

**ORGANİK TUZLARIN DOĞAL BİR ÜRÜNLE
SUDA ÇÖZÜNÜRLEŞTİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimyager Evrim Kılıçgedik
509001261

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 26 Nisan 2004
Tezin Savunulduğu Tarih : 20 Mayıs 2004

Tez Danışmanı : Prof.Dr. Oya ATICI
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Ahmet AKAR
Yrd.Doç. Zeynep Petek ÇAKAR

HAZİRAN 2004

**ORGANİK TUZLARIN DOĞAL BİR ÜRÜNLE
SUDA ÇÖZÜNÜRLEŞTİRİLMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimyager Evrim KILIÇGEDİK
509001261**

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Oya ATICI

**Anabilim Dalı: Kimya
Programı : Kimyagerlik**

NİSAN 2004

ÖNSÖZ

Her alanda bana yardımcı olan tez danışmanım Prof. Dr. Oya ATICI'ya, her anlamda desteğini sunan Sn. Uzman Biyolog Ayşenur ULCA'ya, A&T gıda kontrol laboratuvarı çalışanlarına, her zaman yanımda olan ve beni destekleyen aileme, arkadaşım Aydın ATAŞ'a, arkadaşım Volkan ABAK'a, teknik desteğinden dolayı Dolunay Teknik Cihazlar ve İnşaat Sanayi Tic. Ltd. Şirketi'ne, laboratuvar ve teorik çalışmalarında bana yardımcı olan herkese ve de özellikle çalışmalarım sırasında uykusuz kalıp deneylerime büyük katkı sağlayan Kimyager Metin YILDIRIM'a teşekkür ederim.

Nisan 2004

Evrin Kılıçgedik

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR	v
AÇIKLAMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	xiii
1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI	1
2. TEORİK KISIM	2
2.1. İğde (Elaeagnus Angustifolia) Hakkında Genel Bilgi	2
2.1.1 İğdenin tıbbi yararları	4
2.1.2.İğdenin bileşenleri	5
2.2. β -Kربولinler	9
2.2.1 β -Kربولinlerin biyolojik etkileri	10
2.2.2. β -Kربولinlerin tespiti	11
2.3. Harmanın Sentezlenmesi	13
2.3.1 Harmanın biyosentezi	13
2.3.2. Harmanın sentetik olarak sentezlenmesi	14
2.3.2.1. Triptofan ve prüvik asit reaksiyonuyla elde edilmesi	14
2.3.2.2 Triptofan ve asetaldehit reaksiyonuyla elde edilmesi	15
2.3.2.3 Liserjik asitten elde edilmesi	15
2.3.2.4 β -Aminoetil indol'den elde edilmesi	16
3. DENEYSEL KISIM	17
3.1. Kullanılan Maddeler	17
3.2. Kullanılan Cihazlar Ve Analiz Şartları	17
3.2.1. GC-MS Cihazı	17
3.2.1.1. GC-MS Şartı	17
3.2.2. HPLC Cihazı	18
3.2.2.1. HPLC Şartı	18
3.2.3. LC-MS Cihazı	18
3.2.3.1. LC-MS(I) Şartları	18
3.2.3.2. LC-MS(II) Şartları	18
3.2.4. ICP-MS Cihazı	19
3.3. İğde Meyvesinden Harman Bileşenlerinin Elde Edilmesi	19
3.3.1. Su ile kaynatarak elde edilmesi	19
3.3.2. Metanol ekstraksiyonu ile elde edilmesi	20
3.3.2.1. Kesikli ekstraksiyon ile oda sıcaklığında elde edilmesi	20
3.3.2.2. Sürekli ekstraksiyon ile reflaks sıcaklığında elde edilmesi	21
3.4. TLC Analizleri	21

3.4.1. TLC (I) Şartları	21
3.4.2. TLC (II) Şartları	22
3.5. ICP-MS kullanarak harman bileşiğinin suda çözünme organik tuzu çözme gücünün tayini	22
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Bileşenlerin Suyla Kaynatılarak Elde Edilmesi	23
4.2. Bileşenlerin Metanol Ekstraksiyonu İle Elde Edilmesi	32
4.3. Harman'nın Organik Tuzları Çözme Gücü	43
KAYNAKLAR	48
ÖZGEÇMİŞ	52

KISALTMALAR

E.A.	: <i>Elaeagnus Angustifolia</i>
Var.	: varyete
TSP	: Termospray
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
HPLC	: High Performans Likit Kromatografisi
LC-MS	: Likit Kromatografi-Mass Spektrometri
GC-MS	: Gaz Kromatografi-Mass Spektrometri

AÇIKLAMALAR

Drene

Flavanoid

Fattty asit

Anti-inflamatuvar

Akut inflamasyon

İnflamasyon

Micobakteriyum tiberkilosis

Benzodiazepin reseptör

Nörotransmitter

Anti-malarial

Anti-parkinsoniyan

Antiseptik

CNS simulant

Komutajenik

Tremorojenik

Endogenez

Mutajenik

Akut tremor

Hendek

Hoş kokulu bileşikler

Katı yağ asitleri

İltihap sökücü

Kısa sürede iltihap oluşumu

İltihap oluşumu

Tiberkilos bakterisi

Epilepside kullanılan ilacın

alıcısı(reseptör)

Sinirler arasında iletişim sağlayan

hormon benzeri maddeler

Sıtmayı önleyici

Parkinson önleyici

Mikrop öldürücü

Merkezi sinir sistemi uyarıcısı

Kanseri tetikleyici

Titremeye neden olan

İç yapıda değişikliğe uğramak

Mutasyon oluşumuna neden olan

Kısa sürede ortaya çıkan titreme

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 4.1. İğde meyvesinin asit (A) ile ve baz (B) ile olgunlaştırılması sonunda ele geçen karışıma ait TLC (I) koşulundaki Rf değerleri.....	24
Tablo 4.2. M1, M2 ve M3 maddelerine ait Rf değerleri.....	33
Tablo 4.3. M4 madde karışımına ait Rf değerleri.....	39
Tablo 4.4. Tablo 4.4. İğde meyvesinde ve yaprağında β -karbolin bileşiklerini belirlemek üzere yapılan işlemlerde sonunda ele geçen karışım daki bileşiklere ait GC-MS'teki Rt değerleri ve bileşiklerin çözeltideki miktarları	45
Tablo 4.5. GC-MS'deki Rt değerlerinde gelen bileşiklerin adları ve formülleri	46

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 3.1 : Su ile kaynatma yönteminin düzeneği.....	19
Şekil 3.2 : (a) Soksilet sürekli ekstraksiyon düzeneği; (b) Clevenger sürekli ekstraksiyon düzeneği.....	21
Şekil 4.1 : Baz (B) ile olgunlaştırma sonunda elde edilen karışıma ait GC kromatogramı.....	25
Şekil 4.2 : (a) B maddesinde 14.85 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i; (b) B maddesinde 15,23 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i.....	25
Şekil 4.3 : Norharman (9H-Prido[3,4-b]indol) bileşiğinin muhtemel MS parçalanmaları.....	26
Şekil 4.4 : 1-asetil- β -karbolin bileşiğinin muhtemel MS parçalanmaları.....	27
Şekil 4.5 : 13, 14, 15, 16 no'lu maddelere ait GC kromatogramı.....	27
Şekil 4.6 : 13, 14, 15, 16 no'lu maddelerine ait 19.70'de çıkan pikin MS'i.....	28
Şekil 4.7 : 1,2-benzendikarboksilik asit, bis(2-etilhekzil) esterin parçalanma patronları.....	28
Şekil 4.8 : A maddesine ait GC kromatogramı.....	29
Şekil 4.9 : (a) 14.84 A.Z.'na ait pikin MS sonucu; (b) 15.22. A.Z.'na ait pikin MS sonucu.....	29
Şekil 4.10 : A maddesinin 11, 12 alıkonma zamanına ait MS'i.....	30
Şekil 4.11 : cis-bisiklo[4.4.0]dekan-1-ol-3-on bileşiğinin MS parçalanma patronları.....	30
Şekil 4.12 : M1 maddesinden preperatif TLC ile ele geçen 1 no'lu madde karışımına ait GC kromatogramı.....	34
Şekil 4.13 : M1 maddesinden preparatif TLC ile ele geçen 1 no'lu 18.77 alıkonma zamanlı maddeye ait MS.....	34
Şekil 4.14 : 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletıl)-4-metil-fenol]'ün MS parçalanma patronları.....	35
Şekil 4.15 : M1 madde karışımına ait GC kromatogramı.....	35
Şekil 4.16 : (a) M2 madde karışımının GC kromatogramı (b) M3 madde karışımının GC kromatogramı.....	36
Şekil 4.17 : M2 ve M3 maddesinin 16.99 alıkonma zamanlı piklerinin MS'i.....	37
Şekil 4.18 : 9H-Prido [3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester'in parçalanma patronları.....	37
Şekil 4.19 : M2 madde karışımının 15.07 alıkonma zamanlı pikinin MS'i.....	38
Şekil 4.20 : 1-metil-9H-Prido[3,4-b]indole (harman) parçalanma patronları.....	38
Şekil 4.21 : M4 maddesine ait GC kromatogramı.....	39
Şekil 4.22 : İğde yaprağından ele geçen madde karışımının (Y1) GC kromatogramı..	40
Şekil 4.23 : Y1 madde karışımında 15.90 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i.....	41
Şekil 4.24 : 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metilester (Z,Z,Z)'in parçalanma patronları.....	41
Şekil 4.25 : Y1 madde karışımında 16.01 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i.....	41
Şekil 4.26 : Fitol	42
Şekil 4.27 : Y1 madde karışımında 18.46 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i.....	42
Şekil.4.28 : Hekzandioik asit bis(2-etilhekzil) ester.....	42

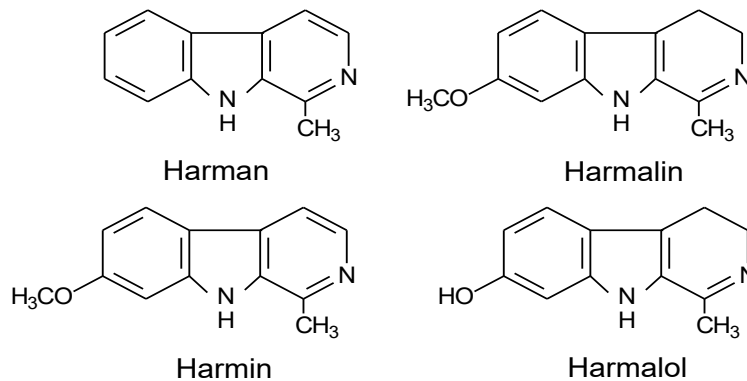
ÖZET

İğde (*Elaeagnus Angustifolia*) 7 m yüksekliğinde meyveleri elips şeklinde kırmızı-kahverengi olan bir ağaçtır. Çeşitli şekillerde adlandırılır. “Kuntze”, “Russian olive” bu adlandırmalar arasındadır. *Elaeagnus Angustifolia* (E.A.) Türkiye’nin birçok yerinde yetişir. E.A., *Elaeagnaceae* familyasından *Elaeagnus* cinsindendir. Yaygın olarak bilinen *Elaeagnus* türleri; *Elaeagnus Angustifolia*, *Elaeagnus Pungens*, *Elaeagnus Commutata* ve *Elaeagnus Multiflora*’dır.

Elaeagnaceae familyasına ait bitkiler gümüşü veya esmer renkli, pul şeklinde örtü tüyleri taşıyan çalı veya ağaçlardır. Bunların 45 civarında türü vardır. Ülkemizde iki türü ve iki cinsi bulunur. E.A. (iğde) Akdeniz ikliminde yetişen ve ülkemizde Çanakkale, Balıkesir, İstanbul, Bilecik, Çankırı, Sinop, Samsun, Gümüşhane, Erzurum, Eskişehir, Ankara, Kayseri, Sivas, Malatya, Siirt, Batman, Bitlis, Kars, Denizli, Konya, Mersin, Adana, Maraş, Urfa, Hakkari, Şemdinli ve daha pek çok yerde doğal olarak yetişen, çok dallanmış dikenli ve dikensiz çeşitlerinin bulunduğu bir ağaçtır. Meyve, zeytin meyvesi büyüklüğünde ve sarımsı renklidir. Bu meyve yenilebilir.

İğde bitkisinin çiçeği ve yapraklarının halk arasında idrar sökücü ve ateş düşürücü olarak kullanıldığı bilinir. Türkiye’de kış aylarında meyveleri iştah açıcı olarak yenilir. İğde meyvesinin kanserin tekrarlama olasılığını azaltma, kanseri durdurma ve hatta bazen kanser gelişimini ters yönde etkileme özelliği vardır. E.A.’nın meyvesi İran’da halk arasında ağrı kesici ve eklem ağrılarını tedavi etmek için anti-inflamatuvar olarak kullanılır.

İğde’de literatür taraması sonucunda β -karbolinler’in diğer bitkilere oranla oldukça fazla olduğu görülmüştür. Bu β -karbolinler, harman, harmalin, harmin, harmaloldur.



β -karbolinler pişirilmiş yemeklerde de oluşabilir. Yemeklere ısı uygulamak yeni maddelerin oluşumuna sebep olur. Bu yeni maddeleri çoğu karbonhidratların proteinlerle reaksiyonundan oluşur. Oluşan bu maddelerden bazıları kansere ve beyin hastalıklarına sebep olabilir.

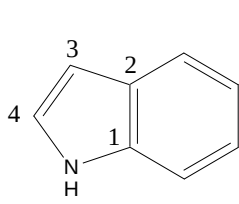
Organik Kimya Anabilim Dalında yapılan bir çalışmada iğde meyvesinin su ile kaynatılarak ele geçen sulu çözeltisinin, içinde bulunan bir veya birkaç bileşenin suda çözünmeyen organik tuzları suda çözünür hale getirdiği, belirlendi. Bu çözünme işleminin iğdenin içinde bulunan β -karbolinler yardımı ile olduğu düşünüldü. Bu nedenle iğdeden bu maddelerin ekstraksiyonu üzerinde yoğunlaşıldı. Ayrıca bu β -karbolinlerden literatür taraması sonuçlarında harmanın daha rahat elde edilmesi ve vücut tarafından da sentezleniyor olması bizi bu bileşiğe yönlendirdi. Standart olarak harman alınarak, azotları aracılığıyla organik tuzları tutup tutmayacağının araştırılması düşünüldü. Ekstraksiyon neticeleri Tablo 1 ve Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 1. İğde meyvesinde ve yaprağında β -karbolin bileşiklerini belirlemek üzere yapılan işlemlerde sonunda ele geçen karışım daki bileşiklere ait GC-MS’deki Rt değerleri ve bileşiklerin çözeltideki miktarları

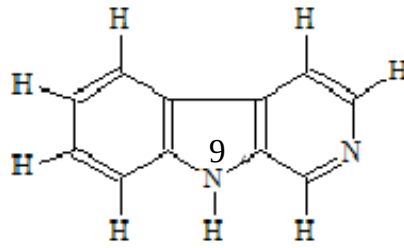
Deney Kodu	Ele geçen karışımdaki bileşiklere ait GC-MS’deki Rt değerleri ve bileşiklerin çözeltideki miktarları (%)								
	11.12	14.85	15.07	15.23	15.90	16.02	16.99	18.46	18.77
B(meyve) Suda refluks sıcaklığında 12 saat	-	54.5	-	45	-	-	-	-	-
A (meyve) Suda asit ile refluks sıcaklığında 12 saat	25	56	-	14	-	-	-	-	-
M1(meyve) Metanolde oda sıcaklığında 4 gün	-	13.5	-	84	-	-	-	-	$\sqrt{*}$
M2(meyve) Metanolde oda sıcaklığında 4+3 gün	-	-	59	27	-	-	15	-	-
M3(meyve) Metanolde oda sıcaklığında 4+3+3 gün	-	10	-	25	-	-	63	-	-
M(meyve) (M1+2+3’ün ortalaması)	-	~8	~20	~46	-	-	~26	-	$\sqrt{*}$
M4(meyve) Metanolde refluks sıcaklığında 2 gün	-	66	-	32	-	-	-	-	-
Y1(yaprak) Metanolde refluks sıcaklığında 2 gün	-	27	-	1	12,5	10	23	0.5	-

* TLC kazımlarında elde edildi.

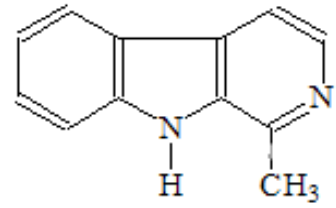
Tablo 2. GC-MS'deki Rt değerlerinde gelen bileşiklerin adları ve formülleri



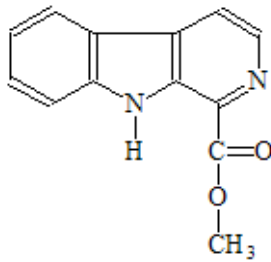
İndol



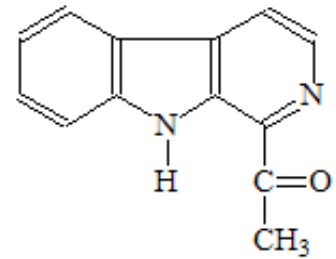
**14.85 : 9H-Prido[3,4-b]indol
norharman**



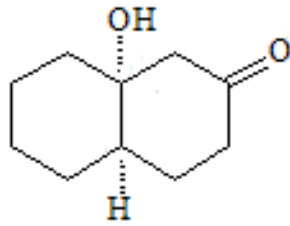
**15.07 : 1-metil-9H-Prido[3,4-b]indole
harman**



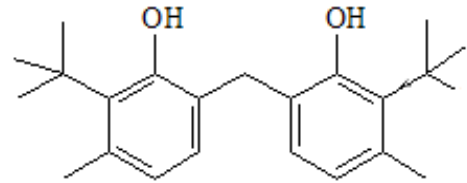
16.99 : 9H-Prido [3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester



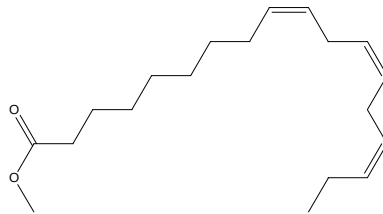
15.23 : 1-asetil-β- karbolin



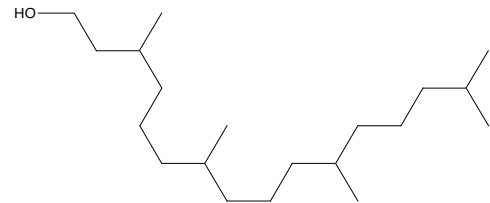
11.12 : cis-bisiklo[4.4.0]dekan-1-ol-3-on



**18.77 : 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-
metil-fenol]**



15.90 : 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metilester (Z,Z,Z)



16.02 : fitol

İğde meyvesinin sulu çözeltisi organik tuzları çözme özelliği gösterdiği için, öncelikli olarak belli miktarlarda iğde meyvesi, suda kaynatıldı. İğde içerisindeki glikozid yapıda olabilecek maddeleri de suya geçirmek için olgunlaştırma işlemi yapıldı. Bu olgunlaştırma işlemi iki şekilde gerçekleşti. İğde çözeltisi suyu

uçurulduktan sonra iki kısma ayrıldı. İlk kısma amonyak katılarak ortam bazik yapıldı (B). İkinci kısma HCl katılarak ortam asidik yapıldı (A). Bu iki kısımda ele geçen maddelere TLC analizleri, GC-MS analizi ve HPLC analizi yapıldı. GC-MS analizleri sonucunda A ve B maddelerinin ikisinde de  -karbolin türevlerinden norharman ve 1-asetil- -karbolin elde edildi. Bu maddelerin yanı sıra, A maddesinde cis-bisiklo[4.4.0]dekan-1-ol-3-on bile i i ele geçirildi (Tablo 1 ve Tablo 2). Ayrıca TLC analizleri sonucunda 0.63 Rf değerinde harman bile i i her iki maddede görüldü.

Ayrıca i de meyvesi ve yapra ından  -karbolinlerin tespiti için metanolle ekstraksiyon yapıldı. Bu ekstraksiyonlar sonucunda norharman ve 1-asetil- -karbolin bileşiklerinin yanı sıra literatürde bulunmayan 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletıl)-4-metil-fenol, 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metilester (Z,Z,Z), Hekzandioik asit-bis(2-etilhekzil) ester ve fitol bileşikleri GC-MS ile tespit edilmiştir (Tablo 1 ve Tablo 2). Ayrıca TLC analizleri sonucunda 0.63 Rf değerinde harman bile i i ele geçen her maddede görülmüştür

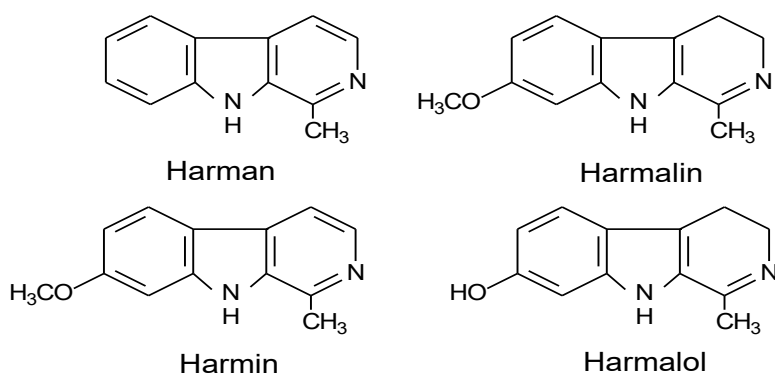
Harman standartı kullanılarak bu bile i in organik tuzları çözüp   zmedi i araştırıldı. Suda   z nme zorluğundan dolayı organik tuz olarak kalsiyum okzalat seçildi. ICP-MS kullanılarak harman çözeltisinde çözünen kalsiyum ile suda çözünen kalsiyum oranları kar ıla tırıldı ve harmanın suda çözünmeyen organik tuzları çözmede herhangi bir katkısının olmadığı görüldü. Sonuç olarak harman ve diğer  -karbolinlerin saf olarak değil, fenolik bileşikler ve enzimler de dahil asidik olan kendi ortamları içinde (pH= 3,7), ger ekle tirmi  olabileceği sonucuna varıldı.

SUMMARY

Oleaster (*Elaeagnus Angustifolia*) is a tree which has 7 m height and has ellipse shaped red-brown fruits. It has various names such as “Kuntze” and “Russian olive”. *Elaeagnus Angustifolia* (E.A) grows at lots of places in Turkey. E.A is from *Elaeagnaceae* family and type of *Elaeagnus*. *Elaeagnus Angustifolia*, *Elaeagnus Pungens*, *Elaeagnus Commutata* ve *Elaeagnus Multiflora* are other types of *Elaeagnus* which is well-known.

Plants which belong to *Elaeagnaceae* family has silver-dark colour. They have 45 types. Two type of them grow in Turkey. Oleaster which grow in the mediterranean climate is found in Çanakkale, Balıkesir, İstanbul, Bilecik, Çankırı, Sinop, Samsun, Gümüşhane, Erzurum, Eskişehir, Ankara, Kayseri, Sivas, Malatya, Siirt, Batman, Bitlis, Kars, Denizli, Konya, Mersin, Adana, Maraş, Urfa, Hakkari, Şemdinli. Oleaster fruits have yellowish colours and has the same size of olive and it is eatable.

The flowers and fruits of this fruits are used as diuretic and antipretic in public. Its fruits are eaten as appetizing in the winter time. It reduces probability of the repetation of cancer and has property of obstruction in cancer progress. In Iran It is used as an antiinflamatuvar to treat joint pain. As a results of researches it is seen that oleaster fruits include β -carbolines more than other plants. Some of these β -carbolines are harman, harmalin, harmin, harmalol.



β -carbolines can form in cooked foods. To cook the foods cause to form new substances. Most of these new substances occur from reaction between corbonhydrates and proteins. These can cause cancer and brain disease.

Experiments which were done in organic chemistry department showed that in the watery form of oleaster fruits, some substances which were extracted from boilig oleaster fruits with water, solved the organic salts which is not soluble in water. It

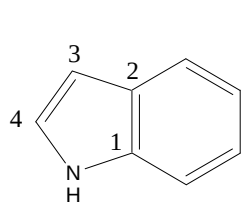
has been thought that this could happen by the effect of β -carbolines which is in oleaster. As a result of researches It has seen that harman which is a kind of β -carbolines is easy compound to get and it can be synthesized in human body. Because of results, our researches focused on this compound. It has been thought that Nitrogen on β -carboline compounds could hold the organic salts. That is why we focused on the these compounds. The results of extraction were given in Table 1 and Table 2.

