



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SALVIA MARASHICA* BİTKİSİNİN BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN  
BELİRLENMESİ**

Ecz. Sibel KIRAN AYDIN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Programı

DANIŞMAN

Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU

2.DANIŞMAN

Doç. Dr. Abdülislam ERTAŞ

İSTANBUL-2017



REPUBLIC OF TURKEY  
BEZMIALEM VAKIF UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

**DETERMINATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS OF THE PLANT  
*SALVIA MARASHICA***

Sibel KIRAN AYDIN  
MASTER THESIS

Pharmacognosy and Natural Products Chemistry Program

SUPERVISOR  
Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU

Second Supervisor  
Assoc. Prof. Dr. Abdülislam ERTAŞ

ISTANBUL-2017

## TEZ ONAY FORMU

**Kurum** : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**Program Seviyesi** : Yüksek Lisans ( X )      Doktora ( )

**Anabilim Dalı** : Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası

**Tez Sahibi** : Ecz. Sibel Kıran Aydın

**Tez Başlığı** : *Salvia marashica* bitkisinin biyoaktif bileşiklerinin belirlenmesi

imza

**Jüri Başkanı ( Danışman)** : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU .....

**Üye** : Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN .....

**Üye** : Prof. Dr. Murat KARTAL .....

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıda belirtilen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun ...../...../..... tarih ve ..... /..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Semra Özçelik  
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

### Thesis Approval Form

Institute : Bezmialem Vakıf University , Institute of Health Sciences

Level of Programme : Master ( X )    Doctorate (   )

Department : Pharmacognosy and Natural Products Chemistry

Student : Sibel KIRAN AYDIN

Title of the Thesis : Determination of bioactive compounds of the plant *Salvia marashica*

		Signature
<b>President of the Jury</b>	: Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU	.....
<b>Member</b>	: Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN	.....
<b>Member</b>	: Prof. Dr. Murat KARTAL	.....

This thesis was approved by the jury stated above in accordance with the related rules of the Postgraduate Education and Training Guide of Bezmialem Vakıf University , and approved by Administrative Board with the decision dated ...../ ...../..... and numbered ..... / .....

Prof. Dr. Semra Özçelik M. D.  
Director of Institute of Health Sciences

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Ecz. Sibel KIRAN AYDIN

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca her konuda desteğini esirgemeyen, yol gösteren ve bilgi birikimini sabırla paylaşarak bu tezin oluşmasını sağlayan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya saygı ve şükranlarımı sunarım.

Değerli bilgilerini, deneyimlerini ve fikirlerini paylaşarak bilimsel çalışmalarına yön veren, laboratuvar çalışmalarında benimle sabırla ilgilenen, anlayış ve hoşgörüsüyle çalışmalarımı destekleyen çok değerli hocam Sayın Doç. Dr. Abduselam Ertaş'a, en az yardımcı danışmanım kadar benimle ilgilenen, laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında sabırla desteklerini esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Boğa'ya, sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım sırasında desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Öztekin Algül'e içten teşekkürlerimi sunarım. *Salvia marashica* bitkisinin toplanmasını sağlayan Yrd. Doç. Dr. Serpil Demirci'ye ve fotoğraflayan Arş. Gör. Tolga Ok'a çok teşekkür ederim. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki başlangıç çalışmalarında bana yardımcı olan Öğr. Gör. Yunus Bektay'a, tez yazımı sırasında sabır ve anlayışıyla yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Burcu Çulhaoğlu'na çok teşekkür ederim. Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'ndeki çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Arş. Gör. Hilal Saruhan Fidan'a, Arş. Gör. Evin Aygün Tuncay'a ve Arş. Gör. Esra Yariş'e çok teşekkür ederim. Her daim yanımda olan, desteğini esirgemeyen eşim Tefvik Aydın'a, kızım Eylül Aydın'a ve oğlum Mem Aren Aydın'a; hayatımdaki en büyük destekçilerim olan babama anneme ve tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

	SAYFA
<b>KAPAK</b>	
<b>İÇ KAPAK</b>	
<b>ONAY SAYFASI</b>	
<b>BEYAN SAYFASI</b>	
<b>TEŞEKKÜR</b>	vi
<b>İÇİNDEKİLER</b>	vii
<b>SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ</b>	x
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	xi
<b>TABLOLAR DİZİNİ</b>	xiii
<b>RESİMLER</b>	xiii
<b>ÖZET</b>	xv
<b>ABSTRACT</b>	xvi
<b>GİRİŞ</b>	1
<b>Tezin Amacı</b>	1
<b>GENEL BİLGİLER</b>	1
<b><i>Salvia marashica</i> Bitkisinin Familyası, Cins, Tür Özellikleri ve Halk Arasındaki Kullanımı</b>	
<b><i>Familya Özellikleri</i></b>	1
<b><i>Cins Özellikleri</i></b>	2
<b><i>Tür özellikleri</i></b>	3
<b><i>Adaçayının Halk Arasındaki Kullanımı</i></b>	8
<b>SEKONDER METABOLİTLER</b>	11
<b>Terpenler</b>	13
<b><i>Monoterpenler</i></b>	14
<b><i>Seskiterpenoitler</i></b>	15
<b><i>Diterpenoitler</i></b>	15

<i>Abietan Diterpenoitler</i>	15
<i>Klerodan Diterpenoitler</i>	16
<i>Labdan ve Pimarane Diterpenoitler</i>	17
<b>Sesterterpenoitler</b>	18
<b>Triterpenoitler</b>	19
<b>Tetraterpenler(Karotenler)</b>	20
<b>Fenolik Bileşikler</b>	21
<b>Flavonoitler</b>	22
<b>ANTIÖKSİDANLAR</b>	25
<b>Antioksidanların Sınıflandırılması</b>	29
<i>Birincil Antioksidanlar</i>	29
<i>İkincil Antioksidanlar</i>	31
<b>ANTİKOLİNESTERAZLAR</b>	32
<b>Alzheimer Hastalığı ve Nedenleri</b>	32
<i>AChE ve BChE İnhibitörleri</i>	33
<i>Kolinesteraz İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığındaki Mekanizması</i>	33
<i>Asetilkolin nörotransmitter</i>	34
<i>Glutamat</i>	35
<b>SİTOTOKSİK AJANLAR</b>	35
<b>GEREÇ ve YÖNTEM</b>	35
<b>Kimyasal Maddeler ve Çözücüler</b>	35
<b>Çözeltilerin Hazırlanması</b>	36
Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler	36
Toplam flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler	37
Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler	37
Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler	37
İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi	38



<b>Cihazlar ve Gereçler</b>	38
<b>Aktivite testleri</b>	39
<b>Antioksidan/Antiradikal Aktivite Testleri</b>	39
<b>Elektron ve Hidrojen Transferine Göre Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri</b>	39
<b>Toplam Fenolik Miktarının Belirlenmesi</b>	39
<b>Toplam Flavonoid Miktarının Belirlenmesi</b>	40
<b><i>β – Karoten Linoleik Asit Yöntemi (Lipit Peroksidasyon İnhibisyon Aktivitesi )</i></b>	40
<b><i>DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi</i></b>	41
<b>ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi</b>	42
<b>CUPRAC Yöntemi</b>	42
<b>Antikolinesteraz Aktivite Testi</b>	43
<b>AchE İnhibisyon Aktivite Testi</b>	43
<b>BChE Aktivite Testi</b>	44
<b><i>Reaktiflerin Hazırlanması ve Testin Yapılışı</i></b>	44
<b>MTT Testi ile Sitotoksitenin Belirlenmesi</b>	45
<b>Kullanılan Kromatografik Yöntemler</b>	46
<b>Kolon Kromatografisi</b>	46
<b>İnce Tabaka Kromatografisi</b>	46
<b>Kullanılan Spektroskopik Yöntemler</b>	46
<b>NMR (Nükleer Magnetik Rezonans )Spektroskopisi</b>	46
<b>Kütle Spektroskopisi</b>	47
<b>LC-MS/MS Çalışma Şartları</b>	47
<b>Bitkinin Ekstre Edilmesi</b>	48
<b>BULGULAR</b>	48
<b>Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Miktar Tayini Sonuçları</b>	48
<b>Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları</b>	50
<b><i>β –Karoten Renk Açılımı Yöntemi Sonuçları</i></b>	50
<b><i>DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları</i></b>	50

<i>ABTS Katyon Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları</i>	51
<i>CUPRAC Antioksidan Aktivite Sonuçları</i>	52
<b>Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları</b>	52
<b>Sitotoksik Aktivite Sonuçları</b>	53
<b>LC-MS/MS ile Fenolik Bileşiklerin Kalitatif ve Kantitatif Analizi</b>	54
<b>LC-MS/MS ile Çalşılan Aseton ve Metanol Ekstrelerinin Kantitatif Analizi</b>	55
<b>Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri</b>	58
<b>SMM-3-2 (3-<math>\beta</math>-hidroksiabieta-8,11,13-tri-en)</b>	58
<b>SMA-29-30_1 (3<math>\beta</math>-hidroksi,18-acetoxymethylene-abieta-8,11,13-trien)</b>	64
<b>SMM-6 (<math>\alpha</math>-amiriltetracosanoate)</b>	67
<b>SMM-7-1-a (oleanolic acid)</b>	71
<b>SMM-7-1-b (ursolic acid)</b>	77
<b>SMM-15-1 ve SMM-15-2_1 (<math>\beta</math> -sitosterol)</b>	82
<b>SMM-15-2_4, SMA-41-43_1 ve SMA_44_48_1 (Lupeol)</b>	87
<b>SMA-27-2 (3-acetyl lupeol)</b>	93
<b>SMA-32-35-1 ve SMA-37-38_3 (lup-12,20(29)-dien )</b>	97
<b>TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	102
<b>KAYNAKÇA</b>	104
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	108

## **SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ**

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
Ac	: Aseton
A•	: Antioksidan radikaller
AH	: Birincil antioksidanlar
APT	: Attached proton test
BCh	: Butirilkolin
BChE/BuChE	: Butirilkolinesteraz enzimi
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
Cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece

dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FCR	: Folin Ciocalteu fenol reaktifi
g	: Gram
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
HMQS	: Heteronuclear multiple quantum coherence (HSQC)
IR	: Infrared spektroskopisi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
ln	: Doğal logaritma
L	: Litre
ln	: Doğal logaritma
m	: Metre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
M	: Molar
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
O <sub>2</sub> •	: Süperoksit radikali
OH•	: Hidroksil radikali
PEs	: Pirokatekole eşdeğer
Q	: Kersetin
QEs	: Kersetine eşdeğer
ppm	: Milyonda bir birim
R•	: Alkil radikalleri
RO•	: Alkoksi radikalleri
ROO•	: Peroksit radikalleri
ROOH	: Hidroperoksitler
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
RS•	: Tiyil radikalleri
RSO•	: Sülfenil radikalleri
RSO <sub>2</sub> •	: Tiyil peroksit radikalleri
s	: Saat
SMA	: <i>Salvia marashica</i> 'nın aseton+ diklorometan ekstresi
SMM	: <i>Salvia marashica</i> 'nın metanol ekstresi
sp	: Subspecies
TMS	: Tetrametilsilan
TOC	: α-Tokoferol
Tween-40	: Polioksietilensorbitan monopalmitat
UV	: Ultraviyole spektroskopisi

<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
<b>Şekil 1.</b> <i>Salvia marashica</i> çiçek kısımlarının çizimleri	4
<b>Şekil 2.</b> Harita Üzerinde Dağılım	6
<b>Şekil 3.</b> Sekonder Metabolitlerin Oluşum Mekanizması	12
<b>Şekil 4.</b> Triterpenlerin oluşum mekanizması	14
<b>Şekil 4.1.</b> <i>Salvia</i> türlerinden elde edilen seskiterpen örnekleri	15
<b>Şekil 4.2.</b> <i>Salvia pomifera</i> ve <i>Salvia hypergeia</i> 'dan elde edilen abietan diterpen örnekleri	16
<b>Şekil 4.3.</b> Melisodorik asit bileşiği	16
<b>Şekil 4.4.</b> 7 $\beta$ -hidroksisandrokopimarik asit ve 14-okso-pimarik asit bileşikleri	17
<b>Şekil 4.5.</b> Manoiloksit, isopimarik asit, 7-okso- 13- epi-pimaron-8,15-dien-18-oik asit	17
<b>Şekil 4.6.</b> Salvilösolit metil ester ve salvilökolit -6,23-lakton bileşikleri	18
<b>Şekil 4.7.</b> Yosgadensolit A ve Yosgadensolit B Bileşikleri	18
<b>Şekil 4.8.</b> 6-dehidroksiyosgadensenol ve 6-dehidroksi-13-epi-yosgadensenol	19
<b>Şekil 4.9.</b> <i>Salvia</i> türlerinden elde edilen bazı triterpenler	19
<b>Şekil 4.10.</b> Salvilymiton ve Salvilymitol	20
<b>Şekil 4.11.</b> $\beta$ -Karoten bileşiği	20
<b>Şekil 4.12.</b> Flavonoitlerin benzoil ve Sınamoil halkası	23
<b>Şekil 4.13.</b> Flavonoitlerin yapılarında substitüenlerin en yaygın yerleşme pozisyonları	24
<b>Şekil 4.14.</b> Flavonoit iskeletleri	24
<b>Şekil 5.</b> Antioksidanların sınıflandırılması	26
<b>Şekil 5.1.</b> Bütillenmiş hidroksianisol ,bütillenmiş hidroksi toluen, propil gallat, tersiyer bütıl hidrokinon, Vitamin E, sentetik antioksidan bileşikleri	28
<b>Şekil 5.2.</b> İkincil antioksidanlar	32
<b>Şekil 6.</b> Pirokatekolün ölçü grafiği	49

Şekil 7. Kersetinin ölçü grafiği	49
Şekil 8. Ekstrelerin $\beta$ -Karoten renk açılımı yönteminde % inhibisyon	50
Şekil 9. Hazırlanan ekstrelerin DPPH serbest radikal giderme yönteminde % inhibisyonu	51
Şekil 10. Hazırlanan ekstrelerin ABTS katyon radikali giderme yönteminde % inhibisyonu	51
Şekil 11. Hazırlanan ekstrelerin CUPRAC aktivite sonuçları	52
Şekil 12. Ekstrelerin canlı hücre serisi (Fibroblast+L929) üzerinde sitotoksik aktiviteleri	53
Şekil 13. Ekstrelerin kanserli akciğer hücre serisi (A549) üzerinde sitotoksik aktiviteleri	54
Şekil 14. LC-MS/MS kalibrasyon noktası standart kromatogramı	57
Şekil 15. Diklorometan+ Aseton ekstresinin LC-MS/MS kromatogramı	57
Şekil 16. Metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramı	58
Şekil 17. 3- $\beta$ -hidroksiabieta-8,11,13-tri-en	58
Şekil 18. 3 $\beta$ -hidroksi,18-acetoxymethylene-abieta-8,11,13-trien	64
Şekil 19. $\alpha$ -amiriltetracosanoate	67
Şekil 20. Oleanolik asit bileşiği	71
Şekil 21. Ursolik asit bileşiği	77
Şekil 22. $\beta$ -sitosterol bileşiği	82
Şekil 23. Lupeol bileşiği	87
Şekil 24. Lupeol-3-asetat bileşiği	93
Şekil 25. lup-12,20(29)-dien	97

## TABLolar DİZİNİ

## SAYFA

<b>Tablo 1.</b> Terpenlerin Sınıflandırılması	13
<b>Tablo 2.</b> Taşıdıkları Karbon Atomu Sayısına Göre Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	21
<b>Tablo 3.</b> Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoit Miktarları	49
<b>Tablo 4.</b> Ekstrelerin $\beta$ -Karoten, DPPH ve ABTS Yöntemlerine Göre Antioksidan Aktiviteleri	50
<b>Tablo 5.</b> CUPRAC Yöntemine Göre Antioksidan Aktiviteleri	52

<b>Tablo 6.</b> Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları	53
<b>Tablo 7.</b> LC-MS/MS Analiz metoduna ait parametreler	55
<b>Tablo 8.</b> Aseton ve Metanol ekstralarının LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi	56

<b>RESİMLER</b>	<b>SAYFA</b>
<b>Resim 1.</b> <i>Salvia marashica</i> (holotip) görünümü	4
<b>Resim 2.</b> <i>Salvia marashica</i> .Mikroskop altında kaliks tiplerinin siyah başlı salgı tüyleri	5
<b>Resim 3</b> <i>Salvia marashica</i> A. İlçim, F.Celep & Doğan	7
<b>Resim 4</b> <i>Salvia marashica</i> çiçeklenme durumu	7
<b>Resim 5.</b> <i>Salvia marashica</i> çiçek görünümü	8
<b>Resim 6.</b> <i>Salvia marashica</i>	8

## ÖZET

*Salvia* türleri terpenik bileşikler açısından zengin olan Lamiaceae familyasına aittirler. Dünyada 900'ü aşkın, Türkiye'de ise 100'ü aşkın *Salvia* türü doğal olarak yetişmektedir. Bu 100 türün 53'ü endemiktir. *Salvia* türlerinin kimyasal yapısı yurt içi ve yurt dışında birçok araştırmacı tarafından incelenmektedir.

*Salvia* türleri terpenoitler ve steroidlerin yanı sıra, flavonoidler ve diğer fenolik bileşikler gibi sekonder metabolitlerce de zengindirler. Özellikle taşıdıkları di- ve triterpenlerden dolayı antiinflamatuar, antiviral, hepatotoksik, sitotoksik-antitümör aktiviteleri olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında taşıdıkları flavonların antioksidan ve antimikrobiyal etkilerinin olduğu da bilinmektedir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *Salvia marashica* İlçim, Celep & Doğan, bitkisinin toprak üstü kısımlarının diklorometan ile aseton ve metanol ekstraktları hazırlandı. Bu ekstraktların toplam fenolik miktarları pirokatekol ve toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildi ve antioksidan aktiviteleri lipid peroksidasyonu inhibisyonu ( $\beta$ -karoten renk açılımı) ve DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, ABTS katyon radikali giderimi ve CUPRAC yöntemleriyle incelenmiştir. Antikolinesteraz aktivitesi ise spektrofotometrik bir yöntemi olan Ellman metodu kullanılarak asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirikolinesteraz (BuChE) enzimlerine karşı invitro olarak belirlendi. Her iki *Salvia marashica* ekstresinin başlıca sekonder metabolitlerini oluşturan di- ve triterpenoitler, flavonoidler ve steroid yapıdaki bileşikler izole edilerek saflaştırıldı, saf bileşiklerin yapıları çeşitli spektroskopik (başlıca NMR, MS ve UV) yöntemlerle tayin edildi. Sonuçta *Salvia marashica* bitkisinin diklorometan+aseton ve metanol ekstraktlarından farklı 10 madde elde edildi. Bu bileşiklerden triterpen yapısında olanların lupeol, lupeol-3-asetat, lup-12,20(29)-dien, lup-20(29)-en, oleanolik asit, ursolik asit ve  $\alpha$ -amyril-tetracosanoate, steroid yapıda olanın ise  $\beta$ -sitosterol olduğu belirlendi. Diterpen olarak ise iki abietane diterpen,  $3\beta$ -hidroksiabieta-8,11,13-trien ve  $3\beta$ -hidroksi,18-asetoksimetilen-abieta-8,11,13-trien doğadan ilk kez elde edilmiştir.

Bu çalışma, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir (Proje No: 114Z801)

**Proje Adı:** Bazı *Salvia* (Adaçayı) türlerinin HPLC-IT-TOF-MS ile taranması, sekonder metabolitlerinin saflaştırılması ve antikanser özelliklerinin belirlenmesi

**Anahtar Kelimeler:** *Salvia marashica*, terpen, diterpenoit, triterpenoit, flavonoid, fenolik, spektroskopi, aktivite

## ABSTRACT

*Salvia* species belong to Lamiaceae (= Labiatae) family plants which are rich in terpenoids. Over 900 *Salvia* species grown throughout the world while there are 100 *Salvia* species in Turkey, 53 out of them being endemic to Turkey. Chemical profile of *Salvia* species have been studying by some of researchers from both Turkey and abroad.

Secondary metabolites of *Salvia* species consist of terpenoids and steroids, flavonoids and other phenolics. They exhibit anti-inflammatory, antiviral, hepatotoxic, cytotoxic-antitumor activities due to the diterpenic and triterpenic constituents. It is also known that *Salvia* flavonoids to have antioxidant and antimicrobial effects. In this master thesis study, acetone and methanol extracts of the aerial parts of *Salvia marashica* plant were prepared. The total phenolic amounts of these extracts were determined as pyrocatechol and total flavonoids equivalent to quercetin. Antioxidant activities were determined by the inhibition of lipid peroxidation ( $\beta$ -carotene color expression), DPPH free radical scavenging activity, ABTS cation radicals scavenging activity and CUPRAC methods, anticholinesterase activity by the Ellman method using acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) enzymes.

The triterpenoids and steroids constitute the major secondary metabolites of the *Salvia marashica* extracts which were isolated and purified and structures of the pure compounds were determined by various spectroscopic methods (mainly NMR, MS and UV) and totally 10 terpenoids were obtained from both dichloromethane+acetone and methanol extracts of *Salvia marashica* plant. Six of them were triterpenoids, elucidated as lupeol, lupeol-3-acetate, lup-12,20(29)-diene, lup-20(29)-ene, amyril-tetracosanoate, oleanolic acid and ursolic acid besides a steroid  $\beta$ -sitosterol. As 2 abietane diterpene, 3 $\beta$ -hydroxyabieta-8,11,13-triene and 3 $\beta$ -hydroxy,18-acetoxymethylene-abieta-8,11,13-triene were obtained for the first time from nature.

The present work was supported by a TUBITAK Project (Project No: 114Z801).

**Project name:** Screening of Some *Salvia* species by HPLC-IT-TOF-MS, purification of secondary metabolites with determination of anticancer properties

**Key Words:** *Salvia marashica*, terpene, diterpenoid, triterpenoid, flavonoid, phenolic, spectroscopy, activity



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Tezin Amacı

Bitkiler çok eski yıllardan beri halk tarafından çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır. *Salvia* türleri terpenoit, flavonoit, steroid, fenolik bileşikler gibi sekonder metabolitlere sahiptirler. Bu sebeple eski çağlardan beri halk arasında hem çeşitli hastalıkların tedavisinde hem de çay olarak kullanılmaktadır. Bazı ülkelerde baharat olarak da kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında Türkiye'nin Kahramanmaraş ilinde yetişen endemik bir adaçayı türü olan *Salvia marashica* türünün farklı çözücülerle tüketilerek hazırlanan ekstralarının antioksidan (DPPH serbest radikal giderimi vs.) antikolinesteraz (AChE ve BChE İnhibisyonu) ve sitotoksik aktivitelerinin incelenmesi, başlıca sekonder metabolitlerinin izole edilmesi ve yapılarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Böylece bir TÜBİTAK projesi çerçevesinde araştırdığımız *Salvia marashica* bitkisinin biyoaktif bileşiklerinin izolasyonu, saflaştırılması ve yapılarının spektroskopik yöntemlerle tayini hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Salvia marashica* Bitkisinin Familya Cins Tür Özellikleri ve Halk Arasında Kullanımı

#### 2.1.1. Familya özellikleri

Lamiaceae familyası ilk kez De Jussieu tarafından 1789 yılında Labiatae olarak adlandırılmıştır. Ardından Lindley tarafından 1836 yılında Lamiaceae olarak adlandırılmıştır [1,2]. Lamiaceae familyasıyla ilgili fosil kayıtları bulunmamaktadır, ama kökeninin Oligosen'e dayandığı düşünülmektedir [3,4].

Lamiaceae (ballıbabagiller) familyası, bir veya çok yıllık, aromatik kokulu, otsu, çalı veya ağacimsi yapıda çiçekli bitki ailesidir. Lamiaceae familyası içerdiği uçucu yağlardan dolayı tıpta ve parfümeride sıklıkla kullanılmaktadır. Yapraklarında, kokulu yağ salgılayan küçük salgı kesecikleri bulunur. Dolayısıyla başta nane, kekik, adaçayı ve lavanta çiçeği

olmak üzere bu familyaya ait çiçekler bol itırlı olur. Başı sekiz hücreli pul şeklindeki salgı tüyleri lamiaceae familyaları için karakteristiktir [5]. Gövdeleri genellikle dört köşelidir. Yapraklar karşılıklı ya da dairesel dizilişli, basit ya da birleşik, dekusat dizilişli stipulasızdır. Çiçekler yaprak koltuklarında kimoza, rasemusa ya da başaklarda ya da tek, erdişi, zigomorfa (nadiren ışınsal) simetridir. Sepaller birleşik, bazen 2 dudaklı, petaller birleşik, 2 dudaklı ya da bazen üst dudak körelmiş, alt dudak 3 lobludur. Çiçekler vertisillastrum durumdadır. Korolla genellikle iki dudaklı olmaktadır. Stamenler 4 veya 2 tanedir. Meyvesi 4 nuksa yarılan bir şizokarptır [6].

Lamiaceae familyası dünyada birkaç bölge dışında Himalaya'lerden Güneybatı Asya'ya, Hawaii ve Avustralya'ya, Afrika ve Amerika'ya kadar hemen her bölgede yetişir. Çok farklı yüksekliklerde ve değişik habitatlarda dağılım gösterirler. Lamiaceae ailesinin yeryüzünde 250 kadar cinsi ve 3200'ü aşkın türü bulunmaktadır. Yurdumuzda ise 46 cins ve bunlara ait 758 takson ile temsil edilen Lamiaceae familyası; 447 endemik türe sahip Asteraceae, 406 endemik türe sahip Fabaceae türünden sonra 257 endemik tür ile Türkiye'nin en zengin üçüncü familyasıdır. Ülkemizdeki endemizm oranı %57'dir [7]. Lamiaceae familyasının en fazla takson içeren cinslerinin başında *Salvia* gelir ve kozmopolit bir cinstir. Ayrıca *Scutellaria*, *Stachys* ve *Thymus* familyanın diğer kozmopolit cinsleridir. *Rosmarinus*, *Phlomis* ve *Sideritis* türleri karakteristik maki ve garig üyeleridir. Genellikle açık habitatlara uyum sağlamışlardır. Sadece birkaç *Salvia* cinsine (*Gomphostemma*) tropikal yağmur ormanlarında rastlanmaktadır.

### 2.1.2. Cins özellikleri

*Salvia* cinsinin ismi, çok eski zamanlarda şifalı bitki olarak tanınmaya başlayan, Latince "salvere" korumak isminden türemiştir [8]. Bazı yörelerde acı elma otu, dişotu, meryemiye, şalba, sultantacı, fatmana otu, kürt reyhanı, çevlikotu, galabor adıyla da bilinir.

Çoğunlukla aromatik kokulu, otsu, yarı çalimsı ya da çalimsı; genellikle çok yıllık, nadiren iki ve tek yıllık bitkilerdir. Gövde dik ya da yatay; salgı tüylü veya salgı tüsüzdür. Kare kesitli tüylü gövdeleri bitkinin ikinci yılında odunsulaşır. Yapraklar tam parçalanmamış durumdadır, genellikle yakıcı kokuya sahip olan gri-yeşil yapraklar bazı türlerde alacalı hatta kırmızı ve mor renklerde olur. *Salvia* türleri kışın yapraklarını dökmezler. Çiçek durumu çeşitli dizilişte kimoza olup vertisillastrumlar çiçekli, uzak veya birbirine yakın gruplar halindedir [6]. Çift dudaklı derin hazneli çiçekleri genellikle mor-mavi renkte iken nadiren

beyaz ya da pembe renkli çiçek açan türler de görülür. *Salvia* türlerinin minik tohumları koyu kahverengi ve yumurta biçimlidir. Genellikle tohumlarıyla kendiliğinden çoğalan adaçayı istenirse gövde çelikleriyle de üretilebilir.

Dünyada *Salvia* cinsinin 900'ü aşkın türü bulunmaktadır. Ağırlıklı olarak orta Amerika, Güney Amerika ve Asya'da bulunur. Türkiye'de ise 100 türe sahiptir. Bunlardan 53'ü endemiktir [ 9].

Bitki kimyası araştırmaları *Salvia* türlerinin eterik uçucu yağlar (thujon % 30-50, %5-15 sineol, borneol, pinen, kafur %20-35), saponin, tanenler, glikozitler, fumarik asit, rosmarinik asit, flavonoidler (% 1-3 arası luteolin, apigenin vb.) [10] ve diğer fenolik bileşiklerin [11] yanı sıra, diterpenler (ferruginol, carnosic asit, carnosol gibi abietanlar) [12,13], triterpenler (ursolik asit, oleanolic asit) [14,15], östrojen benzeri maddeler ve reçineli bileşiklerce de zengin olduğunu göstermiştir [15].

*Salvia* türleri eski zamanlardan beri bütün dünyada soğuk algınlığı, bronşit, tüberküloz, menstrual bozukluklar ve sindirim bozukluklarından korunmak için kullanılmaktadır [16]. Ayrıca antioksidan, antibakteriyel, antitümör, kardioaktif ve antidiyabetik özelliklerinden dolayı da kullanımını mevcuttur [16-17].

### **2.1.3. Tür Özellikleri:**

*Salvia marashica* A. İlçim, F. Celep & Doğan, Akdeniz bölgesinde bulunan Kahramanmaraş yöresinde yetişen endemik bir türdür. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi (KSÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ahmet İlçim Andırın Sarımsak Dağı'nda keşfettiği hoş kokulu yeni adaçayı türüne *Salvia marashica* adını vererek bilime kazandırmıştır [18]. Bu bitki genellikle Nisan ve Mayıs ayında çiçek açar. Çiçekleri lila rengine olup 30-70 cm boyunda çalı şeklindedir.

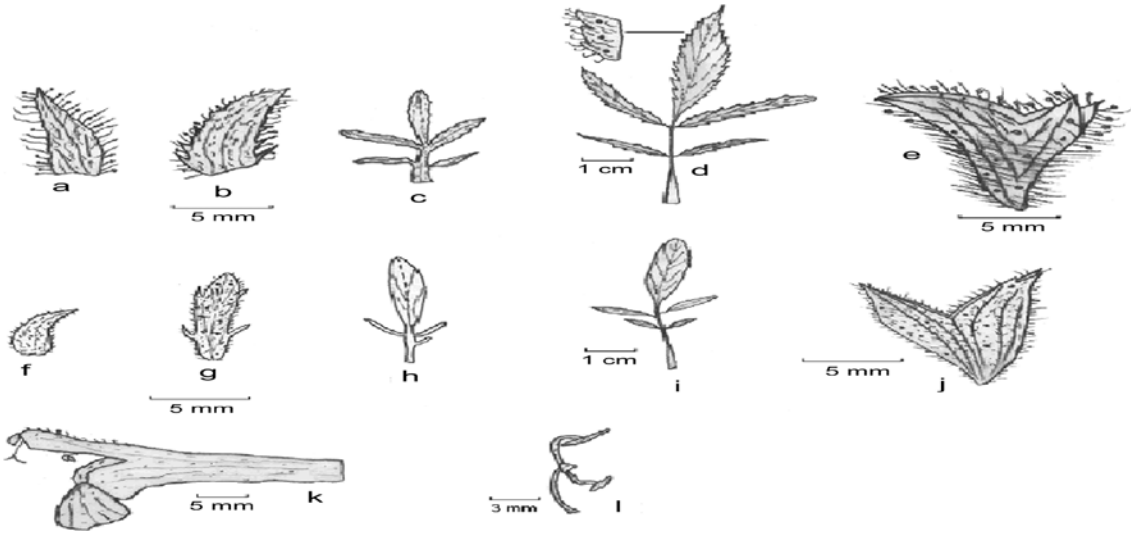
Kahramanmaraş ili Akdeniz ile İran-Turan fitocoğrafya bölgelerinin geçiş kuşağında bulunur. Yükseltiye bağlı olarak bitki örtüsü değişmekte olup *Salvia marashica* bitkisine 500-1200 metreler arasında rastlanır.

*Salvia marashica* İlçim, Celep & Doğan

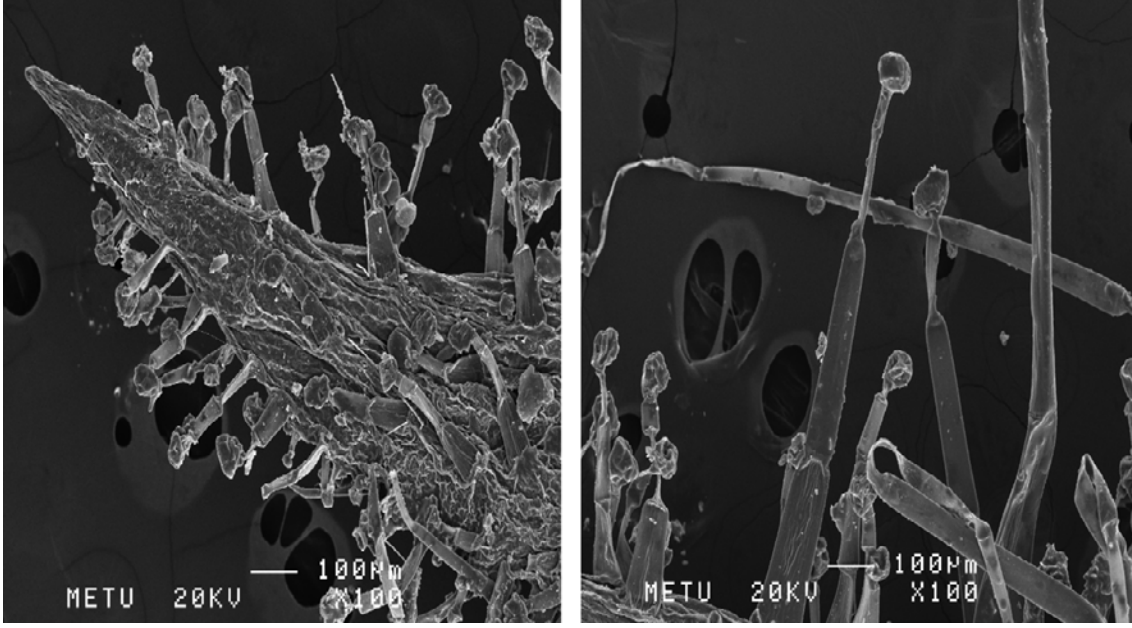
Tip: Turkey. C6 Kahramanmaraş: Yukarı Ceyhan Vadisi, Ahır Dağı, Maksutlu Köyü civarı, kayalık bölgelerde (1450–1600 m) [19]. Etimoloji: Türün epitet adı tip örneğinin toplandığı Kahramanmaraş ilinin adından türetilmiştir. ISTE No: 98045



**Resim 1.** *Salvia marashica* görünümü (holotip) [18]



**Şekil 1.** *Salvia marashica* çiçek kısımlarının çizimleri, **a** ve **b**: Pulsu yaprak. — **c**: Çiçek yaprağı. — **d**: Gövde yaprağı. — **e**: Kaliks. — **f** ve **g**: Pulsu yaprak. — **h**: Çiçek yaprağı. — **i**: Gövde yaprağı. — **j**: Kaliks. — **k**: Taç yaprak. — **l**: Erkek organ. [18]



**Resim 2.** *Salvia marashica*. Mikroskop altında kaliks tiplerinin siyah başlı salgı tüyleri [18].

Çok yıllık çalimsı otlar şeklinde, gövde çok sayıda, toprağa yatıktan dike doğru olan, 30–70 cm boyunda, basit veya dallanmış, steril dallı, aşağı kısımları yaşlı yaprak saplarıyla çevrelenmiş, grimsi-yeşil, yoğun ters dönük piloz tüylere (0.4–0.6 mm) ve uzun villus tüyelerine (1.8-2.5 mm) sahiptir. Doğrusal dikdörtgen şeklinde tüysü yapraklar zıt uçlarda bulunur 1.2-7 x 0.3-1.8 cm ve iki çift yan dal segmenti veya nadiren bir çift ve steril sürgünün üzerindeki tek ufak yaprak, grimsi-yeşil, sapsız beze olarak yoğun tüylü, buruşuk olmayan, terminal segment yan dal, kenar dişliden daha uzun ve enlidir.

Temelde hafifçe genişleyen 0,7-0.3 cm yaprak sapı, 2.0- 4.5 mm uzunlukta sıklıkla geriye eğik tüylüdür. Çiçeklenme salkım şeklindedir. Taç yaprak ovalden eliptiğe sivrileşir gövde yaprakları pinnat veya üçlü dizilişindedir. Çiçek sapı 2-4 mm'dir. Çanak yaprak huni şeklindedir. Üst dudak alttan 1 cm daha uzundur. Stamenler iki adettir. Çanak yaprak tüysüz olup, 22-23 cm uzunluğundadır, dudaklıdır ve en üst noktadan iki parçaya ayrılmıştır.

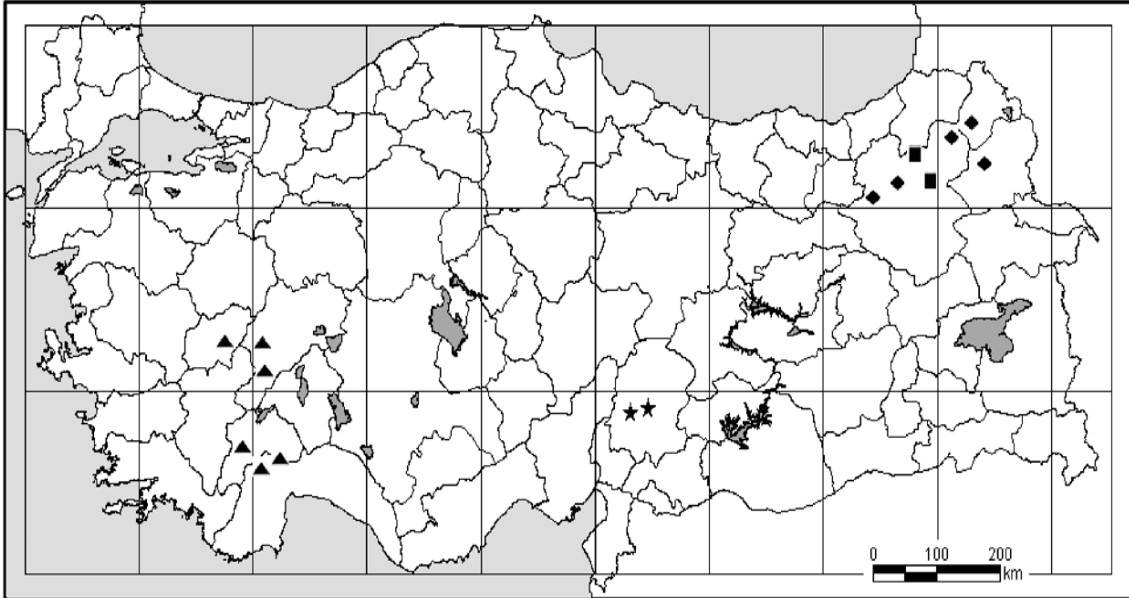
**Yayılışı :** *Salvia marashica* bitkisi sadece Kahramanmaraş'ın Ahır Dağı'nda yetişen oldukça nadir ve endemik bir türdür.

**Habitat ekolojisi ve fenolojisi:** *Salvia marashica* genellikle kayalık dağ yamaçlarında ve 850-1700 m yüksekliklerde yetişir. Yetişme alanlarında vejetasyonu genel olarak *Pinus brutia*, *Rhus coriaria*, *Centarea tomentella*, *Salvia multicaulis*, *Ankryopetalum reuteri*, *Dactylis glomerata*, *Cruciata taurica*, *Thlaspi perfoliatum*, *Papaver spp.*, *Arenaria spp.* ve *Matricaria spp.* türlerinden oluşur.

Nisan ve Mayıs ayında çiçeklenir, Haziran ayında meyveye geçerler.

*Salvia marashica* türünün çiçek durumu çok hücreli, siyah başlı salgı tüyleriyle kaplıdır, bu yönüyle kendisine morfolojik olarak benzeyen diğer türlerden ayrılırlar (Resim 2). Bu tip salgı tüyleri *Salvia* cinsinde oldukça nadirdir[20]. *Salvia officinalis* türünün de çok hücreli siyah başlı salgı tüyleri taşıdığı bilinir, ancak *Salvia officinalis* türü Türkiye’de yetişmez ve *Salvia marashica* ile benzerlik göstermez. Ayrıca *Salvia marashica* bitkisinin kaliksinde çok hücreli, siyah başlı salgı tüyleri yanında yoğun olarak uzun villöz örtü tüyleri de bulunur. Üst dudağı daha uzun olan huni şeklindeki kaliksi ile de diğer tüm türlerden ayrılır. Bu nedenle tüy ve kaliks özellikleri *Salvia marashica* için karakteristiktir ve önemli ayırt edici özellikleridir.

*Salvia marashica* endemik olan diğer üç türe çok benzer, bunlar *Salvia rosifolia*, *Salvia huberi* ve *Salvia pisidica*’dır. Bu türlerden farkı daha büyük, serrat ve yoğun piloz tüylü terminal yaprak segmenti taşıması, çiçek durumunun çok hücreli, siyah başlı salgı tüyleriyle kaplı olması ve bariz iki dudaklı, huni şeklindeki kaliksinin yoğun olarak villöz örtü tüyleri ile kaplı olmasıdır. Ayrıca *Salvia pisidica* bitkisinden uzun gövde boyu ve pembe korollası ile ayrılır. *Salvia marashica* Nisan ayında çiçeklenirken, *Salvia rosifolia* ve *Salvia huberi* Haziran-Ağustos aylarında çiçeklenir. Bazı endemik adaçayı türlerinin harita üzerinde dağılımı Şekil 2’ de gösterilmiştir.



Şekil 2. Harita üzerinde dağılım. *Salvia marashica* (★) *S. rosifolia* (◆) , *S. huberi* (■), *S. pisidica* (▲)



**Resim 3.** *Salvia marashica* A.İlçim, F.Celep & Doğan (Ahrır Dağı) (Fotoğraf: Öğretim Görevlisi Tolga Ok)



**Resim 4.** *Salvia marashica* çiçeklenme durumu [21].



**Resim 5.** *Salvia marashica* çiçek görünümü [21].



**Resim 6.** *Salvia marashica* [21].

#### **2.1.4. Adaçayının Halk Arasında Kullanımı:**

Adaçayı insanlık tarihinin başlangıcından bu yana tedavi edici olarak halk tarafından yaygın kullanılan bir bitkidir. Yaklaşık olarak 6000 yıl önce Mezopotamya'da şifa amaçlı kullanılan



bitkilerin arasında olduğu yapılan kazılarda, elde edilen taş yazı tabletlerinde ortaya çıkmıştır. Bu tabletlerde adaçayı ve adaçayı türlerinden bahsedilmekte ve hangi hastalıklarda şifa amaçlı nasıl kullanılacağı anlatılmaktadır. Bu bilgiler, yeni nesillere aktararak günümüze kadar ulaşmıştır. Tıp dünyasının babası olarak kabul edilen Hipokrates, “Bahçesinde adaçayı ekili olan birisinin nasıl öldüğünü anlayamıyorum,” demiştir. Ünlü hekim Dioscorides kanamalara, kesiklere, ateşlere, idrar yolları taşlarına, kadınların adet dönemi düzensizliklerine adaçayını önermiştir. 1600’lü yıllarda veba salgınından korunmak için kullanılmasıyla ününe ün katmıştır. Ortaçağda art arda sekiz sabah yenilirse sıtmaya iyi geldiğine, astımı tedavi ettiğine inanılırdı. Kurutulmuş adaçayı pipoya konulup içilirdi, taze yaprakları diş temizliğinde, diş eti hastalıklarında kullanılırdı. Adaçayı şans simgeler. Ortaçağda evlerde ve bahçelerde adaçayının bulunmasının şans getirdiğine inanılmıştır. O dönemde yeni evlenenlerin, bebek sahibi olanların evlerinde adaçayı tütsüsü yakması bir ritüel halini almıştır.[22]

Küçük dozlarda anti-enflamatuar olarak kullanılır [16].

