



**TAFLAN ÇEKİRDEĞİNDE (*Laurocerasus officinalis* Roem.) FONKSİYONEL BİLEŞİK ANALİZİ VE ANTİOKSİDAN KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Nusret GENÇ**

**Yüksek Lisans Tezi  
Kimya Anabilim Dalı  
Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ  
2009  
Her hakkı saklıdır**

**T.C.**  
**GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Y. LİSANS TEZİ**

**TAFLAN ÇEKİRDEĞİNDE (*Laurocerasus officinalis* Roem.)  
FONKSİYONEL BİLEŞİK ANALİZİ VE ANTİOKSİDAN  
KAPASİTESİNİN ARAŞTIRILMASI**

**Nusret GENÇ**

**TOKAT**  
**2009**

**Her hakkı saklıdır**

Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ danışmanlığında, Nusret GENÇ tarafından hazırlanan bu çalışma 20/08/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Adem ÖNAL

*İmza* : .....

Üye : Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ

*İmza* : .....

Üye : Yrd. Doç. Dr. İskender PARMAKSIZ

*İmza* : .....

**Yukarıdaki sonucu onaylarım**

**Enstitü Müdürü**

**Prof. Dr. Metin YILDIRIM**

## **TEZ BEYANI**

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin içerdiği yenilik ve sonuçların başka bir yerden alınmadığını, kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapılmadığını, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

Nusret GENÇ

**ÖZET**

Y. Lisans Tezi

Taflan Çekirdeğinde (*Laurocerasus officinalis* Roem.) Fonksiyonel Bileşik Analizi ve Antioksidan Kapasitesinin Araştırılması

Nusret GENÇ

Gaziosmanpaşa Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ  
İkinci Danışman: Doç. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Memelilerde katabolizma sonucu meydana gelen zararlı ara ürünleri bertaraf edebilmek için endojen savunma sistemleri veya eksojen bileşikler ile bunu gerçekleştirirler. Bu amaçla kullanılan eksojen bileşikler biyolojik aktiviteye sahip fonksiyonel bileşiklerdir. Fonksiyonel bileşiklerin doğal ürünlerden saflaştırılması, yapılarının aydınlatılması ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi son yıllarda bilim adamları tarafından çok çalışılan konular arasındadır. Bu çalışmada; Taflan meyvesinin çekirdeğinde bulunan fonksiyonel bileşiklerin analizi ve bunlara ait antioksidan kapasitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Taflan çekirdeğinin metanol/diklormetan (3:1) ekstresinden kromatografik teknikler kullanılarak fonksiyonel bazı bileşikler saflaştırılmış ve yapıları spektroskopik metotlarla (NMR, IR, UV vb.) yapıları aydınlatılmıştır. Bu çalışmada taflan çekirdeğinden siyanojenik glikozitler (amigdalin ve prunasin) ve  $\beta$ -sitosterol bileşikleri saflaştırılarak yapıları aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerin taflan bitkisinden saflaştırılmasına literatürde rastlanmamıştır. Saflaştırılan bu bileşiklerin farklı metotlarla antioksidan kapasiteleri araştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen aktivite sonuçları pozitif kontrol olarak kullanılan standart antioksidan bileşiklerle karşılaştırılmıştır. Amigdalin ve prunasin bileşiklerinin DPPH serbest radikal giderme aktiviteleri yok iken, indirgeme gücü aktiviteleri BHA'dan daha yüksek olduğu fakat BHT ve  $\alpha$ -tokoferolden daha düşük olduğu görülmüştür. Bu bileşiklerin diğer biyolojik (anti kanser, antimikrobiyel, vb.) aktivitelerinin araştırılması yapılabilir.

2009, 61 sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Taflan, *Laurocerasus officinalis*, Antioksidan Kapasitesi, Fonksiyonel Bileşikler, siyanojenik glukozitler, amigdalin, prunasin, beta-sitosterol, HPLC, NMR

**ABSTRACT**

MSc. Thesis

Analysis of Functional Component in Seed of Cherry Laurel (*Laurocerasus officinalis* Roem.) and Investigation of Antioxidant Capacity

Nusret GENÇ

Gaziosmanpaşa University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Mahfuz ELMASTAŞ  
Co Supervisor: Assoc. Prof. İbrahim DEMİRTAŞ

The damage of these reactive compounds can be protected with some endogenous defense system or exogenous compounds. Some bioactive compounds were used for this purpose. In generally, bioactive compounds are named functional compounds. There is trend to investigate of isolation, identification and biological activities of functional compounds from natural sours in recent years. The aim of this work is to investigate functional compounds analysis and their antioxidant capacity of cherry laurel seed. In this work some functional compounds were isolated by chromatographic techniques and identification of their structure by some spectroscopic (NMR, IR, UV, etc.) methods. Amygdaline, prunasin, and  $\beta$ -sitosterol compounds were isolated. These compounds firstly were isolated from cherry laurel seed. The antioxidant capacities of these compounds have been investigated with some different antioxidant methods. Antioxidant results have been compared with standart antioxidant compounds as positive control. There are not scavenging of DPPH free radical activities of amygdaline and prunasin. In this study, it has been shown that reduction power activities of these compounds were higher from BHA and lower from BHT and  $\alpha$ -tocopherol. In the perspective of this study, other biological activities (antitumor, antimicrobial, etc.) will be studied of these compounds.

2009, 61 pages

**Keywords:** Cherry Laurel, *Laurocerasus officinalis*, Antioxidant Capacity, Functional Components, cyanogenic glucosides, amygdalin, prunasin, Beta-sitosterol HPLC, NMR.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca, bilgi, fikir ve literatür temini konusunda her türlü desteğini gördüğüm, her zaman benim için bir yol gösterici olan ve tez yazımında yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Mahfuz ELMASTAŞ ve ikinci danışmanım Doç. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a;

HPLC çalışmaları sırasında deneyimlerini paylaşan Doç. Dr. Ömer IŞILDAK'a

Öncelikle moral desteğinden dolayı ve tezimin yazım aşamasında ve laboratuvar çalışmaları sırasında her türlü bilgi birikimini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Hüseyin AKŞİT'e

Laboratuvar çalışmalarım esnasında güzel bir ortam oluşturan arkadaşlarım Ali RIZA TÜFEKÇİ, Fatih GÜL, Duygu MISIRLI, Nurdan ÖZTÜRK ve Elif ÇELİKARSLAN'a

Bölümümüzün her türlü imkânından faydalanmamı sağlayan Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü yöneticilerine ve manevi desteklerini esirgemeyen bütün öğretim elemanlarına;

Bu çalışmamı 2009/14 proje no ile destekleyen Gaziosmanpaşa Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme

Teşekkürü borç bilirim

Nusret GENÇ

## İÇİNDEKİLER

<b><u>İÇİNDEKİLER</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
SİMGE VE KISALTMALAR.....	viii
1. GİRİŞ.....	i
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Taflan: <i>Laurocerasus officinalis</i> ( <i>Prunus laurocerasus</i> ).....	5
2.2. Literatür Özeti.....	7
2.3. Sekonder Metabolitlerin Ayırma ve Saflaştırılmasında Kullanılan.....	10
2.3.1. Kolon Kromatografisi (KK).....	10
2.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	11
2.3.3. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	12
2.3.4. Gaz Kromatografisi (GC).....	13
2.4. Sekonder Metabolitlerin Aydınlatılmasında Kullanılan Spektroskopik Yöntemler.....	14
2.4.1. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans).....	14
2.4.1.1. <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>13</sup> C-APT ve <sup>13</sup> C-DEPT.....	14
2.4.1.2. İki Boyutlu NMR Teknikleri.....	15
2.4.1.2.1. COSY, HETCOR, HMBC, HSQC, TOCSY.....	16
2.5. Bitki Sekonder Metabolitleri.....	17
2.5.1. Fitosteroller.....	17
2.5.2. Siyanojenik Glikozitler.....	20
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	22
3.1. Bitkisel Materyal.....	22
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	22
3.3. Cihazlar.....	23
3.4. Antioksidan Aktivite Testleri.....	23
3.4.1. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi.....	24
3.4.2. İndirgeme Gücü Aktivitesi (Oyaizu Metodu).....	24
3.4.3. Toplam Fenolik Bileşik.....	24
3.5. Siyanojenik Glikozitler (Prunasin ve Amigdalın) HPLC ile Kantitatif Tayini.....	25
3.6. β-Sitosterolün GC-MS Analizi.....	27
3.7. Taflan Çekirdeği Sabit yağ asitlerinin GC-MS Analizi.....	27
4. BULGULAR ve TARTIŞMA.....	29
4.1. Ayırma/saflaştırma Aşaması.....	29
4.2. Siyanojenik Glikozitlerin İzolasyonu ve Yapı tayini.....	30
4.2.1. Prunasinin İzolasyonu ve Yapı Tayini.....	31
4.2.2. Amigdalının İzolasyonu ve Yapı tayini.....	34
4.3. β-Sitosterol'ün İzolasyonu ve Yapı tayini.....	38
4.4. Karbonhidratların İzolasyonu ve Yapı tayini.....	42
4.4.1. Sukroz.....	42
4.4.2. 3-O-Metil-D-glukopiranoz.....	43
4.5. Antioksidan Aktive Testlerinin sonuçları.....	45

4.5.1. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi.....	45
4.5.2. İndirgeme Gücü Aktivitesi.....	46
4.5.3. Toplam Fenolik Analizi .....	47
4.6. Taflan çekirdeğinin değişik çözücü sistemlerindeki amigdalin ve prunasin miktarları .....	48
4.7. Taflan Çekirdeğinin Yağ asidi Bileşenleri.....	49
5. SONUÇ .....	51
KANAKLAR .....	52
ÖZGEÇMİŞ .....	55
EKLER.....	56
EK-1 Prunasinin HETCOR Spektrumu .....	56
EK-2 Amigdalin HETCOR Spektrumu .....	57
EK-3 Amigdalin HMBC spektrumu .....	58
EK-4 Amigdalin TOCSY spektrumu .....	59
EK-5 $\beta$ -Sitosterol HETCOR spektrumu.....	60
EK-6 $\beta$ -Sitosterol TOCSY spektrumu .....	61

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2. 1. Taflan'ın ( <i>Laurocerasus officinalis</i> ) meyvesi .....	6
Şekil 2. 2. Taflan'ın ( <i>Laurocerasus officinalis</i> ) çekirdeği .....	6
Şekil 2. 3. Bazı doğal steroid türevleri: (a) $\beta$ -sitosterol (b) Kolesterol (c) Ergosterol (d) kampesterol .....	18
Şekil 2. 4. Ana steroid iskeleti ve steroidlerin numaralandırılması .....	19
Şekil 2. 5. Siyanojenik glikozitlerden HCN oluşumu .....	21
Şekil 2. 6. Bazı bitki kökenli siyanojenik glikozitler: (a) linemarin (b) latoustralin (c) Neolinustatin (d) dhurrin (e) sambunigrin .....	21
Şekil 3. 1. Prunasin ve amigdalin karışımının HPLC kromatogramı.....	26
Şekil 3. 2. Amigdalin (R= 0,997768) ve prunasin (R = 0,998307) kalibrasyon eğrileri	26
Şekil 4. 1. kolon kromatografide kullanılan cam kolon .....	29
Şekil 4. 2. Prunasin HPLC kromatogramı.....	31
Şekil 4. 3. Prunasin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	32
Şekil 4. 4. Prunasin $^{13}\text{C-DEPT}$ ve APT spektrumları .....	33
Şekil 4. 5. Amigdalin HPLC kromatogramı.....	35
Şekil 4. 6. Amigdalin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	35
Şekil 4. 7. Amigdalin APT ve DEPT spektrumları.....	36
Şekil 4. 8. Amigdalin $\text{D}_2\text{O}$ -değişim spektrumu .....	37
Şekil 4. 9. $\beta$ -Sitosterol GC-MS kromatogramı.....	38
Şekil 4. 10. $\beta$ -Sitosterol $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	39
Şekil 4. 11. $\beta$ -Sitosterol $^{13}\text{C-DEPT}$ ve APT Spektrumları .....	40
Şekil 4. 12. $\beta$ -Sitosterol MS Spektrumu.....	41
Şekil 4. 13. Sukroz ait 100-MHz $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu.....	42
Şekil 4. 14. 3-O-metil-glikopiranoz $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	43
Şekil 4. 15. 3-O-metil-glukopiranoz $^{13}\text{C}$ APT ve DEPT Spektrumları.....	44
Şekil 4. 16. Taflan çekirdeğinin ham ekstresi, Amigdalin ve prunasinin DPPH radikal giderme aktivitesi .....	45
Şekil 4. 17. Taflan çekirdeğinin ham ekstresi, amigdalin ve prunasinin indirgeme gücü .....	46
Şekil 4. 18. Total fenolik bileşik için kullanılan kalibrasyon grafiği.....	47
Şekil 4. 19. Taflan çekirdeğinin değişik çözücülerle elde edilen ekstraktlarının HPLC kromatogramları .....	48
Şekil 4. 20. Taflan çekirdeği yağ asitleri bileşenleri GC-MS kromatogramı.....	50

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

Tablo 2. 1. Bitkilerde yaygın olarak bulunan Fitosterollerin yaygın ve sistematik isimleri.....	20
Tablo 3. 1. HPLC pompa programı.....	25
Tablo 4. 1. Kolon kromatografide kullanılan çözücü sistemleri fraksiyon aralıkları .....	30
Tablo 4. 2. Prunasın karbon ve proton kimyasal kayma değerleri.....	34
Tablo 4. 3. Amigdalın karbon ve proton kimyasal kayma değerleri.....	37
Tablo 4. 4. Sitosterol karbon ve proton kimyasal kayma değerleri .....	41
Tablo 4. 5. Sukroz karbon kimyasal kayma değerleri.....	42
Tablo 4. 6. 3-O-metil-glukopiranoz karbon ve proton kimyasal kayma değerleri.....	44
Tablo 4. 7. Taflan çekirdeğinin siyanojenik glikozit (amigdalın/prunasın) içerikleri ....	49
Tablo 4. 8. Taflan çekirdeğinin sabit yağ asitleri içeriği.....	50

**SİMGE VE KISALTMALAR**

<b><u>Simge</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
$\delta$	Kimyasal Kayma
APT	Attached Proton Test
BHA	Bütillenmiş Hidroksi Anisol
BHT	Bütillenmiş Hidroksi Toluen
d	Dublet
dd	Dubletin dubleti
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetilsülfoksit
GC-MS	Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
İTK	İnce Tabaka Kromatografi
J	Etkileşme Sabiti
KOH	Potasyum Hidroksit
m	Multiplet
N	Normal
MS	Kütle Spektrometresi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ppm	Milyonda bir kısım
s	Singlet
t	Triplet
TCA	Trikloroasetik asit
UV-VIS	Ultraviyole-Görünür Bölge
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Corralation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Corralation
HETCOR	Heteronuclear Corralation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Corralation

## 1. GİRİŞ

İnsan vücudunda katabolizma sırasında harcanan oksijen, reaktivitesi çok yüksek reaktif oksijen ara ürünleri (ROS) olarak bilinen zararlı bazı radikallere dönüşür. Bu radikallerin oluşumu stres durumlarında artış gösterir ve vücutta birçok hastalığa tetikleyici rol oynar. Bu radikalleri kararsız ve canlı sistemlerde diğer madde ve gruplarla kolay bir şekilde reaksiyona girerler. Oluşan yeni ürünler, hücre harabiyeti, hücre ölümü, yaşlanma ve birçok hastalığa neden olabilen zararlı ürünlerdir. Serbest radikaller yaşlanmayı kolaylaştırdığı gibi Alzeimier's hastalığı, Parkinson Hastalığı, romatizmal hastalıklar, kalp rahatsızlığı, damar sertliği ve kanser gibi hastalıklara öncülük eder. Reaktif oksijen ara ürünleri, lipit peroksidasyonu, protein oksidasyonu ve dejenerasyonu, DNA hasarı gibi ciddi harabiyetlere de yol açabilir. (Dawn, Allan ve Colleen, 1996; Akkuş, 1995; Tietz, 1995; Burtis ve Ashwood, 1999).

Canlı vücutlar, katabolizma sonucu oluşan bu kararsız radikalleri eksisiz hale getirmek için çeşitli sistemlere sahiptirler. Vücuttaki zararsızlaştırma sistemlerinden birisi Antioksidan sistemi olarak tarif edilen antioksidan madde ve Antioksidan enzim sistemidir. Bu sistem katabolizma sonucu meydana gelen reaktif oksijen ara ürünleri ile reaksiyona girerek zararlı olan etkilerini ortadan kaldırır.

Bahsedilen reaktif oksijen ara ürünlerinin en önemlilerinden ilki; moleküler oksijenin bir elektron alarak indirgenmesi veya indirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu ile oluşan ve hidrojen peroksit kaynağı olan süperoksit radikalidir ( $O_2^{\cdot-}$ ). İkincisi ise süper oksit radikalinin bir elektron alması yâda moleküler oksijenin ortamdan iki elektron alarak oluşan kararsız ürünün iki protonla etkileşmesi sonucundan oluşan ve kendisi serbest radikal olmadığı halde bu kategoride değerlendirilen hidrojen peroksittir ( $H_2O_2$ ). Son olarak Fenton reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşan, son derece reaktif, oksijen ara ürünleri içinde en reaktif tür olan hidroksil radikalidir ( $OH^{\cdot}$ ).

Reaktif oksijen türleri, çeşitli serbest radikallerin oluştuğu serbest radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ( $R^{\cdot}$ ), peroksit radikalleri ( $ROO^{\cdot}$ ), alkoksi radikalleri ( $RO^{\cdot}$ ), tiyil radikalleri ( $RS^{\cdot}$ ), sülfonil

radikalleri ( $RSO^*$ ), tiyil peroksit radikalleri ( $RSO_2^*$ ) gibi çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar.

Serbest radikaller, yaşayan hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşenlerine olumsuz olarak etki eder. Süperoksit ve hidroksi radikalleri hücre içinde lipit peroksidasyonuna neden olur. Bunun sonucu hücre organallerinin membran geçirgenliği artarken seçicilik kabiliyeti düşer. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki aminoasitler okside olarak yıkılır, hücre DNA'sı da bu ortamda zarar görür. Serbest radikallerin hücre içinde neden oldukları bu harabiyetin birçok hastalığın başaltıcısı ya da hızlandırıcısı olduğu düşünülmektedir.

Vücut için önemli biyo moleküller olan lipitler ve hücre zarında geçirgenlikten sorumlu kolesterol serbest radikallere karşı oldukça hassastır. Biyo moleküller içerdikleri doymamış bağlar sayesinde ortamdaki radikallerle çok kolay reaksiyon verme eğilimindedirler. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu başlangıçtan itibaren kendi kendini devam ettiren reaksiyon zinciri şeklinde devam eder ve lipitlerin tamamen yıkımına neden olur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin konjüge çift bağlarından bir elektronun serbest radikal tarafından koparılması ile yağ asidi bir lipit radikaline dönüşür. Bu olay enzimatik olmayan lipit peroksidasyonu olarak adlandırılır

Lipitlerin bu radikalik peroksidasyonu, besin maddelerinin saklanması, depolanması ve taşınması sırasında da meydana gelen ve ürün kalitesini, saklama süresini düşüren bir olgudur. Gıda sanayisinde bu istenmeyen olguyu ortadan kaldırmak ürün kalitesi için önemlidir. Bu radikalik oksijen ara ürünleri besinlerdeki lipit ve vitaminlerin yapısını bozarak kötü koku yayan ve genelde toksik özellik taşıyan maddelere dönüştürürler. Gıda sanayinde, bu oksidasyonu önlemek için genelde sentetik olan fenolik bileşikler kullanılmaktadır. Gıda sanayinde bu amaçla kullanılan sentetik ürünlerin çoğu toksik ya da kanserojen etkiye sahiptir (Ashwood, 1999).

Serbest radikaller, proteinler üzerinde de oldukça olumsuz etkilere sahiptirler. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda özellikle sülfür radikalleri ve karbon merkezli organik radikaller

oluşur. Protein-serbest radikal etkileşmesinin sonucunda proteinlerin üç boyutlu yapıları bozulur ve normal yaşamsal işlevlerini yerine getiremezler.

İnsan ve hayvan metabolizmasında, reaktif oksijen türleri ve türlerden kaynaklanan diğer serbest radikallerin bu Zararlı etkilerini ortadan kaldırmak yada etkisini en aza indirmekten sorumlu bazı enzimatik yada enzim olmayan savunma sistemleri mevcuttur. Bu sistemler antioksidan savunma mekanizması olarak adlandırılır. Bu sistemler, hücresel ortamda bulunan serbest radikalleri kendilerine bağlayarak ya tamamen etkisiz hale getirebilirler ya da zararlı etkiyi en aza indirirler. Bu tür koruma mekanizması “toplayıcı etki” olarak adlandırılır. Serbest oksijen türlerine hidrojen sağlayarak onların etkilerini düşürme olayı da “bastırıcı etki” olarak bilinir. Vitamin ve bazı doğal kaynaklı fenoliklerin bu tür etkiye sahip oldukları bilinmektedir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller gibi bazı maddeler serbest radikalleri tamamen kendilerine bağlayarak ve oluşum zincirlerini kırarak etkisiz hale getirirler bu etki “zincir kırıcı” olarak tanımlanır.

Vücudun antioksidan kaynakları; endojen ve eksojen olarak iki sınıfta toplanabilir. Endojen sistemler enzim ve enzim olmayanlar olarak iki grupta incelenir. Enzim olan endojen sınıfında yer alan bazı antioksidan savunma sistemleri; Süperoksit dismutaz (SOD), Glutasyon peroksidaz (GSH-Px), Glutasyon S-Transferazlar (GST), Katalaz (CAT), Mitokondriyal sitokrom oksidaz sistemi ve Hidroperoksidaz olarak sıralanabilir. Enzim olmayan endojen savunma sistemleri ise; melatonin, seruloplazmin, transferrin, miyogloblin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutasyon, sistein, metiyonin, urat, laktoferrin ve albümin gibi maddelerdir.

Eksojen antioksidan savunma sistemleri ise diyetle alınan vitaminler ( $\alpha$ -tokoferol,  $\beta$ -karoten, Askorbik asit ve folik asit ), fenolik (organik asitler, flavonoidler, kateşinler ligninler) ve fenolik olmayan (rezveratrol vb.) çeşitli doğal kaynaklı bileşikler ve ilaçlardır.

Hücre içinde normal metabolik faaliyetler sırasında bir döngü olarak zararlı serbest radikaller oluşmakta ve yukarıda anlatılan vücut antioksidan savunma sistemi ile deaktive edilmektedir. Ancak bazı durumlarda ya serbest radikaller antioksidan

sistemler tarafından bertaraf edilemeyecek kadar fazla oluşur ya da bu enzimatik ya da enzimatik olmayan antioksidan sistem zararlı radikalleri yok edecek kadar fazla bulunmaz. Bu olay oksidatif stres olarak tanımlanır. Canlının, çeşitli hastalık, stres, yorgunluk yeterli ve sağlıklı uyuyamama, çevresel kirlilik, radyasyon UV ışığı gibi dış etmenlerin varlığında vücut antioksidan sistemlerinin etkinliği azalırken zıddına zararlı radikallerin oluşumu da artmaktadır. Bundan dolayı diyetle alınan antioksidan özelliklere sahip besin maddeleri ya da ilaçlara ihtiyaç duyulmaktadır.

