karbondaki diastrotopik protonlar yapıda bağlı iki glikozit grubunun varlığına işaret etmektedir. HMBC ve COSY etkileşimleri şeker grubun varlığını desteklemektedir. Bu durumda bileşiğin yapısının bir glikozitli flavon olan hesperidin olduğu tespit edildi. Literatür taramasında NMR verileri doğrulandı ve hesperidin limon ve diğer narenciye türlerinde bulunan ortak bir bileşen olduğu belirlendi (Matsubara et al. 1985).

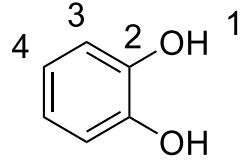
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4. 6).

Tablo 4. 5 Hesperidin bileşine ait H¹ ve C¹³-NMR değerleri

NO	DEPT	H ¹	C ¹³
2	CH	5,48	78,96
3	CH ₂	3,22-2,77	42,53
4	C		197
5	C		163
6	CH	6,10	95,96
7	C		165
8	CH	6,12	96,88
9	C		161
10	C		104
1'	C		131
2'	CH	6,88	118,42
3'	CH	6,83	112,68
4'	C		148,47
5'	C		146,03
6'	CH	6,91	114,65
4''	CH ₃	3,75	56,21
11	CH	4,95	100,07
12	CH	3,20	73,44
13	CH	3,52	76,34
14	CH	3,11	70,03
15	CH	3,24	76,68
16	CH ₂	3,78-3,40	66,80
17	CH	4,50	101,07
18	CH	3,41	71,25
19	CH		68,85
20	CH	3,13	72,50
21	CH	3,37	68,77
22	CH ₃	1,06	18,50

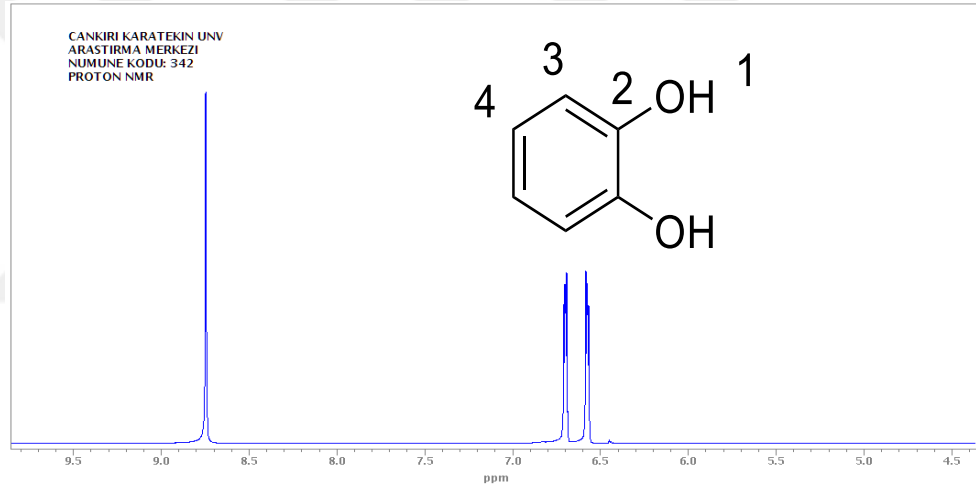
4.1.6. Kateşol bileşinin NMR spektrumları

Kateşol bileşeni sefadex 3-4-2. fraksiyondan yüksek saflıkta izole edildi ve yapısı DMSO çözücüsü ile alınan NMR spektrumları kullanılarak belirlendi. Yapıdaki simetriden yararlanılarak H¹-NMR üzerinden yapı çözüldü (Şekil 4.32).

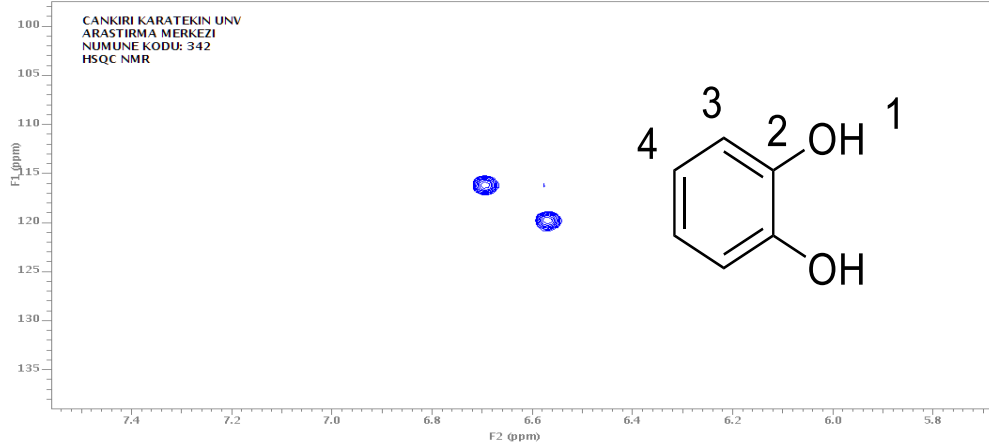


Şekil 4. 32 Kateşol bileşğinin kimyasal formülü

H^1 -NMR da (Şekil 4.33) gözlemlenen 3 sinyalden 8,75 ppm değerine sahip olan protonun HSQC de bir karbon atomuna bağı olmadığı belirlenmiştir (Şekil 4.34).

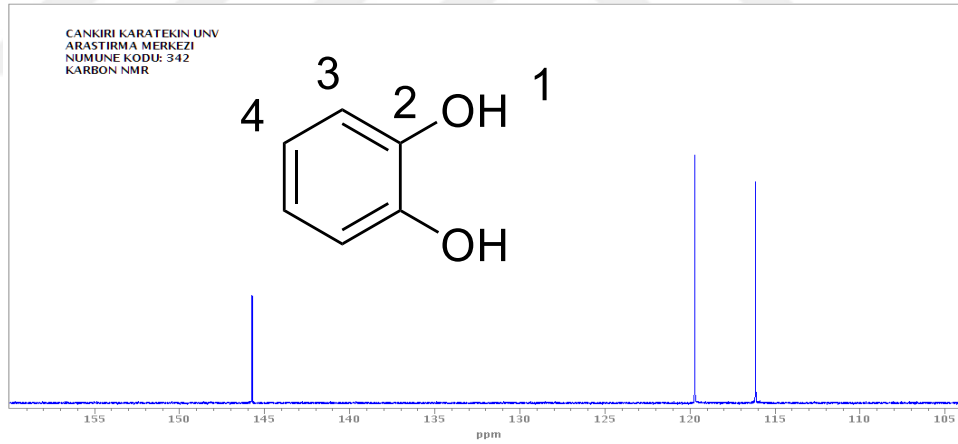


Şekil 4. 33 Kateşol H^1 -NMR spektrumu



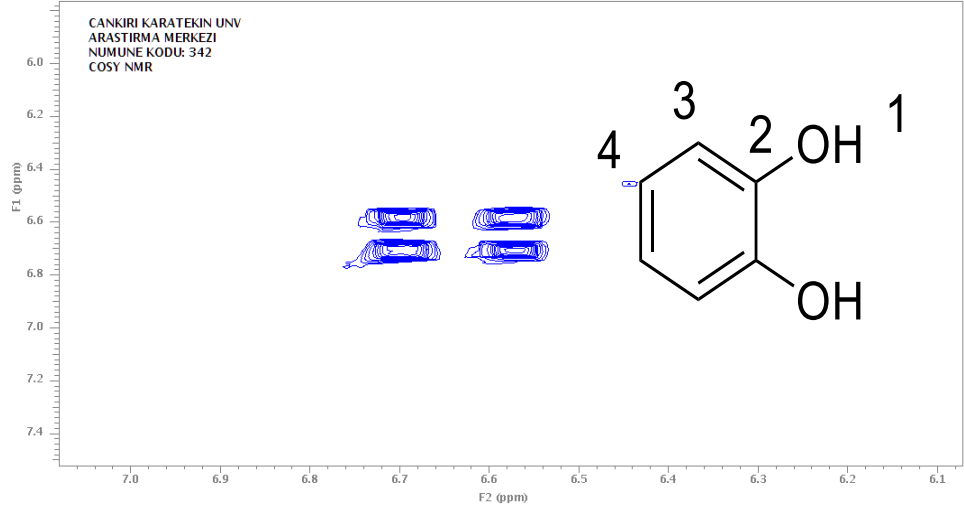
Şekil 4. 34 Kateşol HSQC NMR spektrumu

Diğer iki protonun aromatik bölgede ve C^{13} NMR 3 sinyal gözlenmesi yapının simetrik benzen halkası içerdiğini göstermektedir (Şekil4.35).

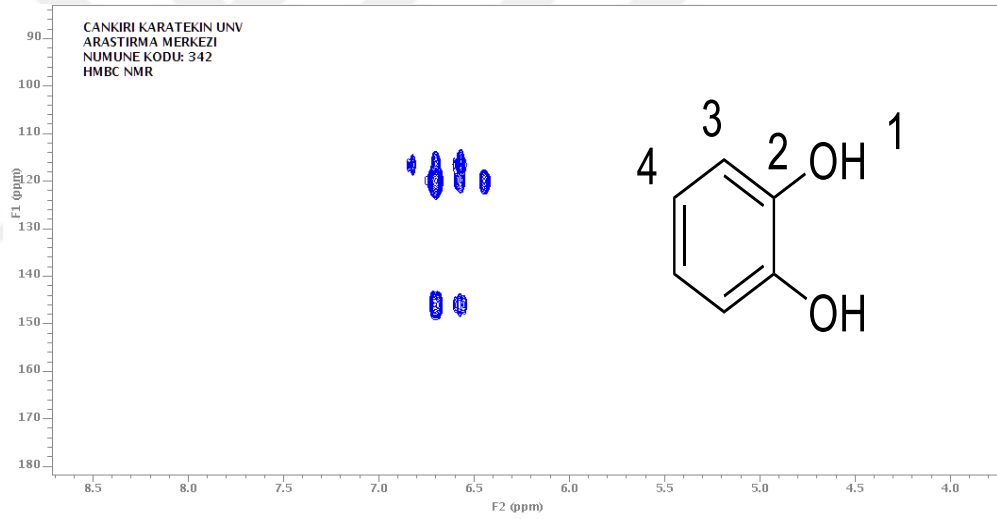


Şekil 4. 35 Kateşol C^{13} NMR spektrumu

Bu durumda yapıda bir simetrinin varlığı gösterilmiş olup protonlara ait COSY etkileşimlerinden komşu oldukları belirlenmiş (Şekil 4.36) ve molekül yapısı HMBC NMR spektrumundan doğrulandı (Şekil 4.37).



Şekil 4. 36 Kateşol COSY NMR spektrumu



Şekil 4. 37 Kateşol HMBC NMR spektrumu

Literatür taramasında yapının limonda bulunan bir fenol türevidir olan kateşol olduğunu doğrulamaktadır (Jang et al. 1991).

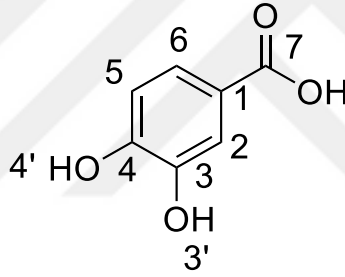
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.6 Kateşol bileşğine ait H¹ ve C¹³-NMR değerleri

NO	DEPT	H ¹	C ¹³
1		8,74	
2	C		145
3	CH	6,69	116,12
4	CH	6,57	119,66

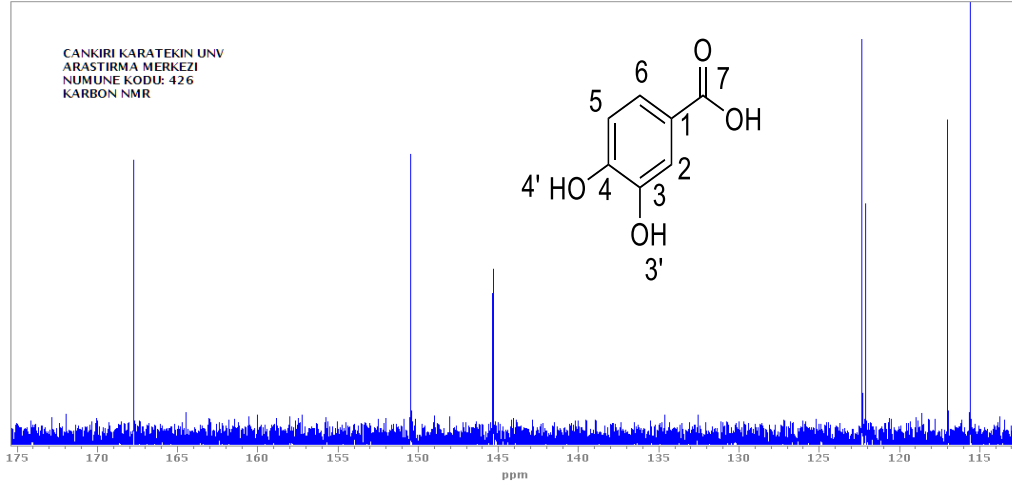
4.1.7. Protokateşik asit bileşğinin NMR spektrumları

Protokateşik asit bileşği sefadex 4-2-6. fraksiyondan saflaştırılarak izole edildi ve yapısı DMSO çözücünde alınan NMR spektrumları kullanılarak belirlendi (Şekil 4.38).



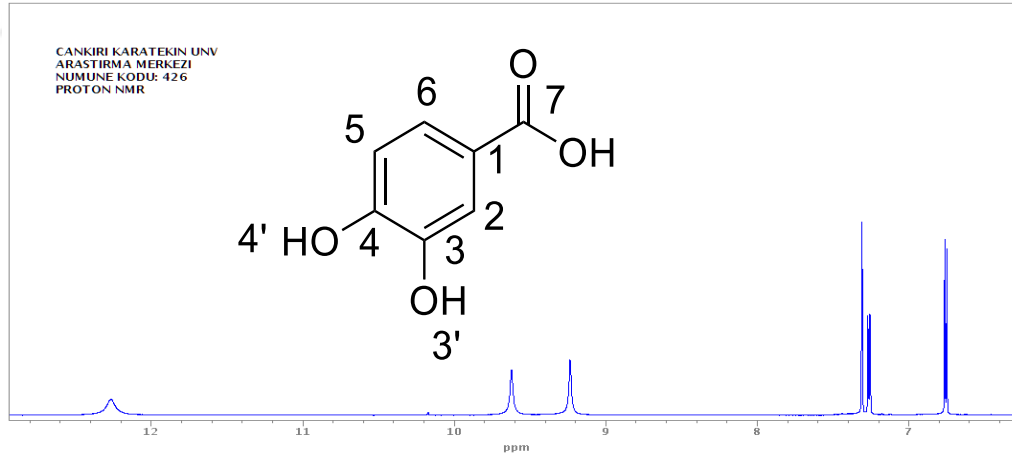
Şekil 4.38 Protokateşik asit bileşğinin kimyasal formülü

C¹³ NMR spektrumunda (Şekil 4.39) 167,87 de alınan sinyal yapıdaki bir karbonil grubunun varlığını desteklemektedir.



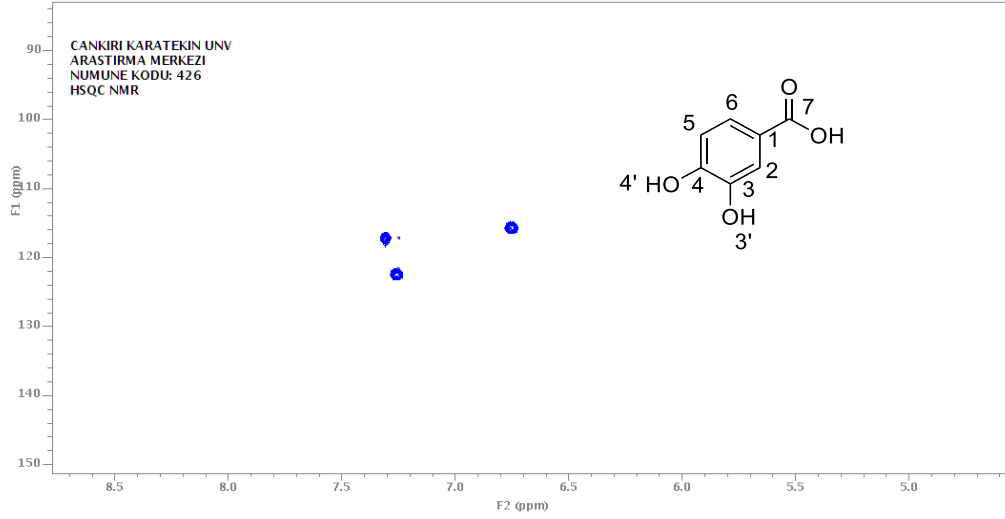
Şekil 4. 39 Protokateşik asit C^{13} NMR spektrumu

Diğer karbon değerlerinin aromatik bölgede olması ve H^1 -NMR (Şekil 4.40) da gözlenen 12 ppm üstündeki H sinyali yapının bir fenolik asit olduğunu göstermektedir.



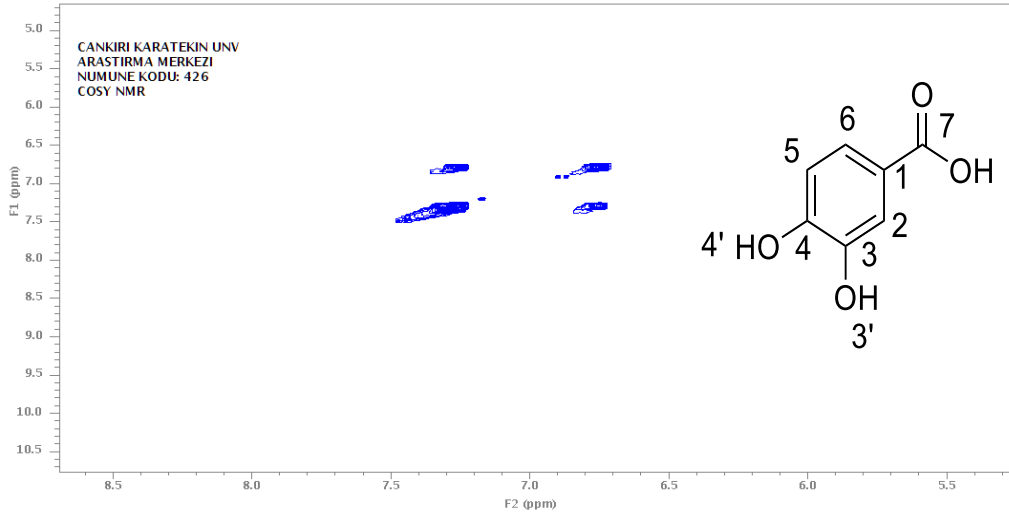
Şekil 4. 40 Protokateşik asit H^1 -NMR spektrumu

9,24 ve 9,63 ppm deki H sinyallerinin HSQC (Şekil 4.41) de karbona atomuna bağlı olmadığı tespit edildiğinden yapıda OH gruplarının varlığı belirlendi.



