



**ÜLKEMİZDE YETİŞTİRİLEN BAZI
CITRUS L. TÜRLERİ ÜZERİNE
FİTOKİMYASAL VE BİYOLOJİK
AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Yüksek Lisans Tezi

Burak TEMİZ

Eskişehir 2020

**ÜLKEMİZDE YETİŞTİRİLEN BAZI *CITRUS* L. TÜRLERİ ÜZERİNE
FİTOKİMYASAL VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI**

Burak TEMİZ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Farmakognozi Anabilim Dalı
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Hale Gamze AĞALAR**

**Eskişehir
Anadolu Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Ocak 2020**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Burak Temiz'in "Ülkemizde Yetiştirilen Bazı *Citrus* L. Türleri Üzerine Fitokimyasal ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları" başlıklı tezi 14/01/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından değerlendirilerek "Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği"nin ilgili maddeleri uyarınca, Farmakognozi Anabilim dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı

İmza

Üye (Tez Danışmanı) : Dr. Öğr. Üye. Hale Gamze AĞALAR

Üye : Prof. Dr. Müberra KOŞAR

Üye : Prof. Dr. Fatih DEMİRCİ

Enstitü müdürü

Prof. Dr. Nalan GÜNDOĞDU-KARABURUN
Müdür

ÖZET

ÜLKEMİZDE YETİŞTİRİLEN BAZI *CITRUS* L. TÜRLERİ ÜZERİNE

FİTOKİMYASAL

VE BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

Burak TEMİZ

Anadolu Üniversitesi

Farmakognozi Anabilim Dalı

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ocak 2020

Danışman: Dr. Öğr. Üye. Hale Gamze AĞALAR

Tez kapsamında, ülkemizde yetiştirilen *Citrus* L. cinsine ait bazı türlerin taze meyve kabuğundan %80 metanol ekstraktları maserasyon ve hızlandırılmış çözücülü ekstraksiyon yöntemleriyle hazırlanmıştır. Elde edilen ekstraktlar, ekstrakt verimleri, toplam fenolik madde ve toplam flavonoid miktarları açısından karşılaştırılmıştır. Ekstraktlar, spektrofotometrik olarak DPPH• süpürücü etki ve antitirozinaz etkileri bakımından değerlendirilmiştir. Ekstraktların parmak izi analizleri Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) ile yapılmıştır. Ekstraktlarda biyolojik aktiviteden sorumlu bileşik/bileşiklerin belirlenmesi için YPİTK-biyolojik aktivite (biyootografi) yöntemleri uygulanmıştır. Biyoaktif maddeler Kütle Spektrometrisi ile analiz edilmiştir. Ekstraktlarda antitirozinaz etkiden sorumlu naringin; antioksidan aktiviteden sorumlu hesperidin ve neohesperidin bileşikler tanımlanmıştır.

Anahtar Sözcükler: *Citrus* L., Antioksidan, Antitirozinaz, YPİTK, Biyootografi

ABSTRACT

PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITY STUDIES ON SOME *CITRUS* L. SPECIES CULTIVATED IN TURKEY

Burak TEMİZ

Anadolu University

Department of Pharmacognosy

Graduate School of Health Sciences, January 2020

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Hale Gamze AGALAR

In the present study, the fresh fruit peels of some species of the genus *Citrus* L. cultivated in our country were prepared with 80% methanol by using two different methods such as maceration and accelerated solvent extraction. The extracts were compared due to the yields of extractions, total phenolic contents and total flavonoid contents. The extracts were evaluated spectrophotometrically DPPH• scavenging effect and antityrosinase activity. The fingerprint analyzes of the extracts were done by High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC). To identify compound(s) which is/are responsible for the biological activities, HPTLC-biological activity (bioautography) methods were employed. The bioactive compounds were analyzed by Mass Spectrometry. In the extracts, naringin which is responsible for the antityrosinase activity; hesperidin and neoeriocitrin, which are responsible for the antioxidant activity were identified.

Keywords: *Citrus* L., Antioxidant, Antityrosinase, HPTLC, Bioautography

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve tez sürecim boyunca her anımda yanımda olan, bilgi ve tecrübelerini daima benimle paylaşan, akademik yolda bana cesaret veren, vizyonu ve misyonu ile ve her şeyden öte insanlığı ile bana yol gösteren çok sevgili danışman hocam Dr. Öğr. Üye. Hale Gamze AĞALAR'a, bitkisel materyallerin toplanması, teşhisi ve teslimi konusunda Araş. Gör. Ebru DUYMUŞ'a, botanik kısımda tecrübelerini ve bilgilerini paylaşarak yardımlarda bulunan Prof. Dr. Yavuz Bülent KÖSE hocama, yüksek lisansa başladıktan sonra bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sayın hocam Neş'e KIRIMER'e, Hızlandırılmış Çözücülü Ekstraksiyon cihazı ile çalışmamızda bize imkanlarını sunan AÜBİBAM'a ve çalışmamda yardımcı olan Yasin DARI ile Süleyman YUR'a, bilimsel ve deneysel anlamda tüm imkanlarını sunan Farmakognozi Anabilim Dalı ailesine ve tüm eğitim hayatım boyunca beni daima destekleyen ve cesaretlendiren aileme sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Bu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı; bu çalışma kapsamında elde edilen tüm veri ve bilgiler için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynaklara kaynakçada yer verdiğimi; bu çalışmamın Anadolu Üniversitesi tarafından kullanılan “bilimsel intihal tespit programı”yla tarandığını ve hiçbir şekilde “intihal içermediğini” beyan ederim. Herhangi bir zamanda, çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması durumunda, ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçları kabul ettiğimi bildiririm.



İÇİNDEKİLER

Sayfa

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI.....	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Rutaceae Familyası	3
2.1.1. Rutaceae familyasına ait cinslerin tayin anahtarı	3
2.2. <i>Citrus</i> L. Cinsi	3
2.2.1. <i>Citrus</i> cinsine ait türlerin tayin anahtarı.....	4
2.2.2. <i>Citrus</i> cinsini orijini, adlandırılma sistemi	5
2.2.3. <i>Citrus</i> meyvelerinin anatomik özellikleri	6
2.3. Tez Kapsamında Araştırılan <i>Citrus</i> L. Türleri ve Botanik Özellikleri	7
2.3.1. <i>Citrus aurantium</i> L. (Turunç)	7
2.3.2. <i>Citrus reticulata</i> Blanco (Mandarin).....	8
2.3.3. <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck (Washington portakalı).....	9
2.3.4. <i>Citrus limon</i> L. (Kütdiken limonu)	10
2.3.5. <i>Citrus x limetta</i> Risso (Tatlı limon)	11
2.3.6. <i>Citrus x bergamia</i> Risso & Poiteau (Bergamot).....	12
2.3.7. <i>Citrus medica</i> L. (Etnak, Ağaç kavunu)	13

2.3.8. <i>Citrus paradisi</i> Macfadyen (Starruby greyfurt)	14
2.3.9. <i>Citrus maxima</i> (Burm.) Merr. (<i>Citrus grandis</i>) (Pomelo, şadek)...15	
2.3.10. <i>Citrus maxima</i> x <i>Citrus paradisi</i> Macfadyen (Oroblanco)	16
2.4. <i>Citrus</i> Türlerinin Halk Arasında Kullanımları.....	16
2.4.1. Dünya genelinde kullanımları	16
2.4.2. Ülkemizde kullanımları	19
2.5. <i>Citrus</i> Türlerinin Makro ve Mikro-bileşenleri.....	21
2.5.1. Makro-bileşenleri.....	21
2.5.2. Mikro-bileşenler.....	22
2.6. <i>Citrus</i> Türlerinde Tanımlanmış Sekonder Metabolitler.....	22
2.6.1. Fenolik asitler.....	22
2.6.2. Flavonoitler	23
2.6.3. Uçucu yağlar	26
2.6.4. Diğer bileşikler	27
2.6.4.1. Limonoitler	27
2.6.4.2. Kumarinler	28
2.6.4.3. Karotenoitler	29
2.7. <i>Citrus</i> Türleri Üzerine Yapılmış Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	31
2.8. <i>Citrus</i> L. Türlerinde Yapılmış Farmakokinetik Çalışmalar	40
2.9. <i>Citrus</i> L. Türleri Üzerine Yapılmış Toksisite Çalışmaları.....	41
2.10. Tezde Kullanılan Ekstraksiyon Çalışmaları Hakkında Genel Bilgiler	42
2.10.1. Ekstraksiyon.....	42
2.10.1.1. Maserasyon	42
2.10.1.2. Hızlandırılmış çözücülü ekstraksiyon	43
2.11. Tezde Araştırılan <i>in vitro</i> Biyolojik Aktivitelerle İlgili Genel Bilgiler	44
2.11.1. Antioksidan aktivite	44
2.11.2. Tirozinaz enzimi, inhibisyonu ve önemi	46

2.12.	Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler ile ilgili Genel Bilgiler	51
2.12.1.	Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (YPİTK)	51
2.12.2.	YPİTK- tamamlanmış biyolojik aktivite yöntemi (Biyootografik metot).....	56
2.12.2.1.	YPİTK-tamamlanmış tirozinaz enzim inhibisyonu	57
2.12.2.2.	YPİTK-tamamlanmış DPPH radikali süpürücü etki.....	58
2.12.3.	Elektrosprey iyonizasyon-Kütle spektrometrisi (ESI-KS)	58
3.	MATERYAL VE METOT	60
3.1.	Bitkisel Materyal.....	60
3.2.	Kullanılan Aletler	60
3.3.	Kullanılan Kimyasal Maddeler	60
3.4.	Ekstraksiyon Yöntemleri.....	62
3.4.1.	Hızlandırılmış çözücülü ekstraksiyon (ASE)	62
3.4.2.	Maserasyon	62
3.5.	Spektrofotometrik Yöntemlerle Miktar Tayini Yöntemleri	63
3.5.1.	Toplam fenolik madde miktar tayini	63
3.5.2.	Toplam flavonoid miktar tayini	63
3.6.	Spektrofotometrik <i>in vitro</i> Biyolojik Aktivite Yöntemleri.....	63
3.6.1.	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki	63
3.6.2.	Tirozinaz enzim inhibisyonu	64
3.7.	Ekstrelerin “Parmak İzi” YPİTK Analizleri	64
3.7.1.	Standart maddelerin hazırlanışı.....	64
3.7.2.	Ekstrelerin çözeltilerinin hazırlanışı	65
3.7.3.	Reaktifler ve hazırlanışları	65
3.7.4.	Ekstrelerin “parmak izi” analizleri için metot optimizasyonu	65
3.8.	Biyootografik Metotlar	66
3.8.1.	YPİTK- DPPH• süpürücü etki tayini.....	67

3.8.2. YPİTK-Tirozinaz enzim inhibisyonu	67
3.8.3. Preperatif-İTK yöntemi ile maddelerin izolasyonu ve KS ile incelenmesi	67
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	69
4.1. Ekstre Verimleri	69
4.2. Ekstrelerde Toplam Fenol Miktar Tayinleri	70
4.3. Ekstrelerde Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri.....	71
4.4. Spektrofotometrik <i>in vitro</i> Biyolojik Aktivite Sonuçları	73
4.4.1. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki	73
4.4.2. Tirozinaz enzim inhibisyonuna ait sonuçlar	74
4.5. Ekstrelerin “Parmak İzi” YPİTK Analiz Bulguları	75
4.5.1. Ekstrelerin YPİTK profillerinin karşılaştırılması.....	88
4.5.1.1. <i>C. aurantium</i> (Turunç)	88
4.5.1.2. <i>C. reticulata</i> (Satsuma kültivarı)	89
4.5.1.3. <i>C. reticulata</i> (Robinson kültivarı)	90
4.5.1.4. <i>C. sinensis</i> (Washington portakalı)	91
4.5.1.5. <i>C. limon</i> (Kütdiken limonu)	92
4.5.1.6. <i>C. limetta</i> (Tatlı limon).....	93
4.5.1.7. <i>C. bergamia</i> (Bergamot)	94
4.5.1.8. <i>C. medica</i> (Etnak)	95
4.5.1.9. <i>C. paradisi</i> (Starruby greyfurtu)	96
4.5.1.10. <i>C. maxima</i> (Pomelo)	97
4.5.1.11. <i>C. maxima</i> x <i>C. paradisi</i> (Oroblanco)	98
4.6. YPİTK-Biyootografik Metotlara Ait Bulgular	99
4.6.1. Biyootografik YPİTK-DPPH radikal süpürücü etki	99
4.6.1.1. Ekstrelerde DPPH• süpürücü etki gösteren ve hesperidin olduğu düşünülen bileşiğin (MS-1) KS analizi.....	101

4.6.1.2. Ekstrelerde DPPH• süpürücü etki gösteren ikinci bileşğin (MS-2) KS analizi	103
4.6.2. Biyootografik YPİTK-Tirozinaz enzim inhibisyonuna ait bulgular	106
4.6.2.1. Tirozinaz inhibisyonu gözlenen bileşğin KS analizi.....	108
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	111
KAYNAKÇA	118
EKLER	144
ÖZGEÇMİŞ	162

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1. Tez kapsamında araştırılan <i>Citrus</i> türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları.....	31
Çizelge 2.2. Reaktif oksijen türleri.....	45
Çizelge 2.3. Antioksidan savunmanın enzimatik ve non-enzimatik radikal temizleyicileri.....	45
Çizelge 2.4. YPİTK ve İTK'nın bazı özellikleri bakımından karşılaştırmaları	53
Çizelge 2.5. İTK ve YPİTK'nın kromatografik parametreleri bakımından karşılaştırmaları.....	54
Çizelge 2.6. YPİTK ile YBSK karşılaştırması.....	54
Çizelge 2.7. Biyootografik aktivite çalışmalarının sınıflandırılması.....	57
Çizelge 3.1. Ekstrelerin kodlanması.....	62
Çizelge 3.2. YPİTK analizlerinde oluşturulan metotlar ve parametreleri hakkında bilgiler.....	66
Çizelge 4.1. Elde edilen kuru ekstrelerin % verimleri.....	69
Çizelge 4.1. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları.....	70
Çizelge 4.1. Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları.....	72
Çizelge 4.1. Ekstrelerin ve standartların DPPH• süpürme kapasiteleri.....	73
Çizelge 4.1. Ekstrelerin ve standardın tirozinaz üzerindeki % inhibisyon değerleri.....	74
Çizelge 4.1. Kullanılan reaktiflerle ilgili genel bilgiler.....	76

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. <i>Citrus</i> meyvelerinin anatomik yapısı.....	6
Şekil 2.2. <i>Citrus aurantium</i> L. meyvelerinin genel görünüşü.....	7
Şekil 2.3. <i>Citrus reticula</i> Blanco meyvelerinin genel görünüşü.....	8
Şekil 2.4. <i>Citrus sinensis</i> L. Osbeck meyvelerinin genel görünüşü.....	9
Şekil 2.5. <i>Citrus limon</i> L. meyvelerinin genel görünüşü.....	10
Şekil 2.6. <i>Citrus limetta</i> meyvelerinin genel görünüşü.....	11
Şekil 2.7. <i>Citrus bergamia</i> meyvelerinin genel görünüşü.....	12
Şekil 2.8. <i>Citrus medica</i> meyvelerinin genel görünüşü.....	13
Şekil 2.9. <i>Citrus paradisi</i> Macfadyen meyvelerinin genel görünüşü.....	14
Şekil 2.10. <i>Citrus maxima</i> meyvelerinin genel görünüşü.....	15
Şekil 2.11. <i>Citrus maxima</i> x <i>Citrus paradisi</i> Macfadyen meyvelerinin genel görünüşü.....	16
Şekil 2.12. <i>Citrus</i> türlerinde bulunan bazı fenolik asitler.....	23
Şekil 2.13. <i>Citrus</i> türlerinde bulunan flavanon aglikonları.....	24
Şekil 2.14. <i>Citrus</i> türlerinde bulunan flavanon neohesperidozit glikozitleri...	25
Şekil 2.15. <i>Citrus</i> türlerinde bulunan flavanon rutinozit glikozitleri.....	25
Şekil 2.16. <i>Citrus</i> türlerinde bulunan polimetoksi flavononlar.....	26
Şekil 2.17. <i>Citrus</i> uçucu yağlarının temel bileşenleri.....	27
Şekil 2.18. <i>Citrus</i> türlerinde bulunan limonoit aglikonları.....	28
Şekil 2.19. <i>Citrus</i> türlerinde bulunan bazı kumarin türevleri.....	29
Şekil 2.20. <i>Citrus</i> türlerinde bulunan bazı karotenoitler.....	30
Şekil 2.21. ASE metodu'nun şematik gösterimi.....	44
Şekil 2.22. Tirozinaz enzimi.....	47
Şekil 2.23. Monofenol ve katekollerin orto-kinonlara oksidasyonu.....	48
Şekil 2.24. L-Tirozinden tirozinaz enzimi ile melanin oluşum mekanizması	49
Şekil 2.25. Kütle spektrometrisinin çalışma prensibi şeması.....	58
Şekil 3.1 YPİTK sistemi.....	65
Şekil 4.1 Gallik asit'in kalibrasyon grafiği.....	70
Şekil 4.2 Kersetin'in kalibrasyon grafiği.....	71

Şekil 4.3.	254 nm’de YPİTK plağı.....	77
Şekil 4.4.	366 nm’de YPİTK plağı.....	78
Şekil 4.5.	AlCl ₃ türevlendirilen ekstrelerin 366 nm’deki görüntüsü.....	79
Şekil 4.6.	AlCl ₃ + PEG ile türevlendirilen plakların 366 nm’deki görüntüsü	80
Şekil 4.7.	H ₂ SO ₄ ile türevlendirilen ekstrelerin 366 nm’deki görüntüsü.....	81
Şekil 4.8.	H ₂ SO ₄ ile türevlendirilen plakların beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü.....	82
Şekil 4.9.	H ₂ SO ₄ ile türevlendirilen plakların beyaz ışık (remisyon + transmisyon) görüntüsü.....	83
Şekil 4.10.	NP/PEG ile türevlendirilen plakların 366nm’deki görüntüsü.....	85
Şekil 4.11.	NP/PEG ile türevlendirilen plakların beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü.....	86
Şekil 4.12.	NP/PEG ile türevlendirilen plakların beyaz ışık (remisyon + transmisyon) görüntüsü.....	87
Şekil 4.13.	Turunç ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	88
Şekil 4.14.	Turunç ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	88
Şekil 4.15.	Satsuma mandarini ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	89
Şekil 4.16.	Satsuma mandarini ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	89
Şekil 4.17.	Robinson mandarini ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	90
Şekil 4.18.	Robinson mandarini ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	90
Şekil 4.19.	Washington portakalı ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	91
Şekil 4.20.	Washington portakalı ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	91
Şekil 4.21.	Kütdiken limonu ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	92

Şekil 4.22.	Kütdiken limonu ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	92
Şekil 4.23.	Tatlı limon ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	93
Şekil 4.24.	Tatlı limon ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	93
Şekil 4.25.	Bergamot ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	94
Şekil 4.26.	Bergamot ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	94
Şekil 4.27.	Etnak ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	95
Şekil 4.28.	Etnak ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	95
Şekil 4.29.	Starruby greyfurtu ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	96
Şekil 4.30.	Starruby greyfurtu ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	96
Şekil 4.31.	Pomelo ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	97
Şekil 4.32.	Pomelo ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	97
Şekil 4.33.	Oroblanco ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	98
Şekil 4.34.	Oroblanco ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları.....	98
Şekil 4.35.	DPPH• çözeltilisine daldırılan plakların beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü.....	99
Şekil 4.36.	DPPH• çözeltilisine daldırılan plakların beyaz ışık (remisyon + transmisyon) görüntüsü.....	99
Şekil 4.37.	DPPH süpürücü etkisi belirlenen MS-1 kodlu bileşik.....	101
Şekil 4.38.	Hesperidin için Q1 taraması ve kütle spektrumu.....	102
Şekil 4.39.	Hesperidin'e ait parçalanmalar.....	103

Şekil 4.40.	DPPH süpürücü etkisi belirlenen MS 2 kodlu bileşik.....	103
Şekil 4.41.	MA'sı 596 olan MS 2 kodlu bileşiğin Q1 taraması ve kütle spektrumu.....	105
Şekil 4.42.	Neoeriositrin'e ait karakteristik parçalanma ürünleri.....	106
Şekil 4.43.	Biyootografik olarak plakta tirozinaz inhibisyonunun değerlendirilmesi.....	106
Şekil 4.44.	Enzim ve substrat çözeltileri püskürtülen plakların inkübasyon sonrası beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü.....	107
Şekil 4.45.	Tirozinaz inhibe edici bant	108
Şekil 4.46.	Naringin'e ait Q1 taraması ve kütle spektrumu.....	108
Şekil 4.47.	Naringin'e ait parçalanma ürünleri ve m/z değerleri.....	109

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Abs	: Absorbans
ABTS	: 2,2'-Azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
AChe	: Asetilkolinesteraz
ALP	: Alkalen fosfataz
ALT	: Alanin transferaz
Amu	: Atomik Kütle Birimi
ASE	: Accelerated Solvent Extraction (Hızlandırılmış Çözücülü Ekstraksiyon)
AST	: Aspartat aminotransferaz
ATCC	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
BChe	: Bütilkolinesteraz
BHT	: Bütilenmiş hidroksitoluen
CAT	: Katalaz
COX	: Siklooksijenaz
DHI	: 5,6-dihidroksi indol
DHICA	: 5,6-dihidroksi indol-2-karboksilik asit
dk	: dakika
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DPPH	: 2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil
ESİ	: Elektrosprey iyonizasyon
ETS	: Elektron taşıma sistemi
FDA	: Gıda ve İlaç Birimi
FRAP	: Demiri İndirgeyici Antioksidan Güç
GAE	: Gallik asit'e eşdeğer
GPO	: Glutasyon peroksidaz
GR _x	: Glutasyon redüktaz
GSH	: Endojen glutasyon
GST	: Glutasyon s transferaz
h	: Hacim
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HIV	: İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü
IC ₅₀	: Maksimum inhibisyonun %50'sini oluşturan doz

IL-6	: İnterlökin-6
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
KE	: Kersetin'e eşdeğer
KOH	: Potasyum hidroksit
KS	: Kütle Spektroskopisi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
<i>m</i> -	: meta
<i>m/z</i>	: Kütle/yük
MA	: Molekül ağırlığı
MAE	: Mikrodalga destekli ekstraksiyon
MeOH	: Metanol
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiyazol-il)-2,5-difenil tetrazolyum bromit
NADPH	: Dihidronikotinamit adenin dinükleotit fosfat
NP	: Natural Product
<i>o</i> -	: orto
<i>p</i> -	: para
PEG400	: Polietilen glikol 400
PGE2	: Prostaglandin E2
PHSE	: Basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu
PLE	: Basınçlı sıvı ekstraksiyonu
PRX	: Peroksiredoksin
PSE	: Basınçlı çözücü ekstraksiyonu
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SFE	: Süperkritik Akışkan Ekstraksiyonu
SOD	: Süperoksit dismutaz
SWE	: Subkritik su ekstraksiyonu
TEAK	: Troloksa Eşdeğer Antioksidan Kapasite
TIC	: Total iyon kromatogramı
TNF- α	: Tümör nekroz faktörü
TRX	: Tioredoksin
UAE	: Ultrasonik ekstraksiyon
UV	: Ultraviyole

WHO	: Dünya sağlık �rg�t�
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
YP�TK	: Yüksek Performanslı �nce Tabaka Kromatografisi



1. GİRİŞ ve AMAÇ

Citrus L. cinsine ait meyveler dünya genelinde taze ya da meyve suyu şeklinde yaygın olarak tüketilmektedir. Ancak, çoğunlukla sekonder metabolitler açısından zengin olan kabukları endüstriyel atık olarak değerlendirilmektedir. *Citrus* meyvelerinin global olarak üretiminin 2009-2010 yıllarında 82 milyon tona ulaştığı, özellikle portakalların üretiminin 50 milyon ton olduğu bilinmektedir. Bu süreçte üretilen portakal türlerinin %34'ü meyve suyu üretiminde kullanılırken yaklaşık bu miktarın %44'ünü de atık olarak kabuklar oluşturmaktadır. Kabuklar, meyve suyu işleme proseslerinin birincil atığıdır ve iyi bir karbonhidrat, pektin, uçucu yağ kaynağıdır.

Genel olarak değerlendirildiğinde, *Citrus* meyve atık ürünlerinin yüksek oranda katma değerli bileşikler (polifenolik bileşikler, karotenoitler, uçucu yağlar) içerdiği, sağlığı olumlu yönde destekleyici olabileceği ve farklı endüstrilerde kullanılabileceği düşünülmektedir. Polifenolik bileşiklerin, karotenoitlerin ve uçucu yağların çok sayıda sağlık üzerine yararlı etkilerinin bulunduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur. Özellikle polifenolik bileşiklerin yararlı hammaddeler olarak fonksiyonel gıda üretiminde, farmasötik ve kozmetik sanayiinde dikkate değer potansiyelleri bulunmaktadır. Son yıllarda, polifenolik bileşiklerin antikarsinogenik, antimutajenik, antiallerjenik ve yaşlanmayı geciktirici etkileri üzerine çalışmalara yoğunlaşmıştır.

Dünya genelinde düşünüldüğünde, yıl bazında milyonlarca ton kabuğun atıldığı ve bu kabukların farklı alanlara faydalı ham madde olarak kazandırılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Bu anlamda ülkemiz de hem toprak hem de iklim koşullarının uygunluğu nedeniyle *Citrus* türlerinin üretiminde ciddi bir potansiyele sahiptir ve çeşitli *Citrus* türlerinin kültürü yapılmaktadır. Ülkemizde bu türler üzerinde daha çok kültür koşullarının belirlenmesi, meyve kalitesinin ve veriminin artırılmasına yönelik ziraat alanında çalışmalar dikkat çekmektedir.

Bu tez kapsamında, ülkemizde kültürü yapılan çeşitli *Citrus* meyvelerinin kabuklarından hazırlanan sulu metanol ekstrelerinin antioksidan ve antitirozinaz etkinlikleri araştırılmış, etkidenden sorumlu bileşiklerin belirlenmesine yönelik eş zamanlı Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) ve biyolojik aktivite yöntemleri ile etkidenden sorumlu bileşiklerin tanımlanması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda iki farklı yöntemle %80 metanol ekstreleri hazırlanan kabukların toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavonoid miktarları spektrofotometrik olarak hesaplanmıştır. Her bir

ekstrenin parmak izi analizleri için uygun YPİTK metotları belirlenmiştir. Ekstrelerinin potansiyel DPPH• süpürücü ve antitirozinaz etkileri spektrofotometrik yöntemlerle araştırılmış, etkiden sorumlu bileşikler için biyootografik metotlardan yararlanılmıştır. Etkiden sorumlu bileşiklerin tanımlanmasında preparatif İTK ve Kütle Spektrometresinden yararlanılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Rutaceae Familyası

Türkiye Florası'na göre familyanın genel tanımlaması; ot, çalı veya ağaç, aromatik veya kötü kokulu. Yapraklar alternat veya karşılıklı, basit veya bileşik, guddelerle noktalı, stipulasız. Çiçekler genellikle hermafrodit ve aktinomorfik. Sepaller 4-5 adet, ayrı veya aşağıda birleşik. Petaller kiremitimsi, nadiren valvat, 4-5 adet, genellikle belirgin. Tabla mevcut. Stamenler petal sayısı ile eşit veya iki katı kadar veya daha fazla, ayrı veya bazen aşağıda birleşik. Ovaryum üstte, birleşik karpelli, 4-5 gözlü, ancak karpeller nadiren tabanda birleşir. Stilus karpel sayısı kadar, ayrı veya birleşik. Meyve kapsül veya hesperidyum [1].

2.1.1. Rutaceae familyasına ait cinslerin tayin anahtarı

1. Ağaçlar her dem yeşil yapraklı, petioller genellikle kanatlı veya kenarlı; meyve büyük, etli hesperidyum (Subfamilya *Aurantioideae*: yetiştirilir) **4. Citrus**

1. Otlar veya yarı çalimsı bitkiler, sadece en dipte odunlu; meyve kuru kapsül (Subfamilya *Rutoideae*)

2. Çiçekler zigomorfik, beyaz veya üzerinde pembe işaretlerle kırmızımsı; yapraklar imparipinnat, yaprakçıklar geniş lanseolat-ovat **3. Dictamnus**

2. Çiçekler aktinomorfik, sarı; yapraklar basit veya üç parçalı veya 2-3 parçalı pinnat

3. Yapraklar 2 veya 3 pinnatisekt; petaller çoğunlukla 4, dişli veya saçaklı, nadiren tam; filamentler aşağıda tüysüz **1. Ruta**

3. Yapraklar basit veya üç parçalı; petaller 5, tam; filamentler alt yüzeyin içinde piloz veya villoz **2. Haplophyllum**

2.2. Citrus L. Cinsi

Türkiye Florası'nın 1988 basımlı 10. cildinin 495-508 sayfalarında yer alan bilgiye göre *Citrus* cinsi şu şekilde tanımlanmıştır: küçük ağaçlar. Yapraklar basit, alternat, ince, yanal damarlar az, genç dallar yaprak aksillerindeki tekli dikenlerle birlikte; petioller çoğu zaman kanatlı veya kenarlı, genellikle yaprak tabanı ile eklemli. Çiçekler beyaz veya morlaşmış, tekli ve aksiller veya kısa aksiller salkım, tam veya ginekeum düşmüş. Kaliks 4-5 parçalı, korolla 4-8 (genellikle 5-) parçalı. Stamenler 4-10 adet, petaller kadar. Ovaryum değişken, genellikle 10-14 gözlü, ovüller iki bitişik sıra halinde.

Meyve etli hesperidyum, tohumlar içi meyve eti ile dolu saplı ve iğ şeklinde keseler ile çevrili.

Kayda değer bir ekonomik öneme sahip cins, ticari öneme sahip birçok meyve ağacı içerir. Bunlar arasından başlıcaları citron (*C. medica* L.), limon (*C. limon* (L.) Burm fil.), acı portakal veya turunç (*C. aurantium* L.), tatlı portakal (*C. sinensis* (L.) Osbeck), Akdeniz ve Satsuma mandarinleri (*C. deliciosa* Ten. ve *C. unshiu* Marc.), pomelo veya şadok (*C. grandis* (L.) Osbeck), greyfurt (*C. paradisi* McFad.), ve laym (*C. aurantifolia* (Christm.) Swingle). Bu türler arasındaki sınırların çizilmesi için anahtar Swingle ve Tanaka'nın çalışmalarına göre aşağıda verilmiştir. Türkiye'de *Citrus* yetiştiriciliği Akdeniz bölgesinde (özellikle İzmir, Aydın, Muğla, Mersin, Seyhan ve Hatay) ve kuzey bölgelerde (özellikle Rize) yapılmaktadır [1].

2.2.1. *Citrus* cinsine ait türlerin tayin anahtarı

1. Petioller kanatsız, dar kenarlı, yaprak tabanına katılır veya eksik eklemli ***C. medica***
1. Petioller kanatlı, en azından çok dar, yaprak tabanına bariz bir şekilde eklemli
 2. Stamenler çok fazla, genellikle petal sayısının 4 katından fazla; çiçekler iki tip, tam veya fonksiyonel olarak erkek; olgun meyve açık sarı, meyve her iki ucundan da memecik şeklinde çıkıntılı ***C. limon***
 2. Stamenler petal sayısının yaklaşık 4 katı kadar; çiçekler genellikle tam; meyvenin her iki ucunda memecik şeklinde çıkıntı yok, veya varsa da olgunlaştığında açık sarı değil
 3. Meyve bariz şekilde basık, her iki ucu yassılaştırmış, kabuk kolayca soyulabilir
 4. Meyve büyük, 6 cm'yi aşar; yapraklar eliptik veya ovat, genellikle 10 cm'yi aşar; tomurcuk 10 mm'yi aşar ***C. unshiu***
 4. Meyve daha küçük, nadiren 6 cm'ye ulaşır; yapraklar dar lanseolat, 10 cm'den küçük; tomurcuklar 10 mm'ye ulaşmaz ***C. deliciosa***
 3. Meyve basık değil, kabuk segmentlere yakından bağlı
 5. Meyve büyük veya çok büyük, 10-15 cm çapında, çok (18-) gözlü, soluk sarı; petioller geniş kanatlı
 6. Kolayca ayrılabilen büyük meyve etli; petioller geniş kanatlı, çevresi hemen hemen kalpsi; tohumlar tek embriyolu, çizgili ***C. grandis***
 6. Meyveler daha küçük, meyve eti birleşik; petioller daha az geniş kanatlı, çevresi kalpsi değil; tohumlar pürüzsüz, poliembriyonik ***C. paradisi***

5. Meyve 5-10 cm çapında, en fazla 13 gözlü; petioller geniş kanatlı ise renk canlı kırmızı veya turuncu

7. Meyve yeşilimsi oldukça asidik pulpası ve sarımsı-yeşil kabuğu ile yumurta şeklinde, genellikle her iki ucunda memcik şeklinde çıkıntılı; yapraklar oldukça küçük ve dar **C. aurantifolia**

7. Meyve yarı küremsi, kabuk solgun turuncudan canlı kırmızı-turuncumsu; yapraklar daha geniş ve büyük

8. Petioller geniş kanatlı; meyve sert kabuklu ve keskin asidik pulpalı

C. aurantium

8. Petioller dar kanatlı; meyve yumuşak kabuklu ve tatlı pulpalı

C. sinensis

Yukarıda verilen Türkiye Florası'ndaki *Citrus* cinsine ait türlerin tayin anahtarına ek olarak son yıllarda yapılan çalışmalar ile taksonomik sınıflandırmaya göre bazı değişiklikler yapılmıştır. Plant List'in 2020 verilerine göre; *Citrus grandis*'in sinonimi *Citrus maxima* olarak belirlenmiştir. Türkiye Florası'nda belirtilen tür tayin anahtarında *C. unshiu*, *C. deliciosa* ve *Citrus reticulata* türleri ayrı türler olarak verilmiştir. Ancak güncel bilgilere dayanılarak *C. unshiu* ve *C. deliciosa* türleri kaldırılmış ve bu iki türün sinonimi olarak *C. reticulata* Blanco belirlenmiştir ([http-1](http://1)).

2.2.2. *Citrus* cinsini orijini, adlandırılma sistemi

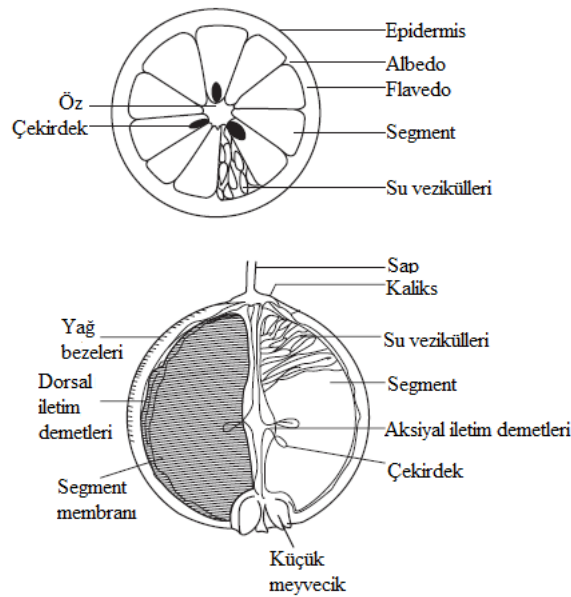
Alt bölüm	: Kapalı tohumlular
Sınıf	: Tek enekliler
Takım	: Sapindales
Familya	: Rutaceae
Alt familya	: Aurantioideae
Cins	: <i>Citrus</i> L.

Narenciyelerin genetik havuzunun Güneydoğu Asya'dan geldiği bilinmektedir. Genel olarak narenciye üretim alanları ekvatorun 35° kuzeyi ve güneyi arasında lokalize olmuştur. *Citrus* türlerinin isimlendirilmelerinde genellikle iki botanikinin sistemi kullanılır. Bunlardan ilki Tanaka sistemidir. Tanaka sisteminin temeli, her tre saf veya hibrit (iki veya daha fazla tür ya da varyeteden) olup olmadığına bakılmaksızın ayrı bir isim vermeyi sağlamaktır. İkinci sistem olan Swingle sistemi ise *Citrus* cinsini önce türlere sonra varyetelere ve son olarak kültür veya hibritlere ayırır [2]. Günümüzde *Citrus*

türlerinin sınıflandırılması ve tarihi geçmişinin aydınlatılması ilerleyen DNA ve gen teknolojileri ile derinleşerek devam etmektedir.

2.2.3. *Citrus* meyvelerinin anatomik özellikleri

Citrus meyveleri ovaryumun gelişmesi, 8-16 karpelin etrafında kümelenmesi ve çiçek eksenine katılmasıyla meydana gelir. Karpeller, çekirdek ve su veziküllerinin de geliştiği segmentlere dönüşür. Perikarp (kabuk), ekzokarp (flavedo) ve mezokarp (albedo) olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.1). Flavedo, kutikül ile çevrelenmiş epidermis ve parankima hücrelerinin de bulunduğu en dıştaki doku tabakasından meydana gelir. Epikarp, hipodermis, dış mezokarp ve yağ bezelerini (lizigen) barındırır [3]. Epikarpın üstü oldukça kompleks bir yapıya ve gelişime sahip çok tabakalı koruyucu deriden (kutikül) oluşmaktadır [4]. Kutikül ise yağ asidi ve selüloz karışımı bir polimer olan kütinden meydana gelmektedir. Kütin matriksi kütin, mum ve hücre duvarı materyallerinden oluşmaktadır.



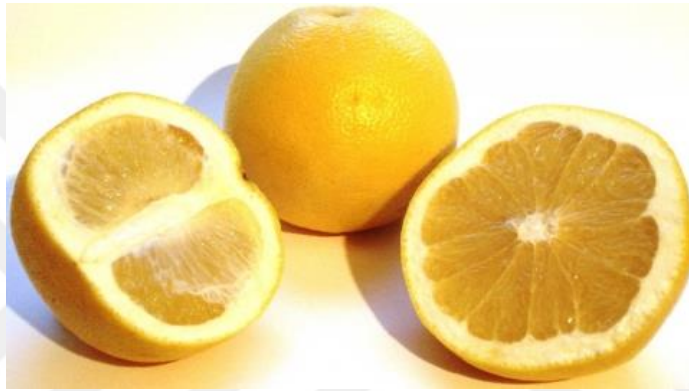
Şekil 2.1. *Citrus* meyvelerinin anatomik yapısı

Albedo iç mezokarptan meydana gelir [5]. Kalınlıkları 1-2 mm (laym)’den 20 mm (pomelo)’ye kadar değişebilir. Dışta flavedoya yapışık, içte ise segment membranlarıyla bağlıdır. Albedo ve flavedo birbiriyle karışmıştır. Endokarp, perikarpın iç kısmı ve segment membranlarının bir bölümünden oluşur. Her bir segment endokarp

membranlarıyla çevrilidir. Meyve suyu, su vezikülleri de denen uca doğru genişleyen çok hücreli keselerin içinde bulunur. Bu yapı tüm segmenti doldurur. Ayrıca karpel septum'u da denen ve segmenti çevreleyen ince duvara yapışıktır. Her bir su kesesi merkezinde çok ufak yağ bezesi barındırır. Ayrıca çekirdekler de segment duvarına yapışık bulunur. Merkezi nüve albedo gibi genellikle beyaz ve süngerimsi yapıdadır ve her segmentin arasında bulunan membranlarla albedoya bağlıdır [3].

2.3. Tez Kapsamında Araştırılan *Citrus L.* Türleri ve Botanik Özellikleri

2.3.1. *Citrus aurantium L.* (Turunç)



Şekil 2.2. *Citrus aurantium L.* meyvelerinin genel görünüşü (<http-2>)

Bitki, ülkemizde “turunç” olarak bilinir, 3 ile 9 metre arasında değişen boya sahip ve *Citrus sinensis*'e göre daha dik ve daha karmaşık taç'a sahiptir. Pürüzsüz ve kahverengi kabuğu ve yeşil dalları vardır. Gençken köşeli ve esnek, çok keskin olmayan, 2.5-8 cm arasında dikenlere sahiptir. Dökülmeyen yeşil yaprakları aromatik, alternat, geniş-kanatlı saplı, tepesindeki küçük noktayla birlikte genellikle ovat, 6.5-13.75 cm uzunluğunda, 3.75-10 cm genişliğinde, ince dişli, üstü koyu yeşil ve altı daha açık renkte küçük yağ bezeleriyle noktalanmıştır. Oldukça kokulu çiçekleri, yaprak aksillerinde tekli veya küçük kümeler halinde, 3.75 cm genişliğindedir. 5 adet beyaz, ince, şerit şeklinde, kıvrık, genişçe ayrılmış petalleri 24 adet sarı stamenlerini çevreler. Çiçeklerin %5-12'si erkektir. Meyve; yuvarlak, oblat, oblong-oval, 7-8 cm genişliğinde, pürüzlüdür. Oldukça ince, aromatik ve acı olan kabuk olgunlaştıkça açık kırmızımsı- turuncu renge bürünür ve ince, basık yağ bezelerine sahiptir. 10-12 adet acı zarlarla ayrılmış dilimler oldukça kuvvetli asidik pulpaya ve birkaç adet çekirdeğe sahiptir. Meyve tamamen olgunlaşınca merkezi çukurlaşır [6]. Anavatanı Güneydoğu Asya olan turunç özellikle Fiji, Samoa,

Guam adalarına aittir. 9. yüzyılda Arabistan'a taşınan turuncun, 1002 yılında Sicilya'da da yetiştirildiği bilinmektedir. Acı portakal olarak da bilinmektedir [7].

2.3.2. *Citrus reticulata* Blanco (Mandarin)



Şekil 2.3. *Citrus reticula* Blanco meyvelerinin genel görünüşü (<http-3>)

Citrus reticulata 7.5 metreye kadar uzayabilen ve yayılan bir ağaçtır. Ucunda genelde çentikli yapraklar sivri uçludur. Çiçekler yaprak aksillerinde tekli veya kümeler halinde bulunabilir. Bu tür içinde birçok farklı mandarin kültürünü barındırır. Bu kültürler kendi içinde 3'e ayrılır; mandarinler, tangerinler ve satsumalar. Robinson mandarini, tangerinler çeşidine aittir ve ilk kez 1960 yılında Amerika'da 'Clementine' mandarini ile 'Orlando' tangelo'sunun tozlaştırılmasıyla elde edilmiştir. Meyveler ortalama 10-22 adet çekirdek içerir. *Citrus reticulata* türünün altında sınıflandırılan kültürlerden bir diğeri ise Satsuma mandarinleridir. İlk kez Japon botanikçi Tanaka tarafından sınıflandırılmıştır. Anavatanı Japonya'dır. Bu türler özellikle erken hasatları ve soğuğa olan dayanıklılıkları ile bilinirler. Satsuma mandarinleri, orta-büyük boylarda basık küre şekilli veya biraz boyunludur. Meyveler olgunlaşınca turuncu-kırmızı bir renge bürünür. Derimsi yapıdaki kabuğu birçok yağ bezesini üzerinde taşır. Kolayca ayrılabilir 10-12 adet segmente sahiptir. Bol suludur ve yoğun aromalı az asidik tada sahiptir. Tüm turunçgil varyeteleri arasında en tatlı tür olarak bilinir. Çekirdekler (0-6 adet) yeşil kotiledona sahiptir [6].

2.3.3. *Citrus sinensis* L. Osbeck (Washington portakalı)



Şekil 2.4. *Citrus sinensis* L. Osbeck meyvelerinin genel görünüşü (<http-4>)

Anavatanı güney Çin olan, 3-15 metre boylarında yaprak dökmeyen bir ağaçtır. Köşeli ve düzenli dallara sahiptir. Dal ve gövde kabuğu rengi yeşilden koyu kahverengine kadar değişebilir. Ağaç, özellikle büyüme fazında iken, genellikle dikenlidir. Yapraklar 6.5-15 cm uzunluğunda, 2.5-9.5 cm genişliğinde, oval veya oval-oblong, pürüzsüz, parlak, üst yüzeyi koyu yeşil iken alt yüzeyi üste göre biraz daha açık renktedir. Petioller genelde dar kanatlı ve yaprak ayasıyla eklemlidir. Yağ vezikülleri tüm yaprak ayasında vardır. Çiçekler yaklaşık 5 cm uzunluğunda ve güzel kokuludur. Kümeler halinde veya tekli bulunabilirler. Korolla, 5 adet beyaz veya açık sarı renkli, oblong ve ince petallere sahiptir. Tüm çiçekler yaklaşık 20-25 adet stamene sahiptir. Meyveler 6.5-9.5 cm çapında, ters ovat veya elipsoittir. ‘Navel’ ismi insan göbeğinin şeklini çağrıştırdığı için verilmiştir. Flavedo genelde sarı veya açık turuncu-kırmızımsı renktedir ve uçucu yağ bezlerini taşır. Albedo beyaz ve süngerimsidir. Pulpa ise sulu ve sarı-turuncu veya açık kırmızımsı renkte, orta asidik ve 10-14 parçadan oluşan membranöz su keseciklerini barındırır [8-10].

2.3.4. *Citrus limon* L. (Kütdiken limonu)



Şekil 2.5. *Citrus limon* L. meyvelerinin genel görünüşü (<http-5>)

Limon, küçük ve yaklaşık 3-6 metre yüksekliğinde kıvrımlı bir ağaçtır. Dalları düzensizdir. Ağaç kabuğu, gövdede açık gri, genç dallarda yeşil ve daha ince dallarda ise morumsu renktedir. Gençken kırmızımsı renkte olup, zamanla üstte koyu yeşil, altta açık yeşil renge bürünen yapraklar; oblong, eliptik veya uzun-ovat ve 6.25-11.25 cm uzunluğundadır. Hafif kokulu çiçekler tek başlarına veya yaprak aksilleri içinde 2 veya daha fazla kümeler halinde olabilir. Tomurcuklar kırmızımsıdır. Açan çiçekleri 4-5 petalli, üst yüzeyi beyaz, alt yüzeyi morumsu ve ortalama 20-40 tane stamen sarı anterler ile birleşmiştir. Meyve, tepe noktasındaki çıkıntı ile oval ve 7-12 cm uzunluğundadır. Meyve kabuğu 6-10 mm kalınlığında, açık sarı renkli, pürüzsüz, aromatik ve yağ bezeleri ile noktalanmıştır. Pulpa solgun sarı renkte ve 8-10 parçalı, sulu ve asidiktir. Bazıları çekirdeksiz olsa da çoğu içi beyaz, pürüzsüz, noktalı, yaklaşık 9.5 mm uzunluğunda, eliptik veya oval şekilli çekirdeklere sahiptir. Limon türlerinin çok uzun zamandır var olduğu bilinse de orjini net olarak belli değildir. *Citrus medica*'nın bir hibriti olduğu düşünülmektedir. İlk bildirilen habitatı Güney Doğu Asya (Myanmar, Güney Çin)'dır. Limon, düşük şeker yoğunluğuna sahip olduğundan, portakal veya greylift ile karşılaştırıldığında soğuğa daha duyarlıdır ve diğer türleri etkilemeyen sıcaklıklarda meyveler donabilir [6, 11, 12].

2.3.5. *Citrus x limetta* Risso (Tatlı limon)



Şekil 2.6. *Citrus x limetta* meyvelerinin genel görünüşü (<http-6>)

Bitki, 6-12 metre uzunluğunda, dikenli ve tepede küresel her daim yeşil bir ağaçtır. Düzensiz dallara sahiptir ve oldukça pürüzsüz ve kahverengi-grimsi ağaç kabuğu vardır. Petioller dar ama belirgin bir şekilde kanatlı ve 8 cm uzunluğundadır. Yapraklar akuminat, 5 cm uzunluğunda ve 2.8 cm genişliğindedir. Çiçekler beyaz, tomurcukları morumsudur. Anterler sarı renkli, stamenler ise serbesttir. Meyveler orta boylu, tepeden basık küresel, kabarık tabanlıdır ve rengi olgunlaştıkça yeşilden sarıya döner. Son derece aromatik, sulu ve asidiktir. Soluk yeşil kotiledona ve mor kalazaya sahip poliembriyonik çekirdekler taşır [13]. Tatlı laym, mosambi limonu, tatlı limon olarak da bilinir. *C. medica* ve *C. aurantium* melezlenmesi sonucu oluşmuştur. Günümüzde ağırlıklı olarak kültürü yapılır. Tropik ve subtropik iklimlerde yetişir.

2.3.6. *Citrus x bergamia* Risso & Poiteau (Bergamot)



Şekil 2.7. *Citrus bergamia* meyvelerinin genel görünüşü (<http-7>)

İlk kez 1818'de Pierre Antoine Poiteau ve Joseph Antoine Risso tarafından isimlendirilen bergamot, *Citrus aurantium* ile *Citrus limon* L. türlerinin hibriti olarak bilinmektedir. Diğer bir görüşe göre turunç ve laym (*C. aurantifolia* (Christm) Swingle)) hibriti veya citron (*C. medica*) ve portakal'ın çaprazlanması sonucu oluştuğu savunulmaktadır. Yeşilimsi sarı rengi, asidik-taze ve canlı aromasıyla karakteristiktir. Bergamot bitkisi, silindirik, koyu grimsi kahverengi saplı ve dikenli ya da dikensiz çok ince düzensiz dallara sahip, 12 metre boyuna kadar büyüeyebilen yaprak dökmeyen küçük bir ağaçtır. Nisan ve mayıs aylarında çiçek açar ve meyveler kasım ayından mart ayına kadar olgunlaşır. Meyve, hesperidyumun alt küresinde hafifçe yassılaştırmıştır ve çok sayıda beze ile kaplı olan 3-6 mm kalınlığındaki kabuğunda uçucu yağları içeren salgı cepleri bulunur. Mezokarp beyaz, endokarp ise çekirdeklerle birlikte yeşilimsi sarı, acı ve ekşi meyve suyunun içeren 10-15 segmente bölünmüştür. Özellikle Kalabriya (Kuzey İtalya'da bir bölge), İtalya, Doğu Afrika, Arjantin, Brezilya ve Türkiye'de yetişmektedir [14, 15].

2.3.7. *Citrus medica* L. (Etnak, Ağaç kavunu)



Şekil 2.8. *Citrus medica* meyvelerinin genel görünüşü (<http-8>)

Bitki, yavaş büyüyen, her dem yeşil küçük ağaç veya çalımıdır. Boyu 2-5 metre arasında değişir ve düzensiz yayılan sert-dikenli (4 cm) dallara sahiptir. Dallar, yaprak ve çiçek tomurcukları gençken morumsudur. Yapraklar; büyük (6-17 cm), soluk yeşil, genelde oblong veya kanatsız petioller ile birlikte hafifçe testere dişlidir. ‘Diamante’ gibi asidik varyetelerin kümelenmiş çiçeklerinin dışı mor, içi beyaz renkte iken, ‘Corsican’ gibi daha tatlı varyetelerin rengi sarımsı beyazdır. Ovat veya oblong şekilli meyveleri uca doğru kabarıktır ve 12-15 cm uzunluğundadır. Derimsi ve yapışkan kabuğun iç tarafı etli, beyaz ve kalın iken, dış tarafı ise ince, yeşilimsi-sarı ve hoş kokuludur. Pulpa genellikle asidik olsa da tatlı olan varyeteler de mevcuttur. Çoğu Citron varyeteleri çok sayıda monoembriyonik çekirdekler içerir. Asidik olanlarda içi siyah olan beyaz çekirdekler, tatlı olanlarda ise renksiz çekirdekler bulunur. Meyvenin rengi olgunlaştıkça yeşilden sarımsı turuncuya döner. Meyveler ağaçtan düşmediği için toplanmadığı sürece ağırlığı 4-5 kiloya kadar ulaşabilir [16]. *Citrus medica* eski ve saf bir *Citrus* türüdür. Genellikle kendi kendine tozlaşmayla döllenir. Genetik çalışmalarla bulunan moleküler kanıtlara göre birçok *Citrus* türü Pomelo, Citron gibi atasal türlerin hibridizasyonu ile oluşmuştur [17].

2.3.8. *Citrus paradisi* Macfadyen (Starruby greyfurt)



Şekil 2.9. *Citrus paradisi* Macfadyen meyvelerinin genel görünüşü (<http-9>)

1830’larda *Citrus paradisi* ismi ilk kez greyfurt’a verilmiştir. *Citrus maxima* (pomelo, şadok) ile *Citrus sinensis* (tatlı portakal)’in hibriti olduğu düşünülmektedir. Ağaç, 4.5- 6 metre boylarında ve dağınık dallara sahiptir. Gövde 15 cm’lik çapa kadar ulaşabilir. Dalları normalde kısa ve yumuşak dikenlere sahiptir. Her dem yeşil yaprakları ovat, 7.5-15 cm uzunluğunda, 4.5-7.5 cm genişliğinde, üstü koyu yeşil, altı daha açık tonda, kenarlarında küçük, yuvarlak dişler bulunan ve küçük yağ bezeleriyle noktalanmıştır. Yaprak sapı geniş, oblanseolat veya ters-ovat kanatlara sahiptir. Çiçekleri beyaz ve dört petallidir. Meyve neredeyse yuvarlak veya hafif armut biçimli ve 10-15 cm genişliğindedir. 1 cm’lik pürüzsüz ve ince noktalı kabuğa sahiptir. Sarı-turuncu kabuğa ve pembe-kırmızı pulpaya sahiptir. Soluk sarı, neredeyse beyazımsı veya pembe-koyu kırmızı renge sahip pulpa ince, membranöz 11-14 bölmeden oluşmaktadır. Çekirdekli veya çekirdeksiz olabilirler. Çekirdekler beyaz, eliptik ve 1.25 cm uzunluğundadır [18].

2.3.9. *Citrus maxima* (Burm.) Merr. (*Citrus grandis*) (Pomelo, şadek)



Şekil 2.10. *Citrus maxima* meyvelerinin genel görünüşü (<http-10>)

“Pomelo, şadek, şadok” gibi isimlerle bilinen ağaç, 5-15 metre boyunda, 10-30 santimetre kalınlığındaki eğri bir gövdeye sahiptir. Dalları alçak ve düzensiz yayılır. Dikenleri 5 cm uzunluğundadır. Köşeli genç dallar sık yoğunlukta, yumuşak, kısa, tüylü ve genellikle dikenlidir. Yapraklar, bileşik, basit görünümlü, bir yaprakçık içeren, alternat, glandular, noktalı, ovattan ovale, 5-20 cm uzunluğunda, 2-12 cm genişliğinde ve derimsi bir yapıdadır. Kokulu çiçekler, tek başlarına veya 2-10’lu kümeler halinde yaprak akslarında veya bazen 10-30 cm uzunluğundaki çiçek salkımlarının terminallerinde 10-15 tane; sap ve kaliks tüylü, 4-5 petalli, sarımsı-beyaz, 1.5-3.5 cm uzunluğunda, dışı biraz tüylü ve sarı-yeşil bezelerle noktalı görünümündedir. Stamenler 20-25 adet, beyaz, belirgin, 4-5’li demetler halinde, başçıklar turuncudur. Meyveler 10-30 cm genişliğinde ve hemen hemen yuvarlaktan oblata veya armut biçimlidir. Kabuğu sıkı veya kolayca çıkarılabilir. Yeşilimsi-sarı veya soluk sarı, minik tüylü, küçük yeşil bezelerle doludur. Kabuk kalınlığı 1.5-2 cm’dir. Albedo yumuşak, beyaz veya pembe renkte, pulpası ise yeşilimsi-sarı veya soluk sarıdan pembe veya kırmızıya doğru değişir ve 11-18 dilime bölünmüştür. Sulu veya oldukça kuru olabilir. Dilimler kolayca yüzülebilir ve keseler birbirine yapışabilir veya gevşek bir şekilde birleşebilir. Lezzeti, hafif-orta şiddette tatlılıktan mayhoş veya asidik bir tada, bazen de belirsiz acımsı bir tada bürünebilir. Çekirdekler, az, iri, sarımsı-beyaz veya beyazdır. Bazı meyveler oldukça çekirdekli olabilir. Pomelo, en büyük narenciye türüdür ve batı dünyasında genel olarak greyfurtun ana atası olarak bilinir. Vejetatif olarak çoğaltılmışsa dikensiz, tohumla çoğaltılırsa 5 cm uzunluğunda dikenli meyveler verir [19, 20].

2.3.10. *Citrus maxima* x *Citrus paradisi* Macfadyen (Oroblanco)



Şekil 2.11. *Citrus maxima* x *Citrus paradisi* Macfadyen meyvelerinin genel görünüşü (<http-11>)

Oroblanco, pomelo ile greyfurtun çaprazlanması sonucu elde edilmiştir. Her daim yeşil ağaçları 7.5-9.5 metreye kadar uzayabilir. Sıkı veya yayılan ve yuvarlak, şemsiye veya vazo şeklindedir. İlk yılında dal yüzeyi tüylü iken, ikinci veya üçüncü yılda çizgili bir yüzeye bürünür. Ağaç kabuğu koyu kahverengi ve pullu veya pürüzsüzdür. Dikenleri düzdür. Petiol; tüylü, uzun veya çok uzun, orta veya geniş kanatlıdır. Yapraklar ovat, orta boyda ve koyu yeşildir. Meyvenin boyu ‘Marsh’ greyfurtuna yakındır ancak daha soluk ve kalın bir kabuğa sahiptir. Pulpası da daha solgundur ve merkezinde daha büyük bir boşluk vardır. Parçaları kolayca ayrılır ve gevşek, sulu ve acı tatlı değildir. Ancak olgunlaşmadan önce oldukça astrenjan bir tada sahiptir. Ayrıca çekirdeksizdir [21].

2.4. *Citrus* Türlerinin Halk Arasında Kullanımları

Dünya’da ve ülkemizde *Citrus* türlerinin ekonomik değeri oldukça yüksektir. Halk arasında çoğunlukla meyveleri besleyici bileşenleri ve vitaminler açısından zengin oluşları nedeniyle sıklıkla tüketilmektedir. Bitkilerin meyveleri dışında, yaprakları, çiçekleri, çekirdekleri ve uçucu yağları çeşitli amaçlarla halk arasında kullanılmaktadır. Bitkilerin meyveleri dışında, yaprakları, çiçekleri, çekirdekleri ve uçucu yağları çeşitli amaçlarla halk arasında kullanılmaktadır.

2.4.1. Dünya genelinde kullanımları

Ortaçağ’da, Akdeniz Bölgesi’nde *C. aurantium* kalp ve vasküler stimülan, sindirimi kolaylaştırıcı, sedatif, trankilizan, iştah stimülanı, genel tonik ve zehirlenmelerde antidot olarak kullanılmıştır. Geleneksel Çin Tıbbı’nda, turuncu gastrointestinal sistem stimülanı ve genel tonik olarak kullanılır [22].

C. maxima diyabet tedavisi için geleneksel olarak kullanılır. Birçok ülkede iltihap kurutucu, antidiyabetik, karaciğer koruyucu etkilerinden dolayı halk arasında kullanılmaktadır. Ateş, gut, artrit, böbrek rahatsızlıklarında ve ülserlerin tedavisinde kullanılabilir. Meyve pulpası ve kabukları iştah açıcı ve tonik olarak, iltihaplarda, öksürükte ve kalp stimülanı olarak, meyve suyu kolesterolün düşürülmesinde ve kilo kaybında, yaprakları epilepsi, kore hastalığında ve konvülsif öksürükte, ayrıca yapraklar hazımsızlığa bağlı karın ağrılarında, dekoksasyonu sıcakken şişliklerde ve ülserlerde yararlıdır. Pomelo kabukları geleneksel olarak güzellik amaçlarıyla kullanılır [20, 23].

C. sinensis meyve kabuklarından elde edilen ürünler ya da olgunlaşmamış bütün kuru meyveleri gastrointestinal sistem rahatsızlıklarında, solunum yolu rahatsızlıklarında özellikle öksürüklerde, uykusuzluk, stres durumunda, epilepsi ve anksiyete durumlarında kullanılmaktadır. *C. aurantium* uçucu yağı aromaterapi uygulamalarında kullanılır. Uçucu yağın, merkezi sinir sistemini uyarıcı, kan basıncını düşürücü etkilerinden dolayı kullanımı önerilmektedir [24]. *C. sinensis* çiçeklerinden hazırlanan dekoksasyonu sedatif etkilerinden dolayı Çin, İtalya, Fransa ve Meksika Geleneksel Tıbbı'nda kullanılır [25].

Çin'in Jingdong, Yunnan Bölgesinde Wuliang Dağlarında *C. reticulata* meyve kabukları yerel halk arasında iltihabı kurutucu olarak kullanılmaktadır [26]. Kuru kabukları Çin Tıbbı'nda, astım ve bronşit gibi solunum sistemi inflamasyon sendromlarında ve hazımsızlıkta yüzyıllardır kullanılır [27]. Çin'in Jingdong, Yunnan Bölgesinde Wuliang Dağlarında *C. medica* var. *sarcodactylis* (Noot) Swingle meyvelerinin ventilasyon şikayetlerinde kullanıldığı kayıtlıdır [26]. Geleneksel Çin Tebatetinde 4000 yıldan beri *C. sinensis*, öksürüklerde, soğuk algınlığında ve solunum sistemi rahatsızlıklarında, ayrıca kilo vermeye yardımcı olarak kullanılır.