Table 1. To determine β -carboline compounds the amount and Rt value of GC-MS of mixture which was obtained from fruits and leafs of oleaster.

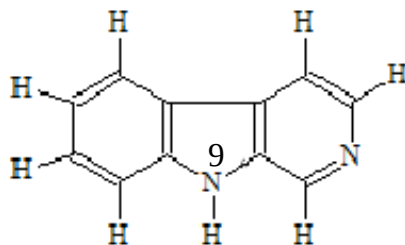
Experiment Code	The amount and Rt value of GC-MS of mixture which was obtained from fruits and leafs of oleaster (%)								
	11.12	14.85	15.07	15.23	15.90	16.02	16.99	18.46	18.77
B(fruit) In the water with base temperature 12 hours	-	54.5	-	45	-	-	-	-	-
A (fruit) In the water with acid temperature 12 hours	25	56	-	14	-	-	-	-	-
M1(fruit) In metanol room temperature 4 days	-	13.5	-	84	-	-	-	-	$\sqrt{*}$
M2(fruit) In metanol room temperature 4+3 days	-	-	59	27	-	-	15	-	-
M3(fruit) In metanol room temperature 4+3+3 days	-	10	-	25	-	-	63	-	-
M(fruit) (M1+2+3's average)	-	~ 8	~ 20	~ 46	-	-	~ 26	-	$\sqrt{*}$
M4(fruit) In metanol reflux temperature 2 days	-	66	-	32	-	-	-	-	-
Y1(leaf) In metanol reflux temperature 2 days	-	27	-	1	12,5	10	23	0.5	-

* it is obtained from TLC.

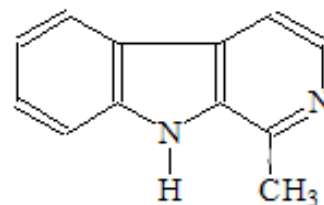
Table 2. The name of the compounds which has Rt value of GC-MS.



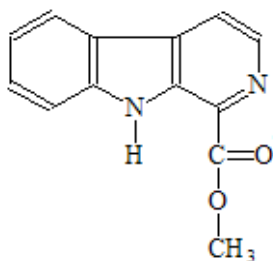
Indole



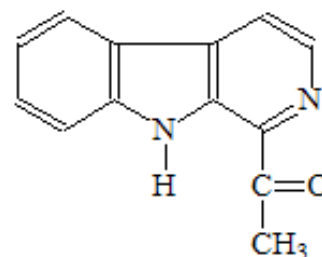
14.85 : 9H-Pydo[3,4-b]indol
norharmene



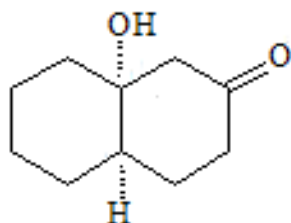
15.07 : 1-metyl-9H-Pydo[3,4-b]indole
harmene



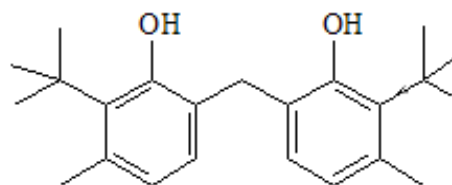
16.99 : 9H-Pydo [3,4-b]indole-1-carboxylic acid, metyl ester



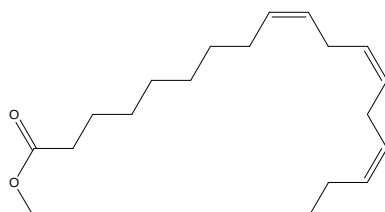
15.23 : 1-asetyl-β-carboline



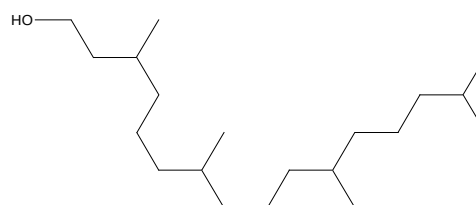
11.12 : cis-biscyclo[4.4.0]decan-1-ol-3-on



18.77 : 2,2'-metylenbis[6-(1,1-dimetyletyl)-4-
metyl-phenol



15.90 : 9,12,15-Octadecatrienoic acid, metilester (Z,Z,Z)



16.02 : Phytol

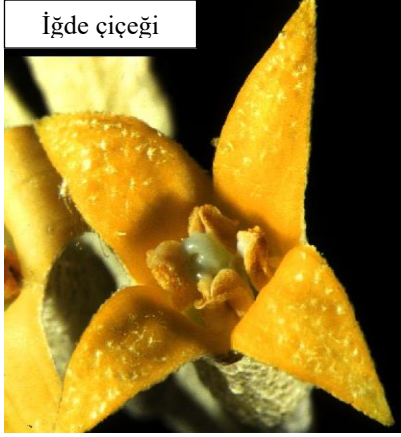
The watery solution of oleaster fruits has the property of solving organic salts. Because of this reason firstly, oleaster fruits were boiled in the water. The ripening

process was done to take the some glycozide compounds which is not soluble in water. This ripening process was done in two ways. After water was evaporated in the oleaster solution, the residual was separated to two parts (A and B). Ammonium hydroxid was added to the first part (B). Hydrochloric acid was added to the second part (A). TLC, GC-MS, HPLC, LC-MS analyses were done for the substances obtained from these two parts. GC-MS analysis showed that these two compounds included norharman and 1-acetyl- β -carboline which are β -carboline. In addition to these compounds cis-bisiklo[4.4.0]decan-1-ol-3-on was determined in A (Table1). Harman compound was also determined by TLC (R_f = 0.63) for both A and B.

Extraction with metanol was done to determine β -carboline in the oleaster fruits and leaf. Norharman and 1-acetyl- β -carboline was found in all substances which are obtained via metanol extraction from oleaster fruits and leaf. 2,2'-metylenbis[6-(1,1-dimetyletyl)-4-metyl-phenol, 9,12,15-Octadecatrienoic acid, metylester (Z,Z,Z), Hexandioic acid-bis(2-etylhekzil) ester and phytol compounds which is not mentioned before about in other articles was also determined by GC-MS (Table1). Harman compound was determined by TLC (R_f =0.63) for all substances.

Harman reference was used to determine whether it had effect to solve organic salts or not. Because of insolubility in water, calcium oxalate was chosen as the organic salt. The amount of calcium which solved in water and in harman solution was compared. It has been seen that harman had no effect to solve the organic salts which are insoluble in water. As a result, harmane and other β -carboline do not solve the organic salts alone, it has been thought that phenolic compound and enzymes help β -carboline to solve the organic salts in their natural acidic environment in oleaster.

BÖLÜM 1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI



İğde (*Eleagnus Angustifolia*) bitkisi Türkiye’de daha önce üzerinde çok kısıtlı çalışmalar yapılmış bir bitkidir. Halk arasında uzun zamandır bu bitkinin çiçeği ve yaprakları idrar sökücü ve ateş düşürücü olarak kullanılmıştır. Kış aylarında meyveleri iştah açıcı olarak yenilir. İğde meyvesinin kanserin tekrarlama olasılığını azaltma, kanseri durdurma ve kimi zaman da kanser gelişimini ters yönde etkileme özelliği vardır.

E.A.’nın meyvesi İran’da da halk arasında ağrı kesici ve eklem ağrılarını tedavi etmek için anti-inflamatuvar olarak kullanılmaktadır. İğde, Orta Asya’da da kendiliğinden yetişir. Özellikle deniz kıyılarında bolca rastlanan iğde ağaçlarının yapraklarından da birçok alanda yararlanılır. Görsel olarak da ilgi çeken iğde, mobilya sektöründe peyzaj malzemesi olarak kullanılır.



Bu çalışmanın iğde meyvesinin suda çözünmeyen organik tuzları çözüp çözmediğinin, çözüyorsa hangi bileşeni ile çözdüğünün belirlenmesidir. Organik Kimya Anabilim Dalında yapılan bir çalışmada iğde meyvesinin su ile kaynatılarak ele geçen sulu çözeltisinin, içinde bulunan bir veya birkaç bileşenin suda çözünmeyen organik tuzları suda çözünür hale getirdiği, belirlendi İğde bitkisinde literatür taraması sonucunda β -karbolinler’in diğer bitkilere oranla oldukça fazla olduğu görüldü. Harman, harmalin, harmin, harmalol bu β -karbolinlerden birkaçıdır. Bu çözünme işleminin iğdenin içinde bulunan üzerindeki azot bağlarından dolayı β -karbolinler yardımı ile olduğu düşünüldü. Bu β -karbolinlerden literatür taraması sonuçlarında harmanın daha rahat elde edilmesi ve vücut tarafından da sentezleniyor olması bizi bu bileşiğe yönlendirdi. Bu nedenle iğdeden bu maddenin ekstraksiyonu üzerinde yoğunlaşıldı.

BÖLÜM 2. TEORİK BİLGİLER

2.1. İğde (*Elaeagnus Angustifolia*) Hakkında Genel Bilgi

İğde (*Elaeagnus Angustifolia*) 7 m yüksekliğinde meyveleri elips şeklinde kırmızı-kahverengi olan bir ağaçtır. Çeşitli şekillerde adlandırılır. “Kuntze”, “Russian”, “Olive” bu adlandırmalar arasındadır. *Elaeagnus Angustifolia* (E.A.) Türkiye’nin birçok yerinde yetişir. E.A., *Elaeagnaceae* familyasından *Elaeagnus* cinsindendir [1]. Yaygın olarak bilinen *Elaeagnus* türleri; *Elaeagnus Angustifolia*, *Elaeagnus Pungens*, *Elaeagnus Commutata* ve *Elaeagnus Multiflora*’dır [2].



Elaeagnaceae familyasına ait bitkiler gümüşü veya esmer renkli, pul şeklinde örtü tüyleri taşıyan çalı veya ağaçlardır [3]. Bunların 45 civarında türü vardır. Ülkemizde iki türü ve iki cinsi bulunur. E.A. (iğde) Akdeniz ikliminde yetişen ve ülkemizde sıkça rastlanan, çok dallanmış dikenli ve dikensiz çeşitlerinin bulunduğu bir ağaçtır. Yaprakları gümüş rengindedir. Meyve, zeytin meyvesi büyüklüğünde ve sarımsı renklidir, yenilebilirdir.

İğde çiçeği (*Flos Elaeagni*) *Elaeagnus Angustifolia* L. (Çiçek iğdesi, Yabani iğde) türünün kurutulmuş çiçekleridir [4]. Bu tür, 7 m kadar bir boya erişebilen, dikenli ve kışın yaprak döken bir ağaççıktır. Yaprakları gümüşü renkli, dar ve uzundur. Çiçekleri 4 parçalı, sarımsı beyaz renkli, hoş ve kuvvetli bir kokudadır. Meyve tek tohumlu, dar uzun 2 cm kadar uzunlukta ve sarımsı esmer renktedir. E.A., Türkiye’de yaygın bir bitkidir. Bu bitkiye su kenarlarında daha çok rastlanır. Orta Anadolu’da tarla kenarlarına çit olarak dikilir. Çiçekler ve yapraklar, infüsyon halinde (% 5) idrar sökücü ve ateş düşürücü olarak kullanılır. Bu türün bir varyetesi (var. *orientalis* (L.) Kuntze) Orta ve Doğu Anadolu’da meyvesi için yetiştirilir. Bu varyetenin meyveleri zeytin tanesi büyüklüğünde, kırmızımtrak esmer renkli, gümüşü pullu, iç kısmı unlu gibi ve tatlı lezzetlidir. Vatanı Orta Asya olduğu sanılan bu

bitkinin meyveleri “iğde” adıyla çerez olarak yenilir. Yaprak ve çiçekleri yukarıdaki tür gibi kullanılır.

E.A. 45 kadar türü bulunan, bir kısmı yaprağını döken, bir kısmı da her zaman yeşil kalan ağaç veya çalılardır. Yaprak döken türler tam güneş isterlerken, her zaman yeşil türler yarı gölgeyede dikilebilirler.

İğde ağacı genel olarak Güney Avrupa’da, Asya ülkelerinde ve Himalayalar’da yetişir. İlk olarak Kuzey Amerika’da sömürgecilik zamanlarında tanınmış ve 1906’da Batı Amerika’da yetiştirilmek üzere halka tanıtılmıştır. 1920’lerin ortalarında Utah ve Nevada’da yerleştirilmiş, 1950’lerde Colorado’da yaygınlaşmıştır. İğde’nin yetiştirilmesi ile ilgili ilk referanslar Batı’da New Mexico, Nevada ve Arizona’da 1903, 1906 ve 1909 yıllarında oluşmuştur. 1940’lı yıllarda Batı’daki pek çok şehirde süs bitkisi olarak yaygınlaşmıştır. 1939’ların başında rüzgar kıran, erozyon önleyici ve uzun ömürlü olması nedeniyle mükemmel bir tür olarak tanıtımı yapılmıştır. Tuzlu topraklara, sıcağa, kuraklığa ve rüzgara ara sıra gerçekleşen yüksek ısıya, geçici su fazlasına, otlara, budanmaya son derece dayanıklıdır [19]. İğde ağacı genellikle su kenarlarında kendiliğinden yetişir.



Geniş bir alana yayılmış olan iğde ağacı ülkemizde Çanakkale, Balıkesir, İstanbul, Bilecik, Çankırı, Sinop, Samsun, Gümüşhane, Erzurum, Eskişehir, Ankara, Kayseri, Sivas, Malatya, Siirt, Batman, Bitlis, Kars, Denizli, Konya, Mersin, Adana, Maraş, Urfa, Hakkari, Şemdinli ve daha pek çok yerde doğal olarak yetişir [5]. Suriye, İran, Afganistan ve Pakistan’da da yetişir. Orta Asya’dan geldiği düşünülmektedir. Türkiye’nin yerel bir bitkisidir. Daha çok su kaynaklarına yakın yerlerde ekilir. Olgun, geniş yapraklı türleri *E. Orientalis* L. ya da *E. Angustifolia* var. *orientalis* (L.) Kuntze olarak tanımlanır.

İğde ağacı hem çalı hem de ağaç olarak sınıflandırılabilir. Büyümesi tamamlandığında yoğun bir çalılık veya ağaçlık meydana getirir. Tek başına büyüyen iğde bitkisi ise, ağaç şeklinde gelişir ve 50 m yüksekliğe ulaşabilir. Gümüşü renkte yaprakları ve küçük meyveleri olan bu bitki genellikle kentsel kısımlarda yeşil yapraklı bitkilere kontrast oluşturmak amacı ile yaygın olarak kullanılır.

Bitki genellikle tohumundan yetişir, ancak bunun yanı sıra kalem aşısı, çelikle üreme veya kök parçalarından da üretilebilir. İyi drene olan topraklarda iyi gelişirler. Genellikle kendiliğinden yetişmesinin sebebi, olgunlaşan meyvelerin doğal süreç içinde zamanı dolduktan sonra dökülmesiyle toprağa karışan tohumunun filizlenerek yetişmesiyle gerçekleşir.

İğde bitkisinin çiçeği oldukça hoş kokulu ve aynı zamanda hoş bir görünümündedir. Genellikle yaz sonunda çiçeklenen iğde ağaçları, güzel görünümlerinden dolayı pek çok yerde peyzaj materyali olarak tercih edilir. Çiçekli rengi beyaz-sarıdır. Çiçeklenme zamanı yazsonu, sonbahar başı veya sonbahar ortası, sonbahar sonu kış ortası olabilir.

Çiçeklenmenin ardından döllenmiş çiçekler zamanla meyveye dönüşür. Meyveleri önce yeşil renkte gelişir. Olgunlaşan meyvelerin rengi zamanla kırmızıya döner. Bu haliyle iğdenin meyvesi oldukça lezzetli bir besin kaynağıdır.

Fenolik asit ve türevleri bitkilerde geniş bir dağılıma sahiptir [6]. Çimlenme, kuruma, olgunlaşma, saklama ve ilerleme, meyve gelişimi aşamalarında fenolik asit dereceleri değişebilir. Bu bileşikler koyu renge, acı tada, bazı yaprakların, meyvelerin, çekirdeğin nahoş tadına sebep olabilir. Bu bileşiklerin gıdaların toksikolojik, duyuşal, besinsel ve antioksidan özelliklerinde olası ajanlar olduğu vurgulanır. Nahoş tadından dolayı taze toplandığında halkın tüketimi için uygun değildir. Birkaç haftadan sonra tatlı tada ulaşır ulaşmaz piyasada satışa sunulur.

2.1.1 İğdenin tıbbi yararları



İğde bitkisinin çiçeği ve yapraklarının halk arasında idrar sökücü ve ateş düşürücü olarak kullanıldığı bilinir [6]. Türkiye’de kış mevsiminde meyveleri iştah açıcı olarak yenilir.

Bu bitkinin çiçekleri kanamayı durdurucu ve ayrıca kalp rahatsızlıklarında kullanılır [1]. Meyvesi kanamayı durdurucudur. Bu türün birçok üyesinin meyvesi vitamin ve mineraller bakımından zengindir. Özellikle A, C, E vitaminleri, flavanoidler ve diğer bioaktif

bileşiklerce zengindir. Meyvede pek rastlanmayan temel fatty asitler bakımından

zengindir. Bu bitki meyvesinin kanserin tekrarlama olasılığını azaltma, kanseri durdurma ve hatta bazen kanser gelişimini ters yönde etkileme özelliği vardır.

E.A.'nın meyvesi İran'da halk arasında ağrı kesici ve eklem ağrılarını tedavi etmek için anti-inflamatuvar olarak kullanılır [7,8]. Ayrıca bu bitkinin meyvesi ve yapraklarının ateş düşürücü etkisi olduğu ileri sürülür. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki ığdenin meyvesinin çeşitli bölümlerinin sulu ekstraktları akut inflamasyonda anti-inflamatuvar etkiye sahiptir. ığdenin çekirdek ekstraksiyonlarının kronik inflamasyona karşı etkili olduğu gözlenmiştir. E.A.'nın flavonoid içerdiği bilinir. Bu etkinin bazı flavonoid bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmüştür. Buna ek olarak, bu bitkinin meyvelerinde linoleik, palmitik ve oleanolik asit gibi fatty asitleri mevcuttur. Ayrıca bu maddelerde anti-inflamatuvar etkisi olduğu iddia edilir. Fakat sulu ekstrakta bu maddelerin düşük miktarda olması nedeniyle anti-inflamatuvar etkiye sahip olamayacağını düşündürmüştür.

Ağrı kesici ilaç olarak kullanılmak üzere yapılan araştırmaların konusu bitkilerdir [8]. ığdenin gribe, sarılığa, astıma, tetanoza ve romatizmal hastalıklara iyi geldiği düşünülür. Bulgar bitkilerinden izole edilen bileşiklerin anti-tümör etkisi araştırılmıştır [20]. Bilinmeyen bileşiğin yağlı karışımını içeren E.A.'nın kabuğu yaprakları ve meyvelerinden yoğunlaştırılmış ekstraksiyonun küçük miktarda anti-lösemik aktiviteye sahip olduğu gözlenmiştir.

2.1.2.ığdenin bileşenleri

E.A.'nın komponentleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. İlk olarak yapılan çalışmada meyve etinin çekirdeğe oranı ve meyvenin şeker içeriği araştırılmıştır [9]. Meyve etinin çekirdeğe oranı % 48'den % 80'e kadar değişen oranlarda ve meyvenin şeker içeriğinin % 43'ten % 59'a kadar değişen oranlarda olduğu tespit edilmiştir.

E.A.'nın kabuğunun iki alkaloid içerdiği bulunmuştur [10,11]. Eleagnine olarak adlandırılan alkaloidlerden biri kristal formda ele geçirilmiştir. Bu madde Et₂O, CHCl₃ ve EtOH da çözülebilir, suda az çözülür. Optikçe inaktiftir. Süblimleştirme ile arındırılır. 180-1.5 °C arasında erir. C₁₂H₁₄N₂ yapısındadır ve bir çift bağa sahiptir (KMnO₄ oksidasyonu) HCl tuzunun erime noktası 253.6-254.6 °C (etanol-CHCl₃'ten), H₂SO₄ ve oksalik asit tuzları suda az çözünür. Başka bir alkaloid ele geçirilmiştir [11]. Fakat vizkoz yağ gibi saf olmayan bir yapıda ele geçirilmiştir. Eleagnine

alkaloid'inin tetrahidroharman'ın rasemik formunda olduğu belirlenmiştir [12]. 2 g alkaloidin 1.5 g AcOH, 10 ml su ve 12 g Ag₂CO₃ ile dehidrogenasyonu 8 saat 180 °C bir kapalı tüpte harmanı vermektedir. Erime noktası 233-4 °C arasındadır. Ve EtOH içinde Na ile tekrar eleagnine yapısına döner. Erime noktası 179-80 °C arasındadır. E.A.'nın dış bölümlerinde de harman alkaloidi araştırılmıştır [14]. E.A.'nın uçucu bölümleri metanol ile ekstrakte edilmiştir. Metanol ekstraksiyonu buharlaştırılmıştır. Kalan madde % 1'lik HCl çözeltisinde çözülüp asit çözeltisi Et₂O ile ekstarkte edilmiştir. Et₂O fazı ayrılıp geriye kalan sulu tabaka % 10 luk NH₄OH çözeltisi eklenerek alkaloid yapılmıştır. (Ph=10) ve CHCl₃ ile ekstrakte edilmiştir. Solvent uçurulduktan sonra kalan madde metanol içinde çözülüp ince tabaka kromatografisi (TLC) yapılmıştır. Bunun için slikajel tabakaları kullanılmıştır. 3 farklı çözeltide TLC denenmiştir. BuOH, metil etil keton, CHCl₃-MeOH(4:1) E.A.'da tetrahidroharman ve harman tanımlanmıştır. İğdede alkaloidlerle yapılan bir başka çalışmada dihidroharman ve 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro-β-karbolin E.A.'dan izole edilmiştir [15]. Diğer bir çalışmada E.A.'nın çiçeğinde dört tane, yaprak ve meyvelerinde sekiz tane olmak üzere, kağıt kromatografisi kullanılarak flavonoidler tespit edilmiştir [16]. Ayrıca E.A.'da fenolik bileşikler tespit edilmiştir [17]. Bu fenolik bileşikler; kafeik, klorojenik ve neoklorojenik asitleri, E. A. yapraklarından izole edilmiştir. Ağaç kabuğundan (+)-kateksin, (-)-epikateşin ve iki diğer kateşin türevleri ele geçirilmiştir. Bir diğer çalışmada çiğ bitki maddelerinde harman alkaloid türevlerinin kromatografik analizi yapılmıştır [18]. E.A.'nın harman alkaloidlerinin eldesi için TLC uygulanmıştır. Alkaloidler için (harman, harmine, harmol, harmaline, harmalol) uygun karışım:

- a) CHCl₃-MeOH-10% sıvı NH₃ (80:20:1.5)
- b) CHCl₃-MeOH(4:1)
- c) CHCl₃-MeOH(3:1)

sonuçlar göstermiştir ki elaeagnaceae için en uygun harman alkaloid kaynağı köklerin kabuğu ve E.A.'nın aerial kısmıdır. Ayrıca araştırmalar göstermiştir ki E.A.'nın temel kısımlarında harmol bulunmaktadır.

E.A.'nın da içinde bulunduğu çeşitli bitkilerden 60 alkaloid ele geçirilmiştir [21]. Bu alkaloidlerden bazıları; kinolin, isokinolin, pirolizidin, indol, aporfin gibi maddelerin türevleridir. Ayrıca E.A.'nın meyvesinde isorharmnetin, isorharmnetin-3-O-β-D-galaktopiranosid ve kafeik asit bulunduğu tespit edilmiştir [22].

