

**YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
(YBSK) YÖNTEMİ İLE MEYVE SULARINDA
HESPERİDİN VE NEOHESPERİDİN TAYİNİ**

Özlem ATLI

Yüksek Lisans Tezi

**YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ
(YBSK) YÖNTEMİ İLE MEYVE SULARINDA
HESPERİDİN VE NEOHESPERİDİN TAYİNİ**

Özlem ATLI

Yüksek Lisans Tezi

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Ocak-2007

Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Bülent ERGUN

ÖNSÖZ

Bilgi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, eksilmeyen hoşgörüsü ve içtenliğiyle desteğini her zaman hissettiğim sevgili hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Bülent ERGUN'a,

Tez çalışmam boyunca bana inanıp bildiklerini tüm hoşgörüsüyle sunan, fikirleriyle yön veren, bilgi ve tecrübelerinin yanı sıra manevi desteğini benimle hiç esirgmeden paylaşan sevgili hocam Sayın Doç. Dr. Göksel ALTIOKKA'ya,

Tez çalışmam süresince bilgisi ve fikirlerini cömertçe sunan, yardımlarıyla bana yön veren, bu yönlendirmeyi hoşgörüsü, içtenliği ve ilgisiyle birleştiren sevgili Arş.Gör. Nafiz Öncü CAN'a,

Sorularımı asla cevapsız bırakmayan, tamamlayıcılığı, bilgisi ve bunları paylaşmadaki başarısıyla yanımda olan sevgili çalışma arkadaşım Öğr. Gör. Ahmet SARAÇOĞLU'na,

Bildikleriyle her seslenişimde sorularıma yanıt olan, sabırla, gayretle çalışmam boyunca bıkmadan benimle ilgilenen değerli arkadaşım Arş. Gör. Arın Gül DAL'a,

Desteğini tüm içtenliğiyle sunan, enerjisiyle gücüme güç katan ve her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Arş. Gör. Nurcan BEKTAŞ'a,

Her zaman tek kelime etmeme ihtiyaç duymadan yardımına koşan, bilgi, tecrübe, sevgi, ilgi maneviyat adına ne varsa canla başla önüme seren sevgili arkadaşım Arş. Gör. Sinem ILGIN'a,

Varolmamın ve bugünlere ulaşmamın sebebi, tükenmeyen sevgi ve destekleriyle yaşama gücümün kaynağı olan sevgili AİLEME,

Sonsuz teşekkürler...

YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (YBSK) YÖNTEMİ İLE MEYVE SULARINDA HESPERİDİN VE NEOHESPERİDİN TAYİNİ

ÖZET

Bu çalışmada, farmakolojik açıdan bir çok etkiye sahip bir biyoflavonoid olan hesperidin ve izomeri olan neohesperidinin, turunçgil türlerine ait bazı taze ve ticari meyve sularındaki miktar tayini, yeni bir yöntem uygulanarak Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi (YBSK) tekniği ile tayin edilmiştir. Akış hızı 1 mL.dak⁻¹ olan asetonitril : su (23:77, h/h) hareketli faz sistemi kullanılmıştır. Sinyaller UV-spektrofotometrik dedektör kullanılarak 280 nm'de kaydedilmiştir. Yöntemin kesinliği ve doğruluğu bu sinyallerle gösterilmiştir. Geliştirilen yöntem ile her iki maddenin ayrımı ve tayini başarıyla sağlanarak taze ve ticari turunçgil türlerine ait meyve sularına uygulanabilirliği gösterilmiştir. Hesperidin ve neohesperidinin meyve sularındaki miktar tayini için geliştirilen yöntemin hızlı, ucuz ve kolay uygulanabilir bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Hesperidin, neohesperidin, YBSK, miktar tayini

DETERMINATION OF HESPERIDIN AND NEOHESPERIDIN IN FRUIT JUICES USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHIC (HPLC) METHOD

ABSTRACT

In this study, hesperidin which has numerous pharmacological properties as a bioflavonoid and its isomer neohesperidin were quantitatively determined using a novel High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) method in some fresh and commercial fruit juices. A solution of acetonitrile:water (23/77, v/v) has been used as mobile phase which was pumped at a flow rate of 1.0 mL/min⁻¹. Signals were detected at 280 nm using UV-spectrophotometric detector and the precision and accuracy of the method have been demonstrated using these signals. Since both substances have been successfully separated and determined using the developed method, application to some fresh and commercial fruit juices of citrus species has also been shown. It is concluded that the method proposed in this study is fast, cheap and easy to apply for the determination of hesperidin and neohesperidin in fruit juices.

Keywords : hesperidin, neohesperidin, HPLC, quantitative determination

	SAYFA
ÖZGEÇMİŞ	i
ÖNSÖZ	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	ix
GİRİŞ ve AMAÇ	1
KAYNAK BİLGİSİ	2
Biyoaktif Bileşikler	2
Flavanoidler	2
Hesperidin	
<i>Fizikokimyasal Özellikleri</i>	3
<i>Besin Kaynakları</i>	4
<i>Farmakokinetiği</i>	5
<i>Farmakolojik Etkileri</i>	7
<i>Damar Sistemi Üzerine Etkileri</i>	7
<i>Antiinflamatuvar Etkiler</i>	7
<i>Enzimler Üzerindeki Etkisi</i>	7
<i>Antimikrobiyal Etkisi</i>	8
<i>Antibakteriyal Etkisi</i>	8
<i>Antifungal Etkisi</i>	8
<i>Antiviral Etkisi</i>	8
<i>Antifertilite Etkisi</i>	9
<i>Antikarsinojenik Etkisi</i>	9
<i>Antimutajenik Etkisi</i>	10
<i>Trombositler ve Hücre Agregasyonu Üzerine Etkileri</i>	10

<i>Ultraviyole Koruyucu Etkisi</i>	10
<i>Analjezik ve Antipiretik Etkisi</i>	11
<i>Antioksidan Etkisi</i>	11
<i>Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi</i>	11
<i>Hormonlar Üzerindeki Etkisi</i>	11
<i>Diğer Etkileri</i>	12
<i>Toksitesisi</i>	12
Neohesperidin	12
GEREÇLER	14
Kimyasal Madde ve Çözeltiler	14
Kullanılan Cihazlar	14
YÖNTEMLER	15
Hesperidin (HS) ve Neohesperidinle (NHS) Yapılan Analitik Çalışmalar	15
HS ve NHS'in Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	17
Hareketli Faz Sistemi	18
Numunelerin Hazırlanması ve Deteksiyon	18
BULGULAR ve TARTIŞMA	19
Optimizasyon	19
Validasyon	21
Yöntemin Örneklere Uygulanması	23
SONUÇ ve ÖNERİLER	30
KAYNAKLAR	31

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL NO ve ADI	SAYFA	
Şekil 1	Hesperidin'in Kimyasal Yapısı	4
Şekil 2	Hesperetin'in Kimyasal Yapısı	4
Şekil 3	Rutinoz'un Kimyasal Yapısı	4
Şekil 4	Neohesperidin'in Kimyasal Yapısı	13
Şekil 5	Neohesperidoz'un Kimyasal Yapısı	13
Şekil 6	Hesperidin'in Akış Hızı- Pik Alanı Grafiği	19
Şekil 7	Neohesperidin'in Akış Hızı- Pik Alanı Grafiği	20
Şekil 8	Hesperidin'in Enjeksiyon Hacmi-Pik Normalizasyonu Grafiği	20
Şekil 9	Neohesperidin'in Enjeksiyon Hacmi-Pik Normalizasyonu Grafiği	20
Şekil 10	Standart Maddelere Ait Kromatogram	21
Şekil 11	Greyfurt Suyuna Ait Kromatogram	24
Şekil 12	Kan Greyfurtu Suyuna Ait Kromatogram	24
Şekil 13	Limon Suyuna Ait Kromatogram	25
Şekil 14	Portakal (Washington) Suyuna Ait Kromatogram	25
Şekil 15	Portakal (Sıkma) Suyuna Ait Kromatogram	26
Şekil 16	Kan Portakalı - Nar Suyuna (Tc) Ait Kromatogram	26
Şekil 17	Portakal (Parçacıklı) Nektarına (Tc) Ait Kromatogram	27
Şekil 18	%100 Portakal Suyuna (Tc) Ait Kromatogram	27

ÇİZELGELER DİZİNİ

ÇİZELGE NO ve ADI	SAYFA
Çizelge 1 HS ve NHS'e ait Gün İçi ve Günler Arası Tekraredilebilirlik Çalışmalarının İstatistiksel Değerlendirmesi	22
Çizelge 2 HS'e Ait Gün İçi ve Günler Arası Regresyon Analizinin İstatistiksel Değerlendirmesi	22
Çizelge 3 NHS'e Ait Gün İçi ve Günler Arası Regresyon Analizinin İstatistiksel Değerlendirmesi	23
Çizelge 4 Çeşitli Taze ve Ticari Meyve Sularındaki HS ve NHS Miktarları ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	28

SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ

% BSS	: % Bağıl Standart Sapma
ATP	: Adenozin Trifosfat
C3H10T1/2	: Sıçan Fibroblast Hücresi
Caco-2	: Barsak Epitel Hücresi
CD-1	: İmmun sistemi genetik olarak zayıf olan İsviçre faresi
COX-2	: Siklooksijenaz-2
CSF	: Koloni Stimule Edici Faktör
DMF	: Dimetilformamid
DMSO	: Dimetilsulfoksit
FG	: Flavonoid Glikozitler
GA	: Güven Aralığı
HS	: Hesperidin (3,5,7- trihidroksi-4- metoksiflavanon - 7-ramnoglukozit)
IS	: İnternal Standart
i.p.	: İntraperitoneal
i.v.	: İntravenöz
LOD	: Saptama Sınırı
LOQ	: Tayin Sınırı
n	: Örnek Sayısı
NHS	: Neohesperidin (3,5,7- trihidroksi-4- metoksiflavanon-7-ramnoglukozit)
PC	: Yumurta fosfotidilkolini içeren
PG ₂	: Prostaglandin 2
PG _{2α}	: Prostaglandin 2α
PH	: Fosforillenmiş Hesperidin
PMF	: Polimetoksillenmiş Flavonlar
PVDF	: Polivinildiklorür
r	: Regresyon Katsayısı
ROT	: Reaktif Oksijen Türleri
s.c.	: Subkutan
sAMP	: Siklik Adenozin Mono Fosfat
Se	: Eğimin Standart Sapması

Sr	: Regresyon Doğrusunun Standart Sapması
SS	: Standart Sapma
Tc	: Ticari
TPA	: 12-O-tetradekanol-13-forbol asetat
UV	: Ultraviyole
YBSK	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
YBSK-ES-MS	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisine Bağlı Elektrosprey Kütle Sektrometresi

GİRİŞ ve AMAÇ

Flavonoidler, bitkinin bütün bölümlerinde doğal yollarla oluşan ikincil metabolitler olarak, geniş bir kimyasal bileşik grubunu oluşturmaktadırlar. Hem serbest halde hem de glikozit halinde biyolojik olarak aktif bileşikler içinde çok önemli bir sınıfı temsil ederler. Flavonoidlerin pek çok biyolojik aktiviteye sahip olması sebebiyle “ bioflavonoidler ” olarak da adlandırılmaktadırlar. Vitamin P olarak da adlandırılan biyoflavonoidler kılcal damar bütünlüğü ile geçirgenliğini arttıran esansiyel bileşikler olduğu belirtilmiştir. Çeşitli bitkilerde bulunan başlıca biyoflavonoidler hesperidin, sitrin, rutin, flavonlar, flavonoller, kateşin ve kesretindir.

Hesperidin, turunçgiller arasında tatlı portakal ve limonda bulunan başlıca flavonoiddir. Olgunlaşmamış taze portakal meyvesinin yaş ağırlığının % 14’ ünü oluşturur ve genellikle vitamin C ile birlikte bulunmaktadır. İlk olarak bir Macar bilim insanı turunçgillerin kabuk flavonoidlerinin kılcal kanamaları önlediğini ve iskorbite bağlı kılcal geçirgenlik üzerindeki etkilerini açıklamıştır (Garg ve ark., 2001).

Hesperidinin damar bütünlüğünü arttırıcı, kılcal damar geçirgenliğini ve kolay yaralanma eğilimini azaltıcı özelliği olduğu belirtilmiştir (Uchiyama ve ark., 2005; Nogata ve ark., 2006). Diyetteki eksikliği kol ve bacaklarda anormal kılcal sızıntıya, ağrıya ve güçsüzlüğe yol açan hesperidinin, aynı zamanda geceleri oluşan bacak kramplarının da sebebi olduğu bildirilmiştir (Philp, 2003). Hesperidin takviyesi ödemi azaltmaya veya sıvı birikimine bağlı olarak oluşan bacaklardaki aşırı şişkinliği azaltmaya yardımcıdır. Hesperidin ve aglikonu olan hesperetinin antikarsinogenik aktivitesi üzerinde son yıllarda pek çok çalışma yapılmıştır (Kohno ve ark., 2001; Labib ve ark., 2004; Justesen ve ark.,2000). Bu çalışmaların sonuçları, hesperidinin apoptozisi indükleyerek antikanser aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2003; Philp, 2003; Knekt ve ark., 2002; Peng ve ark., 2006; Erlund ve ark., 2001; Tommasini ve ark., 2005). Ayrıca hesperidin serbest radikal süpürücü etkisiyle güçlü antioksidan özelliğe sahiptir (Knekt ve ark., 2002; Kohno ve ark., 2001; Chen ve ark., 2003; Justesen ve ark.,2000; Del Caro ve ark., 2004). Serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonundan korunmayı sağlayan hesperidinin diğer flavonoidlerle karşılaştırıldığında belirgin bir antioksidan aktiviteye sahip olduğu yapılan bir çok çalışmayla gösterilmiştir (Peng ve ark., 2006; Ortuno ve ark., 1997; Nogata ve ark., 2006; Del Rio ve ark., 2004; 13; Kanaze ve ark., 2003; Vanamala ve ark., 2006).

Neohesperidin hesperidinin bir izomeri olup greylort, turunç, ekşi portakal, limonda bulunan bir flavonon glikozitidir (Lee ve Kim, 2003; Peterson ve ark., 2006b).

Bu çalışmada, hesperidin ve neohesperidinin Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK) yöntemi ile analizi için yeni bir yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen bu yeni yöntem ile bazı turunçgil türlerine ait sıkma meyve suları ile Türkiyede üretilen ticari turunçgil meyve sularındaki miktar tayinlerinin yapılması amaçlanmıştır.

KAYNAK BİLGİSİ

Biyoaktif Bileşikler

Reaktif oksijen türlerini (ROT) inaktive eden ve oksidatif hasardan korunmayı sağlayan gıdalardaki antioksidanlar biyoaktif moleküller olarak adlandırılırlar (Rao ve Agarwal, 1999). Bu biyoaktif bileşikler, bitkisel ürünlerde ve lipide zengin besinlerde küçük miktarlarda doğal olarak meydana gelen ve besin değerini arttıran bileşiklerdir (Kris-Etherton ve ark.,2002). Bitkisel kaynaklı biyoaktif bileşikler flavonoidler, fitoöstrojenler, bitki steroller, isoflavonlar, organosülfür bileşikler, likopen ve resveratrol'dür (Rao ve Agarwal, 1999; Kris-Etherton ve ark.,2002). Bu fitokimyasal bileşenlerin, hormonal metabolizma ve oksidatif hasar üzerine etkilerinin, sahip oldukları kemopreventif aktiviteden kaynaklandığı düşünülmektedir (Rao ve Agarwal, 1999). Epidemiyolojik bulgular da çeşitli kanser türleri ve kardiyovasküler hastalıklarda meyve ve sebze ağırlıklı diyetlerin koruyucu rolü olduğunu göstermiştir (Rao ve Agarwal, 1999; Giovannucci,1999; Kris-Etherton ve ark.,2002; Matos ve ark., 2000).