Yeterli miklarda alındığında aşırı terlemeyi önlemektedir [16].

Kanamayı durdurucu, antiseptik, spazmolitik ve gaz giderici özelliklerinin yanında ağız iltihaplarını önleme özelliği vardır. Dil, boğaz ve ağız gargaralarında kullanılmaktadır [17].

İçerdiği tanenlerden dolayı kanamayı önleyici [17] ve anti-enflamatuar [16] özelliği vardır.

Gaz sancılarının önlenmesiyle birlikte hazımsızlığın giderilmesinde kullanılır [23].

Saç derisine uygulandığında saçı koyulaştırıcı olarak kullanılır [24].

Mantar önleyici özelliğinden dolayı, banyoda cilt problemlerinin giderilmesinde kullanılır [24]. *Salvia* türlerinden yapılan merhemler kas ağrıların giderilmesinde ve eklem tutulmalarında etkindir [24]. Bunun yanında açık yaralar için mükemmel sonuç verir, ayrıca deri döküntüsü tedavisinde kullanılır [24].

İyi bir saç toniğidir ve saç derisine uygulandığında saçın parlaklığını artırır. Saçı kuvvetlendirir, her gün uygulandığında doğal koyu bir renk oluşturur [24].

Arı sokması ve böcek ısırıklarında kullanılır [24].

Cinsel güçsüzlüğün giderilmesinde kullanılır [25].

Romatizmal ağrılarda haricen kullanılır [26].

Yaralar için losyon veya kompres olarak kullanılır [27].

Varisli damarların iyileştirilmesinde ve bacaklarda bulunan siğillerin giderilmesinde kullanılır [28].

Saç dökülmesini engellemek için kullanılır [29].

Bu ve diğer Lamiaceae familyası bitkilerinin uçucu yağları böceksavar özelliktedirler ve yetiştikleri alanlarda, bahçe ve sahalarda böcek popülasyonunu azaltmaktadır [30].

Sinirsel bozukluklar, depresyon, titreme ve kontrol kaybı gibi durumlarda kullanılır [31].

Alzheimer hastalığının tedavisinde ve benzer şekilde hafıza kaybı ile seyreden nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır [31].

### **Kullanım Biçimleri:**

**Çay hazırlamak:** Yarım veya bir tatlı kaşığı dolusu ince kıyılmış kuru yaprak, bir su bardağı dolusu kaynar suyla haşlanır ve üstü kapalı olarak 10 dakika demlendikten sonra süzülür. Günde 2-3 bardak içilir. Taze bitki kullanılması durumunda 4-5 dakika demleme süresi yeterlidir.

**Çalkalama/Gargara:** 2-3 tatlı kaşığı kurutulmuş ve ince kıyılmış yaprak, 2 bardak soğuk suya eklenir ve ateşe konur. Kaynamaya başlayınca ocaktan indirilir ve üstü kapalı olarak 15 dakika demlendikten sonra süzülür. Günde pek çok kere 5-10 dakika süreli gargaralar yapılır.

**Tentür Kullanımı:** Günde 3 kere, 15-20 damla kadar D 2 inceltisindeki tentür, yarım kahve fincanı suya eklenerek alınır. Çay olarak kullanılabilirdiği her yerde tentür de kullanılabilir.

**Karışımlar:** Gargaralarda ve çalkalamalarda kekikle, sindirim sorunlarında ise Mayıs papatyası ile eşit oranda karıştırılır.

**Adaçayı Sirkesi:** Geniş ağızlı bir şişe, çayır adaçayı çiçeği ile doldurulur, çiçeklerin üstüne çıkacak kadar doğal üzüm sirkesi eklenir ve şişe 14 gün güneşte veya sıcak bir ortamda, arada bir çalkalanarak bekletilir ve süzülür.

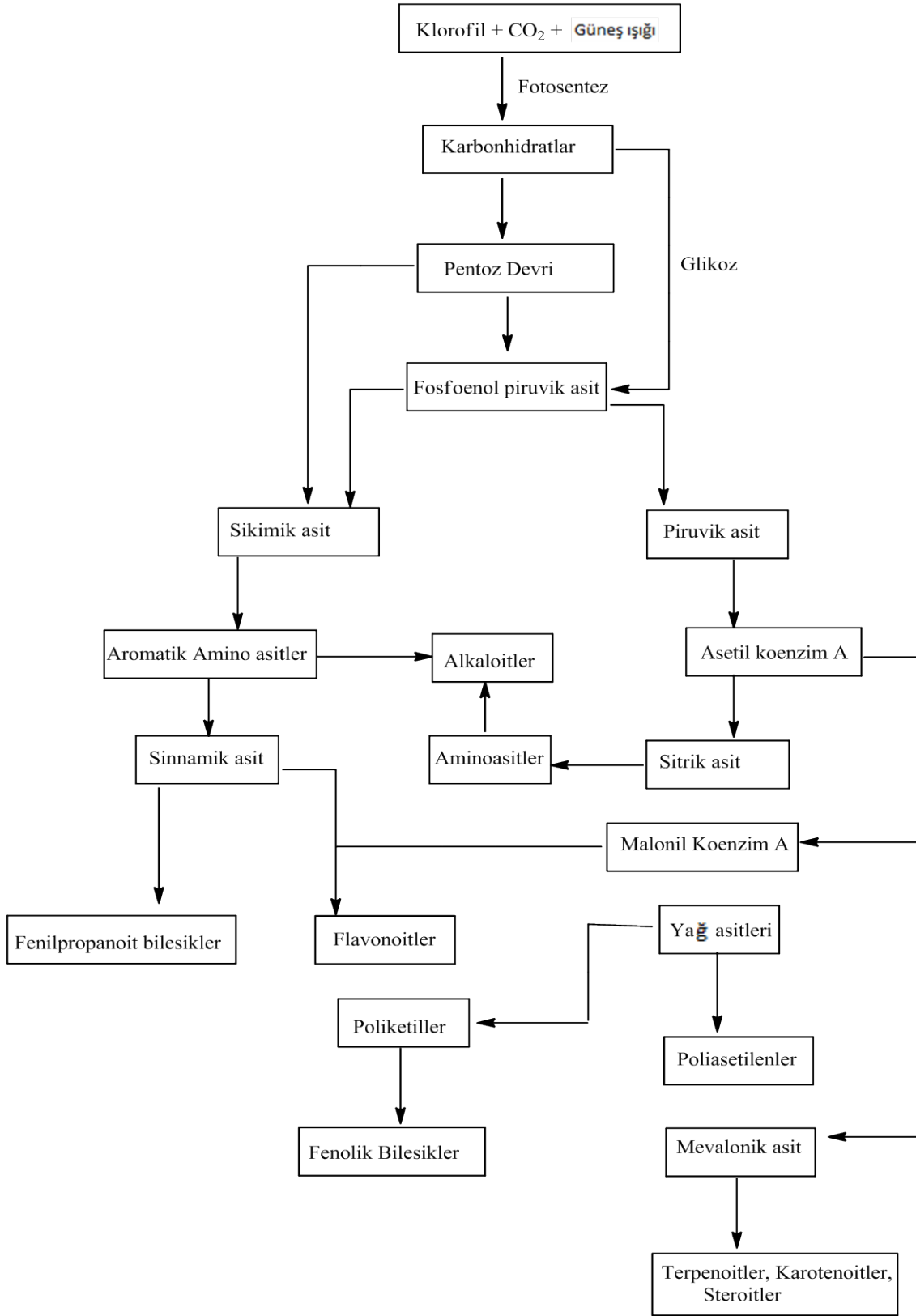
**Oturma banyosu:** İki avuç dolusu yaprak soğuk suda gece boyunca bekletilir. Ertesi gün kaynama derecesine kadar ısıtılır, 5-6 dakika demlendikten sonra süzülür ve banyo suyuna eklenir [22].

Adaçayı bitkisinden; adaçayı çayı, adaçayı yağı, adaçayı tentürü, adaçayı ekstraktı, adaçayı macunu, adaçayı sabunu, adaçayı şampunu, adaçayı likörü ve tütüsü üretilir. Ayrıca içeriğindeki tanen ve uçucu yağların zenginliğiyle çok çeşitli ilaçların muhteviyatına girmiştir. Halk arasında adaçayı içmenin gaz söktürmeye, vücuda kuvvet vermeye, zararlı toksinleri vücuttan atmaya, karaciğeri temizlemeye, stresi azaltmaya, menopoz sonrası belirtileri hafifletmeye, hafızayı güçlendirmeye, kan şekerini düşürmeye, boğaz ve burun hastalıklarına

iyi geldiği düşünülür. Uygun şartlarda kurutulan adaçayı, ağzı kapalı cam bir kavanozda, loş, serin ve kuru bir ortamda saklanıldığında ömrü bir yıldır.

### **3. SEKONDER METABOLİTLER**

Yaşamsal faaliyetler için gerekli olan primer metabolitlerden (aminoasitler, basit karakterli lipitler ve yağlar, basit şekerler) enzimler aracılığıyla sekonder metabolitler meydana gelir. Sekonder metabolitlerin oluşum mekanizması şablon halinde Şekil 3' de gösterilmiştir [32].



Şekil 3. Sekonder metabolitlerin oluşum mekanizması

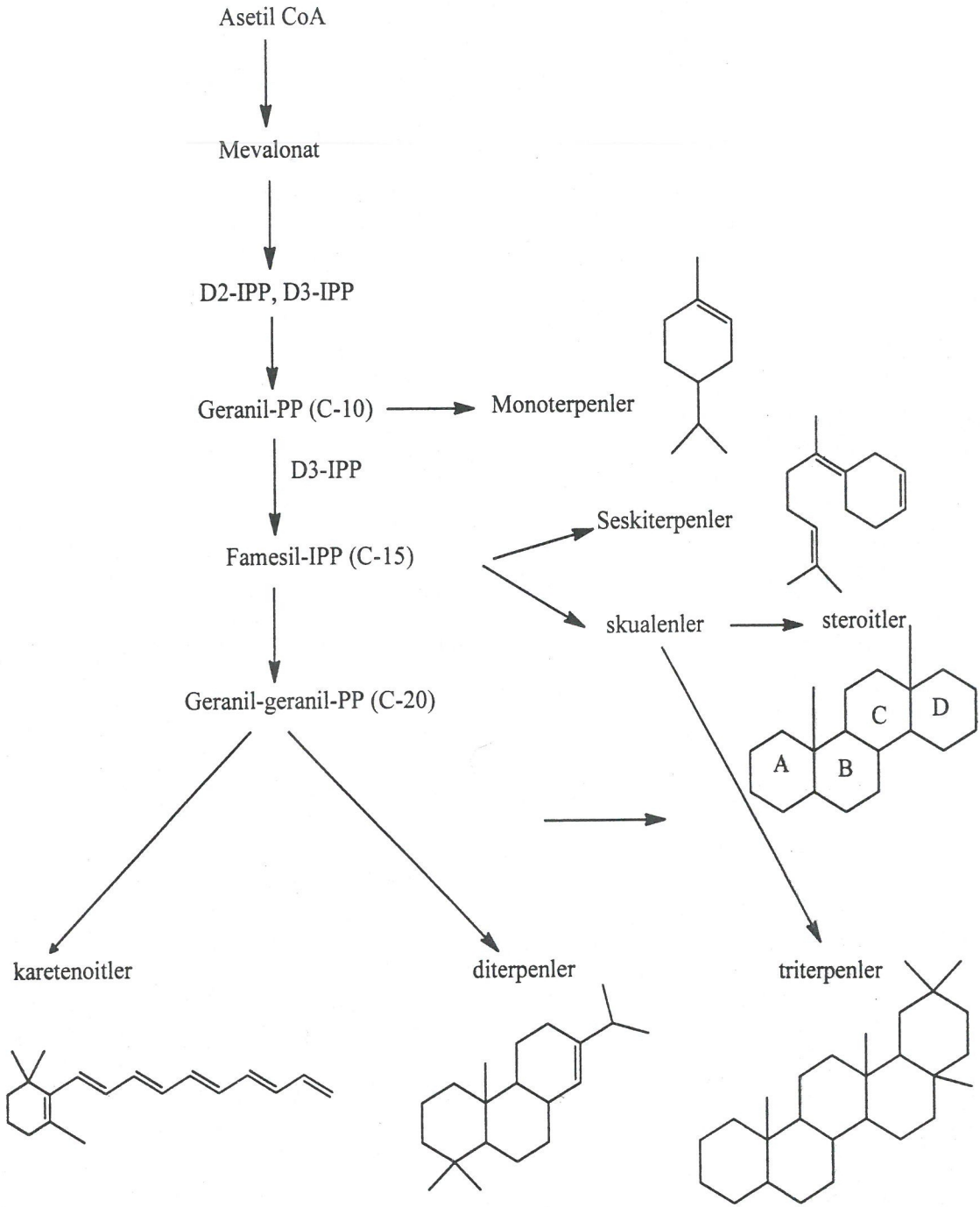
### 3.1. Terpenler

Terpenler, doğal bileşikler içerisinde en yaygın olan organik moleküllerdir. Yapıları oldukça farklılık gösterir. Sadece hidrokarbon içeren terpenler olabileceği gibi alkol, keton, aldehit ve asit grubu taşıyan terpenlere de çok sık rastlanır. Oksijen ihtiva eden terpenler terpenoitler olarak isimlendirilirler. Günümüzde gerek açık zincirli gerekse halkalı yapıda olan çeşitli fonksiyonel gruplara sahip 20.000 den fazla terpen yapısı bilinmektedir. Terpenler, bitki dokularında genellikle serbest olarak, bazıları glikozit ya da organik asit esterleri halinde, bazen de proteinlerle birleşmiş halde bulunurlar [33].

Bugüne kadar yapılan çalışmalar *Salvia* türlerinin ana bileşenlerinin flavonoidler ve terpenoitler olduğunu ortaya koymuştur. *Salvia* türlerinin toprak üstü kısımları çoğunlukla flavanoid, terpenoit ve monoterpener gibi uçucu bileşenleri ihtiva ederken, kök kısımları ise başlıca diterpenoitler taşır. Seskiterpenoitler (15 C) ve sesterterpenler (25 C) ise *Salvia* türlerinden nadir olarak izole edilmiştir. Terpenoitler 5 C dan ibaret olan izopren birimlerinin sayısına göre sınıflandırılırlar. Ruzicka tarafından ortaya atılmış olan ‘İzopren Kuralına’ göre bütün terpenik bileşiklerin karbon iskeletleri izopren birimlerinin iki ya da daha fazlasının bir araya gelmesiyle oluşmuştur [34]. Terpenlerin taşıdıkları karbon sayılarına göre sınıflandırılması Tablo 1’ de, triterpenlerin oluşum mekanizması ise şema halinde Şekil 4’ te gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Terpenlerin sınıflandırılması.

İzopren sayısı	Karbon sayısı	Sınıfı
1	5 C	Hemiterpenler
2	10 C	Monoterpenler
3	15 C	Seskiterpenler
4	20 C	Diterpenler
5	25 C	Sesterterpenler
6	30 C	Triterpenler
8	40 C	Tetraterpenler
n	(5C)n	Politerpenler



**Şekil 4.** Terpenlerin oluşum mekanizması

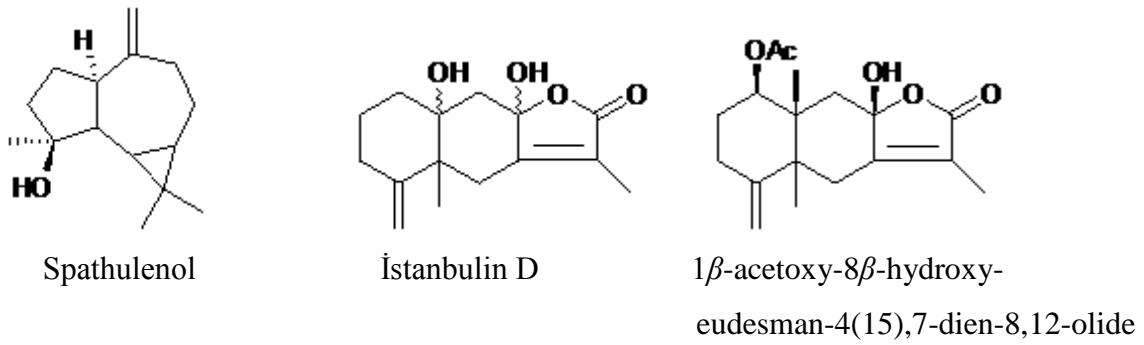
### 3.1.1. Monoterpenler (C<sub>10</sub>)

İki izopren ünitesinin biraraya gelmesiyle oluşan on karbonlu bileşiklerdir. Monoterpenlerde 38 farklı iskelet tipine rastlanmıştır. Bunların çoğu düzenli tiptedir, yani iki izopren molekülü

‘baş-kuyruk’ bağı ile bağlıdır. Birçok monoterpenin doğada tek bir izomeri bulunur. Fakat aynı bitkide iki izomerin bulunması da mümkündür. Monoterpenlerin en yaygın tipleri  $\alpha$ -pinen ve  $\beta$ -pinen’dir. Bunlar am ağaçlarında bulunmakta olup kozmetik sanayinde hammadde, parfümeri sanayinde ise başlangıç maddesi olarak kullanılırlar. Ayrıca monoterpenler antispazmotik, antibakteriyel, antifungal, antikanser ve hatta antialzheimer özellikleri nedeni ile halk ilaçlarında kullanılırlar. Monoterpenler kimyasal yapılarına göre asiklik, monosiklik ve bisiklik monoterpenler olmak üzere üç grupta toplanırlar [35].

### 3.1.2. Seskiterpenoitler (C<sub>15</sub>)

Seskiterpenoitler *Salvia* türlerinde nadir olarak bulunurlar. *S. yosgadensis* bitkisinden izole edilen seskiterpen spathulenol, seskiterpen lakton olan İstanbul D, 1 $\beta$ -acetoxy-8 $\beta$ -hydroxyeudesman-4(15),7-dien-8,12-olid bunların başlıca örnekleri Şekil 4.1’ de verilmiştir.



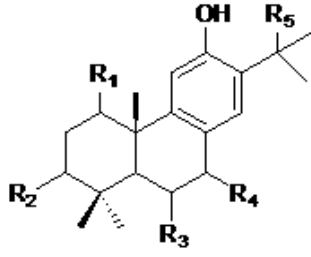
Şekil 4.1. *Salvia* türlerinden elde edilen seskiterpen örnekleri

### 3.1.3. Diterpenoitler (C<sub>20</sub>)

*Salvia* türleri abietan diterpenler başta olmak üzere klerodan, pimarane ve labdan tipli diterpenoitler içerirler.

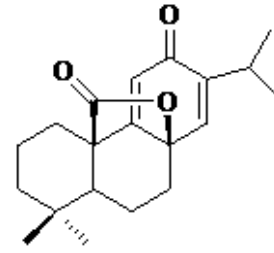
#### *Abietan Diterpenoitler*

Türkiye’de yetişen *Salvia* türlerinde birçok biyolojik aktiviteye sahip yeni abietan diterpenoitler izole edilmiştir. Örneğin Hypargenin A ve B (Şekil 3.2) antibakteriyel aktivite gösterirler. Bu diterpenler *S. hypargeia* bitkisinden izole edilirken değişik bir abietan diterpenoid olan wiedelakton (Şekil 4.2) *S.wiedemanni* Boiss. bitkisinden izole edilmiştir [36].



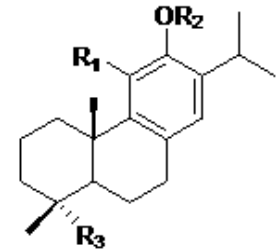
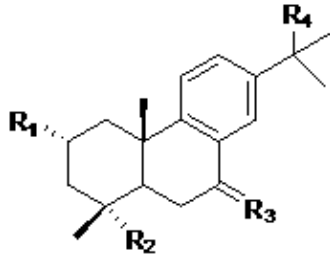
hypargenin A;  $R_1=R_2=O$ ,  $R_3=\beta OH$

hypargenin B;  $R_1=R_2=R_3=H$ ,  $R_4=O$ ,  $R_5=OH$



widelactone

*S. pomifera*'dan yeni yedi abietan diterpenoid, *S. napifolia* Jacq bitkisinden ise 1-okso-ferruginol ve 6-okso-ferruginol izole edilmiştir [36].

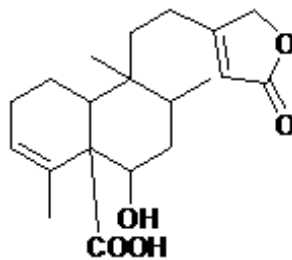


	$R_1$	$R_2$	$R_3$	$R_4$		$R_1$	$R_2$	$R_3$
<b>A</b>	H	$CH_2OH$	H	H	<b>B</b>	H	H	$CH_2OAc$
<b>C</b>	OH	Me	H	H	<b>D</b>	OH	Me	COOH
<b>E</b>	OH	Me	O	H				
<b>F</b>	OH	Me	O	OH				
<b>G</b>	H	$CH_2OAc$	O	H				

Şekil 4.2. *S. pomifera* ve *S. hypargeia* bitkilerinin abietan diterpen örnekleri

### Klerodan Diterpenoidler

Amerika'da yetişen *Salvia* türleri çoğunlukla klerodan tipli diterpenoitler içerirken nadir olarak da abietan diterpenoit içerirler. Bir Meksika bitkisi olan *S. melissodira* Lag. ve *S. languiduline* (Şekil 4.3) den bir klerodan diterpenoit olan melisodorik asit izole edilmiştir [36].

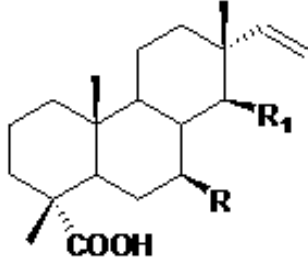


Şekil 4.3. Melisodorik asit bileşiği



### Labdan ve Pimarane Diterpenoitler

Bu tip diterpenoitler Lamiaceae familyası bitkilerinde bulunurlar, ancak *Salvia* türlerinde daha az bulunmuşlardır. *S. wiedemanni* bitkisinin toprak üstü kısımlarından iki pimarane diterpen derivesi; 7 $\beta$ -hidroksisandrakopimarik asit ve 14-oksopimarik asit (Şekil 4.4.) abietan diterpenoitlerin yanısıra izole edilmiştir [33,37].

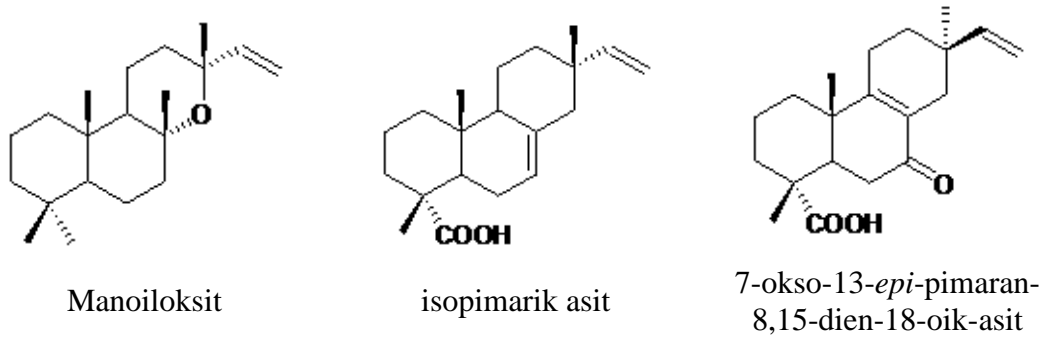


7 $\beta$ -hidroksisandrakopimarik asit: R=OH, R<sub>1</sub>=H,  $\Delta^{8(14)}$

14-oksopimarik asit: R=H, R<sub>1</sub>=O

Şekil 4.4. 7 $\beta$ -hidroksisandrakopimarik asit ve 14-oksopimarik asit bileşikleri

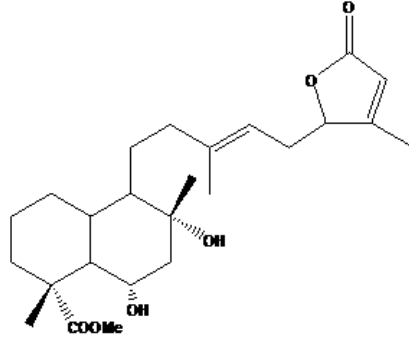
Yine bir labdan diterpen olan manoiloksit (manoyloxide) (Şekil 3.5) *S. candidissima* subsp. *occidentalis*'in ürünüdür. Doğu Akdeniz bölgesine endemik olan *S. heldrichiana* Boiss. bitkisinden üç pimarane diterpen; isopimarik asit, 7 $\beta$ -hidroksisandrakopimarik asit ve 7-okso-13-*epi*-pimarane-8,15-dien-18-oik-asit (Şekil 4.5.) izole edilmiştir [36].



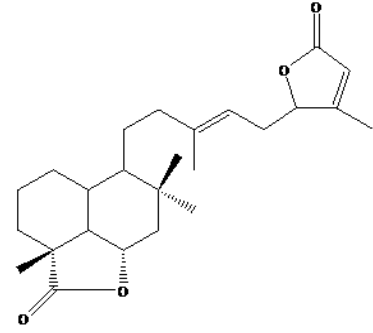
Şekil 4.5. Manoiloksit, isopimarik asit, 7-okso-13-*epi*-pimarane-8,15-dien-18-oik asit bileşikleri

### 3.1.4. Sesterterpenoidler (C<sub>25</sub>)

*S. hypoleuca* Benth. bitkisinden salvilösolid metil ester, salvilösolid- 6,23-lakton (Şekil 4.6.) adlı sesterterpenler izole edilmiştir [38,39].



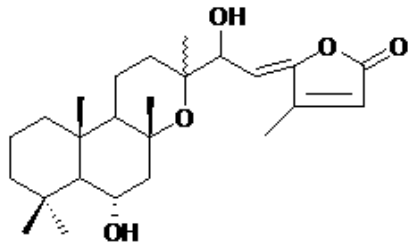
salvilösolit metil ester



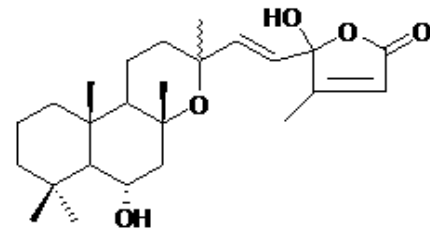
salvilösolit-6,23-lakton

#### Şekil 4.6. Salvilösolit metil ester ve salvilökolit-6,23-lakton bileşikleri

Anadolu'da yetişen endemik bir *Salvia* türü olan *S. yosgadensis* bitkisinden ise yeni sesterterpen lakton yapısında yosgadensolit A ve B olarak isimlendirilen terpenik bileşikler (Şekil 4.7) Türkiye'de bir *Salvia* türünden ilk kez elde edilmişlerdir [33].



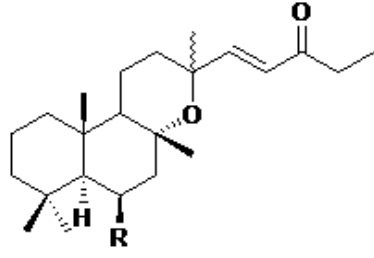
yosgadensolit A



yosgadensolit B

#### Şekil 4.7. Yosgadensolit A ve Yosgadensolit B bileşikleri

*Salvia limbata* C.A. bitkisinden ise iki yeni dinorsesterterpen; 6-dehidroksiyosgadensenol ve 6-dehidroksi-13-*epi*-yosgadensenol elde edilmiştir [36]. Bu iki bileşik, Türkiye'de yetişen *Salvia* türlerinden ilk kez elde edilen di-norsesterterpenlerdir (Şekil 4.8).



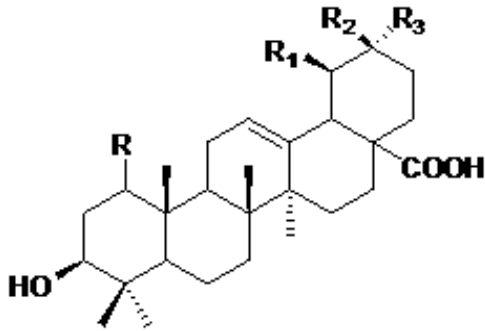
6-dehidroksiyosgadensenol:  $13\beta$  Me, R=H

6-dehidroksi-13-epi-yosgadensenol:  $13\alpha$  Me, R=H

**Şekil 4.8.** 6-dehidroksiyosgadensenol ve 6-dehidroksi-13-epi-yosgadensenol

### 3.1.5.Triterpenoitler (C<sub>30</sub>)

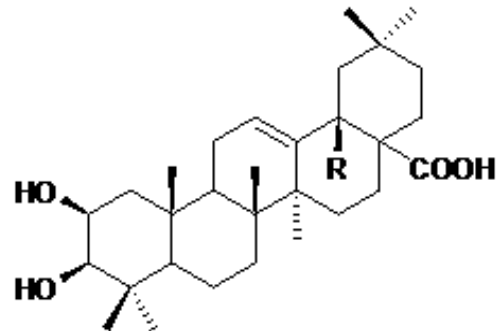
Triterpenoidler tüm *Salvia* türlerinde yaygın olarak bulunurlar. Ursolik asit ve oleanolik asit *Salvia* türlerinden (Şekil 3.9) ilk olarak *S. officinalis* L. den izole edilmiştir [9]. Sonraki yıllarda *S. virgata* Jacq bitkisinden yeni bir triterpenoit olan vergatik asit (virgatik asit) [32],  $2\beta,3\beta,11$ -trihidroxyolean-13(18)-en izole edilmiştir (Şekil 4.9) [36]. Devam eden çalışmalarda Anadolu'da yetişen *Salvia* türlerinden Topçu ve arkadaşları tarafından ursan ve oleanan iskeletine sahip triterpenoidlerin yanı sıra lupan triterpenoidler de elde edilmiş [10,14] ve Van'a endemik bir *Salvia* türü olan *S. kronenburgii* türünden ise çok sayıda hidroksil taşıyan triterpenler izole edilmiştir [37].



Ursolik asit; R=H, R<sub>1</sub>=R<sub>2</sub>=Me, R<sub>3</sub>=H

Oleanolik asit; R=R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Me

Virgatik asit; R=O, R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Me

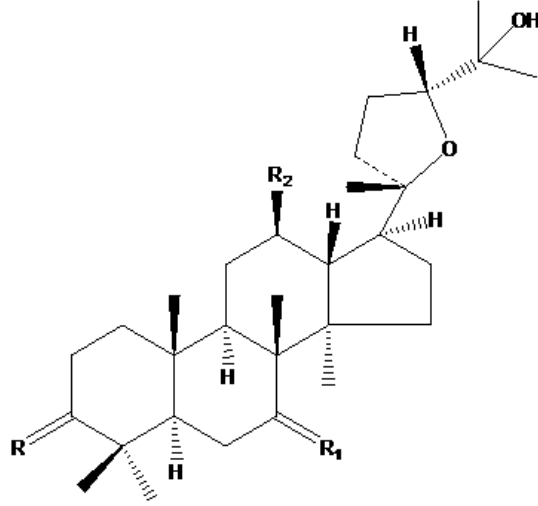


$2\beta,3\beta$ -dihidroksiolean-12-en-28-oik asit; R=H

**Şekil 4.9.** *Salvia* türlerinden elde edilen bazı triterpenler

Dammaran tipli triterpenoitler de ayrıca *Salvia* türlerinin toprak üstü kısımlarından izole edilmiştir, fakat şu ana kadar Türkiye’de yetişen *Salvia* türlerinden elde edilememiştir.

Örneğin salvilymiton ve salvilymitol (Şekil 4.10) *S. hierosolymitanâ*dan izole edilmiştir [40].

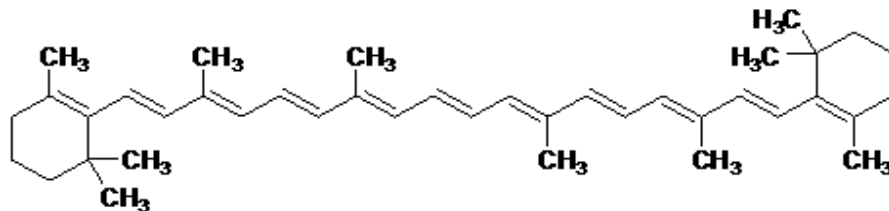


	R	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Salvilymiton	$\alpha$ H, $\beta$ OH	$\alpha$ OH, $\beta$ H	H
Salvilymitol	O	H	OH

Şekil 4.10: Salvilymiton ve salvilymitol bileşikleri

### 3.1.6. Tetraterpenler (Karotenler=C<sub>40</sub>)

40 karbonlu terpenlerdir. Karotenoidler en önemli tetraterpenlerdir. Asiklik, mono- ve bisiklik tetraterpenler de mevcuttur.  $\beta$ -Karoten bileşiği Şekil 4.11’ de verilmiştir.



Şekil 4.11.  $\beta$ -Karoten bileşiği

### 3.2. Fenolik Bileşikler

Bitkilerin diğ er bir ikincil metabolitleri olan fenolik bileşikler yapısında bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan aromatik yapıda bileşiklerdir. Bitkilerden 8000'in üzerinde fenolik bileşik elde edilmiştir [32].

**Tablo 2.** Taşıdıkları karbon atomu sayısına göre fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

C atomu	İskelet	Sınıf	Örnek
6	C <sub>6</sub>	Basit fenoller Benzokinonlar	Hidrokinon 2,6-Dimetoksibenzokinon
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Fenolik asitler	Salisilik asit
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Asetofenonlar Fenilasetik asitler	3-Asetil-6-OMe- benzaldehit <i>p</i> -Hidroksifenilasetik asit
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Hidroksisinnamik asitler Fenilpropenler Kumarinler İzokumarinler Kromonlar	Kafeik asit Eugenol Umbelliferon Bergenin Eugenin
12	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftakinonlar	Juglon
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Ksantonlar	Mangiferin
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Stilbenler Antrakininonlar	Lunularik asit Emodin
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoitler	Kersetin
		İzoflavonoitler	Genistein
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanlar	Pinoresinol
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoitler	Amentoflavon
N	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninler	
	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Kateşol melaninleri	
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Tanenlerle kondense olmuş flavonlar	

Fenolik bileşikler en aktif doğal antioksidanlardandır. Antioksidan etkileri serbest radikalleri bağlamaları, metallerle kelat oluşturmaları ve lipoksijenaz enzimini inaktive etmeleri vd. bazı mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bir polifenolün antioksidan olarak tanımlanabilmesi için iki özelliğe sahip olması gerekir; birincisi, düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyonu geciktirebilme, yavaşlatma veya önleme yeteneğine sahip olması, ikincisi ise serbest radikale dönüştüğünde kararlı bir formda kalabilmesidir [41]. Bitkisel gıdalarda bulunan fenolik maddeler; basit fenolikler, fenolik asitler, flavonoidler, kumarinler, lignanlar, stilbenler ve antosiyanidinler gibi alt gruplara ayrılmaktadır. Fenolik bileşikler iskeletlerindeki karbon atomu sayılarına göre yukarıdaki Tabloda olduğu gibi sınıflandırılmaktadırlar (Tablo 2).

### 3.2.1. Flavonoidler

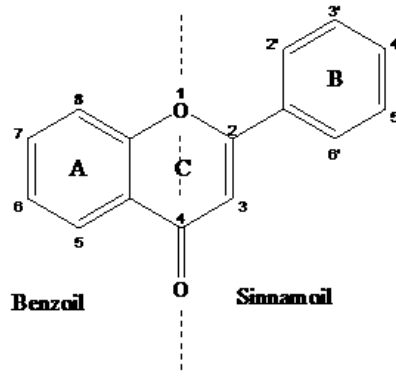
Flavonoidler fenolik yapıdaki bileşiklerin en geniş ve en önemli grubunu oluşturur [42]. Bugüne dek 5000'den fazla flavonoid tanımlanmıştır ve bunlar en az 10 kimyasal alt grupta sınıflandırılmıştır [44]. Flavonoidler bitkilerden fotosentezle meydana gelmektedirler ve hayati gereksinimleri için kullandıkları karbonhidrat, amino asitler gibi birincil metabolitlerden türemektedirler. Karbon iskeleti  $C_6-C_3-C_6$  şeklinde olan flavonoidlerin ana iskeletinde 15 karbon bulunur. Flavonoid bileşiklerinin kimyasal olarak antioksidan özellik göstermelerinin nedenleri şunlardır [41];

1. Aromatik halka yapısında taşıdıkları hidroksil grupları sayesinde hidrojen vererek redoks tepkimesine girebilirler ve bu sayede serbest radikalleri yok edebilirler.
2. Aromatik, heterosiklik ve çoklu doymamış bağlardan oluşan yapılarıyla stabil bir delokalizasyon sistemi oluştururlar.
3. Metal kelatlama kapasitesine sahip yapısal grupları vasıtasıyla  $OH^-$  ve  $O^{2-}$  gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebilirler.

Tıbbi açıdan öneme sahip pek çok bitki türünde flavonoidlerin aktif bileşikler olduğu düşünülmektedir. Bitkilerde genellikle glikozitler şeklinde bulunan flavonoidler biyolojik aktivite ve kimyasal açıdan stabil bileşiklerdir [41].

#### *Flavonoidlerde Yapı Çeşitliliği*

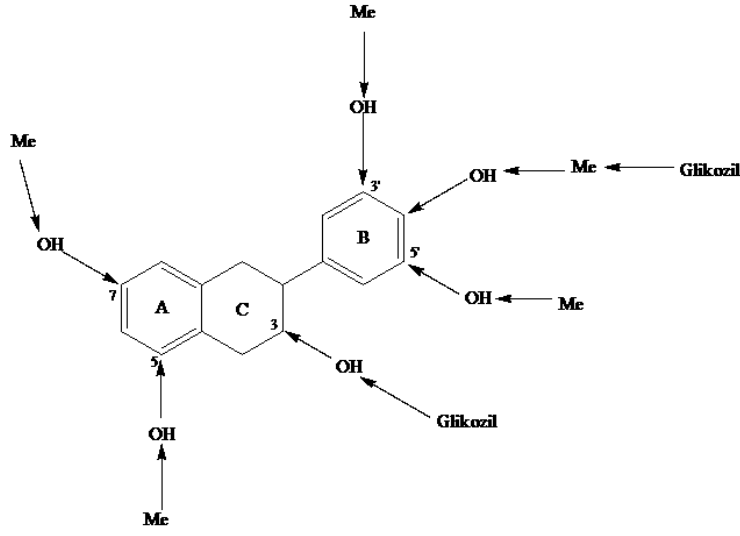
Flavonoidler 2-fenil benzopiran yapısındadır. Bu yapılar Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.12.** Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası

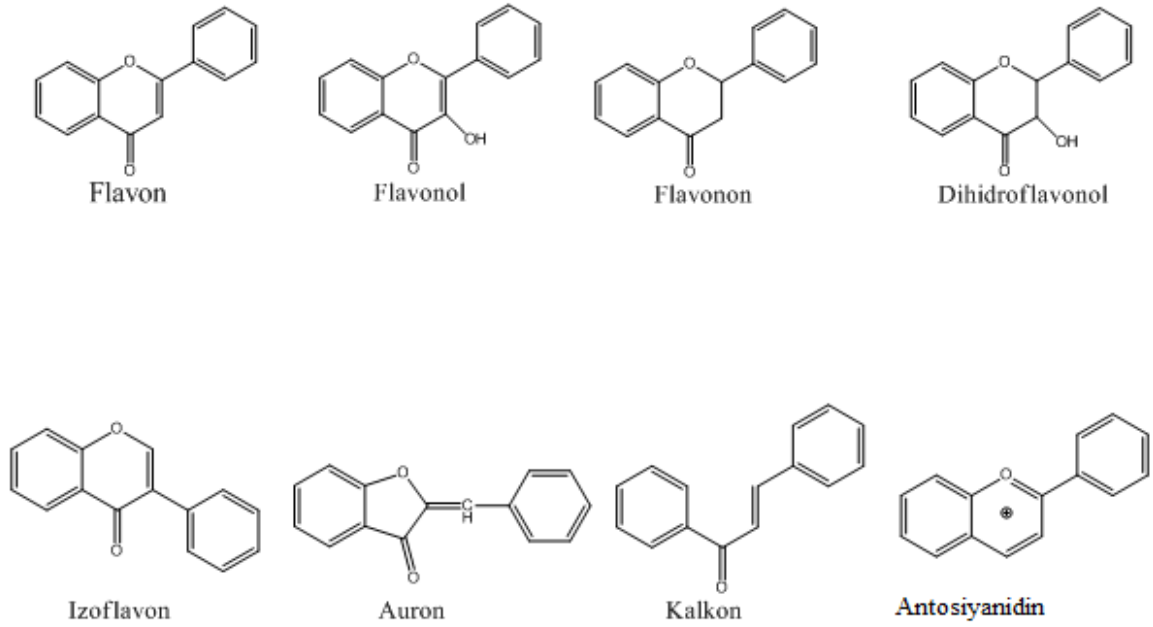
Flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, heterohalka ise C ile gösterilmektedir. A ve C halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılırken, B halkasındaki atomlar ise (') rakamlarla numaralandırılmaktadır. Flavonoidlerdeki yapı çeşitliliği, sadece difenilpropan iskeletinin farklı yapılarda düzenlenmesiyle sınırlı kalmamaktadır. Ayrıca, her sınıf içinde, molekülün aromatik (A ve B) halkalarına bağlanan süstituentlerin sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonları flavonoidlerde gözlenen yapı çeşitliliğine neden olmaktadır. Flavonoid yapılarında en fazla hidroksil gruplara rastlanır. Flavonoid yapısında hidroksil gruplarının bulunması biyosentetik yolun neticesidir. Doğal flavonoidler en fazla yedi hidroksil gurubu içerirler. A halkası çoğunlukla C-5 ve C-7 pozisyonlarında hidroksillenmeye yatkındır. Ancak, A halkasının başka pozisyonlarda da hidroksillendiği flavonoidler, doğada yaygın olarak bulunmaktadır. B halkasının ise genellikle C-4' pozisyonu, çoğu kez C-3' ve C-5' pozisyonlarının hidroksillendiği görülmüştür. C-3' ve C-5' pozisyonundaki hidroksil grupları çoğu kez metillenmiş halde bulunmaktadır. Hidroksil grubu bulundurmayan aromatik halkalar yada C-2' pozisyonunda hidroksil grubu bulunduran flavonoidler doğada nadir olarak bulunurlar. Flavonoidlerin yapısındaki hidroksil gurupları, reaktif özelliklerinden dolayı, kolaylıkla alkillenmekte ya da glikozillenmektedirler. Bu nedenle, flavonoidlerin metoksi ve glikozil türevlerine bitkilerde sık rastlanmaktadır. Metoksi flavonoidlerin yapılarında birden yediye kadar metoksi grubuna rastlanılmaktadır. Doğada en çok mono-, di- veya trimetoksi flavonoidler gözlenmektedir. Flavonoidlerin C-5 ve C-7 pozisyonlarındaki hidroksil gurupları nadir hallerde metillenmiş olarak bulunurlar.

Flavonoit yapılarında sübstitüentlerin genel yerleşme pozisyonları Şekil 4.13' te verilmiştir.



Şekil 4.13. Flavonoit yapılarında sübstitüentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları

Başlıca flavonoit iskeletleri Şekil 4.14' te verilmiştir [32].