Günümüzde antioksidan bileşikler tıp, eczacılık ve gıda sanayinde kullanımı oldukça yaygındır. Bunlar gıdaları bozulmaya karşı korumakta olup onların daha uzun süreli saklanmasını sağlar, bunlardan bazıları bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) bileşikleridir ancak bunların toksik etkilerinden şüphelenilmektedir. Bu nedenle son yıllarda yeni, daha güvenli ve ucuz antioksidan maddelerin bulunması için doğal ürünler üzerinde yaygın çalışmalar yapılmaktadır. Yapılan çalışmalarda yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu tahmin edilen ve tamamen bitki kaynaklı 6000'den fazla molekül bitkilerden izole edilip yapıları aydınlatılmıştır.

Bu bağlamda, bu çalışmada; Karadeniz Bölgesi'nde aktif şekilde meyvesinden yararlanılan Taflan meyvesinin çekirdeğinde bulunan fonksiyonel bileşiklerin analizi ve bunlara ait antioksidan kapasiteleri incelenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Taflan: *Laurocerasus officinalis* ( *Prunus laurocerasus*)

Taflan; *Spermatopyta* bölümü, *Angiospermaea* alt bölümü, *Magnoliatae* (Dicotyledones) sınıfı, *Rosaceae* familyası *Prunoideae* alt familyası *Laurocerasus* Duhamel. cinsine ait bir türdür. Bu tür, *Laurocerasus officinalis* Roemer veya diğer sinonimi *Prunus laurocerasus* (L.) gibi isimleri ile bilinmektedir (Kayacık, 1982) Ülkemizde ise bu bitkinin, ‘Taflan’ın dışındaki en yaygın ismi ‘Karayemiş’dir. Bitki, Karadeniz Bölgesinin bazı yerlerinden ‘gürcü kirazı’, ‘karamış’, ‘kattak’, ‘laz kirazı’, ‘laz yemişi’ gibi isimlerle de anılmaktadır.

Taflan (*Laurocerasus officinalis*), her mevsim yeşil olan, 6 m’ye kadar uzayabilen ve hemen her türlü toprakta yetişebilen bir bitkinin meyvesidir. Türkiye’de özellikle Karadeniz Bölgesi’nde yetişen bu meyve, gerek besin içeriği gerekse bileşimindeki fonksiyonel unsurlardan dolayı önem taşımaktadır. Yuvarlak şekilli ve başlangıçta kırmızı renkte olan meyveler, olgunlaştıkça parlak mor-siyah bir renk almaktadırlar. Taflanın meyve ve çekirdekleri halk arasında tıbbi bitki olarak kullanılmakta ve mide ülseri, sindirim sistemi hastalıkları, bronşit, egzama, hemoroit tedavilerinde etkili olduğu düşünülmektedir. (Baytop, 1984)

Karayemiş meyvelerinin sindirimi kolaydır ve insanı tok tutma özelliği vardır. Reçel ve hatta turşu olarak kullanılan meyveler, pasta, kek ve özellikle hoşaf ve kompostolara koku ve tat kazandırmak için ilave edilmektedir. Karayemiş yaprakları çay gibi demlenerek sinir bozukluklarına faydalı, öksürük dindirici ve spazm kesici, taze yapraklarından elde edilen suyu, spazm çözücü ve bulantı kesici olarak kullanılmaktadır (Alpınar ve Yazıcıoğlu, 1991; İslam, 2005).



Şekil 2. 1. Taflan'ın (*Laurocerasus officinalis*) meyvesi



Şekil 2. 2. Taflan'ın (*Laurocerasus officinalis*) çekirdeği

## 2.2. Literatür Özeti

Taflan halk arasında; Karadeniz Bölgesi'nde taze olarak tüketilmesinin yanında, kurutularak, reçel ve hatta tuzlu olarak da tüketilmektedir. Ayrıca pekmez yapımında da kullanılmaktadır. Alaşalvar ve ark., yaptıkları çalışmada, taze meyve ve kuru meyve bazlı geleneksel yöntemlerle yapılmış olan pekmezin antioksidan kapasitelerini değerlendirmek için, serbest radikal (DPPH, süper oksit radikali ve hidrojen peroksit) giderme aktivite testleri uygulamışlardır. Çalışmada, taze meyve bazlı pekmezin taze meyveye nazaran daha yüksek, kuru meyve bazlı pekmezin ise; pekmez üretimi sırasında antioksidan aktiviteye sahip bazı fonksiyonel moleküllerin bozulmasından dolayı, taze meyveye göre daha düşük aktivite gösterdiği ortaya konulmuştur (Alaşalvar ve ark., 2006).

Taflan çekirdeğinin lipit içeriğinin belirlenmesi için Alaşalvar ve grubu tarafından yapılan çalışmada, çekirdeğin lipit içeriğinin % 38,10 olduğu tespit edilmiştir. Ham lipit ekstraktının ana bileşenlerinin; oleik asit (%62,42-64,18), linoleik asit ve palmitik asit olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada; taflan çekirdeğinin  $\gamma$ - tokoferol miktarının 0.55–0.69 mg/100 g yağ ve  $\beta$ -sitosterol miktarının da 192,5 mg/100 g yağ olduğu rapor edilmiştir (Alaşalvar ve ark., 2006).

Ayaz ve ark., taflanın meyvesindeki şeker içeriğinin, meyve gelişimi ve olgunlaşma sürecindeki değişimini incelemişler ve şu sonuca varmışlardır. Meyvenin şeker içeriği, fruktoz, sukroz, glukoz ve şeker alkolü olan sorbitol'dur. Fruktoz ve glukoz ana bileşenlerdir. Çiçeklenme periyodunun başlangıcından 23 gün sonra ve 58. günün sonuna kadar fruktoz ve glukoz azalmaya başlamış taze ağırlığın %1,3 ve %0,8'i olan minimum seviyeye düşmüştür. Bu iki şekerin miktarı, 65-86. gün aralığında tekrar yükselerek taze ağırlığın % 23,6 ve %20,8'i değerine ulaşmıştır. 23-46. günler arasında sukroz gözlenmemiştir. Sorbitol ise çiçeklenme periyodunun başlangıcından 51 gün sonra minimum seviyede iken 58. günde maksimum seviyesi olan % 13,4'e ulaşmıştır. Glikoz, fruktoz ve sorbitol miktarlarında çiçeklenmeden sonraki 79-85. günler arası (hasat zamanı) hızlı bir artış gözlenmiştir (Ayaz., 2004).

Ayaz tarafından yapılan diğerk bir çalışmada da; taflan meyvesindeki fenolik maddelerin çiçeklenmeden sonraki günler içindeki değişimleri incelenmiştir. Çalışmada kullanılan örnekler çiçeklenmeden 40 gün sonra toplanmış ve meyvelerin fenolik madde içeriği; p-kumarik, kafeik ve ferulik asit (sinamikler) ve benzoik, 4-hidroksibenzoik, vanilik, 3,4-dihidroksibenzoik asit (benzoikler) olarak tanımlanmıştır. Benzoik, 4-hidroksibenzoik, vanilik ve kafeik asitler çiçeklenmeden 6 hafta ile 12 hafta sonraki periyotta arttığı gözlenmiştir. Ferulik ve vanilik asit miktarlarının da olgunlaşma sonrası periyot olan çiçeklenmeden sonraki 12-16 hafta arasında arttığı gözlenirse de bu artış istatistiki olarak anlamlı ( $p=0.05$ ) bulunmamıştır (Ayaz., 2001).

Erdemoğlu ve arkadaşları; geleneksel olarak kullanılan halk bitkilerin ateş düşürücü (antiinflammator) etkilerini belirlemek için yaptıkları çalışmada ilerinde taflanın da bulunduğu yedi bitki türünü kullanmışlar ve bunların en etkili olanların *Laurocerasus officinalis* (taflan) yaprakları, *Nerium oleander* (zakkum) kuru ve taze iekleri *Rhododendron ponticum* (orman gl) yaprakları olduğunu tespit etmişlerdir. Bu üç türün denek hayvanlarında mide gastritine sebep olmadığı da aynı çalışmada ortaya konmuştur (Erdemoğlu, 2003).

Taflan'ın da içinde bulunduğu Prunus trlerinde iki farklı siyanojenik glikozit bulunmaktadır. Mono glikozit olan prunasin siyanojenik bitki kısımlarının hemen hepsinde, diglikozit olan amigdalin ise, yalnızca *Rosaceae* familyasına özgü olup çekirdeklerde ve yapraklarda bulunmaktadır. Siyanojenik glikozitler ve onların hidroliz ürünleri insanlarda akut intoksikasyona ve merkezi sinir sistemi sendromlarına sebep olmaktadır (Gomez ve ark., 1998). Karayemiş ekirdeklerindeki etken maddelerden olan amigdalin (D-mandelonitril- $\beta$ -D-glukozido- 6- $\beta$ -D-glukozit), anti-kanser aktivitesi olduğu iddia edilen ve "Laetrile" adı altında satılan siyanojenik bir glikozittir (Rauws ve ark., 1982). Nitekim, bu maddenin Amerika'da 23 eyalette kanser tedavisinde oral kemoterapik amaçla kullanımına yasal olarak izin verildiği aktarılmaktadır (Newmark ve ark., 1981). Mandelonitrilin gentibiyozit türevi olan amigdalin, potansiyel kemoterapik bir madde olarak yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Örneğin; mesane kanseri tedavisinde, tümör bölgesinde spesifik olarak  $\beta$ -glikozidaz enzimi ile amigdalin aktive edilmiş ve amigdalinin hidrolizi sırasında oluşan güçlü metabolik siyanit zehri

herhangi bir sistemik toksisite yaşanmaksızın kötü huylu hücrelerin öldürülmesini sağlamıştır (Syrigos ve ark., 1998).

Taflan çekirdeğinde varlığı bilinen (Alaşalvar ve ark., 2006) ve ayrıca bu çalışmada çekirdeklerden saf olarak izole edilen bir fitosterol olan  $\beta$ -sitosterol bitkilerde yaygın olarak bulunan bir steroid türevidir. Literatürde,  $\beta$ -sitosterol'ün ve diğer fitosterol türevlerinin damar sertliği, kanser, ülser ve iltihaplara karşı koruduğu rapor edilmiştir (Berger ve ark., 2004). Özel kimyasallarla kanser edilmiş olan ve diyet içeriğinin % 2'si kadar fitosterol içerikli besinler ile beslenen denek hayvanlarında, kanserli hücrelerin büyümesinin engellendiği, tümör boyutlarının küçüldüğü ve prostat, kolon ve meme kanserine yakalanma riskinin düştüğü yapılan çalışmalar sonunda ortaya konmuştur. (Raicht ve ark, 1980; Deschner ve ark., 1982; Janezic ve ark., 1992; Awad ve ark., 1987, 2000, 2001; Ju ve ark., 2004).

Yonghuan ve ark., (2009)  $\beta$ -sitosterol'ü insan mide kanser hücrelerine (SGC-7901) karşı da denemişler ve olumlu sonuçlar almışlardır. Yapılan denemelerde,  $\beta$ -sitosterol'ün değişik konsantrasyonları ile muamele edilen mide kanseri hücrelerinin morfolojik değişikliklere uğradığı, DNA'larının zarar gördüğü ve çoğalmasının engellendiği tespit edilmiştir. Aynı çalışmada  $\beta$ -sitosterol'ün sağlıklı hücrelere karşı herhangi bir toksisitesi gözlenmemiştir.

Muzishina ve ark., yaptıkları çalışmada *Artemisa vulgaris* ve *Perilla frutescens* bitkilerinden izole ettikleri ve taflan çekirdeğinin aktif bileşenlerinden olan ayrıca bu çalışmada da >% 99 saflıkta elde edilen prunasinin DNA polimeraz enzimini inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır. Prunasinin 150  $\mu$ M derişiminde rat pol- $\beta$  enzimini inhibe ettiği fakat calf DNA polimeraz enzimine etki etmediği aynı çalışmada tespit edilmiştir. Rat pol- $\beta$  enzimini inhibisyon yeteneği yağ asitlerinin varlığında arttırılmıştır (Muzishina ve ark., 1999).

### **2.3. Sekonder Metabolitlerin Ayırma ve Saflaştırılmasında Kullanılan Kromatografik Yöntemler**

Doğal kaynaklı özellikle de bitki kaynaklı biyo-aktif moleküllerin yapılarının aydınlatılabilmesi için mutlak surette ayrılmış olması gerekmektedir. Kromatografik ayırma sistemlerinde; ayrılması istenen maddeler ile reaksiyon vermeyen sabit faz ve hareketli faz seçilir. Ayrılacak maddenin özelliğine göre, öncelikle kullanılacak kromatografik yöntem (gaz, sıvı kromatografi gibi) belirlenir. Bu yönteme uygun sabit faz (normal faz, ters faz, silika jel, alümina vb.) ve hareketli faz seçilerek ayırım başlanabilir. İyi bir ayırım için, bu üç parametrenin - kromatografi türü, sabit faz ve hareketli faz - iyi seçilmiş olması gerekmektedir.

#### **2.3.1. Kolon Kromatografisi (KK)**

Kolon kromatografisi, organik moleküllerin ayrılmasında oldukça kullanışlı ve ucuz bir yöntemdir. Ayrılacak olan maddeler kolona sıvı ya da katı olarak yüklenebilir. Sıvı yüklemelerde, ilk olarak başlanacak polaritede çözücü sistemi ile maddeler çözülmelidir. Bunun sebebi, ilk yükleme esnasında istenmeyen bir olay olan maddelerin hızlı ve beraber yürümesi veya kolonun yarılmasına engel olmaktır. KK ile ayırma başlamadan önce mutlaka; ayrılmak istenen karışımı en iyi şekilde ayırabilen mobil faz karışımı ince tabaka kromatografisi (İTK) ile belirlenmelidir. İTK ile belirlenen çözücü sistemi direkt olarak başlangıç mobil fazı olarak kullanılabilir.

KK'da en çok kullanılan sabit faz silika jeldir. Genelde Silika jel 60-230 mesh kullanılır. Daha küçük tanecik boyutlu silika jel ile yapılan ayırmalarda mutlaka vakum desteği gerekir. Bu tür ayırmalar, özellikle bitki ekstraktları için kaba ayırmalar için kullanılır. Bu sistemde, nispeten daha büyük kolonlar kullanılır ve vakum destekli olarak az polardan yüksek polaritelere değişik çözücü sistemleri kolondan geçirilir. Bu yolla, ekstrakt içindeki mader polaritelerine göre kısmen ayrılmış olur. Daha sonra bu parçalar, KK ile ayrılarak izolasyona gidilebilir.

KK'da genelde 10-20 ml arasında fraksiyonlar toplanır. Toplanan her fraksiyon İTK ile kontrol edilerek aynı yürüyenler birleştirilir. İTK da gözle görülmeyen spotları görünür hale getirmek için kullanılan birkaç teknik vardır; UV lambası (254 ve 360 nm), iyot buharına maruz bırakma, Serik sülfat belirteci vb. UV sentetik organik kimya için kullanışlı bir görüntüleme yöntemidir. Ancak doğal ürünlerde bu dalga boylarında görünmeyecek maddeler de mevcuttur. İyot ile görüntüleme; ağzı sıkıca kapatılabilen bir tank içinde silika jel ile iyot karıştırılır. İTK bu tanka konular kapak kapatılarak 12-20 saniye beklendikten sonra alınarak kontrol edilir. Spotlar artık çıplak gözle görülebilir haldedir. Serik sülfat çözeltisi (Seryum(IV)sülfat + Der. Sülfürik Asit+Su) karışımı bir püskürtücü yardımı ile İTK üzerine püskürtülür ve 110 °C'de ısıtılarak spotların görünür hale gelmesi sağlanır.

Bu kontrollerden sonra, tek spot olarak gözlenen maddeler değişik spektroskopik yöntemler ile aydınlatılır. Karışım olarak gözlenenler ise, tekrar daha küçük kolonlarda ayırmaya çalışılır.

Bu çalışmada KK ham bitki ekstraktının fraksiyonlandırılmasında ve saflaştırılmasında kullanılmıştır. Sabit faz olarak silika jel (60-230 mesh), hareketli faz olarak, hekzan, diklormetan, etil asetat ve metanol kullanılmıştır. İTK belirteci olarak da Serik sülfat kullanılmıştır.

### **2.3.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)**

Bir karışım içindeki bileşenlerin ayrılmasını ve kalitatif olarak değerlendirilmesini sağlayan, kromatografinin en basit uygulamalarından biridir. Bazı organik ayırma ve saflaştırma işlemlerinde oldukça kullanışlı ve diğer yöntemlere göre nispeten daha ucuzdur. Alüminyum plakalar üzerine silika jel ya da alimüna partikülleri yerleştirilmiş tabaklar ticari olarak mevcuttur. Kullanım amacına göre kesilerek ya da bütün olarak kullanılabilir. Ya da 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 üzerinden yukarıya doğru kapiler etki ile

tırmanırken uygulanan maddeleri polaritelerine göre koşturur. Uygulama sonrası madde spotları UV (254 ve 366 nm) ışığı altında kontrol edilir. UV 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 çözeltilisi ile yapılmıştır.

### **2.3.3. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Modern HPLC sistemleri istenilen akış hızında (0.1-5 mL/dakika) dört farklı çözücü sistemini izokratik, gradiyent ya da sabit şekilde pompalayabilen bir pompadan, maddeleri yüksek ayırma kapasitesine sahip kolondan ve ayrılan maddeleri tayin edebilecek bir detektörden oluşur. Detektörden çıkan maddeleri toplamaya yarayan fraksiyon toplayıcılar sayesinde ayrı ayrı toplamak da mümkündür. Uygun yazılımlarla HPLC cihazına entegre edilen bu toplayıcılar preparatif olarak maddelerin ayrılmasına olanak sağlar.

HPLC sistemleri, genelde termal olarak kararlı olan ve GC ile analizi mümkün olmayan maddelerin analizlerinde kullanılmaktadır. Yüksek kaynama noktalı, birbirine yakın özelliklerdeki polar maddelerin ayrımı kolaylıkla HPLC sistemlerinde yapılabilmektedir. Uygun detektör seçimi ya da enjeksiyon öncesi türevlendirme işlemleri ile neredeyse bütün termal kararlı maddelerin ayrımı ve ayrılan her maddenin de hem kalitatif hem de kantitatif analizi yapılabilir.

HPLC sistemlerinde kullanılan, uzunlukları 100 mm ile 300 mm, çapı ise 4-6 mm arasında değişen tanecik büyüklüğü 5  $\mu$ m boyutunda olan çelik kolonlar ticari olarak mevcuttur. En yaygın olarak ters faz (apolar dolgu maddeli) ve normal faz ( polar dolgu maddeli) kolonlar kullanılır. Hareketli faz olarak da ters faz kolonlar için genelde değişik mobil faz düzenleyicilerle birlikte ( TCA, TFA, Asetik Asit, Sülfürik asit vb.) su ve asetonitril normal faz kolonlar için metanol , diklormetan vb. çözücüler kullanılır.

#### 2.3.4. Gaz Kromatografisi (GC)

Uçucu organik bileşiklerin tespitinde oldukça yaygın olarak kullanılan GC, 1951 yılından itibaren gelişerek ve oldukça çok yönlü kullanımı olan bir teknolojidir. Özellikle rutin analiz yöntemleri ile belirlenmesi güç olan ve çok zaman alan uçucu ve uçucu hale getirilebilen organik maddelerin bu yöntemle belirlenmesi öncelikli tercih nedenidir. Gaz kromatografisinde analizi yapılacak bileşiğin mutlaka buharlaştırılması gerekmektedir. Bunun için bir GC cihazı toplamda 6 ana parçadan oluşmaktadır. Bunlar, taşıyıcı gazın basınç ayarını yapacak bir regülatör ve valf ünitesi, enjeksiyon sistemi, ayırma kolonu, detektör, detektörün içine konduğu ve sabit sıcaklığı sağlayan fırın ve bir kaydediciden oluşmaktadır.

Taşıyıcı gaz olarak genelde helyum, hidrojen veya azot gibi inert gazlar kullanılır. Belirli bir sıcaklıkta ve akım hızında karışımı kolon içinde sürükleyerek taşır. Numuneler genelde kolona bozunmaya neden olmayacak kadar kısa sürede ve küçük hacimlerde ( $\mu\text{L}$ ) enjekte edilirler. Enjeksiyon portunda numune aniden buharlaştırılarak gaz fazına dönüştürülür. Taşıyıcı gaz ile birlikte kolon içinde sürüklenir. Kolon boyunca kolon içinde ilk olarak adsorbe edilen madde sonradan gelen gaz ile tekrar desorbe edilir ve böylece kolonun değişik noktalarında ve değişik zamanlarda kolon içinde ortaya çıkan gazdaki bileşenler bir detektör yardımı ile kaydedilir. Detektör sinyalleri kaydedicide pik şeklinde grafiğe dökülür. Her bir pik bir bileşeni ifade etmektedir. Her bir pikin alanı konsantrasyonu değerini ifade etmektedir.

Katı numunelerde analizlerin yapılması durumunda az miktarda katı numuneden alınır ve bir tüp içine yerleştirilir. Tüp, daha sonra GC'ye sonradan ilave edilebilen buharlaştırma ünitelerine (örneğin head-space gibi) yerleştirilir ve uygun elektrik akımı, sıcaklık programı vs. verilerek tüpün içindeki katı maddenin tamamen gaz fazına geçirilmesi sağlanır ve sonra tüpün ağzı açılarak buharlaşan gaz, taşıyıcı gazla kolon içinde süpürülür.

## 2.4. Sekonder Metabolitlerin Aydınlatılmasında Kullanılan Spektroskopik Yöntemler

### 2.4.1. NMR (Nükleer Manyetik Rezonans)

Nükleer manyetik rezonans Spektrometresi: belirli çekirdeklerin manyetik alandaki hareketlerini temel alan spektrometre tekniğidir. Organik kimyada ve doğal ürünlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan NMR tekniklerinin en önemlileri H ve C NMR spektrometreleridir. Prensip, uygun çekirdeğe sahip bütün atomlara uygulanabilir. NMR dataları diğer bütün spektral yöntemlere nazaran oldukça fazla bilgi verir. Örneğin IR spektrumu bir karbonil grubunun sadece varlığını belirlerken NMR spektrumu, karbonil grubunun moleküle nereden bağlandığını, komşusundaki protonları, karbonil gruplarının uzayda diğer proton ve karbonlarla etkileşmeleri gibi birçok değerli bilgi verir.

#### 2.4.1.1. $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ , $^{13}\text{C}$ -APT ve $^{13}\text{C}$ -DEPT

##### $^1\text{H}$ ve $^{13}\text{C}$ NMR spektrumları

$^1\text{H}$ -NMR spektrumlarından, moleküldeki kaç değişik protonun bulunduğu, farklı protonların göreceli sayıları, protonların elektronik çevreleri ve bir protonun komşusundaki protonlarla etkileşmeleri gibi bilgileri net bir şekilde elde edilebilir. Kimyasal kayma değerleri ve yarıma şekilleri ile protonların tipi belirlenebilir.

$^{13}\text{C}$ -NMR spektrumlarından, molekülde bulunan farklı karbonların sayısı belirlenir. Karbon sinyallerinin kimyasal kayma değerlerinden her bir karbon atomunun elektronik çevresi hakkında bilgi edinilebilir.  $^{13}\text{C}$ 'ün doğada bulunma yüzdesi % 1,01 olduğundan, karbon NMR spektrumları kaydedilirken proton NMR'a göre nispeten daha fazla örnek gerekir. Ayrıca değişik tekniklerle her bir karbon atomunun türünü belirlemek mümkündür. Bu teknikler APT ve DEPT-NMR spektrumlarıdır.

**DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer):** Bu teknikte, pulslar numune üzerine 45, 90 ve 135°'lik açılarla gönderilerek spektrumlar kaydedilir. İnternal kompleks puls programlarının değiştirilmesi ile karbonlara bağlı olan proton sayılarına göre farklı karbonlar farklı sinyaller verir. DEPT teknikleri molekülde bulunan karbon atomlarının süstitüsyon derecesin kolayca belirlenmesini sağlar.

