



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN
FENOLİK BİLEŞİKLERİN DERİŞİKLENDİRİLMESİ**

**Nagihan KÖKYAR
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Esmâ TÜTEM**

Ekim, 2012

İSTANBUL



**İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN
FENOLİK BİLEŞİKLERİN DERİŞİKLENDİRİLMESİ**

**Nagihan KÖKYAR
Kimya Anabilim Dalı
Analitik Kimya Programı**

**Danışman
Prof. Dr. Esmâ TÜTEM**

Ekim, 2012


İSTANBUL

Bu çalışma 15/11/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı Analitik Kimya programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



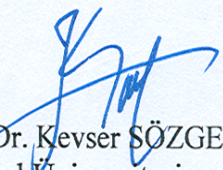
Prof. Dr. Esmâ TÜTEM (Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



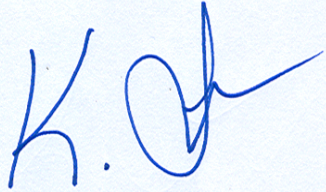
Prof. Dr. Reşat APAK
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK
İstanbul Teknik Üniversitesi
Fen-Edebiyat Fakültesi



Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi



Doç. Dr. Kubilay GÜÇLÜ
İstanbul Üniversitesi
Mühendislik Fakültesi

Bu alışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği'nin 11649 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim sırasında ve tez çalışmalarım boyunca gösterdiği her türlü destek, anlayış ve yardımdan dolayı çok değerli hocam Prof. Dr. Esmâ TÜTEM'e en içten dileklerle teşekkür ederim.

Bu çalışma boyunca yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Doç. Dr. Kevser SÖZGEN BAŞKAN'a ve çalışma arkadaşlarım Sevinç ENCU, Türkan VURAL, Olcay ÇETİN, Şeyda KARAMAN, Nihat ÖZER ve Oben ARSLAN'a çok teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca yanımda olup desteklerini benden esirgemeyen, bu çalışmanın başından sonuna kadar her anlamda bana yardımcı olan sevgili aileme, arkadaşım Eylem YALDIZLI'ya, çalışmalarım süresince her türlü laboratuvar imkânı sağlayan Analitik Kimya Anabilim Dalı'na, bu bölümdeki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam için gerekli portakal suyu endüstrisi atıklarını temin etmem konusunda yardımcı olan Sayın Ebru AKDAĞ'a, MEYED'e, Sayın Birol SAYGI'ya ve Konfrut Gıda San. ve Tic. A.Ş.'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tezimle aynı adı taşıyan 11649 sayılı projeme maddi destek sağlayan İ.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

Ekim, 2012

NAGİHAN KÖKYAR

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	v
TABLO LİSTESİ.....	ix
SEMBOL LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR	3
2.2. DOĞAL ANTİOKSİDANLAR	4
2.2.1. C Vitamini	4
2.2.2. E Vitamini.....	5
2.2.3. Karotenoidler	5
2.2.4. Fenolik Bileşikler.....	6
2.2.4.1. Flavonoidler	7
2.2.4.2. Fenolik asitler	11
2.2.4.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)	12
2.3. BİTKİSEL ATIKLARDAN DOĞAL ANTİOKSİDAN ELDESİ	13
2.3.1. Ekstraksiyon Yöntemleri	13
2.3.1.1. Çözücü Ekstraksiyonu (Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu).....	14
2.3.1.2. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu	15
2.3.1.3. Soxhlet Ekstraksiyonu	15
2.3.1.4. Ultrason Yardımıyla Ekstraksiyon	15
2.3.1.5. Mikrodalga Yardımıyla Ekstraksiyon.....	16
2.3.1.6. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu	16

2.3.1.7. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu.....	17
2.3.1.8. Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction, SPE)	17
2.3.1.9. Mikroekstraksiyon	17
2.3.2. Moleküler Baskılama Tekniği, Moleküler Baskılı Polimerler	18
2.3.3. Çeşitli Atıklardan Doğal Antioksidan Eldesi Çalışmaları	20
2.4. PORTAKAL MEYVESİ.....	21
2.4.1. Portakalın İçeriği ve Sağlık Üzerine Etkileri.....	22
2.4.2. Portakal Suyu Üretimi	24
2.4.3. Portakal Suyu Endüstrisi Atıklarını Değerlendirme Çalışmaları.....	26
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	28
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	28
3.2. KİMYASAL MADDELER	28
3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması	29
3.2.2. Tetrahidrofuranın Kurutulması.....	29
3.3. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN HAZIRLANMASI.....	29
3.3.1. Moleküler Baskılı Polimerlerin Yıkınması	30
3.4. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARININ ANALİZE HAZIRLANMASI.....	31
3.4.1. Portakal Suyu Endüstrisi Atıklarının Kurutulması	31
3.4.2. Kurutulmuş Portakal Suyu Endüstrisi Atıklarının Ekstraksiyonu	31
3.5. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARININ TOPLAM ANTIOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ	32
3.6. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ.....	32
3.7. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERE GERİ BAĞLAMA ÇALIŞMALARI.....	33
3.7.1. Moleküler Baskılı Polimerlerin Şartlandırılması.....	33
3.7.2. Moleküler Baskılı Polimerlere Standart Çözeltilerinin Yüklenmesi.....	33
3.8. SENTETİK ANTIOKSİDAN KARIŞIMI İLE KATI FAZ EKSTRAKSİYONU (SPE) ÇALIŞMALARI.....	34

3.9. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN AYRILMASI (DERİŞİKLENDİRİLMESİ) ÇALIŞMALARI.....	34
3.9.1. Hazırlanan MIP'ler Kullanılarak	34
3.9.2. Katı Faz Ekstraksiyonu.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. UYGUN EKSTRAKSİYON ÇÖZÜCÜSÜNÜN SEÇİLMESİ.....	36
4.2. CUPRAC YÖNTEMİNİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI VE TEAC KATSAYILARININ BELİRLENMESİ.....	37
4.3. HPLC YÖNTEMİNİN ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI	38
4.4. SENTEZLENEN MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARININ YÜKLENMESİ.....	39
4.5. SENTETİK ANTİOKSİDAN KARIŞIMI İLE YAPILAN SPE ANALİZ SONUÇLARI	51
4.6. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARININ ANALİZ SONUÇLARI .	58
4.6.1. Portakal Suyu Endüstrisi Atığı Ekstraktının Toplam Antioksidan Kapasitesi	58
4.6.2. Portakal Suyu Endüstrisi Atığı Ekstraktı Metanol:Distile Su Fazının Kromatografik Analizi.....	58
4.6.3. Portakal Suyu Endüstrisi Atıklarından Fenolik Bileşiklerin Ayrılması (Derişiklendirilmesi) Çalışmaları	59
4.6.3.1. Hazırlanan MIP'ler Kullanılarak	59
4.6.3.2. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE).....	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	75
KAYNAKLAR	78
ÖZGEÇMİŞ	86

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1: C vitamininin kimyasal yapısı	5
Şekil 2.2: α -tokoferol'ün kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.3: β -karoten, likopen ve lutein'in kimyasal yapıları.....	6
Şekil 2.4: Flavonoidlerin genel yapısı	8
Şekil 2.5: Apigenin, luteolin ve krisin'in kimyasal yapıları	8
Şekil 2.6: Kuersetin, kamferol, mirisetin ve izoramnetin'in kimyasal yapıları.....	9
Şekil 2.7: Kateşin, epikateşin, epigallokateşin'in kimyasal yapıları	9
Şekil 2.8: Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin'in kimyasal yapıları (Rha-Glu: Ramnaglukozil).....	10
Şekil 2.9: Genistein ve daidzein'in kimyasal yapıları	10
Şekil 2.10: <i>p</i> -kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit'in kimyasal yapıları	11
Şekil 2.11: Gallik, protokateşuik, vanilik asit'in kimyasal yapıları	12
Şekil 2.12: Kuersetin baskılanmış MIP oluşumunun şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.13: Portakal meyvesinin kesiti	22
Şekil 2.14: Portakal suyu üretimi akış şeması.....	25
Şekil 4.1: 20 kez seyreltilmiş portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktlarının spektrumları.....	36
Şekil 4.2: 10 kez seyreltilmiş portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktlarının spektrumları.....	37
Şekil 4.3: Çeşitli antioksidan standartlarını içeren sentetik karışımın kromatogramı	39
Şekil 4.4: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP2 ve NIP2 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	40
Şekil 4.5: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP2 ve NIP2 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	40
Şekil 4.6: Tetrahidrofuranlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP2 ve NIP2 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	41

Şekil 4.7: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP3 ve NIP3 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	41
Şekil 4.8: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP3 ve NIP3 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	42
Şekil 4.9: Tetrahidrofuranlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP3 ve NIP3 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	42
Şekil 4.10: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP4 ve NIP4 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	43
Şekil 4.11: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP4 ve NIP4 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	43
Şekil 4.12: Tetrahidrofuranlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP4 ve NIP4 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	44
Şekil 4.13: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	44
Şekil 4.14: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	45
Şekil 4.15: Asetonitrilli 5×10^{-5} M hesperidin çözeltisi, hesperidin çözeltisinin MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	45
Şekil 4.16: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringenin çözeltisi, naringenin çözeltisinin MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	46
Şekil 4.17: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP6 ve NIP6 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	46
Şekil 4.18: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP6 ve NIP6 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	47
Şekil 4.19: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringenin çözeltisi, naringenin çözeltisinin MIP6 ve NIP6 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	47
Şekil 4.20: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	48
Şekil 4.21: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	48
Şekil 4.22: Tetrahidrofuranlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	49

Şekil 4.23: Asetonitrilli 5×10^{-5} M hesperidin çözeltisi, hesperidin çözeltisinin MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	49
Şekil 4.24: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP8 ve NIP8 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	50
Şekil 4.25: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP8 ve NIP8 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	50
Şekil 4.26: Tetrahidrofuranlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP8 ve NIP8 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	51
Şekil 4.27: SPE kartuşundan 1., 2., 3. ve 4. kez geçirilen sentetik antioksidan karışımının spektrumları	52
Şekil 4.28: %20, %22, %25 ve %30 DMF eluatlarının spektrumları.....	53
Şekil 4.29: %22 DMF eluatının kromatogramı	53
Şekil 4.30: %25 DMF eluatının kromatogramı	54
Şekil 4.31: %30 DMF eluatının kromatogramı	54
Şekil 4.32: Metanol ile yapılan 1. (5 kez seyreltik), 2. (10 kez seyreltik), 3. (20 kez seyreltik), 4. (5 kez seyreltik), 5. ve 6. elüsyonun spektrumları	55
Şekil 4.33: Metanol ile yapılan 1. elüsyonun kromatogramı.....	55
Şekil 4.34: Metanol ile yapılan 2. elüsyonun kromatogramı.....	56
Şekil 4.35: Metanol ile yapılan 3. elüsyonun kromatogramı.....	56
Şekil 4.36: Metanol ile yapılan 4. elüsyonun kromatogramı.....	56
Şekil 4.37: Metanol ile yapılan 5. elüsyonun kromatogramı.....	57
Şekil 4.38: Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının kromatogramı	59
Şekil 4.39: %30 metanol-%70 asetonitrilli ekstrakt, ekstraktın MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	60
Şekil 4.40: %30 metanol-%70 asetonitrilli ekstrakt, ekstraktın MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları	60
Şekil 4.41: SPE kartuşundan 1., 2. ve 3. kez geçirilen portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının spektrumları	61
Şekil 4.42: SPE kartuşundan 1. ve 2. kez geçirilen 0,01 N HCl'in spektrumları	62
Şekil 4.43: SPE kartuşundan 1. kez geçirilen 0,01 N HCl'in kromatogramı	62
Şekil 4.44: SPE kartuşundan 2. kez geçirilen 0,01 N HCl'in kromatogramı	63

Şekil 4.45: 1., 2. ve 3. %0,1 HCl-%20 metanol eluatının spektrumları	63
Şekil 4.46: 1. %0,1 HCl-%20 metanol eluatının kromatogramı.....	64
Şekil 4.47: 2. %0,1 HCl-%20 metanol eluatının kromatogramı.....	64
Şekil 4.48: 3. %0,1 HCl-%20 metanol eluatının kromatogramı.....	64
Şekil 4.49: 1. ve 2. %20 metanol eluatının spektrumları.....	65
Şekil 4.50: 1. %20 metanol eluatının kromatogramı	65
Şekil 4.51: 2. %20 metanol eluatının kromatogramı	66
Şekil 4.52: 1., 2., 3., 4. ve 5. %100 metanol eluatının spektrumları.....	66
Şekil 4.53: 1. %100 metanol eluatının kromatogramı	67
Şekil 4.54: 2. %100 metanol eluatının kromatogramı	67
Şekil 4.55: 3. %100 metanol eluatının kromatogramı	67
Şekil 4.56: 4. %100 metanol eluatının kromatogramı	68
Şekil 4.57: 5. %100 metanol eluatının kromatogramı	68
Şekil 4.58: SPE kartuşundan geçirilen 3. ve 4. %100 metanol eluatları karışımının spektrumu	69
Şekil 4.59: 1. ve 2. %30 DMF eluatının spektrumları.....	70
Şekil 4.60: 2. %30 DMF eluatının kromatogramı	70
Şekil 4.61: %100 metanol ile yapılan 1. ve 2. elüsyonun spektrumu.....	71
Şekil 4.62: %100 metanol ile yapılan 1. elüsyonun kromatogramı.....	71
Şekil 4.63: %100 metanol ile yapılan 2. elüsyonun kromatogramı.....	72
Şekil 4.64: SPE kartuşundan geçirilen 2. %30 DMF eluatının spektrumu.....	72
Şekil 4.65: 1., 2. ve 3. %22 DMF eluatının spektrumları	73
Şekil 4.66: 3. %22 DMF eluatının kromatogramı	73

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1: Reaktif oksijen, azot, klor türleri	3
Tablo 2.2: Portakal meyvesindeki bazı bileşenlerin derişimleri	23
Tablo 2.3: Türkiye’de yıllara göre üretilen portakal, meyve suyu ve konsantre miktarları	26
Tablo 3.1: Hazırlanan moleküler baskılı polimerlerin kalıp molekül (KM):monomer (M):çapraz bağlayıcı (ÇB) mol oranları ve miktarları	30
Tablo 4.1: Çeşitli antioksidan standartları için CUPRAC yöntemi verileri ve TEAC değerleri.....	38
Tablo 4.2: Çeşitli antioksidan standartlarının HPLC verileri.....	38
Tablo 4.3: Sentetik antioksidan karışımı eluatlarının içerdiği bileşenlerin derişimi (mg/L).....	57
Tablo 4.4: Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazı ve aseton fazının toplam antioksidan kapasiteleri (μmol troloks g^{-1} kuru madde) ^a	58
Tablo 4.5: Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının içerdiği bileşenlerin derişimi (mg g^{-1} kuru madde) ^a	59
Tablo 4.6: Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazı eluatlarının içerdiği bileşenlerin derişimi ($\text{mg}/100 \text{ g}$)	69
Tablo 4.7: 3. ve 4. %100 metanol eluatları karışımı ve eluatlarının içerdiği bileşenlerin derişimi ($\text{mg}/100 \text{ g}$)	74
Tablo 5.1: Portakal suyu endüstrisi atıklarında HPLC çalışmalarının karşılaştırılması	76

SEMBOL LİSTESİ

MIP	: Moleküler baskılı polimer
BHA	: Bütillenmiş hidroksianizol
BHT	: Bütillenmiş hidroksitoluen
CUPRAC	: Bakır(II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
PG	: Propil gallat
TBHQ	: Tersiyer bütihidrokinon
SPE	: Katı faz ekstraksiyonu
CPE	: Bulutlanma noktası ekstraksiyonu
ABS	: Sulu iki fazlı sistemlerde ekstraksiyon
HLE	: Homojen sıvı-sıvı ekstraksiyonu
IL	: İyonik sıvı
CPLLE	: Sürekli akış sıvı-sıvı ekstraksiyonu
SLM	: Desteklenmiş sıvı membran
MMLLE	: Mikro gözenekli membran sıvı-sıvı ekstraksiyonu
UAE	: Ultrason yardımıyla ekstraksiyon
MAE	: Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon
HÇE	: Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
scfe	: Süper kritik akışkan ekstraksiyonu
SDVB	: Stiren-divinilbenzen
MIT	: Moleküler baskılama tekniği
AA	: Akrilamid
AIBN	: 2,2-Azobisisobutironitril
EDMA	: Etilen glikol dimetakrilat
THF	: Tetrahidrofuran

NIP	: Baskısız polimer
KM	: Kalıp molekülü
M	: Monomer
ÇB	: Çapraz bağlayıcı
GF/PET	: Glass fiber/poliester
PTFE	: Politetrafloroetilen
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite
DMF	: N,N-Dimetilformamid

ÖZET

PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN DERİŞİKLENDİRİLMESİ

Antioksidan özelliklerinden dolayı fenolik bileşikler kanser, kalp-damar rahatsızlıkları, katarakt gibi hastalıklara yol açan, kararsız moleküller olan serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesini sağlarlar. Portakal, polifenolik bileşiklerin önemli bir kaynağıdır. Portakaldaki fenolik bileşiklerin büyük bir kısmı hidroksisinnamik asitler ve flavanonların baskın olduğu flavonoidlerdir.

Sentetik antioksidanlar yerine doğal antioksidanların kullanımının önem kazanmasından beri gıda işleme yan ürünlerinden (atıklarından) antioksidanların geri kazanımı çalışmaları artmıştır. Toplam meyve ağırlığının %50'sini oluşturabilen atıkların büyük miktarını narenciye endüstrisi üretir. Kabuklar doğal flavonoidlerin önemli bir kaynağıdır ve tüketilebilir kısımlara oranla daha fazla fenolik bileşik içerirler.

Bu çalışmada portakal suyu endüstrisi atığı öncelikle toplam antioksidan kapasite ve fenolik bileşenler açısından değerlendirilmiştir. Bu amaçla toplam antioksidan kapasite için CUPRAC, fenolik bileşenlerin belirlenmesi ve miktarlandırılması için ters-faz HPLC yöntemlerinden yararlanılmıştır. Toplam antioksidan kapasite portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:su fazı için $78,1 \pm 3,0$ μmol troloks g^{-1} kuru madde, aseton fazı için $2,0 \pm 0,1$ μmol troloks g^{-1} kuru madde olarak bulunmuştur. HPLC ile başlıca fenolik bileşikler naringin $0,144 \pm 0,012$ mg g^{-1} kuru madde ve hesperidin $0,177 \pm 0,013$ mg g^{-1} kuru madde olarak belirlenmiştir.

Fenolik bileşiklerden miktarı en fazla olan flavanon türevi naringin ve hesperidin diğer az miktarlardaki bileşenlerden ayrılması (derişiklendirilmesi) çalışmalarının ticari DPA-6S katı faz ekstraksiyon kartuşu ve çeşitli monomerlerle ve çeşitli oranlarda

hazırlanan MIP'lerle gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. SPE kartuşuyla naringin ve hesperidin diğer bileşiklerden tamamen ayrılırken, birbirinden büyük lde ayrılmıştır. Sentezlenen sekiz MIP'den sadece ikisi düşük adsorplama kapasitesine sahip olduğundan ayırım alışmaları MIP'lerle yapılmamıştır.

SUMMARY

CONCENTRATION OF PHENOLIC COMPOUNDS FROM ORANGE JUICE INDUSTRY WASTES

Because of their antioxidant properties phenolic compounds help to neutralize free radicals, which are unstable molecules that are linked to the development of a number of degenerative diseases including cancer, cardiovascular disease and cataracts. Orange is an important source of polyphenolic compounds. A major part of phenolic compounds in orange are hydroxycinnamic acids and flavonoids, among which flavanones are predominant.

Recovery studies of antioxidants from by-products (wastes) of food processing plants have increased since the replacement of synthetic antioxidants by natural ones has gained importance. Citrus industry produces large quantities of by-products which may account for up to 50% of the total fruit weight. The peels are an abundant source of natural flavonoids, and contain higher amount of phenolics compared to the edible portions.

In this study, the orange juice industry waste primarily evaluated in terms of total antioxidant capacity and phenolic compounds. For this purpose, CUPRAC method for the total antioxidant capacity and reverse-phase HPLC method for identification and quantitation of phenolic compounds were used. Total antioxidant capacity of orange juice industry waste extract methanol:water phase was obtained as $78.1 \pm 3.0 \mu\text{mol trolox g}^{-1}$ dry weight, of acetone phase was obtained $2.0 \pm 0.1 \text{ mmol trolox g}^{-1}$ dry weight. Mainly phenolic compounds, naringin and hesperidin were determined by HPLC as naringin $0.144 \pm 0.012 \text{ mg g}^{-1}$ dry weight and hesperidin $0.177 \pm 0.013 \text{ mg g}^{-1}$ dry weight.

Separation (preconcentration) studies of naringin and hesperidin from the other compounds with small quantities and also each other were aimed to carry out on commercial DPA-6S SPE cartridges and MIPs prepared by various monomers and ratios. Naringin and hesperidin were separated from each other highly while were completely separated from other compounds with SPE cartridges. Because of only two of synthesized eight MIPs had low adsorption capacity, separation studies weren't done with MIPs.

1. GİRİŞ

Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan serbest radikal türlerinin, organizmada var olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenememesi durumunda oluşan “oksidatif stres” DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açarlar. Antioksidanlar, bu serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırırlar [1, 2].

Tarımsal ve endüstriyel atıklar doğal antioksidanların önemli kaynaklarıdır [3]. Bütillenmiş hidrokşianizol (BHA) ve bütillenmiş hidrokşitoluen (BHT) gibi sentetik antioksidanların karsinogenik olabilmeleri, karaciğer hasarına yol açabilmeleri gibi nedenlerle bitkiler ve yan ürünlerinden doğal ve düşük maliyetli antioksidanların ekstrakte edilerek gıdaların, özellikle yağların korunmasında kullanılabilmesine yönelik çalışmalar son yıllarda artmıştır [4]. Toplam meyve ağırlığının %50'sini oluşturabilen çekirdek ve kabuk gibi atıkların büyük miktarını narenciye endüstrisi üretir. Uygun şekilde yararlanılırsa narenciye atıkları fenolik bileşiklerin önemli bir kaynağı olabilir. Kabuklar iyi bir doğal flavonoid kaynağıdır ve yenilebilir kısımlara oranla daha fazla fenolik içerirler [5]. Gorinstein ve arkadaşları, limon, portakal ve greyfurt kabuklarındaki toplam fenolik içeriğin soyulmuş meyvelerdeki içerikten %15 daha fazla olduğunu rapor etmişlerdir [6].

Çeşitli bitkisel atıklardan çeşitli antioksidan (özellikle fenolik) bileşiklerin elde edilmesi çalışmalarında ekstraksiyon teknikleri kullanılmaktadır [7]. SPE’u da mevcut ticari kartuşlar veya MIP’lerle yaygın uygulamaya sahiptir [8].

Moleküler baskılama tekniği, bir kalıp molekülü etrafında fonksiyonel monomerlerin kovalent veya nonkovalent etkileşimlerle düzenlenmesi ve sonrasında uygun bir işlem süreci ile kimyasal fonksiyona sahip katı malzemelerin oluşturulmasını amaçlamaktadır.

İşlem sonrasında kalıp molekülün uzaklaştırılması ile yapıda kalıp molekülüne özgü oyuk bölgeler oluşmakta ve seçimli ayırma, kimyasal tayin ve kataliz gibi işlemler için ideal bir malzeme elde edilmektedir [8-11].

Bu çalışmada meyve konsantresi üretimi yapan Konfrut Gıda San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilen portakal suyu endüstrisi atığı öncelikle toplam antioksidan kapasite ve fenolik bileşenler açısından değerlendirilmiştir. Bu amaçla toplam antioksidan kapasite için CUPRAC, fenolik bileşenlerin belirlenmesi ve miktarlandırılması için ters-faz HPLC yöntemlerinden yararlanılmıştır. Fenolik bileşiklerden miktarı en fazla olan flavanon türevi naringin ve hesperidinin diğer az miktarlardaki bileşenlerden ayrılması (derişiklendirilmesi) çalışmaları ticari DPA-6S katı faz ekstraksiyon kartuşu ve çeşitli monomerlerle, çeşitli oranlarda hazırlanan MIP'lerle incelenmiştir.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. SERBEST RADİKALLER VE ANTİOKSİDANLAR

Serbest radikaller, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllerdir. Bu tip maddeler, eşleşmemiş elektronları sebebiyle genellikle kararsız ve çok reaktiftirler. Hayvanlarda ve insanlarda fizyolojik ve patolojik koşullarda oluşan reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species, ROS), reaktif azot türleri (reactive nitrogen species, RNS) ve reaktif klor türleri (reactive chlorine species) organizmadaki başlıca serbest radikallerdir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1: Reaktif oksijen, azot, klor türleri

Reaktif Oksijen Türleri	Reaktif Azot Türleri	Reaktif Klor Türü
Süperoksit anyonu ($O_2^{\cdot-}$)	Azot oksit (NO)	Hipoklorik asit (HOCl)
Hidrojen peroksit (H_2O_2)	Azot dioksit ($\cdot NO_2$)	
Peroksil radikali ($ROO\cdot$)	Peroksinitrit (ONOO)	
Hidroksil radikali ($OH\cdot$)		
Singlet oksijen (1O_2)		

Bu türlerin, organizmada var olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenememesi durumunda oluşan “oksidatif stres” DNA ve hücre membranları gibi duyarlı biyolojik yapıların oksidatif hasarına neden olan radikalik zincir reaksiyonlarını başlatırlar. Bunun sonucunda başta kanser olmak üzere, kalp-damar hastalıkları ve şeker hastalığı gibi hastalıklara yol açarlar. Antioksidanlar, bu serbest radikallerin olumsuz etkilerini ortadan kaldırırlar [1, 2].

Antioksidanlar, yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir [12].

Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan zararlı maddelerdir. Prooksidan terimi, reaktif türler için kullanılan bir terimdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek az zararlı veya zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı, sağlıklı bir yaşam için antioksidanları önemli kılmaktadır [13].

Antioksidanlar; vücut hücreleri tarafından üretildikleri gibi, gıdalar yoluyla da alınabilmektedir. Gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı serbest radikallerden koruyan başlıca doğal antioksidanlar, esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri) ve fenolik bileşiklerdir. Yapılan pek çok araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır [14].

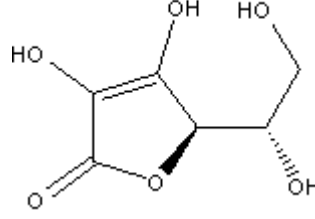
Antioksidanlar, gıdalarda doğal olarak buldukları gibi, gıda endüstrisinde ürünlerin kalitesini korumak ve besin değerlerini muhafaza etmek amacıyla sonradan da eklenebilirler. Bu amaçla kullanılan bütillenmiş hidroksianizol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat (PG), tersiyer bütihidrokinon (TBHQ) gibi yapay antioksidanlar besinlerin acılaşmasını, çürümesini geciktirici özelliğe sahip kimyasal maddelerdir. Ortamda pek az miktarlarda bulunsalar bile etkin olan maddelerdir.

2.2. DOĞAL ANTIOKSİDANLAR

2.2.1. C Vitamini

C vitamini (Şekil 2.1), diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilir ve serbest radikalleri doğrudan söndürebilen güçlü bir antioksidandır [15]. Özellikle çilek, papaya, portakal, kivi, greyfurt, kavun, mango gibi meyvelerde, brokoli, Brüksel lahanası, kırmızı ve yeşil biber, domates, lahana, patates, karnabahar gibi

sebzelerde, portakal suyu, domates suyu gibi meyve sularında bol miktarda bulunmaktadır [16].

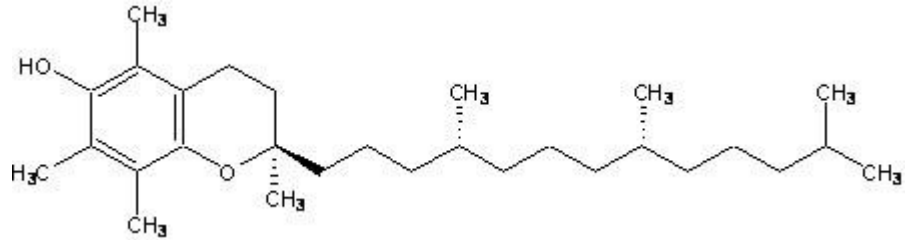


Şekil 2.1: C vitamininin kimyasal yapısı

2.2.2. E Vitamini

E vitamini α -, β -, γ -, δ - tokoferoller ve tokotrienoller içerir. α -tokoferol, özellikle D- α -tokoferol (Şekil 2.2) en yüksek biyolojik aktiviteye sahip tokoferoldür [17, 18]. Zincir reaksiyonlarını sonlandıran bir peroksil radikal süpürücü olarak E vitamininin antioksidan fonksiyonu, iyi bilinmektedir ve birçok kimyacı tarafından tanımlanmıştır [19].

Bitkisel yağlar, fındık, fıstık, ceviz gibi yağlı tohumlar, tam tahıllar, kuru baklagiller ve yeşil yapraklı sebzeler önemli E vitamini kaynaklarıdır [20].



Şekil 2.2: α -tokoferol'ün kimyasal yapısı

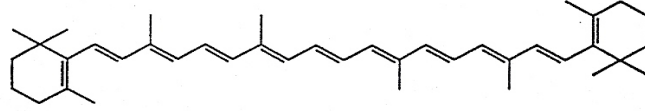
2.2.3. Karotenoidler

Karotenoidler, lipidik fraksiyonlar ile ilişkili olan yağda çözünebilir bileşiklerdir. Kimyasal açıdan bakıldığında, karotenoidler poliisoprenoid bileşiklerdir ve iki ana gruba ayrılabilir:

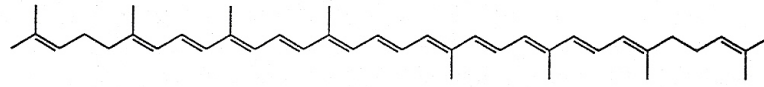
- Sadece karbon ve hidrojen atomlarından oluşan karoten veya hidrokarbon karotenoidleri,
- Hidroksi, keto, epoksi, metoksi ve karboksilik asit grupları gibi en az bir oksijenli fonksiyonel grupları içeren oksijenlenmiş hidrokarbon türevleri olan ksantofiller.

Yapılarında, kimyasal, biyokimyasal ve fiziksel özellikleri etkileyen bir konjuge çift bağ bulunur. Doğal pigmentlerin bu sınıfı doğada yaygın olarak oluşur. Karotenoidler, bitkiler ve çok sayıda mikroorganizma tarafından sentezlenirler, hayvanlar ise gıdalardan temin etmelidirler. Bugüne kadar doğal kaynaklardan 600'den fazla karotenoid izole edilmiştir. Çok sayıda çiçek ve meyvenin renkleri yanı sıra, birçok kuş, böcek ve deniz hayvanlarının güzel renklerinden de sorumludurlar [21].

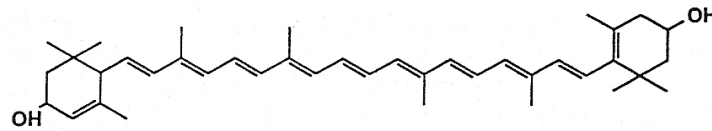
Likopen, β -karoten ve α -karoten, karotenler olarak adlandırılan; β -kriptoksantin, lutein ve zeaksantin, ksantofiller olarak adlandırılan karotenoid sınıfına örnek olarak verilmektedir [16].



β -karoten



Likopen



Lutein

Şekil 2.3: β -karoten, likopen ve lutein'in kimyasal yapıları

2.2.4. Fenolik Bileşikler

Polifenoller; bitki dünyasının büyük bir kısmında bulunan, fitokimyasalların en geniş sınıflarından birini oluşturan ve insan yaşamında gerekli olan bileşiklerdir.

Polifenoller güçlü antioksidanlardır ve aktiviteleri kimyasal yapılarına bağlıdır. Bitki polifenoller çok fonksiyonlu olup, indirgeme aracı, hidrojen atomu verici ve singlet oksijen söndürücü olarak davranırlar. Bazı polifenoller ise metal iyonu kelatlama

özelliklerine sahip antioksidanlar olarak etkilidirler [22]. Bir polifenolün antioksidan olarak tarif edilebilmesi için iki temel şartı sağlaması gerekir:

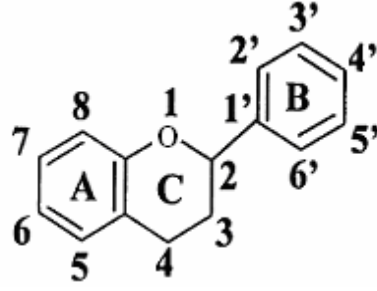
1. Okside olabilen substratlara oranla düşük derişimlerde bulduklarında, otoksidasyonu veya serbest radikal merkezli oksidasyonu erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir [23].
2. Süpürme sonunda oluşan radikal, oksidasyon zincir reaksiyonunu kesmekte kararlı olmalıdır [24].

Bitki fenolikleri; flavonoidler, fenolik asitler, fenolik polimerler (tanenler) olmak üzere üç sınıfa ayrılır.

2.2.4.1. Flavonoidler

Bitki fenollerinin en geniş sınıfını difenilpropan ($C_6C_3C_6$) iskeletine sahip flavonoidler oluşturmaktadır [16]. Doğada, birçoğu yaprak, çiçek ve kökte bulunan 4000'den fazla flavonoid çeşidi vardır. Meyve, sebze, şarap, kakao ve çayda bol miktarda bulunurlar.