Flavonoidler

Sebze ve meyvelerde zengin bir diyetin kronik hastalıklardan korunmada yardımcı olduğu uzun yıllardır bilinmektedir (Vanamala ve ark., 2006; Peterson ve ark., 2006a). Bu koruyucu etkide rol oynayan bileşikler, bir çok çalışmanın konusunu oluşturmuştur. Bunlardan biri olan flavonoid adı verilen bu fenolik bileşiklere giderek artan bir ilgi söz konusudur. Flavonoidler üzerine yapılan araştırmalar iki grup flavonoid üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunlar flavonoller ve izoflavonlardır. Flavononlar yani *Citrus* flavonoidleri daha az ilgi görmüşlerdir. Oysa ki bunlar diğerlerine oranla diyetle daha fazla alınmakta ve belirli biyolojik aktiviteler göstermektedirler (Erlund ve ark., 2001). Flavonoidler bitkide doğal oluşan, düşük molekül ağırlıklı, sekonder metabolitler olarak geniş bir grubu oluştururlar (Chen ve ark., 2003; Garg ve ark., 2001). Bitkinin tüm bölümlerinde; meyve, tohum, çiçek ve ağaç kabuğunda bulunabilirler. Hem serbest halde hem de glikozitler halinde biyolojik aktif bileşikler içinde önemli bir sınıfı temsil etmektedirler. Flavonoidler C₆-C₃-C₆ difenilpropan yapısındadır ve fenil grupları arasındaki üçlü karbon köprüsü, oksijenle halka oluşturmaktadır. Değişik flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve üçlü karbon oksidasyon düzeyinden kaynaklanmaktadır (Garg ve ark., 2001).

Flavonoidler yapısal olarak beş gruba ayrılırlar (Kanaze ve ark., 2004a; Kanaze ve ark., 2004b).

- Antosiyanidinler
- Flavon ve flavonoller
- Flavononlar
- Kateşin ve lökoantosiyanidinler
- Proantosiyanidinler

Flavonoidlerin insan fizyolojisi üzerindeki etkilerine ilişkin birçok makale yayımlanmıştır (Nogata ve ark., 2006). Bir süre kapiller geçirgenlik ve yırtılma

üzerindeki faydalı etkilerinden dolayı “P vitamini” olarak da adlandırılan bu bileşikler için son zamanlarda biyoflavonoidler terimi de kullanılmaktadır (Garg ve ark., 2001; Tsai ve Liu, 2004; Miyake ve ark., 2003). Çeşitli araştırmacılar, flavonoidlerin kılcal damarların kolay yaralanmalara karşı direncini arttırmak başta olmak üzere, soğuga dayanıklılık sağlamak, üst solunum yolları enfeksiyonları, bronşiyal astım, hemofili, purpura, ülser gibi bazı hastalıkların tedavisine ve radyasyon yaralarının iyileştirilmesine yardımcı olmaya kadar uzanan birçok fizyoterapik özellikleri olduğunu belirtmektedirler (Kanaze ve ark., 2003; Nogata ve ark., 2006; Garg ve ark., 2001).

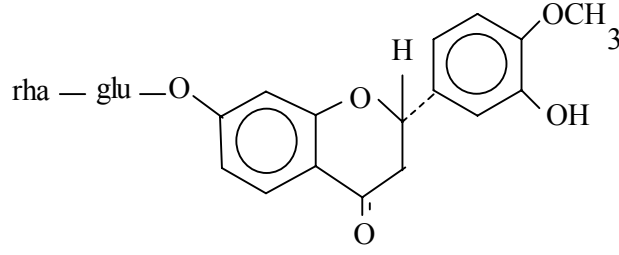
Turunçgil türlerinde bulunan flavonoidler flavon, flavonol, flavonon ve antosiyanidinlerdir. Turunçgillerde en fazla tangeritin ve nobiletin gibi başka hiçbir meyvede bulunmayan flavononlar yer almaktadırlar (Mouly ve ark., 1998). Turunçgil meyvelerinde bulunan diğer flavonoidler çoğunlukla glikozid biçimindedirler. Glikozidik yapıyı oluşturan şekerler genellikle ramnoz ve glikozdur (Belajova ve Suhaj, 2004; Peterson ve ark., 2006b). Bitkisel gıdalarda bulunan flavonon glikozitlerinin en önemlileri hesperidin, eriodiktiol, neohesperidin, naringin ve oleuropein’ dir. Turunçgil flavonoidlerinin kolesterol düşürücü, antioksidan, antikarsinojen ve antiinflamatuvar aktiviteleri söz konusudur (Kanaze ve ark., 2004a; Kanaze ve ark., 2004b; Wu ve ark., 2005; Kohno ve ark., 2001; Del Caro ve ark., 2004; Garg ve ark., 2001).

Hesperidin

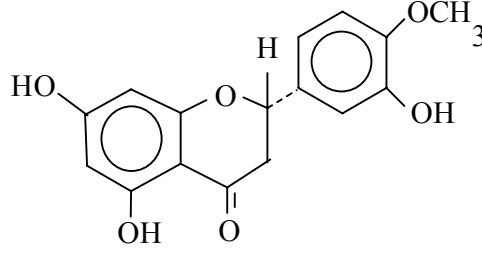
Fizikokimyasal özellikleri

Saf hesperidin uzun saça benzer iğneler halinde açık veya koyu sarı renkte bulunur. Erime noktası 258 - 262°C’ e kadar (250°C’ de yumuşar) değişir. Molekül formülü C₁₈H₃₄O₁₅ ve molekül ağırlığı 610.57 daltondur. Seyreltik alkali ve piridinde kolayca çözünür ve temiz sarı bir çözelti verir. Metanolde ve sıcak glasiyel asetik asitte de çözünür. Aseton, benzen ve kloroformda ise neredeyse hiç çözünmez. Sudaki çözünürlüğü % 2’ dir. Benzer glikozitlerle kompleks kristaller oluşturma özelliği vardır. Bu, hesperidinin çözünürlüğünü ve diğer fiziksel özelliklerini büyük ölçüde etkiler ve saf halde elde edilmesini zorlaştırır. Fakat sıcak suyla yıkayarak ve % 95 metil alkolle ekstre edilip ve buna takiben kristalize ederek saflaştırılabilir (Garg ve ark., 2001). Hesperidinin sudaki çözünürlüğü az olmakla birlikte, bu çözücünün hesperidini safsızlıklardan kurtardığı için kullanıldığına işaret edilmektedir. Bu flavononun sudaki çözünürlüğünün azlığı farmasötik kullanımlarına sınırlamalar getirmektedir (Tommasini ve ark., 2005). Bir çalışmada hesperidinin çözünürlüğünün transglikozidasyonla arttırılabileceği ve hesperidinin mono ve diglikozitlerinin pH 6’da hesperidinden 300 kat fazla çözüldüğü rapor edilmiştir (Kim ve ark., 1999).

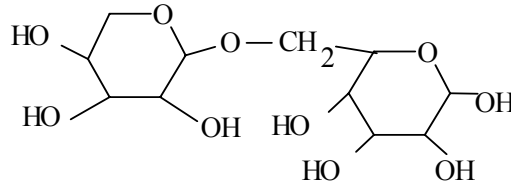
Hesperidin bir flavon glikozitidir. Bir aglikon hesperetin veya metil eriodiktiyol ve buna ek olarak bir disakkarit rutinozdan oluşur (Garg ve ark., 2001). α-L-ramnozil-(1→6)glikoz formülüne sahip rutinoz başlıca limon ve portakalda bulunan tatsız bir disakkarittir. Birer mol ramnoz ve glikozdan oluşan hesperidin ve neohesperidin adlı iki izomerden birinin tatsız diğerinin acı olmasında bu şekerlerin birbirlerine bağlanma biçimleri rol oynamaktadır (Komenati ve ark., 1996; Grohmann ve ark., 2000).



Şekil 1. Hesperidin'in kimyasal yapısı (Hesperetin-7-ramnoğlukozi)



Şekil 2. Hesperetin'in kimyasal yapısı (3,5,7- trihidroksi-4- metoksiflavonon)



Şekil 3. Rutinoz 'un kimyasal yapısı [O-α-L-ramnosil-(1→6) glikoz]

Bir çok araştırmacı flavonoid ve karışımları içinden hesperidin ve/veya hesperetininin ayrılması ve miktarının belirlenmesi için YBSK yönteminden faydalanmışlardır. Bu araştırmaların çoğunda ters faz C-18 kolon ve mobil faz olarak su, acetonitril, metanol ve küçük miktarlarda asitlerle birlikte tetrahidrofuran kullanılmıştır. Dedeksiyon için ise Ultraviyole (UV) detektör ile 280 nm' de çalışılmıştır (Mouly ve ark., 1998; Saija ve ark.; 1998; Ross ve ark.,2000; Del Rio ve ark., 2004; Pupin ve ark., 1997; Vanamala ve ark., 2006; Kanaze ve ark., 2003; Ross ve ark., 2000; Ortuno ve ark., 1997).

Besin Kaynakları

Hesperidin, *Citrus aurantium* (turunç, ekşi portakal), *C.sinensis* (tatlı portakal), *C. Paradisi* (greyfurt), *C.unshiu* (satsuma mandalini), *C.reticulata* (mandalina), *C.limon* (limon), *C. Aurantifolia* (misket limonu) ve Citrus cinsinin (Rutaceae) diğer türlerinin kabuklarından yüksek miktarlarda izole edilir (Del Rio ve ark., 2004; Tommasini ve ark., 2005; El-Shafae ve El-Domiaty, 2001; Vanamala ve ark., 2006; He ve ark., 1997; Kanaze ve ark., 2003; Belajova ve Suhaj, 2004; Peterson ve ark., 2006a; Peterson ve ark., 2006b; Kanaze ve ark., 2004a; Uchiyama ve ark., 2005; Kanaze ve ark., 2004b; Philp, 2003; Wu ve ark., 2005; Tsai ve Liu, 2004; Garg ve ark., 2001).

Limon ve misket limonunun flavonoid tablosu portakala, greyfurt'un ki ise ekşi portakala benzemektedir. Bunlar içinde bulunan başlıca glikozitlerden biri hesperidindir (Erlund ve ark., 2001; Peterson ve ark., 2006a). Hesperidinin tatlı portakalda %25 oranında bulunmaktadır (Peterson ve ark., 2006b). Portakalın dışında başka familyalara ait bitkilerde de bulunduğu (Fabaceae, Betulaceae, Lamiaceae, Papillionaceae) rapor edilmiştir (Garg ve ark., 2001). Sedatif bitkiler olan *Valeriana wallischi* ve *Valeriana officinalis*'de (kediotu) bulunan 2 nöroaktif flavonoidden biridir (Fernandez ve ark., 2005). Ayrıca *Fractus aurantii*'nin (turunç meyvesi) farmakolojik aktivitelerinden de sorumludur (Li ve ark., 2004; Peng ve ark., 2006). Hong Kong da yetişen bitkiler olan *Zanthoxylum avicennae* ve *Z.cuspidatum*' da ağaç kabuğunda bulunduğu rapor edilmiştir (Garg ve ark., 2001).

Hesperidin yüksek konsantrasyonlarda olgunlaşmamış meyvelerde de bulunmaktadır ve konsantrasyonu depolanma sırasında artmaktadır. Epikarp, mezokarp, endokarpda dağılımı ve turunç meyve sularında tespit edilmiştir (Kawaguchi ve ark., 1997). *C.sinensis*' in olgun meyvelerinin değişik dokularındaki hesperidin dağılımı ve konsantrasyonu radioimmunoassay metodu ile ölçülmüş ve yüksek seviyelerde albedoda, membranlarda ve sünger dokuda bulunurken, suyunda ve tohumunda daha az miktarlarda bulunmuştur. Konsantrasyonu, olgunlaşmamış meyvede daha fazladır (kuru ağırlıkta % 40). Ancak olgun tatlı meyvenin kabuk, etli kısmı ve posasında kuru ağırlıkta % 2 iken suyunda sadece % 0.02 - % 0.06 arasındadır. Hesperidinin büyük bir kısmı (≥ 90) işlenen ürünlerde, az bir miktarı ise suyundadır. Portakal kabuğu suyundaki katılar ve melaslar hesperidin ve diğer çözünmeyen flavonoidlerce zengindir. Bu nedenle hesperidinin çoğu kabuklardan veya diğer katı ürünlerden ekstre edilmelidir (Grohmann ve ark., 2000). Hesperidin içeriği açısından sıkma meyve sularıyla tüm meyve arasında belirgin bir fark gözlenirken, sıkma meyve suları ile tüketilen ticari meyve suları arasında çok farklılık gözlenmemiştir (Peterson ve ark., 2006b). Tohumlarda, ışıkla artan tohumlanma esnasında hesperidin üretiminin arttığı öne sürülerek germinasyondan sonra hesperidin içeriğinin artışı tespit edilmiştir (Barthe ve ark., 1988).

Farmakokinetiği

Flavononların absorpsiyonu ve kinetik davranışlarıyla ilgili çok az bilgi bulunmaktadır (Erlund ve ark., 2001). Oral alımda barsak epitelinden absorbe edilmektedir. Hesperidin, tek başına absorbe olmazken glikolizasyonu sonucu absorbe edilebilir hale gelir (Kim ve ark., 1999). Genel olarak besinlerdeki flavonoidlerin ince barsak florasında bulunan bakteriler tarafından degradasyona uğratıldığı ve kolona ulaştığı düşünülmektedir. Flavonoid glikozitlerini hidrolize eden bakteri cinsleri saptanmış ve aglikonların kalın barsaktan absorpsiyonları da kabul edilmiştir (Justesen ve ark.,2000). Hesperidin barsaktaki bakteri enzimlerince hidrolize edildikten sonra absorbe edilmektedir. Aglikonu olan hesperetine konjuge olur. Bu aglikon idrar ve plazmada glukronit ve sülfoglukronit halde bulunur. Sülfoglukronit ve çok az da serbest aglikon halinde idrarla atılır (Tommasini ve ark., 2005; Kanaze ve ark., 2004a; Kanaze ve ark., 2004b ; Tsai ve Liu, 2004).

Turunçgil ürünlerinden hesperidinin oral absorpsiyonunu değerlendirmek için yapılan bir çalışmada 25 yaşındaki sağlıklı beyaz erkeklere 500 mg ilaç, suda ve eşit miktardaki portakal ve greyfurt suyunda verilmiştir. Oral verilen her form mide-barsak kanalından emilirken kümülatif üriner geri alım düşük bir biyoyararlanım göstermiştir (%25' den az). Aglikon, hesperetin, hem idrarda hem plazmada tespit edilmiştir (Ameer ve ark., 1996).

Hesperidin glikozitlerine karşı intestinal geçirgenlik ince barsak epiteli modeli için barsak epitel hücreleri (Caco-2) hücre kültürü kullanılarak araştırılmıştır. Düşük çözünürlüğüne bağlı olarak, hesperidin Caco-2 tek katlı tabakadan geçemezken, glikozitleri zamana ve doza bağımlı davranış göstererek geçebilmişlerdir. Bu geçirgenliğin parasellüler yolla oluştuğu düşünülmektedir (Kim ve ark.,1999).

Hesperidin ve hesperetini içeren 6 flavonoidin metabolizması, oral uygulama yapılan sıçanlarda incelenmiştir. İdrarda görülen başlıca metabolik ürün az miktarda m-kumarik asit ve aglikonlarla birlikte hidroksi fenil propiyonik asittir. Aglikonlar glukronik asitle konjuge ve serbest halde bulunurlar. İntestinal kanaldaki absorpsiyon demetoksilasyonla takip edilerek dehidroksilasyonla m-hidroksi fenil propiyonik asit oluşumuna yol açmaktadır. Bu çalışma, ayrıca tavşanlarda, sıçanlarda ve insanda hesperetinin hesperidinden daha çabuk absorbe edildiğini göstermektedir. İnsanlarda hesperidin metabolizması belirgin farklılık göstermektedir. İdrar metaboliti olarak, 3-hidroksi-4-metoksifenilhidrakrilik asit oluşmuştur. Bu da hesperetinin piran halkasının bu hidrakrilik asidi oluşturmak için bölündüğünü göstermektedir. Çok az miktarda da hesperetinin glukronidi tespit edilmiştir (Garg ve ark., 2001). Hesperidin, barsaktaki bakteriler tarafından aglikonu olan hesperetine alfarnimidaz ve betaglikozidaz veya endobetaglikozidaz enzimleriyle dönüşmektedir. İnsan barsağında oluşan bu metabolitin antiplatelet aktivitesinin ve sitotoksitesinin ana bileşikten daha çok olduğu belirtilmektedir (Kim ve ark., 1998).

Greyfurt ve portakal suyundaki hesperetin ve naringenin idrarla atılımı ve plazma kinetiklerini araştırmak için bir çalışma yapılmıştır. Meyve sularını içen sağlıklı deneklerin kan ve idrar örnekleri toplanmış, elektrokimyasal dedeksiyonla YBSK' de analiz edilmişlerdir. Bu çalışmada, bireysel farklılıkların hesperetin biyoyararlanımını önemli oranda etkilediği bulunmuştur. Hayvan çalışmaları, hesperidin içeren Daflon-500 mg[®] adlı ilacın alımından 96 saat sonra tamamen atıldığını göstermektedir (Meyer, 1994).

