



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Salvia cerino-pruinosa var. *elazigensis* TÜRÜNÜN ANTIOKSİDAN
AKTİVİTE KONTROLLÜ SEKONDER METABOLİT
İZOLASYONU

LEYLA BALUR ADSIZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. ABDULSELAM ERTAŞ

DİYARBAKIR- 2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



ONAY

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anabilim Dalı
Yüksek Lisans öğrencisi'nın
hazırladığı “.....”
başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: .../.../201...

Danışman _____

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı	_____
Üye	_____
Üye	_____
Üye	_____
Üye	_____

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../.../....
tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

...../...../20...

Öğrencinin Adı ve Soyadı

İmza

TEŞEKKÜR

Öncelikle tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bilgi, tecrübe ve rehberliğini benden esirgemeyen ve bana geleceğe dair akademik ilham veren öğrencisi olmaktan büyük mutluluk ve onur duyduğum Sayın Danışman Hocam Doç. Dr. Abduselam Ertaş'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Tezin her aşamasında ve özellikle yapı aydınlatma konusundatecrübesini ve bilgisini bizden esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ufuk Kolak'a teşekkür ederim. Yine yapı aydınlatma konusunda tecrübesini bizden esirgemeyen ve tezimin bir parçası olduğu 114Z801 nolu projenin Danışmanı olan Prof.Dr.Gülaçtı Topçu'ya teşekkür ederim.

Bitki materyallerini toplama ve teşhis konusunda destek veren Sayın Arş. Gör. Mehmet Fırat'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşları İsmail Yener, Esra Yarış, Mehmet Veysi Çağlayan, Eyüp ve Evin Aygün'e teşekkür ederim.

Son olarak benden maddi manevi desteklerini esirgemeyen sevgili ailem, bu çalışma için beni sürekli teşvik eden eşim ve başta Ferhan Arslan olmak üzere tüm değerli dostlarıma sonsuz teşekkürler.

Ayrıca, maddi desteğiyle projenin gerçekleştirilmesinde çok büyük katkısı olan TÜBİTAK'a sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma Tübitak tarafından desteklenmiştir. Proje No: 114Z801

İÇİNDEKİLER

ONAY	i
BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	v
KISALTIMA VE SİMGELER DİZİNİ	xii
ŞEKİL DİZİNİ.....	xiv
RESİM DİZİNİ.....	xix
TABLO DİZİNİ.....	xx
1.1. ÖZET.....	1
1.2. ABSTRACT	3
2.GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
3. GENEL BİLGİLER	8
3.1 Botanik Bilgiler.....	8
3.1.1. Labiatae(Lamiaceae) familyası	8
3.1.2 <i>Salvia</i> L. cinsi	9
3.2. Farmakopelerde Kayıtlı Olan <i>Salvia</i> Türleri	9
3.3. <i>Salvia</i> Türlerinin Kullanımı.....	10
3.4. <i>Salvia</i> Türlerinin Türkiye’de Etnofarmakognozideki Yeri	10
3.5. <i>Salvia</i> Türlerinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi	12
3.6. <i>Salvia</i> Türleri Hakkında Yapılan Kimyasal Çalışmalar	13
3.6.1. <i>Salvia</i> Türlerinde bulunan fenolik asitler	13
3.6.2. <i>Salvia</i> türlerinde bulunan polifenoller.....	14
3.6.3. <i>Salvia</i> türlerinde bulunan terpenler	16
3.7. <i>Salvia</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları	18
3.8. Sekonder Metabolitler	31
3.8.1 Terpenler.....	33
3.8.2. Steroidler	40
3.8.3 Fenolik bileşikler.....	42
3.8.4. Flavonoitler.....	43
3.8.5. Yağ asitleri.....	45

3.9. Antioksidanlar	46
3.9.1. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri.....	48
3.9.2. Gıdalarda kullanılan antioksidanlar	49
3.10. Alzheimer Hastalığı	50
3.10.1. Asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) inhibitörleri.....	51
3.10.2. Kolinesteraz inhibitörlerinin alzheimer hastalığındaki mekanizması.....	51
3.11. Üreaz.....	54
3.12. Tirozinaz	56
3.13. LC-MS Teknikleri	59
3.14. GC/MS	59
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	61
4.1. Bitkisel Materyaller	61
4.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	62
4.2.1. Kimyasal maddeler ve çözücüler.....	62
4.2.2. Çözeltilerin hazırlanması	62
4.3. Cihazlar ve Diğer Gereçler.....	66
4.4. Ekstrelerinin Hazırlanması.....	67
4.5. Toplam Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayini.....	69
4.6. Antioksidan Tayin Yöntemleri.....	70
4.6.1. β -Karoten renk açılım yöntemi.....	70
4.6.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi.....	71
4.6.3. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi.....	71
4.6.4. CUPRAC yöntemi (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi)	72
4.7. Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi.....	72
4.7.1. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE) Aktivite Testi	72
4.7.2. Butirilkolinesteraz enzimi (BChE) aktivite testi	72
4.8. Anti-üreaz Enzim Aktivitesi.....	73
4.9. Anti-tirozinaz Enzim Aktivitesi	73
4.10. LC-MS/MS Cihazı ve Kromatografik Şartlar	74
4.11. GC-MS ile Yağ Asidi Analizi Çalışma Şartları	78
4.12. HPLC-IT-TOF-MS Çalışma Şartları	78
4.13. Kromatografik Yöntemler	79
4.13.1. Sütun Kromatografisi.....	79

4.13.2. İnce Tabaka Kromatografisi	79
4.13.3. Preperatif HPLC.....	80
4.14. Spektroskopik Yöntemler	80
4.14.1. Infra-Red Spektroskopisi (IR).....	80
4.14.2. Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (NMR).....	80
4.14.3. Kütle spektroskopisi	80
5. BULGULAR	81
5.1. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarları	81
5.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları	82
5.2.1. <i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> türünün petrol eteri, kloroform ve etanol ekstralarının antioksidan aktivite sonuçları	82
5.2.2. <i>S. cerino pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> ekstresinin fraksiyonlandırılması ve bu fraksiyonların antioksidan aktivite sonuçları	84
5.2.3. İzole edilen saf maddelerin antioksidan aktivite sonuçları.....	87
5.3. Antikolinestrez Aktivite Sonuçları.....	89
5.3.1. <i>S. cerino pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> ekstralarının antikolinestrez aktiviteleri..	89
5.3.2. İzole edilen ve yapısı aydınlatılan bazı bileşkerin asetilkolinesterez ve butirilkolinesterez enzim aktiviteleri	89
5.4. Üreaz ve Tirozinaz Enzim Aktiviteleri	90
5.4.1. <i>S. cerino pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> ekstralarının anti-üreaz ve anti-tirozinaz enzim aktiviteleri	90
5.4.2. Elde edilen ve yapısı aydınlatılan bazı bileşkerin anti-üreaz ve anti-tirozinaz enzim aktiviteleri	91
5.5. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> Türünün Çeşitli Ekstrelerinin ve Kısımlarının LC-MS/MS ile Fenolik İçerik Analizi	92
5.6. GC-MS ile Yağ Asidi Analiz Sonuçları.....	93
5.7. HPLC-IT-TOF-MS Sonuçları.....	94
5.8. Saf Madde İzolasyonu ve Saf Maddelerin Yapı Tayini	99
5.8.1. Rosmarinik asit	100
5.8.2. Klorojenik asit.....	106
5.8.3. Apigenin	112
5.8.4. Hesperidin.....	118
5.8.5. Fumarik Asit	122
5.8.6. Kafeik asit.....	125
5.8.7. 4-Hidroksi benzoik asit.....	130

5.8.8. 7-Asetil royleanon.....	135
5.8.9. β -Sitosterol	142
5.8.10. Ferruginol	151
5.8.11. Kriptanol.....	159
5.8.12. Inuroyleanol.....	165
5.8.13. 6,7-Dehidroroyleanon	171
5.8.14. Salvigenin.....	181
5.8.15. Ursolik Asit	189
5.8.16. Oleanolik asit.....	194
5.8.17. Salvianolik asit B	200
5.8.18. Luteolin 7-Glikosit.....	206
5.8.19. Salvianolik asit A.....	212
5.8.20. Benzoik asit	217
5.8.21. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat)	221
5.8.22. 4-Hidroksi benzaldehit.....	227
5.8.23. Stigmasterol.....	231
5.8.24. Scoparon.....	236
5.8.25. Bis(2-etilhekzil) tereftalat	242
5.8.26. Sugiol	249
5.8.27. 7- α -hidroksi- β -sitosterol.....	256
5.8.28. Hekzadekanoik asit, n-oktil ester	263
5.8.29. Hekzadekanoik asit, 3-hidroksi-metil ester	267
5.8.30. Protokateşik asit.....	272
6.TARTIŞMA	275
7. SONUÇ.....	278
8. KAYNAKLAR.....	279
9. ÖZGEÇMİŞ.....	307
10. ORJİNALLİK RAPORU	309



KISALTMA VE SİMGELER DİZİNİ

ABTS	: 2,2'-Azinobis (3-etilbenzotrazolin-6-sülfonat)
APT	: Attached proton test
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
Dk	: Dakika
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FCR	: Folin Ciocalteu fenol reaktifi
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	: Heteronuclear multiple quantum coherence
IR	: Infrared spektroskopisi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
O ₂ [•]	: Süperoksit radikali
OH [•]	: Hidroksil radikali
ORAC	: Oksijen radikalini absorplama kapasitesi
Q	: Kersetin
QEs	: Kersetine eşdeğer
RO [•]	: Alkoksi radikalleri
ROO [•]	: Peroksit radikalleri
ROOH	: Hidroperoksitler
ROS	: Reaktif oksijen türleri

- s : Saat
- TMS : Tetrametilsilan
- TOC : α -Tokoferol
- TOSC : Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi
- TRAP : Toplam radikal tutma parametresi
- Tween-40 : Polioksietilensorbitan monopalmitat
- UV : Ultraviyole spektroskopisi
- SCE-KE (Karışık) : *Salvia cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün çiçek, yaprak, dal ve kök kısımlarından hazırlanan etanol ekstresi
- SCE-KK (Karışık) : *S. cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün çiçek, yaprak, dal ve kök kısımlarından hazırlanan kloroform ekstresi
- SCE-PE : *S. cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün çiçek, yaprak, dal ve kök kısımlarından hazırlanan petrol eteri ekstresi
- SCE-TÜE : *S. cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstresi
- SCE-KE : *S. cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün toprak altı (Kök) kısımlarından hazırlanan etanol ekstresi
- SCE-Ç : *S. cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün çiçek kısmından hazırlanan etanol ekstresi
- SCE-Y : *S. cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün yaprak kısmından hazırlanan etanol ekstresi
- SCE-D : *S. cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün dal kısmından hazırlanan etanol ekstresi
- SCE-K : *S. cerino puruinosa* var. *elezigensis* türünün kök kısmından hazırlanan etanol ekstresi

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Sekonder metabolitlerin oluşumu	32
Şekil 2. Terpenlerin oluşumu	34
Şekil 3. Doğada çok bulunan monoterpen iskeletleri	36
Şekil 4. Asiklik monoterpenler	37
Şekil 5. Monosiklik monoterpenler	37
Şekil 6. Bisiklik monoterpenler.....	38
Şekil 7. Trisiklik monoterpenler.....	38
Şekil 8. Monoterpen glikozitler.....	38
Şekil 9. Triterpen iskeletleri.....	40
Şekil 10. Steroitlerin iskelet yapısı.....	41
Şekil 11. Kolesterol	41
Şekil 12. Flavonoit iskeletleri	44
Şekil 13. Tirozinaz-Melanin	56
Şekil 14: Toplam fenolik ölçü eğrisi	69
Şekil 15: Toplam flavonoit ölçüm eğrisi	70
Şekil 16. . <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> türünün çeşitli ekstralarının ve kısımlarının LC-MS/MS analiz kromatogramı	93
Şekil 17. <i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> ekstralarının sırasıyla total, pozitif ve negatif HLC-IT-TOF-MS kromatogramları	95
Şekil 18. Rosmarinik Asit	100
Şekil 19. Rozmarinik asit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz)	102
Şekil 20. Rozmarinik asit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz).....	103
Şekil 21. Rozmarinik asit LC-MS-IT-TOF kromatogramı.....	104
Şekil 22. Rozmarinik asit bileşiğinin IR spektrumu.....	105
Şekil 23. Klorojenik asit	106
Şekil 24. Klorojenik asit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz).....	108
Şekil 25. Klorojenik asit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz)	109
Şekil 26. Klorojenik asit LC-MS-IT-TOF kromatogramı	110
Şekil 27. Klorojenik asit bileşiğinin IR spektrumu	111
Şekil 28. Apigenin	112
Şekil 29. Apigenin bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz).....	114
Şekil 30. Apigenin bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz)...	115
Şekil 31. Apigeninbileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı.....	116
Şekil 32. Apigenin bileşiğinin IR spektrumu.....	117
Şekil 33. Hesperidin	118
Şekil 34. Hesperidin bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz)	119
Şekil 35. Hesperidin bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz) 120	
Şekil 36. Hesperidin bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	121
Şekil 37. Fumarik Asit.....	122
Şekil 38. Fumarik asit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz).....	123

Şekil 39. Fumarik asit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz)	124
Şekil 40. Kaffeik asit.....	125
Şekil 41. Kaffeik asit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz).....	126
Şekil 42. Kaffeik asit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz)	127
Şekil 43. Kaffeik asit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	128
Şekil 44. Kaffeik asit bileşiğinin IR spektrumu	129
Şekil 45. 4-Hidroksi benzoik asit	130
Şekil 46. 4-Hidroksi benzoik asit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	131
Şekil 47. 4-Hidroksi benzoik asit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	132
Şekil 48. 4-Hidroksi benzoik asit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	133
Şekil 49. 4-Hidroksibenzoik asit bileşiğinin IR spektrumu	134
Şekil 50. 7-Asetil royleanon	135
Şekil 51. 7-Asetil royleanon bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz) ..	137
Şekil 52. 7-Asetil royleanon bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz).....	138
Şekil 53. 7-Asetil royleanon bileşiğinin GC-MS kromatogramı.....	139
Şekil 54. 7-Asetil royleanon bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı.....	140
Şekil 55. 7-Asetil royleanon bileşiğinin IR spektrumu.....	141
Şekil 56. β-sitosterol	142
Şekil 57. β-Sitosterol bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz).....	144
Şekil 58. β-Sitosterol bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz).....	145
Şekil 59. β-Sitosterol bileşiğinin HMBC spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	146
Şekil 60. β-Sitosterol bileşiğinin HMQC spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	147
Şekil 61. β-Sitosterol bileşiğinin APT spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz).....	148
Şekil 62. β-Sitosterol bileşiğinin GC-MS kromatogramı	149
Şekil 63. β-Sitosterol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	150
Şekil 64. Ferruginol	151
Şekil 65. Ferruginol bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz).....	153
Şekil 66. Ferruginol bileşiğinin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)....	154
Şekil 67. Ferruginol bileşiğinin HMBC spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	155
Şekil 68. Ferruginol bileşiğinin HMQC spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	156
Şekil 69. Ferruginol bileşiğinin GC-MS kromatogramı	157
Şekil 70. Ferruginol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	158
Şekil 71. Kriptanol.....	159
Şekil 72. Kriptanol bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	161
Şekil 73. Kriptanol bileşiğinin ¹³ C-NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	162
Şekil 74. Kriptanol bileşiğinin GC-MS spektrumu	163
Şekil 75. Kriptanol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı.....	164
Şekil 76. Inuroyleanol	165
Şekil 77. : Inuroyleanol bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	167

Şekil 78. Inuroyleanol bileşiğinin ¹³ C-NMR (APT) Spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	168
Şekil 79. Inuroyleanol bileşiğinin GC-MS spektrumu	169
Şekil 80. Inuroyleanol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	170
Şekil 81. 6,7-Dehidroroyleanon	171
Şekil 82. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	173
Şekil 83. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin ¹³ C NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	174
Şekil 84. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin APT spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz) ...	175
Şekil 85. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin HMBC spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	176
Şekil 86. 6,7-Dehidroroyleanon Bileşiğinin HQBC Spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	177
Şekil 87. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin GC-MS spektrumu	178
Şekil 88. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	179
Şekil 89. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin IR spektrumu	180
Şekil 90. Salvigenin	182
Şekil 91. Salvigenin bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	183
Şekil 92. Salvigenin bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	184
Şekil 93. Salvigenin bileşiğinin APT spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	185
Şekil 94. Salvigenin bileşiğinin GC-MS spektrumu	186
Şekil 95. Salvigenin bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	187
Şekil 96. Salvigenin bileşiğinin IR spektrumu	188
Şekil 97. Ursolik Asit	190
Şekil 98. Ursolik asit bileşiğinin ¹ H-NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	191
Şekil 99. Ursolik asit bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	192
Şekil 100. Ursolik asit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	193
Şekil 101. Oleanolik asit	195
Şekil 102. Oleanolik asit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	196
Şekil 103. Oleanolik asit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	197
Şekil 104. Oleanolik asit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	198
Şekil 105. Oleanolik asit bileşiğinin IR spektrumu	199
Şekil 106. Salvianolik asit B	201
Şekil 107. Salvianolik Asit B bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz)	202
Şekil 108. Salvianolik Asit B bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz)	203
Şekil 109. Salvianolik Asit B bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	204
Şekil 110. Salvianolik asit B bileşiğinin IR spektrumu	205
Şekil 111. Luteolin 7-Glikosit	206
Şekil 112. Luteolin 7-Glikosit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz)	208
Şekil 113. Luteolin 7-Glikosit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz)	209

Şekil 114. Luteolin 7-Glikosid bileşiğinin HMQC spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz)	210
Şekil 115. Luteolin 7-Glikosid bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	211
Şekil 116. Salvianolik asit A	213
Şekil 117. Salvianolik Asit A bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD,600 MHz).	214
Şekil 118. Salvianolik Asit A bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CD ₃ OD,150 MHz)	215
Şekil 119. Salvianolik Asit A bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	216
Şekil 120. Benzoik asit	217
Şekil 121. Benzoik asit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	218
Şekil 122. Benzoik asit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	219
Şekil 123. Benzoik asit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	220
Şekil 124. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat)	221
Şekil 125. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	223
Şekil 126. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	224
Şekil 127. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	225
Şekil 128. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin IR spektrumu	226
Şekil 129. 4-Hidroksi benzaldehit	227
Şekil 130. 4-hidroksi benzaldehit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	228
Şekil 131. 4-Hidroksi benzaldehit bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	229
Şekil 132. 4-Hidroksi benzaldehit bileşiğinin GC-MS kütle spektrumu	230
Şekil 133. Stigmasterol	231
Şekil 134. Stigmasterol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	233
Şekil 135. Stigmasterol bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	234
Şekil 136. Stigmasterol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	235
Şekil 137. Scoparon	236
Şekil 138. Scoparon bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	238
Şekil 139. Scoparon bileşiğinin ¹³ C NMR (APT) spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	239
Şekil 140. Scoparon bileşiğinin GC-MS kütle spektrumu	240
Şekil 141. Skoparon bileşiğinin IR spektrumu	241
Şekil 142. Bis(2-etilhekzil) tereftalat	242
Şekil 143. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	244
Şekil 144. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiğinin APT spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	245
Şekil 145. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiğinin GC-MS spektrumu	246
Şekil 146. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	247
Şekil 147. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiğinin IR spektrumu	248

Şekil 148. Sugiol	249
Şekil 149. Sugiol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz).....	251
Şekil 150. Sugiol bileşiğinin APT spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	252
Şekil 151. Sugiol bileşiğinin GC-MS spektrumu-1	253
Şekil 152. Sugiol bileşiğinin GC-MS spektrumu-2.....	254
Şekil 153. Sugiol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	255
Şekil 154. 7- α -hidroksi- β -sitosterol.....	256
Şekil 155. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz).....	258
Şekil 156. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiğinin APT spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz).....	259
Şekil 157. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiğinin HMQC spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	260
Şekil 158. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiğinin GC-MS spektrumu	261
Şekil 159. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiğinin LC-APCI-MS spektrumu (Pozitif mod)	262
Şekil 160. Hekzadekanoik asit, n-oktil ester.....	263
Şekil 161. Hekzadekanoik asit, n-oktil ester bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz).....	264
Şekil 162. Hekzadekanoik asit, n-oktil ester bileşiğinin GC-MS spektrumu	265
Şekil 163. Hekzadekanoik asit, n-oktil ester bileşiğinin LC-APCI-MSI spektrumu (Pozitif modu)	266
Şekil 164. Hekzadekanoik asit, 3-hidroksi-metil ester.....	267
Şekil 165. Hekzadekanoik asit, 3-hidroksi-, metil ester bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CDCl ₃ , 600 MHz)	268
Şekil 166. Hekzadekanoik asit, 3-hidroksi-, metil ester bileşiğinin APT spektrumu (CDCl ₃ , 150 MHz)	269
Şekil 167. Hekzadekanoik asit, 3-hidroksi-, metil ester bileşiğinin GC-MS spektrumu.....	270
Şekil 168. Hekzadekanoik asit, 3-hidroksi-, metil ester bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı	271
Şekil 169. Protokateşik asit.....	272
Şekil 170. Protokateşik asit bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz) .	273
Şekil 171. Protokateşik asit bileşiğinin APT spektrumu (CD ₃ OD, 150 MHz).....	274

RESİM DİZİNİ

Resim 1. <i>Salvia cerino-pruinosa</i> Rech var. <i>elazigensis</i> A. Kahraman, F.Celep & Dogan.....	61
Resim 2. <i>S. cerino pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> bitkisinin toprak üstü ve altı ekstrelerinin kolonu	84



TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Terpenlerin sınıflandırılması	35
Tablo 2. Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.....	43
Tablo 3. Doğal olarak oluşan Δ^9 -Alkenoik asitler	45
Tablo 4. Doğal olarak oluşan Δ^9 haricindeki diğer doymamış alkenoik asitler.....	45
Tablo 5. Reaktif oksijen ve azot türleri	46
Tablo 6. Çalışılan <i>Salvia cerino-pruinosa</i> Rech var. <i>elazigensis</i> A. Kahraman, F.Celep & Dogan türünün toplanma yerleri, zamanları ve herbaryum numaraları....	61
Tablo 7. . Ön biyolojik aktivite deneylerinde kullanılan <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> 'in etanol ve kloroform ekstrelerinin %verimi.....	68
Tablo 8. LC-MS/MS ile fenolik analizi için kullanılan <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> 'in etanol ekstrelerinin % verimi	68
Tablo 9. İzolasyon çalışmaları için kullanılan <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> 'in etanol ve kloroform ekstrelerinin verimi	69
Tablo 10. 2015-2016-2017 yıllarında toplanan yağ asidi analizi için kullanılan <i>S.</i> <i>cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> örneklerinin petrol eteri ekstrelerinin verimi.....	69
Tablo 11. LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler.....	76
Tablo 12. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> 'in çeşitli kısımlarının farklı ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları ^a	81
Tablo 13. <i>S.cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> ekstrelerinin β -Karoten-Linoleik asit, DPPH serbest radikal ve ABTS katyon radikal aktivite sonuçları ^a	82
Tablo 14. <i>S.cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> ekstrelerinin CUPRAC aktivite sonuçları ^{a,b}	83
Tablo 15. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> türünün toprak üstü ve toprak altı etanol ekstrelerinin fraksiyonları, elde edildikleri çözücü sistemleri, miktarları ve antioksidan aktiviteleri (IC ₅₀) ^a	85
Tablo 16. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> türünün toprak üstü ve toprak altı etanol ekstresinin fraksiyonlarının CUPRAC aktiviteleri ^a	86
Tablo 17. Elde edilen ve yapısı aydınlatılan bileşiklerin antioksidan aktiviteleri ^a	88
Tablo 18. Örneklerin antikolinesteraz aktivite sonuçları ^a	89
Tablo 19. Elde edilen ve yapısı aydınlatılan bazı bileşiklerin asetil- ve butirilkolinesteraz enzim aktiviteleri ^a	90
Tablo 20. Ekstrelerin anti-üreaz ve anti-tirozinaz enzim aktiviteleri	90
Tablo 21. Elde edilen ve yapısı aydınlatılan bazı bileşiklerin anti-üreaz ve anti- tirozinaz enzim aktiviteleri ^a	91
Tablo 22. <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> türünün çeşitli ekstrelerinin ve kısımlarının LC-MS/MS ile fenolik içerik analizi	92
Tablo 23. 2015-2016-2017 yıllarında toplanan <i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> örneklerinin yağ asidi bileşimi	94
Tablo 24. Çalışılan <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> türünün HPLC-IT-TOF-MS sonuçları.....	96
Tablo 25. Çalışılan <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> türünün HPLC-IT-TOF-MS sonuçları (Devam)	97

Tablo 26. Çalışılan <i>S. cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> türünün HPLC-IT-TOF-MS sonuçları (Devam).....	98
Tablo 27. Yapısı aydınlatılan bileşikler	99
Tablo 28. Rosmarinik asit bileşiğinin NMR değerleri.....	101
Tablo 29. Klorojenik asit bileşiğinin NMR değerleri	107
Tablo 30. Apigenin Bileşiğinin NMR Değerleri	113
Tablo 31. Fumarik asit bileşiğinin NMR değerleri.....	122
Tablo 32. Kaffeik asit bileşiğinin NMR değerleri	125
Tablo 33. 4-Hidroksi benzoik asit bileşiğinin NMR değerleri	130
Tablo 34. 7-Asetil royleanon Bileşiğinin NMR Değerleri.....	136
Tablo 35. β -sitosterol bileşiğinin NMR değerleri.....	143
Tablo 36. Ferruginol bileşiğinin NMR değerleri.....	152
Tablo 37. Kriptanol bileşiğinin NMR değerleri	160
Tablo 38. Inuroyleanol bileşiğinin NMR değerleri	166
Tablo 39. 6,7-dehidroroyleanon Bileşiğinin NMR Değerleri	172
Tablo 40. Salvigenin bileşiğinin NMR değerleri.....	182
Tablo 41. Ursolik asit bileşiğinin NMR değerleri	190
Tablo 42. Oleanolik asit bileşiğinin NMR değerleri.....	195
Tablo 43. Salvianolik asit B bileşiğinin NMR değerleri.....	201
Tablo 44. Luteolin-7-glikozit bileşiğinin NMR değerleri.....	207
Tablo 45. Salvianolik asit A bileşiğinin NMR değerleri	213
Tablo 46. Benzoik asit bileşiğinin NMR değerleri.....	217
Tablo 47. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin NMR değerleri ..	222
Tablo 48. 4-Hidroksi benzaldehit bileşiğinin NMR değerleri.....	227
Tablo 49. Stigmasterol bileşiğinin NMR değerleri.....	232
Tablo 50. Scoparon bileşiğinin NMR değerleri	237
Tablo 51. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiğinin NMR değerleri	243
Tablo 52. Sugiol bileşiğinin NMR değerleri	250
Tablo 53. 7- α -hidroksi- β -sitosterol bileşiğinin NMR değerleri	257
Tablo 54. Protokateşik asit bileşiğinin NMR değerleri	272

***Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* Türünün Antioksidan Aktivite Kontrollü Sekonder Metabolit İzolasyonu**

Öğrencinin Adı ve Soyadı: Leyla BALUR ADSIZ

Danışmanı: Doç. Dr. Abdulselem ERTAŞ

Anabilim Dalı: Analitik Kimya

1.1. ÖZET

Amaç: Labiatae familyasında yer almakta olan *Salvia* L. cinsi Türkiye`de %50 si endemik olan 89 tür ile temsil edilmektedir. *Salvia* cinsi uzun yıllardan bu yana halk arasında tedavi amacıyla kullanılmaktadır. Bu çerçevede bölgemizin bir değeri olan endemik *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün kimyasal ve biyolojik yönden detaylı bir şekilde incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* `in, kloroform ve etanol ekstreleri hazırlanarak antioksidan, antikolinesteraz, tirozinaz ve üreaz enzim aktiviteleri araştırılmış ve ekstrelerin kimyasal profili ışığında preparatif HPLC ve diğer klasik kromatografik yöntemlerin kullanılması ile sekonder metabolitler saflaştırılarak yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatılarak, izole edilen bileşiklerin antioksidan aktivitesi belirlenmesi sonrasında üreaz, antikolinesteraz ve tirozinaz enzim aktiviteleri de belirlenmiştir. Ayrıca bu türün yaprak, dal, çiçek, kök ve bunların karışımından hazırlanan etanol ekstreleri LC-MS/MS ile bazı bileşiklerin miktar tayini yapılmıştır ve bu türün tüm kısımlarının petrol eteri ekstresi hazırlanarak GC-MS/MS ile yağ asidi profili belirlenmiştir.

Bulgular: Sonuç olarak *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün toprak altı ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan aktif etanol ekstrelerinden farklı 30 madde elde edilmiştir. Bu bileşiklerden triterpen yapısında olanların ursolik ve oleanolik asitler ile beta-amyrin olduğu, steroid yapıda olanların β -sitosterol, stigmasterol, 7- α -hidroksi- β -sitosterol, γ -sitostenon`e olduğu, diterpen yapısında olanların ferruginol, sugiol, 7-asetil royleanon, kriptanol, 6,7-dehidroroyleanon olduğu flavonoit yapıda

olanların ise salvigenin, apigenin, luteolin 7-glikosid, fenolik yapıda olanların rozmarinik asit, fumarik asit, kaffeik asit, salvianolik asit A ve B, benzoik asit, protokateşik asit, 4-hidroksibenzoik asit, 4-hidroksibenzaldehit, scoparon ve bis-(2- etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat), bis(2-etil heksil) teraftalat olduğu belirlenmiştir.

Sonuç: Böylece kimyasal içerikleri ve yukarıda belirtilen aktiviteleri ilk kez incelenen *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünden elde edilen sonuçlar bilim dünyasına kazandırılmıştır.

Anahtar Sözcükler: *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*, izolasyon, antioksidan, enzim aktivitesi, LC-MS/MS, GC-MS/MS.

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

The antioxidant activity-controlled isolation of secondary metabolite of *Salvia cerino-pruinosa elazigensis*

Student's Surname and Name: Leyla BALUR ADSIZ

Adviser of Thesis: Abdulselam ERTAŞ

Department: Analytical Chemistry

1.2. ABSTRACT

Aim: *Salvia* genus which in Labiatae family is represented by which 50% of the 89 endemic species in Turkey. *Salvia* genus has been used for many years as a treatment for the public. In this perspective it will be mentioned the value of *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* the genus is intended to be studied in detail from the chemical and biological aspects.

Material and Method: In this study *S. cerino-pruinosa* var *elazigensis*, antioxidant, anticholinesterase, tyrosinase and urease enzyme activities of *elazigensis* were investigated by preparing chloroform and ethanol extracts and also using preparative HPLC and other classical chromatographic methods in the chemical profile in the light of the extracts, purifying the structure of secondary metabolites are elucidated by spectroscopic methods after determining the antioxidant activity of isolated compounds which is urease, anticholinesterase and tyrosinase enzyme activities were also determined. In addition, this genus prepared ethonal extracts from leaves, branches, flowers, roots and mixtures of them. Making quantitative analysis of some compounds by LC-MS/MS of these extracts the fatty acid profile was determined by GC-MS/MS preparing petroleum ether extracts of all the sections.

Results: As a result of *S. cerino-pruinosa* var *elazigensis*, 30 different substances were obtained which were different from the active ethanol extracts prepared from the underground and overground parts of the genus. Of these compounds, those in the triterpen structure were identified as ursolic, oleanolic acids and beta-amyrin. It was determined that those in steroids were β -sitosterol, stigmasterol, 7- α -hydroxy-beta sitosterol and g-sitostenone. It was determined dehydrorhenone and ferruginol

also that those include flavonoids were salvigenin, apigenin, luteolin 7-glycoside, rosmarinic acid, fumaric acid, caffeic acid, salvianolic acid A and B, Benzoic acid, protocatechuic acid 4-hydroxybenzoic acid 4-hydroxybenzaldehyde, scopolamine and bis-hexyl benzene 1,2 dicarboxylate, bis (2-ethylhexyl) terephthalate.

Conclusion: Thus, the results obtained from the *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* which studied for the first time the chemical contents and the above-mentioned activities are brought to the scientific world.

Key words: *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*, Isolation, antioxidant, enzyme activity, LC-MS/MS, GC-MS/MS.

This study was supported by TUBITAK(Project No: 114Z801).

2.GİRİŞ VE AMAÇ

Tarihsel sürece göz gezdirilince, bitkilerin insan hayatında ne kadar büyük bir yere sahip olduğu hemen göze çarpar. İlk insanlar, başlangıçta yiyecek ihtiyacı olmak üzere korunma, ısınma ve kendilerini savunabilmek için bitkilerden yararlanmıştı; bunlarla birlikte, bir hastalığa yakalandıkları zaman da akıllarına ilk gelen yine bitkiler olmuştur. M.Ö. 3000 yıllarına kadar gidildiğinde çeşitli tarihi kalıntılardan bu durum açıkça anlaşılmaktadır (1).

Tıpta kullanılmış bitkiler üzerine yazılan ilk eserleri, Çin`de, Hindistan`da, Mısır`da, Roma ve Yunanistan`da bulunmaktadır (2).

Drog veren bitkiler konusuna gelindiğinde ise yazılı belgelerin en yararlıları Ebers Papyrus`larıdır (M.Ö.1550); bunlarda hayvansal ve bitkisel 700 kadar drogun bulunduğu bahsedilmektedir. MateriaMedica (M.S. 77-78), Anadolu yarımadasında doğmuş Grek bir hekim olan PEDANIUS DIOSCORIDES tarafından yazılmıştır; bu eserde Akdeniz ve civarında kullanılmış 500 civarı bitkiden bahsedilmektedir.

Ziyaeddin İbn Baytar, İspanya`da yaşamış ve Şam`da ölmüş olan Arap toplumuna mensup bir hekimdir. Anadolu`yu baştanbaşa dolaşmıştır. Baytarname adındaki eserinde 130 hayvansal ve 1800 kadar bitkisel drog anlatmıştır (M.S. 13. yüzyıl) (1).

Bitkilerin tedavilerde kullanımı çağdan çağa artmıştır. Mezopotamya medeniyeti zamanında 250, Yunanistan`da 600, Arap-Fars medeniyetinin hakim olduğu zamanlarda ise neredeyse 4000 bitkinin tedavilerde kullanıldığı kaynaklarda geçmektedir. On dokuzuncu yüzyılın ilk yıllarında ise, bu sayı 19000`e kadar çıkmıştır. Halabırçok farklı ülkede toplumların ilaç olarak kullandıkları bitkiler de hesaplanırsa 80000-100000 civarında bitkinin tedavi amacıyla kullanıldığı düşünülmektedir (3).

Bitkilerin yapılarında yüksek miktarlarda barındırdıkları fenolik ve flavonoit bileşikleri insanların sağlık durumlarına çok ciddi etki etmektedirler. etki alanının başlıcaları ise flavonoit ve fenolik bileşiklerin antioksidan

aktiviteleridir. Antioksidanlar, insanların bedenlerinde bulunan metabolik reaksiyonlar sonucu oluşan oksidasyon sürecini en çok azaltan ve bu sebeple serbest radikallerin vuku bulmasını engelleyip canlının vücudundaki birçok hasarın engellenmesine yarayan bileşiklerdir (4).

Metabolizmanın işleyişi esnasında doğal proseslerden olan oksidasyonun akabinde, organizmada çeşitli hasarlara sebep veren, kalp ve kanser benzeri ciddi kronik rahatsızlıkların sebebi olan serbest radikallerin oluşumu, bunlarla mücadele içinde olan antioksidan bileşiklere olan ilgiyi bir hayli arttırmıştır. Bu alandaki araştırmalar daha ziyade gıdaların ve farmasötik preparatların antioksidan aktivitelerinin belirlenmesine odaklanmıştır. Bu ilgi esnasında yaşlanma sürecine ve birçok hastalığın patojenitesinde Reaktif Oksijen Türlerinin (ROS) yarattığı tahribatlara yönelmiş bulunmaktadır. İnsanlarda yaşlılık ve kronik rahatsızlıkların kompleks biyolojik aşamaları kabindemeydana gelir. Bu kompleks süreçleri anlamlandırabilmek amacıyla değişik hipotezler öne sürülmüş ve bunlar deneysel olarak teste tabi tutulmuştur. Yaşlanma süreci ile ilgili olarak ileri sürülen birçok teori son zamanlarda moleküler genetik ve deneysel tekniklerde katedilen ilerlemeler ile açıklanma yoluna gidilmeye başlanmıştır. ROS'nin hücrede giderek artış gösterecek şekilde oluşturduğu zararlar esas olmak üzere, yaşlı (senescent) hücrelerde telomer erozyonu, DNA mutasyonları, genom kararsızlığı ve gen profillerindeki değişimleri kapsar (5).

Kanser tedavilerinde kullanılan ilaçlardan beklenen asıl yararlarından biri henüz hasar görmemiş olan dokular ile hücrelerin korunmaya alınmasıdır ve bu tesiri en iyi sağlayan yardımcıların başında meyve antioksidanları gelmektedir. Bitkiler genel itibarıyla çok önemli antioksidan kaynağı olup 8000 civarında farklı yapıda fenolik bileşik içermektedirler (6). Bu sebeple bitkilerin sekonder metabolit ve biyolojik aktivite yönünden incelenmeleri her geçen gün daha çok önem kazanmaktadır.

Prokaryotik mikroorganizmalar, hayvan, bitki ve insanlar gibi canlılarda ortak olan "primer (birincil) metabolit" olarak tanımlanmış olan ve canlılık için gereklilik taşıyan proteinler, karbonhidratlar ve yağlardır. Canlılık faaliyetleri ile doğrudan doğruya ilgisi bulunmayan ve primer metabolizma sonucunda yalnızca

belirliorganizma, cins (tür) veya dokularda sekonder metabolizma sonucunda üretilen diğer maddeler ise “sekonder(ikincil) metabolit” olarak tanımlanmaktadır (7).

Bu tez çalışmasında, *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in, kloroform ve etanol ekstreleri hazırlanarak antioksidan, antikolinesteraz, tirozinaz ve üreaz enzim aktivitelerinin araştırılması ve yine ekstrelerin kimyasal profili ışığında preparatif HPLC ve diğer klasik kromatografik yöntemlerin kullanılması ile sekondermetabolitler saflaştırılarak, izole edilen bileşiklerle organik kimyaya yeni ürünler kazandırılmasını mümkün hale getirmek, saflaştırılmış olan bu sekondermetabolitlerin antioksidan aktivitesi belirlenmesi sonrasındaanti-üreaz, antikolinesteraz ve anti-tirozinaz enzim aktivitelerini belirlemek, ayrıca LC-MS/MS ile bazı flavonoit ve fenolik bileşiklerin miktarsal hesaplamalarının yapılması amacıyla bu türün dal, yaprak, çiçek, kök ve bunların karışımından etanol ekstreleri hazırlanmıştır ve de bunlara ek olarak GC-MS/MS ile yağ asidi profilinin belirlenmesi amacı güdülerek bu türün tüm bölümlerinin petrol eteri ekstresi hazırlanmıştır.

3. GENEL BİLGİLER

3.1 Botanik Bilgiler

3.1.1. Labiatae(Lamiaceae) familyası

Bu familya ilk olarak De Jussieu tarafından 1789 yılında Labiatae olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra ise Lindley tarafından 1836 yılında Lamiaceae olarak tekrardan adlandırılmıştır (8,9). Dünyanın bilinen büyük ve eski familyalarındandır. Familyayla ilgili fosil kayıtları bulunmamasına rağmen kökeninin Oligosen'e veya 70-90 milyon yıl öncesine kadar dayandığını söylemek mümkündür (10,11). Lamiaceae (ballıbabagiller), genellikle güzel kokulu, bir ya da çok yıllık, otsular, nadiren çalılar veya ağaçları kapsamakta olan çiçekli bitkiler familyasıdır. Lamiaceae familyası parfümeride ve tıpta kullanılan çoğu uçucu yağı barındıran familyalardan biri olarak önem taşımaktadır. Yapraklarında, kokulu yağ salgılayan küçük salgı bezleri bulunduğu tespit edilmiştir. Dolayısıyla başta kekik, nane, adaçayı ve lavanta çiçeği olmak üzere bu familyaya mensup türlerin çiçekler bol ıtırli olmaktadır. Sekiz hücreli pul şeklinde olan salgı tüyleri bu familya için karakteristiktir (12). Gövdelerinin ise genellikle 4 köşesi bulunmaktadır. Yapraklarının dizilişi dekusat şeklindedir. Çiçeklerin durumu vertisillastrumdur. Çoğunlukla korolla iki dudaklı şekildedir. Stamenler 4 yahut 2 adettir. Meyva 4 nuksa yarılmış şizokarptır (13, 14). Familya mensupları Dünya'nın birkaç alanı hariç, Himalaya'lardan Güneybatı Asya'ya, Afrika ve Amerika'ya Hawai ve Avustralya'ya kadar değişik alanlarda çok değişik yüksekliklerde ve farklı habitatlarda yetişebilmektedirler. Lamiaceae familyasının yeryüzünde 250 civarında cinsi ve 3200'ü geçen türü bulunmaktadır. Topraklarımızda ise 46 cins ve bunlara ait 758 takson ile temsil edilmekte olan Lamiaceae familyası Türkiye'nin en zengin olan üçüncü familyası durumunda olup ülkemizdeki endemizm oranı % 45 olarak tespit edilmiştir (15). Lamiaceae familyasının en fazla takson içeren cinslerinin başında *Salvia* (c. 900 tür) gelmektedir ve kozmopolit bir cinstir. Ayrıca *Stachys*, *Scutellaria* ve *Thymus* familyanın diğer kozmopolit cinslerindedir. *Sideritis*, *Rosmarinus* ve *Phlomis* türleri karakteristiki mensuplarıdır. Genellikle açık habitatlara uyum sağlamış olan türlerdir. Yalnızca birkaç cinsine (Gomphostemma) tropikal yağmur ormanlarında rastlanır.

3.1.2 *Salvia* L. cinsi

Labiatae familyasında yer alan *Salvia* cinsi Mentheae takımının Nepetoideae alt familyasında bulunmaktadır. *Salvia* cinsi Türkiye de %50 si endemik olan 89 türe ait 94 takson ile temsil edilmektedir (16). Çoğu *Salvia* türü uçucu yağ bakımından değerlendirildiğinde az yada çok etkin kabul edilebilmektedir (0,1-1,0%). *Salvia* cinsi uzun yıllardan bu yana halk arasında tedavi amacıyla kullanılmaktadır (17).

Salvia kelimesi Latince`de sağlık anlamına gelir ve 10. yüzyılda Arap toplumuna mensup olan hekimler adaçayının dünya üzerinde meydana gelmekte olan ölümlere karşı kesin bir çözüm sunacağına inanmışlardır. Çoğu hastalığın tedavisinde örneğin göz problemlerinde, yılan ısırmasında,menstrual dönem dışı kanamalarında, kısırlıkta,zehirlenmede,enfeksiyon hastalıklarında, epilepside, Alzheimer hastalarındaki unutkanlık sorunlarına, bağırsak problemlerine eski çağlardanbu yana halk arasında adaçayı ile çözüm aranmıştır. Eski çağlardan bu yana Yerli Amerikalılar tarafından adaçayınakutsiyet atfedilmiştir. Günümüzde ise çay formunda ve bazı ilaç firmalarının üretmekte olduğu kapsül formunda tıbbi amaçlı olarak kullanılmaktadır (18).

3.2. Farmakopelerde Kayıtlı Olan *Salvia* Türleri

Salvia türleri tüm dünyada hem tıbbi amaçla hem de baharat olarak uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu yaygın kullanıma paralel bir şekilde pek çok farmakopede hem preparatları hem de yaprakları kayıtlı bulunmaktadır. British Herbal Pharmacopoeia (BHP)'nin 1983 ve 1996 baskılarında *S. officinalis* yaprağı kayıtlı bulunmaktadır. BHP 1996`da ise standardize yaprak tozu da yer almaktadır (19). Alman Farmakopesi'nin 1999 basımında da *S.triloba* tentürü veyaprakları kayıtlı bulunmaktadır (20). *S. officinalis* aynı zamanda Avusturya, Macaristan, Fransa ve Çekya farmakopelerinde de kayıtlı bulunmakta ayrıca İsviçre farmakopesinde *S. officinalis* ve *S.triloba* uçucu yağları da kayıtlıdır (21). Ülkemizin de 1994 yılından bu yana resmi farmakopesi olan Avrupa Farmakopesi'nde de *S. officinalis* yaprakları drog olarak kayıtlıdır (22).

3.3. *Salvia* Türlerinin Kullanımı

Salvia'nın Latince kökenli olan salvere (tedavi) veya salvare sözcüğünden türediği bilinmektedir (23). Halk arasında *Salvia* türlerinin yaygın kullanımı çay şeklindedir. Bu cinsin ülkemizde kullanılmakta olan türleri Bölüm 3.4.'te detaylı bir şekilde verilmiştir.

3.4. *Salvia* Türlerinin Türkiye'de Etnofarmakognozideki Yeri

S. aethiopsis L. (Yünlü adaçayı): Türkiye'de yaygın bir tür olarak bulunmaktadır. Bu bitkinin yaprak ve çiçek durumları ise uyarıcı ve midevi olarak antik çağlardan bu yana bilinmektedir (24). Bolu: Yukarısayık, Dörtdivan yöresinde Kızıllıkadı ile bilinmekte ve merhem olarak yaraları iyileştirici olarak kullanılmaktadır(25-27).

S. aramiensis Rech fil.: (Dağçayı): Çay halinde Hatay yöresinde midevi amaçlı kullanılmaktadır (28)

S. aucheri Benthann var. *canescens* Boiss. et Heldr. (Zeytin yapraklıadaçayı): Çay halinde Mersin civarında kullanılmaktadır (29).

S. chrysophylla Stapf: Isparta'nın Sütçüler Beydili yöresinde Bozçavla adıyla bilinmekte olup herbası dekoksion halinde romatizma hastalığına karşı kullanılmaktadır. Lapa şekline getirilen herbası ağrı yapan vücudun kısımlarına uygulanmaktadır (26, 27).

S. cryptantha Montbert et Aucher ex Benthann (Van'da karaot, diğer isimleri kara şalba, kara şapla, kara şalva): Yurdumuzun doğusunda bitkinin yaprakları tekstilde boyama amacıyla kullanılmaktadır (29). Afyonkarahisar, Şuhut, Karacaören yöresinde yakışalbası adıyla bilinmekte olup infüzyon halinde mide rahatsızlıklarında ve dekoksion halinde yara antiseptiği olarak kullanılmaktadır(30). Yaprakları ve çiçekli dalları Orta Anadolu bölgesinde çay olarak kullanılmaktadır(27, 28).

S. dichroantha Stapf: Kayseri, Develi, Büyükkünye yöresinde yağlıkara ve kutnu adlarıyla bilinmekte olup karın ve mide ağrılarına karşı çay şeklinde kullanılır. (29, 31). Niğde bölgesinde yaprak kısmı çıbanların ve haricen yaraların tedavisinde kullanılmaktadır (24, 27).

S. forskahlei L. (Şalba): Çay halinde tüketilir (29).

S. fruticosa Miller (Syn. *S. triloba*): Elma çalbası, adaçayı, Anadolu adaçayı, boz şalba, boz şapla adlarıyla bilinir. Anadolu'nun güneybatısında doğal bir şekilde yetişmektedir. Yapraklarının çayı hazırlanarak tüketilmektedir. Yapraklarından elde edilen uçucu yağına "elmayağı" denmekte olup ve ihraç edilmektedir (29). Gargara ve çay olarak solunum yolları için antiseptik özelliği bulunmasından dolayı kullanılır ve yaralara iyi gelmektedir (28). Bebeklerde kabızlık probleminde karşı emzirilmeden önce meme ucuna sürülerek kullanılabilir. Muğla yöresinde adı 'Almiya Çalbası'dır (27, 30).

S. grandiflora Ten: Dişleri kuvvetlendirdiği için kullanılır, Afyonkarahisar'da adı Ada Çayı'dır. (30).

S. multicaulis Vahl (Kürt reyhanı): Yurdumuzun doğusunda yaralar için kullanılır (24), koku verdiği için de tütüne konulur (27, 29).

S. nemorosa L. (Kara ot, şalba): Erzurum yöresinde gemdaş adıyla bilinip kesiklerde kanı durdurmak amacıyla herba tozu olarak kullanılmakta olup; isegemtaş adıyla Artvin yöresinde bilinmektedir (25, 26).

S. sclarea L. (Ayıkulağı, misk adaçayı, tüylü adaçayı): Yaprakları ve çiçekli dalları kabız, midevi, yatıştırıcı ve terlemeyi azaltıcı, infüzyon (%5) şeklinde kullanılmaktadır (24, 29). Parfümeride, elde edilen uçucu yağı kullanılmaktadır (32). Isparta yöresinde özellikle güneş çarpmalarında kullanılmakta olup dişi sığırkuyruğu olarak adlandırılmıştır (33). Mersin'de ise bitkinin çiçekleri infüzyon haline getirilip siğiller için kullanılmakta olup bölgede paskulak adıyla bilinmektedir (27, 33, 34).

S. tomentosa Miller (Büyük çiçekli adaçayı): Bitkinin yaprak kısmı tıbbi adaçayı yaprağı yerine alternatif olarak kullanılmaktadır (24). Aynı zamanda *S. fruticosa* Miller türü gibi kullanılmaktadır (29). Dekoksasyon veya infüzyon halinde çay olarak, aç karnına içilmektedir. Bilecik, Söğüt bölgesinde Şabla adıyla bilinmekte olup romatizma ağrıları için banyo suyuna katılmak suretiyle kullanılmaktadır, Afyon bölgesinde ise çay haline getirilerek karın ağrısı için kullanılır (26, 27, 30, 35).

S. verbenaca L. (Yabani adaçayı): Yaprakları Misk adaçayı olarak kullanılmakla birlikte koku ve etkisi zayıftır. Tohumlarından üretilen müsilağ özellikle Doğu ülkelerinde göz hastalıkları için kullanılmaktadır (24).

S. verticillata L.: Erzurum bölgesinde dadırak adıyla, İkizdere-Rize'de ise kara ot adıyla bilinmektedir (29), Bitlis, Sibek, Arıdağ coğrafyasında da hart adıyla bilinmekte olup dekoksasyon şeklinde soğuk algınlığında ve nezle olunması durumunda kullanılmaktadır (26, 27, 36).

S. virgata Jacq. : Yılcık adıyla da bilinmektedir (29). Yapraklar özellikle haricen yaralar için iyileştirici olarak kullanılmaktadır (24).

S. viridis L. (Syn. *S. horminum* L.) (Yeşil adaçayı, adaçayı): Kullanış şekli misk adaçayına benzerdir (24, 27).

3.5. *Salvia* Türlerinin Ekonomik ve Tıbbi Önemi

Lamiaceae üyeleri içerdikleri uçucu yağlardan dolayı farmakoloji ve parfümeride kullanılmaktadırlar bundan kaynaklı olarak tıbbi ve ekonomik açıdan büyük öneme sahiptirler(37).

Çoğu *Salvia* türü uçucu yağ özelliği bakımından az ya da çok etkindir (0,1-1,0%).

Biyolojik aktif bileşenlerini belirleyebilmek amacıyla yapılan çok sayıda farmakolojik çalışma bulunmaktadır. İncelenen türler biyolojik aktivite olarak antiviral, antimikrobial, antioksidant, antitümör, antiperspiran aktivite içermektedir ve özellikle sinirsel, zihinsel ve gastrointestinal hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır (38, 39). Bitki merkezli antimikrobiyal ajanlar önemli ölçüde iyileştirici özelliğe sahip bulunmaktadır. Enfeksiyona bağlı rahatsızlıkların tedavisi için kullanılan bileşikler, birçok enfekte olmuş alan için eş zamanlı olarak enfeksiyonu hafifletmektedir(40).

Antibiyotiklerin keşfedildiği güne kadar *Salvia*, bitki çayı içinde sıkça yer almakta olup, tüberküloz hastaları için kronik bronşitin tedavisi için ve terlemeyi önleyici olarak tavsiye edilmiştir. Bunun yanında romatizma, terleme, ateş, seksüel zayıflık, sinirsel ve zihinsel rahatsızlıklar için tedavi etmek amaçlı ve bunların dışında böceklere karşı kullanılırdı(41).

Günümüzde antibiyotik kullanımının artıyor olması ve düzensiz bir şekilde tüketiliyor olması bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine neden olmuştur. Oluşan bu mevcut durum bilim camiasını farklı antibiyotikler geliştirmeye yöneltmiştir (42).

Halk içinde birçok bitki bir araya getirilerek tedavi için kullanılmaktadır. Literatürde etnobotanik araştırmalarda *Salvia* türlerinin bazı enfeksiyonların tedavisi için tesirli olduğu bildirilmiştir(43). Afrika'nın güney kesiminde *Salvia repens*, *S. stenopylla* ve *S.runcinata* mikropları öldürmek ve genel olarak temizleyici olarak kullanılmaktadır. Yaprak kısmı ise kaynatılmak suretiyle ateş, terleme, hazım zorluğu ve baş ağrısı için kullanılır. Bitki ekstratları vücutta oluşan açık yaralar için de kullanılmaktadır. Bunların yanı sıra kadın rahatsızlıkları ve boğaz enfeksiyonlarına karşı kaynatılıp ardından suyu içilirdi. Halk arasındaki kullanımının yaygınlığı bilim insanlarını bu bitkilerin aktif bileşenlerini ve biyolojik aktivitelerini incelemeye yöneltmiştir. Bu alanda yapılan araştırmalarakabinde farklı *Salvia* türlerinin antiinflamatuvar, antikolinesteraz, antibakteriyel ve antikanser aktiviteleri olduğunu ortaya çıkarmıştır. Özellikle *Salvia* türleri yemekleri tatlandırmak ve çoğunlukla ekstratları ise besin maddelerinin raf ömürlerini uzatmak amacıyla kullanılmaktadır. Antioksidan aktivitesinin yanı sıra (44, 45) antibakteriyel ve antiseptik özellikler antifungal, diüretik, antiviral sitotoksik (46, 47), karın ağrısını giderici, sakinleştirici, hipoglisemi (48) ve yaraların iyileştirilmesinde kullanılmaktadır. Keller'in listesine göre adaçayı 60'dan farklı hastalığın tedavisi için kullanılır (49).

3.6. *Salvia* Türleri Hakkında Yapılan Kimyasal Çalışmalar

Salvia'ların en önemli etken maddelerini uçucu yağlar, terpenoitler ve polifenoller oluşturmaktadır (23). Antioksidan aktiviteden fenolik bileşikler sorumlu olmasından dolayı bu başlığın altında *Salvia*'larda bulunan polifenoller konusuna özel olarak odaklanılmıştır.

3.6.1. *Salvia* Türlerinde bulunan fenolik asitler

Polar fenolik asitler *Salvia* sulu ekstratlarının ana bileşenlerini oluşturmaktadır. Bu fenolik asitlerden pek çoğunun *S. chinensis* ve *S. yunnanensis*, *S. miltiorrhiza*'dan izole edilmiş olup yapıları aydınlatılmıştır. *Salvia* türlerinde keşfedilen fenolik

asitlerin başlıcaları kafeik asit türevlerine mensup rosmarinik asit olmakla birlikte 3-metoksi-4- hidroksibenzoik asit (vanillik asit) (50), 3,4-dihidroksibenzoik asit (protokateşik asit), 4-hidroksibenzoik asit (51) ve 2,4-dimetoksibenzoik asit (52), heksil 4-hidroksibenzoat ve 7-metoksikumarin (herniarin) (53) ve 6,7-dihidroksi kumarin (eskuletin) (54) gibi fenolik asitlere de rastlanılmıştır. *Salvia* türlerinde mevcut fenolik asitler kimyasal olarak kategorize edilecek olursa fenolik glikozitleri ve kafeik asit türevleri olmak üzere iki çeşittir. Kafeik asit türevleri kendi içinde dimerler, monomerler, oligomerler, trimerler ve tetramerler olmak üzere 5'e ayrılmaktadır. Kafeik asit monomerlerine, kafeik asit ile birlikte izoferulik asit (55), ferulik asit (56), tartarik asit (53) ve klorojenik asit örnek olarak verilebilir. Kafeik asit dimerleri arasında en önemli olanı rosmarinik asittir (53, 56) ve bu bileşik *Salvia* türlerinde antioksidan etkiden sorumlu olan asıl bileşik olarak belirlenmiştir (56). Rosmarinik asit ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır; kimyasal sentezi (53), hücre kültürlerinde üretilme çalışmaları (57), sıçanlarda biyolojik aktivitesi (58) gibi. Kafeik asit trimerleri grubunda litospermik asitle birlikte salvianolik asitlerin bir bölümüne de rastlanır. Litospermik asitlerin metil esterlerinde yüksek oranda serbest radikal süpürücü etkiye rastlanılmıştır bu etkinin askorbik asitten daha fazla olduğu görülmüştür (59). Benzer tesirlerin bu grubun bir diğer önemli mensubu olan salvianolik asitlerden salvianolik asit A da bulunduğu belirtilmiştir (53). Aynı zamanda Kafeik asit tetramerleri rosmarinik asit dimerleri de olmaktadır. Salvianolik asit L, B, yunnaneik asit ve sagerinik asitler bu grupta bulunmaktadır. Bu asitlerden salvianolik asit B litospermik asit adıyla da bilinmekte ve *Salvia* türlerinde magnezyum, potasyum, amonyum tuzları halinde oldukça yaygın bir şekilde bulunmaktadır. Salvianolik asit E'ye *Salvia* türlerinden sadece *S. miltiorrhiza*' da rastlanmıştır. Kafeik asit oligomerleri sınıfında yalnızca yunnaneik asit A ve B bulunmaktadır. Bunun yanı sıra *Salvia* türlerinde fenolik asitlerin glikozit formları da bulunmaktadır. En fazla rastlanan fenolik asit glikozitleri rosmarinik asit-3-glikozitilecis- ve *trans*-kumarik asitlerin oluşturmuş olduğu glikozitlerdir (53).

3.6.2. *Salvia* türlerinde bulunan polifenoller

Salvia türlerinin içerdiği polifenollerle ilgili yapılan çalışmalar proantosiyandinler, flavonoidleri ve antosiyaninleri kapsamaktadır. Flavonoidlere *Salvia* türlerinde sık bir şekilde rastlanmaktadır (54). Flavonoidler bitkide flavonoller,

flavonlar ve glikozitleri halinde bulunmaktadır. 6-hidroksi flavonoller bu cins için taksonomik bir önem taşırlar ve bu durum *Salvia* türleri için karakteristiktir (60). Flavonoitlerin çoğunluğunu apigenin flavonolleri, luteolin ve bunların 6-hidroksi türevleri oluşturmaktadırlar. *Salvia*'ların yapraklarında flavonollerin metil esterlerine de sık bir şekilde rastlanmaktadır. *S. yosgadensis* de diğer *Salvia* türlerinden farklı bir şekilde luteolin-3-metil eter (chrysoeriol), apigenin-4-metil eter (acacetin) (61) ile 4-metil eter (diosmetin)'e de rastlanmaktadır (52). 6-Hidroksi-apigenin (scutellarein) *Salvia* ekstrelerinde bulunmaktadır. 6-hidroksi-apigenin-6,7-dimetileter (cirsimaritin), 6-hidroksi-apigenin-6,'nin yüksekörandaki antimikrobiyal tesiri, hispidulin'in ise antihepatotoksik tesirleri bilinmektedir (53, 62, 63). *Salvia*'larda bulunan flavonollerin çoğunluğunu kesretin ve kamferol flavonolleri oluşturmaktadır. Bu flavonollerden kesretine *S. dorrii*'de rastlanmıştır (53). Flavon glikozitleri *Salvia*'larda sıklıkla bulunan glikozitlerdir ve apigenin-7-glikozit ve luteolin-7-glikozit bu glikozitlerin başlıcasını oluşturmaktadır. Apigenin ve luteolin glikozitleri de kendi aralarında karşılaştırılacak olursa luteolin glikozitlerinin *Salvia* türlerinde rastlanma oranı apigenin glikozitlerine nazaran daha fazladır. Flavonol ve flavon aglikonlarında olduğu gibi burada da 6-hidroksiflavon glikozitleri *Salvia* türleri için karakteristik bir önem taşımaktadır (53).

Salvia çiçeklerinde antosiyaninlere bol miktarda rastlanır (53, 64). *Salvia*'ların antosiyaninleri ilk olarak Bolton ve Willstater tarafından 1916 tarihinde incelenmiştir ve salvianin pigmenti izole edilmiştir. Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda bu pigmentin yapısı ile ilgili araştırmalar tekrar edilmiş olup yapısı kesin bir şekilde belirlenmiştir. *Salvia*'larda yapılan araştırmalar çiçeklerde bulunan kırmızı ve mavi renklerden delfinidin, pembe renklerden pelargonidin, ,menekşe ve ara renklerinden ise siyanidin antosiyaninlerinin sorumlu olduğunu göstermiştir (53).

Proantosiyanidinler kondanse tanenler adıyla da bilinmektedir ve *Salvia*'larda salvitanin olarak isimlendirilmiştir. *Salvia* preparatlarında tanen bulunması istenmez bu sebeple poliamit jel filtrasyon teknikleri veya kolon kullanarak ortamdaki uzaklaştırılmalıdır. *Salvia*'larda salvitaninler olarak adlandırılmış tanenlerin olduğu biliniyor olmasına rağmen bu maddeler üstünde fazla çalışma yapılmamış ve yapıları tam olarak açığa çıkarılmamıştır (53).

3.6.3. *Salvia* türlerinde bulunan terpenler

Seskiterpenoitler *Salvia* türlerinde nadiren bulunurlar. *S.yosgadensis* bitkisinden izole edilen seskiterpen spathulenol, seskiterpen lakton olan istanbulin D, 1 β -acetoksi-8 β -hidroksieudesman-4(15),7-dien-8,12-olit bunların en önemli örnekleridir (65).

Salvia türleri abietan başta olmak üzere pimarane, klerodan ve labdan tipli diterpenoitler içermektedirler.

Abietan Diterpenoitler

Türkiye’de yetişmekte olan *Salvia* türlerinde birçok biyolojik aktiviteye sahip yeni abietan diterpenoitler izole edilmiştir. Örneğin Hypargenin A ve B antibakteriyel aktivite göstermektedirler. Bu ürünler *S. hypargeia*’dan izole edilirken (66) değişik bir abietan diterpenoit olan wiedelakton *S.wiedemanni* Boiss.’den izole edilmiştir (67).

S. pomifera’dan yeni yedi diterpenoitpomiferon A-G *S.napifolia* Jacq bitkisinden ise 6-okso-ferruginol ve 1-okso-ferruginol izole edilmiştir (67).

Klerodan Diterpenoitler

Amerikan *Salvia* türleri çoğunlukla klerodan tipli diterpenoitler içermekte iken nadiren abietan diterpenoit içermektedirler. Meksika bitkisi olan *S. languiduline* ve *S. melissodira* Lag.’dan bir klerodan diterpenoit olan melisodorik asit izole edilmiştir (68).

Labdan ve Pimarane Diterpenoitler

Bu tip diterpenoitler diğer Lamiaceae familyasına mensup bitkilerde bulunmasına rağmen *Salvia* türlerinde nadiren bulunmaktadır. *S. wiedemanni* bitkisinin toprak üstü bölümlerinden 14-oksopimarik asit ve 7 β -hidroksisandrakopimarik asit abietan diterpenoitler ile birlikte izole edilmiştir (69, 70).

Yine bir labdan diterpen çeşidi olan manoiloksit (manoyloxide) *S. candidissima* susp. *occidentalis*’un bir ürünüdür. Akdenizin doğusunda endemik olarak görülen *S. heldrichiana* Boiss. bitkisinden üç pimarane diterpen; 7 β -hidroksisandrakopimarik

asit, isopimarik asit ve 7-okso-13-*epi*-pimarane-8,15-dien-18-olik-asit izole edilmiştir (71)

Sesterterpenoidler

Sesterterpenoit olarak *S. hypoleuca* Benth. bitkisinden salvilösolid metil ester, salvilösolid- 6,23-lakton elde edilebilmiştir (72, 73).

Anadolu bölgesinde yetişen *S. yosgadensis* bitkisinden de yeni sesterterpen laktonlar elde edilebilmiştir. Bunlar yosgadensolit A ve B olarak isimlendirilmiştir (74).

Salvia limbata bitkisinden ise iki yeni dinorsesterterpen 6-dehidroksi-13-*epi*-yosgadensenol ve 6-dehidroksiyosgadensenol elde edilmiştir (75).

Neredeyse tüm *Salvia* türlerinde yaygın bir şekilde bulunan triterpenoidler; oleanolik asit ve ursolik asit *S. officinalis* L. den izole edilmiştir. (76). Sonraki yıllarda çalışma grubumuz *S. virgata* Jacq bitkisinden yeni bir triterpenoit olan vergatik asit (virgatik asit) (77) ve *S. pinnata* L.'den 2 β ,3 β ,11 α -trihidroksi olean-13(18)-en izole edilmiştir (78). Devam eden çalışmalarda Anadolu'da yetişen *Salvia* türlerinden olan çoğu *S. kronenburgii* olmak üzere toplam 30'u geçen farklı triterpen elde edilmiştir (79).

Dammaran tipli triterpenoitler ise *Salvia* türlerinin toprak üstü bölümlerinden izole edilmiştir, fakat şimdiye dek Türkiye'de yetişen *Salvia* türlerinden elde edilememiştir. Örneğin salvilymitol ve salvilymitone *S. hierosoly-mitana*'dan izole edilmiştir (80).

3.7. *Salvia* Türleri Üzerinde Yapılmış Biyoaktivite Çalışmaları

Alimpic ve arkadaşlarının *Salvia amplexicaulis*'in su, etanol, metanol, etil asetat ve diklorometan ekstralarının kimyasal bileşimi ve biyolojik aktivitelerini incelemek amacıyla yaptıkları çalışmada HPLC kullanarak başta metanol ekstresi olmak üzere etanol ve su ekstralarında, en fazla kamferol glikozitleri (>% 40) ve polifenollerin olduğunu tespit etmişlerdir. Yapılan antioksidan tayin testlerinden DPPH, FRAP ve β -Karoten renk açılım yöntemlerinde su ekstresi en yüksek aktiviteyi göstermiştir, etanol ekstresi ise ABTS yönteminde yüksek aktivite göstermiştir. Metanol ve su ekstraları DPPH yönteminde kullanılan BHT standardından daha yüksek aktivite göstermişlerdir (15.1 u.g / mL, 15.8 u.g / mL ve 17.9 μ g / mL) Bu durum muhtemelen ekstralarda bulunan yüksek miktarda kamferol glikozitlerinden kaynaklanmaktadır. Etanol ekstresi patojenik bakterilere karşı su ekstresinden daha aktif etki göstermiştir, aynı şekilde antinörodejeneratif etkisi de daha güçlü bulunmuştur özellikle tirozinaz inhibisyonunda, etanol ekstraktının ticari inhibitör kojik asit ile karşılaştırıldığında oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık su ekstresi etanol ekstresine göre HCT-116 hücrelerine karşı daha güçlü sitotoksik aktivite göstermiştir. Alimpic ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada *S. amplexicaulis*'in su ve etanol ekstralarının gösterdiği güçlü antioksidan ve antinörodejeneratif etkileri bakımından ilaç ve gıda endüstrisi için gelecek vaad ettiğini ortaya koymuşlardır (81).

Long ve arkadaşları antioksidanların önemi ve bunların hassasiyetle tespit edilmelerinin önemi doğrultusunda yaptıkları çalışmada *S. miltiorriza*'ın (Dan Shen) antioksidan özelliklerini değerlendirmek için HPLC-ECD yöntemi geliştirmişlerdir. Yöntem, seçicilik ve hassaslık açısından optimize edilmiş. Mobil faz pH değeri, tampon konsantrasyonu, tampon tipi, organik solvent türü, gradyan profili ve akış hızı da dahil olmak üzere kromatografik şartlar sistematik olarak araştırılmıştır. Dan Shen örneklerinden oluşturulan 14 partiden oluşan beş antioksidanın kantitatif analizi için düşük pH değeri (2.8), düşük tampon konsantrasyonu (20 mmol / L NaH₂PO₄), sıg bir su-asetonitril gradyanı ve 0.2 mL / dak'lık bir akış hızı belirlenmiş en iyi koşullardır. Tarif edilen yöntem iyi bir geri kazanım (>% 95), analitlerin tümü için 10 (4) 'e kadar lineer aralık, iyi hassasiyet (RSD <% 4.01) ve yüksek duyarlılık

(kafeik asit LOQ, 1.5 u.g / L) göstermiştir. UV saptama ile karşılaştırıldığında, tarif edilen ECD yöntemi, elektro-aktif antioksidanların seçici olarak tespit edilmesini sağladığı için Dan Shen'in antioksidan özelliklerini değerlendirmek için daha etkili olmuştur (82).

S. plebeia'ın toprak üstü kısımlarından hazırlanan etanol ekstratlarından üç yeni seskiterpenoid izole eden Ma ve arkadaşları buldukları seskiterpenoidlerin yapılarını, NMR ve MS spektrumlarının detaylı analizleri sonucu aydınlatmışlardır. Bulunan bu seskiterpenoidler, Salplebeone A, eudesmane lakton iken, salcombe B ve C 12,8-laktam grupları içeren nadir eudesmane seskiterpenoitlerdir (83).

S. fruticosa'nın In vitro antioksidan ve antitümör etkilerini araştırmak için yapılan bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısımları metanol ile ekstrakte edilmiştir. Bu ekstre, metanol ve n-heksan ile bölünmüştür. Luteolin, luteolin 7-O-glukosid, rutin ve salvigenin metanol ile çözülebilir fraksiyonundan izole edilmiştir. n-Heksan fraksiyonu viridiflorol, beta-pinen, 1,8-sineol ana bileşenler olarak elde edilmiştir. Metanol ekstresi meme kanserine (MCF-7 ve MDA-MB-231) ve insan kolorektal karsinoma (RKO ve Caco-2) hücrelerine karşı antitümör etki yaptığı tespit edilmiştir. TUNEL testi *S. fruticosa* subsp. *Thomasii*, apoptoz ile kanser hücrelerinde ölüme yol açmış ve tümöral olmayan 3T3-L1 hücrelerinde düşük sitotoksik etki göstermiştir. Dahası, lipid peroksidasyonunun en üst düzeyde korunmasını sağlamış ve 3T3-L1 fare fibroblastlarında menadiyon tedavisi ile indüklenen oksidatif stresini azaltmıştır. Bu sonuçlar açısından *S. fruticosa* subsp. *Thomasii* biyoaktivitesi, yalnızca gıda olarak değil aynı zamanda nutrasötik / farmasötik endüstrisinde kullanımını teşvik edebilir (84).

Geleneksel tıpta kullanılan *Betonica officinalis* ve *S. officinalis* otlarından alınan ekstraktların fenolik profili, antioksidan, antimikrobiyal ve anti-inflamatuar özellikleri tanımlamak amacıyla yapılan çalışmada elde edilen sonuçlar, ekstraktların stabil 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) ve 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) (ABTS) katyon radikallerini inhibe ettiğini göstermiştir. Bu çalışmayla görüldü ki, *S. officinalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı etkili antibakteriyel ajandır. Ekstraktlar siklooksijenazı (COX-1)

ve proteinin denatürasyonunu engelledi; bu da bu türlerin bitki kaynaklı anti-inflamatuar maddeler için potansiyel bir kaynak olabileceğini düşündürüyor. Bu çalışma ilk defa *B. officinalis*'in bitkisinin antimikrobiyal ve anti-inflamatuar etkinliğini ortaya koymuştur. Bu çalışmanın sonuçları, tıbbi preparatların geliştirilmesi ve bu türün antimikrobiyal, anti-inflamatuar ve yara iyileştirici bir madde olarak kullanılmasına yardımcı olabilir (85).

S. aethiopsis L. ve *S. ceratophylla* L. (Lamiaceae) 'nin metanol ve etil asetat özütlelerinin fenolik bileşimlerini, in vitro antioksidan ve sitotoksikite etkinliklerini incelemek üzere Poyraz ve arkadaşları bir çalışma yürütmüşlerdir. *S. aethiopsis*'in metanol (SA-ME) ve etil asetat (SA-EA) ekstraktlarının toplam fenolik içeriği $94.36 \pm 1.36-290.62 \pm 1.51$ mg GAE / g *S. ceratophylla*'nın metanol (SC-ME) ve etil asetat (SC-EA) ekstraktlarında ise bu değer $168.35 \pm 1.97-330.14 \pm 2.28$ mg GAE / g arasında bulunmuştur. Metanol ve etil asetat ekstraktlarının ana fenolik asidi rosmarinik asit olarak tespit edilmiştir (*S. aethiopsis* için 40.25 ve 140.6 u.g / 100 g bitki; *S. ceratophylla* için 74 ve 234.5 µg / 100 g). *S. aethiopsis* ve *S. ceratophylla* ekstraktlarının fenolik asitleri daha çok sinamik asit türevleri, ardından benzoik asit türevleri içerir. *Salvia*ekstreleri doz bağımlı radikal temizleme faaliyetleri göstermiştir. HPLC sonuçları, antioksidan kapasite ile bu fenolik asitlerin miktarı arasında bir korelasyon olduğunu ortaya koymuştur. Bu bitki ekstraktlarının potansiyel antioksidan özelliklerini görebilmek için, hücrelerin çoğalması MTT tahlili ile değerlendirilmiştir. Ekstraktların canlılık yüzdesi, kontrollere göre belirlendi ve 15.6 -1000 µg mL (-1) ekstrakt konsantrasyonlarında ölçüldü. SA-ME ekstraktının IC50 değeri 24 saatte 230.0 ± 17.3 ve 48 saatte 93.3 ± 5.8 SC-ME için 266.7 ± 41.6 (24 saat) ve 180.0 ± 20.0 (48 saat) olarak bulunmuştur. Ekstraktların sitotoksikite etkileri şu şekilde sıralanabilir, SA-EA> SC-EA> SA-ME> SC-ME. SC-ME en düşük seviyede iken en sitotoksik ekstre yüksek fenolik içeriğe sahip olan SA-EA olarak bulunmuştur (86).

S. miltiorhiza (SM) ve *S. przewalskii*'nin (SP) köklerinden hazırlanan hidroalkolik (% 50 EtOH) ekstraktlarının karşılaştırmalı fitokimyasal analizleri, iki tamamlayıcı LC-MS sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İlk sistem HPLC-DAD-MS, bir iyon tuzak kütle spektrometresi ve ikinci sistem yüksek çözünürlüklü MS /

MS Orbitrap kütle spektrometresinden oluşmaktadır. Tek tek bileşikler, tam moleküler kütlelerin, kütle spektrumu ve tutma sürelerinin standart bileşenlerinkine, çevrimiçi mevcut veri tabanlarına ve literatür verilerine kıyasla önceden yayınlanmış bir yaklaşım kullanılarak tanımlanmıştır. Ek olarak, ekstraktların antioksidatif etkinliklerinin DPPH ve FRAP yöntemleri ile belirlenmesi gerçekleştirildi. Analiz sonucu, her iki türün özlerindeki 39 kimyasal bileşiğin tanımlanmıştır. SP'nin kökünden hazırlanan ekstrede, çeşitli metabolitlerin varlığında, örneğin przewalskinik asit ve türevleri, przewaquinone C, przewaquinone A, rosmarinik asit glikozitleri, methyltanshinonate varlığında SM'den farklıdır, oysa tanshinonlar, salvianolik asitler ve lithospermic asitler her iki türde de bulunmuştur. Ayrıca, SP özü ile karşılaştırıldığında, SM köklerinden hazırlanan hidroalkol ekstresinin FRAP testinde (en fazla 323.92 $\mu\text{M Fe}^{2+} / \text{L}$) ve DPPH testinde (en fazla 78.64 nM TE), daha kuvvetli antioksidan özelliklere sahip olduğu bulunmuştur (87).

S. miltiorrhiza, dikkate değer biyo-aktivitelerine katkıda bulunan birden fazla bileşen içeren geleneksel bir tıbbi Çin bitkisidir. Yapılan bir çalışmada, farklı büyüme dönemlerinden *S. miltiorrhiza*'nın çeşitli yerlerinde kimyasal bileşenlerin dağılımını ve dinamik değişikliklerini araştırılmıştır. *S. miltiorrhiza*'da bulunan 24 bileşiğin (Asitler, flavonoidler, triterpenler ve sakkaritler) (fenolik dahil) doğru olarak tayin edilmesi için, ultra-yüksek performanslı sıvı kromatografi-üçlü dörtlü kutuplu kütle spektrometresi (UPLC-TQ-MS / MS) ve buharlaşmalı ışık saçma detektörü (HPLC-ELSD) yöntemleriyle birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Elde edilen yöntemler iyi doğrusalılık, hassaslık, tekrarlanabilirlik, kararlılık ve iyileşme ile doğrulanmıştır. Sonuçlar, esas olarak salvianolik asitler ve tanshinonlar içeren kökler için bitkinin farklı bölümlerinde kategori ve miktar farklılıkları olduğunu ve sakkaritlerin çoğu stakyoza olduğunu gösterdi. Toprak üstü kısımlarda salvianolik asitler, flavonoidler ve triterpenler (tansinonlar hariç) tespit edildi ve bulunan sakkaritler esas olarak monosakkaritlerdi. Dinamik birikim analizi, *S. miltiorrhiza* Bunge'nin ilkbaharda fide evresi olduğu toprak üstü kısımları için temmuz-ağustos aylarının hasat zamanı olduğunu önermektedir. Bu çalışma, *S. miltiorrhiza*'nın toprak üstü kısımlarının geliştirilmesi ve kullanımı için değerli bilgiler sağlamış ve bitkinin optimum hasat süresinin belirlenmesinde yararlı olmuştur (88).

Silva ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Mato Grosso(MT) ve Rio Grande do Sul (RS) bölgelerinde yetiştirilen chia tohumlarında, makro besinler, nem, kül, diyet lifi, yağ asitleri, mineraller, karotenoidler, vitaminler, flavonoidler, fenolik bileşikler, antioksidan aktivite, fitat ve tanenin görülme ve konsantrasyonu araştırılmış ve karşılaştırılmıştır. Diyet lifi (35.3 g, 100 g (-1), ortalama olarak 18.9 g 100 g (-1), yüksek konsantrasyonlarda lipidler (ortalama olarak 31.2 g, 100 g (-1)), E vitamini (ortalama 8,203.6 µg, 100 g (-1)) gözlenmiştir. İki bölgeden de chia tohumlarında toplam fenolik bileşik ve fitik asit için benzer değerler gözlenmiştir. RS'de yetiştirilen Chia, MT'de yetiştirilen chia'dan daha yüksek antioksidan aktivite göstermiş ve tanin konsantrasyonları, Mato Grosso'da yetiştirilen chia tohumlarında daha yüksek bulunmuştur (19.08-1.08 eq. Katequina / g numune). Sonuç olarak, Brezilya chia tohumlarının, lipidlerin, proteinlerin, toplam diyet lifi, minerallerin ve E vitamininin yüksek konsantrasyonlara sahip olduğunu göstermiştir (89).

Toplan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Kıbrıs'a özgü *S. veneris* Hedge toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin ve uçucu yağının, fenolik bileşenlerinin kompozisyonu GC-MS ve LC-MS/MS ile araştırılmıştır. Ekstre ve uçucu yağın antimikrobiyal, antifungal ve antioksidan aktiviteleri de çalışılmıştır. Antioksidan aktivitesi, TEAC testi (Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi) ve DEPH ile belirlendi. Uçucu yağın% 99.8'ini temsil eden toplam 36 bileşen belirlenmiştir. Uçucu yağın GC-FID ve GC-MS analizi sonucunda, 1,8-sineole (% 51.0), kafurun (% 9.3), kamfenin (% 6.3), alfa-pinen'in (% 5.8) ve beta-pinen'in (% 5.4) ana bileşenler olarak bulunmuştur. LC-MS/MS sonucuna göre, metanol ekstresinde rosmarinik asit esas bileşik olmak üzere, toplam fenol içeriği, 100 mg ekstrede 19 ± 0.20 mg gallic asit olarak belirlenmiştir. Ayrıca, ekstredeki rosmarinik asitin kantitatif analizi de incelenmiştir. *S. veneris*'in toprak üstü kısımları, 16.26 mg / g değerinde yüksek düzeyde rosmarinik asit bulunmuştur. Uçucu yağda herhangi bir antioksidan aktivite gözlenmemesine karşın metanolekstresi güçlü aktivite göstermiştir. Antimikrobiyal aktivite ile ilgili olarak, MIC değerleri, test edilen tüm mikroorganizmalar için 60 µg / mL tb 4000 µg/mL arasında değişmektedir. Bu sonuçlara göre, *S. veneris* gıda, ilaç ve kozmetik endüstrileri için potansiyel yeni bir ürün olarak düşünülebilir (90).

Campania Bölgesi'nde (İtalya) yetiştirilen *S. officinalis*'in yapraklarından elde edilen fenol ekstraktını, niteliksel ve nicelik olarak analiz etmek için LC-MS / MS teknikleri uygulanan bir çalışma yapılmıştır. Abietan diterpenlere %50, fenilpropanoid bileşenlerine %40 ve %10 da flavonoidlere benzeyen SoA541 bulunmuştur. Lignin oligomerleri adaçayı bileşenleri olarak ilk kez tespit edilmiştir. SoA541, SH-SY5Y hücrelerinde <125 ug / mL doz düzeylerinde anti-lipoperoksidatif ve antioksidan özellik göstermiş ve AChE enzimini inhibe etme kabiliyeti donepezil'den çok daha fazla çıkmıştır. Anti-AChE etkililiği dozun maksimumuna (62.5 µg / mL) kadar değişmesine bağlı bulunmuş ve bunun ötesinde etki azalmıştır. Elde edilen veriler, hayvan modellerinde CNS hastalıklarının önlenmesinde "Campania" bölgesinin potansiyel bir kullanımını değerlendirmeyi amaçlayan daha ileri araştırmaları teşvik etmektedir (91).

S. fruticosa M. (Lamiaceae), antioksidan, antimikrobiyal ve antiproliferatif etkinlikleriyle bilinir. Faz I xenobiyotik metabolize edici enzimler olan CYP1A2 ve CYP2E1, faz II enzimlerin, NQO1, GPx ve glutatyon S-transferazların (GST) hareketi ile elimine edilen reaktif metabolitleri üretir. Bu çalışmada HT-29 hücrelerinde *S. fruticosa* ve onun önemli fenolik bileşik rosmarinik asitin (RA) CYP1A2, CYP2E1, NQO1, GPx ve GSTm1 mRNA ekspresyonları ve enzim aktiviteleri üzerine in vitro modülasyon etkileri araştırılmıştır. Bir mRNA ekspresyon analizi CYP1A2 ve CYP2E1 düzeylerinin azaldığı, *S. fruticosa* ve RA tedavilerinin ardından NQO1, GPx ve GSTm1 düzeylerinin arttığını ortaya koymuştur. Gen ekspresyonlarına paralel olarak *S. fruticosa* tarafından GPx ve GST enzim aktiviteleri sırasıyla 1.68 ve 1.48 kat artmıştır. Dahası, RA, GPx ve GST aktivitelerini sırasıyla 1.67 ve 1.94 kat artırmıştır. Bu ön çalışmanın sonuçları, araştırılan enzimlerin *S. fruticosa* tarafından ekspresyonu ve aktivitesindeki değişiklikler nedeniyle ksenobiyotik metabolizmasının değişebileceğini göstermektedir (92).

Bir başka çalışmada *S. syriaca*'nın antidiyabetik, anti-Alzheimer, genel toksisite ve antioksidan aktiviteleri değerlendirilmiştir. Bitkinin uçucu yağı ve metanol ekstresinin fitokimyasal bileşimi, sırasıyla, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi ve ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografi-diyot dizisi detektör teknikleri kullanılarak tanımlanmıştır. *S. syriaca*'ın uçucu yağı, güçlü sitotoksikite, antioksidan,

a-amilaz ve a-glukozidaz önleme faaliyetleri sergilemiştir. Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi analizi, uçucu yağda ana bileşiklerin, spathulenol (% 87.4), izospathulenol (% 7.6) ve bornyl asetat (% 2.7) olduğunu göstermiştir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi analizi, rutin, quercetin, apigenin, rosmarinik asit ve ferulik asidin en bol fenolik bileşenler olduğunu göstermiştir. *S. syriaca*, fonksiyonel gıdalar, tıbbi ve farmasötik uygulamalar için biyoaktif doğal bileşikler açısından değerli bir kaynak olarak görülebilir (93).

Bu çalışmada, *S. nemorosa*'nın kimyasal bileşimi ve antimikrobiyal, toksisite, antioksidan ve enzim önleme aktivitesi değerlendirilmiştir. Fenolik bileşenler HPLC-DAD ile karakterize edilmiş ve rosmarinik asitin ana bileşik olarak (7584 µg / g ekstre) tespit edildiği 11 bileşen tanımlanmıştır. Yapraklarda ve uçucu yağlarda da on altı uçucu bileşen tespit edilmiştir. Oksijenlenmiş seskiterpenler ana bileşenler olarak tespit edilmiştir. Metanol ekstresi, en yüksek toplam fenolik ve flavonoid içeriklerini (sırasıyla 294 mg GAE / g ve 117 mg QE / g) ve en güçlü DPPH radikal temizleme etkinliğini (IC50: 82 µg / mL) göstermiştir. Bitki örnekleri orta ila yüksek aldehid oksidaz, ksantin oksidaz, asetilkolinesteraz ve alfa-glukosidaz önleyici aktivite ve orta sitotoksosite göstermiştir. Ayrıca, EO'lar büyük antimikrobiyal potansiyel sergilemiştir (IZ: 8.8-33.7 mm). Bu bulgular, *S. nemorosa*'nın fonksiyonel gıda ve ilaç endüstrisinde yeni uygulamalar için yararlı olabileceğini gösterir (94).

Eski çağlarda *Salvia* türleri şifalı bitki çayı olarak, tüberkülozda ve ateşli gece terlemelerinde kullanılıyordu. Bugünlerde ise yemeklere tat vermesi için ve çikolata katkılı tatlılarda esans olarak kullanılmakta olup antivirütik, antioksidan, antibakteriyel gibi aktiviteleri içinde kullanılmaktadır (95). Popülerliği sürekli artan bitkilerle tedavide çeşitli hastalıklar için halk arasında sıklıkla Adaçayı kullanılmaktadır. Hayvan deneyleri *Salvia* ekstrelerinin merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için kullanılabileceğini göstermiştir(96). *Salvia* türleri önemli biyolojik aktiviteler göstermektedirler. *S. desoleana* Atzei&Picci geleneksel tıpta kadın hastalıkları, *S. haematodes* Wall türü antidepresant özelliği (97), sindirim ve sinir sistemi hastalıklarında (98) kullanılıyordu.

Salvia türlerinin yükek miktarda uçucu yağa sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Özellikle *S. lavandulifolia*, *S. officinalis*, *S. furuticosa* türleriyle

yapılan çalışmalar bunların uçucu yağ bakımından zengin kaynaklar olduğunu göstermiştir (99).

Gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktivitesi olan sugiol bileşiği *S. albocaerulea* türünden izole edilirken forskalinon bileşiği *S. forskahlei* türünden izole edilmiştir (100).

S. barelicii türüyle yapılan bir çalışma bitkinin toprak altı bölümünden elde edilen diterpenlerin aktiviteleri DPPH serbest radikal giderimi, süperoksit anyon radikal giderim aktivitesi, ABTS katyon radikal giderim ve CUPRAC metodları kullanılarak incelenmiş ve yüksek antioksidan aktiviteye sahip oldukları belirlenmiştir (101).

Birçok *Salvia* türünde bolca bulunan rozmarinik asitin aktivitesi DPPH serbest radikal giderim tekniğiyle incelendiğinde aktivitesinin yüksek antioksidan nitelik gösteren askorbik asitle yarışır düzeyde olduğu gözlenmiştir ($IC_{50}=2.7 \mu\text{g/ml}$) (102).

Forousin ve ark. gaz kromatografisi-kütle spektrumu (GC-MS) tekniğini kullanarak iki *Salvia* türünün (*S. suffruticosa* ve *S. verticillata*) yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemiyle de fenolik içeriğini ve esansiyel yağ içeriğini belirlemişlerdir. Esansiyel yağların invitro antioksidant aktiviteleri 1,1-difenil-2 pikrilhidrazil (DPPH) radikal giderim yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalışmanın sonucunda *S. suffruticosa* için 4 türev belirlenirken *S. verticillata* için 7 türev belirlenmiş ve her iki tür için aynı olan ana bileşenlerden 1,8-sineol'ü *S. suffruticosa* %31.21 içerirken diğer tür %38.26 ve diğer ana bileşen olan kamfor (camphor)' u *S. suffruticosa* %27.11 diğer tür ise %22.98 içerdiğini tespit etmişlerdir. Fenolik bileşen analizinin sonucunda askorbik asit içeriği *S. verticillata* için %33.53 ve *S. suffruticosa* için %23.98, p-hidroksibenzoik asiti içeriği *S. verticillata* için %3.83 ve *S. suffruticosa* için %11.50, vanilik asit içeriği *S. suffruticosa* için %5.86 ve *S. verticillata* için %6.55, sirincik asit içeriği *S. suffruticosa* için %6.29, ferrulik asit içeriği *S. verticillata* için % 6.04 ve *S. suffruticosa* için %6.35, sinapik asit içeriği *S. verticillata* için % 4.93 ve *S. suffruticosa* için %6.26 olarak belirlenmiştir. DPPH serbest radikal giderim yeteneği *S. suffruticosa* için % 0.558 diğer *Salvia* türü için %0.558 olarak belirlenmiştir (103).

S. spinosa türünün metanol ekstresive esansiyel yağı ile yapılan bir çalışmanın sonucunda bitkinin α -glukosidaz inhibitör aktivitesive yüksek DPPH radikal giderim aktivitesi gösterdiği görülmüştür. GC-MS/FID kullanılarak yapılan esansiyel yağ analizi sonucunda tespit edilen 19 bileşenin yağın %98.5' ini oluşturduğu anlaşılmıştır. Esansiyel yağın ana bileşenleri Linalol (%3.9), Karyofilen oksit (63.0), Spathulenol (%23.0) ve trans-karyofilen (%3.0) olarak tespit edilmiştir. Total flavonoid ve fenolik içerikleri sırasıyla 36-377 GEA/g ve QE/g olarak belirlenmiştir. Metanol ekstraktının yüksek miktarda flavonoit ve fenolik içerdiği belirlenmiştir. Çalışma *S. spinosa*' nın farmasötik endüstride ve yiyecek gibi birçok kullanım alanı için yüksek potansiyeli bulunduğunu göstermiştir (104).

S. officinalis türünün toprak üstünde bulunan bölümünün metanol ekstraktından izole edilmiş olan fenolik diterpenlerin hem asetilkolin esteraz enzimini (AChE) hem de B16 melanoma hücrelerinde melanin biyosentezini inhibe etme yeteneklerinin incelenmesi amacıyla yapılan bir araştırmada izole edilen 7b-metoksi rosmanol, 7 diterpen (karnosol, 12-metilkarnosol, rosmanol, 7a-metoksi rosmanol, izorosmanol ve epirosmanol) üretilmiştir. Ellman metodu kullanılarak izole diterpenlerin AChE inhibisyon kabiliyetleri test edilmiştir. AChE'nin aktif kısmında amino asit kalıntılarına izole fenolik diterpenlerin bağlanma afinitesini gözlemleyebilmek için moleküler kenetlenme deneyi yapılmıştır. Sonuç itibariyle izole diterpenlerden isorosmanolün arbutin kadar etkili (potent) melanin inhibisyonu göstermiş olduğu tespit edilmiştir. 7a-metoksirosmanol ve izorosmanol bileşikleri 500 μ M konsantrasyonda AChE aktivitesini sırasıyla %65 ve %50 oranında inhibe ettikleri belirlendi (105).

Salvia türlerinin biyolojik aktiviteye sahip oldukları ve kozmetik, ilaç, parfüm ve gıda sanayisinde büyük ehemmiyete sahip oldukları biliniyor. *S. cadmica* Boiss bitkisinin metanol, su ve etil asetat ekstreslerinin kullanılarak antioksidant aktivitesinin ve enzim inhibitör aktivitesinin incelendiği bir çalışmanın sonucunda metanol ekstraktının DPPH radikal giderimi, fosfomolibden ve CUPRAC deneylerinde güçlü aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır (sırasıyla 54.71, 59.89 μ mol ve 311.96 TEs/g kuru bitki). Su ekstraktının ise güçlü ABTS radikal giderim aktivitesi gösterdiği ortaya çıkmıştır (102.23 μ mol). Yapılan inhibitör aktivite analizlerinin

sonuçlarına göre ekstraktların BChE, AChE ve tirozin üzerine aktivite göstermediği belirlenmiştir. Biyolojik aktivite testlerine paralel olarak ekstraktların fitokimyasal kompozisyonlarında çalışma yapılmıştır. Metanol ekstraktının flavonoit ve fenolik içerik bakımından zengin olduğu belirlenmiştir (sırasıyla 12.96 µmol RE s/g kuru bitki ve 64.98 µmol GAEs/g kuru bitki). Kalitatif analiz yanısıra ekstraktların 23 ayrı bileşikle kantitatif analizi yapılmıştır. Sonuçlar metanol ekstraktının önemli miktarda kaffeik asit, apigenin, klorojenik asit, kaemferol, ferrulik asit, hesperidin, luteolin, protokateşik asit, p-kumarik asit ve rozmarinik asit içerdiğini göstermiştir (106).

S. sclarea bitkisiyle yapılan bir çalışmada bitkinin çiçek ve yaprak kısımlarının metanol ekstraktlarının total fenolik içerikleri gallik aside eşdeğer olarak sırasıyla 106.72 ve 116.22 µg/mg olarak belirlenmiştir. Ekstraktların 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) testinde iyi antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir (sırasıyla 81.33 ve IC₅₀=73 µg/mg). β-karoten/linoleik asit testinde de iyi antioksidan aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir (İnhibisyon yüzdeleri sırasıyla %47.58 ve %40.25). Diğer taraftan bitkinin esansiyel yağı ve ekstraktları test edilen mikroorganizmaların çoğuna karşı ılımlı ve iyi antimikrobiyal aktivite gösterdiği belirlenmiştir (107).

Diğer bir çalışmada *S. hydrangea* DC. Ex Benth ve *S. urmiensis* Bunge türlerinin ekstraktlarının DPPH ve ABTS (2,2-azino-bis (3-etil benzoiazolin-6-sülfonik asit)) radikal giderim aktiviteleri ile total fenolik ve flavonoid içerikleri değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda *S. urmiensis*' in etil asetat ekstraktının 10.0±0.2 µg/ml IC₅₀ değeri ile önemli antioksidan niteliği olduğu ortaya çıkmıştır. Test edilen tüm ekstraktların yüksek flavonoid-fenolik içerik gösterdiği belirlenmiştir (108).

Anadolu'nun güneybatısının endemik türlerinden olan *S. crysophylla*'nın toprak üstünün diklorometan ekstraktının uçucu olmayan ikincil metabolitlerinin ilk kez çalışılmış olduğu bir çalışmada bitkiden izole edilen bileşiklerin yapıları aydınlatılmıştır (Sitosterol, salvigenin, oleanoik asit ve ursolik asit). Saf izole bileşiklerin antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikal giderimi tekniğiyle belirlenmiştir. Elman yöntemiyle incelenen kolinesteraz aktiviteleri (AChE ve BChE) sonucunda triterpenoit olan oleanolik asit ve ursolik asidin AChE'ye karşı

seçici aktivite gösterdiği ve sclareol'ün ise her iki enzimedede oldukça iyi aktivite gösterdiği ortaya çıkmıştır (109).

S. vertisillata türünün metanol ekstraktının β -karoten/linoleik asit ve DPPH testlerinin sonucunda güçlü antioksidant aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Kromatografik teknikler kullanılarak yüksek antioksidant kapasiteli chrysoeriol aktif bileşiği izole edilmiş olup DPPH serbest radikal giderim yönteminde 93.32 (80.23-108.57) mM IC₅₀ değeri ile doza bağlı serbest radikal giderim aktivitesi göstermiş olduğu belirlenmiştir (110).

Misk adaçayının (*S.sclarea*) antimikrobia ve antioksidan aktivitesinin incelendiği bir çalışmada kurutulmuş bitkinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, kloroform ve aseton ekstraktları total antioksidan aktivitesi, antimikrobiyal aktivitesi ve total fenolik içerik bakımından incelenmiştir. Standart olarak BHT ve BHA'nın kullanıldığı linoleik asit emülsiyonunun peroksidasyonunu kloroform ekstresi %93 inhibe ederken aseton ekstresinin ise %68 inhibe ettiği anlaşılmıştır. Kloroform ekstraktının daha aktif olduğu gözlenmiş olup ekstrelerin az da olsa antimikrobiyal ve antifungal özellik gösterdiği belirlenmiştir (111).

İran'dan toplanan *S. santolinifolia*, *S. mirzayanii* ve *S. choloroleuca* türlerinin metanolik ekstreleri olası antioksidan aktiviteleri için DPPH, β -karoten renk giderimi gibi birkaç biyokimyasal test ile taranmış olup ayrıca HPLC analizi ile rozmarinik asit ve kateşin gibi bileşenlerin miktar tayinleri yapılmıştır. Yapılan çalışmanın sonucu *S. choloroleuca* en etkilisi olmak üzere çalışılan bitkilerin yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur(112).

S. microphylla bitkisinin esansiyel yağının antioksidan aktivitesi β -karoten renk giderim testi ve DPPH serbest radikal giderim tekniğiyle belirlenmiş ve β -karoten testinde IC₅₀=770 μ g/ml olarak saptanmıştır(113).

Türkiye'nin endemik türlerinden olan *S. poculatan*'ın toprak üstü bölümünden 4 flavonoid, 2 triterpenoid, 1 diterpenoit ve 1 tane de steroid izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerden β -sitosterol ve ursolik asit ile ham ekstrenin antioksidan aktiviteleri süperoksit anyon radikali giderimi, β -karoten renk giderimi ve ABTS kation radikali giderimi (>100 μ g/ml) yöntemleri ile saptanmıştır. Ekstrenin total

flavonoid ve fenolik içerikleri sırasıyla quercetin pirokatekole eşdeğer olarak belirlenmiş. *S. pocolatan*'ın ekstresi bütrilkolin esteraz inhibitör aktivitesi kadar önemli miktarda antioksidan aktivitesi de gösterdiği saptanmıştır. İzole edilen cirsimaritin ve ursolik asitin yüksek bütrilkolin esteraz inhibisyon aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir (101).

16 *Salvia* L. türünün su ve metanol ekstralarının kullanıldığı bir çalışmada ekstraların zayıf kolin esteraz aktivitesi gösterirken DPPH serbest radikal giderim yönteminde yüksek antioksidan aktivite göstermiş olduğu görülmüş. Ekstrelerin toplam fenolik içeriği $AlCl_3$ reaktifiyle belirlenirken fenolik asitlerin analizi ise HPLC tekniği kullanılarak belirlenmiştir. Ekstreler sirincik asit, gallic asit, p-hidroksi benzoik asit, vanilik asit, kaffeik asit, protokateşik asit, ferrulik asit, klorojenik asit, o- ve p-kumarik asit, rozmarinik asit ve tr-sinamik asit açısından analiz edilmiştir. Kullanılan türlerden *S. ekimiana* türünün metanol ekstresi rozmarinik asit (153.50mg /100g) bakımından en zengin tür olduğu ortaya konmuştur (114).

Çeşitli habitatlarda yetişen 4 *Salvia* türünün metanolik ekstralarının antioksidan aktiviteleri ile fenolik içerik ve bileşimlerinin incelendiği bir çalışmada spektrofotometrik olarak hesaplanan total fenolik içerik *S. officinalis* ekstraları için 112.93-161.37 02 mg GAE/g kuru ağırlık aralığında ve *S. argenta* ekstresi için 67.67-72.02 mg GAE/g kuru ağırlık aralığında değiştiği belirlenmiştir. HPLC analizi ekstralarda özellikle kaffeik asit türevleriyle beraber flavonoid ve fenolik diterpenler gibi birçok fenolik asitin varlığını ortaya çıkarmıştır. Rozmarinik asitin analiz edilen ekstralarda en bol bulunan bileşik olduğu görülmüş ve *S. officinalis* örneklerinde en yüksek değeri vermiş olduğunu göstermiştir (13680.22-18378.00 μ g/g kuru ağırlık). *S. officinalis* metanol ekstraları ABTS (644.85-766.30 μ g/ml) ve DPPH (10.08-3.37 μ g/ml) analizleri ile değerlendirildiğinde en güçlü antioksidan kapasiteye sahip olduğu görülmektedir (115).

S. nemorosa türünün enzim inhibisyonu, kimyasal kompozisyonu, toksisitesi, antimikrobiyal ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmanın sonucunda bitkinin metanol ekstraktının yüksek flavonoid ve fenolik içeriğe sahip olduğu (sırasıyla 117 mg QE/g ve 294 mg GAE/g ekstrakt) ayrıca güçlü DPPH radikal giderim aktivitesi gösterdiği görülmüştür ($IC_{50}=82$ μ g/ml). HPLC-

DAD ile fenolik bileşenler karakterize edilmiş ve 11 bileşen belirlenmiştir. Ana bileşen rozmarinik asit olarak belirlenmiş (7584 µg/g ekstrakt) olup bitkinin orta derecede asetilkolin esteraaz inhibisyon aktivitesi sergilediği saptanmıştır (108).

14 *Salvia* türüyle yapılan başka bir çalışmada ise Ellman metodu kullanılarak türlerin kolin esteraaz inhibisyonu belirlenip kullanılan türler arasından *S. cryptantha*'nın toprak üstü bölümünün diklorometan ve etanol ekstraktlarının AChE' ye (% 56.22 ± 4.18) ve BChE' ye (% 33.80 ± 4.18) karşı en aktif olduğu gözlenmiştir (116).

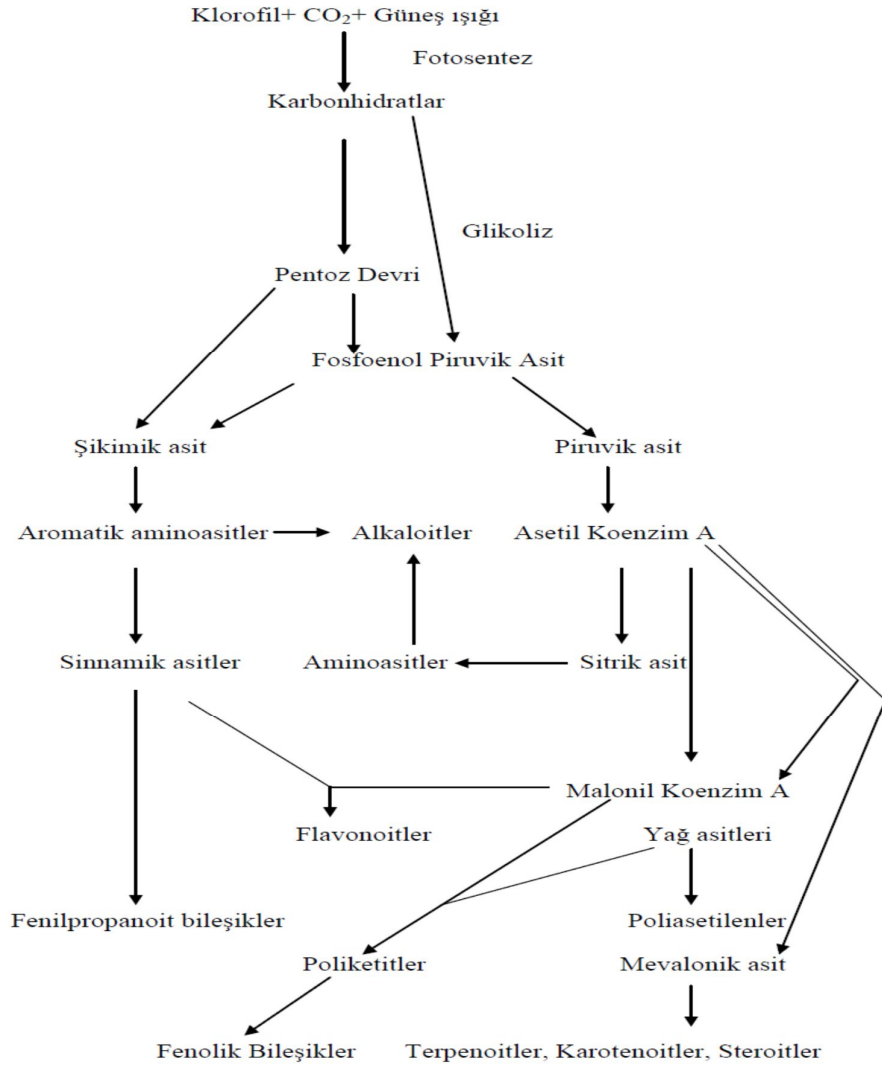
S. bicolor Desf'nin toprak üstü petrol eteri ve metanol ekstraktları kullanılarak bitkinin kimyasal kompozisyonu, analjezik, antioksidan, antiinflamatuvar ve antimikrobiyal aktiviteleri belirlenmiştir. Ayrıca HPLC/MS sonucu 14 fenolik asidin varlığı ortaya konmuş olup bunlardan protokateşik asidin baskın olduğu gözlemlenmiştir (75.22 mg/g kuru örnek). Onu p-kumarik (70.27 mg/g kuru örnek), gallik (68.26 mg/g kuru örnek) ve synergic (54.38 mg/g kuru örnek) asidin takip ettiği saptanmıştır. HPLC/MS ile ayrıca flavonoid içerikte analiz edilmiş ve 5 çeşit flavonoidin varlığı ortaya çıkarılmıştır. İçerdiği flavonoidler denapigenin (88.48 mg/100g kuru örnek) ve 7-O-glukosid (120.25 mg/100g kuru örnek) majör bileşik olarak belirlenmiştir. Her iki ekstrenin antioksidan kapasitesi gallik aside eş değer (GAE) olarak DPPH ve total antioksidan kapasitesi teknikleriyle belirlenmiştir. Her ikisinde mühim miktarda antioksidan aktivite göstermiştir (117).

3.8. Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler; basit şekerler, aminoasitler, basit karakterli lipidler ve yağlar gibi yaşamsal faaliyetler için önem arz eden primer metabolitlerden oluşurlar (Şekil 1) (118). Sekonder metabolitler bitkinin büyüme ve gelişmesinde, dış etkilerden korunmasında, savunma mekanizmasında ve bitkiler arası etkileşimin sağlanmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bitkilerdeki bu organik bileşikler özellikle ilaç yapımında mühim bir yere sahiptir (119).

Sekonder metabolitlerin genel özellikleri;

- Yalnızca belirli bir cins/türe özel olabilir, bu sebeple cins/türün biyokimyasal çeşitliliği sınırlı sayıdadır,
- Moleküllerin stereokimyasal varyasyonları ve yapısal türevleri ise çok sayıdadır,
- Biyosentez sürecinde belirli bir miktar ve zamanda oluşur,
- Sentezlendikleri yerden farklı özelleşmiş doku, organ veya sistemlerde depolanır (örn.: lipofilik maddeler ve uçucu yağlar salgı ceplerinde bulunabilir) gerektiği takdirde ya sentezlerde kullanılır ya da enerji gereksimini karşılar,
- Mutasyon sayesinde metabolit oluşabilme ihtimali vardır(7).



Şekil 1. Sekonder metabolitlerin oluşumu

3.8.1 Terpenler

Terpenler doğal ürünlerin en büyük sınıfını oluşturur (120). Bu bileşikler genellikle uzun bitkilerin her kısmında (çiçek, tohum, yaprak, kök, gövde gibi), yabancı otlarda, yosunlarda, alglerde ve likenlerde, hatta mikrobiyal orjinli bazı böceklerde bile bulunabilmektedir. Sınıfın ekstre veya uçucu yağ gibi bileşikleri, ilk çağlardan beri, koruyucu, aroma içeriği, sabun, parfüm, ilaç ve uyuşturucu ilaç olarak kullanılmaktadır (121).

