



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***FERULAGO BLANCHEANA* BİTKİSİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN  
İZOLASYONU, ANTIOKSİDAN VE ANTIKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Esin Aslan  
Farmakognozi Anabilim Dalı

DANIŞMAN  
Prof. Dr. GÜLAÇTI TOPÇU

İSTANBUL – 2016



REPUBLIC OF TURKEY  
BEZMIALEM VAKIF UNIVERSITY  
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

**ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES FROM *FERULAGO BLANCHEANA*  
WITH ANTIOXIDANT AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES**

MASTER THESIS

Pharm. Esin Aslan  
Department of Pharmacognosy

SUPERVISOR  
Prof. Dr. GÜLAÇTI TOPÇU

ISTANBUL-2016

TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***FERULAGO BLANCHEANA* BİTKİSİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN  
İZOLASYONU, ANTiOKSİDAN VE ANTiKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN  
İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz. Esin Aslan  
Farmakognozi Anabilim Dalı

DANIŞMAN  
Prof. Dr. GÜLAÇTI TOPÇU

İstanbul, Haziran 2016

Bu araştırma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Birimi Tarafından  
Desteklenmiştir.

Proje No: 9.2014/17

## Tez Onay Formu

Kurum : Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Program Seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ( )

Anabilim Dalı : Farmakognozi

Tez Sahibi : Ecz. Esin Aslan

Tez Başlığı : *FERULAGO BLANCHEANA* BİTKİSİNDEKİ SEKONDER  
METABOLİTLERİN İZOLASYONU, ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ  
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

İmza

Jüri Başkanı : ..... ..

Üye : ..... ..

Üye : ..... ..

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.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

**Thesis Approval Form**

Institute : Bezmialem Vakif University, Institute of Health Sciences

Level of Programme: Master (x) Doctorate ( )

Department : Pharmacognosy

Student : Esin Aslan

Title of the Thesis: ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES FROM *FERULAGO  
BLANCHEANA* WITH ANTIOXIDANT AND ANTICHOLINESTERASE  
ACTIVITIES

**Signature**

**President of Jury :** .....

**Member :** ..... .....

**Member :** ..... .....

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

Director of Institute of Health Sciences

## Beyan Formu

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.

İmza :

İsim ve Soyisim : Ecz. Esin Aslan

Tarih:



*Canim Aileme,*

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince hem eczacılık mesleğine hem de hayata yaklaşımıyla bizlere örnek olan, bilgisini ve engin deneyimlerini her zaman cömertçe bizlerle paylaşan saygıdeğer hocam Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı teşekkürlerimi sunarım. Doğal ürünler kimyası alanındaki tutkulu öğrenme ve öğretme aşkını bana da aşılayarak akademik alanda devam etme kararımı almama neden oldunuz, varlığınız ve desteğiniz için teşekkür ederim.

Eğitimim boyunca laboratuvar çalışmalarında bana yardımcı olan, zamanını ve ilgisini benden esirgemeyen, dostluklarını yoğun bir şekilde yanımda hissettiğim başta Arş. Gör. Demet Dinçel olmak üzere Arş. Gör. Tuba Kuşman ve Arş. Gör. Burcu Çulhaoğlu'na tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Tez çalışmam sırasında öğretici ve yardımcı fikirleri ile bana destek olan Yrd. Doç. Dr. Fatemeh Bahadori, Yrd. Doç. Dr. Ece Sevgi, Öğr. Gör. Dr. Çağla Kızıllarlan Hançer'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimde çalıştığım *Ferulago blanchiana* bitkisinin toplanmasını ve teşhisini sağlayan Çukurova Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'nda görevli Öğr. Gör. Dr. Serpil Demirci'ye, izole edilen tüm bileşiklerin NMR ve kütle spektral analizlerini yapan Muhiddin Çergel'e teşekkür ederim.

Dostluklarıyla her zaman beni destekleyip yanımda olan sevgili eczane çalışanlarım Deniz Zambakçı ve Fatih Tuncer'e teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca beni yalnız bırakmayan güçlerini hep arkamda hissettiğim canım aileme, onların zamanından alıp çalışmalarına verdiğim halde beni anlayıp bana destek olan güzel oğullarım Ali Karahan ve Alphan Yaman'a teşekkür ediyorum.

Beni doğal ürünler kimyası yüksek lisansına özellikle ve ısrarla yönlendirip destekleyen eşime ayrıca teşekkür ederim.

Haziran 2016

Ec. Esin Aslan



# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	v
ÇİZELGELER.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ .....	x
SEMBOLLER.....	xii
RESİMLER LİSTESİ .....	xiii
ÖZET .....	xiv
SUMMARY .....	xv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1 Tezin Amacı .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER .....</b>	<b>4</b>
2.1 Botanik Bilgiler .....	4
2.1.1 Türün Sistematikteki Yeri .....	4
2.1.2 Apiaceae (Umbelliferae) Familyası.....	4
2.1.3 <i>Ferulago</i> W. Koch Cinsinin Genel Özellikleri.....	8
2.1.4 <i>Ferulago blancheana</i> Post.....	10
2.2 <i>Ferulago</i> Türlerinin Halk Arasındaki Kullanılışı.....	11
2.3 <i>Ferulago</i> Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar .....	11
2.4 Sekonder Metabolitler .....	16
2.4.1 Steroitler .....	18
2.4.2 Terpenler.....	19
2.4.2.1 Triterpenoitler (C30) .....	21
2.4.3 Kumarinler.....	21
2.4.3.1 Benzen halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler.....	24
2.4.3.2 Piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler .....	25
2.4.3.3 Hem benzen, hem de piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler...26	
2.4.3.4 Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler.....	26

2.4.3.5 Piron halkası ile halkalı yapıların kondenzasyonu sonucu meydana gelen kumarinler.....	28
2.4.3.6 Dimer kumarinler .....	28
2.4.4 Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler .....	28
2.4.4.1 Fenoller ve fenolik asitler .....	29
2.4.4.2 Fenilpropanoidler .....	29
2.4.4.3 Flavonoidler.....	30
2.5 Antioksidanlar .....	32
2.5.1 Antioksidanların Sınıflandırılması .....	34
2.5.2 Antioksidanların Etki Mekanizmaları .....	36
2.5.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri .....	36
2.5.3.1 Elektron transferine dayanan yöntemler.....	37
2.5.3.2 Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler .....	37
2.6 Alzheimer Hastalığı ve Nedenleri .....	38
2.6.1 AChE ve BChE.....	40
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>41</b>
3.1 Bitkisel Materyal .....	41
3.2 Ekstrelerin Hazırlanışı .....	41
3.3 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler.....	43
3.3.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler .....	43
3.3.2 Çözeltilerin Hazırlanması .....	44
3.3.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler .....	44
3.3.2.2 Toplam flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler .....	44
3.3.2.3 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler.....	44
3.3.2.4 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler.....	44
3.3.2.5 Standart çözeltilerin hazırlanması .....	45
3.3.2.6 İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi .....	46
3.4 Cihazlar ve Gereçler .....	46
3.5 Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçerik Miktar Tayinleri .....	47
3.5.1 Toplam Fenolik Miktar Tayini .....	47
3.5.2 Toplam Flavonoid Miktar Tayini .....	48
3.6 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri .....	48
3.6.1 DPPH Serbest Radikalı Giderim Aktivitesi Yöntemi .....	48
3.6.2 $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (lipid peroksidasyon inhibisyonu aktivitesi).....	49
3.7 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemleri .....	50
3.7.1 Ellman Yöntemi.....	50
3.8 İstatistiksel Hesaplamalar .....	50
3.9 Kromatografik Yöntemler .....	50
3.9.1 Kolon Kromatografisi.....	51
3.9.2 İnce Tabaka Kromatografisi .....	52
3.10 Spektroskopik Yöntemler .....	52
3.10.1 NMR Spektroskopisi .....	52
<b>4. DENEYSEL BÖLÜM .....</b>	<b>53</b>
4.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi .....	53

4.1.1 Toplam Fenolik Miktar Tayini .....	53
4.1.2 Toplam Flavonoit Miktar Tayini .....	53
4.2 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri .....	54
4.2.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi .....	54
4.2.2 Lipid Peroksidasyon İnhibisyonu Aktivitesinin Belirlenmesi.....	55
4.3 Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi .....	56
4.3.1 AChE Aktivite Testi .....	56
4.3.2 AChE % İnhibisyon Testi.....	57
4.3.3 BChE Aktivite Testi .....	57
4.3.4 BChE % İnhibisyon Testi .....	58
4.4 <i>Ferulago blanchiana</i> Bitkisinin İzolasyon ve Saflaştırma Çalışmaları .....	58
4.4.1 <i>Ferulago blanchiana</i> Bitkisinin Diklorometan Ekstresinin Fraksiyonlandırılması....	58
4.4.2 <i>Ferulago blanchiana</i> Bitkisinin Etil Asetat/Metanol Ekstresinin Fraksiyonlandırılması .....	59
<b>5. BULGULAR .....</b>	<b>60</b>
5.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Sonuçları .....	60
5.2 Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları .....	60
5.2.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları .....	60
5.2.2 Lipid Peroksidasyon İnhibisyon ( $\beta$ -Karoten renk açılım) Testi Sonuçları.....	62
5.2.3 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları .....	62
5.3 Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri.....	64
5.3.1 Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri.....	65
5.3.1.1 FBD 20-4-1-1 = Bergapten = 5-Metoksipsoralen .....	65
5.3.1.2 FBD 47-2-3 = 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate .....	66
5.3.1.3 FBD 47-1-2-3 (=FBD 47-2-4= FBM 12-13-14-3)= Heraclenol.....	68
5.3.1.4 FBD-20-4-2= Imperatorin .....	70
5.3.1.5 FBM-12-13-14-3 = Byakangelicin .....	71
5.3.1.6 FBD-23-24-5-1= Isoscapoletin .....	73
5.3.1.7 FBD -21-DCM-1 = Stigmasterol.....	74
5.3.1.8 FBD -22-1-4-1 = $\beta$ -Sitosterol .....	75
5.4 İzole Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları .....	76
5.4.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları .....	76
5.4.2 $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit (Lipid Peroksidasyon % İnhibisyon) Toplam Antioksidan Aktivitesi Sonuçları .....	77
5.4.3 Antikolinesteraz Aktivitesi Sonuçları.....	79
<b>6. SONUÇ ve TARTIŞMA.....</b>	<b>81</b>
<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>83</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>89</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>114</b>

## KISALTMALAR

<b>ACh</b>	: Asetilkolin
<b>AChE</b>	: Asetilkolinesteraz enzimi
<b>AcI</b>	: Asetilkolin iyodür
<b>A·</b>	: Antioksidan radikali
<b>AA·</b>	: Antioksidan dimer radikali
<b>AH</b>	: Birincil antioksidanlar
<b>Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O</b>	: Alüminyum nitrat nona hidrat
<b>APP</b>	: Amiloid beta prekürsör proteini
<b>α-Toc</b>	: α-Tokoferol
<b>ATCC</b>	: Amerika hücre kültürü koleksiyonu
<b>BCh</b>	: Butirilkolin
<b>BChE</b>	: Butirilkolinesteraz enzimi
<b>BHA</b>	: Bütillenmiş hidroksi anisol
<b>BHT</b>	: Bütillenmiş hidroksi toluen
<b>BuI</b>	: Butirilkolin iyodür
<b>CUPRAC</b>	: Cupric reducing antioxidant capacity
<b>CuSO<sub>4</sub></b>	: Bakır (II) sülfat
<b>COSY</b>	: Correlation Spectroscopy
<b>DCFH-DA</b>	: Diklorofloresin-diasetat
<b>DCM</b>	: Diklorometan
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>DPPH</b>	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
<b>DTNB</b>	: 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>FCR</b>	: Folin-Ciocalteu reaktifi
<b>FRAP</b>	: Ferric reducing antioxidant power
<b><i>F. amani</i></b>	: <i>Ferulago amani</i>
<b><i>F. angulata</i></b>	: <i>Ferulago angulata</i>
<b><i>F. antiochia</i></b>	: <i>Ferulago antiochia</i>

*F. asparagifolia* : *Ferulago asparagifolia*  
*F. aucheri* : *Ferulago aucheri*  
*F. autumnalis* : *Ferulago autumnalis*  
*F. bernardii* : *Ferulago bernardii*  
*F. blancheana* : *Ferulago blancheana*  
*F. bracteata* : *Ferulago bracteata*  
*F. cassia* : *Ferulago cassia*  
*F. confusa* : *Ferulago confusa*  
*F. glaerosa* : *Ferulago glaerosa*  
*F. humilis* : *Ferulago humilis*  
*F. idaea* : *Ferulago idaea*  
*F. isaurica* : *Ferulago isaurica*  
*F. kurdica* : *Ferulago kurdica*  
*F. latiloba* : *Ferulago latiloba*  
*F. longistylis* : *Ferulago longistylis*  
*F. macrocarpa* : *Ferulago macrocarpa*  
*F. macrosciadia* : *Ferulago macrosciadia*  
*F. mughlae* : *Ferulago mughlae*  
*F. pachyloba* : *Ferulago pachyloba*  
*F. pauciradiata* : *Ferulago pauciradiata*  
*F. platycarpa* : *Ferulago platycarpa*  
*F. sandrasica* : *Ferulago sandrasica*  
*F. setifolia* : *Ferulago setifolia*  
*F. silaifolia* : *Ferulago silaifolia*  
*F. stellata* : *Ferulago stellata*

<i>F. sylvatica</i>	: <i>Ferulago sylvatica</i>
<i>F. syriaca</i>	: <i>Ferulago syriaca</i>
<i>F. thirkeana</i>	: <i>Ferulago thirkeana</i>
<i>F. thyrsoflora</i>	: <i>Ferulago thyrsoflora</i>
<i>F. trachycarpa</i>	: <i>Ferulago trachycarpa</i>
<i>F. trojana</i>	: <i>Ferulago trojana</i>
<b>GC-MS</b>	: Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi
<b>GSH-Px</b>	: Glutasyon peroksidaz
<b>HMBC</b>	: Heteronuclear Multiple Bond Coherence
<b>HMQC</b>	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
<b>HNO<sub>2</sub></b>	: Nitroz asit
<b>H<sub>2</sub>O</b>	: Su
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	: Hidrojen peroksit
<b>HOO·</b>	: Peroksi radikali
<b>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup></b>	: Dihidrojen fosfat anyonu
<b>HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup></b>	: Hidrojen fosfat anyonu
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Sülfürik asit
<b>IC<sub>50</sub></b>	: %50 İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>IR</b>	: Infrared
<b>mRNA</b>	: Mesajcı Ribonükleik Asit
<b>MeOH</b>	: Metanol
<b>MIC</b>	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	: Sodyum karbonat
<b>NaHCO<sub>3</sub></b>	: Sodyum bikarbonat
<b>NMDA</b>	: N-Metil-D-aspartat
<b>NMR</b>	: Nükleer magnetik rezonans
<b>NO</b>	: Azot monoksit
<b>NO·</b>	: Azot monoksit radikali
<b>NO<sup>+</sup></b>	: Nitrozil katyonu
<b>NO<sup>-</sup></b>	: Nitroksi anyonu
<b>ORAC</b>	: Oksijen radikali absorban kapasitesi

<b>O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	: Süper oksit anyon radikali
<b><sup>1</sup>O<sub>2</sub></b>	: Singlet oksijen
<b>O<sub>3</sub></b>	: Ozon
<b>OH<sup>·</sup></b>	: Hidroksil radikali
<b>PEs</b>	: Pirokatekole eşdeğer
<b>PG</b>	: Propil gallat
<b>pH</b>	: Hidrojen gücü
<b>PUVA</b>	: Psoralen Ultra-Violet A
<b>Q</b>	: Kersetin
<b>QEs</b>	: Kersetine eşdeğer
<b>R<sup>·</sup></b>	: Alkil radikali
<b>Rf</b>	: Analitin ilerleme yüksekliği / Çözücünün ilerleme yüksekliği
<b>RO<sup>·</sup></b>	: Alkoksi radikali
<b>ROO<sup>·</sup></b>	: Peroksi serbest radikali
<b>ROOH</b>	: Hidroperoksit
<b>RS<sup>·</sup></b>	: Tiyol radikali
<b>ROS</b>	: Reaktif oksijen türleri
<b>SOD</b>	: Süperoksit dismutaz
<b>TEAC</b>	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi
<b>TBHQ</b>	: <i>tersiyer</i> -Bütihidrokinon
<b>TOSC</b>	: Toplam oksiradikal yöntemi
<b>TRAP</b>	: Toplam radikal yakalama parametresi
<b>UV</b>	: Ultraviyole

## ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. <i>Ferulago</i> türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları.....	15
Çizelge 2.2. Terpenlerin Sınıflandırılması .....	19
Çizelge 2.3. Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen ve azot türleri .....	33
Çizelge 5.1. Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları .....	60
Çizelge 5.2. Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları.....	61
Çizelge 5.3. Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları.....	62
Çizelge 5.4. Ekstrelerin asetilkolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon).....	62
Çizelge 5.5. Ekstrelerin butirilkinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon).....	63
Çizelge 5.6. Saf bileşikler ve miktarları.....	64
Çizelge 5.7. Bergapten bileşiği <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CDCl <sub>3</sub> , ppm).....	66
Çizelge 5.8. 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate bileşiği <sup>1</sup> H verileri (CDCl <sub>3</sub> , ppm) .....	68
Çizelge 5.9. Heraclenol bileşiği <sup>1</sup> H NMR verileri (CDCl <sub>3</sub> , ppm).....	69
Çizelge 5.10. Imperatorin bileşiği <sup>1</sup> H NMR verileri (CDCl <sub>3</sub> , ppm) .....	70
Çizelge 5.11. Byakangelicin bileşiği <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CDCl <sub>3</sub> ) .....	72
Çizelge 5.12. Isoscopoletin bileşiği <sup>1</sup> H NMR verileri (CDCl <sub>3</sub> ) .....	73
Çizelge 5.13. İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi sonuçları.....	76
Çizelge 5.14. İzole saf maddelerin lipid peroksidasyon aktiviteleri sonuçları.....	77
Çizelge 5.15. İzole saf maddelerin antikolinesteraz aktivitelerinin sonuçları.....	79



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>F. blancheana</i> 'nın Türkiye'deki yayılışı [15].....	11
Şekil 2.2. Sekonder Metabolitlerin Oluşumu .....	17
Şekil 2.3. Bir steroidin iskelet yapısı.....	18
Şekil 2.4. Bazı sterol yapıları .....	18
Şekil 2.5. Terpenlerin İzopren Molekülünden Biyosentezi [46] .....	20
Şekil 2.6. Bazı triterpen yapıları.....	21
Şekil 2.7. $\alpha$ - piron, $\gamma$ -piron ve kumarin bileşikleri. ....	22
Şekil 2.8. Kumarin .....	22
Şekil 2.9. Kromon .....	22
Şekil 2.10. Mono-süstitüe kumarinler .....	24
Şekil 2.11. Di-süstitüe kumarinler.....	25
Şekil 2.12. Tri-süstitüe kumarin.....	25
Şekil 2.13. Piron halkası mono-süstitüe kumarin.....	25
Şekil 2.14. Piron halkası di-süstitüe kumarin.....	26
Şekil 2.15. Benzen ve piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan bazı kumarinler.....	26
Şekil 2.16: Lineer ve angular furanokumarinler .....	26
Şekil 2.17. Ksantiletin .....	27
Şekil 2.18. 6,7-Benzokumarin.....	27
Şekil 2.19. Piron halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile oluşan kumarinler .....	28
Şekil 2.20. Dimer Kumarinler .....	28
Şekil 2.21: Fenoller ve fenolik asitler .....	29
Şekil 2.22. Hidroksisinnamik asitler .....	29
Şekil 2.23. Kumarinler .....	30
Şekil 2.24. Lignanlar ve fenilpropenler.....	30
Şekil 2.25. Flavonoid iskeletleri.....	31
Şekil 2.26. Antioksidanların Sınıflandırılması .....	35
Şekil 3.1. <i>Ferulago blancheana</i> bitkisinin diklorometan ve etil asetat/metanol ekstralarının hazırlanması ve fraksiyonlandırılması.....	42

Şekil 3.2. Standart olan pirokatekol bileşiğinin açık yapısı .....	47
Şekil 3.3. Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kersetinin açık yapısı.....	48
Şekil 4.1. Pirokatekolün ölçü grafiği.....	53
Şekil 4.2. Kersetinin ölçü grafiği.....	54
Şekil 4.3. Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması.....	56
Şekil 5.1. <i>Ferulago blanchearia</i> bitkisinin DCM ve Etil asetat/MeOH ekstralarının DPPH serbest radikal giderim aktivite sonuçları.....	61
Şekil 5.2. <i>Ferulago blanchearia</i> bitkisinin DCM ve Etil asetat/MeOH ekstralarının asetilkolinesteraz aktiviteleri .....	63
Şekil 5.3. <i>Ferulago blanchearia</i> bitkisinin DCM ve Etil asetat/MeOH ekstralarının butirilkolinesteraz aktiviteleri.....	63
Şekil 5.4. Bergapten .....	65
Şekil 5.5. 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate .....	67
Şekil 5.6. Heraclenol .....	68
Şekil 5.7. Imperatorin.....	70
Şekil 5.8. Byakangelicin.....	71
Şekil 5.9. Isoscapoletin .....	73
Şekil 5.10. Stigmasterol bileşiği.....	74
Şekil 5.11. $\beta$ -Sitosterol bileşiği .....	75
Şekil 5.12. İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi .....	77
Şekil 5.13. Saf maddelerin $\beta$ -Karoten renk açılım yöntemi ile lipid peroksidasyon % inhibisyon aktiviteleri .....	78
Şekil 5.14. İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu.....	80
Şekil 5.15. İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu .....	80

## SEMBOLLER

<b>cm</b>	: Santimetre
<b>°C</b>	: Santigrat derece
<b>g</b>	: Gram
<b>L</b>	: Litre
<b>ln</b>	: Doğal logaritma
<b>m</b>	: Metre
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>mg</b>	: Miligram
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>mM</b>	: Milimolar
<b>M</b>	: Molar
<b>nm</b>	: Nanometre
<b>ppm</b>	: Milyonda bir birim

## RESİMLER LİSTESİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Resim 1. <i>Ferulago blancheana</i> Post .....	2
Resim 2. <i>Ferulago blancheana</i> Post .....	2
Resim 3. <i>Ferulago blancheana</i> Post .....	3
Resim 4. <i>Ferulago blancheana</i> Post .....	3



## ÖZET

*Ferulago* türleri, aromatik (kokulu) çiçekli bitkiler familyalarından biri olan Apiaceae (=Umbelliferae) familyasına ait bitkilerdir. *Ferulago* ve yakın türleri "Çakşır", "Çağşır" otu olarak bilinmektedir; halk arasında sinir sistemini yatıştırıcı, gaz söktürücü, kurt düşürücü ve ayrıca kökleri afrodizyak olarak kullanılmaktadır. Üzerinde çalışılan *Ferulago blancheana* Post, endemik bir tür olup Kahramanmaraş Başkonuş'ta yetişmektedir (C6 Karesi). *Ferulago blancheana* bilim dünyasına 1888 yılında Boissier'in "Flora Orientalis Supplementum" adlı eserinde tanıtılmıştır.

Dünyada ve Türkiye'de bugüne kadar *Ferulago* türlerinin daha çok uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine çalışılmıştır. *Ferulago* türlerinin izolasyon ve diğer metabolitleri üzerine yapılan çalışmalar oldukça az olmakla beraber *Ferulago blancheana* sekonder metabolitlerinin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri bakımından ilk defa tarafımızdan çalışılmaktadır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında *Ferulago blancheana* bitkisinden sekiz adet bileşik izole edilmiştir. İlk aşamada *Ferulago blancheana* bitkisinin diklorometan ve etil asetat/metanol ekstraları hazırlandı. Bu ekstraların toplam fenolik miktarları pirokatekole ve toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildikten sonra antioksidan aktiviteleri lipid peroksidasyonu inhibisyonu ve DPPH serbest radikal giderim yöntemleri ile saptanmıştır. *Ferulago blancheana* bitkisinin diklorometan ve etil asetat/metanol ekstralarının ve bu ekstralardan elde edilen saf bileşiklerin antikolinesteraz aktiviteleri in vitro Ellman metodu ile AChE ve BChE enzimlerine karşı belirlendi. Ekstrelerin başlıca sekonder metabolitleri kumarinler ve steroid yapıdaki bileşikler izole edilip saflaştırıldı; bu bileşiklerin yapıları çeşitli spektroskopik (NMR, UV) yöntemlerle belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Ferulago blancheana*; furanokumarin; antioksidan aktivite; antikolinesteraz aktivite; heraclenol; imperatorin

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 9.2014/17

## SUMMARY

The *Ferulago* is an aromatic (fragrant) plant, which is a member of one of the flowering plant families, the Apiaceae (=Umbelliferae). The *Ferulago* and its similar species is known as the “giant fennel” (Çakşır, Çağşır); it is used by people traditionally to soothe the nervous system, relieve gas, get rid of worms, and its roots are separately used as an aphrodisiac. The *Ferulago blancheana* Post which is currently being worked on, is an endemic species that grows in Kahramanmaraş Başkonuş (Square C6). The *Ferulago blancheana* was first introduced to the scientific world in Boisser’s work “Flora Orientalis Supplementum” which was published in 1888.

Until today, in Turkey and the world, the *Ferulago* species have mostly been worked for their volatile oils and some activities, in general. The *Ferulago* species, as well as having very little work done in terms of its isolation and other metabolites, the *Ferulago blancheana* is being worked on for the first time in terms of its volatile oil, isolation, and the use of secondary metabolites.

In this thesis study, eight compounds have been isolated from *Ferulago blancheana* plant. In the first stage, the *Ferulago blancheana* plant’s dichloromethane and ethyl acetate /methanol extracts were prepared. After the total phenolics amount and the total flavanoids amount were accounted to as equal to quercetin, and antioxidant activities were detected by inhibition of lipid peroxidation and DPPH free radical scavenging methods. Dichloromethane and ethyl acetate/methanol extracts of *Ferulago blancheana* and the anticholinesterase activities of the pure compounds isolated were identified using the Ellman method against the AChE and BChE enzymes. As the main secondary metabolites of the extracts coumarins, and five furanocoumarin, and two steroids structure isolated and purified; their structures were identified using spectroscopic (NMR, UV) methods.

Keywords: *Ferulago blancheana*; furanocoumarin; antioxidant activity; anticholinesterase activity; heraclenol; imperatorin

This research was supported by the Scientific Research Unit of Bezmialem Vakıf University.  
Project No: 9.2014/17

# 1. GİRİŞ

## 1.1 Tezin Amacı

Tıbbi bitkiler insanlığın varoluşundan bu yana halk arasında çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılan materyallerdir, aktiviteleri sayesinde tedavi amaçlı kullanılan bitkiler arasında *Ferulago* türleri de yer almaktadır. *Ferulago* bitkileri tür farkı gözetilmeksizin halk arasında “çakşır otu” olarak bilinir ve kökleri afrodisyak olarak kullanılır. Aromatik kokulu bitkileri kapsayan bir çiçekli bitkiler familyası olan Apiaceae (Umbelliferae) familyasında yer alan *Ferulago* W. Koch. cinsi dünyada 49 tür ile temsil edilir. Bunlardan 34’ü ülkemizde de yetişmektedir. 19 tür ise sadece ülkemizde yayılış göstermektedir, yani endemiktir. *Ferulago* türlerinin kimyasal yapısı gerek yurt dışı gerekse yurt içindeki bazı çalışma grupları tarafından incelenmektedir. Üzerinde çalışılan *Ferulago blanchiana* bitkisi Türkiye’ye endemik bir türdür. *Ferulago* türlerinin sekonder metabolitleri başlıca kumarinler olmak üzere fenolik bileşikler ve diğer sekonder metabolitlerdir.

Bu tez çalışmasında daha önce kimyasal olarak çalışılmamış endemik bir tür olan *Ferulago blanchiana* bitkisi Kahramanmaraş Başkonuş’tan toplanarak topraküstü kısımlarından diklorometan ve etil asetat /metanol ekstraktları hazırlanmış, içerdikleri sekonder metabolitler; bergapten, 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate, heraclenol, imperatorin, byakangelicin, isosopoletin, stigmasterol ve  $\beta$ -Sitosterol çeşitli kromatografik yöntemlerle (prep. TLC, kolon kromatografisi) izole edildikten sonra saflaştırılmıştır. Saf bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle (NMR, UV) aydınlatılarak, bu bitkilerin gerek ekstraktları, gerekse saf bileşikleri antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri için *in vitro* incelenmiştir.

Oksidasyonun, kanser ve bağışıklık sisteminin zayıflaması ve hatta yaşlanma ile ilgili pek çok hastalık (Alzheimer vb. hafıza kaybı ve bunama ile birlikte seyreden) da önemli bir rol oynadığı bilinen bir gerçektir. Tez çalışmamda bir BAP projesi çerçevesinde araştırdığımız *Ferulago* türünün antioksidan ve antikolinesteraz etkili bileşiklerinin izolasyonu ve yapı tayini çerçevesinde antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteden sorumlu bileşiklerini elde etmeyi hedefledik. Elde edilen ekstrakt ve saf bileşiklerin incelenerek ilaç olma potansiyellerinin araştırılması amaçlanmış ve çalışmalar bu yönde gerçekleştirilmiştir.



foto: Bařar Kayıran

**Resim 1.** *Ferulago blancheana* Post



foto: Bařar Kayıran

**Resim 2.** *Ferulago blancheana* Post





foto: Bařar Kayıran

**Resim 3.** *Ferulago blancheana* Post



foto: Bařar Kayıran

**Resim 4.** *Ferulago blancheana* Post

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Botanik Bilgiler

#### 2.1.1 Türün Sistematikteki Yeri

Bölüm	: Spermatophyta
Alt bölüm	: Angiospermae
Sınıf	: Dicotyledone
Takım	: Apiales (Umbelliflorae)
Familya	: Apiaceae (Umbelliferae)
Cins	: <i>Ferulago</i> W. Koch
Tür	: <i>Ferulago blanchiana</i> Post

#### 2.1.2 Apiaceae (Umbelliferae) Familyası

Apiaceae familyası karakteristik özellikleriyle kolaylıkla ayırtedilebilen 455 cins ve 3600-3751 arasında değişen türe sahip geniş bir familyadır [1]. Ilıman yüksek kesimlerde yaygın olması ve tropikal enlemlerde nadiren bulunmasına rağmen familya üyelerine dünyanın çoğu yerinde rastlanılmaktadır, üç alt familyaya ayrılmıştır; Apioideae her iki yarıkürede de bulunan en büyük alt familyadır, fakat Kuzey Yarıküre’de daha fazladır. Hydrocotyloideae ise çoğunlukla Güney Yarıküre’de bulunmaktadır. Saniculoidae her iki yarıkürede de bulunur, Güney Yarıküre’de daha fazladır [2].

Apiaceae familyası Türkiye’de 100 cinsle temsil edilen üçüncü büyük familyadır, tür sayısı açısından ise 478 türle sekizinci sırada yer alır. Bu türlerin yaklaşık %30’u endemiktir [3].

Bir, iki veya çok yıllık otsu nadiren yarı çalimsı veya çalimsı bitkilerdir, ayrıca dikenli türler de bulunmaktadır. Internodyumların içi boştur, stolonludurlar, bazen tırmanıcıdırlar. Yapraklar tabanda rozet şeklinde toplanmıştır, alternan ve genellikle parçalıdır (ternat veya çok parçalı pinnat) ve stipula yoktur. Bazı cinslerde tam olan yapraklar bulunur, paralel damarlanma göstermeleri nedeniyle monokotilleri andıranlar da vardır. Petioller genellikle geniştir ve tabanda okrea mevcuttur. Çiçek durumu genellikle birleşik umbella nadiren basit umbella (şemsiye) görünümündedir. Çiçekler epigin, tek eşeyli veya hermofrodittir. Sepaller küçük veya eksik, petaller tepede geriye kıvrık beş adettir. 5 adet stamen, ovaryum 2 bazen

tek karpelli her gözde birer ovüllü ve 2 stilus taşıyan genellikle renkli nektar taşıyan bir bölüm bulunur. Meyveleri kuru, olgunlukta iki merikarpa sahip, her merikarp genellikle 5 birincil çıkıntı (kosta), bazen bunların arasında da 4 tane ikincil kosta bulunur. Çıkıntılarının arasında, çıkıntılarının kendisinde ya da tüm meyvede reçine veya salgı kanalları bulunur. Polenleri böcekler yoluyla yayılır; umbellalarda dıştaki çiçekler bazen şekil ve büyüklük yönünden farklı olabilirler, bu nedenle polenlemeyi sağlayan böcekler için çekici olurlar [4].

Apiaceae familyası bitkilerinin ayırt edici taksonomik özellikleri şunlardır:

- Umbellaların sayısı ve uzunluğu
- Çiçek rengi
- Gövdenin alt kısmında kalan fibrilli kalıntılar
- Meyve şekli, üzerindeki girinti (valekulum) ve çıkıntılar (kosta) ve salgı kanalları
- Brakte ve brakteollerin şekli ve bulunup bulunmadıkları
- Yaprak boyutları, yaprakların parçalanış şekilleri, yaprak tabanında bulunan okrea

Apiaceae familyası bitkileri taşıdıkları reçine, zambak, uçucu yağ ve müsilaj karışımları nedeniyle genellikle kendilerine has bir kokuya sahiptirler. Bu karışımlar bitkinin özellikle petiol, yaprak, meyve, gövde ve köklerinde bulunan salgı kanallarında yer almaktadır [5]. Bu familyaya ait türler dünyanın çeşitli bölgelerinde, sitoloji ve bitki kimyası alanlarında yoğun bir şekilde çalışılmaktadır. Bu familya, sekonder metabolitler bakımından oldukça zengindir. Familyanın birçok cinsinden, kumarin, flavonoid, asetilenik bileşikler, seskiterpen laktonlar ve uçucu yağlar elde edilmekte ve bu bileşiklerden tıbbi ve ekonomik açıdan geniş ölçüde yararlanılmaktadır [6,7]. Dünyada bugüne kadar yapılmış araştırmalar sonucunda, Apiaceae familyasına ait uçucu yağlarda 760 adet farklı bileşiğin mevcut olduğu bildirilmiştir. Bu bileşikler; monoterenler, seskiterpenler, terpen aldehyt esterleri, fenilpropan türevleri, non-terpenik alifatik bileşikler, asetilenik bileşenler, fitaldehytler ve türevleri, kükürtlü bileşikler, azot içeren bileşikler olarak gruplandırılmıştır [7,8]. Apiaceae familyasında *Aethusa cynapium* L., *Cicuta virosa* L. ve *Conium maculatum* L. gibi zehirli türler bulunurken, *Anethum graveolens* L., *Apium graveolens* Linn., *Ammi visnaga* (L.) Lam., *Daucus carota* L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Carum carvi* L., *Pastinaca sativa* L., *Coriandrum sativum* L., *Petroselinum crispum* (Miller) A. W. Hill. Ve *Pimpinella anisum* L. gibi bazı türleri tıbbi bitki, gıda ve baharat olarak kullanılır. Apiaceae familyası üyeleri dünyada ekonomik öneme sahip bitki gruplarından. Özellikle besin kaynağı ve hayvan yemi şeklinde kullanılırlar.

Park ve bahçelerde süs bitkisi olarak kullanılan türleri mevcuttur. İçerdikleri uçucu yağlar, alkaloidler ve reçineler nedeniyle tıpta ve kozmetikte yaygın kullanım alanlarına sahiptirler.

Apiaceae (Umbelliferae) familyasında yer alan bitki türlerinin başta gastrointestinal sistem olmak üzere koroner, solunum, dolaşım ve ürogenital sistemler üzerinde tedavi edici etkilerinin olduğu bilinmektedir [1,8]. Ayrıca bu etkilerinin yanında antispazmodik, afrodisyak, uyarıcı, sedatif özelliklere sahip oldukları pek çoğunun da yaralar için topikal uygulamalarda; haşlanma, yanma, böcek sokmaları, ısırıklar ve deri döküntülerinde kullanıldıkları bilinmektedir. Bunların yanısıra bu familya bitkilerinin kellik, hıçkırık ve siğillere iyi geldiği, akıl hastaları ve alkol bağımlıları üzerinde etkili olduğu tespit edilmiştir [9].

Tez konusu olan *Ferulago blanchiana*'nın dahil olduğu Apiaceae familyasına ait bazı bitkilerin halk arasında ilaç olarak veya diğer kullanım amaçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

•*Ammi visnaga* (Diş otu); drog koroner ve miyokardiyal sirkülasyon yetmezliğinde pozitif inotrop rol oynar. Düz kaslar üzerinde antispazmodik etkilidir. *Ammi visnaga*'nın ana etkin maddesinden (kellin, kimyasal sentezi yapılmaktadır) hazırlanan tablet ve enjeksiyon formunda preparatlar vazodilatör etkisinden dolayı anjina pectoris ve bronşiyal astımda kullanılmaktadır. Drogdan elde edilen kellin, vitiligo gibi bazı cilt hastalıklarının PUVA tedavisinde oral ve topikal yoldan kullanılır [10]. Meyveleri asırlardır Türkiye'nin de içinde bulunduğu Yakın Doğu ülkelerinde mesane taşlarını düşürmek için kullanılmıştır. Drog idrar arttırıcı, öksürük kesici, gaz söktürücü, taş ve kurt düşürücü etkilerinden dolayı da kullanılmaktadır. Çiçek durumu sapları ise kürdan olarak kullanılır [11].

•*Centella asiatica* (Gotu kola); kurutulmuş toprak üstü kısımları yara, yanık ve çeşitli cilt hastalıklarının tedavisi ile keloid ve hipertrofik yara izlerinin önlenmesinde ve venöz yetmezlikte etkilidir. Kütanoz deri enfeksiyonlarında, lepröz ülser tipi yaralarda ve ameliyat sonrası sikatrizasyon oluşumunda topikal olarak kullanılır *Centella asiatica*'nın triterpen fraksiyonunun venöz yetmezlik üzerine faydalı olduğu belirlenmiştir [10].

•*Daucus carota* ( Havuç); *Fructus Dauci carotae* adı ile bilinen drog, *Daucus carota* subsp. *sativus* türünün olgun meyveleridir. Drog mideyi, gaz söktürücü, idrar arttırıcı, kurt düşürücü, adet getirici, gebeliği önleyici (Diyarbakır bölgesi) ve cinsel gücü arttırıcı olarak

kullanılmaktadır. Ayrıca yabancı bitkilerin genç sürgünleri de sebze olarak yenilmektedir [11]. Havuç yaprakları, yüksek miktarda içerdiği porfirinlerden dolayı gonadotropik hormonu salgılatan hipofiz bezini stimüle etmektedir. Antihelmentik ve antimikrobiyal etkileri de bulunmaktadır. İçerdiği pektinden dolayı konstipasyona neden olmaktadır. Uçucu yağı bakterisidal etkilidir. Pediatriklerde tonsillit, beslenme bozuklukları ve hazımsızlıkta bir gıda ajanı olarak kullanılmaktadır. Geleneksel tıpta idrar kesesi kum ve taşlarına karşı, sistit, idrarda ürik asit ve uratların arttığı durumlarda kullanılmaktadır [10].