C14 hesperidin metilkalkon' un (suda çözünür, doğal hesperidinin semi-sentetik türevi) reabsorpsiyon ve atılımıyla ilgili sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, 10 mg.kg⁻¹ dozda oral yoldan verilen maddenin 1-2 saat içinde absorbe olduğu gözlenmiştir. Kan profilleri ilacın iyi bir biyoyararlanıma sahip olduğunu göstermektedir. Oral uygulamadan sonra idrarla atılım fasyal atılımdan daha düşüktür. Ancak i.v. yolla uygulamada, kıyaslanabilir düzeye gelmektedirler. Atılım her iki yolda da uygulamadan sonraki ilk 24 saatte gerçekleşmektedir (Garg ve ark., 2001).

Farmakolojik Etkileri

Damar Sistemi Üzerine Etkileri

Hesperidin, varis ve damar yırtılmalarıyla sonuçlanan, kolay yaralanma ve damar geçirgenliği sorunlarını içeren kan damar bozukluklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Garg ve ark., 2001). Hesperidin kılcal damarların geçirgenlik ve kolay yaralanma özelliğini azaltmaktadır (Uchiyama ve ark., 2005; Nogata ve ark., 2006). Ayrıca vasküler bütünlüğü arttırmakta ve kılcal geçirgenliği azaltmaktadır (Garg ve ark., 2001). Diyetteki eksikliği kol ve bacaklarda anormal kılcal sızıntıya, acı ve zayıflığa ve bacak kramplarına yol açabilir (Philp, 2003). Ayrıca kapiller antihemorajik özelliği de saptanmıştır (Garg ve ark., 2001). Hesperidin venöz tonusu ve mikrosirkülasyonu artırarak venöz ülserlerin iyileşmesine yardımcı olmaktadır. Kronik venöz bozukluklar ve hemoroid tedavisinde kullanılan hesperidin, operasyon sonrası oluşabilen tromboembolizmden korunmayı sağlar (Knekt ve ark., 2002; Peng ve ark., 2006; Kanaze ve ark., 2003; Del Rio ve ark., 2004; Tommasini ve ark., 2005; El-Shafae ve El-Domiaty, 2001).

Yapılan bir çalışmada hesperidinin kalsiyum kanallarını bloke ettiği gösterilmiştir (Morita ve ark., 1992). Hesperidinin belirgin bir antihipertansif ve diüretik etkinliği de saptanmıştır (Chen ve ark., 2003; Uchiyama ve ark., 2005). Hesperidin bu etkisi kan reolojisini etkileyen enzim sistemleri üzerindeki etkisinden kaynaklanmaktadır. Buna ek olarak pek çok flavonoidin siklik adenosin mono fosfat (sAMP) fosfodiesterazın inhibitörü olması nedeniyle diüretik etki oluşturdukları düşünülmektedir (Garg ve ark., 2001). İntraperitoneal (i.p.) hesperidin-5-glikozit uygulaması, farelerde yüksek oranda yağ içeren diyetle birlikte total kolesterol seviyesini belirgin bir biçimde düşürürken, serum trigliserit seviyesini etkilememiştir (Tommasini ve ark., 2005; Nogata ve ark., 2006; Ortuno ve ark., 1997; Kanaze ve ark., 2003). Bu nedenle hesperidin-5-glikozit' in hiperlipidemi tedavisinde kullanılması yarar sağlamaktadır. Hesperidinin bu belirgin aktivitesi hepatik kolesterol katabolizmasını arttırmasından kaynaklanmaktadır (Philp, 2003; Miyake ve ark., 2003; Peng ve ark., 2006; Ortuno ve ark., 1997; Kanaze ve ark., 2003; Del Rio ve ark., 2004; Tommasini ve ark., 2005; El-Shafae ve El-Domiaty, 2001).

Antiinflatuar Etkileri

Hesperidinin belirgin antiinflatuar ve analjezik etkileri olduğu saptanmıştır. Prostaglandin 2 (PG₂) ve Prostaglandin 2 α (PG_{2 α})'nın sentezini inhibe etmektedir. Kilitli farelere uygulanan hesperidin ise kolonik hasarı azaltmıştır (Garg ve ark., 2001). Bunun, hesperidinin antioksidan aktivitesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Del Rio ve ark., 2004; Tommasini ve ark., 2005; Uchiyama ve ark., 2005; Chen ve ark., 2003; Knekt ve ark., 2002; Kohno ve ark., 2001).

Enzimler Üzerindeki Etkisi

Mukopolisakkarit hiyalüronik asidi depolimerize eden enzim hiyalüronidazdır. Konnektif doku bağlantılarında özellikle hiyalüronik asit içeren intrafibrilatör çimento maddesinde rol oynadığı bilinmektedir. Kılcal duvarların geçirgenliğini dengelemede ve dokuları desteklemede rol oynamaktadır. Hiyalüronidaz, hiyalüronik asidin yıkımını sağlayarak doku geçirgenliğini artırır. Farelerde, izole

edilmiş konnektif membranlarda yapılmış bir çalışmaya dayanarak, hiyalüronidazın permeabilite artırıcı aktivitesinin fosforillenmiş hesperidin ile 15 dakika veya fazlasında ortadan kalkabildiği tespit edilmiştir. Hesperidin hiyarülonidaz aktivitesini ortadan kaldırmakla birlikte membran bütünlüğünü de sağlamış ve tedavi edilmemiş normal membranların geçirgenliğini de azaltmıştır (Garg ve ark., 2001).

Hesperidin hiyarülonidazdan başka, insan akrosinini de *in vitro* olarak inhibe etmiştir. Ayrıca fare serumunda aldozredüktaz ve alkalın fosfatı da inhibe edici etkisi bulunmuştur. Ancak ksantin oksidazı inhibe etmemiştir. Revers trinskriptaz enzimi üzerinde de inhibitör etkisi olmadığı gözlenmiştir (Garg ve ark., 2001).

Araşidonik asidin non-enzimatik lipid oksidasyonunda ve enzimatik oksidasyonunda siklooksijenaz enzimini stimule etmektedir. Ancak 1,5 lipooksijenazın Citrus bioflavonoidlerince inhibisyonu da rapor edilmiştir (Malterud ve Rydland, 2000). Hesperetin, lipolizi indükleyen epinefrini inhibe etmiş fakat fosfodiesteraz için aynı belirgin inhibe edici aktiviteyi göstermemiştir (Jeong ve ark., 1999).

Hesperidin ve diosmin hem ayrı ayrı hem de kombine halde sıçanlarda granülomaya karşı kullanıldığında prostaglandinleri inhibe etmişlerdir (Damon ve ark., 1987).

Hesperidin'in çeşitli biyolojik etkilerinin, yapısal olarak adenosin trifosfata (ATP) benzerliği nedeniyle ATP ile aynı enzimatik bölgelere bağlanmak için yarışmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir (Vanamala ve ark., 2006). Greyfurt suyu sitokrom P 450 ile metabolize olan ilaçların metabolizmasını inhibe etmektedir (Ortuno ve ark., 1997).

Antimikrobiyal Etkisi

Hesperidin ve hesperetin, *in vitro* olarak pek çok bitki ve hayvan mikroplarına karşı enfeksiyondan koruyucu ve bu mikropların eşleşmesini önleyici özellikler göstermişlerdir (Garg ve ark., 2001).

Antibakteriyal Etkisi

Hesperidin ve hesperitin'in *Helicobacter pylori*'nin gelişimini azalttığı tespit edilmiştir (Knekt ve ark., 2002).

Antifungal Etkisi

Botyrtis cinerea, *Tricoderma glaucum* ve *Aspergillus famigatus*'a karşı hesperidin'in 1-10 µg arasında değişen dozlarda antifungal aktivitesi olduğu rapor edilmiştir (Garg ve ark., 2001).

Antiviral Etkisi

Hesperidin virüs-veziküler stomatite karşı antihiyalüronidaz aktivitesi sebebiyle aktif bir antiviral ajan olarak kullanılmıştır. Ayrıca hesperidin'in influenza virüsüne karşı da aktif olduğu rapor edilmiş ve *Herpes simplex*'e karşı da zayıf bir aktivite gösterdiği bulunmuştur. Bunlar hesperidin'in hücrelerdeki sAMP sentezini stimule etmesinden ve eşleşmeyi önleyici özelliğinden kaynaklanmaktadır (Garg ve ark., 2001). Ayrıca erişkin ve çocuklarda sporadik diyare oluşturan rotavirüse karşı da

belirgin bir inhibe edici etki gösterirken, hesperetinin böyle bir etkisinin olmadığı görülmüştür (Bae ve ark., 2000).

Antifertilite Etkisi

Hesperidin ve türevleri çok uzun zamandan beri antifertilite aktiviteleri açısından değerlendirilmektedirler. 1948' de fosforillenmiş hesperidinin (PH) sperm enzimi olan hiyalüronidazı inhibe ederek antifertilite etkisi gösterdiği saptanmıştır. Oral ve i.p. verildiğinde PH' in antifertilite özelliğini gösterdiği saptanmıştır. Hem erkek hem dişi farelere verildiğinde beklenmeyen hamilelikleri azalttığı gözlenmiştir. Dişilerin menstrual döngüsü ile erkeklerin sperm sayısı ve motilitesi değişmemiştir. İlaç üzerinde yapılan diğer çalışmalar, toksik etkileri olmayan ve steriliteyi azaltmayan bir oral kontraseptif olarak rol oynadığını ortaya koymuştur. Travma, infeksiyon hastalıkları ve sistemik hastalıkların antifertilite özelliğini etkilemediği görülmüştür.

Tavşanlarda PH' nin vajinal uygulamasıyla da belirgin bir kontraseptif etki saptanmıştır. Hiyalüronidazın yumurtanın folikül hücre katmanına spermin geçirgenliğini sağladığı rapor edilmiştir (Garg ve ark., 2001).

Antikarsinojenik Etkisi

Son on yılda hesperidin ve aglikonu hesperetinin antikarsinojenik aktivitesi üzerinde bir çok araştırma yapılmıştır. Bu çalışmalarda, apoptozisi indükleyerek antikanserojenik etki gösterdiği tespit edilmiştir (Labib ve ark., 2004; Justesen ve ark.,2000; Chen ve ark., 2003; Philp, 2003; Knekt ve ark., 2002; Kohno ve ark., 2001; Peng ve ark., 2006; Erlund ve ark., 2001; Tommasini ve ark., 2005).

Erkek fare idrar torbaları üzerinde hesperidin/diosmin kombinasyonu kullanılarak antikarsinojenik etki incelenmiştir. Kombinasyonun, N-bütül-N-(4-hidroksibütül) nitrozamin ile indüklenen karsinogenezisi tümör başlangıç fazında 8 hafta boyunca süren tedavi sonucunda inhibe ettiği görülmüştür. Ayrıca sıçanlar üzerinde yapılan bir çalışmada 500 ppm/kg dozda hesperidinin karsinogenezisi inhibe ettiği tespit edilmiştir (Yang ve ark., 1997). Hesperidinin aynı zamanda 4-nitrokuinolin-1-oksitle indüklenen ağız kanserini inhibe ettiği, lezyonların sayısını, dil dokusundaki poliamin seviyelerini ve hücre proliferasyonunu azalttığı bulunmuştur (Tanaka ve ark., 1994). Bir başka çalışmada, tek başına hesperidin ve diosmin/hesperidin kombinasyonu verildiğinde, hem 4-nitrokuinolin-1-oksitle başlatılan tümör gelişiminin inhibe olduğu hem de azoksimetanla indüklenen sıçan kolon karsinogenezisine karşı kemopreventif etki geliştiği saptanmıştır. Bu sonuçlar artan hücre proliferasyonunun baskılanması sonucunda olduğu bildirilmiştir (Tanaka ve ark., 1997).

Hesperidin, subkutan (s.c.) olarak genetik modifikasyonla bağışıklık sistemi zayıflatılmış İsviçre farelerine (CD-1) uygulandığında 7,12-dimetilbenz(α)antrazen ile indüklenen tümör başlangıcını önlememiş, ancak 12-O-tetradekanol-13-forbol asetat (TPA) indüklenen tümör artışını bir kemopreventif ajan olarak kullanımı sonucu inhibe etmiştir (Koyunku ve ark., 1999).

Antimutajenik Etkisi

Hesperetin antimutajenik aktivitesi *Salmonella typhimurium* mutantları (ters baz çifti substitüsyonları ve çerçeve kayması mutajenleri) kullanılarak değerlendirilmiştir. Citrus flavonoidlerinin antimutajenik aktivitesi üzerinde yapılan bir araştırmada, hesperidin *Salmonella typhimurium* üzerinde benz(α)piren ile indüklenen mutasyonlara karşı zayıf bir antimutajenik etki gösterdiği bildirilmiştir. Sıçanlarda N-metil-N-amilnitrozamin ile indüklenmiş tümör oluşumuna karşı bir antimutajenik etki gösterdiği saptanmıştır (Garg ve ark., 2001).

Diyetle en çok alınan flavonoidlerin sıçan fibroblastlarında (C3H10T1/2) 3-metil kolantren ile indüklenen neoplastik transformasyonu inhibe edici etkileri test edilirken, hesperidin ve hesperetin bu transformasyonu tamamen inhibe eden ajanlar olarak saptanmışlardır (Franke ve ark., 1998).

β-kripto ksantin ve hesperidin içeren C.unshiu Marc. Satsuma mandalinalarının azoksimetanla indüklenen sıçan kolonik adenokarsinomasına karşı hücre proliferasyonunu ve enzim detoksifikasyonunu indüklemesi sebebiyle koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır (Kohn ve ark., 2001).

Hesperidin, 12-o-tetradekaboilforbol-13-asetat uygulanmış CD-1 farelerinde tümör oluşumunu azalttığı ve N-metil-N-amil nitrozaminle indüklenen sıçan yemek borusu tümör oluşumunu, hücre çoğalmasını azaltarak inhibe ettiği öne sürülmüştür (Chen ve ark., 2003).

İnsan meme kanser hücreleri üzerinde *in vitro* olarak yapılan bir çalışmada hesperetin kanserli hücreleri inhibe ettiği saptanmıştır. (He ve ark., 1997).

Trombositler ve Hücre Agregasyonu Üzerine Etkileri

Hesperidin, insanda trombositler üzerinde yapılan bir araştırmada epinefrin ve ADP ile indüklenen trombosit agregasyonunu 0.08 mg.mL^{-1} konsantrasyonunda inhibe ettiği bulunmuştur. Antitrombotik etkisi de söz konusu olan hesperidin, atlar üzerinde yapılan bir araştırmada eritrositlerin agregasyonunu azalttığı gözlenmiştir (Knekt ve ark., 2002). Ayrıca hamsterlar üzerinde yapılan çalışmada hesperidin antiiskemik etkisi görülmüştür (Garg ve ark., 2001).

Ultraviyole Koruyucu Etkisi

Son yıllarda oksidatif cilt hasarını önlemek için flavonoidlerin serbest radikal süpürücü olarak kullanılmaları üzerindeki araştırmalara hız verilmiştir. Ultraviyole radyasyonu yüzünden oluşan oksidatif stres cilt kanseri ve güneş ışığı maruziyetine bağlı yaşlanmanın başlatıcısı olabilmektedir. Bir çalışmada topikal olarak uygulanan hesperetin, tek başına ve *C.sinensis* ile birlikte uygulanan ham ekstresinde diğer flavonoidlerle beraber UV-B ile indüklenmiş cilt eritemini yok edici etkisi araştırılmıştır (Garg ve ark., 2001). Model membran olarak fosfotidilkolin veziküllerini alarak UV radyasyonu ile indüklenen peroksidasyon üzerinde hesperetin etkisi çalışılmıştır. *In vitro* olarak insan cildine bu bileşiklerin nüfuz edişi de ölçülmüştür. Hesperetin yumurta fosfotidilkolini (PC) içeren lipozomları, UV radyasyonu ile indüklenen peroksidasyonu ve oluşan serbest oksijen radikallerini ortadan kaldırarak korumaktadır. Hesperetin ayrıca *Stratum korneum* tabakasından da geçebilmektedir. Bir çalışmada, cilt yüzeylerine

hesperetin jel formunda uygulandıktan sonra cilt UV-B radyasyonuna maruz bırakılarak reflaktör spektrometresiyle eritemin boyutları monitörize edilmiş ve hesperetin topikal fotoprotektif ajan olarak saptanmıştır (Saija ve ark., 1998).