**DEPT45:** Bütün sinyaller pozitif olarak rezonans olurken spektrumda protonlu karbonlar (-CH, -CH<sub>2</sub> ve -CH<sub>3</sub>) gözlenir ancak kuarterner karbonlar gözlenmez. DEPT45 spektrumunda CDCl<sub>3</sub> sinyal vermez.

**DEPT90:** DEPT deneylerinin bu çeşidinde; sadece -CH tipi karbonlar spektrumda pozitif olarak gözlenirken -CH<sub>2</sub>, -CH<sub>3</sub> ve -C tipi karbonlar gözlenmez.

**DEPT135:** Bu tür DEPT deneylerinde ise: -CH ve -CH<sub>3</sub> tipi karbon atomları pozitif pik verirken -CH<sub>2</sub> tipi karbonlar ise negatif olarak pik verir. Kuarterner karbonlar ise bu spektrumlarda gözlenmez.

**APT (Attached Proton Test) :** DEPT deneyleri kadar hassas olmasa da DEPT'e göre bir avantajı, spektrumda bütün karbonların gözlenebilmesidir. -C ve -CH<sub>2</sub> tipi karbonlar spektrumda pozitif olarak gözlenirken, -CH ve CH<sub>3</sub> tipi karbonlar negatif olarak gözlenir.

Sonuç olarak; bir moleküldeki karbonların hangi tip süstitüe oldukları, APT, DEPT90 ve DEPT135 Spektrumları karşılaştırılarak tam olarak belirlenebilir. Bu da doğal kaynaklı moleküllerin yapılarının karmaşıklıklarına rağmen aydınlatılmasını kolaylaştırır.

#### 2.4.1.2. İki Boyutlu NMR Teknikleri

Değişik 2D-NMR teknikleri, 1D-NMR tekniklerinden elde edilen bilgilerin moleküllerin aydınlatılmasında yetersiz kaldığı durumlarda ve 1D tekniklerinde, özellikle de proton spektrumunda üst üste çakışmalardan dolayı spektrumu yorumlamanın imkânsız olduğu durumlarda oldukça kullanışlı ve gerekli bilgiler verir.

#### 2.4.1.2.1. COSY, HETCOR, HMBC, HSQC, TOCSY

##### **COSY (Correlation Spectroscopy):**

2D-NMR tekniklerinden olan COSY; spin-spin etkileşimlerini belirleyerek moleküldeki bağlanmaları tayin etmeye yarar. COSY’de üç bağı kadar etkileşimler görülebilir (proton-protonun bağlı olduğu karbon- bu karbona komşu karbon ve komşuya bağlı proton arasındaki etkileşimler). COSY spektrumlarında her iki eksen de proton spektrumu yer alır ve moleküldeki protonların hangi protonlarla etkileştiği açıkça görülür.

##### **HETCOR (Heteronuclear Correlation):**

Yalnız karbon atomuna doğrudan bağlı olan protonlar arasındaki etkileşimi ortaya koyan bu teknik, moleküldeki protonların hangi karbon atomuna bağlı olduklarını kesin olarak belirlemeye yarar. Spektrumlarda iki eksen yer alır. Bunlardan biri karbon diğeri de proton sinyallerinin yer aldığı eksenlerdir. Etkileşen proton ve karbon atomlarının keşif noktasında çapraz pikler bulunur. HETCOR spektrumlarından; proton karbon eşleşmesi yok ise -bu karbona bağlı proton yoktur-, karbon atomu iki çapraz pik vermişse -karbon atomuna iki farklı proton bağlıdır-, karbon atomu tek çapraz pik vermişse -karbona bağlı proton sayısı birdir ya da bağlı olan protonlar özdeş yorumları yapılabilir.

##### **HMBC (Heteronuclear Multi Bond Coherence) :**

HETCOR spektrumlarında sadece karbona bağlı protonların korelasyonu verilirken HMBC spektrumlarında bir bağ üzerinden olan korelasyonların elimine edilirken iki ve üç bağ bazen de dört bağ üzerinden korelasyonlar gözlenir. İki ve üç bağ üzerinden etkileşimlerin verildiği spektrumlar; yapının daha kolay anlaşılmasını sağlamaktadır. HMBC spektrumları genelde yapıları çok kompleks olan doğal kaynaklı moleküllerin C-C bağlantılarının belirlenmesinde çok sık kullanılmaktadır.

## **HSQC (Heteronuclear Multi Quantum Correlation)**

HSQC spektrumları birbirine direkt olarak bağı olan karbon ve protonların korelasyonunu verir. Spektrumun içerdiği iki eksenin birinde karbon diğesinde ise proton spektrumları yer alır. Çapraz pikler ise bir bağ üzerinden etkileşen karbon-proton eşleşmesini gösterir.

## **TOCSY (Total Correlated Spectroscopy) :**

TOCSY spektrumları her iki ekseninde de proton spektrumu içerir. Çapraz keşim noktalarında ise, 5 bağa kadar kesintisiz proton ağındaki protonların birbirileri ile etkileşimi verilir. Bu teknik özellikle; şekerlerin yapılarının aydınlatılmasında kullanışlı bilgiler sunar. Ancak bağ uzadıkça proton-proton çapraz piklerinin şiddeti azalır.

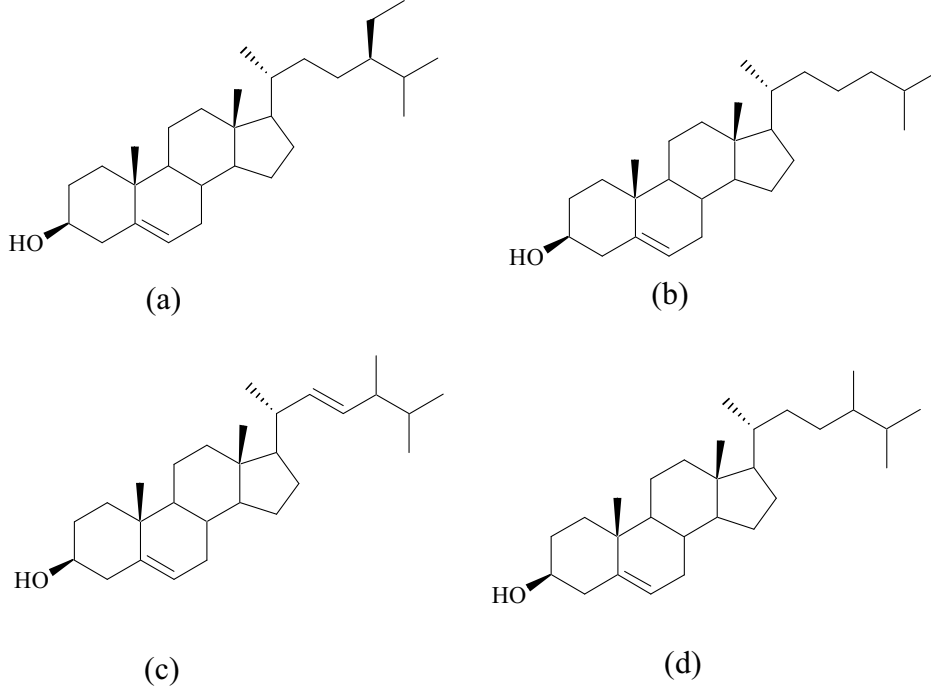
## **2.5. Bitki Sekonder Metabolitleri**

### **2.5.1. Fitosteroller**

Fitosteroller; bitkisel kaynaklı kolesterol türevi sterollerdir. Genel olarak bitkisel sterol olarak adlandırılır ve: 4-Desmetilsteroller (kolestan serileri); 4. karbonunda metil bulundurmayan normal fitosteroller, 4-Monometilsteroller (4 $\alpha$ -metilkolestan serileri) ve 4,4'-Dimetilsteroller (lanostan serileri, triterpen alkoller olarak da bilinirler) olarak üç grupta sınıflandırılırlar.

Doğada; bitkisel yağlar, yağlı tohumlar, bitki tohumları, tahıllar ve tanelerde bulunmaktadır. Kaynaklara göre bitki türevli sterollerin 200'den fazla türevi bilinmektedir. En yaygın olarak bulunanları ise başta  $\beta$ -sitosterol (%80) olmak üzere, stigmasterol, kampesterol ve ergosteroldür. Bu fitosteroller ve kolesterolün hepsi 4-desmetilsterol grubunda yer almaktadır Brassikasterol,  $\Delta$ 5-avenasterol, sitostanol ve kampestanol gibi diğeri bitkisel steroller ise bitkilerde düşük miktarlarda bulunmaktadır.

Stanol olarak adlandırılan doymuş steroller doğada eser miktarda bulunmaktadır. Sterol halkasında çift bağı yoktur. Stanoller, doğada sterollerden daha az bulunmakta ve sterollerin hidrojenlenmesi sonucu oluşmaktadır. Sitosterollerin doyurulması ile sitostanoller; kompesterollerin doyurulması ile kompestanoller oluşmaktadır. Aşağıda bazı steroid türevleri verilmiştir.

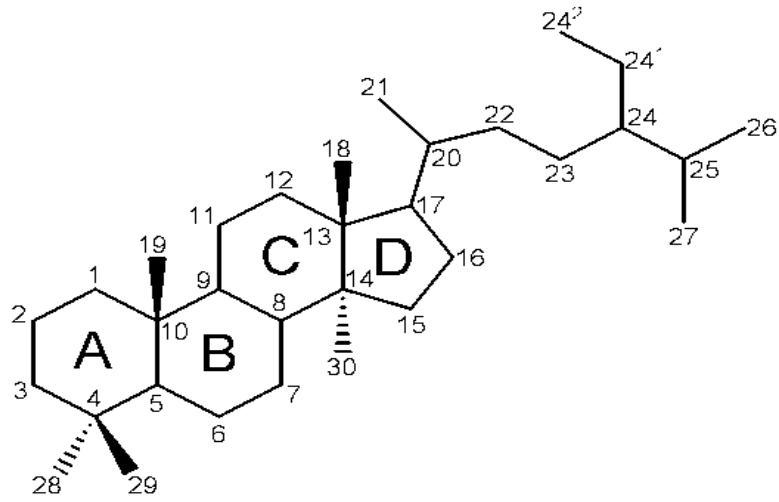


Şekil 2. 3. Bazı doğal steroid türevleri: (a)  $\beta$ -sitosterol (b) Kolesterol (c) Ergosterol (d) kampesterol

Fitosteroller, kolesterolden farklı olarak yan zincirlerinde ekstra bir metil ve etil grubu veya bir çift bağ bulundurmaktadır. Örneğin; kampesterolün 24. Karbonunda bir metil grubu, sitosterolün 24. karbonunda bir etil grubu ve stigmasterolün ise 24. karbonunda bir etil grubu, 22. karbonunda etilenik bağ bulunmaktadır. Bu fitosteroller, kolesterolden farklı olarak ayrıca 28. ve 29. karbonlarını da içerdiklerinden kolesterolden daha hidrofobik bir özelliğe sahiptirler.

Fitosteroller gıda muhtevası veya katkısı olarak gıda sektöründe kullanılmaktadır. Ayrıca bağırsaklarda kolesterol emilmesini azalttıklarından kolesterol azaltıcı bir etkiye sahiptirler. Fitosteroller insanlarda kolesterolü %15 oranında azaltabilirler. Fitosterollerin kolesterol düşürücü etkisinin mekanizması şöyledir: Fitosteroller, misel

formdayken bağırsaklarda çözünebilmektedir. Bu miseller fırçası kenar hücreleriyle etkileşerek enterositlerin içine taşınmaktadır. Bitkisel steroller bu enterositlerin içinde esterleşir, şilomikronların içinde toplanarak limfatiklerin içinden salınırlar. Esterleşmemiş fitosteroller ise sterolin sayesinde lümene geri taşınırlar. Sindirim yolunda kolesterolün misellere girmesini engelleyip toplam kolesterol emilimini azaltırlar. Bu da vücuttaki toplam kolesterol seviyesini kontrol altında tutmaya yardımcı olur.



Şekil 2. 4. Ana steroid iskeleti ve steroidlerin numaralandırılması

Fitosterollerin bilimsel isimleri, C-17'ye bağlı yan zincire, halka sistemindeki ve yan zincirdeki çift bağın konumuna göre verilir. Fitosterollerin bilimsel isimleri oldukça karmaşıktır. Ancak en yaygın olanları özel isimlerle anılmaktadır. Doğada en yaygın olarak bulunan fitosterollerin özel ve bilimsel isimlendirmeleri Tablo 1.1'de verilmiştir.

IUPAC isimlendirmesine göre, fitosteroller Şekil 2.3'te görüldüğü gibi A, B, C ve D olarak adlandırılan dört halkalı sistemden oluşur ve karbon atomlarının numaralandırılması da Şekil 2.3'teki şekildedir. A, B, C halkaları 6 karbonlu D halkası ise 5 karbonludur. Bitkilerde C-17 pozisyonundan bağlı birçok farklı yan zincire sahip fitosteroller bulunmaktadır.

Tablo 2. 1. Bitkilerde yaygın olarak bulunan fitosterollerin yaygın ve sistematik isimleri

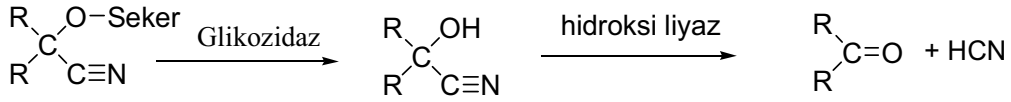
Yaygın isimleri	Sistematik isim	Sterol sınıfı
Sikloartenol	9- $\beta$ -19-siklo-24-lanosten-3- $\beta$ -ol	4,4-dimetil
24-metilen lofenol	4- $\alpha$ -metil-5- $\alpha$ -ergosta-7,24-3- $\beta$ -ol	4-metil
Avenasterol	24-etilkolesta-5,24(28)-Z-dien-3-ol	4-desmetil
Koloestrol	Kolest-5-en-3-ol	4-desmetil
Kampestrol	24-metil-5-kolestern-3-ol	4-desmetil
Brassikasterol	5,22-kolestadien-24-metil-3-ol	4-desmetil
Sitosterol	24-etilkolest-5-en-3-ol	4-desmetil
Stigmasterol	5,22-kolestadien-24-etil-3-ol	4-desmetil

### 2.5.2. Siyanojenik Glikozitler

Siyanojenik glikozitler genellikle bitkilerde azot metabolizmasında ara ürün olarak üretilen sekonder metabolitler olup bir  $\alpha$ -hidroksinitril tipi aglikon bölgeden ve şekerden (genelde D-glukoz) oluşur. Bitki aleminde siyanojenik glikozitlerin dağılımı oldukça geniştir. Bu tür bileşikler içeren bitki taksonları 2500'ün üstündedir. *Fabaceae*, *Rosaceae*, *Linaceae*, *Compositae* gibi familyaların birçok taksonlarında siyanojenik glikozitler oldukça yaygındır. (Brimer ve ark., 1998).

Siyanojenik glukozitlerin, bitki savunmasının (özellikle de herbivorlara karşı) bir parçası olduğu konusunda oldukça güçlü deliller vardır. Değişik bitkilerdeki siyanojenik glikozit miktarı, bitkinin yaşına, fiziksel çevresine bağlı olarak değişir. Ticari olarak önemi olan bazı türlerde de siyanojenik glikozitler bulunur. Bu türler; beyaz yonca, süpürge mısırı, kauçuk ağacı, bambular ve sert çekirdekli meyvelerdir (badem, kiraz, erik, kayısı vb.) (Francisco ve Pinotti, 2000).

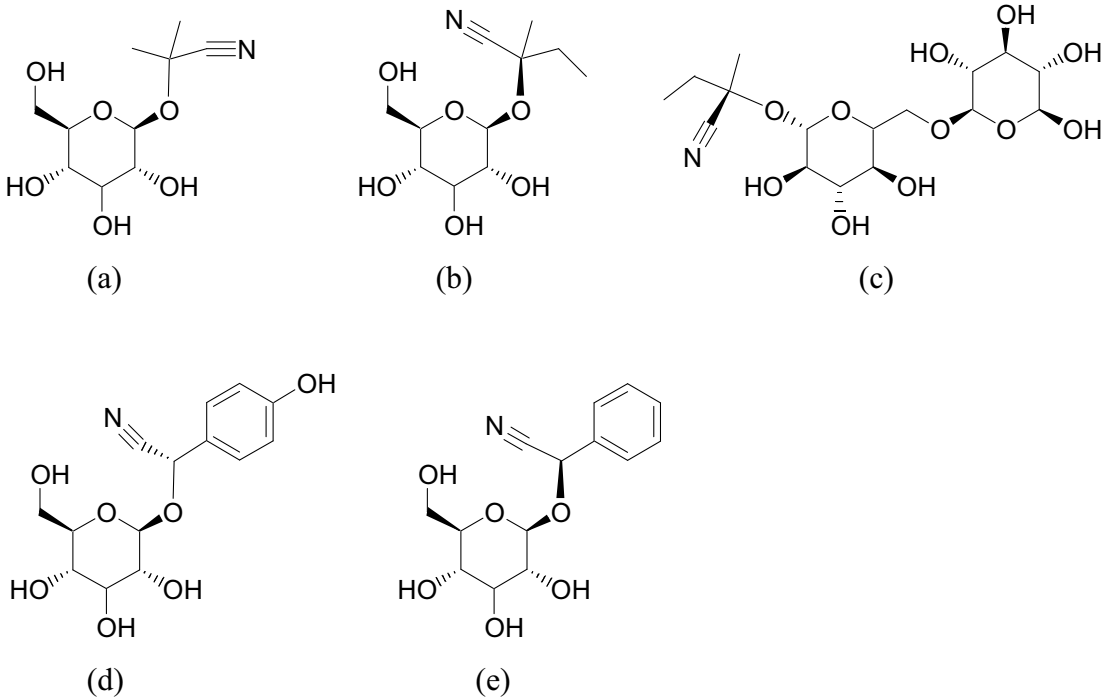
Siyanojenik glukozitleri içeren bitkilerde aynı zamanda bu bileşikler enzimatik olarak hidrolize eden  $\beta$ -glukosidaz enzimini de yaygın olarak bulundurlar. Bitki hücrelerinde siyanojenikler ve enzim ayrı bölgelerde bulunurlar. Ancak bitki dokusu zarar gördüğünde enzim ve siyanojenikler bir araya gelir ve HCN gazı salınır.



Şekil 2. 5. Siyanojenik glikozitlerden HCN oluşumu

HCN'nin ortaya çıkması enzimatik bir olgudur ve şöyle gerçekleşir: önce fiziki zedelenmeler ile birlikte, şekeri hidroliz eden glikozidaz enzimi ile şeker yapıdan ayrılır. Sonra  $\alpha$ -hidroksinitril siyanonitril olarak bilinen hidroliz ürünü kendiliğinden ya da enzimatik olarak bozunarak HCN gazı salar.

Ortaya çıkan HCN gazı, yaşayan organizmalarda  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  ve  $\text{Co}^{2+}$  gibi iyonları bağlama yeteneğine sahip olduğundan birçok canlı için zararlıdır (Cheeke, 1995). Aşağıda bitkilerde yaygın olarak bulunan ve en çok bilinen bazı siyanojenik glikozitler verilmiştir



Şekil 2. 6. Bazı bitki kökenli siyanojenik glikozitler: (a) linamarin (b) latoustralin (c) Neolinustatin (d) dhurrin (e) sambunigrin

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Bitkisel Materyal

Taflan meyveleri Temmuz 2008'de Ordu ilinden toplandı. Meyveler direkt güneş ışığına maruz bırakılmadan kurutuldu (3 hafta). Kurutulan örneklerin çekirdekleri kırılarak çıkartıldı. Çekirdekler mutfak tipi el blenderi (Arçelik K-1255) ile öğütüldü. Ekstraksiyon işlemine kadar -20 °C'de saklandı.

Bu çalışmada, Ekstraksiyon, ayırma saflaştırma ve yapı analiz işlemleri GOPÜ Bitki Araştırma Laboratuar'ında, Antioksidan aktivite testleri ise GOPÜ Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı.

#### 3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çözücüler: Metanol, Asetonitril, petrol eteri 40-60° (Merck), kloroform, etil asetat (Carlo Erba), Diklormetan, etanol (Tekkim). Bütün çözücüler destilleme işlemi yapılmadan kullanıldı. Deiyonize su Milipore 550 cihazından elde edildi. NMR ölçümleri için kullanılan döteryumlu çözümler:  $CDCl_3$  DMSO- $d_6$ ,  $D_2O$  (Merck).

Reaktifler: DPPH,  $FeCl_3$ , ferrozin (Sigma),  $K_3Fe(CN)_6$ , TCA,  $KH_2PO_4$ ,  $Na_2CO_3$ , Folin-Ciocalteu Reaktifi (Sigma-Aldrich), BHA, BHT, Vitamin E, Gallik asit (Merck), Amonyum seryum sülfat (Sigma).

Dolgu maddeleri; Silika jel (Merck 60-230 mesh), silika jel  $G_{F254}$  İTK tabakaları (20x20), Alimüna İTK tabakaları (20x20) (Merck).

Belirteçler: İyot (teknik), Serik sülfat (12 g amonyum seryum(IV)sülfat + 50 mL Derişik. Sülfürik Asit+ 450 mL Su şeklinde hazırlandı).

### 3.3. Cihazlar

GC-MS: Perkin Elmer Clarus500

HPLC: Perkin Elmer Series200 pompa Series200 UV-Vis detektör

NMR: Bruker Avence III 400 MHz <sup>1</sup>H ve 100 MHz <sup>13</sup>C

UV Spektrofotometre: Jasco V-530

Erime Noktası (Elektrotermal 9100 Erime Noktası Tayin Cihazı)

Santrifüj (Hettich EBA20)

Döner buharlaştırıcı (IKA)

Manyetik karıştırıcı (IKA)

Etüv

### 3.4. Antioksidan Aktivite Testleri

Bitki türevli yenilebilir/yenilemez ürünler büyük oranda antioksidan özelliğe sahip fenolik bileşikler (örneğin; fenolik asitler, flavanoidler, antosiyaninler, taninler, lignanlar ve kateşinler) içerir. Bu fenolikler, kalp hastalıkları, bazı kanser türleri ve oksidatif strese bağlı diğer hastalıklara yakalanma riskini arttırdığı bilinen zararlı serbest radikalleri engeller (Ness ve Powles, 1997). Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri temelde onların hidrojen atomu vericisi veya indirgeme ajanı olarak davranmalarından dolayı indirgeyebilme yeteneklerinden kaynaklanır. Bu doğal antioksidanlar; serbest radikal toplayıcısı, zincir kırıcı, proantioksidant metal iyonlarını kompleksleştiricisi olarak davranır.

Meyvelerin, sebzelerin ve diğer bitki türevli ürünlerin antioksidan aktivitesini bir tek testle kesin olarak tespit etmek zordur. Doğal kaynaklı ürünlerin antioksidan aktivitesini değerlendirmek/tahmin etmek için birçok test önerilmiştir. Doğal ürünlerin antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için en azından iki test uygulanmalıdır.