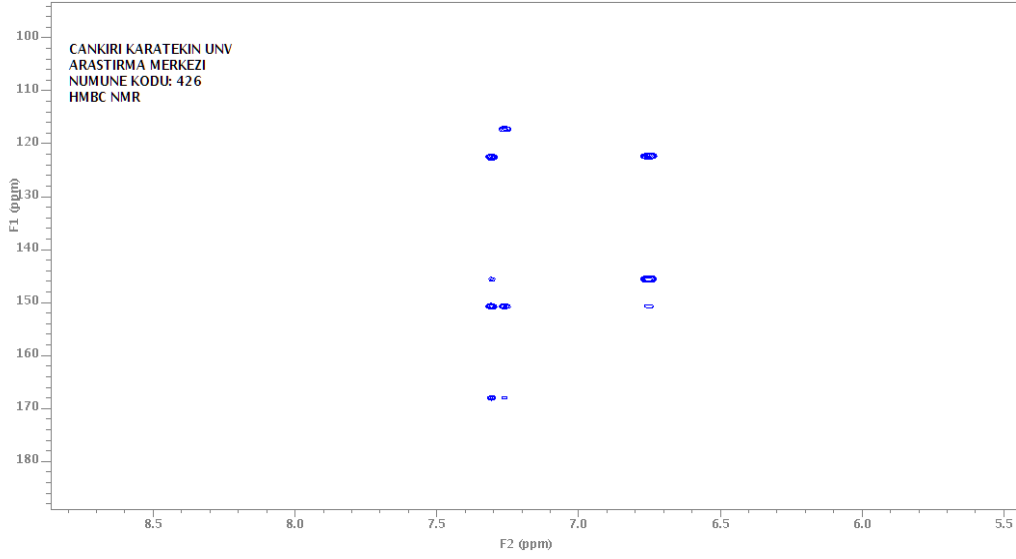
Şekil 4. 41 Protokateşik asit HSQC NMR spektrumu

5 ve 6 nolu karbonlara bağlı protonların COSY etkileşimleri aromatik halkada komşu olduklarını gösterdi (Şekil 4.42).



Şekil 4. 42 Protokateşik asit COSY NMR spektrumu

Aromatik bölge karbonlarının HMBC etkileşimleri tespit edilerek yapıdaki OH gruplarının konumları belirlendi (Şekil 4.43).



Şekil 4. 43 Protokateşik asit HMBC NMR spektrumu

Literatür taraması sonucu yapının limonda ve birçok bitkisel kaynakta yaygın olarak bulunan protokateşik asit olduğu belirlenmiştir (ToDA et al. 1985).

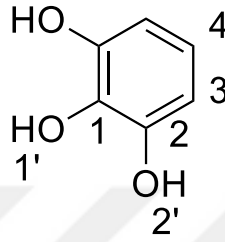
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4. 7 Protokateşik asit H^1 ve C^{13} NMR verileri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
1	C		122,08
2	CH	7,30	117,04
3	C		145,31
4	C		150,44
5	CH	6,75	115,85
6	CH	7,26	122,37
7	C		167,87
3'		9,24	
4'		9,63	

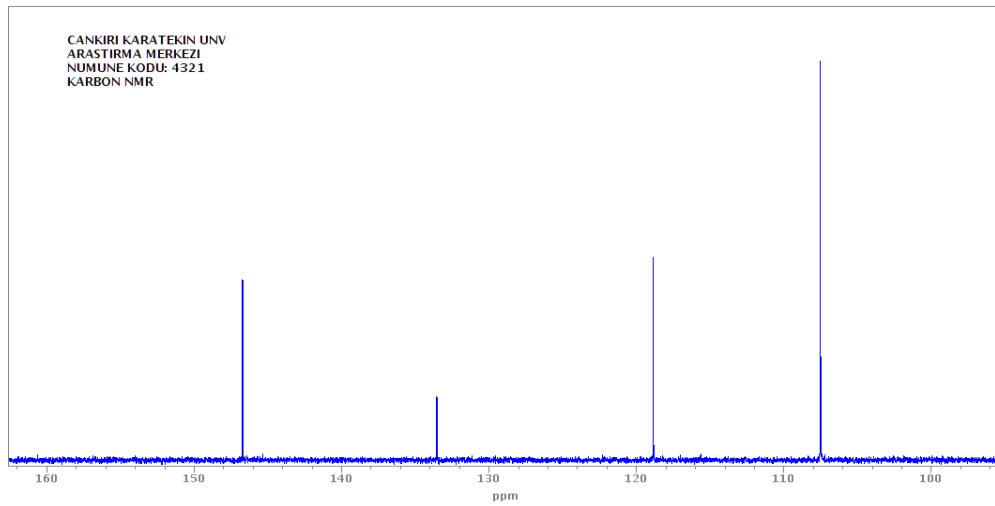
4.1.8. Benzenetriol bileşiğinin NMR spektrumları

Benzenetriol bileşiği sefadex 4-3-2. silika 1. Fraksiyondan saflaştırıldı ve yapısı DMSO çözücüsünde alınan NMR spektrumları ile belirlendi (Şekil 4.44).



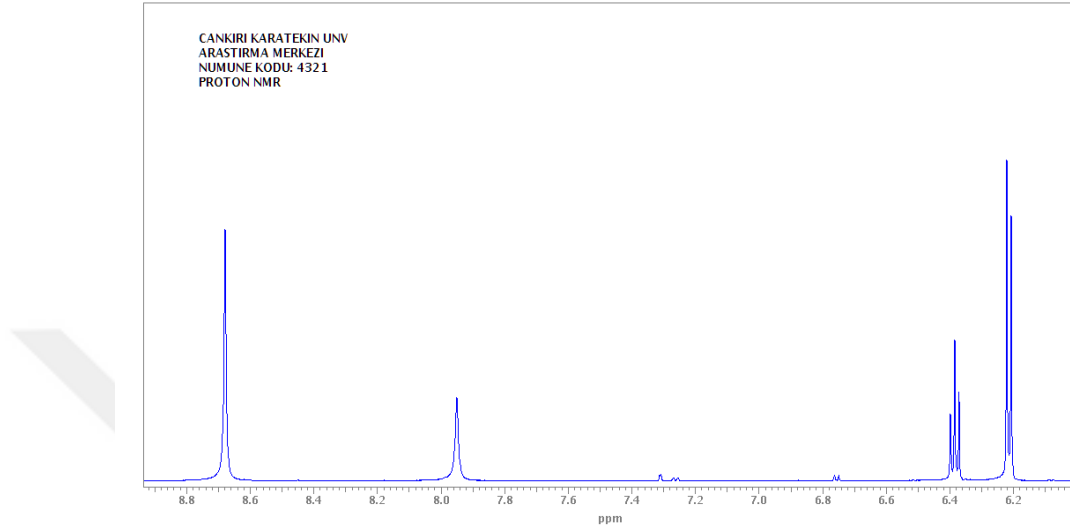
Şekil 4. 44 Benzenetriol bileşiğinin kimyasal formülü

C^{13} NMR (Şekil 4.45) değerlerinin aromatik bölgede yer alması ve dört karbon atomuna ait sinyallerin varlığı, yapıda bir simetrinin olduğunu göstermektedir.

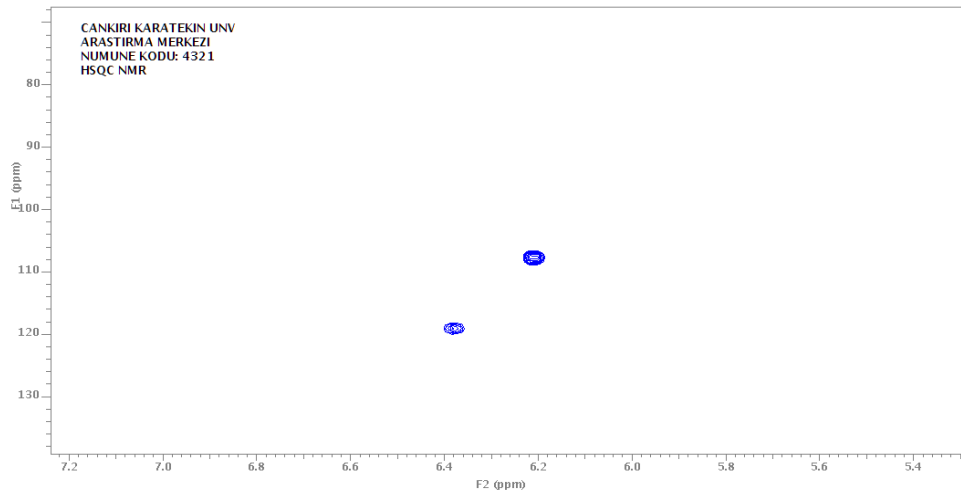


Şekil 4. 45 Benzenetriol C^{13} NMR spektrumu

H^1 NMR spektrumundaki H sinyalleri (Şekil 4.46) ve HSQC den elde edilen veriler (Şekil 4.47) yapıda bir C-H in ve OH grubunun simetrik olduğunu gösterdi.

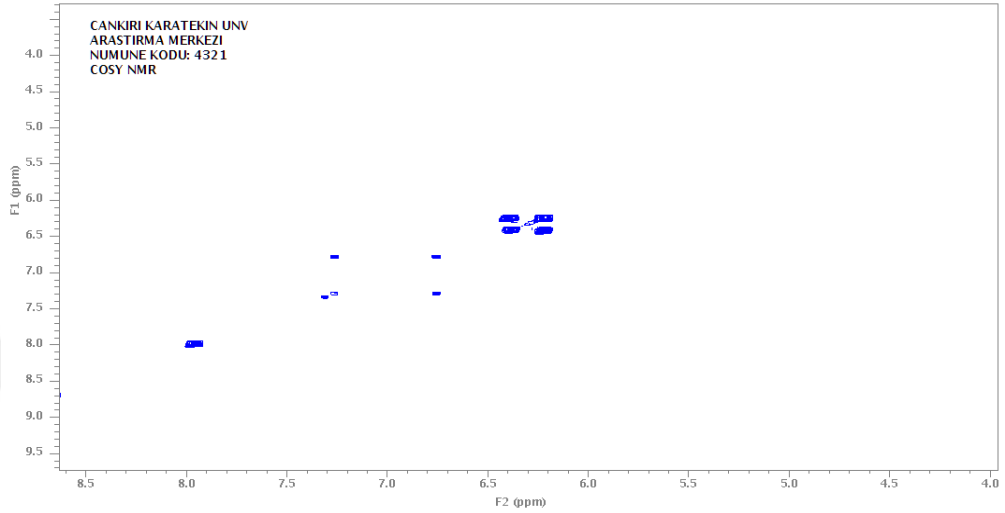


Şekil 4. 46 Benzenetriol H^1 -NMR spektrumu

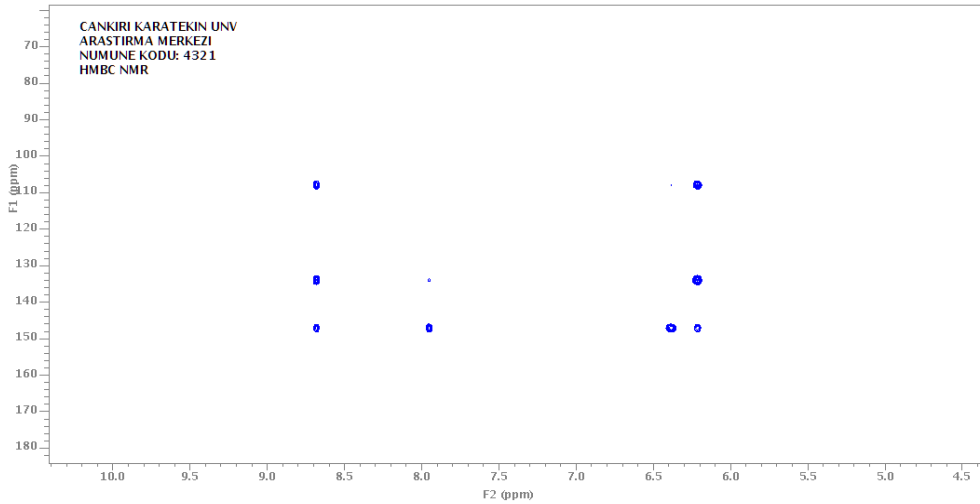


Şekil 4. 47 Benzenetriol HSQC NMR spektrumu

6,21 ve 6,38 ppm de protonların rezonans oldukları H¹-NMR ve COSY spektrumlarıyla belirlenmiştir (Şekil 4.48). Molekülün tam yapısı HMBC etkileşimleri ile belirlendi (Şekil 4.49).



Şekil 4. 48 Benzenetriol COSY NMR spektrumu



Şekil 4. 49 Benzenetriol HMBC NMR spektrumu

Literatürde yapılan taramalar bu bileşiğin limon kabuğu gibi birçok kaynaktan izole edilmiş bir fenol türevi olan benzenetriol olduğunu doğrulandı (Popoff and Theander 1976).

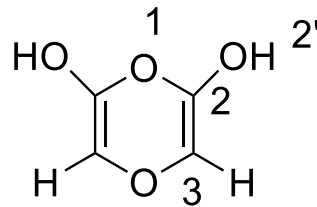
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4. 8 Benzenetriol molekülüne ait H^1 ve C^{13} NMR verileri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
1'		7,94	
1	C		133
2	C		146
3	CH	6,38	118,75
4	CH	6,21	107,66
2'		8,68	

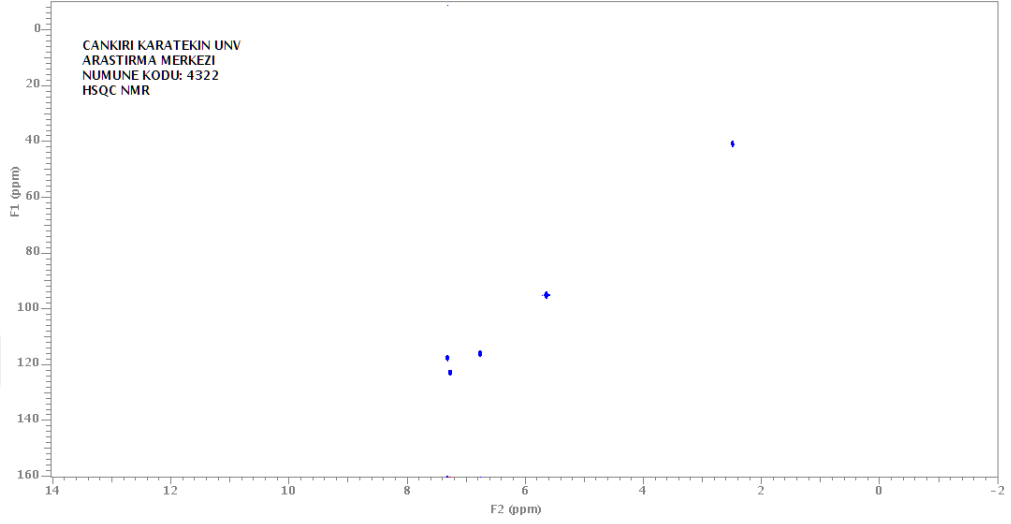
4.1.9. Diglikolik anhidrit bileşiğinin NMR spektrumları

Diglikolik anhidrit bileşiği sefadeks 4-3-2 silika 2 fraksiyondan saflaştırıldı ve yapısı DMSO çözücüsünde alınan NMR spektrumları kullanılarak aydınlatıldı (Şekil 4.50).

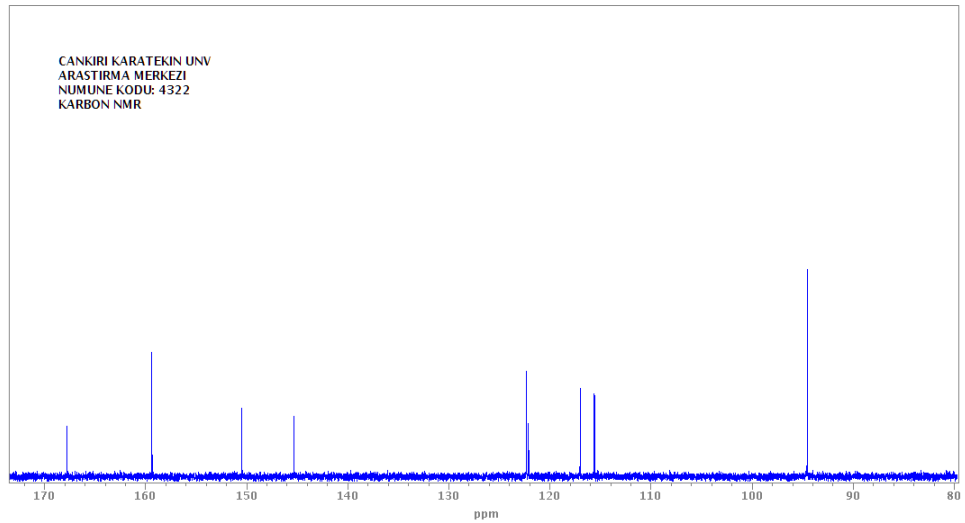


Şekil 4. 50 Diglikolik anhidrit bileşiğinin kimyasal formülü

NMR verilerinde bileşik içinde bulunan safsızlıkların sınıflandırılması sonucu bir moleküle ait 2 C sinyalinin varlığı gözlemlendi ve bu karbonlara bağlı protonlar HSQC de tespit edildi (Şekil 4.51).