E.A.'nın meyve suyundaki hafif metal elementler Air-asetilen atomik absorpsiyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir [23]. İğdenin meyve suyu 107.11 K, 23.05 Na, 42.01 Mg, 8.14 Ca, 2.56 Fe, 0.04 Cu, 0.16 Zn, ve 0.05 mg Mn/100g içermektedir. Belirlemek için air-atomik spektroskopi kullanılmıştır. Örnek spektrometrik analizden önce HNO₃-HClO₄ (5:1) de hazırlanmıştır. Düzeltme oranı % 101-108 olarak tespit edilmiştir. Yapılan bir başka çalışmada E.A.'da karboksilik asit belirlemek için bir mikrobondabak C₁₈ kolon ile zıt fazlı HPLC kullanılmıştır. Eluent çözücü % 2.5 NH₄H₂PO₄ içerir (pH=2.5'te). Oksalik asit, tartarik asit, malik asit, laktik asit, asetik asit, sitrik asit, ve suksinik asidi belirlemek için 200 nm'de UV dedektör kullanılmıştır.

E. Angustifolia'nın çekirdeğinde ve meyve etinde lipidler araştırılmıştır [25]. Linoleik asit tohum yağındaki temel fatty asittir. Meyvesindeki temel fatty asitler; palmitik, oleik ve linoleik asitlerdir. B-Sitosterol temel steroldür. Tohumlarda ve meyvede nonacosane temel alkandır. E.A.'nın taze çiçeğinin başlıca yağları buhar distilasyonu-çözücü ekstraksiyonu ile ekstrakte edilmiştir [26]. Taze çiçeğin % 0.1'i yağ ürünüdür. Kapiler gaz kromatografi-mass spektrometri kullanılarak 85 bileşik ayrılmıştır. Yağın % 96.51'ini oluşturan 47 bileşik tanımlanmıştır. Yağın % 78.88'ini oluşturan temel bileşik trans-etil cinnamet dir. E.A.'nın çekirdeğinde 9 glikolipid ve 7 fosfolipid bileşiği, etli kısmında 8 glikolipid ve 3 fosfolipid bileşiği bulunmuştur [29]. Preparatif TLC kullanılarak çekirdekte 9, etli meyvesinde 8 olmak üzere glikolipidler saf fraksiyonlar halinde elde edilmiştir. Bu maddeler R_f değerleri standart maddelerle karşılaştırılarak tanımlanmıştır. fosfatidilkolinler, . fosfatidilinositoller, mono ve digalactosil digliseridler E.A. meyvesinden elde edilen lipidler arasındadır [30]. İğde'nin çekirdek yağındaki epoksi ve hidroksi fatty asitler gas kromatografi-mass spektrometriyle belirlenmişlerdir. 12-hidroksi-8,10-oktadekadienoik asidde bunlardan biridir [31].

E.A.'da TLC ile oleanolik asit belirlenmiştir [27]. E. angustifolia orientalis'in ağaç kabuğu meyve ve çiçeklenme aşamasında % 0.214 ve % 0.098 oleanolik asit içermektedir. Yaprak, çiçek ve meyvelerinde az miktarda oleanolik asit bulunmuştur. Silika jel G TLC kullanılmıştır. Yürütücü çözelti olarak toluen, dietil eter ve methanol (10:2:1) kullanılmıştır. Bu bitkinin tozundan okzalik asit elde edilmiştir [28]. V₂O₅-MoO₃-FeSO₄-KNO₃ katalizörleri varlığında HNO₃ ve H₂SO₄ ile E.A.'nın oksidasyonu ile okzalik asit hazırlanmıştır. Uygun reaksiyon koşulları; E.A. 80.0g,

HNO₃ (60 %) 276 ml, H₂SO₄ (98 %) 60.0 ml, katalizör 0.10 g, reaksiyon zamanı 8 saat ve sıcaklık 55 °C'dir.

İğde meyvesinin şeker ve fenolik bileşikleri araştırılmıştır [6]. Sebze ve meyvelerinde en önemli yapılar serbest şekerlerdir. Birçok meyvede serbest şekerleri bulmak için çalışmalar yapılmıştır. Fruktoz ve glikoz gibi mono ve disakkaritlerin meyveye lezzet veren temel şekerler olduğu düşünülür. Birçok meyve, örneğin şeftali, mango ve bazı kavunlar sukroz ya da hegzos içerirken, turunşgiller yüksek oranda sukroz içerir.

İğde meyvesinde temel olarak fruktoz ve glukoz bulunmaktadır. İğdenin meyvesinin üç formunda meyvenin etli kısmında palmitoleik asit (16:1), çekirdeğinde linoleik asit (18:0) ve palmitik asit (16:0)'i baskın fosfolipit ve glikolipit olarak tanımlanmaktadır. E.Umbellata meyvesinin buhar distilasyonundan GC-MS ile çiçekli uçucusunda 84 pik izole edilmiştir. Temel bileşenler palmitik asit (16.9 %), eugenol (11.1 %) ve metil palmitat (10.5 %)’dır. Şeker ve lipid analizinin yanı sıra iğdenin olgun meyvesinde glikozidik asitler ve kafeik asit tespit edilmiştir.

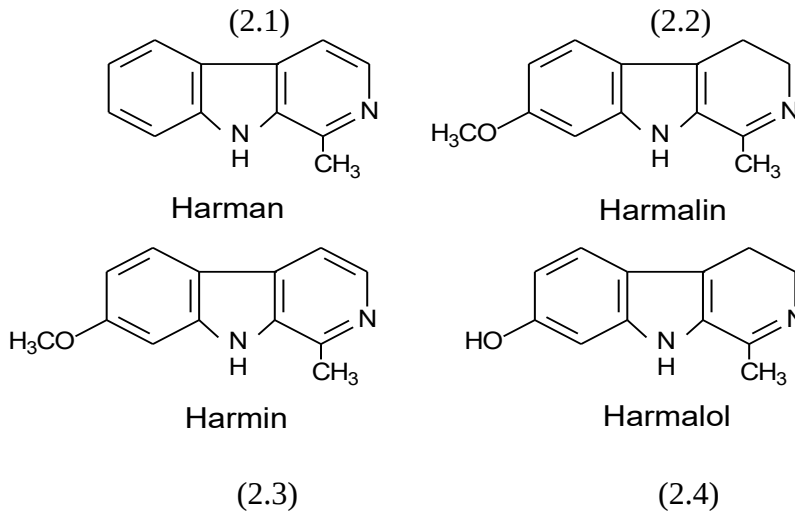
6 tür arasında olgun meyvelerde çözünebilir şeker bileşiği analiz edilmiştir. Trabzon, Gümüşhane ve Erzurum’daki yerel marketlerden iğde meyvesini temsilen üç örnek toplanmıştır. Bu iğdelerde şeker, petrol eteri-kloroform ekastraksiyonu, daha sonra etanol ekstraksiyonu yapılarak TMS ile türevlendirilip gaz kromatografisi ile tespit edilmiştir. Fenolik bileşiklerde etil asetat ekstraksiyonundan sonra HPLC kullanılarak tespit edilmiştir. Farklı marketlerden alınan iğdeler arasında çok fazla bir fark çıkmamıştır. Bu iğdelerdeki fruktoz ve glikoz oranı kuru maddede 27.1 ve 22.3 % olarak bulunmuştur. İğdede baskın şekerin fruktoz olduğu bulunmuştur. Olgun meyvede sukroz bulunamamıştır.

HPLC ile fenolik asit olarak benzoik gurubun dört asidi tespit edilmiştir. Bunlar benzoik asit, 4-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, protokatehik asittir. Sinamik asit gurubu içinde 4-hidroksi sinamik asit, ferulik asit ve kafeik asittir. Bu asitler arasında kuru maddede 45.8 mg/100 g 4-hidroksi benzoik asit en baskın guruptur. Kuru maddede 32 mg/100 g kafeik asit ikinci baskın asittir. Protokatehik, 4-hidroksi sinamik asit ve vanilik asitte oldukça yüksek miktarlarda bulunmuştur (Kuru maddede 14,7-28.1 mg/100 g). E.A. ekstarktındaki C vitaminin indirgenmiş formu 2,6-dikloropfenolindifenol ile titrasyona sokularak belirlenmiştir ve dönüm

noktasının pembe renk olduğu gözlenmiştir [32]. Ekstarktaki toplam vitamin C oranı indirgenmiş formdaki C vitamininin Brom kullanarak 2,3-diketogluonik asite oksidasyonu sonucu belirlenmiştir.

2.2. β -Karbolinler

İğde bitkisinde bulunan β -karbolinler, harman (2.1), harmalin (2.2), harmin (2.3), harmalol (2.4), tetrahidroharman, tetrahidroharmol, N-metil tetrahidroharmandır [14]. Harmalin $C_{13}H_{15}ON_2$ formülüne sahiptir [33]. Renksiz veya açık sarı kristaller halindedir. Optikçe inaktiftir. Bu bileşik su alkol ve eterde az, sıcak suda ve seyreltik asitlerde iyi çözünür. Hidroklorür dihidratı sarı iğneler şeklinde kristallere sahiptir, su ve alkolde kısmen çözünür. Harmalin harminden iki kat daha toksiktir. Kas sistemi üzerinde etkilidir. Kalp kaslarının zayıflamasına bağılı olarak kan basıncını düşürür. Harmin, $C_{13}H_{12}ON_2$ kapalı formülüne sahiptir. Bu alkaloid optikçe inaktiftir ve metanolden renksiz kristaller halinde elde edilir. Su, eter ve alkolde az çözünür. Tuzunun çözeltisi, koyu mavi floresans etkiye sahiptir. Farmakolojik olarak harmalin ile aynı etkileri gösterir. Fakat daha az toksik etkiye sahiptir. Hidroklorürünün mikobakteriyum tuberkilosis'e karşı çok aktif olduğu gözlenmiştir. Harmalol, $C_{12}H_{12}ON_2$ formülüne sahiptir. Trihidratı suda kristallenerek elde edilir. Sıcak su, aseton ve kloroformda tamamen, benzende az çözünür. Bu alkaloid kararsızdır ve havada bozunur. Metil eteri harmalindir. Harman, $C_{12}H_{10}ON_2$ formülüne sahiptir. Bu alkaloid bir çok organik solventte renksiz kristaller olarak elde edilir. Metanol, aseton, kloroform veya eterde iyi çözünür, sıcak suda kısmen çözünür. Mineral asitlerde çözünür ve mavi-menekşe floresans etki gösterir.



β -karbolinler pişirilmiş yemeklerde de oluşabilmektedir. Yemeklere ısı uygulamak yeni maddelerin oluşumuna sebep olur. Bu yeni maddelerin çoğu, karbonhidratların proteinlerle reaksiyonundan oluşur. Oluşan bu maddelerden bazıları kansere ve beyin hastalıklarına sebep olabilir. Maddelerin çoğu heterosiklik aminlerdir. Triptofan ve asetaldehitin reaksiyonu 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -karbolini vermektedir [34]. Bu bileşikte pro-mutajeniktir. Triptofanın glikoaldehit ile reaksiyonu 1-hidroksimetil-tetrahidro- β -karbolini vermektedir [35]. Serotonin formaldehit ile reaksiyonu 6-hidroksi-tetrahidro- β -karbolini vermektedir [36]. Aldehit siklik aminoasitler ve aminlerle (örneğin; triptofan, triptamin, serotonin, fenilanilin) reaksiyona girdiğinde genellikle β -karbolinler ve izoquinolinler oluşmaktadır. Pişirilmiş ve hazır gıdaların hemen hemen hepsinde harman ve norharman mevcuttur [37]. Triptophan yada triptaminin aldehit ile reaksiyonundan oluşur. Bu maddeler beyindeki benzodiazepin reseptörlerini ve nörotransmitterleri etkiler [38]. Eğer bu maddeler anilin gibi aminlerle ileri reaksiyonlara giderirse, mutajenik etki gösterirler [39]. Diğer maddeler; örneğin, 3-hidroksi-metil- β -karbolin yatıştırıcı bir etkiye sahiptir [40]. Fakat uykuyu olumsuz etkiler [41]. Tetrahidro- β -karbolin kalp atışını ve kan basıncını artırır [42]. 5-metoksi-tetrahidro- β -karbolin ve 5-hidroksi-tetrahidro- β -karbolin prolaktin miktarını artırır ve serotonin reseptörlerini etkiler [43]. Bu maddelerin bazıları beyin için toksik etkiye sahiptir. Beyindeki reseptörlerin yıkımı alzheimer, parkinson ve şizofreni gibi hastalıklara sebep olur [44].

2.2.1 β -Karbolinlerin biyolojik etkileri

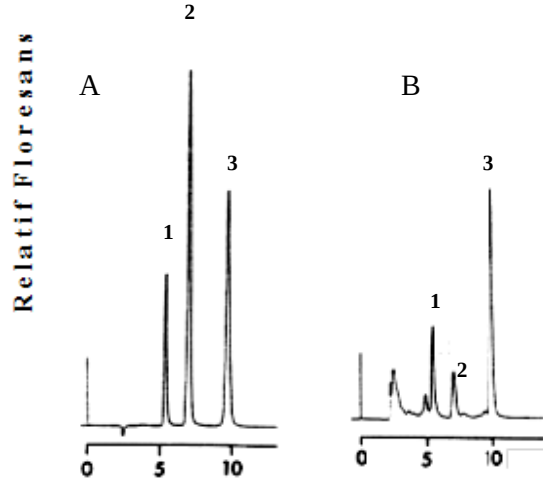
β -Karbolinlerden harman, ilaç sanayiinde anti-malarial, anti-parkinsonyan, antiseptik, CNS simulant, anti-kanser olarak kullanılır.

İnsan beyni tarafından da salgılanan harmanın faydalarının yanısıra fazlasında bir takım zararları bulunmaktadır. Fazladan alınan harman kana karıştığında sinir sistemini olumsuz etkiler. Başlangıçta uyuşturucu etkisi söylene de miktarı fazlalaşınca bilinç kaybı, denge bozukluğu ve hatta zamanla halüsinasyonlara bile yol açmaktadır. Harman ve onun analogu norharmanın memeli hücrelerde komutajenik aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir [45]. Bu bileşikler pridindole türevleridir [46]. Triptofan ve triptamin zengin proteinlerin ısıtılması ile şekillenir ve pişmiş yemeklerde oluşan bileşiklerdir. Sigaradada bu bileşiklerin var

olduğu HPLC kullanılarak tespit edilmiştir [47]. Çalışılan 6 sigarada 2.1-3 µg harman tespit edilmiştir. Pişmiş yemeklerde ise gramında 0.00062-0.377 µg harman tespit edilmiştir. Buğday, pirinç, mısır, soya fasulyesi, üzüm, mantar, sirke gibi bitkilerde harman, harmin, harmaline gibi tremorojenik β-karbolin alkaloidleri bulunmuştur [48]. Ayrıca bu doğal bitkilerden üretilen şarap, bira, viski, brendi ve sigarada da bu maddelere rastlanmıştır. Bu maddeler ayrıca hayvan dokusuna endogenezdır. Biftekten izole edilmiştir. Bu kimyasallara maruz bırakılan laboratuvar hayvanlarında akute tremor gözlenmiştir. Bu β-karbolinler, monoamin oksidazı ve benzodiazepin reseptör bağlarını inhibe eder [49]. Ayrıca mutajenik olmayan bu maddeler ko-mutajenik aktiviteye sahiptir. Anilin ve o-toluidin gibi kanserojenler β-karbolin varlığında mutajenik aktiviteye sahiptirler. Bu maddelerin pişmiş gıdalar, mantarlar ve sigarada olduğu tespit edilmiştir. Alkoliklerde pankreas ve karaciğer kanseri yaygın olmasına rağmen, bunun alkolden mi yoksa alkolün içerdiği kanserojenik aktiviteye sahip maddelerden mi kaynaklandığı çok kesin değildir. Yapılan çalışmalarda alkol içeriği ile β-karbolin konsantrasyonu arasında bir ilişki bulunmamıştır. Fakat, fazla alkol tüketimi aynı zamanda daha fazla β-karbolin tüketimi anlamına geldiği için kanserde β-karbolin'in de etkisi olabileceği düşünülmüştür.

2.2.2. β-Karbolinlerin tespiti

β-Karbolinler, high performans likit kromatografi (HPLC) ve likit kromatografi-mass spektrometri (LC-MS) metoduyla tespit edilebilecek özelliğe sahiptirler [49]. Bu maddelerin tespiti için çeşitli HPLC metodları denenmiştir. Paslanmaz çelik kolon “(150x4.6 mm I.D) cosmosil C18-P(5µm)” dolgu maddeli kolon kullanılarak 0.6 ml/dak. akış hızıyla 300-433 nm dalga boyunda floresans dedektör kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Mobil faz olarak metanol-pH'ı H₃PO₄ ile 3'e ayarlanmış 0.1 M potasyum fosfat buffer (32:68, v/v) kullanılmıştır. Miktar tespiti içinse çeşitli konsantrasyonlarda standart çözeltiler hazırlanarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Konsantrasyon ve pik yüksekliği oranının kullanıldığı bu kalibrasyon grafiğiyle bilinmeyen maddede harman ve norharman konsantrasyonu belirlenmiştir.

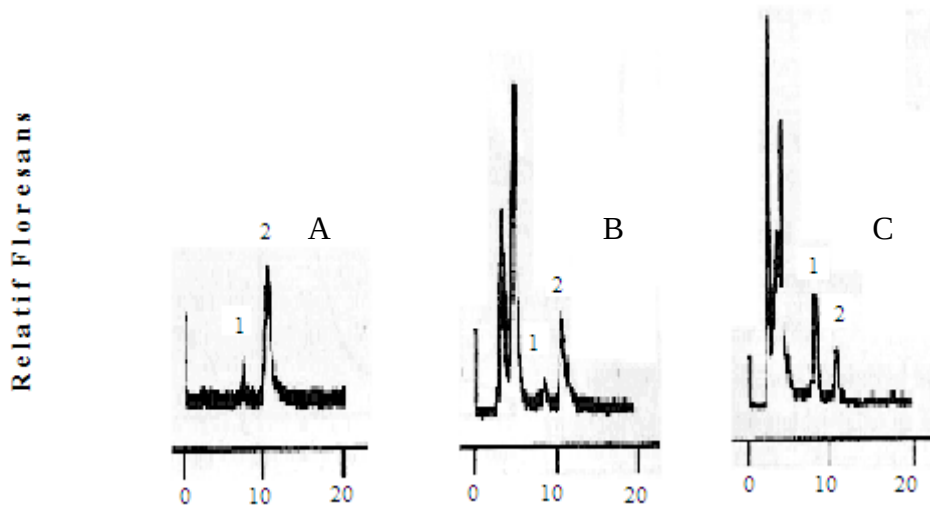


Şekil 2.1. (A) HPLC’de Standart karışımı: 1: norharman, 2: harman, 3: 1-etil- β -karbolin
(B) HPLC’de Brendi örneği : 1: norharman, 2: harman, 3: 1-etil- β -karbolin

LC-MS’de analizör olarak quadrapol kullanılarak metanol-(0.1 M amonyum format+0.1 M formik asit) (pH=3.4) (23:77, v/v) mobil fazı ile bu maddelerin varlığı tespit edilmiştir. Cosmosil 5 C18-P kolon ile 10 dakikada iyi bir ayırım gözlenmiştir. thermosprey (TSP) iyonizasyon mass spektrasında MH^+ harman ve norharman için temel pik olarak tespit edilmiştir. Norharman için MH^+ m/z 169’da 5.8 dakikalık retensiyon zamanında ve harman için MH^+ m/z 183’te 8.5 dakikalık alıkonma zamanında ortaya çıkmıştır.

Amino grup içeren β -karbolinler, uçucu değildir. Bu yüzden GC-MS ile direk analizi zordur. Amidasyon gibi bir türevlendirme reaksiyonuna ihtiyaç duyulur.

Bu maddelerin gıda halkasındaki doğal varlığından dolayı insanlarda gıda tüketimi, sigara ve alkol tüketimini ile ortaya çıkabilir [48]. Toksik etkisinden dolayı araştırma konusudur. İnsan kanında β -karbolin tespiti için çalışmalar yapılmıştır. Aşamalı bir ekstraksiyon işleminin ardından HPLC ile insan ve fare kanında tremorojenik β -karbolin alkaloidlerinin varlığı tespit edilmiştir. Toksik etkisinden dolayı kandaki miktarının tespiti önemlidir. Bunun için HPLC kullanılarak harman ve harmin kanda tespit edilmiştir. Bu metotta mobil faz olarak 17.5 mM potasyum fosfat buffer (monobazik ve dibazik potasyum tuzları eşit konsantrasyonlarda kullanılarak fosforik asitle pH=6.5’e ayarlanmıştır.) –metanol (30:70) 1 ml/dk akış hızıyla 300-435 nm dalga boyunda ölçüm yapılmıştır. Harman için 7-8 dk retensiyon zamanı harmin için 10-11 dk. Retensiyon zamanı olarak tespit edilmiştir.



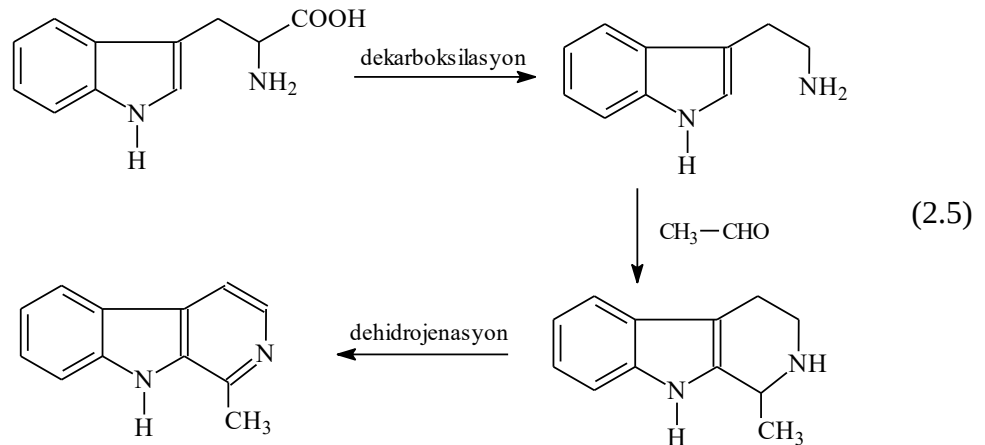
Şekil 2.2. (A) Metanolde harman,ve harman standartlarının HPLC'si; 1:harman, 2:harmin
 (B) İçine harman standardı katılmış insan kanında HPLC;1:harman, 2: harmin
 (C) Hastadan alınmış kan örneğinin HPLC'si;1:harman, 2:harmin

2.3. Harmanın Sentezlenmesi

Harman hem canlılarda biyolojik olarak, hem de sentetik olarak sentezlenir. İnsanlarda beyin tarafından da sentezlenir. Bu nedenle çalışmamızda standart olarak harman kullanılmasına karar verildi. Harmanın laboratuarda sentezlenme sebebi, kullanım alanı geniş olan bu maddenin doğal bitkilerden izolasyonunun zorluğu nedeni ile ucuz ve pratik bir yolla elde edilmesi ihtiyacındandır. Aşağıda verilen harmanın elde edilme yöntemleri görülmektedir.

2.3.1 Harmanın Biyosentezi

İndol halkası içeren harman triptofandan biyosentez yöntemiyle elde edilir. Bu biyosentezde Pictet-Spengler reaksiyonu meydana gelir (2.5) [50].

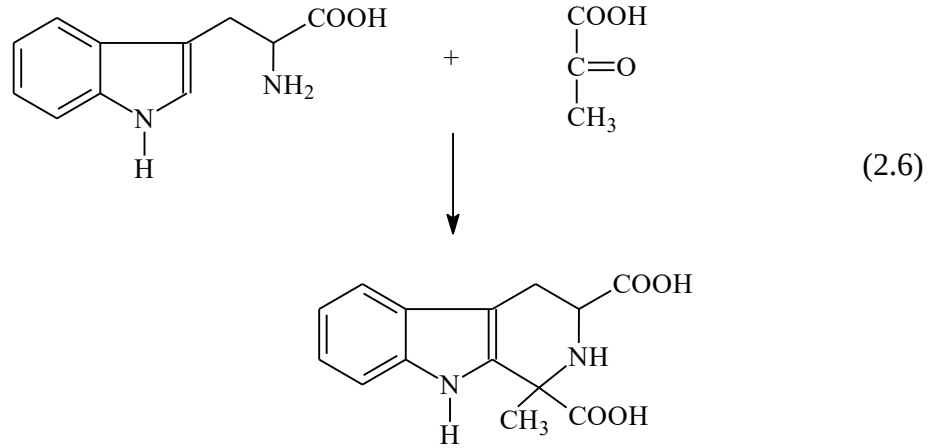


2.3.2. Harmanın Sentetik Olarak Sentezlenmesi

Harman sentetik olarak birkaç yolla üretilmiştir.