Şekil 4.14. Flavonoit iskeletleri

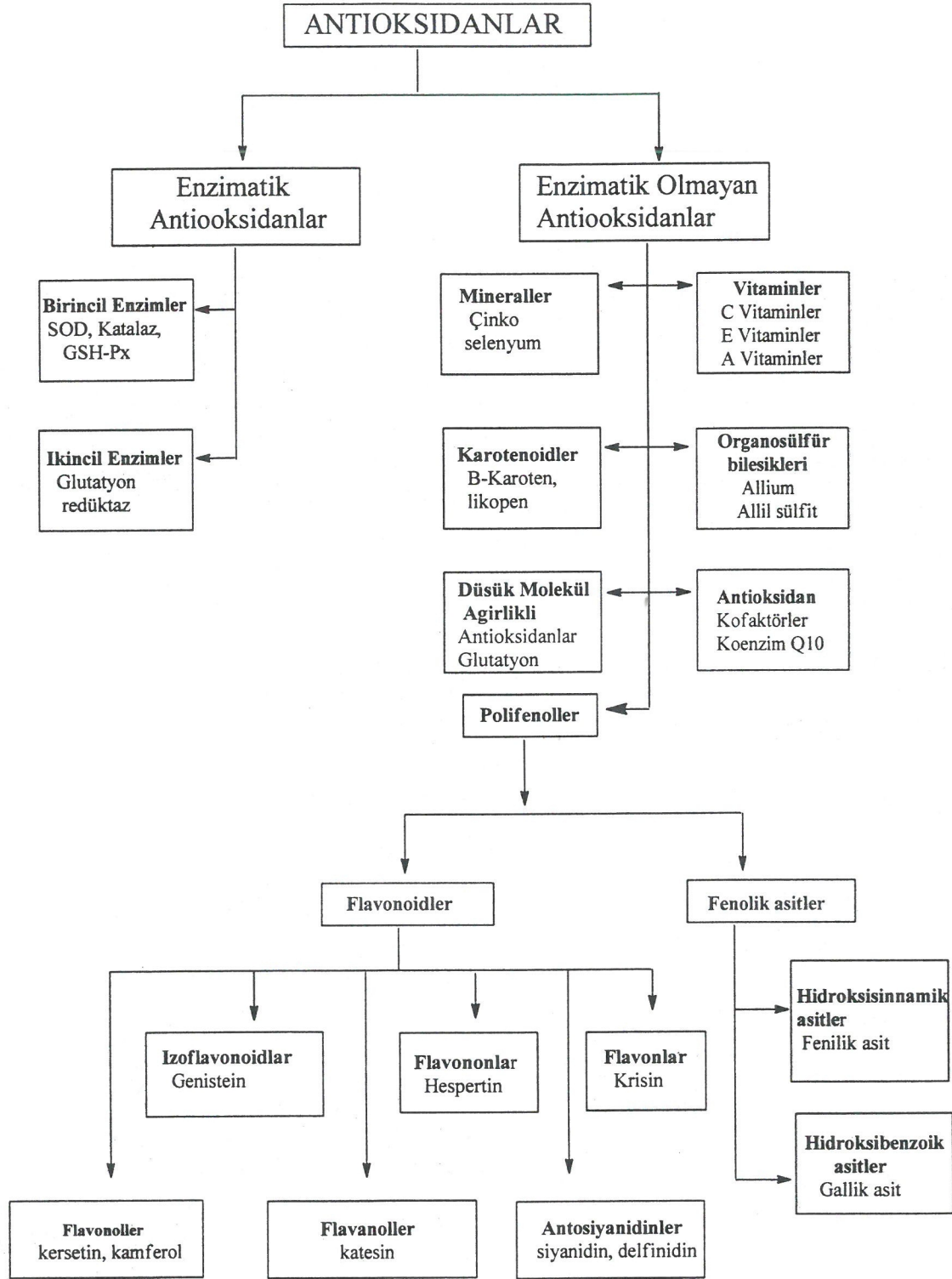


## 4. ANTİOKSİDANLAR

Serbest radikal bir ya da birden çok ortaklanmamış elektron taşıyan yapılardır ve bu elektronlar o atomik ya da moleküler orbitalde tek başına bulunurlar. Bu yapısal durum o maddenin magnetik bir alana çekilmesine yol açar ve bazende o maddenin son derece aktif olmasına neden olur. Bugün kimya ve biyolojide pek çok serbest radikal mevcuttur [44].

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için çok büyük öneme sahip bir elementtir. Canlılarda solunum ile alınan oksijen mitokondrilerdeki elektron taşıma sisteminde aşamalı bir indirgenme işlemine girer ve suya metabolize olur [45]. Ancak bazı durumlarda oksijenin reaksiyonunu tamamlamadan vücuttan ayrıldığı ve geride reaktif ara ürünler bıraktığı gözlemlenmektedir. Bu reaktif ara ürünler genel olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak isimlendirilir [46]. Oksidasyon, radikalik zincir reaksiyonları üzerinden yürür. Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparırlar. Bu özellikleri, radikallerin kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar ve bunların organizmadaki varlığı biyomoleküllerin modifikasyonuna sebep olur [47].

Reaktif oksijen türleri havayla solunum yapan bütün organizmalarda bulunur ve bunlar süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit radikali içerirler. Bu radikaller de DNA, proteinler, yağlar ve küçük moleküller gibi bütün ana moleküllere zarar vererek kalp ve beyin hastalıklarına sebep olur [48]. Antioksidan savunma sistemleri oksidan giderme ve hücre zararını engelleme işine yarayan enzim (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve enzim olmayan (glutatyon, C ve E vitamini) maddeleri içerirler [49]. Antioksidanların genel sınıflandırılması şema halinde Şekil 5' te gösterilmiştir.

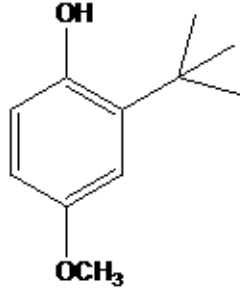


Şekil 5. Antioksidanların sınıflandırılması

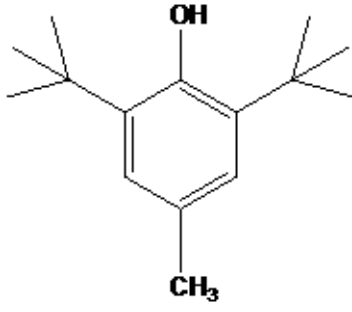
İnsanlarda ve diğer organizmalarda antioksidan savunma sistemleri (enzimler gibi) ve oksidatif tahribatı onarıcı sistemler olmasına rağmen tüm zararı önlemeye yetmemektedir [50]. Antioksidanlar oksidasyon sürecini serbest radikallerle reaksiyona girerek, katalitik

metallerle kompleks oluşturarak ve oksidan giderici gibi davranarak engellerler. Yıllardır birçok araştırmacı özellikle bitkisel olmak üzere doğal kaynaklardan en güçlü ve aynı zamanda toksik olmayan antioksidanlar aramaktadır [51].

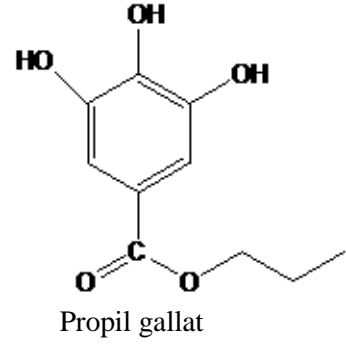
Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında doğal bir şekilde meydana gelmektedir. Bunlar karotenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, glutatyon ve endojen metabolitleri içerir. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar belirgin bir şekilde fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu göstermiştir. Fenolik antioksidanlar, hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu artırarak onun reaktifliğini azaltır. Hidroksil grubuna göre para konumunda etil veya bütül grupların süstitüsüyonu, antioksidan aktiviteyi artırır. Bununla beraber sterik engelleme sebebiyle para pozisyonlardaki uzun zincir veya dallanmış alkil gruplarının varlığı antioksidan etkiyi azaltabilir. Orto pozisyonlardaki dallanmış alkil gruplarının süstitüsüyonları kararlı rezonans yapılar oluşturarak fenolik antioksidanın etkisini artırırlar ve antioksidan radikalinin reaksiyonlara katılma yeteneğini azaltırlar [52]. Bitki kimyası analizleri *Salvia* türlerinde fenolik asitler, fenolik glikozitler ve flavonoidler gibi antioksidan özellik gösteren bileşiklerin oldukça çok olduğunu göstermiştir. Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), ve ter-Bütül hirokinon (TBHQ) gibi antioksidanlar sentetik antioksidanlara örnektir. Sentetik antioksidanların yan etkileri olduğundan son yıllarda doğal antioksidanların üzerine yoğunlaşmıştır. Örneğin BHT non-toksik olmakla beraber, karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiğine dair bazı çalışmalar bulunmaktadır. Farelere yüksek dozlarda verildiğinde ise karaciğerde hasara sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan bazı araştırmalar, BHT gibi bazı sentetik antioksidanların fazla alınması durumunda vücuttan atılamadığı ve adipoz dokuda depolandığını göstermiştir [53]. Binlerce sayıda bitkinin antioksidan aktivitesi test edilmiştir ve bunlardan gelen ana ekstreler ve bazı izole edilen saf maddeler sentetik antioksidanlardan (BHT ve E vitamini) bile daha aktif çıkmıştır. Bundan dolayı bitkiler doğal antioksidan kaynaklarıdır [54]. Bazı sentetik antioksidan bileşiklere örnek Şekil 5.1' de verilmiştir.



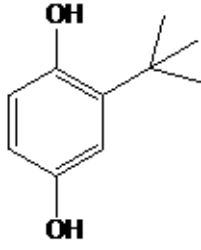
Bütillenmiş hidroksi anisol



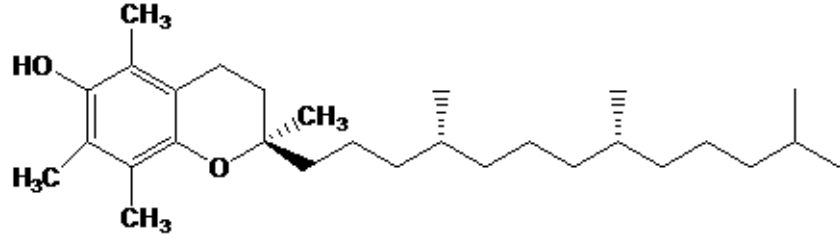
Bütillenmiş hidroksi toluen



Propil gallat



2-Bütül hidrokinon



Vitamin E

**Şekil 5.1.** Bütillenmiş hidroksi anisol, bütillenmiş hidroksi toluen, propil gallat, tersiyer bütül hidrokinon ve vitamin E sentetik antioksidan bileşikleri

**Antioksidanlar başlıca dört farklı tarzda etki gösterirler;**

**Süpürücü etki (Scavenging effect):** Serbest radikalleri etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme.

**Bastırıcı etki (Quencher effect) :** Serbest radikallerle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini artırma.

**Onarıcı etki (Repair effect):** Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması.

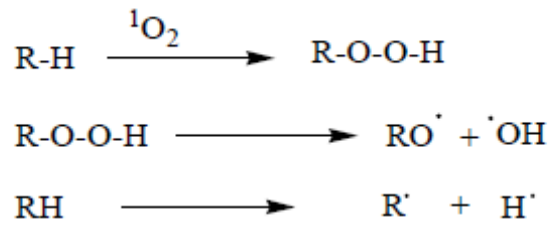
**Zincir kırıcı etki (Chain breaking effect) :** Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme.

#### 4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar, reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Bazı antioksidanlar birden fazla aktivite mekanizması gösterirler ve bunlar çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak isimlendirilmektedirler [55].

##### 4.1.1. Birincil antioksidanlar

Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Bir lipit (alkil) radikali (R $\cdot$ ) oluşturmak için, doymamış yağdan  $\alpha$ -metilenik hidrojen ayrıldığında otooksidasyon başlar [56].



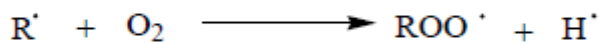
Oluşan lipit radikali çok reaktiftir, sonraki aşamalarda peroksi radikali (ROO $\cdot$ ) oluşturmak için oksijenle tepkimeye girer [57].



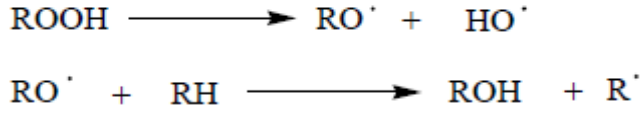
Bu peroksi radikalleri lipitle tepkimeye girerek hidroperoksit ve yeni bir kararsız lipit radikali meydana getirirler [57].



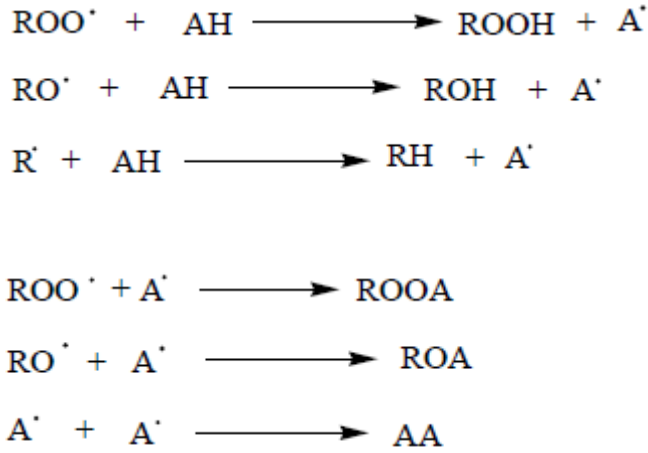
Daha sonra bu lipit radikali başka peroksi radikali oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girer. Bu oksidatif mekanizma kendiliğinden gerçekleşir ve böylece otooksidasyon devam eder [57].



Hidroperoksitler (ROOH) kararsızdırlar ve bozunarak radikaller meydana getirirler. Bu da reaksiyonun hızlanmasına sebep olur [57].



Birincil antioksidanlar (AH) lipid radikalleri (R<sup>·</sup>) ve peroksi radikallerle (ROO<sup>·</sup>) reaksiyona girer ve onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Hidrojen verici olarak birincil antioksidanlar peroksi radikallerine lipidlerden daha çok ilgi gösterirler. Bu sebeple otooksidasyon reaksiyonunda oluşan peroksi (ROO<sup>·</sup>) ve oksi (RO<sup>·</sup>) serbest radikalleri birincil antioksidanlar tarafından giderilirler. Antioksidanlar lipid radikalleriyle doğrudan da etkileşebilirler [57].



Hidrojenin verilmesiyle oluşan antioksidan radikali lipidlerle çok az reaksiyona girer. Oksijen veya lipidlerle antioksidan radikalinin reaksiyonu çok yavaş olduğundan reaksiyon hızı azalır. Kararlı rezonans hibritler oluşturmak için fenol halkasının çevresindeki ortaklanmamış elektronun dağılmasıyla antioksidan radikali kararlı hale getirilir. Antioksidan radikaller peroksi, oksi ve diğer antioksidan radikaller ile sonlandırma tepkimelerine girebilme yeteneğine sahiptirler [56].

Katı ve sıvı yağlarda antioksidan dimerlerin oluşumu gözlenir ve bu oluşum fenolik antioksidan radikallerin kolayca sonlandırma reaksiyonlarına uğradığını gösterir. Antioksidan,

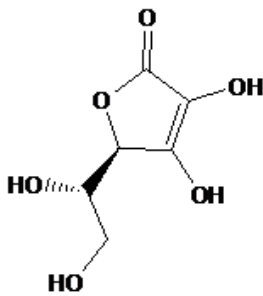
radikal olmayan şekilde ne kadar uzun süre kalırsa antioksidan dimerler otokatalitik serbest radikal zincir mekanizmasını o kadar etkin şekilde durdururlar [56].

#### 4.1.2. İkincil Antioksidanlar

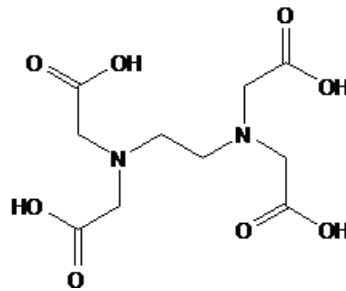
İkincil (tip-2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar birçok reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler. İkincil antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar ama serbest radikalleri daha kararlı yapılara dönüştüremezler. Bu antioksidanlar prooksidan metallere kelat yapabilirler ve onları deaktive edebilirler, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan türlere parçalanmasını sağlayabilirler, singlet oksijeni deaktive edebilirler, ultraviyole radyasyonu absorbe edebilirler veya oksijen giderici olarak davranabilirler. Bu antioksidanlar sıklıkla birincil antioksidanların antioksidan aktivitesini artırırlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil palmitat, lesitin, tartarik asit, EDTA ve  $\beta$ -karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilirler [56].

İkincil antioksidanlar belli başlı etki mekanizmalarına göre 3 gruba ayrılabilir [56]:

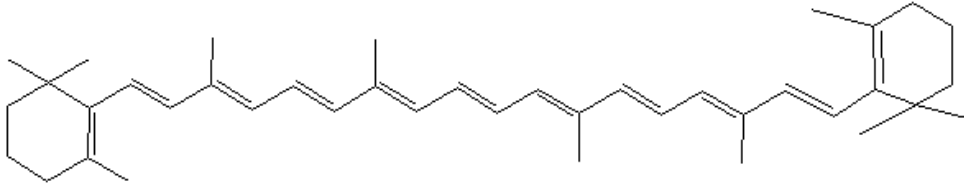
- a) **Kelat Yapıcılar:** Sitrik asit, fosforik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), tartarik asit
  - b) **Oksijen Gidericiler ve İndirgeme Ajanları:** Askorbik asit, askorbil palmitat, eritorbik asit, sodyum eritorbat, sülfidler.
  - c) **Singlet Oksijen Gidericiler:** Karotenoitler ( $\beta$ -Karoten, likopen ve lutein)
- Şekil 5.2' de bazı ikincil antioksidan bileşiklere örnekler verilmiştir.



Askorbik asit (C vitamini )



Etilendiamintetraasetikasit ( EDTA)



$\beta$ -Karoten

Şekil 5.2. İkincil antioksidanlar

## 5. ANTİKOLİNESTERAZLAR

### 5.1. Alzheimer Hastalığı ve Nedenleri

Alman psikiyatrist Aloist Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmış olan Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılardaki primer dejeneratif demansın en sık rastlanan formudur. Demans, bilinci açık bir insanın günlük yaşamını etkileyecek derecede zihinsel ve sosyal uyum yeteneğinin azalması durumudur [57]. Alzheimer hastalığında en erken semptom, genellikle ani başlangıç ve hafıza kaybının meydana gelmesidir. Başlangıçta bu hafıza kaybını yaşlılığa bağlı unutkanlıktan ayırmak güç olabilir. Ancak unutkanlığı olanlar bu durumun farkındadır ve günlük yaşam aktiviteleri minimal düzeyde etkilenir [58]. Yeni bilgilerin hemen unutulması, yakın geçmişi hatırlayamamak, buna karşılık uzak geçmişi çok iyi hatırlamak önemli bir belirteçtir. Alzheimer hastalarında konuşma bozukluğuna sık rastlanır, bu kişiler cümle kurmakta zorlanırlar. Hastalık ilerledikçe hafıza problemleri artar. Zamanla özel bakım işleri bozulur, psikiyatrik semptomlar başlar ve hasta yatağa bağımlı hale gelir [58,59].

Alzheimer hastalığı; beyindeki öğrenme ve hafızayla alakalı bölümlerde kolinerjik nöronların kaybıyla bağlantılı olarak nörofibrillerin düğümlenmesi ve amiloidlerin meydana gelmesi olarak tanımlanır. Kolinerjik çekirdek doku bozulması, kolinerjik sinir iletimini azaltır. Ard arda gelen doku bozulmaları artan toksisiteye bağlı olarak sinirlerin ölümünü hızlandırır [60,61].

Alzheimerli hastalarda beyin neokorteks ve hipokampus gibi yüksek mental fonksiyonlarından sorumlu bölgelerinde patolojik bir protein birikimi görülür. Bu protein birikiminin nedeni  $\beta$ -amiloid plaklardır. Ayrıca neokorteks ve hipokampusun kolinerjik inervasyonunun kaynağı olan bazal ön beyinde ilerleyen bir nöron kaybı da gözlenir. Bu değişimler hafıza kaybıyla sonuçlanan geri dönüşümsüz fonksiyon bozukluklarına yol açar.



Semptomlar ayrıca beynin diğer bölgeleri ve serebral kortekste kolinerjik transmisyonun kaybı ile de ilişkilidir [62].

## 5.2. AChE ve BChE İnhibitörleri

Alzheimer hastalığında ilk ilaç seçeneğini Kolinesteraz inhibitörleri oluşturur. Etkinlikleri US Food and Drug Administration (FDA) tarafından kanıtlanmıştır. Bu etkinlikleri 6 ile 36 hafta arasındaki tedavi süresine incelenmiş ve hastaların bilişsel fonksiyonlarında artış gözlenmiştir [63,64]. Kolinesterazların hastalığı engelleyici ve nörolojik olarak koruyucu etkisinden dolayı ve hastalığın ilk safhalarında nörotoksisiteyi ve fonksiyonel komplikasyonları engellemesi nedeniyle kolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığının tedavisinde umut olmuştur.

Normal erişkin beyinde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır [65]. Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen her dokuda bulunurken, butirikolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferik sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır [66].

## 5.3. Kolinesteraz İnhibitörlerinin Alzheimer Hastalığındaki Mekanizması

Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinesteraz enziminin neden olduğu asetilkolin sinir taşıyıcılarının yıkımını önler. Alzheimerlı hastaların kolinerjik sinirlerinde asetilkolin miktarı azalır. Kolinerjik sinir hücrelerinin kaybı bilişsel olarak tehlike yaratmaktadır. Asetilkolin enzimi, amiloid beta (A-beta) denilen plakaların oluşumunu destekler, bu plakalar ise asetilkolinesteraz enziminin hidrolize olarak kolinin açığa çıkmasını azaltır [67,68].

Amiloid proteinler dallanmayan fibrillerden yapılmıştır ve beta kıvrımlı tabaka yapısı gösterirler.  $\beta$ -amiloid 21. kromozomda kodlanan transmembran protein olan APP (Amiloid Prekürsör Protein) 'nin sekretaz enzimiyle kesilmesi, sonucu oluşur. APP, amiloid diziliminde valin yerine izolösin, glisin yerine fenilalanin değişiminden dolayı mutasyona neden olmakta bu da  $\beta$ -amiloidin depolanmasında etkili olmaktadır. Bu enzimler  $\alpha$  sekretaz,  $\beta$  sekretaz,  $\gamma$  sekretaz enzimleridir. Hastalıkta  $\alpha$  ve  $\beta$  sekretaz enzim aktiviteleri arasındaki dengenin  $\beta$  sekretaz enzim lehine gelişmesi nöronal dejenerasyona sebep olmaktadır [69]. Rees ve B. John, asetilkolinesterazın A-beta ile direkt olarak etkileşebilmesinden dolayı bu peptidin çözünen plakalar içinde kümelenme imkânı bulup, buna uygun şekilde düzenlenen

kolinesteraz inhibitörleri hastalığın ilerlemesini inhibe ederek bulgusal yararlar sağladığını ileri sürmüşlerdir. Birçok veriye dayanarak, bu araştırmacıların hipotezi; asetilkolinesteraz inhibisyonunun amiloid başlatıcı proteini (APP) üreterek, sinir hücrelerini koruyan bir sürecin başlamasını sağlamaktır [60]. Kısacası amiloidler (Amyloidler) beyin hücreleri arasındaki haberleşmeyi engeller ve beyin hücrelerinin yavaş yavaş ölmesine sebep olurlar [70].

Alzheimer hastalarında beta amiloid (A-beta) üretimi sağlıklı bir birey ile aynı olmakla birlikte, beta amiloidlerin dışarı atılmasında sorun yaşanmaktadır. Normal olarak beta amiloidler hücrenin dışına çıktığı zaman erir, ancak bazen erimesi mümkün olmayan ve adına “fibril” denilen birikintiler oluştururlar. Bu fibriller birbirine yapışarak plakalar haline gelir. Her insan yaşlandıkça plaka üretir. Gerçek sorun, bu plakaların iltihaplanma ile sonuçlanan reaksiyonları tetiklemesidir. Beyin, genel olarak, enfeksiyonlarla mücadele ederken serbest radikal denilen toksik ajanlar üretir. İşte bu fibriller de benzer reaksiyonlara zemin hazırlar. Nöronun küresel gövdesi, akson denilen ince uzantılarla kaplıdır. Bunlar diğer hücrelerle bağlantı kurmaya yarar. Adına mikrotüp denilen içyapıların çevresinde oluşan uzantılar, dolaşım sistemi olarak görev yapar; besinleri taşır ve kimyasal mesajları iletir. Bu sistemi, adına tau denilen bir çeşit yapışkanlı protein bir arada tutar. Tau molekülleri, mikrotüplerin kenarlarına sıkıca yapışır. Alzheimer söz konusu olduğunda, tau molekülleri ayrılır ve kendiliğinden düğümler oluşturur. Bu durumda mikrotüpler parçalara ayrılır ve nöronlar ölür [71].

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stres biyomolekülleri oksitleyerek hücre tahribatına neden olur [72]. Toksik beta amiloidlerin yavaş yavaş birikimi, sürekli oksidatif stres ve benzeri olaylarla birleştiğinde nöronlarda yapısal bozukluğa yol açmaktadır. Bu süreç; fonksiyonel aksaklıklara, kavramsal ve davranışsal bozukluklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Beyindeki beta amiloid birikimini hızlandıran patofizyolojik durumlar Alzheimer riskini arttırmaktadır [66].

Sonuç olarak; oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk adımlarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynamaktadır [72].

Beyinde nöronlar arası veya bir nöron ile başka bir (tür) hücre arasında iletişimi sağlayan kimyasal araçılara “nörotransmitter” denir. Sinir sistemi boyunca sinirsel sinyaller bu kimyasal iletkenler aracılığıyla iletilir. Temel olarak iki nörotransmitter madde bulunur:

**Asetilkolin nörotransmitter:** Dokulardaki bilgiyi ve ya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolin esteraz adlı enzim tarafından parçalanır. Bir

sonraki bilgi aktarımı için yeniden asetilkolin üretmek gerekir. Asetilkolin, Alzheimer hastalarında yeterince üretilmemektedir. Asetilkolini parçalayan asetilkolinesteraz enziminin frenlenmesi ile Alzheimer hastalığının ilerlemeyeceği düşünülmektedir [73].

**Glutamat:** Sinir hücrelerinde % 70 oranında bulunur. Görevi; öğrenme ve hafızadır. Alzheimer hastalarında glutamat çok yoğun şekilde salgılanır ve bu durum sinir hücrelerinin tahrip olmasına yol açar. Glutamat salgılanması frenlenirse sinir hücrelerinin ölümünün yavaşlayacağı ve Alzheimer hastalarının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği düşünülmektedir [73].

Alzheimer hastalığında kullanılan iki önemli tedavi seçeneği “kolinesteraz inhibitörler” ve “N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir”:

Kolinesteraz inhibitörleri bellek ve düşünce ile ilgili bir nörotransmitter olan asetilkolinin parçalanmasını önlemeye yardımcı olurlar [66].

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri ise öğrenme ve bellek fonksiyonları açısından önem taşıyan bir transmitter olan glutamata düzenleyici etkiye sahiptir [66].

## 6. SİTOTOKSİK AJANLAR

Dünyada mevcut sentetik antikanser ilaçların yetersiz kalması nedeniyle biyolojik ilaçlara yönelim olmuştur, bunlardan bitkisel kökenli olarak Taxol ve Vinca alkaloidleri oldukça sık kullanılan ajanlardır, ayrıca yine MAb's (monoklonal antibody's) çok kullanılmaktadır.

Bu çalışmada ekstrelerin hücre proliferasyonunun ölçülmesi için önce 3,[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) tetrazolyumtuzu ile sitotoksite testine tabii tutuldu, yani hücre canlılığı ölçüldü. L929 fibroblast ve kanserli Akciğer hücre serisi (A549) üzerine ekstrelerin etkisi incelendi.

## 7. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi ile Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi' nde yürütülmüştür. Bitkisel materyal olarak *Salvia marashica* (ISTE No: 98045) kullanılmıştır. *Salvia marashica* toprak üstü kısımlarının ardarda üç çözücü (diklorometan, aseton ve metanol) ile tüketilmesinin ardından yapılan ince tabaka kromatografisinde diklorometan ve aseton çözücülwerinin aynı lekeleri göstermesi üzerine bu

iki ekstre birleştirelerek aseton ekstresi olarak isimlendirilmiştir. Bundan sonraki çalışmalarda önce her iki ekstrenin toplam fenolik miktarları pirokatekole ve toplam flavonoit miktarları da kersetine eşdeğer olarak belirlenmiştir. Akabinde lipid peroksidasyon inhibisyonu, serbest ve katyon radikal giderimi ve CUPRAC yöntemleriyle antioksidan aktiviteleri araştırılmış, bu amaçla başlıca  $\beta$ -karoten-linoleik asit ile renk açılımı lipid peroksidasyon inhibisyon, DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC (Bakır(II) İndirgeyici Antioksidan Kapasite), yöntemleri kullanılmıştır.

Antikolinesteraz aktivite tayinleri ise asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkinesteraz (BuChE) enzimlerine karşı Ellman metodu ile in vitro yapılmıştır. *Salvia marashica* bitkisinin aseton ve metanol ekstrelerinin taşıdığı biyoaktif bileşiklerin yapıları ise NMR ve MS spektroskopik yöntemleriyle belirlenmiştir.

## 7.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Merck; 1.07734.1000 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm), BHT, BHA, sodyum bikarbonat, potasyum asetat (susuz), asetik anhidrit, petrol eteri, sülfirik asit (%98), Hidroksil amin hidroklorür, metil iyodür, tetrahidrofuran, sodyum hidrür.

Sigma-Aldrich; Chemistry Serium (IV) sülfat, DTNB(5,5'-Dithiobis (2-Nitro-benzoik asit)), Folin Ciocalteu reaktifi,  $\alpha$ -Tokoferol,  $\beta$ - karoten, Tween-40, Linoleik asit, pirokatekol, kersetin, DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil), Sigma-Aldrich asetiltiyokolin iyodür, butiriltiyokolin iyodür, sodyumbifosfatdihidrat, sodyumdihidrojenfosfatdihidrat, asetilkolinesteraz ve butirilkinesteraz, metanol, aseton, etanol, etil asetat

Riedel-de Haen; diklorometan, kloroform, sodyum karbonat, pridin, sodyum sülfat.

Carlo Erba; alüminyumnitratnonahidrat

Fluka; krom (VI) oksit

### 7.1.1. Çözeltilerin Hazırlanması

#### *Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler*

% 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 1 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mL'lik balon jøjeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile hacmine tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit +  $\text{CuSO}_4$ ): Satın alındığı şekilde kullanıldı.

### ***Toplam flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler***

% 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması: 1,76 g  $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

1 M Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması: 0,98150 g  $\text{CH}_3\text{COOK}$  10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

### ***Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler***

0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH tartılarak 100 mL etil alkolde çözüldü. 0,1 mM  $\beta$ -Karoten çözeltisinin hazırlanması: 0,2 mg  $\beta$ -karoten 1 mL kloroformda çözüldü. 20  $\mu\text{g}$  linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform rotavaporatörde uçurulduktan sonra 50 mL oksijen gazı ile doyurulmuş destile su ilave edilerek kuvvetlice karıştırıldı.

### ***Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler***

0,1 M  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  Çözeltisinin Hazırlanması: 1,56 g  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  tartılıp, 100 mL distile suda çözüldü.

0,1 M  $\text{HPO}_4^{2-}$  Çözeltisinin Hazırlanması: 3,556 g  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  tartılıp, 200 mL distile suda çözüldü.

0,1 M pH=8 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 94,7 mL  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ve 5,3 mL  $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$  çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

0,1 M pH=7 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 3,9 mL  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  ve 6,1 mL  $\text{HPO}_4^{2-}$  çözeltilerinden alındıktan sonra 10 mL distile su eklenerek hazırlandı.

DTNB Çözeltisinin Hazırlanması: 16 mg DTNB 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde ve 7,5 mg  $\text{NaHCO}_3$  1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlandı. Kullanma aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi.

AcI: 32,8 mg AcI alınarak, 8 mL deiyonize su eklendi. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

BuI: 4 mg BuI alınarak, 8 mL deiyonize su eklendi. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

AChE Enzimleri: 1,17 mg AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrıldı. Her biri için 0,235 mg/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu. 8 mL distile su eklenmesi sonucu 125  $\mu\text{L}$ 'lik enzim çözeltileri elde edildi. Her bir 125  $\mu\text{L}$ 'lik

örnekte 0,02925 mg enzim bulunmaktadır. 125 µL'lik enzim çözeltisine 460 µL pH=8 tampon çözeltisi eklendi. 585 µL çözelti 25 µL' lik 23 küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 3000 µL'ye tamamlandı.

BChE Enzimleri: 1 mg BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü. Bu çözeltiden 300 µL'lik stoklar oluşturularak küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1800 µL pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilmektedir.

### ***İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi***

Serik sülfat belirtecinin hazırlanması: 2,0 g seryum (IV) sülfat tetrahidrat 100 mL % 10'luk H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de çözülerek hazırlandı. Belirteç, uygun çözücü sisteminde yürütülen ince tabaka plaklarına pulvarizatör kullanılarak püskürtüldü.

## **7.2. Cihazlar ve Gereçler**

Eliza Reader Molecular Devices Spectro Max 340 PC

Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı (NMR): Bruker AC (<sup>1</sup>H: 250 MHz; <sup>13</sup>C: 60 MHz), Varian Mercury (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz), Varian Inova (<sup>1</sup>H: 500 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz)

FT-IR (Thermo, Nicolet 6700)

Ultraviyole Spektrofometresi (UV-Vis) (Shimadzu UV-1601)

Erime derecesi cihazı (Reichert firmasının Kofler model cihazı)

Döner Buharlaştırıcı (Rota Evaporatör, Büchi ve Heidolph)

Hassas terazi (Ohaus Adventurer-Pro)

Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı (IKA RCT basic hot plate)

Vortex IKA MS3 basic

Ultrasonik Banyo (Fisher Scientific FB 15051)

pH-metre (WTW Inolab pH 720)

Etüv (Ecocell)

UV kabin ve lamba (Camag)

Otomatik tekli ve çoklu pipetler (0,5-10 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL)  
(Eppendorf)

Azot Tüpü

### **7.3. Aktivite Testleri**

#### **7.3.1 Antioksidan/Antiradikal Aktivite Testleri**

##### **Elektron ve Hidrojen Transferine Göre Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri :**

**A-** Elektron transfer metodunda antioksidan maddenin ölçümü oksidan maddenin indirgenmesi sonucunda meydana gelen rengin değişiminin ölçülmesi ile yapılır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan madde konsantrasyonuna bağlıdır. Bunlar;

ABTS/TEAC (Antioksidan Kapasite Ölçme Metodu)

DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi

Folin-Ciocalteu (Total Fenolik Madde Miktarı Ölçme Metodu)

FRAP -Ferric Reducing Antioxidant Power- (Demir İyonu İndirgeme Gücü Metodu)

CUPRAC-Cupric Reducing Antioxidant Capacity- Metodu

**B-** Hidrojen atomu transferine dayanan metotların çoğunda antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı tepkimeler gözlenir ve bu metoda dayalı ölçümler genelde azotlu grup taşıyan maddelerin bozulup peroksil radikalleri oluşumuna dayanır. Bunlar;

Düşük dansiteli lipoprotein otooksidasyonunun neden olduğu inhibisyon

Oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC)

Toplam radikal yakalama parametresi (TRAP)

Luminol yöntemi

Fikoeritrin esaslı yöntemler

Krosin yöntemi

DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi

TOSC (Toplam oksiradikal) yöntemi

##### **7.3.1.1. Toplam Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi**

Toplam fenolik bileşik miktarı Slinkard ve Singleton (1977) metoduna dayanarak Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ile belirlendi [78]. Sonuçlar eşdeğer pirokatekol olarak ifade edildi.

#### *Toplam Flavonoit Miktar Tayini*

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak hesaplandı. Standart madde olarak pirokatekol kullanıldı. Ekstrelerin etanolde çözeltileri hazırlandı. 1000 ppm olarak hazırlanan pirokatekol çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri etanolle 200 µL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu karışımlara su, FCR reaktifi ve 3 dk sonra %2'lik Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı ve örneklerin absorbensları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

Standart pirokatekol denklemi:

$$\text{Absorbans}=0.0660 \text{ pirokatekol } (\mu\text{g})- 0.0008 R^2= 0.9918$$

#### **7.3.1.2. Toplam Flavonoid Miktarının Belirlenmesi**

Toplam flavonoid konsantrasyonu Moreno ve arkadaşlarının belirttiği metoda göre yapıldı [78]. Kersetin standart olarak kullanıldı ve sonuçlar eşdeğer kersetin olarak ifade edildi.

#### *Toplam Flavonoit Miktar Tayini*

*Salvia marashica* bitkisinin aseton ve metanol ekstralarının toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak belirlendi [79]. Her bir örnekten 100 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Kersetinin 1000 ppm'lik çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Bu karışımlara 100 µL 1M potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µL %10'luk alüminyum nitrat çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de absorbensları okundu. Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

Standart Kersetin Denklemi: Absorbans= 0.0768 Kersetin(µg)- 0.0109 R<sup>2</sup>= 0.9979

#### **7.3.1.3. β-Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (Lipit Peroksidasyon İnhibisyon Aktivitesi)**

β-Karoten-linoleik asit yöntemi, linoleik asit oksidasyonundan kaynaklanan konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem, β-karotenin



renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir.  $\alpha$ -Toc, BHT, kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 20, 40, 80  $\mu\text{g/mL}$  olacak şekilde, 4 mL  $\beta$ -karoten çözeltisi ilave edildi. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez UV-spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Kontrol olarak etanol kullanıldı. Tüpler 50°C' de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki  $\beta$ -karotenin rengi kayboluncaya kadar (yaklaşık 120 dakika) inkübasyona devam edildi. Bu süre sonunda absorbans tekrar 490 nm' de ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi [76].  $\beta$ -Karotenin renk açılım oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı [77].

$$R = \ln(a/b)/t$$

ln=doğal logaritma

$a$ =başlangıç absorbansı

$b$ = t zaman (dakika) inkübasyonundan sonraki absorbans.

Toplam antioksidan aktivite, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Antioksidan Aktivite (\%İnhibisyon)} = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100$$

#### **7.3.1.4. DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi**

Antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir metottur. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Mor renkli DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla rengi mordan sarıya dönüşür. Bu yöntem antioksidanların süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli yöntemdir. Yöntem hızlı ve basittir. Ancak bazı bileşenlerin (özellikle karotenoidler) 517 nm'de DPPH ile çakışık spektrum vermesi analizin yorumunu güçleştirir. Ayrıca çoğu sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş reaksiyona girer. Bundan dolayı yöntem; DPPH ile tepkimeye giren antioksidanların antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir sonuç vermez. Bunlara ek olarak DPPH'nin rengi; ışık, hava oksijeni, nem ve pH'a fazla duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçların eldesi güçtür [75].

Bitki ekstralarının serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. 10 µg ile 100 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1'er mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden ilave edildi. Kontrol olarak Bütiril hidroksi toluen (BHT) kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm' de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı :

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

#### **7.3.1.5. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi**

Ekstrelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi [80]. Örneklerin etanol çözücüsünde 1000 ppm'lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL alınarak etanol ile hacimleri 40 µL'ye tamamlandı ve üzerlerine 7 mM ABTS katyon radikali çözeltisinden 160 µL ilave edildi. Reaksiyon karanlıkta 6 dakika bekletildikten sonra 734 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ İnhibisyon} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100$$

#### **7.3.1.6. CUPRAC Yöntemi (Bakır (II) İyonu İndirgeme Antioksidan Kapasitesi)**

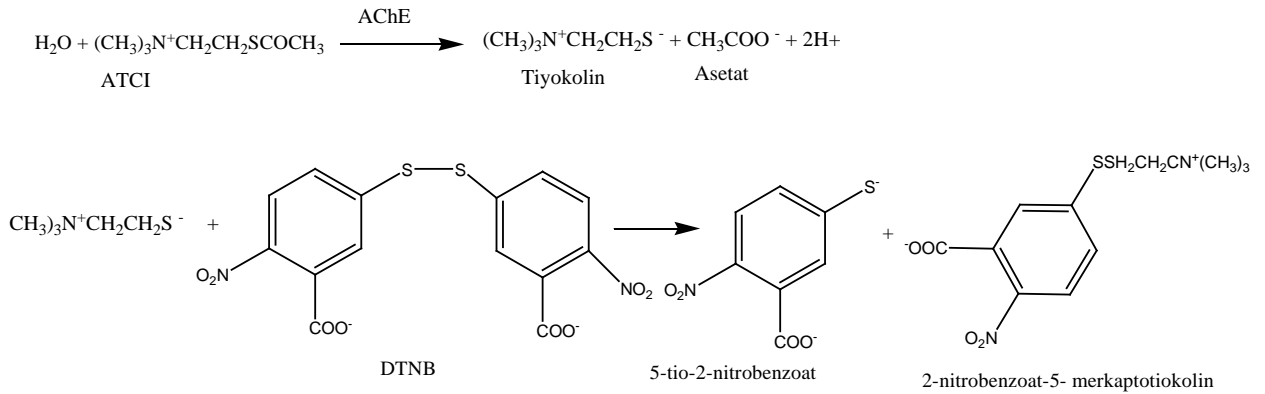
CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenmesi sağlandı ve bu kelatın 450 nm'de absorbansı ölçüldü. Son konsantrasyonları 10, 25, 50, 100 µg/mL olacak (67-x µL) şekilde 1000 ppm'lik hazırlanan örneklerin stok çözeltilerinin ve standartların üzerine, 61 µL 0.01 M CuCl<sub>2</sub>, 61 µL 0.0075 M neokuproin ve 61 µL 1 M NH<sub>4</sub>OAc tamponu ilave edilerek ve 1 saat sonra 450 nm'de absorbans ölçüldü [81]. Örneklerin absorbans değerleri standartlara karşı değerlendirildi.

### 7.3.2. Antikolinesteraz Aktivite Testi

Testler Asetilkolinesteraz (AChE) ve Butirilkolinesteraz BChE (BuChE) enzimlerini inhibe etmek üzere her iki enzime karşı ayrı ayrı in vitro olarak gerçekleştirildi.

Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman ve ark., (82) reaksiyonuna göre modifiye edilerek yapılmıştır. Reaksiyon her iki enzimle de tamamen aynı mekanizma üzerinden gerçekleşmekte, sadece kullanılan enzim (AChE veya BChE) ve onların substratlarının farklı olmasına dayanmaktadır. Gerçekleştirdiğimiz testlerde Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak yılan balığından elde edilen asetilkolinesteraz enzimi ile substrat olarak asetiltiyokolin iyodür, Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi içinse enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkolinesteraz enzimi ile butiriltiyokolin iyodür substratı kullanılmıştır. 5,5'-Ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) ise her iki antikolinesteraz aktivitesinin ölçümü için kullanılmıştır.

Gerçekleşen kimyasal reaksiyonu aşağıda Asetilkolinesteraz enzimi için görmekteyiz.



#### 7.3.2.1. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivite testi

0.1 mM konsantrasyonda pH'ı 8 olan fosfat tamponuna DTNB ve asetilkolinesteraz enzimi eklenip oda sıcaklığında (25°C) 15 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyona asetiltiyokoliniyodür eklenerek başlanmış ve enzim katalizinden oluşan tiyokolinin DTNB ile reaksiyonundan oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoatın konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmüştür.

### 7.3.2.2. BChE Enzim İnhibisyonu Testi

0.1 mM konsantrasyonda pH'ı 8 olan fosfat tamponuna DTNB ve bütirilkolinesteraz enzimi eklenip oda sıcaklığında (25°C) 15 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyona bütiriltiyokolin iyodür eklenerek başlanmış ve enzim katalizinden oluşan tiyokolinin DTNB ile reaksiyonundan oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoatın konsantrasyonu 412 nm de spektrofotometrede ölçülmüştür.

Yukarıdaki işlemler Elisa Reader cihazında 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirilmiştir.

#### *Reaktiflerin Hazırlanışı ve Testin Yapılışı*

**DTNB:** 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7.5 mg NaHCO<sub>3</sub> 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 mL pH=7 tamponu ile hacmi 4 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 mL pH=8 tamponu eklendi.