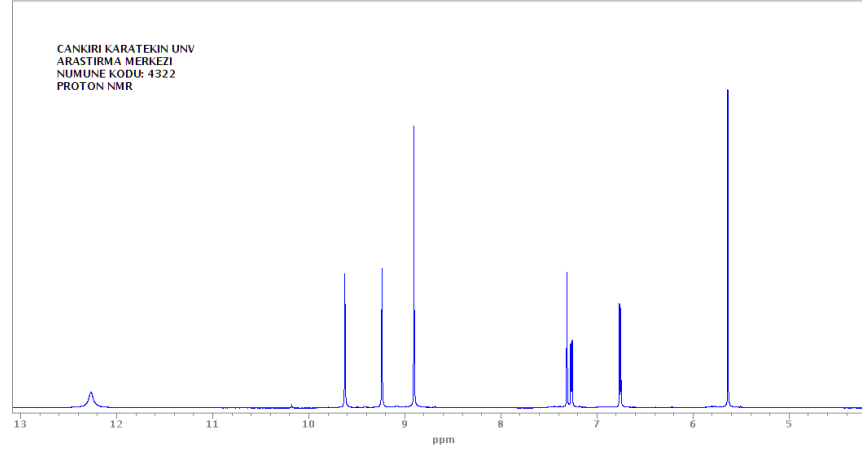


Şekil 4. 51 Diglikolik anhidrit HSQC NMR spektrumu



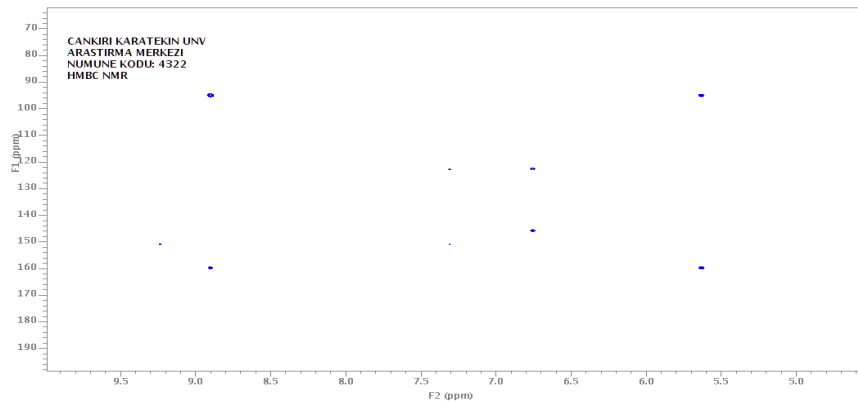
Şekil 4. 52 Diglikolik anhidrit C¹³ NMR spektrumu

Yapıda 2 H sinyali olması ve etkileşim görülmemesi nedeniyle molekülde bir simetri olduğu H^1 -NMR dan belirlendi (Şekil 4.53).



Şekil 4. 53 Diglikolik anhidrit H^1 -NMR spektrumu

H^1 -NMR spektrumunda (Şekil 4.53) tek C-H gözlenmesi diğer karbon atomunun quarterner olması ve bu karbonla OH grubunun etkileşimi HMBC den tespit edildi (Şekil 4.54).



Şekil 4. 54 Diglikolik anhidrit HMBC NMR spektrumu.

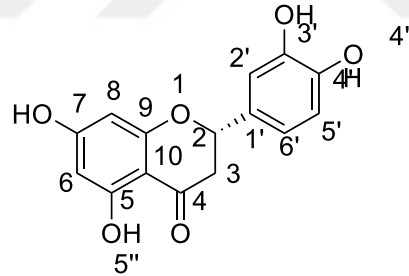
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4. 9 Diglikolik anhidrit bileşiğine ait H^1 ve C^{13} NMR değerleri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
2'		8,90	
2	C		159
3	CH	5,63	94,56

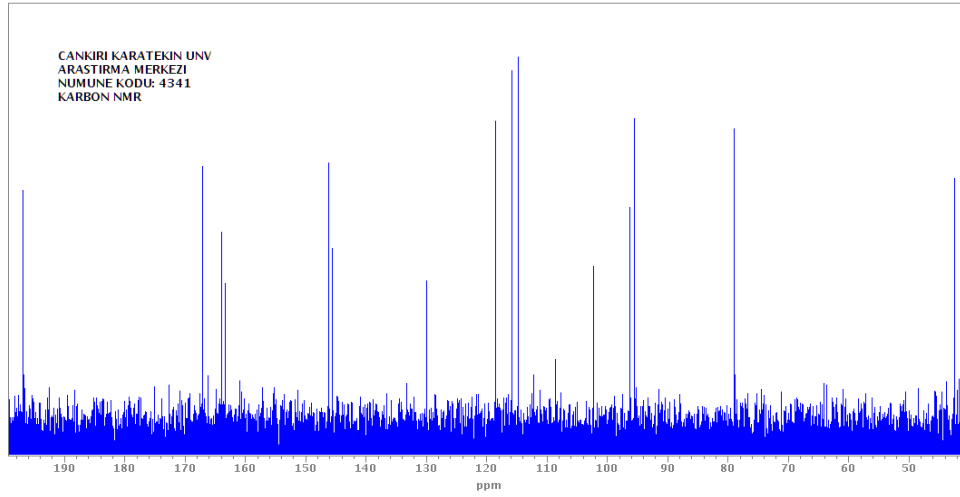
4.1.10. Eriodiktiol bileşiğinin NMR spektrumları

Eriodiktiol bileşiği sefadeks 4-3-4. silka 1. Fraksiyondan yüksek saflıkta izole edildi ve yapısı DMSO çözücüsünde alınan NMR spektrumları kullanılarak belirlendi (Şekil 4.55)

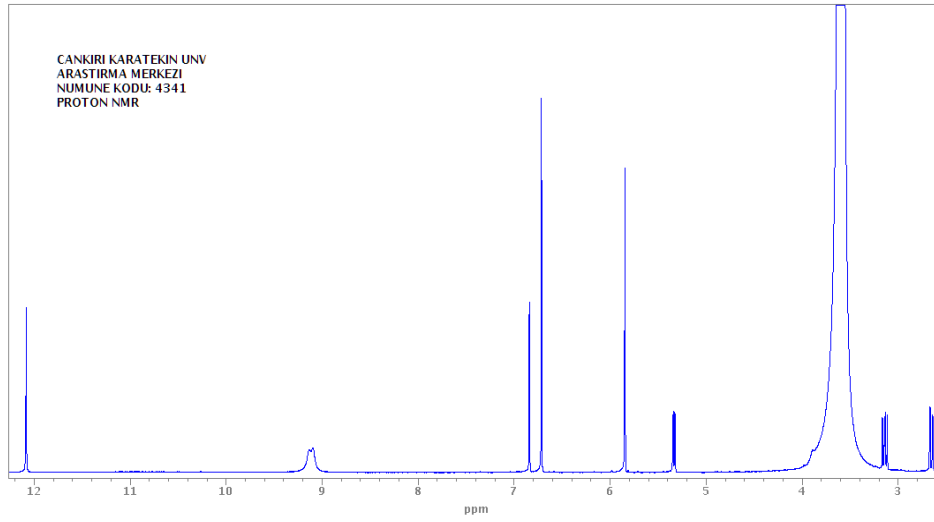


Şekil 4. 55 Eriodiktiol bileşiğinin kimyasal formülü

C^{13} NMR spektrumundan (Şekil 4.56) 4 nolu karbondan (176 ppm) bir karbonil grubunun varlığı ve 12 ppm üzerinde bir H sinyali gözlenmesi ile yapıda bir karbonil OH etkileşmesi olduğu belirlendi (Şekil 4.57).

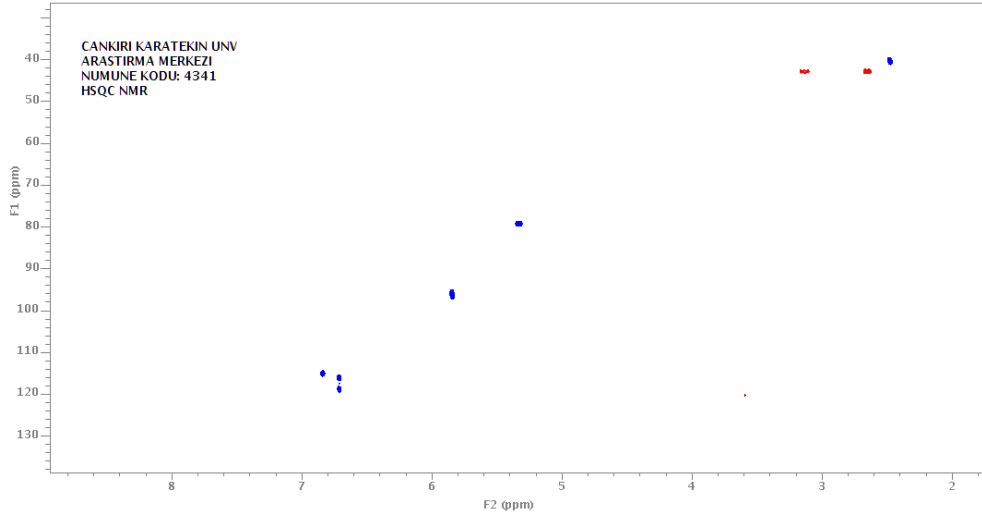


Şekil 4. 56 Eriodiktiol bileşiğine ait C¹³ NMR spektrumu

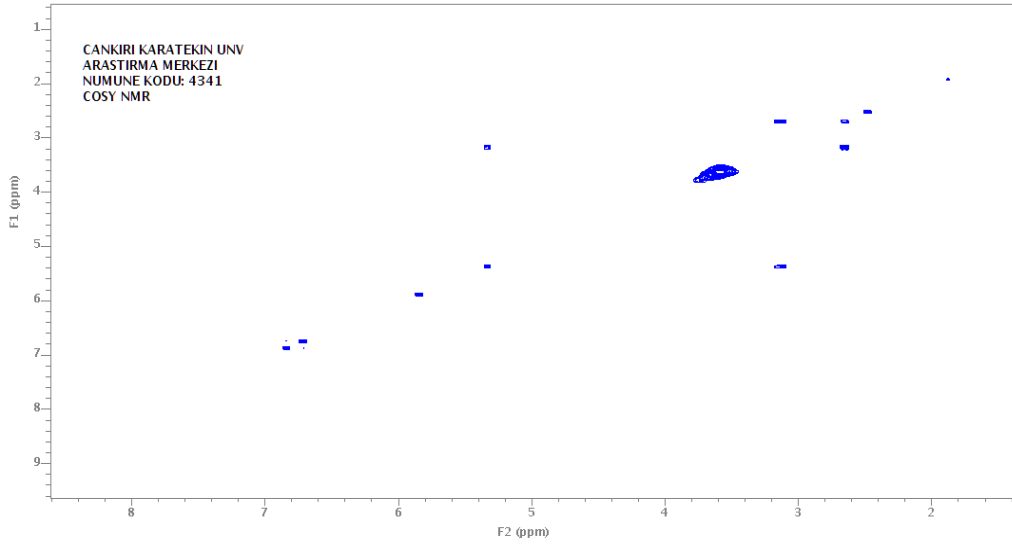


Şekil 4. 57 Eriodiktiol bileşiğine ait H¹-NMR spektrumu

3 nolu karbona bağlı diastropik protonların varlığı HSQC spektrumundan tespit edilerek (Şekil 4.58) 5,33 ppm deki H ile etkileştiği COSY (Şekil 4.59) spektrumundan teyit edildi.

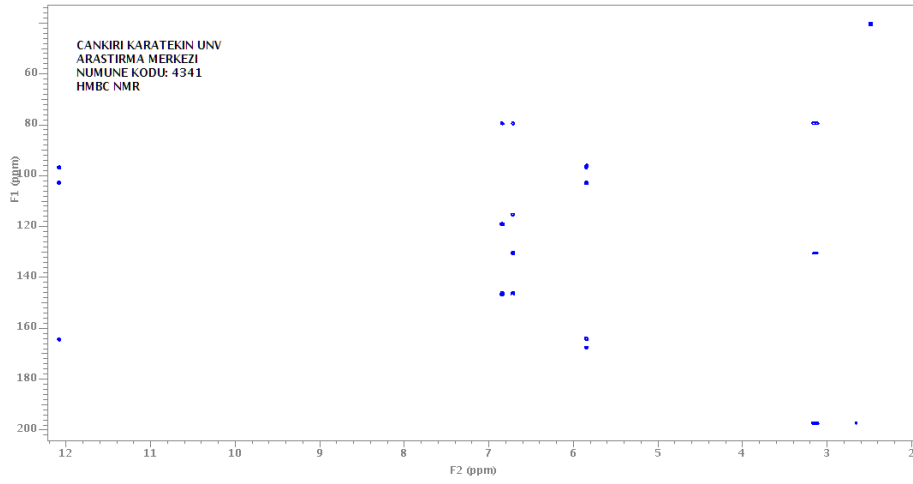


Şekil 4. 58 Eriodiktliol bileşiğine ait HSQC NMR spektrumu



Şekil 4. 59 Eriodiktliol bileşiğine ait COSY NMR spektrumu

2 nolu karbonun B halkasındaki karbonlarla etkileşimi HMBC den bulundu (Şekil 4.60).



Şekil 4. 60 Eriodiktiol bileşiğine ait HMBC NMR spektrumu

6 ve 8 nolu karbonlara bağlı protonların meta etkileşmesi H^1 -NMR spektrumundan belirlenerek HMBC (Şekil 4.60) etkileşimleri ile tam konumları tespit edildi. Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.11).

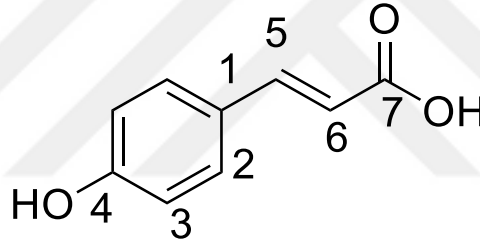
Tablo 4. 10 Eriodiktiol bileşiğine ait H^1 ve C^{13} NMR değerleri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
2	CH	5,33	79
3	CH ₂	2,66-3,12	42,64
4	C		176
5	C		163,85
6	CH	5,84	95,63
7	C		167,05
8	CH	5,84	96,21
9	C		163,28
10	C		102
1'	C		130
2'	CH	6,83	114,78
3'	C		145,6
4'	C		146,09
5'	CH	6,71	115,78
6'	CH	6,71	118,42
4''		9,11	
5''		12,10	

H^1 -NMR da aşağı alana kayan aromatik bölge karbonları (5, 7, 3' ve 4') ve 9,11 ppm de gözlenen H^1 -NMR sinyalleri bu karbonlara OH gruplarının bağlı olduğunu göstermektedir. Bu durumdan bileşiğin bir flavanoit olduğu belirlendi. Literatür taramaları ile molekülün limon ve narenciye türlerinde bulunan bir flavanoit olan eriodiktiol olduğu tespit edildi (Miyake et al. 1997b).

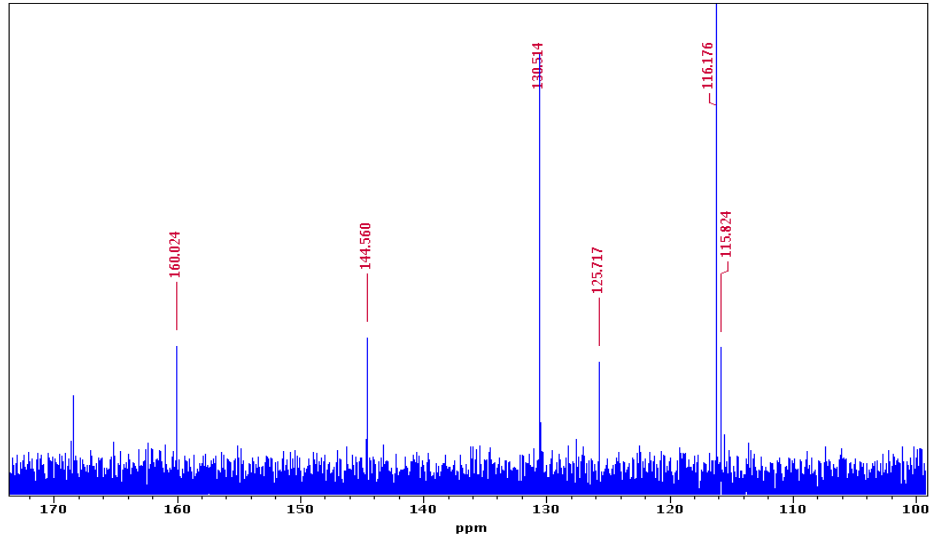
4.1.11. *p*-kumarik asit bileşiğinin NMR spektrumları

p-kumarik asit bileşeni sefadeks 3-4-1. fraksiyondan saflaştırıldı ve yapısı DMSO çözücüsünde alınan NMR spektrumları kullanılarak belirlendi (şekil 4.61).



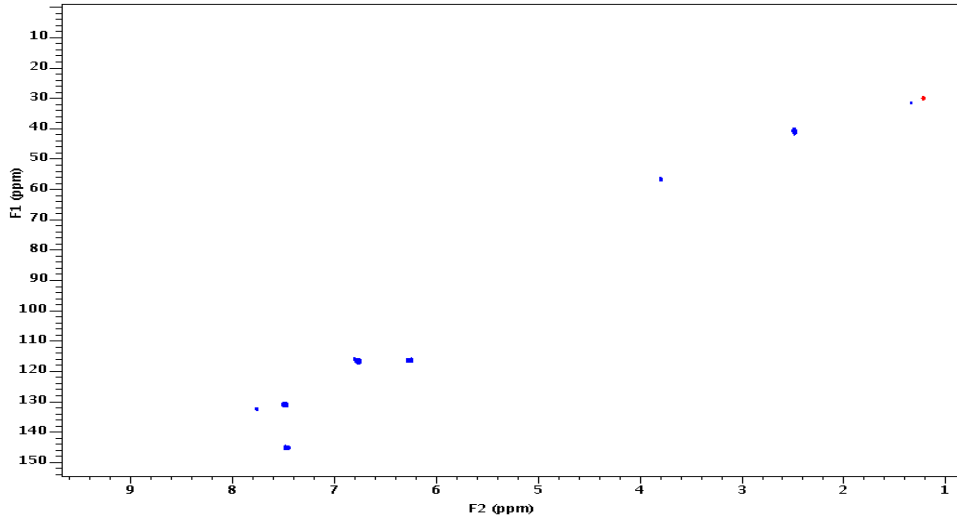
şekil 4. 61 *p*-kumarik asit bileşiğinin kimyasal formülü

C^{13} NMR (şekil 4.62) verilerinde belirlenen 168 ppm değeri bir karbonil grubunu göstermektedir.

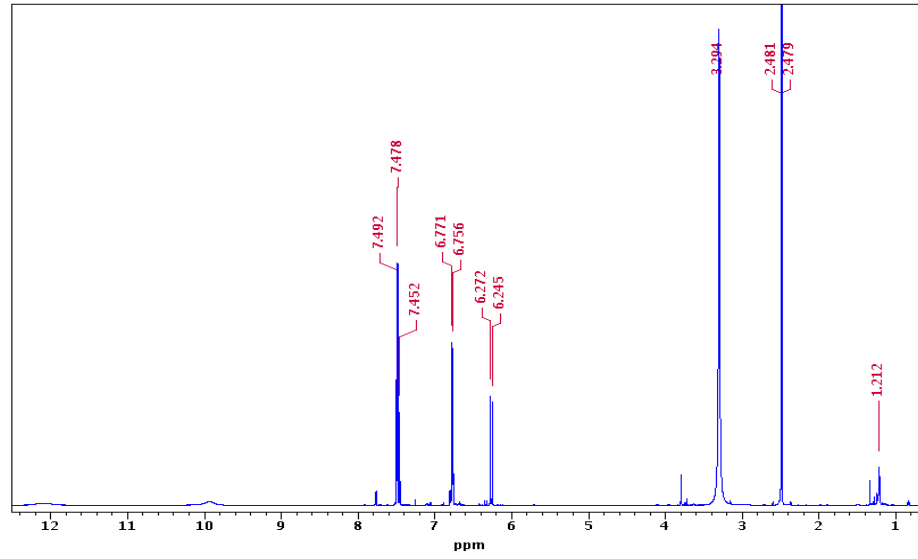


Şekil 4. 62 *p*-kumarik asit bileşiğine ait C^{13} NMR spektrumu

Molekülde 4 farklı areomatik proton olduğu HSQC NMR spektrumundan belirlenmiştir (Şekil 4.63).Ayrıca H^1 NMR spektrumunda 12 ppm değerinde gözlenen yayvan pik molekülün bir fenolik asit olduğuna işaret etmektedir (Şekil 4.64).