Brezilya'da *C. sinensis* yaprak çayı hafif bir trankilizan olarak orta düzeydeki anksiyete ve uykusuzluk durumunda kullanılır. Ayrıca meyve ve çiçekleri baş ağrısını hafifletmede, migren, ateş, grip, alerji ve öksürük durumlarında yatıştırıcı olarak kullanılır [22]. *C. aurantium* çiçekleri, Brezilya geleneksel tıbbında antidepresan, antikonvülzan ve anksiyeteye karşı kullanılmaktadır [28].

Hindistan'ın Uttar Pradesh bölgesinde *C. medica* yaprak ve meyveleri anoreksi, astım, kanser, konstipasyon, diyare, dizanteri, dismenore, ateş, baş ağrısı, hemoroit, bağırsak rahatsızlıkları, deri hastalıkları, kusma, akciğer rahatsızlıkları gibi çeşitli rahatsızlıklarda kullanılmaktadır. *C. limon* meyveleri diş bakımında ve sağlığının korunmasında diş tozu olarak kullanılır [29].

Fransa’da *C. sinensis* anjina, hipertansiyon, konstipasyon, diyare, menstrual rahatsızlıklarda ve kalp çarpıntısı gibi durumlarda kullanılmaktadır [24, 30, 31].

Meksika’da halk arasında *C. sinensis* tüberküloz tedavisinde kullanılır.

Malezya’da 6 bölgeyi (Perak, Kedah, Serian, Sibuti of Sarawak, Kota Belud ve Papar of Sabah) kapsayan bir etnobotanik çalışmada, *Citrus* türlerinin gıda, tıbbi ve kültürel uygulamalarda kullanıldığı bildirilmiştir. Meyvelerin taze olarak yenildiği ya da gıda preparatlarında kullanıldığı bildirilmiş ancak özel bir tarif verilmemiştir. *Citrus aurantifolia*’nın mistik iyileşme ritüellerinde kullanılan önemli bir bileşen olduğu, hazırlanan karışımın tedaviyi eden kişinin görüşünü netleştirerek karşısındaki kişinin problemlerini ya da hastalığını daha iyi teşhis etmesini sağladığı belirtilmiştir. Ayrıca hamile kadınların kötü ruhlardan ve hayaletlerden korunmasında kullanılmaktadır [32].

Nijerya’da, *C. aurantifolia*’nin geleneksel olarak farklı kısımları kullanılmaktadır. Toz edilmiş yapraklardan hazırlanan dekoksasyonu karın ağrılarında içilir, ateşli hastalarda banyo olarak ve göz yıkama suyu olarak kullanılır. Yapraktan hazırlanan lapa ülser yaralarında, deri hastalıklarında uygulanır ve ayrıca doğumdan sonra karın bölgesine uygulanır. Ezilmiş yapraklar, baş ağrısı için alın bölgesine uygulanır. Burun deliğinin yanında ezilerek mide bulantısı yaşayan kişiye ya da ayıltmak için bayılan insana koklatılır. Yaprak infüzyonu, boğaz ağrısı, sarılık ve pamukçuk ile birlikte görülen ateşlerde verilir. Çiçek dekoksasyonu uykusuzluk çekenlerde uykuyu indüklemek için kullanılır. Güneybatı Nijerya’da kökler, gövde kabuğu, dalları, yaprakları ve meyveleri malarya tedavisinde kullanılmaktadır. Meyve suyuna şeker, palm yağı ya da bal eklenerek öksürüğün rahatlatılmasında kullanılır. Seyreltilmiş meyve suyu ağız ve boğaz ağrılarında ağız suyu olarak kullanılır. Meyve suyu ayrıca irritasyonlarda, diyare ve sivrisinek ısırıklarına bağlı şişliklerin tedavisinde faydalıdır. Bazen de zayıflama programlarında kullanılır [33].

Haiti’de *Citrus aurantium* “zorange si” olarak bilinir, gıda ve tıbbi alanda geniş bir kullanıma sahiptir. Yaprakları *Annona muricata* L. yaprakları ile karıştırılarak ateşi düşürmek için kullanılmaktadır. Yaprak kaynatılır, hastanın banyosuna yerleştirilir, sonrasında yapraklarla masaj yapılarak hastanın uygulamadan sonra uyuması sağlanır. Yapraklardan hazırlanan çayı grip semptomlarını iyileştirmede kullanılır. Farklı bir tedavide ise baş ağrısı için yapraklar ısıtılır ve alın bölgesine sıkıca bağlanır. Meyveler ateş üzerinde kül içinde pişirilir, püre haline getirilir, *Ricinus communis* L. yağı ile karıştırılır, ezilmiş alana masaj yapılır. Bu işlemin ezilmiş bölgede koagüle olan kanı

temizlediğine ve o bölgedeki kanlanmayı düzenlediği söylenmektedir. Su ile püre haline getirilen bitki (hangi kısım olduğu belirtilmemiş) bir gece bekletilerek cildi temizlemek için kullanılır. En az 2 hafta bu karışımla yüzü yıkamanın cilt lekelerini giderdiği söylenmektedir. Yapraklarından hazırlanan çayı eşit miktarda kahve (*Coffea arabica* L.) yaprakları ile karıştırılarak duygusal şoklarda kullanılır. Bu karışımın kalp ritmini düzenleyerek sakinleştirdiği söylenmektedir [34].

C. aurantium'un meyve kabukları ve meyve suyu Afrika'nın tropik bölgelerinde ve Latin Amerika'da anksiyete, duygusal şokta, uykusuzlukta ve kriz durumlarında kullanılmaktadır. Kuru çiçek infüzyonu sinirleri yatıştırmada Afrika'da ve Latin Amerika'da; çiçeklerden hazırlanan sulu ekstre Doğu Tıbbı'nda sinirleri rahatlatmak için; yaprak infüzyonu İran'da anksiyete, epilepsi ve sinir harabiyetinde, Afro-brezilyalı halk ise sedatif etkilerinden dolayı kullanılmaktadır. *C. aurantifolia* meyve kabukları ve meyve suyu trankilizan ve anksiyolitik olarak Çin, Brezilya ve Meksika'da halk arasında kullanılır. Toz edilmiş yapraklar Malay'da baş ağrısında, Yucatan'da ise yaprak infüzyonu trankilizan olarak; Meksika Geleneksel Tıbbı'nda çiçekleri anksiyete ve sinirlilik durumlarında kullanılmaktadır. *C. reticulata* ve *C. maxima* bitkilerinden elde edilen aromatik sular stresi rahatlatmak ve uykusuzluk durumunda kullanılır [25].

İran'da geleneksel olarak *C. aurantifolia*'nın meyveleri, soğuk algınlığında kullanılır, antiinflamatuvar, gaz giderici, ruhu canlandırıcı ve neşelendirici etkilerinden dolayı kullanımları kayıtlıdır. *C. aurantium*'un çiçekleri ise hazmı kolaylaştırıcı, sedatif ve fertilitiyi düzenleyici etkilerinden dolayı kullanılmaktadır [35].

2.4.2. Ülkemizde kullanımları

Citrus türlerinin meyvelerinin çoğu ülkemizde halk arasında taze olarak bütün ya da meyve suyu hazırlanarak tüketilmektedir. Ayrıca tatlı, kek, şekerleme, marmelat ya da reçel gibi ürünleri evlerde hazırlanarak ya da endüstriyel olarak işlenmiş ürünler hazır olarak tüketilmektedir.

C. limon kabuğu uyarıcı ve koku verici olarak kullanılmaktadır. Kullanış şekli, %5'lik infüzyon ve tentür şeklindedir. Koku verici olarak kullanılan limon tentürü için taze limon kabuğunun dış kısmı alınır, 50 g kabuk 100 g alkol ile kapalı bir kap içerisinde 8 gün zaman zaman çalkalayarak, temasta bırakılır ve süre sonunda sıkılır ve süzülür. Olgun limon meyvesi sıkılarak usaresi hazırlanır ve bu usare şeker ile tatlandırılarak dahilen yorgunluk giderici ve gribal enfeksiyonlarda dayanıklılık verici olarak kullanılır.

Limon usaresi haricen antiseptik etkisinden dolayı boğaz iltihaplarında gargara olarak kullanılır [36].

Eleşkirt, Ağrı'da limon meyvelerinin çocuklarda ateş tedavisinde kullanıldığı kayıtlıdır [37]. İzmir'de 193 hastayla gerçekleştirilen bir çalışmada, hastaların %51.3'ünün hipertansiyon tedavisi için kullandıkları belirtilmiştir. Bu çalışmada, limon suyunun tek başına ya da sarımsak ile karıştırılarak tansiyonu düşürmek için kullandıkları belirlenmiştir [38].

Karcı ve ark. (2017), Bafra, Samsun'da yaptıkları çalışmada, *Foeniculum vulgare* Mill. toprak üstü kısımlarından hazırlanan dekoksasyonun limon suyu ile birlikte kan glikoz düzeylerini düşürmek için; *Mentha piperita* L. yapraklarından hazırlanan dekoksasyonun dahilen limon meyvesi ile birlikte alınarak kusmaya karşı kullanıldığı kayıtlıdır [39]. Türkiye'de yetişen Apiaceae familyası bitkilerine ait bir derleme çalışmasında, *Petroselinum crispum* (Miller) A.W.Hill yapraklarının dekoksasyonu limon ile birlikte diyabet tedavisinde dahilen kullanılmaktadır [40].

Ankara'da bir hastanede kronik hastalıkları olan 232 hastaya yapılan bir anket çalışmasında, hastaların %39.6'sının limonu diyabet hastalığının tedavisinde kullandıklarını belirtmişlerdir [41].

C. aurantium ise iştah açıcı, midevi, lezzet ve koku verici olarak kullanılmaktadır. Safra söktürücü etkisi de mevcuttur. Kullanılış şekli, 1-2 g toz, hap halinde, günde birkaç defadır. %5-10'luk infüzyonu günde 2-3 bardak tüketilebilir. Koku ve tat vermek için turunç şurubu hazırlanır; çok ince doğranan kabuklar (1 kısım kabuk) eşit miktarda %70'lik alkol (1 kısım) ile karıştırılır, kapalı bir kapta 12 saat tutulur. Bu sürenin sonunda, 10 katı kadar sıcak su (10 kısım) ilave edilir ve 6 saat daha bekletilir. Sonrasında süzülür, sıvı kısım alınarak her 10 kısmı için 18 kısım şeker ilave edilir, karışım hafifçe ısıtılır, şekerin çözünmesi sağlanır, süzülür ve kapalı şişelerde saklanır. Taze turunç çiçeklerinden su buharı distilasyonu ile hazırlanan turunç çiçeği suyu veya kurutulmuş çiçeklerden hazırlanan %1-4'lük infüzyonu yatıştırıcı, midevi, terletici, ateş düşürücü ve uyutucu özelliklerinden dolayı kullanılır. Yatmadan önce, turunç çiçeği suyundan 2-10 g, infüzyondan ise 1 bardak içilmesi tavsiye edilir. Yapraklardan hazırlanan %5'lik infüzyon kuvvet verici, yatıştırıcı, iştah açıcı ve midevi olarak, günde 2-3 bardak içilir. *C. medica* meyve çekirdeklerinden hazırlanan emülsiyon, midevi, acı ilaç ve kurt düşürücü olarak kullanılır. Ağaç kavununun meyveleri gıda olarak tüketilmektedir (Baytop, 1984).

Muğla, Marmaris civarında yapılan bir etnobotanik çalışmada, *C. limon* perikarp ve yaprakları; *C. sinensis* perikarpları alın bölgesine sarılarak baş ağrılarında kullanıldığı belirtilmiştir [42, 43].

2.5. *Citrus* Türlerinin Makro ve Mikro-bileşenleri

2.5.1. Makro-bileşenleri

Citrus meyvelerinin bileşenlerini çözünebilir ve çözünmeyen diğer bileşenler olarak ikiye ayırmak mümkündür. Çözülebilir kısımda mono- ve di-sakkaritler, organik asitler, amino asitler ve diğer minör komponentler mevcutken çözünmeyen kısımda başlıca hücre elemanı olan polisakkaritler değerlendirilmektedir.

Sukroz, glikoz ve fruktoz genellikle 2:1:1 oranında bulunurlar ve meyvenin tatlılığında rol oynarlar. Bu oran, olgunlaşma süreçlerinde ve değişik varyetelerde değişiklik göstermekte ve uzun-dönem depolamada asit oranının artmasıyla düşmektedir. Bazı türlerde eser miktarda mannoz, maltoz, heptüloz, galaktoz, ramnoz, ksiloz ve trehaloz gibi şekerlere rastlanmıştır. Kabuklar da önemli miktarlarda sukroz, glikoz, fruktoz kadar ksiloz ve ramnoz içermektedir. Çözünmeyen kısımda polisakkaritler kabuk, pulpa, meyve ve membranlarda bulunmaktadır. *Citrus* polisakkaritlerini pektin, hemiselüloz, selüloz ve lignin oluşturmaktadır. Nişasta albedoda bol miktarda bulunur ve ayrıca meyveler yeşilken flavedo kısmında da bulunmaktadır. *Citrus* meyvelerinde selüloz, lignin ve pektinden oluşan diyet lifi mevcuttur. Özellikle kabuk ve pulpa diyet lif kaynağıdır.

Meyvelerin tat kalitesini etkileyen bir grup da sitrik asit, malik asit, süksinik asit gibi karboksilik asitlerdir. Organik asitler meyvelerde serbest halde ya da tuz formunda bulunurlar. Sitrik asit meyve suyunda bulunurken, malik, malonik, okzalik ve kinik asitler kabukta bol miktarda bulunur. Diğer asitlerden adipik, izositrik, laktik, akonitik, α -ketoglutarik ve benzoik asitlerin varlığına meyvelerde rastlanmıştır.

Citrus türlerinin azotlu bileşiklerinin yaklaşık %70'ini serbest aminoasitler oluşturmaktadır. Meyve sularında prolin majör aminoasit olarak belirlenmiştir.

Lipitler değerlendirildiğinde, çoğunlukla çekirdek ve kabukta bulunmaktadır. Doymamış yağ asitlerinden oleik (C18:1), linoleik (C18:2) ve linolenik asit (C18:3) bulunurken doymuş yağ asitlerinden palmitik (C16:0) ve stearik asit (C18:0) tanımlanmıştır [44].

2.5.2. Mikro-bileşenler

Meyvelerde, karotenler ve β -kriptoksantin gibi A vitamini prekürsörleri ve A vitamini önemli miktarlarda bulunur. Suda çözünür vitaminler dikkate alındığında, C vitamini yüksek miktarlarda meyvelerde bulunmaktadır. Meyveler ayrıca B vitamin kompleksi (özellikle B₁ vitamini (tiamin) ve B₆ vitamini (piridoksal fosfat)) bakımından zengindir, ayrıca minör miktarlarda B₃ vitamini (niasin), B₂ vitamini (riboflavin) ve B₅ vitamini (pantotenik asit) bulunur. Meyveler ve meyve suları folat açısından da zengin kaynaklardır.

Meyveler ve ürünleri oldukça düşük sodyum içerirken, iyi birer potasyum kaynaklarıdır. Kalsiyum, magnezyum ve fosfor miktarları göreceli olarak düşüktür. Meyvelerde minör miktarlarda bulunan diğer mineraller ise, bakır, çinko, demir, manganezdır [44].

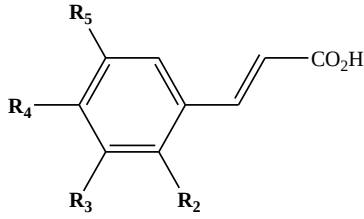
2.6. *Citrus* Türlerinde Tanımlanmış Sekonder Metabolitler

2.6.1. Fenolik asitler

Fenolik asitler, sekonder metabolitlerden fenoliklerin alt sınıfı olarak bilinmektedir. Fenolikler son sınıflandırmayla birlikte polifenolikler ve basit fenoller olarak ikiye ayrılmıştır. Polifenoller (flavonoitler de dahil olmak üzere) en az iki fenol alt birimi içerir. Fenolik asit, yapısında fonksiyonel grup olarak karboksilik asit (-COOH) içeren fenolikler olarak tanımlanır. Ayırt edici iki temel karbon iskeleti içerirler: hidroksisinnamik ve hidroksibenzoik yapısı. Aromatik halka üzerindeki hidroksi (-OH) gruplarının sayısı ve pozisyonları bu farklılığı yaratır [45].

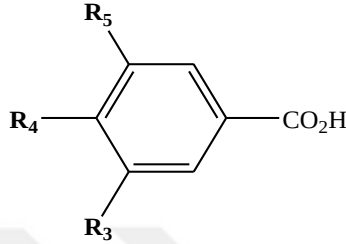
Fenolik asitler bitkinin büyümesi ve üremesi için kritik öneme sahiptir. Çevresel faktörlere (ışık, düşük sıcaklık, kirlilik vs.) cevap olarak üretilirler ve bitkiyi bu faktörlere karşı korurlar [46].

Yapılan çalışmalar *Citrus* türlerinde ferulik asit, *p*-kumarik asit ve sinapik asit'in yoğun, kafeik asit, *p*-hidroksibenzoik asit, vanilik asit, protokateşik asit ve gallik asit'in ise daha düşük oranlarda bulunduğunu göstermektedir [47-52] (Şekil 2.13).



Hidroksisinnamik asit türevleri

R ₂ = OH, <i>o</i> -kumarik asit
R ₃ = OH, <i>m</i> -kumarik asit
R ₄ = OH, <i>p</i> -kumarik asit
R ₃ = R ₄ = OH, kafeik asit
R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OH, ferulik asit
R ₃ = R ₅ = OCH ₃ , R ₄ = OH, sinapik asit



Hidroksibenzoik asit türevleri

R ₃ = OH, <i>m</i> -hidroksibenzoik asit
R ₄ = OH, <i>p</i> -hidroksibenzoik asit
R ₃ = R ₄ = OH, protokateşik asit
R ₃ = OCH ₃ , R ₄ = OH, vanilik asit
R ₃ = R ₅ = OCH ₃ , R ₄ = OH, şiringik asit

Şekil 2.12. *Citrus* türlerinde bulunan bazı fenolik asitler

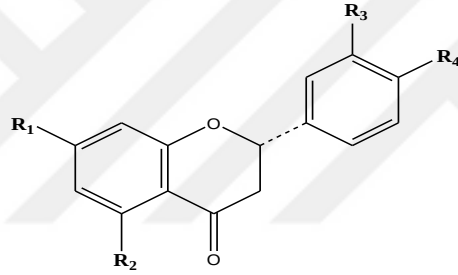
2.6.2. Flavonoidler

Flavonoidler, benzo- γ -piran (kromon) yapısıyla karakterize polifenolik bileşik gruplarının geniş bir kısmını oluşturur. 4000'den fazla flavonoid tanımlanmış ve moleküler yapıları aydınlatılmıştır [53]. Yapısında bulunan 3 fenolik halka (C₆ – C₃ – C₆) A, B ve C (veya piran) halkası olarak adlandırılır. Flavonoidlerin sınıflandırılması kimyasal yapısındaki C halkasının yükseltgenme derecesi ve süstitüent yollarına göre yapılır [54]. Flavonol, flavon, flavanon, flavanol (kateşinler), antosiyanidin, izoflavon, dihidroflavanol ve kalkonlar ana flavonoid gruplarıdır. Flavonoidler monomerik, dimerik veya oligomerik olabilirler.

Bitkilerde flavonoid biyosentezinde kullanılan yolak fenolik asitler, lignin, lignan ve stilbenler gibi sekonder metabolitleri de üreten fenilpropanoit yolağının en uzun kısmıdır. En önemli flavonoid prekürsörü fenilalanin'dir [55]. Bitkilerin flavonoidleri fungal parazitler, otoburlar, patojenler ve oksidatif hücre hasarlarından korunmak için ürettiği düşünülmektedir [56].

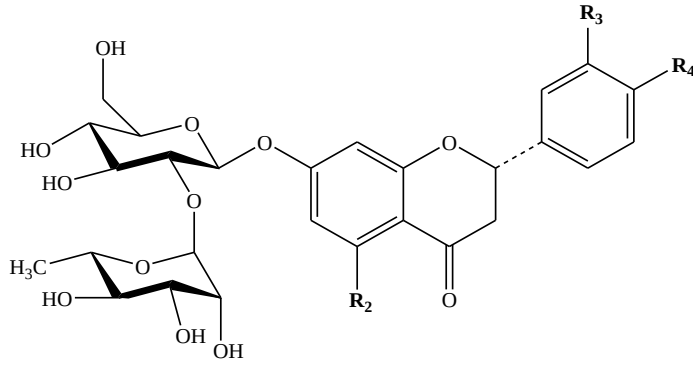
Flavon, flavanon, flavonol ve antosiyaninler (yalnızca kan portakallarında) *Citrus* türlerinde bulunan flavonoid gruplarıdır. Bunlar arasında flavanonlar en çok bulunan gruptur. *Citrus* flavanonları glikozit veya aglikon formlarında bulunur. Aglikon formlar

arasından naringenin ve hesperetin en önemli iki bileşiktir (şekil 2.14). [57]. Glikozit formlar ise iki grup altında toplanır; rutinozit ve neohesperidozit [58]. Neohesperidozidlere örnek olarak naringin, neohesperidin ve neoeriositrin yapılarında flavanon ve neohesperidoz (ramnozil- α -1,2 glikoz) şekeri bulundurur ve acı tatla ilişkilendirilir (şekil 2.15). Rutinozidlere örnek olarak hesperidin, narirutin ve didimin ise yapılarında flavanon aglikonu ve rutinoz (ramnozil- α -1,6 glikoz) gibi disakkarit kalıntıları bulundurur ve tatsızdırlar (şekil 2.16) [57]. 7-O-glikozilflavanonlar *Citrus* meyvelerinde en sık bulunan flavonoidlerdir [59]. Ayrıca O-metoksi gruplarıyla karakterize polimetoksi flavanonlar da mevcuttur (şekil 2.17).



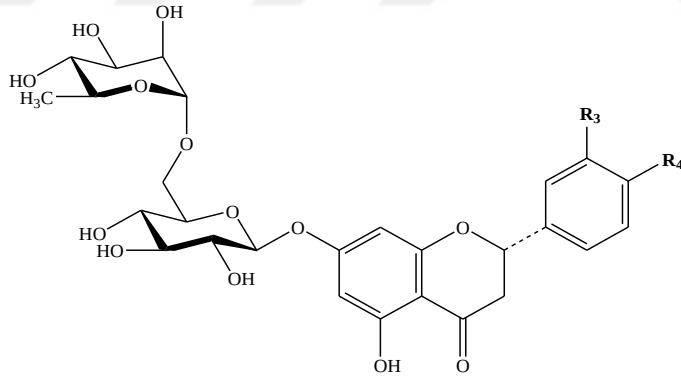
Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Naringenin	OH	OH	H	OH
Hesperetin	OH	OH	OH	OCH ₃
Eridiktiol	OH	OH	OH	OH

Şekil 2.13. *Citrus* türlerinde bulunan flavanon aglikonları



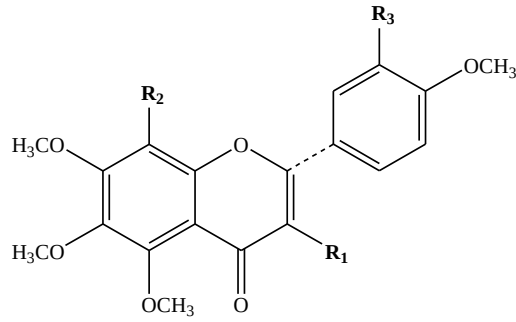
Bileşik	R ₂	R ₃	R ₄
Naringin	OH	H	OH
Neohesperidin	OH	OH	OCH ₃
Neeriositrin	OH	OH	OH
Ponsirin	OH	H	OCH ₃

Şekil 2.14. *Citrus türlerinde bulunan flavanon neohesperidozit glikozitleri*



Bileşik	R ₂	R ₃	R ₄
Narirutin	OH	H	OH
Hesperidin	OH	OH	OCH ₃
Didimin	OH	H	OCH ₃
Eriositrin	OH	OH	OH
Diosmin	OH	OH	OCH ₃

Şekil 2.15. *Citrus türlerinde bulunan flavanon rutinozit glikozitleri*



Bileşik	R ₁	R ₂	R ₃
Skutallarein	H	H	H
Sinensetin	H	H	OCH ₃
Tangeretin	H	OCH ₃	H
Hekzametoksi flavon	OCH ₃	H	OCH ₃
Nobiletin	H	OCH ₃	OCH ₃
Heptametoksi flavon	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃

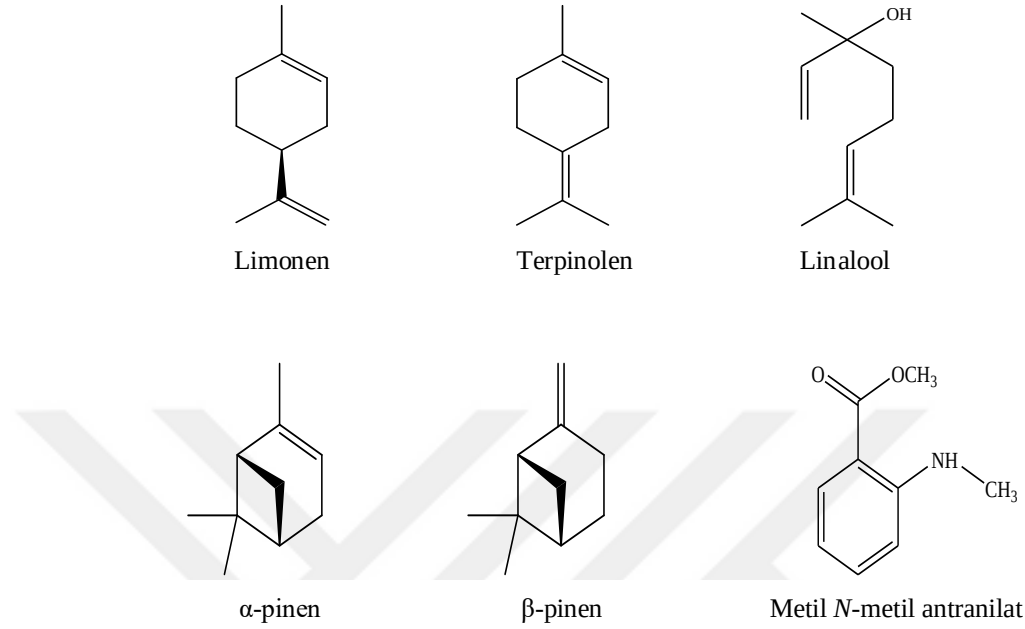
Şekil 2.16. *Citrus türlerinde bulunan polimetoksi flavononlar*

2.6.3. Uçucu yağlar

2-metilbutan iskeletine sahip birçok alkol, aldehit ve ester bileşikleri uçucu yağların minör komponentleridir. Uçucu bileşen kompozisyonlarının çoğunu terpenik bileşikler oluşturur ve izopren (C₅H₈) birimlerinden meydana gelirler. Monoterpenoitlerin prekürsörü geranil pirofosfat'tır. Seskiterpenler 15 karbonlu bileşiklerdir. Bu sebeple seskiterpenler monoterpenoitlere göre daha düşük uçuculuğa ve daha yüksek kaynama noktasına sahiptirler. Farnesol pirofosfat tüm seskiterpenlerin prekürsörüdür [60]. Seskiterpenler mevalonat yolağından, -mono ve -di terpenler metil eritritol yolağından sentezlenir. Bitkide, otoburlara karşı savunma mekanizması veya tozlaşmada rol alan böcekleri etkilemek gibi rolleri vardır [60].

Citrus uçucu yağlarının genel kompozisyonunu mono- ve seskiterpen hidrokarbonları ile onların oksijenli türevleri (alkol, aldehit, ester, eter, vs.), alifatik hidrokarbonlar, alkoller, esterler, asitler ve türevleri oluşturur. Limonen (>%90) *Citrus* uçucu yağlarında bulunan ana bileşendir. Terpinolen, γ -terpinen, α -pinen ve β -pinen ise limonenden sonra gelen ana terpenik bileşenlerdir [61]. Bunun yanında bergamot, misket limonu gibi türlerinde linalol ve linalil asetat majör bileşikler olarak bulunur [62] (Şekil

2.18). Bunlar dışında örneğin mandarin uçucu yağının bir azot esteri olan metil *N*-metil antranilat içerdiği belirlenmiştir [63].

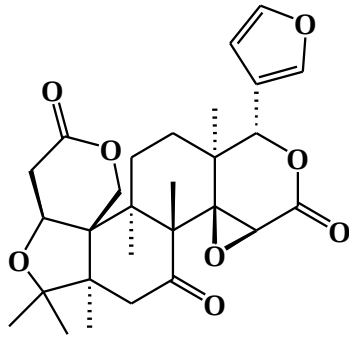


Şekil 2.17. *Citrus* uçucu yağlarının temel bileşenleri

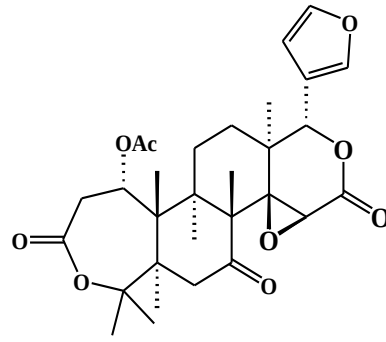
2.6.4. Diğer bileşikler

2.6.4.1. Limonoitler

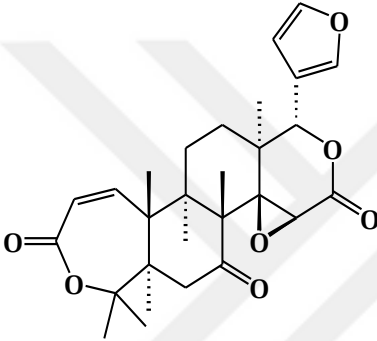
Limonoitler, 4,4,8-trimetil-17-furanilsteroit iskeletine sahip triterpen türevi bileşiklerdir. Aglikon formdaki limonoitler daha çok *Citrus* türlerinin çekirdeklerinde, glikozitleri ise meyvenin suyunda daha yüksek oranda bulunur. *Citrus* limonoitleri iskelet yapısına göre genelde 2 grupta toplanır; daha sık rastlanan 5 halkalı limonin ve 4 halkalı sisteme sahip nomilin (Şekil 2.19). *Citrus* türlerinden 50'den fazla limonoit tanımlanmış ve izole edilmiştir [64].



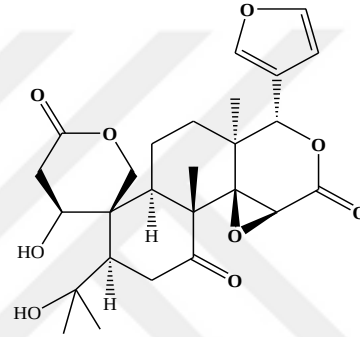
Limonin



Nomilin



Obakünon



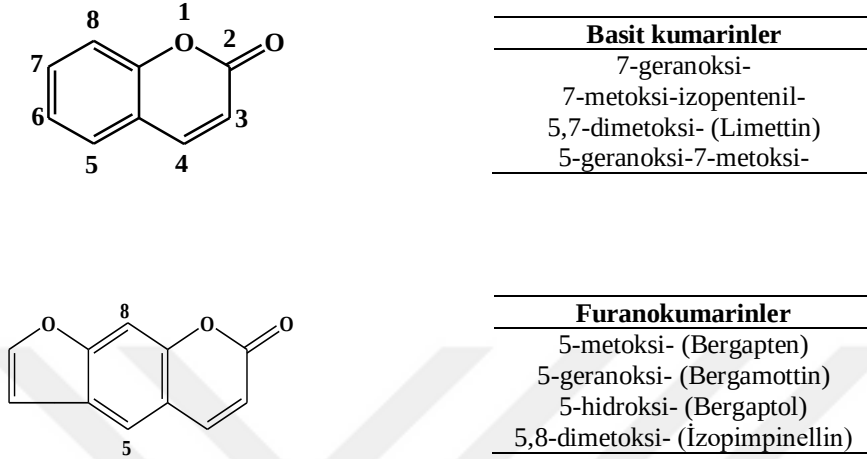
Ichangin

Şekil 2.18. *Citrus* türlerinde bulunan limonoit aglikonları

2.6.4.2. Kumarinler

Kumarinler benzo-2-piron (o-hidroksi sinamik asit laktonu) ana iskeletine sahiptir ve 4 gruba ayrılır: basit kumarinler, furanokumarinler, pironokumarinler ve piron-sübstitüe kumarinler. Basit kumarin ve furanokumarinler (psöralen) soğukta sıkmayla elde edilen *Citrus* uçucu yağlarında bulunurlar ve uçucu özellikte olmamaları nedeniyle distilasyonla elde edilmiş uçucu yağların kompozisyonlarında yer almazlar. Basit kumarin yapısının 5., 7., 8. ve furanokumarin yapısının 5. ve 8. konumlarındaki farklı sübstitüentlerin (hidroksi, metoksi, izopentil, izopentoksil, geronoksil vs.) varlığıyla isimlendirilirler. 5,7-dimetoksi kumarin (limettin), 5-geranoksi-7-metoksi kumarin, 7-geranoksi kumarin (auraptin) ve 7-hidroksi kumarin (umbelliferon) *Citrus* türlerinde en sık rastlanan basit kumarinlerdir [65, 66]. 5-metoksi- (bergapten), 5-hidroksi- (bergaptol),

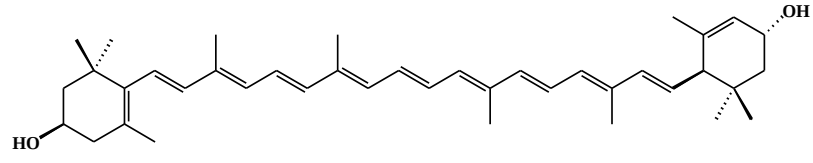
5-geranoksi- (bergamottin), 5-izopentoneoksi- (izoimperatorin), 8-geranoksi- ve 5,8-dimetoksi (izopimpinellin) sübstituentlerine sahip bileşikler ise en sık rastlanan furanokumarin türevleridir [65] (Şekil 2.20).



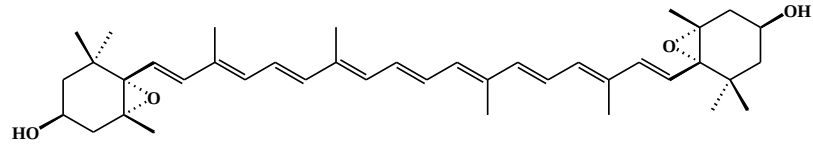
Şekil 2.19. *Citrus* türlerinde bulunan bazı kumarin türevleri

2.6.4.3. Karotenoitler

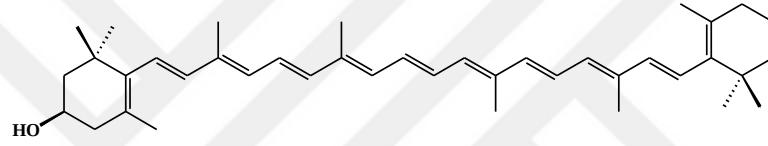
Karotenoitler çifte bağlı konjuge uzun bir zincirden oluşan izoprenoit yapısındadır ve merkezi çifte bağın her iki yanı da genellikle simetriktr [67]. Merkezi zincir, oksijen taşıyan fonksiyonel gruplarla sübstitüe son gruplar taşıyabilir. Pigment bileşikleri olarak da bilinen karotenoitler yapılarına göre iki gruba ayrılırlar: sadece karbon ve hidrojen atomu içeren karotenoitler ve en az bir oksijen atomu içeren *okzo*-karotenoitler (ksantofiller). Polien iskeletindeki konjuge çifte bağların dizilimi ışığı absorplama özelliklerini belirler. Çifte bağların sayısına göre çeşitli *cis/trans* (*E/Z*) konfigürasyonları mümkündür [68]. Doğada genelde *trans*- formda bulunurlar ve bitkiyi ışık hasarına karşı korurlar [69]. Lutein, zeoksantin, β -kriptoksantin, β -karoten, fitoen, α -karoten ve violaksantin *Citrus* türlerinde tanımlanan başlıca karotenoitlerdir [70, 71] (Şekil 2.21).



Lutein



Viyolaksantin



beta- kriptoksantin

Şekil 2.20. *Citrus türlerinde bulunan bazı karotenoitler*

2.7. *Citrus* Türleri Üzerine Yapılmış Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Literatürdeki çalışmalar değerlendirildiğinde, *Citrus* türleri üzerine çalışmaların oldukça fazla olduğu dikkat çekmektedir. Özellikle *C. bergamia*, *C. aurantifolia*, *C. aurantium*, *C. maxima*, *C. sinensis*, *C. reticulata* ve *C. limon* türleri üzerine çalışmalar yoğunlaşmaktadır. Bu türler üzerine özellikle antioksidan, anti-enflamatuvar, antikanser etkiler, sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem üzerine olumlu etkileriyle ilişkili *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır [57, 72-75].

Ülkemizde yapılan çalışmaların daha çok zirai ve fitokimyasal araştırmalar olduğu belirlenmiştir [76-79].

Tez kapsamında kullanılan *Citrus* türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları hakkındaki literatür bilgisi, aktivite türü ve kısaca sonuç şeklinde Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Tez kapsamında araştırılan *Citrus* türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları

Aktivite	Sonuç	Kaynak
<i>C. aurantium</i>		
Anksiyolitik/sedatif	Kabuk uçucu yağı ve su, diklorometan ve <i>n</i> -hekzan fraksiyonlarından oluşan %70’lik etanol yaprak ekstreleri hazırlanmış ve <i>in vivo</i> fare deneylerinde uçucu yağ anksiyolitik etki; uçucu yağ, diklorometan ve <i>n</i> -hekzan fraksiyonları ise sedatif etki göstermiştir.	[80]
Antienflamatuvar	%70’lik kabuk etanol ekstresinin nitrik oksit (NO) üretimini engellediği, olgunlaşmamış meyvelerin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ve etkiyle ilişkili bileşiklerin nobiletin (IC ₅₀ : 26.5 µg/ml) ve tangeretin (IC ₅₀ : 136.6 µg/ml) olduğu belirlenmiştir.	[81]
Antikanser	Flavonoit içeriği yüksek kabuk ekstresinin (%70 metanol) A549 hücre hattında metastazı engellediği ve akciğer kanserinde kullanılabileceği önerilmiştir.	[82]
Antimikrobiyal	Yaprak ve meyve kabuk uçucu yağları bazı gram (+) ve gram (-) bakterilere karşı denenmiş ve oksijenli monoterpen oranı arttıkça antibakteriyel etkinin de arttığı gözlenmiştir. Ayrıca yağların gram pozitiflere daha etkili olduğu belirtilmiştir.	[83]
Antioksidan	Yaşlı yaprakların uçucu yağı, genç yaprak, çiçek ve kabuk uçucu yağlarına oranla DPPH• süpürücü etki testinde daha yüksek (%94) etki göstermiştir.	[84]
Antioksidan	Kabuk uçucu yağının DPPH• (IC ₅₀ : 189 µg/ml), TEAK (38 eqv/troloks) ve β-karoten soldurma (IC ₅₀ : 143 µg/ml) deneyleri gerçekleştirilmiş ve antioksidan kapasiteleri belirlenmiştir.	[85]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

Antioksidan	Meyve suyunun DPPH• süpürücü etkisinin toplam fenolik asit miktarıyla doğru orantılı olarak arttığı gözlemlenmiştir.	[86]
Hipoglisemik ve hipolipidemik	Kabuğun, petrol eteri, etanol ve su ekstraktlarının diyabetik farelerdeki etkisi <i>in vivo</i> olarak araştırılmıştır. 500 mg/kg dozunda etanol ekstresinin kan glikoz seviyesi, toplam kolesterol, trigliserit, LDL ve VLDL seviyelerini düşürürken HDL değerini artırdığı tespit edilmiştir.	[87]
İnsektisit	Kabuk petrol eteri ekstresi <i>Bactrocera oleae</i> (zeytin sineği) ve <i>Ceratitidis capitata</i> (akdeniz meyve sineği) türlerine karşı oldukça etkili görülmüş ve bu böceklerle mücadelede kullanılması önerilmiştir.	[88]
Nöroprotektif etki	Kabuk uçucu yağının AChE (IC ₅₀ : 143 µg/ml) ve BChE (IC ₅₀ : 143 µg/ml) enzimlerini doza bağlı inhibe ettiği gösterilmiştir.	[85]
<i>C. reticulata</i> (Robinson kültivarı)		
Antibakteriyel	<i>n</i> -Hekzan, kloroform ve asetonla kabuklar ekstre edilmiş ve etanolde çözünabilir ve çözünemez fraksiyonlara ayrılmıştır. Gram (+) bakterilere etkinin genel olarak daha iyi olduğu gözlenmiş ve etanolde çözünabilir fraksiyonun en yüksek aktiviteye (IC ₅₀ : 300 µg/ml) sahip olduğu belirtilmiştir.	[89]
Antifungal	Kabuktan elde edilen polimetoksi flavonoit ekstresi <i>Aspergillus niger</i> CICC 2273 üzerine etkili bulunmuş ve MİK değeri 120 µg/ml olarak verilmiştir. Etki mekanizmasının kitin sentezini inhibe ederek hücre duvarının bütünlüğünü bozması ile ilgili olabileceği belirtilmiştir.	[90]
Antifungal	Başlıca bileşenleri limonen, geraniyal ve neral olarak belirlenen kabuk uçucu yağı, <i>Alternaria alternata</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Curvularia lunata</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Helminthosporium oryzae</i> gibi bazı bitki patojenlere karşı denenmiş ve 0.2 ml/100 ml konsantrasyonda tüm patojenleri %100 oranında öldürdüğü tespit edilmiştir.	[91]
Antifungal	Kabuk uçucu yağının ana bileşenleri D-limonen, γ -terpinen ve β -mirsen olarak belirlenmiş ve enfekte satsuma mandarini meyvesinden izole edilen <i>Penicillium italicum</i> ve <i>P. digitatum</i> üzerine etkileri araştırılmıştır. <i>P. italicum</i> 'a karşı 2.5 µg/ml ve <i>P. digitatum</i> 'a karşı 40 µg/ml'de miselyum büyümesini %100 durdurduğu gözlemlenmiştir.	[92]
Antioksidan	Meyve suyunun DPPH• süpürücü etki ve β -karoten soldurma deneylerinde <i>C. limon</i> , <i>C. aurantium</i> ve <i>C. sinensis</i> 'e göre daha düşük etki gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuç toplam fenolik asit miktarının daha düşük olmasıyla ilişkilendirilmiştir.	[86]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

Antioksidan	Kabuk metanol ekstresinin DPPH• süpürücü etkisi, metal-iyon şelatlama ve demir indirgeme kapasitesi (FRAP) incelenmiştir. IC ₅₀ değerleri sırasıyla 0.78 mg/ml, 1.89 mg/ml ve 0.25 mg/ml olarak hesaplanmış ve toplam fenolik madde miktarı ile antioksidan kapasite arasında bir korelasyon bulunmadığı gözlemlenip, fenolik yapıda olmayan başka bileşiklerin de antioksidan etkiden sorumlu olduğu yorumu yapılmıştır.	[93]
Antioksidan	Kabuk etanol (%80) ekstresinin DPPH• süpürücü etkisinde IC ₅₀ değeri 265 µg/ml olarak belirlenmiştir.	[94]
Antioksidan	Kabuk, pulpa ve çekirdek %80 metanol ekstresi ile meyve suyunun antioksidan kapasiteleri DPPH• ve ABTS ⁺ metotları ile çalışılmıştır. Kabuk ve meyve suyu yüksek flavonoit ve fenolik madde içeriğinden dolayı diğer dokulara göre daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.	[95]
Antitirozinaz	Kabuk etanol (%80) ekstresinden 1, 2 ve 4 mg/ml'lik 3 farklı konsantrasyonda örnek hazırlanmış ve 4 mg/ml konsantrasyonda tirozinaz enzimini %27.2 oranında inhibe etmiştir.	[94]
C. reticulata (Satsuma kültivarı)		
Antienflamatuvar	%70'lik kabuk etanol ekstresinin nitrik oksit (NO) üretimini engellediği, olgunlaşmamış meyvelerin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ve etkiyle ilişkili bileşiklerin nobiletin (IC ₅₀ : 26.5 µg/ml) ve tangeretin (IC ₅₀ : 136.6 µg/ml) olduğu belirlenmiştir.	[81]
Antienflamatuvar	Kabuktan izole edilen peptit yapısındaki "citrusin XI" in antienflamatuvar özellikleri belirlenmiş ve sentezlenecek yeni bileşiklere öncü olabileceği tartışılmıştır.	[96]
Antienflamatuvar	Çiçekten elde edilen uçucu yağda majör bileşenler γ-terpinen (%24.7), 2-β-pinen (%16.6) ve 1-metil-2-izopropilbenzen (%11.5) olarak tespit edilmiştir. Bu yağın NO, PGE ₂ , IL-6, TNF-α ve IL-1β seviyelerini arttırırken, COX-2 protein ekspresyon seviyesinde düşüşe neden olduğu gözlenmiştir.	[97]
Hipoglisemik	Kabuk %60 etanol ekstresi Tip 2 diyabetli farelerde <i>in vivo</i> denenmiş ve kan glikoz seviyesinde düşüş gözlenmiştir. Karaciğerdeki enflamasyon ile alakalı biyomarkerların seviyelerindeki düşüş ile birlikte, etkinin antienflamatuvar özelliklerinden geldiği savunulmuştur.	[98]
İmmünomodülatör	Kabuktan elde edilen CPE-II adlı polisakkarit'in immünomodülatör etkisi ortaya konmuştur.	[99]
Pankreatik lipaz inhibisyonu	<i>Diospyros kaki</i> L. meyvesiyle birlikte bir formülasyonun içinde bulunan satsuma kabuğu, pankreatik lipaz inhibisyonunda 1 mg/ml'de %100 inhibisyon göstermiş ve IC ₅₀ değeri 507 µg/ml olarak hesaplanmıştır.	[100]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

C. sinensis		
Antibakteriyel	Yapraktan etanol ve su ekstraktları hazırlanmış ve <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> üzerinde denenmiştir. MİK değeri bulunamamış ancak su ekstresi <i>E. coli</i> 'de belli derece aktif çıkmıştır (disk difüzyon metodu).	[101]
Antifungal	DL-limonen'in ana bileşen olduğu yaprak uçucu yağının 10 günün sonunda 750 ppm'de <i>Aspergillus flavus</i> 'un (NKD-116) büyümesini %100 olarak durdurduğu tespit edilmiştir.	[102]
Antihelmintik	Uçucu yağı, <i>in vitro</i> yumurta testinde 0.99 mg/ml konsantrasyonda <i>Haemonchus contortus</i> parazitlerin yarısını öldürmüştür.	[103]
Antioksidan	Kabuktan sırayla toluen, diklorometan ve metanol ekstraktları hazırlanmış ve metanol ekstresi de artan polaritede farklı fraksiyonlara ayrılmıştır. DPPH• süpürücü etki en yüksek metanol ekstresinden hazırlanan etil asetat fraksiyonunda görülmüş ve toplam fenolik asit miktarıyla güçlü bir korelasyon olduğu belirtilmiştir.	[104]
Antioksidan	Yaprak uçucu yağının ana bileşeni DL-limonen (%90.7) olarak belirlenmiş ve DPPH• süpürücü etkisi için IC ₅₀ değeri 9.45 µl/ml olarak bulunmuştur.	[102]
Hipoglisemik	Meyve çekirdeklerinden <i>n</i> -hekzan ile sabit yağ ekstraksiyonu yapılmış ve uygun formülasyonda farelere enjekte edilmiştir. 28 gün sonunda serum enzimleri ALT, AST ve ALP seviyeleri büyük oranda düşmüş ve metformine benzer bir etki ile kan glikoz seviyesinde ve kolesterolde düşmeye yol açtığı gösterilmiştir.	[105]
C. limon		
Antibakteriyel	Kabuk su ekstresi ve meyve suyu çeşitli gram (+) ve gram (-) bakterilere karşı denenmiştir. Meyve suyunun daha aktif olduğu ortaya konmuştur.	[106]
Antibakteriyel	Neral (%29.4), geraniyal (%19.9) ve limonen (%21.5)'in ana bileşenlerini oluşturduğu uçucu yağ, çeşitli dirençli <i>Acinetobacter</i> suşları üzerinde denenmiştir. MİK değerlerinin 625 ve 1250 µg/ml arasında değiştiği bildirilmiştir.	[107]
Antibakteriyel ve Antifungal	Kabuk artan polaritelerdeki çözücülerle (petrol eteri, kloroform, metanol) sırasıyla ekstre edilmiştir. <i>S. aureus</i> (ATCC 25923), <i>E. coli</i> (ATCC 25922), <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) ve <i>Trichophyton rubrum</i> (ATCC 28188) suşları üzerine etkileri araştırılmıştır. Metanol ekstresi tüm mikroorganizmalara karşı doza bağımlı bir etki göstermiştir.	[108]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

Antihepatotoksik ve Antinefrotoksik	Yapraklardan distilasyonla elde edilen uçucu yağın aspirine bağlı olarak hasar görmüş karaciğer ve böbrek üzerine etkileri araştırılmıştır. Aspirin verildikten sonra karaciğer hasarını işaret eden ALT, AST ve LDH enzimlerinde artış görülmüş ve daha sonra uçucu yağ ve aspirin aynı anda verildiğinde, bu değerlerin normale döndüğü ve yağın karaciğer koruyucu özellikte olduğu ileri sürülmüştür. Ayrıca kandaki protein, kreatinin ve üre miktarları aspirin kullanımıyla artmış ve uçucu yağ ile aspirin verildikten sonra bu değerlerin normal düzeylere düştüğü gözlemlenmiş ve böbrek koruyucu bir aktivitenin olduğu savunulmuştur.	[109]
Antioksidan	Olgun ve olgunlaşmamış meyve suyunun 12.5, 25, 50 ve 100 µl/ml konsantrasyonda hazırlanan numunelerinin antioksidan aktiviteleri DPPH• süpürücü etki ile ölçülmüştür. DPPH• radikal süpürücü etki testinde ham meyvenin suyu verilen konsantrasyon aralığında %80-98 arası etki gösterirken, olgun meyvenin suyu ise %86-95 arası bir etki göstermiştir.	[110]
Hepatoprotektif	Kabuk etanol ekstresi hazırlanmış ve etil asetat ile fraksiyonlanmıştır. Karbon tetraklorür (CCl ₄) sebebiyle hasar görmüş insan karaciğer hücresi HepG2 hücre hattı, farelere günlük belli dozlarda etil asetat ve etanol ekstreleri verilerek kontrol edilmiştir. Sonuçlara göre etanol ekstresi nekroz oluşan karaciğer hücrelerinin yenilenmesini pozitif kontrol (silimarin) kadar artırmıştır.	[111]
Sedatif, anksiyolitik ve antidepresan	Uçucu yağın farelerde GABA-erjik sistemi uyarak anksiyolitik etkiye sebep olduğu ayrıca noradrenerjik ve serotonerjik reseptörleri uyarak antidepresan etkiye katkıda bulunduğu gösterilmiştir.	[112]
Sitotoksik	Ana bileşenleri limonen, γ -terpinen, β -pinen, α -simen ve sitral olan çeşitli limonların uçucu yağları insan kolorektal kanser hücre hattı (Lim1863) üzerinde denenmiştir. Genel olarak IC ₅₀ değeri 5.75-7.92 µg/ml arasında olan örnekler kanserli hücreler üzerinde %80'lik sitotoksiste göstermişlerdir.	[113]
C. limetta		
Antibakteriyel	Kabuk uçucu yağı <i>Propionibacterium acnes</i> (MTCC 1951) türüne karşı denenmiş ve MİK değeri 0.67 mg/ml olarak belirlenmiştir.	[114]
Antienflamatuvar	Limonen, linalol, <i>trans</i> -karveol ve karvon'un ana bileşenlerini oluşturduğu kabuk uçucu yağı, tavşanlar üzerinde deri enflamasyon modelinde <i>in vivo</i> denenmiştir. Akut enflamasyonda etkisi belirlenmiş ve daha önceki çalışmalarda antienflamatuvar etkili olduğu bilinen limonen ile ilişkili bir etki olabileceği bildirilmiştir.	[115]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

Antihiperglisemik	Kabuk metanol ekstresi 200 mg ve 400 mg/kg dozlarda diyabetik fareler üzerinde <i>in vivo</i> uygulanmış ve 15. günün sonunda kan glikoz seviyesinin pozitif kontrolle birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Akut toksik doz 2000 mg/kg olarak verilmiştir. Ayrıca farelerde kilo kaybında da yararlı bulunmuştur.	[116]
Antihipertansif	Kurutulmuş yapraklardan infüzyon hazırlanmış ve 125, 250, 500 ve 1000 mg/kg dozlarda farelere uygulanmıştır. Tüm dozlarda etki görülmüş ve 125 mg/kg'da kan basıncında yaklaşık 25 mmHg'lık düşüş gösterirken 500 mg/kg dozda pozitif kontrol olarak kullanılan telmisartan (3 mg/kg) ile aynı seviyede etki göstermiştir.	[117]
Antioksidan	Ana bileşeni hesperidin olarak belirlenen meyve suyunun antioksidan etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar Troloks'a eşdeğer (μM) olarak verilmiştir: DPPH [•] ; 261, ABTS ^{•+} ; 1446, FRAP; 318.	[118]
<i>C. bergamia</i>		
Antibakteriyal	Meyve %70 metanol ekstresi bazı gram (+) ve gram (-) bakteriler üzerinde denenmiştir. MİK değerlerinin <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) ve <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028) için 500 $\mu\text{g/ml}$, <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212) için 700 $\mu\text{g/ml}$ ve <i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048) için ise 1000 $\mu\text{g/ml}$ olduğu görülmüştür.	[119]
Antienflamatuvar	Tüm meyvenin %70'lik metanol ekstresinin lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen enflamasyon yanıt sonrası oluşan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engellediği ve bu etkinin içeriğinde bulunan flavanonların antioksidan ve antienflamatuvar özelliklerinden ileri geldiği ileri sürülmüştür.	[119]
Antimikoplazmal	Ana bileşenleri limonen, linalil asetat ve linalol olan uçucu yağı, <i>Mycoplasma hominis</i> , <i>M. fermentans</i> ve <i>M. pneumoniae</i> üzerinde denenmiş ve % 0.5-1 (h/h) konsantrasyonlarda MİK değerleri hesaplanmıştır. Aynı suşlarda ana bileşenler üzerinden yapılan deneylerde ise linalol <i>Mycoplasma pneumoniae</i> ve <i>M. fermentans</i> üzerine oldukça aktif (MİK değeri %0.015-0.06; h/h) çıkmıştır.	[120]
Antioksidan	Tüm meyveden elde edilen %70 metanol ekstresinin antioksidan özellikleri DPPH [•] , ABTS ^{•+} ve ORAC yöntemleri ile araştırılmıştır. IC ₅₀ değeri DPPH [•] için 720 $\mu\text{g/ml}$ olarak hesaplanırken, ORAC ve ABTS ^{•+} için sonuçlar Troloks'a eşdeğer μmol cinsinden verilmiş ve ORAC 950 μmol , ABTS ^{•+} ise 136 μmol olarak hesaplanmıştır.	[119]
Antioksidan	Kabuk uçucu yağının DPPH [•] süpürücü etkisi (IC ₅₀ : 193 $\mu\text{g/ml}$), TEAC değeri (26 eqv/troloks) ve β -karoten soldurma etkisi (IC ₅₀ : 125 $\mu\text{g/ml}$) belirlenmiştir.	[85]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

Antiviral	Çekirdeklerden hazırlanan metanol ekstresinin, limonin ve nomilin ile karşılaştırmalı HTLV-1 ve HIV-1 üzerine etkileri incelenmiştir. Limonin her iki virüse karşı da en yüksek aktiviteyi göstermiştir.	[121]
Hipolipidemik	Meyve suyu erkek Wistar farelerine verilmiş ve hepatobilyar geridönüşü geliştirerek kolesterol tüketimini artırdığı gözlemlenmiştir. İçeriğinde bolca bulunan bruteridin ve melitidin isimli maddelerin HMG-CoA redüktaz ile etkileşimlerine bakıldığında selektif bir inhibisyon ile statin-benzeri bir etki yaratabilecekleri görülmüştür.	[122]
Hipolipidemik ve Hipoglisemik	Polifenoliklerce zengin ekstre, fare ve insanlarda denenmiş ve ekstre içeriği ile ekstrede bulunan maddeler etki açısından karşılaştırıldığında, hesperidin ve naringenin'in etkiye çok katkısı olmadığı, en iyi sonucu polifenolik ekstre karışımının verdiği ve bu etkinin maddeler arasındaki sinerjik aktiviteden kaynaklı olabileceği ileri sürülmüştür.	[123]
Nöroprotektif	Kabuk uçucu yağının AChE (IC ₅₀ : 161 µg/ml) ve BChE (IC ₅₀ : 243 µg/ml) enzimlerini doza bağlı inhibe ettiği gösterilmiştir.	[85]
Nörotransmitter aminoasit modifikasyonu	Düşük konsantrasyondaki uçucu yağın, glutamat salıcı sinir uçlarında bulunan presinaptik reseptörlerin aktivasyonu ile uyarıcı aminoasit ekzositozunu stimüle ettiği gösterilmiştir. Yüksek konsantrasyonda ise glutamat salınımını artırdığı gözlemlenmiştir.	[124]
C. medica		
Antibakteriyel	Kabuk uçucu yağı 4 farklı ekstraksiyon metodu ile elde edilmiş ve kompozisyon, verim ve etki bakımından karşılaştırılmıştır. Eşzamanlı ultrasonik/mikrodalga ile desteklenmiş hidrodistilasyon metodu yoluyla elde edilen uçucu yağın anti-biyofilm aktivitesini oldukça geliştirdiği gösterilmiştir.	[125]
Antidiyabetik	Ana bileşenleri limonen (%15), sitropten (%12) ve γ -terpinen olan kabuk uçucu yağının, α -amilaz enzim inhibisyonu araştırılmış ve IC ₅₀ değeri 625 µg/ml olarak bulunmuştur (Akarboz, IC ₅₀ : 50 µg/ml).	[126]
Antienflamatuvar	Yaprak, çiçek ve olgun ve olgunlaşmamış meyve kabuğu %70'lik etanol ile ekstre edilmiş ve karşılaştırmalı olarak makrofaj hücre hatlarındaki nitrik oksit üretimini durdurma kapasiteleri incelenmiştir. Çiçek (IC ₅₀ : 525 µg/ml) ve yaprak (IC ₅₀ : 574 µg/ml) ekstraktları daha aktif bulunmuştur.	[127]
Antifungal	Flavonoidlerce zengin ekstre <i>Penicillium digitatum</i> (CECT 2954) üzerinde etkili görülmüş ve en etkili bileşiğin nobiletin olduğu saptanmıştır. 8 mM konsantrasyonda fungusların büyümesi üzerine nobiletin %75 inhibisyon gösterirken, hesperidin %38 ve naringin %25 inhibisyon göstermiştir.	[128]
Antikanser	Olgun ve ham meyvelerin sularının insan astrasitom kanser hücre hattına (1321) karşı sitotoksik etkileri MTT testi ile denenmiş ve ham meyve suyunun antitumörjenik etkisi daha yüksek hesaplanmıştır.	[129]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

Antioksidan	Yaprak, çiçek, olgun ve olgunlaşmamış meyve kabuğu %70'lik etanol ile ekstre edilmiş ve çiçekteki fenolik ve flavonoit miktarı daha yüksek bulunmuştur. Bu bağlamda yapılan antioksidan deneylerde de en yüksek aktivite çiçekten (DPPH•, IC ₅₀ : 425 µg/ml) ve olgunlaşmamış meyve kabuğundan (DPPH•, IC ₅₀ : 382 µg/ml) elde edilen ekstre ile gözlemlenmiştir.	[127]
Hipoglisemik	Yaprak, çiçek ve olgun ve olgunlaşmamış meyve kabuğu %70'lik etanol ile ekstreleri, α-glukozidaz ve α-amilaz enzimlerinde denenmiştir. α-amilaz'a karşı olgun meyve endokarp (IC ₅₀ : 426 µg/ml) ve yaprak (IC ₅₀ : 438 µg/ml) ekstreleri etkili çıkarken α-glukozidaz'a karşı olgunlaşmamış meyve mezokarp ekstresi (IC ₅₀ : 472 µg/ml) daha aktif çıkmıştır.	[127]
Nöroprotektif	Limonen (%15), sitropten (%12) ve γ-terpinen'in ana bileşenleri olduğu kabuk uçucu yağı antikolinesteraz aktivite açısından denenmiş ve IC ₅₀ değeri 621 µg/ml olarak bulunmuştur (Fizostigmin, IC ₅₀ : 0.07 µg/ml).	[126]
Östrojenik	Yapraktan elde edilen petrol eteri ekstresi genç dişi Wistar farelerine 400 mg/kg/gün dozunda verilmiş ve 7 günün sonunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında uterusun ağırlığında önemli bir azalma olduğu görülmüştür.	[130]
C. paradisi		
Antioksidan	Farklı formülasyonlarda hazırlanan Star Ruby ekstreleri fenolik madde, flavonoit ve antioksidan aktiviteleri bakımından karşılaştırılmıştır. Didimin, naringin, narirutin, ponsirin ve hesperidin, DPPH• radikal süpürücü etki bakımından aktif bileşikler olarak belirlenmiştir.	[131]
Antioksidan	Çekirdeklerden alkollü ve sulu ekstreler hazırlanmıştır. DPPH• radikal süpürücü etkileri araştırılmış ve IC ₅₀ değerleri alkollü ekstre için 258 µg/ml, sulu ekstre için ise 222 µg/ml olarak hesaplanmıştır.	[132]
Hipolipidemik	Star Ruby ve henüz kırmızı rengini almamış Star Ruby kabukları meyveden ayrılarak 4 ayrı numune şeklinde kolesterol açısından zengin beslenen farelere verilmiştir. Kırmızı renkli kabuk ekstresi en iyi etkiyi göstermiş ve kandaki kolesterol, LDL ve trigliserit miktarlarını düşürmüştür.	[133]
C. maxima		
Antidiyabetik	100 µl meyve suyu, α-glukozidaz ve α-amilaz enzim inhibisyonları açısından değerlendirilmiştir. α-glukozidaz'ı %79.75 oranında inhibe ederken (Akarboz, %82.3), α-amilaz'ı %72.8 oranında inhibe etmiştir (Akarboz, %85.19). Akarboz benzeri bu etki sayesinde kan glikoz seviyesi düşürme etkisi, nişasta ve oligosakkaritlerin degradasyonunda gecikme yaratarak glikoz emilimini azaltması yoluyla olabileceği tartışılmıştır.	[134]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

Antidiyabetik	Meyve kabuklarından %80 aseton ekstresi hazırlanmış, bağlı ve serbest fenoliklerin α -glukozidaz ve α -amilaz enzim inhibisyonları karşılaştırılmıştır. 80, 160, 240 ve 320 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda denenen ekstreler için α -amilaz inhibisyonu bağlı fenoliklerde (%12-64) serbestlere (%2-25) oranla daha yüksek çıkmıştır. α -glukozidaz için ise bağlı fenolikler %46-96 arası bir inhibisyon yaparken serbestler %75-80 arası inhibisyona sebep olmuşlardır.	[135]
Antienflamatuvar	%70'lik kabuk etanol ekstresinin nitrik oksit (NO) üretimini engellediği, olgunlaşmamış meyvelerin daha yüksek aktiviteye sahip olduğu ve etkiyle ilişkili bileşiklerin nobiletin (IC_{50} : 26.5 $\mu\text{g/ml}$) ve tangeretin (IC_{50} : 136.6 $\mu\text{g/ml}$) olduğu belirlenmiştir.	[81]
Antifungal	Taze yaprakтан hidrodistilasyon ile elde edilen uçucu yağın ana bileşenleri limonen (%31), <i>E</i> -sital (%17), 1-hekzen,4-metil (%15) ve <i>Z</i> -sital (%13) olarak bulunmuştur. 750 ppm'de <i>Aspergillus flavus</i> 'un (NKD-116) miselyum büyümesini 10 gün sonunda %100 olarak durdurduğu tespit edilmiştir.	[102]
Antihipertansif	Meyve kabuklarından %80 aseton ile hazırlanan ekstre serbest ve bağlı fenolikler üzerinden karşılaştırılarak 31-105 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda Anjiyotensin-I dönüştürücü enzimi üzerinde denenmiştir. Serbest fenolikler (%75-89) bağlılara (%8-49) oranla çok daha kuvvetli bir inhibisyon yapmıştır.	[135]
Antikanser	Yaprak %80 metanol ekstresi apolardan polara doğru fraksiyonlanmıştır. Yapılan MTT deneyleri arasında en iyi sonucu kloroform fraksiyonu HeLa hücrelerine karşı (IC_{50} : 56.54 $\mu\text{g/ml}$) vermiştir ve sağlıklı insan akciğer fibroblastlarına (CCD-25Lu) 200 $\mu\text{g/ml}$ dozunda herhangi bir toksisite göstermemiştir.	[136]
Antikolinesteraz	Meyve suyunun 100 μl 'si asetilkolin esteraz'ı %75 oranında inhibe etmiş ve nöroprotektif açıdan önemli olabileceği tartışılmıştır.	[134]
Antioksidan	Yaprak uçucu yağının ana bileşenleri DL-limonen (%31.93), (<i>E</i>)-sital (%17.75), 1-hekzen, 4-metil (%15.22) ve (<i>Z</i>)-sital (%13.38) olarak belirlenmiş ve uçucu yağ DPPH• süpürücü etkisi belirlenmiştir (IC_{50} değeri 8.84 $\mu\text{l/ml}$).	[102]
Antitirozinaz	100 μl meyve suyu tirozinaz enzimini %77 oranında (Kojik asit, %90.87) inhibe etmiştir. Bu etkinin hesperidin, nobiletin ve naringin ile alakası tartışılmıştır.	[134]
Hepatoprotektif	Yaprak su ekstresinin, non-alkolik karaciğer yağlanması ile indüklenmiş Wistar fareleri üzerinde etkisi <i>in vivo</i> araştırılmıştır. Deney sonunda, karaciğerdeki toplam kolesterol, trigiliserit ve yağ miktarı düşmüştür. Bu etkinin ekstrede bulunan fenolik bileşiklerin antienflamatuvar, antioksidan ve hipolipidemik etkileriyle ilişkili olabileceği öne sürülmüştür.	[137]

Çizelge 2.1. (Devam) *Tez kapsamında araştırılan Citrus türleri ile ilgili yapılmış biyolojik aktivite çalışmaları*

Oroblanco		
Antioksidan	Kabuktan hazırlanan %80 metanol ekstresinin antioksidan etkisi toplam antioksidan kapasite, nitrik oksit testi ve β -karoten soldurma deneyleri ile ölçülmüş ve greyfurtlarla karşılaştırılmıştır. β -karoten soldurma deneyinde 0.2 mg/ml konsantrasyonda pozitif kontrol BHT %94 inhibe ederken oroblanco %90 inhibe ederek en yüksek etkiyi göstermiştir. Toplam fenolik madde miktarıyla antioksidan aktivite arasında kuvvetli bir korelasyon görülmüştür.	[138]
Hepatoprotektif	Oroblanco suyu, Sprague Dawley farelerine verilmiş ve 6 hafta sonunda karaciğerdeki detoksifikasyon enzim düzeylerinde artış görülmüştür.	[139]

2.8. *Citrus* L. Türlerinde Yapılmış Farmakokinetik Çalışmalar

Bitkisel materyallerle hazırlanan ekstrelerdeki biyolojik aktivite çalışmaları her ne kadar önemli olsa da asıl önemli olan biyoaktif bileşenlerin farmakokinetik özelliklerinin aydınlatılmasıdır. Farmakokinetik; aktif bileşenin vücutta absorpsiyonu, dağılımı, metabolizasyonu ve eliminasyonunu ifade eder.