•*Foeniculum vulgare* (Rezene); bitkinin meyveleri mideyi, gaz söktürücü ve süt arttırıcı; yaprağı yara iyi edici; kökü ise idrar arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Meyvelerden hazırlanan %2'lik infüzyonu özellikle süt çocuklarında gaz oluşumunu önlemek yönünden etkilidir. Ayrıca bitkinin genç yapraklı gövdeleri gıda olarak tüketilmektedir [11]. Özellikle bebeklerde ve küçük çocuklarda gaz ve kolik tarzındaki gastrointestinal ağrılarda çayı halinde kullanılır. Anetol ve fenkon sekretolitik etkiye sahiptir. Solunum sisteminin soğuk algınlığı, öksürük gibi şikayetlerinde sekretolitik ve ekspektoran etkisi nedeniyle çayı halinde kullanılır. Ayrıca rezene meyvesi karminatif çay karışımları için çok iyi bir tat düzelticidir [10]. Bunun yanında parfümeri, çeşnicilik, likör, sabun ve ekmek sanayiinde kullanımı mevcuttur [9].

•*Pimpinella anisum* (Anason, Mesirotu); Türkiye'de halk arasında gaz söktürücü, iştah açıcı, süt arttırıcı ve uyku verici olarak kullanılmaktadır. Ekspektoran, hafif spazmolitik, karminatif ve antibakteriyeldir. Dahilen hafif spazmlı gastrointestinal şikayetler ve epigastrik şişkinlik gibi bazı dispeptik rahatsızlıkların semptomatik tedavisinde ve üst solunum yolu infeksiyonlarında kullanılır. Kuvvetli özel bir kokusu ve baharlı bir lezzeti vardır. Bazı içkilerin yapımında kullanılır. Anason esansı bir sinir sistemi uyarıcısıdır. Birçok ilacın içine koku verici olarak konulur [10].

•*Ferula elaochytris* Korovin (Çakşırotu); bu bitkinin kökleri toz edilip bal ile karıştırıldıktan sonra cinsel gücü arttırıcı olarak kullanılmaktadır. Antakya bölgesinde bu drogun kısırlığa karşı iyi geldiği ve bunun yapraklarını yiyen hayvanların ikiz doğurduğu iddia edilmektedir. *Ferula* türlerinin yaprakları, kurutulduktan sonra "Heliz" veya "Helizan" ismi altında, Doğu Anadolu bölgesinde hayvan yemi olarak da kullanılmaktadır. Yaprakları suda haşlanıp

acıkları giderildikten sonra, gıda olarak kullanılır; yumurta ile pişirilerek tüketilir veya turşusu yapılır [11].

Balıkesir'in Edremit ilçesinde *Ferulago trachycarpa* olgun meyveleri toplanıp kurutulduktan sonra, öğütülüp toz haline getirilerek kimyon otu ismiyle baharat olarak kullanılmaktadır [1,8].

### 2.1.3 *Ferulago* W. Koch Cinsinin Genel Özellikleri

*Ferulago* türleri çoğunlukla Akdeniz ülkelerinde yayılış göstermekle beraber; Kuzey Yarıküre'de, Avrupa, Asya ve Afrika'da dağılmıştır. Dünyada 49 türü yetişmektedir. Ülkemizde 34 türü vardır ve bunlardan 19 tanesi endemiktir, endemizmin bu kadar yüksek oluşu Anadolu'nun *Ferulago* cinsinin gen merkezi olduğunu düşündürmektedir [1].

Ülkemizde yetişen *Ferulago* türleri ve bu türlerin endemik olanları aşağıda belirtilmiştir:

1- *Ferulago galbanifera* (Miller) W.Koch.

2- *F. latiloba* Schischkin (E)

3- *F. sandrasica* Peşmen & Quezel (E)

4- *F. humilis* Boiss. (E)

5- *F. macrosciadia* Boiss. & Bal. (E)

6- *F. isaurica* Peşmen (E)

7- *F. autumnalis* Thieb.

8- *F. pauciradiata* Boiss. (E)

9- *F. aucheri* Boiss.(E)

10- *F. asparagifolia* Boiss.

11- *F. cassia* Boiss.

12- *F. amani* Post

13- *F. setifolia* C. Koch

14- *F. stellata* Boiss.

15- *F. bernardii* L. Tomkovich & M. Pimenov

16- *F. longistylis* Boiss. (E)

- 17- *F. platycarpa* Boiss. & Bal. (E)
  - 18- *F. thirkeana* (Boiss.) Boiss. (E)
  - 19- *F. sylvatica* (Besser) Reichb.
  - 20- *F. syriaca* Boiss.
  - 21- *F. mughlae* Peşmen (E)
  - 22- *F. macrocarpa* (Fenzl) Boiss.
  - 23- *F. silaifolia* (Boiss.) Boiss. (E)
  - 24- *F. confusa* Velen.
  - 25- *F. angulata* (Schlecht.) Boiss.
  - 26- *F. blancheana* Post (E)
  - 27- *F. pachyloba* (Fenzl) Boiss. (E)
  - 28- *F. trachycarpa* Boiss.
  - 29- *F. bracteata* Boiss. & Hausskn. (E)
  - 30- *F. antiochia* Saya & Miski (E)
  - 31- *F. kurdica* Post (E)
  - 32- *F. idaea* Özhatay & Akalın (E)
  - 33- *F. trojana* Akalın & Pimenov (E)
  - 34- *F. glaerosa* Kandemir & Hedge
- (E) = Endemik türler [12].

İlk defa 1824'de *Ferula*'dan ayrılan *Ferulago* cinsinin deskripsiyonunu yapan Koch yeni cins için iki türü seçmiştir. *Ferulago nodiflora* (L.) Koch ve *Ferulago thyrsoflora* (Sibth. Et Smith) Koch. Pimenov ve Tomkovich *F. thyrsoflora*'yı lektotip olarak seçmenin ilk deskripsiyona ve nomenklatüre daha uygun olduğunu düşünmektedirler. *Ferulago* türlerinde ilk sınıflandırmayı E. Boisser yapmış ve cinsi 2 seksiyona ayırmıştır. H. Peşmen Türkiye ve Doğu Ege Adaları Florası'nda Türkiye'de yetişen *Ferulago* türlerini 2 seksiyonda incelemiştir. Genel olarak *Ferulago* türlerini ayırt edici özellikler; yaprak dış hatlarının şekli, foliol loplarının şekli, çiçek durumu şeklindedir [1].

*Ferulago* türleri köklerinde ve meyvelerinde uçucu yağ-reçine-zamk karışımından oluşmuş salgı maddeleri taşıdıklarından kendilerine özgü kokuları vardır. Kullanışları ve etkin maddeleri halk arasında aynı adla bilinen *Ferula* türleri ile benzerdir. *Ferula* L., *Ferulago* W. Koch, *Prangos* Lindley cinslerinin türleri genel olarak "Çakşırotu" adıyla tanınırlar ve kullanım amaçları aynıdır.

*Ferulago* türlerinin sekonder metabolitleri başlıca kumarinler olmak üzere fenolik bileşikler ve diğer sekonder metabolitlerdir. Eski çağlardan beri *Ferulago* türleri, halk arasında sakinleştirici, tonik, sindirime yardımcı, karminatif ve afrodisyak olarak kullanılmaktadır [13].

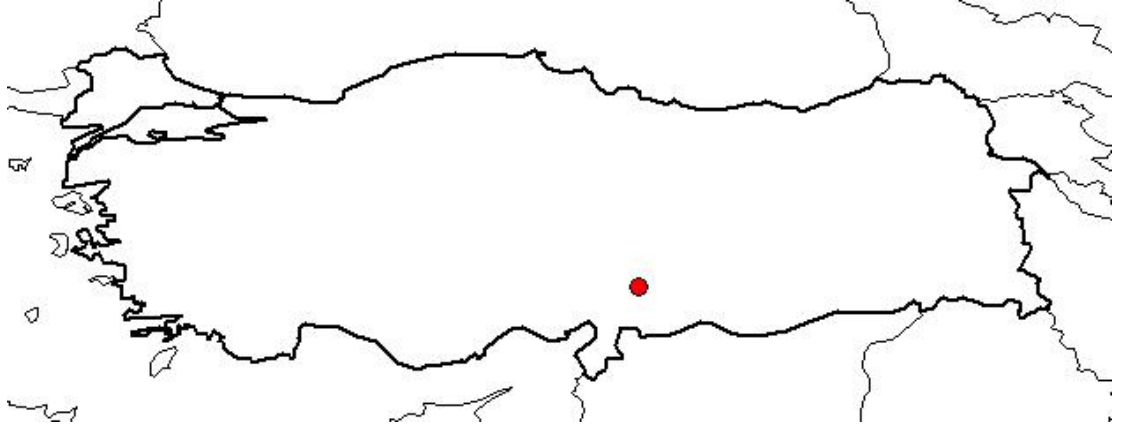
#### **2.1.4 *Ferulago blancheana* Post**

*F. blancheana* uzun boylu, kuvvetli çok yıllık bitkilerdir. Gövdesi 100-200 cm uzunluğunda, oluklu ve köşelidir. Yaprakları 4-5 pinnat, 50-60 x 50-60 cm ve tüsüzdür; lopları linear-filiform, (5-)10-35(-70) mm'dir. Çiçek durumu thyrsoid-panikulat, ışınlar 10-15 adet, 1-2(-4) cm'dir. Brakteler triangular-lanseolat, membranımsı, 5-7 mm; pediseller 3-5 mm; brakteoller 3-6 mm'dir. Merikarplar eliptik, 9-13 x 5-7 mm, dorsal kostalar dar kanatlı, lateral kanatlar 1 mm genişliğinde; dorsal vittalar 12-14, komissural vittalar 6 adettir.

Tip örneği C6 – Kahramanmaraş Ahır Dağı'ndan toplanmıştır. **Şekil 2.1.**'de *F. blancheana*'nın Türkiye'deki yayılışı görülmektedir. Çiçeklenme dönemi Temmuz-Ağustos olan *F. blancheana*, alpin yamaçlarda bulunur. Endemik bir türdür ve sadece tip koleksiyonundan bilinir. *F. thyrsoflora*'ya benzer fakat uzun yaprak loplalarıyla ve büyük merikarplarıyla bu türden ayrılır [14].

*F. blancheana* bilim dünyasına 1888 yılında Boissier'in "Flora Orientalis Supplementum" adlı eserinde tanıtılmıştır.





Şekil 2.1. *F. blanchiana*'nın Türkiye'deki yayılışı [15].

## 2.2 *Ferulago* Türlerinin Halk Arasındaki Kullanılışı

*Ferulago* türünün en çok yetiştiği yerlerden biri olan Anadolu'da, *Ferulago* ve yakın türleri olan *Ferula* L., *Cachyrs* L., *Glaucosciadium* Burt & Davis ve *Prangos* Lindl. türleri fark gözetilmeden yöresel isimleri olan 'Çakşırotu', 'Çakşır' ya da 'Çağşır' olarak bilinir ve bu bitkilerin kökleri halk arasında afrodisyak olarak kullanılmaktadır [16].

- *F. trachycarpa* Bozkır'da (Konya) kişniş, kuzukişnişi, kurtkulağı, kuzubaşı, kuzukemirdi, kuzukulağı isimleri ile tanınmakta ve salata olarak yenmek üzere halk pazarlarında satılmaktadır [1-8].
- *F. trojana*'nın Çanakkale'nin Çan ilçesine bağlı Alanköy'de ve Kumarlar Köyü'nde antihemoroidal olarak kullanıldığı bilinmektedir [5].
- *F. confusa* Şalgamlı Köyü'nde (Tekirdağ-Hayrabolu) sarıçiçek ismiyle tanınmakta ve antidepresif olarak ayrıca da dil tutulmalarında kullanılmaktadır [1].
- *F. sylvatica*'dan hazırlanan çay Bulgaristan'da halk ilacı olarak hemoroitlerin tedavisinde kullanılmaktadır [1].

## 2.3 *Ferulago* Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar

Hazırlık aşamasında yapılan literatür taramalarında çalışma konusunu oluşturan *Ferulago* cinsi ile ilgili bugüne kadar ülkemizde ve dünyada daha çok uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine çalışıldığı görülmüştür. Tez konusu olan *Ferulago blanchiana* üzerinde yapılmış çok az botanik çalışma olup, kimyasal çalışma ise hiç yapılmamıştır. *Ferulago* türlerinin diğer

sekonder metabolitleri üzerine yapılan çalışmalar ise oldukça az sayıdadır. Bu çalışmalar aşağıda belirtilmiştir:

İran'ın batısından toplanan *Ferulago carduchorum* bitkisinden elde edilen uçucu yağ ile antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik, larvisidal aktivite çalışmaları yapılmıştır. Uçucu yağda tespit edilen 43 bileşenin çoğunluğu monoterpenlerden oluşmaktadır (84,63%). *Ferulago carduchorum* uçucu yağı *Candida albicans*'a karşı belirgin bir etki göstermiştir. Ayrıca AChE'yi inhibe ederek; T47D, HEP-G2 ve HT-29 hücreleri üzerinde yüksek sitotoksik etki göstermiştir [17].

Mart 2012 İran'da toplanan *Ferulago angulata* yapraklarının heksan ekstresinin meme kanserinden sorumlu hücrelerden biri olan MCF7 hücresi apoptozisi üzerinde indükleyici etkisi olduğu belirlenmiştir. *Ferulago angulata* bitkisinden izole edilen polycerasoidinin; mRNA'daki değişiklikler ve caspase aktivasyonu yoluyla meme kanseri hücrelerinde mitokondriyal bağımlı apoptozisi indüklediği tespit edilmiştir [18].

*Ferulago campestris* ile yapılan bir çalışmada köklerinin etil asetat ekstresinden izole edilen daucane esterleri, kumarinler ve fenoliklerin olası antiproliferatif etkileri araştırılmış, sonuçta bazı daucane esterlerinin insan tümör hücre hattına karşı ortalama bir antiproliferatif aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. İtalya'dan toplanan bitkiden elde edilen daucane esteri DE-17 glikoprotein Pg-p'nin yüksek seviyelerini eksprese ederek, seçilen hücre hatlarında antiproliferatif etkiyi indüklemiştir [19].

İran'da Chavir olarak bilinen *Ferulago angulata* yaprak ve çiçeklerinin ekstresinin insan adenokarsinoma mide hücre hattı üzerindeki sitotoksik ve proapoptotik aktivitesi araştırılmıştır. Antioksidan etkilerinden dolayı bu bitkinin ekstresinin kanser hücreleri üzerinde apoptozis özellikleri indükleyici kemopreventif ajan olmaya aday bir drog olduğu sonucuna varılmıştır [20].

*Ferulago asparagifolia*'dan ostenol (osthenol) ve prantşimgin kumarinleri ile ramnetin (rhamnetin), izoramnetin (isorhamnetin) ve rutin flavonoidleri izole edilmiştir. Bitkinin etilasetat ekstresinin aegelinol, 3'-senesioylaegelinol (=grandivittin), 3'-angeloylaegelinol

(=agasillin), prantşimgin, 8-metil prantşimgin ve umbelliferon içerdiği, metanol ekstresinin ise; rutarin, klorojenik asid, 3,5-di-(E,E)-kaffeoilkuinik asid ve (-)-angelikoidenol-2-O-β-apiofuranosil-(1→6)-β-glukopiranosid içerdiği tespit edilmiştir [21].

İspanya'dan toplanan *Ferulago capillaris*'in benzen ekstresinin; bergamotin, ostol (osthol), izoimperatorin, (±)oksipeusedanin, alatol (=tert-O-metilprangol), (-)-pranferol, (±)-prangol, prantşimgin, (+)-senesioylprangol, (-)-(2'S,3'R)-3'senecioyloksimarmesin, (+)-(2'S,3'R)-3'-hidroksi prantşimgin, (+)-2"-senesioyloksimarmesin hekzan ekstresinin ise bergapten, bergamotin, izoimperatorin, (±)-oksipeusedanin (oxypeucedanin), 8-(1,1-dimetilallil) bergaptol, (-)-prantşimgin, (-)-izovalerilmarmesin (isovalerylmarmesin) kumarinlerini içerdiği belirlenmiştir [22].

Sicilya'dan toplanan *Ferulago campestris* bitkisinin agasillin (agasyllin), grandivittin, aegelinol benzoat ve felamidin kumarinlerini içerdiği tespit edilmiştir [23]. İzole edilen aegelinol ve agasillin için yapılan antibakteriyel test sonucunda 9 ATCC'ye karşı aktif oldukları belirlenmiştir [24].

*Ferulago subvelutina* köklerinin etilasetat ekstresinden altı kumarin; ostol, oksipeusedanin, ksantotoksin, isoimperatorin, oksipeusedanin hidrat, meranzin hidrat ve bir sterol beta-sitosteril linoleat izole edilerek antioksidan aktivitelerine bakılmıştır [25].

Türkiye'de *Ferulago* türleriyle yapılan fitokimyasal çalışmalar oldukça azdır. *Ferulago aucheri* ile yapılan çalışmada; kloroform ekstresinin ostenol ve izoramnetin 3-galaktozid ve 6-hidroksiapigenin 6-metil eter flavonoidleri, prantşimgin kumarinleri, 1-asetilhidrokinon 4-galaktosid ve kuinol monoasetat aromatik bileşiklerini içerdiği belirtilmiştir [26].

*Ferulago isaurica*'nın 4'-O-benzoyl rutaretin, 4'-O-3-metil-2-butenoil rutaretin furanokumarinleri ve prantşimgin, felamidin, bergapten, ksantotoksin (xanthotoxin) ve izoimperatorin kumarinlerini içerdiği tespit edilmiştir [27]. Yapılan diğer bir çalışmada *Ferulago isaurica*'nın felamedin (1.51) ve prantşimgin (1.17) miktarları belirlenmiştir [28]. Aynı çalışmada *Ferulago syriaca* için felamedin (1.68) ve prantşimgin (0.91) miktarları da belirlenmiştir [28].

Yapılan bir çalışmada, Nevşehir'den toplanan *Ferulago platycarpa* metanol ekstresinin bir furanokumarin olan prantşimgin (prantschimgin) içerdiği görülmüştür [29].



**Çizelge 2.1.** *Ferulago* türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları

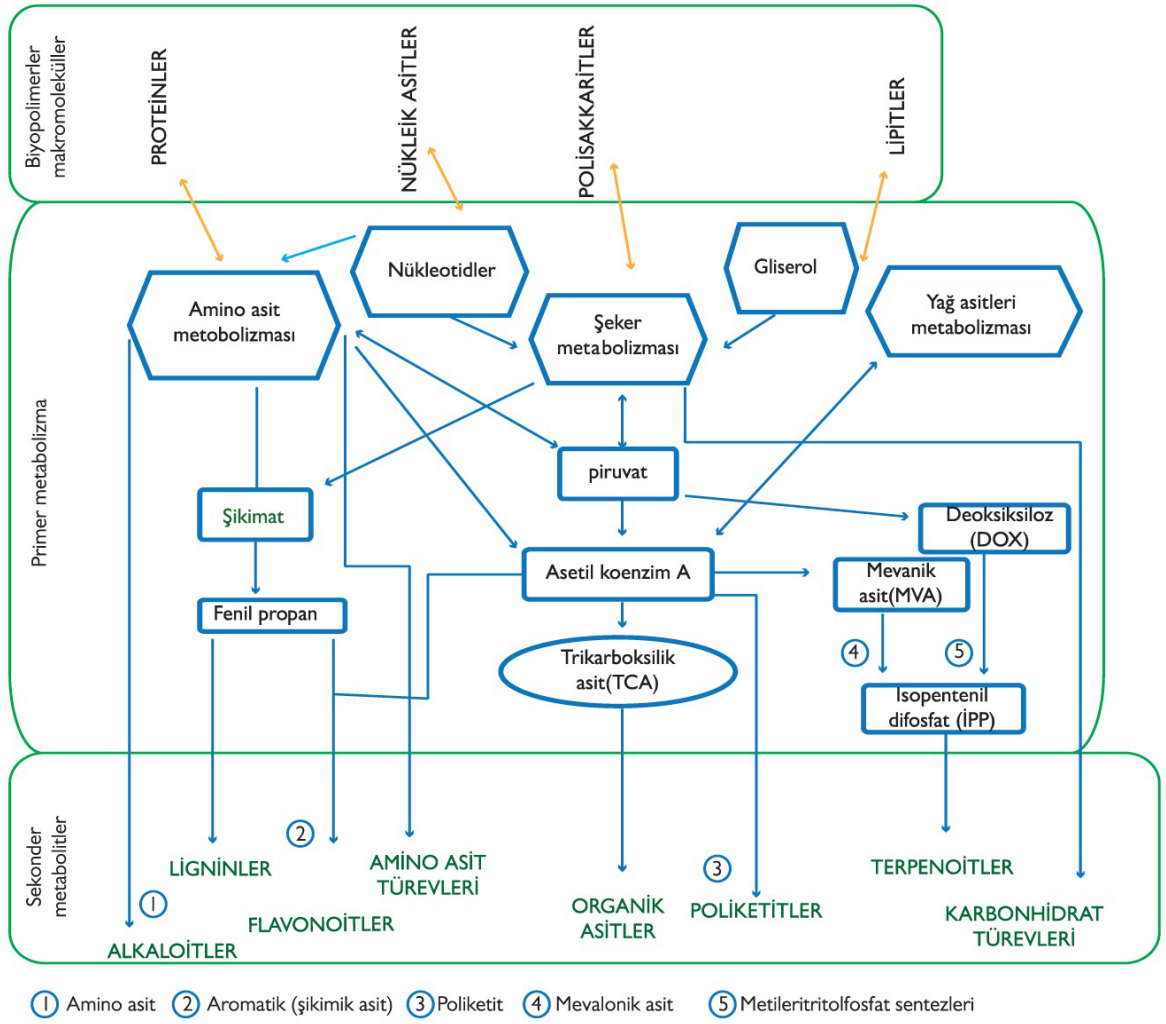
Bitki Adı	Yetiştirildiği Yer	Uçucu Yağ ve Ana Bileşenleri	Biyolojik Aktivite
<i>Ferulago carduchorum</i>	İran	(Z)- $\beta$ -ocimene (43.3%);	Sitotoksik Larvisidal, [17] Antimikrobiyal
		$\alpha$ -pinene (18.23%);	
		bornyl acetate (3.98%)	
<i>Ferulago macedonica</i>	Makedonya	$\alpha$ -pinene (43.10%);	Antioksidan, Antifungal [30]
		sabinene (22.78%)	
<i>Ferulago capillaris</i>	Portekiz	limonene (30.9%);	Antifungal [31]
		$\alpha$ -pinene (35.8%);	
		$\beta$ -fellandren (6%)	
<i>Ferulago sandrasica</i>	Türkiye	ocimene (30.5%);	Antimikrobiyal Antioksidan [32]
		carene-3 (27.4%);	
		pinen (17.8%)	
<i>Ferulago campestris</i>	İtalya	$\alpha$ -pinen; mirsen;	Antimikrobiyal [33]
		$\gamma$ -terpinen; $\alpha$ -humulen	
		spatulenol; karyofillen	
<i>Ferulago asparagifolia</i>	Türkiye	2,3,6-trimetilbenzalhid	[22]
		(%38.9); mirsen (%18.2)	
<i>Ferulago asparagifolia</i>	Türkiye	2,3,6-trimetilbenzalhid	[22]
		(%42); $\alpha$ -pinen (%11.4);	
		trans chrysantenyl asetat (%5.2)	
<i>Ferulago longistylis</i>	Türkiye	$\alpha$ -pinen (%17);	Antimikrobiyal [34]
		2,3,6-trimetil benzalhid(%29);	
		(Z)- $\beta$ -osimen (%16);	
		sabinen (%6);	
		mirsen (%6); bornil asetat (%4)	
<i>Ferulago subvelutina</i>	İran	limonene (27%);	[29]
		$\alpha$ -fellandren (23.1%)	
		$\alpha$ -pinen (13.3%)	
<i>Ferulago angulata</i>	İran	$\alpha$ -fellandren (%24.2);	[35]
		$\beta$ - fellandren (%14.9);	
		$\alpha$ -pinen (%14.7);	
		p-cymen (%10.3);	
		D-3-karen (6.7); (Z)- $\beta$ -osimen (%5.8)	
<i>Ferulago isaurica</i>	Türkiye	$\alpha$ -pinen (31.5);	[36]
		limonen (%24.2);	
		mirsen(%17)	
<i>Ferulago isaurica</i> (meyve kısmı)	Türkiye	terpinolen (%42.1);	[36]
		mirsen (%27)	
<i>Ferulago syriaca</i>	Türkiye	mirsen (%15.3);	[36]
		4,6-guayadien (%10.7)	
<i>Ferulago phialocarpa</i>	İran	$\alpha$ -pinen (%40.9);	[37]
		$\alpha$ - fellandren (%14.2);	
		$\beta$ - fellandren (%9.6)	

## 2.4 Sekonder Metabolitler

Bitkilerde ve diğ er tüm canlılarda madde alışverişi ve dönüşümü, biyokimyasal reaksiyonlarla moleküler ve hücrese l düzeyden itibaren karmaşık bir reaksiyon ağı teşkil ederek gerçekleşir. Temel yapı taşı olarak işlev gösteren basit moleküller primer metabolizma, buradan hareketle oluşan moleküller ise sekonder metabolizma faaliyetlerini gerçekleştirir. Bitki, hayvan ve insan gibi canlılarda ortak “primer (birincil) metabolit” olarak tanımlanan ve canlılık için gerekli olan yapı taşları nükleik asitler, proteinler, yağlar ve karbohidratlardır. Primer metabolitler organizma için “olmazsa olmaz” özellikteki maddelerdir. Bitkilerin savunma mekanizmasında, dış etkilere n korunmasında ve bitkiler arasındaki etkileşimin sağlanmasında sekonder metabolitleri önemli rol oynarlar [38]. Sekonder metabolitlerin genel özellikleri;

- Sadece belirli bir cins/türe özel olabilir, dolayısıyla cins/türün biyokimyasal çeşitliliği sınırlıdır,
- Moleküllerin yapısal türevleri ve stereokimyasal varyasyonları ise çok sayıdadır,
- Biyosentez esnasında belirli bir zaman ve miktarda oluşur,
- Sentezlendikleri yerden farklı özelleşmiş organ, doku veya sistemlerde depolanır (örn.: lipofilik maddeler ve uçucu yağlar salgı ceplerinde bulunabilir) gerektiği takdirde ya sentezlerde kullanılır ya da enerji gereksimini karşılar, şeklinde özetlenebilir.

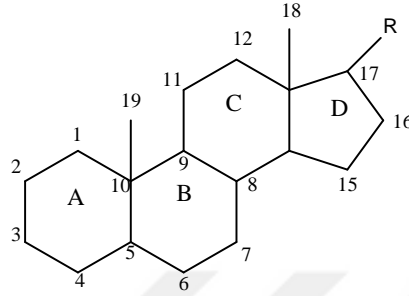
Bitkilerde bu özelliklere sahip organik bileşenler özellikle ilaç yapımında önemli bir yer oluşturmaktadır. Biyosentezik oluşumları göz önüne alındığında sekonder metabolitleri ana iskeletleri ve oluşumları itibarıyla terpenler, fenolik bileşikler ve flavonoidler ile alkaloidler olmak üzere 3 ana grupta sınıflandırılabilir [39]. Yaşamsal faaliyetler için gerekli olan primer metabolitlerden (aminoasitler, basit karakterli lipitler ve yağlar, basit şekerler) enzimatik yollarla sekonder metabolitler oluşur. Primer ve sekonder metabolizma yolları Şekil 2. 2’ de gösterilmiştir [40].



Şekil 2.2. Sekonder Metabolitlerin Oluşumu

## 2.4.1 Steroitler

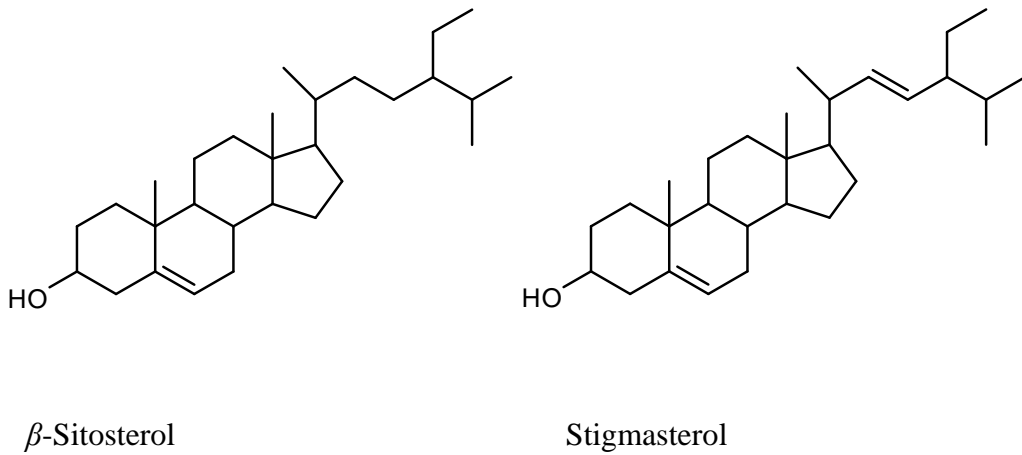
Hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Kalp glikozitleri, mide ve safra asitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları steroid sınıfı bileşikler olup; steroidlerin karakteristik halka yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir.



Şekil 2.3. Steroidin ana iskelet yapısı

Bitkisel steroidlerde genellikle, C-3'te OH, C-5'te çifte bağ, C-17'de yan zincir bulunur.

C-3'teki OH grubu, halkadaki metil gruplarıyla dik açı yaparsa A ve B halkaları *cis* şeklinde birleşmişlerdir. Bu konumdaki OH grubu düzlemin üstündedir yani  $\beta$  şeklindedir. OH grubu metil gruplarına paralel ise A ve B halkaları *trans* yapıda olup OH grubu  $\alpha$  şeklindedir. Yan zincirin konfigürasyonu ise steroidlerde genellikle  $\beta$  şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle *trans* birleşirler [41].



Şekil 2.4. Bazı sterol yapıları



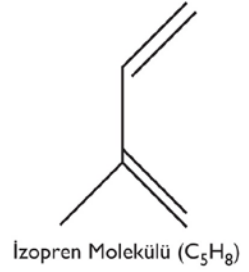
## 2.4.2 Terpenler

Doğal ürünlerin en büyük sınıfını oluşturan terpenler genellikle uzun bitkilerin her bölgesinde (çiçek, tohum, yaprak, kök, gövde gibi), yabani otlarda, yosunlarda, alglerde ve likenlerde hatta mikrobiyal orijinli bazı böceklerde bile bulunmaktadır [42]. İzopren molekülünden oluşan terpenler, karbon sayılarına göre sınıflandırılması Çizelge 2.2'de belirtilmiştir [43].

Çizelge 2.2. Terpenlerin Sınıflandırılması

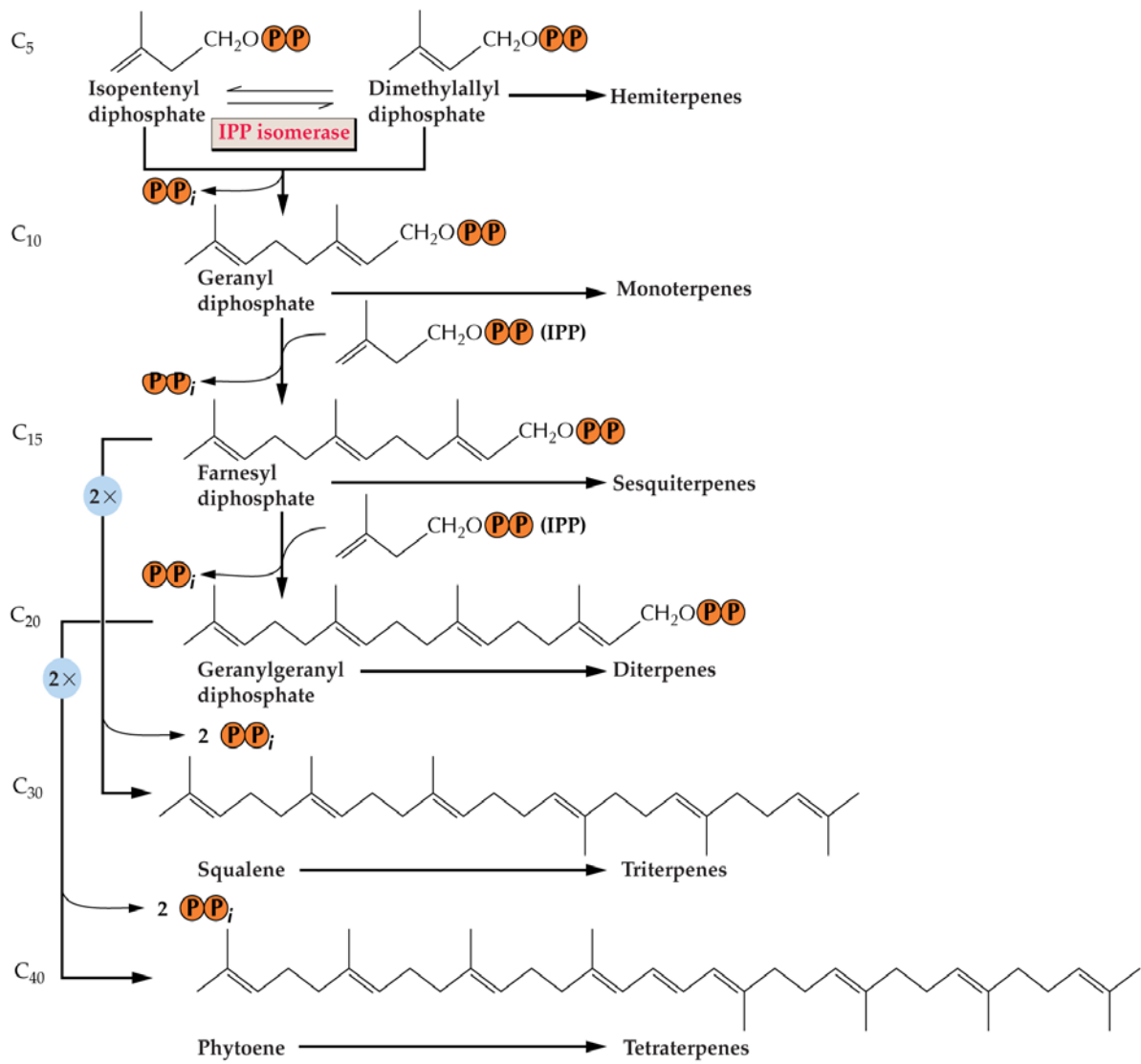
Karbon sayısına (n) göre terpenler:

n	Adı	Bulunuşu
10	Monoterpen	Uçucu yağlar
15	Seskiterpen	Uçucu yağlar, reçineler
20	Diterpen	Reçineler, acı maddeler
25	Sesterterpenler	Reçineler, acı maddeler
30	Triterpenler	Reçineler, acı maddeler
40	Tetraterpenler	Yeşil dokular, kökler, meyveler
100 -	Politerpenler	Lateksler, kökler



Sadece hidrokarbon içeren terpenler bulunabileceği gibi oksijen içeren yani alkol, aldehit, keton ve asit grubu taşıyan terpenler de çok yaygındır. Oksijen içeren terpenler terpenoitler olarak da adlandırılırlar [44].

Terpenoitler izopren birimlerinin sayısına göre sınıflandırılmaktadırlar. Ruzicka'nın "İzopren Kuralına" göre tüm terpenik bileşiklerin karbon iskeletleri izopren birimlerinin iki ya da daha fazlasının birleşmesiyle meydana gelmiştir [45].

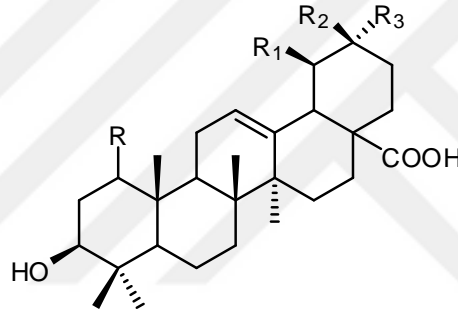


Şekil 2.5. Terpenlerin İzopren Molekülünden Biyosentezi [46]

### 2.4.2.1 Triterpenoitler (C<sub>30</sub>)

Altı izopren biriminden oluşan karbon iskeletine sahip triterpenler, biyosentetik olarak 30C'lu asiklik hidrokarbon squalenden elde edilen bileşiklerdir. Çoğu alkol, aldehit veya karboksilik asit taşıyan siklik yapılardır. Yüksek erime noktasına sahip, renksiz, optikçe aktif ve kimyasal reaktivliğinin kısıtlılığında yapı karakterizasyonu zor olan bileşiklerdir [47].

Triterpenler gerçek triterpenler, saponinler, steroidler ve kardiyak glikozitler olmak üzere en az dört gruba ayrılmaktadır. Bütün triterpenlerin izolasyonu için temel ayırma teknikleri olarak genelde kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi, GC ve GC-MS kullanılmaktadır. Yapıları ise erime noktası, optik çevirme, NMR, kütle spektrumu, UV, IR ve X-ray gibi spektroskopik teknikler ile aydınlatılır [47].



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

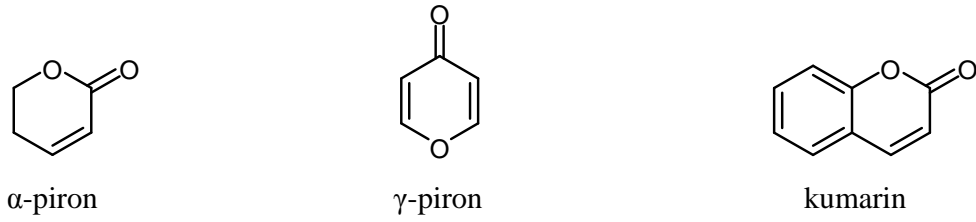
Oleanolik asit; R=R<sub>1</sub>=H, R<sub>2</sub>=R<sub>3</sub>=Me

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

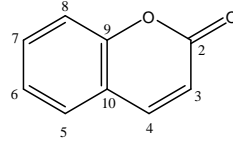
Şekil 2.6. Bazı triterpen yapıları

### 2.4.3 Kumarinler

Piron halkasının benzen halkası ile kondenzasyon tepkimesi sonucu meydana gelen ve benzopiranlar olarak bilinen heterosiklik bileşikler iki ana gruba ayrılmaktadır. Birinci grupta yer alan bu heterosiklik yapıya “kumarin” (coumarin) adı verilmektedir [48]. Kumarinler bir  $\alpha$ -piron halkasının benzen halkasına kondanse olmasıyla oluşan bileşiklerdir.

