

56148

T. C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Sanicula europaea L. BİTKİSİNDEN
ANTİVİRAL BİR MADDENİN SAFLAŞTIRILMASI
VE KİMYASAL KARAKTERİZASYONU

DOKTORA TEZİ

Nazlı ARDA

Biyoloji Anabilim Dalı
(Moleküler Biyoloji — Biyokimya Programı)

Danışman : Prof. Dr. Avni KURU

ŞUBAT — 1996

ÖNSÖZ

“Sanicula europaea L. Bitkisinden Antiviral Bir Maddenin Saflaştırılması ve Kimyasal Karakterizasyonu” başlıklı Doktora tezimin gerçekleştirilmesinde bana her türlü olanağı sağlayan Danışmanım Prof. Dr. Avni Kuru ve değerli bilgileriyle bana ışık tutan ve tezin her aşamasında yol gösteren Doç Dr. Nezhun Gören'e şükranlarımı sunarım. Deneysel çalışmalarında, TÜBİTAK-MAM Kimya Bölümü'nün ve EAL Laboratuvarları'nın yeri büyüktür. Burada çalıştığım süre içinde yardımlarını ve ilgilerini gördüğüm bütün hocalarıma ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Saflaştırma işlemlerinin en önemli aşamasında bana yol göstererek, engin deneyimlerinden yararlanma fırsatını veren Prof. Dr. İhsan Çalış'a ve Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nın bütün elemanlarına çok teşekkür ederim. Yapı tayini sırasında değerli yorumlarıyla beni aydınlatan ve teknik yardımlarda bulunan Dr. Süheyla Kırmızıgül'e teşekkürlerimi sunarım. Tezin birçok aşamasında, İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'ndeki değerli hocalarımla ve sevgili arkadaşlarımla çeşitli şekillerde yardımları olmuştur. Başta Bölüm Başkanımız Prof. Dr. Atilla Özalkan, Dr. Saynur Özdiyâr, Kim. Müh. Yüksel Ceyhan ve Y.Doç. Dr. Haluk Ertan olmak üzere bana daima destek olan bütün hocalarıma ve meslektaşlarıma teşekkür borçluyum. Bitkinin toplanması sırasında tanıdığım Başköse ailesine ve Arhavi'nin yardımsever halkına teşekkür ederim. Aktivite testlerinin çok önemli bir kısmını gerçekleştiren Prof. Dr. Geoffrey Cordell ve Prof. Dr. John Pezzuto ile spektral analizlerin bir kısmının alınmasını sağlayan Prof. Dr. Otto Sticher'e çalışmaya katkılarından dolayı minnettarım. Bu çalışmayı, 567/060593 No.lu Proje kapsamında destekleyen İ.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim. Doktora tezim süresince, yaşadığım tüm zorlukları ve engelleri aşmama yardım eden ve bana zoru başarmayı öğreten, başta Prof. Dr. Ahmet Alp Sayâr olmak üzere ailemin tüm fertlerine huzurlarımızda çok teşekkür ederim.

İstanbul, Şubat 1996

Nazlı ARDA

İÇİNDEKİLER

| | |
|---|-----------|
| ÖNSÖZ..... | I |
| ÖZ..... | IV |
| ABSTRACT..... | IV |
| I. GİRİŞ | 1 |
| II. MATERYAL VE METOD | 21 |
| II.1. BİTKİSEL MATERYAL..... | 21 |
| II.2. AKTİVİTE TESTLERİNDE KULLANILAN MATERYALLER..... | 23 |
| II.3. KİMYASAL MADDELER VE ALETLER..... | 23 |
| II.4. BİTKİNİN TOPLANMASI..... | 25 |
| II.5. EKSTRAKSİYON..... | 25 |
| II.5.1. Soğukta ekstraksiyon..... | 25 |
| II.5.2. Sıcakta ekstraksiyon..... | 27 |
| II.6. AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA..... | 28 |
| II.6.1. Kromatografik yöntemler..... | 28 |
| II.6.1.1. Kolon kromatografisi..... | 28 |
| II.6.1.2. İnce tabaka kromatografisi..... | 30 |
| II.6.1.3. Preparatif tabaka kromatografisi..... | 32 |
| II.6.2. Çöktürme yöntemi..... | 33 |
| II.6.3. Kimyasal yöntemler..... | 34 |
| II.6.3.1. Glikozitin asit hidrolizi..... | 34 |
| II.6.3.2. Glikozitin enzimatik hidrolizi..... | 35 |
| II.7. SPEKTRAL ANALİZ YÖNTEMLERİ..... | 36 |
| II.7.1. Genel yöntemler..... | 36 |
| II.7.2. UV Spektrofotometrisi ile yapılan kantitatif analizler..... | 37 |
| II.8. ANTİVİRAL AKTİVİTE TESTLERİ..... | 38 |
| II.8.1. Bakteriyofaj plak testi..... | 38 |
| II.8.2. Bitkisel virüs üzerindeki etkinin araştırılması..... | 39 |
| II.8.3. HIV - revers transkriptaz testi..... | 41 |
| III. BULGULAR | 42 |
| III.1. EKSTRELER..... | 42 |
| III.2. AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA..... | 43 |
| III.2.1. Kromatografik ayırmalar..... | 43 |
| III.2.1.1. Kolon kromatografisi..... | 43 |
| III.2.1.2. İnce tabaka kromatografisi..... | 46 |

III

| | |
|---|-----|
| III.2.2. Çöktürme ve preparatif tabaka kromatografisi..... | 48 |
| III.2.3. Kimyasal yöntemler..... | 48 |
| III.3. SPEKTRAL ANALİZ..... | 50 |
| III.3.1. Triterpenik saponin glikoziti (Sanikulozit N)..... | 50 |
| III.3.2. Triterpenik saponin aglikonu (Sanikulagenin N)..... | 63 |
| III.3.3. Rozmarinik asit..... | 73 |
| III.3.4. Kafeik asit..... | 77 |
| III.3.5. Hidroksisinnamik türevler ve antioksidan aktivite..... | 80 |
| III.4. ANTİVİRAL AKTİVİTE TESTLERİ..... | 80 |
| III.4.1. Bakteriyofaj plak testi..... | 80 |
| III.4.2. Bitkisel virüs üzerindeki aktivite testleri..... | 81 |
| III.4.3. HIV-RT testleri..... | 81 |
| IV. TARTIŞMA VE SONUÇ..... | 84 |
| V. TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ÖZETLER..... | 91 |
| V.1. ÖZET..... | 91 |
| V.2. SUMMARY..... | 93 |
| VI. KAYNAKLAR..... | 95 |
| VII. KISALTMALAR..... | 102 |
| VIII. ÖZGEÇMİŞ..... | 104 |

ÖZ***Sanicula europaea* L. Bitkisinden Antiviral Bir Maddenin Saflaştırılması ve Kimyasal Karakterizasyonu**

Bu çalışmada *Sanicula europaea* L. ekstrelerinin HIV-1 üzerinde antiviral etki gösterdiği saptandı. Çeşitli spektral ve kimyasal teknikler kullanılarak aktif ekstredeki bileşenlerin moleküler yapıları araştırıldı. Rozmarinik asit ve kaffeik asit yanında yeni bir triterpenik saponin, 3-O-[β -D-arabinopiranozil(1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozil(1 \rightarrow 3)- β -D-glukuronopiranozil propil ester]-3 β ,15,16,22 α ,28 β pentahidroksi Δ^{12} -oleanen-21-anjelic asit izole edildi ve Sanikulozit N olarak adlandırıldı. Esas aktif maddenin rozmarinik asit olduğu belirlendi.

ABSTRACT**Purification and Chemical Characterization of an Antiviral Substance from the Plant *Sanicula europaea* L.**

In this study it was found that the *Sanicula europaea* L. extracts exhibit the antiviral effect on HIV-1. Using various spectral and chemical techniques the molecular structures of the components of the active extract were investigated. Beside the rosmarinic acid and the caffeic acid a new triterpenic saponin, 3-O-[β -D-arabinopyranosyl(1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl propyl ester]-3 β ,15,16,22 α ,28 β pentahydroxy Δ^{12} -oleanen-21-angelic acid was isolated for the first time and it was named as Saniculoside N. It was observed that the rosmarinic acid is the main active component.

I. GİRİŞ

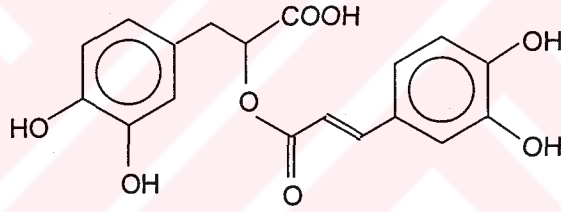
Tarih öncesi çağlardan beri bitkileri besin, odun, kauçuk ve sellüloz gibi ihtiyaç maddelerinin kaynağı olarak kullanmakta olan insanoglu, çeşitli sağlık sorunlarının çözümünde de bitki ekstrelerinden yararlanmaktadır. Halk tıbbı, birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bitki örnekleriyle doludur ⁽¹⁾. Bu çalışmanın bitkisel materyali olan *Sanicula europaea* L. (*Apiaceae*) bitkisi de, Doğu Karadeniz Bölgesi'nde, özellikle Arhavi ve civarındaki köylerde halk tarafından tanınan ve **yara otu** olarak bilinen bir bitkidir. Bu yörelerde, bitkiden hazırlanan çay ülsere, kaynatılmış yaprak posası ise çeşitli yaralara ve egzamaya karşı kullanılmaktadır. Avrupa'da ise, XII. yüzyıldan bu yana yaralara, ağız-boğaz iltihaplarına ve çeşitli mide-barsak hastalıklarına iyi geldiği bilinmektedir ⁽²⁾.

Sanicula' nın özellikle gastrointestinal kanamalarda, üst solunum yolları hastalıklarında, kronik göğüs ağrılarında ve hematüri gibi üriner sistem rahatsızlıklarında kullanılan bir tedavi bitkisi olduğu ve bitkinin adının Latince' deki *Sanare* (= tedavi etmek, iyileştirmek, iyi gelmek) kelimesinden geldiği rapor edilmektedir ⁽³⁾.

Sanicula europaea L. ile ilgili araştırmaların bir kısmı sistematik ve botanik konusundadır ^(4,5,6). Ayrıca bu bitkinin çeşitli kimyasal bileşenlerinin incelendiği çalışmalar da bulunmaktadır ^(3,7,8,9,10,11,12,13).

*S. europaea'*nın kimyasal bileşenleri hakkındaki çalışmalardan ilki, klorojenik ve rozmarinik asitin izolasyonu ve kantitatif tayini konusundadır ⁽³⁾. Bu araştırmanın bulgularına göre, fenol karboksi asit miktarı en yüksek organ çiçektir. Çiçekler, kuru ağırlık temeline göre % 3.1 rozmarinik asit ve % 0.95

klorojenik asit taşır. Rizom da % 2.3 rozmarinik asit ve % 1.2 klorojenik asit içermesi sebebiyle fenol karboksi asit miktarı yüksek organlardan biridir. *Apiaceae*, *Boraginaceae* ve *Lamiaceae*'lerin rozmarinik asit, sinnamik asit türevleri ve antioksidan aktiviteleri konusunda yapılan bir çalışmada, *Sanicula* da incelenmiş ve bitkinin kuru ağırlıkta % 3 den fazla rozmarinik asit içerdiği belirlenmiştir ⁽¹⁴⁾. Bu durumda bitki, rozmarinik asit kaynağı olarak kabul edilmektedir. Aynı araştırmada antioksidan aktivitenin hidroksisinnamik türevlerden ileri geldiği ve esas aktif maddenin, aşağıda kimyasal yapısı gösterilen rozmarinik asit olduğu öne sürülmektedir:



Rozmarinik asit

Rozmarinik asit esas olarak, *Boraginaceae* ve *Lamiaceae* familyalarında bulunur ve antienflamatuar, antibakteriyel, antiviral ve antioksidan aktiviteleri olduğu bilinmektedir⁽¹⁵⁾. Bunun yanı sıra, rozmarinik asitin yapısında yer alan kaffeik asitin de antiviral aktivitesi rapor edilmiştir⁽¹⁶⁾. Sinnamik asit ve hidroksi türevleri, bitki dokularında yer alan önemli fenolik maddelerdir. Çünkü çeşitli

biyolojik aktivitelere sahip bu bileşikler, aynı zamanda kumarinler, flavonoidler, ligninler, benzoik asit türevleri gibi fenolik bileşiklerin öncül maddeleri olarak da iş görmektedirler⁽¹⁷⁾.

Şemsiyegiller (*Umbelliferae*) familyasından birçok bitkinin alifatik karbonik asitler bakımından incelendiği bir araştırmada, *S. europaea*'nın sitrik asit, malik asit, malonik asit ve oksalik asit içerdiği ortaya konulmuş, bitkinin yaprak ve meyvelerinin, diğer organlara kıyasla, alifatik asitler bakımından daha zengin olduğu saptanmıştır⁽⁹⁾.

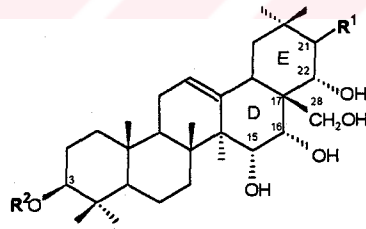
Diğer taraftan, *Sanicula*'daki karbohidratlarla ilgili çalışmada, toprak altı organlarında sukroz içeriğinin yüksek olduğu rapor edilmiş ve sukroz miktarının kökte % 23.1, rizomda % 13.9, yaprakta % 12.8, çiçekte % 6.0 ve meyvede % 5.2 olduğu bildirilmiştir⁽⁷⁾. Aynı çalışmada çiçeklerin sukroza ek olarak fruktoz ve glukoz da içerdiği, ancak bunların sukrozun hidroliz ürünleri olabileceği belirtilmiştir.

Ayrıca, *S. europaea*' dan azot içeren bir siklik bileşik olan allantoin izole edilmiş ve bu maddenin bitkinin farmakolojik aktivitelerinden sorumlu olabileceği öne sürülmüştür⁽¹⁰⁾.

Sanicula'daki flavonlarla ilgili bir çalışmada, bitkinin rutin, izokersitrin ve kamferol 3-O-glikozit (astragalin) flavonoidleri içerdiği bulunmuştur⁽¹³⁾.

Sanicula europaea bitkisinden izole edilmiş ve üzerinde en çok çalışılmış molekül grubu saponinlerdir. Triterpenik yapıda oldukları öne sürülen *Sanicula* saponinlerinin tümü hemolitik aktivite göstermektedir⁽⁸⁾. Bunun yanı sıra, *Sanicula* saponinlerinin antimikrobiyal aktiviteleri de araştırılmış ve bunların *Corynebacterium diphtheria gravis* ve *Mycoplasma mycoides* üremesini inhibe

Sanicula europaea sapogeninleri içinde en fazla miktarda bulunanı, Sanikulagenin A (I) ve Eryngiumgenin D (II,III) sapogeninleridir⁽²¹⁾. Sanikulagenin B' nin, A' nın izomeri olduğu, Sanikulagenin C ve D' nin ise esterleşmeyen saponinlerin yapısında bulunduğu ifade edilmektedir⁽¹¹⁾. Eryngiumgenin B (IV) tipindeki aglikonun *Sanicula europaea*'da minör bileşen olarak yer aldığı, Eryngiumgenin C ve A (V,VI,VII) 'nın ve Sanikulagenin F (VIII)'nin de eser miktarlarda buldukları bildirilmiştir⁽²¹⁾. *Sanicula*'dan izole edilen saponinlerin, aglikon olarak R₁-Barrigenol türevleri taşıdığı anlaşılmağa beraber⁽²¹⁾, bu bileşiklere ait detaylı yapı analizlerinin yapılmadığı görülmektedir. Sadece Sanikulagenin A'ya ait bazı spektral bulgular rapor edilmiştir⁽²¹⁾. *Sanicula* saponinlerinin şeker kısımları ile ilgili bilgilerimiz de sınırlıdır. Bu konuda yapılmış bir çalışmada, *Sanicula* saponinlerinin glikozit yapılarının aşağıdaki gibi olabileceği bildirilmiştir⁽¹²⁾:



| Saponozit | R ¹ | R ² |
|---------------|----------------|--|
| Sanikulozit A | OH } H } | Glu*-1 → 2-Glu.a*-1 → |
| Sanikulozit B | | |
| Sanikulozit C | OH } H } | Glu-1 → 2(3)Glu.a-1 → Ara*-1 → 3(2) |
| Sanikulozit D | | |

*: Glu = Glukoz ; Glu.a = Glukuronik asit ; Ara = Arabinoz

Bilindiđi gibi, saponinler bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan glikozidik bileşiklerdir. Adları, sulu çözeltilerinin sabun gibi köpürmesi nedeniyle, *Latince*'deki *sapo* (= sabun) kelimesinden türetilmiştir ⁽²²⁾. Bu özellikleri nedeniyle eskiden sabunun yerini tutan deterjanlar olarak kullanılmışlardır ⁽²³⁾. Bugün bile, *Saponaria officinalis* kökleri ve *Quillaja saponaria* kabukları gibi saponin içeren bitkisel materyallerin yüzey aktif özelliklerinden yararlanılmaktadır ⁽²⁴⁾.

Saponinlerin en önemli özellikleri arasında acı olmaları, kana enjekte edildiklerinde hemolize ve toz halinde iken hapşırmaya yol açmaları sayılabilir ⁽²³⁾. Balık zehiri olarak kullanılmakla beraber, ağız yoluyla alındıklarında memeliler için toksik değildirler, çünkü barsakta absorbe olmazlar ⁽²⁵⁾.

Bitkisel materyalden su, alkol veya ikisinin karışımı ile ekstre edilen saponinleri saflaştırmanın zor ve zahmetli olduğu öne sürülmektedir ⁽²³⁾.

Saponinler hidroliz ile birbirinden ayrılabilen iki bileşenden oluşur:

- 1) Aglikon (sapogenin, genin)
- 2) Şeker

Aglikon ile şekerler arasındaki bağların kopmasına yol açan hidroliz, seyreltik asitler ya da glikozidazlarla gerçekleştirilir ⁽²⁵⁾.

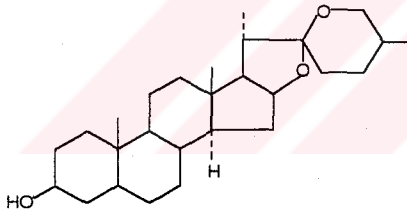
Saponinler, genin (aglikon) yapısına göre 3 gruba ayrılır ⁽²²⁾:

- 1) Steroidal saponinler
- 2) Triterpenoid saponinler
- 3) Steroidal alkaloid saponinler

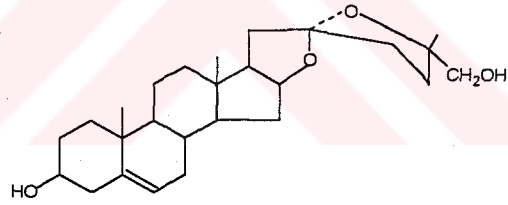
Steroid al saponinler, doğada triterpenoid saponinlere göre daha az rastlanan tiptir ve monokotil bitkilerde, özellikle *Liliaceae*, *Dioscoreaceae* ve *Amaryllidaceae* familyalarında bulunur ⁽²²⁾.

Steroid al saponinler, seks hormonları, kortizon, D vitamini ve kardiyak glikozitlerle ilişkileri dolayısıyla çok büyük önem taşırlar ⁽²⁴⁾. Örneğin, seks hormonlarının sentezinde doğal steroidlerin kullanımı, maliyeti artıran ve uzun süren bir prosesi gerektirdiğinden, hormon üretiminde steroid al sapogeninlerin kullanıldığı kısmî sentez tercih edilmektedir. Benzer şekilde, kortizon sentezinde de başlangıç materyali olarak, yapısı kortizona çok benzeyen steroid al sapogenin (diosgenin) kullanılır.

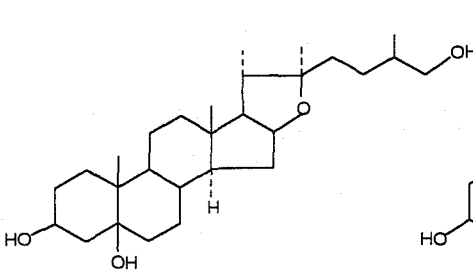
Steroid al saponinler aglikonlarına göre 4 gruba ayrılır ⁽²⁵⁾:



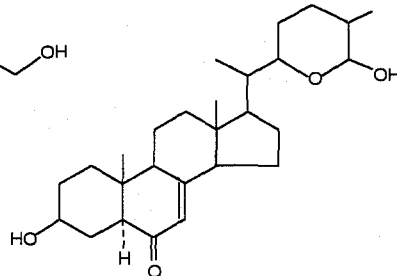
Spirostanol



Nuatigenin



Furostanol



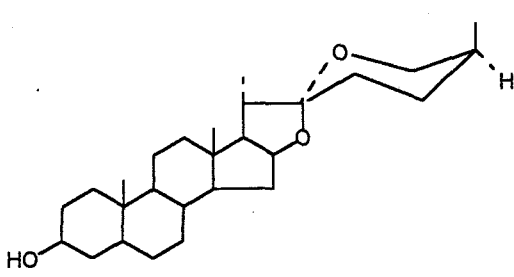
Polipodo

Bazı steroidal saponinler ve elde edildikleri kaynaklar Tablo 1'de görülmektedir.

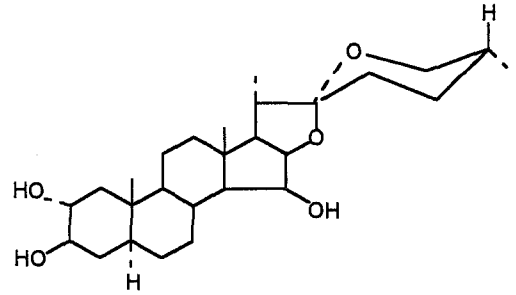
Tablo 1. Bazı steroidal saponinler ve doğada bulunuşları ⁽²⁴⁾.

| Steroidal saponin | Bitkisel kaynak |
|--------------------------|--|
| Sarsaponin | <i>Yucca</i> subsp., <i>Smilax</i> subsp. |
| Digitonin | <i>Digitalis purpurea</i> , <i>D. lanata</i> |
| Gitonin | <i>D. purpurea</i> , <i>D. lanata</i> |
| Tigonin | <i>D. purpurea</i> , <i>D. lanata</i> |
| Dioscin | <i>Dioscorea</i> subsp., <i>Trollium</i> subsp. |
| Sarmentonin | <i>Strophanthus</i> subsp. |
| Heconin | <i>Agave sisalana</i> |

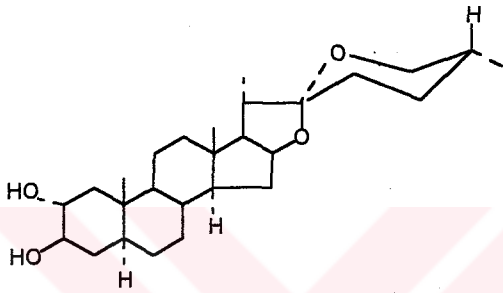
Bu saponinlere ait aglikonlar Şekil 1' de yer almaktadır.