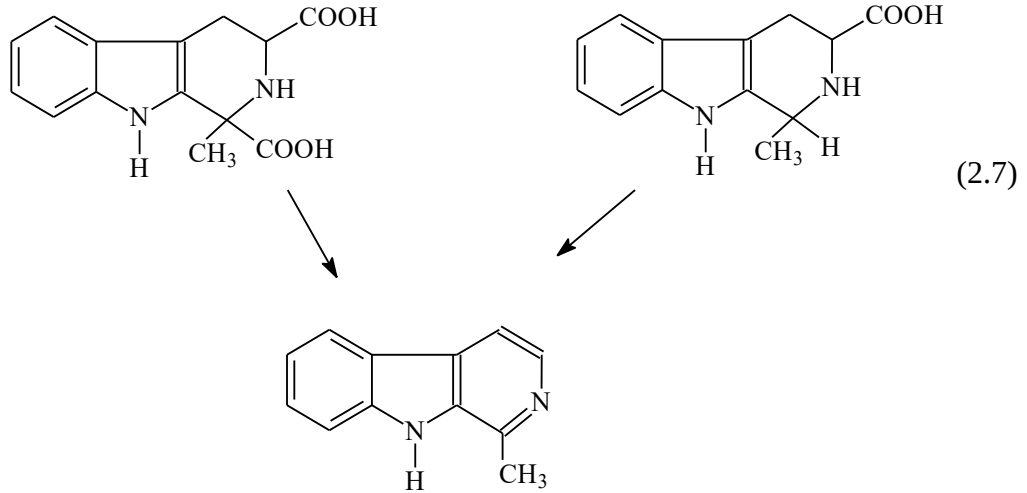
2.3.2.1. Triptofan ve prüvik asit reaksiyonuyla elde edilmesi

a) *1,2,3,4-tetrahidroharman-1,3-dikarboksilik asit sentezi*: Prüvik asit ile triptofanın reaksiyonundan elde edilir (2.6) [51]. 1 g triptofan 80 ml distile suya eklenir, çözünmesi için ısıtılır. Çözelti, oda sıcaklığına kadar soğuduktan sonra 3 ml prüvik asit eklenir. Bir gece bekletildiğinde çözeltideki beyaz kristallerin varlığı görülür. Çözelti filtre edilir. Kağıtta kalan kristaller suyla yıkanır.



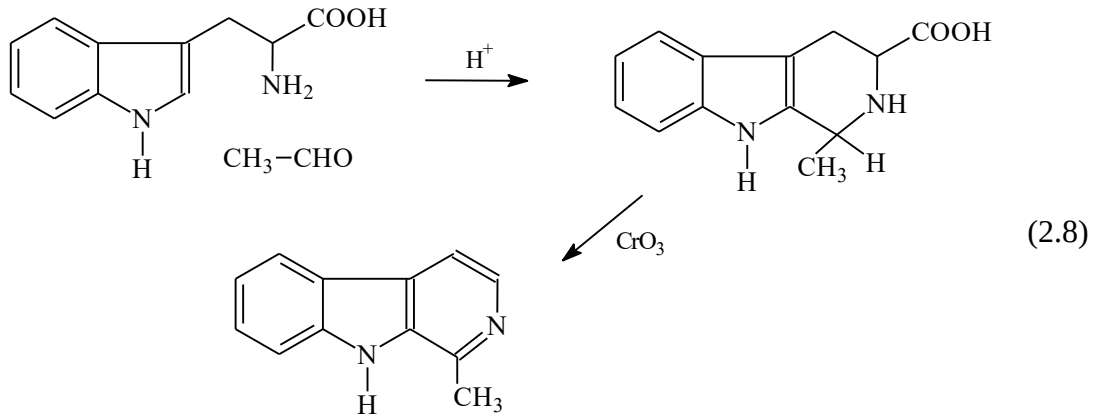
b) *1,2,3,4-tetrahidroharman-3-dikarboksilik asit sentezi*: 0.3 g triptofan sıcak suda çözülür ve soğutulur. 0.1 ml asetaldehit ve 0.1 ml asetik asit ile muamele edilir. Bir gece beklenir. Renksiz kristaller şekillenir, çözelti süzülür, kağıtta kalan kristaller distile suyla yıkanır.

Elde edilen 1,2,3,4-tetrahidroharman-3-dikarboksilik asitten 0.28 g 72 ml kaynayan suda çözülür. 14 ml % 10 potasyum dikromat çözeltisi eklenir. Çözeltide bulanıklık ortaya çıktığında 1.4 ml asetik asit eklenir. Çözelti 1 saat ısıtıldıktan sonra oda sıcaklığında soğutulur. Reaksiyona girmeyen fazla maddeleri indirgemek için 14 ml % 5 sodyum sülfid ile reaksiyona sokulur. Karışım sodyum karbonat ile alkalin yapıldıktan sonra, eter ile ekstrakte edilir. 1,2,3,4-tetrahidroharman-1,3-dikarboksilik asidin oksidasyonu ile aynı yol izlenerek harman elde edilir (2.7).



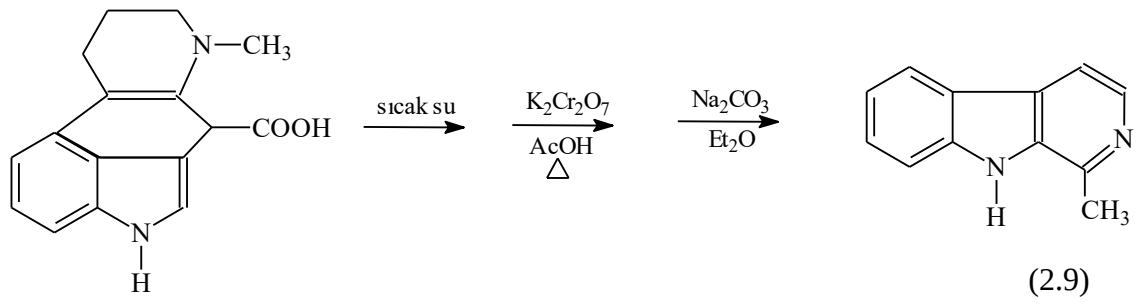
2.3.2.2 Triptofan ve asetaldehit reaksiyonu ile elde edilmesi

Triptofanın asetaldehit ile kondenzasyonu ve alanin ile oksidasyonu ürün olarak harmanı verir (2.8) [52].



2.3.2.3 Liserjik asitten elde edilmesi

3-metil-3,4,5,6-tetrahidro-4-karbolin-5 karboksilik asidin (liserjik asit) 18 ml'lik kaynayan sudaki 70 mg'ına 3.5 ml % 10'luk potasyum kromat çözeltisi ile 0.7 ml AcOH çözeltisi eklenir [53]. Bir dakikalık kaynamadan sonra karışım soğutulur ve sodyum karbonat ile alkali yapılır. Bu çözeltinin eter ile ekstraksiyonu harmanı verir (2.9).



2.3.2.4 β-Aminoetil indol'den elde edilmesi

3-(β-Aminoetil)indole (I)'ün oda sıcaklığında Ac_2O ile muamelesi sonucu I Ac türevlerine dönüşür [54]. Bu türevlerin rengi açık sarıdır, kaynama noktası 180-200 °C ve erime noktası 77 °C dir. Bu türevlerin sülfirik asit içerisinde potasyum permanganat ile kaynatılması sonucunda % 55 harman ve 200 °C'deki paladyum ile reaksiyonundan % 89 harman elde edilir.

BÖLÜM-3 DENEYSEL KISIM

3.1. Kullanılan Maddeler

İğde yaprakları	: Bursa ve Niğde bölgelerinden temin edilmiştir
Kloroform	: Merck (HPLC grade)
Magnezyum sülfat	: Merck
Sodyum Sülfat	: Merck
Metanol	: J.T. Baker (HPLC grade)
Amonyumhidroksit	: Merck
Eter	: Merck
Hidroklorik asit	: Merck
Kalsiyum okzalat	: Fluka
Nitrik Asit	: Merck

3.2. Kullanılan Cihazlar Ve Analiz Şartları

3.2.1. GC-MS Cihazı

GC-MS spektrumları Thermofinnagen MS Plus model cihazda Restec 5 MS (0.25x30m, 0.25 film kalınlığı) kolonda gerçekleştirilmiştir. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır. İyonlaştırma ünitesi olarak elektron impact (EI, 70 eV) ve dedektör olarak single quadrapole kullanılmıştır.

3.2.1.1. GC-MS Şartı

Enjektör sıcaklığı	280 °C	
İyon force sıcaklığı	280 °C	
Sıcaklık programı	100°C	5 dakika izotermal
	5 °C/dk	280 °C
	280 °C	7 dakika izotermal

Akış hızı	1 ml/dk
Enjeksiyon tipi	oto enjeksiyon

3.2.2. HPLC Cihazı

HPLC kromatogramları Thermofinnagen cihazında C₁₈ kolonda gerçekleştirilmiştir. Dedektör olarak floresans dedektör kullanılmıştır.

3.2.2.1. HPLC Şartı

Mobil faz	metanol-0.1 M potasyum fosfat buffer (HCl kullanılarak pH=3 yapıldı) (32:68,v/v)
Akış hızı	1 ml/dk
Dedektör dalga boyu	300 nm-433 nm
Enjeksiyon tipi	oto enjeksiyon

3.2.3. LC-MS Cihazı

3.3.4.5'te LC-MS(I) Şartlarında Themofinnagen LSQ cihazında hipersil C₁₈ (2µm x 150mm)(5µ)kolonda ve iyon trap dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.4.6'da LC-MS(II) Şartlarında Themofinnagen LSQ cihazında İnersel ODS (2µm x 150mm)(5µ)kolonda ve iyon trap dedektör kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3.1. LC-MS(I) Şartları

Mobil Faz	metanol-(0.1 M amonyum format+0.1 M formik asit)(pH:3.4)(23:77,v/v)
Akış hızı	0.2 ml/dk
Enjeksiyon tipi	oto enjeksiyon

3.2.3.2. LC-MS(II) Şartları

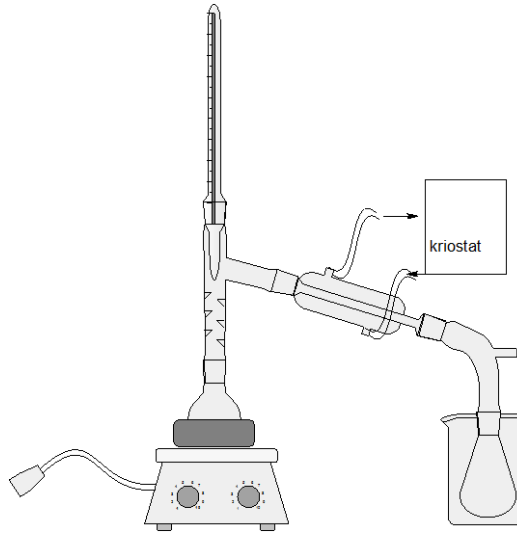
Mobil Faz	asetonitril-% 0.1 formik asit (20:80,v/v)
Akış hızı	0.2 ml/dk
Enjeksiyon tipi	oto enjeksiyon

3.2.4. ICP-MS Cihazı

Agilent 7500a ICP-MS cihazında quadrapole dedektör kullanılarak analizler yapılmıştır. Tşıyıcı gaz olarak argon kullanılmıştır.

3.3. İğde Meyvesinden Harman Bileşenlerinin Elde Edilmesi

3.3.1. Su ile kaynatarak elde edilmesi



Şekil 3.1. Su ile kaynatma yönteminin düzeneği

500 g iğde meyvesi Şekil 3.1’deki balona yerleştirildi. Üzerini kapatacak şekilde bir miktar su eklendi. Fraksiyon başlığı ve düz soğutucu takıldıktan sonra uçucuların ele geçmesi için tuzak kuruldu. Daha uçucu olanları da yakalamak için ikinci bir tuzak kurulup içine kloroform konuldu. Karışım 12 saat boyunca kaynatıldı. Ele geçen iğde çözeltisinin suyu uçuruldu ve pH’ı 3.70 olan iğde çözeltisi iki kısma ayrılarak herbirine aşağıdaki işlemler yapıldı.

A) Asit ortamda olgunlaştırma (A):

İğde çözeltisinin ilk kısmına, % 10’luk 40 ml asetik asit çözeltisi katılarak pH’ı 3.10 yapıldı. Madde geri soğutuculu balona kondu. 3 saat kaynatıldıktan sonra %5’lik Na_2CO_3 ile nötrleştirildi. Eter ile ekstrakte edildi. Eter çözeltisi Na_2SO_4 ile kurutulduktan sonra eter rotary evaporatörde uçuruldu.

B) Bazik ortamda olgunlaştırma (B):

İğde çözeltisinin ikinci kısmına, % 25’lik amonyum hidroksit katıldı (pH=10). Geri soğutuculu balona konup 3 saat kaynatıldı. Nötrleştirilmeden önceki pH değerinin 5.25 olduğu gözlemlendi. %25’lik amonyum hidroksit katılarak nötrleştirildi. Eter çözeltisi Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra eter rotary evaporatörde uçuruldu.

A ve B olarak adlandırılan iki kısımdan ele geçen eter ekstraktlarının bileşenleri TLC, GC-MS ve HPLC-MS kullanılarak aydınlatılmaya çalışıldı.

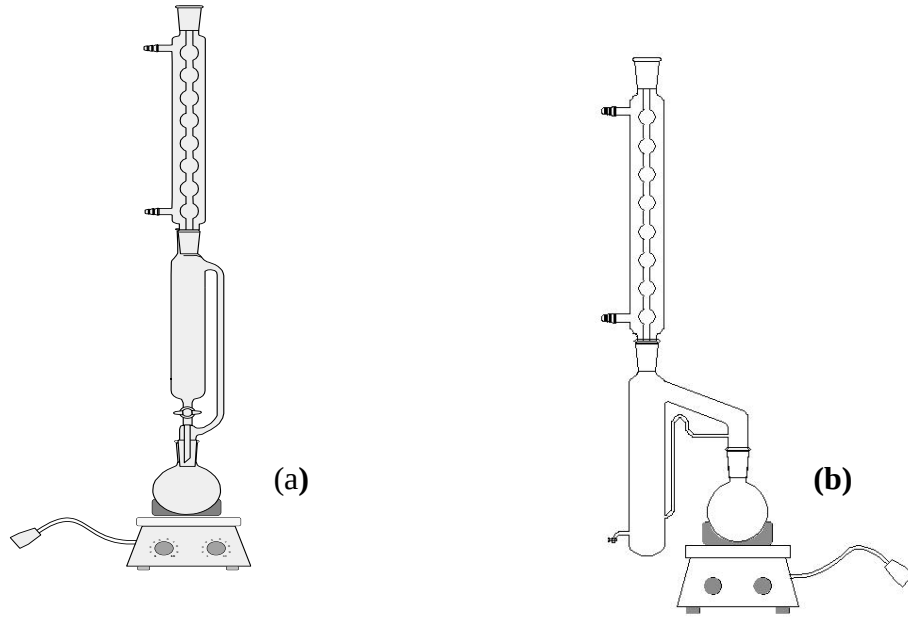
3.3.2. Metanol ekstraksiyonu ile elde edilmesi

3.3.2.1. Kesikli ekstraksiyon ile oda sıcaklığında elde edilmesi

500 g iğde meyvesi bir balona tartıldı. Üzerine 1 lt metanol eklendi. Mekanik karıştırıcı ile 4 gün metanol içinde ısı verilmeden, karıştırıldı. Nuçe erleninde süzülüp posasından arındırıldı. Metanollü çözeltiyi kalan ince posa kalıntılarından ayırmak için tekrar süzgeç kağıdı kullanılarak süzme işlemi uygulanarak ilk kısım elde edildi. Geriye kalan posaya tekrar 1 lt metanol eklendi. 3 gün boyunca manyetik karıştırıcı ile metanol içerisinde bekletildi. Bir önceki işlemler uygulanarak süzüldü (ikinci kısım) ve kalan posa üçüncü kez 1 lt metanol içerisine kondu ve aynı işlemler uygulandı (üçüncü kısım).

Metanole yatırılmış iğdenin ilk kısmı Rotaryde uçuruldu. Ele geçen bal kıvamındaki madde kalan metanolünde giderilmesi için bir gün vakum etüvünde bekletildi %1’lik HCl’de çözüldü. Eter ile ekstrakte edildi. Eter fazı kurutuldu ve eter uçuruldu. pH’ı 0.90 olan sulu faza %25’lik amonyum hidroksit eklendi ve pH= 10’a ayarlandı. Bu çözelti kloroform ile ekstrakte edildi. Kloroform fazı alındı. Kloroform uzaklaştırıldı. Dipte eser miktarda keskin kokusu olan sarı-kahverengi bir madde ele geçti. Bu madde metanolde çözüldü. TLC, GC-MS ve HPLC-MS kullanılarak bileşenleri analiz edildi. Metanole yatırılmış iğdenin ikinci ve üçüncü kısmı için de birinci kısma uygulanan işlemler yapıldı ve TLC, GC-MS, HPLC-MS kullanılarak bileşenleri analiz edildi.

3.3.2.2. Sürekli ekstraksiyon ile reflaks sıcaklığında elde edilmesi



Şekil 3.2. (a) Soksilet sürekli ekstraksiyon düzeneği, (b) Clevenger sürekli ekstraksiyon düzeneği

Şekil 3.2a.'da görülen soksilet düzeneğine süzgeç kağıdından yapılan kartuj içindeki iğde meyvesi (M) [veya iğde yaprağı (Y)] yerleştirildi. İki gün boyunca metanol ile refluks edildi. Metanol rotary evaporatörde kuruluğa kadar uçuruldu. Kıvamlı madde %1'lik HCl ile çözüldü ve eter ile ekstrakte edildi. Su fazının pH'ı %10'luk NH_4OH ile 10 yapıldı. pH'ı 10 olan çözelti kloroform ile ekstrakte edildi. Kloroform fazı MgSO_4 ile kurutuldu, çözücü uzaklaştırıldı ve geriye kalan kıvamlı madde karışımı metanolde çözüldü. Elde edilen madde TLC, HPLC-MS ve GC-MS kullanılarak analiz edildi.

Metanole yatırılmış iğde meyvesinin (veya iğde yaprağının) ekstraksiyon işlemleri, ayrıca Clevenger sürekli ekstraksiyon düzeneği ile de yapıldı (Şekil 3.2b.), işlemler uygulandı ve TLC,GC-MS, HPLC-MS kullanılarak bileşenleri analiz edildi.

3.4. TLC Analizleri

3.4.1. TLC (I) Şartları

Tabaka	20 cm x 20 cm Silika Gel 60
Yürütücü	Kloroform % 80

Metanol % 20

3.4.2. TLC (II) Şartları

Tabaka	Silika Gel 60 HF ₂₅₄
Tabaka boyutları	20 cm x 20 cm
Tabaka kalınlığı	1000 µ
Tabakanın hazırlaması	60 g adsorban 120 ml suyla çalkalandı. Çekilen tabakalar 60 dakika havada, 17 saat 100 °C etüvde kurutuldu. Kullanmadan önce soğuması için içinde kurutucu olan vakum etüvünde bekletildi.
Yürütücü	Kloroform % 80 Metanol % 20
Tank Doygunluk süresi	1.5 saat

3.5. ICP-MS kullanarak harman bileşiğinin suda çözünme organik tuzu çözme gücünün tayini

Harman bileşiğinin suda çözünmeyen organik tuzları çözme kapasitesini tespit etmek için kalsiyum okzalat (CaC_2O_4) ile reaksiyona sokuldu. Üç behere 0.05 gr harman maddesi tartıldı. 50'şer ml deiyonize su eklendi. Beherlerden birine HCl katılarak ortam asidik yapıldı. Diğer beherede NH_4OH katılarak ortam bazik yapıldı. 50°C'lik su banyosunda bir süre çözünmesi için ısıtıldı. Sadece asidik ortamda harmanın çözündüğü gözlemlendi. Beher su banyosundan alınarak oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Üzerine 0.05 gr CaC_2O_4 eklendi. Blank olarak 0.05 gr CaC_2O_4 asidik yapılmış 50 ml su içeren bir başka behere eklendi. İki çözeltide 100ml'ye deiyonize su ile tamamlandı. Süzüldü ve süzüntü Ca tespiti için ICP-MS'de analiz edildi.

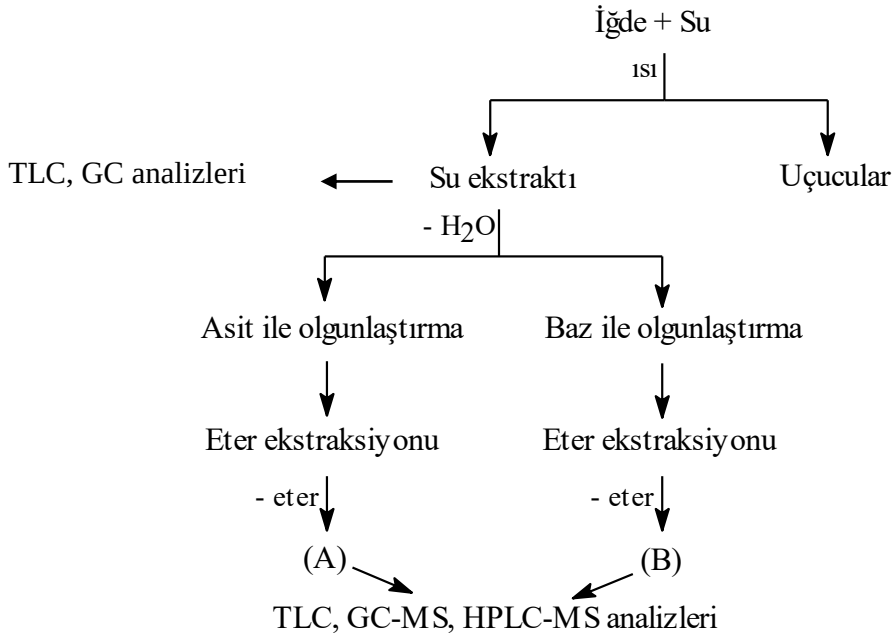
ICP-MS'de Ca tespiti için 2, 5, 10, 20, 40, 80 mg/lt (ppm)'lik kalibrasyon standartları hazırlandı. Bu standartlar kullanılarak kalibrasyon grafiği çizildi ve bu grafik yardımı ile çözeltilerde Ca tespiti yapıldı.

BÖLÜM 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Literatür çalışmaları, iğde suyunda suda çözünmeyen organik tuzların çözünmesinin, iğde meyvesinde ve iğde yapraklarında bulunan β -karbolin bileşiklerinden kaynaklanabileceğini, düşündürmüştür. Bu sebeple Bursa ve Niğde bölgelerinden sağlanan iğde meyveleri ve yapraklarına yapılan deneylerde çoğunlukla bu bileşenler üzerinde durulmuştur. Bu bileşenlerin elde edilmesi için, denemeler sonunda oluşturulan su veya metanol çözücülü, kesikli veya sürekli iki yöntem uygulanmıştır. Bu çalışmaların, suda çözünmeyen organik asitleri iğde suyunun nasıl veya hangi bileşeni ile çözdüğü ile ilgili çalışmalar ile birleştirilmesi hedeflenmiştir.

4.1. Bileşenlerin suyla kaynatılarak elde edilmesi

Organik Kimya Anabilim Dalında yapılan çalışmalarda iğde meyvesinin su ile kaynatılması sonunda ele geçen çözeltinin, doğal ortamı içinde suda çözünmeyen organik tuzları çözdüğü belirlenmiştir.



İğde suyundan, β -karbolin bileşiklerini az veya çok çözen çözücülerle ekstraksiyon sonunda şeker bileşikleri, çeşitli alkaloid karışımları alınmıştır. Bu çözeltiler içinden β -karbolin bileşiklerini belirlemek mümkün olmamıştır. Asidik iğde suyundan β -karbolin bileşiklerini alabilmek için, iğdenin su ekstraktı iki kısma bölünmüştür. Birinin ortam asitliği 3 diğerrinin ortam asitliği 10 yapılarak, asidik ve bazik hızlı olgunlaştırma da diyebileceğimiz kaynatma işlemi yapılmıştır. Yapılan işlem şematik olarak yukarıda verilmiştir.