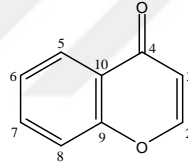


**Şekil 2.7.** α- piron, γ-piron ve kumarin bileşikleri.



**Şekil 2.8.** Kumarin

Bir γ-piron halkasının benzen halkasına kondanse olmasıyla oluşan bileşiklere “kromon” (chromon) adı verilir ve bunlar ikinci grup heterosiklik yapıdaki benzopiranlardır [48].



**Şekil 2.9.** Kromon

Benzo α-piron grubunun ana bileşiği olan kumarinler serbest halde ilk kez 1822’de Vogel tarafından tonka baklası (*Semen Tonka*) adı verilen ve Güney Amerika’da yetişen Fabaceae familyasından *Dipteryx odorato* (*Coumarouna odorato*) isimli ağacın kurutulmuş hoş kokulu tohumlarından izole edilmiş, 1868 yılında da Perkin tarafından sentezlenmiştir. Elde edilen bu bileşiğe bitkinin cins isminden esinlenilerek kumarin adı verilmiştir. Kumarinler Angiospermae bölümü dikotiledon bitkilerde serbest ya da heterozit olarak bulunur. Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae, Moraceae, Rosaceae, Rutaceae, Rubiaceae, Solanaceae ve monokotillerden Gramineae (Poaceae) ve Orchidaceae familyalarında kumarinlere rastlanılmaktadır. Esas olarak yapraklarda sentezlenmesine rağmen, yüksek miktarlarda meyvede, daha sonra da kök ve gövdede bulunmaktadır [2]. Çoğunlukla *Dipteryx odorato* ve diğer *Dipteryx* çeşitlerinden elde edilmekle birlikte *Melilotus alba* (Fabaceae), *Hierochloe odorata* (Poaceae), *Glycyrrhiza glabra* (meyankökü), tatlı yonca ve lavanta gibi bitkilerde ve

vişne, çilek, şeftali gibi meyvelerde de bulunmaktadır [2]. Bitkilerdeki rolleri korunma ile ilgili olup bitkiye UV perdeleme etkisi, çimlenme inhibisyonu ve antimikrobiyel özellikler kazandırır. Yonca gibi bitkinin yenilebilen kısmındaki kumarinler, memelilerde güçlü iç kanamalara sebep olabilirler. Bu keşif en sonunda rodentisitlerin (rat zehiri) gelişimine ve ilgili bileşiklerin de inme tedavisinde ve önlenmesinde kullanımına yol açmıştır. Aynı şekilde *Heracleum mantegazzianum* (giant hogweed)'un yaprak dokusunda bulunan ışığa duyarlı bileşik olan 8-methoxypsoralen, deri veya uzun dalga ultraviyole (UV-A 320-380 nm) radyasyonu teması ile açığa çıkan fitofotodermatit (deri fototoksik inflamatuvar erüpsiyonu) hastalığına yol açar. Ayrıca psoralen günümüzde başarılı bir şekilde, ağız yoluyla tedavi ve UV-A fototerapi tedavisi karışımıyla çeşitli deri hastalıklarının (egzema, sedef hastalığı) tedavisinde kullanılmaktadır. Kumarinler ve kumarin türevleri antibiyotik, antikoagülan, antikanser, antienflamatuvar, diüretik, vazodilatör, dermatolojik, hepatotoksik ve bakteriyostatik biyolojik aktiviteleri sebebiyle özellikle biyoloji ve tıp alanındaki araştırmalara konu olmaktadır. Bitkilerde serbest veya glikozitleri halinde yaygın olarak bulunan kumarinlerin *in vivo* olarak birçok tümör türüne karşı etkili olduğu, bazılarının anti-HIV aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [49].

Kumarin kimyasal yapısından dolayı, *o*-hidroksisinnamik asitten türetilmiş bir lakton grubudur. Kumarin vanilyaya benzeyen güzel kokulu bir madde olup, özellikle parfümeride ve pipo tütünleri ile Amerikan tipi tütünlerin kokulandırılmasında kullanılmaktadır. Benzo  $\alpha$ -piron grubunun en yaygın sınıfı olan kumarinler, güçlü pigmentler oldukları için renkli bileşikler olarak oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Kumarinler aslında floresans özellik gösteren bileşikler değildirler. Ancak alkali çözeltileri UV'de yeşil renkte floresans verir. 7-Hidroksi kumarinler, örneğin umbelliferon parlak mavi renkte floresan verirken, 6-Hidroksi kumarinlerin derişik H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dışındaki çözeltileri floresans vermez [50]. Kapalı formülü C<sub>9</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> olan kumarin bileşiğinin molekül ağırlığı 146.15 g/mol olup; parlak kristal yapılı bir bileşiktir, erime noktası 68-70 °C'dir. Kloroform, dietileter, etanol ve yağlarda çözünürken kaynar suda az, oda sıcaklığındaki suda ise çok az miktarda çözünür [51].

Benzo  $\alpha$ -piron grubunun en bilinen sınıfı olan kumarinler, güçlü pigmentler oldukları için renkli bileşikler olarak yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kumarinler laboratuvarında sentezlendikten hemen sonra parfüm ve tatlandırıcı yapımında kullanılmaya başlanmıştır ve o tarihten beri sanayide parfümeri kimyasalı olarak kullanılmaktadır [52].

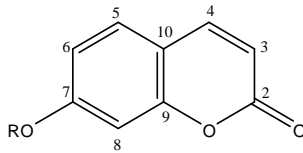
Kumarinlerin kimyasal yapısı Strecker ve Fitting tarafından aydınlatılmış ve ilk kimyasal sentezi 1868 yılında Perkin reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir [48]. Kumarinler ilk önce benzoik asit türevi olarak adlandırılmışlarsa da Perkin'in *o*-hidroksi sinnamik asit ile salisil aldehiti etkileşirmesi sonucu bir lakton halkası olduğu tespit edilmiştir. Kumarinler ve türevleri, kimyasal yapılarından dolayı *o*-hidroksi sinnamik asitin lakton türevleri olarak adlandırılırken diğer yandan; benzen ve 1,2 piron halkasının etkileşimi sonucu oluştuğu da söylenebilir. Bu nedenle de kumarinler; oksijen içeren heterosiklik bileşiklerin bir türüdür. Kumarinler kumaron gibi diğer heterosiklik bileşiklere de dönüştürülmesi oldukça kolay olan bileşiklerdir. Bitkilerden uygun çözücülerle ekstraksiyon sonucu, farklı yöntemler uygulanarak izole edilirler [50].

Kumarinler başlıca 6 sınıfta incelenebilir [48]:

1. Benzen halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler
2. Piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler
3. Hem benzen, hem de piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler
4. Benzen halkasına halkalı yapıların kondanse olması ile meydana gelen kumarinler
5. Piron halkasına halkalı yapıların kondanse olması ile meydana gelen kumarinler
6. Dimer kumarinler

#### 2.4.3.1 Benzen halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler

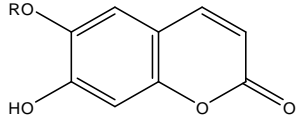
Kumarinlerin benzen halkasına farklı sübstitüentlerin bağlanması sonucu mono-, di-, tri- sübstitüe kumarinler meydana gelmektedir [53]. Mono-sübstitüe kumarinlere umbelliferon ve herniarin verilebilir. Benzen halkası üzerinde 2 tane sübstitüent taşıyan kumarinler di-sübstitüe kumarinler olup, skopoletin ve eskuletin bu gruba örnek verilebilir. Genelde bitkilerden elde edilen tri-sübstitüe kumarinlere örnek fraksetin ise *Fraxinus excelsior*'dan izole edilmiştir [54].



R=H 7-Hidroksikumarin (Umbelliferone)

R=CH<sub>3</sub> 7-Metoksikumarin (Herniarin)

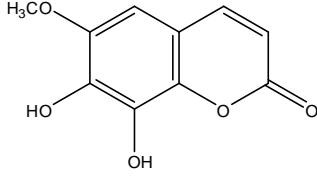
Şekil 2.10. Mono-sübstitüe kumarinler



R=H 6,7-Dihidroksikumarin (Eskuletin)

R=CH<sub>3</sub> 7-Hidroksi-6-Metoksikumarin (Skopoletin)

Şekil 2.11. Di-süstitüe kumarinler

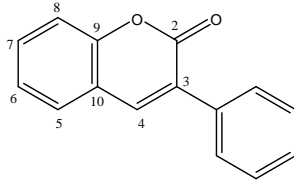


7,8-Dihidroksi-6-metoksikumarin (Fraksetin)

Şekil 2.12. Tri-süstitüe kumarin

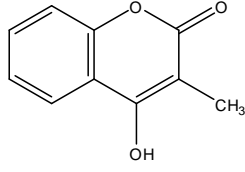
#### 2.4.3.2 Piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler

Piron halkasının 3. ve 4. pozisyonuna hidroksil, alifatik veya aromatik grupların bağlanmasıyla oluşan kumarinlerdir [53]. Özellikle 3 ya da 4 numaralı karbon atomunda fenil grubu içeren kumarinlerin antioksidan aktivite gösterdikleri bilinmektedir [55].



3-Fenilkumarin

Şekil 2.13. Piron halkası mono-süstitüe kumarin

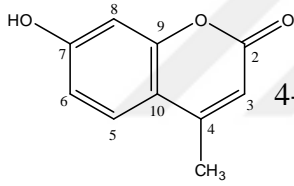


3-Metil-4-hidroksikumarin

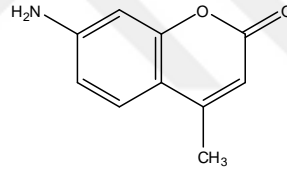
Şekil 2.14. Piron halkası di-süstitüe kumarin

### 2.4.3.3 Hem benzen, hem de piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler

Bu sınıfta yer alan kumarinler florofor olarak kullanılırlar [53]. 4-Metilumbelliferon su kaynaklarında bakteriyel kontaminasyonun tespiti için uygulanan testlerde fluoresans sinyal oluşturması amacıyla kullanılır. 7-Amino-4-metilkumarin peptid türevleri, proteaz enziminin araştırılmasında kullanılır.



4-Metilumbelliferon



7-Amino-4-metilkumarin

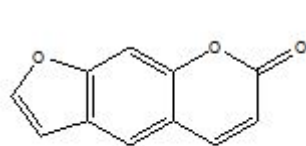
Şekil 2.15. Benzen ve piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan bazı kumarinler

### 2.4.3.4 Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler

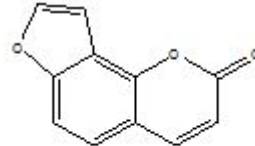
Kumarinin benzen halkasına beş üyeli furan halkasının kondanse olmasıyla “furanokumarinler” meydana gelir. Bu sınıfın birçok üyesi lineer bir furanokumarin olan psoralenin veya onun daha kararlı açısız izomeri anjelisinin türevidir [53].

Lineer Furanokumarin: Furan halkası ile benzen halkası aynı düzlemde bulunurlar.

Açısız (Angular) Furanokumarin: Furan halkası ile benzen halkası farklı düzlemde yer alırlar.



Psoralen

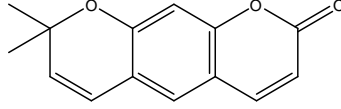


Angelicin

Şekil 2.16: Lineer ve angular furanokumarinler

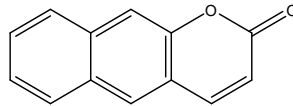


Kumarinin benzen halkasına bir piron halkasının kondanse olmasıyla “piranokumarinler” oluşmaktadır.



Şekil 2.17. Ksantiletin

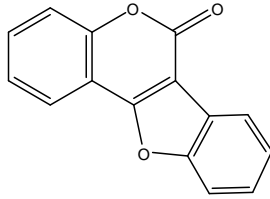
Kumarinin benzen halkasına bir benzen halkasının kondanse olmasıyla “benzokumarinler” meydana gelir [53]. *Juncus acutus* rizomlarından etil asetat ile ekstrakte edilen bazı benzokumarinler antifungal özellikleri bir mantar türü olan yeşil algler üzerinde araştırılmış ve yüksek inhibitör etki gösterdikleri tespit edilmiştir [56]. Ayrıca bazı polisiklik kumarin türevlerinin kanser tedavisinde etkileri araştırılmaktadır [57].



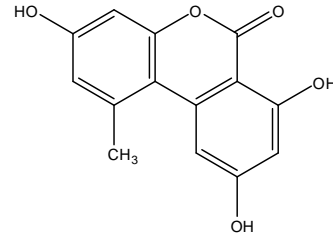
Şekil 2.18. 6,7-Benzokumarin

### 2.4.3.5 Piron halkası ile halkalı yapıların kondenzasyonu sonucu meydana gelen kumarinler

Kumarinin piron halkasının 3. ve 4. pozisyonundaki karbon atomlarına halkalı yapıların kondenzasyonu sonucu oluşan kumarin türevleridir [53].



Kumestan

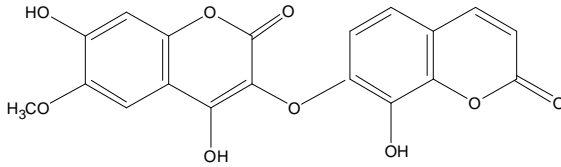


Aeterniyol

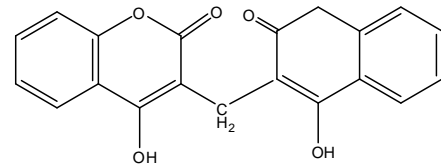
Şekil 2.19. Piron halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile oluşan kumarinler

### 2.4.3.6 Dimer kumarinler

İki kumarinin piron halkalarının 3. pozisyonundaki karbon atomlarının birleşmesiyle değişik yapılarda kumarin türevleri meydana gelmektedir [53].



Dafnoretin



Bishidroksikumarin (Dikumarol)

Şekil 2.20. Dimer Kumarinler

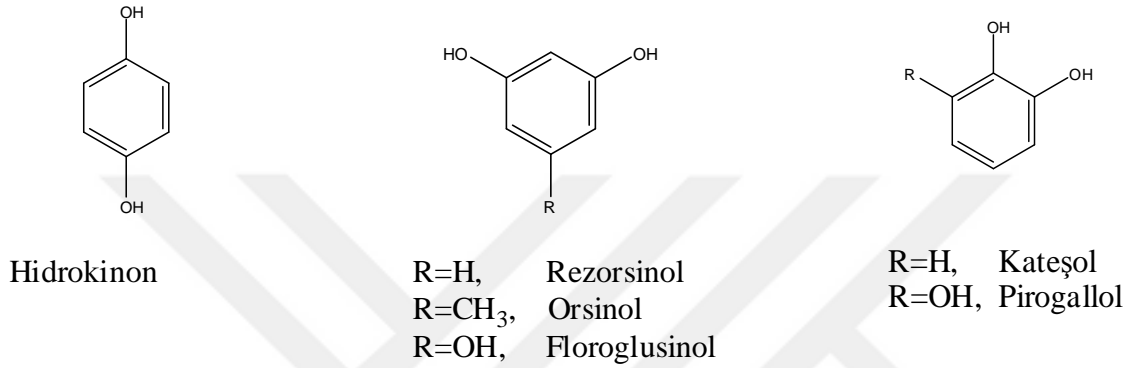
### 2.4.4 Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler

Fenolik bileşikler bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir ya da daha fazla sayıda hidroksil süstitüenti içeren bir sekonder metabolit sınıfıdır. Bu sınıfın en geniş grubunu flavonoidler oluşturmakla beraber fenilpropanoidler ve fenolik kinonlar da oldukça fazla sayıda bitkilerde yer alan fenolik bileşiklerdir. Bitkilerde bulunan ligninler, melaninler ve tanenler gibi polimerik bileşenler de polifenolik bileşiklerdendir [58].

Zaman zaman fenolik üniteler proteinler, alkaloidler ve terpenoidlerde de görülmektedir.

#### 2.4.4.1 Fenoller ve fenolik asitler

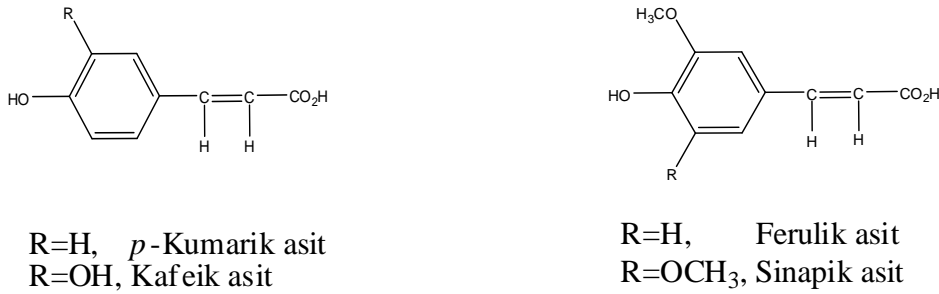
Serbest fenoller ve fenolik asitler bitkilerden genellikle beraber izole edildikleri için birlikte anılmaktadırlar. Bitki dokularının asit hidrolizi eterde çözünen çok sayıda fenolik asit açığa çıkarır. p-Hidroksibenzoik asit, vanilik asit, protokateşuik asit, gentisik asit, sirinjik asit yaygın olarak bulunan fenolik asitlere örnektir. Fenolik asitlere oranla daha nadir olarak bulunan serbest fenollerden en çok rastlanılan serbest fenol hidrokinondur. Kateşol, orsinol, floroglusinol ve pirogallol bitkilerde yaygın bulunmamakla beraber diğer önemli serbest fenollerdendir [59].



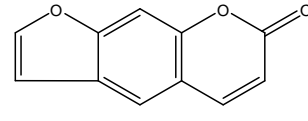
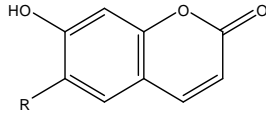
Şekil 2.21: Fenoller ve fenolik asitler

#### 2.4.4.2 Fenilpropanoitler

Fenilpropanoitler aromatik halkaya üç karbonlu yan zincir bağlanmasıyla meydana gelen bileşikler olup, biyosentetik olarak aromatik aminoasit proteini olan fenilalaninden türevlendirilmektedirler. Yaygın olarak rastlanılan fenilpropanoitler hidroksisinnamik asitlerdir (sinapik, kafeik, ferulik ve p-kumarik). Bununla beraber hidroksikumarinler, fenilpropenler ve lignanlar diğer önemli fenilpropanoitlerdir [60].



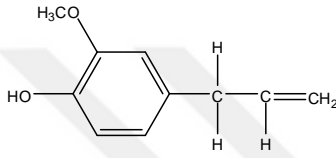
Şekil 2.22. Hidroksisinnamik asitler



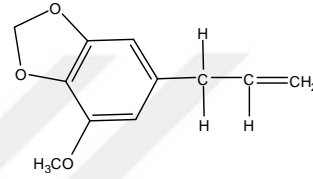
R=H, Umbelliferon  
R=OH, Eskuletin (Aesculetin)  
R=OCH<sub>3</sub>, Skopoletin

Psoralen

Şekil 2.23. Kumarinler



Öjenol (Eugenol)



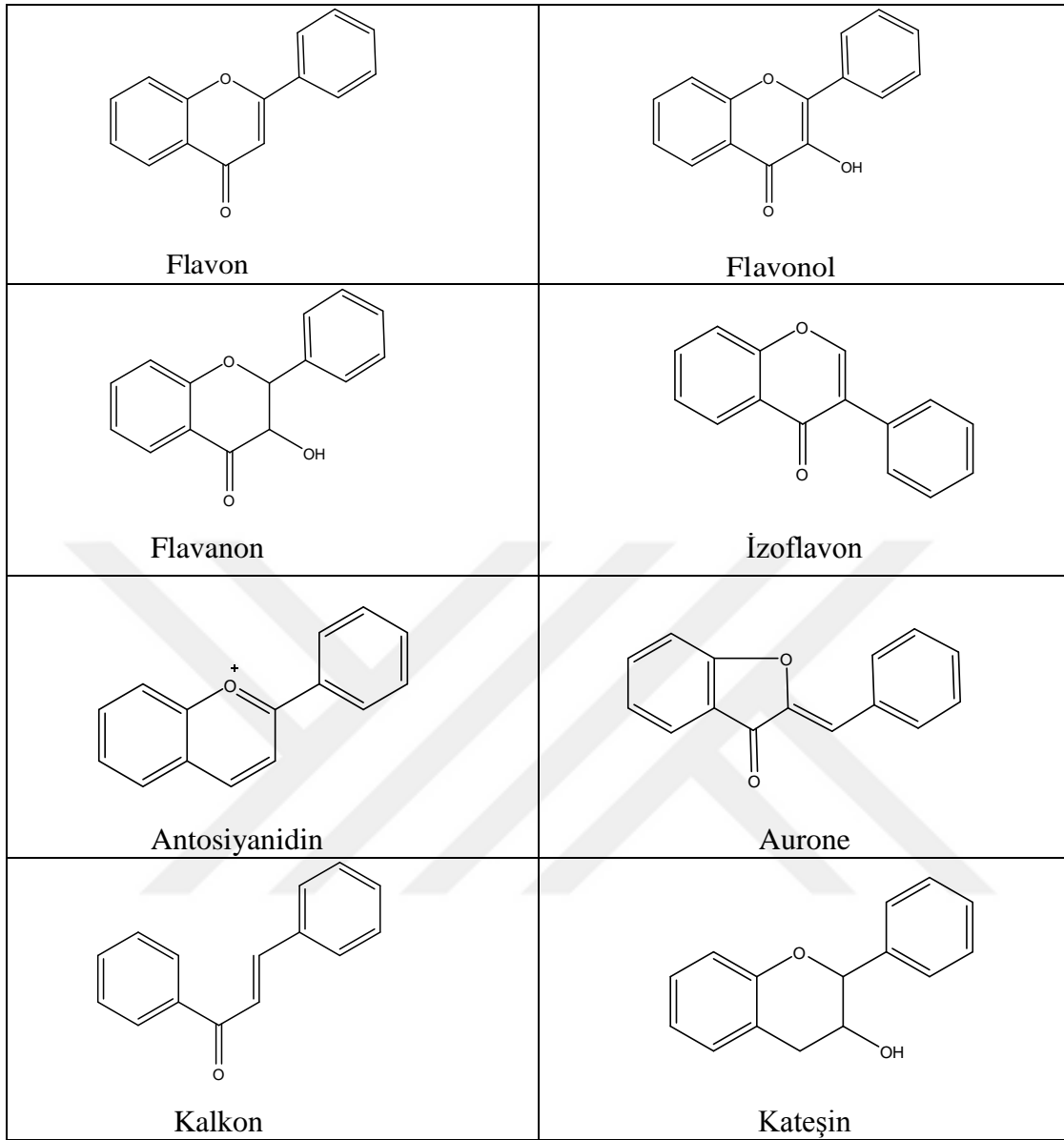
Miristisin (Myristicin)

Şekil 2.24. Lignanlar ve fenilpropenler

### 2.4.4.3 Flavonoitler

Bitki dokularında genellikle karışım halinde bulunurlar. Şimdiye kadar bitkilerden 4000' den fazla flavonoit izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır [61]. Flavonoitlerin bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi önemli özellikleri vardır [62]. Flavonoitlerin antioksidatif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiülserojen, antiviral, antimutajenik ve antikarsinojenik etki gibi çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteler gösterdikleri bilinmektedir [63]. UV ışınlarından koruma özelliklerine sahip olmaları sebebiyle kozmetik ürünlerde kullanılmaktadırlar.

Flavonoitler çok geniş bir grup olup çok sayıda sınıfa ayrılmaktadır. Farklı iskelet yapısına sahip flavonoitler Şekil 2.25' de gösterilmiştir:



Şekil 2.25. Flavonoit iskeletleri

## 2.5 Antioksidanlar

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan ve besinlerin oksijen kullanarak enerjiye dönüşümü sırasında meydana gelen reaktif moleküllerdir. Bu tip moleküller eşleşmemiş elektronları olmasından dolayı oldukça reaktiftirler. Serbest radikaller herhangi bir etkileşime girerek elektron alır veya verirler. Bu nedenle pozitif, negatif veya nötral olabilirler. Reaktif oksijen türevi serbest radikaller proteinlere, lipitlere, karbohidratlara ve DNA gibi hücre bileşenlerine zarar verebilirler.

Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, radikal oluşumunu sınırlandırması, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu moleküller ise antioksidanlardır. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve çeşitli antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik oksidatif stres olarak tanımlanır [64].

Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbohidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluştururlar [65]. Bu durum “Oksidatif Stres” olarak ifade edilir [66]. Oksidatif stres; yaşlanma, kanser, kalp hastalıkları, diyabet ve diyabetin komplikasyonları başta olmak üzere pek çok patolojik tablonun ve de yaşlanmanın patogenezi ile yakın ilişkiindedir [67]. Serbest radikaller, oksijen molekülleri yaşam için vazgeçilmez olmakla birlikte, metabolizma sırasında serbest radikal kaynağı olarak bilinen ve son derece reaktif olan ara ürünler oluşur.

Reaktif oksijen ve azot türleri oksidatif stresin sorumluları olup, radikalik ve radikalik olmayan türleri içermektedir [68]. Radikalik oksijen türlerine, süperoksit anyon ( $O_2^-$ ), hidroksil ( $OH^\cdot$ ), peroksit ( $HOO^\cdot$ ) ve alkoksi ( $RO^\cdot$ ) radikalleri; azot türlerine, azot monoksit ( $NO^\cdot$ ) radikalleri örnektir. Radikalik olmayan oksijen türlerine ise, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ), ozon ( $O_3$ ) ve singlet oksijen ( $O_2$ ); azot türlerine ise, nitroz asit ( $HNO_2$ ), nitrozil katyonu ( $NO^+$ ) ve nitroksi anyonu ( $NO^-$ ) örnek gösterilebilir [69]. Bu radikallerin yanı sıra tiyol radikalleri ( $RS^\cdot$ ) ve karbon merkezli radikaller de bulunmaktadır [70].

**Çizelge 2.3.** Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen ve azot türleri [65]

Reaktif Türler	Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit	$H_2O_2$
	Hidroksi	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
	Peroksi	$ROO^{\cdot}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
	Alkoksi	$RO^{\cdot}$	Ozon	$O_3$
	Hidroperoksi	$HOO^{\cdot}$	Singlet oksijen	$^1\Delta_g \ ^1O_2$
Reaktif Azot Türleri (RNS)	Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Nitröz asit	$HNO_2$
	Azot dioksit	$NOO^{\cdot}$	Nitrozil katyonu	$NO^+$
			Nitroksi anyonu	$NO^{\cdot -}$
			Diazot tetraoksit	$N_2O_4$
			Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot}$
			Peroksinitröz asit	$ONOOH$
			Nitronyum katyonu	$NO_2^+$
			Alkiperoksit nitritler	$ROONO$

Antioksidanlar insan vücudunda reaktif oksijen çeşitlerinin verebileceği zararları yok ederler ya da azaltırlar [71]. Antioksidan içeriği zengin olan sebze ve meyvelerin tüketilmesi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu doku hasarına bağlı hastalıklardan insanları korumaktadır [72-73]. Günümüzde işlenmiş gıdaların bozunmasını önlediği ve raf ömrünü uzattığı için gıdalarda katkı maddesi olarak sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol), BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (*t*-bütillhidrokinon) en fazla kullanılan sentetik antioksidan maddelerdir. Bununla beraber sentetik antioksidanlar ve meydana gelen yan ürünlerin çeşitli kanser hastalıklarına neden oldukları belirlenmiştir [74-75]. Tüketiciler bunların sağlık açısından güvenilirlikleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadırlar. Örneğin BHT non-toksik olmasına rağmen, karaciğerde CYP-450 enzim sistemine zarar verdiğine dair çalışmalar mevcuttur. Farelere yüksek dozlarda verildiğinde karaciğerde hasara sebep olduğu görülmüştür. Bazı araştırmalar BHT gibi bazı sentetik antioksidanların fazla alınması durumunda vücuttan atılmadığı ve adipoz dokuda depolandığını göstermiştir [76]. Bu sebeple doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidanların bulunması için yapılan araştırmalar giderek önemli hale gelmiş ve bu alanda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. Ticari amaçla kullanılan en önemli doğal antioksidanlar askorbik asit ve tokoferollerdir. Karotenoitler, fenolik bileşikler,

flavonoitler, amino asitler ve enzimatik antioksidanlar (glukoz oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz) diğer doğal antioksidan kaynaklarıdır [77].

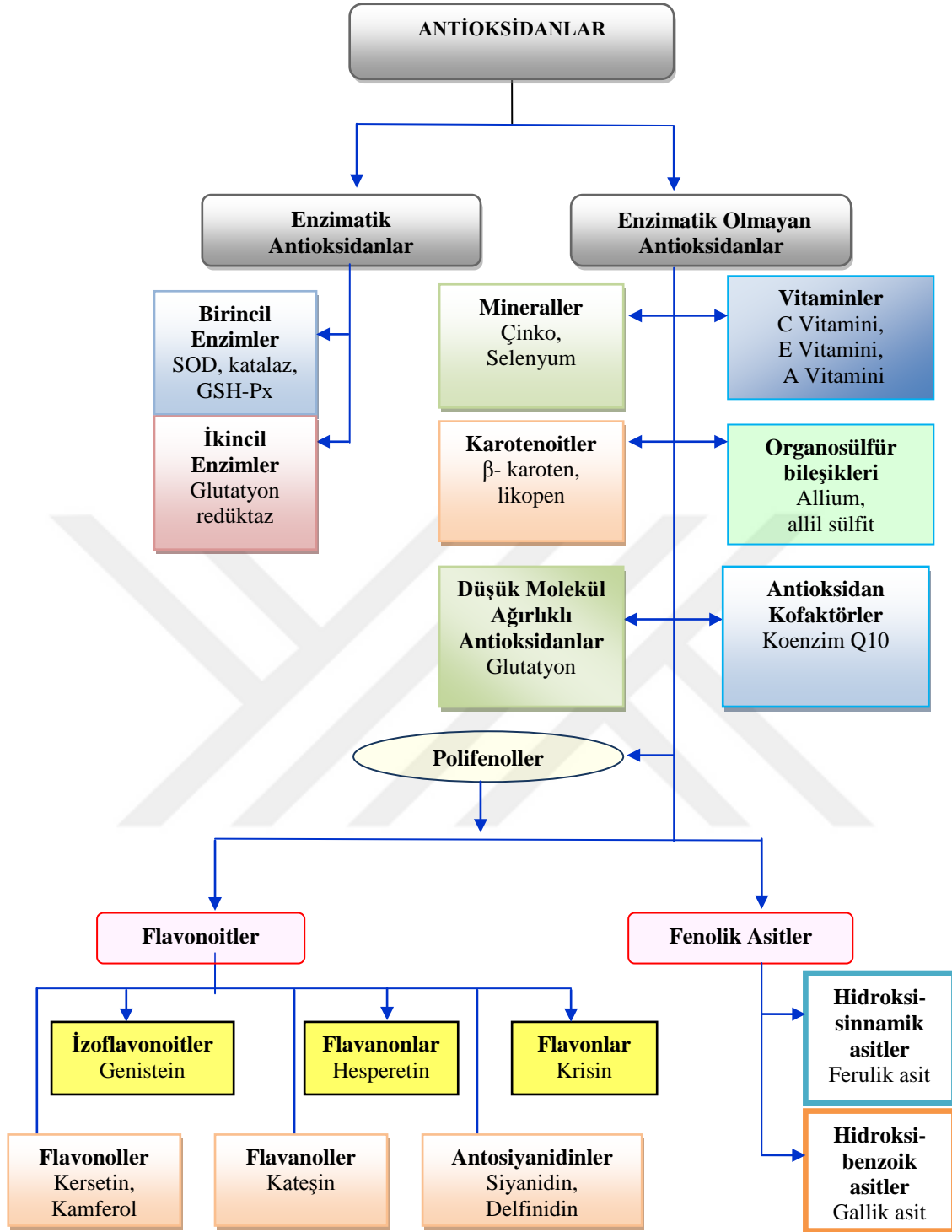
Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında doğal olarak meydana gelmektedir; fenoller, flavonoitler, karotenoitler, vitaminler, glutasyon ve endojen metabolitleri içerirler. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı, singlet ve triplet oksijen söndürücüsü, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon görürler [78]. Sebze ve meyveler de birçok antioksidan içerirler. Doğal antioksidan bileşikler; sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır [79]. Bu nedenle bol miktarda sebze ve meyve tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azalttığı gibi, kanserde ve ölüm oranında düşüş meydana getirdiği belirtilmiştir. En önemli doğal antioksidanlar arasında tokoferoller, karotenoidler, askorbik asit ve skualen sayılabilir. Askorbik asit, bitkilerde ve bazı memelilerin karaciğerinde glukozdan sentezlenir, bazı enzimlerde kofaktör olarak görev yapar. Bunlardan en önemlisi, kollagenin biyosentezinde yer alan prolinin hidroksiproline enzimatik hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarına katılmasıdır. Askorbik asitin en önemli özelliği indirgeyici bir molekül olmasıdır. Askorbik asit  $Fe^{3+}$ 'ü  $Fe^{2+}$ 'ye indirgeyebilir. *In vivo* olarak indirgeyici özelliğinden dolayı, bazı organik radikallerin söndürülmesinde de önemli rolü vardır. Askorbik asit dopamin- $\beta$ -hidroksilaz aktivitesi için de gereklidir.

Flavonoitler fenolik yapılarından dolayı antioksidan özellik göstermektedirler, etkin bir şekilde hücreleri ve dokuları reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerinden korurlar.

### **2.5.1 Antioksidanların Sınıflandırılması**

Antioksidanların gıdalarda ve biyolojik yapılarda bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan çeşitleri Şekil 2.26 gibi sınıflandırılırlar:





Şekil 2.26. Antioksidanların Sınıflandırılması

## 2.5.2 Antioksidanların Etki Mekanizmaları

Antioksidanlar dört farklı şekilde etki ederler:

- 1) Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma ya da daha az reaktif yeni bir moleküle çevirme “toplayıcı” etkidir. Antioksidan enzimler (SOD, katalaz) bu şekilde fonksiyon gösterirler.
- 2) Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme “bastırıcı” etkidir. Askorbik asit (C Vitamini),  $\alpha$ - tokoferol (E Vitamini), flavonoidler (kersetin, kateşin vb.) bastırıcı etkiye sahiptirler.
- 3) Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki “zincir kırıcı” olarak adlandırılır. Hemoglobinin, albumin gibi bileşiklerin etki mekanizmaları bu şekildedir.
- 4) Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması “onarıcı” etkidir.

Antioksidanlar yükseltgenen maddeler olduğu için zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir süre yükseltgenen maddeyi koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam edecektir.

Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, yani hidrojen veya elektron donör olarak indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile açıklanır [75]. Bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır:

- ◆ Hidrojen veya elektron donör olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- ◆ Radikal süpürme yeteneği
- ◆ Metal kelatlama potansiyeli
- ◆ Diğer antioksidanlarla olan iletişim şekli

## 2.5.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivite tayininde kullanılan yöntemler ise ikiye ayrılır:

1. Elektron transferine dayanan yöntemler
2. Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler

### 2.5.3.1 Elektron transferine dayanan yöntemler

Antioksidan maddenin ölçümü oksidan maddenin indirgenmesi sonucu oluşan rengin değişiminin ölçülmesi ile yapılır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan madde konsantrasyonuna bağlıdır [77].

Elektron transferine dayanan yöntemler:

- ◆DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi
- ◆FRAP -ferric reducing antioxidant power- (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) yöntemi
- ◆CUPRAC -cupric reducing antioxidant capacity- (Bakır II iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi
- ◆TEAC/ABTS -Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi

### 2.5.3.2 Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler

Antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı reaksiyonlar oluşur. Azotlu grup taşıyan maddelerin bozunup peroksil radikalleri oluşumu esasına dayanır [77].

Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler:

- ◆Düşük dansiteli lipoprotein otooksidasyonunun neden olduğu inhibisyon
- ◆Oksijen radikali absorban kapasitesi (ORAC)
- ◆Toplam radikal tutma parametresi (TRAP)
- ◆Luminol yöntemi
- ◆DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi
- ◆Fikoeritrin (PE) esaslı yöntemler
- ◆Krosin yöntemi
- ◆TOSC (Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi) yöntemi

Ayrıca toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarlarını belirlemek amacıyla kullanılan yöntemlerde antioksidan aktivite tayin yöntemleri arasında kabul edilmektedir:

- ◆Folin Ciocalteu yöntemi [80].
- ◆Alüminyum nitrat [81].

## 2.6 Alzheimer Hastalığı ve Nedenleri

Alzheimer hastalığı ilk kez 1906'da Alman psikiyatrist Aloist Alzheimer tarafından düşünce kontrolü, beynin hafıza ve konuşma yetisi gibi fonksiyonların yer aldığı bölümde, karmaşık mesajları milyonlarca sinir hücresi arasında taşıyan kimyasalların (nörotransmitter) düzeyinin azalması ve sinir hücrelerinin yok olması ile, normal düşünce ve hafıza yetilerinin kaybolduğu bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Alzheimer hastalığının ortaya çıkışına dair ilk belirti genellikle hafıza kaybıdır. Hastalık daha sonra beynin öğrenme, bilgiyi değerlendirme, mantıklı hale getirme ve diğer fonksiyonlarını da etkileyerek ilerleme gösterir [82]. Alzheimer hastalığı; dejeneratif, nörolojik bir hastalık olup amiloid  $\beta$  protein içeren senile plaklarının oluşumu ve kolinerjik nöromedyatörlerin kaybolması olarak açıklanır[83]. Alzheimer hastalığı olan kişilerde yapılan otopsilerin sonucuna göre; bu hastalarda karakteristik plak ve düğüm oluşumunun yanında mitokondrial işlev bozukluğu, iltihaplanma, astroglıyoz, mikroglıyal aktiflenme, sinaptik hasar, nöron tahribatı ve apoptosis bulgularına da rastlanmıştır [84]. Başlangıçta bu hafıza kaybını yaşlılıkla birlikte gelişen unutkanlıktan ayırmak güç olabilir. Bununla beraber unutkanlığı olanlar bu durumun farkındadır ve günlük yaşam aktiviteleri minimal düzeyde etkilenir [85]. Yeni bilgilerin çabuk unutulması, yakın geçmişi hatırlarken zorlanmak ya da hatırlayamamak, buna karşılık uzak geçmişi çok iyi hatırlamak belirgin bir özelliktir. Alzheimer hastalarında konuşma bozukluğu sıkça rastlanır, cümle kurarken zorlanırlar. Hastalık ilerledikçe bellek problemleri artar. Zamanla özel bakım işleri bozulur ve hasta yatağa bağımlı kalır [85-86].