BChE enzimi için substrat olarak kullanılan butirilkolin iyodürün 4 mg'ı 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 mL lik hacim, pH=8 tamponu ile 16 mL'ye tamamlandı.

**BChE Enzim Çözeltisi:** 0,2 mg bütirilkolinesteraz enzimi 1,8 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözümlenerek hazırlandı.

Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve 20 µL substrat (BcI) herbir kuyucuğa ilave edildi.

Standart olarak Galanthus bitkisinden izole edilmiş antikolinesteraz etkili bir alkaloid olan ve halihazırda tüm dünyada hafif-orta dereceli Alzheimer tedavisinde ilaç olarak kullanılan an Galanthamin kullanıldı.

Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.

Aynı işlem AChE enzimi ile başlayarak aynı şekilde gerçekleştirildi. Mikroplakadaki etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve asetilkolin iyodür (AcI) (20 µL) herbir kuyucuğa ilave edildi. Standart

olarak galantamin kullanıldı. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.

### 7.3.3. MTT Testi ile Sitotoksitenin belirlenmesi

Sitotoksitenin belirlenmesi için MTT testi kullanıldı. Sitotoksik aktiviteler hizmet alımı ile KÜBTAL (Kırıkkale Üniversitesi)' e yapılmıştır. Bu test hücre proliferasyonunun ölçülmesi için 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) tetrazolyumtuzu'nun kullanıldığı hassas bir metoddur. Eğer canlılık %70 in altında hesaplanırsa numune sitotoksik potansiyele sahip demektir. L929 Fibroblast hücreleri ve A549 hücreleri 96 well plakelere her bir kuyucuğa  $1.0 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekimi yapıldı. Hücreler 24 saat süreyle inkübasyona bırakıldı. Numuneler 1mg/ ml olacak şekilde hazırlandı. UV altında sterilizasyonu yapıldı ve 0,20 µm lik filtreden geçirildi. Hazırlanan ekstraktlardan belirlenen 100 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml konsantrasyonlarda hücrelere uygulanarak 24 saat inkübe edildi. Kontrol olarak sadece besi ortamı hücrelere uygulandı. 24 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar atılarak her kuyucuğa 100 µl besiyeri ve 10 µl MTT çözeltisi ilave edildi. 37 °C'de 3,5 saat inkübasyondan sonra kuyucuklara 150 µl DMSO eklenerek 15 dakika inkübe edildi. Hücre canlılığının tespiti için 96 kuyucuklu plate'in absorbans değerleri ELISA plate okuyucuda 570 nm'de okutuldu. Kontrol grupları baz alınarak % canlılık aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı.

$$\text{Viab. \%} = \frac{100 \times \text{OD}_{570a}}{\text{OD}_{570b}}$$

$\text{OD}_{570a}$ : numunenin optik yoğunluğunun değeri

$\text{OD}_{570b}$ : kontrol grubunun optik yoğunluğu

## 7.4. Kullanılan Kromatografik Yöntemler

### 7.4.1. Kolon Kromatografisi

Ekstreleri fraksiyonlandırmak ve bu fraksiyonlardan saf madde elde etmek amacıyla kolon kromatografisi yöntemi kullanıldı. Sütun dolgu maddesi olarak silikajel [81] ve Sephadex LH-20 kullanıldı. Ekstreler az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş, ekstre miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silikajel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına yerleştirildi. Elüsyona apolar bir çözücü olan % 100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla diklorometan, aseton ve metanol ile polarite artırılarak elüsyona devam edildi, sonunda % 100 metanol ile elüsyon tamamlandı.

Benzer fraksiyonlar birleştirildi ve saflaştırma için daha küçük boyuttaki kolonlarda adsorban olarak silikajel kullanıldı.

### 7.4.2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde, alüminyum üzerine silikajel kaplı hazır plaklardan (20x20 cm) [82] ve cam plaklardan (20x20; 20x10) yararlanıldı. Tatbik edilen maddelerin uygun çözücü sistemleriyle ilerlemesi sağlandı. Çözücü ile yürütme işleminin ardından ortaya çıkan lekeler UV ışık altında işaretlendikten sonra özel bir belirteç olan serik sülfat belirteci ile etüvde 105 °C'de 5 dakika bekletilerek belirgin lekeler gözlenmesi sağlandı. İnce tabaka kromatografisinde maddelere özgü Rf değerleri sayesinde farklı maddeler ayırt edilebildi.

Ayrıca preparatif ince tabaka kromatografisi (prep. TLC); az miktardaki karışımlardan istenilen maddeyi ayırt etmek için uygulandı. Önce uygun analitik koşullar belirlendi. İçindeki bileşikler ayrı ayrı izole etmek istediğimiz madde; plaklara başlangıç çizgisi boyunca düzgün bir şekilde tatbik edildikten sonra maddelerin ayrılmasına olanak verecek uygun polariteye sahip çözücü sistemi belirlenerek yürütüldü. UV ışık altında birbirinden ayrılmış çizgiler halinde maddeler tespit edilerek, ayrı ayrı erlenlere alındıktan sonra uygun çözücülerle muamele edilen maddeler saf halde geri kazanıldı.

## 7.5. Kullanılan Spektroskopik Yöntemler

### 7.5.1. NMR (Nükleer Magnetik Rezonans) Spektroskopisi

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, APT(attach proton test) ve <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY (proton-proton etkileşimi için). APT testi ise C atomlarının hangi tip olduğunu yani CH, ve CH<sub>3</sub> protonlarını spektrumun alt tarafında, CH<sub>2</sub>

ve C katerner protonlarını ise üst tarafta gösteren bir  $^{13}\text{C}$  NMR tekniğidir. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), döterometanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ve döterodimetilsülfoksit ( $\text{CD}_3\text{SOCD}_3$ ) kullanıldı. Saf bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR analizleri 600 MHz,  $^{13}\text{C}$  NMR analizleri 150 MHz Varian ID-6508 indirect problu cihazlarda TÜBİTAK'ta yapılmıştır.

### **7.5.2. Kütle Spektroskopisi**

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin NMR sonuçları değerlendirildikten sonra kütle spektroskopisi yardımıyla kesin sonuçlar elde edildi. Kütle spektrumları (+) APCI (Positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization) metoduyla LCQ-Deca Ion Trap cihazıyla alınmıştır.

#### **7.5.2.1 LC-MS/MS çalışma şartları**

Bitki ekstralarının kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan LC-MS/MS cihazının genel sistemi: Shimadzu Neexera model UHPLC cihazı ile Shimadzu LCMS 8040 model üçlü kuadrupol kütle spektrometre cihazının birleşiminden oluşmaktadır. Kullanılan sıvı kromatografi sistemi LC-30 AD model gradient pompa, DGU-20A3R model degazer, SIL-30AC model oto örnekleme ve CTO-10ASvp model kolon fırınından oluşmaktadır. Kromatografik ayırım, Inertsil ODS-4 model C18 (100 mm $\times$ 2,1 mm, 2 $\mu\text{m}$ ) kolonda yapılmıştır. Kolon fırını 35 °C'a ayarlanmıştır. Elüsyon gradiyentinde hareketli faz A için ultrasaf su ve hareketli faz B için asetonitril kullanılmıştır. Ek olarak, daha iyi bir kromatografik ayırım ve iyonlaştırmayı kolaylaştırmak için su fazına 10 mM amonyum format ve % 0,1 formik asit eklenmiştir. Analitlerin optimum ayırımının gerçekleşmesi için yapılan pek çok denemenin ardından en uygun UHPLC gradiyent profili 5-20% B (0-10 dk), 20% B (10-22 dk), 20-50% B (22-36 dk), 95% B (36-40), 5% B (40-50 dk) şeklinde optimize edilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0,25 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 4  $\mu\text{L}$  olarak belirlenmiştir.

Üçlü kuadrupol kütle spektrometresi (MS) hem negatif hem de pozitif modda çalışan bir ESI (elektrosprey iyonlaştırma) kaynağı ile donanımlıdır. LC-ESI-MS/MS verileri cihazda kayıtlı olan by LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japonya) yazılımı ile toplanarak işlenmiştir. Analitlerin miktarsal tayini için cihaz ile MRM (multiple reaction monitoring) modunda çalışılmış ve moleküler (parent) iyonlar bir veya iki parçalanma ürünü (product

ions) (ilki kantitatif amaçlı diğeri kalitatif amaçlı kullanılmıştır) ile kombine edilmiştir. Kütle spektrometresinde optimize edilen diğere parametreler şunlardır: arayüz (interface) sıcaklığı; 350 °C, DL sıcaklığı; 250 °C, heat block sıcaklığı; 400 °C, nebulizer gaz (N<sub>2</sub>) akışı; 3L/dk ve kurutma gazı (N<sub>2</sub>) sıcaklığı; 15L/dk.

## **7.7. Bitkinin Ekstre Edilmesi**

*Salvia marashica* bitkisinin toprak üstü kısımları (2065gr) gölgede kurutulduktan sonra bitki değirmeninde küçük parçalar haline getirilerek öğütüldü. Toz haline getirilen bitkiye oda sıcaklığında ilk olarak diklorometan ilave edildi. Bu şekilde tüketilen bitki süzülde ve çözücü rotavapor da uçurularak ekstre elde edildi, bir kaba alındı ve ikinci maserasyon işlemi için tekrar diklorometan içerisinde beklemeye alındı.

*Diklorometan ile İlk tüketimden elde edilen ekstre*; 14,4 g, (%0,69 Verim)

Daha sonra diklorometan ile ikinci tüketimden sonra elde edilen ekstre ilk DCM Ekstresinin üzerine ilave edildi. Diklorometan ekstresi toplamı = 237,30 g olduğu gözlemlendi.

Müteakiben aynı bitki Aseton ile ekstre edildi ve toplam Ac Ekstresi: 115.89 g olarak elde edildi.

Diklorometan ekstresi ile Aseton ekstresi ince tabaka kromatografisi (İTK) ile (Mobil faz DCM:Ac / 9:1 sisteminde) mukayese edildi ve ekstrelerde aynı maddeler olduğu gözlemlendi.

Standart olarak Ursolik Asit ve Oleanolik Asit kullanıldı ve ekstrelerde Ursolik asit/Oleanolik asit varlığı gözlemlendi.

Net olarak 13.05 g metanol ekstresi ve 28,7 g aseton ekstresi elde edilerek kolon uygulamasına geçildi.

## **8. BULGULAR**

### **8.1. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri Sonuçları:**

Hazırlanan iki ekstrenin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. Metanol ekstresinin fenolik içerik bakımından aseton ekstresine göre çok daha zengin olduğu tespit edildi. Fakat flavonoit içerik bakımından ise birbirine yakın değerlerde içeriğe sahip oldukları tespit edildi (Tablo 3). Ayrıca her iki ekstrenin fenolik içeriğinin flavonoit içeriğine oranla daha zengin olduğu belirlendi.



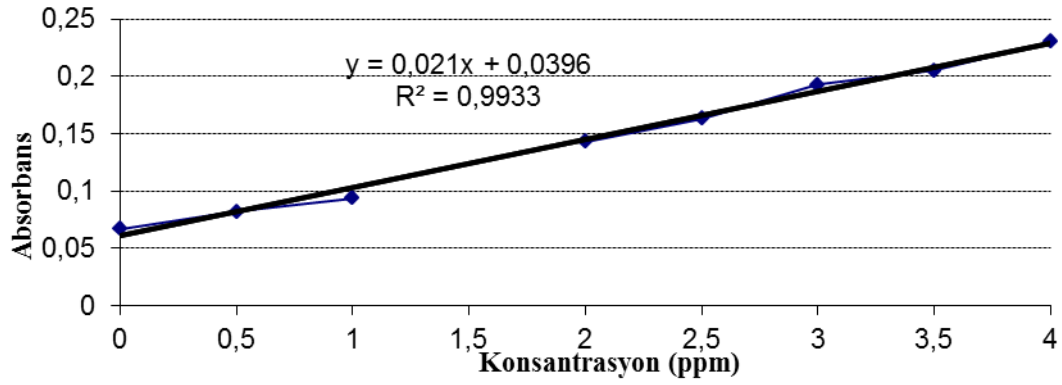
**Tablo 3.** Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoit Miktarları<sup>a</sup>

Ekstreler	Toplam Fenolik Miktar ( $\mu\text{gPEs/mg}$ ekstre) <sup>b</sup>	Toplam Flavonoit Miktar ( $\mu\text{gQEs/mg}$ ekstre) <sup>c</sup>
SMA	46,19 $\pm$ 2,14	25,13 $\pm$ 1,15
SMM	172,38 $\pm$ 3,37	30,46 $\pm$ 0,81

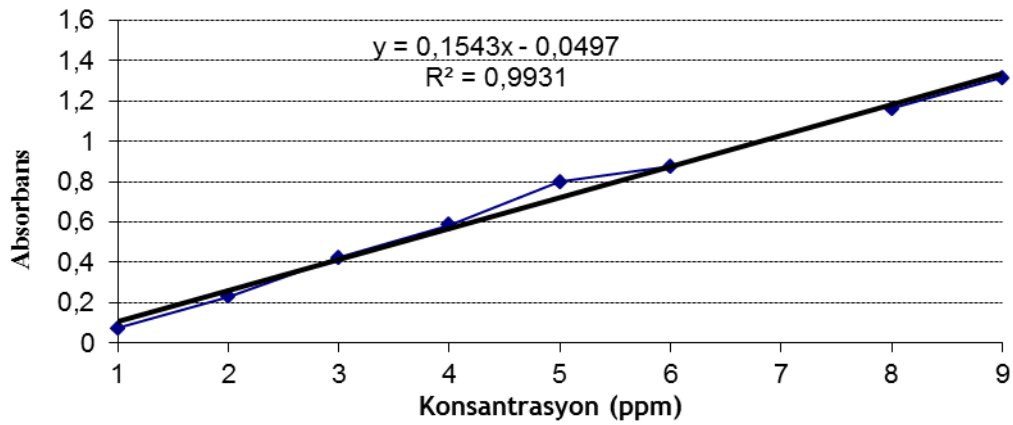
<sup>a</sup> Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verildi.

<sup>b</sup> Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik ( $y=0,021x+0,0396$   $R^2=0,9993$ )

<sup>c</sup> Kersetine eşdeğer flavonoit içerik ( $y=0,1543x-0,0497$   $R^2=0,9931$ )



**Şekil 6.** Pirokatekolün ölçü grafiği



**Şekil 7.** Kersetinin ölçü grafiği

## 8.2. Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

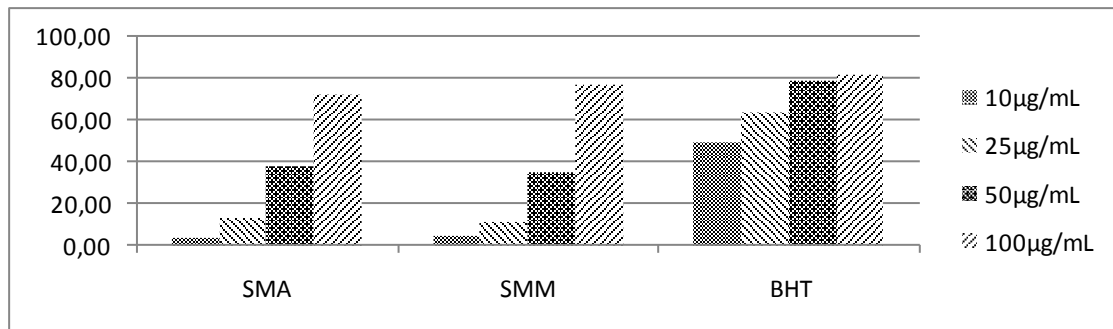
### 8.2.1. $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları

Hazırlanan ekstrelerin toplam antioksidan aktiviteleri  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemine göre dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) yapıldı. Antioksidan aktivite karşılaştırmalarında standart olarak BHT kullanıldı. Bu yöntemde iki ekstrenin 100  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonda %70 civarında inhibisyon gösterdiği tespit edildi (Şekil 8). Aynı şekilde iki ekstrenin  $\text{IC}_{50}$  değerlerinin yakın olduğu belirlendi (Tablo 4).

**Tablo 4.** Ekstrelerin  $\beta$ -Karoten, DPPH ve ABTS yöntemlerine göre antioksidan aktiviteleri<sup>a</sup>

Bitki türü	$\beta$ -Karoten-linoleik asit	DPPH Serbest Radikal	ABTS Katyon Radikal
SMA	69,98 $\pm$ 1,70	208,95 $\pm$ 3,65	93,72 $\pm$ 1,39
SMM	67,83 $\pm$ 1,15	33,59 $\pm$ 0,72	15,04 $\pm$ 0,08
BHT	11,3 $\pm$ 0,03	58,86 $\pm$ 0,50	22,29 $\pm$ 0,67

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

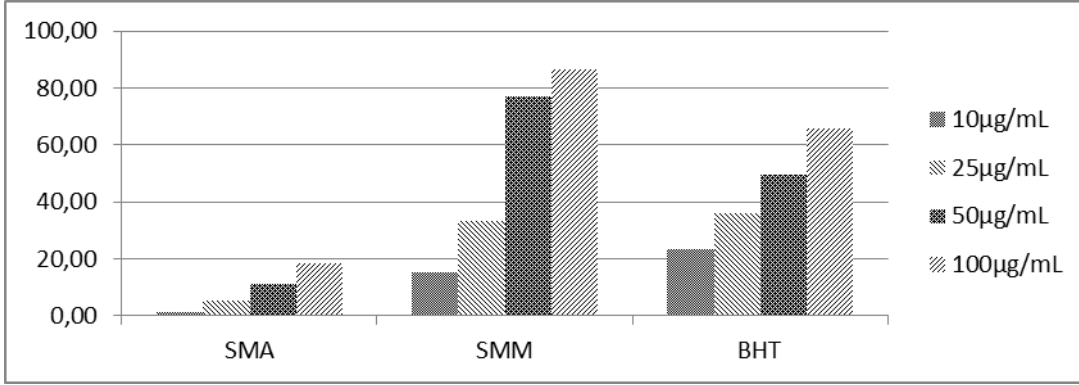


**Şekil 8.** Ekstrelerin  $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yönteminde % İnhibisyon

### 8.2.2. DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları

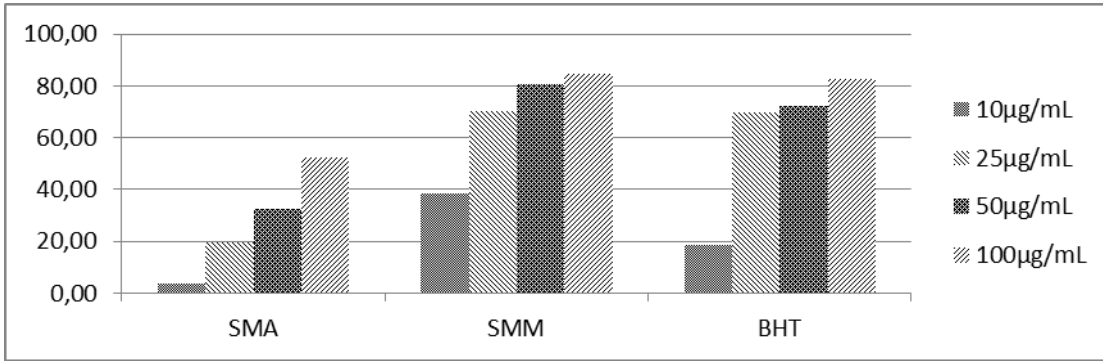
Hazırlanan ekstrelerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi dört farklı

konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) tayin edildi (Şekil 9). Daha sonra IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Standart olarak kullanılan BHT'e göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı. Bu yöntemde, Özellikle metanol ekstresinin hem aseton ekstresine hemde standart olarak kullanılan BHT'ye göre çok daha aktif olduğu tespit edildi. Metanol ekstresinin IC<sub>50</sub>: 33,59±0,72 olduğu standart olarak kullanılan BHT için ise IC<sub>50</sub>: 58,86±0,50 olduğu belirlendi



**Şekil 9.** Hazırlanan Ekstrelerin DPPH Serbest Radikali Giderim Yönteminde % İnhibisyonu

### 8.2.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları



**Şekil 10.** Hazırlanan Ekstrelerin ABTS Katyon Giderim Yönteminde % İnhibisyonu

Hazırlanan ekstrelerin ABTS Katyon Radikali Giderim aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) tayin edildi (Şekil 10). Daha sonra IC<sub>50</sub> değerleri hesaplandı. Standart olarak kullanılan BHT'e göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı. Metanol ekstresi 100 µg/mL konsantrasyonda %84,62 inhibisyon gösterdi. Metanol ekstresi (IC<sub>50</sub>: 15,04± 0,08) standart olarak kullanılan BHT'den (IC<sub>50</sub>:22,29±0,67) daha yüksek aktivite sergiledi (Tablo 4).

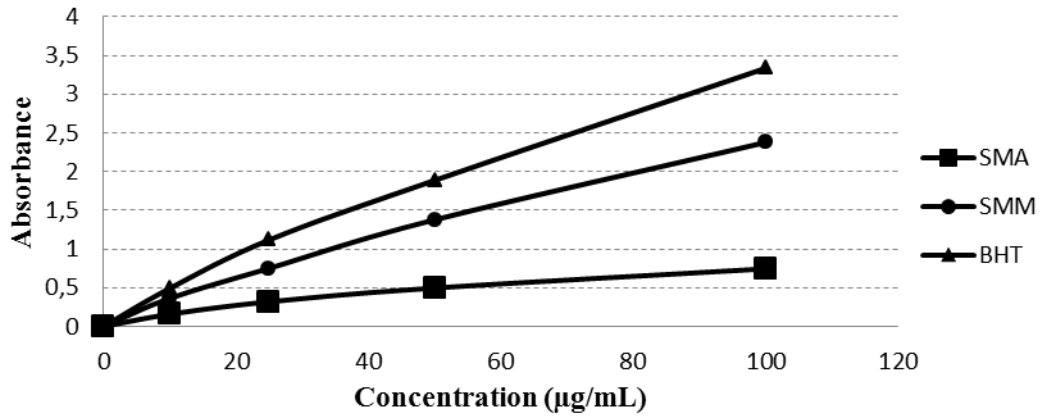
## 8.2.4.CUPRAC Antioksidan Aktivite Sonuçları

**Tablo 5:** Ekstrelerin CUPRAC Yöntemine Göre Antioksidan Aktiviteleri<sup>a</sup>

Ekstreler	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
SMA	0,157±0,03	0,318±0,02	0,496±0,02	0,745±0,05
SMM	0,362±0,06	0,751±0,02	1,377±0,05	2,378±0,14
BHT	0,491±0,065	1,117±0,098	1,887±0,045	3,337±0,184

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.

CUPRAC antioksidan tayin metodu dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) çalışıldı (Şekil 11). Bu yöntemde de metanol ekstresinin aseton ekstresine göre daha aktif olduğu tespit edildi. Fakat metanol ekstresinin standart olarak kullanılan BHT'den daha düşük aktivite gösterdiği belirlenmiştir.



**Şekil 11.** Hazırlanan Ekstrelerin CUPRAC Aktivite Sonuçları

## 8.3. Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Antikolinesteraz aktivite sonuçlarına göre (Tablo 6) 200 µg/mL konsantrasyonunda test edilen ekstrelerin asetilkolinesteraz enzim aktivitesinin olmadığı tespit edilmiştir. Butirilkolinesteraz enzim inhibisyonunda ise aynı konsantrasyonunda metanol ekstresinin %74,59 aktiviteyle aseton ekstresinden daha aktif olduğu ve standart olarak kullanılan galantamine yakın aktivite gösterdiği izlenmiştir.

**Tablo 6:** Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları <sup>a</sup>

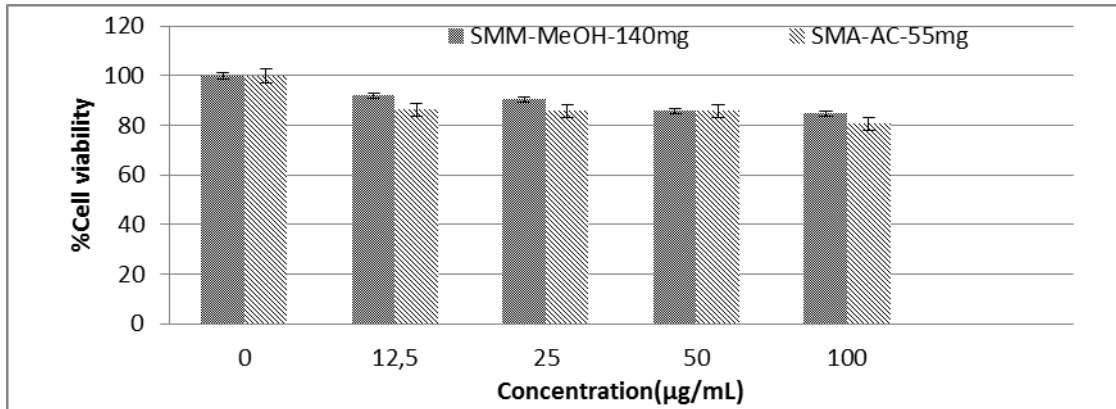
Ekstreler	AChE(%İnhibisyon)	BChE (%İnhibisyon)
SMA	A.D.	50,63±1,93
SMM	A.D.	74,59±3,27
Galantamin <sup>b</sup>	76,08 ± 0,39	76,52 ± 0,41

a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir (200 µg/mL).

b: Standart madde, A.D.: Aktif değil

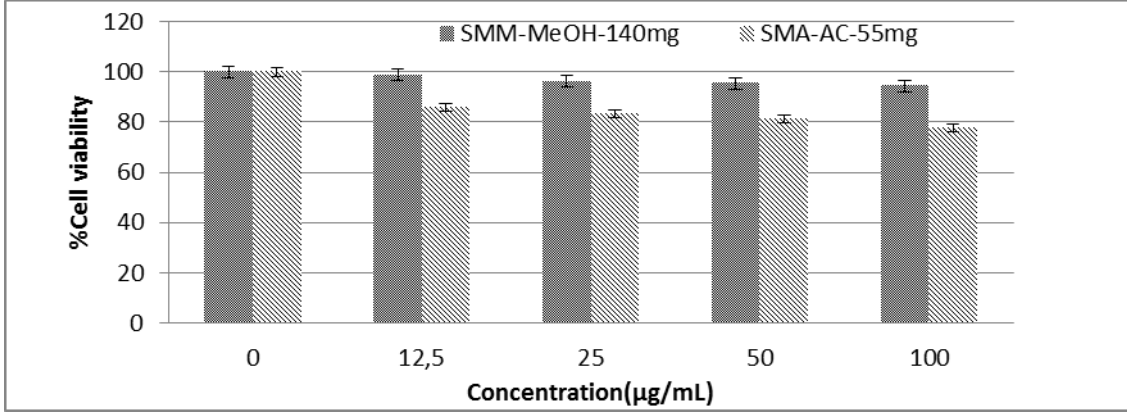
#### 8.4. Sitotoksik Aktivite Sonuçları

Sitotoksik aktivite sonuçları Şekil 11-12’de verilmiştir. Genel olarak çalışılan iki ekstrenin de antioksidan aktivitelerinin aksine sitotoksik aktivitelerinin düşük-orta derecede aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Sağlıklı fibroblast L929 hücreleri üzerinde her iki ekstre tüm konsantrasyonlarda benzer davranış göstermiş ve test edilen dört konsantrasyonun en yüksek konsantrasyonunda (100 µg/mL) bile hücrelerin en az %80 i canlı kalmıştır (Şekil 12).



**Şekil 12.** Ekstrelerin Canlı Hücre Serisi (Fibroblast L929) Üzerine Sitotoksik Aktivitesi

Akciğer kanseri hücresi olan A549’a karşı ise aseton ekstresinin daha etkili olduğu şekil 13 te izlenmektedir, metanol ekstresi tüm konsantrasyonlarda kanserli hücreleri hemen hemen hiç öldürmezken aseton ekstresinin test edilen dört konsantrasyonda da kanserli hücreleri % 20-25 öldürdüğü, yani hücre canlılığının %75-80 arası olduğu izlenmektedir.



**Şekil 13.** Ekstrelerin Kanserli Akciğer Hücre Serisi (A549) Üzerindeki Sitotoksik Aktivite Sonuçları

### 8.5.LC-MS/MS ile Fenolik Bileşiklerin Kalitatif ve Kantitatif Analizi

Hazırlanan diklorometan+ aseton ve metanol ekstralarının fenolik profilleri LC-MS/MS cihazı ile belirlendi. LC-MS/MS çalışmasında 27 fitokimyasal standart bileşiğin analizi yapıldı. Bu çalışmada kullanılan kimyasallar şunlardır:

Fenolik asitler: Gallik asit, p-kumarik asit, salisilik asit, kafeik asit, 4-hidroksi benzoik asit, rozmarinik asit, klorojenik asit, protokateşik asit

Flavonoitler: Kersetin, naringenin, fisetin, hesperetin, rutin, kamferol, luteolin, mirsetin, apigenin

Fenolik olmayan organik asitler: Kuinik asit, malik asit

Fenolik aldehit: Vanilin

Benzopiran: Kumarin

LC-MS/MS analiz metodunda kullanılan analitik parametler Tablo 7’de verilmiştir.

**Tablo 7.** LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler (<sup>a</sup>RT: Alıkonma zamanı, <sup>b</sup>R<sup>2</sup>: Belirleme katsayısı, <sup>c</sup>RSD: Bağıl standart sapma, <sup>d</sup>LOD/LOQ (µg/L): Belirleme sınırı/Tayın sınırı, <sup>e</sup>U (%): 95% güven seviyesinde bağıl standart belirsizlik (k=2)

Analit no	Analit	RT <sup>a</sup>	Denklem	R <sup>2b</sup>	RSD % <sup>c</sup>	Linearite Aralığı mg/L	LOD/LO Q (µg/L) <sup>d</sup>	%Geri kazanım	U <sup>e</sup>
1	Kuiknik asit	3.36	f(x)=33.6626*x+25132.9	0.9927	0.0388	250-10000	22.3 / 74.5	103.3	4.8
2	Malik asit	3.60	f(x)=93.6102*x-5673.77	0.9975	0.1214	250-10000	19.2 / 64.1	101.4	5.3
3	Tr-Asonitik asit	4.13	f(x)=79.2908*x-28416.2	0.9933	0.3908	250-10000	15.6 / 51.9	102.8	4.9
4	Gallik asit	4.25	f(x)=358.069*x+26417.5	0.9901	0.4734	25-1000	4.8 / 15.9	102.3	5.1
5	Klorojenik asit	5.29	f(x)=48.9828*x+26779.7	0.9932	0.1882	250-10000	7.3 / 24.3	99.7	4.9
6	Protokateşik asit	5.51	f(x)=36.8568*x+6197.38	0.9991	0.5958	100-4000	25.8 / 85.9	100.2	5.1
7	Tannik asit	6.30	f(x)=90.2704*x+30233.2	0.9955	0.9075	100-4000	10.2 / 34.2	97.8	5.1
8	Tr-Kafeik asit	7.11	f(x)=1585.16*x+83957.5	0.9942	1.0080	25-1000	4.4 / 14.7	98.6	5.2
9	Vanilin	8.57	f(x)=44.5478*x-574.867	0.9995	0.4094	250-10000	10.1 / 33.7	99.2	4.9
10	p-Kumarik asit	9.17	f(x)=73.5303*x+27064.3	0.9909	1.1358	100-4000	15.2 / 50.8	98.4	5.1
11	Rozmarinik asit	9.19	f(x)=18.0298*x-1149.86	0.9992	0.5220	250-10000	10.4 / 34.8	101.7	4.9
12	Rutin	9.67	f(x)=51.8835*x+3841.66	0.9971	0.8146	250-10000	17.0 / 56.6	102.2	5.0
13	Hesperidin	9.69	f(x)=195.773*x+105641	0.9973	0.1363	250-10000	21.6 / 71.9	100.2	4.9
14	Hiperosid	9.96	f(x)=0.978146*x+827.221	0.9549	0.2135	100-4000	12.4 / 41.4	98.5	4.9
15	4-OH-benzoik asit	11.38	f(x)=635.003*x+54284.6	0.9925	1.4013	25-1000	3.0 / 10.0	106.2	5.2
16	Sinapinik asit	11.39	f(x)=915.178*x+72571.4	0.9904	0.6619	25-1000	4 / 13.3	106.2	5.0
17	Mirisetin	11.42	f(x)=54.2823*x+5414.67	0.9991	2.8247	100-4000	9.9 / 32.9	106.0	5.9
18	Fisetin	12.10	f(x)=331.870*x+34409.0	0.9988	2.4262	100-4000	10.7 / 35.6	96.9	5.5
19	Kumarin	12.18	f(x)=236.639*x+34370.3	0.9924	0.4203	100-4000	9.1 / 30.4	104.4	4.9
20	Kersetin	13.93	f(x)=206.102*x+1693.14	0.9995	4.3149	25-1000	2.0 / 6.8	98.9	7.1
21	Naringenin	14.15	f(x)=1100.55*x+39055.7	0.9956	2.0200	25-1000	2.6 / 8.8	97.0	5.5
22	Hesperetin	14.80	f(x)=160.323*x+6545.07	0.9961	1.0164	25-1000	3.3 / 11.0	102.4	5.3
23	Luteolin	14.84	f(x)=111.474*x+3057.10	0.9992	3.9487	25-1000	5.8 / 19.4	105.4	6.9
24	Kamferol	14.85	f(x)=20.9677*x+571.241	0.9917	0.5885	25-1000	2.0 / 6.6	99.1	5.2
25	Apigenin	16.73	f(x)=543.793*x+18525.6	0.9954	0.6782	25-1000	0.1 / 0.3	98.9	5.3
26	Ramnetin	18.41	f(x)=110.091*x+632.444	0.9994	2.5678	25-1000	0.2 / 0.7	100.8	6.1
27	Krisin	20.60	f(x)=698.787*x+23531.7	0.9965	1.5530	25-1000	0.05 / 0.17	102.2	5.3

### 8.6. LC-MS/MS ile Çalışılan Diklorometan+ Aseton ve Metanol Ekstrelerinin Kantitatif Analizi

Diklorometan+aseton ve metanol ekstrelerinin fitokimyasal madde içerikleri kantitatif olarak LC-MS/MS cihazında belirlendi. Sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir. Genel olarak metanol ekstresinin hem fenolik hem de flavonoid içerik bakımından diklorometan+aseton ekstresinden daha zengin olduğu tespit edildi. Metanol ekstresinin özellikle rosmarinik asit (33330,62 ± 1534,89 µg analit/g ekstre) bakımından oldukça zengin olduğu belirlendi (Tablo 8).

**Tablo 8.** Diklorometan+Aseton (SMA) ve Metanol (SMM) Ekstrelerinin LC-MS/MS ile Kantitatif Analizi

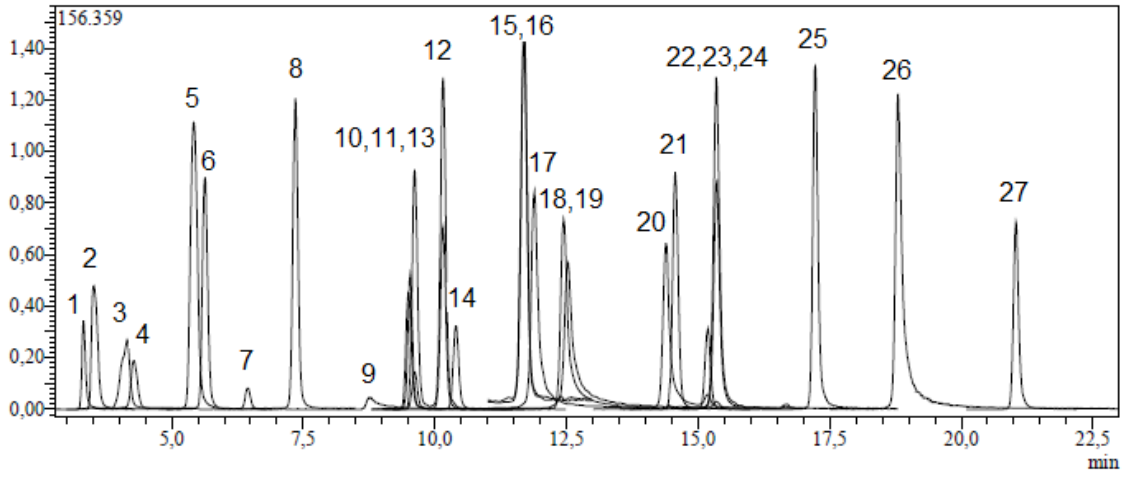
Bileşik	Ana İyon(m/z) <sup>a</sup>	MS <sup>2</sup> (Collision Energy) <sup>b</sup>	Miktar (µg analit/g extre) <sup>c</sup>	
			SMA	SMM
Kuiniik asit	190.95	85 (22),93 (22)	9,45±0,36	333,45±12,31
Malik asit	133.05	115 (14),71 (17)	72,67±3,52	223,04±11,35
Tr- Asonitik asit	172.85	85 (12),129 (9)	N.D	N.D
Gallik asit	169.05	125 (14),79 (25)	1,31±0,02	6,06±0,03
Klorojenik asit	353	191 (17)	N.D	54,57±2,51
Protokateşik asit	152.95	109 (16),108 (26)	40,29±2,01	234,62±8,98
Tannik asit	182.95	124 (22),78 (34)	N.D	346,55±12,83
Tr-Kafeik asit	178.95	135 (15),134 (24),89 (31)	139,53±8,57	752,65±35,39
Vanilin	151.05	136 (17),92 (21)	100,76±4,98	11,98±0,45
p-Kumarik asit	162.95	119 (15),93 (31)	42,79±1,62	52,97±2,09
Rozmarinik asit	358.9	161 (17),133 (42)	288,07±13,76	33330,62±1534,89
Rutin	609.1	300 (37),271 (51),301 (38)	N.D	32,10±2,50
Hesperidin	611.1	303,465	5,97±0,09	284,28±11,23
Hiperosid	463.1	300,301	N.D	51,74±2,46
4-OH-benzoik asit	136.95	93,65	49,66±2,34	138,78±7,03
Sinapinik asit	136.95	93,65,75	48,96±2,29	125,72±5,56
Mirisetin	317	179,151,137	N.D.	N.D.
Fisetin	284.95	135,121	N.D.	N.D.
Kumarin	146.95	103,91,77	D.	D.
Kersetin	300.9	179,151,121	D.	D.
Naringenin	270.95	151,119,107	D.	D.
Hesperetin	300.95	164,136,108	9,27±0,45	7,61±0,36
Luteolin	284.95	175,151,133	33,27±1,59	125,31±6,76
Kamferol	284.95	217,133,151	35,07±1,63	135,55±7,21
Apigenin	268.95	151,117	37,91±1,87	54,78±2,59
Ramnetin	314.95	165,121,300	N.D.	N.D.
Krisin	253	143,119,107	N.D.	N.D.