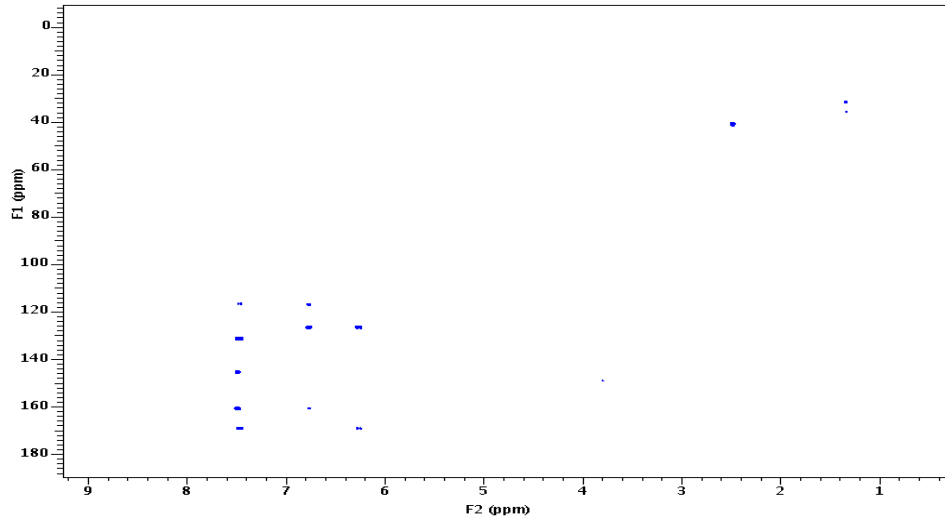


Şekil 4. 63 *p*-kumarik asit bileşiğine ait HSQC NMR spektrumu

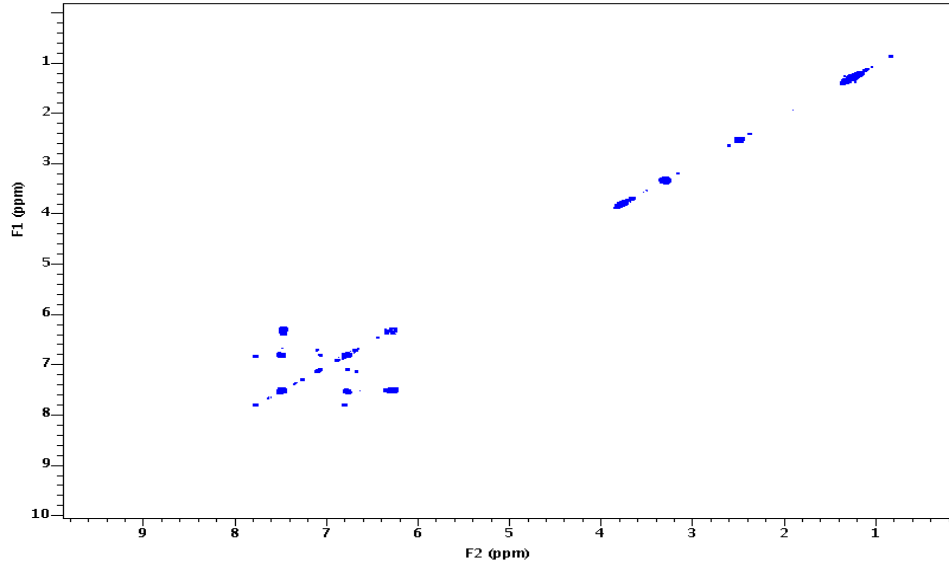


Şekil 4. 64 *p*-kumarik asit bileşiğine ait H^1 -NMR spektrumu

HMBC (Şekil 4.65) ve COSY spektrumundan (Şekil 4.66) karbonil grubuna komşu 5 ve 6 nolu karbonlara bağlı komşu protonların varlığı belirlenmiş ve bu yapının bir aromatik halkaya bağlandığı tespit edildi.



Şekil 4. 65 *p*-kumarik asit HMBC NMR spektrumu



Şekil 4. 66 *p*-kumarik asit bileşiğine ait COSY NMR spektrumu

Aromatik halkada protonların diğerleri ile karşılaştırılması aromatik bölgedeki iki protonun simetrik olduğunu göstermiştir. H^1 -NMR daki OH sinyalleride aromatik bölgede simetriyi sağlayacak şekilde konumlanacağından yapının *p*-kumarik asit olduğu tespit edildi. Literatür karşılaştırmalarından yapı doğrulanarak bileşiğin limon kabuğunda bulunduğu belirlendi (Hoff et al. 1994).

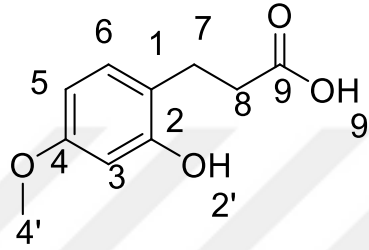
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4. 11 *p*-kumarik asit bileşiğine ait H^1 ve C^{13} NMR değerleri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
1	C		125,75
2	CH	7,48	130,47
3	CH	6,79	116,19
4	C		159,03
5	CH	7,45	144,63
6	CH	6,25	115,89
7	C		168

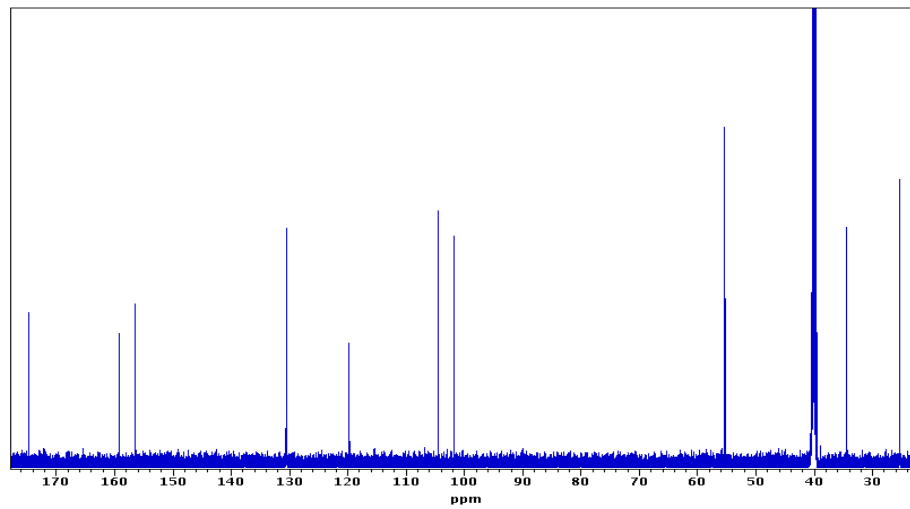
4.1.12. 2-hidroksi-4-metoksi-benzenepropanoik asit bileşiğinin NMR spektrumları

2-hidroksi, 4-metoksi-fenilpropanoik asit bileşiği 4-3-4. fr den kristallendirilerek saflaştırıldı. Bileşiğin yapısı d-DMSO da alınan NMR spektrumları kullanılarak belirlendi (Şekil 4.67).



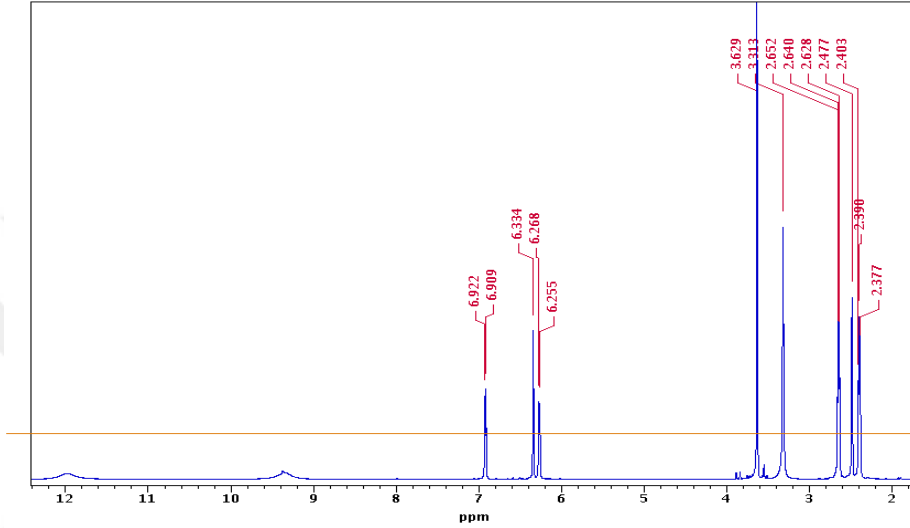
Şekil 4. 67 2-hidroksi 4-metoksi fenilpropanoik asit bileşiğinin kimyasal formülü

175 ppm de gözlenen C^{13} sinyali yapıda bir karbonil grubunun varlığını, 110 ppm ile 160 ppm arasında gözlenen 6 adet karbon sinyali aromatik bir halkanın var olduğunu göstermektedir (Şekil 4.68).



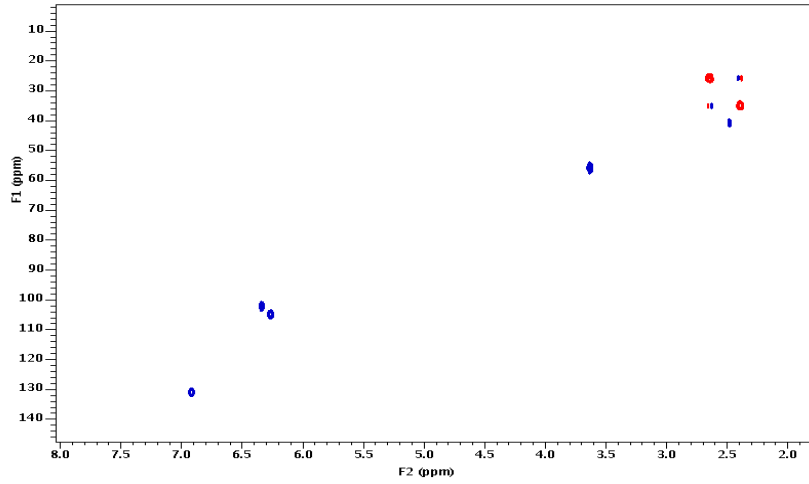
Şekil 4. 68 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiği C^{13} NMR spektrumu

H^1 -NMR spektrumunda görülen 12 ppm deki asidik OH sinyali ve 6-8 ppm arasında gözlenen aromatik H sinyalleri molekülün bir fenolik asit olduğunu belirtir. Ayrıca H^1 NMR spektrumunda 3.62 ppm de bir metoksi grubu ve 2.37 ile 2.62 ppm aralığında 2 alkil H sinyali görülmektedir (Şekil 4.69).



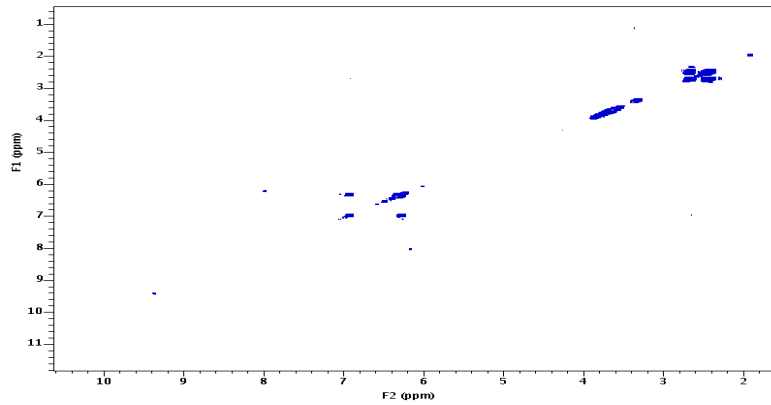
Şekil 4. 69 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiği H^1 -NMR spektrumu

2.37-2.62 ppm aralığındaki H sinyallerinin CH_2 grubu olduğu HSQC spektrumundan belirlenmiştir. HSQC spektrumunda ayrıca 3 aromatik proton ve metoksi grubuna ait H sinyalleri de gözlenmektedir (Şekil 4.70).



Şekil 4.70 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiği HSQC NMR spektrumu

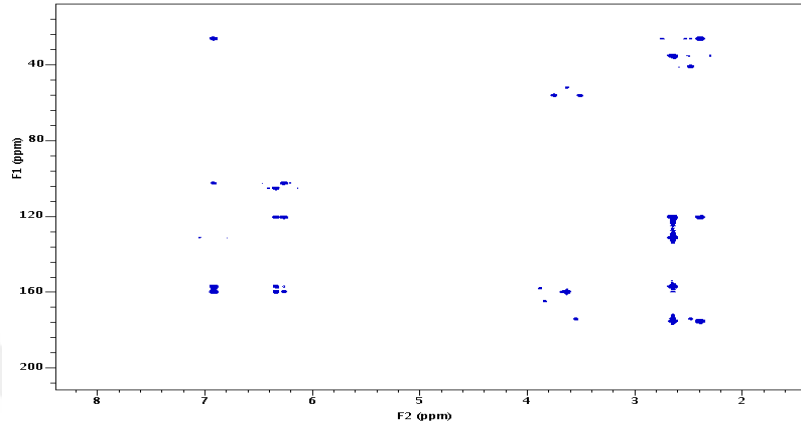
CH₂ gruplarının birbirine komşu protonlar oldukları COSY spektrumundaki etkileşmelerden tespit edildi. COSY spektrumunda gözlemlenen aromatik etkileşmelerde 6.25 ve 6.91 ppm deki H sinyallerinin benzen halkasında birbirlerine *orto* konumda olduğu belirlendi (Şekil 4.71).



Şekil 4.71 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit bileşiği COSY NMR spektrumu

HMBC spektrumunda karbonil grubunun CH₂ gruplarıyla etkileşmelerinin gözlenmesi ve aromatik halkayla etkileşmesinin bulunmaması karbonil grubunun alkil zincirinin uc kısmında olgunu gösterdi. Metoksi grubunun benzen halkasıyla olan etkileşimi tespit

edilerek 156 ppm deki 4 numaralı karbona bağlı olduğu belirlendi. 6 nolu karbon atomunun CH₂ gruplarıyla etkileşiminin belirlenmesi orto konumlu aromatik protonların alkil grubuna en yakın konumda olduğunu gösterdi (Şekil 4.72).



Şekil 4. 72 2-hidroksi 4- metoksi, benzenepropanoik asit bileşiği HMBC NMR spektrumu

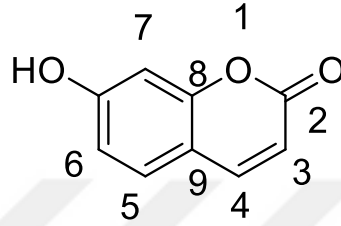
Molekülün H¹ ve C¹³ NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.13).

Tablo 4. 12 2-hidroksi 4- metoksi fenilpropanoik asit H¹ ve C¹³ NMR değerleri

NO	DEPT	H ¹ -NMR	C ¹³ NMR
1	C		119,66
2	C		159,06
3	CH	6,33	101,64
4	C		156,06
5	CH	6,26	104,57
6	CH	6,91	130,50
7	CH ₂	2,63	26,06
8	CH ₂	2,38	34,58
9	C		174,59
4'	CH ₃	3,63	55,19
2'		9,32	
9'		12,00	

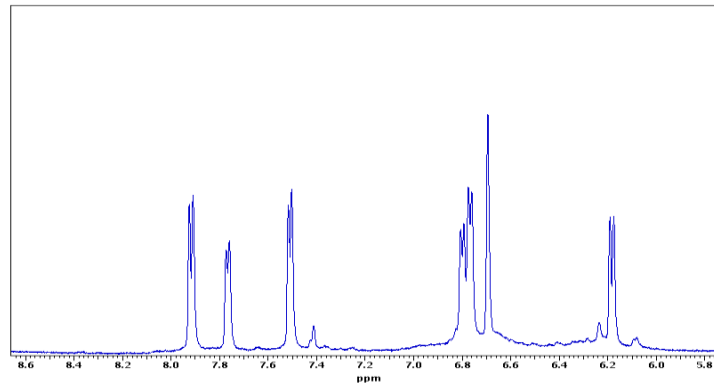
4.1.13. Umbelliferon bileşiminin NMR spektrumları

Umbelliferon molekülü 3-4-4. fraksiyondan izole edildi ve yapısı D-DMSO çözücüsünde alınan NMR spektrumları kullanılarak belirlendi (Şekil 4.73).



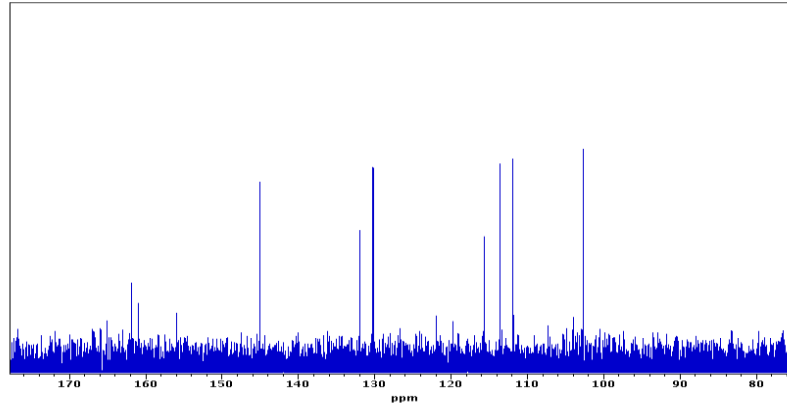
Şekil 4. 73 Umbelliferon bileşiminin kimyasal formülü

H^1 -NMR spektrumunda gözlemlenen 4 dublet sinyali yapıda birbirine komşu halde iki grup *orto* konumlu aromatik protonların varlığını göstermektedir (Şekil 4.74).