Alzheimer hastalarında beynin neokorteks ve hipokampus gibi yüksek mental fonksiyonlarından sorumlu bölgelerinde beyin hücreleri üzerinde patolojik küremsi protein birikintileri (plak) veya liflerin (fibriller) oluştuğu tespit edilmiştir. Bu artık madde yığılmasına beta-A4 proteini (42 aminoasitten oluşur) ve APP proteininin (amyloid precursor protein) sebep olduğu belirtilmiştir. Beyindeki beta-A4 ve APP proteinleri "amiloidler" olarak adlandırılmaktadır. Amiloidler beyin hücreleri arasındaki haberleşmeyi engelleyerek beyin hücrelerinin zamanla ölmesine neden olurlar [87].

APP, sağlıklı nöronlar tarafından üretilmekte olup normal proteinlerdir. APP'nin tanımlanmasıyla vücudumuzun en az üç çeşit enzim ürettiği ortaya çıkmıştır. Bunlar alfa, beta ve gama salgıları olarak adlandırılır. Alfadan farklı olarak beta ve gama enzimleri beraber hareket ederek, adına beta amiloid (A-beta) denilen daha kısa daha yapışkan bir protein

üretirler. Beta amiloidler nöronların etrafındaki sıvının içinde birikerek plakalar oluştururlar [87].

Alzheimer hastalarında beta amiloid (A-beta) üretimi sağlıklı bir birey ile aynı olup sorun beta amiloidlerin dışarı atılmasında yaşanmaktadır. Normalde beta amiloidler hücrenin dışına çıktığı zaman erir, ancak bazen erimesi mümkün olmayan ve adına “fibril” denilen birikintiler oluştururlar [88]. Bu fibriller birbirine yapışarak plakaları meydana getirir. Her insan yaşlandıkça plaka üretmektedir. Gerçek sorun bu plakaların iltihaplanma ile sonuçlanan reaksiyonları tetiklemesidir. Beyin enfeksiyonlarla savaşırken serbest radikal denilen toksik ajanlar üretmektedir. Bu fibriller de benzer reaksiyonlara zemin hazırlarlar [87].

Oksidatif stresin hücre tahribatıyla sonuçlanan biyomoleküllerin oksitlenmesine neden olduğu bilinmektedir [83]. Toksik beta amiloidlerin yavaş yavaş birikimi, sürekli oksidatif stres ve benzeri olaylarla birleştiğinde nöronlarda yapısal bozukluk oluşumuna sebep olmaktadır. Bu süreç; fonksiyonel aksaklıklara, kavramsal ve davranışsal bozukluklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Beyindeki beta amiloid birikimini hızlandıran patofizyolojik durumlar Alzheimer riskini arttırmaktadır [85].

Sonuç olarak; oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk basamaklarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynamaktadır [87].

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

1) Asetilkolin nörotransmitter: Dokulardaki bilgiyi ve ya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolin esteraz isimli enzim tarafından parçalanır. Bir sonraki bilgi aktarımı için yeniden asetilkolin üretilmelidir. Alzheimer hastalarında yeterince asetilkolin üretilmemektedir. Asetilkolini parçalamakla görevli olan asetilkolinesteraz enziminin frenlenmesi ile Alzheimer hastalığının ilerlemeyeceği düşünülmektedir [89].

2) Glutamat nörotransmitter: Sinir hücrelerinde % 70 oranında bulunmaktadır. Görevi; öğrenme ve hafıza ile ilgilidir. Alzheimer hastalarında glutamat çok aşırı şekilde salgılanmakta ve bu durum sinir hücrelerinin tahrip olmasına sebep olmaktadır. Glutamat salgılanması frenlenirse sinir hücrelerinin ölümünün yavaşlayacağı ve Alzheimer hastasının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği düşünülmektedir [89].

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 engellemeye yardımcı olmaktadır [85].

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri ise öğrenme ve bellek fonksiyonları açısından önem taşıyan bir transmitter olan glutat'ı düzenleyici etki gösterirler [85].

Alzheimer hastalarında karşılaşılan en önemli biyokimyasal değişiklik hipokampus ve beyin korteksindeki asetilkolin (ACh) seviyesinin azalmasıdır. Alzheimer hastalığının tedavisi için asetilkolinin hidrolizinden sorumlu olan asetilkolinesteraz enziminin (AChE) inhibisyonu yöntemi en çok kabul gören yaklaşımdır [85]. Bu yaklaşım göz önünde bulundurularak anti-Alzheimer aktivite testleri asetilkolinesteraz ve butirikolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu odaklı gerçekleştirilmiştir.

Anti-Alzheimer aktivite testlerinde Ellman metodu kullanılmaktadır.

### **2.6.1 AChE ve BChE**

Vücutta asetilkolinesteraz (AChE) ve butirikolinesteraz (BChE) olmak üzere iki tane kolinesteraz enzimi vardır [85]. Normal erişkin beyinde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır [90]. Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, butirikolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferik sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır [85]. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE, geriye kalan %20'sinden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir. AChE'nin kolinerjik iletimdeki rolü oldukça iyi bilinmekle beraber BChE'nin rolü yeterince anlaşılamamıştır. Normal beyinde sinaptik asetilkolin hidrolizinin esas olarak AChE tarafından yapıldığı, BChE'nin buna çok az katkısının olduğu kabul edildiğinden [85], bu çalışmada Ellman metodu ile gerçekleştirilen antikolinesteraz aktivite testleri; hem asetilkolinesteraz hem de butirikolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu incelenerek gerçekleştirilmiştir.

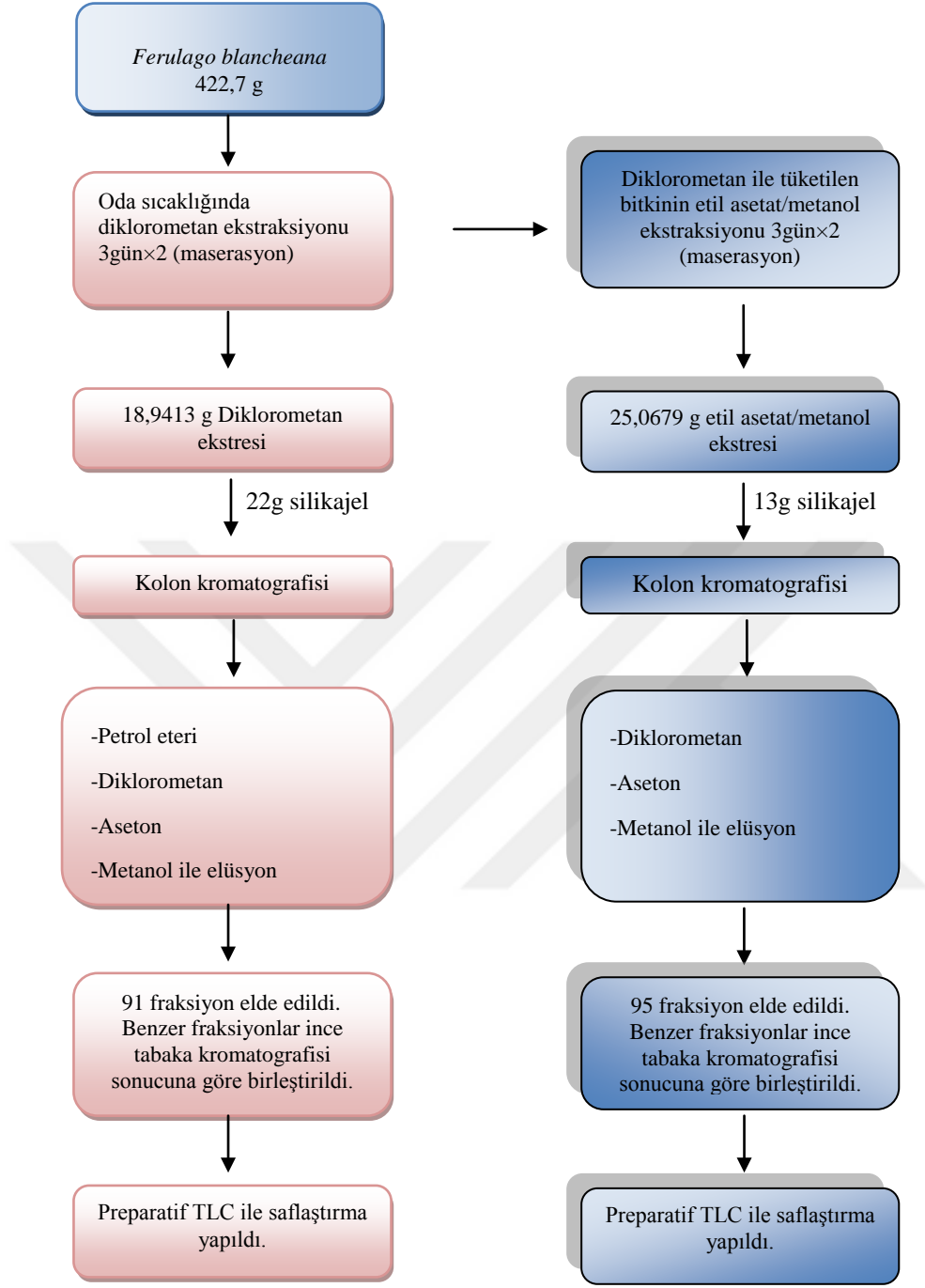
### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

#### **3.1 Bitkisel Materyal**

*Ferulago blanchiana* Post C6 Kahramanmaraş, Başkonuş yaylası yangın kulesi çevresi, 1800 metre'den, 06.07.2011 tarihinde, Serpil Demirci & Tuba Kuşman tarafından toplandı ve Prof. Dr. Emine Akalın tarafından teşhis edildi (Herbaryum No: ISTE 97800).

#### **3.2 Ekstrelerin Hazırlanışı**

Bitkinin toprak üstü kısmı gölgede kurutulduktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan *Ferulago blanchiana*'nın (422,7 g) öncelikle oda sıcaklığında diklorometan ile ekstraksiyonu (3gün×2) yapıldı. Daha sonra diklorometan ile tüketilen bitkilerin oda sıcaklığında etil asetat/metanol ekstraksiyonu (3gün×2) yapıldı. Rotaevaporatörde çözücüleri uçurulduktan sonra ekstreler elde edildi.



**Şekil 3.1.** *Ferulago blancheana* bitkisinin diklorometan ve etil asetat/metanol ekstratlarının hazırlanması ve fraksiyonlandırılması



### 3.3 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

#### 3.3.1 Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

- Merck 1.07734.1000 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm)
- Merck 1.05554.0001 TLC Silica gel 60 F<sub>254</sub>
- Sigma-Aldrich metanol
- Sigma-Aldrich aseton
- Sigma-Aldrich etanol
- Sigma-Aldrich etil asetat
- Merck petrol eteri
- Riedel-de Haen diklorometan
- Riedel-de Haen kloroform
- Aldrich Chemistry Serium (IV) sülfat
- Sigma-Aldrich DTNB(5,5'-Dithiobis (2-Nitro-benzoik asit))
- Sigma-Aldrich Folin Ciocalteu reaktifi
- Sigma-Aldrich  $\alpha$ -Tokoferol
- Merck BHT (Bütillenmişhidroksi toluen)
- Fluka BHA (Bütillenmişhidroksi anisol)
- Sigma-Aldrich  $\beta$ - karoten
- Sigma-Aldrich Tween-40
- Sigma-Aldrich Linoleik asit
- Sigma-Aldrich pirokatekol
- Sigma-Aldrich Kersetin
- Riedel-de Haen sodyum karbonat
- Merck sodyumbikarbonat
- Carlo Erba alüminyum nitrat nonahidrat
- Merck potasyum asetat(susuz)
- Sigma-Aldrich DPPH(2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil)
- Sigma-Aldrich asetiltiyokolin iyodür
- Sigma-Aldrich butiriltiyokolin iyodür
- Sigma-Aldrich asetilkolinesteraz
- Sigma-Aldrich butirilkolinesteraz
- Sigma-Aldrich sodyum bifosfat dihidrat
- Sigma-Aldrich sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
- Sigma-Aldrich galantamin hidrobromür

### 3.3.2 Çözeltilerin Hazırlanması

#### 3.3.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler

**% 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması:** 1 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mL'lik balon jojeye koyuldu, deiyonize su ile çözüldükten sonra yine deiyonize su ile hacmine tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + CuSO<sub>4</sub>): Satın alındığı şekliyle kullanılmıştır.

#### 3.3.2.2 Toplam flavonoit miktar tayininde kullanılan çözeltiler

**% 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması:** 1,76 g Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.9H<sub>2</sub>O 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözülerek balonun hacmine tamamlandı. Böylece %10'luk alüminyum nitrat çözeltisi hazırlandı.

**1 M Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması:** 0,98150 g CH<sub>3</sub>COOK 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

#### 3.3.2.3 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

**0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması:** 4 mg DPPH tartılarak 100 mL etil alkolde çözülerek hazırlanmıştır.

**0,1 mM  $\beta$ -Karoten çözeltisinin hazırlanması:** 0,2 mg  $\beta$ -karoten 1 mL kloroformda çözüldü. 20  $\mu$ g linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform rotaevaporatörde uçurulduktan sonra 50 mL oksijen gazı ile doyurulmuş destile su ilave edilerek kuvvetlice karıştırıldı.

#### 3.3.2.4 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

**0,1 M H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> Çözeltisinin Hazırlanması:** 1,56 g H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup> tartılıp, 100 mL distile suda çözüldü.

**0,1 M HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup> Çözeltisinin Hazırlanması:** 3,556 g H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> tartılıp, 200 mL distile suda çözüldü.

**0,1 M pH=8 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması:** 94,7 mL HPO<sub>4</sub><sup>-</sup> ve 5,3 mL H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 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 karıştırılır. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlanır. Kullanma aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi.

**AcI:** 32,8 mg AcI alınarak, 8 mL deiyonize su eklendikten sonra kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

**BuI:** 4 mg BuI alınarak, 8 mL deiyonize su eklendikten sonra kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

**AChE Enzimleri:** 1,17 mg (498,3498 U) AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözülerek ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrıldı. Böylece her biri için 99,66996 U/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu. 1 mL'lik stoklarda 125  $\mu\text{L}$ 'lik 8 eşit bölüme ayrıldı. Her bir 125  $\mu\text{L}$ 'lik örnekte 0,02925 mg enzim bulunur. 125  $\mu\text{L}$ 'lik enzim çözeltisine 460  $\mu\text{L}$  pH=8 tampon çözeltisi eklendi (0,021297 U/ $\mu\text{L}$ ). Toplamda 585  $\mu\text{L}$  olan çözelti 25  $\mu\text{L}$ 'lik 23 küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 2150  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandı ( $2,476 \times 10^{-4}$  U/ $\mu\text{L}$ ).

**BChE Enzimleri:** 1 mg (11,4 U) BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü (2,28 U/mL). Bu çözeltilerden 300  $\mu\text{L}$ 'lik stoklar oluşturularak küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi (0,00228 U/ $\mu\text{L}$ ). Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1850  $\mu\text{L}$  pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

### 3.3.2.5 Standart çözeltilerin hazırlanması

#### a. Kersetin çözeltisinin hazırlanması

25,8 mg kersetin 25 mL etil alkolde çözülerek 1000 ppm'lik konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı.

#### b. Pirokatekol çözeltisinin hazırlanması

10 mg pirokatekol 100 mL su ile çözülerek 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı.

**c. BHT (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisinin hazırlanması**

10 mg BHT 10 mL etanol içinde çözülerek 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı.

**d. BHA (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksianisole) çözeltisinin hazırlanması**

10 mg BHA 10 mL etanol içinde çözülerek 1000 ppm'lik BHA çözeltisi hazırlandı.

**e.  $\alpha$ -Tokoferol çözeltisinin hazırlanması**

%97'lik 10,31 mg  $\alpha$ -tokoferol 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik  $\alpha$ -tokoferol çözeltisi hazırlandı.

**f. Galantamin hidrobromür çözeltisinin hazırlanması**

4 mg galantamin hidrobromür 1 mL etil alkolde çözülerek 4000 ppm'lik konsantrasyonda galantamin çözeltisi hazırlandı.

**3.3.2.6 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 püskürteç kullanılarak püskürtüldü.

**3.4 Cihazlar ve Gereçler**

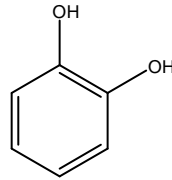
- Eliza Reader Molecular Devices Spectro Max340 PC
- Hassas terazi (Ohaus Adventurer-Pro)
- Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı (IKA RCT basic hot plate)
- Etüv (Ecocell)
- pH-metre (WTW Inolab pH 720)
- Vortex IKA MS3 basic
- UV kabin ve lamba (Camag)
- Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı (NMR): Saf bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR analizleri 600 MHz ve 400 MHz, <sup>13</sup>C NMR analizleri 150 MHz ve 100 MHz Varian ID-6508 invers problu NMR spektrometrelerinde yapılmıştır.
- Döner Buharlaştırıcı (Rota Evaporatör, Büchi ve Heidolph)
- Ultrasonik Banyo (Fisher Scientific FB 15051)
- Otomatik tekli ve çoklu pipetler (0,5-10  $\mu$ L, 20–200  $\mu$ L, 100–1000  $\mu$ L, 1000–5000  $\mu$ L) (Eppendorf) , •Azot Tüpü

### 3.5 Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçerik Miktar Tayinleri

#### 3.5.1 Toplam Fenolik Miktar Tayini

Numunelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak standart olan pirokatekole eşdeğer olarak belirlenmektedir. Toplam fenolik ayırıcı olarak bilinen Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) bazlı yöntem, örneğin indirgeme kapasitesini ölçmektedir. FC reaktifi sadece fenolik bileşenleri değil, birçok fenolik yapıda olmayan bileşenleri de indirgeme yeteneği vardır [88]. Bu yöntemde kullanılan  $\text{CuSO}_4$  (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfo molibdik fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla  $\text{Cu(II)}$ 'nin reaksiyonundan açığa çıkan  $\text{Cu(I)}$  olasılıkla molibdatotungstat ayırıcını heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlandınc 750 nm'de örnek absorbanları ölçülür.

3 mg olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlandı. 1000 ppm olarak hazırlanan pirokatekol çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150,175 $\mu\text{L}$  alınarak hacimleri etanolle 200  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlandı. Hazırlanan bu karışımlara su, FCR reaktifi ve 3 dk sonra %2'lik  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı ve örneklerin absorbanları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

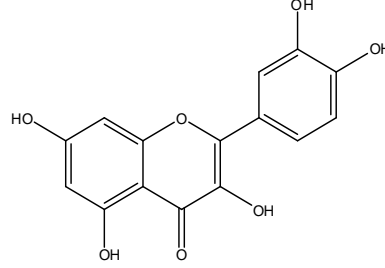


Pirokatekol

Şekil 3.2. Standart olan pirokatekol bileşiğinin açık yapısı

### 3.5.2 Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Toplam flavonoit içeriklerinin belirlenmesi yönteminde, numunelerin toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi. Standart flavonoit bileşik olarak kersetin kullanılmaktadır.



Kersetin

Şekil 3.3. Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kersetinin açık yapısı

3 mg olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlanarak, her bir örnekten 100 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Standart olarak kullanılan 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 edilerek karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 415 nm'de absorbanları okundu.

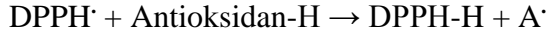
### 3.6 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

#### 3.6.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin süpürücü etkilerini ölçmeye dayanan bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Mor renkli DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla rengi mordan sarıya döner, bu yöntem antioksidanların süpürme kabiliyetlerini değerlendiren basit ve geçerli yöntemdir. Bununla beraber bazı bileşenlerin (karotenoitler) 517 nm'de DPPH ile çakışık spektrum vermesi analizin yorumunu güçleştirir. Ayrıca çoğu sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş tepkimeye girer. Bu yüzden yöntem; DPPH ile tepkimeye giren antioksidanların antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir değerlendirme vermez. Bunlara ek olarak DPPH'nin rengi; ışık,

hava oksijeni, nem ve pH'a fazla duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesi zordur. [89].

Tepkime mekanizması aşağıdaki gibidir.



DPPH serbest radikali kullanılarak bitki ekstralarının ve saf maddelerin serbest radikal giderim aktiviteleri belirlendi. 50 µg ile 500 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1'er mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\%inhibisyon)} = \left( \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100$$

$A_{\text{kontrol}}$  kontrolün absorbansı,  $A_{\text{örnek}}$  örneğin absorbansıdır.

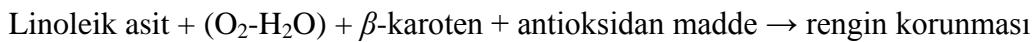
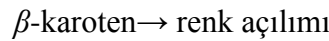
Reaksiyon karışımının düşük absorpsiyon göstermesi serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu belirtir.

### 3.6.2 $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (lipid peroksidasyon inhibisyonu aktivitesi)

Toplam antioksidan aktivite olarak da adlandırılan yöntem, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesine yöneliktir.  $\beta$ -Karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. Antioksidan maddenin varlığında oluşan bozunma ürünleri antioksidan tür tarafından temizlendiğinden veya bu tepkimenin oluşumu engellendiğinden  $\beta$ -karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.



↓



### 3.7 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemleri

#### 3.7.1 Ellman Yöntemi

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivite testleri Ellman metodu olarak bilinen spektrofotometrik yöntem esas alınarak ölçüldü. Enzim olarak elektrik balığından (*Electrophorus electricus*, Ee-AChE) elde edilen asetilkolinesteraz ve at serumundan (*Equus caballus*, Ec-BChE) elde edilen bütirilkolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetilkolin iyodür ve bütirilkolin iyodür, aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanıldı. Sırasıyla asetilkolin iyodür veya bütirilkolin iyodürün enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlendi. Kontrol olarak etanol, standart olarak ise *Galanthus* bitkisinden elde edilen alkaloid yapıda olan galantamin kullanıldı.

Antikolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\%inhibisyon = \left( \frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \right) \times 100$$

(A= Absorbans)

### 3.8 İstatistiksel Hesaplamalar

Aktivite sonuçlarında elde edilen veriler 3 paralel testin ortalama  $\pm$  standart sapması olarak verildi. Sonuçlar Student-*t* testine göre % 95 güven sınırları içinde bulundu. Konsantrasyon ile absorbanslar arasında ölçü eğrileri çizildi ve ilgili regresyon denklemleri bulundu. En küçük kareler yönteminin kullanıldığı doğrusal regresyon analizi eğim, intersept ve korelasyon katsayılarının değerlendirilmesiyle yapıldı.

### 3.9 Kromatografik Yöntemler

Maddeler karışımının bir hareketli faz yardımıyla, bir sabit faz üzerinden geçirilerek bileşenlerine ayrılması işlemi kromatografi olarak adlandırılır. Kromatografik ayırım; karışımı oluşturan bileşenlerden her birinin sabit fazda tutunma ve hareketli faz ile sürüklenme eğilimlerinin birbirinden farklı olması ilkesine dayanmaktadır. Bileşenlerin her biri



kromatografik sistemde farklı hızlarla ilerler ve birbirinden ayrılırlar. Kromatografik yöntem ilk kez 1850'li yıllarda Runge, 1890'lı yıllarda Reed ve 1900'lü yıllarda Amerikalı petrol kimyacı D. T. Day tarafından geliştirilmiş olmasına rağmen, 'kromatografinin babası' ünvanı Polonyalı botanikçi M. S. Tswett için kullanılmaktadır. Tswett 1906 yılında bir cam boru içine doldurulan adsorbanlar üzerinden bitki ekstraktlarını geçirmiş ve klorofil, ksantofil, karoten gibi pigmentlerin kolonun farklı yerlerinde renkli halkalar halinde ilerlediğini gözlemlemiştir. Bu sebeple renklerin grafiği ya da renklerin ayrılması anlamına gelen kromatografi terimi günümüze kadar kullanılagelmiştir.

Bu tez çalışması sırasında hazırlanan ekstrelerin fraksiyonlandırılması için kolon kromatografisi, benzer fraksiyonları birleştirmek ve saf madde elde etmek için ince tabaka kromatografisi teknikleri kullanılmıştır [90].

İnce tabaka kromatografisinde, alüminyum üzerine silikagel kaplı hazır plaklar (20 x 20 cm) ve cam plaklar (20 x 20 ; 20 x 10) kullanıldı. Cam plakları hazırlamada adsorban olarak Silikagel GF<sub>254</sub> kullanıldı. Ekstrelerin kolon kromatografisi ile ayrılmasıyla elde edilen fraksiyonların karşılaştırılmasında ince tabaka kromatografisi plakları kullanıldı. Maddeleri saflaştırmak için preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

### **3.9.1 Kolon Kromatografisi**

Ekstrelerin fraksiyonlandırılması ve bu fraksiyonlardan saf madde izolasyonu için kolon kromatografisinden yararlanılmıştır. Madde miktarına bağlı olarak farklı genişlik ve uzunluklarda cam kolonlar, kolon dolgu maddesi olarak silikajel (Merck 1.07734) kullanıldı. Ekstreler az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra toz kıvamına getirilen karışım dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş, ekstre miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silikajel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına dolduruldu. Bu işlem sonucunda adsorban ve üzerine doldurulan maddenin üst yüzeyinin düzgün olmasına dikkat edildi. Elüsyona (bileşiklerin kolon boyunca ilerlemesi) apolar bir çözücü olan % 100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla diklorometan, aseton ve metanol ile polarite arttırılarak elüsyona devam edildi, sonunda % 100 metanol ile elüsyon tamamlandı. Bileşiklerin renkli olması durumunda ise bu bileşikler renkli halkalar halinde kolonda gözlenip, farklı erlenlerde toplandı. Maddelerin renkli olmaması durumunda ise; bileşenleri saf halde elde edebilmek için erlen olabildiğince sık aralıklarla (100'er ml'lik erlenlerde) değiştirildi. Benzer fraksiyonlar ince

tabaka kromatografisi yardımıyla birleştirildikten sonra saflaştırma için preparatif ince tabaka kromatografisi veya daha küçük boyuttaki kolonlar (adsorban silikajel) kullanıldı.

### **3.9.2 İnce Tabaka Kromatografisi**

İnce tabaka kromatografisinde (İTK), arkası alüminyum kaplı hazır silikajel plaklardan (20 x 20 cm) (Merck 1.05554) ve cam plaklardan (20 x 20 ; 20 x 10) yararlanıldı. Cam plakları hazırlamada adsorban olarak Silikajel 60 GF254 (Merck 1.07730) kullanıldı. 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 maddeleri saflaştırmak için preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı. Önce uygun çözücü sistemleri belirlendi. Bu yöntemde içindeki bileşikleri ayrı ayrı izole etmek istediğimiz madde; plaklara başlangıç çizgisi boyunca düzgün bir şekilde tatbik edildikten sonra maddelerin ayrılmasına olanak verecek uygun polariteye sahip daha önceden belirlediğimiz çözücü sistemi belirlenerek yürütüldü. UV ışık altında birbirinden ayrılmış çizgiler halinde maddeler tespit edilerek, ayrı ayrı erlenlere alındıktan sonra uygun çözücülerle maddeler saf halde geri kazanıldı.

### **3.10 Spektroskopik Yöntemler**

#### **3.10.1 NMR Spektroskopisi**

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, APT, spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform ( $\text{CDCl}_3$ ), döterometanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) kullanıldı. Saf bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR analizleri 600 MHz ve 400 MHz,  $^{13}\text{C}$  NMR analizleri 150 MHz ve 100 MHz Varian ID-6508 invers problu NMR spektrometrelerinde UME-TÜBİTAK'ta yapılmıştır.

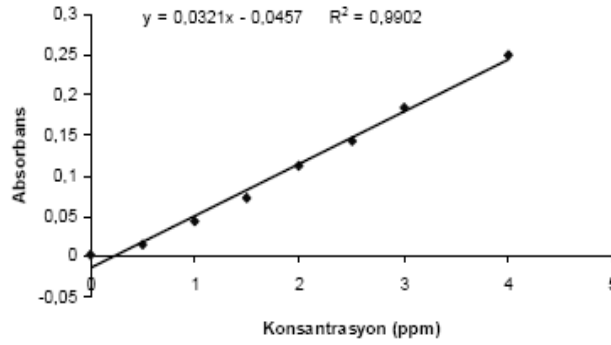
## 4. DENEYSEL BÖLÜM

### 4.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi

#### 4.1.1 Toplam Fenolik Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi [80]. 3 mg olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik 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 absorbansları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

$$\text{Absorbans} = 0,0148 \text{ pirokatekol } (\mu\text{g}) + 0,0225 \quad (R^2 = 0,9953)$$



Şekil 4.1. Pirokatekolün ölçü grafiği

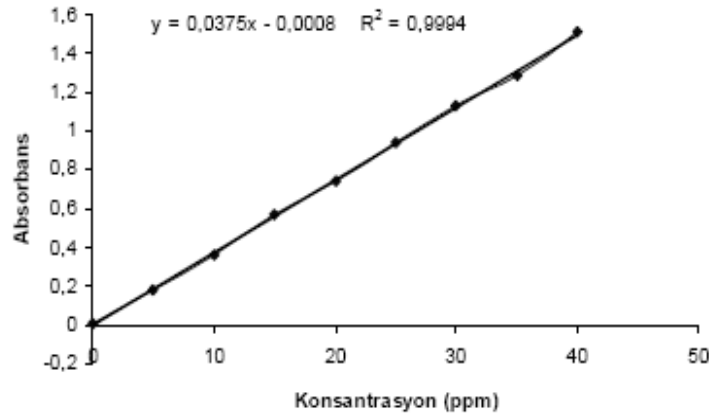
#### 4.1.2 Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi [81]. Örneklerden 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

çözeltilisinden ilave edildi. Karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm’de absorbansları okundu.

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

$$\text{Absorbans} = 0,1574 \text{ kersetin } (\mu\text{g}) - 0,1239 \quad (R^2 = 0,9968)$$



Şekil 4.2. Kersetinin ölçü grafiği

## 4.2 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

### 4.2.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi

Antioksidanlar radikallere proton vererek absorpsiyonu azaltırlar. Ekstreler, fraksiyonlar ve saf maddelerin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 517 nm’de karakteristik absorpsiyonu olan kararlı serbest bir radikaldir. DPPH’ın 517 nm’deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlendi. Örneklerin 50 µg ile 500 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm’de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\%inhibisyon)} = \left( \frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \right) \times 100$$

$A_{kontrol}$  kontrolün absorbansı,  $A_{örnek}$  örneğin absorbansı

#### 4.2.2 Lipid Peroksidasyon İnhibisyonu Aktivitesinin Belirlenmesi

Toplam antioksidan aktivite olarak da adlandırılan bu yöntemde, standart olarak kullanılan  $\alpha$ -Toc, BHT, BHA kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$  olacak şekilde, 4 mL  $\beta$ -karoten çözeltisi ilave edildi. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez 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 dk) inkübasyona devam edildi. Absorbans yine 490 nm'de ölçüldü.  $\beta$ -Karoten renk açılım oranı (R), aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t}$$

ln: doğal logaritma,  $a$ : başlangıç absorbansı,  $b$ : inkübasyondan sonraki absorbans,  $t$ : inkübasyon süresi (dk).

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

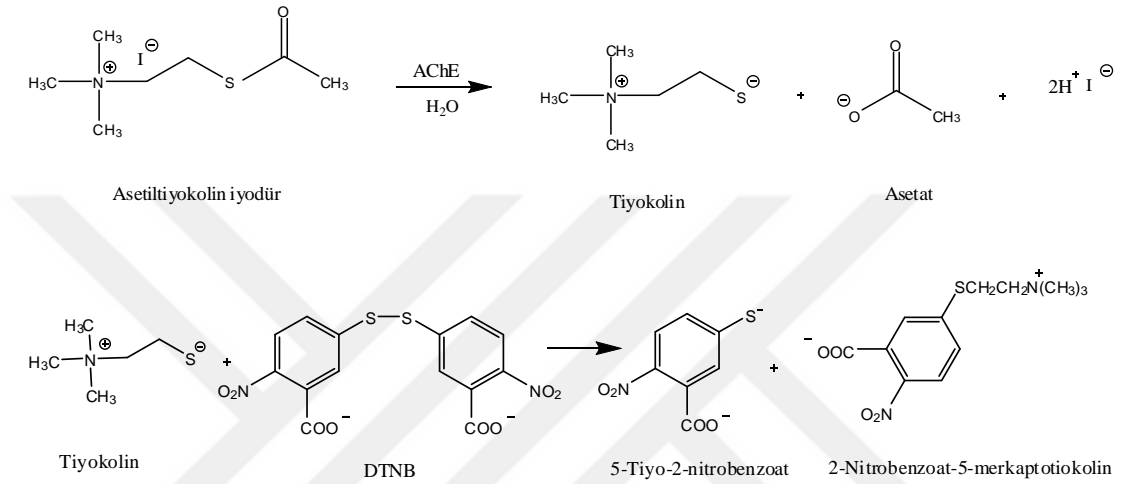
$$\text{AA (\% inhibisyon)} = \left( \frac{R_{kontrol} - R_{örnek}}{R_{kontrol}} \right) \times 100$$

$R_{kontrol}$  kontrolün renginin açılma hızı ve  $R_{örnek}$  örneğin renginin açılma hızıdır.

### 4.3 Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi

#### 4.3.1 AChE Aktivite Testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Reaksiyon şematik olarak Şekil 4.3' te gösterilmektedir:



Şekil 4.3. Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması

Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmektedir.

#### Reaktiflerin Hazırlanışı

- 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.
- Substrat: 32,8 mg asetilkolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.
- Enzim Çözeltisi: 0,2 mg asetilkolinesteraz enzimi 3 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözülerek hazırlandı.

#### 4.3.2 AChE % İnhibisyon Testi

- Mikroplakadaki kuyucuklara 130  $\mu$ L fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10  $\mu$ L ve enzim çözeltilisinden 20  $\mu$ L konuldu.
- Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi.
- 10 dakika sonra 20  $\mu$ L DTNB reaktifi ve substrat (20  $\mu$ L) her bir kuyucuğa ilave edildi.
- Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorban okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanlardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.
- Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM dan 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak IC<sub>50</sub> değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

#### 4.3.3 BChE Aktivite Testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak butirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanılmaktadır.

#### Reaktiflerin Hazırlanışı

- 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.
- Substrat: 4 mg butirilkolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.
- Enzim Çözeltilisi: 0,2 mg butirilkolinesteraz enzimi 1,8 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözülerek hazırlandı.

#### 4.3.4 BChE % İnhibisyon Testi

- 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 substrat (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.
- Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak IC<sub>50</sub> değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

#### 4.4 *Ferulago blanchiana* Bitkisinin İzolasyon ve Saflaştırma Çalışmaları

##### 4.4.1 *Ferulago blanchiana* Bitkisinin Diklorometan Ekstresinin Fraksiyonlandırılması

*Ferulago blanchiana* bitkisinin toprak üstü kısımlarının tamamı gölgede kurutulduktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan bitki (422,7g) oda sıcaklığında üç kez diklorometan ile masere edildi. Rotaevaporatörde çözücüsü uçurulduktan sonra diklorometan ekstresi elde edildi. Elde edilen diklorometan ekstresi (18,9413g) kurutulduktan sonra silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyon sistemine apolar bir çözücü olan %100 petrol eteri ile başlanmış ve polarite belli oranda artırılarak sırasıyla diklorometan, aseton ve %100 metanole kadar devam edilerek 91 fraksiyona ulaşılmıştır. İTK sonuçlarına göre benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir.



#### **4.4.2 *Ferulago blancheana* Bitkisinin Etil Asetat/Metanol Ekstresinin Fraksiyonlandırılması**

Bitkinin diklorometan ile tüketilmesinin ardından yine üç kez etil asetat/metanol ile tüketilmesiyle elde edilen ekstre (25.0679g) adsorban maddesi silikajel olan bir kolonda fraksiyonlarına ayrıldı. Bu işlem sırasında çözücü sistemi olarak %100 diklorometan ve ardından sırasıyla artan polaritede aseton ve metanol ilave edilmiştir. Her bir çözücü sistemiyle toplamda 95 fraksiyon elde edilmiş, İTK ile kontrol edilerek benzerlik gösteren fraksiyonlar birleştirilmiştir. Bu fraksiyonlardan preparatif ince tabaka kromatografisi ve kristallendirme ile elde edilen saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.



## 5. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *Ferulago blancheana* bitkisinin toprak üstü kısımları kurutulup toz edildi ve diklorometan ile tüketilerek diklorometan ekstresi elde edildi. Tüketilen bitki bu kez etil asetat/metanol (1:1) karışımı ile tüketilerek etil asetat/metanol ekstresi elde edildi. Antioksidan aktivite tayinleri ise başlıca iki yöntem DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ve  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemleriyle incelendi. Antikolinesteraz aktivite tayinleri ise asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolin esteraz (BChE) enzimlerine karşı Ellman metodu ile yapıldı. Ayrıca tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları da sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. *Ferulago blancheana*'dan elde edilen diklorometan ve etil asetat/metanol ekstrelerinin taşıdığı sekonder metabolitler kromatografik yöntemlerle (kolon kromatografisi, İTK) izole edilerek saflaştırılan bileşiklerin yapıları NMR spektroskopisi yöntemiyle belirlendi.

### 5.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Sonuçları

Tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi.