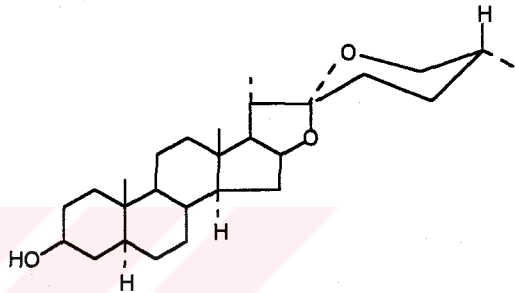
Sarsasapogenin



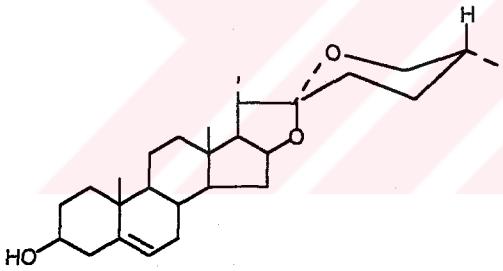
Digitogenin



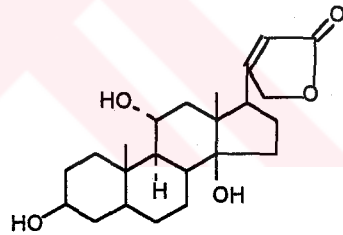
Gitogenin



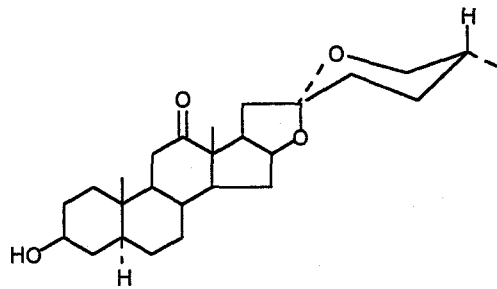
Tigogenin



Diosgenin



Sarmentogenin



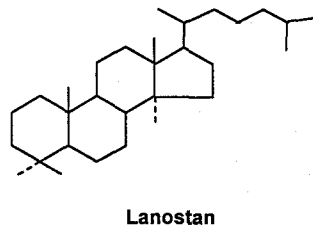
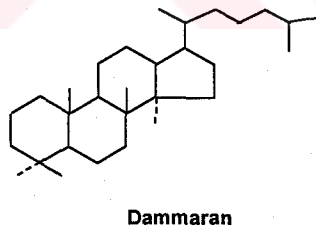
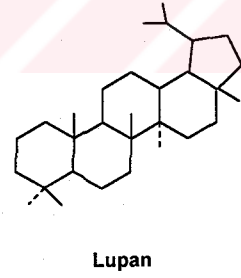
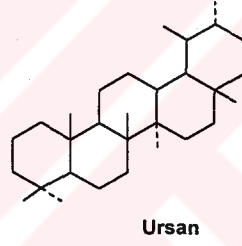
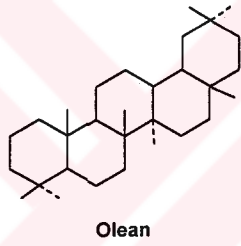
Hecogenin

Şekil 1. Steroidal saponin aglikonlarından örnekler.

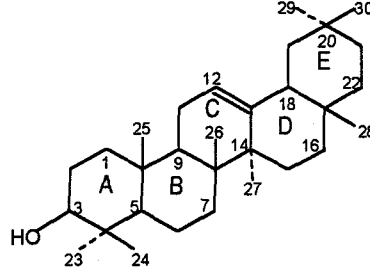
Triterpenik saponinler ise, monokotil bitkilerde nadiren yer almalarına karşın, dikotil bitkilerde, özellikle *Caryophyllaceae*, *Sapindaceae*, *Polygalaceae*, *Sapotaceae* da bol miktarda, *Phytolaccaceae*, *Ranunculaceae*, *Rutaceae*, *Cucurbitaceae*, *Umbelliferae*, *Primulaceae* ve *Compositae* gibi familyalarda önemli miktarda bulunurlar ⁽²⁴⁾.

Doğadaki saponin glikozitler, çoğunlukla triterpenik yapıda aglikonlar taşırlar. Son yıllarda bu tip glikozitlerin izolasyonu, kimyasal ve biyolojik özellikleri ile ilgili çalışmalar çok büyük gelişme göstermiştir ^(26,27,28,29,30,31,32,33).

Triterpenik glikozitlerde rastlanan karakteristik aglikon iskeletlerinden bazıları ⁽³⁴⁾ aşağıda görülmektedir:



Triterpenik aglikonlar, çoğunlukla β -amirin iskeletine sahiptir ⁽³⁴⁾.



β -Amirin iskeleti

β -Amirin iskeletine sahip triterpenlerde C-3'e bir OH bağlıdır. C-21, C-22 ve C-26'ya veya nadiren C-2 ve C-15'e bağlı OH grubu da bulunabilir. Bu tip yapılarda C-23/C-24, C-29/C-30 ve C-28'deki metiller değişik fonksiyonel gruplara oksitlenebilir. Bu gruplar genellikle hidroksil veya karboksil grubuna, bazen de aldehitlere dönüşür. Molekülde bir çifte bağ varsa, bu genellikle C-12 ile C-13 arasındadır. Bazen C-17 ile C-18 arasında da bulunabilir. Epoksit oluşumu genel olarak C-13 ile C-28 atomları arasında gerçekleşir.

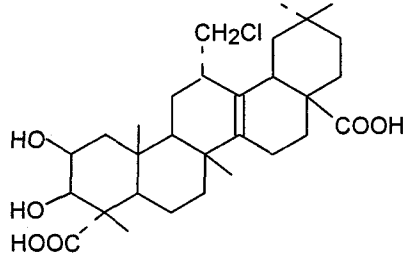
Triterpenik glikozitler, **monodesmozidik** (tek şeker zinciri içeren) veya **bisdesmozidik** (iki şeker zinciri içeren) tipte olabilirler ⁽³⁴⁾.

Monodesmozidik glikozitler, aglikona C-3'deki OH grubu üzerinden oluşan glikozidik bağ ile bağlı, düz veya dallanmış bir şeker zinciri içeren glikozitlerdir. Nötral, ester, asidik ve açıl glikozitler olmak üzere dört farklı tipi vardır. Nötral glikozitlere nadiren rastlanır. Bunlarda sadece 3-OH grubundan

şeker bağlıdır. Ester glikozitler ise çok kompleks yapıdadır ve esterleşmede formik asit, asetik asit, n-bütirik asit, izobütirik asit, valerik asit, 3,3-dimetil akrilik asit, ferulik asit ve N-metil antranilik asit gibi asitler kullanılır. Asidik glikozitlerde ise, ya aglikon ya şeker, ya da her ikisi birden asit karakter gösterir. Her iki komponenti de asit yapıda olan son grup bileşikler çok polardır. Açıl glikozitlere doğada çok nadir rastlanır. Aglikondaki C-17 atomuna bağlı karboksilden bir şeker ünitesi integre olmuştur.

Bisdesmozidik glikozitler iki şeker zinciri taşır. İkinci şeker ünitesi aglikona daima C-28'den bağlanır. C-3 atomundan olan bağlantıda bağ tipi glikozidik iken, C-28'den olan bağlantıda bağ tipi O-açıl-glikozidiktir. Sadece dammaran tipi glikozitlerde her iki şeker de glikozit bağı ile moleküle bağlanır. Bu tip aglikonlarda aldehit ve karboksil grubu da bulunmaz. Bisdesmozidik glikozitlerin nötral ve asidik olmak üzere iki farklı tipi vardır. Nötral olanlarda aglikon genelde asidiktir ve çoğunlukla oleanolik asit veya hederagenin türündedir. Şekerlerden biri 3-OH grubundan, diğeri 28-COOH grubundan bağlıdır. Asidik bisdesmozidik glikozitlerde ise moleküle asit karakteri veren kısım, karbohidrat ünitesinde bulunan D-glukuronik asittir. Bu tipin aglikonu genellikle gipsogenindir. Şeker zincirindeki monosakkaritler nedeniyle polariteleri yüksek olur.

Polygala türlerinde bulunan senegenin, klor içermesi sebebiyle bahsedilen saponinlerden farklıdır⁽³⁵⁾.



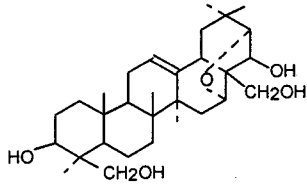
Senegenin

Hayvansal kaynaklı triterpen glikozitler de vardır. Bunlarda aglikon lanostan veya oleana benzer. Şeker zincirinin sonunda bir hidrojen sülfat grubu lokalize olmuştur. Genellikle holothuroidlerde (deniz hıyarı) ve astreoidlerde (deniz yıldızı) bulunur⁽³⁴⁾.

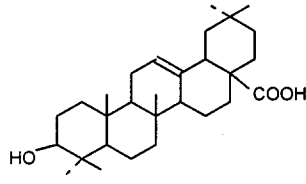
Bilinen önemli triterpenik saponinler elde edildikleri bitkisel kaynaklarla beraber Tablo 2’de yer almaktadır. Şekil 2’de ise, yapıları ortaya konulmuş bazı triterpenik saponin aglikonlarından örnekler görülmektedir.

Tablo 2. Bazı triterpenik saponinler ve doğada bulunuşları ^(24,36,37).

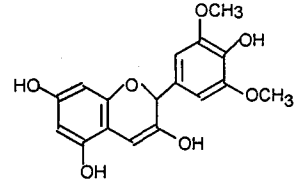
| Triterpenik saponin | Bitkisel kaynak |
|----------------------------|--|
| Aescine | <i>Aesculus hippocastanum</i> |
| Aralin | <i>Aralia japonica</i> |
| Calendula-saponin | <i>Calendula officinalis</i> |
| Cyclamin | <i>Cyclamen eurapeum</i> |
| Glycyrrhicic acid | <i>Glycyrhiza</i> subsp. |
| Guaiac-saponin | <i>Guajacum</i> subsp. |
| Gypsophila-saponin | <i>Gypsophila</i> , <i>Caryophyllaceae</i> subsp. |
| Hederin | <i>Hedera helix</i> , <i>Araliaceae</i> |
| İlwensisaponin | <i>Scrophularia ilwensis</i> |
| Primula-saponin | <i>Primula</i> subsp. |
| Priverasaponin | <i>Primula veris</i> |
| Primacrosaponin | <i>P. veris</i> |
| Quillaia-saponin | <i>Quillaja saponaria</i> |
| Thymus-saponin | <i>Thymus vulgaris</i> |



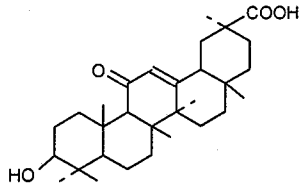
Aescigenin



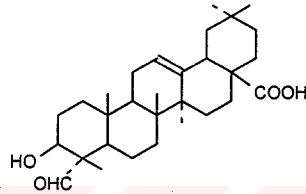
Aralosit C



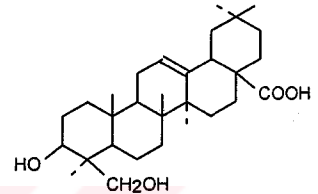
Primuludin (Syringidin)



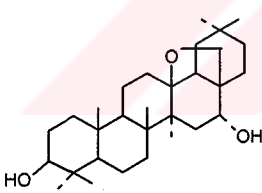
Glisiretinik asit



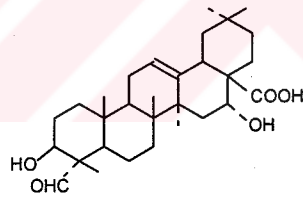
Gypsogenin



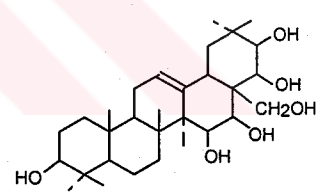
Hederagenin



Protoprimulagenin



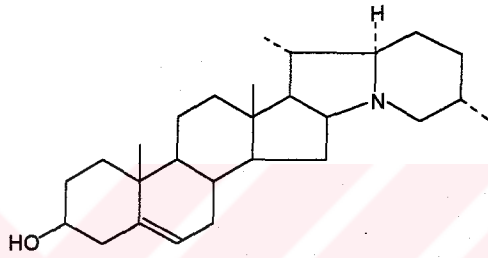
Kuillaik asit



R1-Barrigenol

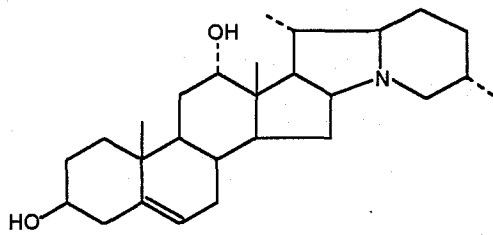
Şekil 2. Triterpenik saponin aglikonlardan örnekler.

Steroid alkoloid saponinler ⁽³⁸⁾, *Solanaceae* familyasında yaygındır. Sterol iskeletine dahil olan azot içeren üç alkaloid grubu vardır. Patates sürgünlerinden ve diğer *Solanum* türlerinden izole edilmiş solanidin bunlardan birini temsil eder. Solanidin, bitkide çoğunlukla glikozit şeklinde bulunmaktadır:



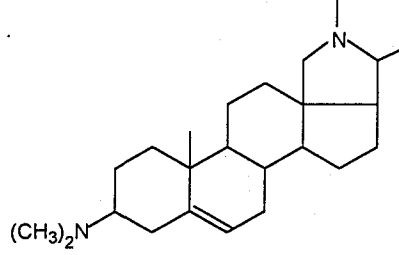
Solanidin

Veratrum alkaloidleri, *Liliaceae* türü bitkilerin kök ve rizomlarında, oldukça toksik glikozitler şeklinde yer alan ikinci tip steroidal alkaloid saponinlerdir. Sterol iskeletine sahip rubijervin bu grup bileşiklere bir örnektir.



Rubijervin

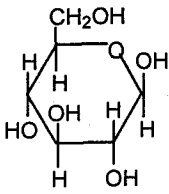
Üçüncü grubun temsilcisi ise $C_{24}H_{40}N_2$ kapalı formülüne sahip konessin'dir.



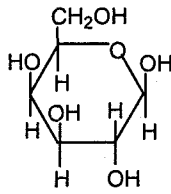
Konessin

Saponinlerde nadir şekerlere rastlanmaz. Saponinlerdeki piranoz veya furanoz formunda bulunan şekerlerin tipi ve sayısı değişkendir. Bağlanma basit ya da dallanma şeklinde gerçekleşebilir. Glikozidik bağların konfigürasyonu, normalde D-şekerlerde β -, L-şekerlerde ise α - dır. Bununla beraber son yıllarda α -D-glikozidik ve β -L-arabinozidik bağ tiplerine de rastlanmaktadır (34).

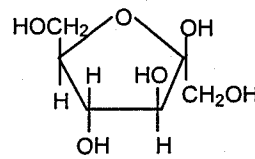
Bugüne kadar saponinlerde belirlenmiş monosakkaritler ve uronik asitler şunlardır ⁽²²⁾:



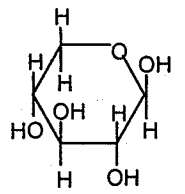
β -D-Glukoz



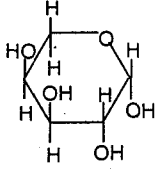
β -D-Galaktoz



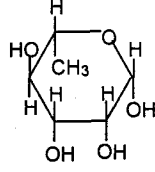
β -D-Fruktoz



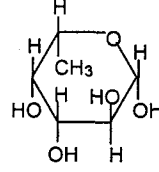
β -D-Ksiloz



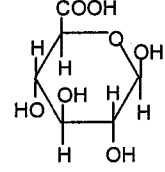
α -L-Arabinoz



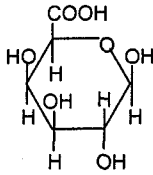
α -L-Ramnoz



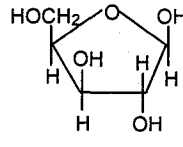
α -L-Fukoz



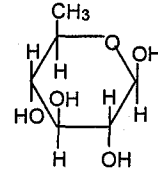
β -D-Glukuronik asit



β -D-Galakturonik asit



β -D-Riboz



6-Deoksi- β -D-Glukoz
(D-izoramnoz; quinovose)

Moleküle bağı son monosakkarit genellikle bir pentozdur. Taşıdıkları şeker sayısına göre saponinleri **mono-**, **di-**, **tri-** ve **tetraozit** olarak adlandırmak mümkündür. En azından dört veya beş monosakkarit içeren ozitlere ise **oligozitler** denir ⁽³⁹⁾.

Daha önce de değinildiği gibi, tek şeker zinciri içeren (monodesmozidik) saponinlerde, bu şeker bakiyesi aglikona C-3 atomundaki OH grubundan glikozidik bağ ile bağlanırken, iki şeker zinciri içeren (bidesmozidik) saponinlerde, ikinci şeker zinciri, aglikona C-28'den O-açıl-glikozidik bağ ile

bağlanır. Bisdesmozidik steroidal glikozitlerde ise şeker bakiyesinin bağlantısı, C-26 atomundaki OH grubundan glikozidik bağ ile gerçekleşir.

Saponozit tipi glikozitler, geniş kullanım alanı bulan bitkisel bileşiklerdir. Bu tip ilaçlar çağlar boyunca öksürük, gut, sifilis gibi hastalıklara karşı başarıyla kullanılmışlarsa da, son yıllarda çoğunlukla balgam söktürücü ve diüretik olarak uygulama bulmaktadır ⁽²²⁾. Ayrıca henüz deney aşamasında olan bir uygulama şekli de, burundan aerosol şeklinde hastaya verilen insülinin absorblanmasını artırıcı olarak kullanımındır ⁽²³⁾. Daha önce değinildiği gibi, saponinlerden türetilen ilaçlar (örneğin, seks hormonları, kortizon) da, eczacılık sektöründe önemli yer tutmaktadır ⁽²⁴⁾.

Bugüne dek çeşitli araştırmacılar tarafından saponinlerde belirlenmiş biyolojik aktiviteler arasında antiöksüdatif, tonik, antileprus ⁽²²⁾, antifungal, molluskisidal ⁽⁴⁰⁾, antifilojistik ⁽⁴¹⁾, antienflamatuvar ⁽⁴²⁾, ekspektoran ve insektisit ⁽⁴³⁾ aktiviteleri sayılabilir. Ayrıca antitümör ve antiviral aktiviteleri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır ^(29,44,45,46).

Eczacılık sektörü dışında, örneğin gıda endüstrisinde de saponozitlerden yararlanılır ⁽⁴⁷⁾. Alkolsüz içeceklerin hazırlanmasında saponince zengin *Sarsaparilla* bitkisinin kullanımı, buna bir örnek teşkil eder.

Buraya kadar ele alınan literatür bilgilerinden de anlaşılacağı gibi, *Sanicula europaea* L. bitkisi, özellikle taşıdığı glikozidik yapılar dolayısıyla kompleks bir kimyasal içeriğe sahiptir.

Sanicula europaea' dan izole edilen moleküllerin yapısal analizleri ile ilgili çalışmaların yanı sıra, bazı kimyasal bileşenlerinin biyolojik aktivitelerini konu alan araştırmalar da incelendiğinde, bitkinin antimikrobiyal ^(3,18,19), hemolitik ⁽⁸⁾

ve antioksidan ^(14,19) aktivitelerinin bulunduğu, ancak, antiviral aktivitesinin bugüne dek hiç araştırılmadığı anlaşılmaktadır.

Sanicula europaea L. bitkisinin antiviral aktivitesi ile ilgili araştırmalarımızın en önemli çıkış kaynağı, halk arasında bir tedavi bitkisi olarak kabul görmesine rağmen, antiviral aktivitesinin daha önce hiç incelenmemiş olmasıdır.

Bu konu ile ilgili araştırmalar, *Sanicula europaea* ekstrelerinin bakteriyofaj T2hr⁺ ile infekte *Escherichia coli* B2 kültürlerinde virüsidal etkisinin ortaya konulduğu iki çalışma^(48,49) ile, araştırma grubumuz tarafından başlatılmış olup genişletilerek sürdürülmektedir. Hayvansal virüsler üzerinde etkili olan bazı kimyasal maddelerin, bakteri ve bitki virüsleri üzerinde de benzer bir aksiyona sahip olduğunun bilinmesi ^(50,51,52), bakteriyofaj T2'nin çoğalmasını önleyen *Sanicula europaea* ekstrelerinin de, hayvansal virüsleri inhibe edebileceği fikrini vermektedir.

Bu bakış açısından yola çıkılarak, bu çalışmada *Sanicula europaea* L. bitkisinden antiviral madde ya da maddelerin izolasyonu, saflaştırılması ve yapılarının çeşitli spektral ve kimyasal yöntemlerle aydınlatılması hedef alınmıştır.

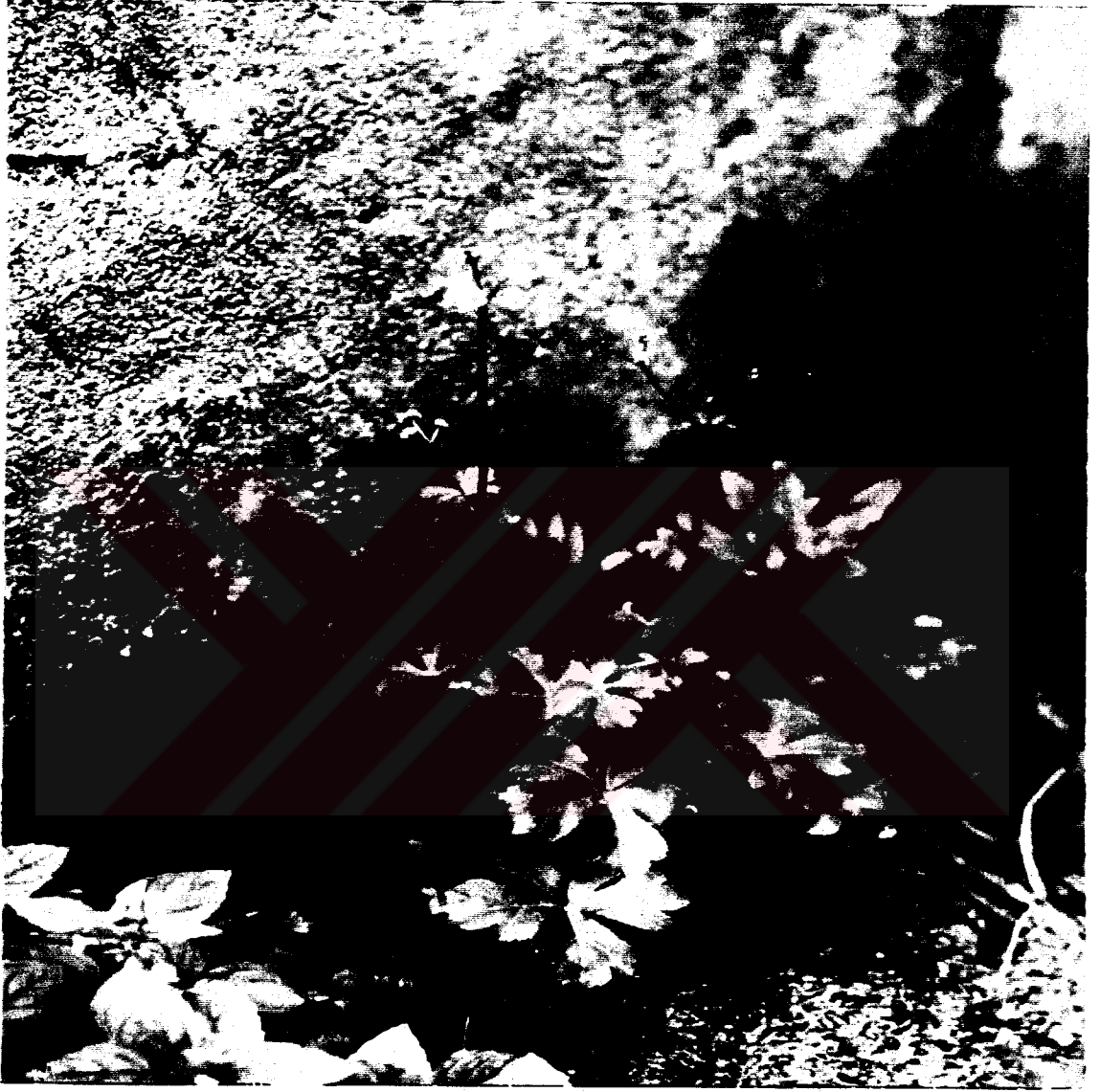
II. MATERYAL ve METOD

II.1. Bitkisel Materyal

Bu çalışmada, bitkisel materyal olarak aşağıda sistematik künyesi verilen *Sanicula europaea* L. bitkisi kullanıldı.

| | |
|-----------------|----------------------------------|
| Takım | : <i>Apiales</i> |
| Familiya | : <i>Umbelliferae (Apiaceae)</i> |
| Cins | : <i>Sanicula</i> L. |
| Tür | : <i>Sanicula europaea</i> L. |

Düzgün veya yivli gövdesi 15-60 cm arasındadır. 3-12 cm, 3-5 kısımlı 2-9 adet bazal yaprak taşır. Segmentleri kama şeklinde, yekpare veya 3 loblu, kenarları düzensiz testere dişi şeklinde, dişler ince diken kaplı ve petiyol yapraktan uzundur. Floral yapraklar 2-3 üçlü yapraktan ibaret olup mızrak şeklindedir. Dişli kısımlar genellikle 0.5-1 cm boyutundadır. 2-4 adet birincil yaprakların hepsi aynı boydadır (1-2.4 cm). Üç adet sekonder yaprağın boyutları 0.5-1 cm arasında değişir. 3-5 adet braktesi vardır. Hermafrodit çiçeklerin dışında çok sayıda erkek çiçek bulunur. 5-8 adet çiçeği vardır. Meyveleri 2.5 x 2.5 mm boyutundadır. Bitkinin genel görünümü Şekil 3'de yer almaktadır.