Başka bir çalışmada, hesperidinin siklodekstrin ve glukano-transferaz ile transglikozidasyonu sağlanmış ve hesperidinle aynı absorpsiyon spektrumundaki mono ve diglikozitleri hazırlanmıştır. Bunlar yüksek ultraviyole ışığa maruz bırakıldıklarında UV ışınlarını absorbe eden pigmentlerin rengini stabilize ettikleri gözlenmiştir. Araştırmacılar renk stabilizatörü olarak yiyecek ürünlerinde kullanılabilceğini önermektedirler (Komenati ve ark., 1994).

Analjezik Ve Antipiretik Etkisi

Hesperidin farelerde s.c. ve i.p. uygulama sonucunda analjezik aktivite göstermiştir. Bu etki periferik bir mekanizmayla açıklanmaktadır. Ayrıca ateşi de azaltmaktadır. Hesperidin hem histamin hem de prostaglandin salınımını inhibe ederek savunucu bir gastrik faktör ve asit sekresyonları ile gastrik mukoza lezyonlarından koruyucu bir ajan olarak rol oynamaktadır (Del Rio ve ark., 2004; Labib ve ark., 2004; Garg ve ark., 2001).

Antioksidan Etkisi

Hesperidinin elektron transfer ve proton transfer reaksiyonundaki süperoksit radikalini azalttığı bulunmuştur. Metal iyonlarının şelatörleri olduğundan serbest radikal süpürücü özellikleriyle etkili antioksidanlardır (Knekt ve ark., 2002). Ayrıca karaciğer homojenatlarında süperoksitle indüklenen kemoluminesans sergilemiştir. Stimule edilmiş nötrofillerden reaktif oksijen türlerinin açığa çıkmasını da önlemiştir. Hesperidin serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonundan korunmayı sağlamaktadır (Knekt ve ark., 2002; Kohno ve ark., 2001; Deng ve ark., 1997; Chen ve ark., 2003; Labib ve ark., 2004; Justesen ve ark.,2000). Böylece hesperidin diğer flavonoidlerle karşılaştırıldığında belirgin bir antioksidan olarak karşımıza çıkmaktadır (Del Caro ve ark., 2004; Peng ve ark., 2006; Ortuno ve ark., 1997; Nogata ve ark., 2006; Del Rio ve ark., 2004; Erlund ve ark., 2001; Kanaze ve ark., 2003; Vanamala ve ark., 2006).

Bağışıklık Sistemi Üzerine Etkisi

Hesperidinin bağışıklık sistemini baskılayıcı aktivite sergilediği saptanmıştır. Bakteriyel α -amilazına karşı antikor üretimini intragastrik uygulamayla baskılamıştır. Başka bir çalışmada ise, hesperidinin erkek farelerde intragastrik uygulamayla hücrel immüniteyi arttırdığı gözlenmiştir (Garg ve ark., 2001).

Hesperidin en güçlü koloni stimule edici faktör olan CSF'nin (immunomodülatör aktivitenin göstergesi) indükleyici aktivitesini doza bağımlı olarak göstermiştir (Kawaguchi ve ark., 1999).

Hormonlar Üzerindeki Etkisi

Hesperidin östrojen seviyelerini dengelemeye yardımcı ve buna bağlı inflamasyon ve ağrıyı azaltıcı etkiye sahiptir. Yapılan bir çalışmada, menopozal semptomlardan şikayetçi 94 kadına 1 ay boyunca her gün 900 mg hesperidin, 300 mg hesperidin metil kalkan, 1200 mg C vitamini verilmiş ve bir ayın sonunda sıcak basmalarının hastaların %53'ünde, tüm diğer semptomların da %34'ünde azaldığı görülmüştür (Philp, 2003).

Hesperidin bir fitoöstrojen olup, seks hormonlarına bağlı biyolojik cevapları ve östrojen reseptörlerine bağlanmayı etkilemektedir (Erlund ve ark., 2001).

Diğer etkileri

Hesperidinin antiallerjik, antihemoroidal, kanama durdurucu, yara iyileştirici ve strese bağlı ülserle karşı koruyucu etkisi de vardır (Garg ve ark., 2001).

Ayrıca hesperidin sedatif ve uyku düzenleyici etkiye de sahiptir. Diazepam ile sinerjik etki gösterir (Fernandez ve ark., 2005).

Toksitesisi

Genel olarak, hesperidini de içeren *Citrus* bioflavonoidlerinin hamilelikte bile güvenli olduğu ve hiçbir yan etkilerinin olmadığı bilinmektedir. Erkek ve dişi farelerde yapılan bir deney sonucunda PH' nin organizmaya ve dokulara non-toksik olduğu, birikim özelliği olmadığı ve hiçbir alerjik reaksiyona yol açmadığı saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak insanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, PH antifertilite ajanı olarak vitaminler, hormonlar, amfetamin türevleri gibi diğer susbitüsyon faktörleriyle birlikte uygulanmıştır. Bunun dışında, travma, enfeksiyonlar veya sistemik hastalıklar antifertilite etkisini azaltmamıştır (Garg ve ark., 2001).

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, 26 hafta boyunca Daflon® 500 mg gastrik intübasyonla uygulanmış; ölüm, ağırlıkta değişimler, standart testlerde anormalliklere rastlanmamıştır (Damon ve ark., 1987). Metil hesperidinin % 5 gibi yüksek oranlarda diyetle birlikte oral yoldan verilmiş, ancak farelerde hiçbir mutajenik ve karsinojenik aktivite gözlenmemiştir. Sıçan ve farelerde hiçbir belirgin toksik etki görülmemiştir. Ayrıca hesperidin, günlük besin alımını, vücut kilo alımını ve besin etkinliğini de etkilememiştir (Kawaguchi ve ark., 1997).

İnsanlarda yapılan bir çalışmada, hesperidin uygulanan denekler ile plasebo uygulaması yapılan denekler karşılaştırıldığında hesperidin uygulanan grupta belirgin yan etkiler görülmemiştir (Meyer, 1994).

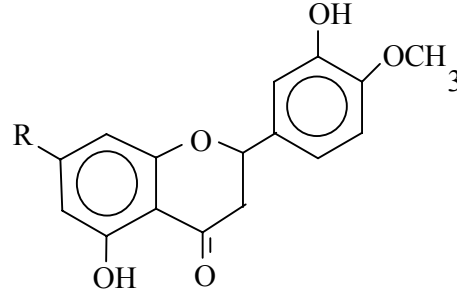
Neohesperidin

Neohesperidin greyfurt, turunç, ekşi portakal ve ponderosa limonlarında (*Citrus limon var. Ponderosa*) bulunan bir flavonon glikozitidir (Lee ve Kim, 2003; Peterson ve ark., 2006b). Neohesperidin portakal, mandalin, turunç, limon ve ağaç kavununda (*Citrus medica*) yaygın olarak bulunan ve tatsız bir glikozit olan hesperidinin (C₂₈-H₃₄-O₁₅) bir izomeridir. Neohesperidin, greyfurt ve mandalinanın tatlı ve sulu bir hibridi olan tangeloda en fazla miktarda yer almaktadır. Ekşi portakaldaki neohesperidin miktarı 100 g meyve suyu için 11 mg ağırlığa eşdeğerdir (Peterson ve ark., 2006b). Özellikle turunçların karakteristik acılığında rolü olan neohesperidin, alkol ve suda çözülebilen bir bileşiktir. Molekül esasına göre hazırlanan çözeltileri karşılaştırıldığında neohesperidinin acılığı naringinin 1/10'u kadardır (Garg ve ark., 2001).

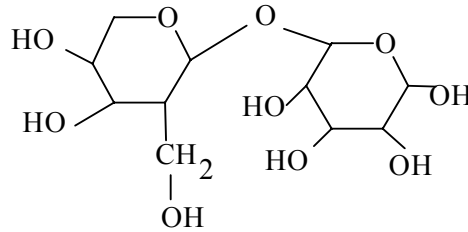
Molekülün taşıdığı disakkarit ile acılığı arasında bağlantı olduğu bilinmektedir. Rutinozidler tatsızken, neohesperidozidler acıdır. Her iki form da bir mol ramnoz ve bir mol glikoz taşır ve iki izomerik formu oluştururlar. Rutinoz kimyasal olarak α-L-ramnozil-(1→6) glikoz formülüne, neohesperidoz ise α-L-ramnozil-(1→2) glikoz formülüne sahiptir. Bu farklılık sadece 2 şeker ünitesinin konfigürasyon

farklılığından kaynaklanmaktadır (Belajova ve Suhaj, 2004). Acı neohesperidozidlerin başlıca olarak greyfurtta bulunduğu gözlenmiştir (Garg ve ark., 2001).

Neohesperidin (hesperetin-7- β -neo hesperidaz) varlığı *Cynara humilis* ve *C. cornigera*, olmak üzere Yunanistan'da yetişen 2 *Cynara* türünde de bulunmuştur (Garg ve ark., 2001). Neohesperidin, hidrokalkonuna kimyasal olarak dönüştürülebilmekte ve tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır (Ortuno ve ark., 1997).



Şekil.4. Neohesperidin' in kimyasal yapısı (Hesperidin için R= ramnoz,glukoz; Neohesperidin için R= neohesperidoz)



Şekil.5. Neohesperidozun kimyasal yapısı [O- α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 2) glüköz]

GEREÇLER

Kimyasal Madde ve Çözeltiler

Hareketli fazların ve çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan asetonitril ve metanol Merck KGaA (Almanya) firmasının ürünü olup YBSK saflıktadır. HS, Sigma (Almanya) ve NHS, Fluka (Almanya) firmasından temin edilmiştir.

Analizlerde kullanılan bidistile su laboratuvarımızda üretilmiştir.

Kullanılan Cihazlar

Kullanılan YBSK cihazı, LC 6A model pompa ile birlikte otomatik örnekleyici model (loop) enjektöre sahip SPD-A10 UV değişken dalga boylu detektör ile C-R7A model integratörü içermektedir (hepsi Shimadzu, Japonya). Çözeltilerin içerdiği çözünmemiş safsızlıkların çöktürülmesi amacıyla ise 1-6 model Sigma (Almanya) marka santrifüj aleti kullanılmıştır ve çözeltiler Bandelin Sonorex (Almanya) model ultrasonik banyo kullanılarak degaze edilmiştir. Sıvı kromatografisi için analiz edileceklerin ayrımı ise 5 µm 150 mm x 4.6 mm Hypersil C₁₈ kolon ile gerçekleştirilmiştir (Teknokroma, İspanya). Süzme işlemi için 0.45 µL'lik membran filtreler (polivinildiflorür (PVDF)) kullanılmış ve homojenizasyonu sağlamak için çözeltiler Heidolph (Almanya) marka çalkalayıcı ile karıştırılmıştır.

YÖNTEMLER

Hesperidin (HS) ve Neohesperidinle (NHS) Yapılan Analitik Çalışmalar

Li ve arkadaşları (2004), *Bulpleurum falcatum L. ve Fractus aurantii* (turunç meyvesi) dekoksasyonunun oral uygulamasından sonra sıçan serumunda LC-MS/MS yöntemi kullanarak naringin, HS ve NHS'i tayin etmişlerdir. Waters Oasis HLB model katı faz ekstraksiyon kartuşlarından geçirilen internal standart (IS) eklenmiş serum uçurulmuş ve mobil fazda çözündürülerek enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak asetonitril:su (25:75 h/h) kullanılmıştır. Dedeksiyon fotodiyod dizisi detektörü kullanılarak yapılmıştır. Kolon sıcaklığı 40°C' a ; akış hızı ise 0,8mL.dak⁻¹' a ayarlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi için 0,2 mg.mL⁻¹ konsantrasyonlarında naringin, HS ve NHS'in metanolde stok solüsyonları hazırlanmış ve 20.0 - 500.0 ng.mL⁻¹ aralığında olacak şekilde seyreltilmiş ve 100 ng.mL⁻¹ IS ilave edilmiştir. Kalibrasyon çözeltileri 2.0 - 50.0 ng.mL⁻¹ aralığındaki konsantrasyonlarında olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu yöntemde tayin sınırı (LOQ) %20 olmakla birlikte naringin, NHS ve HS için Saptama sınırı (LOD) 0.7 ng.mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

Mouly ve arkadaşları (1998), portakal sularında sıvı kromatografisi kullanarak flavonon glikozitleri (FG) ve polimetoksillenmiş flavonların (PMF) ayrımını gerçekleştirmişlerdir. Standart çözeltiler 50 µg.mL⁻¹ HS, 5 µg mL⁻¹NHS olacak şekilde hazırlanmıştır. HS su:dimetilformamid (30:70 h/h) ile seyreltilmiştir. Numuneler için, elle sıkılmış portakal suları ile endüstriyel portakal suları (25 ml) 20 ml DMF ile seyreltilmiştir. Su banyosunda 90°C' de 10 dakika tutulup soğutulduktan sonra 10 dakika santrifuj edilmişlerdir. 5 ve 0.45 µm' lik akrodisk filtrelerden süzülüp 20 µl hacimde olacak şekilde enjekte edilmişlerdir. Dedeksiyon HS ve NHS için 280 nm'de ; ve maddeler için ise 260-350 nm aralığında fotodiyot dizisi detektörüyle yapılmıştır. A çözücüsü olarak asetonitril ve B çözücüsü olarak su asetik asit (96:4) gradiyent profiline sahip mobil faz kullanılarak ayrılmıştır. Kolon sıcaklığı 35°C' e ve akış hızı 1.0 mL.dak⁻¹'ya ayarlanmıştır. Analiz süresi 60 dakika olup bu yöntem için LOQ değeri 0.1 mg/l bulunmuştur.

Del Rio ve arkadaşları (2004), *Citrus limon'* da (limon) bulunan HS, diosmin ve eriositrin flavonoidlerini YBSK' de tayin etmişlerdir. Olgunlaşmamış meyvenin genç yaprak, kök ve çiçekleri, olgun meyvenin flavedo, albedo ve pulp kısımları kullanılmıştır. Bunlar kurutularak dimetilsülfoksit (DMSO) ile 30 dakika ekstre edilmiş 6 mg.mL⁻¹ kuru ağırlıkta olacak şekilde ayarlanıp 0.45 µm'lik naylon membranlardan süzölmüşlerdir. Analiz 35°C' ye ayarlanmış kolon ve hareketli faz olarak su:metanol:asetonitril:asetik asit (15:2:2:1 h/h/h/h) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon için 280 nm' de UV-görünür diyot dizisi detektörü kullanılmıştır. HS'in tüm kültürlerdeki başlıca flavonoid olduğu tespit edilmiştir. Çiçekte bile yaklaşık 100 g kuru ağırlığın 5 g' ını oluşturduğu gözlemlenmiştir.

El-Shafae ve arkadaşları (2001), Buchu yapraklarında (*Barosma betulina* bitkisinin yaprakları)ve farmasötik dozaj formlarında (Dioven[®], Diosed[®] ve Daflon[®]) HS ve diosmin tayini yapabilmek için geliştirilmiş sıvı kromatografisi metodları kullanmışlardır. Tüm kromatografik analizler 345 nm' de çift ışınli absorbans detektörü kullanılarak 1.5 mL.dak⁻¹ akış hızında gerçekleştirilmiştir.

Hareketli faz olarak ise metanol-su karışımı (60:40 h/h) kullanılmıştır. Kalibrasyon için 5-100 µg.mL⁻¹ aralığındaki derişimlerde metanolde %10 DMSO kullanılarak hazırlanmış diosmin ve 5-75 µg.mL⁻¹ aralığındaki derişimlerde aynı şekilde hazırlanmış HS stok çözeltileri kullanılmıştır. 1 g toz haldeki Buchu yaprağı 4 kere 15 dakika süreyle %10 DMSO içeren metanolden geçirilip filtre edilmiştir. Uygun işlem basamaklarından geçirildikten sonra elde edilen numunelerin her birinden 10 ‘ar µl enjeksiyon hacminde YBSK’ a verilmiştir. % bağıl standart sapma değerleri %1.9’un altında olan çalışmada analiz zamanlarının 6 dakikanın altında olduğu belirtilmiştir.

Vanamala ve arkadaşları (2006), portakal ve grefurt sularında değişik biyoaktif flavonoidleri tayin etmişlerdir. Ters faz YBSK yöntemiyle 280 nm’ de UV detektörle yürütülen çalışmada mobil faz olarak asetonitril(%70) ve su : asetik asit (%4 ile başlayıp %70’de son bulan) karışımları gradiyent sistemle kullanılmıştır. Kolon olarak 5µm’lik C18 kolon kullanılmıştır. Çalışmada HS’in 34,20. dakika da NHS’in ise 35,17. dakikada gözleendiği belirtilmiştir.