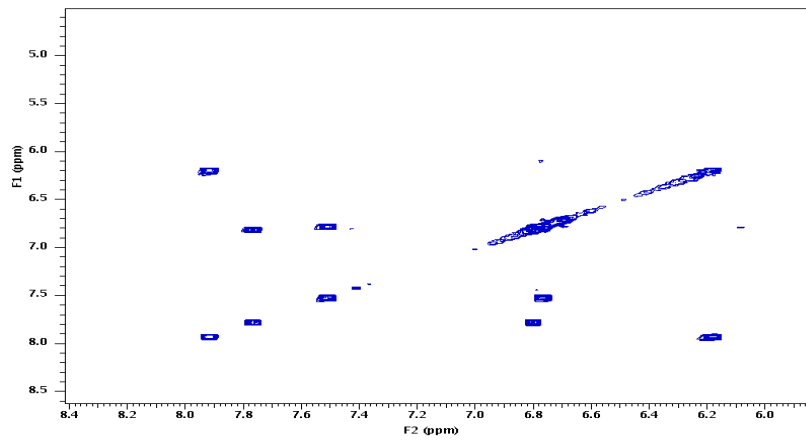
Şekil 4. 74 Umbelliferon bileşiminin H^1 -NMR spektrum

C¹³ NMR spektrumunda gözlenen aromatik karbon sinyalleri yapının aromatik bir halka ve aşağı alandaki karbonil karbonu sinyali (161ppm) aromatik halkaya bağlı bir yapının var olduğunu göstermektedir (Şekil 4.75).

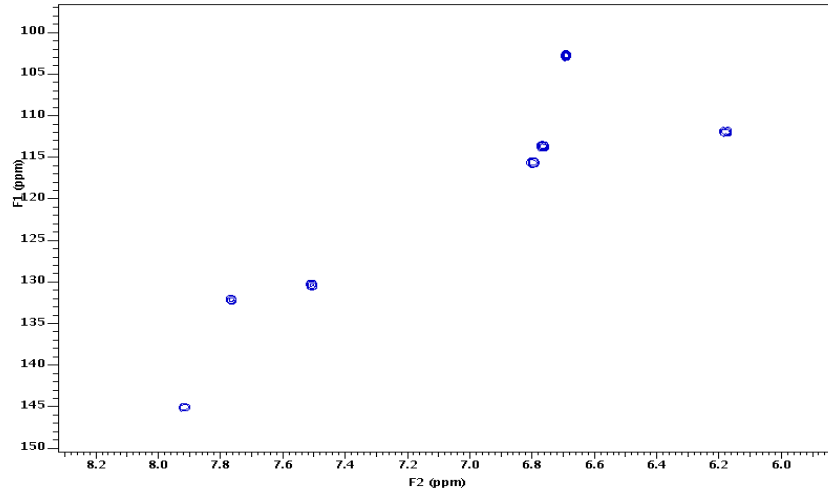


Şekil 4. 75 Umbelliferon bileşiğinin C¹³ NMR spektrumu

COSY spektrumunda gözlenen 7.91 ppm-6.18 ppm ve 7.50-6.77 ppm etkileşimleri H¹-NMR spektrumundaki dublet etkileşimlerin hangi protonlar arasında olduğunu belirtmektedir (Şekil 4.76).

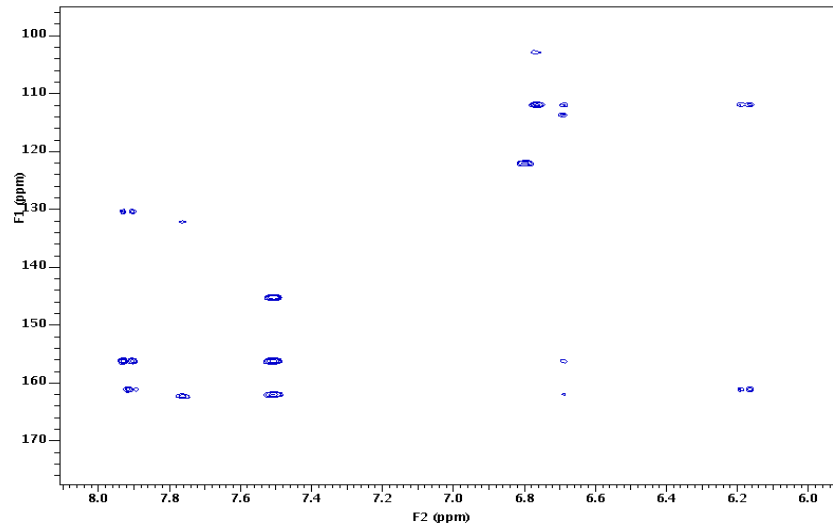


Şekil 4. 76 Umbelliferon bileşiğinin COSY NMR spektrumu



Şekil 4. 77 Umbelliferon bileşiğinin HSQC NMR spektrumu

Bu doğrultuda yapıda komşu iki CH aromatik grubun varlığı tespit edilmiş olup bu grupların tam konumları HMBC spektrumundan tespit edildi (Şekil 4.78).



Şekil 4. 78 Umbelliferon bileşiğinin HMBC NMR spektrumu

HMBC etkileşimlerinden daha önceki analizlerde de gözlemlendiği gibi 6.18-7.91 ppm de komşu protonların 161 ppm karbonil karbonuna komşu oldukları ve yapının spesifik kumarin özelliği gösterdiği tespit edilmiştir. Spektrumlardaki proton sinyallerinin CH oldukları HSQC NMR spektrumundan belirlenerek, karbonil karbonuna komşu 6,18 ppm deki protonun benzen halkasındaki 130 ppm etkileşimi görüldü. Proton sinyallerinde aşağı alanda gözlenen OH grubunun benzen halkasında olduğu ve 6.69 ppm deki singlet proton sinyalinin 112 ppm de HMBC etkileşimi görülmüş ve yapının umbelliferon olduğu tespit edildi.

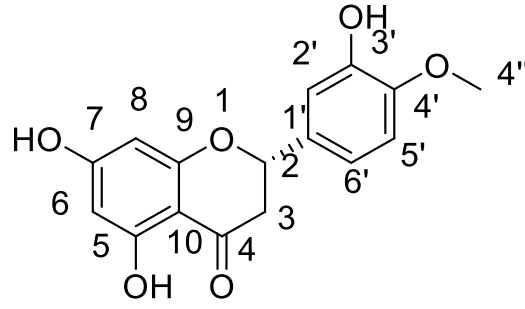
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4. 13 Umbelliferon bileşiğinin H^1 ve C^{13} NMR değerleri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
2	C		161,75
3	CH	6,18	111,78
4	CH	7.91	145,08
5	CH	7.50	130,24
6	CH	6,76	113,56
7	C		155,96
8	CH	6,69	102,,61
9	C		160,81
10	C	H1	113,56

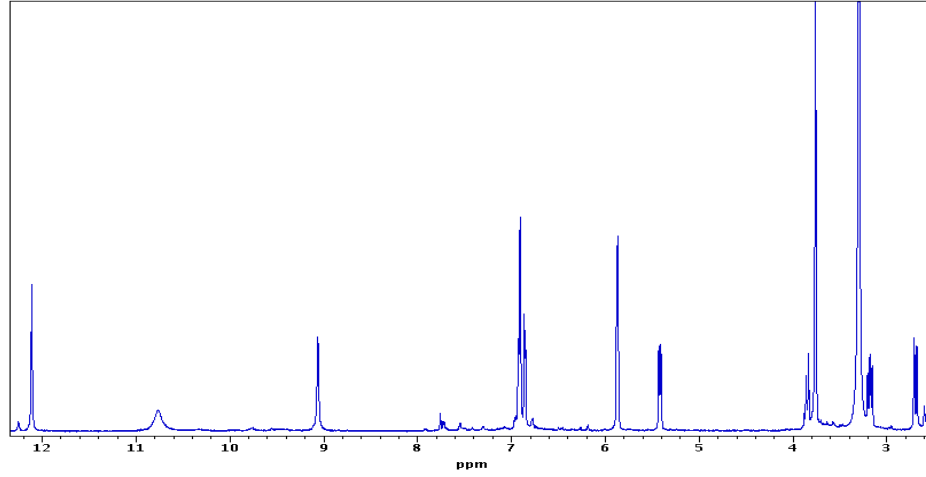
4.1.14 . Hesperetin bileşiğinin NMR spektrumları

Hesperetin bileşiği 4-10. fr den izole edildi ve yapısı D-DMSO da alınan NMR spektrumları kullanılarak belirlendi (Şekil 4.79).



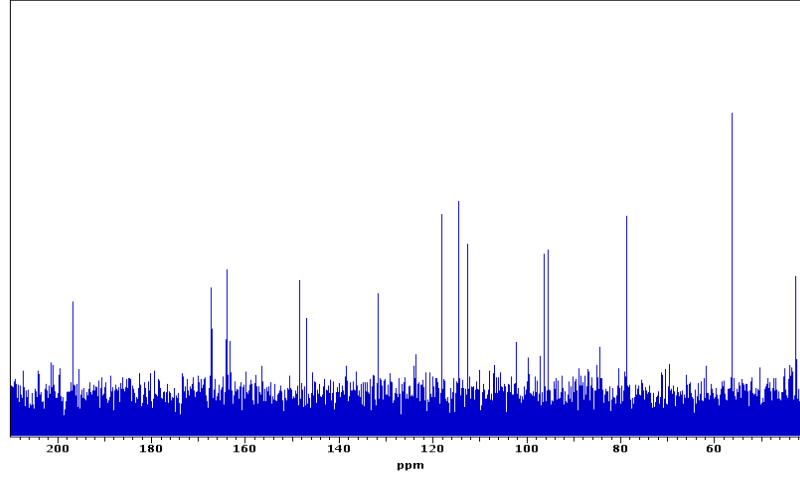
Şekil 4. 79 Hesperetin bileşiğinin kimyasal formülü

H^1 -NMR da gözlenen 12 ppm singlet OH sinyali yapıda karbonil karbonu ile hidrojen bağı yapıldığını göstermektedir. Ayrıca H^1 -NMR 'de (Şekil 4.80) gözlenen aromatik bölge sinyalleri bileşiğin aromatik halkaya sahip olduğunu göstermektedir. H^1 -NMR spektrumundaki sinyaller dikkate alındığında yapının bir flavanon olduğu görülmektedir.



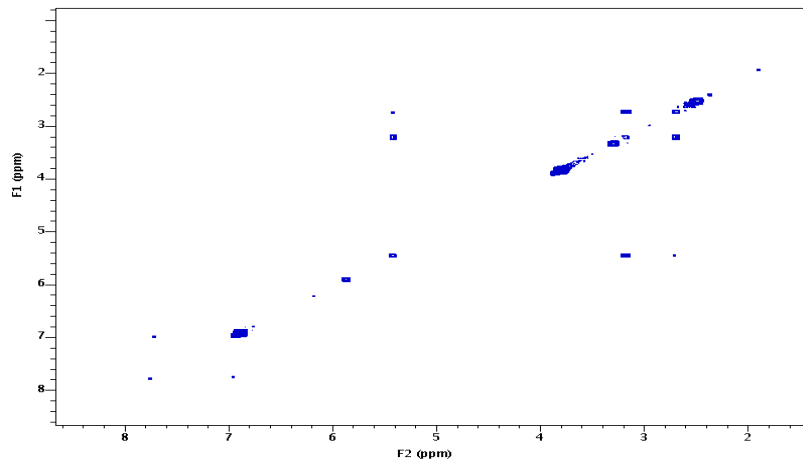
Şekil 4. 80 Hesperetin bileşiğinin H^1 NMR spektrumu

C^{13} NMR spektrumu incelendiğinde 198 ppm deki karbonil karbonu yapının flavanoid olduğunu desteklemektedir (Şekil 4.81).

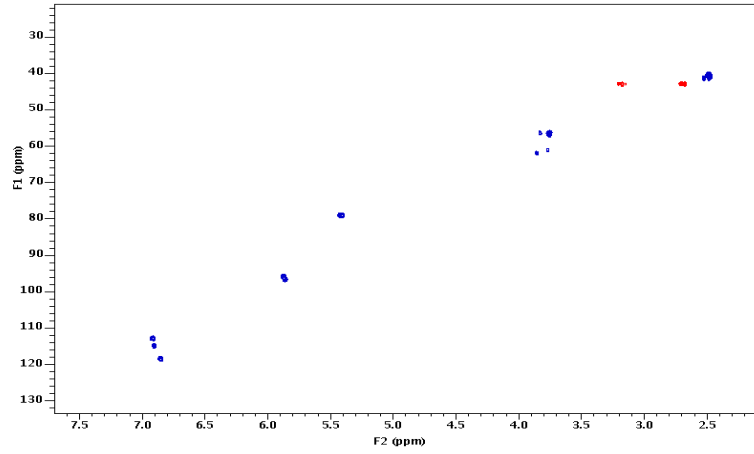


Şekil 4. 81 Hesperetin bileşiğinin C¹³ NMR spektrumu

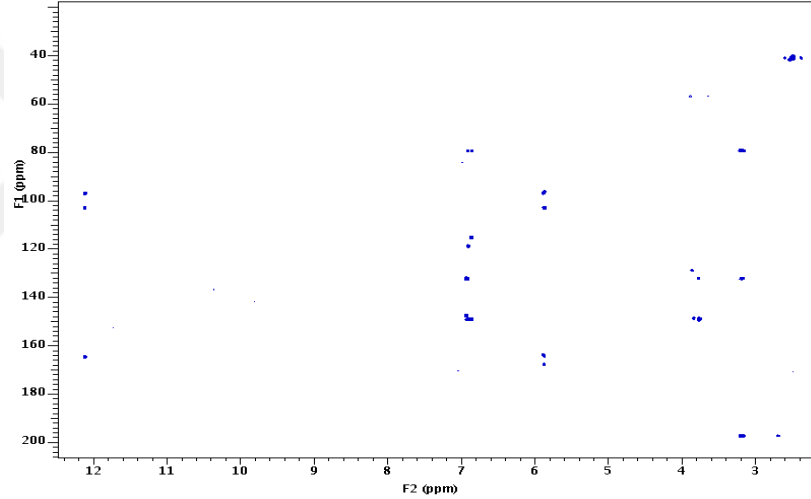
COSY spektrumu incelendiğinde alifatik bölgede ve aromatik aşağı alandaki etkileşimler göze çarpmaktadır (Şekil 4.82). Alifatik bölgedeki etkileşimlerde HSQC spektrumunda CH₂ grubu olarak tespit edilen protonların (2.69 -3.19 ppm) aynı karbon atomuna bağlı oldukları (43,27) ve birbirleri ile etkileştikleri görülmektedir (Şekil 4.83). Bu tür diastrotopik protonların komşu karbonu kiral bir merkezdir ve flavanonların genel bir karakteristik özelliğidir.



Şekil 4. 82 Hesperetin bileşiğinin COSY NMR spektrumu



Şekil 4. 83 Hesperetin bileşiğinin HSQC NMR spektrumu



Şekil 4. 84 Hesperetin bileşiğinin HMBC NMR spektrumu

HSQC spektrumu incelendiğinde üç tane singlet proton olduğu görülmektedir(5.85, 5.87, 6.89). 5.85 ve 5.87 protonlarının HMBC etkileşimleri incelendiğinde A halkasındaki oldukları görülmüştür (Şekil 4.84). Alifatik bölgedeki etkileşimlerden yola çıkarak kiral merkez protonuyla etkileşen karbonlar tespit edilerek B halkası ve bu halkaya bağlı H¹-NMR sinyallerinde görülen metoksi grubunun konumu saptanmıştır. Tahmini program çizimleri ve literatürdeki taramalar yapının hesperetin olduğunu göstermiştir (Maltese et al. 2009).

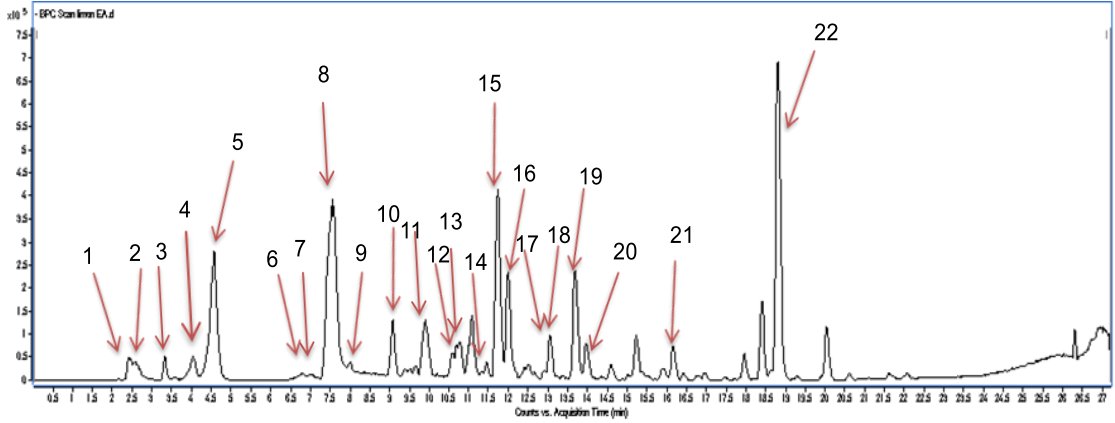
Molekülün H^1 ve C^{13} NMR değerleri aşağıda ki tabloda verilmiştir (Tablo 4.15).

Tablo 4. 14 Hesperetin bileşiğinin NMR değerleri

NO	DEPT	H^1	C^{13}
1			
2	CH	5,42	78,77
3	CH2	2,69-3,19	43,27
4	C		196,73
5	C		163,91
6	CH	5,85	96,13
7	C		167,1
8	CH	5,87	95,36
9	C		163,25
10	C		102,1
1'	C		131,61
2'	CH	6,89	114,61
3'	C		146,42
4'	C		148,33
5'	CH	6,84	118,29
6'	CH	6,91	112,48
4''	CH3	3,77	56,31

4.2.HPLC-TOF/MS analizi sonuçları

Limon etil asetat ekstresi HPLC-TOF/MS cihazında ana bileşenleri standartlara göre belirlendi ve aşağıdaki kromatogram elde edildi (Şekil 4.85). Kütüphane taramasına göre bu bileşiklerin molekül formülleri belirlendi.