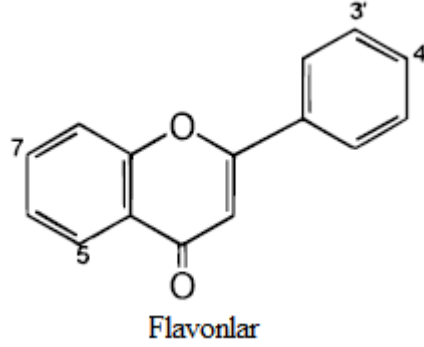
Flavonoidler; önemli antioksidan ve kelatlama özelliğine sahip, düşük moleköl ağırlıklı ve en geniş bitki fenolikleri sınıfıdır. 6'şar karbonlu A, B ve 3 C'lu C halkalarından oluşan heterosiklik bileşikler, hetero halkanın yükseltgenme derecesine göre farklılaşırlar. Aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C olarak ifade edilir. Karbon atomları C halkasındaki oksijenden başlayarak, B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') rakamlarla numaralandırılır (Şekil 2.4). Antioksidan aktivitelerini belirleyen ve aromatik halkalara bağlı olan birçok fenolik hidroksil grubu içerirler. Metal kelatlama, lipid peroksidasyonunu engelleme, reaktif oksijen türlerini içeren diğer prosesleri azaltma özellikleri vardır. Bitkilerde genellikle 3-O-glikozitleri ve polimerleri şeklinde bulunurlar. Glikozit birimi genellikle glukozdur ancak glukoramnoz, galaktoz, arabinoz ve ramnoz ya da daha farklı olabilmektedir. Bu bileşikler yapılarına bağlanan grupların çeşidi, konumu ve sayısına göre farklı radikal söndürme ve kelatlama aktivitesine sahiptirler [25]. İnsan ve hayvanlarda mide-bağırsak sisteminden emilirler, değişmeden ya da metabolitleri halinde idrar ve dışkı ile atılırlar [26].



Şekil 2.4: Flavonoidlerin genel yapısı

Flavonoidler; **antosiyantinler** ve **antoksaninler** şeklinde sınıflandırılır. **Antoksaninler**, renksiz veya beyazdan sarıya dönük renkte olurlar ve flavon, flavonol, flavanol, flavanon ve izoflavonlar olarak sınıflandırılırlar [16].

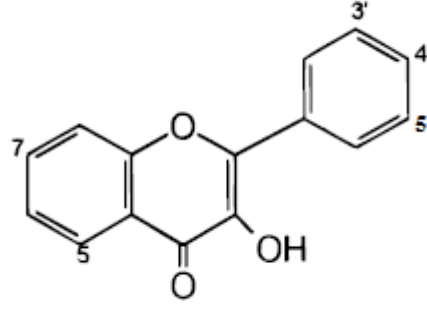
Flavon sınıfına ait temel bileşikler; apigenin, luteolin ve krisindir. Maydanoz, kereviz ve zeytinde bol miktarda bulunmaktadır [25].



	5	7	3'	4'
Luteolin	OH	OH	OH	OH
Apigenin	OH	OH	-	OH
Krisin	OH	OH	-	-

Şekil 2.5: Apigenin, luteolin ve krisin'in kimyasal yapıları

Flavonoller (3-hidroksiflavon), flavonun 3 no'lu C atomuna bağlı bir hidroksil grubu taşırlar. Flavonoidlerin bitkilerde en yaygın olarak bulunan sınıfıdır. En önemli flavonoller kuersetin, glikozitlenmiş kuersetin (rutin), kamferol, mirisetin, izoramnetindir. Kuersetin, flavonoidlerin en önemli bileşiği ve bitkilerin temel fenolik bileşenidir, elmada, soğanda, çayda ve lahanada bol miktarda bulunmaktadır [22, 25].

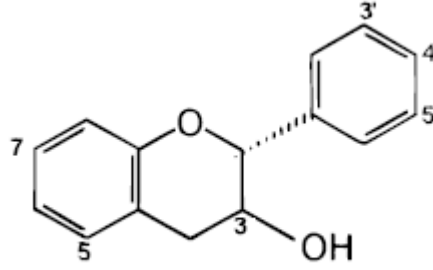


Flavonoller

	5	7	3'	4'	5'
Kuersetin	OH	OH	OH	OH	-
Kamferol	OH	OH	-	OH	-
Mirisetin	OH	OH	OH	OH	OH
İzoramnetin	OH	OH	OH	OCH ₃	-

Şekil 2.6: Kuersetin, kamferol, mirisetin ve izoramnetin'in kimyasal yapıları

Flavonoidlerin C halkasında bulunan C-4'teki karbonil grubunun mevcut olmaması halinde flavanol oluşur. Flavanoller flavonların indirgenmiş türevleridir. En önemlileri kateşin ve epikateşin'dir. Kateşin ve epikateşinin gallik asitle kombinasyonları sonucu kateşin ve epikateşin gallatlar meydana gelir. Bu bileşikler çoğunlukla yeşil ve siyah çayda, kırmızı ve beyaz şarapta, şeftalide ve elmada yüksek miktarda bulunur [16, 22].

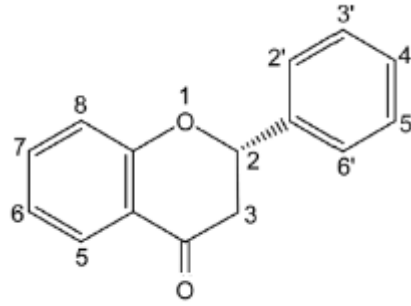


Flavanoller

	3	5	7	3'	4'	5'
(+)-Kateşin	β OH	OH	OH	OH	OH	-
(-)-Epikateşin	α OH	OH	OH	OH	OH	-
(-)-Epigallokateşin	α OH	OH	OH	OH	OH	OH

Şekil 2.7: Kateşin, epikateşin, epigallokateşin'in kimyasal yapıları

Flavonun dihidro türevleri ise flavanonlardır. En önemlileri naringenin, naringin, hesperidin ve hesperetin'dir. Naringin naringenin'in, hesperidin hesperetin'in glikozitidir. Greyfurt ve portakalda bol miktarda bulunurlar.

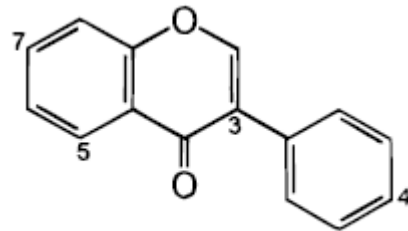


Flavanonlar

	5	7	3'	4'
Naringenin	OH	OH	-	OH
Naringin	OH	<i>O</i> -Rha-Glu	-	OH
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃
Hesperidin	OH	<i>O</i> -Rha-Glu	OH	OCH ₃

Şekil 2.8: Naringenin, naringin, hesperetin ve hesperidin'in kimyasal yapıları (Rha-Glu: Ramnaglukozil)

Flavonların izomeri olan izoflavonlarda B halkası C halkasına 3 konumundan bağlı olup, en bilinen bileşikleri genistein ve daidzeindir. Baklagil ve soya fasülyesinde fazla miktarda bulunmaktadır [27].



İzoflavonlar

	5	7	4'
Genistein	OH	OH	OH
Daidzein	-	OH	OH

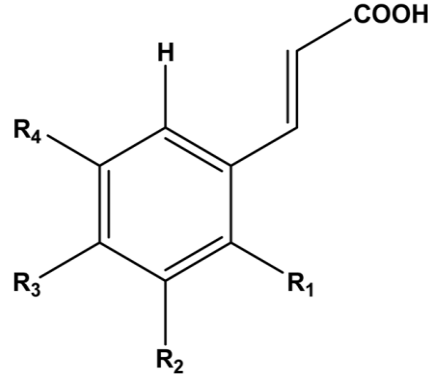
Şekil 2.9: Genistein ve daidzein'in kimyasal yapıları

Antosiyaninler, antosiyanidinlerin glikozitleri olup çiçeklere ve meyvelere kırmızı, mavi ve mor renkleri veren, suda çözünebilir en önemli bitki pigment sınıfıdır [16]. Renkleri büyük ölçüde pH'a bağlıdır [28]. Apigenidin, siyanidin, malvidin ve delphinidin antosiyanidin sınıfına ait bileşiklerdir. Antosiyanidinler, gıdalarda serbest halde değil, glikozit şeklinde bulunurlar. Genellikle glukoz, galaktoz, arabinoz, ramnoz, ksiloz ve fruktoza bağlıdırlar [29].

2.2.4.2. Fenolik asitler

Fenolik asitler, **hidroksibenzoik asit** ve **hidroksisinnamik asit** olarak adlandırılan farklı iki sınıftan oluşmaktadır [16].

Hidroksisinnamik asitler, fenil-propanoid türevleridir ve genellikle bitkisel gıdalarda bulunur [30]. Hidroksisinnamik asitler, bitkilerin fenolik metabolizmalarında merkezi rol oynayan ve fenil alaninin biyosentetik türevi olan fenolik bileşenlerdir. Bu bileşikler aynı zamanda flavonoidlerin öncüsüdür ve bitkilerde hücre duvarının yapısına katılırlar [31]. Genellikle bu tür fenolik asitler bitkilerde esterleri halinde veya şekerlerle, organik asitlerle veya yağlarla birleşmiş halde bulunurlar [32]. Hidroksisinnamik asitler trans konumunda daha kararlıdır. Ancak UV ışınlarına maruz bırakıldıklarında trans izomerinden cis izomerine dönüşürler [33]. Bu bileşenler meyve, sebze, çiçek, fındık, tohum ve şarap, çay, kahve ve zeytinyağı gibi bitki-türevli ürünlerde bulunurlar [16, 34]. Kafeik asit, *p*-kumarik asit ve kafeik asidin kuinik asit esteri olan klorojenik asit, elma, armut ve üzüm gibi meyvelerde ve bitkilerde en çok bulunan hidroksisinnamik asitlerdir [16].



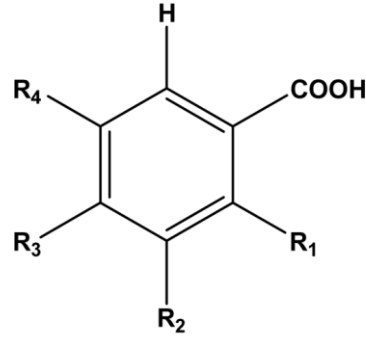
Hidroksisinnamik asitler

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
<i>p</i> -Kumarik asit	H	H	OH	H
Kafeik asit	H	OH	OH	H
Ferulik asit	H	OCH ₃	OH	H
Sinapik asit	H	OCH ₃	OH	OCH ₃

Şekil 2.10: *p*-kumarik asit, kafeik asit, ferulik asit ve sinapik asit'in kimyasal yapıları

Hidroksibenzoik asitler, yapılarındaki hidroksi ve metoksi gruplarının yerleşimi ve sayılarına göre çeşitlenirler. Bunlardan birkaçı; gallik, vanilik ve protokateşuik asit'dir. Monohidroksibenzoatlar etkili hidroksil radikal süpürücülerdir çünkü hidroksillenmeye

ve hidroksil radikallerine yüksek reaktivite göstermeye eğilimlidirler. Fenolik halka ile karboksilat grubu arasına metilen grubu girmesiyle oluşan fenilasetik asitlerde *orto* ve *meta* hidroksi türevleri 1 mM'a yakın antioksidan aktivite gösterirler. Dihidroksi benzoik asit türevlerinin antioksidan aktiviteleri hidroksil gruplarının konumlarına bağlı olup, *o-p* konumlarında aktivite yüksek olurken *m-p* konumlarına sahip olanlarda aktivite düşer [22].



Hidroksibenzoik asitler

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Gallik asit	H	OH	OH	OH
Protokateşuik asit	H	OH	OH	H
Vanilik asit	H	OCH ₃	OH	H

Şekil 2.11: Gallik, protokateşuik, vanilik asit'in kimyasal yapıları

2.2.4.3. Fenolik Polimerler (Tanenler)

Fenolik polimerler, yüksek molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Kondanse tanenler bu gruba girerler. Besin tanenleri denilince genellikle kateşin ve epikateşin polimerleri anlaşılmaktadır. Koyu renkli ve tadı buruk bileşiklerdir [16].

Kondanse tanenler proantosiyandinin biosentezinde, nükleofilik zincir sonlandırma birimi olarak flavan-3-oller (kateşinler) ve elektrofilik zincir genişletici birimi olarak flavan-3,4-diol/flavan-4-oller (lökoantosiyandinler) önemli rol oynamaktadırlar [35]. En çok bulunan prosiyanidin dimerleri Prosiyanidin B1, B2, B3 ve B4'tür. Bu dimerler asit ile ısıtıldığında 1 molekül kateşin ve 1 molekül antosiyandin (siyanidin) serbest hale geçer [33].

2.3. BİTKİSEL ATIKLARDAN DOĞAL ANTIÖKSİDAN ELDESİ

2.3.1. Ekstraksiyon Yöntemleri

Ekstraksiyon kısaca, bileşiklerin bir fazdan diğerine taşınması işlemidir. İdeal bir ekstraksiyon süreci hızlı, basit ve ucuz olmalıdır. Ekstrakte edilen maddeler kayıp ve bozunmaya uğramadan elde edilmeli, ek bir saflaştırma gerektirmemeli ve artık çözücü içermemelidir. Ekstraksiyonlar birkaç şekilde sınıflandırılabilir;

- Analitik-preparatif (ayrılacak saf bileşiğin miktarına bağlı olarak)
- Kesikli-sürekli (ayrılacak materyali ekstraksiyon cihazına besleme şekline bağlı olarak)
- İçerdiği fiziksel ilkelere dayanarak (ekstraksiyon tamamen dağılıma mı dayanır yoksa adsorpsiyon veya diğer işlemleri mi içerir?)
- İçerdiği fazların türüne dayanarak (böylece sıvı-sıvı ekstraksiyonu, gaz-katı ekstraksiyonu, süperkritik akışkan ekstraksiyonu vb. şeklinde adlandırılır) [36].

Literatürde mevcut ekstraksiyon yöntemleri aşağıdaki gibi listelenebilir [37, 38];

- Çözücü ekstraksiyonu (Sıvı-sıvı ekstraksiyonu)
- Katı-sıvı ekstraksiyonu
- Soxhlet ekstraksiyonu
- Ultrason yardımıyla ekstraksiyon
- Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon
- Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu
- Süperkritik akışkan ekstraksiyonu
- Katı faz ekstraksiyonu (Solid phase extraction, SPE)
- Bulutlanma noktası ekstraksiyonu (Cloud point extraction, CPE)
- Sulu iki fazlı sistemlerde ekstraksiyon (Extraction in aqueous biphasic systems, ABS)
- Homojen sıvı-sıvı ekstraksiyonu (Homogenous liquid-liquid extraction, HLLE)
- İyonik sıvılara ekstraksiyon (Extraction to ionic liquids, IL)
- Sürekli akış sıvı-sıvı ekstraksiyonu (Continuous flow liquid-liquid extraction, CPLLE)
- Desteklenmiş sıvı membran (Supported liquid membrane extraction, SLM) ekstraksiyonu
- Mikro gözenekli membran sıvı-sıvı ekstraksiyonu (Microporous membrane liquid-liquid extraction, MMLLE)
- Mikroekstraksiyon
 - ✓ Katı faz mikroekstraksiyon
 - ✓ Manyetik karıştırma çubuğu ile ekstraksiyon
 - ✓ Sıvı faz mikroekstraksiyon
 - Asılı damla mikroekstraksiyon
 - Dağıtıcı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon
 - Yüzen katı organik damla mikroekstraksiyon
 - Oyuk fiber sıvı faz mikroekstraksiyon

Bu yöntemlerden sadece bitkisel atıklardan fenolik bileşiklerin ekstraksiyonunda kullanılanlar aşağıda kısaca açıklanmıştır.

2.3.1.1. Çözücü Ekstraksiyonu (Sıvı-Sıvı Ekstraksiyonu)

Çözelti veya sıvı örneklerdeki analitler, karışmayan bir çözücüyle doğrudan dağılımla ekstrakte edilebilir. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu, karışmayan iki fazda bir analitin bağlı çözünürlüğüne dayanır ve denge dağılımı katsayısı tarafından yönetilir. Bir analitin ekstraksiyonu, karışmayan iki sıvı fazın çözüldürücü gücü (polarite) arasındaki farklar ile gerçekleşir [39].

2.3.1.2. Katı-Sıvı Ekstraksiyonu

Katı-sıvı ekstraksiyonu çözünen maddenin, katıdan, onu çevreleyen, sıvı çözücüye transferine dayanmaktadır. Ekstraksiyon için çözücü olarak genellikle su, etanol, etanol-su karışımları, hekzan ve karbondioksit kullanılır fakat eğilim, doğal kimyasalların kullanımına doğru gitmektedir.

Katı parçacık içindeki ekstre edilecek bileşen ile çözücü arasındaki etkileşim süresince meydana gelen basamaklar şu şekildedir;

1. Çözücünün katı matrise girişi
2. Ekstre edilecek bileşiklerin çözücüde çözünmesi (Ekstre)
3. Ekstrenin katı matris dışına taşınımı
4. Ekstrenin katı matrisin dış yüzeyinden çözücüye taşınımı
5. Ekstrenin çözücüde içinde difüzyonu
6. Ekstre ve katıyı ayırma [40].

2.3.1.3. Soxhlet Ekstraksiyonu

Soxhlet ekstraksiyonu, doğal materyallerden metabolitleri izole etmek için kullanılan en eski tekniklerden biridir. Teknik, orta ve düşük uçuculuk ve termal kararlılıktaki analitlerin izole edilmesi ve zenginleştirilmesi için kullanılmaktadır. Yüksek geri kazanım sağlar. Fakat uzun ekstraksiyon süresi ve fazla çözücü, soğutma suyu ve elektrik enerjisi tüketimi gibi birkaç kusuru vardır [41].

2.3.1.4. Ultrason Yardımıyla Ekstraksiyon

Ultrasonlar, 16 kHz-1 GHz frekans aralıklı, insanların işitemediği dalgalardır. Ultrasonik titreşimler, örnek matrisinden bazı analitlerin salıverilmesini kolaylaştıran enerji kaynaklarıdır [41]. Ultrason yardımıyla ekstraksiyon (Ultrasound-assisted extraction, UAE)'un mekanizması, hücre duvarlarının bozulması, parçacık boyutu küçülmesi ve hücre zarlarından artmış kütle transferine yol açabilen, mekanik boşluk oluşturma ve ısısal etkinliklerine atfedilir [42]. UAE, daha kısa işlem süresi, basit uygulama, daha az çözücü ve enerji tüketimi gibi üstünlükler sunabilen ekstraksiyon tekniklerinden biridir. Dolayısıyla UAE, “çevre dostu” veya “yeşil” teknik olarak adlandırılabilir [43].

2.3.1.5. Mikrodalga Yardımıyla Ekstraksiyon

Mikrodalgalar 0,3-300 GHz aralığında değişen elektromanyetik ışımalardır ve genellikle doğal ürünlerde 2,5-75 GHz'de ekstraksiyon gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga yardımıyla ekstraksiyon (Microwave-assisted extraction, MAE), katı örnekle temas halinde olan çözücünün ısıtılması ve çözücü içindeki örnekteki bileşenlerin ayrılması için mikrodalga enerjisinin kullanıldığı bir yöntemdir. Son zamanlarda, MAE işlem süresi, çözücü ve enerji tüketiminin az olması nedeniyle geleneksel ekstraksiyon yöntemlerine potansiyel bir alternatif olarak büyük ilgi görmektedir [44].

2.3.1.6. Hızlandırılmış Çözücü Ekstraksiyonu

Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu (HÇE), mevcut ekstraksiyon tekniklerine alternatif olarak geliştirilen ve bu yöntemlere nazaran ekstraksiyon süresi, çözücü tüketimi, ekstraksiyon verimi ve tekrarlanabilirlik açısından daha iyi bir katı-sıvı ekstraksiyon tekniğidir. Çözücülerin kritik noktalarına ulaşmadan yüksek basınç ve yüksek sıcaklıkta ekstraksiyon işleminin gerçekleştirildiği bu teknik literatürde;

- Hızlandırılmış çözücü ekstraksiyonu,
- Basınçlı çözücü ekstraksiyonu,
- Basınçlı akışkan ekstraksiyonu,
- Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu,
- Yüksek basınçlı çözücü ekstraksiyonu,
- Yüksek basınç yüksek sıcaklıkta çözücü ekstraksiyonu,
- Subkritik çözücü ekstraksiyonu gibi isimlerle anılmaktadır.

Bu tekniğin geleneksel çözücü ekstraksiyon tekniklerine üstünlüğü; uygulanan basınç sayesinde çözücünün kaynama noktası sıcaklığı üzerinde de sıvı kalabilmesi ve yüksek sıcaklıklarda ekstraksiyona müsaade etmesidir. Yüksek sıcaklık ve basınç ile sağlanan bu koşullar analit çözünürlüğü ve analitin desorpsiyon kinetiğini geliştirmektedir. Bu teknik ile 3-20 dakikada 3,3-20,3 MPa basınç ve 40-200°C sıcaklıkta kapalı bir ortamda analitin ekstraksiyonu gerçekleştirilebilmektedir. HÇE işleminde ekstraksiyon performansını etkileyen faktörler; örnek miktarı ve bileşimi, çözücünün hacmi ve akış hızı, sıcaklık, ekstraksiyon süresi, döngü ve basınçtır [45].

2.3.1.7. Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu

Süperkritik akışkan ekstraksiyonu (scfe), bileşenlerin ana yapıdan ayrılması esnasında çözücü olarak süperkritik akışkanın kullanıldığı metottur. Çözünürlüğünün ayarlanabilir olmasından dolayı, süperkritik akışkanlar (başta süperkritik karbon dioksit-scCO₂ olmak üzere) ayırma ve saflaştırma, kromatografi, polimerizasyon ve fraksiyonlama, tanecik tasarımı, biyoteknoloji, yağların modifikasyonu, suların arıtılması gibi çok değişik uygulamalarda geniş bir kullanım alanına sahiptir. Süreç, ekstraksiyon ve ayırma olarak iki temel aşamadan oluşmaktadır. Ekstraksiyon aşamasında süper kritik akışkan (çözücü) ham ekstreyi içeren ekstraksiyon kolonu içerisinden akarken çözünen bileşenleri ekstrakte eder. Kolondan çıkan çözelti ayırıcıda düşük basınca genleştirilir, böylece süper kritik akışkan ve çözünen birbirinden ayrılır. Geri kazanılan süper kritik akışkan tekrar sisteme geri beslenebilir. Bir scfe sürecinin tasarımı ve işletilmesi; işlem basıncı, sıcaklığı, çözünen madde özellikleri (molekül ağırlığı, polarite, çözünürlük, dağılım katsayısı), tanecik boyutu ve şekli, matriks yapısı ve özellikleri, nem miktarı, CO₂ akış hızı, CO₂/besleme oranı, ekstraksiyon süresi ve sıvılar arasındaki yoğunluk farkı gibi parametrelerden etkilenir [46].

2.3.1.8. Katı Faz Ekstraksiyonu (Solid Phase Extraction, SPE)

Katı faz ekstraksiyonu, az vakumla örneğin işlenmesine izin veren boyuttaki gözenekli partikülleri içeren tek kullanımlık kartuşların 1970'lerde tanıtılmasından beri sıvı örnekler için yaygın olarak kullanılan bir laboratuvar tekniği olmuştur. Tipik bir katı faz ekstraksiyon kartuşu, gözenekli metal veya plastik fritler arasına doldurulmuş, partikül büyüklüğü 50-60 µm olan bir sorbanı içeren kısa bir kolondan oluşur. Kullanılan sorbanların birçoğu, genel amaçlı, sınıfa özgü ve hatta bileşiğe özgü ekstraksiyonlar için istenileni karşılamaktadır [47]. Çeşitli tipte sorbanlar geliştirilmiştir, en fazla kullanılanları C18 ve C8 bağlı silika, karbon siyahı ve polimerik reçinelerdir. Apolar bileşikler C18 veya C8 sorbentlerle kolayca önderişiklendirilebilirken, en polar bileşikler düşük kopma hacimleri nedeniyle sorun olabileceklerinden polimerik veya karbon sorbentler tavsiye edilir [48].

2.3.1.9. Mikroekstraksiyon

Karmaşık örneklere uygulanan ayırma ve zenginleştirme işlemleri ile örnek, analiz için istenilen özelliklere getirilir. Klasik örnek hazırlama teknikleri sıvı-sıvı ekstraksiyonu, katı-sıvı ekstraksiyonu ve katı faz ekstraksiyonu gibi yöntemlerin otomasyon zorluğu,

örnek ve organik sıvının büyük miktarda kullanılması, karmaşık ve zaman alıcı olması gibi eksiklikleri vardır. Zararlı kimyasalların ve organik çözücülerin büyük miktarlarda kullanılması çevre kirliliğine, laboratuvar personeline sağlık risklerine, atık arıtma ve ek işletme maliyetlerine sebep olur. İdeal örnek hazırlama teknikleri hızlı, kullanımı kolay, ucuz ve birçok analitik cihaza uygulanabilir olmalıdır. Bu konudaki yeni eğilim organik çözücü tüketimini en aza indirme, örnek hazırlama basamağını basitleştirme ve küçültme şeklindedir. Bu nedenle mikroekstraksiyon yöntemlerine ilgi önemli ölçüde artmıştır. Mikroekstraksiyon yöntemleri;

- Klasik sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve sıvı-katı ekstraksiyonlarında kullanılan toksik ve pahalı ekstraksiyon sıvılarının kullanımını mikrolitre seviyelerine indirmeleri,
- Buharlaştırma, saflaştırma gibi işlemlere gerek duyulmaması,
- Yüksek zenginleştirme oranı,
- Ekstraksiyon ve zenginleştirmenin yanı sıra ayırma işleminin de yapılabilmesi,
- Ekstraksiyon sonrasında alınan örneğin doğrudan gaz kromatografisi (GC) veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'ne enjekte edilebilmesine olanak sağlaması ve
- Otomasyonun yapılabilmesi gibi

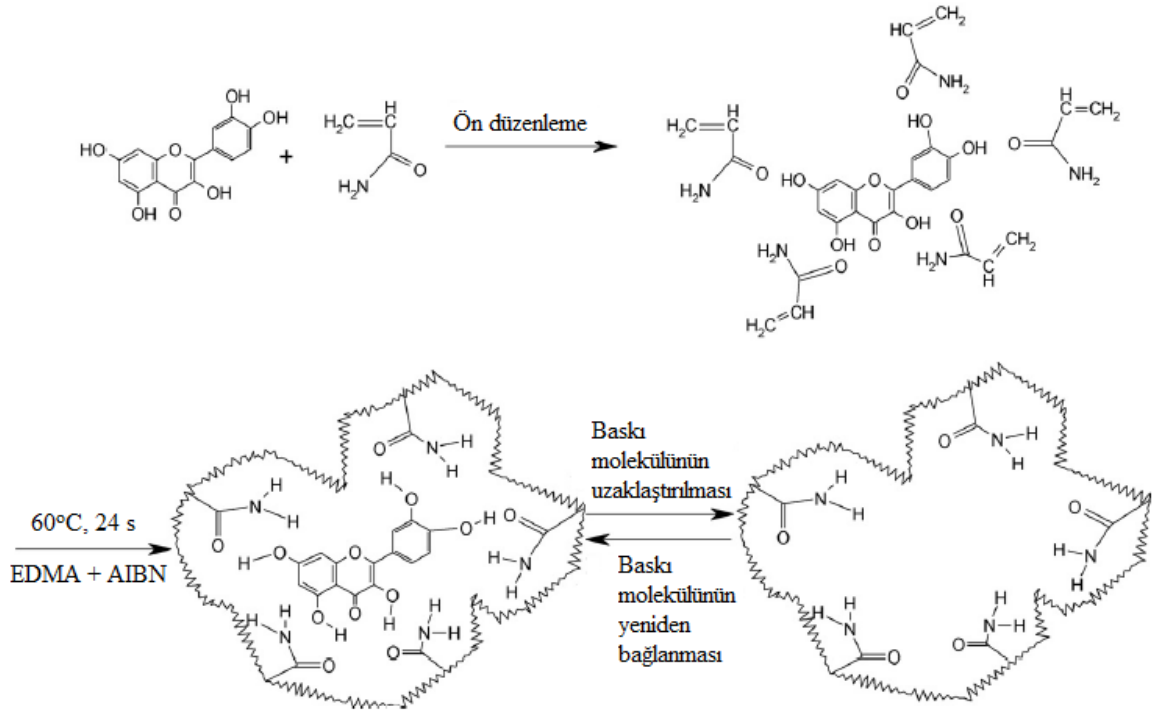
üstünlüklerinden dolayı son zamanlarda klasik sıvı-sıvı, katı-sıvı ve katı faz ekstraksiyon yöntemlerinin yerlerini almaya başlamışlardır [38].

2.3.2. Moleküler Baskılama Tekniği, Moleküler Baskılı Polimerler

Moleküler baskılama tekniği (Molecularly imprinted technique, MIT), bir kalıp bileşiği etrafına fonksiyonel monomerleri yerleştirmek ve çözültide çapraz bağlayıcıyla karıştırmak yoluyla polimer hazırlanması için kullanılan bir tekniktir [49]. Yöntem, kovalent veya nonkovalent bağlar sayesinde, uygun fonksiyonel monomerlerle bir hedef bileşiğin (kalıp) çözültisinde kompleksleşmeyi gerektirir. Kendi kendine monte olan kompleks, çapraz bağlayıcı bir molekülün aşırısıyla bir polimerizasyon reaksiyonu başlatıcısı tarafından yerinde dondurulur [50]. Polimerizasyonun tamamlanmasından sonra ılımlı ekstraksiyon koşulları altında (örneğin; polar bir çözücü kullanarak Soxhlet ekstraksiyonu) baskı molekülü uzaklaştırılır ve kalan boşluklar boyut, şekil ve işlevsellik açısından baskı molekülünü tamamlayıcıdır, dolayısıyla kullanılan baskı

molekölü için tanıma bölgeleri olarak hizmet verir [51]. Oluşan moleküler baskılı polimer (MIP)'in, başka şekil ve boyutlu moleküllere tercihen kalıbı seçimli adsorplaması beklenir [50].

Teknik, Şekil 2.12'de kuersetin baskılanmış MIP (Molecular imprinted polymer, moleküler baskılı polimer) için şematik olarak gösterilmiştir. Yöntemde seçilmiş kalıp moleküllerinin (kuersetin) ilk olarak fonksiyonel monomerlerle (akrilamid, AA) bağ etkileşimleri kurmasına izin verilmiştir. Bunun için polimerize olabilen fonksiyonel monomerler porojenik çözücüde bir kalıp molekölü etrafında önceden düzenlenmiştir. Oluşan kompleksler, termal polimerizasyonla bir serbest radikal başlatıcı (2,2-Azobisisobutironitril, AIBN) varlığında çapraz bağlayıcının (etilen glikol dimetakrilat, EDMA) aşırısıyla kopolimerize edilmiştir. Kalıp moleküllerinin uzaklaştırılmasından sonra, şekille birlikte polimer ağında fonksiyonel grupların hassas konumsal düzenlemesiyle özel bağlanma alanları oluşur. Böylece, hedef moleküllerin tersinir bağlanması ve yüksek seçimlilikle tanınması gerçekleştirilir [52].



Şekil 2.12: Kuersetin baskılanmış MIP oluşumunun şematik gösterimi

Wulff ve Sarhan [53] tarafından icat edildiğinden beri MIT, biyosensör, biyokimyasal ayırım, antikor benzeşmesi, enzim kataliz benzeşmesi, likit kromatografisi için sabit faz vs. içeren birçok alanda geniş ölçüde kullanılmıştır [52, 54]. MIP'ler, ilaçlar, pestisitler,

karbohidratlar, peptitler ve diğer biyolojik moleküllerin baskılanması için yoğun olarak kullanılmaktadırlar. Özellikle antioksidan özellikleri nedeniyle gıda ve ilaç endüstrisiyle yakından ilgili olan fenolik bileşiklerin baskılanması çalışmaları da literatürde yer almaktadır [8, 51, 52]. MIT, ilgili analitlerin kesin olarak seçilmesi, ayrılması ve ön derişiklendirilmesi için SPE kartuşlarının hazırlanmasında alternatif ve kolay bir yoldur [8]. Çevresel araştırma ve farmasötik analiz alanlarında kromatografik ayırım aracı ve biyoaktif bileşikleri zenginleştirmek için katı faz ekstraksiyonu malzemesi olarak da kullanılmaktadır [49]. Bunların içinde, bitkiler veya diğer doğal örneklerden fonksiyonel bileşiklerin ekstraksiyonunda ayırım materyalleri olarak kullanılan MIP'ler en fazla araştırılanlarıdır [54]. Özellikle, moleküler tanıma yeteneği, hazırlama kolaylığı ve yüksek sıcaklık, yüksek basınç, asit, baz ve hatta organik çözücü gibi sert çevresel şartlara dayanma, MIP'i örnek ön derişiklendirilmesi ve SPE'de çok umut verici bir ayırım materyali haline getirir [49].

MIP'ler, doğal/proteinli reseptörlere kıyasla farklı avantajlar sunar: kolay hazırlama, düşük fiyat, termal koşullara ve aşırı kimyasala dayanma, uzun raf ömrü ve deney tasarımında gelişmiş çok yönlülük. MIP'ler, hedef analitlerin ayırma faktörünü arttırarak kompleks ayırma problemlerini çözebilen uygun ortamı sağlar ve geleneksel kromatografik araçların genel seçiciliğini arttırır [50].