Citrus türleri ile alakalı yapılan biyolojik aktivite çalışmaları özellikle içerdikleri flavonoit türevi bileşikler üzerine yoğunlaşmış ve literatürde de çoğunlukla bu flavonoitlerin farmakokinetik çalışmaları üzerinde yoğunlaşmıştır. Glikozit formdaki flavonoitlerin kan plazmasında aglikon formda bulundukları ve bunun başlıca sebebinin bağırsak mikroflorasındaki bakterilerin enzimatik parçalaması olduğu bilinmektedir. Ayrıca aglikon formdaki flavonoitler de bağırsak mikroflorasında çeşitli fenolik asit türevlerine parçalanmaktadır. Bu sebeple flavonoitlerin biyoyararlanımları genellikle zayıftır. *Citrus* türlerinde bol miktarda bulunan flavanon türevi hesperidin ve naringin glikozitlerinin aglikon formu hesperetin ve naringenin üzerine yapılan bir çalışmada, bu maddeler 6 sağlıklı gönüllüye oral formda 135 mg verilmiştir. 20 dakika sonra plazma konsantrasyonları görülüp sırasıyla 4 ve 3.5 saat sonra pik yaptıkları gözlemlenmiştir. Pik plazma konsantrasyonları hesperetin için 825.78 ± 410.63 ng/ml, naringenin için 2009.51 ± 770.82 ng/ml olarak hesaplanmış ve absorpsiyonları hızlı olsa da bağırsak florasında bulunan bakteriler tarafından parçalanıp fenolik asitler gibi yan ürünlere dönüşmesi sebebiyle biyoyararlanımları düşük bulunmuştur. Ayrıca yarılanma ömürleri hesperetin için 3.05 ± 0.91 , naringenin için ise 2.31 ± 0.4 olarak hesaplanmıştır [140]. Bir başka *Citrus* flavanonu diosmin üzerine yapılan bir araştırmada sağlıklı gönüllülere oral olarak

diosmin verildikten sonra plazmada yalnızca aglikon formu diosmetin bulunmuştur [141]. *Citrus* polimetoksi flavonoitlerinden tangeretin ve nobiletin'in farmakodinamik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada Sprague-Dawley erkek farelerine nobiletin 260.6 mg/kg, tangeretin 213.6 mg/kg dozda verilmiştir. Nobiletin ve tangeretin için pik yaptığı konsantrasyon sırasıyla 4.62 mg/L ve 1.63 mg/L , yarılanma ömürleri 12 saat ve 7 saat olarak hesaplanmıştır [142]. Bir başka çalışmada ise nobiletin'in düşük biyoyarlanımını artırmak amacıyla nanoboyut partikülleri ile özel bir formülasyon geliştirilmiş ve biyoyarlanımını artırılmıştır. Sonuçlara göre yeni formülasyon ile birlikte nobiletin'in yarılanma ömrünün 2.6 saatten 3.5 saate, plazma maksimum konsantrasyonunun ise 62 ng/mL'den 437 ng/mL'ye yükseldiği görülmüştür [143]. *Citrus* türlerinde bulunan limonoit grubuna ait limonin üzerine yapılan bir çalışmada limonin glikozidinin (0.25-2 g/200 ml su) kan plazmasında limonin aglikonu ve limonin epimeri olan bir bileşik formunda bulunduğu gözlemlenirken kan plazmasında limonin 1.74-5.27 nmol/L, epimeri olan bileşik ise 5.13 nmol/L konsantrasyonda bulunmuştur [144].

2.9. *Citrus* L. Türleri Üzerine Yapılmış Toksisite Çalışmaları

Citrus türlerinde bulunan bazı polimetoksi flavonoitleri üzerinde yapılan bir çalışmada, genetik toksisite ile ilişkileri *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA102, TA1535 ve TA1537 suşları üzerinde araştırılmış ve 0.0005-5 mg/plak konsantrasyon aralığında herhangi bir toksik etkinin olmadığı bulunmuştur [145]. Yapılan başka bir çalışmada, özellikle *C. aurantium* 'un olgunlaşmamış kabuğunda bulunan alkaloit yapısındaki *p*-sineprin adlı bileşiğin toksisitesi araştırılmıştır. Kilo kaybında kullanılan efedra'nın 2004'te FDA tarafından yan etkileri nedeniyle yasaklanmasından sonra, kilo vermek için %3-6 *p*-sineprin içeren standardize *C. aurantium* ekstreleri giderek artan bir oranda semptomimetik aktiviteleri ile ilişkili olarak kullanılmaktadır [146]. Akut toksisitenin araştırıldığı çalışmada %2.5 *p*-sineprin içeren *C. aurantium* ekstresinin erkek albino CF1 farelerinde 300-5000 mg/kg dozda lokomotor aktiviteyi baskımlarken, 100-2000 mg/kg dozda saf *p*-sineprin'in piloereksiyon, nefes darlığı, salvasyon ve lokomotor aktiviteyi baskılama etkilerine neden olduğu ve bu etkilerin geri dönüşümlü olarak 3-4 saat içinde kendiliğinden geçtiği gözlemlenmiştir. Bu toksik etkilerin adrenerjik stimülasyonla ilişkili olduğu ve bu ekstre ve maddenin kullanımında dikkatli olunması gerektiği belirtilmiştir [147]. Rahman vd., (2014), *C. macroptera* Montrouz'un 2000 mg/kg dozda farelerde herhangi bir akut toksisitesinin olmadığını bulmuştur [148]. Bir

başka çalışmada *C. sinensis* kabuklarının su ve etanol ekstraktları akut, sub-akut ve sub-kronik toksisite bakımından Wistar farelerinde incelenmiştir. Ekstraktların akut (5000 mg/kg), sub-akut (250,1000,5000 mg/kg) ve sub-kronik (yalnızca su ekstraktları denenmiş, 250,1000,5000) toksisitesi bulunmamıştır [149]. Başka bir çalışmada, *C. limetta* yapraklarından hazırlanan su ekstraktının 2000 mg/kg dozda akut toksisitesi ICR erkek farelerde incelenmiş ve herhangi bir toksik etki gözlemlenmemiştir [117].

2.10. Tezde Kullanılan Ekstraksiyon Çalışmaları Hakkında Genel Bilgiler

2.10.1. Ekstraksiyon

Latince “extrahere” (çekip çıkarma) kelimesinden türeyen ekstraksiyon; karışımında bulunan bir madde veya madde grubunun çeşitli çözücüler vasıtasıyla bir fazdan başka bir faza geçirilmesi işlemidir. Her zaman istenen bir maddenin elde edilmesi için değil, istenmeyen safsızlıkların uzaklaştırılması için de kullanılır. Ekstraksiyon basamaklarında büyük önem taşıyan tüm parametrelerin optimize edilmesi ile elde edilen ekstrakt ve ürünlerin tekrarlanabilir olması günümüzün gerekliliklerindendir [150].

Ekstraksiyon sırasında kullanılan organik çözücülerin çevreye ve canlılara olan toksik etkileri nedeniyle günümüzde ‘yeşil kimya’ kavramı daha da önem kazanmıştır. Bu kavramın en önemli prensiplerinden ilki çevre ve canlılar için toksik olmayan ve az uçuculuğa sahip su, CO₂, organik tuz tabanlı çözücüler, agroçözücüler (etanol, gliserol, terpenler, bitkisel yağların yağ asitlerinin metil esterleri) veya ‘yeşil kimya’ etiketi altında pazara sürülen yeni dönem organik çözücülerin kullanımıdır. İkinci prensip ise ekstraksiyon aşaması ile ilgilidir. Bu aşamada geleneksel ekstraksiyon metodlarına oranla parametrelerin (sıcaklık, basınç, akış, enerji vs.) daha hassas kontrolü sayesinde daha selektif ve düşük bütçeli işlem basamakları sonrasında, aynı veya daha yüksek verimlerde ekstraktlar elde etmek mümkündür [151]. Bu ekstraksiyon metodlarının en önemlileri; süperkritik akışkan ekstraksiyonu (SFE), subkritik su ekstraksiyonu (SWE), mikrodalga destekli ekstraksiyon (MAE), ultrasonik ekstraksiyon (UAE) veya hızlandırılmış çözücülü ekstraksiyondur (ASE) [150].

2.10.1.1. Maserasyon

Kullanılacak drog/örnek veya maddenin uygun bir çözücüde ısı uygulamadan belli bir süre bekletilmesidir. Çözücünün örnek ile temasını daha efektif kılmak için genellikle düzenli karıştırma işlemi uygulanır. Bazı bileşiklerin ısı ile bozunmasını

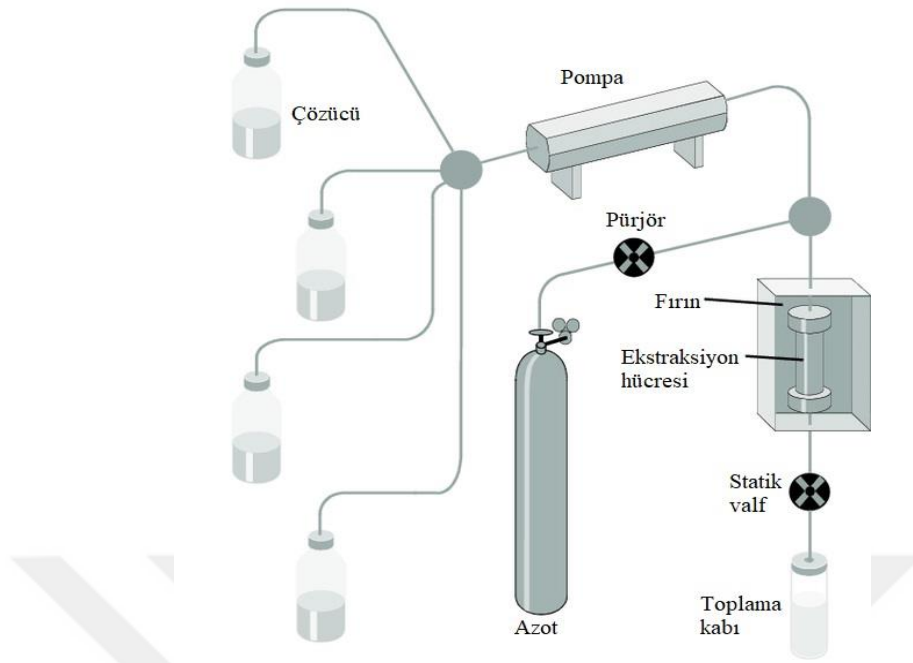
engellemek amacıyla karanlıkta da yapılabilir. Genelde ekstre edilecek katı örneğin 10 katı kadar çözücü kullanılır. Bu yöntemde ayrıca bitkinin hücre duvarlarının yıkılarak içindeki çözünür fitokimyasalların ortama salınması istenir.

En basit ve kolay ekstraksiyon metodu maserasyon olsa da ortaya çıkan yüksek miktarlardaki çözücü artığı ve bu artıkların yönetilmesi önemli bir problem olabilmektedir. Herhangi bir sakıncası olmadığı sürece sıcaklık üzerindeki değişimler ve çözücü seçimi ekstraksiyonda daha az miktarda çözücü kullanılmasına olanak sağlayabilir [152].

2.10.1.2. Hızlandırılmış çözücülü ekstraksiyon (*Accelerated Solvent Extraction, ASE*)

Bu yöntem, yüksek sıcaklık (50-200 °C) ve yüksek basınçlarda (10-15 MPa) yapılan bir katı-sıvı ekstraksiyon tekniğidir (Şekil 2.22). Ayrıca basınçlı sıvı ekstraksiyonu (PLE), basınçlı çözücü ekstraksiyonu (PSE), yüksek basınçlı çözücü ekstraksiyonu (HPSE), basınçlı sıcak çözücü ekstraksiyonu (PHSE) gibi isimlere de sahiptir. Daha az çözücü miktarlarıyla daha kısa zaman diliminde çalışmaya olanak sağladığı için günümüzde organik madde ekstraksiyonunda etkili bir yöntem olarak kullanılmaktadır [153].

Sıcaklığın artması ile birlikte analitler ile matriks komponentleri arasındaki yüzey gerilimi ve viskozite azalır, çözücünün difüze olabilirliliği kolaylaşır. Yüksek basınç ise kaynama noktasının üzerindeki sıcaklıklarda çözücünün hala sıvı kalmasını sağlar [154]. Yüksek sıcaklık çözünürlüğü ve kütle transferini artırırken, ekstraksiyon selektivitesini azaltır [153].



Şekil 2.21. ASE metodu'nun şematik gösterimi

2.11. Tezde Araştırılan *in vitro* Biyolojik Aktivitelerle İlgili Genel Bilgiler

2.11.1. Antioksidan aktivite

Oksijenli solunum ile elektron taşıma sisteminde (ETS) çeşitli enzimler ve indirgeme basamaklarıyla suya kadar indirgenen oksijen molekülü (O_2), çeşitli sebeplerle bu reaksiyonu bazen tamamlayamadan ortamdan uzaklaşır ve indirgenme reaksiyonunu tamamlamak için her türlü hücre materyale zarar verme eğilimine giren reaktif (son orbitallerinde eşleşmemiş bir elektron içeren) bir türe dönüşür [155, 156]. Reaktif oksijen türleri (ROS) canlı dokularda sürekli üretilir ve doğada radikal veya radikal olmayan formlarda bulunabilir (Çizelge 2.2). Bu kontrollü üretim canlı dokuda bulunan glutatyon peroksidaz (GPO), glutatyon redüktaz (GRx), glutatyon-S-transferaz (GST), endojen glutatyon (GSH), süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve diğer antioksidanlar (A,C, E vitaminleri) (Çizelge 2.3) ile nötralize edilerek doku fonksiyonlarının normal düzeylerde sürdürülmesini sağlar [157]. Antioksidanlar hedef doku veya hücredeki oksidatif hasarı erteleyebilmeli, geciktirebilmeli veya önleyebilmelidir. ROS'lar ve antioksidanlar arasındaki denge bozulup, ROS'lara doğru kaymaya başladığında canlıda doku hasarına yol açan oksidatif stres artar [158].

Çizelge 2. 2. Reaktif oksijen türleri

Radikal türler	Moleküler oksijen (O ₂), süperoksit (O ₂ [•]), hidroksil (•OH), peroksil (RO ₂ [•]), alkoksil (RO [•]), hidroksiperoksil (HO ₂ [•])
Radikal olmayan türler	Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂), hipokloröz asit (HOCl), ozon (O ₃), peroksinitrit (ONOO ⁻), singlet oksijen (¹ O ₂)

Canlı organizmanın kendi içinde bulunan antioksidan savunma mekanizmasının dışında, besinler yoluyla alınan bazı bitkisel sekonder metabolitlerin (fenolik asitler, flavonoidler vs.) antioksidan görevi görerek bu savunmaya büyük katkıların olduğunu keşfedilmiştir. Özellikle polifenolik bileşiklerin bu aktiveleri anlaşıncaya, etki mekanizması üzerinde yoğunlaşmıştır [159].

Çizelge 2. 3. Antioksidan savunmanın enzimatik ve non-enzimatik radikal temizleyicileri

Enzimatik	Non-enzimatik
Süperoksit dismutaz (SOD)	All-trans-retinol 2 (A vitamini)
Katalaz (CAT)	Askorbik asit (C vitamini)
Glutasyon peroksidaz (GTPx)	α -tokoferol (E vitamini)
Tiyoredoksin (TRX)	β -karoten
Peroksiredoksin (PRX)	Glutasyon
Glutasyon redoksidaz (GST)	

Polifenolik bileşiklerin antioksidan aktiviteleri iki temel mekanizmayla açıklanabilir. İlk mekanizmada serbest radikal antioksidan maddeden bir hidrojen koparır ve antioksidan maddenin kendisi radikal haline geçer. Bu mekanizma ‘H-atom transferi’ olarak bilinir. Antioksidan radikali’nin (ArO[•]) stabilitesi, maddenin antioksidan kapasitesiyle ilişkilidir. Genellikle ArO[•], yapısındaki hidrojen bağları, konjugasyonlar ve rezonanslar sayesinde non-reaktif bir fenoksil radikali olarak davranır [160].



İkinci mekanizmada (tekli-elektron transferi) ise antioksidan madde serbest radikale bir elektron vererek radikal katyon haline bürünür [160].



Flavonoidlerin bu mekanizmalar dışındaki başka yollarla da antioksidan etki yarattığı bilinmektedir. Bunlardan biri metal şelatlama özelliğidir. Bu özellik oksijen metabolizmasında ve serbest radikal formasyonunda kritik rolleri olan Fe²⁺ ve Cu⁺ gibi metalleri şelatlayarak veya bağlayarak onları oksidasyona elverişli hallerinden uzak tutmalarından ileri gelmektedir [161]. Ayrıca serbest radikal üretimiyle alakalı enzimleri (ksantin oksidaz, lipooksijenaz, protein kinaz C, siklooksijenaz, mikrozomal

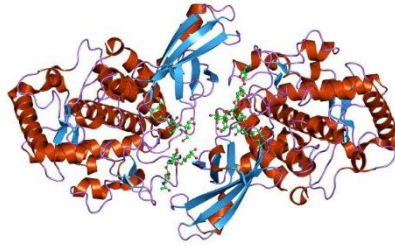
monooksijenaz, mitokondriyal suksinoksidaz ve NADPH oksidaz) baskılayarak intraselüler antioksidanlar gibi de davranabilirler. Vücut içindeki enzimatik antioksidanları indüklemeleri ayrıca bu etkilerinden sorumludur [162]. Oksidatif stres yaratan NO üretimini engelleyerek [163], ürik asit miktarını arttırarak [164] ve düşük molekül ağırlıklı antioksidanların etkilerini arttırarak [165] da vücut içindeki antioksidan aktiviteye destek olurlar.

Flavonoitlerin antioksidan etkileri ve bu etkinin gücü, B halkasındaki *orto*-3',4'-dihidroksi grubunun varlığı (kateşin, lutein, kersetin vs.), A halkasındaki *meta*-5,7-dihidroksi dizilimi (apigenin vs.), C halkasındaki 4-keto ve 3-hidroksil grupları ile 2. ve 3. karbon atomları arasındaki doymamış bağ ve O-metilasyonlar ile doğrudan ilişkilidir [159]. C halkasında 3-OH grubu taşıyan flavonoitler faz II enzimlerini kodlayan gen grubunun dizilimini düzenleyen elektrofile duyarlı elementi (EpRE) aktive edip antioksidan etkiye ayrıca katkıda bulunurlar [166]. Yine C halkasında 4-keto grubu ve 2,3-çifte bağ içeren flavonoitlerin B halkasındaki elektron delokalizasyonu antioksidan aktiviteye katkıda bulunmaktadır [167]. A ve B halkalarının C halkasıyla paylaştıkları ortak atomlardaki konjugasyon aromatik çekirdeğin rezonans etkisine sebep olarak stabil flavonoit radikalinin oluşmasını sağlar [161]. O-metilasyonun önemi ise biyoyararlanım ve metabolik stabilite ile ilişkilidir. Metillenmiş flavonoitler hepatik biyotransformasyondan hidroksilli türlerine göre daha iyi korunurlar [168]. Bunun yanında intestinal absorpsiyonları da daha iyidir [169]. Yapısında metoksi grupları da içeren flavonoitler böylece daha iyi biyoyararlanım ve emilimle vücuda alınır ve antioksidan özellikleri daha kuvvetli olur. NO üretimini engelleyerek katkıda bulundukları antioksidan aktivite 2,3-çifte bağ ve 3,5,4'-trihidroksi yapısı ile ilişkilidir. Trihidroksi yapısının metilasyonu ile etki artarken glikozit varlığı ise etkiyi düşürür [170, 171]. Ayrıca halkasındaki 3',4'-dihidroksi pozisyonunda *o*-difenolik grupların varlığı ve flavonoller için ise C halkasında 4-keto ve 5-hidroksi veya 4-keto ve 3-hidroksi gruplarının varlığı ise metal şelatlama özelliklerinin etki gücünü belirler [159].

2.11.2. Tirozinaz enzimi, inhibisyonu ve önemi

Tirozinaz (E.C. 1.14.18.1), tip III bakır içeren oksidoredüktazlar grubunun bir üyesidir (Şekil 2.23). Hakkındaki ilk biyokimyasal araştırmalar 1895 yılında *Russula nigricans* mantarının kesildikten sonra havayla teması anında önce kırmızı sonra siyaha dönmesi üzerine başlamıştır. Monofenollerin *orto*-hidroksilasyonu ile difenollere

dönüşmesi (kriolaz veya monofenolaz aktivitesi) ve difenollerin sıralı oksidasyonla o-kinonlara dönüşmesinde (katekolaz veya difenolaz aktivitesi) rol alır [172]. Fungus, bitki, bakteri ve hayvanlarda doğal olarak bulunur ve doğadaki maddelerin L- izomerlerine afinitesi daha yüksek olsa da geniş bir substrat (L-DOPA, L-tirozin, katekol, kafeik asit, tiramin, fenol, *p*-aminofenol, krezol, *p*-krezol, dopamin, 4-hidroksianisol, L-izoproterenol, 4-butilkatekol ve pirogallol) spektrumuna sahiptir [173]. Karakterizasyonu en iyi bilinen tirozinazlar *Streptomyces glaucescens* bakterisi ve *Neurospora crassa* ile *Agaricus bisporus* mantarlarından izole edilen türlerdir.

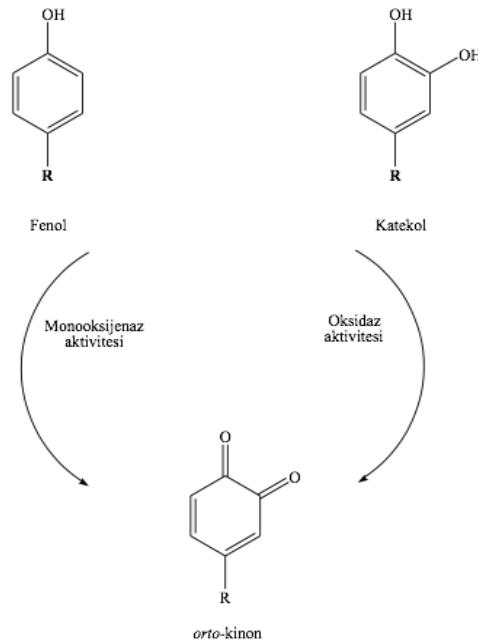


Şekil 2.22. Tirozinaz enzimi (<http-12>)

Farklı kaynaklardan elde edilen tirozinazların göze çarpan ilk özelliği merkezindeki bakır bağlayıcı bölgenin korunumlu olmasıdır. Bu bölge ayrıca sıkı bir şekilde muhafaza edilmiş amino asit kalıntıları da içerir [174]. Bir tirozinaz molekülü iki bakır atomu (Cu_A ve Cu_B) içerebilir. İki çekirdekli bakır kümelerinin her biri üç histidinle bağlanmış durumdadır. Melanin pigmentlerinin oluşumunda aktif bölgelerindeki farklı bakır yapılarıyla üç tip tirozinaz (oksi-, met-, deoksi-) görev alır. Oksijenli formu (oksi-tirozinaz, E_{oksi}) her biri iki güçlü ekuatoryal ve bir zayıf konsal N_{His} ligandlarıyla birbirine bağlı, iki tetragonal bakır (II) atomu içerir. Ekzojen oksijen molekülü yapıya peroksit gibi bağlanır ve iki bakır atomu arasında köprü görev görür. Met-tirozinaz (E_{met}), oksiformuna benzer bir şekilde endojen bir köprüyle birleşmiş iki adet tetragonal bakır (II) iyonu içerir. Deoksi-tirozinaz (E_{deoksi}), hidroksit köprüsü hariç met- formundakine benzer bir düzende, iki adet bakır (I) iyonu içerir [175].

Melanin, genelde fenolik prekürsörlerin oksidasyonu ile oluşan *orto*-kinonlardan meydana gelirken bazen de katekollerin çeşitli yollarla oksidasyonu sonucunda oluşur (Şekil 2.24) [176]. Melanin sentezinin ilk basamağında tirozinin oksidasyonu ile dopakinon oluşur. Bu reaksiyon tirozinaz ile katalizlenir. Tirozinden dopakinonun

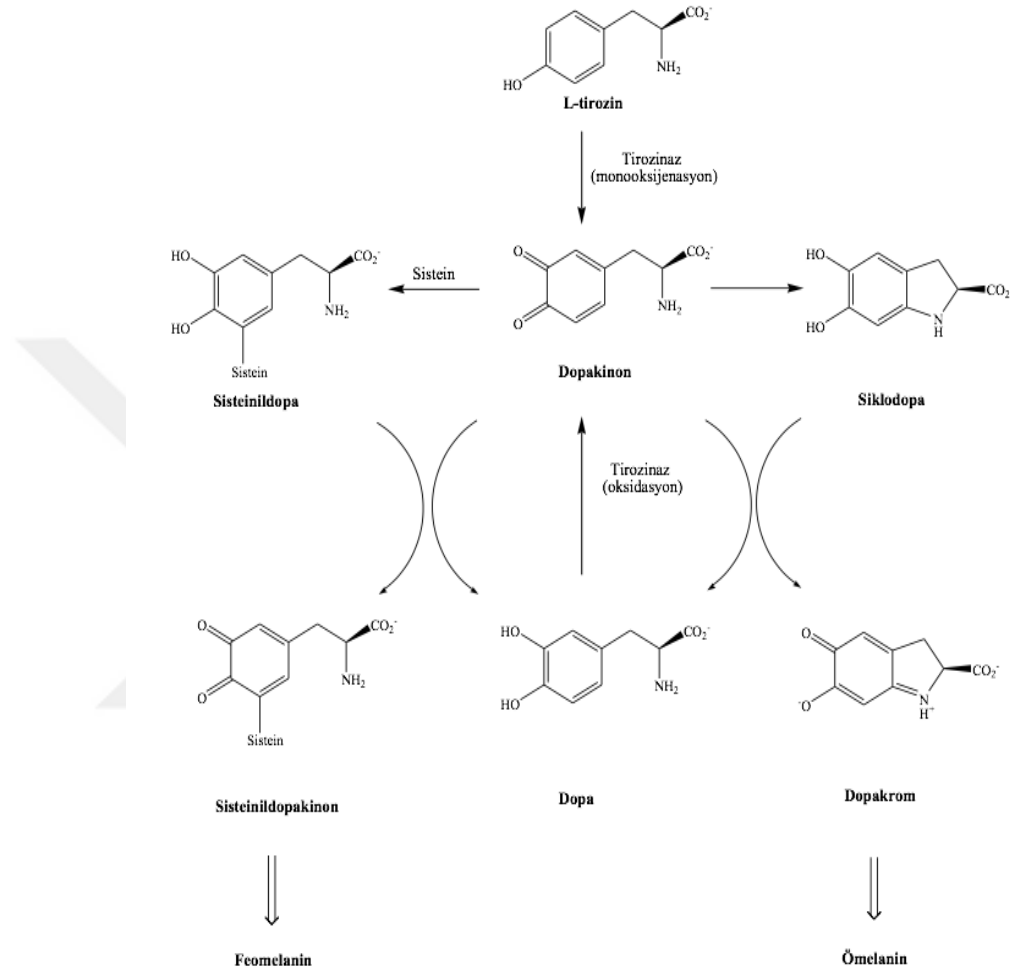
oluştugu bu ilk basamak aynı zamanda hız kısıtlayıcı basamaktır. Çünkü geri kalan reaksiyon fizyolojik pH değerlerinde kendiliğinden de gerçekleşebilir [177]. Dopakinon ise oto-oksidasyon ile dopa ve dopakrom'a çevrilir. Dopa aynı zamanda tirozinaz substratıdır ve tekrar dopakinona okside olur. Dopakinon reaksiyonunda ortaya çıkan ürünlerden 5,6-dihidroksiindol (DHI) ve 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilik asit (DHICA) bir dizi oksidasyon reaksiyonundan geçer ve 'ömelanin' formunu alır. Siyah-kahverengi renkten sorumlu inert bir pigment olan ömelanin UV fotonlarının absorplanmasında görev alır [178]. Sistein veya glutatyon varlığında dopakinon, sisteinildopa veya glutatyonildopa'ya çevrilir ve sonrasında 'feomelanin' oluşur (şekil 2.25). Kırmızı-turuncu renkten sorumlu olan feomelaninin UV absorplama özelliği daha düşüktür. Ömelanin ile sinerjik etki göstererek UV fotonlarının serbest radikal formuna dönüşmesini engellediği düşünülmektedir [179]. Bu iki ana pigmente ek olarak, tirozinden başlayan reaksiyon ile oluşan ve melanine dahil olan fenolik monomere 'allomelanin' denir [175].



Şekil 2.23. Monofenol ve katekollerin orto-kinonlara oksidasyonu

Tirozinazın fazla sentezlenmesi hiperpigmentasyonla alakalı melanoz ve yaşlılık lekeleri gibi çeşitli dermatolojik bozukluklara yol açar [176]. Tirozinazdaki mutasyonlar malign melanom oluşumuyla, tirozinaz yokluğu veya hasarı ise tip I okülokütanöz albinizm ile ilişkilendirilir [180-182]. İnsan fizyolojisindeki sorunlar dışında tirozinaz aktivasyonu bitki ve mantardaki doku yaralanmaları sonrasında oluşan esmerleşmeden

sorumludur. Hasat sonrası esmerleşme, ürünün ticari değerini azalttığı için endüstride önemli bir sorundur. Bu sebeple besin esmerleşmesini engellemek ve cilt beyazlatıcı özelliklerinden dolayı potansiyel tirozinaz inhibitörleri önem kazanmıştır [175].



Şekil 2.24. *L-Tirozinden tirozinaz enzimi ile melanin oluşum mekanizmaları*

‘Tirozinaz inhibitörü’ kavramı doğrudan enzim-inhibitör etkileşiminin dışında o-dopakinon, L-dopa ve dopakrom arasındaki yükseltgenme-indirgenme reaksiyonlarının dengesiyle de tanımlanabilmektedir. Tirozinaz aktivitesinin inhibisyonu deneysel gözlemlere göre şu şekillerde yapılabilir:

1) Askorbik asit gibi indirgeyici ajanlar o-dopakinon’un dopa’ya indirgenmesine sebep olur ve dopakinon ile melanin oluşumunu engelleyerek melanojenez inhibitörü olarak kullanılır.

- 2) o-dopakinon süpürücü etkiye sahip bileşikler (tiyo- grubu içeren çoğu bileşik gibi) melanojenez inhibitörü olarak bilinirler ve dopakinonla girdikleri reaksiyon sonucunda renksiz ürünler ortaya çıkarırlar.
- 3) Bazı fenolik bileşikler gibi alternatif enzim substratları enzime iyi bir afinite gösterdiğinde dopakrom oluşumu engellenir.
- 4) Asit ve bazlar gibi spesifik olmayan enzim inaktivatörleri spesifik olmayan enzim denatürasyonuna sebep olur.
- 5) Mekanizma tabanlı inhibitörler gibi spesifik tirozinaz inaktivatörleri ayrıca intihar substratları olarak bilinirler. Bu inhibitörler enzim tarafında katalizlenip enzimle kovalent bağ oluşturarak, reaksiyon boyunca geri dönüşümsüz bir inaktivasyona sebep olabilir.
- 6) Spesifik tirozinaz inhibitörleri geri dönüşümlü olarak enzime bağlanır ve katalitik kapasitesini azaltır [175].

Tüm bu mekanizmaların yanı sıra gerçek tirozinaz inhibitörleri, enzime bağlanarak onu inhibe eden spesifik tirozinaz inaktivatörleri (5) ve inhibitörleri (6) olarak addedilirler. En çok bilinen tirozinaz inhibitörü olan kojik asit, bir fungal metabolitidir. Gıda sanayiinde enzimatik esmerleşmeyi önlemek için ve kozmetik alanında renk açıcı olarak kullanılır [183]. Kojik asit monofenolaz aktivitesini yarışmalı, difenolaz aktivitesini ise yarışmalı veya yarışmasız inhibe eder. Etki mekanizması enzimin aktif bölgesinde bulunan bakırı şelatlamasıyla alakalıdır [184]. Yeni inhibitörlerin araştırılmasında pozitif kontrol olarak kullanılır. Diğer potansiyel tirozinaz inhibitörleri L-mimozin substrat analogu [185] ve tropolondur [186].

Standart tirozinaz inhibitörlerine ek olarak son zamanlarda bazı doğal kaynaklı polifenolik bileşiklerin de enzim inhibisyonunda etkin rol alabileceği ortaya konmuştur. Bu bileşiklerden flavonoidler yapısal benzerlikler nedeniyle de üzerine en çok yoğunlaşılacak gruptur.

Birçok flavonol L-dopanın tirozinazla oksidasyonunda genellikle yarışmalı bir inhibisyon yapar ve yapısındaki 3-hidroksi-4-keto varlığı bakır şelatlayıcı etkisinde anahtar görevi görür [187, 188]. Bazı flavonoller üzerine yapılan çalışmalarda tirozinaz enzim inhibisyonunda etki sıralaması kersetin > mirisetin > kemferol > galangin şeklinde verilmiştir [189]. Kersetin ve kemferol aglikonlarının glikozit formlarında ise etki daha düşük çıkmıştır [190]. Başka bir çalışmada *Morus alba* L. türünden izole edilen Mulberrosit F (morasin M-6,3'-di-O-glikopiranozit) bileşiğinin tirozinaz enzimini kojik asitten 4.5 kat daha yüksek bir etkiyle inhibe ettiği gösterilmiştir [191]. Ayrıca *M. alba*

ağaç kabuğundan izole edilen norartokarpetin (5,7,2',4'-tetrahidroksiflavon) tirozinazı yarışmalı inhibe ederken kojik asitten 10.4 kat daha yüksek etki göstermiştir [192]. Yine *M. alba* kökünden izole edilen oksiresveratrol [193] ve streppogenin (5,7,2',4'-tetrahidroksiflavanon) [194] isimli bileşiklerin de potansiyel tirozinaz inhibitörleri olduğu gösterilmiştir. *Marrubium velutinum* Sm. ve *M. cylleneum* Boiss. & Heldr. türlerinde bulunan artokarpetin, norartokarpetin'in 7. karbonundaki hidroksil grubunun metoksilenmiş halidir. 7. karbonun metoksillenmesi ile etkinin 100 kat düştüğünün gösterildiği bir çalışmada, yine aynı türlerden izole edilen 45 flavonoit glikoziti incelendiğinde glikozit varlığının etkiyi oldukça düşürdüğü gözlenmiştir [195]. Spesifik hidroksil gruplarının metoksilasyon ve glikozilasyon ile kaybı neticesinde inhibisyon etkisi düşmektedir. *Glycyrrhiza glabra* L. türünün tohum ve köklerinden izole edilen izoflavan yapısındaki glabridin'in kojik asitten 15 kat daha aktif olduğu ve arbutine göre depigmentasyonda daha aktif olduğu görülmüştür [196]. Yine son zamanlarda aynı türün kökünden izole edilen gliasperin C maddesinin tirozinaz inhibisyonunda glabridinden 2 kat daha aktif olduğu gözlemlenmiştir. Buna rağmen antimelanojeniz inhibitör aktivitesi açısından glabridin daha etkili çıkmıştır [197].

Flavonoit grubu içinde bulunan ve potansiyel tirozinaz inhibitörleri olan bir diğer bileşik grubu şalkonlardır. *G. glabra* kökünden izole edilen şalkon yapısındaki likurasit, izolikuiritin ve likoşalkon A'nın tirozinaz inhibisyonları karşılaştırılmış ve en etkili çıkan likoşalkon A'nın kojik asitten 5.4 kat daha etkili olduğu görülmüştür [198]. Başka bir çalışmada pirenillenmiş şalkonlar, flavanon analoglarıyla karşılaştırılmış ve şalkonların çok daha aktif çıktığı görülmüştür [199]. Şalkon yapısının potansiyel olarak inhibitör aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir. *Morus nigra* L.'dan izole edilen 2,4,2',4'-tetrahidroksi-3-(3-metil-2-bütenil)-şalkon bileşiğinin kojik asitten 26 kat etkili olduğu bulunmuştur [200]. Diğer flavonoit yapılarına benzer şekilde, şalkonlarda da yapıdaki 4-rezorsinol (aromatik halkadaki 2,4-dihidroksi grupları) varlığı tirozinaz inhibisyonunda gerekli olan temel yapıdır [175].

2.12. Tez Kapsamında Kullanılan Yöntemler ile ilgili Genel Bilgiler

2.12.1. Yüksek performanslı ince tabaka kromatografisi (YPİTK)

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) geniş bir alanda, sıklıkla tercih edilen, maliyeti düşük ve hızlı bir ayırma yöntemidir. Bu yöntemde ayırma işlemi, katı bir destek üzerine kaplanmış ince bir tabaka halindeki adsorban materyal üzerinden çözücü sisteminin

develope edilmesi ile gerçekleşir. İTK çalışmalarında çevresel faktörler, deneyi yapan kişi gibi parametrelere bağlı olarak tekrarlanabilir sonuçlar almakta zorluklar yaşanmakla birlikte yöntem validasyon problemleri de yaşanabilmektedir. Son yıllarda, bu tür sorunları azaltmak adına standardize ve modifiye plaklar üretilmeye başlanmıştır. Ayrıca, yarı- ya da tam otomatik sistemleri geliştirilerek İTK aşamalarının kontrollü bir şekilde yapılması sağlanmıştır. Bu sebeple validasyon problemlerini ortadan kaldıran ve tekrar edilebilir sonuçlar veren ileri bir İTK yöntemi olarak YPİTK, özellikle son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. YPİTK, tıbbi bitkiler ve takviye edici gıdalar, biyolojik ve klinik ürünler, gıda ve içecekler, çevresel kirlilikler, farmasötik ürünler, kimyasallar ve kozmetik ürünlerin analizinde geniş olarak kullanılmaktadır [201].

Bu alanların içinde, bitki analizlerinde YPİTK uygulamaları;

- Materyalin tanımlanması
- Fitokimyasalların kalitatif ve kantitatif analizleri
- Ham madde ve bitmiş ürünlerin kalite kontrolleri
- Tağşışın belirlenmesi
- Stabilite alışmaları ve bozulmuş ürünlerin araştırılması
- Paketlenmiş ürünleri standardizasyonu

Kullanılan adsorban tabakalardaki yüksek kalitenin yanında develope tankı, ileri görüntüleme cihazları, otomatik örnek uygulayıcılar ve densitometrik cihazlar gibi ileri enstrümanların kullanımı da YPİTK'nın üstünlüklerindendir [202]. YPİTK, sonuçların görsel olarak sunulabilmesi, basit ve ucuz olması, örneklerin paralel analiz edilebilmesi, hızlı sonuç vermesi ve birden fazla teşhis olanağı gibi avantajları dolayısıyla geniş çapta kullanılmaktadır [203].

YPİTK ve İTK'nin bazı özellikleri bakımından karşılaştırılması izelge 2.4.'te verilmiştir.

Çizelge 2. 4. YPİTK ve İTK'nın bazı özellikleri bakımından karşılaştırmaları

	İTK	YPİTK
Prensip	Düzensel Kromatografi	Düzensel Kromatografi
Öncelik	Basitlik, düşük maliyet	Tekrarlanabilirlik, ayırım gücü
İşlem basamakları	Esnek, kural yok	Yüksek standardize metodoloji/optimize parametreler
Metotlar	Yalnızca birkaç parametre tanımlanmış	İyi tanımlanmış ve valide edilmiş
Esneklik	Çok yüksek	Valide edilmiş metotlar için yok Metotlar arasında yüksek esneklik
Hedef	Hızlı, ön sonuçlar	Güvenilir ve analitik sonuçlar
Veri yapısı	Basit kromatogram görüntüleri, fotoğraf	İzlenebilir dijital görüntüler/ her plakta SST ile data tarama/GMP'ye uyumlu raporlama
Numune/Standart	Plak üstünde yan yana	Aynı veya farklı plaklarda
Plak	İTK herhangi formatta	YPİTK 20 x10 cm
Cihazlar	Yok ya da basit	Basitten karmaşığa doğru
Maliyet	Çok düşük	İTK'ya göre orta-çok pahalı YBSK ile karşılaştırıldığında örnek başına düşük

YPİTK, analizlerin valide edilebilirliği dışında analiz kalitesinin İTK'ya oranla çok daha iyi sonuçlanmasını sağlamaktadır. Bu durumun başlıca sebepleri YPİTK'da daha küçük çaplı silikajel partiküllerinin kullanılması, daha küçük plaka yüksekliği, daha düşük saptama sınırları ve daha düşük hacimlerde uygulama yapılabilmesidir. Bu avantajlara ek olarak YPİTK ile İTK analizleri arasındaki temel kromatografik parametrelerdeki farklılıklar çizelge 2.5.'te verilmiştir.

Çizelge 2. 5. İTK ve YPİTK'nın kromatografik parametreleri bakımından karşılaştırmaları

Parametre	İTK	YPİTK
Plak kalınlığı (µm)	100-250	100-200
Partikül boyutu (µm)	8-10	6-8
Por boyutu (nm)	6	6
Uygulama hacmi (µL)	1-5	0.1-5
Develope mesafesi (cm)	7-15	3-7
Ayrım süresi (dk)	30-200	3-20
Plak başına örnek miktarı	<10	<36
Saptama sınırı: absorpsiyon	1-5 ng	100-500 pg
Saptama sınırı: floresans	50-100 pg	5-10 pg
Plaka yüksekliği (µm)	35-75	23-25

YPİTK doğruluk ve kesinlik ile Çizelge 2.6.'da verilen bazı özellikler bakımından Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi ile de karşılaştırılabilir [204-208].

Çizelge 2. 6. YPİTK ile YBSK karşılaştırması

YPİTK	YBSK
Sıvı Kromatografisi	Sıvı Kromatografisi
Düzlemsel Kromatografi	Kolon Kromatografisi
Adsorpsiyon kromatografisi daha yaygın	Partisyon Kromatografisi daha yaygın
Açık sistem	Kapalı sistem
Opere edilmesi kolay	Eğitimli personel gerekli
Yarı-otomatik, bilgisayar kontrollü sistem	Tam otomatik, bilgisayar kontrollü sistem
Örnek uygulama, ayırma, dedeksiyon gibi analiz basamakları bölünmüş durumda	Tüm basamaklar birbirini takip eden prosesle yürütülür
Aynı anda birçok örnek analiz edilebilir.	Tek seferde bir örnek analiz edilebilir.
Mobil faz düşük miktarlarda kullanılır.	Mobil faz yüksek miktarlarda kullanılır.
Analiz öncesinde sistemin şartlandırılmasına gerek yok.	Analizden önce tüm sistem şartlandırılmalıdır; parametreler değiştirildiğinde sistem tekrar şartlandırılmaz.
İki boyutlu kromatografi kolay uygulanabilir.	Uygulanabilir değil.
Mobil fazın ön işleme tutulmasına gerek yok; analitik seviyedeki çözücüler kullanılabilir.	Mobil faz filtrasyon, gaz giderme gibi ön işlemlerden geçmelidir; YPSK seviyesi etiketli yüksek kalitede çözücüler kullanılmalıdır.

Çizelge 2.6. (devam) YPİTK ile YBSK karşılaştırması

Plaklar tek kullanımlıktır.	Aynı kolon birçok kez kullanılabilir. Ancak aşırı miktarda kalan örnekler kolonda birikerek kolonu kirletebilir ve sahte piklerin oluşmasına neden olabilir.
Ayrımdan sonra plak üzerinde spesifik veya spesifik olmayan reaktiflerle türevlendirme mümkündür.	Uygulanabilir değil.
Mobil faz, sabit faz üzerinde kapiler kuvvet ile atmosferik basınç altında akar.	Mobil faz dış kuvvet (basınç) ile akar.
Numune hazırlanması kolay ve temizleme gerekli değil, numune için çözücü seçimi önemli değil.	Kolona zarar vermemek için numune uygun ve karmaşık saflaştırma işlemlerinden geçmeli, numune mobil faz ile uyumlu bir çözücüde hazırlanmalı.
Mobil faz için seçilecek çözücü çeşitliliği sınırsızdır.	Çözücülerin dalga boyu kesici özelliklerinden dolayı seçim şansı sınırlıdır. Ayrıca, kolon çok düşük (<2) veya çok yüksek (>8) pH değerlerindeki mobil faza duyarlı olabilir.
Görsel saptama mümkündür.	Görsel saptama mümkün değildir.
Maliyeti ucuz	Pahalı
Yüksek uçuculukta olan örneklerle veya ışığa ve oksijene duyarlı maddelerle çalışmada zorluklar.	Adsorban tabaka ile geri dönüşümsüz etkileşime giren maddelerle çalışmada zorluklar
Düşük kararlılık ve sınırlı ayırım kapasitesi	Devamlı ve sabit akış elüsyonuna olanak sağlayan yüksek basınç etkisi yüksek kararlılık sağlar.
Nem, sıcaklık veya hava kirlilikleri gibi çevresel şartlardan etkilenebilir.	Çevresel parametrelerden daha az etkilenir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre dünya popülasyonunun %80'inden fazlasında, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, birincil sağlık korumaları geleneksel bitkilere bağlı tıbbi dayalıdır. Günümüzde özellikle bitkisel ekstraktların kalite kontrollerinde 'parmak izi' analizi büyük bir önem teşkil etmektedir. Parmak izi analizi, materyal, ekstre veya fraksiyonun tanımlanmasına yardımcı olan karakteristik kimyasal yapıların analizlerinin referans maddelerle karşılaştırmalı olarak kromatografik yöntemlerle yapılmasıdır. YPİTK ile yapılan klasik parmak izi analizlerinde analit ile standartlar aynı kromatografik şartlar altında aynı plakta ayrılır. Birçok örnek, standart madde veya standart ekstre ile aynı plak üzerinde paralel olarak karşılaştırılabilir [208].

Böylece kompleks bir matrikse sahip bitkisel materyalin kalite kontrollerinde aynı anda farklı dalga boyları ile (254 nm, 366 nm, beyaz ışık (remisyon, transmisyon, remisyon + transmisyon), türevlendirme) aynı plak üzerinde elde edilen karakteristik parmak izi görüntüsü standardize ekstreler ve referans maddeler ile karşılaştırılabilir. Parmak izi analizlerinin yanında YPİTK kantitatif analizleri de mümkün kılmaktadır. Bu sayede herhangi bir materyal içerisinde aranacak bir maddenin miktar tayinlerinin de yapılabilmesi bu yöntemi oldukça cazip kılmaktadır. Bitkisel materyallerdeki kalite kontrollerinin analitik tekniklerle tayininde YPİTK yöntemi tüm bu avantajları ile birlikte kalitatif ve kantitatif tayinlerde farmakopelerde YBSK yöntemine yeni bir alternatif olarak yerini almıştır.

2.12.2. YPİTK- tamamlanmış biyolojik aktivite yöntemi (Biyootografik metot)

İTK analizlerinin biyolojik aktivite çalışmalarıyla kombine edildiği yöntemlere biyootografi denir. İTK ile ayrımı gerçekleştirilen, plak üzerindeki bileşiklerin biyolojik olarak aktif mi değil mi sorusuna yanıt veren metotlardır. Bu metotlar, etki-yönlendirilmiş analizler arasında oldukça popülerdir. Bitki ekstrelerinin fitokimyasal analizleri ve biyoaktif bileşenlerinin tanımlanması için ucuz ve etkili bir yöntemdir. Bu yöntem, İTK plağında kısa sürede çoklu-bileşen içeren matrikslerin eş zamanlı kromatografik ayrımını gerçekleştirir ve İTK plağında doğrudan etkili bileşiklerin belirlenmesini sağlar. Uygun bir ortamda hazırlanan biyolojik hedefe önceden develope işlemi yapılmış ve kurutulmuş plak uygulanır, gerekli koşullarda inkübasyon süresi sonunda, biyolojik hedef inhibitörü görüntülenebilir hale gelir. Böylece etkiden sorunlu bileşikler belirlenir [209].

İlk kez 1946 yılında Goodall ve Levi penisilin saflığını ölçmek için kağıt kromatografisi tabanlı biyootografiyi tanımlamıştır [210]. İTK-tabanlı biyootografi ise 1961 yılında Nicolaus ve ark. tarafından tanıtılmıştır [211].

Biyootografik yöntemler en sık biyoaktivite (enzim inhibisyonu, antioksidan, antibakteriyel, antifungal) tayininde ve hedefe yönelik aktif bileşen izolasyonunda kullanılır [212-214]. Literatürde bulunan biyootografik biyolojik aktivite çalışmalarına örnekler çizelge 2.7’de verilmiştir.

Biyolojik aktivite çalışmalarında çoğunlukla spektrofotometrik metotlar kullanılır. Elde edilen ekstrelerin biyolojik aktiviteleri incelendikten sonra aktif bileşenlere ulaşabilmek amacıyla uzun fraksiyonlama işlemlerine gerek duyulur. Bu durumda biyootografik metot büyük bir avantaj sağlar. Çünkü ekstrenin içindeki

bileşikler önce YPİTK metodu ile ayrılır. Ayrılan her bir maddenin çalışılan biyolojik aktivitesi plak üzerinde doğrudan görülür. Böylece fraksiyonlama işlemlerine gerek duymadan ekstre içindeki aktiviteden sorumlu maddeler ve hatta bu maddelerin diğer spektrometrik yöntemlerle yapısının aydınlatılması çok kısa bir sürede yapılabilmektedir.

Çizelge 2. 7. Biyootografik aktivite çalışmalarının sınıflandırılması

Aktivite	Yöntem	Kaynak
Antioksidan	DPPH•	[215]
	ABTS•+	[216]
	β-karoten soldurma	[217]
Enzim	tirozinaz	[218]
	pankreatik lipaz	[219]
	asetilkolin esteraz	Diazoization ile [220]
		Elman reaksiyonu ile [221]
	α-amilaz	[222]
	α-glikozidaz	[223]
	β-glikozidaz	[224]
	ksantin oksidaz	[225]
Antimikrobiyal	Agar difüzyon veya kontakt biyootografi	[226]
	Direkt İTK ile biyootografik tanımlama	[227]
		[228]
		[229]
	Daldırma veya Agar kaplama	[230]

2.12.2.1. YPİTK-tamamlanmış tirozinaz enzim inhibisyonu

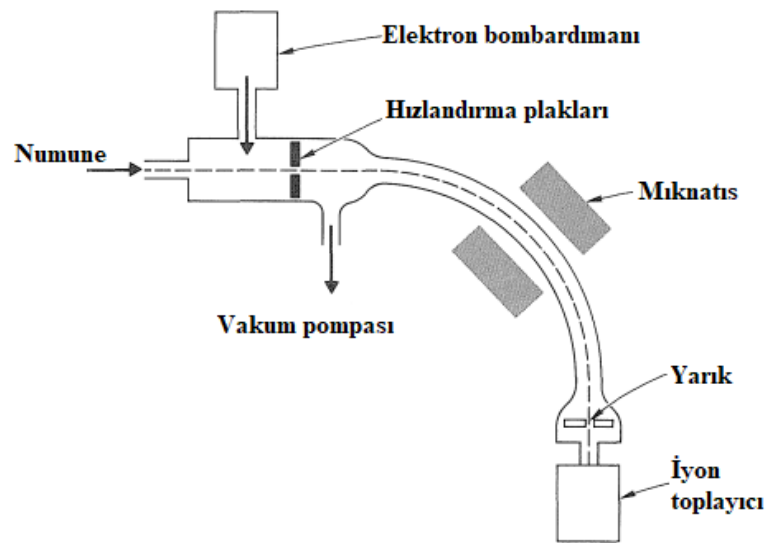
İlk biyootografik yöntem mantardan izole edilen tirozinaz inhibitörlerinin belirlenmesi amacıyla 2007 yılında Wangthong ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Tirozinaz ve L-tirozin çözeltileri sırasıyla İTK plağına püskürtülmüş ve inkübasyon sonunda, tirozin oksidasyonu sonucu oluşan dopakinondan dolayı koyu renkli zeminde beyaz spotların varlığı tirozinaz inhibitörü olarak belirlenmiştir [231]. Son yıllarda, biyootografik tirozinaz deneyleri, deney tasarımı ve metodoloji açısından optimize edilmeye çalışılmaktadır. Bu bağlamda, İTK çalışmaları, YPİTK çalışmalarına adapte edilmeye başlanmıştır. Taibon vd., (2015) tirozinaz substratı olarak levodopa kullanarak daha iyi sonuçlar elde etmiştir [232].

2.12.2.2. YPİTK-tamamlanmış DPPH radikali süpürücü etki

YPİTK tamamlanmış DPPH• metodu, genellikle antiradikal bileşiklerin tespitinde uygulanır. Develope edilmiş YPİTK plaklarına DPPH•çözeltisi ya homojen bir şekilde püskürtülür ya da YPİTK plakları DPPH• çözeltisine daldırılır, inkübasyon sonunda plak değerlendirilmektedir. Antioksidan varlığında, DPPH• redüksiyona uğrayarak difenil pikril hidrazine dönüşür, yani DPPH•'ın karakteristik mor rengi çok açık sarı renge dönüşmektedir. Bu nedenle, aktif antiradikal bileşikler YPİTK plağında mor zeminde açık sarı bantlar şeklinde görüntülenir [233].

2.12.3. Elektrosprey iyonizasyon-Kütle spektrometrisi (ESI-KS)

Kütle spektrometrisi basit veya karmaşık karışımlardaki iyonların yapılarını ve miktarlarını kütle-yük (m/z) oranlarına göre analiz eden bir tekniktir. Kütle spektrometreleri tipik olarak bir iyonizasyon kaynağı, bir analizör ve bir dedektörden oluşur (Şekil 2.26). Analizör manyetik alanda saptırma ile, uçuş süresine göre veya dört kutuplu elektrostatik alan ile ayrımı sağlayabilir. Manyetik alanda saptırma ile ayrımında, numune iyonizasyon kaynağının içinde iyonize edilir ve daha sonra vakum altında elektrik ve manyetik alanlar yardımıyla hızlandırılır. Ayrılan iyonlar belli bir yarıçap ile saparak dedektöre ulaşır ve bu yarıçap kütleleriyle ilişkilendirilir. Bu veriler daha sonra entegre bilgisayar ve yazılımlar aracılığı ile değerlendirilir. Bu sistemler petrokimyasallardan proteinlere kadar birçok bileşiğin aydınlatılmasında kullanılmaktadır.



Şekil 2.25. Kütle spektrometrisinin çalışma prensibi şeması

Kütle spektrometrisinde en kritik noktalardan biri bileşiğin iyonlaşmasıdır. Bileşiklerin m/z oranlarını elde edebilmek için iyonlaşmayı sağlayan birçok iyonizasyon kaynağı ve yöntemi kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanı elektrosprey iyonizasyon (ESI) yöntemidir. ESI-KS üç bölüme ayrılabilir: örnek karışımının elektrik yüklü damlacıklara nebulizasyonu, iyonların damlacıklardan kurtulması ve iyonların atmosferik basınçtaki iyonizasyon bölgesinden vakum ile kütle analizörüne taşınması [234]. ESI yumuşak bir iyonlaştırma yöntemidir ve polar ve uçucu olmayan bileşikler için idealdir. Küçük moleküllerden oldukça büyük biyopolimerlere kadar geniş bir kütle aralığında çalışabilmeyi mümkün kılmaktadır. Yüksek iyonlaşma etkinliğine sahip olması, sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez ile uyumlu olması avantajları arasındadır.