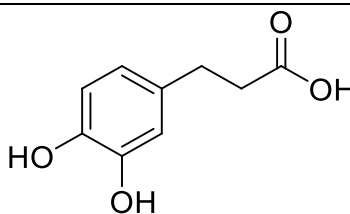
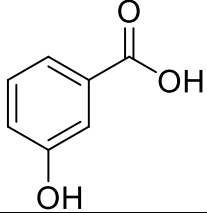
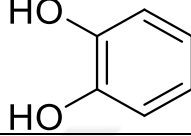
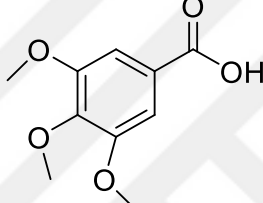
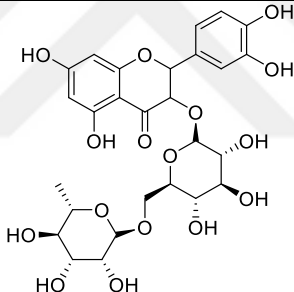
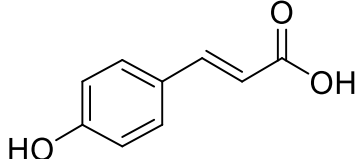
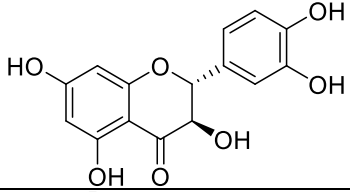
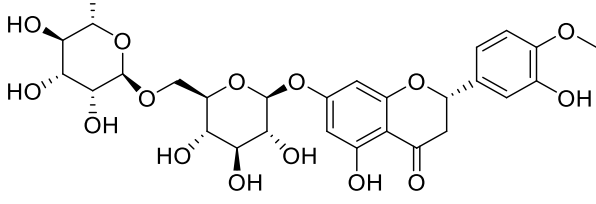


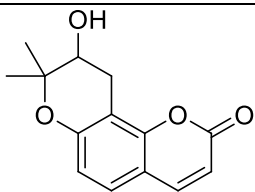
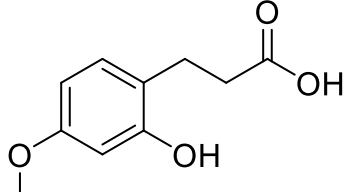
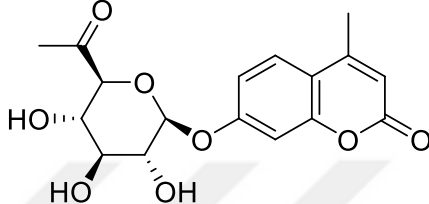
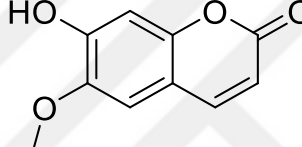
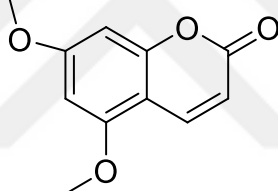
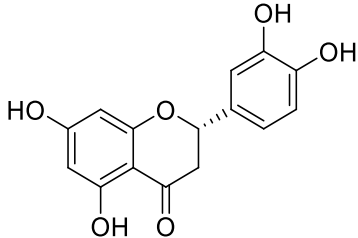
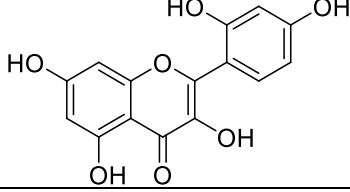
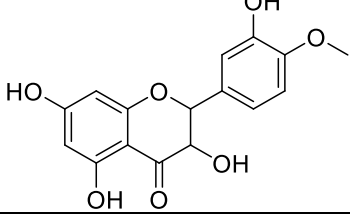
Şekil 4. 85 Limon posası etilasetat ekstresine ait HPLC-TOF/MS kromatogramı;

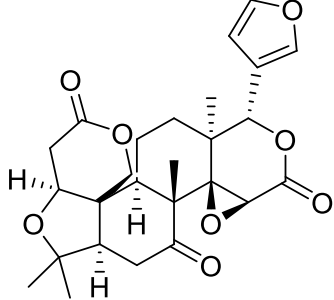
Kromotogramda gösterilen oklara ait moleküller tabloda verilmiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4. 15 HPLC-TOF/MS kütüphane taraması sonucu belirlenen bileşikler

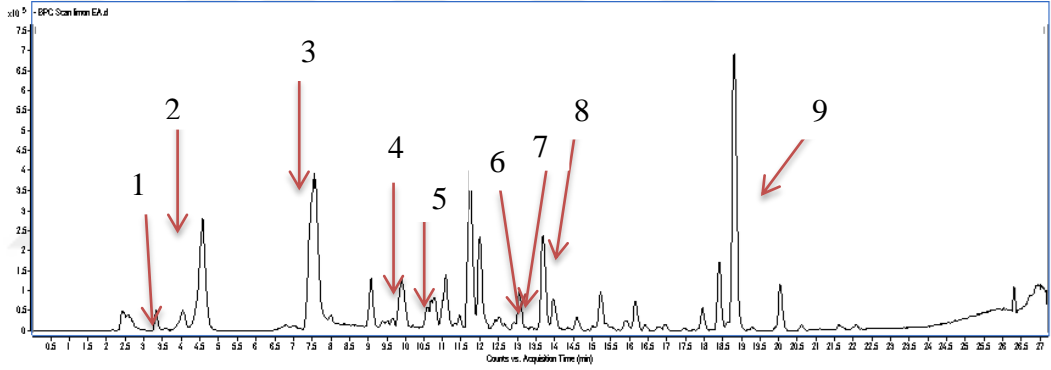
Sıra	Molekül adı	Molekül formülü
1	Gallik asit	<chem>O=C(O)c1cc(O)c(O)c(O)c1</chem>
2	Furancarboxylic acid	<chem>O=C(O)c1ccoc1</chem>
3	Gentisik asit	<chem>O=C(O)c1cc(O)ccc1O</chem>
4	Pirogallol	<chem>Oc1cc(O)c(O)cc1</chem>
5	Protokateşik asit	<chem>O=C(O)c1cc(O)ccc1O</chem>

6	Dihidroksifenilpropionik asit	
7	<i>m</i> -salisilik asit	
8	Kateşol	
9	Eudesmik asit	
10	Rutin	
11	<i>p</i> -kumarik asit	
12	Dihidroguercetin	
13	Hesperidin	

14	Lomatin	
15	4-hydroxy3-methoxyphenil propionik asit	
16	4-methylumberriferyl beta-D-glukuronoid	
17	Skopoletin	
18	Sitropten	
19	Eriodiktiol	
20	Morin	
21	Tamariksetin	

22	Limonin	
----	---------	------------------------------------------------------------------------------------

Tespit edilen ana bileşenler arasından 14 bileşen izole edilip yapıları belirlendi, bu bileşenlerden 9'una ait kromatografik pikler kütüphane taraması sonucu RT değerlerine göre belirlendi ve aşağıda ki kromatogramda gösterildi (Şekil 4.86).



Şekil 4. 86 İzole edilen bileşiklerin piklerini gösteren HPLC/TOF-MS kromatogramı

İzole edilen bileşiklerin kütüphane taramasına göre kromatogramdaki yerleri; (1)- benzenetriol, (2)- protokateşik asit, (3)- kateşol, (4)- p-kumarik asit, (5)- hesperidin, (6)- skopoletin, (7)- sitropten, (8)- eriodiktiol, (9) - limonin

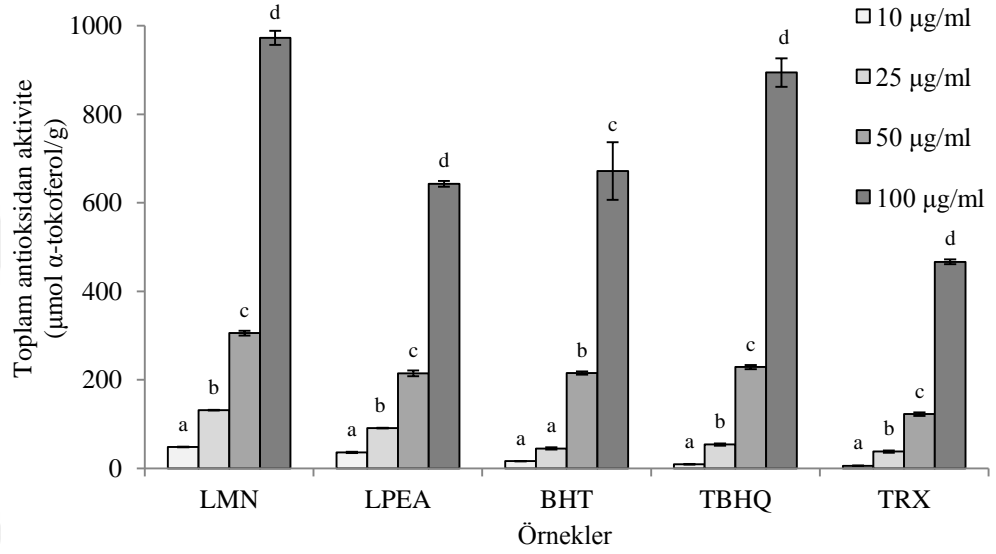
Standart bileşenlere göre EA limon posası ekstresine yapılan HPLC-TOF/MS analizinden elde edilen verilerine göre ana bileşenleri gösteren tablo aşağıda verilmiştir (Tablo 4.19).

Tablo 4. 16 HPLC-TOF/MS de standartlara göre belirlenen ana bileşenler ve miktarları

Madde Adı	Madde miktarı (mg/kg)
Gentisik asit	127,11
4-hidroksi benzoik asit	11,15
protokateşik asit(2)	3,56
kafeik asit	2,74
vanilik asit	8,13
siringik asit	1,2
Rutin	1,73
Polidatin	3,33
kuarçetin-3- β -D-glukozit	0,32
Naringin	1,8
Diosmin	6,25
Taksifolin	1,15
Hesperidin(5)	17,79
Neohesperidin	11,02
Morin	1,67
Kuarçetin	0,18
sinnamik asit	0,58
gallik asit	2,66
fumarik asit	3,51
sinapik asit	9,32
p-kumarik asit(4)	59,78
Kateşin	0
4-hidroksi benzaldehit	0
ferulik asit	7,48
Apigenin	0,75
Diosmetin	0
Eupatorin	0

4.3.AKTİVİTE VERİLERİ

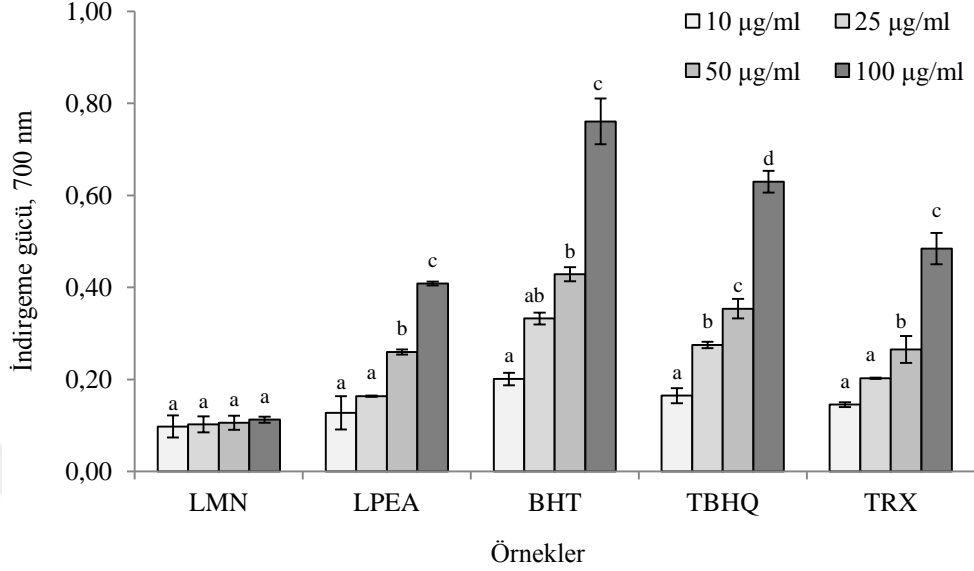
4.3.1. Limonin (LMN) ve limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) toplam antioksidan aktivite testi sonuçları



Şekil 4. 87 Limonin ve limon posası etil asetat ekstresi antioksidan aktiviteleri

Total antioksidan aktivite tayini için kullanılan Mo (VI)'nın Mo (V)'e indirgenmesine dayalı yöntem sonucunda limon atıklarından saflaştırılan limonin molekülünün standartların hepsinden daha yüksek aktivite gösterdiği tespit edildi. Aynı şekilde ham ekstrenin de standartlar kadar yüksek total antioksidan aktivite gösterdiği belirlendi.

4.3.2. Limonin (LMN) ve limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) indirgeme gücü testi sonuçları

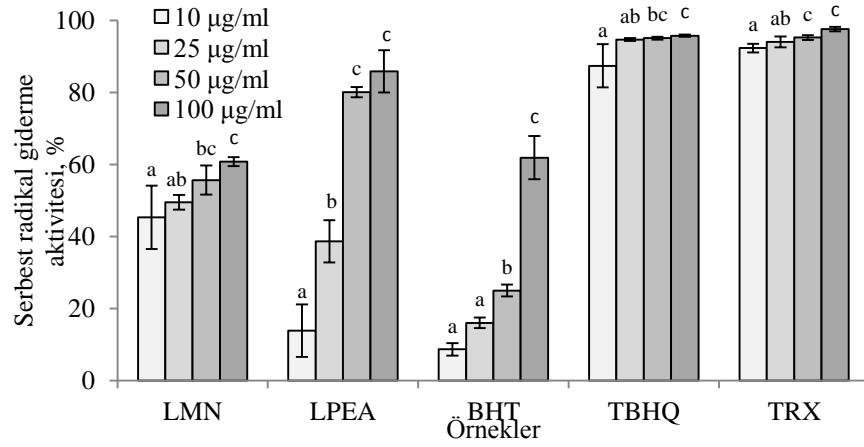


Şekil 4. 88 Limonin ve etil asetat ekstresinin indirgeme gücü değerleri

Fe^{+3} iyonlarının standartlara göre indirgenme gücü karşılaştırılmasında kullanılan spektrometrik ölçümler sonucu elde edilen veriler etil asetat limon posası ekstresinin ve bu ekstreten izole edilen limonin molekülünün standartlardan çok daha düşük bir indirgeme gücü düzeyi gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.88).

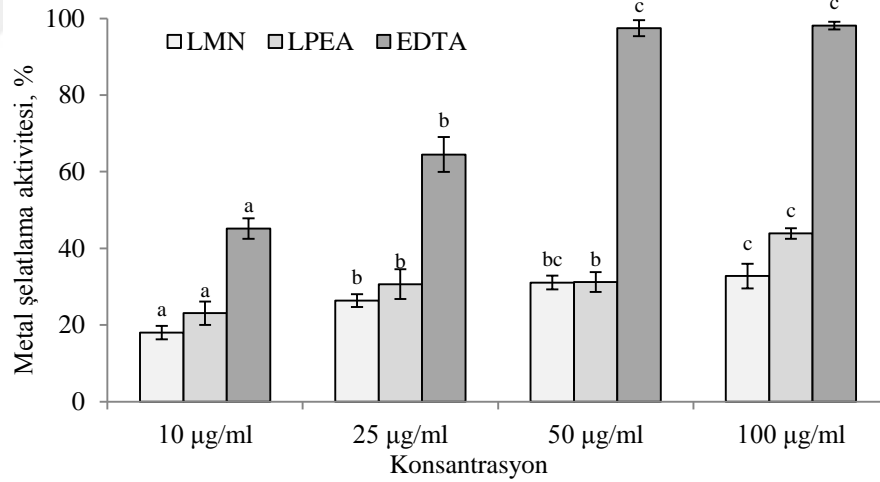
4.3.3. Limonin (LMN) ve Limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) serbest radikal giderme aktivite sonuçları

DPPH' serbest radikale karşı, standartlar TBHQ, BHT, troloks'e göre EA limon posası ekstresi ve saflaştırılan limonin molekülünün oluşan serbest radikalleri giderme aktivitesi 517 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerle belirlenmiştir. Limonin ve etil asetat limon posası ekstresinin DPPH' giderme aktivitesinin standartlardan daha düşük olduğu gözlemlendi (Şekil 4.89).



Şekil 4. 89 Limonin ve etil asetat ekstresi serbest radikal giderme aktiviteleri

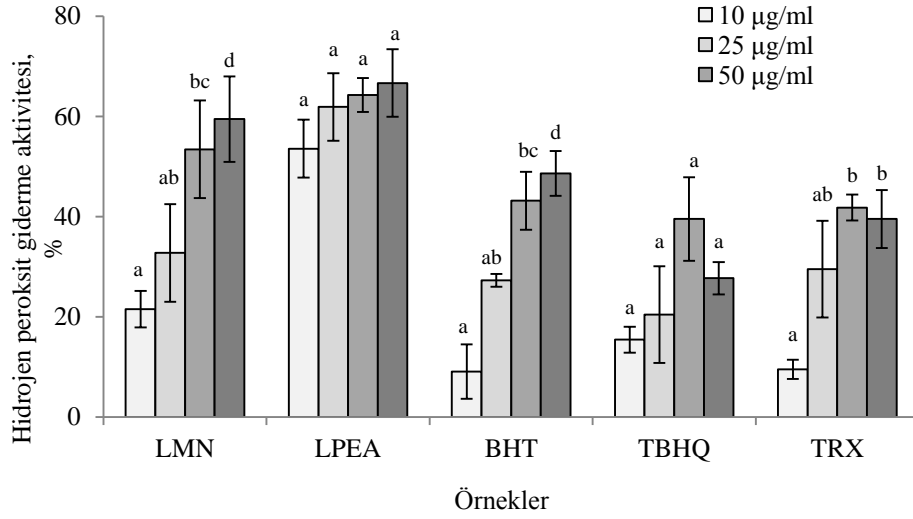
4.3.4. Limonin (LMN) ve limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) metal şelatlama aktivite sonuçları



Şekil 4. 90 Limonin ve etil asetat ekstresinin metal şelatlama aktivite grafiği

EDTA ile karşılaştırmalı olarak gerçekleştirilen konsantrasyona bağlı metal şelatlama aktivitesi testinde limonin ve etil asetat ekstresinin EDTA standardından daha düşük bir metal şelatlama aktivitesi gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.90).