Çizelge 5.1. Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları

Ekstreler	Toplam Fenolik Miktarı ( $\mu\text{g}$ pirokatekol eşdeğer)/mg Ekstre	Toplam Flavonoit Miktarı ( $\mu\text{g}$ quercetin eşdeğer)/mg Ekstre
<i>Ferulago blancheana</i> diklorometan ekstresi	42,98 $\pm$ 0,84	19,66 $\pm$ 0,47
<i>Ferulago blancheana</i> etil asetat/metanol ekstresi	46,4 $\pm$ 0,14	19,53 $\pm$ 0,71

### 5.2 Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

#### 5.2.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları

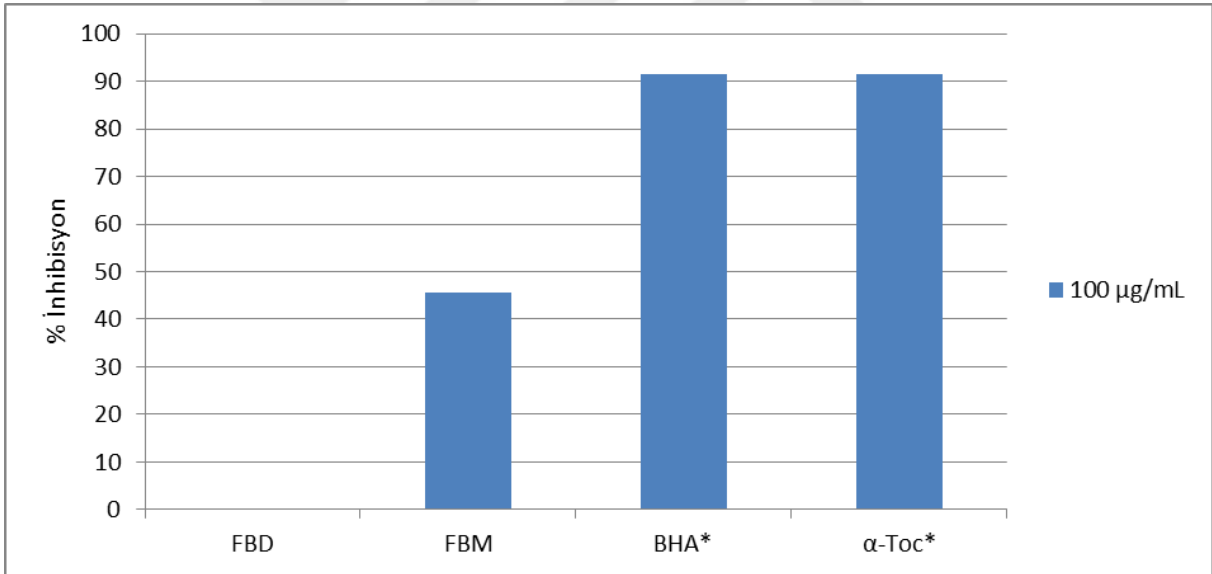
*Ferulago blancheana*'dan elde edilen diklorometan ve etil asetat/metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHT, BHA ve  $\alpha$ -tokoferole göre aktivite karşılaştırmaları

yapıldı. Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyon olarak Çizelge 5.2 de verilmiştir.

**Çizelge 5.2.** Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

Ekstreler	100 µg/mL
<i>Ferulago blancheana</i> diklorometan ekstresi	0,15 ±0,88
<i>Ferulago blancheana</i> etil asetat/metanol ekstresi	45,49 ±0,82
BHA*	91,37±0,06
α-Toc*	91,62±0,25

\*standart



**Şekil 5.1.** *Ferulago blancheana* bitkisinin Diklorometan ve Etil asetat/MeOH ekstrlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivite sonuçları

*F. blancheana* bitkisinin diklorometan ekstresi aktif değilken, etil asetat/metanol ekstresi orta derecede inhibisyon göstermiştir.

### 5.2.2 Lipid Peroksidasyon İnhibisyon ( $\beta$ -karoten renk açılım) Testi Sonuçları

*Ferulago blanchiana*'dan elde edilen diklorometan ve etil asetat/metanol ekstralarının toplam antioksidan aktiviteleri  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemine göre dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) incelendi. Antioksidan aktivite sonuçlarının karşılaştırmasında standart olarak BHT ve BHA kullanıldı.

**Çizelge 5.3.** Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları

Ekstreler	100 $\mu\text{g/mL}$
<i>Ferulago blanchiana</i> diklorometan ekstresi	-
<i>Ferulago blanchiana</i> etil asetat/metanol ekstresi	-
BHT*	91,15 $\pm$ 0,73
BHA*	99,43 $\pm$ 0,36

\*standart

Sonuç olarak her iki ekstre anlamlı lipid peroksidasyonu inhibisyonu göstermemiştir.

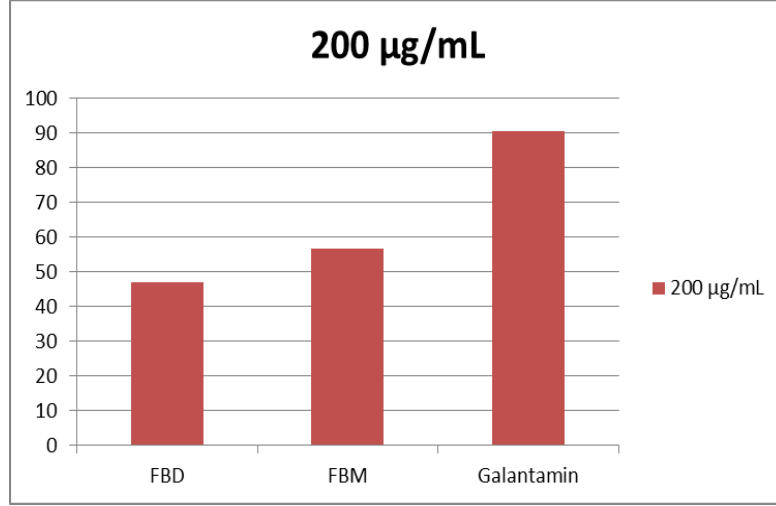
### 5.2.3 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

*F.blanchiana* bitkisinin toprak üstü diklorometan ve etil asetat/metanol ekstralarının AChE ve BChE % inhibisyon değerleri Çizelge 5.4' de verilmiştir.

**Çizelge 5.4.** Ekstrelerin asetilkolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	200 $\mu\text{g/mL}$
<i>Ferulago blanchiana</i> diklorometan ekstresi	46,9 $\pm$ 0,12
<i>Ferulago blanchiana</i> etil asetat/metanol ekstresi	56,78 $\pm$ 0,21
Galantamin*	90,7 $\pm$ 0,59

\*standart



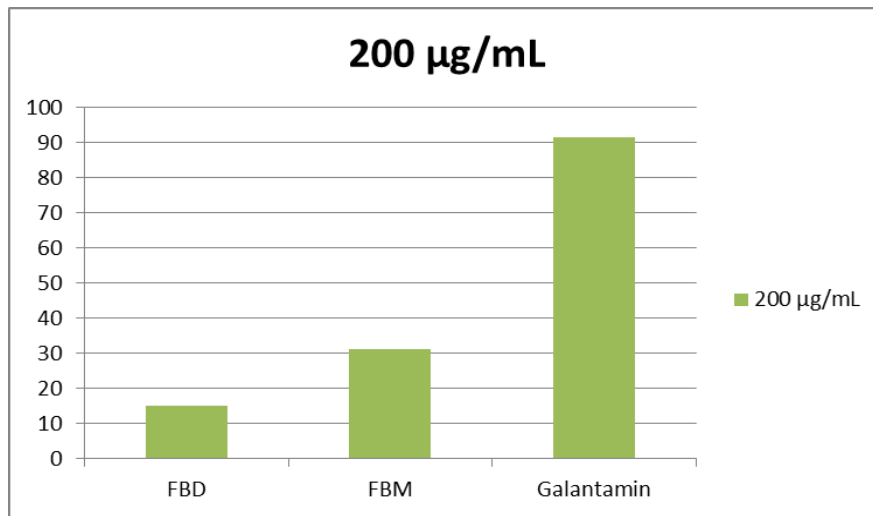
Şekil 5.2. *Ferulago blancheana* bitkisinin Diklorometan ve Etil asetat/MeOH ekstralarının asetilkolinesteraz aktiviteleri

Her iki ekstrede orta derecede asetilkolinesterazı inhibe etmiştir.

Çizelge 5.5. Ekstrelerin butirikolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	200 µg/mL
<i>Ferulago blancheana</i> diklorometan ekstresi	15,15 ± 0,23
<i>Ferulago blancheana</i> etil asetat/metanol ekstresi	31,09 ± 2,58
Galantamin*	91,59 ± 1,12

\*standart



Şekil 5.3. *Ferulago blancheana* bitkisinin Diklorometan ve Etil asetat/MeOH ekstralarının butirikolinesteraz aktiviteleri

Her iki ekstre butirilkolinesteraza karşı daha düşük olmakla birlikte, asetilkolinesteraza benzer aktivite göstermişlerdir.

### 5.3 Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri

*Ferulago blancheana*'dan izole edilen saf bileşikler aşağıda verilmektedir;

- Bergapten
- 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate
- Heraclenol
- Imperatorin
- Byakangelicin
- Isoscooletin
- Stigmasterol
- $\beta$ -Sitosterol

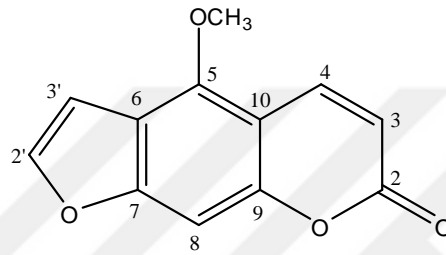
**Çizelge 5.6.** Saf bileşikler ve miktarları

Saf Bileşikler	İzole Edilen Saf Bileşik Miktarı
Bergapten	3,2 mg
8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate	2,6mg
Heraclenol	3,1mg
Imperatorin	2,3mg
Byakangelicin	3,0mg
Isoscooletin	1,9mg
Stigmasterol	7,4mg
$\beta$ -Sitosterol	3,4mg

### 5.3.1 Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri

#### 5.3.1.1 FBD 20-4-1-1 = Bergapten = 5-Metoksipsoralen

Bileşik renksiz iğne şeklinde kristaller halinde elde edilmiştir. Silikajel plakta UV ışık altında (254 nm) parlak mavi renkli olarak görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında sarı renkte gözlendi. Kumarinlerin UV ışık altında parlak mavi renkte izlenmesi nedeniyle bu bileşiğin kumarin olabileceği düşünüldü.



Şekil 5.4. Bergapten

Bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda 6,28 ppm ve 8,16 ppm’de 9,3 Hz’lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği izlenimini arttırmıştır. Ayrıca bileşiğe ait <sup>13</sup>C- NMR spektrumu incelendiğinde 161,0 ppm’de izlenen ve konjuge karbonil karbonuna ait olabileceğine işaret eden karbon sinyali kumarin yapısını doğrulamıştır. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 7,15 ppm’de singlet ve 7,60 ve 7,24 ppm’lerde 2,4 Hz’lik dubletler olarak izlenmiştir. 4,27 ppm’de ise singlet olarak gözlenen üç protonluk sinyal ise molekülde bir metoksi grubunun varlığını ortaya koymuştur. Basit bir kumarin halkasına bu üç proton ve bir metoksi grubu yerleştirilemeyeceğinden ve iki dublet sinyalinin *J* değerlerinin 2,3 Hz olması yapıya bir furan halkasının kondanse olabileceğini düşündürmüştür. Yapıdaki metoksi grubunun biyogenetik olarak C-5 ya da C-8 den hangisine yerleşmiş olabileceği bileşiğin NMR verileri ile araştırıldı. Literatür verileri de yapının bergapten olduğunu doğrulamıştır [7].

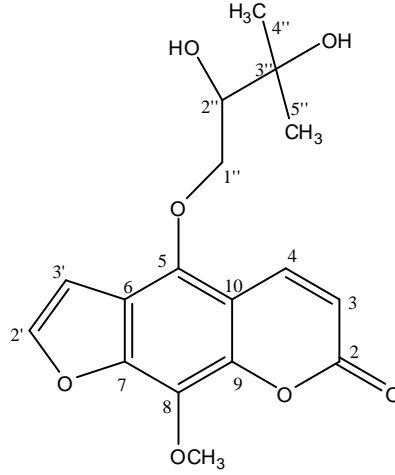
**Çizelge 5.7.** Bergapten bileşiği  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri ( $\text{CDCl}_3$ , ppm)

Pozisyon	$^1\text{H}$ ( $\delta$ , $J$ =Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
2	–	161,40
3	6,28(d, $J$ = 9,3 Hz)	112,50
4	8,16(d, $J$ =10,0 Hz)	139,20
5	–	149,57
6	–	112,51
7	–	158,32
8	7,15, s	93,85
9	–	152,71
10	–	106,02
2'	7,60(d, $J$ =2,4 Hz)	144,53
3'	7,24(d, $J$ =2,4 Hz)	105,02
( $\text{C}_5\text{-OCH}_3$ )	4,27, s	60,08

### 5.3.1.2 FBD 47-2-3 = 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate

Bileşik şeffaf renkli iğne kristaller şeklinde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba altında 254 nm'de sarı renkte gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde  $105^\circ\text{C}$ 'de yakıldığında kahverengi bir renk aldı.





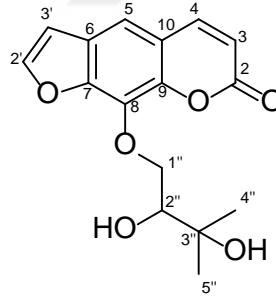
Şekil 5.5. 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate

$^1\text{H}$  NMR spektrumunda 8,14 ve 6,30 ppm'de 10,0 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller yapının kumarin olduğunu açıkça göstermiştir. Diğer bir dublet çifti ise 7,64 ve 7,02 ppm'de karakteristik 2,4 Hz'lik etkileşim sabiti vermesi kumarin halkasına bir furan halkasının kondanse olduğunu göstermiştir. 4,20 ppm'de bir  $\text{OCH}_3$  grubuna işaret eden üç protonluk singlet sinyali ve buna karşılık gelen karbon sinyali de 60 ppm'de izlenmiştir. Aromatik sinyallerin dışında ayrıca 4,60 ve 4,27 ppm'deki kimyasal kaymalarıyla oksijene komşu olduğu anlaşılan AB çifti protonları, dubletin dubleti olarak 10,0 Hz'lik geminal etkileşimlerinin yanı sıra daha küçük  $J$  değerli visinal etkileşim göstermişlerdir. 3,83 ppm'deki dubletin dubleti olarak izlenen protonun  $J$  değerlerinin de bu daha küçük etkileşim sabitleriyle aynı olması AB protonları ile visinal (komşu) olduğunu göstermiştir.  $\text{CH}_2$  grubuna karşılık gelen bu AB protonlarının kumarin halkasına oksijen üzerinden bağlı olduğu belirgindir, aksi halde daha üst alanda rezonansa gelmeleri gerekirdi.  $^{13}\text{C}$  NMR (BB ve APT) spektrumunda oksijenli karbonların izlendiği 55-80 ppm arasında 77,3 ppm'de  $\text{CH}_2\text{O}$  grubunun karbonu izlenirken, bir 3,83 ppm'e karşılık gelen karbon ise 76 ppm'de izlenmiştir. Ayrıca bir oksijenli katerner karbon atomu 77,0 ppm'de ve iki metil karbonu ise 26,71 ppm'de izlenmiştir.  $^1\text{H}$  NMR'da bu metil grupları 1,28 ve 1,32 ppm'de izlenmiştir. 3,46 ppm'de izlenen singletin bir OH pikine ait olduğu düşünülmüş olup, bu hidroksilin de metil grupları ile aynı karbon atomuna bağlı olduğu saptanmıştır. Tüm spektral veriler benzer kumarinlerle karşılaştırıldığında bileşiğin 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate olduğu belirlenmiştir.

**Çizelge 5.8.** 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate bileşiği <sup>1</sup>H NMR verileri (CDCl<sub>3</sub>, ppm)

Pozisyon	<sup>1</sup> H ( δ, J=Hz)
3	6,30 (d, J=10,0 Hz)
4	8,14 (d, J=10,0 Hz)
5	—
8	—
2'	7,64 (d, J=2,4 Hz)
3'	7,02 (d, J=2,4 Hz)
1'' <sub>a</sub>	4,60 (dd, J=2,40 ve 10,0 Hz)
1'' <sub>b</sub>	4,27 (dd, J=7,60 Hz ve 9,90 Hz)
2''	3,83 (dd, J=2,30 Hz ve 7,60 Hz)
3''	3,46, s (OH)
4''	—
5''	1,32, s, 3H
6''	1,28, s, 3H
(C <sub>8</sub> -OCH <sub>3</sub> )	4,20, s, 3H

### 5.3.1.3 FBD 47-1-2-3 (=FBD 47-2-4= FBM 12-13-14-3)= Heraclenol



**Şekil 5.6.** Heraclenol

Bileşik renksiz iğne şeklinde kristaller halinde elde edilmiştir. UV ışık altında (366 nm) parlak sarı renkli olarak görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında kahverengi renkte gözlendi. Kumarinlerin UV ışık altında parlak sarı renkte izlenmesi nedeniyle bu bileşiğin kumarin olabileceği düşünüldü.

Bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda 6,39 ppm ve 7,78 ppm'de 9,4 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği izlenimini vermiştir. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 7,40 ppm'de singlet ve 7,71 ve 6,84 ppm'lerde 2,4 Hz'lik dubletler olarak izlenmiştir. Aromatik sinyallerin dışında ayrıca 4,76 ve 4,42 ppm'deki kimyasal

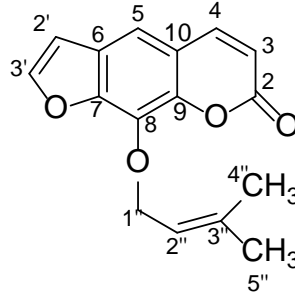
kaymalarıyla oksijene komşu olduğu anlaşılan AB çifti protonları, dubletin dubleti olarak 10,0 Hz'lik geminal etkileşimlerinin yanı sıra daha küçük  $J$  değerli visinal etkileşim göstermişlerdir. 3,87 ppm'deki dubletin dubleti olarak izlenen protonun  $J$  değerlerinin de bu daha küçük etkileşim sabitleriyle aynı olması AB protonları ile visinal (komşu) olduğunu göstermiştir. CH<sub>2</sub> grubuna karşılık gelen bu AB protonlarının kumarin halkasına oksijen üzerinden bağlı olduğu belirgindir. Metil grupları 1,30 ve 1,34 ppm'de singlet olarak izlenmiştir.

Tüm spektral veriler benzer kumarinlerle karşılaştırıldığında bileşiğin heraclenol olduğunu belirtmiştir. Literatür verileri de bunu doğrulamıştır. [7].

**Çizelge 5.9.** Heraclenol bileşiği <sup>1</sup>H NMR verileri (CDCl<sub>3</sub>, ppm)

Pozisyon	<sup>1</sup> H ( $\delta$ , $J$ =Hz)
3	6,39 (d, $J$ =9,4 Hz)
4	7,78 (d, $J$ =9,4 Hz)
5	7,40
8	–
2'	7,71 (d, $J$ =2,4 Hz)
3'	6,84 (d, $J$ =1,7 Hz)
1'' <sub>a</sub>	4,76 (dd, $J$ =2,90 ve 10,0 Hz)
1'' <sub>b</sub>	4,42 (dd, $J$ =7,70 Hz ve 10,0 Hz)
2''	3,87 (dd, $J$ =2,40 Hz ve 7,70 Hz)
3''	–
4''	1,34, s, 3H
5''	1,30, s, 3H

### 5.3.1.4 FBD-20-4-2= Imperatorin



Şekil 5.7. Imperatorin

Bileşik renksiz iğne şeklinde kristaller halinde elde edilmiştir. UV ışık altında (366 nm) parlak sarı renkli olarak görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında kahverengi renkte gözlendi. Kumarinlerin UV ışık altında parlak sarı renkte izlenmesi nedeniyle bu bileşiğin kumarin olabileceği düşünüldü.

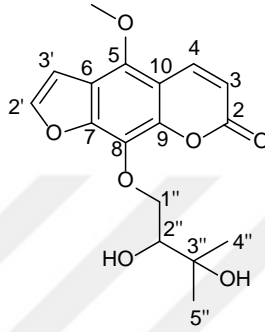
Bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda 6,37 ppm ve 7,76 ppm’de 9,3 Hz’lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği izlenimini vermiştir. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 7,36 ppm’de singlet ve 7,69 ve 6,81 ppm’lerde 2,4 Hz’lik dubletler olarak izlenmiştir. Ayrıca aromatik sinyallerin dışında 5,01 ppm’deki iki hidrojenlik dubletin ve 5,6 ppm’deki tripletin kimyasal kaymalarıyla oksijene komşu olduğu anlaşılmıştır. 1,72 ve 1,74 ppm’de çıkan üç protonluk metil sinyallerinin ise kimyasal kaymaları sebebiyle çifte bağa komşu olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 5.10. Imperatorin bileşiği <sup>1</sup>H NMR verileri (CDCl<sub>3</sub>, ppm)

Pozisyon	<sup>1</sup> H ( δ, J=Hz)
3	6,37 (d, J=9,3 Hz)
4	7,76 (d, J=10,0 Hz)
5	7,36, s
8	-
2'	7,69 (d, J=2,3 Hz)
3'	6,81 (d, J=2,4 Hz)
1'' <sub>a,b</sub>	5,01 ppm, d, 2H, J=7,1 Hz
2''	5,6 ppm, t, 1H
3''	-
4''	1,72, s, 3H
5''	1,74, s, 3H

### 5.3.1.5 FBM-12-13-14-3 = Byakangelicin

Bileşik açık sarı renkte katı halinde/renksiz kristal halinde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba altında 254 nm'de kahve mavisi renginde gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında kahverengi gözlendi. UV ışık altındaki mavi rengi nedeniyle izole edilen bu bileşiğin de bir kumarin olabileceği düşünüldü.



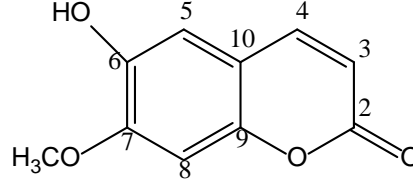
Şekil 5.8. Byakangelicin

Bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda ( $\text{CDCl}_3$ ) kumarin halkasının H-3 ve H-4'üne karşılık gelen 8,11 ve 6,28 ppm'de izlenen 10,0 Hz'lik karakteristik dubletlerinin izlenmesi yapının bir kumarin olabileceğini kuvvetle işaret etmiştir. Ayrıca bileşiğe ait  $^{13}\text{C}$ - NMR spektrumu incelendiğinde 160,16 ppm'de izlenen katerner karbon sinyali kumarin yapısını doğrulamıştır. Spektrumdaki diğer bir dublet çiftinin ise 7,01 ve 7,63 ppm'de 2,3 Hz'lik etkileşim vermesi de yapıya bir furan halkasının kondense olduğunu göstermiştir. Bileşiğin APT tekniğiyle alınan  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları yapının 17 karbon taşıdığını ve bu karbonlardan 5'inin CH, 1'inin  $\text{CH}_2$ , 1'inin  $\text{OCH}_3$ , 2'sinin  $\text{CH}_3$  ve 8'inin katerner karbondan ibaret olduğu saptanmıştır. Oksijenli karbonların izlendiği 55-80 ppm arasında 76,1 ppm'de  $\text{CH}_2\text{O}$  grubunun karbonu izlenirken, bir 3,86 ppm'e karşılık gelen karbon ise 76 ppm'de izlenmiştir. Ayrıca bir oksijenli katerner karbon atomu 75,95 ppm'de ve iki metil karbonu ise 26,71 ppm'de izlenmiştir.  $^1\text{H}$  NMR'da bu metil grupları 1,27 ve 1,31 ppm'de izlenmiştir. Tüm spektral veriler benzer kumarinlerle karşılaştırıldığında bileşiğin byakangelicin olduğu belirlenmiştir. [7].

**Çizelge 5.11.** Byakangelicin bileşiği  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri ( $\text{CDCl}_3$ )

Pozisyon	$^1\text{H}$ ( $J = \text{Hz}$ )	$^{13}\text{C}$
2	–	160,16
3	6,28 (d, $J=10,0$ Hz)	112,86
4	8,11(d, $J=10,0$ Hz)	139,47
5	–	143,93
6	–	114,46
7	–	150,16
8	–	126,05
9	–	144,88
10	–	107,44
2'	7,63 (d, $J=2,3$ Hz)	–
3'	7,01 (d, $J=2,3$ Hz)	–
( $\text{C}_5\text{-OCH}_3$ )	4,18, s, 3H	60,71
1''- $\text{CH}_2$	4,59 (dd, $J=2,9$ ve 10,1 Hz) 4,26 (dd, $J=8,2$ ve 10,5 Hz)	76,10
2''-CH	3,86 (dd, $J=3,0$ ve 8,2 Hz)	75,95
3''-Cq	–	71,51
4''- $\text{CH}_3$	1,31, s, 3H	26,71
5''- $\text{CH}_3$	1,27, s, 3H	26,71

### 5.3.1.6 FBD-23-24-5-1= Isoscooletin



Şekil 5.9. Isoscooletin

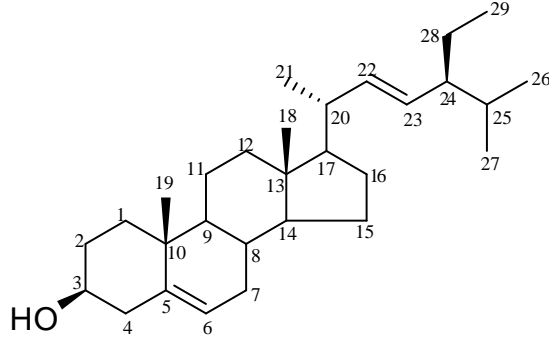
Beyaz renkli katı toz olarak elde edilen bileşik UV ışık altında (254 nm) parlak mavi renkli olarak görülmüş, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında açık pembe renkte gözlenmiştir. Kumarinlerin UV ışık altında parlak mavi renkte izlenmesi nedeniyle izole edilen bu bileşiğin kumarin olabileceği düşünüldü.

Bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda 7,67 ppm ve 6,31 ppm’de izlenen  $J = 9,4$  Hz’lik dubletler yapının kumarin olabileceği izlenimini kuvvetlendirmiştir. Bileşiğe ait iki aromatik proton sinyali 7,84 ppm ve 6,86 ppm’de singletler halinde izlenmiştir. Aromatik sinyaller dışında 3,98 ppm’de izlenen üç protonluk singlet sinyali de yapıda bir metoksi varlığını işaret etmiştir. Basit bir kumarin halkasına metoksi grubu dışında herhangi bir gruba ait pik olmayışı ve aromatik sinyallerin singlet çıkması sebebiyle yapıda bir hidroksil substituentinin varlığını düşündürmüştür.

Çizelge 5.12. Isoscooletin bileşiği <sup>1</sup>H NMR verileri (CDCl<sub>3</sub>)

Pozisyon	<sup>1</sup> H ( $\delta$ , $J$ =Hz)
3	6,31 (d, $J = 9,4$ Hz)
4	7,67 (d, $J = 9,4$ Hz)
5	6,86, s
8	7,84, s
OCH <sub>3</sub>	3,98, s

### 5.3.1.7 FBD -21-DCM-1 = Stigmasterol



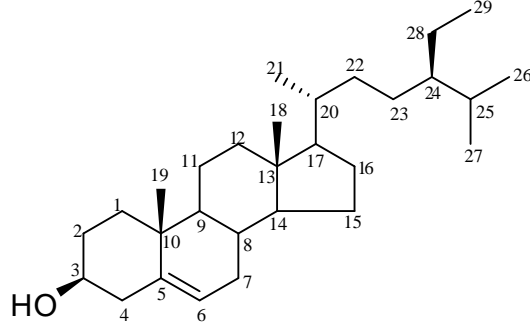
Şekil 5.10. Stigmasterol bileşiği

Bileşik beyaz katı halinde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında mavi-mor bir renk aldı.

<sup>1</sup>H NMR spektrumunda proton sinyalleri  $\beta$ -sitosterol ile çok büyük benzerlikler göstermiştir, hatta metil proton sinyallerinin tamamen aynı ppm lerde izlenmesi bu bileşimde bir steroid olduğuna işaret etmiştir. Bir hidroksil grubu taşıyan C-3’ün proton sinyali benzer şekilde 3.53 ppm de izlenmiştir. C-5 ve C-6 arasındaki çifte bağın varlığı 5.34 ppm’de izlenen olefinik proton sinyali ile belirlenmiştir. Bu çifte bağın yanısıra yapıda ikinci bir çifte bağın varlığı  $\delta$  5.05 (dd,  $J = 16$  ve 5 Hz) ve 5.16 (dd,  $J = 16$  ve 7 Hz) de izlenen sinyaller ile anlaşılmıştır. Bu olefinik protonların komşu protonlarla olan etkileşimi ve birbirleriyle olan 16 Hz’lik trans etkileşimi göz önüne alındığında  $\Delta^5$  stigmasteran iskeleti üzerinde bu bağın yerleşebileceği yerin sadece yan zincirdeki  $\Delta^{22}$  konumunda olabileceği anlaşılmıştır. Sonuç olarak bu steroidin stigmasterol (stigmasta-5,22-dien-3-ol) olduğu kesinlik kazanmıştır.



### 5.3.1.8 FBD -22-1-4-1 = $\beta$ -Sitosterol



Şekil 5. 11.  $\beta$ -Sitosterol bileşiği

Beyaz renkli katı madde olarak elde edilen bileşik silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmemesine rağmen, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında önce mavi sonra kahverengi bir renk aldı.

Bileşiğin  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda 3.53 ppm’de izlenen multiyet sinyali bize yapıda oksijen taşıyan bir sübstitüente komşu protona ait olabileceğini gösterdi. 5.35 ppm’de gözlenen multiyetimsi dublet sinyali ise olefinik bir proton olarak yorumlandı. 1-2 ppm arasındaki metilen zarfının yanısıra metil piklerinin multiplisitetleri yapının bir steroid olabileceğini düşündürmüştür. Alınan  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunda 6 metil sinyalinin çıkış şekli (2 singlet, 3 dublet ve 1 tripletten ibaret) ise;  $\delta$  0.68 (3H, s, Me-18), 0.81 (3H, d,  $J=6,64$  Hz, Me-27), 0.83 (3H, d,  $J=7,03$  Hz, Me-26), 0.85 (3H, t,  $J=7,81$  Hz, Me-29), 0.92 (3H, d,  $J=6,25$  Hz, Me-21) ve 1.01’’de (3H, s, Me-19) izlenen metil sinyalleri bileşiğin 29 C’lu stigmasten yapısına sahip olduğunu ispatlamıştır. Biyojenetik olarak ve karakteristik bölünme şekli dikkate alındığında OH grubunun C-3’e yerleşmesi, tüm spektral veriler ve fiziksel özelliklerine dayanarak bu bileşiğin yapısının  $\beta$ -Sitosterol olduğunu kanıtlamıştır.

## 5.4 İzole Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

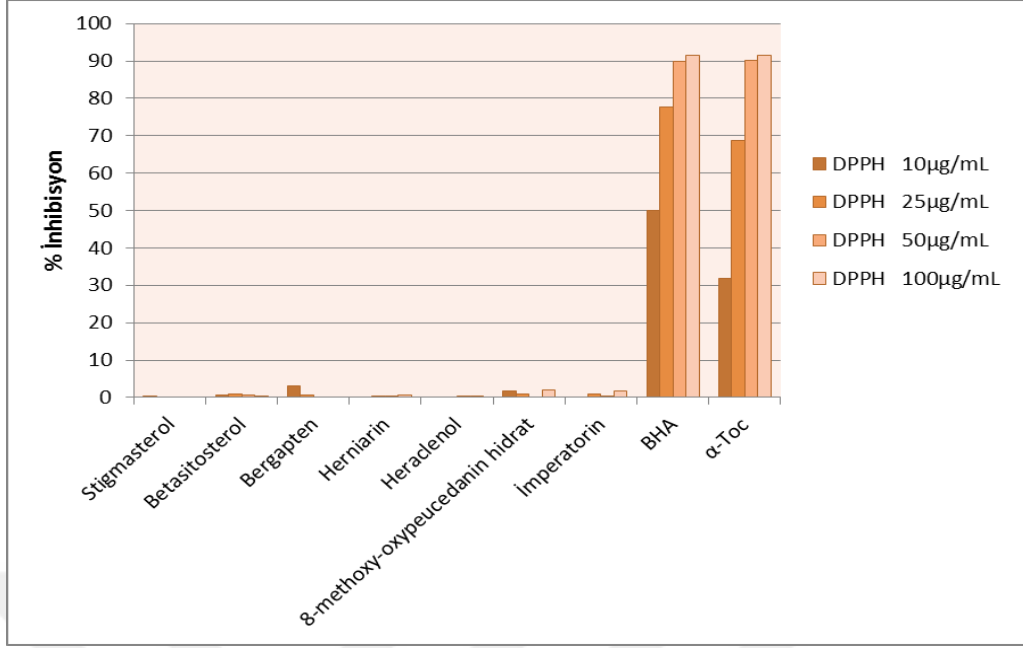
### 5.4.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları

İzole saf bileşiklerinin DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi Çizelge 5.14’de gösterilmiştir. Elde edilen byakangelicin miktarı DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi bakılabilmesi için yeterli olmadığından aktivite yapılamamıştır.

Çizelge 5.13. İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi aktivite sonuçları

DPPH Serbest Radikal Giderimi (% İnhibisyon) Aktivitesi				
Saf Bileşikler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
Bergapten	3,15±0,64	0,79±0,11	-	-
8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate	1,85±0,23	0,93±0,30	-	2,07±0,51
Heraclenol	-	-	0,07±0,02	0,50±0,13
Imperatorin	-	1,04±0,32	0,50±0,18	1,80±0,15
Isoscopoletin	-	0,08±0,06	0,23±0,02	0,55±0,07
Stigmasterol	0,37±0,22	-	-	-
β-Sitosterol	0,77±0,31	0,85±0,25	0,77±0,41	0,23±0,06
*BHA	49,92±0,23	77,66±0,67	89,89±0,54	91,37±0,06
*α-Toc	31,77±0,46	68,73±0,2	90,21±0,25	91,62±0,45

\*standart



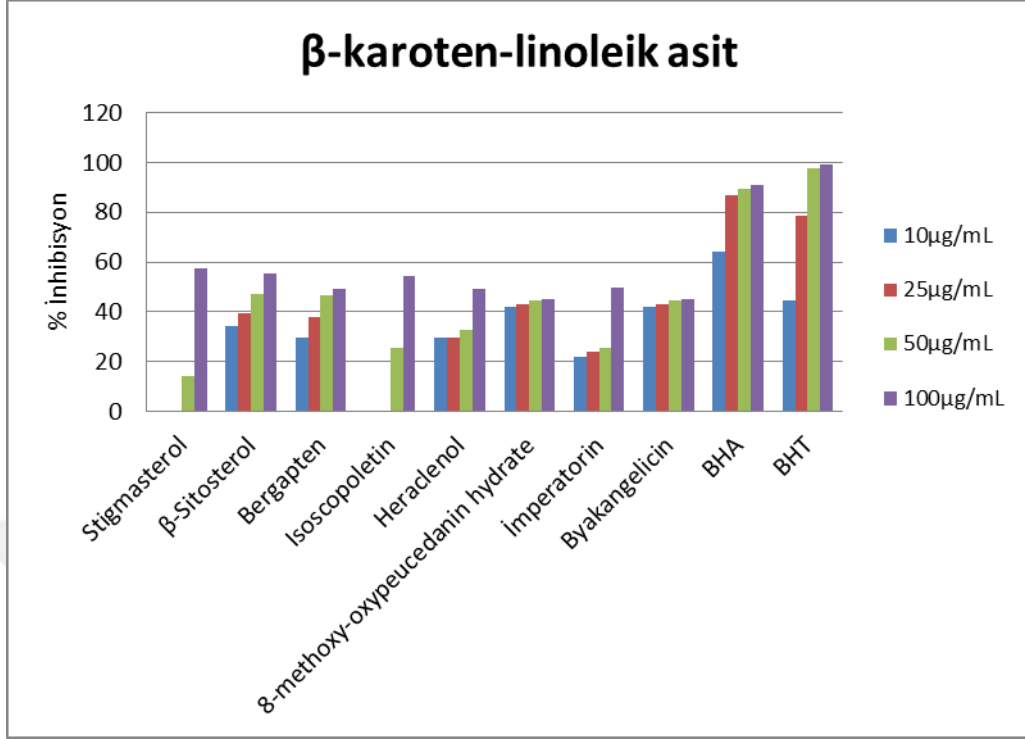
Şekil 5.12. İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi

#### 5.4.2 $\beta$ -KAROTEN-LINOLEİK ASİT (LİPİD PEROKSİDASYON % İNHİBİSYON) TOPLAM ANTIOKSİDAN AKTİVİTESİ SONUÇLARI

Çizelge 5.14. İzole saf maddelerin lipid peroksidasyon (% inhibisyon) aktiviteleri sonuçları

Saf Maddeler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
Bergapten	29,52±0.66	37,74±0.45	46,39±0.28	49,36±0.37
8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate	42,12±0.59	43,11±0.75	44,41±0.62	44,99±0.18
Heraclenol	29,38±0,55	29,38±0,55	32,83±0,66	49,36±0.46
Imperatorin	21,80±0.43	23,95±0.23	25,28±0.33	49,77±0.36
Byakangelicin	42.12 ± 2.56	43.11 ± 2.34	44.41 ± 2.21	44.99 ± 2.22
Isoscopoletin	-	-	25,31±0,88	54,39±0.28
Stigmasterol	-	-	14,12±2,48	57,48±0.11
$\beta$ -Sitosterol	34,17±1,72	39,29±1,72	47,07±0,66	55,17±0.32
*BHA	64,11±0,65	86,69±0,54	89,35±0,27	91,15±0,73
*BHT	44,67±0,25	78,76±0,61	97,66±0,84	99,43±0,36

\*standart



Şekil 5.13. Saf maddelerin β-karoten renk açılım yöntemi ile lipid peroksidasyon aktiviteleri

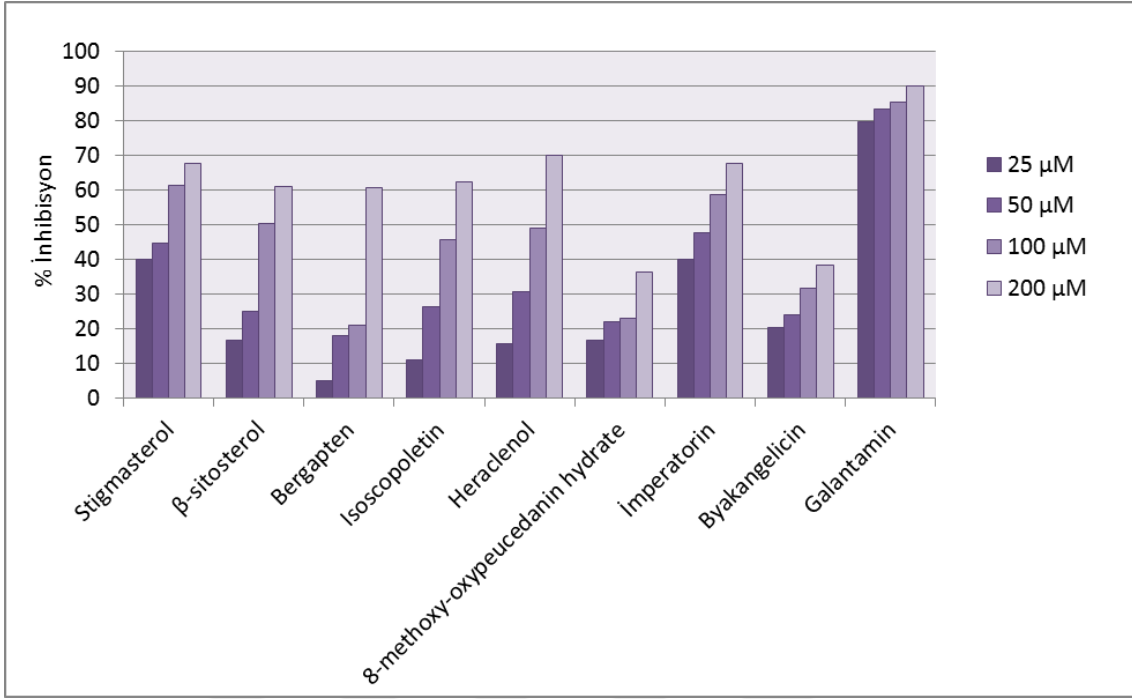
Bu yöntemlerde 10, 25, 50, 100 μg/mL konsantrasyonlarda 3 paralel çalışma yapıldı. α-TOC, BHA ve BHT standart olarak kullanıldı.