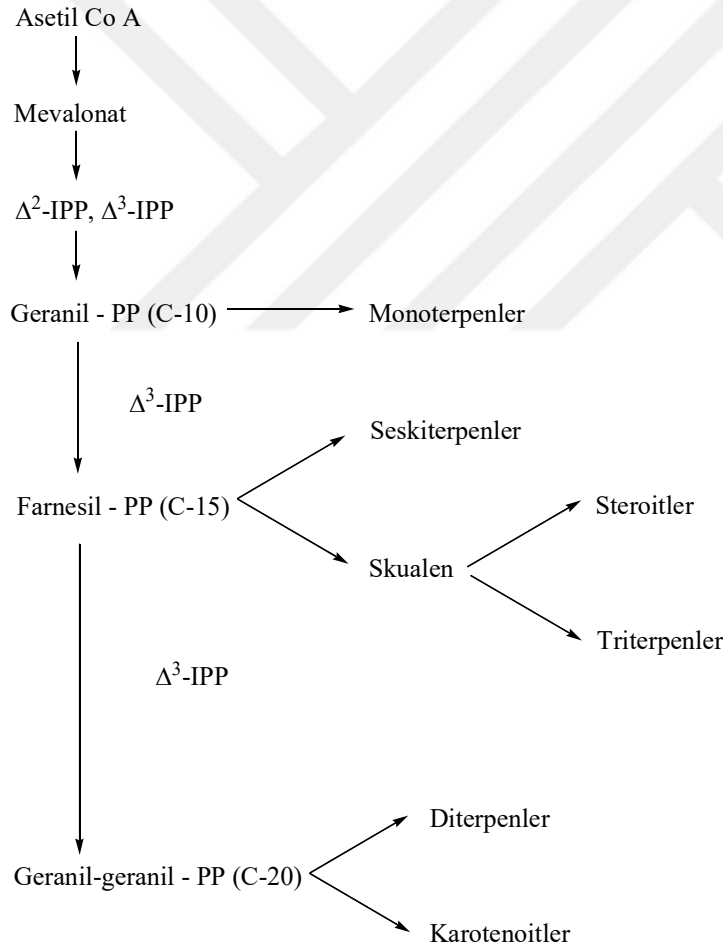
Yalnızca hidrokarbon içeren terpenler olabilmekle birlikte, oksijen içeren yani alkol, aldehit, keton ve asit grubu taşıyan terpenler de çok fazladır. Oksijen ihtiva eden terpenler terpenoitler olarak da isimlendirilirler. Bugün gerek halkalı, gerekse açık zincirli yapıda olan çeşitli fonksiyonel gruplara sahip 20.000'den çok terpen yapısı biliniyor. Terpenler bitki dokularında genellikle serbest bir şekilde, bazıları organik asit esterleri ya da glikozitler halinde, bazen de proteinlerle birleşmiş bir şekilde bulunurlar(122).

Salvia türlerinin ana bileşenleri terpenoitler ve flavonoidlerdir. Bu bitkilerin toprak üstü bölümleri büyük çoğunlukla terpenoit, flavonoid ve monoterenler gibi uçucu bileşenleri içerirken, kök bölümleri ise esas olarak diterpenoitleri içermektedir. Hem sesterterenlere hem de seskiterpenoitlere *Salvia* türlerinde nadiren rastlanmaktadır.

3.8.1.1. Terpenlerin oluşumları

Terpenlerin ana iskelet bölümü beş karbonlu izopren birimlerinden oluşur. Yapısında izopren birimi bulunan bileşiklere izoprene benzeyen anlamına gelen izoprenoid adı verilir. İzopren birimini meydana getiren mevalonik asitin başlangıç maddesi asetil koenzim A'dır (123). Asetil coenzim A'nın ikincil metabolitlerin oluşumundaki rolü Şekil 2'de gösterilmiştir. Mevalonik asitin 2 molekül ATP (adenozintrifosfat) ile fosforlanması akabinde mevalonik asit-5-pirofosfat oluşmaktadır. Mevalonik asit-5-pirofosfatın tersiyer OH grubunun fosforlanması sonrasında dehidrasyon ve dekarboksilasyon ile izopentil pirofosfat oluşur. İzopentil pirofosfatın enzim ile izomerizasyonu ardından dimetilallil ester oluşur (118). Bahsini ettiğimiz bu iki izomerin kondenzasyonu geranil pirofosfatı oluşturur. Bu

madde monoterpeneri vermektedir. Geranil pirofosfatın izopentil pirofosfat ile kondenzasyonu sonucu farnesil pirofosfatı oluşturmaktadır. Bu madde seskiterpenlerin geçiş bileşiği özelliğini göstermektedir. Bu maddenin tekrar izopentil pirofosfat ile kondenzasyonu geranil-geranil pirofosfatı vermektedir. Geranil-geranil pirofosfat diterpenleri ve karotenoitleri oluşturmaktadır. Geranil, izopentil ve farnesil pirofosfat moleküllerinin birbirleriyle değişik kondenzasyonları ardından daha yüksek yapılı terpenler oluşmaktadır. Örneğin; triterpenler iki farnesil pirofosfatın, karotenoitler ise iki geranil-geranil pirofosfatın kondenzasyonu ile oluşmaktadır.



Şekil 2. Terpenlerin oluşumu

3.8.1.2. Terpenlerin sınıflandırılması

İzopentil pirofosfat aktif bir olefin bileşiği konumundadır. İzopentil pirofosfat moleküllerinden iki, üç, dört, beş, altı ve sekizi birleşerek halkalı ya da açık zincirli terpenleri oluştururlar. Terpenlerin ana iskeletleri 5 karbonlu izopren (2-metil-1,3-butadien) moleküllerinden oluştuğundan sınıflandırılabilmesi için izopren birimlerinin sayısına göre yapılır (Tablo 1). Ruzicka'nın ortaya atmış olduğu "İzopren Kuralına" göre bütün terpenlerin karbon iskeletleri izopren birimlerinin iki ya da daha fazlasının birleşmesi sonuca oluşmuştur (124).

Terpenler fiziksel özelliklerine göre iki gruba ayrılırlar:

1. Uçucu Terpenler: Su buharı sayesinde sürüklenabilen uçucu yağlar ve küçük moleküllü terpenler olarak adlandırılırlar.
2. Uçucu Olmayan Terpenler: Büyük moleküllü terpenler; bazı seskiterpenler, triterpenler, diterpenler, politerpenler ve sesterterpenlerdir.

Tablo 1. Terpenlerin sınıflandırılması

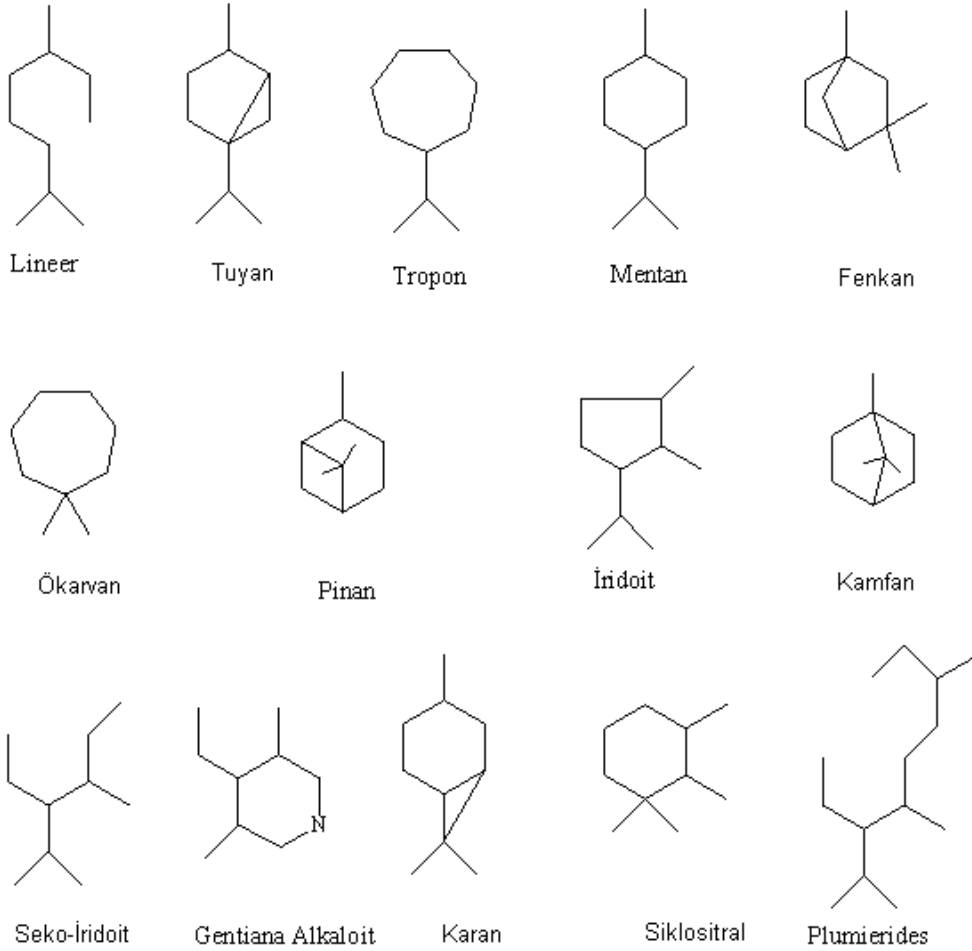
İzopren Sayısı	Sınıfı	C Sayısı
1	Hemiterpenler	5 C
2	Monoterpenler	10 C
3	Seskiterpenler	15 C
4	Diterpenler	20 C
5	Sesterterpenler	25 C
6	Triterpenler	30 C
8	Tetraterpenler (Karotenoitler)	40 C
N	Politerpenler	(5 C) _n

Hemiterpenler (C5)

Ana iskelet kısmı toplamda 5 karbondan oluşan en küçük terpen birimidir. İzoterpenler kendiliklerinden monoterpenlerin pirolizinden oluştuğu biliniyorsa da, istenilen şekilde bu bileşiklerin biyokimyasal olarak elde edilebilmesi imkan dahilinde değildir (121).

Monoterpenler

Monoterpenler 10 karbonlu bir yapıya sahip olup bitkiler aleminde yaygın bir şekilde bulunan uçucu bileşiklerdendir. Parfüm ve gıda maddelerinde koku verici olarak kullanılan antibakteriyal, antifungal, antioksidan ve antikanser etkilere sahiptirler. Monoterpenler taşıdıkları ana iskelet yapısına göre sınıflandırılırlar, doğada çok bulunan bazı monoterpen iskeletleri Şekil 3'te gösterilmiştir (125). Gaz kromatografisi ve GC-MS yöntemleri bu bileşiklerin analizinde kullanılır (120).

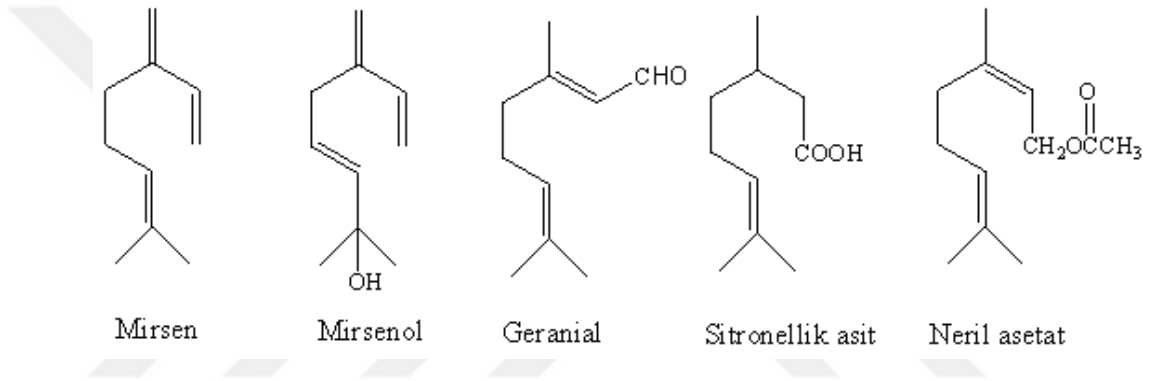


Şekil 3. Doğada çok bulunan monoterpen iskeletleri

Monoterpenler başlıca 3 grup altında toplanabilir:

Asiklik monoterpenler:

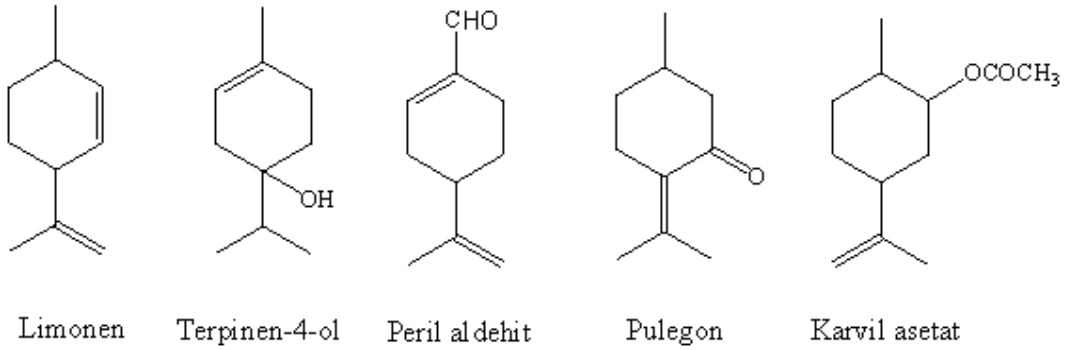
Düz zincirli bir yapıya sahiptirler, çifte bağ taşıyabilirler. Asimetrik karbon atomları sebebiyle optikçe aktiftirler. Hidrokarbonlarına mirsen, aldehitlerine geranial, alkollerine mirsenol, asitlerine sitronellik asit ve esterlerine neril asetat örnek olarak verilebilir (Şekil 4).



Şekil 4. Asiklik monoterpenler

Monosiklik monoterpenler:

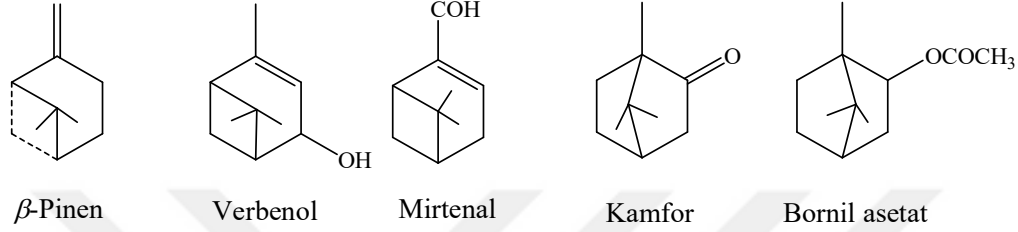
Bir halka ve Çifte bağ taşırlar. Hidrokarbonlarına limonen, aldehitlerine peril aldehit, alkollerine terpinen-4-ol, ketonlarına pulegon, esterlerine karvil asetat örnek olarak verilebilir (Şekil 5).



Şekil 5. Monosiklik monoterpenler

Bisiklik monoterpenler:

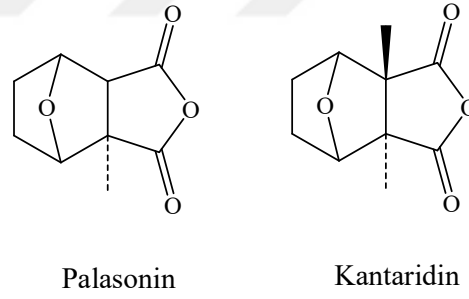
Çifte bağ ve iki halka taşırlar. Hidrokarbonlarına β -pinen, aldehitlerine mirtenal, alkollerine verbenol, ketonlarına kamfor, esterlerine bornil asetat örnek olarak verilebilir (Şekil 6).



Şekil 6. Bisiklik monoterpenler

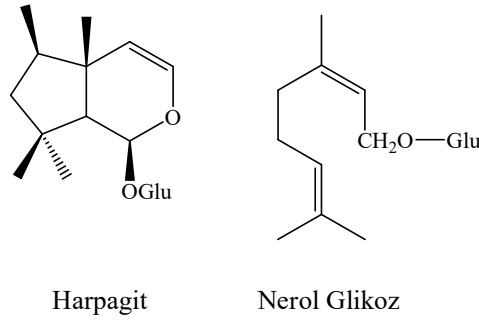
Trisiklik monoterpenler:

Üç halka taşımaktadırlar, kantaridin ve palasonin örnek olarak verilebilir (Şekil 7).



Şekil 7. Trisiklik monoterpenler

Monoterpen glikozitlere örnek olarak nerol glikoz ve harpagit verilebilir (Şekil 8).



Şekil 8. Monoterpen glikozitler

Seskiterpenoitler (C₁₅)

Daha ziyade uçucu yağların bileşiminde bulunmaktadırlar. Uçucu yağlar dışında özellikle *Compositae* familyasının karakteristik (Santonin, Germakranolid gibi) bileşikleridirler. Antitümör, sitotoksik, antileukemik ve antimikrobiyal aktiviteleri bilinmektedir. Aktivitenin α , β -doymamış- γ -lakton halkasından kaynaklandığı düşünüyor. Dimeri gossipol ve hemigossipol adlı seskiterpen pamuğun olgunlaşmamış çiçek tomurcuklarında bulunmakla birlikte tohumlarında da bulunur (*Gossypium* sp.), antifertilite etkiye sahiptir. (7)

Diterpenoitler (C₂₀)

20 Karbonlu bileşikler halindedirler. Pimarik asit ve izomerleri, abietik asit gibi reçine asitleriditerpen yapıya sahiptirler. Ayrıca, Colombo radix'in acı maddelerinden furanoditerpenlerdir. Labiatae familyasından *Teucrium chamaedrys* (Kısa Mahmut Otu), flavon, *Teucrium scorodonia* uçucu yağ ve diterpenler taşır. Antiromatik ve diaforetik olarak kullanılmaktadırlar.

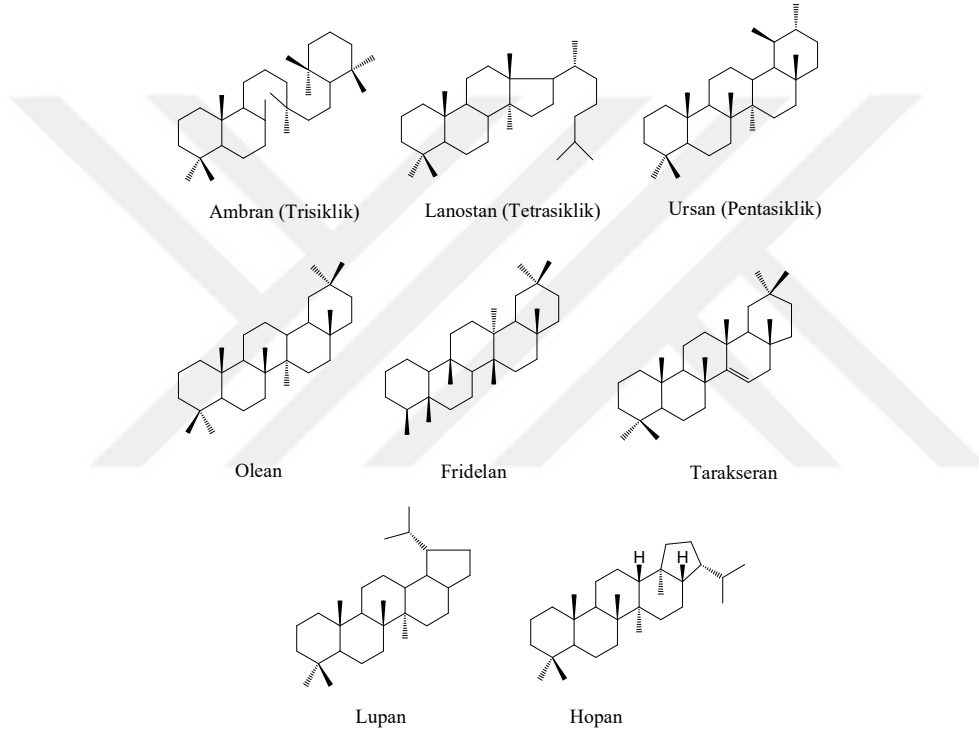
Klorofil, Vitamin A, Vitamin K'nın yapısında da bulunurlar. Bazı diterpen türevlerine alkaloidlerde de rastlanmaktadır. *Delphinium*, *Aconitum* ve *Garrya* alkaloidleri gibi. Labiatae familyasından *Coleus* türlerinde ise Forskolin bulunmaktadır. Bu nedenle *Coleus*'lar glokom, astım tedavisi ve konjestif kardiyomiyopatide ümit verici bir drogtur. Euphorbiaceae familyasında bulunan diterpenler forbol türevidirler. Bunun yanı sıra Tymelaceae familyasında bulunurlar, dafnan, tiglian ve ingenon türevleri şeklinde sınıflandırılırlar(7).

Triterpenler

Triterpenler altı izopren biriminden oluşmakta olup 30 karbonlu halkalı yapılara sahiptirler. Bitkilerde serbest olarak bulunabilirler bunun yanı sıra triterpenik saponinler olarak isimlendirilen glikozitleri halinde de bulunabilmektedirler. Serbest triterpenler, aldehit, epoksi, asit, alkol, keton ve lakton gruplarından bir ya da birkaçını bir arada taşıyabilme kapasitesine sahiptirler. Doğal triterpenik bileşiklerin iskelet yapıları Şekil 9'da verildi. Taşıdıkları fonksiyonel gruplar ve halka sayısı da isimlendirmede etkindir. Triterpenler taşıdıkları halka sayılarına göre pentasiklik,

trisiklik ve tetrasiklik olarak üç grupta toplanmaktadırlar. Hiç süstitüent taşımazlarsa triterpen hidrokarbonlar olarak isimlendirilirler.

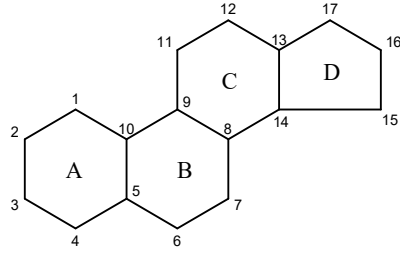
Triterpenlerin tanımlanmasında renk reaksiyonları önem taşımaktadır. Liebermann-Burchard en fazla kullanılan renk reaksiyonudur. Mavi-yeşil renk triterpenlerin varlıklarını gösterirken, aynı reaksiyon steroidlerle yavaş bir şekilde yürümekte olup kızıl kahve bir renk vermektedir(124).



Şekil 9. Triterpen iskeletleri

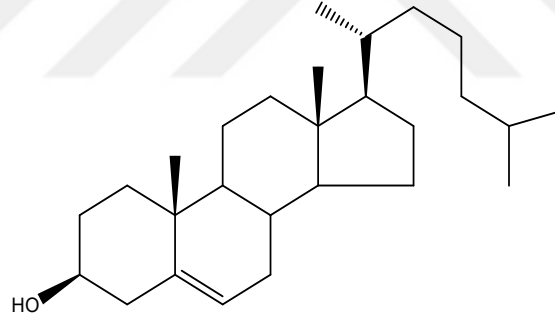
3.8.2. Steroidler

Hayvanlarda ve bitkilerde yaygın bir şekilde bulunan bileşiklerdir. Mide ve safra asitleri, adrenal korteks hormonları, kalp glikozitleri ve cinsiyet hormonları steroid sınıfı bileşiklerdir. Steroitlerin karakteristik halka yapıları ise siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir (Şekil 10).



Şekil 10. Steroitlerin iskelet yapısı

Bitkisel steroidler genellikle, C-3'te OH,, C-17'de yan zincir, C-5'te çifte bağ taşırlar. C-3'teki OH grubu, halkadaki metil gruplarıyla dik açı yaptıkları takdirde A ve B halkaları *cis* şeklinde birleşmişlerdir. Bu konumdaki OH grubu β şeklindedir. OH grubu metil gruplarına paralel ise A ve B halkaları *trans* yapıda olup OH grubu α halindedir. Yan zincirin konfigürasyonunda ise steroidlerde bu durum genellikle β şeklindedir. C ile D halkaları ve B ile C halkaları genellikle *trans* olarak birleşirler (126).



Şekil 11. Kolesterol

UV spektrumu steroidlerin yapı tayinini yapmak hususunda fazla bilgi vermez. Steroitlerin çifte bağları genel itibariyle izole durumdadır ve 200-210 nm aralığında güçlü bir uç absorpsiyon yaparlar. IR spektrumunda, alifatik C-H bağları 2850-2900 cm^{-1} 'de, hidroksil grupları 3000-3500 cm^{-1} 'de, görülür. Parmak izi bölgesi karışık olmakla birlikte karakteristiktir. ^1H NMR spektrumunda, metilen pikleri 1,5-2,5 ppm aralığında, metil pikleri 0-1,5 ppm aralığında çıkar. Steroitlerde metilen pikleri çok karmaşık olmakla birlikte yaygındır. Bu nedenle metilen pikleri yerine metilen zarfı denilir. Hidroksil grubuna, doymamışlık pikleri 5-6 ppm'de komşu hidrojenler 3,5-4,5 ppm'de izlenir. Kütle spektrumunda $[\text{M}]^+$, $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$, $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ ayrıca $[\text{M}-\text{yan zincir}]^+$ veya $[\text{M}-\text{D}+\text{yan zincir}]^+$ pikleri görülür.

3.8.3 Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler genel itibariyle bir ya da daha fazla hidroksil grubu taşımakta olan aromatik bileşiklerdir. Bu bileşikler bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanırlar. Bitkiler türlerinden 8000'in üzerinde fenolik bileşik elde edilmiştir (118).

Fenolikler en aktif olan doğal antioksidanlar olmakla birlikte, metallerle kelat oluşturmaları, antioksidan etkileri serbest radikalleri bağlamaları ve lipoksijenaz enzimini inaktive etmeleri ile gerçekleşmektedir. Bir polifenolün antioksidan olarak tanımlanabilmesi için iki niteliğe sahip olması gerekmektedir. Birincisi, düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyonu geciktirebilme, önleme veya yavaşlatma yeteneğine sahip olması, ikincisi de kendisi serbest radikale dönüştüğünde kararlı bir formda kalabilme niteliğidir (127). Bitkisel gıdalarda bulunan fenolik maddeler; lignanlar fenolik asitler, flavonoidler ve stilbenler benzeri alt gruplara ayrılmaktadırlar.

Fenolik bileşikler iskeletlerindeki karbon atomu sayıları baz alınarak sınıflandırılırlar (Tablo 2).

Tablo 2. Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

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

3.8.4. Flavonoitler

Flavonoitler fenolik bileşikler arasında bulunan en geniş ve en önemli grubudur (128). Bugüne kadar 5000'den fazla flavonoit tanımlanmış olup en aşağı 10 kimyasal alt grup olarak sınıflandırılmaya gidilmiştir. Çam ve Hısıl (129) flavonoitlerin bitkilerin fotosentezle ürettikleri ve yaşamsal gereksinimleri için kullandıkları

aminoasitler, karbonhidrat gibi birincil metabolitlerden türemiş olduklarını belirtmişlerdir. Flavon bileşiklerinin kimyasal olarak antioksidan özellik göstermelerinin aşağıda özetlenen üç nedenden kaynaklandığı düşünülmektedir (127).

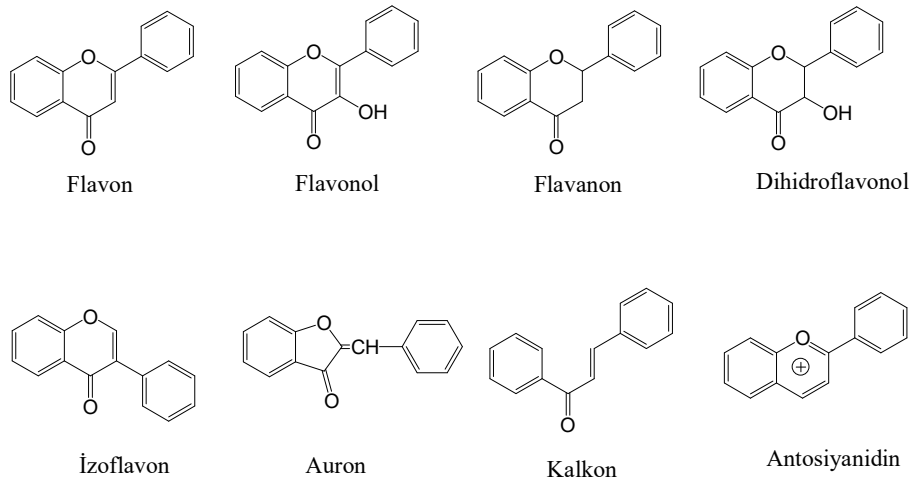
1. Aromatik halka yapılarındaki hidroksil grupları yardımıyla hidrojen vererek redoks reaksiyonuna girebilmektedirler ve bu sayede serbest radikalleri yok edebilme yeteneği kazanırlar.

2. Heterosiklik, aromatikve çoklu doymamış bağlardan oluşan yapılarıyla stabil bir delokalizasyon düzeni oluştururlar.

3. Metal kelatlama kapasitesi bulunan yapısal grupları vasıtasıyla O^{2-} ve OH^- gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebilmektedirler.

Tıbbi açıdan önemli kabul edilen birçok bitki türünde flavonoidlerin aktif ingredientler olduğu düşünülmektedir. Bitkilerde genellikle glikozitler şeklinde bulunan flavonoidler kimyasal stabiliteye ve hidrolik aktiviteye sahip bileşiklerdir (127).

Biyosentez araştırmalarından çıkan sonuçlara göre fenil alanin gibi aminoasitlerin enzimatik deaminasyonlarından oluşan sinamik asit türevleri malonil koenzim A ile kondanse olarak flavonoidleri oluşturmaktadırlar. Karbon iskeleti $C_6-C_3-C_6$ şeklinde olan flavonoidlerin ana iskeletinde toplamda 15 karbon bulunur (118, 130). Şekil 12`de farklı flavonoid iskeletleri gösterilmiştir.



Şekil 12. Flavonoid iskeletleri

3.8.5. Yağ asitleri

Yağ asitleri yapısal olarak uzun zincirli karboksilik asitlerdir. Doymuş ve doymamış yağ asitleri, uzun zincirli alkoller (vakslar), gliserol (katı ve sıvı yağlar), şeker türevleri (glikolipitler), ve bazı fosfor içeren moleküllerle (fosfolipitler) esterleşmiş olarak ortaya çıkmaktadırlar. Hidroksi asitler, doymamış yağ asitleri, ketoasitler ve bu fonksiyonel gruplardan iki ya da daha fazlasını içeren asitler hayvanlarda ve bitkilerde yaygın olarak bulunurlar. Çoğu doymamış yağ asidinde bazı yapısal benzerlikler görülmesine rağmen bunları sınıflandırmak oldukça zordur (Tablo 3,4) (118).

Tablo 3. Doğal olarak oluşan Δ^9 -Alkenoik asitler

İsim	Yapı
Gadoleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Oleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Palmitoleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Miristoleik	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Δ^9 -undesenoik	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Δ^9 -desenoik	$\text{CH}_2=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Tablo 4. Doğal olarak oluşan Δ^9 haricindeki diğer doymamış alkenoik asitler

Yaygın isim	Sistemantik isim
Linderik	Δ^4 -dodesenoik asit
Lauroleik	Δ^5 -dodesenoik asit
Tsuzuik	Δ^4 -tetradeseenoik asit
Petroselinik	Δ^6 -octadesenoik asit
Vaksenik	Δ^{11} -octadesenoik asit

3.9. Antioksidanlar

Vücutumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, nükleik asitler, proteinler ve karbonhidratlar oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizmaya zarar verebilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilirler (131). Bu durum genellikle “Oksidatif Stres” şeklinde ifade edilir. Oksidatif stresin baş sorumluları reaktif azot ve oksijen türleridir (Tablo 5) (132).

Tablo 5. Reaktif oksijen ve azot türleri

Reaktif Oksijen Türleri		Reaktif Azot Türleri	
Radikaller	Radikal Olmayanlar	Radikaller	Radikal Olmayanlar
Süperoksit ($O_2^{\bullet-}$)	Hidrojen Peroksit (H_2O_2)	Azot Oksit (NO^{\bullet})	Nitröz Asit (HNO_2)
Hidroksi (HO^{\bullet})	Hipokloröz Asit ($HClO$)	Azot dioksit (NO_2^{\bullet})	Nitrozil Katyonu (NO^+)
Peroksi (RO_2^{\bullet})	Hipobromöz Asit ($HBrO$)		Nitroksi Anyonu (NO^-)
Alkoksit (RO^{\bullet})	Ozon (O_3)		Diazot tetraoksit (N_2O_4)
Hidroperoksi (HO_2^{\bullet})	Singlet Oksijen ($^1\Delta_g \text{ } ^1O_2$)		Diazot trioksit (N_2O_3)
			Peroksinitrit anyonu ($ONOO^-$)
			Peroksinitröz Asit ($ONOOH$)
			Nitronyum Katyonu (NO_2^+)
			Alkilperoksi nitrit ($ROONO$)

Reaktif oksijen ve azot türleri insan bedeninde çeşitli durumlarda meydana gelirler:

- Hücrenin normal solunum yapması sırasında yan ürün olarak azot ve reaktif oksijen türleri oluşur.
- Hidrojen peroksit ve süperoksit miktarı, bazı biyomoleküllerin (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, sitokrom P450 ve elektron transport zincirlerinin bazı bileşikleri) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonu ile artış gösterebilirler (133, 134).
- Vücutumuz, gerek doğal ve gerekse insan kaynaklı radyasyona maruz kalabilmektedir. Yüksek enerjili elektromagnetik ışın, suyu parçalayabilir ve hidroksi radikali oluşturur (135).

Azot türleri ve reaktif oksijen dışarıdan da organizmaya alınabilmektedirler. Sigara çıkan dumanının ana bileşiği NO_2^{\bullet} 'dir. NO_2^{\bullet} 'in sigara olefinleri ile reaksiyona girmesiyle karbon merkezli radikallerin oluştuğu düşüncesi hakimdir. Ayrıca sigara içimi nötrofilleri aktive ederek dolaylı bir şekilde serbest radikal üretimini artırmaktadır (131).

Yabancı organizmalara karşısında koruyucu bir görev yürüten fagositler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eosinofiller) yabancı organizmayı öldürebilmek için hidrojen peroksit ve süperoksit üretirler. Bu önemli savunma sisteminin bozukluğu, doku hasarıyla sonuçlanan aşırı fagosit aktivitesinin eşlik ettiği romatoid artirit ve iltihaplı bağırsak rahatsızlığı benzeri bazı hastalıklara sebep olduğu bilinmektedir (136-138).

Oksidasyon, radikalik zincir reaksiyonları aracılığıyla yürür. Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme yöneliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparmaktadırlar. Bu nitelikleri, radikallerin kimyasal olarak aktif olmalarını sağlamasının yanı sıra bunların organizmadaki varlığı biyomoleküllerin modifikasyonuna sebep olmaktadır.

Azot türleri ve reaktif oksijen DNA bazlarını hasara uğratarak mutasyona sebep olmaktadır. OH^{\bullet} (139, 140), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (138, 141) ve ONOO^- (142, 143) DNA hasarının sebebi olarak bilinir. DNA hasarı kanserden sorumlu olan baş faktör olarak kabul görmektedir (144). Hücrede DNA tamir mekanizmaları mevcuttur; ancak bu mekanizmalar bazen yetersiz kalabilirler.

Antioksidanlar, oksidasyonu başlangıç ve/veya gelişme basamağında önleyen veya geciktiren maddelerdir. Canlı organizmalarda antioksidan aktiviteye sahip bileşiklerin bulunması yaşam için önemli bir ihtiyaçtır. Antimutajenik, antikarsinojenik, yaşlanmayı geciktirici gibi birçok etki canlılardaki antioksidan özellikteki maddelerden kaynaklanır (145). Antioksidan maddelerin eksikliğinde reaktif oksijen ve azot türleri kanser, diabet, kireçlenme, parkinson, AIDS, beyin ve kalp hastalıkları gibi birçok hastalığın ortaya çıkmasına sebep olurlar (146).

Doğal kaynaklı antioksidanlar, bitkilerde var olan azotlu bileşikler (alkaloitler, klorofil türevleri, proteinler, aminler), fenolik bileşikler (tokoferoller, fenolik asitler,

flavonoitler, organik asitler ve karotenoitlerdir (147, 148). Histidin, sistein, metiyonin, triptofan ve lizin (149) gibi aminoasitlerle birlikte sülfürlerce zengin olduğu bilinen tiyoredoksin (150) proteini de antioksidan özellikler göstermektedirler.

Yapılan çoğu epidemiyolojik çalışma bolca meyve-sebze tüketimi yapılmasının kanser hastalıklarını ve kalp-damar hastalıklarını azalttığını ortaya koymuştur (151, 152). Sebze ve meyvelerin bu etkileri içermiş oldukları antioksidan maddelere (askorbik asit, tokoferoller, karotenoitler, flavonoitler) dayandırılmaktadır. Örneğin yeşil çay yaprakları (-)-epikateşin, (-)-epigallokateşin, (-)-epikateşin gallat ve (-)-epigallokateşin gallat içerirler (153, 154) ve antiaterosklerotik (155, 156), antihipertansif (157), antioksidatif (158), antikarsinojenik (51, 156) gibi etkilere sahiptirler. Kateşinler metal iyonlarını bağlayıcı ve oksijen radikalini tutabilen antioksidanlar olarak bilinmektedirler (159, 160).

Bunların yanı sıra sentetik antioksidanlar ise besinlerin bozunmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak amaçlı kullanılırlar. Günümüzde BHA (bütillenmiş hidroksianisol), PG (propil gallat), BHT (bütillenmiş hidroksitoluen) ve TBHQ (*t*-bütilhidrokinon) en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturmuş oldukları yan ürünlerin çeşitli hastalıklara yol açma ihtimalinin var olduğunu ortaya koyan çalışmalar da vardır (45, 161). Bu sebeple doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini alabilecek yeni antioksidan maddelerin araştırılmasına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmış ve bunun üzerine yapılan araştırmalar artmıştır.

3.9.1. Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

Antioksidan aktivitenin belirlenebilmesimaksadıyla kullanılan yöntemlerden bazıları şunlardır:

- CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi (162).
- FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) yöntemi (163).
- Folin Ciocalteu yöntemi (164).
- TRAP (Toplam radikal tutma parametresi) yöntemi (165).

- Luminol yöntemi (166).
- DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi (167).
- Fikoeritrin (PE) esaslı yöntemler (168).
- Krosin yöntemi (169).
- DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi (170).
- ORAC (Oksijen radikal absorbands kapasitesi) yöntemi (171).
- TOSC (Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi) yöntemi (172).
- Siklik voltametri yöntemi (173).
- β -Karoten renk açılım yöntemi (174).
- Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi (175).
- ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi (176).
- Metal bağlama yöntemi (177).

3.9.2.Gıdalarda kullanılan antioksidanlar

Gıdalarda bulunan lipitler, özellikle doymamış lipitler, çok hızlı bir şekilde okside olup gıdaların bozulmasına yol açmaktadırlar. Besin maddelerinde antioksidan maddeler kullanılmasında asıl amaç bu oksidasyonu geciktirmek ve gıdaların raf ömrünü uzatabilmektir (178).

Sentetik antioksidanlar

BHT (butillenmiş hidroksi toluen), BHA (butillenmiş hidroksianisol), trolox, propil gallat sentetik antioksidanlardandır. Bunlardan BHA ve BHT lipit peroksidasyonunu engellemede başarı sağlamaktadır. Trolox, α -tokoferolün suda çözünen hali olarak da düşünülebilir. Propil gallat'sa suda çözünebilir güçlü bir antioksidandır. Sentetik antioksidanlar insanlarda sebep oldukları negatif etkilerinden dolayı son dönemlerde bunların yerine kullanılacak alternatif doğal antioksidanlar üzerindeki çalışmalar büyük yoğunluk kazanmıştır (179).

Doğal antioksidanlar

Besin maddelerinde koruyucu amaçlı olarak doğal antioksidanların kullanılması fikri, sentetik antioksidanların toksik etkilerinin açığa çıkması ile hız kazanmıştır. Ancak sentetik antioksidanlar kadar güçlü antioksidanlar bulabilmek de zordur ve çoğu zaman doğal antioksidanlar gıdaları korumada tek başlarına yeterli olmamaktadır ve bu sebeple sentetik antioksidanlarla birlikte kullanılmaktadırlar. Gıdalarda doğal antioksidan kullanımını sınırlayan bir başka durum da hoşagitmeyen veya çok güçlü olan kokular ve tatlardır. Bu maksatlarla doğal antioksidan madde arayışında Lamiaceae gibi kokusu ve tadı hoş olan familyalar araştırılmaktadır (178).

3.10. Alzheimer Hastalığı

Alman psikiyatrist Aloist Alzheimer tarafından 1906 tarihinde tanımlanmış olan Alzheimer hastalığı (AH), ihtiyarlarda primer dejeneratif demansın en sık görülen formudur. Bilinci açık bir insanın günlük yaşamını etkileyecek derecede zihinsel ve sosyal uyum yeteneğinin azalması durumuna 'Demans' denmektedir (180). Alzheimer hastalığında en erken semptom, genel olarak hafıza kaybının progresyonudur. Başlangıçta bu hafıza kaybını yaşlılığa bağlı unutkanlıktan ayırmak güç gelmektedir. Ancak unutkanlığı olanlar bu durumun farkındadır ve günlük yaşam aktiviteleri minimum düzeyde kalmaktadır (181). Yakın geçmişi hatırlayamamak, yeni bilgilerin hemen unutulması, buna karşılık uzak geçmişi çok iyi hatırlamak önemli bir niteliktir. Alzheimer hastalarında konuşma bozukluğuna sık rastlanır, tümce kurmakta zorlanırlar. Hastalık ilerleme kaydettikçe bellek problemleri de giderek artar. Zaman ilerledikçe kişisel bakımlarını yapamaz hale gelirler, psikiyatrik semptomlar baş gösterir ve hasta yatağa bağımlı kalır (181-183). Alzheimer hastalığı, beyindeki hafıza ve öğrenme ile alakalı bölümlerde kolinerjik nöronların kayba uğramasıyla bağlantılı olarak nörofibrillerin düğümlenmesi ve amiloitlerin oluşumu olarak tanımlanır. Kolinerjik çekirdek doku bozulması ise kolinerjik sinir iletimini azaltmaktadır. Birbiri ardına gelen doku bozulmaları artan toksisiteye bağlı hafıza kaybıyla sonuçlanan geri dönüşümsüz fonksiyon bozukluklarına sebep olmaktadır. Alzheimerlı hastalarda beynin hipokampus ve neokorteks gibi yüksek mental fonksiyonlarından sorumlu bölgelerinde beyin hücreleri üzerinde patolojik bir protein birikimi görülür. Oluşan mevcut protein birikimi β -amiloit plaklarıdır.

3.10.1. Asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) inhibitörleri

Standart bir erişkin beyninde AChE yaygın bir şekilde bulunurken, BChE az miktarlarda bulunmaktadır (184). Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunabilirken, butirilkolinesteraz enzimi ise yalnızca merkezi ve periferel sinir sistemi plazma ve karaciğerde bulunmaktadır (185).

Kolinesteraz inhibitörleri Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (US Food and Drug Administration, FDA) tarafından Alzheimer hastalığının ilk ilaç tedavisi olarak kanıtlanmıştır. Alzheimer hastalarındaki iyileştirici etkileri 6 ile 36 hafta arasındaki tedavi sürecinde incelenmiş ve bilişsel fonksiyonlarındaki artış gözlem altına alınmıştır(186, 187). Kolinesterazların, nörolojik olarak koruyucu ve hastalığı engelleyici etkisinden dolayı, hastalığın ilk safhalarında da fonksiyonel komplikasyonları ve nörotoksisiteyi engellemesi Alzheimer hastalığının tedavisinde umut olmuştur.

3.10.2. Kolinesteraz inhibitörlerinin alzheimer hastalığındaki mekanizması

Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinesteraz enziminin sebep olduğu asetilkolin sinir taşıyıcılarının yıkımını engellemektedir. Alzheimer hastalarının kolinerjik sinirlerinde asetilkolin miktarı azalma gösterir. Kolinerjik sinir hücrelerinin kaybı ise bilişsel anlamda bir tehlike yaratmaktadır. Asetilkolin enzimi amiloit-beta denilen plakaların oluşumunu destekler, bu plakalar ise asetilkolinesteraz enziminin bozunumunun azalmasına sebep olur (188, 189). Amiloit, çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok organlarında ve dokularda hücreler arasında depolanan anormal bir proteindir.

Bu protein yapısı dallanmayan fibrillerden oluşmaktadır ve beta kıvrımlı tabaka yapısı göstermektedir. β -Amiloit, 21. kromozomda kodlanan transmembran protein olan APP (Amiloit Prekürsör Protein)'nin sekretaz enzimiyle kesilmesi akabinde oluşur. APP amiloit diziliminde glisin yerine fenilalanin, valin yerine izolösin, değişiminden dolayı mutasyona sebep olmakta bu da β -amiloit depolanmasında etkili olmaktadır.

Bu enzimler γ -sekretaz, α -sekretaz, β -sekretaz enzimleridir. Hastalıkta α - ve β - sekretaz enzim aktiviteleri arasındaki dengenin β -sekretaz enzim lehine gelişme

göstermesi nöronal dejenerasyon sonucu göstermektedir (190). Birmijoin ve Rees asetilkolinesterazın β -amiloit ile doğrudan etkileşebildiğinden bu peptit çözünen plakalar içinde kümelenebilme imkânı bulur, buna uygun bir şekilde düzenlenen kolinesterez inhibitörleri hastalığın ilerleyişini inhibe ederek bulgusal yararlar sağladığı iddiasındadırlar (191). Çok sayıda veriye dayanarak, bu araştırmacıların hipotezi; asetilkolinesteraz inhibisyonunun amiloit başlatıcı proteini (APP) üretmesi, sinir hücrelerini koruyucu bir sürecin başlamasını sağlamaktır (191). Özetle amiloitler beyin hücreleri arasındaki iletişimi önler ve bunun sonucunda beyin hücrelerinin yavaş yavaş ölmesine neden olurlar (192).

Alzheimer hastalarında β -amiloit üretimi sağlıklı kabul edilebilecek bir birey ile aynı olmakla birlikte, β -amiloitlerin dışarı atımında problem yaşanmaktadır. Normal olarak β -amiloitler hücre dışına çıkış yaptığı zaman erir, fakat bazen erimeyen ve adına “fibril” denilen birikintiler oluştururlar. Söz konusu fibriller birbirlerine yapışarak plakalar haline gelir. Tüm insanlar yaşlandıkça plaka üretir. Asıl sorun, bu plakaların iltihaplanmasıyla sonuçlanan reaksiyonları tetiklemesidir. Beyin, genel itibariyle, enfeksiyonlarla mücadele ederken serbest radikal adı verilen toksik ajanlar üretir. İşte bu fibriller de benzer bir şekilde reaksiyonlara ortam hazırlar. Nöronun küresel gövdesi, akson adı verilen ince uzantılarla kaplıdır. Bunlar diğer hücrelerle bağlantı kurmaya yarar. Adına mikrotüp denilen içyapıların çevresinde oluşan uzantılar, besinleri taşır, dolaşım sistemi olarak görev yapar ve kimyasal mesajların iletimini sağlar. Bu sistemi, tau isimli bir çeşit yapışkanlı protein birarada tutar. Tau'nun molekülleri, mikrotüplerin kenarlarına sıkıca yapışır. Alzheimer baş gösterdiğinde, tau molekülleri ayrılır ve kendiliğinden düğümler oluşturmaya başlarlar. Bu durumda mikrotüpler parçalara ayrılır ve nöronlar ölür (193).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) sebep olduğu oksidatif stres, hücre tahribiyle sonuçlanan biyomoleküllerin oksitlenmesine sebep olur (194). Toksik β -amiloitlerin yavaşça birikimi, sürekli oksidatif stres ve benzeri olaylarla bir araya geldiğinde nöronlarda yapısal bozukluğa neden olur. Bu süreç, kavramsal ve davranışsal bozukluklara, fonksiyonel aksaklıklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Beyindeki β -amiloit birikimini hızlandıran patofizyolojik durumlar Alzheimer'ın ortaya çıkış ihtimalini arttırmaktadır (185). Sonuçta, oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk evrelerinden biri olup, hastalıkta patojenik bir role sahiptir (194).

Beyinde bir nöron ile başka bir (tür) hücre arasında veya nöronlar arasında iletişimi sağlayan kimyasallara “nörotransmitter” adı verilir. Sinir sistemi boyunca sinirsel sinyaller bu kimyasal aktarıcılar aracılığıyla iletilir. Alzheimer hastalığına sebep olan iki ana nörotransmitter vardır.

1. Asetilkolin nörotransmitter: Dokulardaki bilgiyi veya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini ifa ettikten sonra asetilkolinesteraz adlı enzim tarafından parçalanır. Bir diğer bilgi aktarımı için yeniden asetilkolin üretmek ihtiyacı doğar. Asetilkolin, Alzheimer hastalarında gerektiği kadar üretilmemektedir. Asetilkolini parçalayan asetilkolinesteraz enziminin frenlenebilmesi sonucunda Alzheimer hastalığının ilerleme kaydedemeyeceği düşünülmektedir (49).

2. Glutamat: Bu nörotransmitter sinir hücrelerinde % 70 oranında vardır. Görevi, hafıza ve öğrenmedir. Alzheimer hastalarında glutamat çok fazla salgılanır ve bu durum sinir hücrelerinin tahribata uğramasına sebep olur. Glutamat salgılanması frenlenebilirse sinir hücrelerinin ölümünün azalacağı ve Alzheimer hastasının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği tahmin edilmektedir(49).

Alzheimer hastalığında kullanılan iki önemli tedavi seçeneği “N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir”ve “kolinesteraz inhibitörler”. Kolinesteraz inhibitörleri, düşünce ve bellek ile ilgili bir nörotransmitter olan asetilkolinin parçalanmasını engellemeye yardımcı olurlar. NMDA reseptör antagonistleri ise bellek fonksiyonları ve öğrenme açısından önem taşıyan bir transmitter olan glutamat’ı düzenleyici tesire sahiptir (185).

3.11. Üreaz

Üreaz enzimi (Üre amidohidrolaz; E.C. 3.5.1.5.), hidrolaz kategorisine giren, üreyi karbon dioksit ve amonyuma normal reaksiyonlara göre 1014 kat daha hızlı kataliz eden bir enzimdir (195, 196).

Üreaz enzimine özel ilgi gösterilmesinin üç nedeni vardır. İlk neden 1926 tarihinde Sumner tarafından kristal bir halde izole edilen ilk enzim olması, ikinci neden 1975'de Dixon ve arkadaşları tarafından metaloenzimler içerisinde nikel içeren ilk enzim olduğunun bulunması, üçüncüsü ise proteinlerdeki sülfhidril grupların varlığının 1951'de aynı araştırmacı tarafından ilk kez üreaz için tanımlanabilmiş olmasıdır (197).

Üreaz birçok bitki, lifli mantarlarda, alg, omurgasız ve bakterilerde bulunan bir enzimdir (198). Bilinen bütün üreazların amino asit dizilişleri yüksek derecede benzerlik gösteriyor olmasına rağmen bulunduğu kaynağa bağlı olarak üreaz enziminin bir, iki veya üç polipeptit zincirinden oluşmuş olabileceğini göstermektedir. Biyokimyasal baz alındığında en iyi karakterize edilen yeşil fasulye (*Canavalia ensiformis*) üreazıdır. Bitki üreazları ile ilgili iyi genetik veriler soya fasulyesi (*Glycine max*) üreazına aittir. Embriyo-spesifik üreaz yeşil fasulye ve soya fasulyesi gibi tohumlarda bol bulunurken diğer tip üreazlar birçok bitkinin vejetatif dokularında daha az oranlarda bulunmaktadır (199).

Üreazın işlevi in vivo ve in vitro ortamlarda oluşan üreyi hidroliz etmek ve oluşan ürünleri azot kaynağı olarak organizmanın kullanımına sunmaktır. Bu ürünlerden biri olan amonyum iyonu bitkiler ve toprak mikroorganizmaları tarafından alıkonup kullanılır (200).

Bitkilerde üreaz muhtemelen savunma proteini olarak etki etmekte ve azot transport yollarına katılmaktadır (200). İnsan ve hayvanlarda ise üreaz gastro intestinal ve idrar yolları enfeksiyonlarında, idrar yolu taşlarının oluşumuna sebep olan enfeksiyonlardaviral faktör olarak kendini göstermektedir (201).

Üreaz üzerine yapılan biyokimyasal araştırmalar genellikle kristal yapısı (202), aktif nikel merkezi (201) ve inhibitörleri üzerine odaklanmıştır (203, 204). Üreaz

ailesinde en çok kullanılan üreaz üyesi yeşil fasulye (*Canavalia ensiformis*) üreazdır (205, 206).

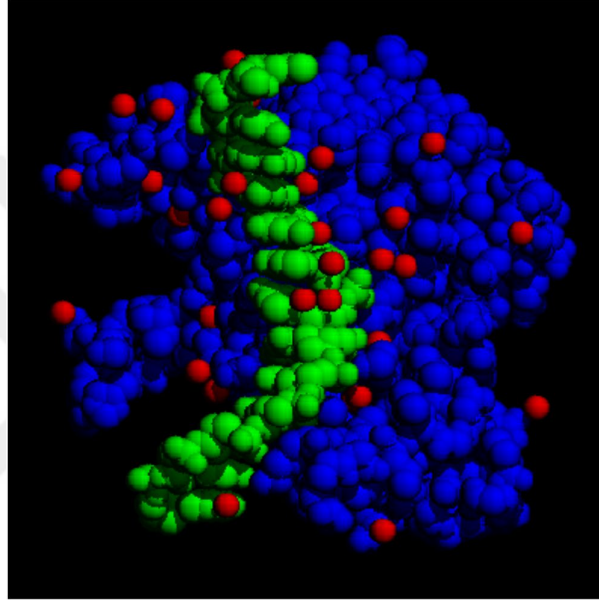
Üreaz bilinmekte olan tek nikel içerikli hidrolazdır (207) ve 1 mM'lık EDTA içeren tampon çözeltileri ile yapılan enzim izolasyonlarında Ni²⁺ iyonlarının proteine sıkı bir şekilde bağlandıkları görülmüştür (200).

Üreazın katalizi sonucunda birçok mekanizma önerisinde bulunulmuştur (208, 209). En çok kabul gören 1999 tarihinde Ciurli ve arkadaşları tarafından önerilmiş olan iki Ni²⁺ iyonunun farklı roller almaları üzerine olan yaklaşımdır (209). Bu iyonlardan bir tanesi üreyi bağlayarak ve aktive ederken, diğer Ni²⁺ iyonunu ise nukleofil olan suyu bağlayarak aktive eder.

Karplus ve arkadaşları 1997'de *Klebsiella aerogenes* üreazı için ayrıntılı bir mekanizma önerisinde bulunmuşlardır (210). Söz konusu mekanizmada üre birinci Ni atomuna (Ni¹) karbonil oksijeniyle koordine olurken ikinci Ni atomuna (Ni²) hidrolitik su bağlanmaktadır. Bu bağlı durumda dört üre protonu protein ile hidrojen bağı oluşturmaktadır. Protonların üçtanesi oksijen atomlarına, dördüncü bağ ise hidrojen akseptörü olarak sistein 319 (Cys319) kalıntısına hidrojen bağı ile bağlanmışlardır. Ni²⁺'nin hidroksid halindeki OH⁻ tarafı üredeki karbonil karbonuna saldırıda bulunarak tetrahedral hidrate üre şekli kazandırmaktadır. Hidrat ürenin oluşumu sürecinde üre azotu olan histidin 320 (Hys 320) kalıntısı ile etkileşerek Hys 320 tarafından protonlanır. Bu protonlanmada ürenin konjuge asid değeri pKa=-2'den hidrat üre halinde aşağı yukarı pKa=6'ya ulaşmaktadır. Sonuç itibariyle azotun protonlanmasıyla tetrahedral bir merkez oluşmakta olup, amonyum iyonu ortamdaki uzaklaşır, bağlı karbamatsa enzimden disosiyeye edilebilir bir duruma gelmektedir (210).

3.12. Tirozinaz

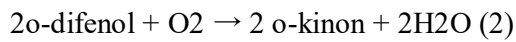
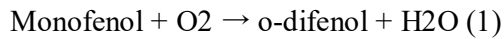
Tirozinaz (EC 1.14.18.1) polifenol oksidaz, katekolaz, monofenol oksidaz veya fenolaz olarak da bilinmektedir. Tirozinaz ismi substrat olarak enzimin tirozin (monohidroksifenilalanin) ve dihidroksifenilalanine karşı spesifikliği sebebiyle verilmiştir (211).



şekil 13. Tirozinaz-Melanin

Tirozin; norepinefrin, dopamin, melanin, epinefrin ve tiroksinin ön maddesidir. Endojen olarak fenilalaninden sentez edilir. Proteinlerle de vücuda alınmaktadır.

Tirozinaz doğada çokça bulunur (212). Daha yaygın olarak bitkilerde bulunuyor olmasına rağmen, bazı hayvan organlarında ve mikroorganizmalarda genellikle mantarlarda bulunur (213). Tirozinmonofenolazla hidroksilasyona uğrar. 3,4-dihidroksifenilalanin (L-DOPA) difenolazile oksidasyona uğrayarak o-dopakinon'a dönüşmektedir. O-dopakinon sulu çözeltilerinde stabil olmamakla birlikte hızlıca non-enzimatik reaksiyon verir (214).



Tirozinaz, melanositlerdeki melanini biyosentetik yolunda üç farklı reaksiyonla kataliz etmektedir (Şekil 13). Birinci yol; L-DOPA'nındopakinon'a oksidasyonu. İkinci yol; tirozinin L-DOPA'ya hidroksilasyonu. Bunlara ek olarak üçüncü yol ise, insanlarda siklizasyon, dopakinonun ve oksidatif polimerizasyonu da içeren bir seri kompleks reaksiyonla melaninine dönüşmesidir (215).

Anormal melanin pigmenti üretimi insanlarda çok ciddi bir estetik sorundur. Genel itibariyle orta ve ileriki yaşlarda sık bir şekilde rastlanır (216). Kozmetik olarak önemlidir ve özellikle yumuşak derinin iyi olduğunun bir işareti olarak değerlendirildiği kültürlerde veya fiziksel güzelliğe oldukça önem verilen kültürlerde hem hayat kalitesini hem de görünüşü düşürmektedir (217). Eksojen sebepler özellikle ultraviyole ışığa maruz kalma melasma, çil vesolar lentiginos gibi pigmental anormalliklerin yaygın sebebidir (218). Bazı kimyasallara ve ilaçlara maruz kalmanın yanı sıra belirli hastalıkların varlığı da hiperpigmentasyonla sonuçlanmaktadır. Depigmente edici ajanlar genel itibariyle hiperpigmentasyon bozukluklarının giderilebilmesi için reçetelenmektedir (219).

Doğada bir hayli yaygın olmasıyla birlikte yapılan araştırmalar tirozinazın özellikle şeftali, avokado, mantar, yumru patates, elma, muz, çay yaprakları, kahve tohumları ve tütün yapraklarında diğer kaynaklardakine oranlandığında çok daha yüksek konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir (220). Ayrıca yabancı pirinç, kayısı, buğday, yabancı gül, domates, mısır yaprakları, enginar, ıspanak, yonca, yulaf, bezelye, şeker kamışı yaprağı, armut, bakla yaprakları, fasulye, üzüm, zeytin gibi meyve ve sebzelerde de tirozinazın olduğu tespit edilmiştir (221). Bu yapılan çalışmalar doğrultusunda tirozinaz enziminin büyük olasılıkla tüm bitkilerde bulunduğu şeklinde bir genellemeye gidilmiştir.

Bitki hücrelerinde enzimin dağılımı ve miktarı meyve veya bitkilerin yaşına, türüne ve olgunluğuna bağlıdır (221). Farklı kaynaklardan elde edilen enzim ekstraktlarının her üç çeşit PPO aktivitesine göre farklı oranlara sahip olduğu bildirilmektedir (223). Patates, baklava mantar, elma, şeker pancarı yaprağı gibi birçok ekstre iki çeşit PPO aktivitesine de sahip iken, muz, armut, çay yaprağı, tütün, hint kirazı, ve kiraz PPO enzimlerinin mono hidroksi fenollere etki etmediği anlaşılmıştır (224). Yeşil yapraklarda enzimin çoğunluğu kloroplastlardadır. Patates

yumrusunun neredeyse tüm hücrel fraksiyonlarda protein miktarıyla orantılı bir değerde tirozinaz enzimi içerdiği saptanmıştır. Taze elmada ise mitokondrilerde ve kloroplast toplanmıştır. Yine enzimin üzümün kabuğunda etli kısmından veya üzümün öz suyundan daha yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Tirozinaz enzimi elmanın bütün bölümlerinde saptanmasına rağmen armut ve elmanın her ikisinin suyu tirozinaz aktivasyonundan neredeyse tamamen yoksundur ve tirozinaz neredeyse tamamen posada kalmaktadır. Benzer sonuç üç erik, onaltı şeftali, üç kiraz kültüründe de bildirilmiştir. Mitokondri ve kloroplast fraksiyonlarından elde edilen enzimin substrat spesifikliğı de farklılık göstermektedir (221).

Bitkilerde mevcut olan tirozinaz içeriğı tarımsal yöntemlerden de etkilenir. Örnek verecek olursakşeker kamışı yapraklarında aktivite düzeyi, toprak eser element olarak bakır ile muamele edildiğinde artış göstermektedir (221).

Tirozinaz bitkisel dokularda ilk önce inaktif formlar halinde sentezlenmekte ve zaman geçtikçe çeşitli etkenlerle, örneğın dokuda doğal olarak bulunan proteazlar veya birtakım solunum metabolitlerince aktif hale getirilmektedirler. İşte bu sebeplerle bitkisel dokularda çoğunlukla bu enzimin bir bölümü inaktif formda, bir bölü ise aktif formda bulunmaktadır. Örnek verecek olursak aktif formdaki enzimlerin, inaktif formdakilere oranı; marullarda 2:1, ıspanaklarda 1:2 ve domateslerde 1:1 olduğu halde bakla, bezelye ve fasulye çeşitlerinde tüm tirozinaz enzimlerinin inaktif halde bulunabildiğı belirlenmiştir (225).

Tirozinaz insanlarda dahil olmak üzere hayvansal organizmaların özellikle de deri, göz pigmentlerinde ve saçta bulunur (220). Gessard, mürekkep balığının mürekkep kesesinde; Onslow, Bhagvat ve Richter eklem bacaklıların kanında siyah ırk tavşanların derilerinde (226); Pinhey, bazı kabuklu hayvanların kanında; tirozinaz enziminin var olduğunu bildirmişlerdir (227). Arnow derinin güneş ışığı ile bronzlaşmasının tirozinaz tesiriyle olduğunu bildirmiştir (228). Tirozinaz böceklerdeki dış iskelet oluşumunda da çok ciddi bir öneme sahiptir (229).

Karidesler ekonomik değeri bakımından ciddi getirisi olan su ürünlerindedir. Ölüm sonrası karideslerin karamaya başladıkları gözlemlenebilir. Karama, raf ömürlerinin kısalmasına, besinsel kayıplara dolayısıyla pazar değerinin düşmesine, tüketici sağlığının tehlikeye girmesine neden olur. Ülke ekonomisi açısından bu

olayın mümkün olduğunca geciktirilmesi gerekmektedir. Kararmanın geciktirilebilmesi için; sodyum bisülfid benzeri sülfid bileşiklerinin yanında eritorbatlar, 4-heksilresorsinoller, fisin, kojik asit, sodyum benzoat, mantar ve çiçekli bitkilerden elde edilen ekstraktlar, deniz suyuyla yıkama, hızlı dondurma ve buzlama gibi yöntemler de kullanılabilir.

Melanosisin önlenmesi için sodyum bisülfid gibi sülfid bileşikleri, 4-heksilresorsinoller, glutatyon, eritorbat, fisin, sistin, sodyum benzoat ile kojik asit, çiçekli bitkilerden elde edilen ekstraktlardaki fenolik bileşikler, mantarlardan hazırlanan ekstreler (230, 231) ve hızlı dondurma yöntemleri kullanılmaktadır.

3.13. LC-MS Teknikleri

Kütle spektrometrisi (MS), yapı aydınlatılması, organik, biyoorganik ve organometalik bileşiklerin doğrulanması ve farmasötik, adli tıp, gıda, çevre ve diğer bilimlerde miktarsal analiz için yoğunlukla kullanılmaktadır. MS dedektörleri bilinmeyen maddelerin yapısal saptamaları ve doğrulanabilmesi için geniş ölçüde kullanılırlar (232).

MS dedektörleri; manyetik kuvvet alanlarını ve/veya elektrik kullanarak iyonları kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayıran optik cihazlardır. MS`deiyonlar m/z oranlarına göre ayırtırmak, numuneden iyonları oluşturmak ve iyonların bolluğu ölçülür. MS dedektörleri nötr moleküllerin kütlelerini doğrudan ölçme yeteneğinden yoksundur. Molekölü iyonlaştırarak iyonun kütle/yük (m/z) oranını ölçerler.

Kütle spektrometre cihazları üç temel birimden oluşmaktadır iyonları elektromanyetik alan uygulayarak kütlelerine göre sıralayan kütle analizörü, numune moleküllerini gaz fazındaki iyonlara dönüştüren bir iyon kaynağı ve her bir iyonun miktarını hesaplayan bir dedektör. Kütle spektrometre tekniği hem kalitatif hem de kantitatif maksatlarla kullanılabilir (233).

3.14. GC/MS

GC/MS analizi adı verilen yöntemde, kütle spektrometrisi ve gaz kromatografi teknikleri birlikte kullanılır. Gaz kromatografi (GC) karışımdaki bileşenleri birbirinden ayırır ve ona bağlı bulunan kütle spektrometresi (MS) ise, bu bileşenlerin her birinin yapısal niteliklerine ilişkin olan bilgileri elde etmemizi sağlar. Eğer

derişimi bilinen standartlar kullanılacak olursa, GC/MS yöntemiyle örnekteki ilgili nicel veriler de elde edilir.

GC yönteminde karışımın oldukça küçük bir kısmını analiz etmek mümkündür. Bu yöntemde uygulama, genellikle numunenin seyreltik bir çözeltisinin 0,001 mL (1,0 µl) lik ya da daha az olan bir miktarının, bir şırıngayla gaz karomotografinin ısıtılan kısmına verilmesiyle başlamaktadır. Numune, enjeksiyon bölümünde buharlaşır ve soy bir gazla kapiler kolona taşınır. Tipik bir kapiler kolon, çapı 0,1 mm ile 0,5 mm arasında değişen ve 10-30 m boyunda olan ince bir borudur ve sıcaklığı analiz edilecek numunenin uçuculuğuna göre ayarlanması mümkün olan bir bölmenin ('fırının') içerisine yerleştirilmiştir. Kapiler kolonun iç yüzeyi, genel itibariyle polar olmayan bir 'durağan fazla' kaplanır (durağan faz olarak, yüksek kaynama noktasına sahip viskoz sıvılar olan silikon esaslı polimerler kullanılır). Karışımındaki moleküller, bir gaz tarafından kolon boyunca sürüklendikleri esnada, kaynama noktalarına ve durağan faza ilgisi yüksek olan moleküller kolonu daha uzun sürede geçerken, kaynama noktası düşük olan ve polar olmayan moleküller kolonu çok daha erken geçerler. Her bir bileşenin kolonu geçme zamanına alıkonma süresi ismi verilir. Alıkonma süresinin uzunluğu, numuneye ve kullanılan kolona bağlı olmak üzere, genellikle 1 ile 30 dakika arasında değişebilir.

Karışımındaki bulunan her bir bileşen GC kolonundan çıktıktan sonra kütle spektrometrisine girmektedir. Burada elektron bombardımanına uğrayan örnek moleküllerinden parçalar ve moleküler iyon oluşur. Ve sonunda bu kısımda kütle spektrumu elde edilir. Bu sayede, orijinal karışımında bulunan her bir bileşenin ayrılıp kütle spektrumlarının kaydedilmesi oldukça önemli bir avantajdır. GC/MS yönteminin karışımları ayırma ve her bileşenin yapısı hakkında bilgi sağlama yeteneği onu analitik, organik sentez ve adli tıp laboratuvarlarının vazgeçilmez aracı haline getirmiştir. (234).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Bitkisel Materyaller

Salvia cerino-pruinosa Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan (Resim 1), yapılan arazi taramalarında, 13-23 Temmuz 2015 tarihleri arasında, " B7 Elazığ: 20. km Elazığ" dan Pertek" e, Kireçtaşı yamaçlar, 1010 m, 38°49'12" N, 39°13'02" E, 16 Temmuz 2015, *M. Fırat 32539* (VANF) " lokasyonunda, bitkiden 4 kg alınarak kurutuldu ve Herbaryum örnekleri M.Fırat dubletleri ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Fakültesi Herbaryumuna (VANF) konmuştur.

2015 yılında ilk arazisinde toplanan *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan türü 2016 ve 2017 yılında da aynı lokaliteden ve yılın aynı ayında 300'er gram toplandı (Tablo 6).

Tablo 6. Çalışılan *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan türünün toplanma yerleri, zamanları ve herbaryum numaraları

Toplanma yeri	Toplanma zamanı	Hava sıcaklığı	Herbaryum numarası
B7 Elazığ: 20. km Elazığ dan Pertek e, Kireçtaşı yamaçlar, 1010 m, 38°49'12" N, 39°13'02" E	16 Mayıs 2015	25°C	M. Fırat 32539 (VANF)
B7 Elazığ: 20. km Elazığ dan Pertek e, Kireçtaşı yamaçlar, 1010 m, 38°49'12" N, 39°13'02" E	25 Mayıs 2016	26°C	<i>M. Fırat</i> 32685(VANF)
B7 Elazığ: 20. km Elazığ dan Pertek e, Kireçtaşı yamaçlar, 1010 m, 38°49'12" N, 39°13'02" E	12 Mayıs 2017	24°C	<i>M. Fırat</i> 33831 (VANF)



Resim 1. *Salvia cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* A. Kahraman, F.Celep & Dogan

4.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

4.2.1. Kimyasal maddeler ve çözücüler

β -karoten, linoleik asit, kersetin, pirokatekol, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), potasyum iyodür, potasyum hidroksit, DTNB (5,5-ditiyobis(2-nitro benzoik asit)), asetilkolinesteraz, butirilkolinesteraz, α -tokoferol Sigma firmasından (St. Louis); Tween-40, hekzan, petrol eteri, kloroform, diklorometan, dietil eter, metanol, etanol, alüminyum nitrat, potasyum asetat, hidroklorik asit, silika jel 60 (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM, Merck KGaA 1.07734), ince tabaka plakları (Alufolien Kieselgel 60F₂₅₄, Merck KGaA 1.05554) Merck (Darmstadt, Almanya), Sephadex LH-20, galantamin hidrobromür, sodyum metoksit, alüminyum klorür (Sigma-Aldrich), asetiltiyokolin iyodür, Folin-Ciocalteu reaktifi (Applichem), butiriltiyokolin iyodür (Fluka), susuz sodyum sülfat, sodyum karbonat, sodyum asetat, borik asit, sodyum hidrojen fosfat ve sodyum dihidrojen fosfat Riedel-de-Haen firmasından, üreaz (*Canavaliaensiformis* (Jack bean) Tip III, toz, 15.000-50.000 ünite/g), fenol ($\geq 99\%$), üre ($\geq 99.5\%$) vekojiç asit, tirozinaz (liyofilize toz, ≥ 1000 ünite/mg) ve 3,4-dehidroksi-L-fenilalanin ($\geq 98\%$) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi. Kullanılan kimyasal maddeler ve tüm çözücüler analitik saflıktadır.

4.2.2. Çözeltilerin hazırlanması

4.2.2.1. Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 2 g Na₂CO₃ 100 mL'lik balon jöjeye konuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile hacmine tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + CuSO₄) satın alındığı şekilde kullanıldı.

4.2.2.2. Toplam flavonoit miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması: 17,6 g Al(NO₃)₃.9H₂O 100 mL'lik balon jöjeye konuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

1 M Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması: 9,6150 g CH_3COOK 100 mL'lik balon jojeye konuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

4.2.2.3. β -Karoten renk açılım yönteminde kullanılan çözelti

β -Karoten reaktifinin hazırlanması: 0,2 mg β -Karoten 1 mL kloroformda çözümlenerek bir balona aktarıldı. Üzerine 200 μL Tween-40 ve 20 μL linoleik asitten ilave edip karıştırıldı. Vakum altında kloroform uçurulduktan sonra üzerine daha önceden oksijen ile doyurulmuş 50 mL su ilave edildi ve kuvvetlice çalkalandı.

4.2.2.4. DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti

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

4.2.2.5. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti

7 mM ABTS katyon radikalinin hazırlanması: 19,2 mg ABTS tartılarak 5 mL suda çözüldü. Üzerine toz halinde 3,3 mg potasyum peroksi disülfat ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) eklenip karıştırıldı. Karanlıkta oda sıcaklığında 12-16 saat beklendi. Bekleme süresi sonunda çözelti kullanılmaya başlamadan önce absorpsiyonu ~ 0.70 olacak şekilde seyreltildi.

4.2.2.6. CUPRAC yönteminde kullanılan çözeltiler

10 mM Bakır (II) klorür dihidrat çözeltisinin hazırlanması: 42,62 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ tartılarak 25 mL suda çözüldü.

1 M Amonyum asetat tamponunun hazırlanması: 1,927 g NH_4OAc tartılarak 25 mL suda çözüldü, NH_3 ve asetik asit yardımıyla pH= 7'ye ayarlandı.

7,5 mM Neokuproin çözeltisinin hazırlanması: 76,6 mg neokuproin tartılarak 50 mL % 96'luk alkolde çözüldü.

4.2.2.7. Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ve 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltilerinin hazırlanması: 8,890 g Na_2HPO_4 tartıldı ve 500 mL deiyonize su ile çözüldü. 1,56 g NaH_2PO_4 tartıldı ve 100 mL deiyonize su ile çözüldü.

pH 7 Tamponu: Hazırlanan 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 6,1 mL ve hazırlanan 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 3,9 mL alınarak karıştırıldı ve deiyonize su ile 20 mL'ye tamamlandı. pH metre ile pH 7 kontrol edildi.

pH 8 Tamponu: Hazırlanan 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 94,7 mL ve hazırlanan 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 5,3 mL alınarak karıştırıldı ve deiyonize su ile 200 mL'ye tamamlandı. pH metre ile pH 8 kontrol edildi.

DTNB reaktifinin hazırlanması: 16 mg DTNB 1 mL pH 7 tamponunda çözüldü. 7,5 mg NaHCO_3 1 mL pH 7 tamponunda çözüldü. Her iki çözelti karıştırılarak hacim pH 7 tamponuyla 4 mL'ye tamamlandı. Kullanılmadan önce pH 8 tamponuyla hacmi 8 mL'ye tamamlandı.

Enzim çözeltisinin hazırlanması: 0,2 mg enzim (asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz ayrı yerlerde olmak üzere) 1 mL fosfat tamponunda (pH 8) çözüldü.

Asetiltiyokolin iyodür çözeltisinin hazırlanması: 16,4 mg asetiltiyokolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözülerek pH 8 tamponuyla hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

Butiriltiyokolin iyodür çözeltisinin hazırlanması: 4 mg butiriltiyokolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözülerek pH 8 tamponuyla hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

Asetilkolinesteraz enziminin hazırlanması: 1,17 mg (498,3498 U) AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrıldı. Her biri için 99,66996 U/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu ve 1 mL'lik stoklar da 125 μL 'lik 8 eşit bölüme ayrıldı (0,09966996 U/ μL). 125 μL 'lik enzim çözeltisine 460 μL pH=8 tampon çözeltisi eklendi (0,021297U/ μL) . 585 μL çözelti 25 μL 'ik 23 tane küçük eppendorf tüplere doldurularak daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 2150 μL 'ye tamamlandı ($2,476 \times 10^{-4}$ U/ μL).

Butirilkolinesteraz enziminin hazırlanması: 1 mg (11,4 U) BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü (2,28 U/mL). Bu çözeltiden 300 μL 'lik stoklar oluşturulup küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi (0,00228 U/ μL). Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1850 μL

pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilir ($3,1813 \times 10^{-4}$ U/ μ L).

4.2.2.8. Üreaz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

pH 8,2 Fosfat tamponunun hazırlanması: 0,001 M NaH_2PO_4 'den 4 mL, 0,01 M Na_2HPO_4 'den 96 mL alınıp oluşturulan 100 mL'lik çözelti deiyonize su ile 200 mL'ye seyreltildi.

Fenol reaktifinin hazırlanması: %1'lik fenol reaktifi için 200 mg fenol 10 mL deiyonize suda çözüldü. %0,005'lik sodyum nitroprussid için 1 mg sodyum nitroprussid alınıp 10 mL deiyonize suda çözüldü. Hazırlanan fenol reaktifi ve sodyum nitroprussid 1:1 oranında karıştırıldı.

Alkal reaktifinin hazırlanması: %0,5'lik NaOH için 100 mg NaOH 10 mL deiyonize suda çözüldü. 0,1'lik NaOCl için 0,1105-0,1658 mL NaOCl (%10-15) 10 mL deiyonize suda çözüldü. Daha sonra hazırlanan NaOH ve NaOCl çözeltileri 1:1 oranında karıştırıldı.

Üreaz enziminin hazırlanması: 1 mg enzim 1 mL tampon çözeltisinde çözüldü. 50 μ L'lik porsiyonlara ayrılarak eppendorf tüplerine kondu. Kullanılırken 2000 μ L veya 3000 μ L'ye tampon çözeltisiyle seyreltildi.

Substrat çözeltisinin hazırlanması: 0,1 M'lik üre çözeltisi tampon çözeltisi kullanılarak hazırlandı.

4.2.2.9. Tirozinazaktivite tayininde kullanılan çözeltiler

Tampon çözeltisinin hazırlanması (pH:6,8): 0,1 M Na_2HPO_4 'den 49 mL, 0,1 M NaH_2PO_4 'den 1 mL alınarak hacmi deiyonize su ile 200 mL'ye seyreltildi. Böylece çözeltinin molaritesi 100 mM oldu. Tekrardan yarı yarıya seyreltilerek molarite 50 mM olacak şekilde ayarlandı ve pH kontrol edildi.

Tirozinaz enziminin hazırlanması: 1 mg enzim 250 μ L tampon çözeltisi kullanılarak çözüldü. 50 μ L'lik porsiyonlar halinde eppendorf tüplerine kondu. Deneyde kullanılırken 50 μ L'lik enzim porsiyonları 2000 μ L veya 3000 μ L tampon çözeltisinde çözüldü.

L-DOPA çözeltisinin hazırlanması: 8,4 mg DOPA 5 mL deiyonize suda çözüldü.

4.2.2.10. Standart çözeltilerinin hazırlanması

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

Pirokatekol Çözeltisinin Hazırlanması: 10 mg pirokatekol 100 mL su ile çözülerek 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı.

BHT (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksitoluen) Çözeltisinin Hazırlanması: 10 mg BHT 10 mL etanol içinde çözülerek 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlandı.

BHA (2-*t*-bütil-4-hidroksianisol) Çözeltisinin Hazırlanması: 10 mg BHA 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik BHA çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlandı.

α -Tokoferol Çözeltisinin Hazırlanması: %97'lik 10,31 mg α -tokoferol 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik α -tokoferol çözeltisi hazırlandı. Ayrıca 2500 ppm'lik çözelti de hazırlandı.

4000 μ M Galantamin Çözeltisinin Hazırlanması: 2,3 mg galantamin 2 mL etanolde çözülerek galantamin çözeltisi hazırlanmış olur.

Tiyüre Çözeltisinin Hazırlanması: 2 mg tiyüre 2 mL etanolde çözülerek tiyüre çözeltisi hazırlandı.

Kojik Asit Çözeltisinin Hazırlanması: 2 mg kojik asit 2 mL etanolde çözülerek kojik asit çözeltisi hazırlandı.

4.3. Cihazlar ve Diğer Gereçler

- UV/Vis spektrofotometresi (Shimadzu UV-1601, Japonya)
- IR spektrofotometresi (Perkin Elmer Tetra-100)
- NMR (Varian UNITY INOVA-500 MHz ve Varian UNITY INOVA-600 MHz)
- LC-MS/MS (Shimadzu LCMS 8040 model)
- LC-MS-IT-TOF (Shimadzu)
- GC-MS (20AT Agilent)
- Rotaevaporator (Büchi, İsviçre)

- Otomatik pipetler (20-200 μ L, 100-1000 μ L, 500-5000 μ L) (Eppendorf, Almanya)
- Hassas terazi (Scaltec SBA 31)
- Manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Almanya)
- pH-metre (Thermo,USA)
- BioTek Power Wave XS (Amerika Birleşik Devletleri)
- Elma S15 ultrasonic bath (Almanya)
- Ultra saf su cihazı (Younglin Instrument, aquaMAX-Ultra, Kore)
- Vortex (LMS Co. LTD, Japonya)
- Hesap makinası (Casiofx-3600 PA, Japonya)
- Pulvarizatör
- 1cm'lik cam küvetler
- Balon jojeler (10, 25, 50, 100 mL)
- Magnetler
- Armudi cam balonlar
- Tanklar
- Ayırma hunileri (1 L'lik)

4.4. Ekstrelerinin Hazırlanması

Arazi çalışmaları sonucu toplanan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün ön biyolojik aktivite deneylerinde kullanılmak üzere kloroform ve etanol ekstreleri hazırlandı. Genel olarak etanol ekstre veriminin kloroform ekstre veriminden yüksek olduğu belirlendi (Tablo 7). Ayrıca *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* bitkisi az miktarda çiçek, yaprak, dal ve kök şeklinde kısımlara ayrıldı. Bu kısımların LC-MS/MS'te fenolik içeriğin miktarsal tayini için etanol ekstreleri hazırlandı. Bu kısımlardan özellikle yaprak ve çiçek ekstrelerinin veriminin dal ve kök ekstre veriminden daha yüksek olduğu tespit edildi (Tablo 8). İzolasyon çalışmaları için

toplanan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türü kök ve toprak üstü kısımlara ayrılarak gölgede kurutuldu. Bu türlerin kloroform ve etanol ekstraları hazırlandı (Tablo 9). Özellikle izolasyon çalışmaları için klorofil ve türevleri çok ciddi problemlere yol açmaktadır. En azından kök kısımlarının ekstraları hazırlanarak izolasyon çalışmalarında klorofil ve türevlerinin neden olacağı problemlerin önüne geçilmesi düşünüldü. Genel olarak toprak üstü kısımlardan hazırlanan etanol ekstralarının veriminin daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca yağ asidi bileşimini GC-MS ile belirlemek için petrol eteri ekstraları hazırlandı (Tablo 10). Ayrıca elde edilen tüm ekstraların çözücüleri evaporatörde uçuruldu. Çözücülerden kurtarılan ekstralar tartılarak % verim hesapları yapıldı.

Tablo 7. . Ön biyolojik aktivite deneylerinde kullanılan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in etanol ve kloroform ekstralarının % verimi

	Kodu	Kuru miktar (g)	Ekstre (g)	%verim
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (Karışık-Etanol) ^a	SCE-KE	48,50	1,51	3,11
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (Karışık-Kloroform)	SCE-KK	28,90	0,21	0,72

^aKarışık: Bitkinin kök, yaprak, çiçek ve dal kısımlarının karışımından hazırlanan ekstre

Tablo 8. LC-MS/MS ile fenolik analizi için kullanılan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in etanol ekstralarının % verimi

	Kodu	Kuru Miktar (g)	Ekstre (g)	% Verim
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (Çiçek)	SCE-Ç	10,65	0,99	9,36
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (Yaprak)	SCE-Y	10,27	0,68	6,60
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (Dal)	SCE-D	15,86	0,06	0,40
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (Kök)	SCE-K	28,31	0,42	1,47

Tablo 9. İzolasyon çalışmaları için kullanılan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in etanol ve kloroform ekstralarının verimi

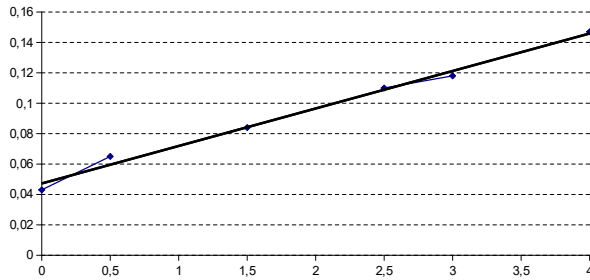
	Kodu	Kuru Miktar (g)	Ekstre (g)	% Verim
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (T.Ü-Etanol)	SCE-TÜE	2814	107,88	3,83
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (Kök-Etanol)	SCE-KE	1343	20,00	1,49
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (T.Ü-Kloroform)	SCE-TÜK	2814	19,04	0,67
<i>Salvia cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i> (Kök-Kloroform)	SCE-KK	1343	12,9	0,96

Tablo 10. 2015-2016-2017 yıllarında toplanan yağ asidi analizi için kullanılan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* örneklerinin petrol eteri ekstralarının verimi

Tür	Kod	Kuru Miktar (g)	%Verim 2015/2016/2017
<i>S.cerino-pruinosa</i> var. <i>elazigensis</i>	SCE-PE	50	0,50/0,52/0,46

4.5. Toplam Fenolik ve Flavonoit Miktar Tayini

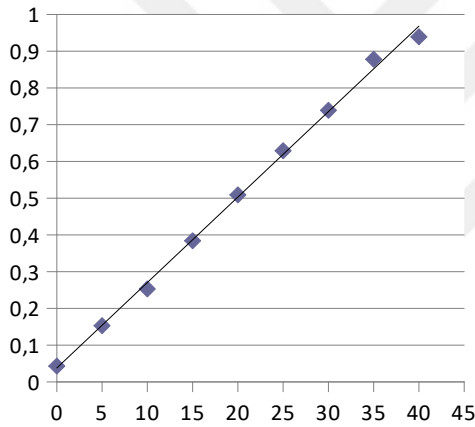
Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (235). 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µL alınarak hacimleri distile su ile 184 µL'ye tamamlandı. Çalışılacak bitkilerin etanol ekstralarının 1000 ppm konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Bir miligram ekstre içeren örnek çözeltilerinden 4 µL alınır, distile su ile 184 µL'ye tamamlandı. Pirokatekol çözeltileri ve örneklere 4 µL Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) ve 3 dk sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden 12 µL ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında bekletildikten sonra örneklerin absorbanları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi (Şekil 14).



Şekil 14: Toplam fenolik ölçü eğrisi

$$\text{Absorbans} = 0,0123x + 0,0349 \quad (R^2: 0,9916)$$

Hazırlanan ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi (236). 1000 ppm`lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 ve 8 µL alınarak hacimleri %80`lik etanol ile 192 µL`ye tamamlandı. 4 µL 1 M potasyum asetat eklendi ve bir dakika sonra 4 µL %10`luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm`de mikropilaka reader ile absorbansları okundu. Çalışılacak bitkilerin etanol ekstrelerinin tek konsantrasyonda (1000 ppm) hazırlanan çözeltilerinin de absorbans değerleri okundu. Ekstrelerin toplam flavonoit içerikleri, standart kersetin grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi (Şekil 15).



Şekil 15: Toplam flavonoit ölçüm eğrisi

$$\text{Absorbans} = 0,0232x + 0,0379 \quad (R^2: 0,9975)$$

4.6. Antioksidan Tayin Yöntemleri

4.6.1. β-Karoten renk açılım yöntemi

Ekstrelerin 1000 ppm`lik çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL alınarak distile su ile hacimleri 40 µL`ye tamamlanarak ve üzerlerine β-karoten-linoleik asit çözeltisinden her bir örneğe 160 µL ilave edilir edilmez mikropilaka reader ile başlangıç absorbansları 490 nm`de ölçüldü. Hazırlanan çözeltiler 50°C`de 120 dakika bekletildi (174). Bu süre sonunda absorbanslar tekrar ölçüldü. β-Karotenin renk açılım oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı.

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

In: Doğal logaritma, a: Başlangıç absorbansı, b: 2 saat inkübasyondan sonraki absorbans, t: Zaman (dakika)

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

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

R_{kontrol} : Kontrolün renk açılım oranı, $R_{\text{örnek}}$: Örneğin renk açılım oranı

4.6.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi

Ekstrelerin ve saf maddelerin serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlendi (170). Örneklerin etanol çözücüsünde 1000 ppm`lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL alınarak etanol ile hacimleri 40 µL`ye tamamlandı ve üzerlerine 0,1 mM DPPH çözeltisinden 160 µL ilave edildi. Hazırlanan çözeltilerin oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm`de absorbansları ölçüldü. Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

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

A: Absorbans

4.6.3. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi

Ekstrelerin ve saf maddelerin ABTS katyon radikal giderim aktiviteleri 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak belirlendi (176). Örneklerin etanol çözücüsünde 1000 ppm`lik stok çözeltileri hazırlandı. Bu stok çözeltilerden 2, 5, 10 ve 20 µL alınarak etanol ile hacimleri 40 µL`ye tamamlandı ve üzerlerine 7 mM ABTS katyon radikali çözeltisinden 160 µL ilave edildi. Reaksiyon karanlıkta 6 dakika bekletildikten sonra 734 nm`de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. ABTS katyon radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

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

4.6.4. CUPRAC yöntemi (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi)

CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenmesi sağlandı ve bu kelatın 450 nm'de absorbanı ölçüldü. Son konsantrasyonları 10, 25, 50, 100 µg/mL olacak (67-x µL) şekilde 1000 ppm lik hazırlanan örneklerin stok çözeltilerinin ve standartların üzerine, 61 µL 0.01 M CuCl₂, 61 µL 0.0075 M neokuproin ve 61 µL 1 M NH₄OAc tamponu ilave edilerek ve 1 saat sonra 450 nm'de absorban ölçüldü (162). Örneklerin absorban değerleri standartlara karşı değerlendirildi.

4.7. Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi

Bu metod Ellman metoduna göre uygulandı (237). Asetilkolinin AChE tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra, tiyokolinin sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu vermek üzere 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon verdiği kolorimetrik bir metoddur, bu deneysel işlem 96 kuyucuğa sahip mikrolaka plate de yapıldı.

4.7.1. Asetilkolinesteraz Enzimi (AChE) Aktivite Testi

Asetilkolinesteraz enziminin kullanıldığı aktivite testinde substrat olarak asetiltiyokolinyodür kullanıldı. Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun derişimi 412 nm'de mikrolaka reader ile ölçüldü. Mikrolakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), ekstrelerin etanolla 4000 ppm derişiminde hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ilave edildi ve sonra 20 µL enzim çözeltilisinden eklendi. Hazırlanan çözelti 10 dk süre ile 25°C de inkübe edildi ve 10 dk sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat eklendi. Kullanılan standart bileşigi ise galantamindir. Hazırlanan mikrolaka Elisa okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorban okundu ve Asetilkolinesteraz enzim aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki denklem ile hesaplandı. Her bir numuneden paralel üç çalışma yapıldı.

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

4.7.2. Butirilkolinesteraz enzimi (BChE) aktivite testi

Asetilkolinesteraz enzim (AChE) aktivite testindeki metot izlendi. Farklı olarak butirilkolinesteraz aktivitesi için enzim olarak butirilkolinesteraz enzimi, substrat ise

butiriltiyokolin iyodür kullanıldı. Hesaplamalar aşağıdaki denkleme göre yapıldı. Her numuneden paralel üç çalışma yapıldı.

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

4.8. Anti-ürez Enzim Aktivitesi

Ürez inhibisyon aktivitesi için enzim olarak ürez kullanıldı (238). Mikroplakadaki kuyucuklara etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanarak çözeltilerinden 10 µL, enzim çözeltisinden 25 µL ve Substrat olarak 50 µL üre konularak ve 630 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Daha sonra bu çözelti 15 dakika süre ile 30°C de inkübe edilerek ve 15 dakika sonra 45 µL fenol reaktifi ve 70 µL alkali reaktif ilave edilerek ve yine 30°C de inkübe edilerek ve 20 dakika sonra Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 630 nm dalga boyunda son absorbans okundu. Ürez aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak Tiyöre kullanıldı. Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

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

4.9. Anti-tirozinaz Enzim Aktivitesi

Trozinaz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak trozinaz kullanıldı (239). Mikroplakadaki kuyucuklara 150 µL fosfat tamponu (pH =6,8), ekstrelerin etanol içinde 4000 ppm konsantrasyonda hazırlanarak çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konularak ve 3 dk karıştırılarak 475 nm dalga boyunda ilk absorbans okundu. Daha sonra bu çözelti 10 dakika süre ile 37°C de inkübe edilerek ve 10 dakika sonra 20 µL L-DOPA ilave edilerek ve yine 37°C de inkübe edildi ve 10 dakika sonra Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 475 nm dalga boyunda son absorbans okundu. Trozinaz aktivitesi (% inhibisyon) aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı. Standart olarak Kojik asit kullanıldı.

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

Her bir örnekten üç paralel çalışma yapıldı.

4.10. LC-MS/MS Cihazı ve Kromatografik Şartlar

LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler (alınma zamanı (RT), ana (parent) iyonlar: standard bileşiklerin moleküler iyonları (m/z oranı), belirleme katsayısı (R^2), bağıl standart sapma (RSD), belirleme ve tayin alt sınırları (LOD/LOQ ($\mu\text{g/L}$)), 95% güven seviyesinde bağıl standart belirsizlik ($k=2$) (U (%)) Tablo 11, 12’de verilmiştir.

LC-MS/MS metodunda kullanılan kimyasallar ve sınıfları şunlardır:

Fenolik asitler (15 adet): p-kumarik asit, o-kumarik asit, gallik asit, kafeik asit, vanilik asit, salisilik asit, 4-hidroksi benzoik asit, ferulik asit, klorojenik asit, rozmarinik asit, protokateşik asit, sinnamik asit, sinapinik asit, sirinjik asit, pirokatekol.

Flavonoitler (17 adet): Fisetin, hesperetin, naringenin, rutin, kersetin, kamferol, mirisetin, kersitrin, luteolin, apigenin, krisin, hesperidin, likiritigenin, izokersitrin, apigetrin, roifolin, nikotiflorin.

Fenolik olmayan organik asitler (3 adet): Kinik asit, malik asit, fumarik asit.

Fenolik aldehit (1 adet): Vanilin.

Benzopiran (1 adet): Kumarin.

37 Fitokimyasalın kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan LC-MS/MS sistemi; Shimadzu Neexera model UHPLC cihazı ile Shimadzu LCMS 8040 model üçlü kuadrupol kütle spektrometre cihazının birleşiminden oluşmaktadır. Kullanılan sıvı kromatografi sistemi LC-30 AD model gradient pompa, DGU-20A3R model degazer, CTO-10ASvp model kolon fırını ve SIL-30AC model oto örnekleyiciden oluşmaktadır. Kromatografik ayırım, Inertsil ODS-4 model C18 (100 mm×2,1 mm, 2 μm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında kolon fırını 35 °C’ye ayarlanmıştır. Elüsyon gradiyentinde hareketli faz A için ultrasaf su ve hareketli faz B için asetone kullanılmıştır. Ayrıca, daha iyi bir kromatografik ayırım ve iyonlaştırmayı kolaylaştırmak için su fazına 10 mM amonyum formate ve % 0,1 formik asit eklenmiştir. Analitlerin optimum ayırımının gerçekleşmesi için yapılan pek çok denemenin ardından en uygun UHPLC gradiyent profili 5-20% B (0-10 dk), 20% B (10-22 dk), 20-50% B (22-36 dk), 95% B (36-40), 5% B (40-50 dk) şeklinde

optimize edilmiştir. Hareketli faz akış hızı 0,25 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 4 µL olarak belirlenmiştir.

Üçlü kuadropol kütle spektrometresi hem negatif hem de pozitif modda çalışan bir ESI (elektrosprey iyonlaştırma) kaynağı ile donanımlıdır. LC-ESI-MS/MS verileri cihazda kayıtlı olan by LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japonya) yazılımı ile toplanarak işlenmiştir. Analitlerin miktarsal tayini için cihaz ile MRM (multiple reaction monitoring) modunda çalışılmış ve moleküler (parent) iyonlar bir veya iki parçalanma ürünü (product ions) (ilki kantitatif amaçlı diğeri kalitatif amaçlı kullanılmıştır) ile kombine edilmiştir. Kütle spektrometresinde optimize edilen diğere parametreler şunlardır: ara yüz (interface) sıcaklığı; 350 °C, DL sıcaklığı; 250 °C, heat block sıcaklığı; 400 °C, nebulizer gaz (N₂) akışı; 3 L/dk ve kurutma gazı (N₂) sıcaklığı; 15 L/dk.

Tablo 11. LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler

No	Analitler	RT ^a	Ana İyon(m/z) ^b	Parçalanma İyonları	İyon Modu	Kalibrasyon Denklemi	R ^{2c}	RSD% ^d		Lineerite Aralığı (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Geri Kazanım (%)		U ^f
								Aynı Gün	Farklı Günler			Aynı Gün	Farklı Günler	
1	Kumarin	17.40	147.05	91.0-103.2	Poz	y=33.64x-89700	0.994	0.01306	0.01239	1000-20000	208.4/228.4	0.99947	1.00081	0.0237
2	Hesperidin	12.67	610.90	303.1-465.1	Poz	y=1340.27x-43769	0.998	0.00945	0.01126	25-1000	3.4/4.2	1.01733	1.01263	0.0262
3	p-Kumarik asit	11.53	162.95	119.3-93.3	Neg	y=3199.20x+13002	0.992	0.01820	0.01727	25-1000	7.3/9.1	1.00617	1.01224	0.0516
4	o-kumarik asit	15.45	162.95	119.4-93.3	Neg	y=1219.34x-10915	0.999	0.02730	0.02566	25-1000	24.4/31.1	0.98344	0.99061	0.0513
5	Gallik asit	3.00	168.85	125.2-79.2	Neg	y=226.76x+38152	0.998	0.01601	0.01443	250-10000	95.5/106.9	1.00004	1.00454	0.0282
6	Kafeik asit	8.80	178.95	135.2-134.3	Neg	y=3963.32x+178156	0.998	0.01454	0.01469	25-1000	18.4/22.4	1.00917	0.98826	0.0354
7	Vanilik asit	8.57	166.90	152.3-108.3	Neg	y=35.84x-12097	0.999	0.00528	0.00619	1000-20000	122.2/139.7	1.00093	1.04095	0.0508
8	Salisilik asit	11.16	136.95	93.3-65.3	Neg	y=5286.26x+309192	0.989	0.01016	0.01242	25-1000	5.0/6.5	1.00989	0.99013	0.0329
9	Kinik asit	1.13	190.95	85.3-93.3	Neg	y=41.06x+10671	0.996	0.00259	0.00274	250-10000	75.8/79.4	1.00288	0.98778	0.0082
10	4-OH-benzoik asit	7.39	136.95	93.3-65.3	Neg	y=409.03x+112079	0.998	0.01284	0.01538	250-10000	33.2/38.1	0.99662	1.00058	0.0289
11	Ferulik asit	12.62	192.95	178.3	Neg	y=80.45x-31782	0.997	0.00708	0.00619	250-10000	36.6/42.0	0.99987	1.00289	0.0494
12	Klorojenik asit	7.13	353.15	191.2	Neg	y=781.36x-18697	0.998	0.00058	0.00076	25-1000	6.2/8.1	1.00806	0.99965	0.0069
13	Rozmarinik asit	14.54	359.00	161.2-197.2	Neg	y=909.67x-201692	0.994	0.02014	0.01751	100-5000	6.6/8.8	0.99206	1.03431	0.0713
14	Protokateşik asit	4.93	152.95	108.3	Neg	y=297.75x+30590	0.995	0.01236	0.01296	100-5000	28.2/31.4	0.99404	1.01070	0.0411
15	Sinamik asit	25.61	147.00	103.15-77.3	Neg	y=9.06x-12403	0.996	0.00648	0.00816	5000-20000	821.8/859.7	1.00051	0.99927	0.0143
16	Sinapinik asit	12.66	222.95	208.3-149.2	Neg	y=141.96x-73294	0.992	0.01446	0.01517	250-10000	78.7/86.1	1.00164	0.99962	0.0281
17	Fumarik asit	1.48	115.00	71.4	Neg	y=64.99x-11592	0.997	0.00536	0.00460	100-5000	28.1/34.5	0.99748	0.99867	0.0124
18	Vanilin	10.87	151.00	136.3-92.2	Neg	y=446.10x+70934	0.998	0.00696	0.00793	250-10000	44.3/53.1	0.99679	0.99611	0.0280

(^aRT: Alıkonma zamanı, ^bAna İyon(m/z):Standard bileşiklerin moleküler İyonları (m/z oranı), ^cR²: Belirleme katsayısı, ^dRSD:Bağlı standart sapma, ^eLOD/LOQ (µg/L): Belirleme sınırı/Tayın sınırı, ^f U (%): 95% güven seviyesinde bağlı standart belirsizlik (k=2))

Tablo 12. LC-MS/MS analiz metoduna ait analitik parametreler (Devam)

No	Analitler	RT ^a	Ana İyon(m/z) ^b	Parçalanma İyonları	İyon Modu	Kalibrasyon Denklemi	R ^{2c}	RSD% ^d		Lineerite Aralığı (µg/L)	LOD/LOQ (µg/L) ^e	Geri Kazanım (%)		U ^f
								Aynı Gün	Farklı Günler			Aynı Gün	Farklı Günler	
19	Pirokatekol	6.48	109.00	108.35-91.3	Neg	y=30.61x+14735	0.996	0.01313	0.01339	1000-20000	261.1/278.4	0.99987	0.99936	0.0235
20	Malik asit	1.23	133.00	115.2-71.3	Neg	y=316.95x-42041	0.999	0.00477	0.00527	250-10000	55.3/67.5	1.01266	0.99836	0.0113
21	Sirinjik asit	9.02	196.95	182.2-167.3	Neg	y=42.33x-52547	0.996	0.01049	0.01345	1000-20000	212.5/233.3	0.99922	0.99977	0.0238
22	Hesperetin	31.76	300.95	164.2-136.2	Neg	y=876.67x+48916	0.997	0.03209	0.02605	25-1000	5.6/6.9	0.98850	0.99435	0.0562
23	Naringenin	30.68	270.95	151.2-119.3	Neg	y=4315.1x+178410	0.995	0.02054	0.02019	25-1000	5.4/6.4	0.99883	1.01002	0.0521
24	Rutin	12.61	609.05	300.1-271.1	Neg	y=561.91x-16879	0.997	0.00473	0.00624	25-1000	5.5/6.5	1.00994	0.98017	0.0159
25	Kersetin	28.17	300.90	151.2-179.2	Neg	y=1198.48x+480562	0.990	0.01589	0.01360	100-5000	23.3/28.9	0.98470	1.00103	0.0543
26	Kersitrin	16.41	447.15	301.1-255.1	Neg	y=339.39x+38910	0.999	0.01528	0.02320	100-5000	22.0/25.2	0.99726	1.00620	2.0079
27	Apigenin	31.43	268.95	117.3-151.2	Neg	y=4548.36x+295252	0.990	0.02304	0.02204	25-1000	5.4/6.3	1.01444	1.01331	0.0650
28	Krisin	36.65	252.95	143.3-119.4	Neg	y=2032.13x+95593	0,993	0.00490	0.00630	25-1000	5.4/6.2	1.00338	1.00437	2.0083
29	Likiritigenin	25.62	254.95	119.3-135.1	Neg	y=2384.96x+59141	0,996	0.01849	0.01738	25-1000	5.5/6.6	1.00333	0.99957	0.0341
30	İzokersitrin	13.42	463.00	300.1-271.1	Neg	y=803.23x+4981	0,999	0.00682	0.00515	25-1000	5.4/6.3	1.00594	1.00722	0.0133
31	Apigetrin	16.59	431.00	268.2-239.2	Neg	y=1775.55x+91121	0,993	0.01797	0.01607	25-1000	5.4/6.1	1.01394	1.00419	0.0597
32	Roifolin	16.11	577.05	269.2-211.1	Neg	y=237.15x+11887	0,999	0.00747	0.01528	100-5000	23.1/27.9	1.01046	1.01739	0.0941
33	Nikotiflorin	14.68	593.05	285.1-255.2	Neg	y=498.38x+79274	0,991	0.00737	0.00875	100-5000	22.4/25.5	1.02558	1.00970	0.0276
34	Fisetin	19.30	284.95	135.2-121.3	Neg	y=547.46x+274791	0,991	0.00557	0.00820	250-10000	54.4/61.4	0.99877	1.00031	0.0148
35	Luteolin	28.27	284.75	133.2-151.2	Neg	y=3272.65x+150557	0,997	0.00575	0.00696	25-1000	5.4/6.5	1.00772	0.99524	0.0174
36	Mirisetin	18.72	317.00	179.2-151.3	Neg	y=583.55x+205727	0,999	0.00652	0.00711	250-10000	53.2/57.2	0.99982	1.00042	0.0126
37	Kamferol	31.88	284.75	255.1-117.3	Neg	y=26.29x+87558	0,992	0.01436	0.01070	1000-20000	206.6/214.3	0.99971	0.99851	0.0209

4.11. GC-MS ile Yağ Asidi Analizi Çalışma Şartları

Yüz miligram yağ örneği, 0,1M KOH çözeltisi ve metanol (2 mL) içinde 1 saat geri çeviren soğutucuda tutulup çözelti soğutulduktan sonra 5 mL su ilave edildi. Sulu karışım, 0,5 mL HCl çözeltisi ile nötralize edilip ve hekzan:dietil eter (1:1; 3-5 mL) karışımı ile ekstre edildi. Organik tabaka ayrılarak ve su ile yıkanarak (10 mL), daha sonra susuz Na₂SO₄ üzerinde kurutuldu. Organik çözücü rota evaporatörde uçurularak yağ asidi esterleri elde edildi. GC-MS analizi apolar Phenomenex DB-5 kolonunda (30 m×0,32 mm, 0.25 µm film kalınlığı) helyum gazı (1mL/dak ve 20 psi) ile yapıp GC fırın sıcaklığı 40°C'de 5 dakika tutulup, 280°C'ye 5°C/dakika hızla çıkarıldı ve bu sıcaklıkta (280°C) 10 dakika sabit tutuldu. Split oranı 1:20 olarak ayarlanarak injeksiyon hacmi 0.1 µL'dir. Kütle spektrometresi (EI/MS) 70 eV iyonizasyon enerjisine ayarlandı. Kütle spektrometresi tarama aralığı m/z 35-450 atomik kütle birimi (amu) aralığına ayarlandı. NIST ve Wiley GC-MS kütüphaneleri ile bileşenlerin belirlenmesinde kullanıldı. Ayırılan bileşenlerin relatif yüzde miktarı, computerized integratörle toplam iyon kromatografisinden hesaplandı (240).

4.12. HPLC-IT-TOF-MS Çalışma Şartları

Shimadzu LCMS-IT/TOF hibrit yüksek çözünürlüklü kütle spektrometre sistemi ile fitokimyasalların taranması gerçekleştirilmiştir. Cihaz MS1 modunda çalışılmıştır. Sıvı kromatografi sistemi (Shimadzu) binary gradient pompa (LC-20 AD), otoörnekleyici (SIL-20AC), degazer (DGU-20A3) ve kolon fırınından (CTO-20AC) oluşmaktadır. Kromatografik ayırım için Eclipse XDB C18 (4.6×150 mm,3.5 µm) kolon kullanılmıştır. Gradient elüsyon için hareketli faz A (% 0.1 formik asit+ 5 mM amonyum format+ultrasaf su) ve hareketli faz B ((% 0.1 formik asit+ 5 mM amonyum format+metanol) kullanılmıştır. Uygulanan gradiyent şu şekildedir (dak-%B): 0-25 dk arası % 7.5 B-% 70 B, 25-50 dk arası % 70 B-% 95 B, 50-60 dk arası % 95 B, 60.01- 75 dk arası % 7.5 B. Analiz toplam 75 dakika sürmüş olup akış hızı 0.2 mL/dk olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı ise 35 °C olarak seçilmiştir.

HPLC çıkışından gelen sıvı kütle spektrometre girişindeki hem pozitif hem de negatif modda çalışan elektrosprey iyonlaştırma kaynağı (ESI)"na oradan da hibrit IT-TOF sistemine girmektedir. Çalışılan kütle aralığı 100-1000 (m/z) olarak

belirlenmiştir. Nebülizer gaz olarak 1.5 L/dk akış hızında N2 kullanılmıştır. Arayüz (interface) ve dedektör voltajları sırasıyla 4.5 kV ve 1.61 kV olarak belirlenmiştir. CDL ve heat block sıcaklıklar ise 200 °C olarak ayarlanmıştır. MS1 spektrumları alınmış ve iyon birikme zamanı 30 milisaniye olarak seçilmiştir.

4.13. Kromatografik Yöntemler

4.13.1. Sütun Kromatografisi

Ekstreleri fraksiyonlandırarak, fraksiyonlardan saf maddeler elde etmek amacıyla iki çeşit dolgu maddesi kullanıldı. Bu dolgu maddeleri silika jel ve Sephadex LH-20'dir.

Ekstreler az miktarda uygun çözücüde çözülerek silika jel ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş, ekstre miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silika jel ile doldurulmuş sütunun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Her bir ekstrenin elüsyonuna %100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla kloroform, aseton ve metanol ile polarite artırılarak elüsyona devam edildi, sonunda %100 metanol ile elüsyon tamamlandı. Benzer fraksiyonlar İTK yapılarak birleştirildi ve saflaştırma için daha küçük boyuttaki sütunlarda silika jelin yanı sıra Sephadex LH-20 adsorban olarak kullanıldı.

Sephadex LH-20 ile hazırlanan sütunlarda karışımın polaritesine göre iki çözücü sistemi kullanıldı: apolar özellik gösteren fraksiyonlar için hekzan:kloroform:metanol (7:4:1) çözücü sistemi, polar özellik gösteren fraksiyonlar için ise %100 metanol kullanıldı. Fraksiyonlar, sütunda kullanılacak çözücü sisteminde çözülerek sıvı halde Sephadex LH-20 ile doldurulmuş sütunun üst kısmına ilave edildi. Benzer fraksiyonlar İTK yapılarak birleştirildi.