### 3.4.1. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi

Serbest radikal (DPPH·) giderme aktivitesi Liyana-Pathirana'nın özetlediği metotta bazı modifikasyonlar yapılarak değerlendirildi (Liyana-Pathirana ve Shaihidi, 2005). DPPH· (2,2-difenil-1-pikril hidrazil) 0,135 mM'lik etanol çözeltisinin 1 mL si üzerine değişik konsantrasyonlarda (40-80-160 µg/mL) numune çözeltisi ilave edildi. Son hacim etanol ile 4 mL'ye tamamlandı. Karışım şiddetli şekilde vortekslenerek oda sıcaklığında ve karanlıkta inkübe edildi. Spektrofotometrik ölçüm (Jasco V-530, Japan Servo Co. Ltd., Japan) oda şartlarında, 517 nm'de yapıldı. Denemeler üç tekrarlı olarak yapıldı. Numunelerin % serbest radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formülle hesaplandı

$$\% \text{SRG} = [ (\text{Abs}_{\text{kontrol}} - \text{Abs}_{\text{numune}}) / \text{Abs}_{\text{kontrol}} ] \times 100$$

$\text{Abs}_{\text{kontrol}}$ : etanol + DPPH çözeltisinin absorbansı,

$\text{Abs}_{\text{numune}}$  = etanol + DPPH + ekstrakt / standart absorbansı

Sonuçlar, % serbest radikal giderme  $\pm$  standart sapma olarak hesaplandı.

### 3.4.2. İndirgeme Gücü Aktivitesi (Oyaizu Metodu)

Taflan çekirdeği ve izole edilen moleküllerin indirgeme gücü Oyaizu metoduna göre değerlendirildi (Oyaizu, 1986). Standart ve numunelerin etanol içindeki farklı derişimlerine (40, 80 ve 120 mg/mL) fosfat tamponu (2.5 mL, 0.2 M, pH 6.6) ve potasyum ferrik siyanür [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] (2.5 mL, %1) ilave edildi. Bu karışım 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, bu karışıma TCA (2,5 mL, % 10) ilave edildikten sonra 10 dakika 3000 rpm'de santrifüjlendi. Karışımdan 2.5 mL alınarak destile su (2.5 mL) ve  $\text{FeCl}_3$  (0.5 mL, % 0.1) ilave edildi. Elde edilen son karışımın absorbansları 700 nm'de kaydedildi. Yüksek absorbans yüksek indirgeme olarak değerlendirildi. Ölçümler üç tekrar olarak yapılmış sonuçlar absorbans  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir.

### 3.4.3. Toplam Fenolik Bileşik

Ham taflan ekstraktının total fenolik bileşik tayini Folin-Ciocalteu reaktifi ile yapıldı (Slinkard ve Singleton 1977). Bitki ekstraktı (0.5 mL, 1 mg/mL) üzerine 10 kat

seyreltilmiş Folin-Ciocalteu reaktifi (2.5 mL) ve Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 mL, 75g/L) ilave edildi. Bu karışım vortekslenildikten sonra 50°C de 5 dakika inkübe edildi. Numuneler oda sıcaklığına getirildikten sonra 760 nm'deki absorbansları spektrofotometrede kaydedildi. Kontrol olarak su kullanıldı. Standart olarak kullanılan gallik asitin değişik derişimleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisini oluşturuldu. Sonuçlar mg/L gallik aside eşdeğer fenolik madde ± standart sapma olarak verildi.

### 3.5. Siyanojenik Glikozitler (Prunasin ve Amigdalın) HPLC ile Kantitatif Tayini

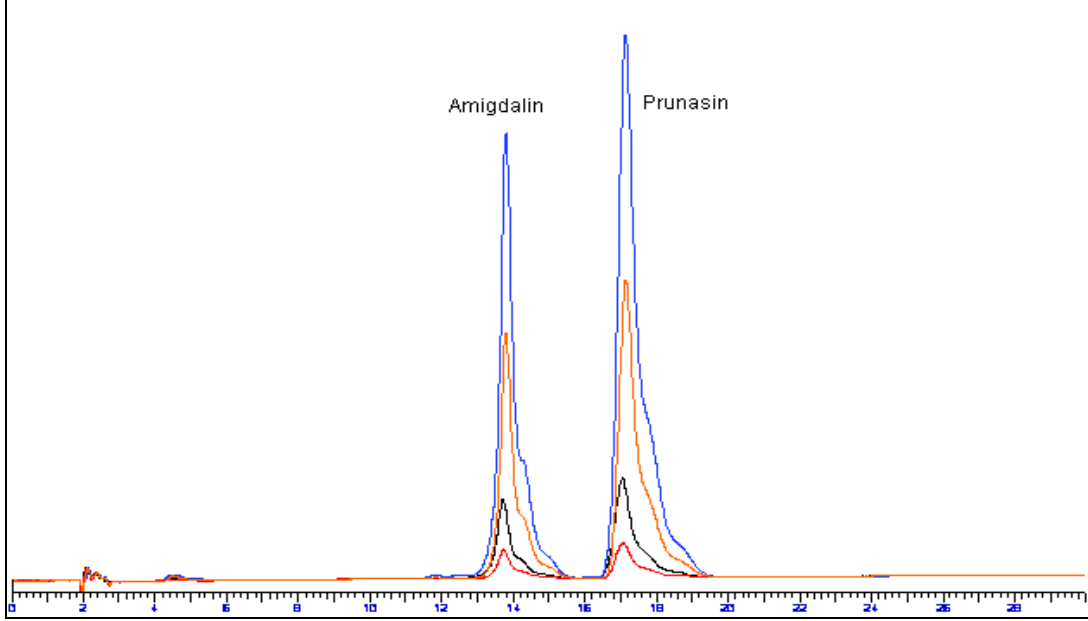
Kantitatif analiz Perkin Elmer Series200 pompa ve Series200 UV detektör'e sahip HPLC sistemi ile yapıldı. Hareketli faz olarak asetonytril (Çözücü A) (Merck, HPLC grade) ve deiyonize su (Çözücü B) kullanıldı. Ayrım için Dionex C18 ( 4.6 x 150 mm, 0.5 µm partikül büyüklüğü) kolon kullanıldı. Çalışma 218 nm'de ( Berenguer ve ark., 2002) yapıldı. Hareketli faz programı Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3. 1. HPLC pompa programı

	Akış hızı (mL/dak)	Zaman (dakika)	Çözücü A (Deiyonize Su)	Çözücü B Asetonytril	Eğim
Adım 1	1.00	3	97.0	3.0	0
Adım 2	1.00	1	97.0	3.0	0
Adım 3	1.00	5	94.0	6.0	1
Adım 4	1.00	9	91.0	9.0	1
Adım 5	1.00	15	85.0	15.0	1
Adım 6	1.00	5	0.0	100.0	0

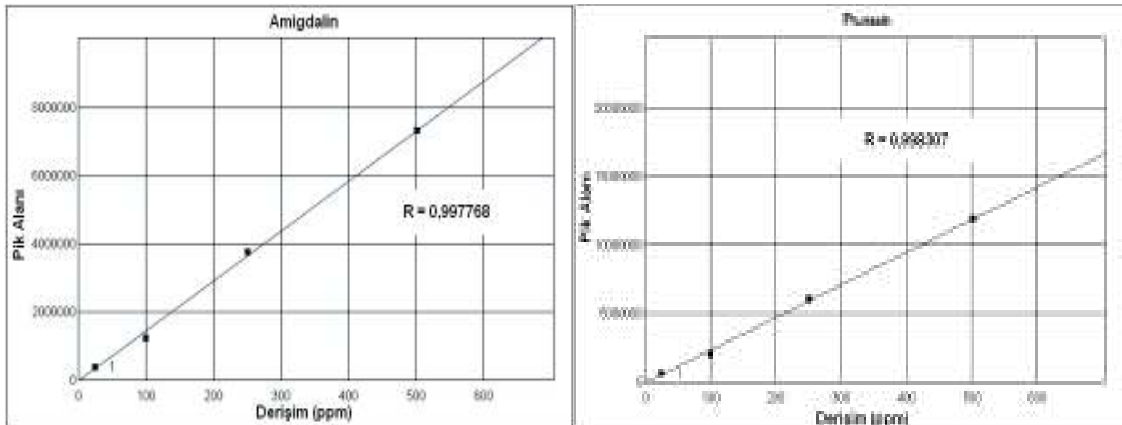
Standart olarak Taflan çekirdeklerinden saf olarak elde edilen prunasin ve amigdalın kullanıldı. Her iki standardın da metanolde 15 mg/mL stok çözeltileri hazırlandı. Kantitatif analiz için yukarıdaki analiz şartları kullanılarak amigdalın ve prunasinin 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden seyreltme ile (metanol ile) 500, 250, 100 ve 25 ppm'lik derişimlerden 20 µL hacimli enjektör ile cihaza verildi. Elde edilen kromatogramlar Şekil 3.2'de verilmiştir.

Örnek numuneleri; 6 mg Taflan çekirdeği 6 mL değişik çözücü sistemleri içinde (metanol:kloroform, metanol, metanol:su ve su) 24 saat oda sıcaklığında 8 devir/dakika hızla orbital çalkalayıcıda ekstrakte edildi. Bitki posaları adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. Süzüntü 0,22 naylon membrandan (Chrom tech.) geçirildikten sonra 20  $\mu$ L alınarak direkt olarak analiz edildi.



Şekil 3. 1. Prunasin ve amigdalın karışımının HPLC kromatogramı

Bu derişimlere cihazın verdiği cevaplar Total Chrom v.1.2 yazılımı ile işlenerek kalibrasyon eğrileri hazırlandı. Kalibrasyon eğrileri Şekil 3.3'te verilmiştir.



Şekil 3. 2. Amigdalın ( $R = 0,997768$ ) ve prunasin ( $R = 0,998307$ ) kalibrasyon eğrileri

Taflan çekirdeğindeki siyanojenik glikozitlerin kantitatif olarak belirlenmesi ve bu iki bileşenin hangi solvent sistemi ile daha kolay ekstrakte edilebilirliğini belirlemek için eşit miktarda tartılan (60 mg) çekirdek örnekleri metanol, metanol:kloroform (1:1), metanol:su (1:1) ve su ile ekstrakte edilerek (6 mL) her bir ekstrakt için kantitatif analiz yapıldı. Ekstraksiyon işlemleri üç tekrarlı olarak yapıldı. Sonuçlar g siyanojenik glikozit / kg çekirdek  $\pm$ standart sapma olarak hesaplandı.

### **3.6. $\beta$ -Sitosterolün GC-MS Analizi**

GC fırın programı; başlangıç sıcaklığı 100 °C'ye ayarlandı. 5 dakika başlangıç sıcaklığında bekletildi. 5°C/dak ısıtma hızı ile 200 °C'ye çıkıldı. Yine 5 °C/dak ısıtma hızı ile 280 °C'ye çıkıldı. Son olarak bu sıcaklıkta 20 dakika tutuldu. Taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dak akış hızı ile Helyum kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 1  $\mu$ L, seyreltme oranı 100:1, çözücü gecikmesi 3 dakika, transfer hattı sıcaklığı 200 °C, iyon kaynağı sıcaklığı 250 °C, iyonlaştırma enerjisi 70 eV olarak ayarlandı. Kolon olarak 0,25  $\mu$ m ID 30 m x 250  $\mu$ m BPX 20 (5% fenil Polisilfenilen-siloksan) apolar kolon kullanıldı.

### **3.7. Taflan Çekirdeği Sabit yağ asitlerinin GC-MS Analizi**

Sabit yağ analizi için 100 mg yağ örneği (kolon kromatografide %100 hekzan ile alınan kısım) tartılarak hekzan (3 mL) içinde çözüldü. Esterleştirme işlemi için yağ örneği üzerine metanol içinde hazırlanan KOH (3 mL, 0.5 N) çözeltisinden eklendi. 3 dakika vorteksledi. Üst fazdan 1 mL alınarak direk olarak GC-MS analiz yapıldı.

GC fırın programı; başlangıç sıcaklığı 100 °C'ye ayarlandı. 5°C/dak ısıtma hızı ile 180 °C'ye çıkıldı. Bu sıcaklıkta 8 dakika bekletildi. Yine 5 °C/dak ısıtma hızı ile 260 °C'ye çıkıldı. Son olarak bu sıcaklıkta 10 dakika tutuldu. Taşıyıcı gaz olarak 1 ml/dak akış hızı ile Helyum kullanıldı. Enjeksiyon hacmi 1  $\mu$ L, seyreltme oranı 200:1, çözücü gecikmesi 4 dakika, transfer hattı sıcaklığı 200 °C, iyon kaynağı sıcaklığı 250°C, iyonlaştırma enerjisi 70 eV olarak ayarlandı. Kolon olarak 0,25  $\mu$ m ID 30 m x 250  $\mu$ m BPX 20 (5% fenil Polisilfenilen-siloksan) apolar kolon kullanıldı.

Sabit yağ asitlerinin tanımlanması elde edilen MS verilerinin mevcut MS veri banklarındaki (NIST ve Willey) verilerin Turbomass v.5.20 yazılımı ile karşılaştırılması yapıldı. Bileşenlerin oranları pik alanları baz alınarak değeriendirildi.

## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1. Ayırma/safılaştırma Aşaması

900 g taflan çekirdek öğütüldü. 3:1 metanol/kloroform (3,5 L) ile 2'şer gün ara ile 5 defa oda şartlarında ekstrakte edildi. Ekstraktlar toplanarak 40 °C'de düşük basınç altında (600 mm Hg) kuruluğa kadar evapore edildi. Toplam kuru ekstrakt olarak 187,27 g elde edildi. Ekstraksiyon verimi, % verim =  $(W1*100)/ W2$  formülü ile hesaplandı. Formüldeki W1: kuru ekstraktının ağırlığı, W2: ekstraksiyonda kullanılan kuru bitkisel materyalinin ağırlığıdır.

% Verim =  $(187,27*100)/900 = 20,80$  olarak hesaplandı. Ekstraktlar kolon kromatografisinde ayırım yapılıncaya kadar +4 °C'de saklandı.

İzolasyon çalışmalarının ilk basamağı olarak uygulanan kolon kromatografisi işleminde Şekil 3.1'de görülen 10 cm x 50 cm boyutlarındaki cam kolon kullanıldı. Fraksiyonlar 250 mL cam erlenlere toplandı. Kolon ve çözücüyü geri kazanma işlemleri eş zamanlı olarak devam ettirildi. Döner buharlaştırıcıda çözücüsü uzaklaştırılan fraksiyonlar 18 mL'lik tüplere toplanarak İTK kontrollü olarak birleştirildi.



Şekil 4. 1. Kolon kromatografide kullanılan cam kolon

Kolon dolum işleminde 1 kg silika jel kullanıldı. Dolum sırasında silika jel hekzan ile bulamaç yapılarak kolona aktarıldı. Ayırma işleminden sonra kolondan 5 L hekzan geçirilerek kolon stabilizasyonu sağlandı. Ham ekstrakt mümkün olan en az metanol ile çözülerek 1:1 olacak şekilde silika jel ile karıştırılarak kuru hava ile kuruluğa kadar çözücüsü uzaklaştırıldı. Tamamen kurutulmuş silika jel-ham ekstrakt karışımı kolona yüklendi. Kullanılan çözücü sistemi ve fraksiyon aralıkları Tablo 4.1’de verilmiştir.

Tablo 4. 1. Kolon kromatografide kullanılan çözücü sistemleri fraksiyon aralıkları

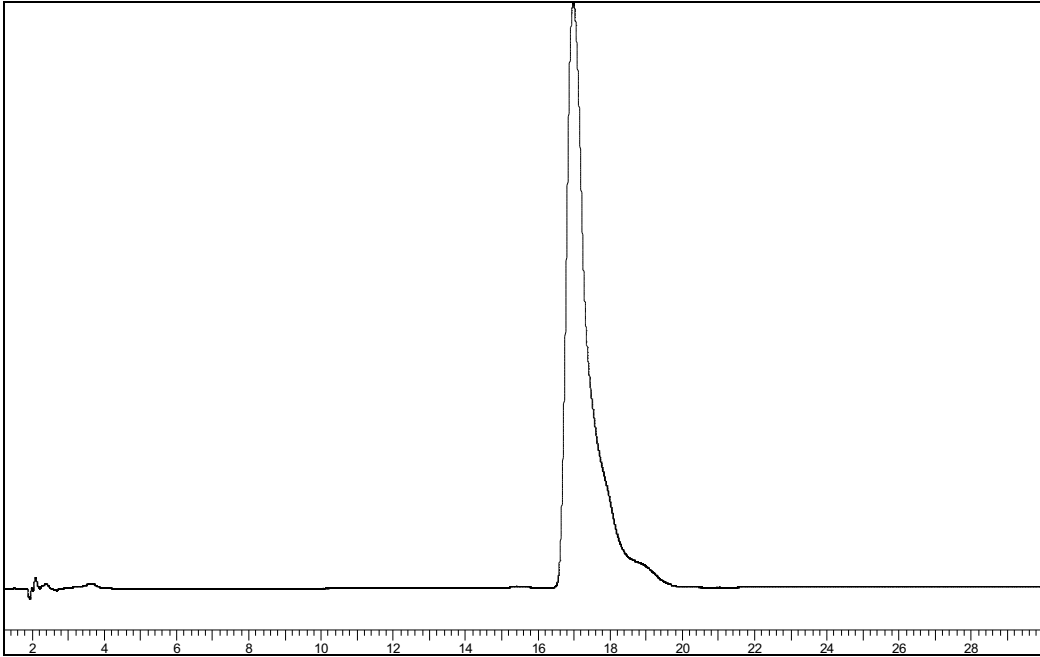
Çözücü Sistemi	Hacim (L)	Fraksiyon Aralıkları	Bileşenler
% 100 hekzan	7,5	-	-
%20 Diklormetan/hekzan	7,5	-	-
% 40 Diklormetan/hekzan	2,85	1-12	Lipit
% 80 Diklormetan/hekzan	4,2	13-22	Lipit
% 100 Diklormetan	19,5	23-104	$\beta$ -Sitosterol
% 50 Etil asetat/diklormetan	5,5	105-139	Karışım
% 75 Etil asetat/diklormetan	9,65	140-182	Karışım
% 100 Etil asetat	7,25	183-218	Karışım
% 5 Metanol/etil asetat	8,350	219-276	Prunasin
% 10 Metanol/etil asetat	17,1	277-407	3-O-Metil-D-glukopiranoz
% 12 Metanol/etil asetat	28,5	408-582	Karışım
% 15 Metanol/etil asetat	29,65	583-760	Amigdalin
% 20 Metanol/etil asetat	22,2	761-876	Amigdalin
% 50 Metanol/etil asetat	31,5	877-1037	Amigdalin
% 75 Metanol/etil asetat	18,75	1038-1133	Amigdalin
% 100 Metanol	10	1134-1260	Sukroz
Toplam	250		

#### 4.2. Siyanojenik Glikozitlerin İzolasyonu ve Yapı tayini

Taflan çekirdeğinin kimyasal bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla yapılan kolon kromatografi işleminden iki farklı siyanojenik glikozit saf olarak izole edildi. Bu iki siyanojenikten birisinin prunasin, diğerinin ise amigdalin olduğu spektroskopik olarak tayin edildi.

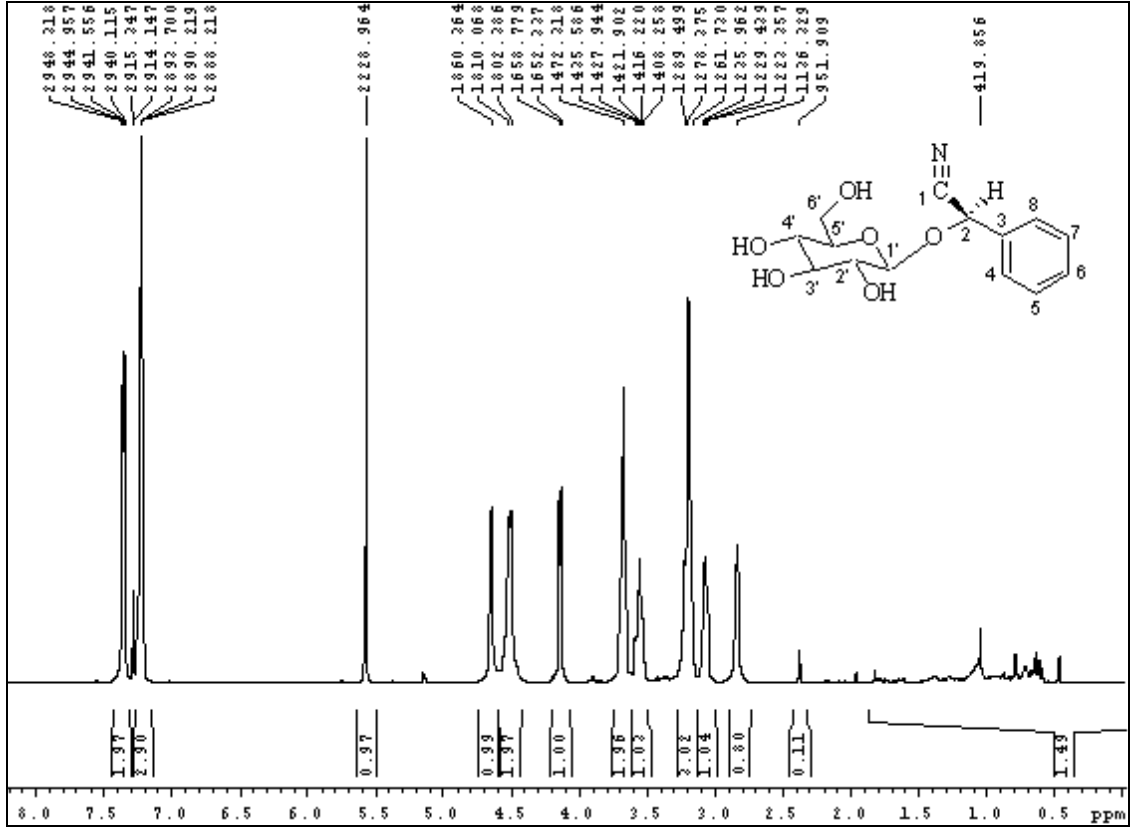
#### 4.2.1. Prunasinin İzolasyonu ve Yapı Tayini

Kolon kromatografisinde %5 metanol/etil asetat çözücü sistemi ile toplanan fraksiyonlardan 223-235 fraksiyon aralığı İTK kontrolü ile birleştirildi. İTK kontrolü Serik sülfat belirteci püskürtülerek 100 °C'de ısıtılarak yapıldı. Prunasin spotlarının sarıdan-siyaha renk değiştirerek yandığı gözlemlendi. Toplanan fraksiyon aralığı birleştirilerek kristaller ayrıldı. Kristallerin beyaz renkli, iğne şeklinde ve oldukça parlak olduğu gözlemlendi. Safılık kontrolü için kristallerden 5 mg tartılıp 10 mL metanol içinde çözülerek Bölüm 3.5'te verilen metot ile HPLC kromatogramı kaydedildi. İzole edilen bileşiğin oldukça saf olduğu gözlemlendi. Kromatogram Şekil 4.2'de verilmiştir. Erime noktası 150-152 °C (Nakajima.,1998. e.n:149-150 °C) olarak gözlemlendi.