### 5.4.3 Antikolinesteraz Aktivitesi Sonuçlar

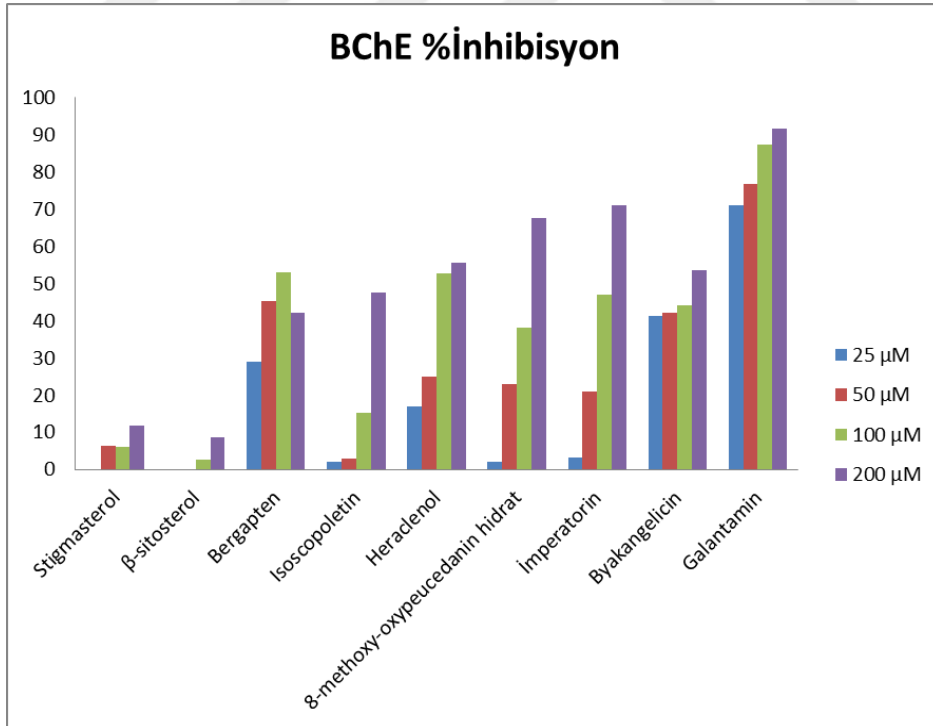
Çizelge 5.15. İzole saf maddelerin antikolinesteraz aktivitelerinin sonuçları

	AChE				BChE			
	25	50	100	200	25	50	100	200
<b>Saf Maddeler</b>								
Bergapten	4,85± 0,33	17,91±0,25	20,87±0,39	60,59±0,45	29,04±0,86	45,34±0,78	52,98±1,41	42,19±0,94
8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate	16,58±0,29	21,90±0,56	23,06±0,35	36,52±0,63	2,03±0,16	22,97±0,45	38,11±0,55	67,60±1,02
Heraclenol	15,67±0,65	30,54±0,54	48,97±0,12	69,96±0,25	16,85±0,66	25,01±0,45	52,62±0,22	55,60±0,33
Imperatorin	39,9±0,66	47,56±0,45	58,88±0,36	67,56±0,27	3,28±0,32	21,01±0,45	46,90±0,56	71,13±0,66
Byakangelicin	20,33 ± 2,86	24,06 ± 2,70	31,68 ± 2,31	38,21 ± 2,42	41,33 ± 1,95	42,25 ± 1,88	44,08 ± 1,18	53,66 ± 1,92
Isoscopoletin	11,03±0,12	26,32±0,20	45,56±0,31	62,31±0,65	2,18±0,9	2,89±0,89	15,28±0,67	47,68±0,88
Stigmasterol	39,93±0,17	44,61±0,22	61,29±0,34	67,78±0,47	-1,89± 0,99	6,31±0,79	6,01±0,23	11,70±0,35
β-Sitosterol	16,55±0,56	24,92±0,26	50,39±0,32	61,16±0,25	-16,88±0,98	-17,41±0,85	2,59±0,45	8,61±0,35
*Galantamin	79,8±0,31	83,27±0,25	85,53±0,36	90,07±0,12	71,11±0,63	76,75±0,88	87,32±0,55	91,59±1,12

\*Standart



Şekil 5.14. İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu



Şekil 5.15. İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu

## 6. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında Apiaceae familyasına ait endemik *Ferulago blancheana* bitkisinden hazırlanan ekstrelerin sekonder metabolitlerinin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

*Ferulago* türleri üzerindeki araştırmalar oldukça azdır ve daha ziyade onların uçucu yağ ve aktiviteleri ile ilgilidir, fakat sınırlı sayıda da olsa dünyada *Ferulago* türlerinin sekonder metabolitleri üzerine araştırmalar vardır. Bununla beraber Türkiye’de *Ferulago* türlerinin sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve yapı tayini üzerine hiç araştırma yoktur, sadece bazı aktivite ve uçucu yağ çalışmaları bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalara göre bu cinsin sekonder metabolitlerinin başlıca kumarinler, steroidler ve diğer fenolik bileşiklerden ibaret olduğu anlaşılmıştır. Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait sekonder metabolitlerle yapılan aktivite çalışmaları sonucunda birçok sekonder metabolitin antibakteriyel aktivite başta olmak üzere antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda çalışmalarımız saf bileşiklerin izole edilmesinin ardından antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin tayin edilmesi sürecini takip etmiştir.

İzolasyon işlemine ekstrelerin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması ile başlanmış, fraksiyonların preparatif ince tabaka kromatografisiyle saflaştırılması ile devam edilmiştir. Elde edilen bileşiklerin saflığı öncelikle ince tabaka kromatografisi ile kontrol edildikten sonra saf bileşiklerin spektral analizleri (NMR) yapıldı.

Bu tez çalışmasında *Ferulago blancheana* bitkisinden biri kumarin yapısında isoscopoletin, diğer beşi furanokumarin yapıda bergapten, byakangelicin, heraclenol, 8-methoxy-oxypeucedanin hydrate ve imperatorin ve steroid yapıda ise stigmasterol ile  $\beta$ -sitositerol elde edilmiştir. Furanokumarinlerin yapıları NMR tekniği ile belirlenmiştir.

Hazırlanan diklorometan ve etil asetat/metanol ekstrelerinin toplam fenolik miktarları pirokatekole, toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildikten sonra antioksidan aktiviteleri  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemi ve DPPH serbest radikal giderim yöntemi ile belirlenmiştir. Bu iki antioksidan aktivite testi sonucunda diklorometan ekstresi hemen hemen hiç aktivite göstermemesine rağmen, etil asetat/metanol ekstresi DPPH serbest radikal giderim aktivitesini orta derecede göstermiştir. Ancak  $\beta$ -KAROTEN

renk açılım yöntemi ile lipid peroksidasyon inhibisyonunu ise gösterememiştir. Daha sonra ekstrelerden izole edilen saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri de bu iki yöntem ile tayin edilmiştir. Bu bileşiklerin düşük derecede DPPH serbest radikal giderim aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir, furokumarinlerin yapısında serbest radikal süpürücü grupların olmayışı bunun nedeni olarak düşünülebilir. Buna karşın,  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemi ile incelenen tüm bileşikler lipid peroksidasyonunu orta derecede inhibe etmişlerdir.

Hazırlanan diklorometan ve etil asetat/metanol ekstrelerinin ve bu ekstrelerden elde edilen saf bileşiklerin antikolinesteraz aktiviteleri Ellman metodu ile in vitro olarak tayin edilmiştir. İzole edilen bileşikler genelde orta/iyi derecede antikolinesteraz aktivite göstermişlerdir. Test edilen steroidlerden stigmasterol ve  $\beta$ -sitosterol ve furanokumarinlerden ise bergapten, imperatorin, isoscopoletin ve heraclenol iyi derecede AChE inhibisyonu göstermiştir. BChE enzimi inhibisyonunda ise imperatorin ve 8-methoxy-oxypeucedanin hydrate bileşiklerinin iyi derecede aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Her iki antikolinesteraz aktivite testi sonucunda imperatorin bileşiği en aktif bileşik olarak izlenmiştir.

Sonuç olarak son yıllarda grubumuzun da dahil olduğu bazı çalışmalarda, kumarinlerin kayda değer antikolinesteraz aktivitelerinin bildirilmesi, kumarin taşıma potansiyeline sahip bitkilerden antikolinesteraz bileşiklerin izole edilebileceği ve hatta daha aktif furanokumarin türevlerinin sentezlenmesi ile yeni potansiyel ilaçların keşfedilebileceğini göstermektedir.



## KAYNAKLAR

- [1] Akalın, E., 1999: “Türkiye’nin Batısında Yetişen *Ferulago* Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik Araştırmalar”, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [2] Erdurak, S., 2003: “*Ferulago isaurica* Peşmen ve *F. syrica* Boiss. (Umbelliferae) Türleri Üzerinde Araştırmalar” Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [3] Akalın, E., Kızıllarslan Ç., 2013: “Fruit anatomy of some *Ferulago* (Apiaceae) species in Turkey” *Turk J Bot* (2013) 37: 434-445
- [4] Ecevit Genç G., Akalin Uruşak E., 2012: "Comparison between two *Eryngium* from Turkey: *E. heldreichii* and *E. davisii*. *Bocconea*.", *Bocconea*, vol.24, pp.243-247
- [5] Sacli, S. ve Akalin, E., 2001: “Preliminary Ethnobotanical Study From Kaz Dağı (Balıkesir/Çanakkale) I: Uses And Vernacular Names”, *Turkey-J. Fac.Pharm.*, **34**(2), 9-16.
- [6] Davis, P. ve diğ., 1988: “ *Prangos* Lindl. , *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*”, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, **10**, pp. 151
- [7] Dincel, D., Hatipoglu, S D., Goren, A C., 2013: "Anticholinesterase furocoumarins from *Heracleum platytaenium*, a species endemic species to Ida Mountains" *Turkish Journal of Chemistry*. Volume: **37**, Issue: 4, pp.675-683
- [8] Kubeczka, K. H., 1982: “*Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects*” (Ed: Margaris, N., Koedam, N., Vokou, D.), Netherland, pp. 165-167.
- [9] French, D. H., 1971: “*Ethnobotany of the Umbelliferae*”, (Ed: Heywood V.H.), Academic Press., London, England, pp. 385-402.
- [10] Demirezer, Ö., (Ed.) 2011: *FFD Monografıları*, Nobel Tıp Kitabevi.
- [11] Baytop, T. 1999: “*Türkiye’de Bitkiler İle Tedavi*”, Nobel Tıp Kitabevi, pp.320
- [12] Şatır E., 2006: “*Ferulago platycarpa* Boiss.&Bal. Üzerinde Farmasötik Botanik Yönünden Araştırmalar” Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- [13] Erdemoglu, N., Akalin, E., Akgoc, M., Cikrikci, S., Bilsel, G., 2008: “Comparison of the Seed Oils of *Ferulago trachycarpa* Boiss. Different Localities with Respect to Fatty Acids”, *Martinus Nijhoff Publishers Rec. Nat. Prod.* **2:1**, 13-18.
- [14] Davis, P. ve diğ., 1972: “ *Ferulago blanchiana* , *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*”, Edinburgh Univ. Press, Edinburgh, **4**.
- [15] [www.tubives.com](http://www.tubives.com): Turkish Plants Data Service
- [16] Ozhatay, N., Akalin, E., 2000: “A New Species of *Ferulago* W. Koch (Umbelliferae) From North-west Turkey”, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **133**: 535-542.
- [17] Golfakhrabadi, F., Khanavi, M., 2015: “Biological Activities and Composition of *F.carduchorum* Essential Oil”, *Journal of Arthrod-Borne Diseases* **9**:104-115
- [18] Karimian, H. , Fadaeinasab, M. 2015: “Chemopreventive Activity of *Ferulago angulate* against Breast Tumor in Rats and the Apoptotic Effect of Polycerasoidin in MCF7 Cells: A Bioassay-Guided Approach” *Plos One* **10**:5

- [19] **Dall'Acqua, S., Linardi, MA.** 2014: "Natural daucane esters induces apoptosis in leukaemic cells through ROS production" *Phytochemistry* 108: 147-156
- [20] **Heidari, S., Akrami, H.** 2014: "Anti-tumor Activity of *Ferulago angulata* Boiss. Extract in Gastric Cancer Cell Line via Induction of Apoptosis" *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 13: 1335-1345
- [21] **Alkhatib, R., Hennebelle, T., Raomy, V.,** 2009: Coumarins, Caffeoyl Derivatives and a Monoterpenoid Glycoside from *Ferulago asparagifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. **37**, issue 3, 230-233.
- [22] **Jimenez, B., Gr, G., Cannizzo, S., Amico, V., Bizzini, M., Piattelli, M., ande, M. C., Anaya, J., Torres, P., Grade, M.,** 2000: Coumarins from *Ferulago capillaris* and *F. brachyloba*. *Phytochemistry*, **53**, 1025-1031.
- [23] **Rosselli, S., Maggio, A. M., Faraone, N.,** 2009: "The Cytotoxic Properties of Natural Coumarins Isolated from Roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of Synthetic Ester Derivatives of Aegelinol", *Natural Product Communications*. Vol. **4**, issue 12, 1701-1706.
- [24] **Basile, A., Sorbo, S., Spadaro, V., Bruno, M., Maggio, A., Faraone, N., Rosselli, S.,** 2009: "Antimicrobial and Antioxidant Activities of Coumarins from the Roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae)", *Molecules*. Vol. **14**, issue 3, 939-952.
- [25] **Naseri, M.; Monsef-Esfehani, HR.** 2013: "Antioxidative Coumarins from the Roots of *Ferulago subvelutina*" *Asian Journal of Chemistr.* Vol.25, Issue: 4, 1875-1878
- [26] **Doganca, S., Ulubelen, A., Tuzlaci, E.,** 1991: "1-Acetylhydroquinone 4-galactoside from *Ferulago aucheri*". *Phytochemistry*. Vol. **30**, issue 8, 2803-2805.
- [27] **Kilic, C. S., Okada, Y., Coskun, M., Okuyama, T.,** 2006: "New Furanocoumarins Isolated from Roots of *Ferulago isaurica* Pesmen Growing in Turkey". *Heterocycles*. Vol. **69**, issue 1, 489
- [28] **Kilic, C. S., Coskun, M.,** 2006: "Felamedin and Prantschimgin contents of Chloroform Fractions of *Ferulago isaurica* and *F. syriaca* Growing in Turkey". *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. **42**, issue 3, 351-352.
- [29] **Satir, E., Kilic, C. S., Coskun, M.,** 2009: "Prantschimgin Content of Methanolic Extract of Roots of *Ferulago Platycarpa*", *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. **45**, Number 6, 872-873.
- [30] **Mileski, KS., Dzamic, AM.** 2015: "Composition, Antimicrobial and Antioxidant Properties of Endemic Species *Ferulago macedonica* Micevski & E. Mayer", *Records of Natural Products*. Vol. **9**, Issue: 2, 208-223
- [31] **Pinto, E., Hrimpeng, K.** 2013: "Antifungal activity of *Ferulago capillaris* essential oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* and dermatophyte species". *European Journal of Clinical Microiology & Infectious Diseases*. Vol. **32** Issue: 10, 1311-1320
- [32] **Celik, A., Arslan, I., Herken, EN.** 2013: "Constituents, Oxidant-Antioxidant Profile, and Antimicrobial Capacity of the Essential Oil Obtained from *Ferulago Sandrasica* Pesmen and Quezel". *International Journal of Food Properties*. Vol. **16** Issue: 8, 1655-1662.
- [33] **Maggi, F., Trillini, B., Papa, F.,** 2009: "Chemical Composition and Antimicrobial Activity of The Essential Oil of *Ferulago campestris* (Besser)

- Grecescu Growing in Central Italy’’. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. **24**, issue 6, 309-315.
- [34] **Ozkan, A. M. G., Demirci, B., Demirci, F., Baser, K. H. C.**, 2008: ‘‘Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Ferulago longistylis* Boiss. Fruits’’. *Journal of Essential Oil Research*. Vol. **20**, issue 6, 569-573.
- [35] **Aklaghi, H.**, 2008: ‘‘Chemical Composition of The Essential Oil from The Aerial Parts of *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss. From Northeast Iran’’. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Vol. **11**, issue 5, 544-547.
- [36] **Erdurak, C. S. Coskun, M., Demirci, B., Baser, K. H. C.**, 2006: ‘‘Composition of The Essential Oil of Fruits and Roots of *Ferulago isaurica* Peşmen and *F. syriaca* Boiss.(Umbelliferae) from Turkey’’. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. **21**, issue 1, 118-121.
- [37] **Masoudi, S., Rustaiyan, A., Ameri, N.**, 2004: ‘‘Volatile Oils of *Ferulago phialocarpa* Rech. F. et. H. Reidl and *Leutea elbursensis* Mozaffarian from Iran’’. *Journal of Essential oil Research*. Vol. **16**, issue 2, 143-144.
- [38] **Kürkçüoğlu, M.**, 2010: ‘‘Sekonder Metabolitler’’, Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri, TC. Anadolu Üniversitesi Yayını, Eskişehir, pp. 11.
- [39] **Hanson, R. J.**, ‘‘Tutorial Chemistry Texts, Natural Products: The Secondary Metabolites’’, *Royal Society of Chemistry*, pp. 1-2.
- [40] **Hansel R., Sticker O.**, 2007: *Pharmakognosie-Phytopharmazie*, Springer-Lehrbuch, München
- [41] **Cram, D. J. ve diğ.**. 1964: ‘‘*Organic Chemistry*’’, McGraw-Hill Book Company, New York.
- [42] **Yilmaz, A., Boga, M., Topcu, G.**, 2016: ‘‘Novel Terpenoids with Potential Anti-Alzheimer Activity from *Nepeta obtusicrena*’’, *Records Of Natural Products*, Volume: 10, Issue: 5, pp: 530-541.
- [43] **Kürkçüoğlu, M.**, 2010: ‘‘Sekonder Metabolitler’’, *Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri*, TC. Anadolu Üniversitesi Yayını, Eskişehir, 74.
- [44] **Boiteau, P ve diğ.**. 1969: ‘‘Triterpenoides’’, *Gauthier-Villars*, 3.
- [45] **Harborne J. B. ve diğ.**. 1988: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 129, Chapman&Hall, London.
- [46] **Croteau R., Kutchan T., Lewis G.**, 2000: *Natural Products* (Secondary Metabolites), Chapter: 24, 1258
- [47] **Harborne, J. B. ve diğ.**. 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 42-43.
- [48] **Boğa, M.**, 2005: ‘‘Kumarin Türevi Yeni 14:4 Taç Eter Bileşiklerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması’’, Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [49] **Thomson, R. H.**, 1993: *The Chemistry of Natural Products*, Second Edition, Cahpman& Hall, Suffolk, 106.
- [50] **Kavran, G.**, 1998: ‘‘Bazı Kumarin Türevlerinin Sentezleri ve UV Spektrumları’’, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [51] **Cohen, A.J.**, 1979: ‘‘Critical Review of The Toxicology of Coumarin With Special Reference to Interspecies Differences in Metabolism and Hepatotoxic

- Response and Their Significance to Man”, *Food and Chemical Toxicology*, 17, 277,289
- [52] **El-Khatib, R. M., Nassr, L. A. E.**, 2007: “Reactivity Trends of The Base Hydrolysis of Coumarin and Thiocoumarin an Binary Aqueous Methanol Mixtures at Different Temperature”. *Spectrochimica Acta*, **67**: 643-648.
- [53] **Kavran, G.**, 1998. “Bazı Kumarin Türevlerinin Sentezleri ve UV Spektrumları”, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [54] **Coffey, S.**, 1997: “Rood’s Chemistry of Carbon Compounds”, *Elsevier*, New York Vol:4
- [55] **Karataş, M.**, 2011: “Hidroksi Kumarin Kuarterner Amonyum Tuzlarının Sentezi ve Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, Balıkesir Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Balıkesir.
- [56] **Dellagrecia, M., Fiorentino, A., Isidori, M.**, 2003: “Benzocoumarins from the Rhizomes of *Juncus Acutus*”, *Tetrahedron*, **Vol:59**, 4821-4825
- [57] **Harvey, R.G., Cortez, C.**, 1988: “A New Coumarin Synthesis and Its Utilization for The Synthesis of Polycyclic Coumarin Compounds With Anticarcinogenic Properties”, *J. Org. Chem.*, Vol:53, 3939-3943
- [58] **Harborne, J. B. ve diğ.**, 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 40-41.
- [59] **Harborne, J. B. ve diğ.**, 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 49-50.
- [60] **Guliyev, V.B. ve diğ.**, 1999: *Flavonoidler*, Bakanlar Matbaacılık, İstanbul.
- [61] **Harborne, J. B. ve diğ.**, 1982: *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall, London.
- [62] **Deschner, E.E. ve diğ.**, 1991: “Quercetin and Rutin as Inhibitors of Azoxymethanol-Induced Colonic Neoplasia”, *Carcinogenesis*. Vol. **12**:1193-1196.
- [63] **Verma, A.K. ve diğ.**, 1988: “Inhibition of 7,12-Dimethylbenz(A)Anthracene-Induced and N-Nitrosomethylurea-Induced Rat Mammary-Cancer by Dietary Flavonol Quercetin”, *Cancer Research*. Vol. **48**: 5754-5758.
- [64] **Gönenç, A. ve diğ.**, 2002: “Lipid Peroxidation and antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients”, *Dialysis and Transplantation*, **31**, pp. 88-96.
- [65] **Papas, A. M.**, 1996: Determinants of antioxidant status in humans, *Lipids*, **31**, pp. 77–82.
- [66] **Zhao, G. R. ve diğ.**, 2006: “Antioxidant Activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*”, *Food Chem*, **99**, pp. 767-771.
- [67] **Atalay, M. ve diğ.**, 2002: “Diabetes, Oxidative Stress and Physical Exercise”, *Journal of Sports Science and Medicine*, **1**, pp. 1-14.
- [68] **Ulubelen, A. ve diğ.**, 1991: “1-Acetylhydroquinone 4-galactoside from *Ferulago aucheri*”, *Phytochemistry*. **30**, pp. 2803-2805.
- [69] **Özgen, U. ve diğ.**, 2006: “Antioxidant Properties of Some Medicinal Lamiaceae (Labiatae) Species”, *Pharm Biol*, **44**, pp.107-112.
- [70] **Reische, D. ve diğ.**, 2002: *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, New York: Marcel Dekker Inc., pp. 489-516.

- [71] Rang, R. Y. ve diğ.. 2006: Distribution of 127 Edible Plant Species for Antioxidant Activities by Two Assays. *J Sci Food Agric*, **86**, pp. 2395-2403.
- [72] Acuna, U. ve diğ.. 2002: "Antioxidant Activity of Ten Edible North American Plants". *Phytother Res*, **16**, pp. 63-65.
- [73] Topçu, G. ve diğ.. 2007: "Antioxidant Activity of Stem and Root Extracts of *Rhubarb (Rheum ribes)*: An Edible Medicinal Plant". *Food Chem*, **103**, pp. 623-630.
- [74] Yamazaki, E. ve diğ.. 2007: "Antioxidant Activity of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum*) Fruit". *Food Chem*, **100**, pp. 171- 177.
- [75] Rice-Evans, C. A. ve diğ.. 1997: "Antioxidant Properties of Phenolic Compounds", *Trends in Plant Science*, **2**, pp. 152-159.
- [76] Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, *Clarendon Press*, **543**, Oxford.
- [77] Özyürek, M., 2008: "Reaktif Oksijen Türleri Süpürücü Antioksidan Aktivitenin Ölçümünde Modifiye Cuprac Yöntemlerinin Geliştirilmesi", İstanbul Üniversitesi, Doktora tezi, İstanbul.
- [78] Larson, R. A., 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*; **27**, 969- 978.
- [79] Pratt, D. E., Hudson, B. J. F., 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants.; Hudson B.J.F., Ed.; *Elsevier*; Amsterdam, pp 17-192.
- [80] Singleton, V. L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, **299**, 152-178
- [81] 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. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 109-114.
- [82] Hartman, R. E., 2010: "Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology". *Taylor & Francis Group, LLC*, chapter 16.
- [83] Akalın, H., Ü., 2003. "Alzheimer Hastalarının Lenfositlerinde rRNA İfadeleşmesinin Araştırılması", *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- [84] Yamantürk, P., 2000. Alzheimer Hastalığı, Sendrom, **12**, pp. 72-81.
- [85] Culhaoglu, B., Hatipoglu, S. D., Donmez, A., et al. 2015: "Antioxidant and anticholinesterase activities of lupane triterpenoids and other constituents of *Salvia trichoclada*", *Medicinal Chemistry Research*, Volume: 24, Issue: 11, pp: 3831-3837
- [86] Demans Dergisi 2002: "Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri", **2**, pp. 5-9.
- [87] Singleton, V. L. ve diğ.. 1965: "Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolibdic-phosphotungstic Acid Reagents", *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, pp. 144-158.
- [88] Singleton, V. L. ve diğ.. 1999: "Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent", *Methods in Enzymology*, **299**, pp. 152-178.
- [89] Sanchez, M. C. ve diğ.. 1998: "Procedure to Measure The Antiradical Efficiency of Polyphenols", *Journal of The Science of Food and Agriculture*, **76**, pp. 270-276.

[90] Poole, C. F. ve diğ.. “*Chromatography Today*” Elsevier Science B.V. pp. 649-726.



## **EKLER**

**EK A.1:** Bergapten bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK A.2:** Bergapten bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK A.3:** Bergapten bileşığının  $^{13}\text{C}$  NMR (APT) spektrumu

**EK B.1:** 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK B.2:** 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK B.3:** 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK C.1:** Heraclenol bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK C.2:** Heraclenol bileşığının  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

**EK D.1:** Imperatorin bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK D.2:** Imperatorin bileşığının  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

**EK E.1:** Byakangelicin bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK E.2:** Byakangelicin bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK E.3:** Byakangelicin bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK E.4:** Byakangelicin bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK F.1:** Isoscopoletin bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK F.2:** Isoscopoletin bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK G.1:** Stigmasterol bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK G.2:** Stigmasterol bileşığının  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

**EK H.1:**  $\beta$ -Sitosterol bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

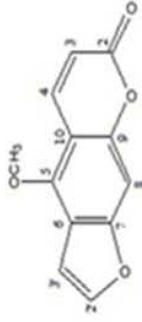
**EK H.2:**  $\beta$ -Sitosterol bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK H.3:**  $\beta$ -Sitosterol bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

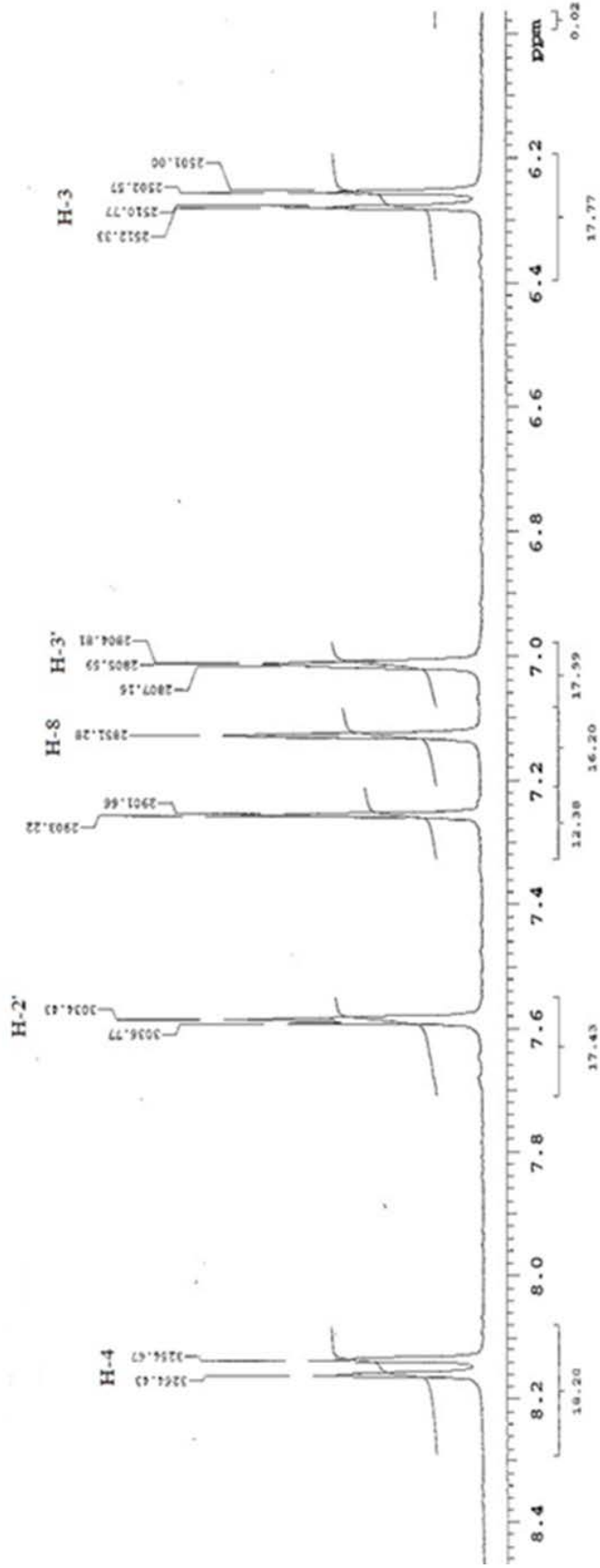
**EK H.4:**  $\beta$ -Sitosterol bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK H.5:**  $\beta$ -Sitosterol bileşığının  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

**EK H.6:**  $\beta$ -Sitosterol bileşığının  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

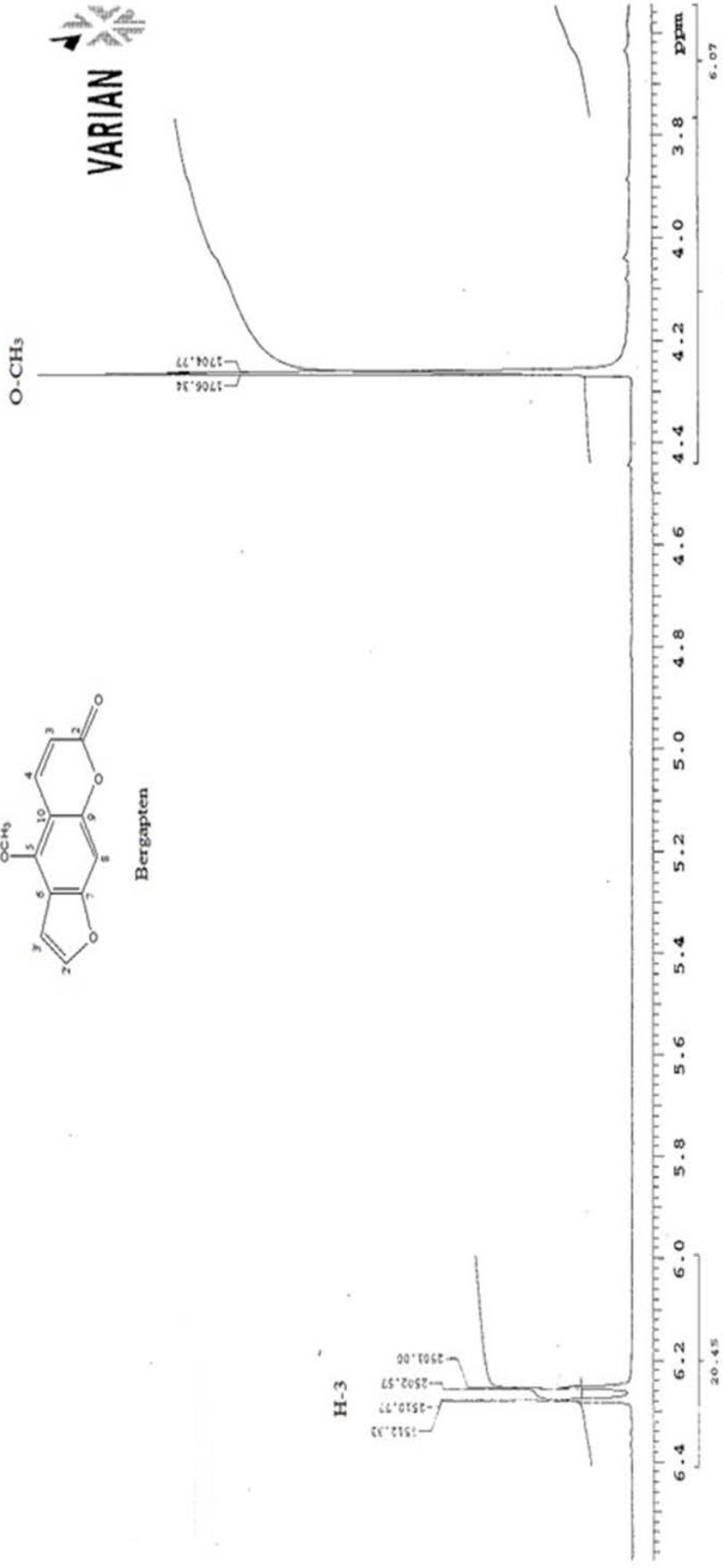
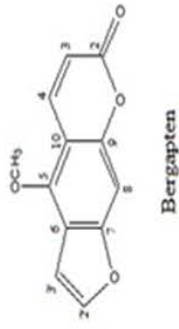


Bergapten

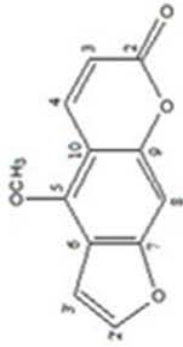


EK A.1. Bergapten bileşğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

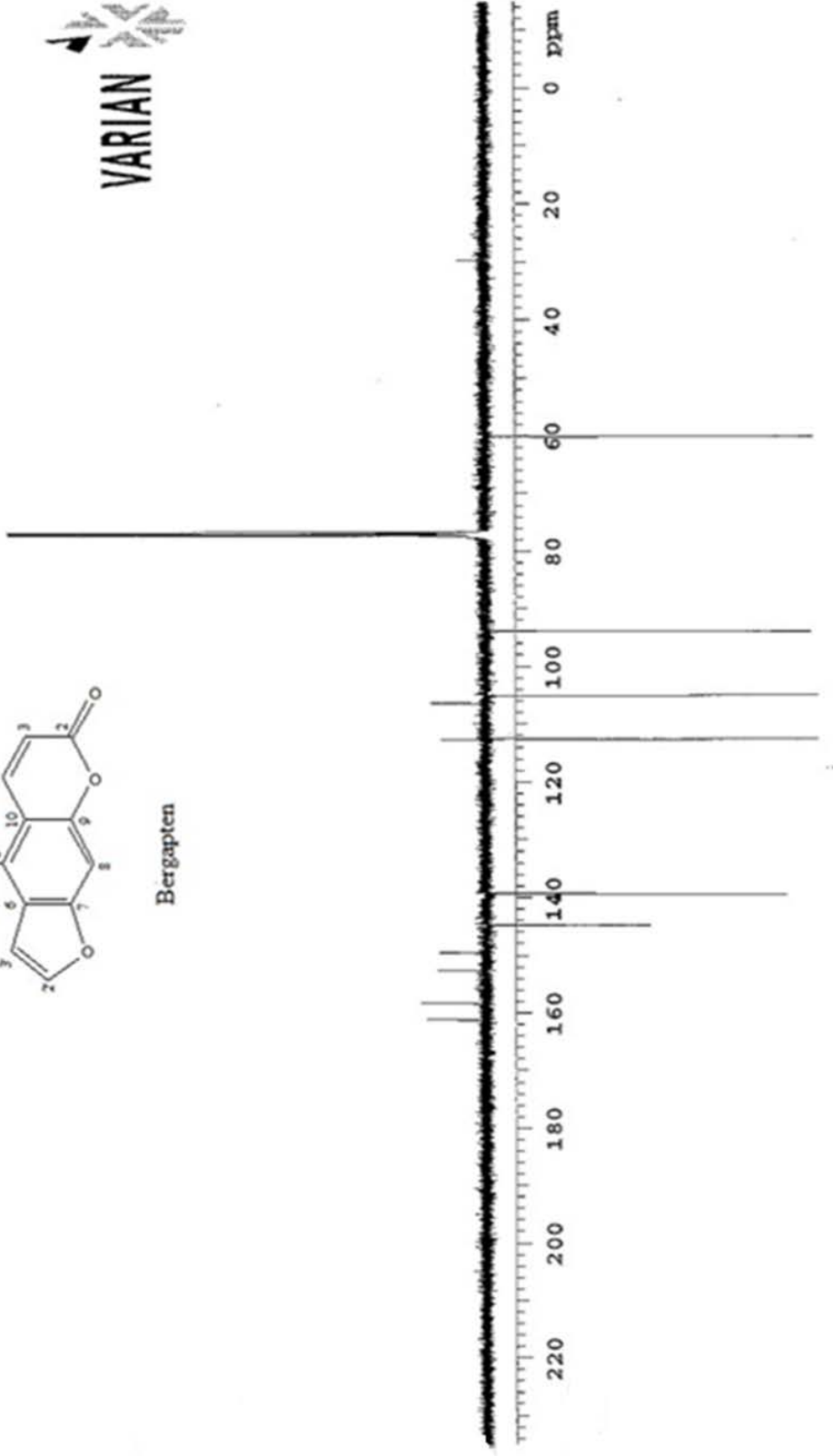




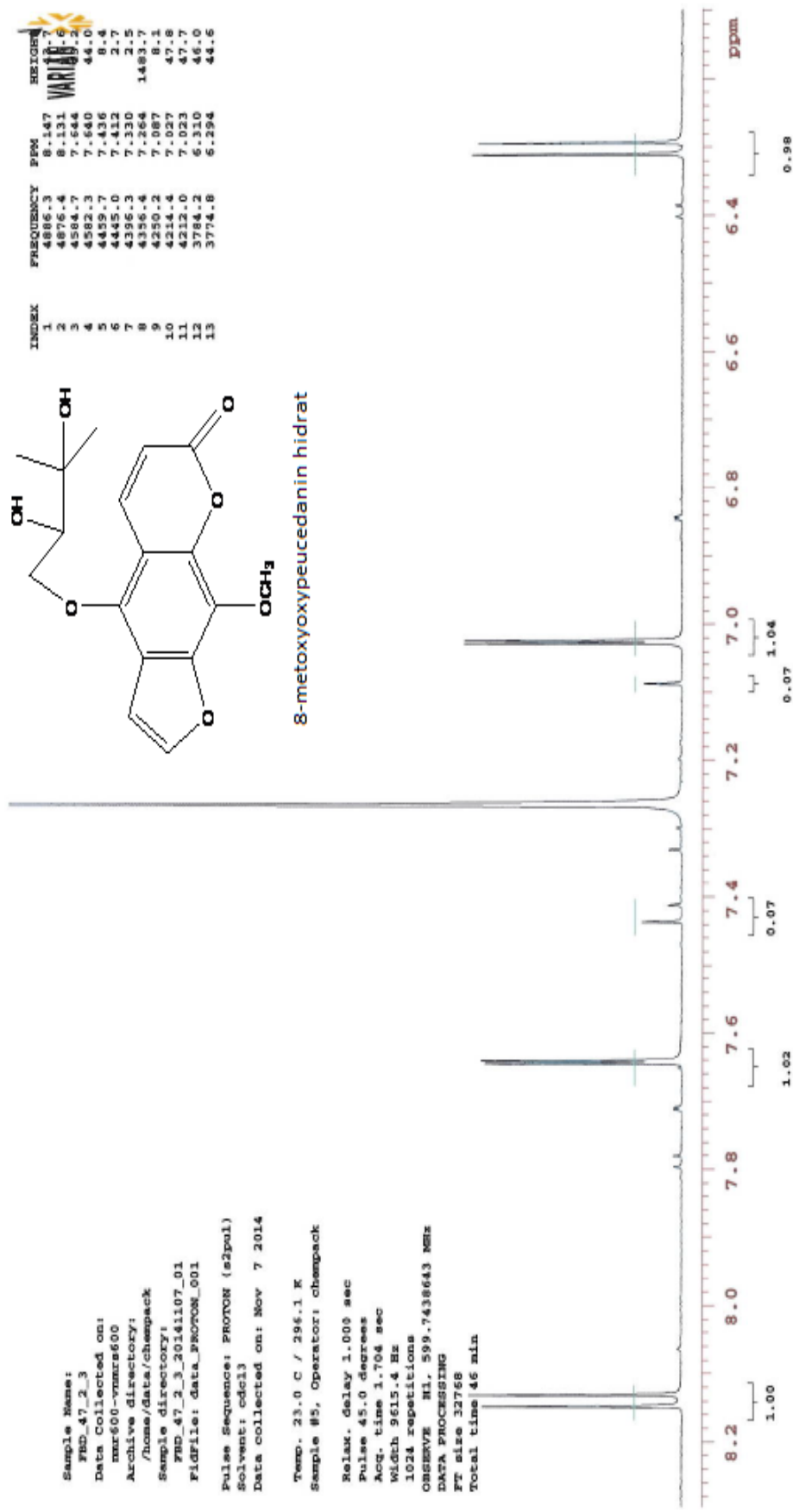
**EK A.2. Bergapten bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu**



