

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**MEYVE SUYU ENDÜSTRİSİNDE YAN ÜRÜN OLAN MEYVE
POSALARINDAN DEĞERLİ KİMYASALLARIN İZOLASYONU VE
AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Mehmet Ali DEMİRCİ

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Kimya Anabilim Dalı

ÇANKIRI

2017

Her Hakkı Saklıdır.

TEZ ONAYI

Mehmet Ali DEMİRCİ tarafından hazırlanan “**Meyve Suyu Endüstrisinde Yan Ürün Olan Meyve Posalarından Değerli Kimyasalların İzolasyonu ve Aktivite Çalışmaları**” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Muhammed ALTUN

Üye : Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil GEÇİBESLER

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Doç. Dr. Tamer KEÇELİ
Enstitü Müdürü

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

MEYVE SUYU ENDÜSTRİSİNDE YAN ÜRÜN OLAN MEYVE POSALARINDAN DEĞERLİ KİMYASALLARIN İZOLASYONU VE AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Mehmet Ali DEMİRCİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Bu çalışma atıl durumdaki meyve posalarında (elma ve mandalina) var olan değerli kimyasal bileşenleri kromatografik yöntemler ile (kolon kromatografisi, İTK vb.) izole etmek, spektroskopik yöntemler ile kimyasal yapılarını tayin etmek ve antioksidan kapasitesini incelemek amacı ile yapılmıştır. Bu kapsamda atıl durumdaki meyve posaları Tokat DİMES fabrikasından temin edildi. Meyve posaları oda şartlarında kurutuldu. Meyve posalarına saf su ilave edildi ve 2 saat kaynatıldı. Elde edilen su fazları sırasıyla Etil asetat ve n-bütanol organik çözücülerini ile ekstraksiyona tabi tutuldu. Elde edilen ekstraktlardan kromatografik yöntemlerle 6 adet kimyasal bileşen saflaştırıldı. Bu doğal bileşiklerin yapıları spektroskopik metodlarla (HPLC-TOF/MS, NMR) belirlenerek 5-hidroksi maltol, protokateşik asit, Kuersetin, gallik asit, gentisik asit ve kojik asit oldukları belirlendi. Elma posasının etil asetat ve n-bütanol ekstraktları ile elma posasından izole edilen 5-hidroksi maltol bileşiğine ait antioksidan aktiviteleri belirlendi. Elma posasının etil asetat ekstresinden elde edilen kojik asit bileşiğinin HeLa hücre hatlarına karşı antiproliferatif aktivite çalışmaları yapıldı.

2017, 92 Sayfa

Anahtar Kelimeler: Antioksidan aktivite, antiproliferatif aktivite, elma posası, izolasyon, mandalina posası, meyve posaları, NMR

ABSTRACT

Master of Science Thesis

ISOLATION AND ACTIVITY STUDIES OF VALUABLE CHEMICALS RECYCLING OF FRUIT PULPS GENERATED IN JUICE INDUSTRY AS BY-PRODUCT

Mehmet Ali DEMİRÇİ

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

This study was carried out with the aim of isolating precious chemical components present in fruit pulps (apple and tangerine) by chromatographic methods (column chromatography, TLC etc.), determining their chemical structures by spectroscopic methods and examining the antioxidant capacity. In this context, fruit pulps were obtained from Tokat DİMES, factory. The fruit pulps were dried in room conditions. Destilated water was added to the fruit pulps and boiled for 2 hours. The resulting water phases were subjected to extraction with ethyl acetate and n-butanol organic solvents, respectively. From the obtained extracts. 6 chemical components were purified by chromatografic methods. These natural compounds were identified by the spectroscopic methods (HPLC-TOF/MS, NMR) to be 5-hydroxy maltol, protocatechic acid, quercetin, gallic acid, gentisic acid and kojic acid. The antioxidant activities of apple pulp extracted with ethyl acetate and n-buthanol as well as the isolated 5-hydroxy maltol compound was determined. The antiproliferative activity of the isolated kojic acid obtained from ethyl acetate extract of apple pulp were investigated against the HeLa cell lines.

2017, 92 Pages

Key words: Antioxidant activity, antiproliferative activity, apple pulp, fruit pulps, isolation, NMR, tangerine pulp

TEŞEKKÜR

Eğitim-öğretim hayatımda ve çalışmalarımda maddi manevi her türlü desteğini sunan çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a, yüksek lisans eğitimimde değerli katkıları bulunan Sayın Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU'na ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Muhammed ALTUN'a, hem laboratuvar dıőında hem de laboratuvar içinde çalıőmalarımda yardımlarını esirgemeyen Arő. Gör. Serkan KOLDAŞ'a, Uzm. Ali Rıza TÜFEKÇİ'ye, Uzm. Fatih GÜL'e, Arő. Ömer Talat AKAR'a, yüksek lisans tezimin araştırma konusu olan meyve posalarını gönderen Sayın Gökhan GÖKDEMİR'e ve DİMES yöneticilerine, antioksidan aktivite tayinlerinde yardımlarından dolayı Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Tefik ÖZEN'e, Meyve posalarını kaynatma işlemlerinde kullanılan destilasyon cihazını Kimya Bölümüne hibe eden Ayhan AKBEK'e ve her zaman yanımda olan ve daima destek olan Babam Ali Rıza DEMİRCİ'ye, Annem Naőide DEMİRCİ'ye, kardeőim Ahmet Rıza DEMİRCİ'ye ve her daim hayır dualarını eksik etmeyen Hanife nineme canı gönülden teőekkürlerimi ve őükranlarımı sunarım.

Bu tez FF011015L32 nolu ankırı Karatekin Üniversitesi Bilimsel Araőtırması Projeleri (BAP) Birimi tarafından desteklenmiőtir.

Mehmet Ali DEMİRCİ

ankırı, Temmuz 2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hastalıklar ve Sekonder Metabolitler	4
2.1.1. Kanserin Tanımı	4
2.1.2. Kansere Neden Olan Etmenler	4
2.1.3. Kanserin Tedavi Edilmesi	5
2.1.4. Oksidasyon ve Antioksidan Aktivite	6
2.1.5. Antioksidan Aktivite Açısından Yapı-Aktivite İlişkisi	6
2.2. Çalışılan Meyvelere Ait Literatür Bilgisi.....	7
2.3. Bitkiler ve Sekonder Metabolitler	8
2.3.1. Sekonder Metabolitler	8
3. MATERYAL ve METOD	9
3.1. Yapılan İşlemler	9
3.1.1. Materyallerin Temini:	9
3.1.2. Özütleme (Ekstraksiyon) İşlemi:	10
3.2. Kullanılan Saflaştırma Metotları	11
3.2.1. Fraksiyonlandırma işlemi.....	11
3.2.2. Kolon Kromatografisi.....	12
3.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi.....	12
3.2.4. HPLC-TOF/MS	13
3.2.5. NMR Spektroskopisi.....	14
3.2.2. Biyolojik Aktivite Testleri	15
3.2.2.1. Antioksidan Aktivite Testleri	15
3.2.2.2 Antiproliferatif Aktivite Testi	19
4. BULGULAR.....	20
4.1. HPLC-TOF/MS Verileri.....	21
4.1.1. Kromatogramlar	21
4.1.1.1. Elma posasının etil asetat ekstraktı.....	21
4.1.1.2. Elma n-BuOH ekstraktı.....	22
4.1.1.3. Mandalina etil asetat ekstraktı	23
4.1.1.4. Mandalina n-BuOH ekstraktı	25
4.1.1.5. Meyve Posalarının HPLC-TOF/MS Kantitatif Sonuçları.....	27
4.2. NMR Verileri.....	29
4.2.1. 5-Hidroksi maltol	30
4.2.2. Protokatesik Asit	36
4.2.3. Kuersetin.....	42
4.2.4. Kojik Asit	48
4.2.5. Gallik Asit	54

4.2.6. Gentsik Asit	60
4.3. Antioksidan Aktivite Testleri	66
4.4. Antiproliferatif Aktivite Testi	73
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	74
KAYNAKLAR	77
ÖZGEÇMİŞ.....	79



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde değer
°C	Santigrat derece

Kısaltmalar

BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
BHT	Bütillenmiş hidroksitoluen
¹³ C	Karbon 13 izotopu
CDCl ₃	Dötero kloroform
CD ₃ OD	Dötero metanol
COSY	Correlated Spectroscopy- Korelasyonlu Spektroskopi
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer NMR
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium- High Glucose
DMSO	Dimetil sülfoksit
DPPH•	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil radikali
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EtOAc	Etilasetat
FeCl	Demir klorür
FeCl ₂	Demir (II) klorür
FeCl ₃	Demir (III) klorür
H ₂ SO ₄	Sülfürik asit
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidroklorik asit
HeLa	İnsan rahim kanser hücresi
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation- Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu

HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence- Heteronükleer tek kuantum tutarlılık
^1H	Hidrojen (proton)
Hz	Hertz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
J	Jiromanyetik Sabit
Kg	Kilogram
L	Litre
mg	miligram
mM	milimolar
μg	mikrogram
μL	mikrolitre
n-BuOH	n-bütanol
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
nm	Nanometre
SS	Standart sapma
ppm	Milyonda bir birim
TBA	2-tiyobarbitürik asit
TCA	Trikloroasetik asit
TBHQ	tert-Butilhidrokinon
TOF/MS	Uçuş zamanlı/Kütle spektrometresi
UV	Ultraviyole

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Meyve posalarını kaynatma işlemi için kullanılan destilasyon düzeneği	10
Şekil 3.2 Meyve posalarına uygulanan ekstraksiyon basamakları.....	11
Şekil 3.3 HPLC-TOF/MS cihazı.....	13
Şekil 3.4 600 MHz NMR cihazı	14
Şekil 4.1 Elma ve mandalina posasından izole edilen kimyasal bileşenler.....	20
Şekil 4.2 Elma posasının EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucunda elde edilen kromatogramı.....	21
Şekil 4.3 Elma posasının n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucunda elde edilen kromatogramı.....	23
Şekil 4.4 Mandalina posasının EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucunda elde edilen kromatogramı.....	24
Şekil 4.5 Mandalina posasının n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucunda elde edilen kromatogramı.....	25
Şekil 4.6 5-hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d ₆ alınan ¹ H NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz).....	30
Şekil 4.7 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d ₆ alınan ¹³ C NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz).....	31
Şekil 4.8 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d ₆ alınan DEPT ¹³ C NMR spektrumu(¹³ C: 125 MHz).....	32
Şekil 4.9 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d ₆ alınan ¹ H- ¹³ C-HSQC NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz; ¹ H: 600 MHz).....	33
Şekil 4.10 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d ₆ alınan ¹ H- ¹³ C-HMBC NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz; ¹ H: 600 MHz).....	34
Şekil 4.11 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d ₆ alınan COSY NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz).....	35
Şekil 4.12 Protokateşik asit bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan ¹ H NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz).....	36
Şekil 4.13 Protokateşik asit bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan ¹³ C NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz).....	37
Şekil 4.14 Protokateşik asit bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan DEPT ¹³ C NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz).....	38
Şekil 4.15 Protokateşik asit bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan ¹ H- ¹³ C-HSQC NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz; ¹ H: 600 MHz).....	39
Şekil 4.16 Protokateşik asit bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan ¹ H- ¹³ C-HMBC NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz; ¹ H: 600 MHz).....	40
Şekil 4.17 17 Protokateşik asit bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan COSY NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz).....	41
Şekil 4.18 Kuersetin bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan ¹ H NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz).....	42
Şekil 4.19 Kuersetin bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan ¹³ C NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz).....	43
Şekil 4.20 Kuersetin bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan DEPT ¹³ C NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz).....	44
Şekil 4.21 Kuersetin bileşiğinin CD ₃ OD-d ₄ alınan ¹ H- ¹³ C-HSQC NMR spektrumu (¹³ C:	

125 MHz; ^1H : 600 MHz).....	45
Şekil 4.22 Kuersetin bileşiğinin $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ alınan $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; ^1H : 600 MHz).....	46
Şekil 4.23 Kuersetin bileşiğinin $\text{CD}_3\text{OD-d}_4$ alınan COSY NMR spektrumu (^1H : 600 MHz).....	47
Sekil 4.24 Kojik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz).....	48
Sekil 4.25 Kojik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz).....	49
Şekil 4.26 Kojik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan DEPT ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz).....	50
Şekil 4.27 Kojik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan $^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; ^1H : 600 MHz).....	51
Şekil 4.28 Kojik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; ^1H : 600 MHz).....	52
Şekil 4.29 Kojik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan COSY NMR spektrumu (^1H : 600 MHz).....	53
Şekil 4.30 Gallik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz).....	54
Şekil 4.31 Gallik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz).....	55
Şekil 4.32 Gallik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan DEPT ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz).....	56
Şekil 4.33 Gallik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; ^1H : 600 MHz).....	57
Şekil 4.34 Gallik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan $^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; ^1H : 600 MHz).....	58
Şekil 4.35 Gallik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan COSY NMR spektrumu (^1H : 600 MHz).....	59
Şekil 4.36 Gentsik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz).....	60
Şekil 4.37 Gentsik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz).....	61
Şekil 4.38 Gentsik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan DEPT ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz).....	62
Şekil 4.39 Gentsik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan $^1\text{H-}^{13}\text{C-HMBC}$ NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; ^1H : 600 MHz).....	63
Şekil 4.40 Gentsik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan $^1\text{H-}^{13}\text{C-HSQC}$ NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; ^1H : 600 MHz).....	64
Şekil 4.41 Gentsik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan COSY NMR spektrumu (^1H : 600 MHz).....	65
Şekil 4.42 5-HM bileşiğinin oksidasyon reaksiyonu.....	68
Şekil 4.43 5-HM bileşiğinin DPPH süpürücü aktivitesi(a), 5-HM bileşiğindeki hidroksil grupları ile serbest radikallerin stabilizasyonu(b).....	69
Şekil 4.44 5-HM bileşiği Fe^{2+} iyonlarının kenetlenmesi için önerilen reaksiyon.....	72
Şekil 4.45 Kojik asit bileşiğinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite test sonucu.....	73

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 DİMES'den elde edilen yıllık atık posa miktarları (2014 yılı verisi).....	3
Çizelge 4.1 Elma posasının EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS kütüphane taraması verilerine göre olası kimyasal bileşiklerin kolondan çıkış zamanları ve molekül kütleleri.....	22
Çizelge 4.2 Elma posasının n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS kütüphane taraması verilerine göre olası kimyasal bileşiklerin kolondan çıkış zamanları ve molekül kütleleri.....	23
Çizelge 4.3 Mandalina posasının EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucuna göre yapılan kütüphane taraması verilerine göre olası kimyasal bileşiklerin kolondan çıkış zamanları ve molekül kütleleri.....	24
Çizelge 4.4 Mandalina posasının n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucuna göre yapılan kütüphane taraması verilerine göre olası kimyasal bileşiklerin kolondan çıkış zamanları ve molekül kütleleri.....	25
Çizelge 4.5 Elma ve mandalina meyve posalarının HPLC-TOF/MS kantitatif analiz sonuçları.....	27
Çizelge 4.6 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin toplam antioksidan aktivite kapasiteleri.....	68
Çizelge 4.7 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-HM bileşiğinin indirgeme gücü kapasiteleri.....	69
Çizelge 4.8 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin serbest radikal giderme aktiviteleri.....	70
Çizelge 4.9 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin hidrojen peroksit giderme aktiviteleri.....	71
Çizelge 4.10 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin lipit peroksidasyon inhibisyonları.....	72
Çizelge 4.11 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin metal şelat aktivite değerleri.....	73

1. GİRİŞ

Yaşadığımız gezegende insanların kaliteli bir hayat sürmesi için sağlıklı yaşlanmaları gereklidir. Hastalanan her birey, doğrudan bir hekime başvurarak tedavi olmaya çalışmaktadır. Hekim, hastaya tedavi amaçlı sentetik ilaçları reçete olarak yazmaktadır. Genellikle bu şekilde hastalar tedavi edilmektedir. Bazı hastalar ise, normal tıpta bulamadığı tedaviyi, geleneksel ve tamamlayıcı tıp ile bulmaya çalışmaktadır. Geleneksel tedavi yöntemi aslında, asırlardır halk arasında şifalı olarak adlandırılan bitkilerin, bazen kaynatılıp suyu içilerek bazen de havanda dövüldükten sonra yaralı bölgenin üzerine kaplanması ile insanların şifa bulmasıdır.

Geçmiş zamanlarda insanlar genellikle doktorların önerdiği sentetik ilaçları kullanarak tedavi olmaktadır. Lakin, son yüzyılda yaşanan savaşlar, fabrikalardan rastgele çevreye atılan kimyasal atıklar, insanların sağlıksız beslenmesi ve spor yapmaması sonucu, sağlıklı insan hücrelerinin zamanla mutasyona uğramasıyla çağımızın meşhur hastalığı kanser oluşmaktadır. Kanser, aşama aşama insan bünyesinde çoğalmaktadır. Genellikle kanserin 1. ve 2. evrelerinde insanlar hasta olduklarını bilmemektedirler. Ne yazık ki çoğu insan kanser hastası olduğunu, yakalandığı kanserin son evresinde farkına varmaktadırlar. İster erken safha da ister son safha da olsun kanseri yenmek kolay değildir. Son çeyrek asırda sıklıkla tedavi yöntemi olarak ilaç tedavisi (kemoterapi) uygulanmakta ve kanserli kısım yeteri kadar azaldığında, küçük bir operasyonla kanserli kitle alınmaktadır. Daha sonra kanser hücrelerinin tekrar canlanma ihtimali vardır. Çünkü kanserli hücreler kan yoluyla vücudun her tarafına ulaşabilirler. Kemoterapi işe yarayabilir fakat her insanın buna dayanma gücü farklıdır. Ayrıca ameliyat ile hastalıklı kısmı almak sadece geçici bir çözüm olmaktadır. Kanserli hücreleri kesin olarak vücuttan atmak gereklidir.

Zaman içinde geleneksel tedavilerde kullanılan bitkilerin, bilim insanları tarafından laboratuvar araştırmalarında kullanılması sonucu, bazı kanser hücrelerine karşı olumlu

sonuçlar alınmıştır. Bu sonuçlardan sonra daha fazla bitkisel kökenli ilaçlar, hemen hemen her kanser hcreti çeşidine uygulanmıştır. Bazıları çok olumlu sonuç verirken bazıları hiç sonuç vermemiştir. Bu gerçekten umut verici bir durumdur. Yakın gelecekte bu tür çalışmaların daha da artması ile kanser hastalıklarının tedavisinde başarı yüzdesinin artacağı beklenilmektedir.

Bitkilerden elde edilen kimyasal bileşenlerin yapılarının belirlenmesinde pek çok spektroskopik yöntemler kullanılmaktadır. Ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon, atomik absorpsiyon, infrared, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve kütle GC-MS, HPLC-TOF/MS) gibi çeşitli yöntemler vardır. Ultraviyole-görünür bölge absorpsiyon spektroskopisinde çözelti içindeki kimyasal bileşiğin absorpladığı foton miktarı belirlenerek, kimyasal bileşiğin hangi dalga aralığında olduğu tayin edilebilir. Infrared cihazında ise kimyasal bileşiğin içindeki atomların titreşimleri gözlemlenerek, kimyasal bileşiğin yapısını bulmak için önemli ipuçları elde edilebilir. Nükleer manyetik rezonans cihazına yerleştirilen kimyasal bileşiğe uygulanan manyetik alan sonucu cihaza bağlı ekranda, organik bileşiğin C ve H iskeletini gösteren pikler oluşur ve bu piklerin okunması vasıtasıyla kimyasal bileşiğin kimyasal yapısı ve sterokimyası çözülebilir. Kütle spektrometresi yardımıyla kimyasal bileşiğin molekül ağırlığı tayin edilebilir. Birkaç spektroskopik yöntem kullanılarak kimyasal bileşiğin yapısı kesin olarak belirlenebilir.

Gelişmiş ülkelerde geri dönüşümün önemi çok fazladır. Öyle ki bazı ülkeler, diğer ülkelerden geri dönüşüm için atık madde istemektedirler. Ülkemizde ise geri dönüşüm pek fazla kullanılmamakta ve hatta kullanılsa bile gelişmiş yöntem ve metodlara başvurulmamaktadır. Örneğin bu tez çalışmasında kullanılan atık meyve posalarının, ülkemizde yeniden kullanılma alanları genellikle yem sanayisi gibi oldukça düşük maliyetli yerlerdir. Oysa yapılan bu tez çalışması sonucu elde edilen ve ileri düzeyde çalışmalar ile daha fazla elde edilebilecek çok sayıda değerli bileşikler, meyve posalarında mevcuttur. Ancak atık meyve posalarından değerli kimyasalların elde edilmesi için endüstriyel ölçekte ileri teknolojinin kullanılmasından ziyade, az ama

garanti ücret alınan yem sanayisinde değerlendirilmektedir. Atık meyve posalarından elde ettiğimiz değerli kimyasalların yurt dışı menşeli satıcı firmaların kataloglarına bakıldığında bu kimyasal bileşenlerin gramı hatta miligram fiyatları oldukça yüksektir. Fakat meyve suyu fabrikalarının da ellerindeki atık meyve posalarını, yem sanayisinde değerlendirmelerinin başlıca sebebi, ülkemizde bu tür değerli kimyasalların yeniden değerlendirilip elde edilebileceği bir yöntem ve tesis bulunmamaktadır.

Çizelge 1.1 DİMES'den elde edilen yıllık atık posa miktarları (2014 yılı verileri)

Meyve Adı	Toplanan Atık Posa
Beyaz üzüm	202 Ton
Elma	650 Ton
Nar	1125 Ton
Limon	3500 Ton
Mandalina	23 Ton
Greyfurt	288 Ton
Portakal	14000 Ton
Vişne	430 Ton
Şeftali	820 Ton
Kayısı	314 Ton
Kırmızı Üzüm	20 Ton

Tez çalışması kapsamında kullanılan atıl durumdaki meyve posaları Tokat DİMES fabrikasından temin edildi. Meyve posaları oda şartlarında kurutuldu. Meyve posalarına saf su ilave edildi ve 2 saat kaynatıldı. Elde edilen su fazı sırasıyla etil asetat ve n-bütanol organik çözücüleri ile ekstraksiyona tabi tutuldu. Ekstraksiyonlar döner buharlaştırıcı cihaz yardımıyla çözücüleri uzaklaştırıldı. Geriye kalan ekstraktlardan kromatografik yöntemlerle 6 adet kimyasal bileşen saflaştırıldı. Bu doğal bileşiklerin yapıları spektroskopik metodlarla (HPLC-TOF/MS, NMR) belirlenerek 5-hidroksi maltol, protokateşik asit, Kuersetin, kojik asit, gallik asit ve gentisik asit oldukları belirlendi. İzole edilen 5-hidroksi maltol bileşiği, elma etil asetat ve n-bütanol ekstraktlarına antioksidan aktivite testleri yapıldı. Ayrıca kojik asit bileşiğinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite çalışması gerçekleştirildi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastalıklar ve Sekonder Metabolitler

2.1.1. Kanserin Tanımı

Genetik bir hastalık olan kanser, hücresel gelişimi kontrol eden genlerde hasar meydana getirip kontrolsüz hücre büyümelerine yol açmaktadır. Genelde kalıtsal değildir (Horvathova *et al.* 2007). Ancak, kanser olaylarının %1'inde, eşey-kök hücrelerinin çeşitli genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonraki nesillere aktarılır ve bu değişim, yeni neslin kansere yatkınlığını oluşturur (Cummings and Klug 2002).

İnsanların yakalandıkları kanserler, biyolojik ve klinik bakımlardan birbirlerinden çok farklı özellikleri olan ortalama 100 değişik hastalıktan oluşmaktadır. Bazıları çok yavaş ilerleyen, tedavi edilmediklerinde bile uzun yıllar boyu yaşama olanak veren durumlardır. Diğer yandan tedavi edilmediklerinde genelde aylar içinde organdan organa metastaz olarak ölüme yol açabilen saldırgan kanserler de bilinmektedir (Prieto and Lambert 1999).

2.1.2. Kansere Neden Olan Etmenler

Etrafımızda bulunan kimyasal ve biyolojik ajanlar, kanser oluşumunda oldukça etkilidir. Bu ajanlar hücre içerisindeki proteinler, lipitler ve en önemlisi hücrenin genetik materyali olan nükleik asitler ile etkileşmektedirler. Tek bir ajan, tümör oluşumunda etkili değildir. Başlatıcı (initiator) karsinojenler genetik değişikliklere sebep olur, daha sonra artırıcı (promoter) karsinojenler bu mutasyona uğramış hücrelerin çoğalmasını

uyarır, başlatıcılar kendileri karsinojen değildir. Hücrelerin karsinojen maddeye başlatıcılardan önce maruz kalmış olması gerekir, ne kadar zaman önce olduğu önemli değildir. Kimyasal karsinojenler, alkilasyon ajanları, polisiklik ve heterosiklik hidrokarbonlar, aromatik aminlerdir. Çok sayıda DNA ve RNA virüslerinin canlılarda amiplerden primatlara kadar hayvan türlerinde ve viral orijinli insan kanserlerine yol açtığı bulunmuştur. Kansere yol açan virüsler, değişik mekanizmalarla hücrelerde dönüşüme yol açarlar (Clayson 2000; Cotran *et al.* 1999; Livolsi *et al.* 1994; Prieto and Lambert 1999; Von Gadowet *et al.* 1997).

2.1.3. Kanserin Tedavi Edilmesi

Kanser tedavisinde üç ana yaklaşım vardır: cerrahi, radyasyon ve kimyasal tedavi. Kimyasal tedavi sitotoksik ilaçlarla az sayıdaki kanser türü için tercih edilen bir yöntemdir. Bu ilaçların etkinliği; kanserin tipine, hastanın biyolojik ve fizyolojik durumuna, tümörün büyümesi veya yayılıp yayılmadığına bağlıdır. Birçok tümörde cerrahi ve radyasyona yardımcı olarak kullanılır (Bökesoy vd. 2000).

Kanserin kimyasal tedavisinde üç hedef vardır. Birincisi kesin tedavi; kullanılan ilaçlarla tümörün büyümesini engelleyecek ölümcül sitotoksik etki sağlamak istenmektedir. İdeal olarak bu ilaçların sadece maliyn hücreleri etkilemesi amaçlanır. İkincisi, kontrol; eğer kanserin tamamen ortadan kaldırılması mümkün değilse, büyümesini durdurmak ve yayılmasını önlemek, hastanın normal hayatını sürdürmesidir. Üçüncüsü anlık tedavi; kanser son evrede ise kesin tedavisi ve yayılmasını engellemek mümkün olmayabilir. Böyle durumda, hastalığın belirtilerine yönelik tedavi ve hayat kalitesini artırmak hedeflenir (Bökesoy vd. 2000).

2.1.4. Oksidasyon ve Antioksidan Aktivite

Oksidasyon, bir atom ya da molekülün bir alıcıya elektron vermesi olayıdır. İnsan bünyesindeki ve besinlerdeki lipidler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler oksidasyona uğrayabilmekte ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilmektedir. Bilim dünyasında buna “Oksidatif stres” denilmektedir (Ruacan 2003). Oksidatif stres bazı kanser türleri ve koroner kalp hastalıkları gibi çeşitli kronik hastalıkların riskini artırmanın yanı sıra, Parkinson gibi nörodejeneratif rahatsızlıklarla hücre ve deri yaşlanmasına da neden olmaktadır (Ame *et al.* 1993; Gerber *et al.* 2002; Kris-Etherton *et al.* 2002; Papas 1996).

2.1.5. Antioksidan Aktivite Açısından Yapı-Aktivite İlişkisi

Antioksidan aktivite; ekstraksiyon metoduna, çözücüsünün polaritesi ve türüne, izolasyon tekniklerine ve aktif bileşiklerin saflığına bağlıdır (Meyer *et al.* 1998). Bu faktörün haricinde ekstraksiyon süresinin de antioksidan aktiviteyi etkilediği tespit edilmiştir (Lapornik *et al.* 2005). Fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin kimyasal yapısına bağlı olduğu rapor edilmiştir. Antioksidan aktivite için antioksidanın diğer bileşiklerle etkileşimi önemli olduğundan, bir bileşiğin antioksidan potansiyeli antioksidan test sistemine, aynı test sistemi için çözücü polaritesine göre farklılıklar gösterebilmektedir (Livolsi *et al.* 1994). Bu sebepten bir bileşiğin antioksidan aktivitesi belirlenirken, bu bileşiğin bir yöntemde güçlü bir antioksidan, başka bir yöntemde ise prooksidant olduğu rapor edilmiştir (Tozlu *et al.* 2011).