Şekil 3. *Sanicula europaea* L.

Sanicula europaea, ormanlık ve gölgelik yerlerde, 2200 metreye kadar yetişir.

Dünyada yabancı olarak yetiştiği yerler: Kuzey Batı Avrupa'dan Akdeniz'e kadar yer alan bölgeler, Caucasus, Batı Sibirya, İran'ın kuzeyi, Hindistan, Malezya ve Güney Afrika.

Türkiye bitki örtüsündeki yayılışı: Kuzey ve Güney Anadolu, Kırklareli, Belgrat Ormanları (İstanbul), Bolu, Kastamonu, Sinop, Samsun, Trabzon, Rize, Artvin, Çoruh, Balıkesir, Bursa, Bilecik ve Hatay⁽⁵³⁾.

II.2. Aktivite Testlerinde Kullanılan Materyaller

Bakteriyofaj plak testinde, *Escherichia coli* B2 suşu ve T2hr⁺ bakteriyofajı kullanıldı. Bitkisel virüs deneyi, tütün (*Nicotiana tabacum* Samsun-Maden) bitkisi üzerinde ve tütün mozaik virüsü (TMV) ile yapıldı. Hayvansal virüs üzerindeki etkinin araştırılmasında kullanılan *in vitro* testler ise, insan immün yetersizliği virüsü [Human Immunodeficiency Virus-Type 1 (HIV-1 P66/P51)]'ne ait revers transkriptaz enzimi ile gerçekleştirildi.

II.3. Kimyasal Maddeler ve Aletler

Kullanılan tüm organik çözücüler, iki kez distillenerek içerdikleri safsızlıklardan kurtarıldı. Kaba ayırımlarda genelde teknik çözücülerden, spektral çalışmalarda ise Merck çözücülerden yararlanıldı. NMR deneylerinde Aldrich marka dötöro çözücüler ve yine aynı firmaya ait NMR tüpleri kullanıldı.

Bakteriyofaj deneyleri, Nutrient Broth (**Oxoid**) besiyeri ve bakteriyolojik agar (**Difco**) ile, bitkisel virüs deneyleri ise **Sigma** tarafından üretilmiş kimyasal maddelerle gerçekleştirildi. Kolon kromatografisinde poliklar dolgu maddesi olarak polivinilpolipirrolidon (**General Anilin & Film Corp.**); ters faz dolgu maddesi olarak Lichroprep RP-18 (**Merck**); silikajel kolon dolgu maddesi olarak Silicagel G60 (70-230 mesh) (**Merck**) kullanıldı. İnce tabaka kromatografisi deneyleri, **Merck** firmasından sağlanan hazır silikajel plaklar (DC-Alufohlen, Kieselgel 60F₂₅₄) üzerinde yapıldı. Preparatif tabaka kromatografisinde kullanılan plaklar, yine aynı firmaya ait Kieselgel 60 G ve Kieselgel 60 HF 254 adsorbanları ile hazırlandı. Kullanılan diğer tüm kimyasal maddeler de, **Merck**, **Sigma** veya **Fluka** firmalarından sağlandı.

Orta basınçlı likit kromatografi hariç, diğer tüm kolon kromatografisi yöntemlerinde, çeşitli boylarda, teflon musluklu cam kolonlar kullanıldı. Orta basınçlı likit kromatografi yönteminde ise, basınca dayanıklı **Labomatic** kolon (18.5x352 mm)'dan alınan fraksiyonlar, **LKB** 17 000 Minirac fraksiyon toplayıcısında biriktirildi. Silikajel plaklar, UV-Original Hanau Fluotest **Heraeus** Type 5301 UV lambası (254/366 nm) altında incelendi. Preparatif plaklar **Camag** plak dökme aygıtında hazırlandı. Spektral analizlerde, **Shimadzu** 200 model UV spektrometresi; **Perkin Elmer** 983 model IR spektrometresi; **Bruker** AC-200 MHz ve AMX-600 MHz NMR aletleri ile **Zabspec** marka kütle spektrometresi kullanıldı. Optik çevirme açıları **Schmidt Haensch Polartronic E** polarimetre ile ölçüldü. Evaporasyon işlemleri **Bibby** RE 100 tipi döner buharlaştırıcıda gerçekleştirildi. Liyofilizasyonda **Leybold-Heraeus** marka, Lyovac GT2 liyofilizatör kullanıldı.

II.4. Bitkinin Toplanması

Sanicula europaea L. bitkileri, Ağustos 1992'de Doğu Karadeniz Bölgesinden toplandı. Arhavi ve çevresindeki köylerde, 200-1000 m yükseklikte, fındık ağaçlarının ve ormanların oluşturduğu gölgelerde, ayrıca, yakınında bir dere veya su yatağı bulunan yol ve patikaların kenarındaki yamaçlarda yetişen yabancı bitkiler toplandıktan sonra gölgede kurutuldu. Bu çalışmada, bitkinin sadece toprak üstü kısımları toplanarak, rizomlu bir bitki olan *Sanicula europaea*'nın doğal florasına zarar vermemeye özen gösterildi. Karadeniz Bölgesinden toplanan tohumlar, İ. Ü. Fen Fakültesi Botanik Bahçesine ekildi ve burada yetiştirilen bitkiler, taze materyal kaynağı olarak kullanıldı.

Toplanan bitkilerin tür tayini, İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı'nın bünyesinde bulunan herbaryumda (Herb.No. 864) yapıldı.

II.5. Ekstraksiyon

Bu çalışmada kullanılan ekstraksiyon yöntemleri, işlemin gerçekleştirildiği temperatüre göre soğukta ve sıcakta olmak üzere iki grup altında toplanır.

II.5.1. Soğukta Ekstraksiyon

Antiviral maddenin sıcakta bozunabileceği gözönüne alınarak, oda temperaturünde maserasyon yöntemiyle ekstraksiyon ön planda tutuldu. Soğukta

hazırlanan ve kontaminasyon ya da inaktivasyon risklerine karşı, çalışmalar boyunca soğukta (4 °C) muhafaza edilen ekstraktlar şunlardır:

Kloroform Ekstresi: Gölgede kurutulmuş ve toz haline getirilmiş 750 gram bitkisel materyal, 5 litre kloroform (CHCl₃) ile oda sıcaklığında, sık sık karıştırılarak üç gün bekletildi. Bu süre sonunda maserat, müslin ve filtre kağıdından süzülerek bitki artıklarından kurtarıldı. Elde edilen karışım, evaporatörde kuruluğa kadar buharlaştırıldı ve aktivite testleri için saklandı. Süzme işlemi sonunda ayrılan bitkisel materyal ise, % 96 etanol ekstresinin hazırlanmasında kullanılmak üzere oda sıcaklığında ve gölgede kurutuldu.

% 96 Etanol Ekstresi: Kloroform ekstresinin hazırlanmasında kullanıldıktan sonra süzülen ve kurutulmuş bitki tozları (750 g), 5 litre % 96 (v/v) etanol (EtOH) ile oda sıcaklığında 2 gün bekletildi. Süzme işlemi ile bitkisel kalıntılardan ayrılan % 96 EtOH ekstresi, evaporatörde buharlaştırılarak konsantre edildi ve aktivite testlerinde kullanılmak üzere saklandı.

Protein Ekstresi: 25 g taze bitki, 30 mM 2-merkaptoetanol (β-ME) içeren 150 ml 0.05 M sodyum fosfat tamponu (pH 7.2) ile soğuk havan ve homojenizatörde ekstrakte edildi. Bitkisel artıklar santrifüj ile (10 000 devir/dakika, 4 °C, 15 dakika) uzaklaştırıldı. Sıvı faz, tanenlerden kurtarılmak üzere, hacminin 1/5'i kadar katı polivinilpirolidon (PVP) ile çalkalandı. Tekrar santrifüjlendi. Sıvı faz, eşit hacimde % 10 triklorasetik asit (TCA) ile muamele edilerek proteinler çöktürüldü. Çökelti santrifügasyonla ayrıldı ve az miktarda saf suda

süspanse edilerek sellüloz dializ tüplerinde (Sigma D-2272) dializ edildi. Dializ, saf suya karşı, 48 saat süreyle, 4 °C'da ve sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi. Bu işlemden sonra liyofilize edilen protein ekstresi, aktivite testlerinde kullanılmak üzere 4 °C'da saklandı.

II.5.2. Sıcakta Ekstraksiyon

Birçok aktif molekülün sıcaklığa dayanıklı olduğu ve hatta bunların ancak yüksek sıcaklıklarda izole edilebildiği göz önüne alınarak, *Sanicula europaea* bitkisinden, yüksek ve orta sıcaklıklarda da iki tip ekstre hazırlandı. Bu ekstratlar da, diğerleri gibi, çalışma boyunca 4 °C'da muhafaza edildi.

% 70 Etanol Ekstresi: Toz haline getirilmiş 5 gram kuru bitki, Soxhlet cihazında, 100 mililitre % 70 (v/v) EtOH ile 8 saat kaynatıldı. İşlem sonunda çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırıldı ve elde edilen ekstre aktivite testlerinde denenmek üzere saklandı.

% 50 Etanol Ekstresi: Toz haline getirilmiş 940 gram kuru bitki, 6 litre % 50 (v/v) EtOH ile su banyosunda (65 °C), devamlı karıştırılarak bir saat bekletildi⁽¹⁴⁾. Süzme ve filtrasyon ile bitki kalıntılarından ayrılan sıvı karışım, alçak basınçta evaporasyon ile konsantre edildi. Evaporasyon sırasında karşılaşılan köpürme problemi, karışıma 1-butanol (n-BuOH) katılması ve vakum kontrolü ile önlendi.

II.6. Ayırma ve Saflaştırma

Yapılan aktivite testleri sonucunda (Tablo 14), en yüksek anti-HIV aktivitesine sahip ekstrenin, % 50 EtOH ekstresi olduğu belirlendi. Bu ekstrenin, ana bileşen olarak saponozit karışımı içerdiği ön kromatografik denemelerle anlaşıldıktan sonra, ham ekstre çeşitli ayırma ve saflaştırma işlemlerinden geçirilerek antiviral madde ya da maddeler izole edilmeye çalışıldı. Bu yöntemler uygulamadaki farkları itibariyle iki grupta toplanmaktadır: **kromatografik yöntemler** ve **çöktürme yöntemi**.

II.6.1. Kromatografik Yöntemler

Bu çalışmada kullanılan kromatografik yöntemler, yapılış esaslarına göre ayrı ayrı gruplar halinde verilmektedir.

II.6.1.1. Kolon Kromatografisi

Sanicula bitkisinden hazırlanmış % 50 EtOH ekstresi, aşağıda belirtilen çeşitli tipte kolonlarda saflaştırıldı.

Poliklar Kolon Kromatografisi: % 50 EtOH ekstresi, poliklar kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı. Musluklu kolon, 1 gece % 50 (v/v) metanol (MeOH)'de şişirilmiş poliklar ile hazırlandı. Dolgu maddesi çöktükten sonra, kolon musluğu açılarak fazla çözücü boşaltıldı. Minimum miktarda suda

süspanse edilmiş % 50 EtOH ekstresi, bir pipetle cidara değdirilerek kolona uygulandı. Elüsyona saf su ile başlandı, MeOH oranı artırılarak devam edildi ve sütun son olarak aseton (Me₂CO) ile yıkandı. Elde edilen her bir fraksiyon, daha sonraki aktivite testlerinde denenmek üzere 4 °C'da saklandı.

Orta Basıncılı Likit Kromatografisi: Poliklar kolon kromatografisi ile elde edilen fraksiyonların ileri derecede saflaştırılmasında, orta basınçlı likit kromatografi (Medium Pressure Liquid Chromatography :MPLC) yönteminden yararlanıldı⁽³⁶⁾.

Bu yöntemde, ters faz dolgu maddesi (Lichroprep RP-18) ile hazırlanmış kolon kullanıldı. Dimetilsülfoksit (DMSO) içinde hazırlanan karışım, Rheodyn injektör yardımıyla kolona yüklendi. Elüsyona % 50 (v/v) MeOH ile, orta basınçta (yaklaşık 10 bar) başlandı. MeOH oranı artırılarak işleme devam edildi. Elüsyonda kullanılan çözücülerin içindeki hava, çözücü kabının ultrasonikatörde kısa bir süre bekletilmesi ile giderildi. Fraksiyonlar, otomatik fraksiyon toplayıcısı ile toplandı ve ince tabaka kromatografisi (İTK) ile incelendi.

Ters Faz-Vakum Likit Kromatografisi: Aktif fraksiyonların saflaştırılmasında, RP-18 dolgu maddesi ile hazırlanmış normal bir kolona vakum uygulayarak gerçekleştirilen kromatografik yöntem de denendi. Bu kolonda, su ile başlayan elüsyona % 30 (v/v) MeOH ile devam edildi. Daha sonra kolon MeOH ve CHCl₃ ile yıkanarak işlem tamamlandı. Bu kolondan alınan fraksiyonlar İTK ile incelendi. Saponinler, MeOH ile elüe oldular. Elde edilen saponin karışımı, silikajel kolon kromatografisi ile saflaştırıldı.

Silikajel Kolon Kromatografisi: 100 gram silikajel, 1 litre $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80:20:2 [v:v:v]) sisteminde süspansiyon edilerek kolona döküldü. Uygulanan vakum ile dolgu maddesinin çökmesi sağlandı. 10 gram silikajel ile birlikte kurutulmuş 5 gram saponin karışımı, kolonun üst yüzeyine uygulandı. Elüsyona, kolon hazırlamada kullanılan solvent sistemi ile başlandı. Daha sonra aynı çözücü sistemi 70:30:3 [v:v:v] ve 60:40:4 [v:v:v] oranlarında hazırlanarak sütundan geçirildi. Kolon en son olarak MeOH ile yıkandı. Buradan toplanan fraksiyonlardan ana saponini içeren fraksiyon, bir kez daha silikajel kolon kromatografisinde ayrılarak, içerdiği minör saponinlerden ve diğer safsızlıklardan kurtarıldı.

II.6.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi (İTK) yöntemi, ayırma ve saflaştırma işlemlerinin hemen her aşamasında geniş çapta kullanıldı. Kolon kromatografisi teknikleri ile elde edilen fraksiyonlar ve kimyasal yöntemlerle elde edilen sıvı fazlar İTK ile kontrol edildi. Spektrel analizle incelenecek saf maddelerin standartlarla karşılaştırılmasında da İTK yönteminden yararlandı.

Bütün uygulamalarda hazır silikajel plaklar kullanıldı. Değişik çözücü sistemlerinde kromatografik ayırımın gerçekleştirildiği plaklar, kurutulduktan sonra UV ışınları altında incelendi ve lekelerin görünür hale getirilmesinde çeşitli tipte belirteçlerden yararlandı. Bu çalışmada kullanılan çözücü sistemleri ve belirteçler, aşağıda ayrı ayrı gruplar halinde verilmektedir.

İTK Çözücü Sistemleri

A.) $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (61:32:7, v/v) : Kolon kromatografisi yöntemleriyle elde edilen fraksiyonlar bu sistemde incelendi. Saponinler, fenolik maddeler, yağlar, organik asitler ve flavonlar için uygun bir sistem olduğu, özellikle glikozitlerin ayrılmasında etkili olduğu belirlendi. Bu sistemin kullanıldığı işlemlerde, plaklar üzerine sülfürik asit ve/veya serik sülfat belirteçleri püskürtüldü.

B.) Toluen-Etil asetat (EtOAc)- CH_3COOH (4:5:2 , v/v) : Bu sistem, saflaştırılmış aromatik karboksilli asitlerin standartlarla karşılaştırılmasında kullanıldı ve plaklar, demir (III) klorür ya da serik sülfat belirteçleri püskürtülerek incelendi.

C.) EtOAc: Saponinlerin asit hidrolizi sonucu ele geçen triterpenik aglikonun İTK ile saflaştırılmasında hareketli faz olarak EtOAc kullanıldı. Sapogeninler sülfürik asit veya serik sülfat belirteçleri ile görünür hale getirildi.

D.) $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (65:30:10,v/v)+ % 10 MeOH: Bu sistem saponinlerin asit hidrolizi sonucu ele geçen monosakkaritler ve glukuronik asitin standartlarla karşılaştırılmasında kullanıldı. Sistem, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (65:30:10, v/v) çözücü karışımının ayırma hunisinde bir süre bekletilmesinden sonra oluşan alt faza % 10 (v/v) MeOH ilavesi ile hazırlandı ve şekerler anisaldehit belirteci ile renklendirildi.

Belirteçler

Sülfürik asit belirteci

% 30 H₂SO₄ çözeltilisidir.

Serik sülfat belirteci

10 g Ce(SO₄)₂.4H₂O

50 ml derişik H₂SO₄

450 ml saf su ile hazırlanır.

Demir (III) klorür belirteci

% 3 FeCl₃ çözeltilisidir.

Anisaldehit belirteci

1 ml anisaldehit

1 ml derişik HCl

0.5 ml CH₃COOH

45 ml EtOH karışımıdır ve kullanılacağı zaman taze hazırlanmalıdır.

II.6.1.3. Preparatif Tabaka Kromatografisi

Bu teknik, esas olarak çöktürme yöntemi sırasında elde edilen eter ve etil asetat fazlarındaki aromatik karboksilli asitlerin saflaştırılmasında kullanıldı.

100 g Kieselgel 60 G ve 50 g Kieselgel 60 HF 254 adsorbanlarının 350 ml saf suda süspansiyonu edilmesi ile hazırlanan karışım, 20x20 cm boyutundaki cam plaklara, preparatif plak dökme aygıtı ile 0.5 mm kalınlığında döküldü. Plaklar oda sıcaklığında kurutulduktan sonra, 100 °C' da 1 saat tutularak aktive edildi. Bir plaka çizgi şeklinde uygulanan yaklaşık 10 mg madde, CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7, v/v) sistemi ile doyurulmuş cam tanklarda kromatografik olarak ayrıldı. Plak yüzeyinde ayrılmış maddeler, gerek UV ışınları altında, gerekse demir (III) klorür ve serik sülfat belirteçleri ile incelendi. Plaktan tek bant halinde kazınan saf maddeler, MeOH-CHCl₃ (1:1, v/v) çözücü karışımında 2 saat bekletilerek ayrıldı, İTK yöntemi kullanılarak standart maddelerle karşılaştırıldı ve yapıları çeşitli spektral yöntemler yardımıyla incelendi.

II.6.2. Çöktürme Yöntemi

% 50 EtOH ekstresinde bulunan aktif fraksiyonlarda, saponin dışında kalan maddeleri belirleyebilmek amacıyla, saponinlerin çöktürülerek uzaklaştırılması temeline dayanan yöntem kullanıldı ⁽³⁾. Bu yöntemin uygulanması sırasında özellikle aromatik karboksilli asitlerin izolasyonu amaçlandı.

Vakumda buharlaştırılarak yoğunlaştırılmış % 50 EtOH ekstresi, hacminin 5 katı eter (Et₂O) ile muamele edildi. Oluşan çökelti süzülerek, süzüntü vakumda kuruluğa kadar buharlaştırıldı. 100 ml suda çözündüğünde 3.8 pH değerine sahip bu faz önce Et₂O ile, sonra EtOAc ile ekstre edildi. Organik fazlar evaporasyonla kurutulurken, en son kalan su fazı liyofilize edilerek saklandı. Çökelti ise çok az

miktarda sulu MeOH'de süspansiyon edilip hacminin 5 katı Me₂CO ile muamele edildi. Bu işlem sonunda da oluşan çökelti süzüldü. Süzüntü evapore edildi ve kalıntı suda çözülerek Et₂O ve EtOAc ile ekstre edildi. Saponozitlerden oluşan çökelti vakumda buharlaştırılarak kurutuldu. Çöktürme yöntemi ile ele geçen tüm fazlar İTK yöntemi ile ayrı ayrı incelendi ve saponinlerin çöktüğü, aromatik karboksilli asitlerin ise Et₂O ve EtOAc fazlarında kaldığı belirlendi. Organik fazların ileri derecede saflaştırılmasında preparatif tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

II.6.3. Kimyasal Yöntemler

II.6.3.1. Glikozitin Asit Hidrolizi

Elde edilen saf saponin glikozitine uygulanan asit hidroliz işlemlerinde iki farklı yol izlendi.

1. Saponinin aglikon (sapogenin) kısmı ile şeker kısmını birbirinden ayırarak aglikonu saf bir şekilde elde etmeyi hedefleyen asit hidroliz ⁽³³⁾ işleminde, 30 mg saponin 5 ml MeOH'de çözündürülerek 5 ml benzen ve 5 ml 2 N HCl ile muamele edildi ve 95°C'da, 6 saat geri çeviren soğutucu altında bekletildi. Sapogeninler CHCl₃ ile ekstre edilerek organik faza çekildi. Yapıdan ayrılan şeker bakiyeleri ise sulu fazda kaldılar. CHCl₃ fazı, silikajel plaklara çizgi şeklinde uygulandı ve hareketli faz olarak EtOAc kullanılmak suretiyle, İTK ile temizlendi. Ele geçen saf glikozit aglikonu, spektral analiz yöntemleriyle

incelendi. Su fazı ise, 95 °C su banyosunda buharlaştırıldı ve vakum etüvünde bekletilerek tamamen kurutuldu. Az miktarda saf suda çözülen bu kalıntıdaki şekerler, İTK yöntemi kullanılarak referans şekerler ile karşılaştırıldı. Bu yöntemde elde edilen bulgular çok belirgin olmadığından, glikozitteki monosakkaritler ve glukuronik asitin ispatı için, aşağıdaki yöntem kullanıldı.

2. Glikozitteki şekerlerin belirlenmesine yönelik asit hidroliz tekniğinde⁽⁵⁴⁾, referans şekerler ile saf glikozit (saponin), silikajel plağa yanyana uygulandılar. Plak, derişik HCl ile doyurulmuş bir kromatografi tankında, 100 °C'da 15 dakika bekletildi. Bu süre sonunda tanktan dikkatlice çıkarılan plak, asit kokusu kalmayınca dek çeker ocakta bekletildi. Kuruduktan sonra % 10 (v/v) MeOH içeren CHCl₃-MeOH-H₂O (65:30:10, v/v) çözücü sisteminde yürütüldü. Hidroliz ürünleri, plak üzerine anisaldehit belirteci püskürtülerek karşılaştırıldı. Glikozitin yapısında bulunan ve asit buharlarıyla hidrolize uğrayan monosakkaritler ile standart şekerlere ait bantların fotoğrafı çekildi.