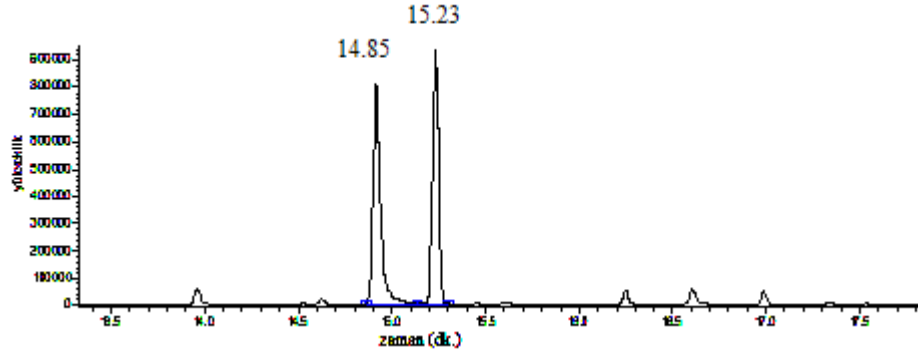
Önce ele geçen çözeltilerde harman ve harman türevlerinin olup olmadığını anlamak için 20 cm x 20 cm Silika Gel 60 plakaları ve CHCl_3 -MeOH(4:1) yürütücüsü çözücüsü kullanıldı (TLC I, Tablo 4.1.). TLC I analizi, asit (A) ile olgunlaştırma sonunda elde edilen madde karışımının, yürümeyen maddeler dışında beş ayrı madde olduğunu gösterdi. Baz (B) ile olgunlaştırma sonunda elde edilen maddeler de ise yürümeyen maddeler yanında altı madde gözlemlendi.

Tablo 4.1 İğde meyvesinin asit (A) ile ve baz (B) ile olgunlaştırılması sonunda ele geçen karışıma ait TLC (I) koşulundaki Rf değerleri

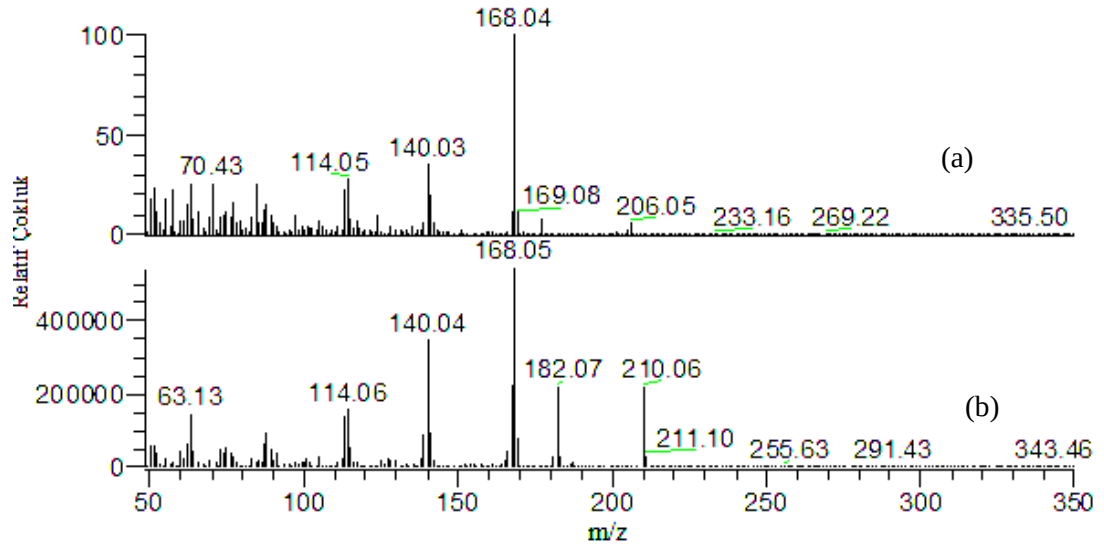
Madde kodu	1. zon	2. zon	3. zon	4. zon	5. zon	6. zon	7. zon	8. zon
A	0.01	0.23	0.4	-	0.63	-	0.83	0.86
B	0.01	-	0.4	0.58	0.63	0.69	0.83	0.86
Harman	-	-	-	-	0.63	-	-	-

Oluşan maddeleri ayrı ayrı elde etmek için TLC (II) koşullunda preparatif çalışmalar yapıldı. Bu amaçla Silika Gel 60 HF254 kullanılarak önce 1000 μ 'luk plakalar hazırlandı. Yürütücü çözücü olarak CHCl_3 -MeOH (4:1) kullanıldı. B bileşiğinde Rf değeri 0.0-0.02 (16) olan zonun biri sarı, diğeri mor renk birbirine karışmış iki maddenin, Rf değeri 0.4 (15) olan zonun mor-açık mavi, 0.6-0.7 (14) Rf değerine sahip zonun açık buz mavisi, 0.8-0.9 (13) Rf değerine sahip zonunda mor-mavi floresans verdiği gözlemlendi. Birbirinden tam ayrılamadığı için altı bölge yerine, dört bölge preparatif tabakadan spatül yardımı ile kazındı. Baz (B) ile olgunlaştırma sonunda elde edilen maddelerin bileşenlerini ve B karışımından preparatif TLC ile

ele geçen 13, 14, 15, 16 nolu maddeleri tanımlamak için GC-MS ve HPLC-MS analizleri yapıldı. Şekil 4.1.'deki GC kromatogramında B maddesinin 8 bileşene sahip olduğu ve bu bileşenlerden 14.85 ve 15.23 alıkonma zamanlarına sahip iki pikin yoğunlukta olduğu görülmektedir. Küçük bileşenlerin B karışımındaki miktarı en fazla % 1-2 arasında değiştiği belirlenmiştir.

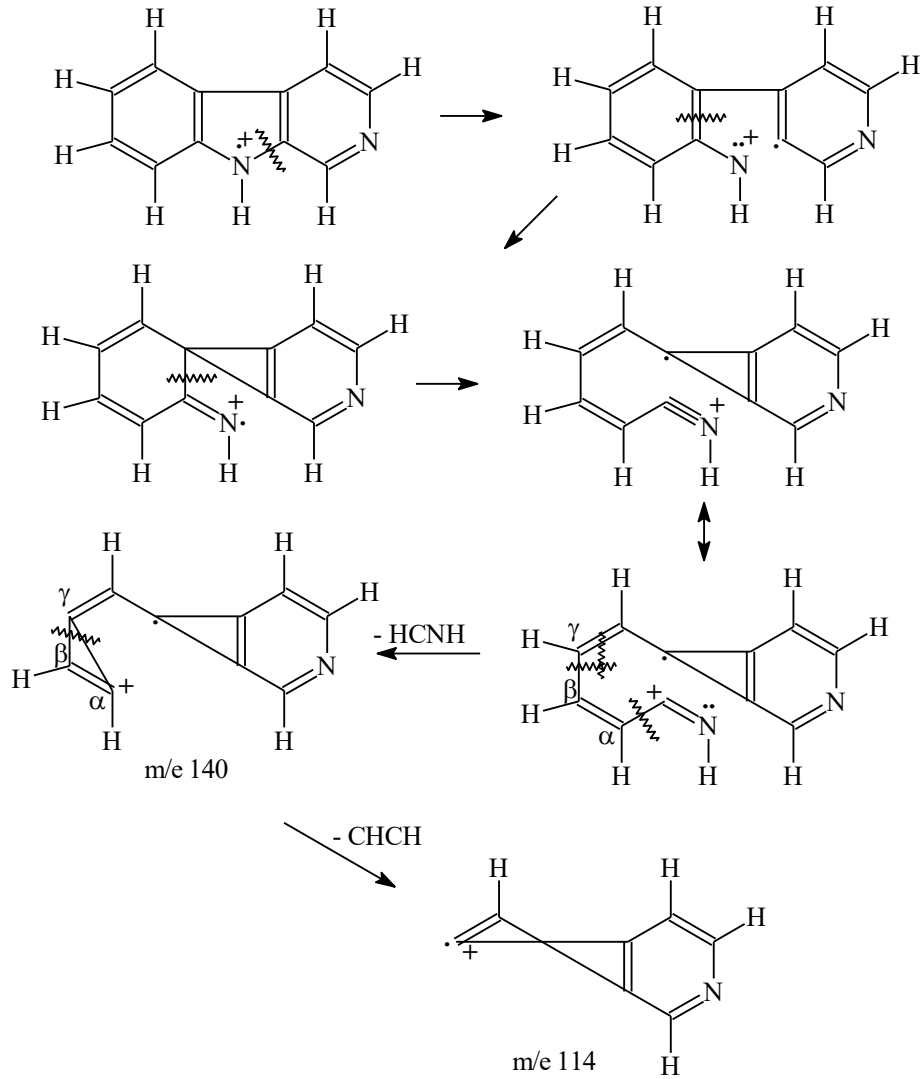


Şekil 4.1 Baz (B) ile olgunlaştırma sonunda elde edilen karışıma ait GC kromatogramı.



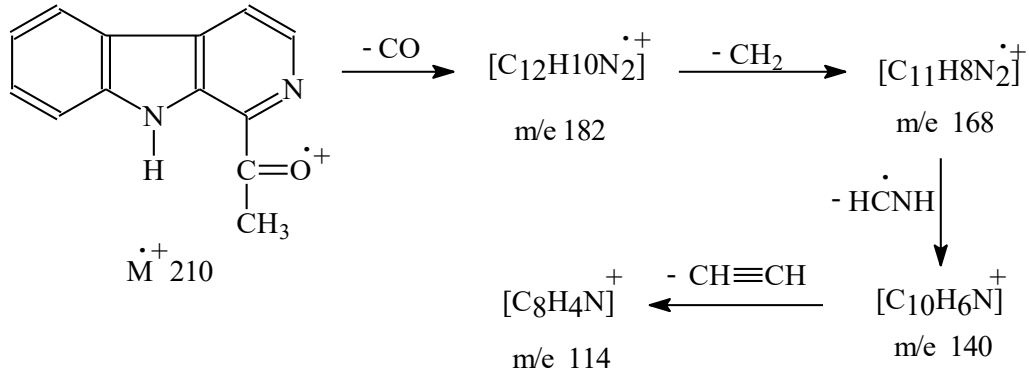
Şekil 4.2.(a) B maddesinde 14.85 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i
(b) B maddesinde 15.23 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i

Şekil 4.2a.'da B maddesinin %54.5'ünü oluşturan 14.85 alıkonma zamanına sahip pikin, MS'teki parçalanma patronlarında moleküler pikinin 168 olduğu görülmektedir. Norharmanında molekül ağırlığı 168'dir. Aynı zamanda norharmanın 168, 140, 114 ve 70'deki parçalanma patronları 14.85'teki pikin MS'i ile eşleştiğinden B maddesinde 14.85'teki piki norharman olduğu görülmektedir (Şekil 4.3).



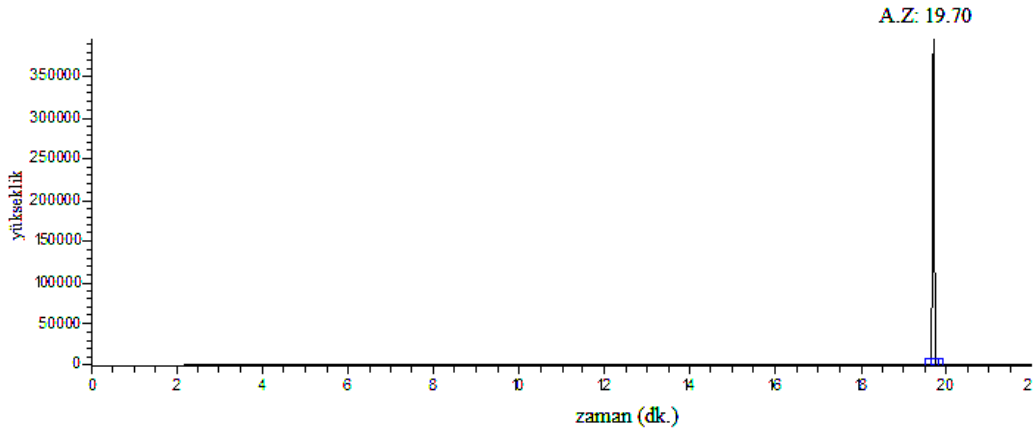
Şekil 4.3. Norharman (9H-Prido[3,4-b]indol) bileşiğinin muhtemel MS parçalanmaları.

Şekil 4.2b.'de B maddesinin %45'ünü oluşturan 15.23 alkonma zamanına sahip pikin MS'inde norharmandan farklı olarak, 182 ve 210'da ekstra parçalanma patronları bulunmaktadır. 1-asetil- β -karbolin'in moleküler piki 210'dur. Bu maddede parçalanarak harmanın molekül ağırlığına sahip 182'de pik vermektedir. 15.23'ait MS 1-asetil- β -karbolin'in MS pikleri ile bire bir örtüşmesi bu maddenin 1-asetil- β -karbolin olduğunu göstermektedir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. 1-asetil-β-karbolin bileşiğinin muhtemel MS parçalanmaları.

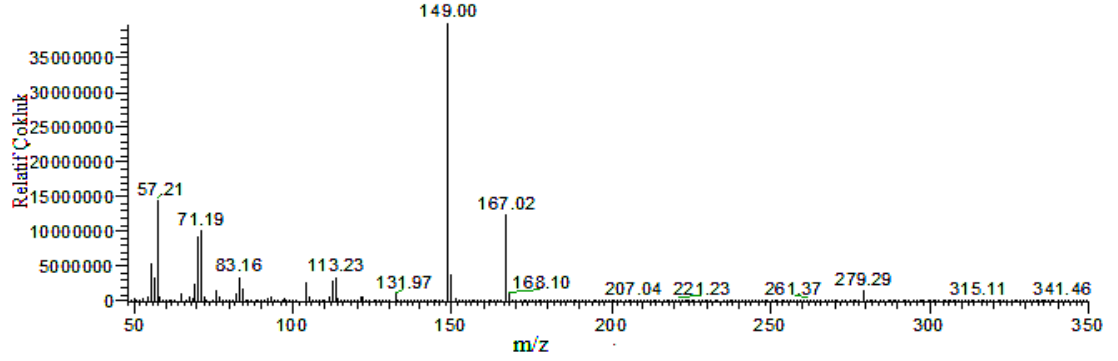
B maddesinin preparatif TLC sonucunda birbirinden ayrılıp kazınan 13, 14, 15, 16 maddelerinde de GC-MS kullanılarak tanımlama yapılmıştır. Bu maddelerin GC kromotogramları Şekil 4.5'te görülmektedir.



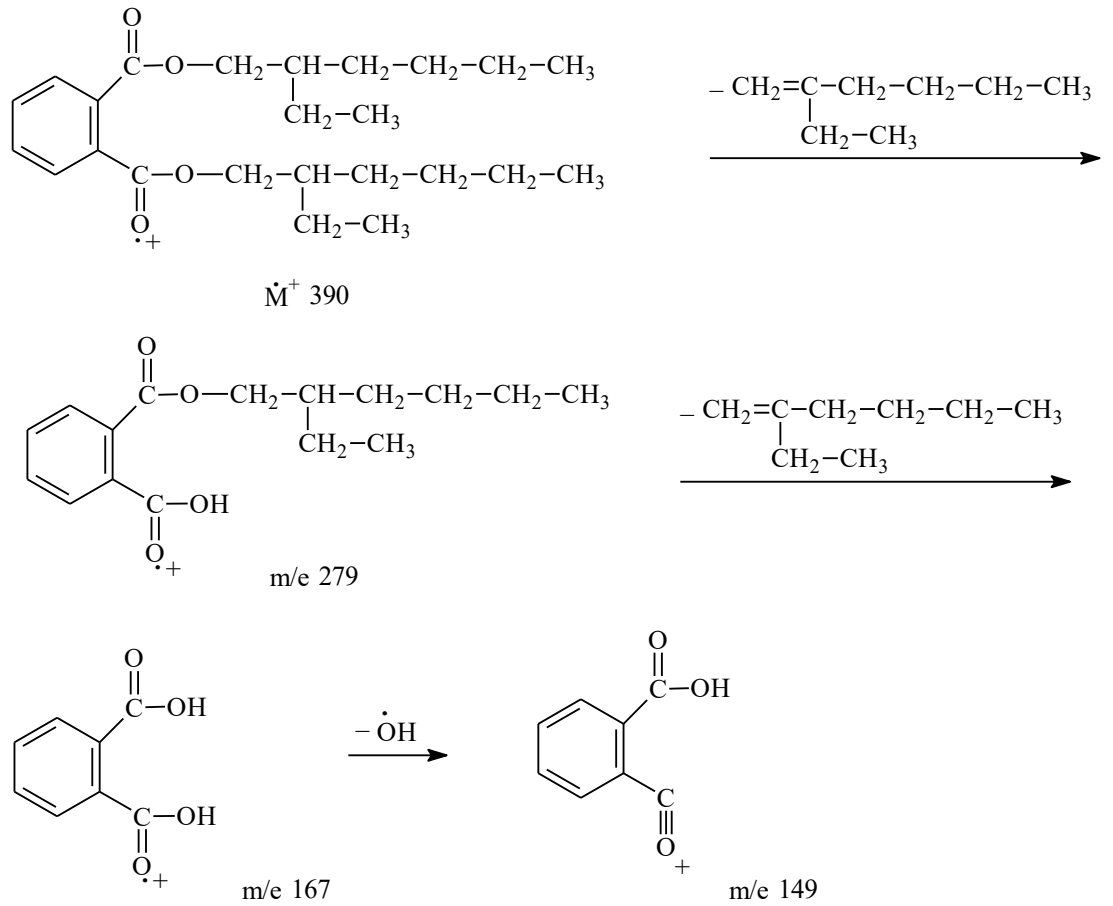
Şekil 4.5. 13, 14, 15, 16 no'lu maddelere ait GC kromotogramı.

B karışımının GC kromotogramının aksine, karışıma preparatif TLC uygulanması ile ele geçen 4 madde de 19.70 alıkonma zamanında tek pik vermiştir. Alıkonma zamanı 19.70 olan maddenin MS spektrumu Şekil 4.6.'da görülmektedir. Şekil 4.6'da görüldüğü gibi MS parçalanma patronları olan 167, 149, 113, 83, 71, ve 57, 19.70 alıkonma zamanındaki pikin 1,2-benzendikarboksilik asit, bis(2-etilhekzil) esterin parçalanma patronları ile bire bir örtüşmektedir (Şekil 4.7). B maddesinin preparatif TLC sonucunda birbirinden ayrılıp kazınması ile ele geçen 13, 14, 15 ve 16 maddelerinde olması beklenen harman ve norharman gibi maddeler yerine iğde ile ilgisi olmayan bir madde ele geçmiştir. Ele geçen 1,2-benzendikarboksilik asit, bis(2-etilhekzil) ester veya DOP olarak da adlandırılan madde, bilindiği gibi bir çok endüstriyel üründe plastifiyan olarak kullanılmaktadır. Bu maddenin numunelerin

koyulduğu kaplara ait kapakların, metanol çözücüsü ile temasından gelmiş olabileceği düşünülmüştür.



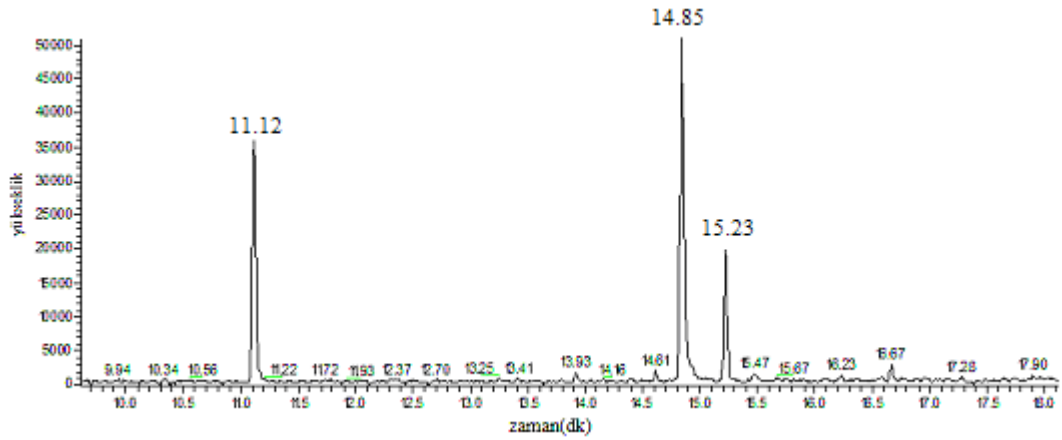
Şekil 4.6. 13, 14, 15, 16 no'lu maddelerine ait 19.70'de çıkan pikin MS'i



Şekil 4.7. 1,2-benzendikarboksilik asit, bis(2-etilheksil) esterin parçalanma patronları

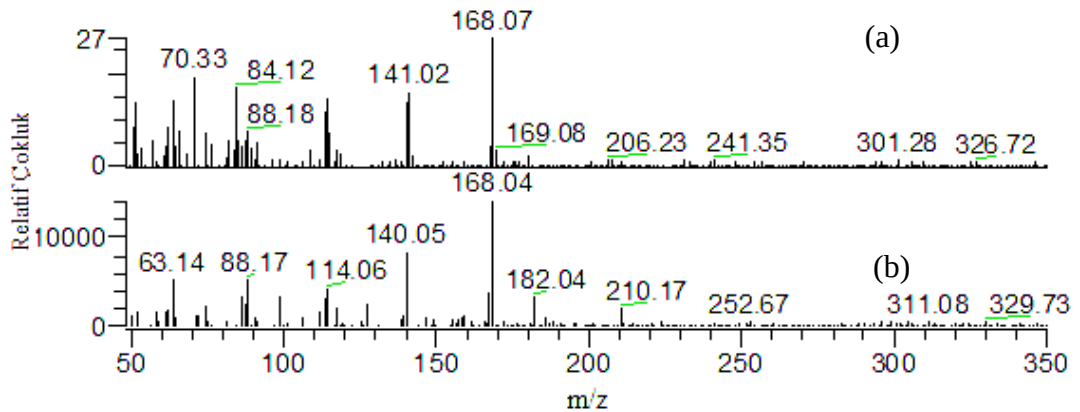
Ayırarak analiz etmek istediğimiz maddelere ne olduğunu anlamak üzere, plakalarda tekrar preparatif çalışma yapıldı. Zonlar kazınıp metanole alındı. Geriye kalan silika ve kağıtta kalıntı kalıp kalmadığı UV lambası ile kontrol edildiğinde, maddelerin silika gel ve süzgeç kağıdında kaldığı tespit edildi. Bu sonuç, preparatif TLC çalışmalarında kullanılan HF katkılı silika gel tarafından β -karbolin bileşiklerinin tutulduğunu düşündürdü.

Asit (A) ile olgunlaştırma sonunda elde edilen maddedeki bileşenleri tanımlamak için de GC-MS analizi yapılmıştır. Bu madde için GC kromotogramı Şekil 4.8’de görülmektedir.



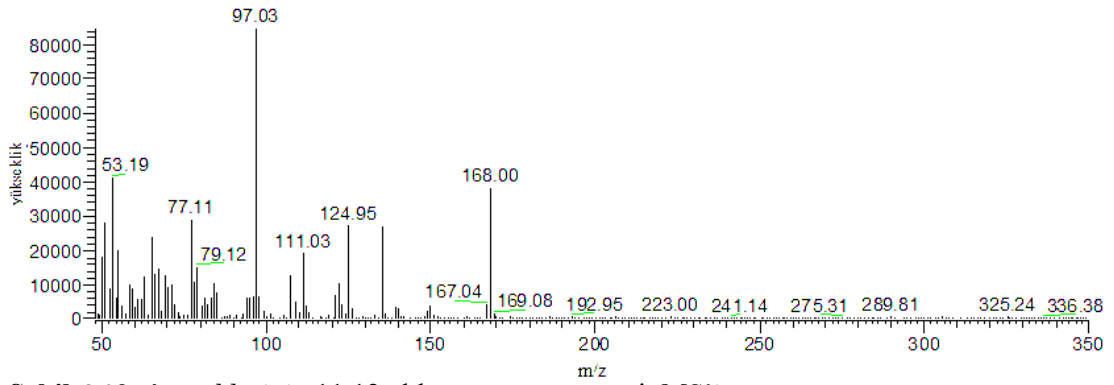
Şekil 4.8. A maddesine ait GC kromotogramı

A maddesine ait GC kromotogramında bu maddeye ait TLC’yi destekleyici üç pik görülmektedir. Bu üç pikin alıkonma zamanları 11.12, 14.85 ve 15.23’tür ve bu üç pik karışımın % 95’ini teşkil etmektedir. Alıkonma zamanı 14.85 ve 15.23 olan piklerin MS sonuçları Şekil 4.9.’da görülmektedir.