2.2. Çalışılan Meyvelere Ait Literatür Bilgisi

Tüm dünyada ölüm nedenleri arasında kalp hastalıkları birinci, kanser hastalıkları ise ikinci sıradadır. Dünya Sağlık Örgütü, bu yaygın hastalıklardan korunulması için daha fazla meyve ve sebze tüketilmesini öngören bir program önermektedir. Bunun başlıca nedeni; meyve, sebze ve türevi gıdaların en zengin antioksidan kaynağı olması ve kanser ve kalp hastalıkları riskini azaltmasıdır. Meyve ve meyve suyunda bulunan antioksidan bileşiklerin en bilinenleri karotenoidler ile C ve E vitaminleridir. Ancak, son 20 yılda yapılan araştırmalar fenolik bileşiklerin bu açıdan daha etkili olduğunu kanıtlamıştır. Fenoliklerin başlıca örnekleri; kateşin, epikateşin, kaempferol, Kuersetin, naringenin, hesperidin, floridzin ve siyanidin ile delfinidin, malvidin gibi antosiyaninlerdir. Turuncu rengin kaynağı olan karotenoidler şeftali, kayısı ve portakalda; kırmızı-mor rengi veren antosiyaninler vişne, üzüm, erik ve narda; buruk tadın kaynağı olan kateşin ve epikateşinler ise elma, armut, ayva gibi meyvelerde daha çok bulunmaktadır. Türk Gıda Kodeksi'ne göre meyve oranı meyve suyunda %100 olmalıdır. Meyve nektarında ise minimum meyve oranı çeşide göre değişmektedir ve vişne nektarında %35, kayısı nektarında %40, şeftali nektarında %45, portakal nektarında %50' dir (Ekşi 2006).

2.3. Bitkiler ve Sekonder Metabolitler

2.3.1. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler primer metabolitlerden farklı olarak, bitkilerin hayatlarını devam ettirmelerini sağlaması için değil, savunma ve ekolojik çevreden etkilenmemesi için bitkiler tarafından üretilen ve kullanılan doğal kimyasal bileşiklerdir. Çünkü canlının kendisini diğer canlılardan koruması, bulunduğu zorlu çevre şartlarında hayatta kalabilmesi için sekonder metabolitler hayati öneme sahiptir (Lemriss *et al.* 2003). Sekonder metabolitler farklı renk, koku ve tat gibi özellikleri olan kimyasal bileşiklerdir (Vining and Ebreo 1990).

Sekonder metabolitler genelde bitkilerde, bakteri ve mantarlarda üretilirler. Bitkilerin ortamlarıyla uyumunda, korunmasında ve yaşamaya devam etmesinde sekonder metabolitler oldukça önemlidirler. Tabiatı keşfedilen sekonder metabolitler genelde piroller, terpenler, flavonoidler, peptitler, glikopeptitler, indoller ve alkaloidlerdir (Dong and Liang 2003).

Bitkilerin ürettiği sekonder metabolitlerden bazıları, bazen sadece bir bitki tarafından üretilir. Başka bir bitkide aynı durumdan müzdarip olmasına rağmen farklı bir sekonder metabolit üreterek kendisini koruyabilir. Farklı bitki türlerinin her biri aynı veyahut farklı etmenlerden dolayı kendilerini korumak ve yaşamlarını devam ettirebilmek için binlerce sekonder metabolit üretebilirler. Bilim insanları, bitkilerden elde ettikleri sekonder metabolitler sayesinde kimya sanayisinde kullanılabilecek çok değerli kimyasal bileşenleri üretebiliyorlar (Oskay and Oskay 2009).

3. MATERYAL ve METOD

3.1. Yapılan İşlemler

3.1.1. Materyallerin Temini:

Tez projesi kapsamında kullanılan materyaller, Tokat ilinde hizmet veren DİMES meyve suyu fabrikasından sağlandı. İlgili kuruluştan alınan meyve suyu posalarının taşınma işlemi uygun sıcaklıkta gerçekleştirildi. Güneş görmeyen ağzı kapaklı koyu cam kaplarda saklanan ve havalandırma sorunu olmayan yerlerde, materyaller muhafaza edildi.

Kullanılan Kimyasallar

Etil asetat (Merck), metanol (Merck), hekzan (Merck), diklorometan (Merck), kloroform (Merck), n-bütanol (Merck), silika jel, TLC (İTK) tabakalar, kromatografik izolasyon çalışmalarında kullanıldı. HPLC/TOF-MS analizleri için %0.1 formik asit ve asetonitril çözücüleri kullanıldı. Antioksidan ve diğer indirgeme testleri için Bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tert-Butilhidrokinon (TBHQ), Bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), C vitamini, troloks, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), linoleik asit, fosfat tamponu, α - tokoferol, Trikloroasetik asit (TCA), 2-tiyobarbitürik asit (TBA), Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), $K_3Fe(CN)_6$, sodyum fosfat, amonyum molibdat, Demir klorür (FeCl), $Na_2S_2O_3$ kullanıldı.

NMR analizleri için çözücü olarak döteryumlu çözücüler (DMSO ve CD_3OD) kullanıldı. Kanser çalışmaları için DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), tripsin EDTA, HeLa (insan rahim kanseri hücresi) kullanıldı.

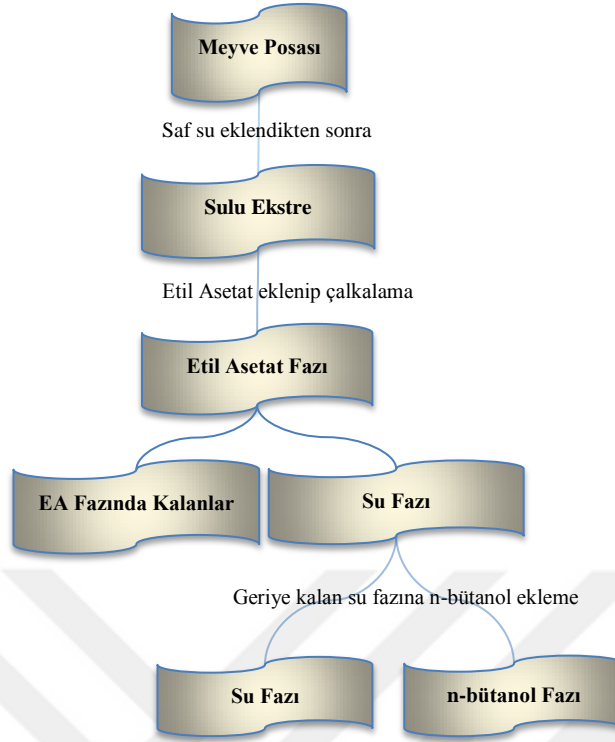
3.1.2. Özütlenme (Ekstraksiyon) İşlemi:

Demirtaş ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada (Demirtaş *et al.* 2013), suda çözünebilen fenoliklerin alınması için etil asetat çözücü ekstraksiyonu yöntemi kullanıldı. Benzer metod kullanılarak geliştirilen ekstraksiyon cihazı Şekil 3.1'de görülmektedir. Bu amaçla, Ayhan AKBEK tarafından tasarlanan ve Nizip sanayisinde yaptırılan 25 Lt kapasiteli ve uçucu kısmın geri kazanılmasını sağlamak için, geri soğutuculu ve ısı kontrollü destilasyon düzeneği kullanıldı (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Meyve posalarını kaynatma işlemi için kullanılan destilasyon düzeneği

Belirli miktarda meyve posası, suda 2-3 saat reflüks altında kaynatıldı. Elde edilen karışım önce bir bez ile, sonrada süzgeç kağıdında süzüldü. Elde edilen sulu faz, sırasıyla etil asetat ve n-bütanol çözücüleri kullanılarak ekstraksiyon işlemleri gerçekleştirildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Meyve posalarına uygulanan ekstraksiyon basamakları

Elde edilen fraksiyonların çözücüsü uzaklaştırıldıktan sonra izolasyon ve aktivite test işlemleri için hazır hale getirildi (Demirtas *et al.* 2013). Aynı çözücü sisteminde bu işlem 2-3 defa ekstraksiyona tabi tutuldu ve elde edilen bütün ekstraktların çözücülerini uzaklaştırıldı.

3.2. Kullanılan Saflaştırma Metotları

3.2.1. Fraksiyonlandırma işlemi

Hedef fraksiyonun belirlenmesi için meyve posası, ekstraksiyon işlemine tabi tutuldu. Ayırma hunusine alınan ham meyve posa ekstraktlarından elde edilen fraksiyonlar

apolardan polara doğru artan çözücü sistemi kullanılarak fraksiyonlandırıldı. Her bir fraksiyon ayrı ayrı toplandı ve çözücüleri döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı.

3.2.2. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi çalışmaları için farklı ebatlarda ve özellikte kolonlar kullanıldı. Fraksiyonlandırma işlemi sonucunda elde edilen hedef ekstredeki bileşenlerin ayrılması için kolon kromatografisi işlemi uygulandı. Kolon kromatografisi cam kolonlarda dolgu maddesi kuru yükleme/bulamaç yaparak gerçekleştirildi. Ekstre uygun bir çözücüde çözüldü ve ardından içine bir miktar silika jel eklendi. Ekstre içindeki çözücü döner buharlaştırıcı ile geri kazanılarak, ekstrenin silika jel tarafından emilmesi sağlandı. Silikajel ve ekstrenin içinden çözücüyü tamamen uzaklaştırmak için oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Kolona ilk olarak silika jel dolduruldu ve bir hortum yardımıyla kolon çeperlerine yavaş yavaş vurularak silika jelin kolon içine iyice oturması sağlandı. Silikajelin kolon içindeki üst tabakası düzleştirildikten sonra toz silika jel ve ekstre karışımı kolona dolduruldu. Ekstre-silika jel karışımından oluşan tabakanın üst yüzeyi düzleştirildi ve bu tabakanın üzerine cam yünü/pamuk/deniz kumu dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Kolon kromatografisinde ayırımı yapılacak karışımların çözücü sistemleri ince tabaka kromatografisi ile belirlendi.

3.2.3. İnce Tabaka Kromatografisi

Herhangi bir karışım içindeki bileşenlerin kalitatif analizinin yapılmasını sağlayan kromatografi çeşididir. Alüminyum plakalar üzerine silikajel ya da alimüna partikülleri yerleştirilmiş tabaklar ticari olarak mevcuttur. Uygun aparatlarla destek fazı cam plakalar üzerine çekilerek preparatif olarak da kullanılabilir. Numune uygulaması kapiler bir tüp kullanılarak yapılır. Uygulanan numune spotları kuruduktan sonra plaka az miktar mobil faz içeren cam bir tank içine alınır. Mobil faz plakanın üzerine yukarıya

doğru kapiler etki ile tırmanır. Uygulama sonrası madde spotları UV (254 ve 366 nm) ışığı altında kontrol edilir. UV (ultraviyole) ışığı altında görünmeyen bileşenler iyot, seriksülfat gibi reaktiflerle görünür hale getirildikten sonra değerlendirme yapılır. R_f değerleri aynı olan maddeler aynı maddeler olarak değerlendirilir. Bu çalışmada İTK uygulamaları kolon kromatografisi ile toplanan fraksiyonlardan aynı olanlarını birleştirmek için kullanılmıştır. Spotların görünür hale getirilmesi işlemi seriksülfat çözeltisi ile yapılmıştır.

3.2.4. HPLC-TOF/MS

Meyve posası etkstrelerinin fenolik bileşen analizi Agilent marka, 1260 Infinity HPLC modeli ve 6210 Time of Flight, LC/MS dedektörü ve ZORBAX SB-C18 (4,6 x 100 mm, 3,5 μ m) kolonu ile kantitatif yapıldı (Şekil 3.3). Hareketli faz olarak içerisinde %1'lik formik asit bulunan ultra saf su ve asetonitril kullanıldı. Akış oranı dakikada 0.6 ml olarak, enjeksiyon hacmi 10 μ L ve kolon sıcaklığı 35°C olacak şekilde programlama yapıldı. A (Su), B (asetonitril). Solvent programı, 0-1. dakika aralığında %10 B; 1-20. dakika aralığında %50 B; 20-23. dakika aralığında %80 B; 23-30.dakika aralığında%10 B çözücüsü kolondan geçecek şekilde programlama yapıldı.



Şekil 3.3 HPLC-TOF/MS cihazı

3.2.5. NMR Spektroskopisi

Kromatografik yöntemler sonucu izole edilen bileşiklerin yapılarını tayin etmek için Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında var olan 600 MHz NMR cihazı kullanılarak (Şekil 3.4) bileşiklere ait ^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC ve COSY NMR'ları dötero çözücülerle (DMSO, CD_3OD , CDCl_3) alınarak kesin yapıları tayin edildi.



Şekil 3.4 600 MHz NMR cihazı

3.2.2. Biyolojik Aktivite Testleri

3.2.2.1. Antioksidan Aktivite Testleri

Total Antioksidan Kapasite

Bitki ekstralarının toplam antioksidan kapasitesi, spektrofotometrik fosfomolibden yöntemine göre çalışıldı. Bu yöntem, ortamda bulunan Mo (VI)'ün ortama konan indirgeyici ajan tarafından Mo (V)'e indirgenmesi sonucu oluşan yeşil rengin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır (Prieto and Lambert 1999). 1 mg/mL konsantrasyonda olan stok ekstre çözeltisinden alınan 200 µL örnek ve 2 mL reaktif çözeltisi (0,6 M'lık sülfürik asit, 28 mM'lık sodyum fosfat ve 4 mM'lık amonyum molibdat) tüplere konularak ağızları kapatıldıktan sonra 95°C'de 90 dakika inkübe edildi. Örnekler oda sıcaklığında soğutuldu ve 695 nm dalga boyunda kör örneğe (0,2 mL metanol, 2 mL reaktif çözeltisi) karşı absorbans okutuldu. Total antioksidan kapasite sonuçları mg α-TE (α-tokoferol ekivalenti) /g ekstre şeklinde verildi.

İndirgeme Gücü Tayini

1 mL farklı konsantrasyonda hazırlanmış ekstraktlar (ve standartların; BHA, TBHQ, BHT, C vitamini, troloks ve α-tokoferol), 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 10 dakika 2200 rpm'de 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 konsantrasyonlarda absorpsiyonlarındaki artış, indirgeme gücü kapasitesinin konsantrasyonuna bağlı artışını gösterir (Oyaizu 1986).

Serbest Radikal Giderme Aktivitesi (DPPH Testi)

Bitki ekstratlarının DPPH serbest radikalini süpürücü etkileri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil stabil radikalinin menekşe/mor rengini giderme yetenekleri ile ölçülmektedir. Bu maddelerin DPPH ile oluşturdukları rengin 517 nm'de ölçümüne ve standart madde ile karşılaştırılmasına dayanmaktadır (Blois 1958). Metot, ekstraktların bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanır. Reaksiyon karışımının absorbansının düşmesi, serbest radikal giderme aktivitesinin göstergesidir. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini etkinliğinin giderilmesi çalışmaları çeşitli araştırmacıların ortaya koydukları metodu takiben yapılmıştır (Hatano *et al.* 1988). Bu metoda göre, 0,1-0,5 µg/mL'lik konsantrasyona sahip olan 1 mL'lik örnekler ve standartların çözeltileri, 0,1 mM'lık DPPH çözeltisinin 1 mL'si ile vorteks yardımıyla 30 saniye karıştırıldıktan sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 60 dakika bekletildi. Ardından 517 nm'de kör numuneye karşı spektrofotometrik ölçüm alındı.

H₂O₂ Giderme Aktivitesi

H₂O₂ giderme aktivitesi; H₂O₂ (1,0 mL, 0,1 mM) ve 1,0 mL bitki ekstraktından hazırlanmış (veya standartların; BHA, TBHQ, BHT, C vitamini, troloks ve α-tokoferol) çözeltileri ilave edilerek iyice karıştırıldı. 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 (Zhao *et al.* 2006).

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

V_o , H_2O_2 nin bulunduğu ortamda (ekstrakt veya standart madde olmadan; dd H_2O kullanılır) harcanan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hacmi (mL), V_1 ise ekstrakt veya standart maddenin bulunduğu karışımda $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ hacmini (mL) göstermektedir.

Lipit Peroksidasyonu İnhibisyon Testi

1 mL (10, 25, 50, 100 g/mL) ekstrakt çözeltileri (veya standart çözeltileri), 550 μL linoleik asit (0,02 M), 500 μL fosfat tamponu (100 μM , pH 7,4) ve 150 μL askorbik asit (10 μM) homojen karışması için vorteksle karıştırıldı. Linoleik asit peroksidasyonu 0,1 mL FeSO_4 'ün (10 μM) eklenmesiyle başlatıldı. Reaksiyon karışımı 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 dakika sallantılı su banyosunda inkübe edildi. Karışım $20-25^\circ\text{C}$ 'ye soğutuldu. Daha sonra karışımdan 3 mL ayrı deney tüplerine alındı ve 3 mL n-bütanol ilave edildi. Homojen karışım 10 dakika santrifüjlendi ve renkli üst faz spektrofotometre küvetine aktarıldı. Karışımın absorpsiyonu 532 nm'de okundu. Linoleik asit peroksidasyon inhibisyon yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı (Ntambi *et al.* 2002).

$$\% \text{ inhibisyon} = 1 - (A_o - A_1)/A_o \times 100$$

A_o , kontrol; ekstrakt numunesi yerine (veya standart) çözücü kullanılan karışımının absorbansı, A_1 ekstrakt (veya standart) bulunan karışımının absorbansı

Metal Şelatlama Aktivitesinin Belirlenmesi

Metal şelatlama özelliği olan antioksidan maddeler serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirir ve böylece fenton reaksiyonları sonucu oluşan hidroksil ve peroksit gibi radikal oluşumunu inhibe eder. Bu deneyde örneklerin Fe^{+2} şelatlama etkisi incelendi. Bu amaçla $FeCl_2$ çözeltisi kullanıldı. Fe^{+2} iyonu ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin 562 nm'de mor renk oluşturmasına dayanılarak şelatlama aktivitesi belirlendi. Örneklerin ve standartların metal şelatlama kapasitesi Dinis ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemler esas alınarak uygulandı (Dinis *et al.* 1994). Örnek ve standart çözeltilerinin konsantrasyonları 10, 25, 50 ve 100 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde toplam hacimleri metanol ile 2 ml'ye tamamlandı. Her bir numune 25 μL , 2 mM $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ çözeltisi ile 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 100 μL , 5 mM ferrozin eklenerek 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Demir iyonları ve ferrozinin oluşturduğu kompleksin absorbanı 562 nm'de ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

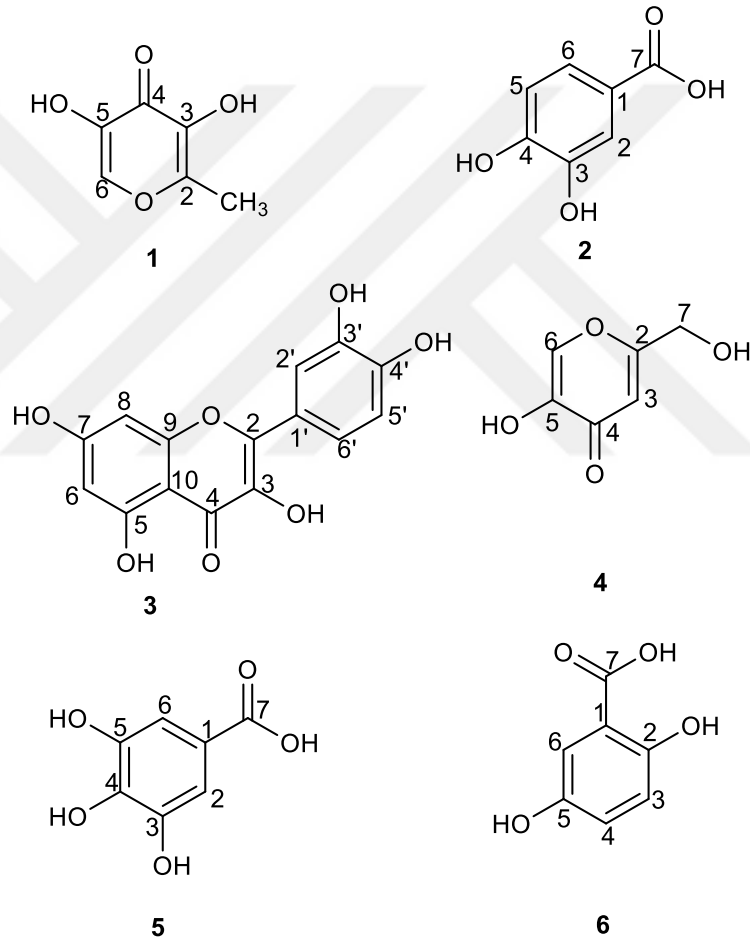
Tüm veriler üçer defa uygulanmıştır. Sonuçlar, ortalama değerler ve standart sapmalar (ortalama + SS) olarak gösterildi. Örnekler arasındaki ortalamanın istatistiksel karşılaştırması sırasıyla tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Tukey's SPSS 20.0 kullanılarak analiz edildi. Sonuçların istatistiksel farklılıkları $\alpha = 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi,.

3.2.2.2 Antiproliferatif Aktivite Testi

Üzerinde 96 adet kuyucuk bulunan ve tabanı altın kaplama elektronik bir devreye sahip E-plate 96'nın her bir kuyucuğuna 50'şer μL besiyeri eklendi. E-plate 96'ya eklenen besiyeri 15'er dakika önce steril kabinde sonra CO_2 inkübatöründe bekletildi (37°C , %5 CO_2). Daha sonra kuyucukların arka plan okuması yapıldı. Kuyucuklarda olması istenen hücre sayısı (25.000 hücre/kuyucuk) hesaplanarak oluşturulmuş hücre süspansiyonundan 100'er μL kuyucuklara eklendi. E-plate 96'da bulunan hücrelerin eklendikleri kuyucukların dibine çökmeleri ve oluşturulan yeni ortamlarına uyum sağlayabilmeleri için yarım saat steril kabinde bekletildikten sonra gerçek zamanlı hücre analizi (xCELLigence RTCA SP) cihazına yeniden yerleştirildi. E-plate 96 üzerindeki hücrelerin kuyucuk tabanına tutunarak büyüme sürecine girmeleri sağlandı. Bu süre sonunda E-plate tekrar steril kabine alındı ve kuyucuklara, farklı derişimlerde bitki ekstraktı içeren kültür ortamı çözeltisi eklendi. Her bir numune için yüksek (100 μL), orta (50 μL) ve düşük doz (10 μL) olmak üzere üç farklı konsantrasyon ve her bir doz için üç tekrar yapılarak çalışıldı. Kuyucukların son hacmi besi yeri ile 200 μL 'ye tamamlandı. Numune eklendikten sonra plaka son kez RTCA cihazına yerleştirildi ve 74 saat boyunca hücrelerin yaşam/ölüm durumları gerçek zamanlı olarak 10 dakika aralıklarla ölçüldü ve kaydedildi.

4. BULGULAR

Elma posasından 5-Hidroksi maltol (5-HM), protokateşik asit, Kuersetin ve kojik asit, mandalina posasından gallik asit ve gentisik asit bileşikleri kromatografik ve spektroskopik yöntemlerle izole edildi. Elde edilen kimyasal bileşenler Şekil 4.1'de görüldüğü üzere sırasıyla **1**, **2**, **3**, **4**, **5** ve **6** nolu bileşiklerdir.



Şekil 4.1 Elma posasından 5-hidroksi maltol (**1**), protokateşik asit (**2**), Kuersetin (**3**), kojik asit (**4**) ve mandalina posasından gallik asit (**5**) ve gentisik asit (**6**) bileşikleri elde edildi.

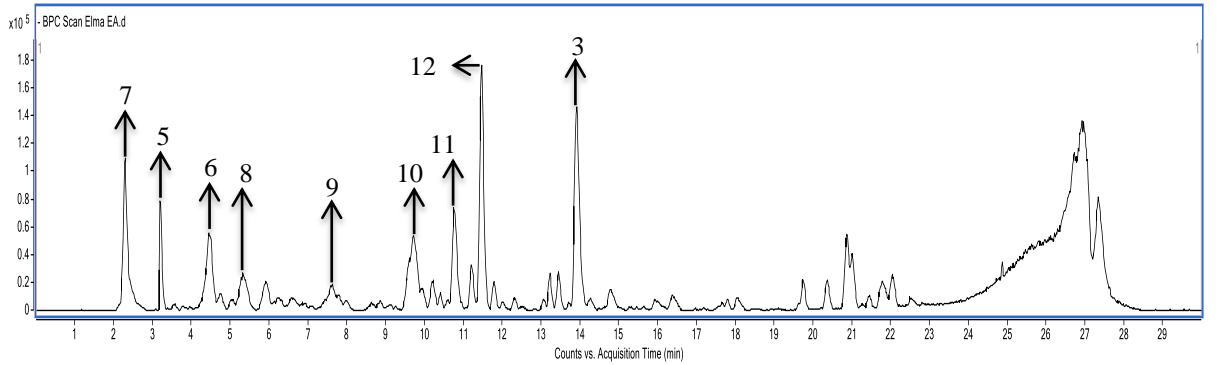
4.1. HPLC-TOF/MS Verileri

HPLC-TOF/MS (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi-Uçuş zamanlı/Kütle Spektrometresi) cihazına verilen numuneler de tespit edilen kimyasal bileşenlerin kromatogramları oluştu. Bu kromatogramlarda oluşan piklerin cihaz veri tabanındaki standart kimyasal bileşenler ile karşılaştırılmaları yapıldı. Ayrıca cihaza verilen örnekteki kimyasal bileşenlerin kantitatif analiz sonuçları elde edildi.

4.1.1. Kromatogramlar

4.1.1.1. Elma posasının etil asetat ekstraktı

Elma posasının etil asetat ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucuna göre elde edilen kromatogramda, dokuz adet kimyasal bileşen tespit edildi (Şekil 4.2). Belirlenen bileşiklerden sekiz tanesinin kütüphane tarama sonuçları ve molekül ağırlıkları belirlenirken, 11,86. Dakikada gelen ve molekül ağırlığı 241,0947 olan **12** nolu bileşik kütüphane taramasında belirlenemedi.



Şekil 4.2 Elma posasının EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucunda elde edilen kromatogramı

Kromatogramda belirtilen diğer kimyasal bileşenlerin isimleri HPLC-TOF/MS kütüphane taramasına göre Çizelge 4.1'de gösterildi. Ayrıca kapalı formülleri, molekül ağırlıkları ve kolondan geliş sırası çizelgede belirtildi.