He ve arkadaşları (1997), ekşi portakaldaki 8 flavonoidi YBSK’ a bağıl elektrosprey kütle spektrometresi (YBSK-ES-MS) ve foto diyod dizisi detektörle analiz etmişlerdir. Gradiyent sistemin (A çözücüsü olarak: %0.6 Asetik asit ve B çözücüsü olarak metanol) kullanıldığı yöntemde dedeksiyon 290 nm’ de gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak 5µm’lik 2.1x150 mm C18 kolon kullanılmıştır. Akış hızının 0.2 mL.dak⁻¹ olduğu çalışmada sıcaklık 45°C olarak kontrol edilmiştir. HS ve NHS için çözücü olarak metanol kullanılmıştır. Analizde HS 17.6. dakikada NHS ise 18.5. dakikada gözlenmiştir.

Pupin ve arkadaşları (1997), Brezilya portakal sularında flavonon glikozitlerini UV detektörlü ters faz YBSK yöntemi kullanarak tayin etmişlerdir. HS’in dimetilformamid:su (2:1 , h/h) çözeltilisinde çözüldüğü çalışmada analiz 280 nm’ de gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak su: asetonitril: tetrahidrofuran: asetik asit (80:16:3:1 h/h/h/h) kullanılmış ve akış hızı 1 mL.dak⁻¹ olarak belirlenmiştir. Kolon olarak ise 5µm’lik (250x4.6 mm) C18 Nucleosil kolon kullanılmıştır. HS için % geri kazanım oranı ortalama %106.5 olarak bulunmuştur.

Kanaze ve arkadaşları (2004b), yaptıkları çalışmada portakal suları ve farmasötik formülasyonlardaki diosmin, HS ve naringin miktarlarını hızlı bir ters faz YBSK ile tayin etmişlerdir. Çalışmada rhoifoin internal standart olarak kullanılmış ve mobil faz tetrahidrofuran: su: asetik asit (21:77:2 h/h/h) olarak belirlenmiştir. Kolon olarak 5µm’lik (250x4.6 mm) C8 kolon kullanılmıştır. Flavonoidler metanol : DMSO (1:1 h/h) çözeltilisinde çözüldürülmüşler ve 280 nm’ de akış hızı 0.85 mL.dak⁻¹ olacak şekilde analiz edilmişlerdir. Analizde HS 12. dakikada gözlenmiştir ve LOQ değeri %15 olarak saptanmıştır.

Ross ve arkadaşları (2000), 9 ticari grefurt suyundaki flavonoid miktarlarını YBSK ile karşılaştırmışlardır. Rutinin internal standart olarak kullanıldığı çalışmada standart flavonoid çözeltileri metanolde hazırlanmıştır. Tayin 280 nm’ de UV detektörle ve su-asetonitril’den oluşan gradiyent sistemli mobil faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kolon olarak C18 (150x4.6 mm) kolon seçilmiştir. Akış hızınının 1 mL.dak⁻¹ olarak seçildiği çalışmada HS 20.62. dakikada NHS ise 21.46. dakikada alıkonulmuştur.

Ortuno ve arkadaşları (1997), yüksek flavonoid içeren portakal kültürlerini ters faz YBSK yöntemi kullanarak tayin etmişlerdir. HS ve NHS standartları DMSO' da çözülmüşlerdir. Mobil faz olarak su: metanol: asetonitril: asetik asit (15:2:2:1 h/h/h/h) karışımının kullanıldığı çalışmada akış hızı 1 mL.dak⁻¹ olarak belirlenmiştir. Analiz için 5µm'lik (250x4 mm) C18 kolon kullanılmıştır. Deteksiyon 280 nm' de fotodiyod dizisi detektörü ile yapılmıştır. HS ve NHS için alıkonma zamanları sırasıyla 17.0 ve 19.6 dakikadır.

Belajova ve Suhaj (2004), portakal sularındaki fenolik bileşikleri C₆ fenil faz kolon ve fotodiyod dizisi detektör kullanarak YBSK yöntemi ile analiz etmişlerdir. Standart çözeltiler 0.1 mg.mL⁻¹ derişimde olacak şekilde metanolde çözülmüşlerdir. Analiz 285 nm' de 0.8 mL.dak⁻¹ akış hızında gradiyent sistem (0.01 M fosforik asit : metanol (80:20 h/h) ve metanol (%100) karışımları) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HS ve NHS için alıkonma zamanları sırasıyla 27.77 ve 28.19 dakikadır.

Nogata ve arkadaşları (2006), portakal türlerinin meyve dokularındaki (flavedo, albedo ve epidermis) flavonoid bileşimlerini bir YBSK yöntemi ile tarif etmişlerdir. Analiz mobil faz olarak gradiyent sistemli sulu 10mM fosforik asit ve metanol karışımı kullanılarak ve fotodiyod dizisi detektörüyle 285 nm' de yapılmıştır. Analiz için kolon olarak C18 RP kolon (250x4.0 mm) kullanılmıştır. Akış hızı olarak 0.6 mL.dak⁻¹ seçilmiş ve kolon sıcaklığı 40°C e ayarlanmıştır. Analiz zamanı ise 90 dakika olarak belirlenmiştir.

Tsai ve Liu (2004), anestezi altındaki sıçanların safra ve kanındaki ekstra selüler HS miktarını mikrodiyalizle birlikte YBSK metoduyla tayin etmişlerdir. Analiz için UV detektörle 283 nm' de çalışılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril : 0.1 M amonyum asetat karışımı (30:70 h/h) kullanılmıştır ve akış hızı 0.05 mL.dak⁻¹'a ayarlanmıştır. Ayırma işlemi; 5µm 150x1.0 mm C18 ODS-2 mikrobor kolon kullanılarak yapılmıştır. Analiz zamanı 10 dakikadır. Yöntem valide edilmiştir.

Xia ve arkadaşları (2006), *Citri Reticulatae*'nin (mandalina) perikarpında semi-mikro YBSK ile birlikte elektrokimyasal dedeksiyon yöntemi kullanarak HS tayini yapmışlardır. Analiz için mobil faz olarak metanol: su: fosforik asit (40:60:0.5 h/h/h) kullanılmış akış hızı 30 µl/dak ve kolon sıcaklığı 30°C' e ayarlanmıştır. Internal standart olarak mirisetin kullanılmıştır. Bitkideki HS metanolle ekstre edilip mobil fazla seyreltilerek tayin edilmiştir. Analizde HS'in alıkonma zamanı 15.5 dakika olarak tespit edilmiştir. Yöntemin bağıl standart sapması %3.59'dan az ve HS'in geri kazanım yüzdesi ise %99.83'den fazla bulunmuştur. Yöntemde HS için LOD değeri 3.06 ng.mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

HS ve NHS'in Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Stok çözeltinin hazırlanması için 32.9 mg HS tartılmış ve 50 mL metanolde çözümlenerek karıştırılmış ve çözülmüş gazların uzaklaştırılması için 5 dakika süreyle ultrasonik banyoda tutulmuştur. Gerekli seyreltmeler bu stoktan yine metanol kullanarak yapılmıştır.

NHS stoku için de, 1 mg NHS tartılmış ve 10 mL metanolde çözümlenerek karıştırılmış ve çözülmüş gazların uzaklaştırılması için 5 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletilmiştir. Gerekli seyreltmeler bu stok çözeltiden yine metanolle yapılmıştır.

Akış hızı, enjeksiyon hacmi taramalarında ve tekraredilebilirliğin incelenmesinde HS'in 1.5×10^{-6} M ve NHS'in 2×10^{-6} M derişimdeki çözeltileri yukarıdaki stoklardan metanolla seyreltilerek hazırlanmıştır.

HS için kalibrasyon çözeltileri son derişimleri 1.00, 1.50, 2.12, 3.18, 4.24×10^{-7} M ve 1.5, 2.12, 3.18, 4.24, 5.30×10^{-6} M olacak şekilde metanolla seyreltilerek hazırlanmıştır. NHS için ise 1, 2, 3, 4, 5×10^{-7} M ve 1, 2, 3, 4, 5×10^{-6} M son derişime sahip çözeltiler yine metanolla seyreltilerek hazırlanmıştır.

Hareketli Faz Sistemi

Deneşler süresince kullanılacak hareketli faz asetonitril : su (23:77 h/h) olacak şekilde 1000 mL hazırlanmıştır. Hareketli fazın içerisindeki çözünmüş gazların ve oksijenin uzaklaştırılması için ultrasonik banyoda 15 dakika tutulmuştur. Ayırma ve miktar tayini işlemleri bu çözelti kullanılarak yürütülmüştür. Mobil fazın akış hızı 1.0 mL.dak^{-1} , enjeksiyon hacmi ise 15 μL olacak şekilde ayarlanmıştır.

Numunelerin Hazırlanması ve Deteksiyon

Analizi yapılacak 20 örnekten elle sıkılan turunçgil türlerinin meyvelerinden elde edilen sular öncelikle 1:10 oranında mobil fazla seyreltilmiş ardından çalkalanarak 0.45 μL 'lik membran filtrelerden süzülerek enjeksiyon yapılmıştır. Ticari meyve sularından bazıları özellikle kolloid yapıda olanlar da aynı işleme tabi tutulmuştur. Diğer ticari meyve suları örnekleri direkt 0.45 μL membran filtrelerden süzülerek sisteme verilmiştir.

Maddelerin maksimum absorbans verdiği dalga boyu literatürler esas alınarak 280 nm olarak seçilmiş ve ölçümler bu dalga boyunda gerçekleştirilmiştir (Mouly ve ark., 1998; Del Rio ve ark., 2004; Pupin ve ark., 1997; Vanamala ve ark., 2006; Kanaze ve ark., 2003; Ross ve ark., 2000; Ortuno ve ark., 1997)

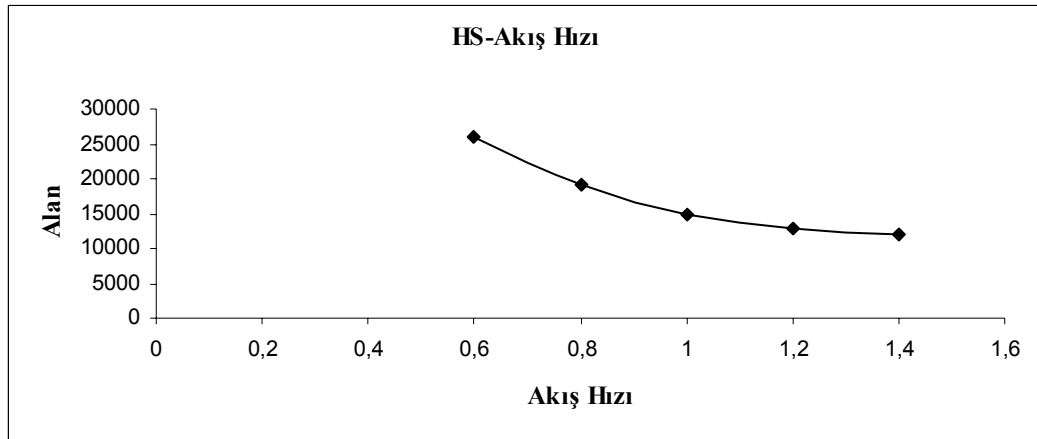
Yapılan analizlerde pik alanları bulunarak elde edilen veriler ilişkili kalibrasyon denkleminde yerine konularak elle sıkılan ve ticari olarak piyasada bulunan meyve suları çeşitlerinde HS ve NHS'in miktar tayini yapılmıştır.

BULGULAR ve TARTIŞMA

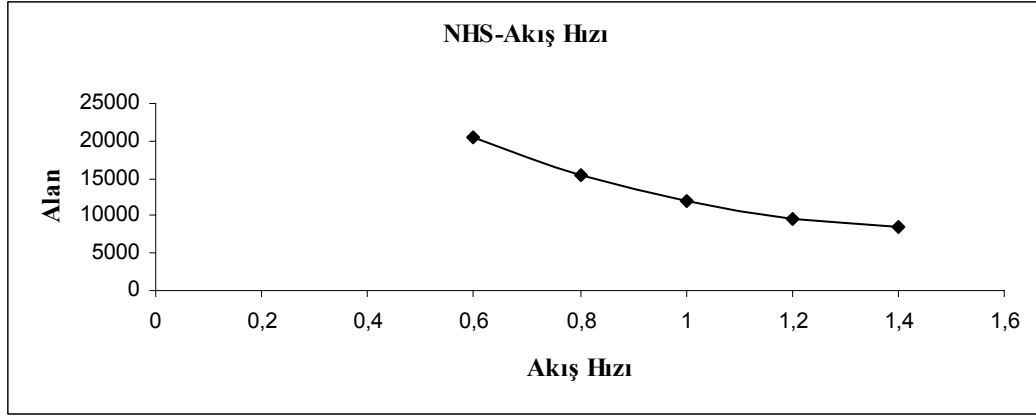
Optimizasyon

Yöntem geliştirme aşamasında, hareketli faz seçimi için yürütülen çalışmalara öncelikle izokratik hareketli faz sistemlerinin denenmesi ile başlanmıştır. İzokratik sistemler, göreceli basit bileşimleri, kolay hazırlanabilir olmaları ve düzgün baz çizgisi gibi kromatografik avantajlara sahip olmaları nedeniyle analiz işlemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu düşünceden yola çıkılarak, metanol, asetonitril, su ve benzeri genel kullanıma ait ters faz çözücülerinden oluşan farklı bileşimlerde birçok hareketli faz denenmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir. Değerlendirmeler sonucunda %20 – 30 aralığında asetonitril içeren veya benzeri polariteye sahip hareketli fazların maddelerin sürüklenmesi için yeterli çözücü gücünü sağladığı gözlenmiştir. Analize konu olan bu maddeler, kimyasal yapıları nedeniyle maksimum absorpsiyonlarını UV spektrumda 280 nm dalgaboylarında yapmaktadırlar. Yapılan literatür incelemeleri sonucunda da, maddelerin detekte edileceği dalga boyu olarak 280 nm'nin uygun olduğu sonucuna varılmış ve bu dalga boyu tüm çalışma boyunca kullanılmıştır (Mouly ve ark., 1998; Del Rio ve ark., 2004; Pupin ve ark., 1997; Vanamala ve ark., 2006; Kanaze ve ark., 2003; Ross ve ark., 2000; Ortuño ve ark., 1997).

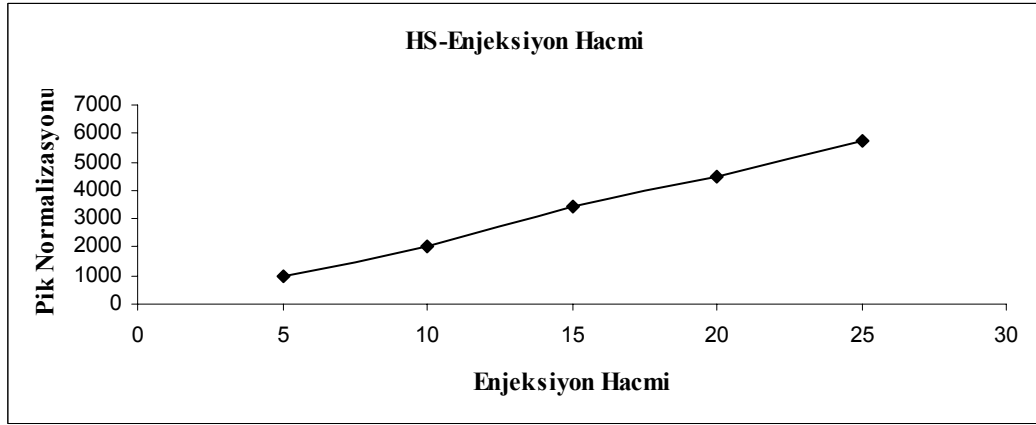
Akış hızının belirlenmesi çalışmalarında 0.6 –1.4 mL.dak⁻¹ aralığında tutulan akış hızlarında standart madde kolona enjekte edilmiş ve akış hızı-sinyal ilişkileri incelenmiştir. 0,8 – 1,2 mL.dak⁻¹ aralığındaki değerlerde, akış hızına bağlı sinyal değişiminin en az olduğu tespit edilmiştir. HS ve NHS için akış hızına karşı pik alanı grafikleri şekil 6 ve 7'de sunulmuştur. Analizde harcanan hareketli faz sarfiyatının uygun koşullar altında en azda tutulması için akış hızı olarak 1.0 mL.dak⁻¹ seçilmiştir. Enjeksiyon hacmi çalışmaları 5-25 µl arasında yürütülmüş ve 15 µl olarak seçilmiştir. HS ve NHS için incelenen enjeksiyon hacimlerine karşı pik normalizasyonu grafikleri şekil 8 v 9'da verilmiştir. Her iki aşamada kullanılmak üzere 1,5x 10⁻⁶ M HS ve 2x10⁻⁶ M NHS içeren karışım kullanılmıştır.