3. MATERİYAL VE METOT

3.1. Bitkisel Materyal

Bitkisel materyal olarak çeşitli *Citrus* türlerinin meyveleri kullanılmıştır. Meyveler, Aralık 2017’de Adana, Çukurova Üniversitesi, Subtropik Meyve Araştırma ve Uygulama Merkezi, Çukurova Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Alanları’ndan toplanmıştır. Bitkilerin tür ve çeşitlerinin belirlenmesi ve toplanması Araş. Gör. Ebru Duymuş (Çukurova üniversitesi, Ziraat fakültesi Toprak Bilimi ve Bitki Besleme Bölümü, Balcalı, Adana) tarafından yapılmıştır.

3.2. Kullanılan Aletler

YPİTK- Otomatik örnek uygulayıcısı, ATS4 (CAMAG)
YPİTK- Otomatik developpe tankı, ADC2 (CAMAG)
YPİTK- Daldırma aygıtı (CAMAG)
YPİTK- Reprostar III görüntüleyici (CAMAG)
Hızlandırılmış çözünürlü ekstraksiyon cihazı (Dionex ASE 300)
Rotavapor (Buchi)
Çalkalayıcı (IKA KS 269 Basic)
Mini inkübatör (Benchmark)
Liyofilizatör (Labconco)
UV-spektrofotometre (Shimadzu PharmaSpec UV-1700)
Mikroplak okuyucu (BioTek Power Wave XS)
Homojenizatör (Heidolph SlientCrusher M)
Etüv (WTB BINDER)
ESI-KS (MDS Sciex 3200 Q Trap)
Mikroplak ısıtıcılı karıştırıcı (BIOSAN Thermoshaker PST 100HL)
pH metre (Ohaus, Starter 3100M)
Analitik terazi (Mettler Toledo-MS204S)
Ultrasonik banyo (BANDELIN Sonorex)
Vorteks (Heidolph reaxtop)

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH•) (Aldrich)
Alüminyum triklorür heksahidrat (AlCl₃.6H₂O) (Merck)

Amonyak (Emboy)
Asetik asit (Sigma-Aldrich)
Aseton (Merck)
Dietil eter (Sigma-Aldrich)
Difenil borinik asit (Sigma-Aldrich)
Diklorometan (Merck)
Dimetik sülfoksit (DMSO) (Merck)
Dipotasyum hidrojen fosfat (Merck)
Etanol (Sigma-Aldrich)
Etil asetat (Sigma-Aldrich)
Folin-ciocalteu reaktifi (Merck)
Formik asit (Merck)
Gallik asit (Sigma)
Hesperidin (Sigma)
Kafeik asit (Sigma)
Kersetin (Sigma)
Kloroform (Merck)
Klorojenik asit (Indena)
Kojik asit (Sigma-Aldrich)
L-Askorbik asit (Sigma)
L-DOPA (Sigma)
Magnezyum klorür hekzahidrat ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
Metanol (Merck)
Polietilen glikol 400 (PEG 400) (Merck)
Potasyum hidroksit (Merck)
Rutin (Sigma)
Silikajel 60F_{254s} Diol cam YPİTK plağı (10x10 cm) (Merck)
Silikajel Lichrospher 60F_{254s} cam YPİTK plağı (20x10 cm) (Merck)
Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (Merck)
Sülfürik asit (Carlo Erba)
Tirozinaz enzimi (12.000 U/ml, mantar kaynaklı, Sigma)
Toluen (Merck)
Triton x-100 (Aldrich)

3.4. Ekstraksiyon Yöntemleri

3.4.1. Hızlandırılmış çözücülü ekstraksiyon (ASE)

10'ar gram taze meyve kabukları albedosundan ayrıldıktan sonra küçük parçalar halinde kesilmiş ve hücrelere yerleştirildikten sonra %80'lik metanol ile ekstre edilmiştir. Ekstraksiyon 121°C'de ve 1500 psi basınç altında 2 döngülü olacak şekilde yapılmıştır. Ekstraksiyon yaklaşık 20 dakika sürmüş ve ortalama 180 ml çözücü harcanmıştır. Elde edilen ekstrelerden metanol rotavapor (<40°C) ile uzaklaştırılmış ve geriye kalan sulu kısım dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir. Elde edilen kuru ekstreler tüm çalışmalar boyunca ışık ve nemden uzak tutularak muhafaza edilmiştir.

3.4.2. Maserasyon

Albedosundan ayrılmış 10'ar gram taze meyve kabukları 100 ml 80%'lik metanol ile homojenizatörde 5000 rpm'de eşit parçacık büyüklüğüne getirildikten sonra oda sıcaklığında ve karanlık ortamda masere edilmiştir. Maserasyon işlemi otomatik çalkalayıcıda 150 rpm'de, üç tekrarlı ve toplamda 48 saat olacak şekilde yapılmıştır. Elde edilen ekstrelerden metanol rotavapor (<40°C) ile uzaklaştırılmış ve geriye kalan sulu kısım dondurulduktan sonra liyofilize edilmiştir. Elde edilen kuru ekstreler tüm çalışmalar boyunca ışık ve nemden uzak tutularak muhafaza edilmiştir.

Liyofilizasyon sonrası elde edilen kuru ekstreler çizelge 3.1.'de gösterildiği gibi kodlanmıştır.

Çizelge 3. 1. Ekstrelerin kodlanması

Tür	ASE	Maserasyon
<i>C. aurantium</i> (Turunç)	1A	2A
<i>C. reticulata</i> (Satsuma kültivarı)	1B	2B
<i>C. reticulata</i> (Robinson kültivarı)	1C	2C
<i>C. sinensis</i> (Washington portakalı)	1D	2D
<i>C. limon</i> (Kütdiken limonu)	1E	2E
<i>C. limetta</i> (Tatlı limon)	1F	2F
<i>C. bergamia</i> (Bergamot)	1G	2G
<i>C. medica</i> (Etnak, ağaç kavunu)	1H	2H
<i>C. paradisi</i> (Starruby greyfurt)	1J	2J
<i>C. maxima</i> (Pomelo, Şadek)	1K	2K
<i>C. maxima x C. paradisi</i> (Oroblanco)	1L	2L

3.5. Spektrofotometrik Yöntemlerle Miktar Tayini Yöntemleri

3.5.1. Toplam fenolik madde miktar tayini

Ekstrelerde toplam fenolik madde miktar tayini gallik asite eşdeğer olarak Folin-Ciocalteau yöntemi [235] kullanılarak yapılmıştır. Deney tüpüne 6 ml distile su eklendikten sonra üzerine 100 µl ekstre (5 mg/ml) ve 500 µl Folin- Ciocalteau reaktifi ilave edilmiştir. 1 dakika bekletildikten sonra 1.5 ml %20'lik sulu Na₂CO₃ ilave edilip 10 ml'ye distile su ile tamamlanmıştır. Kontrol olarak ekstre içermeyen reaktif karışımı kullanılmıştır. 2 saat 25°C'de inkübe edildikten sonra absorbans 760 nm'de ölçülmüştür. Gallik asit'in kalibrasyon eğrisi aynı şartlarda ve 1-0.8-0.6-0.4-0.2-0.1 mg/ml konsantrasyonlarda hesaplanarak ekstreler ile karşılaştırılmıştır. Deneyler üç tekrarlı yapılarak ekstrelerdeki toplam fenolik madde miktarları hesaplanmıştır.

3.5.2. Toplam flavonoit miktar tayini

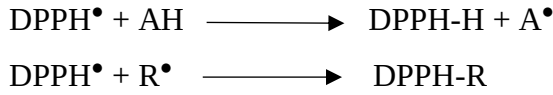
Ekstrelerde toplam flavonoit miktar tayini kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır [236]. 200 µl ekstre (5 mg/ml), 200 µl etanolik alüminyum triklorit (AlCl₃) çözeltisi (20g/L) ile karıştırılmış ve ardından 4.6 ml absö etanol eklenmiştir. Çözeltilerin absorbansları 25 °C de 40 dakika bekletildikten sonra 415 nm de ölçülmüştür. Numune köru için AlCl₃ yerine 1 damla asetik asit (%15'lik) kullanılmıştır. Kersetinin kalibrasyon eğrisi aynı şartlarda ve 1-0.8-0.6-0.4-0.2-0.1 mg/ml konsantrasyonlarda hesaplanarak ekstreler ile karşılaştırılmıştır. Bütün deneyler üç tekrarlı yapılmış ve ekstrelerdeki toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak hesaplanmıştır.

3.6. Spektrofotometrik *in vitro* Biyolojik Aktivite Yöntemleri

3.6.1. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki

DPPH• süpürücü etki tayini Prieto'nun yöntemine göre yapılmıştır. 0.2 mM'lık DPPH• çözeltisi karanlık ortamda metanol ile hazırlanmıştır. Deney 96-kuyucuklu mikropiplerde yapılmıştır. Ekstrelerden (5 mg/ml) 200 µl ilk sütuna koyulduktan sonra diğer tüm kuyucuklara 100 µl metanol konulmuştur. Daha sonra çok kanallı pipet aracılığı ile ekstrelerden 8 seri seyreltme yapıldıktan sonra tüm kuyucuklara 100 µl DPPH• eklenip oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika inkübe edilmiştir (A). Numune kontrolünde DPPH• yerine 100 µl metanol konulmuştur. Absorbanslar 515 nm de ölçölüp inhibisyon yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. C vitamini ve gallik asit pozitif kontrol,

ekstre+MeOH ekstre kontrolü (B), DPPH•+MeOH negatif kontrol (C) ve MeOH (D) çözücü körü olacak şekilde aynı mikroyuvarla uygulanmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı yapılmıştır [237]. Farklı konsantrasyonlardaki yüzde inhibisyonlar hesaplandıktan sonra Sigmaplot 14.0 programı ile IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.



$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(C-D)-(A-B)}{(C-D)} \times 100 \quad (3.1.)$$

3.6.2. Tirozinaz enzim inhibisyonu

Ekstrelerin tirozinaz inhibisyon aktiviteleri Likhitwitayawuid ve ark. yöntemine göre küçük değişikliklerle yapılmıştır. Ekstreler 50 mg/ml konsantrasyonda DMSO ile stok çözelti olarak hazırlandıktan sonra farklı konsantrasyonlara dilüe edilmiştir. Substrat olarak kullanılan L-DOPA 5 mM konsantrasyonda ve fosfat tamponunda hazırlanmıştır. Örneklerin her bir konsantrasyonu için 4 farklı kuyucuk tasarlanmıştır. Farklı reaktif karışımlarını içeren bu kuyucuklardan **A**, 20 µl 100 mM'lık fosfat tamponu (pH 6.8) ve aynı tamponda hazırlanan 20 µl tirozinaz (200 U/ml) **B**, 40 µl fosfat tamponu; **C**, 20 µl tirozinaz (200 U/ml) ve 20 µl ekstre **D**, 20 µl ekstre ve 20 µl fosfat tamponu içermektedir. Tüm kuyucuktaki karışımlar 37°C'de 10 dakika boyunca mikroyuvarlak çalkalayıcısında karıştırılmıştır. Daha sonra bu karışıma 160 µl L-DOPA (5 mM) eklenip tekrar 37 °C'de 10 dakika boyunca inkübe edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kojik asit kullanılmıştır. Absorbanslar 475 nm'de ölçülüp tirozinaz aktivitesinin yüzde inhibisyonu aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır. Tüm deneyler üç tekrarlı yapılmıştır [238].

$$\% \text{ inhibisyon} = \frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \times 100 \quad (3.2.)$$

3.7. Ekstrelerin “Parmak İzi” YPİTK Analizleri

3.7.1. Standart maddelerin hazırlanışı

Rutin, hesperidin, kersetin, klorojenik asit, kafeik asit, elajik asit ve gallik asit çözeltileri 1 mg/ml olacak şekilde metanolde çözülmüştür.

3.7.2. Ekstrelerin çözeltilerinin hazırlanışı

Tüm ekstreler 5 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde %80 metanolde çözülmüş, 0.45 µ çapındaki filtreden süzölmüştür.

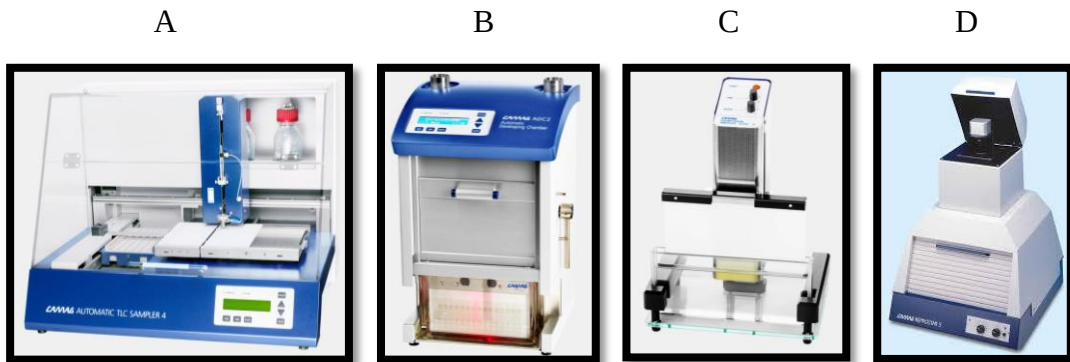
3.7.3. Reaktifler ve hazırlanışları

Natural product / PEG 400 çözeltilisi (NP/PEG); 1 g difenilborinik asit 200 ml etil asetatda çözüldürölmüştür. 10 g PEG400'un 200 ml diklorometanda çözüldürölmesiyle PEG çözeltilisi hazırlanmıştır. Sülfürik asit (H₂SO₄) çözeltilisi ise dondurucuda soğutulmuş 180 ml metanole 20 ml sülfürik asidin dikkatlice eklenmesiyle hazırlanmıştır. Alüminyum triklorür (AlCl₃) çözeltilisi için 1 g AlCl₃ 100 ml etanolde çözülmüştür. Potasyum hidroksit (KOH) çözeltilisi ise 10 g KOH'un 10 ml distile suda çözüldükten sonra 100 ml'ye etanol ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

3.7.4. Ekstrelerin “parmak izi” analizleri için metot optimizasyonu

YPİTK sistemi, winCATS programı ile entegreli olarak kontrol edilmiştir. Standart ve ekstrelerin plaklara uygulanmasında ATS 4 (CAMAG®, İsviçre, Automatic TLC Sampler 4), plakların mobil fazda developpe edilmesi ve developpe işlem parametrelerinin oluşturulmasında ADC2 (CAMAG®, İsviçre, Automatic Development Chamber 2), reaktiflere plakların daldırılmasında Immersion device III (CAMAG®, İsviçre), plakların UV ve beyaz ışıktaki incelenmesi ve görüntülenmesinde Reprostar 3 (CAMAG®, İsviçre) kullanılmıştır (Şekil 3.1).

YPİTK analizleri için en iyi parametrelerin seçilmesi amacıyla literatür bilgileri dikkate alınarak 5 farklı metot oluşturulmuştur. Metotlarla ilgili bilgiler Çizelge 3.2'de verilmiştir.



Şekil 3.1. YPİTK sistemi, (A), Otomatik örnek uygulayıcısı ATS4, (B), otomatik developpe tankı ADC2, (C), daldırma aygıtı III, (D), Görüntüleyici

Çizelge 3. 2. YPİTK analizlerinde oluşturulan metotlar ve parametreleri hakkında bilgiler

	Metot 1	Metot 2	Metot 3	Metot 4	Metot 5
Plak	20 x 10 cm YPİTK Lichrospher 60F _{254s}	20 x 10 cm YPİTK Lichrospher 60F _{254s}	20 x 10 cm YPİTK Lichrospher 60F _{254s}	10 x 10 cm YPİTK Diol 60F _{254s}	20 x 10 cm YPİTK Lichrospher 60F _{254s}
Plak aktivasyonu	Metanolde develope edilmiş plak etüvde 121 °C’de 10 dk tutulmuştur				
Uygulama	Plağın 8 mm alt ve 15 mm sol köşeden itibaren 9 mm’lik bantlar halinde				
Ekstreler	5-10 µl	10 µl	30 µl	10 µl	5 µl
Standartlar	hesperidin 3 µl, rutin 0.2 µl, klorojenik asit 1 µl, kafeik asit 1 µl, kersetin 1 µl				
Mobil faz	Etil asetat: Asetik asit: Formik Asit: Su (100:11:11:26, h:h:h:h)	Etil asetat: Metanol: Asetik asit: Su (25:2:2:1, h:h:h:h)	Toluen: Dietil Eter: Asetik asit: (60:40:10, h:h:h)	Etil asetat: Asetik asit: Formik Asit: Su (100:11:11:26, h:h:h:h)	Etil asetat: Asetik asit: Su (75:15:10, h:h:h)
Develope işlemi	70 mm (iki-dipli tank, CAMAG, İsviçre)				
Saturasyon	20 dk mobil faz ve filtre kağıdı ile				
Ön şartlandırma	5 dk mobil faz ile temas etmeden				
Nem	%33 nem (doymuş MgCl ₂ .6H ₂ O ile)				
Kurutma	10 dk				
Reaktifler	NP/PEG400, AlCl ₃ ve H ₂ SO ₄ çözeltileri	NP/PEG400	%10 KOH, H ₂ SO ₄ ve NP/PEG400	NP/PEG 400	NP/PEG 400
Görüntüleme	UV 366 nm, 254 nm, beyaz ışık				

3.8. Biyootografik Metotlar

YPİTK analizi 20 x 10 cm YPİTK Lichrospher 60F_{254s} plaklarında yapılmıştır. Analiz öncesi tüm plaklar metanolde yıkanıp etüvde 121 °C’de 10 dk tutularak aktive edilmiştir. Ekstre ve standart çözeltiler, 25 µl’lik şırınga ile donatılmış otomatik örnek uygulayıcısı ATS4 ile, 8 mm alt ve 15 mm sol köşeden itibaren 9 mm’lik bantlar halinde uygulanmıştır. Plaklar daha sonra iki dipli tank içerisinde etil asetat: asetik asit: formik asit:su (100:11:11:26, h:h:h:h) mobil fazı kullanılarak ADC2 sisteminde 70 mm develope edilmiştir. Develope işlemi 20 dk mobil faz ile saturasyonu sağlanan ve doymuş magnezyum klorür-6-hidrat (MgCl₂.6H₂O) çözeltisi ile nemi %33’e sabitlenmiş ortamda

gerçekleştirilmiştir. 10 dk kurutma işleminin ardından Reprostar 3 görüntüleme sistemi ile 366 nm altında görüntüler kaydedilmiştir

3.8.1. YPİTK- DPPH• süpürücü etki tayini

Yukarıda belirlenen parametrelerde ayrımı gerçekleştirilen YPİTK plağı, metanolde hazırlanan %0.05'lik DPPH• çözeltisine daldırma cihazı (CAMAG, Immersion device) yardımı daldırılmıştır (hız 5, süre 1 sn). Oda sıcaklığında 1 dk kurutulduktan sonra karanlıkta 30 dk bekletilip Reprostar 3 ile görüntüler beyaz ışıktaki kaydedilmiştir. Cihazlar analiz boyunca winCATS programı ile kontrol edilmiştir.

3.8.2. YPİTK-Tirozinaz enzim inhibisyonu

Yukarıda belirlenen parametrelerde ayrımı gerçekleştirilen YPİTK plağının yüzeyindeki asidik ortamı nötralize etmek için plak %32 NH₃ çözeltisi ile 10 dk doyurulmuştur. 20 dakika azot gazına tutulan plaklara fosfat tamponunda (pH 6.8) hazırlanan ve %1 Triton-X içeren L-DOPA (11.92 mM) çözeltisinden homojen bir şekilde ve ıslak bir yüzey oluşturmayacak şekilde 2.5 ml püskürtülmüştür. Ardından fosfat tamponunda (pH 6.8) hazırlanan enzim çözeltisinden homojen bir şekilde ve ıslak bir yüzey oluşturmayacak şekilde (400 U/ml) 3 ml püskürtülüp 10 dk karanlıkta ve oda sıcaklığında inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra 5 dk azot gazı ile kurutulup Reprostar 3 ile görüntüler beyaz ışık altında kaydedilmiştir. Analiz boyunca kullanılan sistemler winCATS programı ile kontrol edilmiştir.

3.8.3. Preparatif-İTK yöntemi ile maddelerin izolasyonu ve KS ile incelenmesi

Biyootografik yöntemler sonucunda etkili bulunan maddelerin incelenmesi amacı ile ekstraler preparatif İTK amacıyla uygun bulunan metot ile developpe edilmiştir. Bu işlem için tüm ekstraler (5 mg/ml) plağa 30 mm'lik bantlar halinde 75 µl uygulanmıştır. Aktif bulunan bileşikler plaktan izole edilerek uygun miktarda metanolde çözülmüştür. Daha sonra çözelti 0.45 µm'lik filtreden geçirildikten sonra KS sistemine verilmek üzere etiketlenmiştir.

Biyoaktif bileşikler, preparatif İTK ile izole edildikten sonra analizleri Kütle Spektroskopisi (Applied Biosystems, 3200 Q-Trap MS/MS) ile gerçekleştirilmiştir. Sistem, Analyst Software 1.6 ile kontrol edilmiştir. İzole edilen bileşikler metanol çözeltileri halinde manuel enjeksiyon ile sisteme verilmiş ve toplam iyon

kromatogramlarının taranması için 5 dk'lık analiz süresi belirlenmiştir. Toplam iyon kromatogramlarındaki iyonların yoğunluklarına göre belirlenen $[M-H]^-$ piklerinden belirlenen molekül ağırlıklarına göre bileşikler, bileşik optimizasyonu için sisteme tanıtılmış, en yüksek miktardaki yedi fragmentine göre kütle spektrumları ve bileşiğin analizi için optimum parametreler negatif modda ölçülmüştür. Elde edilen spektrumlar ya standart ile ya da literatür verileri doğrultusunda tanımlanmıştır.

Yöntem: Q1 tarama

Polarite: Negatif mod

Kütle aralığı: 100- 1000 amu

Collison gas: Azot

Collison energy (CE): 38-90

Collision enerhy spread (CES): 0

Declostiring potential (DP): 55 - 75

Enterance potential (EP): 8 - 10

Curtain gas: 10

Ionspray voltage (IS): -4500

Gas Source 1 (GS1): 16

Gas source 2 (GS 2): 0

CAD: medium

Ihe: on

Temperature: 0

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstre Verimleri

Taze meyve kabuklarından %80 metanol ile maserasyon ve hızlandırılmış çözücülü ekstraksiyon yöntemleri ile elde edilen kuru ekstrelerin verimleri çizelge 4.1.'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Elde edilen kuru ekstrelerin % verimleri

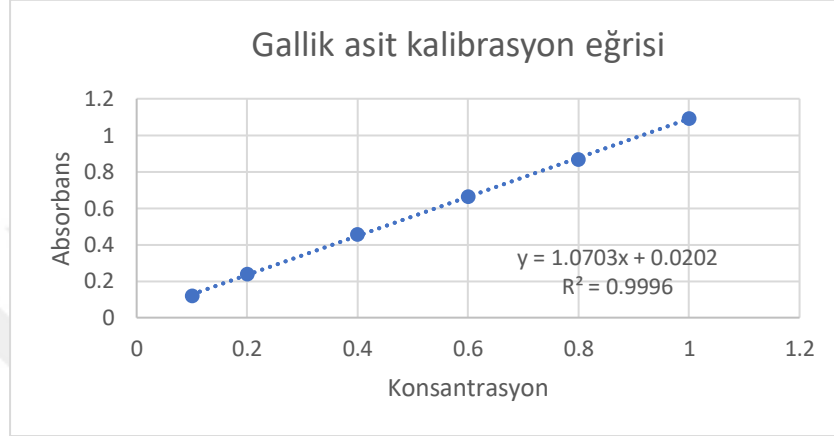
Ekstre kodları	% verim	
	ASE (1)	Maserasyon (2)
A	10,11	8,89
B	14,09	13,63
C	10,18	10,22
D	13,16	9,18
E	9,25	7,58
F	9,62	8,43
G	11,29	8,49
H	8,36	8,58
J	10,61	11,86
K	7,81	9,07
L	9,99	10,86

1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir

Robinson mandarini, etnak, starruby greyfurtu, pomelo ve oroblanco ekstrelerinde verim, maserasyon yöntemi ile daha yüksek hesaplanmıştır. Buna karşılık turunç, satsuma mandarini, Washington portakalı, küt diken limonu, tatlı limon ve bergamot türlerinin ASE ekstrelerinin verimleri daha yüksek bulunmuştur. Turunç ekstresinde ASE yöntemiyle verimi maserasyona göre %12.2 oranında artırırken, Washington portakalında ASE yöntemi, maserasyona oranla %39.8'lik daha yüksek verimle ekstraksiyona olanak sağlamıştır. Bergamot ASE ekstresi maserasyona göre %28 daha yüksek verimle gerçekleşmiştir. Pomelo ekstresinde ise maserasyon yöntemi ASE'ye göre %12,6 daha yüksek verimle ekstraksiyona olanak sağlamıştır.

4.2. Ekstrelerde Toplam Fenol Miktar Tayinleri

Spektrofotometrik yöntem ile Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak gerçekleştirilen toplam fenolik madde miktar tayinlerinin sonuçları gallik asite eşdeğer olarak hesaplanmıştır. Gallik asit kalibrasyon eğrisi şekil 4.1.'de verilmiştir. Sonuçlar 3 tekrarlı deneylerin ortalaması olarak standart sapmalarıyla birlikte çizelge 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Gallik asit'in kalibrasyon grafiği

Çizelge 4. 2. Ekstrelerin toplam fenolik madde miktarları (mg_{GAE}/g_{ekstre})

Ekstre kodları	ASE (1)	Maserasyon (2)
A	46,49 ± 1,49	41,88 ± 1,6
B	30,7 ± 0,65	29,8 ± 0,47
C	57,98 ± 0,28	42,63 ± 0,49
D	46,4 ± 0,09	40,76 ± 0,47
E	37,96 ± 0,88	34,53 ± 1,1
F	35,37 ± 0,28	38,08 ± 0,19
G	49,01 ± 0,09	40,89 ± 1,59
H	42,66 ± 0,09	51,47 ± 1,33
J	35,75 ± 0,09	43,97 ± 1,4
K	46,93 ± 2,68	66,77 ± 1,21
L	26,96 ± 0,47	30,88 ± 0,28

1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir.

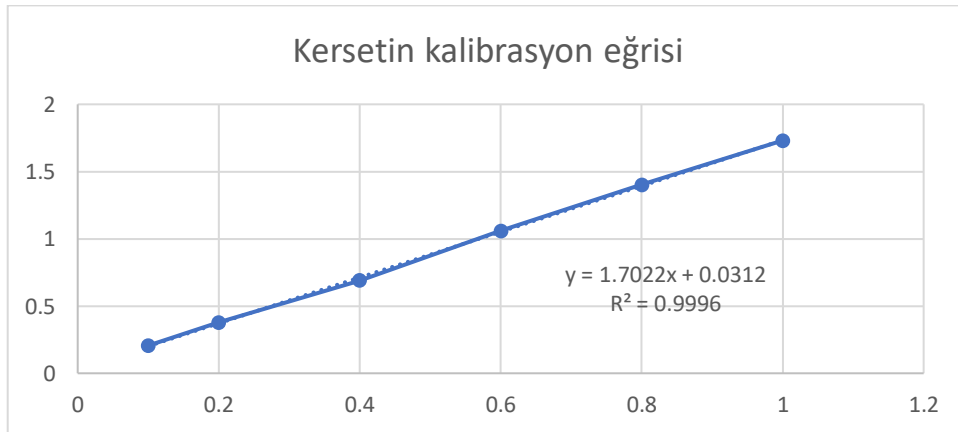
ASE yöntemiyle hazırlanan ekstrelerde robinson mandarini en yüksek fenolik maddeye sahip ekstre olarak bulunmuştur. Fenolik madde miktarı bakımından robinson mandarinini sırasıyla bergamot, pomelo, Washington portakalı, turunç, etnak izlemektedir. Oroblanco ve satsuma mandarini ise en düşük fenolik maddeye sahip ekstreler olarak bulunmuştur.

Maserasyon yöntemiyle hazırlanan ekstrelerinde ise pomelo en yüksek fenolik madde miktarına sahip iken pomeloyu sırasıyla etnak, robinson mandarini, star ruby greyfurtu, turunç, bergamot ve Washington portakalı izlemektedir. ASE ekstrelerinde olduğu gibi oroblanco ve satsuma mandarini en düşük fenolik madde miktarına sahip türler olarak bulunmuştur.

Satsuma mandarini, tatlı limon, etnak, starruby greyfurtu, pomelo ve oroblanco türlerinde maserasyon ile elde edilen ekstrelerin fenolik madde miktarları daha fazla bulunurken diğer türlerin (turunç, robinson mandarini, Washington portakalı, kütdiken limonu ve bergamot) ASE ekstrelerinde fenolik madde miktarı daha fazla bulunmuştur.

4.3. Ekstrelerde Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri

Ekstrelerdeki toplam flavonoit miktarları, spektrofotometrik yöntem ile $AlCl_3$ 'ün flavonoitlerle verdiği sarı renk reaksiyonuna dayanarak kersetine eşdeğer hesaplanmıştır. Kersetin'in kalibrasyon grafiği şekil 4.2.'de verilmiştir. Sonuçlar üç tekrarlı olarak standart sapmalarıyla birlikte çizelge 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.2. Kersetin'in kalibrasyon grafiği

Çizelge 4. 3. Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları (mg_{KE}/g_{ekstre})

Ekstre kodları	ASE (1)	Maserasyon (2)
A	9,92 ± 0,05	7,69 ± 0,11
B	6,09 ± 0,7	4,44 ± 0,15
C	9,06 ± 0,58	15,92 ± 0,11
D	2,37 ± 0,65	5,18 ± 0,05
E	11,37 ± 0,7	8,55 ± 0,19
F	18,23 ± 0,05	17,5 ± 0,53
G	20,38 ± 0,12	15,8 ± 0,39
H	22,34 ± 0,35	21,83 ± 0,35
J	4,52 ± 0,25	7,26 ± 0,036
K	20,85 ± 0,25	19,17 ± 0,73
L	4,95 ± 0,4	3,3 ± 0,22

1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greylort; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstrere, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstrere maserasyon ile elde edilen ekstrere temsil etmektedir

ASE ekstrerelerinde etnak en yüksek flavonoit içeriğine sahip iken bergamot ve tatlı limon ve robinson mandarininin diğere yüksek flavonoit miktarına sahip türler olduğu bulunmuştur. Washington portakalı ve starruby greylortu ise en düşük flavonoit içeriğee sahip ekstrere olarak bulunmuştur.

Maserasyon ekstrerelerinde ise ASE’de olduğu gibi etnak’ın flavonoitlerce en zengin ekstre olduğu gözlemlenmiştir. Tatlı limon, pomelo, robinson mandarini ve bergamot ise flavonoitlerce en zengin çıkan diğere türlerdir. Buna karşılık oroblanco, satsuma mandarini, starruby greylortu, Washington portakalı, turunç ve küt diken limonunun ise en düşük flavonoit içeriğine sahip olduğu bulunmuştur.

İki ekstraksiyon yöntemi karşılaştırıldığında turunç, robinson mandarini, Washington portakalı, etnak ve starruby greylortunun maserasyon ekstrerelerindeki flavonoit miktarı daha yüksek çıkarken diğere türlerde ASE ekstrereleri flavonoitlerce daha zengin çıkmıştır.

4.4. Spektrofotometrik *in vitro* Biyolojik Aktivite Sonuçları

4.4.1. 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikalini süpürücü etki

ASE ve maserasyon yöntemiyle %80 metanol ile elde edilen ekstrelerin DPPH• r süpürücü etkileri standart (pozitif kontrol) olarak kullanılan gallik asit ve askorbik asit (vitamin C) ile karşılaştırmalı olarak IC₅₀ değerleri üzerinden çizelge 4.4.'te verilmiştir. Sonuçlar 3 tekrarlı yapılan deneylerin ortalaması olarak standart sapma değerleriyle birlikte verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Ekstrelerin ve standartların DPPH radikalini süpürme kapasiteleri

Ekstre kodları	IC ₅₀ (µg/ml)	
	ASE (1)	Maserasyon (2)
A	314,8 ± 3,6	226,6 ± 14,3
B	876,1 ± 22,9	568 ± 8,4
C	265,7 ± 6,9	259,2 ± 5,54
D	516,4 ± 1,6	350,6 ± 9,5
E	345 ± 16,6	268,7 ± 7,3
F	517,7 ± 17,6	306,6 ± 20,2
G	264,1 ± 5,7	192,9 ± 5,34
H	260,5 ± 0,6	169,1 ± 8,5
J	745,3 ± 18,5	417,9 ± 6,6
K	427,2 ± 0,5	175,8 ± 0,7
L	688 ± 2,5	456,4 ± 10,2
Asorbik asit		9,35 ± 0,05
Gallik asit		1,93 ± 0,02

1A, 2A, turunc ekstre; 1B, 2B, satsuma mandarin ekstre; 1C, 2C, robinson mandarin; 1D, 2D, Washington portakali; 1E, 2E, kütiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstre; 1H, 2H, etnak ekstre; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstre; 1L, 2L, oroblanco ekstre; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir.

ASE yöntemiyle hazırlanan ekstreler arasında etnak, bergamot ve robinson mandarin en yüksek antioksidan aktiviteye sahip ekstreler olarak bulunurken bu türleri sırasıyla turunc ve tatlı limon ekstreleri izlemiştir. Satsuma mandarin ise en düşük antioksidan aktiviteye sahip ekstre olarak bulunmuştur.

Maserasyon yöntemiyle elde edilen ekstrelerde ise etnak yine en kuvvetli antioksidan etkili ekstre olarak bulunurken ASE yöntemiyle hazırlanan ekstrelerin tam tersine pomelo ekstre, etnaktan sonra en kuvvetli antioksidan olarak bulunmuştur.

Pomelodan sonra antioksidan aktivite bakımından sırasıyla bergamot, turunç, robinson mandarini ve tatlı limon en aktif çıkmıştır. Satsuma mandarini ekstresinin en zayıf antioksidan aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur.

Maserasyon yöntemiyle elde edilen ekstreler, ASE yöntemiyle elde edilen ekstrelere göre daha kuvvetli bir antioksidan aktivite göstermiştir. Ancak bu etkiler pozitif kontrollerden daha düşüktür.

4.4.2. Tirozinaz enzim inhibisyonuna ait sonuçlar

Ekstrelerin potansiyel tirozinaz enzim inhibisyonları, standart olarak kullanılan kojik asit ile karşılaştırılarak çizelge 4.5.'te iki farklı konsantrasyondaki % inhibisyonları cinsinden verilmiştir. % inhibisyon sonuçları 3 tekrarlı yapılan deneylerin ortalamaları olarak standart sapma değerleriyle birlikte verilmiştir.

Çizelge 4. 5. Ekstrelerin ve standartın tirozinaz üzerindeki % inhibisyon değerleri

Ekstre kodları	5 mg/ml		10 mg/ml	
	ASE (1)	Maserasyon (2)	ASE (1)	Maserasyon (2)
A	46,45 ± 3,68	56,44 ± 0,19	54,17 ± 2,8	72.32 ± 1,7
B	10,75 ± 0,4	20,65 ± 1,94	51,38 ± 1,17	37.05 ± 2,98
C	27,78 ± 2,42	28,92 ± 9,82	32,22 ± 2,62	18.9 ± 0,19
D	-	14,53 ± 3,4	9,18 ± 0,58	55.27 ± 1,56
E	20,46 ± 1,83	25,32 ± 2,33	51,09 ± 1,65	61.75 ± 3,01
F	38,54 ± 0,58	61,01 ± 0,49	70,96 ± 4,17	81.23 ± 1,26
G	36,54 ± 3,35	67,91 ± 3,69	77,51 ± 1,91	95.07 ± 3,66
H	71,35 ± 2,43	63,63 ± 6,47	71,51 ± 1,85	81.52 ± 5,25
J	45,83 ± 1,26	44,25 ± 3,69	67,33 ± 2,62	67.65 ± 2,55
K	56,24 ±	70,54 ± 5,35	74,65 ± 1,17	89.3 ± 2,28
L	42,63 ± 1,56	64,9 ± 3,21	59,42 ± 2,25	66.29 ± 2,61
Kojik asit*	3,619 ± 0,01 µg/ml			

* IC_{50} değeri, 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir.

Ekstrelerin tirozinaz enzim inhibisyonları 5 mg/ml ve 10 mg/ml konsantrasyonlarda değerlendirildiğinde konsantrasyona bağlı bir inhibisyonun olduğu görülmektedir. 10 mg/ml konsantrasyonda robinson mandarini ve Washington portakalı hariç tüm ekstreler %50'nin üstünde bir inhibisyon göstermiştir. Robinson ve satsuma mandarini ve starruby greyfurtu hariç türlerin maserasyon ekstreleri ASE'ye göre 10 mg/ml konsantrasyonda daha kuvvetli bir inhibisyon etki göstermiştir. Hem maserasyon hem de ASE ekstrelerinde bergamot en etkili ekstre olarak bulunurken pomelo, etnak ve tatlı limon diğer etkili bileşikler olarak yorumlanmıştır.

5 mg/ml konsantrasyonda ise etnak ve starruby greyfurtu dışındaki tüm örneklerin maserasyon ekstrelerinin daha kuvvetli tirozinaz inhibisyonu yaptıkları görülmüştür. Maserasyon ekstrelerinden pomelo en aktif çıkarken, ASE ekstrelerinde ise etnak en etkili ekstre olarak bulunmuştur. Başta Washington portakalı olmak üzere satsuma mandarini, robinson mandarini ve kütiken limonu 5 mg/ml konsantrasyonda en zayıf etkili ekstreler olarak bulunmuştur. Washington portakalının ASE ekstresi ise bu konsantrasyonda herhangi bir inhibitör etki göstermemiştir.

Starruby greyfurtundan hazırlanan her iki ekstrenin de (maserasyon ve ASE) benzer oranlarda inhibisyon yaptıkları görülmüştür.

Ekstrelerin genel olarak yüksek konsantrasyonlarda etki gösterdiği ve konsantrasyon azaldıkça etkinin önemli bir şekilde düştüğü veya ortadan kaybolduğu görülmüştür. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanılan kojik asit ile karşılaştırıldığında ekstrelerin tirozinaz inhibisyonları zayıf bulunmuştur.

4.5. Ekstrelerin “Parmak İzi” YPİTK Analiz Bulguları

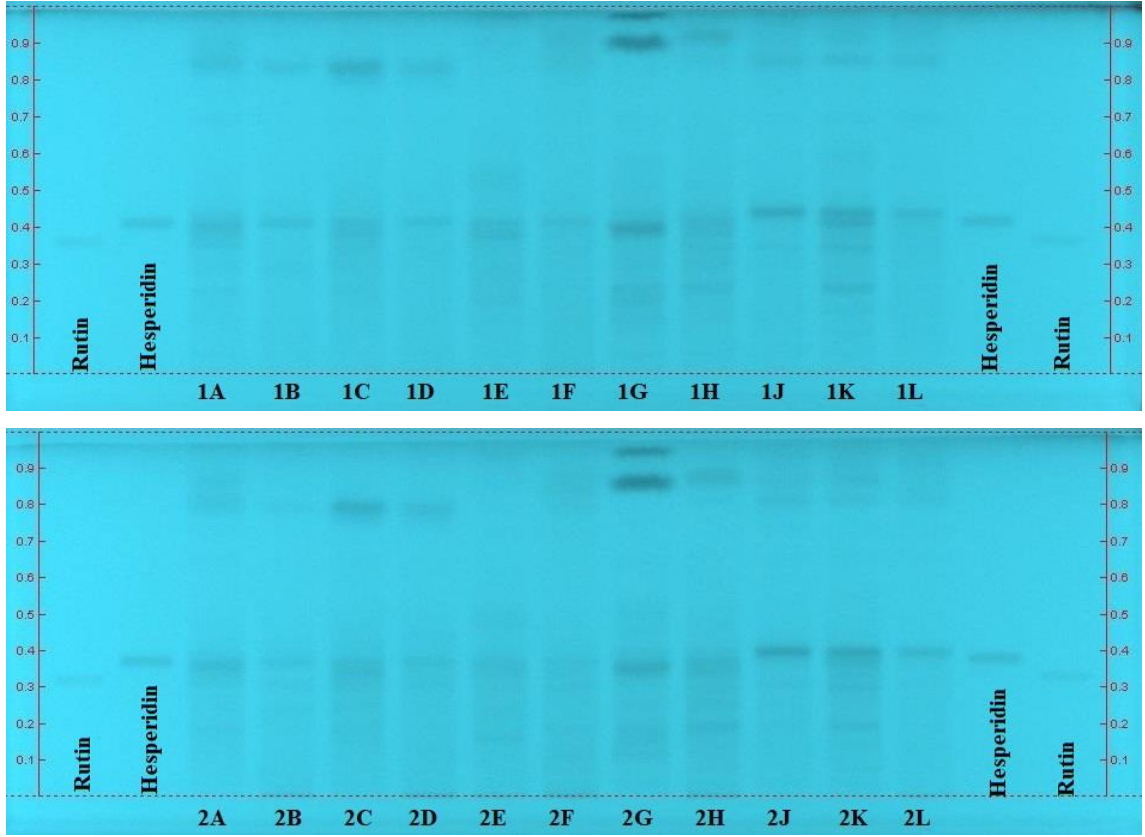
Literatür bilgileri doğrultusunda belirlenen metotlar değerlendirildiğinde, YPİTK Lichrospher 60F_{254s} plakta, etil asetat: asetik asit: formik asit: su (100:11:11:26, *h:h:h:h*) mobil fazıyla gerçekleştirilen ayrımın en iyi olduğu belirlenmiştir. Diğer mobil faz sistemleri ile elde edilen görüntüler Ekler (Ek-1- Ek-18'e) kısmında verilmiştir.

Kullanılan reaktiflerin kullanım amaçları ve değerlendirilme bilgileri Çizelge 4.6.'da verilmiştir. Her bir reaktif uygulanmasıyla elde edilen görüntüler paylaşılmış, benzerlikler ve farklılıklar ortaya konulmuştur.

Çizelge 4. 6. *Kullanılan reaktiflerle ilgili genel bilgiler*

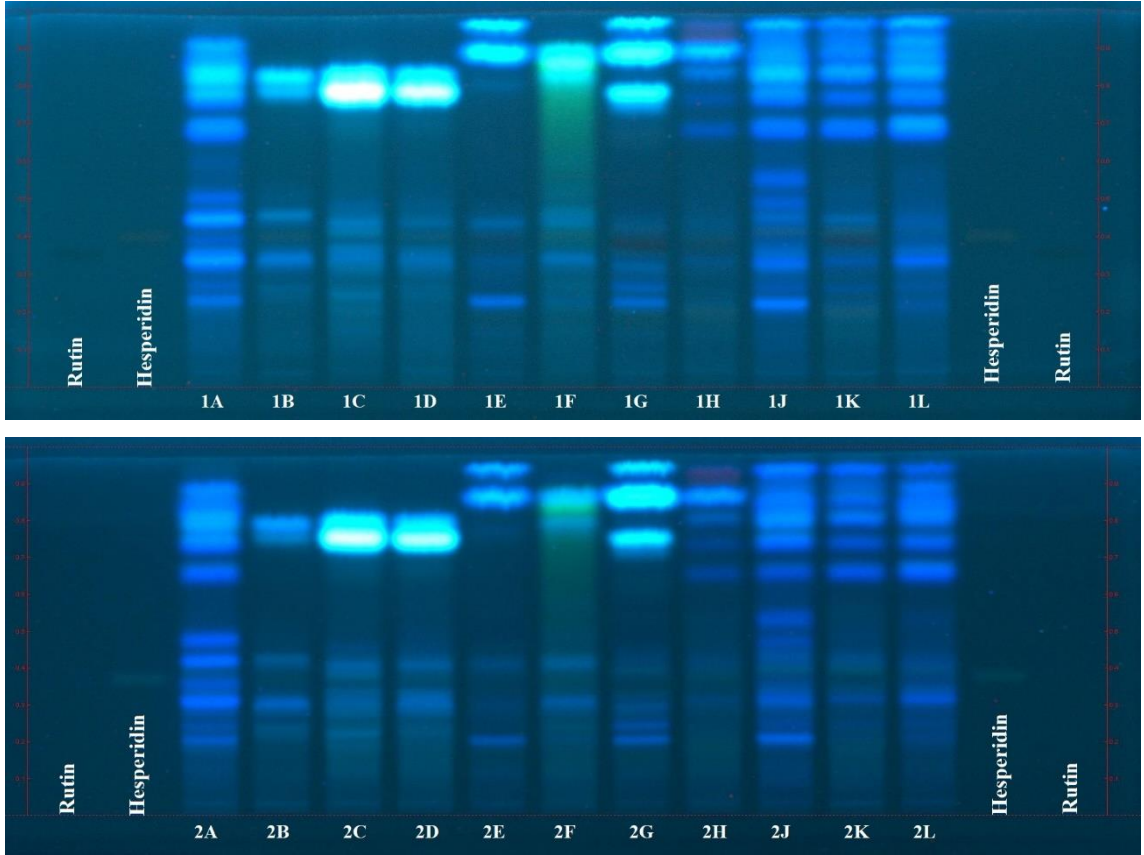
Reaktif	Kullanım şekli	Değerlendirme	Teşhis
Alüminyum klorür	Homojen bir şekilde plağa püskürtülür ve kurutulur.	UV 366 nm	Flavonoitler, antrakinonlar
Natural product / PEG 400 çözeltisi	Plak 100°C’de 3 dk ısıtılır, sıcakken NP çözeltisine daldırılır, soğuk hava yardımıyla kurutulur, ardından PEG400 çözeltisine daldırılır, kurutulur.	UV 366 nm	Flavonoitler, karbonhidratlar, antosiyaninler, bitki asitleri
Potasyum hidroksit (KOH) çözeltisi	Homojen bir şekilde plağa püskürtülür ve kurutulur.	Beyaz ışık UV 366 nm	Antrakinonlar, antronlar, kumarinler, flavonoitler
Sülfürik asit (H ₂ SO ₄) çözeltisi	Plak reaktife daldırılır (1 s), ardından 100°C’de 5 dk ısıtılır.	Beyaz ışık UV 366 nm	Genel reaktif

Develope işleminden sonra kurutulan plaklar;



Şekil 4.3. 254 nm'de YPİTK plağı (Rutin (0,2 µl), Hesperidin (3 µl); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

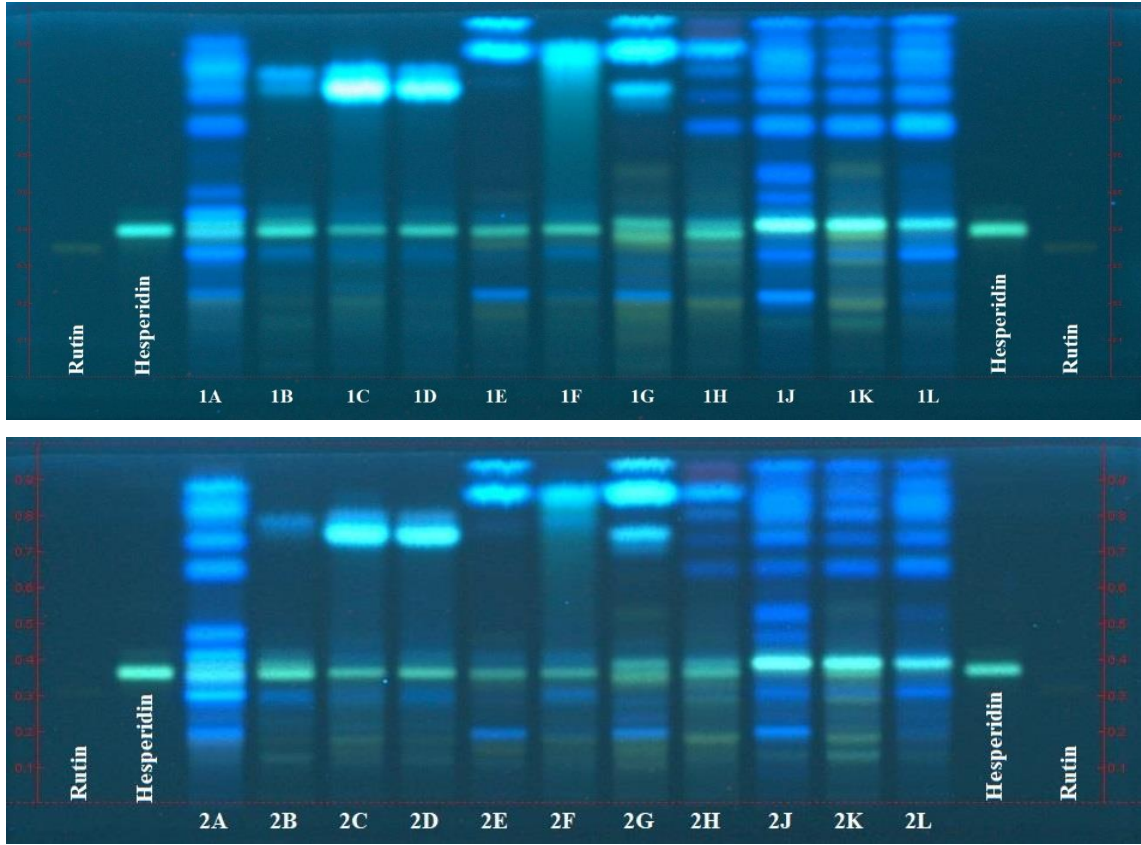
Develope işleminden sonra kurutulan plaklar;



Şekil 4.4. 366 nm'de YPİTK plağı (Rutin (0,2 µl), Hesperidin (3 µl); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

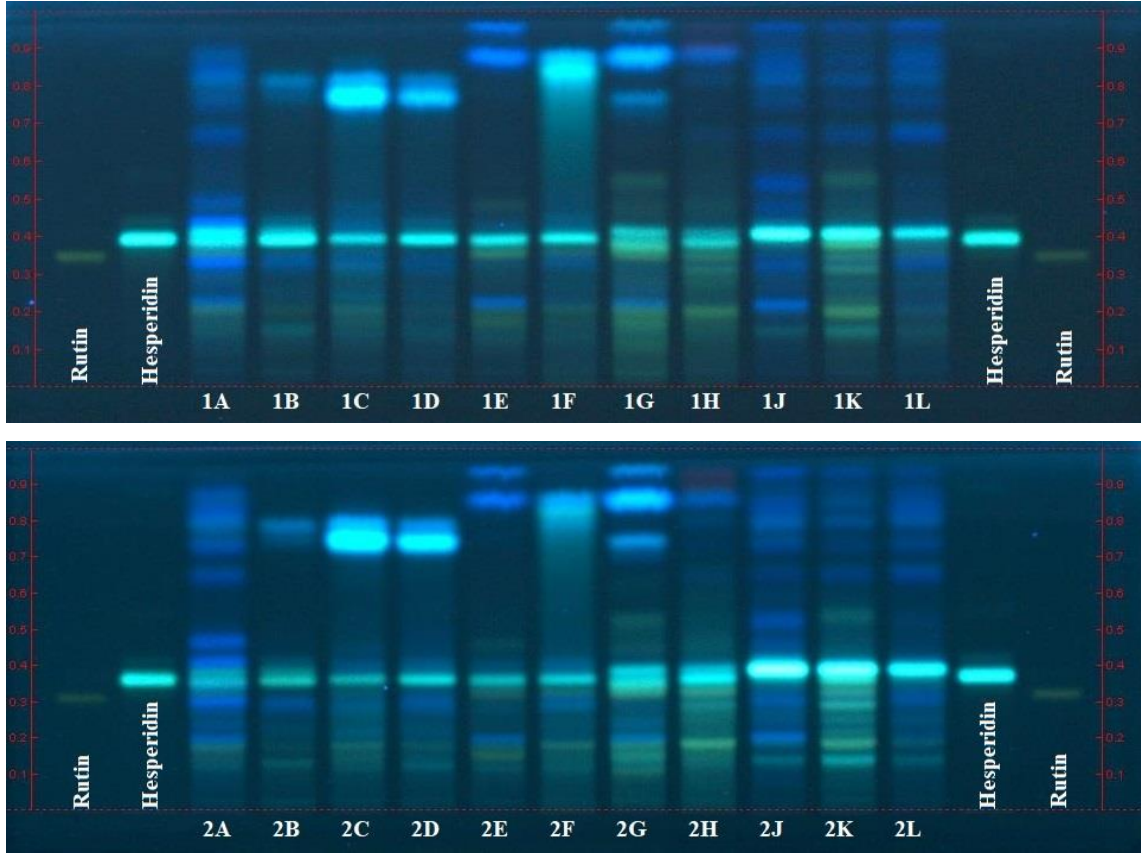
AlCl₃ ile türevlendirme

Citrus türleri flavonoit bakımından zengin bir kaynak olduğu için bu reaktif seçilen türevlendirme ajanlarından biridir. Ayrım sonunda AlCl₃ ile farklı ışımlar yapan flavonoitler şekil 4.5'te görülmektedir. Turunç, satsuma mandarini, robinson mandarini, Washington portakalı, küt diken limonu, tatlı limon ve etnak'ın standart olarak kullanılan hesperidin ile aynı Rf değerinde [239] bant verdiği gözlemlenmektedir. Bunun aksine starruby greyfurt'u, pomelo ve oroblanco'nun ise hesperidinin hemen üstünde (Rf 0.42) hesperidin ile aynı ışıma sahip bir bant verdikleri görülmüştür. Etnak ve bergamot ekstraları ise aynı şekilde hesperidinin hemen üstünde benzer ışımayı yapan zayıf bir bant vermektedir.



Şekil 4.5. *AlCl₃ türevlendirilen ekstraların 366 nm'deki görüntüsü (Rutin (0,2 µl), Hesperidin (3 µl)); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ; 1H, 2H, etnak ; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstralar, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstralar maserasyon ile elde edilen ekstraları temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)*

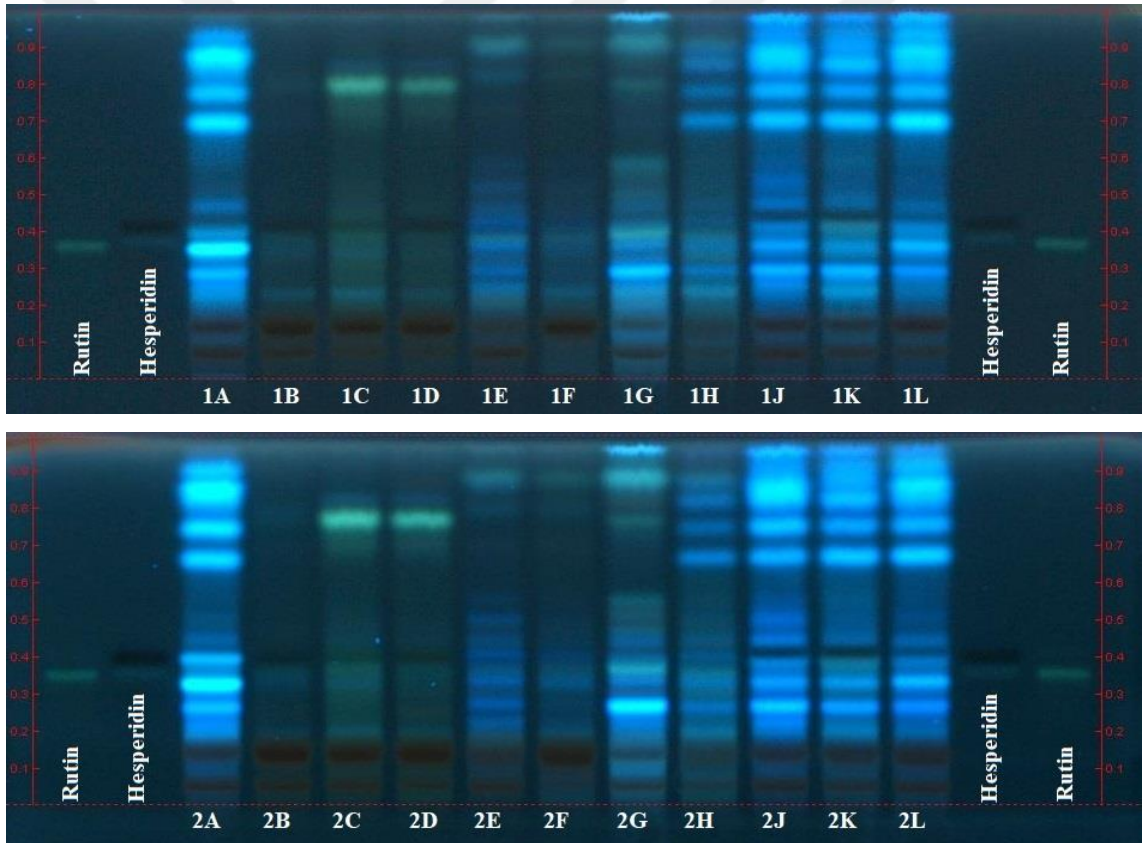
$AlCl_3$ uygulanmış plaklarda, PEG 400 ise bu ışımların daha net bir görüntü vermelerini sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.



Şekil 4.6. $AlCl_3$ + PEG ile türevlendirilen plakların 366 nm'deki görüntüsü (Rutin (0,2 µl), Hesperidin (3 µl); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

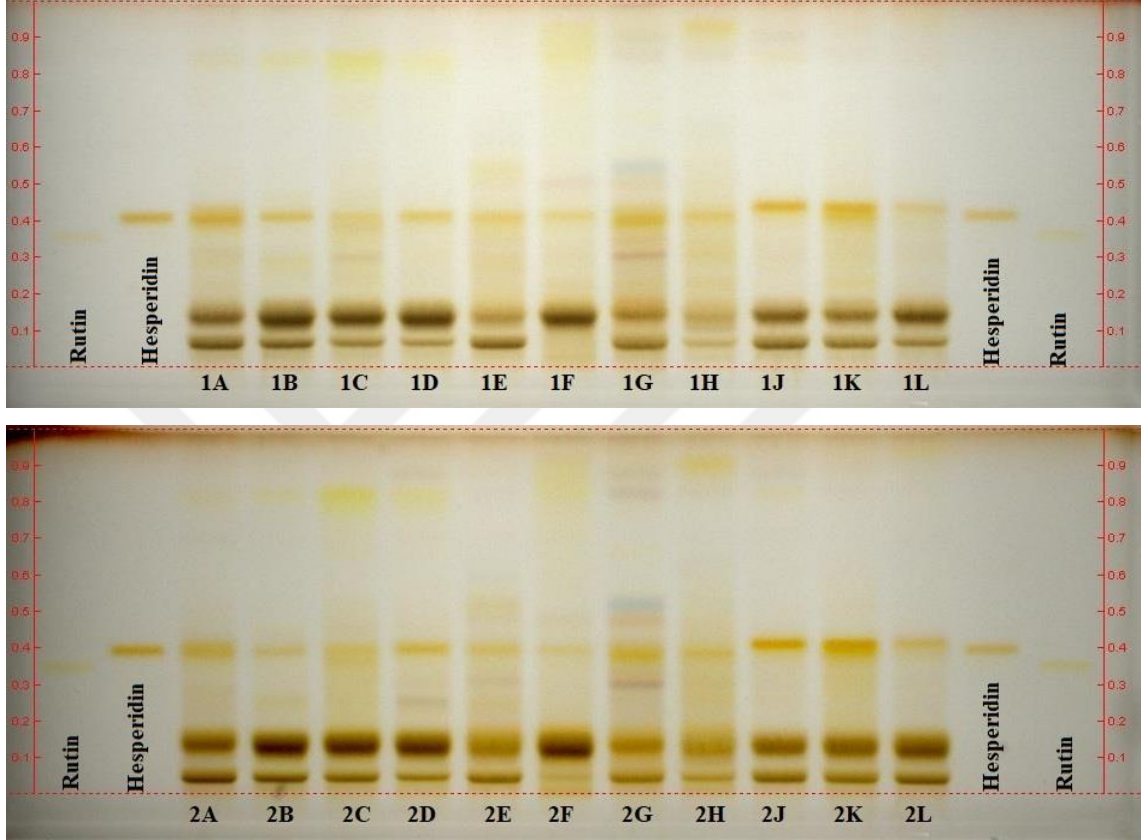
H₂SO₄ ile türevlendirme

Sülfürik asit reaktifi genel bir reaktif olarak bilinmektedir. Çok çeşitli maddelerin 366 nm ve beyaz ışık altında farklı renklerde görünüm kazanmalarını sağlar. Genel profilin aydınlatılması için bu reaktifle birlikte beyaz ışık altında Rf 0.4 değerinde hesperidin'in sarı renkli bir bant (366 nm'de siyah) verdiği gözlemlenmiştir. Ayrıca starruby, pomelo ve oroblancoya ait Rf 0.42 bandının (366 nm'de siyah) yine sarı renk ile beyaz ışık altında gözüktüğü görülmektedir. 366 nm'de ışımaları gözükmeyen Rf 0,08 ve Rf 0,14 bantları sülfürik asit reaktifi ile 366 nm'de siyah ve beyaz ışık altında kahverengi bantlar verirken bu bileşiklerin *Citrus* türlerinde ortak olarak bulunduğu saptanmıştır (Rf 0,08 maddesi tatlı limon'un ASE ekstresinde görülmemektedir).