<sup>a</sup>Ana iyon(m/z): Standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı),

<sup>b</sup>MS<sup>2</sup>(CE): MRM fragmentleri için gerekli parçalama enerjisi

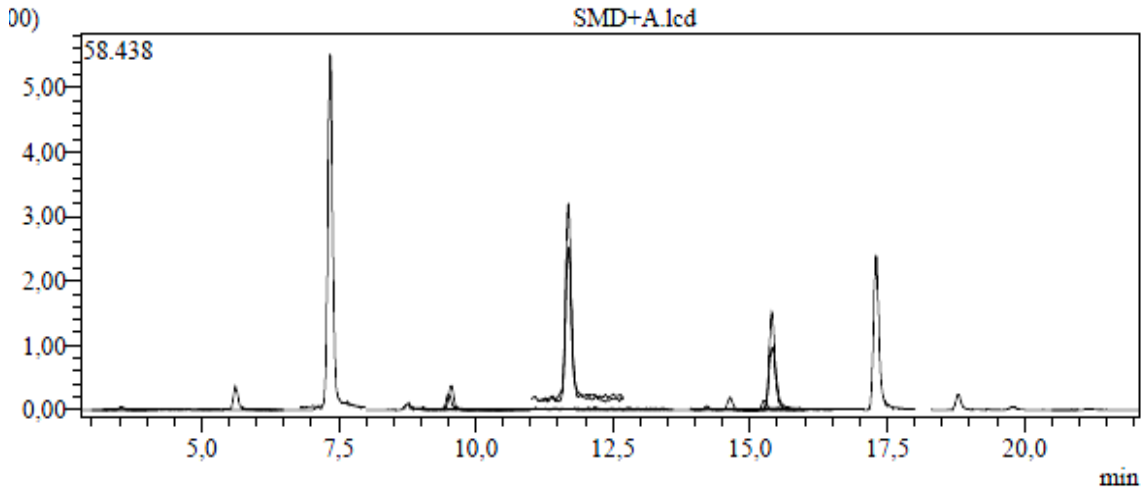
N.D: Tespit edilmedi, D: Tespit edildi



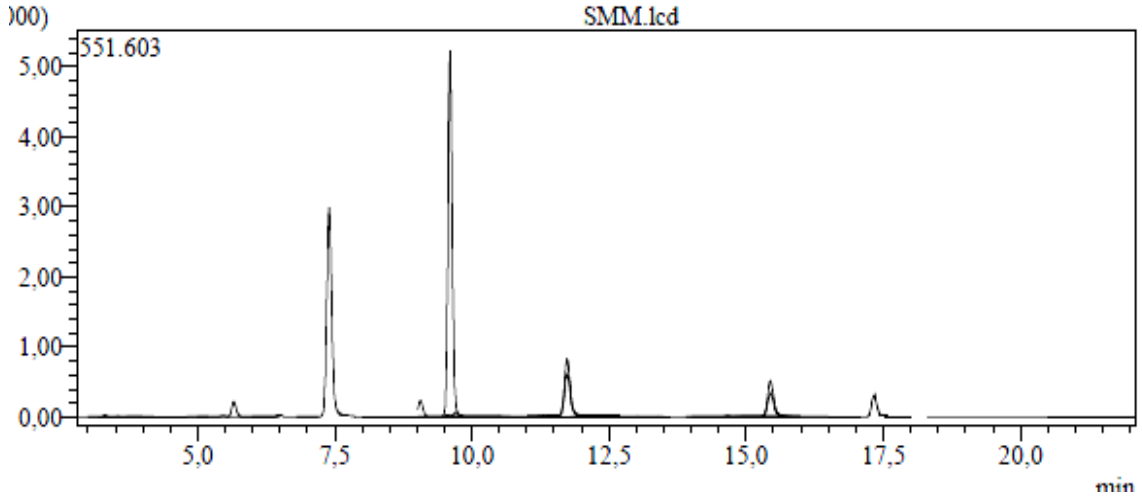


**Şekil 14.** LC-MS /MS Kalibrasyon Noktası Standart Kromatogramı

1: Kuinik asit, 2: Malik asit, 3: Tr-Asonitik asit, 4: Gallik asit, 5: Klorojenik asit, 6: Protokateşik asit, 7: Tannik asit, 8: Tr-Kafeik asit, 9: Vanilin, 10: p-Kumarik asit, 11: Rozmarinik asit, 12: Rutin, 13: Hesperidin, 14: Hiperosid, 15: 4-OH-benzoik asit, 16: Sinapinik asit, 17: Mirisetin, 18: Fisetin, 19: Kumarin, 20: Kersetin, 21: Naringenin, 22: Hesperetin, 23: Luteolin, 24: Kamferol, 25: Apigenin, 26: Ramnetin, 27: Krisin)



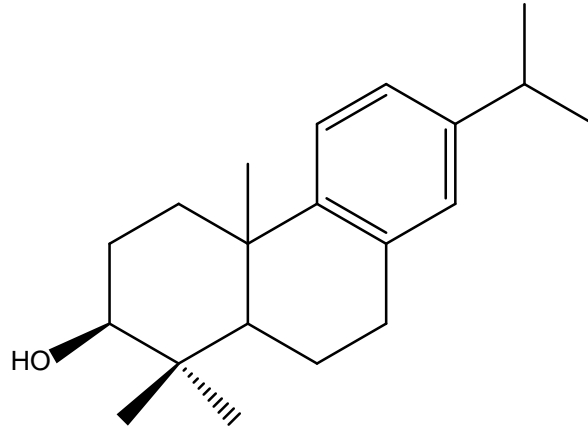
**Şekil 15.** Diklorometan+Aseton Ekstresinin LC-MS/MS kromatogramı



Şekil 16. Metanol ekstresinin LC-MS/MS kromatogramı

## 8.7. ELDE EDİLEN SAF BİLEŞİKLERİN YAPI TAYİNLERİ

### 8.7.1. SMM-3-2: 3β-hidroksiabieta-8,11,13-trien



Şekil 17. 3-β-hidroksiabieta-8,11,13-trien

Petroleteri:Diklorometan (9:1) çözücü sistemindeki fraksiyondan 0.0159g (% verim=0.00076) olarak elde edilen bileşiğin alınan <sup>1</sup>H NMR spektrumunda metil bölgesinde dört metil sinyali izlenmiştir. Bulardan 0.93, 0.94 ve 1.18 ppm'de izlenen sinyaller 3 singlet metilinin varlığına işaret etmiştir. Ayrıca dublet şeklinde izlenen 2 metil sinyali ise üst üste 1.22 ppm'de izlenmiştir. Bu iki metil dubletinin bağlı oldukları C'nun protonu (H-15) ile 6.4

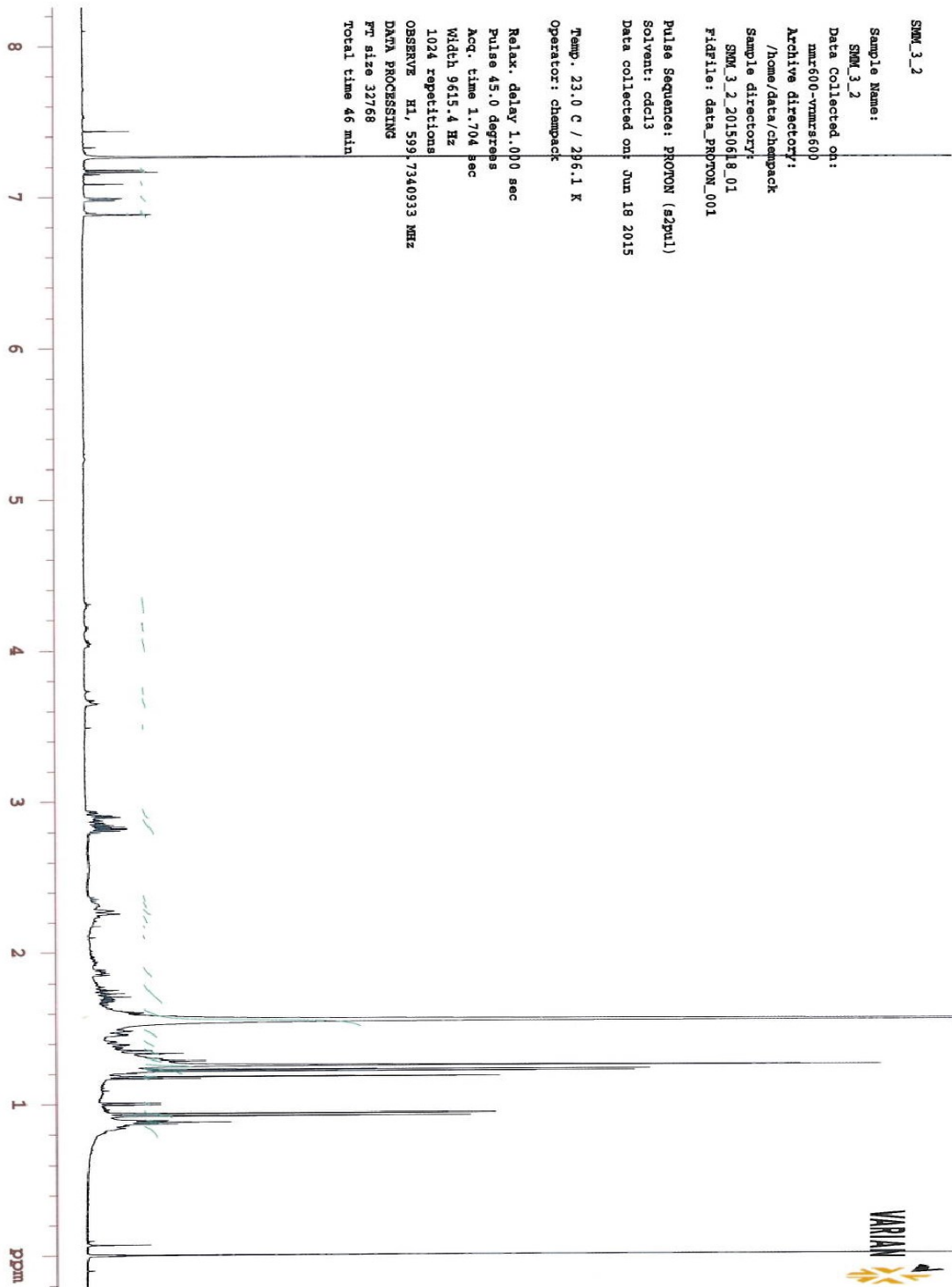
Hz'lik bölünme değeri ( $J$  coupling) vermesi ve dolayısıyla H-15 sinyalinin de aynı  $J$  değeriyle 2.82 ppm de 6.4 Hz lik bir septet olarak izlenmesi molekülde bir isopropil grubunun varlığına işaret etmiştir. Bu da molekülün abietan diterpen olabileceğini göstermektedir.

H-15 sinyali ile kısmen örtüşen sinyal ise 2.92 ppm de izlenen bir protonluk dd sinyali ( $J=10.5$  ve  $4.2$  Hz) vererek H-3 sinyaline işaret etmiş ve  $J$  değerleri C-3'te  $\beta$  konumunda bir hidroksil (OH) grubunun varlığını göstermiştir.

Ayrıca, 6.9 - 7.20 ppm'ler arasında 3 ayrı proton sinyalinin izlenmesi aromatik bir abietan iskeletinin olduğunu, yani diterpenin C halkasının aromatik olduğunu göstermiştir. C halkası protonları 6.89 ppm'de genişlemiş bir singlet (br s, H-14) ve 6.99 ppm'de dubletdublet ( $J=8.2$  ve  $1.2$  Hz, H-12) ve 7.18 ppm'de ( $J=8.2$  Hz, H-11) dublet olarak izlenmiş ve sırasıyla H-14, H-12 ve H-11 protonlarına işaret etmiştir.

Alınan  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumunda karbon sinyalleri ne yazık ki izlenememiştir. Fakat yukarıdaki NMR bulgularına dayanarak bu bileşiğin  $3\beta$ -hidroksiabieta-8,11,13-trien yapısında olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür çalışması bu bileşiğin doğadan ilk kez elde edildiğini göstermektedir. Fakat daha önce bu bileşiğin (3-OAc) asetil türevinden 3-OH'ına dönüştürülerek sentez yoluyla elde edildiği literatürden izlenmiştir [83].

SMM-3-2. 3β-hidroksiabieta-8,11,13-trien (<sup>1</sup>H-NMR, CDCl<sub>3</sub>)



smm\_3\_2

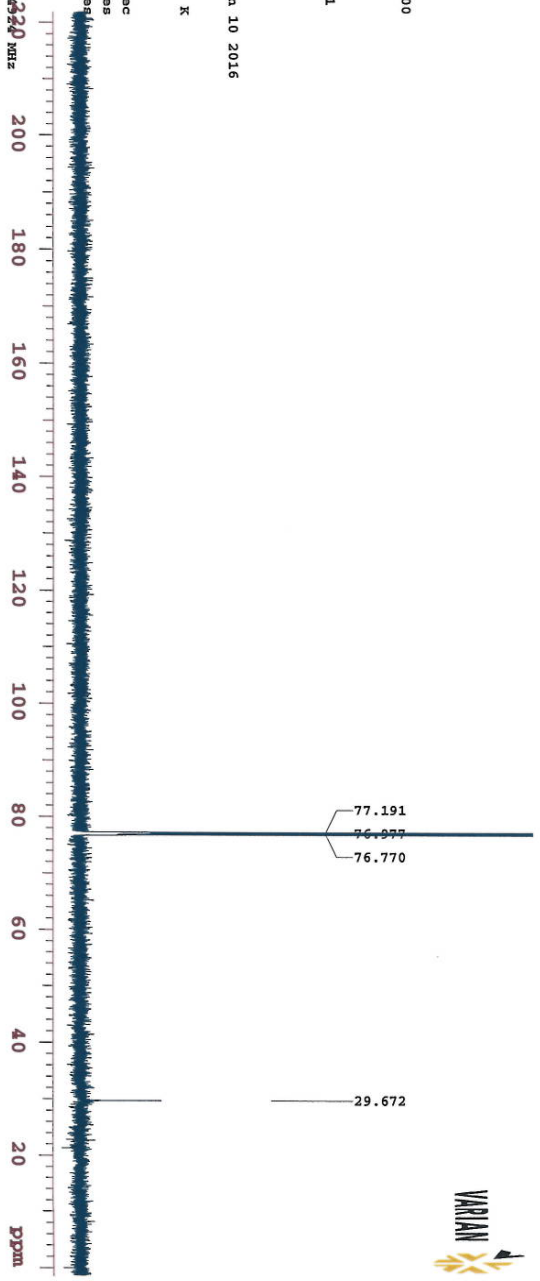


Sample Name: smm\_3\_2  
Data Collected on: Agilent-NMR-vnmr5600  
Archive directory: /home/data  
Sample directory: smm\_3\_2\_20160610\_01  
FidFile: APT\_01

Pulse Sequence: APT  
Solvent: cdcl3  
Data collected on: Jun 10 2016

Temp. 25.0 C / 298.1 K  
Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec  
1st pulse 90.0 degrees  
2nd pulse 45.0 degrees  
Acq. time 0.865 sec  
Width 37878.8 Hz  
120000 repetitions  
OBSERVE C13, 150.7994320 MHz  
DECOUPLE H1, 599.721174 MHz  
Power 44 dB  
on during acquisition  
WALTZ-16 modulated  
DATA PROCESSING  
Line broadening 0.5 Hz  
FT size 65536  
Total time 62 hr, 42 min



SNM\_3\_2

Sample Name:

SNM\_3\_2

Data Collected on:

Agilent-NMR-vnmr5600

Archive directory:

/home/data

Sample directory:

SNM\_3\_2\_20160513\_01

F1: file: ghsqc\_01

Pulse Sequence: ghsqc

Solvent: cdcl3

Data collected on: Jun 13 2016

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: vnmr1

Relax. delay 1.300 sec

Acq. time 0.150 sec

Width 9615.4 Hz

2D Width 34677.1 Hz

32 repetitions

2 x 513 increments

OBSERVE H1, 599.719118 MHz

DECOUPLE C13, 150.8153271 MHz

Power 36 dB

on during acquisition

off during delay

W40\_OnNMR modulated

DATA PROCESSING

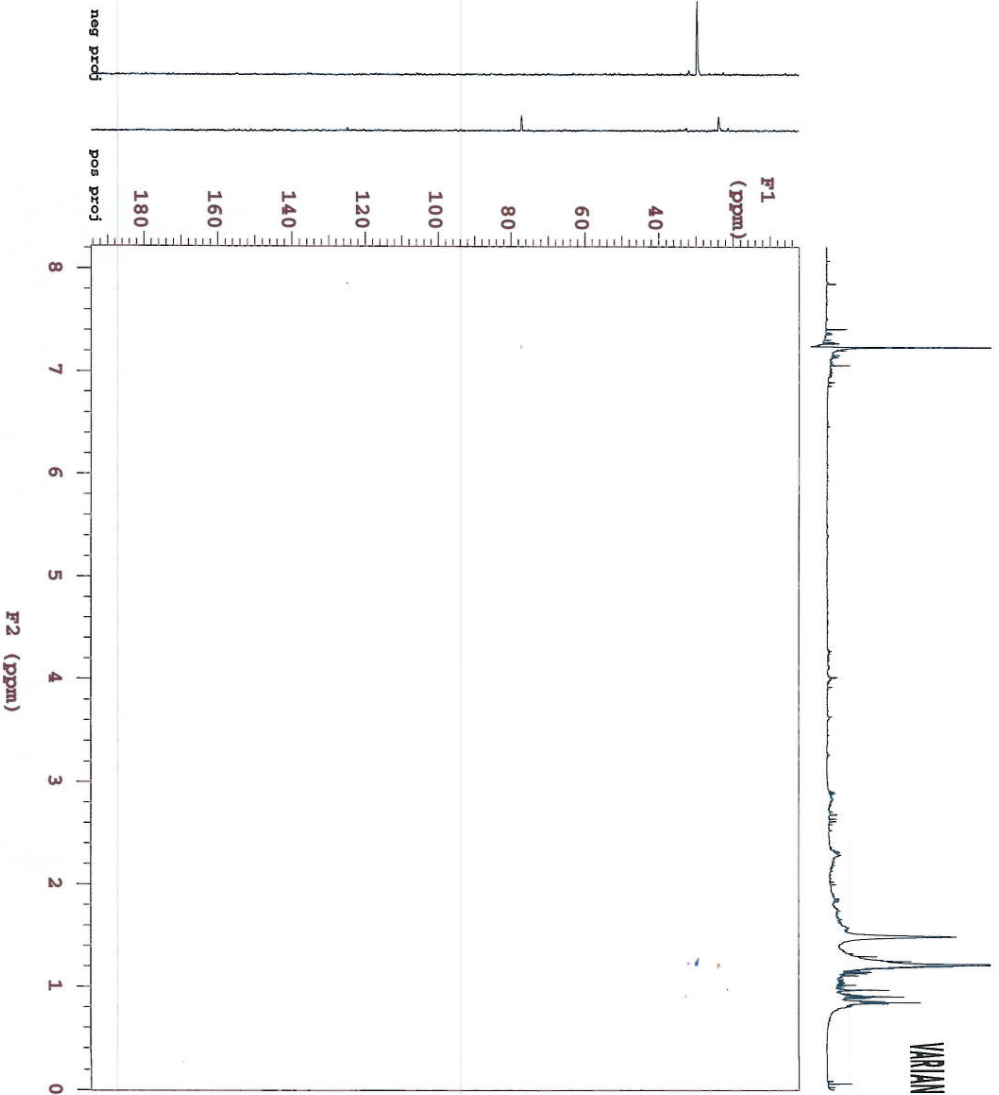
Gauss apodization 0.069 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.014 sec

FT size 4096 x 4096

Total time 13 hr, 36 min



SNW\_3\_2

Sample Name:

SNW\_3\_2

Data Collected on:

Agilent-NMR-VNMR5600

Archive directory:

/home/data

Sample directory:

SNW\_3\_2\_20160613\_01

Fidfile: ghsqc\_01

Pulse Sequence: ghsqc

Solvent: cdcl3

Data collected on: Jun 13 2016

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Operator: ymmr1

Relax. delay 1.300 sec

Acq. time 0.150 sec

Width 9615.4 Hz

2D width 34677.1 Hz

33 repetitions

2 x 512 increments

OBSERVE H1, 599.719118 MHz

DECOUPLE C13, 150.8153271 MHz

Power 36 dB

off during acquisition

on during delay

W40\_OneNMR modulated

DATA PROCESSING

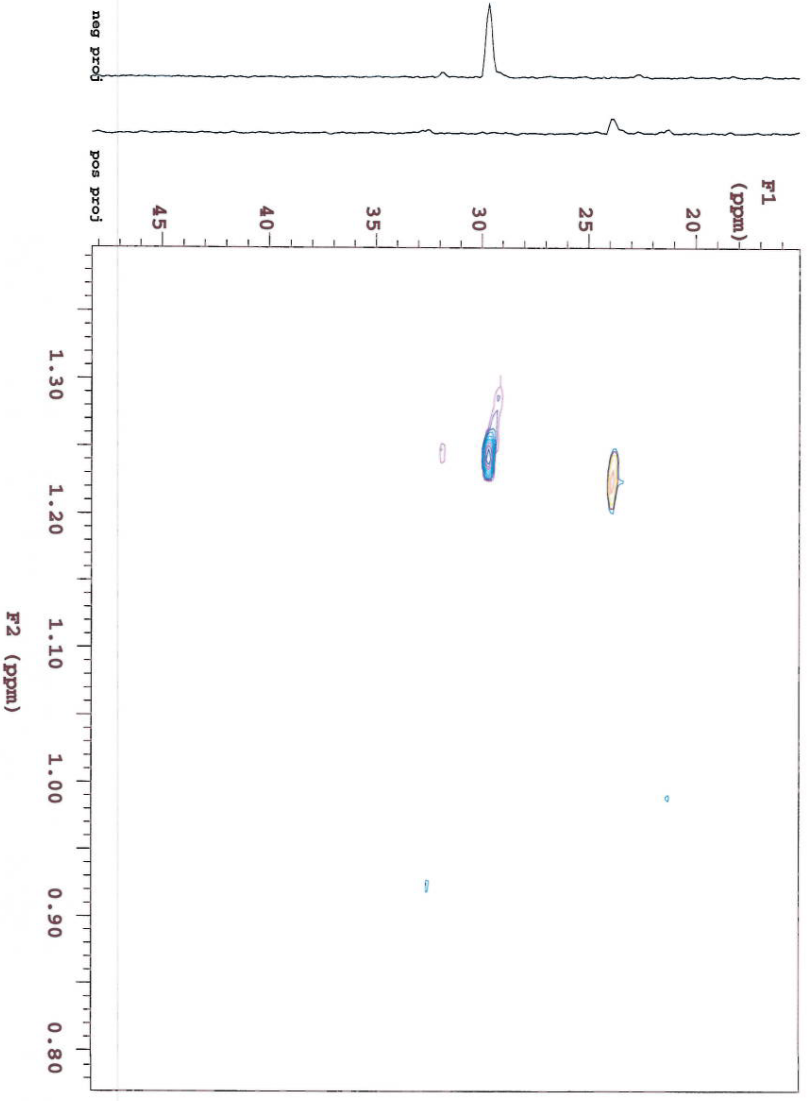
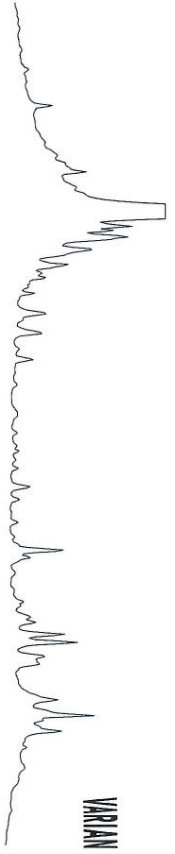
Gauss apodization 0.069 sec

F1 DATA PROCESSING

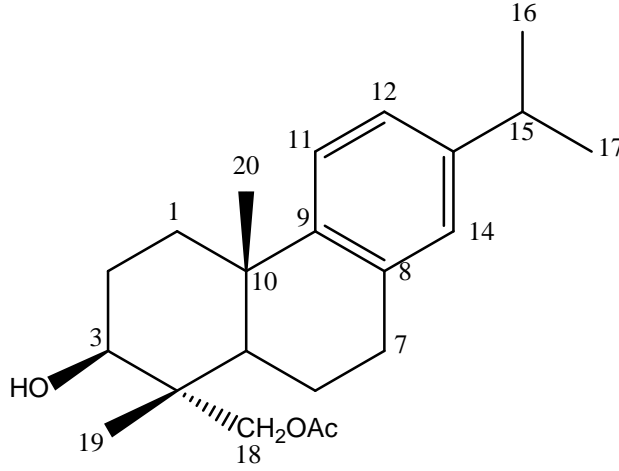
Gauss apodization 0.014 sec

FT size 4096 x 4096

Total time 13 hr, 36 min



### 8.7.2. SMA 29-30\_1 (3 $\beta$ -hidroksi,18-asetoksimetilen-abieta-8,11,13-trien)



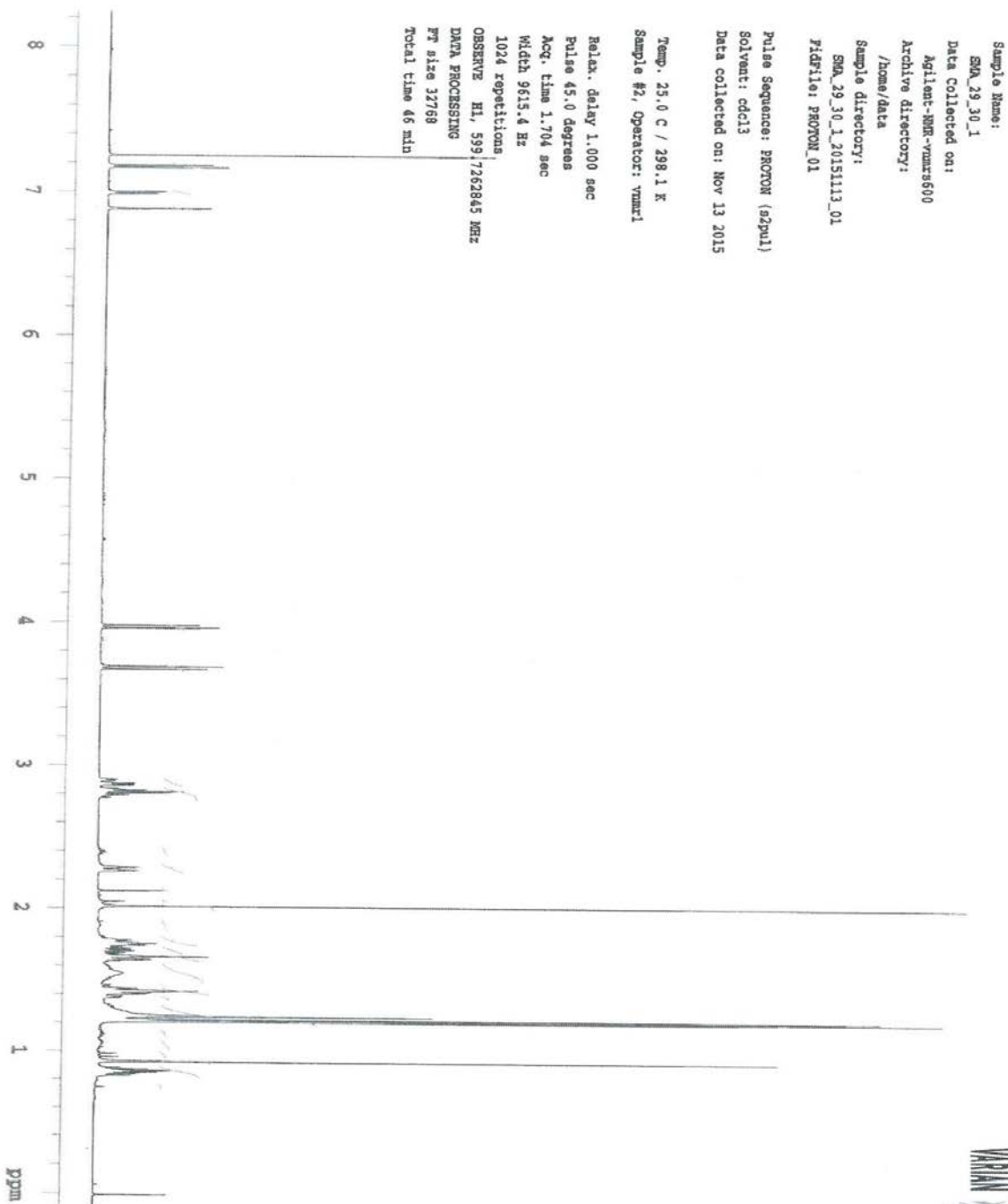
**Şekil 18.** 3 $\beta$ -hidroksi,18-asetoksimetilen-abieta-8,11,13-trien

DCM:PE (6:4) çözücü sistemi ile elüe edilen si-gel kolonun 29. fraksiyonundan 0.086 gr (% verim=0.0041) olarak elde ettiğimiz bileşiğimizin  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) spektrumunda aromatik alanda üç sinyalin 6.89 (brs, H-14), 6.99 (dd,  $J=1.75$  ve 8.3 Hz, H-12) ve 7.17 (d,  $J=8.3$  Hz) ppm'de izlenmesi aromatik bir halkanın varlığına işaret etmiştir. Yapıda 4 metil grubunun 0.93 (s), 1.22 (d,  $J=7.0$  Hz) ( $2\text{CH}_3$ ), 1.21 (s) ppm'de iki singlet ve iki dublet metili olarak izlenmesi bir abietan diterpen iskeletinin var olabileceğine işaret etmiştir. Nitekim 2.82 ppm'de gözlenen 7 Hz'lik septet sinyali abietan diterpenlerin isopropil grubunun varlığını kanıtlamıştır.  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda 3.68 ppm ( $J=11.2$  Hz) ve 3.97 ppm'de ( $J=10.6$  Hz) dubletler halinde izlenen protonların yanısıra bir asetat grubuna ait  $\text{CH}_3$  grubunun 2.02 ppm'de izlenmesiyle yapıda bir asetoksimetilen grubunun varlığı anlaşılmıştır. Abietan diterpenlerde mevcut olan 5 metil grubu yerine 4 metil grubunun izlenmesi de bu asetoksi metilen grubunun metil gruplarından birinin yükseltgenmesiyle oluştuğunu göstermiş ve C-4'e bağlı  $\alpha$ -asetoksimetilen olduğu saptanmıştır. Bu durumda yapının 3 $\beta$ -hidroksi,18-



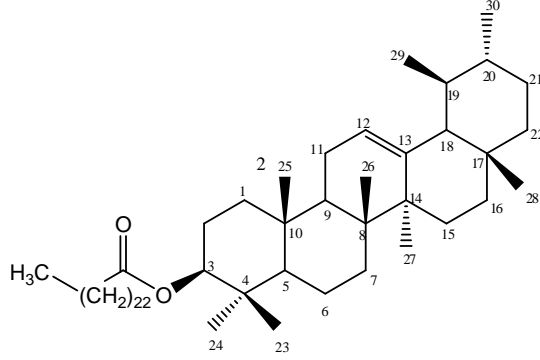
acetoxymethylene-abieta-8,11,13-trien şeklinde olduğu tespit edilmiştir. Yapılan literatür çalışmaları bu bileşimin doğadan ilk kez elde edildiğini göstermiştir.

SMA 29-30\_1. 3β-hidroksi,18-asetoksimetilen-abieta-8,11,13-trien (<sup>1</sup>H-NMR, CDCl<sub>3</sub>)



### 8.7.3. SMM-6 ( $\alpha$ -amiriltetracosanoate = Urs-12-en-3ol, tetracosanoat)

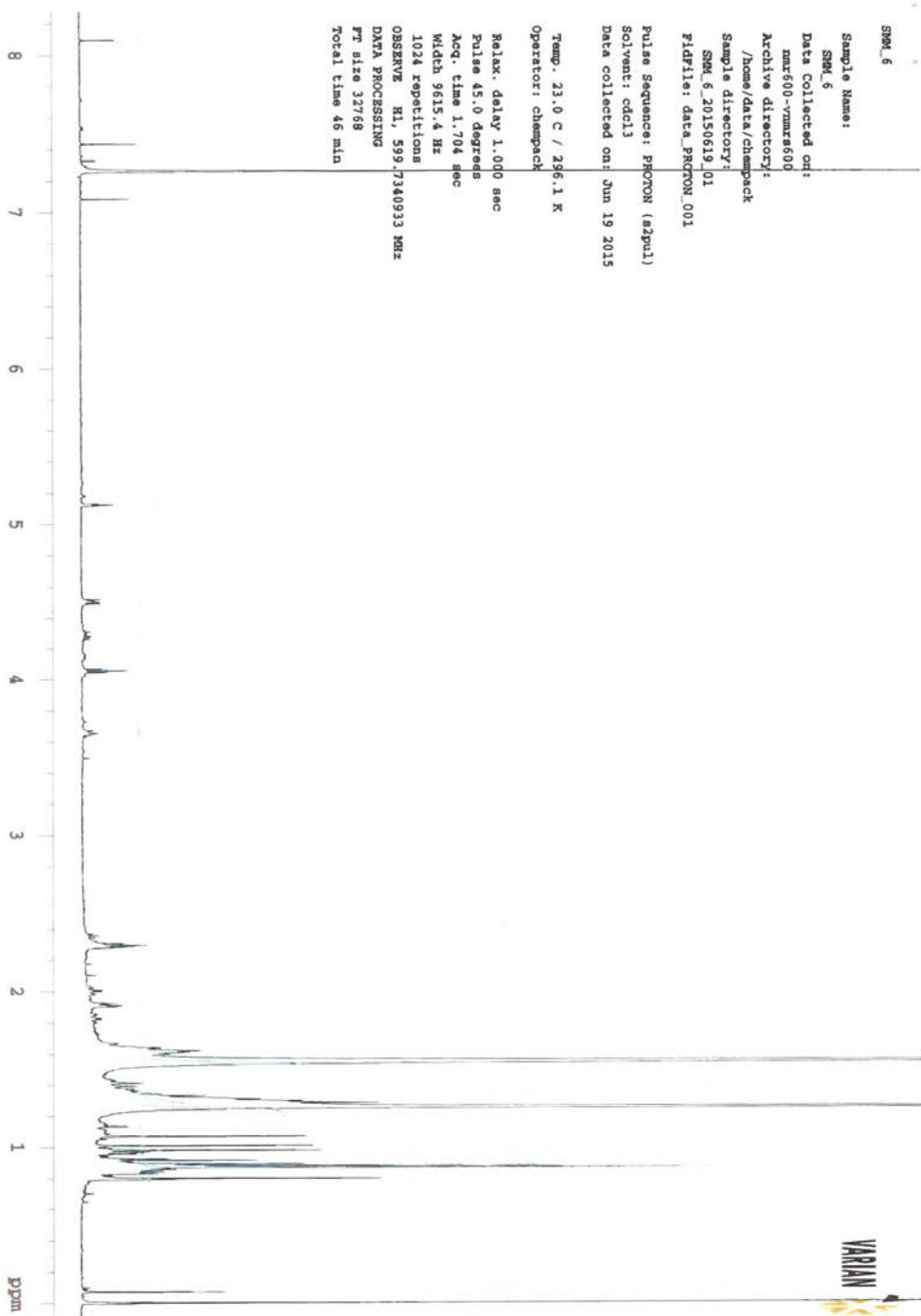
DCM:PE (1:1) çözücü sisteminden 0,0098 g (%verim=0.00047) olarak elde ettiğimiz SMM\_6 bileşiği saflaştırıldı. Bu bileşik beyaz renkli katı toz halinde elde edilmiştir. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) izlenmeyen (366 nm’de mor renkli) bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında turuncu renk aldı.



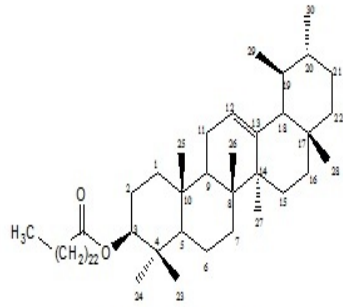
Şekil 19:  $\alpha$ -amiriltetracosanoate

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda 8 metil sinyalinin ikisinin dubletler 0.92 (3H,d,  $J = 6,8$  Hz) ve 0,86 ppm (3H, d,  $J = 6,5$  Hz), diğerlerinin ise singletler halinde  $\delta$  1.07, 1,01, 0.97, 0.91, 0.83 ve 0,80 ppm’de izlenmesi bileşiğin ursan tipi bir triterpen olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca triplet metil sinyalinin 0,87 ppm’de izlenmesi yapıda bir zincir uç metili grubunun varlığına işaret etmiştir.  $^1\text{H NMR}$  spektrumunda bileşikte bir çift bağın varlığı dar bir triplet ( $J = 2,5$  Hz) olarak 5.12 ppm’de izlenen sinyal ile anlaşılmıştır, konumu ise  $J$  değerine dayanılarak  $\Delta^{12}$  olarak belirlenmiştir, nitekim ursan ve oleanan triterpenlerde ilk çift bağın bulunduğu yer biyogenetik olarak genelde C-12 ile C-13 arasındadır.  $^1\text{H NMR}$  spektrumunda 4,50 ppm’de dubletindubleti ( $J = 5,6; 10,2$  Hz) şeklinde izlenen proton sinyali ise bileşikte bir ester grubunun varlığına işaret etti. Oksijenlenmiş substitüent biyogenetik olarak ursan tipi triterpenlerde C-3’de yer almaktadır. Bu ester grubunun uzun zincirli yapısı 1,25 ppm civarındaki uzun boylu proton sinyali ile  $^1\text{H-NMR}$  sinyali ve buna karşılık gelen 29 ppm civarında izlenen karbonlarla  $^{13}\text{C}$  spektrumunda saptanmış, kütle spektrumu ile bu zincirin 24 karbonlu tetracosanoate esterine ait olduğu kesinlik kazanmıştır. Bu esterin C-3 den kopması ile 409 piki temel pik olarak izlenmiştir. Literatür verileri de bunu doğrulamıştır [63].

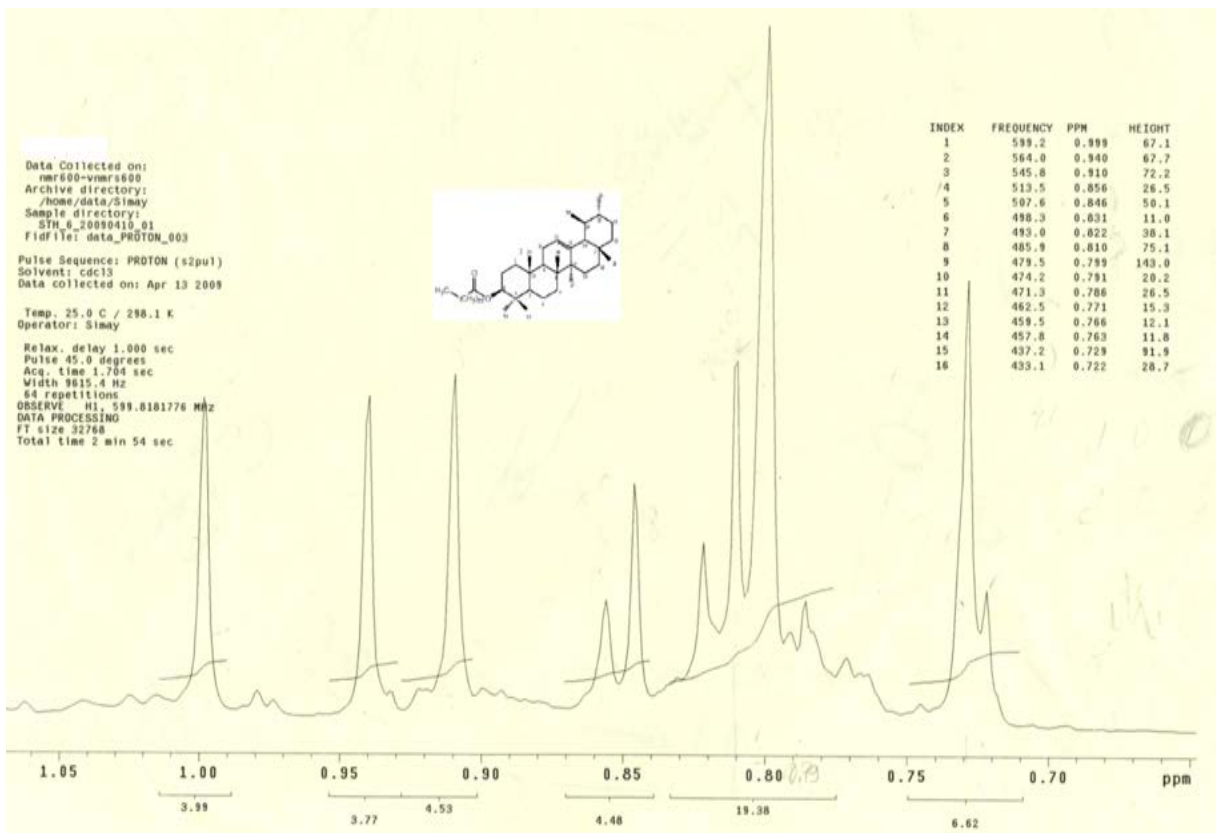
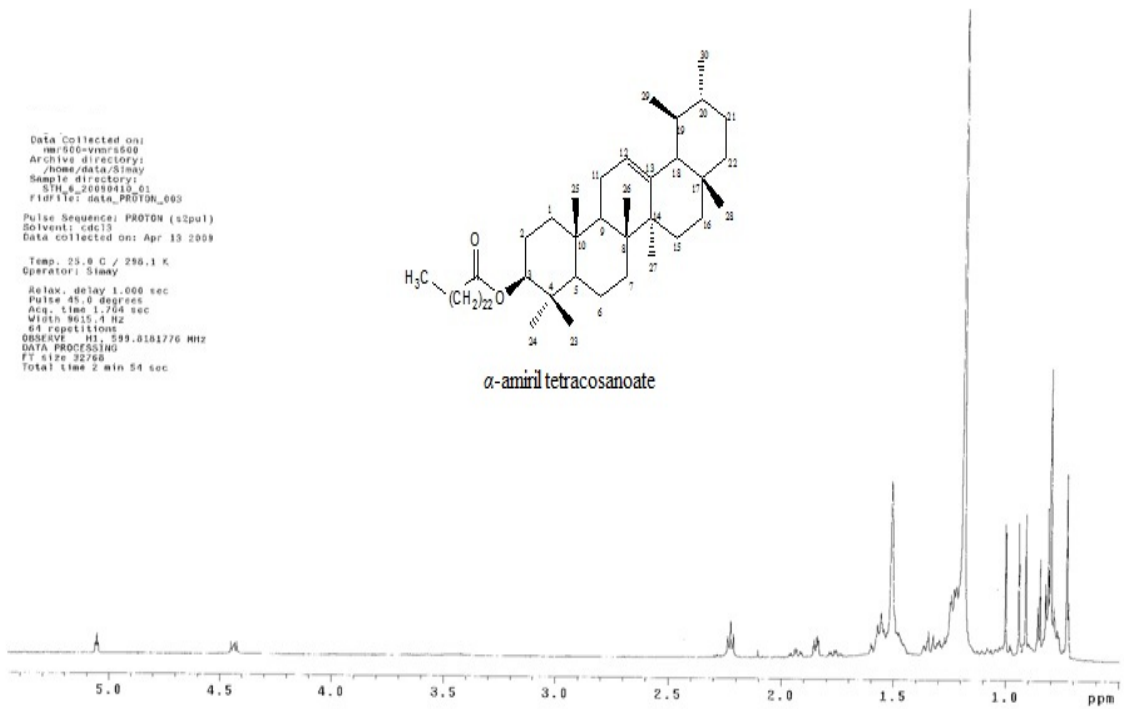
SMM-6.  $\alpha$ -amiriltetracosanoate ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

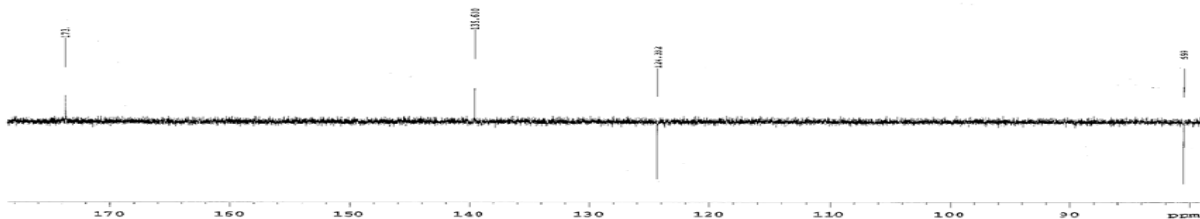


Data Collected on: nmr600-vnmr600  
 Archive directory: /home/data/Simay  
 Sample directory: STH\_6\_20090410\_01  
 Fidfile: data\_PROTON\_003  
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdc13  
 Data collected on: Apr 13 2009  
 Temp: 25.0 C / 298.1 K  
 Operator: Simay  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 64 repetitions  
 OBSERVE: H1, 599.8181776 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 2 min 54 sec



$\alpha$ -amiril tetracosanoate

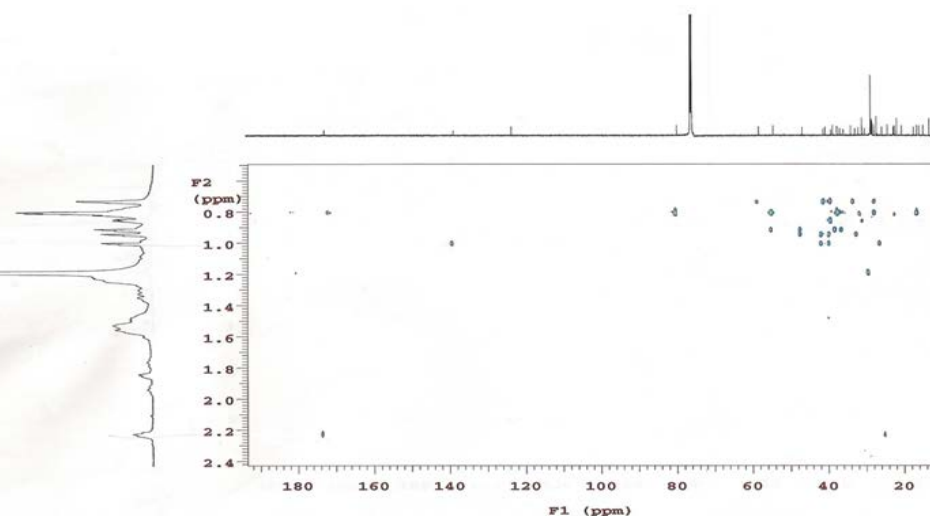




Data Collected on:  
 mar600-vmars600  
 Archive directory:  
 /home/data/Simay  
 Sample directory:  
 FMS\_20090417\_01  
 FidFile: data\_gHBC\_001

Pulse Sequence: gHBC  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Apr 18 2009  
 Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #2, Operator: Simay

Relax. delay 1.000 sec  
 Acq. time 0.150 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 2D Width 36199.1 Hz  
 4 repetitions  
 2 x 256 increments  
 OBSERVE H1, 599.8181758 MHz  
 DATA PROCESSING  
 Sine bell 0.075 sec  
 F1 DATA PROCESSING  
 Gauss apodization 0.013 sec  
 FT size 4096 x 8192  
 Total time 43 min

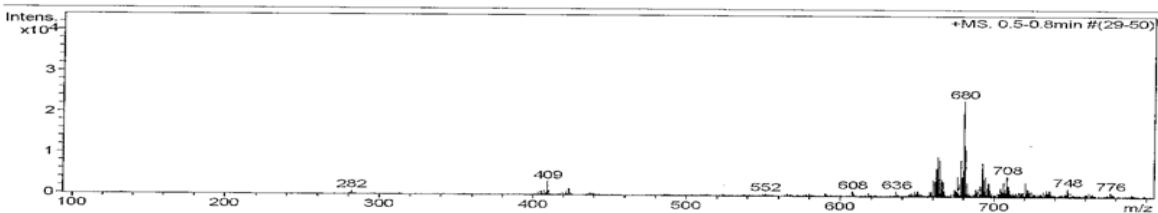


### Mass Spectrum Molecular Formula Report

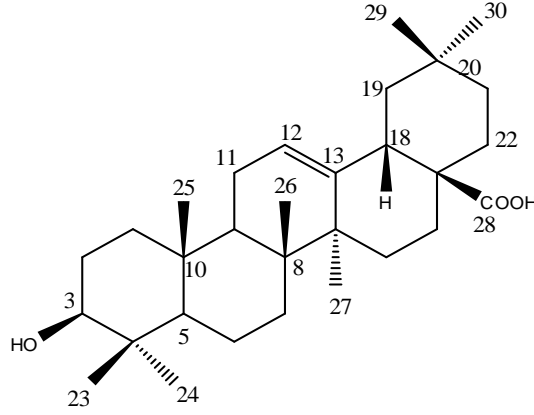
**Analysis Info**  
 Analysis Name: D:\Data\data\reserpine.m  
 Method: reserpine.m  
 Sample Name:  
 Comment:  
 Operator: bruker customer  
 Instrument / Ser#: micrOTOF-Q 36  
 1:15:23 PM

**Acquisition Parameter**  
 Source Type: APCI  
 Focus: Not active  
 Scan Begin: 100 m/z  
 Scan End: 800 m/z  
 Ion Polarity: Positive  
 Set Capillary: 4000 V  
 Set End Plate Offset: -500 V  
 Set Collision Cell RF: 600.0 Vpp  
 Set Nebulizer: 2.0 Bar  
 Set Dry Heater: 200 °C  
 Set Dry Gas: 4.0 l/min  
 Set Divert Valve: Waste

**Generate Molecular Formula Parameter**  
 Formula, min.  
 Formula, max.  
 Measured m/z  
 Check Valence  
 Nitrogen Rule  
 Filter H/C Ratio  
 Estimate Carbon  
 Tolerance  
 Minimum  
 Electron Configuration  
 Minimum  
 Charge  
 Maximum  
 Maximum



#### 8.7.4. SMM-7-1-a. Oleanolik asit=3β-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit



Şekil 20. Oleanolik asit bileşiği

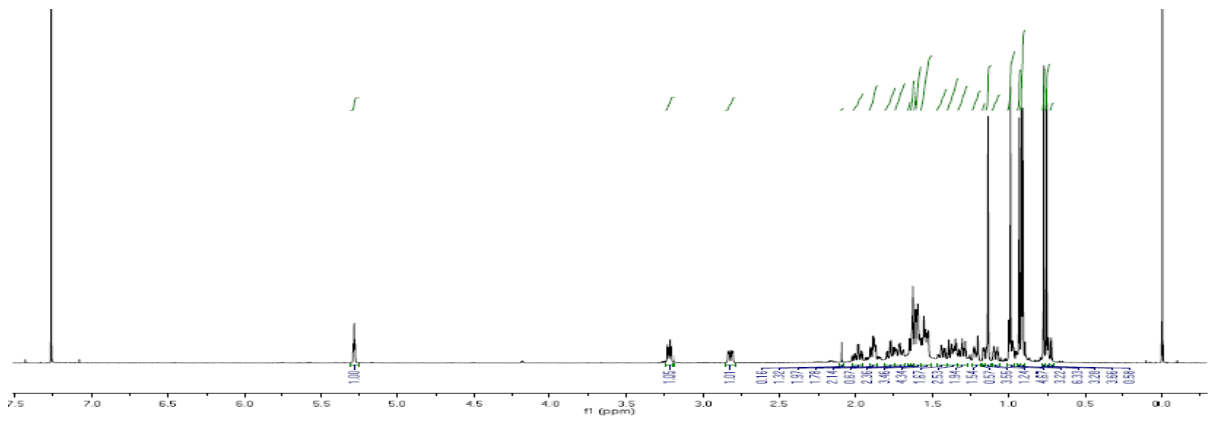
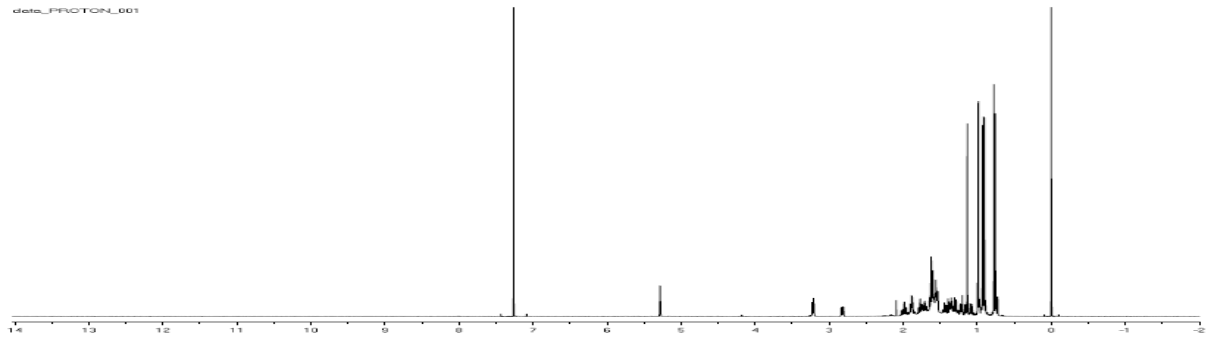
DCM:PE (1:1) çözücü sisteminden 7. fraksiyonda 3 g (% verim= 0.00014) olarak gelen beyaz renkli bileşik katı toz halde elde edildi ve erime derecesi 304-306 °C olarak belirlendi. Silika jel kaplı plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında eflatun-mor renk aldı.