2.3.3. Çeşitli Atıklardan Doğal Antioksidan Eldesi Çalışmaları

Schieber ve arkadaşları, elma suyu üretimi birincil yan ürünü olan elma posasından pektin ve fenolik bileşiklerin birlikte geri kazanımı için bir işlem geliştirilmişlerdir. İşlem, seyreltik mineral asitli kurutulmuş elma posasının ekstraksiyonunu ve bir hidrofobik stiren-divinilbenzen kopolimerizatıyla fenolik bileşenlerin adsorpsiyonunu kapsamaktadır. Metanollü elüsyonun ardından polifenolikler vakum altında derişiklendirilmiş, liyofilizasyonla stabilize edilmiş ve HPLC ile tanımlanmıştır. Baskın bileşikler floridzin, klorojenik asit ve kuersetin glukozitleridir [55].

Bileşiklerin yeni bir sınıfı, aminoetiltiyo-flavan-3-ol konjugatları, sistamin varlığında polimerik proantosiyandinlerin tiyolizi ile üzüm posasından elde edilmiştir [56].

Üzüm posası, dut, patlıcan kabukları ve kırmızı lahanadan antosiyaninlerin polimerik reçine üzerine adsorpsiyonu bildirilmiştir. Nar suyu ve kırmızı lahanadan ekstraktlarından antosiyanin geri kazanımı için katyon değiştirici reçineler ve killeri kullanılmıştır [57].

2.4. PORTAKAL MEYVESİ

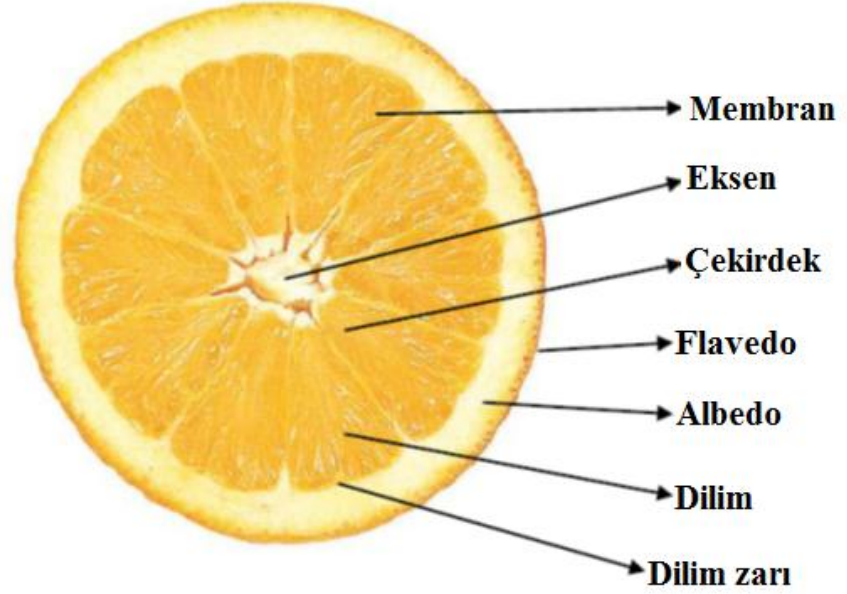
Portakal, Latince *Citrus sinensis* adıyla bilinen, sulu ve tatlı meyvesi olan küçük bir ağaçtır. Kendisine özgü bir kokusu olan portakal, C vitamini açısından da oldukça zengindir. Ana vatanı Çin olan portakal, Türkiye’de Akdeniz ve Ege Bölgelerinde yetiştirilir. Akdeniz Bölgesi’nin Çukurova ve Antalya yöresi Türkiye’nin portakal ihtiyacının büyük bir kısmını karşılamaktadır.

Boyu 10 m’ye kadar uzayan portakal ağacı, turunçgiller içinde en yüksek olan ve en uzun yaşayan ağaçtır. Portakal ağaçlarının kökleri yüzeye yakındır ve çoğunlukla toprağın 60-65 cm derinliğine kadar yayılır. Gevşek yapılı, verimli, orta derinlikte, geçirgen topraklarda daha iyi yetişmektedir. Portakal bahçelerinin kurulacağı yer önemlidir. Soğuğa karşı limonlara göre daha dayanıklı olan portakallar, -2°C’ye kadar dayanmaktadır. Narin bir bitki olduğu için bahçenin kurulacağı yere, budama, sulama ve gübreleme uygulamalarının tam zamanında ve gereği gibi yapılmasına özen göstermek gerekir.

Portakal ağacı, çok sayıda çeşide sahiptir. Mevcut olan çeşitlerin çaprazlanmasıyla da yeni türler ortaya çıkmaktadır. Türk Standartları Enstitüsü tarafından hazırlanan TS 34 (2007) standardı doğrultusunda kabul edilen portakalın başlıca çeşitleri Alanya dilimli, Washington Navel, Thomson Navel, Akçay şekeri, Yafa ve Kan portakallarıdır [58].

Portakal kabukları flavedo ve albedo denen iki katmandan oluşmaktadır. Flavedo, en dışta bulunan rengi sarıdan portakal kırmızısına kadar değişen ince tabaka olup, karotenoid pigmentleri ve yağ hücrelerini içerir. Eğer kabuk sıkıştırılır, bir darbe etkisinde kalır veya yüzeye iğne gibi bir cisim sokulursa, hücrelerin basınç altında tuttuğu yağ damlacıkları dışarı adeta fışkırarak çıkar. Kabuk yağı denen bu madde, portakal suyu üretiminde önemli sorunlar oluşturmakta ve teknolojiyi zorlamaktadır. Flavedo katmanının en dışında; yani, meyvenin yüzeyinde, ince bir mum filmi bulunur

ki bu epidermisi; yağmura, su kaybına ve mantar enfeksiyonlarına karşı koruyan doğal bir bariyerdir. Flavedonun hemen altında; adeta devamı şeklinde, beyaz renkte, kalınca keçeeye benzer bir katman olan albedo ise daha iri hücrelerden oluşmaktadır. Burada besin maddeleri ve suyu taşıyan damarlar yer almaktadır. Meyve eti yani endokarp radyal olarak yerleştirilmiş dilimlerden oluşur. Dilimler parankim hücrelerinin birçoğunun yan yana gelmesiyle, içinde meyve suyu bulunan keseciklerden oluşan bir yapı gösterir. Dilim içindeki üst üste yığılı bu meyve suyu keseciklerini, yüksek moleküllü materyalden oluşmuş bir dilim zarı sarar. Dilimlerin etrafında dizildiği eksenin ortasına gelen bölgede, dilimler içinde çekirdekler veya çeşide göre, çekirdek izleri bulunur. Meyve olgunlaştıkça yine çeşide bağlı olarak meyve eti ile kabuğun sıkı bağlantısı pektolitik enzimlerin etkisi ile gevşer. Portakallarda meyvedeki kabuk oranının genellikle %50 civarında olduğu kabul edilmektedir. Kabuğun yaklaşık %30'unu flavedo, %70'ini albedo oluşturmaktadır. Portakal meyvesinin kesiti Şekil 2.13'de verilmiştir [59].



Şekil 2.13: Portakal meyvesinin kesiti

2.4.1. Portakalın İçeriği ve Sağlık Üzerine Etkileri

Portakalın yapısında B1, B2, B3, B5, B6, B9 ve C vitaminleri, kalsiyum, demir, magnezyum, fosfor, potasyum, çinko, karbonhidrat, şeker, lif, yağ ve protein bulunmaktadır [60]. Portakal meyvesindeki bazı bileşenlerin derişimleri Tablo 2.2'de verilmiştir [59].

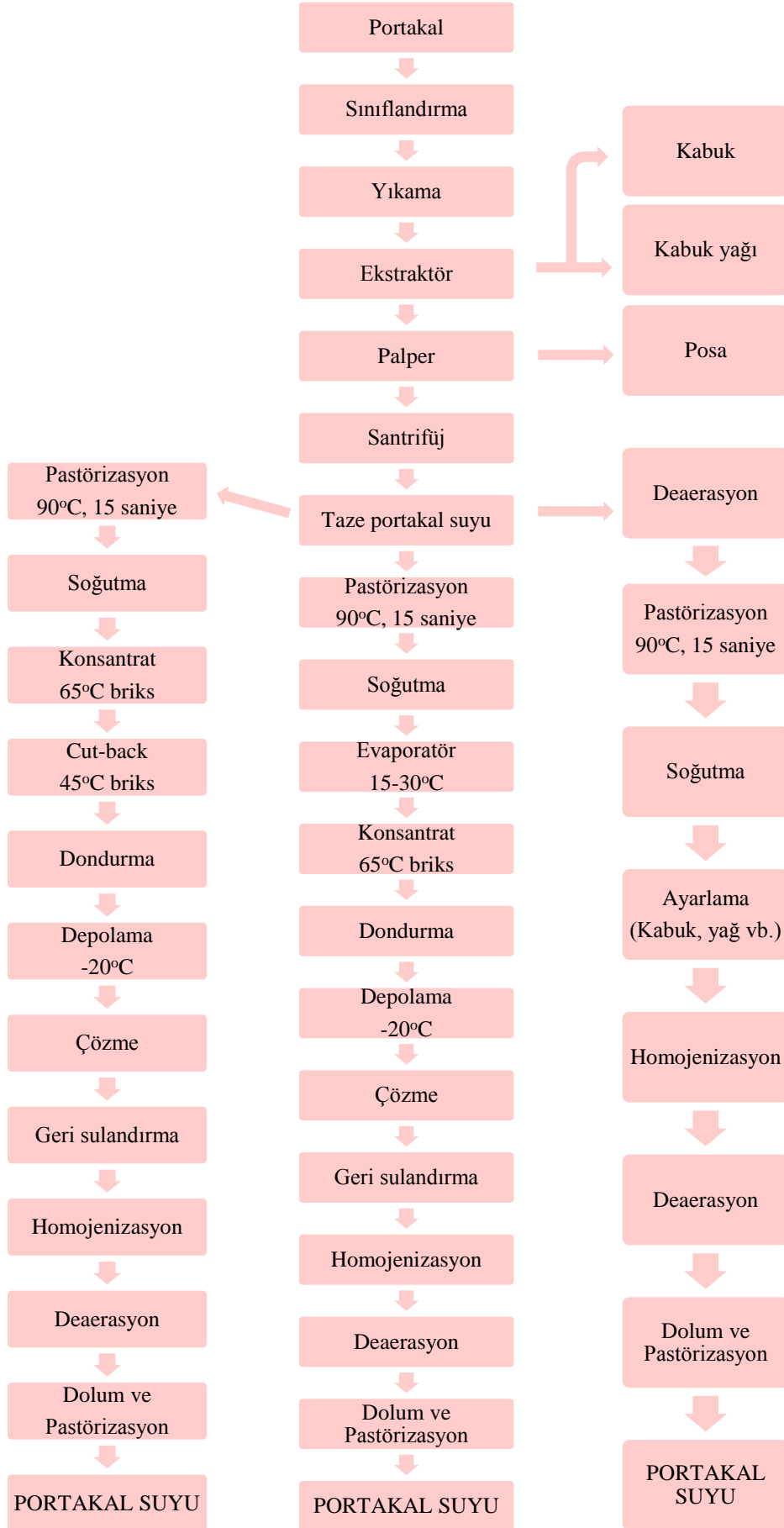
Tablo 2.2: Portakal meyvesindeki bazı bileşenlerin derişimleri

Bileşenler	Derişimleri
Su	860 (g/kg)
Protein	7,0-13,0 (g/kg)
Yağ	1,0-3,0 (g/kg)
Lif	5,0 (g/kg)
Kül	5,0-7,0 (g/kg)
Kalsiyum	400-430 (mg/kg)
Fosfor	170-220 (mg/kg)
Demir	2,0-8,0 (mg/kg)
Karoten	1200 (μ g/kg) (Vit. A)
Thiamin	1,0 (mg/kg)
Riboflavin	0,4 (mg/kg)

Belirli dejeneratif hastalıklara karşı portakal suyunun potansiyel koruyucu etkisinden sorumlu çok sayıda antioksidan, portakal suyunda doğal olarak bulunur. Son epidemiyolojik çalışmalara göre, fazla portakal suyu tüketimi, kanserin farklı çeşitleri, kardiyovasküler ve nörolojik hastalıklar gibi hastalıkları ve serbest radikallere bağlı oksidatif hasar riskini azaltmayla ilişkilidir. L-Askorbik asit, karotenoidler, flavonoidler ve diğer polifenolik bileşikler toplam antioksidan aktiviteye katkıda bulunan, portakal suyunun en önemli maddeleridir [61]. Portakal ve portakal suyunda bulunan fenolik bileşiklerin önemli bir kısmı hidroksisinnamik asitler ve flavonoidlerdir (flavanon sınıfı flavonoidler baskın olarak bulunur). Portakal flavonoidleri, özellikle hesperidin, antienflamatuar, antihipertansif, diüretik, analjezik ve hipolipidemik aktiviteler gibi terapötik özelliklerin geniş bir aralığını gösterir [62].

2.4.2. Portakal Suyu Üretimi

Portakal meyvesi fabrikaya geldiğinde yıkama işlemine tabii tutulmakta, daha sonra kabuğuyla birlikte posa haline dönüştürülmektedir. Portakal meyvesinden meyve suyu üretimi akış şeması Şekil 2.14’de verilmiştir [63].



Şekil 2.14: Portakal suyu üretimi akış şeması

Portakal üretimi ülkemizde son yıllarda artış göstermiş ve üretimin büyük bir kısmı da ihraç edilmektedir. Tablo 2.3’de Türkiye’de yıllara göre üretilen portakal, meyve suyu ve konsantresi miktarları verilmiştir.

Tablo 2.3: Türkiye’de yıllara göre üretilen portakal, meyve suyu ve konsantre miktarları

Yıllar	Portakal (kton)	Meyve suyu ve konsantre (kton)
1995	0,92	0,21
1996	0,84	0,28
1997	0,89	0,29
1998	0,74	0,32
1999	0,97	0,32
2000	1,10	0,31
2001	1,07	0,31
2002	1,25	0,32
2003	1,25	0,35
2004	1,30	0,36
2005	1,45	0,37

2.4.3. Portakal Suyu Endüstrisi Atıklarının Değerlendirme Çalışmaları

Narenciye suyu ekstraksiyon işlemi esnasında, toplam meyve ağırlığının yaklaşık yarısına tekabül eden kabuk, çekirdek, hücre ve membran atıkları gibi binlerce ton yan ürün oluşur [4, 64]. Oluşan atıkların, gübre, hayvan yemi, kömür, kimyasal bileşiklerin adsorpsiyonu, biyo-yağ üretimi ve temel yağlar ve pektinin ekstraksiyonu gibi kullanım alanları vardır [65].

Portakal kabuğundaki flavonoidler, esas olarak flavanon glikozitleri (narirutin-4'-O-glukozit, eriositrin, narirutin, hesperidin, isosakuranetin-7-rutinozit), polimetoksillenmiş

flavon aglikonları (sinensetin, hekza-*O*-metilkuersetajetin, nobiletin, hekza-*O*-metilgossipetin, 3,5,6,7,8,3',4'-heptametoksiflavon, tangeritin ve 5-hidroksi-3,7,8,3',4'-pentametoksiflavon), flavon glikozitleri (diosmin, apigenin-7-*O*-rutinozit, rutin) ve C-glukozillenmiş flavonlar (apigenin-6,8-di-C-glukozit)'den oluşmaktadır [66]. Portakal posası gibi narenciye yan ürünleri, doğal olarak elde edilen flavonoidlerin zengin bir kaynağıdır. Gorinstein ve arkadaşları limon, portakal ve greyfurt kabuklarındaki toplam fenolik içeriğin soyulmuş meyvelere göre %15 daha fazla olduğunu bildirmişlerdir [6].

Mauro ve arkadaşları, narenciye sektörünün atık portakal kabuklarından hesperidin elde etmek için yeni bir yöntem ileri sürmüşlerdir. Yöntem, stiren-divinilbenzen (SDVB) reçinesi üzerinde hesperidin'in seyreltik ekstraktının adsorpsiyonuna ve alkali çözücüler vasıtasıyla çok daha küçük hacimlerde desorpsiyonuna dayalıdır. Derişik çözeltilerin asitlendirilmesinden sonra hesperidin, iyi bir verim ve yüksek saflıkla çöker, böylece fazla seyreltmeden kaynaklanan sorunların üstesinden gelinir. Hesperidin, sulu doymuş bir Ca(OH)₂ çözeltisiyle kabuktan ekstrakte edilmiştir. Reçine üzerinde adsorpsiyonu optimize etmek için berrak ekstraktlar nötrale edilmiştir. En etkili eluent, %10 etanol içeren 0,5 N NaOH çözeltisidir. Kristallendirilmiş çözeltinin yeniden kullanımı, ürünün saflığı ve verimini artırır, taze alkali ekstraktların nötralizasyonu için gerekli asit miktarını azaltır. Reçine her adsorpsiyon-desorpsiyon döngüsünden sonra yıkanmalıdır ve her beş döngüden sonra yenilenmelidir. Sonuçlar bir endüstriyel uygulama için yararlı bir başlangıç noktası teşkil edebilir [67].

Manthey ve Grohmann, portakal kabuğu ekstraktındaki hidroksisinnamatların geri kazanımını, cam bir kolon içine yerleştirilmiş, suyla dengelenmiş DE-52 selüloz reçinesine bu bileşiklerin bağlanmasıyla gerçekleştirmişlerdir [68].

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

Bu çalışmada; kimyasal madde ve portakal suyu endüstrisi atıklarını tartmak için Radwag WAS 220/X analitik terazi, ekstraksiyon işlemleri ve kimyasal maddelerin çözünmesine yardımcı olmak için Bransonic 221 ultrasonik banyo, tetrahidrofuranın kurutulması ve polimer sentezi için EKT Hei-Con kontak termometreli, ısıtıcılı Heidolph MR Hei-Standard manyetik karıştırıcı, çalkalama ve polimerlerin yıkanmasında ısıtma işlemleri için 10 kademeli Memmert su banyosu, polimerleri kurutmak için Wisd WiseVen Wov-30 vakum etüvü, çözeltileri karıştırmak için Elektro-mag girdap karıştırıcı, santrifüj işlemleri için Elektro-mag M 4812 P santrifüj cihazı, portakal suyu endüstrisi atığı örneklerinin dondurularak kurutulmasında Telstar Cryodos freeze-dryer, bidistile su üretimi için Millipore Simpak 1 Synergy 185 bidistile su sistemi, absorbans ölçümleri ve spektrum çizimleri için Cary 1E UV-Vis spektrofotometre, HPLC ayırımları için Waters 1525 Binary HPLC pompa, 2998 PDA dedektör ve In-Line degazerden oluşan HPLC cihazı kullanılmıştır.

3.2. KİMYASAL MADDELER

Kullanılan kimyasal maddeler; troloks (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit) (Fluka), naringin (Sigma), hesperidin (Fluka), naringenin (Aldrich), bakır(II)klorür dihidrat ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck), amonyum asetat (Riedel-de Haën), neokuproin (2,9-dimetil-1,10-fenantrolin) (Sigma), %96'lık etanol (Merck), metanol (Sigma-Aldrich), kloroform (Sigma-Aldrich), %37'lik hidroklorik asit (Riedel-de Haën), *o*-fosforik asit (Merck), asetik asit (Riedel-de Haën), tetrahidrofuran (Sigma-Aldrich), benzofenon (Merck), sodyum (Merck), moleküler elek 0,3 nm (Merck), silikon yağı (Sigma-Aldrich), 4-Vinilpiridin (Aldrich), akrilamid (Sigma), etilen glikol dimetakrilat (EDMA) (Aldrich), azobisisobutironitril (AIBN) (Aldrich), Discovery

DPA-6S SPE kartuşu (Supelco), Hipersil C18 (250x4,6 mm, 5µm) HPLC kolonu (Thermo)'dur.

3.2.1. Çözeltilerin Hazırlanması

10^{-2} M naringin, hesperidin, troloks ve naringenin stok çözeltileri metanol, tetrahidrofuran ve/veya asetonitrilde hazırlandı, -20°C 'de saklanarak kullanıldı.

CUPRAC yönteminde; $1,0 \times 10^{-2}$ M Cu(II) klorür çözeltisi ve 1 M amonyum asetat tampon (pH 7,0) çözeltisi distile suda, $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi %96'lık etanolde hazırlandı.

3.2.2. Tetrahidrofuranın Kurutulması

200 mL tetrahidrofurana (THF) 4 g benzofenon ve 2 g sodyum eklendi. 2 saat boyunca 500 rpm'de manyetik karıştırıcıyla karıştırıldı. Azot atmosferi altında distillendi [69]. Erlene alınıp moleküler elek eklendi. Azot geçirildi ve $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

3.3. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERİN HAZIRLANMASI

İki tip monomer (4-Vinilpiridin, akrilamid), üç tip kalıp molekül (naringin, hesperidin, naringenin) ve çapraz bağlayıcı (EDMA) çeşitli oranlarda (Tablo 3.1) karıştırılıp başlatıcı (AIBN) eklenerek vida kapaklı 20 mL'lik tüplerde 60°C 'de 24 saat bekletilerek MIP'ler ve kalıp molekül kullanılmadan NIP (Non-imprinted polymer, baskısız polimer)'ler hazırlandı.

MIP1 ve MIP2'de kalıp molekülüne 10 mL kurutulmuş THF eklenip 10 dakika azot geçirildi. Monomer eklenip 10 dakika daha azot geçirildi. 10 dakika bekletildikten sonra çapraz bağlayıcı eklenip 10 dakika azot geçirildi. Başlatıcı eklendikten sonra 10 dakika daha azot geçirilerek kapatıldı [51, 8].

MIP3, MIP4, MIP5 ve MIP6'da farklı olarak çapraz bağlayıcı ilavesinden önce 10 dakika bekletilmedi. Çapraz bağlayıcı ve başlatıcı aynı anda ilave edildi.

MIP7’de kalıp molekülü ve monomere 10 mL kurutulmuş THF eklenip 30 dakika ultrasonik banyoda bekletildi. Çapraz bağlayıcı ve başlatıcı eklenip 15 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmüş gaz uzaklaştırıldı. 15 dakika azot geçirildi [52].

MIP8’de kalıp molekülü ve monomere 50 mL kurutulmuş THF eklenip 20 dakika azot geçirildi. Manyetik karıştırıcıyla 150 rpm’de 6 saat karıştırıldı. Çapraz bağlayıcı ve başlatıcı eklenip 20 dakika ultrasonik banyoda bekletilerek çözünmüş gaz uzaklaştırıldı. 15 dakika azot geçirildi [70].

Tablo 3.1: Hazırlanan moleküler baskılı polimerlerin kalıp molekül (KM):monomer (M):çapraz bağlayıcı (ÇB) mol oranları ve miktarları

Polimer Adı (KM:M:ÇB Mol Oranları)	Kalıp Molekül			Monomer		Çapraz Bağlayıcı	Başlatıcı
	Naringin (mg)	Hesperidin (mg)	Naringenin (mg)	4-Vinilpiridin (mL)	Akrilamid (mg)	EDMA (mL)	AIBN (mg)
MIP1 (1:4:20)	—	282,4	—	0,2	—	1,74	18
MIP2 (1:4:20)	268,5	—	—	0,2	—	1,74	18
MIP3 (1:2:10)	268,5	—	—	0,1	—	0,89	9,1
MIP4 (1:5:30)	268,5	—	—	0,25	—	2,7	26,6
MIP5 (1:2:10)	—	—	125,9	0,1	—	0,89	9,1
MIP6 (1:5:30)	—	—	125,9	0,25	—	2,7	26,6
MIP7 (1:7:46,25)	232,2	—	—	—	200	3,5	10 [52]
MIP8 (1:6:20)	170,1	—	—	0,2	—	1,14	40 [70]

3.3.1. Moleküler Baskılı Polimerlerin Yıkınması

MIP1, MIP2, MIP3, MIP4, MIP5, MIP6 ve baskısız çiftleri 4:1 metanol:asetik asit karışımı, MIP7, MIP8 ve baskısız çiftleri 9:1 metanol:asetik asit karışımı kullanılarak 95°C’de Soxhlet ekstraksiyon sistemiyle yıkandı. Asetik asiti uzaklaştırmak için tüm polimerler metanolla yıkandı. Polimerler süzgeç kağıdından süzülüp havada kurutuldu.

3.4. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARININ ANALİZE HAZIRLANMASI

3.4.1. Portakal Suyu Endüstrisi Atıklarının Kurutulması

Meyve konsantresi üreten Konfrut Gıda San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilen portakal suyu endüstrisi atıkları el ile parçalanarak freeze-dryer'da -40°C 'de yaklaşık 18-24 saat süreyle kurutuldu. Analizleri öncesinde havanda öğütülerek ince toz haline getirildi.

3.4.2. Kurutulmuş Portakal Suyu Endüstrisi Atıklarının Ekstraksiyonu

Dondurularak kurutulmuş portakal suyu endüstrisi atıkları %70 metanol, aseton, distile su ve 2:1:3 oranında kloroform:metanol:distile su [71] karışımıyla ekstrakte edildi.

Bu amaçla; %70 metanol, aseton ve distile su ile yapılan ekstraksiyonlar için dondurularak kurutulmuş portakal suyu endüstrisi atıklarından 1'er g tartıldı. Önce çözücünün 10 mL'si ile 30 dakika, daha sonra ikinci bir 10 mL'si ile yine 30 dakika ve son olarak 5 mL çözücü ile 30 dakika daha ultrasonik banyoda ağızları kapalı cam erlenler içinde üç kademedeki ekstrakte edildi. Bu üç ekstrakt bir araya getirilerek son hacim 25 mL'ye tamamlandı. Tüm ekstraktlar önce süzgeç kağıdından daha sonra %70 metanollü ve distile sulu ekstraktlar GF/PET (Glass fiber/poliester) 1,0/0,45 μm 'lik, asetonlu ekstrakt ise PTFE (Politetrafloroetilen) 0,45 μm 'lik enjektör uçlu mikrofiltreden süzüldü ve analiz öncesi -20°C 'de saklandı.

2:1:3 oranında kloroform:metanol:distile su karışımıyla yapılan ekstraksiyon için; dondurularak kurutulmuş portakal suyu endüstrisi atıklarından 2 g tartılıp 30 mL karışım eklendi. 30 dakika ultrasonik banyoda ağızları kapalı cam erlenler içinde ekstrakte edildi. Alt faz ayırma hunisiyle alındı. Portakal suyu endüstrisi atığı örneklerini de içeren üst faz 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip dekante edildi. 30 mL ve 15 mL karışım ile aynı işlemler tekrarlanarak üç kademedeki ekstraksiyon işlemi tamamlandı. İki farklı fazdaki üçer ekstrakt ayrı ayrı bir araya getirilerek kloroform fazında son hacim 25 mL'ye, metanol:distile su fazında son hacim 50 mL'ye tamamlandı. Tüm ekstraktlar önce süzgeç kağıdından sonra metanol:distile su fazı GF/PET 1,0/0,45 μm 'lik, kloroform fazı ise PTFE 0,45 μm 'lik enjektör uçlu mikrofiltreden süzüldü ve analiz öncesi -20°C 'de saklandı.

MIP'lerde flavanon ayırımı (derişiklendirmesi) denemeleri için portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktının metanol:distile su fazı freeze-dryer'da -40°C 'de yaklaşık 4-6 saat süreyle kurutuldu. En iyi geri bağlama asetonitrilde olduğundan, fakat ekstrakt asetonitrilde çözünmediğinden %30 metanol-%70 asetonitril karışımı eklenerek ultrasonik banyoda çözdürüldü. PTFE $0,45\ \mu\text{m}$ 'lik enjektör uçlu mikrofiltreden süzüldü ve analiz öncesi -20°C 'de saklandı.

3.5. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARININ TOPLAM ANTİOKSİDAN KAPASİTELERİNİN BELİRLENMESİ

Portakal suyu endüstrisi atıklarının toplam antoksidan kapasitelerinin belirlenmesi için ana bilim dalımızda geliştirilen CUPRAC yöntemi seçildi.

Bir deney tüpü içerisine sırasıyla 1 mL $1,0 \times 10^{-2}$ M Cu(II) klorür çözeltisi, 1 mL $7,5 \times 10^{-3}$ M neokuproin çözeltisi ve 1 mL 1 M amonyum asetat tampon (pH 7,0) çözeltisi ilave edildi. Daha sonra x mL antioksidan standart çözeltisinden veya portakal suyu endüstrisi atığı örneğinden ve son olarak (1,0-x) mL distile su ilave edilerek çözeltiler karıştırıldı. Tüpler oda sıcaklığında ağzı kapalı olarak 30 dakika bekletildi. Süre sonunda çözeltilerin 450 nm'deki absorbanları içinde örnek bulunmayan referans çözeltiliye karşı ölçüldü [72].

Kalibrasyon doğruları troloks, naringin ve hesperidin antioksidan standartlarıyla oluşturulup, molar absorplama katsayıları hesaplandı.

Yöntem, portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktlarının sırasıyla flavonoidleri ve karotenoidleri içeren metanol:distile su ve kloroform fazı örneklerine uygulandı.

3.6. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARININ FENOLİK BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Metanol (A) ve %0,2 *o*-H₃PO₄ (B) ikili çözücü sisteminden oluşan hareketli fazın gradient elüsyonu uygulanarak HPLC analizi ile belirlendi.

- 3 dakika %55 (A), eğim (1,0)
- 3 dakika %60 (A), eğim (1,0)
- 3 dakika %65 (A), eğim (1,0)
- 3 dakika %70 (A), eğim (1,0)
- 3 dakika %75 (A), eğim (1,0)
- 3 dakika %80 (A), eğim (1,0)
- 2 dakika %85 (A), eğim (1,0).

Akış hızı 1 mL/dakika'dır. Dedeksiyon (belirleme) dalga boyu 280 nm'dir.

Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktının metanol:distile su fazı, MIP ve DPA-6S SPE kartuş eluatları ve antioksidan standartları enjekte edilmeden önce kolon, 10 dakika %100 metanolle yıkandı ve 10 dakika da dengelendi.

3.7. MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERE GERİ BAĞLAMA ÇALIŞMALARI

3.7.1. Moleküler Baskılı Polimerlerin Şartlandırılması

Polimerler -60 cmHg ve 50°C'de vakum etüvünde 2 saat süreyle kurutuldu. 0,1 g (standart çözeltilerle bekletilen MIP5-NIP5, MIP7-NIP7), 0,15 g (ekstraktla bekletilen MIP5-NIP5) ve 1 g (ekstraktla bekletilen MIP7-NIP7) tartılan polimerlere 10 mL asetonitril, THF veya metanol eklendi. Oda sıcaklığında, dakikada 160 ileri-geri hareketli çalkalayıcıda 1 saat çalkalandı. Çözücüler dekante edildi.

3.7.2. Moleküler Baskılı Polimerlere Standart Çözeltilerinin Yüklenmesi

Şartlandırılan polimerlere asetonitril, THF veya metanolle hazırlanan 5×10^{-5} M standart çözeltilerinden 5'er mL eklendi. 24 saat bekletildikten sonra spektrumları çizildi. Standart çözeltilerinin spektrumlarıyla karşılaştırılarak polimerlerin adsorpsiyon yüzdeleri belirlendi.

3.8. SENTETİK ANTİOKSİDAN KARIŞIMI İLE KATI FAZ EKSTRAKSİYONU (SPE) ÇALIŞMALARI

SPE kartuşu 10 mL metanol ve 10 mL 0,01 N HCl geçirilerek şartlandırıldı. 4 defa 2'şer mL %25 metanollü 5×10^{-4} M naringin-hesperidin karışımı geçirilerek kartuşlar yüklendi (Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazı %25 metanollü olduğu için naringin-hesperidin karışımı %25 metanolde hazırlandı.). Karışımdaki bileşenlerin tutulması, eluatların spektrumları çizilerek izlendi. Her elüsyondan sonra kartuş temizlenip, şartlandırılıp, yeniden yükleme yapılması koşuluyla 2'şer mL %20, %22, %25 ve %30 N,N-Dimetilformamid (DMF) ile elüsyon işlemi yapıldı. Eluatların spektrumları ve kromatogramları çizildi.

3.9. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARINDAN FENOLİK BİLEŞİKLERİN AYRILMASI (DERİŞİKLENDİRİLMESİ) ÇALIŞMALARI

3.9.1. Hazırlanan MIP'ler Kullanılarak

Şartlandırılan polimerlere 10 kez seyreltilen %30 metanol-%70 asetonitril karışımında çözülen portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktından 5'er mL eklendi (MIP'lerin geri bağlama kapasitesi iyi olmadığından ekstrakt 10 kez seyreltilerek kullanıldı.). 24 saat bekletildikten sonra spektrumları çizildi. Başlangıç çözeltisinin spektrumuyla karşılaştırıldı.