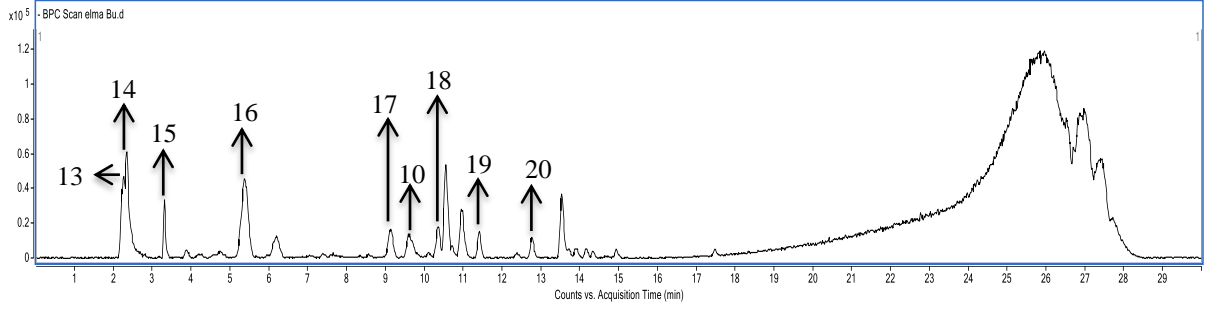
Çizelge 4.1 Elma posasının EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS kütüphane taraması verilerine göre olası kimyasal bileşiklerin kolondan çıkış zamanları ve molekül kütleleri

No	Bileşik Adı	Molekül Formülü	Molekül Kütle	Geliş Zamanı
7	Fumarik Asit	C ₄ H ₄ O ₄	116,0330	2,334
5	Gallik asit	C ₇ H ₆ O ₅	169,0159	3,284
6	Gentisik Asit	C ₇ H ₆ O ₄	153,0197	4,436
8	Klorojenik Asit	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0885	5,351
9	Kafeik Asit	C ₉ H ₈ O ₄	179,0351	7,613
10	Kuersetin-3-β-D-glikozit	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0899	9,731
11	Apigenin-7-glikozit	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	433,0794	10,228
12	Belirlenemedi	-	241,0947	11,862
3	Kuersetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0378	13,887

Elma posasının etil asetat ekstresinin kromatogramları ve kütüphane taraması sonucu cihaz tarafından önerilen kimyasal bileşiklerin eşleştikleri Çizelge 4.5'de kantitatif analiz sonuçlarında görülmektedir.

4.1.1.2. Elma n-BuOH ekstraktı

Elma posası bütanol ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucuna göre elde edilen kromatogram sonucunda, dokuz adet kimyasal bileşen tespit edildi (Şekil 4.3). Bu kimyasal bileşenlerin isimleri HPLC-TOF/MS kütüphane taraması sonucuna göre Çizelge 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.3 Elma posasının n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucunda elde edilen kromatogramı

Çizelge 4.2 Elma posasının n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS kütüphane taraması verilerine göre olası kimyasal bileşiklerin kolondan çıkış zamanları ve molekül kütleleri

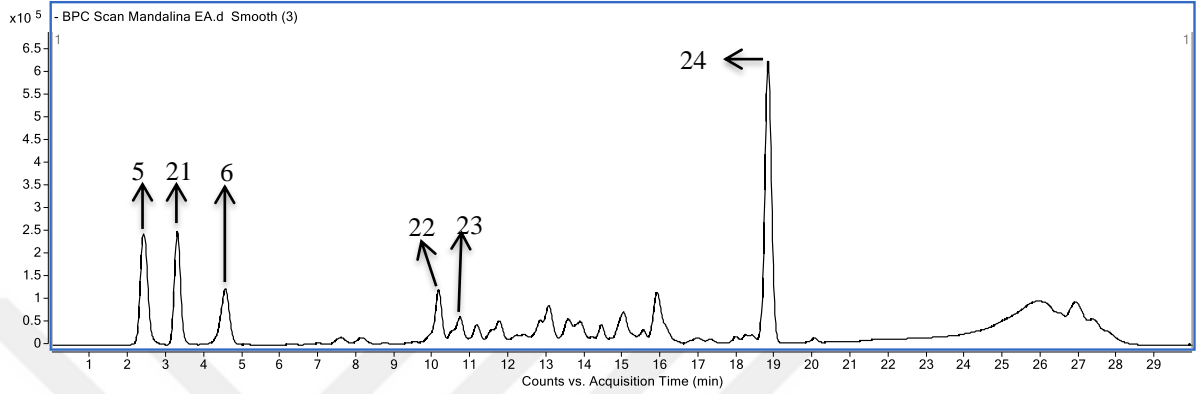
No	Bileşik Adı	Molekül Formülü	Molekül Kütleleri	Geliş Zamanı
13	Belirlenemedi	-	195,026	2,260
14	Belirlenemedi	-	155,000	2,356
15	Belirlenemedi	-	111,0099	3,303
16	Belirlenemedi	-	177,0420	5,372
17	Rutin	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1469	9,143
10	Kuersetin-3-β-D-glikozit	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0892	9,608
18	Belirlenemedi	-	567,1739	10,330
19	Belirlenemedi	-	435,1313	11,405
20	Belirlenemedi	-	409,1512	12,753

Elma n-BuOH ekstresinin kromatogramına bakıldığında ve kütüphane taraması sonucu önerilen muhtemel fenolik bileşen sayısının az olduğu ve Çizelge 4.5'deki kantitatif analiz sonucundan da anlaşılmaktadır. Kütüphane taraması sonucu bazı fenolik bileşenlerin mevcut kütüphane listesinde olmadığından Çizelge 4.2'de isimleri yazılamamıştır.

4.1.1.3. Mandalina etil asetat ekstraktı

Mandalina posası etil asetat ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucuna göre elde edilen

kromatogram sonucunda, Şekil 4.4'de görüldüğü gibi 6 adet kimyasal bileşen tespit edildi. Bu kimyasal bileşenlerin isimleri HPLC-TOF/MS kütüphane taraması sonucuna göre Çizelge 4.3'de gösterildi.



Şekil 4.4 Mandalina posasının EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucunda elde edilen kromatogramı

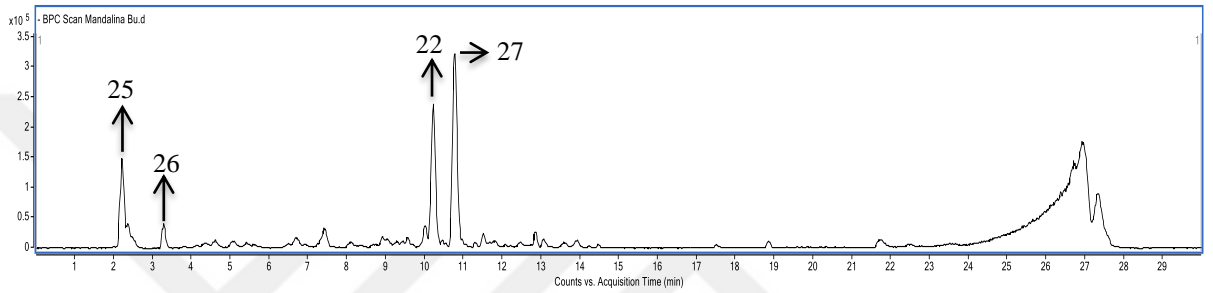
Çizelge 4.3 Mandalina posasının EtOAc ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucuna göre yapılan kütüphane taraması verilerine göre olası kimyasal bileşiklerin kolondan çıkış zamanları ve molekül kütleleri

No	Bileşik Adı	Molekül Formülü	Molekül Kütleli	Geliş Zamanı
5	Gallik asit	$C_7H_6O_5$	169,0159	2,401
21	Hidroksihidrokyonen	$C_6H_6O_3$	126,0329	3,284
6	Gentisik asit	$C_7H_6O_4$	153,0203	4,551
22	Naringin	$C_{27}H_{32}O_{14}$	579,1732	10,167
23	Neohesperidin	$C_{28}H_{34}O_{15}$	609,1827	10,729
24	8-Hidroksikarapinik asit	$C_{26}H_{30}O_8$	470,1948	18,816

Mandalina EtOAc ekstresinin kromatogramına ve kütüphane sonucuna bakıldığında standartlar ile uyumlu bir ilişki görülmektedir ve bu ilişki, Çizelge 4.5'deki kantitatif analiz sonuçlarıyla da doğrulanmaktadır.

4.1.1.4. Mandalina n-BuOH ekstraktı

Elma posası bütanol ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucuna göre elde edilen kromatogram sonucunda, Şekil 4.5'te görüldüğü gibi dört adet kimyasal bileşen tespit edildi. Bu kimyasal bileşenlerin isimleri HPLC-TOF/MS kütüphane taraması sonucuna göre Çizelge 4.4'de gösterildi.



Şekil 4.5 Mandalina posasının n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucunda elde edilen kromatogramı

Çizelge 4.4 Mandalina posasının n-BuOH ekstresinin HPLC-TOF/MS sonucuna göre yapılan kütüphane taraması verilerine göre olası kimyasal bileşiklerin kolondan çıkış zamanları ve molekül kütleleri

No	Bileşik Adı	Molekül Formülü	Molekül Kütleleri	Geliş Zamanı
25	Belirlenemedi	-	195,0530	2,225
26	Belirlenemedi	-	169,0160	3,284
22	Naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	579,1764	10,199
23	Neohesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609,1882	10,761

Mandalina n-BuOH ekstresinin Şekil 4.5'deki kromatogramına ve Çizelge 4.4'deki kütüphane sonucuna bakıldığında kısmi bir korelasyon görülmektedir ve bu korelasyon da Çizelge 4.5'de ki kantitatif analiz sonuçlarıyla doğrulanmaktadır. Kromatogram da **25** ve **26** nolu bileşiklerin kütüphane taraması sonucu bu fenolik bileşenlerin HPLC-TOF/MS cihazının mevcut kütüphane listesinde olmadığı belirlendi. Çizelge 4.5'deki

kantitatif sonucunda mandalina n-BuOH kısmında en yüksek miktarda hesperidin olmasına rağmen ne kromatogramda ne de kütüphane taramasında bu sonuç çıkmamıştır.



4.1.1.5. Meyve Posalarının HPLC-TOF/MS Kantitatif Sonuçları

HPLC-TOF/MS cihazında mevcut olan kantitatif analiz programı yardımıyla, cihaza verilen numunelerdeki kimyasal bileşenlerin, farklı çözücüler ile yapılan ekstraksiyonlarda kantitatif analiz sonuçları Çizelge 4.5'de görülmektedir.

Çizelge 4.5 Elma ve mandalina meyve posalarının HPLC-TOF/MS kantitatif analiz sonuçları

Madde Adı	ELMA		MANDALİNA	
	EtOAc (mg/kg)	n-BuOH (mg/kg)	EtOAc (mg/kg)	n-BuOH (mg/kg)
Gentisik asit	12,56	0,66	31,85	2,42
Klorojenik asit	8,94	3,11	0,11	0,46
4-Hidroksi benzoik asit	1,68	0,22	0,95	0,038
Protokateşik asit	0,7	0,47	0,48	E
Kafeik asit	1,59	E	0,58	E
Vanilik asit	8,99	0,23	0,78	0,34
Siringik asit	0,81	E	E	E
Rutin	0,22	1,4	0,035	1,17
Polidatin	E	E	2,32	E
Skutellarin	0,32	E	E	E
Kuersetin-3-β-D-glukozit	7,11	1,6	0,036	E
Naringin	0,00049	0,0012	16,13	40,51
Diosmin	2,93	E	2,92	5,21
Hesperidin	E	E	9,15	66,9
Neohesperidin	E	E	5,88	42,66
Morin	3,97	0,49	0,4	0,57
Kuersetin	6,83	E	E	E
Sinnamik asit	0,35	E	0,25	0,48
Naringenin	E	E	1,07	E
Gallik asit	0,47	E	37,08	2,69
Fumarik asit	84,91	3,47	0,81	3,17
Sinapik asit	0,11	E	13,27	E
p-Kumarik asit	0,079	E	0,8	E
Kateşin	E	1,007	E	0,55
Diosmetin	E	E	19,2	E
Eupatorin	E	E	0,74	E

Çizelgede “E” (Eser miktarda bulunan) sembolü, cihazdan alınan kantitatif analiz sonucuna göre algılama sınırının altında kalan bileşenleri göstermektedir. Ayrıca sonuçlar 1 kg meyve posasında bulunan kimyasal bileşimin mg miktarını gösterir.

Çizelge 4.5’de elma ve mandalina meyve posalarının EtOAc ve n-BuOH ekstraktlarına ait kantitatif sonuçları vardır. Elma, EtOAc ve n-BuOH kısımlarına bakıldığında en yüksek miktarda fumarik asit olduğu görülmektedir. Mandalinanın EtOAc kısmında en yüksek miktarda Gentisik asit bulunurken, n-BuOH kısmında ise Hesperidin kimyasal maddesinin en yüksek miktarlarda olduğu görülmektedir.

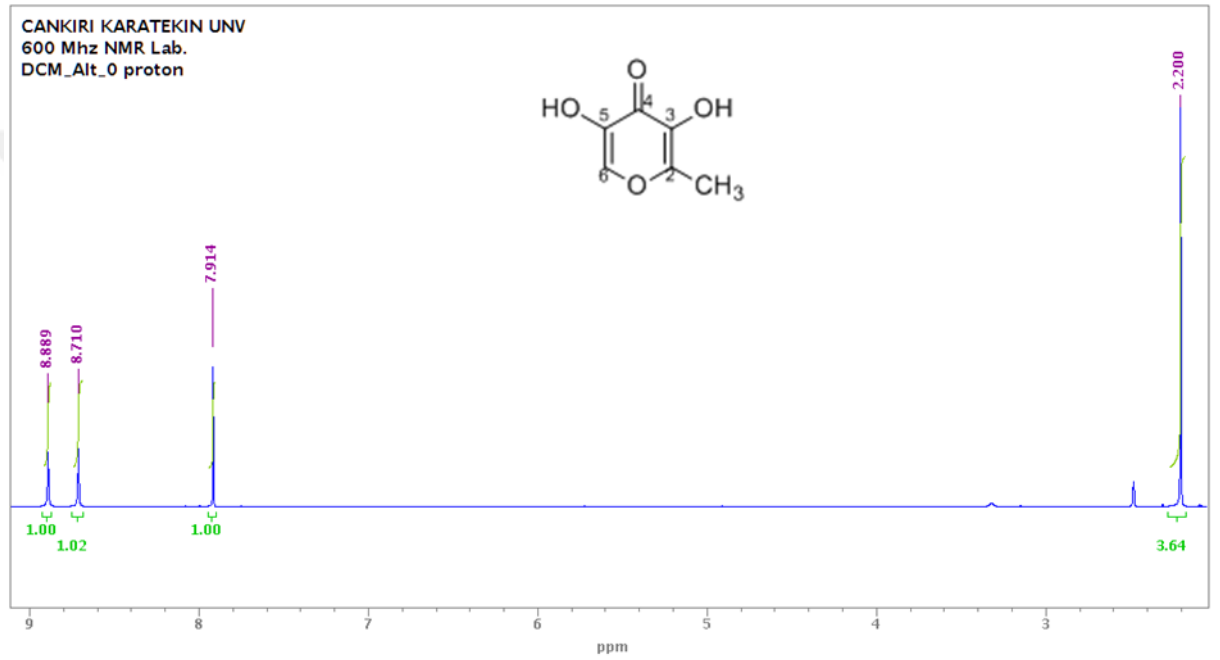


4.2. NMR Verileri

NMR cihazına verilen örneklerin ^1H NMR sonuçları tek boyutlu (1D), 0 (TMS – Tetrametilsilan-) ppm'den başlayıp +14 ppm (milyonda bir birim) gibi değerlere kadar çıkan bir spektrum üzerinde beliren pikler olarak hidrojen (proton) değerleri gözlemlendi. NMR cihazına ait VNMR-J programı vasıtasıyla bu proton değerlerinin altında kalan alan (integrasyon) değerleri, birbirleriyle etkileşimleri olan protonların jromanyetik sabit değerleri vasıtasıyla protonların birbirlerine orto, meta ve para konumunda olup olmadıkları ve her bir protonun yarılmaları (singlet, dublet, triplet, multiplet) tespit edildi. ^{13}C NMR sonuçları ise 0-220 ppm aralığında spektrumda beliren pikler olarak gözlemlendi. DEPT ^{13}C NMR ise ^{13}C NMR gibi 0-220 ppm aralığında ve üst üste dizilmiş dört yatay spektrum üzerinde (yukarıdan aşağıya $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}$ ve $-\text{C}$) karbon değerleri gözlemlendi. HSQC 2D NMR (yatay ekseninde proton spektrumu, dikey ekseninde karbon spektrumu) tekniği ile karbon atomuna bağlı olan proton/protonlar tespit edildi. HMBC 2D NMR tekniği ile kimyasal bileşikteki bir karbon atomuna bağlı hidrojen atomunun yapıdaki diğer karbon atomları ile maksimum dört bağa kadar olan etkileşimi tespit edilerek molekülde bu karbon atomlarının yerleri tespit edildi. COSY 2D NMR (dikey ve yatay eksenlerde proton spektrumları) tekniği ile birbirleriyle etkileşimleri bulunan protonlar, iki boyutlu spektrum üzerinde gözlemlendi.

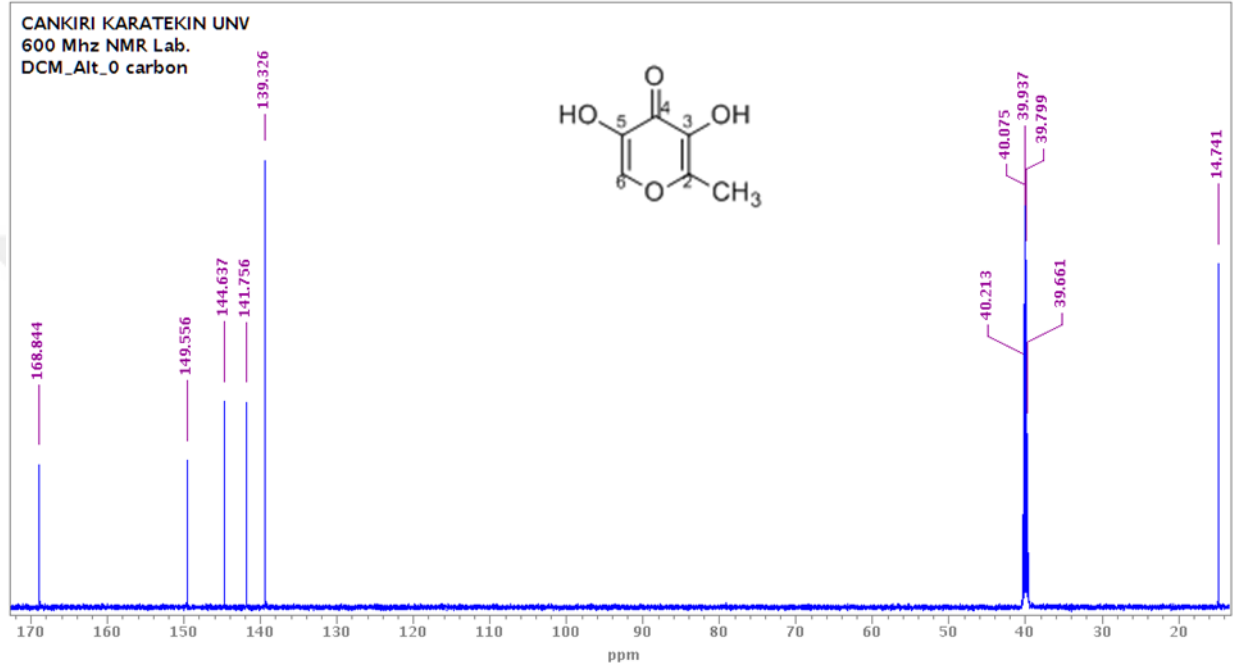
4.2.1. 5-Hidroksi maltol

Bileşiğe ait ^1H NMR spektrumu incelendiğinde aromatik halkanın C-6 karbonuna bağlı olan proton 7.91 ppm de singlet olarak rezonans olmaktadır. C-2 karbonuna bağlı olan özdeş metil protonlarında 2.20 ppm de rezonans olduğu Şekil 4.6'da görülmektedir.



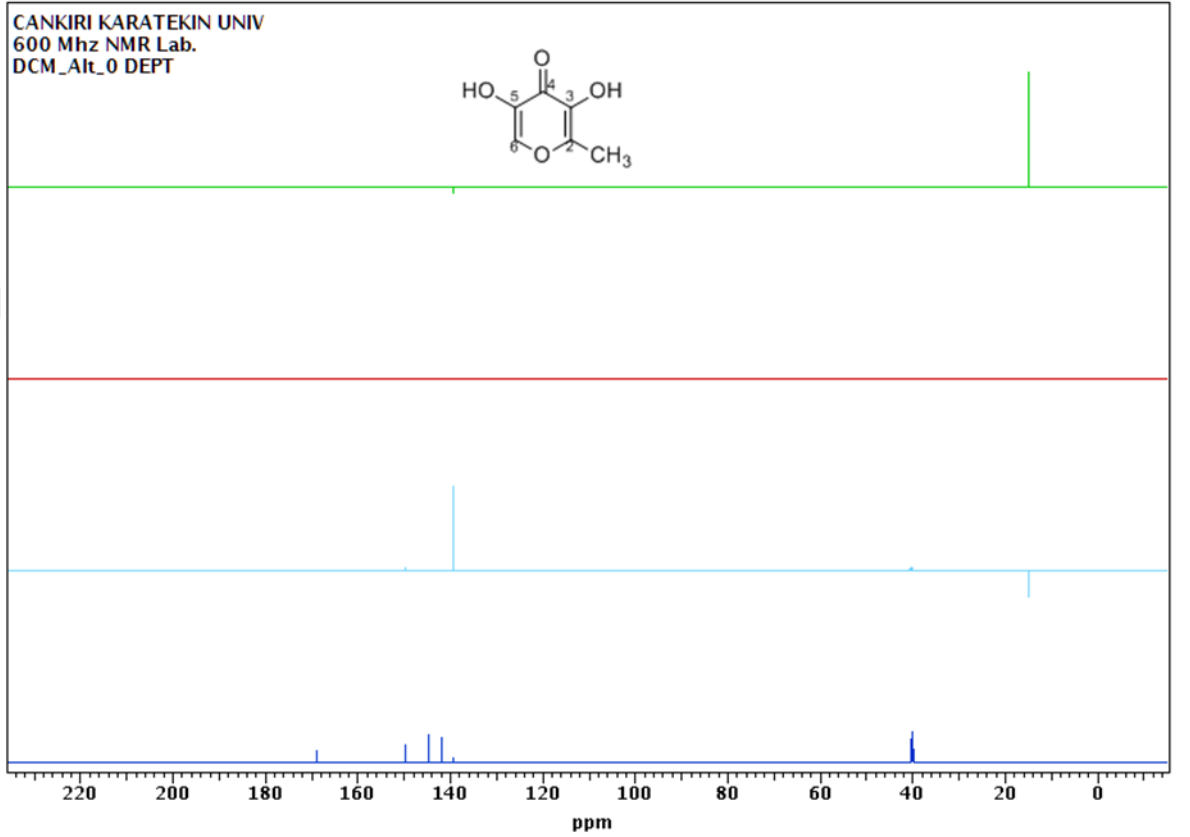
Şekil 4.6 5-hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz)

Bileşiğe ait karbon spektrumu incelendiğinde sırasıyla; C-2 karbon atomunun 141.75 ppm, C-3 karbon atomunun 139.32 ppm, C-4 karbonil karbonu 168.84 ppm, C-5 karbon atomunun 144.63 ppm, C-6 karbon atomunun 149.55 ppm ve C-2 karbonun bağlı olan metil karbonunun 14.74 ppm de rezonans oldukları Şekil 4.7'de belirlenmiştir.



Şekil 4.7 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹³C NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz)

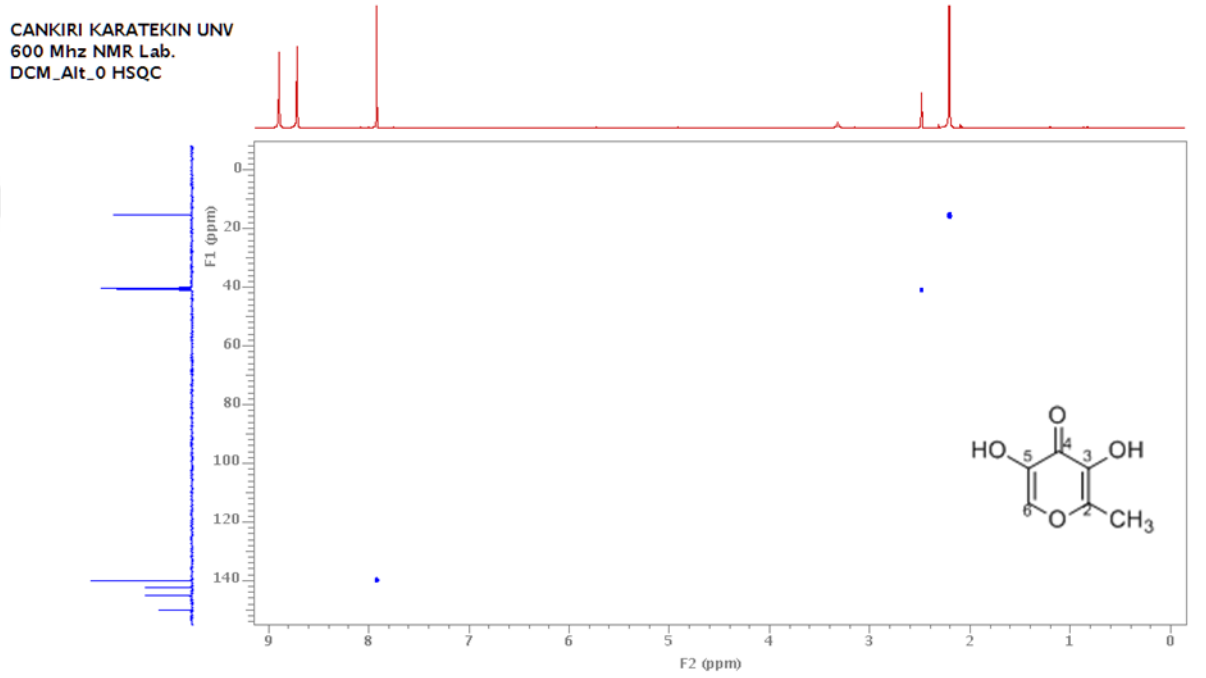
DEPT spektrumuna göre bileşikte bir adet $-CH_3$, bir adet $-CH$ ve dört adet $-C$ (kuaterner karbon) olduğu Şekil 4.8'de belirlenmiştir.



Şekil 4.8 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO- d_6 alınan DEPT ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz)

5-HM bileşiğinde metilen karbonu bulunmadığından, kırmızı ile görülen ve iki hidrojen içeren DEPT NMR spektrumunda rezonans gözlenmedi. Kuarterner karbonlar genelde daha kısa ve proton içeren karbonlar ise daha uzun oldukları spektrumda görülmektedir. Ayrıca karbon sinyallerinin rezonans oldukları kayma değerleri, önerilen yapı ile uyumludur. DEPT spektrumu incelendiğinde, en güçlü rezonansın üç hidrojen atomu içeren metil grubuna ait olduğu görülmektedir.

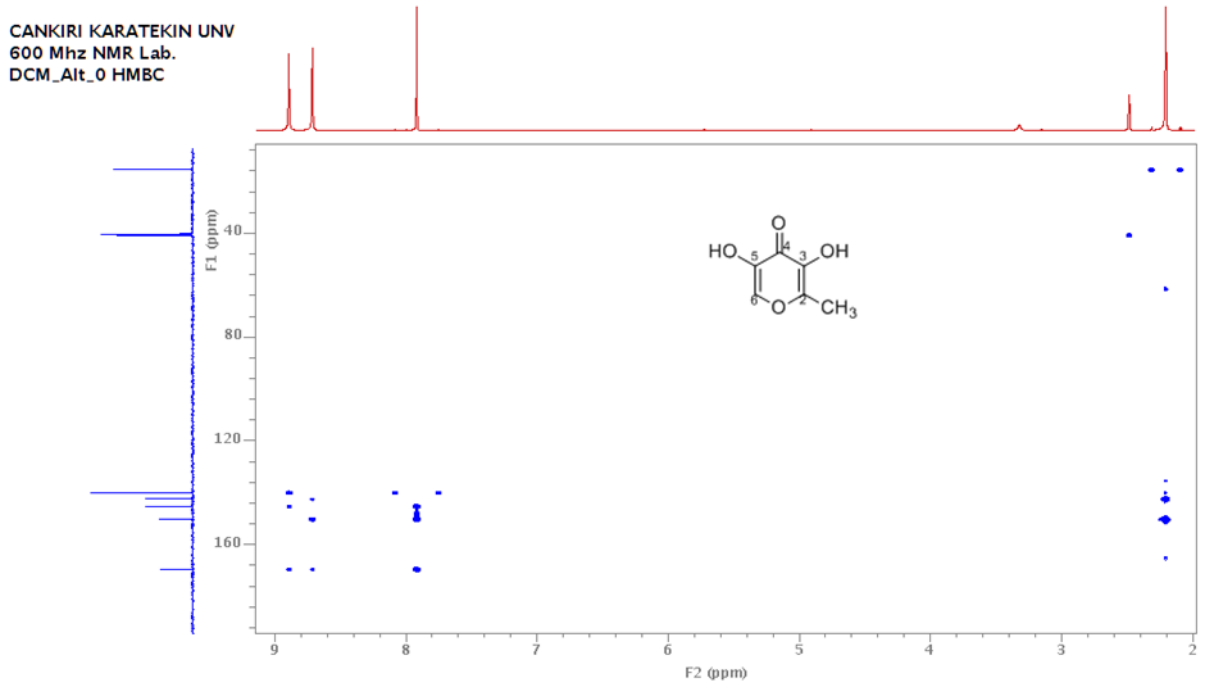
Bileşiğe ait HSQC spektrumu incelendiğinde 7.90 ppm deki singlet olarak rezonans olan protonun 139.28 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğunu ve 2.20 ppm de singlet olarak rezonans olan özdeğ metil protonlarının 14.68 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğu bu yöntemle Şekil 4.9'da belirlenmiştir.