4.13.2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde (İTK), silika jel hazır plaklardan (20×20 cm) yararlanıldı. Sütun kromatografisinde elde edilen fraksiyonların karşılaştırılmasında İTK plakları kullanıldı. Maddeleri saflaştırmak için preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

4.13.3. Preperatif HPLC

Genel olarak silikajel kolonlarda Aseton/MeOH: 9/1 sistemi ve sonrasında gelen polar fraksiyonları C-18 kolondan sabit MeOH/Su:70/30 çözücü sistemi ile fraksiyonlandırılmıştır. Bu fraksiyonlarda C-18 kolon takılı DAD dedektörlü preperatif HPLC’de MeOH/Su:50/50 sabit çözücü sistemi ile çalışılmıştır.

4.14. Spektroskopik Yöntemler

4.14.1. Infra-Red Spektroskopisi (IR)

Saf maddeler kloroformda çözülerek cihazda ATR kristalinin üzerine bir damla olarak damlatıldı.

4.14.2. Nükleer magnetik rezonans spektroskopisi (NMR)

Saf maddelerin ^1H NMR, ^{13}C NMR, APT, HMBC ve HMQC spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS), çözücü olarak döterokloroform ve döterometanol kullanıldı.

4.14.3. Kütle spektroskopisi

Saf maddelerin kütle spektrumları Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde bulunan GC-MS ve Dicle Üniversitesi Araştırma Merkezinde bulunan LC-MS-IT-TOF cihazlarında alındı.

5. BULGULAR

5.1. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarları

Tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi (Tablo 12). *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türü için toplam fenolik ve flavonoit içerik bakımından SCE-Y ekstresinin daha zengin olduğu tespit edildi. Etanol ekstrelerinin total fenolik-flavonoit içeriğinin kloroform ekstresinin içeriğinden zengin olması bu türün içerdiği fenolik ve flavonoit bileşiklerin daha çok polar özellikte olması anlamına gelmektedir. Yine bu türün toprak üstü kısımlarının kök kısımlarına göre hem toplam fenolik hem de toplam flavonoit bakımından daha zengin olduğu belirlendi. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün çeşitli kısımlarının etanol ekstreleri arasında yaprak ekstresinin hem fenolik hem de flavonoit içerik bakımından daha zengin olduğu saptandı.

Tablo 12. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in çeşitli kısımlarının farklı ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları^a

Ekstreler	Toplam Fenolik Miktarı (μg pirokatekole eşdeğer)/mg Ekstre ^b	Toplam Flavonoit Miktarı (μg kersetine eşdeğer)/mg Ekstre ^c
SCE-PE	97,18 \pm 2,00	16,46 \pm 0,51
SCE-KK	152,26 \pm 2,92	30,08 \pm 1,62
SCE-KE	212,99 \pm 5,99	52,60 \pm 1,96
SCE-K	119,77 \pm 9,99	23,08 \pm 0,36
SCE-D	81,64 \pm 3,99	17,99 \pm 0,30
SCE-Y	229,94 \pm 2,00	65,95 \pm 0,90
SCE-Ç	187,57 \pm 1,89	41,02 \pm 0,18

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

b: Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik. ($y=0,0123x + 0,0349$ $R^2=0,9916$)

c: Kersetine eşdeğer flavonoit içerik. ($y=0,0232x + 0,0379$ $R^2=0,9975$)

5.2. Antioksidan Aktivite Sonuçları

5.2.1. *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün petrol eteri, kloroform ve etanol ekstralarının antioksidan aktivite sonuçları

5.2.1.1. β -Karoten-Linoleik asit, DPPH serbest radikal ve ABTS katyon radikal giderim aktivite sonuçları

Hazırlanan tüm ekstraların 4 farklı yöntemle antioksidan aktiviteleri belirlendi (Tablo 13). Tüm antioksidan aktivite yöntemlerinde standart olarak α -Toc ve BHT kullanıldı. *S.cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün petrol eteri ekstresinin (SCE-PE) sadece β -Karoten-linoleik asit yönteminde (IC₅₀: 98,02±3,56) aktif olduğu belirlendi. Yine bu türün özellikle etanol ekstresinin 3 yöntemde de çok aktif olduğu belirlendi. Bu türün çeşitli kısımlarından hazırlanan etanol ekstralarının aktiviteleri incelendiğinde özellikle yaprak (SCE-Y) ve çiçek (SCE-Ç) ekstralarının çok aktif olduğu belirlendi. Özellikle DPPH serbest radikal ve ABTS katyon radikal yöntemlerinde gösterdikleri aktivite içerdikleri toplam fenolik içerik ile paralellik gösterdi. Yine bu ekstraların bu iki yöntemde gösterdikleri aktivite standart olarak kullanılan α -TOC ve BHT'den daha yüksek olduğu tespit edildi.

Tablo 13. *S.cerino-pruinosa* var. *elazigensis* ekstralarının β -Karoten-Linoleik asit, DPPH serbest radikal ve ABTS katyon radikal aktivite sonuçları^a

Örnekler	IC ₅₀ Değerleri ^b		
	β -Karoten-linoleik asit	DPPH Serbest Radikal	ABTS Katyon Radikal
SCE-PE	98,02±3,56	>1000	>1000
SCE-KK	102,68±0,03	>1000	503,91±2,46
SCE-KE	28,95±0,11	10,51±0,56	24,09±0,62
SCE-K	35,87±0,04	39,85±0,39	46,08± 0,02
SCE-D	193,52 ±4,30	89,35±0,53	75,92± 0,56
SCE-Y	69,04±0,98	5,72±0,71	2,43±0,21
SCE-Ç	99,96±0,74	10,58±0,69	6,25±0,49
BHA	1,5±0,01	7,88±0,20	17,59±0,10
α -TOC	2,1±0,10	16,30±0,79	9,74±0,42
BHT	1,3±0,03	58,86±0,50	13,25±0,27

^aSonuçlar IC₅₀ olarak verilmiştir

^bSonuçlar 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

5.2.1.2. CUPRAC yöntemi (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) aktivite sonuçları

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünün çeşitli ekstralarının CUPRAC aktivite sonuçları Tablo 14`de absorban değerleri olarak verildi. Toplam fenolik içeriği yüksek olan ve diğer 3 antioksidan yöntemde çok iyi derecede aktivite gösteren *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün CUPRAC yönteminde de iyi derecede aktivite gösterdiği belirlendi. Çalışılan tüm ekstralar arasında en yüksek toplam fenolik içeriğe sahip SCE-Y ekstresinin bu yöntemde de en yüksek aktiviteyi gösterdiği belirlendi. Özellikle kök kısımlarından hazırlanan etanol ekstralarının de orta derecede aktiviteye sahip olduğu saptandı. Sonuçlara genel olarak baktığımızda ise etanol ekstralarının, petrol eteri ve kloroform ekstralarına göre çok daha aktif olduğu belirlendi. Etanol ekstralarının çoğu, standart olarak kullanılan BHT`den bazılarının ise α -TOC`den daha aktif olduğu tespit edildi.

Tablo 14. *S.cerino-pruinosa* var. *elazigensis* ekstralarının CUPRAC aktivite sonuçları^{a,b}

Örnek	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100µg/mL
SCE-PE	0,120±0,007	0,149±0,015	0,267±0,067	0,462±0,041
SCE-KK	0,118±0,007	0,150±0,012	0,201±0,016	0,312±0,026
SCE-KE	0,368±0,020	0,667±0,138	1,532±0,110	2,230±0,246
SCE-K	0,254±0,079	0,375±0,022	0,696±0,018	1,131±0,053
SCE-D	0,131±0,009	0,225±0,008	0,332±0,019	0,680±0,014
SCE-Y	0,404±0,035	0,810±0,023	1,634±0,103	2,719±0,098
SCE-Ç	0,273±0,018	0,546±0,061	1,042±0,015	2,183±0,154

^a Sonuçlar absorban değeri olarak verilmiştir

^b Sonuçlar 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir

5.2.2. *S. cerino pruinosa* var. *elazigensis* ekstresinin fraksiyonlandırılması ve bu fraksiyonların antioksidan aktivite sonuçları

S. cerino pruinosa var. *elazigensis* bitkisinin toprak üstü kısımlarının gölgede kurutulmuş miktarı 2816 g' dır. Toprak üstü kısımları maserasyon yöntemi ile 3 kez (24 saat) etanolla ekstre edildi. 97,04 g etanol ekstresi elde edildi ve bunun 27,82 g 'ı ayrıldı. Geriye kalan 69,22 g'ı çok az metanol ile çözülerek 89,19 g silika gel karıştırılıp kurutuldu ve havanda toz haline getirildi. 636 g silika gel kolona yerleştirildikten sonra toz haline getirilen ekstre kolonun üstüne eklendi (Resim 2).



Resim 2. *S. cerino pruinosa* var. *elazigensis* bitkisinin toprak üstü ve altı ekstrelerinin kolonu

S. cerino pruinosa var. *elazigensis* bitkisinin toprak altı kısımlarının gölgede kurutulmuş miktarı 1343 g' dır. Kök kısımları maserasyon yöntemi ile 3 defa (24 saat) etanolla ekstre edildikten sonra toplam 20 g ekstre elde edildi. Bu miktarın 1,2882 g 'ı ayrıldı. Geriye kalan 19,86 g'ı çok az metanol ile çözülerek 28.55 g silika gel karıştırılıp kurutuldu ve havanda toz haline getirildi. 152,68 g silika gel kolona yerleştirildikten sonra toz haline getirilen ekstre kolonun üstüne eklendi (Resim 2).

Tablo 15. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün toprak üstü ve toprak altı etanol ekstratlarının fraksiyonları, elde edildikleri çözücü sistemleri, miktarları ve antioksidan aktiviteleri (IC₅₀)^a

TOPRAK ÜSTÜ				IC ₅₀	
Fraksiyon kodu	Çözücü Sistemi	Miktar	DPPH	ABTS	
1	SCETUE1-13	(%100PE)-(%80PE-%20DCM)	0,6693g	>1000	>1000
2	SCETUE14-16	(%60PE-% 0DCM)	0,7096g	872,1±38,5	>1000
3	SCETUE17-24	(%40PE-%60DCM)-(%10PE-%90DCM)	4,3458g	535,02±15,6	384,53±18,12
4	SCETUE25-34	(%10PE-%90DCM)-(%90DCM-%10AC)	7,7507g	672,71±30,3	416,93±17,60
5	SCETUE35-40	(%90DCM-%10AC)-(%80DCM-%20AC)	2,5642g	89,39±1,7	25,10±1,26
6	SCETUE41-44	(%60DCM-%40AC)-(%40DCM-%60AC)	6,8249g	15,36±0,7	<10
7	SCETUE45-48	(%40DCM-%60AC)-(%20DCM-%80AC)	8,2943g	<10	<10
8	SCETUE49-56	(%20DCM-%80AC)-(%60AC-%40Me)	16,8136g	16,40±0,2	<10
9	SCETUE57-60	(%60AC-%40Me)-(%40AC-%60Me)	16,341g	40,78±0,7	23,66±0,4
10	SCETUE61-64	(%40AC-%60Me)-(%20AC-%80Me)	2,1513g	16,20±0,4	<10
11	SCETUE65-69	(%100Me)	1,4869g	21,08±0,2	<10
12	SCETUE70-73	(%90Me-%10Su)-(%50Me-%50Su)	2,1939g	19,55±0,8	<10
TOPRAK ALTI					
1	SCEKE1	(%100PE)	0,1184g	>1000	>1000
2	SCEKE2-7	(%100PE)-(%80PE-%20DCM)	0,0411g	496,66±6,2	409,19±13,9
3	SCEKE8-10	(%70PE-%30DCM)	0,3908g	>1000	486,75±21,6
4	SCEKE11-13	(%60PE-%40DCM)-(%50PE-%50DCM)	1,1788g	163,43±5,6	42,63±0,2
5	SCEKE14-16	(%40PE-%60DCM)-(%30PE-%70DCM)	1,6923g	59,74±0,9	33,04±0,5
6	SCEKE17-18	(%20PE-%80DCM)-(%10PE-%90DCM)	4,0096g	57,61±2,3	29,28±0,7
7	SCEKE19-20	(%100DCM)-(%90DCM-%10AC)	3,9216g	191,09±6,8	43,15±0,2
8	SCEKE21-26	(%90DCM-%10AC)-(%40DCM-%60AC)	4,9337g	48,25±0,5	21,46±1,2
9	SCEKE27-30	(%30DCM-%70AC)-(%10DCM-%90AC)	1,6233g	159,33±7,6	61,73±0,5
10	SCEKE31-32	(%100AC)-(%90AC-%10Me)	0,6089g	100,19±0,1	44,19±0,5
11	SCEKE33-37	(%80AC-%20Me)-(%90Me-%10Su)	2,2605g	686,70±32,5	220,49±5,7
	BHT			58,86±0,50	13,25±0,27
	α-TOC			16,30±0,8	9,74±0,4

^aSonuçlar üç paralel ölçümün ortalaması ve standard sapması şeklinde verilmiştir.

Tablo 16. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün toprak üstü ve toprak altı etanol ekstrelerinin fraksiyonlarının CUPRAC aktiviteleri^a

TOPRAK ÜSTÜ				
Fraksiyon kodu	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
SCETUE1-13	0,066±0,004 ^b	0,176±0,008	0,182±0,003	0,199±0,004
SCETUE14-16	0,197±0,032	0,294±0,012	0,377±0,001	0,519±0,002
SCETUE17-24	0,197±0,009	0,29±0,053	0,376±0,041	0,470±0,015
SCETUE25-34	0,197±0,008	0,285±0,014	0,383±0,017	0,52±0,011
SCETUE35-40	0,339±0,045	0,626±0,045	0,976±0,012	1,642±0,077
SCETUE41-44	0,741±0,050	1,425±0,039	2,573±0,104	3,99±0,085
SCETUE45-48	0,652±0,118	1,360±0,079	2,403±0,186	3,806±0,058
SCETUE49-56	0,781±0,127	1,396±0,074	2,351±0,059	3,451±0,149
SCETUE57-60	0,350±0,024	0,658±0,053	1,085±0,090	2,247±0,147
SCETUE61-64	0,665±0,059	1,502±0,122	2,520±0,099	3,796±0,097
SCETUE65-69	0,627±0,108	1,137±0,013	2,068±0,081	3,359±0,452
SCETUE70-73	0,709±0,107	1,157±0,026	2,141±0,040	3,243±0,124
TOPRAK ALTI				
SCEKE1	0,202±0,003	0,240±0,003	0,348±0,067	0,427±0,001
SCEKE2-7	0,158±0,002	0,148±0,004	0,207±0,050	0,615±0,061
SCEKE8-10	0,220±0,043	0,249±0,007	0,347±0,011	0,474±0,012
SCEKE11-13	0,280±0,010	0,479±0,052	0,698±0,021	1,033±0,026
SCEKE14-16	0,354±0,052	0,578±0,037	0,911±0,038	1,419±0,042
SCEKE17-18	0,351±0,073	0,597±0,048	0,964±0,029	1,522±0,027
SCEKE19-20	0,262±0,024	0,368±0,017	0,574±0,017	0,847±0,008
SCEKE21-26	0,361±0,043	0,589±0,126	0,898±0,025	1,382±0,042
SCEKE27-30	0,250±0,004	0,366±0,016	0,568±0,022	0,928±0,063
SCEKE31-32	0,270±0,030	0,418±0,023	0,711±0,018	1,213±0,096
SCEKE33-37	0,170±0,004	0,200±0,006	0,258±0,010	0,365±0,003
BHT	0,305±0,023	0,746±0,057	1,528±0,068	2,551±0,066
α-TOC	0,605±0,086	1,344±0,035	2,256±0,042	3,987±0,007

^aSonuçlar üç paralel ölçümün ortalaması ve standard sapması şeklinde verilmiştir.

^bAbsorbans değerleri.

S. cerino pruinosa var. *elazigensis* bitkisinin toprak üstü etanol ekstresinden 73, toprak altı etanol ekstresinden 37 fraksiyon elde edildi. Yapılan ince tabaka kromatografisi sonuçlarına göre benzer fraksiyonlar birleştirilerek toprak üstü etanol ekstresinden toplamda 12, toprak altı etanol ekstresinden 11 fraksiyon elde edildi ve antioksidan aktiviteleri çalışıldı. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yönteminde *S. cerino pruinosa* var. *elazigensis* bitkisinin toprak üstü etanol ekstresinin 41-44, 45-48 numaralı fraksiyonları standart olarak kullanılan BHT ve α -TOC den, toprak altı etanol ekstresinin 17-18, 21-26 numaralı fraksiyonların BHT'den daha iyi aktivite gösterdikleri belirlendi. ABTS katyon radikali giderim aktivitesinde ise toprak üstü etanol ekstresinin 41-44, 45-48, 49-56, 61-64, 65-69 ve 70-73 numaralı fraksiyonların standart olarak kullanılan BHT ve α -TOC bileşiklerinden daha aktif oldukları belirlendi (Tablo 15). CUPRAC-Bakır(II) indirgeme kapasitesi sonuçlarına bakıldığında toprak üstü etanol ekstresinin 41-45 numaralı fraksiyonun standartlardan daha iyi bakır (II) indirgeme gücüne sahip olduğu belirlendi (Tablo 16). Aktivite sonuçlarına göre genel olarak toprak üstü fraksiyonların aktiviteleri toprak altı fraksiyonlarından daha aktif olduğu görüldü. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi, ABTS katyon radikal giderim aktivitesi ve CUPRAC-Bakır(II) indirgeme kapasitesi sonuçlarına bakıldığında her üç yöntemde de en aktif olan toprak üstü 41-44, 45-48, 54-60, 61-64, toprak altı 14-16, 17-18, 21-26 numaralı fraksiyonlardan öncelikle saf madde izolasyonuna gidildi.

5.2.3. İzole edilen saf maddelerin antioksidan aktivite sonuçları

İzole edilen 30 maddenin antioksidan aktivitesi 3 yöntemle (DPPH Serbest Radikal, ABTS Katyon Radikal, CUPRAC) belirlendi (Tablo 17). Bu maddelerin genel olarak çok aktif oldukları tespit edildi. Elde edilen fenolik bileşiklerin oldukça aktif oldukları görülmektedir. Ayrıca bu türün çok güçlü bir antioksidan özelliğe sahip rosmarinik asit içeriği de düşünüldüğünde *S. cerino pruinosa* var. *elazigensis* zenginleştirilmiş ekstraktlarının gıda koruyucu olma potansiyellerinin olduğu görülmektedir.

Tablo 17. Elde edilen ve yapısı aydınlatılan bileşlerin antioksidan aktiviteleri^a

No	Madde	Antioksidan Aktivite		
		IC ₅₀		A _{0,5}
		DPPH Serbest Radikal	ABTS Katyon Radikal	CUPRAC
1.	Rosmarinik Asit	1,21±0,06	1,70±0,07	1,21±0,01
2.	Klorojenik Asit			
3.	Apigenin	45,87±1,43	2,57±0,05	124,70±4,23
4.	Hesperidin	157,30±88,03	161,51±9,76	40,16±1,01
5.	Fumarik Asit	273,74	150,47	105,35±3,03
6.	Kaffeik Asit	3,56±0,03	1,65±0,06	7,41±0,02
7.	4-Hidroksibenzoik Asit	29,73±4,32	354,63±58,58	18,13±0,15
8.	7-Asetil royleanon	12,17±0,16	27,64±1,05	35,55±1,02
9.	β-Sitosterol	72,11±1,94	154,34±2,12	22,17±0,98
10.	Ferruginol	33,80±2,20	6,61±0,27	49,83±2,02
11.	Kriptanol	87,19±9,90	55,25±2,02	70,05±3,03
12.	Inuroyleanol	2,21±0,06	5,11±1,13	7,12±0,02
13.	6,7-dehidroroyleanon	16,84±0,18	55,73±6,33	28,56±1,04
14.	Salvigenin	62,05±26,49	19,13±2,78	49,83±1,54
15.	Ursolik Asit	20,04±1,04	104,44±8,06	178,09±5,02
16.	Oleanolik Asit	45,02±1,31	275,73±67,11	11,72±0,06
17.	Salvianolik Asit B	4,31±0,03	3,51±0,03	13,90±0,07
18.	Luteolin 7-Glikosid	5,58±0,06	3,85±0,09	3,75±0,01
19.	Salvianolik Asit A	4,06±0,04	2,66±0,07	4,76±0,01
20.	Benzoik Asit	72,40±0,29	12,48±0,02	34,50±1,17
21.	Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat)	>1000	280,50±3,81	213,80±5,70
22.	4-hidroksi benzaldehit	>1000	15,30±0,19	48,65±1,13
23.	Stigmasterol	>1000	312,75±4,92	172,48±1,15
24.	Skoparon	186,39±0,50	65,09±0,61	164±1,09
25.	Bis(2-etilhekzill) ftalat	>1000	248,04±3,50	136,57±1,32
26.	Sugiol	150,09±2,05	69,61±0,29	54,50±1,10
27.	7α-hidroksi-β sitosterol	>1000	176,59±3,70	180,30±1,50
28.	Heksadekanoik Asit, n-oktil ester	>1000	112,52±1,18	113,60±2,19
29.	Heksadekanoik Asit, 3-hidroksi-, metil ester	340,92±4,79	231,54±2,68	152,60±2,72
30.	Protokateşik Asit	2,11±0,07	1,42±0,05	2,20±0,12

a: Sonuçlar üç paralel ölçümün ortalaması ve standard sapması şeklinde verilmiştir.

5.3. Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

5.3.1. *S. cerino pruinosa* var. *elazigensis* ekstrelerinin antikolinesteraz aktiviteleri

Salvia cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünden hazırlanan ekstrelerinin asetilkolinesteraz aktivitelerinin olmadığı fakat orta derecede butirilkolinesteraz enzim aktivitesi gösterdikleri belirlendi (Tablo 18). Bu türün sadece dal kısımlarından hazırlanan etanol ekstresinin düşük butirilkolinesteraz enzim aktivitesine sahip olduğu saptandı.

Tablo 18. Örneklerin antikolinesteraz aktivite sonuçları^a

Örnekler	AChE (% İnhibisyon)	BChE (% İnhibisyon)
SCE-PE	AD	48,44±0,95
SCE-KK	AD	55,67±0,95
SCE-KE	AD	40,67±1,28
SCE-K	AD	57,28±1,36
SCE-D	AD	9,60±0,57
SCE-Y	AD	45,36±1,52
SCE-Ç	AD	40,67±0,19
Galantamin ^b	86,14±0,38	80,18±0,46

^a200µg/mL

^bStandart madde

AD: Aktif değil

5.3.2 İzole edilen ve yapısı aydınlatılan bazı bileşiklerin asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzim aktiviteleri

İzole edilen 24 saf maddelerin antikolinesteraz enzim aktivitelerine asetil- ve butiril-kolinesteraz olmak üzere iki yöntemle bakıldı (Tablo 19). Özellikle elde edilen diterpen yapısındaki bileşiklerin oldukça aktif oldukları görüldü. Gram seviyesinde elde edilen 6,7-dehidroroyleanon bileşiğinin ilaç etken maddesi olma potansiyeli bulunmaktadır. Bu bileşiğin kolay ve yüksek oranda elde edildiği düşünüldüğünde ilerde patent olma potansiyelinde bulunmaktadır.

Tablo 19. Elde edilen ve yapısı aydınlatılan bazı bileşkerin asetil- ve butirikolinesteraz enzim aktiviteleri^a

No	İsim	Asetilkolinesteraz Enzim Aktivitesi		Butirikolinesteraz Enzim Aktivitesi	
		50 ppm'deki %inhibisyon	IC ₅₀	50 ppm'deki %inhibisyon	IC ₅₀
1.	Rosmarinik Asit	A.D.	-	A.D.	-
2.	Klorojenik Asit	A.D.	>1000	A.D.	672,10±12,12
3.	Apigenin	A.D.	-	86,24	16,45
4.	Hesperidin	A.D.	-	A.D.	-
5.	Fumarik Asit	A.D.	-	25,41	180,95
6.	Kaffeik Asit	A.D.	-	A.D.	-
7.	4-Hidroksibenzoik Asit	A.D.	-	A.D.	-
8.	7-Asetil royleanon	67,57	18,93	85,29	12,87
9.	β-Sitosterol	A.D.	-	A.D.	-
10.	Ferruginol	95,76	3,96	84,92	15,57
11.	Kriptanol	87,93	8,40	78,96	14,63
12.	Inuroyleanol	77,43	5,58	58,98	36,24
13.	6,7-dehidroroyleanon	93,69	5,61	99,92	1,52
14.	Salvigenin	A.D.	-	A.D.	-
15.	Ursolik Asit	53,99	49,89	68,50	32,34
16.	Oleanolik Asit	40,12	60,60	43,00	62,12
17.	Salvianolik Asit B	A.D.	-	A.D.	-
18.	Luteolin 7-Glukozit	A.D.	-	A.D.	-
19.	Salvianolik Asit A	73,16	23,04	52,00	48,32
20.	Benzoik Asit	A.D.	>1000	A.D.	>1000
21.	Stigmasterol	A.D.	>1000	11,84±0,01	140,98±5,23
22.	Sugiol	A.D.	>1000	61,09±2,98	9,07±0,12
23.	7-alfa-hidroxy-beta sitosterol	A.D.	>1000	A.D.	A.D.
24.	Prokateşik Asit	A.D.	>1000	9,52±0,96	908,45±13,21

a: Sonuçlar üç paralel ölçümün ortalaması ve standard sapması şeklinde verilmiştir.

5.4. Üreaz ve Tirozinaz Enzim Aktiviteleri

5.4.1. *S. cerino pruinosa* var. *elazigensis* ekstrelerinin anti-üreaz ve anti-tirozinaz enzim aktiviteleri

Salvia cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünden hazırlanan ekstrelerinin üreaz enzim aktivitelerinin olmadığı fakat orta derecede tirozinaz enzim aktivitesi gösterdikleri belirlendi. Bu türün yaprak kısımlarından hazırlanan etanol ekstresinin orta derecede tirozinaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlendi (Tablo 20).

Tablo 20. Ekstrelerin anti-üreaz ve anti-tirozinaz enzim aktiviteleri

No	Ekstreler	Tirozinaz Enzim Aktivitesi		Üreaz Enzim Aktivitesi	
		4000 ppm'deki %inhibisyon	Eşdeğer kojik asit µg kojik asit/mg ekstre	4000 ppm'deki %inhibisyon	Eşdeğer tıyoüre µg/mg ekstre
1	SCE-PE	5,26	1,05	A.D.	---
2	SCE-KK	21,61	2,28	A.D.	---
3	SCE-KE	10,36	1,92	A.D.	---
4	SCE-Ç	9,69	0,24	A.D.	---
5	SCE-Y	27,40	3,40	A.D.	---
6	SCE-K	24,88	1,99	A.D.	---
7	SCE-D	17,35	3,32	A.D.	---

5.4.2. Elde edilen ve yapısı aydınlatılan bazı bileşiklerin anti-ürezaz ve anti-tirozinaz enzim aktiviteleri

Yapısı aydınlatılan bazı bileşiklerin tirozinaz ve ürezaz enzim aktiviteleri tablo 21’de verildi. Ürezaz enzim aktivitesinde asetil royleanon bileşiğinin enaktif bileşik olduğu belirlendi. Asetil royleanon bileşiğinin 12,5 ppm konsantrasyonda diğer saf bileşiklere göre ürezaz enzim aktivitesinde %82 inhibisyon göstermesi dikkat çekicidir.

Tablo 21. Elde edilen ve yapısı aydınlatılan bazı bileşiklerin anti-ürezaz ve anti-tirozinaz enzim aktiviteleri^a

No	İsim	Tirozinaz Enzim Aktivitesi		Ürezaz Enzim Aktivitesi	
		12,5 ppm'deki %inhibisyon	Ekivalent kojik asit µg kojik asit /mg ekstre	12,5 ppm'deki %inhibisyon	Ekivalent tiyoüre µg /mg ekstre
1.	Rosmarinik Asit	12,11	105,58	A.D.	-
2.	Klorojenik Asit	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
3.	Apigenin	A.D.	-	A.D.	-
4.	Hesperidin	A.D.	-	33,87141	126,6055
5.	Fumarik Asit	A.D.	-	A.D.	-
6.	Kaffeik Asit	14,15	125,24	A.D.	-
7.	4-Hidroksibenzoik asit	A.D.	-	A.D.	-
8.	Asetil royleanon	A.D.	-	82,33022	399,626
9.	β-Sitosterol	A.D.	-	A.D.	-
10	Ferruginol	2,81	15,95	A.D.	-
11	Kryptanol	A.D.	-	A.D.	-
12	Inuroyleanol	A.D.	-	A.D.	-
13	6,7-dehidroyleanon	8,82	73,93	A.D.	-
14	Salvigenin	A.D.	-	A.D.	-
15	Ursolik Asit	A.D.	-	33,70717	125,6802
16	Oleanolik Asit	9,06	76,24	A.D.	-
17	Salvianolik Asit B	A.D.	-	45,52603	192,2686
18	Luteolin 7-Glukozit	A.D.	-	A.D.	-
19	Salvianolik Asit A	A.D.	-	A.D.	-
20	Benzoik Asit	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
21	Stigmasterol	A.D.	A.D.	A.D.	A.D.
22	Sugiol	A.D.	A.D.	39,83±1,05	158,33±7,83
23	7-alfa-hydroxy-beta sitosterol	A.D.	A.D.	40,11±1,76	150,19±6,38
24	Prokateşik Asit	16,04±0,02	142,38±4,21	A.D.	A.D.

^a Sonuçlar üç paralel ölçümün ortalaması ve standard sapması şeklinde verilmiştir.

5.5. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* Türünün Çeşitli Ekstrelerinin ve Kısımlarının LC-MS/MS ile Fenolik İçerik Analizi

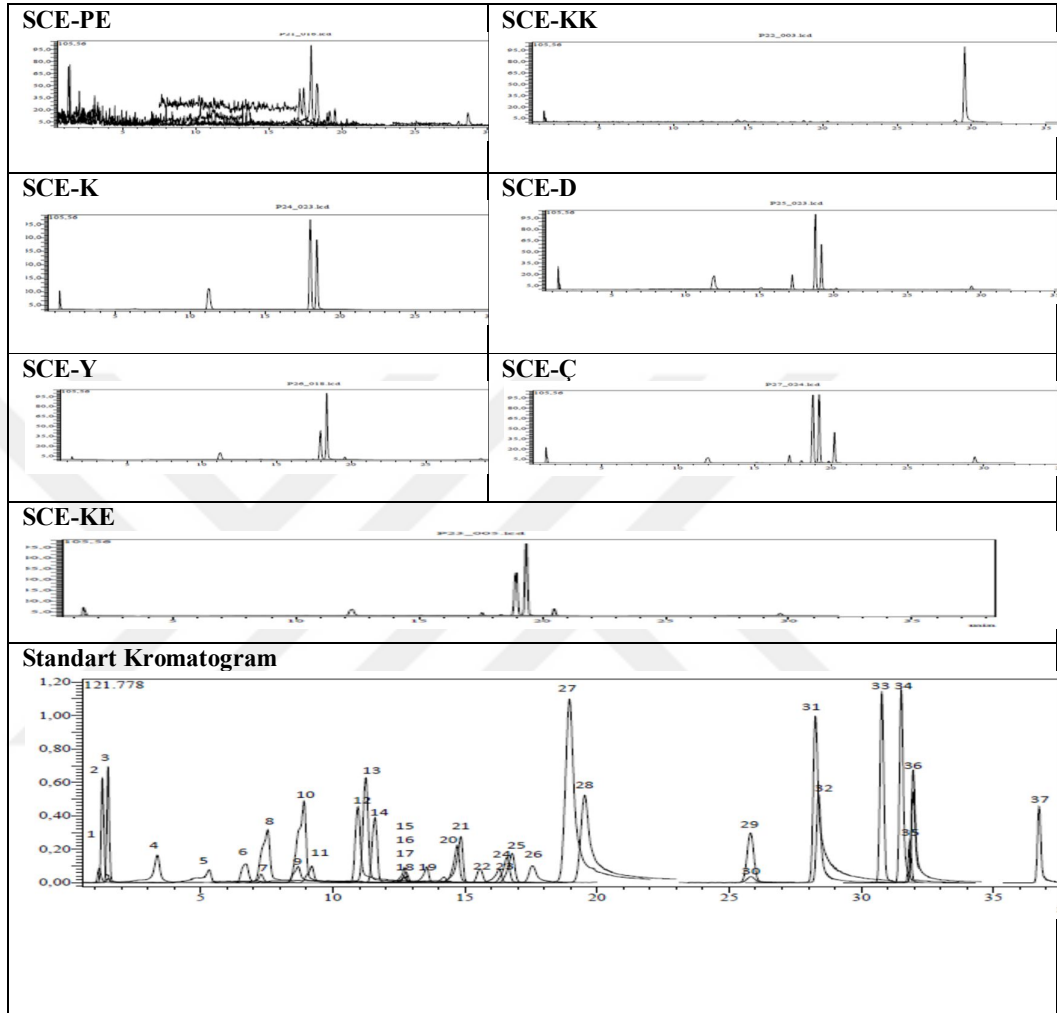
S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünün çeşitli kısımlarının ve çeşitli ekstrelerinin fenolik içeriği LC-MS/MS ile belirlendi (Şekil 16) . *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün apolar ve toplam fenolik-flavonoit içerik bakımından en fakir ekstresi olan SCE-PE LC-MS/MS’te de aynı paralellikte sonuç verdi. Genel olarak *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*’in majör bileşikleri rosmarinik, malik ve fumarik asitler olduğu tespit edildi. Özellikle SCE-Y ekstresinin rosmarinik asit bakımından çok zengin olduğu tespit edildi (Tablo 22).

Tablo 22. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün çeşitli ekstrelerinin ve kısımlarının LC-MS/MS ile fenolik içerik analizi

#	Analit	SCE-PE	SCE-KK	SCE-KE	SCE-K	SCE-D	SCE-Y	SCE-Ç
1	Kumarin	T.E. ^a	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
2	Hesperidin	10,55 ^b	13,48	285,31	22,54	77,69	44,15	1047,65
3	p-Kumarik asit	0,24	5,01	45,18	15,39	10,57	121,3	33,95
4	o-kumarik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
5	Gallik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
6	Kafeik asit	T.E.	2,33	320,7	463,82	147,63	879,52	267,87
7	Vanilik asit	T.E.	T.E.	142,06	929,47	575,19	691,71	T.E.
8	Salisilik asit	T.E.	4,01	41,81	12,61	30,67	100,35	36,77
9	Kinik asit	T.E.	T.E.	291,87	T.E.	T.E.	208,17	318,44
10	4-OH-benzoik asit	T.E.	T.E.	T.E.	112,98	T.E.	T.E.	T.E.
11	Ferulik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
12	Klorojenik asit	T.E.	T.E.	62,88	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
13	Rozmarinik asit	11,1	9,3	15666,13	7107,27	1701,59	34638,45	14898,05
14	Protokateşik asit	T.E.	T.E.	214,34	694,85	156,44	626,7	130,61
15	Sinamik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
16	Sinapinik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
17	Fumarik asit	77,03	269,82	2068,33	578,29	1656,57	738,3	1214,7
18	Vanilin	T.E.	83,12	68,04	247,38	50,8	24,32	T.E.
19	Pirokatekol	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
20	Malik asit	T.E.	135,56	4482,51	2908,19	1453,65	3004,02	5743,01
21	Sirinjik asit	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
22	Hesperetin	T.E.	7,91	19,18	T.E.	5,7	T.E.	25,98
23	Naringenin	T.E.	5,18	5,05	T.E.	3,31	3,28	4,58
24	Rutin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
25	Kersetin	T.E.	T.E.	3,98	T.E.	T.E.	T.E.	5,84
26	Kersitrin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
27	Apigenin	0,45	104,97	85,14	2,78	27,27	131,79	225,77
28	Krisin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
29	Likiritigenin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
30	İzokersitrin	4,99	T.E.	135	6,64	11,08	165,93	262,4
31	Apigetrin	3,5	10,73	1549,17	33,85	63,19	1599,2	6902,16
32	Roifolin	T.E.	T.E.	422,96	32,59	93,1	940,47	481,94
33	Nikotiflorin	T.E.	T.E.	1430,38	T.E.	1453,96	T.E.	3573,88
34	Fisetin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
35	Luteolin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
36	Mirisetin	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.
37	Kampferol	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.	T.E.

^a ND: Tespit edilemedi.

^b RSD değerleri gereç ve yöntem bölümünde µg/L değeri olarak verilmiştir.



Şekil 16. . *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün çeşitli ekstralarının ve kısımlarının LC-MS/MS analiz kromatogramı

5.6. GC-MS ile Yağ Asidi Analiz Sonuçları

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünün 2015, 2016 ve 2017 yıllarında toplanan örneklerinin petrol eteri ekstralarının yağ asidi profili GC-MS ile belirlendi (Tablo 23). Ekstrelerin yağ içeriklerinin %100'ü belirlendi. Üç yılda da toplanan örneklerden hazırlanan ekstralarına bileşenlerinin oleik asit olduğu tespit edildi. Genel olarak ekstraların bileşimindeki yağ asitlerinin daha çok doymamış olduğu belirlendi. 2015, 2016 ve 2017 yıllarında toplanan örneklerin yağ asidi bileşimi

karşılaştırıldığında genel olarak ekstrelerin içerik olarak bileşiminin yıllara bağlı olarak değişmediği tespit edildi.

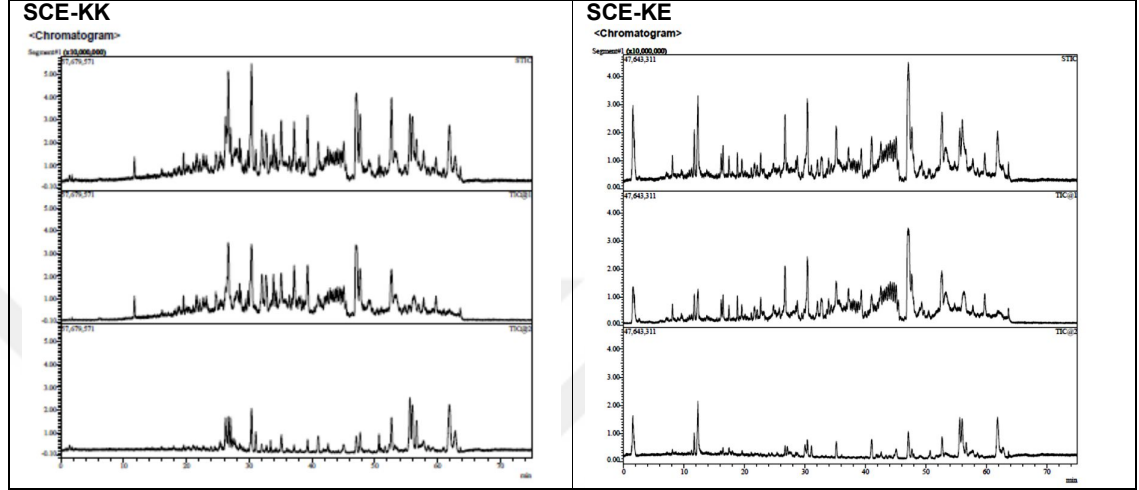
Tablo 23. 2015-2016-2017 yıllarında toplanan *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* örneklerinin yağ asidi bileşimi

RT	Bileşen	SCE-PE(% İçerik) 2015/2016/2017
27.93	2-Palmitoleik asit	-/-
28.31	Palmitik asit	8.02/12.68/10,65
29.76	Palmitoleik asit	-/-
31.39	cis-10 heptadekanoik asit	-/-
31.85	Stearik asit	1.66/2.12/-
33.10	Oleik asit	67.08/56.88/72,65
34.62	Linoleik asit	-
34.69	Heksadekadienoik asit	-/26.02/14,65
35.14	Araşidonik asit	4.69/-
36.33	cis-11-eikosenoik asit	-/-
36.66	Linolenik asit	-/-
37.83	cis-11,14-eikosadienoik asit	-/-
38.40	Behenik asit	12.50/-/2,05
39.63	Erusik asit	-/-
41.27	cis-13,16-dokosadienoik asit	-/-
41.85	Lignoserik asit	6.05/2.29/-
43.33	Nervonik asit	-/-

5.7. HPLC-IT-TOF-MS Sonuçları

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünün tüm bitki kısımlarının kloroform ve etanol ekstreleri LC-MS IT-TOF cihazında optimize edilen kapsamlı 75 dakikalık bir metotla analiz edilerek genel fitokimyasal profili belirlendi. Yapılan bu çalışmada farklı sınıflardan 74 farklı sekonder metabolit tespit edildi. Molekül formülleri tespit edilen fitokimyasalların tahmini isimleri, alıkonma zamanları, tespit edilen iyon formları, ölçülen m/z değerleri (tam kütle olarak verilmiştir) Tablo 24, 25, 26'da verildi. LC-MS/IT-TOF taramasına ait kromatogramlar (TIC) ise Şekil 17'te verildi. LC-MS/IT-TOF taramasına ait dataların yorumlanması yapılırken intensite 2.500000 üzerinde olan pikler değerlendirildi. Yani bu tür daha çok majör bileşenler açısından incelendi. Bu yüzden tablo da verilen bileşiklerin ilgili türde kesinlikle olduğu söylenebilirken sadece bir türde bir bileşik sonuçlarımıza göre yok gözüküyorsa ancak bu bileşiğin bu türde olmadığı değil majör bileşen olmadığı sonucu çıkarılmalıdır. Ayrıca tarama sonuçlarına göre tahmini isimler verilmiştir. O

kapalı formüle ve kütleyle sahip bir bileşen içerdiği kesinlikle söylenebilirken o bileşiğin ismi ise tahmini söylenebilir. Çünkü o formül ve tam kütleyle sahip birden fazla doğal bileşik olabilir.



Şekil 17. *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* ekstralarının sırasıyla total, pozitif ve negatif HLC-IT-TOF-MS kromatogramları

Tablo 24. Çalışılan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün HPLC-IT-TOF-MS sonuçları

	Molekül Formülü	Molekülün Adı	[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M-H] ⁻	R.T.	SCE-KK	SCE-KE
1.	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	Araşidonik asit/ Fitanik asit			311,2956	56,62	*	*
2.	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	Behenik asit			339,3269	55.59-62.76		*
3.	C ₂₂ H ₄₀ O	2-Oktadesilfuran		338,3417		47.00-47.92	*	*
4.	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	Ursolik asit / Oleanolik asit			455,3531	34.36-34.9	*	*
5.	C ₂₀ H ₂₆ O ₃	6,7-Dehidroroyleanon/ Taksodion/ 8-hidroksi-12-okso-abieta-9(11),13-dien-20-oik asit 8,20-lakton	315,1955			25,84	*	
6.	C ₂₉ H ₅₀ O ₅	Homokastasteron/ 28-homokastasteron			477,3585	56.00-56.3	*	*
7.	C ₂₂ H ₄₂ O	Z-5-Metil-6-heneikosen-11-on		340,3574		52,52		*
8.	C ₂₄ H ₄₈ O ₂	Lignoserik asit/ tetrakosanoik asit			367,3582	61,97	*	
9.	C ₂₂ H ₃₈ O	(Heksadesiloksiy)benzen/ 2,4-Dioktilfenol		336,3261		42,48	*	*
10.	C ₂₃ H ₄₀ O ₄	Persin	381,2999			40,99	*	*
11.	C ₃₀ H ₅₂ O ₃	Listerin/ Mirhanol A			459,3844	61,81	*	
12.	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	Sirsilineol/ Santin/ Eupatilin	345,0969			20,3	*	*
13.	C ₁₈ H ₁₆ O ₆	Salvigenin	329,102			24.68-25.00-27.78	*	*
14.	C ₂₄ H ₁₂ O ₅	İmperatorin	381,0758			1,46		*
15.	C ₁₀ H ₁₄ O ₁₀	2-(2-(2,3-dihidroksipropoksi)-2-oksoetil)-2-(formiloksi)succinic asit			293,0514	1.46-1.53		*
16.	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Rosmarinik asit			359,0772	12,28		*
17.	C ₂₁ H ₃₆ O ₄	2-Monolinolenin	353,2686			35,2		*
18.	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	Sirsimaritin/4'-Metilcapillarisin/ Velutin	315,0868			22,82	*	*
19.	C ₃₈ H ₆₂ O ₉	Goyaglikosid C	663,4467			56,32		*
20.	C ₄₆ H ₇₂ O ₁₂	Apoleogenin B			815,4951	47,2		*
21.	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	11-Hidroksiheksadekanoikasit			271,2289	31,06	*	
22.	C ₂₁ H ₂₆ O ₁₅	5,7,8-Trihidroksikumarin-5-β-gentiobiosit		536,161		59,75	*	*
23.	C ₂₈ H ₄₆ O ₂	Kolesteril format/ ergost-3,6-dion		432,3836		47,71	*	*
24.	C ₃₀ H ₅₀ O ₂	Betulin/ Inotodiol		460,4149		52,69	*	*

Tablo 25. Çalışılan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün HPLC-IT-TOF-MS sonuçları (Devam)

	Molekül Formülü	Molekülün Adı	[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M-H] ⁻	R.T.	SCE-KK	SCE-KE
25.	C ₂₁ H ₄₀ O ₇	Pentadekanoik asit beta-D-glukozit		422,3112		26,64	*	*
26.	C ₂₄ H ₄₆ O ₆	Sorbitan monostearat		448,3633		39,28	*	*
27.	C ₂₃ H ₄₄ O ₆	Glutarik asit		434,3476		37,14	*	
28.	C ₂₂ H ₃₀ O ₆	Megaphone/ Megafon			389,197	27,03	*	
29.	C ₂₁ H ₄₀ O ₆	Dodekanoedioik asit		406,3163		32,06	*	
30.	C ₃₀ H ₃₄ O ₂	Parvifloren H/ anthogorgien G	427,2632			26,69	*	*
31.	C ₁₉ H ₃₄ O ₃	(±)-Methopren	311,2581			30,38	*	
32.	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₀	Sophorasid A			473,1453	26,24	*	
33.	C ₂₆ H ₄₄ O ₆	Dresigenin B	453,3211			39,35	*	
34.	C ₁₇ H ₃₀ O ₃	(12S)-12-Hidroksi-16-heptadesinoik asit/simpleksolid A/portentol	283,2268			26,68	*	
35.	C ₂₇ H ₅₆ O ₅	3-[2-hidroksi-3-(4,8,12,16-tetrametilheptadekoksipropoxy)propan-1,2-diol	461,4201			52,7	*	
36.	C ₂₀ H ₂₄ O ₅	Rosmadial	345,1697			26,48	*	
37.	C ₃₂ H ₅₄ O ₂	hopane-30-ilasetat		488,4462		57,81	*	
38.	C ₂₅ H ₅₂ O ₅	Gliseril dibehenate/ Docosanoik asit	433,3888			47,67	*	
39.	C ₂₉ H ₄₈ O ₂	(3β,24S)-3-Hidroksistigmast-5-en-7-on	429,3727			49,32	*	*
40.	C ₁₉ H ₃₆ O ₆	1-O-aseti-2-O-[(R)-3-hidroksitetradekanoyl]-sn-gliserol		378,285		28,46	*	
41.	C ₂₈ H ₄₈ O ₃	Kerevisterol / (3α,5α,8α,9β)-5-Hidroksi-3-metoksiKolestan-6-on			431,3531	55,99	*	
42.	C ₁₉ H ₂₆ O ₂	Androstenedion/ 1-Androstenedion/ Boldenon	287,2006			19,54-22,65	*	
43.	C ₂₇ H ₄₆ O ₅	Aplidiasterol B/ Koprokholik asit	451,3418			22,72-30,37	*	*
44.	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	Orientalin A/Limaprost	381,2636			32,84	*	
45.	C ₂₀ H ₂₈ O ₂	Sugiol/6,7-dehidrosalviol	301,2162			27,74	*	*
46.	C ₂₁ H ₃₄ O ₆	Irkinolin A/ Sarkostin	383,2428			28,46	*	
47.	C ₂₅ H ₄₂ O ₅	mangikol A	423,3105			26,67	*	
48.	C ₂₀ H ₃₈ O ₅	16,17,18,20-tetrahidroksi-10,11,14,15-tetrahidronerilgeraniol		376,3058		32,85	*	

Tablo 26. Çalışılan *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün HPLC-IT-TOF-MS sonuçları (Devam)

	Molekül Formülü	Molekülün Adı	[M+H] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M-H] ⁻	R.T.	SCE-KK	SCE-KE
49.	C ₁₉ H ₂₆ O ₄	Ubiquinon 2	319,1904			25.76-26.22	*	
50.	C ₁₈ H ₂₈ O ₂	Bolandiol/19-Norandrosterone α -Parinarikasıit/Stearidonikasıit	277,2162			25,56	*	
51.	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	Kosmosiin/Afzelin/ Vitexin	433,1129			12,34		*
52.	C ₁₉ H ₂₄ O ₂	Boldion/Metribolone	285,1849			18,83		*
53.	C ₁₉ H ₂₆ O ₃	Epimestrol/ Formestane/ Dripetenon C	303,1955			16,15		*
54.	C ₁₈ H ₃₂ O ₅	(+)-Aspicilin/ malingicasit		346,2588		16,46		*
55.	C ₂₀ H ₂₆ O ₄	Karnosol/6-Hidroksisalvinolon /7,20-Epoksiroyleanon			329,1758	28.45-30	*	*
56.	C ₂₀ H ₂₈ O ₄	Karnosik asit/7 α -Hidroksiroyleanon			331,1915	27.10-30	*	*
57.	C ₁₇ H ₂₀ O ₃	6,7-Dehidroroyleanon	273,1485			21,00	*	*
58.	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	Genkwanin/akasetin	285,0758			21,8-24,7	*	*
59.	C ₂₀ H ₂₄ O ₂	Kandi dissiol	297,1849			18.2-25,8-32,0	*	*
60.	C ₂₀ H ₂₈ O ₃	Hypargenin B/ Kriptanol/ Royleanon	317,2111			25,50-27,60	*	*
61.	C ₂₉ H ₁₄ O ₇	Tanımlanamadı			473,0667	12,26		*
62.	C ₁₉ H ₄₄ O ₃	Tanımlanamadı	339,3469			47,11		*
63.	C ₁₄ H ₃₀ O ₂₀	Tanımlanamadı		536,1669		59,77	*	
64.	C ₃₁ H ₅₄ O ₅	Tanımlanamadı			505,3898	61.69-61.81		*
65.	C ₃₁ H ₆₆ O ₁₄	Tanımlanamadı	663,4525			56,32	*	
66.	C ₂₉ H ₃₈ O	Tanımlanamadı		420,3261		33,86	*	
67.	C ₂₂ H ₄₂ O ₉	Tanımlanamadı			449,2756	26,68	*	
68.	C ₃₂ H ₃₈ O ₂	Tanımlanamadı	445,2945			30,28	*	
69.	C ₃₂ H ₃₈ O	Tanımlanamadı	439,2995			37,15	*	*
70.	C ₂₅ H ₄₈ O ₇	Tanımlanamadı		478,3738		35,08	*	
71.	C ₂₃ H ₄₈ O ₅	Tanımlanamadı		404,3496		42,26	*	
72.	C ₃₄ H ₄₂ O ₂	Tanımlanamadı	483,3258			32,3	*	*
73.	C ₃₂ H ₃₈ O ₂	Tanımlanamadı	455,2945			30,41		*
74.	C ₃₃ H ₄₀ O	Tanımlanamadı	453,3152			39,34		*

5.8. Saf Madde İzolasyonu ve Saf Maddelerin Yapı Tayini

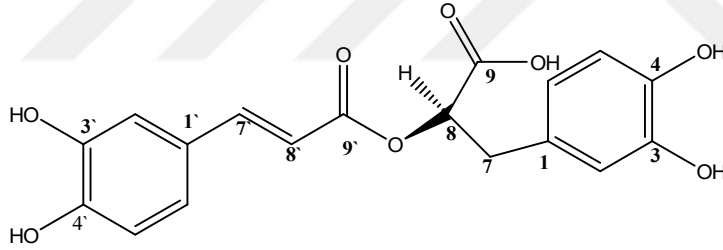
Tablo 26'da *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünden izole edilen ve yapıları aydınlatılan maddelerin listesi verildi. Tablo 27'da 1-6 ve 16-18 numaralı maddeler preparatif HPLC ile diğer maddeler ise preparatif İTK ile elde edildi. Yapı aydınlatma çalışmalarında her maddenin ¹H-NMR, ¹³C-NMR ve 2D-NMR spektrumları alındı ve literatürdeki spektroskopik değerlerle karşılaştırılarak yapıya karar verildi.

Tablo 27. Yapısı aydınlatılan bileşikler

No	İsim
1.	Rozmarinik Asit
2.	Klorojenik Asit
3.	Apigenin
4.	Hesperidin
5.	Fumarik Asit
6.	Kaffeik Asit
7.	4-Hidroksibenzoik Asit
8.	7-Asetil royleanon
9.	β-Sitosterol
10.	Ferruginol
11.	Kriptanol
12.	Inuroleanol
13.	6,7-dehidroroleanon
14.	Salvigenin
15.	Ursolik
16.	Oleanolik
17.	Salvianolik Asit B
18.	Luteolin 7-Glikosid
19.	Salvianolik Asit A
20.	Benzoik Asit
21.	Bis-(2-etil heksil benzene 1,2 dikarboksilate)
22.	4-hidroksi benzaldehit
23.	Stigmasterol
24.	Scoparon
25.	Bis(2-etilhekzil) tereftalat
26.	Sugiol
27.	7α-hidroksi-β-sitosterol
28.	Heksadekanoik Asit, n-oktil ester
29.	Heksadekanoik Asit, 3-hidroksi-metilester
30.	Prokateşik Asit

5.8.1. Rosmarinik asit

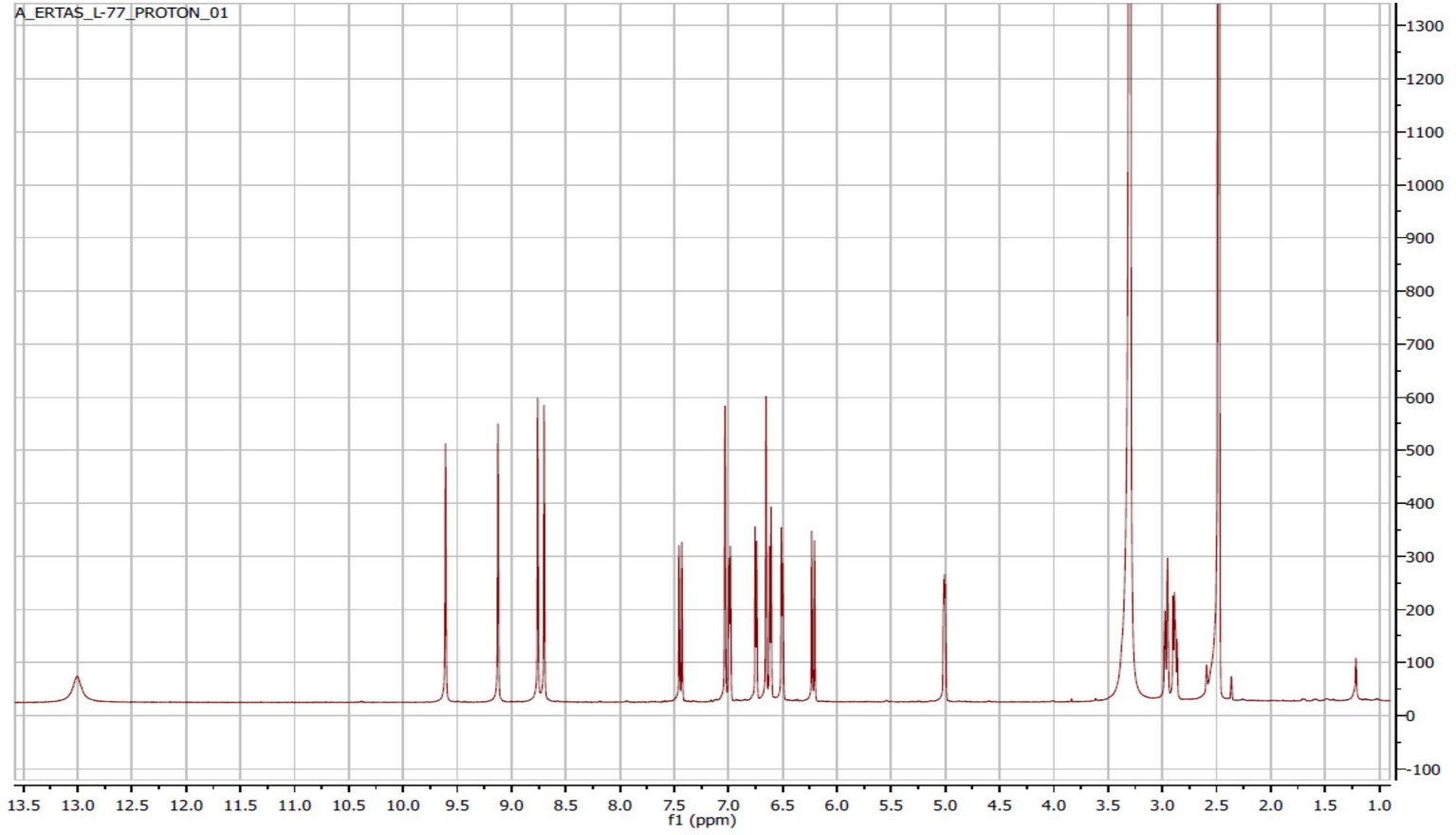
Türün toprak üstü kısımlarının etanol ekstresinin çok sayıdaki fraksiyonundan preparatif HPLC ile MeOH/Su:50/50 sisteminde beyaz renkte katı şekilde elde edildi. Preparatif HPLC’de DAD dedektörde UV max dalga boyu 332 nm olan pik toplandı. Farklı saflıklarda olmak üzere yaklaşık 150 mg elde edildi (Şekil 18). ¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD, 600 MHz) δ 7,03 (brs), 6,75 (d, J=6 Hz), 6,99 (d, J=6 Hz), 2,96 (brd, J=12 Hz), 2,92 (dd, J=13,8; 9,6 Hz), 6,22 (d, J=12Hz), 6,50 (d, J=2 Hz), 6,65 (brs), 6,63 (d, J=6 Hz), 7,45 (d, J=18 Hz) ve 5.01’de (m) görülen pikler sırasıyla H-2, H-5, H-6, H-7a, H-7b, H-8, H-2’, H-5’, H-6’, H-7’ ve H-8’ protonlarına aittir (241, 242). Validasyonu yapılmış olan metod ile LC-MS-IT-TOF’ta çalışıldığında bu maddenin rosmarinik asit standardı ile aynı alıkonma zamanına sahip olduğu görüldü ve izlenen [M-H]⁻ piki (m/z 359.0772 (C₁₈H₁₆O₈)) ile L-77 maddesinin rosmarinik asit olduğu doğrulandı. Tablo 28’de L-77’nin ¹H ve ¹³C NMR değerleri verildi (Şekil 19-22).



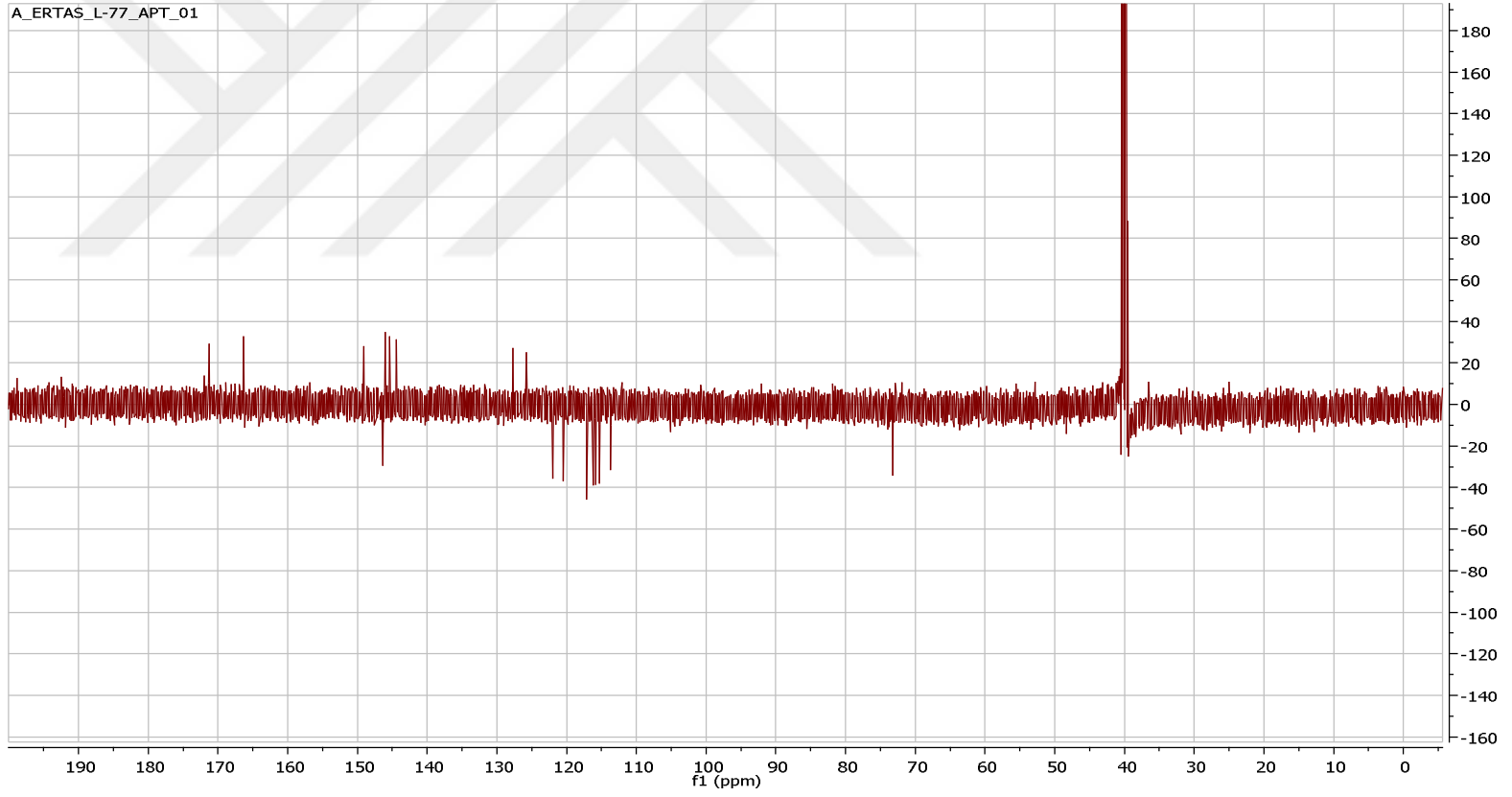
Şekil 18. Rosmarinik Asit

Tablo 28. Rosmarinik asit bileşğinin NMR değeri

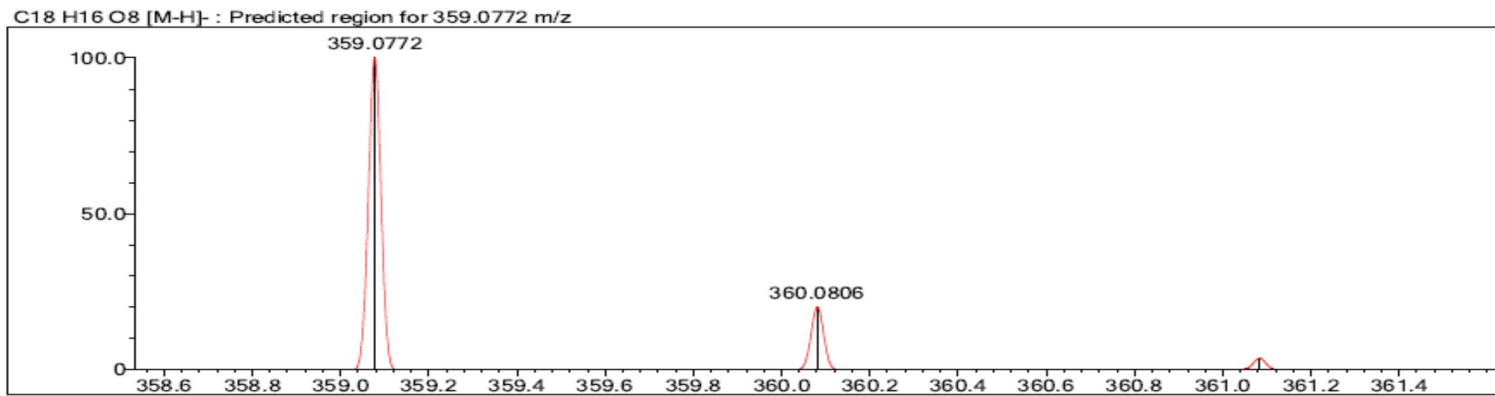
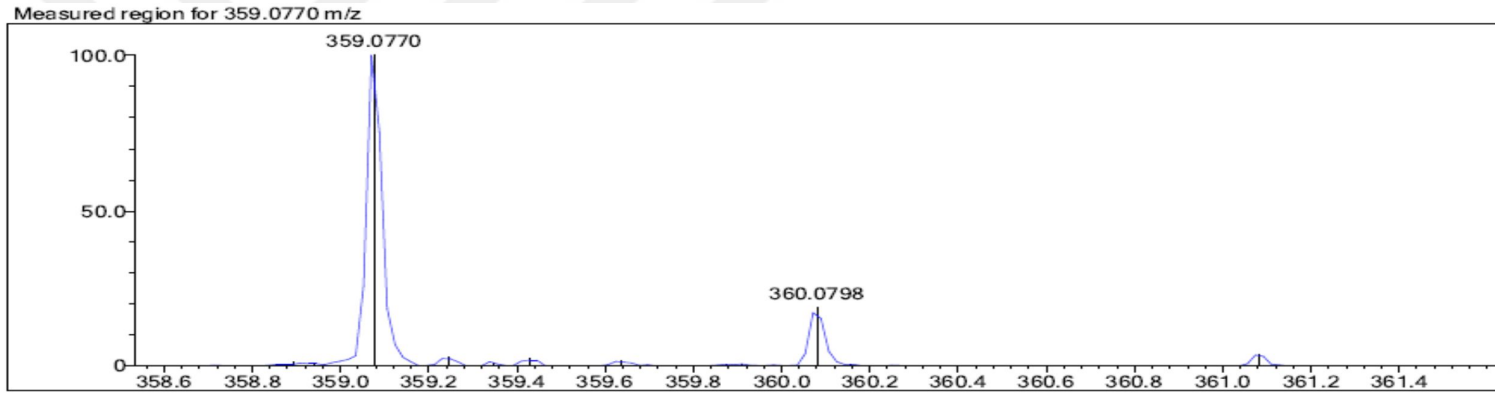
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	129.63	-
2	113.69	7,03 <i>brs</i>
3	147.49	-
4	149.30	-
5	114.28	6,75 <i>d</i> (<i>J</i> =6 Hz)
6	122.84	6,99 <i>d</i> (<i>J</i> =6 Hz)
7	38.60	a 2,96 <i>brd</i> (<i>J</i> =12,0) b 2,92 <i>dd</i> (<i>J</i> =13.8; 9.6 Hz)
8	115.3	6,22 <i>d</i> (<i>J</i> =12 Hz)
9	169.1	-
1'	131.18	-
2'	117.1	6,50 <i>d</i> (<i>J</i> =2 Hz)
3'	147.49	-
4'	144.71	-
5'	116.0	6,65 <i>brs</i>
6'	122.83	6,63 <i>d</i> (<i>J</i> =6 Hz)
7'	147.4	7,45 <i>d</i> (<i>J</i> =18 Hz)
8'	82.509	5.01 <i>m</i>
9'	175.50	-



Şekil 19. Rozmarinik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CD_3OD , 600 MHz)



Şekil 20. Rozmarinik asit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)

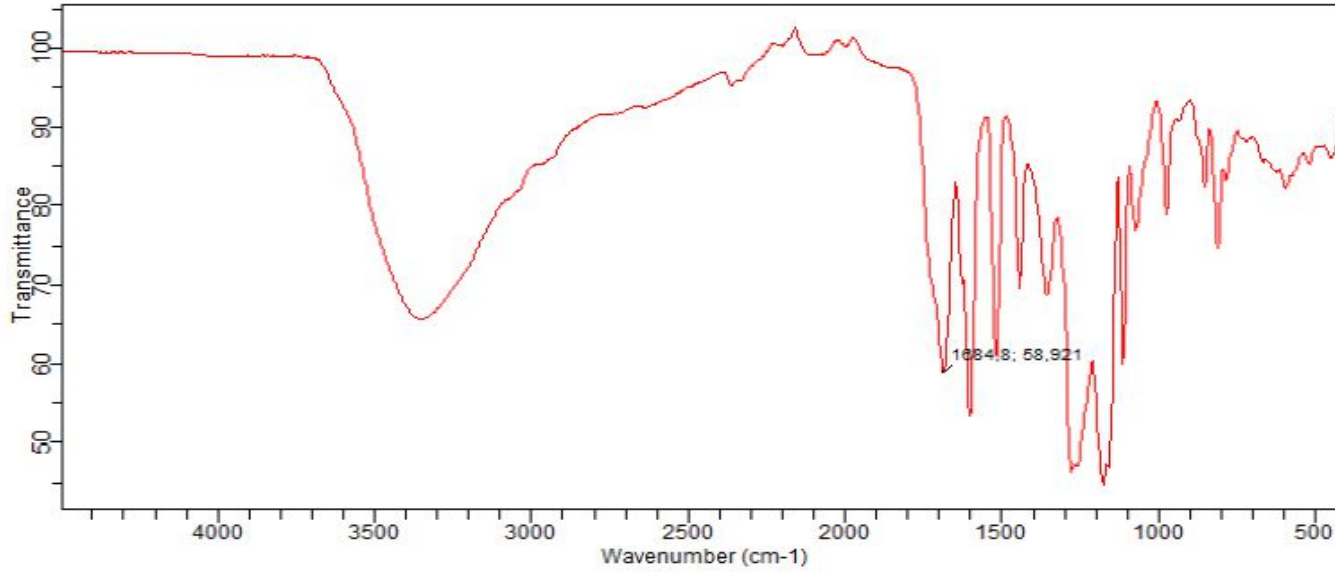


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	77.55	C18 H16 O8	[M-H] ⁻	359.0770	359.0772	-0.2	-0.56	77.55	11.0

Şekil 21. Rozmarinik asit LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:ROSMARİNİC ASİT
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\ROSMARİNİC ASİT_2018-05-10T14-37-23.a2r

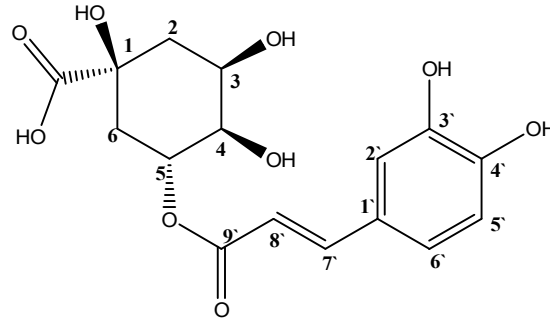
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.10.2018 2:37:23
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 22. Rozmarinik asit bileşiğinin IR spektrumu

5.8.2. Klorojenik asit

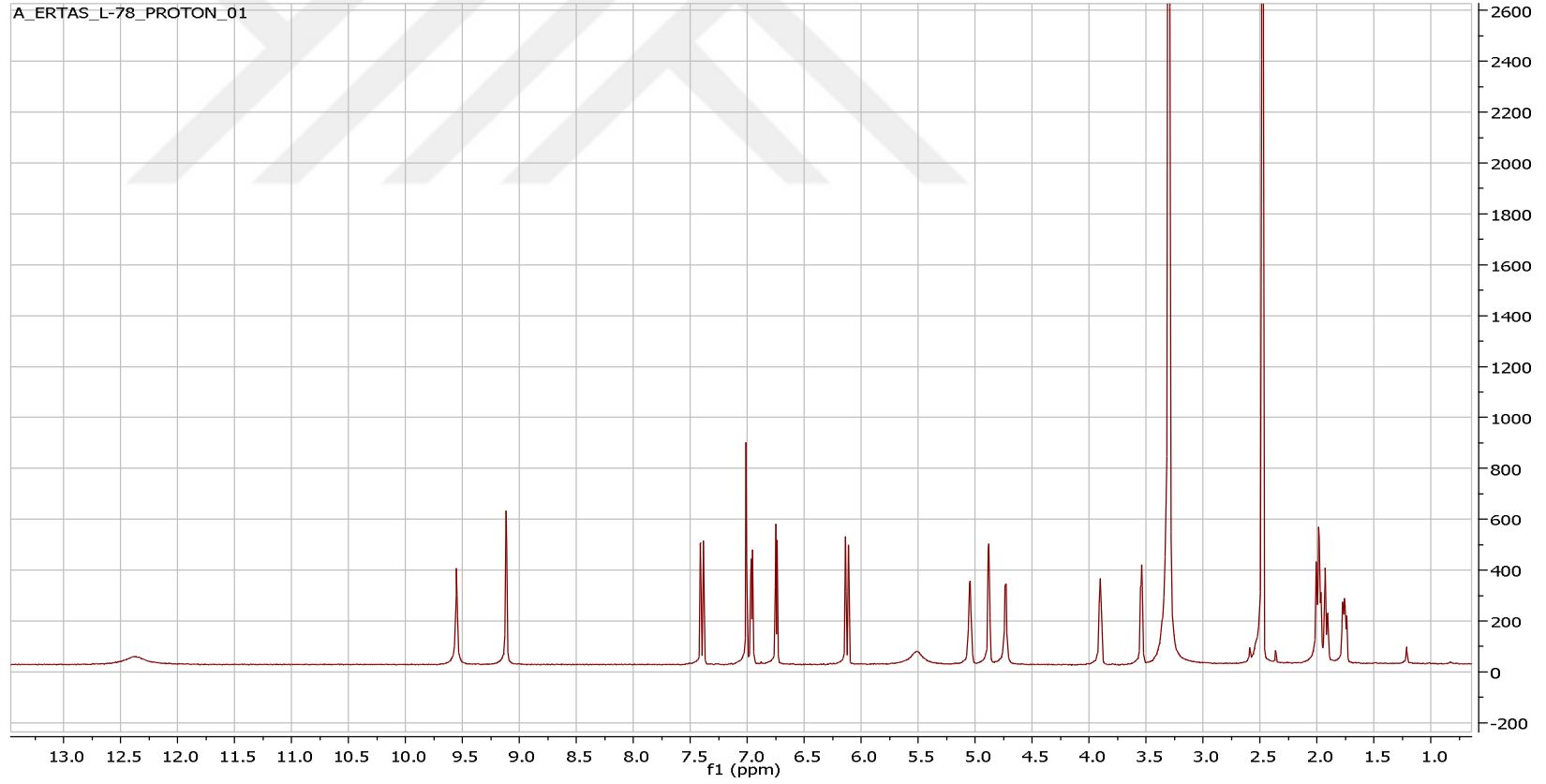
Türün toprak üstü etanol ekstresinin polar fraksiyonlarının C-18 kolan dolgu maddesi ile hazırlanan kolanlarda MeOH/SU:70/50 sabit çözücü sisteminden geçirilerek alt fraksiyonlara ayrıldı. Yüksek saflıkta 30 mg beyaz toz halinde elde edildi (Şekil 23). Bu fraksiyonlardan preparatif HPLC sisteminde MeOH/Su:50/50 çözücü sisteminde UV max dalga boyu 325 nm olan pik toplandı. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (CD_3OD , 600 MHz) δ 2.00 *m* -1.75 *dd* $J=$ 13.9, 7.2 Hz, 5.51 *brs*, 3.54 *brs*, 3.90 *brs*, 7.0 *brs*, 6.77 *d* ($J=$ 7.8 Hz), 6.98 *d* ($J=$ 7.8 Hz), 7.40 *d* ($J=$ 16.2 Hz), 6.12 *d* ($J=$ 15.6 Hz), 9.12 *s* ve 9.55 *s* ppm'de proton sinyalleri izlendi. İleri NMR teknikleri ile çalışılmadan önce LC-MS-IT-TOF sistemi ile madde analiz edildi. Bu bileşik validasyonu yapılmış metot ile çalışıldığında klorojenik asit ile aynı alıkonma süresine sahip olduğu görüldü. Ayrıca LC-MS-IT-TOF ile elde edilen kütle spektrumunda izlenen m/z 353.0881 $[\text{M-H}]^-$ piki $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$ kapalı formülünü önerdi. NMR ve kütle spektrumları birlikte değerlendirildiğinde ve literatür verileri ile kıyaslandığında bu bileşiğin klorojenik asit olduğu doğrulandı (243). Tablo 29'da klorojenik asitin ^1H NMR değerleri verildi (Şekil 24-27).



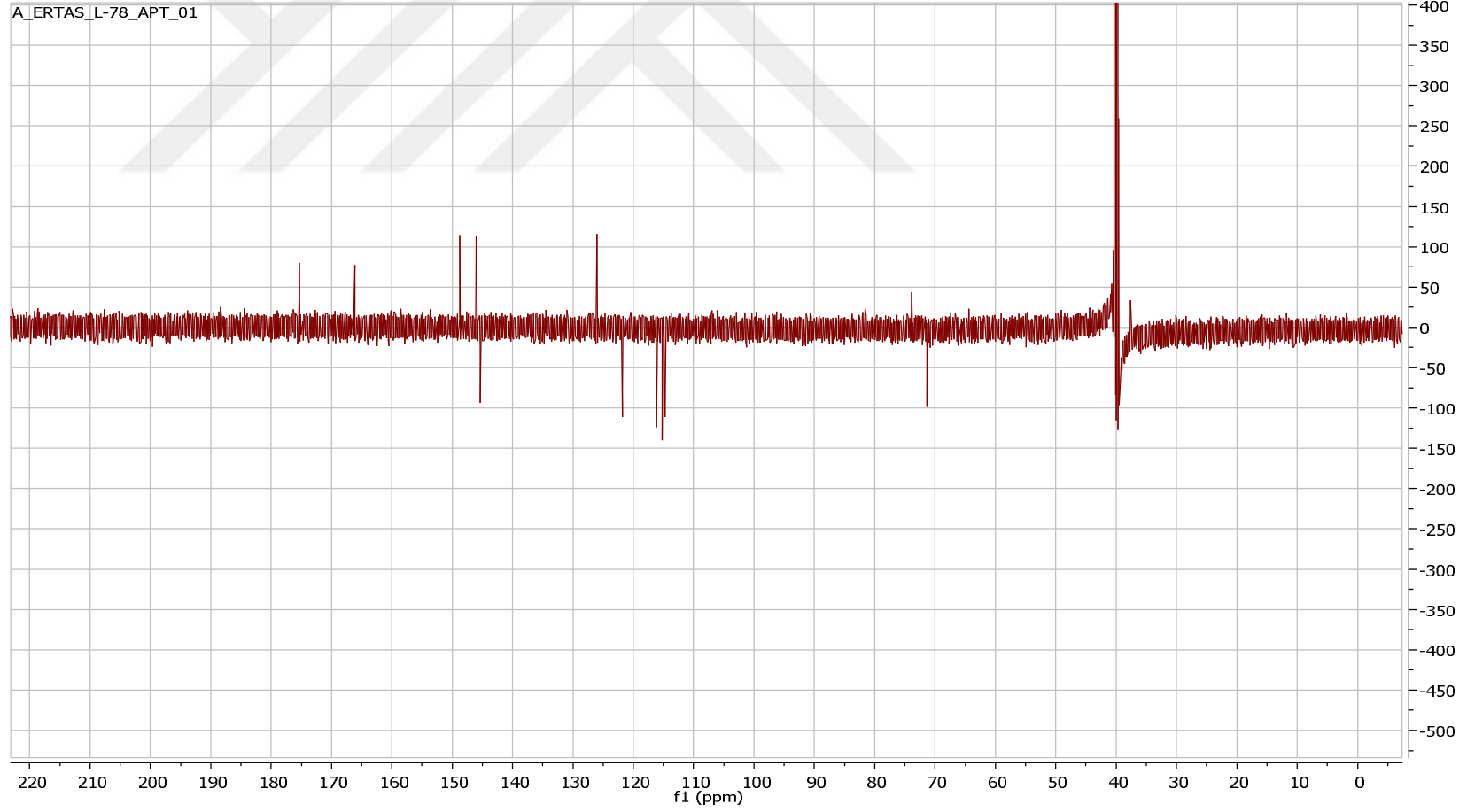
Şekil 23. Klorojenik asit

Tablo 29. Klorojenik asit bileşiminin NMR değerleri

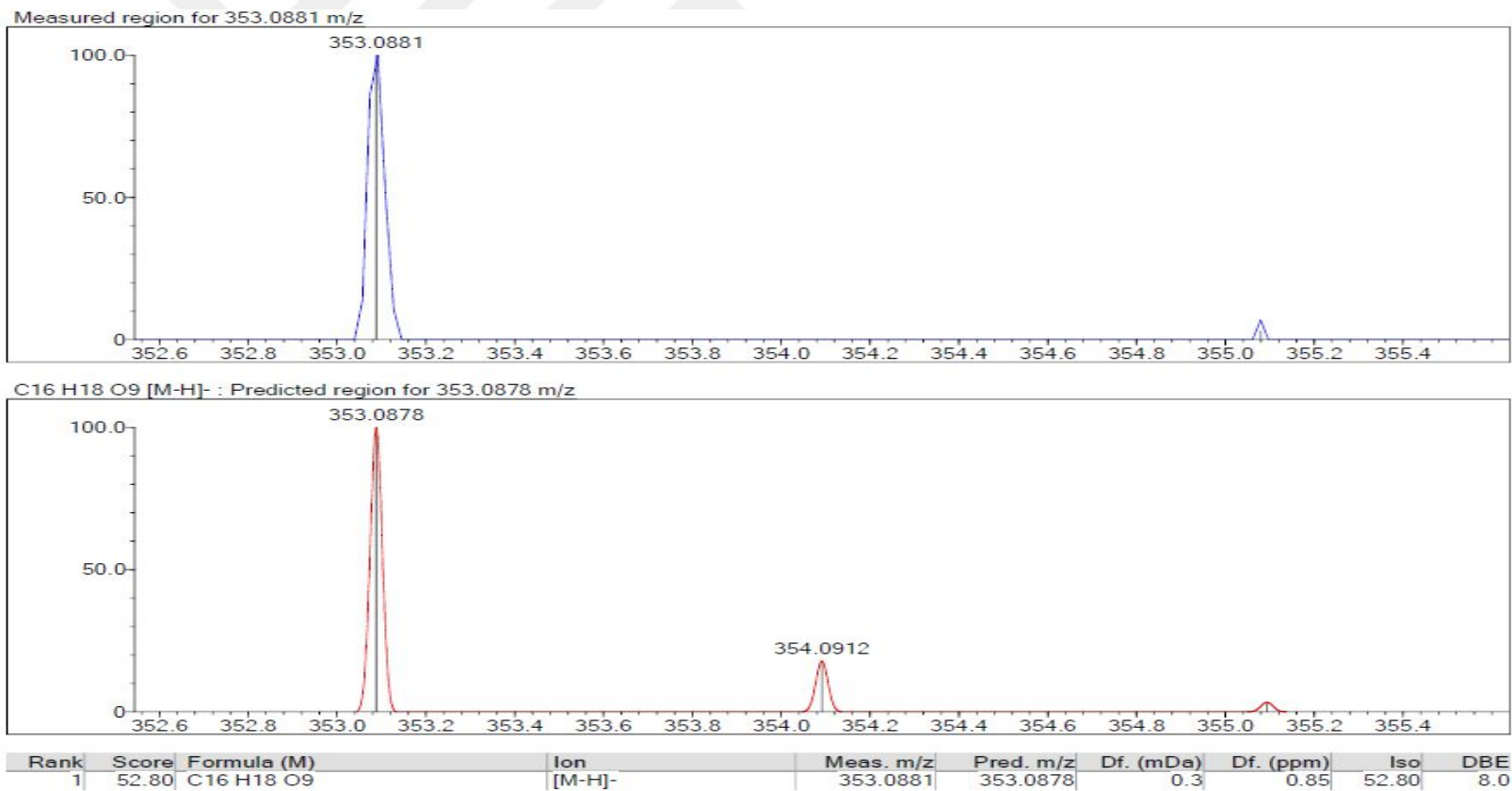
Pozisyon	¹ H-NMR
1	
2	2.00 m ,2H- 1.75 dd J= 13.9, 7.2 Hz
3	3,90 brs
4	3.54 brs
5	5.51 brs
6	2.00 m ,2H- 1.75, 2H dd J= 13.9, 7.2 Hz
1'	
2'	7.0 brs
3'	
4'	
5'	6.77 d (J=7.8 Hz)
6'	6.98 d (J=7.8 Hz)
7'	7.40 d (J=16.2 Hz)
8'	6.12 d (J=15.6 Hz)
9'	
3'-OH	9.12 s
4'-OH	9.55 s



Şekil 24. Klorojenik asit bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CD₃OD, 600 MHz)



Şekil 25. Klorojenik asit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)

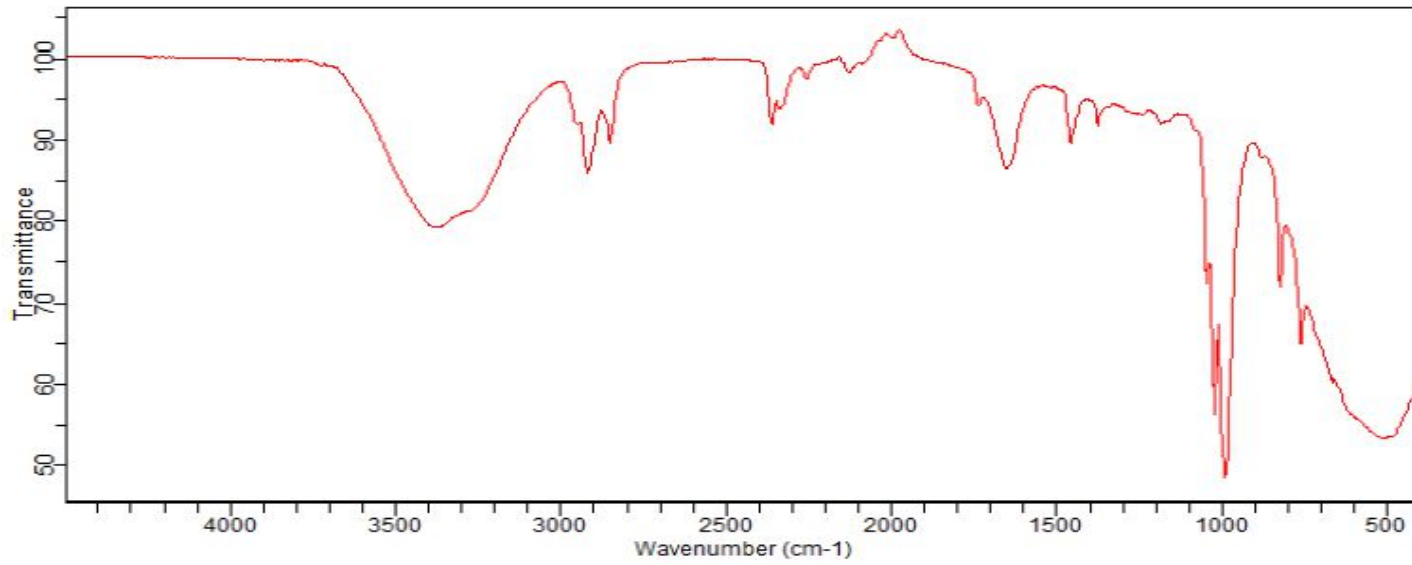


Şekil 26. Klorojenik asit LC-MS-IT-TOF kromatogram



Sample ID:L-78
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\L-78_2018-05-09T12-32-05.a2r

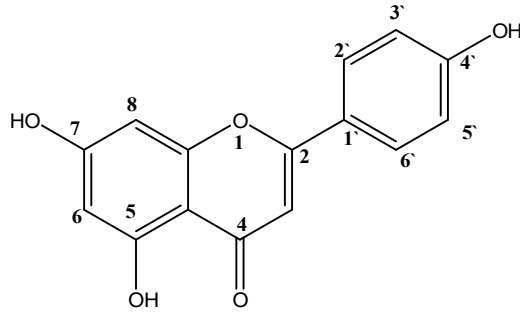
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.09.2018 12:32:05
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 27. Klorojenik asit bileşiğinin IR spektrumu

5.8.3. Apigenin

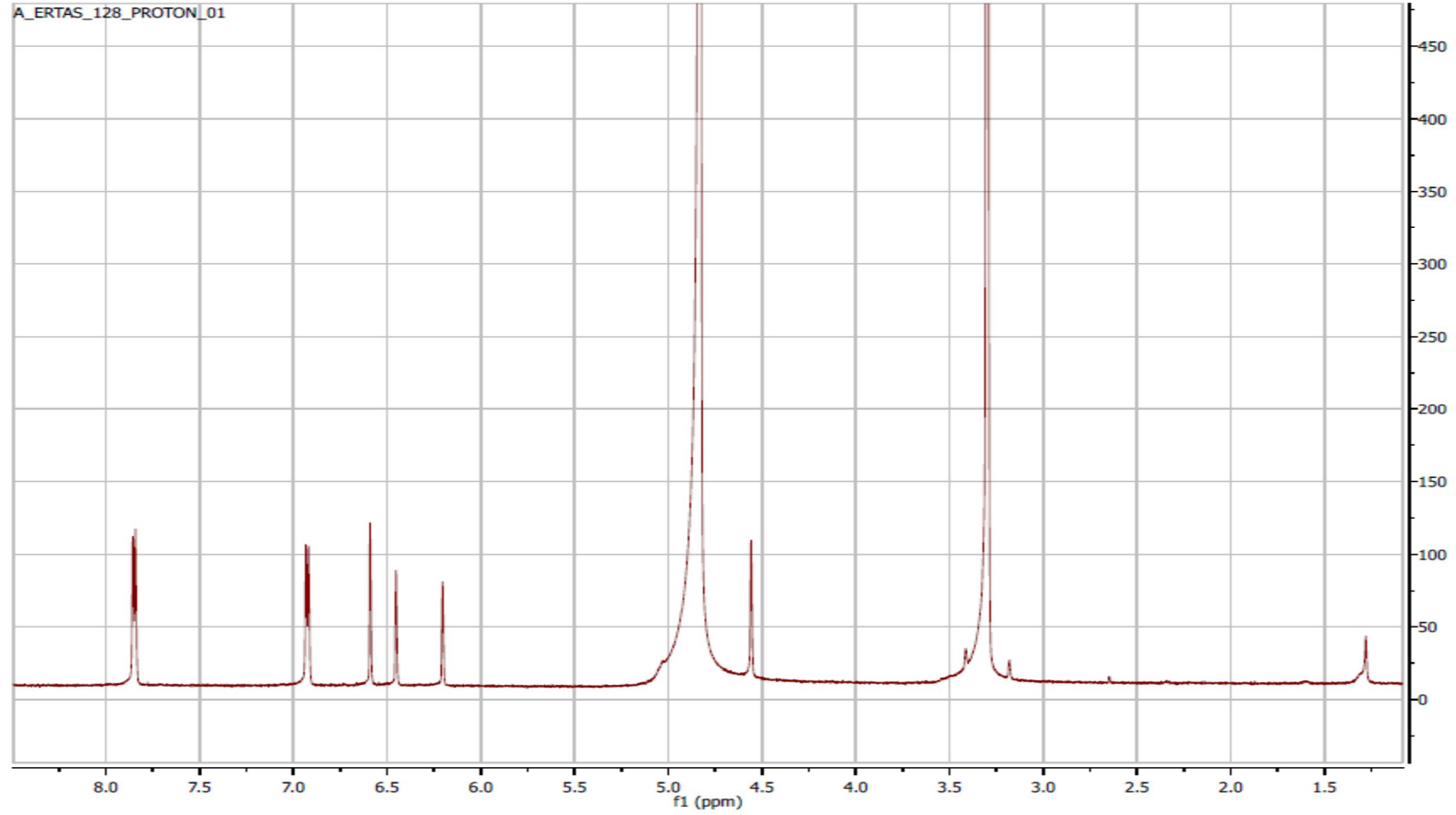
Toprak üstü kısımların etanol ekstralarının %50 Aseton/Metanol ve sonrası fraksiyonların birleştirilip C-18 kolonda MeOH/SU:70/50 sabit çözücü sisteminden geçirilerek alt fraksiyonlara ayrıldı. Bu alt fraksiyonların MeOH/Su:50/50 çözücü sisteminde preparatif HPLC'de 342 nm dalga boyunda max absorbans veren pik toplandı. Toplam 20 mg sarımsak toz halinde elde edildi (Şekil 28). ¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD, 600 MHz) δ 6.59s, 6.20s, 6.45s, 7.85 d ($J=8.4$ Hz) ve 6.92 d ($J=7.8$ Hz) ppm'de proton sinyalleri izlendi. Aromatik bölgede izlenen proton sinyalleri bize yapının fenolik veya flavonoid yapısında olabileceğini düşündürdü. İleri NMR teknikleri ile çalışılmadan önce LC-MS-IT-TOF sistemi ile madde analiz edildi. Bu bileşik validasyonu yapılmış metot ile çalışıldığında apigenin ile aynı alıkonma süresine sahip olduğu görüldü. Ayrıca LC-MS-IT-TOF ile elde edilen kütle spektrumunda izlenen m/z 269.0450 [M-H]⁻ piki C₁₅H₁₀O₅ kapalı formülünü önerdi. NMR ve kütle spektrumları birlikte değerlendirildiğinde ve literatür verileri ile kıyaslandığında bu bileşiğin apigenin olduğu doğrulandı (244-246). Tablo 30'da C-128'in ¹H ve ¹³C NMR değerleri verildi (Şekil 29-32).



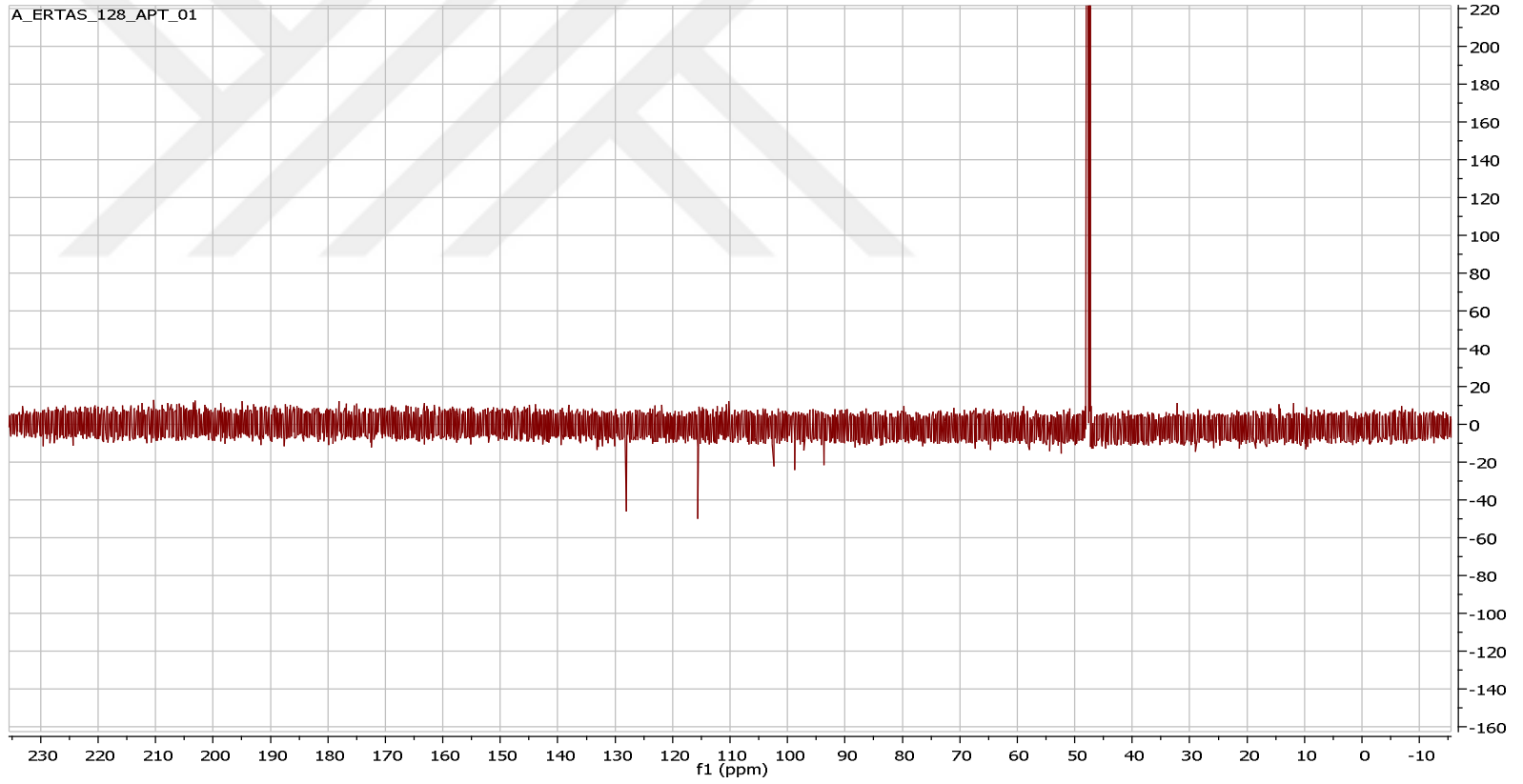
Şekil 28. Apigenin

Tablo 30. Apigenin Bileşiminin NMR Değerleri

Pozisyon	¹ H-NMR
1	-
2	-
3	6.59s
4	-
5	-
6	6.20s
7	-
8	6.45s
9	-
10	-
1'	-
2', 6'	7.85 <i>d</i> (<i>J</i> =8.4 Hz)
3', 5'	6.92 <i>d</i> (<i>J</i> =7.8 Hz)
4'	-
5-OH	-

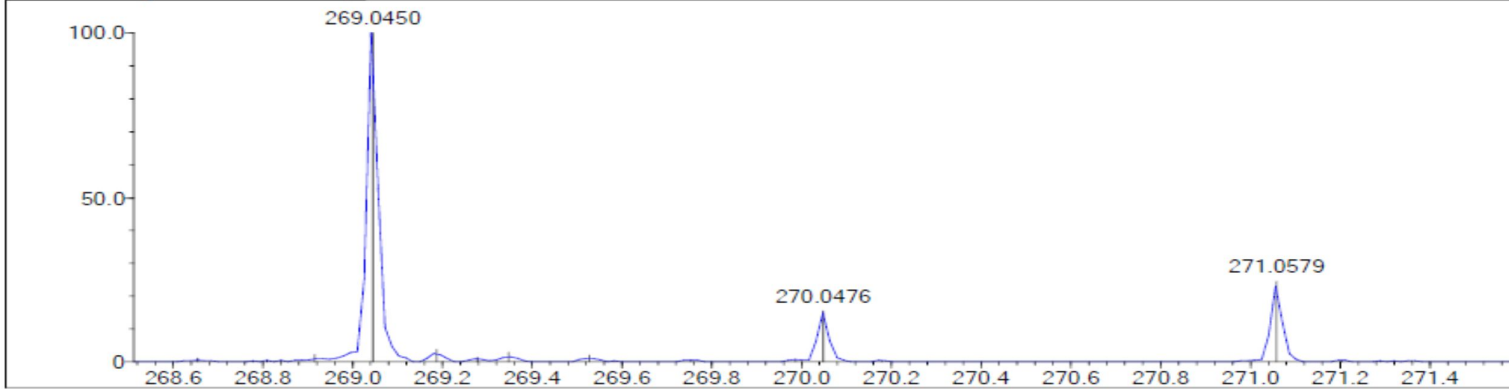


Şekil 29. Apigenin bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CD₃OD, 600 MHz)

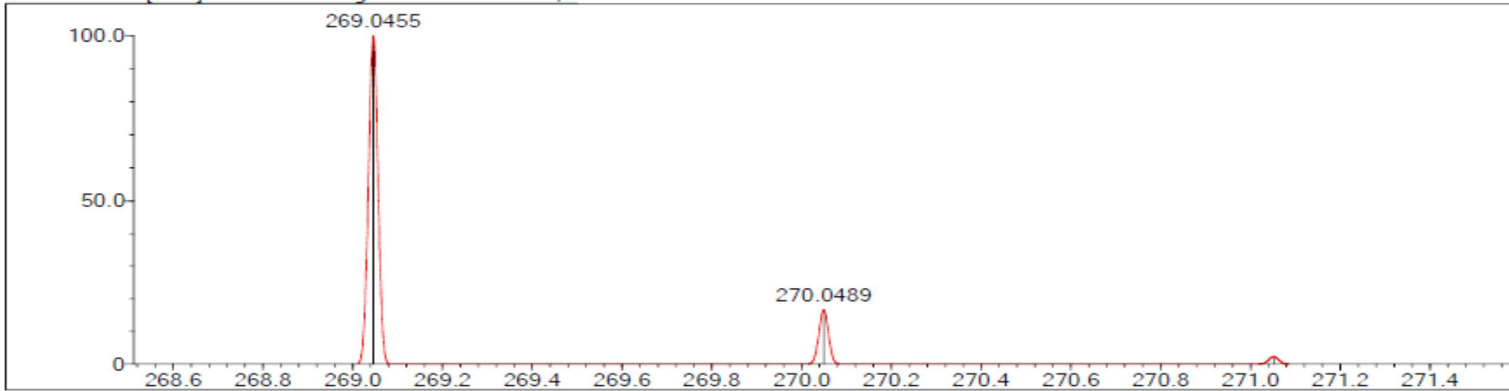


Şekil 30. Apigenin bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)

Measured region for 269.0450 m/z



C15 H10 O5 [M-H]⁻ : Predicted region for 269.0455 m/z



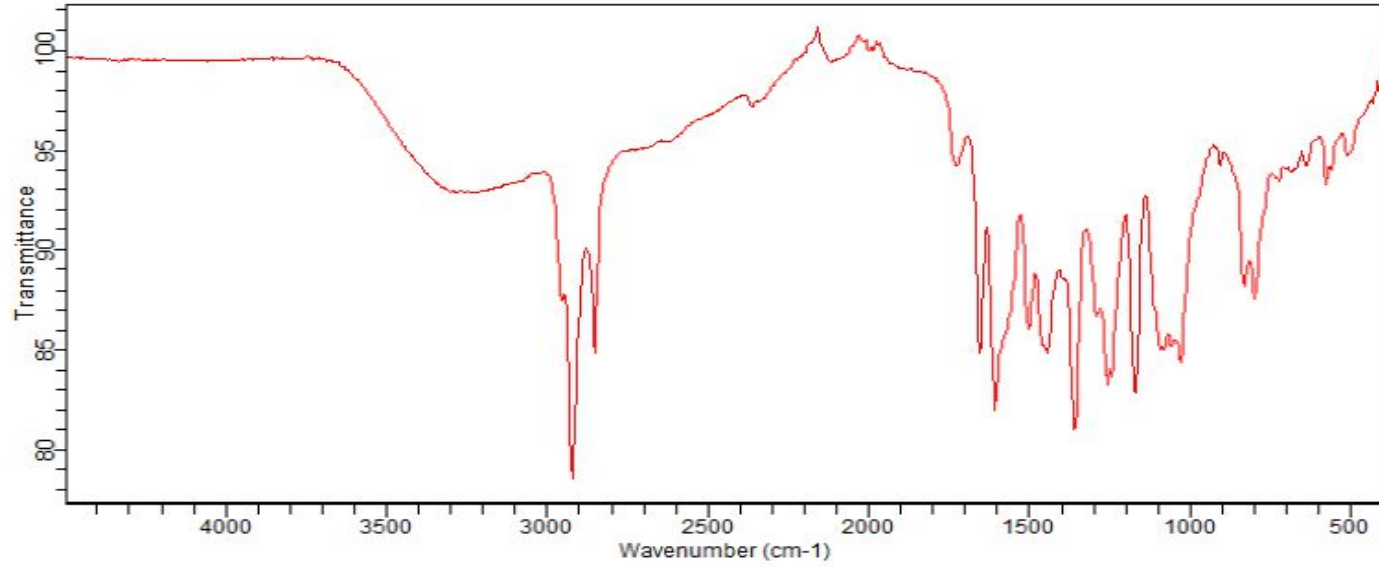
Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	33.29	C15 H10 O5	[M-H] ⁻	269.0450	269.0455	-0.5	-1.86	34.02	11.0

Şekil 31. Apigeninbileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı



Sample ID:C-128
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\C-128_2018-05-09T17-27-31.a2r

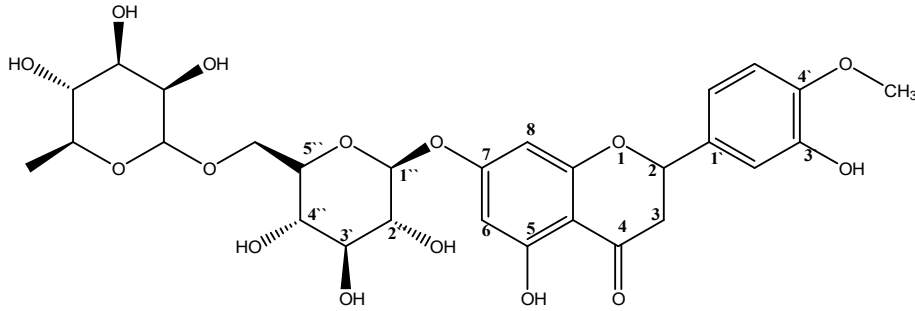
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.09.2018 5:27:31
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



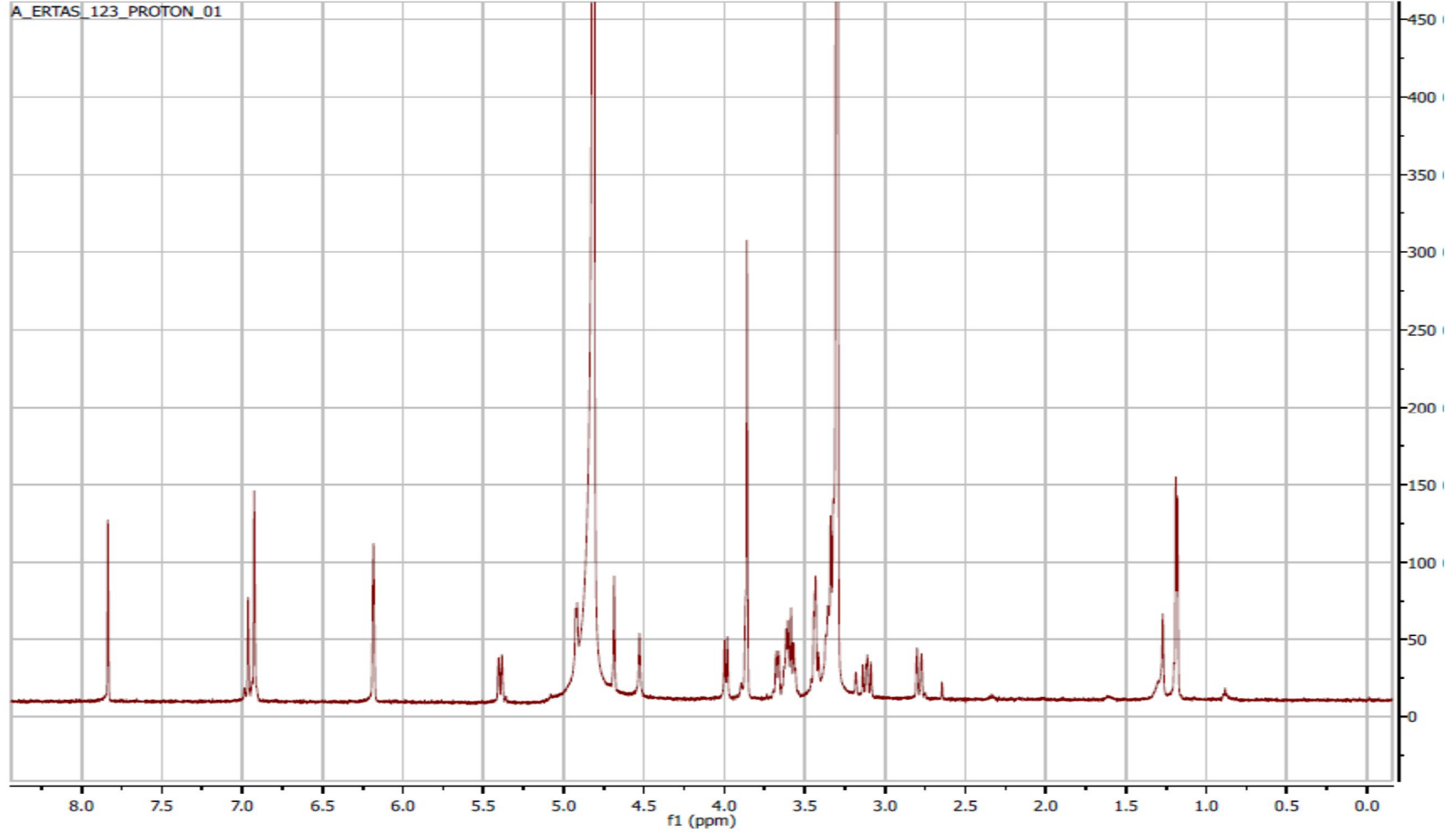
Şekil 32. Apigenin bileşiğinin IR spektrumu

5.8.4. Hesperidin

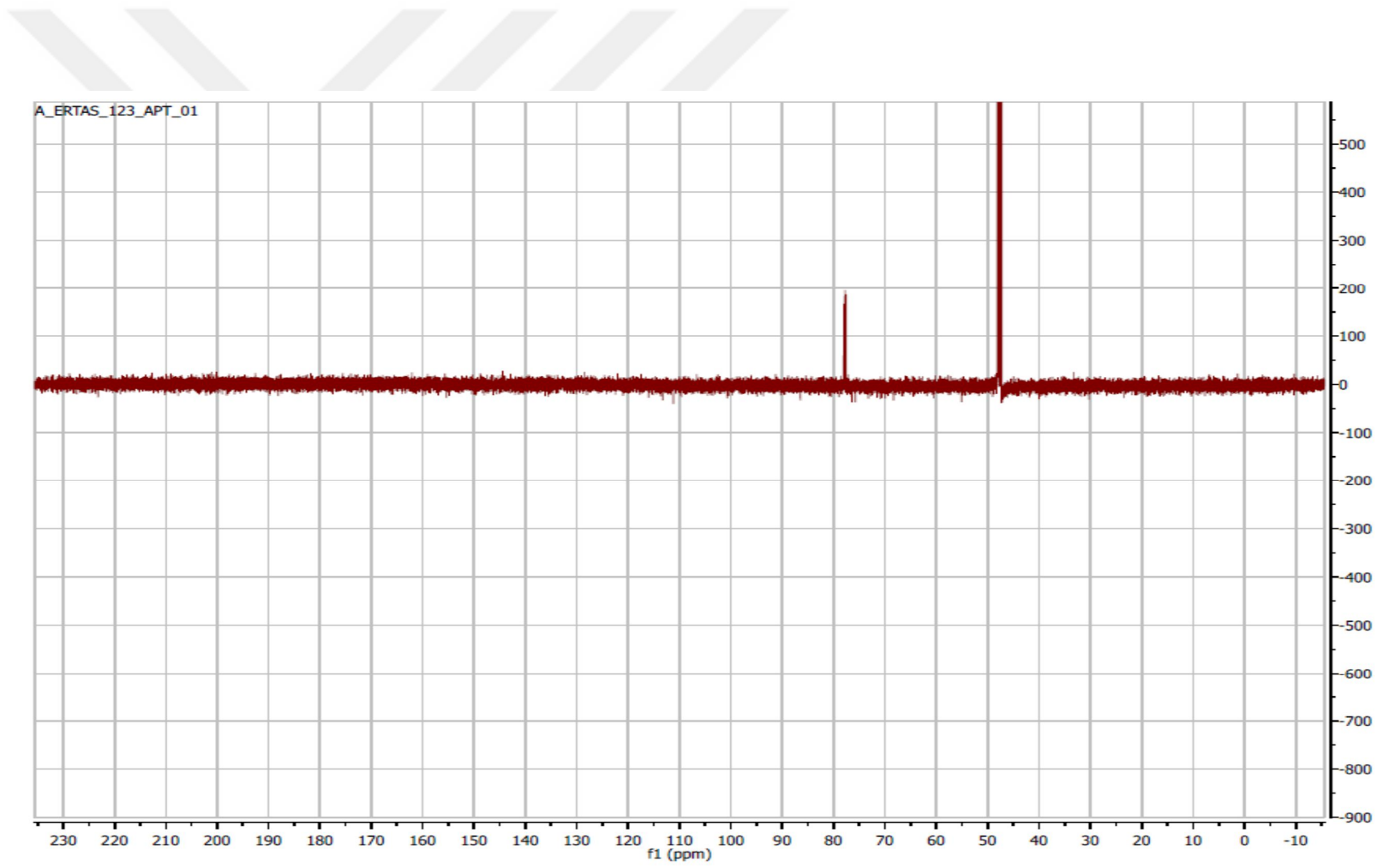
Türün toprak üstü kısımlarından hesperidin diğer bir flavonoit olan apigeninin elde edildiği aynı kromatografik tekniklerle elde edildi. HPLC’de 285 ve 326 nm dalga boyunlarında max absorbands veren pik toplandı. Toplam 22 mg sarımsak toz halde elde edildi (Şekil 33). ¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD, 600 MHz) δ 7.8 (s), 6,96 (s) ve 6.18 (s), ppm’de aromatik bölgede sinyaller izlendi. Bunlara ilaveten δ 5.39 (d, $J = 12$ Hz), δ 4.93 (d, $J = 4.8$ Hz) izlenen proton sinyalleri yapıda iki farklı şeker grubunun anaomerik karbonlarını, 3-4 ppm arasındaki diğer sinyalleri şeker gruplarının diğer protonlarını gösterdi. Ayrıca δ 3.86 ppm’de 3H lık bir metoksi singleti ve δ 1.19 ppm’de 3H karakteristik ramnoz şekeri metili tespit edildi. Bu bilgiler bize yapının aromatik yapıda olduğu ve şeker gruplarının bağlı olabileceğini düşündürdü. İleri NMR teknikleri ile çalışılmadan önce LC-MS-IT-TOF sistemi ile madde analiz edildi. Bu bileşik validasyonu yapılmış metot ile çalışıldığında hesperidin ile aynı alıkonma süresine sahip olduğu görüldü. Ayrıca LC-MS-IT-TOF ile elde edilen kütle spektrumunda izlenen m/z 609.1794 [M-H]⁻ piki C₂₈H₃₄O₁₅ kapalı formülünü önerdi. NMR ve kütle spektrumları birlikte değerlendirildiğinde ve literatür verileri ile kıyaslandığında bileşiğin hesperidin olduğu doğrulandı (247,248) (Şekil 34-36).