II.6.3.2. Glikozitin Enzimatik Hidrolizi

Saponinin aglikonunu elde etmek için, glikozidik bağların selektif kesimini sağlayan enzimatik hidroliz⁽²²⁾ de denendi. Saf suda 1 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan saponin çözeltisinin pH'sı asetik asit ile 4'e ayarlandı. 1 mg enzim (β -glukuronidaz, 3.2.1.13) ilave edildikten sonra sıvı yüzeyi petrol eteri ile örtüldü. Reaksiyon karışımı, oda temperaturünde 3 gün bekletildi ve oluşan çökelti santrifüjle ayrıldı. Elde edilen bu ilk çökeltide sapogeninler ayrıldı. Süzüntü geri soğutucu altında aseton ile ısıtıldı ve çöken enzim, filtrasyonla

uzaklaştırıldı. Süzüntüdeki aseton evaporatörde uçurulduktan sonra az miktarda saf su ilave edildi ve bu sulu çözelti 3 kez n-BuOH ile ekstre edildi. n-BuOH fazında progeninler, su fazında ise şekerler ayrıldı. Her iki faz da, evaporasyonla konsantre edildi ve İTK ile incelendi.

II.7. Spektral Analiz Yöntemleri

II.7.1. Genel Yöntemler

Bitkisel materyalden elde edilen saf maddelerin yapılarını aydınlatmak amacıyla kullanılan spektral yöntemler, TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi (MAM), Enstrümantal Analiz Laboratuvarları (EAL)'nda, uzman teknisyenler tarafından yürütüldü. Bu yöntemler kızılötesi (IR), proton nükleer manyetik rezonans ($^1\text{H-NMR}$), karbon-13 nükleer manyetik rezonans ($^{13}\text{C-NMR}$, APT:Attached Proton Technique) ve kütle spektrometri (Electron Impact (EI)-ve Fast Atom Bombardment (FAB)-MS) yöntemleridir. Ayrıca, izole edilmiş olan saponozit molekülü, Zürih Federal Teknoloji Enstitüsü Eczacılık Bölümü'nde, iki dimensiyonlu NMR tekniği (HETCOR:Heteronuclear Correlation) ile de incelendi. Saponin ve aglikonunun spesifik çevirme açıları, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Organik Kimya Bölümü'nde ölçüldü. Bu maddelere ait spektrumlar ve yorumları, çalışmanın Bulgular bölümünde yer almaktadır.

II.7.2. UV Spektrofotometrisi ile Yapılan Kantitatif Analizler

Sanicula europaea ekstralarında bulunan rozmarinik asit, kafeik asit gibi hidrokisinnamik türevlerin ve bunlardan kaynaklanan antioksidan aktivitenin kantitatif olarak belirlenmesinde, spektral yöntem⁽¹⁴⁾ kullanıldı.

Hidrokisinnamik türev içeriğinin belirlenmesi için, 0.25 g kuru bitki, 50 ml % 50 (v/v) EtOH ile 1 saat 65 °C'da inkübe edildi. Bitki parçacıkları süzülerek uzaklaştırıldı. Sıvı kısımdan alınan 1 ml örnek, 1 ml 0.5 M HCl, 1 ml Arnov reaktifi (2.35 g NaMoO₄.2H₂O ve 2 g NaNO₂ 20 ml saf suda çözülerek hazırlandı) ve 1 ml 1N NaOH içeren reaksiyon ortamının son hacmi, saf su ile 10 ml'ye tamamlanarak 505 nm'de absorbans ölçüldü. Bu deneyde şahit olarak, 0.1 mg/ml rozmarinik asit kullanıldı. Kuru ağırlık temeline göre % cinsinden hidrokisinnamik türev içeriği, $2D/D_0$ (D:örneğin absorbansı; D₀: şahitin absorbansı) formülünden hesaplandı.

% 50 EtOH ekstresinin antioksidan aktivitesi, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) reaktifi ile, spektrofotometrik olarak saptandı⁽¹⁴⁾. Bu amaçla, 2.5 ml 0.6×10^{-4} M DPPH reaktifine 10 µl ekstre ilave edilerek oda temperaturünde 30 dakika bekletildi. Ayrıca, 2.5 ml reaktife, 10 µl çözücü (EtOH) katılarak kör örnek (Blank) de hazırlandı. 30 dakika sonunda her iki karışımın 517 nm'deki absorbansları ölçüldü. Kör örnek ölçümünde belirlenen absorbans değerinin % 50 düşmesine yol açacak ekstre konsantrasyonu (CE₅₀), hesap yoluyla bulundu ve antioksidan aktivite olarak ifade edildi.

II.8. Antiviral Aktivite Testleri

II.8.1. Bakteriyofaj Plak Testi

Sanicula ekstrelerinin antifaj aktivitelerini belirlemek için, daha önce geliştirilmiş aktivite testinde ^(48,49) önerildiği gibi, *Escherichia coli* B2 bakteri kültürü ile, bu suşu infekte etme yeteneğine sahip bakteriyofaj T2hr⁺ kullanıldı. Saf *Escherichia coli* kültürünün hazırlanması için, stok bakteri önce % 3 (m/v) NB (Nutrient Broth) içeren sıvı besiyerinde süspansiyon edildi. Bu süspansiyondan bir öze bakteri alınarak, % 1.5 (m/v) agarlı NB katı besiyerine tek koloni verecek şekilde, seyreltme yöntemi ile ekildi. Tek bir koloniden iğne ile alınan bakteriler NB besiyerine aktararak, çalkalayıcı etüvde (37 °C ve 120 devir/dakika) bir gece inkübe edildi. Bütün deneylerde, bu yolla hazırlanmış bir gecelik kültürler kullanıldı. İnfektif faj sayısı, çift katlı agar yöntemi ile belirlendi. Uygun sulandırılarda NB besiyerinde süspansiyon edilmiş faj, belli miktarda sıvı bakteri kültürü ile birlikte, eritilmiş yumuşak agar besiyerinde (% 0.7 [m/v] agarlı NB) karıştırıldı ve % 1.5 (m/v) agarlı NB besiyeri içeren petrilere döküldü. Yumuşak agar donduktan sonra petrilere ters çevrilerek 37 °C'da bir gece inkübe edildi. Besiyeri üzerinde infekte bakterilerin parçalanması sonucu oluşan ve **plak** adı verilen saydam alanlar sayıldı. Ekstrelerin faj üzerinde virüsidal etki gösterip göstermediğini belirlemek üzere, ekstre ile muamele edilen fajın oluşturduğu plak sayısı, ekstre ile işlem görmemiş (kontrol grubu) fajın oluşturduğu plak sayısı ile karşılaştırıldı. Faj sayısında, dolayısıyla plak sayısında azalmaya yol açan

ekstreler, **aktif** olarak kabul edildi. Antifaj aktivitesi araştırılan tüm ekstreler, son konsantrasyonları 1 mg/ml olacak şekilde hazırlandı ve her bir ekstrenin antifaj aktivitesi, aşağıda formülü verilen **% inhibisyon** oranı ile ifade edildi.

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 \times P_0 - P / P_0$$

P = Deney grubu plak sayısı

P₀ = Kontrol grubu plak sayısı

II.8.2. Bitkisel Virüs Üzerindeki Etkinin Araştırılması

Bitkisel virüs üzerindeki antiviral aktivitenin araştırılması için kullanılan sistem, tütün-tütün mozaik virüsü sistemidir. Bu sistemde yer alan tütün bitkilerinin yetiştirilmesinde, bitki doku kültürü yönteminden⁽⁵⁵⁾ faydalanıldı. Bu amaçla, tütün (*Nicotiana tabacum* Samsun-Maden) tohumları 0.5 mg/l 2,4-diklorofenoksiasetik asit (2,4-D) içeren Murashige-Skoog (MS) besiyerinde çimlendirildi. MS besiyeri (pH 5.4), 30 g/l sukroz, 10 g/l agar, 1 mg/l MS vitamin, 4.2 g/l MS tuz karışımından oluşmaktadır. Steril ortamda ve standart doku kültürü koşullarında çimlenen tohumlar, kök oluşumu için taze MS besiyerine aktarıldı. Yeterli oranda kök oluşumu gözlenen bitkicikler, steril olmayan koşullara adaptasyonlarını kolaylaştırmak üzere perlite aktarıldı. Bir süre sonra, torf toprağına alınan bitkiler üzerinde virüs deneyleri gerçekleştirildi. Virüs inokülasyonu, deneyin çeşitli aşamalarında bitkinin en genç iki yaprağının

karborandum ile çizilmesi ve virüs süspansiyonunun bu yapraklara sürülmesi şeklinde yapıldı. Antiviral etkisi araştırılacak ekstre ise iki şekilde uygulandı:

1. Yapraklar üzerine sürerek;
2. Tüm bitki üzerine püskürterek.

Birinci yöntemde, 50 mg/ml, 5 mg/ml ve 500 µg/ml olmak üzere üç farklı ekstre konsantrasyonu denendi. İkinci yöntemde ise, tüm bitki üzerine püskürtülen ekstre konsantrasyonları 5 mg/ml, 500 µg/ml ve 50 µg/ml olacak şekilde ayarlandı. Her iki tip uygulama için de, üç farklı strateji izlendi:

- a. Ekstre ile virüs birlikte uygulandı;
- b. Önce ekstre uygulandı, bir gün sonra virüs enfeksiyonu yapıldı;
- c. Ekstre uygulamasından bir hafta sonra virüs enfeksiyonu yapıldı.

Bitkilerin bir kısmı, ekstrenin virüs enfeksiyonu üzerindeki etkisini kontrol amacıyla, sadece virüs ile muamele edilirken, bir kısmı da enfeksiyonu kontrol amacıyla, infekte bitkilerden tamamen ayrı bir ortamda, sağlıklı bir şekilde yetiştirildi.

II.8.3. HIV - Revers Transkriptaz Testi

Sanicula europaea L.'den hazırlanmış ekstrelerin hayvansal virüsler üzerindeki etkisini incelemek için yapılan deneyler, Chicago Illinois Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Bölümü'nden, Prof. Dr. John Pezzuto ve Prof. Dr. Geoffrey Cordell ile kurulan "Bilimsel Araştırmalarda Uluslararası İşbirliği Programı" çerçevesinde gerçekleştirildi. Bu amaçla, HIV-RT (Human Immunodeficiency Virus-Reverse Transcriptase) testi ⁽⁵⁶⁾ kullanıldı.

Bu testte, 50 mM Tris.HCl (pH 8) tamponu, 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 2.5 µg/ml BSA, 41µM poli(rA) $\{ \in 260 \text{ (mM)}=7.8 \}$, 9.5 µM oligo (dT) $\{ \in 260 \text{ (mM)}=5.6 \}$, 20 µM TTP ve 0.5 µCi (³H)TTP içeren reaksiyon ortamına, 10 µl HIV-1 (p66/p51) revers transkriptaz enzimi ilave edilerek 1 saat, 37 °C'da inkübe edildi. Bu süre sonunda ortama 25 µl 0.1 M EGTA eklendi ve reaksiyon kabı buza oturtularak reaksiyon durduruldu. Karışım, 2.5 cm DE-81 (Whatman) filtre kağıdından hazırlanmış disklere üniform şekilde damlatılarak oda temperaturünde 15 dakika bekletildi. Daha sonra dört kez % 5 (m/v) Na₂HPO₄ . 7H₂O ile ve iki kez distile su ile yıkandı. Kurutulan filtre kağıtları likit sintilasyon cihazına yerleştirilerek radyoaktif sayım yapıldı. Enzim inhibisyonunu test etmek için DMSO içinde hazırlanmış bitki ekstreleri enzim ilavesinden hemen önce reaksiyon ortamına ilave edildi. Bir ekstre için en az 5 farklı konsantrasyon denendi. İnhibisyona yol açan ortalama konsantrasyon (IC₅₀), ekstre konsantrasyonu ile enzim aktivitesi arasındaki lineer regresyon bağıntısından yararlanılarak hesaplandı.

III. BULGULAR

III.1. Ekstreler

Sanicula europaea L. bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanmış ekstrere ve miktarları Tablo 3' de özetlenmektedir.

Tablo 3. *Sanicula europaea*'dan hazırlanmış ekstrere.

| Ekstre adı | Bitki (ağırlık), ekstraksiyon sıvısı (hacim) | Miktar |
|----------------------------|---|---------|
| CHCl ₃ ekstresi | Kuru bitki (750 g), CHCl ₃ (5 l) | 10.38 g |
| %96 EtOH ekstresi | Kuru bitki (750 g), % 96 EtOH (5 l) | 5.20 g |
| Protein ekstresi | Taze bitki (25 g), fosfat tamponu (150 ml) | 1 g |
| %70 EtOH ekstresi | Kuru bitki (5 g), % 70 EtOH (250 ml) | 0.1 g |
| %50 EtOH ekstresi | Kuru bitki (940 g), % 50 EtOH (6 l) | 123 g |

Tablo 3'de görülen ilk iki ekstre oda temperaturünde maserasyon yöntemi ile, protein ekstresi 4 °C'da homojenizasyonla, % 70 EtOH ekstresi Soxhlet cihazında ve % 50 EtOH ekstresi su banyosunda (65 °C) hazırlandı.

III.2. Ayırma ve Saflaştırma

III.2.1. Kromatografik Ayırmlar

III.2.1.1. Kolon Kromatografisi

Poliklar Kolon Kromatografisi: % 50 EtOH ekstresinin poliklar kolonda fraksiyonlandırılması ile 7 ayrı fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlar ve toplandıkları elüsyon çözeltileri aşağıda verilmektedir:

| Fraksiyon no. | Elüsyon çözeltisi (v/v) |
|---------------|-------------------------|
| 1 | Saf H ₂ O |
| 2 | % 10 MeOH |
| 3 | % 30 MeOH |
| 4 | % 50 MeOH |
| 5 | % 70 MeOH |
| 6 | Saf MeOH |
| 7 | Saf Me ₂ CO |

Bu fraksiyonların anti-HIV aktiviteleri (Tablo 14), HIV-RT testi ile araştırıldı ve aktif fraksiyonlar, orta basınçlı likit kromatografi tekniği kullanılarak ileri derecede saflaştırıldı.

Orta Basıncılı Likit Kromatografisi: Poliklar kolondan alınmış ve HIV-RT testinde aktif oldukları saptanmış 3,4,5 no.lu fraksiyonlar, bu kolona yüklendi. Fraksiyonlar ve elüsyonda kullanılan MeOH % leri aşağıda görülmektedir:

| Fraksiyon no. | Elüsyonda kullanılan MeOH % si (v/v) |
|---------------|--------------------------------------|
| 1-14 | % 50 |
| 15-34 | % 55 |
| 35-70 | % 60 |
| 71-84 | % 65 |
| 85-94 | % 70 |
| 95-111 | % 80 |
| 112-120 | Saf MeOH |

Orta basınçlı likit kromatografi kolonunda ayrılan yaklaşık 650 mg karışımdan, toplam 76 mg saf saponin glikoziti izole edildi.

Ters Faz-Vakum Likit Kromatografisi: Dolgu maddesi olarak RP-18'in kullanıldığı bu kolona vakum uygulanması, ayırma işlemini çabuklaştırdı. Toplanan her bir fraksiyon, İTK ile incelendiğinde birden fazla leke ortaya koydu. Dolayısıyla bu kolondan saf madde elde edilemedi. Ancak, metanol ile elüe olan 3 no.lu fraksiyonun saponin karışımı olduğu belirlendi ve bu fraksiyon

silikajel kolonda daha ileri derecede saflaştırıldı. Ters faz dolgu maddesi ile paketlenmiş kolondan alınan fraksiyonlar aşağıdaki gibidir:

| Fraksiyon no. | Elüsyon çözeltisi |
|---------------|-----------------------|
| 1 | Saf H ₂ O |
| 2 | % 30 (v/v) MeOH |
| 3 | Saf MeOH |
| 4 | Saf CHCl ₃ |

Silikajel Kolon Kromatografisi: Bu yöntem, ters faz kolon kromatografisi ile elde edilen ve saponin içeren 3 no.lu fraksiyonun saflaştırılmasında kullanıldı. Değişik oranlarda hazırlanmış CHCl₃: MeOH: H₂O sisteminin kolondan geçirilmesiyle ayrılan fraksiyonlar aşağıda görülmektedir:

| Fraksiyonlar | Elüent oranları (v:v:v) |
|--------------|-------------------------|
| 1, 2 | 80 : 20 : 2 |
| 3, 4 | 70 : 30 : 3 |
| 5-15 | 60 : 40 : 4 |
| 16 | Saf MeOH |

Silikajel kolondan toplanan fraksiyonların İTK ile incelenmeleri sonucunda 6-8 no.lu fraksiyonlarda ayrılan saponin, içerdiği az miktardaki safsızlıklardan temizlenmek amacıyla bir kez daha silikajel kolondan geçirildi.

Bu işlem sırasında tek bir elüsyon çözeltisi ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ [80:20:2, v/v]) kullanıldı. Bu ayırma işlemi ile, kolona uygulanan 1.5 g saponin karışımından 200 mg saf saponin glikoziti (**Sanikulozit N**) izole edildi.

III.2.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi

Ayırma ve saflaştırma işlemlerinin her aşamasında İTK yönteminden yararlanıldı.

Sülfirik asit belirteci plağa püskürtüldüğünde saponinler ve sapogeninler, keskin hatlar şeklinde pembe-kahverengi lekelerle dönüştü. Reaktif püskürtülmüş plak, birkaç dakika $120\text{ }^\circ\text{C}$ ' da bırakıldığında, saponinlerin ve sapogeninlerin bulunduğu bölgeler, 366 nm 'de parlak kırmızı lekeler verecek şekilde yandı. Diğer birçok bileşik de bu belirteç ile kahverengi tonlarında lekeler oluşturdu.

Serik sülfat belirtecinin püskürtüldüğü plaklar, $120\text{ }^\circ\text{C}$ ' da 5 dakika bekletildiğinde, çoğunlukla kahverengi tonlarında lekelerin oluştuğu, fenol içeren karboksilli asitlerin ise pembe-kahverengi yandığı gözlemlendi.

Demir (III) klorür reaktifinin, rozmarinik ve kaffeik asit ile çok belirgin gri lekeler oluşturduğu belirlendi.

Saponozitlerin karbohidrat bileşenini belirlemeye yönelik asit hidroliz deneyinden sonra, şekerlerin bulunduğu İTK plağı, anisaldehit belirteci ile muamele edildi ve $120\text{ }^\circ\text{C}$ 'da, 5 dakika bekletildi. Bu belirtecin, glukuronik asit ile kahverengi, glukoz ile gri-mavi ve arabinoz ile sarımsı yeşil renk ortaya koyduğu belirlendi.

Bu çalışmada izole edilen maddelerin İTK ile belirlenmesinde kullanılan mobil fazlar ve belirteçler, Tablo 4' de toplu halde görülmektedir.

Tablo 4. *Sanicula europaea* bitkisinden değişik yöntemlerle elde edilmiş olan bileşiklerin İTK analizleri. [A]: CHCl₃-MeOH-H₂O (61:32:7, v/v); [B]: Toluen-EtOAc-AcOH (4:5:2, v/v); [C]: EtOAc ; [D]: CHCl₃-MeOH-H₂O (65:30:10, v/v) + %10 (v/v) MeOH . (+) : kullanıldı ; (-) : kullanılmadı. Ar-COOH: Aromatik karboksilli asit (rozmarinik ve kaffeik asit). k.p.:kahverengi-pembe; k.:kahverengi; g.k.:gri-kahverengi; g.m.:gri-mavi ; s.y.:sarımsı yeşil .

| Bileşik tipi | Mobil faz | Belirteçler ve madde ile oluşturdukları renkler | | | |
|--------------|-----------|---|-----------------------------------|-------------------|-----------------|
| | | H ₂ SO ₄ | Ce(SO ₄) ₂ | FeCl ₃ | Anisaldehit |
| Saponin | [A] | (+) k.p. | (+) k. | (-) | (-) |
| Sapogenin | [A] , [C] | (+) k.p. | (+) k. | (-) | (-) |
| Şeker | [D] | (-) | (+) k.p. | (-) | (+)k.,g.m.,s.y. |
| Ar-COOH | [A] , [B] | (+) k. | (+) g.k. | (+) g. | (-) |

III.2.2. Çöktürme ve Preparatif Tabaka Kromatografisi

% 50 EtOH ekstresindeki saponinler, flavonoidler, bazı fenolik bileşikler ve yağlar, çöktürme yöntemiyle uzaklaştırıldıktan sonra eter ve etil asetat fazlarına çekilen aromatik karboksilli asitler, preparatif tabaka kromatografisi ile saflaştırıldı ve izole edilen asitlerin **rozmarinik asit** ve **kaffeik asit** oldukları standart maddelerle karşılaştırılarak belirlendi.

Toluen-EtOAc-AcOH (4:5:2, v/v) sisteminde rozmarinik asitin R_f değeri 0.49 ve kaffeik asitin R_f değeri 0.72 olarak bulundu.

III.2.3. Kimyasal Yöntemler

Sanicula' dan izole edilen saponin glikoziti (Sanikulozit N)' nin bir kısmı asidik ve enzimatik hidrolize uğratılarak aglikon ve şeker kısımları birbirinden ayrıldı.

Aglikon ve şeker kısımlarının ayrılmasında, her iki yöntemde de başarı kaydedildi. Enzimatik hidrolize göre daha kolay uygulanan asit hidroliz sonunda elde edilen sapogenin (**Sanikulagenin N**), çeşitli spektral yöntemlerle analiz edildi.

Glikozitteki şekerlerin belirlenmesinde, silikajel plak üzerinde gerçekleştirilen asit hidroliz tekniği kullanıldı. Derişik HCl buharlarına tutularak hidrolize uğratılan glikozitin yapısındaki şekerlerle, aynı plakta glikozitin yanına uygulanmış referans şekerlerin ince tabaka kromatografisinde oluşturduğu bantlar (Şekil 4) incelendi ve glikozitte arabinoz, glukoz ve glukuronik asit bulunduğu belirlendi. Sanikulozit N'nin iki dimensiyonlu NMR spektrumu (Şekil 10) da bu bulguyu desteklemektedir.



Şekil 4. Sanikulozit N'nin silikajel plak üzerinde asit hidrolize uğratılarak referans şekerlerle karşılaştırılması. Glu: glukoz ; Ara: arabinoz ; Glu.a: Glukuronik asit .

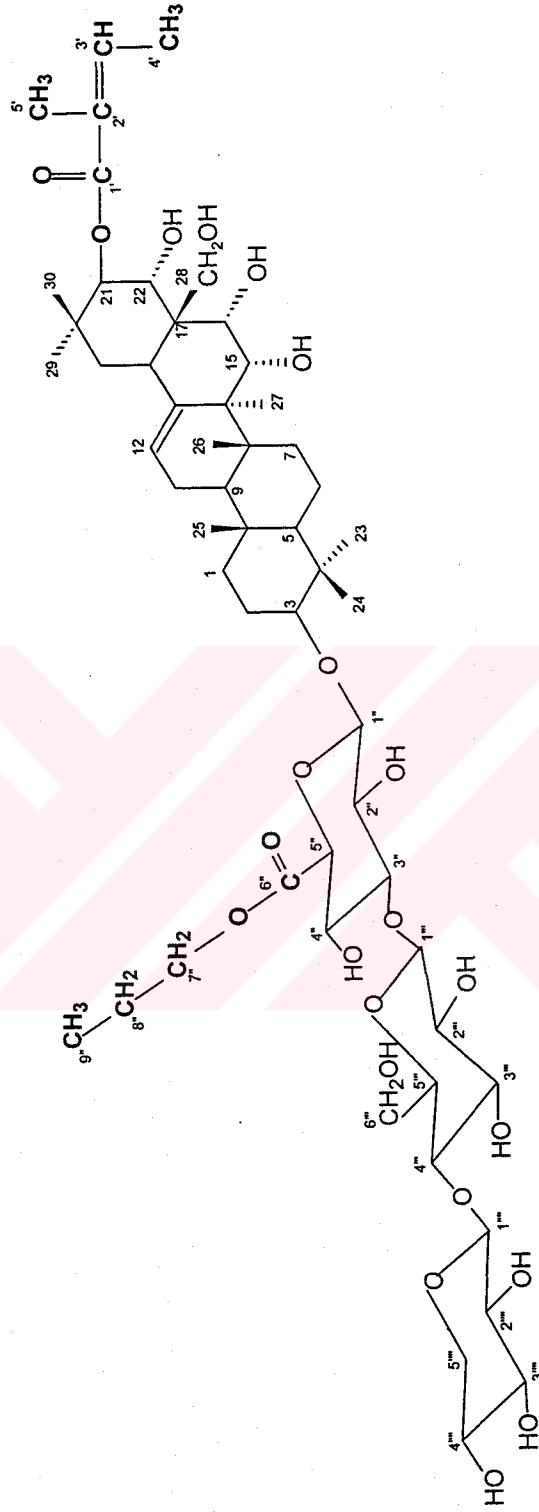
III.3. Spektral Analiz

Sanicula europaea L. bitkisinden değişik yöntemlerle elde edilen saf moleküllerin (Sanikulozit N, Sanikulagenin N, rozmarinik asit ve kaffeik asit) yapılarını ortaya koyan spektral analiz sonuçları aşağıda verilmektedir.