Şekil 4.9 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹H-¹³C-HSQC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

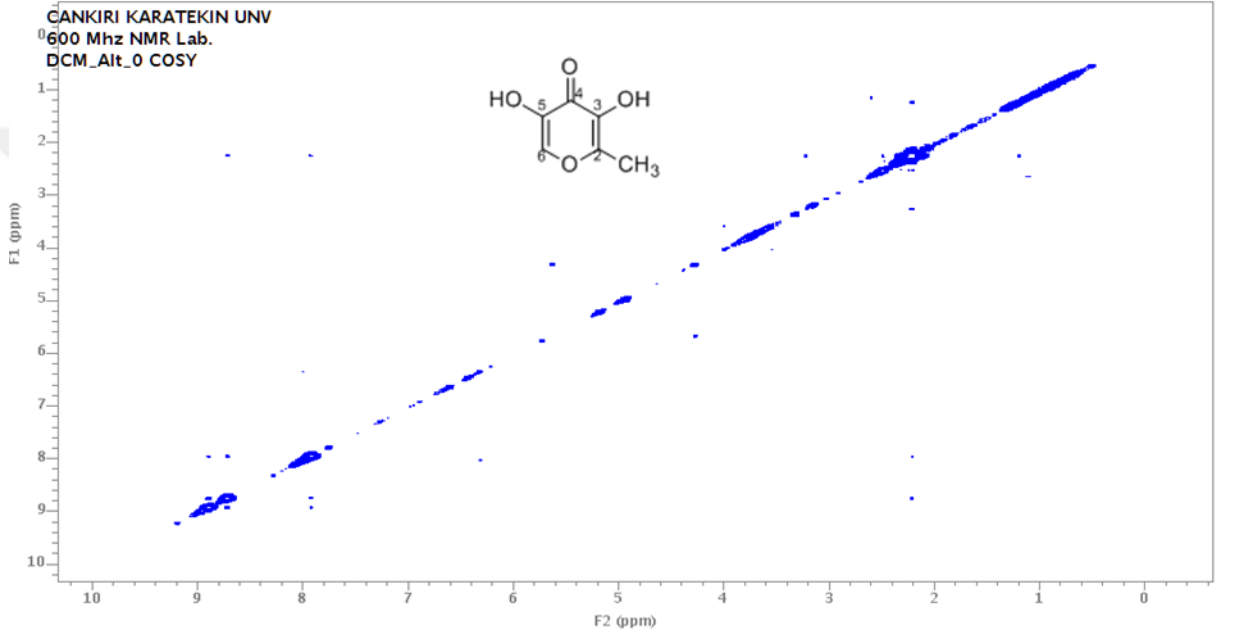
Karbon-proton eğleşmesini gösteren Şekil 4.9 incelendiğinde, aromatik bölgede sadece bir CH grubunun olduğu ve 3 ppm in altında (daha yukarı alanda) çözücü ve safsızlık etkileşimleri gözlenmektedir. Ayrıca 8-9 ppm arasında gelen sinyallerin oksijene bağlı hidrojenlerden kaynaklandığı, 2D NMR spektrumunda etkileşmesinin bulunmadığından anlaşılmaktadır. HSQC spektrumu önerilen yapı ile uyumludur ve sadece bir aromatik proton ve metil protonlarının karbon etkileşimleri spektrumda görölmektedir.

HMBC spektrumu ile bileşikte, protonların komşu karbon atomları ile üç bağ üzerinden etkileşimlerini göstermektedir. Bu etkileşim bazen dört bağa kadar çıkabilir. Buna göre C-6 karbonuna bağlı olan ve 7.91 ppm de rezonans olan aromatik proton, sırasıyla; 144.63 ppm, 168.84 ppm, 141.75 ppm deki karbonlar ile etkileştiği belirlenmiştir. Bileşiğe ait özdeş metil protonlarının 141.75 ppm ve 149.59 ppm deki karbonlar ile korelasyonu 2D HMBC tekniği ile Şekil 4.10'da belirlenmiştir.



Şekil 4.10 5-Hidroksi maltol bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹H-¹³C-HMBC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

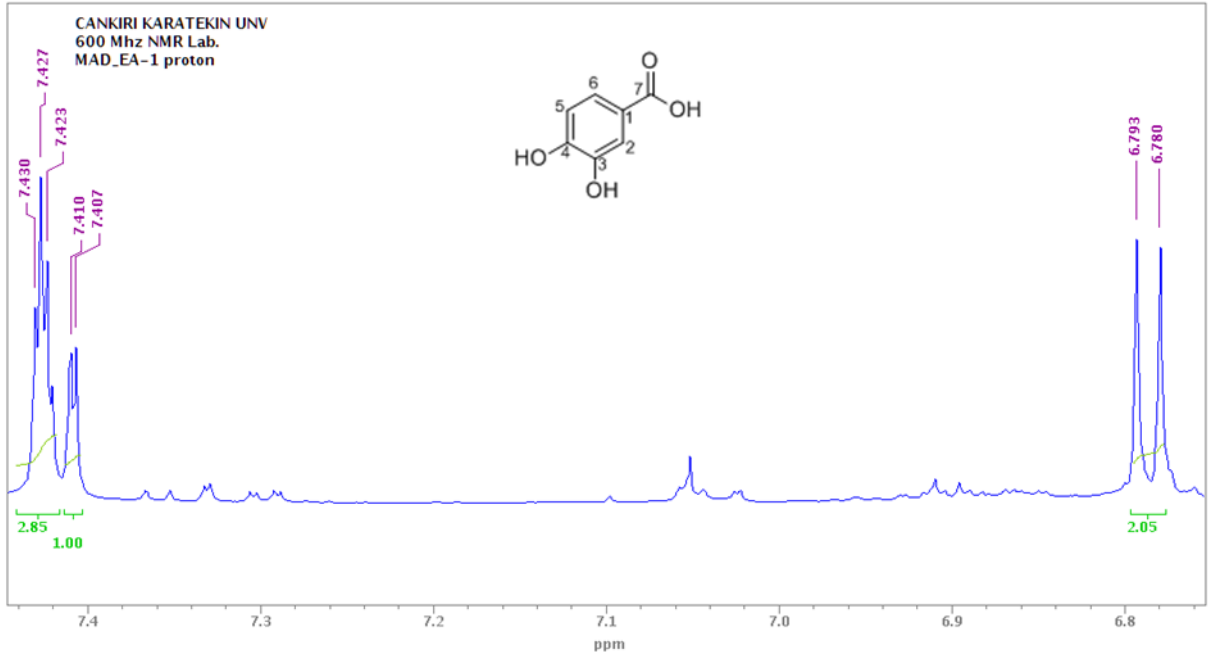
Bileşğin COSY spektrumuna göre 7.91 ppm deki aromatik protonun 2.20 ppm deki özdeş metil protonları ile etkileşimi beklenen bir durum olmamakla birlikte, bileşğin içerdiği safsızlıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Aynı aromatik protonun –OH protonları ile etkileşimide benzer şekilde safsızlıklardan kaynaklandığı düşünülmekte ve Şekil 4.11’de görülebilmektedir.



Şekil 4.11 5-Hidroksi maltol bileşğinin DMSO-d₆ alınan COSY NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

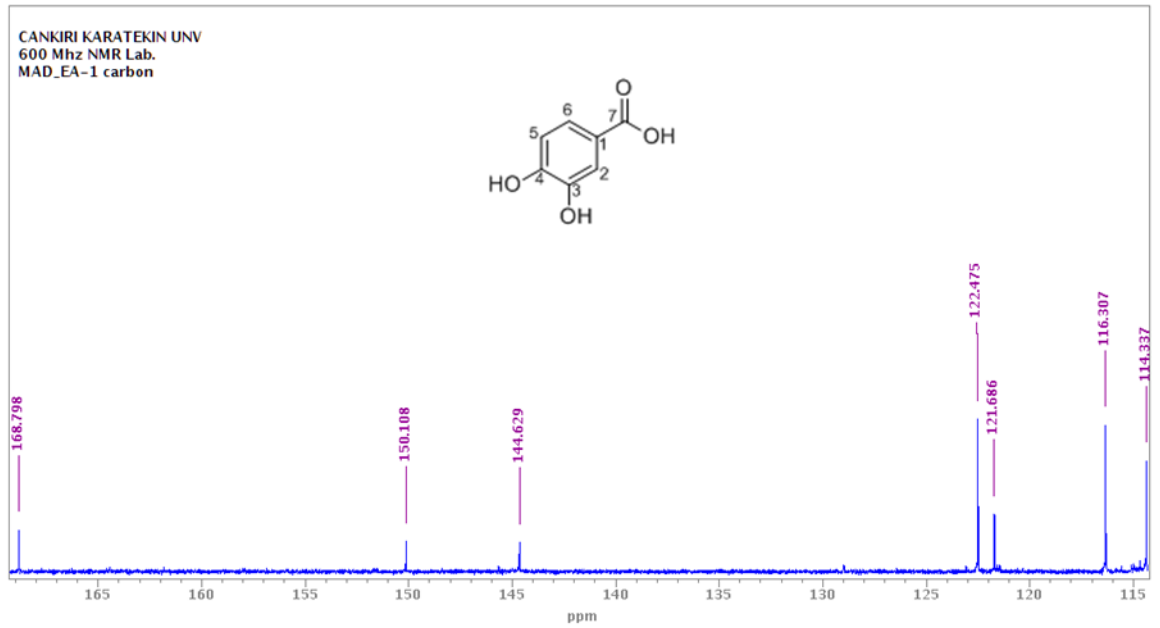
4.2.2. Protokateşik Asit

Bileşiğe ait ^1H NMR incelendiğinde bileşikte üç tane farklı aromatik proton bulunmaktadır. Buna göre 7.43 ppm deki protonun 1.83 Hz'lik Jiromanyetik sabitine sahiptir ve bu etkileşim meta etkileşim olarak belirlenmiştir. Yine molekülde 7.41 ppm de rezonans olan ve dubletin dubleti olarak yarıldığı görülen proton komşu protonla 7.83 Hz'lik orta etkileşmesi ve 1.83 Hz'lik meta etkileşmesi yaptığı etkileşim sabitlerinden belirlenmiştir. 6.78 ppm'de rezonans olan diğer aromatik protonun komşu 7.41 ppm deki proton ile 8.48 Hz'lik etkileşim sabiti ile birbirlerine karşı orto konumunda olduğu Şekil 4.12'de belirlenmiştir.



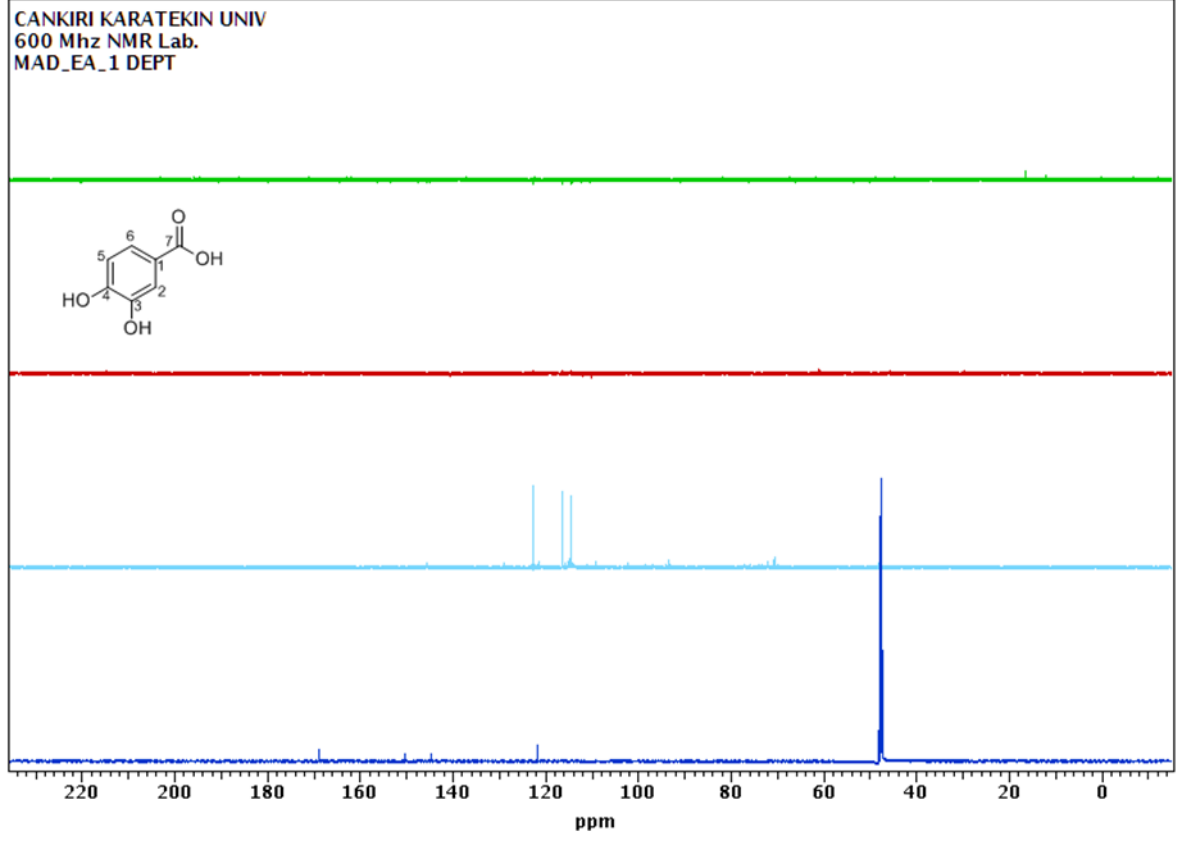
Şekil 4.12 Protokateşik asit bileşiğinin $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz)

Bileşiğe ait karbon spektrumu incelendiğinde sırasıyla; C-1 karbon atomunun 121.68 ppm, C-2 karbon atomunun 116.30 ppm, C-3 karbonil karbonu 144.57 ppm, C-4 karbon atomunun 150.10 ppm, C-5 karbon atomunun 114.30 ppm ve C-6 karbon atomunun 122.47 ppm ve C-7 karbon atomunun 168.78 ppm de rezonans oldukları Şekil 4.13'de belirlenmiştir.



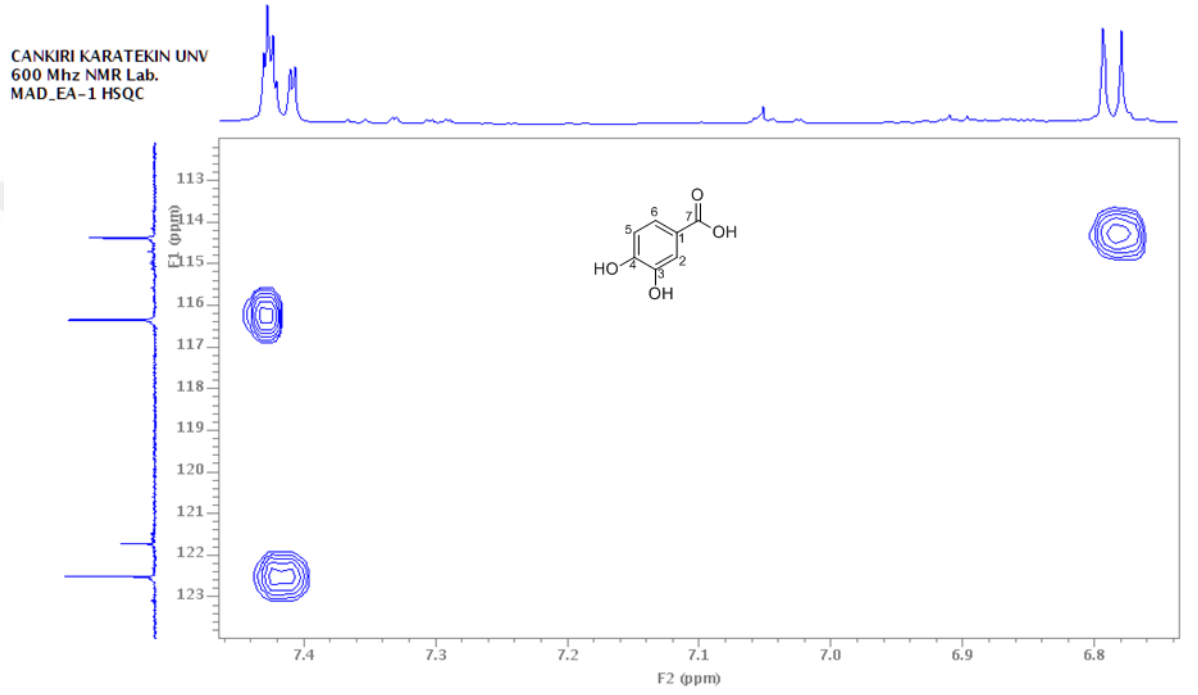
Şekil 4.13 Protokateşik asit bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan ¹³C NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz)

DEPT spektrumuna göre bileşikte üç adet –CH ve dört adet –C (kuaterner karbon) olduğu Şekil 4.14’de belirlenmiştir.



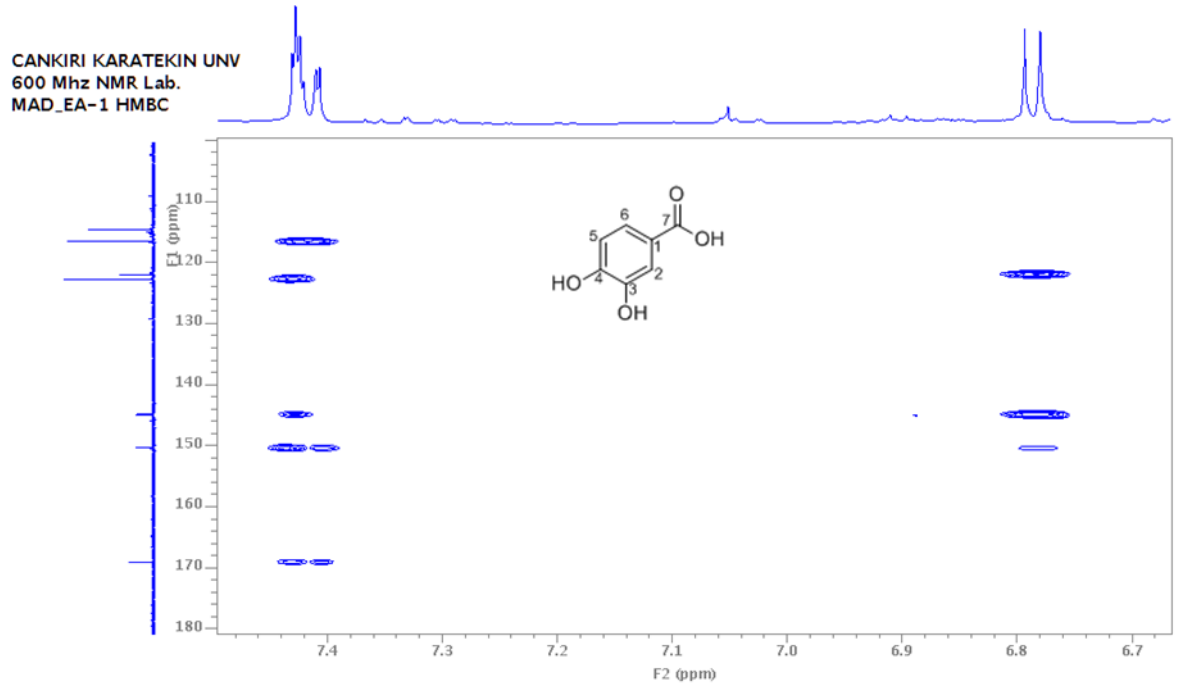
Şekil 4.14 Protokateşik asit bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan DEPT ¹³C NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz)

Bileşiğe ait HSQC spektrumu incelendiğinde 7.41 ppm de dubletin dubleti olarak rezonans olan protonun 122.47 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğunu, 6.78 ppm de dublet olarak rezonans olan protonun 114.30 ppm deki karbona bağlı olduğu ve 7.43 ppm de dublet olarak rezonans olan protonun 116.30 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğu Şekil 4.15’de belirlendi.



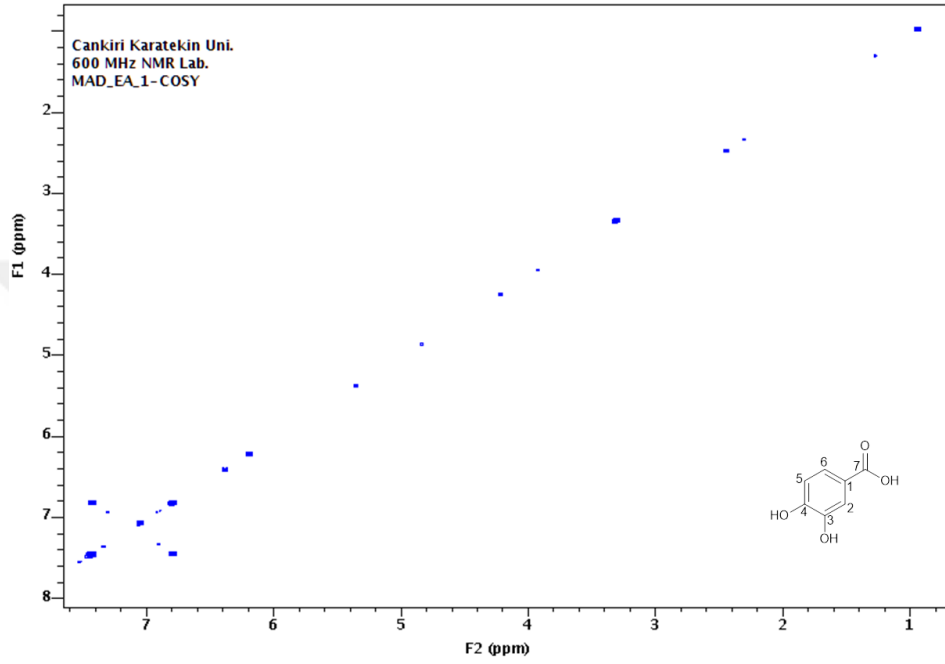
Şekil 4.15 Protokateşik asit bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan ¹H-¹³C-HSQC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

HMBC spektrumu ile bileşikte, birbirine komşu olan karbon ve protonların birbiri ile olan etkileşimleri maksimum dört bağ da dahil olmak üzere belirlenmektedir. Buna göre C-2 karbonuna bağlı olan ve 7.43 ppm de rezonans olan aromatik proton sırasıyla; 122.47 ppm, 168.79 ppm deki karbonil karbonu ile, 121.68 ppm deki ve 144.57 ppm deki karbonlar ile etkileştiği belirlenmiştir. 7.41 ppm deki C-6 karbonuna bağlı proton sırasıyla; 114.30 ppm deki karbon, 168.79 ppm deki karbon, 121.68 ppm deki karbon, 150.10 ppm deki karbon ve 116.30 ppm deki karbonlar ile korelasyonu 2D HMBC tekniği ile belirlenmiştir. Son olarak C-5 karbonuna bağlı olan ve 6.78 ppm de dublet olarak rezonans olan proton sırasıyla; 150.10 ppm deki karbon ile, 122.47 ppm deki karbon ile ve 144.57 ppm deki karbon ile korelasyonu 2D HMBC tekniği ile Şekil 4.16'da belirlenmiştir.



Şekil 4.16 Protokateşik asit bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan ¹H-¹³C-HMBC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

COSY spektrumuna göre, bileşikte birbirine orta pozisyonda bağlı olan ve 7.41 ppm deki aromatik protonun 6.78 ppm deki aromatik proton ile etkileşimi Şekil 4,17'de belirlenmiştir.

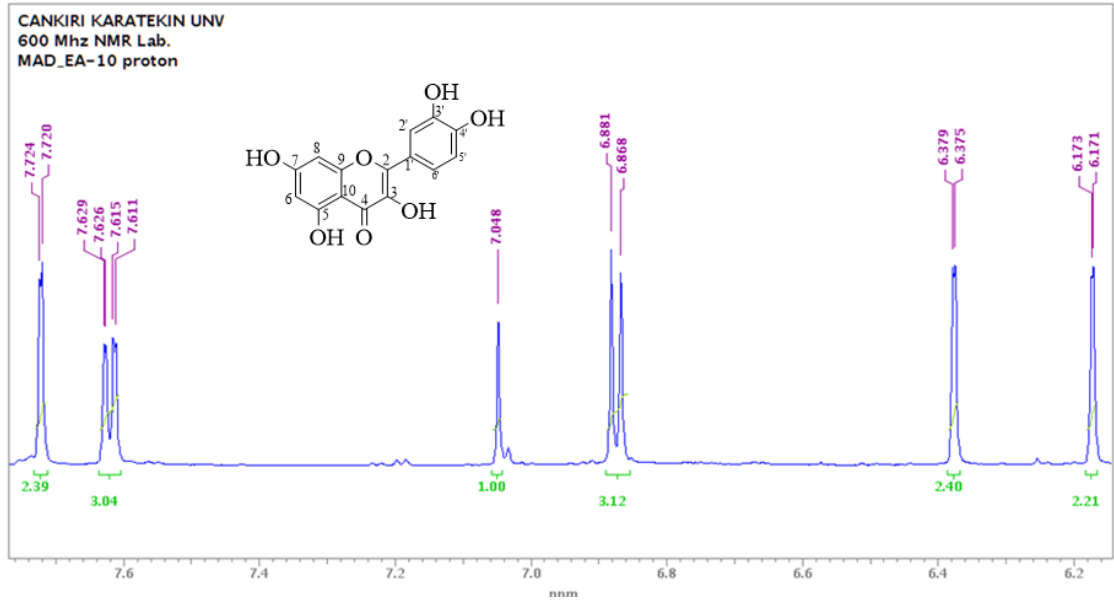


Şekil 4.17 Protokateşik asit bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan COSY NMR spektrumu (¹H: 600 MHz)

Protokateşik asit bileşiğine ait COSY spektrumunda, H2 ve H6 protonlarının meta etkileşimleri görülmektedir ve COSY spektrumu önerilen yapı ile uyumlu olduğu görülmektedir.