Şekil 33. Hesperidin

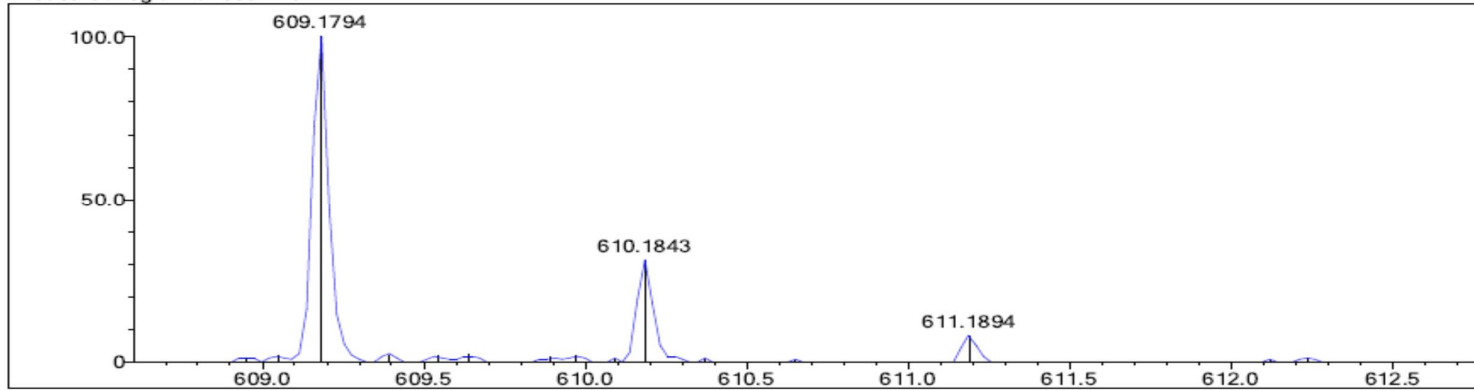


Şekil 34. Hesperidin bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CD₃OD, 600 MHz)

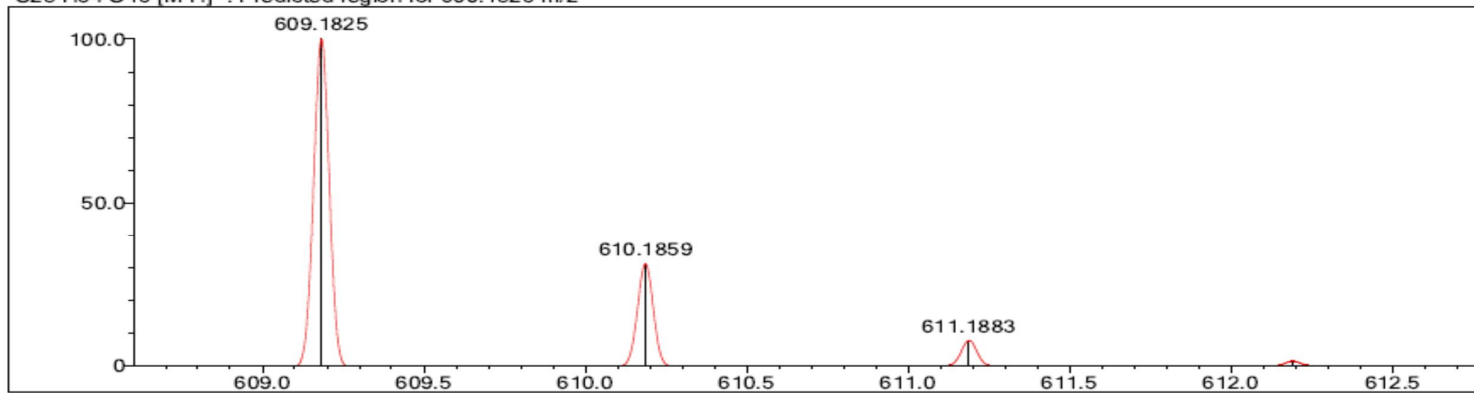


Şekil 35. Hesperidin bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)

Measured region for 609.1794 m/z



C28 H34 O15 [M-H]⁻ : Predicted region for 609.1825 m/z

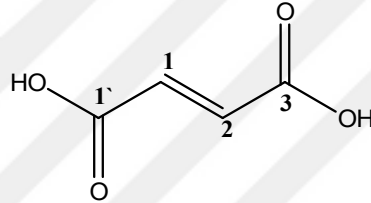


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	50.89	C28 H34 O15	[M-H] ⁻	609.1794	609.1825	-3.1	-5.09	57.12	12.0

Şekil 36. Hesperidin bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.5. Fumarik Asit

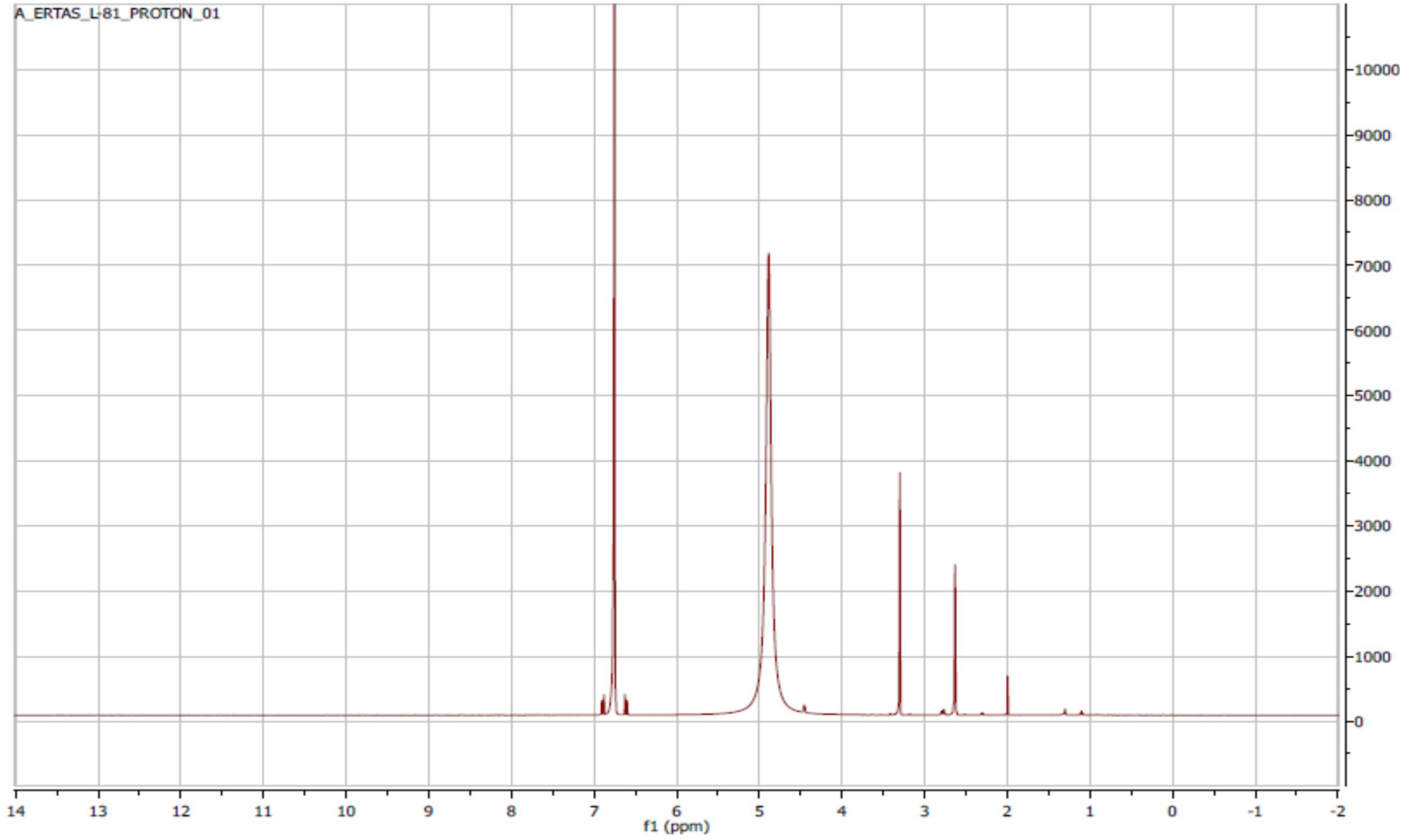
Türün toprak üstü kısımların etanol ekstraktlarından ince tabaka kromatografisi yöntemiyle aseton/MeOH:9.5/0.5 çözücü sisteminde elde edildi (Şekil 37). Beyaz katı halinde yaklaşık 10 mg elde edildi. $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, D_2O) spektrumunda δ 6,76 ppm'de rezonans olan singlet protonunu izlendi. Moleküldeki tek protonun olefinik proton olduğu düşünüldü. APT (150 MHz, CD_3OD) spektrumu incelendiğinde δ 135.33 ve δ 167.82 ppm'de rezonans olan sırasıyla 1 metin ve 1 katerner karbon görüldü. NMR değerleri maddenin simetrik olabileceğini düşündürdü. Literatür araştırması sonucu bitkilerde bol bulunan organik asitlerden biri olan fumarik asit olduğu belirlendi. Tablo 31'de bu bileşiğin ^1H ve ^{13}C NMR değerleri verildi (Şekil 38, 39).



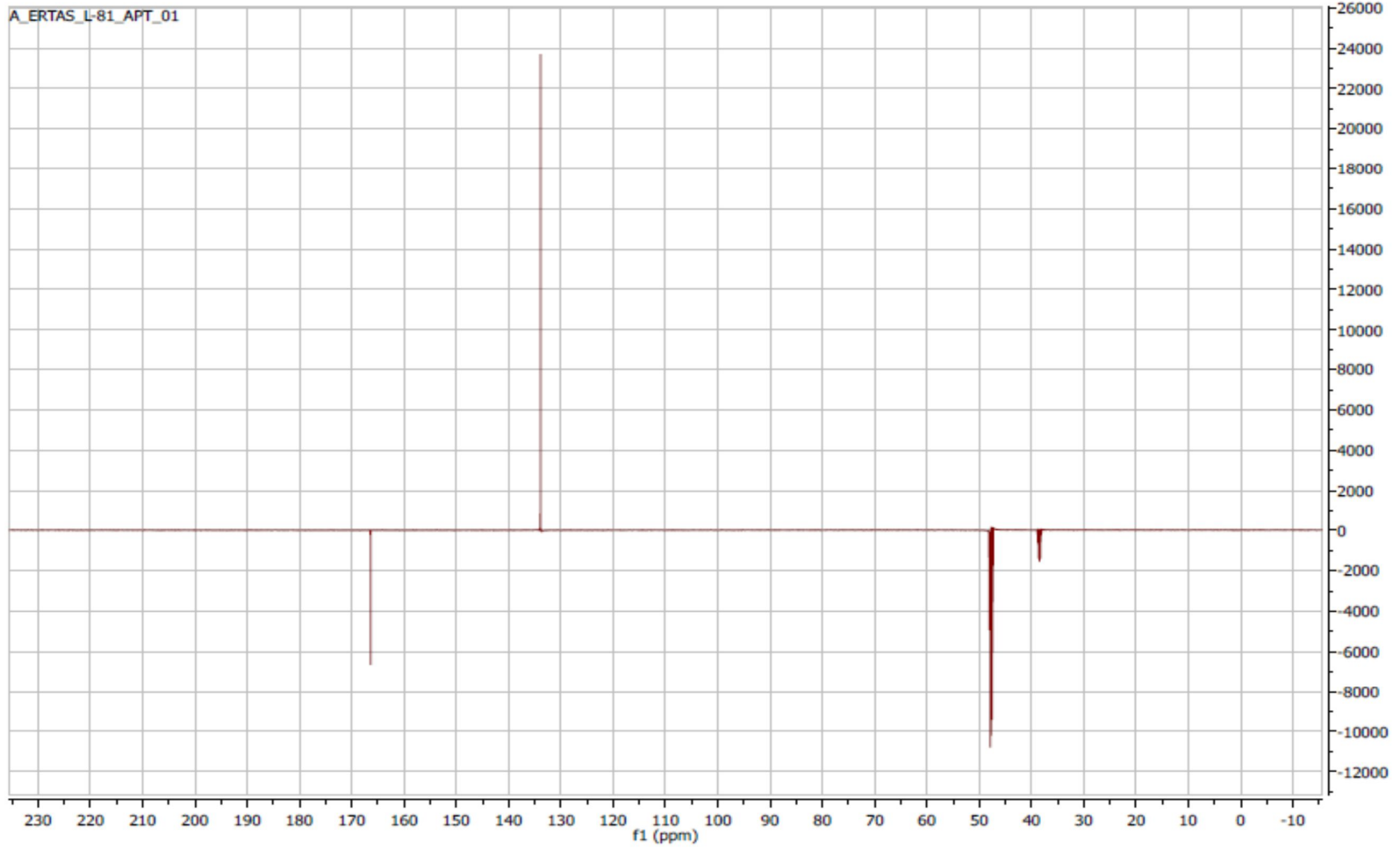
Şekil 37. Fumarik Asit

Tablo 31. Fumarik asit bileşiğinin NMR değerleri

Pozisyon	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$
1	167.82	-
2	135.33	6.67
3	135.33	6.67
4	167.82	-



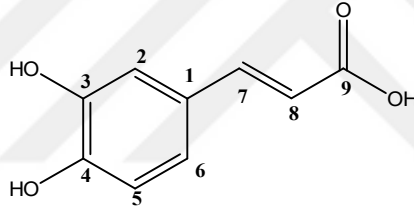
Şekil 38. Fumarik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CD_3OD , 600 MHz)



Şekil 39. Fumarik asit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)

5.8.6. Kaffeik asit

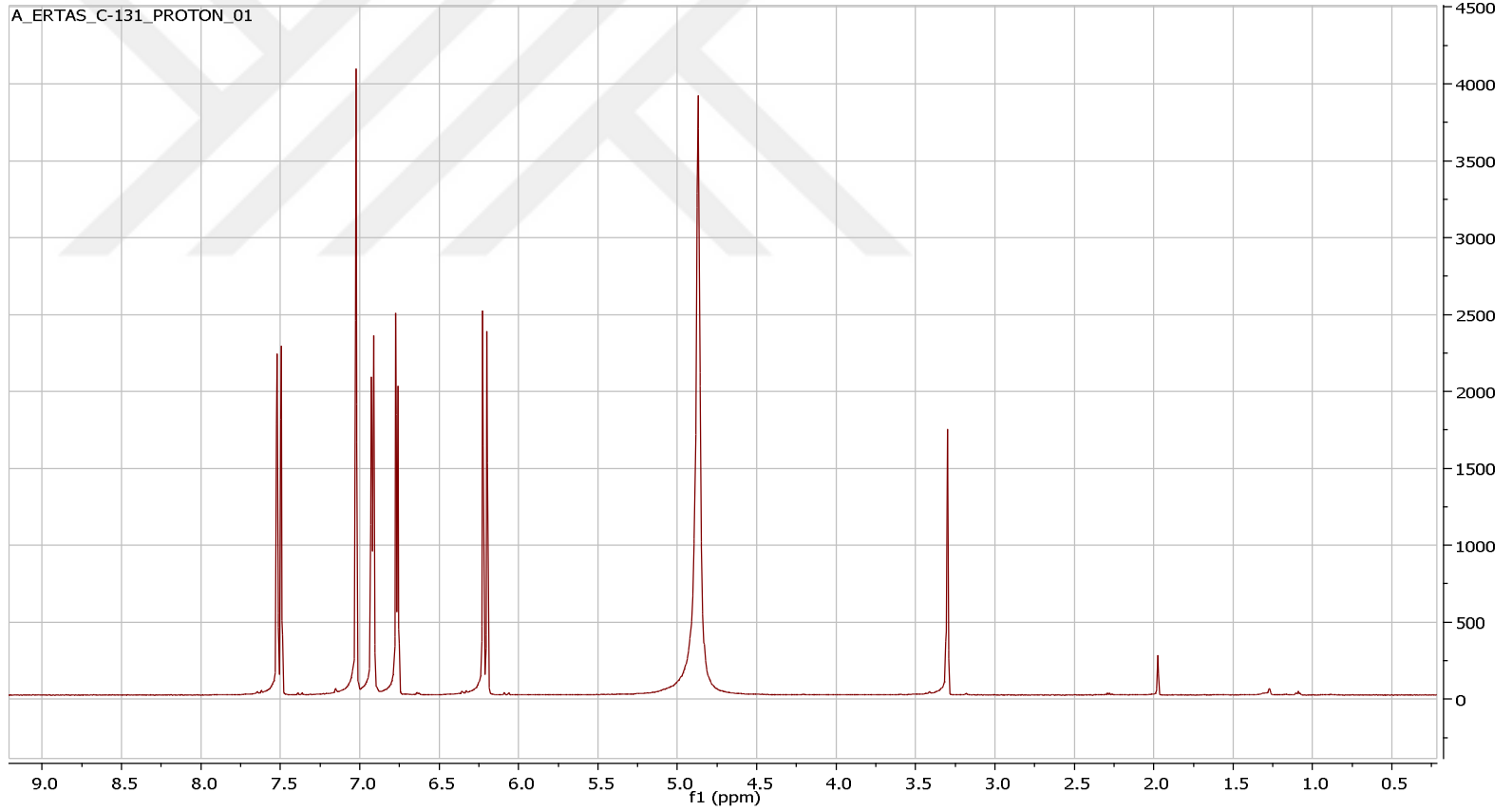
Diğer bileşiklerin aksine türün kök kısımlarının etanol ekstrelerinden preparatif HPLC ile elde edildi. Beyaz katı halinde 72 mg olarak elde edilmiştir (Şekil 40). $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (CD_3OD , 600 MHz) δ 7,02 brs, 6.77 d ($J=7.8$ Hz), 6.92 d ($J=7.8$ Hz), 7.51 d ($J=15.6$ Hz) ve 6.23 d ($J=15.6$ Hz) ppm'de sinyalleri izlendi. APT (CD_3OD , 150 MHz) spektrumunda çift bağ bölgesinde, δ 116.6, 122.9, 146.8 ve 115.2 ppm'de karbon sinyalleri izlendi. Ayrıca δ 128.04, 146.9 ve 149.5 ppm'de 3 adet katerner karbon ve δ 171.4 ppm'de karbonil katerner karbonu izlendi. LC-MS-IT-TOF ile elde edilen kütle spektrumunda izlenen m/z 179.0332 $[\text{M-H}]^-$ piki $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$ kapalı formülünü önerdi. $^1\text{H-}$ ve APT spektrumları birlikte değerlendirildiğinde bu bileşiğin kaffeik asit olduğu doğrulandı. Tablo 32'de bu bileşiğin ^1H ve ^{13}C NMR değerleri verildi (Şekil 41-44).



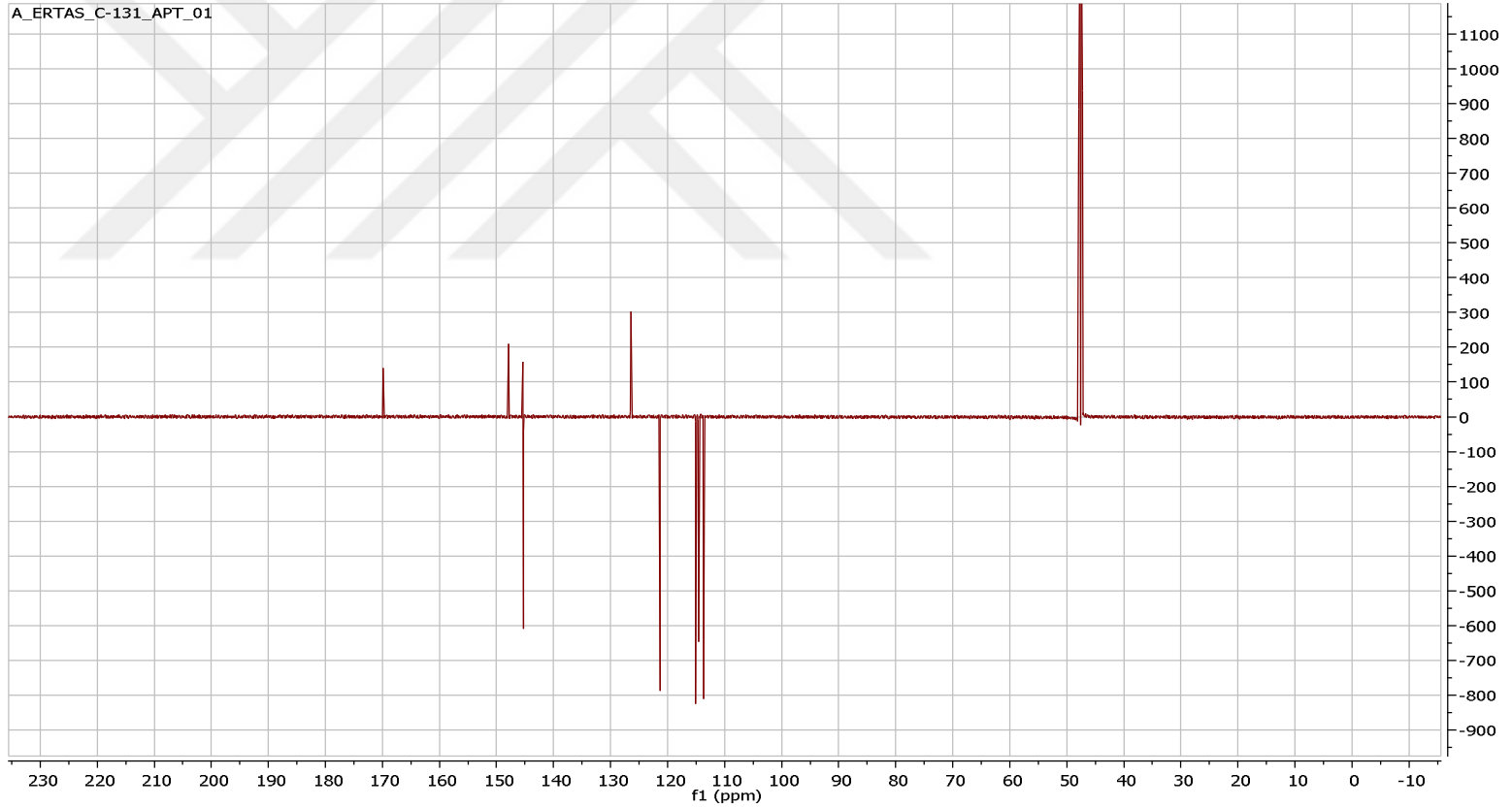
Şekil 40. Kaffeik asit

Tablo 32. Kaffeik asit bileşiğinin NMR değerleri

Pozisyon	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$
1	128.04	-
2	116.1	7,02 brs
3	146.9	-
4	149.5	-
5	116.6	6.77 d ($J=7.8$ Hz)
6	122.9	6.92 d ($J=7.8$ Hz)
7	146.8	7.51 d ($J=15.6$ Hz)
8	115.2	6.23 d ($J=15.6$ Hz)
9	171.4	-



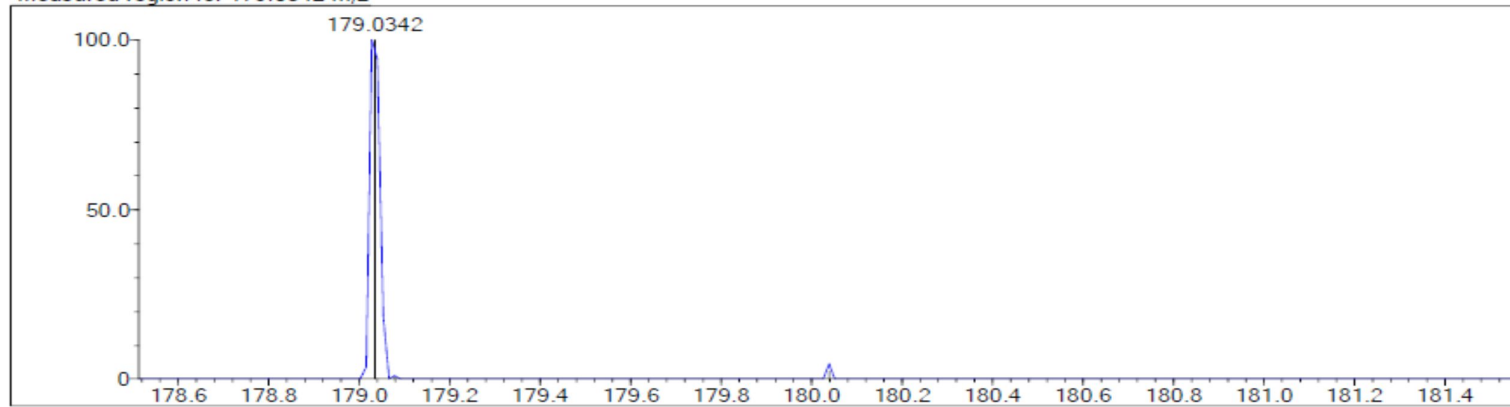
Şekil 41. Kafeik asit bileşiminin ¹H NMR spektrumu (CD₃OD, 600 MHz)



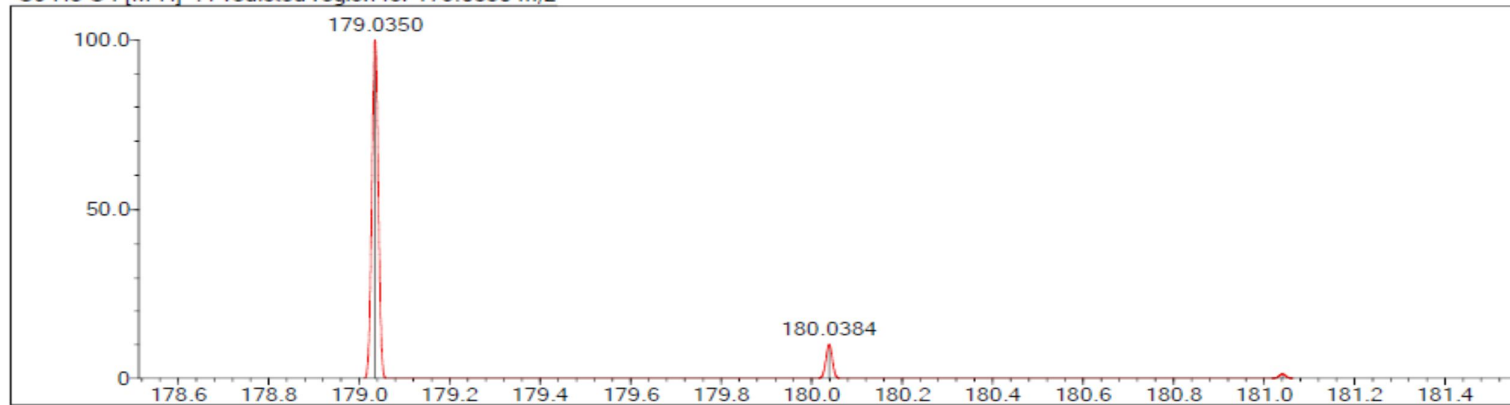
Şekil 42. Kafeik asit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)



Measured region for 179.0342 m/z



C9 H8 O4 [M-H]⁻ : Predicted region for 179.0350 m/z

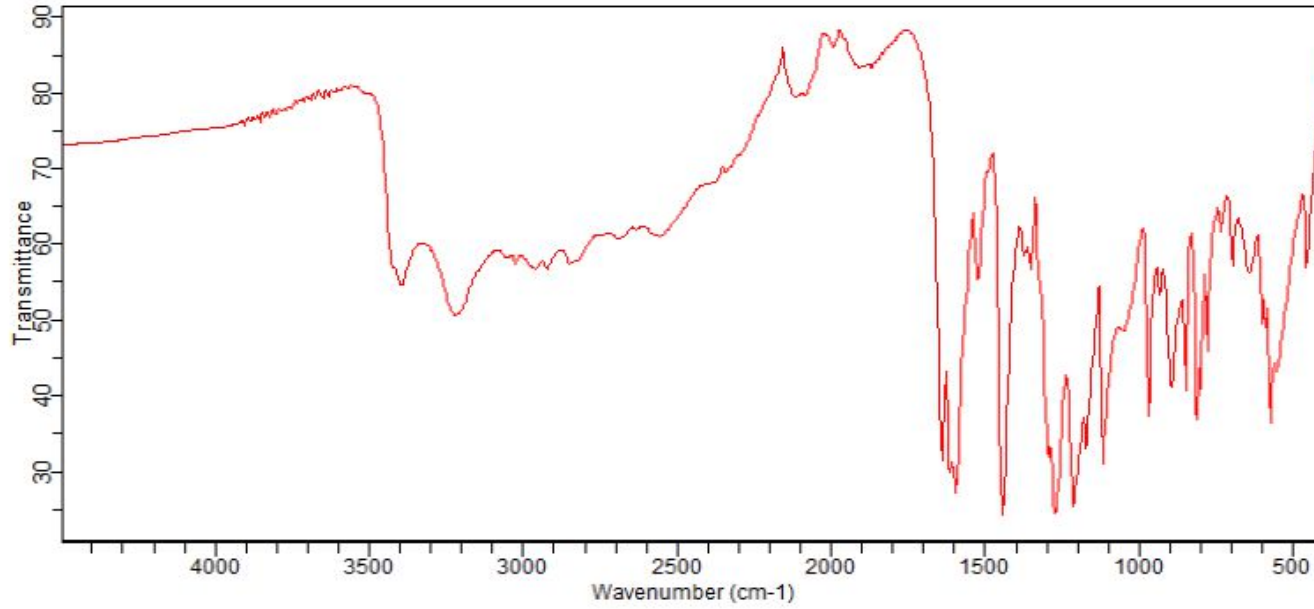


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	24.37	C9 H8 O4	[M-H] ⁻	179.0342	179.0350	-0.8	-4.47	26.69	6.0

Şekil 43. Kafeik asit bileşiminin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:C-131
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\C-131_2018-05-09T17-38-24.a2r

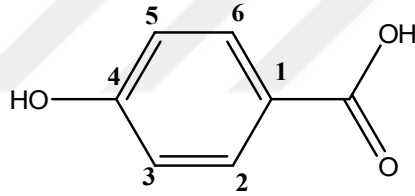
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.09.2018 5:38:24
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 44. Kaffek asit bileşiminin IR spektrumu

5.8.7. 4-Hidroksi benzoik asit

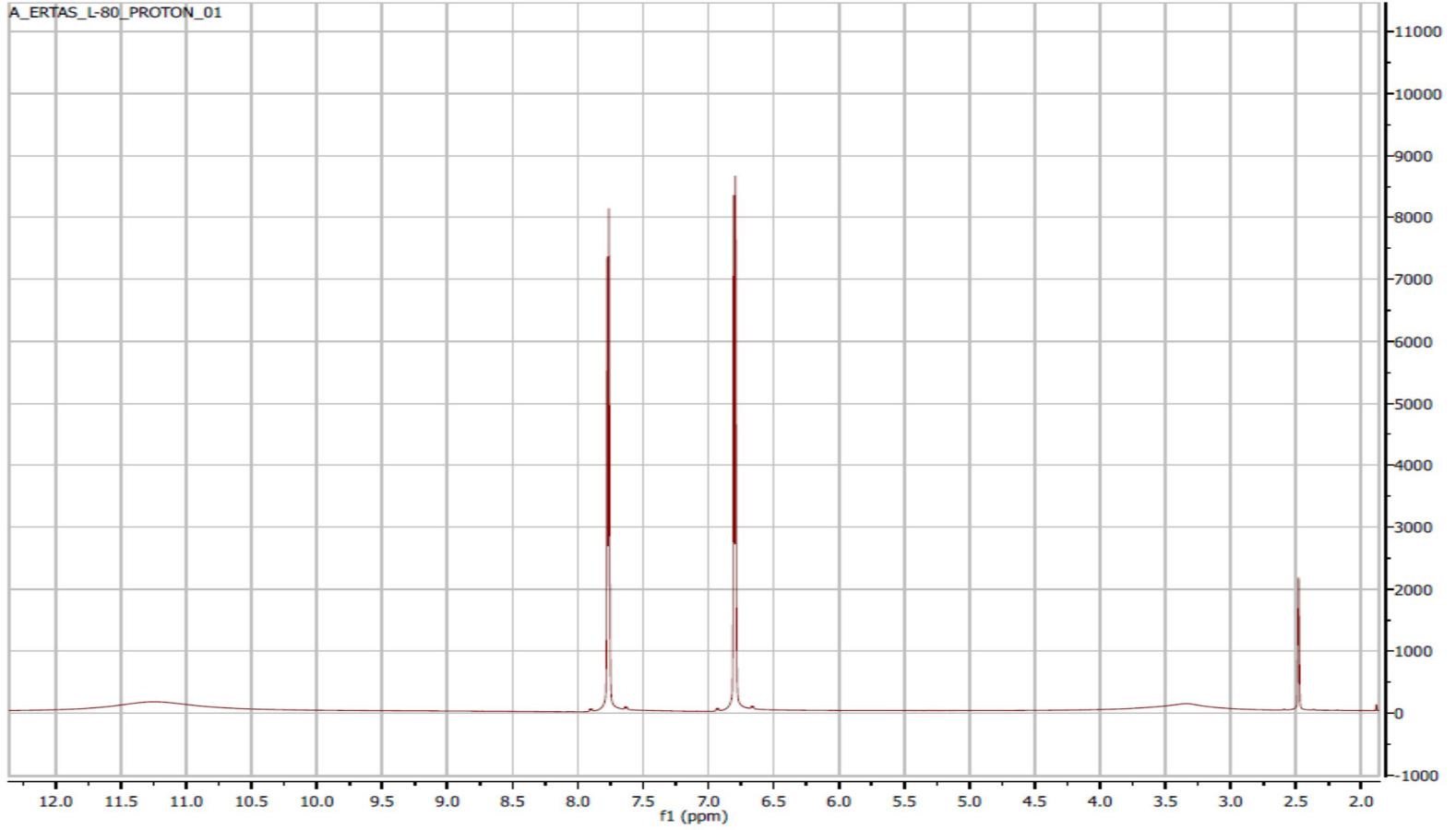
Diğer fenolik bileşiklerin aksine preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemiyle diklorometan/aseton:9.8/0.2 çözücü sisteminde elde edildi. 42 mg beyaz toz olarak elde edildi (Şekil 45). Aynı zamanda preparatif HPLC ile MeOH/Su:1/1 çözücü sisteminde de elde edildi. Hem H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) hem de C-NMR da sadece fenolik bölgede ve 11.25 ppm'de yayvan pik vermesi bileşiğin basit bir fenolik sit olacağını düşündürdü. ¹H-NMR'da 6,81 (J=7,4 Hz) ve 7,75 (J=8,2 Hz) ppm'de 2'şer protonluk pik vermesi yapının simetrik ve para konumunda –OH grubunun varlığına (2,4 ppm) işaret etmiştir. ¹H NMR sinyallerinin kayma değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen [M+HCOO]⁻ piki m/z 167,0354'e (C₇H₆O₃) dayanarak bu bileşiğin 4-hidroksibenzoik asit olduğu saptanmıştır ve NMR değerleri (Tablo 33) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (Şekil 46-49).



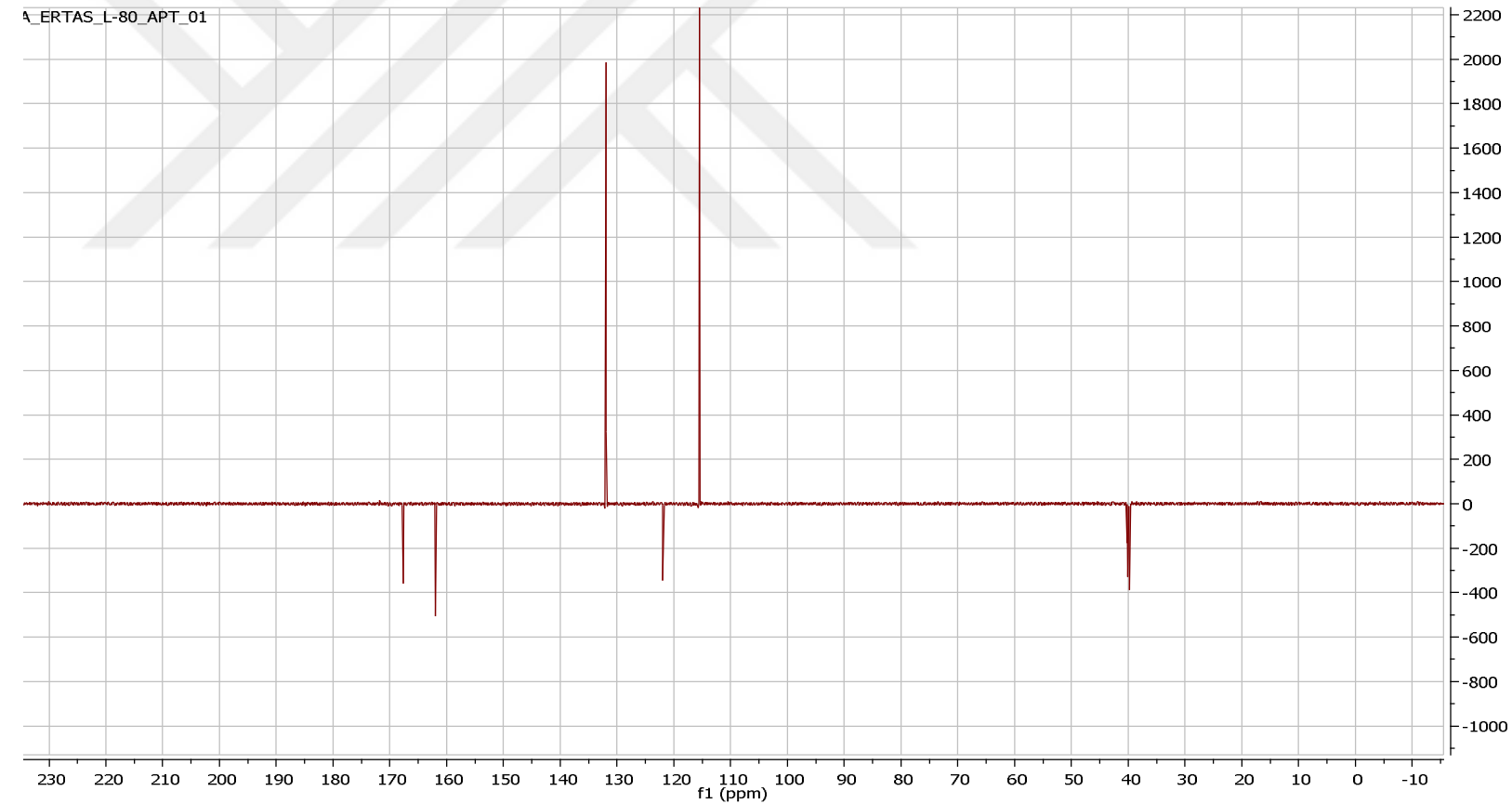
Şekil 45. 4-Hidroksi benzoik asit

Tablo 33. 4-Hidroksi benzoik asit bileşiğinin NMR değerleri

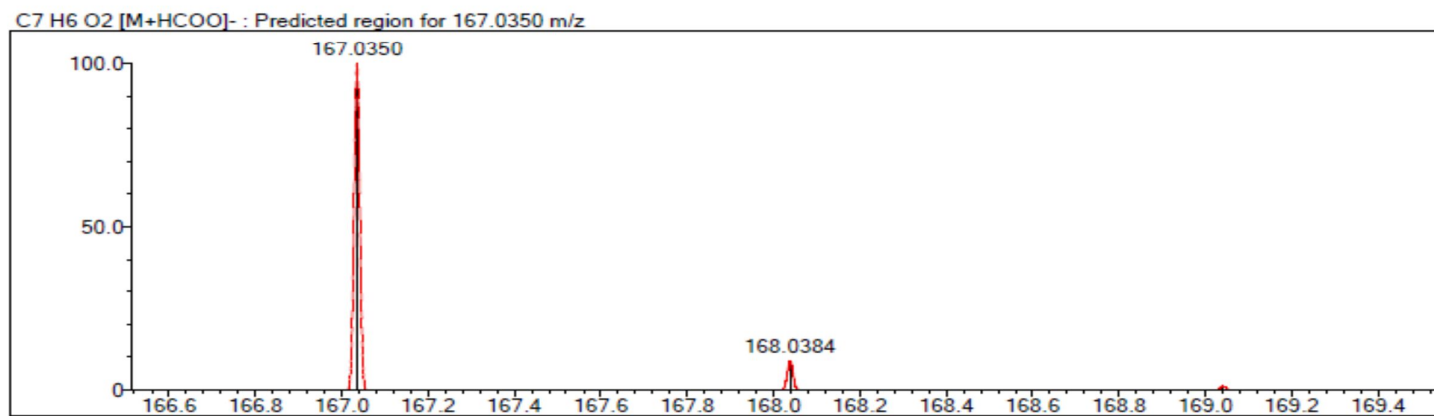
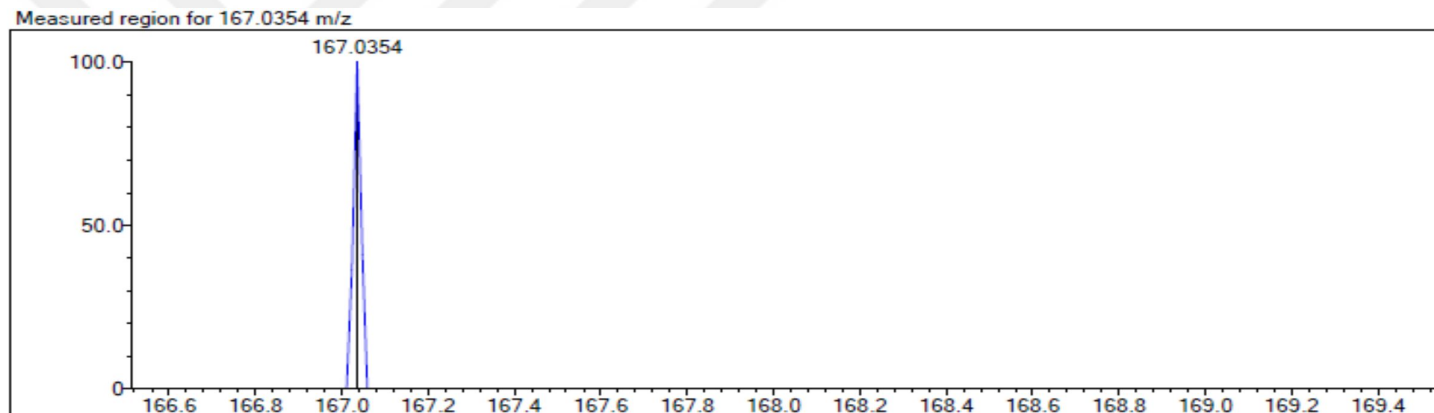
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	121,93	-
2	115,53	6,81 d (J=7,4 Hz)
3	131,93	7,75 d (J=8,2 Hz)
4	162,00	-
5	131,93	7,75 d (J=8,2 Hz)
6	115,53	6,81 d (J=7,4 Hz)
7-COOH	167,65	-



Şekil 46. 4-Hidroksi benzoik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



Şekil 47. 4-Hidroksi benzoik asit bileşğinin ¹³C NMR (APT) spektrumu (CDCl₃, 150 MHz)



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
2	0.00	C7 H6 O2	[M+HCOO] ⁻	167.0354	167.0350	0.4	2.39	0.00	5.0

Şekil 48. 4-Hidroksi benzoik asit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogram

Sample ID:L-80
Sample Scans:128

Background Scans:128
Resolution:8

System Status:Good

File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\L-80_2018-05-09T13-10-57.a2r

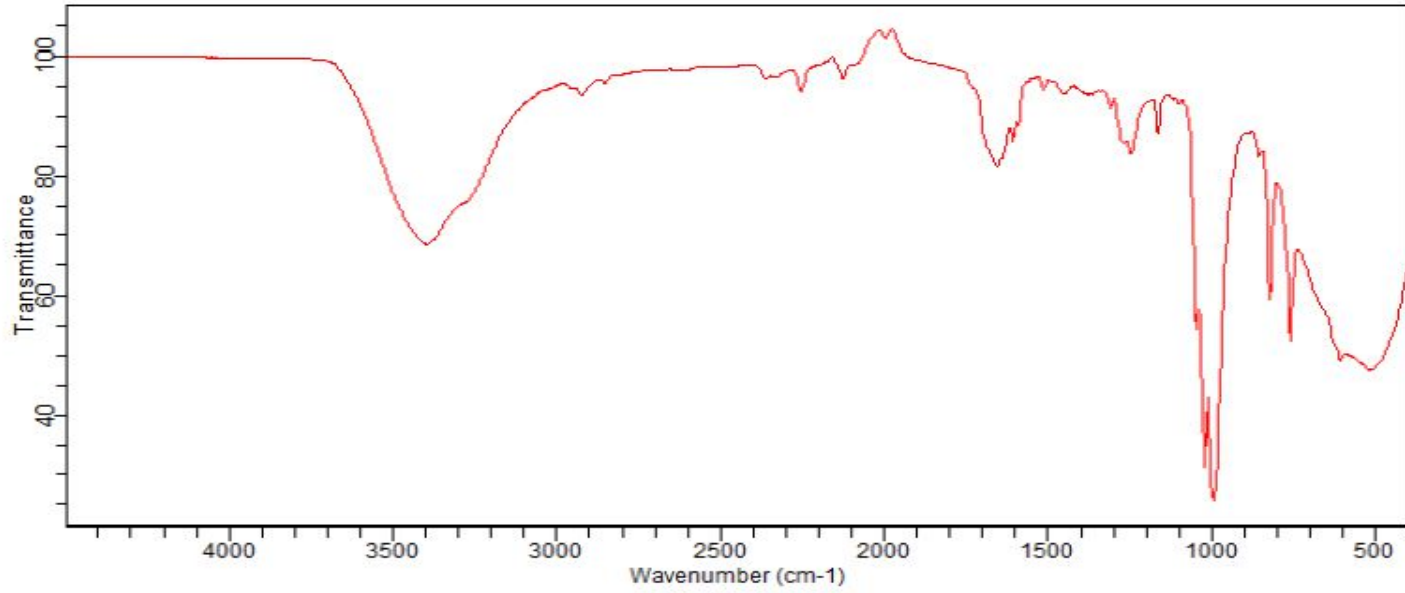
Method Name:zeynep

User:Admin

Date/Time:05.09.2018 1:10:57

Range:4500 - 400

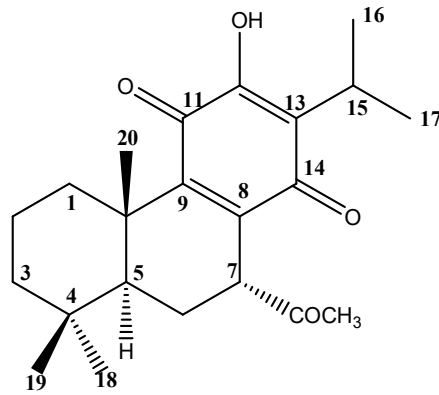
Apodization:Triangular



Şekil 49. 4-Hidroksibenzoik asit bileşiğinin IR spektrumu

5.8.8. 7-Asetil royleanon

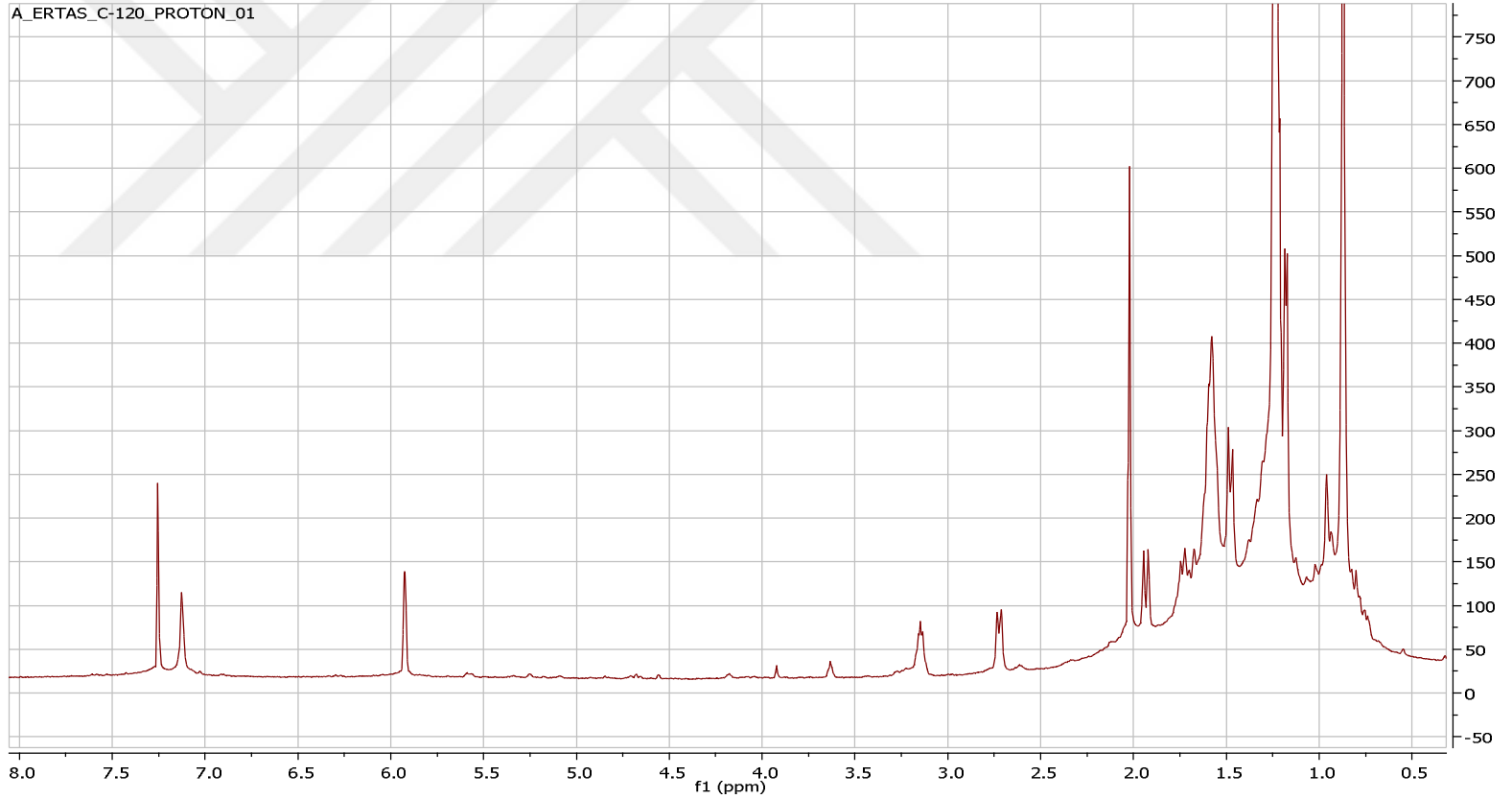
Türün hem toprak altı hemde toprak üstü etanol ekstrelerinden preparatif ince tabaka kromatografisi (Çözücü sistemi Petrol eteri/Diklorometan: 1:2) ile elde edildi (Şekil 50). Özellikle toprak altı etanol ekstresinde 6,7-dehidroroyleanon gibi daha yüksek miktarda olduğu belirlendi. Turuncu kristal şeklinde elde edildi. Silika jel plakta UV lamba altında (254nm) kızıl kahverenkli görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında kahverengi renk aldı. ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz ve 400MHz) spektrumunda karakteristik olarak beş metil sinyali (0,87, 0,88, 1,21, 1,21 ve 1,22) sinyalinin izlendi. Bunlardan 1.21 deki metil sinyallerinin 7,5 Hz lik dubletler halinde ve 3.15 ppm de bir ise metin protonun septet ($J=6,8$ Hz, H-15) halinde izlenmesi yapıda bir isopropil grubunun varlığını gösterdi, bu sinyaller yapının abietan bir diterpen olabileceğine işaret etmiş, fakat herhangi bir aromatik proton sinyali izlenmemesine rağmen 7.21 ppm deki geniş singletin aromatik bir OH varlığını düşündürdü. Karakteristik H-1 metilen pikleri 2,73 ppm' de d ($J=12,7$ Hz) halinde izlendi. Ayrıca 5,95 ppm' de (brds, H-7) izlenen sinyal ve yanı sıra bir asetil metili 2.02 ppm de izlendi. Bu sinyaller yapıda C-7 de ki hidroksil grubunun yerine bir asetil grubunun varlığına işaret ederek yapı 7 α -asetil royleanon= 7 α -asetil-horminon (7 α -asetil-12-hidroksi-8,12-abietadiene-11,14-dion) olarak saptandı (Ulubelen vd., 1999; Hensch vd., 1975). ¹H NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen [M+H]⁺ piki 359,1695 (C₂₂H₃₀O₄) dayanarak bu bileşiğin 7 α -asetil royleanon olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 34) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (Şekil 51-55).



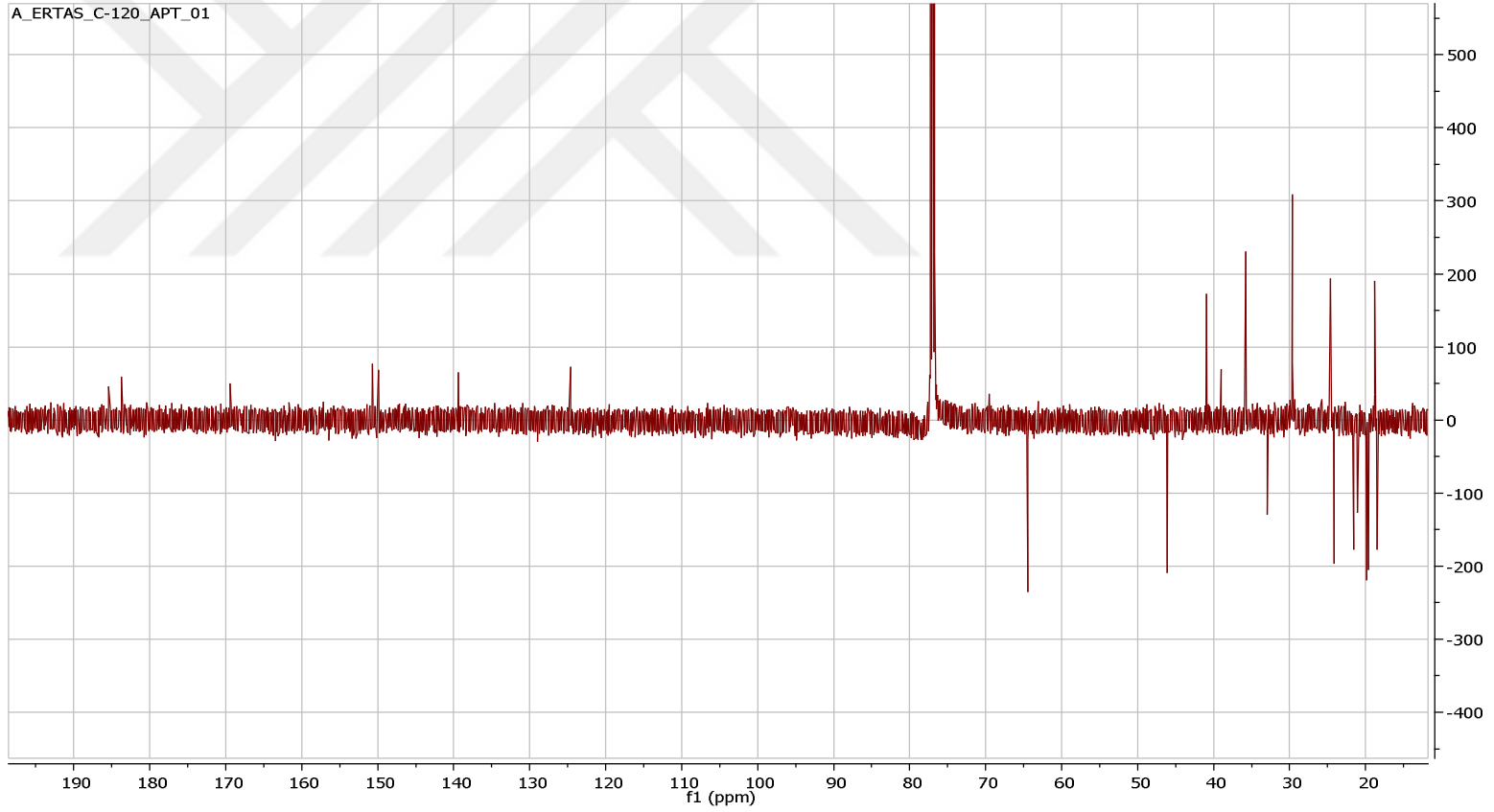
Şekil 50. 7-Asetil royleanon

Tablo 34. 7-Asetil royleanon Bileşğinin NMR Değerleri

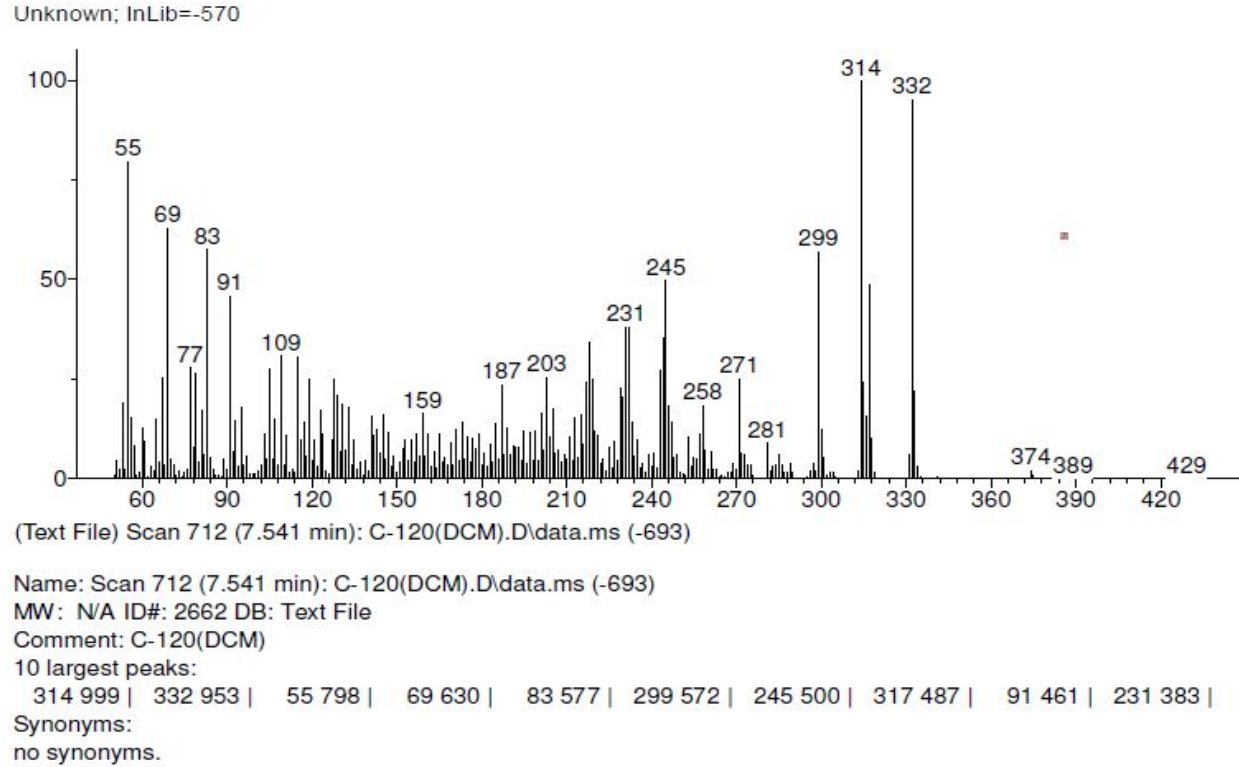
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	35,2	2,73 d (J=12,7 Hz)
2	18,7	-
3	29,7	-
4	39,0	-
5	21,0	-
6	35,7	1,92 d (J=14,5 Hz)
7	64,4	5,95 dd
8	149,9	-
9	139,4	-
10	41,0	-
11	183,7	-
12	150,7	-
13	124,6	-
14	185,1	-
15	32,9	3,15 sept (J=6,8 Hz)
16	19,6	1,21 d (J=7,1 Hz)
17	18,5	1,21 d (J=7,2 Hz)
18	21,5	0,87 s
19	19,8	0,88 s
20	24,6	1,22 s
7-COCH ₃	46,1	2,02
7-COCH ₃	169,8	-



Şekil 51. 7-Asetil royleanon bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)

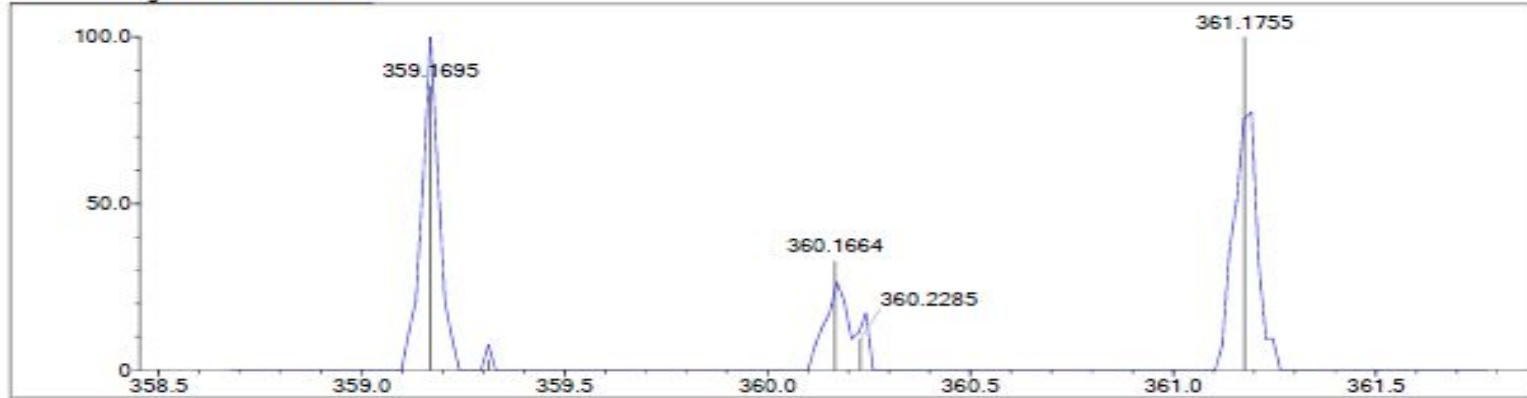


Şekil 52. 7-Asetil royleanon bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

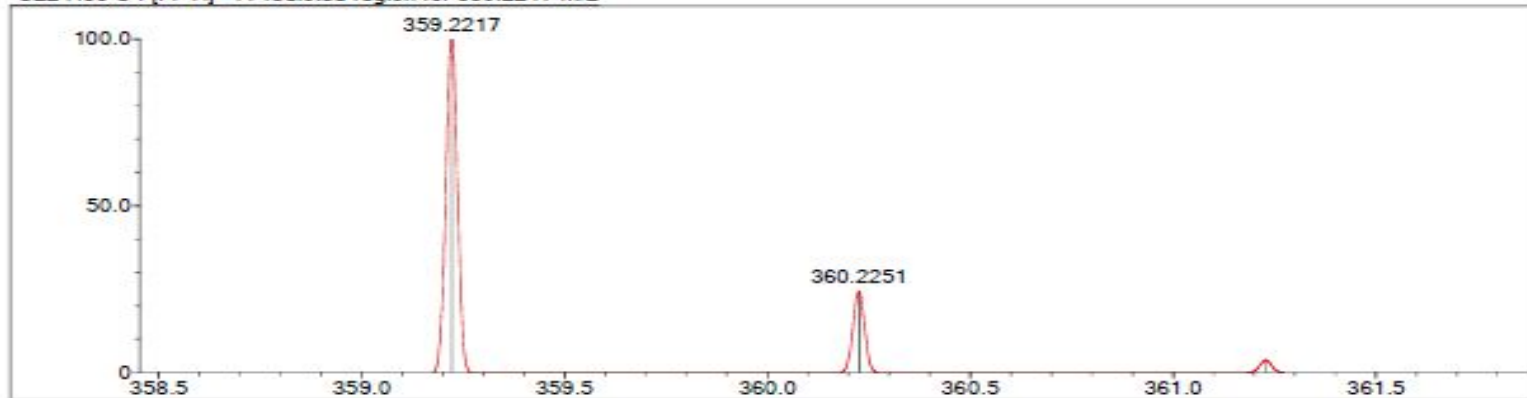


Şekil 53. 7-Asetil royleanon bileşiğinin GC-MS kromatogramı

Measured region for 359.1695 m/z



C22 H30 O4 [M+H]⁺ : Predicted region for 359.2217 m/z

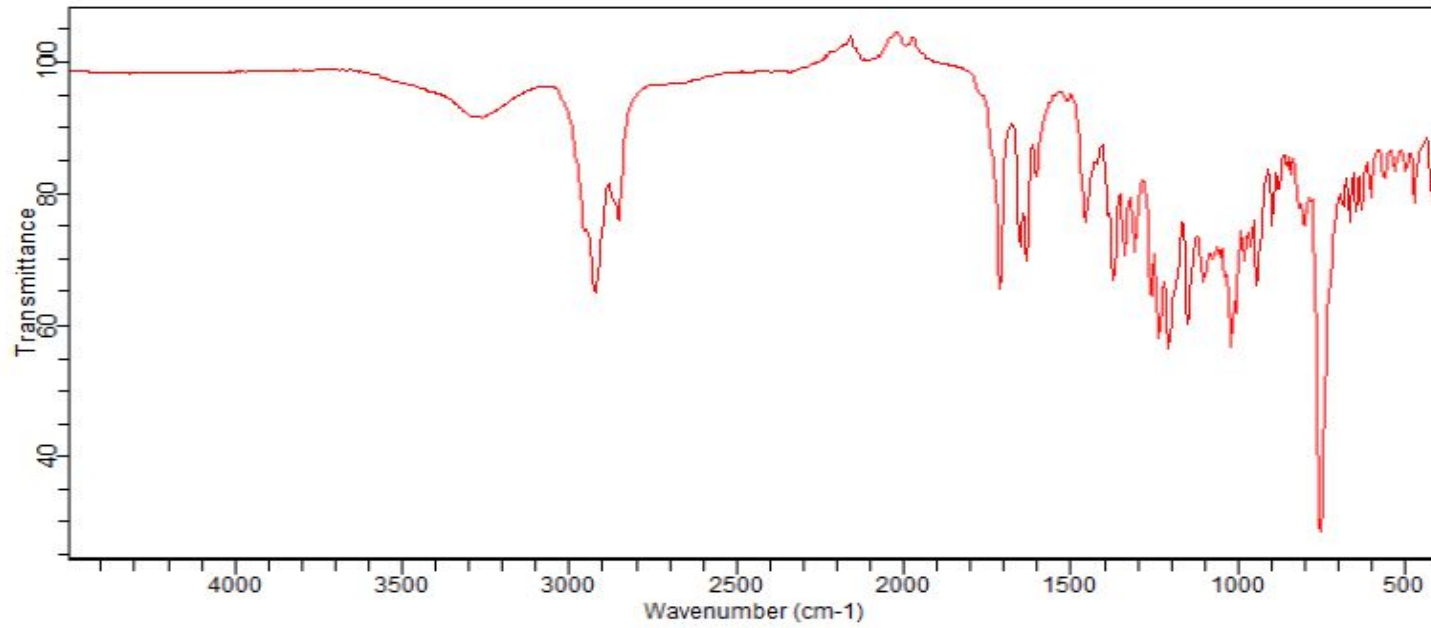


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
26	0.00	C22 H30 O4	[M+H] ⁺	359.1695	359.2217	-52.2	-145.34	0.00	8.0

Şekil 54. 7-Asetil royleanon bileşiminin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:C-120
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\C-120_2018-05-09T17-43-47.a2r

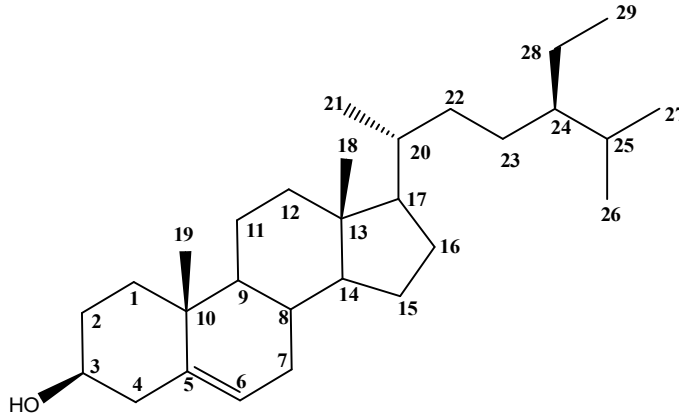
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.09.2018 5:43:47
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 55. 7-Asetil royleanon bileşğinin IR spektrumu

5.8.9. β -Sitosterol

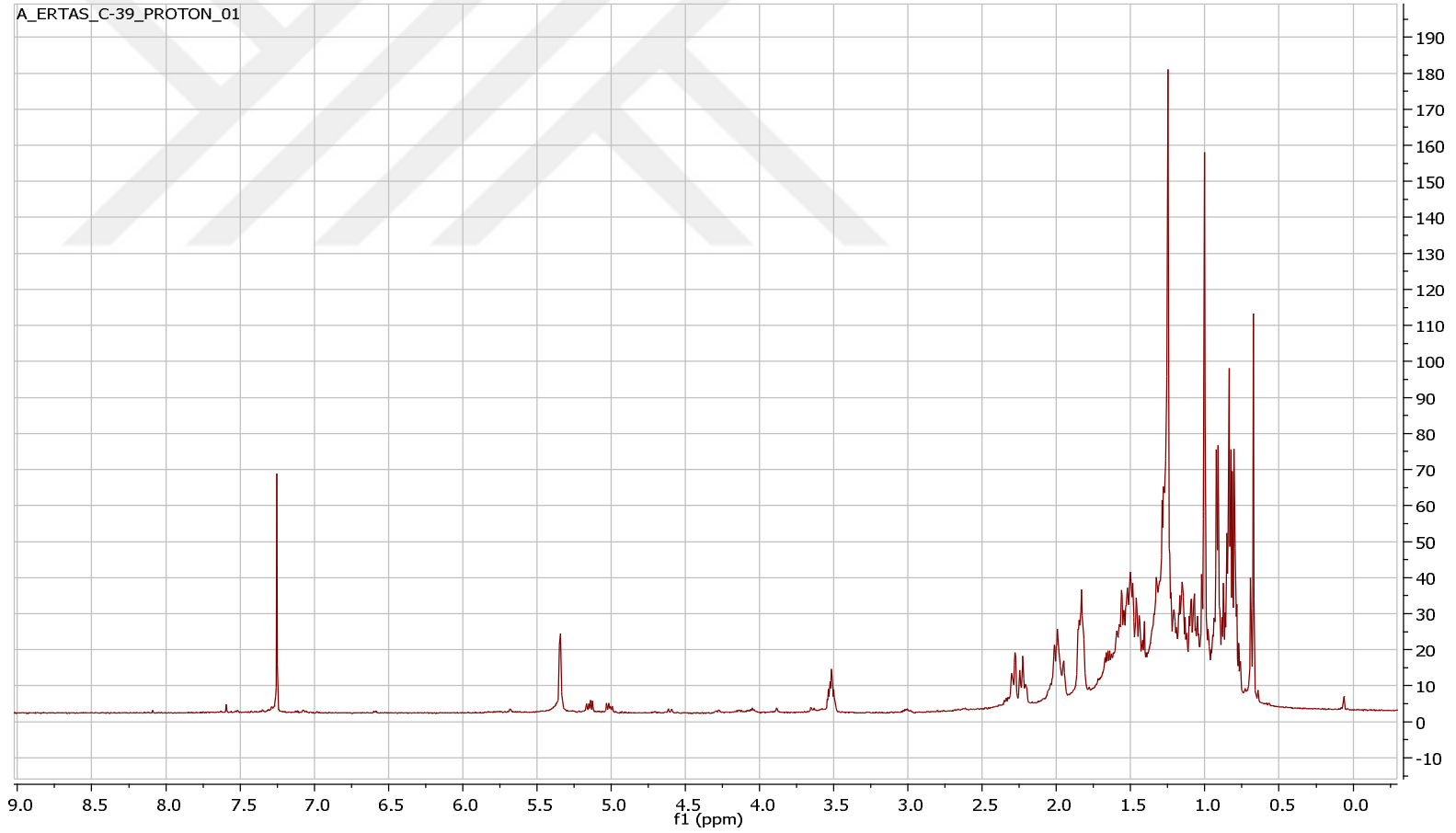
Hem toprak üstü hemde toprak altı etanol ekstrelerinden elde edildi. Fraksiyonlar preparatif ince tabaka kromatografisi yapıldıktan sonra DCM:AC 9.8/0.2 çözücü sisteminde İTK'sı yapıldı. Renksiz olan bu bileşik 172 mg olarak elde edildi (Şekil 56). Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında önce turkuaz sonra çok karakteristik kahverengi kırmızı bir renk aldı. ^1H NMR (CDCl_3 , 600, 400 ve 300 MHz) spektrumunda δ 0.67 (3H, s, Me-18), 0.81 (3H, d, $J=6,9$ Hz, Me-27), 0.83 (3H, d, $J=7.1$ Hz, Me-26), 0.85 (3H, t, $J=7,81$ Hz, Me-29), 0.92 (3H, d, $J=6,4$ Hz, Me-21) ve 1.0'de (3H, s, Me-19) izlenen metil sinyalleri bileşiğin steroidal bir iskelete sahip olduğu izlenimini verdi. δ 3.52'de (1H, *m*, H-3 α) izlenen proton sinyali bileşikte bir hidroksil veya başka bir oksijenli grubun varlığına işaret etti. Yapıda bir olefinik proton ise 5.35 ppm (1H, *m*, H-6) de izlendi. ^1H NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen $[\text{M}+\text{HCOO}]^-$ piki 459,3831'e ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$) dayanarak bu bileşiğin β -sitosterol (Stigmast-5-en-3-ol) olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 35) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (240). Nitekim ince tabaka kromatografisinde yapılan karşılaştırma sonucunda da standart madde ile aynı Rf değerinde ve aynı karakteristik renkte izlendi (240) (Şekil 57-63).



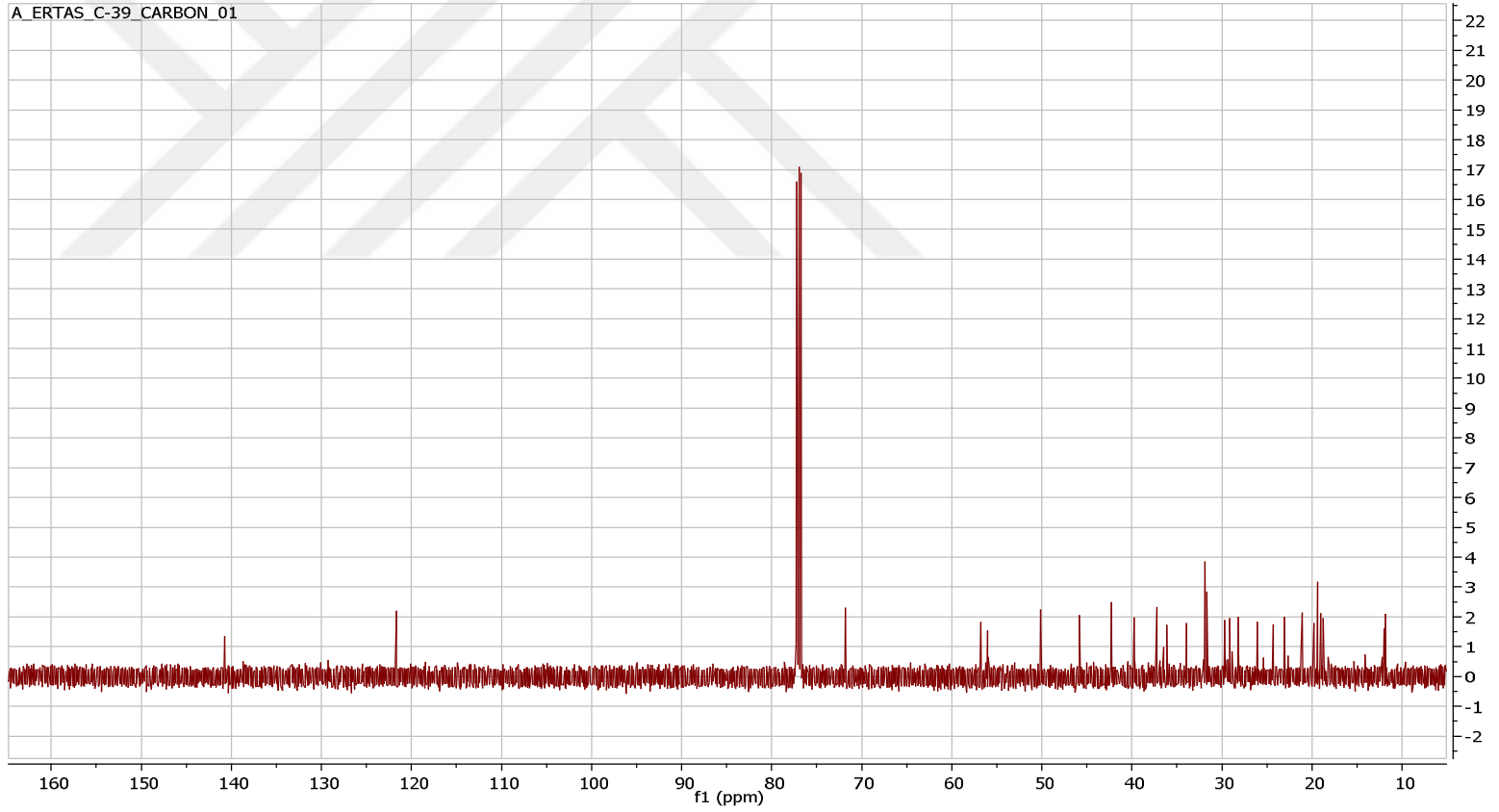
Şekil 56. β -sitosterol

Tablo 35. β -sitosterol bileşğinin NMR değerleri

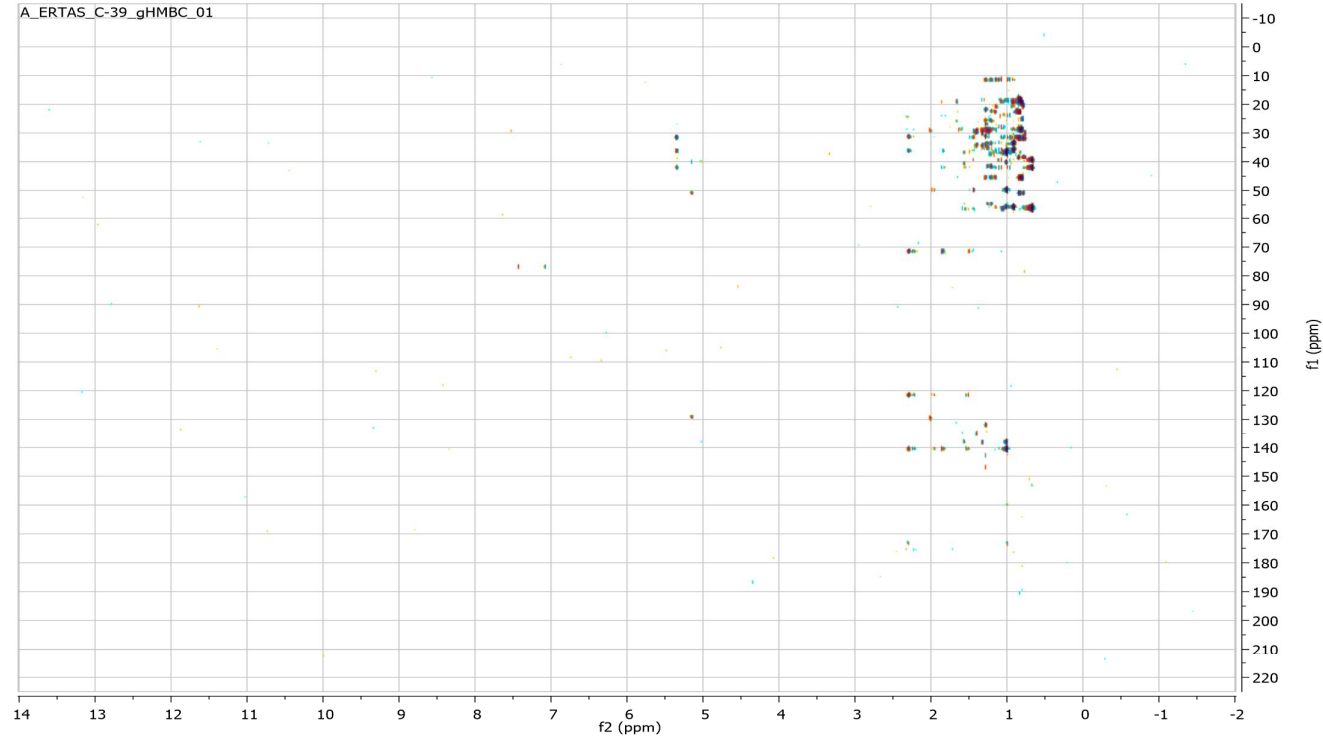
Pozisyon	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$
1	39,7	-
2	31,9	-
3	71,8	3,52 m
4	42,3	2,26 dt (J=20,1; 10,6 Hz)
5	140,7	
6	121,7	5,35 m
7	33,9	1,96 m
8	31,8	-
9	50,1	-
10	36,5	-
11	23,0	-
12	37,2	1,99 m
13	39,8	-
14	56,8	-
15	21,1	-
16	31,7	1,84 m
17	56,1	-
18	12,0	0,67 s
19	18,8	1,00 s
20	36,1	-
21	19,0	0,92 d (J=6,4 Hz)
22	26,1	-
23	28,2	-
24	45,8	-
25	29,1	-
26	19,8	0,83 d (J=7,1 Hz)
27	19,4	0,81 d (J=6,9 Hz)
28	24,3	-
29	11,8	0,85 t (J=7,8 Hz)



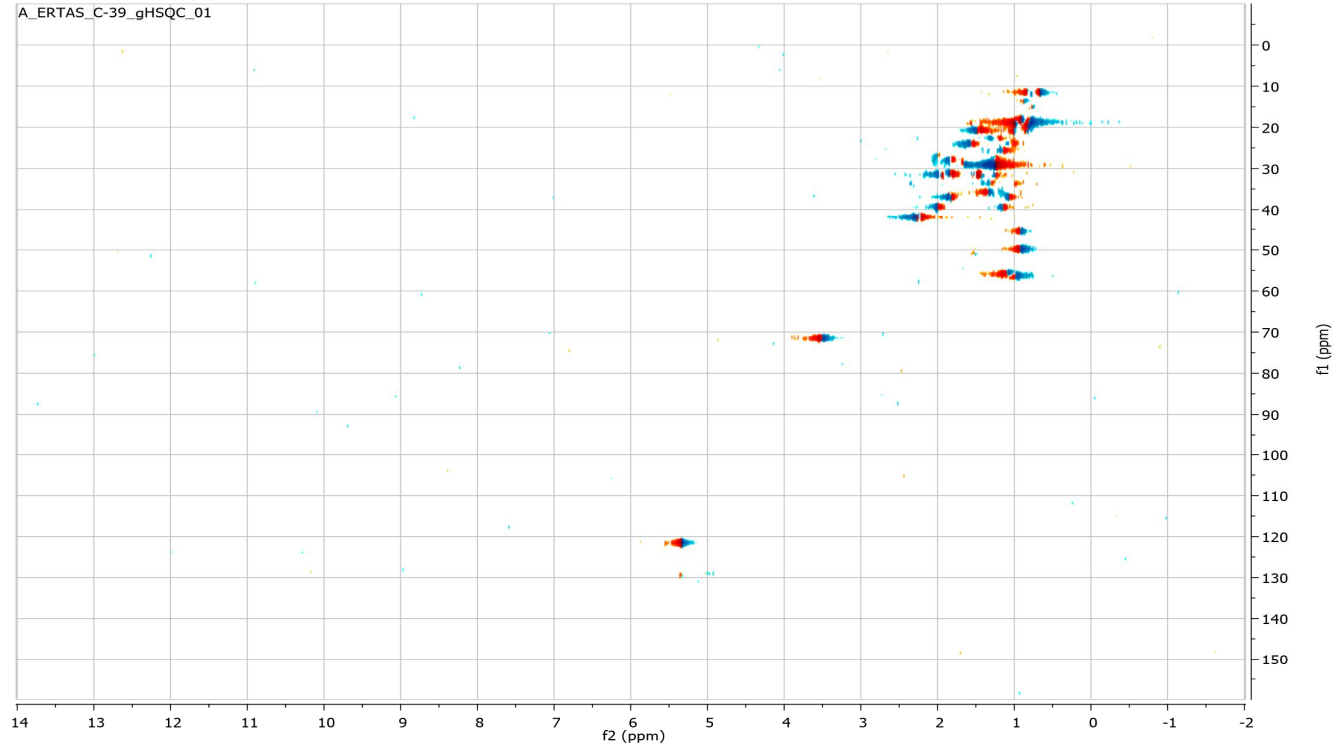
Şekil 57. β -Sitosterol bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



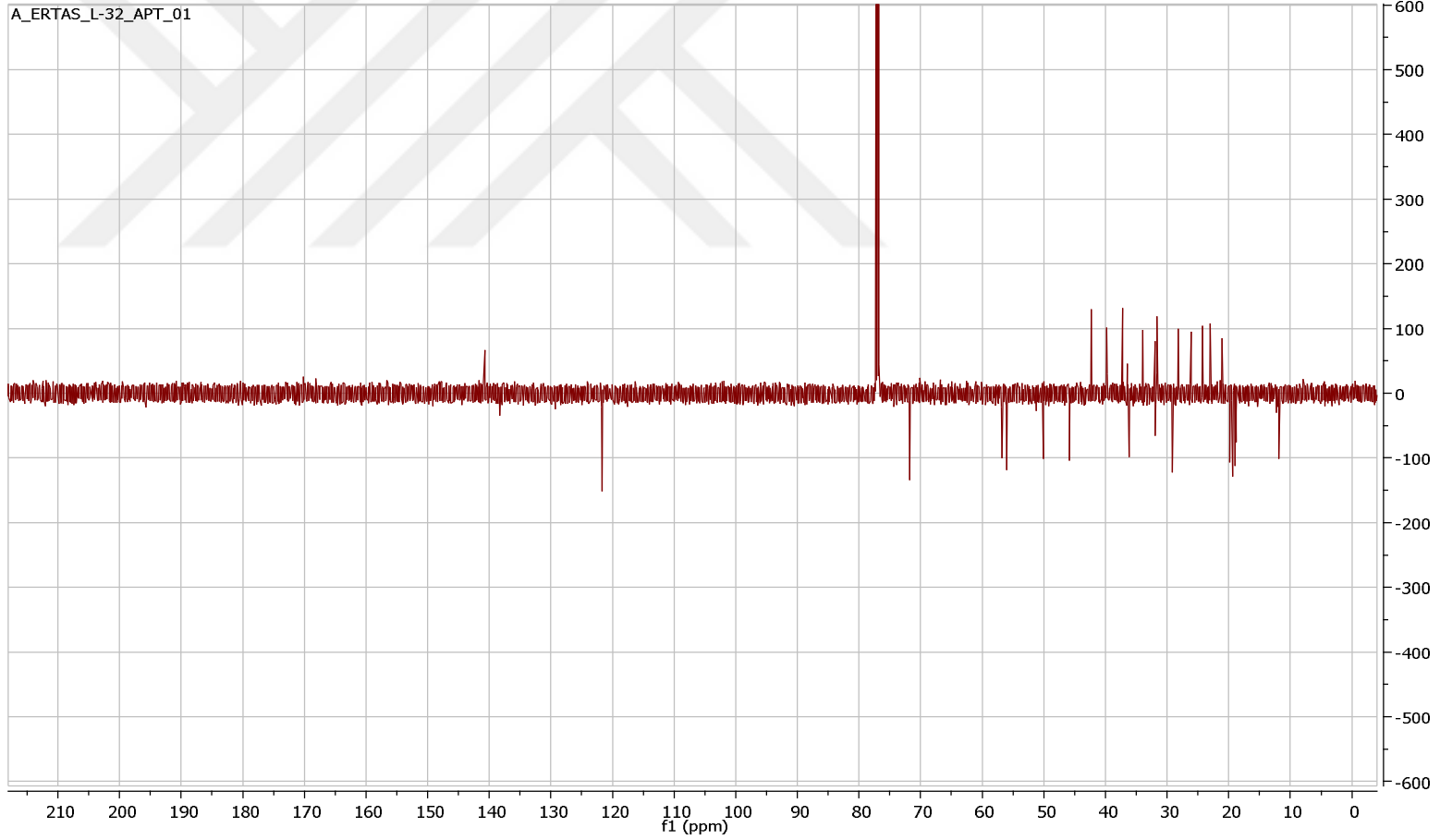
Şekil 58. β -Sitosterol bileşiminin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)



Şekil 59. β -Sitosterol bileşiğinin HMBC spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



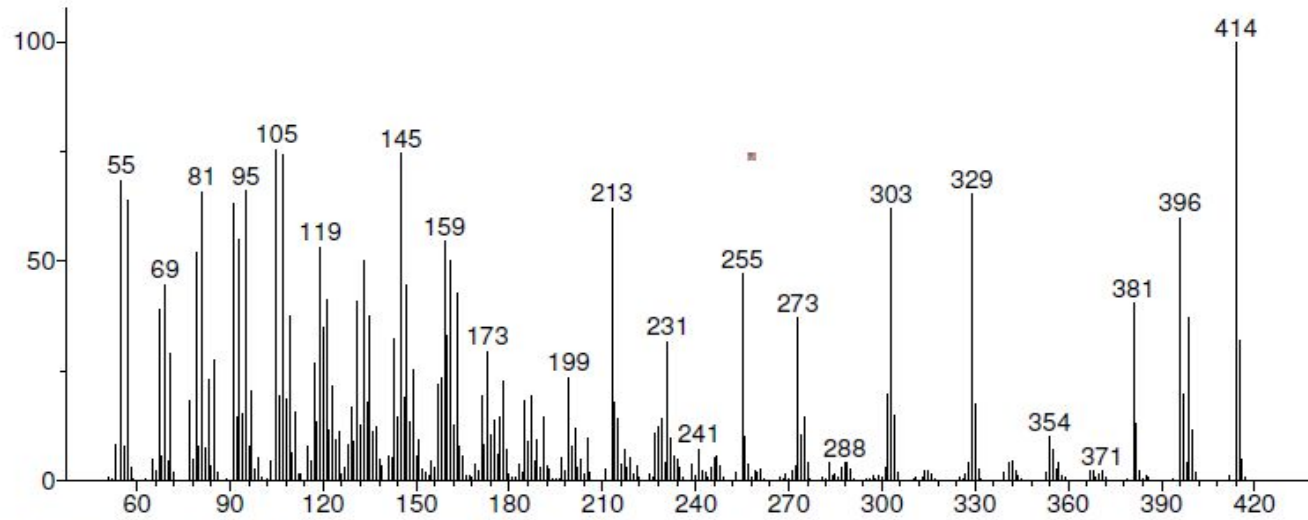
Şekil 60. β -Sitosterol bileşiminin HMQC spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



Şekil 61. β -Sitosterol bileşiğinin APT spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)



Unknown; InLib=471



(Text File) Scan 3123 (25.622 min): C-39(DCM).D\data.ms (-3106)

Name: Scan 3123 (25.622 min): C-39(DCM).D\data.ms (-3106)

MW: N/A ID#: 2088 DB: Text File

Comment: C-39(DCM)

10 largest peaks:

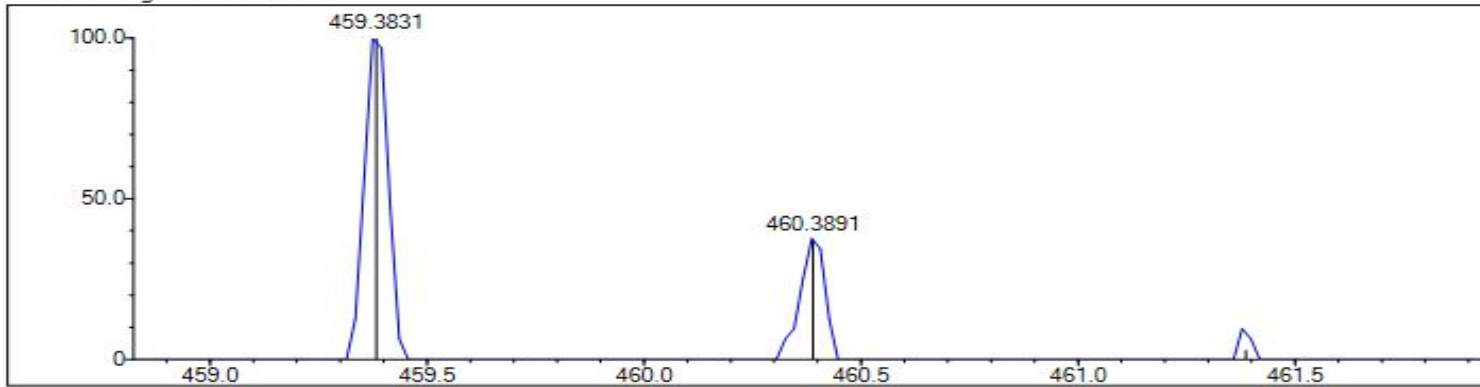
414 999 | 105 757 | 145 747 | 107 742 | 55 685 | 95 661 | 81 659 | 329 654 | 57 637 | 91 630 |

Synonyms:

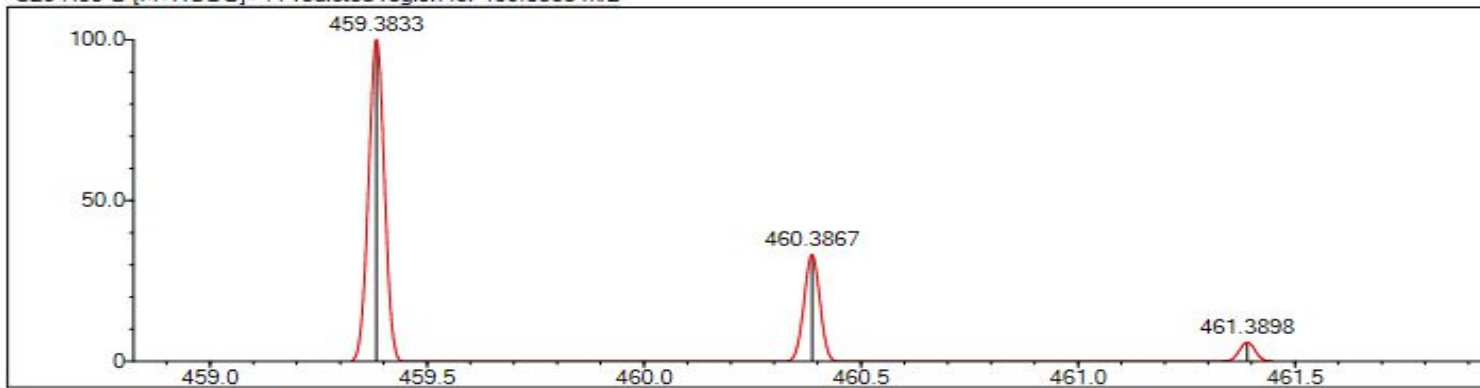
no synonyms.

Şekil 62. β -Sitosterol bileşiğinin GC-MS kromatogramı

Measured region for 459.3831 m/z



C29 H50 O [M+HCOO]⁺ : Predicted region for 459.3833 m/z

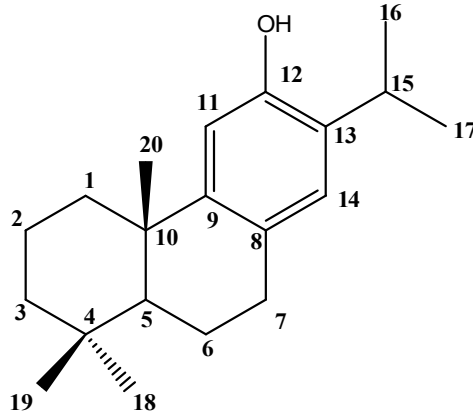


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	76.58	C29 H50 O	[M+HCOO] ⁺	459.3831	459.3833	-0.2	-0.44	76.58	5.0

Şekil 63. β -Sitosterolbileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.10. Ferruginol

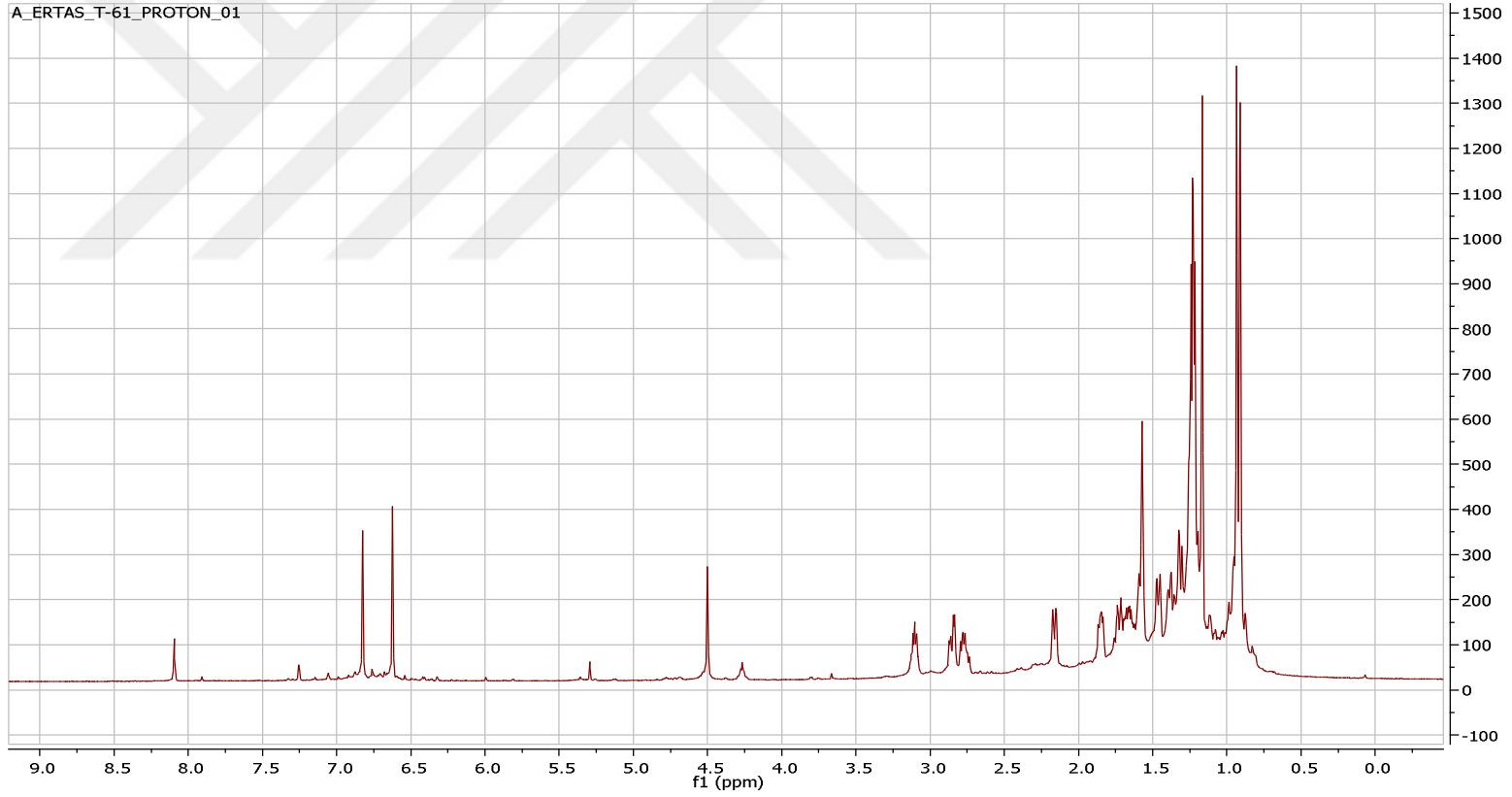
Hem toprak üstü hemde toprak altı kısımlarının etanol ekstratlarından elde edildi. Preparatif ince tabaka kromatografisi ile DCM:AC 9.8/0.2 çözücü sisteminde yaklaşık 80 mg elde edildi (Şekil 64). Özellikle Elazığ'dan toplanan 3 türde daha fazla bulunduğu gözlemlendi. ¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 600MHz ve 400 MHz) üç metil sinyali 0,91, 0,93 ve 1,17 ppm de singletler halinde ve iki metil sinyali dubletler halinde 1,21 ve 1,24 ppm de izlendi. Aslında iki dublet metil protonlarına ait sinyaller birbirine çok yakın rezonans olduklarından triplet şeklinde görüldü. Spektrumda 3,10 ppm de izlenen metin sinyalinin bu iki metil dubleti ile yaptığı etkileşim sonucu septet şeklinde izlenmesiyle bir isopropil grubunun varlığı anlaşıldı. 6,62 ve 6,83 ppm de izlenen singlet sinyalleri halkada bir aromatikliğin varlığını kuvvetlendirdi. ¹H NMR'da diğer karakteristik sinyaller 2,8 ppm civarında izlenmiştir. Bunlardan 2,85 ppm' de izlenen ddd ($J=1,8;7;17$ Hz) ve 2,77 ppm de multipl benzilik metilen (CH₂-7) proton çiftine işaret etti. Kütle spektrumunda moleküler piki kapalı formülü olan (C₂₀H₃₀O) ye karşılık gelen m/z 286 da izlendi, tüm spektral verileri göz önüne alınarak yapının *Salvia* türlerinde yaygın ve biyolojik aktivitesi yüksek bir abietan diterpen olan ferruginol olduğu belirlendi (67). Tablo 36'da ferruginol'ün ¹H ve ¹³C NMR değerleri verildi (Şekil 65-70).