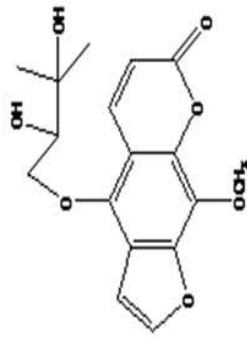
Bergapten



EK A.3. Bergapten bileşğinin <sup>13</sup>C NMR(APT) spektrumu



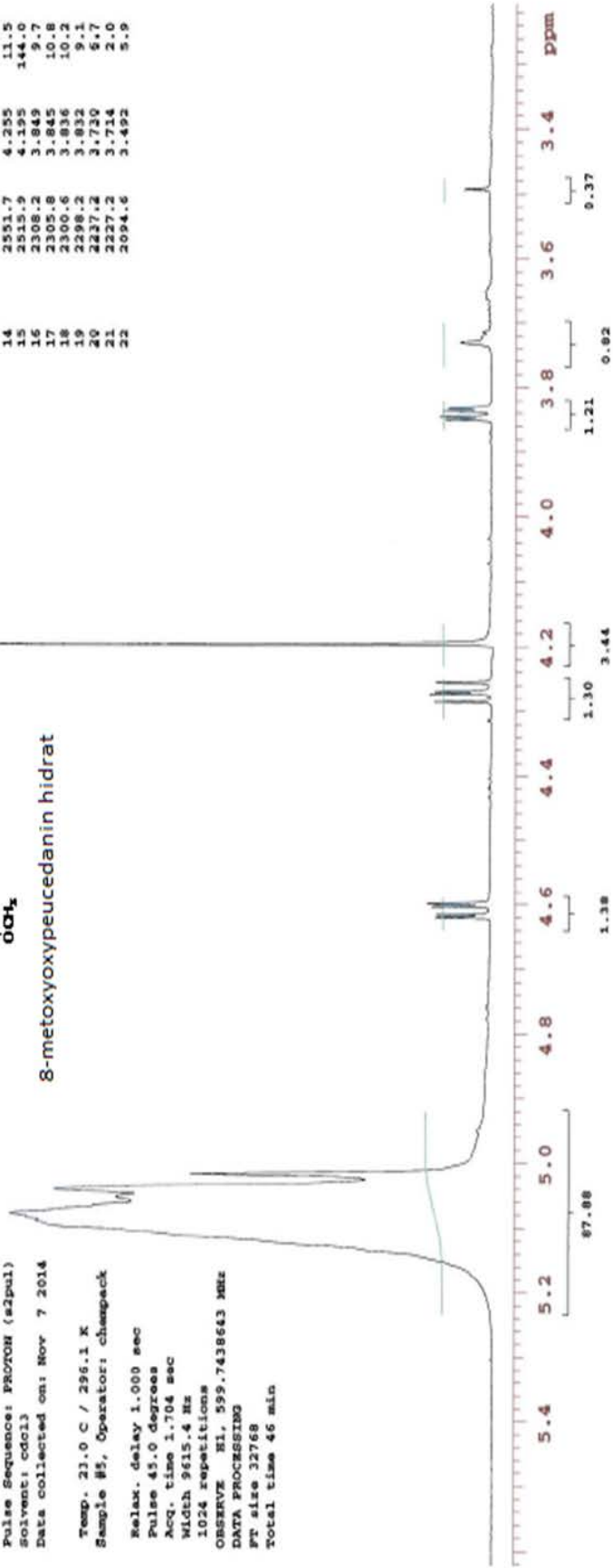
EK B.1. 8-Methoxy-oxypeucedanin hydrate bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



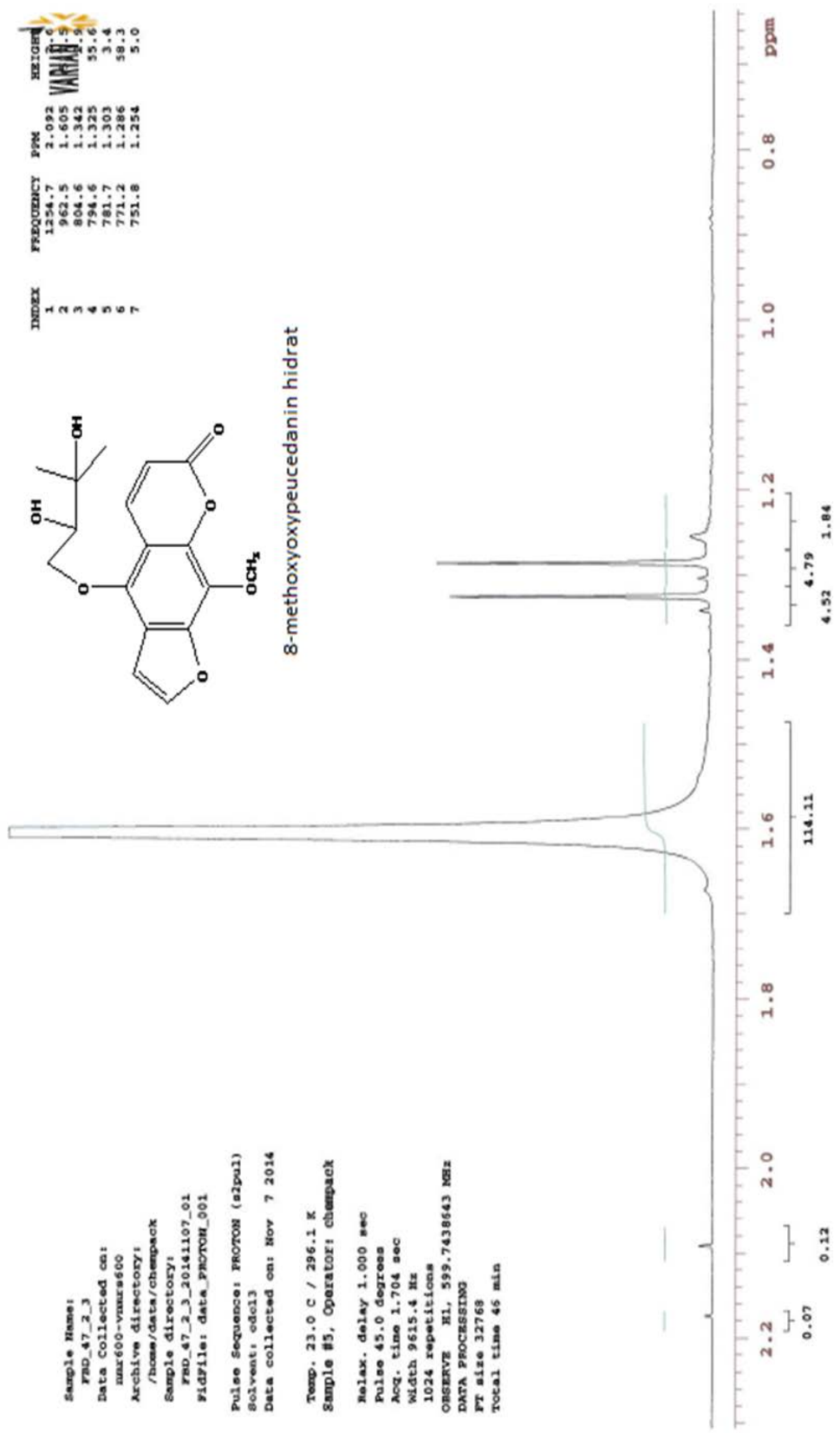
8-metoxyoxypeucedanin hidrat

INDEX	FREQUENCY	PPM	REGIONS
1	1051.8	5.088	9.2
2	1045.3	5.078	6
3	1030.0	5.052	6
4	1023.0	5.040	90.5
5	1008.3	5.016	62.5
6	998.4	4.949	2.9
7	2770.6	4.820	11.6
8	2767.7	4.815	11.4
9	2760.7	4.803	12.4
10	2757.7	4.798	13.3
11	2569.9	4.285	12.0
12	2562.3	4.272	12.9
13	2560.0	4.268	11.9
14	2551.7	4.255	11.5
15	2515.9	4.135	144.0
16	2308.2	3.849	9.7
17	2305.8	3.845	10.8
18	2300.6	3.836	10.2
19	2298.2	3.832	9.1
20	2237.2	3.730	8.7
21	2227.2	3.714	2.0
22	2094.6	3.492	5.9

Sample Name:  
 FID\_47\_2\_3  
 Data Collected on:  
 mmr600-vmrar600  
 Archive directory:  
 /home/data/chempack  
 Sample directory:  
 FID\_47\_2\_3\_20141107\_01  
 File: data\_PROTON\_001  
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 7 2014  
 Temp. 23.0 C / 296.1 K  
 Sample #5, Operator: chempack  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE N1, 599.7438643 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min



EK B.2. 8-Metoxyoxypeucedanin hydrate bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



EK B.3. 8-Methoxy-xypeucedanin hydrate bileşinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

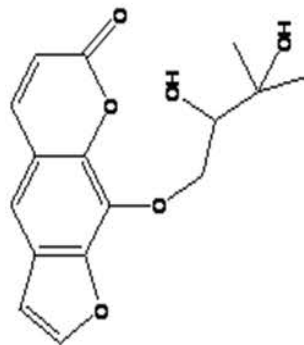
Sample Name:  
 FSD\_47\_1\_2\_3  
 Data Collected on:  
 mmr600-vnmr600  
 Archive directory:  
 /home/data/chempack  
 Sample directory:  
 FSD\_47\_1\_2\_3\_20141107\_01  
 Fidfile: data\_PROTON\_001

Pulse Sequence: PROTON (a2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Nov 7 2014

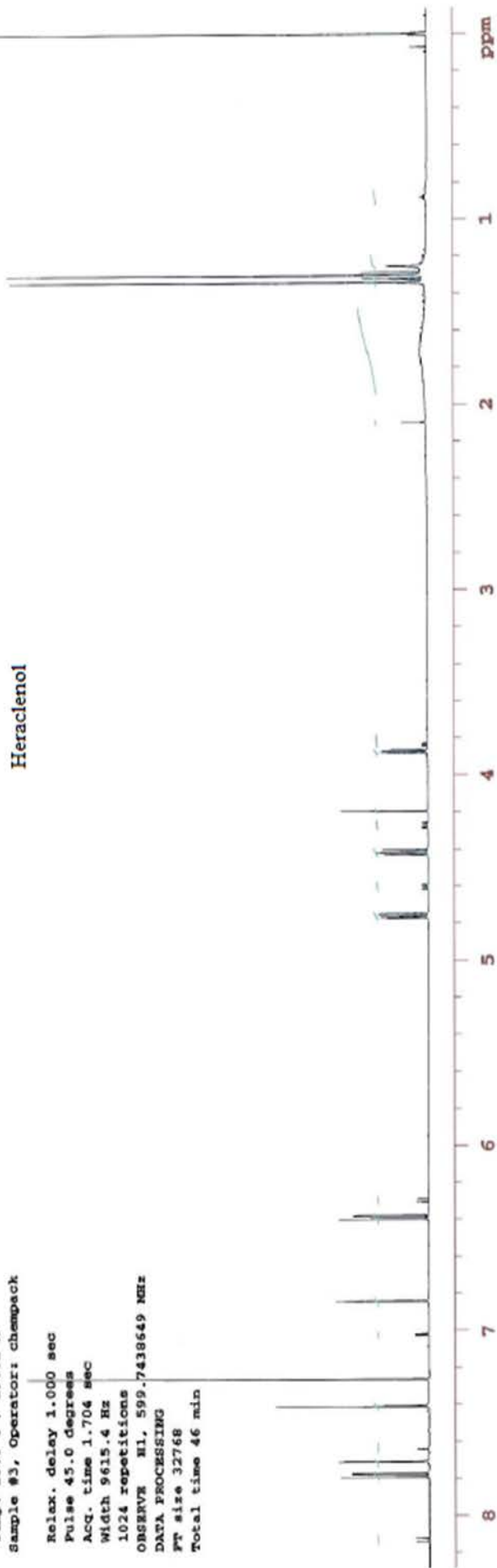
Temp. 23.0 C / 296.1 K  
 Sample #3, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions

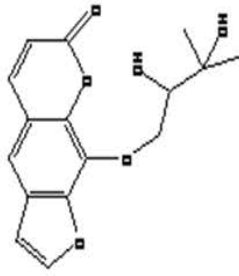
OBSERVE M1, 599.7438649 MHz  
 DATA PROCESSING  
 F2 size 32768  
 Total time 46 min



Heraclenol

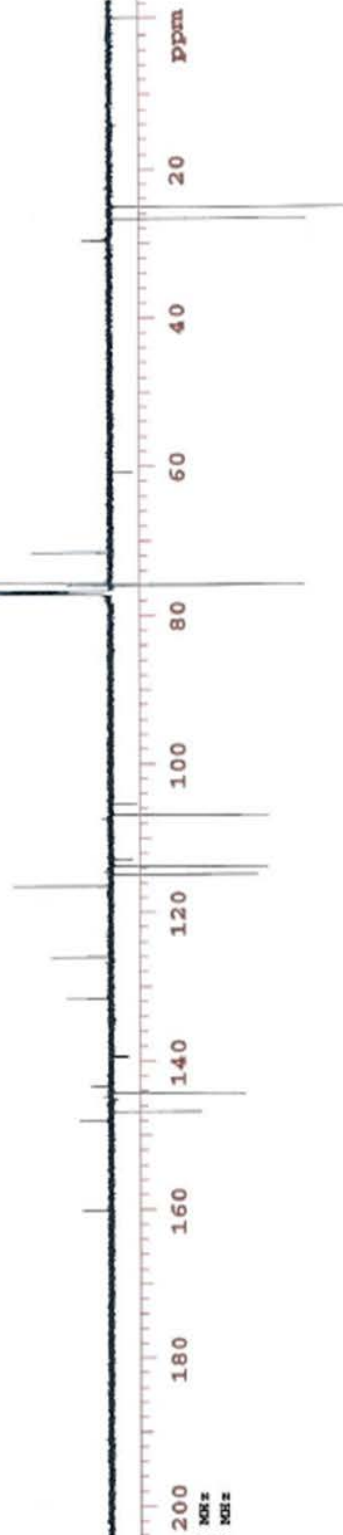


EK C.1. Heraclenol bileşğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

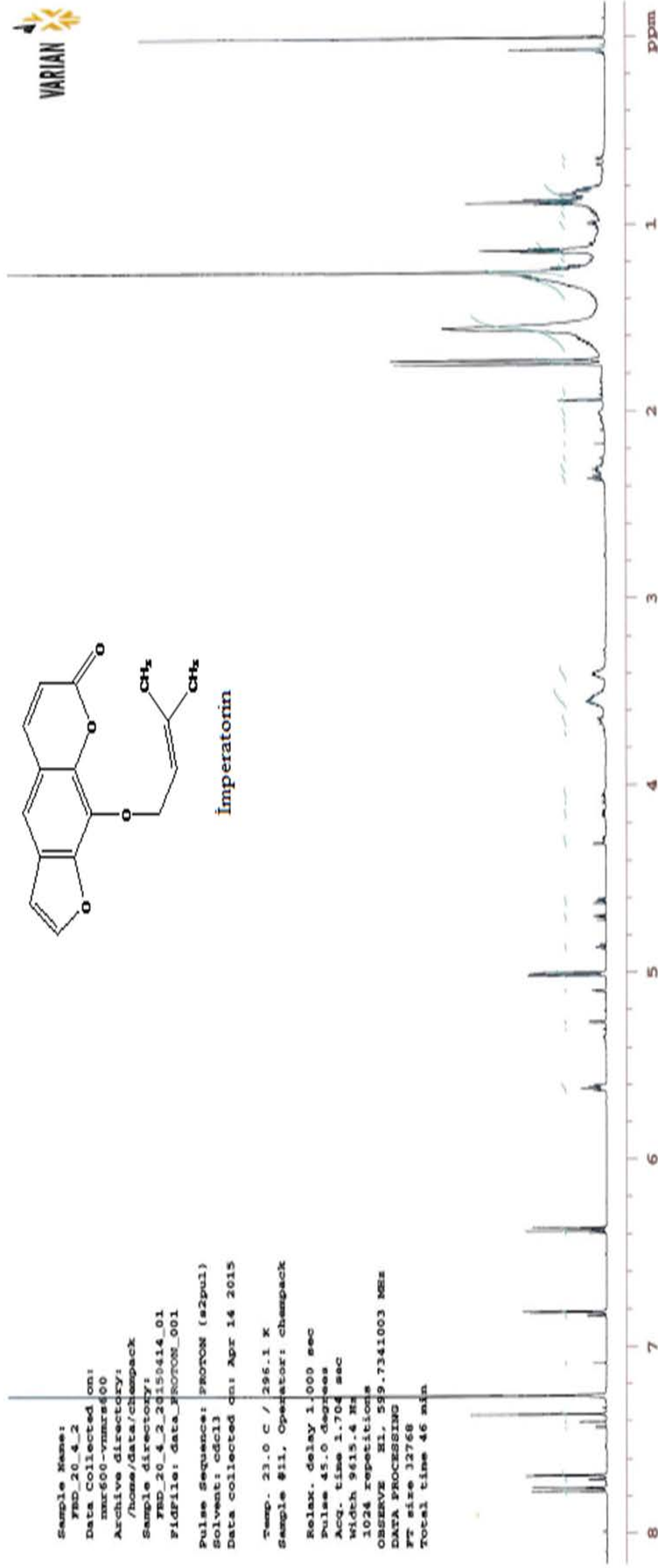


Heracleenol

F8D\_47\_1\_2\_3  
 Sample Name: F8D\_47\_1\_2\_3  
 Data Collected on: nmr600-vnmr600  
 Archive directory: /home/data/chempack  
 Sample directory: F8D\_47\_1\_2\_3\_20141219\_01  
 FIDfile: data\_APT\_001  
 Pulse Sequence: APT  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Dec 19 2014  
 Temp. 23.0 C / 296.1 K  
 Operator: chempack  
 Relax. delay 2.000 sec  
 1st pulse 90.0 degrees  
 2nd pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 0.865 sec  
 Width 37878.8 Hz  
 75000 repetitions  
 OBSERVE C13, 150.8057169 MHz  
 DECOUPLE H1, 599.7468720 MHz  
 Power 44 dB  
 on during acquisition  
 WALTZ-16 modulated  
 DATA PROCESSING  
 Line broadening 0.5 Hz  
 FT size 65536  
 Total time 60 hr, 1 min

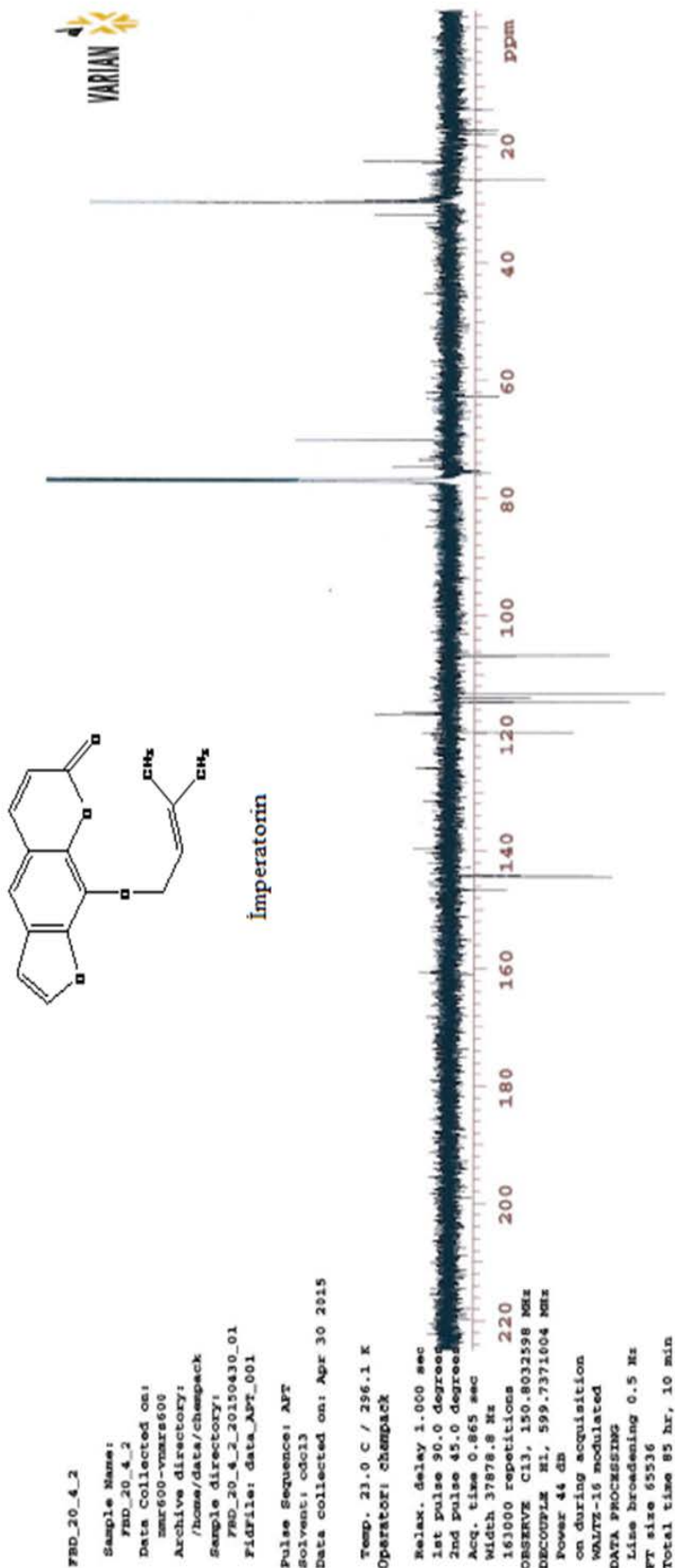


EK C.2. Heracleenol bileşiminin <sup>13</sup>C NMR spektrumu

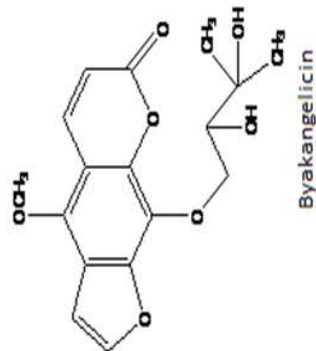


EK D.1. Imperatorin bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu





EK D.2. Imperatorin bileşiminin <sup>13</sup>C NMR spektrumu



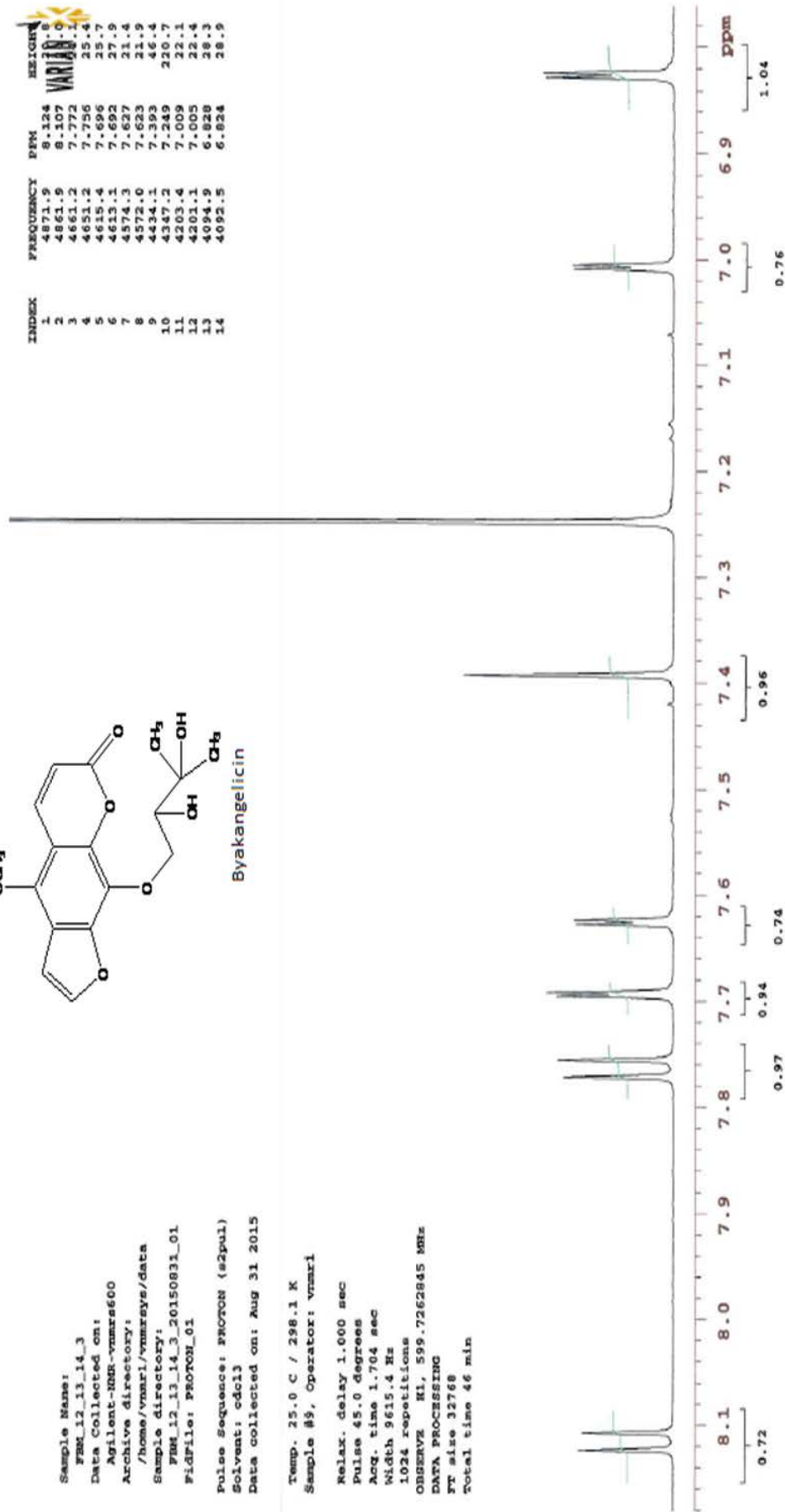
INDEX	FREQUENCY	PPM	REGION
1	4871.9	8.124	10.8
2	4861.9	8.107	10.0
3	4661.2	7.772	10.1
4	4651.2	7.756	25.4
5	4615.4	7.696	25.7
6	4613.1	7.692	27.9
7	4574.3	7.627	21.4
8	4572.0	7.623	21.9
9	4434.1	7.393	46.4
10	4347.2	7.249	220.7
11	4203.4	7.009	22.1
12	4201.1	7.005	22.4
13	4094.9	6.828	28.3
14	4092.5	6.824	28.9

Sample Name:  
 F08\_12\_13\_14\_3  
 Data Collected on:  
 Agilent-DMK-vnmr600  
 Archive directory:  
 /home/vnmr1/vnmr600/data  
 Sample directory:  
 F08\_12\_13\_14\_3\_20150831\_01  
 Fidfile: PROTON\_01

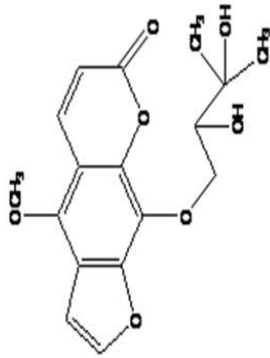
Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Aug 31 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #9, Operator: vnmr1

Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE F1, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min



EK E.1. Byakangelicin bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

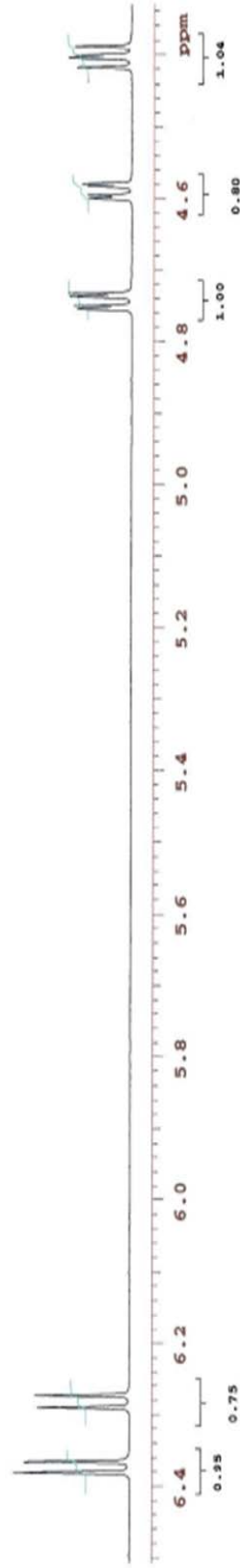


Byakangelicin

INDEX	FREQUENCY	PPM	REMARKS
1	3827.2	6.382	
2	3777.9	6.281	
3	3777.9	6.281	
4	3762.7	6.274	
5	2851.9	4.755	
6	2848.9	4.750	
7	2841.3	4.738	
8	2838.9	4.734	
9	2757.2	4.594	
10	2757.2	4.594	
11	2748.6	4.583	
12	2746.2	4.579	
13	2650.0	4.419	
14	2641.7	4.405	
15	2639.4	4.401	
16	2631.6	4.388	

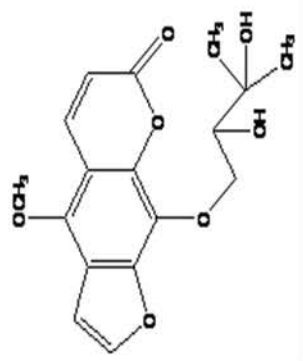
Sample Name:  
 FM12\_13\_14\_3  
 Data Collected on:  
 Agilent-NMR-vmr600  
 Archive directory:  
 /home/vmr1/vmr600/data  
 Sample directory:  
 FM12\_13\_14\_3\_20150831\_01  
 FIDFile: PROTOR\_01  
 Pulse Sequence: PROTOR (s2pal)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Aug 31 2015

Temp: 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #: Operator: vmr1  
 Relax. delay: 1.000 sec  
 Pulse: 45.0 degrees  
 Acq. time: 1.704 sec  
 Width: 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE: 90. 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min



EK E.2. Byakangelicin bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	2650.0	4.419	12.4
2	2641.7	4.405	12.3
3	2639.4	4.401	12.0
4	2631.8	4.388	12.9
5	2561.3	4.271	9.5
6	2553.1	4.257	11.2
7	2550.8	4.253	9.9
8	2543.2	4.241	9.7
9	2505.6	4.178	125.8
10	2318.6	3.866	11.2
11	2315.4	3.861	11.7
12	2310.2	3.852	11.0
13	2307.8	3.848	11.2
14	2297.3	3.831	9.1
15	2294.3	3.826	9.1
16	2289.0	3.817	8.7
17	2286.7	3.813	8.8
18	2134.7	3.559	2.1
19	2128.8	3.550	3.7
20	2123.5	3.541	4.3
21	2118.3	3.532	3.9
22	2113.6	3.524	3.2
23	2110.6	3.519	3.3
24	2106.5	3.512	3.0
25	2103.6	3.508	2.9
26	2100.6	3.503	2.8
27	2032.0	3.402	2.9
28	2036.7	3.396	4.1
29	2032.0	3.388	4.2
30	2027.3	3.380	4.2
31	2023.2	3.374	3.3
32	1957.5	3.264	4.9



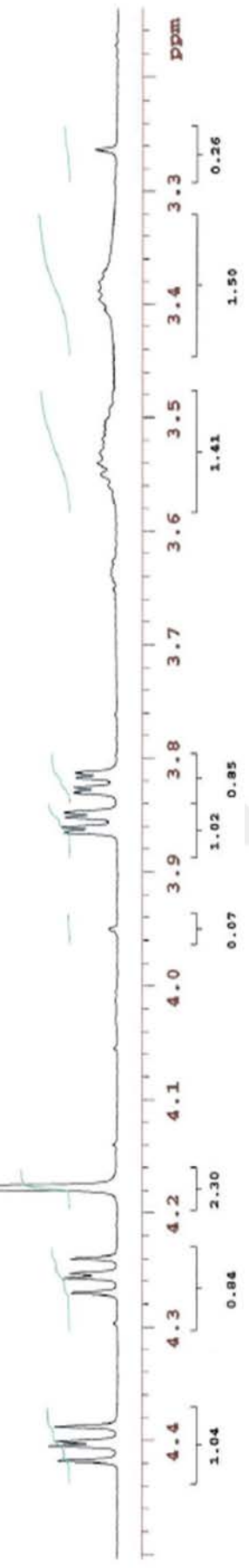
Byakangelicin

Sample Name: FHM\_12\_13\_14\_3  
 Data Collected on: Agilent-NMR-vnmr600  
 Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data  
 Sample directory: FHM\_12\_13\_14\_3\_20150831\_01  
 Fidfile: FPROTON\_01

Pulse Sequence: FPROTON (s2pul)  
 Solvent: CDCl3  
 Data collected on: Aug 31 2015

Temp. 25.0 C / 298.1 K  
 Sample #9, Operator: vnmr1

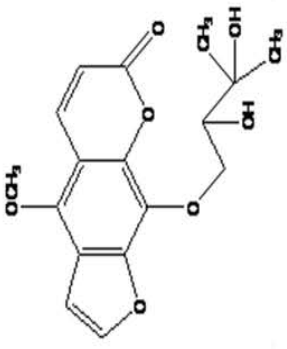
Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE H1, 599.7262845 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min



EK. E.3. Byakangelicin bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

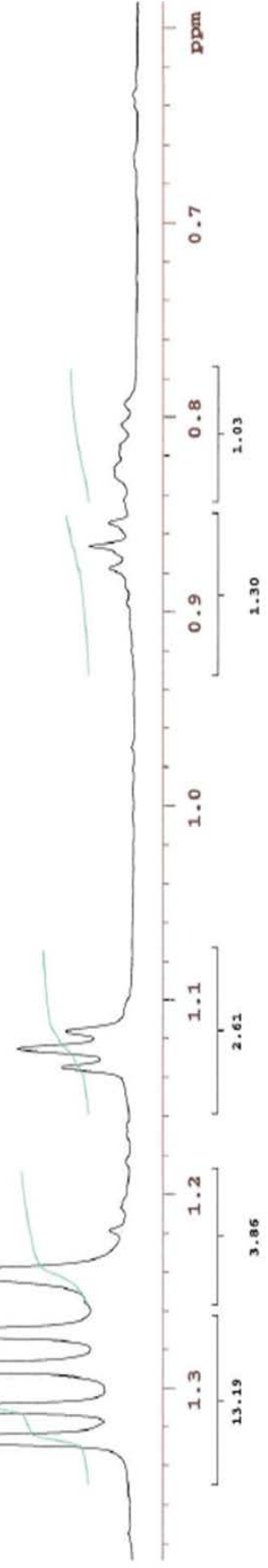


INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	795.4	1.326	1.3
2	786.0	1.311	1.3
3	773.1	1.289	1.3
4	762.6	1.272	109.1
5	752.6	1.255	10.7
6	743.8	1.240	49.2
7	730.9	1.219	5.8
8	723.8	1.207	3.4
9	709.8	1.183	2.4
10	701.5	1.170	2.2
11	698.6	1.165	2.2
12	681.0	1.136	15.2
13	675.1	1.126	24.3
14	669.3	1.116	14.5
15	537.2	0.896	2.3
16	531.9	0.887	2.6
17	526.6	0.878	5.8
18	519.6	0.866	10.0
19	512.6	0.855	6.0
20	505.3	0.843	3.0
21	497.9	0.830	4.9
22	495.5	0.826	5.0
23	490.8	0.818	3.8
24	489.1	0.816	3.7
25	482.0	0.804	3.5
26	475.6	0.793	2.8