4.2.3. Kuersetin

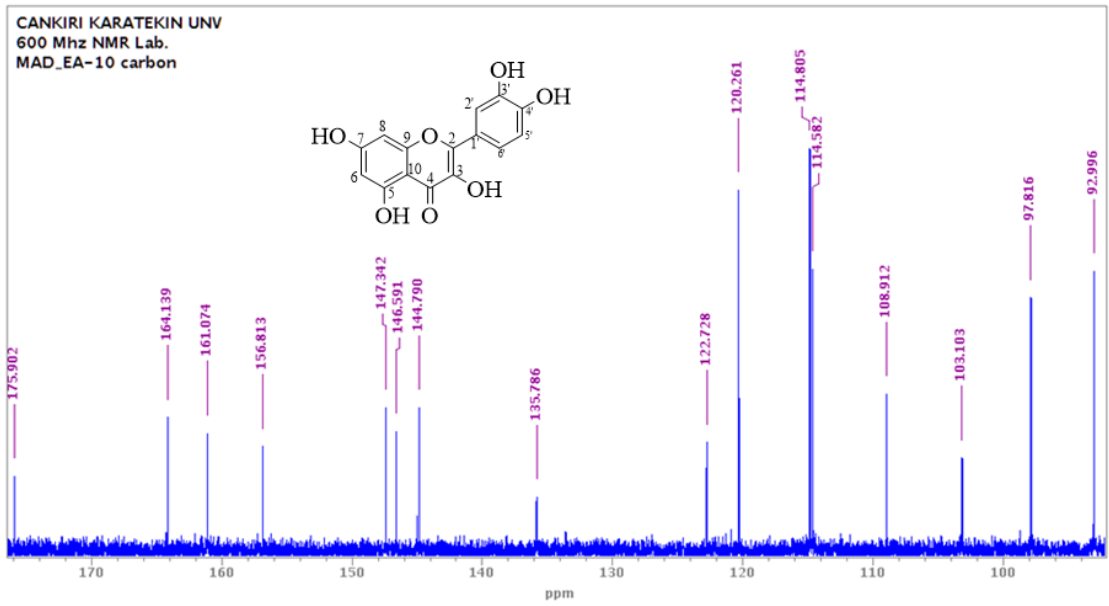
Bileşiğe ait ^1H NMR incelendiğinde bileşikte beş tane farklı aromatik proton bulunmaktadır. Bunların iki tanesi A halkasında diğer üç tanesi B halkasında bulunmaktadır. A halkasındaki protonlar: 6.37 ppm de dublet olarak rezonans olan protonun, 2.15 Hz'lik etkileşim sabitine göre meta etkileşmesi yaptığı ve daha aşağı alanda geldiği belirlenmiştir. 6.16 ppm de dublet olarak rezonans olan protonun, 2.15 Hz'lik etkileşim sabitine göre meta etkileşmesi yaptığı ve daha yukarı alanda geldiği belirlenmiştir. B halkasındaki protonlar: C-2' karbonuna bağlı 7.72 ppm de dublet olarak yarılan ve 1.92 Hz'lik etkileşim sabitine sahip olduğu belirlenmiştir. C-6' karbonuna bağlı 7.,61 ppm de dubletin dubleti ($J=8.59$ Hz orto etkileşimi, $J= 1.92$ Hz meta) olarak rezonans olduğu belirlenmiştir. C-5' karbonuna bağlı 6.86 ppm de dublet ($J= 8.59$ Hz orto) olarak yarıldığı Şekil 4.18'de belirlenmiştir.



Şekil 4.18 Kuersetin bileşiğinin $\text{CD}_3\text{OD}-d_4$ alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz)

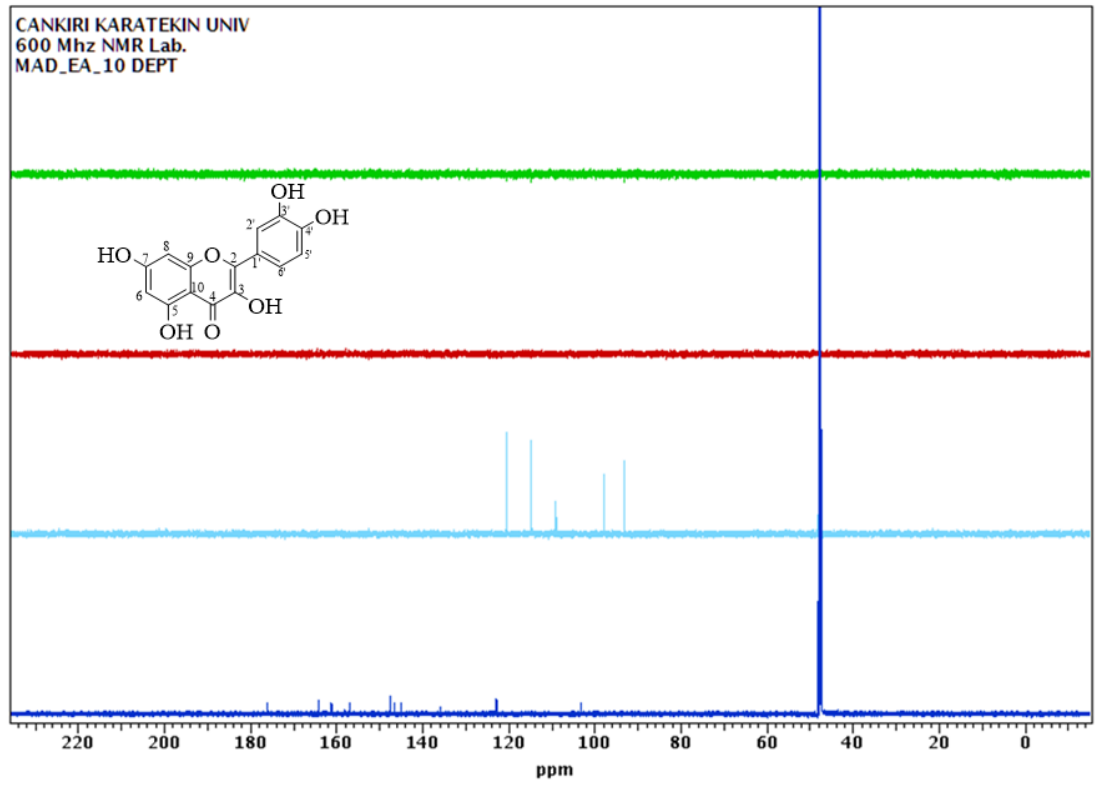
Bileşiğe ait ^{13}C karbon spektrumu incelendiğinde sırasıyla; C-2 karbon atomunun 147.34 ppm de, C-3 karbon atomunun 135.78 ppm de, C-4 karbonil karbonu 175.90

ppm de, C-5 karbon atomunun 161.07 ppm de, C-8 karbon atomunun 97.90 ppm de, C-7 karbon atomunun 164.13 ppm de, C-6 karbon atomunun 92.92 ppm de, C-9 karbon atomunun 156.81 ppm de, C-10 karbon atomunun 103.10 ppm de, C-1' karbon atomunun 122.72 ppm de, C-2' karbon atomunun 114.52 ppm de, C-3' karbon atomunun 146.59 ppm de, C-4' karbon atomunun 144.79 ppm de, C-5' karbon atomunun 114.80 ppm de ve C-6' karbon atomunun 120.26 ppm de rezonans oldukları Şekil 4.19'da görülmektedir.



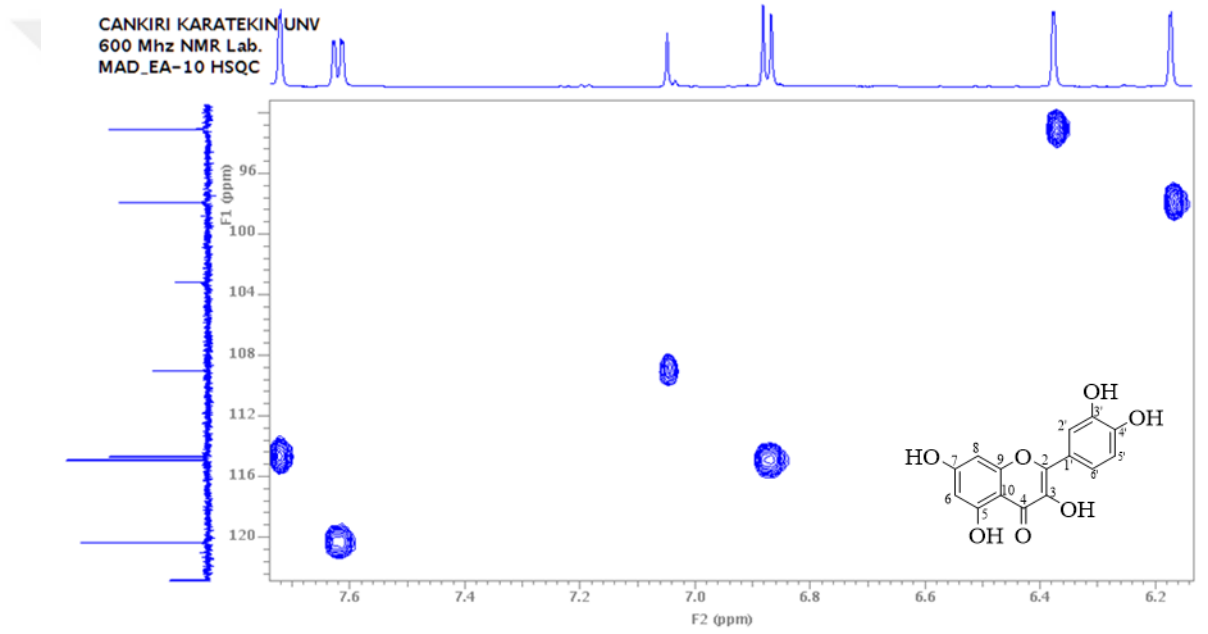
Şekil 4.19 Kuersetin bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan ¹³C NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz;)

DEPT spektrumuna göre bileşikte beş adet –CH ve on adet –C (kuaterner karbon) var olduğu Şekil 4.20’de görülmektedir.



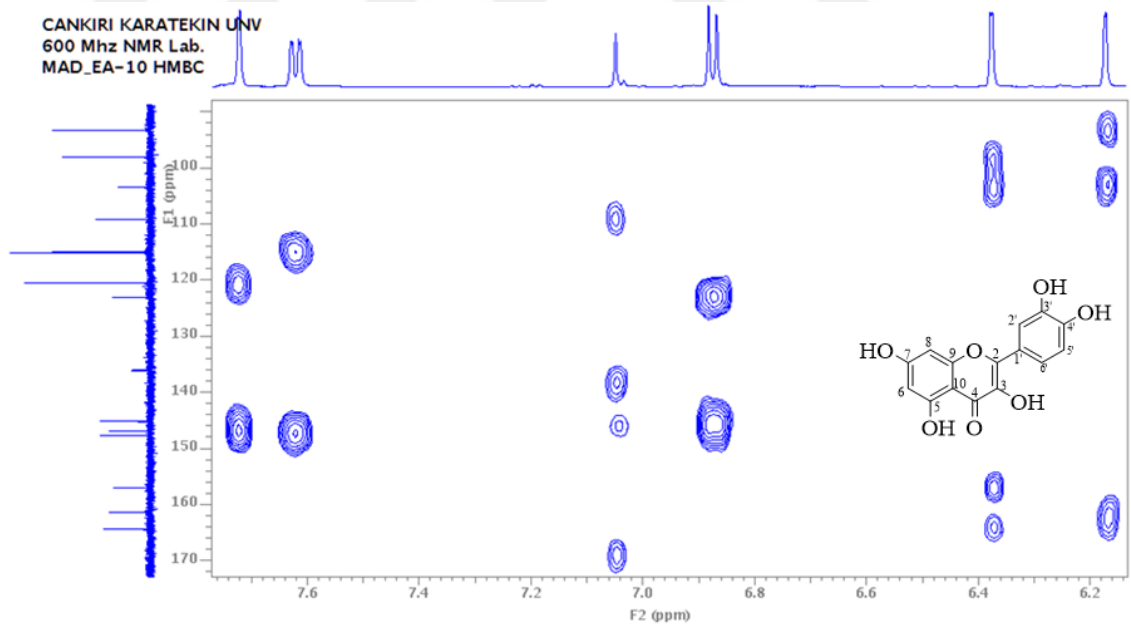
Şekil 4.20 Kuersetin bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan DEPT ¹³C NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz)

Bileşiğe ait HSQC spektrumu incelendiğinde; A halkasındaki, 6.37 ppm de dublet olarak rezonans olan protonun 92.92 ppm deki karbon atomuna ve 6.16 ppm de dublet olarak rezonans olan protonun 97.90 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğu belirlenmiştir. B halkasındaki, 7.61 ppm de dubletin dubleti olarak rezonans olan protonun 120.26 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğunu, 6.86 ppm de dublet olarak rezonans olan protonun 114.80 ppm deki karbona bağlı olduğunu ve 7.72 ppm de dublet olarak rezonans olan protonun 114.52 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğu bu teknikle Şekil 4.21’de belirlenmiştir.

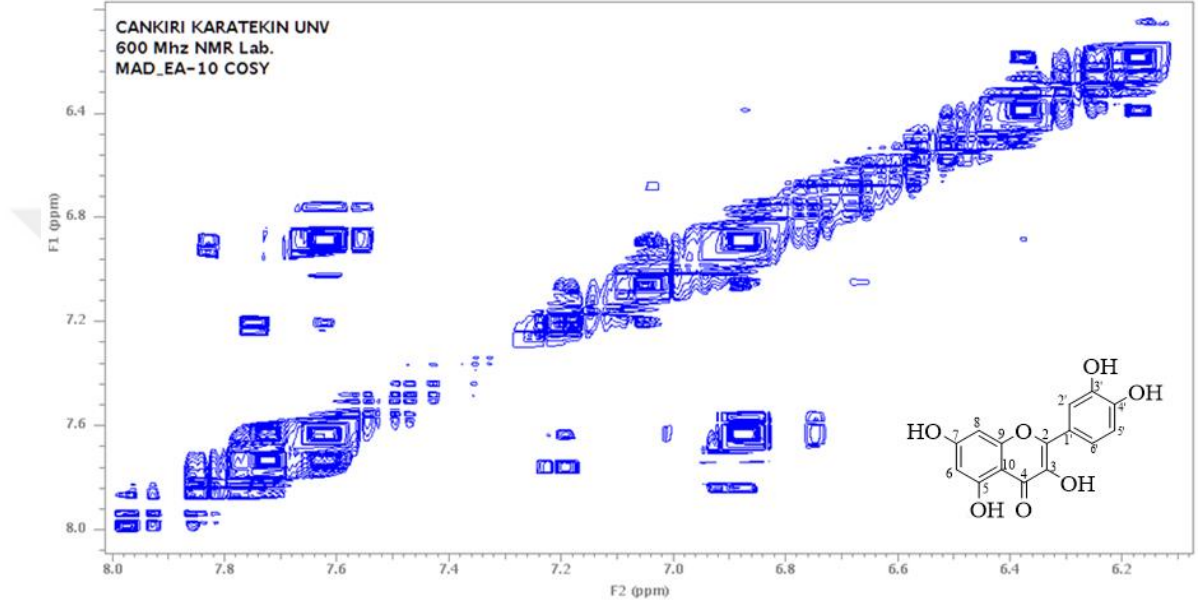


Şekil 4.21 Kuersetin bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan ¹H-¹³C-HSQC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

HMBC spektrumu ile bileşikte, birbirine komşu olan karbon ve protonların birbiri ile olan etkileşimleri maksimum dört bağ da dahil olmak üzere belirlenmektedir. Bileşiğin A halkasındaki C-8 karbonuna bağlı olan ve 6.37 ppm de rezonans olan aromatik proton sırasıyla; 156.81 ppm, 164.13 ppm, 97.90 ppm ve 103.10 ppm deki karbonlar ile etkileştiği belirlenmiştir. C-6 karbonuna bağlı olan 6.16 ppm de rezonans olan aromatik proton sırasıyla; 161.06 ppm, 164.13 ppm ve 92.92 ppm deki karbonlar ile etkileştiği belirlenmiştir. Bileşiğin B halkasındaki C-2' karbonuna bağlı olan ve 7.72 ppm de rezonans olan aromatik proton sırasıyla; 122.72 ppm, 146.59 ppm, 114.52 ppm ve 120.26 ppm deki karbonlar ile etkileştiği belirlenmiştir. C-5' karbonuna bağlı olan 6.86 ppm de rezonans olan aromatik proton sırasıyla; 144.79 ppm, 120.26 ppm ve 122.72 ppm deki karbonlar ile etkileştiği belirlenmiştir. Son olarak aynı halkadaki C-6' karbonuna bağlı, 7.61 ppm de rezonans olan aromatik proton sırasıyla; 122.72 ppm, 147.34 ppm, 114.80 ppm ve 114.52 ppm deki karbonlar ile etkileştiği Şekil 4.22'de belirlenmiştir.



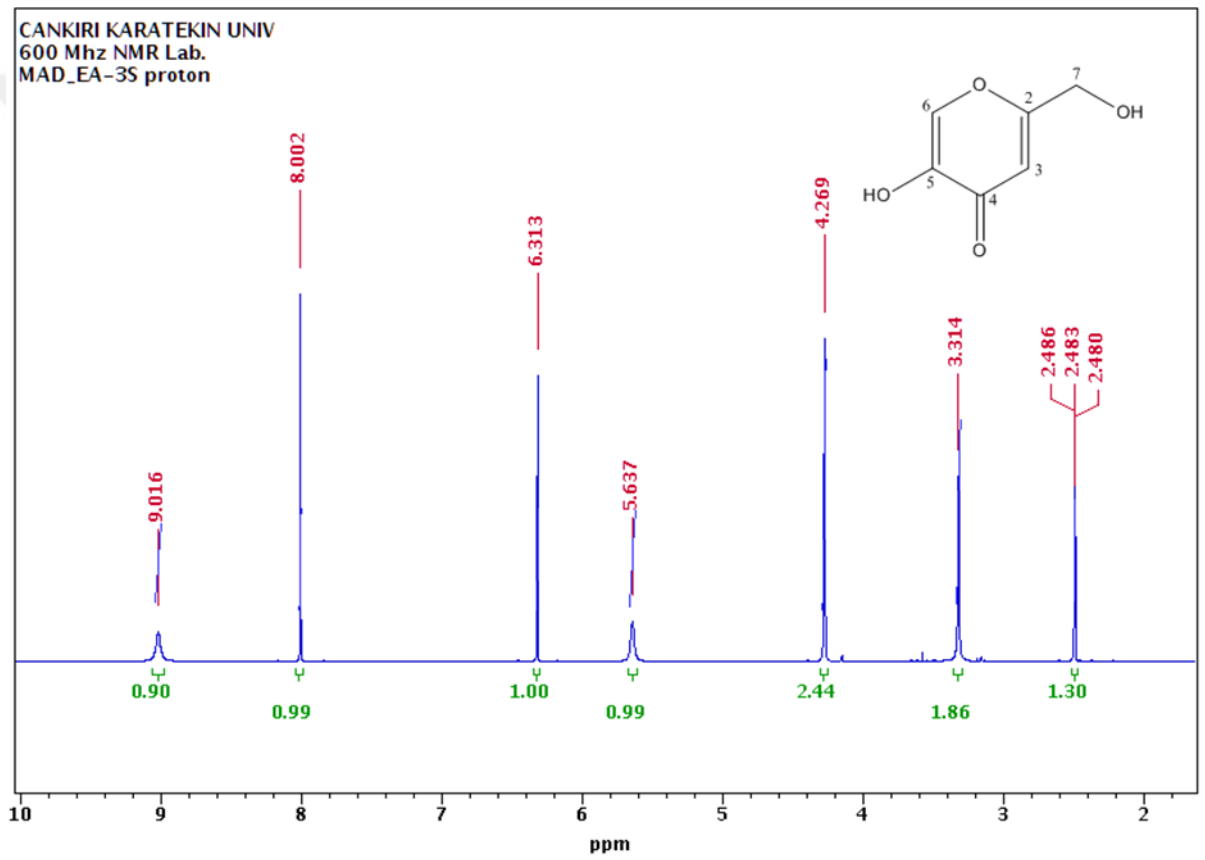
COSY spektrumuna göre, B halkasında birbirine orta pozisyonda bağı olan ve 7.61 ppm deki aromatik protonun 6.86 ppm deki aromatik proton ile etkileşimi belirlenmiştir. A halkasında birbirine meta pozisyonunda bağı olan 6.37 ppm deki aromatik protonun 6.16 ppm deki proton ile etkileşimde olduğu Şekil 4.23'de belirlenmiştir.



Şekil 4.23 Kueretin bileşiğinin CD₃OD-d₄ alınan COSY NMR spektrumu (¹H: 600 MHz)

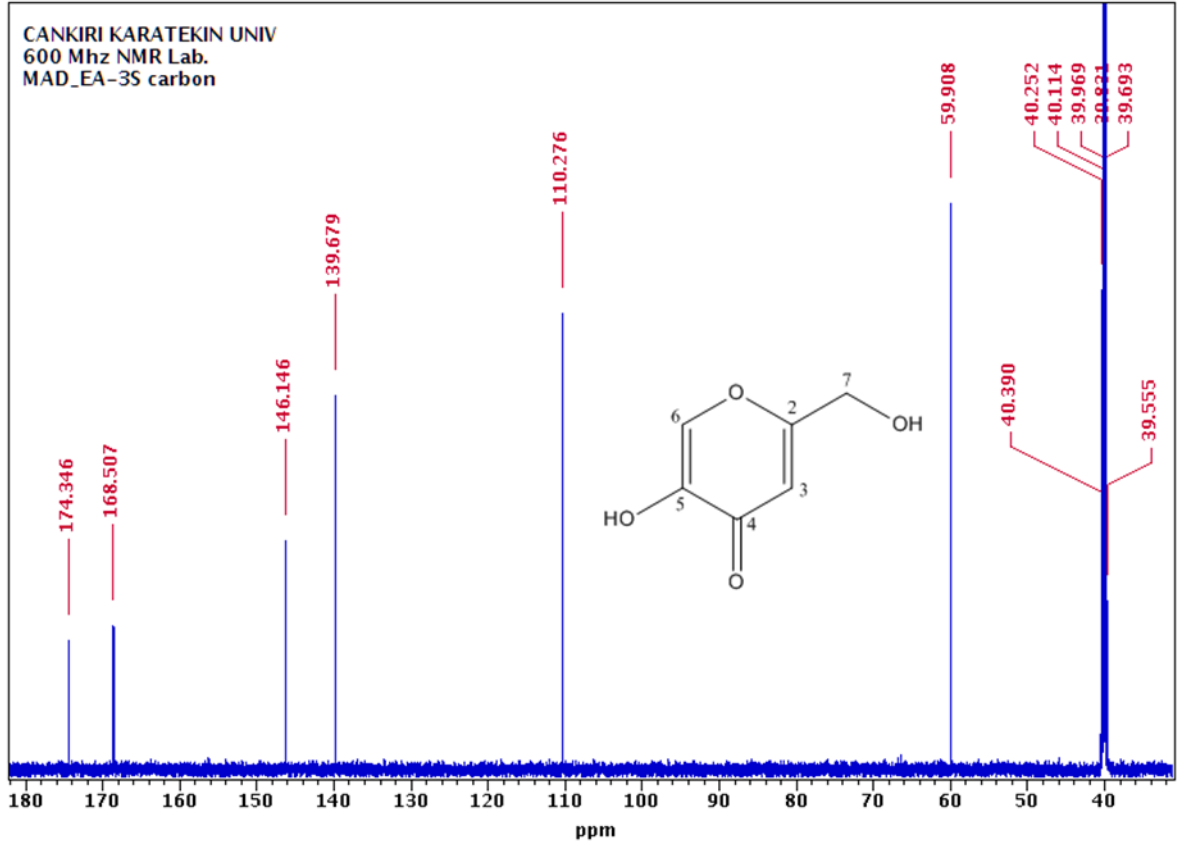
4.2.4. Kojik Asit

Bileşiğe ait ^1H NMR spektrumu incelendiğinde aromatik halkanın C-6 karbonuna bağlı olan proton 8.00 ppm de singlet olarak rezonans olmaktadır. C-3 karbonuna bağlı olan proton 6.31 ppm de rezonans olmaktadır. C-7 karbonuna bağlı olan özdeş metil protonları da 4.26 ppm de rezonans oldukları Şekil 4.24'de belirlenmiştir.



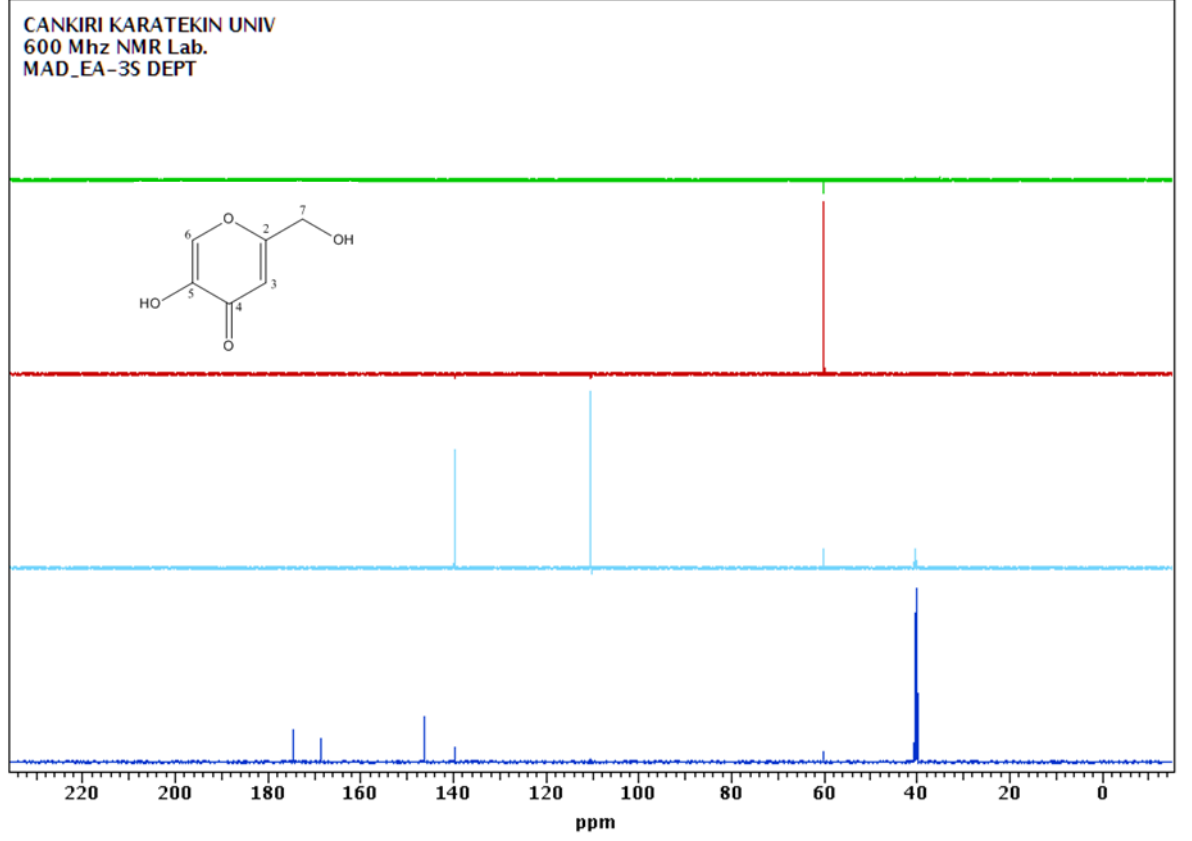
Sekil 4.24 Kojik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz)

Bileşiğe ait karbon spektrumu incelendiğinde sırasıyla; C-2 karbon atomunun 168.50 ppm, C-3 karbon atomunun 110.27 ppm, C-4 karbonil karbonu 174.34 ppm, C-5 karbon atomunun 146.14 ppm, C-6 karbon atomunun 139.67 ppm ve C-2 karbonuna bağlı olan C-7 karbon atomunun 59.90 ppm de rezonans oldukları Şekil 4.25’de belirlenmiştir.