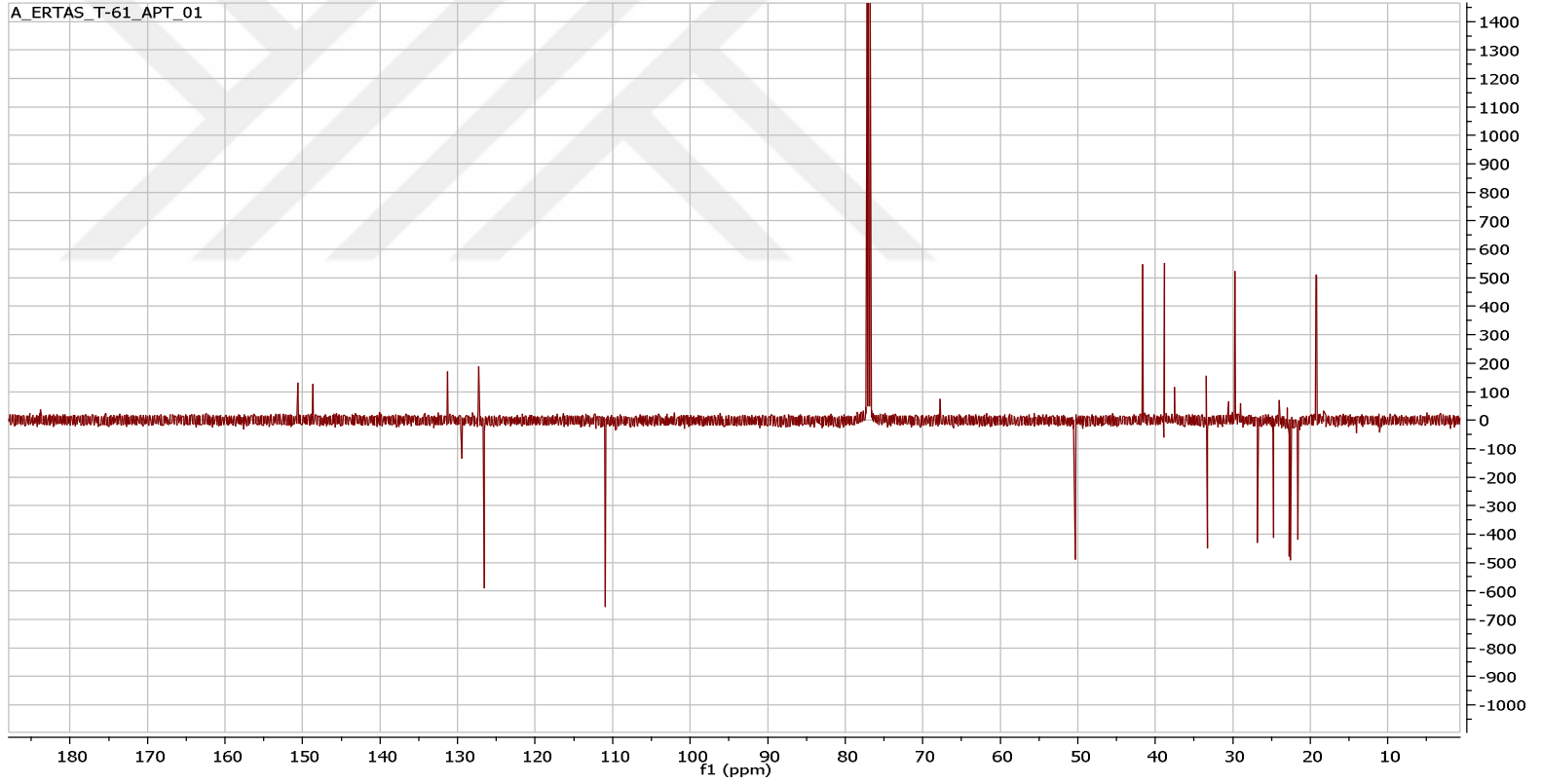
Şekil 64. Ferruginol

Tablo 36. Ferruginol bileşiminin NMR değerleri

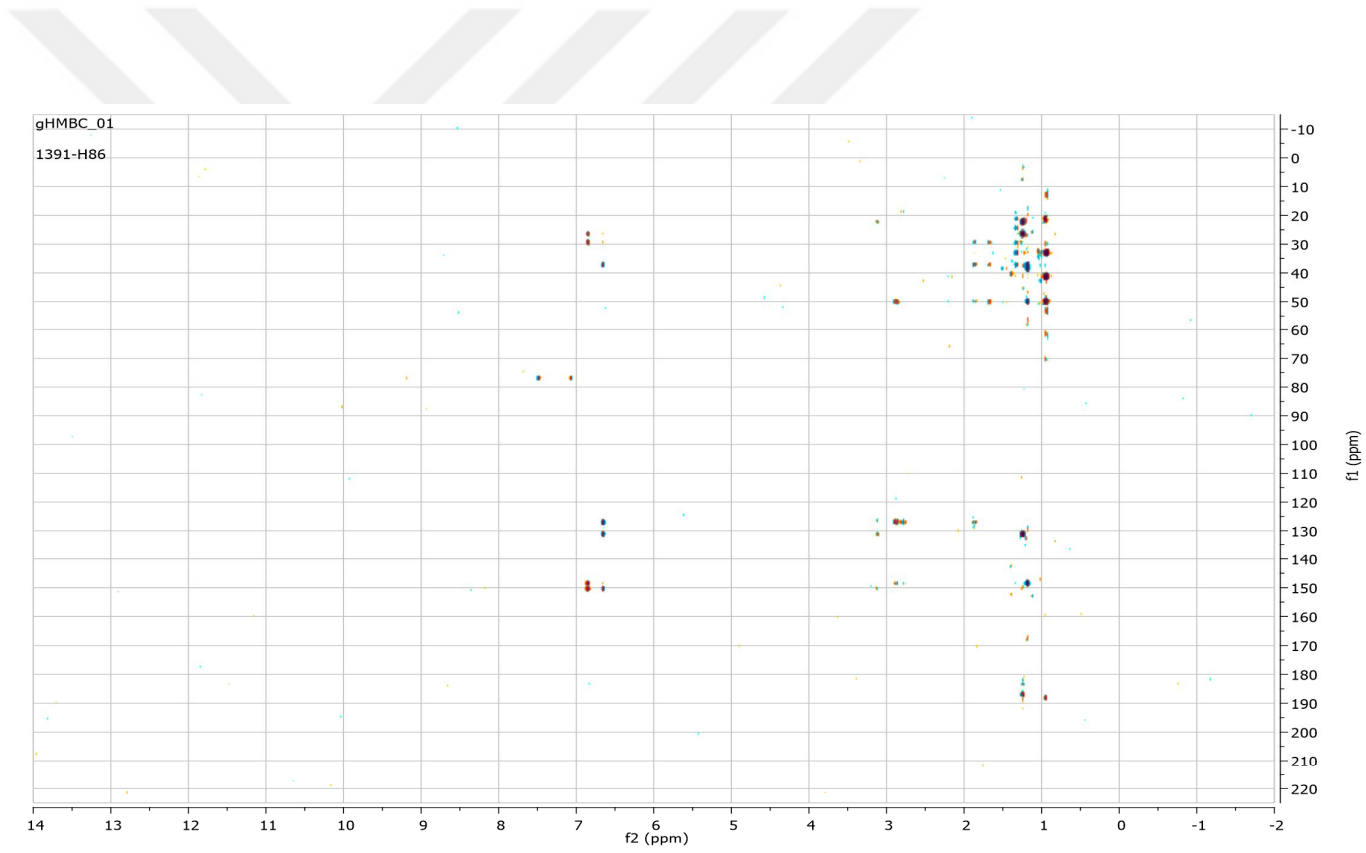
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	38,9	a 1,37 m b 2,16 dt (J=12,5; 4,0; 1,0 Hz)
2	19,3	a 1,73 ddd (J=13,7; 6,5; 3,0 Hz) b 1,59 ddd (J=14,0; 10,0; 3,2 Hz)
3	41,6	a 1,19 m b 1,46 ddd (J=12,46; 3,5; - Hz)
4	33,3	-
5	50,3	a 1,31 dd (J=12,5; - Hz)
6	19,1	a 1,85 ddd (J=17,0; 6,0; 3,5 Hz) b 1,65 m
7	29,7	a 2,76 ddd (J=17,0; 11,0; 7,8 Hz) b 2,85 ddd (J=17,0; 6,2; - Hz)
8	127,2	-
9	148,6	-
10	37,4	-
11	110,9	6,62 s
12	150,6	-
13	129,5	-
14	126,6	6,83 s
15	26,8	-
16	22,7	1,24 d (J=7,1 Hz)
17	22,5	1,21 d (J=7,1 Hz)
18	33,3	0,93 s
19	21,6	0,91 s
20	24,8	1,17 s
12-OH	-	4,50 s



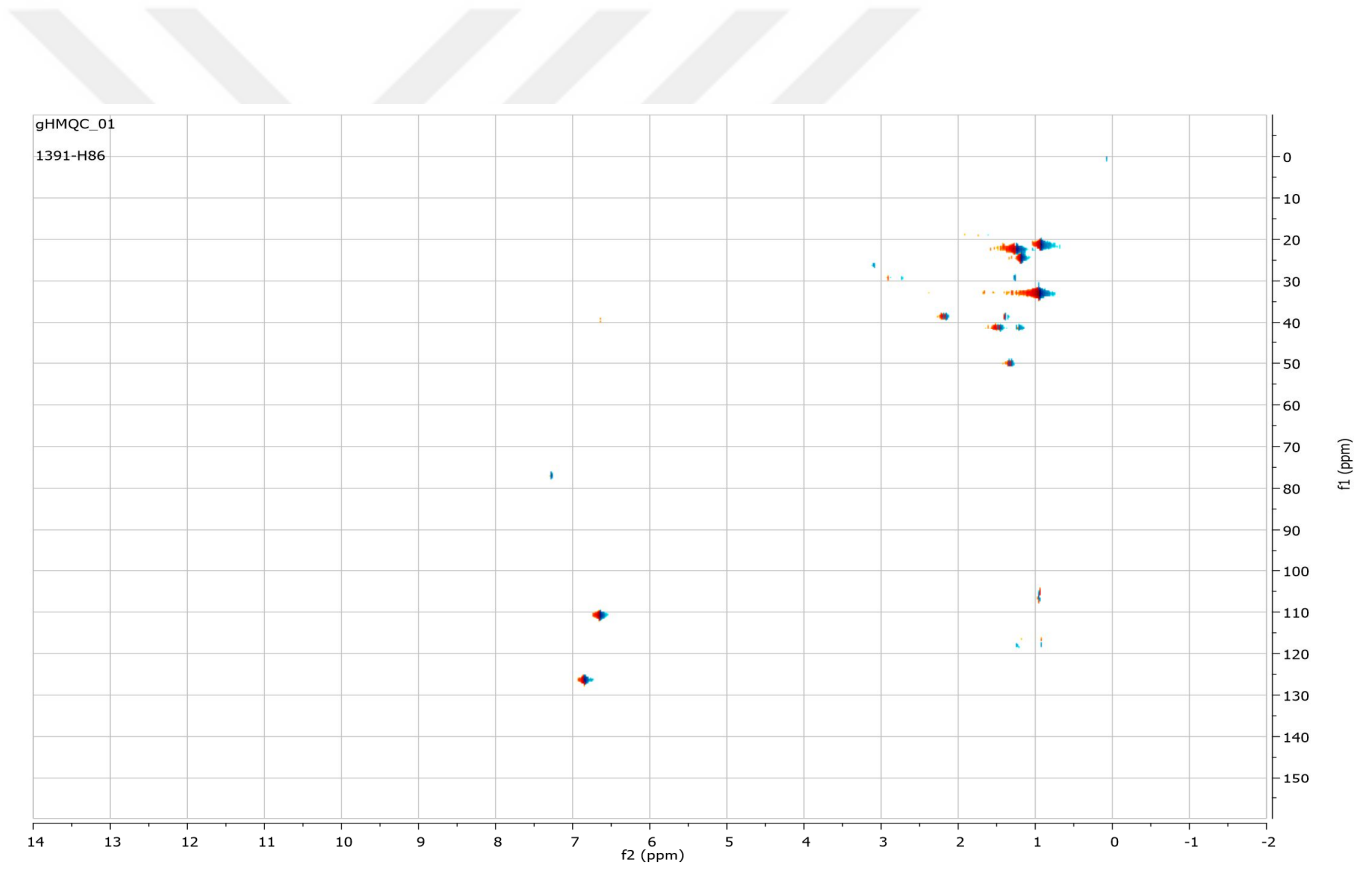
Şekil 65. Ferruginol bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 66. Ferruginol bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)



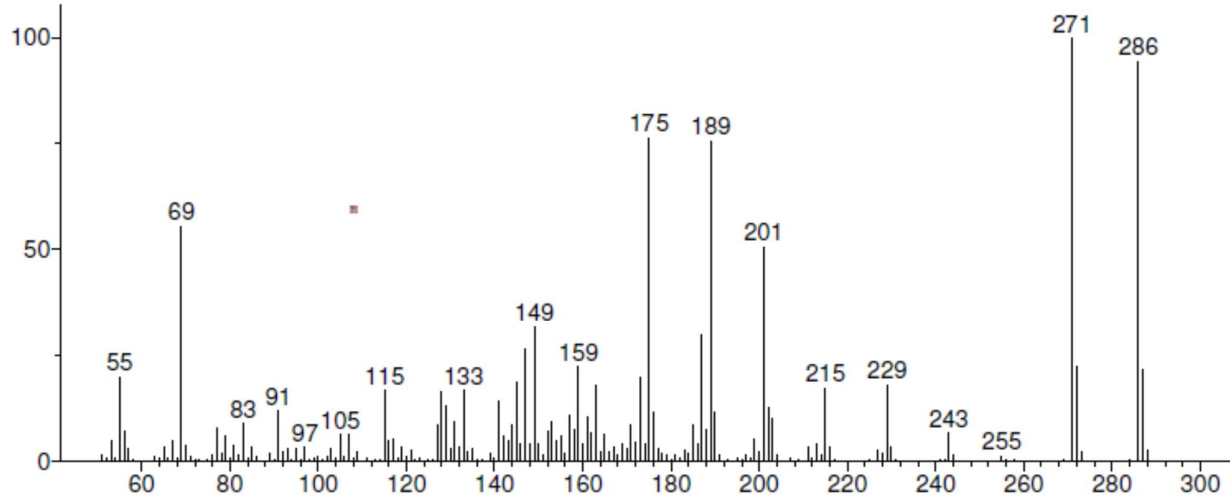
Şekil 67. Ferruginol bileşiğinin HMBC spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 68. Ferruginol bileşiğinin HMQC spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Unknown; InLib=242



(Text File) Scan 1152 (11.293 min): C-99.D\data.ms

Name: Scan 1152 (11.293 min): C-99.D\data.ms

MW: N/A ID#: 1718 DB: Text File

Comment: C-99

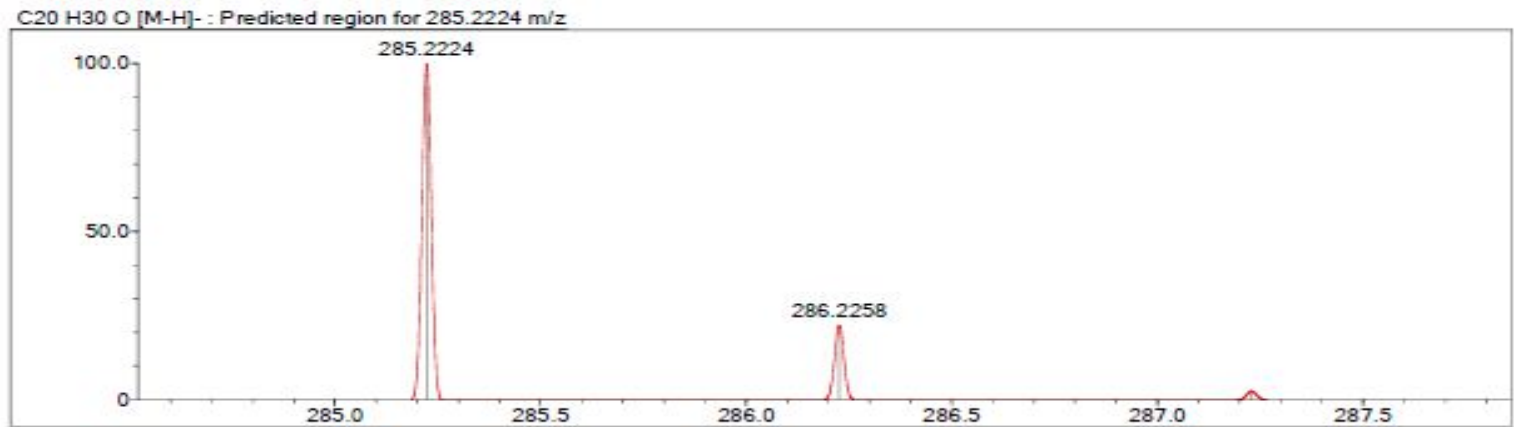
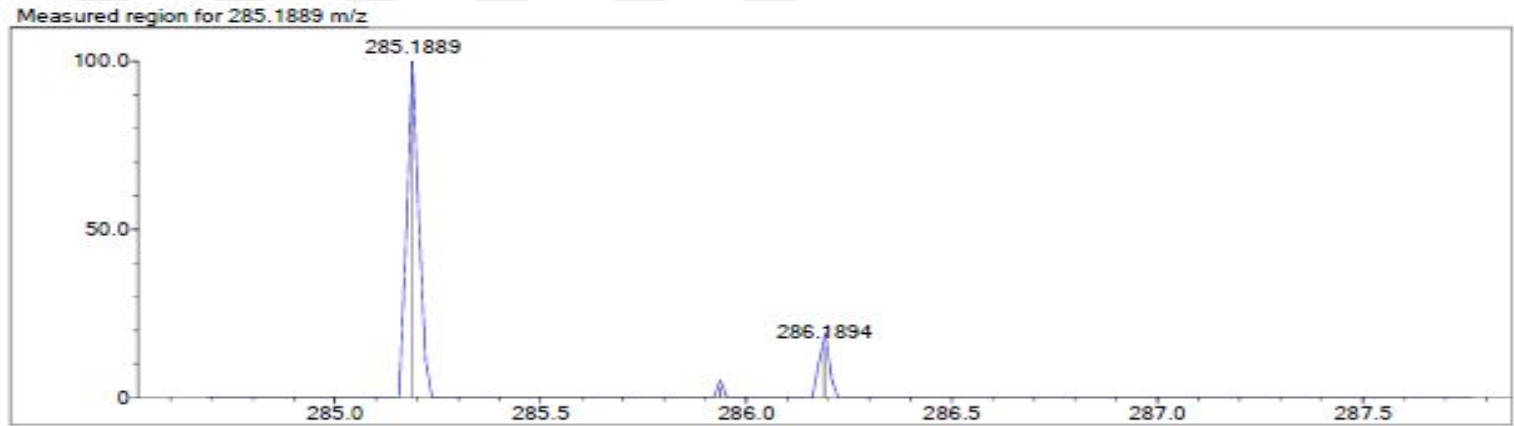
10 largest peaks:

271 999 | 286 945 | 175 763 | 189 757 | 69 557 | 201 509 | 149 319 | 187 297 | 147 262 | 159 225 |

Synonyms:

no synonyms.

Şekil 69. Ferruginol bileşiğinin GC-MS kromatogramı

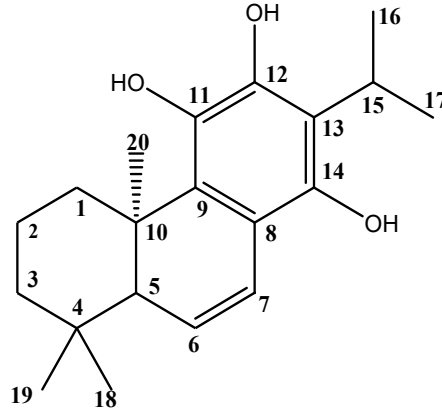


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
12	0.00	C ₂₀ H ₃₀ O	[M-H] ⁻	285.1889	285.2224	-33.5	-117.47	0.00	6.0

Şekil 70. Ferruginol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.11. Kriptanol

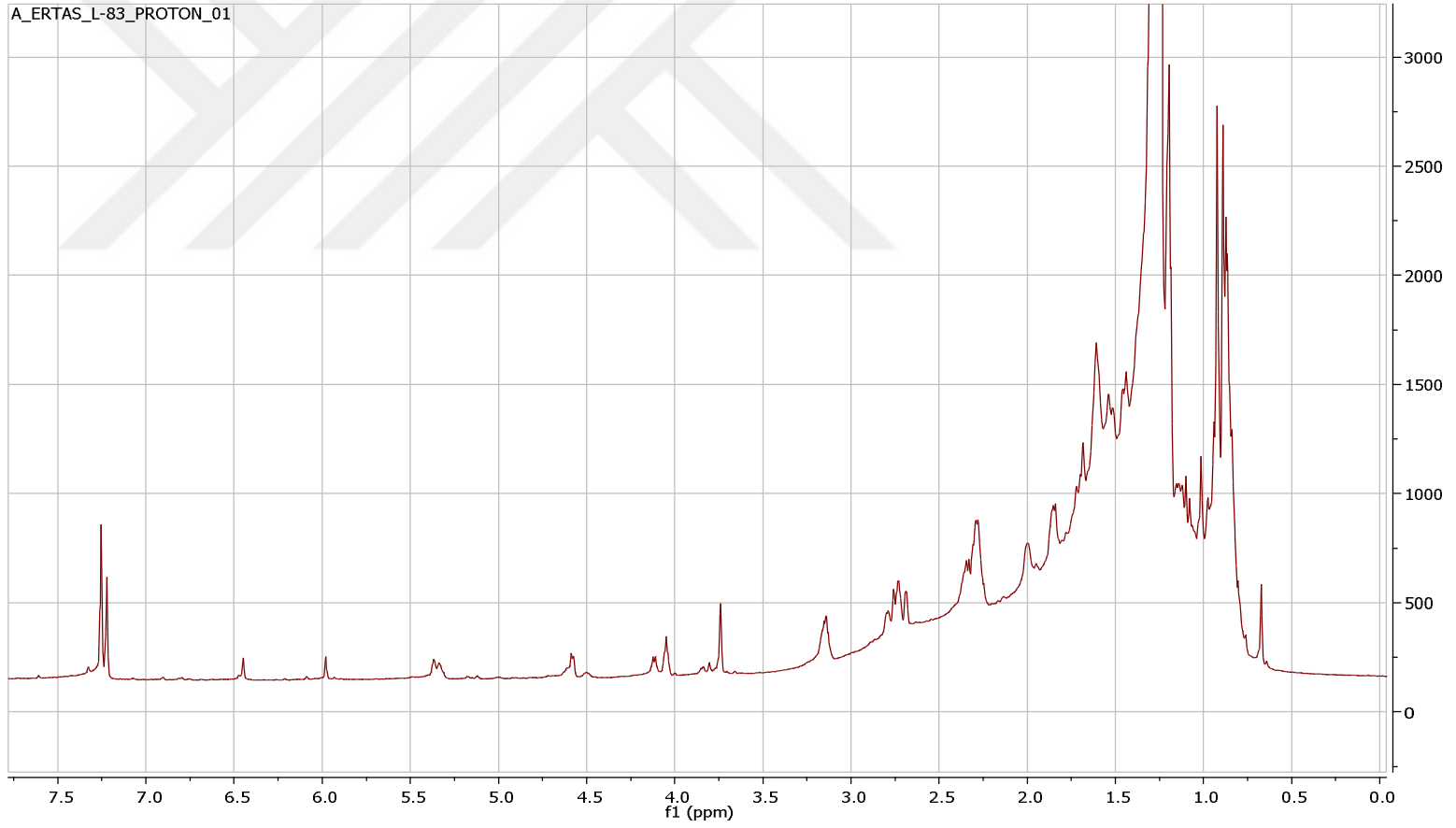
Toprak alt etanol ekstresinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile petrol eteri/diklorometan:1/9 çözücü sisteminde elde edildi (Şekil 71). Turuncu renkte 2,8mg olarak elde edildi. ^1H NMR (CDCl_3 , 600MHz) spektrumunda karakteristik olarak beş metil sinyali (0,84, 0,95, 1,21, 1,33 ve 1,33) sinyalinin izlendi. Bunlardan 1,33' deki metil sinyallerinin dubletler halinde ve 3.15 ppm'de bir ise metin protonun septet halinde izlenmesi yapıda bir isopropil grubunun varlığını gösterdi, bu sinyaller yapının abietan bir diterpen olabileceğine işaret etmiş, fakat herhangi bir aromatik proton sinyali izlenmemesine rağmen 5,4, 5,3 ve 4,6 ppm'deki geniş singletlerin aromatik OH'ların varlığını düşündürdü. Ayrıca 5,95 (brd s) ve 6,45 (brd s) ppm'de izlenen pikler yapıda bir çift bağa işaret etmektedir. Bunların yanı sıra GC-MS kütle spektrumunda moleküler piki kapalı formülü olan ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$) ye karşılık gelen m/z 316' da ayrıca M- CH_3 pikide 301'de izlendi. ^1H NMR sinyallerinin kayma değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen $[\text{M}-\text{H}]^-$ piki 315.1960 ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_3$) dayanarak bu bileşiğin kriptanol olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 37) literatür değereleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (249) (Şekil 72-75).



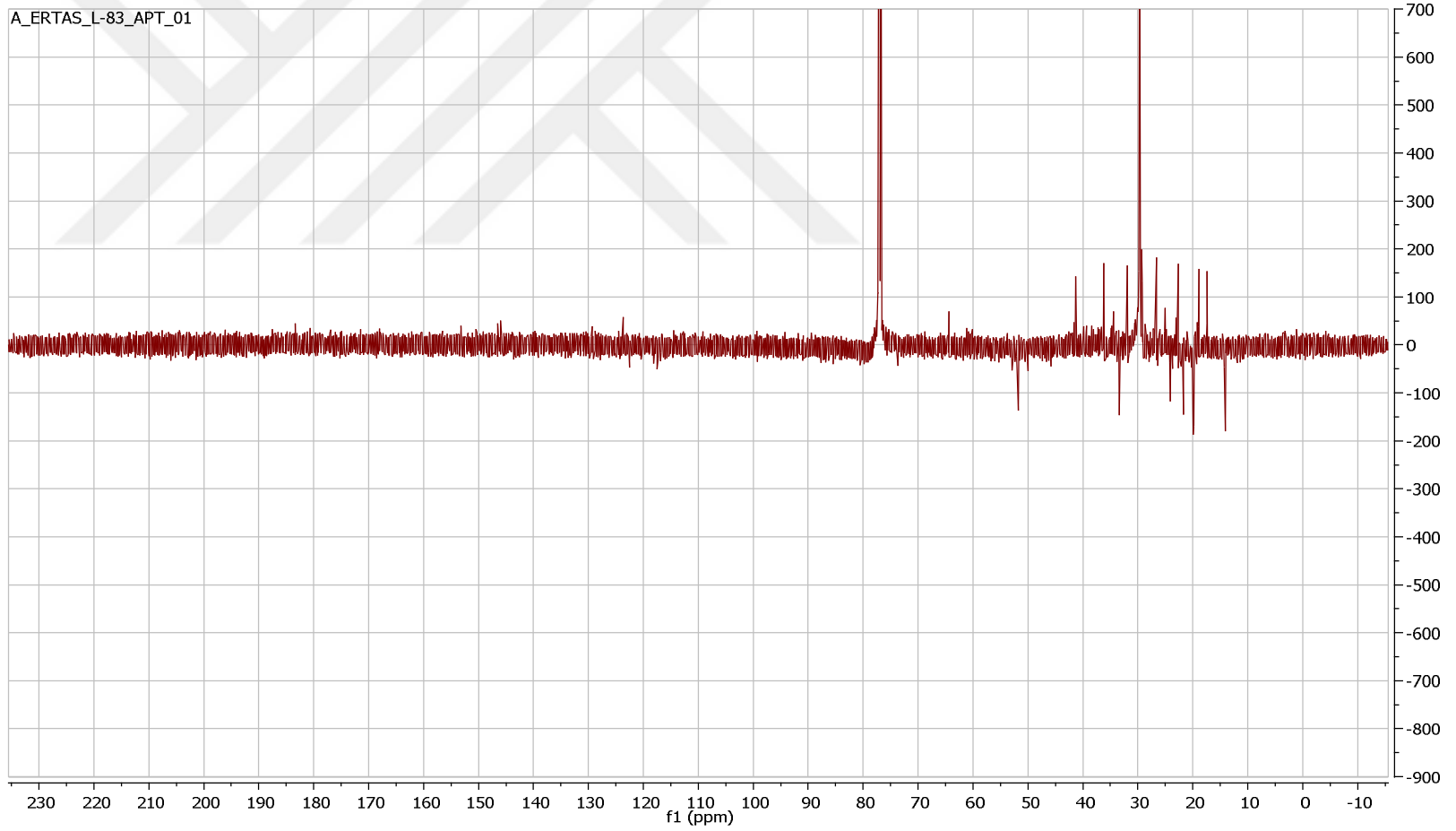
Şekil 71. Kriptanol

Tablo 37. Kriptanol bileşğinin NMR değeri

Pozisyon	¹ H-NMR
1	-
2	-
3	-
4	-
5	-
6	5,95 brd s
7	6,45 brd s
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	3,15 s (J=7,0 Hz)
16	1,33 d (J=7,0 Hz)
17	1,33 d (J=7,0 Hz)
18	0,95 s
19	0,84 s
20	1,21 s
11-OH	5,41
12-OH	5,35
14-OH	4,62

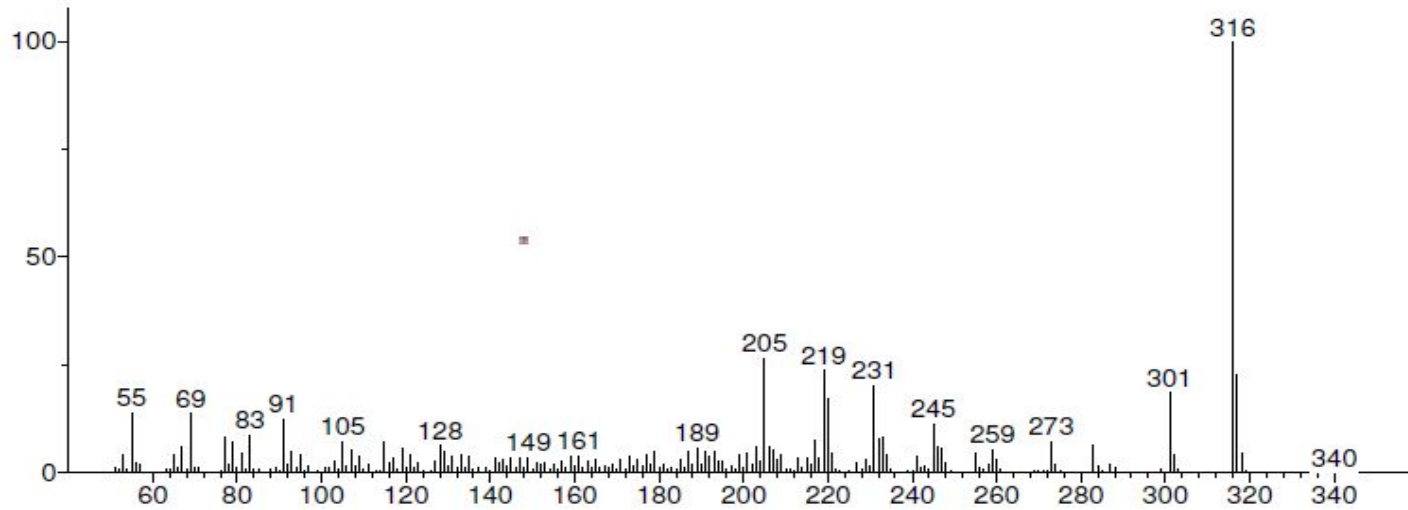


Şekil 72. Kriptanol bileşiğinin¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 73. Kriptanolbileşiginin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

Unknown; InLib=-984



(Text File) Scan 448 (5.890 min): L-83(DCM).D\data.ms (-417)

Name: Scan 448 (5.890 min): L-83(DCM).D\data.ms (-417)

MW: N/A ID#: 2652 DB: Text File

Comment: L-83(DCM)

10 largest peaks:

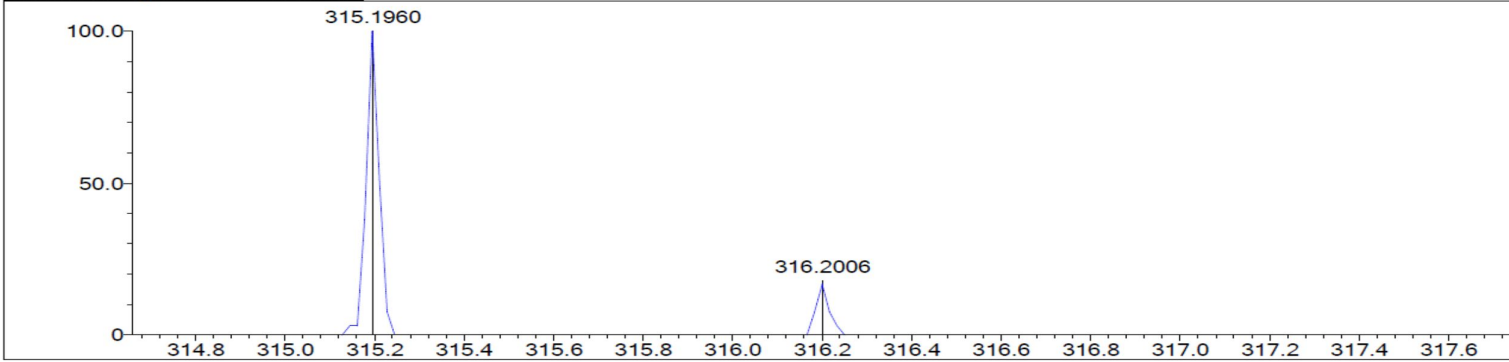
316 999 | 205 267 | 219 239 | 317 225 | 231 205 | 301 188 | 220 170 | 55 142 | 69 139 | 91 128 |

Synonyms:

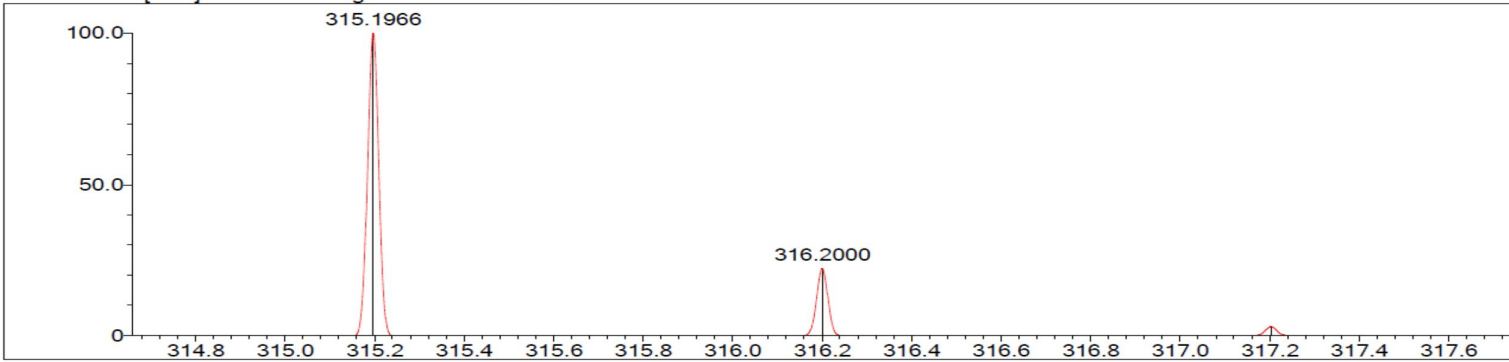
no synonyms.

Şekil 74. Kriptanol bileşiğinin GC-MS spektrumu

Measured region for 315.1960 m/z



C20 H28 O3 [M-H]⁻ : Predicted region for 315.1966 m/z

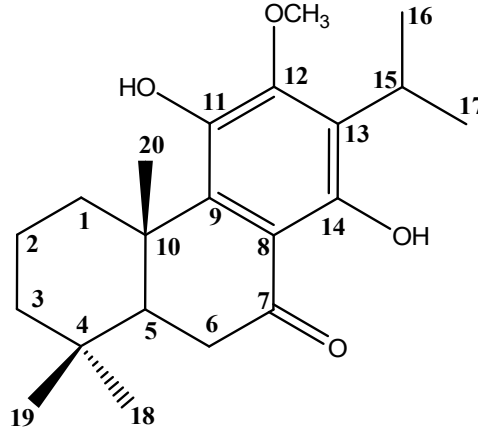


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	65.07	C20 H28 O3	[M-H] ⁻	315.1960	315.1966	-0.6	-1.90	66.57	7.0

Şekil 75. Kriptanol bileşiminin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.12. Inuroyleanol

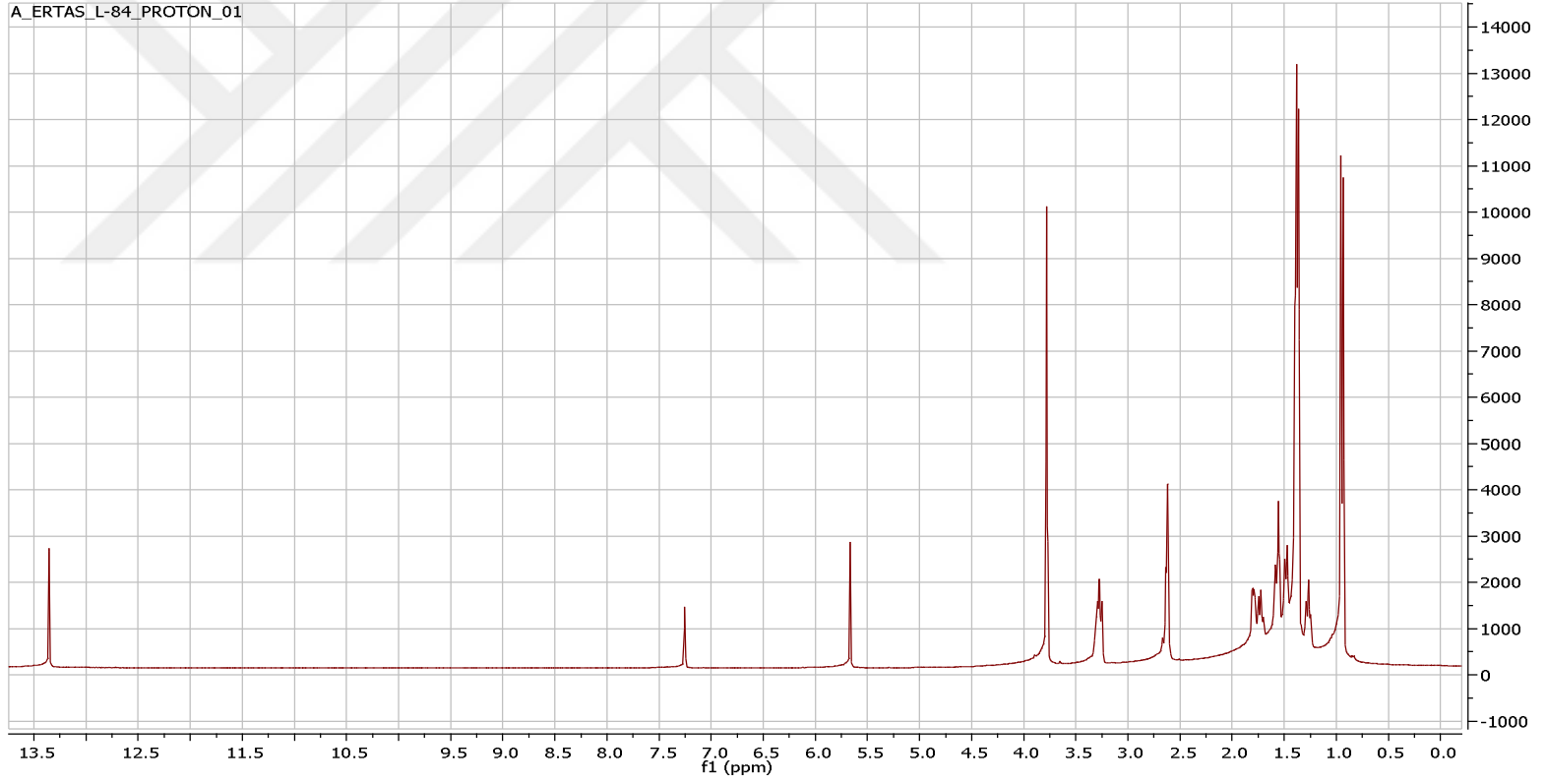
Etanol ekstrelerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile saf diklorometan çözücü sisteminde 12 mg elde edildi (Şekil 76). Silika jel plakta UV lamba altında (254nm) kahverenkli görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında kızıl kahverengi renk aldı. ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz) spektrumunda karakteristik olarak beş metil sinyali (0,94, 0,96, 1,35, 1,37 ve 1,37) sinyalinin izlendi. Bunlardan 1.37’ deki metil sinyallerinin 7,6 Hz lik dubletler halinde ve 3.27 ppm de bir ise metin protonun septet halinde izlenmesi yapıda bir isopropil grubunun varlığını gösterdi, bu sinyaller yapının abietan bir diterpen olabileceğine işaret etti, fakat herhangi bir aromatik proton sinyali izlenmemesine rağmen 5,67 ppm’deki geniş singletin aromatik bir OH varlığını düşündürdü. Ayrıca 13,35 ppm’de izlenen singletin C-7 ile H-14 arasındaki hidrojen bağı yapmış protona ait olduğu görüldü. Diğer bir pik ise metoksi grubuna ait 3 protonluk pik şeklinde 3,78 ppm’de izlendi. Bunların yanı sıra GC-MS kütle spektrumunda moleküler piki kapalı formülü olan (C₂₁H₃₀O₄) ye karşılık gelen *m/z* 346’ da ayrıca M-CH₃ pikide 331’de izlendi. ¹H NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF’ta izlenen [M-H]⁻ piki 345.2071 (C₂₁H₃₀O₄) dayanarak bu bileşiğin inuroyleanol olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 38) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (Şekil 77-80)



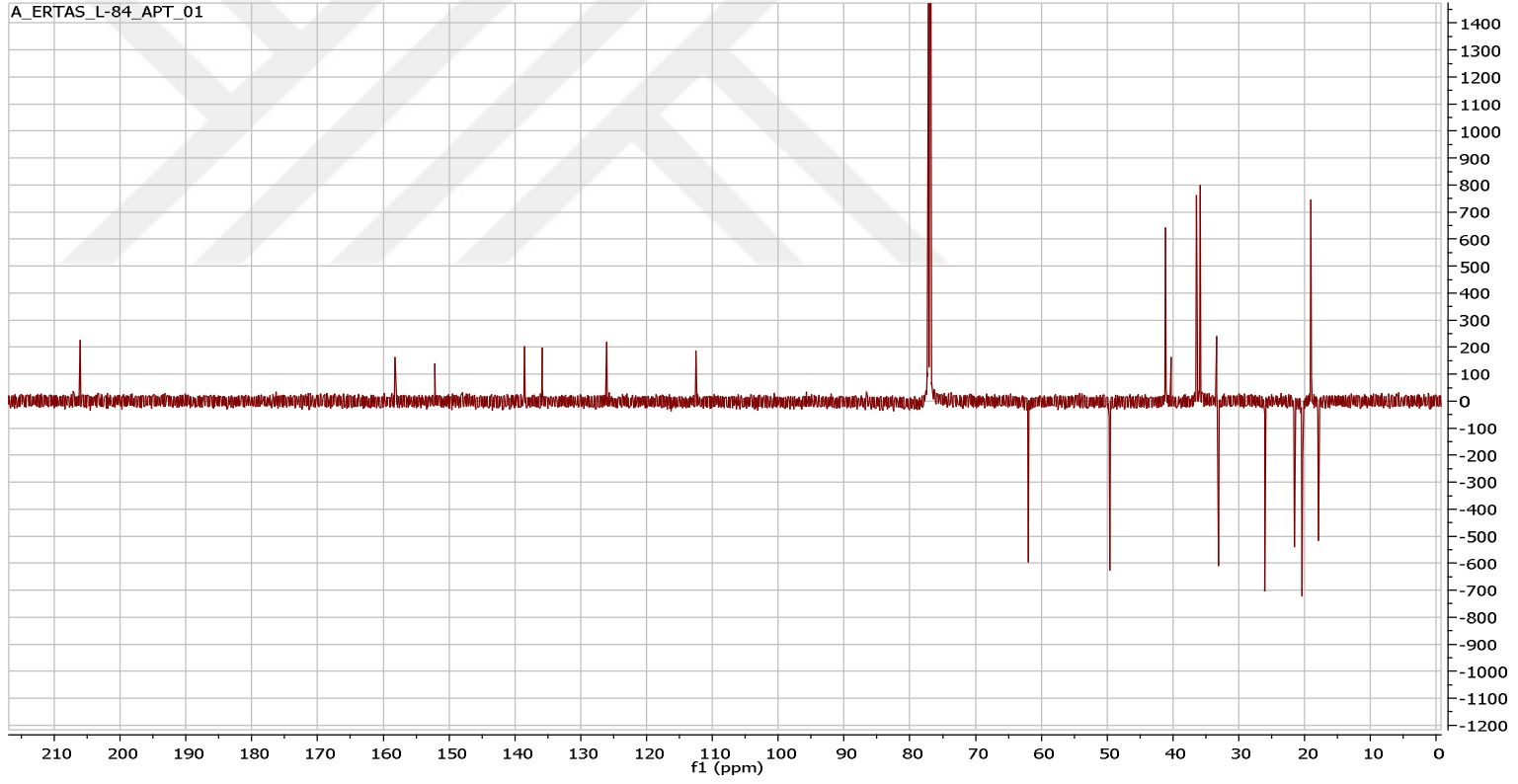
Şekil 76. Inuroyleanol

Tablo 38. Inuroyleanol bileşğinin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	36,4	2,62 m
2	19,1	-
3	35,8	-
4	33,4	-
5	49,6	-
6	41,1	2,62 m
7	206,8	-
8	112,5	-
9	126,1	-
10	40,3	-
11	152,1	-
12	138,5	-
13	135,85	-
14	158,2	-
15	33,1	3,27 sept (J=6,5 Hz)
16	20,3	1,37 d (J=7,6 Hz)
17	17,9	1,37 d (J=7,6 Hz)
18	21,5	0,96 s
19	20,4	0,94 s
20	26,0	1,35 s
-OCH ₃	62,1	3,78
11-OH	-	5,67 s
12-OH	-	13,35 s

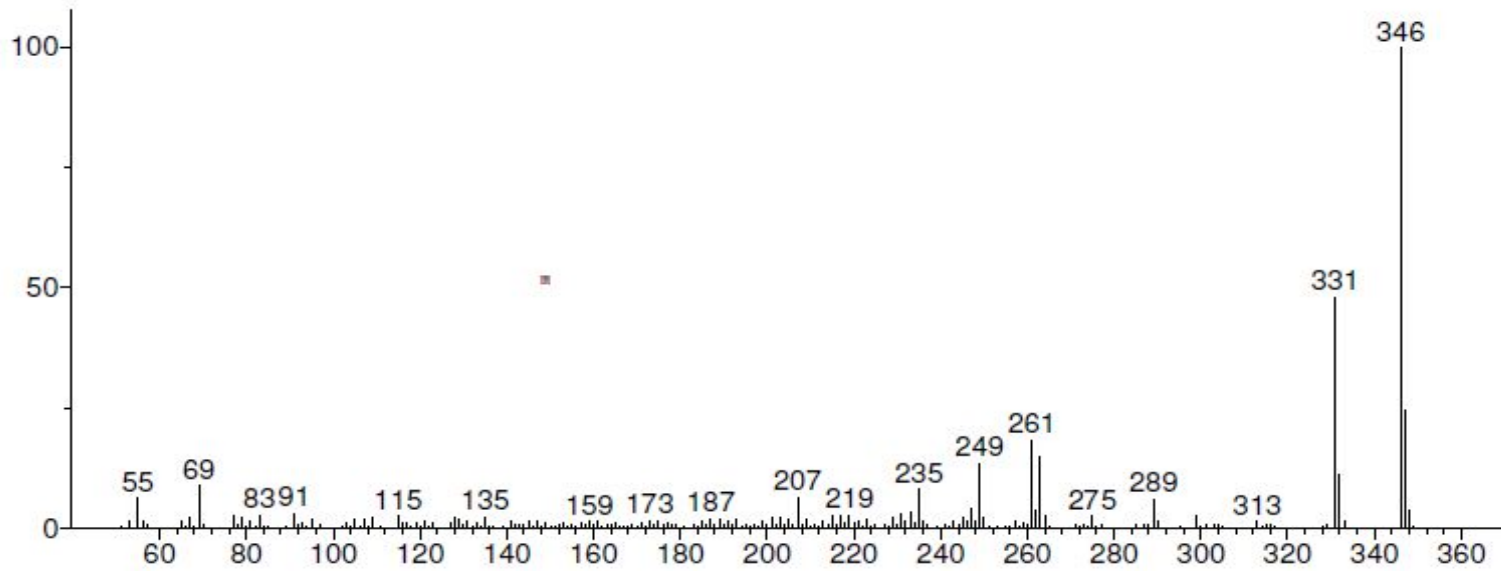


Şekil 77. : Inuroyleanol bileşiğinin¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 78. Inuroyleanol bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) Spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

Unknown; InLib=-1149



(Text File) Scan 682 (7.353 min): L-84(DCM).D\data.ms (-656)

Name: Scan 682 (7.353 min): L-84(DCM).D\data.ms (-656)

MW: N/A ID#: 2653 DB: Text File

Comment: L-84(DCM)

10 largest peaks:

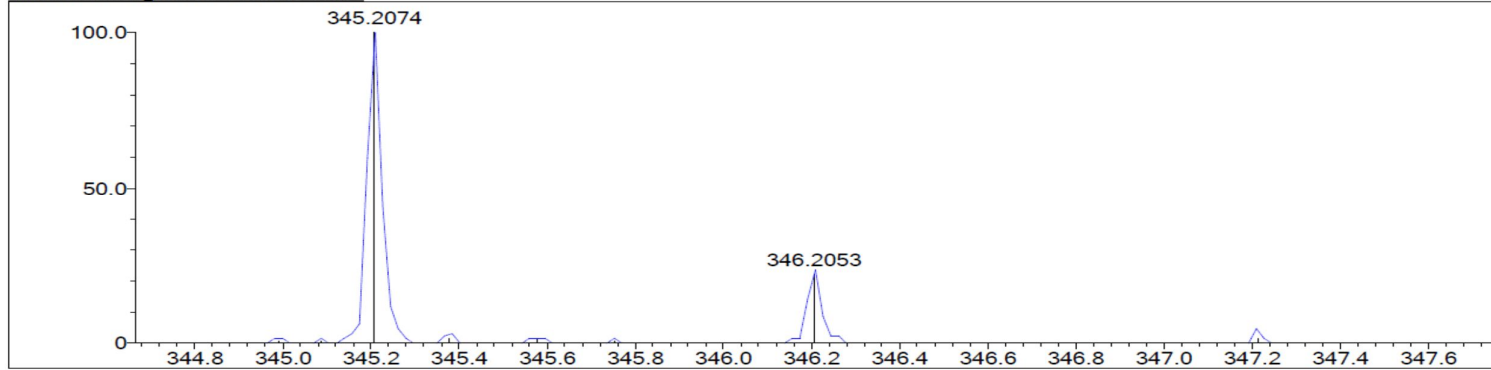
346 999 | 331 483 | 347 245 | 261 187 | 263 150 | 249 138 | 332 110 | 69 91 | 235 85 | 207 68 |

Synonyms:

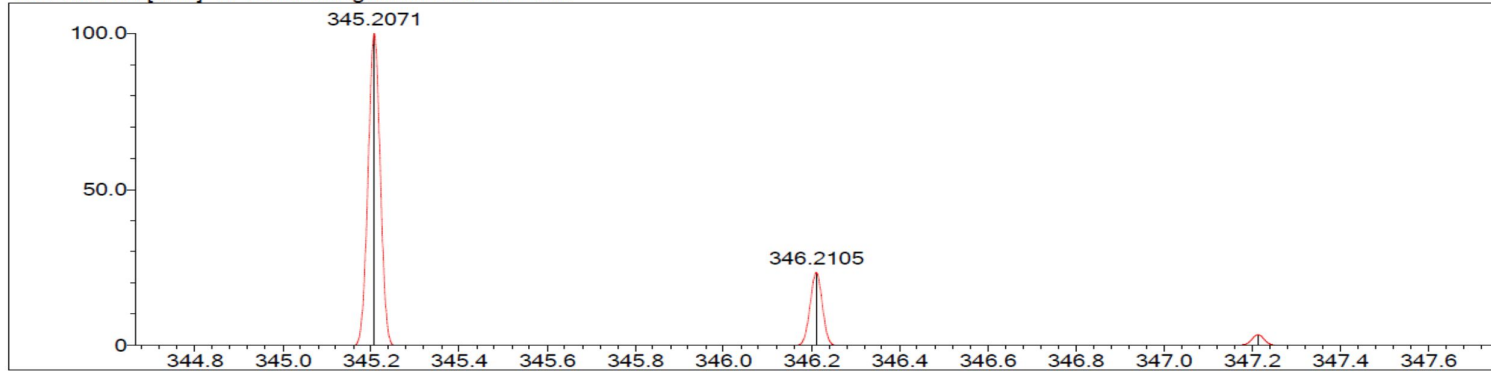
no synonyms.

Şekil 79. Inuroleanol bileşiğinin GC-MS spektrumu

Measured region for 345.2074 m/z



C21 H30 O4 [M-H]⁻ : Predicted region for 345.2071 m/z

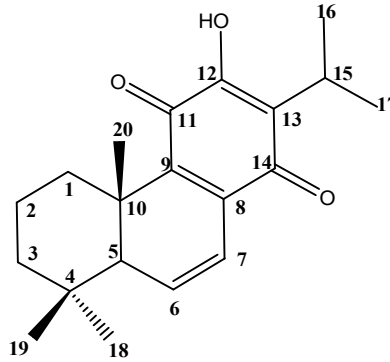


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	86.58	C21 H30 O4	[M-H] ⁻	345.2074	345.2071	0.3	0.87	86.58	7.0

Şekil 80. Inuroyleanol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.13. 6,7-Dehidroroyleanon

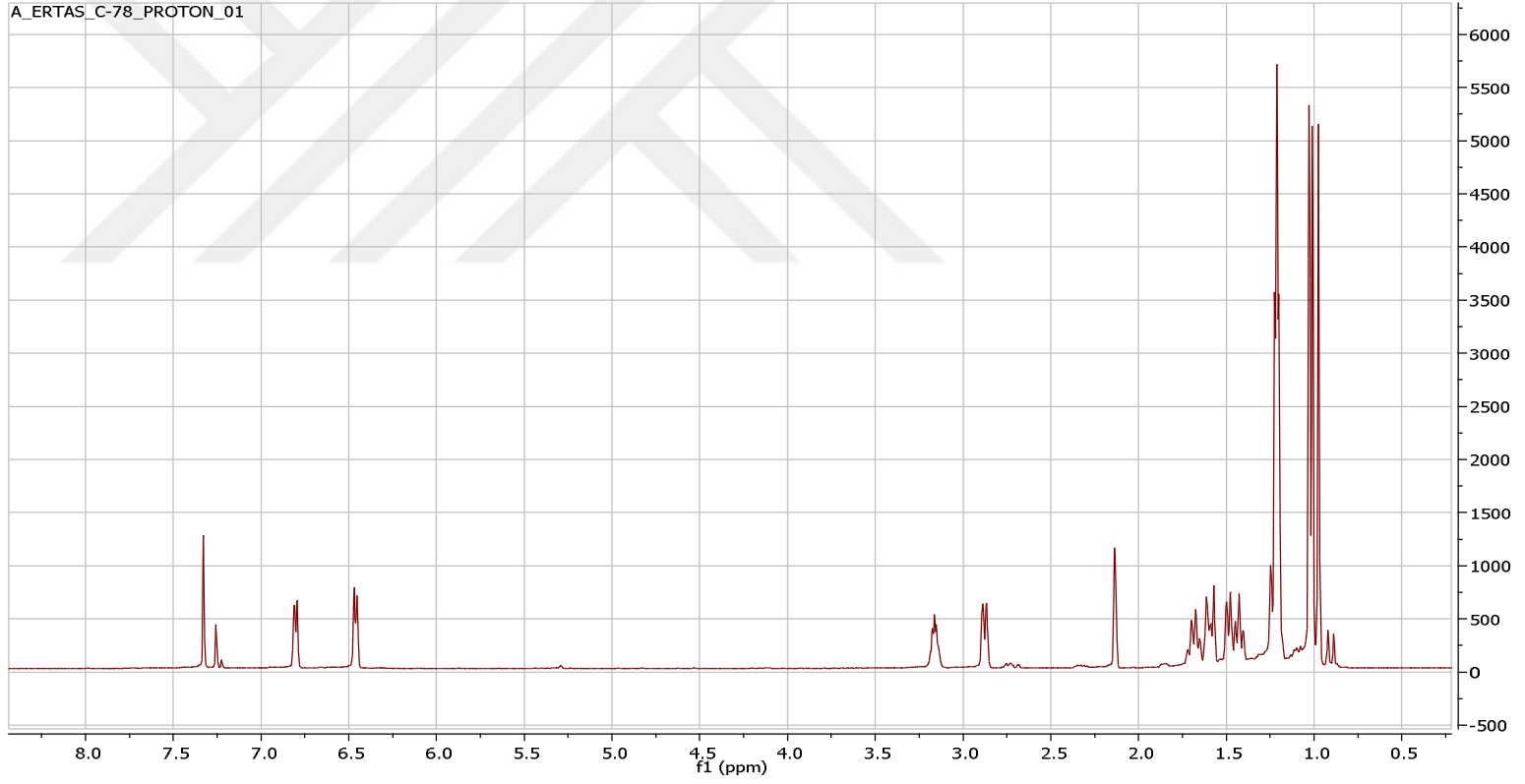
Toprak altı etanol ekstresinin ana kolonundan kristal olarak elde edildi. Kristal olarak elde edilen madde toprak altı etanol ekstresinin ana kolonundan %40 DCM-%60 PE çözücü sisteminden elde edildi (Şekil 81). İlk aşamada katı kristal kısım sıvı kısımdan ayrıldı. Katı ve sıvı kısımlarıyla yapılan İTK'da en iyi (3:1) (PE:DCM) çözücü sisteminde ayrılma gözlemlendi. Bileşik preparatif İTK ile kırmızı renkli kristal şeklinde saf olarak elde edildi. ¹H NMR (CDCl₃, 600MHz ve 400MHz) spektrumunda karakteristik olarak beş metil sinyali (0,98, 1,01, 1,03, 1,21 ve 1,21) sinyalinin izlendi. Bunlardan 1.21 deki metil sinyallerinin 6,9 Hz lik dubletler halinde ve 3.15 ppm de bir ise metin protonunun septet (dt) ($J=13,8$; 6,9 Hz, H-15) halinde izlenmesi yapıda bir isopropil grubunun varlığını gösterdi, bu sinyaller yapının abietan bir diterpen olabileceğine işaret etmiş, fakat herhangi bir aromatik proton sinyali izlenmemesine rağmen 7.33 ppm deki geniş singletin aromatik bir OH varlığını düşündürdü. Karakteristik H-1 β piki 2,89 ppm' de d ($J=12,7$ Hz) halinde izlendi. Ayrıca 6,46 dd ($J=9,7$ Hz) ve 6,81 dd ($J=9,6$ Hz)' de izlenen pikler yapıda bir çift bağa işaret etmektedir. ¹H NMR sinyallerinin kayma değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen [M+H]⁺ piki 315,1954'e (C₂₀H₂₈O₃) dayanarak bu bileşiğin 6,7-dehidroroyleanon olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 39) Kusumoto ve arkadaşlarının elde ettiği 6,7-dehidroroyleanon bileşiği ile aynı olduğu tespit edildi (250) (Şekil 82-89).



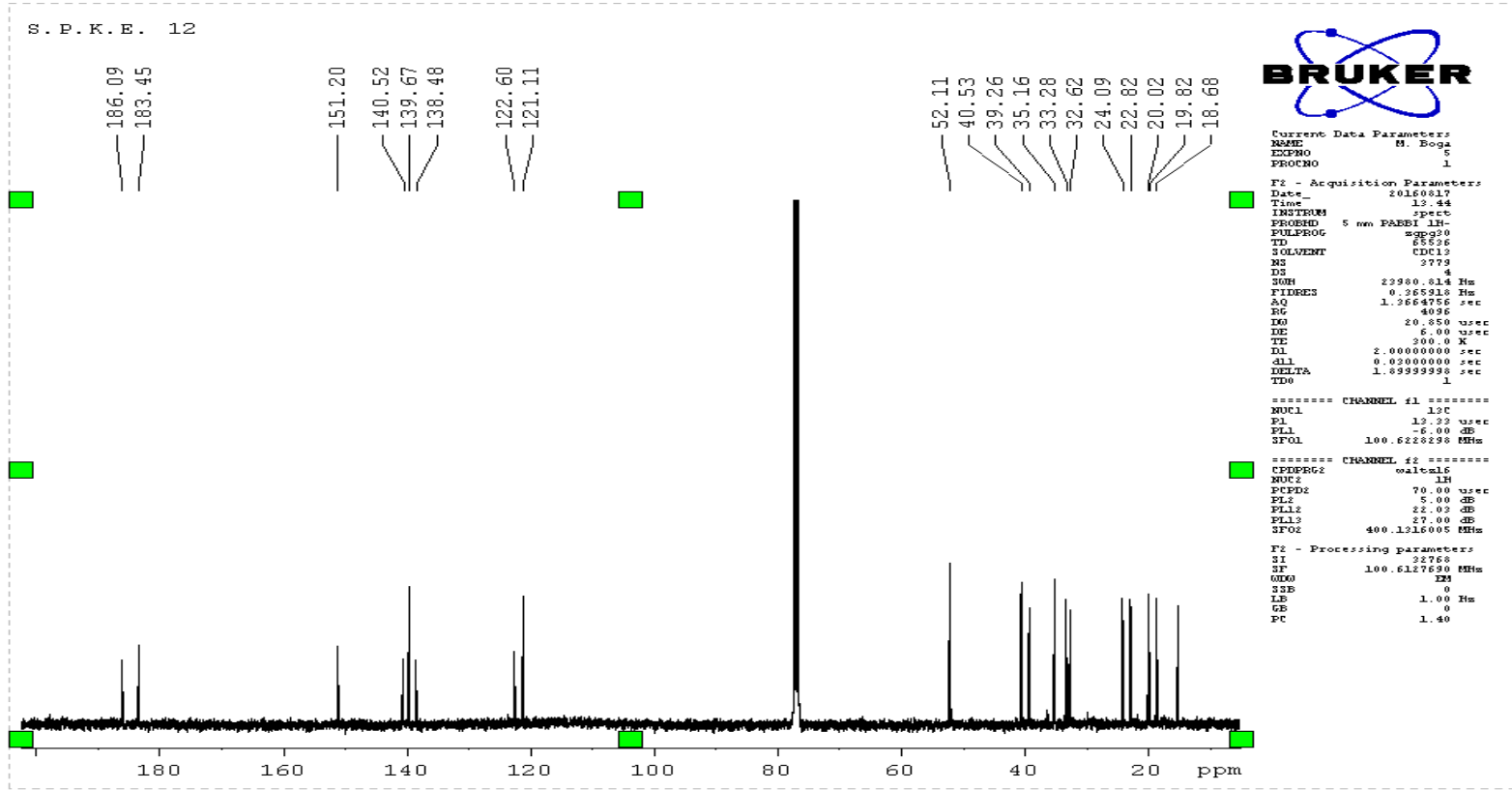
Şekil 81. 6,7-Dehidroroyleanon

Tablo 39. 6,7-dehidroroyleanon Bileşğinin NMR Değerleri

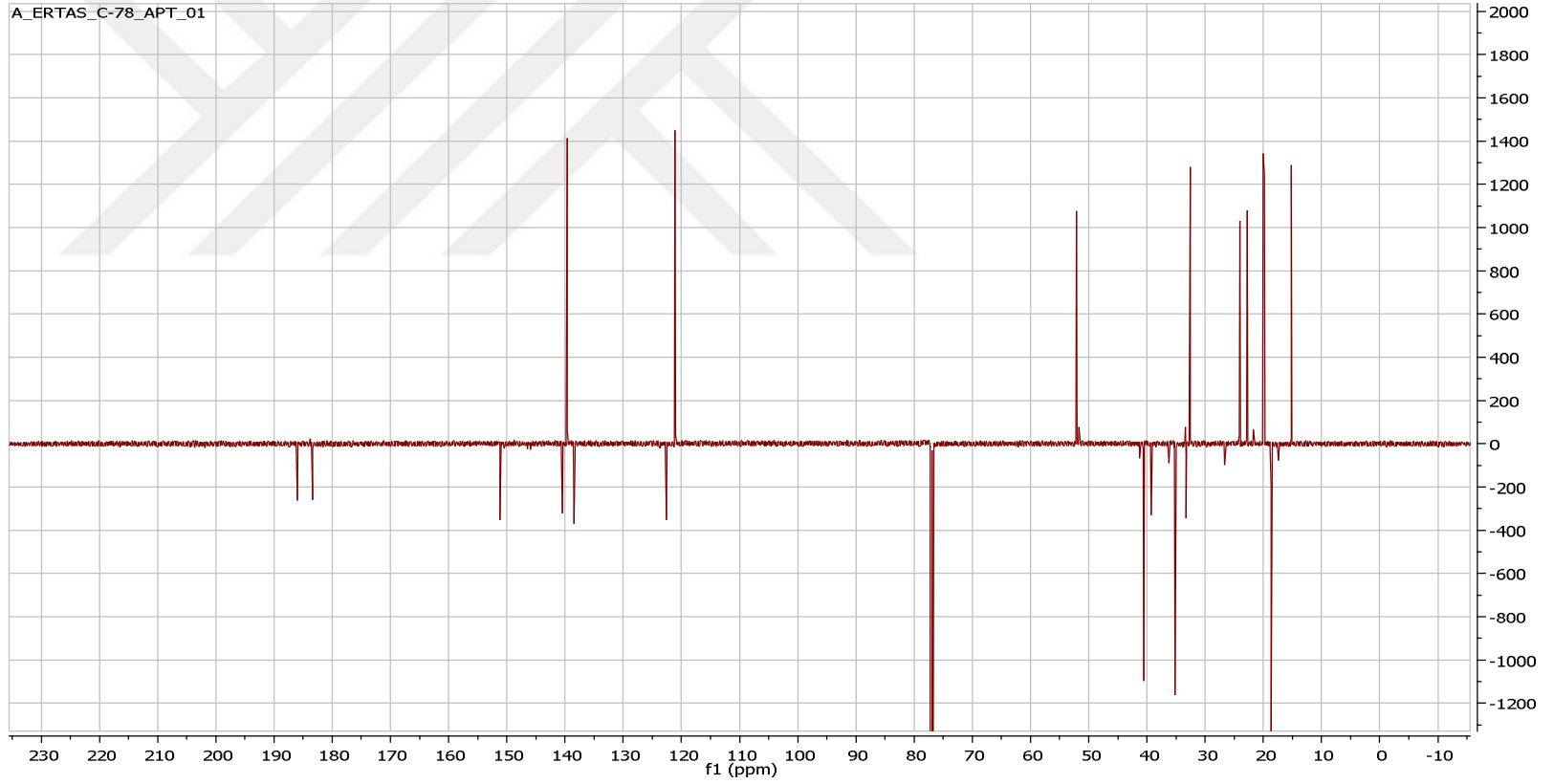
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	35,1	2,89 d (J=13,3 Hz)
2	18,7	-
3	40,5	-
4	33,3	-
5	52,1	2,14 s
6	139,6	6,46 dd (J=9,7 Hz)
7	121,1	6,81 dd (J=9,6 Hz)
8	138,4	-
9	140,5	-
10	39,2	-
11	183,4	-
12	151,2	-
13	122,6	-
14	186,0	-
15	24,1	3,15 dt (J=13,8; 6,9 Hz)
16	19,8	1,21 d (J=6,9 Hz)
17	20,0	1,21 d (J=6,9 Hz)
18	32,6	0,98 s
19	22,8	1,01 s
20	15,2	1,03 s
12-OH	-	7,33 s



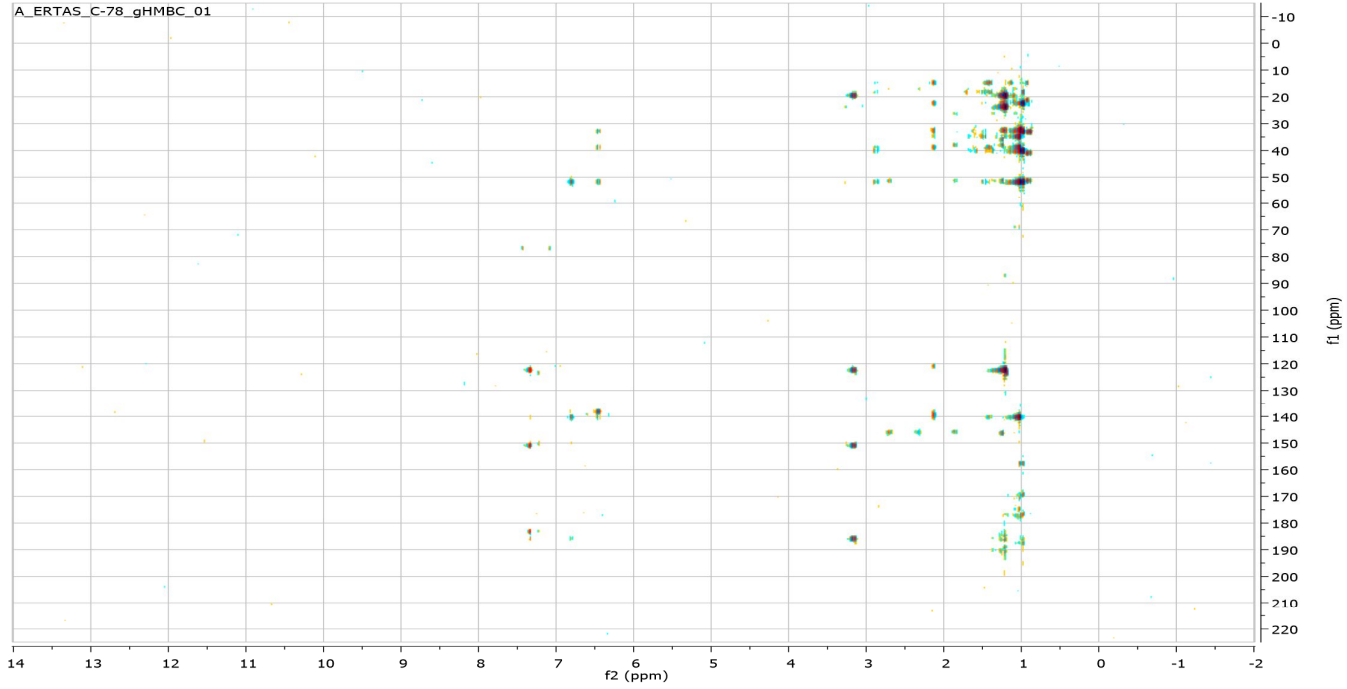
Şekil 82. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



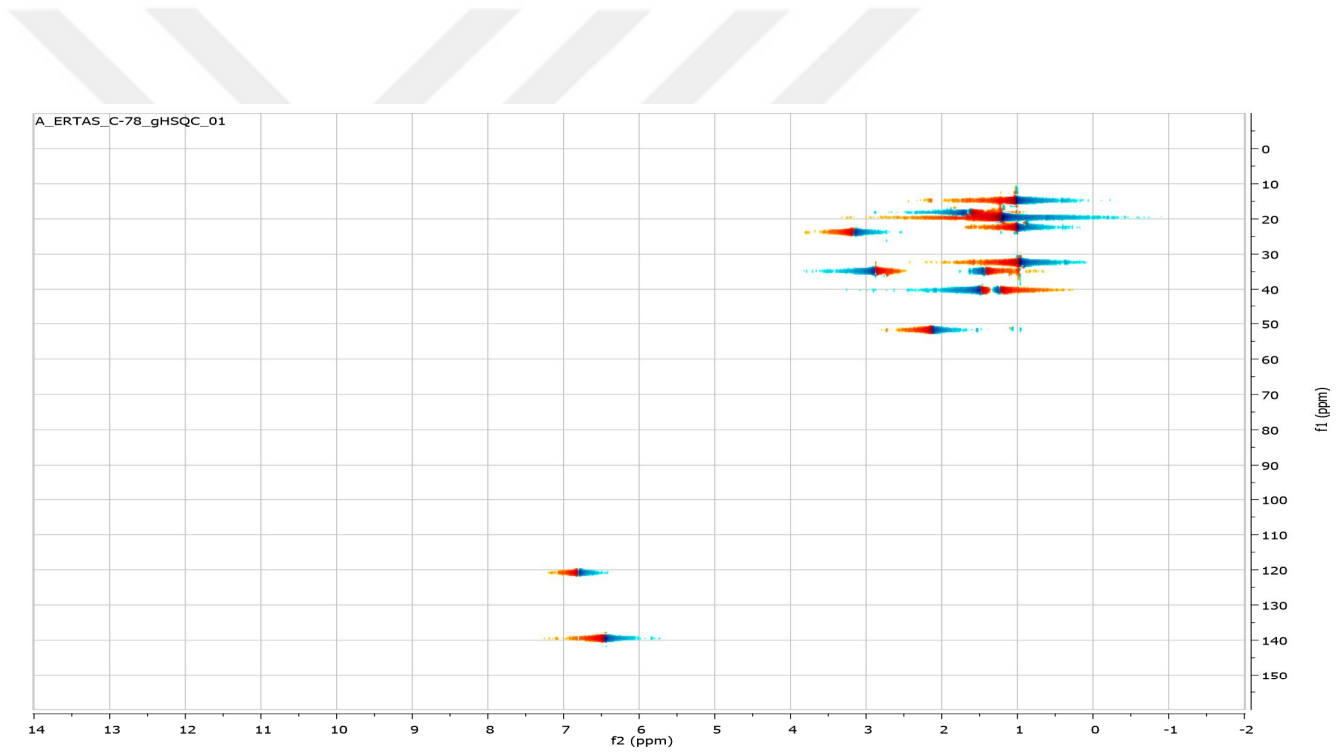
Şekil 83. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin ¹³C NMR Spektrumu (CDCl₃, 150 MHz)



Şekil 84. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin APT spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

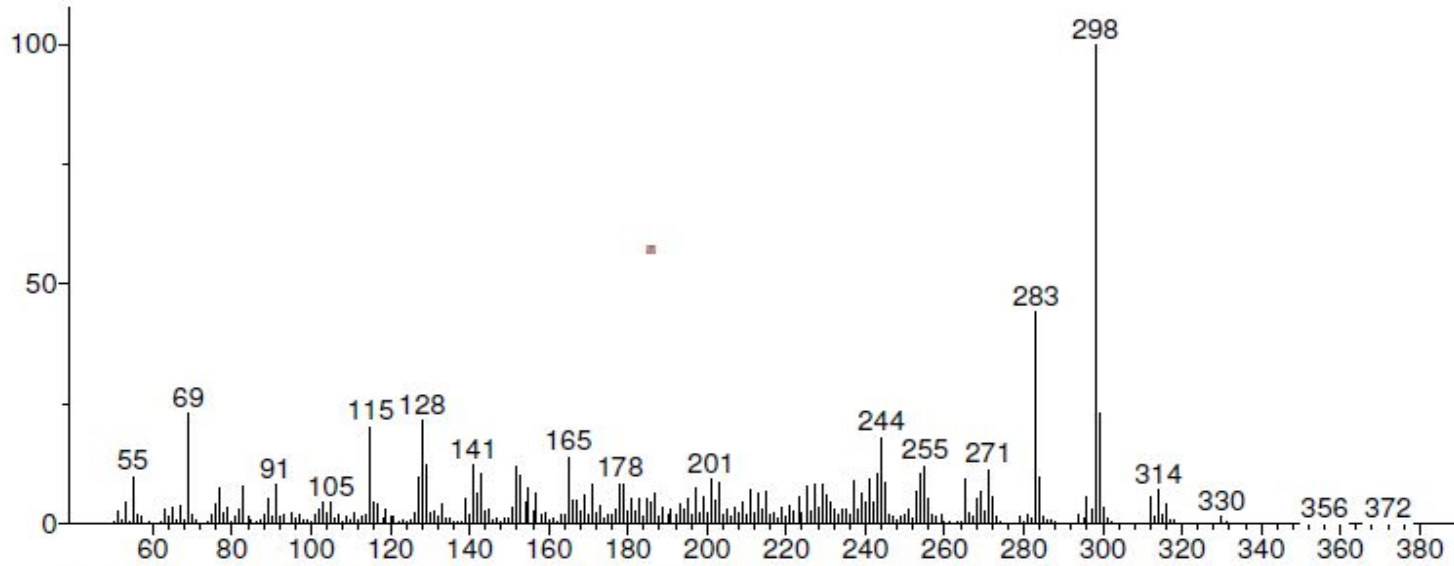


Şekil 85. 6,7-Dehidroroleanon bileşiminin HMBC spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 86. 6,7-Dehidroroyleanon Bileşiminin HMQC Spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)

Unknown; InLib=-733



(Text File) Scan 1195 (11.562 min): C-78.D\data.ms (-1128)

Name: Scan 1195 (11.562 min): C-78.D\data.ms (-1128)

MW: N/A ID#: 2675 DB: Text File

Comment: C-78

10 largest peaks:

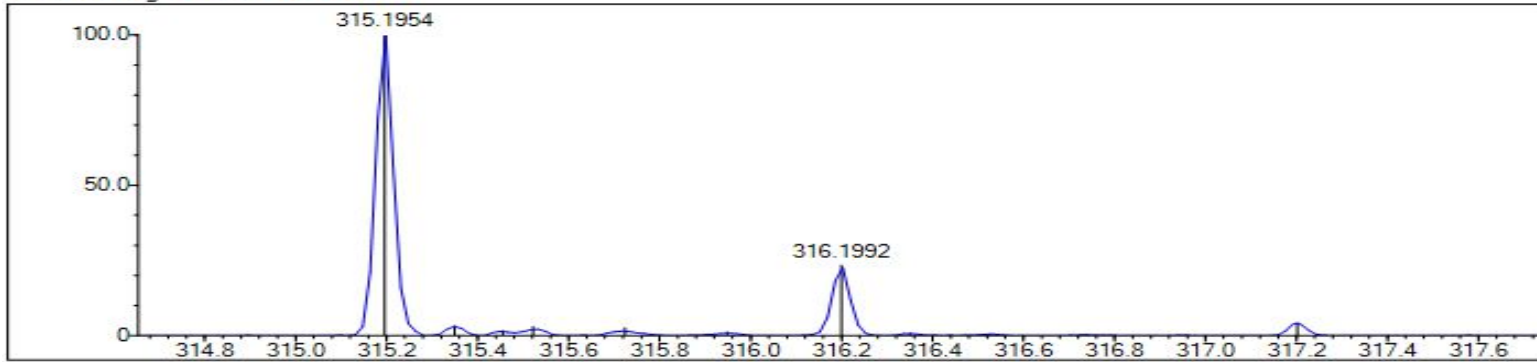
298 999 | 283 444 | 69 233 | 299 230 | 128 217 | 115 205 | 244 183 | 165 142 | 141 125 | 255 123 |

Synonyms:

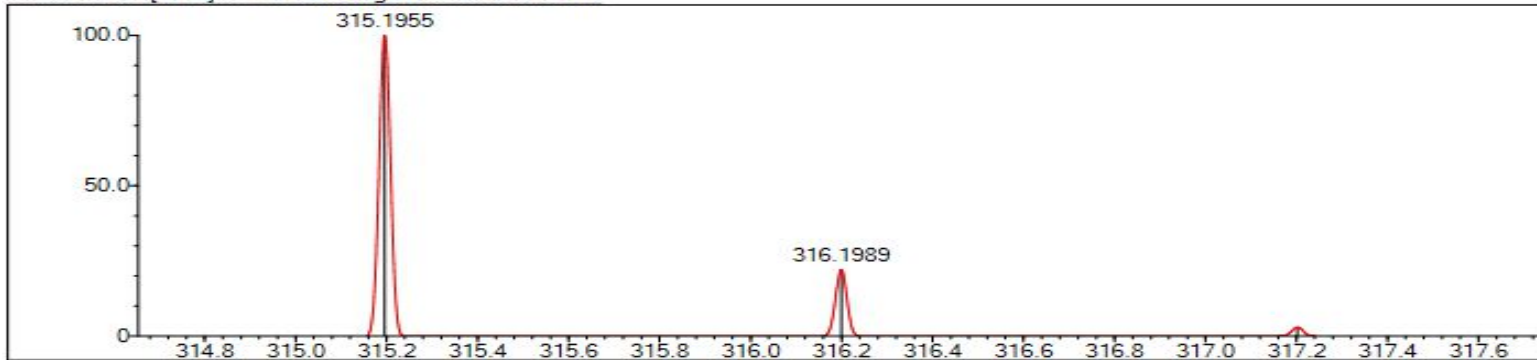
no synonyms.

Şekil 87. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin GC-MS spektrumu

Measured region for 315.1954 m/z



C20 H26 O3 [M+H]⁺ : Predicted region for 315.1955 m/z



Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	90.31	C20 H26 O3	[M+H] ⁺	315.1954	315.1955	-0.1	-0.32	90.31	8.0

Şekil 88. 6,7-Dehidroroyleanon bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:SPKE-12

Sample Scans:128

Background Scans:128

Resolution:8

System Status:Good

File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\SPKE-12_2018-05-09T12-06-11.a2r

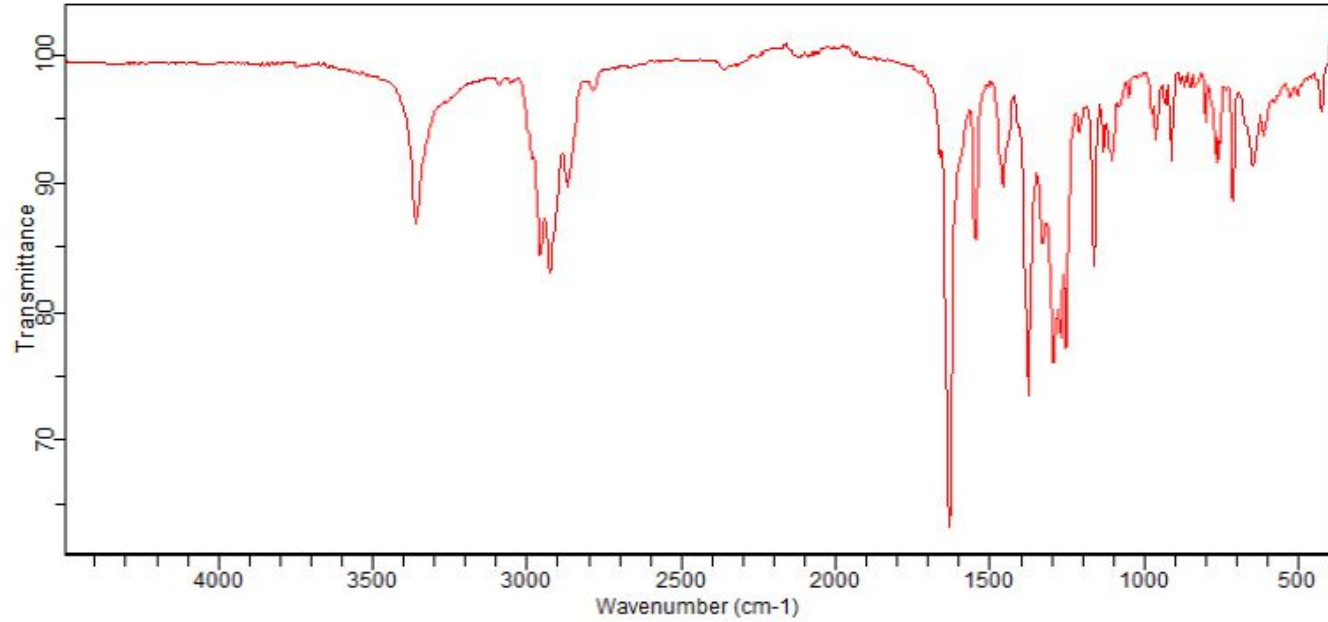
Method Name:zeynep

User:Admin

Date/Time:05.09.2018 12:06:11

Range:4500 - 400

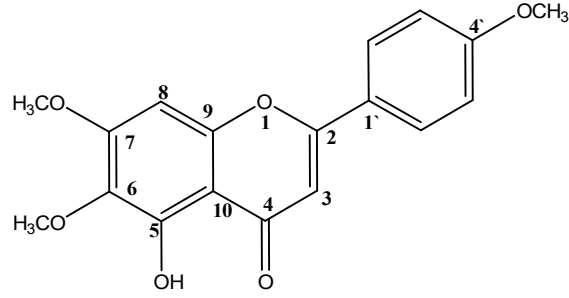
Apodization:Triangular



Şekil 89. 6,7-Dehidroroyleanon bileşinin IR spektrumu

5.8.14. Salvigenin

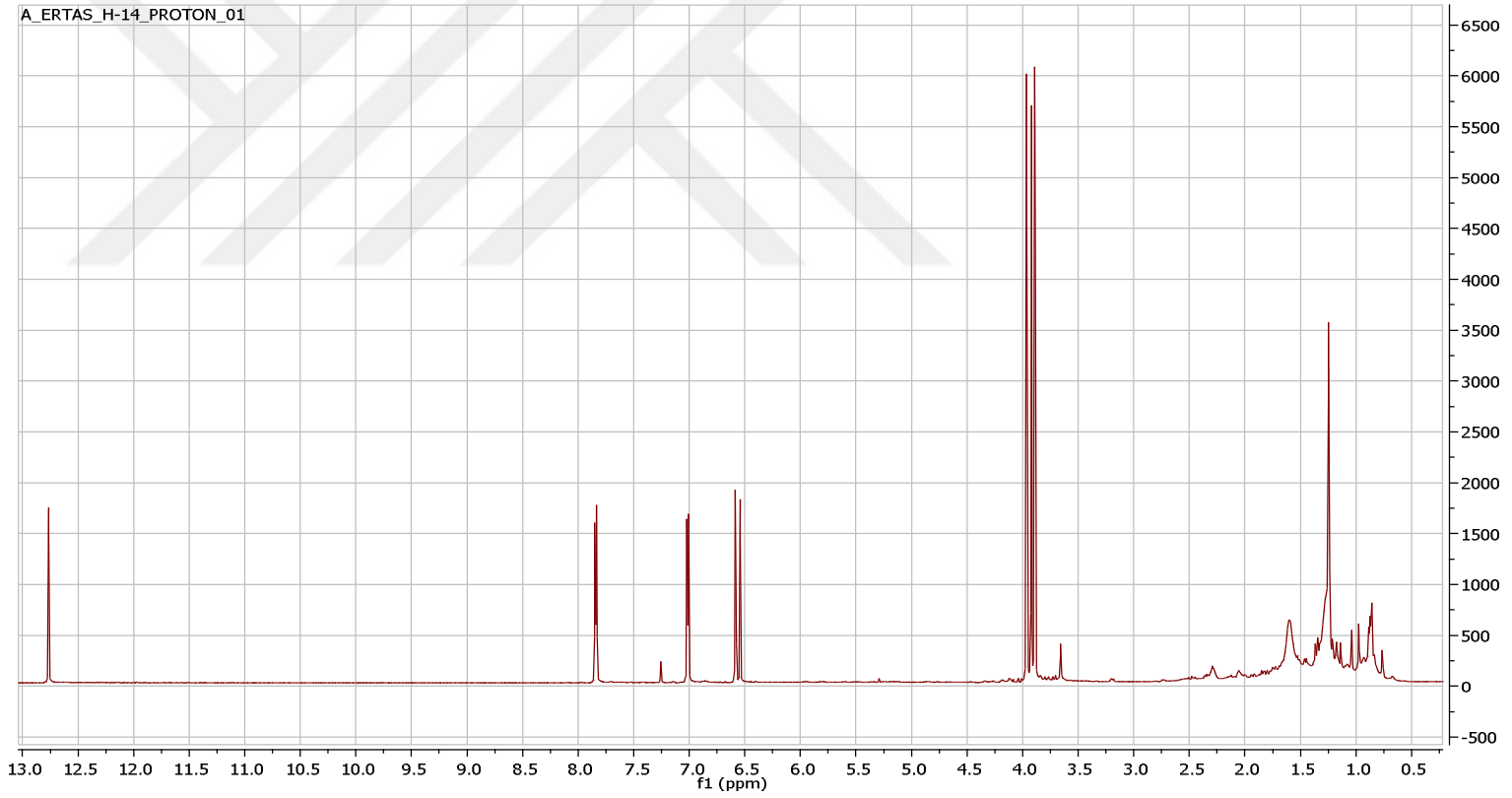
Toprak üstü etanol ekstrelerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile diklorometan/aseton:9.8/0.2 çözücü sisteminde elde edildi (Şekil 90). NMR analiz sonuçlarına göre maddenin yapısının Salvigenin olduğu tespit edildi. 42 mg sarı kristal olarak elde edildi. Sarı renkli kristaller halinde, UV ışık altında (366 nm) ise koyu-mor renkli olarak gözlemlendi (42 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında sarı-kahverengi renk aldı. UV ışık altında 366 nm de koyu mor renkli olarak gözlenmesi, bileşiğin bir flavonoid olabileceğine işaret etti. ¹H NMR (CDCl₃, 600, 400 ve 300MHz) spektrumunda aromatik alanda iki singlet protonu 6,54 ve 6,58 ppm de ve her biri ikişer protonluk iki genişlemiş dubleti 7,02 ve 7,84 ppm de izlendi. UV ışık (366 nm) altındaki rengi ve UV absorpsiyon bantlarının yanı sıra ¹H NMR spektrumundaki 12,77 ppm de izlenen hidrojen bağı yapmış OH grubunun varlığı flavonoidlerdeki C-5 hidroksil grubunun varlığına işaret etmiş ve B halkasındaki karakteristik genişlemiş dublet sinyallerinin multiplisitesi ile kimyasal kayma değerleri yapının p-süstitüe bir flavon olduğunu gösterdi. Biyogenetik olarak flavonlarda genelde C-5 de (12,5 ppm) ve C-7 de OH grubu gözlenir. C-5 deki hidroksilin başka bir grup olarak izlenmesi çok nadirken C-7 deki hidroksil yerine farklı süstitüentlerde yerleşebilir. ¹H NMR spektrumunda δ 3.89, 3.92 ve 3.96 da 3'er protonluk singletler halinde izlenen üç metoksi grubunun lokasyonu ise B halkasındaki C-4' ve A halkasındaki C-6 ve C-7 olarak tespit edildi. Çünkü metoksilerden birinin C-4' da olacağı B halkası protonlarının multiplisitelerinden kesindi ve ¹H NMR da izlenen iki aromatik proton singletinden biri mutlaka H-3'e ait olmalıydı, diğeri ise ya H-8 veya H-6'ya ait olabilirdi. İkinci metoksi bu durumda mutlaka C-7 de, fakat diğeri ise ya C-8 ya da C-6 da olmalıydı. ¹H NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen [M+H]⁺ piki m/z 329,1005 ne dayanarak bu bileşiğin *Salvia* türlerinde çok yaygın olan bileşiğin salvigenin olduğu saptandı ve NMR değerleri literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (101). Tablo 40'da H-14'ün ¹H ve ¹³C NMR değerleri verildi (Şekil 91-96) .



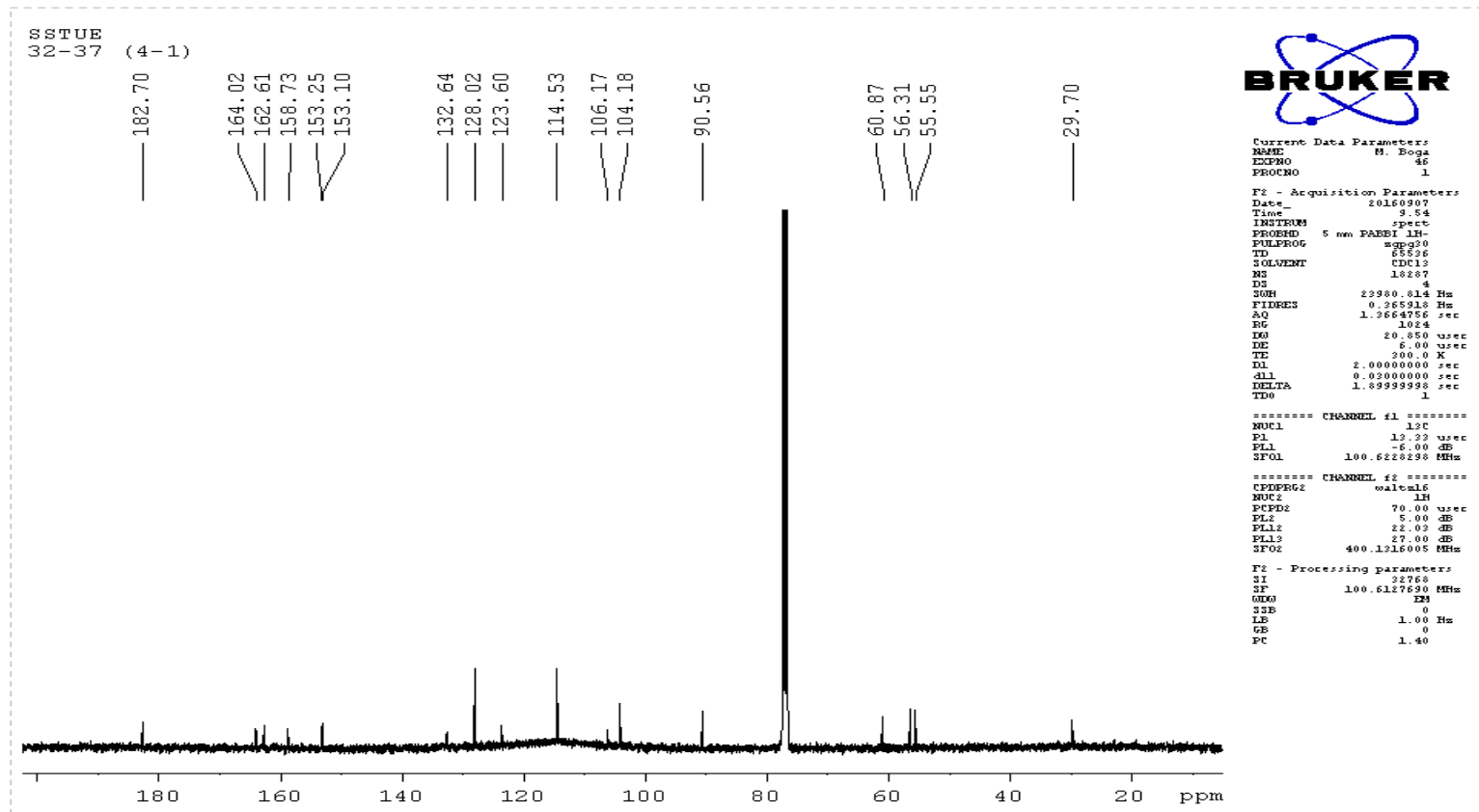
Şekil 90. Salvigenin

Tablo 40. Salvigenin bileşiminin NMR değerleri

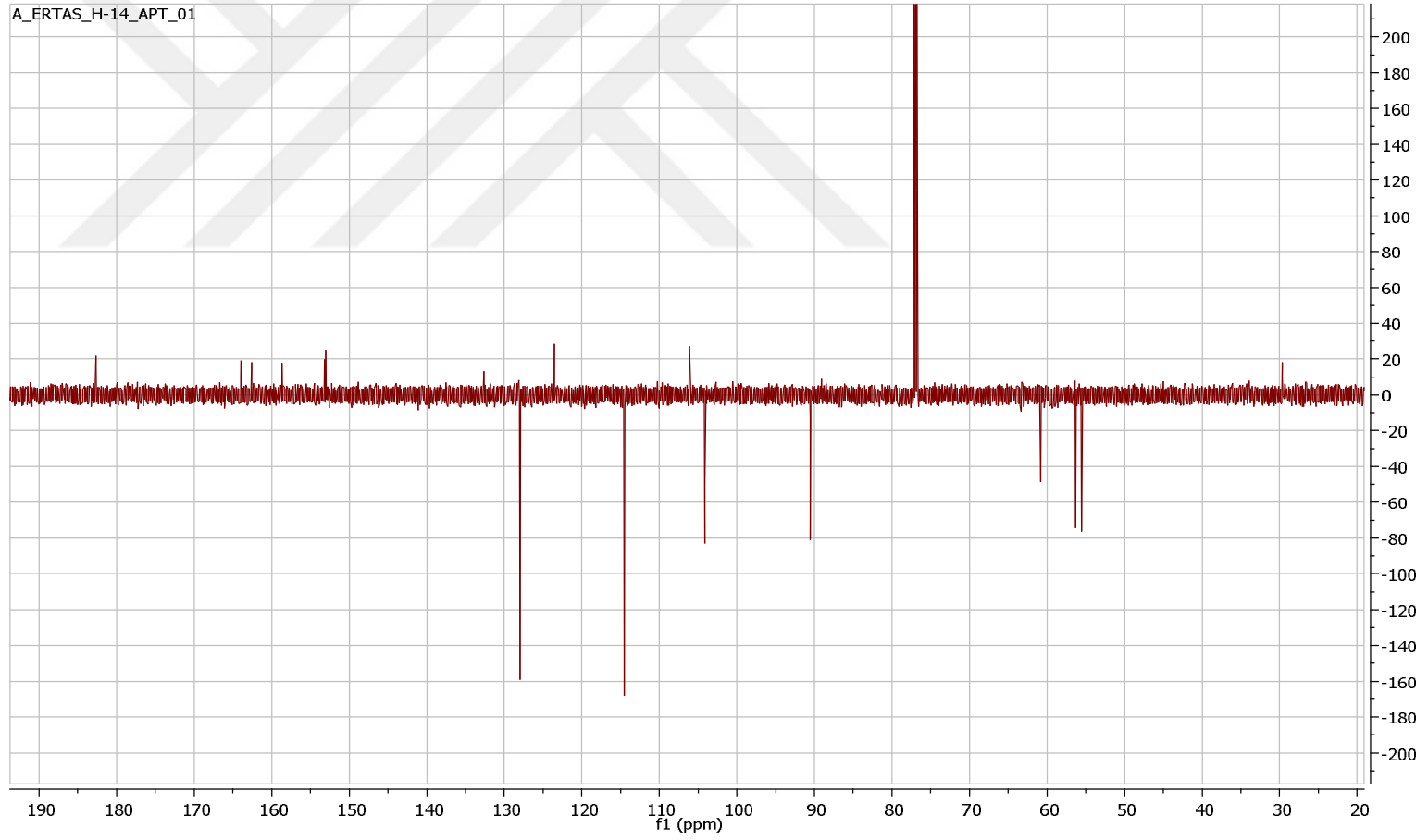
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	106,1	-
2	164,0	-
3	104,1	6,54 s
4	182,7	-
5	153,1	-
6	132,6	-
7	158,7	-
8	90,5	6,58 s
9	153,0	-
10	106,1	-
1'	123,7	-
2'	127,9	7,84 d (J=8,6 Hz)
3'	114,5	7,02 d (J=8,6 Hz)
4'	162,6	-
5'	114,5	7,02 d (J=8,6 Hz)
6'	127,9	7,84 d (J:8,6 Hz)
6-OCH ₃	55,5	3,89 s
7-OCH ₃	56,3	3,92 s
4'-OCH ₃	60,8	3,96 s



Şekil 91. Salvigenin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)

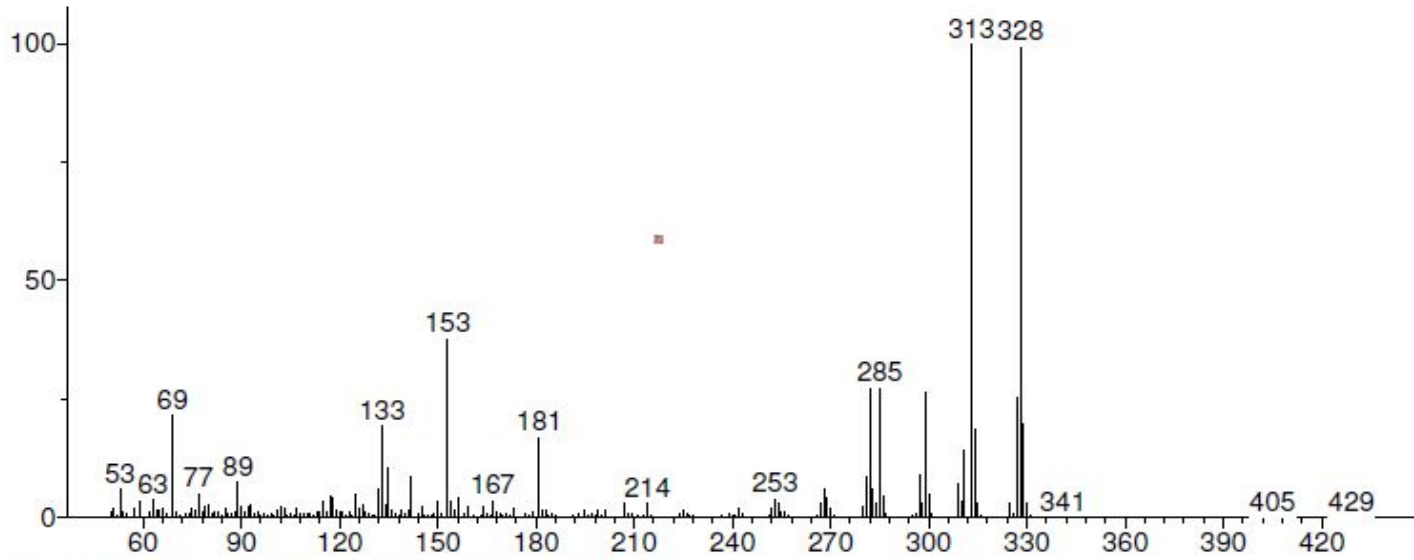


Şekil 92. Salviaenin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)



Şekil 93. Salviaenine bileşiğinin APT spektrumu (CDCl₃, 150 MHz)

Unknown; InLib=667



(Text File) Scan 2929 (24.409 min): H-14(DCM).D\data.ms

Name: Scan 2929 (24.409 min): H-14(DCM).D\data.ms

MW: N/A ID#: 2156 DB: Text File

Comment: H-14(DCM)

10 largest peaks:

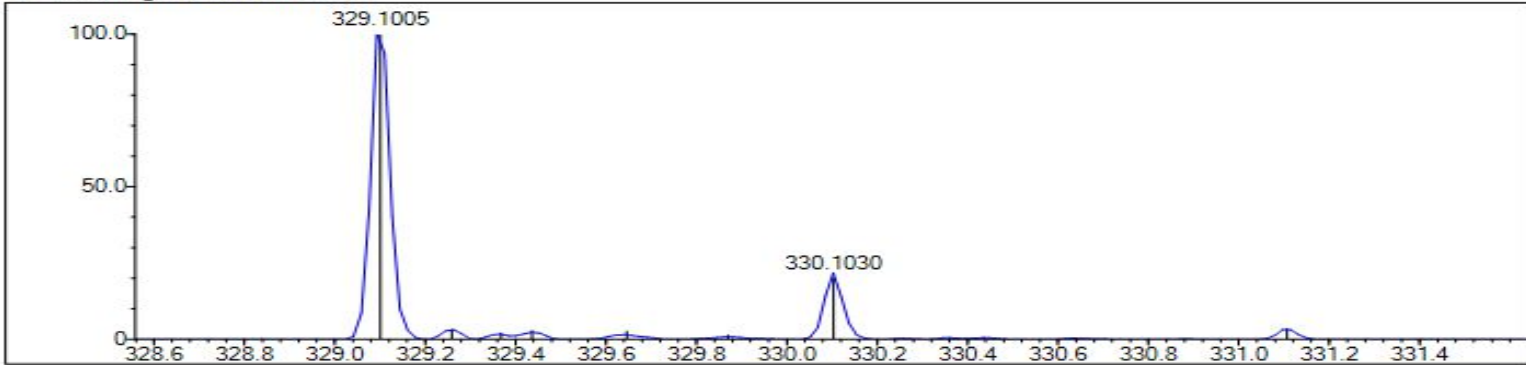
313 999 | 328 993 | 153 379 | 285 276 | 282 274 | 299 262 | 327 252 | 69 217 | 329 196 | 133 195 |

Synonyms:

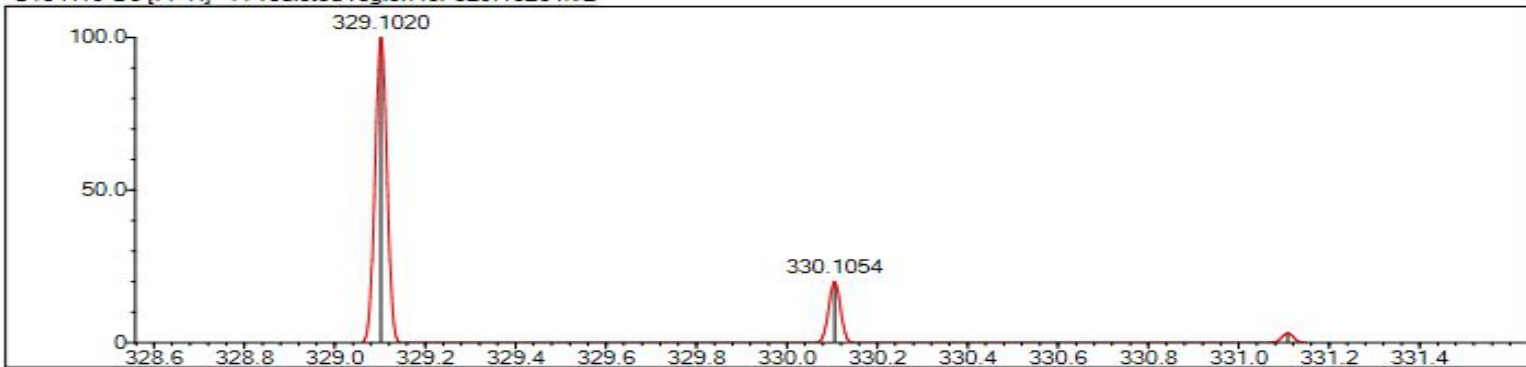
no synonyms.