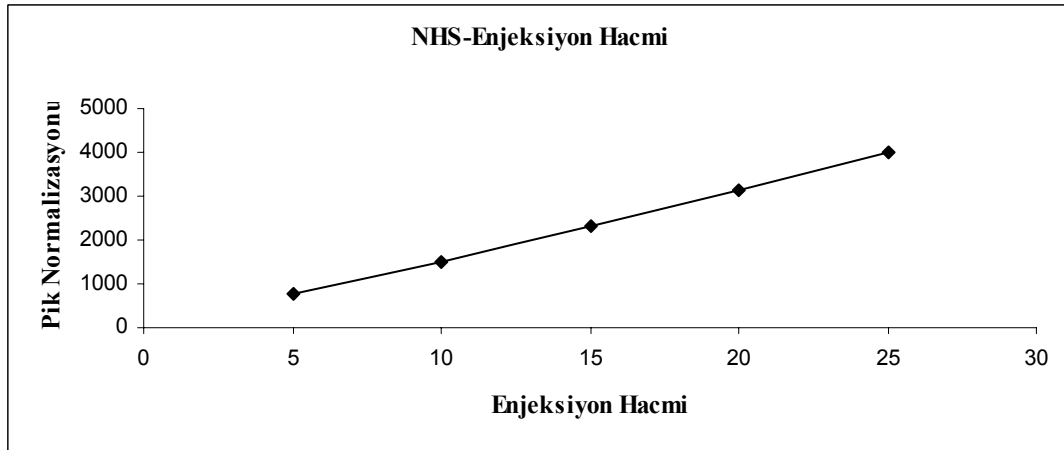
Şekil 6. HS'in Akış Hızı- Pik Alanı Grafiği



Şekil 7. NHS'in Akış Hızı-Pik Alanı Grafiği



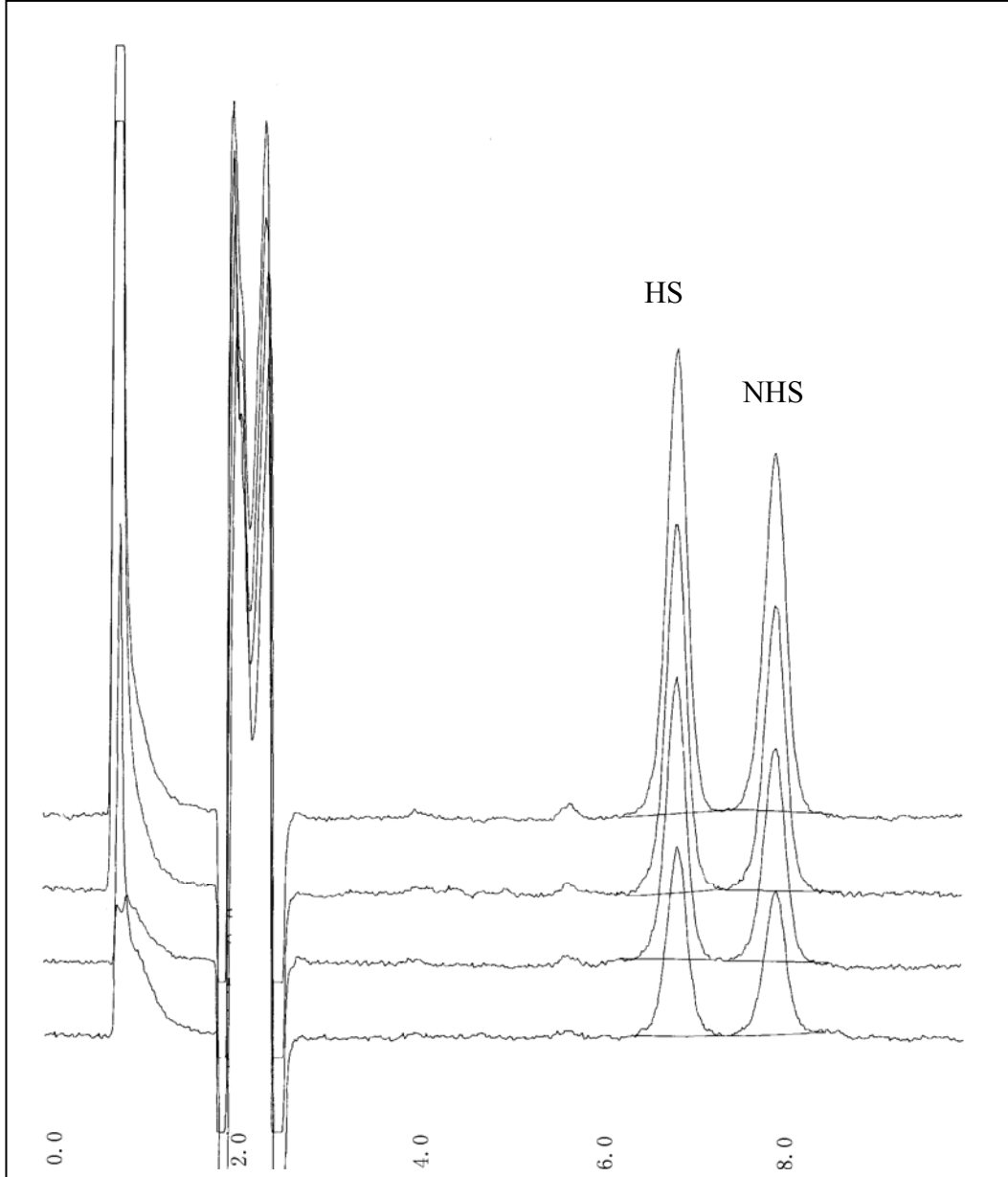
Şekil 8. HS'in Enjeksiyon Hacmi-Pik Normalizasyonu Grafiği



Şekil 9. NHS Enjeksiyon Hacmi-Pik Normalizasyonu Grafiği

Yürütülen ön çalışmalar ışığında, izokratik ayırma prensibine göre hazırlanan hareketli fazın, 1.0 mL.dak^{-1} değerindeki akış hızının ve 280 nm dalga boyunda tayininin en uygun analiz parametreleri olduğuna karar verilmiştir.

Yukarıda belirtilen ön araştırmalar doğrultusunda yurütuln analizlerde, HS ve NHS içeren numunenin analizi yaklaşık 8.5 dakikada tamamlanmıştır. Geliř zamanlarına göre maddelerin sinyalleri, sırasıyla, HS için 7.1 ± 0.1 NHS için 8.20 ± 0.1 dakikada detekte edilmiştir. Standart maddelere ait kromatogram Şekil 10'da görülmektedir.



Şekil 10. Standart maddelere ait kromatogram

Validasyon

Yöntemin kesinliğinin incelenmesi amacıyla HS'in 1.5×10^{-6} M ve NHS'in 2×10^{-6} M derişimdeki ozeltileri 10 ayrı enjeksiyonla ve birbirini takip eden 3 günde YBSK ile analiz edilmiştir. Pik normalizasyon değerleri kullanılarak yapılan istatistiksel değerlendirmeler izelge 1'de verilmektedir.

Çizelge 1. HS Ve NHS'e Ait Gün İçi ve Günler Arası Tekrar Edilebilirlik Çalışmalarının İstatistiksel Değerlendirmesi

	Gün İçi Kesinlik						Günler Arası Kesinlik	
	1.Gün (n=10)		2.Gün (n=10)		3.Gün (n=10)		Günler Arası (n=30)	
	HS	NHS	HS	NHS	HS	NHS	HS	NHS
Ortalama	3264	2144	3337	2206	3190	2303	3264	2218
SS	12.35	19.40	29.86	24.57	43.56	41.40	67.98	72.74
% BSS	0.38	0.90	0.89	1.11	1.36	1.80	2.08	3.27
GA	7.65	12.02	18.51	15.23	27.00	25.66	24.32	26.03

SS: Standart Sapma, % BSS: % Bağıl Standart Sapma, GA: Güven Aralığı, n: Örnek Sayısı

Çizelge 1'den de görüldüğü gibi düşük % bağıl standart sapma değerleri veren yüksek tekrar edilebilirlik sonuçları elde edilmiştir.

Yöntemin doğruluğunun incelenmesi için HS'in 1.00×10^{-7} - 4.22×10^{-6} M ve NHS'in 1×10^{-7} M - 5×10^{-7} M çözeltileri 3 set halinde hazırlanmış ve enjeksiyonları yapılmıştır. HS ve NHS için doğruluk deney sonuçları pik normalizasyonlarına göre sırasıyla çizelge 2 ve 3'te verilmiştir.

Çizelge 2. HS'e Ait Gün İçi ve Günler Arası Regresyon Analizinin İstatistiksel Değerlendirmesi

	Gün İçi Doğruluk			Günler Arası Doğruluk
	1.Gün (n=10)	2.Gün (n=10)	3.Gün (n=10)	Günler Arası (n=30)
Eğim, a	1.26×10^9	1.28×10^9	1.22×10^9	1.25×10^9
Kesim, b	45.85	46.88	44.82	45.85
r	0.9948	0.9948	0.9948	0.9948
Sr	704.42	720.20	688.55	704.40
Se	1.24×10^8	1.27×10^8	1.21×10^8	1.24×10^8
GA _{0.05}	$\pm 8.37 \times 10^7$	$\pm 8.55 \times 10^7$	$\pm 8.18 \times 10^7$	$\pm 8.36 \times 10^7$

n: Örnek sayısı, r: Regresyon Katsayısı, Sr: Regresyon Doğrusunun Standart Sapması, Se: Eğimin standart sapması, GA_{0.05} : Güven Aralığı

Çizelge 3. NHS'e Ait Gün İçi ve Günler Arası Regresyon Analizinin İstatistiksel Değerlendirmesi

	Gün İçi Doğruluk			Günler Arası Doğruluk
	1.Gün(n=10)	2.Gün (n=10)	3.Gün (n=10)	Günler Arası (n=30)
Eğim, a	9.01x10 ⁸	9.27x10 ⁸	9.68x10 ⁸	9.32x10 ⁸
Kesim, b	183.66	189.03	197.33	190.00
r	0.9930	0.9930	0.9930	0.9930
Sr	546.97	562.97	587.67	565.87
Se	1.04 x10 ⁸	1.07 x10 ⁸	1.12 x10 ⁸	1.07 x10 ⁸
GA _{0,05}	7.00x10 ⁸	7.20x10 ⁸	7.51x10 ⁸	7.23x10 ⁸

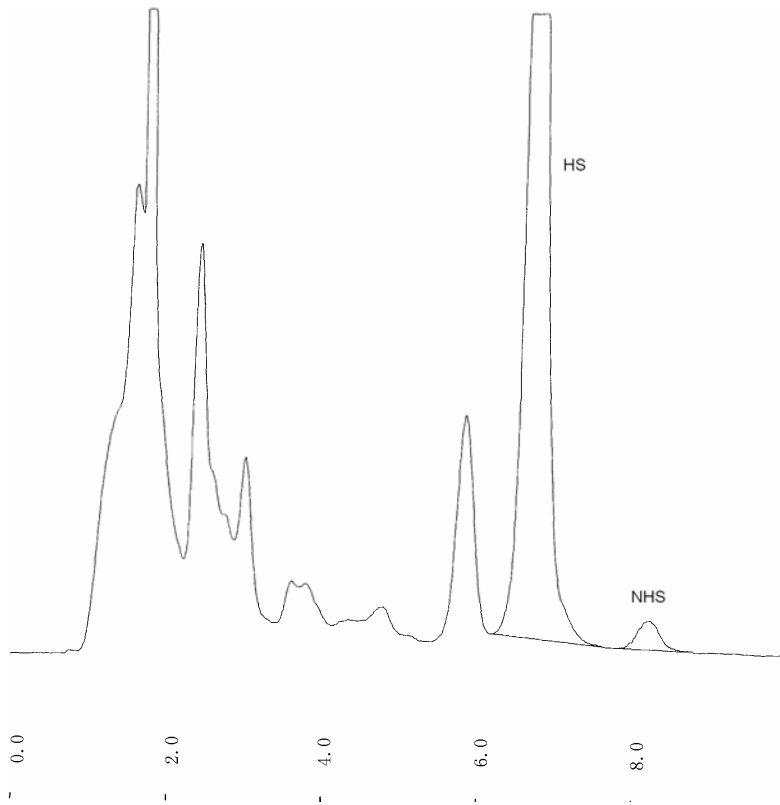
n: Örnek sayısı, r: Regresyon Katsayısı, Sr: Regresyon Doğrusunun Standart Sapması, Se: Eğimin Standart Sapması, GA_{0,05} : Güven Aralığı

HS ve NHS'in YBSK yöntemiyle saptama sınırı (Limit of detection, LOD) değerinin belirlenmesi için pik alanları dikkate alınarak sinyal/gürültü = 3 oranı, tayin sınırı (Limit of quantification, LOQ) değerinin belirlenmesi için pik alanları değerlendirilerek sinyal/gürültü = 10 oranı kullanılmıştır. Yukarıda belirtilen koşullarda yöntemin saptama sınırı HS için 1.85×10^{-6} M, NHS için 2.00×10^{-6} M olarak ve tayin sınırı da HS için 5.60×10^{-6} M, NHS için 6.07×10^{-6} M olarak bulunmuştur.

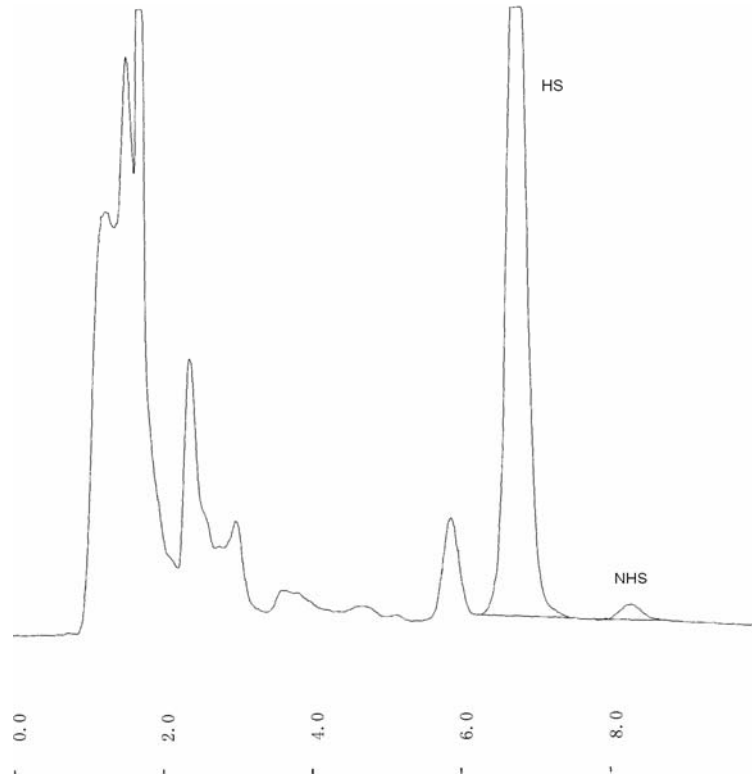
Yöntemin Örneklere Uygulanması

Yukarıda geliştirilen yöntem bazı taze turunçgil meyveleri ile bazı ticari meyve sularına uygulanmıştır. Taze turunçgil meyveleri elle sıkıldıktan sonra elde edilen meyve suları gerekli seyreltmelerden sonra 0.45 µL'lik membran filtrelerden süzülerek enjeksiyon yapılmıştır. Ticari meyve sularından turunçgiller nektarı ile parçacıklı portakal suyu da aynı işleme tabi tutulmuştur. Diğer ticari meyve suları örnekleri direkt 0.45 µL membran filtrelerden süzülerek sisteme verilmiştir.