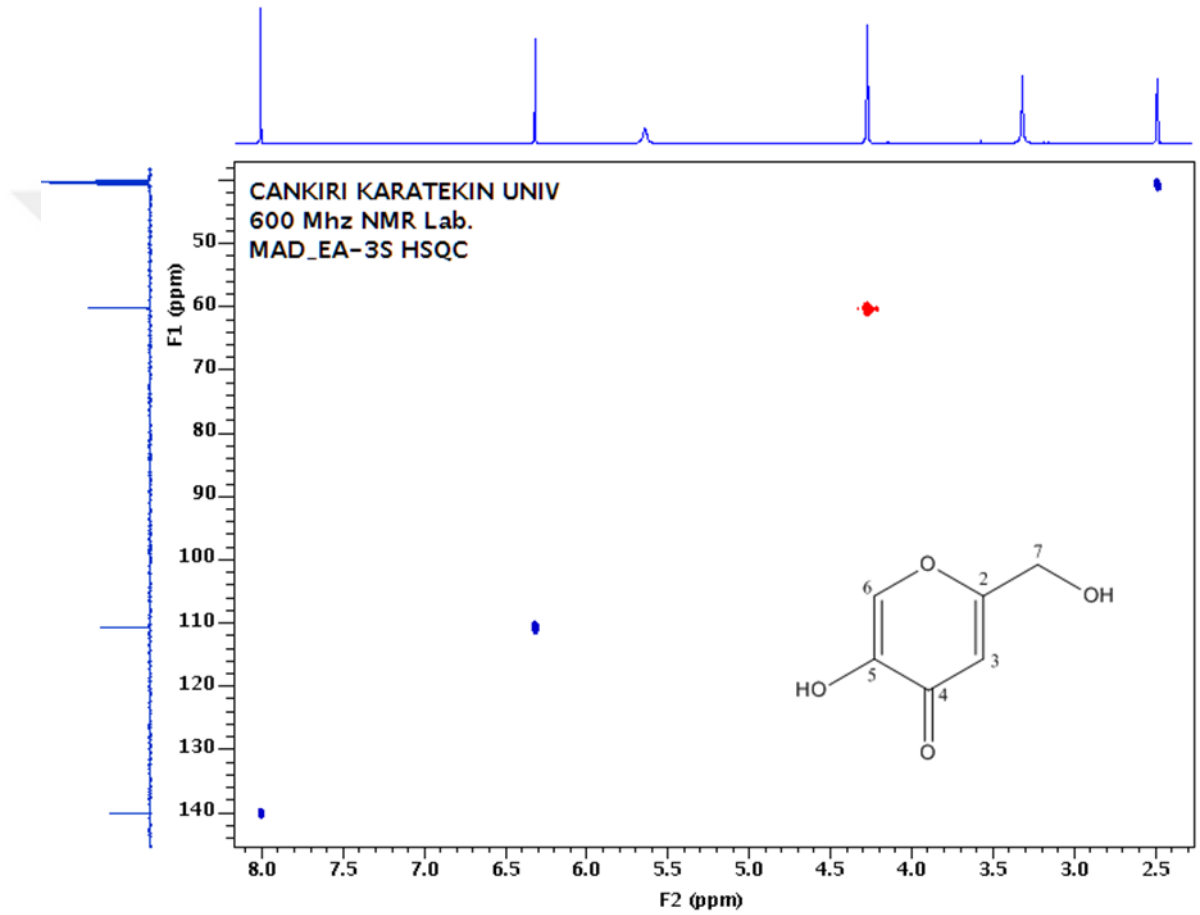
Şekil 4.25 Kojik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹³C NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz)

DEPT spektrumuna göre bileşikte bir adet $-CH_2$, iki adet $-CH$ ve üç adet $-C$ (kuaterner karbon) var olduğu Şekil 4.26'da belirlenmiştir.



Şekil 4.26 Kojik asit bileşiğinin DMSO- d_6 'de alınan DEPT ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz)

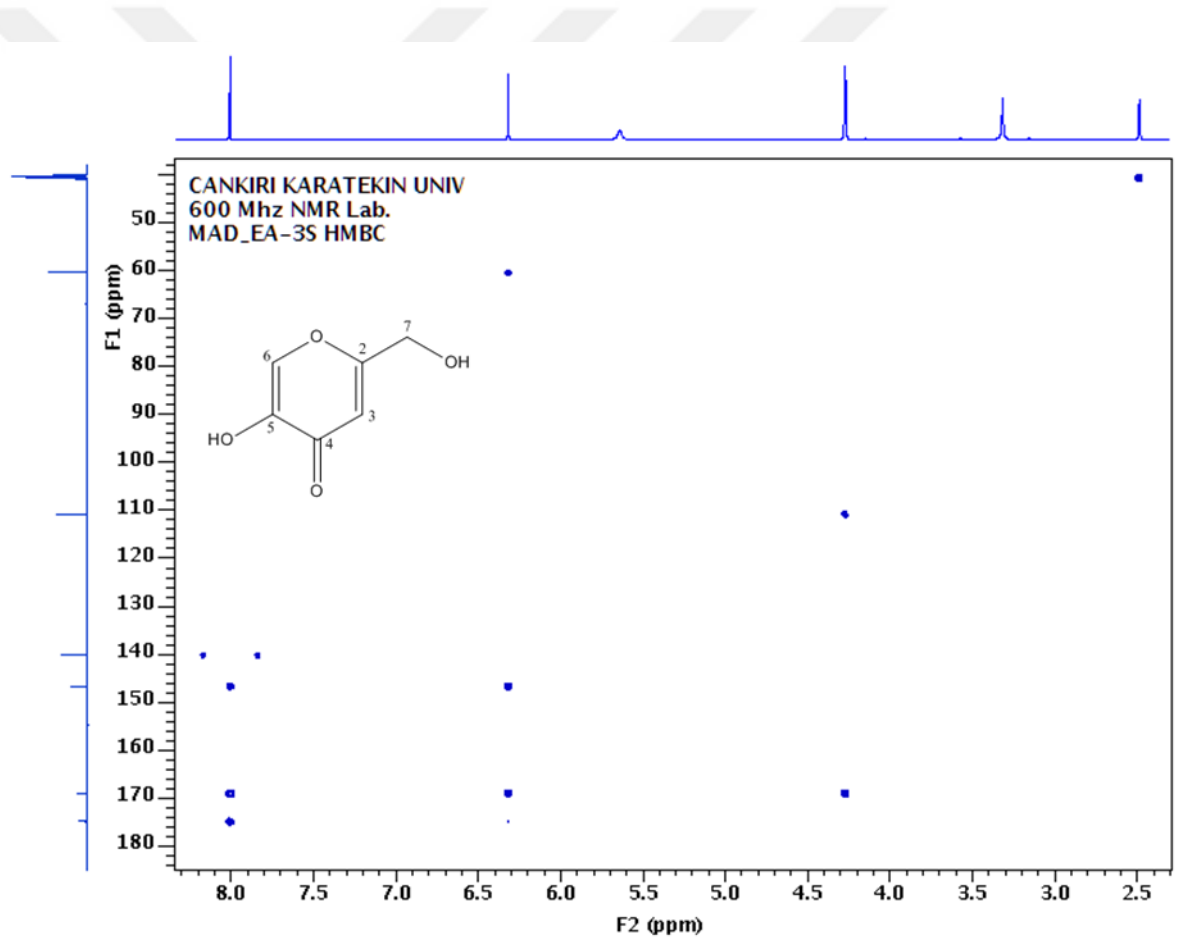
Bileşiğe ait HSQC spektrumu incelendiğinde 8.00 ppm deki singlet olarak rezonans olan protonun 139.67 ppm deki karbona atomuna bağlı olduğunu, 4.26 ppm de singlet olarak rezonans olan özdeş metil protonlarının 59.90 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğu, 6.31 ppm deki singlet olarak rezonans olan protonun 110.27 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğu bu yöntemle Şekil 4.27'de belirlenmiştir.



Şekil 4.27 Kojik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹H-¹³C-HSQC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

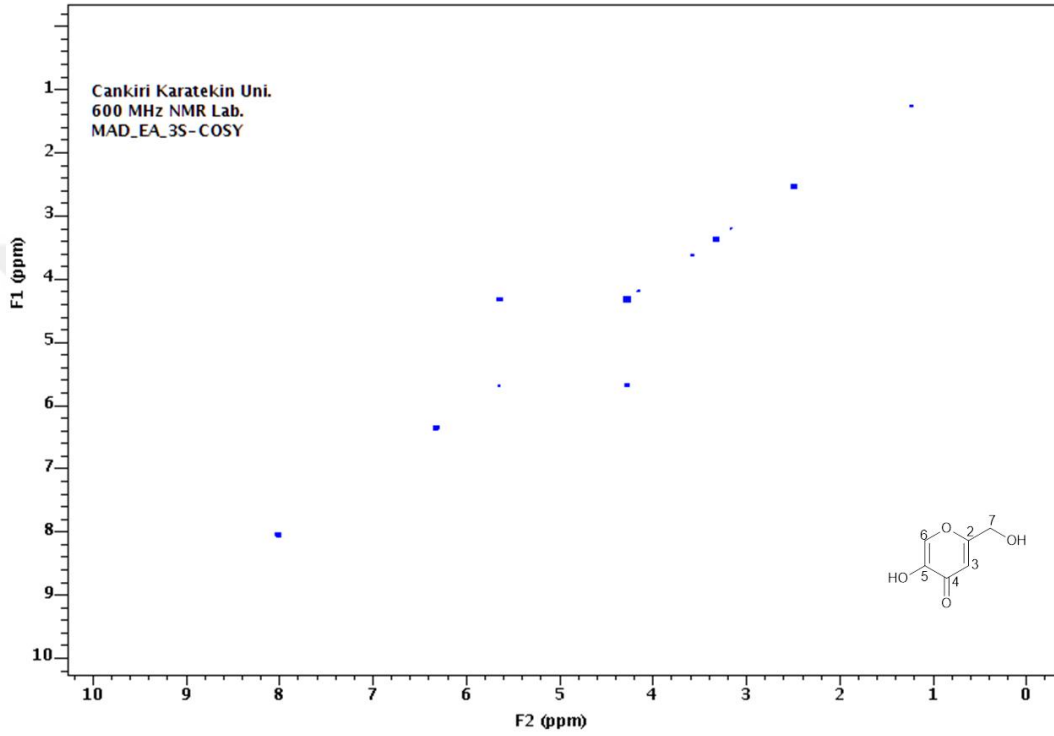
HSQC spektrumunda CH₂ gruplarının farklı renkte görülmesi, HETCOR spektrumuna göre bir üstünlük sağlamaktadır. Kojik asit bileşiğinde bulunan bir adet metilen proton-karbon eşleşmesi kırmızı renkte, diğerleri ise mavi renkte görülmektedir. Bileşikte iki aromatik ve bir alifatik proton-karbon eşleşmesi spektrumda görülmektedir ve önerilen yapı ile uyumludur.

HMBC spektrumu ile bileşikte, birbirine komşu olan karbon ve protonların birbiri ile olan etkileşimleri maksimum dört bağ da dahil olmak üzere belirlenmektedir. Buna göre C-6 karbonuna bağlı olan ve 8.00 ppm de rezonans olan aromatik proton, sırasıyla; 174.34 ppm, 168.50 ppm, 146.14 ppm, 110.27 ppm, 59.90 ppm deki karbonlar ile etkileştiği, C-3 karbonuna bağlı olan ve 6.31 ppm'de rezonans olan aromatik proton, sırasıyla; 174.34 ppm, 168.50 ppm, 146.14 ppm, 139.67 ppm, 59.90 ppm deki karbonlar ile etkileştiği belirlenmiştir. Bileşiğe ait C-7 karbon atomuna bağlı olan özdeş metil protonlarının sırasıyla; 174.34 ppm, 168.50 ppm, 139.67 ppm, 110.27 ppm deki karbon atomu ile korelasyonu 2D HMBC tekniği ile Şekil 4.28'de belirlenmiştir.



Şekil 4.28 Kojik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹H-¹³C-HMBC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

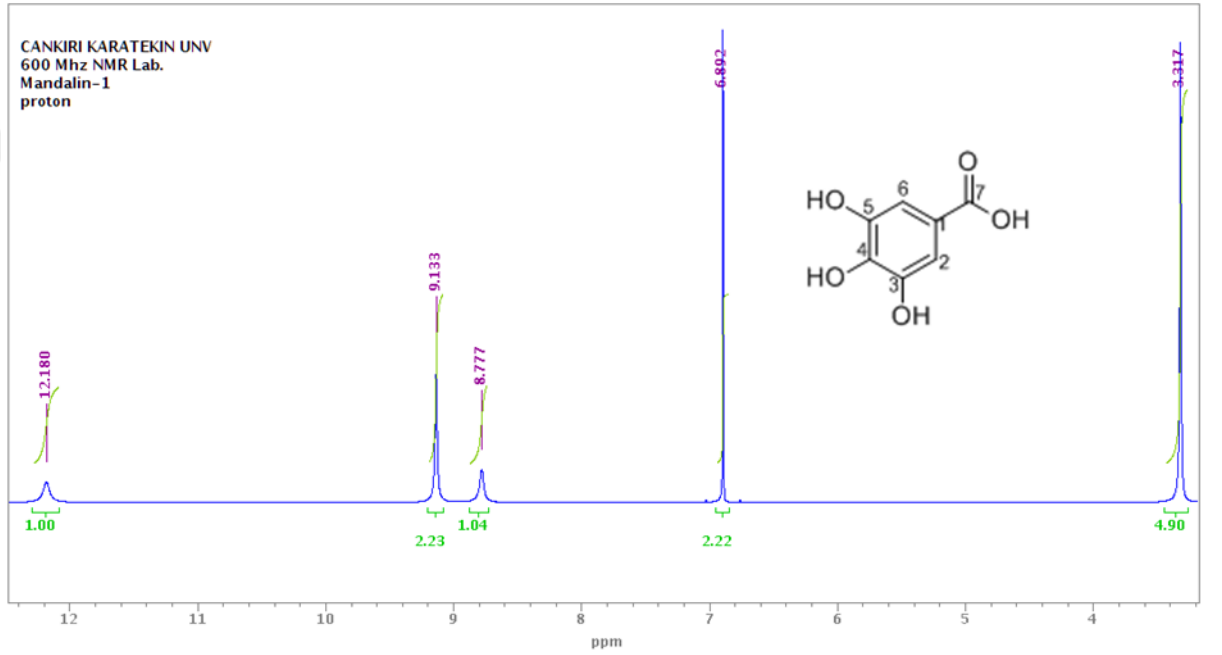
Bileşğin COSY spektrumuna göre 8.00 ppm deki aromatik protonun halkada bulunan diğer aromatik proton ile etkileşmediği ve singlet protonun rezonansı görülmektedir. Spektrum dikkatlice incelendiğinde sadece metilen protonlarının hidroksil protonu ile olan etkileşimi Şekil 4.29'da görülmektedir.



Şekil 4.29 Kojik asit bileşğinin DMSO-d₆ alınan COSY NMR spektrumu (¹H: 600 MHz)

4.2.5. Gallik Asit

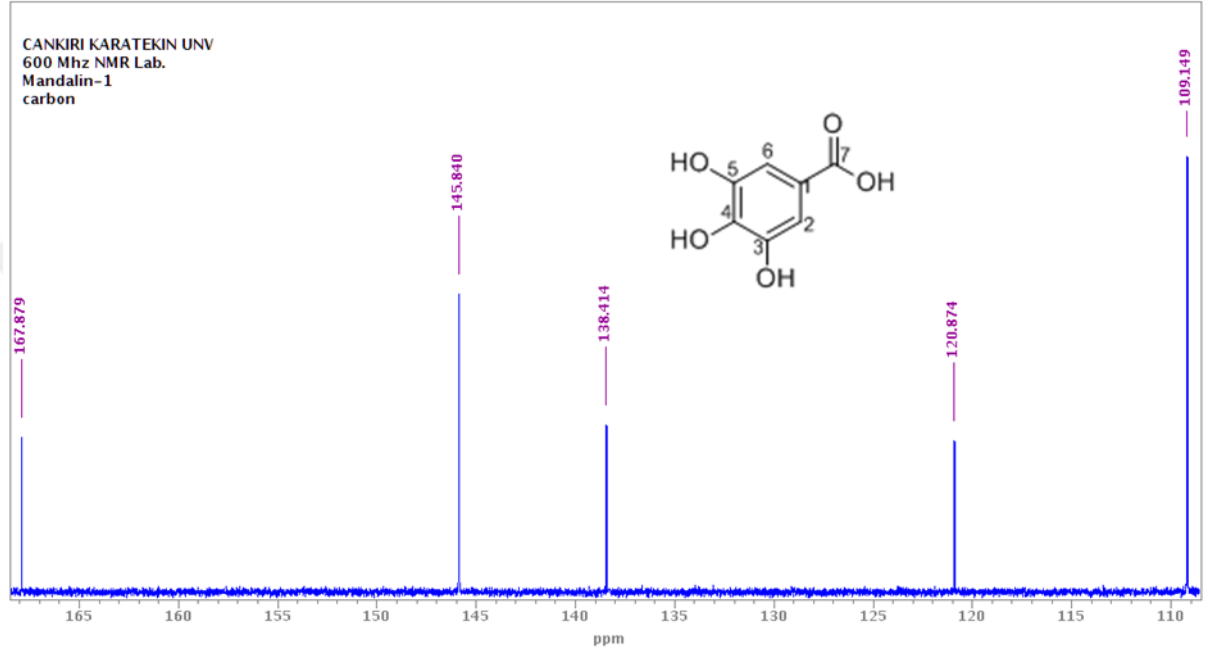
Bileşiğe ait Şekil 4.30'daki veri, ^1H NMR spektrumu incelendiğinde aromatik halkanın simetrik olmasından dolayı 6.89 ppm de singlet olarak rezonans olan H-2 ve H-6 protonlarının aynı alanda oldukları Şekil 4.30'da tespit edilmiştir.



Şekil 4.30 Gallik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz)

Ayrıca hidroksil grupları 9 ppm civarlarında rezonans olurken, karboksilik asit protonu rezonans etkisi ile aşağı alana kaymakta ve 12 ppm de rezonans olmaktadır. İntegrasyon değerleri ve diğer veriler yapı ile uyumludur.

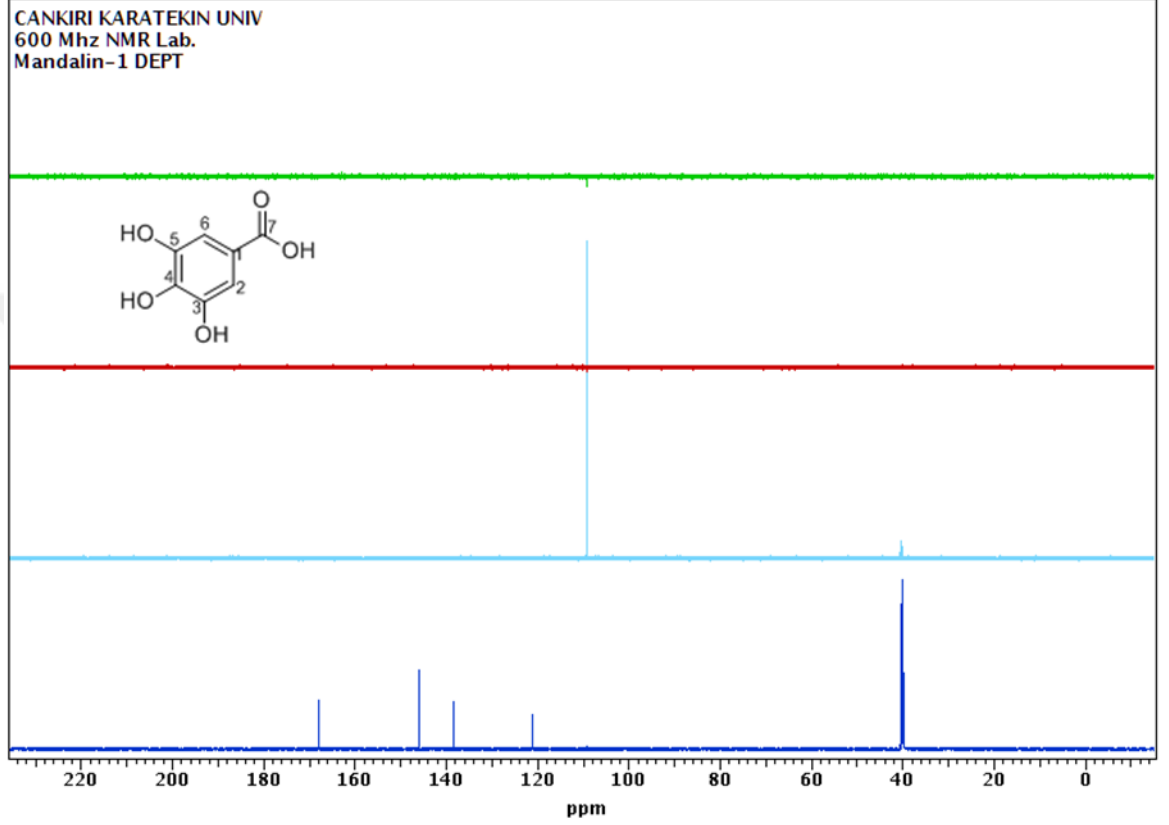
Bileşiğe ait karbon spektrumu incelendiğinde sırasıyla; C-1 karbon atomunun 120.87 ppm, C-2 ve C-6 karbonları 145,.84 ppm, C-3 ve C-5 karbonları 109.14 ppm, C-4 karbon atomunun 138,.41 ppm ve C-7 karbonil karbonununun 167.87 ppm de rezonans oldukları Şekil 4.31'de belirlenmiştir.



Şekil 4.31 Gallik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹³C NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz)

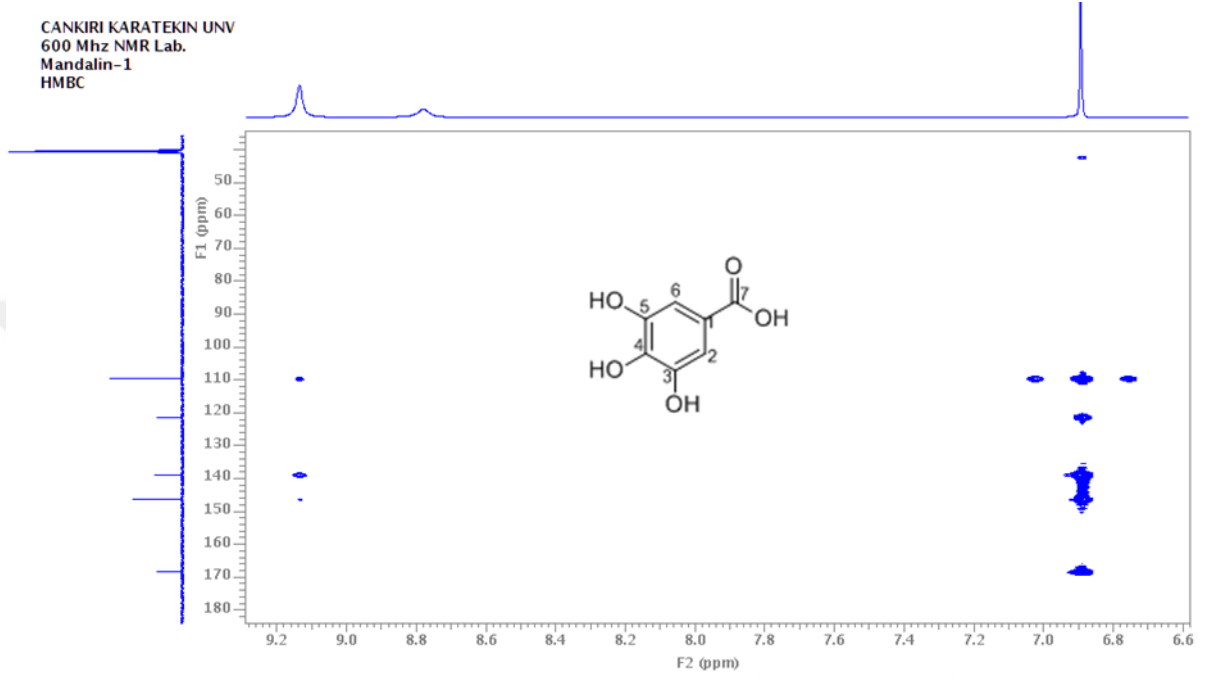
Toplamda yedi karbon atomu içeren gallik asit bileşiğinde, mevcut simetriden dolayı toplam beş karbon atomu görülmektedir. Belirlenen karbon sayıları ve bileşikteki simetriden dolayı, 2 ile 6 nolu karbonlar ve 3 ile 5 nolu karbonlar birlikte rezonans olmaktadır. Bu veriler ışığında karbon sayıları yapı ile uyumludur.

DEPT spektrumuna göre bileşikte simetriden dolayı iki adet eşdeğer –CH ve bir adet eşdeğer –C (kuaterner karbon) ve üç adet farklı alanda rezonans olan –C (kuaterner karbon) var olduğu Şekil 4.32’de belirlenmiştir.



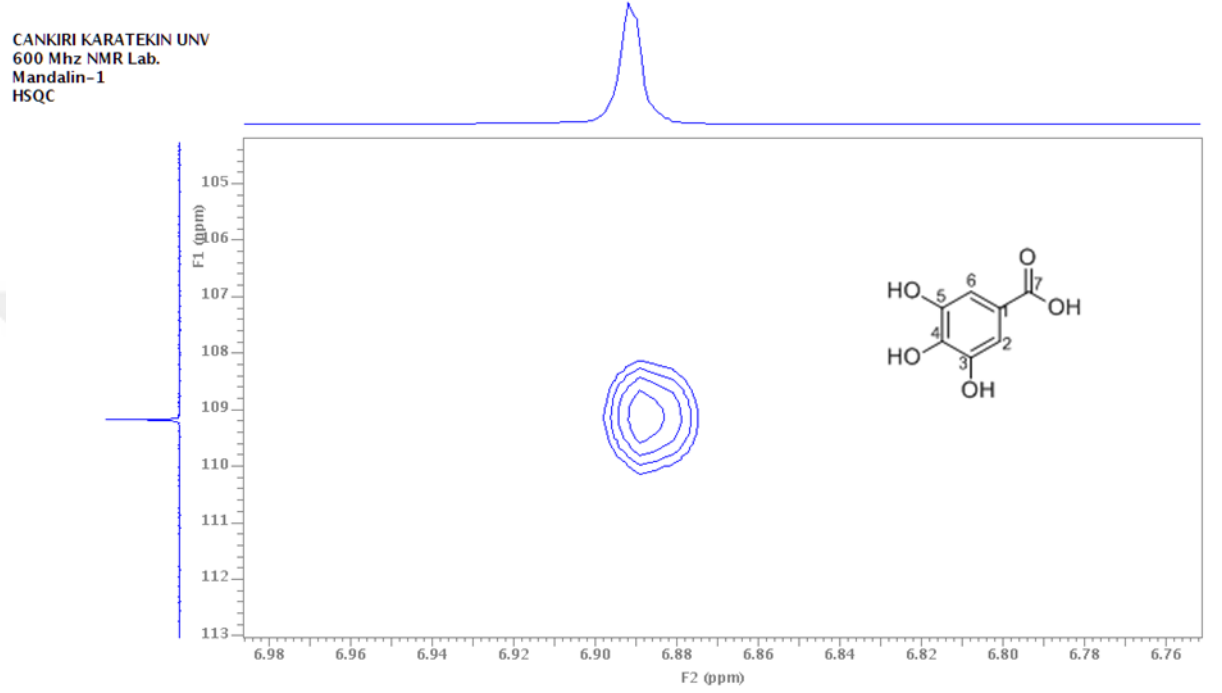
Şekil 4.32 Gallik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan DEPT ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz)

HMBC spektrumuna göre 6.89 ppm de rezonans olan aromatik proton, sırasıyla; 120.87 ppm, 138.41 ppm, 145.84 ppm, 167.87 ppm'deki karbonlar ile etkileştiği Şekil 4.33'de belirlenmiştir.