Şekil 94. Salvigenin bileşiğinin GC-MS spektrumu

Measured region for 329.1005 m/z



C18 H16 O6 [M+H]⁺ : Predicted region for 329.1020 m/z

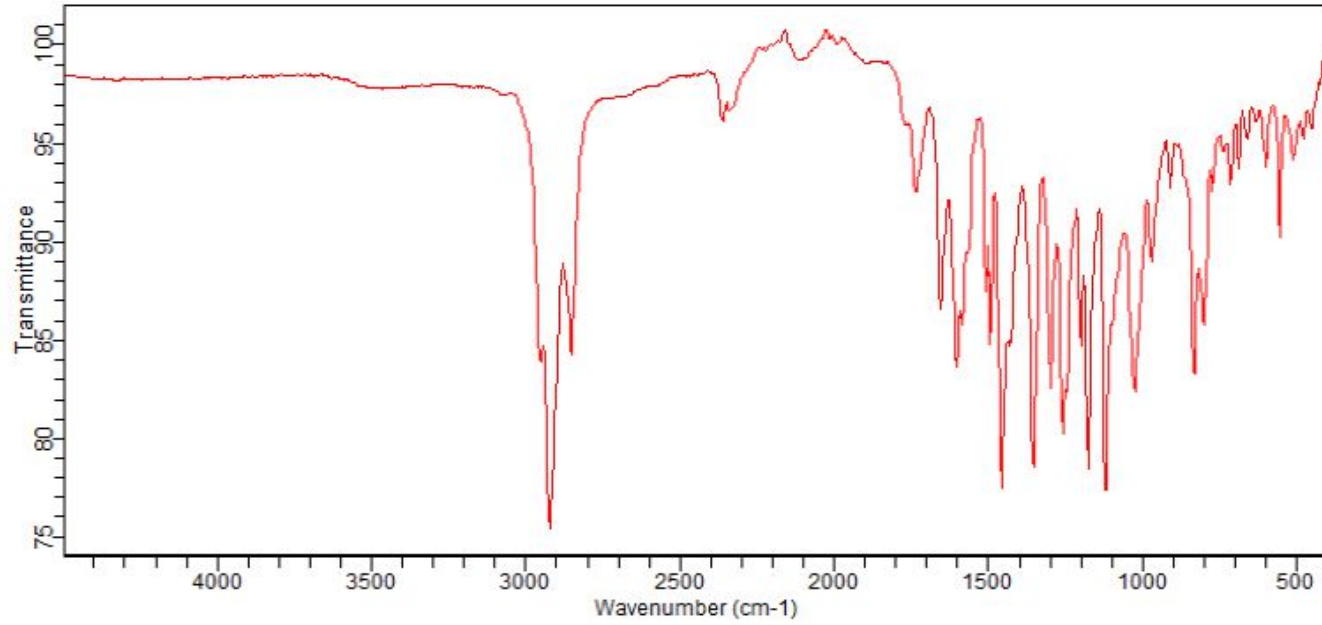


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	91.10	C18 H16 O6	[M+H] ⁺	329.1005	329.1020	-1.5	-4.56	100.00	11.0

Şekil 95. Salvigenin bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:H-14
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\H-14_2018-05-09T16-24-18.a2r

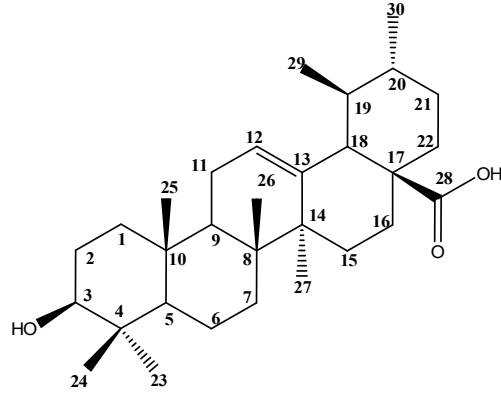
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.09.2018 4:24:18
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 96. Salvigenin bileşiğinin IR spektrumu

5.8.15. Ursolik Asit

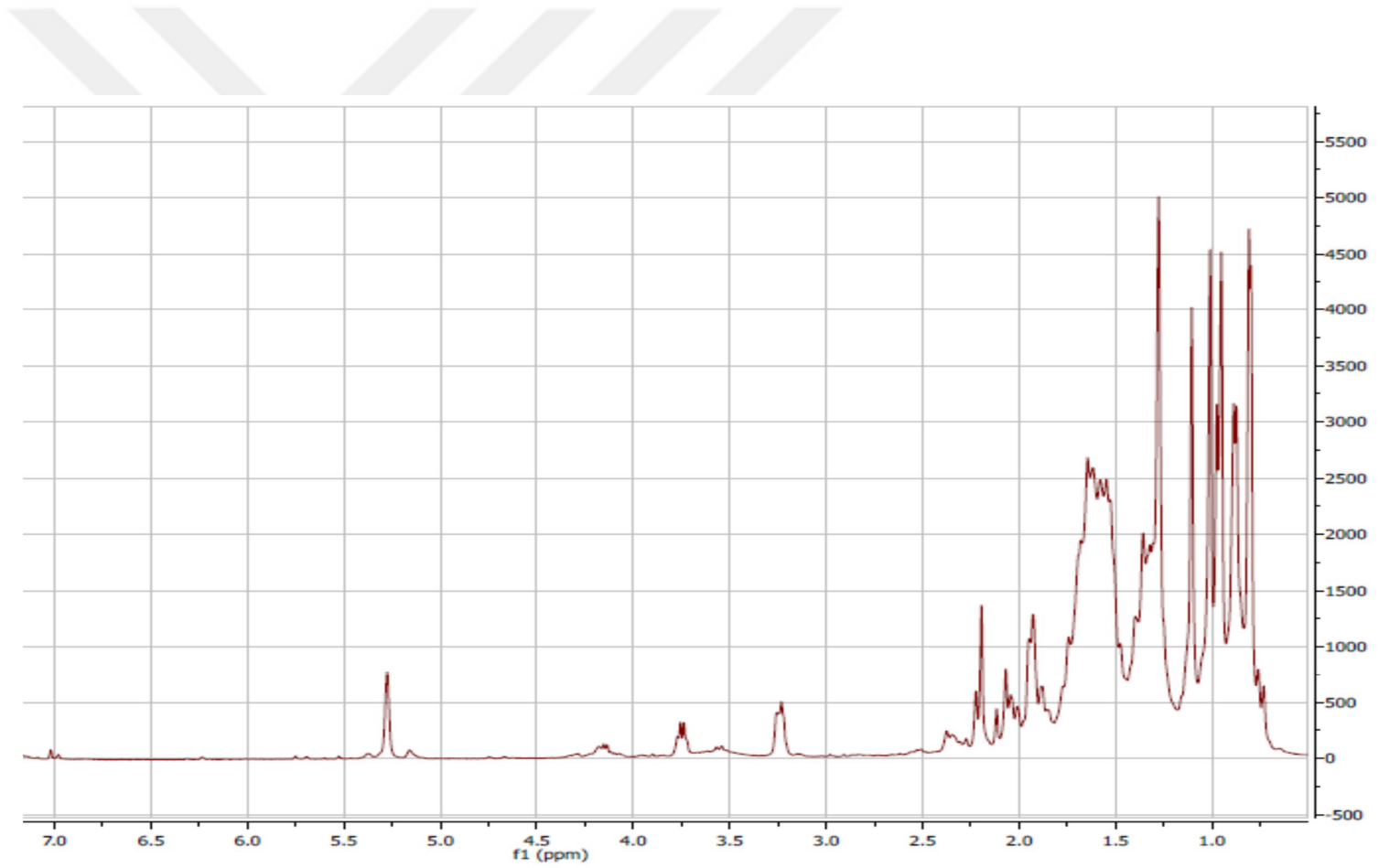
Toprak üstü kısmının etanol ekstresinin ana kolonundan elde edildi. Yapılan ince tabaka kromatografisi sonuçlarına göre en iyi ayrılma (1Ac: 9DCM) çözücü sisteminde 2 kez yürütülerek gözlemlendi. Preperatif İTK ile bu çözücü sisteminde saflaştırma işlemi yapıldı (6mg). Beyaz renkli olan bu bileşik amorf halde elde edildi (Şekil 97). Silikajel plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında pembe-mor renk aldı. ¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 600 ve 400MHz) 0.75-1.15 ppm ler arasında izlenen beş metil singletinin yanı sıra 0.91 ppm de ve 0.78 ppm'de *J* değerleri 6,6 Hz olan iki dublet metilinin varlığı bileşiğin ursan yapısında olduğunu göstermektedir. Oleanolik asit ve ursolik asit bileşiklerinin IR ve kütle spektral bulguları hemen hemen aynı olduklarından bu spektrumlara dayanarak bu bileşik ayırt edilemez, ancak saflaştırma işlemleri sonucu bileşiğin ¹H NMR spektrumunda C-19 ve C-20 deki metil gruplarının dubletler şeklinde ve dolayısıyla ¹³C NMR da metilen (CH₂) ve metin (CH) sayılarının oleanolik asitten farklı olarak gözlenmesi bu bileşiğin ursan yapısında olduğunu göstermektedir. Nitekim ¹H NMR spektrumunda 3,2 ppm civarında izlenen dd (*J*=4,5 ve 10,8Hz) sinyali hidroksile komşu protona (H-3 α), 5.30 ppm deki dar triplet sinyali ise vinilik bir protona (H-12) işaret etti. ¹H NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen [M+Na]⁺ piki *m/z* 479,3500'e (C₃₀H₄₈O₃) dayanarak bu bileşiğin *Salvia* türlerinde çok yaygın olan ursolik asit (3 β -hidroksi-urs-12-en-28-oik asit) olduğu saptandı ve NMR değerleri literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (240). Tablo 41'de ¹H ve ¹³C NMR değerleri verildi (Şekil 98-100).



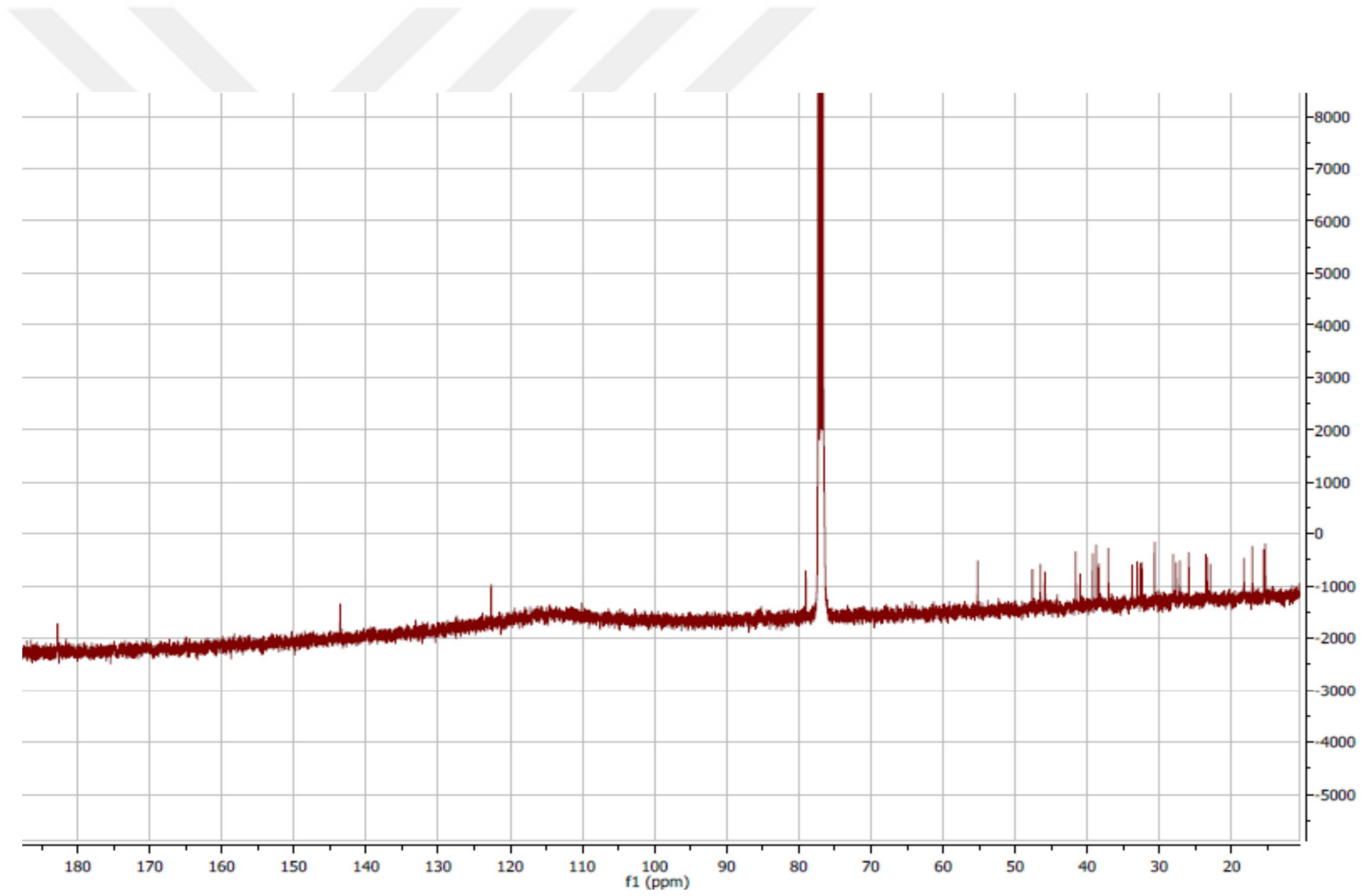
Şekil 97. Ursolik Asit

Tablo 41. Ursolik asit bileşiğinin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	39,1	-
2	27,2	-
3	79,2	3,20 dd (10,8;4,5 Hz)
4	39,4	-
5	55,1	-
6	19,1	-
7	33,5	-
8	39,2	-
9	47,5	-
10	37,1	-
11	23,6	-
12	123,2	5,30 t (J = 2,5 Hz)
13	143,5	-
14	41,5	-
15	28,1	-
16	23,6	-
17	46,5	-
18	40,1	2,16 d (J=11 Hz)
19	38,9	-
20	38,7	-
21	33,8	-
22	32,6	-
23	28,1	1,01 s
24	15,5	0,75 s
25	15,3	0,95 s
26	17,1	0,80 s
27	25,9	1,15 s
28	183,1	-
29	33,1	0,78 d (J=6,6 Hz)
30	23,6	0,92 d (J=6,6 Hz)

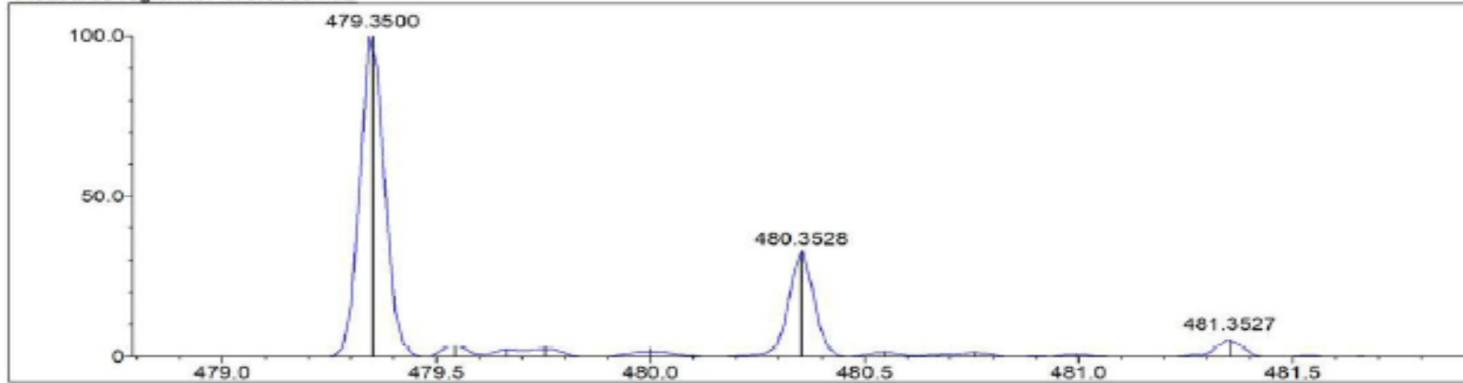


Şekil 98. Ursolik asit bileşiğinin ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)

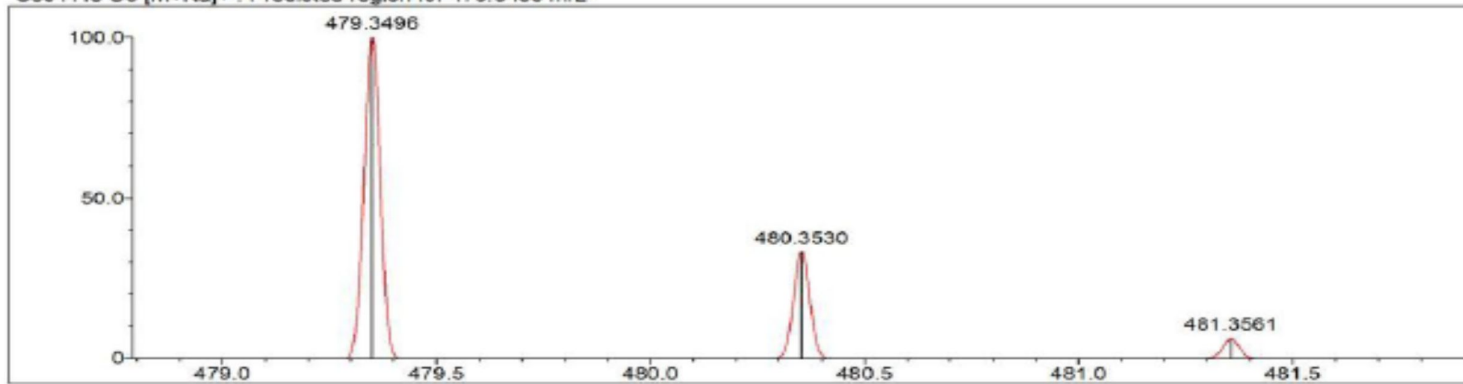


Şekil 99. Ursolik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

Measured region for 479.3500 m/z



C₃₀H₄₈O₃ [M+Na]⁺ : Predicted region for 479.3496 m/z

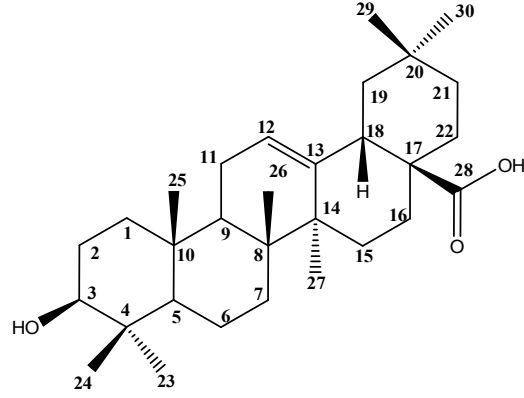


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	96.82	C ₃₀ H ₄₈ O ₃	[M+Na] ⁺	479.3500	479.3496	0.4	0.83	96.82	7.0

Şekil 100. Ursolik asit bileşiminin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.16. Oleanolik asit

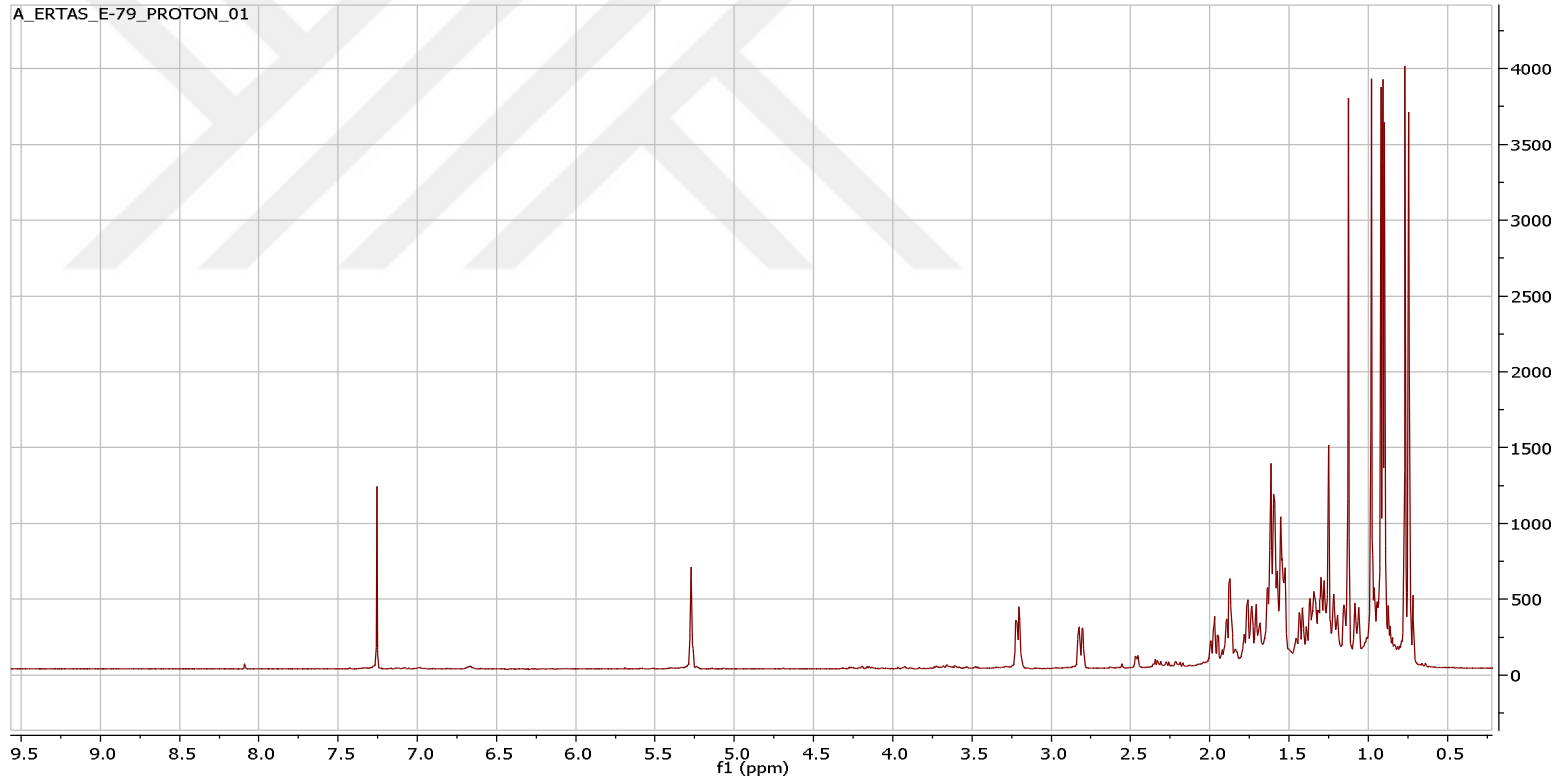
Toprak üstü kısmının etanol ekstresinin ana kolonundan elde edildi. Beyaz renkli olan bu bileşik silika jel kaplı plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında pembe-mor renk aldı (Şekil 101). ¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 600 ve 400MHz) 0,75-1,25 ppm arasında çıkan metil pikleri singletler şeklindedir. Tüm metillerin singletler halinde izlenmesi bileşiğin oleanan iskeletine sahip olduğuna işaret etti. 3,22 ppm deki dublet dublet ($J= 3,7$ ve $11,2$ Hz) hidroksile komşu α - protona, 5,25 ppm deki triplet ($J=2,5$ Hz) ise bir olefinik protona (vinilik protona) işaret etmektedir. Ayrıca 2,81 ppm de izlenen $J=2,6$ ve $J=13,0$ Hz’lik dd etkileşim gösteren pikin ise H-18 protonuna ait olduğu ve hatta bu sinyalin bu kadar aşağı alanda izlenmesinin nedeni ise C-17’ye bağlı (-COOH) asit grubundan ileri geldiği düşünüldü. Birbirinin izomeri olan oleanolik asit ile ursolik asiti birbirinden ¹H NMR da ayıran en karakteristik pikler H-19 ve H-20 ye bağlı metil sinyalleri ve H-19 protonu ile etkileşen H-18 sinyalinin verdiği bölünme ve kayma değeridir. Oleanolik asitde H-18 β sinyali bu bileşikte de izlendiği gibi daima 2,6 ve 13 Hz lik karakteristik dublet dubletler halinde 2,8 ppm civarında izlenir. Nitekim ¹³C NMR’ın da asit karbonili 183,3 ppm de, Δ^{12} çifte bağ karbonları 122,6 ve 143,6 da, hidroksil taşıyan karbon (C-3) ise 79,0 de izlendi. ¹H NMR sinyallerinin kayma değerleri ve LC-MS-IT-TOF’ta izlenen $[M+Na]^+$ piki m/z 479,3500’e (C₃₀H₄₈O₃) dayanarak bu bileşiğin *Salvia* türlerinde çok yaygın olan oleanolik asit (3 β -hidroksiolean-12-en-28-oik asit) olduğu saptandı ve NMR değerleri literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (240). Tablo 42’de ¹H ve ¹³C NMR değerleri verildi (Şekil102-105).



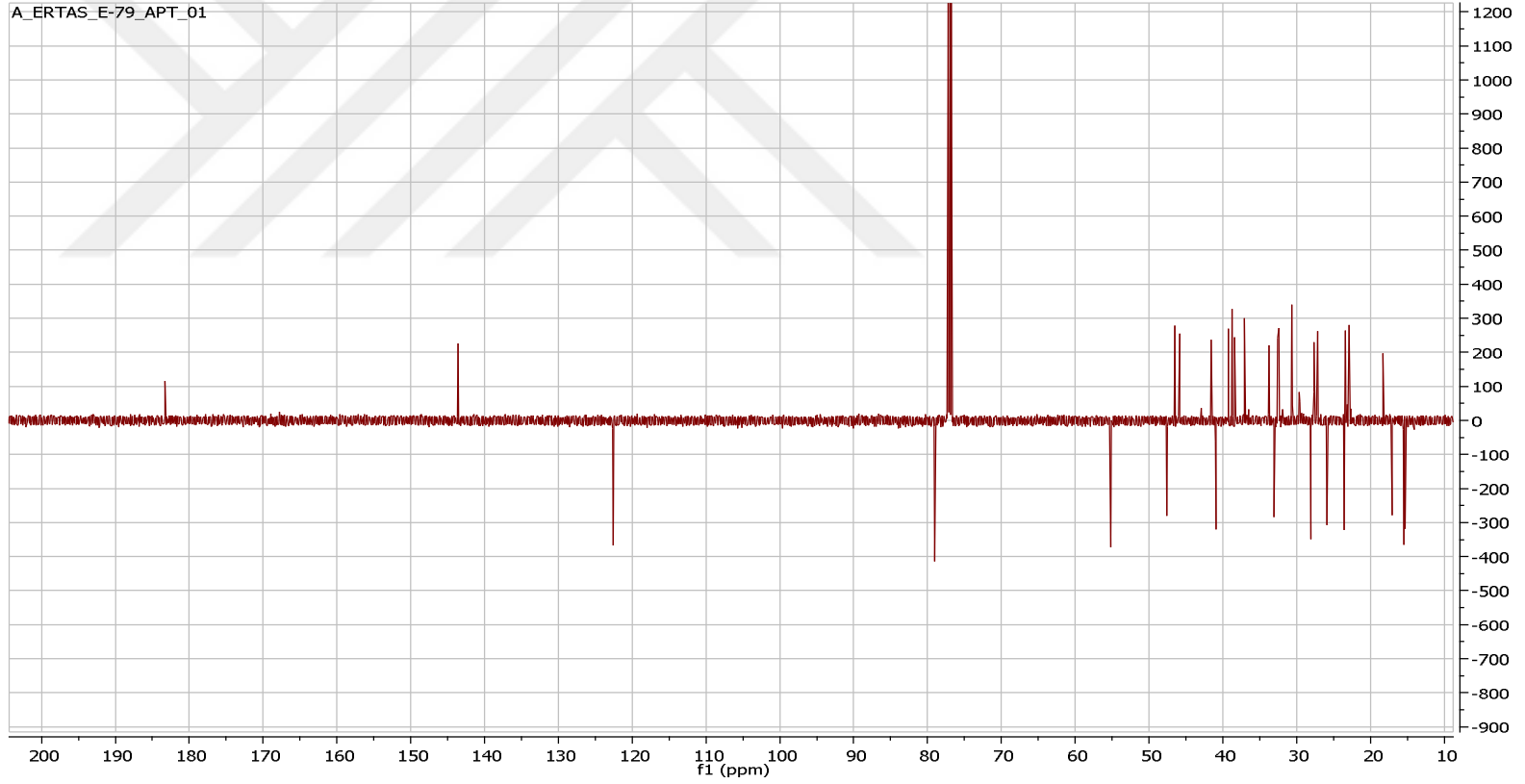
Şekil 101. Oleanolik asit

Tablo 42. Oleanolik asit bileşiminin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	39,2	-
2	27,1	-
3	79,0	3,22 dd (11,2;3,7 Hz)
4	38,7	-
5	55,2	-
6	18,3	-
7	33,7	-
8	39,3	-
9	47,6	-
10	37,1	-
11	23,6	-
12	122,6	5,22 t (J = 2,5 Hz)
13	143,6	-
14	41,5	-
15	28,1	1,71 m
16	23,6	1,96 m
17	46,5	-
18	40,1	2,81 dd (J=13,0;2,6 Hz)
19	45,9	-
20	30,7	-
21	33,8	-
22	32,6	-
23	28,1	0,94 s
24	15,5	0,74 s
25	15,3	0,89 s
26	17,1	0,77 s
27	25,9	1,1 s
28	183,3	-
29	33,1	0,87 s
30	23,6	0,90 s

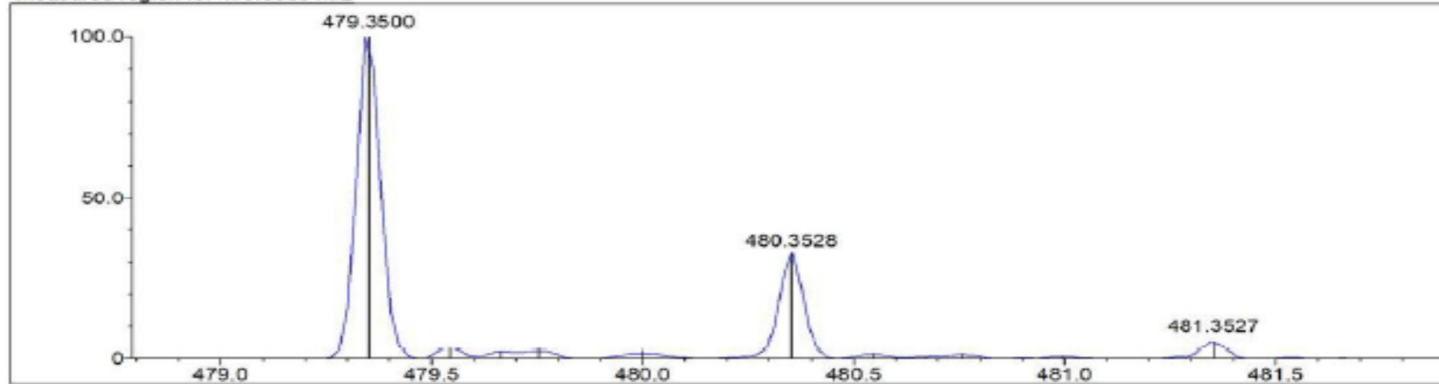


Şekil 102. Oleanolik asit bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)

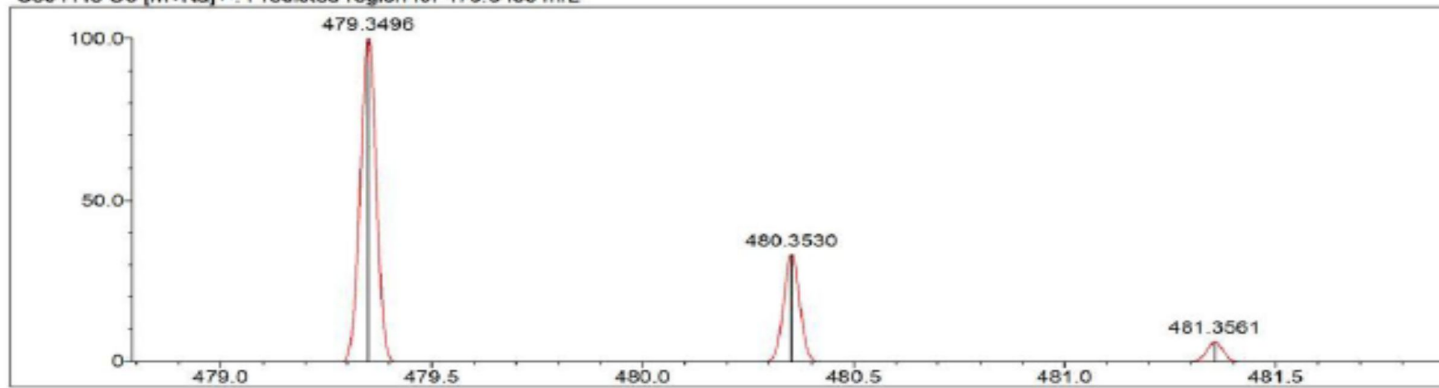


Şekil 103. Oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

Measured region for 479.3500 m/z



C30 H48 O3 [M+Na]⁺ : Predicted region for 479.3496 m/z

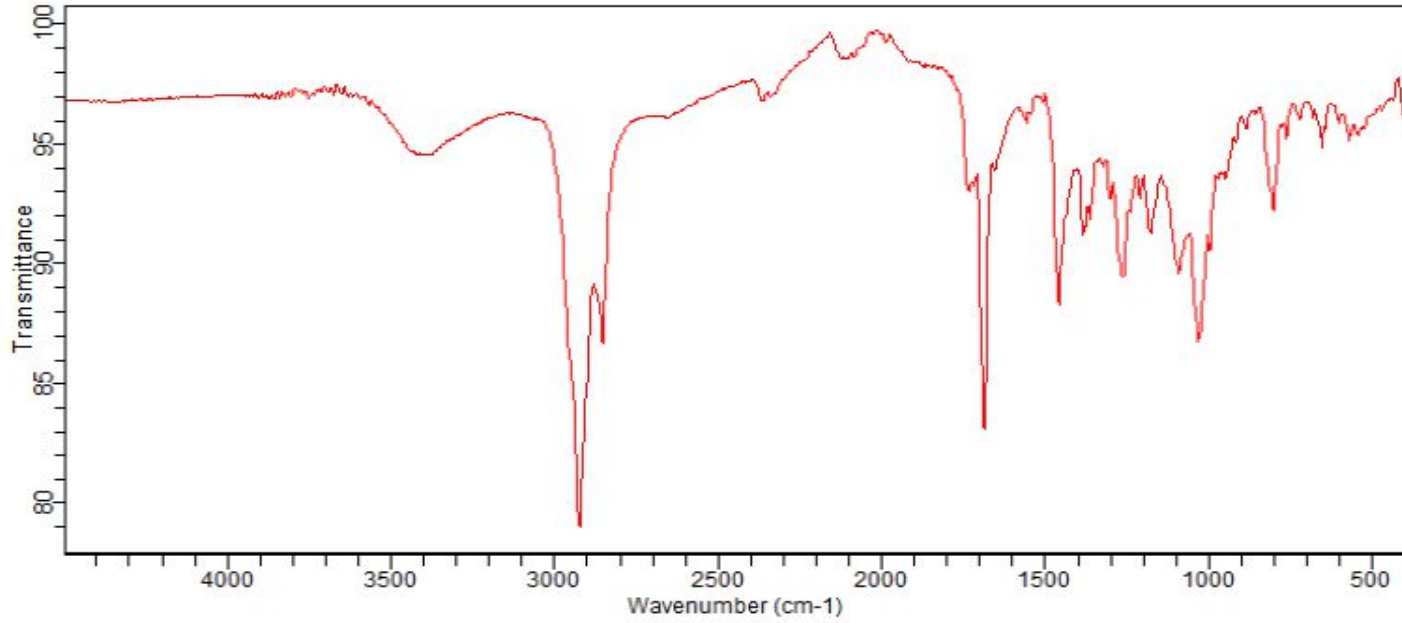


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	96.82	C30 H48 O3	[M+Na] ⁺	479.3500	479.3496	0.4	0.83	96.82	7.0

Şekil 104. Oleanolik asit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:E-79
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\E-79_2018-05-10T12-16-18.a2r

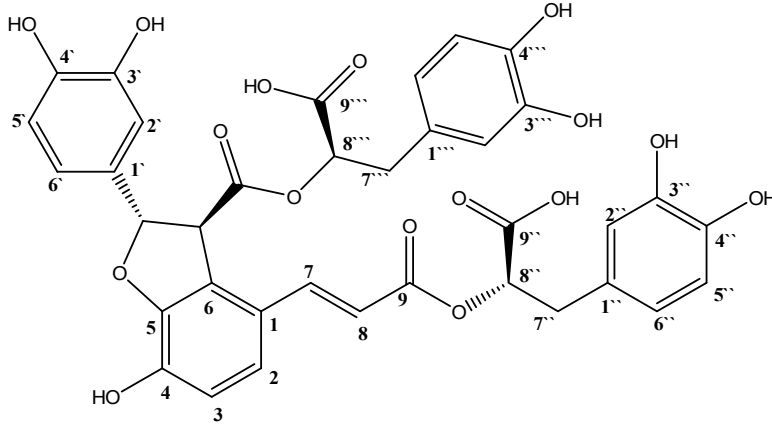
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.10.2018 12:16:18
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 105. Oleanolik asit bileşğinin IR spektrumu

5.8.17. Salvianolik asit B

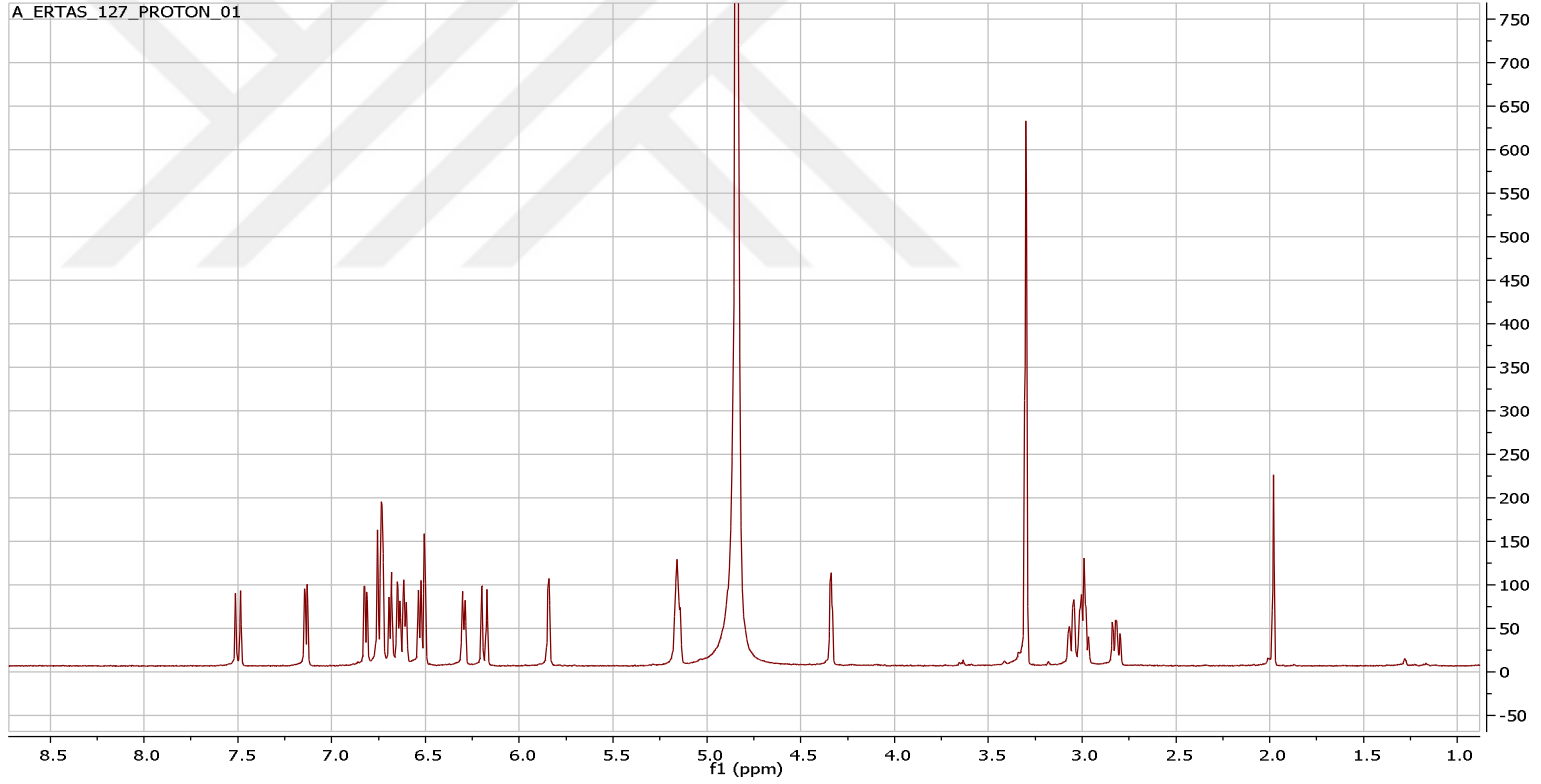
Toprak üstü kısımlarının etanol ekstratlarından preparatif HPLC’de MeOH/Su çözücü sisteminde elde edildi. Beyaz renkte toz halde 21 mg elde edildi (Şekil 106). ¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD, 600 MHz) δ 7.50- 6.17 ppm’ de aromatik bölgede 13 sinyal izlendi. Ayrıca δ 5.84 *d* (*J*=4.1 Hz), 5.15 *d* (*J*=9.2 Hz) ve 5.17 *d* (*J*=9.0 Hz) ppm’de oksijenlenmiş proton sinyalleri izlendi. APT (CD₃OD, 150 MHz) spektrumu değerlendirildiğinde yapıda δ 168.2, 172.4, 172.4 ve 172.2 ppm’de karbonil karbonları izlendi. Bunlara ilaveten δ 146.9, 149.2, 146.1, 143.3, 146.7, 146.2, 145.2 ve 145.1 ppm’de oksijenlenmiş karbonlar izlendi. Bu sinyaller genelde aromatik halkalara OH grubu bağlandığında izlenebilmektedir. Daha ileri NMR analizlerine devam etmeden önce elde edilen spektral değerler literatür ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucu δ 6.82 *d* (*J*=8.3 Hz), 7.14 *d* (*J*=8.4 Hz), 7.50 *d* (*J*=15.9 Hz) ve 6.19 *d* (*J*=15.9 Hz) ppm’de izlenen sinyallerin *salvia* türlerinde rastlanan biyolojik özellikleri nedeniyle önemli bir bileşik olan Salvianolik Asit B’nin A kısmında izlenen protonlar, δ 6.50 *brs*, 6.53 *d* (*J*=7.9 Hz), 6.30 *d* (*J*=7.9 Hz), 3.0-2.84 *m*, 5.15 *d* (*J*=9.2 Hz) ppm’de izlenen sinyallerin B kısmındaki protonlar, δ 6.73 *brs*, 6.73 *brs*, 6.76 *brs*, 5.84 *d* (*J*=4.1 Hz), 4.34 *d* (*J*=4.2 Hz) sinyallerin C kısmındaki protonlar ve δ 6.64 *d* (*J*=8.1 Hz), 6.69 *d* (*J*=8.0 Hz), 6.61 *d* (*J*=7.9 Hz), 3.0-2.84 *m*, 5.17 *d* (*J*=9.0 Hz) sinyallerin D kısmındaki protonlar ile örtüştüğü görüldü. ¹H ve ¹³C NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF ta izlenen M-H piki *m/z* 717.1461 (C₉H₈O₃) ne dayanarak bu bileşiğin salvianolik Asit B olduğu saptandı ve literatür ile NMR değerleri (Tablo 43) kıyaslanarak yapı doğrulandı (251, 252) (Şekil 107-110).



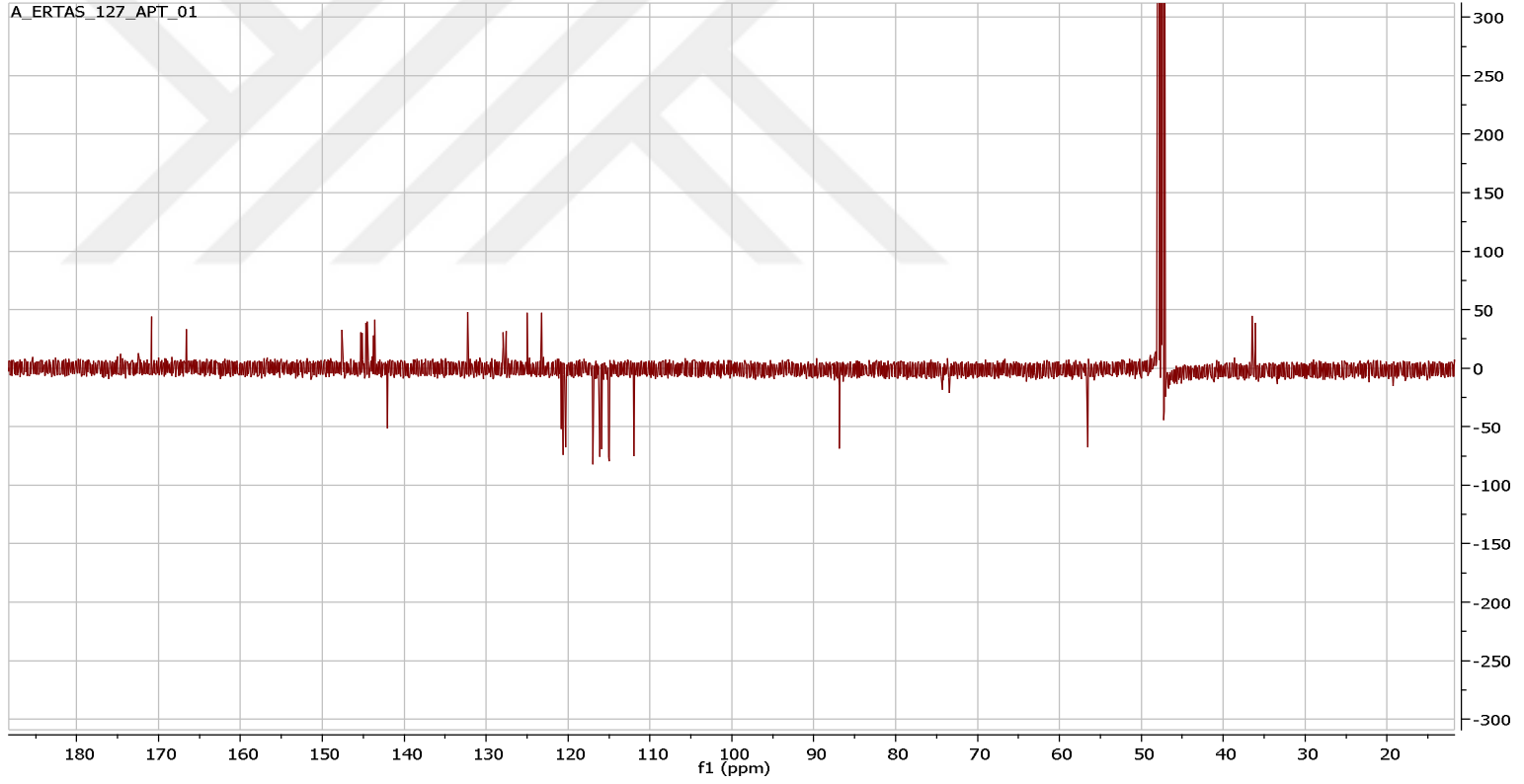
Şekil 106. Salvianolik asit B

Tablo 43. Salvianolik asit B bileşiminin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	124.8	-
2	126.6	-
3	146.9	-
4	149.2	-
5	118.6	6.82 <i>d</i> (<i>J</i> =8.3 Hz)
6	121.8	7.14 <i>d</i> (<i>J</i> =8.4 Hz)
7	143.6	7.50 <i>d</i> (<i>J</i> =15.9 Hz)
8	117.7	6.19 <i>d</i> (<i>J</i> =15.9 Hz)
9	168.2	-
1'	133.8	-
2'	113.5	6.73 <i>brs</i>
3'	146.1	-
4'	143.3	-
5'	116.5	6.73 <i>brs</i>
6'	118.5	6.76 <i>brs</i>
7'	88.4	5.84 <i>d</i> (<i>J</i> =4.1 Hz)
8'	58.1	4.34 <i>d</i> (<i>J</i> =4.2 Hz)
9'	172.4	-
1''	129.1	-
2''	116.8	6.50 <i>brs</i>
3''	146.7	-
4''	146.2	-
5''	116.6	6.53 <i>d</i> (<i>J</i> =7.9 Hz)
6''	122.2	6.30 <i>d</i> (<i>J</i> =7.9 Hz)
7''	38.0	3.0-2.84 <i>m</i>
8''	74.99	5.15 <i>d</i> (<i>J</i> =9.2 Hz)
9''	172.4	-
1'''	129.5	-
2'''	117.4	6.64 <i>d</i> (<i>J</i> =8.1 Hz)
3'''	145.2	-
4'''	145.1	-
5'''	118.5	6.69 <i>d</i> (<i>J</i> =8.0 Hz)
6'''	122.4	6.61 <i>d</i> (<i>J</i> =7.9 Hz)
7'''	37.68	3.0-2.84 <i>m</i>
8'''	75.87	5.17 <i>d</i> (<i>J</i> =9.0 Hz)
9'''	172.2	-

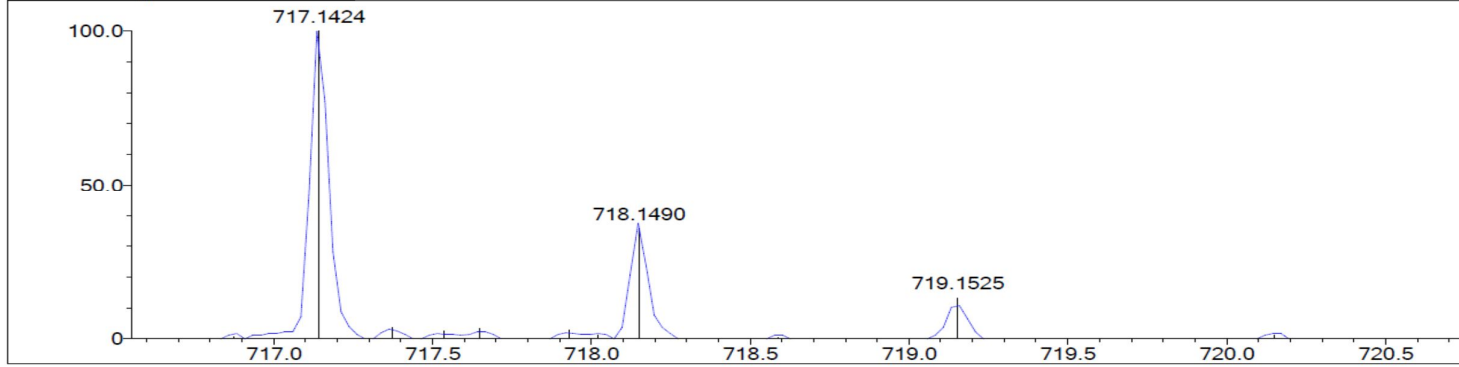


Şekil 107. Salvanolik Asit B bileşiminin ¹H NMR spektrumu (CD₃OD, 600 MHz)

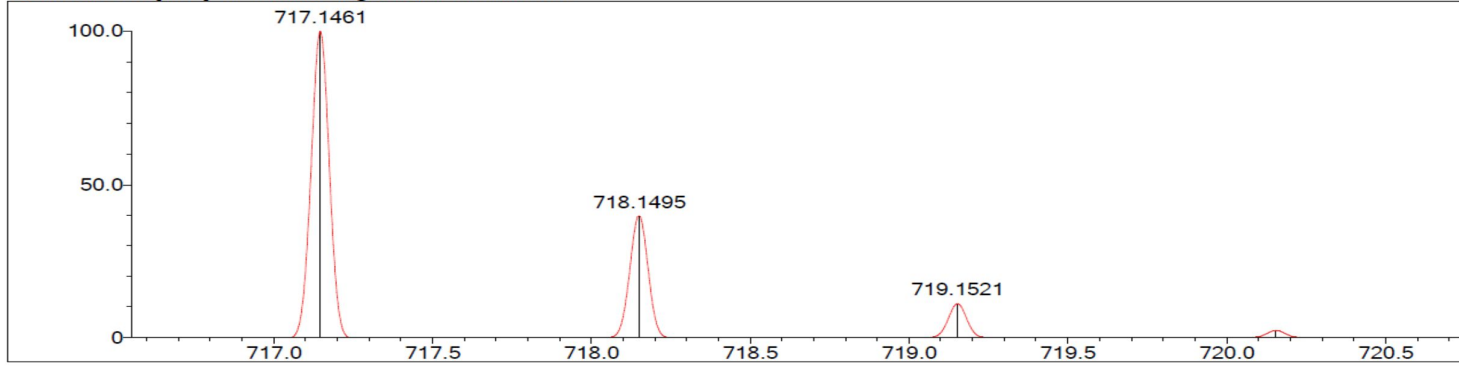


Şekil 108. Salvanolik Asit B bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)

Measured region for 717.1424 m/z



C36 H30 O16 [M-H]⁻ : Predicted region for 717.1461 m/z

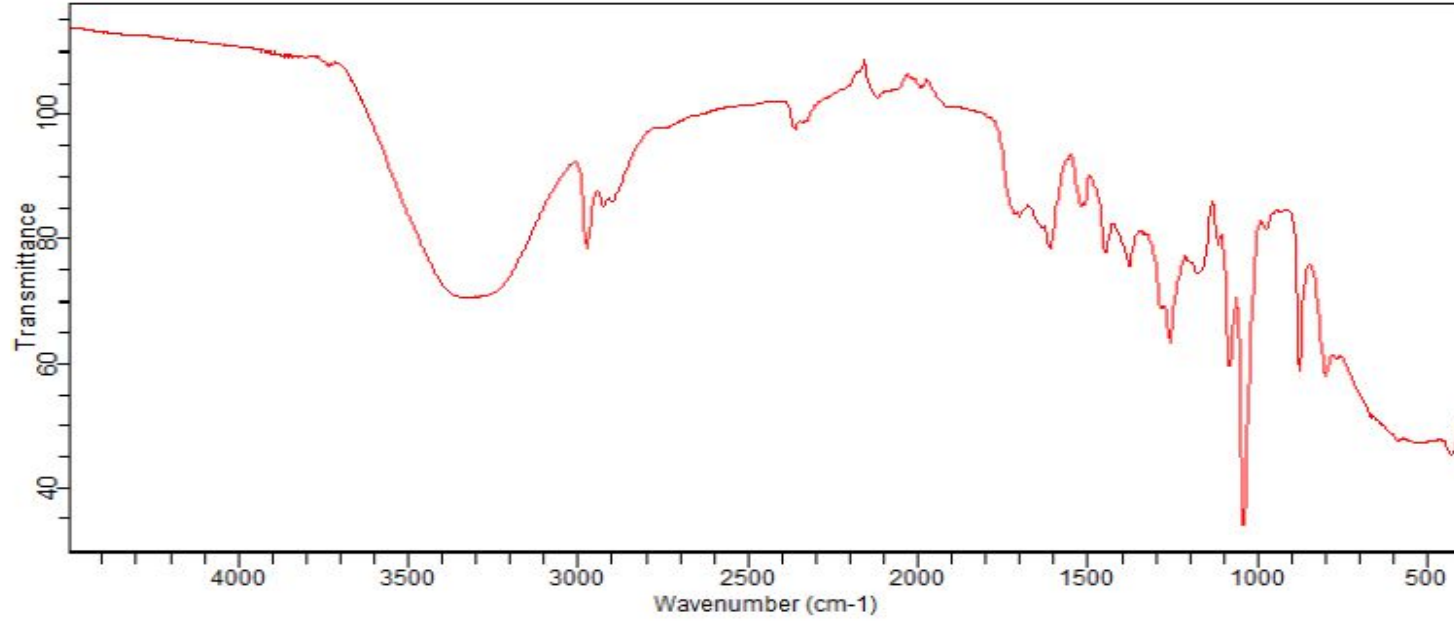


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	66.45	C36 H30 O16	[M-H] ⁻	717.1424	717.1461	-3.7	-5.16	75.17	22.0

Şekil 109. Salvanolik Asit B bileşiminin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:C-127
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\C-127_2018-05-10T11-06-46.a2r

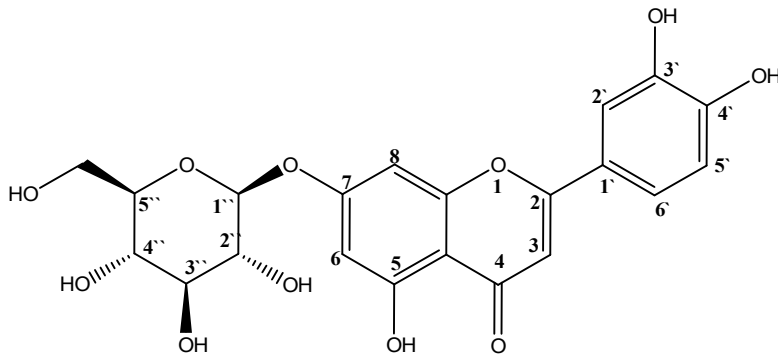
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.10.2018 11:06:46
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 110. Salvanolik asit B bileşğinin IR spektrumu

5.8.18. Luteolin 7-Glikosid

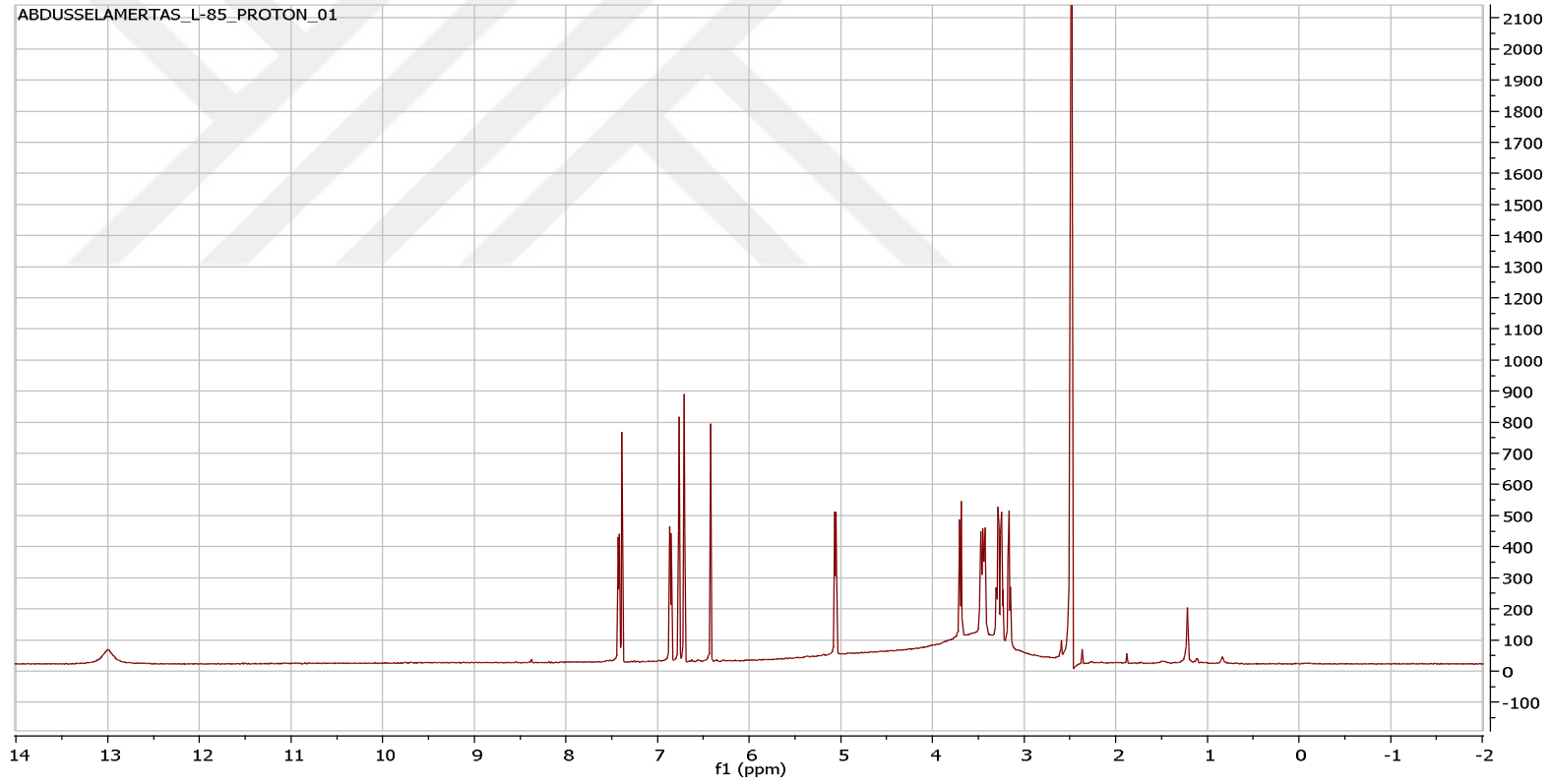
Toprak üstü kısımlarının etanol ekstratlarından preparatif HPLC’de MeOH/Su çözücü sisteminde elde edildi (Şekil 111). $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (CD_3OD 600 MHz) δ 7.44- 6.44 ppm’ de aromatik bölgede 6 sinyal izlendi. δ 3.71 ve 3.25 ppm arasında bir şeker molekülündeki hidroksillenmiş protonları gösteren protonlarla birlikte δ 5.08 *d* ($J=7.3$ Hz) ppm’de şeker olduğu düşünülen molekül anomerik protonu izlendi. APT ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) spektrumu değerlendirildiğinde yapıda δ 181.7. Bunlara ilaveten δ 161.1, 145.9 ve 150.7 ppm’de oksijenlenmiş karbonlar izlendi. Bu sinyaller genelde aromatik halkalara OH grubu bağlandığında izlenebilmektedir. Aromatik bölgede izlenen protonlar ve şeker molekülüne ait sinyaller birlikte değerlendirildiğinde yapının şeker bağlı bir flavonoid olabileceği düşünüldü. Daha ileri NMR analizlerine devam etmeden önce elde edilen spektral değerler literatür ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucu δ 6.73 *s*, 6.44 *s*, 6.78 *s*, 7.40 *s*, 6.87 *d* ($J=8.2$ Hz) ve 7.44 *d* ($J=8.4$ Hz) ppm’de izlenen sinyallerin luteolin iskeletine ait olduğu görüldü. δ 5.08 *d* ($J=7.3$ Hz) ppm ‘de izlenen anomerik proton ile 3.71- 3.25 ppm de izlenen diğer protonların glukoz yapısı ile örtüştüğü görüldü. ^1H ve ^{13}C NMR sinyallerinin kayma değerleri ve LC-MS-IT-TOF ta izlenen M-H piki m/z 447.0933 ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$) ne dayanarak bu bileşiğin luteolin 7-glikosid olduğu saptandı ve literatür ile NMR değerleri (Tablo 44) kıyaslanarak yapı doğrulandı (50, 252-255) (Şekil 112-115).



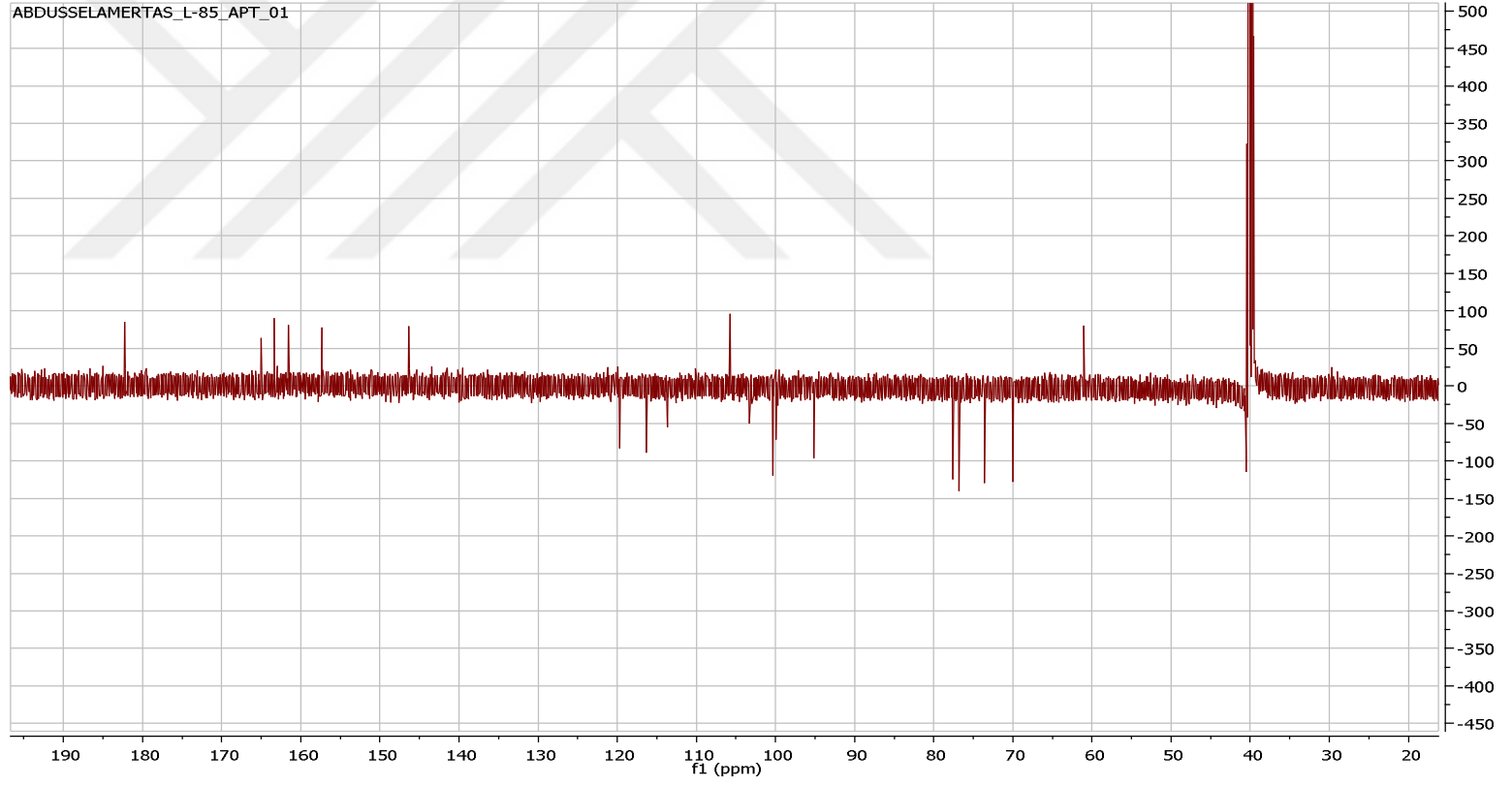
Şekil 111. Luteolin 7-Glikosid

Tablo 44. Luteolin-7-glikozit bileşiminin NMR değerleri

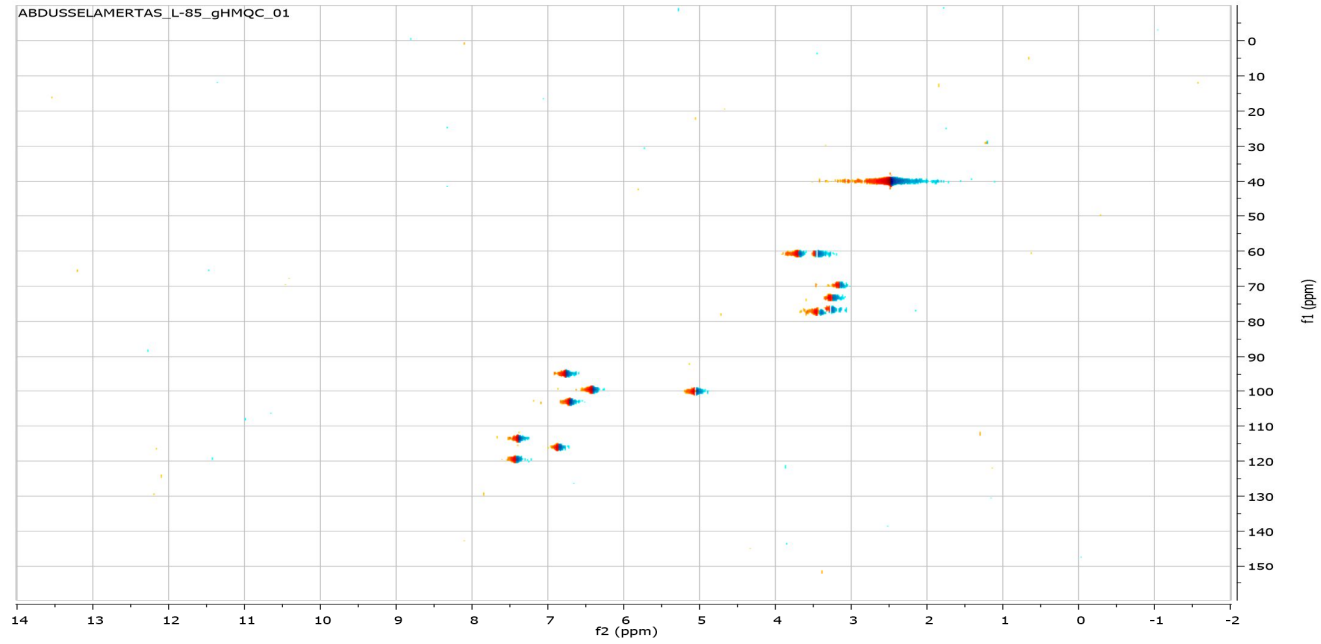
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	-	-
2	164.5	-
3	102.9	6.73 <i>s</i>
4	181.7	-
5	161.1	-
6	99.46	6.44 <i>s</i>
7	162.9	-
8	94.6	6.78 <i>s</i>
9	156.9	-
10	105.5	-
1'	120.7	-
2'	113.2	7.40 <i>s</i>
3'	145.9	-
4'	150.7	-
5'	115.9	6.87 <i>d</i> (<i>J</i> =8.2 Hz)
6'	119.2	7.44 <i>d</i> (<i>J</i> =8.4 Hz)
1''	99.8	5.08 <i>d</i> (<i>J</i> =7.3 Hz)
2''	73.0	3.30 <i>m</i>
3''	76.4	3.26 <i>m</i>
4''	69.5	3.25 <i>t</i> (<i>J</i> =8.9 Hz)
5''	77.1	3.43 <i>m</i>
6''	60.6	3.71 <i>d</i> (<i>J</i> =7.3 Hz) - 3.43 <i>m</i>



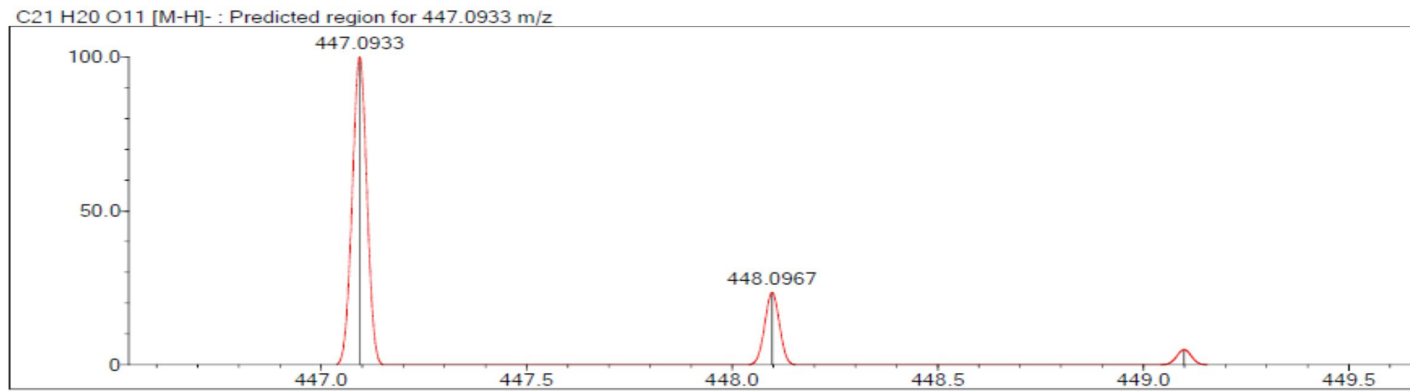
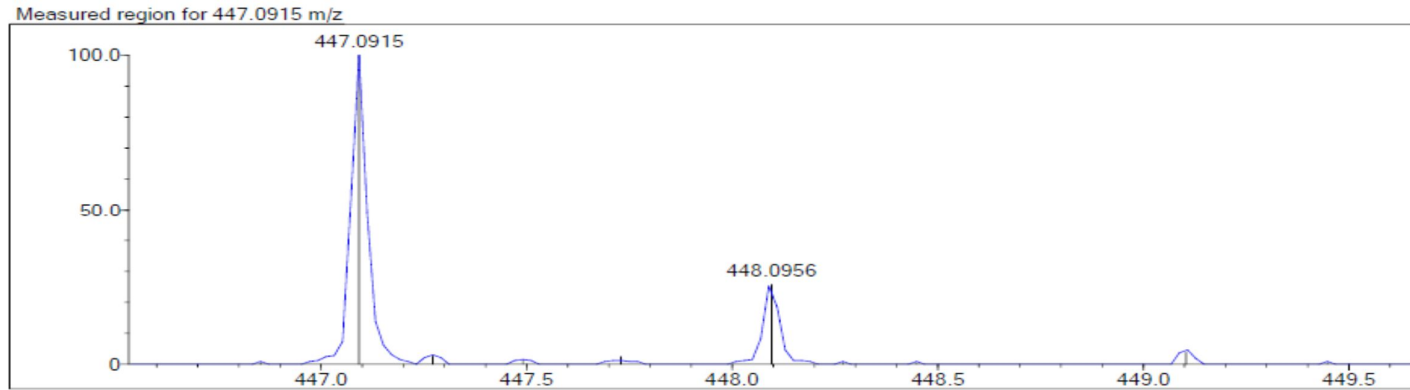
Şekil 112. Luteolin 7-Glikosit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CD_3OD , 600 MHz)



Şekil 113. Luteolin 7-Glikosit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)



Şekil 114. Luteolin 7-Glikosid bileşiğinin HMQC spektrumu (CD₃OD, 600 MHz)

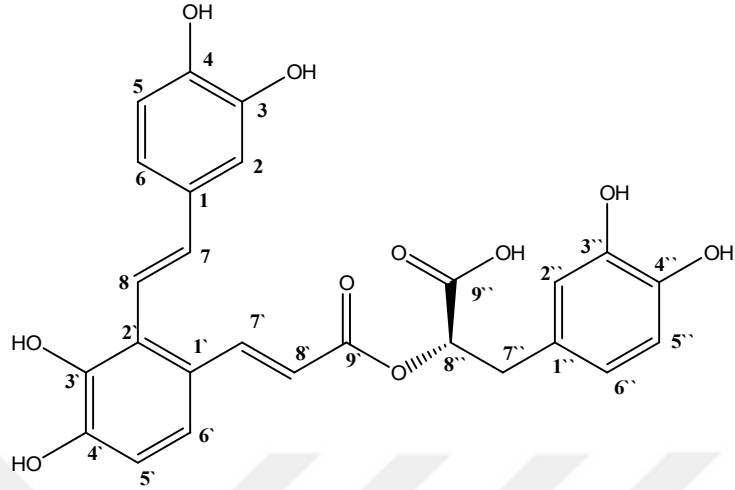


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	77.63	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	447.0915	447.0933	-1.8	-4.03	84.00	12.0

Şekil 115. Luteolin 7-Glikosit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.19. Salvianolik asit A

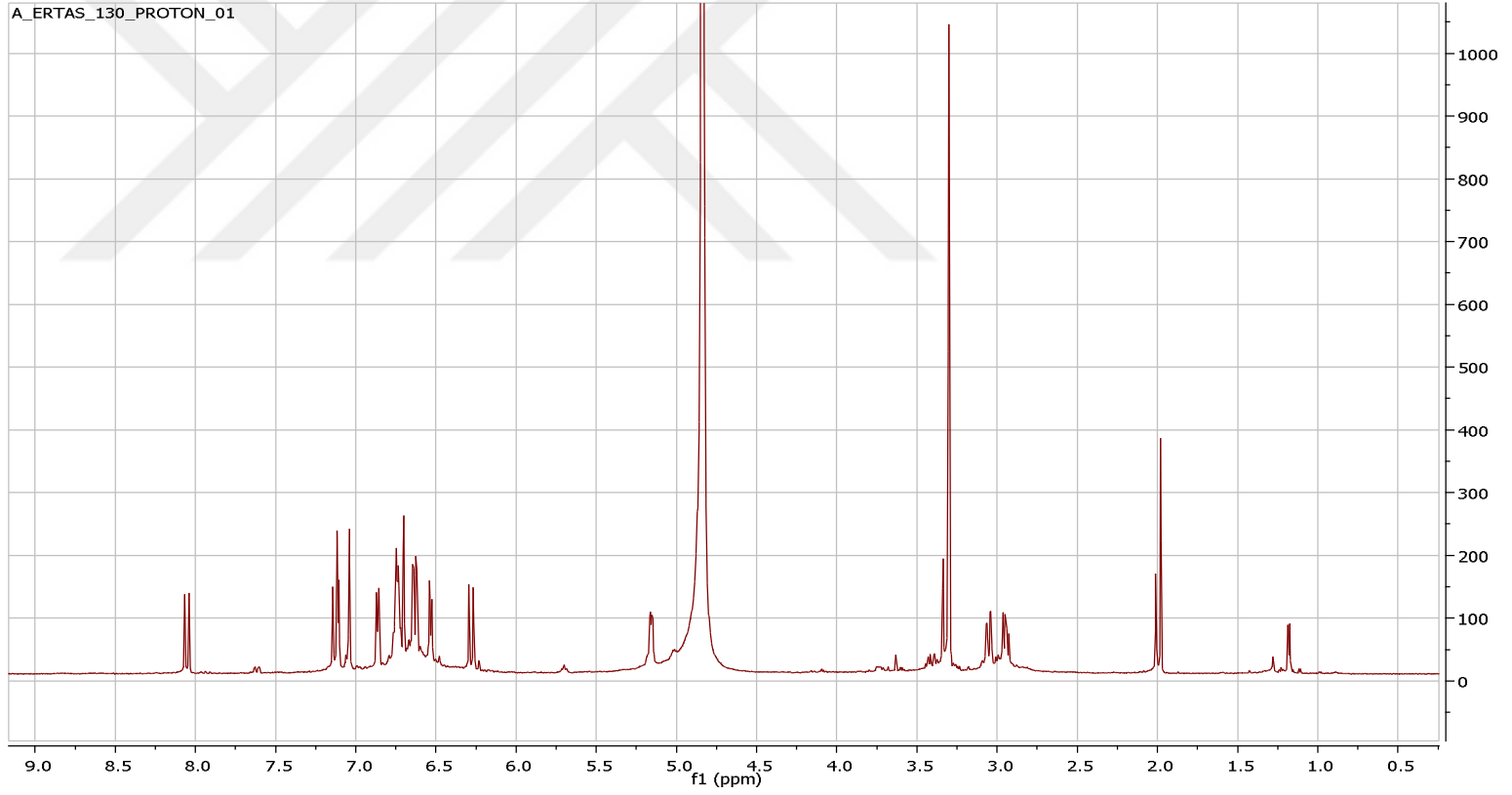
Toprak üstü kısımlarının etanol ekstratlarından preparatif HPLC’de MeOH/Su çözücü sisteminde elde edildi (Şekil 116). Beyaz renkte toz halde 38 mg elde edildi. ¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD, 600 MHz) δ 8.05- 6.28 ppm’ de aromatik bölgede 12 sinyal izlendi. Ayrıca δ 5.16 *dd* (*J*=8.4- 3.7 Hz) ppm’de oksijenlenmiş proton sinyali izlendi. APT (CD₃OD, 150 MHz) spektrumu değerlendirildiğinde yapıda δ 168.8 ve 173.6 ppm’de karbonil karbonları izlendi. Bunlara ilaveten δ 146.6, 146.9, 146.3, 148.4, 145.4 ve 144.6 ppm’de oksijenlenmiş karbonlar izlendi. Bu sinyaller genelde aromatik halkalara OH grubu bağlandığında izlenebilmektedir. Daha ileri NMR analizlerine devam etmeden önce elde edilen spektral değerler literatür ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucu δ 6.82 *d* (*J*=7.7 Hz), 7.14 *d* (*J*=8.5 Hz), 8.05 *d* (*J*=15.8 Hz) ve 6.28 *d* (*J*=15.8 Hz) ppm’de izlenen sinyallerin *salvia* türlerinde rastlanan biyolojik özellikleri nedeniyle önemli bir bileşik olan Salvianolik Asit A’ninA kısmında izlenen protonlar, δ 6.81 *d* (*J*=2.8 Hz), 6.71 *d* (*J*=8.0 Hz), 6.74 *dd* (*J*=8.2- 3.6 Hz), 3.05 *dd* (*J*=14.4- 3.3 Hz), 2.94 *dd* (*J*=14.2- 8.7 Hz) ve 5.16 *dd* (*J*=8.4- 3.7 Hz) ppm’de izlenen sinyallerin B kısmındaki protonlar, δ 7.12 *d* (*J*=2.0 Hz), 6.86 *d* (*J*=7.9 Hz), 7.04 *brs*, 7.13 *d* (*J*=16.2 Hz) ve 6.71 *brs* sinyallerin C kısmındaki protonlar ile örtüştüğü görüldü (Sun vd., 2009). ¹H ve ¹³C NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF ta izlenen M-H piki *m/z* 493.1146 (C₂₆H₂₂O₁₀) ne dayanarak bu bileşiğin salvianolik asit A olduğu saptandı ve literatür ile NMR değerleri (Tablo 45) kıyaslanarak yapı doğrulandı (255, 256) (Şekil 117-119).



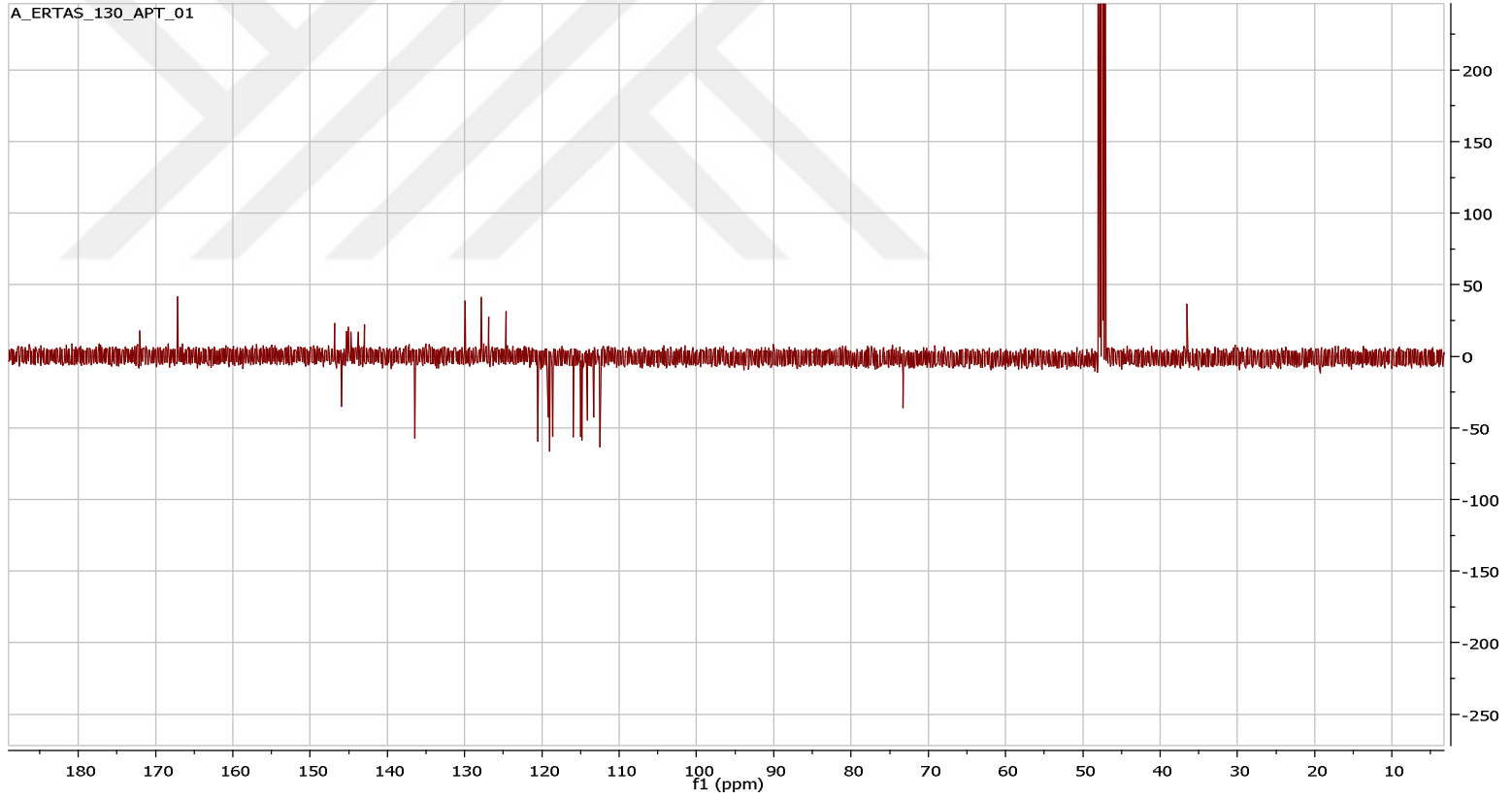
Şekil 116. Salvianolik asit A

Tablo 45. Salvianolik asit A bileşiminin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	128.5	-
2	120.2	7.12 <i>d</i> (<i>J</i> =2.0 Hz)
3	146.6	-
4	146.9	-
5	114.0	6.86 <i>d</i> (<i>J</i> =7.9 Hz)
6	120.5	7.04 <i>brs</i>
7	138.0	7.13 <i>d</i> (<i>J</i> =16.2 Hz)
8	116.6	6.71 <i>brs</i>
1'	126.2	-
2'	131.5	-
3'	146.3	-
4'	148.4	-
5'	115.7	6.82 <i>d</i> (<i>J</i> =7.7 Hz)
6'	122.2	7.14 <i>d</i> (<i>J</i> =8.5 Hz)
7'	147.5	8.05 <i>d</i> (<i>J</i> =15.8 Hz)
8'	116.4	6.28 <i>d</i> (<i>J</i> =15.8 Hz)
9'	168.8	-
1''	129.4	-
2''	117.5	6.81 <i>d</i> (<i>J</i> =2.8 Hz)
3''	145.4	-
4''	144.6	-
5''	114.9	6.71 <i>d</i> (<i>J</i> =8.0 Hz)
6''	120.7	6.74 <i>dd</i> (<i>J</i> =8.2- 3.6 Hz)
7''	38.1	3.05 <i>dd</i> (<i>J</i> =14.4- 3.3 Hz) 2.94 <i>dd</i> (<i>J</i> =14.2- 8.7 Hz)
8''	74.9	5.16 <i>dd</i> (<i>J</i> =8.4- 3.7 Hz)
9''	173.6	-

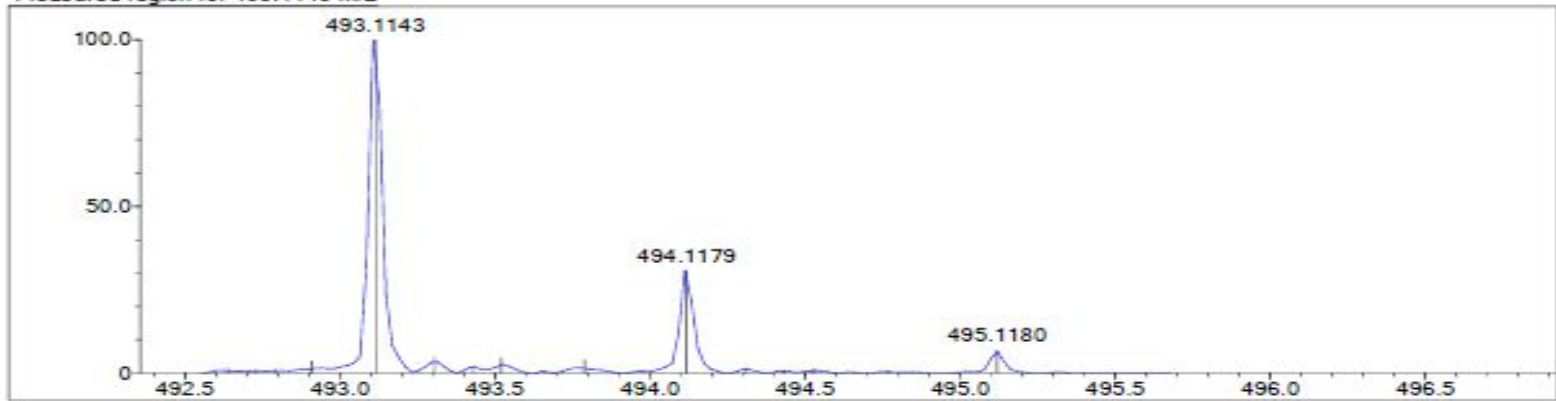


Şekil 117. Salvanolik Asit Abileşiminin ^1H NMR spektrumu (CD_3OD , 600 MHz)

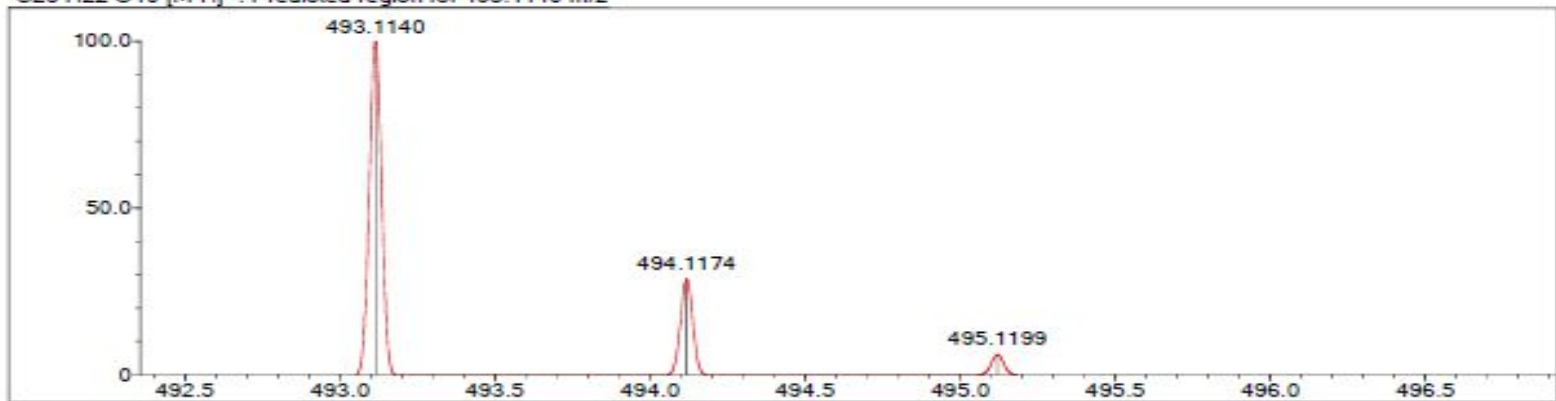


Şekil 118. Salvanolik Asit A bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CD_3OD , 150 MHz)

Measured region for 493.1143 m/z



C26 H22 O10 [M-H]⁻ : Predicted region for 493.1140 m/z

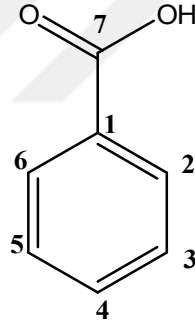


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	81.70	C26 H22 O10	[M-H] ⁻	493.1143	493.1140	0.3	0.61	81.70	16.0

Şekil 119. Salviaanolik Asit A bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.20. Benzoik asit

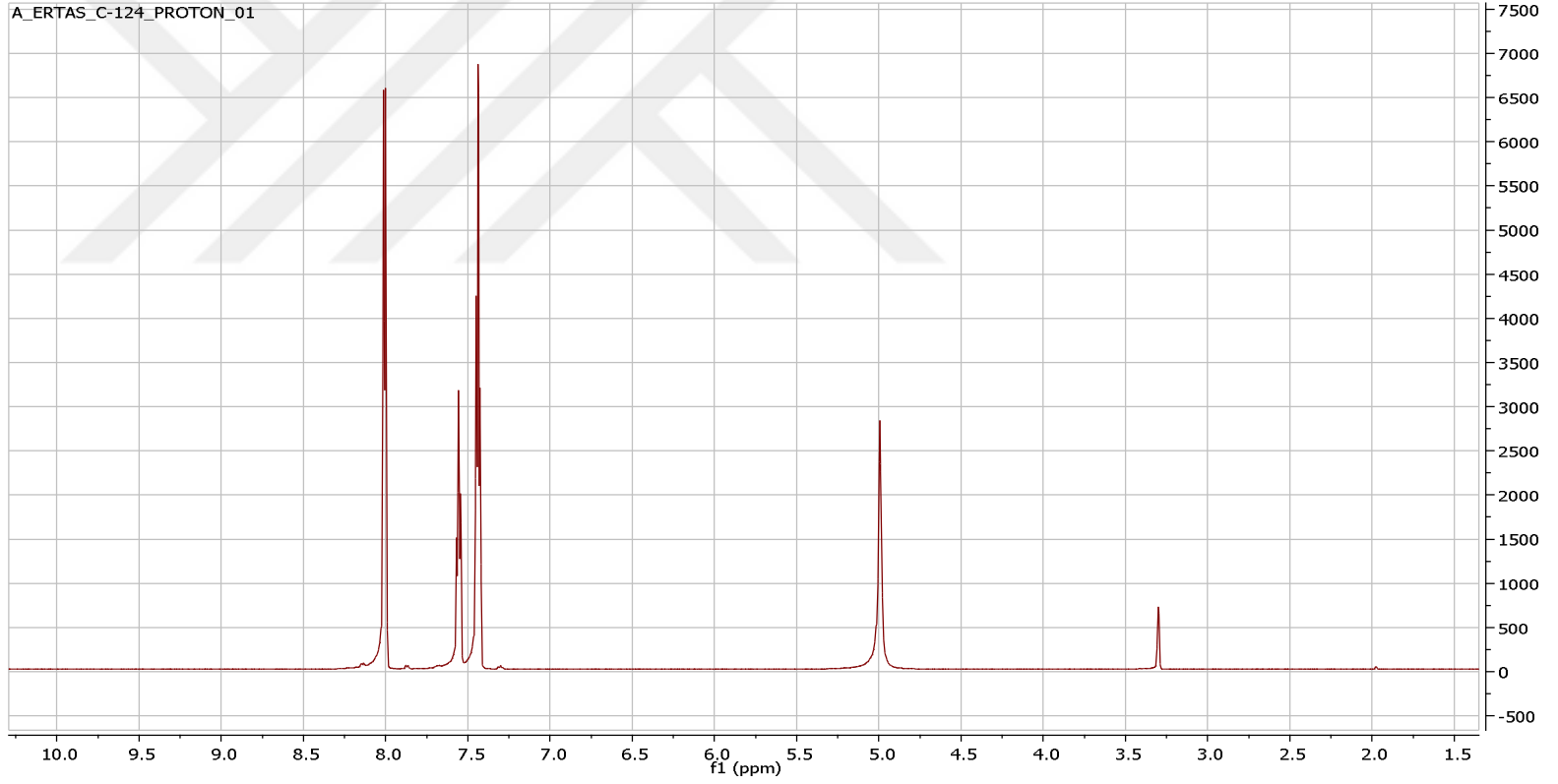
Toprak üstü kısımlarının etanol ekstratlarından preparatif ince tabaka kromatografisi ile diklorometan/aseton:2/1 çözücü sisteminde beyaz renkte toz halde yaklaşık 18 mg olarak elde edildi (Şekil 120). Aynı zamanda preparatif HPLC ile MeOH/Su:1/1 çözücü sisteminde de elde edildi. Hem ¹H-NMR (CD₃OD, 600 MHz) hem de ¹³C-NMR da sadece fenolik bölgede ve 5 ppm'de pik vermesi bileşiğin basit bir fenolik asit olacağını düşündürdü. ¹H-NMR'da 8,00 d (J=7,5 Hz) ve 7,44 dd (J=7,5 Hz) ppm'de 2'şer protonluk pik ve 7,56 ppm'de dd (J=7,3 Hz) pik vermesi yapının halkaya sadece asit grubunun bağlı olduğunu gösterdi. ¹H NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen [M+HCOO]⁻ piki m/z 167,0354'e (C₇H₆O₂) dayanarak bu bileşiğin benzoik asit olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 46) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (257) (Şekil 121-123).



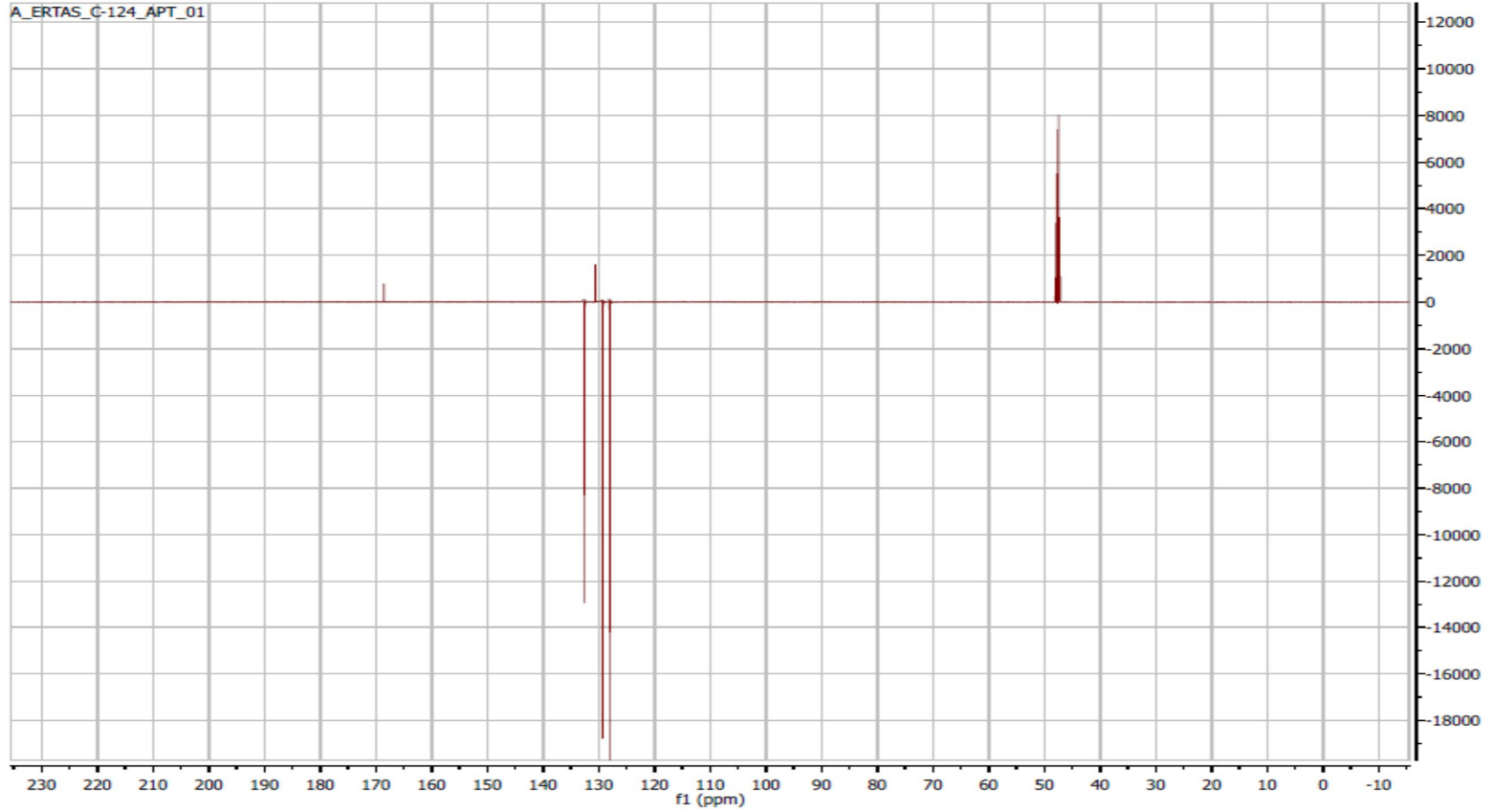
Şekil 120. Benzoik asit

Tablo 46. Benzoik asit bileşiğinin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	130,60	-
2	127,80	8,00 d (J=7,5 Hz)
3	129,10	7,44 dd (J=7,5 Hz)
4	132,35	7,56 dd (J=7,3 Hz)
5	129,10	7,44 dd (J=7,5 Hz)
6	127,80	8,00 d (J=7,5 Hz)
7-COOH	168,55	-

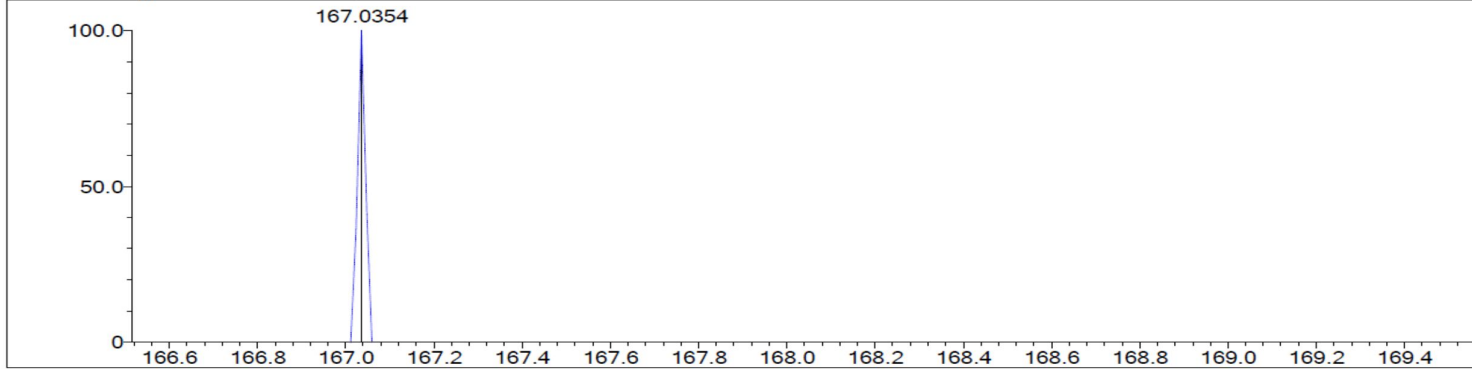


Şekil 121. Benzoik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)

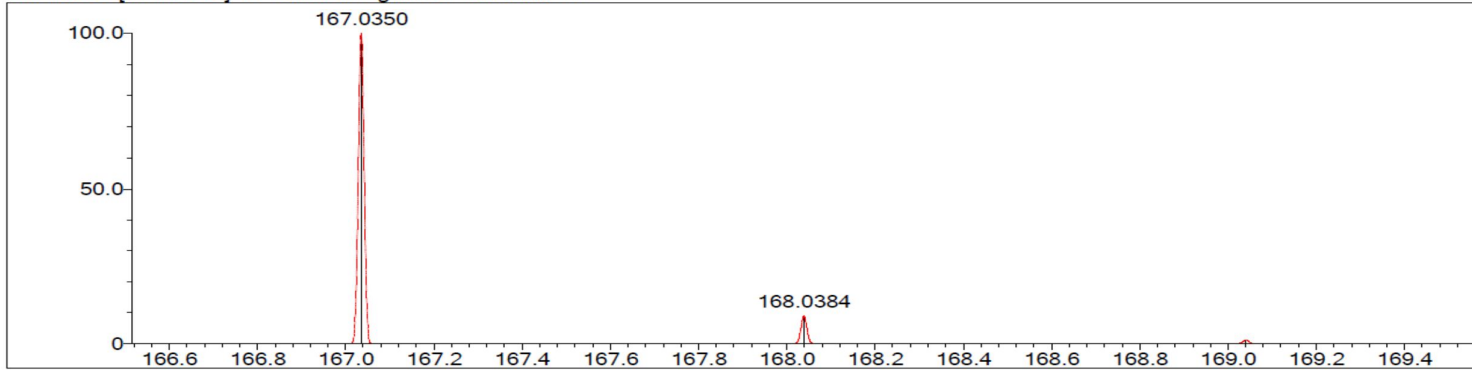


Şekil 122. Benzoik asit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

Measured region for 167.0354 m/z



C7 H6 O2 [M+HCOO]- : Predicted region for 167.0350 m/z

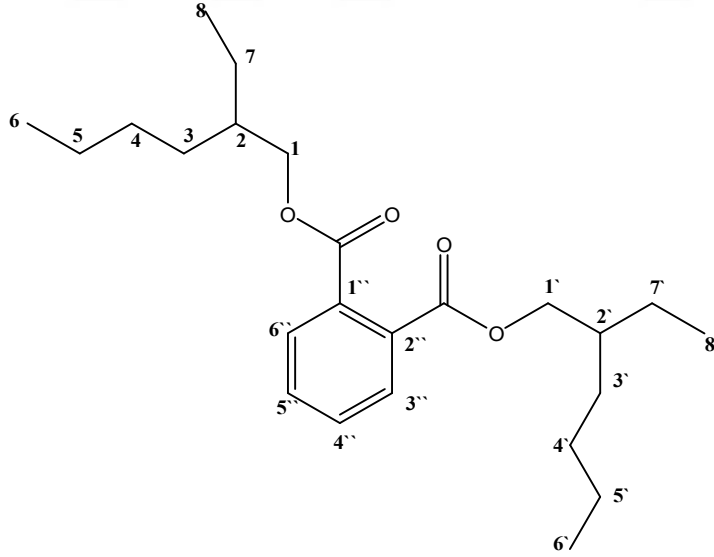


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
2	0.00	C7 H6 O2	[M+HCOO]-	167.0354	167.0350	0.4	2.39	0.00	5.0

Şekil 123. Benzoik asit bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.21. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat)

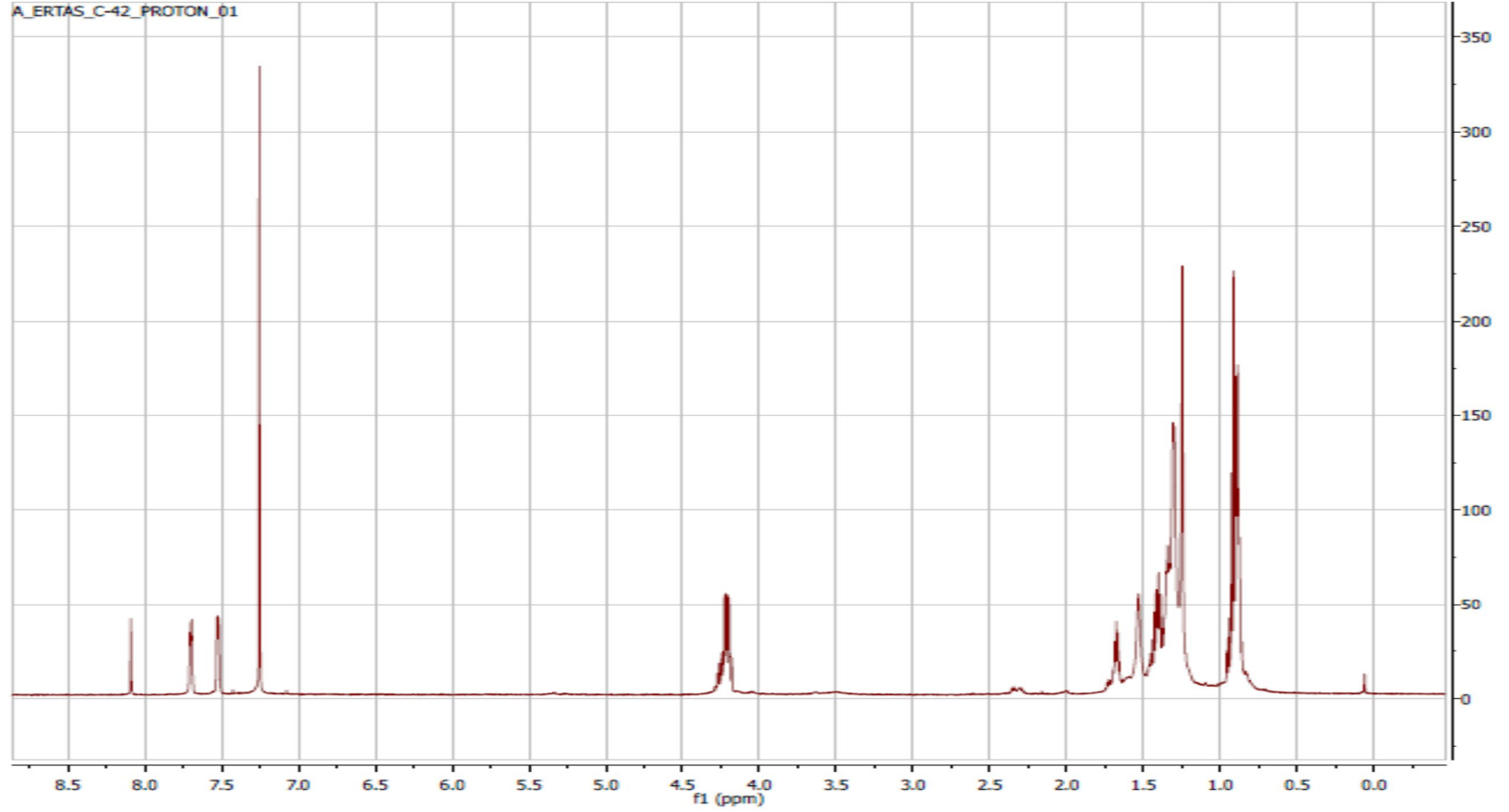
Türün hem toprak altı hem de toprak üstü kısımların etanol ekstralarının çok sayıda fraksiyonundan (24 tane) preparatif ince tabaka kromatografisi ile petroleteri/diklorometan:1/3 çözücü sisteminde beyaz renkte toz halde yaklaşık 300 mg olarak elde edildi (Şekil 124). Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında açık mor görülen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) önce sarı bekleyince mor renk aldı. ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) spektrumunda 7,70 (2H, dd, J = 3,42; 5,86 Hz) H-3'' ve H-6'', 7,52 (2H, dd, J = 3,42; 5,86) H-4'' ve H-5'', 4,21 (4H, pentet, J = 5,86 Hz) H-1 ve H-1', 1,55 (2H, m) H-2 ve H-2', 1,32-1,22 (8 CH₂, m), 0,93 (6H, t, J = 5,00 Hz) Me-6 ve Me-6', 0,89 (6H, t, J = 5,00 Hz) Me-8 ve Me-8' pikleri izlendi. ¹H ve ¹³C NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF ta izlenen M+H piki m/z 391.2843 (C₂₄H₃₈O₄) ne dayanarak bu bileşiğin bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) olduğu saptandı ve literatür ile NMR değerleri (Tablo 47) kıyaslanarak yapı doğrulandı (240) (Şekil-125-128).