III.3.1. Triterpenik saponin glikoziti (Sanikulozit N)

Bu çalışmada, *Sanicula europaea* L. bitkisinden yeni bir saponin glikoziti (Şek. 5) izole edildi ve yapısı spektral yöntemler ve bazı kimyasal reaksiyonlarla aydınlatıldı.

Bu glikozitin spesifik çevirme açısı $[\alpha]_D^{18} = -89.88$ (% konsantrasyon 0.1, MeOH) olarak bulundu.



Şekil 5. *Sanicula europaea* L.'den izole edilen yeni triterpen glikozit (Sanikulozit N).

Sanikulozit N'nin spektrumlarından elde edilmiş veriler, sayısal olarak şöyle ifade edilebilir:

IR spektrumu (Şekil 6)

| Dalga sayısı ($\bar{\nu}$) | Fonksiyonel grup |
|---|---|
| 3400 cm^{-1} | O—H |
| 2970, 2920, 2880, 2850 cm^{-1} | C—H |
| 1730, 1570 cm^{-1} | $\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{C}=\text{O} \end{array}$ |
| 1410, 1250, 1160 cm^{-1} | C—O |

$^1\text{H-NMR}$ Spektrumu (Şekil 7)

Saponinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda en belirgin şekilde saptanan sinyaller, aglikonun C-3, C-12 ve C-3' atomlarına bağlı protonlar ile şekerlerin anomerik protonlarına ait sinyallerdir. Moleküldeki diğer protonların da, karakteristik ppm aralıklarında kimyasal kayma gösterdikleri belirlenmiştir. Saponinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda belirlenen sinyaller ve etkileşim sabitleri (J değerleri) Tablo 5'de görülmektedir.

Tablo 5. Triterpen saponin (Sanikulozit N)'in ¹H-NMR kimyasal kayma (δ) değerleri (CD₃OD, 200 MHz)

[m: multipler; gs: geniş singler; gkk: geniş kvartet kvartet; d: duplet]

| Aglıkon | | | | | | Şekerler | |
|-----------------|------------------|------------------------|--------------------------|--|----------------------------------|----------|-------------------------|
| H-3 α | H-12 | H-3' (anjelik asit) | CH ₂ O ve CHO | Ester CH ₃ leri ve CH, CH ₂ | 7 x CH ₃ (aglıkon) | | Anomerik Protonlar |
| 3.23 (1H, m) | 5.46 (1H, gs) | 6.06 (1H, gkk) | 3.40 - 4.10 | 1.30 - 2.10 | 0.87 - 1.07 | glu.a. | 5.48 1H, d, J=9 Hz |
| | | | | | | glu | 5.81 1H, d, J=10 Hz |
| | | | | | | ara | 4.94 1H, d, J=7.6 Hz |

¹³C-NMR (APT) Spektrumu (Şekil 8)

Saponinin, ¹³C-NMR spektrumunda belirlenen pikler, Tablo 6'da yer almaktadır.

Tablo 6. Triterpen saponin (Sanikulozit N)'in C-13 kimyasal kayma değerleri (200 MHz, CD₃OD).

| Aglikon | Kimyasal kayma değeri (ppm) |
|---------|-----------------------------|
| C-1 | 37.9 |
| C-2 | 27.0 |
| C-3 | 91.8 |
| C-4 | 37.2 |
| C-5 | 56.8 |
| C-6 | 19.6 |
| C-7 | 40.4 |
| C-8 | 40.4 |
| C-9 | belirlenemedi*. |
| C-10 | 36.5 |
| C-11 | 24.8 |
| C-12 | 127.0 |
| C-13 | 143.6 |

devam edecek

Tablo 6'nin devamı

| Aglikon | Kimyasal kayma değeri (ppm) |
|---------------------|------------------------------------|
| C-14 | 42.3 |
| C-15 | 73.0 |
| C-16 | 77.1 |
| C-17 | belirlenemedi*. |
| C-18 | 42.0** |
| C-19 | belirlenemedi*. |
| C-20 | 30.0** |
| C-21 | 82.1 |
| C-22 | 80.5 |
| C-23 | 29.6 |
| C-24 | 16.3 |
| C-25 | 20.7 |
| C-26 | 17.1 |
| C-27 | 28.5 |
| C-28 | 60.8 |
| C-29 | 29.6 |
| C-30 | 20.9 |
| C-1' (Anjelik asit) | 174.1** |

devam edecek

Tablo 6'nın devamı

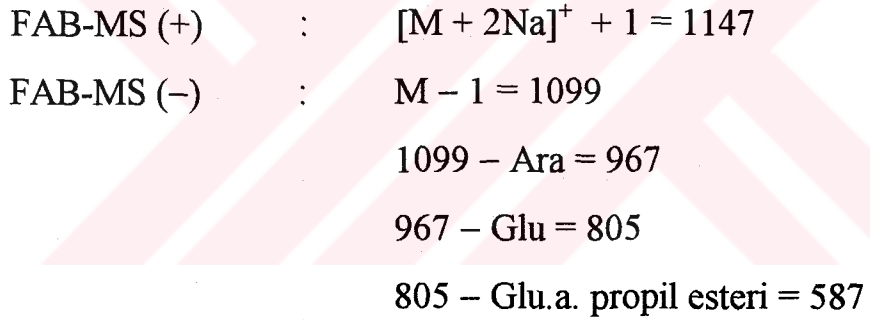
| Aglikon | | Kimyasal kayma değeri (ppm) | | | | |
|---|-------|-----------------------------|----------------|----------------|------|-------|
| C-3'(Anjelic asit) | | 138.0** | | | | |
| Şekerler | C-1 | C-2 | C-3 | C-4 | C-5 | C-6 |
| Glu. a. | 105.4 | 75.0 | <u>86.6***</u> | 70.0 | 76.2 | 156.0 |
| Glu | 104.8 | 74.7 | 78.0 | <u>78.9***</u> | 78.3 | 63.6 |
| Ara | 103.3 | 72.7 | 73.0 | 68.5 | 67.8 | - |
| Propil ester metili (C-9'') | 42.3 | | | | | |
| * : Sinyal, CD ₃ OD pikinin içinde kaldığından belirlenemedi. ** : Bu spektrumda çok belirgin değildir. *** : Bir sonraki şekere bağlanma noktası. | | | | | | |

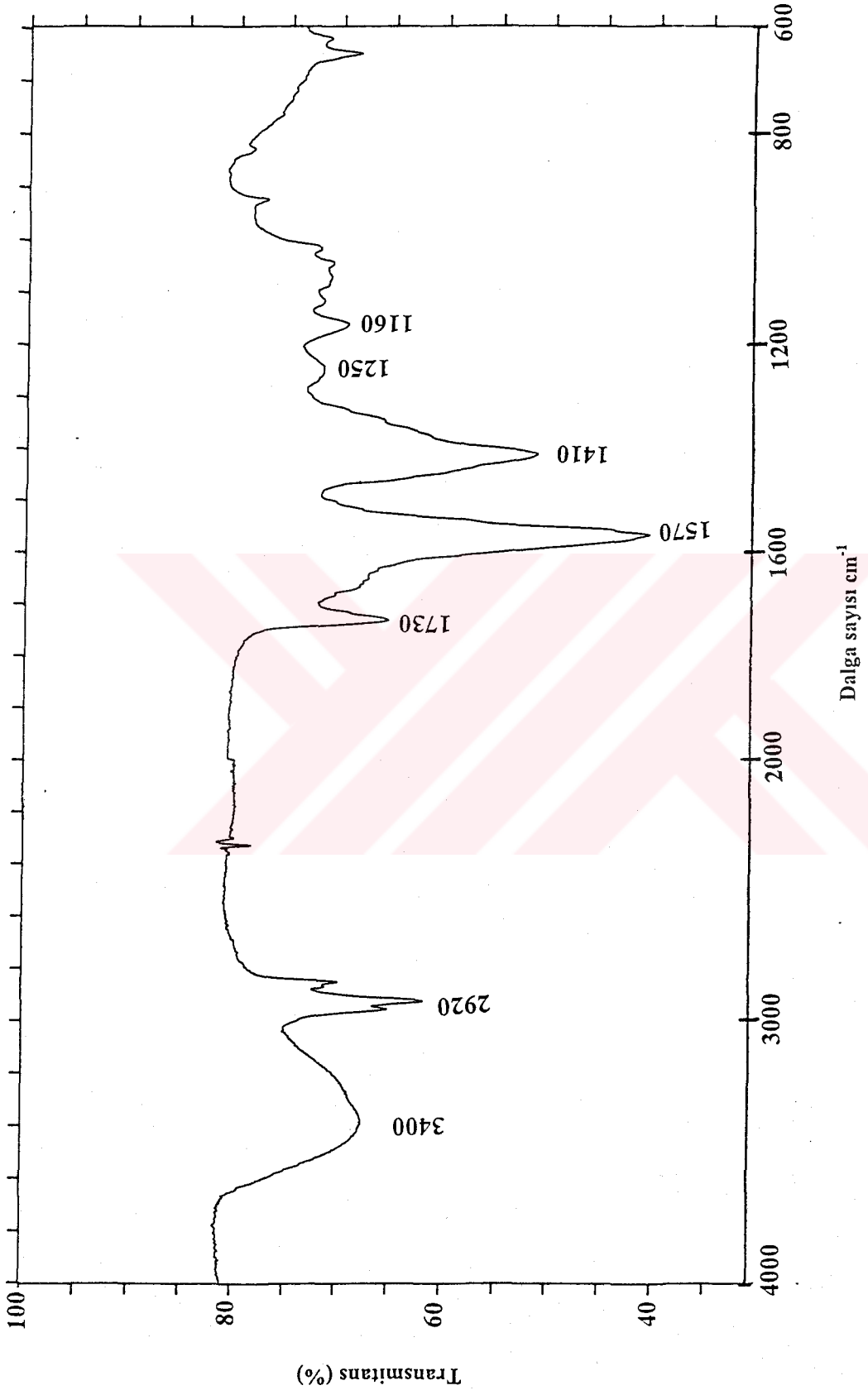
Heteronükleer Korelasyon (HETCOR) Spektrumu (Şekil 9)

Sanikulozit N'nin yapısındaki şekerler (arabinoz, glukoz ve glukuronik asite ait anomerik protonlar) bu spektrumda net olarak görüldü. Ayrıca bu spektrumda gözlenen etkileşim izleri, diğer spektrumların ortaya koyduğu verileri destekledi.

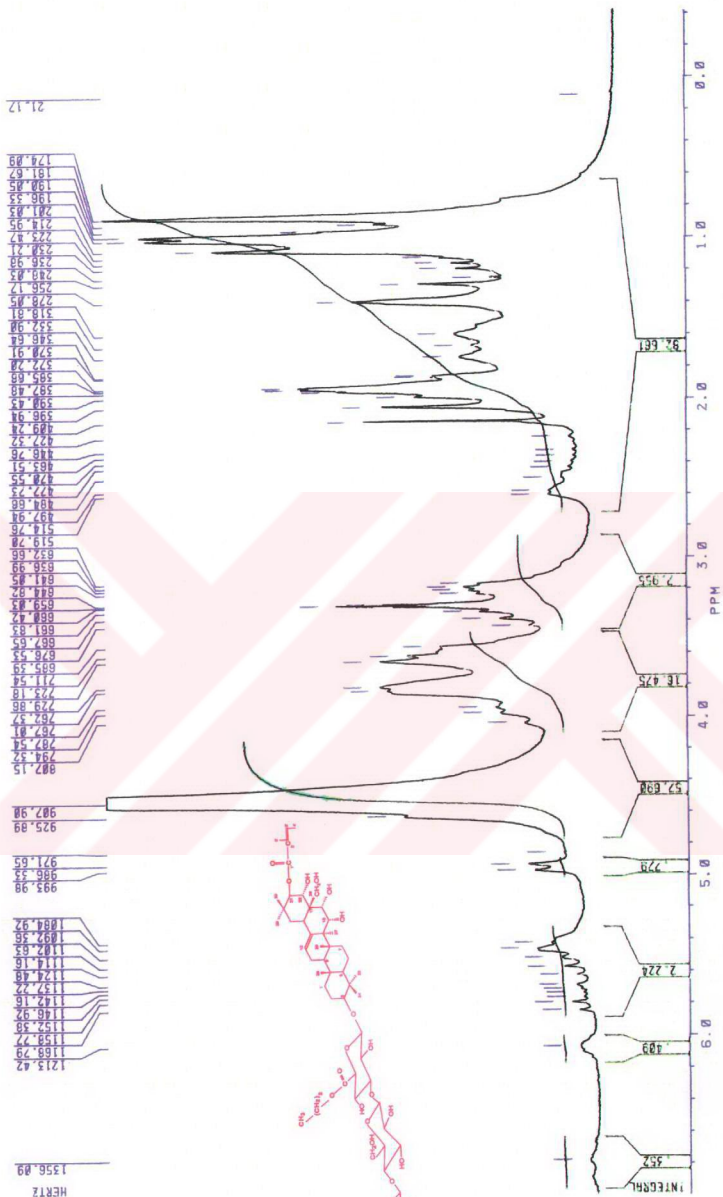
Kütle spektrumu (Şekil 10)

Sanikulozit N' nin kütlesi m/z 1100 $[M^+]$ $[C_{55}H_{88}O_{22}]$ dir. Kütle spektrumları negatif iyon FAB-MS [FAB-MS (-)] ve pozitif iyon FAB-MS [FAB-MS (+)] (Fast Atomic Bombardment - Mass Spectrometry) teknikleriyle alınmıştır.

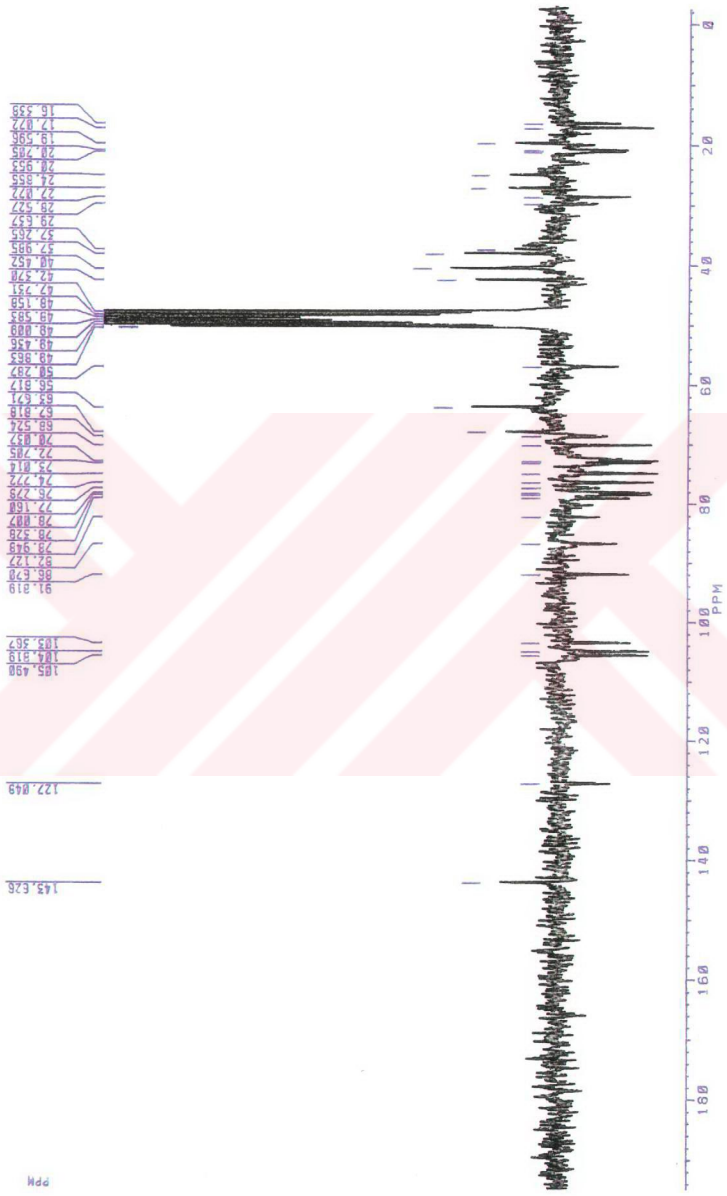




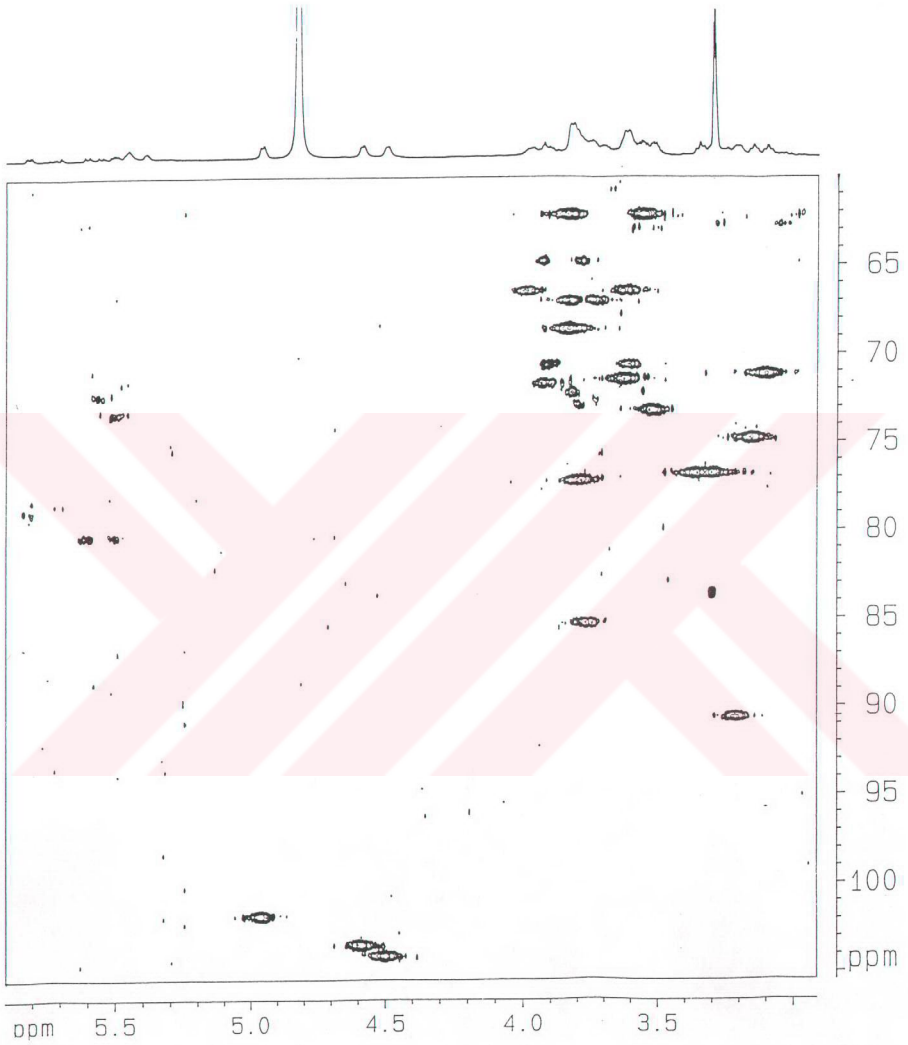
Şekil 6. Sanikulozit N' nin IR spektrumu (KBr tablet).



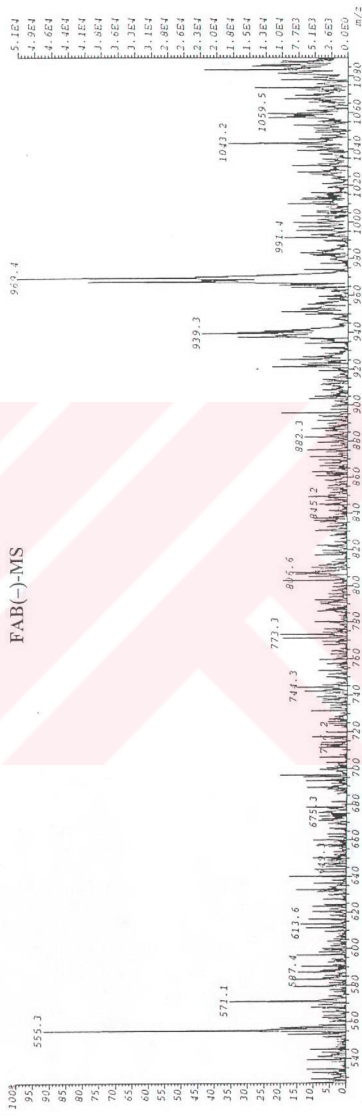
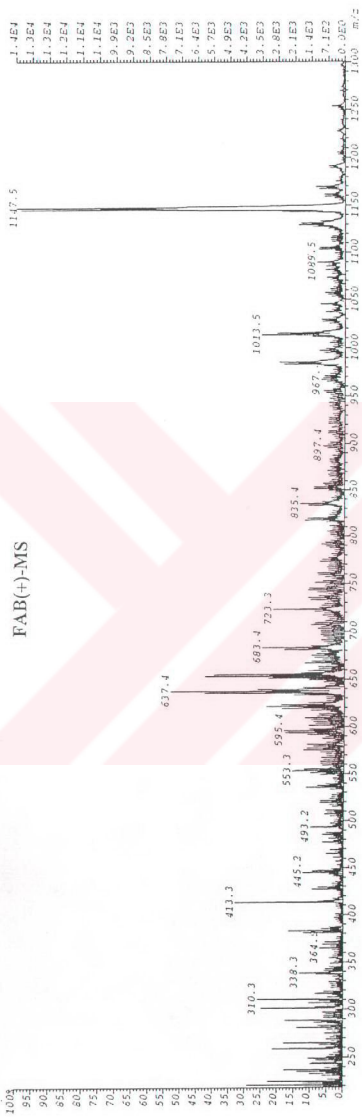
Şekil 7. Samikulozit N' nin ¹H-NMR spektrumu (200 MHz, CD₃OD).



Şekil 8. Samukozit N' nin ¹³C-NMR (APT) spektrumu (200 MHz, CD₃OD).



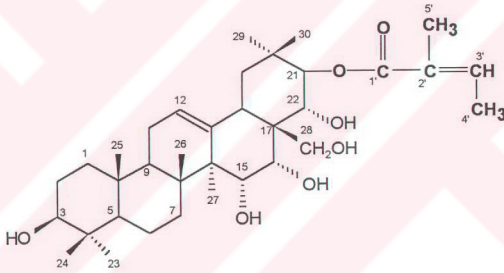
Şekil 9. Sanikulozit N⁷ nin iki dimensiyonlu (HETCOR) spektrumu (600 MHz, CD₃OD).



Şekil 10. Samikulozit N' nin FAB(+) ve FAB(-) kütle spektrumları.