<sup>1</sup>H NMR spektrumunda 0.68-1.30 ppm arasında çıkan 7 metil sinyali yapının bir triterpen olduğu konusunda fikir vermiştir. Bileşiğin <sup>13</sup>C-NMR spektrumu incelendiğinde 180.02 ppm de çıkan pik karboksilik asit, 144 ve 123 ppm deki sinyaller ise yapıda bir çifte bağın olduğunu düşündürür. 3.18’ppmdeki dubletin dubleti şeklinde izlenen pik 4,5 ve 9,5 Hz lik etkileşim değerlerine sahip olup 3 numaralı C’da yine sekonder bir hidroksil grubunun varlığını göstermiştir. Piklerden yola çıkarak yapıda bulunduğunu kabul ettiğimiz OH, karboksilik asit ve çifte bağ, bu triterpenin oleanolik asit veya ursolik asit olduğunu düşündürdü. Ursolik asitin oleanolik asitten tek farkı <sup>1</sup>H NMR spektrumunda 7 metil grubundan 5’ inin singlet, diğer 2 metil grubunun ise dublet olarak izlenmesidir. Bu da ikinci triterpenin ursan iskeletine sahip olduğuna işaret etmiştir, yani oleanan iskeletinde E halkasında bulunan geminal dimetil grubu (aynı karbona bağlı iki metil grubu) yerine ursan iskeletine sahip yapılarda E halkasında bir metilin C-19, diğer metilin C-20’ ye bağlı olduğu gözlenmiştir. Birbirinin izomeri olan oleanolik asit ile ursolik asiti <sup>1</sup>H NMR da ayıran en karakteristik özellik budur. Dolayısıyla <sup>13</sup>C NMR spektrumunda da ursolik asitte 1 olefinik, 1 sekonder OH grubu taşıyan CH’a ait karbon sinyallerine ilaveten (40-60) ppm arasında 5

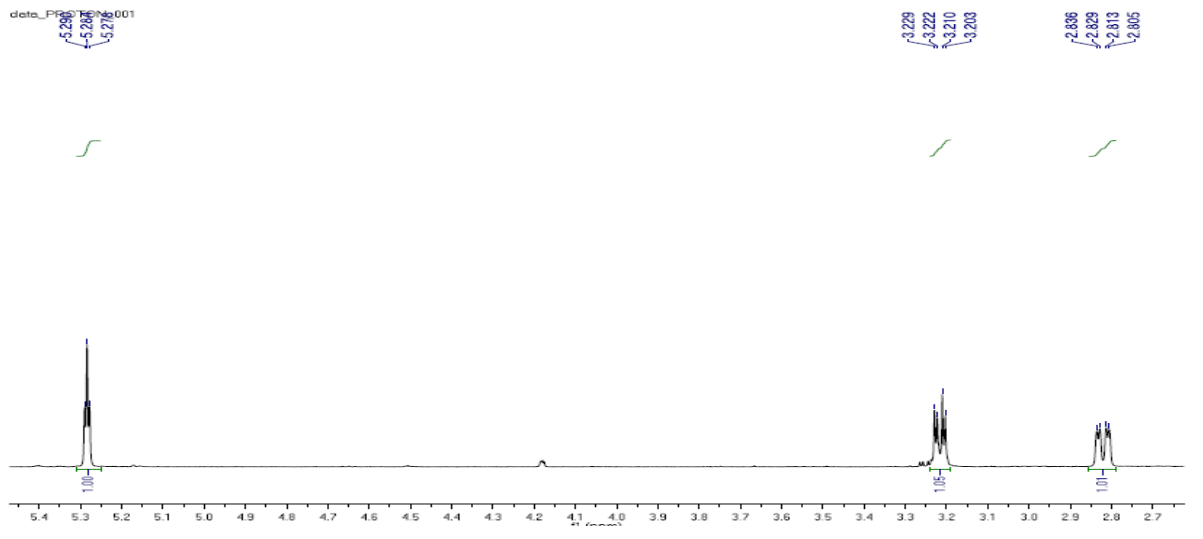
alifatik CH, yani toplam 7 CH izlenecektir. Oysa oleanolik asit de biri olefinik, biri sekonder OH (C3-hidroksil) grubunu taşıyan CH'ın yanısıra (40-60) ppm'ler arasında sadece 3 alifatik CH grubuna ait sinyal izlenecektir. Ursolik asit de fazladan izlenen iki CH grubu (C-19 ve C-20) na ait karakteristik olarak 39-40 ppm civarında izlenen sinyaller oleanolik asit de izlenmemiştir. H-19 protonu ile etkileşen H-18 sinyalinin verdiği bölünme ve kayma değeri de yine oleanolik asit için oldukça karakteristiktir. Nitekim bileşiğin  $\beta$  konumundaki H-18 sinyali C-19 protonlarıyla 2,5 ve 12 Hz lik etkileşim değeri vererek karakteristik bir dublet dublet şeklinde 2.8 ppm civarında izlenmiştir. C-12'ye bağlı H-12 olefinik protonu ise 5.21 ppm'de yine dar triplet (2.5 Hz) olarak izlenmiştir. Tüm spektral veriler ve literatür verilerine dayanarak yapının *Salvia* türlerinde çok rastlanan  $3\beta$ -hidroksiolean-12-en-28-oik asit (oleanolik asit) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca standart örnekle de ince tabaka kromatografisinde farklı çözücü sistemlerinde kıyaslanarak yapının kesin olarak oleanolik asit olduğu ispatlanmıştır.

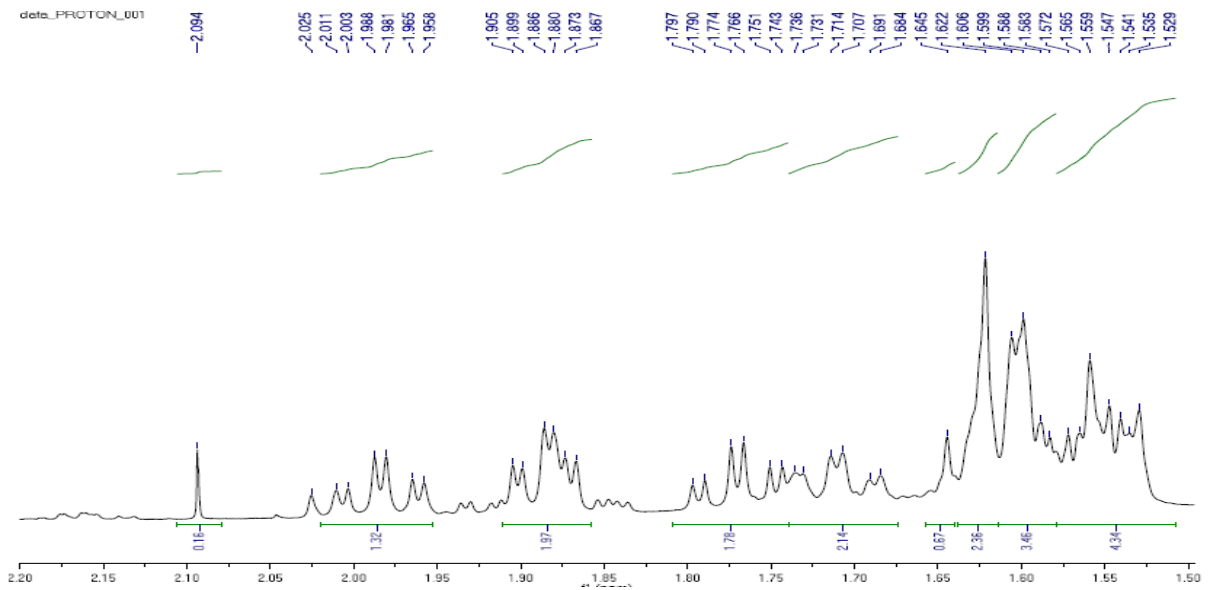
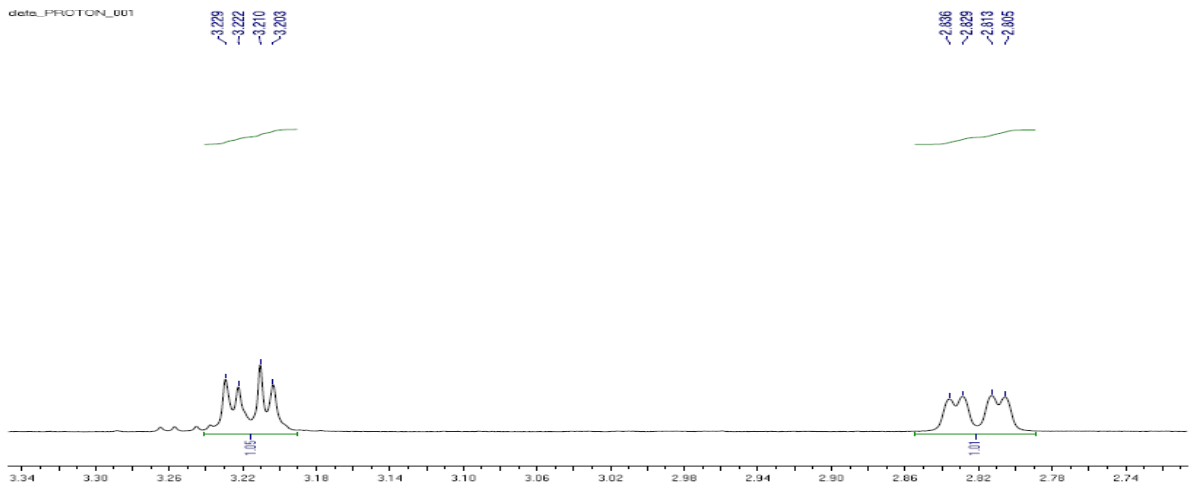
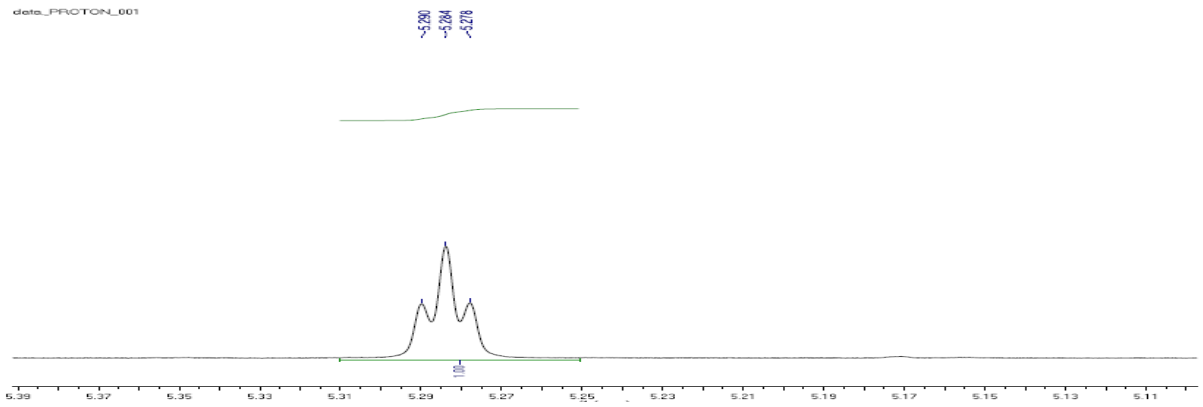


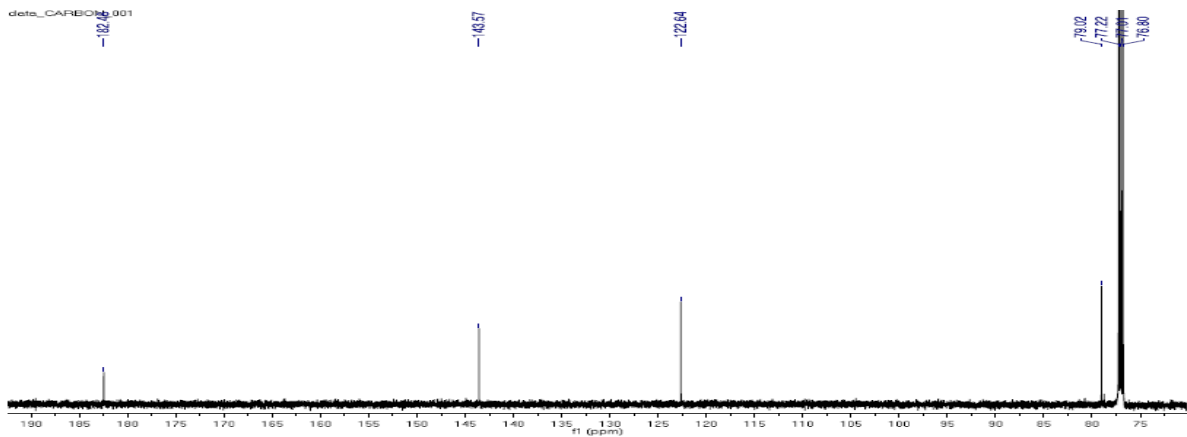
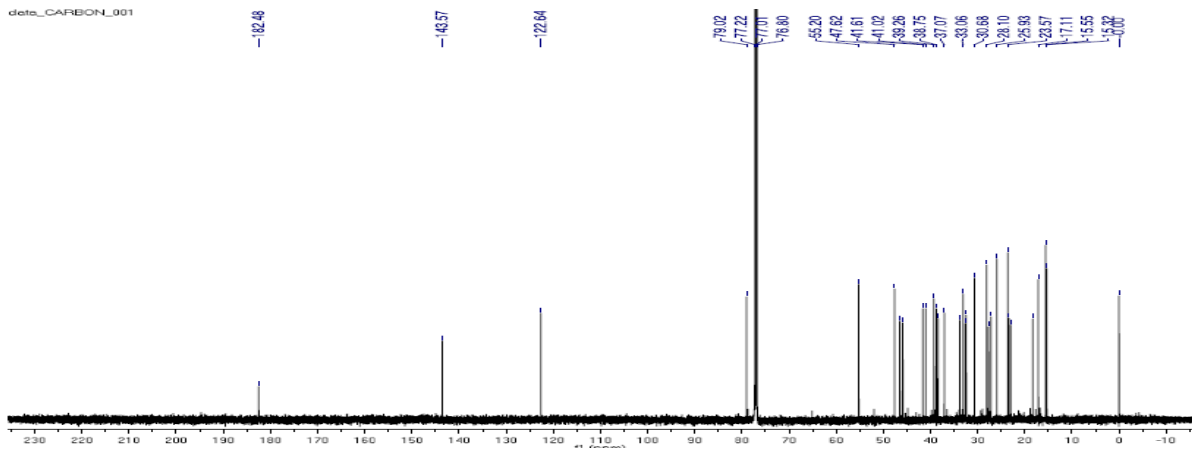
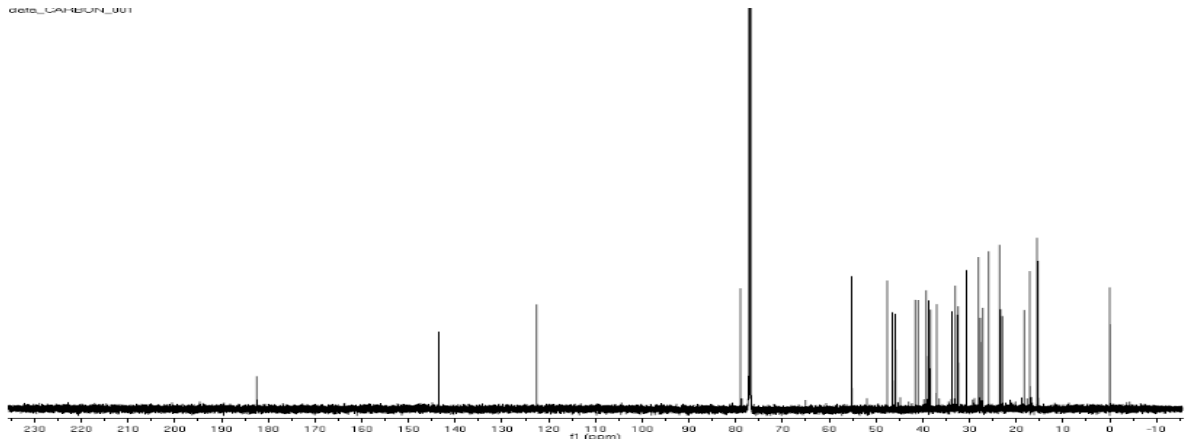
SMM-7-1-a. Oleanolik asit NMR spektrumları ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CDCl}_3$ )

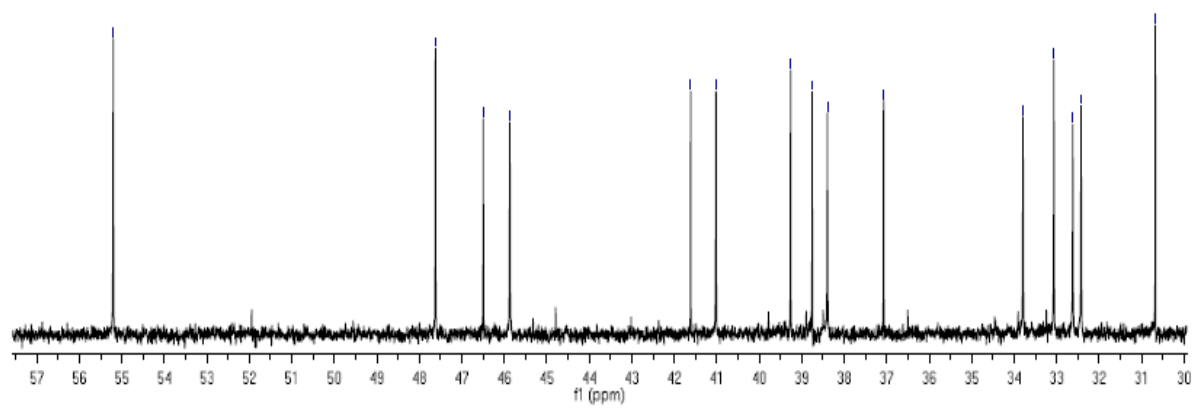
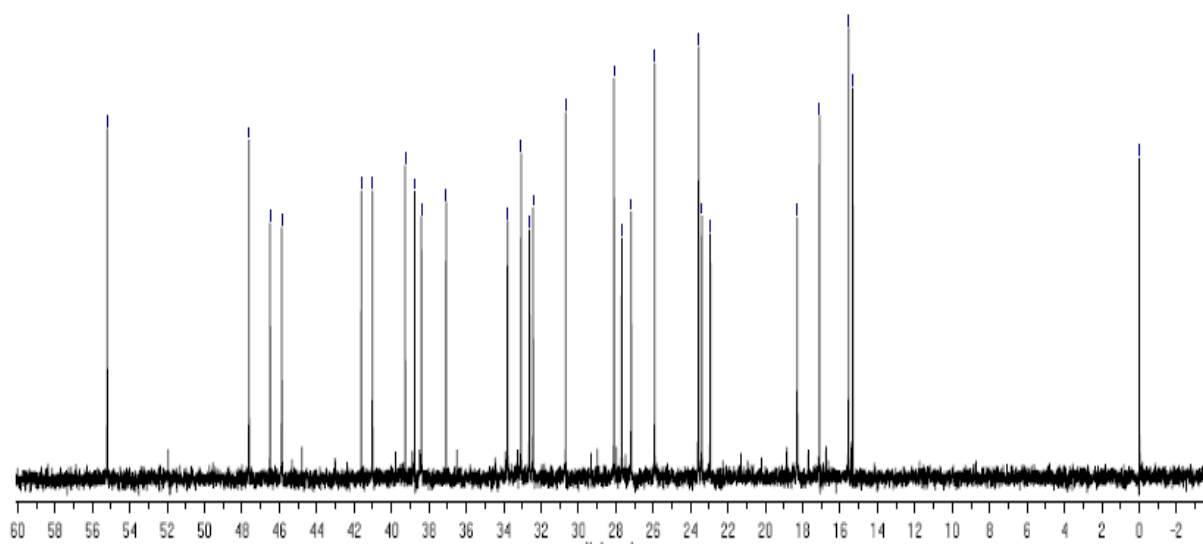


data\_F1000001

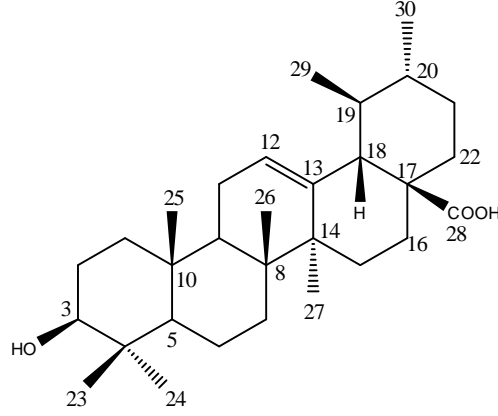








**SMM-7-1-b. Ursolik asit=3β-hidroksi-12-ursen-28-oik asit**

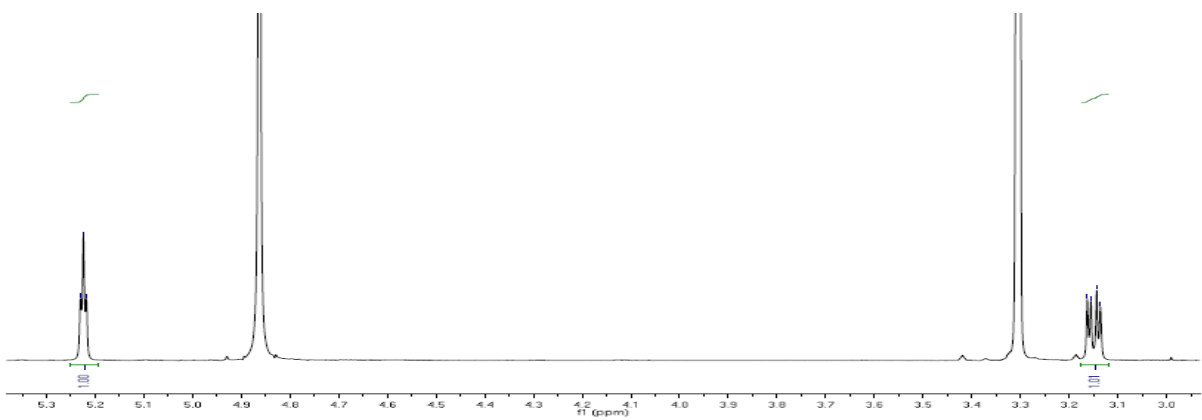
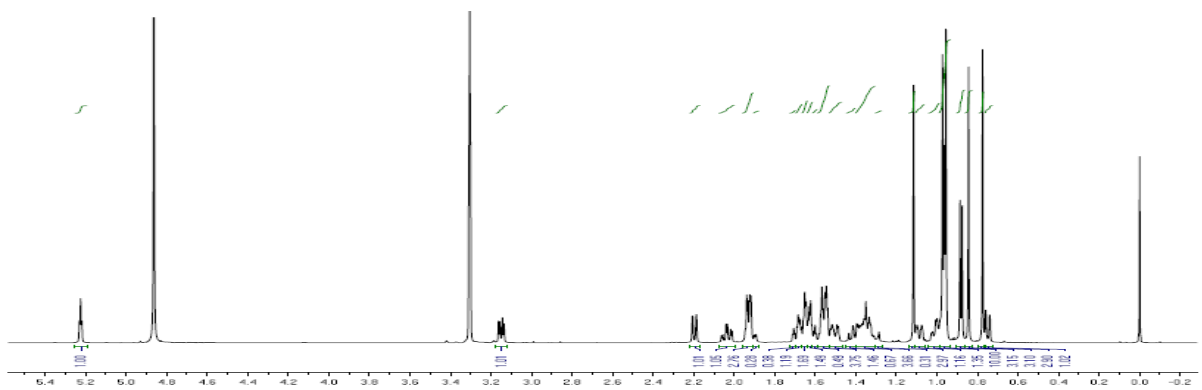
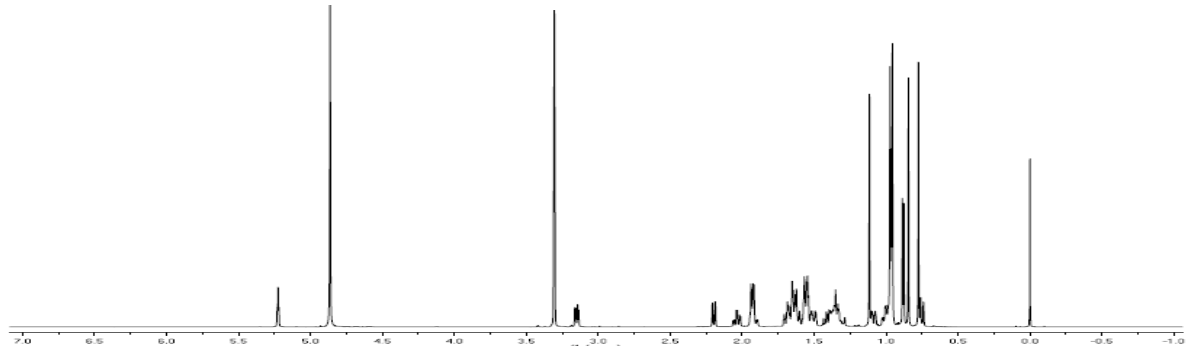


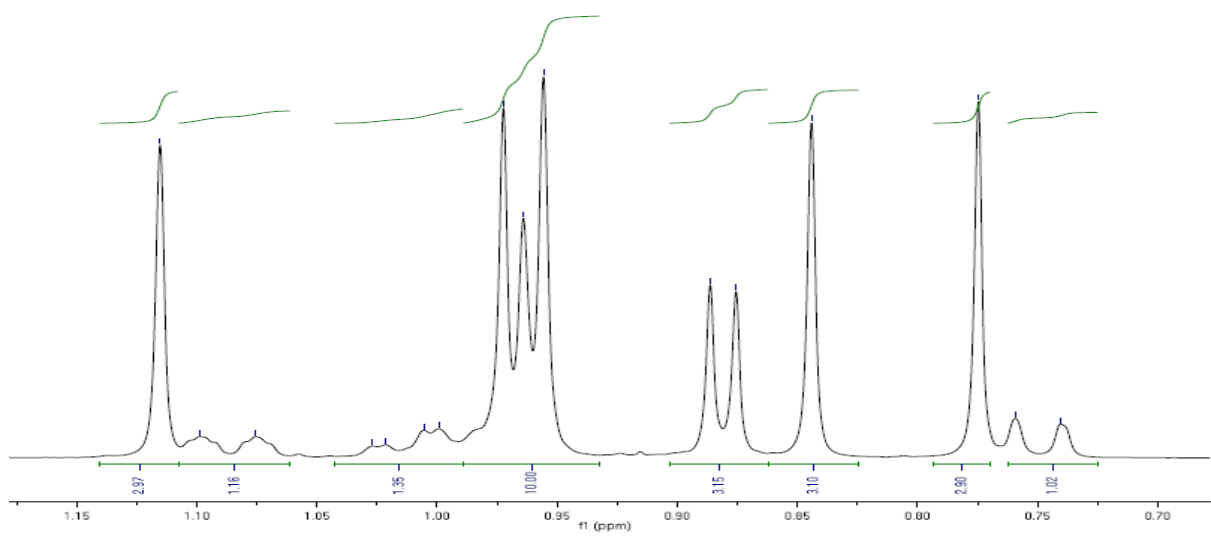
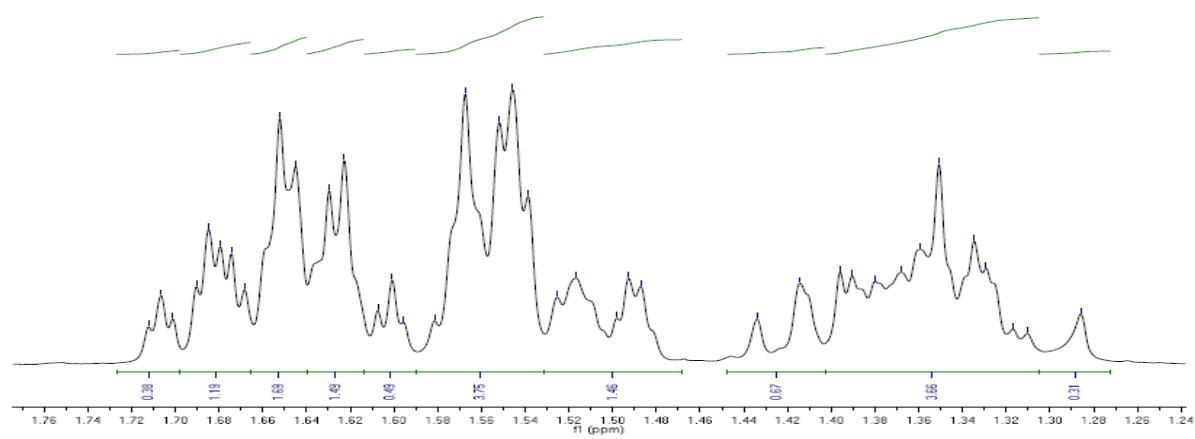
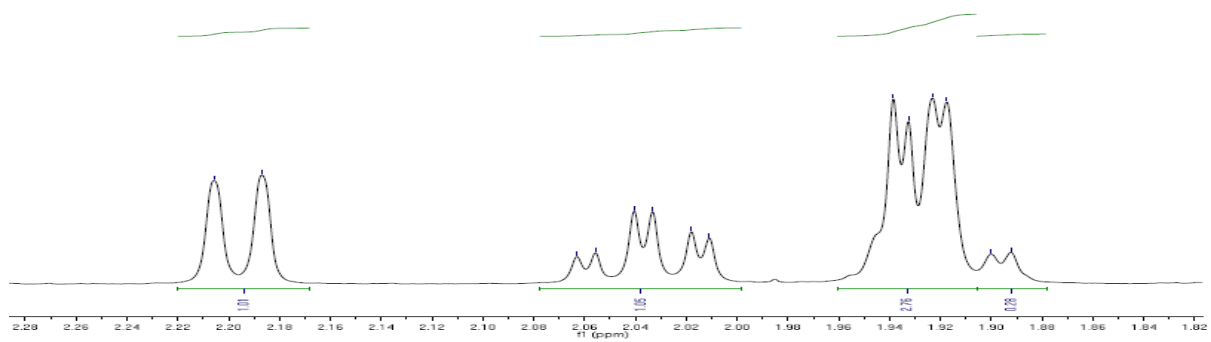
**Şekil 21.** Ursolik asit bileşiği

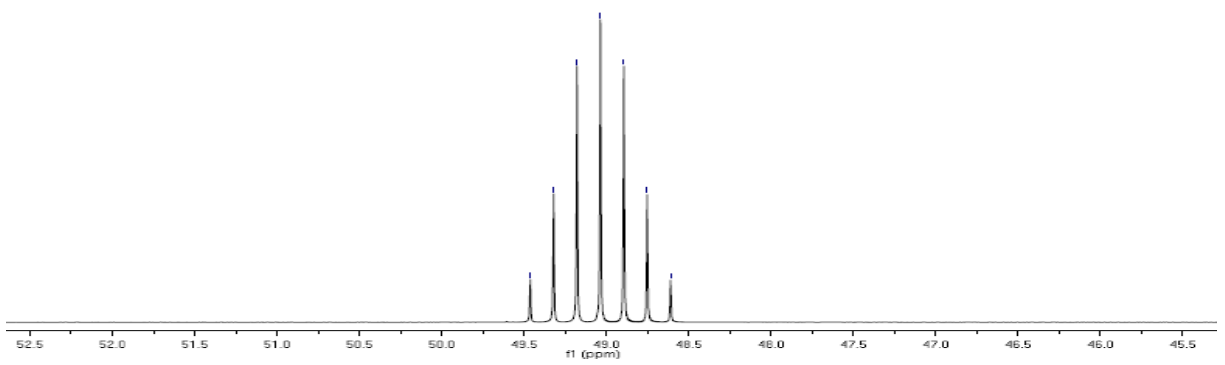
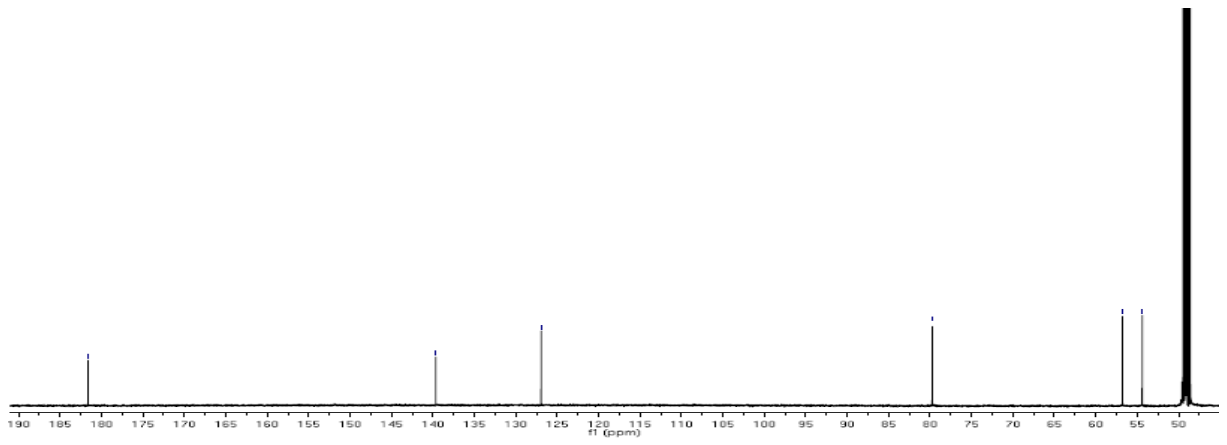
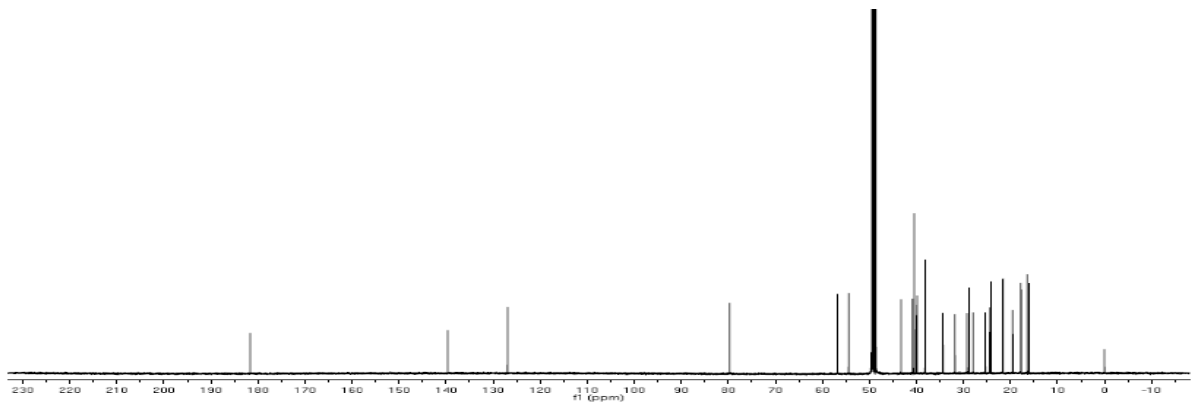
Beyaz renkli olan bu bileşik katı toz halde elde edildi ve erime noktası 290 °C olarak bulundu. Silikajel plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında eflatun-mor renk aldı.

<sup>1</sup>H NMR spektrumunda (CDCl<sub>3</sub>, 600 MHz) yine üst alanda çıkan metil singletleri yapının triterpen iskeletine sahip olduğunu düşündürdü. Fakat bu kez 0.75-1.05 ppm ler arasında beş metil singleti ve 0.86 ppm ile 0.78 ppm de çıkan 6,5 Hz lik iki metil dupleti (sırasıyla Me-29 ve Me-30) bileşiğin ursan yapısında bir triterpen olduğunu düşündürdü. <sup>1</sup>H-NMR bulguları incelenip literatür verileri ile karşılaştırıldığında tamamen uygunluk gösteren veriler, bize bu yapının *Salvia* türlerinden daha önce de izole edilen ve Lamiaceae bitkilerinde oldukça yaygın olarak bulunan ursolik asit olduğunu göstermiştir.