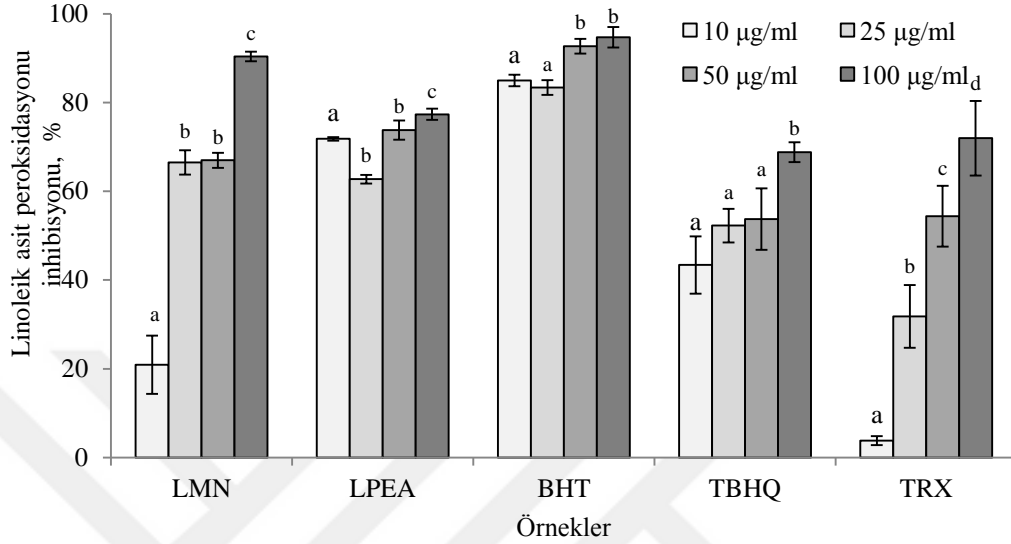
4.3.5. Limonin (LMN) ve Limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) H₂O₂ giderme aktivite sonuçları



Şekil 4. 91 Limonin ve etil asetat ekstresinin peroksit giderme aktiviteleri

Farklı derişimlerde saflaştırılan limonin molekölü ve etil asetat limon posası ekstresi standartlarla karşılaştırmalı H₂O₂ giderme testine tabi tutulmuştur. Limonin ve atil asetat ekstresinin standartlardan çok daha yüksek bir H₂O₂ giderme aktivitesi sergilediği belirlendi (Şekil 4.19).

4.3.6. Limonin (LMN) ve limon posası etilasetat ekstresinin (LPEA) linoleik asit peroksidasyonu inhibisyonu aktivite sonuçları

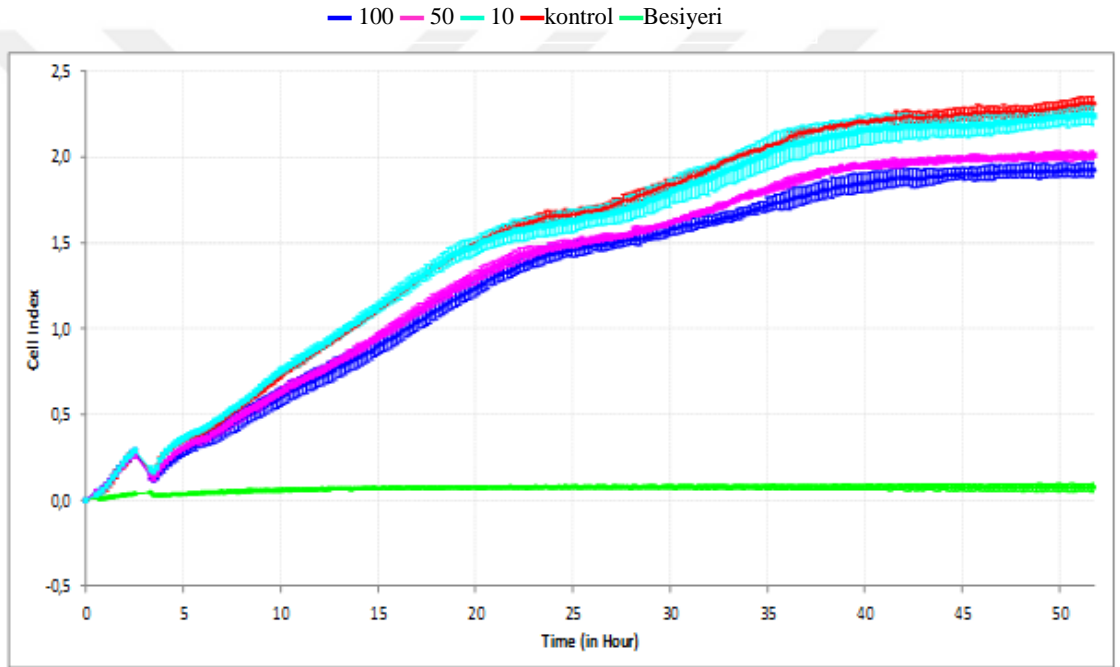


Şekil 4. 92 Limonin ve etil asetat ekstresinin linoleik asit peroksidasyonu inhibisyonu aktiviteleri

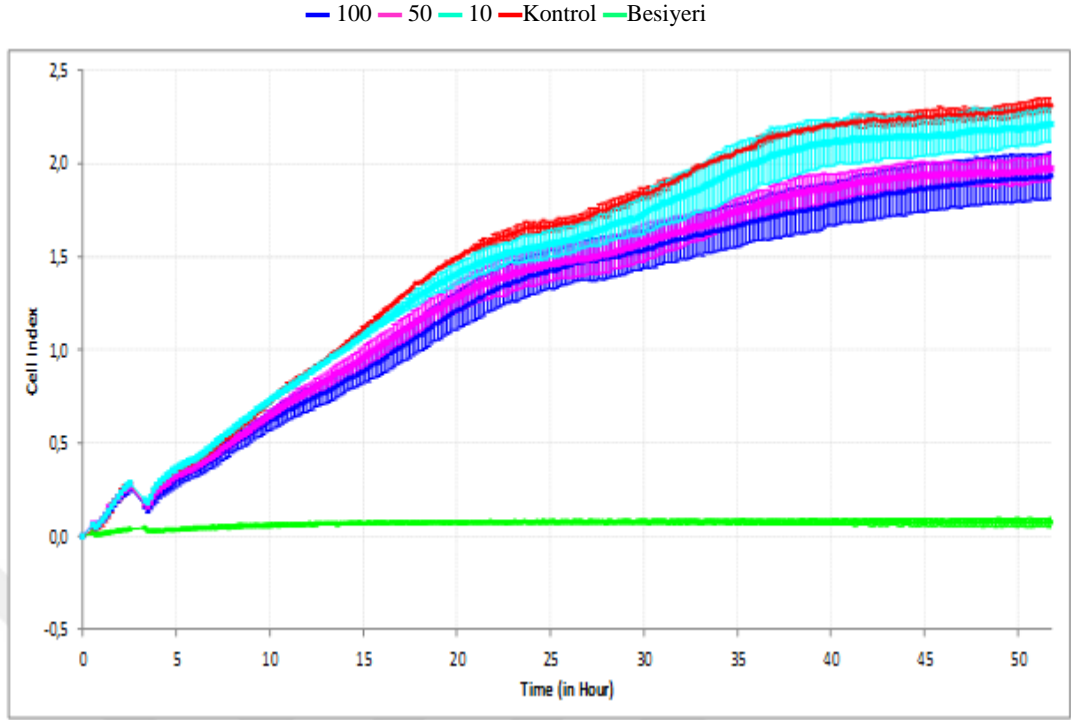
Linoleik asidin peroksidasyonuna karşı standartlar BHT, TBHQ TRX 'e göre saflaştırılan limonin molekülü ve eti asetat limon posası ekstresi karşılaştırmalı aktivite testine tabi tutuldu. Konsantrasyona bağlı deneyler sonunda limonin molekülünün konsantrasyon artırdıkça standartlardan daha yüksek bir peroksidasyon aktivitesi sergilediği belirlendi. EA ekstresinin ise konsantrasyondan bağımsız neredeyse aynı seviyede bir aktivite gösterdiği belirlendi (Şekil 4.92). Bu durum linoleik asit peroksidasyonunun ekstre tarafından önlenmesinde ekstredeki farklı maddelerin limoninden daha aktif bir rol oynadığını göstermektedir.

4.3.7. Kanser aktivite testi

Protokateşik asit PC3 kanser hücre hattına karşı 10, 50, 100 µg/mL dozajında *in vitro* ortamda aktivite testine tabi tutuldu. Test sonuçlarına göre her bir dozajın herhangi bir aktivite göstermediği belirlendi ve her dozda PC3 hücrelerinin kontrol grubuyla aynı düzeyde çoğaldığı bulundu. Protokateşik asidin prostat kanseri hücre hattına karşı herhangi bir antiproliferatif aktivitesi olmadığı tespit edildi (Şekil 4.93).

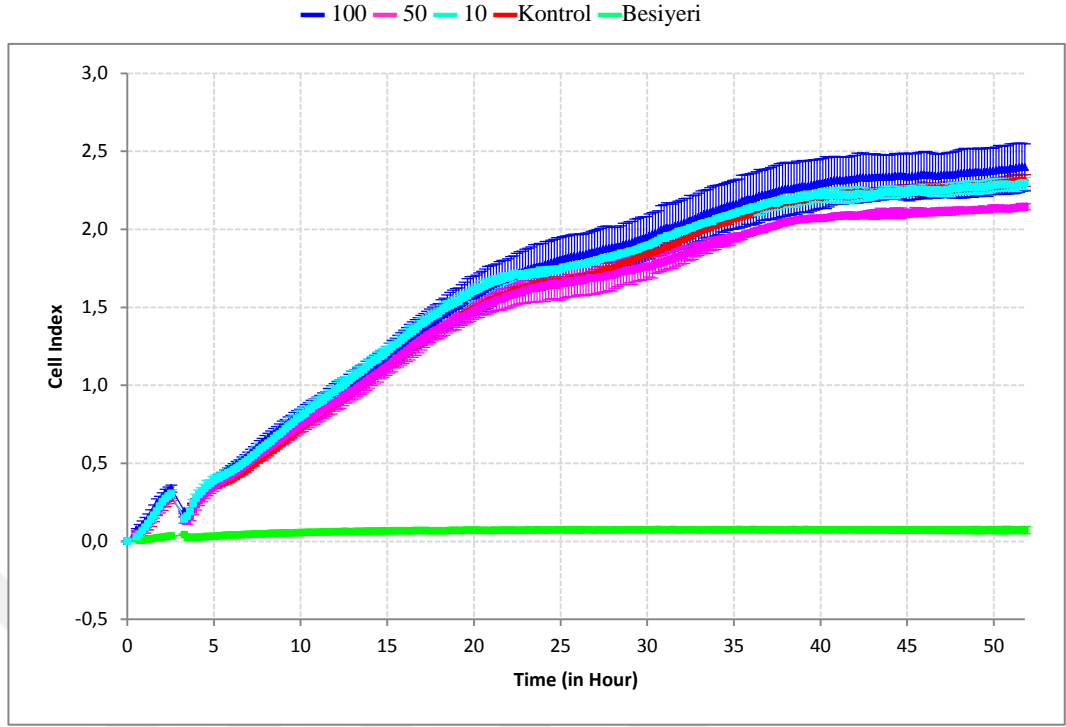


Şekil 4. 93 Protokateşik asitin PC3 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktiviteleri



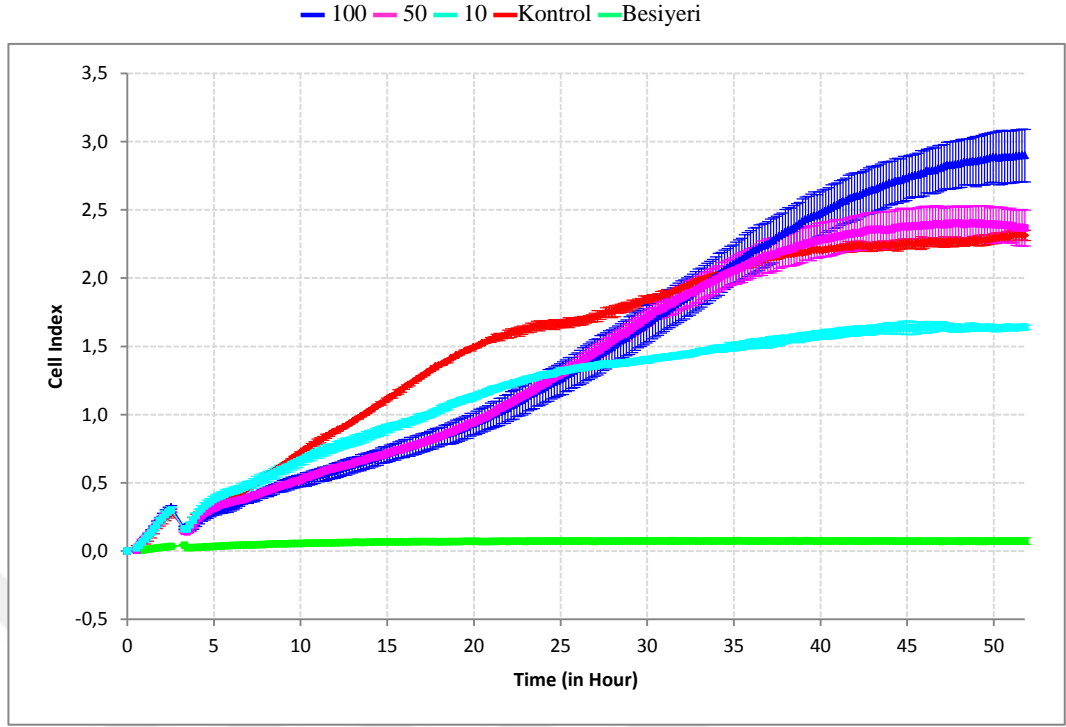
Şekil 4. 94 Diglikolik anhidrit bileşiğinin PC3 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktiviteleri

Etil asetat limon posasından izole edilen diglikolik anhidrit bileşiği PC3 kanser hücre hattına karşı farklı konsantrasyonlarda test edilmiştir. Deneyler sonunda hiçbir antiproliferatif aktivite göstermediği belirlendi (Şekil 4.94).



Şekil 4. 95 Limonin bileşiğinin PC3 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktiviteleri

EA limon posası ekstresinden yüksek saflıkta izole edilen limonin triterpenoit bileşiği PC3 kanser hücre hattına karşı test edildi. Deneysel neticesinde tüm derişimlerin kontrol grubuyla aynı düzeyde çoğaldığı ve hiçbir aktivite göstermediği bulundu (Şekil 4.95).



Şekil 4. 96 Eriodiktiol bileşiğinin PC3 hücre hattına karşı antiproliferasyon aktivteleri

Eriodiktiol flavanoidi PC3 kanser hücre hattına karşı test edilmiştir. Bu bileşiğin farklı dozajlarda yapılan testi sonucunda 10 µg/mL dozajında çok az bir aktivite sergilediği ancak doz artışına bağlı olarak aktivitenin azaldığı ve kontrol grubuyla aynı seviyede bir hücre çoğalması olduğu gözlemlendi (Şekil 4.96).

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Limon posasının suda kaynatılması ve etil asetat ile yapılan ekstraksiyon işlemleri sonucunda elde edilen ekstre HPLC-TOF/MS cihazı ile fenolik bileşen analizi gerçekleştirildi. Etil asetat ekstresinin 7,5 g lık bölümü kromatografik yöntemlerle 7 ana fraksiyona ayrıldı. Bu fraksiyonların ilk 4 üne tekrar farklı çözücü sistemleri kullanılarak kolon kromatografisi uygulandı ve alt fraksiyonlar elde edildi. Bu şekilde ekstrenin bileşenleri boyutlarına ve polaritelerine göre birçok alt fraksiyona dağıtıldı. Bu fraksiyonların her biri benzer bileşenleri içermelerine göre TLC yardımıyla birleştirilerek birbirinden farklı alt fraksiyonlar oluşturuldu. Bu fraksiyonlandırma işlemi sayesinde aynı polaritede birçok bileşenin farklı fraksiyonlara geçtiği gözlemlendi. Bu farklı çözücü sistemlerinde alt fraksiyonlandırma yöntemi ile ekstreyi oluşturan bileşenlerin ayrılabilir düzeye indirilmesiyle her bir fraksiyondaki bileşen sayısı azaltılmış oldu. Daha sonra sefadex ile izolasyonu gerçekleştirilemeyen aynı boyutta ki farklı polariteli bileşenlerin ayrılması küçük silika kolon kromatografisi uygulanarak ana bileşenlerin birçoğunun saflaştırılması sağlandı. Yapılan izolasyon işlemleri sonucunda 14 ana bileşen izole edildi. Bu bileşenler bir limonoid türevi olan limonin, üç tane flavaoid türevi olan hesperidin, hesperetin ve eriodiktiol, üç tane fenolik asit protokateşük asit, 2-hidroksi-4-metoksi-benzenepropanoik asit ve p-kumarik asit, üç tane kumarin türevi; umbelliferon, skopoletin ve sitropten, iki tane fenol türevi pirogallol ve kateşol, bir tane fenolik asit esteri 2-hidroksi 4 metoksi propanoik asit metil ester ve bir anhidrit; diglikolik anhidrit izole edildi. Sayılan bu bileşiklerin yapıları H^1 -NMR, C^{13} NMR, COSY, HMBC, ve HSQC NMR spektrumları kullanılarak belirlendi.

İzolasyon işlemlerinde kullanılan sefadex LH-20 kolona uygulanan farklı çözücü sistemleri ekstredeki molekülleri aktif bir şekilde sınıflamış izolasyon işlemi kolaylık sağlamıştır. Bir dextran türevi olan sefadex gözenek içeren mikron çapında boncuklar şeklindedir. Bu küresel dolgu maddesinin üzerinde bulunan por denen gözenekler farklı çözücülerin etkisiyle büyüyüp daralmakta ve moleküllerin

hareketlerini sınırlayıp serbest bırakmadır. Yoğunluğu yüksek kloroform, metanol gibi çözücü sistemleri bu gözeneklerin şişmesine ve daha büyük çapta moleküllerin kolayca hareket etmesine olanak sağlamaktadır. Yoğunluğu düşük çözücü sistemlerinin kullanılması ile hem sefadex boncuklarının kendi boyutları hem de boncuk yüzeyindeki porların çapları daralmaktadır. Bu nedenle moleküllerin hareketi sınırlanmakta kolon boyunca ilerlemesi yavaşlatılmaktadır. Akış hızı yavaşlatılan kolonda moleküller porlarda daha uzun süre kalabilmekte, porlarla etkileşimi zor olan büyük moleküller kolaylıkla uzaklaşmakta ve kolon boyunca daha rahat ilerlemektedir. Çözücü sisteminin yoğunluğunun azaltılması ile sıkışan sefadex boncukları ekstrenin kolonda kalma süresini artırdığından, porlarla etkileşim tam olarak meydana gelmekte ekstredeki küçük çaplı moleküller porlarda daha uzun süre kaldığından iyi bir ayırım gözlenmektedir. Bizim kullandığımız sistemde yoğunluğu kloroformdan daha düşük olan etil asetat ve hekzan karışımı hem uygun bir polarite aralığı oluşturmuş hem de sefadex boncuklarının çaplarını daraltarak kolonda hareketi sınırlamıştır. Bu ayırım sayesinde kullanımı yaygın olan metanol-kloroform gibi yoğun karışımlardan daha etkili bir ayırım yapılmıştır. Daha düşük yoğunluklu eter gibi çözücülerin ard arda kullanımı sefadex ile yapılan kromatografinin ayırım gücünü artırmıştır. Alt fraksiyonların her biri bir diğerinde yalnızca safzırlık olarak bulunan bileşenlerden oluşması sağlanmış ve etkili bir eksklusyon kromatografisi yapılmıştır. Bu yöntemlerle birçok bileşen ayrılmış ayrılamayan bileşenlerde silika kolon kromatografisinde kolaylıkla ayrılacak düzeye indirilmiştir. EA limon posası ekstresinin içerdiği ana bileşenlerin birçoğu saflaştırılıp NMR teknikleri ile moleküler formülleri belirlenerek uygulanan izolasyon yönteminin üstünlüğü kanıtlanmıştır.