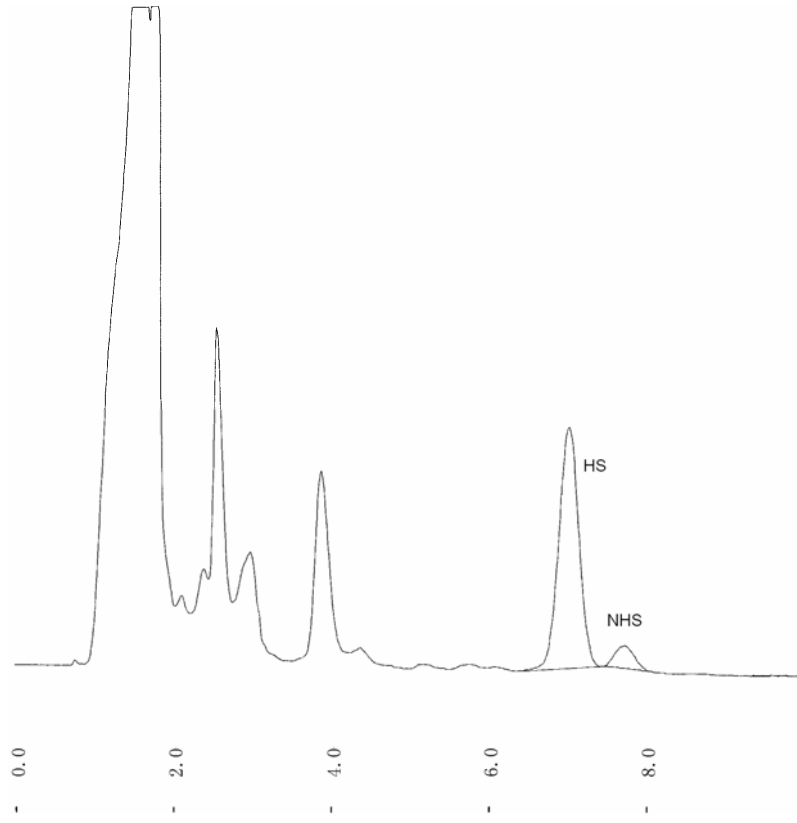
Çalışmada çeşitli kaynaklardan sağlanan 20 farklı numunenin analizi belirlenen koşullarda gerçekleştirilmiş, analizler sonucu elde edilen kromatogramların bazıları aşağıda verilmiştir.



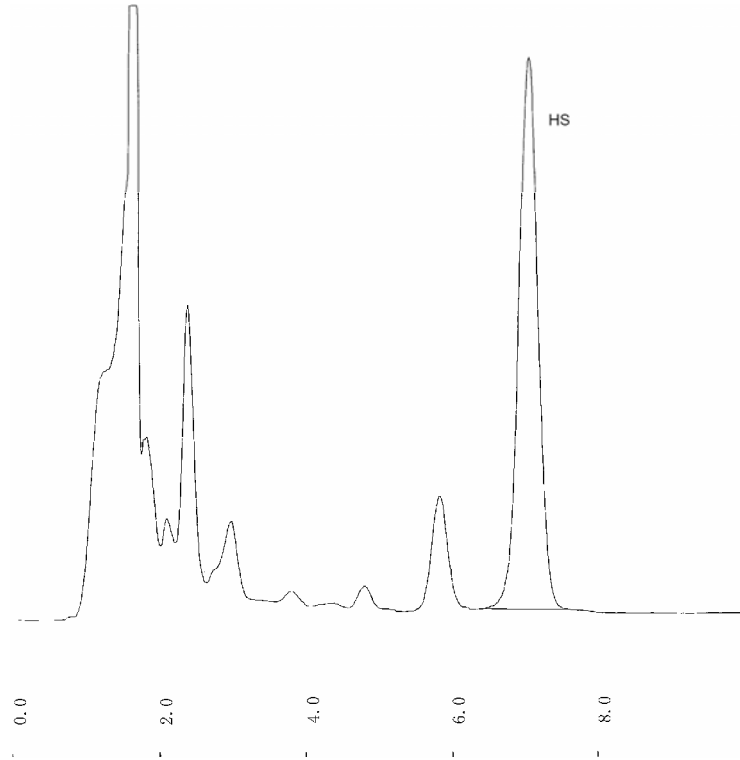
Şekil 11. Greyfurt Suyuna Ait Kromatogram



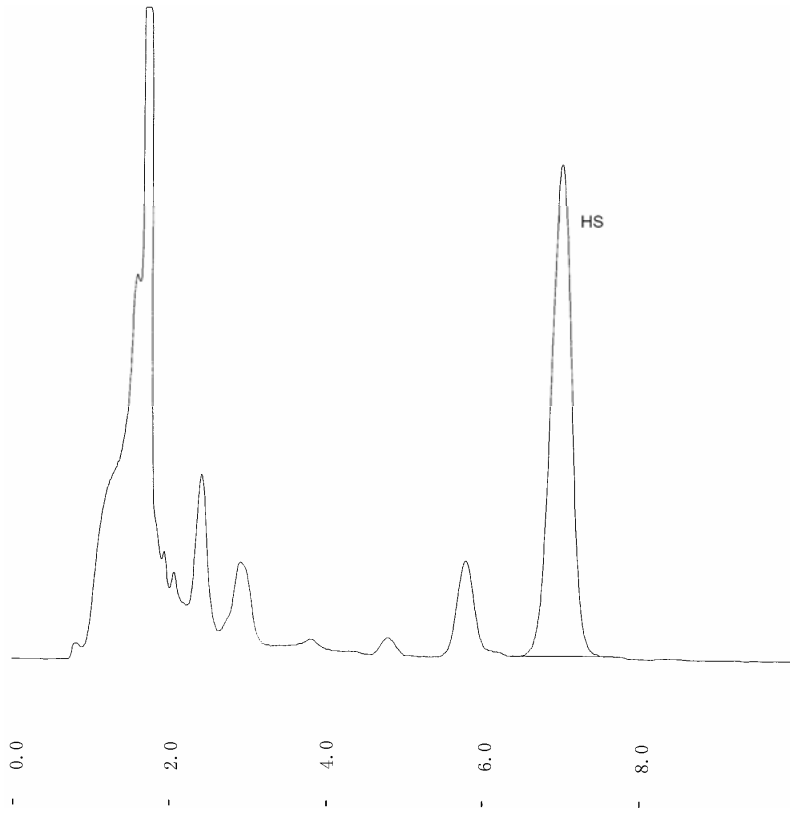
Şekil 12. Kan Greyfurtu Suyuna Ait Kromatogram



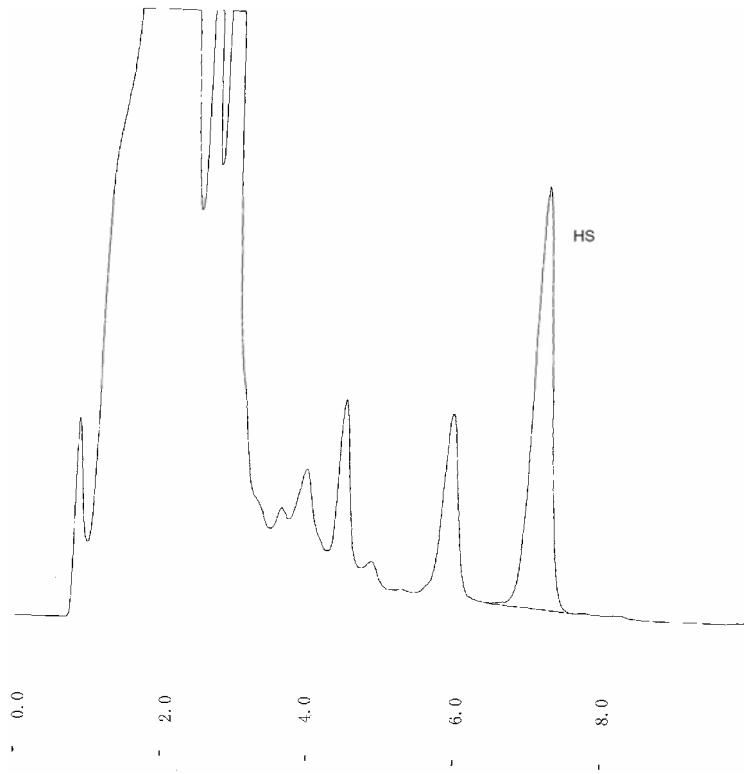
Şekil 13. Limon Suyuna Ait Kromatogram



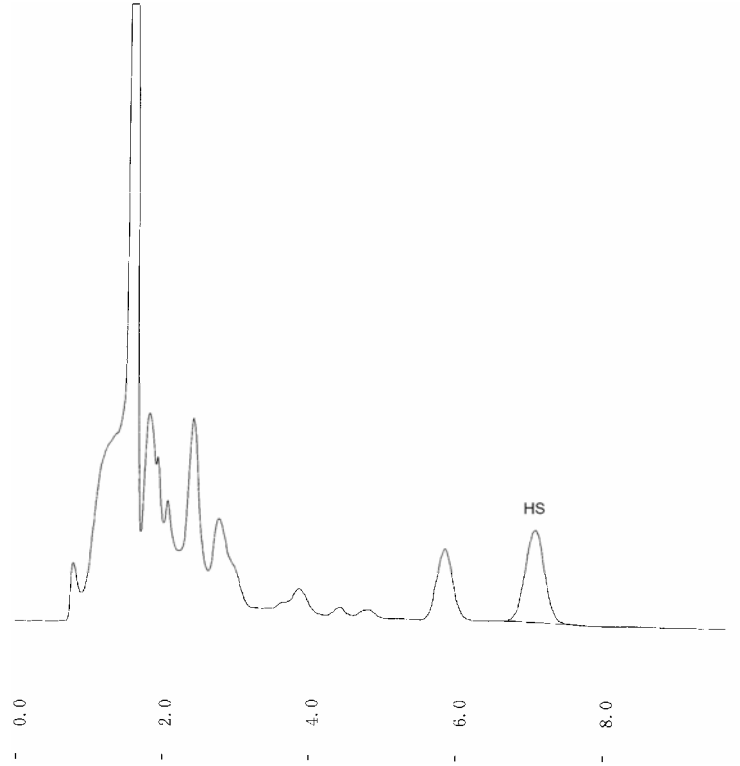
Şekil 14. Portakal (Washington) Suyuna Ait Kromatogram



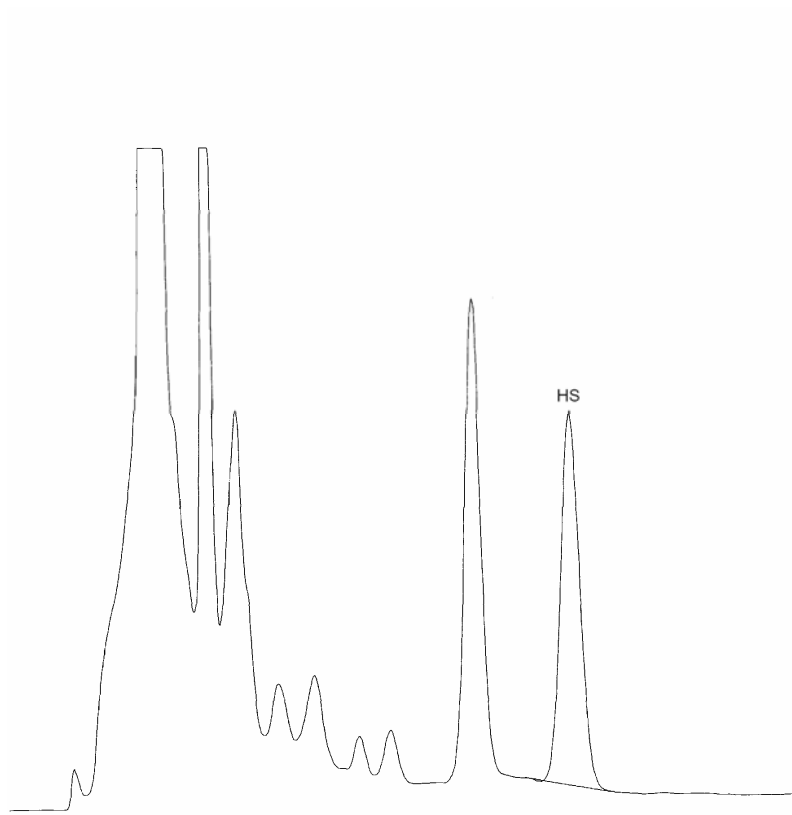
Şekil 15. Portakal (Sıkma) Suyuna Ait Kromatogram



Şekil 16. Kan Portakalı - Nar Suyuna (Tc) Ait Kromatogram



Şekil 17. Portakal (Parçacıklı) Nektarına (Tc) Ait Kromatogram



Şekil 18. %100 Portakal Suyuna (Tc) Ait Kromatogram

Kromatogramlardan elde edilen sonuçlara göre her numune içerisindeki HS ve NHS miktarları ayrı ayrı hesaplanmış ve sonuçlar Çizelge 4'te verilmiştir.

Çizelge 4. Çeşitli Taze ve Ticari Meyve Sularındaki HS ve NHS Miktarları

Numune	HS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	NHS ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Turunçgiller nektarı (Tc)	44.71	0.31
Havuç-portakal nektarı (Tc)	72.51	0.73
Tropik kokteyl (Tc)	42.14	0.14
Kan portakalı suyu	230.20	4.91
Greyfurt suyu	286.96	9.46
Mandalina (satsuma) suyu	145.30	0.00
Mandalina suyu	237.81	0.00
Limon suyu	66.00	6.60
Portakal (sıkma) suyu	138.38	0.36
Portakal nektarı (Tc)	36.17	0.22
Limon sosu (Tc)	481.56	0.00
Nar-kan portakalı suyu (Tc)	23.38	0.81
% 100 portakal suyu (Tc)	38.29	0.05
Portakal suyu (parçacıklı, Tc)	28.19	0.00
Portakal nektarı (Tc)	83.61	0.04
Portakal nektarı (Tc)	30.57	0.00
Portakal-mandalina-ananas nektarı (Tc)	27.79	0.00
Portakal-mandalina-greyfurt nektarı (Tc)	164.53	1.63
Portakal (washington) suyu	163.03	0.00
Sirke	0.00	0.00

Tc: Ticari

Numunelerin herhangi bir ön işleme gerek duyulmaksızın doğrudan baskılama yoluyla sularının çıkartılması ve başka kimyasal bir işlem yapılmadan yalnızca süzülerek alele verilmesi madde kaybının en azda tutulması açısından büyük yarar sağlamıştır.

Çizelge 4'te görüldüğü üzere, analiz edilen HS ve NHS miktarları farklı meyvelerde farklı düzeylerde bulunmaktadır. Sonuçlar incelendiğinde HS ve NHS'in taze meyve sularında daha yüksek miktarlarda bulunduğu görülmüştür. HS'in NHS'e göre daha çok üründe bulunduğu, turunçgillere acı tadı veren NHS 'in ise daha çok greyfurt ve limonda bulunduğu gözlenmiştir. Bu bulgular da literatür verileriyle uyusmaktadır.

Çizelgede bazı sonuçlar $0.00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak verilmiştir. Bu değerlere sahip olan numunelerdeki ilgili NHS miktarının mutlak yokluk yerine detekte edilemeyecek düzeyde az olarak yorumlanmasının daha sağlıklı olacağı düşünülmelidir.

Çalışmaya konu edilen ve insan sağlığı açısından yararları tartışılmayacak ölçüde büyük olan flavonoidlerden olan HS ve NHS, ülkemizde yetişen ve tüketici açısından kolay elde edilebilir turunçgillerde yüksek oranlarda bulunması oldukça sevindiricidir. Ne var ki ülkemizde üretilen ve tüketilen tüm gıda maddelerinin profilinin çıkartılabilmesi için daha ileri teknoloji çalışmalara gerek olduğu açıktır. Bu açıdan bakıldığında sunulan çalışma uzun bir araştırmanın ancak ilk basamağını oluşturmaktadır.