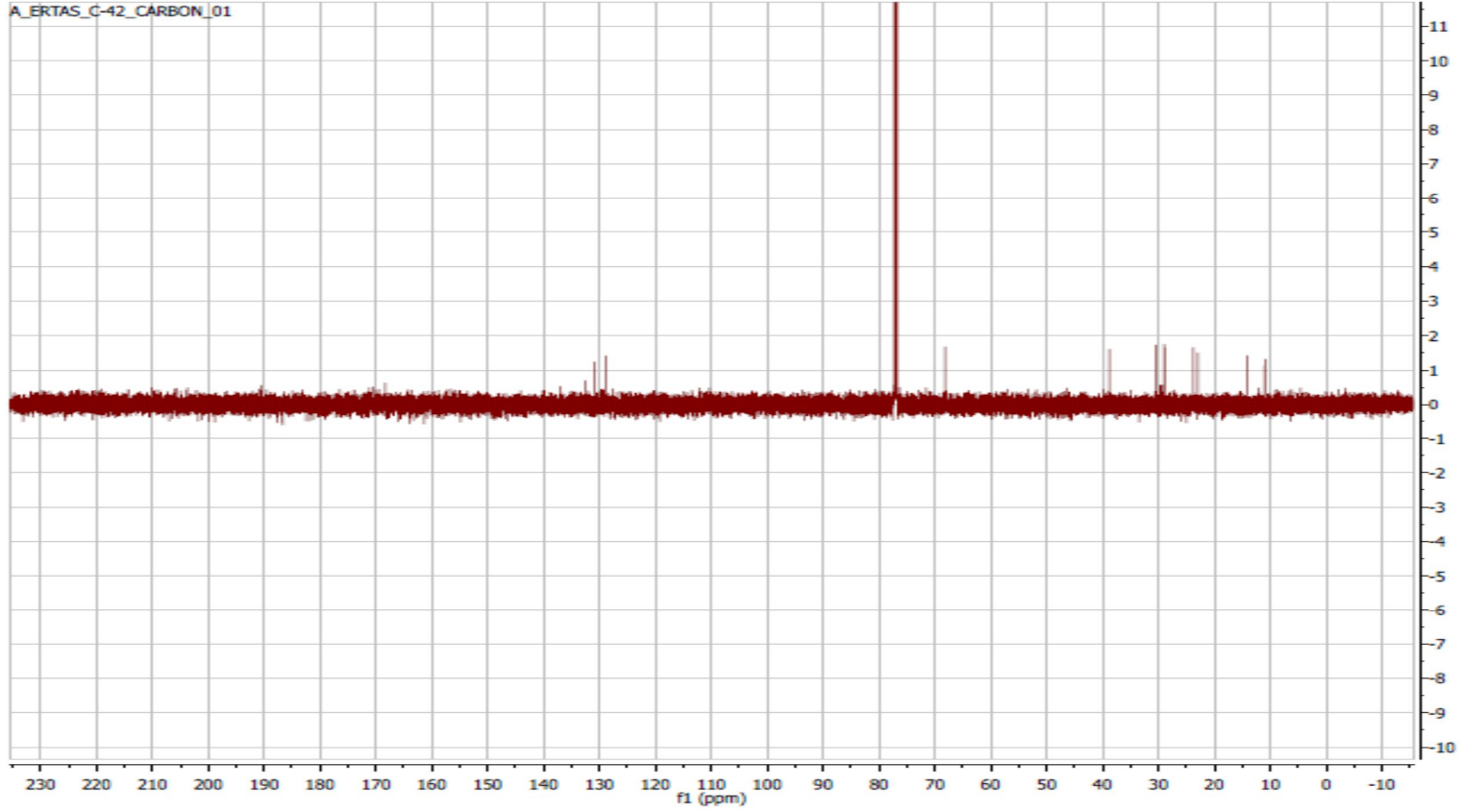
Şekil 124. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat)

Tablo 47. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşğinin NMR değerleri

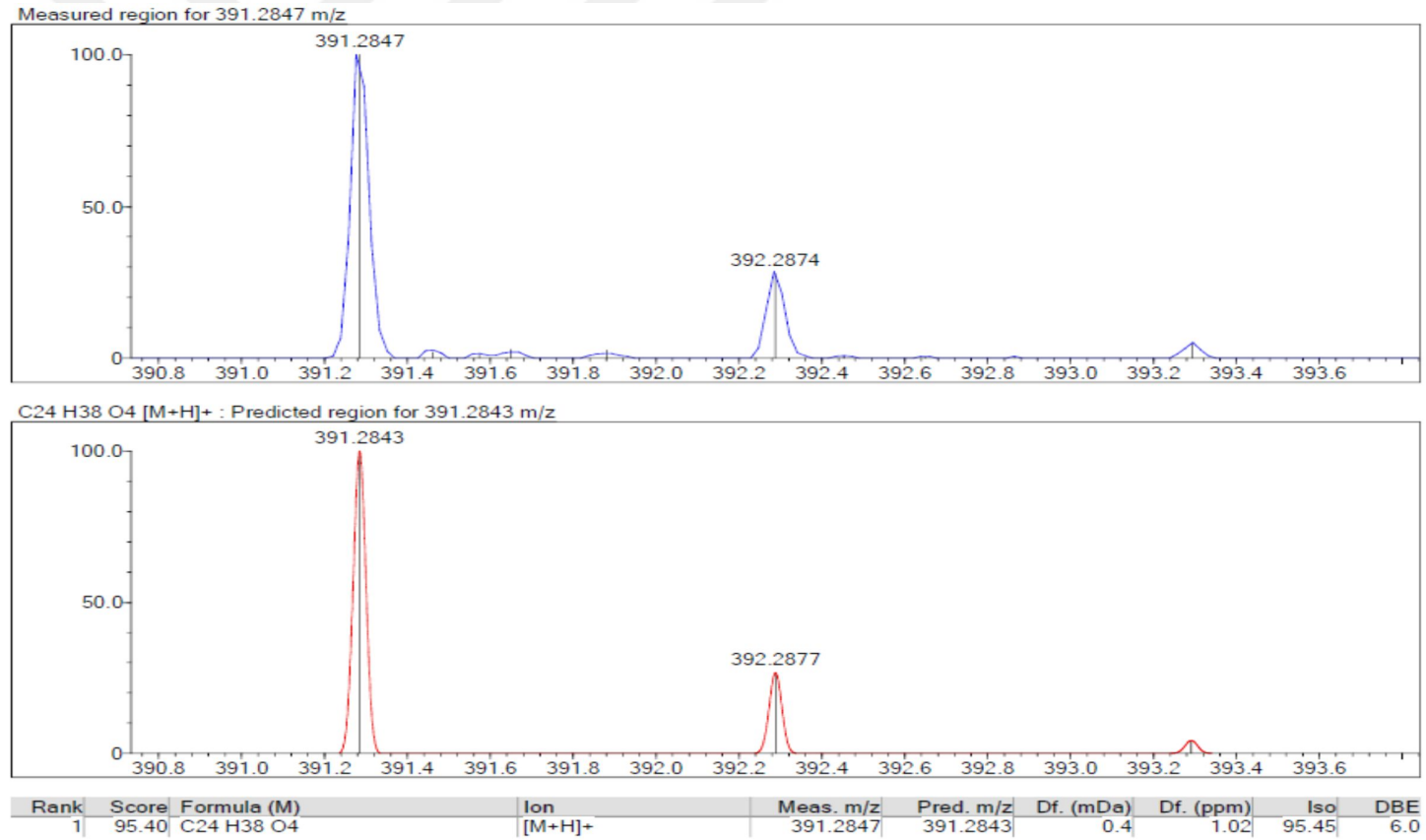
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1, 1'	67,70	4,21 pentet (J = 5,86 Hz)
2, 2'	39,04	1,55 m
3, 3'	30,53	1,32-1,22 m
4, 4'	28,69	1,32-1,22 m
5, 5'	22,96	1,32-1,22 m
6, 6'	10,65	0,93 t (J = 5,00 Hz)
7, 7'	23,86	1,32-1,22m
8, 8'	13,64	0,89 t (J = 5,00 Hz)
1'', 2''	132,82	-
4'', 5''	131,35	7,52 dd (J = 3,42; 5,86 Hz)
3'', 6''	128,97	7,70 dd (J = 3,42; 5,86 Hz)
C=O	167,36	-



Şekil 125. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



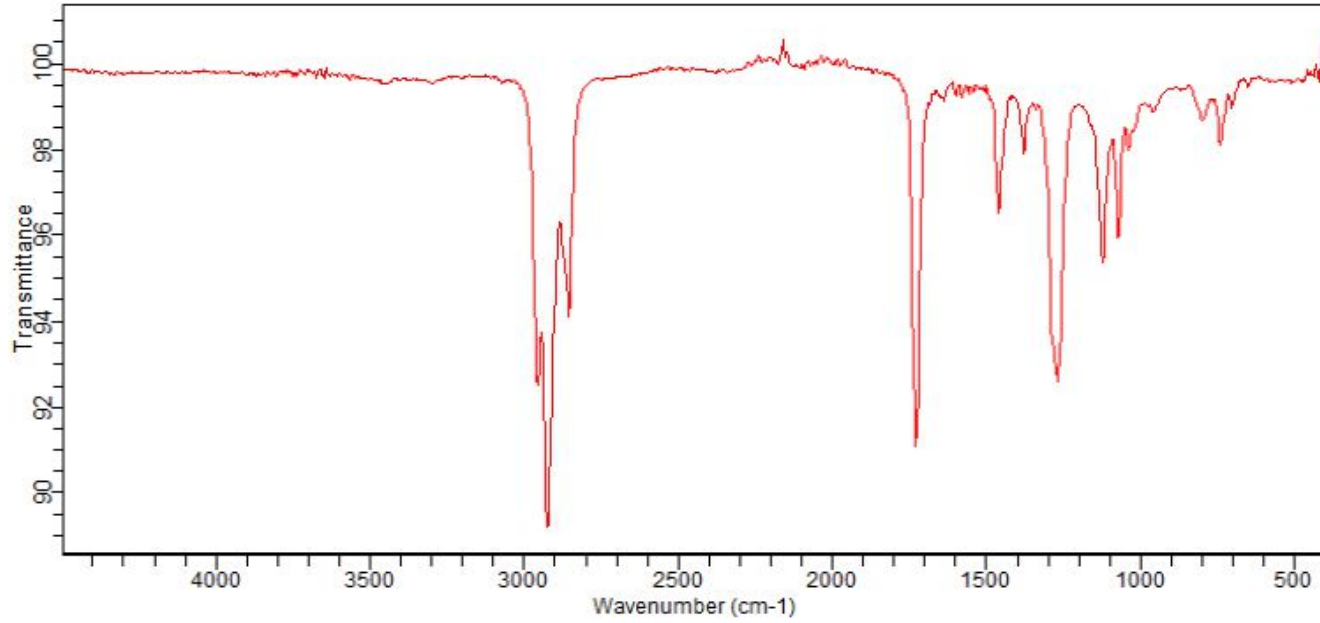
Şekil 126. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)



Şekil 127. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:E-57
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\E-57_2018-05-10T12-30-12.a2r

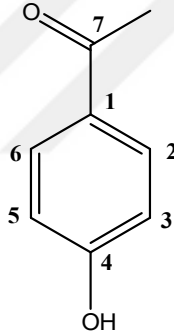
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.10.2018 12:30:12
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 128. Bis-(2-etil heksil benzen 1,2 dikarboksilat) bileşiğinin IR spektrumu

5.8.22. 4-Hidroksi benzaldehit

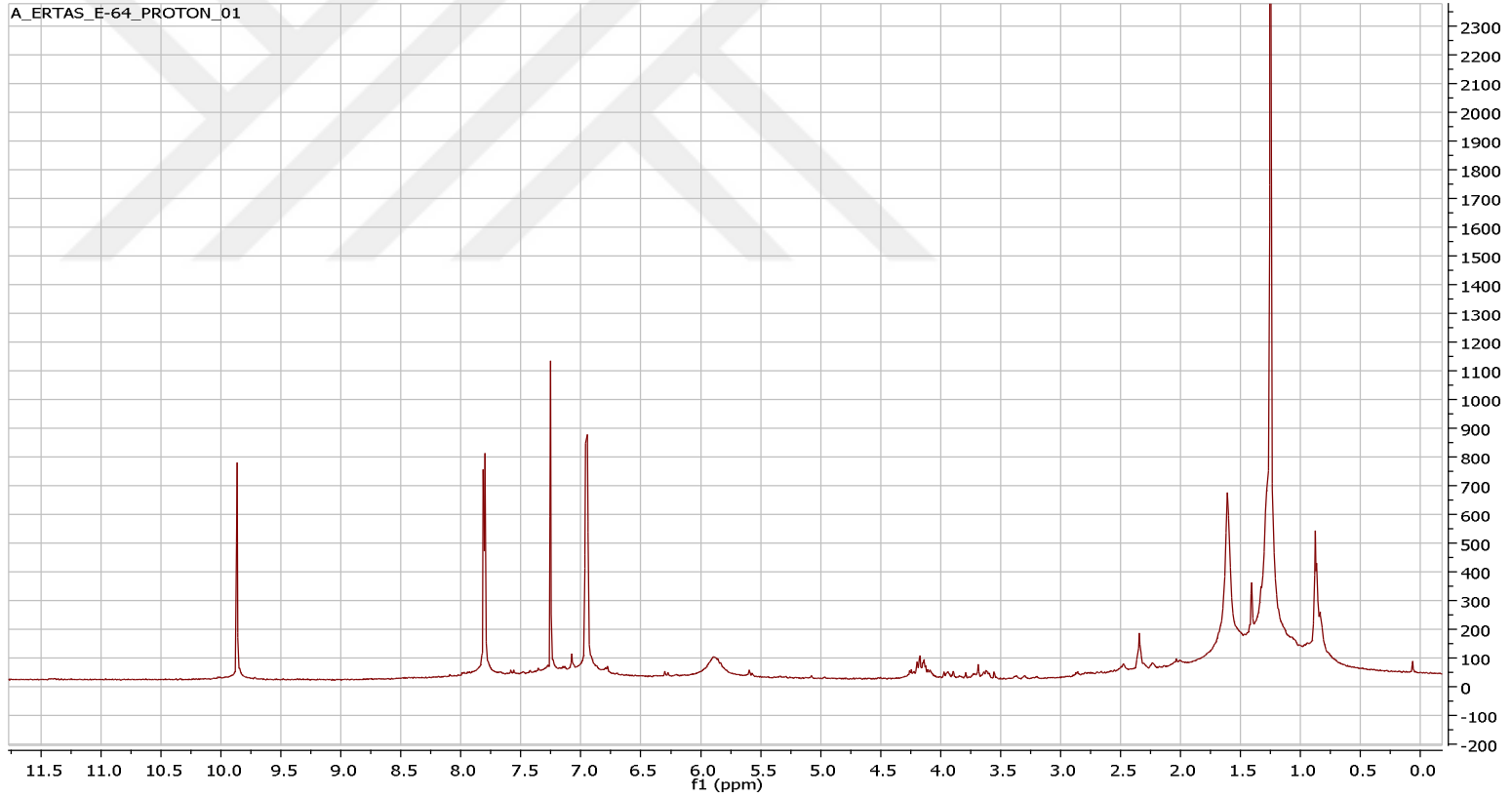
Toprak üstü kısımlarının etanol ekstrelerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile diklorometan/aseton:9/1 çözücü sisteminde beyaz renkte toz halde yaklaşık 14 mg olarak elde edildi (Şekil 129). Hem H-NMR (CDCl_3 , 600 MHz) hem de C-NMR da sadece fenolik bölgede pik vermesi bileşiğin basit bir fenolik asit olacağını düşündürdü. $^1\text{H-NMR}$ 'da 6,95 d ($J=7,8$ Hz) ve 7,81 d ($J=7,8$ Hz) ppm'de 2'şer protonluk pik vermesi yapının simetrik ve para konumunda $-\text{OH}$ grubunun varlığına (5,5 ppm) işaret etti. Ayrıca 9,87 ppm'de singlet olan pik yapıda bir aldehit grubunun varlığına işaret etti. $^1\text{H NMR}$ değerleri ve GC-MS'te ta izlenen M piki m/z 122 dayanarak bu bileşiğin 4-hidroksi benzaldehit olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 48) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (257) (Şekil 130-132)



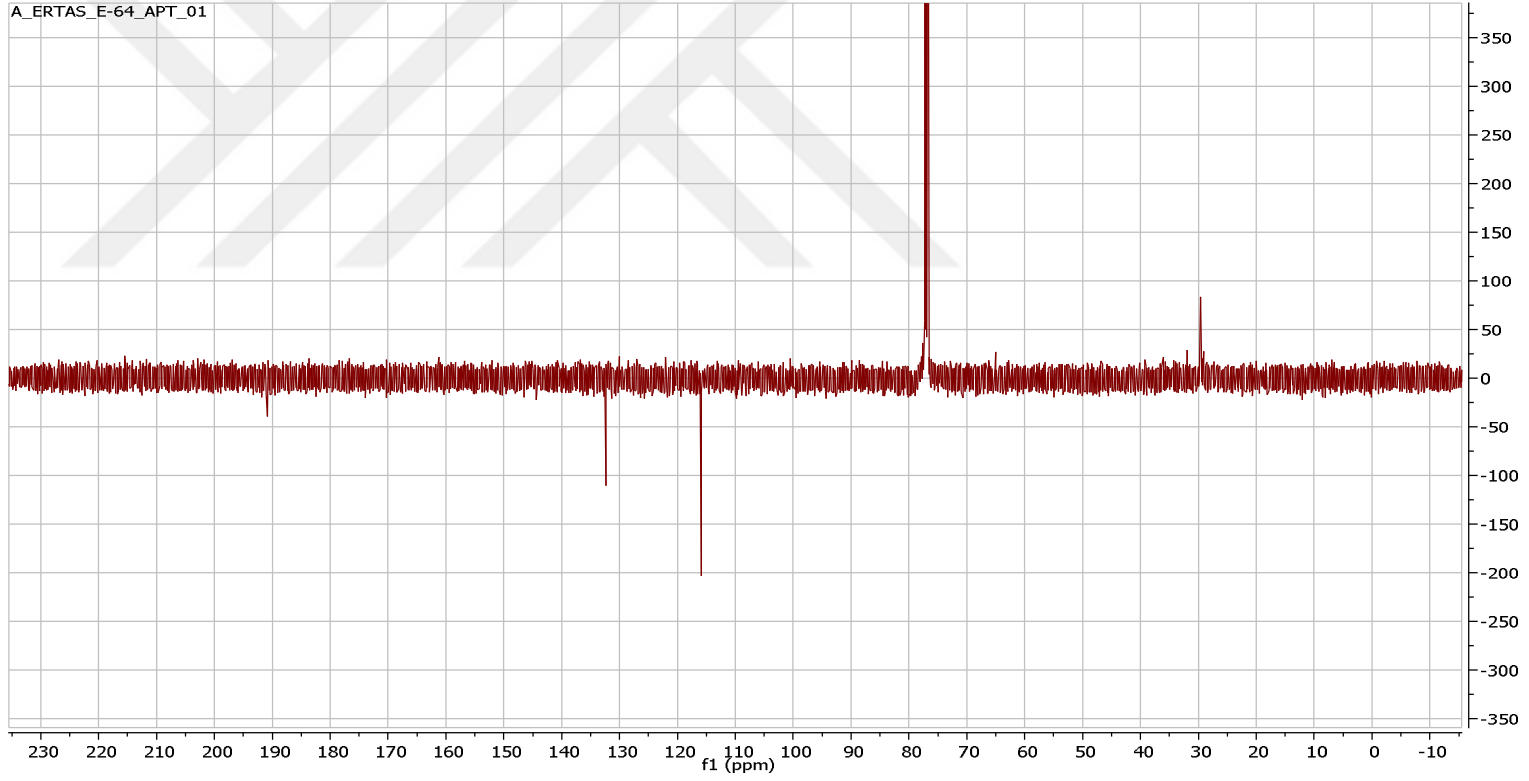
Şekil 129. 4-Hidroksi benzaldehit

Tablo 48. 4-Hidroksi benzaldehit bileşiğinin NMR değerleri

Pozisyon	$^{13}\text{C-NMR}$	$^1\text{H-NMR}$
1	121,93	-
2	115,89	6,95 d ($J=7,8$ Hz)
3	132,34	7,81 d ($J=7,8$ Hz)
4	161,80	-
5	132,34	7,81 d ($J=7,8$ Hz)
6	115,89	6,95 d ($J=7,8$ Hz)
7-CHO	191,60	9,87

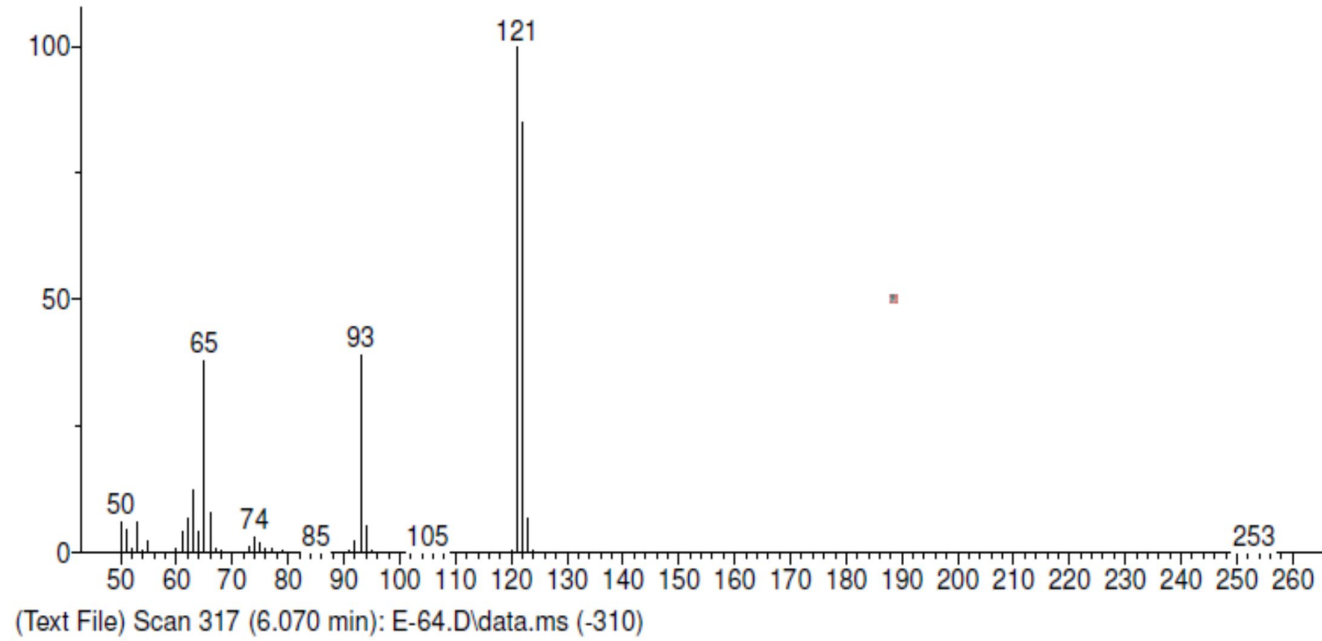


Şekil 130. 4-hidroksi benzaldehit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



Şekil 131. 4-Hidroksi benzaldehit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

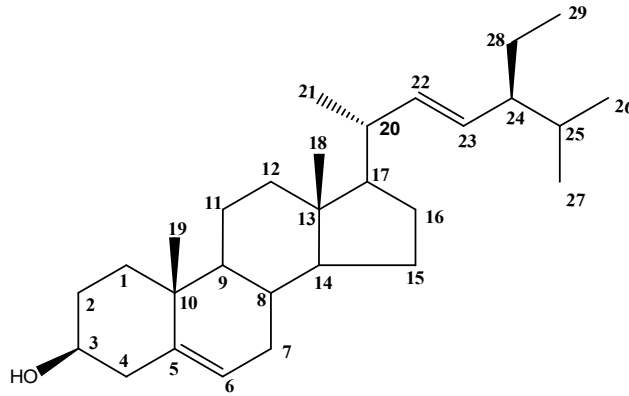
Unknown; InLib=144



Şekil 132. 4-Hidroksi benzaldehit bileşiğinin GC-MS kütle spektrumu

5.8.23. Stigmasterol

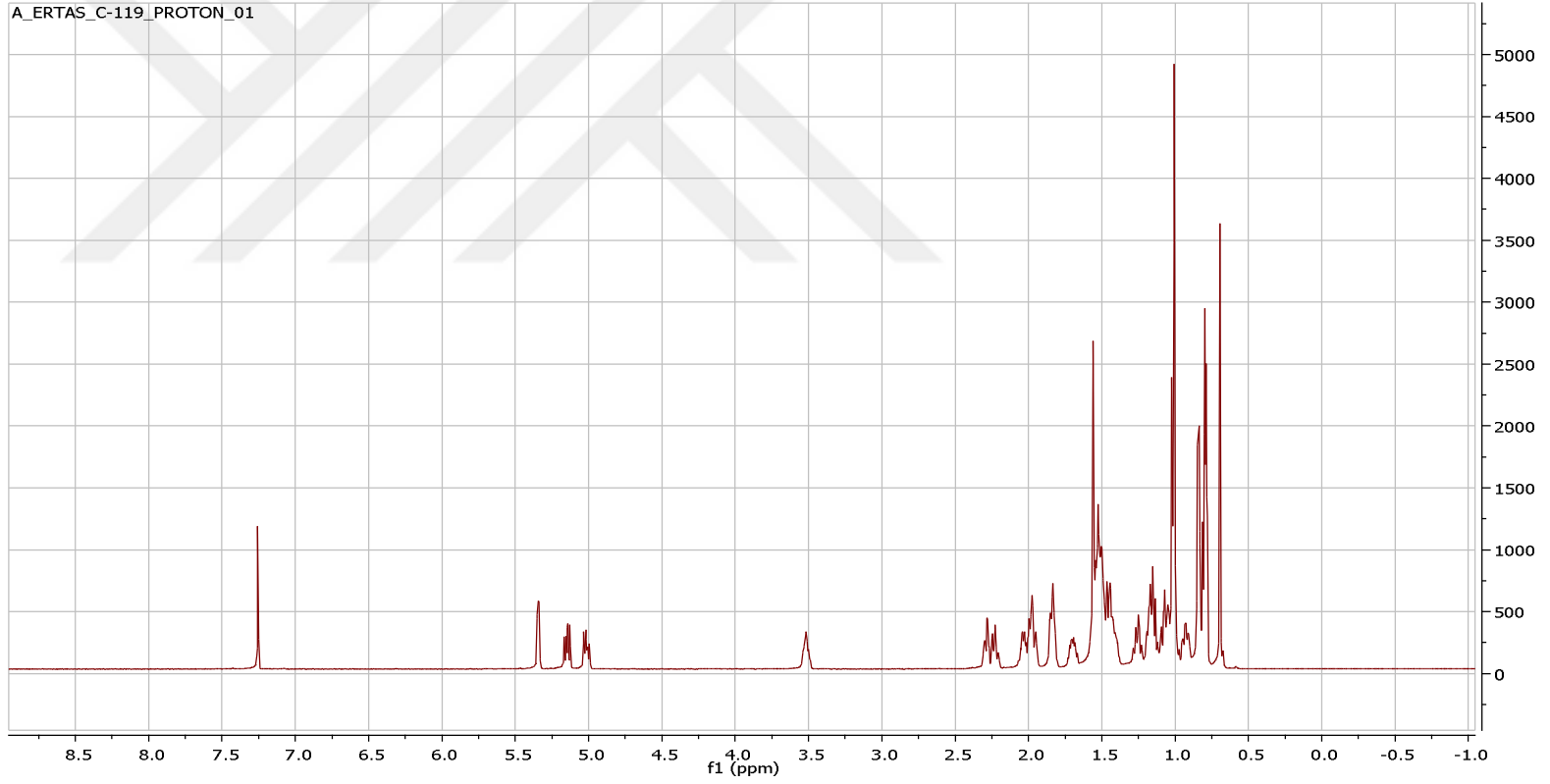
Hem toprak altı hem de toprak üstü kısımların etanol ekstraktlarından preparatif ince tabaka kromatografisi ile petroleteri/diklorometan:1/9 çözücü sisteminde beyaz renkte toz halde yaklaşık 56 mg olarak elde edildi (Şekil 133). Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında önce turkuaz sonra kahverengi-kırmızı bir renk aldı. ¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 600 MHz) proton sinyalleri β-sitosterol ile çok büyük benzerlikler göstermiştir, hatta metil proton sinyallerinin tamamen aynı ppm lerde izlenmesi bu bileşiğinde bir steroid olduğuna işaret etti. C-3 proton sinyali benzer şekilde 3,52 ppm de izlendi. C-5 ve C-6 arasındaki çift bağ bulunduğu olefinik proton sinyalinin 5,35 ppm’ de izlendi. Bu çift bağın yanısıra yapıda ikinci bir çift bağın varlığı δ 5,02 (dd, *J*=15,1 ve 8,6 Hz) ve 5,15 (dd, *J*=15,1 ve 8,7 Hz) de sırasıyla izlenen sinyaller ile anlaşıldı. Bölünme şekilleri ve bir trans etkileşime işaret eden 15 Hz lik *J* değerleri göz önüne alındığında Δ⁵ stigmasteran iskeleti üzerinde bu bağın yerleşebileceği yerin yan zincirinde sadece Δ²² konumunda yerleşmesi gerektiği anlaşıldı. ¹H NMR sinyallerinin kayma değerleri ve LC-MS-IT-TOF’ta izlenen [M+Na]⁺ piki *m/z* 435,3587’ye (C₂₉H₄₈O) dayanarak bu bileşiğin *Salvia* türlerinde çok yaygın olan stigmasterol (stigmastera-5,22-dien-3-ol) olduğu saptan ve NMR değerleri literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (249). Tablo 49’da ¹H ve ¹³C NMR değerleri verildi (134-136).



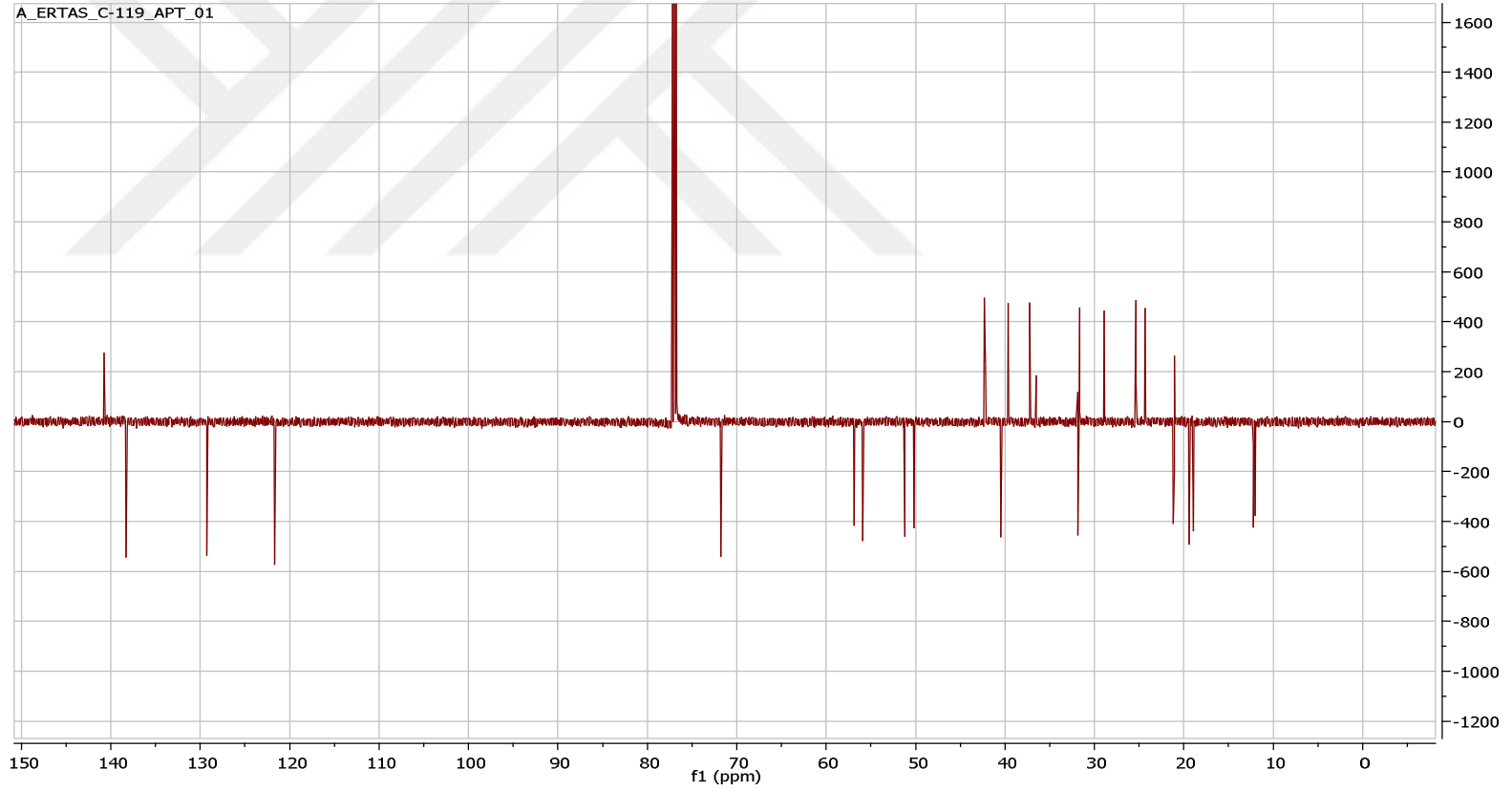
Şekil 133. Stigmasterol

Tablo 49. Stigmasterol bileşğinin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	37,2	-
2	31,9	-
3	71,8	3,52 dt (J=11; 8,7 Hz)
4	42,3	-
5	140,7	-
6	121,7	5,35 d (J=2,5 Hz)
7	31,8	-
8	31,9	-
9	51,2	-
10	36,5	-
11	21,2	-
12	39,7	-
13	42,2	-
14	56,8	-
15	24,3	-
16	28,9	-
17	55,9	-
18	12,2	0,69 s
19	19,4	1,01 s
20	40,6	-
21	21,7	0,83 d (J=6 Hz)
22	138,3	5,02 dd (J=15,1; 8,6 Hz)
23	129,3	5,15 dd (J=15,1;8,7 Hz)
24	50,1	-
25	31,9	-
26	21,1	0,81 d (J=6 Hz)
27	19,0	0,84 d (J=6 Hz)
28	25,4	-
29	12,1	0,97 t (J=8,6 Hz)

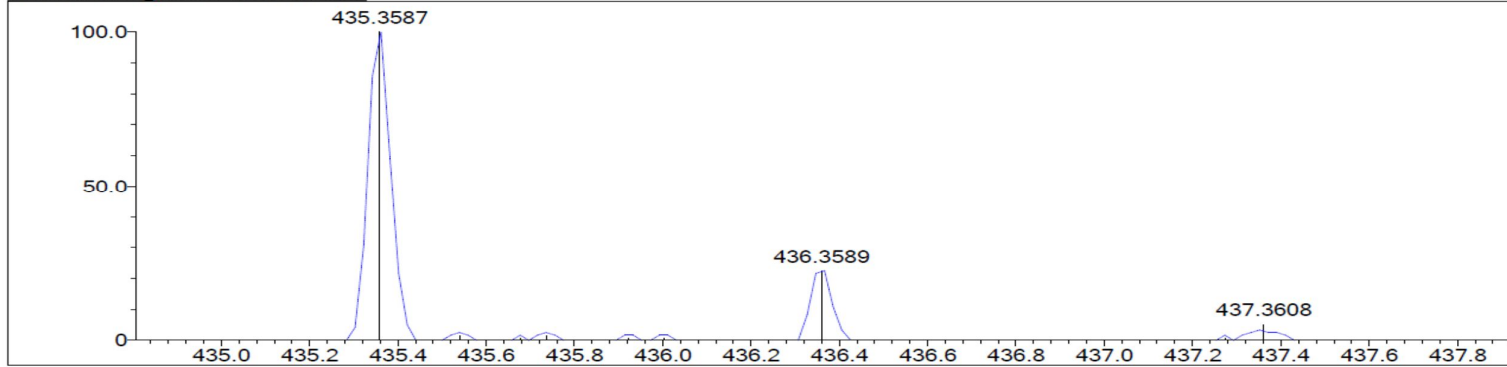


Şekil 134. Stigmasterol bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)

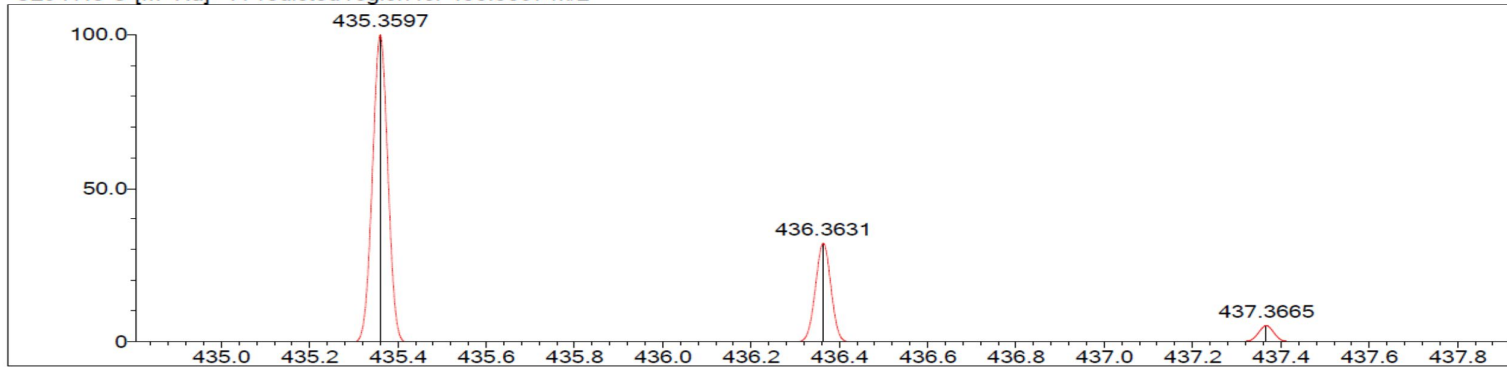


Şekil 135. Stigmasterol bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

Measured region for 435.3587 m/z



C₂₉H₄₈O [M+Na]⁺ : Predicted region for 435.3597 m/z

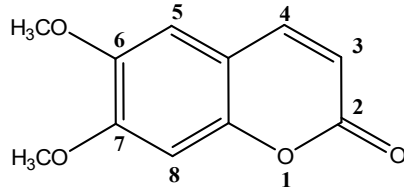


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	55.87	C ₂₉ H ₄₈ O	[M+Na] ⁺	435.3587	435.3597	-1.0	-2.30	57.74	6.0

Şekil 136. Stigmasterol bileşiminin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.24. Scoparon

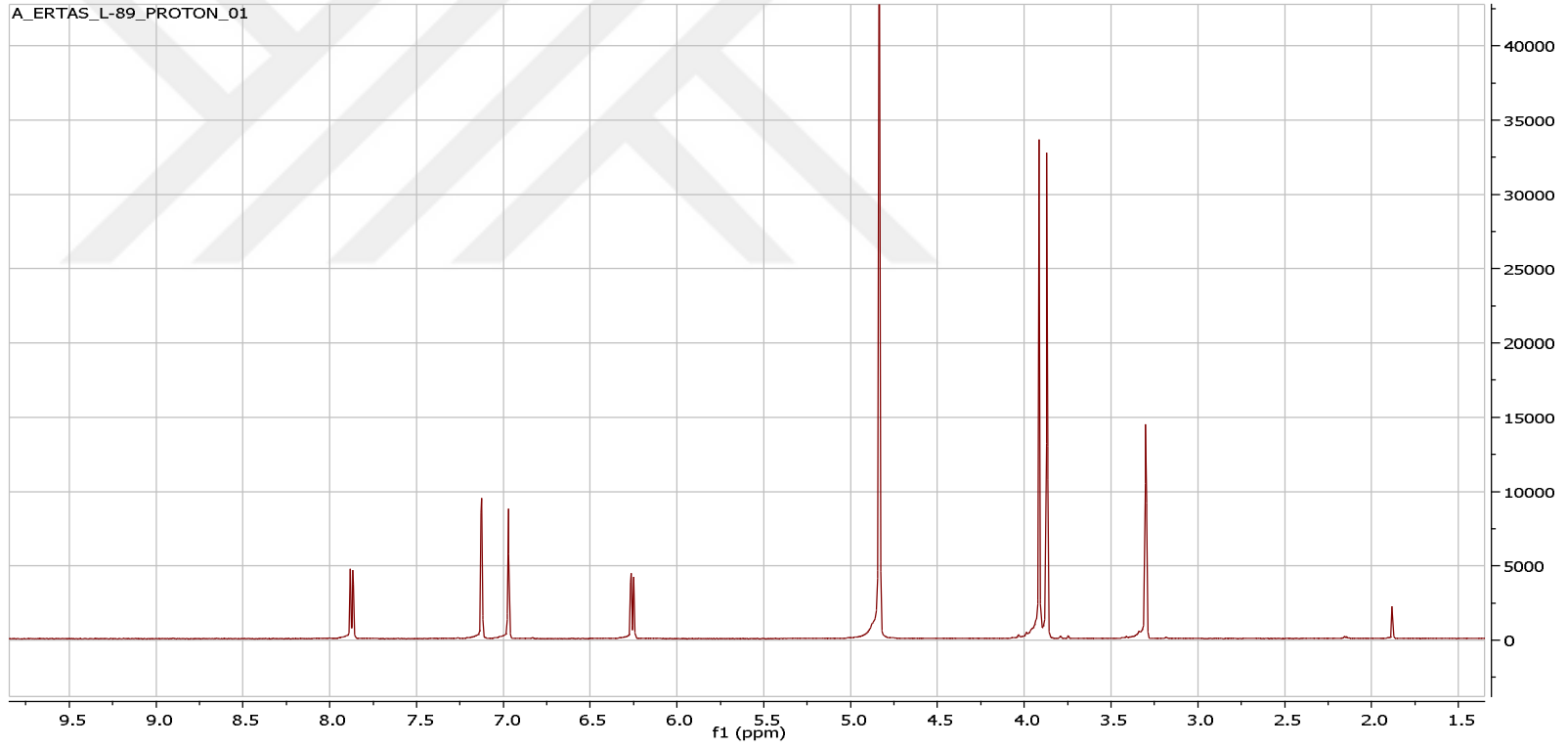
Toprak üstü kısımlarının etanol ekstrelerinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile diklorometan/aseton:3/1 çözücü sisteminde beyaz renkte toz halde yaklaşık 4 mg olarak elde edildi (Şekil 137). ¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD, 600 MHz) δ 7.87- 6.26 ppm' de aromatik bölgede 4 sinyal izlendi. Ayrıca δ 3.94 s (3H) ve δ 3.96 s (3H) ppm'de metoksi metilleri izlendi. APT (CD₃OD, 150 MHz) spektrumu değerlendirildiğinde toplam 11 tane karbon sinyali izlendi. Bu durum yapının 4 aromatik proton ve 2 metoksi grubuna sahip küçük bir molekül olduğunu gösterdi. Daha ileri NMR analizlerine devam etmeden önce elde edilen spektral değerler literatür ile karşılaştırıldı. Bu karşılaştırma sonucu δ 6.26 d ($J=9.4$ Hz), 7.87 d ($J=9.4$ Hz), 7.13 s ve 6.97 s ppm'deki aromatik sinyaller ve δ 3.94 ve 3.96 ppm'deki metoksi sinyalleri tıbbi bitkilerde rastlanan scoparon bileşiği ile örtüştü (Ma et al., 2006). Ayrıca GC-MS ile elde edilen kütle spektrumunda izlenen m/z 206 [M]⁺ piki C₁₁H₁₀O₄ kapalı formülünü önerdi. Ek olarak molekülden metil kopması sonucu izlenen m/z 191[M-CH₃]⁺ molekül formülünü destekledi. ¹H ve ¹³C NMR değerleri ve GC-MS te izlenen M piki m/z 206 (C₁₁H₁₀O₄) ne dayanarak bu bileşiğin scoparon olduğu saptandı ve literatür ile NMR değerleri (Tablo 50) kıyaslanarak yapı doğrulandı(258) (Şekil 138-141).



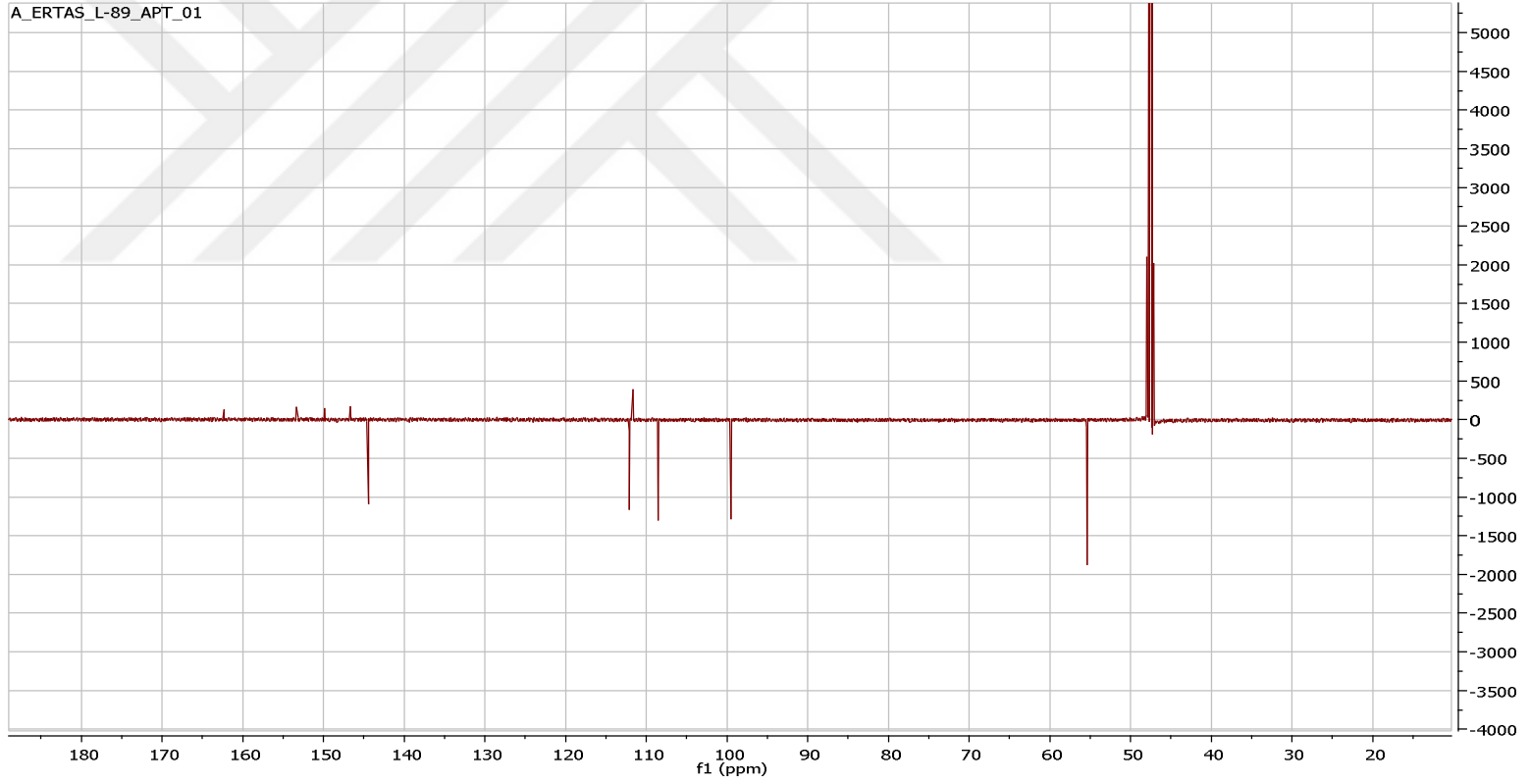
Şekil 137. Scoparon

Tablo 50. Scoparon bileşiminin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	-	-
2	163.9	-
3	110.1	6.26 <i>d</i> (<i>J</i> =9.4 Hz)
4	146.0	7.87 <i>d</i> (<i>J</i> =9.4 Hz)
5	113.7	7.13 <i>s</i>
6	151.4	-
7	154.9	-
8	101.1	6.97 <i>s</i>
9	148.3	-
10	113.2	-
6-OCH ₃	57.0	3.94
7-OCH ₃	57.0	3.96



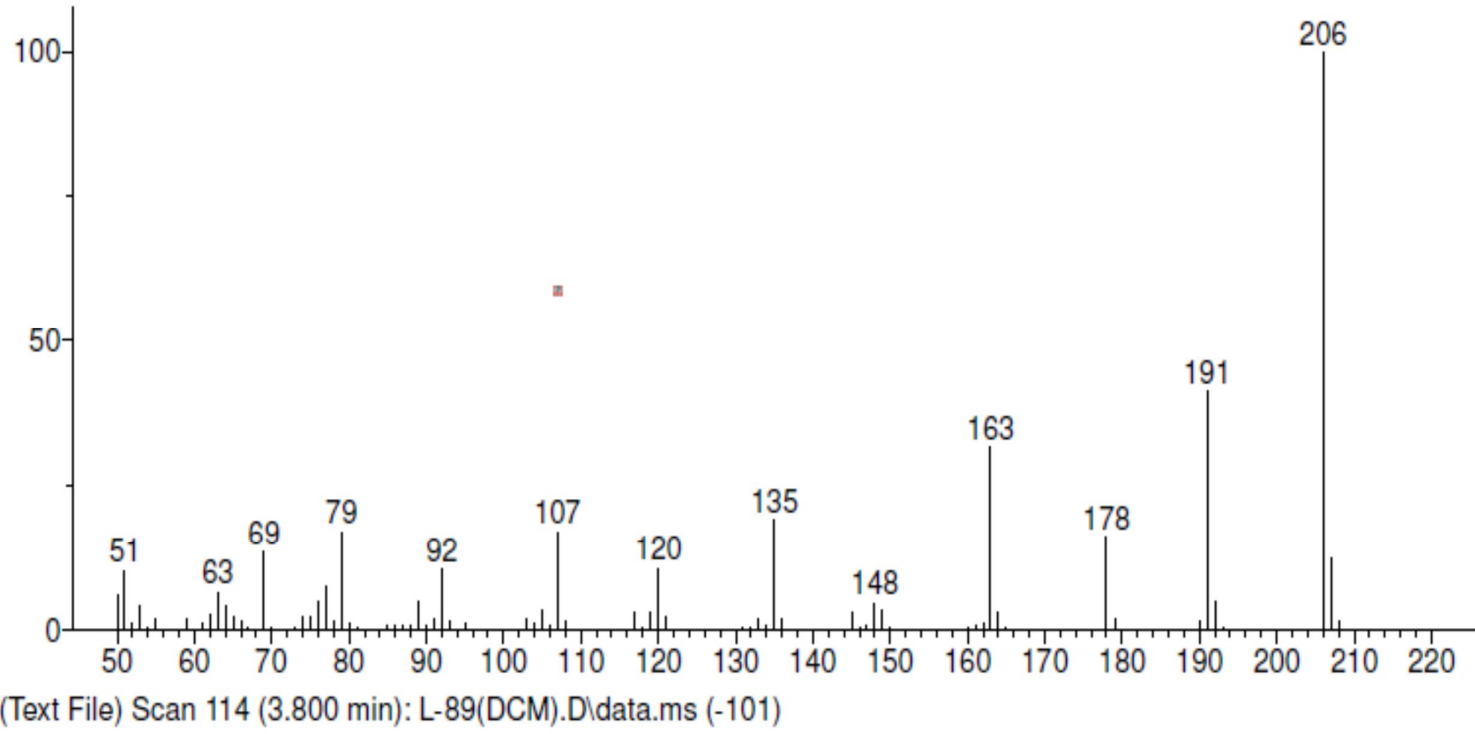
Şekil 138. Scoparon bileşiminin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)



Şekil 139. Scoparon bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)



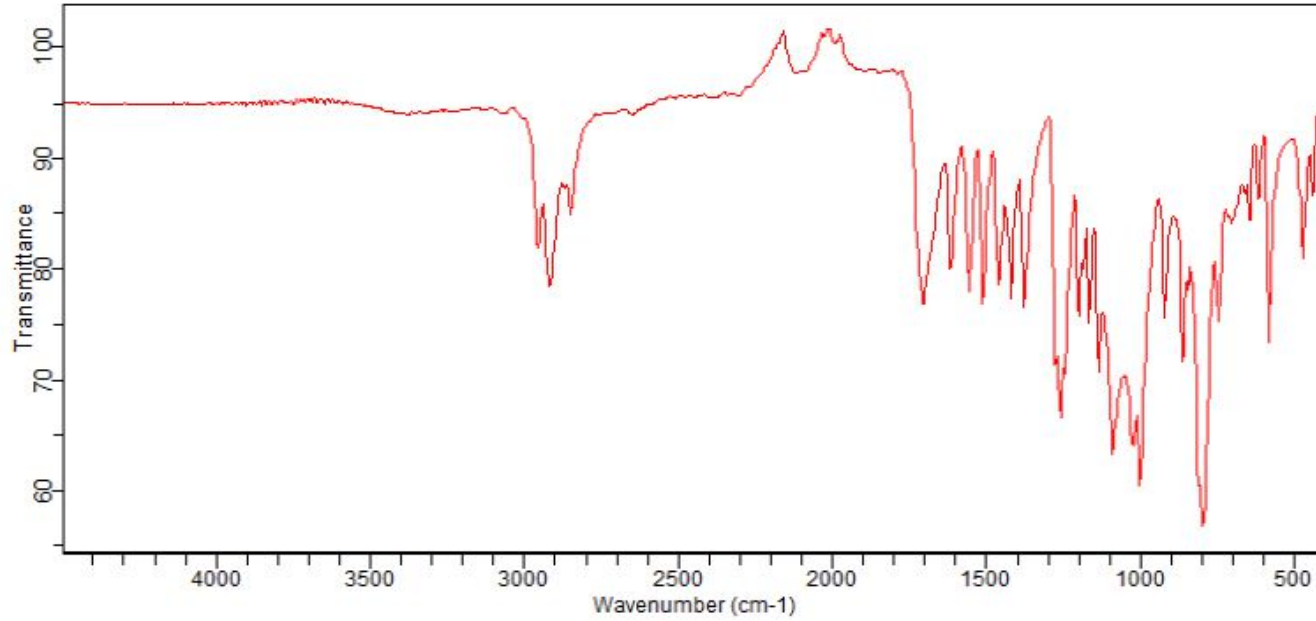
Unknown; InLib=336



Şekil 140. Scoparon bileşiğinin GC-MS kütle spektrumu

Sample ID:L-89
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\L-89_2018-05-09T14-40-28.a2r

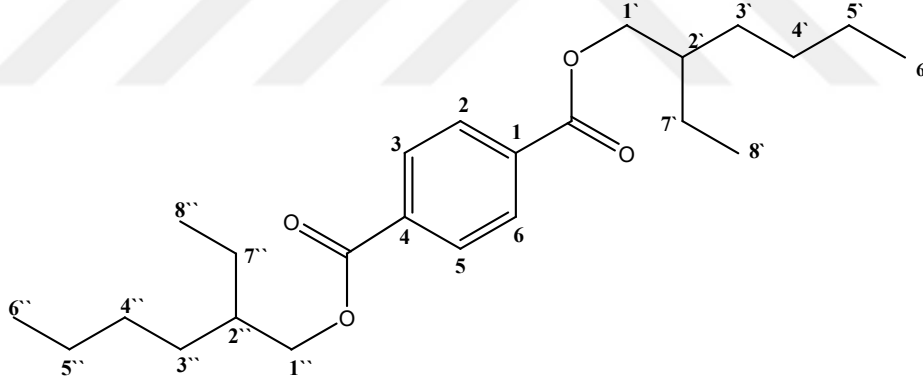
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.09.2018 2:40:28
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 141. Skoparon bileşğinin IR spektrumu

5.8.25. Bis(2-etilhekzil) tereftalat

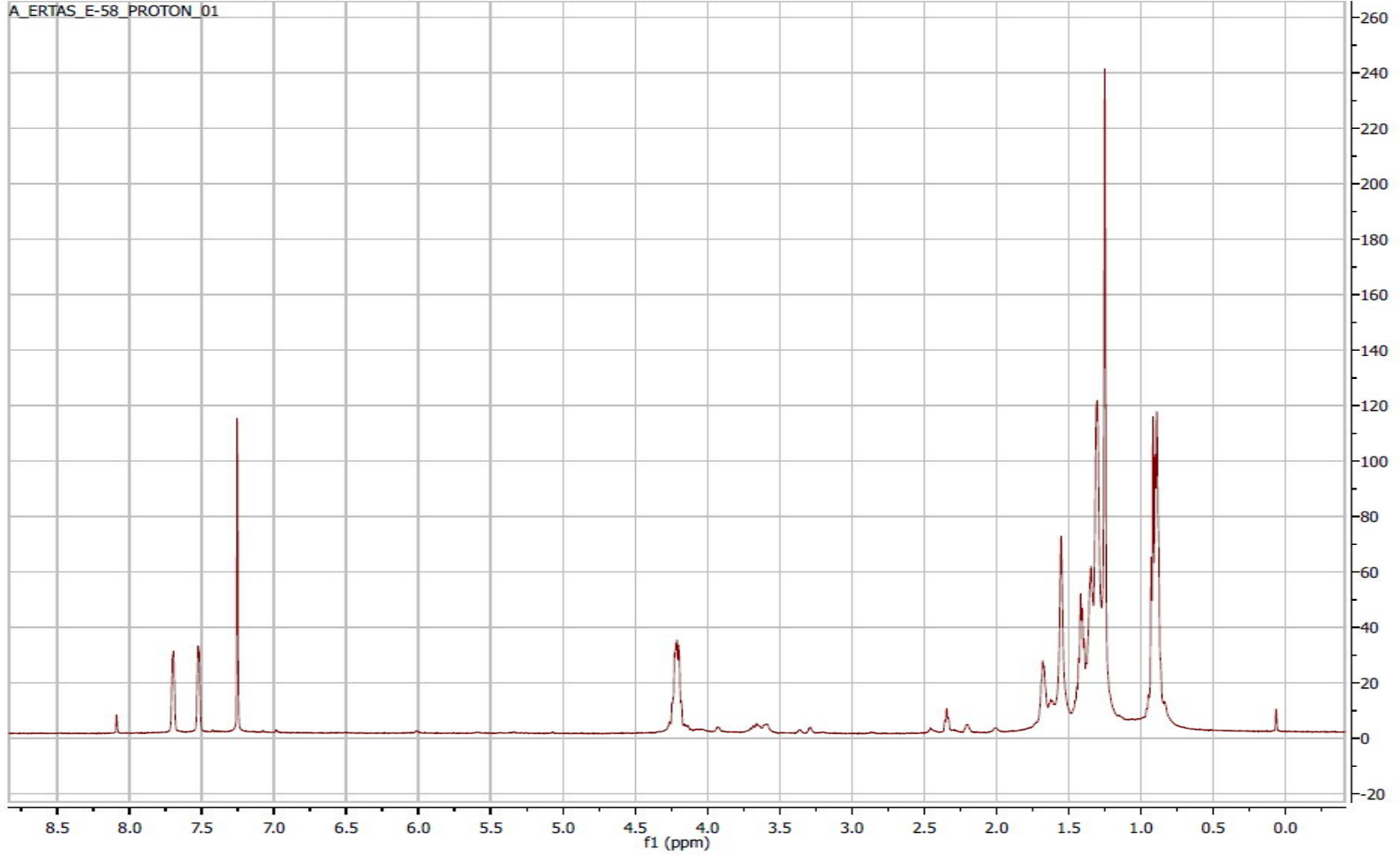
Hem toprak altı hem de toprak üstü kısımların etanol ekstralarının çok sayıda fraksiyonundan preparatif ince tabaka kromatografisi ile petroleteri/diklorometan:1/3 çözücü sisteminde beyaz renkte toz halde yaklaşık 210 mg olarak elde edildi (Şekil 142). Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında açık mor görülen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) önce sarı bekleyince mor renk aldı. ¹H-NMR (CDCl₃, 600 MHz) spektrumunda 8,09 m (4H, H-2, 3, 5 ve 6, 4,26 (4H, pentet, J = 5,86 Hz) H-1' ve H-1'', 1,56 (2H, m) H-2' ve H-2'', 1,33-1,46 (8 CH₂, m), 0,93 (6H, t, J = 5,00 Hz) Me-6' ve Me-6'', 0,89 (6H, t, J = 5,00 Hz) Me-8' ve Me-8'' pikleri izlendi. ¹H ve ¹³C NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF ta izlenen M+H piki *m/z* 391.2844 (C₂₄H₃₈O₄) ne dayanarak bu bileşiğin bis(2-ethylhexyl) terephthalate olduğu saptandı ve literatür ile NMR değerleri (Tablo 51) kıyaslanarak yapı doğrulandı (240) (Şekil 143-147).



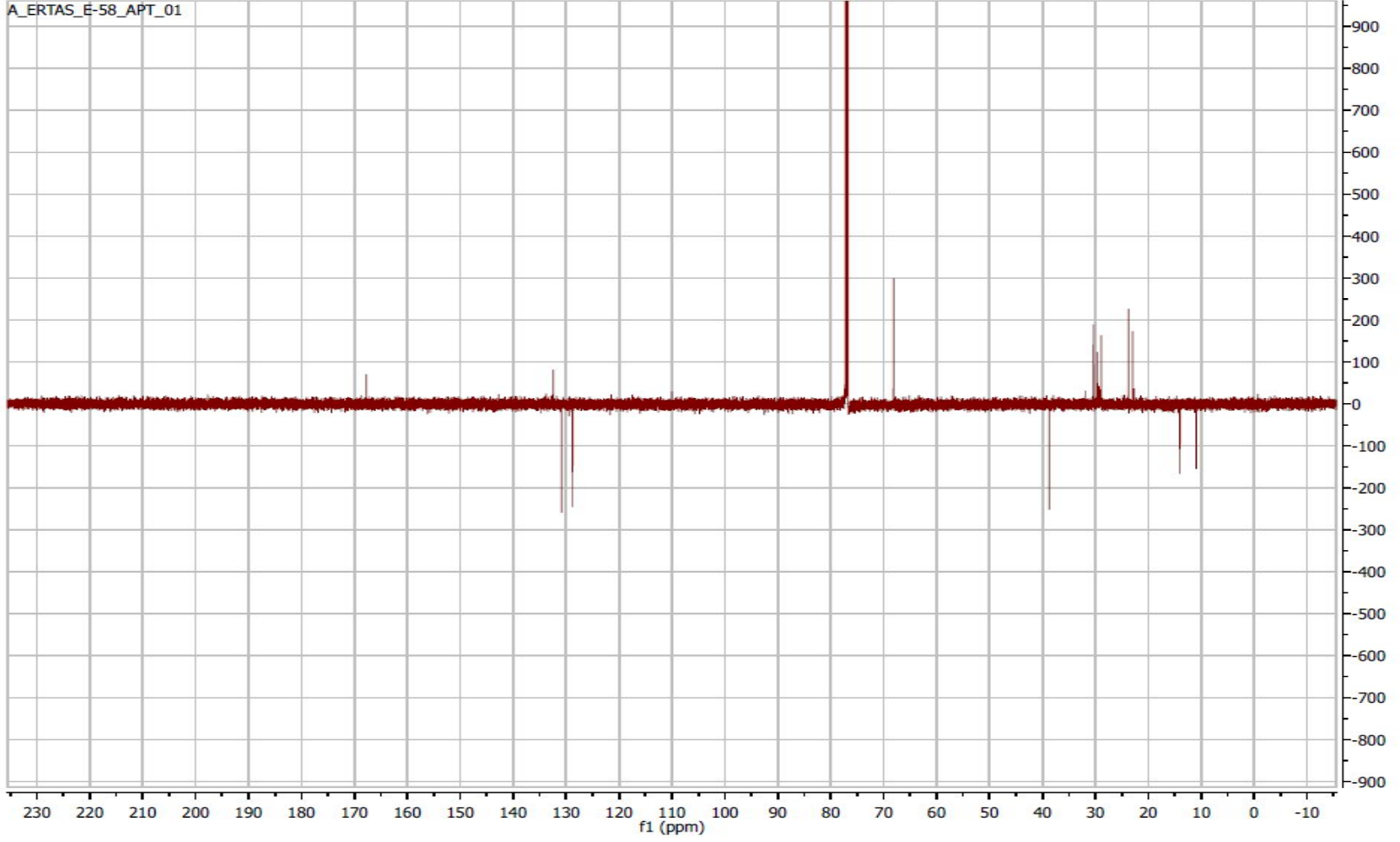
Şekil 142. Bis(2-etilhekzil) tereftalat

Tablo 51. Bis(2-etilhekzil) tereftalat bileşğinin NMR değeri

Pozisyon	¹ H-NMR
1	-
2	8,09 m
3	8,09 m
4	8,09 m
5	8,09 m
6	8,09 m
7	-
8	-
1'	4,26 pentet (J = 5,86 Hz)
2'	1,56 m
3'	1,33-1,46 m
4'	1,33-1,46 m
5'	1,33-1,46 m
6'	0,93 t (J = 5,00 Hz)
7'	1,33-1,46 m
8'	0,89 t (J = 5,00 Hz)
1''	4,26 pentet (J = 5,86 Hz)
2''	1,56 m
3''	1,33-1,46 m
4''	1,33-1,46 m
5''	1,33-1,46
6''	0,93 t (J = 5,00 Hz)
7''	1,33-1,46 m
8''	0,89 t (J = 5,00 Hz)



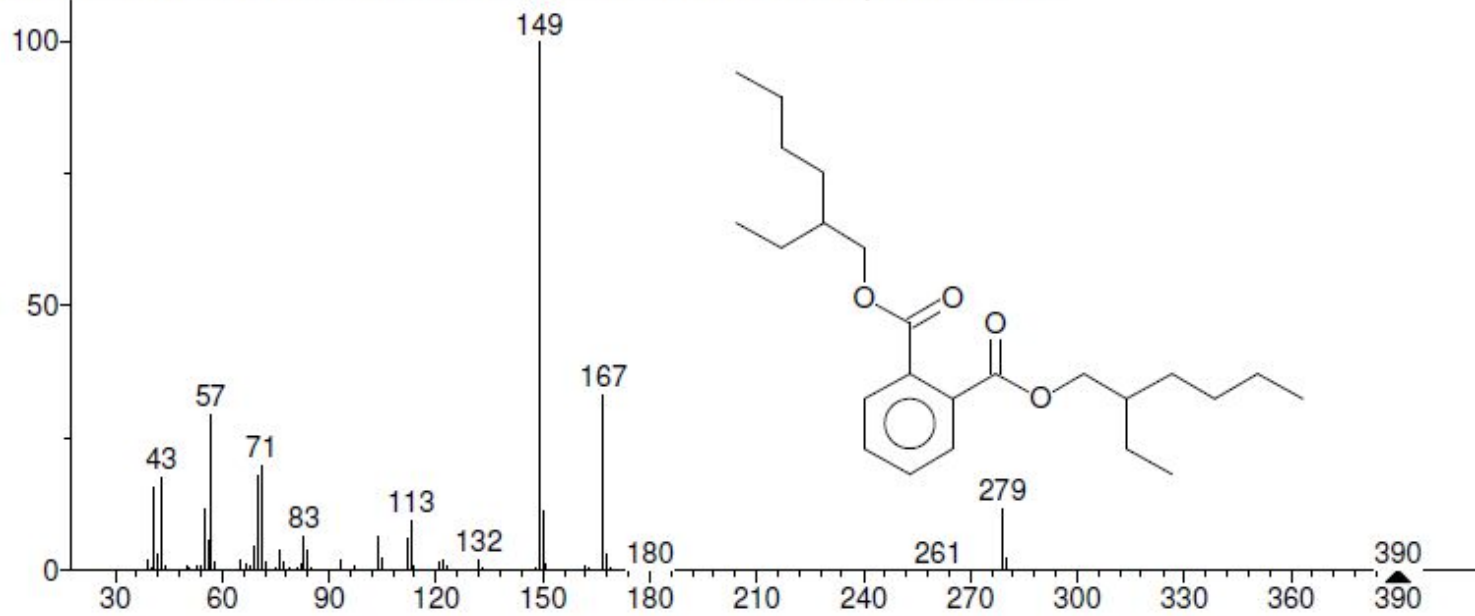
Şekil 143. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiminin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 144. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 150 MHz)

Hit 1 : Bis(2-ethylhexyl) phthalate

C₂₄H₃₈O₄; MF: 960; RMF: 960; Prob 44.3%; CAS: 117-81-7; Lib: replib; ID: 23539.

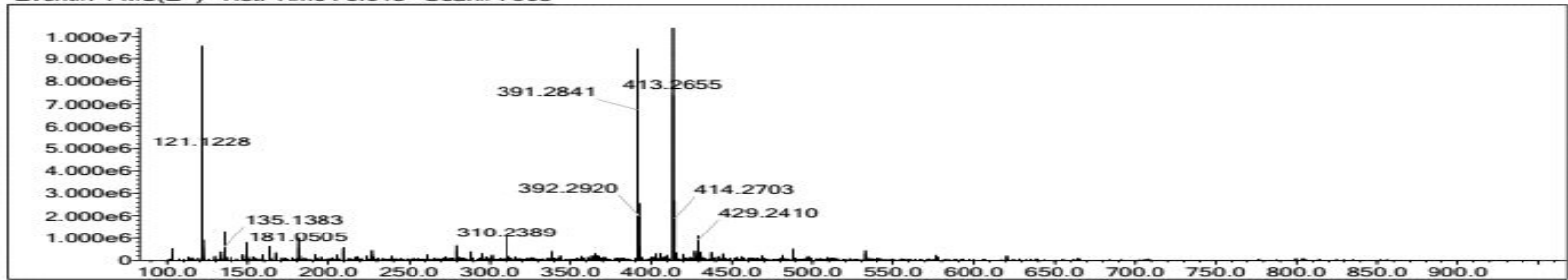


(replib) Bis(2-ethylhexyl) phthalate

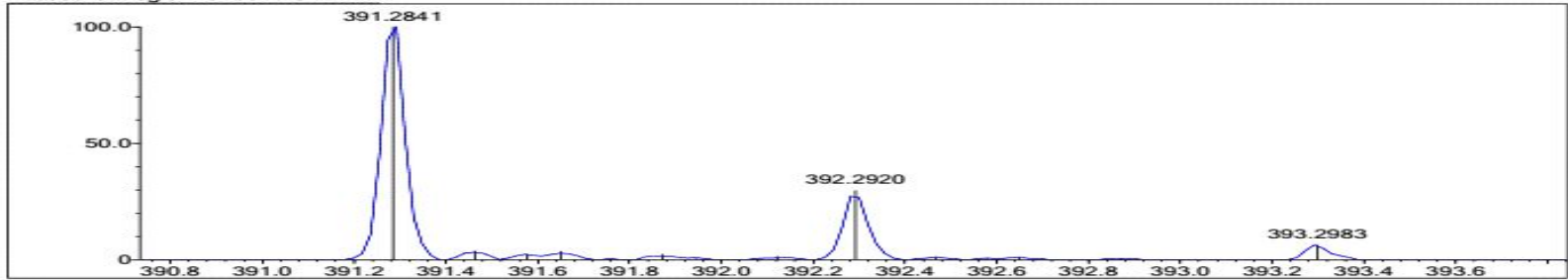
Şekil 145. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiminin GC-MS spektrumu



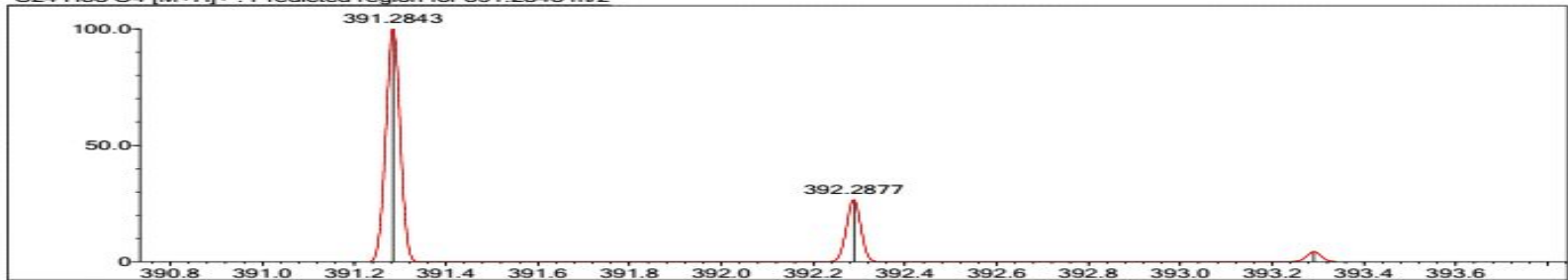
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 6.013 Scan#: 903



Measured region for 391.2841 m/z



C24 H38 O4 [M+H]⁺ : Predicted region for 391.2843 m/z

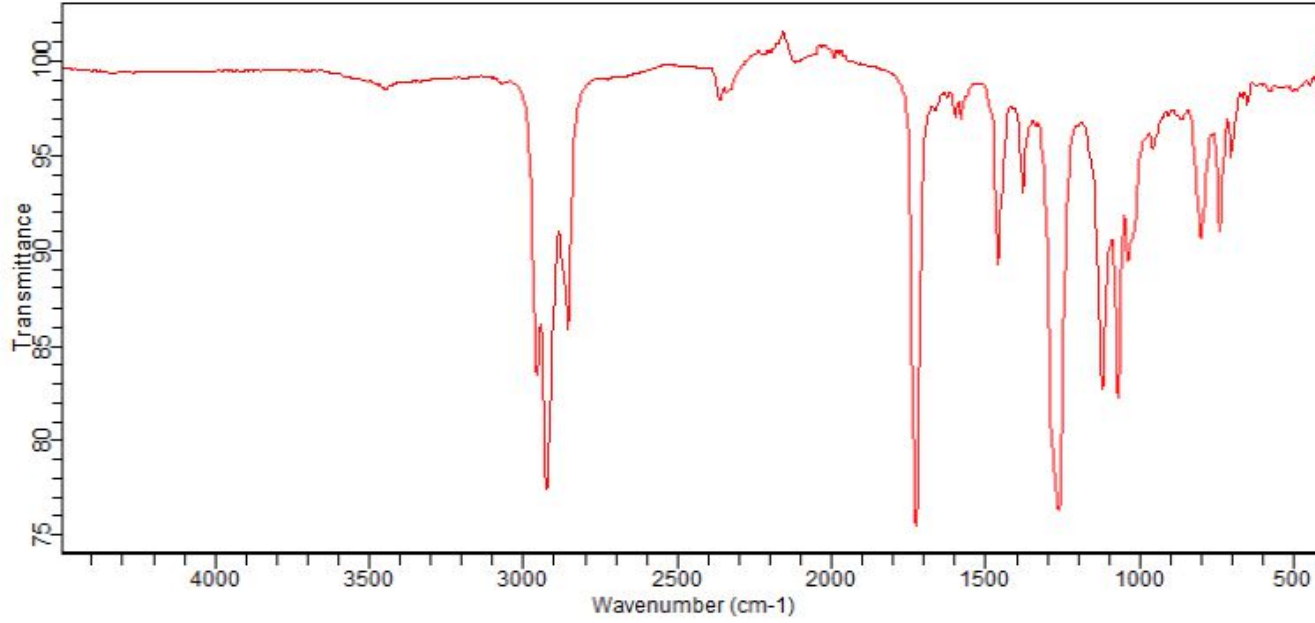


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	91.35	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	[M+H] ⁺	391.2841	391.2843	-0.2	-0.51	91.35	6.0

Şekil 146. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

Sample ID:E-21
Sample Scans:128
Background Scans:128
Resolution:8
System Status:Good
File Location:C:\Users\Public\Documents\Agilent\MicroLab\Results\E-21_2018-05-10T14-15-21.a2r

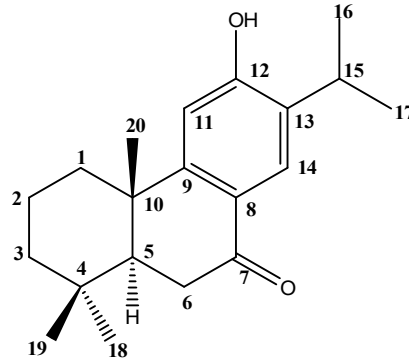
Method Name:zeynep
User:Admin
Date/Time:05.10.2018 2:15:21
Range:4500 - 400
Apodization:Triangular



Şekil 147. Bis(2-etilheksil) tereftalat bileşğinin IR spektrumu

5.8.26. Sugiol

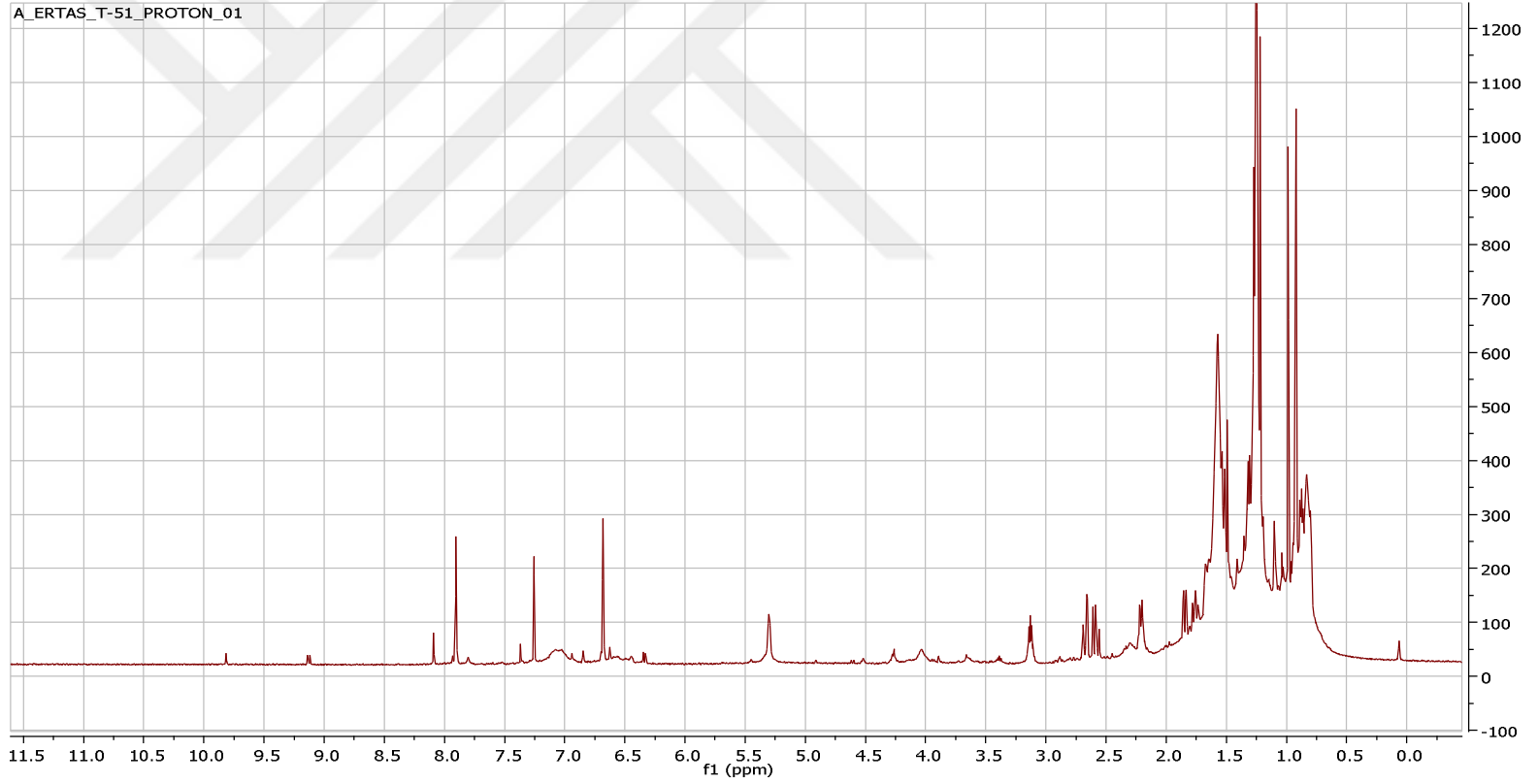
Toprak altı etanol ekstrelerinden elde edildi. Preparatif ince tabaka kromatografisi ile petroleteri/diklorometan:1/9 çözücü sisteminde yaklaşık 14 mg elde edildi (Şekil 148). ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz) spektrumunda üç metil sinyali 0,92, 0,99 ve 1,22 ppm de singletler halinde ve iki metil sinyali dubletler halinde 1,25 ve 1,27 ppm ($J=7,1$ Hz) de izlendi. Spektrumda 3,13 ppm de izlenen metin sinyalinin bu iki metil dubleti ile yaptığı etkileşim sonucu septet şeklinde izlenmesiyle bir isopropil grubunun varlığı anlaşıldı. 6,68 ve 7,91 ppm de izlenen singlet sinyalleri halkada bir aromatikliğin varlığını kuvvetlendirdi. ^1H NMR'da diğer karakteristik sinyaller 2,6 ppm civarında izlenmiştir. Bunlardan 2,68 ppm' de izlenen dd ($J=1,8;17$ Hz) H-1 ve 2,59 ppm de dd keto grubuna komşu proton çiftine (H-6) işaret etti. Keton grubunun varlığı nedeniyle H-14 ferruginol'den (6,83 ppm) farklı olarak daha aşağı alanda (7,91 ppm) izlendi. Kütle spektrumunda moleküler piki kapalı formülü olan ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$) ye karşılık gelen m/z 300'de ayrıca M- CH_3 pikide 285'te izlendi, ^1H NMR değerleri ve LC-MS-IT-TOF'ta izlenen $[\text{M}+\text{H}]^+$ piki m/z 301.2165'e ($\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$) dayanarak bu bileşiğin sugiol olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 52) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (259) (Şekil 149-153).



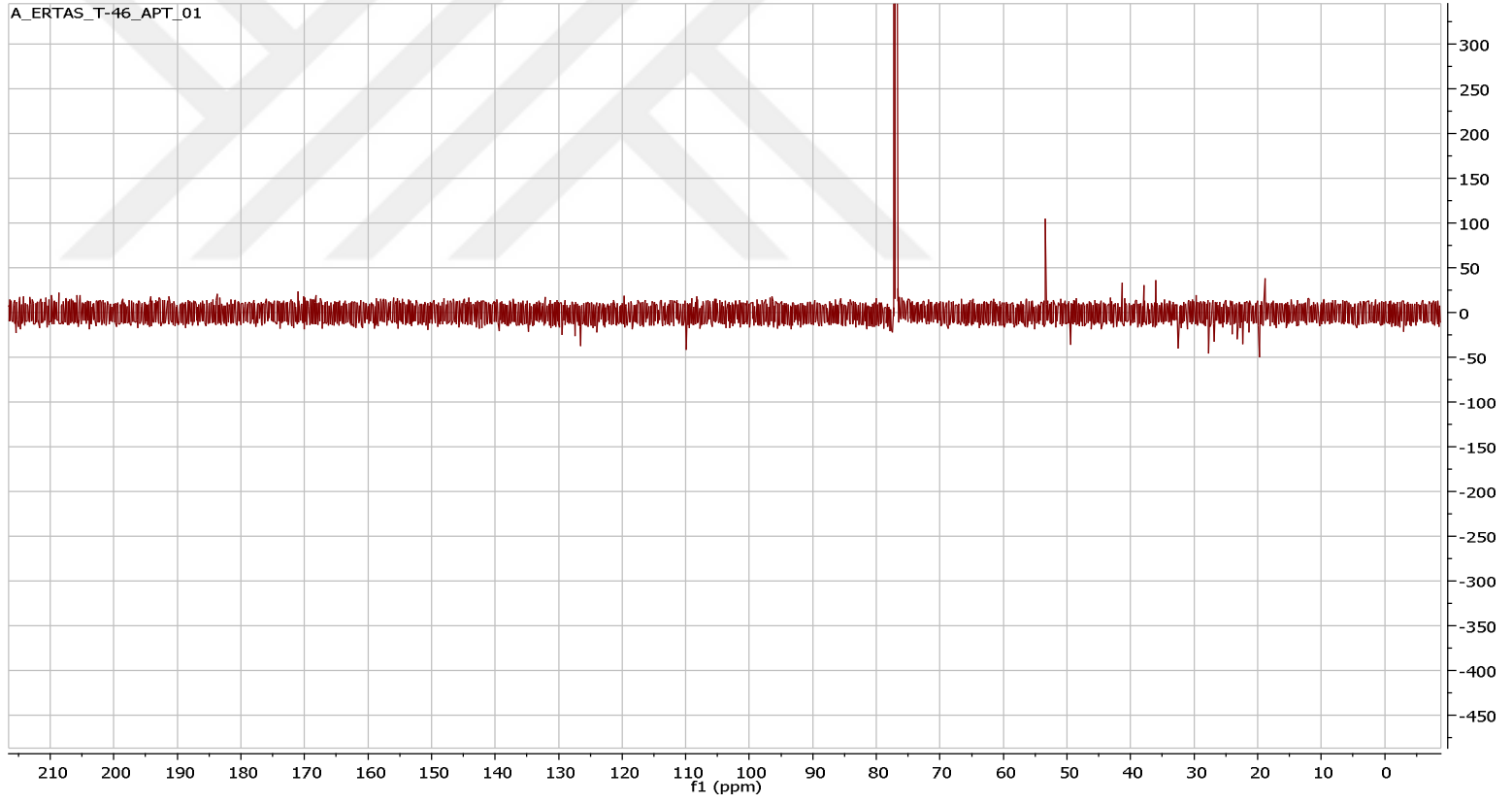
Şekil 148. Sugiol

Tablo 52. Sugiol bileşinin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
		1,56 dd (J=1,8; 13 Hz)
1	38,5	2,68 dd (J=1,8; 13 Hz)
2	19,1	-
3	40,9	-
4	-	-
5	50,2	-
6	19,3	2,59 dd
7	209,3	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	110,9	6,68 s
12	-	-
13	-	-
14	126,6	7,91 s
15	26,7	3,13 septet (J=7,0 Hz)
16	22,6	1,25 d (J=7,1 Hz)
17	22,3	1,27 d (J=7,1 Hz)
18	33,4	1,22 s
19	21,5	0,92 s
20	24,8	0,99 s
12-OH	-	5,30 s

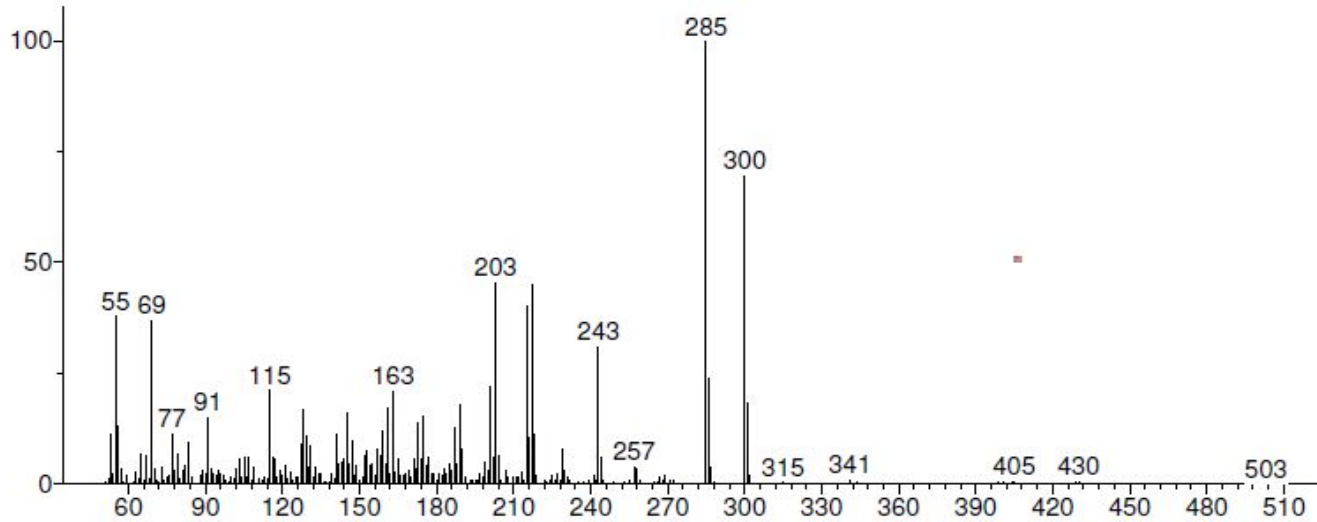


Şekil 149.Sugiol bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 150. Sugiol bileşiğinin APT spektrumu (CDCl₃, 150 MHz)

Unknown; InLib=276



(Text File) Scan 723 (7.610 min): T-51.D\data.ms (-712)

Name: Scan 723 (7.610 min): T-51.D\data.ms (-712)

MW: N/A ID#: 2658 DB: Text File

Comment: T-51

10 largest peaks:

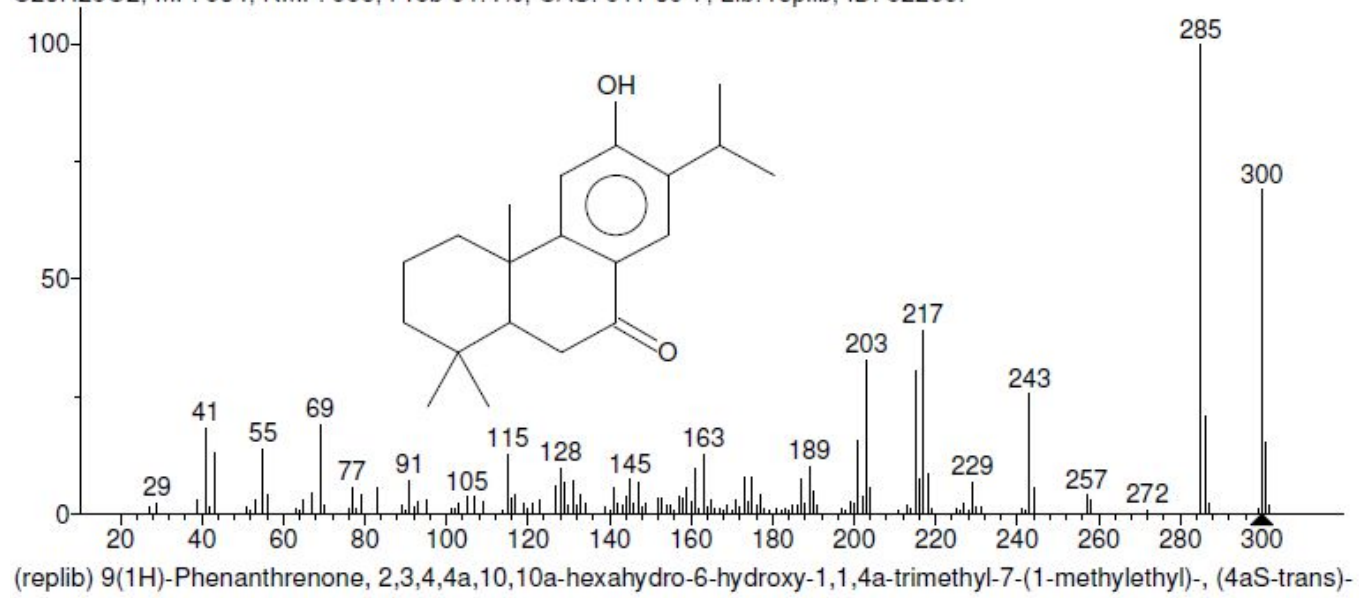
285 999 | 300 697 | 203 457 | 217 447 | 215 399 | 55 380 | 69 370 | 243 313 | 286 236 | 201 220 |

Synonyms:

no synonyms.

Şekil 151.Sugiol bileşiminin GC-MS spektrumu-1

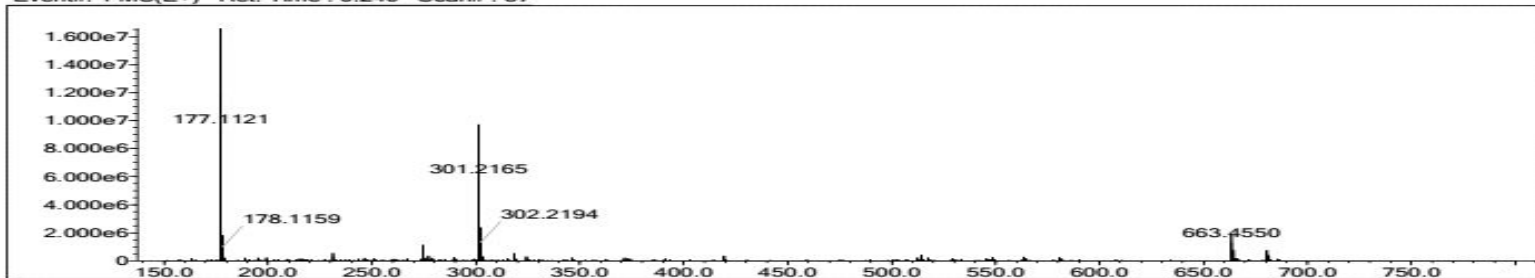
Hit 1 : 9(1H)-Phenanthrenone, 2,3,4,4a,10,10a-hexahydro-6-hydroxy-1,1,4a-trimethyl-7-(1-methylethyl)-, (4aS-trans)-
C₂₀H₂₈O₂; MF: 904; RMF: 938; Prob 91.4%; CAS: 511-05-7; Lib: replib; ID: 32235.



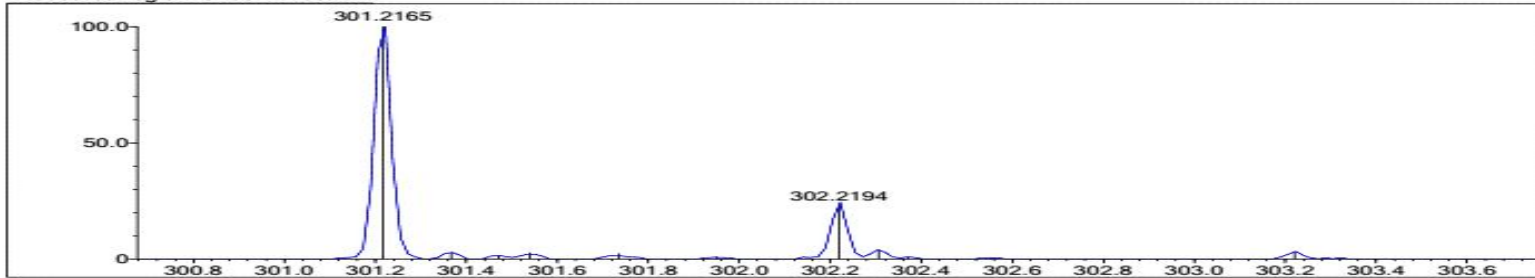
Şekil 152. Sugiol bileşiğinin GC-MS spektrumu-2



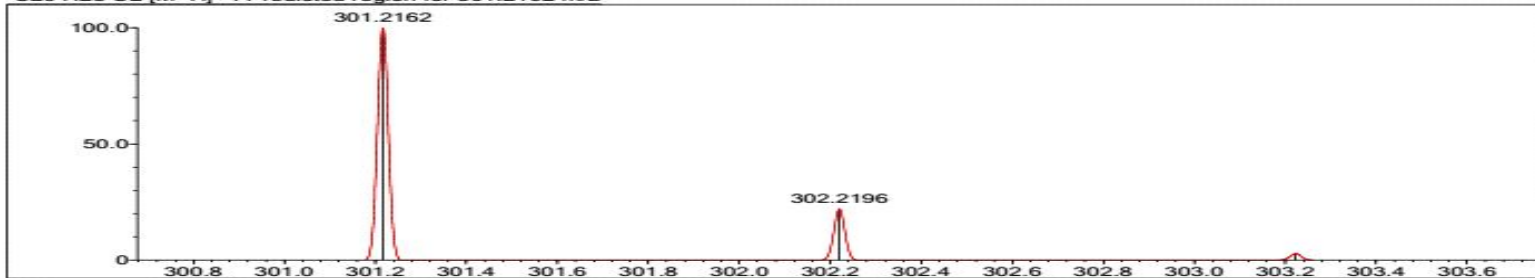
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 0.240 Scan#: 37



Measured region for 301.2165 m/z



C20 H28 O2 [M+H]⁺ : Predicted region for 301.2162 m/z

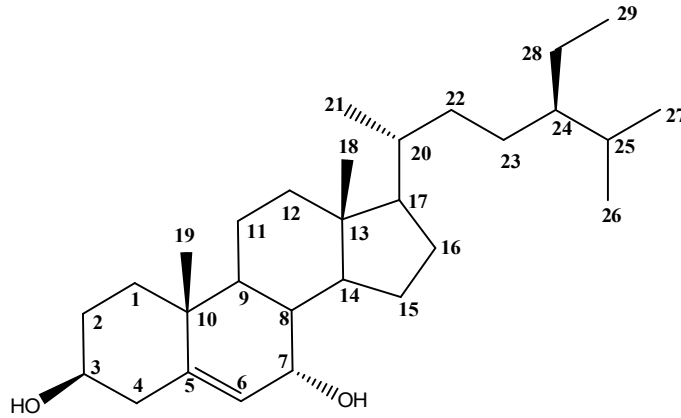


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	97.29	C20 H28 O2	[M+H] ⁺	301.2165	301.2162	0.3	1.00	97.29	7.0

Şekil 153. Sugiol bileşiğinin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.27. 7- α -hidroksi- β -sitosterol

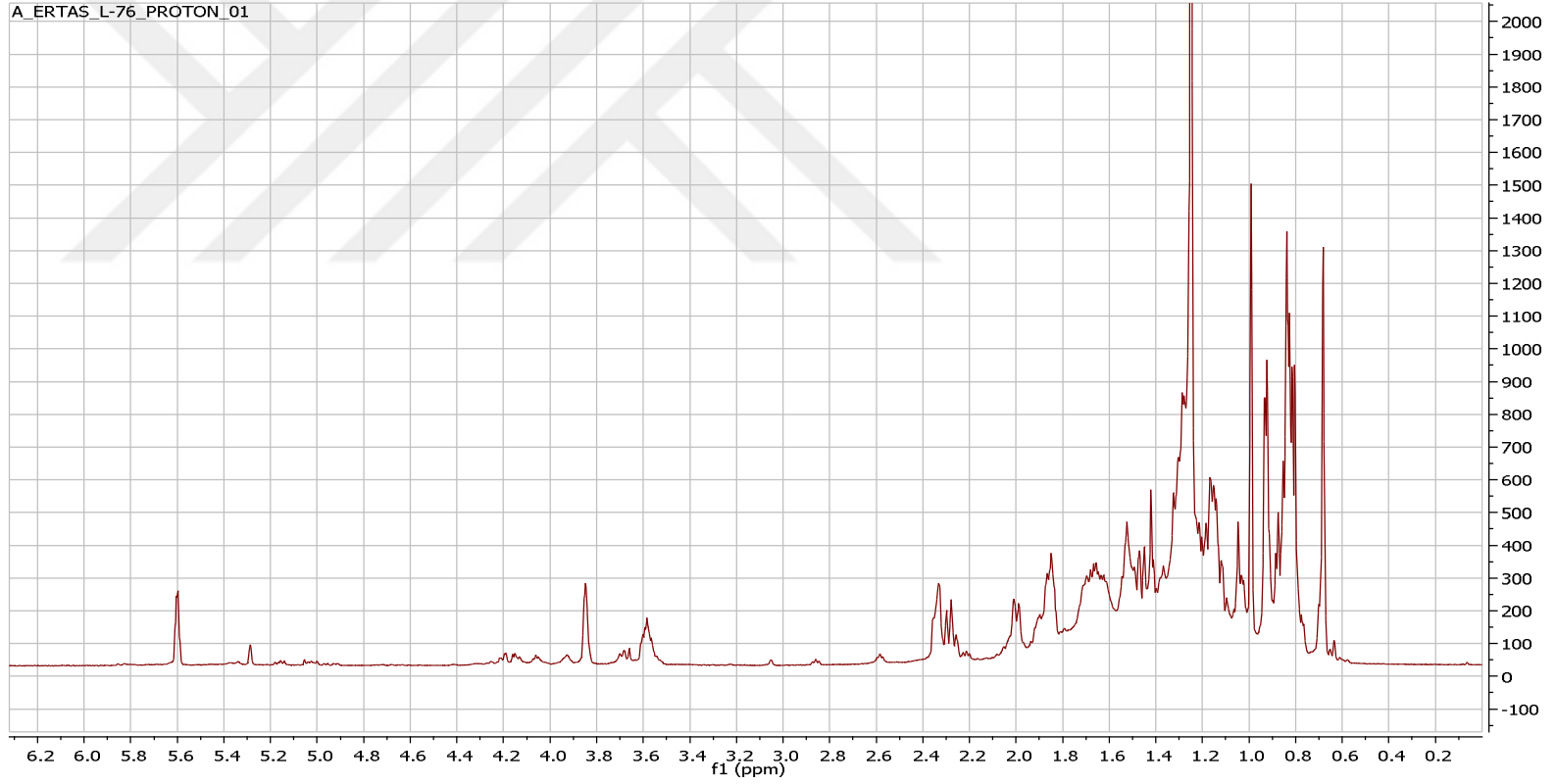
Hem oprak üstü hemde toprak altı etanol ekstrelerinden elde edilmiştir. Fraksiyonlar preparatif ince tabaka kromatografisi yapıldıktan sonra DCM:AC 9/1 çözücü sisteminde İTK'sı yapıldı. Renksiz olan bu bileşik 4,5 mg olarak elde edildi (Şekil 154). Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında koyu mavi bir renk aldı. ^1H NMR spektrumunda (CDCl_3 , 600 MHz) δ 0.67 (3H, s, Me-18), 0.81 (3H, d, $J=6,9$ Hz, Me-27), 0.83 (3H, d, $J=7.1$ Hz, Me-26), 0.85 (3H, t, $J=7,81$ Hz, Me-29), 0.92 (3H, d, $J=6,4$ Hz, Me-21) ve 0,99'da (3H, s, Me-19) izlenen metil sinyalleri bileşiğin steroidal bir iskelete sahip olduğu izlenimini verdi. δ 3.58'de (1H, *m*, H-3 α)izlenen proton sinyali bileşikte bir hidroksil veya başka bir oksijenli grubun varlığına işaret etti. Yapıda bir olefinik proton ise 5.60 ppm (1H, *m*, H-6) da izlendi. β -sitosterol bileşiğinde bu olefenik proton 5,35 ppm sinyal vermişti. Buda komşusunda oksijenli bir grubun varlığına işaret etmektedir. Ayrıca 3,85 ppm'de dar multipler bir pikin varlığı 7 konumunda bir hidroksil grubun varlığına işaret etmektedir. ^1H NMR değerleri ve GC-MS'te izlenen 430 kütleyle ($\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}_2$) dayanarak bu bileşiğin 7- α -hidroki- β -sitosterol (Stigmast-5-en-3,7-diol) olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 53) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (Şekil 155-159).



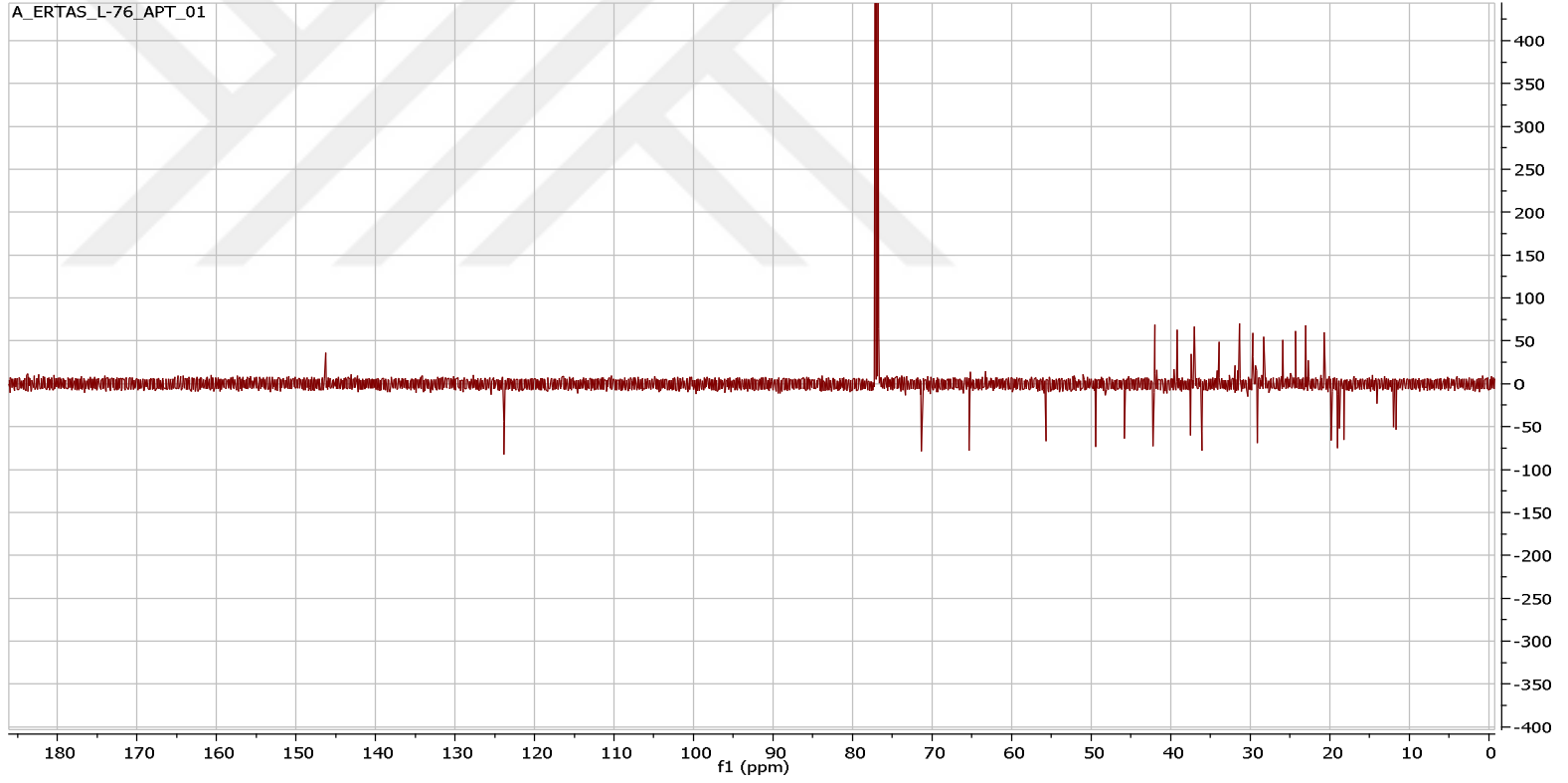
Şekil 154. 7- α -hidroksi- β -sitosterol

Tablo 53.7- α -hidroksi- β -sitosterol bileşiminin NMR değerleri

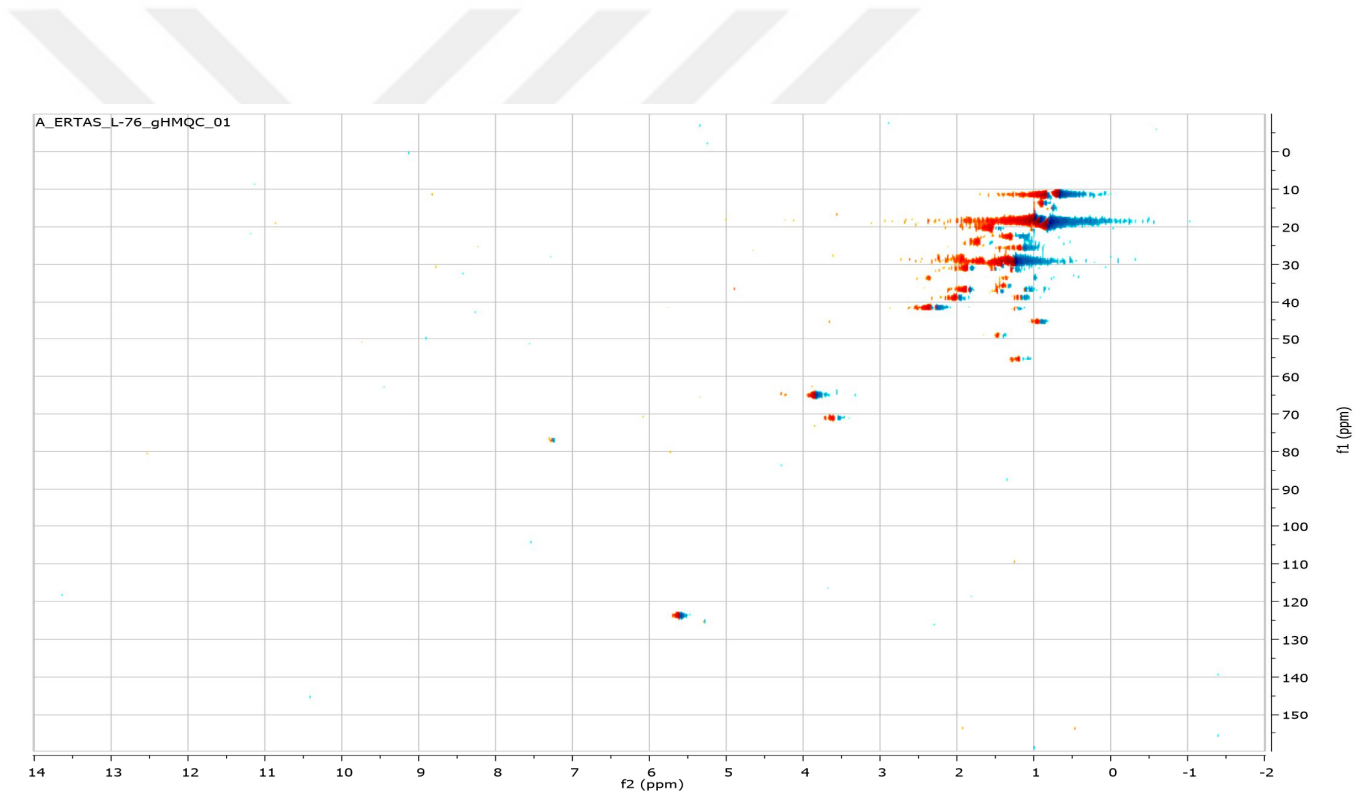
Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	37,4	-
2	31,4	-
3	71,3	3,58 m
4	42,1	2,28 m
5	146,2	
6	123,8	5,60 m
7	65,4	3,85 brs
8	37,4	-
9	42,2	-
10	37,5	-
11	23,1	-
12	39,1	1,99 m
13	42,3	-
14	49,4	-
15	25,9	-
16	28,2	1,84 m
17	55,9	-
18	11,6	0,67 s
19	18,8	0,99 s
20	36,1	-
21	18,2	0,92 d (J=6,4 Hz)
22	34,0	-
23	29,7	-
24	45,8	-
25	28,5	-
26	19,8	0,83 d (J=7,1 Hz)
27	19,0	0,81 d (J=6,9 Hz)
28	24,2	-
29	12,0	0,85 t (J=7,8 Hz)



Şekil 155. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiminin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)

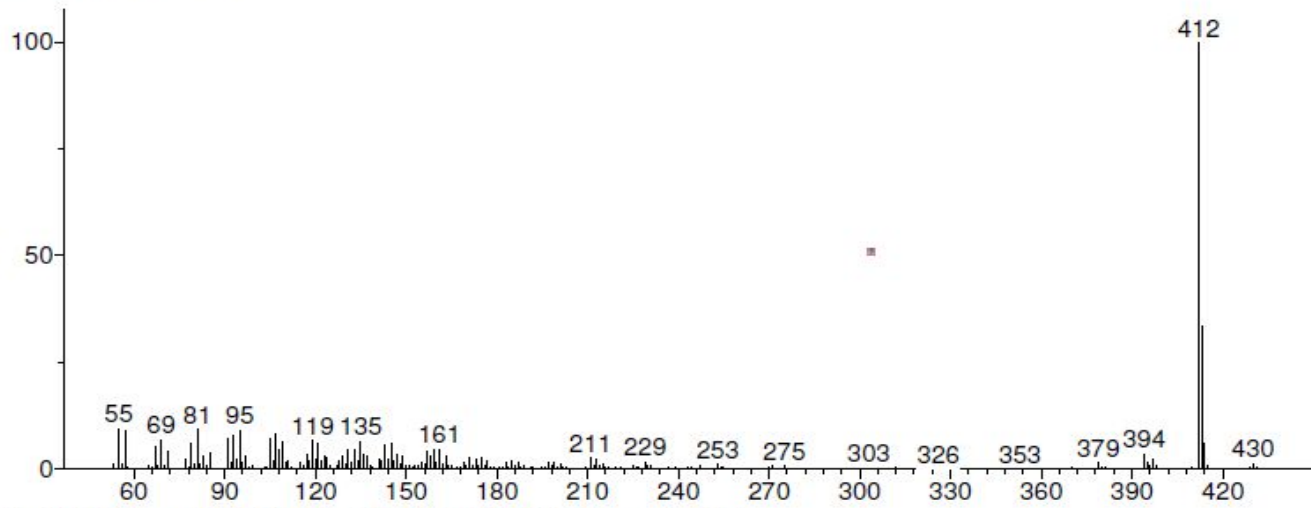


Şekil 156. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiğinin APT spektrumu (CDCl₃, 150 MHz)



Şekil 157. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiğinin HMQC spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)

Unknown; InLib=-898



(Text File) Scan 1446 (12.132 min): L-76(DCM).D\data.ms (-1412)

Name: Scan 1446 (12.132 min): L-76(DCM).D\data.ms (-1412)

MW: N/A ID#: 2660 DB: Text File

Comment: L-76(DCM)

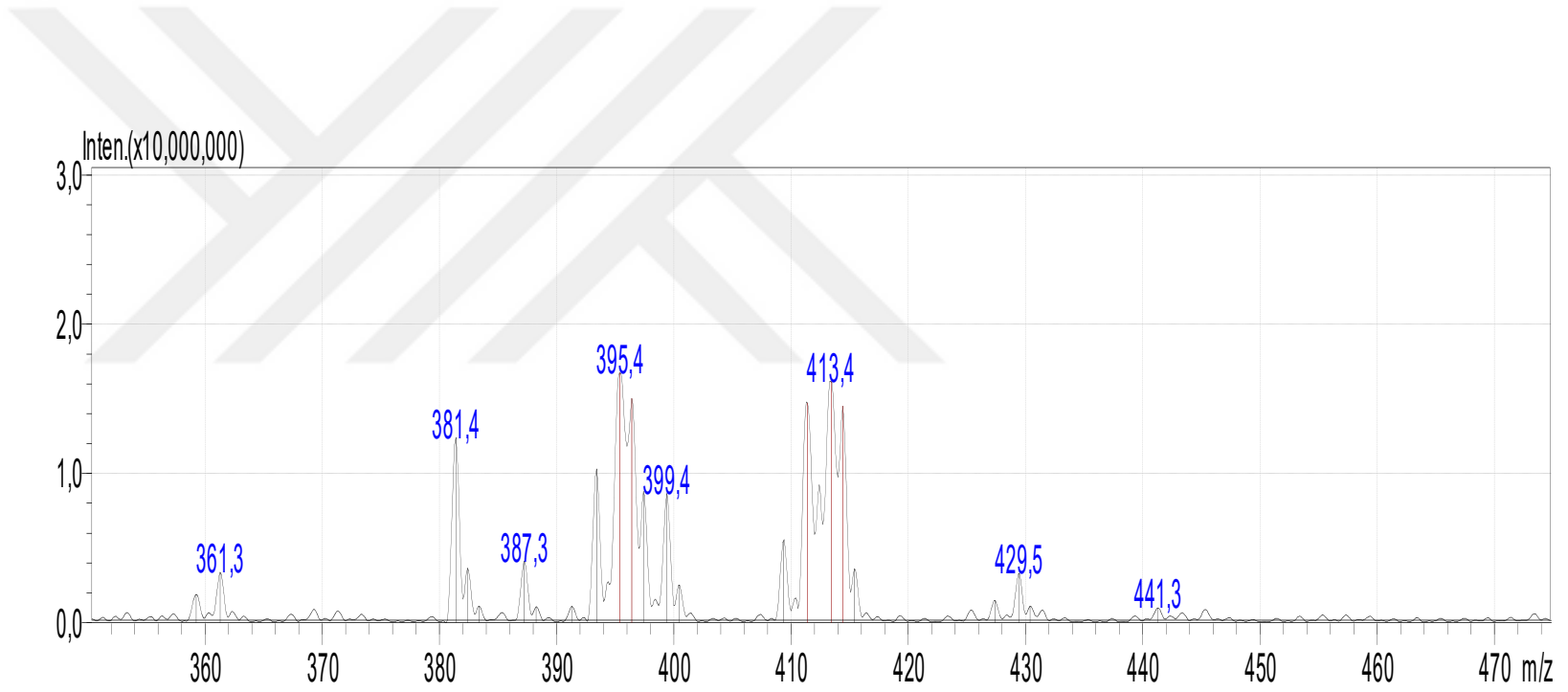
10 largest peaks:

412 999 | 413 332 | 55 96 | 81 95 | 95 93 | 57 90 | 107 80 | 93 78 | 91 72 | 69 71 |

Synonyms:

no synonyms.