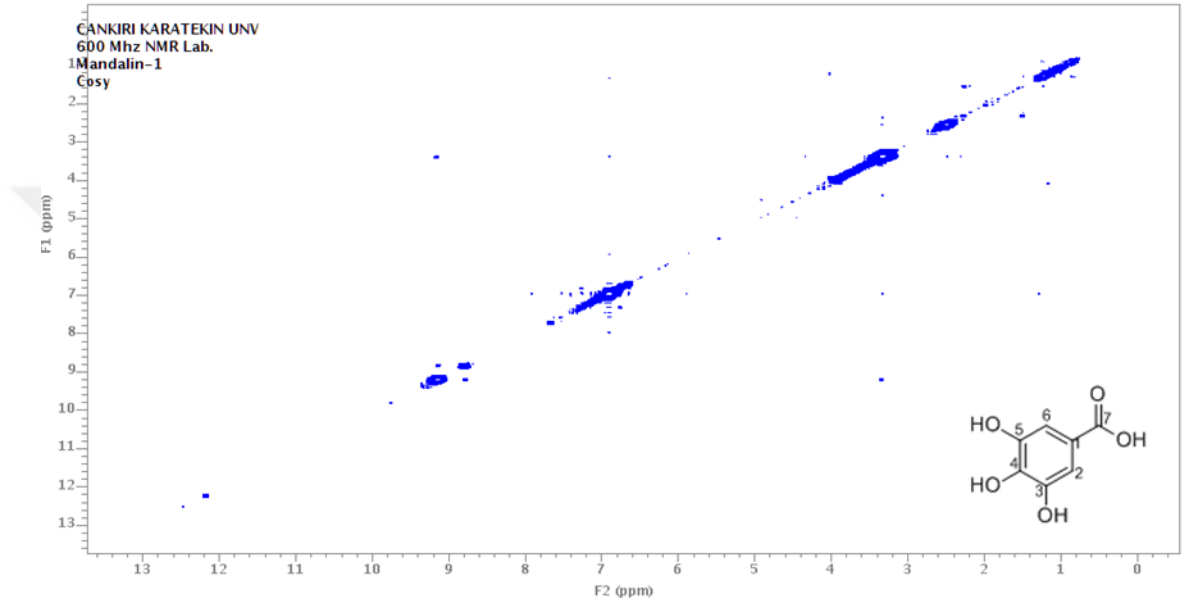
Şekil 4.33 Gallik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹H-¹³C-HMBC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

Bileşiğe ait HSQC spektrumu incelendiğinde 6.89 ppm deki singlet olarak rezonans olan protonun 109.14 ppm'deki karbona atomuna bağlı olduğu Şekil 4.34'de belirlenmiştir.



Şekil 4.34 Gallik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹H-¹³C-HSQC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

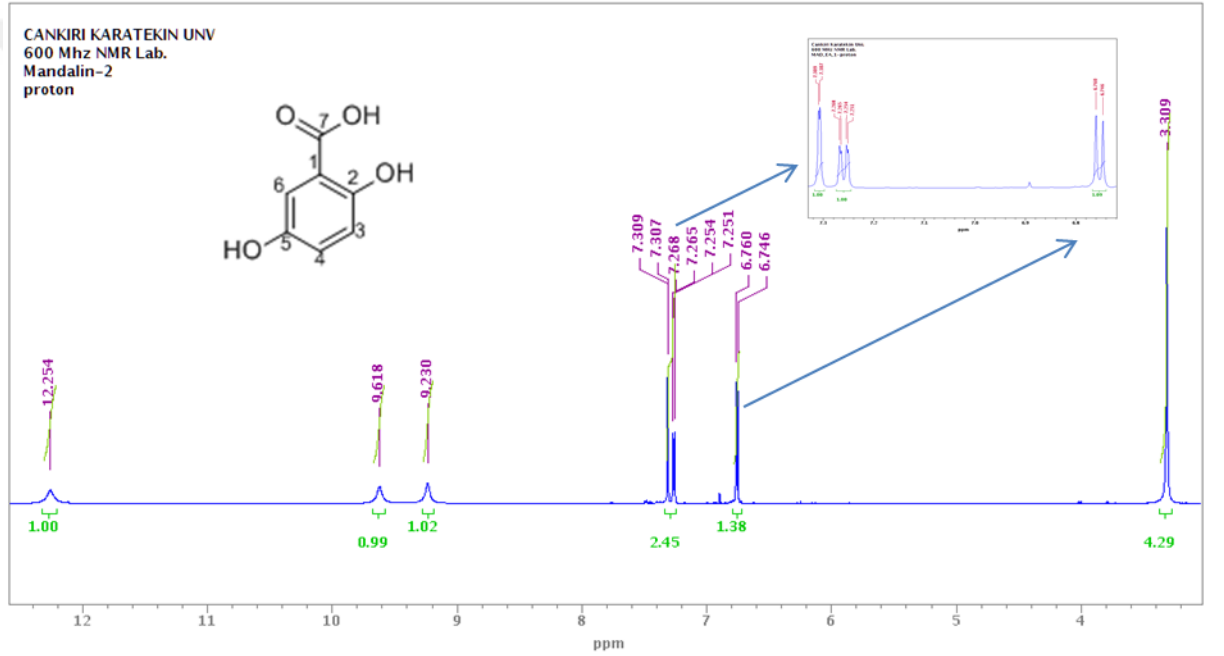
Şekil 4.30'a bakıldığında aromatik halkada rezonans olan protonların yapıdaki simetriden dolayı proton spektrumunda tek bir yerde (6.89 ppm) ve singlet olarak pik verdikleri gözlemlendi. COSY spektrumunda birbiri ile etkileşimi olan protonları görebildiğimiz için, gallik asit bileşiğinde ki protonların birbirlerine simetrik olmasından dolayı bu spektrumda kayda değer bir pik Şekil 4.35'de gözlenmemiştir.



Şekil 4.35 Gallik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan COSY NMR spektrumu (¹H: 600 MHz)

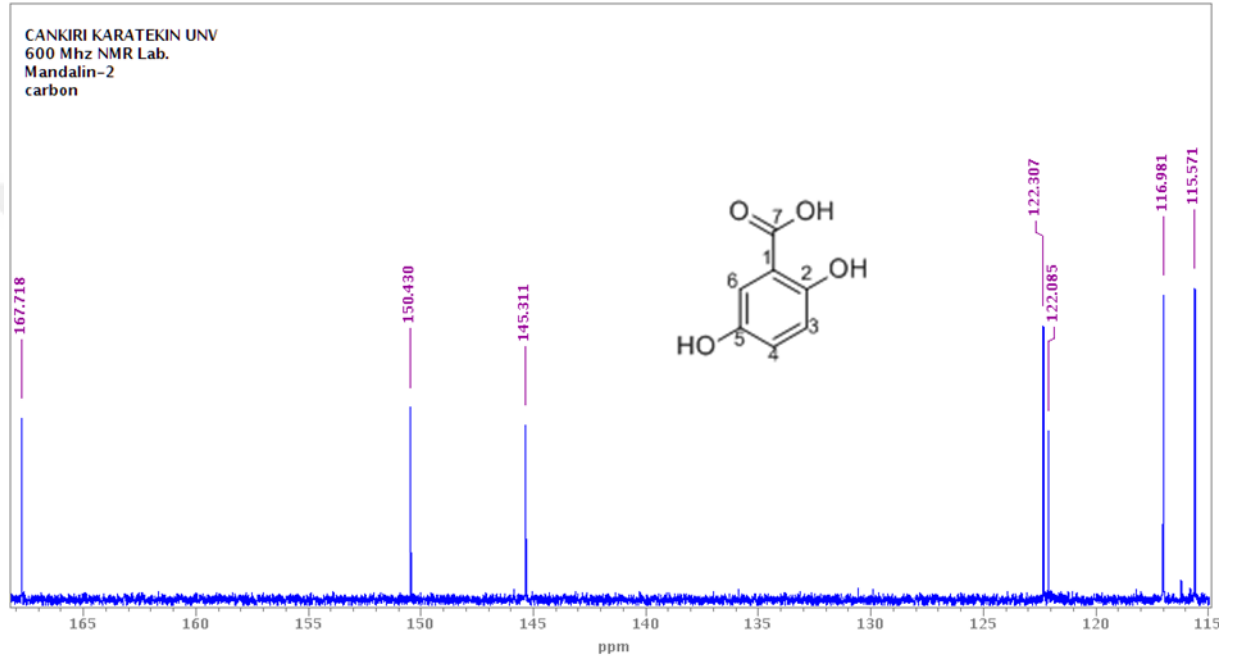
4.2.6. Gentisik Asit

Bileşiğe ait ^1H NMR incelendiğinde bileşikte 3 tane farklı aromatik proton bulunmaktadır. Buna göre 7.31 ppm deki protonun singlet olarak spektrumda pik verdiği belirlendi. Yine molekülde 7.26 ppm de rezonans olan aromatik protonun komşu 6.75 ppm deki proton ile 8.28 Hz'lik etkileşim sabiti ile birbirlerine karşı orto konumunda olduğu Şekil 4.36'da belirlenmiştir.



Şekil 4.36 Gentisik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan ^1H NMR spektrumu (^1H : 600 MHz)

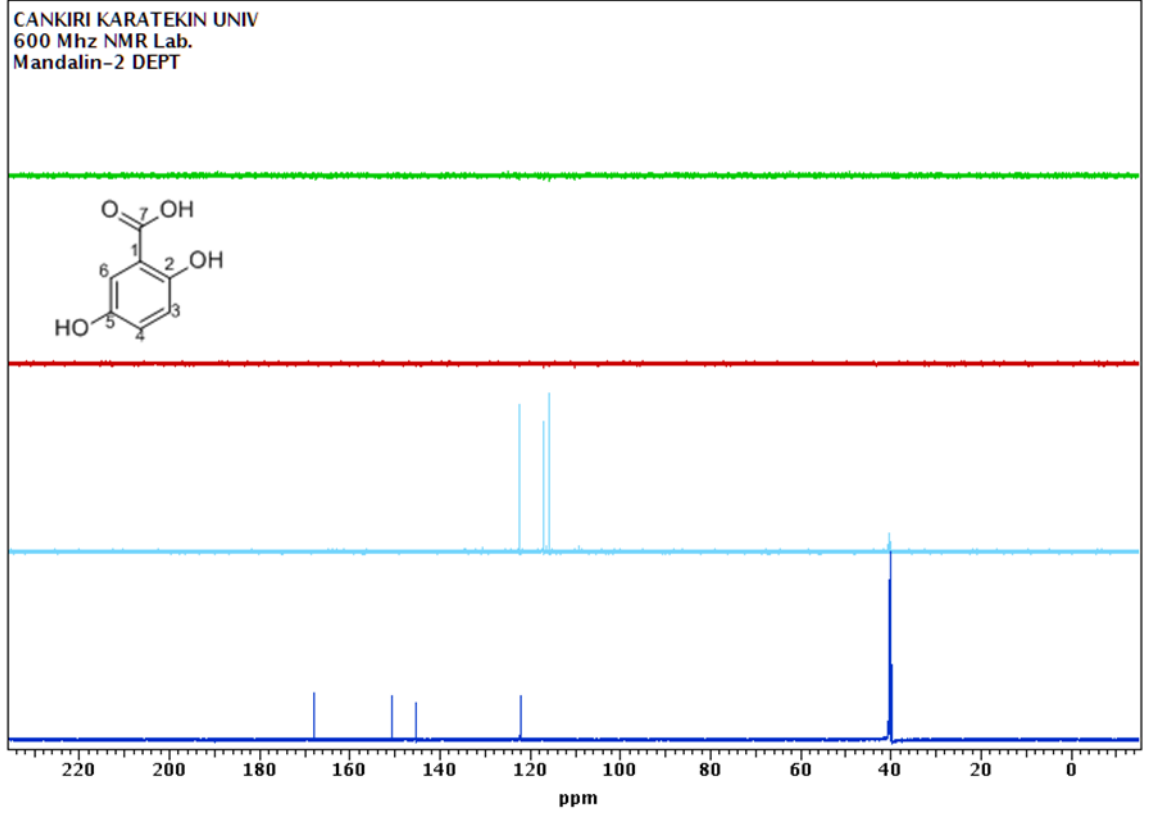
Bileşiğe ait karbon spektrumu incelendiğinde sırasıyla; C-1 karbon atomunun 122.07 ppm, C-2 karbon atomunun 145.31 ppm, C-3 karbon atomunun 115.58 ppm, C-4 karbon atomunun 122.30 ppm, C-5 karbon atomunun 150.43 ppm, C-6 karbon atomunun 116.97 ppm ve C-7 karbonil karbonununun 167.72 ppm de rezonans oldukları Şekil 4.37'de belirlenmiştir.



Şekil 4.37 Gentisik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹³C NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz)

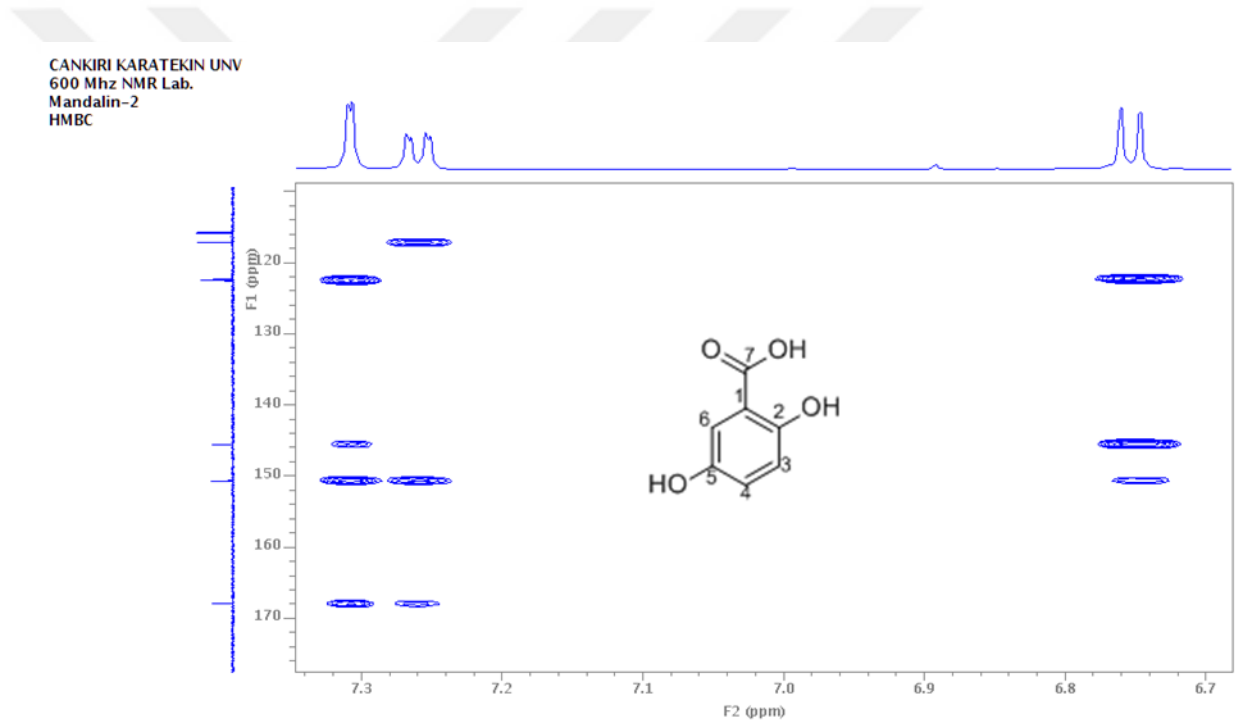
Gentisik asit bileşiğine ait yedi karbon atomu bileşik ile uyumludur. Hidroksil grupların para konumlarında olması ve 1 ile 2 nolu aromatik karbonlarda fonksiyonel grupların bağlı bulunması, aromatik karbonların 150 ppm ve 145 ppm civarında rezonans olmasını sağlamaktadır.

DEPT spektrumuna göre bileşikte üç adet –CH ve dört adet farklı alanda rezonans olan –C (kuaterner karbon) var olduğu Şekil 4.38’de belirlenmiştir.

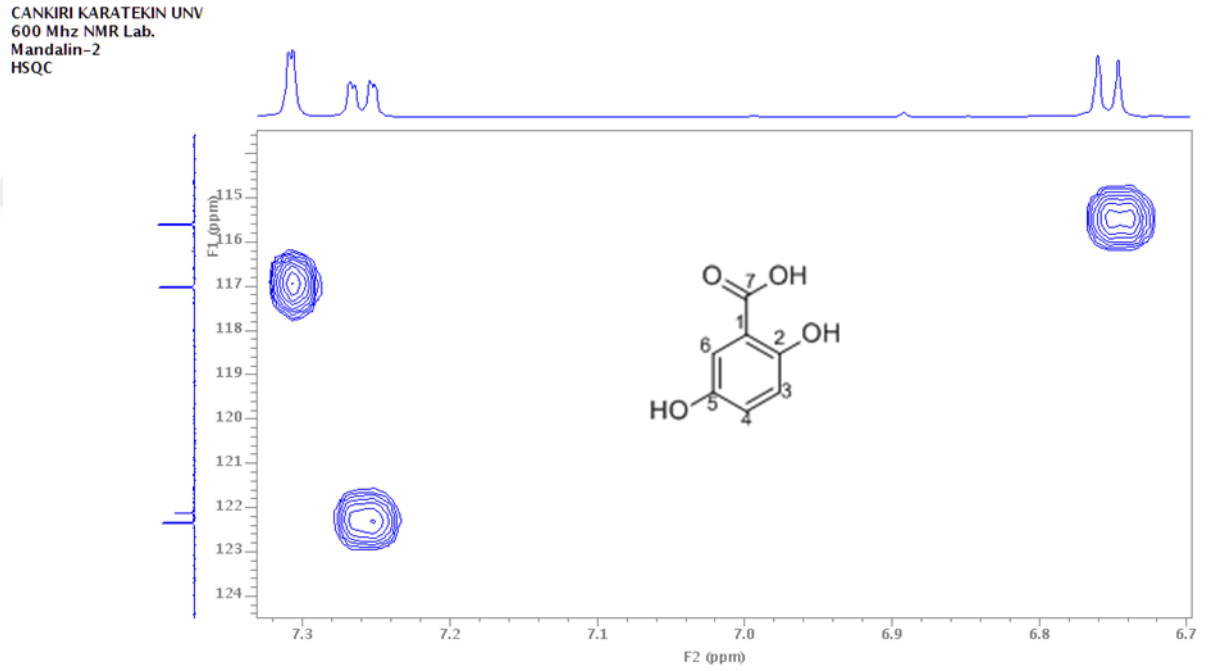


Şekil 4.38 Gentisik asit bileşiğinin DMSO- d_6 alınan DEPT ^{13}C NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz)

HMBC spektrumuna göre 6.75 ppm de rezonans olan aromatik proton, sırasıyla; 122.07 ppm, 122.30 ppm, 145.38 ppm deki karbon atomu ile kuvvetli, 150.49 ppm deki karbonlar ile zayıf etkileşim gösterdiği, ayrıca 168.72 ppm deki karbonil karbonu ile zayıf da olsa etkileşim gösterdiği bu teknik ile belirlenmiştir. Spektrumdaki 7.26 ppm de rezonans olan protonun sırasıyla; 150.49 ppm deki karbon atomu ile kuvvetli, 115.58 ppm deki karbon atomu ve 116.97 ppm deki karbon atomları ile etkileştiği belirlenmiştir. Son olarak 7.31 ppm de singlet olarak rezonans olan protonun 122.30 ppm deki karbon atomu ile, 122.07 ppm deki karbon atomu ile, 145.01 ppm deki karbon atomu ile, 150.49 ppm deki karbon atomu ile etkileştiği Şekil 4.39'da belirlenmiştir.

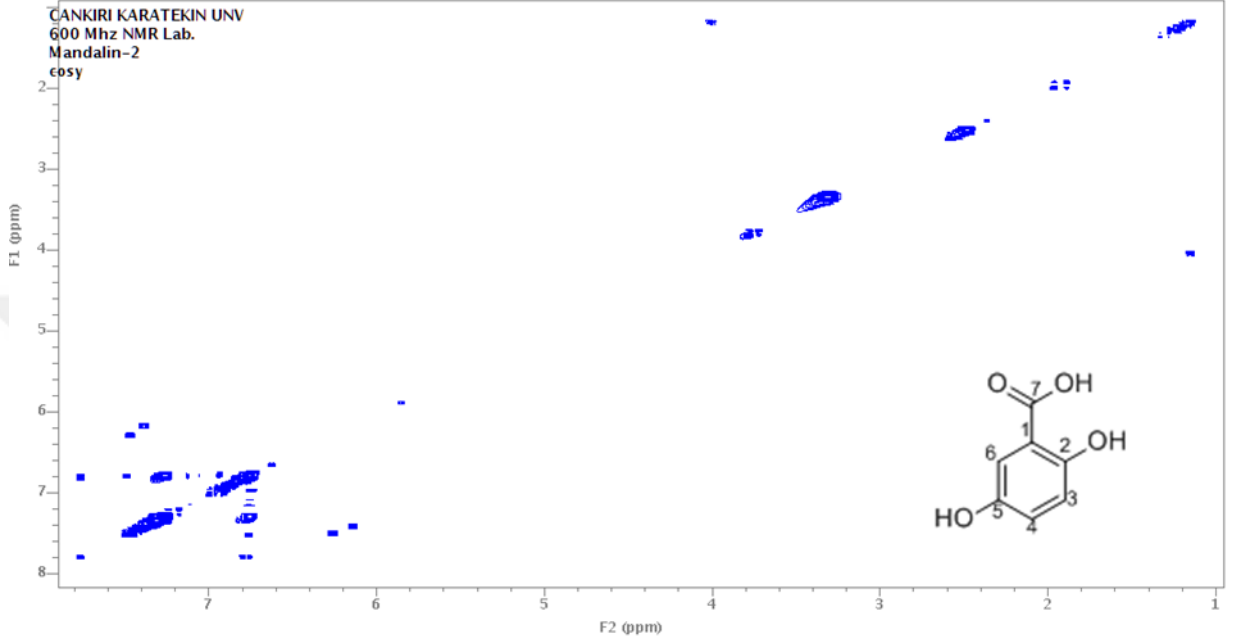


Bileşiğe ait HSQC spektrumu incelendiğinde 7.31 ppm deki singlet olarak rezonans olan protonun 116.97 ppm deki karbona atomuna bağlı olduğu belirlenmiştir. Yine HSQC spektrumuna gore 6.74 ppm deki protonun 115.58 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğu ve 7.26 ppm deki protonun 122.30 ppm deki karbon atomuna bağlı olduğu bu nmr tekniği ile şekil 4.40'da belirlenmiştir.



şekil 4.40 Gentisik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan ¹H-¹³C-HSQC NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

COSY spektrumuna bakıldığında 7.26 ppm de rezonans olan aromatik protonun, 6.75 ppm deki aromatik proton ile 8.28 Hz'lik etkileşim sabiti ile birbirlerine karşı orto konumunda oldukları bu nmr tekniği ile Şekil 4.41'de belirlenmiştir.



Şekil 4.41 Gentisik asit bileşiğinin DMSO-d₆ alınan COSY NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; ¹H: 600 MHz)

4.3. Antioksidan Aktivite Testleri

İnsan bünyesinde bulunan antikorlar vücuda dışardan girebilecek ve içerde oluşabilecek zararlı mikroorganizmalara karşı koruma görevindedirler. Vücuda zarar verebilecek olan serbest radikalik haldeki moleküller yediğimiz yemeklerde, sigara ve alkol tüketiminde, hareketsiz bir yaşam ve stres durumlarında vücutta oluşmaktadırlar. Bu kimyasal bileşikler vücutta başıboş halde kan içerisinde dolaşarak, hürelere ve hatta vücuttaki kimyasal olaylara karışarak insan bünyesinde istenmeyen hasarlara yol açabilir. Vücut içindeki antikorlar bu kimyasal bileşenler ile insan ömrü boyunca sürekli savaş halindedir. Ancak vücudun bazı sebeplerden ötürü zayıf düşmesi sonucu antikorlar da zayıf düşerek veya yetersiz kalarak, serbest haldeki radikalik kimyasal bileşiklerle olan savaşlarında başarı elde edemezler. Bu ve benzeri durumların oluşmaması için dışardan gıda olarak aldığımız doğal antioksidan kaynağı olan meyve-sebze gibi bitkisel ürünlerde bulunan kimyasal bileşenler antikorlar ile birlikte, serbest haldeki radikalik kimyasal bileşenler ile savaşır ve o kimyasal bileşenleri yok ederler.

Elma posasının EtOAc ektresinden izole edilen 5-HM kimyasal bileşiğinin, EEA ve ENBU ekstralarının bazı standart maddeler ile kıyaslanarak yapılan antioksidan sonuçlarına ait veriler Çizelge 4.6-4.11'da verildi..

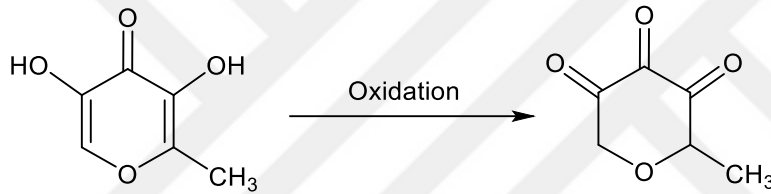
Çizelge 4.6 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin toplam antioksidan aktivite kapasiteleri.

ÖRNEKLER	Toplam antioksidan aktivite (695 nm)			
	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
5-HM	0,2032±0,0032	0,2144±0,0022	0,2514±0,0011	0,2722±0,0038
EEA	0,1174±0,0007	0,1254±0,0028	0,1734±0,0020	0,2594±0,0018
ENBU	0,1804±0,0092	0,2085±0,0015	0,2210±0,0018	0,2904±0,0072
C vit	0,0414±0,0026	0,1352±0,0048	0,2076±0,0029	0,3667±0,0021
BHA	0,0386±0,0068	0,1017±0,0094	0,1936±0,0029	0,3761±0,0074
BHT	0,0728±0,0024	0,0797±0,0045	0,1916±0,0034	0,2986±0,0289
TBHQ	0,0407±0,0032	0,0959±0,0043	0,2035±0,0041	0,3975±0,0144
TRX	0,0271±0,0019	0,0677±0,0047	0,1091±0,0034	0,2075±0,0025
E Vit	0,0403±0,0037	0,0933±0,0132	0,2511±0,0100	0,4856±0,0135

Elma posasından izole edilen 5-hidroksi maltol (5-HM) bileşiğinin Çizelge 4.6'da görüldüğü üzere standart maddelere göre antioksidan aktivitesi daha yüksek çıktığı gözlemlendi. Elma etilasetat ekstresinin (EEA) ve elma n-bütanol (ENBU) ekstresinin diğer standart maddelere göre aktiviteleri neredeyse hepsinden yüksek olduğu ama 5-HM bileşiğinden daha az antioksidan etkiye sahip oldukları gözlemlendi. Bunun sebebi 5-HM bileşiği tek başına yüksek aktiviteye sahipken, EEA ve ENBU içindeki diğer kimyasal bileşiklerin ve 5-HM'nin sinerjik etkiye sahip olamamasından dolayı, EEA'nın ve ENBU'nun antioksidan aktiviteleri 5-HM bileşiğinden daha düşük aktiviteye sahip oldukları de gözlemlendi.

Çizelge 4.7 Elma posasından etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-HM bileşiğinin indirgeme gücü kapasiteleri.