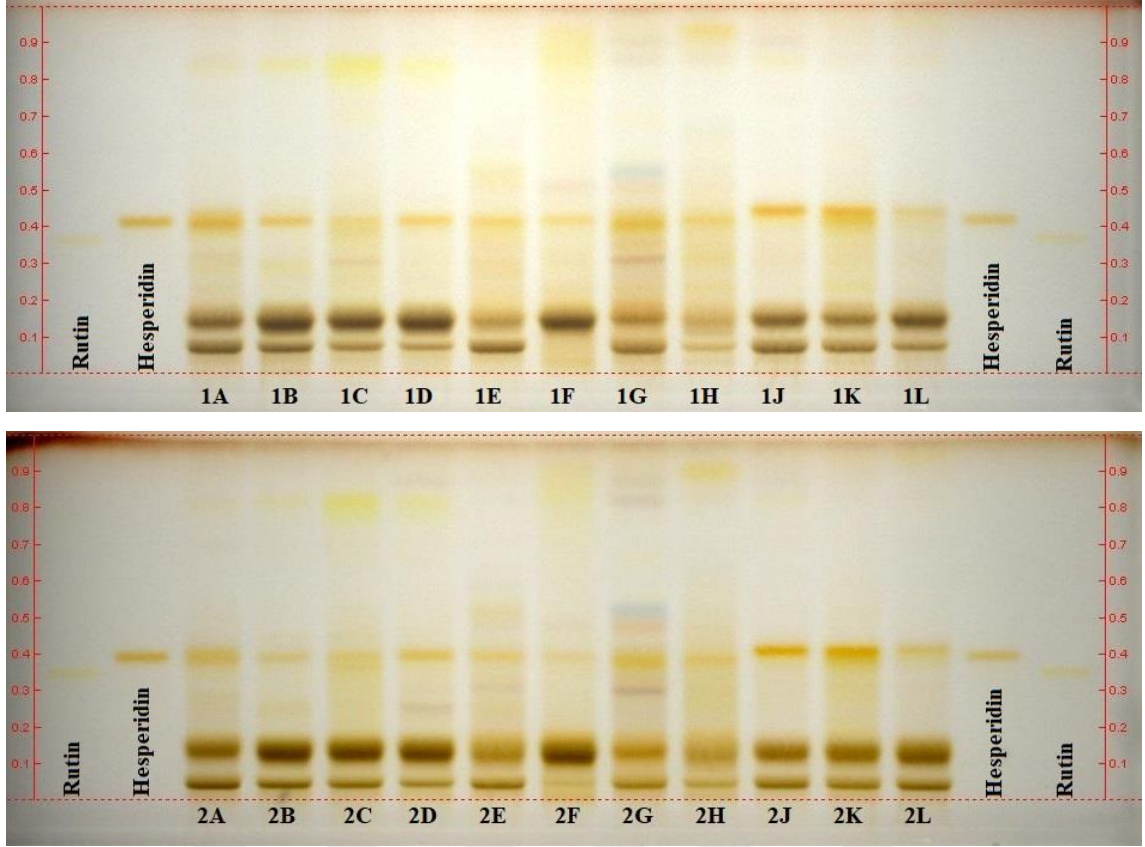


Şekil 4.7. *H₂SO₄ ile türevlendirilen ekstrelerin 366 nm'deki görüntüsü (Rutin (0,2 µl), Hesperidin (3 µl); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)*

Beyaz ışık (transmisyon, remisyon + transmisyon) görüntülerinde özellikle bergamota ait Rf 0.51 (tatlı limonda da var) ve Rf 0.55 değerlerinde birbirine yakın gözüken pembe ve mavi bantlar dikkat çekmektedir. Turunç, satsuma mandarini, robinson mandarini ve Washington portakalı ise Rf 0.81 değerinde ortak sarı bantlar vermiştir.



Şekil 4.8. H_2SO_4 ile türevlendirilen plakların beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü (Rutin (0,2 μ l), Hesperidin (3 μ l); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstratlar, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstratlar maserasyon ile elde edilen ekstratları temsil etmektedir. Ekstratlar 10 μ l uygulanmıştır)

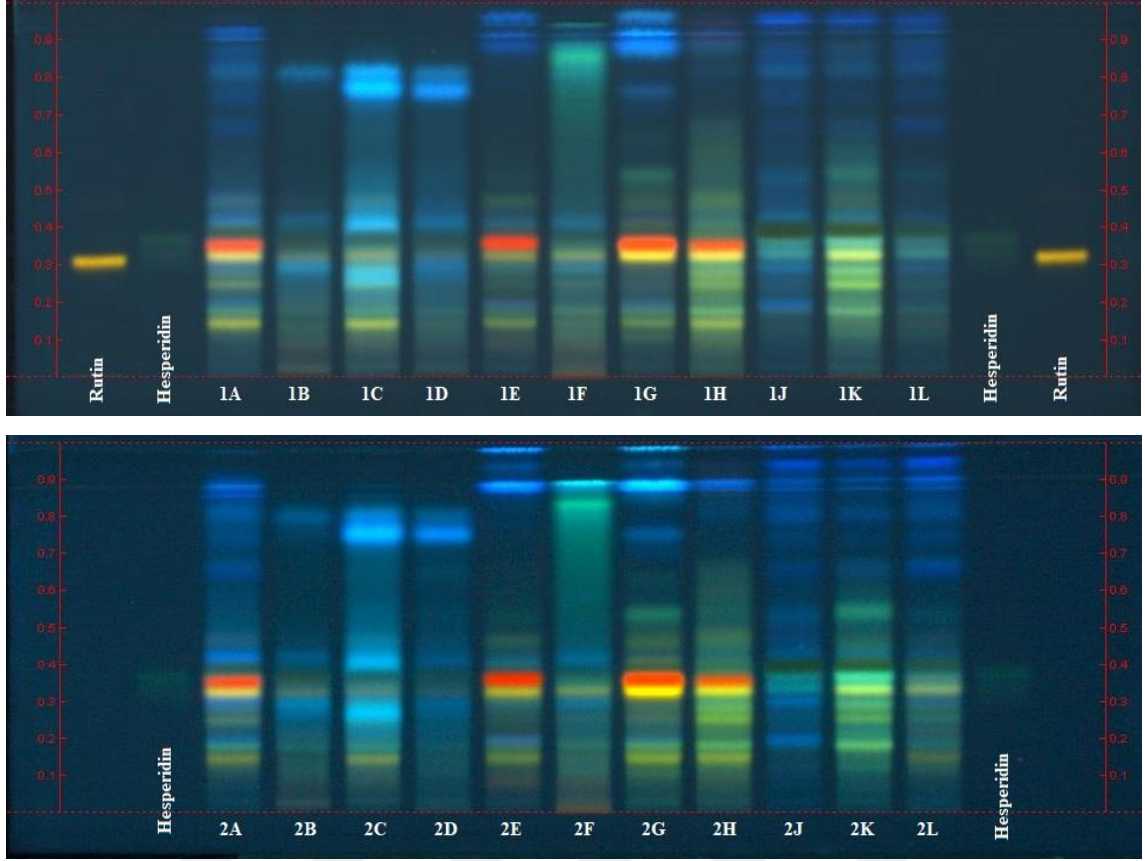


Şekil 4.9. H_2SO_4 ile türevlendirilen plakların beyaz ışık (remisyon + transmisyon) görüntüsü (Rutin (0,2 μ l), Hesperidin (3 μ l); 1A, 2A, turunc ekstre; 1B, 2B, satsuma mandarin; 1C, 2C, robinson mandarin; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstraktlar, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstraktlar maserasyon ile elde edilen ekstraktları temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

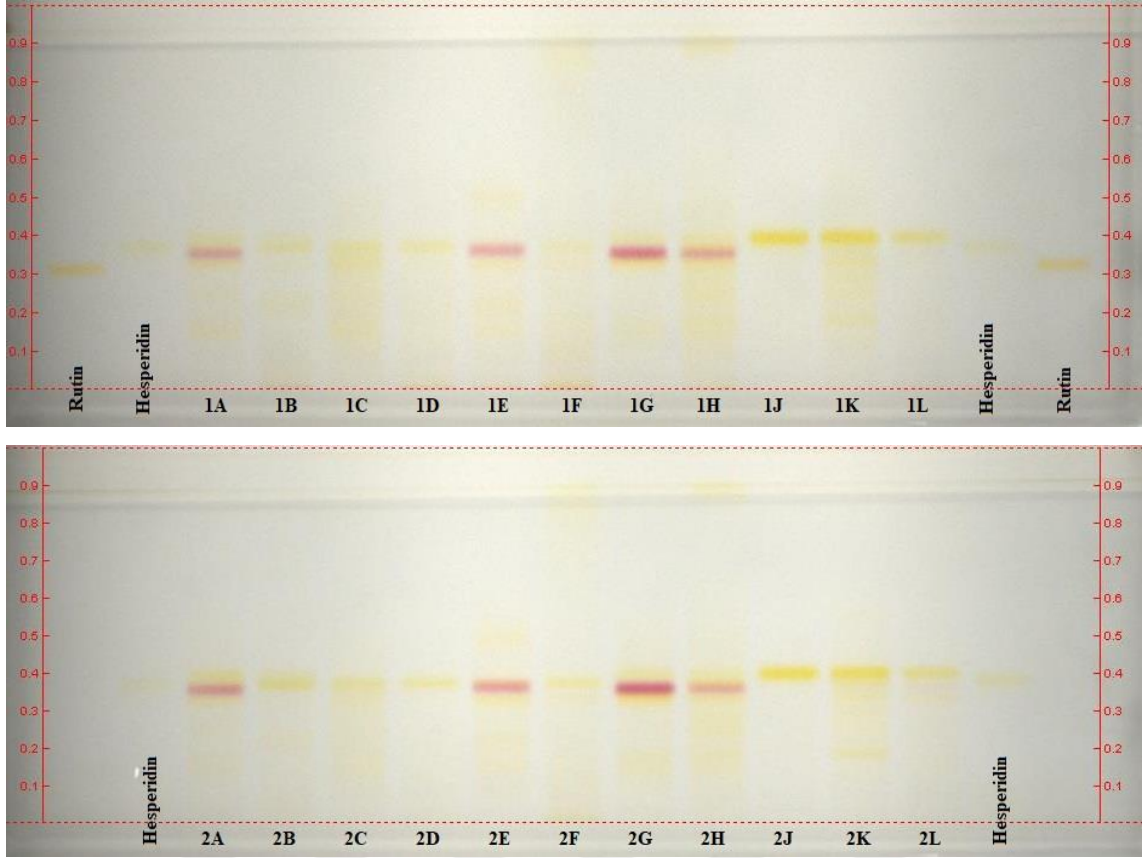
NP/PEG ile türevlendirme

NP/PEG fenolik yapıdaki bileşiklerin (özellikle flavonoidler) 366 nm'de karakteristik renklerde ışıma yapmalarını sağlayan bir türevlendirme ajanıdır. Ayrıca beyaz ışık altında bu maddelerin sarı renk vermelerini de sağlar. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi hesperidin bu metot ile koyu yeşil-kahverengimsi bir bant verirken Rf 0.42 değerindeki bandın da (özellikle starruby, pomelo ve oroblanco'da dominant) aynı renklenmeyi verdiği görülmüştür. Bu türevlendirme ile birlikte bazı ortak bantlar daha iyi seçilmiştir. Rf 0.18 maddesinin turuncu renkteki bandı ve bazı türler arasında ortak olarak bulunduğu dikkat çekmiştir. Yine Rf 0.23 bandının mavi renkte gözüktüğü ve bazı türler arasında ayırt edici olduğu bulunmuştur. Karakteristik kırmızı bandın hemen altında gözüken sarı bandın (Rf 0.35) özellikle limon, tatlı limon, bergamot ve etnak için ayırt edici olduğu görülürken bergamot ekstralarında daha yoğun bir ışımaya sahip olduğu bulunmuştur. Etnak ve pomelo ekstraları düşük Rf değerlerinde farklı renklerde bazı flavonoidlerin ışımlarına sahip olduğu ayrıca dikkat çekici bir özelliktir (şekil 4.10).

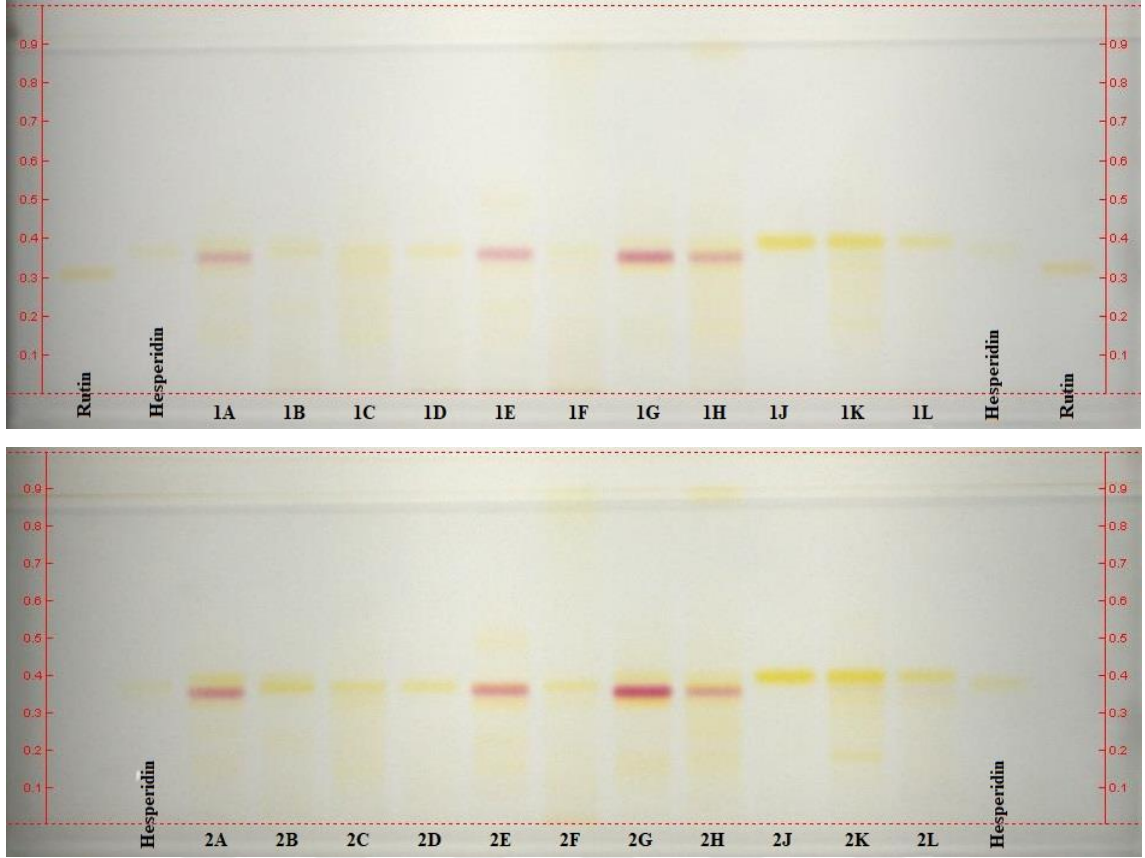
366 nm'de yine turuncu, kütiken limonu, bergamot ve etnak'a ait karakteristik bir kırmızı bant da dikkat çekmektedir. Bu bant türevlendirme sonrasında oluşmayıp birkaç dakika sonra kendiliğinden ortaya çıktığı ve 366 nm'de olduğu gibi beyaz ışık altında da açık kırmızı-pembemsi bir renk ile karakterize bir şekilde görülmektedir (şekil 4.10). Literatür ile karşılaştırıldığında eriodiktol türevi bileşiklerin aynı karakteristik özelliğe sahip olduğu bulunmuştur [240].



Şekil 4.10. NP/PEG ile türevlendirilen plakların 366nm'deki görüntüsü (Rutin (0,2 μ l), Hesperidin (3 μ l); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarinini; 1C, 2C, robinson mandarinini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)



Şekil 4.11. NP/PEG ile türevlendirilen plakların beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü (Rutin (0,2 μ l), Hesperidin (3 μ l); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstraler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstraler maserasyon ile elde edilen ekstraleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

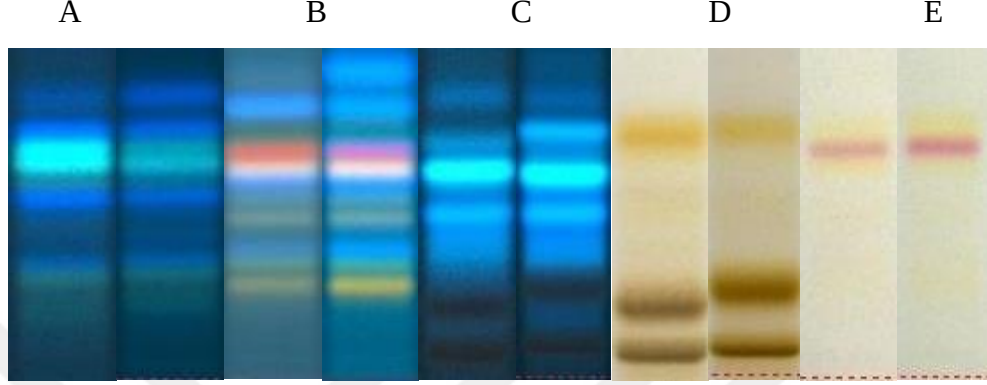


Şekil 4.12. NP/PEG ile türevlendirilen plakların beyaz ışık (remisyon + transmisyon) görüntüsü (Rutin (0,2 µl), Hesperidin (3 µl); 1A, 2A, turunc ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarin; 1C, 2C, robinson mandarin; 1D, 2D, Washington portakali; 1E, 2E, kütiken limonu; 1F, 2F, tatli limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstriler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstriler maserasyon ile elde edilen ekstrileri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

4.5.1. Ekstrelerin YPİTK profillerinin karşılaştırılması

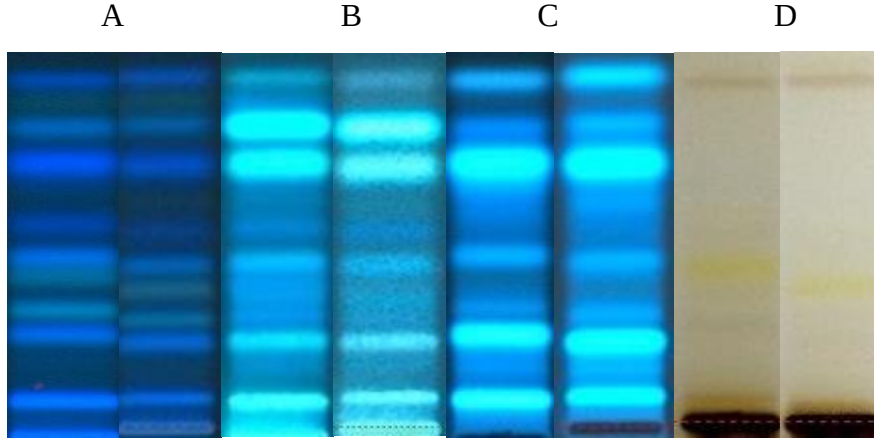
4.5.1.1. *C. aurantium* (Turunç)

Ekstraksiyon metodunun fitokimyasal maddeler üzerine etkisine bakıldığında her iki ekstrenin de benzer bantları verdikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Turunç ASE ve maserasyon ekstraktlarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

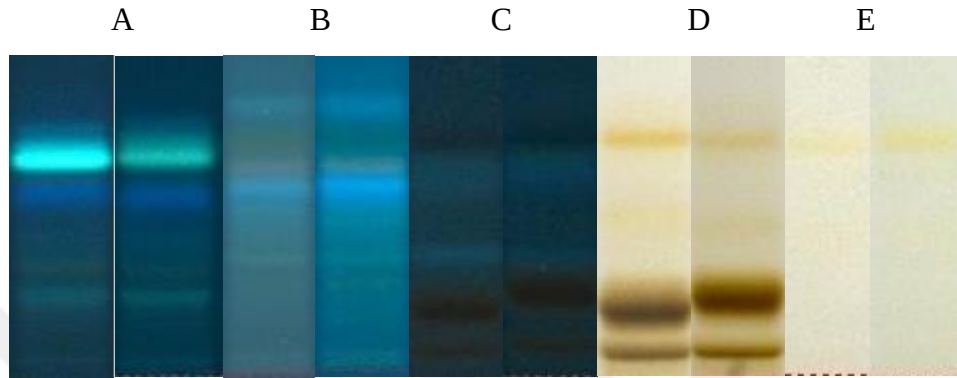
Apolar bileşenlerin ayrımının yapıldığı metot (Metot 3) sonucunda turunç ASE ve maserasyon ekstraktlarının Aynı Rf değerlerinde benzer bantları verdikleri görülmüştür (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. Turunç ASE ve maserasyon ekstraktlarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

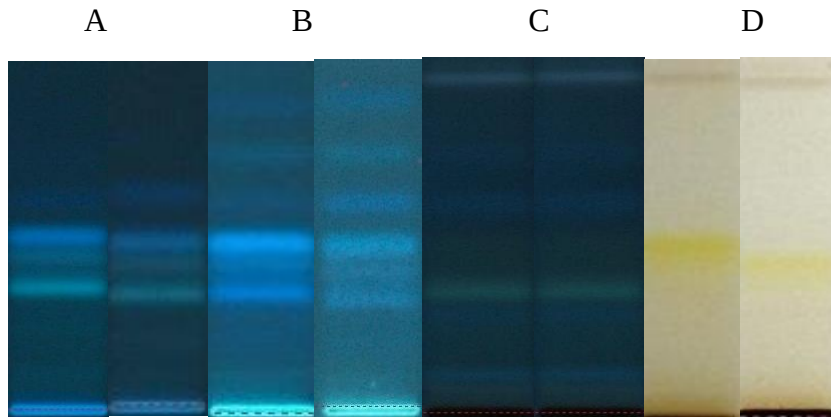
4.5.1.2. *C. reticulata* (Satsuma kùltivarı)

Satsuma mandarinini incelendiğinde genel olarak kompozisyonun aynı olduğu gör÷lmüştür. $AlCl_3$ türevlendirmesinden sonra elde edilen 366 nm görüntülerinde R_f 0.42’de yeşilimsi ışımaya yapan maddenin ASE ekstresinde daha yoğun bir ışımaya sahip olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *Satsuma mandarinini* ASE ve maserasyon ekstrlerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

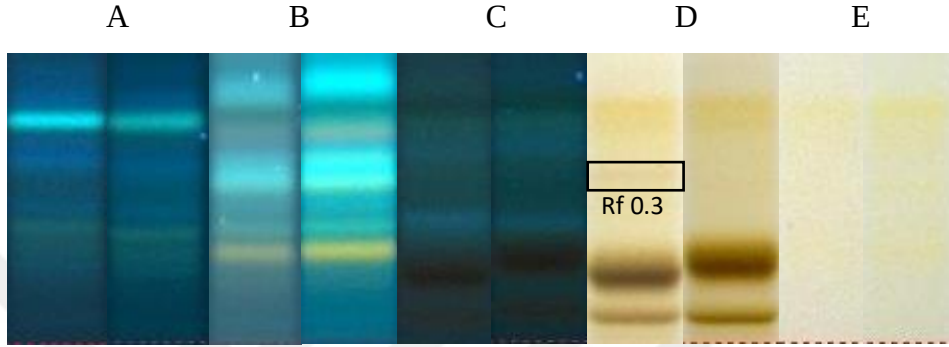
YPİTK ile apolar bileşenlerin ayrımı sonucunda satsuma ASE ve maserasyon ekstrlerinin kompozisyonlarının aynı olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. *Satsuma mandarinini* ASE ve maserasyon ekstrlerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

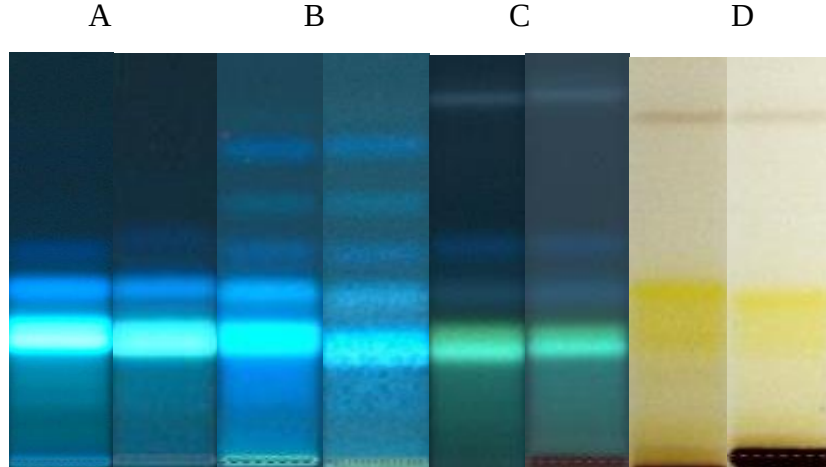
4.5.1.3. *C. reticulata* (Robinson kùltivarı)

C. reticulata incelendiğinde özellikle H_2SO_4 t÷revlendirmesinde beyaz ışıık altında gör÷nen Rf 0.3 değerindeki zayıf bant yalnızca ASE ekstresinde gözlemlenmiştir. Bu durum maddenin ısı ile daha iyi ekstre edildiği veya ısı ile bozunma sonucu oluşan bir yan ürün olabileceği yorumu yapılmıştır. Yine aynı t÷revlendirmedeki kahverengi bantlar arası Rf farkları aynı gözlemlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. Robinson mandarini ASE ve maserasyon ekstrlerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayırımı, $AlCl_3$ t÷revlendirmesi (A), NP/PEG t÷revlendirmesi (B,E), H_2SO_4 t÷revlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

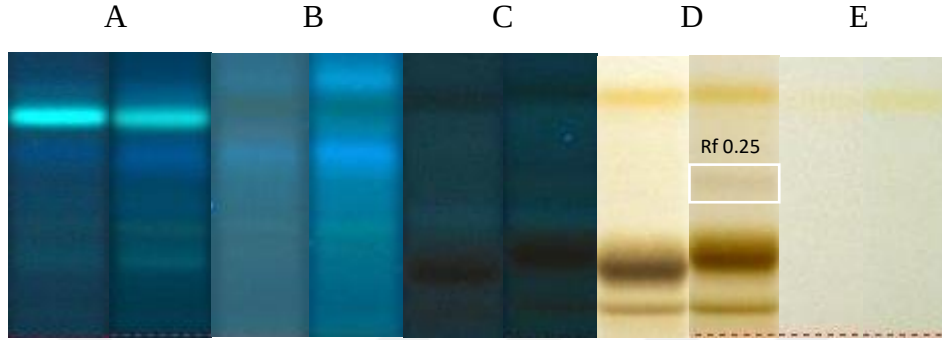
Yapılan analizler sonucunda Robinson mandarininin ASE ve maserasyon ekstrlerinin apolar bileşimleri benzer çıkmıştır (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Robinson mandarini ASE ve maserasyon ekstrlerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH t÷revlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 t÷revlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

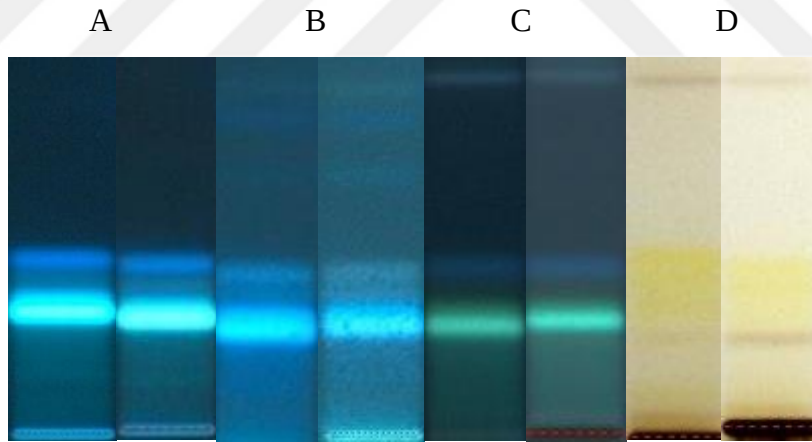
4.5.1.4. *C. sinensis* (Washington portakalı)

Maserasyon ekstresinin sülfürik asit türevlendirmesinin beyaz ışık görüntüsünde Rf 0.25 değerinde ASE ekstresinde bulunmayan bir bandın varlığı göze çarpmıştır. (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. *Washington portakalı* ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

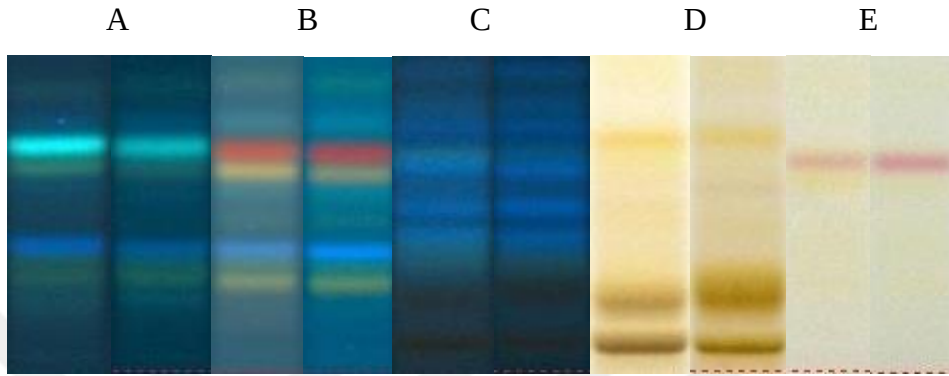
Apolar maddelerin ayrımı sonucunda her iki ekstrenin de benzer bantları verdikleri görülmüştür (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. *Washington portakalı* ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

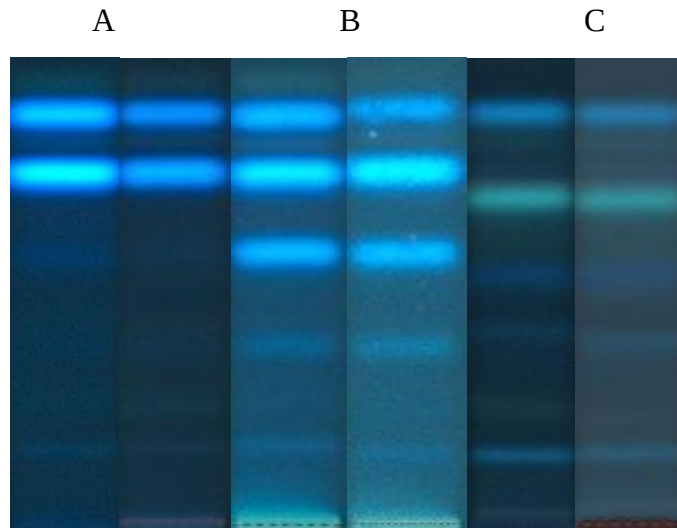
4.5.1.5. *C. limon* (Kütdiken limonu)

Kütdiken limon ekstreleri karşılaştırıldığında H_2SO_4 türevlendirmesiyle elde edilen plaklardaki renklenen bantların benzer olduğu gözlenmiştir. Polar bileşenlerinin kompozisyonu bakımından ise genel olarak bir farklılık olmadığı görülmüştür (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. Kütdiken limonu ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

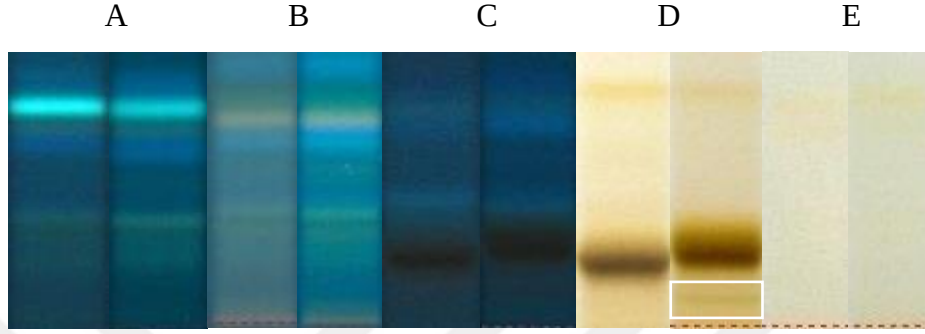
Apolar bileşiklerin karşılaştırılması sonucunda her iki ekstrenin de benzer bantları verdikleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.22).



Şekil 4.22. Kütdiken limonu ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

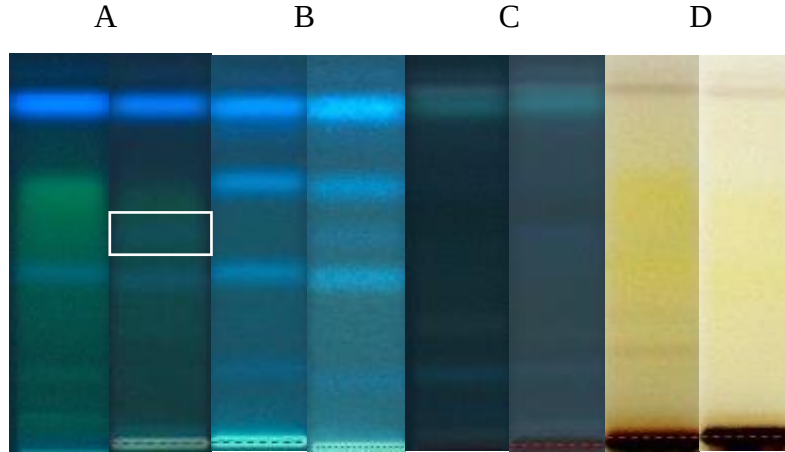
4.5.1.6. *C. limetta* (Tatlı limon)

Tatlı limon'un diğer türlerin aksine H_2SO_4 türevlendirildikten sonra Rf 0,08 değerindeki bandı maserasyon ekstresinde oldukça zayıf iken ASE ekstresinde görülmemiştir. $AlCl_3$ ve NP/PEG ile farklı renklerde ışıma yapan flavonoit ve grubu bileşiklerin kompozisyonunda önemli bir değişiklik görülmemiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. Tatlı limon ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

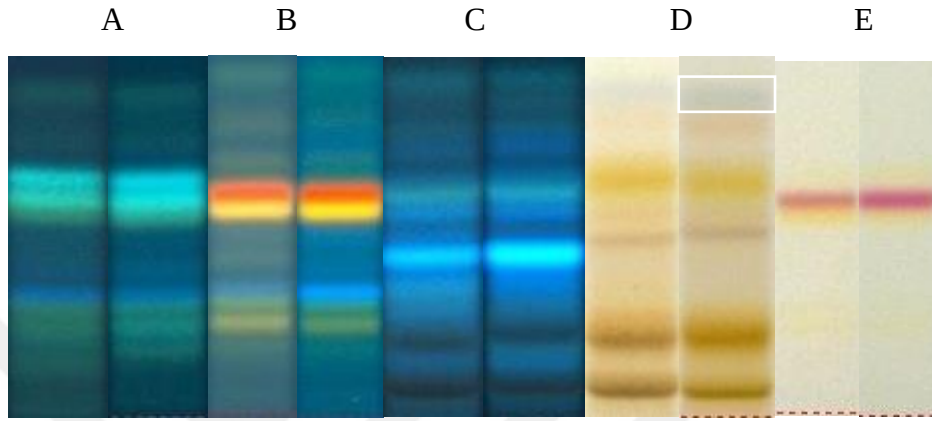
Apolar kompozisyon analizleri incelendiğinde 366 nm ve $AlCl_3$ ve H_2SO_4 ile türevlendirme sonrası elde edilen 366 nm görüntülerinde Rf 0.35 değerinde mavi bant veren madde yalnızca maserasyon ekstresinde görülmüştür (Şekil 4.24).



Şekil 4.24. Tatlı limon ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

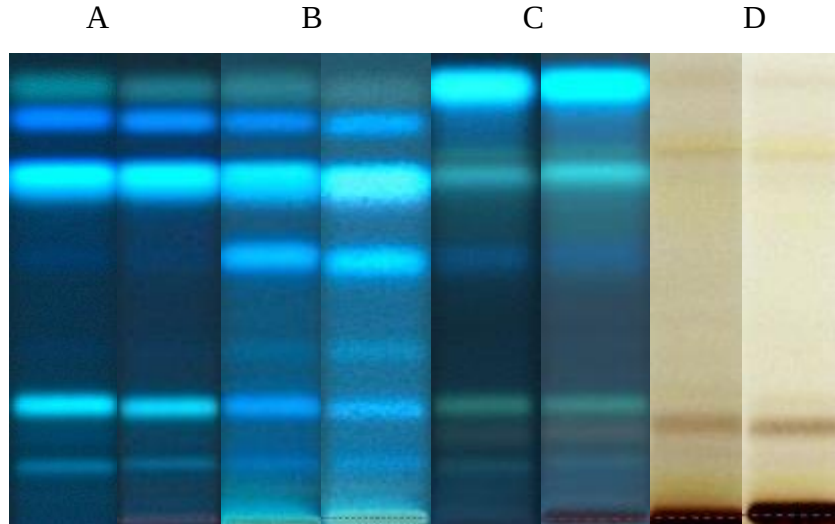
4.5.1.7. *C. bergamia* (Bergamot)

Bergamot ekstralarının polar bileşikleri karşılaştırıldığında H_2SO_4 türevlendirmesindeki R_f 0.55'teki mavi bandın bergamota özgün olduğu bulunmuştur. ASE ve maserasyon ekstraları arasında farklı bir kompozisyon bulunmamıştır (Şekil 4.25).



Şekil 4.25. Bergamot ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

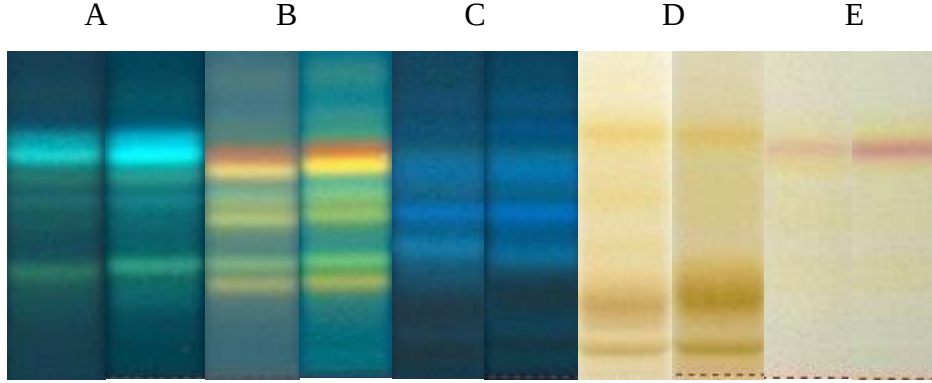
Bergamotun daha apolar bileşiklerden oluşan kompozisyonunun her iki ekstraksiyon metodu sonucunda benzer bantları verdikleri görülmüştür (Şekil 4.26).



Şekil 4.26. Bergamot ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

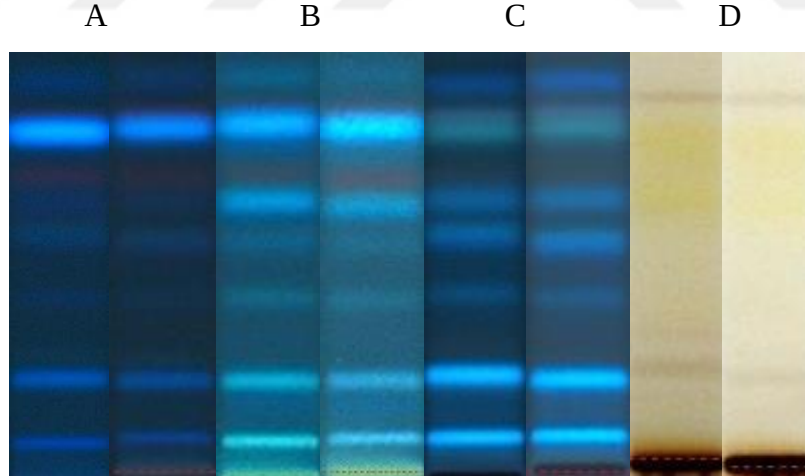
4.5.1.8. *C. medica* (Etnak)

Ayrım sonucunda etnak'ın ASE ve maserasyon ekstralarının polar kompozisyonunda bir değişiklik gözlenmemiştir (Şekil 4.27).



Şekil 4.27.Etnak ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

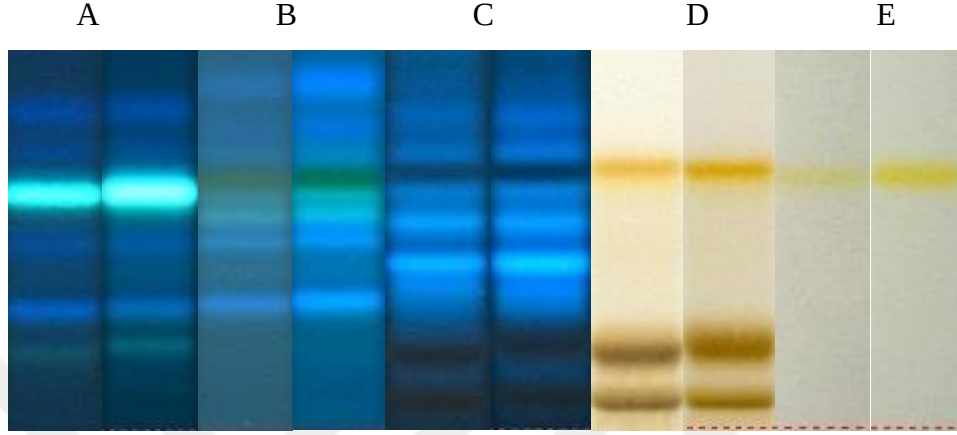
Apolar bileşikler için uygulanan metot sonucunda elde edilen ayrımlara göre iki farklı ekstre ile elde edilen örneklerin kompozisyonları arasında bir farklılık görülememiştir (Şekil 4.28)



Şekil 4.28.Etnak ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

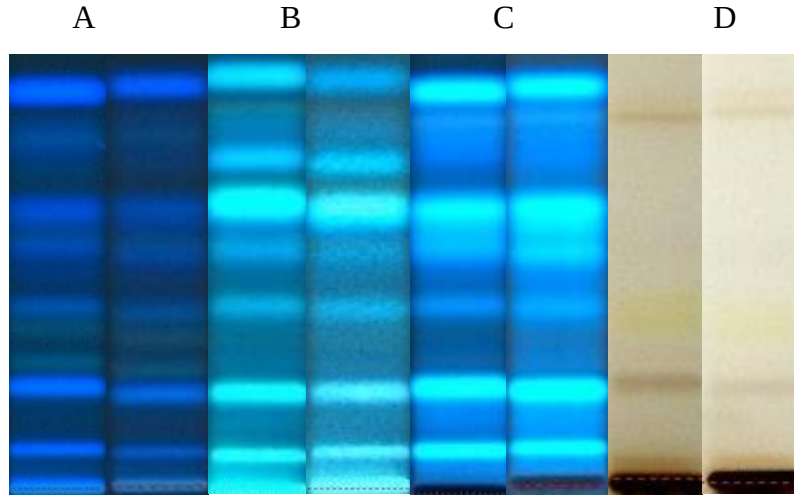
4.5.1.9. *C. paradisi* (Starruby greyfurtu)

Starruby greyfurt ekstralarında naringin bantının maserasyon ekstresindeki ışıma yoğunluğu dikkat çekmiştir. Ancak ekstraksiyon metotlarının karşılaştırmasında polar bileşenlerin kompozisyon farklılığında herhangi bir farklılık bulunamamıştır (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Starruby greyfurtu ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

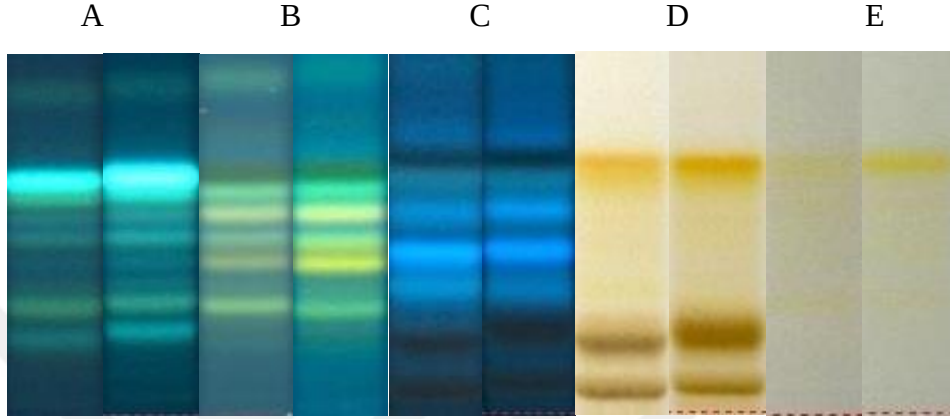
Farklı türevlendirme basamaklarından sonra daha apolar bileşikler incelendiğinde ise polar bileşenlerin kompozisyonunda olduğu gibi aynı şekilde kompozisyon farklılığı görülmemektedir (Şekil 4.30).



Şekil 4.30. Starruby greyfurtu ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

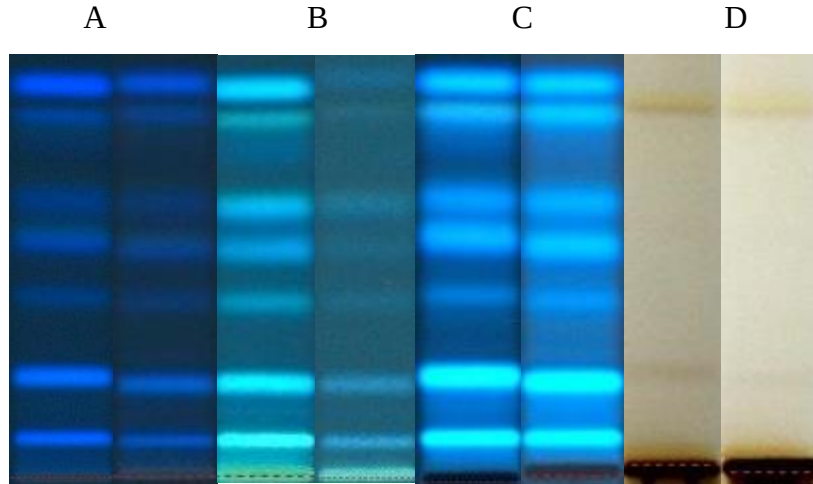
4.5.1.10. *C. maxima* (Pomelo)

Pomelo kabuk ekstresi incelendiğinde kompozisyonunda genel olarak bir farklılık gözükmesine de Rf 0.42 değerinde tüm görüntülerde gözüken ve naringin olduğu saptanan bileşiğin maserasyon ekstralarında ASE'ye oranla daha yoğun bir ışımaya sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Pomelo ASE ve maserasyon ekstralarının metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

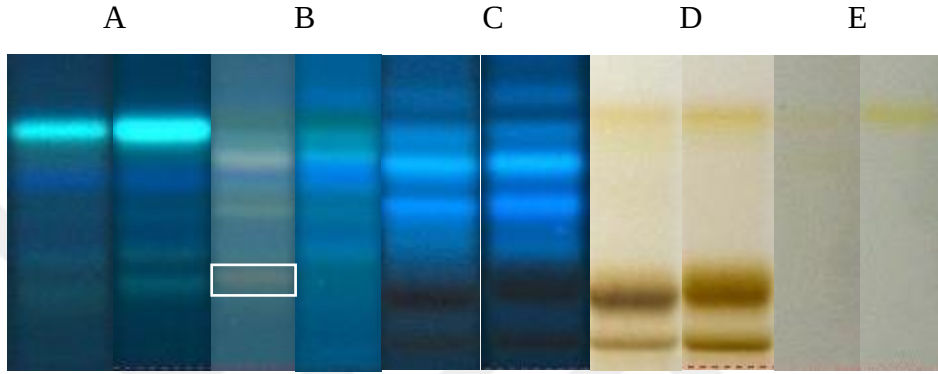
Daha apolar bileşiklerin kompozisyonları açısından Pomelo ekstresinde anlamlı bir fark göze çarpmamıştır (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Pomelo ASE ve maserasyon ekstralarının metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

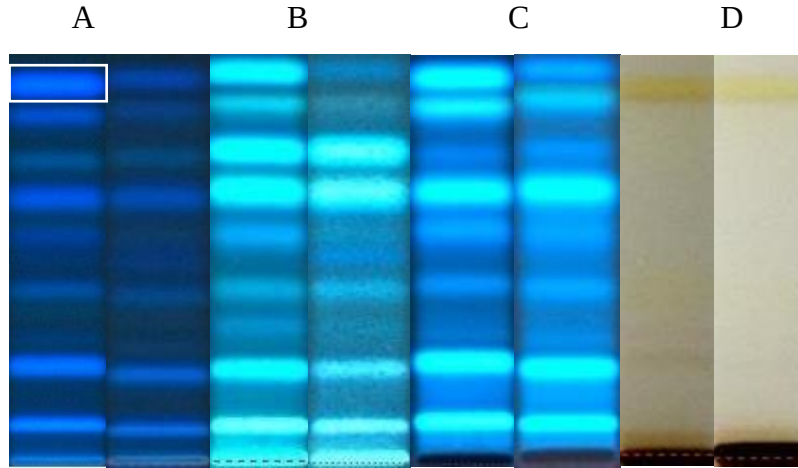
4.5.1.11. *C. maxima* x *C. paradisi* (Oroblanco)

Hibrit bir tür olan oroblaco analizlerinde NP/PEG türevlendirilmesinde Rf 0.16 değerindeki bandın ASE ekstresinde bulunurken maserasyon ekstresinde olmadığı veya eser miktarda bulunduğu görülmüştür. Bunun dışında $AlCl_3$ ile 366 nm (açık yeşil bant) ve NP/PEG (sarı bant) ile alınan beyaz ışık görüntülerinde naringin olarak bulunan bileşiğin maserasyon ekstrelerinde daha yoğun bir ışıma yaptığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Oroblanco ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 1 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 1 ayrımı, $AlCl_3$ türevlendirmesi (A), NP/PEG türevlendirmesi (B,E), H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

Apolar bileşenlerin ayrımında Rf değerleri 0.57 ve 0.63 olan maddelerin ışımaları genel olarak ASE ekstrelerinde daha yoğun gözlemlenmiştir (Şekil 4.34).

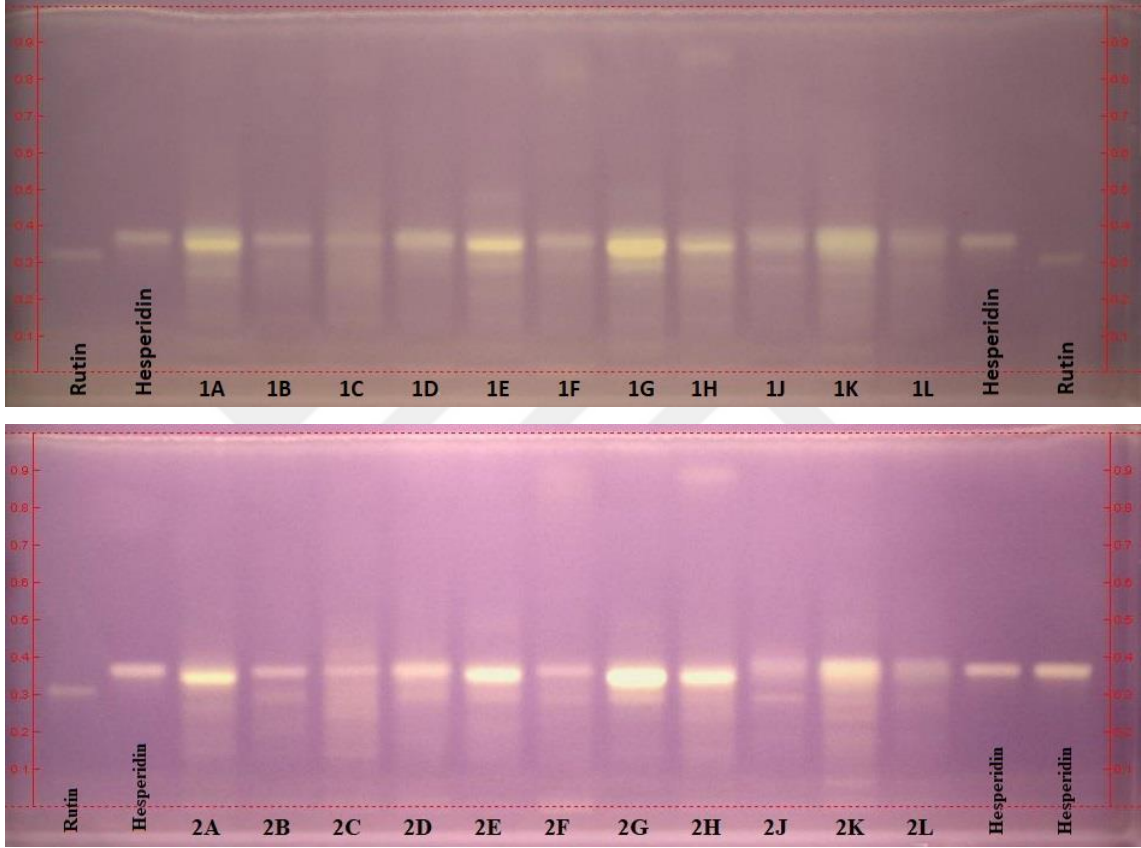


Şekil 4.34. Oroblanco ASE ve maserasyon ekstrelerinin metot 3 ile YPİTK karşılaştırmaları (metot 3 (A), metot 3 ve KOH türevlendirmesi (B), metot 3 ve H_2SO_4 türevlendirmesi (C,D), her karşılaştırmada soldaki ASE, sağdaki maserasyon ekstresi)

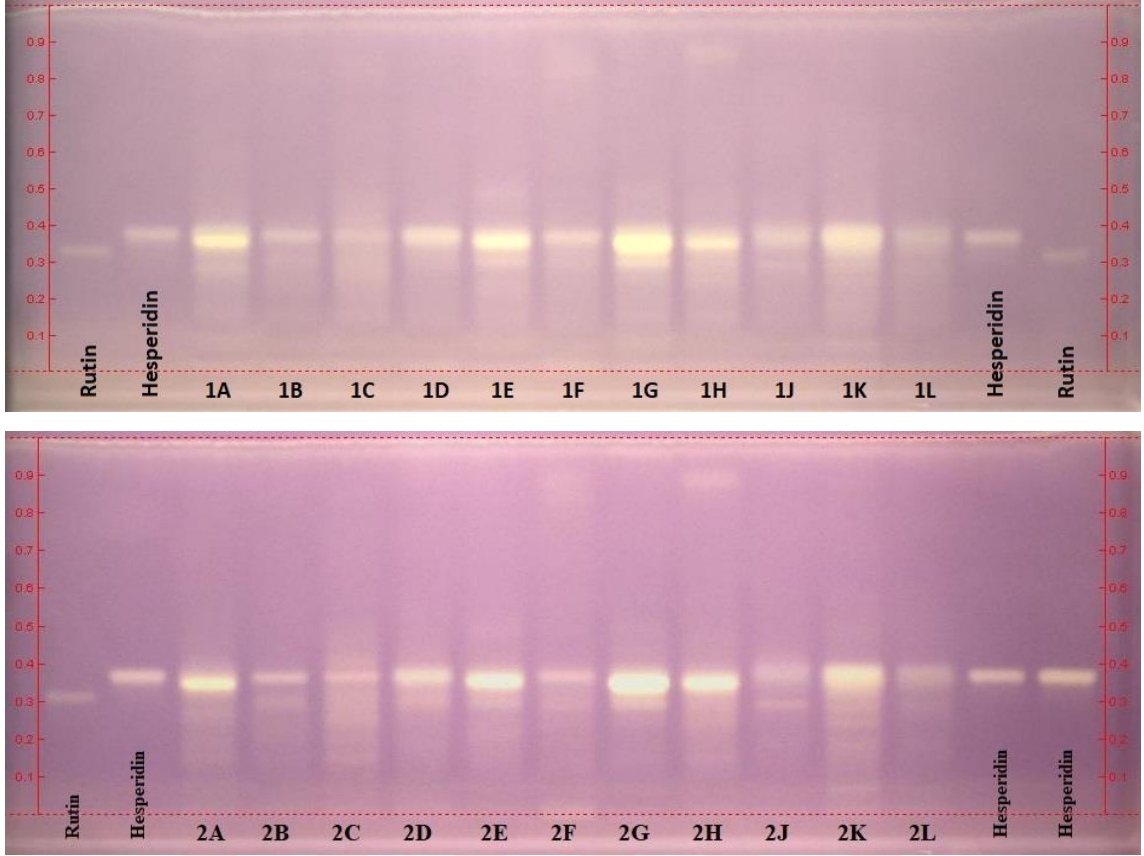
4.6. YPİTK-Biyootografik Metotlara Ait Bulgular

4.6.1. Biyootografik YPİTK-DPPH radikal süpürücü etki

Ayrımı yapılan ve kurutulan plaklar %0.05 DPPH• çözeltisine daldırma aygıtı (CAMAG®, İsviçre, Immersion device III) ile hız:5, süre:1 olacak şekilde daldırılmış ve 1 dk kurutulduktan sonra, 30 dk karanlıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda plaklar beyaz ışıktaki incelenmiştir.



Şekil 4.35. DPPH•çözeltisine daldırılan plakların beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü (Rutin (0,2 µl), Hesperidin (3 µl, en sağdaki 4 µl); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütüden limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstraler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstraler maserasyon ile elde edilen ekstraleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

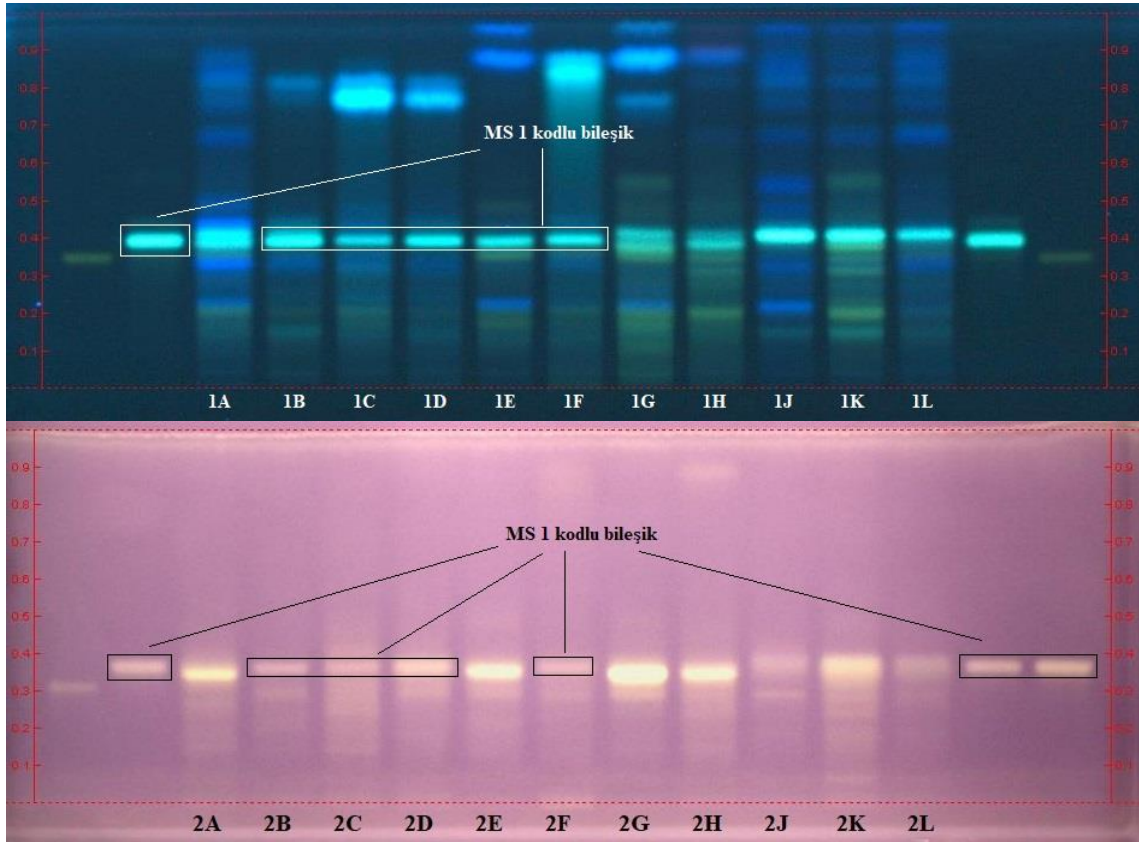


Şekil 4.36. *DPPH•* çözeltisine daldırılan plakların beyaz ışık (remisyon + transmisyon) görüntüsü (Rutin (0,2 µl), Hesperidin (3 µl, en sağdaki 4 µl); 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot; 1H, 2H, etnak; 1J, 2J, starruby greyluft; 1K, 2K, pomelo; 1L, 2L, oroblanco; 1 kodlu ekstraller, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstraller maserasyon ile elde edilen ekstralleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

Beyaz ışıkta incelenen plaklarda, mor renkli zemin aktif DPPH radikalini işaret ederken, çok açık sarı bantlar redükte olan DPPH radikalini yani hidrazin türevini göstermektedir. Plaklarda görüldüğü üzere, hesperidin 3 µg, rutin 200 ng, klorojenik asit 1 µg ve kafeik asit 1 µg dozlarda DPPH radikalini süpürücü etki göstermiştir.