3.9.2. Katı Faz Ekstraksiyonu

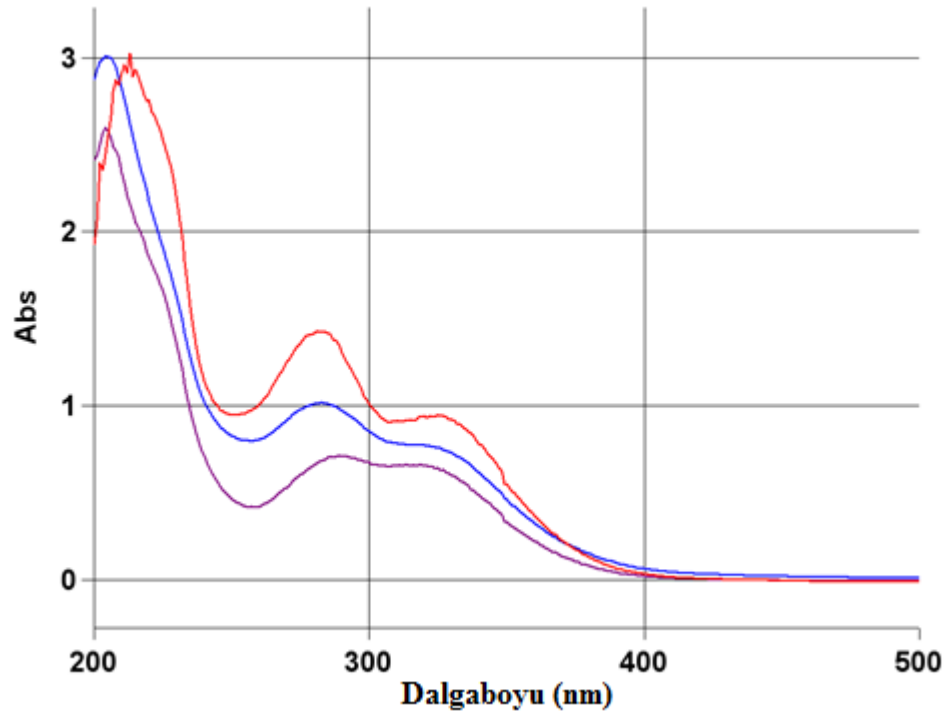
SPE kartuşu 10 mL metanol ve 10 mL 0,01 N HCl geçirilerek şartlandırıldı. 3 defa 2'şer mL portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazı geçirilerek kartuşlar yüklendi. Ekstrakttaki bileşenlerin tutulması, eluatların spektrumları çizilerek izlendi. Fenolik harici bileşikleri uzaklaştırmak için 2 defa 2'şer mL 0,01 N HCl geçirildi ve spektrumları çizildi [73]. Kartuş azot gazı ile kurutuldu. Elüsyon işlemi sırasıyla 3 defa 2'şer mL %0,1 HCl-%20 metanol, 2 defa 2'şer mL %20 metanol ve kartuş temizlenene kadar 2'şer mL metanol geçirilerek yapıldı. Her bileşim için eluatların spektrumları ve kromatogramları çizildi.

SPE kartuşu 10 mL metanol ve 10 mL 0,01 N HCl geçirilerek Şartlandırıldı. nceki denemede spektrumlarda en yüksek absorbans gösteren iki eluat (3. ve 4. % 100 metanol eluatları) birleştirilip kartuŐtan geçirilerek naringin ve hesperidinin birbirinden ayrılması denemeleri yapıldı. 2 defa 2'Şer mL %30 DMF, daha sonra 2 defa 2'Şer mL metanol geçirilip spektrumları ve kromatogramları çizildi. Kartuş temizlenene kadar metanol geçirildi. SPE kartuşu 10 mL metanol ve 10 mL 0,01 N HCl geçirilerek Şartlandırıldı. 2. kez 2 mL %30 DMF geçirilerek elde edilen eluat kartuşa yüklenerek bir önceki aŐamada bir miktar deriŐiklendirilen hesperidinin daha fazla ayrılmasına çalıŐıldı. 3 defa 2'Şer mL %22 DMF geçirilerek spektrumları çizildi. 3. kez geirilenin kromatogramı da çizildi.

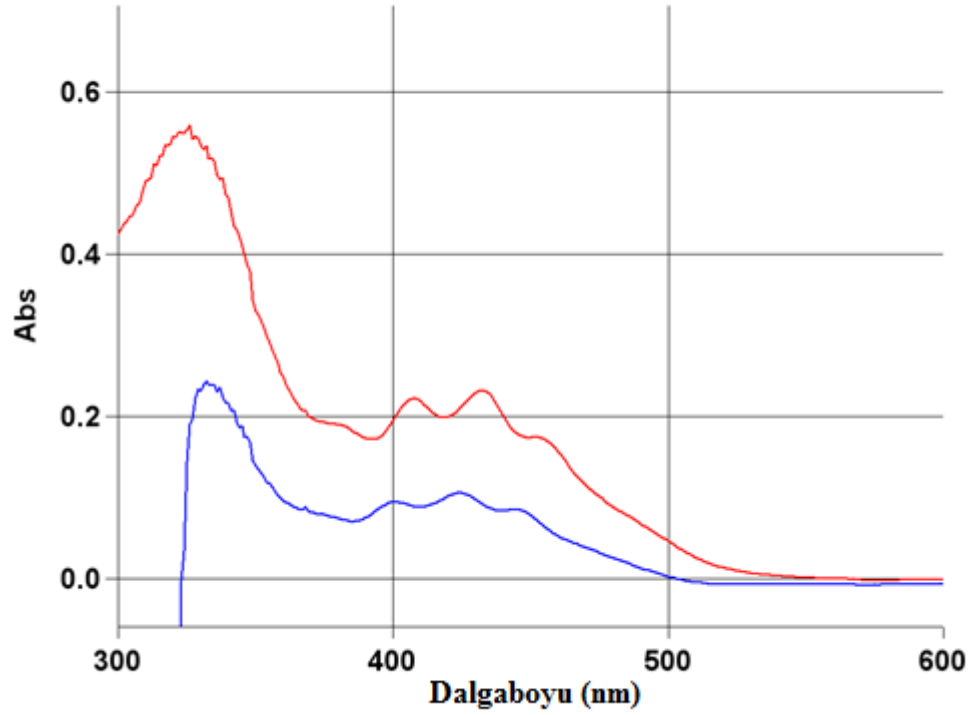
4. BULGULAR

4.1. UYGUN EKSTRAKSİYON ÇÖZÜCÜSÜNÜN SEÇİLMESİ

Şekil 4.1 ve 4.2’de farklı çözücülerle ekstrakte edilmiş portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktlarının spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.1: 20 kez seyreltilmiş portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktlarının spektrumları
(%70 metanol, 2:1:3 kloroform:metanol:distile su karışımı metanol:distile su fazı, distile su)



Şekil 4.2: 10 kez seyreltilmiş portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktlarının spektrumları

(2:1:3 kloroform:metanol:distile su karışımı kloroform fazı, aseton)

Spektrumlarından görüldüğü üzere flavonoidlerin ekstraksiyonu için en uygun çözücü %70 metanol çözeltisi olarak belirlenmesine rağmen, karotenoidlerin ekstraksiyonu için uygun çözücünün kloroform olması ve flavonoidler ile karotenoidlerin aynı anda ekstraksiyonuna olanak sağlamasından dolayı literatürde bu amaçla papaya, mango gibi çeşitli meyvelerde karotenoidlerin ve fenolik bileşiklerin tayininde kullanılmış olan 2:1:3 kloroform:metanol:distile su karışımı [71] tercih edilmiştir.

4.2. CUPRAC YÖNTEMİNİN ÇEŞİTLİ ANTIÖKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI VE TEAC KATSAYILARININ BELİRLENMESİ

Troloks, naringin ve hesperidin CUPRAC yöntemiyle kalibrasyon doğruları çizildi. Tablo 4.1'de verilen doğru denklemlerinde x: derişim, y: absorbands ve r: korelasyon katsayısını ifade etmektedir.

Naringin ve hesperidin standart antioksidanlarına uygulanan CUPRAC yöntemi sonrasında, absorbands ve molar derişim arasında çizilen kalibrasyon grafiğinin eğiminden molar absorplama katsayıları (ϵ) bulunarak, bu değerin troloksun molar

absorplama katsayısına bölünmesiyle elde edilen troloks eşdeğeri antioksidan kapasite (TEAC) değerleri hesaplandı. Tablo 4.1’de çeşitli antioksidan standartlarının CUPRAC yöntemine göre elde edilen TEAC değerleri görülmektedir.

Tablo 4.1: Çeşitli antioksidan standartları için CUPRAC yöntemi verileri ve TEAC değerleri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)	TEAC _{CUPRAC}
Troloks	$1,5 \times 10^4 x + 0,0138$	0,9998	1
Naringin	$4,6 \times 10^2 x + 0,159$	0,9992	0,03
Hesperidin	$1,2 \times 10^4 x + 0,2749$	0,9992	0,8

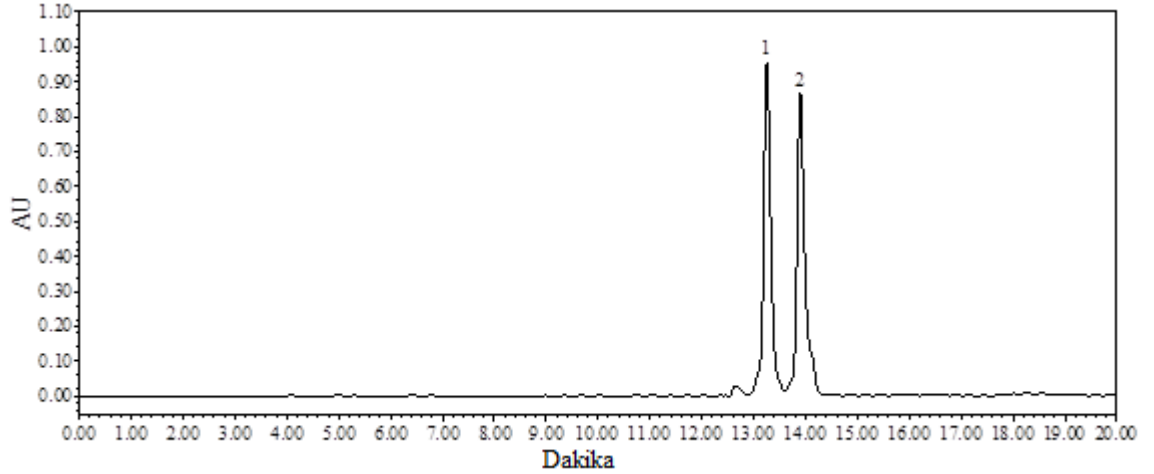
4.3. HPLC YÖNTEMİNİN ÇEŞİTLİ ANTIOKSİDAN STANDARTLARINA UYGULANMASI

Tablo 4.2’de çalışılan örneklerde varlığı saptanan fenolik bileşiklerin standartlarının HPLC’de geliştirilen metotla elde edilen pik alanları ile derişim arasında çizilen doğru denklemleri görülmektedir. Tablo 4.2’de verilen doğru denklemlerinde y: pik alanı, c: derişim ve r: korelasyon katsayısını ifade etmektedir.

Tablo 4.2: Çeşitli antioksidan standartlarının HPLC verileri

Antioksidan	Doğru Denklemi	(r)
Naringin	$3 \times 10^{10} x + 2 \times 10^5$	0,9989
Hesperidin	$4 \times 10^{10} x - 2 \times 10^5$	0,9994

Şekil 4.3’de naringin ve hesperidin standartlarını içeren sentetik karışımın kromatogramı görülmektedir.

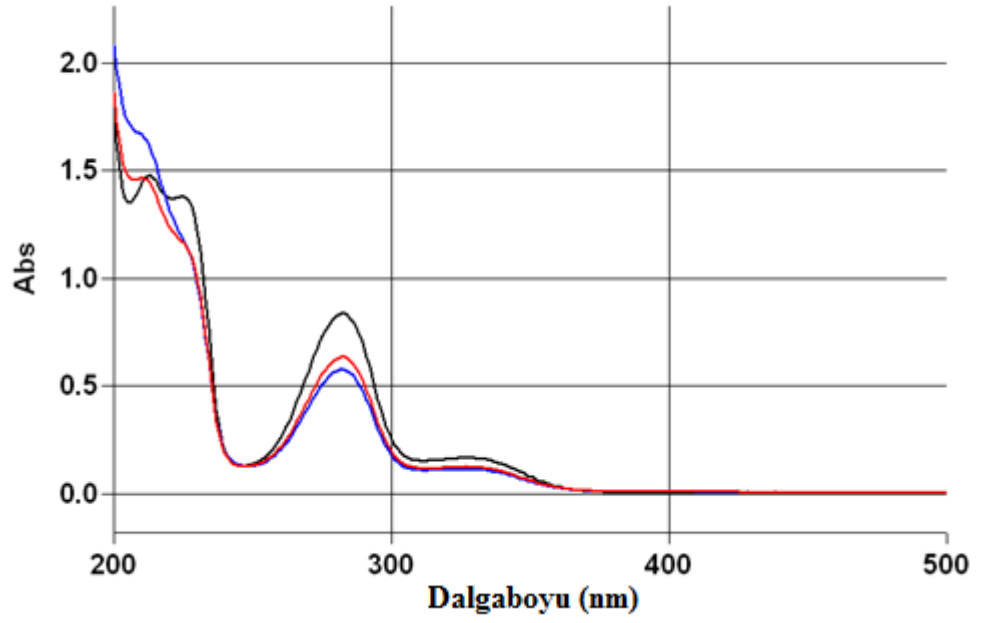


Şekil 4.3: Çeşitli antioksidan standartlarını içeren sentetik karışımın kromatogramı

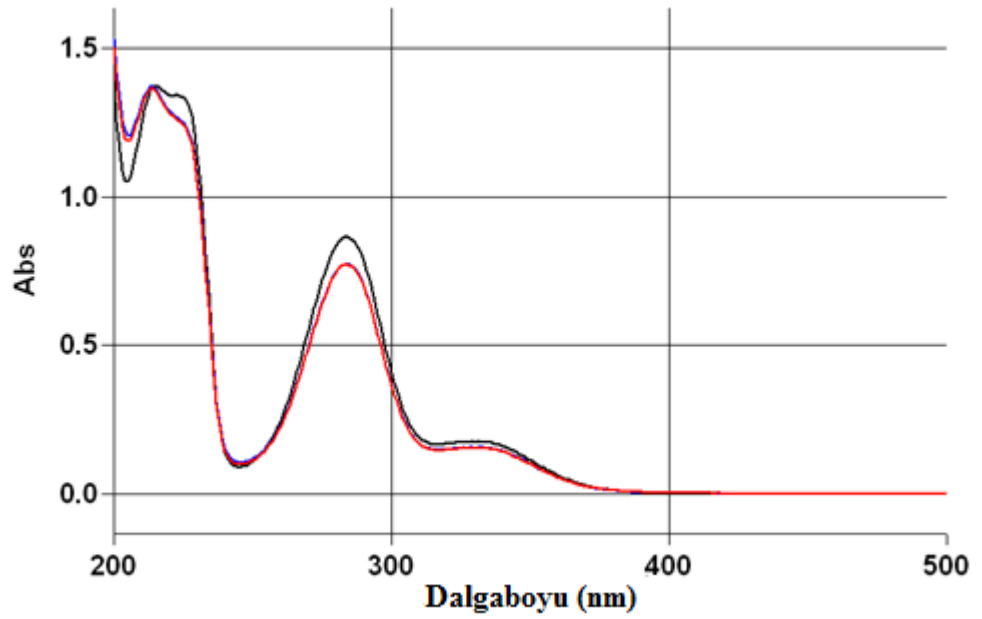
(1: Naringin, 2: Hesperidin)

4.4. SENTEZLENEN MOLEKÜLER BASKILI POLİMERLERE ÇEŞİTLİ ANTİOKSİDAN STANDARTLARININ YÜKLENMESİ

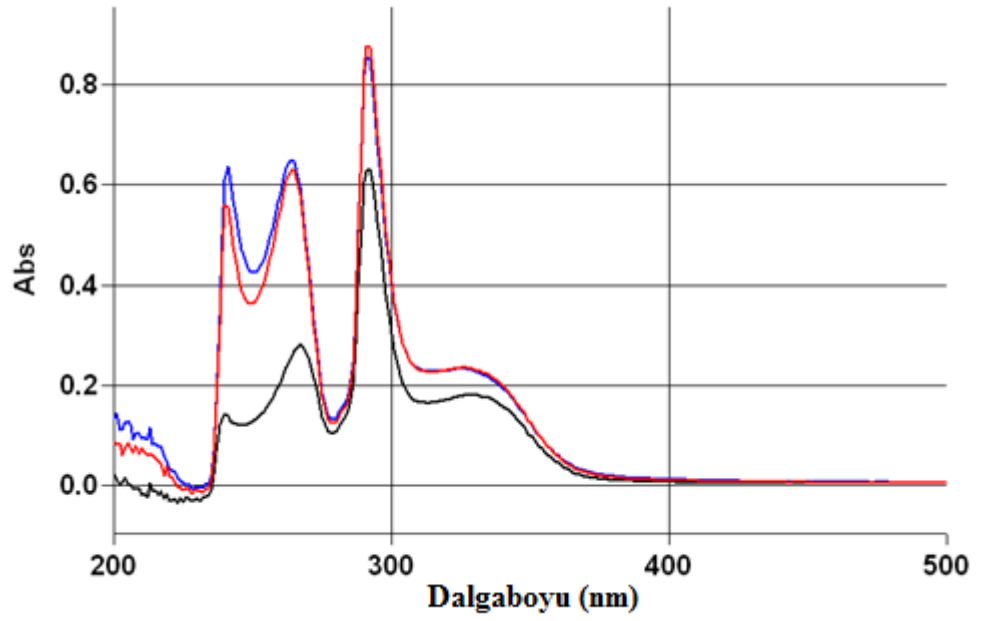
Sentezlenen polimerlere kalıp moleküllerinin standart çözeltileri ile geri bağlama çalışmaları yapılarak sentez sırasında kalıp molekülünün baskılanıp baskılanmadığı belirlendi. Bu işlem yapılırken standart çözeltiler farklı çözücülerde hazırlanarak çözücünün geri bağlama üzerindeki etkisi incelendi. Şekil 4.4-4.26'da polimerlerin standart çözeltileri ile 24 saat oda sıcaklığında bekletilmesi sonunda elde edilen spektrumlarının 24 saat oda sıcaklığında bekletilen standart çözeltilerin spektrumları ile karşılaştırılması görülmektedir. Hesperidin tetrahidrofuranda çözünmediği için, MIP1 sentezlenmesine rağmen hesperidin baskılanmadığı düşünüldüğünden MIP1 ve NIP1 çiftine antioksidan standartları yüklenmemiştir.



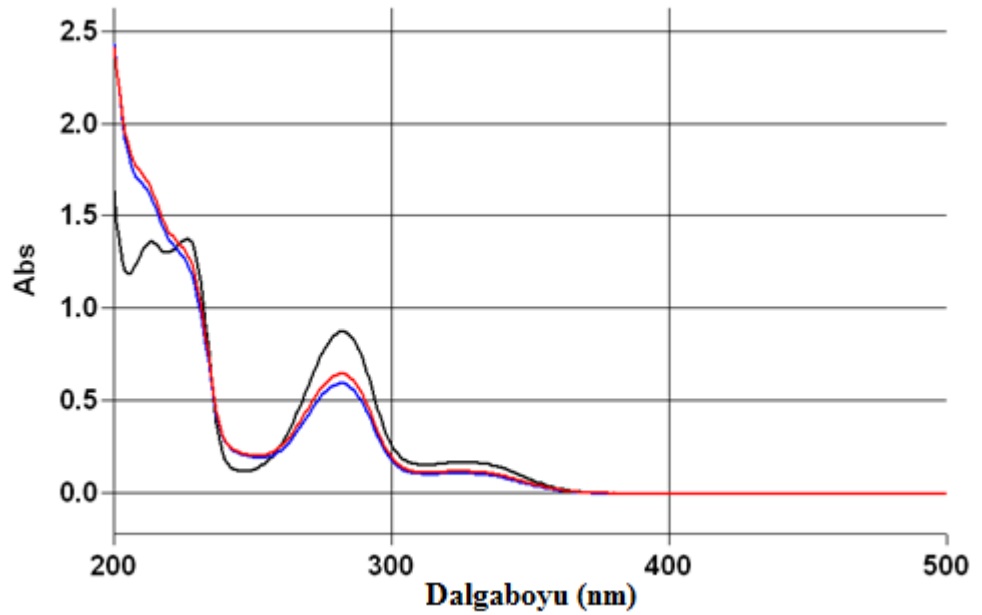
Şekil 4.4: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP2 ve NIP2 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



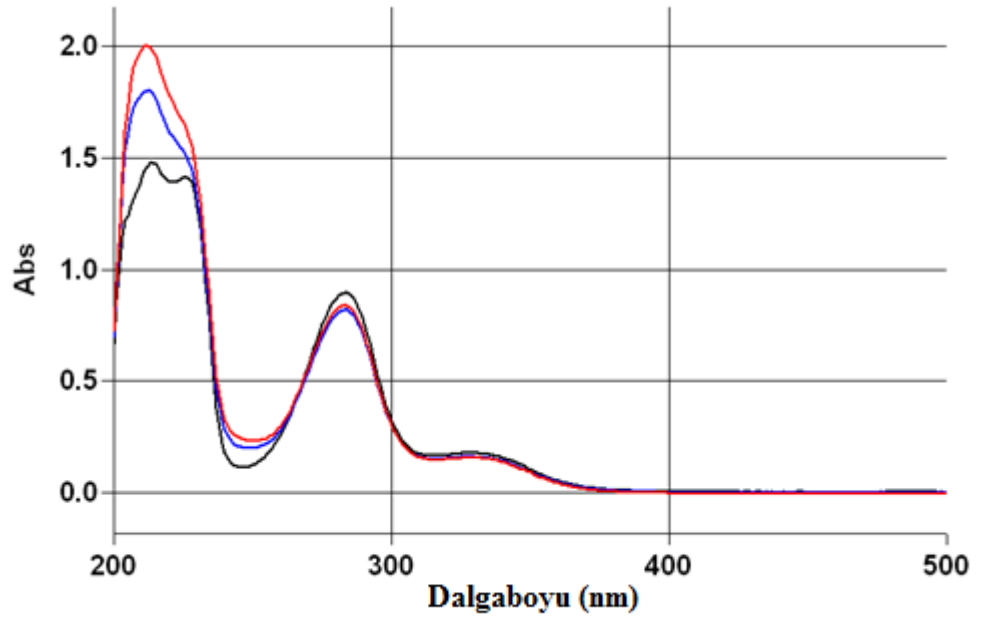
Şekil 4.5: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP2 ve NIP2 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



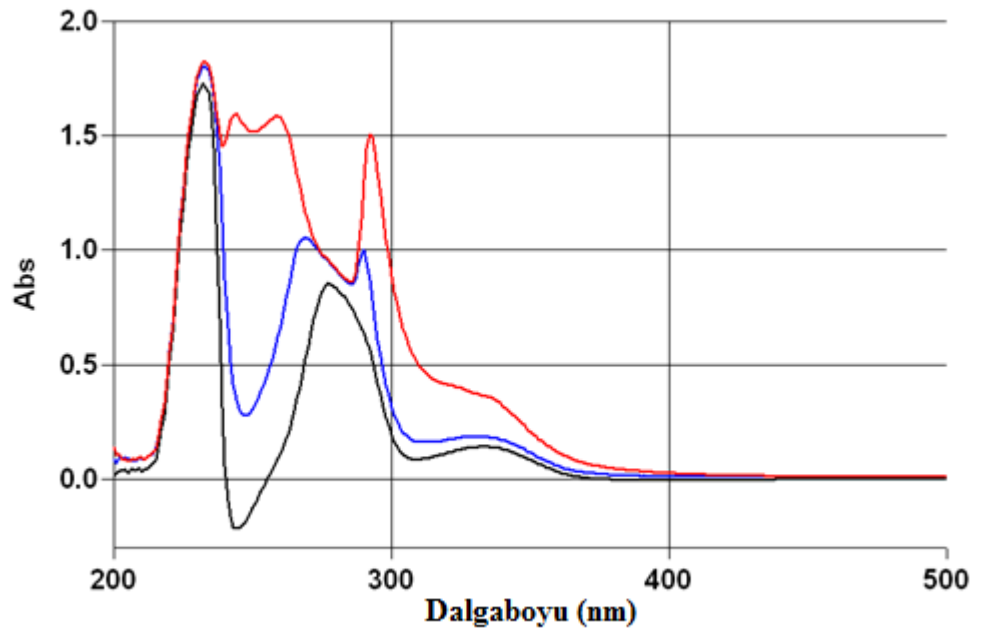
Şekil 4.6: Tetrahidrofuranlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP2 ve NIP2 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



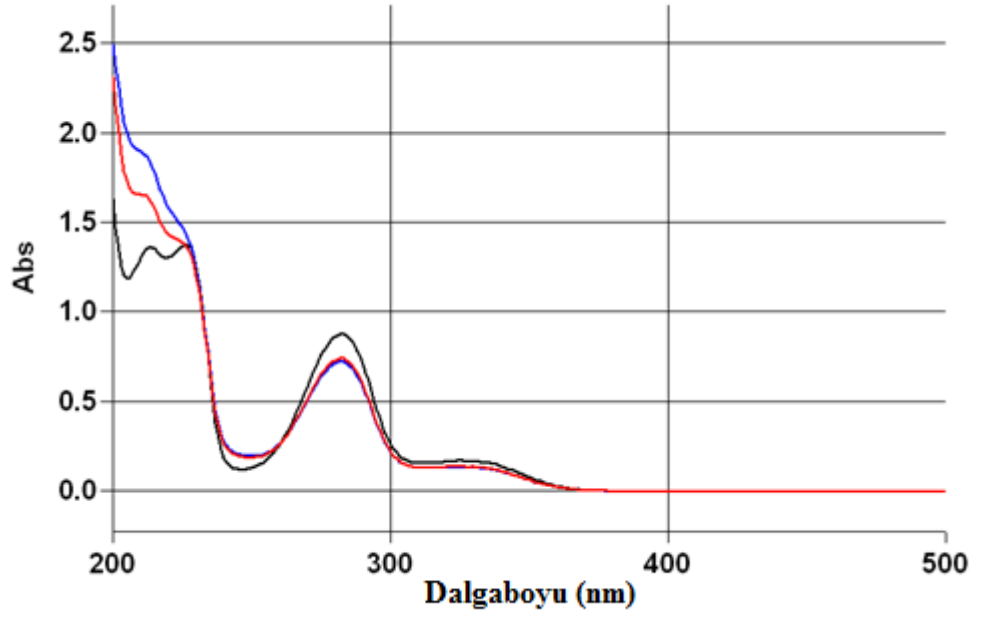
Şekil 4.7: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP3 ve NIP3 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



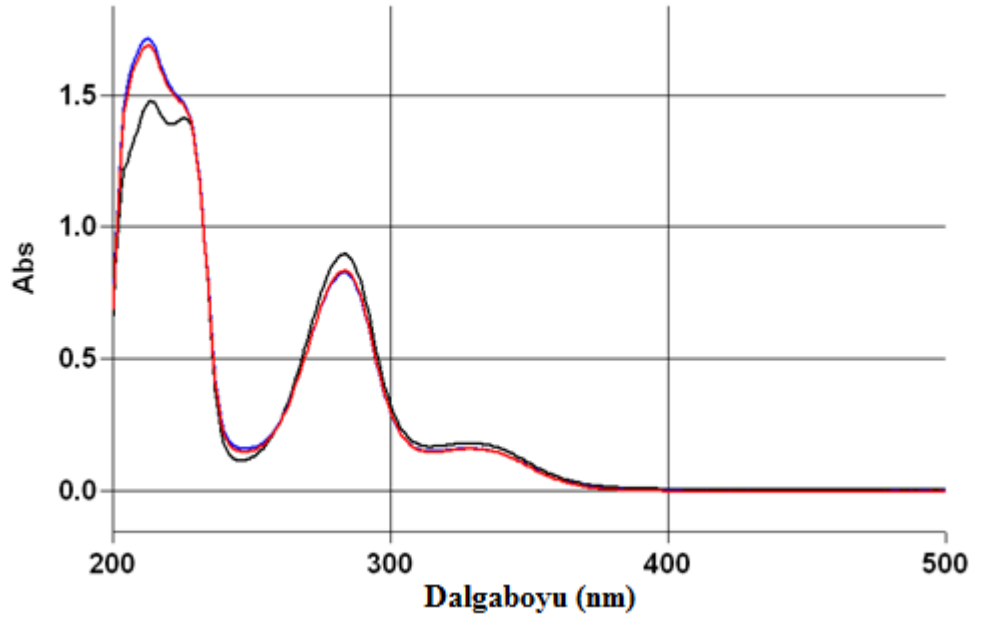
Şekil 4.8: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP3 ve NIP3 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



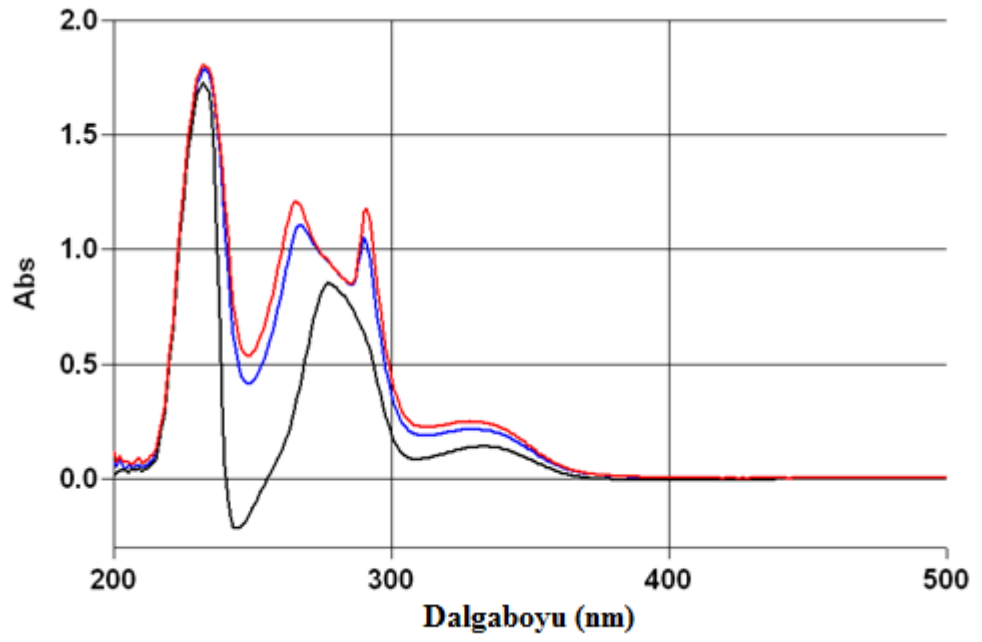
Şekil 4.9: Tetrahidrofuranlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP3 ve NIP3 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



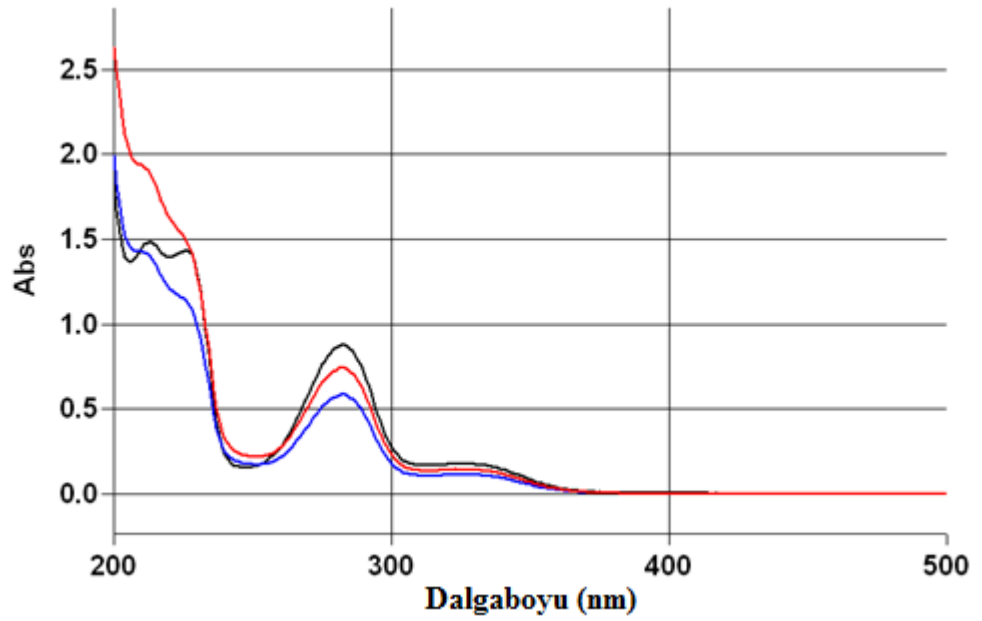
Şekil 4.10: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP4 ve NIP4 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



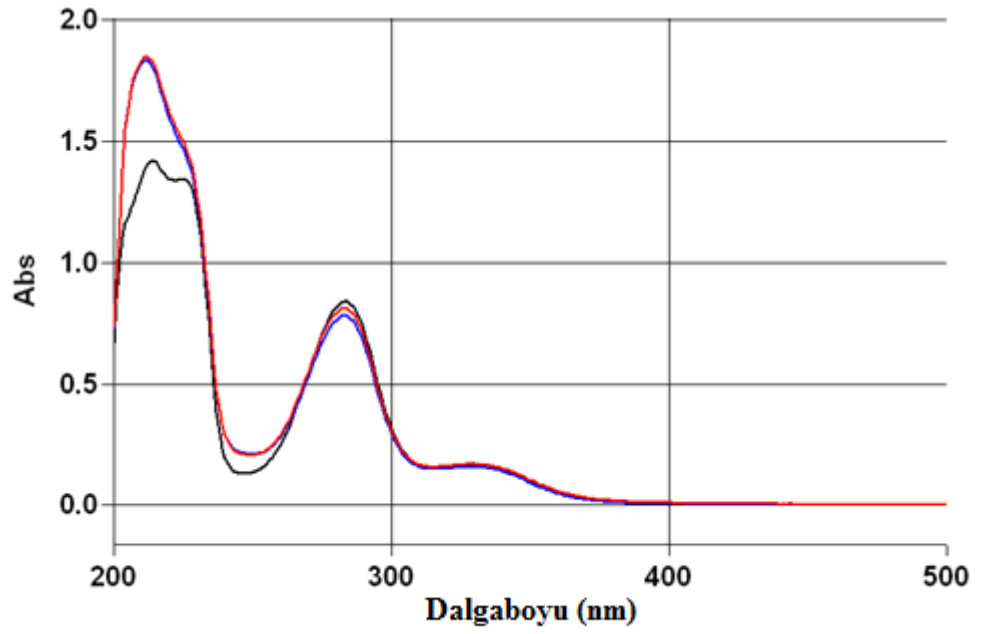
Şekil 4.11: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP4 ve NIP4 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