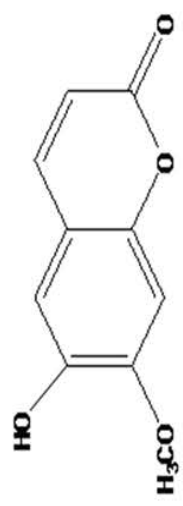
Byakangelicin

Sample Name: FHM\_12\_13\_14\_3  
 Data Collected on: Agilent-HMR-vnmr600  
 Archive directory: /home/vnmr1/vnmrsys/data  
 Sample directory: FHM\_12\_13\_14\_3\_20150831\_01  
 Fidfile: PROTON\_01  
 Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Aug 31 2015  
 Temp. 25.0 C / 299.1 K  
 Sample #9, Operator: vnmr1  
 Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1024 repetitions  
 OBSERVE HL 599.7262865 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 46 min



EK E.4. Byakangelicin bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	4752.6	7.991	7.3
2	4699.7	7.836	7.3
3	4607.0	7.662	6.4
4	4597.6	7.666	16.7
5	4457.9	7.433	41.6
6	4395.1	7.329	15.8
7	4355.2	7.262	6236.8
8	4249.0	7.085	46.0
9	4114.0	6.860	29.1
10	3787.1	6.315	20.3
11	3777.7	6.299	19.1
12	3179.7	5.302	29.1



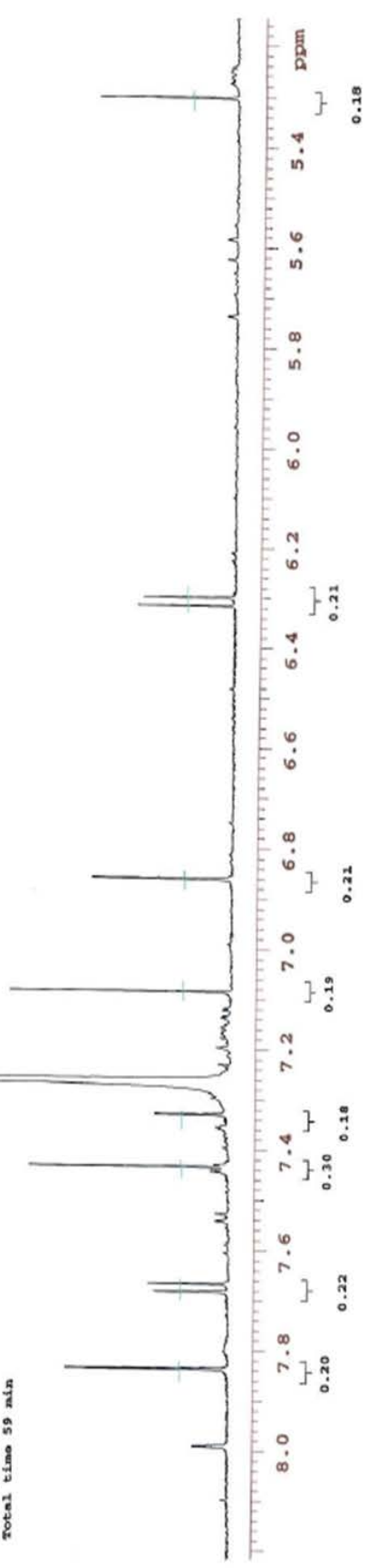
Isoscopoletin

Sample Name:  
 FMD\_23\_24\_5\_1  
 Data Collected on:  
 mar600-nmr600  
 Archive directory:  
 /home/data/chempack  
 Sample directory:  
 FMD\_23\_24\_5\_1\_20150710\_01  
 F1dfile: data\_PROTON\_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Jul 10 2015

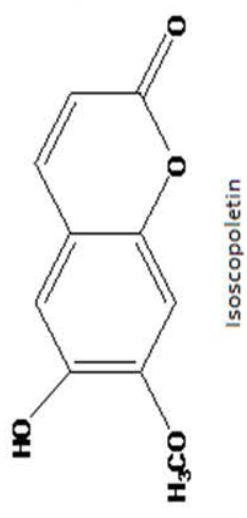
Temp. 23.0 C / 296.1 K  
 Sample #4, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1320 repetitions  
 OBSERVE H1, 599.7295326 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 59 min



EK. F.1. Isoscopoletin bileşinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

FREQUENCY	PPM	HEIGHT
2162.1	3.605	11.7
2158.5	3.599	11.5
2152.7	3.589	11.7
2143.9	3.575	19.3
2138.0	3.565	27.4
2132.1	3.555	31.5
2126.8	3.546	26.4
2122.1	3.539	21.6
2118.6	3.533	22.6
2115.1	3.527	19.7
2111.6	3.521	19.1
2109.2	3.517	18.2
2102.8	3.506	12.3
2094.6	3.493	13.3
2051.1	3.420	12.7
2045.9	3.411	20.4
2041.2	3.403	20.4
2036.5	3.396	19.6
2031.8	3.388	13.9
2014.2	3.358	16.5

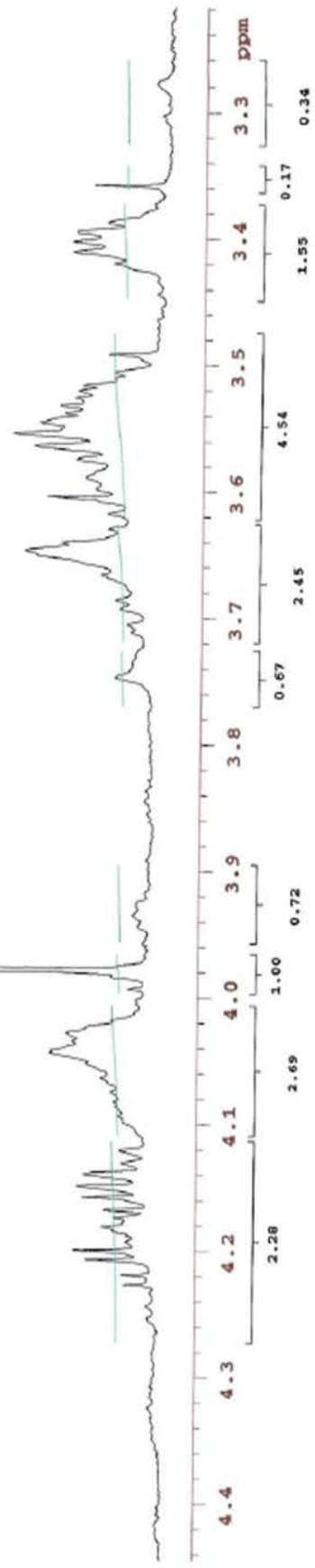


Sample Name: FMD\_23\_24\_5\_1  
 Data Collected on: nmr600-vnmr600  
 Archive directory: /home/data/chempack  
 Sample directory: FMD\_23\_24\_5\_1\_20150710\_01  
 FIDfile: data\_PROTON\_001

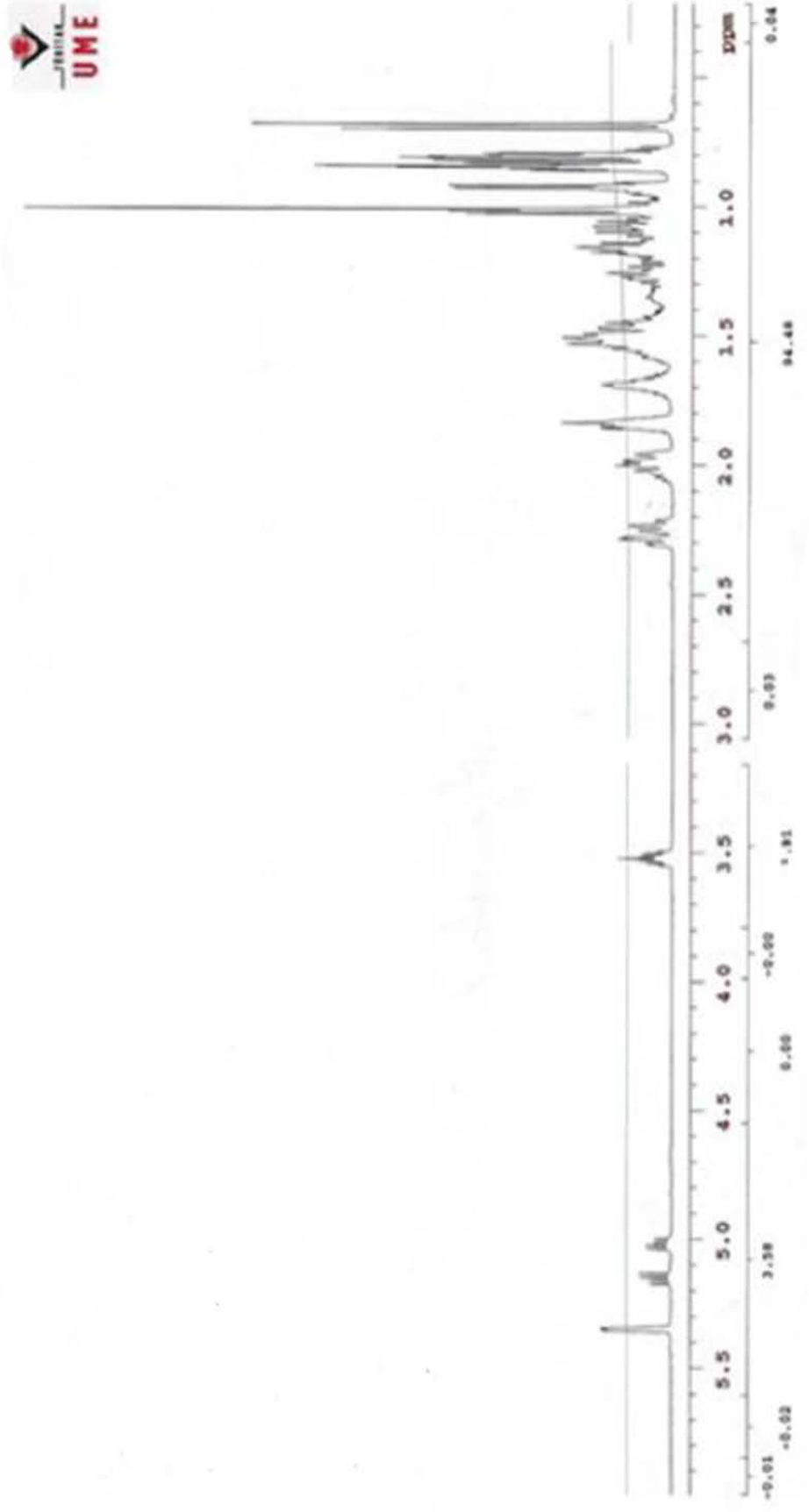
Pulse Sequence: PROTON (zgpg30)  
 Solvent: cdcl3  
 Data collected on: Jul 10 2015

Temp. 23.0 C / 296.1 K  
 Sample #4, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec  
 Pulse 45.0 degrees  
 Acq. time 1.704 sec  
 Width 9615.4 Hz  
 1320 repetitions  
 OBSERVE H1, 599.7295326 MHz  
 DATA PROCESSING  
 FT size 32768  
 Total time 59 min

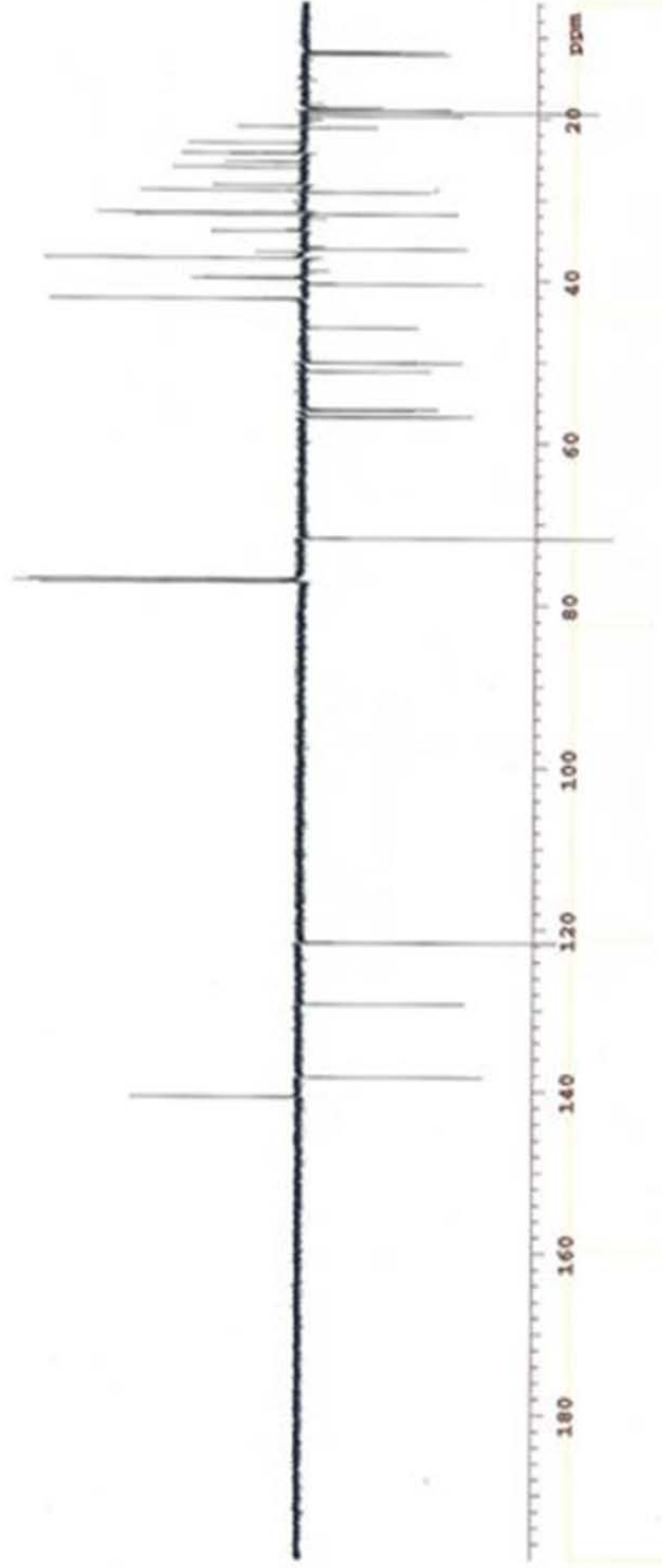


EK F.2. Isoscopoletin bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

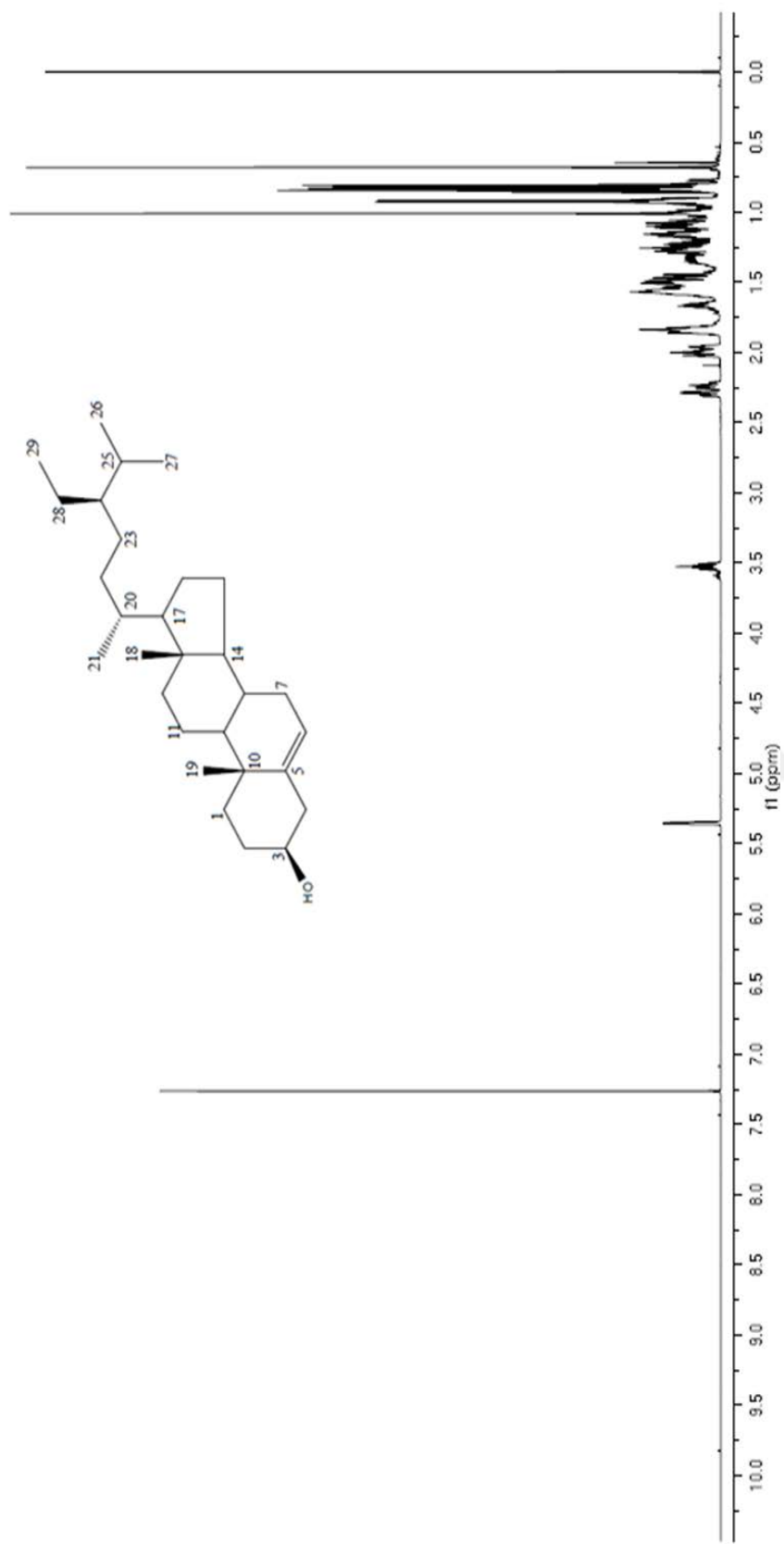


**EK G.1.** Stigmasterol bileşiminin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

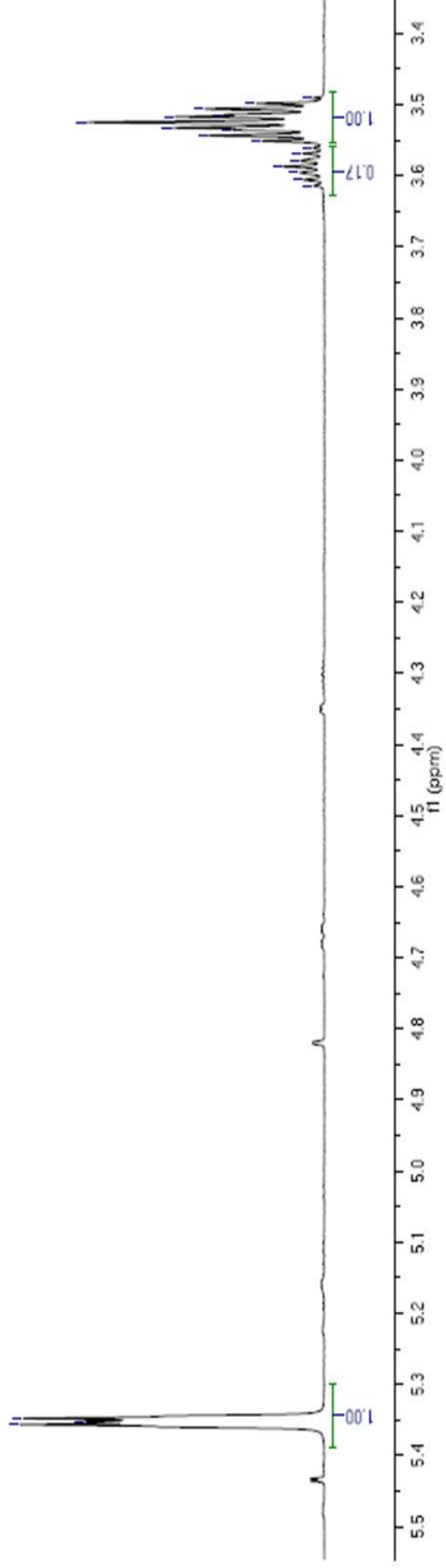
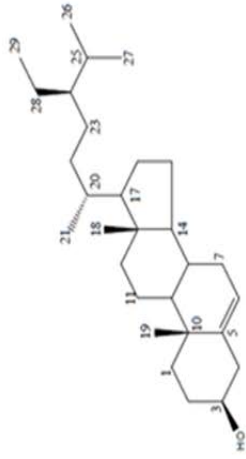




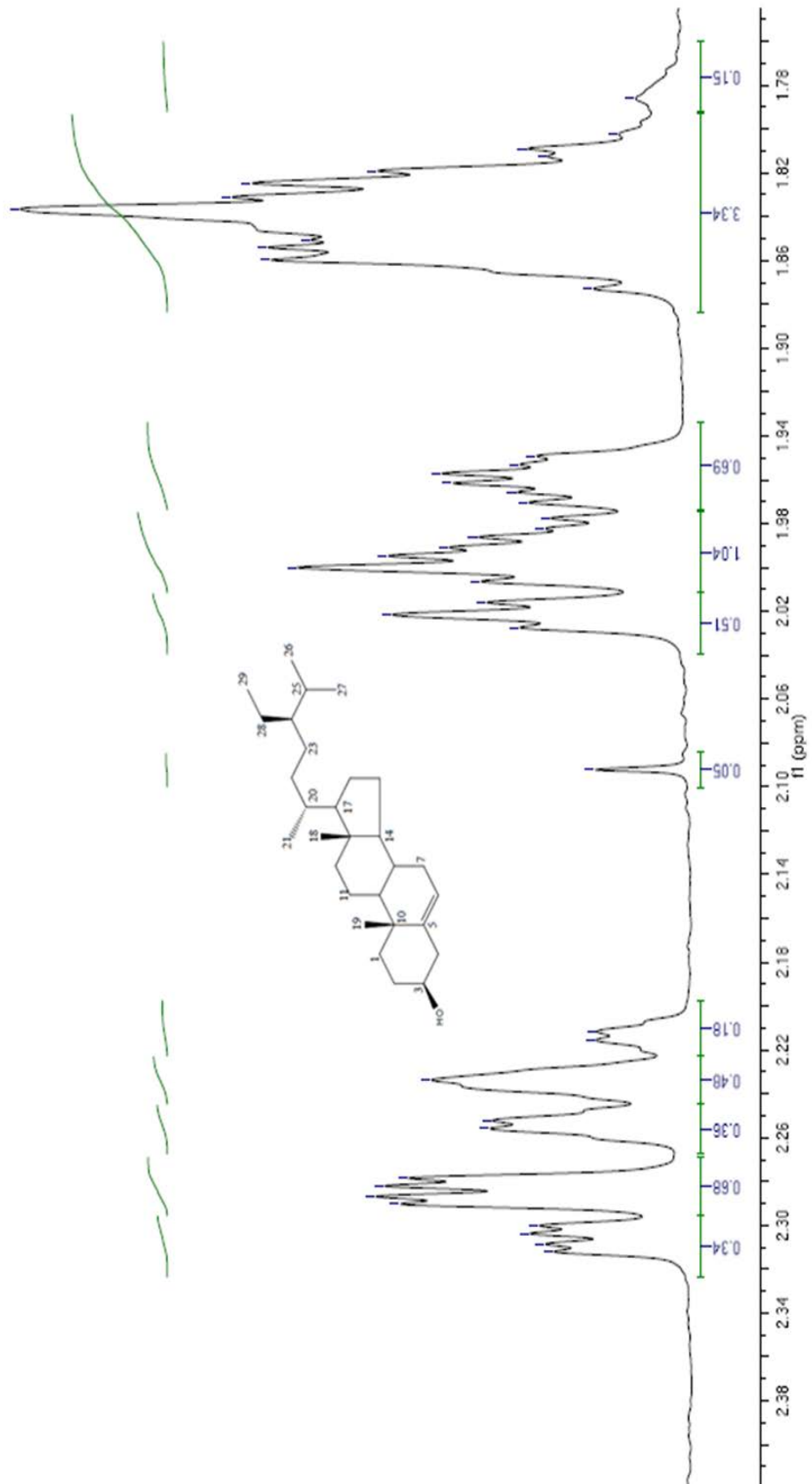
**EK G.2.** Stigmasterol bileşiminin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



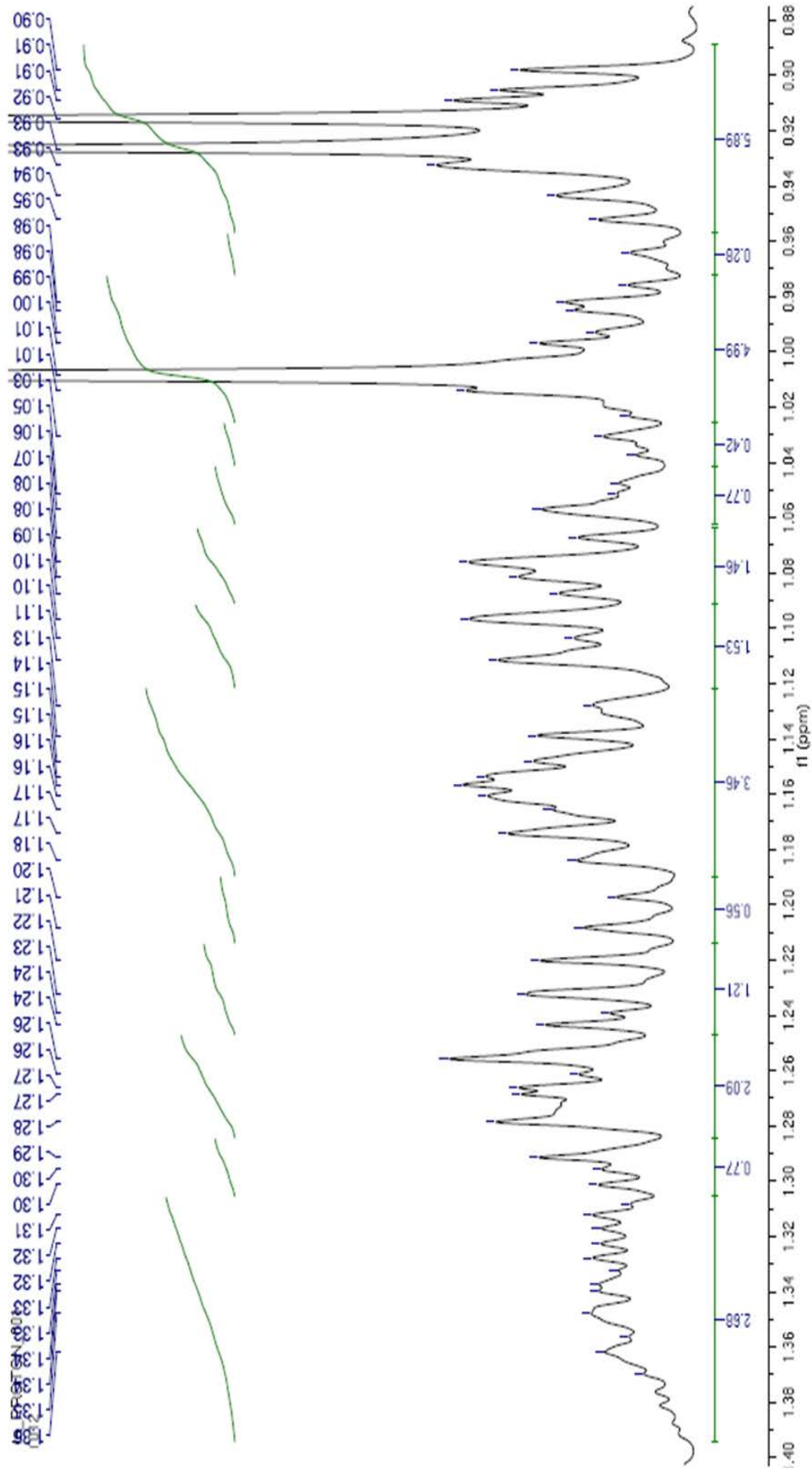
**EK H.1.**  $\beta$ -Sitosterol bileşiminin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



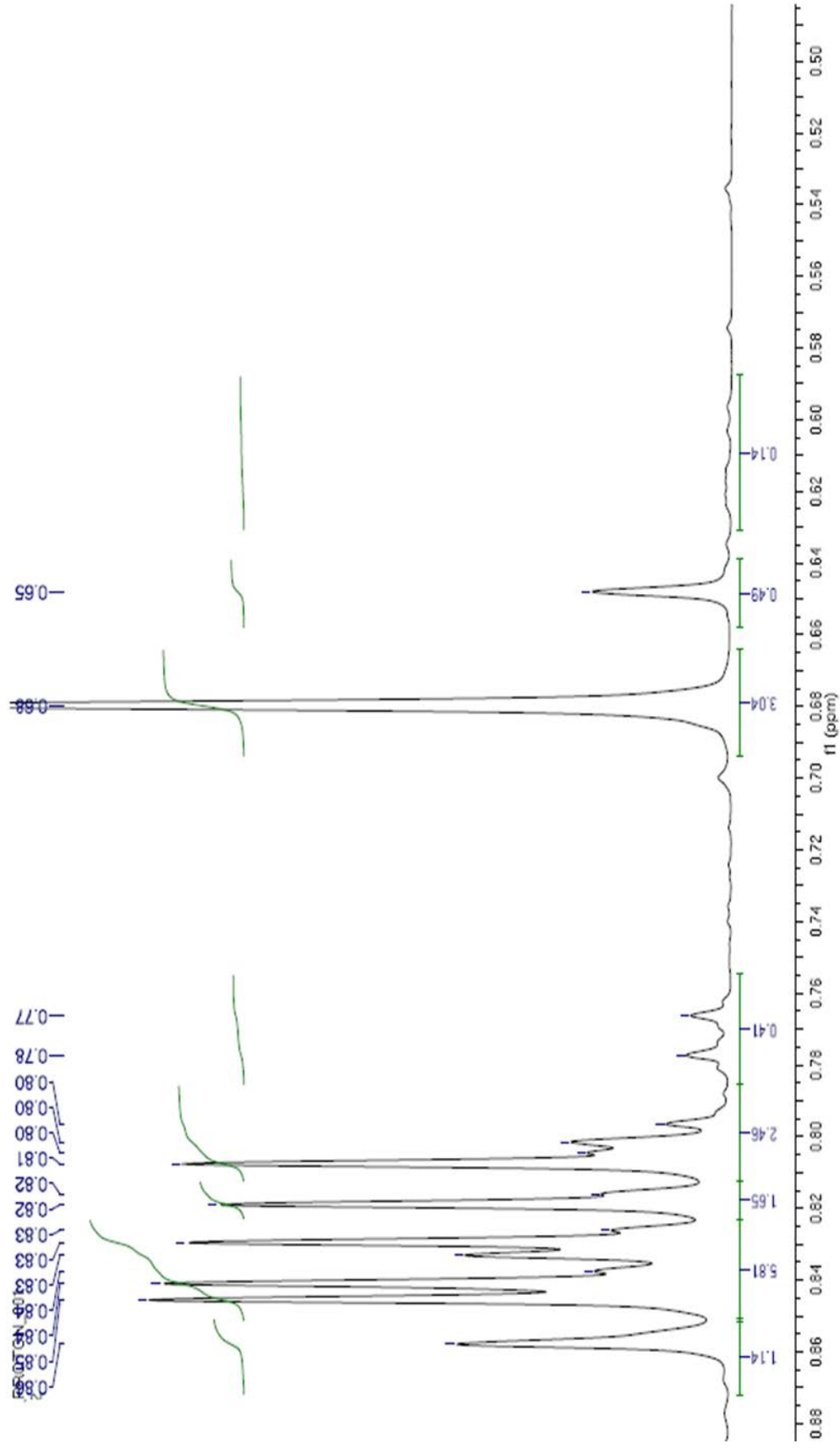
EK H.2.  $\beta$ -Sitosterol bileşiminin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



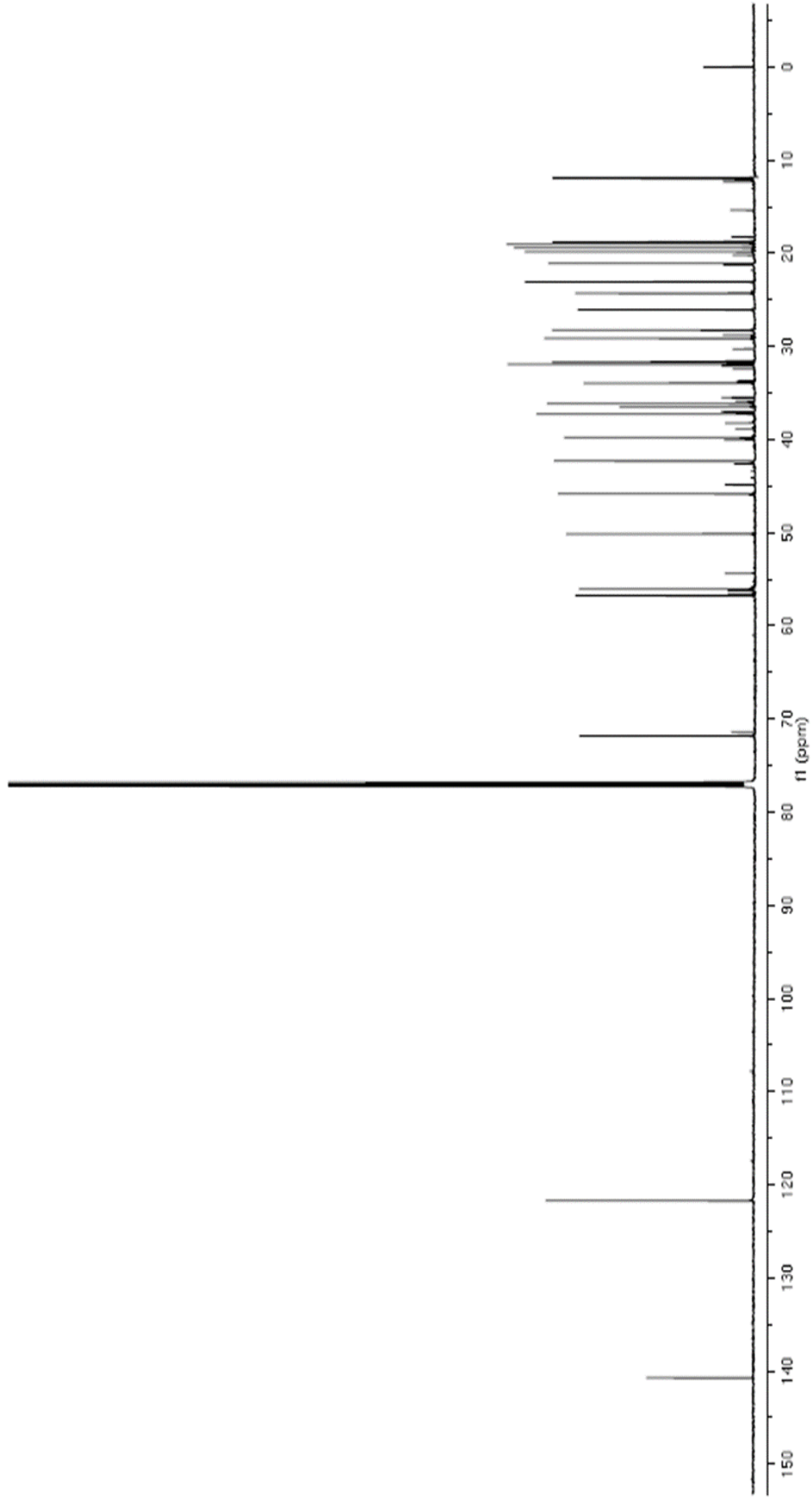
**EK H.3.**  $\beta$ -Sitosterol bileşiminin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



**EK H.4.**  $\beta$ -Sitoosterol bileşiminin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



**EK H.5.**  $\beta$ -Sitosterol bileşiminin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



**EK H.6.**  $\beta$ -Sitosterol bileşğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



## ÖZGEÇMİŞ

- 1. Adı Soyadı** : Esin Aslan
- Adres** : Cumhuriyet mh. Kazım Orbay cd. Elysium Residence D Blok No:3  
Şişli/İstanbul
- Telefon**  
**Mail** : 0 212 2301346 – 0 212 2962107 – 0 530 2000020  
: esin\_ercin@yahoo.com
- 2. Doğum Tarihi** : 23.03.1976
- 3. Unvanı** : Eczacı
- 4. Öğrenim Durumu** : Lisans

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
<b>Lisans</b>	Eczacılık	İstanbul Üniversitesi	1997
	İşletme	Anadolu Üniversitesi	2011
	Felsefe	Anadolu Üniversitesi	-
<b>Yüksek Lisans</b>	Farmakognozi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	2016
<b>Doktora</b>			



---

## 5. Akademik Unvanlar

Eczacı, İşletmeci

## 6. Yüksek Lisans Tezleri

*Ferulago blanchiana* bitkisindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi

## 7. Ulusal/Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan bildiri kitabında basılan bildiriler

• Esin Erçin Aslan, Demet Dincel, Gülaçtı Topçu. Isolation of Furocoumarins From *Ferulago blanchiana* Post and Investigation of Their Anticholinesterase Activity. 19<sup>th</sup> International Congress 22-24 July, 2015 Bonn, Germany

• Begüm Çakar Haberdar, Esin Erçin Aslan, Demet Dincel, Gülaçtı Topçu. Biological Activities and Chemical Composition of *Ferulago idaea*. 11<sup>th</sup> International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-11) in Ankara, June 9-12, 2015

## 8. Projeler

*Ferulago blanchiana* bitkisindeki sekonder metabolitlerin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi, BAP No: 9.2014/17

## 9. İdari Görevler

Erçin Eczanesi – Eczacı

İstanbul Eczacı Odası Dermokozmetik ve Besin Takviyeleri Komisyonu

İstanbul Eczacı Odası MİSEP Komisyonu

## 10. Bilimsel Kuruluşlara Üyelikleri

Klinik Eczacılık Derneği

Aromaterapi Derneği

**11. Son iki yılda verdiğiniz lisans ve lisansüstü düzeydeki dersler için aşağıdaki tabloyu doldurunuz.**

Akademik Yıl	Dönem	Dersin Adı	Öğrenci Sayısı
2014-2015	GÜZ	6EME401.1 Eczacılık Mevzuatı ve Etik	21
		5EI201.1 Eczane İşletmeciliği	13
	BAHAR	6ECI402.1 Eczacılık İşletmeciliği	20
		6EME302.1 Eczacılık Mevzuatı ve Etik	35
		5EKS202.1 Eczane Kayıtları ve Stok Yönetimi	13
		5EME102.1 Eczacılık Mevzuatı ve Etik	18
2015-2016	GÜZ	ECH205.1 Eczane İşletmeciliği	18
	BAHAR	6AYD501.1 Eczane Yönetimi ve İşletmeciliği	12
		6ECI402.1 Eczacılık İşletmeciliği	38
		ECH125.1 Eczacılık Mevzuatı ve Etik	18
		ECH226.1 Eczane Kayıtları ve Stok Yönetimi	17