III.3.2. Triterpenik Saponin Aglikonu (Sanikulagenin N)

Sanicula europaea L. bitkisinden izole edilen saponinin asidik hidrolizi sonucu ele geçen ve spesifik çevirme açısı $[\alpha]_D^{18} = + 26.96$ (% konsantrasyon 0.25 , MeOH) olarak bulunan aglikon (Sanikulagenin N), Şekil 11’de yer almaktadır.



Şekil 11. *Sanicula europaea* L.'den izole edilen saponinin aglikonu (Sanikulagenin N).

Sanikulagenin N'nin yapısının aydınlatılmasında kullanılan detaylı spektral analizlere ait yorumlar aşağıda yer almaktadır.

¹H-NMR Spektrumu (Şekil 12)

¹H-NMR spektrumunun sayısal yorumu Tablo 7'de gösterilmektedir.

Tablo 7. Triterpen saponin aglikonunun (Sanikulagenin N'nin) ¹H-NMR kimyasal kayma (δ) değerleri [CDCl₃, 200 MHz].

| Aglikon protonları | Kimyasal kayma değerleri (ppm) |
|--------------------|--------------------------------|
| H - 3 | 3.22, dd *, J(Hz): 3,2=3,2'=6 |
| H-12 | 5.37, gs* |
| H-15 | 4.31, gs |
| H-16 | 4.04, gd*, J(Hz): 15,16= 4 |
| H-21 | 5.40, d, J(Hz): 21,22=10 |
| H-22 | 3.92, d, J(Hz): 21,22=10 |
| H-23 | 0.79, 3H, s* |
| H-24 | 0.90, 3H, s |
| H-25 | 0.94, 3H, s |
| H-26 | 0.96, 3H, s |
| H-27 | 1.34, 3H, s |
| H-28 | 3.54, d, J(Hz): 28,28'=12 |
| H-28' | 3.31, d, J(Hz): 28,28'=12 |
| H-29 | 1.00, s |
| H-30 | 1.00, s |

devam edecek

Tablo 7'nin devamı

| Ester protonları | Kimyasal kayma değerleri (ppm) |
|-------------------------|--|
| H-3' | 6.12, k*, J(Hz):3',4'=7 ve J(Hz):3',5'=1.5 |
| H-4' | 1.83, gd, J(Hz):4',3'=7 |
| H-5' | 1.72, gs |

* dd: duplet duplet; gs: geniş singlet; gd: geniş duplet; d: duplet; s: singlet; k: kuartet

Spin-Decoupling ¹H-NMR Spektrumu (Şekil 13)

Aglıkondaki protonların yerlerini ve birbirleriyle etkileşimlerini saptamak amacıyla, ¹H-NMR spektrumunda spin eşleşmelerinin giderilmesine dayalı proton ışınlama (spin-decoupling) tekniğinde elde edilen bulgular (Tablo 8), geminal etkileşimde bulunan protonlara ait dupletlerin, birbirlerinden etkilenerek singlete dönüştüklerini ortaya koymaktadır.

¹³C-NMR Spektrumu (Şekil 14)

Sanikulagenin N' nin ¹³C-NMR spektrumunda belirlenen pikler ve kimyasal kayma değerleri Tablo 9'da görülmektedir.

Tablo 8. Triterpen saponin aglikonu (Sanikulagenin N)' nun spin-decoupling NMR spektrumunda ışınlanan pikler ve spin etkileşimleri.

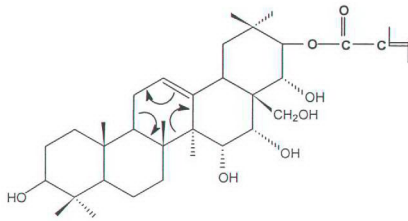
| Işınlanan pik | Etkilenen pik(ler) |
|--|--|
| 6.12, H-3', (1) | 1.83, H-4', gd*, 7 Hz 1.72, H-5', gs* |
| 5.40, H-21, (2) | 3.22, H-22, d*, 10 Hz |
| 3.92, H-22, (3) | 5.40, H-21, d, 10 Hz |
| 3.54, H-28, (4) | 3.31, H-28', d, 12 Hz |
| 3.31, H-28', (5) | 3.54, H-28, d, 12 Hz |
| 1.83, H-4', (6) | 6.12, H-3', k* 7 ve 1.5 Hz |
| * gd: geniş duplet ; gs: geniş singlet ; d: duplet ; k: kuartet. | |

Tablo 9. Triterpen saponin aglikonu (Sanikulagenin N)'nun C-13 APT kimyasal kayma değerleri (CDCl₃, 200 MHz).

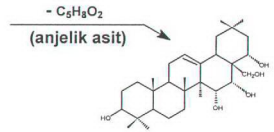
| Aglikon | Kimyasal kayma değeri (ppm) |
|----------------|------------------------------------|
| C-12 | 125.6 (-) |
| C-13 | 142.4 (+) |
| C-16 | 71.2 (-) |
| C-21 | 80.7 (-) |
| C-22 | 79.0 (-) |
| C-28 | 67.0 (+) |
| C-3' | 138.0 (-) |

Kütle Spektromu (Şekil 15)

Sanikulagenin N'nin EI (Electron Impact) tekniği ile çekilmiş kütle spektrumunda (Şekil 15) elde edilen parçalanma ürünleri aşağıda verilmektedir.



m/z : 589 (C₃₅H₅₅O₇)



m/z : 488

↓ - H₂O

m/z : 470

↓ - H₂O

m/z : 452

↓ - CH₂OH

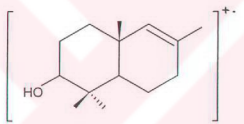
m/z : 422

↓ - H₂O

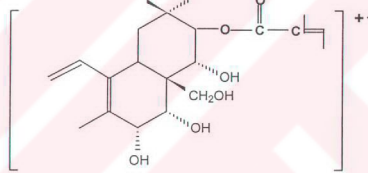
m/z : 404

↓ - H₂O

m/z : 368



a



b

a ve b : Retro Diels-Alder Fragmentleri

a - H⁺, m/z : 207 (C₁₄H₂₄O)

↓ - H₂O

m/z : 189

b, m/z : 380 (C₂₁H₃₂O₆)

↓ - H₂O

m/z : 362

↓ - C₅H₉O₂
(anjelik asit)

m/z : 280

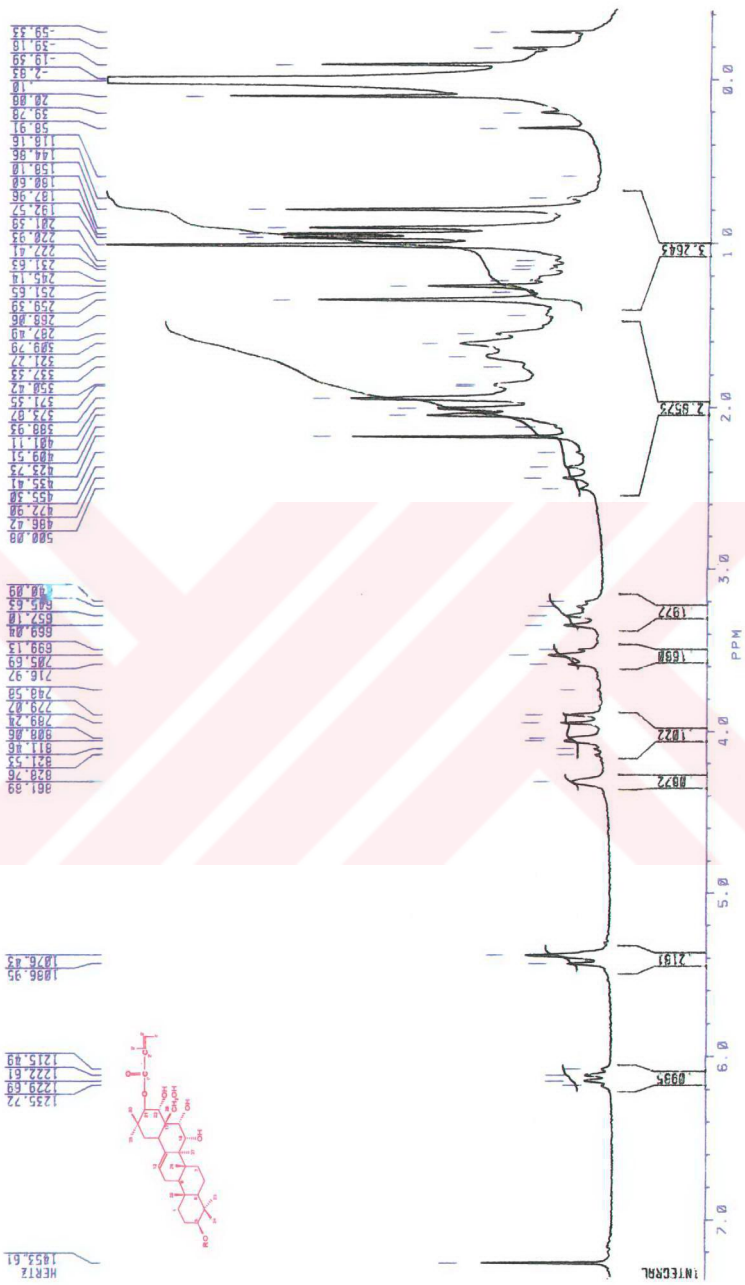
↓ - H₂O

m/z : 262

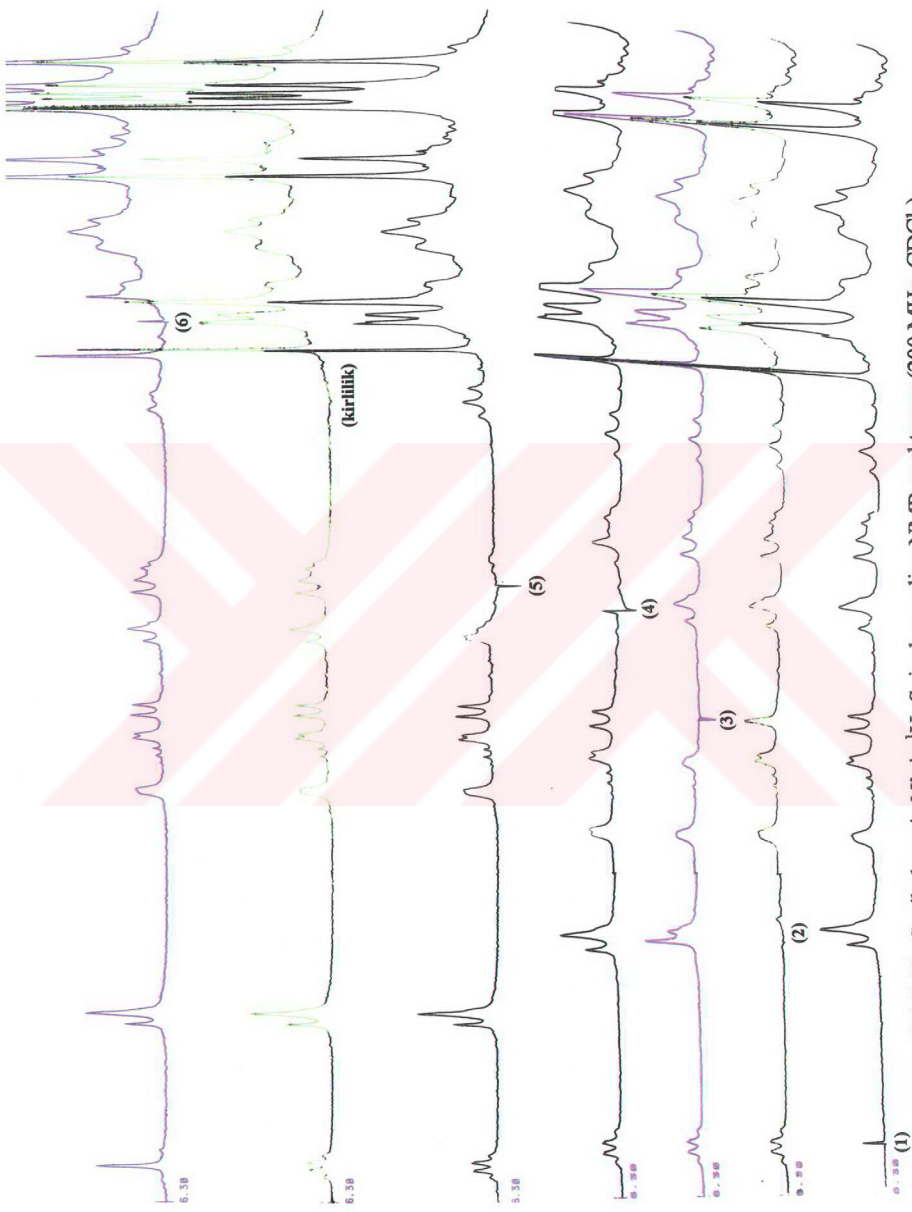
↓ - CH₂OH → m/z : 249

↓ - H₂O

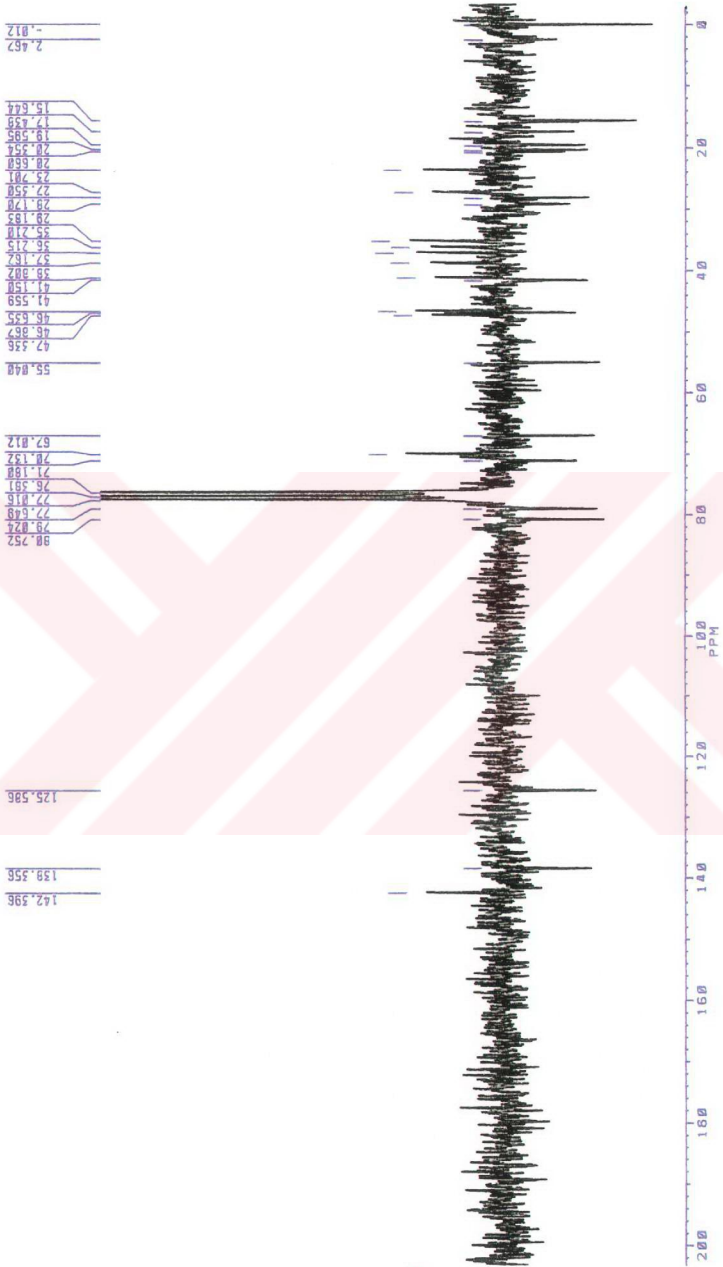
m/z : 231



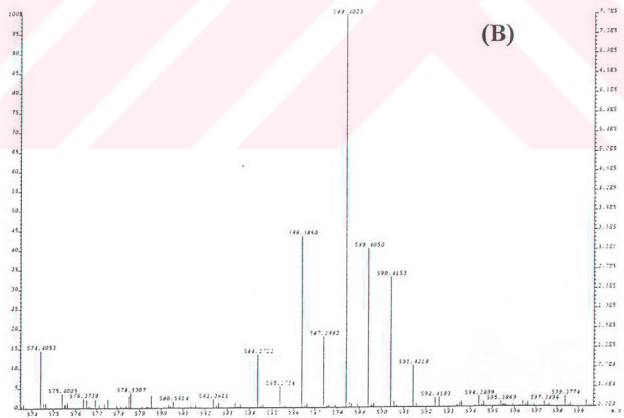
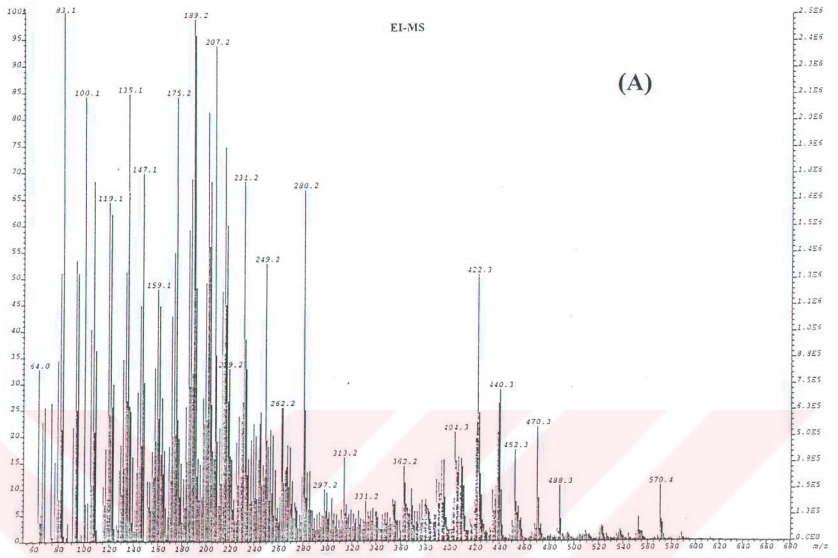
Şekil 12. Sanikulagenin N' nin ¹H-NMR spektrumu (200 MHz, CDCl₃).



Şekil 13. Sanikulagenin N'nin ¹H-Spin decoupling NMR spektrumu (200 MHz, CDCl₃).



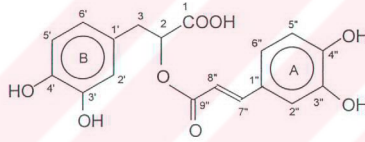
Şekil 14. Sanikulagenin N⁷'nin ¹³C-NMR spektrumu (200 MHz, CDCl₃).



Şekil 15. (A). Sanikulagenin N' nin kütle spektrumu. (B). Bu spektrumda m/z: 574-599 arasındaki piklerin yüksek çözünürlümlü (high resolution) görünümü.

III.3.3. Rozmarinik Asit

Bu çalışmada *Sanicula europaea* L.'den izole edilen rozmarinik asit (Şekil 16), bilinen bir madde olduğundan ayrıntılı spektral analizleri yapılmadı. İTK yönteminde standart madde ile karşılaştırılarak belirlenen rozmarinik asitin ¹H-NMR spektrumu (Şekil 17) çekildi.



Şekil 16. Rozmarinik asit.

¹H-NMR Spektrumu (Şekil 17)

Rozmarinik asitin ¹H-NMR spektrumunda belirlenen pikler aşağıda yorumlanmaktadır (Tablo 10).

Tablo 10. Rozmarinik asitin ^1H -NMR kimyasal kayma (δ) değerleri (200 MHz, d_5 -piridin).

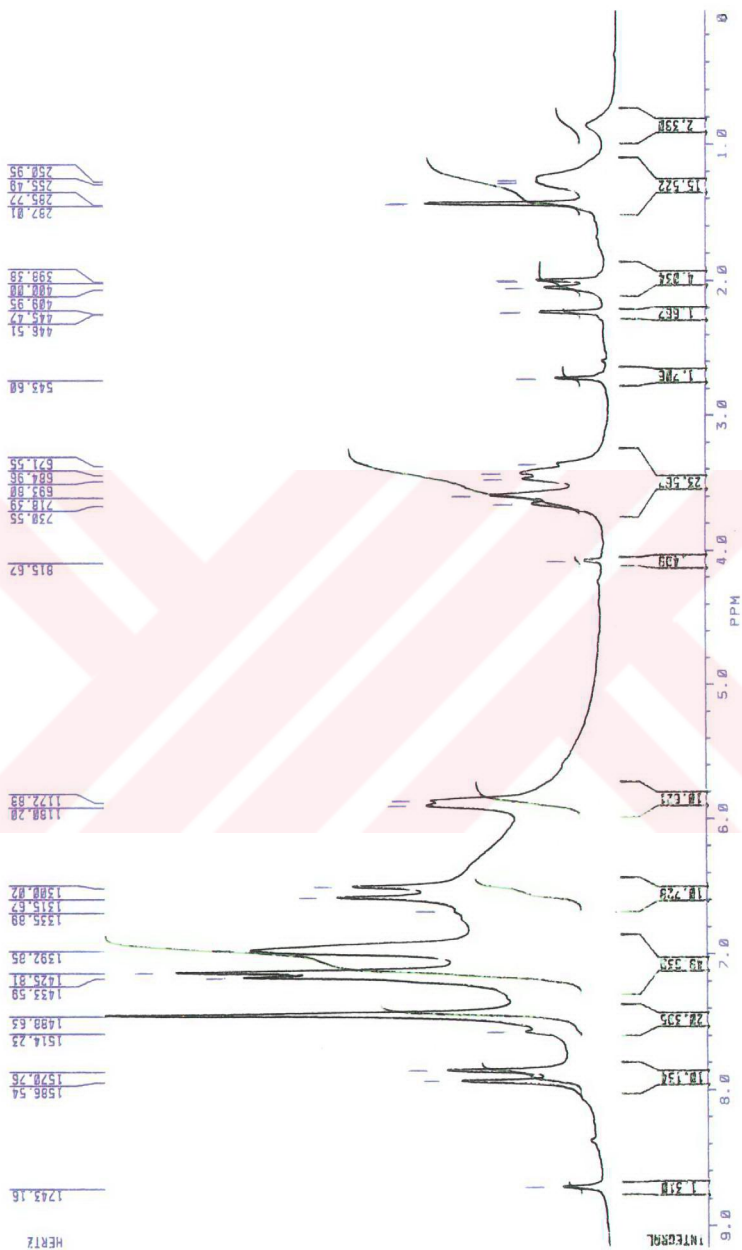
| Protonlar | Kimyasal kayma değeri (ppm) |
|---|-----------------------------|
| H-5' | 7.14, d*, J(Hz)=8 |
| H-7'' | 7.80, d, J(Hz)=15 |
| H-8'' | 6.61; d, J(Hz)=15 |
| H-2 | 5.87** |
| H-3 α ve H-3 β | 3.65-3.35** |
| H-2'' | 7.43** |
| H-6' | 6.61** |
| * d: duplet ** Yarılmalar gözlenmedi. | |

^{13}C -NMR Spektrumu

Rozmarinik asitin ^{13}C -NMR' da ortaya koyduğu kimyasal kaymalar, daha önce belirlenmiş olup (⁵⁷), sayısal veriler Tablo 11' de yer almaktadır.

Tablo 11. Rozmarinik asitin C-13 kimyasal kaymaları⁽⁵⁷⁾
(D₂O, 15.1 MHz)

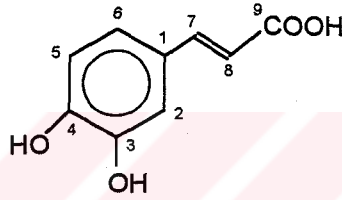
| Karbonlar | Kimyasal kayma değeri (ppm) |
|------------------|------------------------------------|
| C-1 | 36.8 |
| C-2 | 76.2 |
| C-3 | 177.2 |
| C-1' | 129.9 |
| C-2' | 117.1 |
| C-3' | 143.7 |
| C-4' | 142.4 |
| C-5' | 115.9 |
| C-6' | 121.8 |
| C-1'' | 126.5 |
| C-2'' | 113.6 |
| C-3'' | 143.7 |
| C-4'' | 146.7 |
| C-5'' | 115.9 |
| C-6'' | 122.4 |
| C-7'' | 145.8 |
| C-8'' | 115.0 |
| C-9'' | 168.6 |



Şekil 17. Rozmarinik asitin ¹H-NMR spektrumu (200 MHz, d₅-piridin).