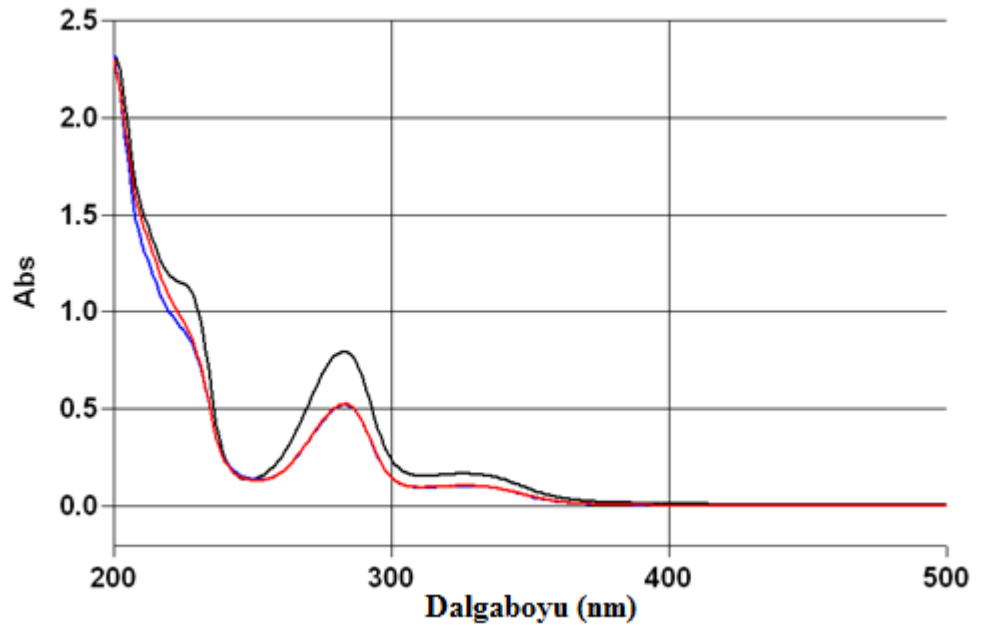
Şekil 4.12: Tetrahidroforanlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP4 ve NIP4 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



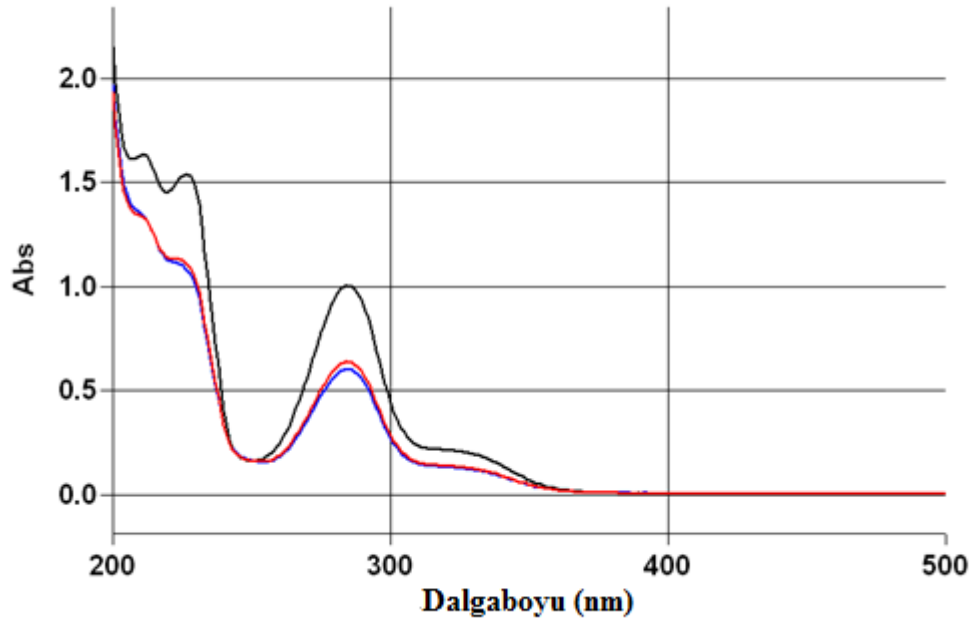
Şekil 4.13: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



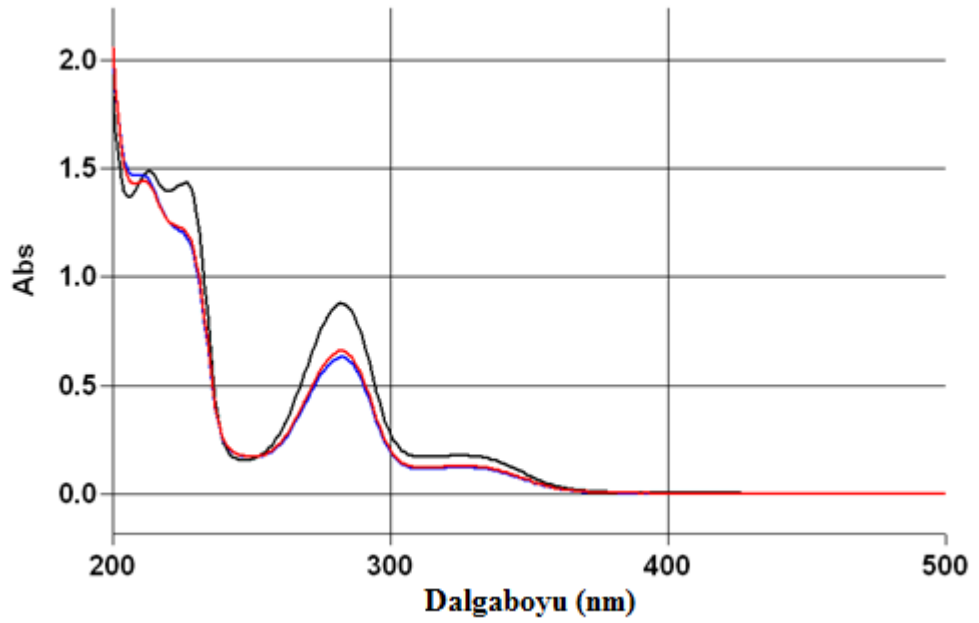
Şekil 4.14: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



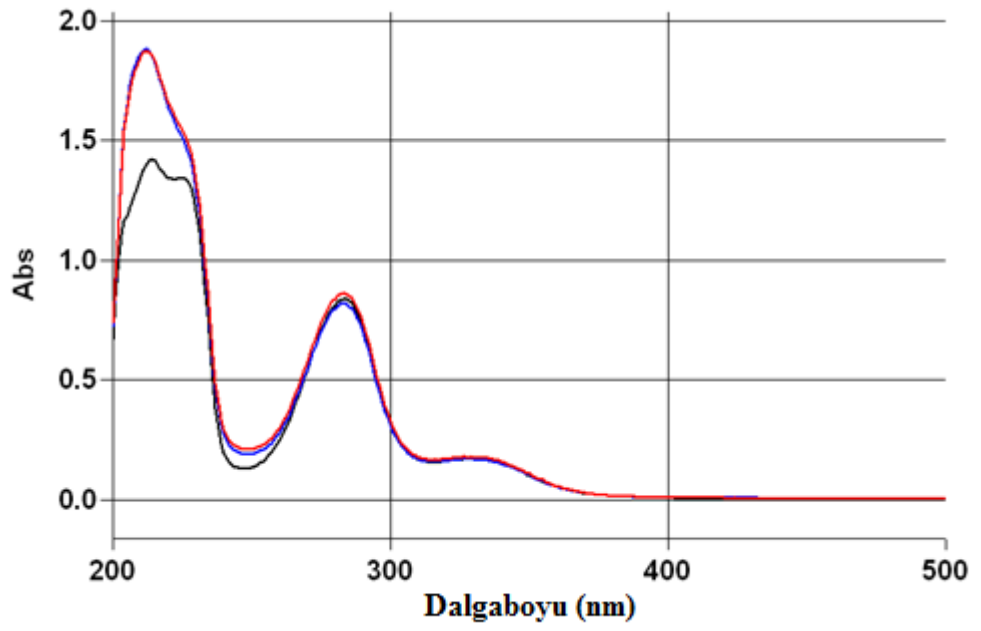
Şekil 4.15: Asetonitrilli 5×10^{-5} M hesperidin çözeltisi, hesperidin çözeltisinin MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



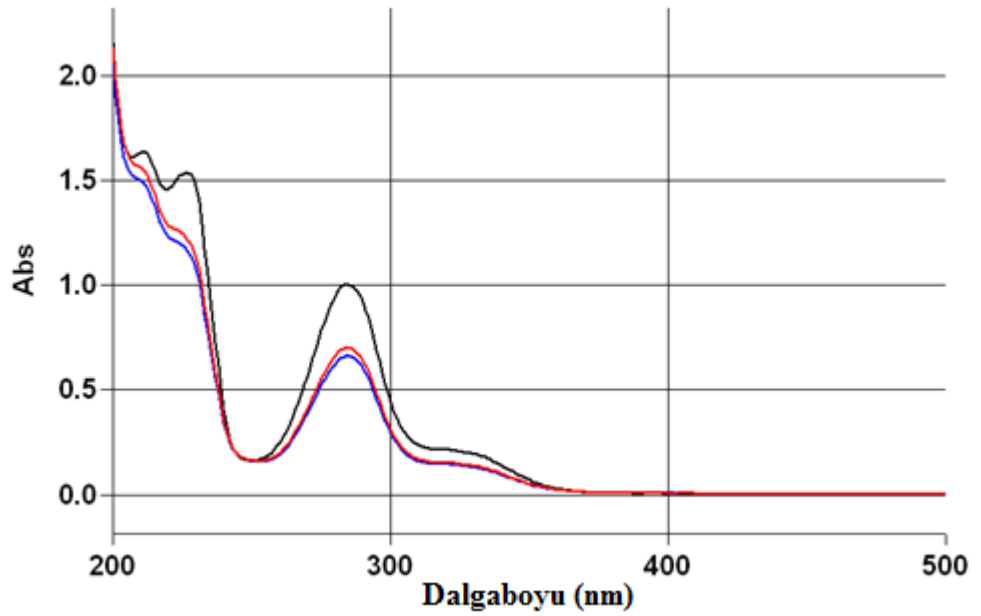
Şekil 4.16: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringenin çözeltisi, naringenin çözeltisinin MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



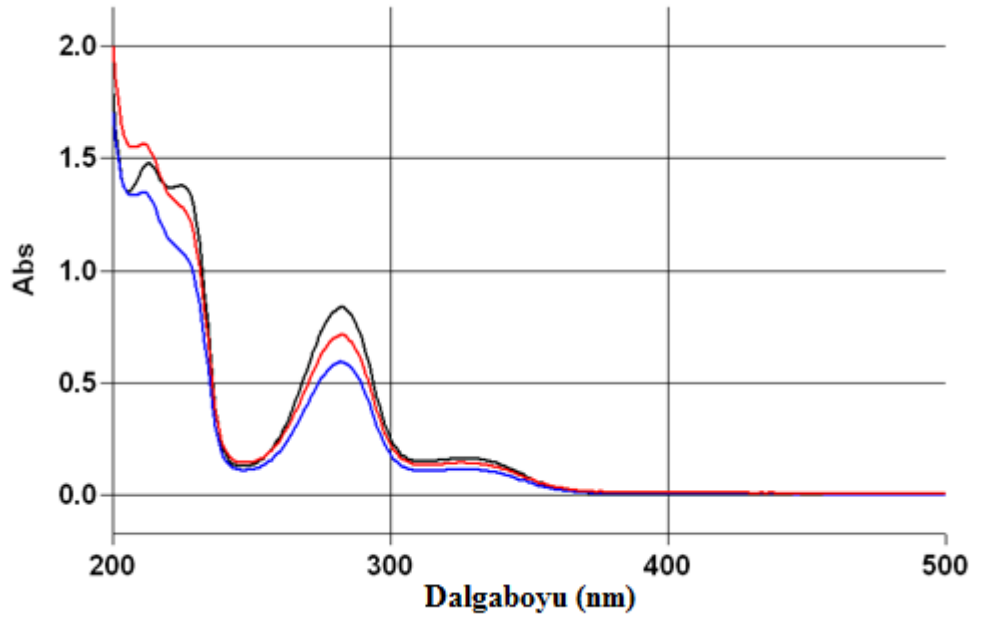
Şekil 4.17: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP6 ve NIP6 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



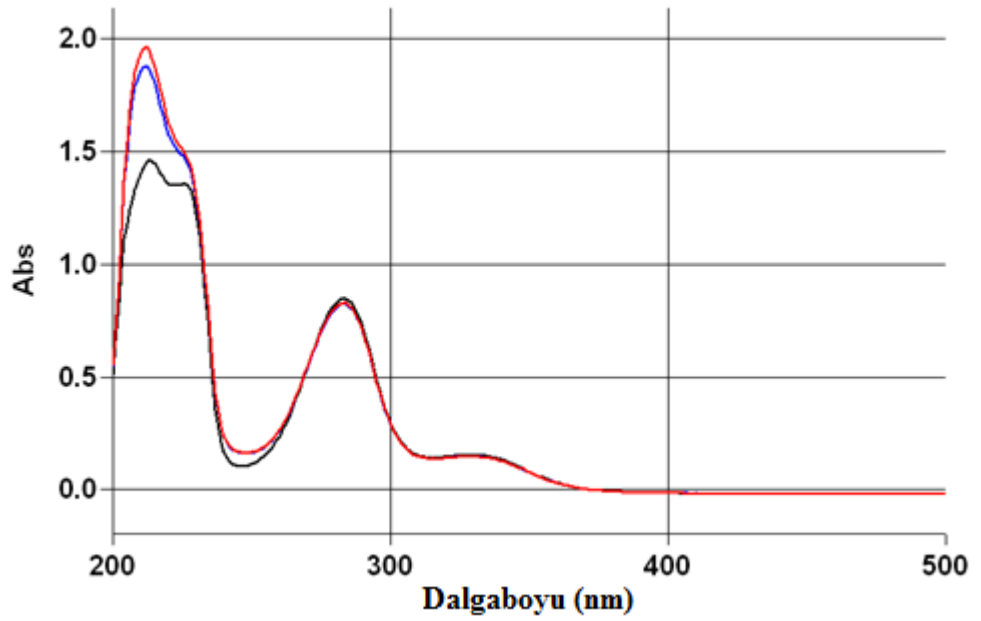
Şekil 4.18: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP6 ve NIP6 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



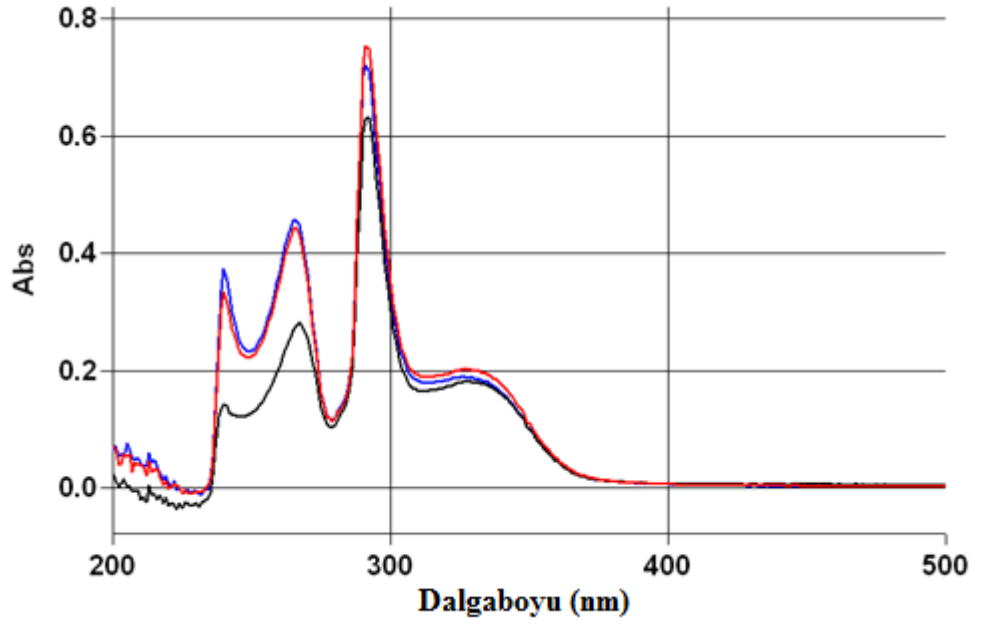
Şekil 4.19: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringenin çözeltisi, naringenin çözeltisinin MIP6 ve NIP6 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



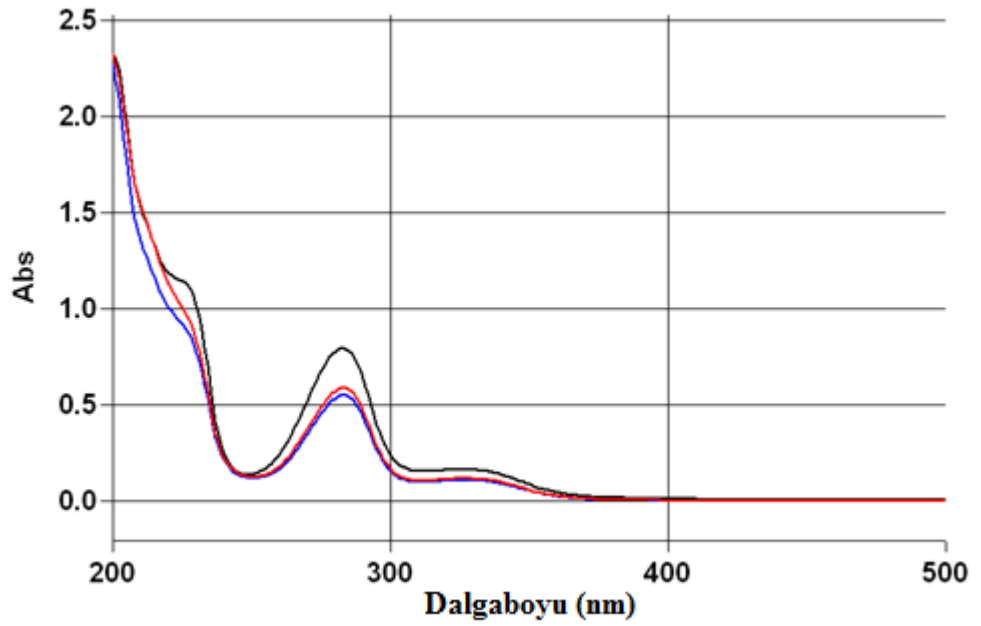
Şekil 4.20: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



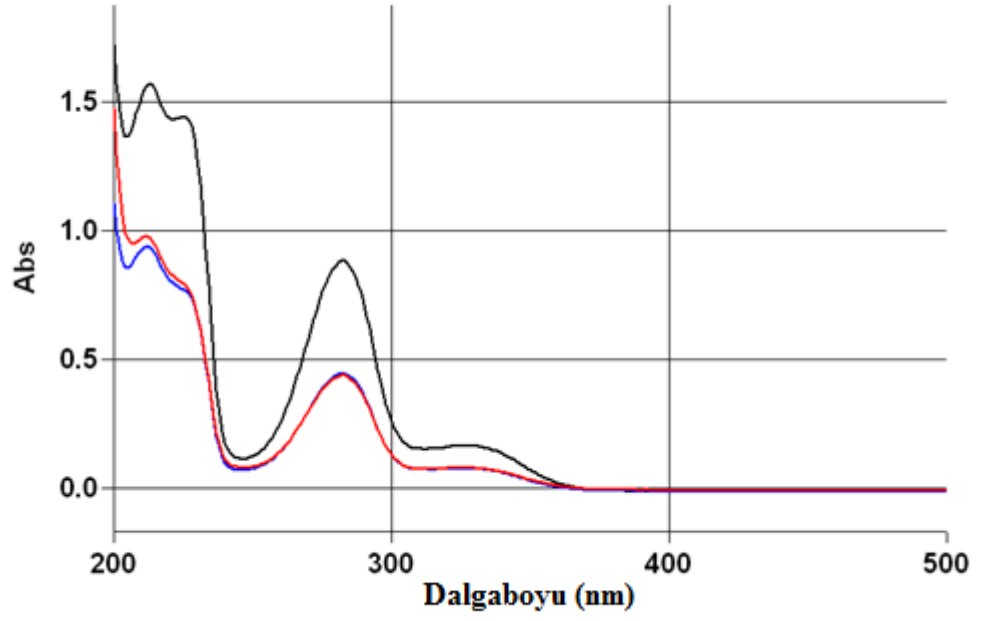
Şekil 4.21: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



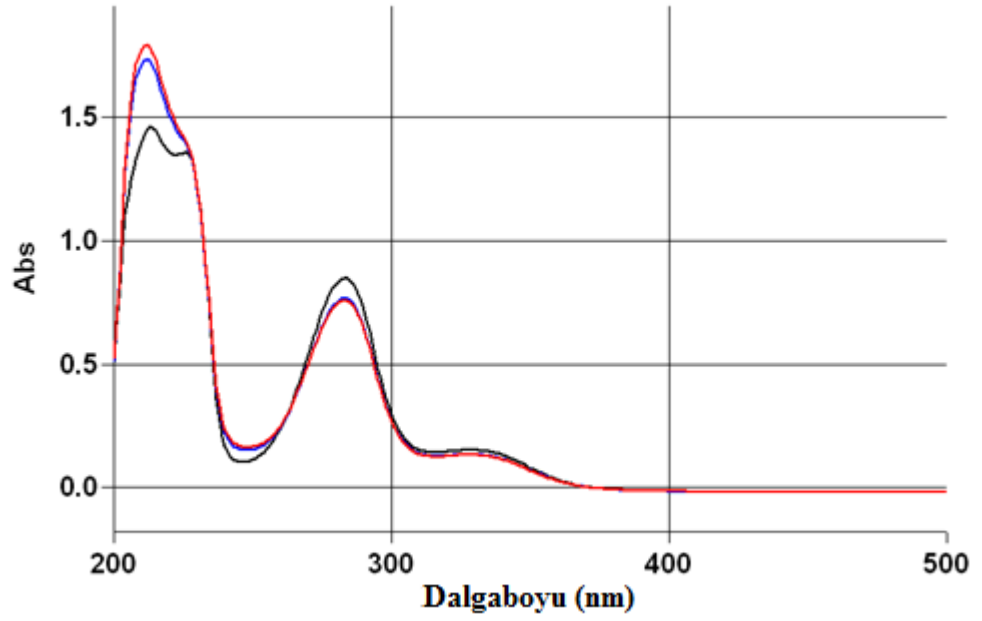
Şekil 4.22: Tetrahidroforanlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



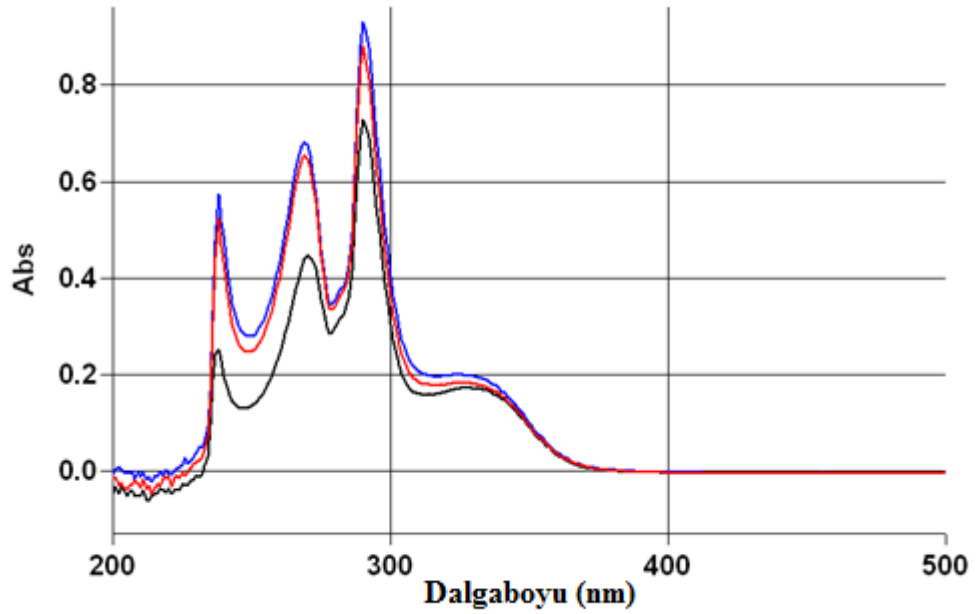
Şekil 4.23: Asetonitrilli 5×10^{-5} M hesperidin çözeltisi, hesperidin çözeltisinin MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



Şekil 4.24: Asetonitrilli 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP8 ve NIP8 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları



Şekil 4.25: Metanollü 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP8 ve NIP8 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları

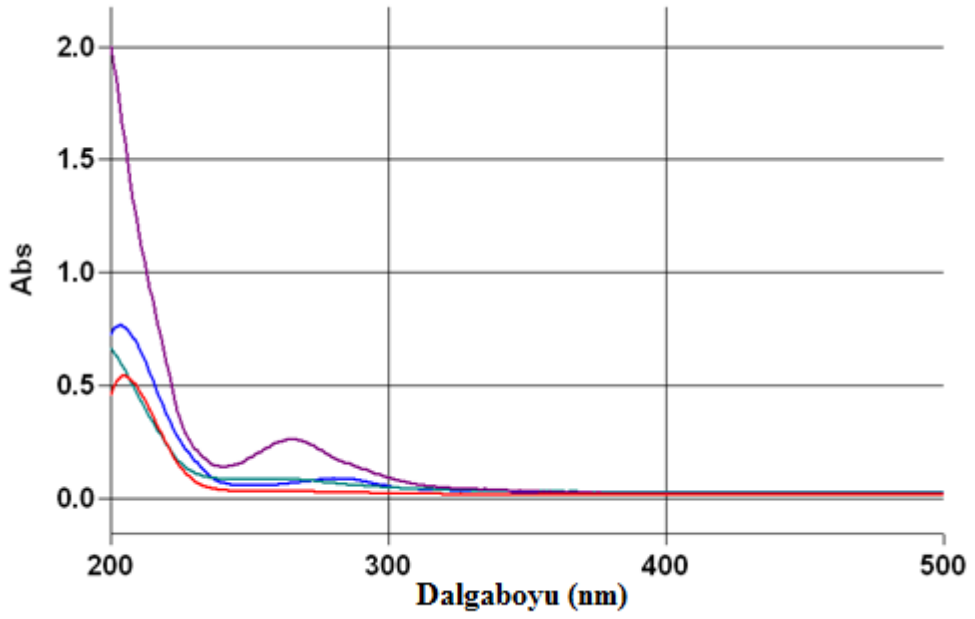


Şekil 4.26: Tetrahidrofuranlı 5×10^{-5} M naringin çözeltisi, naringin çözeltisinin MIP8 ve NIP8 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları

Geri bağlama çalışmaları neticesinde elde edilen spektrumlar incelendiğinde; tetrahidrofuranla yapılan denemelerde moleküler baskılı ve baskısız polimerlerin maksimum absorbanlarının standart çözeltisinin maksimum absorbanından daha yüksek olduğu ve moleküler baskılı-baskısız polimerlerin absorbanlarında bir farklılık olmadığı, metanolla yapılan denemelerde MIP2, MIP3, MIP4 ve MIP8 baskısız polimerleriyle aynı miktarda geri bağlama yaparken diğer polimerlerin hiç geri bağlama yapmadığı, asetonitrille yapılan denemelerde ise tüm polimerlerin geri bağlama yaptığı görülmektedir. Buna göre asetonitrille yapılan geri bağlama çalışmaları değerlendirildiğinde baskısız polimerlerinden daha fazla bağlama kapasitesine sahip, MIP5 ve MIP7 olmak üzere iki tane polimer vardır. MIP5 standart çözeltisinin %32,9'unu, MIP7 ise %28,9'unu adsorplamaktadır.

4.5. SENTETİK ANTİOKSİDAN KARIŞIMI İLE YAPILAN SPE ANALİZ SONUÇLARI

Şekil 4.27'de 2'şer mL %25 metanollü 5×10^{-4} M naringin-hesperidin karışımının 4 defa SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen spektrumlar görülmektedir.

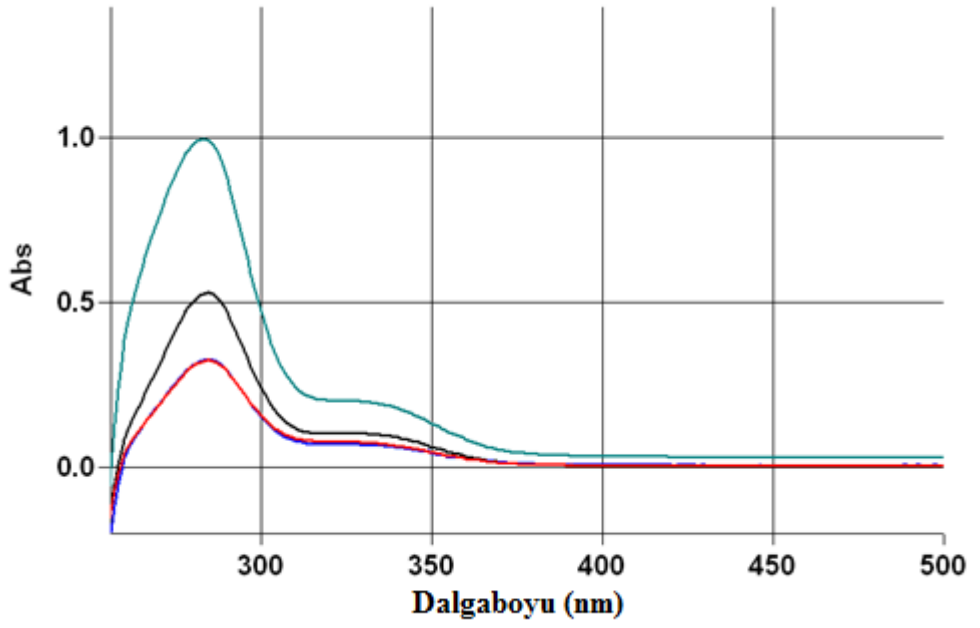


Şekil 4.27: SPE kartuşundan 1., 2., 3. ve 4. kez geçirilen sentetik antioksidan karışımının spektrumları

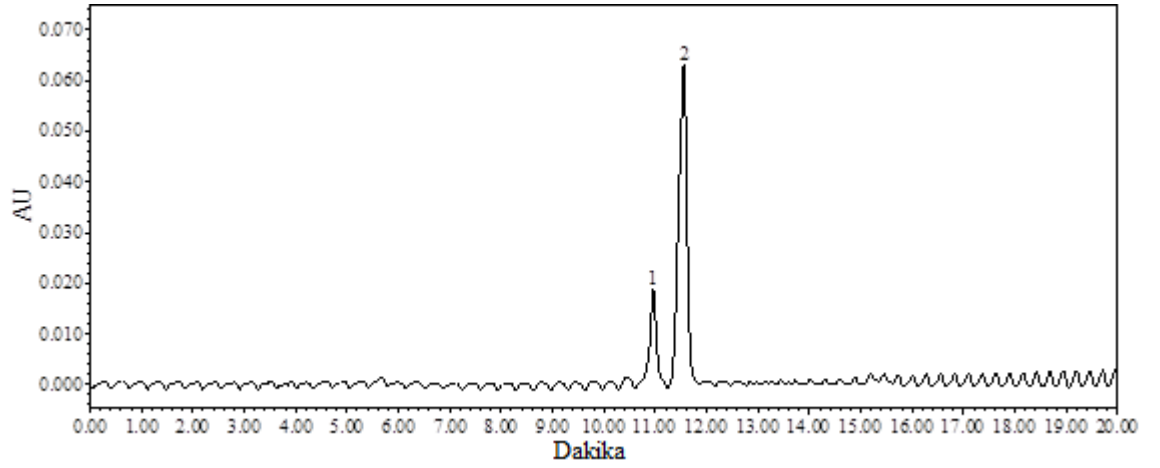
SPE kartuşu 6 mL standart antioksidan karışımında bulunan bileşenlerin tamamını tutmuş, dördüncü 2 mL karışım eklendiğinde doyuma ulaşmıştır. SPE kartuşu toplamda $1,95 \times 10^{-3}$ M standart antioksidan karışımı tutmuştur.

Şekil 4.28-4.31'de sırasıyla 2'şer mL %20, %22, %25 ve %30 N,N-Dimetilformamidin SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen spektrumlar ve kromatogramlar görülmektedir.

Şekil 4.3 (sayfa 39) başlangıç karışımının kromatogramıdır.