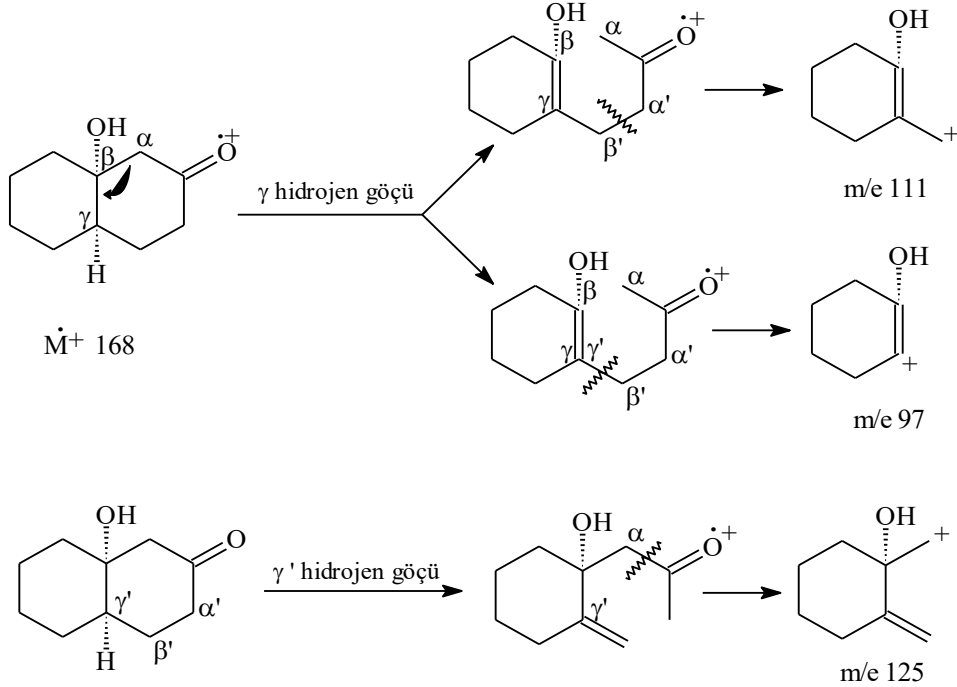


Şekil 4.9. (a) 14.84 A.Z.’na ait pikin MS sonucu
.....(b) 15.22 A.Z.’na ait pikin MS sonucu

14.85 ve 15.23'te gelen piklerin MS'i, B maddesinde belirlenen aynı alıkonma zamanına sahip bileşenlerin MS'i ile aynıdır. 14.85 alıkonma zamanlı pikin 168,140 ve 114 temel parçalanma patronları ile Şekil 4.4'teki norharman'ın parçalanma patronları birebir örtüşmektedir. Dolayısıyla bu maddenin norharman olduğu tespit edilmiştir. 15.23'teki pikte 210'da moleküler iyon piki görülmektedir. Bu maddenin de Şekil 4.5'teki 1-asetil- β -karbolin'in MS parçalanma pikleri olan 210, 182, 168, 140, 114 pikleri ile örtüştüğü görülmektedir. Dolayısıyla bu maddenin 1-asetil- β -karbolin olduğu tespit edilmiştir. Asitle kaynatma ve bazla kaynatma sonucunda ele geçen maddelerin ikisinde de β -karbolin türevlerinin olduğu görülmüştür.



Şekil 4.10. A maddesinin 11,12 alıkonma zamanına ait MS'i



Şekil 4.11. cis-bisiklo[4.4.0]dekan-1-ol-3-on bileşiğinin MS parçalanma patronları

A karışımının ~ % 25-7'sini oluşturan GC kromatogramında 11.12 alıkonma zamanına sahip ekstra bir pik görülmektedir (Şekil 4.8.). Bu maddeye ait MS sonucu Şekil 4.10'da görülmektedir. Spektrumlardan da görüldüğü gibi 11.12 alıkonma zamanına sahip pikte moleküler iyon piki 168'dir. Cis-bisiklo[4.4.0]dekan-1-ol-3-one bileşiğinin moleküler iyon pikide 168'dir. Aynı zamanda iki bileşiğinde 168, 125, 111 parçalanma patronları da örtüşmektedir (Şekil 4.11). Dolayısı ile A maddesindeki 11.12 alıkonma zamanına sahip pikin cis-bisiklo[4.4.0]dekan-1-ol-3-on olduğu düşünülmüştür.

A karışımı, B karışımı ve B karışımının preparatif çalışmasıyla ele geçen 13, 14, 15, 16 no'lu maddelerin TLC çalışmaları varolduğu görülen harman bileşiği, GC-MS çalışmaları belirlenememiştir. Harman bileşiğinin GC-MS çalışmaları belirlenmemesinin sebebi araştırılmıştır. Bunun için harman standardı GC-MS'de analiz edilmiştir. Onlarca deneme sonunda harmanın bir kere küçük bir pik verdiği görülmüştür. Diğer β -karbolin bileşiklerinin GC-MS'te belirgin pikler verirken, harman bileşiğinin vermemesinin sebebi tam olarak anlaşılamamıştır.

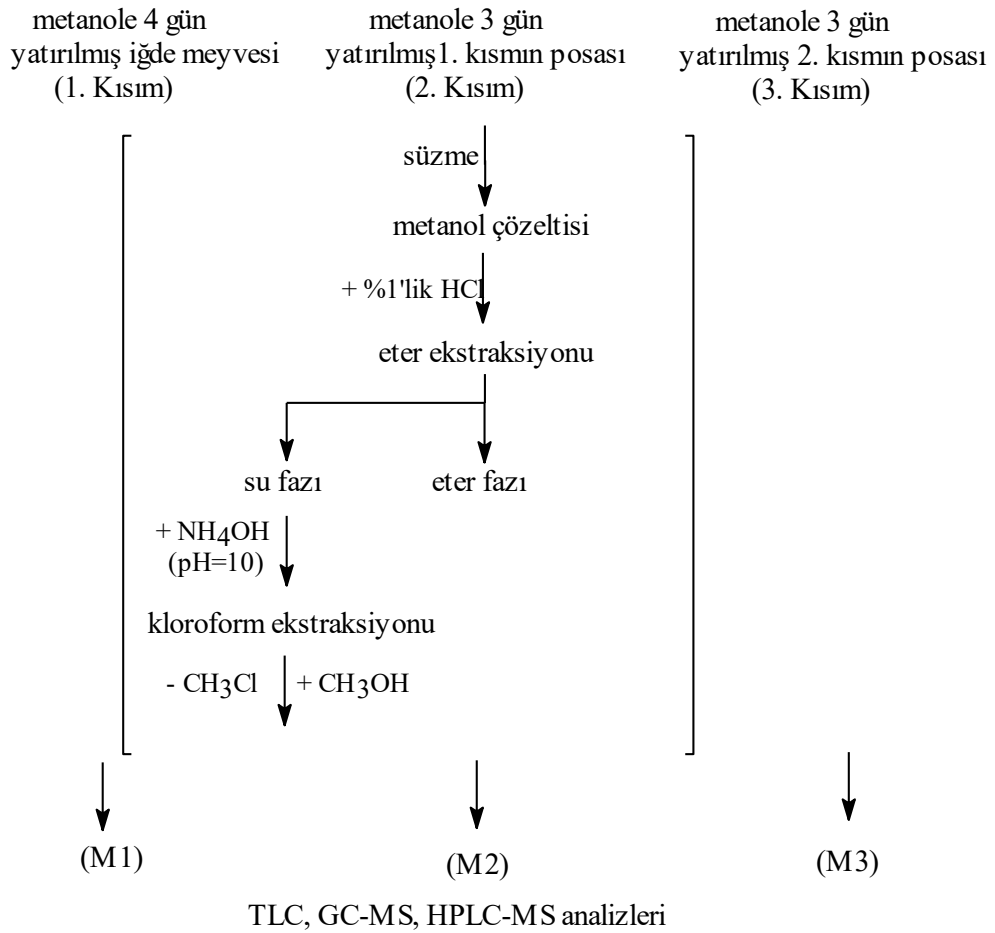
Ayrıca harman standardı, A karışımı, B karışımı ve B karışımının preparatif çalışmasıyla ele geçen 13, 14, 15, 16 no'lu maddelerin hepsine, Bölüm 3.2.2.'de belirtilen koşullar kullanılarak HPLC analizi, Bölüm 3.2.3.'de belirtilen koşullar kullanılarak LC-MS analizleri yapılmıştır. Harman standardının LC-MS analizleri sonunda 1.7, HPLC analizleri sonunda 1.5 alıkonma zamanında düzgün bir pik verdiği görülmüştür. Oysa diğer tüm numunelerin, aynı merkezli birbirine karışmış yaygın pikler verdiği belirlenmiştir. GC-MS sonuçlarında da görüldüğü gibi iğde meyvesinden ele geçen madde karışımlarında diğer β -karbolin türevlerinden bileşikler mevcuttur. Bu türevlerin, HPLC ve LC-MS'de yaklaşık aynı yerlerde pik vermesinin bu yayılmaya sebep olduğu veya bu maddelerin birbirinden ayrılmasında kolonun yetersiz kaldığı, düşünülebilir. Sonuçta bu maddelerin hepsine uygulanan LC-MS ve HPLC-MS analizleri de bize tam ayırım sonuçları verememiştir.

Özetle baz ile olgunlaştırılan iğde meyvesinin sulu çözeltisinin ~ % 99'unu norharman ve 1-asetil- β -karbolin bileşiklerinin; asit ile olgunlaştırılan iğde meyvesinin sulu çözeltisinin ~ % 95'ini norharman, 1-asetil- β -karbolin ve cis-bisiklo[4.4.0]dekan-1-ol-3-on bileşiklerinin oluşturduğu tespit edildi. Preparatif TLC çalışmaları β -karbolin bileşiklerinin HF katkılı silika gel tarafından tutulduğunu

düşündürdü. LC-MS ve HPLC-MS analizleri de bize tam sonuçlar vermedi. Harman bileşiği sadece TLC’de belirlenebildi.

4.2. Bileşenlerin metanol ekstraksiyonu ile elde edilmesi

Çözücü olarak metanol kullanılan deneylerde kesikli ekstraksiyon ve sürekli ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Metanol çözücülü ortamda deneylerin yapılmasının sebebi iğde meyvesi ve yaprağında bulunan β -karbolin bileşenlerini tam olarak çekebilmek ve böylece hangilerinin suya geçtiğini belirleyebilmekti. Bu amaçla, önce aşağıdaki ana hatları gösterilen kesikli ekstraksiyon yöntemi, kullanıldı. Üç kez ard arda metanol ekstraksiyonu yapıldı. Bu üç aşamada izlenen adımlar ve ele geçen madde kodları aşağıdaki şemada gösterilmiştir. Metanol içerisinde bir kaç günlük ısı uygulamadan yatırmanın sebebi ısı ile kaybedeceğimiz β -karbolin bileşenlerini de ele geçmesini sağlamaktır.



Önce ele geçen çözeltilerde harman ve harman türevlerinin olup olmadığını anlamak için 20 cm x 20 cm Silika Gel 60 plakaları ve $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}(4:1)$ yürütücüsü çözücüsü kullanıldı (TLC I, Tablo 4.2.). TLC I analizi, metanolde bekletilen birinci kısmın (M1) sonunda elde edilen madde karışımında, yürümeyen maddeler yanında altı, metanolde bekletilen ikinci kısmın (M2) sonunda elde edilen karışımında, yürümeyen maddeler yanında yedi, metanolde bekletilen birinci kısmın (M3) sonunda elde edilen madde karışımında ise yürümeyen maddeler yanında altı madde olduğunu gösterdi.

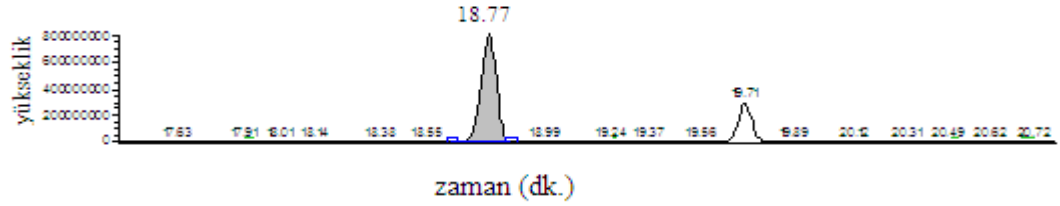
Tablo 4.2 M1, M2 ve M3 maddelerine ait Rf değerleri

Madde kodu	1. zon	2. zon	3. zon	4. zon	5. zon	6. zon	7. zon	8. zon
M1	0,01	-	0.6	0.63	0.69	0.71	0.74	0.9
M2	0,01	0.25	0.6	0.63	0.69	0.71	0.74	0.9
M3	0,01	-	0.6	0.63	0.69	0.71	0.74	0.9
Harman	-	-	-	0,63	-	-	-	-

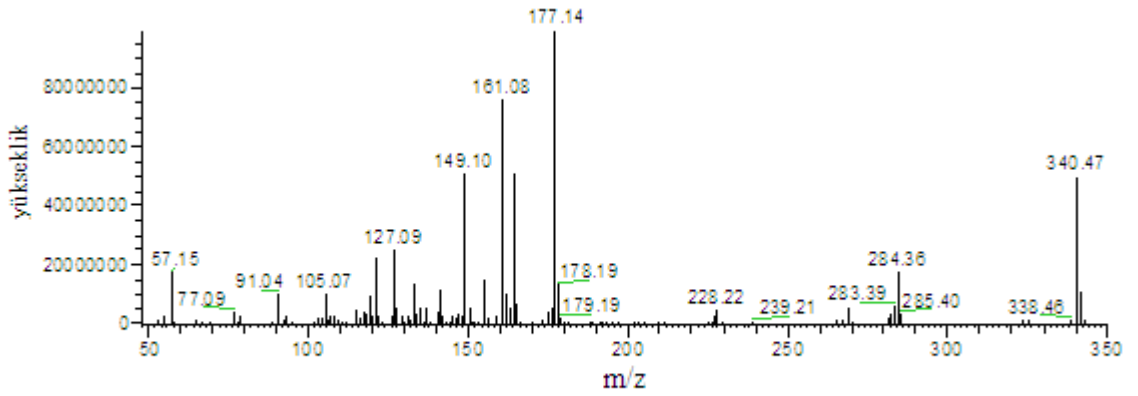
M1 ve M3 maddesinde altı zon görülmüştür. M2 maddesinde bu zonların yanısıra 0.25 Rf değerine sahip ekstra bir zon görülmektedir. Bu üç maddeyi temsilen M1 maddesi için 20 cm x 20 cm büyüklüğünde Silika Gel 60 HF₂₅₄ plakalar ve yürütücü solvent $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (4:1) kullanılarak preparatif TLC yapılmıştır. Bunun sonucunda 0,0-0,02 (1) Rf değerinde sarı ince ve mavi , 0,6-0,69 (2) Rf değerinde mavi kalın, 0,7-0,75 (3) Rf değerinde mavi-yeşil, 0,9 (4) Rf değerinde ince sarı ve 0,97 (5) Rf değerinde gene ince sarı floresans veren zonlar gözlenmiştir. Birbirinden tam ayırlamadığı için yedi bölge yerine beş bölge kazanmıştır. Bu maddeler spatül yardımı ile erlenlere aktarılıp, metanolde çözülerek süzülüp numune şişelerine konmuştur. 1, 2, 3, 4, 5 no'lu maddeler GC-MS ve HPLC-MS ile analiz edilmiştir.

M1 maddesinden preparatif TLC ile kazınarak alınan 5 zon için de GC-MS çalışması yapılmıştır. Kazınan zonlardan 0,0-0,02 (1) hariç diğer tüm zonların GC analizleri, 19.70 alıkonma zamanında tek pik vermiştir. Alıkonma zamanı 19.70 olan maddenin

MS parçalanma patronları Şekil 4.7’de görülen parçalanma patronları ile bire bir örtüşmesi pikin, 1,2-benzendikarboksilik asit, bis(2-etilhekzil) ester veya DOP olduğunu, dolayısıyla silika gel tarafından β -karbolin bileşiklerinin tutulduğunu göstermiştir. Rf değeri 0,0-0,02 arasında olan zonun kazanması ile ele geçen maddeye ait GC kromotogramı Şekil 4.12’te gözükmektedir.

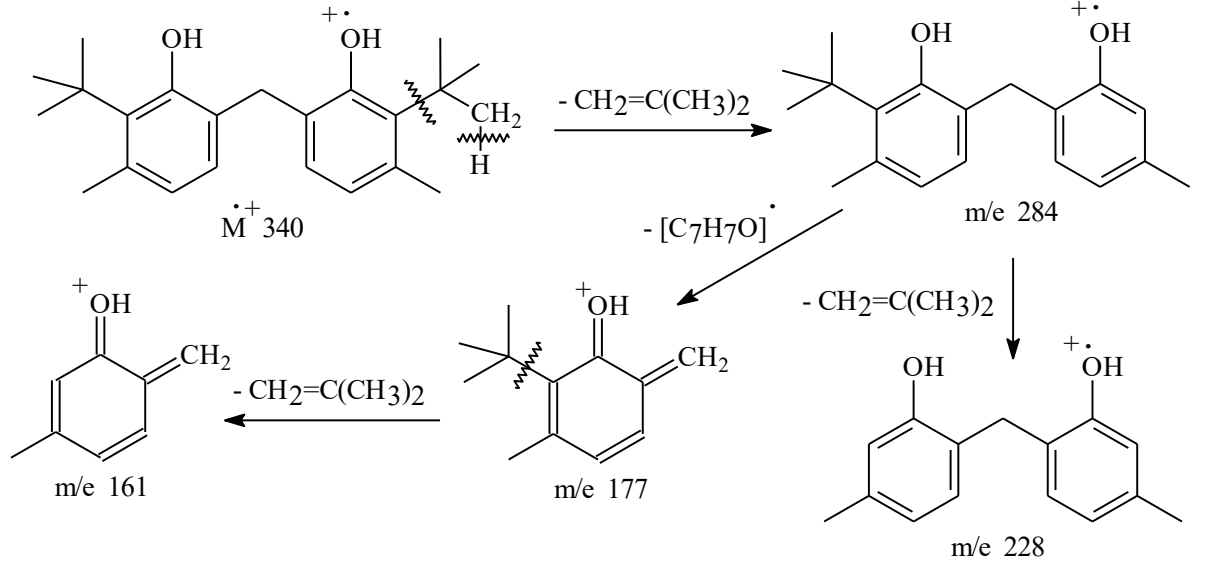


Şekil 4.12. M1 maddesinden preparatif TLC ile ele geçen 1 no’lu madde karışımına ait GC kromotogramı



Şekil 4.13. M1 maddesinden preparatif TLC ile ele geçen 1 no’lu 18,77 alıkonma zamanlı maddeye ait MS

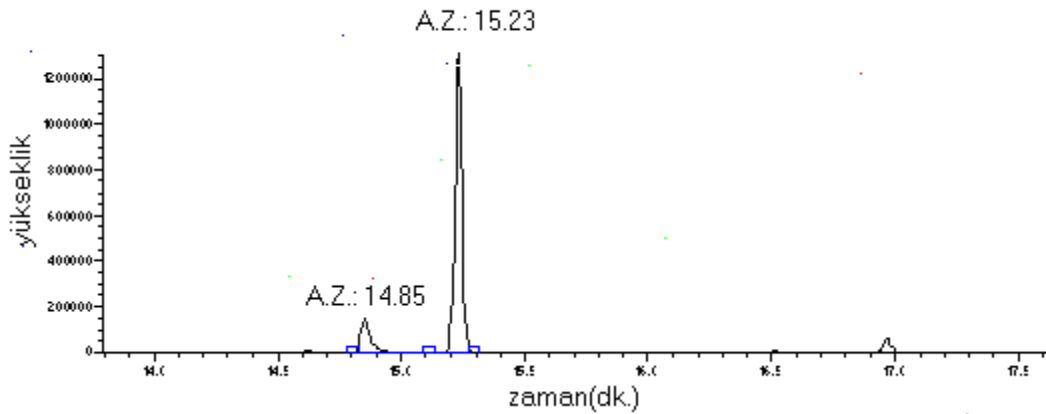
Kromotogramda DOP dışında 18,77’de görülen ekstra pike ait MS spektrumu (Şekil 4.13), bu maddenin moleküler iyon pikinin 340 ve diğer parçalanma patronları 284, 177, 161, 149, 127 ve tipik benzilik parçalanması olan 91 piki ile 2,2’-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol parçalanma patronları ile bire bir örtüşmektedir (Şekil 4.14).



Şekil 4.14. 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol'ün MS parçalanma patronları

2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol bileşiği bu çalışmanın diğer ilginç bir maddesidir. Literatür araştırmalarında 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol bileşiğinin iğde bitkisinde bulunduğu dair hiçbir veriye raslanmamıştır.

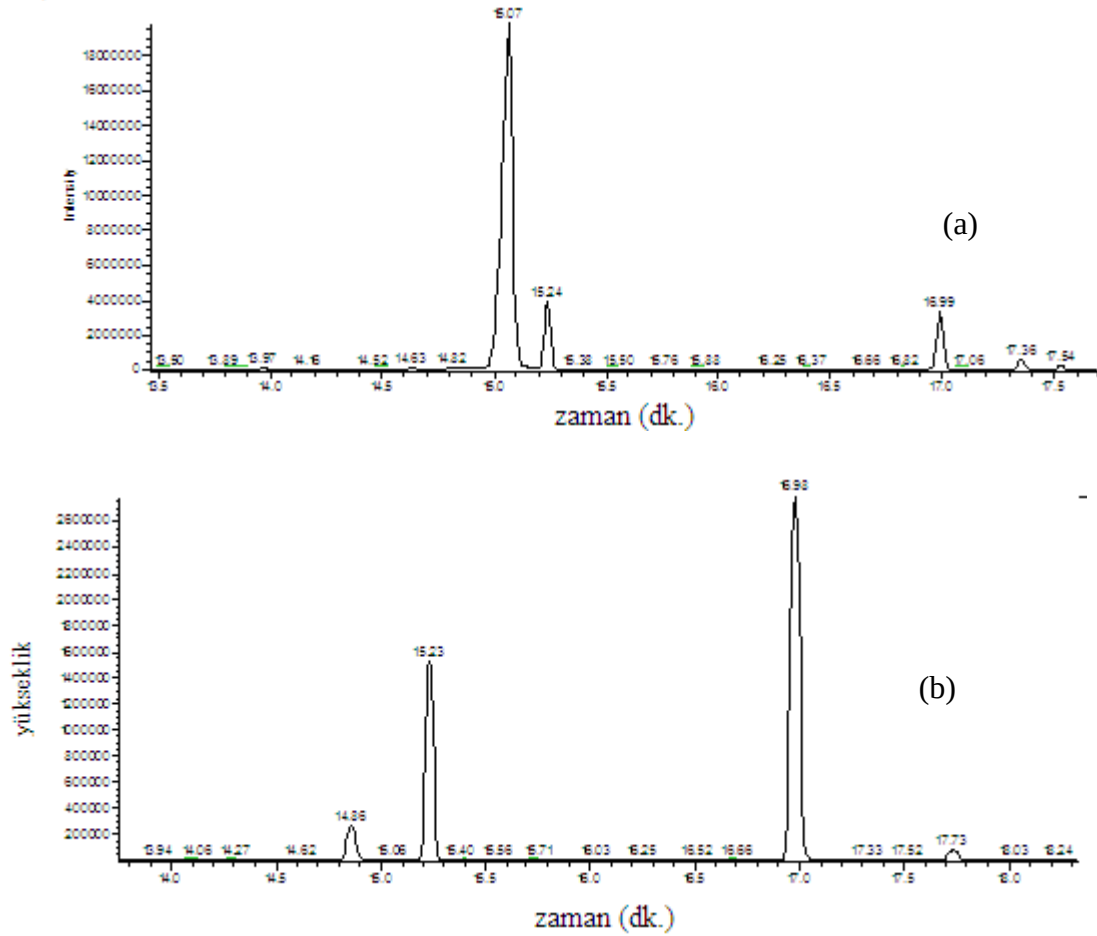
Preparatif çalışma dışında M1, M2 ve M3 ile gösterilen çözeltilerde de β -karbolin türevleri araştırılmıştır. Metanolde bekletilen birinci kısmın sonunda elde edilen M1 madde karışımının GC kromotogramın'da, M1 maddesinin 3 bileşene sahip olduğu ve bu bileşenlerden 14.85 ve 15.23 alıkonma zamanlarına sahip iki pikin yoğunlukta olduğu görülmektedir (Şekil 4.15). Küçük bileşenin M1 karışımındaki miktarı en fazla % 2,5-3,5 arasında değiştiği belirlenmiştir.