III.3.4. Kafeik Asit

Kafeik asit (Şekil 18) de iyi karakterize edilmiş bir asittir. Bu çalışmada *Sanicula europaea* L.' den izole edilen ve İTK yöntemiyle saptanan kafeik asitin spektral verileri, konu ile ilgili literatür bilgilerine dayanmaktadır^(57,58).

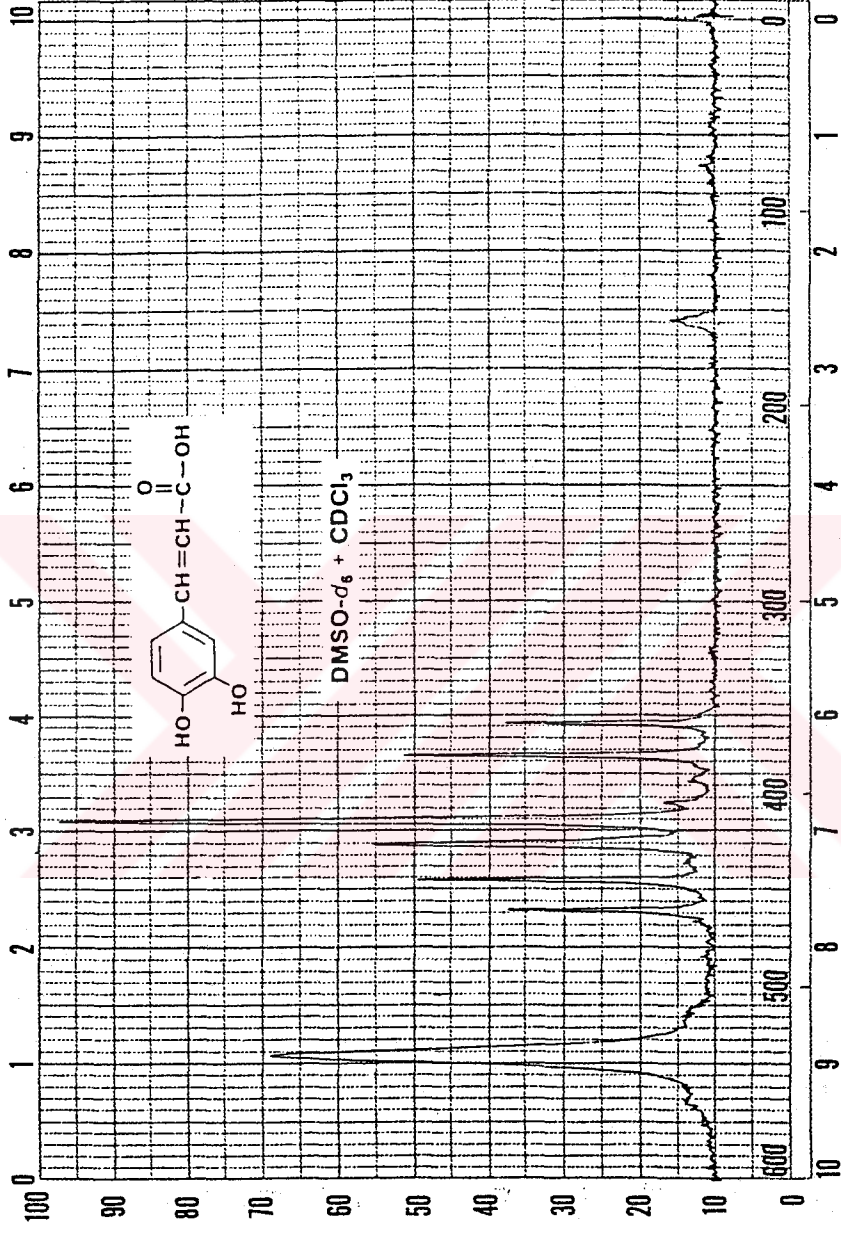


Şekil 18. Kafeik asit

Kafeik asitin ¹H-NMR spektrumu Şekil 19'da, C-13 kimyasal kaymaları ise Tablo 12'de görülmektedir.

Tablo 12. Kaffeik asitin C-13 kimyasal kaymaları ⁽⁵⁷⁾ (D₂O, 15.1 MHz).

| Karbonlar | Kimyasal kayma değeri (ppm) |
|------------------|------------------------------------|
| C-1 | 127.8 |
| C-2 | 114.5 |
| C-3 | 144.1 |
| C-4 | 145.9 |
| C-5 | 116.1 |
| C-6 | 121.4 |
| C-7 | 141.0 |
| C-8 | 121.2 |
| C-9 | 176.0 |



Şekil 19. Kaffeyk asitin 1H -NMR spektrumu⁽⁵⁸⁾

III.3.5. Hidroksisinnamik Türevler ve Antioksidan Aktivite

Sanicula europaea L. bitkisinin % 50 EtOH ekstresinde yer alan rozmarinik ve kaffeik asit gibi hidroksisinnamik asit türevleri, spektral yöntemle kantitatif olarak da belirlendi. Bu ekstrede, kuru ağırlık temeline göre % 3 hidroksisinnamik türev bulunduğu saptandı.

Antioksidan aktivite, DPPH reaktifinin 517 nm' deki absorbans değerini yarıya düşüren ekstre konsantrasyonu (CE₅₀) şeklinde ifade edildi. % 50 EtOH ekstresinin antioksidan aktivitesinin 104. 8 µg/ml olduğu hesaplandı.

III.4. Antiviral Aktivite Testleri

III.4.1. Bakteriyofaj Plak Testi

Sanicula europaea L. ekstrelerine uygulanan bakteriyofaj plak testinin bulguları, Tablo 13'de gösterilmiştir.

Tablo 13. *Sanicula europaea* ekstrelerinin T2hr⁺ ile infekte *E.coli*B2 suşlarında, faj üzerine gösterdikleri % inhibisyon değerleri.

| Ekstre | % İnhibisyon değeri |
|--------------------|---------------------|
| Kloroform ekstresi | 0 |
| % 96 EtOH ekstresi | 36 |
| Protein ekstresi | 26 |
| % 70 EtOH ekstresi | 39 |
| % 50 EtOH ekstresi | 50 |

III.4.2. Bitkisel Virüs Üzerindeki Aktivite Testleri

Bitkisel virüs üzerindeki aktivite deneyinin başlatılmasından itibaren iki ay süreyle izlenen bitkilerde, ekstrelerin aktivitesini gösteren bir bulgu kaydedilmedi. Çeşitli tipte ve konsantrasyonda ekstre uygulanmış tütünler ile, kontrol grubu tütünler arasında virüs infeksiyonunun yol açtığı morfolojik bozukluklar bakımından bir fark gözlenmedi. Virüs infeksiyonu tüm bitkilerde, yapraklarda buruşma şeklinde kendini gösterdi. Seçilen ekstre konsantrasyonlarının konak üzerinde toksik etkisi görülmedi. *Sanicula*'dan hazırlanmış ekstrelerin, tütünde TMV infeksiyonunu önleyemediği ve/veya infeksiyonun yol açtığı olumsuz etkileri ortadan kaldıramadığı belirlendi.

III.4.3. HIV-RT Testleri

S. europaea ekstreleri ve bunların saflaştırılması sırasında elde edilen çeşitli fraksiyonlar ile saf maddeler, elde edilmiş sıralarına göre, HIV-RT testinin yapıldığı Illinois Üniversitesi (USA), Eczacılık Fakültesi'ne gönderildi. Farklı zamanlarda yapılan tüm testlerin sonuçları Tablo 14'de görülmektedir.

Tablo 14. *Sanicula europaea* bitkisinden elde edilen ham ekstreler ile saf maddelerin antiviral aktivite testleri. Antiviral aktivite, HIV-1 RT enzim inhibisyonu olarak verilmiştir.

| Ham ekstreler | | %inhibisyon | Aktivite |
|----------------------------|------------------|-------------|---------------------|
| CHCl ₃ ekstresi | | 47.1 | Zayıf aktif |
| % 96 EtOH ekstresi | | 6.0 | İnaktif |
| Protein ekstresi | | 15.0 | İnaktif |
| % 70 EtOH ekstresi | | 72.6 | Orta derecede aktif |
| % 50 EtOH ekstresi | | 99.5 | Çok aktif |
| Frak. no. | Elüsyon çöz. | %inhibisyon | Aktivite |
| 1 | H ₂ O | 21 | inaktif |
| 2 | %10 EtOH | 59.8 | Zayıf aktif |
| 3 | % 30 EtOH | 79.1 | Aktif |
| 4 | % 50 EtOH | 81.5 | Aktif |
| 5 | % 70 EtOH | 76.3 | Aktif |
| 6 | % 96 EtOH | 33.8 | Zayıf aktif |
| 7 | Aseton | 44.3 | Zayıf aktif |
| Saf maddeler | | | |
| Madde adı | | %inhibisyon | Aktivite |
| Sanikulozit N | | 20.1 | İnaktif |
| Rozmarinik asit | | 57.4 | Zayıf aktif |
| Kaffeik asit | | 0 | İnaktif |

Tablo 14' de yer alan % 70 EtOH ve % 50 EtOH ekstralarının inhibisyon konsantrasyonları, sırasıyla 152.6 ve 39.0 $\mu\text{g/ml}$ ' dir. % 50 EtOH ekstresinin poliklar kolonda fraksiyonlandırılması sonucu ele geçen 3, 4 ve 5 no.lu aktif fraksiyonların inhibisyon konsantrasyonları ise, sırasıyla, 127.9, 97.0 ve 102.7 $\mu\text{g/ml}$ ' dir.

IV. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyada yaşanan en büyük sağlık sorunlarından biri de viral hastalıklardır. Virüslerle savaşmak, çoğu zaman imkansızdır. Çünkü virüsler infekte ettikleri konak hücrenin metabolizmasını kullanırlar. Bu bakımdan virüslere karşı geliştirilecek stratejiler, konak hücrelerinden bağımsız oldukları noktalarda yoğunlaştırılmalıdır. Konak hücre metabolizması için gerekli olmayan, ancak virüs için şart olan bir kademe ya da reaksiyonu durdurabilen veya virüslerin hücreye girişlerini, konağa zarar vermeden önleyen virüs-spesifik bir antiviral ajanın ortaya konulması çok zor olmasına rağmen, bu konu ile ilgili çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmektedir (59,60,61,62). Özellikle viral infeksiyonlara karşı bitkisel kökenli ilaçların kullanımı (63,64,65) ve aktif molekül gruplarının tayini ile ilgili araştırmalar (66,67,68,69,70) son yıllarda bir hayli artış göstermiştir.

Bu çalışmada halk arasında kullanılmakta olan *Sanicula europaea* L. bitkisinden hazırlanan ekstrelerinin antiviral aktiviteleri araştırılmış ve aktif fraksiyonlardan yeni bir saponin glikoziti ile rozmarinik asit ve kaffeik asit izole edilmiştir.

Yapısı bir ve iki dimensiyonlu NMR teknikleri ve bazı kimyasal reaksiyonlar yardımıyla aydınlatılan saponin glikoziti, daha önce *Sanicula europaea*'dan izole edilen saponinlere (11,12,21) kısmen benzemektedir. Bugüne dek *Sanicula europaea*'dan izole edilmiş saponinler içinde, sadece Sanikulozit A, B, C ve D'nin yapıları tam olarak verilmiş (12), diğerlerinin yapıları ise glikozit halinde iken belirlenememiş, ancak bunların karışımı hidroliz edilerek aglikonlar ve şekerler ayrı ayrı incelenmiştir (11,21). Bu aglikonlardan da sadece Sanikulagenin

A' nin yapısı spektral analizlerle ortaya konulmuştur ⁽¹¹⁾. Yapılan literatür çalışmaları sırasında, diğer glikozitlerle ilgili spektral verilere rastlanmadığı gibi, aynı zamanda bazı araştırma raporları arasında çelişkiler olduğu da görülmektedir. Örneğin, Hiller ve ark. (1968), Sanikulagenin A' nin C-21'de dimetilakrilat esteri ve C-22'de asetat esteri taşıdığını bildirmekte⁽¹¹⁾, buna karşın başka bir çalışmada da C-21'de asetat, C-22'de dimetil akrilat esteri bulunduğunu ifade etmektedirler⁽²¹⁾. C-22'de anjelik ya da tiglik asit içeren aglikon yapılarının nasıl ortaya konulduğu belirsizdir. Dolayısıyla, ilk kez bu çalışmada, *Sanicula europaea*'dan izole edilmiş bir saponin glikozitinin ve bu glikozite ait aglikonun moleküler yapısı, ayrıntılı bir şekilde aydınlatılmaktadır. Kullanılan modern spektral yöntemlerle varılan sonuçlar, triterpenik aglikonun C-21'ine anjelik asit bağlı olduğunu ve moleküldeki şeker zincirinin ilk bakiyesi glukuronik asitin 6 no.lu karbonunun propil alkol ile esterleşmiş bulunabileceğini göstermektedir. Kimyasal adı 3-O-[β-D-arabinopiranozil (1→4)-β-D-glukopiranozil (1→3)-β-D-glukuronopiranozil propil ester]-3β,15,16,22α,28β pentahidroksi Δ¹²-oleanen-21-anjelik asit olan bu saponin "**Sanikulozit N**" olarak adlandırılmıştır.

Sanikulozit N'nin asit hidrolizi sonucu ele geçen saponin aglikonu da, ilk kez bu çalışmada ortaya konulmuştur. "**Sanikulagenin N**" adı verilen bu aglikon, 3β,15,16,22α,28β pentahidroksi Δ¹²-oleanen-21-anjelik asit yapısındadır.

Sanicula europae'dan izole edilen aromatik karboksilli asitler (rozmarinik ve kaffeik asit) bitkinin antioksidan aktivitesine⁽⁷¹⁾ yol açabilecek hidroksisinnamik asit türevlerdir. Şahit olarak rozmarinik asit kullanarak

yaptığımız spektral ölçümler sonucu bitkideki hidroksisinnamik asit türevlerinin yüksek (% 3) bulunması, bu bitkiyi önemli bir rozmarinik asit kaynağı kabul eden çalışmayı ⁽¹⁴⁾ desteklemekte ve 104.8 µg/ml olarak hesaplanan antioksidan aktiviteyi açıklamaktadır. Rozmarinik asit, özellikle son yıllarda üzerinde yoğun çalışmaların sürdürüldüğü bir sekonder metabolittir ^(14,15,57,71,72). Bu asitin birçok farmakolojik aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir⁽¹⁵⁾. Bu çalışma ile, rozmarinik asitin HIV üzerinde de aktif olduğu ortaya konulmuştur.

Araştırmamızda antiviral aktivite yönünden ortaya konulan en önemli sonuç, *Sanicula europaea* ekstrelerinin, *in vitro*'da HIV revers transkriptaz enzimini inhibe ettiğinin belirlenmesi olmuştur. Test edilen *Sanicula* ekstreleri içinde en yüksek inhibisyona (% 99.5), 39 µg/ml konsantrasyondaki % 50 EtOH ekstresi ile ulaşılmıştır. Ayrıca 152.6 µg/ml konsantrasyondaki % 70 EtOH ekstresinin yol açtığı inhibisyon % 72.6 olarak belirlenmiştir. Anti-HIV aktivitesi gösteren diğer bir ekstre de CHCl₃ ekstresidir. Ancak % 47.1 inhibisyona yol açan bu ekstrenin aktivitesi çok azdır. Bu bulgular, detaylı olarak ele alınarak incelenmesi gereken ekstrelerin alkolik ekstreler olduğunu ortaya koymaktadır. *Sanicula europa* ekstrelerinin bakteriyofajlar üzerindeki etkilerini incelemek için gerçekleştirdiğimiz bakteriyofaj plak testlerinde benzer bir yargıya varılmıştır. Çünkü bu testlerde bakteriyofaj üzerindeki en yüksek inhibisyon, % 50 EtOH ekstresi ile elde edilmiştir. Hayvansal virüslere karşı kullanılmakta olan kimyasal ajanların, bakteriyofaj plak testinde olumlu sonuçlar verdiğinin bilinmesi ⁽⁶⁰⁾, fajlar üzerinde aktif olan bir maddenin, hayvansal virüsler üzerinde de etkili olabileceğini düşündürmektedir. Bunun yanısıra, faj inhibitörü bir maddenin

ortaya konulabilme ihtimali, endüstriyel açıdan da önem taşır. Zira böyle bir inhibitör, fermentasyon tanklarında kullanılan bakteri kültürlerinin fajla infekte olarak zarara yol açmasını önleme potansiyeline sahiptir. Gerek tıbbi, gerekse endüstriyel açıdan bakıldığında, daha ayrıntılı incelenmesi gereken *Sanicula europaea* ekstresinin, en yüksek antifaj aktivitesine sahip % 50 EtOH ekstresi olduğu düşünülmüştür. Böylece, daha sonra gerçekleştirilen HIV-RT testleri ile paralel sonuçlar ortaya koyan bakteriyofaj plak testinin, antiviral madde arama çalışmalarında kullanılabileceği sonucu da ortaya çıkmaktadır.

Ayrırma işlemleri sırasında, alkollü ekstraların ana bileşen olarak saponozitler içerdiği saptanmış ve saflaştırma işlemleri, en yüksek antiviral aktiviteye sahip % 50 EtOH ekstresi üzerinde yoğunlaştırılmıştır. % 50 EtOH ekstresinin poliklar kolon kromatografik ayırımı sonucu ele geçen fraksiyonlara HIV-RT testi uygulandığında (Tablo 14), aktif moleküllerin kolondan arka arkaya alınan üç fraksiyonda (3, 4 ve 5) toplandığı belirlenmiştir. Bunların içinde 4 no.lu fraksiyonun en aktif olduğu, yani daha düşük konsantrasyonda inhibitör etki gösterdiği saptanmıştır. Her üç fraksiyonda da elüsyon çözeltisinin sulu metanol olması, aktif bileşenlerin hidrofilik karakteri hakkında ipuçları taşımaktadır. Nispeten az sayıda bileşenden oluştukları ve ana bileşenin saponin tipinde moleküller olduğu ince tabaka kromatografisiyle anlaşılan her üç fraksiyonun ileri derecede saflaştırılması sonucu ele geçen ve yapısı aydınlatılan ana saponin molekülü, saf halde iken HIV-RT üzerinde inhibe edici etki göstermemekle beraber, ilk defa bu çalışmada ortaya konulan orjinal yapısı nedeniyle önem taşımaktadır. Ayrıca, bu molekülün rozmarinik ve kaffeik asitle

birlikte aktif fraksiyonların ana bileşeni olması, antiviral etkide rolü olabileceğini düşündürmektedir.

Aktif fraksiyonlarda bulunan saponin dışındaki maddelerin elde edilmesine yönelik çöktürme deneyi sonucunda ele geçen aromatik karboksilli asitlerden rozmarinik asit, saf halde iken HIV-RT enzimi üzerinde inhibe edici etki göstermiştir. 200 µg/ml konsantrasyondaki rozmarinik asit, % 57.4 inhibisyona yol açtığından bu aktivite zayıf olarak kabul edilmektedir. Bununla beraber, aktif fraksiyonun diğer bileşenleriyle birarada bulunduğu, yüksek inhibisyon değerleri ortaya koyulmaktadır. Örneğin, saponozit, rozmarinik asit ve kaffeik asiti karışım halinde içeren 4 no.lu fraksiyon, 97 µg/ml konsantrasyonda % 81 inhibisyona yol açmaktadır. Fraksiyonlandırılmamış % 50 EtOH ekstresi ile de % 99.5 inhibisyona erişilmektedir. Saflaştırma işlemlerinden sonra aktivitede gözlenen düşüşün nedeni bilinmemekle beraber, antiviral aktivitenin, karışımdaki bileşenlerin sinerjistik etkileşimlerine bağlı olduğu söylenebilir.

Aktif fraksiyondan izole edilen kaffeik asitin HIV-RT testinde inaktif olduğu belirlenmiştir. Oysa bu maddenin anti-HIV aktivitesine sahip olduğu öne sürülmektedir⁽¹⁶⁾. Ancak, yukarıda da ifade edildiği gibi, kaffeik asitin rozmarinik asit ve Sanikulozit N ile beraber aktif fraksiyonun bir bileşeni olması nedeniyle önem taşıdığı ifade edilebilir. Buna benzer bir durum, bazı araştırmacılar tarafından da öne sürülmüştür⁽⁷³⁾. Bu araştırmacılar *in vitro* antiviral aktivite gösteren bazı bitkisel ekstraları, acyclovir ile birlikte Herpes simplex virüsü üzerinde denemişlerdir. Bitkisel ekstralarla acyclovir kombine şekilde kullanıldığında, virüs çoğalmasını önleyen terapötik aktivitede artış olduğu

bildirilmektedir. Sonuç olarak, geleneksel tıpta kullanılan bazı bitkisel ekstrelerin tedavi değerinin yüksek olması, bu ekstrelerdeki aktif bileşen(ler)in, karışım halinde bulduklarında birbirleriyle girmiş oldukları etkileşimlerden kaynaklanabilir. En azından üç bileşen içerdiğini bildiğimiz ham ekstrenin en yüksek antiviral aktivite değerini ortaya koyması da, bu görüşü destekleyen önemli bir göstergedir.

Diğer yandan, bazı bitkilerden elde edilen maddelerin, diğer bazı bitkilerdeki virüs infeksiyonunu önlediği veya durdurduğu bildirilmektedir (74,75). Örneğin, *Dianthus caryophyllus*'tan izole edilen protein yapıdaki bir maddenin TMV üzerindeki inhibitör etkisi rapor edilmiştir (74). Ayrıca *Cycas revoluta* köklerinden hazırlanmış ekstrelerin, PVX, PVY, TMV gibi virüsler üzerinde antiviral aktivite gösterdiği bildirilmiştir (75). *Sanicula europaea* ekstrelerinde böyle bir aktivitenin bulunup bulunmadığını kontrol etmek amacıyla gerçekleştirilen bitki-bitkisel virüs deneyleri sonucunda ekstrelerde böyle bir aktivite belirlenmemiştir.

Bu çalışmada ortaya çıkan sonuçlar, şöyle özetlenebilir:

- Sanicula europaea* L. bitkisinin özellikle alkollü ekstreleri, *in vitro*'da HIV revers transkriptaz enziminin inhibisyonuna yol açmaktadır.
- Aktif fraksiyondan yeni bir **triterpen saponin** ile **rozmarinik asit** ve **kaffeik asit** izole edilmiştir.

•İlk kez bu çalışmada izole edilen saponinin moleküler yapısı modern spektral yöntemlerle aydınlatılmış ve ortaya konulan bu orjinal yapı **Sanikulozit N** olarak adlandırılmıştır.

•Bu yeni saponinin asit hidrolizi sonucunda elde edilen aglikonun yapısı spektral yöntemlerle aydınlatılmış ve bu aglikon **Sanikulagenin N** olarak adlandırılmıştır.

•Aktif fraksiyondan izole edilen ve kimyasal karakterizasyonu gerçekleştirilen saf maddelerden glikozit yapısında olan saponin ve kaffeik asitin, tek başlarına bulduklarında antiviral aktivite göstermedikleri saptanmıştır.

•Aktif fraksiyonun üçüncü bileşeni rozmarinik asitin ise, düşük bir anti-HIV aktivitesine (% 57.4) sahip olduğu belirlenmiştir. Ancak aktif fraksiyonda yer alan diğer moleküllerle birarada bulunduğu aktivitenin yaklaşık iki katına çıkması (% 99.5), moleküller arasında sinerjistik etkileşim olduğunu düşündürmektedir.