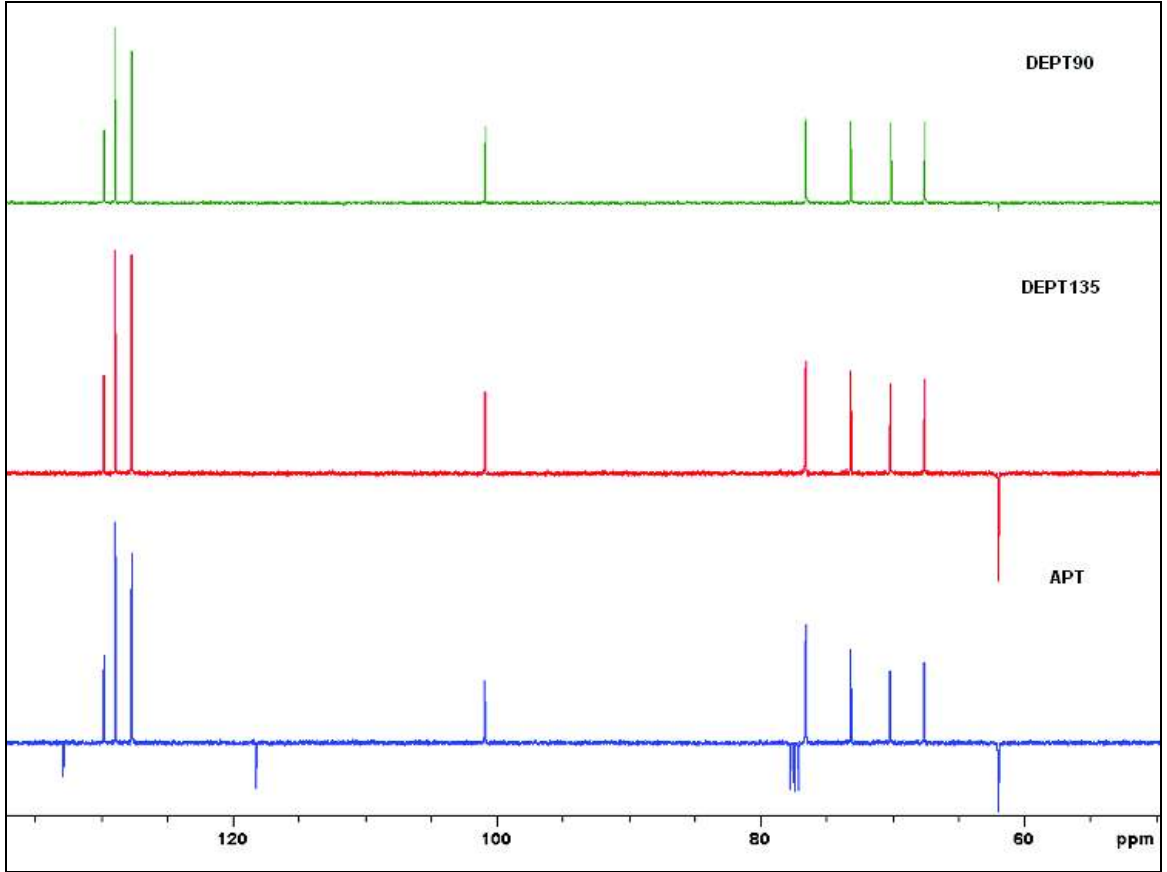
Şekil 4. 2. Prunasin HPLC kromatogramı

Elde edilen kristallerden 30 mg tartılarak yapı analizi için 4:1 oranında  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$  karışımında çözüldü.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT ve APT spektrumları ve HETCOR spektrumları kaydedildi.



Şekil 4. 3. Prunasin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

Prunasinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu incelendiğinde aromatik bölgedeki iki farklı multipletin mono süstitüe benzen halkasının varlığını gösterdi.  $\delta_H = 4.13$  ppm'deki dublet (7.8 Hz) moleküle bağlı glukozit grubuna ait anomerik protona spesifiktir (Fu ve ark., 2008). Buradan glukozit grubunun varlığı anlaşılmaktadır.  $\delta_H = 5.56$  ppm'deki singlet 2 numaralı karbona bağlı protona aittir. Glukozit kısmındaki  $-CH_2$  (6' karbon protonları) grubuna protonlar  $\delta_H = 3.51$  ve  $3.68$  ppm'de ayrı ayrı rezonans olukları gözlenmiştir (diastrotopik protonlar). Bu etkileşmeler HETCOR spektrumundan açıkça gözlenmiştir (EK- 1).



Şekil 4. 4. Prunasin  $^{13}\text{C}$ -DEPT ve APT spektrumları

Prunasine ait karbon spektrumları (DEPT ve APT) incelendiğinde aromatik halkadaki 3 CH karbonlarından (DEPT-135, DEPT-90 ve APT spektrumlarında pozitif) simetrik olan  $\text{C}_4\text{-C}_8$  ( $\delta_{\text{C}} = 128.95$  ppm) ve  $\text{C}_5\text{-C}_7$  ( $\delta_{\text{C}} = 129.79$  ppm) karbonları nispeten daha şiddetli olarak gözlenirken 1 adet C ( $\delta_{\text{C}} = 132.91$  ppm- APT’de negatif DEPT’lerde yok) karbonu daha az şiddetli olarak gözlenmiştir. Bu da mono süstitüe benzen halkasını doğrulamaktadır.  $\delta_{\text{C}} = 118.26$  ppm’deki C karbonu ise (APT’de negatif ve DEPT’lerde yok) siyano grubundaki karbon atomuna aittir (Gomez ve ark., 1999; Berenguer-Navarro ve ark., 2000). Bu karbon atomu siyano grubuna spesifiktir.  $\delta_{\text{C}} = 100.88$  ppm’deki karbon atomu (APT ve DEPT’lerde pozitif olduğundan CH) glukoz grubunun anomerik karbonuna aittir. Şeker grubuna ait diğer  $\text{CH}_2$  karbonu (APT ve DEPT-135’te negatif DEPT-90’da yok) 62.00 ppm’de gözlenmektedir. Tablo 4.2’de prunasine ait karbon ve protonların kimyasal kayma değerleri verilmiştir.

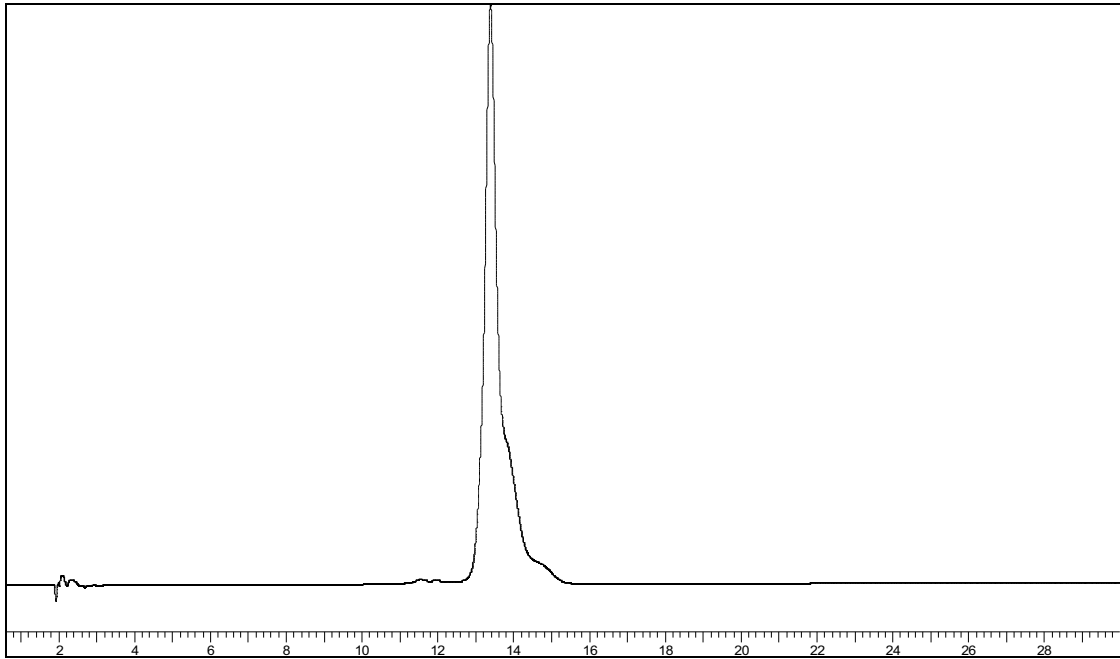
Tablo 4. 2. Prunasin karbon ve proton kimyasal kayma değerleri

Karbon No	DEPT, APT	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
1	C	118,26	-
2	CH	67,49	5,56 (s)
3	C	132,91	-
4-8	CH	128,95	7,22
5-7	CH	129,79	7,45
6	CH	127,68	7,35
1'	CH	100,80	4,13 (7.8 Hz)
2'	CH	70,03	3.20
3'	CH	73.12	3,18
4'	CH	76,55	3.05
5'	CH	76,62	3,89
6'	CH <sub>2</sub>	62,00	3.51-3,68

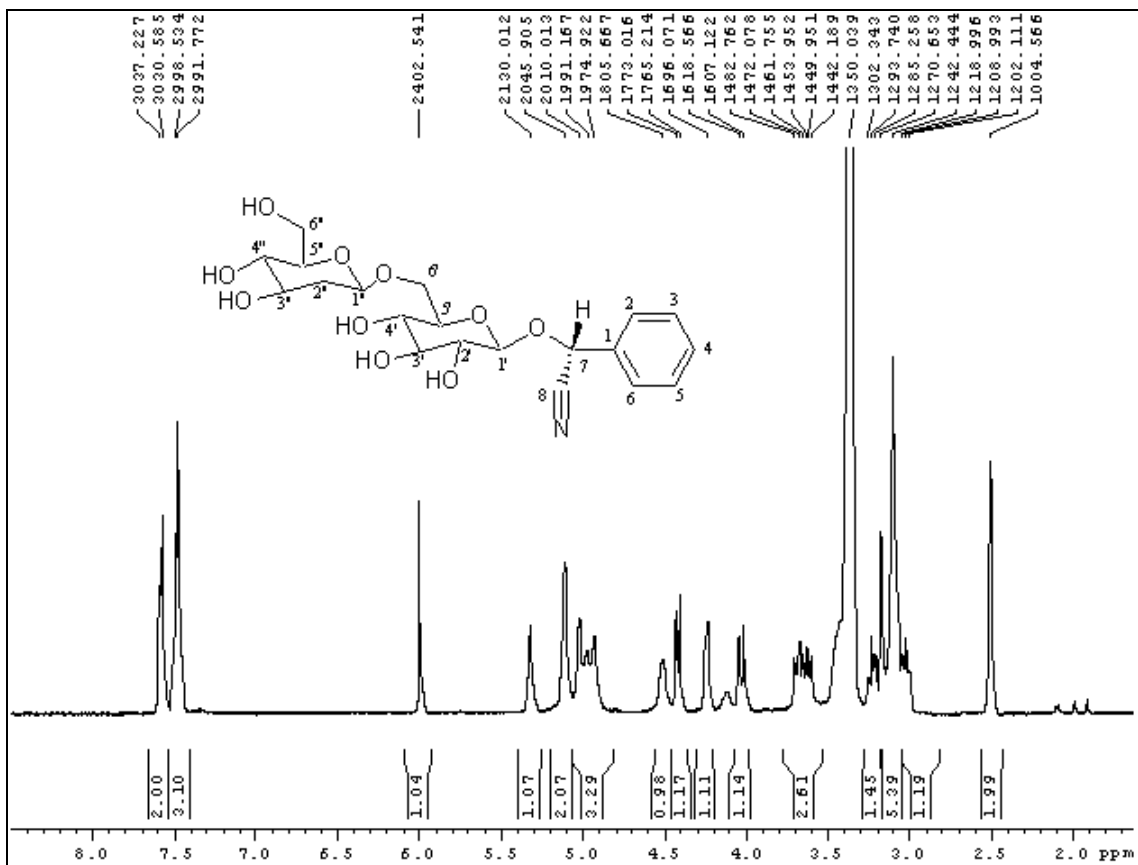
#### 4.2.2. Amigdalinin İzolasyonu ve Yapı tayini

Kolon kromatografisinde % 15 metanol/etil asetat çözücü sistemi toplanan 590-1050 fraksiyon aralığının İTK kontrolü ile aynı maddeler olduğu gözlemlendi. Bazı fraksiyonların az da olsa safsızlık içermesine karşın bütün fraksiyonlar birleştirildi ve etil asetat içinde tekrar kristallendirildi. Kristallerin beyaz renkte ve küçük boyutlarda olduğu, metanol ve suda kolay çözüldüğü gözlemlendi. Elde edilen kristallerin saflığı Bölüm 3.5'te verilen metot ile HPLC'de analiz edildi. Kristallerin oldukça saf olduğu gözlemlendi. Erime noktası 210-212 °C (Chitnis.,1985. e.n: 210-215 °C) olarak belirlendi.

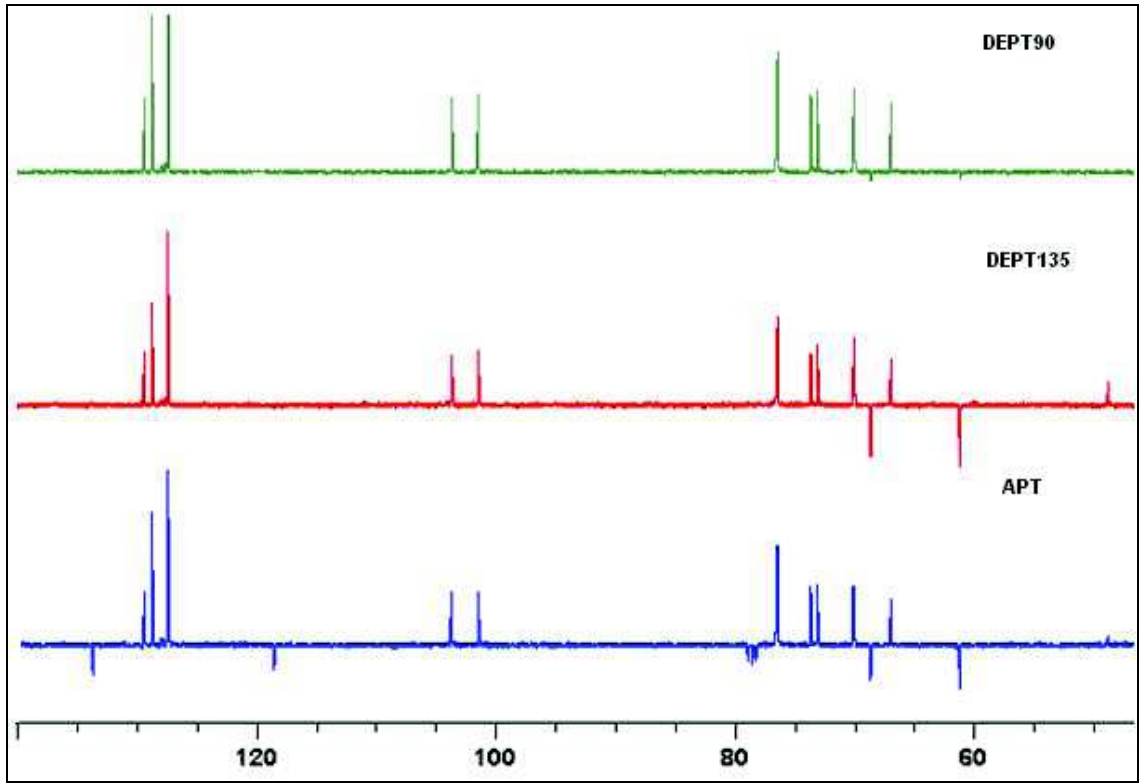
Elde edilen kristallerden 30 mg tartılarak yapı analizi için DMSO-d<sub>6</sub> içinde çözüldü. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, APT, HETCOR, HMBC ve TOCSY spektrumları kaydedildi.



Şekil 4. 5. Amigdalin HPLC kromatogramı

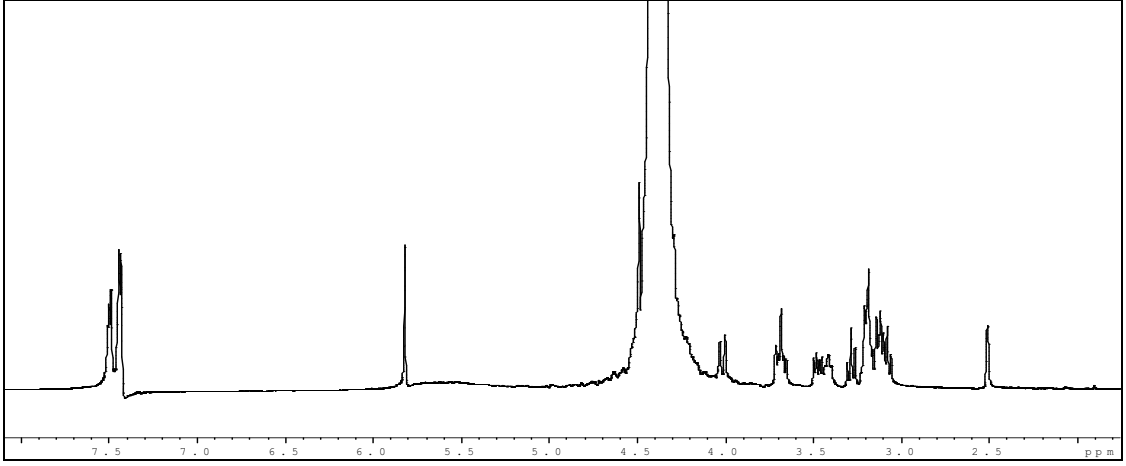
Şekil 4. 6. Amigdalin <sup>1</sup>H -NMR spektrumu

Amigdalinin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (Şekil 4.6) incelendiğinde prunasine benzer şekilde mono süstitüe benzen halkasının varlığı kolayca anlaşılmaktadır.  $\delta_{\text{H}}=4.29$  ppm ve  $\delta_{\text{H}}=4.46$  ppm'de dublet olarak rezonans olan protonlar sırası ile C-1' ve C-2'' karbonlarına bağlı anomerik protonlara aittir ( $J=7.8$  Hz ve  $6.6$  Hz etkileşme sabitleri ile). 7 numaralı karbona ait proton ise  $\delta_{\text{H}}=5.94$  ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. C-6' ve C-6'' karbonlarına bağlı olan diasterotopik  $\text{CH}_2$  protonları ise sırası ile  $3.70-4.11$  ppm ve  $3.56-3.75$  ppm'de rezonans olmuşlardır. Bu etkileşmeler EK 2'de verilen HETCOR spektrumunda açıkça görülmektedir.



Şekil 4. 7. Amigdaline APT ve DEPT spektrumları

Amigdaline APT ve DEPT spektrumları incelendiğinde; aromatik bölgede 3 CH ve 1 C (APT'de negatif) tipi karbon atomu,  $101.39$  ve  $103.58$  ppm'de glukoz grubunun iki anomerik karbon piki (sırası ile C-1' ve C-1'') yine glukoz grubuna ait iki  $\text{CH}_2$  karbonları (APT ve DEPT-135'te negatif)  $68.53$  ve  $61.09$  ppm'de rezonans oldukları gözlenmektedir. Glukoz grubuna ait diğer 8 CH karbonun alifatik bölgede APT ve DEPT'lerde pozitif olarak rezonans olmuştur.



Şekil 4. 8. Amigdaline D<sub>2</sub>O-değişim spektrumu

Amigdalinin D<sub>2</sub>O eklenerek alınan spektrumunda 1-5 ppm aralığında rezonans olan hidroksil piklerinin kaybolduğu gözlemlendi. Ayrıca D<sub>2</sub>O ilavesinin DMSO pikinin kimyasal kayma değerini de değiştirdiği gözlemlendi. Böylelikle çözücü piki altında kalan 3.74 ve 4.11 ppm'de rezonans olan C-6'karbonundaki diastereotopik protonların ayrılması da gözlemlenmiş oldu.

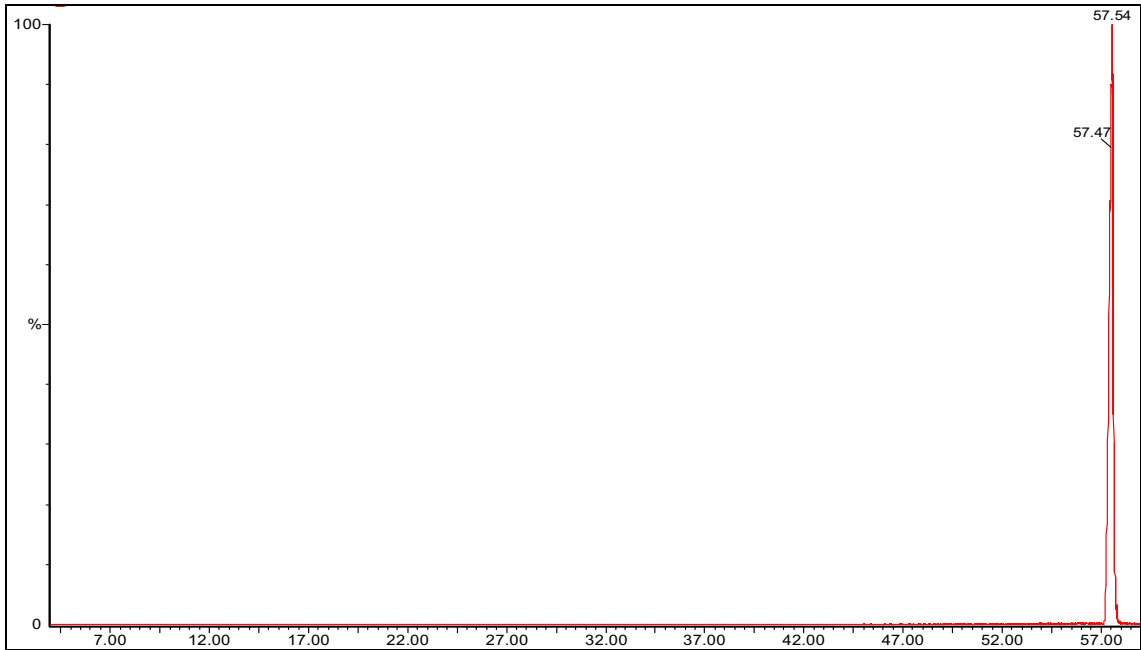
Tablo 4. 3. Amigdaline karbon ve proton kimyasal kayma değerleri

Karbon No	DEPT, APT	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
1	C	133.61	-
2	CH	128.62	7.62 m
3	CH	127.27	7.41 m
4	CH	129.30	7.42 m
5	CH	127.27	7.41 m
6	CH	128.62	7.62 m
7	CH	66.86	5.94 s
8	C	118.42	-
1'	CH	101.39	4.29 d (7.8 Hz)
2'	CH	73.02	3.20
3'	CH	76.30	3.20-3.37 m
4'	CH	69.94	3.20 m
5'	CH	76.43	3.20 m
6'	CH <sub>2</sub>	68.53	3.70 -4.11m
1''	CH	103.58	4.46 d (6.6 Hz)
2''	CH	73.52	3.14 d (6.8 Hz)
3''	CH	76.25	3.42 m
4''	CH	70.02	3.23 m
5''	CH	76.43	3.20 m
6''	CH <sub>2</sub>	61.09	3.56-3.75 m

### 4.3. $\beta$ -Sitosterol'ün İzolasyonu ve Yapı tayini

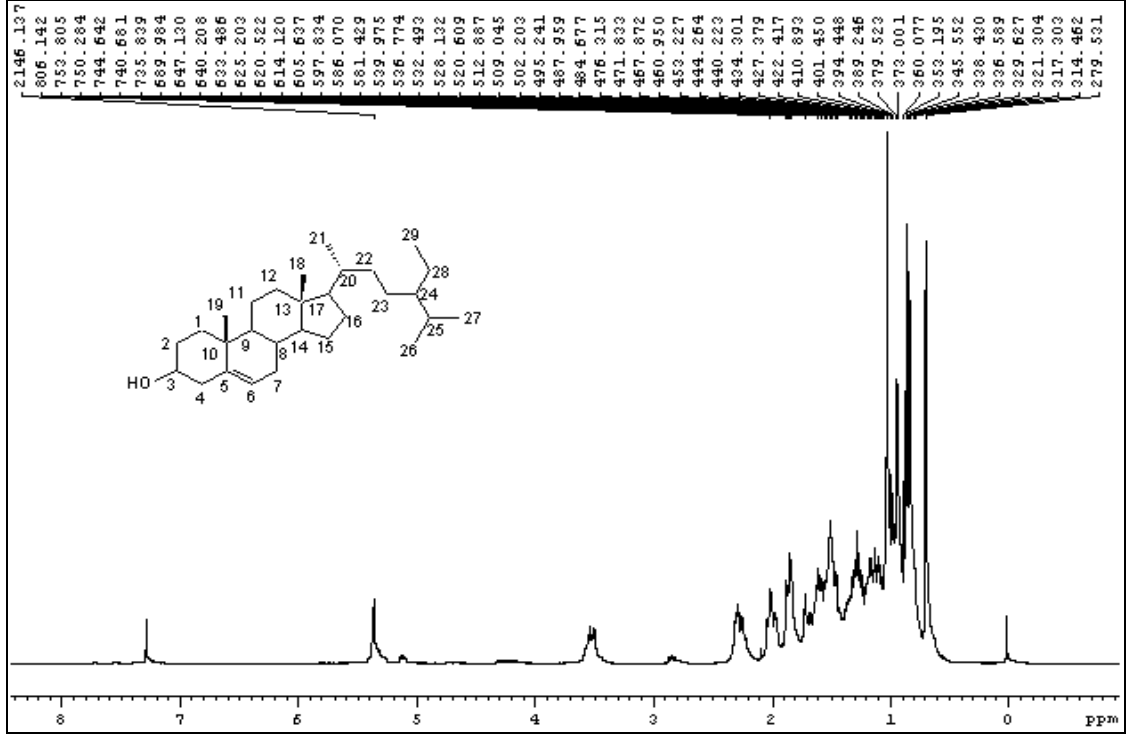
Kolon kromatografide % 80 diklormetan/hekzan sistemi ile toplanan fraksiyonlardan 62.fraksiyonda tüp çeperinde kristallerin oluştuğu gözlemlendi. Bu kristaller sırası ile 3'er mL hekzan ve %1 dietileter/hekzan karışımları yıkandı. Kristaller diklormetan ile çözülerek tekrar kristallendirildi (elde edilen kristaller 40 mg olarak tartıldı). Maddenin şeffaf renkte, iğne şeklinde kristallendiği, diklormetan ve kloroformda iyi çözüldüğü gözlemlendi. Serik sülfat belirteci ile 100 °C'de ısıtıldığında kırmızı/mor renkte yandığı gözlemlendi.