Ekstrelerde hesperidin ile aynı Rf değerine sahip satsuma mandarini, robinson mandarini, Washington portakalı ve tatlı limon ekstrallerinde belirlenen bant DPPH radikali süpürücü etki göstermiştir. Bu ekstrallerde gözlemlenen bandın hesperidin olup olmadığı Kütle Spektroskopisi ile araştırılmıştır. Ayrıca turunç, küt diken limonu, bergamot ve etnak ekstrallerinde ise hesperidin Rf değerinden daha düşük değere sahip ve daha yüksek DPPH radikalini süpürücü etki gösteren bir bant tespit edilmiştir.

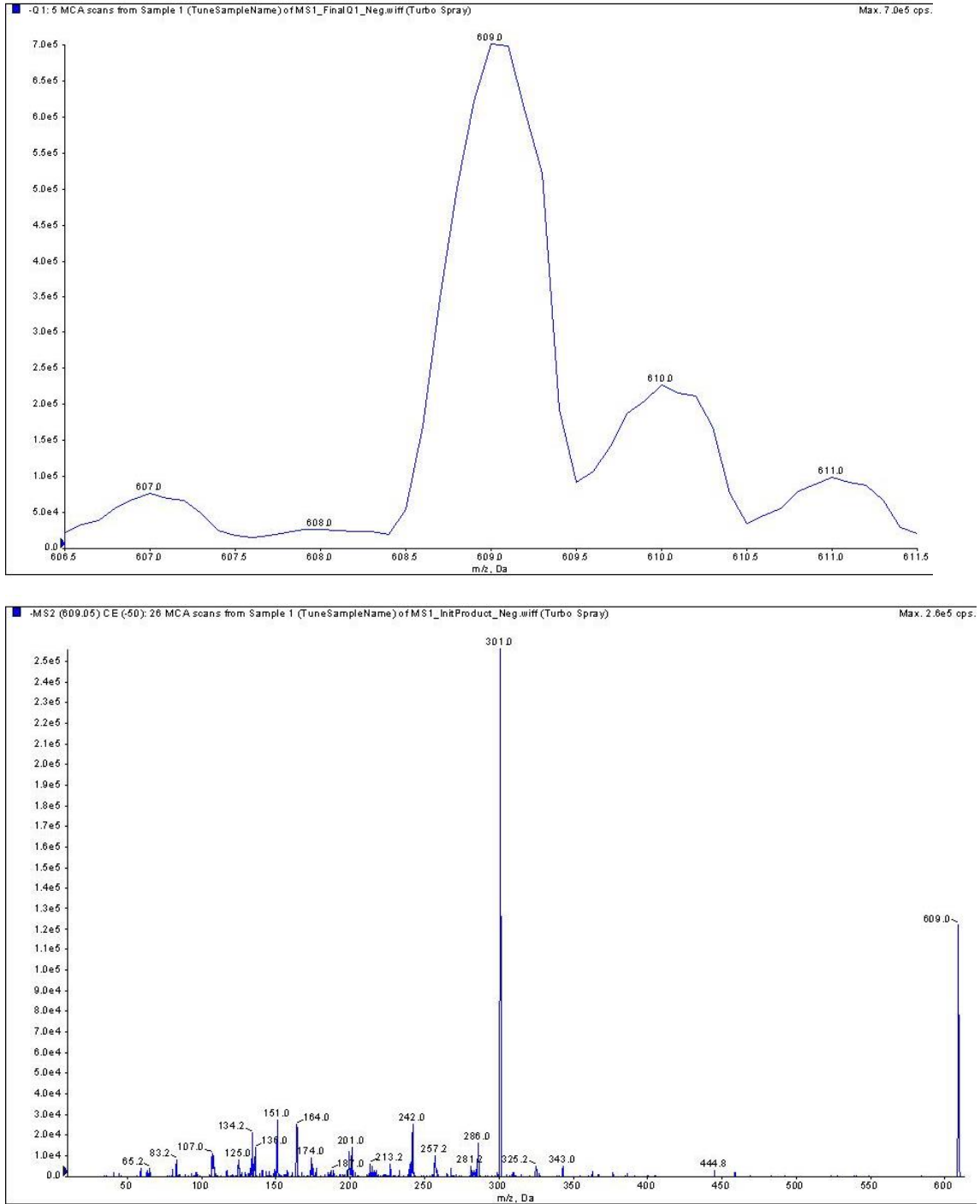
4.6.1.1. Ekstrelerde DPPH• süpürücü etki gösteren ve hesperidin olduğu düşünülen bileşiğin (MS-1) KS analizi



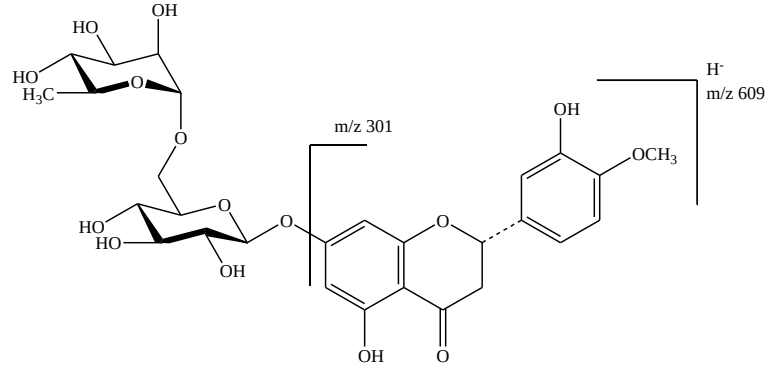
Şekil 4.37. DPPH• süpürücü etkisi belirlenen MS-1 kodlu bileşik (1A, turunc ekstresi; 1B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, robinson mandarini; 1D, Washington portakalı; 1E, küt diken limonu; 1F, tatlı limon; 1G, bergamot ekstresi; 1H, etnak ekstresi; 1J, starruby greyfurt; 1K, pomelo ekstresi; 1L, oroblanco ekstresi; ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

DPPH süpürücü etkisi gözlemlenen MS 1 kodlu bileşik, YPİTK-preparatif çalışma ile metanolle plaktan ekstre edilmiştir. Metanollü karışım, Kütle Spektroskopisi analizi için manuel enjeksiyon ile sisteme verilmiştir. Q1 taraması negatif modda yapılarak $[M-H]^-$ pikleri total iyon kromatogramında (TIC) araştırılmıştır. Bileşiğin, hesperidin ile aynı R_f 'te olması bileşiğin hesperidin olma olasılığını kuvvetlendirmiştir. Ayrıca Q1 taramasında yoğunluğu diğer piklere göre daha yüksek olan m/z 609 $[M-H]^-$ piki belirlenmiştir. Fragmentlerinin belirlenmesi için bileşik optimizasyonu negatif modda yapılmıştır. Bu analiz sonucunda maddenin kütle spektrumu (şekil 4.38) elde edilmiştir. Spektrum değerlendirildiğinde, m/z 301 $[M-H-308]^-$ pikinin majör pik olduğu dikkat çekmektedir. m/z 301 $\rightarrow$ 151 $[M-H-150]^-$ parçalanmasının yanı sıra m/z 164, m/z 242 ve m/z 286 fragmentleri karakteristik olarak hesperetin'e ait olduğu düşünülmüştür.

(Şekil 4.39) [241]. Fragmentler oluşurken 308 amu'luk farkın moleküler iyon pikinden rutinozit kopmasını işaret etmektedir. Çünkü 308 amu'luk fark sadece rutinozit kopmalarında görülmektedir. Bu nedenle molekül ağırlığı 610 olan madde hesperidin (hesperetin rutinozit) olarak tanımlanmıştır. Standart hesperidin aynı koşullarda KS sistemine verilmiş, MS 1 kodlu bileşiğin hesperidin olduğu belirlenmiştir.

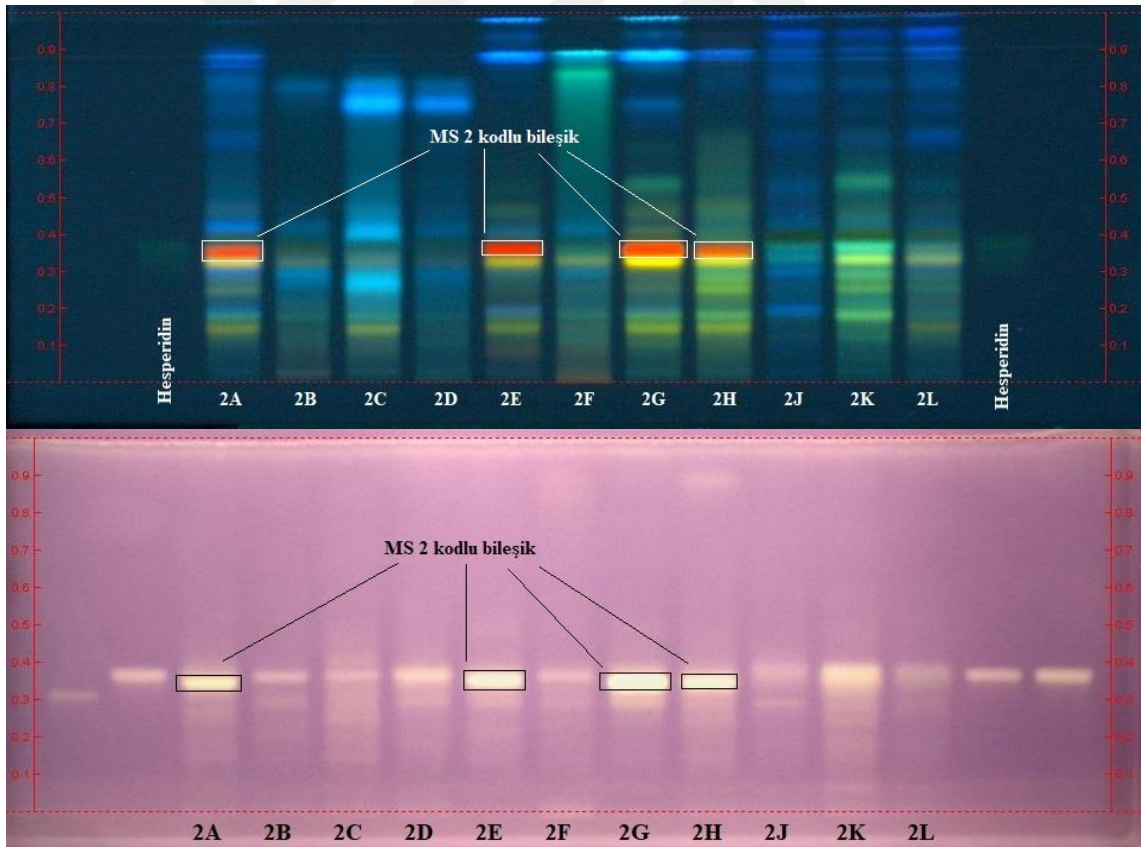


Şekil.4.38. Hesperidin için Q1 taraması ve kütle spektrumu



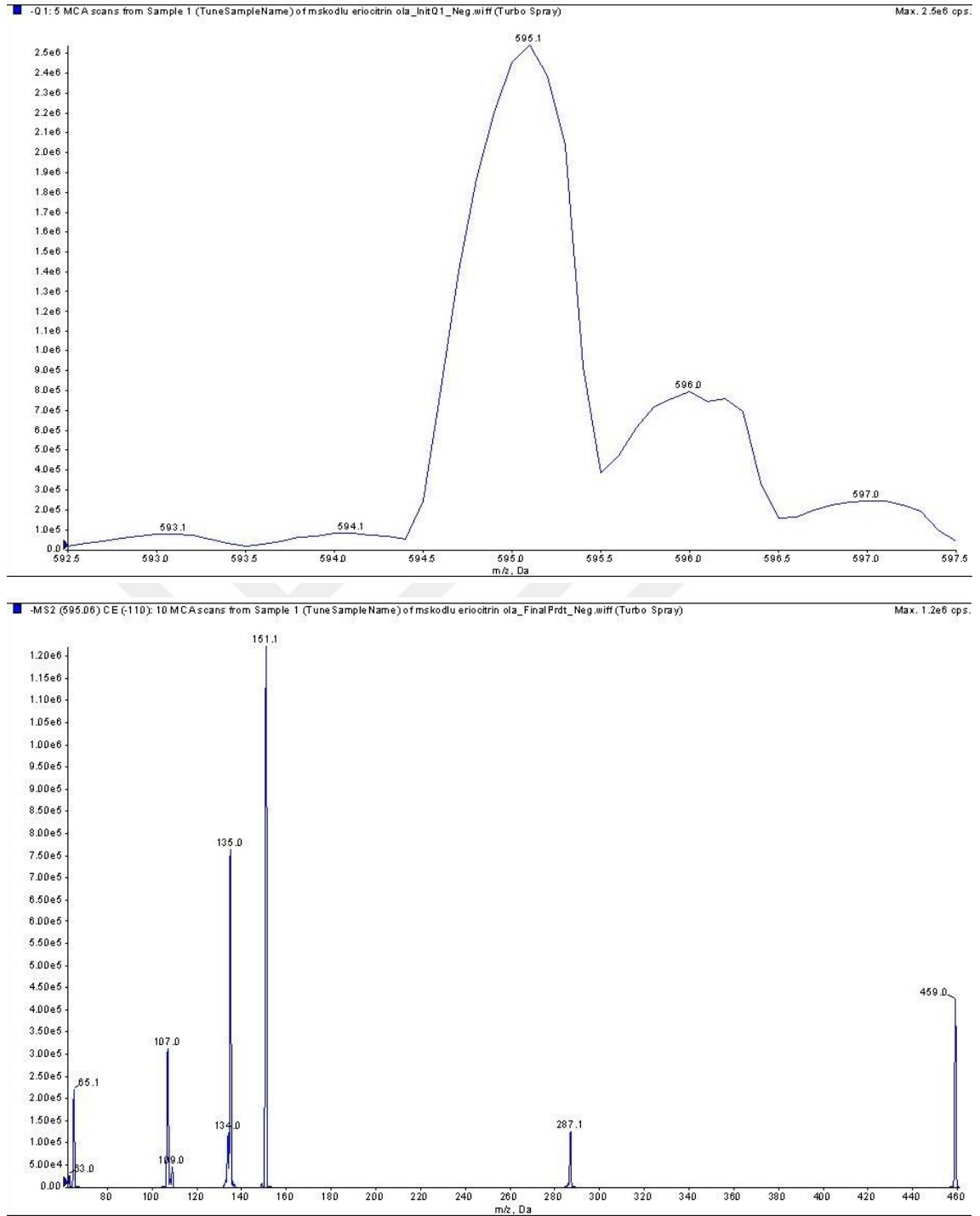
Şekil 4.39. Hesperidin'e ait parçalanmalar

4.6.1.2. Ekstrelerde DPPH• süpürücü etki gösteren ikinci bileşiğin (MS-2) KS analizi

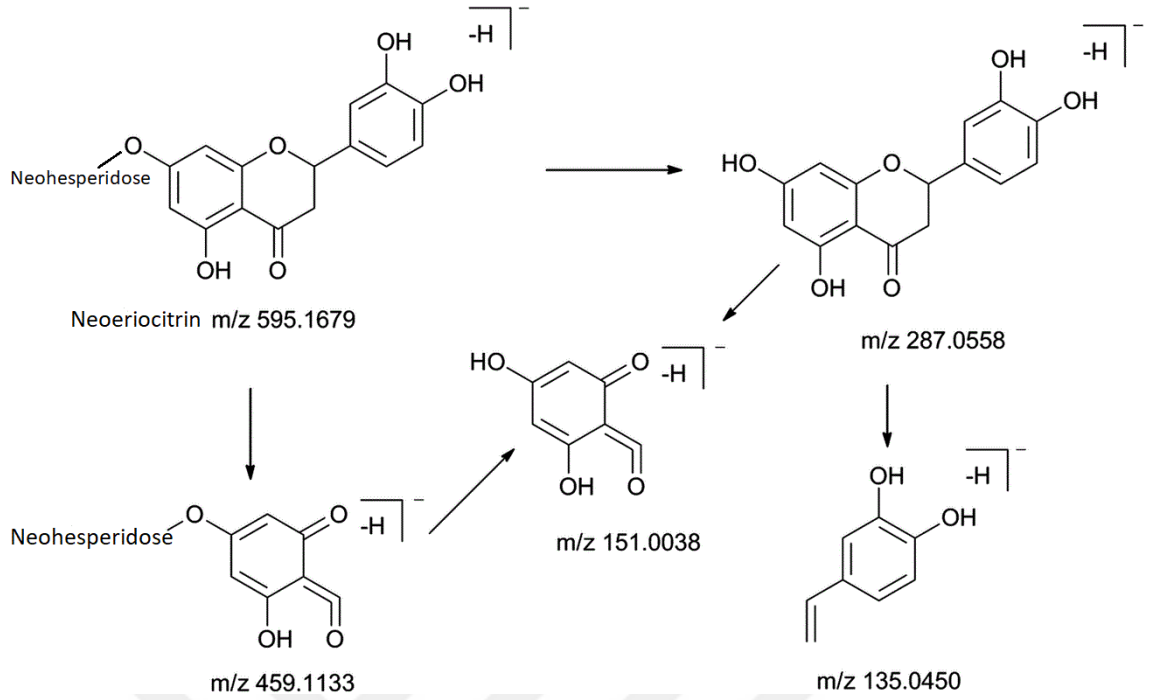


Şekil 4.40. DPPH• süpürücü etkisi belirlenen MS 2 kodlu bileşik (1A, turunc ekstresi; 1B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, robinson mandarini; 1D, Washington portakalı; 1E, kütiken limonu; 1F, tatlı limon; 1G, bergamot ekstresi; 1H, etnak ekstresi; 1J, starruby greyfırt; 1K, pomelo ekstresi; 1L, oroblanco ekstresi; ekstrere 10 µl uygulanmıştır)

Plaklarda DPPH radikali süpürücü etkisi hesperidine oranla daha yüksek olduğu gözlenen MS-2 kodlu bileşik, YPİTK-preparatif çalışma ile metanolle plaktan ekstre edilmiştir. Metanollü karışım, Kütle Spektroskopisi analizi için manuel enjeksiyon ile sisteme verilmiştir. Q1 taraması negatif modda yapılarak $[M-H]^-$ pikleri total iyon kromatogramında (TIC) araştırılmıştır. Total iyon kromatogramında m/z 595 $[M-H]^-$ iyon pikinin yoğunluğu diğerlerine göre yüksek olarak belirlenmiştir. Bileşiğin kütle spektrumunun alınabilmesi için bileşik optimizasyonu negatif modda yapılmıştır. Elde edilen spektrum (Şekil 4.41.) değerlendirildiğinde, m/z 595 $[M-H]^-$ moleküler iyon pikinin fragmentleri m/z 459 $[M-H-136]^-$, m/z 287, m/z 151, m/z 135, m/z 107, m/z 65 görülmektedir. Literatür araştırmaları sonucunda NP/PEG türevlendirmesi ile oluşan kırmızı bantların *Citrus* türlerinde eriodiktiyol türevi bileşikler olarak yorumlandığı dikkate alınarak, m/z 287 $[M-H-308]^-$ fragmentinin varlığı yapıdan kopan disakkarit sonucunda eriodiktiyol aglikon yapısı olarak yorumlanmıştır. Ayrıca yine m/z 287 aglikonundan koparak oluşan m/z 151 ve m/z 135 fragmentleri eriodiktiyol aglikon yapısını kuvvetlendirmektedir. Bileşiğin eriositrin/neoeriositrin'in karakteristik parçalanmalarını verdiği ve m/z 459 ile m/z 287 fragmentlerinin yoğunluklarına bakılarak m/z 287 piki oldukça düşük yoğunlukta bulunduğu için bileşiğin neohesperidoz türevi şeker taşıdığı düşünülmüştür (Şekil 4.42). Bu bilgiler altında bileşik neoeriositrin olarak yorumlanmıştır [242].



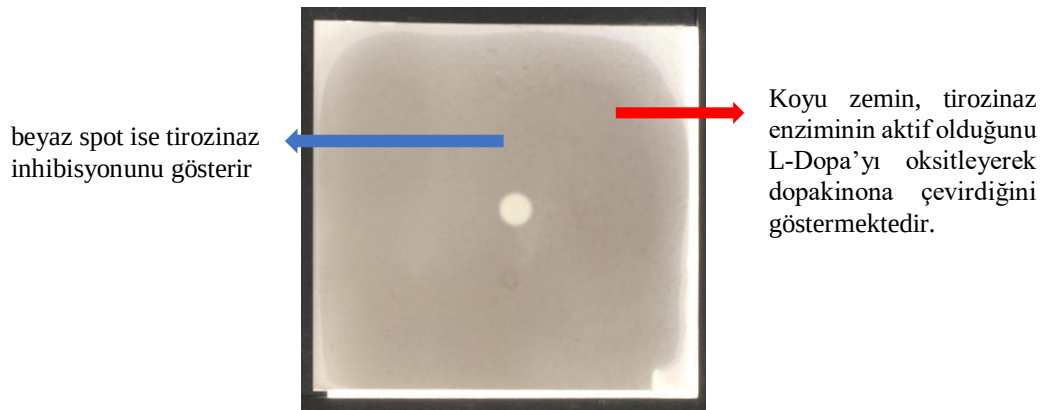
Şekil 4.41. MA'sı 596 olan MS 2 kodlu bileşiğin Q1 taraması ve kütle spektrumu



Şekil 4.42. Neoiriositrin'e ait karakteristik parçalanma ürünleri

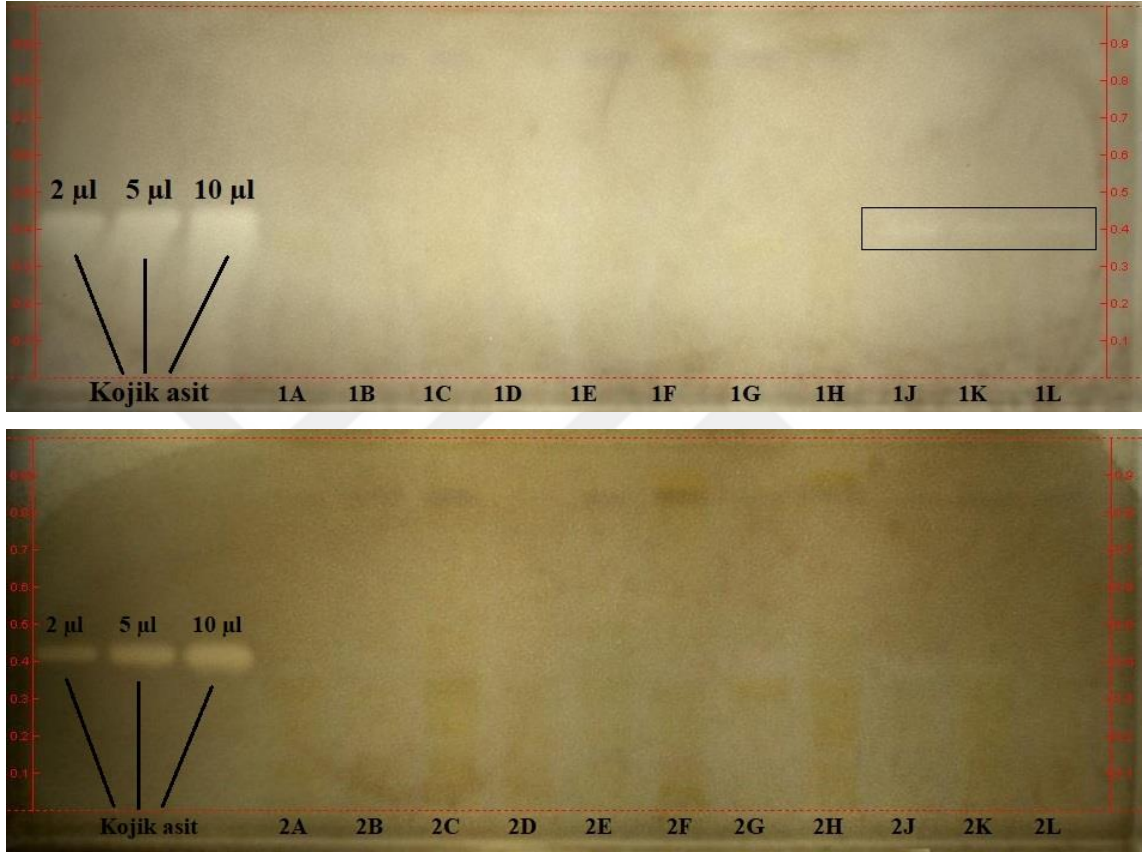
4.6.2. Biyootografik YPİTK-Tirozinaz enzim inhibisyonuna ait bulgular

Ayrımı yapılan ve kurutulan plaklara, önce tirozinaz enzimi plak yüzeyinde ıslak bir alan oluşturmayacak homojen bir şekilde püskürtülmüştür. Ardından Triton-X ile hazırlanan L-Dopa çözeltisi plak yüzeyine yine ıslak bir alan oluşturmayacak şekilde homojen püskürtülmüştür. Püskürtme işlemlerinin sonunda enzime uygun koşullarda plak inkübasyona bırakılmış ve ardından 5 dk azot gazına tutulmuştur.



Şekil 4.43. Biyootografik olarak plakta tirozinaz inhibisyonunun değerlendirilmesi

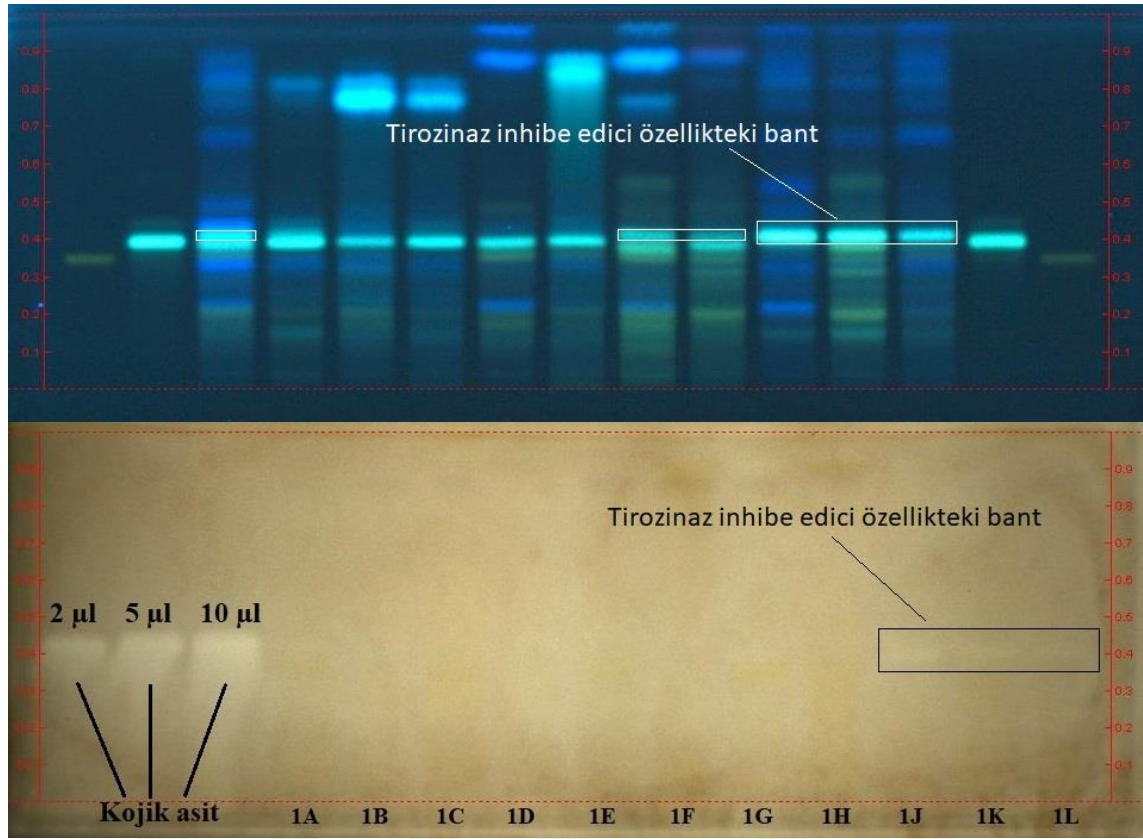
Elde edilen plaklar beyaz ışıkta değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak, tirozinaz enzim inhibitörü olarak kojik asit tercih edilmiştir. Plaklara 1 mg/ml konsantrasyonda metanolde hazırlanan kojik asit 2 µl, 5 µl ve 10 µl uygulanmıştır.



şekil 4.44. Enzim ve substrat çözeltileri püskürtülen plakların inkübasyon sonrası beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü (1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütdiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 30 µl uygulanmıştır)

Plaklara uygulanan ekstreler 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanmıştır, bu ekstrelerin uygulanma miktarı 30 µl olarak belirlenmiştir. 150 µg uygulanan ekstreler incelendiğinde, starruby greyfurt, pomelo ve oroblanco ekstrelerinde tirozinaz enzimini çok zayıf şekilde inhibe eden ve aynı Rf değerine sahip bantlar gözlenmiştir. Bu bileşiğin tanımlanmasında Kütle Spektroskopisi kullanılmıştır.

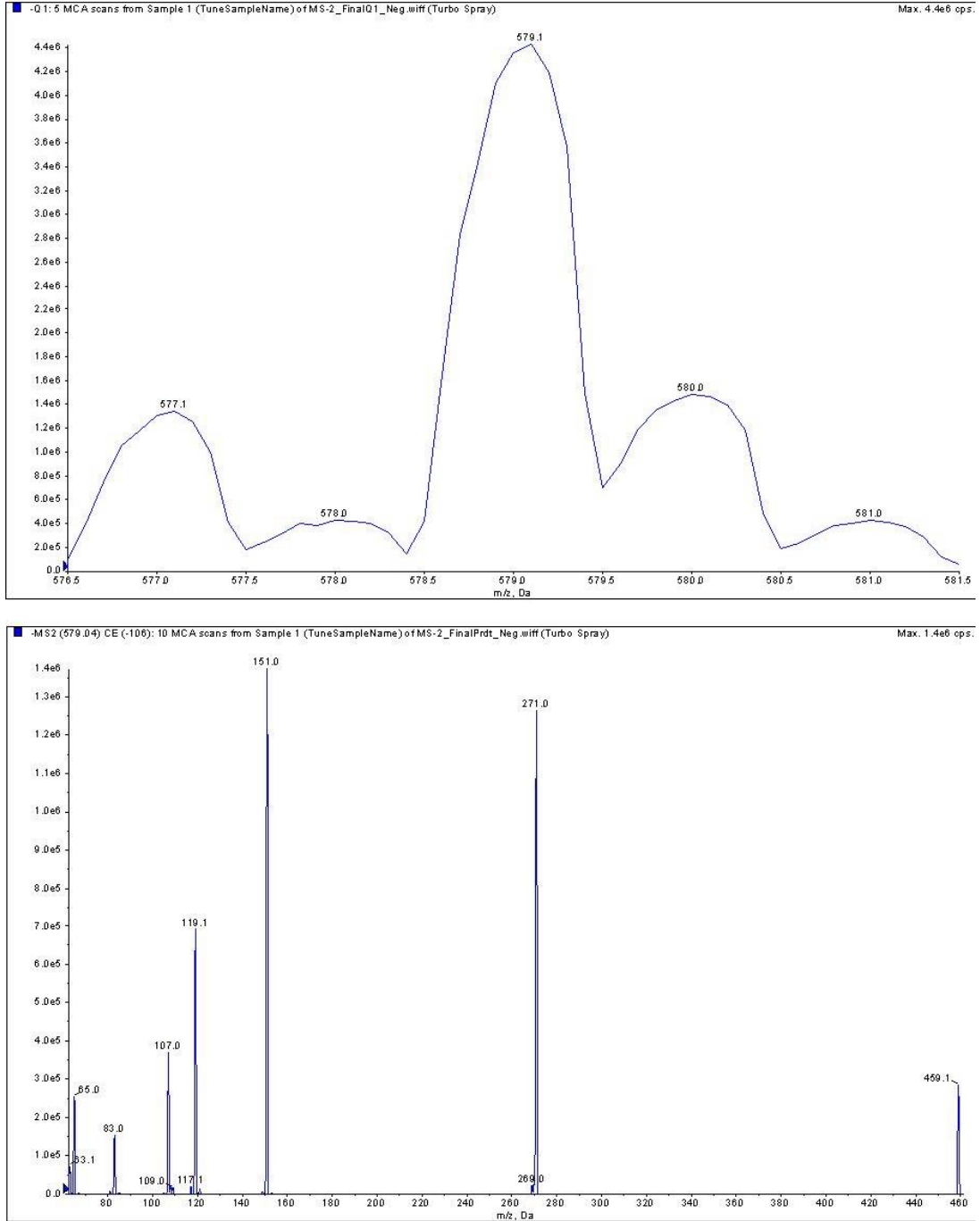
4.6.2.1. Tirozinaz inhibisyonu gözlenen bileşğin KS analizi



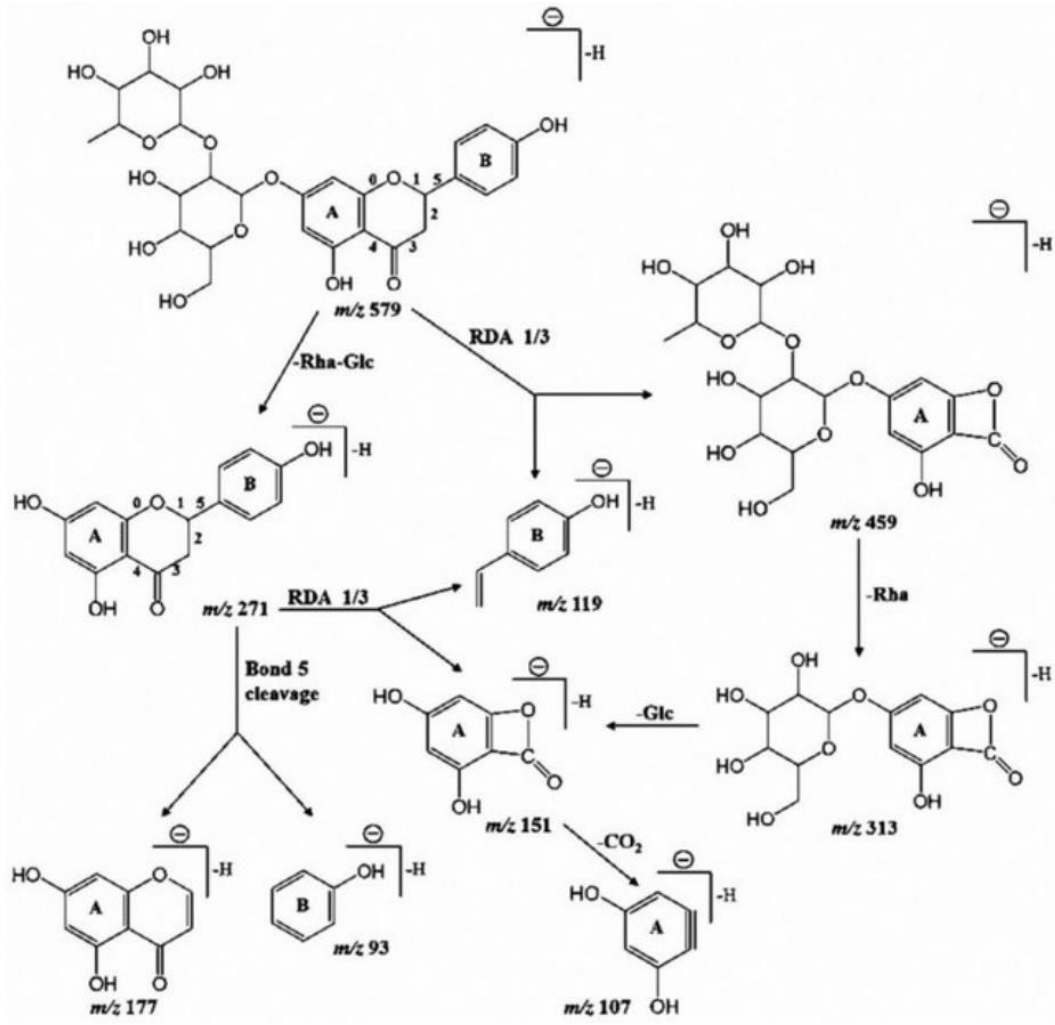
Şekil 4.45. Tirozinaz inhibe edici bant, 2A, turunc ekstresi; 2B, satsuma mandarini ekstresi; 2C, robinson mandarini; 2D, Washington portakalı; 2E, kütdiken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 30 µl uygulanmıştır)

Tirozinaz enzim inhibisyonu yapan bileşik, YPİTK-preparatif çalışma ile metanolle plaktan ekstre edilmiştir. Metanollü karışım, Kütle Spektroskopisi'ne manuel enjektör ile uygulanmıştır. Kütle spektroskopisi'nde ilk olarak pozitif ve negatif modlarda Q1 MS analizi yapılmıştır. Elde edilen total iyon kromatogramları (TIC) değerlendirildiğinde negatif modda bir pikin yüksek yoğunluğa sahip olduğu belirlenmiştir. Bu taramada miktarı oldukça yüksek olan m/z 579 $[M-H]^-$ pikinin fragmentlerine parçalanması için bileşik optimizasyonu yapılmıştır. Bu analiz sonucunda maddenin kütle spektrumu (şekil 4.44) elde edilmiştir. Spektrum değerlendirildiğinde, m/z 271 $[M-H-308]$, m/z 151 $[M-H-308-120]$ piklerinin majör pikler olduğu dikkat çekmektedir. m/z 271 $\rightarrow$ 151 parçalanmaları karakteristik olarak naringenin'e ait olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, spektrumda görülen m/z 119, m/z 107 ve

m/z 83 piklerinin de naringenin'e ait olduğu fikrini desteklemiştir (Şekil 4.45). Fragmentler oluşurken 308 amu'luk farkın moleküler iyon pikinden neohesperidozit kopmasını işaret etmektedir. Çünkü 308 amu'luk fark sadece neohesperidozit kopmalarında görülmektedir. Bu nedenle molekül ağırlığı 580 olan madde naringin (naringenin neohesperidozit) olarak yorumlanmıştır [242, 243].



Şekil 4.46. Naringin'e ait Q1 taraması ve kütle spektrumu



Şekil 4.47. Naringin'e ait parçalanma ürünleri ve m/z değerleri

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Ülkemiz, *Citrus* cinsine ait türlerin yetiştirilmesi için oldukça elverişli bir iklime ve toprak yapısına sahiptir. Dünyada ve ülkemizde meyvelerin, pazar payı yüksek ve ekonomik öneme sahip olduğu bilinmektedir.

Meyveler, halk arasında gıda olarak kullanımlarının yanı sıra endüstriyel olarak işlenerek gıda sanayiinde değerlendirilmektedir. Uçucu yağlarının parfümeride, gıda ve içecek sanayiinde tat ve koku verici olarak, kozmetik sanayiinde geniş bir kullanım alanına sahiptir. Ayrıca uçucu yağlar iyi birer limonen kaynağı olarak değerlendirilmektedir. *Citrus* meyvelerinin C vitamini ve B vitaminlerince zengin oluşu ve iyi bir folat kaynağı olarak tüketildiği bilinmekte, ayrıca taşıdığı diyet liflerinden dolayı besinsel lif kaynakları arasında görülmektedir. Meyvelerin kabuk uçucu yağları, pektik polisakkaritleri (pektin), flavonoidleri ve organik asitleri üzerine hem de sağlık üzerine etkileri araştırmalarla ortaya konulmakta ve bu tür çalışmalar güncelliğini korumaktadır [57, 244-247]. Ayrıca *Citrus* türlerinin yaprakları, çiçekleri, kabukları ve çekirdekleri de araştırmacıların ilgi odağındadır [73].

Dünya meyve ticaretinde büyük bir paya sahip olan bu türlerin meyveleri gıda olarak tüketildikten veya çeşitli endüstriyel alanlarda işlem gördükten sonra kabukları ve çekirdekleri atık olarak ortaya çıkmaktadır. Ancak kabukların çeşitli fitokimyasallar bakımından zengin oldukları, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip oldukları literatür ile de desteklenmektedir. Atık olarak ortaya çıkan bu kabukların tekrar endüstriyel alanda değerlendirilebilirliği, yapısında bulundurduğu çeşitli biyoaktif bileşiklerinin izolasyonu veya biyolojik aktiviteleri doğrultusunda halk arasında veya piyasaya sürülebilecek bir preparat olarak kullanılabilirlik potansiyeli yüksek görülmektedir.

Ülkemizde özellikle Ege ve Akdeniz Bölgeleri'nde yetiştirilen *Citrus* cinsine ait tür ve çeşit sayısı günden güne artmaktadır. Meyveler halk arasında taze olarak yenilmekte ya da meyve suyu şeklinde tüketilmektedir. Ayrıca endüstriyel olarak işlenmiş ürünler de sıklıkla kullanılmaktadır. Bilimsel çalışmalar değerlendirildiğinde, ülkemizde ziraat alanında yapılmış projeler (meyve kalitesi, toprak özellikleri, yetiştiricilik vb) ve tezler dikkat çekmekle birlikte az sayıda fitokimyasal çalışmaya rastlanmıştır. Bu doğrultuda, tez kapsamında meyve kabuklarının değerlendirilerek potansiyel etkilerinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Taze kabuklardan, %80 metanol ile hem maserasyon hem de hızlandırılmış çözünürlü ekstraksiyon yöntemleri (ASE) ile ekstraktlar hazırlanmıştır. Hazırlanan ekstraktlar verim, toplam fenolik bileşikleri ve toplam

flavonoit miktarları bakımından karşılaştırılmıştır. Tüm ekstraksiyon sürecinde ASE yönteminde ekstraksiyon başına ortalama 180 ml çözücü harcandığı maserasyonda ise 300 ml çözücü harcandığı ve maserasyon ile ekstraksiyonun 48 saat sürerken ASE’de ekstraksiyon başına 20 dk harcanması dikkat çekmektedir. Ekstraksiyon işleminde zamandan kazanç sağlaması, kullanılacak daha az miktardaki çözücüler sayesinde maliyeti düşürmesi ve ayrıca yine çözücü miktarının azalması ile birlikte çevreye verilecek kirliliğin azalması nedeniyle ASE yönteminin daha avantajlı olduğu yorumlanmıştır. Ekstre verimleri açısından değerlendirildiğinde, meyve türüne göre değişiklik belirlense de genel olarak ASE yöntemiyle elde edilen ekstrelerin verimleri daha yüksek bulunmuştur. Toplam fenolik madde bakımından değerlendirildiğinde ise maserasyon yöntemiyle (oda sıcaklığında) elde edilen ekstrelerin daha zengin olduğu hesaplanmıştır. ASE yönteminde uygulanan sıcaklığın ekstrelerin toplam fenolik madde miktarını düşürdüğü şeklinde yorumlanmıştır. Ekstreler arasındaki genel karşılaştırmaya göre ise pomelo, etnak, bergamot, robinson mandarini ve turunç en yüksek fenolik içeriğe sahip ekstreler olarak bulunmuştur. Toplam fenol miktar tayini sonuçlarına paralel olarak etnak, pomelo, bergamot ve robinson mandarini yine en yüksek flavonoit içeriğine sahip türler iken tatlı limon (maserasyon yöntemiyle elde edilen ekstrede miktar daha düşük) da yüksek flavonoit içeriği ile dikkat çekmiştir.

Ekstrelerin kromatografik analizleri için Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (YPİTK) yöntemi tercih edilmiştir. Fazla sayıdaki ekstrenin tek bir plak üzerinde analizine olanak sağlayan, hızlı ve maliyeti diğer kromatografik yöntemlere göre daha düşük olan bu yöntemde, ayırımın optimizasyonu ve ‘parmak izi’ analizinin gerçekleştirilebilmesi için literatüre dayalı olarak çeşitli metotlar denenmiştir. Bu metotlar arasında değiştirilen birincil parametre mobil fazdır. Çeşitli mobil fazlar denendikten sonra etil asetat:asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26, *h:h:h:h*) en uygun çözücü sistemi olarak seçilmiştir. Farklı olası bileşik gruplarının belirlenebilmesi için spesifik veya spesifik olmayan türevlendirme reaktifleri kullanılmıştır.

Kabuk ekstrelerinin potansiyel biyolojik aktivitelerinin araştırılmasında *in vitro* antioksidan ve tirozinaz enzim inhibisyonu yöntemleri planlanmıştır. Son yıllarda, anti-aging, detoksifikasyon gibi kavramlara olan ilginin artması ve özellikle doğal kaynaklı antioksidanlar üzerine çalışmaların yoğunlaşmasına neden olmuştur. Tirozinaz enzimi ise melanin pigmentinin biyosentez sürecinde rol oynayan önemli bir enzimdir. Melanin pigmentinin aşırı üretildiği durumlarda hiperpigmentasyona bağlı olarak çeşitli

rahatsızlıklar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle tirozinaz enziminin inhibisyonu klinik açıdan önem taşıdığı kadar kozmetik anlamda da leke açıcı ürünler açısından değer taşımaktadır. Ayrıca, tirozinaz inhibitörleri gıda endüstrisinde bitki kararmalarını önlemek amacıyla kullanılabilmektedir.

Bu çalışmada, ekstrelerin biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesinde spektrofotometrik ve YPİTK ile kombinlemiş biyootografik metotlar uygulanmıştır. Bu sayede, kromatografik olarak ayrımı gerçekleştirilen ekstrelerin biyolojik aktiviteleri doğrudan plak üzerine uygulandığından etkiden sorumlu bileşiklerin tanımlanması hedeflenmiştir.

Spektrofotometrik yöntemle DPPH radikali süpürücü etki tayininde tüm türlerin maserasyon ekstreleri ASE ekstrelerine oranla daha aktif çıkmıştır. Etnak ekstresi (hem ASE, hem maserasyon) en yüksek aktiviteye sahip ekstre olarak bulunmuştur. Ona çok yakın değerlerde DPPH radikali süpürücü aktivite gösteren diğer türler ise pomelo ve bergamot maserasyon ekstreleridir. Ayrıca maserasyon ekstrelerinden etnak ve pomelonun en yüksek fenolik madde ve flavonoit içeriğine sahip olması DPPH• süpürücü etkide de en iyi sonuçları vermeleri bakımından önemlidir ve pozitif korelasyon belirlenmiştir. Ayrıca flavonoit miktar tayininde etnak ve pomelo dışında yüksek iki içeriğe sahip ekstre bergamot ve tatlı limon olarak bulunmuştur. Buna paralel olarak DPPH radikali süpürücü etkide de bu iki ekstre etnak ve pomelodan sonra en etkili ekstreler olarak belirlenmiştir. Ekstrelerin DPPH• süpürücü etkileri pozitif kontrol olarak kullanılan C vitamini ve gallik asit ile karşılaştırılabilir bir seviyede değildir.

YPİTK ile kombine biyootografik metotlarda YPİTK deneylerinde etil asetat:asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26 h:h:h:h) mobil fazı ile elde edilen ayırım üzerinden devam edilmiştir. DPPH• çözeltisine daldırılan plak üzerinde oluşan beyaz bantlar radikal süpürücü etkiye sahip maddeler olarak yorumlanmıştır. Plaklarda, ekstrelerde iki farklı bandın DPPH'ın rengini soldurduğu ve DPPH radikalini süpürücü etkileri gözlenmiştir. Bu bantlardan ilki MS-1 olarak isimlendirilmiş ve satsuma mandarini, robinson mandarini, Washington portakalı ve tatlı limon ekstrelerinde belirlenmiştir. MS-1 kodlu bileşiğin hesperidin ile aynı Rf değerine sahip olduğundan hesperidin olabileceği yorumlanmıştır. Preparatif-İTK yöntemiyle plaktan izole edilen MS-1 kodlu bileşiğin Kütle Spektroskopisi ile analizlerinde karakteristik kütle parçalanmaları yorumlanarak ve standart hesperidin ile karşılaştırıldıktan sonra hesperidin olduğu belirlenmiştir. Hesperetin aglikon yapısının 7-O-rutinozit glikoziti olan

hesperidin çoğu *Citrus* türünde bulunmaktadır. Bu türler için karakteristik olan bu flavanon yapısı bazı *Citrus*'larda da 7-O-hesperidozit glikoziti olan neohesperidin formunda bulunur.

Hesperidine çok yakın Rf değerine sahip ve turunç, küt diken limonu, bergamot ve etnak ekstrelerinde ortak olarak belirlenen ikinci bir bant MS-2 koduyla isimlendirilmiştir. MS-2 kodlu bileşik, NP/PEG ile türevlendirmeden bir süre sonra kırmızı renk almaktadır. MS-2 kodlu bileşik preparatif-İTK ile izole edildikten sonra Kütle Spektroskopisi ile analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen karakteristik parçalanmalar ve literatür taramaları ile örtüşen sonuçlara göre bileşik neoeriositrin olarak yorumlanmıştır. Bu bileşiğin özellikle bergamotta yoğun bir ışımaya sahip olduğu görülmüştür. Literatür bilgileri doğrultusunda neoeriositrin'in bergamot kabuklarının sulu alkolik ekstrelerinde oldukça yoğun bulunması da elde edilen sonuçlarla örtüşmektedir [119]. Ayrıca neoeriositrin'in bergamot dışında turunç [248] türlerinde de yoğun olarak bulunduğu ancak limon türlerinde özellikle kabuk kısmında eriositrin'e oranla daha az ve nadir bulunduğu gösterilmiştir [249, 250].

Flavonoitlerin en iyi bilinen özelliklerinden biri de antioksidan aktiviteleridir. Bu aktivitelerini birçok farklı mekanizma ile gösterebilmektedirler. Tez kapsamında bu özellikleri DPPH• radikalini süpürücü etkileri üzerinden araştırılmıştır. Radikal süpürücü etkilerden sorumlu bileşikler başlıca hesperidin ve eriositrin/neoeriositrin olarak bulunurken aktiviteye katkı sağlayan başka minör bantların da olduğu görülmüştür. Ayrıca starruby greyfurtu, pomelo ve oroblanco ekstrelerinde hesperidin'in hemen üstünde bant veren ve ayrıca antitirozinaz aktivite ile ilişkili olarak tanımlanan naringin, yine bu ekstrelerde radikal süpürücü etkiye katkı sağlayan bileşik olarak tanımlanmıştır. Ekstrelerin spektrofotometrik ve biyootografik antioksidan aktiviteleri karşılaştırıldığında özellikle (pomelo ekstresi dışında), neoeriositrin içeren ekstrelerin antioksidan aktivitelerinin diğer ekstrele göre daha kuvvetli olduğu görülmüştür. Buna paralel olarak biyootografik DPPH radikal süpürücü etki yönteminde tanımlanan neoeriositrin'in oldukça kuvvetli bir beyaz zon'a sebep olduğu görülmektedir. Ayrıca literatür taramalarında da bu bileşiğin hesperidin ve naringin'e göre daha iyi bir radikal süpürücü etkiye sahip olduğu bulunmuştur [251]. Hesperidin, naringin veya neoeriositrin gibi flavonoitlerin antioksidan aktiviteleri arasındaki farklılıkların yapılarıyla ilişkileri incelendiğinde ise başlıca farklılığın içerdikleri -OH (hidroksil) gruplarının sayısı ve pozisyonuyla alakalı olabileceği düşünülmektedir. Bu bileşiklerin ortak noktası A

halkasında 5 pozisyonunda bir hidroksil grubu içermeleri ve yine A halkasının 7 pozisyonundaki disakkarit içeriğidir. C halkasındaki karakterleri ise flavanon türevi olmalarıyla alakalı olarak aynıdır. B halkasında ise 3' ve 4' konumlarının taşıdığı sübstitüe gruplar ana farklılıklarını oluşturmaktadır. Naringin yalnızca 3' konumunda bir hidroksil grubu taşıırken hesperidin 3' hidroksil grubuna ek olarak 4' konumunda bir metoksi (-OCH₃) grubu içerir. Eriositrin veya neoeriositrin gibi eriodiktiyol aglikonuna sahip bileşikler ise hem 3' hem de 4' konumlarında hidroksil grubu taşırlar. Bir flavonoit'in iyi bir antioksidan özellik taşıması için gerekli kilit özelliklerden biri de B halkasındaki 3',4' dihidroksi yapısıdır. Bu sebeple bu molekülün radikal süpürücü etkisinin diğer ana *Citrus* flavanonlarına oranla daha yüksek olmasının B halkasındaki hidroksil sayısı ve pozisyonlarıyla ilişkili olabileceği yorumu yapılmıştır.

Spektrofotometrik tirozinaz enzim inhibisyonu deneylerinde iki farklı konsantrasyonda denenen ekstrelerde doza bağımlı bir inhibisyonun olduğu gözlenmiştir. Özellikle bergamot, pomelo ve etnak ekstreleri 10 mg/ml konsantrasyonda yüksek bir inhibisyon gösterirken 5 mg/ml konsantrasyonda doza bağımlı olarak inhibitör özelliklerinin azaldığı görülmüştür. Washington portakalının ASE ekstreleri 10 mg/ml konsantrasyonda %9'luk bir inhibisyon yaparken bu etki 5 mg/ml'de ortadan kalkmıştır. 10 mg/ml konsantrasyonda % inhibisyon değerleri neredeyse her tür için %50'nin üzerindeyken bergamot (%95), pomelo (%89), etnak (%81) ve tatlı limon (%81) en etkili türler olarak bulunmuştur. Ancak tüm bu değerler pozitif kontrol olarak kullanılan kojik asit ile karşılaştırılabilir değildir. *Citrus hassaku* Hort. Tanaka üzerine yapılan bir çalışmada *Citrus* flavonoitlerinin antitirozinaz aktiviteleri çalışılmıştır. %50 etanol ekstresinin IC₅₀ değeri 4.7 mg/ml hesaplanırken fraksiyonlama ile etkiden sorumlu bileşikler izole edildiğinde, naringin'in tirozinaz inhibisyonu IC₅₀ 1.9 mM, narirutin'in 2 mM olarak bulunmuştur [252]. Bir başka çalışmada robinson mandarini kabuğundan hazırlanan %80 etanol ekstresinin 4 mg/ml konsantrasyonda %27 oranında inhibisyon gösterdiği bulunmuştur [94]. *C. hystrix* Chakr., *C. maxima* (kırmızı) ve *C. maxima* (beyaz) meyvelerinin suyu antitirozinaz aktivite açısından değerlendirildiğinde 200 µl meyve sularının %77 ile %80 arasında bir inhibisyon yaptıkları gözlemlenmiştir [134]. Genel olarak *Citrus* türlerinin doza bağımlı tirozinaz inhibisyonu yaptıkları ancak bu inhibisyonun zayıf olduğu söylenebilir.

Biyootografik tirozinaz deneylerinde ayrımlar yine etil asetat:asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26) çözücü sisteminden oluşan mobil faz ile sağlanmıştır. Tirozinaz

inhibisyonları doza bağımlı olduğu için etkinin olup olmadığını gözlemleyebilmek amacıyla ekstralar 30 µl uygulanmış ancak ekstralarda spektrofotometrik sonuçlara paralel olarak tek bir istisna dışında aktivite gözlemlenmemiştir. Starruby greyfurtu, pomelo ve oroblanco ekstralarında hesperidinin hemen üstünde Rf 0.42 değerinde bant veren maddenin tirozinaz inhibisyonu yaptığı belirlenmiştir. Preparatif-İTK ile izole edilerek KS ile incelenen madde karakteristik parçalanmaları ve literatür bilgilerine dayanarak naringin olarak tanımlanmıştır. Spektrofotometrik yöntemlerle *C. hassaku* Hort. ex Tanaka meyvesinin tirozinaz inhibisyonunun araştırıldığı ve fraksiyonlama ile naringin'in etkili bileşik olarak bulunduğu çalışma ile çalışmamız benzer sonuçlar taşımaktadır [252]. Naringin bir naringenin 7-O-neohesperidozit glikozitidir ve *Citrus* türlerindeki acı tat ile ilişkilendirilir. Greyfurt türlerinin (starruby greyfurtu, pomelo ve oroblanco gibi) ana flavanon glikozitidir. Yapılan birçok çalışma greyfurt türlerinin yanı sıra turunç, bergamot ve diğer *Citrus* türlerinin de naringin içerdiğini göstermiştir [242, 253-255]. Preparatif yöntemler ile saflaştırma ve naringinin tek başına inhibisyonunun araştırılması için daha yüksek miktarlarda meyve ile çalışmak planlanmaktadır.

Ayrıca yapılan biyootografik tirozinaz sonuçları spektrofotometrik sonuçlarla karşılaştırıldığında naringin taşıyan türlerden pomelonun her iki yöntemle birlikte iyi bir korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ancak spektrofotometrik yöntem ile pomelodan daha aktif çıkan bergamot veya biraz daha az aktif çıkan etnak ve tatlı limon ekstralarına bakıldığında daha yüksek konsantrasyonlarda aktiviteye katkıda bulunan başka bileşiklerin de olabileceği düşünülmektedir. Naringin *Citrus* türlerinde antitirozinaz aktiviteden sorumlu bileşikler arasından en etkilisi olmakla birlikte literatürde çalışılan hesperidin, narirutin ve nobiletin veya bunlar dışındaki başka bileşiklerin de ekstre içinde aktiviteye katkıda bulunması söz konusudur.

Son yıllarda bitkisel ekstralarda biyolojik aktivite yönlendirmeli fraksiyonlama ve izolasyon çalışmaları popülerlik kazanmıştır. Ekstrelerin biyolojik aktivitelerinden sorumlu biyoaktif bileşik/bileşiklerin belirlenmesi, doğal kaynaklı ve tedavide kullanılma potansiyeli olabilecek aday bileşiklerin araştırılmalarına öncülük etmektedir. YPİTK-biyolojik aktivite metotları da aktivite-yönlendirmeli araştırmalar arasında yer almaktadır. Bu yöntemin avantajı kısa sürede, düşük maliyetle, etkili bir şekilde biyolojik hedef-bileşik ilişkisinin kurulmasının sağlanmasıdır. Özellikle optimizasyonu sağlanmış, güvenilir ve tekrarlanabilir kromatografik ayrımlar YPİTK metodu ile gerçekleştirilmektedir. Biyolojik hedefin biyootografik metotlara transferinin sağlanması

ve yöntemin geliştirilmesi ile kromatografik olarak ayrımı gerçekleştirilmiş birden fazla (maksimum 15) örneğin aynı plak üzerinde değerlendirilmesi sağlanabilmektedir. Biyolojik hedef-bileşik ilişkisi plak üzerinde doğrudan görülebilmektedir. Bu tür deneysel çalışmalar, toplam maliyeti düşürmekle birlikte kısa sürede aktiviteden sorumlu bileşiğin tanımlanmasına da olanak sağlamaktadır. YPİTK sistemleri, UV-spektrofotometrelerle kombine halde kullanılmakta (densitometrik çalışmalar) iken son yıllarda kütle spektroskopisi, nükleer manyetik rezonans gibi spektroskopik yöntemlerle kombine halde bileşiklerin tanımlanmasında rol oynamaktadır.

Ekonomik değeri iyi bilinen ve taşıdığı biyoaktif fitokimyasallar nedeniyle terapötik potansiyelleri olan *Citrus* türlerine ait örneklerin araştırılması konusu ülkemiz araştırmacıları açısından da önemlidir. Bu nedenle *Citrus* türlerinin potansiyellerinin iyi değerlendirilmesi ve farklı biyolojik aktivitelerinin belirlenerek farmasötik alanda kullanılabilirliği değerlendirilmelidir.