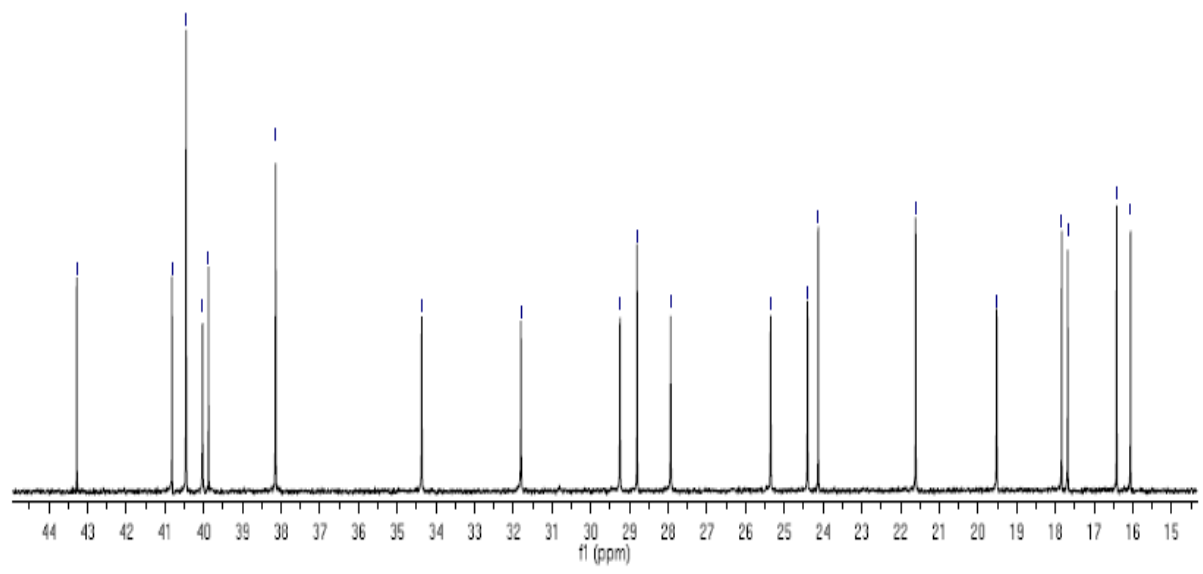
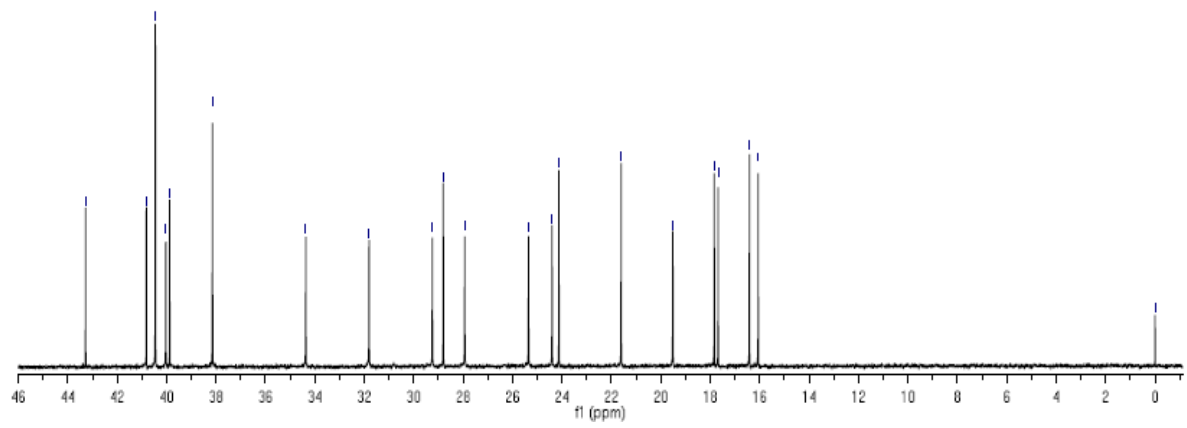
SMM-7-1-b. Ursolik asit NMR spektrumları ( $^1\text{H-NMR}$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



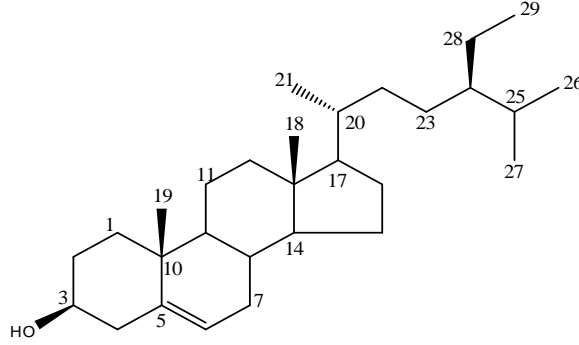








### 8.7.5. SMM-15-1 ve SMM-15-2\_1 = ( $\beta$ -Sitoesterol) Stigmast-5-en-3-ol

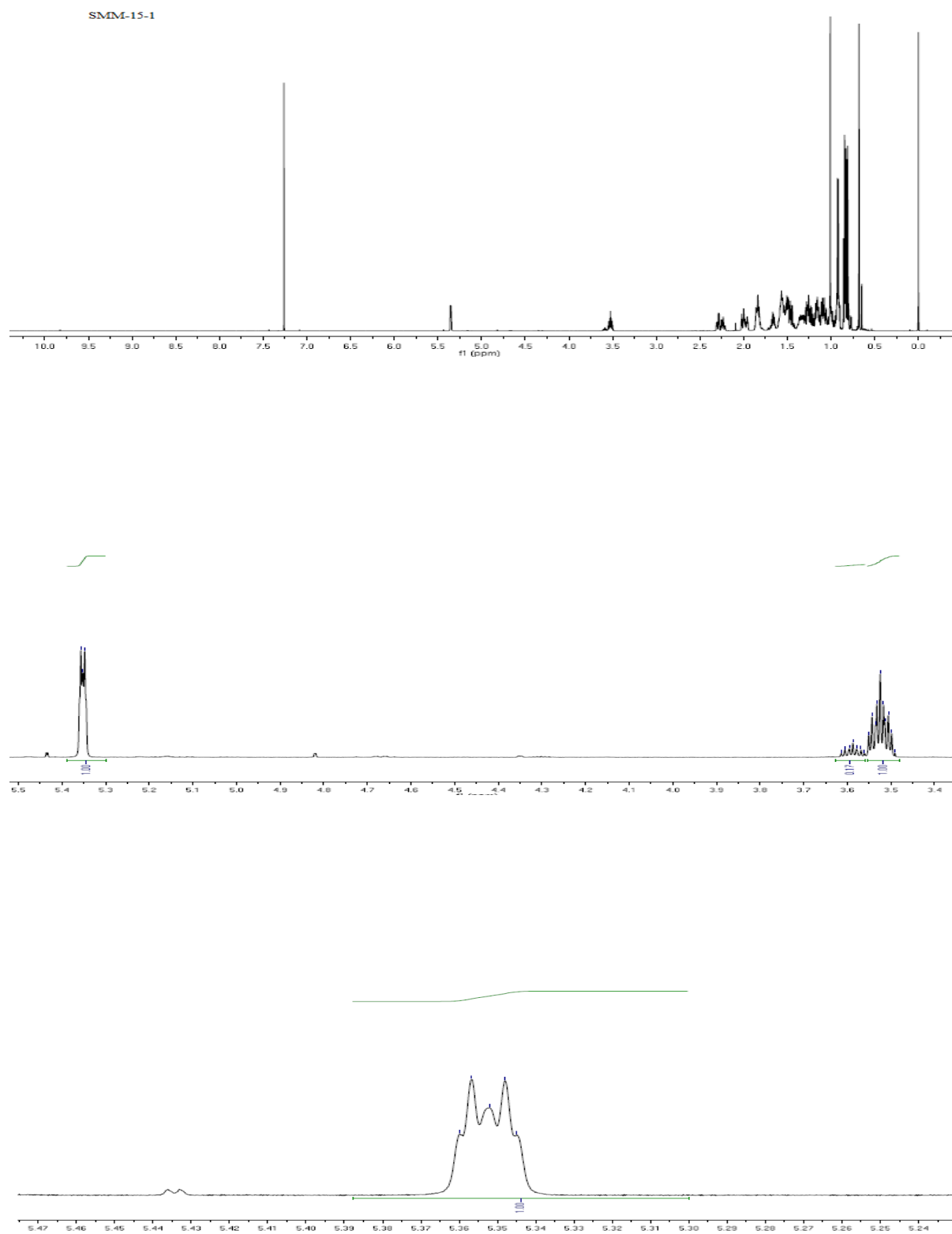


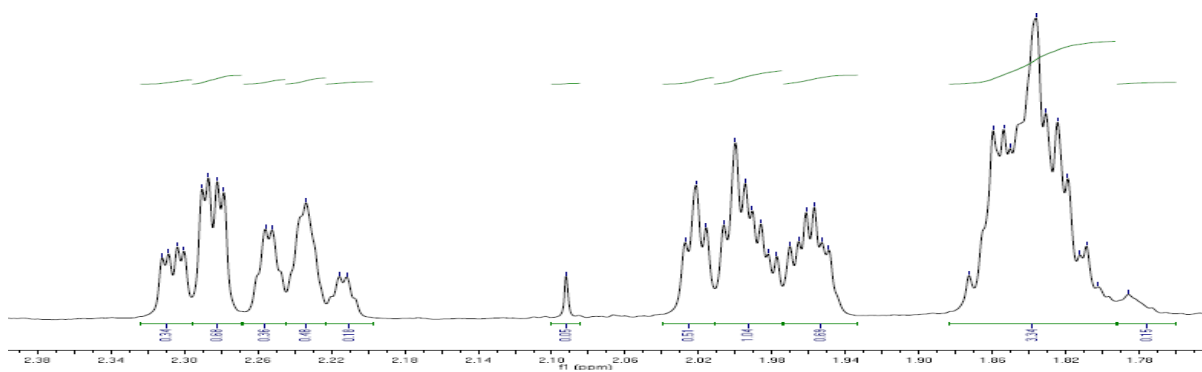
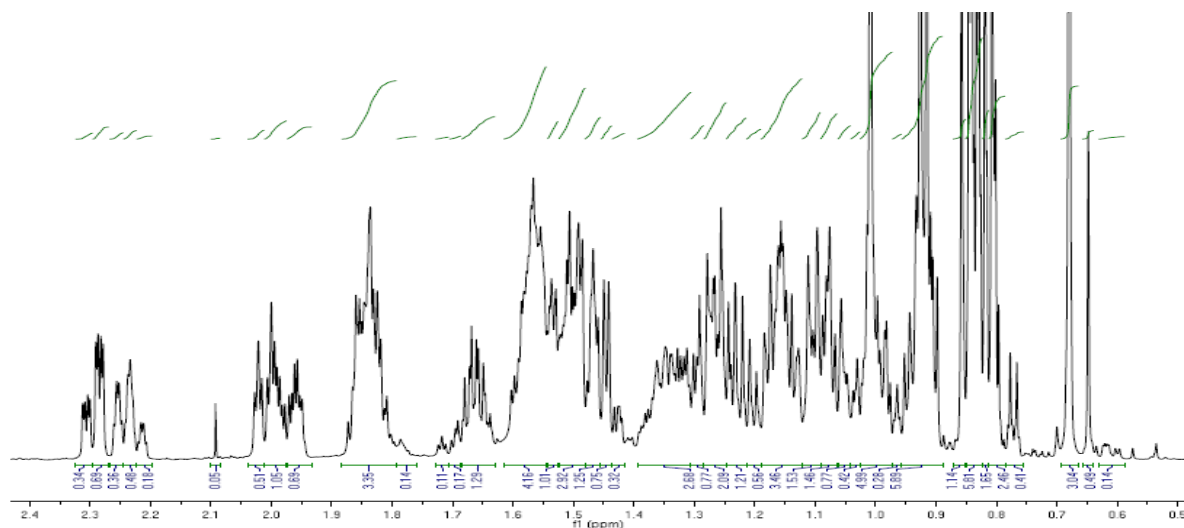
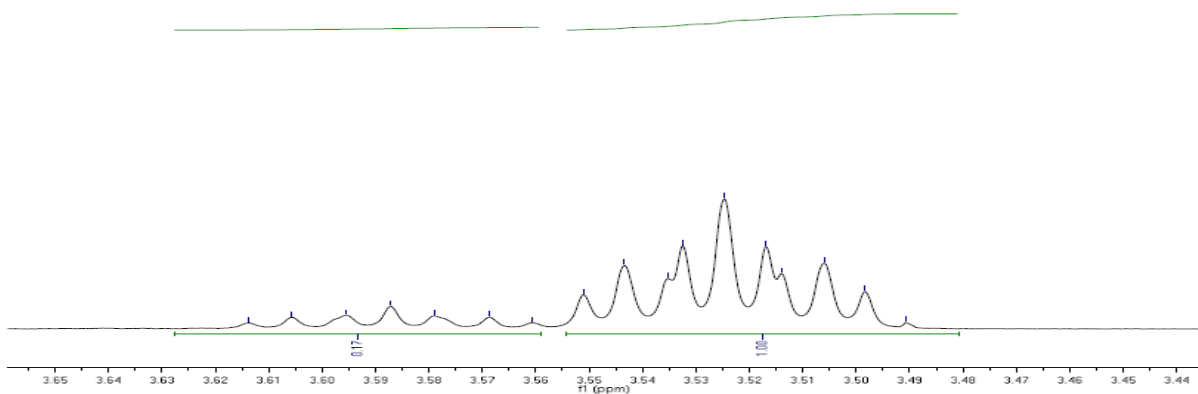
Şekil 22.  $\beta$ -sitoesterol bileşiği

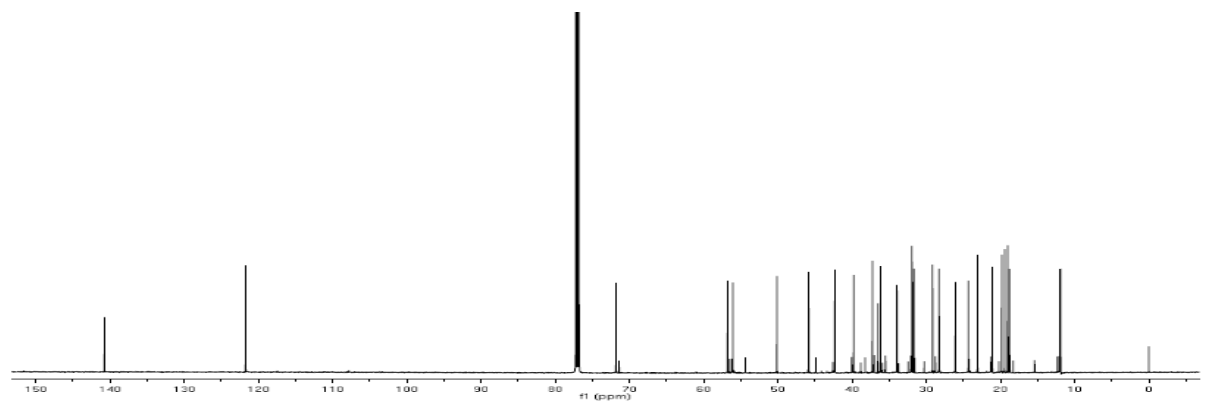
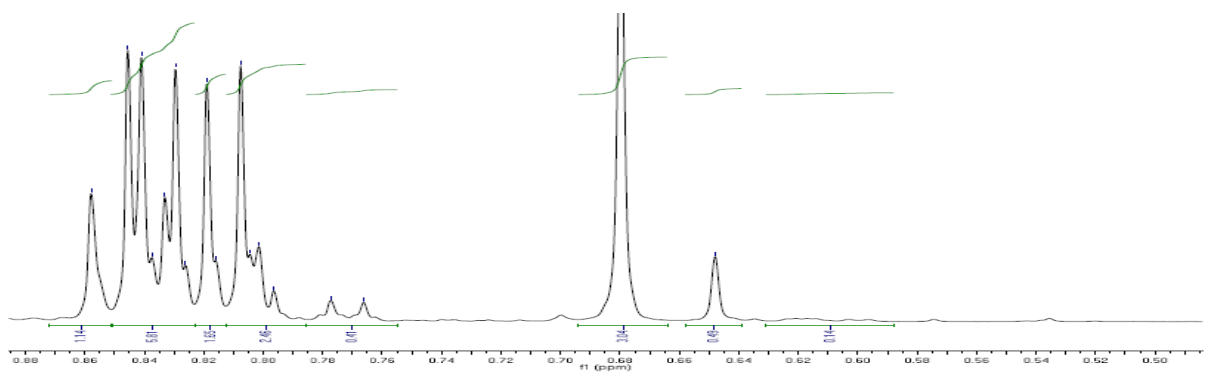
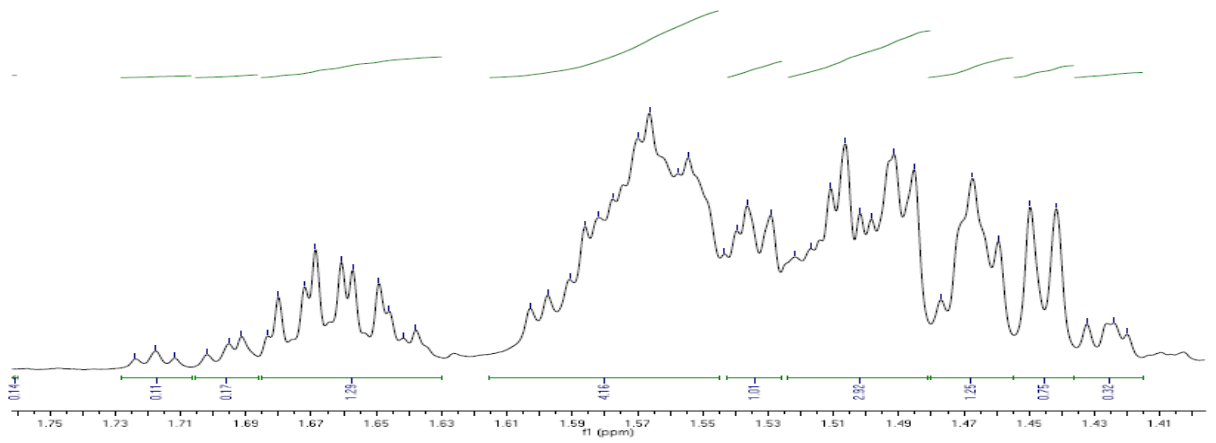
DCM:PE (8:2) çözücü sisteminden 15. Fraksiyonda 0.0382 g (% verim=0.00184) olarak elde edilen beyaz renkli katı madde olarak elde edilen bileşiğin erime noktası 137-138 °C olarak belirlendi. Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında önce mavi sonra kahverengi bir renk aldı.

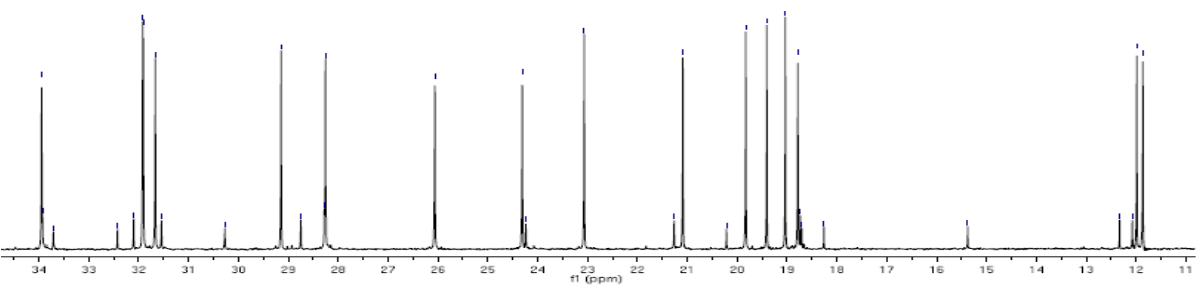
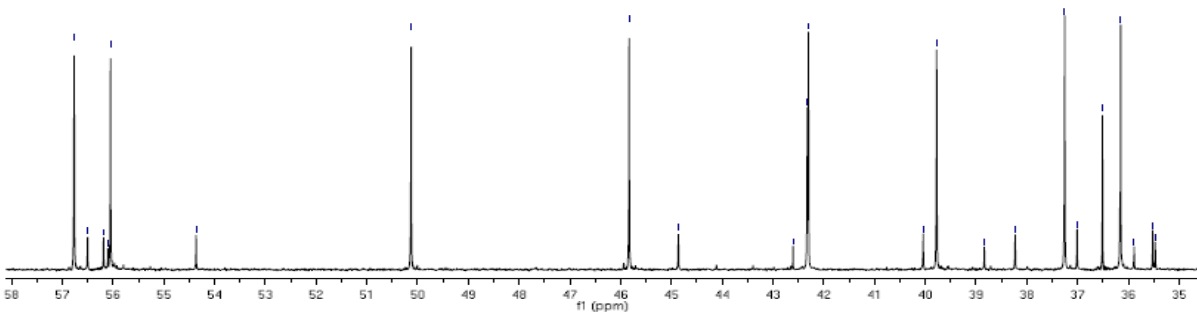
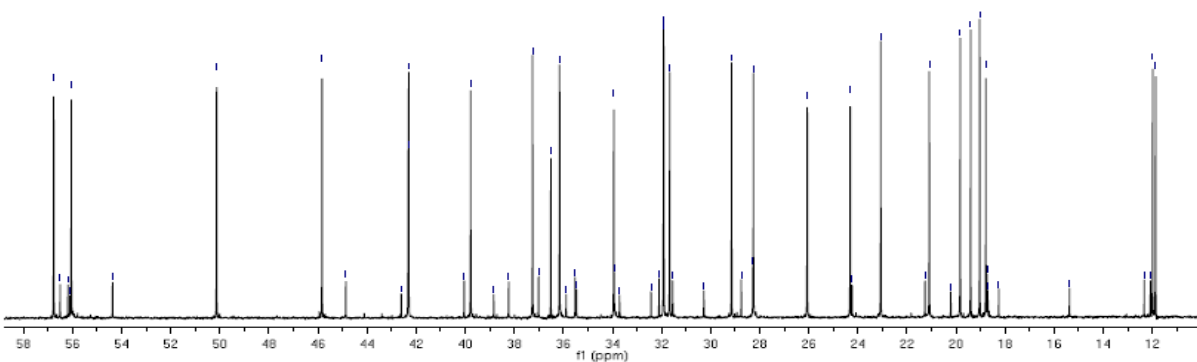
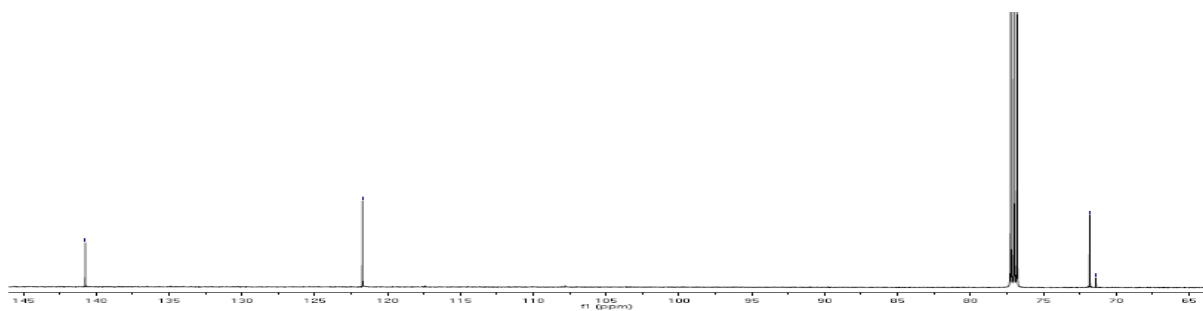
Bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda 3.52 ppm’de izlenen multiplet sinyali bize yapıda oksijen taşıyan bir sübstitüente komşu protona ait olabileceğini gösterdi. 5.35 ppm’de gözlenen multipletimsi dublet sinyali ise olefinik bir proton olarak yorumlandı. 1-2 ppm arasındaki metilen zarfının yanısıra metil piklerinin multiplisiteleri yapının bir steroid olabileceğini düşündürmüştür. Alınan  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunda 6 metil sinyalinin çıkış şekli (2 singlet, 3 dublet ve 1 tripletten ibaret) bileşiğin 29 C’lu stigmasten yapısına sahip olduğunu ispatlamıştır. Biyojenetik olarak ve karakteristik bölünme şekli dikkate alındığında OH grubunun C-3’e yerleşmesi ve literatür verilerinin de bunu doğrulaması ve de tüm spektral veriler ve fiziksel özelliklerine dayanarak bu bileşiğin yapısının *Salvia* türlerinden daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan  $\beta$ -sitoesterol olduğunu kanıtlamıştır.

SMM-15-1 ve SMM-15-2\_1.  $\beta$ -Sitosterol ( $^1\text{H-NMR, CDCl}_3$ )

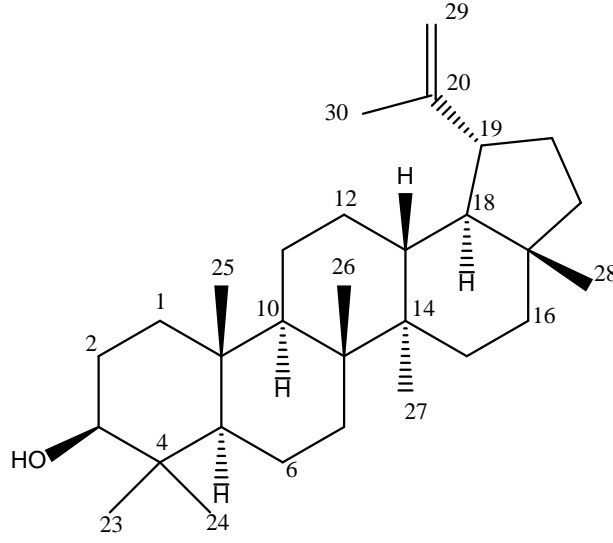








### 8.7.6. SMM-15-2\_4, SMA-41-43\_1 ve SMA-44-48\_1 (Lupeol = Lup(20)29-en-3-ol)



Şekil 23. Lupeol bileşiği

SMM-15-2\_4 ekstresi DCM:PE (8:2) çözücü sistemi ile 15. Fraksiyondan 0.1892 g (% verim=0.0091) olarak, SMA-41-43\_1 ekstresi %100 DCM çözücü sisteminden 0.2588g (% verim= 0.012) olarak, SMA-44-48\_1 ekstresi ise Ac:DCM (1:9) çözücü sisteminden 0.1523 g (% verim= 0.007) olarak beyaz renkli katı toz halinde elde edilmiştir. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) kahverengi tonlarında görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında koyu eflatun-mor rengini aldı.

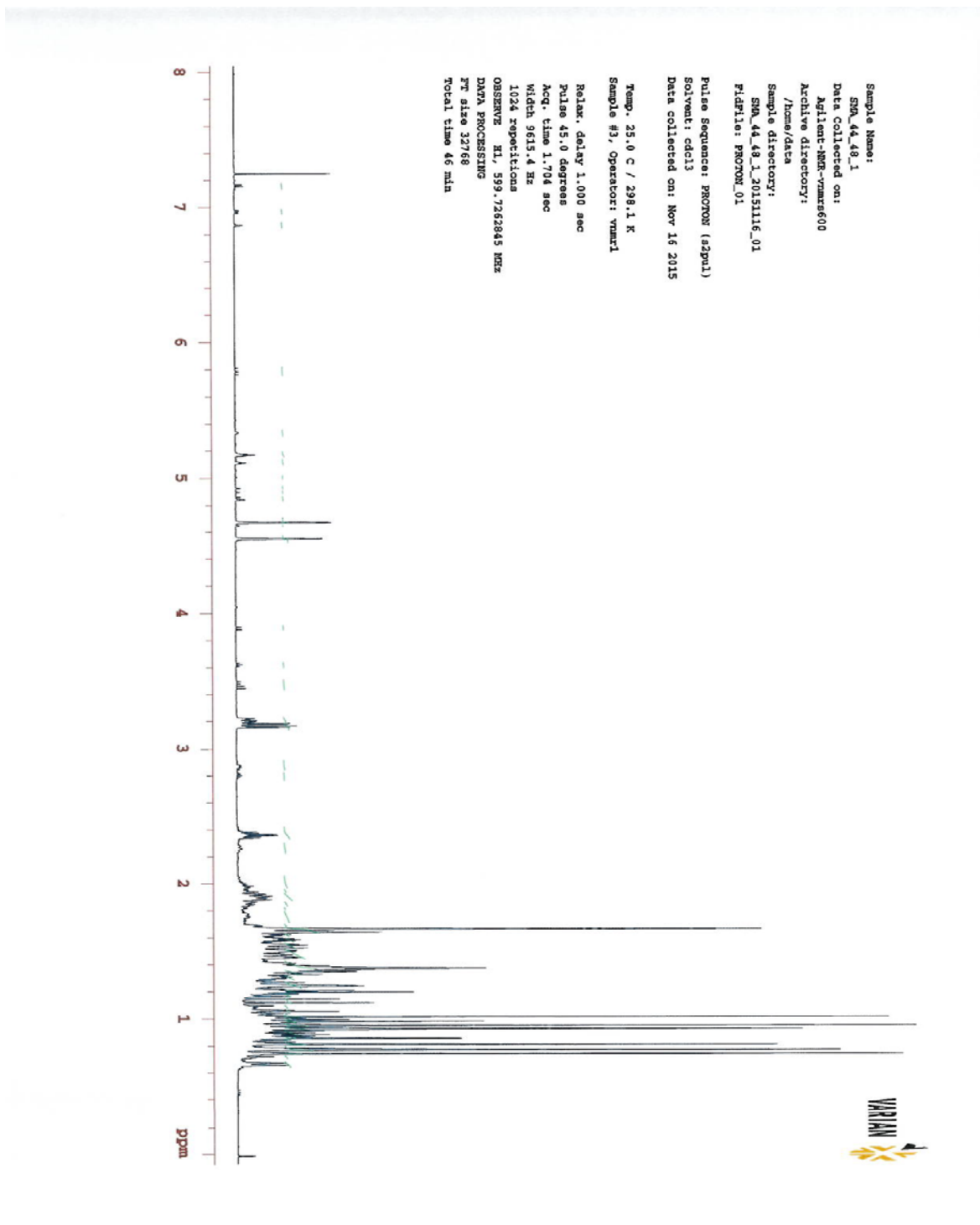
Lupeolün <sup>1</sup>H -NMR spektrumu incelendiğinde 1.61 ve 0.69 ppm arasındaki bölgede 7 tane singletin varlığı bize bu bileşiğin triterpen iskeletine sahip olduğu konusunda ipucu vermiştir. 4.50 ve 4.62 ppm'de 1-2 Hz'lik dubletler olarak gözlenen sinyaller yapıda terminal bir çifte bağın olduğunu ve birbirleriyle dublet verdiğini düşündürmüştür. 1.61 ppm'de çıkan 3 protonluk singlet piki ise bu sinyalin vinilik bir metile ait olabileceğini, yani 4.62 ve 4.50 ppm'deki piklerle birlikte değerlendirildiğinde bir isopren grubunun varlığını göstermiştir. <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda 3.12 ppm'deki sinyal ise bir hidroksil grubuna komşu bir protonun varlığını ve bu protonun komşu C atomundaki iki protonla etkileşimi sonucu dubletin dubleti şeklinde izlendiğini ifade etmektedir. Lupan triterpenler, hatta pek çok tip triterpen yapısında bulunan ilk OH grubu biyojenetik olarak C-3'de izlendiğinden ve gerek bölünme şekli gerekse kimyasal kayması literatür verileriyle karşılaştırıldığında bu bileşiğin 3.12 ppm'deki

sekonder OH grubunun C-3'de olduğu kesinlik kazanmıştır. Bileşiğin <sup>13</sup>C-NMR (APT) spektrumunu incelediğimizde 150.95 ve 109.32 ppm'deki sinyaller de yine isopropenil grubundaki karbonların varlığını doğrulamıştır. Spektrumun 38-55 ppm arası incelendiğinde 5 tane CH karbonunun varlığı ve C-3 de hidroksil taşıyan karbonun ise 72.58 ppm' de rezonansa geldiği izlenmiştir.

Tüm sonuđlar deđerlendirildiđinde bu bileřiđin yapısının *Salvia* tűrlerinden daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan lupeol olduđuna karar verilmiřtir.



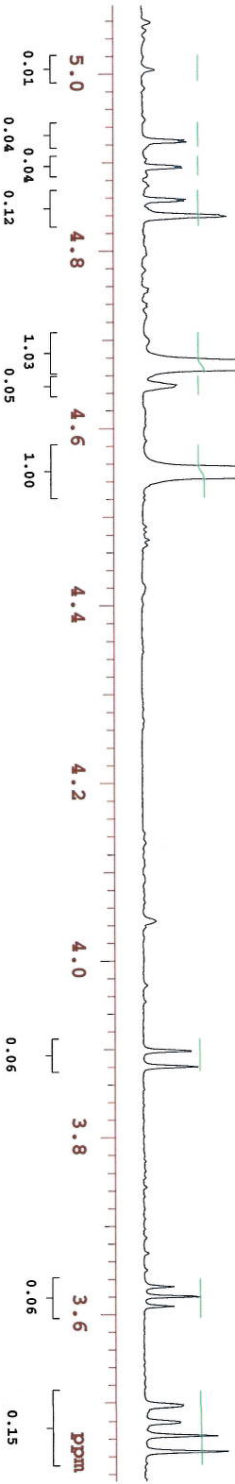
SMM-15-2\_4, SMA-41-43\_1 ve SMA-44-48\_1. Lupeol (<sup>1</sup>H-NMR, CDCl<sub>3</sub>)



Sample Name:  
 SMA\_44\_48\_1  
 Date Collected on:  
 Agilent-NMR-vnmr5600  
 Archive directory:  
 /home/data  
 Sample directory:  
 SMA\_44\_48\_1\_20151116\_01  
 FIDfile: PRONON\_01

Pulse Sequence: PRONON (q2pu1)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 16 2015

Temp: 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #3, Operator: vnmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE HI, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min



INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	2954.0	4.926	7.6
2	2952.8	4.924	7.6
3	2936.4	4.896	7.2
4	2935.2	4.894	7.2
5	2914.1	4.859	7.9
6	2912.9	4.857	7.6
7	2902.3	4.832	15.0
8	2803.1	4.674	144.0
9	2800.8	4.670	144.0
10	2788.5	4.650	6.3
11	2729.8	4.552	131.0
12	2337.7	3.898	8.5
13	2327.2	3.880	9.7
14	2178.1	3.632	5.4
15	2171.1	3.620	10.0
16	2164.6	3.609	5.4
17	2097.7	3.498	7.0
18	2086.6	3.479	6.4
19	2077.2	3.464	13.0
20	2066.6	3.446	14.8

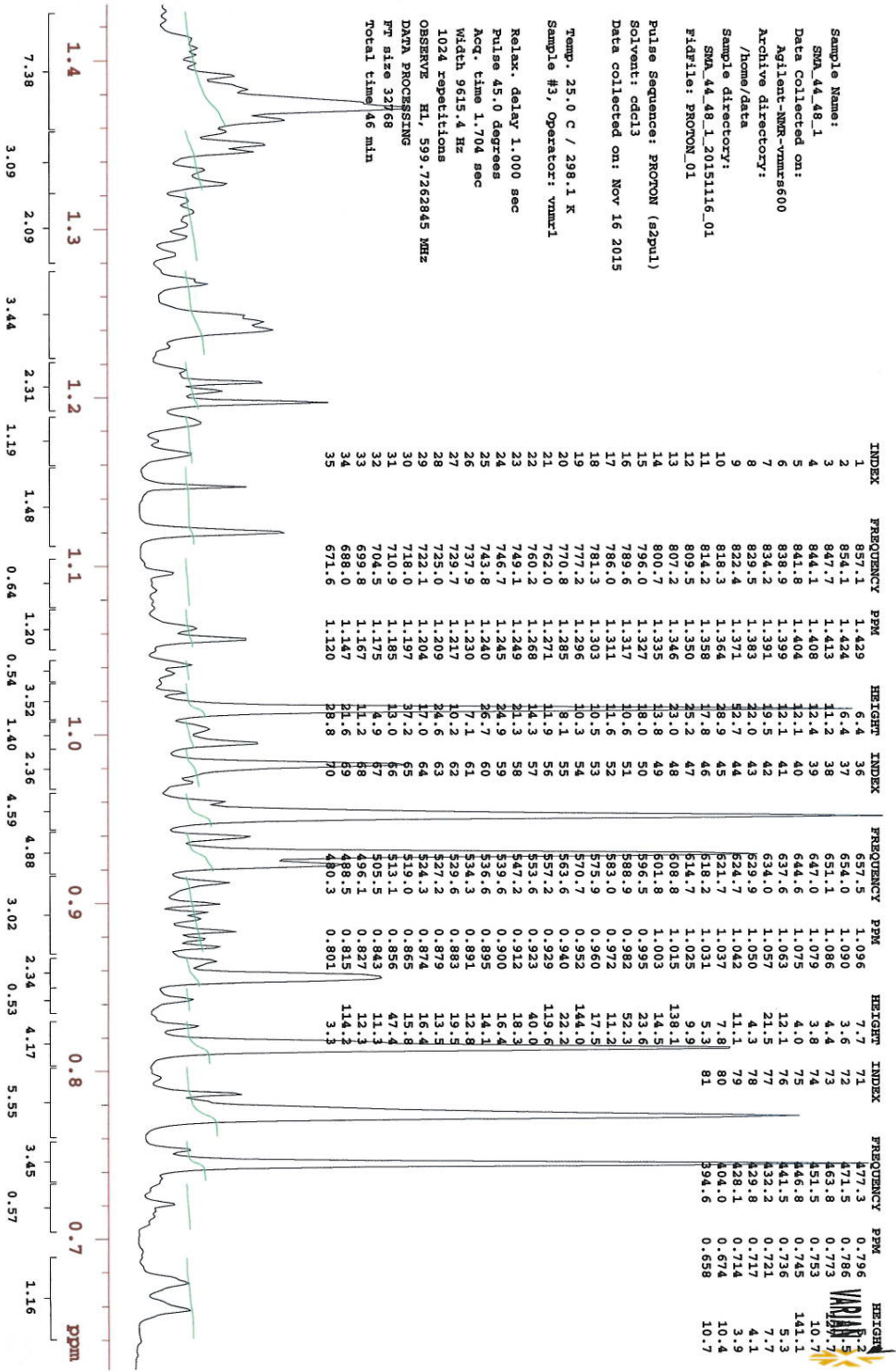
Sample Name: SMA\_44\_48\_1  
 Data Collected on: Agilent-NMR-Vnmr600  
 Archive directory: /home/data  
 Sample directory: SMA\_44\_48\_1\_20151116\_01  
 Filefile: PROTON\_01

Pulse Sequence: PROTON (szpnl)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 16 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #3, Operator: vnmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.104 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE H1, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min



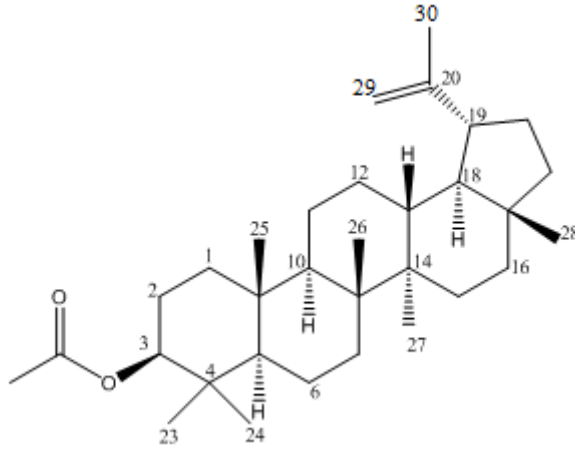
INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	1932.8	3.223	38.3
2	1930.5	3.219	38.4
3	1927.5	3.214	39.6
4	1925.8	3.211	21.9
5	1921.7	3.204	31.4
6	1919.3	3.200	29.7
7	1916.4	3.195	20.6
8	1914.6	3.192	27.6
9	1909.9	3.185	80.9
10	1904.6	3.176	78.7
11	1898.2	3.165	91.0
12	1893.5	3.157	81.2
13	1728.6	2.882	5.2
14	1725.0	2.876	7.6
15	1720.9	2.870	6.2
16	1718.0	2.865	8.2
17	1714.5	2.859	5.2
18	1707.4	2.847	4.8
19	1687.5	2.814	6.3
20	1680.4	2.802	8.1
21	1673.4	2.790	6.1
22	1438.7	2.339	3.2
23	1439.8	2.384	30.3
24	1434.0	2.374	33.4
25	1418.7	2.356	60.4
26	1412.8	2.356	61.7
27	1407.5	2.347	36.9
28	1401.7	2.337	34.8
29	1389.9	2.318	3.9
30	1365.9	2.278	6.4
31	1361.8	2.271	4.3
32	1353.6	2.257	8.8
33	1344.8	2.242	3.5
34	1341.8	2.237	3.9



Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #3, Operator: ymmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9613.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE H1, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min

Sample Name: SMA\_44\_48\_1  
 Data Collected on: Agilent-NMR-ymmr600  
 Archive directory: /home/data  
 Sample directory: SMA\_44\_48\_1\_20151116\_01  
 F1/Dir: PROTON\_01  
 Pulse Sequence: PROTON (z2pu1)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 16 2015

### 8.7.7. SMA-27-2 ( 3-acetyl-lupeol = Lup-20(29)-en-3-asetat)



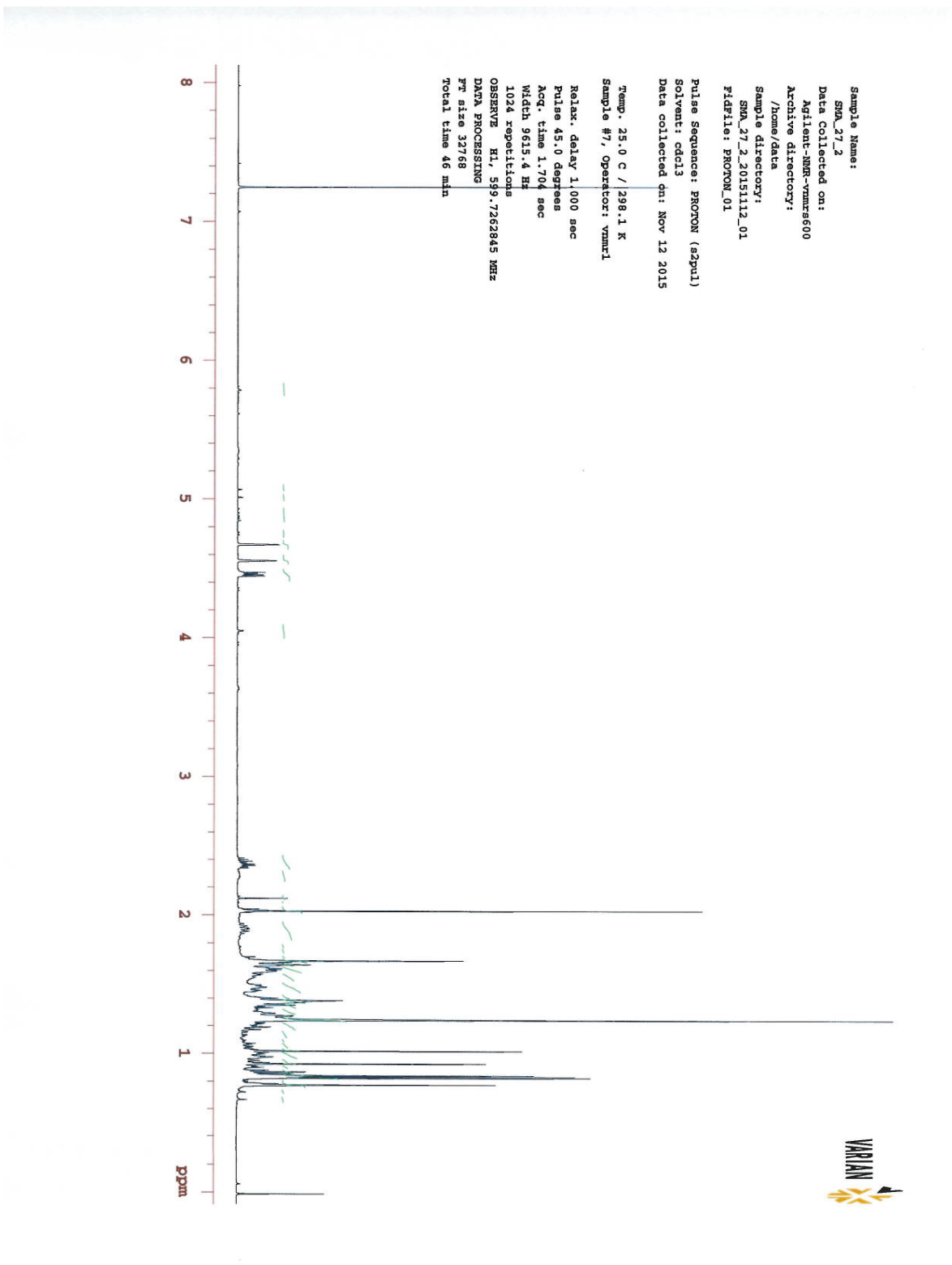
Şekil 24. Lupeol-3-asetat bileşiği

DCM:PE (6:4) çözücü sisteminden 27. fraksiyonda 0.0256 g (% verim= 0.0012) olarak gelen bileşik beyaz katı toz görünümünde elde edildi. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) kahverengi tonlarında görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında koyu eflatun rengini aldı ve kısa bir süre içinde rengi soldu.