Kristallerin saflık kontrolü Bölüm 3.6'da verilen yöntem ile GC-MS ile yapıldı. Kristallerden 5 mg tartılarak 2 mL dikolormetanda çözülerek direkt olarak GC-MS analizi yapıldı. Elde edilen GC-MS kromatogramı Şekil 4.9'da verilmiştir.  $\beta$ -Sitosterol'ün yüksek saflıkta elde edildiği belirlendi. Erime noktası 127-129 °C (Wang., 2004. e.n:136-137 °C ) olarak gözlemlendi.



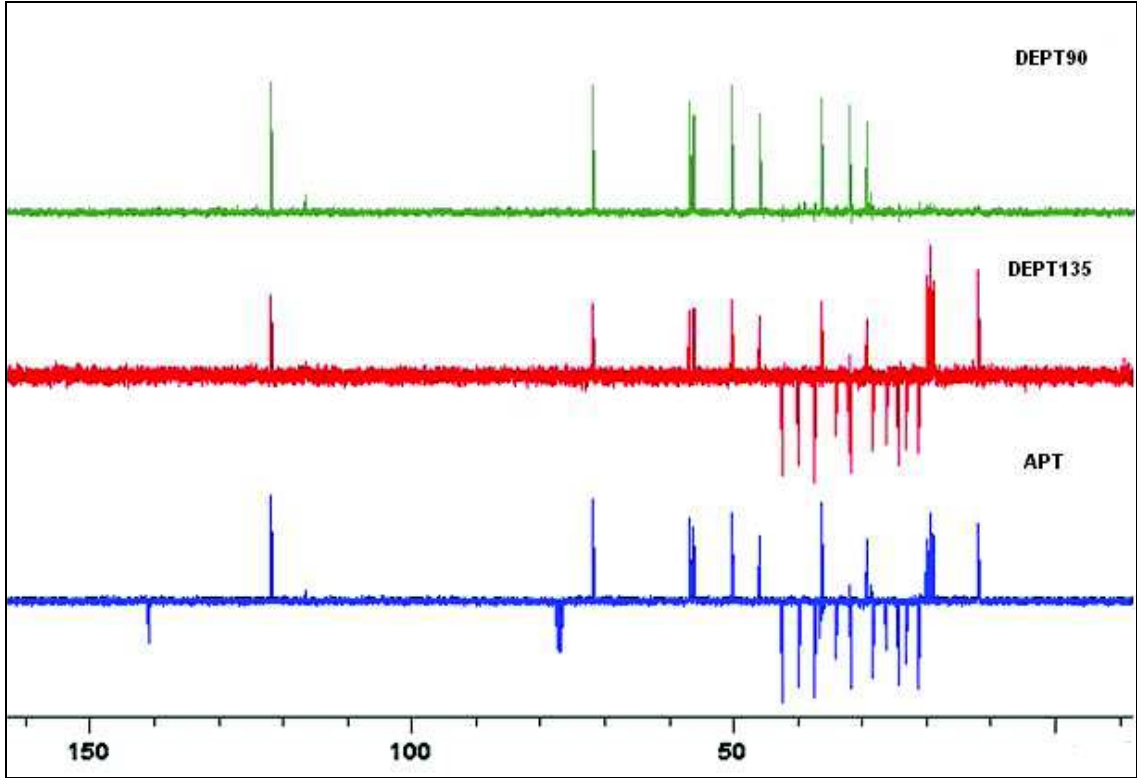
Şekil 4. 9.  $\beta$ -Sitosterol GC-MS kromatogramı

Elde edilen kristallerin tamamı, yapı analizi için  $\text{CDCl}_3$  içinde çözüldü.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT ve APT spektrumları ile iki boyutlu HETCOR, HMBC ve TOCSY spektrumları kaydedildi.



Şekil 4. 10.  $\beta$ -Sitosterol  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu

$\beta$ -Sitosterol'ün  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu incelendiğinde; 6 numaralı çift bağ karbonunun 5.34 ppm'de rezonans olduğu, metil protonlarının 0.85 ile 1.05 ppm aralığında rezonans oldukları gözlemlendi. 3 numaralı karbona bağlı proton 3.54 ppm'de rezonans olduğu proton spektrumundan açıkça görülmektedir. Spektrumun 0.8-3 ppm aralığı oldukça karmaşık olmasından dolayı Tablo 4.4'te verilen kimyasal kaymalar HETCOR spektrumundan (EK 5) yararlanılarak elde edilmiştir. Elde edilen kimyasal kayma değerleri literatürle tam uyum içindedir (Lobna ve ark., 2007).



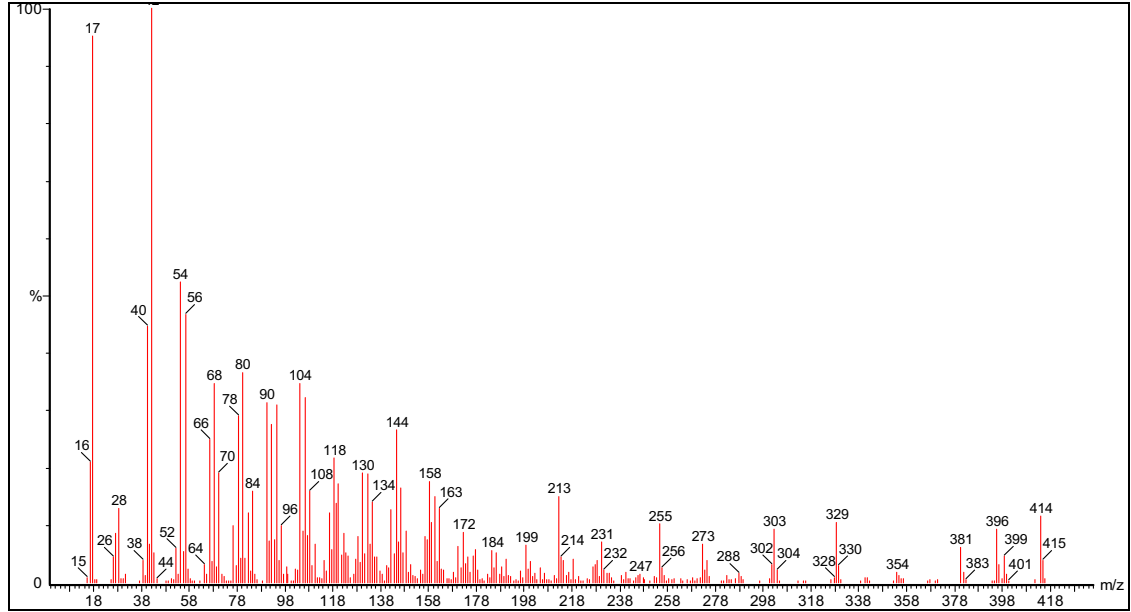
Şekil 4. 11.  $\beta$ -Sitosterol  $^{13}\text{C}$ -DEPT ve APT Spektrumları

Şekil 4.11’de verilen  $\beta$ -Sitosterole ait APT ve DEPT Spektrumları incelendiğinde 140.8 ppm’de rezonans olan C-5 karbonu (APT’de negatif DEPT-135 ve DEPT-90’da yok) ve 121.7 ppm’de rezonans olan C-6 karbonu steroid halkasına spesifiktir (Lobna ve ark., 2007). APT spektrumu incelendiğinde moleküle ait 11 tane  $\text{CH}_2$  ve 6 tane  $\text{CH}_3$  karbonunun pozitif olarak, 9 tane CH ve 3 tane C karbonunun negatif olarak rezonans olduğu gözlemlendi. 31.9 ppm’de rezonans olan 7 ( $\text{CH}_2$ ) ve 8 (CH) numaralı karbonların farklı tip olmasından dolayı çakışmaya rağmen DEPT-135 spektrumundan kolayca anlaşılabilir. 18.8 ppm’de rezonans olan 21 ve 26 numaralı metil karbonlarının çakışması da HETCOR spektrumundan her iki metil grubu karbonunun farklı protonlarla (1.09 ppm’de 21 nolu karbona bağlı metil protonları ve 0.92 ppm’de rezonans olan 26 nolu karbona ait metil protonları) etkileşiminden anlaşıldı.

Tablo 4.4’te  $\beta$ -Sitosterol’e ait karbon ve protonların kimyasal kayma değerleri ve karbon atomlarının türleri özetlenmiştir. Steroid türevleri gibi kesintisiz proton ağı içeren moleküllerin aydınlatılması için uygun bir yöntem olan TOCSY spektrumundan (EK 6) C-1 ve C-5 proton şebekesi steroidin yapısının belirlenmesinde büyük rol oynamıştır.

Tablo 4. 4.  $\beta$ - Sitosterol karbon ve proton kimyasal kayma değerleri

Karbon No	DEPT, APT	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)	Karbon No	DEPT, APT	$\delta_C$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm)
1	CH <sub>2</sub>	37.3	1.84	16	CH <sub>2</sub>	28.2	1.25-1.83
2	CH <sub>2</sub>	31.6	1.52	17	CH	56.1	1.10
3	CH	71.7	3.54	18	CH <sub>3</sub>	12.0	0.85
4	CH <sub>2</sub>	42.2	2.28	19	CH <sub>3</sub>	19.0	0.81
5	C	140.8	-	20	CH	36.1	1.35
6	CH	121.7	5.34	21	CH <sub>3</sub>	18.8	1.09
7	CH <sub>2</sub>	31.9	1.74	22	CH <sub>2</sub>	33.9	1.01-1.31
8	CH	31.9	1.95	23	CH <sub>2</sub>	26.1	1.16
9	CH	50.1	0.92	24	CH	45.8	0.92
10	C	36.5	-	25	CH	29.2	1.66
11	CH <sub>2</sub>	21.1	1.64-0.97	26	CH <sub>3</sub>	18.8	0.92
12	CH <sub>2</sub>	39.8	1.16-2.00	27	CH <sub>3</sub>	19.4	1.00
13	C	42.3	-	28	CH <sub>2</sub>	23.1	1.25
14	CH	56.8	0.98	29	CH <sub>3</sub>	11.9	0.84
15	CH <sub>2</sub>	24.3	1.08-0.96				

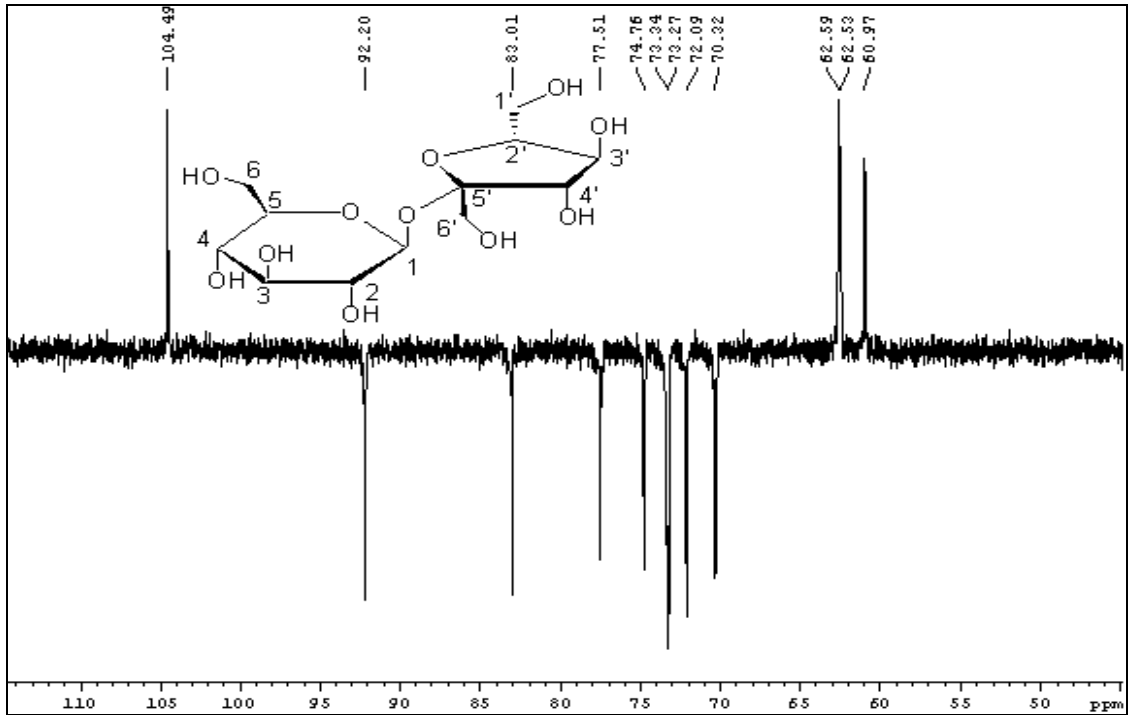
Şekil 4. 12.  $\beta$ -Sitosterol MS Spektrumu

Kütle spektrumunda molekülün m/z oranı 414, 396, 329, 303, 273, 255, 231, 213 olan fragmentler gözlenmiştir. m/z 396 kütle fragmenti ( $C_{29}H_{48}^+$ ) molekülden bir  $H_2O$ 'nun ilk etapta ayrıldığıının delilidir.

#### 4.4. Karbonhidratların İzolasyonu ve Yapı tayini

##### 4.4.1. Sukroz

%75 metanol/etilasetat karışımında toplanan 1070-1110 fraksiyonlarında kristallenmeler gözlemlendi. Bu kristaller fraksiyonlardan alınarak sırası ile hekzan, etilasetat ve metanol ile yıkandı. Kristaller tamamen kurutulduktan sonra 40 mg alınarak DMSO-d<sub>6</sub> ile çözülerek <sup>13</sup>C-NMR spektrumu alındı. Elde edilen veriler, kristallerin sukroz olduğunu gösterdi. Aşağıda Sukroza ait <sup>13</sup>C-NMR spektrumu verilmiştir. Elde edilen veriler literatürle uyum içindedir (Alan ve ark., 1979).



Şekil 4. 13. Sukroz ait 100-MHz <sup>13</sup>C-NMR spektrumu

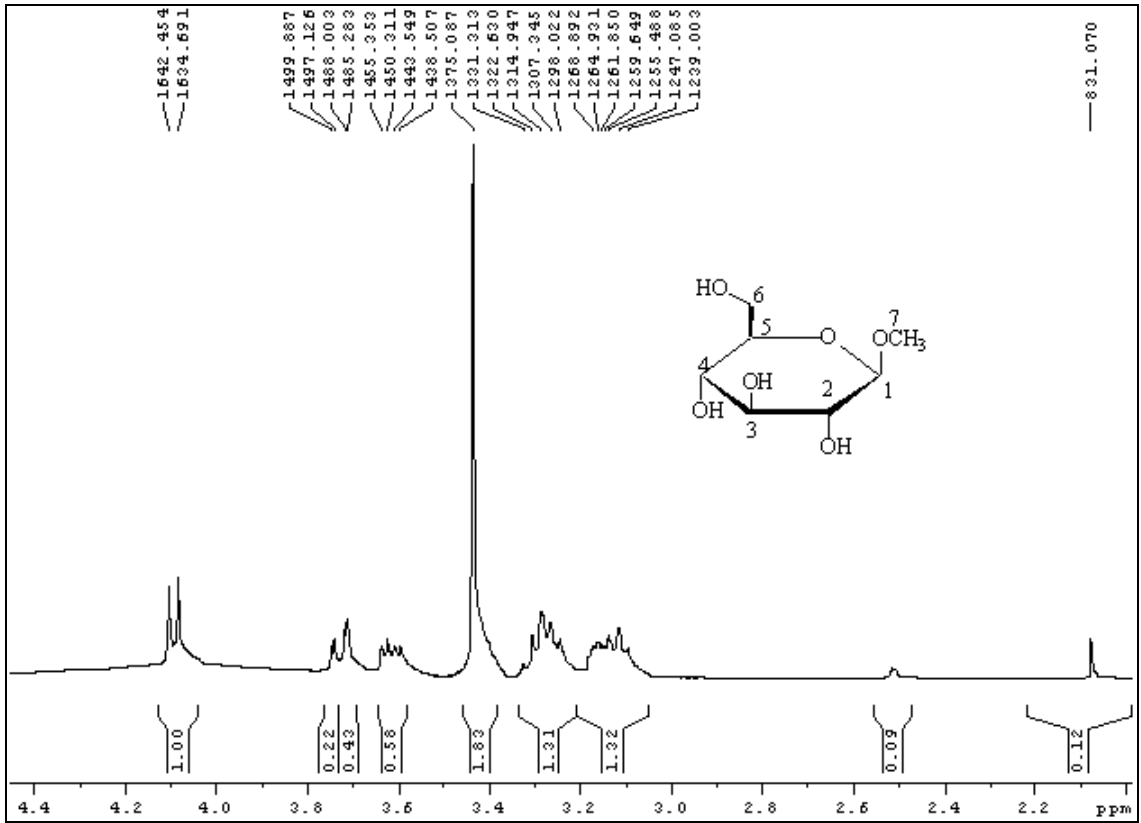
Tablo 4. 5. Sukroz karbon kimyasal kayma değerleri

C No.	<sup>13</sup> C-NMR	C No.	<sup>13</sup> C-NMR
1	92.18	1'	82.99
2	74.63	2'	74.69
3	73.12	3'	77.42
4	72.06	4'	62.46
5	73.22	5'	104.46
6	62.57	6'	60.90

#### 4.4.2. 3-O-Metil-D-glukopiranoz

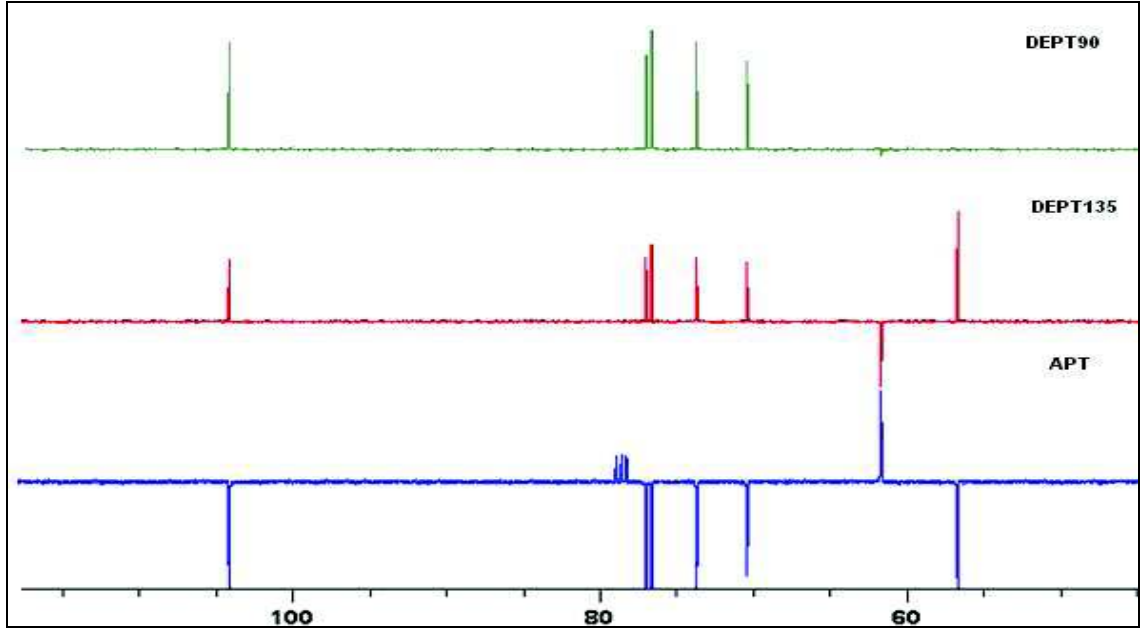
%10 metanol/etilasetat karışımında toplanan fraksiyonlardan 292-346 aralığındaki 302-346 fraksiyon aralığının İTK kontrolü ile tek madde olduğu gözlemlendi. Bu fraksiyon aralığı toplanarak çözücüsü dönel buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Kalan madde etil asetat ile çözülerek kristallendirildi. Kristallerin, şeffaf, renksiz ve büyük boyutlu oldukları gözlemlendi. Yapılan İTK çalışmalarında Serik sülfat belirteci ile 100 °C'de kahverengi olarak yandığı gözlemlendi. Erime noktası 102-104 °C olarak gözlemlendi.

Yapı analizi için, kristallerden 30 mg tartılarak DMSO-d<sub>6</sub> içinde çözüldü, <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT ve APT spektrumları ile iki boyutlu HETCOR, HMBC ve TOCSY spektrumları kaydedildi. Yapılan spektroskopik değerlendirmeler sonucunda molekülün 3-O-metil-D-glukopiranoz olarak tayin edildi.



Şekil 4. 14. 3-O-metil-glikopiranoz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

Molekülün  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu incelendiğinde şeker gruplarına spesifik olan anomerik proton (C-1) 7.76'lık etkileşme sabitiyle 4.07 ppm'de dublet olarak rezonans olmuştur. Metoksi grubu ise 3.43 ppm'de singlet olarak, molekülde bulunan 3 -OH grubu 3.40-3.90 ppm aralığında, CH protonları ise 3.0-3.5 ppm aralığında multipl olarak rezonans olmuştur.



Şekil 4. 15. 3-O-metil-glukopiranoz  $^{13}\text{C}$ -APT ve DEPT Spektrumları

Bileşiğin APT ve DEPT spektrumlarından; 61.65 ppm'de rezonans olan  $\text{CH}_2$  karbonu (C; APT'de pozitif DEPT-135'te negatif ve DEPT-90'da yok), 104.11 ppm'de rezonans olan anomerik karbon (CH; APT'de negatif, DEPT'lerde pozitif), 56.65 ppm'de rezonans olan metil karbonu ( $\text{CH}_3$ ; APT'de negatif, DEPT-135'te pozitif DEPT-90'da yok) ve APT'de negatif DEPT'lerde pozitif olarak rezonans olan CH karbonları gözlenmiştir. Tablo 4.6'da karbon-proton eşleşmeleri verilmiştir.