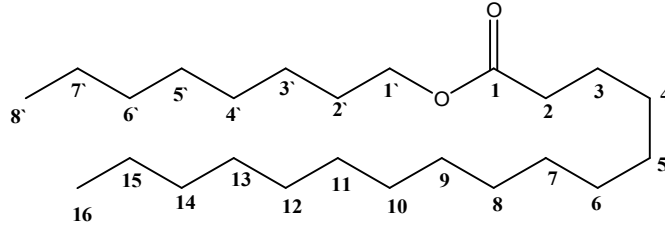
Şekil 158. 7 α -hidroksi- β sitosterolbileşiğinin GC-MS spektrumu



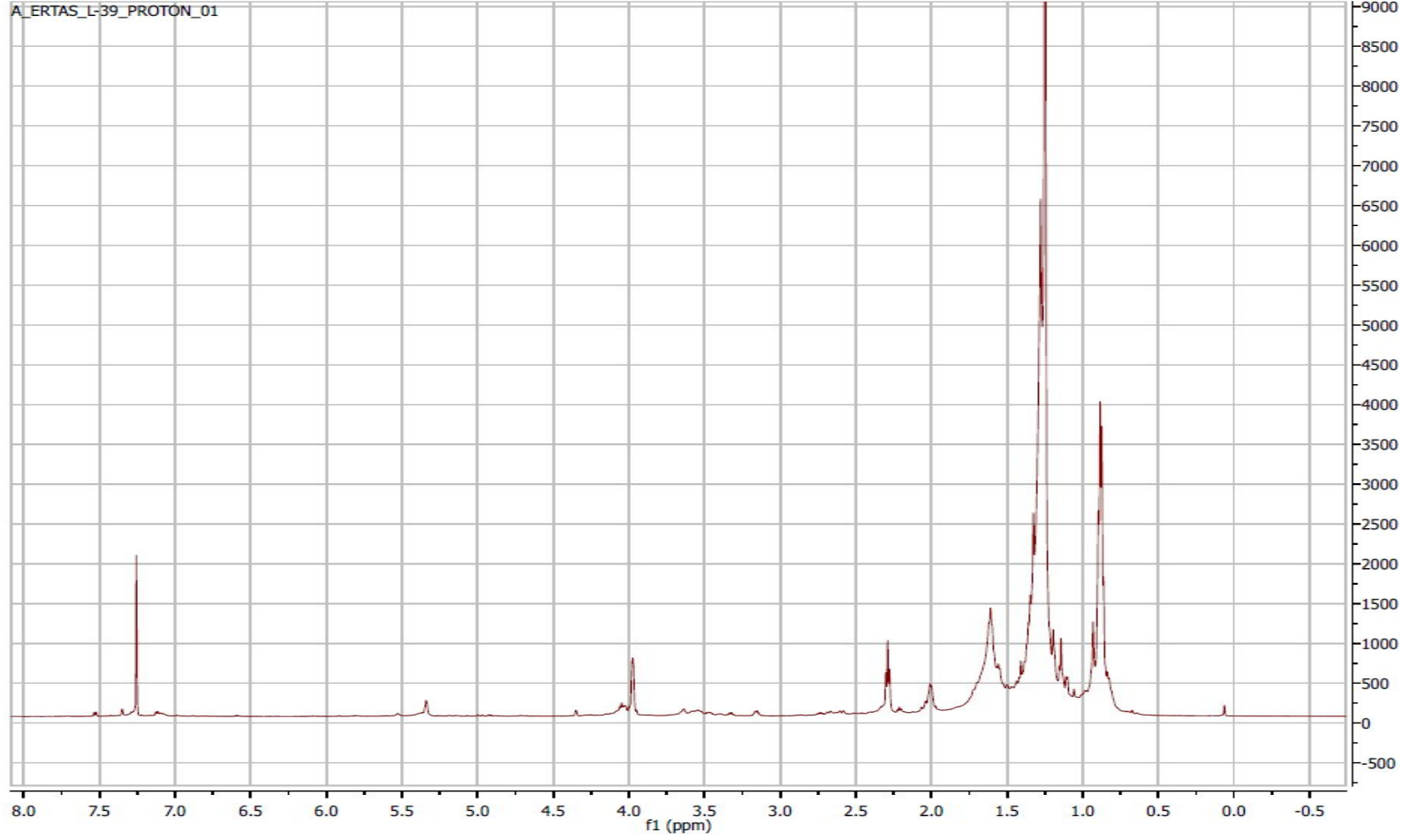
Şekil 159. 7 α -hidroksi- β sitosterol bileşiğinin LC-APCI-MS spektrumu (Pozitif mod)

5.8.28. Hekzadekanoik asit, n-oktil ester

Toprak üstü etanol ekstresinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile petroleteri/diklorometan:9/1 çözücü sisteminde elde edildi. Yaklaşık 3 mg olarak elde edildi (Şekil 160). $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (CDCl_3 , 600 MHz) δ 0.88 t ($J= 6.3$ Hz) ppm’de yağ asidi zincirinin sonundaki metil grubuna ait triplet , δ 1.25 ppm’de çok sayıda metilen grubunu gösterir geniş singlet, δ 1.63 t ($J= 5.5$ Hz) ve 2.29 t ($J= 7.4$ Hz) ppm’de sırası ile karbonil grubuna komşu ilk 2 metilen sinyalleri bize karakteristik yağ asidi yapısı olduğu düşündürdü. Ayrıca vinilik bölgede sinyal izlenmemesi bize yapının doymuş yağ asidi olduğunu önerdi. Bunlara ilaveten δ 3.98 t ($J= 2.8$ Hz) ppm’de yağ asidine ester bağlandığında izlenen ilk komşu metilen grubuna ait sinyal izlendi. Daha ileri NMR teknikleri ile çalışılmadan önce bu madde GC-MS ile analizlendi. GC-MS kütüphanesinde yapılan taramalar sonucu yapının 24 karbonlu Hexadecanoic asit, n-octyl ester olduğu anlaşıldı. Ayrıca kütle spektrumunda izlenen m/z 368 $[\text{M}]^+$ sinyali molekül formülünü destekledi (Şekil 161-163).

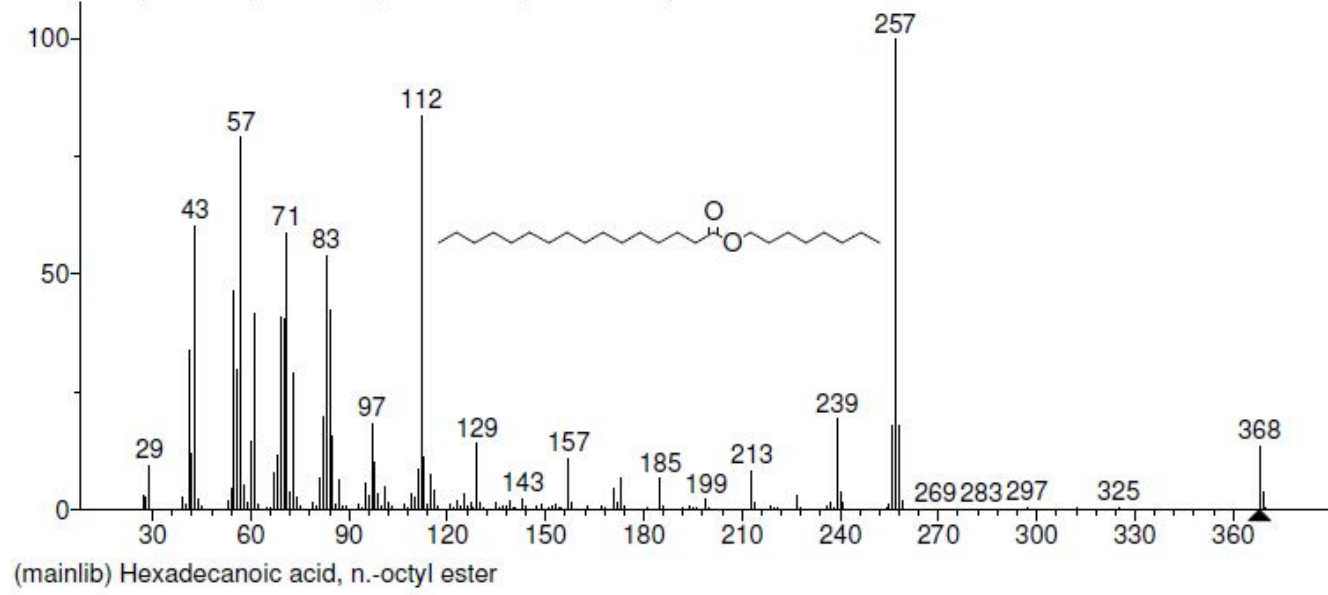


Şekil 160. Hekzadekanoik asit, n-oktil ester

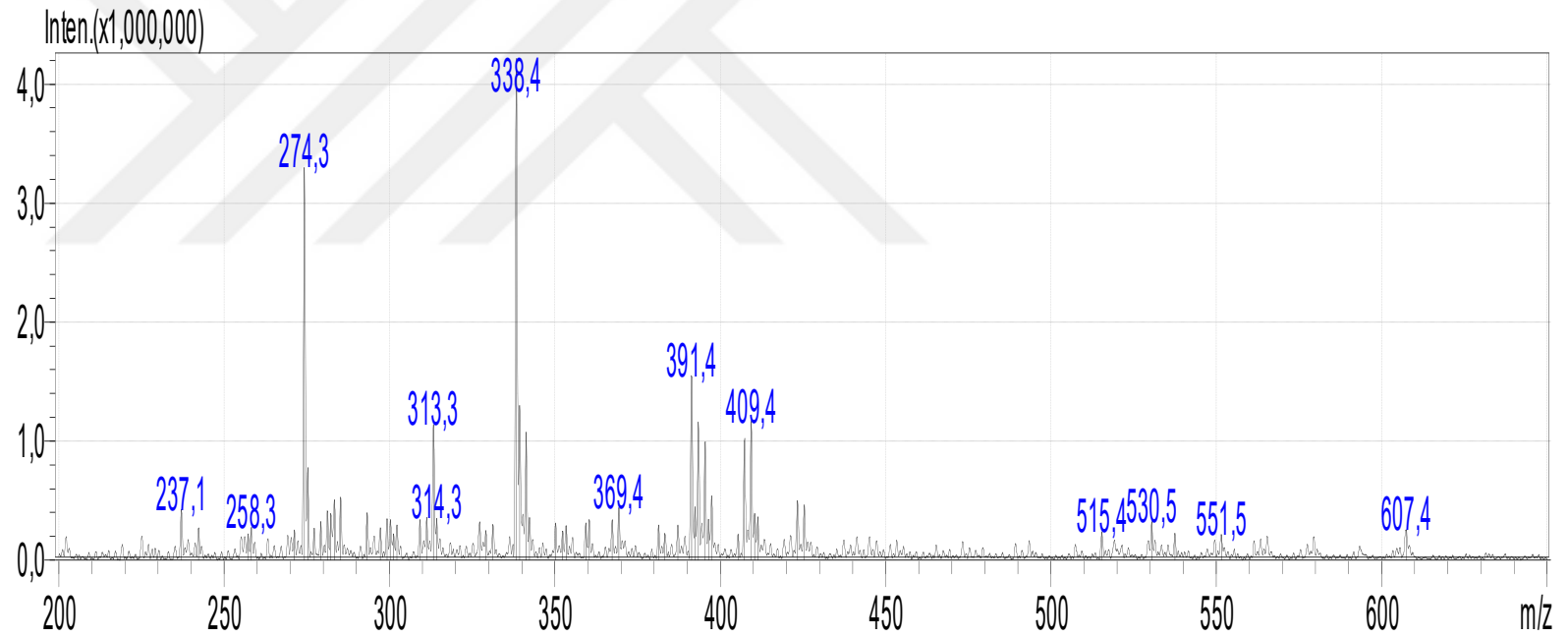


Şekil 161. Hegzadekanoik asid, n-oktil ester bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)

Hit 1 : Hexadecanoic acid, n.-octyl ester
C₂₄H₄₈O₂; MF: 799; RMF: 807; Prob 42.9%; Lib: mainlib; ID: 212174.



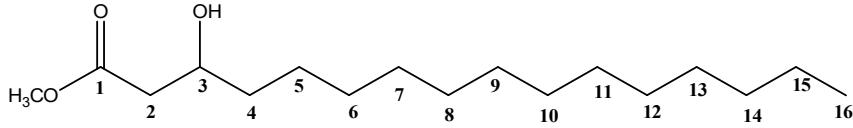
Şekil 162. Hegzadekanoik asid, n-oktil ester bileşiğinin GC-MS spektrumu



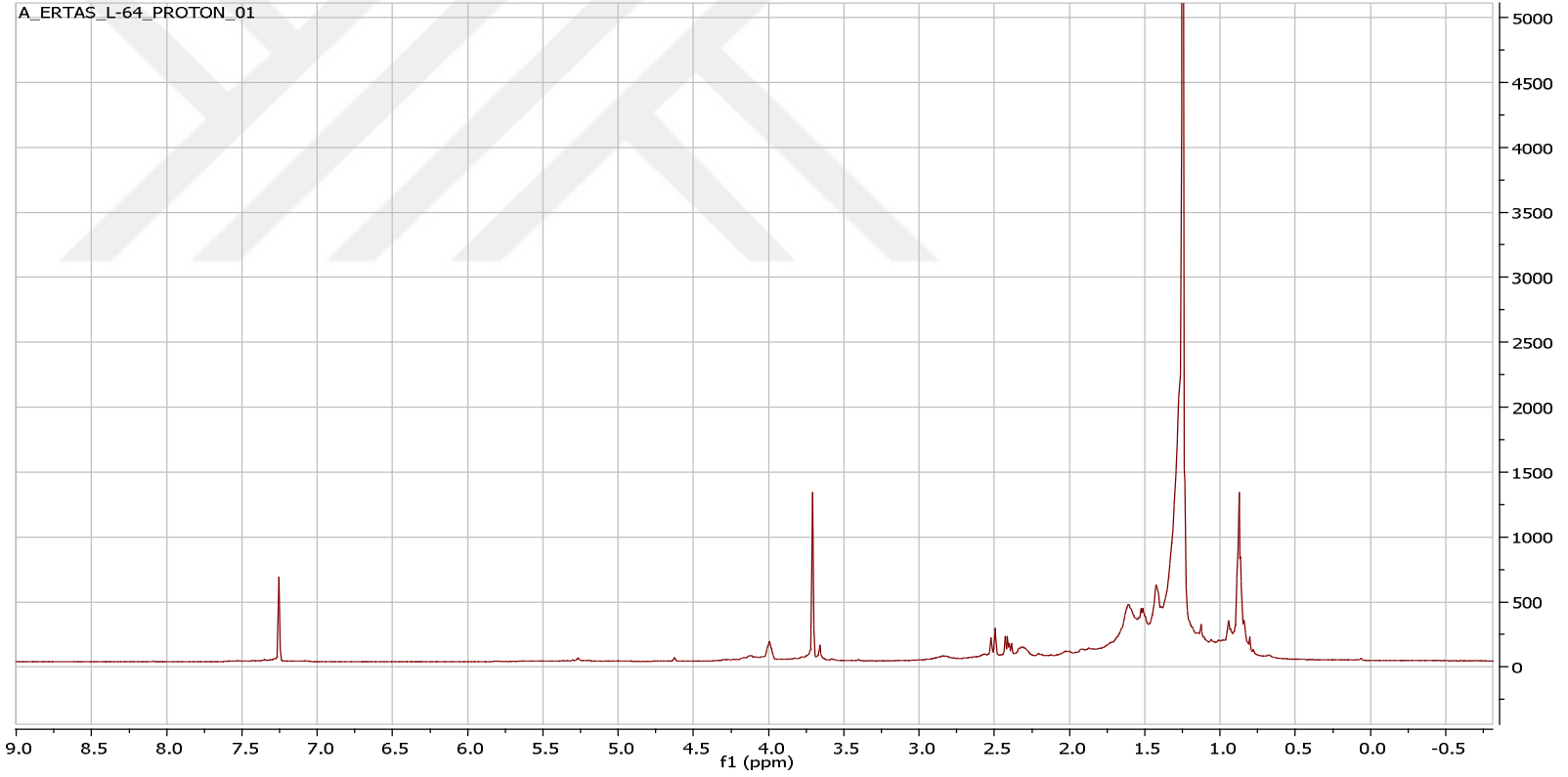
Şekil 163. Hegzadekanoik asid, n-oktil ester bileşiğinin LC-APCI-MSI spektrumu (Pozitif modu)

5.8.29. Hekzadekanoik asit, 3-hidroksi-metil ester

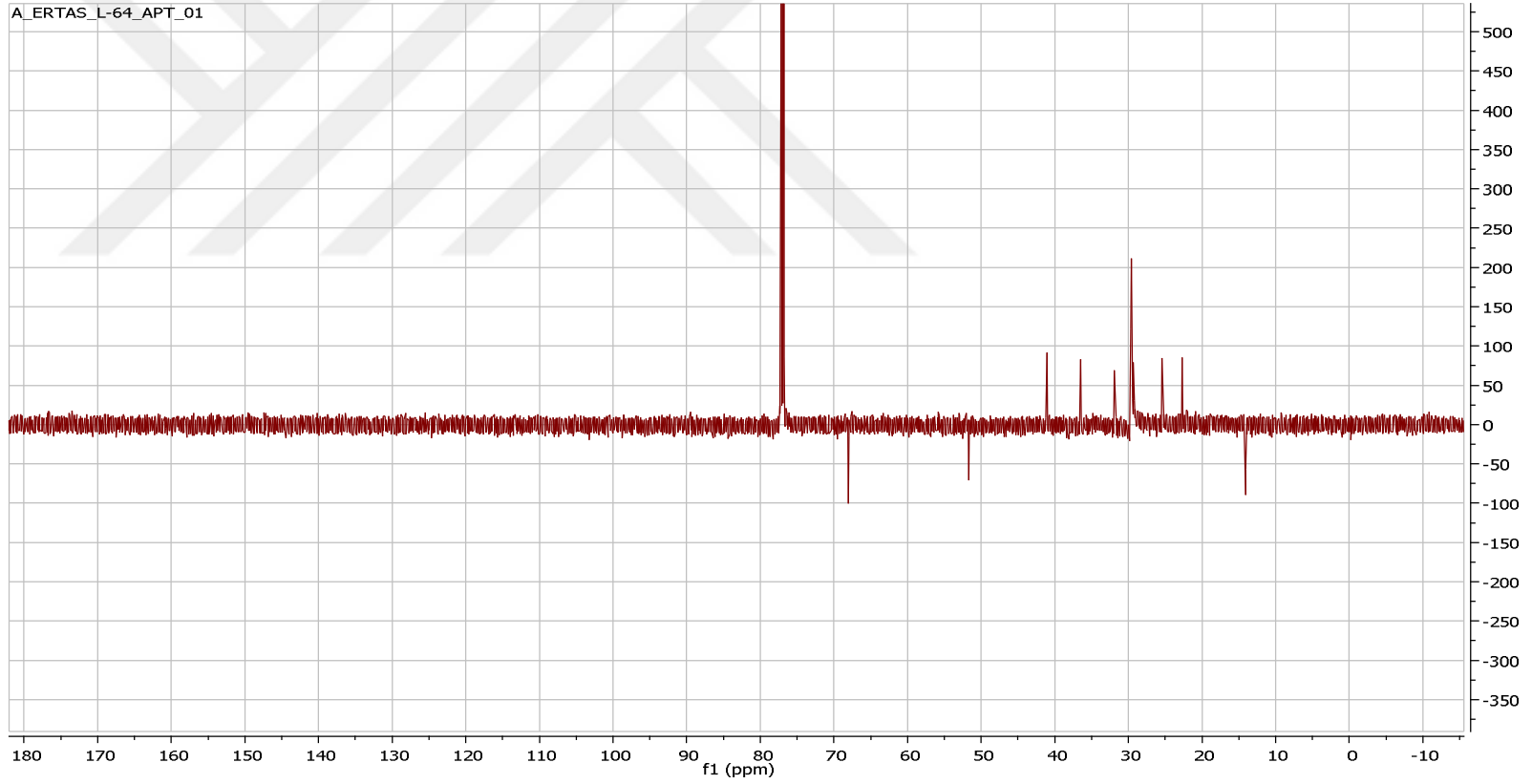
Toprak üstü etanol ekstresinden preparatif ince tabaka kromatografisi ile petroleteri/diklorometan:6/1 çözücü sisteminde elde edildi. Yaklaşık 2 mg olarak elde edilmiştir (Şekil 164). $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (CDCl_3 , 600 MHz) δ 0.87 t ($J= 6.4$ Hz) ppm'de yağ asidi zincirinin sonundaki metil grubuna ait triplet, δ 1.25 ppm'de çok sayıda metilen grubunu gösterir geniş singlet, δ 1.61 m, 2.40 m ve 2.50 m ppm'de sırası ile karbonil grubuna komşu metilen sinyallerini izlenmesi karakteristik yağ asidi yapısı olduğu düşündürdü. Ayrıca vinilik bölgede sinyal izlenmemesi bize yapının doymuş yağ asidi olduğunu önerdi. Bunlara ilaveten δ 3.66 m ve 4.00 m ppm'de yağ asidine metoksi ve OH grubu bağlandığında izlenen sinyaller görüldü. Daha ileri NMR teknikleri ile çalışılmadan önce L-64 maddesi GC-MS ile analizlendi. GC-MS kütüphanesinde yapılan taramalar sonucu yapının 17 karbonlu Hexadecanoic acid-3-hydroxy-methyl ester olduğu anlaşıldı. Ayrıca LC-MS-IT-TOF ile elde edilen kütle spektrumunda izlenen m/z 309.2261 $[\text{M}+\text{H}]^+$ piki $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_3$ kapalı formülünü önererek yapıyı destekledi (Şekil 165-168).



Şekil 164. Hekzadekanoik asit, 3-hidroksi-metil ester

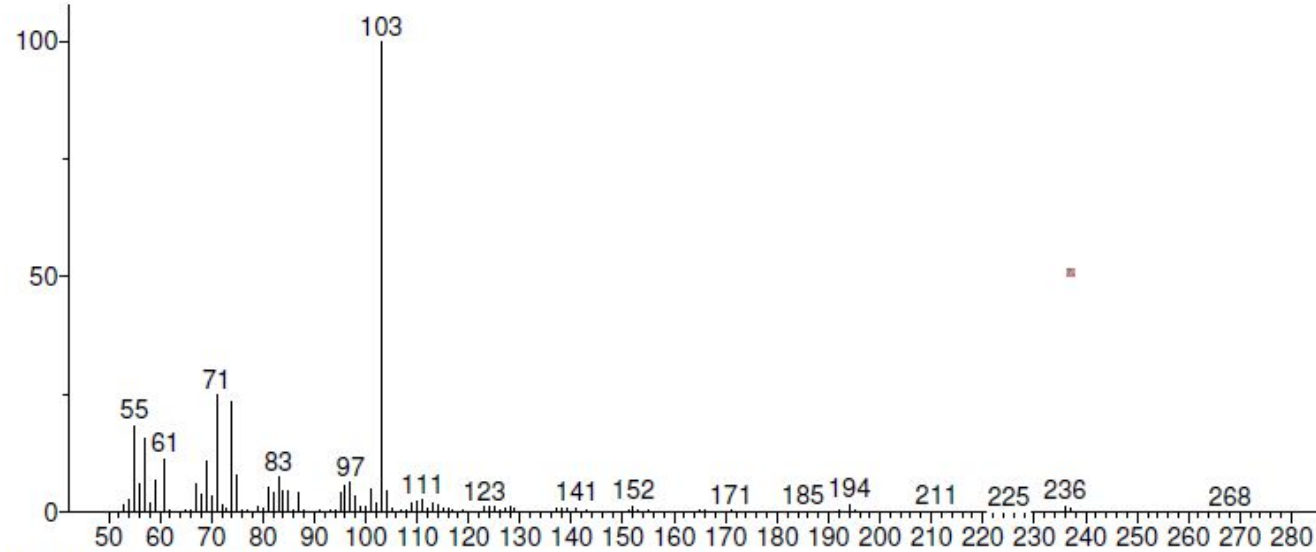


Şekil 165. Hegzadekanoik asid, 3-hidroksi-, metil ester bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 600 MHz)



Şekil 166. Hegzadekanoik asid, 3-hidroksi-, metil ester bileşiğinin APT spektrumu (CDCl₃, 150 MHz)

Unknown; InLib=-101



(Text File) Scan 245 (4.620 min): L-64(DCM).D\data.ms (-231)

Name: Scan 245 (4.620 min): L-64(DCM).D\data.ms (-231)

MW: N/A ID#: 2661 DB: Text File

Comment: L-64(DCM)

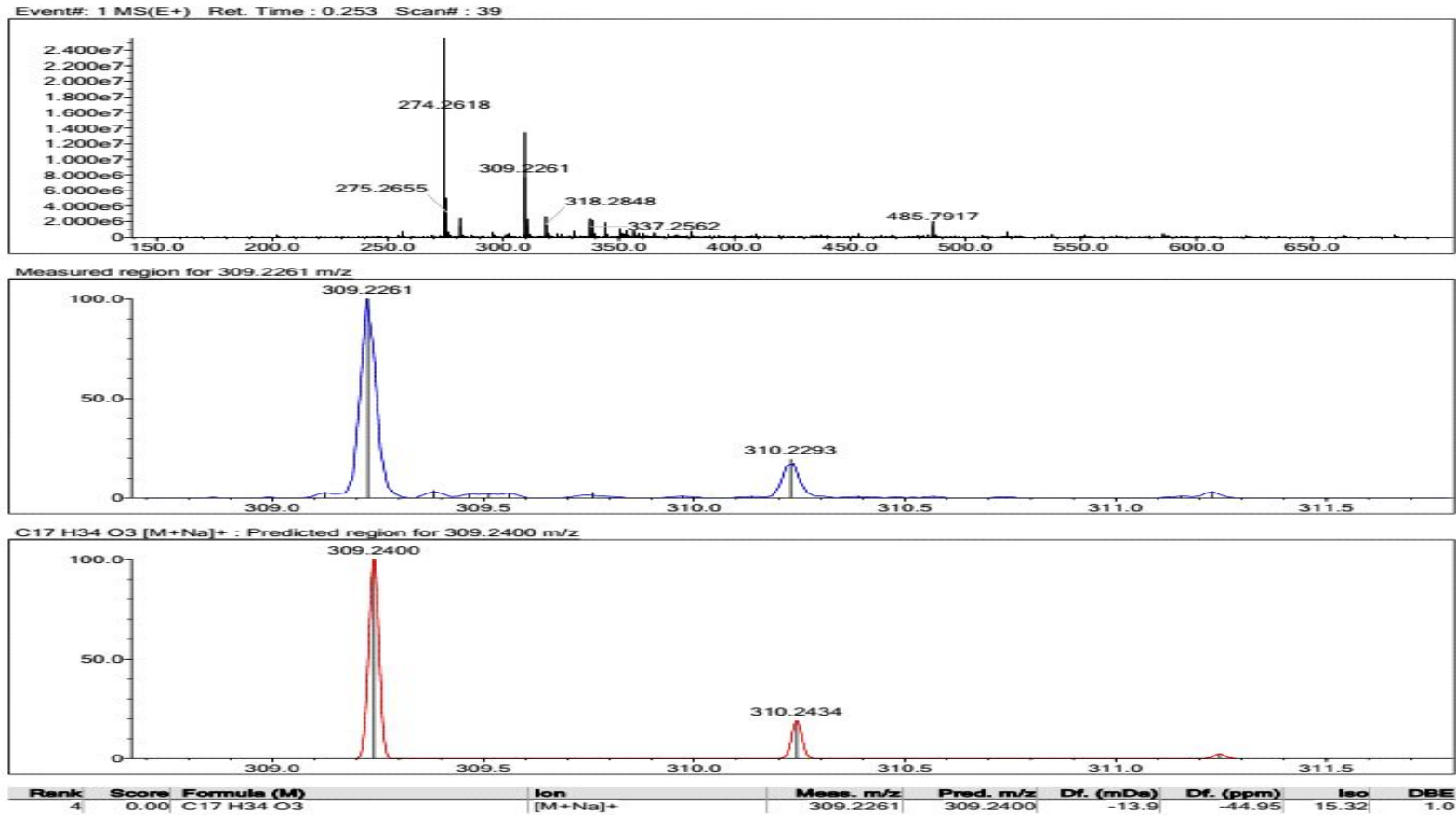
10 largest peaks:

103 999 | 71 251 | 74 235 | 55 187 | 57 155 | 61 115 | 69 109 | 75 78 | 83 77 | 59 66 |

Synonyms:

no synonyms.

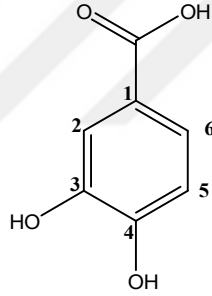
Şekil 167. Hegzadekanoik asid, 3-hidroksi-, metil ester bileşiğinin GC-MS spektrumu



Şekil 168. Hegzadekanoik asid, 3-hidroksi-, metil ester bileşiminin LC-MS-IT-TOF kromatogramı

5.8.30. Protokateşik asit

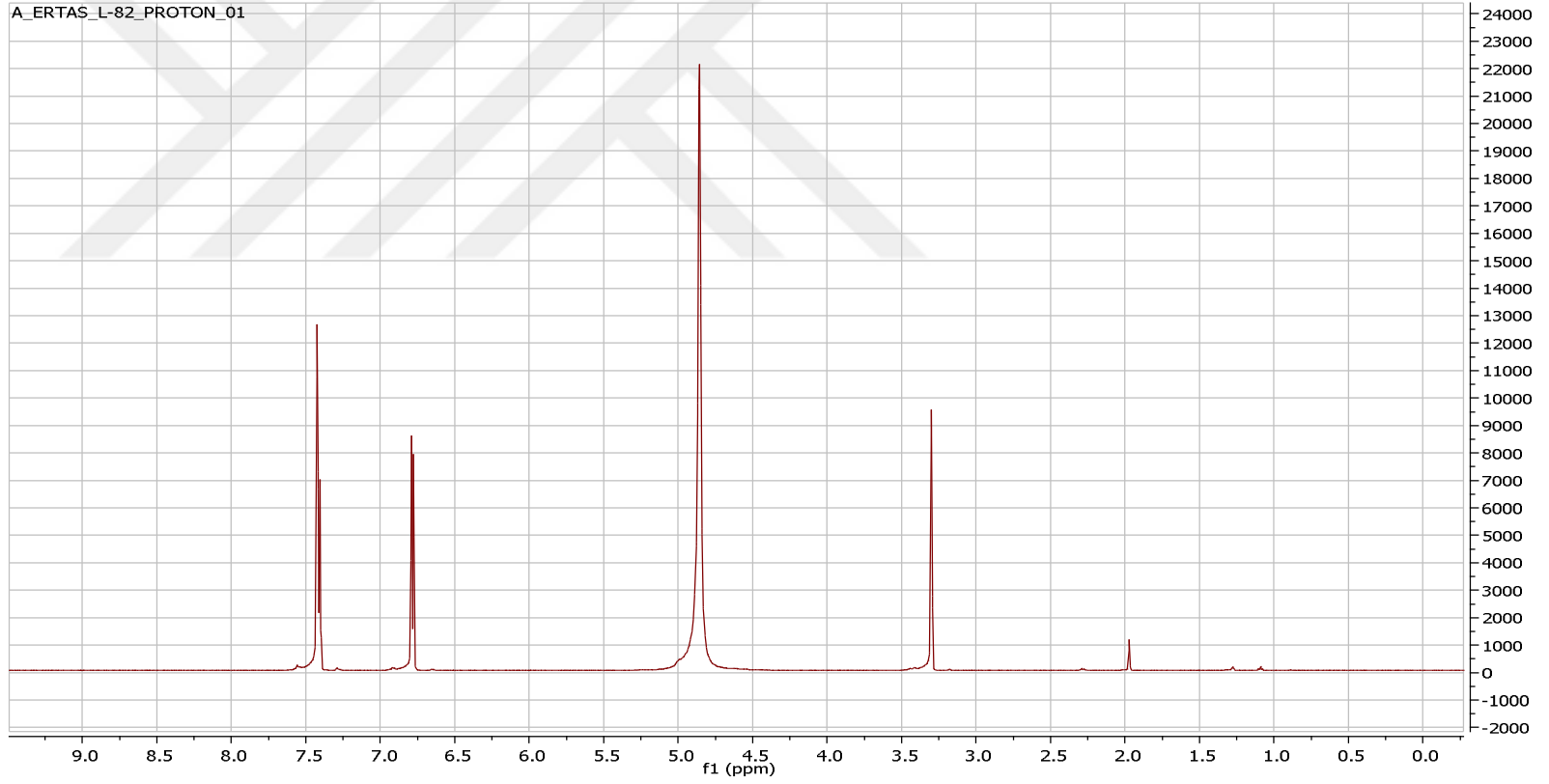
Toprak üstü etanol ekstresinden, yaklaşık 12 mg beyaz amarf katı olarak elde edildi. (Şekil 169). Preperatif HPLC ile MeOH/Su:1/1 çözücü sisteminde de elde edildi. Hem H-NMR hem de C-NMR da sadece fenolik bölgede pik vermesi bileşiğin basit bir fenolik bileşik olacağını düşündürdü. ¹H-NMR'da 6,80 d (J=8,1 Hz) ve 7,40 d (J=8,1 Hz) ve 7,43 ppm'de 1'er protonluk pik vermesi halkanın 3 tarafından bağlı olduğunu gösterdi. Ayrıca 3,32 ppm'de -OH grubuna ait yayvan pik izlendi. C-NMR'da ise 4 katerner karbon ve 3 metilen karbonu izlendi. Bunlardan asit grubuna ait olup 168,98 ppm'de izlendi. ¹H ve ¹³C NMR değerlerine dayanarak bu bileşiğin protokateşik asit olduğu saptandı ve NMR değerleri (Tablo 54) literatür değerleri ile kıyaslanarak yapı doğrulandı (Renata vd., 2012) (Şekil 170-171).



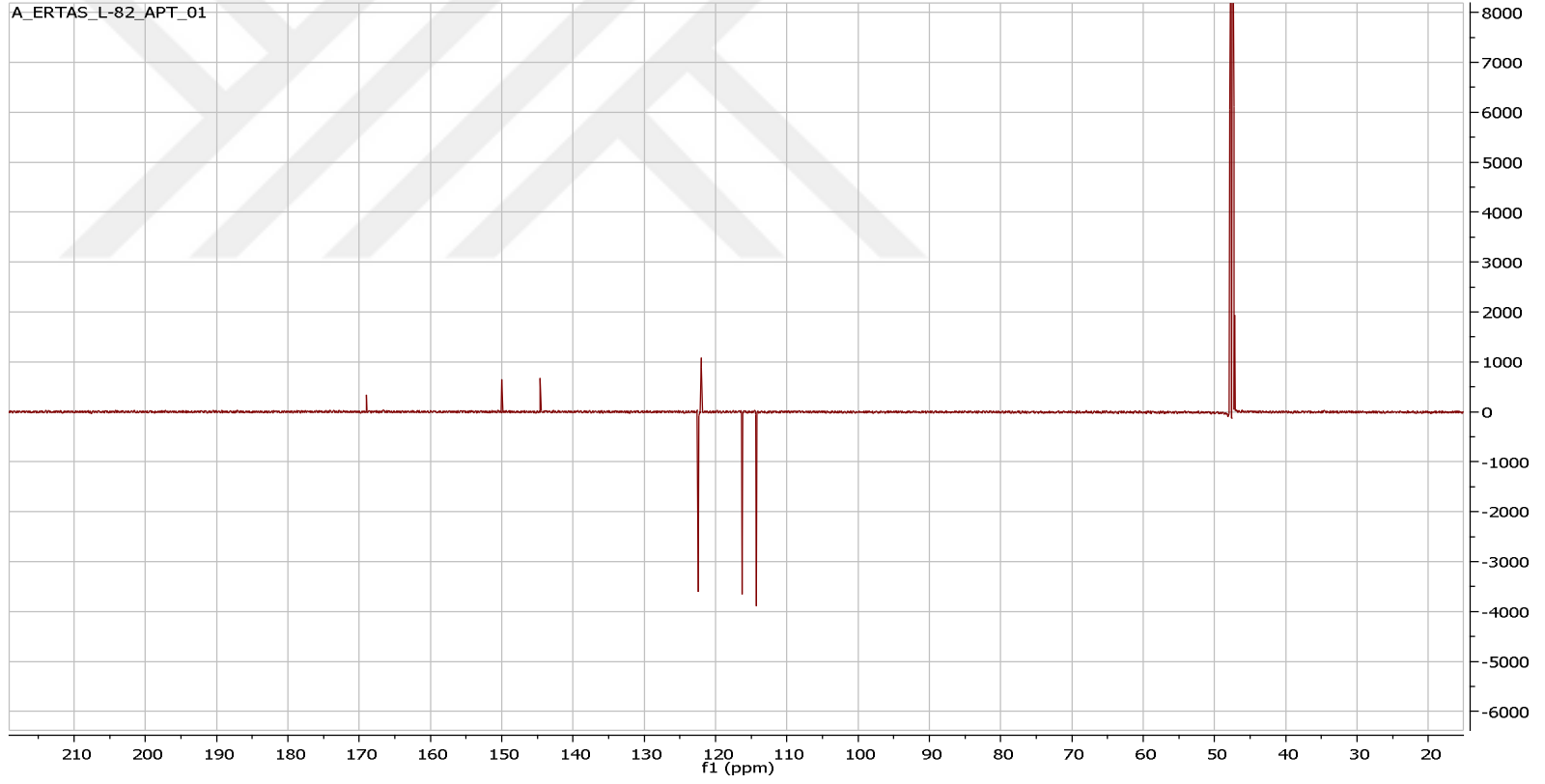
Şekil 169. Protokateşik asit

Tablo 54. Protokateşik asit bileşiğinin NMR değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR
1	121,9	-
2	114,3	7,42 s
3	144,6	-
4	150,1	-
5	116,3	7,40 d (J=8,1 Hz)
6	122,4	4,80 d (J= 8,1 Hz)
-COOH	169	-
-OH	-	3,32 s



Şekil 170. Protokateşik asit bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CD₃OD, 600 MHz)



Şekil 171. Protokateşik asit bileşiğinin APT spektrumu (CD₃OD, 150 MHz)

6.TARTIŞMA

Ülkemizin doğu bölgesinde yetişen ve endemik bir tür olan *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türü toplanıp herbaryum örnekleri oluşturulmuştur (M. Fırat 32539 (VANF), M. Fırat 32685(VANF), M. Fırat 33831 (VANF)). *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in, kloroform ve etanol ekstreleri hazırlanarak antioksidan, antikolinesteraz, tirozinaz ve üreaz enzim aktivitelerinin araştırılması ve yine ekstrelerin kimyasal profili ışığında preparatif HPLC ve diğer klasik kromatografik yöntemlerin kullanılması ile sekonder metabolitler saflaştırılarak, izole edilen bileşiklerle organik kimyaya yeni ürünler kazandırılmasını mümkün hale getirmek, saflaştırılmış olan bu sekonder metabolitlerin antioksidan aktivitesi belirlenmesi sonrasında üreaz, antikolinesteraz ve tirozinaz enzim aktivitelerini de belirlemek, ayrıca bu türün yaprak, dal, çiçek, kök ve bunların karışımından etanol ekstreleri hazırlanmış olup bu ekstrelerin LC-MS/MS ile bazı flavonoit ve fenolik bileşiklerin miktarsal hesaplamalarının yapılması ve de bunlara ek olarak bu türün tüm bölümlerinin petrol eteri ekstresi hazırlanarak GC-MS/MS ile yağ asidi profilinin belirlenmesi amacı güdülmüştür.

Tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi (Tablo 12). Genel olarak türün polar ekstrelerinin total fenolik içerik bakımından daha zengin olduğu tespit edilmiştir. Etanol ekstrelerinin total fenolik-flavonoit içeriğinin kloroform ekstresinin içeriğinden zengin olması bu türün içerdiği fenolik ve flavonoit bileşiklerin daha çok polar özellikte olması anlamına gelmektedir. Ayrıca tüm ekstrelede toplam fenolik içeriğin toplam flavonoit içerikten daha zengin olduğu görülmektedir. Ayrıca türün çeşitli kısımlarından hazırlanan etanol ekstreleri kendi içinde değerlendirildiğinde yaprak kısımlarından hazırlanan ekstrenin daha zengin olduğu belirlenmiştir. Genel olarak bu türün toprak üstü kısımlarının kök kısımlarına göre hem total fenolik hem de total flavonoit bakımından daha zengin olduğu söylenebilir.

Hazırlanan tüm ekstrelerin 4 farklı yöntemle antioksidan aktiviteleri belirlendi (Tablo 13, 14). Tüm antioksidan aktivite yöntemlerinde standart olarak α -Toc ve BHT kullanıldı. *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis* türünün toplam fenolik içerik

bakımından zengin olan etanol ekstralarının yine çalışılan 4 antioksidan yöntemde daha aktif olduğu görülmektedir. Türün çeşitli kısımlarından hazırlanan etanol ekstraları kendi içinde değerlendirildiğinde özellikle yaprak (SCE-Y) ve çiçek (SCE-Ç) ekstralarının çok aktif olduğu belirlendi. Özellikle CUPRAC, DPPH serbest radikal ve ABTS katyon radikal yöntemlerinde gösterdikleri aktivite içerdikleri total fenolik içerik ile paralellik göstermiştir. Yine bu ekstraların bu iki yöntemde gösterdikleri aktivite standart olarak kullanılan α -TOC ve BHT'den daha yüksek olduğu tespit edildi. Genel olarak bu türün etanol ekstralarının daha aktif olduğu söylenebilir.

S. cerino pruinosa var. *elazigensis* bitkisinin toprak üstü etanol ekstresinin hazırlanan silikajel kolonundan 73, toprak altı etanol ekstresinden 37 fraksiyon elde edildi. Benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucu toprak üstü etanol ekstresinden toplamda 12, toprak altı etanol ekstresinden 11 fraksiyon elde edildi ve antioksidan aktiviteleri çalışıldı. Toprak üstü fraksiyonlarından 41-44, 45-48, 49-56, 61-64, 65-69 ve 70-73, toprak altı fraksiyonlardan 7-18, 21-26 numaralı fraksiyonların standart olarak kullanılan BHT ve α -TOC bileşiklerinden daha aktif oldukları belirlendi. Bu nedenle izolasyon çalışmalarında bu fraksiyonlara öncelik verildi.

Daha sonrasında elde edilen 30 maddenin antioksidan aktivitesi 3 yöntemle (DPPH Serbest Radikal, ABTS Katyon Radikal, CUPRAC) belirlenmiştir. Bu maddelerin genel olarak çok aktif oldukları tespit edilmiştir. Elde edilen fenolik bileşiklerin oldukça aktif oldukları görülmektedir. Ayrıca bu türün çok güçlü bir antioksidan özelliğe sahip rosmarinik asit içerdiğidikkate alındığında *S. cerino pruinosa* var. *elazigensis* zenginleştirilmiş ekstraktlarının gıda koruyucu olma potansiyellerinin olduğu görülmektedir.

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünün hazırlanan ekstralarının asetilkolinesteraz aktivitelerinin olmadığı fakat orta derecede butirikolinesteraz enzim aktivitesi gösterdikleri belirlendi. Elde edilen saf maddelerin antikolinesteraz enzim aktiviteleri asetil- ve butiril-kolinesteraz olmak üzere iki yöntemle tespit edildi. Özellikle elde edilen diterpen yapısındaki bileşiklerin oldukça aktif oldukları belirlendi. Gram seviyesinde elde edilen 6,7-dehidroroyleanon bileşiğinin ilaç etken maddesi olma potansiyeli bulunmaktadır.

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünün hazırlanan ekstralarının üreaz enzim aktivitelerinin olmadığı fakat orta derecede tirozinaz enzim aktivitesi, yaprak kısımlarından hazırlanan etanol ekstresinin orta derecede tirozinaz enzim aktivitesi gösterdiği belirlendi. Elde edilen saf maddelerin tirozinaz enzim aktivitelerinin düşük olduğu tespit edildi. Üreaz enzim aktivitesinde ise asetil royleanon bileşiğinin oldukça aktif olduğu tespit edildi. Asetil royleanon bileşiğinin 12,5 ppm konsantrasyonda diğer saf bileşiklere göre üreaz enzim aktivitesinde %82 inhibisyon göstermesi dikkat çekicidir.

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünün çeşitli kısımlarının ve çeşitli ekstralarının fenolik içeriği LC-MS/MS ile belirlendi. Genel olarak *S. cerino-pruinosa* var. *elazigensis*'in majör bileşikleri rosmarinik, malik ve fumarik asitler olduğu tespit edildi. Özellikle SCE-Y ekstresinin rosmarinik asit bakımından çok zengin olduğu (ağırlık olarak ekstrenin %3,46 ü) tespit edildi.

S. cerino-pruinosa var. *elazigensis* türünün 2015, 2016 ve 2017 yılında toplanan örneklerinden hazırlanan petrol eteri ekstralarının yağ asidi profili GC-MS ile belirlendi. Üç yılda da toplanan örneklerden hazırlanan ekstralarının bileşenlerinin oleik asit olduğu tespit edildi. *S. cerino-pruinosa* Rech var. *elazigensis* türünün tüm bitki kısımlarının kloroform ve etanol ekstraları LC-MS IT-TOF cihazında optimize edilen kapsamlı 75 dakikalık bir metotla analiz edilerek genel fitokimyasal profili belirlendi. Yapılan bu çalışmada farklı sınıflardan 74 farklı sekonder metabolit tespit edilmiştir.

7. SONUÇ

Bu tez çalışmasında, Lamiaceae familyasının üyesi olan *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* bitkisinin kimyasal içeriği ve biyolojik aktiviteleri ilk kez belirlendi. Sonuç olarak yapılan bu tez çalışmasının, dünyada ve ülkemizde yaygın olarak kullanılan *Salvia* türlerinin kimyasal içeriğinin ve çeşitli aktivitelerinin incelenmesinin doğal aktif maddelerin bulunması açısından bilimsel anlamda literatür bilgisine katkı sunacağı açıktır.

Dolayısıyla güçlü antioksidan özelliğine sahip bu türün uygun formlarının ve izole edilen bazı sekonder metabolitlerinin tıp, eczacılık ve kozmetik vs. alanlarında kullanılabileceği görülmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Tanker N. Prof. Dr. Mehmet KOYUNCU Prof. Dr. Maksut COŞKUN, Farmasötik Botanik Ders Kitabı, Ankara 1993.
2. Karamanoğlu K., Farmasötik Botanik Ders Kitabı, Ankara, 1977.
3. Sezik, E. Bitkilerle Tedavi. Bilim ve Teknik,1990, 277: 12.
4. Benkeblia, N., Free- radical scavenging capacity and properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. An International Journal, 2005, 48: 753-759.
5. Wei Y.H., C.Y. Pang, The role of mitochondria in human aging process. Biotech International, 2005, 17: 8-13.
6. Davidson GP, Decker TR. Chemopreventive role of fruits and vegetables in oropharyngeal cancer. Nutr Clin Pract 2009; 24: 250–60.
7. Kürkçüoğlu M.,Bitki Kimyası ve Analiz Yöntemleri, Anadolu Üniversitesi, 2010, 25-49.
8. Greuter, W., International Code of Botanical Nomenclature, Koetz Scientific Books, Konigstein, Germany, 1988.
9. Hedge, I.C., A global survey of the Lamiaceae, Advencis in Labiatae Science, 1992, 7-18 .
10. Hedge, I.C., Lamiaceae of South-West Asia: diversity, distribution and endemism, Proceeding of the royal society, Edingburgh, 1986,89B., 23-25.
11. Chadeaud, M., Emberger, L., Traite De Botanique (Systematique), Tome II, 1960, 832-833.
12. Baytop, A., Farmasötik Botanik Ders Kitabı, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1996.

13. Davis P., H., 1982. Flora of Turkey an The East Eagen Islands, Edinburg University Pres, Edinburg, 1982, 7, 335-346.
14. Hatipođlu, S., *Salvia adenophylla* ve *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin Aktivite Odaklı İzolasyonu ve Yarı Sentetik Türevlerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz aktivitelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye, 2010.
15. Başer, K., H., C., Kırimer N., Essential Oils of Lamiacea Plants of Turkey, Acta Horticulturae, 2006, 723, 163-171.
16. Baser, K.H.C., "Aromatic Biodiversity among the Flowering Plant Taxa of Turkey", Pure Appl. Chem, 2002, 74: 527-545.
17. Delamare, A.P.L., Moschen-Pistorello, I.T. ,Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S., "Antibacterial Activity of the Essential Oils of *Salvia Officinalis* L. and *Salvia Triloba* L. Cultivated in South Brazil", 2005.
18. Onlooker, "Sage against Age", The Pharmaceutical Journal Vol, 1995, 255: 708.
19. British Herbal Pharmacopoeia, Sage leaf, British Herbal Medicine Association, Great Britain, 1996, p.164.
20. Deutsches Arzneiburch (DAB), *Salvia triloba folium*, Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, Germany, 1999.
21. Reynolds, J.E.F., Sage, Martindale The Extra Pharmacopoeia, 31. edition, The Royal Pharmaceutical Society, 1996, p.1749.
22. European Pharmacopoeia, Sage leaf (*Salvia officinalis*), Third edition, Suppl. 2, Council of Europe, Strasbourg, France, 1999, p.847.
23. Kintzios, S.E., Sage, III ve V, Harwood Academic Publishers, 2000.

24. Baytop, T., Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi, Nobel Tıp Kitapevleri, İkinci Baskı, 1999.
25. Sezik, E., Yeşilada, E., Tabata, M., Honda, G., Takaishi, Y., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y., Traditional Medicine in Turkey VIII Folk Medicine in East Anatolia; Erzurum, Erzincan, Ağrı, Kars, Iğdır, Provinces, Economic Botany, 1997, 51, 195-211.
26. Sezik, E. and Yeşilada, E., Uçucu Yağ Taşıyan Türk Halk İlaçları, Essential Oils, Kırmır, N., Mat, A. (Eds.), Anadolu Üniversitesi Basımevi, Eskişehir, 1999, 98-131.
27. Eröz, İ., Eskişehir Çevresinde Yetişen Bazı *Salvia* Türleri Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı, Eskişehir, 2001.
28. Baytop, A., Türkiye’de Kullanılan Yabani ve Yetiştirilmiş Aromatik Bitkiler, Doğa TU Eczacılık D.,1, 1991, 76-88.
29. Baytop, T., Türkçe Bitki Adları Sözlüğü, Türk Dil Kurumu Yayınları No: 578, Ankara, 1994.
30. Honda, G., Yeşilada, E., Tabata, M., Sezik, E., Fujita, T., Takeda, Y., Takaishi, Y., Tanaka, T., Traditional Medicine in Turkey VI Folk Medicine in West Anatolia, Afyon, Kütahya, Denizli, Muğla, Aydın, Provinces, Journal of Ethnopharmacology, 1996, 53, 75-87.
31. Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Tanaka, T., Takeda, Y., Traditional Medicine in Turkey X Folk Medicine in Central Anatolia, Journal of Ethnopharmacology, 2001, 75, 95-111.
32. Akgül, A., Baharat Bilimi ve Teknolojisi, Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, No: 15, Ankara, 1993.
33. Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takaishi, Y., Traditional Medicine in Turkey V Folk Medicine in the Inner Taurus Mountains, Journal of Ethnopharmacology, 1995, 46, 133-152.

34. Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K., Ikeshiro, Y., Traditional Medicine in Turkey IV. Folk Medicine in the Mediterranean Subdivision, Journal of Ethnopharmacology, 1993, 39, 31-38.
35. Fujita, T., Sezik, E., Tabata, M., Yeşilada, E., Honda, G., Takeda, Y., Tanaka, T., Takaishi, Y., Traditional Medicine in Turkey VII Folk Medicine in Middle and West Black Sea Regions, Economic Botany, 1995, 49, 406-422.
36. Tabata, M., Sezik, E., Honda, G., Yeşilada, E., Fukui, H., Goto, K., Ikeshiro, Y., Traditional Medicine in Turkey III. Folk Medicine in East Anatolia, Van and Bitlis Provinces, International Journal of Pharmacognosy, 1994, 32, 3-12.
37. Tümen, G., Sezik, E., Baser, K.H.C., "The Essential Oils of *Saturja parmassica* Hedr. And Sart, Ex Boiss subsp. *siplea* P.H Davis", Flav.Frag.J., 1992, 7(1): 43-46.
38. Parekh, J., Jadeja, D., Chanda, S., "Efficacy of Aqueous and Methanol Extracts of Some Medicinal Plants for Potential Antibacterial Activity", Turk J.Bio., 2005, 29: 203-210.
39. Digrak, M., ılıçım, A., Alma, M. H., Şen S., .Tr. J. Of Biology, "Antimicrobial Activities of the Extracts of Various Plants (Valex, Mimosa Bark, Gallnut Powders, *Salvia* Sp. and *Phlomis* Sp.)", Tr. J. Of Biology, 1999, 23: 241-248.
40. Verastegui M.A., S.J.S., "Antimicrobial Activity of Extracts Three Major Plants from the Chihuahuan Desert", Ethnopharmacol, 1996, 52: 175-177.
41. Kamatoua, G.P.P., Viljoen A.M., Gono-Bwalya A.B., van Zyl R.F., van Vuuren R.L., Lourens, A.C.U., Baser, K.H.C., Demirci B., Lindsey K.L., van Staden J., Steenkamp, "The in Vitro Pharmacological Activities and a Chemical Investigation of Three South African *Salvia* Species", Journal of Ethnopharmacology, 2005, 102: 382-390.
42. Nostro, A., Germano, M.P., Angelo, V.D., Marino, A. And Cannatelli, M.A., "Extraction Methods and Bioautography for Evaluation of Medicinal Plant Antimicrobial Activity", Letters in Applied Microbiology, 2000, 30: 379-384.

43. Kamatoua, G.P.P., Viljoen A.M., Van Vuuren, S.F., Van Zyl, R.L., "In Vitro Evidence of Antimicrobial Synergy between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonurus*", South African Journal of Botany, 2006, 72: 634-636.
44. Kabouchea, A., Kabouchea, Z., Öztürk, M., Kolak vetopçu G., "Antioxidant Abietane Diterpenoids from *Salvia barrelieri*", Food Chemistry, 2006, 102(4): 1281-1287.
45. Tepe, B., "Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of the Methanolic Extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher Ex Benth) and *Salvia verbenaca* (L.) From Turkey", Bioresource Tecnology, 2007.
46. Lin, L.Z., Wang, X. M., Huang, X. L., Huang, Y., & Cordell, G. A., "Sapriolactone, a Cytotoxic Norditerpene from *Salvia prionitis*", Phytochemistry, 1989, 28: 3542-3543.
47. Ulubelen, A., Topcu, G., Chai, H. B., & Pezzuto, J. M., "Cytotoxic Activity of Diterpenoids Isolated from *Salvia hypargeia*" Pharmaceutical Biology, 1999, 37: 148-151.
48. Jimenez, J., Risco, S., Ruiz, T., & Zarzuelo, A., "Hypoglycemic Activity of *Salvia lavandulifolia*", Planta Medica, 1986, 52: 260-262.
49. Orhan, İ., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yılmaz, G., Kan, ve ark., Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. Food Chemistry, 2007, 103, 1247-1254.
50. Lu, Y., Foo, L.Y. Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*, Phytochemistry, 2000, 55(3), 263-267.
51. Wang, Z.Y., Huang, M.T., Lou, Y.R., Xie, J.G., Reuhl, K.R. ve ark., Inhibitory effects of black tea, green tea, decaffeinated black tea and decaffeinated green tea on ultraviolet B light-induced skin carcinogenesis in 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-initiated SKH-1 mice. Cancer Research, 1994, 54, 3428-3435.

52. Topçu, G., Tan, N., Ulubelen, A., Sun, D., Watson, W. H., Terpenoids and Flavonoids From the Aerial Parts of *Salvia candidissima*, *Phytochemistry*, 1995,40, 501-504.
53. Lu, Y. and Foo, L.Y., Polyphenolics of *Salvia*, *Phytochemistry*, 2002,59, 117–140.
54. Ulubelen, A. and Tuzlacı, E., Flavonoids and Triterpenoids From *Salvia euphratica* and *S. longipedicellata*, *Fitoterapia*, 1990a,61, 185.
55. AI, C.B. and LI, L.N., Salvianolic acids D and E: Two new depsides from *Salvia miltiorrhiza*, *Planta Medica*,1992,58, 197–199.
56. Cuvelier, M.E., Berset, C., Richard, H., Antioxidant Constituents in sage (*Salvia officinalis*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,1994,42, 665-669.
57. Morimoto, S., Goto, Y., Shoyama, Y., Production of Lithospermic Acid B and Rosmarinic Acid in Callus Tissue and Regenerated Plantlets of *Salvia miltiorrhiza*, *Journal of Natural Products*, 1994,57, 817–823.
58. Nakazawa, T. and Ohsawa, K., Metabolism of Rosmarinic Acid in Rats, *Journal of Natural Products*, 1998,61, 993–996.
59. Kang, H.S., Chung, H.Y., Jung, J.H., Kang, S.S., Choi, J.S., Antioxidant effect of *Salvia miltiorrhiza*, *Archives of Pharmacal Research*, 1997,20, 496–500.
60. Thomas-Barberan, F.A. and Wollenweber, E., Flavonoid Aglycons from the Leaf Surfaces of Some Labiatae Species, *Plant Systematics and Evolution*, 1990,173, 109-118.
61. Topçu, G., Ulubelen, A., Timothy, C., Tao-Che, C., Sesterterpenes and Other Constituents of *Salvia yosgadensis*, *Phytochemistry*, 1996b,42, 1089-1092.
62. Adzet, T., Canigueral, S., Iglesias, J., A Chromatographic Survey of Polyphenols from *Salvia species*, *Biochemical Systematic Ecology*, 1988,16, 29-32.

63. Santos-Gomes, P.C., Seabra, R.M., Andrade P.B., Fernandesferreira, M., Phenolic Antioxidant Compounds Produced by In Vitro Shootsof Sage (*Salvia officinalis* L.), Plant Science, 2002,162, 981-987.
64. LU, Y. and FOO, L.Y., Antioxidant Activity of Polyphenols from Sage(*Salvia officinalis*), Food Chemistry, 2001,75, 197-202.
65. Topçu, G. and Ulubelen, A., Abietane and rearranged abietane diterpenes from *Salvia montbretii*. J. Nat. Prod., 1996,59, 734–737.
66. Ulubelen, A., Evren, N., Tuzlacy, E. and Johansson, C., Diterpenoids from the roots of *Salvia hypargeia*. J. Nat. Prod.,1988,51, 1178–1183.
67. Ulubelen, A., Topçu, G., Chen, S., Ca., P. and Snyder, J. K., A new abietane diterpene from *Salvia wiedemannii* Boiss. J. Org. Chem., 1991,56, 7354–7356.
68. Rodriguez-Hahn, L., Martinez, G. and Romo, J., Estructura del acido melisodorico, un diterpeno aislado de *Salvia melissofora* Lag, Rev. Latinoamer.Quim., 1973,4, 93–100.
69. Topçu, G. and Ulubelen, A., Diterpenoids from *Salvia wiedemannii*. Phytochemistry, 1990,29, 2346–2348.
70. Topçu, G. and Ulubelen A., Diterpenoids from *Salvia wiedemannii*. Phytochemistry, 1991, 30, 2412–2413.
71. Ulubelen, A., Topçu, G. and Tan, N., Diterpenoids from *Salvia heldrichiana*. Phytochemistry, 1995b,40, 1473–1475.
72. Rustaiyan, A., Niknejad, A., Nazarians, L., Jakupovic, J. and Bohlman, F., Sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. Phytochemistry, 1982,21,1812-1813.
73. Rustaiyan, A. and Koussari, S., Further sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. Phytochemistry, 1988,27,1767–1769.
74. Topçu, G., Ulubelen, A., Tam, T.C.-M. and Tao-Che, Norditerpenes and Norsester terpenes from *Salvia yosgadensis*. J. Nat. Prod., 1996a,59,113–116.

75. Ulubelen, A. Topçu, G., Sönmez, U., Eris, C. and Özgen, U., Norsesterterpenes and diterpenes from the aerial parts of *Salvia limbata*. *Phytochemistry*, 1996, 43, 431–434.

76. Brieskorn, C. H. and Schlumprecht, I., Constituents of *Salvia officinalis*, VIII. Isolation of ursolic acid. *Arch, der Pharm.*, 1951,284, 239–242.

British Herbal Pharmacopoeia, The 1983. B.H.M.A

77. Ulubelen, A. and Ayanoglu, E., Vergatic acid, a new pentacyclic triterpene from *Salvia virgata* *Phytochemistry*, 1976, 15, 309–311.

78. Ulubelen, A. and Topçu, G., Terpenoids from *Salvia pinnata*. *Phytochemistry*, 1984,23, 133–134.

79. Topçu, G., Ulubelen, A., Eriş, C., Di-and Triterpenoids of *Salvia pomifera*, *Phytochemistry*, 1994,36, 743-745.

80. Pedresos, S., Rodriguez, B., de la Torre, M.C., Bruno, M., Savona, G., Perales, A. and Torres, M., Dammarane triterpenes of *Salvia hierosolymitana*. *Phytochemistry*, 1990,29, 919–922.

81. Alimpic, A., Knezevic, A., Milutinovic, M., Stevic, T., Savikin, K., Stajic, M., Markovic, S., Marin, PD., Matevski, V., Duletic-Lausevic, S., Biological activities and chemical composition of *Salvia amplexicaulis* Lam. Extracts, *Industrial Crops and Products*, 2017; 105:1-9.

82. Long, Z., Gamache, P., Guo, ZM., Pan, YY., Zhang, YH., Liu, XD., Jin, Y., Liu, LY., Liang, LN., Li, RY., A highly sensitive high performance liquid chromatography-electrochemical detection method for the determination of five phenolic compounds from *Salvia miltiorrhiza*, *Chinese Journal of Chromatography*, 2017; 35:897-905.

83. Ma, LF., Wang, PF., Wang, JD., Tong, XM., Shan, WG., Zhang, H., Zhan, ZJ., New Eudesmane Sesquiterpenoids from *Salvia plebeia* R. Br., *Chemistry and Biodiversity*, 2017; 14

84. Tundis, R., Iacopetta, D., Sinicropi, MS., Bonesi, M., Leporini, M., Passalacqua, NG., Ceramella, J., Menichini, F., Loizzo, MR., Assessment of antioxidant, antitumor and pro-apoptotic effects of *Salvia fruticosa* Mill. subsp *thomasi* (Lacaita) Brullo, Guglielmo, Pavone & Terrasi (Lamiaceae), Food and Chemical Toxicology, 2017; 106:155-164.

85. Paun, G., Neagu, E., Moreoanu, V., Ungureanu, O., Cretu, R., Ionescu, E., Tebrencu, CE., Ionescu, R., Stoica, I., Radu, GL., Phytochemical analysis and in vitro biological activity of *Betonica officinalis* and *Salvia officinalis* extracts, Romanian Biotechnological Letters, 2017; 22:12751-12761.

86. Poyraz, IE., Ciftci, GA., Ozturk, N., Phenolic Contents, in vitro Antioxidant and Cytotoxicity Activities of *Salvia aethiopsis* L. and *S. ceratophylla* L. (Lamiaceae), Rec. Nat. Prod., 2017; 11: 345-355.

87. Ozarowski, M., Piasecka, A., Gryszczynska, A., Sawikowska, A., Pietrowiak, A., Opala, B., Mikolajczak, PL., Kujawski, R., Kachlicki, P., Buchwald, W., Determination of phenolic compounds and diterpenes in roots of *Salvia miltiorrhiza* and *Salviaprzewalskii* by two LC-MS tools: Multi-stage and high resolution tandem mass spectrometry with assessment of antioxidant capacity, Phytochemistry Letters, 2017; 20:331-338

88. Zeng, HT., Su, SL., Xiang, X., Sha, XX., Zhu, ZH., Wang, YY., Guo, S., Yan, H., Qian, DW., Duan, JN., Comparative Analysis of the Major Chemical Constituents in *Salvia miltiorrhiza* Roots, Stems, Leaves and Flowers during Different Growth Periods by UPLC-TQ-MS/MS and HPLC-ELSD Methods, Molecules, 2017;22.

89. Silva, BP., Anunciacao, PC., Matyelka, JCD., Della Lucia, CM., Martino, HSD., Pinheiro-Sant'Ana, HM., Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in different places, Food chemistry, 2017; 221:1709-1716.

90. Toplan, GG., Kurkcuoglu, M., Goger, F., Iscan, G., Agalar, HG., Mat, A., Baser, KHC., Koyuncu, M., Sariyar, G., Composition and biological activities

of *Salvia veneris* Hedge growing in Cyprus, *Industrial Crops and Products*, 2017; 97:41-48.

91. Pacifico, S., Piccolella, S., Lettieri, A., Nocera, P., Bollino, F., Catauro, M., A metabolic profiling approach to an Italian-sage leaf extract (SoA541) defines its antioxidant and anti-acetylcholinesterase properties, *Journal of Functional Foods*, 2017;29:1-9.

92. Altay, A., Bozoglu, F., *Salvia fruticosa* Modulates mRNA Expressions and Activity Levels of Xenobiotic Metabolizing CYP1A2, CYP2E1, NQO1, GPx, and GST Enzymes in Human Colorectal Adenocarcinoma HT-29 Cells, *Journal Nutrition and Cancer*, 2017;69:892-903.

93. Bahadori, MB., Dinparast, L., Zengin, G., Sarikurkcu, C., Bahadori, S., Asghari, B., Movahhedini, N., Functional components, antidiabetic, anti-Alzheimer's disease, and antioxidant activities of *Salvia syriaca* L., *International Journal of Food Properties*, 2017; 20:1761-1772.

94. Bahadori, MB., Asghari, B., Dinparast, L., Zengin, G., Sarikurkcu, C., Abbas-Mohammadi, M., Bahadori, S., *Salvia nemorosa* L.: A novel source of bioactive agents with functional connections, *LWT-Food Science and Technology*, 2017;75:42-50.

95. Anonymus, *Salviae folium* (Salbeiblaetter), Bundesanzeiger Nr. 90/1985, Bundesanzeiger Nr. 50/1990. In *Verffentliche Monographien. Bekanntmachung her die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln. Entwurf der Aufberetungskommission für den humanmedizinischen Bereich, phytotherapeutische Therapie- richtung und Stoffgruppe (Kommission E)*, Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte Berlin, 1994, pp. 464.

96. Newall, C. A., Anderson, L. A. and Phillipson, J. D., *A guide for Health-care Professionals*, London, 1996.

97. Akbar, A., Tariq M., Nisa, M., Pharmacological studies on *Salvia haematodes* Wall. Acta Trop., 1985,42 (4), 371–374
98. Peana, A. and Satta, M., Effects of the essential oil from *Salvia desoleana* and *Salvia sclarea* on the CNS. Ars Pharmaceutica, 1992,33 (1–4), 458–461.
99. Biondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Ruberto, G., Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Sicilian Aromatic Plants. Flavour and Fragrance Journal, 1993,8, 331–337.
100. Ulubelen, A., Sönmez, U., Topcu, G., Johansson, C.B., An abietane diterpene and two pimaric acids from *Salvia forskahlei*. Phytochemistry, University Press, London, 1996, 42 (1), 145–147.
101. Kolak, U., Kabouche, A., Ozturk, M., Kabouche, Z., Topcu, G. and Ulubelen, A., Antioxidant Diterpenoids from the Roots of *Salvia barrelieri*, Phytochem. Anal., 2009, 20, 320–327.
102. Lee, A.R., Chang, W.L., Lin, H.C., King, M.L., Isolation and bioactivity of new tanshinones. J. Natural Products, 1987,50, 157–61.
103. Forouzin F, Jamei R, Heidari R 2015 Compositional Analysis and Antioxidant Activity of Volatile Components of Two *Salvia* spp Trop J Pharm Res, November 2015; 14(11): 2013
104. Bahadori M, Valizadeh H, Asghari B, Dinparast L, Moridi Farimani M, Bahadori S. Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. Journal Of Functional Foods. October 1, 2015;18(Part A):727-736. Available from: ScienceDirect, Ipswich, MA. Accessed December 14, 2016

105. Sallam A, Mira A, Ashour A, Shimizu K. Acetylcholine esterase inhibitors and melanin synthesis inhibitors from *Salvia officinalis*. *Phytomedicine*. September 15, 2016;23(10):1005-1011.
106. Kocak M, Sarikurkcu C, Cengiz M, Kocak S, Uren M, Tepe B. *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Industrial Crops & Products*. July 1, 2016;85:204-212.
107. Safaei-Ghomi J, Masoomi R, Jookar Kashi F, Batooli H. Bioactivity of the Essential Oil and Methanol Extracts of Flowers and Leaves of *Salvia sclarea* L. from Central Iran. *Journal Of Essential Oil-Bearing Plants*, May 18, 2016;19(4):885-896.
108. Bahadori M.B., M. Mirzaei Cytotoxicity, antioxidant activity, total flavonoid and phenolic contents of *Salvia urmiensis* Bunge and *Salvia hydrangea* DC. ex Benth *Research Journal of Pharmacognosy*, 2015, pp. 27–32
109. Culhaoglu B, Yapar G, Dirmenci T, Topcu G. Bioactive constituents of *Salvia chrysophylla* Stapf. *Natural Product Research*, 2016, n.d.;27(4-5):438-447.
110. Nickavar B, Rezaee J, Nickavar A. Effect-Directed Analysis for the Antioxidant Compound in *Salvia verticillata*. *Iranian Journal Of Pharmaceutical Research*, 2016;15(1):241-246.
111. Gülçin İ, Oğuz M, Oktay M, Beydemir Ş, Küfrevioğlu Ö. Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Turkish Journal Of Agriculture And Forestry*. January 1, 2004;28(1):25.
112. Asadi S, Khodaghali F, Ghahremanzamaneh M, et al. Chemical Composition Analysis, Antioxidant, Antiglycating Activities and Neuroprotective Effects of *S. choleroleuca*, *S. mirzayanii* and *S. santolinifolia* from Iran. *American Journal Of Chinese Medicine*. June 2011;39(3):615.

113. Lima R, Cardoso M, Andrade M, Guimarães P, Batista L, Nelson D. Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. Journal Of The American Oil Chemists' Society (JAOCS), 2012;89(3):523-528.
114. Orhan I, Senol F, Ozturk N, Akaydin G, Sener B. Profiling of in vitro neurobiological effects and phenolic acids of selected endemic *Salvia* species. Food Chemistry, 2012;132:1360-1367.
115. Ben Farhat M, Landoulsi A, Chaouch-Hamada R, Sotomayor J, Jordan M. Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. Industrial Crops And Products, 2016, n.d.;49:904-914.
116. Orhan I, Senol F, Dogan M, et al. Assessment of anticholinesterase and antioxidant properties of selected sage (*Salvia*) species with their total phenol and flavonoid contents. *Industrial Crops & Products*. January 2013;41:21-30.
117. Ibrahim T. Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. *Molecules*, 2012;17(10):11315-11334.
118. Geisman, T. A., and Crout, D. H. G., *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. California: Freeman, Cooper and Company, 1969, 4, 66, 67, 137-166, 212, 213, 217.
119. Hanson, R. J., "Tutorial Chemistry Texts, Natural Products: The Secondary Metabolites", Royal Society of Chemistry, 1.
120. Thomson, R. H., *The Chemistry of Natural Products*, Second Edition, Cahpman& Hall, Suffolk, 1993, 106.

121. Mann, J., Davidson R. S., Hobbs J. B., Banthorpe, D. V., Harborne, J. B., Natural Products, First Edition, Pearson Education, London, 1994, 289.
122. Topçu, G., Bodge, S.G., Gören, A.C., Kılıç, T., Yıldız, Y.K., Watson, W.H., CCDC, 2001. Private Communication, 1078, Chambridge Crystallographic Data Centre.
123. Tedder, J. M., Nechvatal, A., Murray, A. W. ve Carnduff, J., Basic Organic Chemistry. Belfast: University Press, 1972, 219.
124. Boiteau, P. ve Pasich, B., Ratsimamanga AR. Les Triterpenoids. Gauthier-Villards, 1964, 3, 32, 184, 469.
125. Devon, T. K. ve Scott, A., Terpenes. Handbook of Naturally Occurring Compounds. New York and London: Academic Press, 1972, 5-200.
126. Cram, D. J. ve Hammond G. S., Organic Chemistry. New York: McGraw-Hill Book Company, 1964, pp. 671-673.
127. Oğuz, A., Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tokat, 2008.
128. Acar, J., Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri. Gıda Kimyası, Ed:Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1998, 435-452.
129. Çam, M. ve Hısıl, Y., Gıdalardaki Flavonoidler ve Önemi. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara, 2003.
130. Harborne, J.B., Mabry, T.J. ve Mabry, H., The Flavonoids. London-New York: Chapman and Hall, 1975, pp. 35-37, 865-867.

131. Papas, A.M., Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, 1996, 31, 77-82.
132. Aruoma, O.I. ve Cuppett, S.L., *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept*. Illinois: Champaign, AOCS Press, 1997, pp. 241.
133. Fridovich, I., Superoxide dimutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, 1986, 58, 61-97.
134. Halliwell, B. ve Gutteridge, J.M.C., *Free Radicals in Biology and Medicine*. (2nd ed.), Oxford: Clarendon Press, 1989, pp. 543.
135. Von-Sonntag, C., *The Chemical Basis of Radiation Biology*, London: Taylor & Francis, 1987, pp. 15-49.
136. Moncada, S, Palmer, R. ve Higgs, E., Nitric oxide physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, 1991, 43, 109-142.
137. Babior, B.M. ve Woodman, R.C., Chronic granulomatous disease. *Seminars in Hematology*, 1990, 27, 247-259.
138. Anggård, E., Nitric oxide: Mediator, murderer and medicine. *The Lancet*, 1994, 343, 1199-1206.
139. Takeuchi, T., Nakajima, M. ve Morimoto, K., Establishment of a human system that generates $O_2^{\cdot -}$ and induces 8-hydroxydeoxyguanosine, typical of oxidative DNA damage, by a tumor promoter. *Cancer Research*, 1994, 54, 5837-5840
140. Floyd, R. A., Watson, J. J., Haris, J., West, M. ve Wong, P. K., Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1986, 137, 841-846.

141. Aruoma, O.I., Halliwell, B. ve Dizdaroğlu, M., Iron ion-dependent modification of bases in DNA by the superoxide radical-generating system hypoxanthine/xanthine oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264, 13024-13028.
142. Floyd, R.A., West, M.S., Eneff, K.L., Hogsett, W.E. ve Tingey, D.T., Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1988, 262, 266-272.
143. Yermilov, V., Rubio, J. ve Ohshima, H., Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Letters*, 1995, 376, 207-210.
144. Guyton, K.Z. ve Kensler, T.W., Oxidative mechanism in carcinogenesis. *British Medical Bulletin*, 1993, 49, 523-544.
145. Cook, N.C. ve Saman, S., Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1996, 7, 66-76.
146. Packer, L. ve Cadenoas E., Oxidative Stress and Disease. *Handbook of Antioxidants*. 2nd Edn., New York, Basel, USA: Marcel Dekker, 2002, pp. 5-8.
147. Larson, R.A., The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 1988, 27, 969-978.
148. Hudson, B.J.F., *Food Antioxidants*. London and New York: Elsevier Applied Science, 1990, pp.: 1-316.
149. Taylor, M.J. ve Richardson, T., Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin, *Journal of Food Science*, 1980, 45, 1223-1227.
150. Buchanan, B.B., Schurmann, P., Decottignies, P.T. ve Lozano, R.M., *Perspectives in biochemistry and biophysics: thioredoxin: a multifunctional*

regulatory protein with a bright future in technology and medicine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994, 314, 257-260.

151. Hertog, M.G.L., Feskens, E.J.M., Hollman, P.C.H., Katan, M.B. ve Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet*, 1993, 342, 1007-1011.

152. Stampfer, M.J., Hennekens, C.H., Manson, J.E., Colditz, G.A., Rosner, B. ve Willet, W.C., Vitamin E consumption and the risk of coronary disease in women. *The New England Journal of Medicine*, 1993, 328, 1444-1449.

153. Amarowicz, R. ve Shahidi, F., A rapid chromatographic method for separation of individual catechins from green tea. *Food Research International*, 1996, 29, 71-76.

154. Ho, C-T., Chen, C-W., Wanasundara, U.N. ve Shahidi, F., Natural antioxidants from tea. *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications*. Champaign IL: AOCS Press, 1997, pp. 213-223.

155. Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. ve Kromhout, D., Dietary antioxidant flavonoids and the risk of coronary heart disease: the Zutphen elderly study. *The Lancet*, 1993, 342, 1007-1011.

156. Luo, M., Kannar, K., Wahlqvist, M.L. ve O'Brien, R.C., Inhibition of LDL oxidation by green tea extract. *The Lancet*, 1997, 349, 360-361.

157. Henry, J.P. ve Stephens-Larson, P. Reduction of chronic psychosocial hypertension in mice by decaffeinated tea. *Hypertension*, 1984, 6, 437-444.

158. Ho, C.T., Chen, Q., Shi-Zhang, K.Q. ve Rosen, R.T., Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various Chinese teas. *Preventive Medicine*, 1992, 21, 520-525.

159. Husain, S.R., Cillard, J. ve Cillard, P., Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*, 1987, 26, 2489-2491.

160. Chen, Y., Zheng, R., Zhongjian, J. ve Yong, J., Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Radicals Biology and Medicine*, 1990,9, 19-21.
161. Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O. ve Inoue, T., Antioxidant activity of Japanese pepper (*Zanthoxylum piperitum*) fruit. *Food Chemistry*, 2007, 100, 171-177.
162. Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. ve Karademir, S. E., Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, 52(26), 7970-7981.
163. Benzie, I. F. F. ve Strain, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 1996, 239, 70-76.
164. Singleton, V.L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R.M., Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxidants and Antioxidants*, 1999,299, 152-178.
165. Wayner, D.D.M., Burton, G.W., Ingold, K.U. ve Locke, S., Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, 1985, 187, 33-37.
166. Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G. ve Maxwell, S.R.J., Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, 1992, 266, 265-277.
167. Valkonen, M. ve Kuusi, T., Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research*, 1997, 38, 823-833.
168. Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E. ve Ferro-Luzzi, A., A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, 1995, 18, 29-36.

169. Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F., Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology & Medicine*, 1998, 24, 1228-1234.
170. Blois, M.S., Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 1958, 181, 1199-1200.
171. Prior, R.L. ve Cao, G., In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 27, 1173-1181.
172. Winston, G.W., Regoli, F., Dugas, A.J., Fong, J.H. ve Blanchard, K.A., A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1998, 24, 480-493.
173. Kohen, R., Beit-Yannai, E., Berry, E. M. ve Tirosh, O., Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. *Methods in Enzymology*, 1999, 300, 285-296.
174. Miller, H.E., A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 1971, 48, 91.
175. Liu, F., Ooi, V.E.C. ve Chang, S.T., Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 1997, 60, 763-771.
176. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C., Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 1999, 26, 1231-1237.
177. Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. ve Almeida, L. M., Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1994, 315, 161-169.
178. Bachmayer, O., *Antioxidant Properties of Aqueous Extracts from Selected Culinary Herbs*, Yüksek Lisans Tezi, University of Helsinki, Division of Pharmacognosy, Helsinki, Finland, 2004.

179. Sebranek, J.G., Sewalt, V.J.H., Robbins, K.L. Houser, T.A., Comparison of a Natural Rosemary Extract and BHA/BHT for Relative Antioxidant Effectiveness in Pork Sausage, *Meat Science*, 2005,69, 289–296.
180. Karaman, Y., Alzheimer Hastalığı ve Diğer Demanslar, Kayseri, 2002, pp. 90-210.
181. Akalın, H.Ü., Alzheimer hastalarının lenfositlerinde rRNA ifadenmesinin araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2003.
182. Payao, S.L.M., Smith, M.A.C., Kormon-Borlotto, M.H., Toniolo, J., Investigation of the nucleolar organizer regions in Alzheimer's disease. *Gerontology*, 1994, 40, 13-17.
183. Yamantürk, P., Alzheimer Hastalığı, *Sendrom*, 2000, 12, 72-81.
184. Appleyard, M.E., Secreted acetylcholinesterase: non-classical aspects of a classical enzyme. *Trends in Neurosciences*, 1992, 15, 485-490.
185. Hartman, R. E., Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology. İçinde Cadenas, E ve Packer, L. (Eds.) *Micronutrients and Brain Health*. Taylor & Francis Group, 2010.
186. Mohs, R.C., Doody, R.S., Morris, J.C., Ieni, J.R., Rogers, S.L., Perdomo, C.A. ve ark., A 1-year, placebo-controlled preservation of function survival study of donepezil in AD patients published correction appears in *Neurology*. *Neurology*, 2001, 57, 481-488.
187. Raskind, M.A., Peskind, E.R., Truyen, L., Kershaw, P. ve Damaraju, C.R.V., The cognitive benefits of galantamine are sustained for at least 36 months: A long-term extension trial. *Archives of Neurology*, 2004,61, 252-256
188. Rees, T., Hammond, P.I., Soreq, H., Younkin, S. ve Birimijoin, S., Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiology of Aging*, 2003,24, 777-787.

189. Hu, W., Gray, N.W. ve Brimijoin, S., Amyloid-beta increases acetylcholinesterase expression in neuroblastoma cells by reducing enzyme degradation. *Journal of Neurochemistry*, 2003,86, 470-478.
190. Simon, L., Alzheimer hastlığında erken tanı ve tedavi. Novartis, İstanbul, 2001, pp. 1-74.
191. Standridge, J.B., Pharmacotherapeutic approaches to the treatment of Alzheimer's disease. *Clinical Therapeutics*, 2004, 26, 615-630.
192. Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S. ve Qirion, R., Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies, *Progress in Neurobiology*, 2002, 68, 209-245.
193. Lanari, A., Silvestrelli, G., Tomassoni, D. ve Pametti, L., Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mechanism of Ageing and Development*, 2006, 127, 158-165.
194. Piazzzi, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M., Mancini, F. ve ark., Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2008, 18, 423-426.
195. Kayastha, A.M., DAS, N., A simple laboratory experiment for teaching enzyme immobilization with urease and its application in blood urea estimation, *Biochemical Education*, 1999,27, 114-117.
196. Hirayama, C., Sugimura, M., Saito, H., Nakamura, M., Purification and properties of urease from the leaf of mulberry, *Morus alba*, *Phytochemistry*, 2000,53 325-330.
197. Qin, Y., Cabral, J.M.S., Properties and application of urease, *Biocatalysis and Biotransformation*, 2002,20, 1-14.

198. Lubbers, M.W., Rodrigues, S.B., Honey, N.K., Thornton, R.J., Purification and characterization of urease from *Schizosaccharomyces pombe*, *Canadian Journal of Microbiology*, 1996,42, 132-140.
199. Sirko, A., Brodzik, R., Plant ureases: Roles and regulation, *Acta Biochimica Polonica*, 2000,47, 1189-1195.
200. Mobley, H.L.T., Hausinger, R.P., Microbial ureases: Significance, regulation, and molecular characterization, *Microbiological Reviews*, 1989,53, 85-108.
201. Burne, R. A., Chen, Y.M., Bacterial ureases in infectious diseases, *Microbes and Infection*, 2000,2, 533-542.
202. Blakeley, R.L., Zerner, B., Jack bean urease: The first nickel enzyme, *Journal of Molecular Catalysis*, 1984, 23, 263-292.
203. Andrews, R.K., Dexter, A., Blakeley, R.L., Zerner, B., Jack bean urease (EC 3.5.1.5). 8. On the inhibition of urease by amides and esters of phosphoric acid, *Journal of the American Chemical Society*, 1986,108, 7124-
204. Odake, S., Morikawa, T., Tsuchiya, M., Imamura, L., Kobashi, K., Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by hydroxamic acid derivatives, *Biological Pharmaceutical Bulletin*, 1994,17 (10), 1329-1332.
205. Faye, L., Greenwood, J.S., Chrispeels, M.J., Urease in jack bean (*Canavalia ensiformis* (L.) DC) seeds is cytosolic protein, *Planta*, 168, 1986, 579-585.
206. Follmer, C., Pereira, F.V., Silveira, N.P., Carlini, C.R., Jack bean urease (EC 3.5.1.5) aggregation monitored by dynamic and static light scattering, *Biophysical Chemistry*, 2004a, 111, 79-87.
207. Mulrooney, S.B., Ward, S.K., Hausinger, R.P., Purification and properties of the *Klebsiella aerogenes* UreE Metal-Binding Domain, a functional metallochaperone of urease, *Journal of Bacteriology*, 2005, 187, 3581-3585.

208. Dixon, N.E., Riddles, P.W., Gazzola, C., Blakeley, R.L., Zerner, B., Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. on the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea and related compounds, *Canadian Journal of Biochemistry*, 1980, 58, 1335-1344.
209. Ciurli, S., Benini, S., Rypniewski, W.R., Wilson, K.S., Miletta, S., Mangani, S., Structural properties of the nickel ions in urease: novel insights into the catalytic and inhibition mechanisms, *Coordination Chemistry Reviews*, 1998, 190-192, 331-355.
210. Karplus, P.A., Pearson, M.A., Hausinger, R.P., 70 years of crystalline urease: what have we learned? *Accounts of Chemical Research*, 1997,30, 330-337.
211. Whitaker, J.R., Principles of enzymology for the food sciences second edition, Marcel Dekker, Inc., New York-America, 1994, pp. 517-520.
212. Cooksey, C. J., Garratt P, J., Land, E. J., Pavel, S., Ramsden, C. A., Riley, P. A. et al., Evidence of the indirect formation of the catecholic intermediate substrate responsible for the autoactivation kinetics of tyrosinase, *Journal of Biological Chemistry*, 1997,272, 26226–26235.
213. Parvez, S., Kang, M., Chung, H-S., Bae, H., Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetic and agriculture industries, *Phytotherapy Research*, 2007,21, 805-816.
214. Garcia-Canovas, F., Garcia-Carmona, F., Vera-Sanchez, J., Iborrapastor, J. L., Lozano-Teruel, J. A., The role of pH in the melanin biosynthesis pathway, *Journal of Biological Chemistry*, 1982,257, 8738–8744.
215. Sugumaran, M., Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis comparison with insect cuticular sclerotization, *Federation of European Biochemical Societies Letter*, 1991,293, 4–10.
216. Kalka, K., Mukhtar, H., Turowski-Wanke A., Merk H., Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation, *Skin Pharmacology and Applied Skin Physiology*, 2000,13, 143-149.

217. Mantle, D., Gok, M.A., Lennard, T.W., Adverse and beneficial effects of plant extracts on skin and skin disorders, *Adverse Drug Reaction Toxicology Review*, 2001, 20, 89-103.
218. Maeda, K., Fukuda M., In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *Journal of the Society of Cosmetic Chemists*, 1991,42, 361–368.
219. Kubo I., Yokokawa Y., Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*, *Phytochemistry*, 1992, 31, 1075-1077.
220. Witkop, G.J., Inherited disorders of pigmentation, *American Journal of Clinical Dermatology*, 1985,3, 70 -13.
221. Vamos–Vigyazo, L., Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1981,15, 49-127.
222. Tolbert, N. E., Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts, *Plant Phatology*, 1973,51, 234.
223. Pendharkar, M. B., Nair, P. M., Alterations in *Solanum tuberosum* polyphenol oxidase activity induced by gamma irradiation, *Phytochemistry*, 1964,13, 1373.
224. Mayer, A. M., Polyphenol oxidases in plants: recent progress, *Phytochemistry*, 1987, 26,11-20.
225. Cemeroglu, B., Yemencioğlu, A., Özkan, M., Meyve Ve Sebzelerin Bileşimi Cilt No:24, Gıda Teknolojisi Yayınları- Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, 2001, 138.
226. Onslow, M.W., Oxidising enzymes, VI. A Note on tyrosinase, *Biochemical Journal*, 1923,17, 216–219.
227. Bhagvat, K. and Richter, D., Animal phenolases and adrenaline, *Biochemical Journal*, 1938,32, 1397–1406.

228. Arnow, L. E., The Formation of the dopa by the exposure of tyrosine solutions to ultraviolet radiation, *Journal of Biological Chemistry*, 1937,120,151
229. Nelson, J.M., Dawson, C.R., Tyrosinase, *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology*, 1944,4, 99-152.
230. Garcia A., Fulton JE. JR., The combination of glycolic acid and hydroquinone or kojic for the treatment of melasma and related conditions, *Dermatologic Surgery*, 1996, 22, 443-447.
231. Wada, S., Ichikava, H., Tatsumi, K., Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant, *Biotechnology and Bioengineering*, 1995,45, 304- 309.
232. Chiu, C.M., Muddiman, D.C., What is Mass Spectrometry?, *American Society for Mass Spectrometry*, <http://www.asms.org/whatisms.>, 2008.
233. Yılmaz, M.A., Bazı Achillea L. Türlerinin LCMS-IT/TOF ve LC-MS/MS İle Metabolik Profillerinin Çıkarılması ve Biyolojik Aktivitelerinin Belirlenmesi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır, 2015.
234. Solomons G., Fryhle C., *Organik Kimya, Literatür*, 2002.
235. Slinkard, K., Singleton, V. L., “Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods“, *American Journal of Enology and Viticulture*, 1977, 28(1), 49-55
236. Moreno, M. I. N., Isla, M. I., Sampietro, A. R., Vettuone, M. A., “Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina“, *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, 71(1-2), 109-114.
237. Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. ve Featherstone, R.M., A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7, 88-95.

238. Hina Z., Ghazala H.R., Arfa K., Huma S., Sabiha T., Ajmal K., Anti-urease Activity of *Mimusops elengi* Linn (Sapotaceae), *European J. Med. Plants*, 2015, 6, 223-230.
239. Hearing VJ., Jiménez, M., Mammalian tyrosinase-the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, *Int. J. Biochem.*, 1987, 19, 1141-7.
240. Ertaş, A., Gören, A.C., Haşimi, N., Tolun, V., Kolak, U., Chemical Constituents of *Mentha longifolia* subsp. *noeana* with Antioxidant, Anticholinesterase and Antimicrobial Activities, *Records of Natural Products*, 2015, 9(1), 105-115.
241. Exarchou, V., Troganis, A., Gerothanassis, I.P., Tsimidou, M., Boskou, D. "Identification and quantification of caffeic and rosmarinic acid in complex plant extracts by the use of variable-temperature two-dimensional nuclear magnetic resonance spectroscopy", *J. Agric. Food Chem.*, 2001, 49, 2-8.
242. Guan, C., Parrot, D., Wiese, J., Sönnichsen, F.D., Saha, M., Tasdemir, D., Weinberger, F., "Identification of rosmarinic acid and sulfated flavonoids as inhibitors of microfouling on the surface of eelgrass *Zostera marina*", *Biofouling*, 2017, 33, 867-880.
243. Jung, H.A., Park, J.C., Chung, H.Y., Kim, J., Choi, J.S., Antioxidant Flavonoids and Chlorogenic Acid from the Leaves of *Eriobotrya japonica*, *Archives of Pharmacal Research*, 1999, 22(2): 213-218.
244. Alwahsh, M.A.A., Khairuddean, M., Chong, W.K., "Chemical constituents and antioxidant activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers", *Rec. Nat. Prod.*, 2015, 9, 159-163.
245. Chaturvedula, V.S.P., Prakash, I., "Flavonoids from *Astragalus propinquus*", *J. Chem. Pharm. Res.*, 2013 5, 261-265.
246. Ulubelen, A., Topcu, G., Eriş, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., Bozok-Johansson, C., Terpenoids from *Salvia sclarea*, *Phytochemistry*, 1994, 36(4), 971-974.

247. Karayıldırım, Ç.K., “Characterization and in vitro Evolution of Antibacterial Efficacy of Novel Hesperidin Microemulsion”, *Celal Bayar Univ. J. Sci.*, 2017, 13, 943–947.
248. Lahmer, N., Belboukhari, N., Cheriti, A., Sekkoum, K., “Hesperidin and hesperitin preparation and purification from *Citrus sinensis* peels”, *Der Pharma Chem.*, 2015, 7, 1–4.
249. Kolak, U., Topçu, G., Birteksöz, S., Ötük, G., Ulubelen, A., Terpenoids And Steroids From The Roots Of *Salvia Blepharochlaena*, *Türkisch Journal of Chemistry*, 2005, 29, 177 – 186.
250. Kusumoto, N., Ashitani, T., Hayasaka, Y., Murayama, T., Ogiyama, K., Takahashi, K. “Antitermitic activities of abietane-type diterpenes from *Taxodium distichum* cones”, *J. Chem. Ecol.* 2009, 35, 635–642.
251. Ai, C.B., Li, L.N., Stereostructure of Salvianolic Acid B and Isolation of Salvianolic Acid C from *Salvia miltiorrhiza*, *Journal of Natural Products*, 1988, 5 (11), 145–149.
252. Sun, Y., Zhu, H., Wang, J., Liu, Z., Bi, J., 2009. Isolation and purification of salvianolic acid A and salvianolic acid B from *Salvia miltiorrhiza* by high-speed counter-current chromatography and comparison of their antioxidant activity. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, 877, 733–737. doi:10.1016/j.jchromb.
253. Chiruvella, K.K., Mohammed, A., Dampuri, G., Ghanta, R.G., Raghavan, S.C., Phytochemical and Antimicrobial Studies of Methyl Angolensate and Luteolin-7-O-glucoside Isolated from Callus Cultures of *Soymida febrifuga*. *Int. J. Biomed. Sci.*, 2007, 3, 269–78.
254. Lin, L.C., Pai, Y.F., Tsai, T.H., Isolation of Luteolin and Luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and Their Pharmacokinetics in Rats. *J. Agric. Food Chem.*, 2015, 63, 7700–7706.
255. Gohari, A.R., Ebrahimi, H., Saeidnia, S., Foruzani, M., Ebrahimi, P., Ajani, Y., Flavones and Flavone Glycosides from *Salvia macrosiphon* Boiss, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 2011, 10(2), 247–251.

256. Li, L.N., Rui, T.; Chen, W.M., Salvanolic Acid A, a New Depside from Roots of *Salvia miltiorrhiza*, *Planta Medica*, 1984, 50(3), 227-228.
257. Zhang Z., Liao L., Moore J., Wu T., ve Wang Z., ‘‘Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.)’’. *Food Chemistry*, 2009, 113, 160-165.
258. Ma, C.H., Ke, W., Sun, Z.L., Peng, J.Y., Li, Z.X., Zhou, X., Fan, G.R., Huang, C.G., Large-Scale Isolation and Purification of Scoparone from *Herba artemisiae scopariae* by High-Speed Counter-Current Chromatography. *Chromatographia*, 2006, 64, 83–87.
259. Topcu G., Gören A.C., 2007. ‘‘Biological Activity of Diterpenoids Isolated from Anatolian Lamiaceae Plants’’ *Records of Natural Products* 1(1) May 2007.



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	LEYLA	Soyadı	BALUR ADSIZ
Doğum Yeri	DİYARBAKIR	Doğum Tarihi	10. 07. 1988
Uyruğu	T.C.	Tel	05330352008
E-posta	l_balur@hotmail.com		

EĞİTİM DÜZEYİ

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	ANADOLU ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ	2011
Lise	NAMIK KEMAL LİSESİ	2005

İŞ DENEYİMİ

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
ECZACI	LİCE ECZANESİ	2011-

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	75,16055	74,28229	65,65611

Posterler

Evin Aygün Tuncay, Leyla Balur, Mehmet Fırat, İsmail Yener, Eyüp Tuncay, Hilal Saruhan Fidan, Esra Yarış, Mehmet Boğa, Abdulselam Ertaş, Cupric Reducing Antioxidant Capacity (CUPRAC), DPPH Free and ABTS Cation Radical Scavenging Activities of Ethanol Extract Fractions of Endemic *Salvia cerino pruinosa* var. *elazigensis*, 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, 9-12 May 2017, Konya, Turkey

Hilal Saruhan Fidan, Leyla Balur, Esra Yarış, Sevgi İrtegin, Abdulselam Ertaş, Mehmet Fırat, Ufuk Kolak, Gülaçtı Topçu, In Vitro Cytotoxic Activity of *Salvia kurdica* From Anatolia, 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, 9-12 May 2017, Konya, Turkey

Leyla Balur, Hatice Cakirca, Abdulselam Ertaş, Evin Aygun Tuncay, Eyyup Tuncay, Mehmet Veysi Caglayan, Mehmet Fırat, Gulacti Topcu, Ufuk Kolak, *Secondary Metabolites Isolation Of Salvia cerino pruinosa Rech* var. *elazigensis*, 2nd International Gazi Pharma Symposium Series, 11-13 October 2017, Ankara, Turkey

Mehmet Akdeniz, Fırat Aydın, Işıl Aydın, Mehmet Fırat, İsmail Yener, Mustafa Abdullah Yılmaz, Leyla Balur, Mehmet Veysi Çağlayan, Abdulselam Ertaş, The essential oil composition of *Hypericum scabrum* collected from different localities, 1st International Congress on Medicinal and Aromatic Plants, 9-12 May 2017, Konya, Turkey.

10. ORJİNALLİK RAPORU

Yüksek Lisans Tezi

ORJİNALLİK RAPORU

% 10	% 7	% 1	% 7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Batman University Öğrenci Ödevi	% 4
2	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
3	es.scribd.com İnternet Kaynağı	% 1
4	Submitted to Mugla University Öğrenci Ödevi	<% 1
5	Submitted to Gaziosmanpasa Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
6	dspace.trakya.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
7	Submitted to Dicle University Öğrenci Ödevi	<% 1
8	Submitted to Ondokuz Mayıs Universitesi Öğrenci Ödevi	<% 1
9	GÖKPINAR, Şevket, KORAY, Tufan, AKÇIÇEK,	<% 1

Eren, GÖKSAN, Tolga and DURMAZ, Yaşar.
"Algal antioksidanlar", Tubitak, 2006.

Yayın

10	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
11	www.dunyagida.com.tr İnternet Kaynağı	<%1
12	vdocuments.site İnternet Kaynağı	<%1
13	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	<%1
14	www.slideshare.net İnternet Kaynağı	<%1
15	usk2015.firat.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
16	Submitted to Kahramanmaraş Sütçü İmam University Öğrenci Ödevi	<%1
17	İPEK, Arif and GÜRBÜZ, Bilal. "Türkiye florasında bulunan salvia türleri ve tehlike durumları", Tarla Bitkileri Merkez Araştırma Enstitüsü, 2010. Yayın	<%1

18	Submitted to Trakya University Öğrenci Ödevi	<%1
19	acikerisim.deu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
20	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
21	www.locus.ufv.br İnternet Kaynağı	<%1
22	Submitted to Pamukkale Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
23	YILMAZ, İsmet. "Antioksidan içeren bazı gıdalar ve oksidatif stres", İnönü Üniversitesi, 2010. Yayın	<%1
24	Submitted to Aksaray Aniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
25	pharmacy.erciyes.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
26	kutuphane.pamukkale.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
27	www.happycampus.com İnternet Kaynağı	<%1
28	MENGELOĞLU, Fırat Zafer, METİN, Umre, ÖZDEMİR, Nesibe and ODUNCU, M. Kadir. "Mazı meşesi (Quercus infectoria) gal	<%1

tohumlarının antimikrobiyal etkinliği", TUBITAK, 2011.

Yayın

29	mariovalle.name İnternet Kaynağı	<%1
30	acikarsiv.ankara.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
31	KÜÇÜKER, Emine, ÖZTÜRK, Burhan, ÖZKAN, Yakup and YILDIZ, Kenan. "YAPRAKTAN ÜRE UYGULAMASININ FARKLI ARMUT (PYRUS COMMUNIS L.) ÇEŞİTLERİNDE VERİM, MEYVE KALİTESİ VE BİOAKTİF BİLEŞİKLER ÜZERİNE ETKİSİ", Niğde Üniversitesi, 2015. Yayın	<%1
32	www.scribd.com İnternet Kaynağı	<%1
33	docplayer.biz.tr İnternet Kaynağı	<%1
34	studylibtr.com İnternet Kaynağı	<%1
35	www.kimya2012.mu.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
36	earsiv.atauni.edu.tr İnternet Kaynağı	<%1
37	slymnylmz.com	

	İnternet Kaynağı	<% 1
38	www.acgpubs.org İnternet Kaynağı	<% 1
39	Ana Alimpić, Aleksandar Knežević, Milena Milutinović, Tatjana Stević et al. "Biological activities and chemical composition of <i>Salvia amplexicaulis</i> Lam. extracts", <i>Industrial Crops and Products</i> , 2017 Yayın	<% 1
40	www.sagliklica.com İnternet Kaynağı	<% 1
41	doaks.org İnternet Kaynağı	<% 1
42	www.tubas.org.tr İnternet Kaynağı	<% 1
43	repositorio.ufc.br İnternet Kaynağı	<% 1
44	tailieu.vn İnternet Kaynağı	<% 1
45	<i>Biodiversity</i> , 2002. Yayın	<% 1



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



TEZ SAVUNABİLİRLİK VE ORJİNALLİK
BEYAN FORMU

I. ÖĞRENCİ BİLGİLERİ

Adı ve Soyadı: Leyla Balur Adsız

Numarası: 16878006

Eğitim – Öğretim Yılı: 2018

Yarıyıl: GÜZ BAHAR

Anabilim Dalı: Analitik Kimya Anabilim Dalı

Programı: TEZLİ YÜKSEK LİSANS

Lisansüstü Eğitime Başlama Tarihi: 08.08.2016

Tez Konusu: *Salvia cerino-pruinosa* var. *elazigensis* Türünün Antioksidan Aktivite Kontrolü Sekonder Metabolit İzolasyonu

II. İNTİHAL RAPORU BİLGİLERİ

Rapor Türü: TEZ SAVUNMA SINAVI ÖNCESİ TEZ SAVUNMA SINAVI SONRASI

Sayfa Sayısı: 337

Benzerlik Oranı: % 10

Raporlama Tarihi: 07/11/2018

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın kapak sayfası, giriş, ana bölümler, tartışma ve sonuç kısımlarından oluşan toplam 337 sayfalık kısmına ilişkin, **07/11/2018** tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan intihal raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 10 'dur.

Uygulanan filtrelemeler:

- Kabul/Onay, Beyan, Teşekkür, İçindekiler, Kısaltma ve Simgeler, Şekil, Resim ve Tablolar sayfaları hariç,
- Kaynakça (Bibliyografya) hariç
- Alıntılar hariç
- Tez Danışmanı onayıyla kelime ve %'lik filtresi uygulaması (% 1)

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Programlarda Tez Çalışması İntihal Raporu Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edilmesi durumunda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Yukarıda bilgileri verilen tezi bilimsel, şekilsel ve etik kurallar çerçevesinde inceledim. Tezin Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği ve Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu kurallarına uygun olduğunu onaylarım. Jüri karşısında savunabilir olduğunu bilgilerinize arz ederim.

(İmza)

..../..../.....

Öğrenci

(İmza)

..../..../.....

Danışman