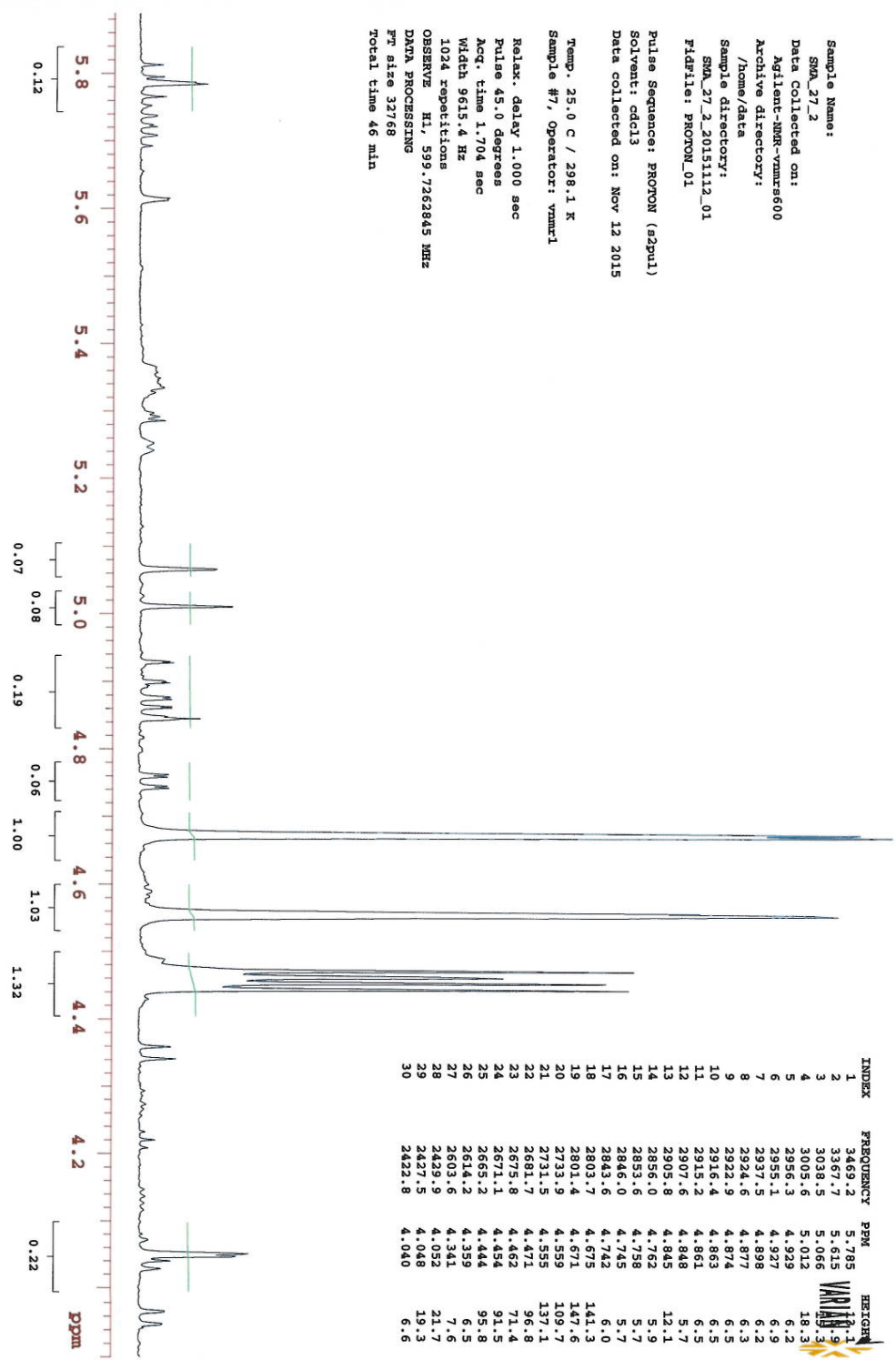
Lupeolün <sup>1</sup>H NMR spektrumu incelendiğinde 1.67 ve 0.77 ppm arasındaki bölgede 7 tane metil sinyalinin varlığı bize bu bileşiğin triterpen iskeletine sahip olduğu konusunda ipucu vermiştir. Bunlardan 6’ sı 0.77, 0.82, 0.83, 0.84, 0.95 ve 1.02 ppm’de singletler halinde izlenmiştir. 4.46 ve 4.67 ppm’lerde 1-2 Hz’lik dubletler olarak gözlenen sinyaller yapıda terminal bir çifte bağın olduğunu düşündürmüştür. 1.67 ppm’de çıkan 3 protonluk singlet piki ise bu sinyalin vinilik bir metile ait olabileceğini, yani 4.67 ve 4.46 ppm deki piklerle birlikte değerlendirildiğinde bir isopropilen grubunun varlığını göstererek lupan iskeletinin daha lup-20(29)-en iskeletinin varlığına işaret etmiştir. Lupeolden en önemli farkı ise lupeolde C-3’te bulunan OH yerine bir asetil grubunun yani lupeol asetata ait sinyallerin izlenmesidir.

2.03 ppm’de izlenen asetat CH<sub>3</sub> sinyali ve H-3 α protonunun 4.46 dd (J= 5 ve 9) izlenmesi C-3 β- pozisyonunda yerleştiğini göstermiştir. Tüm bu verilere dayanarak bileşiğin daha önce de bazı *Salvia* türlerinden ve diğer bitki türlerinden elde edilen 3-acetyl lupeol (3-asetat-lup-20(29)-en) olduğu belirlenmiştir.

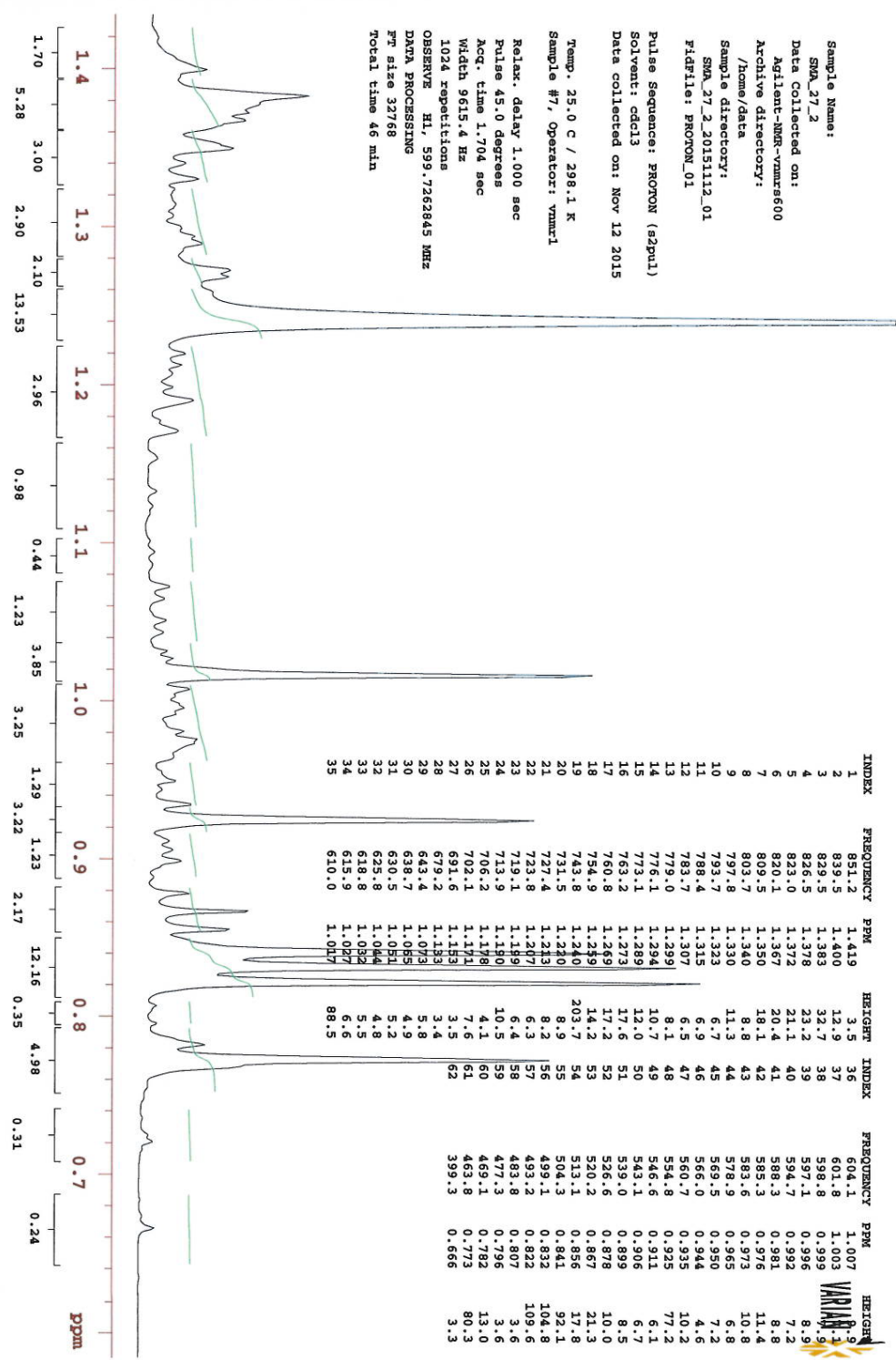
SMA-27-2. Lupeol asetat (<sup>1</sup>H-NMR, CDCl<sub>3</sub>)



Sample Name: SMA\_27\_2  
 Data Collected on: Agilent-NMR-vnmr5600  
 Archive directory: /home/data  
 Sample directory: SMA\_27\_2\_20151112\_01  
 FIDfile: PROTON\_01  
 Pulse Sequence: PROTON (zgpg1)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 12 2015  
 Temp: 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #7, Operator: vnmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE H1, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min

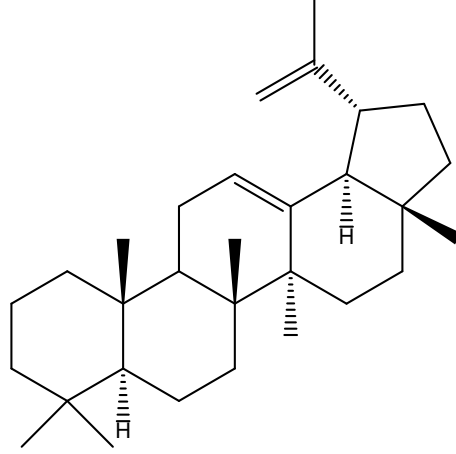


Sample Name: SMA\_27.2  
 Data Collected on: Agilent-NMR-vnmr500  
 Archive directory: /home/data  
 Sample directory: SMA\_27\_2\_2015112\_01  
 FIDfile: PROTON\_01  
 Pulse Sequence: PROTON (zgpg3)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 12 2015  
 Temp: 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #7, Operator: vnmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE HI, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min





### 8.7.8. SMA-32-35\_1 ve SMA -37-38-3 (Lup-12,20(29)-dien) ve Lup-20(29)-en



**Şekil 25.** Lup-12,20(29)-dien

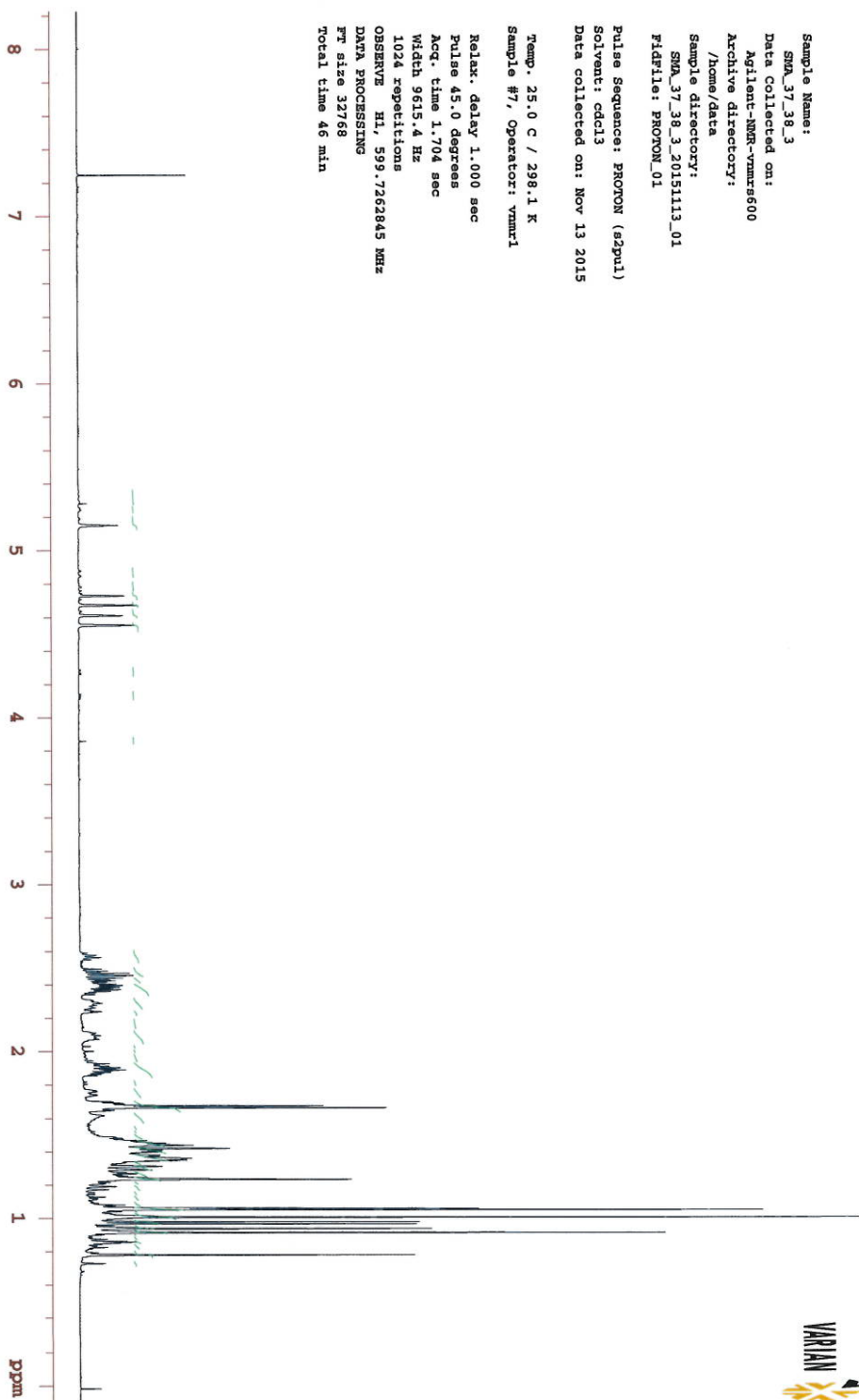
SMA\_32\_35\_1 DCM:PE (8:2) çözücü sisteminin 32,33,34,35. fraksiyonlarından 0.072 g (% verim=0.0035) olarak, SMA-37-38\_3 de DCM:PE karışımının 37 ve 38. fraksiyonlarından 0.1973 g (% verim= 0.0095) olarak elde edilmiştir. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) kahverengi tonlarında görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında koyu eflatun-mor rengini aldı.

Bileşiğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu incelendiğinde 1.61 ve 0.69 ppm arasındaki bölgede çok sayıda metil protonlarına ait sinyallerin izlenmesi CDCl<sub>3</sub> de alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda triterpen iskeletine sahip iki bileşiğin bir arada izlendiği ipucunu vermiştir. 4.61 ve 4.73 ppm’lerde bir çift ve ayrıca 4.55 ve 4.67 ppm’lerde ikinci bir çift 1-2 Hz’lik dubletler olarak gözlenen sinyaller yapıda terminal iki çifte bağ olduğunu düşündürmüştür. 1.61 ve 1.62 ppm’de çıkan her biri 3 protonluk singlet pikleri ise bu sinyallerin vinilik metil protonlarına ait olabileceğini göstermiştir. Bileşikte 5.20 ppm’de izlenen dar triplet (*J*=3 Hz) oleanane ve ursan tipi triterpenlerde sıklıkla görünen, lupan triterpenlerde daha nadir izlenen C-halkasında C-12 ile C-13 arasındaki bir çifte bağın varlığına işaret etmiştir. Nitekim <sup>13</sup>C-NMR (APT) spektrumunu incelediğimizde 150.95 ve 109.32 ppm’deki sinyaller de yine isopropenil grubundaki karbonların varlığına işaret ederken ayrıca olefinik bir CH ve katerner C sinyallerini 123 ve 135.5 ppm’lerde göstermiştir.

Bu iki bileşik birbirinden ayıramamıştır. Fakat  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu açıkça her iki bileşikte de halka dışı izopropilen grubuna ait metilen sinyalleri 4.73 ve 4.61 ppm'de ve 4.55 ve 4.67 ppm'de iki çift olarak izlenmiş, ayrıca bu isopropilen gruplarına ait vinilik metil sinyalleri de 1.60 ve 1.61'ppm de izlenmiştir. Bileşiklerden intensitesi göreceli olarak kısa olanın C12-13 ( $\Delta^{12}$ ) arasında ilave bir çifte bağa sahip olduğu saptanmıştır.

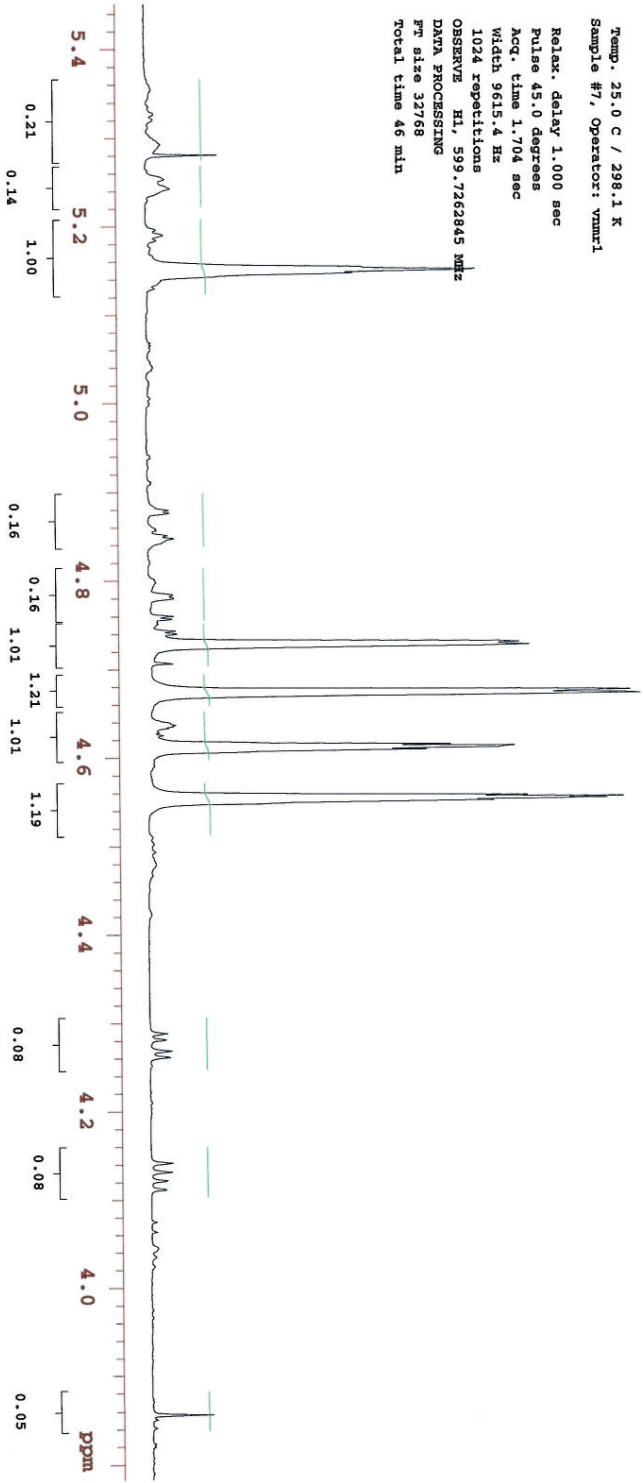
Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde bu iki bileşikten birinin lup-20(29)-en, diğerinin (daha az yüzdeyle bulunanın, yani intensitesi düşük sinyaller verenin ise olan lup-12,20(29)-dien olduğu saptanmıştır.

SMA-32-35\_1 ve SMA -37-38\_3. lup-12,20(29)-dien (<sup>1</sup>H-NMR, CDCl<sub>3</sub>)



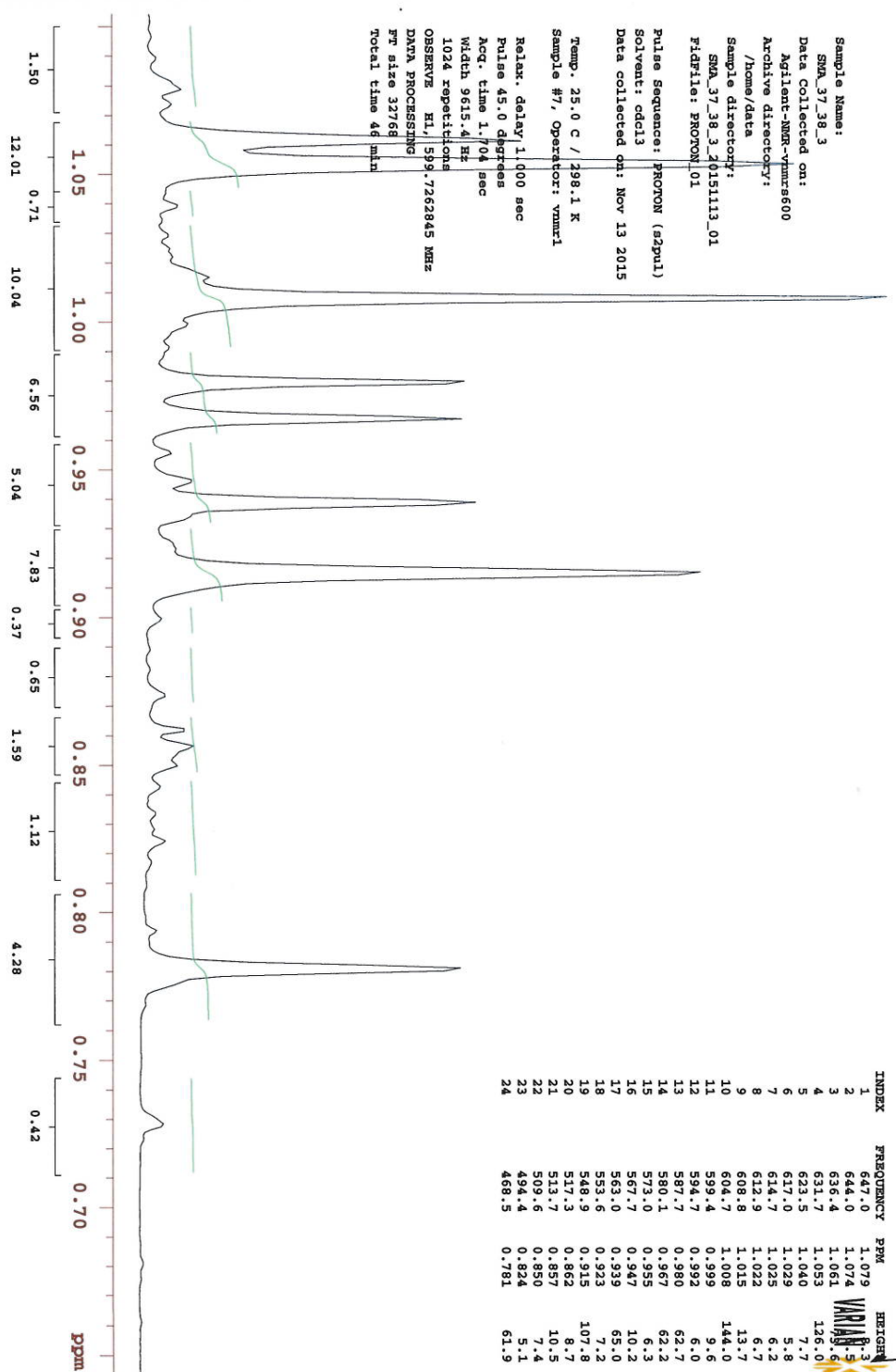
Sample Name: SMA\_37\_38\_3  
 Data Collected on: Agilent-NMR-vnmr600  
 Archive directory: /home/data  
 Sample directory: SMA\_37\_38\_3\_20151113\_01  
 FIDFile: PROTON\_01  
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 13 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #7, Operator: ymmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE H1, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 F2 size 32768  
 Total time 46 min



INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	3167.0	5.281	12.9
2	3088.9	5.151	7.7
3	3086.6	5.147	8.8
4	2842.5	4.740	5.3
5	2836.6	4.720	66.2
6	2834.8	4.727	67.9
7	2803.7	4.675	85.8
8	2801.4	4.671	87.6
9	2767.3	4.614	53.8
10	2766.2	4.612	65.2
11	2763.8	4.608	49.4
12	2732.7	4.557	67.5
13	2731.5	4.555	84.5
14	2730.4	4.553	81.6
15	2729.2	4.551	61.5
16	2313.1	3.857	10.8

Sample Name: SMA\_37\_38\_3  
 Data Collected on: Agilent-NMR-Vnmrse600  
 Archive directory: /home/data  
 Sample directory: SMA\_37\_38\_3\_40151113\_01  
 FIDfiles: PROTON 01  
 Pulse Sequence: PROTON (szpul1)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 13 2015  
 Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #/ Operator: vnmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse delay 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE F1, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 PR size 32768  
 Total time 46 min



INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	647.0	1.079	1.079
2	644.0	1.074	1.074
3	636.4	1.061	1.061
4	631.7	1.053	1.053
5	623.5	1.040	1.040
6	617.0	1.029	1.029
7	614.7	1.022	1.022
8	612.9	1.015	1.015
9	608.8	1.008	1.008
10	604.7	1.008	1.008
11	599.4	0.999	0.999
12	594.7	0.992	0.992
13	587.7	0.980	0.980
14	580.1	0.967	0.967
15	573.0	0.955	0.955
16	567.7	0.947	0.947
17	563.0	0.939	0.939
18	553.6	0.923	0.923
19	548.9	0.915	0.915
20	517.3	0.862	0.862
21	513.7	0.857	0.857
22	509.6	0.850	0.850
23	494.4	0.824	0.824
24	468.5	0.781	0.781

## 6. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu tez çalışmasında Türkiye’de yetişen Lamiaceae familyasına ait endemik bir adaçayı türü olan *Salvia marashica* bitkisinin biyoaktif bileşenlerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. *Salvia marashica* bitkisi Kahramanmaraş’ın Ahır Dağı’nda yetişmektedir.

Bugüne kadar *Salvia* türleri yapılan çalışmalar sonucunda başlıca sekonder metabolitlerinin terpenik bileşikler ve bazı flavonoidler ile diğer fenolik bileşiklerden ibaret olduğu anlaşılmıştır. *Salvia* türünün ait olduğu Lamiaceae (Labiatae) familyasına ait sekonder metabolitlerle yapılan aktivite çalışmaları sonucunda bu familyaya ait birçok sekonder metabolitin, antibakteriyel, antiviral, antioksidan, sitotoksik/antitümör ve antikolinesteraz aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmada öncelikle toplanan *Salvia marashica* bitkisi teşhis edilip gölgede kurutulduktan sonra diklorometan, aseton ve metanol ekstraları hazırlandı. Diklorometan ve aseton ekstralarının İTK ile içeriğinin çok benzer olabileceği izlenerek bu ekstralar birleştirilip SMA (*Salvia marashica* aseton) olarak kodlandırıldı. İzolasyon işlemine ekstraların kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması ile başladıktan sonra, fraksiyonların küçük kolonlarla ve/veya preparatif ince tabaka kromatografisiyle saflaştırılması ile devam edildi. Elde edilen bileşiklerin saflığı öncelikle ince tabaka kromatografisi ile kontrol edildikten sonra spektral analizleri NMR, LC-MS/MS spektroskopik teknikleri kullanılarak yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda her iki ekstreden toplam 10 farklı bileşik edilmiştir. *Salvia marashica* aseton ekstresinin 5 fraksiyonundan 4 farklı lupan triterpen (lupeol, 3-asetil lupeol, lup-12,20(29)dien, lup-20(29)-en-3-ol) izole edilirken, *Salvia marashica* metanol ekstresinin 6 fraksiyonundan 6 saf bilinen bileşik (3 $\beta$ -hidroksiabieta-8,11,13-trien, oleanolik asit, ursolik asit, lupeol,  $\alpha$ -amirintetracosanoat,  $\beta$ -sitosterol) elde edilmiştir. Bunlardan lup-12,20(29)dien, lup-20(29)-en bileşikleri karışım halinde elde edilmiş, miktarları az olduğu için saflaştırılamamışlardır. İzole edilen bileşiklerden çoğu daha önce diğer bazı *Salvia* türlerinden elde edilmiş olmasına rağmen bir abietan diterpen olan 3 $\beta$ -hidroksi,18-asetoksimetilen-abieta-8,11,13-trien doğadan ilk kez *Salvia marashica*’nın metanol ekstresinden izole edilmiştir. Bu diterpene çok benzeyen 3 $\beta$ -hidroksi-abieta-8,11,13-trien bileşiğinin ise yarı sentez yoluyla daha önce elde edilen asetil türevinin hidrolizi sonucu elde edildiği, doğadan ise ilk kez bu tez çalışmasında izole edildiği belirlenmiştir.

Hazırlanan diklorometan+aseton ve metanol ekstralarının önce total fenolik ve total flavonoid miktarlarına bakılmış ve ekstraların fenolik bileşiklerce flavonoidlerden daha zengin olduğu anlaşılmıştır. Antioksidan aktiviteleri ise DPPH serbest radikal giderim aktivitesi,  $\beta$ -karoten-linoleik asit yöntemi, ABTS katyon radikali giderimi ve CUPRAC yöntemleriyle incelenmiştir. LC-MS/MS ile aseton ve metanol ekstralarının kalitatif ve kantitatif analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak metanol ekstresinin hem fenolik hem de flavonoid içerik bakımından aseton ekstresinden daha zengin olduğu tespit edilmiştir. Metanol ekstresinin özellikle birçok bitkide ve adaçayı türlerinde yoğun bulunan polifenolik yapıdaki güçlü bir antioksidan olan rosmarinik asit bakımından zengin olduğu belirlenmiştir. Metanol ekstresi bunun dışında kafeik asit, tannik asit, kuinik asit, hesperidin, prokateşik asit, malik asit, kamferol, 4-OH-benzoik asit, sinapinik asit, kumarik asit, apigenin bileşikleri açısından zengindir. Aseton ekstresi ise metanol kadar yüksek miktarda olmamakla birlikte rosmarinik asit, kafeik asit, vanilin, 4-OH-benzoik asit, sinapinik asit, malik asit, prokateşik asit, luteolin, kamferol, apigenin içermektedir. Bileşiklerin kolinesteraz inhibisyon aktiviteleri asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimlerine karşı in vitro Ellman yöntemleriyle test edilmişlerdir. Butirilkolinesteraz enzim inhibisyonunda ise bitkinin metanol ekstresinin aseton ekstresinden daha aktif olduğu ve 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonunda standart olarak kullanılan galantamine yakın aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Her iki ekstrenin ayrıca sağlıklı fibroblast L929 hücrelerine ve A549 akciğer kanser kürelerine karşı sitotoksitesi incelenmiş ve her iki ekstrenin sağlıklı L929 hücrelerine karşı genelde sitotoksik olmadığı ve en yüksek konsantrasyonda bile en az % 80 hücrenin canlı kaldığı belirlenmiştir. Buna karşın, akciğer kanser hücrelerine karşı metanol ekstresi pek bir etki göstermezken aseton ekstresinin orta derece sitotoksik olduğu saptanmıştır.

Yapıları aydınlatılan bileşiklerin yanısıra elde edilen bazı bileşikler tam olarak saflaştırılmadığından yapıları tayin edilememiştir. Fakat genelde bu bileşik karışımlarının alınan NMR spektrumlarından triterpenik bileşiklerden ibaret olduğu izlenimi alınmıştır. Özellikle *Salvia marashica* bitkisinin triterpenlerce zengin olduğu belirlenmiş ve bu triterpenik bileşikleri taşıyan, fakat kolayca saflaştırılmayan fraksiyonların daha sonra aktivitelerinin daha detaylı olarak araştırılması ve mümkünse saflaştırılması gerektiği hedeflenmiştir.

Sonuç olarak *Salvia marashica* bitkisinden elde edilen saf di- ve triterpenlerin çoğunun genelde yüksek antioksidan ve antikolinesteraz aktivite göstermesi *Salvia* türlerinin potansiyel ilaç ajanları olarak daha detaylı araştırılması ve bazı daha aktif türevlerinin yarı-sentezle elde edilerek Türkiye'nin değerli bir doğal kaynağı olan bu endemik bitkisinin değerlendirilmesinin gerekliliğine bir kez daha işaret etmiştir.

## 9.KAYNAKÇA

- [1] **Greuter, W (ed)**, 1988: International Code of Botanical Nomenclature, Koetz Scientific books, D. 2640, Konigstein, Germany.
- [2] **Hedge, I.C.**, 1992: "A global survey of the Lamiaceae" *Advencis in Labiatea Science*, s: 7-18.
- [3] **Hedge, I.C.**, 1986: "Lamiacea of South-West Asia: diversity, distribution and endemism" *Proceeding of the Royal society*, 89B, 23-25, Edingburgh.
- [4] **Chadefaud, M., Emberger, L.**, 1960: *Traite De Botanique (Systematique)*, Tome II, s:832-833.
- [5] **Baytop, A.**, 1996: *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, 4.Baskı, İstanbul : İstanbul Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 34637.
- [6] **Davis P., H.**, 1982: *Flora of Turkey an The East Eagen Islands*. Vol.7, Edinburg: Edinburg University Pres;. Pp 335-346
- [7] **Başer, K., H., C., Kırimer N.**, 2006: *Essential Oils of Lamiaceae Plants of Turkey*. *Acta Horticulturae*, 723, 163-171.
- [8] **Grieve, M.**, 1984: *A Modern Herbal*. Savvas Publishing. ISBN unknown.
- [9] **Briekorn, C. H. And Schlumprecht, I.**, 1951: *Constituents of Salvia officinalis*, VIII. Isolation of ursolic acid. *Arch, der Pharm.* 284, 239-242. *British Herbal Pharmacopoeia*, The 1983. B.H.M.A
- [10] **Topcu, G., Tan, N., Ulubelen, A., Sun, D., & Watson, W. H.**, 1995: *Terpenoids and flavonoids from the aerial parts of Salvia candidissima*. *Phytochemistry*, 40, 501-504.
- [11] **Lu, Y. Foo, L. Y.**, 2002: *Polyphenolics of Salvia– a review*. *Phytochemistry*, 59, 117–140.
- [12] **Topcu, G., Ulubelen, A.**, 2007: *Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques*. *Journal of Molecular Structure*, 834–836, 57–73.
- [13] **Ulubelen, A., Topcu, G., & Tan, N.**, 1992: *Diterpenoids from Salvia candidissima*. *Tetrahedron Letters*, 33, 7241–7244.
- [14] **Topcu, G.**, 2006: *Bioactive Triterpenoids from Salvia Species*. *Journal of Natural Products*, 69, 482–487.



- [15] Kahraman A., Celep F., Dogan M., 2010: Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae). South African Journal of Botany, 76, 187–195.
- [16] **British Herbal Pharmacopoeia, The** 1983: B.H.M.A.: ISBN 0–903032–07–4.
- [17] Evans, W.C., 1989: *Trease and Evans, Pharmacognosy*. 13th edition. Balliere Tindall ISBN 0–7020–1357–9.
- [18] İlçim, A., Celep, F. & Doğan, M. 2009: *Salvia marashica* ( Lamiaceae ), a new species from Turkey. \_Ann. Bot. Fennici 46: 75-79
- [19] Davis, P. H. (Ed.) 1965: *Flora of Turkey and the East Aegean Islands* 1. — Edinburgh Univ. Press, Edinburgh.
- [20] Dönmez, A. 2001: A new Turkish species of *Salvia* L. (Lamiaceae).— *Bot. J. Linn. Soc* 137: 413– 416.
- [21] [www.obanet.com](http://www.obanet.com) *Salvia marashica* resimleri.
- [22] Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi\_Prof.Dr.Turhan Baytop\_(s142)
- [23] Stuart, M., 1986: The Encyclopaedia of Herbs and Herbalism. Orbis ISBN 0-85613-700-6. Talalaj, S. & Czechowicz, A.S. (1989).
- [24] Fluck, Hans., 1988: *Medicinal Plants*. W. Foulsham & Co. Ltd. ISBN 0–572–00996–8.
- [25] Grieve, M., 1984: *A Modern Herbal*. Savvas Publishing. ISBN unknown.
- [26] Back, P., 1987: *The Illustrated Herbal*. Hamlyn Publishers through Octopus Books printed in Hong Kong by Mandarin. ISBN No. 0 600 553 361.
- [27] Trattler, R., 1985: *Better Health through Natural Healing*. Thorsons Publishers. ISBN 0–7225–1382–8.
- [28] Valnet, J., 1986: *The Practice of Aromatherapy*. C.W. Daniel Co. Ltd. ISBN 0–85207–143–4.
- [29] Council of Scientific. Industrial Research, India, 1948–76: *The Wealth of India: Raw Material.*, 11 Vols. Vol. 9. (Rh-So), New Deli: CSIR.
- [30] Lust, L., 1986: *The Herb Book*. 16th. impression, Bantam Publishing. ISBN 0–553–17273–5.
- [31] Onlooker., 1995: Sage against age. *The Pharmaceutical Journal*, 255, p.708.
- [32] Geisman, T. A., and Crout, D. H. G., 1969: Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. California: Freeman, *Cooper and Company*, 4, 66, 67, 137-166, 212, 213, 217.
- [33] Topçu, G., Ulubelen, A., Tam, T.C.-M. and Tao-Che, C, 1996: Norditerpenes and Norsesterterpenes from *Salvia yosgadensis*. *J. Nat. Prod.* 59, 113–116.
- [34] Boiteau, P., Pasich, B., Ratsimamanga, R. Les., 1969: Triterpenoides. *Gauthier-Villars Paris*, p 3-5.
- [35] Manitto, P., 1981: Biosynthesis of Natural Products, Ellis Harwood Ltd., Connecticut, p 255-262.
- [36] Ulubelen, A., Topçu, G., Chen, S., Ca., P. and Snyder, J. K. 1991: A new abietane diterpene from *Salvia wiedemannii* Boiss. *J. Org. Chem.* 56, 7354–7356.
- [37] Topçu, G. and Ulubelen, A. 1996: Abietane and rearranged abietane diterpenes from *Salviamontbretii*. *J. Nat. Prod.* 59, 734–737.
- [38] Rustaiyan, A. and Koussari, S. 1988: Further sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*, 27,1767–1769.
- [39] Rustaiyan, A., Niknejad, A., Nazarians, L., Jakupovic, J. and Bohlman, F., 1982: Sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*, 21,1812-1813.

- [40] Pedresos, S., Rodriguez, B., de la Torre, M.C., Bruno, M., Savona, G., Perales, A. and Torres, M. 1990: Dammarane triterpenes of *Salvia hierosolymitana*. *Phytochemistry*, 29, 919–922.
- [41] Oguz, A., 2008: Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tokat, 2008.
- [42] Acar, J., 1998: Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Gıda Kimyası, Ed: Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 435-452.
- [43] Çam, M. ve Hıslı, Y., 2003: Gıdalardaki Flavonoidler ve Önemi. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara.
- [44] Brent, J.A., Rumack, H.H., 1991: Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Biochemistry, *Clinical Toxicology*, 31, 139-171.
- [45] Cadenas, E., and Davies, K. J. A., 2000: Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, And Aging, *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 222–230.
- [46] Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2003: Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, *Food Chemistry*, 83, 371-382.
- [47] Çakar, B., 2010: *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu, Antioksidan ve Antikolinestrez Aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [48] Halliwell, B., 1999: Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutrition Reviews*, 57, 104-113.
- [49] Halliwell, B., 1994: Free radicals and Antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, 57, 253-265.
- [50] Simic, M.G., 1998: Mechanisms of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* 202, 377-386.
- [51] Shahidi, K., Wanasundara, P.K.J.P.D., 1992: Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 32, 67-103.
- [52] Krinsky, N. I., 1989: Antioxidant function of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, 7, 617–635.
- [53] Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989: Free Radicals in Biology and Medicine, *Clarendon Press*, 543, Oxford.
- [54] Cosquni, M., Torsoni, M.A., Stoppa, G.R., Ogo, S.H., 2003: T-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids. *Biomed. Pharmacoter*, 57, 124-129
- [55] Ulubelen, A., Topcu, G., Sönmez, U., Choudhary, M. I., & Atta-ur-Rahman, 1995: Abietane diterpenes from *Salvia napifolia*. *Phytochemistry*, 40, 861.
- [56] Reische, D. W., Lillard, D. A., Eitenmiller, R. R., Akoh, C. C., Min, D. B., 2002: *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, New York: Marcel Dekker Inc 2002. pp.489-516.
- [57] Karaman, Y., 2002: Alzheimer Hastalığı ve Diğer Demanslar, 90-210, Kayseri.
- [58] Akalın, H., Ü., 2003: Alzheimer Hastalarının Lenfositlerinde rRNA İfadeleşmesinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi. Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- [59] Yamantürk, P., 2000: Alzheimer Hastalığı, *Sendrom*, 12, 72-81.

- [60] **John, B., Standridge, M.,D.**, 2004: Pharmacotherapeutic Approches to the Treatment of Alzheimer's Disease. *Clinical Therapeutics*, 26, 5.
- [61] **Zheng, WH, Bastianetto S, Mennicken F, et al.**, 2002: Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures. *Neuroscience*.115, 201–211.
- [62] **Mann, D. M.**, 1989: The pathogenesis and progression of the pathological changes of Alzheimer's disease, *Ann Med*, 21, 133–136.
- [63] **Mohs RC, Doody RS, Morris JC, et al, for the "312" Study Group.** , 2001: A 1-year, placebo-controlled preservation of function survival study of donepezil in AD patients [published correction appears in *Neurology*. 2001;57:1942]. *Neurology*.57, 481–488.
- [64] **Raskind MA, Peskind ER, Truyen L, et al.**, 2004: The cognitive benefits of galantamine are sustained for at least 36 months: A long-term extension trial. *Arch Neurol.*,61, 252–256.
- [65] **Demans Dergisi** 2002: 2: 69-73 Appleyard ME, 1992 Trends Neurosci, 15: 485-490.
- [66] **Hartman, R. E.**, 2010: Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology. *Taylor & Francis Group, LLC*, chapter 16.
- [67] **Rees, T, Hammond, P.I, Soreq, H., et al.**, 2003: Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol Aging*.24, 777–787.
- [68] **Hu, W., Gray, N.,W., Brimijoin, S.**, 2003: Amyloid-beta increases acetylcholinesterase expression in neuroblastoma cells by reducing enzyme degradation. *J Neuroche.*,86, 470–478.
- [69] **Simon, L.**, 2001: Alzheimer Hastlağında Erken Tanı ve Tedavi. *Novartis*, İstanbul,1-74.
- [70] **Daniel, S. A. et al.** 2002: Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to  $\beta$ -amyloid peptides, cognition, and treatment strategie, *Neurobiology*, 68, 209–245.
- [71] **Lanari, A., et al.** 2006: Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, 127, 158–165.
- [72] **Piazzzi, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M., Mancini, F., Recanatini, M., Andrisano, V. and Rampa, A.**, 2008: Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*,8, 423–426.
- [73] **Orhan, İ., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yılmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., Şener, B., Choudhary, M. I.**, 2007: Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*,103, 1247–1254.
- [74] **Sanchez, M. C., Larrauri, J. A., Saura, C. F. A.**, 1998: Procedure to Measure The Antiradical Efficiency of Polyphenols. *Journal of The Science of Food and Agriculture*, 76: 270-276.
- [75] **Reische, D. W., Lillard, D. A. ve Eitenmiller, R. R.** 2002: Antioxidants. İçinde C. C. Akoh, D. B. Min, (Eds.). *Food Lipids, Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker Inc, 489-516.
- [76] **Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., Linssen, P. H.**, 1998: Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures From Some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *J Sci Food Agric*, 77: 140-146.
- [77] **Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C.**, 2003: Antioxidant Activity and Total Phenolics of Edible Mushroom Extracts. *Food Chem*, 81: 249–255.

- [78] Slinkard, K., & Singleton, V. L. 1977: Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- [79] Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A., 2000: Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. of Ethnopharmacology*, 71, 109-114.
- [80] Re, R., Pellegrini, N., Protegente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. 1999: "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free Radical Bio Med*, 26(9-10), 1231-1237.
- [81] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. 2004: "Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 7970–7981.
- [82] Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. 1961: A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemistry and Pharmacology*, 7, 88–95.
- [83] A. Ulubelen and G. Topcu 1992: Abietane diterpenoids from *Salvia pomifera*

## 8. ÖZGEÇMİŞ

- Ad Soyad** : Sibel KIRAN AYDIN
- İletişim Bilgileri**
- Adres** : Aren Eczanesi Kiremithane Mah. 4408 Sokak No:2/1 Akdeniz /MERSİN
- Telefon** : 0 (531) 793 95 19 – 0 (324) 237 70 55
- e-Mail** : ecz.sibelkiran@ hotmail.com
- Doğum Yeri ve Tarihi** : Mardin -1984
- Ünvanı** : Eczacı
- Öğrenim Durumu** : Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2003-2007)