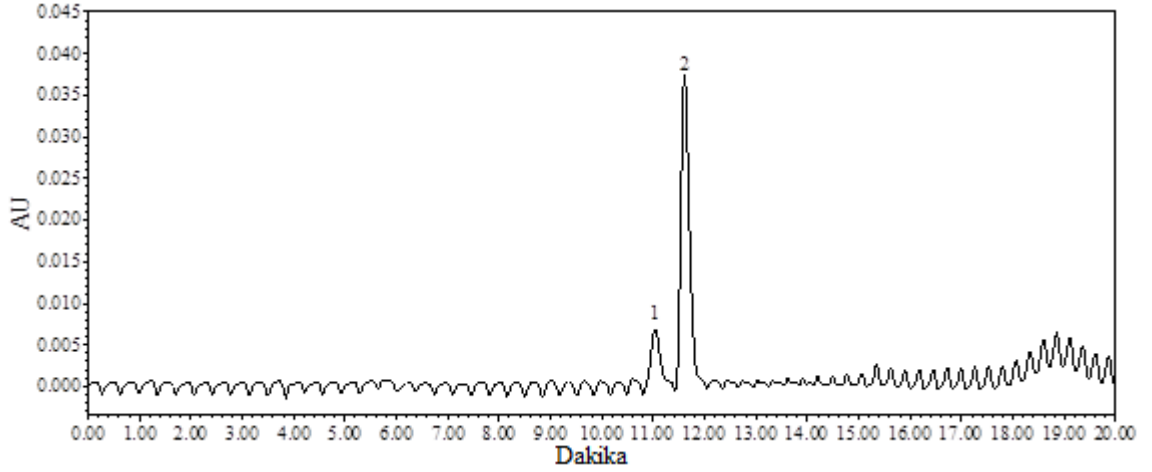


Şekil 4.28: %20, %22, %25 ve %30 DMF eluatlarının spektrumları



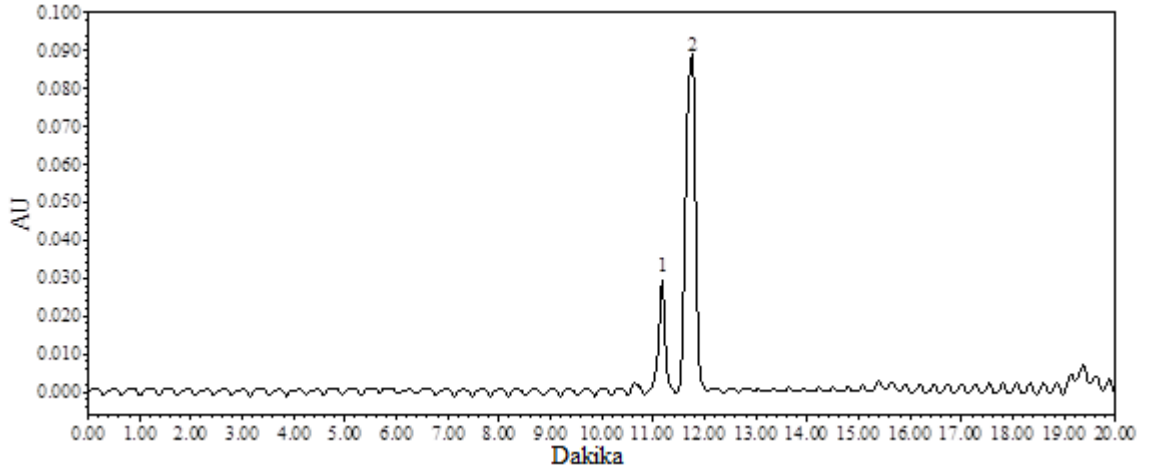
Şekil 4.29: %22 DMF eluatının kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)



Şekil 4.30: %25 DMF eluatının kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)

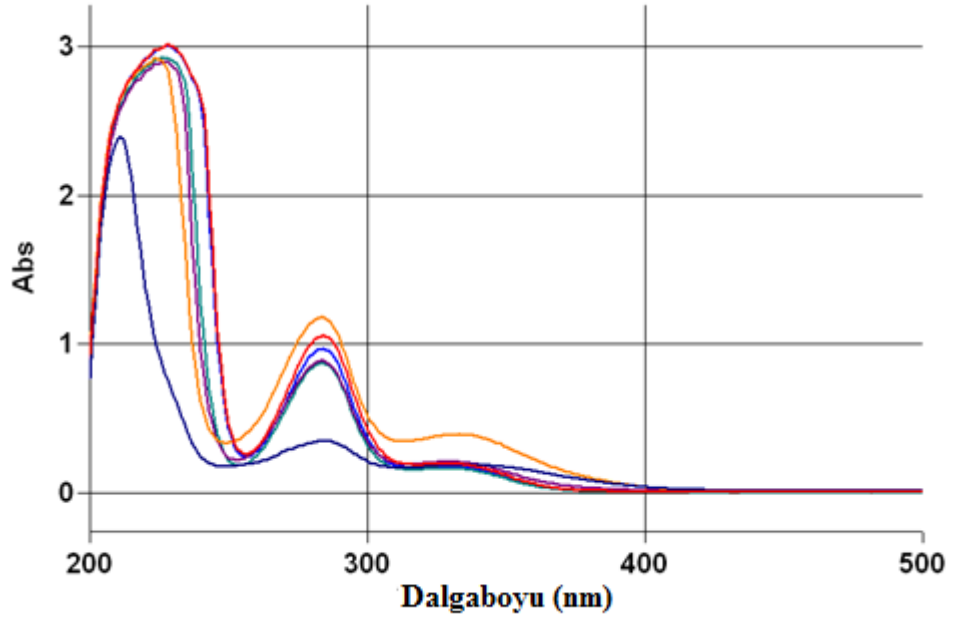


Şekil 4.31: %30 DMF eluatının kromatogramı

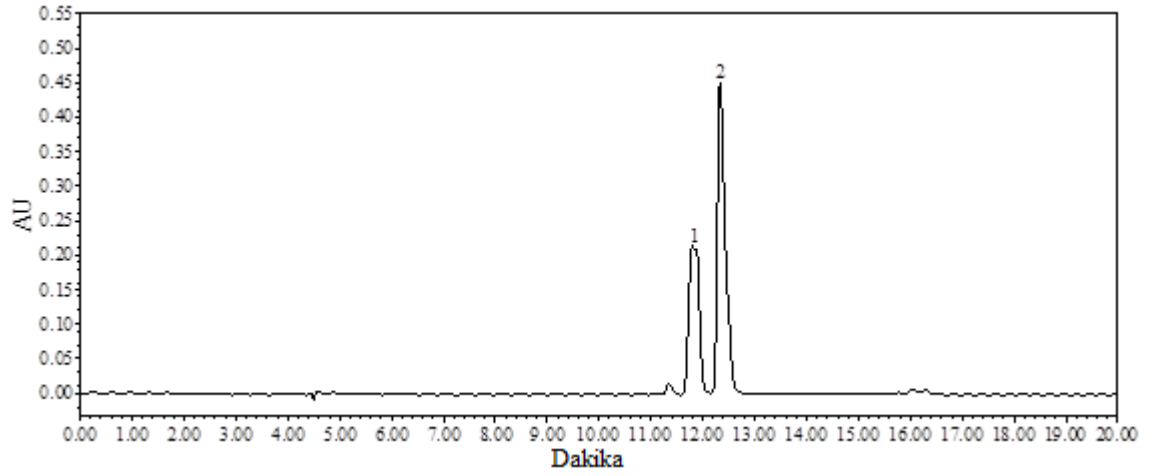
(1: Naringin, 2: Hesperidin)

Spektrumlar incelendiğinde en iyi elüsyon veriminin %30 DMF ile elde edildiği, daha sonra sırasıyla %22, %25 ve %20 şeklinde olduğu görülmektedir. Kromatogramlarda ise naringin-hesperidin ayrımı sırası %25>%30>%22 DMF şeklindedir. Ancak %25 DMF ile çok az miktarda bileşen alındığı için portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazında sırasıyla %30 ve %22 DMF ile elüsyon yapılmıştır.

Şekil 4.32-4.37'de %22 DMF elüsyonundan sonra 6 kez 2'şer mL %100 metanolün SPE kartuşundan geçirilmesiyle yapılan elüsyonların spektrumları ve kromatogramları görülmektedir.

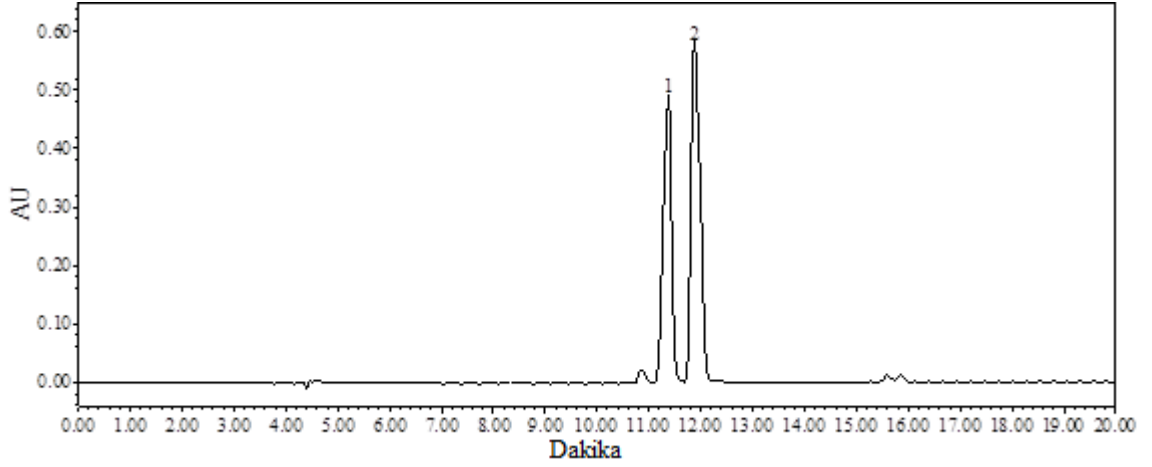


Şekil 4.32: Metanol ile yapılan 1. (5 kez seyreltik), 2. (10 kez seyreltik), 3. (20 kez seyreltik), 4. (5 kez seyreltik), 5. ve 6. elüsyonun spektrumları



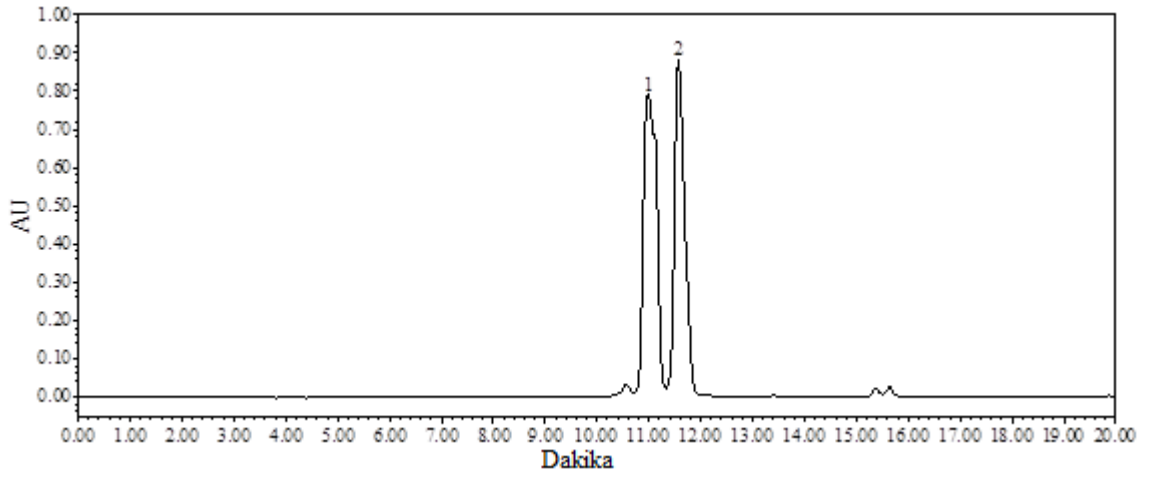
Şekil 4.33: Metanol ile yapılan 1. elüsyonun kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)



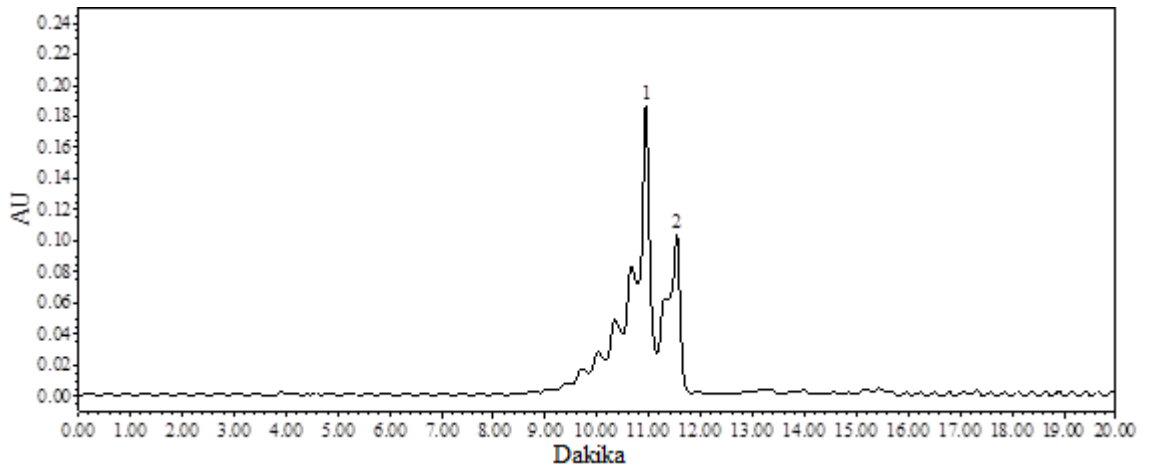
Şekil 4.34: Metanol ile yapılan 2. elüsyonun kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)



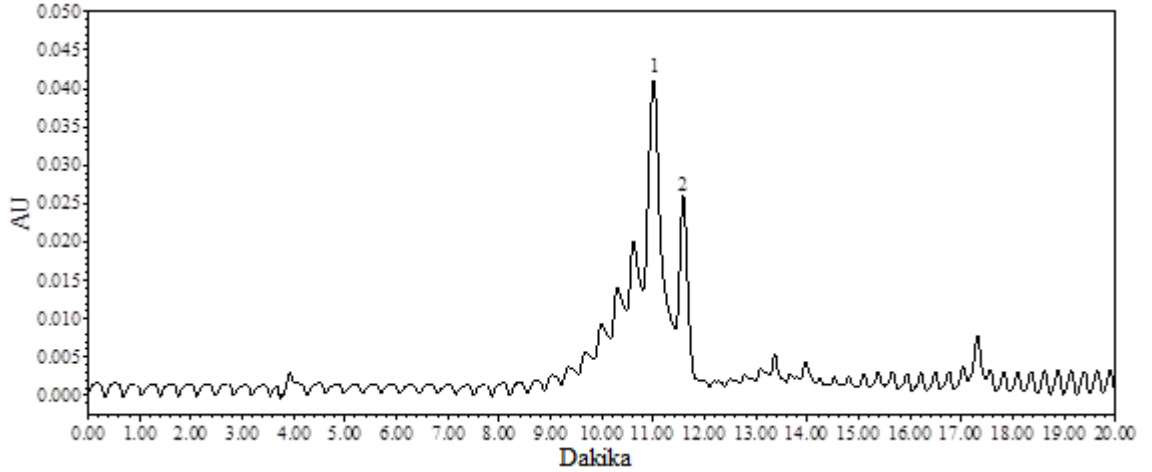
Şekil 4.35: Metanol ile yapılan 3. elüsyonun kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)



Şekil 4.36: Metanol ile yapılan 4. elüsyonun kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)



Şekil 4.37: Metanol ile yapılan 5. elüsyonun kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)

%100 metanol ile yapılan elüsyonların spektrumları kıyaslandığında absorpsiyonlar büyükten küçüğe 3>2>1>4>5>6 şeklinde sıralanmaktadır. Kromatogramlar ve Tablo 4.3'den de anlaşılacağı gibi kartuşta bir kez 2 mL %22 DMF ile elüsyondan geri kalan naringin ve hesperidin % 100 metanolla elüsyonunda 1.'den 6.'ya doğru gidildikçe naringin miktarı hesperidin miktarına yaklaşmakta daha sonra ise hesperidin miktarından daha fazla olmaktadır.

Tablo 4.3: Sentetik antioksidan karışımı eluatlarının içerdiği bileşenlerin derişimi (mg/L)

Örnek	Naringin	Hesperidin
%22 DMF eluati	Tayin sınırının altında	1,15
1. %100 metanol eluati	4,24	6,08
2. %100 metanol eluati	7,95	8,85
3. %100 metanol eluati	20,61	14,47
4. %100 metanol eluati	2,63	1,90
5. %100 metanol eluati	2,47	0,51
%25 DMF eluati	Tayin sınırının altında	0,84
%30 DMF eluati	0,07	1,70

4.6. PORTAKAL SUYU ENDÜSTRİSİ ATIKLARININ ANALİZ SONUÇLARI

Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının toplam antioksidan kapasitesi CUPRAC yöntemi, antioksidan bileşenleri ise HPLC ile belirlendi. Ayrıca portakal suyu endüstrisi atıklarındaki bazı fenolik bileşiklerin MIP'ler ve bir ticari SPE kartuş ile ayrılması (derişiklendirilmesi) çalışmaları yapıldı.

4.6.1. Portakal Suyu Endüstrisi Atığı Ekstraktının Toplam Antioksidan Kapasitesi

Tablo 4.4'de portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktının metanol:distile su fazı ve kloroform fazının CUPRAC yöntemi ile bulunmuş toplam antioksidan kapasiteleri görülmektedir. Kloroform, su ile faz oluşturacağından kloroform uçurulup, kalan katı maddenin asetonunda çözülmesiyle elde edilen ekstrakta CUPRAC yöntemi uygulanmıştır.

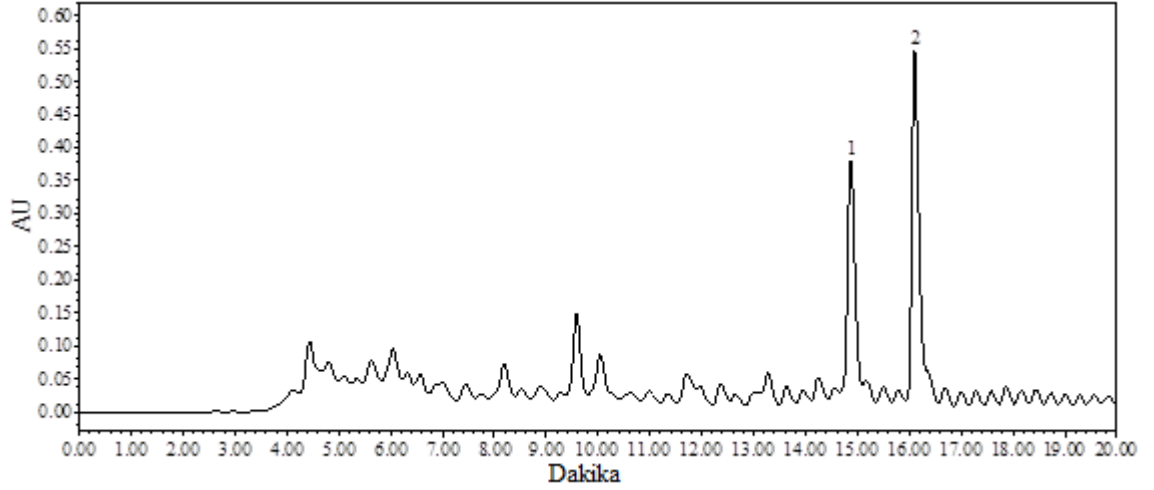
Tablo 4.4: Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazı ve aseton fazının toplam antioksidan kapasiteleri (μmol troloks g^{-1} kuru madde)^a

Ekstrakt	CUPRAC
Metanol:distile su fazı	78,1 \pm 3,0
Aseton fazı	2,0 \pm 0,1

a: Sonuçlar, ortalama \pm standart sapma (n=4) olarak verilmiştir.

4.6.2. Portakal Suyu Endüstrisi Atığı Ekstraktı Metanol:Distile Su Fazının Kromatografik Analizi

Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının kromatografik analizinde naringin ve hesperidin, ekstrakta yapılan standart eklemeleri ile belirlenmiştir. Tanımlanan piklerin PDA spektrumlarının, hem bu bileşiklerin literatürde verilen [74, 75] maksimum dalgaboyları ile hem de standartlarının PDA spektrumları ile karşılaştırılmasıyla da doğrulama yapılmıştır.



Şekil 4.38: Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)

Tablo 4.5: Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının içerdiği bileşenlerin derişimi (mg g^{-1} kuru madde)^a

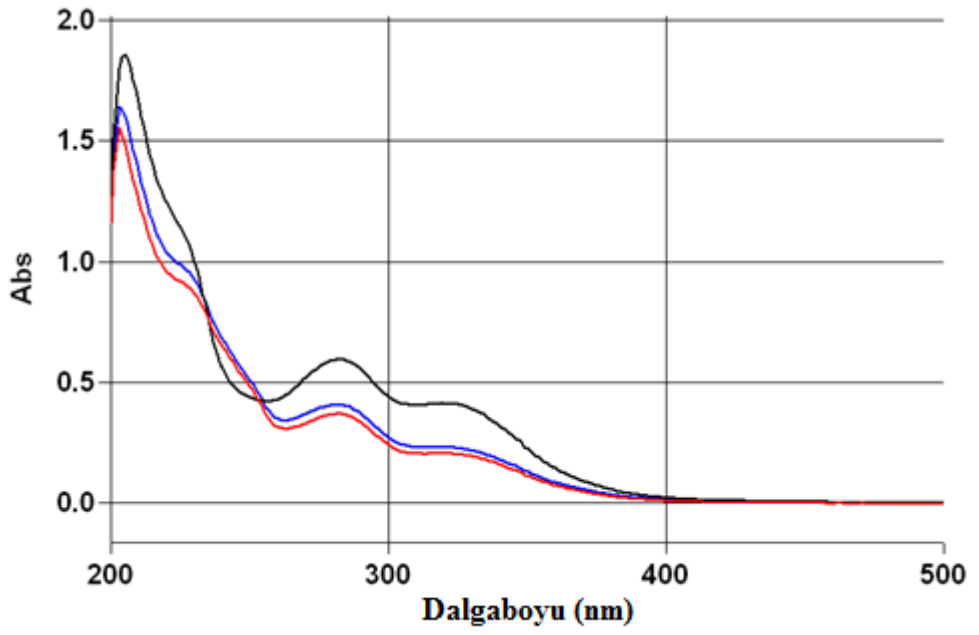
Ekstrakt	Naringin	Hesperidin
Metanol:distile su fazı	0,144±0,012	0,177±0,013

a: Sonuçlar, ortalama±standart sapma (n=3) olarak verilmiştir.

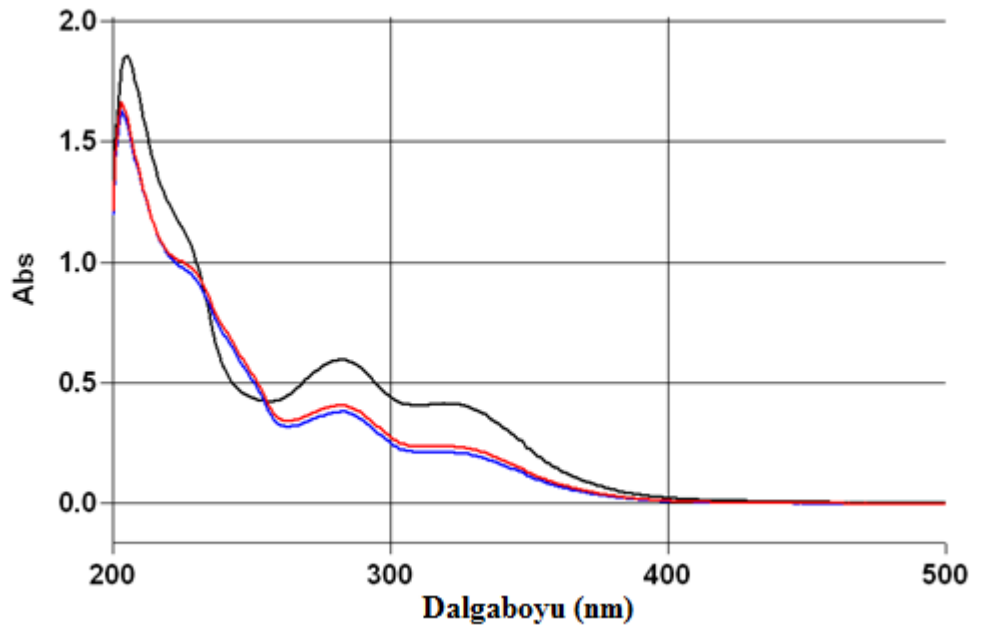
4.6.3. Portakal Suyu Endüstrisi Atıklarından Fenolik Bileşiklerin Ayrılması (Derişiklendirilmesi) Çalışmaları

4.6.3.1. Hazırlanan MIP'ler Kullanılarak

Şekil 4.39 ve 4.40'da %30 metanol-%70 asetonitrilli ekstrakt yüklenen polimerlerin ve %30 metanol-%70 asetonitrilli ekstraktın 24 saat bekletilmesi sonunda elde edilen spektrumlarının karşılaştırılması görülmektedir.



Şekil 4.39: %30 metanol-%70 asetonitrilli ekstrakt, ekstraktın MIP5 ve NIP5 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları

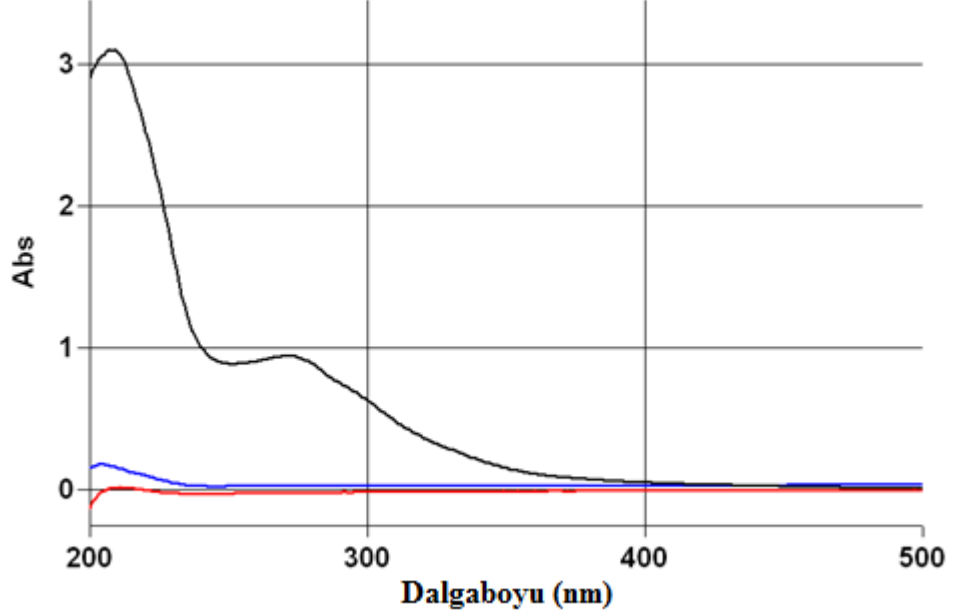


Şekil 4.40: %30 metanol-%70 asetonitrilli ekstrakt, ekstraktın MIP7 ve NIP7 ile 24 saat bekletilmesi sonundaki spektrumları

Spektrumlarından görüldüğü üzere her iki MIP'in de geri bağlama kapasitesi %40 civarındadır. Ancak MIP ve NIP'ler arasında önemli bir fark yoktur.

4.6.3.2. Katı Faz Ekstraksiyonu (SPE)

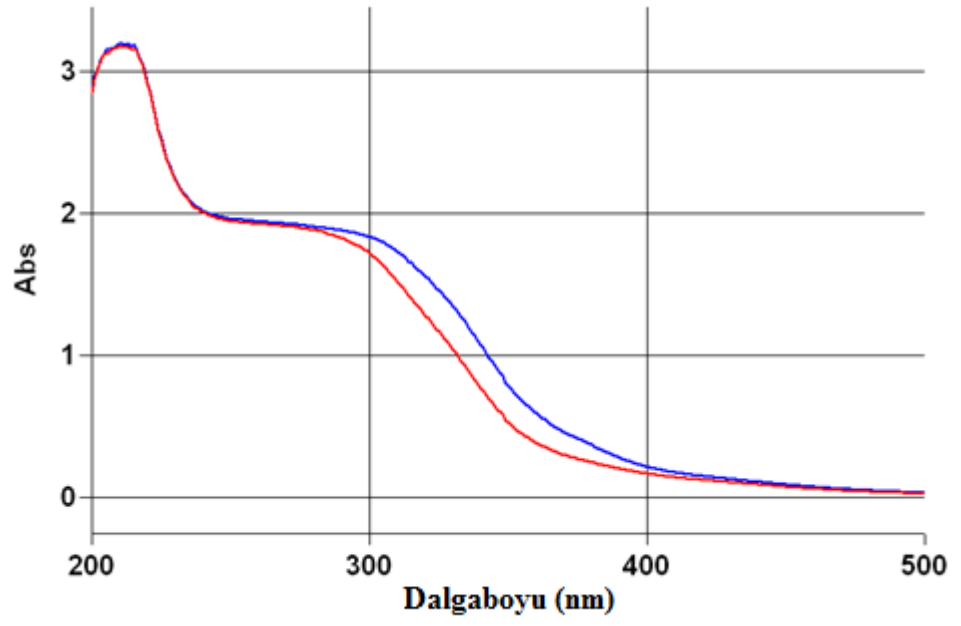
Şekil 4.41'de 2'şer mL portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının 3 defa SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen spektrumlar görülmektedir.



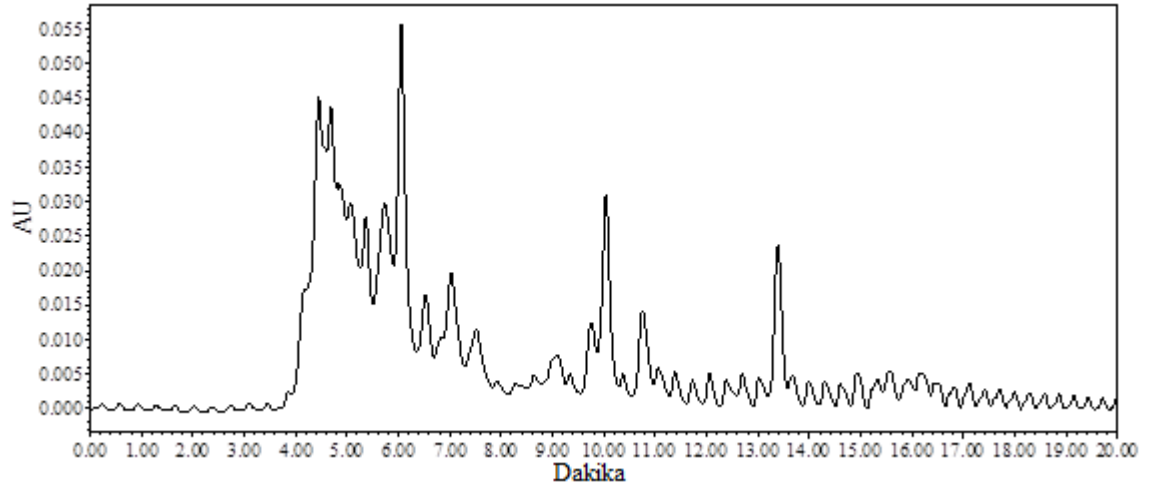
Şekil 4.41: SPE kartuşundan 1., 2. ve 3. kez geçirilen portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazının spektrumları

SPE kartuşu 4 mL ekstraktta bulunan bileşenlerin tamamını tutmuş, üçüncü 2 mL ekstrakt eklendiğinde doyuma ulaşmıştır.