Toksikolojik açıdan değerlendirildiğinde ise HS'in siklooksijenaz-2 (COX-2) inhibisyonu yapma potansiyeli yüksek olduğundan özellikle kronik olarak spesifik COX-2 inhibitörü nonsteroidal antiinflamatuvar ilaçları (koksibler gibi) kullanan hastaların sürekli ve yüksek miktarda HS almaları COX-2 inhibisyonunun artması ve buna bağlı istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına yol açabilir. Kronik olarak COX-2 enziminin inhibe edilmesi tromboz gelişimi ve buna bağlı inme ve kalp krizlerini, böbrek ve karaciğer yetmezliği gelişim olasılığını arttırmaktadır (Garret ve FitzGerald, 2004; Davies ve Jamali, 2004; Warner ve Mitchell, 2004; Hirata ve ark., 2005). HS, sedatif-hipnotiklerle sinerjistik etki gösterdiğinden bu tür ilaçları kullanan hastaların yüksek miktarda HS içeren meyve sularını tüketmesi ilaca bağlı oluşan etkinin artmasına ve istenmeyen santral etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilir (Fernandez ve ark., 2005). Yüksek miktarda HS alınması antitrombotik etkisinden dolayı riskli hastalarda tromboz gelişimini önlerken pıhtılaşma problemi olanlarda ve antikoagülan tedavisi yapılan hastalarda ise kanama eğilimini arttırabilir. Ayrıca HS, bağışıklık sistemini baskılayarak antikor üretimini azalttığından, özellikle bağışıklık sistemi zayıflamış kişilerde bakterilere karşı vücut direncinin azalmasına neden olabilir (Garg ve ark., 2001). Bundan başka, HS sperm ve yumurtanın birleşmesini engelleyerek zigot oluşumunu önlediğinden çocuk yapmaya çalışan çiftlerin fazla miktarda narenciye suyu tüketmemeleri önerilebilir (Garg ve ark., 2001).

SONUÇ ve ÖNERİLER

YBSK, yüksek ayırma gücünün yanı sıra, doğruluk ve tekrar edilebilirlik gibi analizler açısından öncelik oluşturan özelliklerinden dolayı hemen her çeşit analiz için yaygın olarak kullanılan etkin bir ayırma tekniğidir. YBSK kullanımı sonucunda elde edilen sonuçlardaki istatistiksel uyum ve kesinlik, bu yöntemle ait dezavantajlar olarak bilinen çözücü maliyeti, yüksek saflıkta çözücü kullanımı ve uzun analiz süresi gibi parametreleri önemsiz kılmaktadır. Genel olarak, kullanılan detektörlere de bağlı olmak koşuluyla, çok düşük derişimlerdeki tayinlere olanak sağlaması da YBSK için ayrıca bir üstünlüktür. Bu noktada, bilim dünyasının son yıllarda üzerinde önemle durduğu ve geçerliliğini günden güne arttıran konulardan olan gıdalardaki antioksidan ve antikanserojen etkili bileşiklerin analizleri ve bu maddelerin hangi grup besinlerde hangi miktarlarda bulunduğu saptanması kolaylıkla ele alınabilir hale gelmiştir.

YBSK tekniği kullanarak antioksidan ve antikanserojen olan HS ve NHS turunçgiller içindeki miktarının saptanması çalışmalarına yöntem geliştirme aşaması ile başlanmıştır. Tayin için özgün bir analiz yönteminin geliştirilebilmesi için hareketli faz seçimi, uygun analiz koşulların belirlenmesi, yöntem geçerliliğinin araştırılması ve geliştirilen yöntemin numunelere uygulanması gibi birçok safhada yürütülen çalışmalar sonucunda özgün değeri yüksek ve uygulamada pratik bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Bu önerilen yöntem daha geniş türlerde ve besin gruplarında HS ve NHS tayini yapmaya yönelik rutin laboratuvar çalışmalarında uygulanabilir.

KAYNAKLAR

- Ameer, B., Wintraub, RA., Johnson, JV., Yost, RA., Rouseff, RL., Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 60, 34-40 (1996)
- Bae, EA., Han, MJ., Lee, M., Kim, DH., In vitro inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity, *Biol. Pharm. Bull.*, 23, 1122-1124 (2000)
- Barthe, GA., Jourdan, PS., McIntosh, CA., Mansell, RL., Radioimmunoassay for the quantitative determination of hesperidin and analysis of its distribution in *Citrus sinensis*, *Phytochemistry*, 27, 249-254 (1988)
- Belajová, E., Suhaj, M., Determination of phenolic constituents in citrus juices: Method of high performance liquid chromatography, *Food Chem.*, 86 (3), 339-343 (2004)
- Chen, Y., Shen, S., Lin, H., Rutinoid at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids, *Biochem. Pharm.*, 66, 1139-1150 (2003)
- Damon, M., Elandre, O., Michel, F., Labrid, C., Crastes de Paulet, A., Effect of chronic treatment with a purified flavonoid fraction on inflammatory granuloma in the rat. Study of prostaglandin E2 and F2 alpha and thromboxane B2 release and histological changes, *Arzneimittelforsch*, 37, 1149-1153 (1987)
- Davies, N.M., Jamali, F., COX-2 selective inhibitors cardiac toxicity: getting to the heart of the matter, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, 7 (3), 332-336 (2004)
- Del Caro, A., Piga, A., Vacca, V., Agabbio, M., Changes in flavonoids, vitamin C and antioxidant capacity in minimally processed citrus segments and juices during storage, *Food Chem.*, 84 (1), 99-105 (2004)
- Del Rio, J.A., Fuster, M.D., Gomez, P., Porrás, I., Garcia-Lidon, A., Ortuno, A., Citrus limon: a source of flavonoids of pharmaceutical interest, *Food Chem.*, 84 (3), 457-461 (2004)
- Deng, W., Fang X., Wu, J., Flavonoids function as antioxidants: By scavenging reactive oxygen species or by chelating iron?, *Radiat. Phys. Chem.*, 50 (3), 271-276 (1997)
- El-Shafae, A.M., El-Domiaty, M.M., Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plant extracts and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 26, 539-545 (2001)
- Erlund, I., Meririnne, E., Alfthan, G., Aro, A., Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperitin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice, *Human Nutrition and Metabolism*, 131, 235-241 (2001)
- Fernandez, S. P., Wasowski, C., Paladini, A. C., Marder, M., Synergistic interaction between hesperidin, a natural flavonoid, and diazepam, *Eur. J. Pharmacol.*, 512 (2-3), 189-198 (2005)
- Franke, AA., Cooney, RV., Custer, LJ., Mordan, LJ., Tanaka, Y., Inhibition of neoplastic transformation and bioavailability of dietary flavonoid agents, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 439, 237-248 (1998)

- Garg, A., Garg, S., Zaneveld, L.J.D., Singla, A.K., Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin, *Phytother. Res.*, 15, 655-669 (2001)
- Garret, A., FitzGerald, M.D., Coxibs and cardiovascular disease, *N. Engl. J. Med.*, 351 (17), 1709-1711 (2004)
- Giovannucci, E., Tomatoes, tomato-based products, lycopene, and cancer: review of the epidemiologic literature, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 317-331 (1999)
- Grohmann, K., Manthey, J.A., Cameron, R.G., Acid-catalyzed hydrolysis of hesperidin at elevated temperatures, *Carbohydr. Res.*, 328 (2), 141-146 (2000)
- He, X., Lian, L., Lin, L., Bernart, M.W., High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.), *J. Chromatogr. A.*, 791, 127-134 (1997)
- Hirata A, Murakami Y, Shoji M, Kadoma Y, Fujisawa S., Kinetics of radical-scavenging activity of hesperetin and hesperidin and their inhibitory activity on COX-2 expression, *Anticancer Res.*, 25 (5), 3367-3374 (2005)
- Jeong, H.J., Shin, Y.G., Kim, I.K., Tezzuto, J.M., Inhibition of aromatase activity by flavonoids, *Arch. Pharm. Res.*, 22, 309-312 (1999)
- Justesen, U., Arrigoni, E., Larsen, B.R., Amado, R., Degradation of Flavonoid Glycosides and Aglycones During *in vitro* Fermentation with Human Faecal Flora, *Lebensm. Wiss. Technol.*, 33 (6), 424- 430 (2000)
- Kanaze, F.I., Gabrieli, C., Kokkalou, E., Georgarakis, M., Niopas, I., Simultaneous reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the determination of diosmin, hesperidin ve naringin in different citrus fruit juices and pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33, 243-249 (2003)
- Kanaze, F.I., Kokkalou, E., Georgarakis, M., Niopas, I., A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of the citrus flavanone aglycones hesperetin and naringenin in urine, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 36 (1), Pages 175-181 (2004)
- Kanaze, F.I., Kokkalou, E., Georgarakis, M., Niopas, I., Validated high-performance liquid chromatographic method utilizing solid-phase extraction for the simultaneous determination of naringenin and hesperetin in human plasma, *J. Chromatogr. B.*, 801 (2), 363-367 (2004)
- Kawaguchi, K, Mizuno, T., Aida, K., Uchino, K., Hesperidin as an inhibitor of lipases from porcine pancreas and *Pseudomonas*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 102-104 (1997)
- Kawaguchi, K., Kikuchi, S., Takayanagi, K., Yoshikawa, T., Kumazawa, Y., Colony stimulating factor inducing activity of hesperidin, *Planta. Med.*, 65, 365-366 (1999)
- Kim, DH.,Jung, EA., Sohng, IS., Han, JA., Intestinal bacterial metabolism of flavonoids and its relation to some biological activities, *Arch. Pharm. Res.*, 21, 17-23 (1998)

- Kim, M., Kometani, T., Okada, S., Shimizu, M., Permeation of hesperidin glycosides across Caco-2 cell monolayers via the paracellular pathway, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 63, 2183-2188 (1999)
- Knekt, P., Kumpulainen, J., Jarvinen, R., Rissanen, H., Heliövaara, M., Reunanen, A., Hakulinen, T., Aromaa, A., Flavonoid intake and risk of chronic diseases, *Am. J. Clin. Nutr.*, 76, 560-568 (2002)
- Kohno, H., Taima, M., Sumida, T., Azuma, Y., Ogawa, H., Tanaka, T., Inhibitory effect of mandarin juice rich in β -cryptoxanthin and hesperidin on 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced pulmonary tumorigenesis in mice, *Cancer Lett.*, 174 (2), 141-150 (2001)
- Kometani, T., Nishimura, T., Nakae, T., Takii, H., Okada, S., Synthesis of neohesperidin glycosides and naringin glycosides by cyclodextrin gluconotransferase from an alkalophilic *Bacillus* Species, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 60, 645-649 (1996)
- Kometani, T., Terada, Y., Nishimura, T., Takii, H., Okada, S., Transglycosylation of hesperidin by cyclodextrin glucotransferase from an alkalophilic *Bacillus* Species in alkaline pH and properties of hesperidin glycosides, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 58, 1190-1194 (1994)
- Koyunku, H., Berkada, B., Baykut F., Preventive effect of hesperidin against inflammation in CD-1 mouse skin caused by tumor promoter, *Anticancer Res.*, 19, 3237-3241 (1999)
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A.E., Etherton, T.D., Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer, *The American J. Of Med.*, 113, 71-88 (2002)
- Labib, S., Erb, A., Kaus, M., Wickert, T., Richling, E., The Pig Caecum Model: A Suitable Tool to Study the Intestinal Metabolism of Flavonoids, *Mol. Nutr. Food Res.*, 48, 326-332 (2004)
- Lee, H.S., Kim, J.G., Effects of debittering on red grapefruit juice concentrate, *Food Chem.*, 82 (2), 177-180 (2003)
- Li, X., Xiao, H., Liang, X., Shi, D., Liu, J., LC-MS/MS determination of naringin, hesperidin and neohesperidin in rat serum after orally administering the decoction of *Bulpleurum falcatum* L. and *Fractus aurantii*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34, (1), 159-166 (2004)
- Malterud, K.E., Rydland, K.M., Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel, *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5576-5580 (2000)
- Matos, H.R., Di' Mascio, P., Medeiros, M.H.G., Protective effect of lycopene on lipid peroxidation and oxidative DNA damage in cell culture, *Archives of Biochem. And Biophysics*, 383, 56-59 (2000)
- Meyer, O.C., Safety and security of Daflon[®] 500 mg in venous insufficiency and haemorrhoids diseases, *Angiology*, 45, 579-584 (1994)

- Miyake, Y., Minato, K., Fukumoto, S., Yamamoto, K., Oya-Ito, T., Kawakishi, S., Osawa, T., New Potent Antioxidative Hydroxyflavonones Produced with *Aspergillus saitoi* from Flavanone Glycoside in Citrus Fruit, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 67 (7), 1443-1450 (2003)
- Morita, O., Sasaki, H., Sato, S., Calcium antagonists containing phenols, Patent Japan Kokai Tokkyo Koho, 04 243, 822 (1992)
- Mouly, P., Gaydou, E. M., Auffray, A., Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography, *J. Chromatogr. A*, 800 (2), 171-179 (1998)
- Nogata, Y., Sakamoto, K., Shiratsuchi, H., Ishii, T., Yano, M., Ohta, H., Flavonoid composition of fruit tissues of Citrus species, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70 (1), 178-192 (2006)
- Ortuño, A., Reynaldo, I., Fuster, M.D., Botía, J, Puig, D.G., Sabater, F., Lidón, A.G., Porras, I., Del Río, J.A., Citrus cultivars with high flavonoid contents in the fruits, *Sci. Hortic.*, 68 (1-4), 231-236 (1997)
- Peng, Y., Liu, F., Ye, J., Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Fructus aurantii* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *J. Chrom. B.*, 830, 224-230 (2006)
- Peterson, J., Beecher, G.R., Bhagwat, S.A., Dwyer, J.T., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D.B., Holden, J.M., Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature, *J. Food Compost. Anal.*, 19 (1), S74-S80 (2006)
- Peterson, J., Beecher, G.R., Bhagwat, S.A., Dwyer, J.T., Gebhardt, S.E., Haytowitz, D.B., Holden, J.M., Flavanones in oranges, tangerines (mandarins), tangors, and tangelos: a compilation and review of the data from the analytical literature, *J Food Compost Anal.*, 19 (1), S66-S73 (2006)
- Philp, H., Hot flashes - a review of the literature on alternative and complementary treatment approaches, (*Altern. Med. Rev.*) 8 (3), 284-302 (2003)
- Pupin, A.M., Dennis, M.J., Toledo, A.C.F., Flavanone glycosides in Brazilian orange juice, *Food Chem.*, 61 (3), 275-280 (1997)
- Rao, A.V., Agarwal, S., Role of lycopene as antioxidant carotenoid in the prevention of chronic diseases: a review, *Nutr. Res.*, 19, 305-323 (1999)
- Ross, A.S., Ziska, D.S., Zhao, K., ElSohly, M.A., Variance of common flavonoids by brand of grapefruit juice, *Fitoterapia*, 71 (2), 154-161 (2000)
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., Giacchi, M., De Pasquale, A., Bonina, F., Influence of different penetration enhancers on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effects of flavonoids, *Int. J. Pharm.*, 175, 85-94 (1998)
- Tanaka, T., Makita, H., Kawabata, K., Mori, H., Chemoprevention of azoxymethane-induced rat colon carcinogenesis by the naturally occurring flavonoids, diosmin and hesperidin, *Carcinogenesis*, 18, 957-965 (1997)
- Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Hirose, Y., Chemoprevention of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and

hesperidin: Comparison with protective effects of beta carotene, *Cancer Res.*, 54, 4653-4659 (1994)

Tommasini, S., Calabro, M.L., Stancanelli, R., Donato, P., Costa, C., Catania, S., Villari, V., Ficarra, P., Ficarra, R., The inclusion complexes of hesperitin and its 7-rhamnoglucoside with (2-hidroxypropyl)- β -cyclodextrin, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 39, 572-580 (2005)

Tsai, T.H., Liu, M.C., Determination of extracellular hesperidin in blood and bile of anaesthetized rats by microdialysis with high-performance liquid chromatography: a pharmacokinetic application, *J. Chromatogr. B*, 806, 161-166 (2004)

Uchiyama, M., Kim, I.H., Kawahara, N., Goda, Y., HPLC separation of hesperidin and the C-2 epimer in commercial hesperidin samples and herbal medicines, *Chirality*, 17, 373-377 (2005)

Vanamala, J., Reddivari, L., Yoo, K. S., Pike, L. M., Patil, B. S., Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices, *J. Food Compos. Anal.*, 19 (2-3), 157-166 (2006)

Warner, T.D., Mitchell, J.A., Cyclooxygenases: new forms, new inhibitors, and lessons from the clinic, *The FASEB Journal*, 18, 790-804 (2004)

Wu, T., Guan, Y., Ye, J., Determination of flavonoids and ascorbic acid in grapefruit peel and juice by capillary electrophoresis with electrochemical detection, *Food Chem.*, 12, 1-7 (2005)

Xia, J., Kotani, A., Hakamata, H., Kusu, F., Determination of hesperidin in *Pericarpium Citri Reticulatae* by semi-micro HPLC with electrochemical detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1-5 (2006)

Yang, M., Tanaka, T., Hirose, Y., Deguchi, T., Mori, H., Kawadan, Y., Chemopreventive effects of diosmin and hesperidin on N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine induced urinary bladder carcinogenesis in male ICR mice, *Int. J. Can.*, 73, 719-724 (1997)