Şekil 4.15. M1 madde karışımına ait GC kromotogramı

% 13.5'ini oluşturan 14.85 alkonma zamanına sahip pikin MS'teki parçalanma patronlarından, moleküler pikinin 168 olduğu ve parçalanmalarının Şekil 4.3'te norharman ile örtüştüğü belirlenmiştir. Dolayısıyla bu maddenin norharman olduğu tespit edilmiştir. M1 maddesinin % 84'ünü oluşturan 15.23 alkonma zamanına sahip pikin, MS'deki parçalanma patronlarında moleküler pikinin 210 olduğu ve parçalanmalarının Şekil 4.4'te verilmiş olan 1-asetil- β -karbolin ile örtüştüğü, dolayısıyla bu maddenin 1-asetil- β -karbolin olduğu tespit edilmiştir.

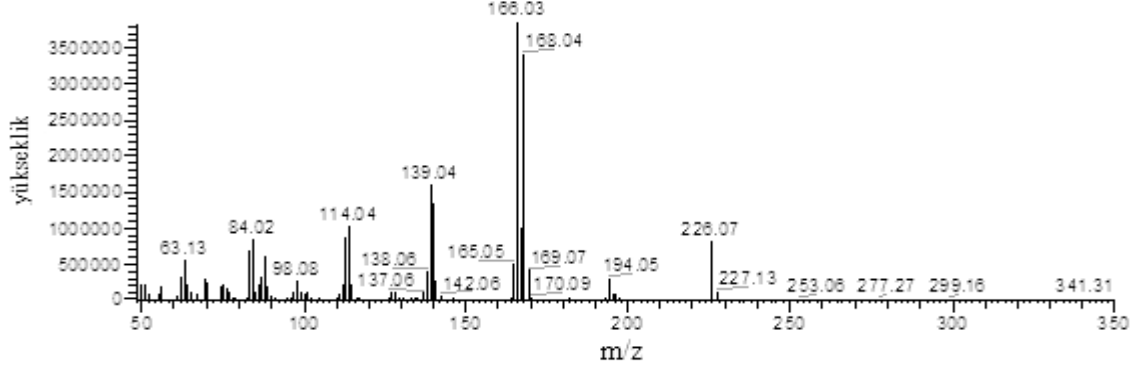
M2 ve M3 maddeleri için de GC-MS analizi yapılmıştır. Bu maddelerin GC kromotogramı Şekil 4.16'da görülmektedir.



Şekil 4.16. (a) M2 madde karışımının GC kromotogramı
 (b) M3 madde karışımının GC kromotogramı

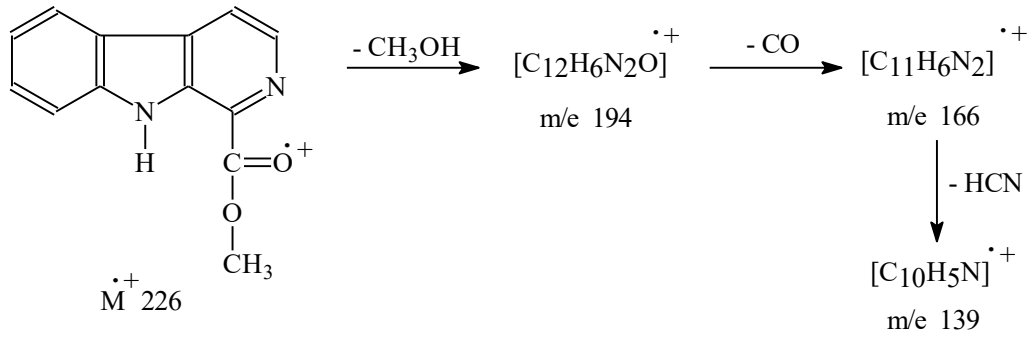
Metanole yatırılmış ikinci kısımda ele geçen M2 madde karışımının % 90'ını 15.07, 15.23 ve 16.99 alkonma zamanında üç maddenin, metanole yatırılmış üçüncü kısımda ele geçen M3 madde karışımının % 98'ini 14.85, 15.23 ve 16.99 alkonma zamanında üç maddenin oluşturduğu görülmektedir. M2 ve M3'te 15.23 alkonma zamanına sahip pikin MS parçalanma patronlarının Şekil 4.4'te görülen 1-asetil- β -karbolin'in parçalanma patronları ile aynı olduğu tespit edilmiştir. M3 maddesinde

14.85 alıkonma zamanlı pikin MS'i norharman ile örtüştüğü belirlenmiştir. Parçalanma patronlarından bu maddenin norharman olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3).



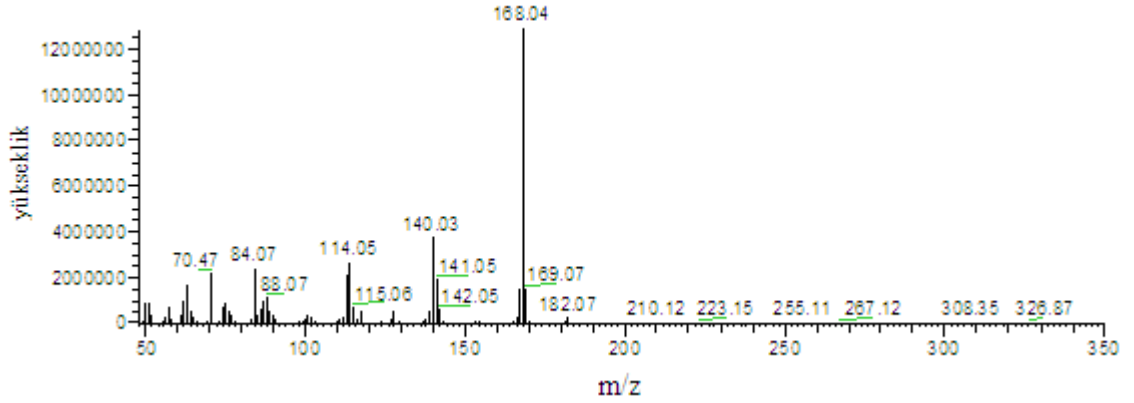
Şekil 4.17. M2 ve M3 maddesinin 16.99 alıkonma zamanlı piklerinin MS'i

M2 madde karışımının % 15'ini ve M3 madde karışımının % 63'ünü teşkil eden 16.99 alıkonma zamanlı piklerin MS'leri aynıdır (Şekil 4.17). Bu maddenin moleküler iyon piki 226'dır. 166, 140, 114 parçalanma patronları bu maddenin norharmanın bir türevi olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3). 226 ve 194'teki parçalanmalar bu maddenin 9H-Prido[3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester parçalanması ile birebir örtüştüğünü göstermiştir (Şekil 4.18.)



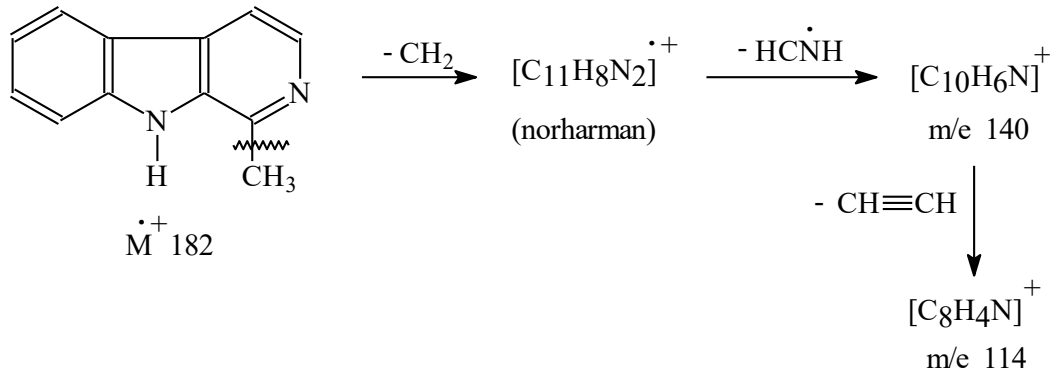
Şekil 4.18. 9H-Prido [3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester'in parçalanma patronları

Ele geçen 9H-Prido[3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester bileşiği, bu çalışmanın bir diğer ilginç bir maddesidir. Literatür araştırmalarında 9H-Prido[3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester (veya norharman-1-karboksilik asit, metil ester) bileşiğinin iğde bitkisinde bulunduğu dair hiçbir veriye raslanmamıştır.



Şekil 4.19. M2 madde karışımının 15.07 alıkonma zamanlı pikinin MS'i

M2 madde karışımının % 59'unu teşkil eden 15.07 alıkonma zamanlı pikin MS spektrogramı Şekil 4.19.'da görülmektedir. Bu maddenin moleküler iyon piki 182'dir. 168, 140, 114 parçalanma patronları bu maddenin norharmanın bir türevi olduğunu göstermektedir (Şekil 4.3.). 182 pikin bu maddeye bir metil gurubunun bağlı olduğunu göstermektedir (Şekil 4.20.). Dolayısıyla bu maddenin 1-metil-9H-Prido[3,4-b]indole (harman) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.20. 1-metil-9H-Prido[3,4-b]indole (harman) parçalanma patronları

Bu tespit; TLC çalışmalarında varolduğu görülen, onlarca standart ile GC-MS çalışmalarından sadece bir GC-MS enjeksiyonunda belirlenen, harman bileşiğinin belirlenebildiği diğer bir çalışmadır.

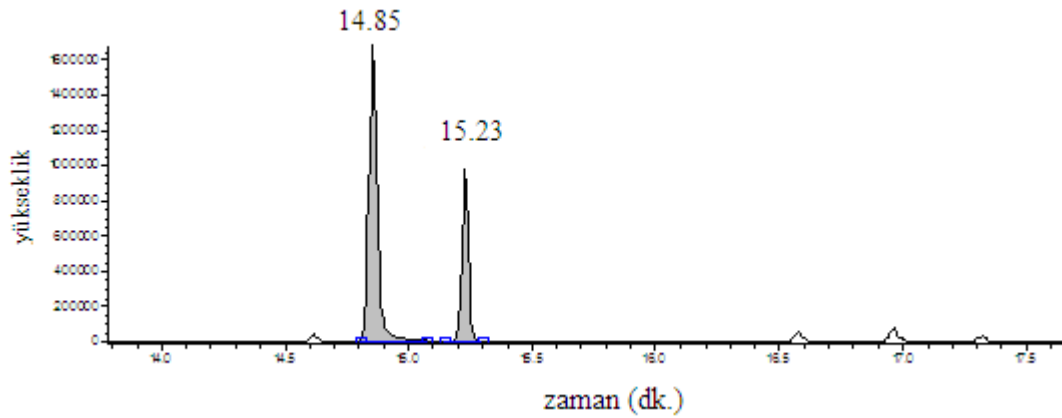
Son olarak hem iğde meyvesi hemde iğde yaprağında sürekli ekstraksiyon ile reflaks sıcaklığında β -karbolin bileşiklerini elde edilmesine çalışıldı. Sıcaklık vermeden yapılan işlemlerden farklı olarak soksilet düzeneği kullanılarak metanol ekstraksiyonu yapılmıştır (Şekil 3.2a). Ayrıca kloroform ile ekstraksiyon clevenger sürekli ekstraksiyon sistemi ile de yapılmıştır (Şekil 3.2b).

İğde meyvesinde metanolle yapılan ekstraksiyon sonunda ele geçen madde karışımında (M4) harman ve harman türevlerinin olup olmadığını anlamak için 20 cm x 20 cm Silika Gel 60 plakaları ve CHCl₃-MeOH(4:1) yürütücüsü çözücüsü kullanıldı (TLC I, Tablo 4.3.). M4'te yürümeyen maddeler dışında 5 madde olduğu görüldü.

Tablo 4.3 İğde meyvesinden elde edilen M4 madde karışımına ait Rf değerleri

Madde kodu	1. zon	2. zon	3. zon	4. zon	5. zon	6. zon
M4	0,01	0.6	0.63	0.69	0.71	0.9
Harman	-	-	0,63	-	-	-

M4 madde karışımının GC kromatogramı Şekil 4.21.'de görülmektedir. Şekil 4.21.'deki GC kromatogramında M4 maddesinin 6 bileşene sahip olduğu ve bu bileşenlerden 14.85 ve 15.23 alıkonma zamanlarına sahip iki pikin yoğunlukta olduğu görülmektedir. Küçük bileşenlerin M4 karışımındaki miktarı en fazla % 1-2 arasında değiştiği belirlenmiştir.



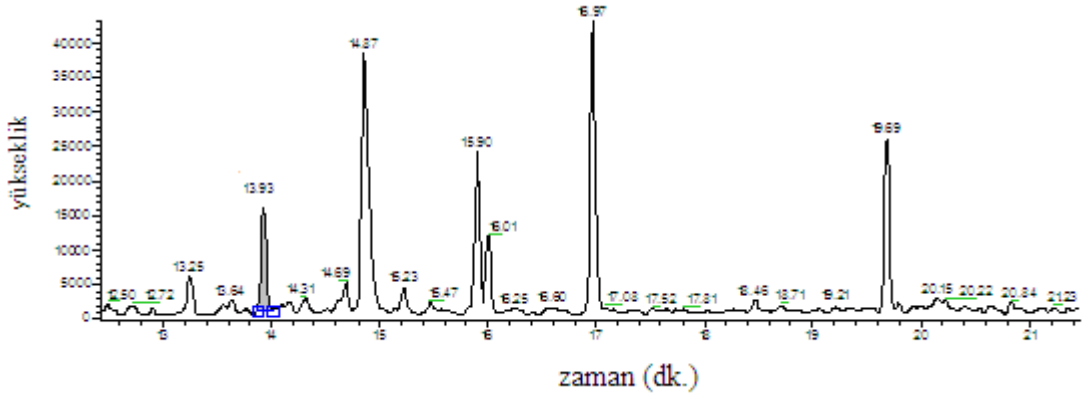
Şekil 4.21. M4 maddesine ait GC kromatogramı

M4 maddesinin % 66'sını oluşturan 14.85 alıkonma zamanlı pikin MS parçalanma patronlarından bu maddenin norharman olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.3.). M4 maddesinin % 32'sini oluşturan 15.23 alıkonma zamanlı pikin MS parçalanma patronlarından bu maddenin 1-asetil-β-karbolin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.4.).

İğde yaprağında metanol ile sürekli ekstraksiyon sonunda ele geçen madde karışımında da (Y1) TLC I koşulları kullanılarak kaç bileşen içerdiğinin tespiti

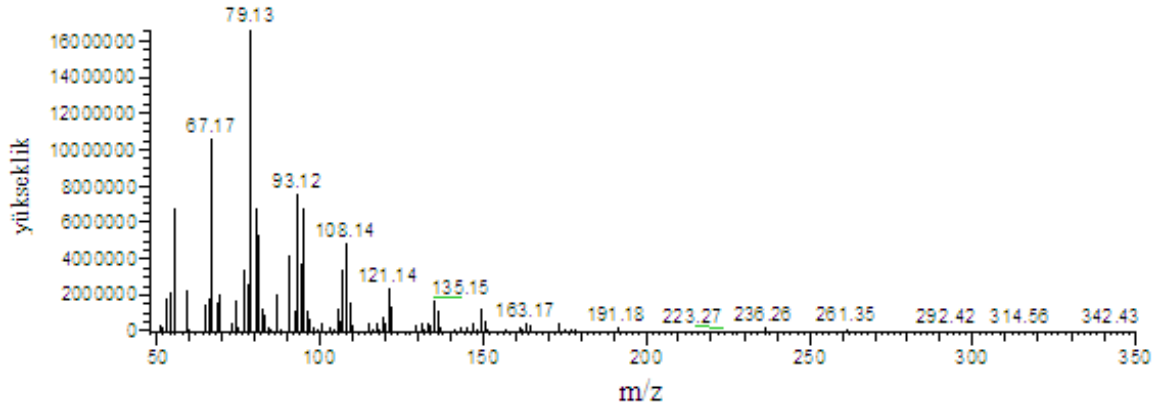
yapılmaya çalışılmıştır. Fakat yapraktaki klorofilin kırmızı floresansının zonları kapatması sebebiyle 0.63'teki mavi floresans hariç diğer zonlar seçilememiştir.

Y1 madde karışımına ait GC kromotogramı şekil 4.22'de gösterilmiştir. Y1 madde karışımında 14.85, 15.23, 15.90, 16.02, 16.97, 18.46 ve 19.70 alıkonma zamanlarına sahip 7 pik karışımdaki maddelerin % 90'ını teşkil etmektedir. Y1 madde karışımının ~ % 27'sini teşkil eden 14.85 ve ~ % 1'ini teşkil eden 15.23 piklerinin MS'leri ve piklerin parçalanma patronlarından norharman (Şekil 4.3) ve 1-asetil- β -karbolin'in (Şekil 4.4) olduğu tespit edilmiştir. Y1 madde karışımında 19.70 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i Şekil 4.6 ile aynıdır. MS parçalanma patronları olan 167, 149, 113, 83, 71, ve 57, 19.70 alıkonma zamanındaki pikin, şişe kapaklarından gelmiş olabilecek 1,2-benzendikarboksilik asit, bis(2-etilhekzil) ester (Şekil 4.7) veya DOP olduğunu göstermektedir.

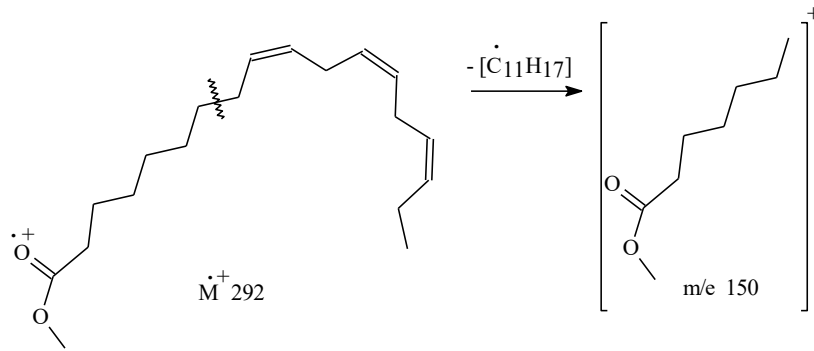


Şekil 4.22. İğde yaprağından ele geçen madde karışımının (Y1) GC kromotogramı

Y1 madde karışımının ~ % 12,5'ini teşkil eden 15.90 alıkonma zamanlı pikin 135, 121, 108, 93, 79 parçalanma patronları 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metilester (Z,Z,Z)'in parçalanma patronları ile bire bir örtüşmektedir (Şekil 4.23. ve 4.24). Dolayısıyla bu maddenin omega 3 metil esteri olarak da bilinen 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metilester (Z,Z,Z) olduğu tespit edilmiştir.

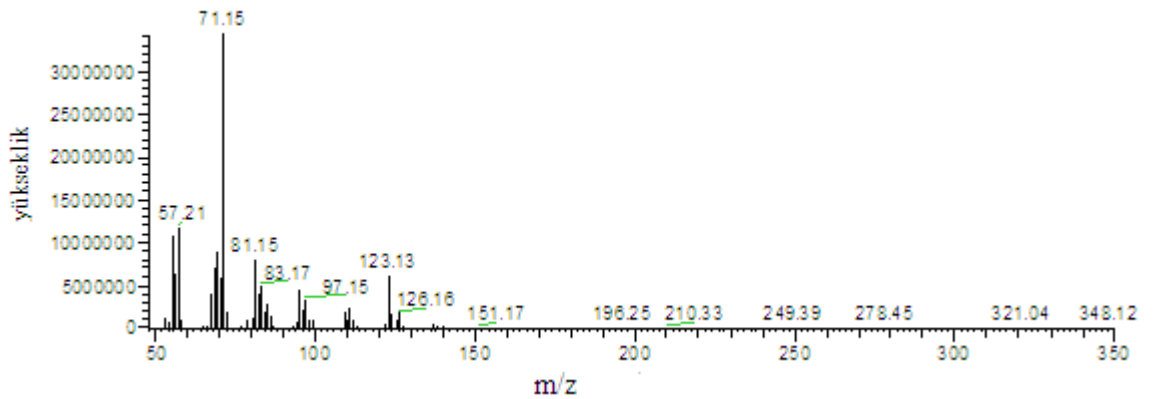


Şekil 4.23. Y1 madde karışımında 15.90 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i

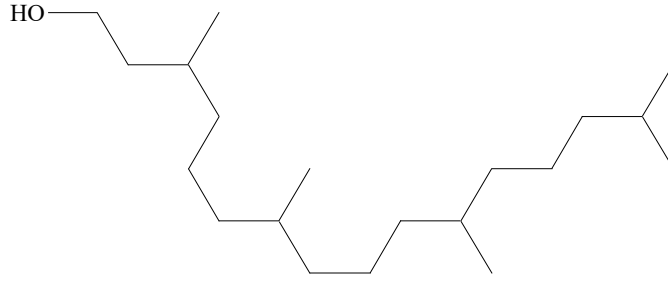


Şekil 4.24. 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metilester (Z,Z,Z)'in parçalanma patronları

Y1 madde karışımının ~ % 10'unu teşkil eden 16.01 alıkonma zamanlı pikin 123, 81,71 ana parçalanma patronları Fitol'ün parçalanma patronları ile bire bir örtüşmektedir (Şekil 4.25 ve 4.26). Dolayısıyla bu maddenin fitol olduğu tespit edilmiştir.