ÖRNEKLER	İndirgeme gücü (700 nm)			
	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
5-HM	0,2317±0,0156	0,3969±0,0247	0,6388±0,0124	0,9653±0,0515
EEA	0,1705±0,0152	0,1759±0,0066	0,2699±0,0170	0,4124±0,0095
ENBU	0,1333±0,0066	0,1681±0,0162	0,2257±0,0142	0,3022±0,0237
C vit	0,3094±0,0106	0,3143±0,0046	0,4721±0,0103	0,3276±0,0881
BHA	0,2956±0,0102	0,2743±0,0096	0,4372±0,0450	0,7254±0,0203
BHT	0,3207±0,0138	0,3326±0,0130	0,4285±0,1152	0,7609±0,0696
TBHQ	0,2646±0,0162	0,2752±0,0069	0,3538±0,0212	0,6298±0,0234
TRX	0,2046±0,0052	0,2029±0,0014	0,2653±0,0295	0,4845±0,0342
E vit	0,1683±0,0068	0,1714±0,0061	0,1876±0,0609	0,3221±0,0427

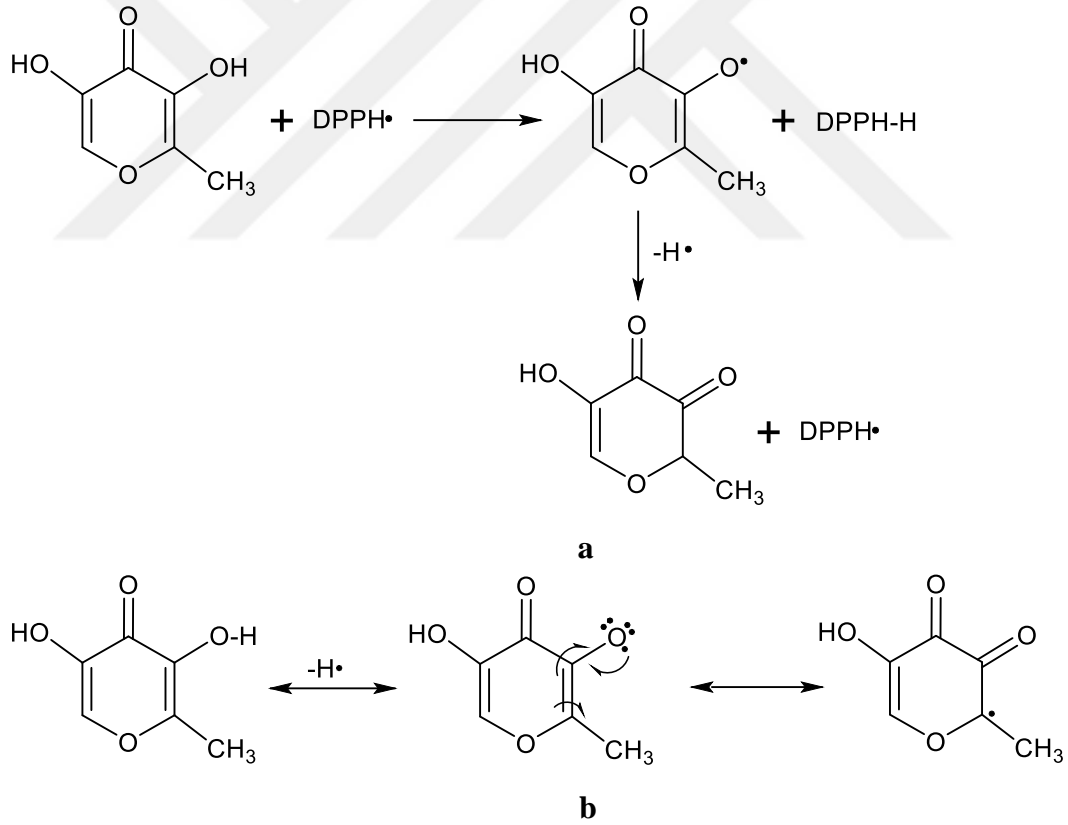


Şekil 4.42 5-HM bileşiğinin oksidasyon reaksiyonu

Elma posasından izole edilen 5-HM bileşiğinin Çizelge 4.7'de görüldüğü üzere standart maddelere göre indirgeme gücü daha düşük olduğu gözlemlendi. EEA ve ENBU ekstresinin diğer standart maddelere göre aktivitelerinin neredeyse hepsinden düşük olduğu görüldü. Ayrıca 5-HM bileşiğinden daha az indirgeme gücüne sahip oldukları gözlemlendi. Bunun sebebi 5-HM bileşiği tek başına yüksek indirgeme gücüne sahipken, EEA ve ENBU içindeki diğer kimyasal bileşiklerin 5-HM bileşiği ile sinerjik etkiye sahip olamamalarından dolayı, EEA'nın ve ENBU'nun indirgeme güçleri 5-HM bileşiğinden daha düşük oldukları gözlemlendi.

Çizelge 4.8 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin serbest radikal giderme aktiviteleri.

ÖRNEKLER	Serbest radikal giderme aktivitesi, %			
	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
5-HM	41,63±5,53	67,27±0,43	73,66±0,22	88,99±1,14
EEA	38,65±3,11	61,51±0,78	71,14±6,02	78,18±1,15
ENBU	4,01±1,83	24,23±1,40	32,26±7,31	37,24±6,06
C vit	34,25±1,22	39,05±0,49	42,75±1,20	48,44±0,33
BHA	68,38±1,21	70,73±0,57	74,85±0,84	82,87±0,79
BHT	8,67±1,73	16,02±1,50	25,00±1,65	61,88±6,02
TBHQ	87,39±6,01	94,66±0,38	95,06±0,40	95,75±0,33
TRX	92,30±1,20	94,03±1,49	95,24±0,67	97,59±0,60
E Vit	85,78±3,98	87,76±2,99	91,52±1,15	95,59±0,63



Şekil 4.43 5-HM bileşiğinin DPPH süpürücü aktivitesi (a), 5-HM bileşiğindeki hidroksil grupları ile serbest radikallerin stabilizasyonu (b)

Çizelge 4.8'de görüldüğü üzere elma posasından izole edilen 5-HM bileşiğinin serbest radikal giderme aktivitesinin standart maddelerin neredeyse tamamından daha düşük olduğu gözlemlendi. EEA ve ENBU ekstralarının diğer standart maddelere göre aktiviteleri neredeyse hepsinden düşük olduğu belirlendi. Ayrıca 5-HM bileşiğinden daha düşük serbest radikal giderme aktivitelerine sahip oldukları gözlemlendi. EEA'nın ve ENBU'nun serbest radikal giderme aktiviteleri 5-HM bileşiğinden daha düşük oldukları gözlemlendi. Bunun sebebi 5-HM bileşiği tek başına yüksek serbest radikal giderme aktivitesine sahipken, EEA ve ENBU içindeki diğer kimyasal bileşiklerin 5-HM bileşiği ile sinerjik etkiye sahip olamamaları olabilir.

Çizelge 4.9 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstraları ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin hidrojen peroksit giderme aktiviteleri.

ÖRNEKLER	Hidrojen peroksit giderme aktivitesi, %			
	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
5-HM	25,01±8,53	37,93±7,31	40,52±8,53	60,34±4,88
ENBU	14,41±3,74	47,35±7,90	60,00±8,32	64,41±7,90
EEA	14,29±6,73	66,67±6,73	64,29±10,10	71,43±6,73
C vit	38,24±4,16	59,52±3,37	52,94±8,32	55,88±12,48
BHA	13,64±6,43	35,91±0,64	47,73±3,21	56,82±3,21
BHT	9,09±6,43	27,27±1,29	43,18±5,79	48,64±4,50
TBHQ	15,45±2,57	20,45±9,64	39,55±8,36	27,73±3,21
TRX	9,55±1,93	29,55±9,64	41,82±2,57	39,55±5,79
E vit	31,82±6,43	40,45±7,07	34,55±1,29	47,73±3,21

Çizelge 4.9'da görüldüğü üzere elma posasından izole edilen 5-HM bileşiğinin hidrojen peroksit giderme aktivitesinin standart maddelerin neredeyse tamamından daha yüksek olduğu gözlemlendi. EEA ve ENBU ekstresinde diğer standart maddelere göre aktivitelerinin neredeyse hepsinden yüksek ama 5-HM bileşiğinden daha düşük hidrojen peroksit giderme aktivitelerine sahip oldukları gözlemlendi. Bunun sebebi 5-HM bileşiği tek başına yüksek hidrojen peroksit giderme aktivitesine sahipken, EEA ve ENBU içindeki diğer kimyasal bileşiklerin 5-HM bileşiği ile sinerjik etkiye sahip olamamalarından dolayı, EEA'nın ve ENBU'nun hidrojen peroksit giderme aktiviteleri 5-HM bileşiğinden daha düşük oldukları gözlemlendi.

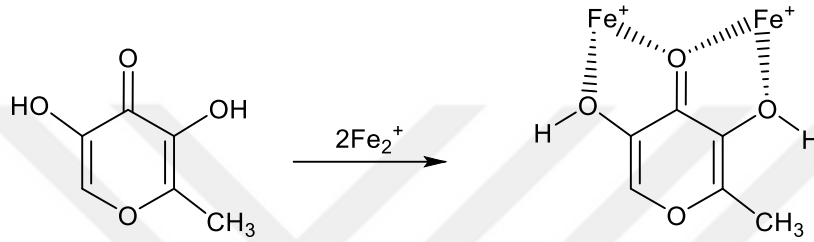
Çizelge 4.10 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstraları ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin lipit peroksidasyon inhibisyonları.

ÖRNEKLER	Lipit peroksidasyonu inhibisyonu, %			
	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
5-HM	6,31±5,77	42,01±1,08	50,50±1,20	69,08±0,98
EEA	70,20±1,00	76,29±0,27	77,69±1,00	79,48±0,30
ENBU	10,03±1,76	33,01±20,30	52,38±0,65	59,24±0,69
C vit	37,41±1,32	41,88±1,80	54,11±2,28	51,65±2,21
BHA	36,81±4,60	46,04±0,83	48,42±1,19	48,61±6,77
BHT	84,96±1,27	83,36±1,65	92,68±1,68	94,70±2,31
TBHQ	43,39±6,44	52,26±3,77	53,73±6,90	68,82±2,22
TRX	3,80±1,01	31,78±7,08	54,41±6,85	71,97±8,40
E Vit	12,48±1,56	34,51±8,07	38,00±6,72	72,38±6,12

Çizelge 10'da görüldüğü üzere elma posasından izole edilen 5-HM bileşiğinin lipit peroksidasyonu inhibisyonu standart maddelerin neredeyse tamamından daha düşük olduğu gözlemlendi. EEA ekstresinin diğer standart maddelere göre lipit peroksidasyonu inhibisyonu neredeyse tamamından daha yüksek olduğu gözlemlendi. ENBU ekstresinde diğer standart maddelere göre lipit peroksidasyonu inhibisyonu neredeyse hepsinden düşük ama 5-HM bileşiğinden daha yüksek lipit peroksidasyonu inhibisyonuna sahip olduğu gözlemlendi. Bunun sebebi 5-HM bileşiği tek başına düşük lipit peroksidasyonu inhibisyonuna sahipken, EEA ve ENBU içindeki diğer kimyasal bileşiklerin yüksek bir sinerjik etkiye sahip olduklarından 5-HM bileşiğinden daha fazla lipit peroksidasyonu inhibisyonuna sahip oldukları belirlendi.

Çizelge 4.11 Elma posasının etilasetat, n-bütanol ekstreleri ve etilasetat ekstresinden elde edilen saf bileşik 5-hidroksi maltol bileşiğinin metal şelat aktivite değerleri.

ÖRNEKLER	Metal şelat aktivitesi, %			
	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
5-HM	9,97±0,21	15,05±0,27	22,69±1,04	26,13±1,01
ENBU	8,60±3,80	10,92±0,17	14,16±3,91	18,95±3,45
EEA	20,50±5,64	43,75±0,90	45,15±0,21	36,74±0,33
EDTA	45,19±2,66	64,07±0,86	97,34±0,13	97,87±0,21

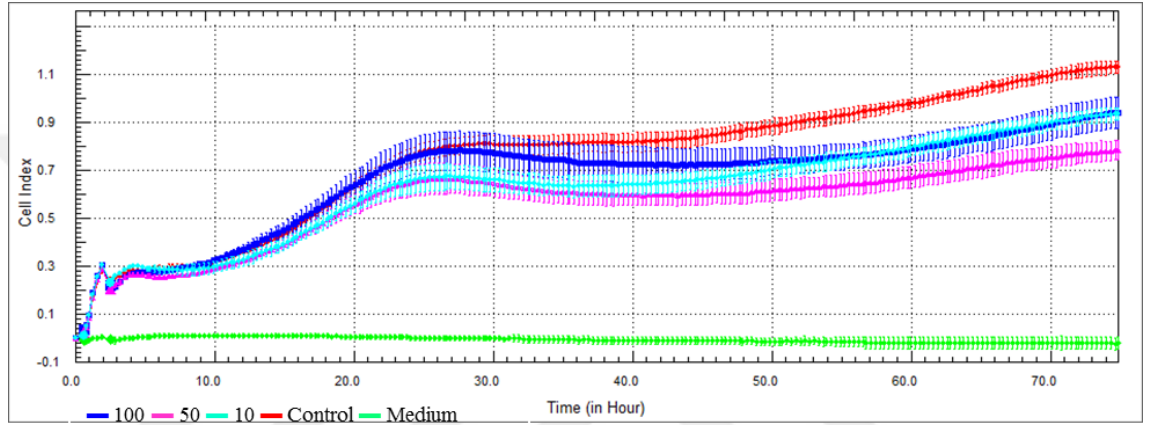


Şekil 4.44 5-HM bileşiği Fe^{2+} iyonlarının kenetlenmesi için önerilen reaksiyon

Çizelge 4.11’de görüldüğü üzere elma posasından izole edilen 5-HM bileşiğinin standart maddeye göre metal şelat aktivitesinin daha düşük olduğu gözlemlendi. EEA ekstresinin standart maddeye göre metal şelat aktivitesi daha az olduğu gözlemlendi. ENBU ekstresinde standart maddeye göre metal şelat aktivitesi daha az ve ayrıca 5-HM bileşiğinden daha düşük metal şelat aktivitesi sahip olduğu gözlemlendi. Bunun sebebi 5-HM bileşiği tek başına düşük lipid peroksidasyonu inhibisyonuna sahipken, EEA içindeki diğer kimyasal bileşiklerin yüksek bir sinerjik etkiye sahip olduklarından 5-HM bileşiğinden daha fazla, ENBU içindeki diğer kimyasal bileşiklerin düşük bir sinerjik etkiye sahip olmalarından ötürü 5-HM bileşiğinden daha az metal şelat aktivitesine sahip olduğu belirlendi.

4.4. Antiproliferatif Aktivite Testi

Antiproliferatif aktivite testi bitkisel kaynaklı kimyasal bileşenleri laboratuvar şartlarında çoğaltılan insan kanser hücrelerine karşı yapılan deneyler sonucu elde edildi. Bu test Çankırı Karatekin Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında yapıldı.



Şekil 4.45 Kojik asit bileşiğinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite test sonucu

Elma posasının etil asetat ekstresinden izole edilen Kojik asit bileşiğinin xCELLigence RTCA SP (Aceabio, USA) cihazı ile yapılan HeLa kanser hücrelerine (rahim kanseri) karşı gösterdikleri aktivite 100, 50 ve 10 µg/mL konsantrasyonlarında incelendi. Oldukça düşük bir aktivite elde edildiği Şekil 4.42'de görülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında meyve (elma ve mandalina) posalarının çeşitli işlemlerden sonra elde edilen kimyasal bileşenlerin izolasyonları, 5-HM kimyasal bileşimine ait antioksidan aktivitelerinin tayini ve kojik asit kimyasal bileşimine ait HeLa kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite testi yapıldı.

Doğada bulunan bitkilerin, meyve ve sebzelerin içlerinde değerli kimyasal bileşenler olan sekonder metabolitler bulunmaktadır. Sekonder metabolitler, bitkilerin kendilerini diğer canlılara ve tabiat şartlarına karşı korumak için ürettikleri doğal kimyasal bileşenlerdir. Bu bileşenlerin antioksidan ve antiproliferatif aktivite gibi biyolojik etkileri vardır.

Günümüzde alternatif tıpta kullanılan bitkilerin bu özelliklerinden yararlanılarak yüksek antioksidan kapasiteye sahip olmaları ve yan etkilerinin olmamasından dolayı ilaç sektöründe ve gıda-beslenme sektörlerinde kullanımları artmaktadır.

Atıl durumdaki meyve posalarından geri dönüşüm yöntemiyle bu değerli kimyasalları insanlığa kazandırmak ülkemiz için hem ciddi kaynak sağlayacaktır hemde sağlık ve ilaç sektörü açısından muasır medeniyetlerle yarışma fırsatı sunacaktır.

Meyve (elma ve mandalina) posalarında bulunan kimyasal bileşenlerin izolasyonu, elde edilen etil asetat ekstraktlarının kolon kromatografi tekniği ile fraksiyonlandırılması yapıldı. İTK sonuçlarına göre benzer fraksiyonlar birleştirildi ve küçük kolonlarla saflaştırma çalışmalarına devam edildi. Bu işlemlerden sonra kimyasal bileşenlerin saflık kontrolleri spektral (HPLC-TOF/MS ve NMR) analizler ile yapıldı.

Yapılan bu çalışmada antioksidan aktivite potansiyellerini belirlemek için çeşitli tayin metodları kullanıldı. Sonuçlar doğal ve standart antioksidan bileşenler ile kıyaslandı. Elma ve mandalina posalarının etil asetat ve n-bütanol ekstraherinden 6 adet kimyasal bileşen saflaştırıldı. Elma posasının etil asetat ekstresinden izole edilen 5-hidroksi maltol bileşiğinin antioksidan test sonuçlarına bakıldığında, standart maddelere göre daha yüksek aktiviteye sahip olduğu gözlemlendi. 5-HM bileşiği ile yapılan bir çalışmada, parçalanma ürünleri olarak 13 bileşen elde edildi. Ancak, 5-HM bileşiğinin ısıya dayanıklı ve en yüksek oranda geri kazanıldığı (% 12.7), bu durum bileşiğin gıda takviyesi ve doğal antioksidan olarak kullanımı konusunda endüstriyel öneme sahip olduğunu göstermektedir(Kim and Baltes 1996).

Bu tez çalışmasında elma posasının etilasetat ekstresinden izole edilen kojik asit bileşiğine antiproliferatif aktivite testi yapıldı. Bu çalışmada, kanserli hücre olarak HeLa kanser hücreleri kullanıldı. Yapılan test sonucu kojik asit bileşiğinin HeLa hücrelerine karşı güçlü antiproliferatif etki göstermediği gözlemlendi. Literatürde yapılan çalışmalarda ise, kojik asidin kozmetik ve gıda takviyesi olarak tüketimi çok eski yıllara dayanmaktadır (Cabanés, Chazarra *et al.* 1994)(Burdock, Soni *et al.* 2001). Ancak endüstriyel ölçekte üretimi ve kullanımı için ileri düzeyde araştırmalara ihtiyaç vardır.

Son olarak elma ve mandalina posalarının etil asetat ekstraherinden 6 adet kimyasal bileşen izole edildi. NMR ve HPLC-TOF/MS cihazları kullanılarak saflık kontrolleri tayin edildi. Bunlar; 5-hidroksi maltol, protokateşik asit, Kuersetin, kojik asit, gallik asit ve gentsik asit molekülleridir. 5-hidroksi maltol bileşiğinin, toplam antioksidan kapasitesi, indirgeme gücü, serbest radikal giderme kapasitesi, hidrojen peroksit giderme kapasitesi, lipit peroksidasyonu inhibisyonu ve metal şelat kapasitesi belirlendi. Kojik asit bileşiğinin HeLa hücrelerine karşı antiproliferatif aktivite testi yapıldı. Antioksidan testleri sadece 5-HM, EEA ve ENBU'ya yapılırken, antiproliferatif aktivite testi sadece kojik asit bileşiği ile yapıldı.

Bu çalışmada tespit edilen bulguların ışığında, daha sonra yapılacak ileri düzeyde çalışmalar ile, katma değeri yüksek ürünlerin endüstriyel ölçekte elde edilmesi için, meyve ve sebze posalarından değerli kimyasalların izole edilmesi ve ilaç-sağlık, gıda, kozmetik ve diğer sektörlerde kullanımının araştırılması ve belirlenmesi gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- Acar, C., Ramsheyyi, A., Pagny, J.-Y., Jebara, V., Barrier, P., Fabiani, J.-N., Carpentier, A. 1998. The radial artery for coronary artery bypass grafting: clinical and angiographic results at five years. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 116(6); 981-989.
- Ame, S., Shigrenaga, M., & Hagen, T. M. 1993. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of ageing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7915-7922).
- Beyer, W., Palache, A., De Jong, J., & Osterhaus, A. 2002. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy: a meta-analysis. *Vaccine*, 20(9); 1340-1353.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181(4617); 1199-1200.
- Bökesoy, T., Çakıcı, Ğ., ve Melli, M. 2000. *Farmakoloji Ders Kitabı. 1. Türk Farmakoloji Derneği.* Ankara: Gazi Kitabevi.
- Burdock, Soni and Carabin 2001. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 33(1); 80-101.
- Cabanes, Chazarra and GARCIA-CARMONA 1994. Kojic Acid, a Cosmetic Skin Whitening Agent, is a Slow-binding Inhibitor of Catecholase Activity of Tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(12); 982-985.
- Clayson, D. B. (2000). *Toxicological carcinogenesis*: CRC Press.
- Collins, C., Grange, J., & Yates, M. 1984. Mycobacteria in water. *Journal of Applied Bacteriology*, 57(2); 193-211.
- Cotran, R. S., Kumar, V., Collins, T., & Robbins, S. 1999. Tissue repair: cellular growth, fibrosis, and wound healing. *Robbins pathologic basis of disease*, 6(89-112).
- Cummings, M., & Klug, W. 2002. *Genetik*, 6. baskı. Palme Yayıncılık, Ankara, 816
- 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.
- Dinis, T. C., Madeira, V. M., & Almeida, L. M. 1994. Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of biochemistry and biophysics*, 315(1); 161-169.
- Dong, J., & Liang, Z. 2003. Analysis on the factor influencing secondary metabolite accumulation in plants. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 24(10); 1979-1983.
- Ekşi, A. 2006. Antioksidan kaynağı olarak meyve suyu ve meyve nektarı. *Dünya Gıda*, 11(6); 85-88.
- Gerber, M., Boutron-Ruault, M.-C., Hercberg, S., Riboli, E., Scalbert, A., & Siess, M.-H. 2002. Food and cancer: state of the art about the protective effect of fruits and vegetables. *Bulletin du Cancer*, 89(3); 293-312.
- Hatano, T., Aota, K., Ikeda, S., Nakamura, K., & Ogawa, K. 1988. Growth of the 2223 phase in leaded Bi-Sr-Ca-Cu-O system. *Japanese journal of applied physics*, 27(11A); L2055.
- Horvathova, J., Suhaj, M., Polovka, M., Brezova, V., & Simko, P. 2007. The influence of gamma-irradiation on the formation of free radicals and antioxidant status of oregano (*Origanum vulgare* L.). *Czech journal of food sciences*, 25(3); 131-143.
- Kim and Baltes 1996. On the role of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4 (H)-pyran-4-one in the Maillard reaction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(1); 282-289.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Etherton, T. D. 2002. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American journal of medicine*, 113(9); 71-88.
- Lapornik, B., Prošek, M., & Wondra, A. G. 2005. Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *Journal of food engineering*, 71(2); 214-222.
- Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J., Saintpierre-Bonaccio, D., Boiron, P. 2003. Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian journal of microbiology*, 49(11); 669-674.

- Livolsi, V., Merino, M., Brooks, J., Saul, S., & Tomaszewski, J. 1994. The national medical series for independent study. *Pathology*; 305-328.
- Meyer, A. S., Heinonen, M., & Frankel, E. N. 1998. Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61(1); 71-75.
- Ntambi, J. M., Choi, Y., Park, Y., Peters, J. M., & Pariza, M. W. 2002. Effects of conjugated linoleic acid (CLA) on immune responses, body composition and stearoyl-CoA desaturase. *Canadian journal of applied physiology*, 27(6); 617-627.
- Oskay, D., & Oskay, M. 2009. Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi. *Ecological Life Sciences*, 4(2); 31-41.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Eiyogaku zasshi= Japanese journal of nutrition*.
- Papas, A. M. 1996. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, 31(1); S77.
- Prieto, C. A., & Lambert, D. L. 1999. Fundamental parameters of nearby stars from the comparison with evolutionary calculations: masses, radii and effective temperatures. arXiv preprint astro-ph/9911002;
- Ruacan, S. 2003. Karsinogenez, Klinik Onkolojinin Biyolojik Temelleri XV.
- Slinkard, K., & Singleton, V. L. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28(1); 49-55.
- Tozlu, E., Cakir, A., Kordali, S., Tozlu, G., Ozer, H., & Akcin, T. A. 2011. Chemical compositions and insecticidal effects of essential oils isolated from *Achillea gypsicola*, *Satureja hortensis*, *Origanum acutidens* and *Hypericum scabrum* against broadbean weevil (*Bruchus dentipes*). *Scientia Horticulturae*, 130(1); 9-17.
- Vining, J., & Ebreo, A. 1990. What makes a recycler? A comparison of recyclers and nonrecyclers. *Environment and behavior*, 22(1); 55-73.
- von Gadow, A., Joubert, E., & Hansmann, C. F. 1997. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with that of other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*), α -tocopherol, BHT, and BHA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(3); 632-638.
- Zhao, G.-R., Xiang, Z.-J., Ye, T.-X., Yuan, Y.-J., & Guo, Z.-X. 2006. Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chemistry*, 99(4); 767-774.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Ali DEMİRCİ
Doğum Yeri : YILDIRIM / BURSA
Doğum Tarihi : 03 / 07 / 1988
Medeni Hali : Bekâr
Yabancı Dili : İngilizce
Adres : Arabayatağı Mah. Kayın Sk. No:12 Yıldırım/BURSA
Tel : 05364451525
E-posta : mehmetalidemirci88@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise	: Emirsultan Lisesi	2002-2005
Önlisans	: Uludağ Üniversitesi	2007-2009
Lisans	: Çankırı Karatekin Üniversitesi	2010-2014
Yüksek Lisans	: ÇKÜ Organik Kimya Anabilim Dalı	2014-2017

Çalıştığı Kurumlar ve Yıl

Uludağ Üniversitesi – Asistan öğrenci Nilüfer / BURSA 2008-2009

Çankırı Karatekin Üniversitesi – Kısmi personel Merkez / ÇANKIRI 2011-2012

Çankırı Karatekin Üniversitesi – Sözleşmeli personel Merkez / ÇANKIRI 20.08.2015-20.08.2017

Sertifikalar

Nükleer Manyetik Rezonans 600 MHz (Çankırı Karatekin Üniversitesi – Haziran 2015)

Nükleer Manyetik Rezonans 600 MHz Cihazı Yazılım, Donanım, Bakım, Kalibrasyon ve Kullanıcı Sertifikası (SEM-2014)

Thermo Scientif Flash 2000 Elemental Analyzer (Redoks Ltd.Şti – Haziran 2013)

HPLC-TOFF (SEM – Haziran 2013)

Mass Spectroscopy (SEM – Haziran 2013)

GC-MS (SEM – Haziran 2013)

ICP-MS (SEM – Haziran 2013)

Flash Chromatography (Çankırı Karatekin Üniversitesi – Haziran 2013)

FT-IR (Çankırı Karatekin Üniversitesi – Haziran 2013)

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

Koldaş, S., et al., Phytochemical screening, anticancer and antioxidant activities of *Origanum vulgare* L. ssp. *viride* (Boiss.) Hayek, a plant of traditional usage. *Journal of the science of food and agriculture*, 2015. **95**(4): p. 786-798.

Uluslararası Kongreler

- 1- M. Ali DEMİRCİ, Selma İPEKÇİOĞLU, Büşra ÇOBAN, Duygu YILMAZ, Sariye AÇIKGÖZ, Fatih GÜL, İbrahim DEMİRTAŞ, Melaleuca alternifolia'dan Uçucu Yağ Karışımının Kolon Kromatografisi Yöntemiyle Saflaştırılması ve Antioksidan aktivitesinin incelenmesi, 2012 Kromatografi Kongresi, Haziran 2012 Tokat, TÜRKİYE
- 2- Mehmet Ali DEMİRCİ, Özdem SORĞUN, Selma İPEKÇİOĞLU, İbrahim DEMİRTAŞ, Lütfi BEHÇET, Bingöl İli ve Çevresinde Yetişen Bazı Bitki Türlerinin Antiproliferatif Aktivitelerinin İncelenmesi, 1. Ulusal Organik Kimya Kongresi, Kasım 2013 Sakarya, TÜRKİYE
- 3- Mehmet Ali DEMİRCİ, İbrahim DEMİRTAŞ, Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU, Feyza ÖKE ALTUNTAŞ, Serkan KOLDAŞ, *Origanum acutidens* Bitkisine Ait Antiproliferatif Ve Antioksidan Aktivitelerinin İncelenmesi, 1. ÇNÜ Bitirme Tezi Sempozyumu, Mayıs 2014 Çankırı, TÜRKİYE
- 4- Mehmet Ali DEMİRCİ, İbrahim DEMİRTAŞ, Tevfik ÖZEN, Atıl Durumdaki Meyve Posalarından Geri Kazanılan Kimyasalların Biyolojik Aktivitesi, 3. Uluslararası İlaç ve Eczacılık Kongresi, Nisan 2017 İstanbul, TÜRKİYE