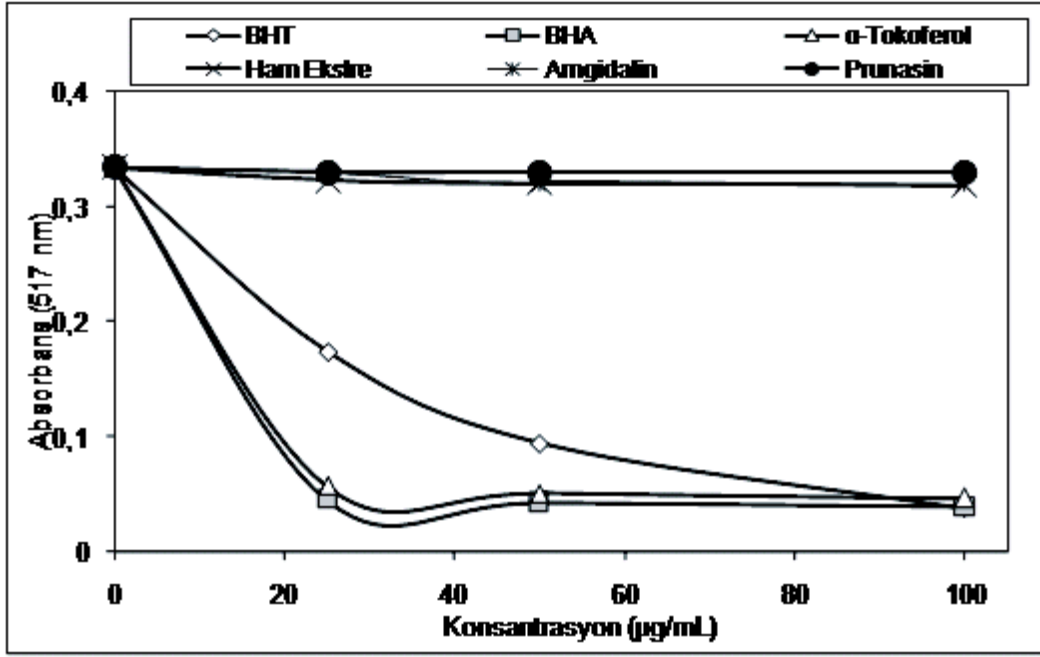
Tablo 4. 6. 3-O-metil-glukopiranoz karbon ve proton kimyasal kayma değerleri

Karbon No	DEPT, APT	$\delta_{\text{C}}$ (ppm)	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)
1	CH	104.11	4.07 d (7.76 Hz)
2	CH	73.66	3.26 m
3	CH	76.94	3.17 m
4	CH	70.37	3.16 m
5	CH	76.57	3.17 m
6	$\text{CH}_2$	61.65	3.75 m
7	$\text{CH}_3$	56.65	3.43 s

#### 4.5. Antioksidan Aktive Testlerinin sonuçları

Taflan çekirdeğinin ham ekstresi ve çekirdekten saflaştırılan bileşiklerin antioksidan kapasiteleri, serbest radikal giderme aktivitesi, indirgeme gücü aktivitesi ve ham ekstrenin total fenolik bileşik tayini yapılarak belirlenmiştir.

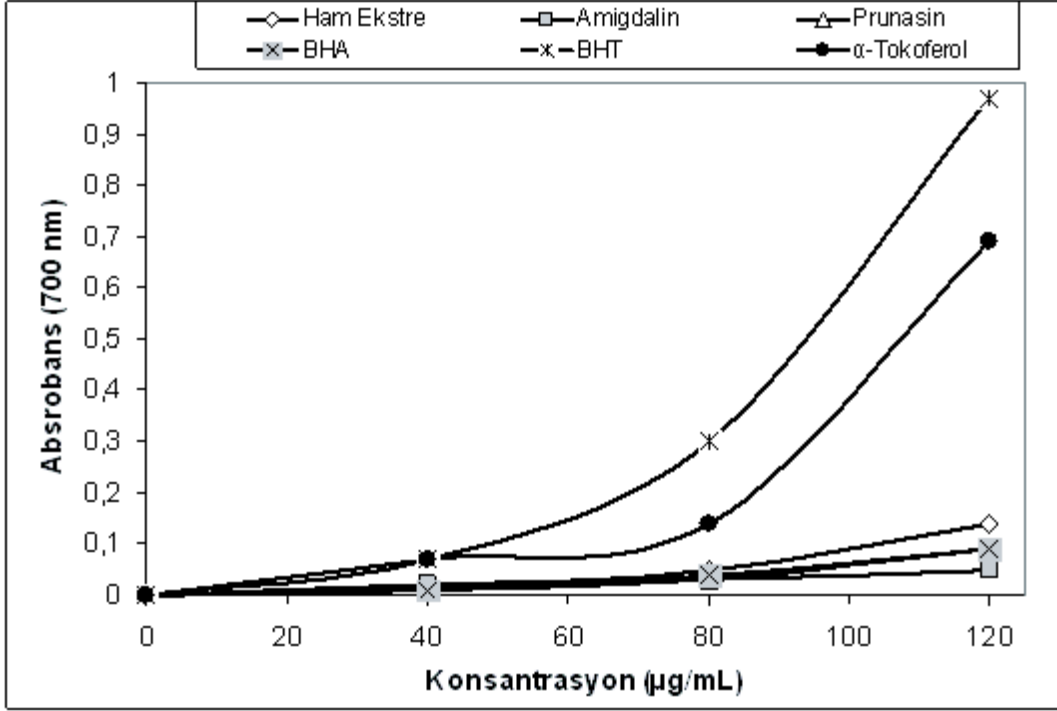
##### 4.5.1. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi



Şekil 4. 16. Taflan çekirdeğinin ham ekstresi, amigdalın ve prunasinin DPPH radikal giderme aktivitesi

Şekil 4.16'da görüldüğü gibi taflan çekirdeğinin ham ekstresi ve bu ekstreden saflaştırılan amigdalın ve prunasin bileşiklerinin DPPH serbest radikali giderme aktiviteleri yoktur. Bu teste elde edilen sonuçları pozitif kontrol olarak kullanılan BHT, BHA ve α-tokoferol standartları ile karşılaştırılarak yapılmıştır.

#### 4.5.2. İndirgeme Gücü Aktivitesi

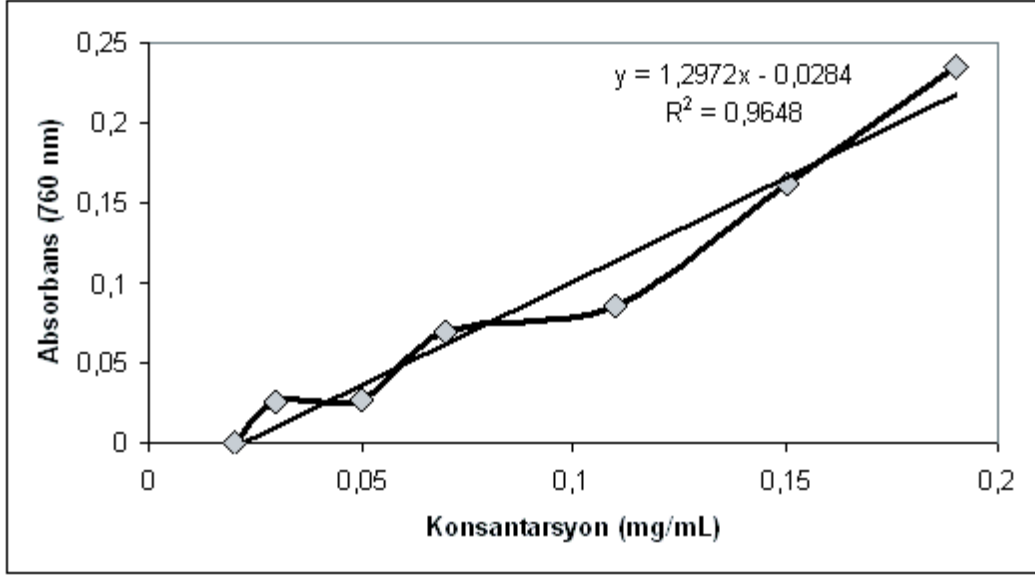


Şekil 4. 17. Taflan çekirdeğinin ham ekstresi, amigdalın ve prunasinin indirgeme gücü

Şekil 4.17’de görüldüğü gibi taflan bitkisinin çekirdeğinin ham ekstresi, amigdalın ve prunasinin indirgeme gücü aktivitesi pozitif kontrollerle karşılaştırıldığında BHT ve  $\alpha$ -tokoferol en yüksek aktiviteyi gösterirken ham ekstrenin aktivitesi BHA’dan daha yüksek tespit edilmiştir. Amigdalın ve prunasin bileşiklerinin indirgeme gücü en düşük aktiviteyi gösterdiğini şekil 4.22’de de görülmektedir. İndirgeme gücü büyükten küçüğe doğru sırasıyla BHT >  $\alpha$ -tokoferol > ham ekstre > BHA > amigdalın = prunasin şeklindedir.

#### 4.5.3. Toplam Fenolik Analizi

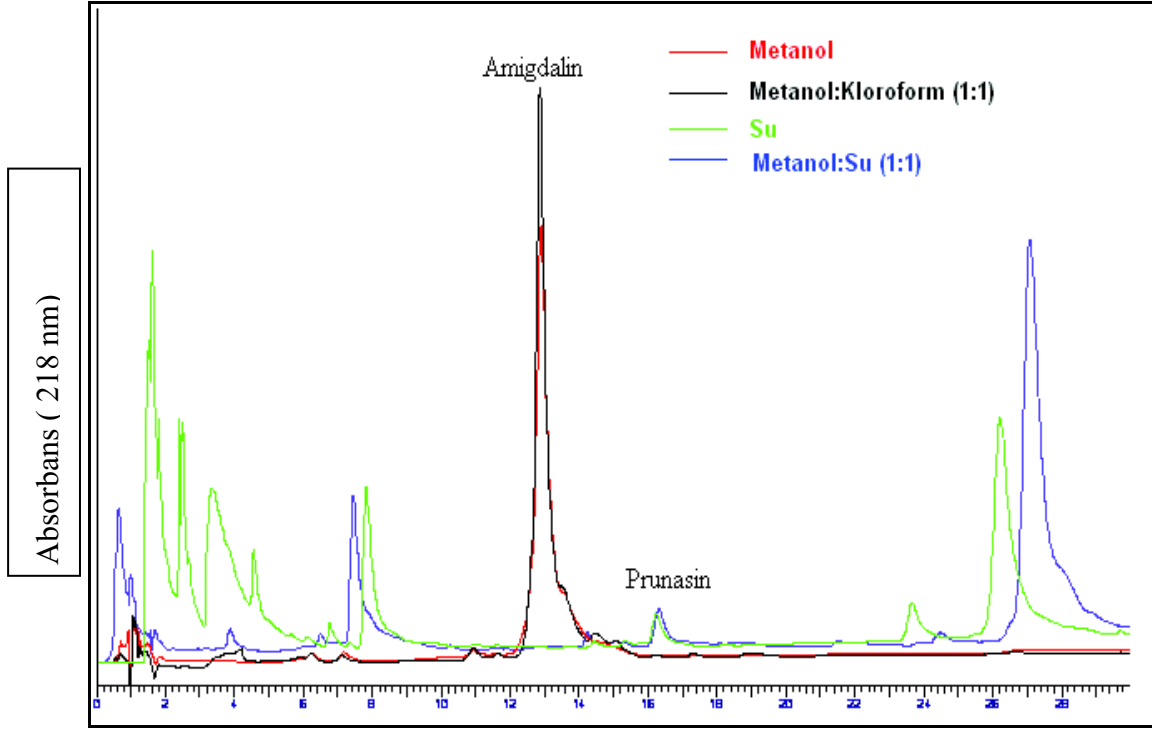
Fenolik bileşik miktar tayini Gallik aside eşdeğer gram olarak hesaplandı. Taflan çekirdeğinin metanol:diklormetan (3:1) ekstresinde toplam fenolik bileşik miktarı 30 mg/kg ekstre olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4. 18. Total fenolik bileşik için kullanılan kalibrasyon grafiği

#### 4.6. Taflan çekirdeğinin değişik çözücü sistemlerindeki amigdalin ve prunasin miktarları

Analiz, Bölüm 3.5’te özetlenen metot ile yapıldı. Ekstraksiyon işlemleri üç tekerrürlü olarak yapıldı. Taflan çekirdeğindeki siyanojenik glikozitlerin kantitatif tayininde sonuçlar; her bir çözücü sistemi için üç analizin ortalama değeri  $\pm$  standart sapma olarak hesaplandı. Elde edilen kromatogramlar ve g amigdalin-prunasin/kg taflan çekirdeği olarak değerlendirildi. HPLC kromatogramları Şekil 4.19’de hesaplanan amigdalin ve prunasin miktarları Tablo 4.7’de verilmiştir.



Şekil 4. 19. Taflan çekirdeğinin değişik çözücülerle elde edilen ekstraktlarının HPLC kromatogramları

Tablo 4. 7. Taflan çekirdeğinin siyanojenik glikozit (amigdalin/prunasin) içerikleri

Siyanojenik Glikozitler	Çözücü sistemi			
	Metanol	Metanol:su (1:1)	Metanol:Kloroform (1:1)	Su
Amigdalin (g/ kg)	85.18 ± 6,82	-	93.06 ± 11.73	-
Prunasin (g/kg)	0.58 ± 0.19	1.92 ± 0.11	4.25 ± 0.35	2.01 ± 0,41

Tablo 4.8 incelendiğinde, değişik çözücü sistemleri ile ekstrakte edilen Taflan çekirdeğinin amigdalin içeriğinin, sırasıyla 93,06 ve 85,18 g amigdalin/kg taflan çekirdeği değeriyle en fazla metanol:kloroform ve metanol sistemi ile elde edildiği görülmektedir. Metanol:su ve sadece su ile yapılan ekstraksiyonların amigdalin içermediği tespit edilmiştir.

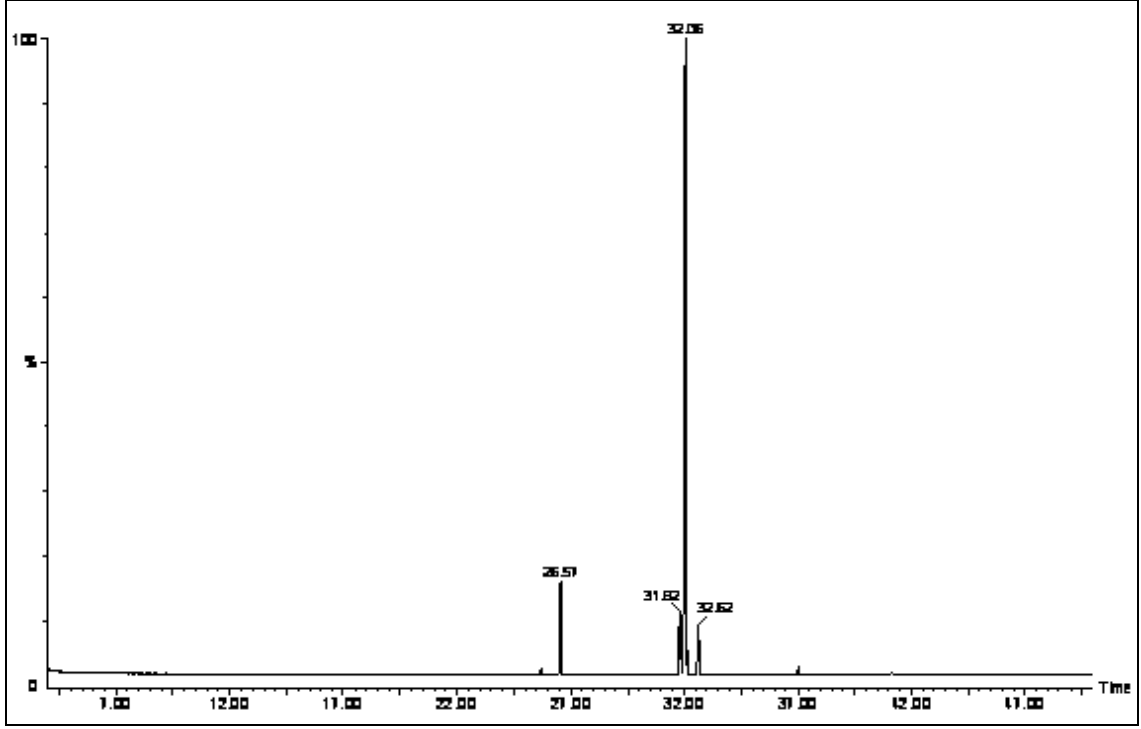
Prunasin ise; metanol:kloroform, su, metanol:su ve metanol çözücü sistemleri için sırası ile 4.25, 2.01, 1.92 ve 0.58 g/kg çekirdek hesaplanmıştır.

#### 4.7. Taflan Çekirdeğinin Yağ asidi Bileşenleri

Analiz Bölüm 3.7’de anlatılan yöntemle yapıldı. Elde edilen GC-MS kromatogramı Şekil 4.20’de verilmiştir. Tablo 4.8 ‘de Taflan çekirdeğinin sabit yağ içeriği kolonda alıkonma sürelerine göre sıralanarak verilmiştir.

Taflan çekirdeğinin sabit yağ asidi içeriği: % 72.92 oranında oleik asit, % 12.8 palmitik asit, % 6.5 linoleik asit, % 0.9 elaidik asit, % 4.46 stearik asit % 0.62 araşidik asit olarak belirlenmiştir.

Taflan çekirdeğinin yağ asidi bileşenleri incelendiğinde; insan sağlığı için esansiyel (vücut içinde sentezlenemeyen diyetle alınması gereken yağ asitleri) olan oleik asit, linoleik asit gibi yağların varlığı çekirdeklerin besin olarak tüketilebilirliğini ortaya koymaktadır.



Şekil 4. 20. Taflan çekirdeği yağ asitleri bileşenleri GC-MS kromatogramı

Tablo 4. 8. Taflan çekirdeğinin sabit yağ asitleri içeriği

Pik No	Rt*	Nümerik isim	Yaygın İsim	%
1	26.57	C16:0	Palmitik asit	12.8
2	31.82	C18:2	Linolik Asit	4.46
3	32.06	C18:1 c	Oleik asit	72.92
4	32.13	C18:1 t	Elaidik asit	0.9
5	32.62	C18:0	Stearik asit	4.46
6	37.01	C20:0	Araşidik asit	0.62

\*Rt: kolonda alıkonma süresi (dakika)

## 5. SONUÇ

Yapılan çalışmada; taflan çekirdeğinden siyanojenik glikozitler olan amigdalin ve prunasinin yanında bir fitosterol olan  $\beta$ -sitosterol, sukroz ve 3-O-metil-glukopiranoz izole edilmiş ve yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılmıştır.

İzole edilen siyanojenik glukozitler standart olarak kullanılarak yapılan HPLC çalışmasında farklı çözücü sistemleri ile elde edilen Taflan çekirdeği ekstraktlarının amigdalin ve prunasin içerikleri araştırılmıştır. Analiz sonuçlarına göre; çekirdek ekstraktlarından metanol:kloroform ve metanol ekstraktlarının sırasıyla 93,06 ve 85,18 gr amigdalin/kg içerdiği sulu ekstraktın ise amigdalin içermediği tespit edilmiştir. Prunasin içeriği ise şu şekildedir; metanol:kloroform, su, metanol:su ve metanol çözücü sistemleri için sırası ile 4.25, 2.01, 1.92 ve 0.58 g/kg.

Çekirdeklerin yağ asidi bileşenlerinin ise; % 72.92 oranında oleik asit, % 12.8 palmitik asit, % 6.5 linoleik asit, % 0.9 elaidik asit, % 4.46 stearik asit % 0.62 araşidik asit olduğu belirlenmiştir. Bu veriler literatür ile uyum içindedir (Erciyes ve ark., 1995).

Taflan çekirdeğinin ve saflaştırılan bileşiklerin antioksidan kapasitelerini belirleyebilmek için yapılan antioksidan aktivite testlerine göre bu bitkinin çekirdeğinin iyi bir antioksidan kapasiteye sahip olmadığı sonucuna varılmıştır. Yapısı aydınlatılan amigdalin ve prunasinin antioksidan kapasiteleri DPPH serbest radikal giderme aktivitesi ve indirgeme gücü aktivitesine göre araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, amigdalin ve prunasin bileşiklerin antioksidan aktiviteleri olmadığı görülmüştür.

Bu çalışmada yapısı aydınlatılan bileşiklerin antioksidan olarak değil belki başka biyolojik aktiviteleri araştırılması gereklidir. Çünkü başka bitkilerden saflaştırılan bazı siyanojenik glikozit bileşikleri anti kanser olarak kullanılmıştır (Rauws ve ark., 1982). Newmark ve arkadaşlarının beyanlarına göre 1980'li yıllarda bu tür glikozitlerin Amerika'da kemoterapi amaçla kullanıldığını beyan etmektedirler (Newmark ve ark., 1981).

## KANAKLAR

- Akkuş, İ., 1995. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri., Mimoza Yayınları., Konya.
- Alan J.J., H Peter, K Alan., Mc Phail, 1979. Sucrose: An assignment of the <sup>13</sup>C NMR parameters by selective decoupling. *Aust. J. Chem.*, (32), 2763-2766.
- Alasalvar, C., Wanasundara, U., Zhong, Y., ve Shahidi, F., 2006. Functional Lipid Characteristics of Cherry Laurel Seeds (*Laurocerasus Officinalis* Roem.), *Journal of Food Lipids* (13), 223–234.
- Awad, A. B., Downie, A. C., Fink, C. S., 2000. Inhibition of growth and stimulation of apoptosis by  $\beta$ -sitosterol treatment of human breast cancer MDA-MB-231 cells in culture. *Int. J. Mol. Med.*, (5), 541– 545.
- Awad, A. B., Fink, C. S., Williams, H., 2001. In vitro and in vivo (SCID mice) effect of phytosterols on the growth and dissemination of human prostate cancer PC-3 cells. *Eur. J. Cancer Prev.*, (10), 507–513.
- Awad, A. B., Hernandez, A. Y. T., Fink, C. S., Mendel, S. L., 1997. Effect of dietary phytosterols on cell proliferation and protein kinase C activity in rat colonic mucosa. *Nutr. Cancer.* (27), 210–215.
- Ayaz, FA., 2001. Changes in phenolic acids of cherry laurel (*Laurocerasus officinalis* ('Oxygemmis') fruit during maturation. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica.* (43), 23-26.
- Baytop, T. (1984). *Therapy with medicinal plants in Turkey (past and present)*. Istanbul: Istanbul University Publication No. 3255.
- Berenguer-Navarro, V., Giner-Galvaà N, R. M., Graneà-Teruel, N., 2002. Chromatographic Determination of Cyanoglycosides Prunasin and Amygdalin in Plant Extracts Using a Porous Graphitic Carbon Column. *J. Agric. Food Chem.* (50), 6960-6963.
- Berger, A.; Jones, P. J. H.; Abumweis, S. S., 2004. Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids Health Dis.*(3) 5-7.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* (26), 1199–1200.
- Brimer, L., Cicalini, A.R., Federici, F. ve Petruccioli, M. 1998. Amygdalin degradation by *Mucor circinelloides* and *Penicillium aurantiogriseum*: mechanisms of hydrolysis. *Arch. Microbiol.* (169), 106-112.
- Burtis, CA., Ashwood, ER., 1999. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company.Philadelphia, Pennsylvania.
- C.M. Liyana-Pathirana F. Shahidi C. Alasalvar, 2006. Antioxidant activity of cherry laurel fruit *Laurocerasus officinalis* Roem.) and its concentrated juice. *Food Chemistry.* (99),121–128.
- Carter, P., 1971. Spectrophotometric determination of serum iron the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). *Analytical Biochemistry*, (40), 450-458.
- Cheeke, P.R., 1995. Endogenous toxins and mycotoxin in forage grasses and their effects on livestock. *J. Ani. Sci.*, (73), 909-918.
- Chitnis, M.P., et al. , 1985. Studies on high-dose chemotherapy of amygdalin in murine P388 lymphocytic leukaemia and P815 mast cell leukaemia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 109, 208-209.
- Dawn, BM., Allan, DM., Colleen, MS., 1996. *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*.Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland.