Etil asetat limon posası ekstresinin ana bileşenlerini tespit etmek için yapılan kantitatif ve kalitatif HPLC/TOF –MS analizlerinde standartlar ve kütüphane taraması ile etil asetat limon posası ekstresinde 18 flavanoid 14 fenolik asit 4 fenol 4 kumarin türevi tespit edilmiştir. Flavanoidlerden hesperidin, hesperetin ve eriodiktiol, fenolik asitlerden protokteşik asit, 2-hidroksi-4-metoksibenzenepropanoik asit ve *p*-kumarik asit, kumarin türevlerinden sitropten, umbelliferon ve skopoletin, fenollerden kateşol ve benzenetriol izole edilmiştir.

Yapılan izolasyon işlemleri ile elde mevcut olan standart bileşiklere göre yapılmış fenolik taramasında kantitatif ve kalitatif analizi gerçekleştirilen bileşenlerin çalışılan ilk 4 fraksiyondan bazılarının izole edildiği görülmektedir. *p*-kumarik asit, hesperidin, ve protokateşik HPLC-TOF/MS kantitatif analizi ile tespit edilmiş ve izolasyon işlemleri ile izole edilmiştir. Ayrıca kütüphane taraması sonucu varlığı belirlenen eriodiktiol, benzenetriol, kateşol, sitropten, skopoletin, 2-hidroksi-4-metoksi benzenepropanoik asit ve limoninde izolasyon işlemleri ile saflaştırılmış ve molekül yapıları NMR teknikleri ile belirlenmiştir. Kantitatif analiz sonuçlarına göre EA limon posası ekstresinin ana bileşenlerini gentisik asit, *p*-kumarik asit, hesperidin, 2-hidroksibenzoik asit, neohesperidin, vanilik asit, ferulik asit ve sinapik asit olarak belirlenmiştir. HPLC-TOF/MS analizi sonucunda elde edilen kromatograma göre hazırlanmış kütüphane taramasında ana bileşenler limonin, 4-hidroksi-3-metoksifenil propionic asit, kateşol, eriodiktiol, protokateşik asit, 4-metillumberriferil beta-D-glukuronoid ve *p*-kumarik asit olarak belirlenmiştir. İzole edilen bileşenlerle karşılaştırıldığında kütüphane taraması sonucu belirlenen bileşenlerin ve kromatogramda ki piklerin boyutlarının EA limon posası ekstresinin ana bileşenlerinin tespitinde daha kapsamlı ve doğru sonuç verdiği görülmektedir. Kromatogramda ki göze çarpan önemli piklere ait bileşiklerin çoğunluğu izole edilip yapıları aydınlatılmıştır. Bu durumda EA limon posası ekstresinin ana bileşenleri; limonin, 4-hidroksi-3-metoksifenil propanoic asit, kateşol, eriodiktiol, protokateşik asit, *p*-kumarik asit ve hesperidin olarak tespit edilmiştir.

Aktivite testleri için yeterli düzeyde olan limonin bileşiğine ve EA limon posası ekstresine antioksidan, metal şelatlama, H₂O₂ giderme, linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu, indirgeme gücü testleri uygulandı. İzole edilen limonin, eriodiktiol, protokateşik asit ve diğlikolik anhidrit bileşikleri PC3 kanser hücre hatlarına karşı xCELLing cihazında antiproliferasyon aktivite testine tabi tutuldu.

Mo (VI) indirgenmesine dayanan total antioksidan testinde, BHT, troloks ve TBHQ standartlarına göre saf limonin bileşiğinin konsantrasyona bağlı olarak standartlardan

daha fazla total antioksidan aktivite sergilediği görülmektedir. Aynı şekilde ham ekstre de oldukça yüksek antioksidan aktiviteye sahiptir. Ekstrenin ve limonin bileşiğinin gösterdiği bu aktivite Mo(VI)'nın indirgenmesinde aktif rol oynayan elektron vermeye eğilimli grupların varlığını göstermektedir. Özellikle ekstrede yoğun olarak bulunduğu tespit edilen fenolik asitler ve hidroksi flavanoidler güçlü birer antioksidan özellik sergilemektedir. Ekstrenin güçlü antioksidan potansiyeli fenolik yapılardaki hidroksil protonlarının asidik özellik göstermesine bağlanabilir. Limonin molekülünün total antioksidan aktivitesinin yüksek olması içerdiği elektron vermeye eğilimli karbonil gruplarından kaynaklanmaktadır.

İndirgeme gücü testinde limonin ve ham ekstrenin indirgeme güçleri standartlara göre oldukça az gözükmektedir. Fe⁺³'ün indirgenmesine dayalı testte Limon posası EA ekstresi ve limonin molekülünün Fe⁺³ iyonlarının indirgenmesi için gereken elektron çiftlerini yeteri kadar aktaramadığı görülmektedir. Limonin molekülünün sergilediği indirgeme gücü EA ekstresinden ve kullanılan standartlardan daha az görülmektedir. Bu durum EA ekstresindeki limonin dışı ana bileşenlerin aktivitelerinin oldukça yüksek olduğunu göstermektedir. etil asetat ekstresinin içerdiği yoğun fenolik asit ve flavanoid türevlerinin içerdiği elektron verici gruplar indirgeme kapasitesinde etkilidir.

Canlı organizmalarda biyolojik mekanizmalarla oluşan H₂O₂ molekülünün bozunması sonucunda ·OH radikalleri oluşturmaktadır. Bu radikaller biyolojik sistem açısından son derece tehlikeli olup hücrede çok büyük yıkıma neden olmaktadır. H₂O₂ giderme testinde limonin ve ham ekstre standartlardan daha yüksek bir aktivite sergilemektedir. Etil asetat ekstresi ve limonin molekülünün standartlardan daha yüksek peroksit radikali tutma aktivitesi göstermesi ·OH radikalini bağlayabilecek grupların varlığını göstermektedir.

Linoleik asit peroksidasyonu doymamış yağ asitleri ve steroidlerin radikalik mekanizma üzerinden bozularak hücre içi zararlı moleküllerin oluşmasına neden olan karmaşık bir biyolojik süreçtir. Bu sürecin önlenmesi sağlıklı bir metabolizma için önem arz

etmektedir. Linoleik asit peroksidasyon inhibisyonu testinde limonin ve etil asetat limon posası ekstrenin standartlar kadar kayda değer bir aktivite gösterdiği görülmektedir. Antioksidan ve peroksit giderme testlerinde olduğu gibi linoleik asit peroksidasyonunun önlenmesinde limon posası etil asetat ekstresinin içeriğindeki çeşitli fenolik bileşiklerin benzer radikalik yollar üzerinden peroksidasyonu önlediği söylenebilir.

Canlı organizmadaki bazı metal iyonlarının hücreden uzaklaştırılması hücrenin metabolik süreçlerini düzgün işlemesi için gereklidir. Özellikle civa, kurşun, krom gibi ağır metaller hücre için son derece tehlikelidir. Bu metallerin vücuttan uzaklaştırılması organik moleküllerin bu metallerin iyonlarıyla kararlı şelatlar oluşturmasıyla mümkün olabilmektedir. EDTA gibi bazı şelatlayıcı ajanlar bu iş için oldukça kullanışlıdır. Ayrıca günlük tüketimle alınan gıdaların içerdiği organik moleküllerin şelatlama kapasitesi de bu bağlamda önem arz etmektedir. Etil asetat limon posası ekstresi ve izole edilen limonin molekülü EDTA standardına karşı Fe^{+3} 'u şelatlaması açısından incelenmiştir. Doza bağlı olan denemelerde limon posası etil asetat ekstresinin limonin molekülünden daha iyi bir şelatlama gösterdiği belirlenmiştir. Ekstrenin içerdiği çeşitli kimyasal bileşiklerin toplam şelatlama kapasitesi izole edilen limonin molekülünden daha fazla gözükmektedir. Bu durumda ekstre içerisinde şelatlama özelliği oldukça fazla olan moleküllerin var olduğu görülmektedir.

Limon posasından yeterli düzeyde izole edilen limonin, protokateşik asit, eriodiktiol ve diglikolik anhidrit PC3 hücre hattına karşı antiproliferatif aktivite testlerine tabi tutulmuştur. 10, 50, 100 mg/mL dozajlarında uygulanan testlerde karşılaştırma amaçlı kontrol grubu ve hücre eklenmeyen bir besi yeri test edilmiştir. Her numune üç tekrarlı olacak şekilde hazırlanmış, sonuçlar standart sapma değerleri ile grafik şeklinde verilmiştir. 50 saatlik süre boyunca her 10 dk alınan empedans değerleri ile hücrelerin çoğalması veya ölümleri ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda yapılan deneylerde sayılan bileşiklerin hiçbirinin prostat kanseri hücre hattına karşı *in vitro* ortamda antiproliferatif aktivite göstermediği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

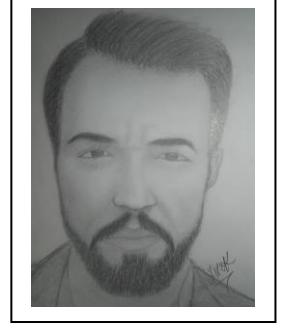
- Ahn, Y.J., Kwon, M., Park, H.M., Han, C.K. (1997). Potent insecticidal activity of Ginkgo biloba derived trilactone terpenes against Nilaparvata lugens. In (ACS Publications).
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. Food chemistry 99(1), 191-203.
- Bayazit, V., Konar, V. 2010. Biochemical and physiological evaluations of limonoids as potential cancer destroyers. Journal of Animal and Veterinary Advances 9(7), 1099-1107.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. nature 181(4617), 1199-1200.
- Bocco, A., Cuvelier, M.-E., Richard, H., Berset, C. 1998. Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46(6), 2123-2129.
- Choi, C.W., Kim, S.C., Hwang, S.S., Choi, B.K., Ahn, H.J., Lee, M.Y., Park, S.H., Kim, S.K. 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. Plant science 163(6), 1161-1168.
- de Menezes, H.D., Pereira, A.C., Brancini, G.T., de Leão, H.C., Júnior, N.S.M., Bachmann, L., Wainwright, M., Bastos, J.K., Braga, G.U. 2014. Furocoumarins and coumarins photoinactivate Colletotrichum acutatum and Aspergillus nidulans fungi under solar radiation. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 131(74-83).
- Del Rio, J., Fuster, M., Gómez, P., Porrás, I., García-Lidón, A., Ortuño, A. 2004. Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest. Food Chemistry 84(3), 457-461.
- Demirtas, I., Erenler, R., Elmastas, M., Goktasoglu, A. 2013. Studies on the antioxidant potential of flavones of Allium vineale isolated from its water-soluble fraction. Food Chemistry 136(1), 34-40.
- Dhanavade, M.J., Jalkute, C.B., Ghosh, J.S., Sonawane, K.D. 2011. Study antimicrobial activity of lemon (Citrus lemon L.) peel extract. British Journal of pharmacology and Toxicology 2(3), 119-122.
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., Aro, A. 2001. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. The Journal of nutrition 131(2), 235-241.
- Esti, M., Cinquanta, L., La Notte, E. 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. Journal of Agricultural and Food Chemistry 46(1), 32-35.
- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L., Singla, A. 2001. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. Phytotherapy Research 15(8), 655-669.
- Guo, C., Yang, J., Wei, J., Li, Y., Xu, J., Jiang, Y. 2003. Antioxidant activities of peel, pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research 23(12), 1719-1726.
- Guthri, N., Morley, K., Hasegawa, S., Manner, G.D., Vandenberg, T. (2000). Inhibition of human breast cancer cells by citrus limonoids. In (ACS Publications).

- Haber, F., Weiss, J. 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London Series A, Mathematical and Physical Sciences* 147(861), 332-351.
- Hoff, W., Dux, P., Hard, K., Devreese, B., Nugteren-Roodzant, I., Crielaard, W., Boelens, R., Kaptein, R., Van Beeumen, J., Hellingwerf, K. 1994. Thiol ester-linked p-coumaric acid as a new photoactive prosthetic group in a protein with rhodopsin-like photochemistry. *Biochemistry* 33(47), 13959-13962.
- Jacob, R., Hasegawa, S., Manners, G. 2000. The potential of citrus limonoids as anticancer agents. *Perishables Handling Quarterly* 102(6-8).
- Jang, H.G., Cox, D.D., Que Jr, L. 1991. A highly reactive functional model for the catechol dioxygenases. Structure and properties of [Fe (TPA) DBC] BPh₄. *Journal of the American Chemical Society* 113(24), 9200-9204.
- Johnston, K., Stern, D., Waiss, A. 1968. Separation of flavonoid compounds on Sephadex LH-20. *Journal of Chromatography A* 33(539-541).
- Justesen, U., Knuthsen, P., Leth, T. 1998. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavanones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 799(1), 101-110.
- Leventhal, H., Easterling, D.V., Coons, H.L., Luchterhand, C.M., Love, R.R. (1986). Adaptation to chemotherapy treatments. In *Women with cancer* (Springer), pp. 172-203.
- Maltese, F., Erkelens, C., van der Kooy, F., Choi, Y.H., Verpoorte, R. 2009. Identification of natural epimeric flavanone glycosides by NMR spectroscopy. *Food chemistry* 116(2), 575-579.
- Matsubara, Y., Kumamoto, H., Iizuka, Y., Murakami, T., Okamoto, K., Miyake, H., Yokoi, K. 1985. Structure and hypotensive effect of flavonoid glycosides in Citrus unshiu peelings. *Agricultural and biological chemistry* 49(4), 909-914.
- Min, Y.D., Kwon, H.C., Yang, M.C., Lee, K.H., Choi, S.U., Lee, K.R. 2007. Isolation of limonoids and alkaloids from *Phellodendron amurense* and their multidrug resistance (MDR) reversal activity. *Archives of pharmacal research* 30(1), 58-63.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Morimitsu, Y., Osawa, T. 1997a. Isolation of C-glucosylflavone from lemon peel and antioxidative activity of flavonoid compounds in lemon fruit. *Journal of agricultural and food chemistry* 45(12), 4619-4623.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Morimitsu, Y., Osawa, T. 1998. Characteristics of antioxidative flavonoid glycosides in lemon fruit. *Food Science and Technology International, Tokyo* 4(1), 48-53.
- Miyake, Y., Yamamoto, K., Osawa, T. 1997b. Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-rutinoside) from lemon fruit (*Citrus limon* BURM. f.) and its antioxidative activity. *Food Science and Technology International, Tokyo* 3(1), 84-89.
- Niketic-Aleksic, G., Hrazdina, G. 1972. Quantitative analysis of the anthocyanin content in grape juices and wines. *Lebensmittel-Wissenschaft+ Technologie Food science+ technology*.

- Nogata, Y., Ohta, H., Sumida, T., Sekiya, K. 2003. Effect of extraction method on the concentrations of selected bioactive compounds in mandarin juice. *Journal of agricultural and food chemistry* 51(25), 7346-7351.
- Oktay, M., Gülçin, İ., Küfrevioğlu, Ö.İ. 2003. Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts. *LWT-Food Science and Technology* 36(2), 263-271.
- Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics* 44(6), 307-315.
- Pietta, P.-G. 2000. Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products* 63(7), 1035-1042.
- Popoff, T., Theander, O. 1976. Formation of aromatic compounds from carbohydrates. *Acta Chem Scand* 30(397-402).
- Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry* 269(2), 337-341.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J., Paganga, G. 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free radical biology and medicine* 20(7), 933-956.
- Sarıca, Ş. 2011. Nar suyu yan ürünlerinin hayvan beslemede kullanım olanakları. *Gaziosmanpaşa Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi* 2011(2).
- Srimanth, K., Rao, V.R., Krishna, D.R. 2002. Synthesis and evaluation of anticancer activity of some imidazothiazolyl, imidazobenzothiazolyl and dihydroimidazothiazolyl coumarins. *Arzneimittelforschung* 52(05), 388-392.
- ToDA, S., Miyase, T., Arichi, H., Tanizawa, H., Takino, Y. 1985. Natural antioxidants. III. Antioxidative components isolated from rhizome of *Curcuma longa* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 33(4), 1725-1728.
- Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., Giammanco, M. 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry* 104(2), 466-479.
- Tsukamoto, H., Hisada, S., Nishibe, S. 1985. Coumarin and secoiridoid glucosides from bark of *Olea africana* and *Olea capensis*. *Chemical and pharmaceutical bulletin* 33(1), 396-399.
- Wang, Y.-C., Chuang, Y.-C., Hsu, H.-W. 2008. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan. *Food chemistry* 106(1), 277-284.
- Wei, K., Wang, L., Zhou, J., He, W., Zeng, J., Jiang, Y., Cheng, H. 2011. Catechin contents in tea (*Camellia sinensis*) as affected by cultivar and environment and their relation to chlorophyll contents. *Food chemistry* 125(1), 44-48.
- Wilcox, L.J., Borradaile, N.M., Huff, M.W. 1999. Antiatherogenic properties of naringenin, a citrus flavonoid. *Cardiovascular Therapeutics* 17(2), 160-178.
- YAMAN, K. 2012. Bitkisel Atıkların Değerlendirilmesi ve Ekonomik Önemi. *Journal of Forestry Faculty of Kastamonu University* 12(2).
- Yu, J., Dandekar, D.V., Toledo, R.T., Singh, R.K., Patil, B.S. 2007. Supercritical fluid extraction of limonoids and naringin from grapefruit (*Citrus paradisi* Macf.) seeds. *Food Chemistry* 105(3), 1026-1031.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yaşar İPEK
Doğum Yeri : TOSYA/KASTAMONU
Doğum Tarihi : 20/06/1992
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce
Adres : Karşıyaka Mah. Yazıçam Cad. No:6
Tel : 05061161301
E-posta : ahmedyasar512@gmail.com



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Tosya Anadolu İmam Hatip Lisesi -2006-2010
Lisans : Çankırı Karatekin Üniversitesi 2011-2015
Yüksek Lisans : ÇKÜ Organik Kimya Anabilim Dalı 2015-2017

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Çankırı Karatekin Üniversitesi – Sözleşmeli personel Merkez / ÇANKIRI
05.09.2017-

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Yaşar İpek, Tefik Özen and İbrahim Demirtas, Extraction, purification, characterization and antioxidant activities of heat-resistance phenolic compounds from lemon pulp. Article 3, Volume 1, Issue 4, Autumn 2017, Page 199-206.