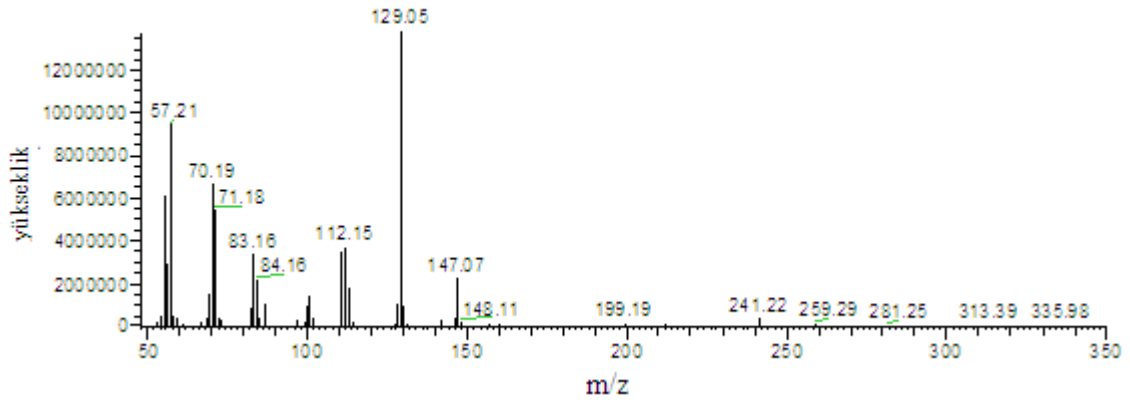


Şekil.4.25. Y1 madde karışımında 16.01 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i

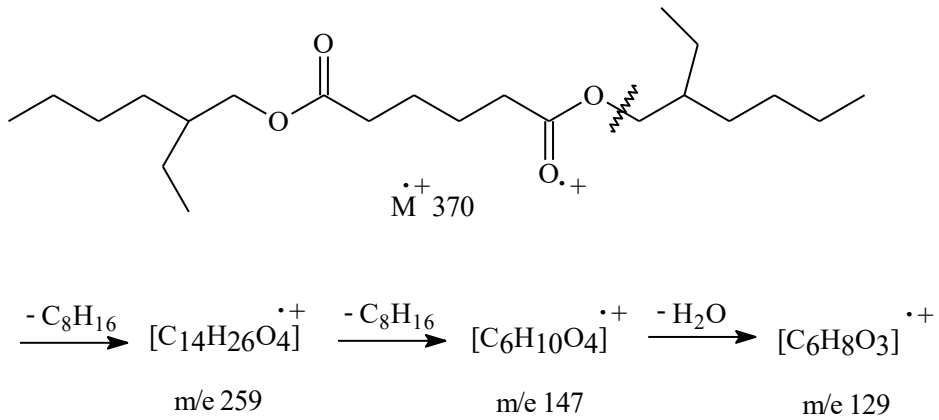


Şekil 4.26. Fitol

Y1 madde karışımının ~ % 0.5'ini teşkil eden 18.46 alıkonma zamanlı pikin 259, 147, 129 ana parçalanma patronları hekzandioik asit bis(2-etilhekzil) ester'in parçalanma patronları ile birebir örtüşmektedir (Şekil 4.27. ve 4.28.). Dolayısıyla bu maddenin Hekzandioik asit bis(2-etilhekzil) ester olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.27. Y1 madde karışımında 18.46 alıkonma zamanına sahip pikin MS'i



Şekil 4.28. Hekzandioik asit bis(2-etilhekzil) ester

İğdede ısı uygulamadan metanole yatırılmış ilk kısım (M1), ikinci kısım (M2), üçüncü kısım (M3), soksilet düzeneği kullanılarak ısı ile metanol ekstraksiyonu ile ele geçmiş madde karışımı (M4) ve aynı şekilde yaprakta soksilet ile ele geçmiş madde karışımı (Y1)'de HPLC analizi yapılmıştır. Ayrıca bu maddelere belirtilen koşullar kullanılarak LC-MS analizleri yapılmıştır. Isı verilmeden elde edilen madde karışımlarında olduğu gibi, aynı merkezli birbirine karışmış yaygın pikler elde edilmiştir. Bunun sebebi daha önce belirtildiği gibi, β -karbolin türevlerinin iğde içinde birarada bulunması kolonların bu karışımları ayırmak için yetersiz kalmasından dolayı aynı yerde geniş pik vermesindendir.

Özetle iğde meyvesinin metanol çözücüsü kullanılarak oda sıcaklığında 11 günlük kesikli ekstraksiyonu sonunda norharman, harman, 1-asetil- β -karbolin ve gene bir β -karbolin bileşiği olan 9H-prido[3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester bileşikleri elde edilirken, metanol çözücüsü kullanılarak reflaks sıcaklığında 2 günlük sürekli ekstraksiyon sonunda sulu ortamda baz ile olgunlaştırma sonunda olduğu gibi sadece norharman ve 1-asetil- β -karbolin elde edilebilmiştir. İğde yapraklarında ise β -karbolin bileşiklerinin dışında lipid bileşenleri belirlenmiştir.

4.3. Harman'nın Organik Tuzları Çözme Gücü

İğde meyvesinin kaynatılmış suyunda suda çözünmeyen organik tuzların çözündüğü daha önce yapılan çalışmalarda gözlenmiştir. Bu çalışmanın amacı bu çözünmeyi sağlayan muhtemel bileşiğin araştırılmasıdır. İğde içerisinde yoğun olarak bulunan β -karbolin türevlerinin çözünmeyi sağladığı düşünülmüştür. Hem canlılarda örneğin; insanlarda beyin tarafından biyolojik olarak ve sentetik olarak sentezlenmesi, ayrıca diğerlerine göre daha ucuz olması nedeniyle çalışmamızda standart olarak harman kullanılmasına karar verildi.

Deneyssel kısımda Bölüm 3.4.'te anlatıldığı gibi harman bileşiğinin suda çözünmeyen organik tuzları çözme kapasitesini tespit etmek için kalsiyum okzalat (CaC_2O_4) ile reaksiyona sokulmuştur. Harman standardının sadece asidik ortamda çözündüğü görülmüştür. İğdenin su ile kaynatılmasında iğdeye geçmesinin sebebi iğde suyunun asidik olmasındandır ($\text{pH}=3.70$). Deneyssel kısımda anlatıldığı gibi 0.05 gr iğde suda asidik ortamda çözülüp üzerine 0.05 gr kalsiyum okzalat eklenmiştir. Blank olarak 0.05 gr kalsiyum okzalat suda asidik ortamda çözölmüştür. Bu iki madde 100

ml'ye tamamlanıp, süzölüp Ca tespiti için ICP-MS'te analiz edilmiştir. Ayrıca süzgeç kağıdında kalan çözünmemiş kalsiyum okzalat tartılarak ICP-MS'teki sonuçla karşılaştırılmıştır.

Süzgeç kağıdında tartım sonuçlarına göre blank çözeltisinde kalsiyum okzalatın % 53.6'sının çözündüğü ve harman çözeltisinde kalsiyum okzalatın %54'ünün çözündüğü görülmüştür. ICP-MS ile yapılan çalışmada ele geçen Ca miktarından blank çözeltisinde 0.05gr/100ml kalsiyum okzalatın (çözünen Ca miktarı 6.7 mg/100 ml) % 43 çözündüğü, 0.05 gr/100ml harman çözeltisinde 0.05 gr/100ml kalsiyum okzalatın (çözünen Ca 6.3 mg/100 ml) % 40 çözündüğü tespit edilmiştir. Burdanda harman içeren çözeltinin kalsiyum okzalatın çözünmesinde bir katkısının olmadığı anlaşılmıştır. İğdenin 20gr/100 ml sulu çözeltisinde kalsiyum okzalatın % 32'sinin çözündüğü belirlenmiştir. Sonuç olarak harman ve diğer β -karbolinlerin saf olarak değil, fenolik bileşikler ve enzimler de dahil asidik olan kendi ortamları içinde (pH= 3,7), gerçekleştirmiş olabileceği sonucuna varıldı.

SONUÇLAR

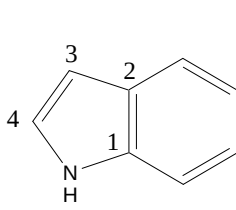
1. Bursa ve Niğde’den alınan iğde meyveleri ve yapraklarına uygulanan ekstraksiyon neticeleri Tablo 4.4 ve Tablo 4.5’te özetlenmiştir. Tablo 4.4’te, ekstraksiyon sonucunda % 90-99 oranında β -karbolin bileşiklerinin elde edildiği görülmektedir.

Tablo 4.4. İğde meyvesinde ve yaprağında β -karbolin bileşiklerini belirlemek üzere yapılan işlemlerde sonunda ele geçen karışım daki bileşiklere ait GC-MS’teki Rt değerleri ve bileşiklerin çözeltideki miktarları

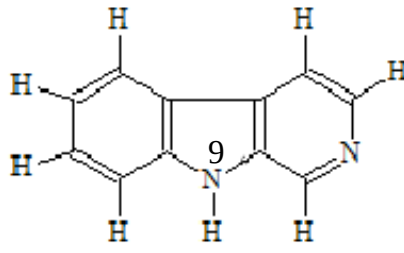
Deney Kodu	Ele geçen karışımındaki bileşiklere ait GC-MS’deki Rt değerleri								
	11.12	14.85	15.07	15.23	15.90	16.02	16.99	18.46	18.77
	ve bileşiklerin çözeltideki miktarları (%)								
B(meyve) Suda refluks sıcaklığında 12 saat	-	54.5	-	45	-	-	-	-	-
A (meyve) Suda asit ile reflüks sıcaklığında 12 saat	25	56	-	14	-	-	-	-	-
M1(meyve) Metanolde oda sıcaklığında 4 gün	-	13.5	-	84	-	-	-	-	√*
M2(meyve) Metanolde oda sıcaklığında 4+3 gün	-	-	59	27	-	-	15	-	-
M3(meyve) Metanolde oda sıcaklığında 4+3+3 gün	-	10	-	25	-	-	63	-	-
M(meyve) (M1+2+3’ün ortalaması)	-	~8	~20	~46	-	-	~26	-	√*
M4(meyve) Metanolde reflüks sıcaklığında 2 gün	-	66	-	32	-	-	-	-	-
Y1(yaprak) Metanolde reflüks sıcaklığında 2 gün	-	27	-	1	12,5	10	23	0.5	-

* TLC kazımlarında elde edildi.

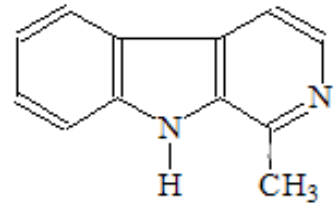
Tablo 4.5. GC-MS'deki Rt değerlerinde gelen bileşiklerin adları ve formülleri



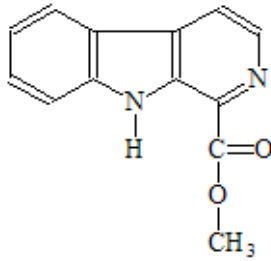
İndol



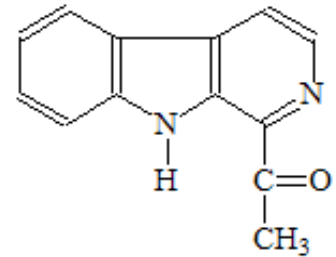
14.85 : 9H-Prido[3,4-b]indol
norharman



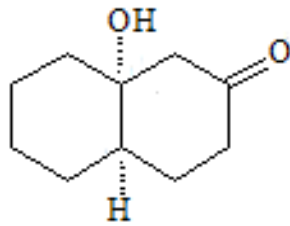
15.07 : 1-metil-9H-Prido[3,4-b]indole
harman



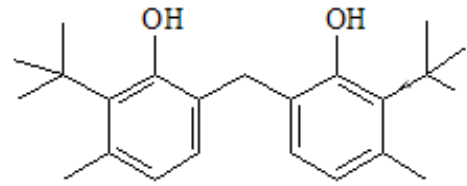
16.99 : 9H-Prido [3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester



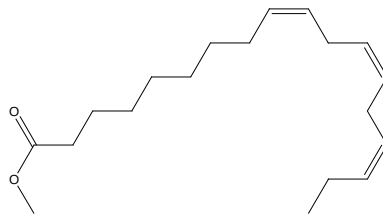
15.23 : 1-asetil-β- karbolin



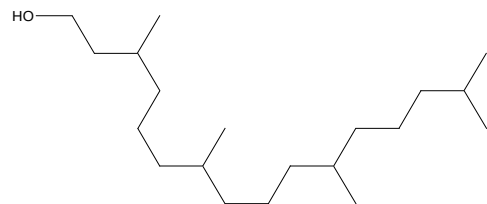
11.12 : cis-bisiklo[4.4.0]dekan-1-ol-3-on



18.77 : 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol]



15.90 : 9,12,15-Oktadekatrienoik asit, metilester (Z,Z,Z)



16.02 : fitol

2. Literatür araştırmalarında iğde meyvesinde bulunduğu dair hiçbir veriye raslanmayan, 2,2'-metilenbis[6-(1,1-dimetiletil)-4-metil-fenol ve 9H-Prido[3,4-b]indole-1-karboksilik asit, metil ester (veya norharman-1-karboksilik asit, metil ester) olarak adlandırılan iki yeni bileşik ele geçmiştir.

3. Standart harman çözeltisinde çözünen kalsiyum ile suda çözünen kalsiyum oranlarının karşılaştırılması, harmanın suda çözünmeyen organik tuzları çözmede herhangi bir katkısının olmadığı gösterdi. Sonuç olarak harman ve diğer β -karbolinlerin saf olarak değil, fenolik bileşikler ve enzimler de dahil asidik olan kendi ortamları içinde (pH= 3,7), gerçekleştirmiş olabileceği sonucuna varıldı.

4. Suda çözünmeyen organik tuzları çözmede, harman ve diğer β -karbolinlerin saf olarak değil, fenolik bileşikler ve enzimler de dahil asidik olan kendi ortamları içinde (pH= 3,7) herhangi bir katkısının olup olmadığının araştırılması gerekir.

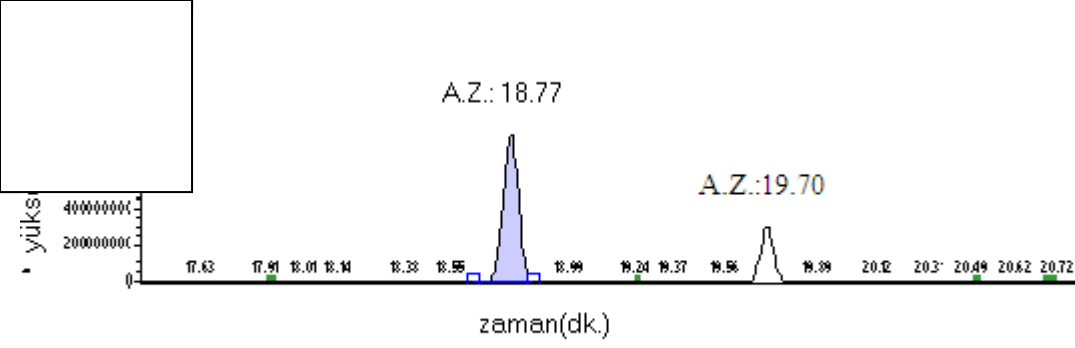
KAYNAKLAR

- [1] **ECONOMOU, A.S.; SPANOUDAKİ M.J.**
- [2] “EHRETIA PHILIPPINENSIS”, 272
- [3] **BAYTOP, A.**, 1991. “Farmasötik Botanik Ders Kitabı”, İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, No.: 3637, 215-216
- [4] **BAYTOP, T.**, 1999. “Türkiye’de Bitkilerle Tedavi, Geçmişte ve Bugün”, 233
- [5] **MCKEAN, D.R.**,1982. “Flora of Turkey and East Aegean Island”, Edinburgh; Edinburgh University Press,533-534
- [6] **AYAZ, F.A.; BERTOFT, E.**, 2001. “Sugar and Phenolic Acid Composition of Stored Commercial Oleaster Fruits”, *Journal of Food Composition and Analysis*,**14**, 505-511.
- [7] **HOSSEİNZADEH, H., RAHİMİ, R.**, 1999. “Anti-inflammatory effects of *Elaeagnus Angustifolia* L. Fruits in mice and rats”, *Irn J Med Sci*, **24**,144-147.
- [8] **AHMADIANI, A.; HOSSEINY, j.; SEMNANİAN, S.; JAVAN, M.; SAEEDİ, F.; KAMALİNEJAD, M.; SAREMİ, S.**, 2000.”Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *elaeagnus angustifolia* fruit extract”, *Journal of Ethnopharmokology*, **72**, 287-292.
- [9] **ZABRAMNYİ, D.T.**, 1939. “Fruit of Central Asiatic Varieties of *elaeagnus*”, *Acta Univ.asiae Mediae*, **34**, 21-44.
- [10] **MASSAGETOV, P.S.**,1946. “Alkaloids of plants of the family *Elaeagnaceae*”, *J.Gen.Chem.*, **16**, 139-140.
- [11] **MASSAGETOV, P.S.**,1946. “Alkaloids in plants of the family *Elaeagnaceae*”, *J.Gen.Chem.*, **16**, 775-776.
- [12] **MENSİKOV, G.P.; GUREVİCH, E.L.; SAMSONOVA, G.A.**, 1950. “Alkoloids of *elaeagnus angustifolia*”, *J. Gen. Chem*, **20**, 1927-8.
- [13] **RAEZ, G., FUZİ, J.**, 1959. “The presence of leucoanthocyanins in herbs”, *Acta Pharm.Hung.*, **29**, 64-70.

- [14] **LUTOMSKI, J.; KOWALEWSKI, Z.; DROST, K.**, 1967. "Simple carboline alkaloids", *Herba Pol*, **13**, 103-7.
- [15] **NIKOLAEVA, A.G.**, 1970. *Khim Prir Soedrin*, **6**, 638.
- [16] **NIKOLAEVA, A.G.; KRIVENCHUK, P.E.; PROKOPENKO, A.P.** , 1971. *Form. Zh.*, **26**, 56-60.
- [17] **NIKOLAEVA, A.G.; KRIVENCHUK, P.E.; PROKOPENKO, A.P.** , 1970, *Khim. Prir. Soedin.*, **6**, 765.
- [18] **STANISLAW, G.; WANDA, R.**, 1973. *Galansk. Tow. Nauk.*, **8**, 137-143
- [19] **NEOFITOV, V.A.; KREPKII, I.S.**, 1974. "Russian olive (*elaegnus angustifolia*) in protecting planting of nothern and western Kazakhstan.", *Vestn. S-kh. Nauk. Kaz.*, **17**, 82-9.
- [20] **POPOV, D.; NAIDENOVA, E; DRYANOUSKA, L.**, 1983. *Farmatsiya*, **33**, 10-14
- [21] **SADYKOV, YU.D.**, 1987. "Alkaloids of some plants present in the flora of Tadzhikistan.", *Otd. Biol. Nauk*, **4**, 48-52.
- [22] **KUSOVA, R.D.; KAZAKOV, A.L. , LUNKYANCÍKOV, M.S.**, 1988. "Phenolic compounds in fruits of *elaegnus angustifolia*", *Khim. Prir. Soedin.* , **3**, 455-6.
- [23] **QUÍKHUA, Y.**, 1989. "Air-asetylene atomic absorbtion determination of light metal elements in oleaster fruit juice", *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, **9**, 79-80.
- [24] **LIANCHAO, L.; TIANRONG, L., PEÍHONG, W.**, 1989. "Determination of organid acid in foods by reversed-phase HPLC.", *Fenxi Ceshi Tongbao.*, **8**, 21-6.
- [25] **GONCHAROVA, N.P.; GLUSHENKOVA, A.I.**, 1990. "Lipids of oleaster fruits", *Khim. Prir. Soedin.*, **1**, 17-21.
- [26] **ZHAOLIN, L.; NING, C.; DUNYUAN, X.; HAIQUAN, L.; YAOZU, C.**, 1989. "Chemical Constituent of the volatile oil of fresh flowers of *Elaeagnus angustifolia*", *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xucbao*, **10**, 804-8.
- [27] **ZHONG, J.; JIN, J.; LÍ, X.**, 1991., "Determination of oleanolic acid in russion olive by TLC-scannig", *Zhongcaoyao*, **22**, 398-9.
- [28] **SHANG, T.; AN, H.; QÍÀ, D.; PU, W.**, 1991., "Manufacture of oxalic acid from *elaegnus angustifolia* powder", *Huaxue Shijie*, **32**, 112-14.

- [29] **GONCHAROVA, N.P.; ISAMUKHAMEDOV, A. Sh.; GLUSHENKOVA, A.I.**, 1993. "Glycolipids and phospholipids of the fruit of *elaegnus angustifolia*", *Chemistry of Natural Compounds*, **29**, 5.
- [30] **KUSOVA, R.D.; LUKYANCÍKOV, M.S.**, 1989. "Fatty acid composition of the oil from fruits of *elaegnus angustifolia*", *Khim. Prir. Soedin.*, **6**, 846.
- [31] **GONCHAROVA, N.P.; PLUGAR, V.N.; RASHKES, Ya. V.; ISAMUKHAMEDOV, A. Sh.; GLUSHENKOVA, A.I.**, 1994. "Oxygenated fatty acids of seeds of *elaegnus angustifolia*", *Khim. Prir. Soedin.*, **6**, 715-19.
- [32] **ZHANG, Y.**, 1995. "Determination of vitamin C in *elaegnus angustifolia*", *Huaxue Shijie*, **36**, 379-82.
- [33] **MAHMOUDIAN, M.; JALILPOUR, H.; SALEHIAN, P.**, 2002, "Toxicity of *peganum harmala*", *Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics*, **1**, 1-4.
- [34] 1991. "Tetrahydro- beta- carbolines in food stuffs, urine and milk, physiological implications", *Nutr. Rev.*, **49**, 367
- [35] **PAPAVERGON, E.**, 1992. "Tetrahydro-beta-carboline-carboxylicacids in smoked foods", *Food Addit. Contam.*, **9**, 83-95.
- [36] **ROMMELSPACHER, H.**, 1982. "Is there a correlation between the concentration of beta-carbolines and their pharman colodynamic effects?", *Prog. Clin. Biol. Res.*, **90**, 41-55.
- [37] **OVENÍK, E.**, 1989. "Influence of creatine, amino acids and water on the formation of mutagenic heterocyclic amines found in cooked meat", *Carcinogenesis*, **10**, 1293-1301.
- [38] **ROMMELSPACHER, H.**, 1991. "Beta carbolines and tetrahydroisoquinolines; detection and function in mammals", *Planta. Med.*, **57**, 585-592.
- [39] **BEAMOND, J.A.**, 1998. "Effects of some cooked food mutagens", *Food Chem Toxicol*, **36**, 455-466.
- [40] **NAUGHTON, N.**, 1985. "A benzodiazepine antagonist inhibits the cerebral metabolic and respiratory depressant effects of fentanyl", *Life Sci*, **36**, 2239-2245.
- [41] **HOFFMAN, W.**, 1984. *Eur. J. Pharmacol.*, **106**, 585-591.
- [42] **WIBLE, J.H.**, 1996. "Cardiovascular effects of beta- carbolines in conscious rats", *Hypertens. Res.*, **19**, 161-170.

- [43] **ROVESCALLI, A.C.**, 1987. *J. Endocrinal. Invest.*, **10**, 65-72
- [44] **TAKAHOSKI, T.** 1994. *J. Neural. Transm.Gen.*, **98**, 107-118.
- [45] **BOÏSSET, M.; BILLAUD, C.; DESJEUX, JF**, “Studies on the mechanism of intestinal passage of the food comutagen harman in the rabbit”
- [46] **SALVI, N.A.; CHOUGHULEY, A.S.U.; SHETTY, TK; BHATTACHARYA, R.K.**, 1992. “Nitropyridoindoles-formation”, *Characterization and Mutagenicity*, **34**, 123-131.
- [47] **TOTSUKA, Y., USHIYAMA, H.; ISHIHARA, J; SINHA, R; GOTO, S; SUGIMURA, T; WAKABAYASHI, K**, 1999. “Quantification of the co-mutagenic beta-carbolines, norharman ve harman in cigarette smoke condensates ve cooked foods”, *Food and Feed Chemistry*, **143**, 139-143.
- [48] **ZHENG, W., WNAH, S.; BARNES, L.V.; GUAN, Y.; LOIS, E.D.**, 2000. “Determination of harmane and harmine in human blood using reversed-phased high-performance liquid chromatography and flourescence dedction”, *Analytical Biochemistry*, **279**, 125-129.
- [49] **ADACHI, JI; MIZOI, Y.; NAITO, T.; YAMAMOTO, K.; FUJIWARA, S.; NINOMIYA, I.**, 1991. “Determination of beta-carbolines in foodstuffs by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography-mass spectrometry”, *Journal of Chromatography*, **538**, 331-339.
- [50] **GLASBY JS.**”Encyclopedia of the alkoloids”,1978. London; plenum press; 1367.
- [51] **CHU, N.T.; CLYDESDALE, F.M.**, 1976. “Reaction between amino acids and organic acids: reaction of tryptophan and pryruvic acid”, *Journal of Food Science*, **41**, 891-894.
- [52] **ROBINSON, R.**, 1947.
- [53] **JACOPS, W.A.;CRAİG, L.C.**, 1936. *J. Biol. Chem.*, **113**, 759-65.
- [54] **SPATH, E.; LEDENER, E.**, 1930. *Ber.*, **63**, 120-5



ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Bingöl’de doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul’da tamamladı. 1995 yılında İ.T.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde Lisans öğrenimine başladı ve 2000 yılında mezun oldu. Aynı yıl başladığı Yüksek Lisans çalışmalarına devam etmektedir. Ayrıca, mart 2003’ten beri A&T Gıda Kontrol Labaratuvarı Ltd. Şti.’de kimyager olarak çalışmaktadır.

Evrin KILIÇGEDİK