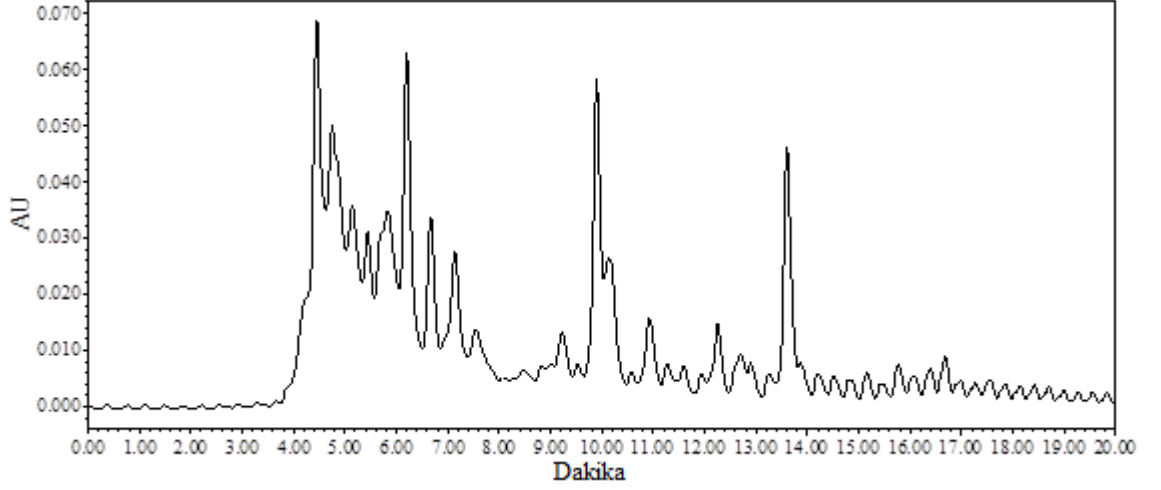
Şekil 4.42'de 2'şer mL 0,01 N HCl'in 2 defa SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen spektrumlar, Şekil 4.43 ve 4.44'de ise kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.42: SPE kartuşundan 1. ve 2. kez geçirilen 0,01 N HCl'in spektrumları



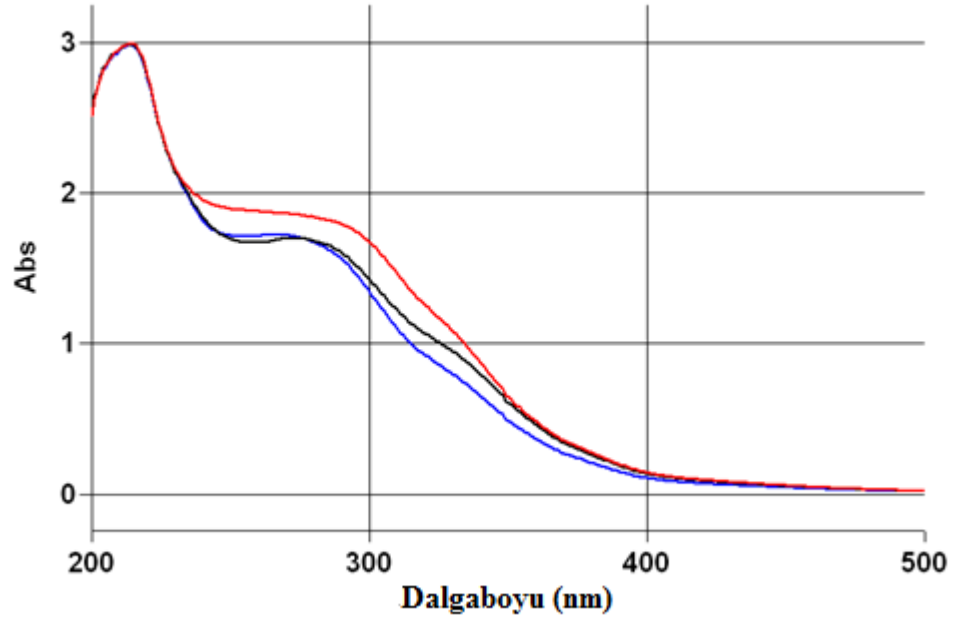
Şekil 4.43: SPE kartuşundan 1. kez geçirilen 0,01 N HCl'in kromatogramı



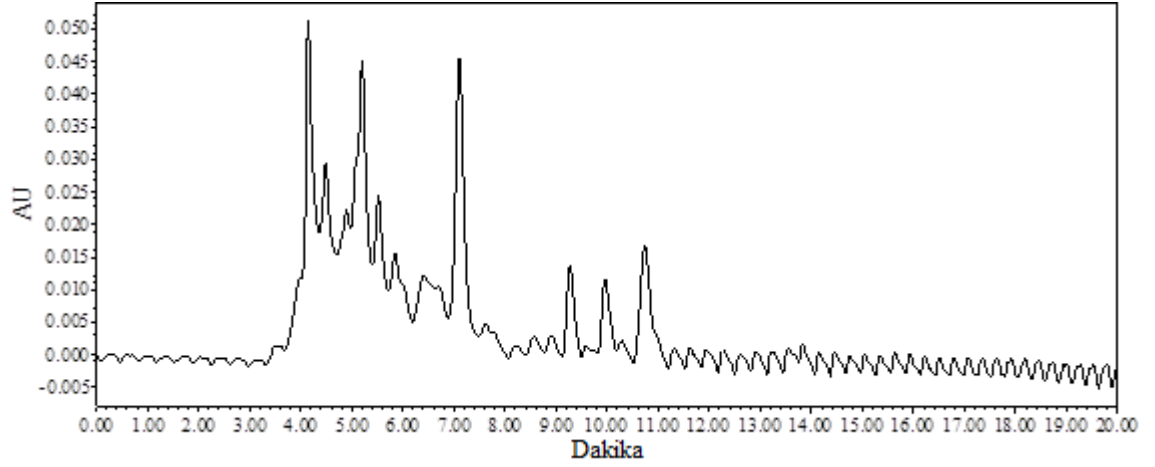
Şekil 4.44: SPE kartuşundan 2. kez geçirilen 0,01 N HCl'in kromatogramı

SPE kartuşundan 0,01 N HCl geçirerek fenolik harici bileşikler alınmıştır. Kromatogramdan da anlaşılacağı gibi naringin ve hesperidine ait pikler görülmektedir.

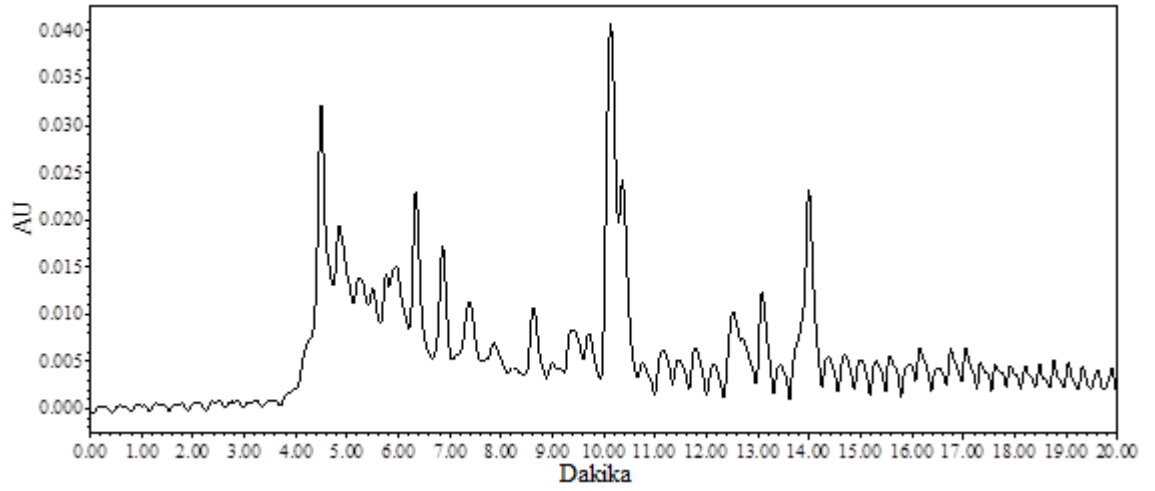
Şekil 4.45'de 2'şer mL %0,1 HCl-%20 metanolün 3 defa SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen eluatların spektrumları, Şekil 4.46-4.48'de ise kromatogramları görülmektedir.



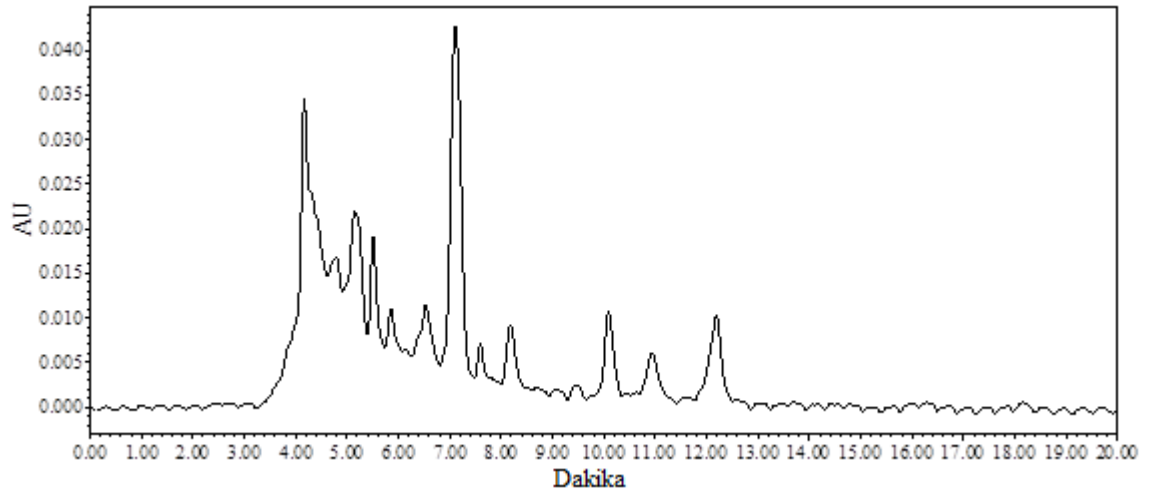
Şekil 4.45: 1., 2. ve 3. %0,1 HCl-%20 metanol eluatının spektrumları



Şekil 4.46: 1. %0,1 HCl-%20 metanol eluatının kromatogramı



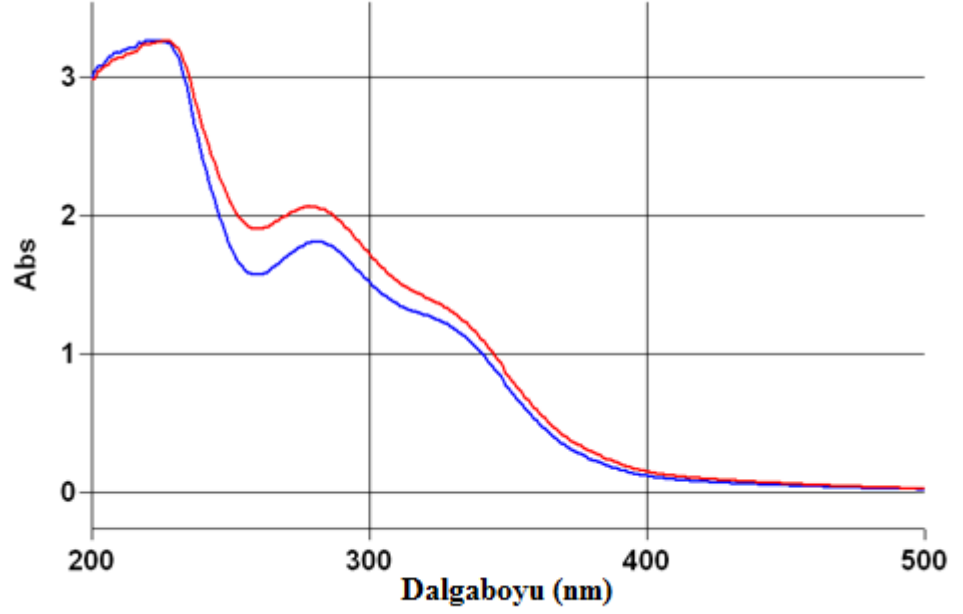
Şekil 4.47: 2. %0,1 HCl-%20 metanol eluatının kromatogramı



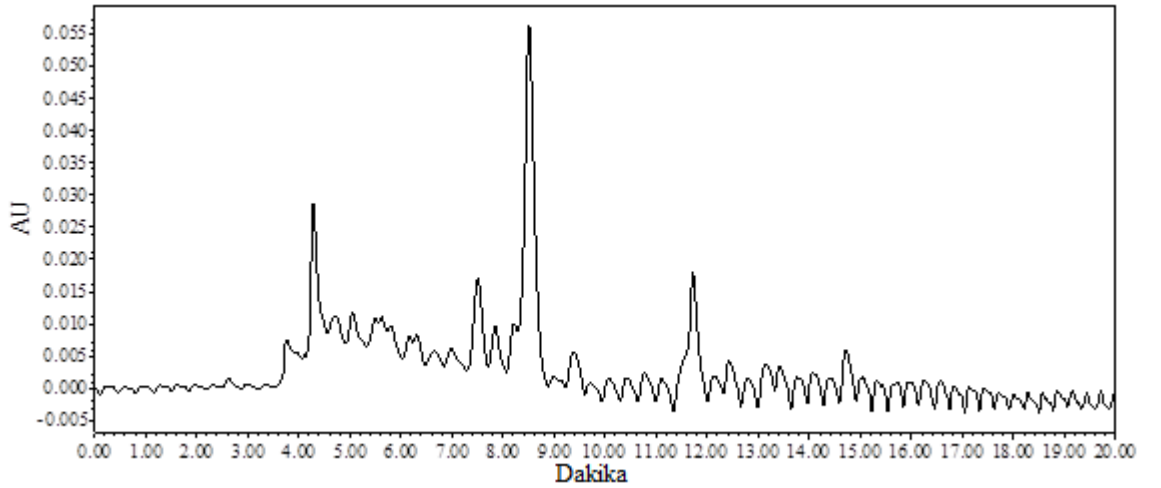
Şekil 4.48: 3. %0,1 HCl-%20 metanol eluatının kromatogramı

%0,1 HCl-%20 metanol ile yapılan elüsyon işleminde, tanımlanamayan küçük pikler görülmüştür.

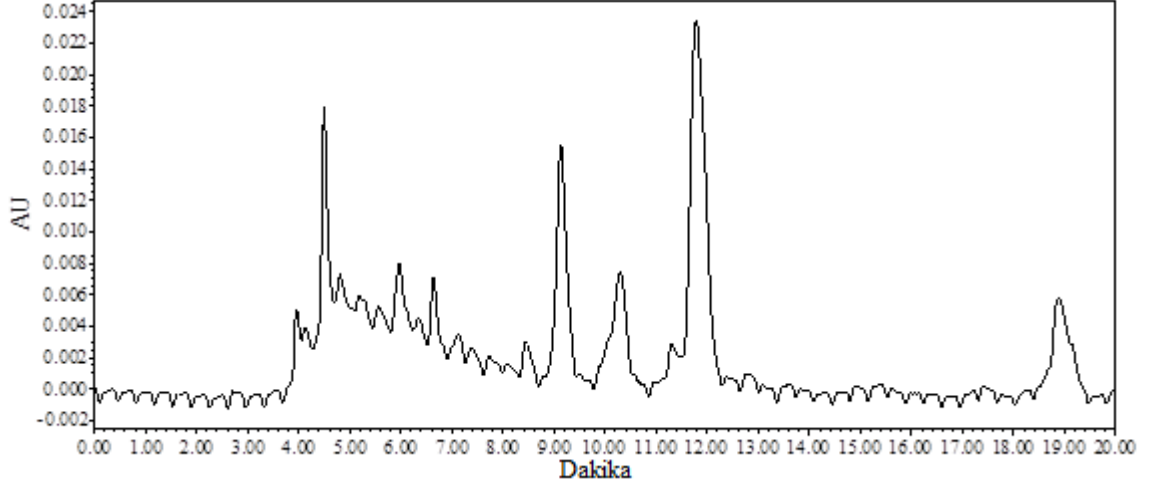
Şekil 4.49'da 2'şer mL %20 metanolün 2 defa SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen eluatların spektrumları, Şekil 4.50 ve 4.51'de ise kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.49: 1. ve 2. %20 metanol eluatının spektrumları



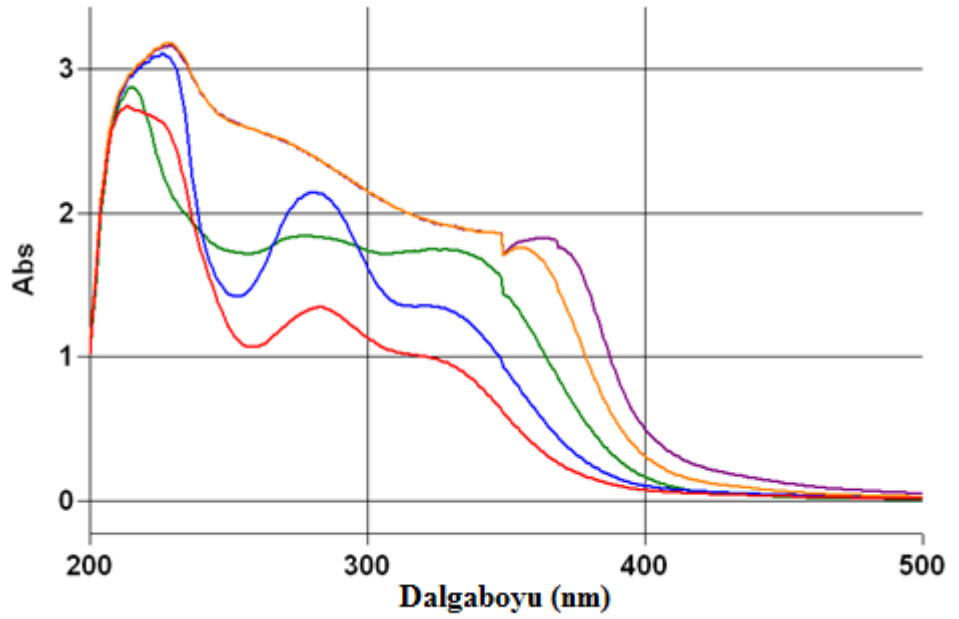
Şekil 4.50: 1. %20 metanol eluatının kromatogramı



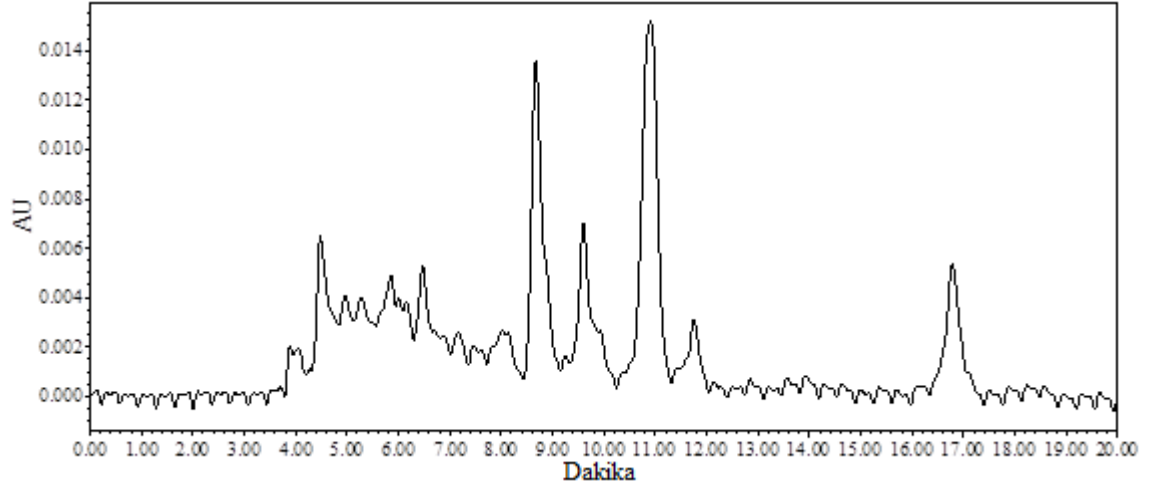
Şekil 4.51: 2. %20 metanol eluatının kromatogramı

Asitli ortamdan asitsiz ortama geçiş basamağı olarak yapılan bu işlemde bir önceki basamakta olduğu gibi tanımlanamayan küçük pikler görülmüştür.

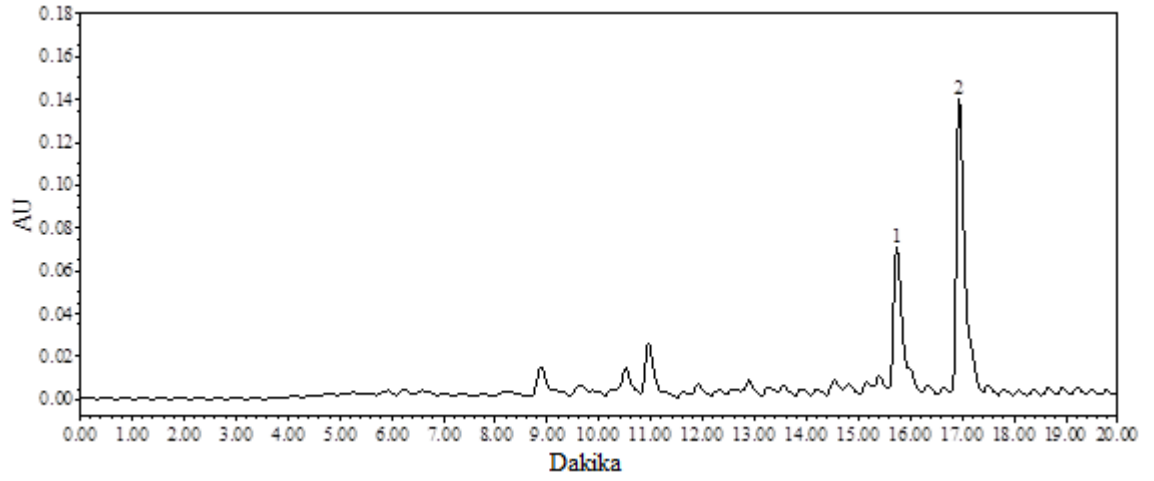
Şekil 4.52'de 2'şer mL %100 metanolün 5 defa SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen eluatların spektrumları, Şekil 4.53-4.57'de ise kromatogramları görülmektedir.



Şekil 4.52: 1., 2., 3., 4. ve 5. %100 metanol eluatının spektrumları

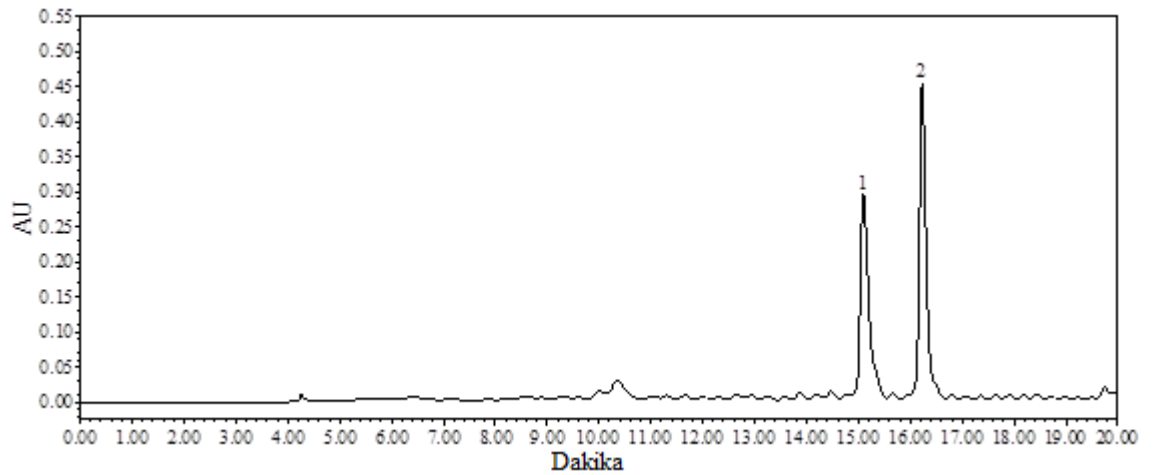


Şekil 4.53: 1. %100 metanol eluatının kromatogramı



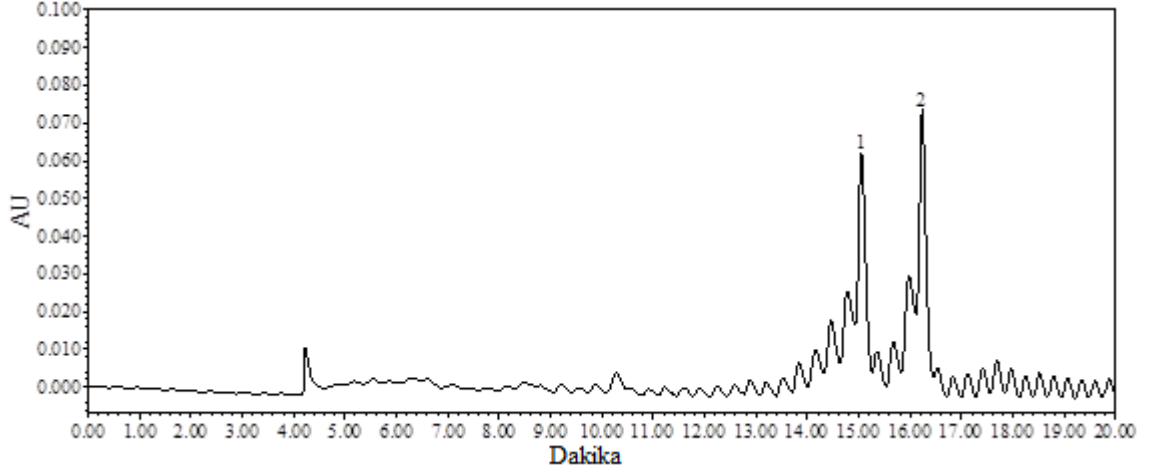
Şekil 4.54: 2. %100 metanol eluatının kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)



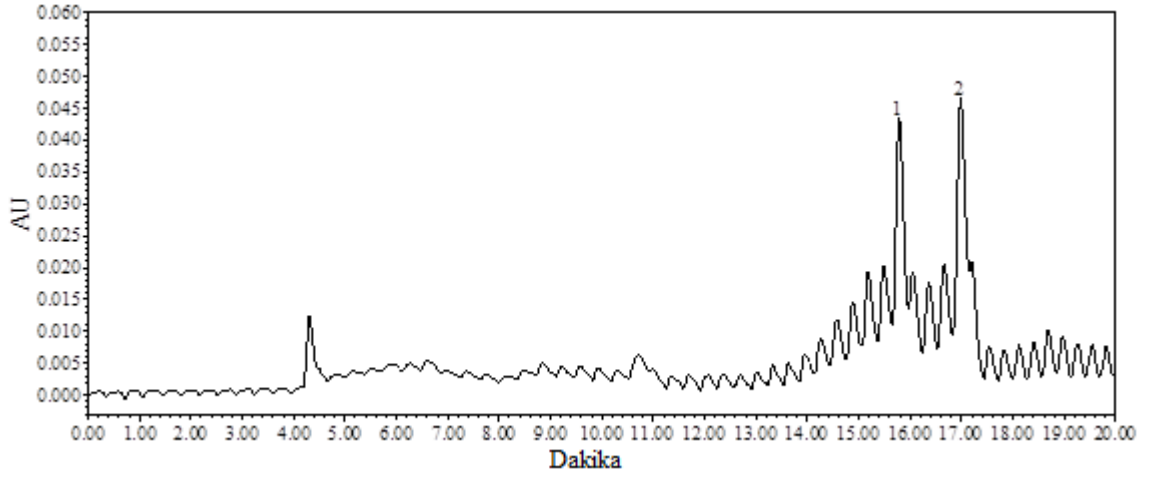
Şekil 4.55: 3. %100 metanol eluatının kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)



Şekil 4.56: 4. %100 metanol eluatının kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)



Şekil 4.57: 5. %100 metanol eluatının kromatogramı

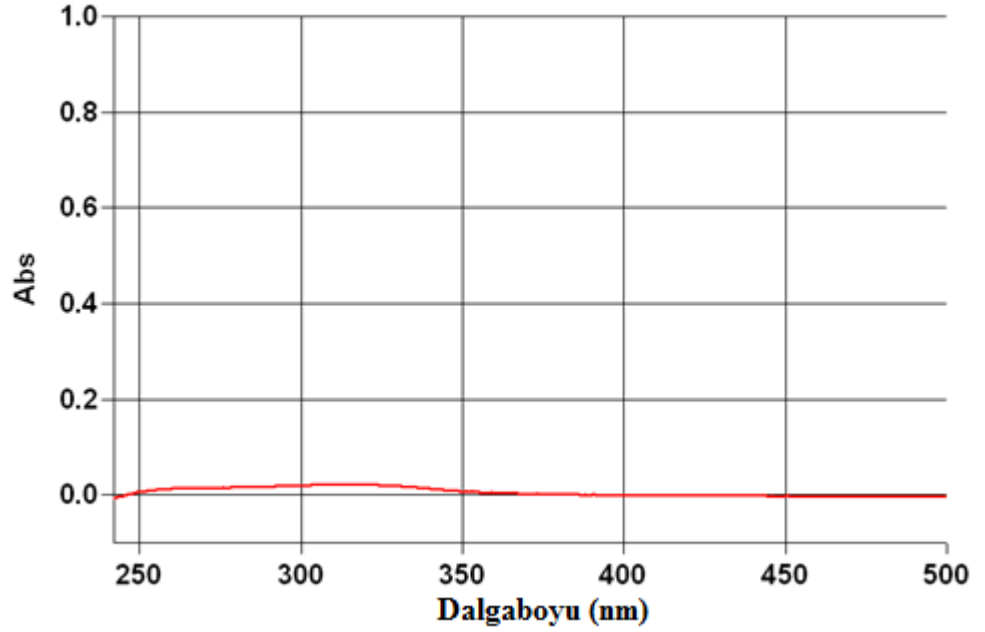
(1: Naringin, 2: Hesperidin)

%100 metanollü elüsyon işlemlerinin spektrumları ve kromatogramları incelendiğinde 1. eluatta naringin ve hesperidin harici pikler, 2. eluatta diğer piklerin bir kısmı ile birlikte bir miktar naringin ve hesperidin görülmektedir. Spektrumunda en yüksek absorbansın gözlemlendiği 3. eluatın kromatogramında ise naringin ve hesperidin diğer tüm bileşenlerden pratikçe ayrılmış haldedir. 4. ve 5. eluatların spektrumlarında yüksek absorbans olmasına rağmen kromatogramlarında bu durumu destekleyecek pikler görülmemiştir.

Tablo 4.6: Portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazı eluatlarının içerdiği bileşenlerin derişimi (mg/100 g)

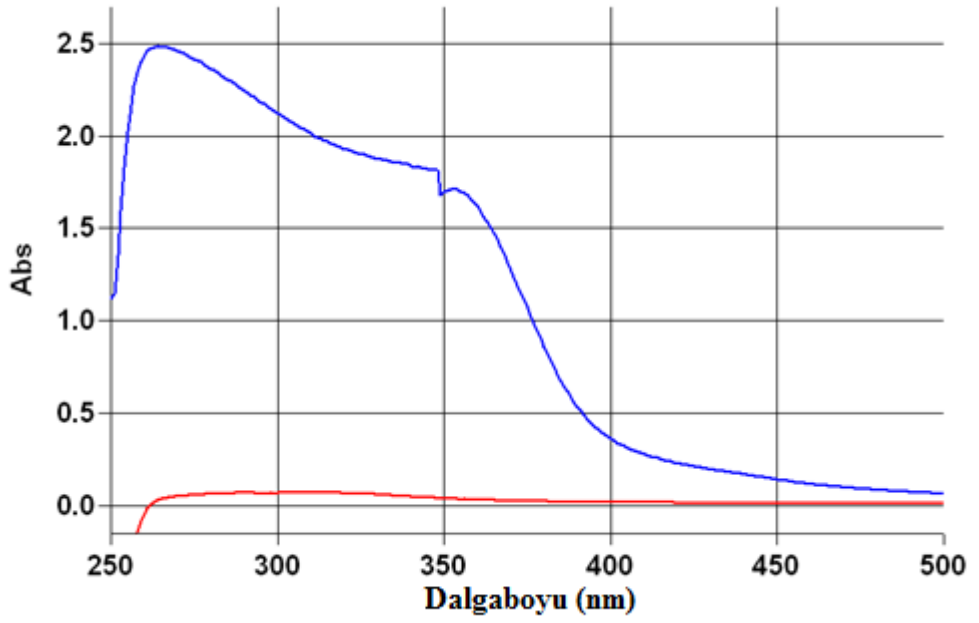
Örnek	Naringin	Hesperidin
2. % 100 metanol eluatı	17,11	67,20
3. % 100 metanol eluatı	145,89	161,96
4. % 100 metanol eluatı	9,63	27,20
5. % 100 metanol eluatı	2,33	20,39

Şekil 4.58'de 3. ve 4. %100 metanol eluatlarının birleştirilip SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen spektrum görülmektedir. Buna göre SPE kartuşu bileşenlerin tamamını tutmuştur.