- Deschner, E. E., Cohen, B. I., Raicht, R. F., 1982. The kinetics of the protective effect of  $\beta$ -sitosterol against MNU-induced colon neoplasia. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, (103), 49–54.
- Duh, P.D., Tu, Y., Yen, G.C., 1999. Antioxidant activity of water extract of harnng jjur (*Chrysanthemum morifolium* Ramat). *Lebnesmittel-Wissenschaft Und Technol.* (32), 269–277.
- Erciyes, A.T., Tüter, M., Kabasakal, O. S., Dandik, L., 1995. Seed oil chracteristic of *Onopordumtauricum* Willd. and *Prunus lauricerasus* L., *Fat Science Technology*, (10), 387-389.
- Erdemoglu, N., Küpeli, E., Yesilada, E., 2001. Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* (89), 123–129.
- Francisco., I.A., ve Pinotti., M.H.P., 2000. Cyanogenic Glycosides in Plants, *Brazilian Archives of Biology and Technology.* (43), 487-497.
- Fu, P., Zhao C., Tang, J., Shen, Y., XU, X., ve Zhang, W., 2008. New Flavonoid Glycosides and Cyanogenic Glycosides from *Dracocephalum peregrinum*. *Chem. Pharm. Bull.*(2), 207-210.
- Gomez, E., Burgos, L., Soriano, C. ve Marin, J. 1998. Amygdalin content in the seeds of several apricot cultivars. *J. Sci. Food Agric*, (77) 184-186.
- Janezic, S. A.; Rao, A. V., 1992. Dose-dependent effects of dietary phytosterols on epithelial cell proliferation of the murine colon. *Food Chem. Toxicol.* (30), 611–616.
- Ju, Y. H., Clausen, L. M., Allred, K. F., Almada, A. L., Helferich, W. G., 2004.  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitosterol glucoside, and a mixture of  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen- responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *J. Nutr.*,(134), 1145–1151.
- Liyana-Pathirana, C.M., Shaihidi, F., 2005. Antioxidant activity of commerical soft and hard wheat (*Triticum aestivum* L.) as affected by gastric pH condition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (53), 2433-2440.
- Mitsuda, H., Yuasumoto, K., Iwami, K., 1996. Antioxidation action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Journal of Japanese Society of Food and Nutrition (Eiyo to Shokur)*, (19), 210–214.
- Mizushlna, Y.,Takahashi, N., Ogawa, A., Tsurugaya, K., Koshino, H., Takemura, M., Yoshida, S., Matsukage, A., Sugawara, F., ve Sakaguchi, K., 1999. The Cyanogenic Glucoside, Prunasin (D-Mandelonitrile-  $\beta$ -D-Glucoside), Is a Novel Inhibitor of DNA Polymerase  $\beta$ 1. *J. Biochem.* (126), 430-436.
- Nakajima, N., Ubukata, M.,1998. Facila Synthesis of Cyanajen Glycosides ( R )-Prunasin, Linamarin and ( S)- Heterodendrin. *Biochem.* (62), 453-458.
- Newmark, J., Brady, R.O., Grimley, P.M., Gal, A.E., Waller, S.G. ve Thistlethwaite, J.R., 1981. Amygdalin (Laetrile) and prunasin  $\beta$ - glucosidases: Distribution in germ-free rat and in human tumor tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, (78), 6513-6516.
- Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucosamine, *Japan.J.Nutri.* (44), 307–315.
- Prakasam, A., Sethupathy, S., Pugalendi K.V., 2005. Antiperoxidative and antioxidant effects of Casearia Esculante root extract in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Yale J Biol Med.* (78), 15-23.

- Raicht, R. F.; Cohen, B. I.; Fazzini, E. P., Sarwal, A. N. ve Takahashi, M., 1980. Protective effect of plant sterols against chemically induced colon tumors in rats. *Cancer Res.* (40), 403–405.
- Rauws, A.G., Olling, M. ve Timmerman, A. 1982. The pharmacokinetics of amygdalin. *Arch. Toxicol.* (3-4), 311-319.
- Shahidi, F., ve Naczk, M., 2004. Phenolics in food and nutraceuticals, Boca Raton, FL: CRC Press , 60-61.
- Slinkard, K., Singleton, V.L., 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture.* (28), 49–55.
- Syrigos, K.N., Busza, G.R. ve Epenetos, A.A.1998. In vitro cytotoxicity following specific activation of amygdalin by  $\beta$ - Glucosidase conjugated to a bladder cancer-associated monoclonal antibody. *Int. J.Cancer.* (78), 712-719.
- Var M, Ayaz FA, 2004. Changes in sugar composition in cherry laurel (*CV oxygemmis*) fruit during development and ripening. *Pakistan Journal of Botany* (36), 389-394.
- Wang, S., Furuno, T., ve Cheng, Z., 2004. Study of extraction of phytosterol from masson pine raw tall oil, *Journal of Wood Science*, 48 (6). 505-511
- Zhao, Y., Chang, S. K. C., Qu, G., Li, T., Cui, H., 2009.  $\beta$ -Sitosterol Inhibits Cell Growth and Induces Apoptosis in SGC-7901 Human Stomach Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.*,(57), 5211–5218.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Nusret GENÇ  
 Doğum Tarihi ve Yeri: 20.03.1984 / Ereğli  
 Medeni Hali : Bekar  
 Yabancı Dili : İngilizce  
 Telefon :05355908562  
 Faks : -  
 e-mail : nusretgenc@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	GOPÜ. Fen Bilimleri Enst. Kimya ABD	-
Lisans	GOPÜ Fen Edebiyat Fak. Kimya	23.05.2007
Lise	Cumhuriyet Lisesi	20.06.2001

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev

### Yayımlar

Zeren, İ., Elmastaş, M., **Genç, N.**, Aktürk, E., 2009. Alıç Meyvesinin (*Crataegus xyacantha*) Antioksidan Aktivitesinin İncelenmesi. 23. Ulusal Kimya Kongresi, Cumhuriyet Üniversitesi.

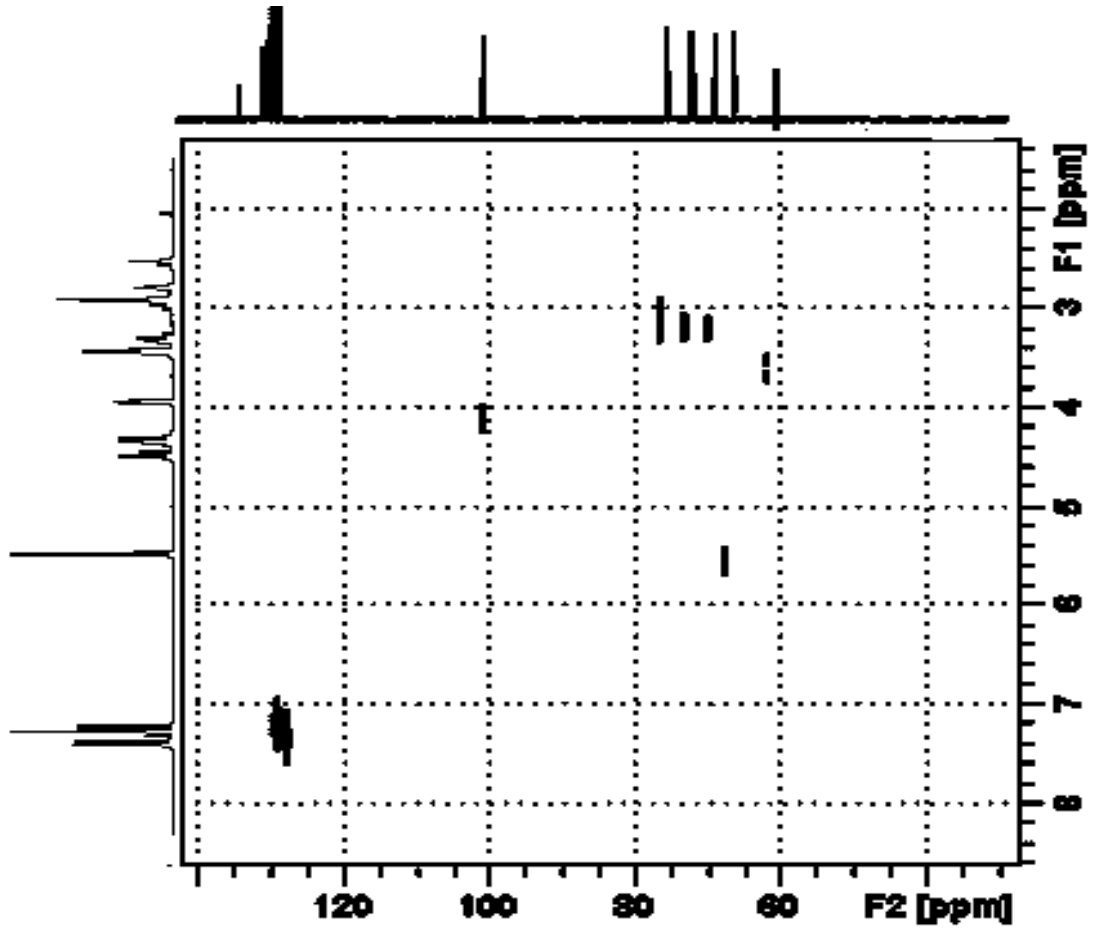
Çinkılıç, S., Elmastaş, M., **Genç, N.**, 2009. Papatyanın (*Matricaria chamamomilla*) Antioksidan Kapasitesinin İncelenmesi. 23. Ulusal Kimya Kongresi, Cumhuriyet Üniversitesi.

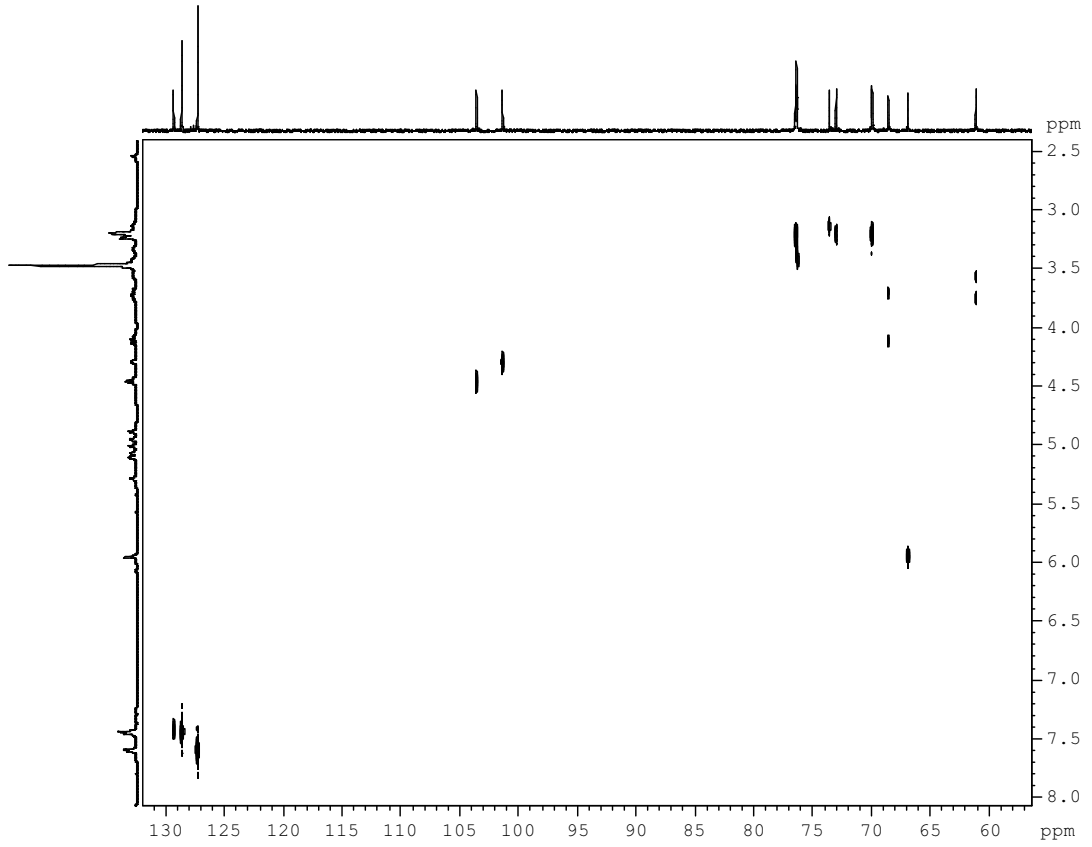
Kırış, T., Elmastaş, M., **Genç, N.**, 2009. 23. Böğürtlen (*Rubus fruticosus*) Bitkisinin Antioksidan Kapasitesinin Araştırılması. Ulusal Kimya Kongresi, Cumhuriyet Üniversitesi.

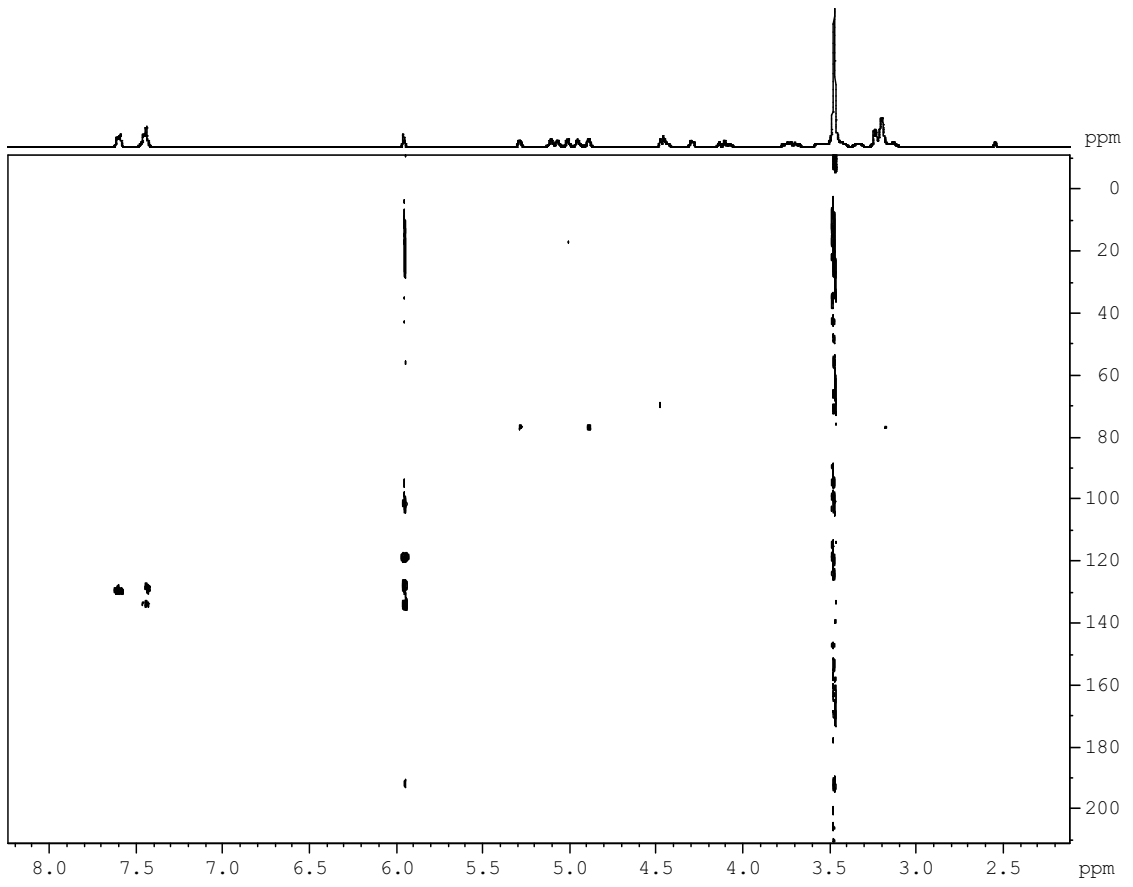
Bayan, Y., Işıldak, Ö., Elmastaş, M., **Genç, N.**, 2009. Meyan Kökünün Antioksidan ve Radikal Giderme Aktiviteleri. 23. Ulusal Kimya Kongresi, Cumhuriyet Üniversitesi.

EKLER

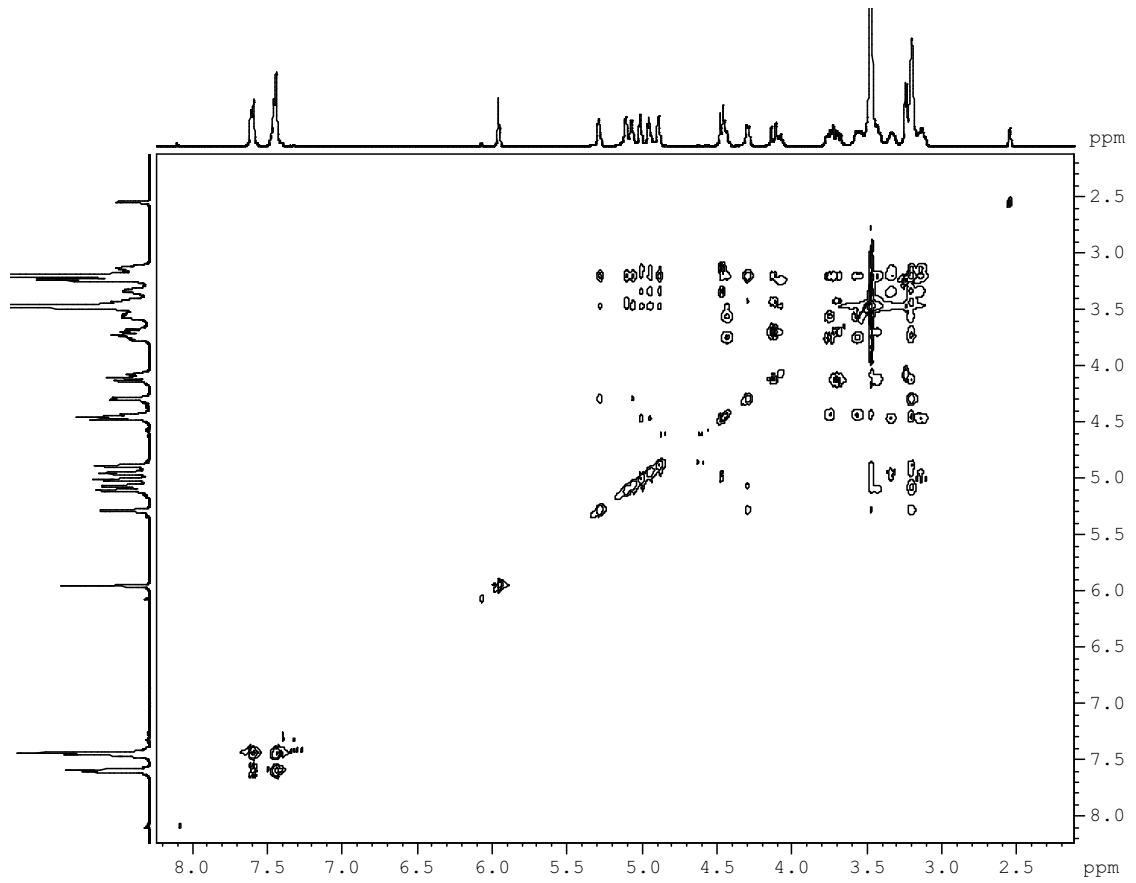
EK-1 Prunasinin HETCOR Spektrumu

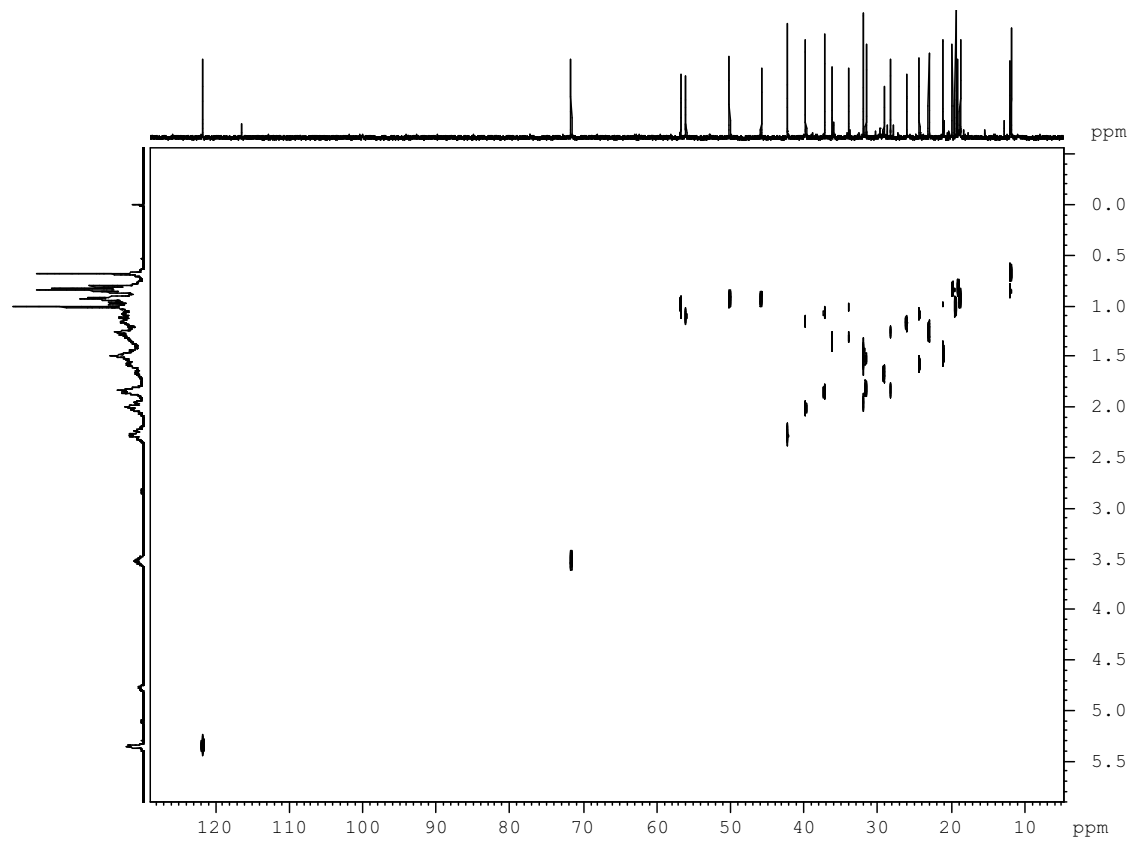


**EK-2 Amigdalın HETCOR Spektrumu**

**EK-3 Amigdalın HMBC spektrumu**

## EK-4 Amigdalín TOCSY spektrumu



**EK-5  $\beta$ -Sitosterol HETCOR spektrumu**

EK-6  $\beta$ -Sitosterol TOCSY spektrumu