KAYNAKÇA

- [1] Davis, P.H., Mill, R. R. ve Tan, K. (1988) *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. Edinburgh: Edinburgh University Press. 495-508.
- [2] Dugo, G. ve Di Giacomo, A. (2002) *Citrus: the genus citrus*: CRC Press.
- [3] Ladanyia, M. (2010). *Citrus fruit: biology, technology and evaluation*: Academic press.
- [4] Baker, E.A., Procopiou, J., ve Hunt, G.M. (1975). The cuticles of Citrus species. Composition of leaf and fruit waxes. *J. Sci. Food Agric.*, 26(8), 1093-1101.
- [5] Scott, F.M., ve K.C. Baker. (1947) Anatomy of Washington navel orange rind in relation to water spot. *Botanical Gazette*, 108(4), 459-475.
- [6] Morton, J.F. ve C.F. Dowling. (1987). *Fruits of warm climates*. Vol. 20534: JF Morton Miami, FL.
- [7] Karthikeyan, V. ve J. Karthikeyan. (2014). *Citrus aurantium* (Bitter Orange): A Review of its Traditional Uses. *Phytochemistry and Pharmacology*, 4(4), 766-772.
- [8] Swingle, W.T., (1967). *The botany of citrus and its wild relations*. The citrus industry, 1: 190-422.
- [9] Ladaniya, M.S., (2008). *Commercial fresh citrus cultivars and producing countries*. *Citrus Fruit: Biology, Technology and Evaluation*. San Diego: Academic Press.
- [10] Roussos, P.A., (2016). *Orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck)*, in *Nutritional Composition of Fruit Cultivars*. Academic Press, 469-496.
- [11] Caballero, B., Trugo, L.C., ve Finglas P.M. (2003). *Encyclopedia of food sciences and nutrition*. Academic press.
- [12] Dev, C. ve Nidhi, S., (2016). Basketful benefit of citrus limon. *International Research Journal of Pharmacy*, 7(6): 1-3.
- [13] Ancillo, G. ve A. Medina. (2014). *Los cítricos*. Universitat de València, Jardí Botànic.
- [14] Bagetta, G., Morrone, L.A., Rombolà, L., Amantea, D., Russo, R., Berliocchi, L., Sakurada, S., Sakurada, T., Rotiroti, D., and Corasaniti, M.T., (2010) Neuropharmacology of the essential oil of bergamot. *Fitoterapia*, 81(6): 453-461.
- [15] Bölükbaşı, Ş.C., Ürüştan, H., Erhan, M.K., ve Kızıltunç, A., (2010) Effect of dietary supplementation with bergamot oil (*Citrus bergamia*) on performance and

- serum metabolic profile of hens, egg quality and yolk fatty acid composition during the late laying period. *European Journal of Poultry Science*, 74, 172-177.
- [16] Dianxiang, Z. ve Mabberley, D., (2018). *CITRUS Linnaeus, Sp. Pl. 2: 782. 1753. Flora China*, 90-96.
- [17] Lim, T., (2012) *Citrus medica*, in *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. Springer, 682-689.
- [18] Ng, T.B., Bekhit, A.E., Fang, E.F., Li, X., Lu, Q., Guo, H., ve Wong, J.H., (2016). Grapefruit (*Citrus paradisi*) Oils, in *Essential Oils in Food Preservation. Flavor and Safety*. Elsevier, 463-470.
- [19] Scora, R.W. ve Nicolson, D.H. (1986). The Correct Name for the Shaddock, *Citrus Maxima*, Not *C. Grandis* (Rutaceae). *Taxon*, 35(3), 592-595.
- [20] Vijaylakshmi, P. ve Radha, R. (2015). An overview: *Citrus maxima*. *The Journal of Phytopharmacology*, 4(5), 263-267.
- [21] Soost, R.K. ve Cameron, J., (1980) *Oroblanco*. a triploid pummelo-grapefruit hybrid. *HortScience*, 15(5), 667-669.
- [22] Pimenta, F.C.F., Tavares, A.C., Neto, G.C., Alves, M., Pimenta, M.F., Diniz, J.M., ve Diniz, F.F.M. (2017). Pharmacological Actions of *Citrus* Species. *Citrus Pathology*, 197.
- [23] Singh, A. ve Singh, R., (2017). Ethnomedicinal, Pharmacological, Antimicrobial Potential and Phytochemistry of *Trichosanthes Anguina* Linn.-a review. *Bulletin of Pure & Applied Sciences-Botany*, 36(2), 82-90.
- [24] Mannucci, C., Calapai, F., Cardia, L., Inferrera, G., D'Arena, G., Di Pietro, M., Navarra, M., Gangemi, S., Ventura, E., Spagnolo, E., ve Calapai, G. (2018) Clinical Pharmacology of *Citrus aurantium* and *Citrus sinensis* for the Treatment of Anxiety. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2018, 1-18.
- [25] Sohi, S., ve Shri, R., (2018). Neuropharmacological potential of the genus *Citrus*: A review. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 7(2), 1538-1548.
- [26] Gao, L., Wei, N., Yang, G., Zhang, Z., Liu, G., ve Cai, C., (2019). Ethnomedicine study on traditional medicinal plants in the Wuliang Mountains of Jingdong, Yunnan, China. *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*, 15(1), 41.

- [27] Malleshappa, P., Kumaran, R.C., Venkatarangaiah, K., ve Parveen, S. (2018) Peels of Citrus Fruits: A Potential Source of Anti-inflammatory and Anti-nociceptive Agents. *Pharmacognosy Journal*, 10(6s), 172-178.
- [28] Bakhshaei, S. (2017). Phyto-pharmacological effect of nine medicinal plants as a traditional treatment on depression. *J. Appl. Pharm*, 9(3), 1-5.
- [29] Chaudhari, S.Y., Ruknuddin, G., ve Prajapati, P. (2016) Ethno medicinal values of Citrus genus: A review. *Medical Journal of Dr. DY Patil University*, 9(5), 560.
- [30] Milind, P. ve Dev, C. (2012). Orange: range of benefits. *Int Res J Pharm*, 3(7), 59-63.
- [31] Favela-Hernández, J.M.J., González-Santiago, O., Ramírez-Cabrera, M.A., Esquivel-Ferriño, P.C., ve Camacho-Corona, M.D.R. (2016). Chemistry and Pharmacology of Citrus sinensis. *Molecules*, 21(2), 247.
- [32] Gerten, D., Salma, I., Shafie, M.S.M., Shariah, U., Brooke, P. Wong, W., ve Norhayati, M.H. (2015). Traditional knowledge and practices related to genus Citrus, Garcinia, Mangifera and Nephelium in malaysia. *Open Access Library J*, 2, 1-11.
- [33] Enejoh, O.S., Ogunyemi, I.O., Bala, M.S., Oruene, I.S., Suleiman, M.M., ve Ambali, S.F. (2015). Ethnomedical importance of Citrus aurantifolia (christm) swingle. *The Pharma Innovation*, 4(8, Part A), 1.
- [34] Paul, A. ve Cox, P.A. (1995). An Ethnobotanical survey of the uses for Citrus aurantium (Rutaceae) in Haiti. *Economic Botany*, 49(3), 249.
- [35] Jazayeri, S.B., Amanlou, A., Ghanadian, N., Pasalar, P., ve Amanlou, M. (2014). A preliminary investigation of anticholinesterase activity of some Iranian medicinal plants commonly used in traditional medicine. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22(1), 17.
- [36] Baytop, T., (1984). *Türkiye’de Bitkilerle tedavi (Geçmişte ve Bugün)*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları No 3255, Eczacılık Fakültesi No 40.
- [37] Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., ve Takeda, Y., (1997). Traditional medicine in Turkey viii. folk medicine in east Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır provinces. *Economic Botany*, 51(3), 195-211.

- [38] Bahar, Z., Kizilci, S., Beser, A., Besen, D.B., Gördes, N., Ersin, F., Kissal, A., ve Capik, C., (2013). Herbal therapies used by hypertensive patients in Turkey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(2), 292-298.
- [39] Karcı, E., Gürbüz, İ., Akaydın, G., ve Günbatan, T. (2017). Folk medicines of Bafra (Samsun-Turkey). *Turkish Journal of Biochemistry*, 42(4), 381-399.
- [40] Doğan, A., Şenkardeş, İ., Bulut, G., ve Tuzlacı, E., (2014). An ethnopharmacological review on the Turkish Apiaceae species. *Journal of Faculty Pharmacy of Istanbul University*, 44(2), 163-179.
- [41] Nalubega, R., Nyanzi, S.A., Nakavuma, J.L., ve Kamatenesi-Mugisha, M. (2013). Ethnobotanical uses of *Lantana trifolia* L. and *Sida cuneifolia* Roxb. in Mukungwe and Wabinyonyi Sub-counties of Central Uganda. *Journal of Complementary Medicine Research*, 2(3), 155-164.
- [42] Erbay, M.Ş., Anıl, S., ve Melikoğlu, G., (2018). Plants used as painkiller in traditional treatment in Turkey-II Headache. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 22(1).
- [43] Gürdal, B. ve Kültür, Ş. (2013). An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey). *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 113-126.
- [44] Liu, Y., Heying, E., ve Tanumihardjo, S.A. (2012). History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(6), 530-545.
- [45] Robbins, R.J., (2003). Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- [46] Kefeli, V.I., Kalevitch, M.V., ve Borsari, B. (2003). Phenolic cycle in plants and environment. *J. Cell Mol. Biol*, 2(1), 13-18.
- [47] Bocco, A., Cuvelier, M.E., Richard, H., ve Berset, C. (1998). Antioxidant activity and phenolic composition of citrus peel and seed extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(6), 2123-2129.
- [48] Ma, Y.-Q., Chen, J.C., Liu, D.H., ve Ye, X.Q. (2009). Simultaneous extraction of phenolic compounds of citrus peel extracts: Effect of ultrasound. *Ultrasonics sonochemistry*, 16(1), 57-62.

- [49] Hayat, K., Hussain, S., Abbas, S., Farooq, U., Ding, B., Xia, S., Jia, C., Zhang, X., ve 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(1), 63-70.
- [50] Xu, G., Chen, J., Liu, D., Zhang, Y., Jiang, P., ve Ye, X. (2008). Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *Journal of food science*, 73(1), 11-18.
- [51] Ledesma-Escobar, C., Priego-Capote, F., ve Luque de Castro, M. (2015) Characterization of lemon (Citrus limon) polar extract by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in high resolution mode. *Journal of mass spectrometry*, 50(11), 1196-1205.
- [52] Sârbu, C., Naşcu-Briciu, R.D., Kot-Wasik, A., Gorinstein, S., Wasik, A., ve Namieśnik, J. (2012). Classification and fingerprinting of kiwi and pomelo fruits by multivariate analysis of chromatographic and spectroscopic data. *Food Chemistry*, 130(4), 994-1002.
- [53] Pierpoint, W., (1986). *Flavonoids in the human diet. Plant flavonoids in biology and medicine: Biochemical, pharmacological, and structure-activity relationships*, 125-140.
- [54] Pietta, P.-G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035-1042.
- [55] Andersen, O.M. ve Markham, K.R. (2005). *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. CRC press.
- [56] Harborne, J.B. (1988). *Flavonoids in the environment: structure-activity relationships*. Plant flavanoids in biology and medicine II, 17.
- [57] Tripoli, E., La Guardia, M., Giammanco, S., Di Majo, D., ve Giammanco, M. (2007). Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food chemistry*, 104(2), 466-479.
- [58] Macheix, J.-J., (2017). *Fruit Phenolics*, CRC press.
- [59] Benavente Garcia, O., Castillo, J., Sabater, F., ve Del Rio, J.A. (1995) Characterization of a S-adenosyl-L-methionine: eriodictyol 4'-O-methyltransferase from Citrus aurantium. Developmental changes in the levels of 4'-O-methoxyflavonoids and S-adenosyl-L-methionine: eriodictyol 4'-O-methyltransferase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 33(3), 263-271.

- [60] Baser, K.H.C. ve Buchbauer, G. (2015). *Handbook of essential oils: science, technology, and applications*. CRC press.
- [61] Sawamura, M. (2011). *Citrus essential oils: flavor and fragrance*. John Wiley & Sons.
- [62] Dugo, G. ve Mondello, L. (2010). *Citrus oils: composition, advanced analytical techniques, contaminants, and biological activity*. CRC press.
- [63] Wilson III, C.W. ve Shaw, P.E. (1981). Importance of thymol, methyl N-methylantranilate, and monoterpene hydrocarbons to the aroma and flavor of mandarin cold-pressed oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(3), 494-496.
- [64] Tundis, R., Loizzo, M.R., ve Menichini, F. (2014). An overview on chemical aspects and potential health benefits of limonoids and their derivatives. *Critical reviews in food science and nutrition*, 54(2), 225-250.
- [65] Stanley, W.L. ve Jurd, L. (1971). Citrus coumarins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 19(6), 1106-1110.
- [66] Mercolini, L., Mandrioli, R., Ferranti, A., Sorella, V., Protti, M., Epifano, F., Curini, M., ve Raggi, M.A. (2012). Quantitative evaluation of auraptene and umbelliferone, chemopreventive coumarins in citrus fruits, by HPLC-UV-FL-MS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(8), 1694-1701.
- [67] Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9(15), 1551-1558.
- [68] Stahl, W.ve Sies, H. (2003). Antioxidant activity of carotenoids. *Molecular aspects of medicine*, 24(6), 345-351.
- [69] Rao, A.V.ve Rao, L.G. (2007). Carotenoids and human health. *Pharmacological research*, 55(3), 207-216.
- [70] Matsumoto, H., Ikoma, Y., Kato, M., Kuniga, T., Nakajima, N., ve Yoshida, T. (2007). Quantification of carotenoids in citrus fruit by LC-MS and comparison of patterns of seasonal changes for carotenoids among citrus varieties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(6), 2356-2368.
- [71] Dugo, P., Škeříková, V., Kumm, T., Trozzi, A., Jandera, P., ve Mondello, L. (2006). Elucidation of carotenoid patterns in citrus products by means of comprehensive normal-phase× reversed-phase liquid chromatography. *Analytical chemistry*, 78(22), 7743-7750.

- [72] Rafiq, S., Kaul, R., Sofi, S., Bashir, N., Nazir, F., ve Nayik, G.A. (2018). Citrus peel as a source of functional ingredient: A review. *Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences*, 17(4), 351-358.
- [73] Sharma, K., Mahato, N., ve Lee, Y.R. (2019). Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 35(2), 265-284.
- [74] Galati, E., Monforte, M., Kirjavainen, S., Forestieri, A., Trovato, A., ve Tripodo, M. (1994). Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid.(Note I): antiinflammatory and analgesic activity. *Farmaco (Societa chimica italiana: 1989)*, 40(11), 709-712.
- [75] Monforte, M., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A., Galati, E., ve Lo, R.C. (1995). Biological effects of hesperidin, a Citrus flavonoid.(note II): hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco (SocietÃ chimica italiana: 1989)*, 50(9), 595-599.
- [76] Ozkan, B., Akcaoz, H. ve Karadeniz, F. (2004). Energy requirement and economic analysis of citrus production in Turkey. *Energy Conversion and Management*, 45(11-12), 1821-1830.
- [77] Karadeniz, F. (2004). Main organic acid distribution of authentic citrus juices in Turkey. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 28(4), 267-271.
- [78] Uygun, N. ve Satar, S. (2008). The current situation of citrus pests and their control methods in Turkey. *IOBC-WPRS Bulletin*, 38, 2-9.
- [79] Önelge, N. (2010). Citrus viroids in Turkey. in *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)*.
- [80] Carvalho-Freitas, M.I.R. ve Costa, M. (2002). Anxiolytic and sedative effects of extracts and essential oil from Citrus aurantium L. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(12), 1629-1633.
- [81] Choi, S.-Y., H.-C. Ko, S.-Y. Ko, J.-H. Hwang, J.-G. Park, S.-H. Kang, S.-H. Han, S.-H. Yun, and S.-J. Kim, (2007). Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(4), 772-778.

- [82] Park, K.-I., H.-S. Park, M.-K. Kim, G.-E. Hong, A. Nagappan, H.-J. Lee, S. Yumnam, W.-S. Lee, C.-K. Won, and S.-C. Shin, (2014). Flavonoids identified from Korean Citrus aurantium L. inhibit Non-Small Cell Lung Cancer growth in vivo and in vitro. *Journal of Functional Foods*, 7, 287-297.
- [83] Azhdarzadeh, F. and M. Hojjati, (2016). Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (Citrus aurantium) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*, 3(1), 43-50.
- [84] Sarrou, E., P. Chatzopoulou, K. Dimassi-Therious, and I. Therios. (2013) Volatile constituents and antioxidant activity of peel, flowers and leaf oils of Citrus aurantium L. growing in Greece. *Molecules*, 18(9), 10639-10647.
- [85] Tundis, R., M.R. Loizzo, M. Bonesi, F. Menichini, V. Mastellone, C. Colica, and F. Menichini, (2012). Comparative study on the antioxidant capacity and cholinesterase inhibitory activity of Citrus aurantifolia Swingle, C. aurantium L., and C. bergamia Risso and Poit. peel essential oils. *Journal of food science*, 77(1), 40-46.
- [86] Tounsi, M.S., W.A. Wannes, I. Ouerghemmi, S. Jegham, Y.B. Njima, G. Hamdaoui, H. Zemni, and B. Marzouk. (2011). Juice components and antioxidant capacity of four Tunisian Citrus varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(1), 142-151.
- [87] Sharma, M., J. Fernandes, D. Ahirwar, ve R. Jain, (2008). Hypoglycemic and hypolipidimic activity of alcoholic extract of Citrus aurantium in normal and alloxan-induced diabetic rats. *Pharmacologyonline*, 3, 161-171.
- [88] Siskos, E., M. Konstantopoulou, ve B. Mazomenos, (2009). Insecticidal activity of Citrus aurantium peel extract against Bactrocera oleae and Ceratitis capitata adults (Diptera: Tephritidae). *Journal of applied entomology*, 133(2), 108-116.
- [89] Jayaprakasha, G.K., P.S. Negi, S. Sikder, L.J. Mohanrao, and K.K. Sakariah, (2000). Antibacterial activity of Citrus reticulata peel extracts. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(11-12), 1030-1034.
- [90] Wu, T., D. Cheng, M. He, S. Pan, X. Yao, and X. Xu, (2014). Antifungal action and inhibitory mechanism of polymethoxylated flavones from Citrus reticulata Blanco peel against Aspergillus niger. *Food Control*, 35(1), 354-359.

- [91] Chutia, M., P.D. Bhuyan, M. Pathak, T. Sarma, and P. Boruah, (2009). Antifungal activity and chemical composition of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. *LWT-Food Science and Technology*, 42(3), 777-780.
- [92] Tao, N., L. Jia, and H. Zhou, (2014). Anti-fungal activity of *Citrus reticulata* Blanco essential oil against *Penicillium italicum* and *Penicillium digitatum*. *Food chemistry*, 153, 265-271.
- [93] Su, M.-S., Y.-T. Shyu, and P.-J. Chien, (2008). Antioxidant activities of citrus herbal product extracts. *Food Chemistry*, 111(4), 892-896.
- [94] Ya, W., Z. Chun-Meng, G. Tao, Z. Yi-Lin, and Z. Ping, (2015). Preliminary screening of 44 plant extracts for anti-tyrosinase and antioxidant activities. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 28(5).
- [95] ZHANG, H., Y.-f. YANG, and Z.-q. ZHOU, (2018). Phenolic and flavonoid contents of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruit tissues and their antioxidant capacity as evaluated by DPPH and ABTS methods. *Journal of integrative agriculture*, 17(1), 256-263.
- [96] Noh, H.J., D. Hwang, E.S. Lee, J.W. Hyun, P.H. Yi, G.S. Kim, S.E. Lee, C. Pang, Y.J. Park, and K.H. Chung, (2015). Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of *Citrus unshiu*. *Journal of ethnopharmacology*, 163, 106-112.
- [97] Kim, M.-J., K.-W. Yang, S.S. Kim, S.M. Park, K.J. Park, K.S. Kim, Y.H. Choi, K.K. Cho, and C.-G. Hyun, (2014). Chemical composition and anti-inflammation activity of essential oils from *Citrus unshiu* flower. *Natural product communications*, 9(5).
- [98] Park, H.-J., U.J. Jung, S.-J. Cho, H.-K. Jung, S. Shim, and M.-S. Choi, (2013). *Citrus unshiu* peel extract ameliorates hyperglycemia and hepatic steatosis by altering inflammation and hepatic glucose-and lipid-regulating enzymes in db/db mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(2), 419-427.
- [99] Shin, M.-S., S.B. Park, and K.-S. Shin, (2018). Molecular mechanisms of immunomodulatory activity by polysaccharide isolated from the peels of *Citrus unshiu*. *International journal of biological macromolecules*, 112, 576-583.

- [100] Kim, G.-N., M.-R. Shin, S.H. Shin, A.R. Lee, J.Y. Lee, B.-I. Seo, M.Y. Kim, T.H. Kim, J.S. Noh, and M.H. Rhee, (2016). Study of antiobesity effect through inhibition of pancreatic lipase activity of Diospyros kaki fruit and Citrus unshiu peel. *BioMed research international*, 2016.
- [101] Ekwenye, U.N.andO.V. Edeha, (2010). The antibacterial activity of crude leaf extract of Citrus sinensis (sweet orange). *Int J Pharm Bio Sci*, 1(4), 742-750.
- [102] Singh, P., R. Shukla, B. Prakash, A. Kumar, S. Singh, P.K. Mishra, and N.K. Dubey, (2010). Chemical profile, antifungal, antiaflatoxicogenic and antioxidant activity of Citrus maxima Burm. and Citrus sinensis (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. *Food and Chemical Toxicology*, 48(6), 1734-1740.
- [103] Gaínza, Y.A., L.F. Domingues, O.P. Perez, M.D. Rabelo, E.R. López, and A.C. de Souza Chagas, (2015). Anthelmintic activity in vitro of Citrus sinensis and Melaleuca quinquenervia essential oil from Cuba on Haemonchus contortus. *Industrial Crops and Products*, 76, 647-652.
- [104] Anagnostopoulou, M.A., P. Kefalas, V.P. Papageorgiou, A.N. Assimopoulou, and D. Boskou, (2006). Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (Citrus sinensis). *Food chemistry*, 94(1), 19-25.
- [105] Chilaka, K., E. Ifediba, and J. Ogamba, (2015). Evaluation of the effects of Citrus sinensis seed oil on blood glucose, lipid profile and liver enzymes in rats injected with alloxan monohydrate. *Journal of Acute Disease*,. 4(2), 129-134.
- [106] Hindi, N.K.K.andZ.A.G. Chabuck, (2013). Antimicrobial activity of different aqueous lemon extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 3(6), 74.
- [107] Guerra, F.Q.S., J.M. Mendes, W.A. de Oliveira, F.S. de Souza, V. Trajanov, H.D.M. Coutinho, and E. de Oliveira Lima, (2013). Antibacterial activity of the essential oil of Citrus limon against multidrug resistant Acinetobacter strains. *Rev Bras Farm*, 94(94), 142-147.
- [108] Ali, J., B. Das, and T. Saikia, (2017). Antimicrobial activity of lemon peel (Citrus limon) extract. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 9(4), 79-81.

- [109] Bouzenna, H., S. Dhibi, N. Samout, I. Rjeibi, H. Talarmin, A. Elfeki, and N. Hfaiedh, (2016). The protective effect of Citrus limon essential oil on hepatotoxicity and nephrotoxicity induced by aspirin in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 83, 1327-1334.
- [110] Rekha, C., G. Poornima, M. Manasa, V. Abhipsa, J.P. Devi, V. Kumar, and T.R.P. Kekuda, (2012). Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits. *Chemical Science Transactions*, 1(2), 303-310.
- [111] Bhavsar, S.K., P. Joshi, M.B. Shah, and D. Santani, (2007). Investigation into Hepatoprotective Activity of Citrus limon. *Pharmaceutical Biology*, 45(4), 303-311.
- [112] Lopes Campêlo, L., C. Gonçalves e Sá, A. de Almeida, J. Pereira da Costa, T. Costa Marques, C. Mendes Feitosa, G. Barros Saldanha, and R. Mendes de Freitas, (2011). Sedative, anxiolytic and antidepressant activities of Citrus limon (Burn) essential oil in mice. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66(8), 623-627.
- [113] Jomaa, S., A. Rahmo, A.S. Alnori, and M.E. Chatty, (2012). The cytotoxic effect of essential oil of Syrian Citrus limon peel on human colorectal carcinoma cell line (Lim1863). *Middle East Journal of Cancer*, 3(1), 15-21.
- [114] Qidwai, A., M. Pandey, S.K. Shukla, R. Kumar, A. Pandey, and A. Dikshit, (2016). Antibacterial activity of mentha piperita and citrus limetta against *Propionibacterium acnes* (anaerobic bacteria). *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(7), 2917.
- [115] Maurya, A.K., S. Mohanty, A. Pal, C.S. Chanotiya, and D.U. Bawankule, (2018). The essential oil from Citrus limetta Risso peels alleviates skin inflammation: In-vitro and in-vivo study. *Journal of ethnopharmacology*, 212, 86-94.
- [116] KunduSen, S., P.K. Haldar, M. Gupta, U.K. Mazumder, P. Saha, A. Bala, S. Bhattacharya, and B. Kar, (2011). Evaluation of antihyperglycemic activity of Citrus limetta fruit peel in streptozotocin-induced diabetic rats. *ISRN endocrinology*, 2011.
- [117] Perez, Y.Y., E. Jimenez-Ferrer, D. Alonso, C.A. Botello-Amaro, and A. Zamilpa, (2010). Citrus limetta leaves extract antagonizes the hypertensive effect of angiotensin II. *Journal of ethnopharmacology*, 128(3), 611-614.

- [118] Barreca, D., E. Bellocco, C. Caristi, U. Leuzzi, and G. Gattuso, (2011). Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. *Food Chemistry*, 129(2), 417-422.
- [119] Gabriele, M., S. Frassinetti, L. Caltavuturo, L. Montero, G. Dinelli, V. Longo, D. Di Gioia, and L. Pucci, (2017). Citrus bergamia powder: Antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory properties. *Journal of functional foods*, 31, 255-265.
- [120] Furneri, P.M., L. Mondello, G. Mandalari, D. Paolino, P. Dugo, A. Garozzo, and G. Bisignano, (2012). In vitro antimycoplasmal activity of Citrus bergamia essential oil and its major components. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 52, 66-69.
- [121] Balestrieri, E., F. Pizzimenti, A. Ferlazzo, S.V. Giofrè, D. Iannazzo, A. Piperno, R. Romeo, M.A. Chiacchio, A. Mastino, and B. Macchi, (2011). Antiviral activity of seed extract from Citrus bergamia towards human retroviruses. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19(6), 2084-2089.
- [122] Mollace, V., I. Sacco, E. Janda, C. Malara, D. Ventrice, C. Colica, V. Visalli, S. Muscoli, S. Ragusa, and C. Muscoli. (2011). Hypolipemic and hypoglycaemic activity of bergamot polyphenols: from animal models to human studies. *Fitoterapia*, 82(3), 309-316.
- [123] Janda, E., A. Lascalea, C. Martino, S. Ragusa, S. Nucera, R. Walker, S. Gratterer, and V. Mollace, (2016). Molecular mechanisms of lipid-and glucose-lowering activities of bergamot flavonoids. *PharmaNutrition*, 4, S8-S18.
- [124] Morrone, L.A., L. Rombolà, C. Pelle, M.T. Corasaniti, S. Zappettini, P. Paudice, G. Bonanno, and G. Bagetta, (2007). The essential oil of bergamot enhances the levels of amino acid neurotransmitters in the hippocampus of rat: implication of monoterpene hydrocarbons. *Pharmacological research*, 55(4), 255-262.
- [125] Zhang, H., Z. Lou, X. Chen, Y. Cui, H. Wang, X. Kou, and C. Ma, (2019). Effect of simultaneous ultrasonic and microwave assisted hydrodistillation on the yield, composition, antibacterial and antibiofilm activity of essential oils from *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis*. *Journal of food engineering*, 244, 126-135.

- [126] Conforti, F., G.A. Statti, R. Tundis, M.R. Loizzo, and F. Menichini, (2007). In vitro activities of *Citrus medica* L. cv. Diamante (Diamante citron) relevant to treatment of diabetes and Alzheimer's disease. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 21(5), 427-433.
- [127] Menichini, F., M.R. Loizzo, M. Bonesi, F. Conforti, D. De Luca, G.A. Statti, B. de Cindio, F. Menichini, and R. Tundis. (2011). Phytochemical profile, antioxidant, anti-inflammatory and hypoglycemic potential of hydroalcoholic extracts from *Citrus medica* L. cv Diamante flowers, leaves and fruits at two maturity stages. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1549-1555.
- [128] Ortuño, A., A. Báidez, P. Gómez, M. Arcas, I. Porras, A. García-Lidón, and J. Del Río, (2006). *Citrus paradisi* and *Citrus sinensis* flavonoids: Their influence in the defence mechanism against *Penicillium digitatum*. *Food Chemistry*, 98(2), 351-358.
- [129] Entezari, M., A. Majd, F. Falahian, S. Mehrabian, M. Hashemi, and A.A. Lajimi, (2009). Antimutagenicity and anticancer effects of *Citrus medica* fruit juice. *Acta Medica Iranica*, 373-377.
- [130] El-Alfy, T.S., M.H. Hetta, N.Z. Yassin, R.F. Abdel Rahman, and E.M. Kadry, (2012). *Estrogenic activity of Citrus medica* L. leaves growing in Egypt.
- [131] Agudelo, C., L. Barros, C. Santos-Buelga, N. Martínez-Navarrete, and I.C. Ferreira, (2017). Phytochemical content and antioxidant activity of grapefruit (Star Ruby): A comparison between fresh freeze-dried fruits and different powder formulations. *LWT*, 80, 106-112.
- [132] Giamperi, L., D. Fraternale, A. Bucchini, and D. Ricci, *Antioxidant activity of Citrus paradisi seeds glyceric extract*. *Fitoterapia*, 2004. 75(2): p. 221-224.
- [133] Gorinstein, S., H. Leontowicz, M. Leontowicz, J. Drzewiecki, Z. Jastrzebski, M.S. Tapia, E. Katrich, and S. Trakhtenberg, (2005). Red Star Ruby (Sunrise) and blond qualities of Jaffa grapefruits and their influence on plasma lipid levels and plasma antioxidant activity in rats fed with cholesterol-containing and cholesterol-free diets. *Life sciences*, 77(19), 2384-2397.

- [134] Abirami, A., Nagarani, G. ve Siddhuraju, P. (2014). In vitro antioxidant, anti-diabetic, cholinesterase and tyrosinase inhibitory potential of fresh juice from *Citrus hystrix* and *C. maxima* fruits. *Food Science and Human Wellness*, 3(1), 16-25.
- [135] Oboh, G. ve Ademosun, A.O. (2011). Shaddock peels (*Citrus maxima*) phenolic extracts inhibit α -amylase, α -glucosidase and angiotensin I-converting enzyme activities: A nutraceutical approach to diabetes management. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 5(3), 148-152.
- [136] Kim, H., Moon, J.Y., Mosaddik, A., ve Cho, S.K. (2010). Induction of apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells by polymethoxylated flavone-rich *Citrus grandis* Osbeck (Dangyuja) leaf extract. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2435-2442.
- [137] Feksa, D.L., R.P. Coelho, A.A. da Costa Güllich, E.S. Dal Ponte, J.d.C.E. Piccoli, ve V. Manfredini, (2018). Extract of *Citrus maxima* (pummelo) leaves improve hepatoprotective activity in Wistar rats submitted to the induction of non-alcoholic hepatic steatosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 338-346.
- [138] Gorinstein, S., M. Cvikrova, I. Machackova, R. Haruenkit, Y.-S. Park, S.-T. Jung, K. Yamamoto, A.L.M. Ayala, E. Katrich, ve S. Trakhtenberg, (2004). Characterization of antioxidant compounds in Jaffa sweets and white grapefruits. *Food Chemistry*, 84(4), 503-510.
- [139] Hahn-Obercyger, M., A.H. Stark, and Z. Madar, (2005). Grapefruit and oroblanco enhance hepatic detoxification enzymes in rats: possible role in protection against chemical carcinogenesis. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(5), 1828-1832.
- [140] Kanaze, F., Bounartzi, M., Georgarakis, M., ve Niopas, I. (2007). Pharmacokinetics of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin after single oral administration in human subjects. *European journal of clinical nutrition*, 61(4), 472.
- [141] Codignola, A., E. Sher, D. Cova, R. Perego, L. De Angelis, ve F. Clementi, (1992). Flavonoids extracted from *Citrus limon* as vasoactive drugs: pharmacodynamic and pharmacokinetic studies of diosmin. *Planta Medica*, 58(S 1), 628-628.

- [142] Yuen, H.-Q., Q.-H. Hwang, X.-Y. Zhang, ve Z.-X. Zhou, (2014). Cellular antioxidant activity and pharmacokinetic study of polymethoxylated flavonoids in extract of citrus reticulata ‘Chachi’peel. *Food Science and Technology Research*, 20(3), 629-637.
- [143] Onoue, S., A. Uchida, H. Takahashi, Y. Seto, Y. Kawabata, K. Ogawa, K. Yuminoki, N. Hashimoto, ve S. Yamada, (2011). Development of high-energy amorphous solid dispersion of nanosized nobiletin, a citrus polymethoxylated flavone, with improved oral bioavailability. *Journal of pharmaceutical sciences*, 100(9), 3793-3801.
- [144] Manners, G.D., R.A. Jacob, P. Andrew III, T.K. Schoch, ve S. Hasegawa, (2003). Bioavailability of citrus limonoids in humans. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(14), 4156-4161.
- [145] Delaney, B., K. Phillips, C. Vasquez, A. Wilson, D. Cox, H. Wang, ve J. Manthey, (2002). Genetic toxicity of a standardized mixture of citrus polymethoxylated flavones. *Food and chemical toxicology*, 40(5), 617-624.
- [146] De Smet, P.A., (2004). Health risks of herbal remedies: an update. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 76(1), 1-17.
- [147] Arbo, M., E. Larentis, V. Linck, A. Aboy, A. Pimentel, A. Henriques, E. Dallegrave, S. Garcia, M. Leal, ve R. Limberger, (2008). Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of Citrus species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of Citrus aurantium extract and p-synephrine. *Food and chemical toxicology*, 46(8), 2770-2775.
- [148] Rahman, H., Eswaraiah, M. C., ve Dutta, A. (2014). Neuropharmacological activities of ethanolic extract of Citrus macroptera (Varannamensis) fruit peels. *Global Journal of Pharmacology*, 8(4), 609-616.
- [149] Tarkang, P.A., G.A. Agbor, T. Armelle, L. Tchokouaha, D. Kemeta, ve Y. Ngadana, (2012). Acute and sub-chronic toxicity studies of the aqueous and ethanolleaf extracts of Citrus sinensis (Linnaeus) Osbeck (pro sp.) in Wistar rats. *Der Pharmacia Lettre*, 4(5), 1619-1629.
- [150] Bubalo, M.C., S. Vidović, I.R. Redovniković, ve S. Jokić, (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and bioproducts processing*, 109, 52-73.

- [151] Chemat, F., Vian, M.A., ve Cravotto, G., (2012). Green extraction of natural products: concept and principles. *International journal of molecular sciences*, 13(7), 8615-8627.
- [152] Handa, S., Khanuja, S., Longo, G., ve Rakesh, D. (2008). Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants, *United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology*, İtalya
- [153] Sun, H., Ge, X., Lv, Y., ve Wang, A. (2012). Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography A*, 1237, 1-23.
- [154] Richter, B.E., B.A. Jones, J.L. Ezzell, N.L. Porter, N. Avdalovic, ve C. Pohl, (1996). Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. *Analytical Chemistry*, 68(6), 1033-1039.
- [155] Scandalios, J.G., (1997). *Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses*. (No. 04; QP177, S2)
- [156] Cadenas, E. ve Davies, K.J., (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3-4), 222-230.
- [157] Urso, M.L. ve Clarkson, P.M. (2003). Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*, 189(1-2), 41-54.
- [158] Yeum, K.-J., R.M. Russell, N.I. Krinsky, ve G. Aldini, (2004). Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 430(1), 97-103.
- [159] Rice-Evans, C., Miller, N., ve Paganga, G. (1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in plant science*, 2(4), 152-159.
- [160] Leopoldini, M., T. Marino, N. Russo, ve M. Toscano, (2004). Antioxidant properties of phenolic compounds: H-atom versus electron transfer mechanism. *The Journal of Physical Chemistry A*, 108(22), 4916-4922.
- [161] Banjarnahor, S.D. ve Artanti, N. (2014). Antioxidant properties of flavonoids. *Medical Journal of Indonesia*, 23(4), 239-44.
- [162] Procházková, D., Boušová, I., ve Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, 82(4), 513-523.

- [163] Vanacker, S.A., M.N. Tromp, G.R. Haenen, W. Vandervijgh, ve A. Bast, (1995). Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochemical and biophysical research communications*, 214(3), 755-759.
- [164] Lotito, S.B. ve Frei, B. (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radical Biology and Medicine*, 41(12), 1727-1746.
- [165] Yeh, S.-L., W.-Y. Wang, C.-H. Huang, ve M.-L. Hu, (2005). Pro-oxidative effect of β -carotene and the interaction with flavonoids on UVA-induced DNA strand breaks in mouse fibroblast C3H10T1/2 cells. *The Journal of nutritional biochemistry*, 16(12), 729-735.
- [166] Lee-Hilz, Y.Y., Boerboom, A.M.J., Westphal, A.H., van Berkel, W.J. Aarts, J.M. ve Rietjens, I.M. (2006). Pro-oxidant activity of flavonoids induces EpRE-mediated gene expression. *Chemical research in toxicology*, 19(11), 1499-1505.
- [167] Wolfe, K.L. ve Liu, R.H. (2008). Structure– activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(18), 8404-8411.
- [168] Wen, X. ve Walle, T. (2006). Methylated flavonoids have greatly improved intestinal absorption and metabolic stability. *Drug metabolism and disposition*, 34(10), 1786-1792.
- [169] Walle, T., N. Ta, T. Kawamori, X. Wen, P.A. Tsuji, ve U.K. Walle, (2007). Cancer chemopreventive properties of orally bioavailable flavonoids— methylated versus unmethylated flavones. *Biochemical pharmacology*, 73(9), 1288-1296.
- [170] Matsuda, H., Morikawa, T., Ando, S., Toguchida, I., ve Yoshikawa, M. (2003). Structural requirements of flavonoids for nitric oxide production inhibitory activity and mechanism of action. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 11(9), 1995-2000.
- [171] Kim, H.K., B.S. Cheon, Y.H. Kim, S.Y. Kim, ve H.P. Kim, (1999). Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. *Biochemical pharmacology*, 58(5), 759-765.
- [172] Faccio, G., K. Kruus, M. Saloheimo, ve L. Thöny-Meyer, (2012). Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, 47(12), 1749-1760.

- [173] Espín, J.C., R. Varón, L.G. Fenoll, M.A. Gilabert, P.A. García-Ruíz, J. Tudela, ve F. García-Cánovas, (2000). Kinetic characterization of the substrate specificity and mechanism of mushroom tyrosinase. *European Journal of Biochemistry*, 267(5), 1270-1279.
- [174] García-Borrón, J.C. ve Solano, F. (2002). Molecular anatomy of tyrosinase and its related proteins: beyond the histidine-bound metal catalytic center. *Pigment Cell Research*, 15(3), 162-173.
- [175] Chang, T.-S., (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, 10(6), 2440-2475.
- [176] Ramsden, C.A. ve Riley, P.A. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 22(8), 2388-2395.
- [177] Halaban, R., R.S. Patton, E. Cheng, S. Svedine, E.S. Trombetta, M.L. Wahl, S. Ariyan, ve D.N. Hebert, (2002). Abnormal acidification of melanoma cells induces tyrosinase retention in the early secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 277(17), 14821-14828.
- [178] Hoogduijn, M.J., E. Cemeli, K. Ross, D. Anderson, A.J. Thody, ve J.M. Wood, (2004). Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. *Experimental cell research*, 294(1), 60-67.
- [179] Mitra, D., X. Luo, A. Morgan, J. Wang, M.P. Hoang, J. Lo, C.R. Guerrero, J.K. Lennerz, M.C. Mihm, ve J.A. Wargo, (2012). An ultraviolet-radiation-independent pathway to melanoma carcinogenesis in the red hair/fair skin background. *Nature*, 491(7424), 449.
- [180] Spritz, R.A., J. Oh, K. Fukai, S.A. Holmes, L. Ho, D. Chitayat, T.D. France, M.A. Musarella, S.J. Orlow, ve R.E. Schnur, (1997). Novel mutations of the tyrosinase (TYR) gene in type I oculocutaneous albinism (OCA1). *Human mutation*, 10(2), 171.
- [181] Kim, Y.-J. ve Uyama, H. (2005). Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and molecular life sciences CMLS*, 62(15), 1707-1723.

- [182] Olivares, C. ve Solano, F. (2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment cell & melanoma research*, 22(6), 750-760.
- [183] Chen, J.S., C.I. Wei, ve M.R. Marshall, (1991). Inhibition mechanism of kojic acid on polyphenol oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(11), 1897-1901.
- [184] Cabanes, J., S. Chazarra, ve Garcia-Carmona, F. (1994). Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 46(12), 982-985.
- [185] Cabanes, J., F. Garcia-Canovas, J. Tudela, J.A. Lozano, ve F. García-Carmona, (1987). L-mimosine a slow-binding inhibitor of mushroom tyrosinase. *Phytochemistry*, 26(4), 917-919.
- [186] Espín, J.C. ve Wichers, H.J. (1999). Slow-binding inhibition of mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase isoforms by tropolone. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(7), 2638-2644.
- [187] Kubo, I. ve Kinst-Hori, I. (1999). Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *Journal of agricultural and food chemistry*, 47(10), 4121-4125.
- [188] Kubo, I., I. Kinst-Hori, S.K. Chaudhuri, Y. Kubo, Y. Sánchez, ve T. Ogura, (2000). Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 8(7), 1749-1755.
- [189] Xie, L.-P., Q.-X. Chen, H. Huang, H.-Z. Wang, ve R.-Q. Zhang, (2003). Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. *Biochemistry (Moscow)*, 68(4), 487-491.
- [190] Nugroho, A., J.-K. Choi, J.-H. Park, K.-T. Lee, B.C. Cha, ve H.-J. Park, (2009). Two new flavonol glycosides from *Lamium amplexicaule* L. and their in vitro free radical scavenging and tyrosinase inhibitory activities. *Planta medica*, 75(04), 364-366.
- [191] Lee, S.H., S.Y. Choi, H. Kim, J.S. Hwang, B.G. Lee, J.J. Gao, ve S.Y. Kim, (2002). Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 25(8), 1045-1048.

- [192] Ryu, Y., T. Ha, M. Curtis-Long, H. Ryu, S. Gal, ve K. Park, (2008) Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by flavones from the stem barks of *Morus lhou* (S.) Koidz. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 23(6), 922-930.
- [193] Shin, N.-H., S.Y. Ryu, E.J. Choi, S.-H. Kang, I.-M. Chang, K.R. Min, ve Y. Kim, (1998). Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. *Biochemical and biophysical research communications*, 243(3), 801-803.
- [194] Jeong, S.H., Y.B. Ryu, M.J. Curtis-Long, H.W. Ryu, Y.S. Baek, J.E. Kang, W.S. Lee, ve K.H. Park, (2009). Tyrosinase inhibitory polyphenols from roots of *Morus lhou*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(4), 1195-1203.
- [195] Karioti, A., Protopappa, A., Megoulas, N., ve Skaltsa, H. (2007). Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 15(7), 2708-2714.
- [196] Yokota, T., Nishio, H., Kubota, Y., ve Mizoguchi, M. (1998). The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment cell research*, 11(6), 355-361.
- [197] Kim, H.J., S.H. Seo, B.-g. Lee, ve Y.S. Lee, (2005). Identification of tyrosinase inhibitors from *Glycyrrhiza uralensis*. *Planta medica*, 71(08), 785-787.
- [198] Fu, B., H. Li, X. Wang, F.S. Lee, ve S. Cui, (2005). Isolation and identification of flavonoids in licorice and a study of their inhibitory effects on tyrosinase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(19), 7408-7414.
- [199] Hyun, S.K., W.-H. Lee, D.M. Jeong, Y. Kim, ve J.S. Choi, (2008). Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(1), 154-158.
- [200] Zhang, X., X. Hu, A. Hou, ve H. Wang, (2009). Inhibitory effect of 2, 4, 2', 4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(1), 86-90.
- [201] Sherma, J., (1990). Planar chromatography. *Analytical chemistry*, 62(12), 371-381.

- [202] Shewiyo, D., E. Kaale, P. Risha, B. Dejaegher, J. Smeyers-Verbeke, ve Y. Vander Heyden, (2012). HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: A review of the method development and validation steps. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 66, 11-23.
- [203] Srivastava, M., (2010). *High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)*. Springer Science & Business Media.
- [204] Krasikov, V., (2003). Contemporary planar chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 58(8), 706-720.
- [205] Srivastava, M., (2011). *An overview of HPTLC: A modern analytical technique with excellent potential for automation, optimization, hyphenation, and multidimensional applications*, in *High-performance thin-layer chromatography (HPTLC)*. Springer. p. 3-24.
- [206] Poole, C.F. ve Riffenburgh, R.H. (2003). *The essence of chromatography*. Elsevier.
- [207] Guzelmeric, E., (2015). *Development and Validation of Qualitative and Quantitative High Performance Thin-layer Chromatographic Methods for Analysis of Marker Compounds in Matricaria Recutita L. and Cynara Scolymus L. Extracts: Doctor of Philosophy Thesis*. Yayınlanmamış doktora tezi. İstanbul: Yeditepe Üniversitesi, Sağlık bilimleri enstitüsü.
- [208] Milojković-Opsenica, D., P. Ristivojević, F. Andrić, ve J. Trifković, (2013). Planar chromatographic systems in pattern recognition and fingerprint analysis. *Chromatographia*, 76(19-20), 1239-1247.
- [209] Bräm, S. ve Wolfram, E. (2017). Recent Advances in Effect-directed Enzyme Assays based on Thin-layer Chromatography. *Phytochemical Analysis*, 28(2), 74-86.
- [210] Goodall, R. ve Levi, A. (1946). A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Nature*, 158(4019), 675.
- [211] Nicolaus, B., Coronelli, C., ve Binaghi, A. (1961). Microbiological determination of antibiotics by thin layer chromatograms. *Experientia*, 17, 473.
- [212] Heinemann, B., A.J. Howard, ve Z.J. Hollister, (1967). Application of paper chromatograms to the study of inducers of λ bacteriophage in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 15(4), 723-725.

- [213] Choma, I.M. ve Grzelak, E.M. (2011). Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2684-2691.
- [214] Houghton, P.J., (2000). Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. *Phytotherapy Research*, 14(6), 419-423.
- [215] Takao, T., F. Kitatani, N. Watanabe, A. Yagi, ve K. Sakata, (1994). A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 58(10), 1780-1783.
- [216] Zampini, I.C., R.M. Ordoñez, ve M.I. Isla, (2010). Autographic assay for the rapid detection of antioxidant capacity of liquid and semi-solid pharmaceutical formulations using ABTS•+ immobilized by gel entrapment. *Aaps Pharmscitech*, 11(3), 1159-1163.
- [217] Whittern, C.C., E.E. Miller, ve D.E. Pratt, (1984). Cottonseed flavonoids as lipid antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61(6), 1075-1078.
- [218] Zhou, J., Q. Tang, T. Wu, ve Z. Cheng, (2017). Improved TLC bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of tyrosinase inhibitors in natural products. *Phytochemical Analysis*, 28(2), 115-124.
- [219] Tang, J., J. Zhou, Q. Tang, T. Wu, ve Z. Cheng, (2016). A new TLC bioautographic assay for qualitative and quantitative estimation of lipase inhibitors. *Phytochemical Analysis*, 27(1), 5-12.
- [220] Yang, Z., X. Zhang, D. Duan, Z. Song, M. Yang, ve S. Li, (2009). Modified TLC bioautographic method for screening acetylcholinesterase inhibitors from plant extracts. *Journal of separation science*, 32(18), 3257-3259.
- [221] Rhee, I.K., M. van de Meent, K. Ingkaninan, ve R. Verpoorte, (2001). Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of chromatography A*, 915(1-2), 217-223.
- [222] Xiao, Z., R. Storms, ve A. Tsang, (2006). A quantitative starch? Iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical biochemistry*, 351(1), 146-148.
- [223] Salazar, M.O. ve Furlan, R.L. (2007). A rapid TLC autographic method for the detection of glucosidase inhibitors. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 18(3), 209-212.

- [224] Lund, B.M. ve Lyon, G. (1975). Detection of inhibitions of *Erwinia carotovora* and *E. herbicola* on thin-layer chromatogram. *Journal of Chromatography A*, 110(1), 193-196.
- [225] Ramallo, I.A., S.A. Zacchino, ve R.L. Furlan, (2006). A rapid TLC autographic method for the detection of xanthine oxidase inhibitors and superoxide scavengers. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 17(1), 15-19.
- [226] Meyers, E. ve Smith, D.A. (1964). Bioautography of antibiotic spread-layer chromatograms. *Journal of Chromatography A*, 14, 129-132.
- [227] Meyer, J. ve Dilika, F. (1996). Antibacterial activity of *Helichrysum pedunculatum* used in circumcision rites. *Journal of Ethnopharmacology*, 53(1), 51-54.
- [228] Schmourlo, G., R.R. Mendonça-Filho, C.S. Alviano, ve S.S. Costa, (2005). Screening of antifungal agents using ethanol precipitation and bioautography of medicinal and food plants. *Journal of ethnopharmacology*, 96(3), 563-568.
- [229] Silva, M.T., S.M. Simas, T.G. Batista, P. Cardarelli, ve T.C. Tomassini, (2005). Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L.(Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 779-782.
- [230] Marston, A., (2011). Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. *Journal of Chromatography A*, 1218(19), 2676-2683.
- [231] Wangthong, S., I. Tonsiripakdee, T. Monhaphol, R. Nonthabenjawan, ve S.P. Wanichwecharungruang, (2007). Post TLC developing technique for tyrosinase inhibitor detection. *Biomedical Chromatography*, 21(1), 94-100.
- [232] Taibon, J., A. Ankli, S. Schwaiger, C. Magnenat, V.-I. Boka, C. Simões-Pires, N. Aligiannis, M. Cuendet, A.-L. Skaltsounis, ve E. Reich, (2015). Prevention of false-positive results: development of an HPTLC autographic assay for the detection of natural tyrosinase inhibitors. *Planta medica*, 81(12/13), 1198-1204.
- [233] Orsini, F., I. Vovk, V. Glavnik, U. Jug, ve D. Corradini, (2019). HPTLC, HPTLC-MS/MS and HPTLC-DPPH methods for analyses of flavonoids and their antioxidant activity in *Cyclanthera pedata* leaves, fruits and dietary supplement. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 1-12.

- [234] Bruins, A.P., (1998). Mechanistic aspects of electrospray ionization. *Journal of Chromatography A*, 794(1-2), 345-357.
- [235] Singleton, V.L., R. Orthofer, ve R.M. Lamuela-Raventós, (1999). *Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent*, in *Methods in enzymology*. Elsevier, 152-178.
- [236] Miliauskas, G., P. Venskutonis, ve T. Van Beek, (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
- [237] Prieto, J.M., (2012). Procedure: Preparation of DPPH Radical, and antioxidant scavenging assay. *DPPH Microplate Protocol*, p. 7-9.
- [238] Likhitwitayawuid, K. ve Sritularak, B. (2001). A new dimeric stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Artocarpus gomezianus*. *Journal of natural products*, 64(11), 1457-1459.
- [239] Barbhuiya, A.R., M.L. Khan, ve S. Dayanandan, (2016). Genetic structure and diversity of natural and domesticated populations of *Citrus medica* L. in the Eastern Himalayan region of Northeast India. *Ecol Evol*, 6(12), 3898-911.
- [240] Wagner, H. ve Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Springer Science & Business Media.
- [241] Justesen, U., (2000). Negative atmospheric pressure chemical ionisation low-energy collision activation mass spectrometry for the characterisation of flavonoids in extracts of fresh herbs. *Journal of Chromatography A*, 902(2), 369-379.
- [242] Zhang, M., C. Duan, Y. Zang, Z. Huang, ve G. Liu, (2011). The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chemistry*, 129(4), 1530-1536.
- [243] Kachlicki, P., A. Piasecka, M. Stobiecki, ve Ł. Marczak, (2016). Structural characterization of flavonoid glycoconjugates and their derivatives with mass spectrometric techniques. *Molecules*, 21(11), 1494.
- [244] Arias, B.A. ve Ramón-Laca, L. (2005). Pharmacological properties of citrus and their ancient and medieval uses in the Mediterranean region. *Journal of Ethnopharmacology*, 97(1), 89-95.

- [245] M Calderon-Montano, J., E. Burgos-Morón, C. Pérez-Guerrero, ve M. López-Lázaro, (2011). A review on the dietary flavonoid kaempferol. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11(4), 298-344.
- [246] Dosoky, N.S. ve Setzer, W.N. (2018). Biological activities and safety of Citrus spp. essential oils. *International journal of molecular sciences*, 19(7), 1966.
- [247] Minzanova, S.T., V.F. Mironov, D.M. Arkhipova, A.V. Khabibullina, L.G. Mironova, Y.M. Zakirova, ve V.A. Milyukov, (2018). Biological activity and pharmacological application of pectic polysaccharides: A review. *Polymers*, 10(12), 1407.
- [248] Pellati, F., Benvenuti, S., ve Melegari, M. (2004). High-performance liquid chromatography methods for the analysis of adrenergic amines and flavanones in Citrus aurantium L. var. amara. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 15(4), 220-225.
- [249] Miyake, Y., K. Yamamoto, ve T. Osawa, (1997). Isolation of eriocitrin (eriodictyol 7-rutinoside) from lemon fruit (Citrus limon BURM. f.) and its antioxidative activity. *Food Science and Technology International*, 3(1), 84-89.
- [250] Minato, K.-i., Y. Miyake, S. Fukumoto, K. Yamamoto, Y. Kato, Y. Shimomura, ve T. Osawa, (2003). Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise-induced oxidative damage in rat liver. *Life sciences*, 72(14), 1609-1616.
- [251] Yu, J., L. Wang, R.L. Walzem, E.G. Miller, L.M. Pike, ve B.S. Patil, (2005). Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53(6), 2009-2014.
- [252] Itoh, K., N. Hirata, M. Masuda, S. Naruto, K. Murata, K. Wakabayashi, ve H. Matsuda, (2009). Inhibitory effects of Citrus hassaku extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 32(3), 410-415.
- [253] Yusof, S., H.M. Ghazali, ve G.S. King, (1990). Naringin content in local citrus fruits. *Food Chemistry*, 37(2), 113-121.
- [254] Giannuzzo, A.N., H.J. Boggetti, M.A. Nazareno, ve H.T. Mishima, (2003). Supercritical fluid extraction of naringin from the peel of Citrus paradisi. *Phytochemical Analysis*, 14(4), 221-223.