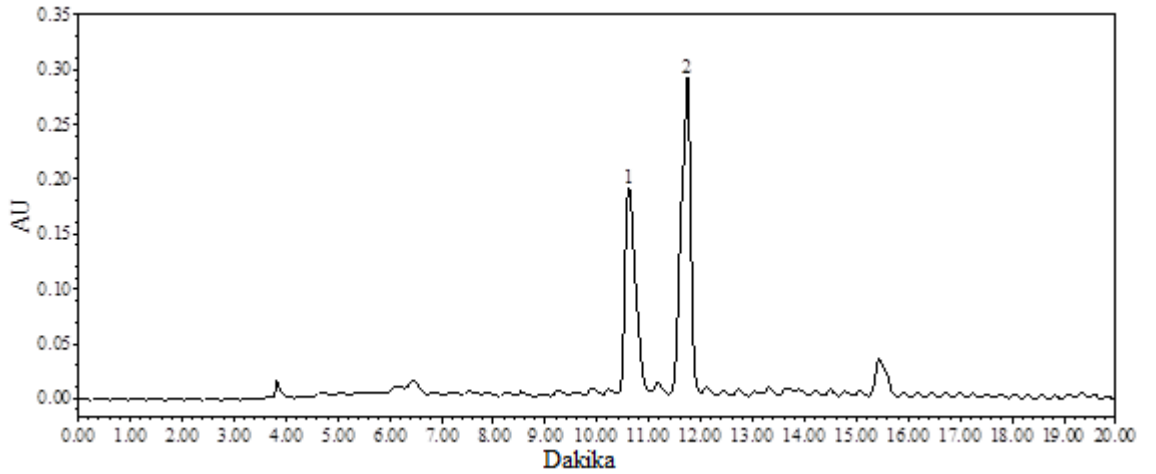


Şekil 4.58: SPE kartuşundan geçirilen 3. ve 4. %100 metanol eluatları karışımının spektrumu

Şekil 4.59'da 2 kez 2'şer mL %30 N,N-Dimetilformamidin SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen eluatların spektrumları, Şekil 4.60'da ise 2. eluatın kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.59: 1. ve 2. %30 DMF eluatının spektrumları

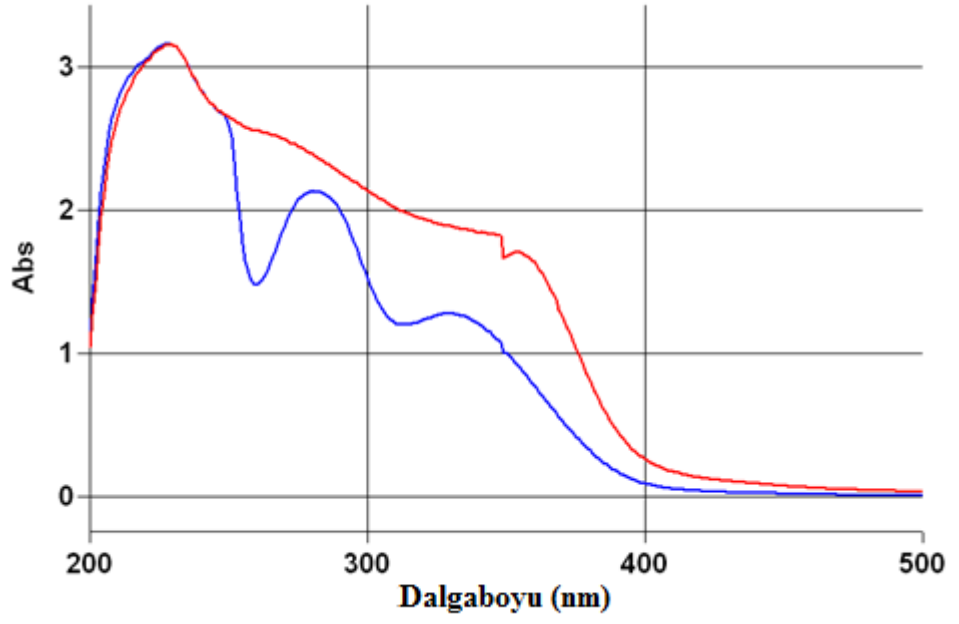


Şekil 4.60: 2. %30 DMF eluatının kromatogramı

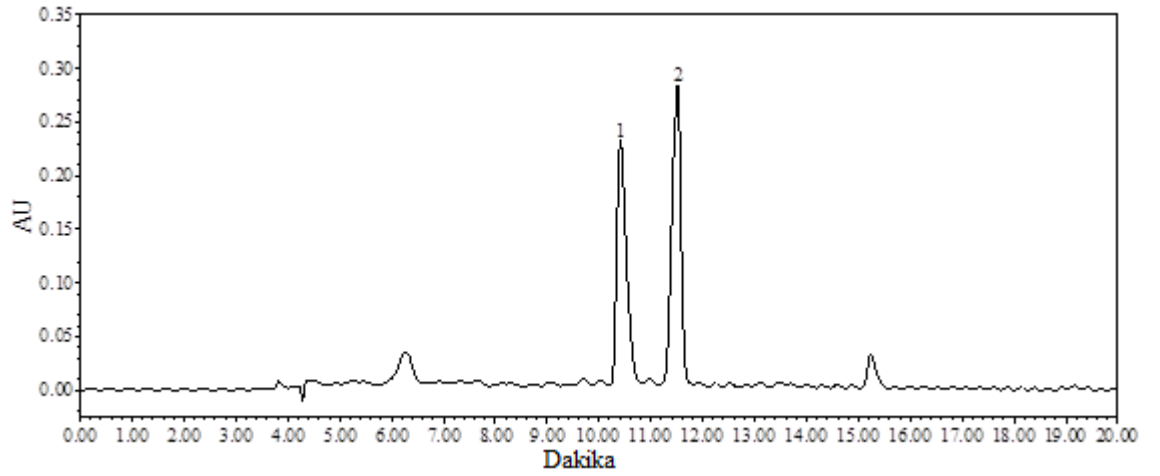
(1: Naringin, 2: Hesperidin)

%30 DMF ile yapılan ilk elüsyonda SPE kartuşunda tutunan herhangi bir bileşen alınamamış, 2. elüsyonda ise naringinin %37,17'si ve hesperidinin %39,11'i birlikte alınmıştır.

Şekil 4.61'de 2 kez 2'şer mL metanolün SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen eluatların spektrumları, Şekil 4.62 ve 4.63'de ise kromatogramları görülmektedir.

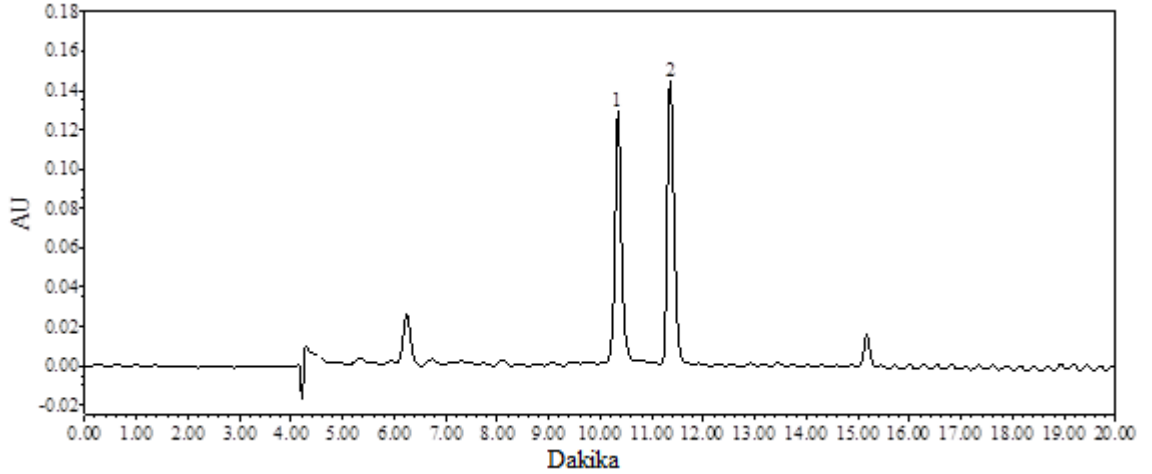


Şekil 4.61: %100 metanol ile yapılan 1. ve 2. elüsyonun spektrumu



Şekil 4.62: %100 metanol ile yapılan 1. elüsyonun kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)

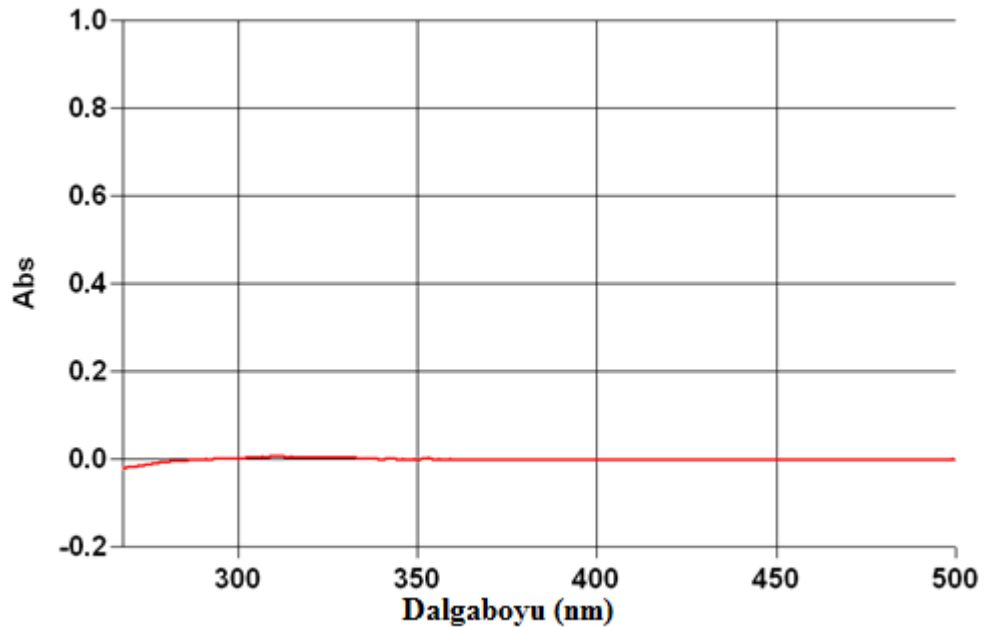


Şekil 4.63: %100 metanol ile yapılan 2. elüsyonun kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)

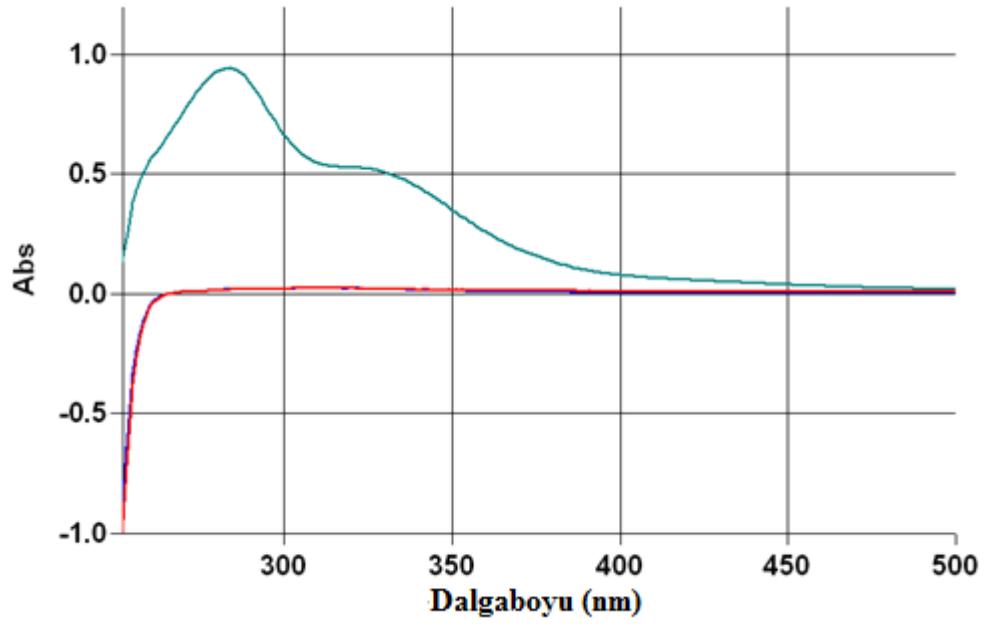
Metanol ile yapılan elüsyonların 1.'sinde toplamda daha fazla bileşen alınmıştır. Tablo 4.7'de görüldüğü üzere naringin ve hesperidin miktarı aynıdır. 2.'sinde ise hesperidinin miktarı naringine göre daha fazladır.

Şekil 4.64'de 2. %30 DMF eluatının SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen spektrum görülmektedir. Yine bileşenlerin tamamı tutunmuştur.

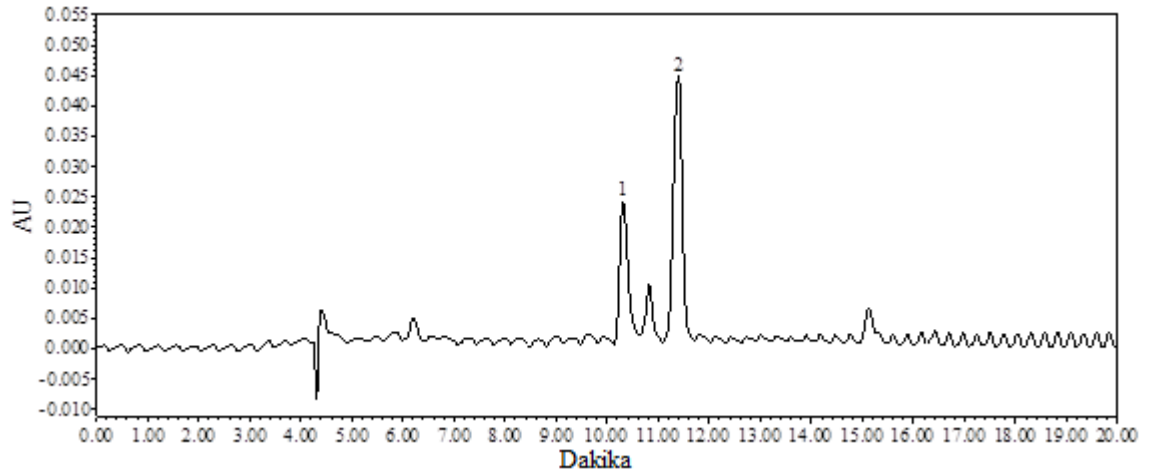


Şekil 4.64: SPE kartuşundan geçirilen 2. %30 DMF eluatının spektrumu

Şekil 4.65'de 3 kez 2'şer mL %22 DMF'nin SPE kartuşundan geçirilmesiyle elde edilen eluatların spektrumları, Şekil 4.66'da ise 3. eluatın kromatogramı görülmektedir.



Şekil 4.65: 1., 2. ve 3. %22 DMF eluatının spektrumları



Şekil 4.66: 3. %22 DMF eluatının kromatogramı

(1: Naringin, 2: Hesperidin)

%22 DMF ile yapılan ilk iki elüsyonda SPE kartuşunda tutunan herhangi bir bileşen alınamamış, 3. elüsyonda ise naringinin %1,79'u ve hesperidinin %39,79'u birlikte alınmıştır.

Tablo 4.7: 3. ve 4. %100 metanol eluatları karışımı ve eluatlarının içerdiği bileşenlerin derişimi (mg/100 g)

Örnek	Naringin	Hesperidin
3. ve 4. %100 metanol eluatları karışımı	6,15	7,57
2. %30 DMF eluatı	2,29	2,96
1. %100 metanol eluatı	2,61	2,75
2. %100 metanol eluatı	0,84	1,18
3. %22 DMF eluatı	0,04	1,18

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sentetik antioksidanların bazı hastalıklara yol açabilmesi nedeniyle doğal antioksidanların bitkiler ve yan ürünlerinden ekstrakte edilmelerine olan ilgi son yıllarda artmıştır [4]. Bu nedenle bu tez çalışmasında Konfrut Gıda San. ve Tic. A.Ş.'den temin edilen portakal suyu endüstrisi atıklarının toplam antioksidan kapasiteleri, antioksidan özelliğe sahip temel bileşikleri ve MIP ve SPE yöntemleriyle başlıca fenolik bileşenlerinin (naringin ve hesperidin) ayrılması (derişiklendirilmesi) araştırılmıştır.

Çeşitli çözücüler ile yapılan ön denemeler sonucunda 2:1:3 kloroform:metanol:distile su karışımı ile 90 dakika süreyle üç kademeli ekstraksiyon işleminin hem fenolik bileşiklerden hem de karotenoid içeriğinden gelen toplam antioksidan kapasiteyi belirlemek için uygun olduğuna karar verilmiştir. Metanol:distile su fazı 1,0/0,45 µm'lik GF/PET, kloroform fazı 0,45 µm'lik PTFE filtrelerden süzöldükten sonra ve gerektiği durumlarda seyreltme yapılarak kullanılmıştır.

Bu çalışmada toplam antioksidan kapasite tayini için, spektrofotometrik olarak CUPRAC yöntemi seçilmiştir. Tablo 4.4'de göröldüğü gibi portakal suyu endüstrisi atıklarının CUPRAC yöntemi ile belirlenmiş olan toplam antioksidan kapasitesi metanol:distile su fazı (fenolik bileşikler) için $78,1 \pm 3,0$, aseton fazı (karotenoidler) için $2,0 \pm 0,1$ µmol trolox g⁻¹ kuru maddedir.

Ters faz HPLC analizi neticesinde portakal suyu endüstrisi atıklarında naringin ve hesperidin belirlenmiştir. Portakal suyu endüstrisi atıklarında belirlenen naringin ve hesperidin miktarları literatürdeki değerle Tablo 5.1'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 5.1: Portakal suyu endüstrisi atıklarında HPLC çalışmalarının karşılaştırılması

Antioksidan	Literatür [4] (mg/100 g)	Çalışmamız (mg/100 g)
Naringin	48,61	144,01
Hesperidin	146,73	177,67

Literatürdeki değerle çalışmamızda bulunan değerler arasındaki farkın ekstraksiyon koşullarının, portakal cinslerinin ve yetiştirme şartlarının farklı olması, ayrıca numune olarak literatür çalışmasında portakal kabuğu kullanılırken çalışmamızda kullanılan örneklerin endüstriyel atık olması gibi çok sayıda nedenden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Portakal suyu endüstrisi atıklarından bazı fenolik bileşiklerin ayrılması (derişiklendirilmesi) çalışmaları için MIP ve SPE yöntemleri seçilmiştir.

MIP yönteminde çeşitli oranlarda, farklı kalıp molekülleriyle MIP ve NIP'ler sentezlenmiştir. Sentezlenen baskılı ve baskısız polimerlere 3 farklı çözücüde hazırlanan standart antioksidan çözeltilerinin yüklenmesi suretiyle geri bağlama çalışmaları yapılmıştır. Böylece hem çözücünün geri bağlama üzerindeki etkisi, hem de kalıp molekülünün baskılanıp baskılanmadığı incelenmiştir. Metanol, THF ve asetonitrille yapılan geri bağlama çalışmaları neticesinde çözücünün geri bağlamayı önemli ölçüde etkilediği, naringin ve hesperidinin geri bağlanmasında en iyi çözücünün asetonitril olduğu belirlenmiştir. Kalıp molekülünün baskılandığı polimerler MIP5 ve MIP7'nin geri bağlama kapasitelerinin düşük olması nedeniyle MIP'lere yüklenecek ekstrakt seyreltik olmalıdır. Buna karşılık HPLC analizinde naringin ve hesperidine ait piklerin gözlenebilmesi için MIP'lere yüklenecek ekstrakt derişik olmalıdır. Bu nedenle spektrofotometrik ve kromatografik analizler uyumlu olarak yürütülemedi, sadece spektrofotometrik analiz yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde; her iki MIP'in de ekstraktta bulunan bileşenlerin bir miktarını geri bağlayabildiği ancak baskısız çiftlerinden kayda değer ölçüde farklanmadığı gözlenmiştir.

SPE yönteminde farklı oranlarda asitli ve asitsiz metanol ile elüsyon yapılarak portakal suyu endüstrisi atığı ekstraktı metanol:distile su fazında bulunan naringin ve hesperidin

diğer fenolik bileşenlerden ayrılmıştır. Naringin ve hesperidinin birbirinden ayrılması için naringin ve hesperidini içeren eluat, DPA-6S SPE kartuşuna yüklendikten sonra farklı oranlarda DMF ile yapılan elüsyon çalışmalarında en iyi sonuç, %22 DMF ile alınmakla birlikte naringin ve hesperidinin tam olarak birbirinden ayrılması mümkün olmamıştır.

KAYNAKLAR

1. FANG, Y.Z., YANG, S., WU, G., 2002, Free radicals, antioxidants, and nutrition, *Nutrition*, 18 (10), 872-879.
2. HALLIWEL, B., ARUOMA, O.I., 1991, DNA damage by oxygen-derived species: its mechanisms and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters*, 281 (1-2), 9-19.
3. MOURE, A., CRUZ, J. M., FRANCO, D., DOMINGUEZ, J. M., SINEIRO, J., DOMINGUEZ, H., NUNEZ, M. J., PARAJO, J. C., 2001, Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72, 145-171.
4. KHAN, M.K., ABERT-VIAN, M., FABIANO-TIXIER, A.-S., DANGLES, O., CHEMAT, F., 2010, Ultrasound-assisted extraction of polyphenols (flavanone glycosides) from orange (*Citrus sinensis* L.) peel, *Food Chemistry*, 119, 851-858.
5. MA, Y.-Q., CHEN, J.-C., LIU, D.-H., YE, X.-Q., 2009, Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound, *Ultrasonics Sonochemistry*, 16, 57-62.
6. GORINSTEIN, S., MARTIN-BELLOSO, O., PARK, Y. S., HAREUNKIT, R., LOJEK, A., CIZ, M., CASPI, A., LIBMAN, I., TRAKHTENBERG, S., 2001, Comparison of some biochemical characteristics of different citrus fruits, *Food Chemistry*, 74, 309-315.
7. PESCHEL, W., SANCHEZ-RABANEDA, F., DIEKMANN, W., PLESCHER, A., GARTZIA, I., JIMENEZ, D., LAMUELA-RAVENTOS, R., BUXADERAS, S., CODINA C., 2006, An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes, *Food Chemistry*, 97, 137-150.
8. WEISS, R., MOLINELLI, A., JAKUSCH, M., MIZAIKOFF, B., 2002, Molecular imprinting and solid phase extraction of flavonoid compounds, *Bioseparation*, 10, 379-387.

9. WULFF, G., 1995, Molecular imprinting in cross-linked materials with the aid of molecular templates- a way towards artificial antibodies, *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34, 1812-1832.
10. MOSBACH, K., RAMSTRÖM, O., 1996, The emerging technique of molecular imprinting and its future impact on biotechnology. *Bio/technology*, 14, 163-170.
11. U, Y., LI, C., LIU, X., HUANG, W., 2002, Molecular recognition through the exact placement of functional groups on non-covalent molecularly imprinted polymers, *Journal of Chromatography A*, 950, 89-97.
12. HALLIWEL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J., ARUOMA, O.I., 1995, The characterization of antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, 33 (7), 601-617.
13. CAO, G., PRIOR, R.L., 1999, The measurement of oxygen radical absorbance capacity in biological samples, *Methods in Enzymology*, 299, 50-62.
14. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1997, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trends in Plant Science*, 2 (4), 152-159.
15. GÜÇLÜ, K., SÖZGEN, K., TÜTEM, E., ÖZYÜREK, M., APAK, R., 2005, Spectrophotometric determination of ascorbic acid using copper(II)-neocuproine reagent in beverages and pharmaceutical, *Talanta*, 65 (5), 1226-1232.
16. CADENAS, E., PACKER, L., 2002, *Handbook of Antioxidants*, Marcel Dekker, New York-Basel, 0-8247-0547-5.
17. BJORNEBOE, A., BJORNEBOE, G.E., DREVON, C.A., 1990, Absorption, transport and distribution of vitamin E, *The Journal of Nutrition*, 120 (3), 233-242.
18. BRIGELIUS-FLOHE, R., TRABER, M.G., 1999, Vitamin E: function and metabolism, *FASEB Journal*, 13, 1145-1155.
19. TRABER, M., ATKINSON, J., 2007, Vitamin E, antioxidant and nothing more, *Free Radical Biology & Medicine*, 43, 4-15.

20. GRY, J., BLACK, L., ERIKSEN, F.D., PILEGAARD, K., PLUMB, J., RHODES, M., SHEEHAN, D., KIELYB, M., KROON, P.A., 2007, EuroFIR-BASIS - a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods, *Trends in Food Science & Technology*, 18, 434-444.
21. RODRIGUEZ-BERNALDO DE QUIROS, A., COSTA, H.S., 2006, Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review, *Journal of Food Composition And Analysis*, 19, 97-111.
22. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., PAGANGA, G., 1996, Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids, *Free Radical Biology & Medicine*, 20 (7), 933-956.
23. HALLIWEL, B., 1990, How to characterise a biological antioxidant, *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32.
24. SHAHIDI, F., WANASUNDARA, P.D., JANITHA P.K., 1992, Phenolic antioxidants, *Critical Review of Food Science and Nutritional*, 32 (1), 67-103.
25. HEIM, K.E., TAGLIAFERRO, A.R., BOBILYA, D.J., 2002, Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 13 (10), 572-584.
26. COOK, N.C., SAMMAN, S., 1996, Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *Nutritional Biochemistry*, 7 (2), 66-76.
27. RICE-EVANS, C.A., MILLER, N.J., BOLWELL, P.G., BRAMLEY, P.M., PRIDHAM, J.B., 1995, The relative activities of plant-derived polyphenolic flavonoids, *Free Radical Research*, 22 (4), 375-383.
28. CLIFFORD, M.N., 2000, Anthocyanins- nature-occurrence and dietary burden, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 1063-1072.
29. HOSSEINIAN, F.S., LI, W., BETA, T., 2008, Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat, *Food Chemistry*, 109, 916-924.
30. ABU-AMSHA, R., CROFT, K.D., PUDDEY, I.B., PROUDFOOT, J.M., BEILIN, L.J., 1996, Phenolic content of various beverages determines the extent of inhibition of human serum and low density lipoprotein oxidation in vitro: identification and mechanism of action of some cinnamic acid derivatives from red wine, *Clinical Science*, 91, 449-458.

31. HELLER, W., FORKMANN, G., 1993, Biosynthesis of flavonoids, The flavonoids: Advances in Research since 1986, Chapman & Hall, London, 499-535.
32. WALLACE, G., FRY, S.C., 1994, Phenolic components of the plant cell wall, *International Review of Cytology*, 151, 229-267.
33. SPANOS, G.A., WROLSTAD, R.E., 1992, Phenolics of apple, pear and white grape juices and their changes with processing and storage: A review, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (9), 1478-1487.
34. HERRMANN, K., 1989, Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods, *Critical Review Food Science and Nutrition*, 28 (4), 315-347.
35. FERREIRA, D., SLADE, D., 2002, Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles, *The Royal Society of Chemistry*, 19, 517-541.
36. COOKE, M., POOLE, C.F., 2000, *Encyclopedia of separation science*, Academic Press, UK, 118.
37. WORSFOLD, P., TOWNSHEND, A., POOLE, C., 1995, *Encyclopedia of analytical science*, UK, 31, 575.
38. ALVER, E., DEMİRCİ, A., ÖZCİMDER, M., 2012, Microextraction methods, *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 30, 75-90.
39. RIDGWAY, K., LALLJIE, S.P.D., SMITH, R.M., 2007, Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in foods, *Journal of Chromatography A*, 1153, 36-53.
40. TOSUN, G., 2009, *Üzüm Çekirdeğinden Monomerik Flavan-3-ol Bileşiklerinin Ekstraksiyonunun Optimizasyonu ve Kütle Transfer Parametrelerinin İncelenmesi*, Yüksek lisans tezi, Anadolu Üniversitesi.
41. ROMANIK, G., GILGENAST, E., PRZYJAZNY, A., KAMINSKI, M., 2007, Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70, 253-261.
42. PAN, Z., QU, W., MA, H., ATUNGULU, G.G., MCHUGH, T.H., 2011, Continuous and pulsed ultrasound-assisted extractions of antioxidant from pomegranate peel, *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 1249-1257.

43. TABARAKI, R., HEIDARIZADI, E., BENVIDI, A., 2012, Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, 12, 1-32.
44. HAYAT, K., HUSSAIN, S., ABBAS, S., FAROOQ, U., DING, B., XIA, S., JIA, C., ZHANG, X., XIA, W., 2009, Optimized microwave-assisted extraction of phenolic acids from citrus mandarin peels and evaluation of antioxidant activity *in vitro*, *Separation and Purification Technology*, 70, 63-70.
45. ÇAM, M., HIŞIL, Y., 2006, Basınçlı Solvent Ekstraksiyonu Ve Uygulamaları, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3, 79-86.
46. DİNÇER, S., BARAN, ACARALI, N., UZUN, İ.N., DENİZ, S., 2007, A second option in special separation operations: supercritical fluid processes, *Journal of Engineering and Natural Sciences*, 25 (2), 106-128.
47. POOLE, C.F., GUNATILLEKA, A.D., SETHURAMAN, R., 2000, Contributions of theory to method development in solid-phase extraction, *Journal of Chromatography A*, 885, 17-39.
48. MASQUE, N., GALIA, M., MARCE, R.M., BORRULL, F., 1997, Chemically modified polymeric resin used as sorbent in a solid-phase extraction process to determine phenolic compounds in water, *Journal of Chromatography A*, 771, 55-61.
49. LI, H., LIU, Y., ZHANG, Z., LIAO, H., NIE, L., YAO, S., 2005, Separation and purification of chlorogenic acid by molecularly imprinted polymer monolithic stationary phase, *Journal of Chromatography A*, 1098, 66-74.
50. THEODORIDIS, G., LASAKOVA, M., SKERIKOVA, V., TEGOU, A., GIANTSIOU, N., JANDERA, P., 2006, Molecular imprinting of natural flavonoid antioxidants: Application in solid-phase extraction for the sample pretreatment of natural products prior to HPLC analysis, *Journal of Separation Science*, 29, 2310-2321.
51. MICHALIOF, C., MANESIOTIS, P., PANAYIOTOU, C., 2008, Synthesis of caffeic acid and p-hydroxybenzoic acid molecularly imprinted polymers and their application for the selective extraction of polyphenols from olive mill waste waters, *Journal of Chromatography A*, 1182, 25-33.
52. SONG, X., LI, J., WANG, J., CHEN, L., 2009, Quercetin molecularly imprinted polymers: Preparation, recognition characteristics and properties as sorbent for solid-phase extraction, *Talanta*, 80, 694-702.

53. WULFF, G., SARHAN, A., 1972, The use of polymers with enzyme-analogous structures for the resolution of racemates, *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 11(4), 341.
54. DING, L., LI, H., TANG, F., YAO, S., 2006, Molecularly Imprinted Solid-Phase Extraction of Epicatechin from Tea Beverage, *Analytical Letters*, 39(12), 2373-2385.
55. SCHIEBER, A., HILT, P., STREKER, P., ENDREB, H.U., RENTSCHLER, C., CARLE, R., 2003, A new process for the combined recovery of pectin and phenolic compounds from apple pomace, *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 4, 99-107.
56. SCHIEBER, A., STINTZING, F.C., CARLE, R., 2001, By-products of plant food processing as a source of functional compounds-recent developments, *Trends in Food Science & Technology*, 12, 401-413.
57. SOTO, M.L., MOURE, A., DOMINGUEZ, H., PARAJO, J.C., 2011, Recovery, concentration and purification of phenolic compounds by adsorption: A review, *Journal of Food Engineering*, 105, 1-27.
58. Türk Standartları Enstitüsü (TSE), 2007, Turunçgil Meyveleri, 34, 32.
59. YALIM, S., 2002, *Turunçgil ürünlerinde naringin (4',5,7-Trihydroxyflavanone 7-Rhamnoglucoside) miktarının belirlenmesi ve giderilmesi*, Yüksek lisans tezi, Mersin Üniversitesi.
60. 2012, *Portakal* [online], <http://tr.wikipedia.org/wiki/Portakal>, [Ziyaret Tarihi: 16 Eylül 2012].
61. POLYDERA, A.C., STOFOROS, N.G., TAOUKİS, P.S., 2005, Effect of high hydrostatic pressure treatment on post processing antioxidant activity of fresh Navel orange juice, *Food Chemistry*, 91, 495-503.
62. KLIMCZAK, I., MALECKA, M., SZLACHTA, M., GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A., 2007, Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices, *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 313-322.
63. *Portakal suyu üretimi akış şeması* [online], www.food.hacettepe.edu.tr/turkish/ouyeleri/gmu428/turunçgil_suyu_uretimi.pdf, [Ziyaret Tarihi: 16 Eylül 2012].

64. GARAU, M.C., SIMAL, S., ROSSELLO, C., FEMENIA, A., 2007, Effect of air-drying temperature on physico-chemical properties of dietary fibre and antioxidant capacity of orange (*Citrus aurantium* v. *Canoneta*) by-products, *Food Chemistry*, 104, 1014-1024.
65. REZZADORI, K., BENEDETTI, S., AMANTE, E.R., 2012, Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products, *Food and Bioproducts Processing*, 10.1016.
66. SAWALHA, S.M.S., ARRAEZ-ROMAN, D., SEGURA-CARRETERO, A., FERNANDEZ-GUTIERREZ, A., 2009, Quantification of main phenolic compounds in sweet and bitter orange peel using CE-MS/MS, *Food Chemistry*, 116, 567-574.
67. MAURO, A.D., FALLICO, B., PASSERINI, A., RAPISARDA, P., MACCARONE, E., 1999, Recovery of hesperidin from orange peel by concentration of extracts on styrene-divinylbenzene resin, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4391-4397.
68. MANTHEY, J.A., GROHMANN, K., 2001, Phenols in citrus peel byproducts. Concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel molasses, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 3268-3273.
69. *Drying ether and THF using sodium wire* [online], Analytical Chemistry Resources, <http://delloyd.50megs.com/moreinfo/drying2.html> [Ziyaret Tarihi: 16 Eylül 2012].
70. ZENG, H., WANG, Y., LIU, X., KONG, J., NIE, C., 2012, Preparation of molecular imprinted polymers using bi-functional monomer and bi-crosslinker for solid-phase extraction of rutin, *Talanta*, 93, 172-181.
71. EPRILIATI, I., KERVEN, G., D'ARCY, B., GIDLEY, M.J., 2010, Chromatographic analysis of diverse fruit components using HPLC and UPLC, *Analytical Methods*, 2, 1606-1613.
72. APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMİR, S.E., 2004, Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (26), 7970-7981.
73. LI, B.B., SMITH, B., HOSSAIN, MD.M., 2006, Extraction of phenolics from citrus peels, I. Solvent extraction method, *Separation and Purification Technology*, 48, 182-188.

74. HERNANDEZ, T., ESTRELLA, I., CARLAVILLA, D., MARTIN-ALVAREZ, P.J., MORENO-ARRIBAS, V.M., 2006, Phenolic compounds in red wine subjected to industrial malolactic fermentation and ageing on less, *Analytica Chimica Acta*, 563, 116-125.
75. SAKAKIBARA, H., HONDA, Y., NAKAGAWA, S., ASHIDA, H., KANAZAWA, K., 2003, Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 571-581.

ÖZGEÇMİŞ

24.12.1986 İstanbul doğumluyum. 1992 yılında başladığım ilköğrenimimi Güngören İlköğretim ve Cumhuriyet İlköğretim okullarında tamamladıktan sonra 2000 yılında Bağcılar Lisesi'nde öğrenim gördüm. 2003 yılında Öğrenci Seçme ve Yerleştirme Merkezi tarafından düzenlenen üniversite giriş sınavı sonucunda İ.Ü. Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü'ne girmeye hak kazandım ve 4 yıllık üniversite öğrenimimi tamamlayıp 2009 yılında mezun oldum. 2009 yılında İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.