- [255] Moulehi, I., S. Bourgou, I. Ourghemmi, ve M.S. Tounsi, (2012). Variety and ripening impact on phenolic composition and antioxidant activity of mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) and bitter orange (*Citrus aurantium* L.) seeds extracts. *Industrial Crops and Products*, 39, 74-80.

http-1 <http://www.theplantlist.org/> (Erişim tarihi: 02.12.2019)

http-2 <http://tropical.theferns.info/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-3 <https://kwspecialties.on.ca/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-4 <https://www.naturafun.com/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-5 <http://subtropik.cu.edu.tr/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-6 <https://www.rootssimple.com/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-7 <http://dflaw.co/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-8 <http://citruspages.free.fr/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-9 <https://www.planetorganic.com/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

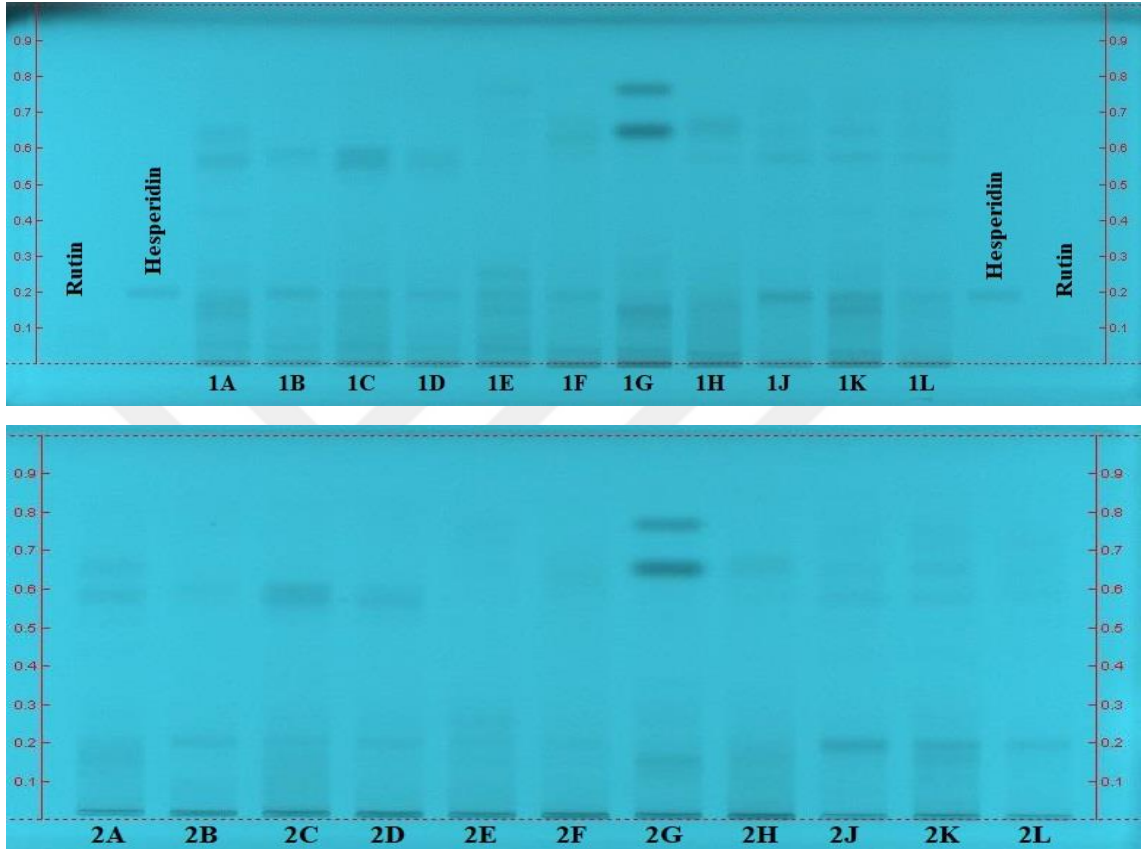
http-10 <https://befreshcorp.net/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-11 <https://www.friedas.com/> (Erişim tarihi: 24.11.2019)

http-12 <https://en.wikipedia.org/wiki/Tyrosinase> (Erişim tarihi: 04.12.2019)

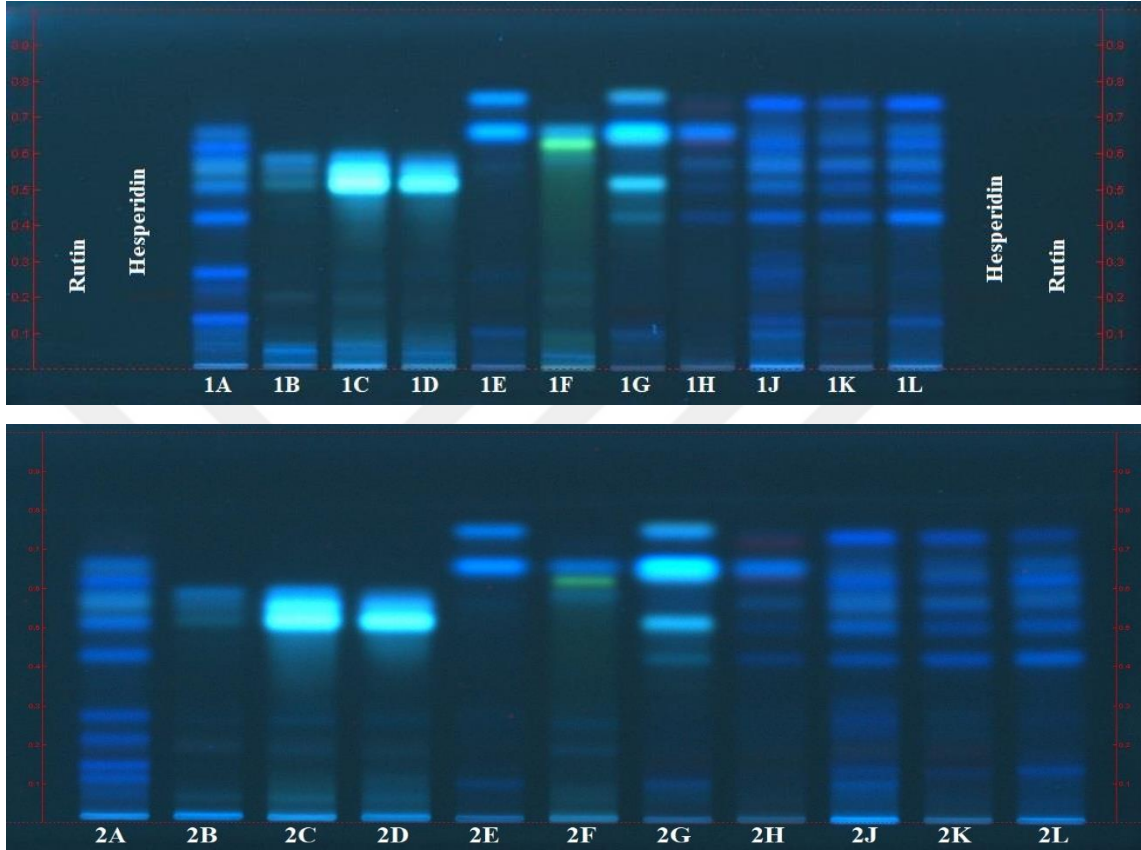
EKLER

EK 1. Metot 2 (Etil asetat:metanol:su:asetik asit, (25:2:2:1; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayrımın 254 nm görüntüsü



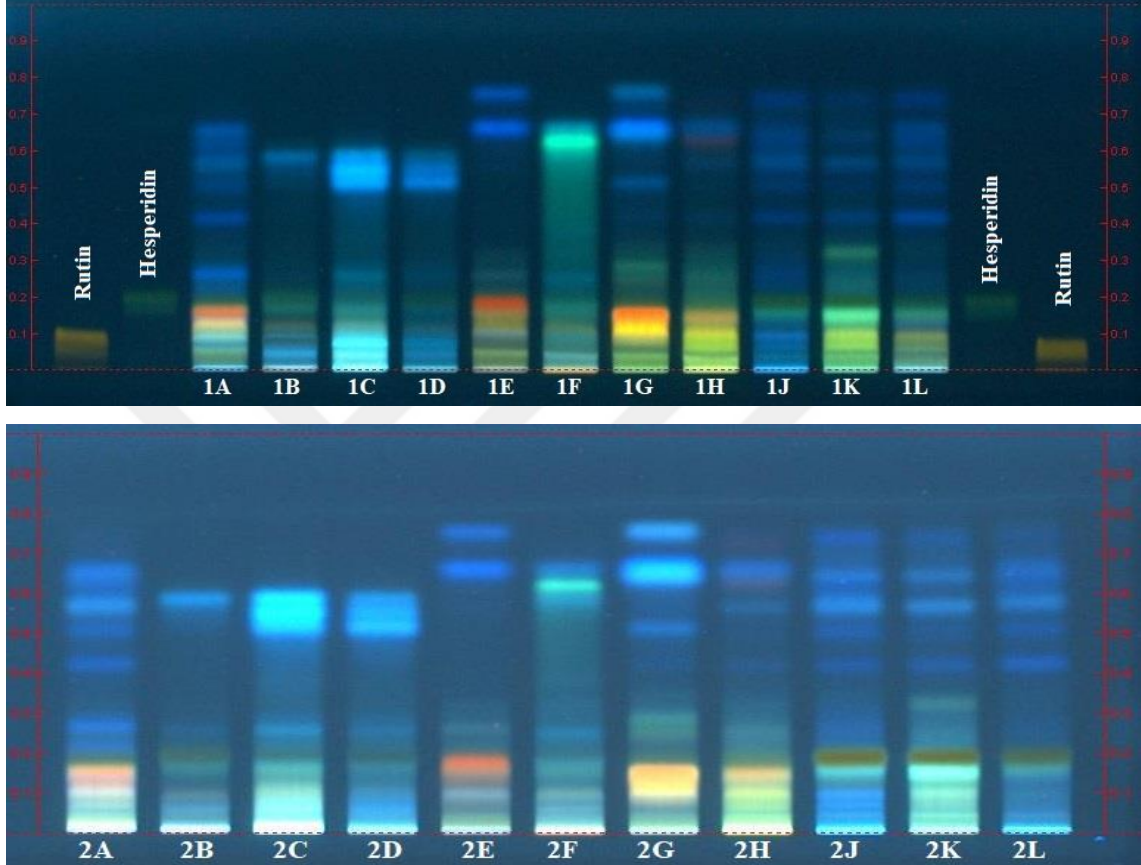
Rutin 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütdiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

EK 2. Metot 2 (Etil asetat:metanol:su:asetik asit, (25:2:2:1; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayırımın 366 nm görüntüsü



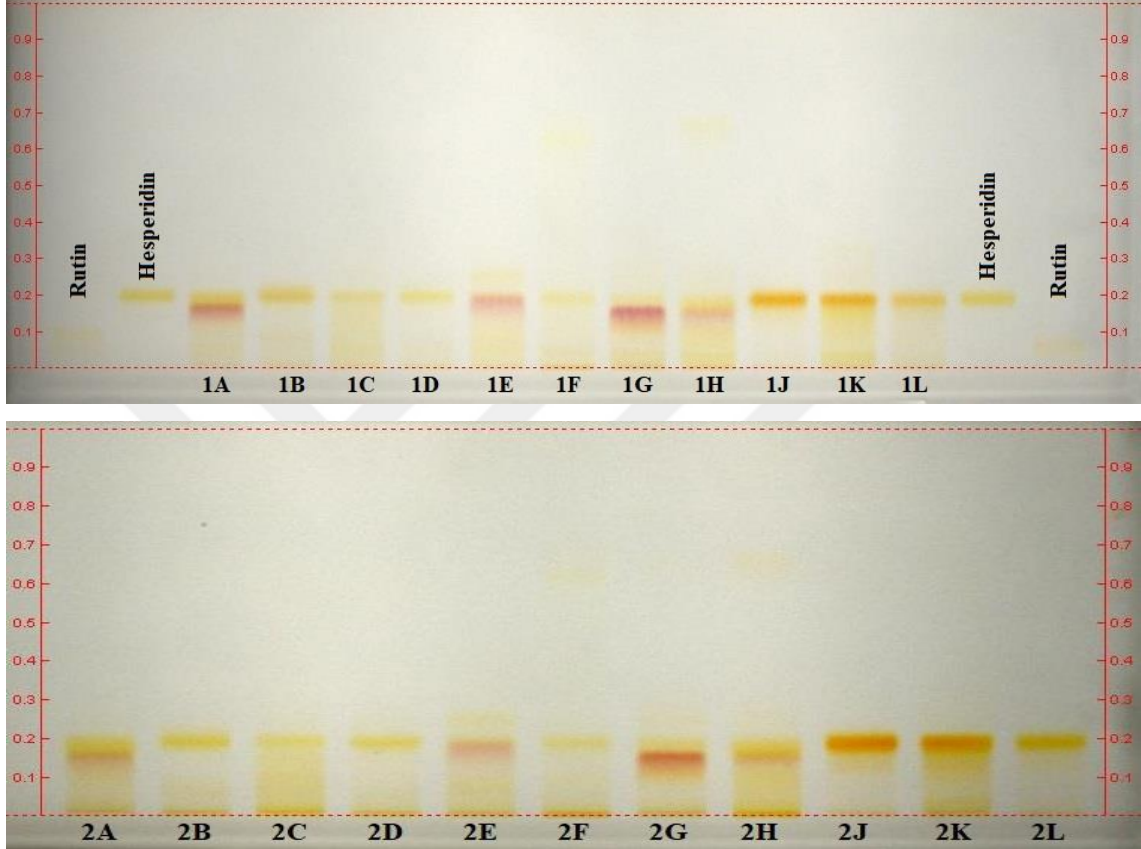
Rutin 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

EK 3. Metot 2 (Etil asetat:metanol:su:asetik asit, (25:2:2:1; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayırımın NP/PEG 400 türevlendirmesi sonrasındaki 366 nm görüntüsü



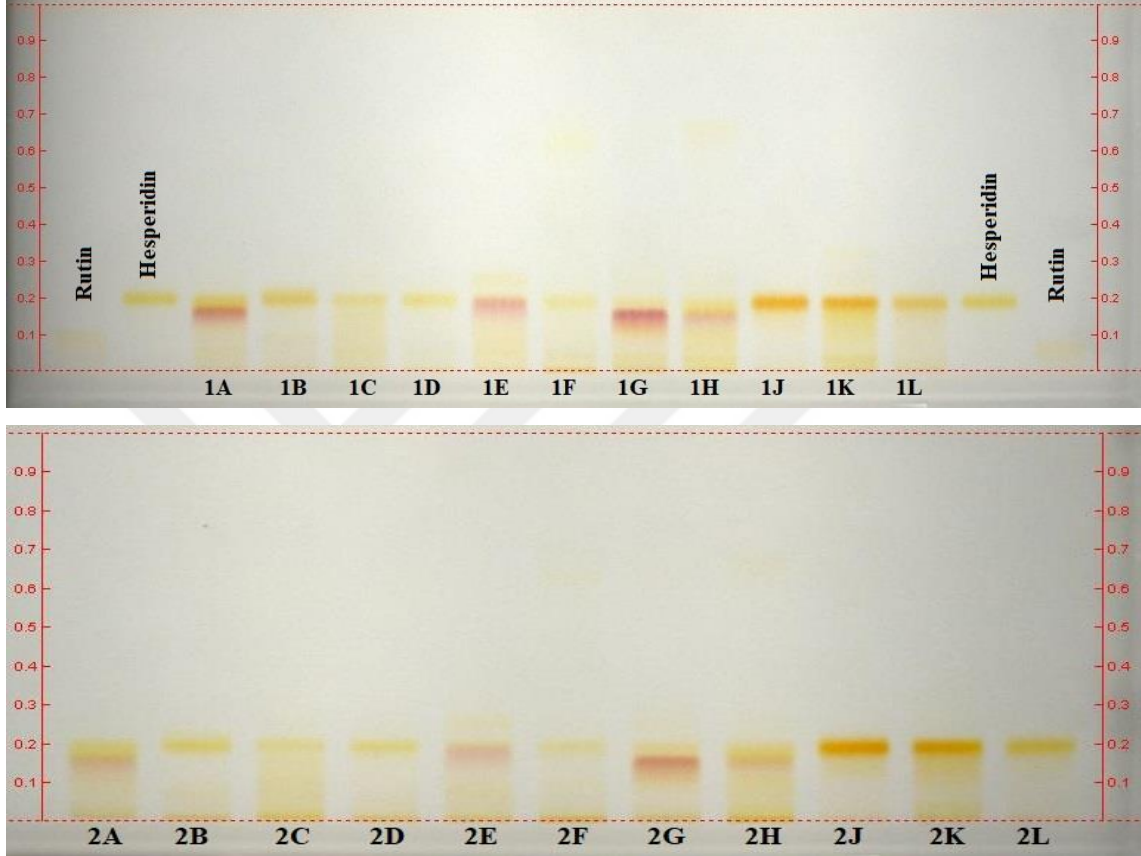
Rutin 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütüden limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

EK 4. Metot 2 (Etil asetat:metanol:su:asetik asit, (25:2:2:1; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayırımın NP/PEG 400 türevlendirmesi sonrasındaki beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü



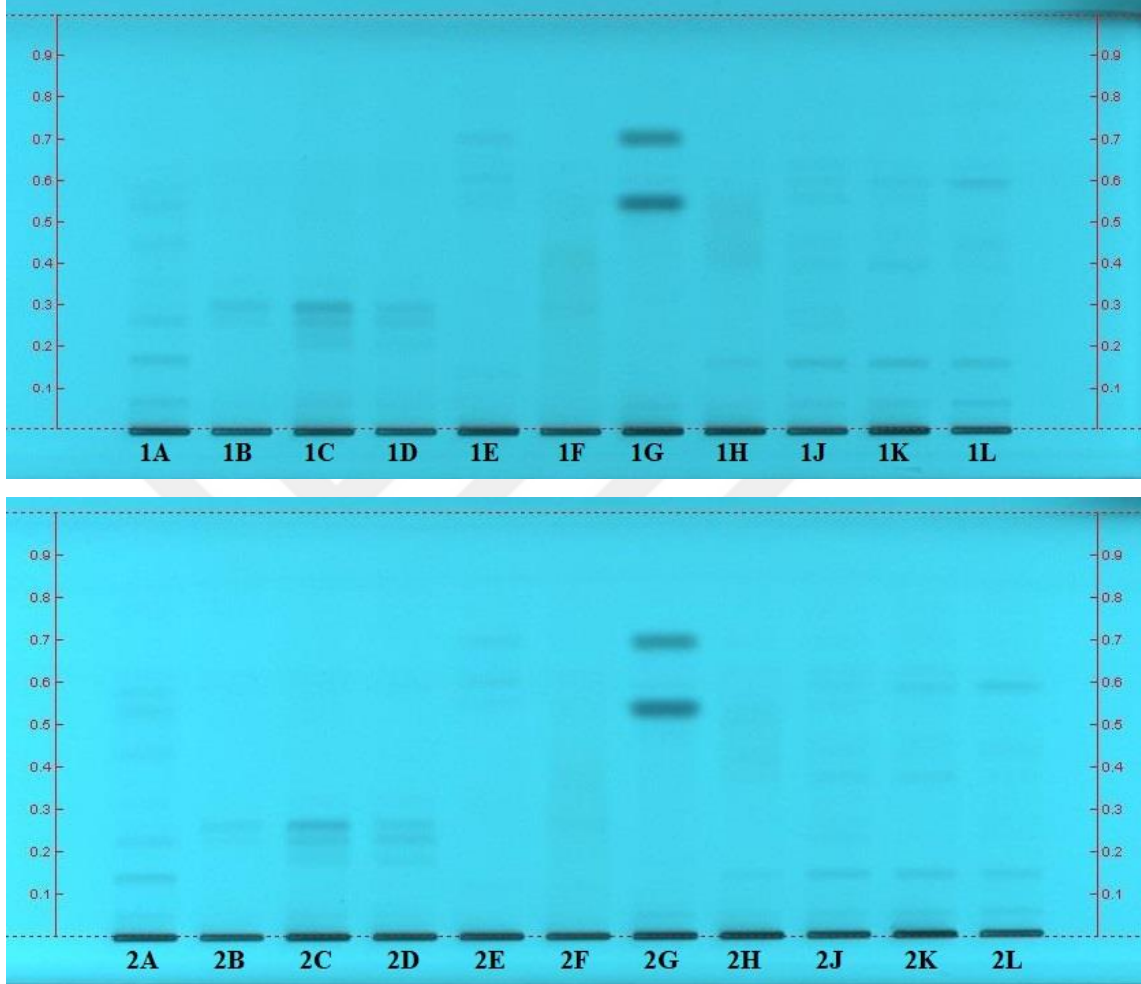
Rutin 0.2 µl, hesperidin 3 µl; 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarin ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarin; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstrler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstrler maserasyon ile elde edilen ekstrleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

EK 5. Metot 2 (Etil asetat:metanol:su:asetik asit, (25:2:2:1; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayırımın NP/PEG 400 türevlendirmesi sonrasındaki beyaz ışık (transmisyon + remisyon) görüntüsü



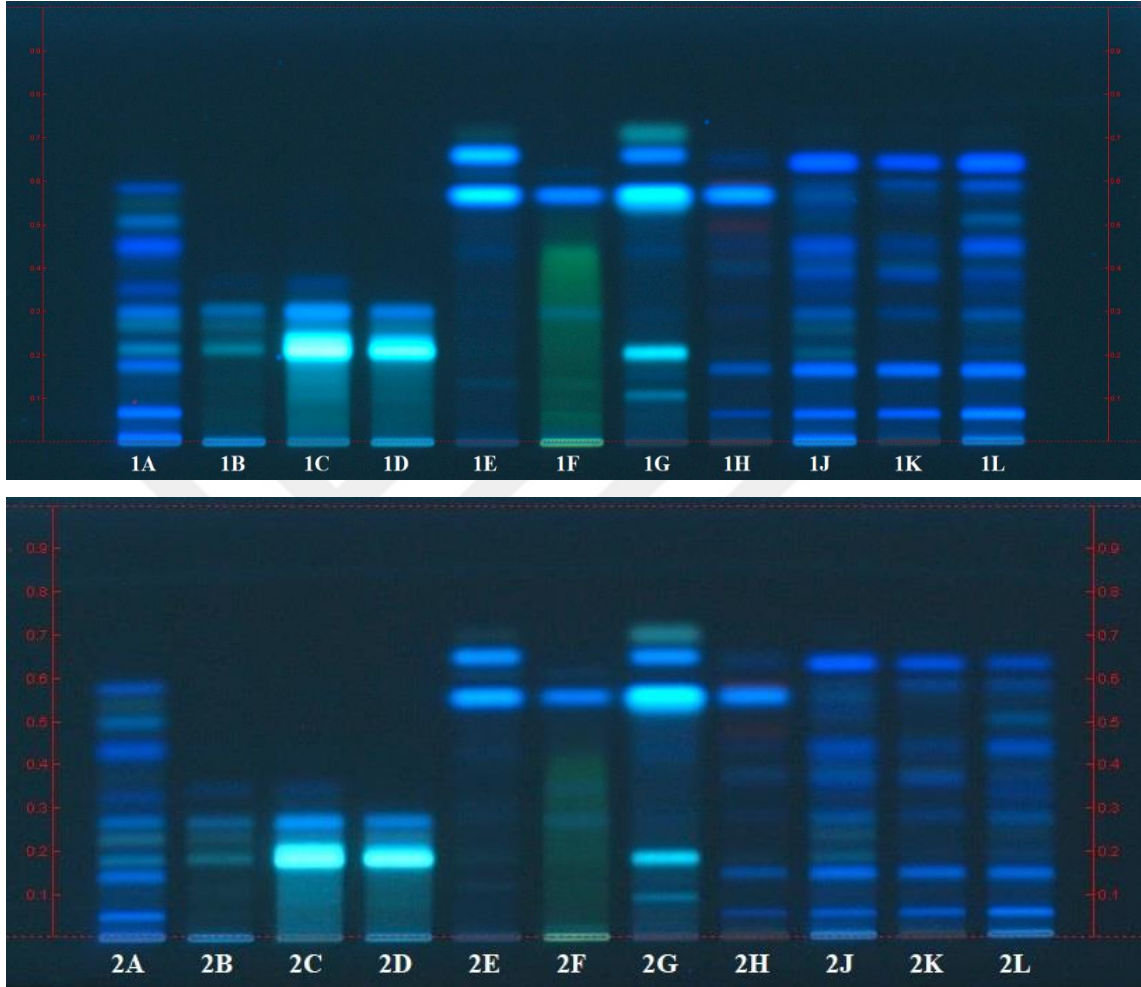
Rutin 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütdiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

EK 6. Metot 3 (Toluen:dietil eter:asetik asit (6:4:1; *h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayrımın 254 nm görüntüsü



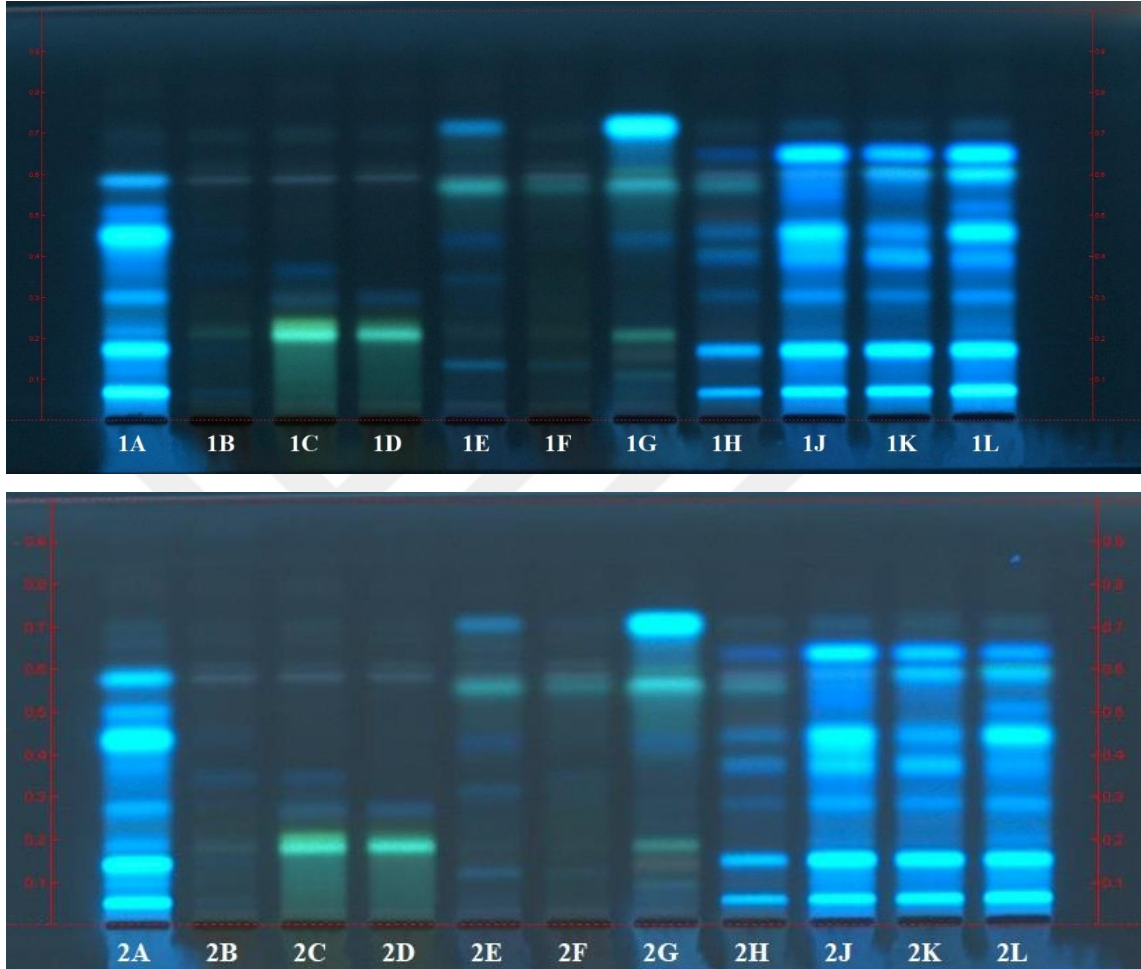
1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyluft; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstrler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstrler maserasyon ile elde edilen ekstrleri temsil etmektedir. Ekstreler 30 µl uygulanmıştır)

EK 7. Metot 3 (Toluen:dietil eter:asetik asit (6:4:1; *h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayrımın 366 nm görüntüsü



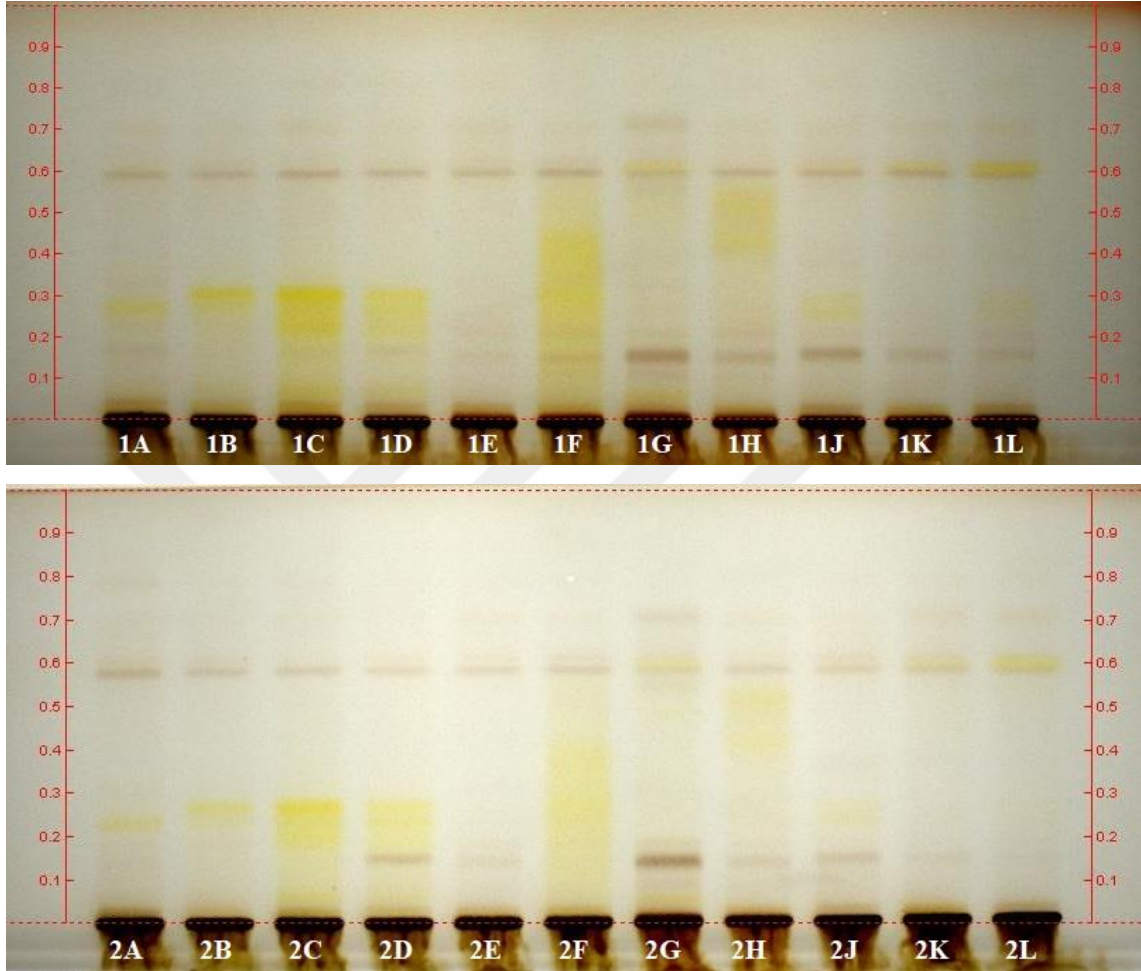
1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 30 μ l uygulanmıştır)

EK 8. Metot 3 (Toluen:dietil eter:asetik asit (6:4:1; *h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayrımın H₂SO₄ türevlendirmesi sonrasındaki 366 nm görüntüsü



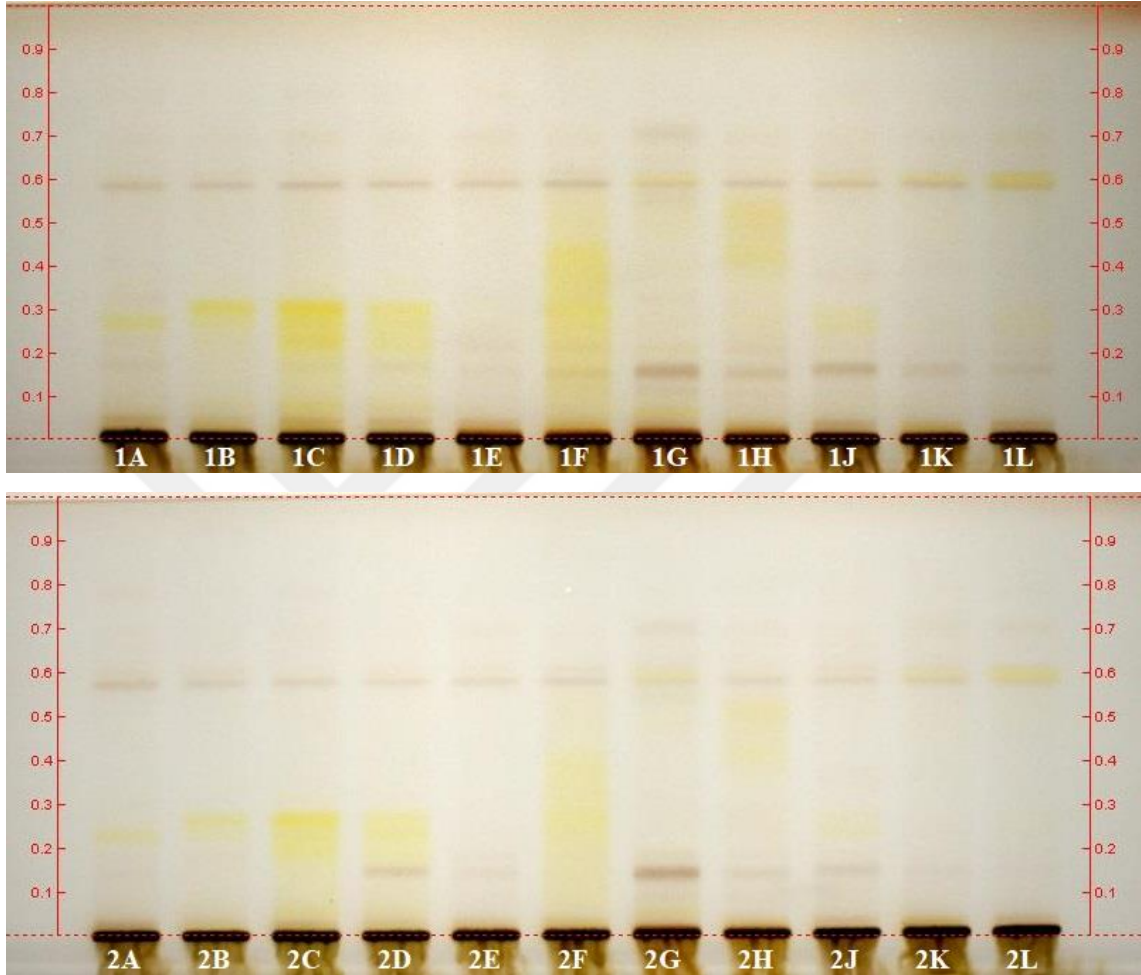
1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarinini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarinini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstrere, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstrere maserasyon ile elde edilen ekstrere temsil etmektedir. Ekstreler 30 μ l uygulanmıştır)

EK 9. Metot 3 (Toluen:dietil eter:asetik asit (6:4:1; *h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayrımın H₂SO₄ türevlendirmesi sonrasındaki beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü



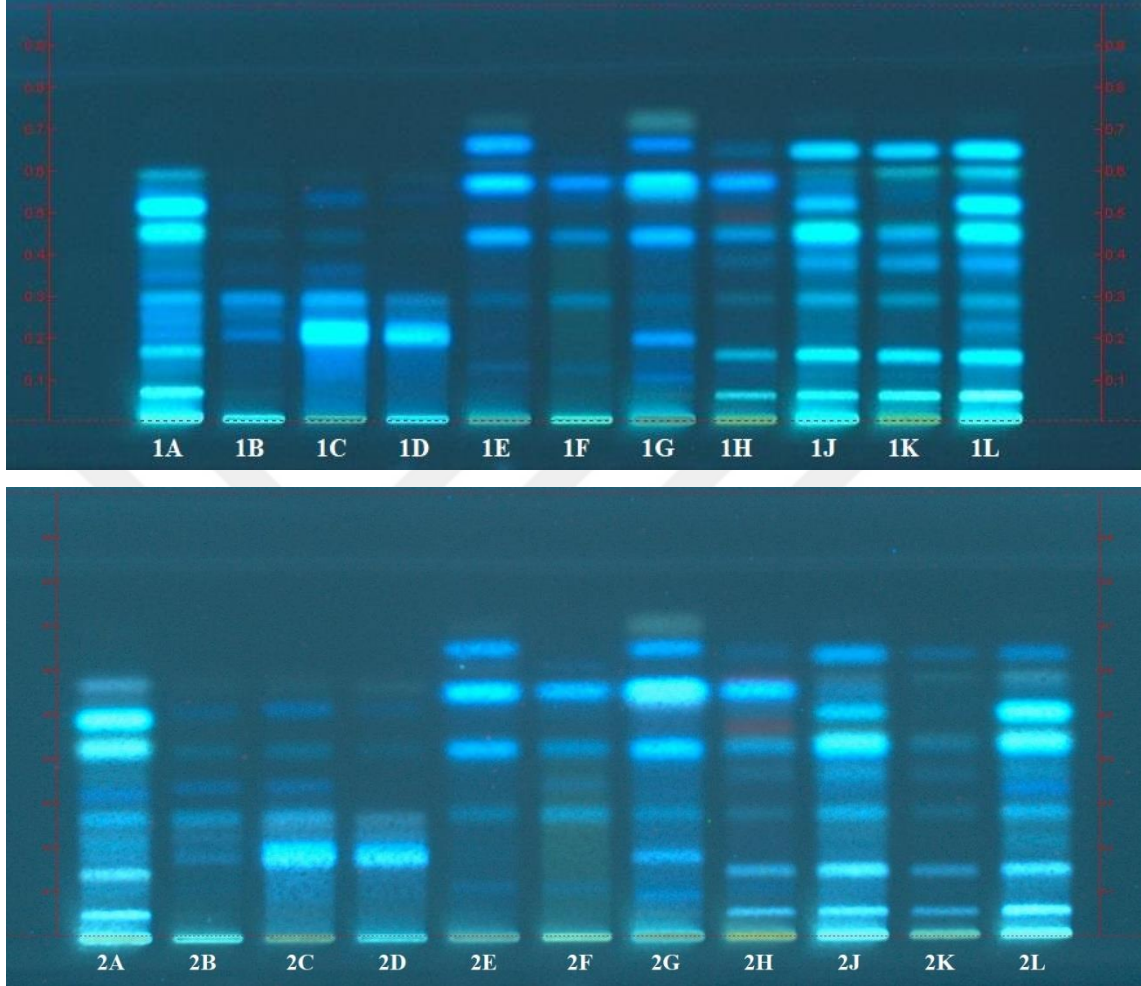
1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyluft; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstrere, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstrere maserasyon ile elde edilen ekstrere temsil etmektedir. Ekstreler 30 µl uygulanmıştır)

EK 10. Metot 3 (Toluen:dietil eter:asetik asit (6:4:1; *h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayrımın H₂SO₄ türevlendirmesi sonrasındaki beyaz ışık (remisyon + transmisyon) görüntüsü



1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, kütiken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstreler, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 30 μ l uygulanmıştır)

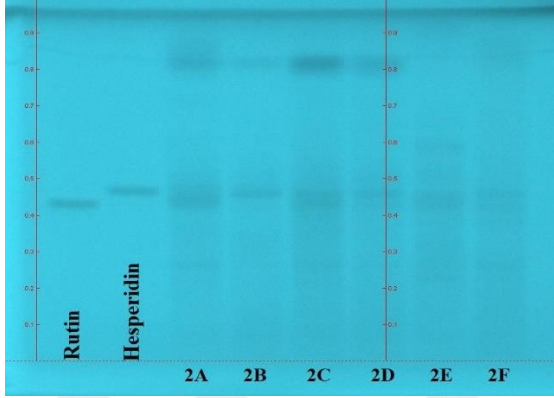
EK 11. Metot 3 (Toluen:dietil eter:asetik asit (6:4:1; *h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayırımın %10 KOH türevlendirmesi sonrasındaki 366 nm görüntüsü



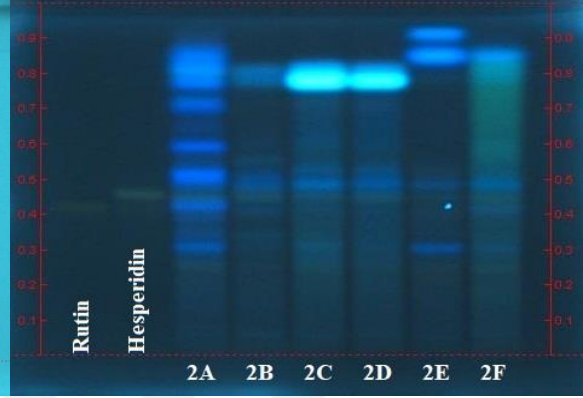
1A, 2A, turunç ekstresi; 1B, 2B, satsuma mandarini ekstresi; 1C, 2C, robinson mandarini; 1D, 2D, Washington portakalı; 1E, 2E, küt diken limonu; 1F, 2F, tatlı limon; 1G, 2G, bergamot ekstresi; 1H, 2H, etnak ekstresi; 1J, 2J, starruby greyfurt; 1K, 2K, pomelo ekstresi; 1L, 2L, oroblanco ekstresi; 1 kodlu ekstrere, ASE yöntemiyle ve 2 kodlu ekstrere maserasyon ile elde edilen ekstrere temsil etmektedir. Ekstreler 30 μ l uygulanmıştır)

EK 12. Metot 4 (etil asetat:asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayrımın 254 ve 366 nm görüntüsü

a) 254 nm

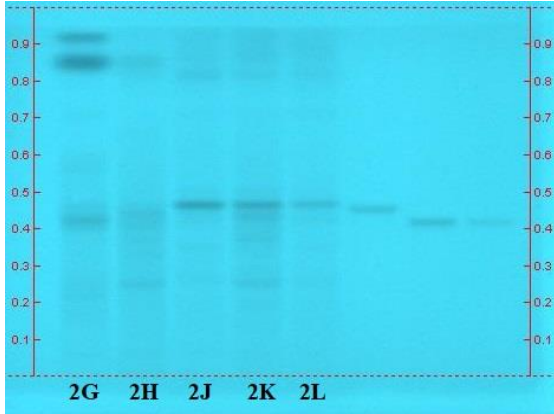


b) 366 nm

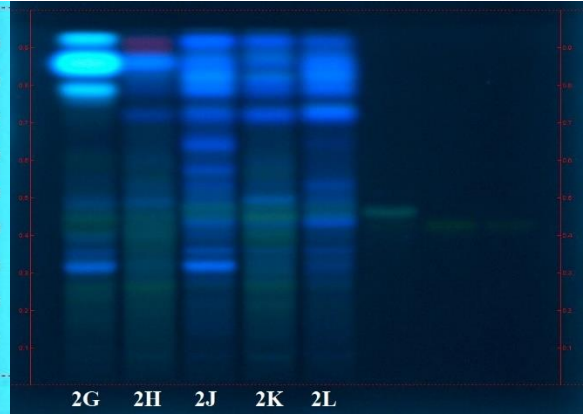


Rutin 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarini ekstresi; 2C, robinson mandarini; 2D, Washington portakalı; 2E, kütdiken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

a) 254 nm

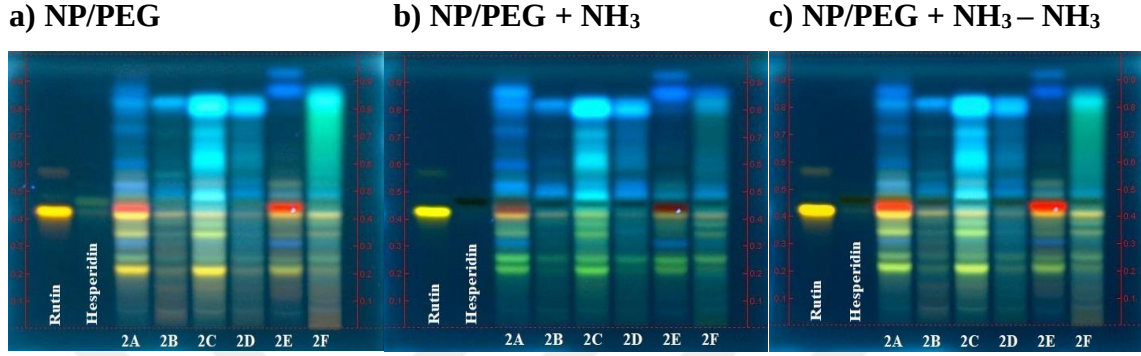


b) 366 nm

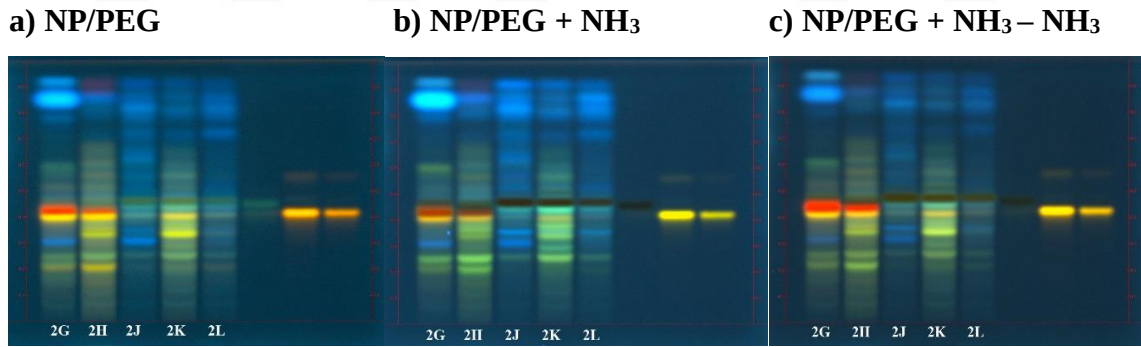


Rutin 0.8 ve 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarini ekstresi; 2C, robinson mandarini; 2D, Washington portakalı; 2E, kütdiken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

EK 13. Metot 4 (etil asetat:asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayırımın NP/PEG türevlendirmesi, NH₃ ile doyurulması (NP/PEG + NH₃) ve NH₃'ün ortamdan uzaklaştırılması (NP/PEG + NH₃ – NH₃) sonrasındaki 366 nm görüntüsü



Rutin 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarinini ekstresi; 2C, robinson mandarinini; 2D, Washington portakalı; 2E, küt diken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstraler maserasyon ile elde edilen ekstraleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)



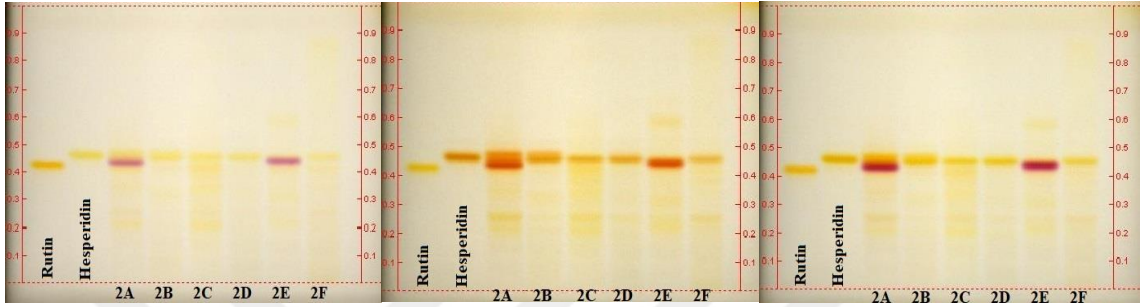
Rutin 0.8 ve 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarinini ekstresi; 2C, robinson mandarinini; 2D, Washington portakalı; 2E, küt diken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstraler maserasyon ile elde edilen ekstraleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

EK 14. Metot 4 (etil asetat:asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayırımın NP/PEG türevlendirmesi, NH₃ ile doyurulması (NP/PEG + NH₃) ve NH₃'ün ortamdan uzaklaştırılması (NP/PEG + NH₃ – NH₃) sonrasındaki beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü

a) NP/PEG

b) NP/PEG + NH₃

c) NP/PEG + NH₃ – NH₃

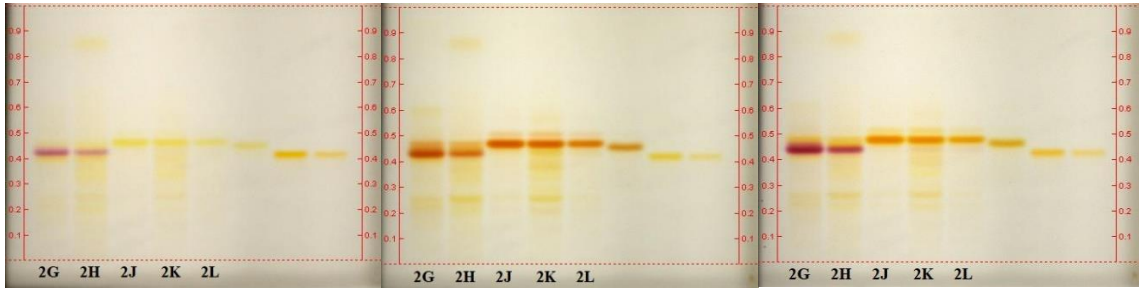


Rutin 0.2 µl, hesperidin 3 µl; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarinini ekstresi; 2C, robinson mandarinini; 2D, Washington portakalı; 2E, küt diken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstraleler maserasyon ile elde edilen ekstraleleri temsil etmektedir. Ekstreler 10µl uygulanmıştır)

a) NP/PEG

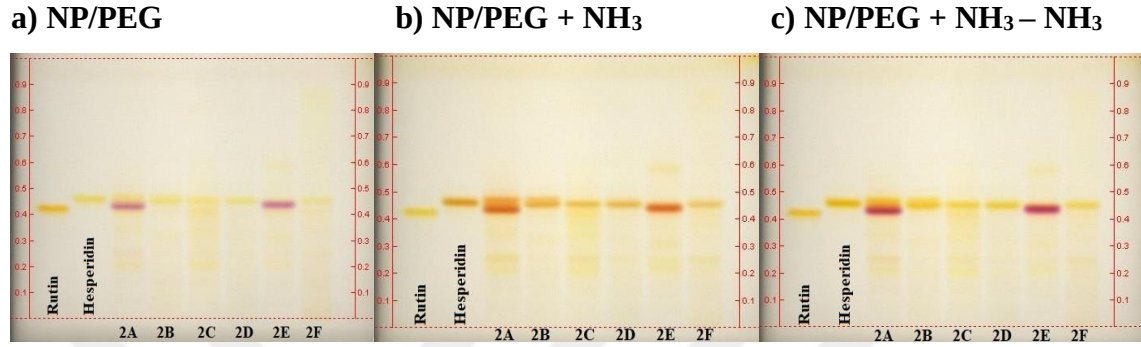
b) NP/PEG + NH₃

c) NP/PEG + NH₃ – NH₃

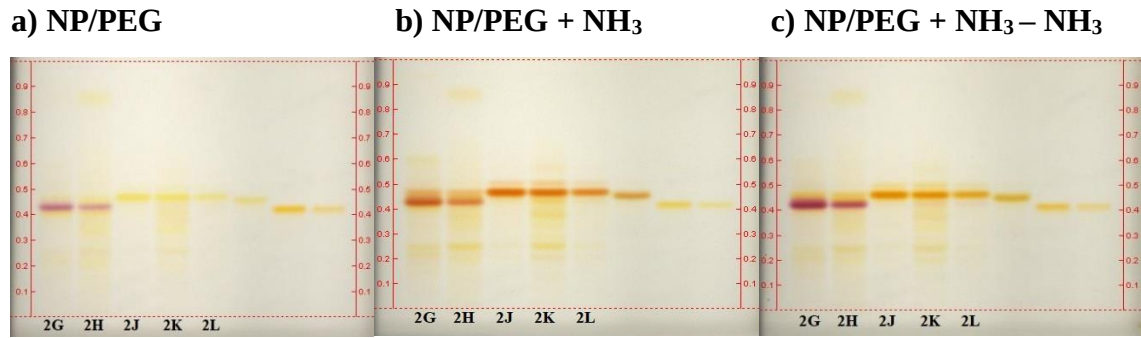


Rutin 0.8 ve 0.2 µl, hesperidin 3 µl; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarinini ekstresi; 2C, robinson mandarinini; 2D, Washington portakalı; 2E, küt diken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstraleler maserasyon ile elde edilen ekstraleleri temsil etmektedir. Ekstreler 10µl uygulanmıştır)

EK 15. Metot 4 (etil asetat:asetik asit:formik asit:su (100:11:11:26; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayırımın NP/PEG türevlendirmesi, NH₃ ile doyurulması (NP/PEG + NH₃) ve NH₃'ün ortamdan uzaklaştırılması (NP/PEG + NH₃ – NH₃) sonrasındaki beyaz ışıık (remisyon + transmisyon) görüntüsü



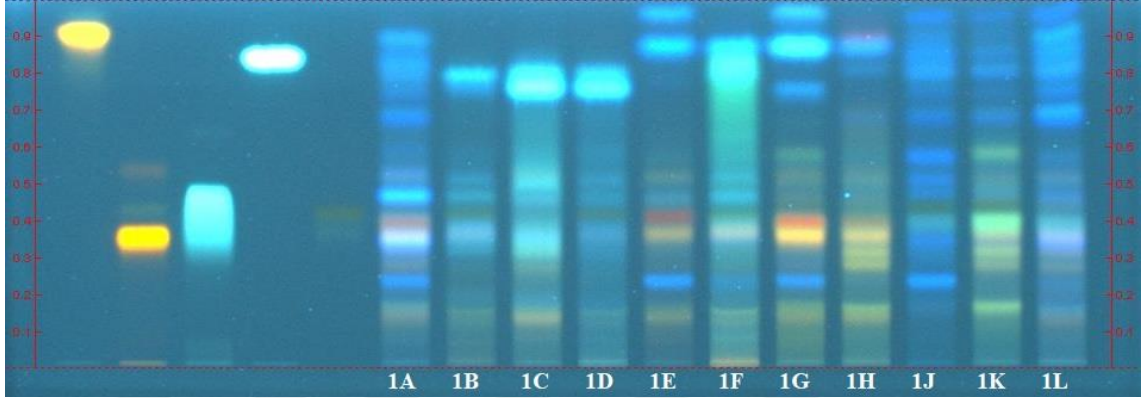
Rutin 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarinini ekstresi; 2C, robinson mandarinini; 2D, Washington portakalı; 2E, kütdiken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstrere maserasyon ile elde edilen ekstrere temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)



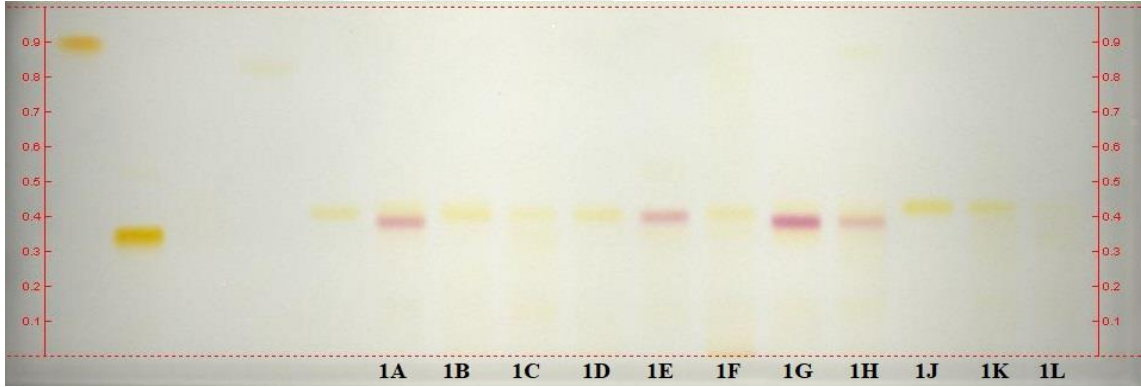
Rutin 0.8 ve 0.2 μ l, hesperidin 3 μ l; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarinini ekstresi; 2C, robinson mandarinini; 2D, Washington portakalı; 2E, kütdiken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstrere maserasyon ile elde edilen ekstrere temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

EK 16. Metot 5 (Etil asetat:formik asit:su, (75:15:10; *h:h:h*) mobil faz sistemi) ile elde edilen ayrımın NP/PEG türevlendirmesi sonrasındaki 366 nm ve beyaz ışık (transmisyon ve remisyon + transmisyon) görüntüsü

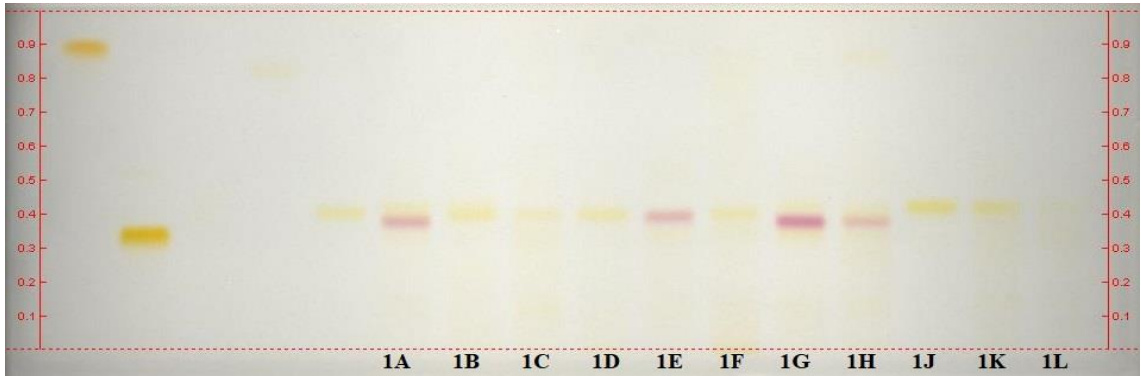
a) 366 nm



b) Beyaz ışık (transmisyon)



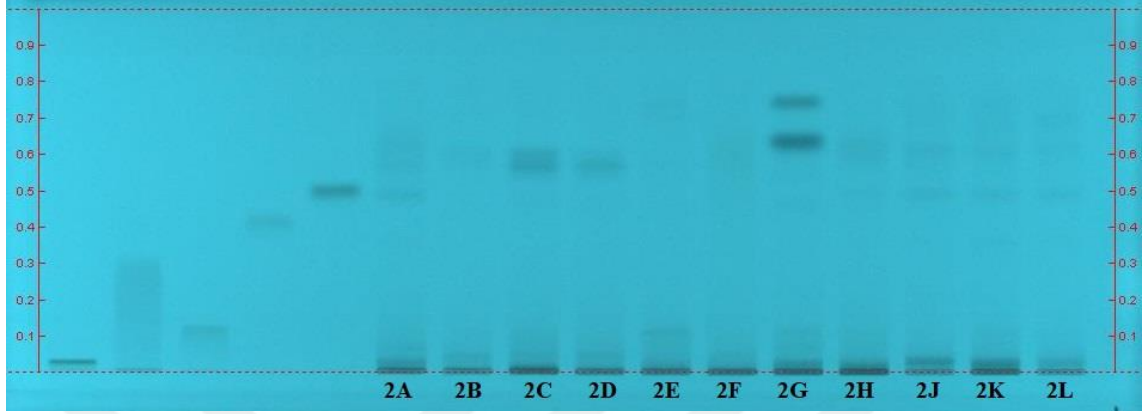
c) Beyaz ışık (remisyon + transmisyon)



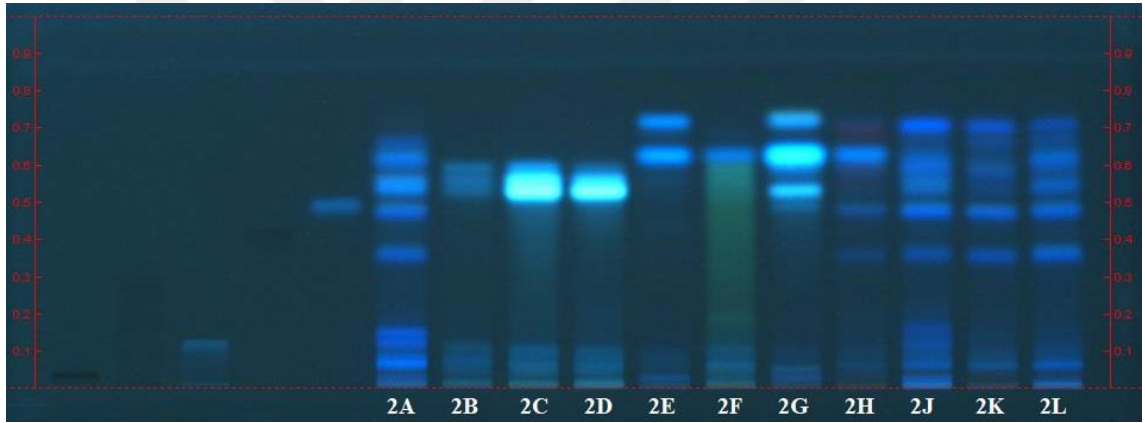
Soldan sağa sırasıyla: Kerasetin 1 μ l, rutin 1 μ l, klorojenik asit 1 μ l, kafeik asit 1 μ l, hesperidin 2 μ l; 1A, turunc ekstre; 1B, satsuma mandarin ekstre; 1C, robinson mandarin; 1D, Washington portakalı; 1E, kütiken limonu; 1F, tatlı limon; 1G, bergamot ekstre; 1H, etnak ekstre; 1J, starruby greyfurt; 1K, pomelo ekstre; 1L, oroblanco ekstre; 1 kodlu ekstrere, ASE yöntemiyle elde edilen ekstrere temsil etmektedir. Ekstreler 5 μ l uygulanmıştır)

EK 17. Kloroform:etil asetat:aseton:formik asit (4:3:2:1; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi ile elde edilen ayrımın 254 ve 366 nm görüntüsü

a) 254 nm



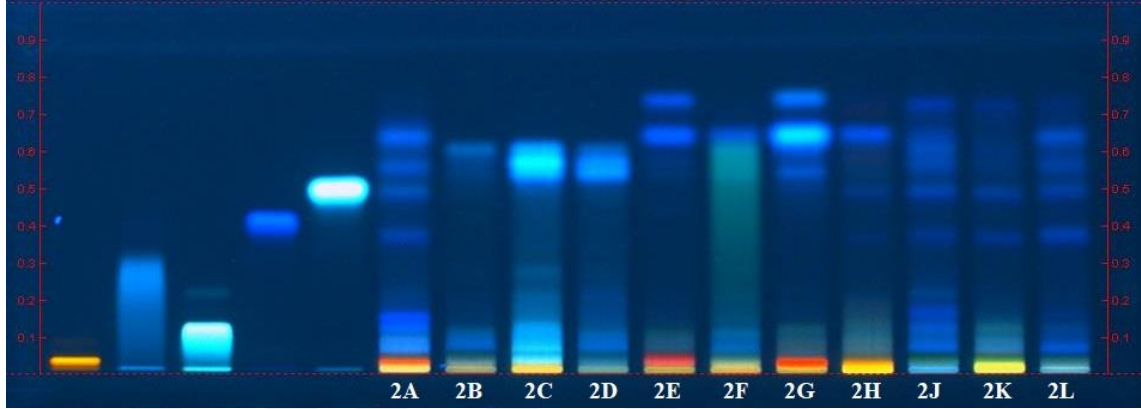
b) 366 nm



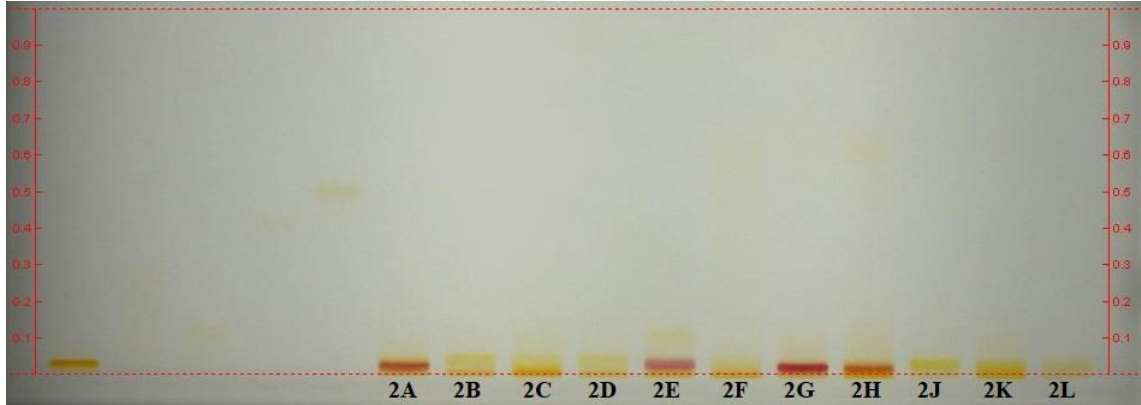
Sırasıyla soldan sağa: rutin 1 μ l, elajik asit 1 μ l, klorojenik asit 1 μ l, gallik asit 1 μ l, kafeik asit 1 μ l; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarini ekstresi; 2C, robinson mandarini; 2D, Washington portakalı; 2E, küt diken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 μ l uygulanmıştır)

EK 18. Kloroform:etil asetat:aseton:formik asit (4:3:2:1; *h:h:h:h*) mobil faz sistemi ile elde edilen ayrımın NP/PEG türevlendirmesi sonrasındaki 366 nm ve beyaz ışık (transmisyon) görüntüsü

a) 366 nm



b) beyaz ışık (transmisyon)



Sırasıyla soldan sağa: rutin 1 µl, elajik asit 1 µl, klorojenik asit 1 µl, gallik asit 1 µl, kafeik asit 1 µl; 2A, turunç ekstresi; 2B, satsuma mandarini ekstresi; 2C, robinson mandarini; 2D, Washington portakalı; 2E, kütdiken limonu; 2F, tatlı limon; 2G, bergamot ekstresi; 2H, etnak ekstresi; 2J, starruby greyfurt; 2K, pomelo ekstresi; 2L, oroblanco ekstresi; 2 kodlu ekstreler maserasyon ile elde edilen ekstreleri temsil etmektedir. Ekstreler 10 µl uygulanmıştır)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burak Temiz
Yabancı Dil : İngilizce
Doğum Yeri ve Yılı : Çorum 01.01.1994
E-posta : burakttemiz@gmail.com, buraktemiz@anadolu.edu.tr

Eğitim ve Mesleki Gelişimi:

İlköğretim: 1999-2007, Cumhuriyet İlköğretim Okulu
Lise: 2008-2012, Erdek Anadolu Lisesi
Lisans: 2012-2017, Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Eczacılık
Yüksek lisans: 2017-, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Farmakognozi ABD

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler

1) Agalar H.G., **Temiz, B.**, Ozturk, G., Demirci, B., Kirimer, N., Antimicrobial Activities and Fatty Acid Compositions of Kumquat, Limequat and Mexican Lime Seeds, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences, Ankara-Turkey, June 26-29, 2018.

2) **Temiz, B.**, Demirci, B., Agalar, H.G., Drying Effects on the Volatile Compounds of Kumquat, Limequat and Mexican Lime Fruits, 66th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research (GA), Shanghai-China, August 26-29, 2018.

3) **Temiz, B.**, Agalar, H.G., Evaluation of Antityrosinase Potentials of Kumquat, Limequat and Lime Fruits Extracts by HPTLC-bioautographic and Spectrophotometric Methods, 6th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants (WOCMAP), Famagusta-Cyprus, November 13-17, 2019.

4) Agalar, H.G., **Temiz, B.**, Demirci, B., Identification of Fatty Acids and Volatile Compounds of Bergamot Fruits, 6th World Congress on Medicinal and Aromatic Plants (WOCMAP), Famagusta-Cyprus, November 13-17, 2019.

Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

1) Agalar, H.G., **Temiz, B.**, Demirci, B., HS-SPME and microdistillation methods for the volatile compounds of bergamot fruits cultivated in Turkey, NVEO, 6 (4), 21-25, 2019.

Araştırmacı Olarak Yer Aldığı Ulusal Projeler

1) Bergamot meyvelerinin uçucu bileşikleri ve yağ asitlerinin incelenmesi, BAP Proje No: 1805S209, 2018-2019 (Tamamlandı)

2) *Arum maculatum* L. Yumrularının Sitotoksik Aktiviteleri ve Kimyasal Bileşimi Açısından İncelenmesi, BAP Proje No: 1805S197, 2018-2019 (Tamamlandı)

3) Bazı Narenciye türleri Üzerine Farmakognozik Araştırmalar, BAP Proje No: 1806S235, 2018- (Devam ediyor)

4) *Salvia sclarea* L. Örneklerinin Mikroorganizmalar Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi, BAP Proje No: 1905S080, 2019- (Devam ediyor)

Organizasyon Komitesinde Yer Aldığı Kongreler

Yerel	1. Aroid Ulusal Kongresi, Eskişehir-Türkiye, 26-29 Haziran 2019
Organizasyon	
Komitesi	