•*Sanicula europaea* bitkisinin, antiviral aktiviteye sahip önemli bir tıbbi bitki olduğu anlaşılmıştır.

V. TÜRKÇE VE İNGİLİZCE ÖZETLER

V.1. ÖZET

Sanicula europaea L. Bitkisinden Antiviral Bir Maddenin Saflaştırılması ve Kimyasal Karakterizasyonu

Bu çalışmada *Sanicula europaea* L. (Apiaceae) ekstrelerinin antiviral aktivitesi araştırıldı ve bu aktiviteden sorumlu moleküllerin kimyasal yapıları belirlendi.

Değişik çözücülerin kullanıldığı çeşitli yöntemlerle hazırlanan bitkisel ekstrelerin antiviral aktiviteleri üç farklı sistemde test edildi. İlk sistem olarak bakteri (*E.coli*)-bakteriyofaj (T2) sistemi kullanıldı ve % 50 etanol ekstresinin antifaj etkisi olduğu belirlendi. İkinci sistem olarak tütün (*Nicotiana tabacum*)-tütün mozaik virüsü (TMV) sistemi kullanıldı ve ekstre, virüs ile infekte tütün bitkilerinde TMV'ye karşı test edildi ancak antiviral bir etki saptanmadı. HIV (Human Immunodeficiency Virus) - RT (revers transkriptaz) deneyi, bitkisel ekstrenin antiviral aktivitesinin araştırılmasında üçüncü sistem olarak kullanıldı ve % 50 etanol ekstresinin HIV-RT aktivitesini % 99.5 oranında inhibe ettiği belirlendi.

Antiviral aktivite gösteren % 50 etanol ekstresi kolon, ince tabaka ve preparatif tabaka kromatografileri ile ileri derecede saflaştırıldı ve ayrılan fraksiyonlar HIV-RT sisteminde test edildi. Bu testlerde antiviral aktivite gösteren fraksiyonlar aktif fraksiyonlar olarak nitelendirildi.

Aktif fraksiyonlardan yeni bir triterpen glikozit izole edildi ve bu bileşiğin kimyasal yapısı spektral (kızılötesi, nükleer manyetik rezonans ve kütle spektrometrisi) ve kimyasal (asidik ve enzimatik hidroliz) yöntemlerle belirlendi.

Yeni triterpen glikozitin moleküler yapısı 3-O-[β -D-arabinopiranozil (1 \rightarrow 4)- β -D-glukopiranozil (1 \rightarrow 3)- β -D-glukuronopiranozil propil ester]-3 β ,15,16,22 α ,28 β pentahidroksi Δ^{12} -oleanen-21-anjelik asit olarak ortaya kondu ve **Sanikulozit N** olarak adlandırıldı. Sanikulozit N'nin asit hidrolizi sonucu elde edilen yeni aglikonun yapısı yukarıda bahsedilen spektral ve kimyasal teknikler yardımıyla 3 β , 15, 16, 22 α , 28 β pentahidroksi Δ^{12} -oleanen-21-anjelik asit olarak belirlendi. Yeni aglikon **Sanikulagenin N** olarak adlandırıldı. Sanikulozit N'deki şeker bakiyelerinin glukuronik asit, glukoz, arabinoz (1:1:1) olduğu ince tabaka kromatografisi ve heteronükleer korelasyon spektroskopisi ile gösterildi.

Aktif fraksiyonların diğer ana komponentlerinin rozmarinik asit ve kaffeik asit olduğu bulundu. Sanikulozit N, rozmarinik asit ve kaffeik asitin saf haldeki antiviral etkileri HIV-RT sisteminde incelendi. Bunlardan sadece rozmarinik asidin 200 μ g/ml konsantrasyonda % 57.3 inhibisyona yol açtığı, kaffeik asit ve Sanikulozit N' nin ise antiviral etkiye sahip olmadığı belirlendi. Rozmarinik asit, kaffeik asit ve Sanikulozit N içeren aktif ekstrenin HIV-RT sistemindeki antiviral aktivitesi % 99.5 inhibisyon değerinde olduğundan aktif ekstrede antiviral etki yönünden moleküller arası sinerjistik etkileşim olduğu varsayımı ileri sürülebilmektedir.

Sanicula europaea L. ekstresinin gösterdiği antiviral aktivitenin biyokimyasal ve moleküler temeli izole ettiğimiz moleküllerle gerçekleştirilecek rekonstitüsyon ve komplementasyon testleri kullanılarak ileri derecede aydınlatılabilecektir.

V.2. SUMMARY

Purification and Chemical Characterization of an Antiviral Substance from the Plant *Sanicula europaea* L.

In this study the antiviral activity of *Sanicula europaea* L. (Apiaceae) extracts was investigated and the chemical structure of the molecules responsible for this activity was determined.

The antiviral activity of the extracts prepared through various methods by the use of several solvents was tested in three different systems. The first system was bacterium (*Escherichia coli*) - bacteriophage (T2) system and the 50 % ethanolic extract was found to show an antiphage effect. As a second system tobacco (*Nicotiana tabacum*) - tobacco mosaic virus (TMV) system was used and the extract was tested against TMV in the virus infected tobacco plants but no antiviral effect was observed. HIV (Human Immunodeficiency Virus) - RT (reverse transcriptase) assay was used as the third system in order to investigate the antiviral activity of the plant extract and it was found that the 50 % ethanolic extract to inhibit of HIV-RT activity to an extent of 99.5 %.

The 50 % ethanolic extract with antiviral activity was further purified through column, thin layer and preparative layer chromatography and the fractions separated were tested using the HIV-RT assay. Fractions exhibiting antiviral activity in these tests were considered to be active fractions.

A new triterpene glycoside was isolated from the active fractions and the chemical structure of this compound was established using spectral (infrared, nuclear magnetic resonance and mass spectrometries) and chemical (acidic and enzymatic hydrolysis) techniques. The molecular structure of the new triterpene

glycoside was defined as 3-O-[β -D-arabinopyranosyl (1 \rightarrow 4)- β -D-glucopyranosyl(1 \rightarrow 3)- β -D-glucuronopyranosyl propyl ester]-3 β ,15,16,22 α ,28 β pentahydroxy Δ^{12} -oleanen-21-angelic acid and was named as **Saniculoside N**. As a product of acidic hydrolysis of Saniculoside N, a new aglycone was obtained and its structure was determined as 3 β , 15, 16, 22 α , 28 β pentahydroxy Δ^{12} -oleanen-21-angelic acid and named as **Saniculagenin N**. Thin-layer chromatography and heteronuclear correlation spectroscopy results revealed that the sugar residues of glycoside as glucuronic acid, glucose and arabinose were present in 1:1:1 ratio.

It was determined that the major remaining components of the active fractions were rosmarinic acid and caffeic acid. Antiviral effects of Saniculoside N, rosmarinic acid and caffeic acid were investigated using HIV-RT assay, separately. Antiviral tests of rosmarinic acid showed slight antiviral effect of 57.4 % inhibition on HIV-RT system, whereas caffeic acid and Saniculoside N exhibited no significant antiviral impact. Since the antiviral activity of the active extract including rosmarinic acid, caffeic acid and Saniculoside N was observed to an extent of 99.5 % inhibition, it is proposed that a synergistic interaction between the molecules may cause to enhance the overall antiviral activity.

Biochemical and molecular basis of the antiviral activity of the *Sanicula europaea* extract may be clarified and established further performing reconstitution and complementation tests in respect of the compounds isolated in this study.

VI. KAYNAKLAR

1. BAYTOP, T. (1984): **Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi**. İ.Ü. Yayınları. No. 3255
2. WINKELMANN, W. (1951): Sanikel. *Sanicula europaea* L.: Heil Aller Schäden, Bruchkraut, Heildolde, Waldkette, Schornigel. **Die Wirkstoffe Unserer Heilpflanzen**. Darstellung und anwendung. Verlag Otto Walter AG Olten.
3. HILLER, K. (1965): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe Einiger Saniculoideae. I. Mitteilung: *Sanicula europaea* L. Isolierung und Quantitative Erfassung von Chlorogen- und Rosmarinsäure. **Pharmazie** 20, 574-579.
4. INGHE, O., TAMM, C. O. (1985): Survival and Flowering of Perennial Herbs. IV. The Behaviour of *Hepatica nobilis* and *Sanicula europaea* on Permanent Plots During 1943-1981. **Oikos** 45(3), 400-420.
5. GRUBER, M. (1988): Mixed Woods with *Carpinus betulus* L. in Hautes-Pyrenees(France). **Bull. Soc. Hist. Nat. Toulouse** 124(0), 35-42.
6. MITCHELL, P. L., WOODWARD, F. I. (1988): Responses of Three Woodland Herbs to Reduced Photosynthetically Active Radiation and Low-red to Far-red Ratio in Shade. **J. Ecol.** 76(3), 807-825.
7. HILLER, K. (1966): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe Einiger Saniculoideae.3. Mitteilung: Vorkommen und Mengenmaessige Verteilung von Saccharose in *Sanicula europaea* L. **Pharmazie** 21(1), 59.
8. HILLER, K., LINZER, B. (1967): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe Einiger Saniculoideae. 5. Mitteilung: Hämolytische Aktivität von Eryngium-Species Sowie Jahreszeitliche Schwankungen im Hämolytischen Index von *Sanicula europaea* L. und *Eryngium planum* L. **Pharmazie** 22(6), 321-324.
9. HILLER, K., KOTHE, N., PFEIFER, S. (1967): Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe Einiger Saniculoideae. 8. Mitteilung: Aliphatische Carbonsäuren. **Pharmazie** 22(12): 718-722.
10. CONSTANTINESCU, E., PISLARASU, N., FORSTNER, S. (1968): Üeber Inhaltsstoffe von *Sanicula europaea* L. **Pharmazie** 23(1), 34-35.
11. HILLER, K., LINZER, B., PFEIFER, S., TÖKES, L., MURPHY, J. (1968): Über die Saponine von *Sanicula europaea* L. 9. Mitteilung: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe Einiger Saniculoideae. **Pharmazie** 23(7), 376-387.

12. KÜHNER, K., VOIGT, G., HILLER, K., RABE, H., FRANKE, P., DUBE, G., HABISCH, D. (1985): Glycosidstrukturen der Saponine von *Sanicula europaea* L. 39. Mitteilung: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. **Pharmazie** **40(8)**, 576-578.
13. CISOWSKI, W., BIEGANOWSKA, M. L. (1986): Analiza Związków Flawonoidowych z Ziela Meum Athamanticum Jacq. I *Sanicula europaea* L. ZA Pomocą HPLC. **Herba Polonica** **3-4**, 155-159.
14. LAMAISON, J. L., PETITJEAN-FREYTET, C., CARNAT, A. (1990): Teneurs en Acide Rosmarinique, en Dérivés Hydroxycinnamiques Totaux et Activité Antioxydante chez les Apiacées, les Borraginacées et les Lamiacées Médicinales. **Ann. pharmaceutiques françaises** **48(2)**, 103-108.
15. PARNHAM, M.J., KESSELRING, K. (1985): **Drugs of the Future** **10**, 756-757.
16. KÖNIG, B., DUSTMANN J. H. (1985): The Caffeylics as a New Family of Natural Antiviral Compounds. **Naturwissenschaften** **72 (12)**, 659-661.
17. ELLIS, B. E., TOWERS, G. H. N. (1970): Biogenesis of Rosmarinic Acid in *Mentha*. **Biochem. J.** **118**, 291-297.
18. TRZENSCHIK, U., PRZYBOROWSKI, R., HILLER, K. LINZER, B. (1967): Antimikrobielle Eigenschaften der *Sanicula*-saponine. **Pharmazie** **22(12)**, 715-717.
19. BRANTNER, A., GREIN, E. (1994): Antibacterial Activity of Plant Extracts Used Externally in Traditional Medicine. **Journal of Ethnopharmacology** **44**, 35-40.
20. JACKER, H. -J., HILLER, K. (1976): Zur Antiexsudativen Wirksamkeit der Saponine aus *Eryngium planum* L. und *Sanicula europaea* L. **Pharmazie** **31(10)**, 747-748.
21. HILLER, K., KEIPERT, M., PFEIFER, S., TÖKÉS, L., MADDOX, M.L. (1970): Zur Struktur der Eryngiumsapogenine. 14. Mitteilung: Zur Kenntnis der Inhaltsstoffe einiger Saniculoideae. **Pharmazie** **25**, 769-774.
22. HILLER, K., WOITKE, H. -D. (1972): Saponins. **Pharmaceutical Applications of Thin-Layer and Paper Chromatography.**, K. Macek ed., Chapter 13, ISBN 0-444-4039-4, Elsevier Publishing Company, Amsterdam.
23. GENNARO, A.R. (1990): **Remington's Pharmaceutical Sciences**, 18th ed., ISBN 0-912734-04-3, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania.

24. TREASE, G.E. (1966): **A Textbook of Pharmacognosy**, 9th ed., Baillière, Tindall and Cassell Ltd., Great Britain.
25. ELKS, J. (1971): Steroid Saponins and Sapogenins. **Rodd's Chemistry of Carbon Compounds**, 2nd ed., by S. Coffey, Vol. 2 Part Chapter 18, ISBN 0-444-40775-8, Elsevier Pub. Co., Amsterdam.
26. HILLER, K., VOIGT, G., DÖHNERT, H. (1981): Zur Struktur des Hauptsaponins aus *Hydrocotyle vulgaris* L. **Pharmazie** **36(12)**, 844-846.
27. AMOROS, M., FAUCONNIER, B., GIRRE, R. L. (1987): In Vitro Antiviral Activity of a Saponin from *Anagallis arvensis*, *Primulaceae*, against *Herpes Simplex Virus* and *Poliovirus*. **Antiviral Research** **8(1)**, 13-25.
28. LEVY, M., ZEHAVI, U., NAIM, M., POLACHECK, I. (1989): Isolation, Structure Determination, Synthesis, and Antifungal Activity of a New Native Alfalfa-root Saponin. **Carbohydrate Research** **193**, 115-123.
29. DE TOMMASI, N., CONTI, C., STAIN, M. L., PIZZA, C. (1991): Structure and *in vitro* Antiviral Activity of Triterpenoid Saponins from *Calendula arvensis*. **Planta Medica** **57(3)**, 250-253.
30. BADER, G., WRAY, V., HILLER, K. (1992): Virgaureasaponin 3, A 3,28-Bisdesmosidic Triterpenoid Saponin from *Solidago virgaurea*. **Phytochemistry** **31(2)**, 621-623.
31. BADER, G., TUJA, D., WRAY, V., HILLER, K. (1994): New Triterpenoid Saponins from *Heteropappus altaicus* (Willd.) Novopokr. and *Heteropappus biennis* (Ldb.) Tamamsch. **Pharmazie** **49(2/3)**, 209-212.
32. CHAUDHURI, S.K., FULLAS, F., BROWN, D.M., WANI, M.C., WALL, M.E., CAI, L., MAR, W., LEE, S.K., LUO, Y., ZAW, K., FONG, H.H.S., PEZZUTO, J.M., KINGHORN, A.D. (1995): Isolation and Structural Elucidation of Pentacyclic Triterpenoids from *Maprounea africana*. **Journal of Natural Products** **58(1)**, 1-9.
33. KIRMIZIGÜL, S., ANIL, H., ROSE, M.E. (1995): Triterpenoid Glycosides from *Cephalaria transsylvanica*. **Phytochemistry** **39(5)**, 1171-1174.
34. KIRMIZIGÜL, S. (1993): Isolation and Structure Determination of *Cephalaria transsylvanica* L. Glycosides. **Ph.D. Thesis**. Ege University Graduate School of Natural and Applied Sciences Chemistry Department. Code No. : 10.0600.0000.68.

35. BUDAVARI, S. (1989): **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals**, 11th ed., ISBN 911910-28-X, Merck & Co. Inc., USA, sayfa:1340.
36. ÇALIŞ, İ., ZOR, M., BAŞARAN, A. A., WRIGHT, A. D., STICHER, O. (1993): 84. Ilwensisaponins A, B, C and D: Triterpene Saponins from *Scrophularia ilwensis*. **Separatum Helvetica Chimica Acta** **76**, 1352-1360.
37. ÇALIŞ, İ., YÜRÜKER, A., RÜEGGER, H., WRIGHT, A. D., STICHER, O. (1992): Triterpene Saponins from *Primula veris* subsp. *macrocalyx* and *Primula elatior* subsp. *meyeri*. **Journal of Natural Products** **55(9)**, 1299-1306.
38. FIESER, L.F. and FIESER M. (1956): **Organic Chemistry**, 3rd ed., Reinhold Publishing Co., New York.
39. KOCHETKOV, N.K., KHORLIN, A.J. (1966): Oligoside, Ein Neuer Typ von Pflanzenglykosiden. **Arzneimittel-Forschung** **16**, 101-109.
40. OHTANI, K., HOSTETTMANN, K. (1992): Molluscicidal and Antifungal Triterpenoid Saponins from the Leaves of *Rapanea melanophloeos*. **Abstracts of Short Lectures and Poster Presentations of the 40th Annual Congress on Medicinal Plant Research**, Trieste, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, sayfa: 134.
41. BADER, G., HILLER, K. (1992): New Ester Saponins from *Solidago virgaurea*. **Abstracts of Short Lectures and Poster Presentations of the 40th Annual Congress on Medicinal Plant Research**, Trieste, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, sayfa: 134.
42. KLUY, V., WRAY, V., WILLUHN, G. (1992): Steroidal Saponins from *Solanum dulcamara*. **Abstracts of Short Lectures and Poster Presentations of the 40th Annual Congress on Medicinal Plant Research**, Trieste, Thieme Medical Publishers, Inc., New York, sayfa: 135.
43. ÇALIŞ, İ. (1987): Saponin ve Sapogenol. I. Üç *Primula* türünün Sapogenol Bileşikleri Üzerinde Karşılaştırmalı Bir Çalışma. **Doğa Tıp ve Eczacılık Dergisi** **11(2)**, 206-215.
44. RAO, G. S., SINSHEIMER, J. E., COCHRAN, K. W. (1974): Antiviral Activity of Triterpenoid Saponins Containing Acylated β -Amyrin Aglycones. **Journal of Pharmaceutical Sciences** **63(3)**, 471-473.
45. AMOROS, M., GIRRE, R. L. (1987): Structure of Two Antiviral Triterpene Saponins from *Anagallis arvensis*. **Phytochemistry** **26(3)**, 787-791.

46. YANG-HUA, Y., CHU-LU, W. (1989): A New Active Saponin from *Phytolacca esculenta*. **Planta Medica** **55**, 551-552.
47. REYNOLDS, E.F. (1982): **Martindale The Extra Pharmacopoeia**, 28th ed., ISBN 0-85369-160-6, The Pharmaceutical Press, London, sayfa: 376.
48. TURAN, K. (1991): *Sanicula europaea* L. Ekstraktlarının Olası Antiviral Aktivitesinin Bakteriyofajlarda Denenmesi. **Yüksek Lisans Tezi**. İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
49. KARAGÖZ, A. (1992): *Sanicula europaea* L. Ekstrelerinin Antiviral Etkisi Üzerine İncelemeler. **Yüksek Lisans Tezi**. İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü.
50. GRAHAM, D. M., NELSON, F. E. (1954): Inhibition of Lactic Streptococcus Bacteriophage by Crystal Violet and Other Agents. **J. Gen. Physiol.** **37**, 121-138.
51. DAWSON, W.O. (1984): Effects of Animal Antiviral Chemicals on Plant Viruses. **Phytopathology** **74(2)**, 211-213.
52. SUZUKI, H., OKUBO, A., YAMAZAKI, S., SUZUKI, K., MITSUYA, H., TODA, S. (1989): Inhibition of the Infectivity and Cytopathic Effect of Human Immunodeficiency Virus by Water-soluble Lignin in an Extract of the Culture Medium of *Lentinus edodes*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **160**, 367-373.
53. HEDGE, I.C., LAMOND, J.M. (1972): *Sanicula europaea* L. **Flora of Turkey and East Aegean Islands**, Vol.4, P.H. Davis, University Press, Edinburgh, sayfa:265-290.
54. KARTNIG, T. H. , WEGSCHAIDER, O. (1971): Eine Möglichkeit zur Identifizierung Von Zuckern aus Kleinsten Mengen Von Glykosiden Oder aus Zuckergemischen. **Journal of Chromatography** **61**, 375-377.
55. GÖZÜKIRMIZI, N., ARI, Ş. ORALER, G. OKATAN, Y., ÜNSAL, N. (1990): Callus Induction, Plant Regeneration and Chromosomal Variations in Barley. **Acta Bot. Neerl.** **39(4)**, 379-387.
56. PENGSUPARP, T., CAI, L., FONG, H.H.S., KINGHORN, A.D., PEZZUTO, J.M., WANI, M.C., WALL, M.E. (1994): Pentacyclic Triterpenes Derived from *Maprounea africana* Are Potent Inhibitors of HIV-1 Reverse Transcriptase. **Journal of Natural Products** **57(3)**, 415-418.
57. KELLEY, C.J., HARRUFF, R.C., CARMACK, M. (1976): Polyphenolic Acids of *Lithospermum ruderale*. II. Carbon-13 Nuclear Magnetic

- Resonance of Lithospermic and Rosmarinic Acids. **Journal of Organic Chemistry** 41(3), 449-455.
58. POUCHERT, C.J. (1983): **The Aldrich Library of NMR Spectra**, 2nd ed., vol.2, Aldrich Chemical Company, Inc., USA, sayfa 181.
 59. ANDREI, G. ve DE CLERCQ, E. (1990): Inhibitory Effect of Selected Antiviral Compounds on Arenavirus Replication *in vitro*. **Antiviral Research** 14(4-5), 287-300.
 60. BLOCK, T.M., GRAFSTROM, R.H. (1990): Novel Bacteriological Assay for Detection of Potential Antiviral Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 34(12), 2337-2341.
 61. CHE, C.T. (1991): Marine Products as a Source of Antiviral Drug Leads. **Drug Development Research** 23(3), 201-218.
 62. SANGUINETTI, M., POSTERARO, B., ROSSOLINI, G.M., SATTA, G. (1995): Development of a Yeast Retrotransposon-based System Useful for Screening of Potentially Active Anti-retroviral Compounds. **Microbiologica** 18(2), 117-125.
 63. RASTOGI, R.P., DHAWAN, B.N. (1990): Anticancer and Antiviral Activities in Indian Medicinal Plants: a Review. **Drug Development Research** 19(1), 1-12.
 64. CHEN, H.C., CHOU, C.K., LEE, S.D., WANG, J.C., YEH, S.F. (1995): Active Compounds from Saussurea Lappa Clarke that Suppress Hepatitis B Virus Surface Antigen Gene Expression in Human Hepatoma Cells. **Antiviral Research** 27(1-2), 99-109.
 65. VLIETINCK, A.J., VAN HOFF, L., TOTTE, J., LASURE, A., VANDEN BERGHE, D., RWANGABO, P.C., MVUKIYUMWAMI, J. (1995): Screening of Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral Properties. **Journal of Ethnopharmacology** 46(1). 31-47.
 66. VAN HOOFF, L., TOTTE, J., CORTHOUT, J., PIETERS, L.A., MERTENS, F., VANDEN BERGHE, D.A., VLIETINCK, A.J., DOMMISSE, R., ESMANS, E. (1989) : Plant Antiviral Agents, VI. Isolation of Antiviral Phenolic Glucosides from *Populus* Cultivar Beaupre by Droplet Counter-Current Chromatography. **Journal of Natural Products** 52(4), 875-878.
 67. CORTHOUT, J., PIETERS, L.A., CLAEYS, M. VANDEN BERGHE, D.A., VLIETINCK, A.J. (1991): Antiviral Ellagitannins from *Spondias mombin*. **Phytochemistry** 30(4), 1129-1130.

68. HAYASHI, K., HAYASHI, T., MORITA, N. NIWAYAMA, S. (1990): Antiviral Activity of an Extract of *Cordia salicifolia* on Herpes simplex Virus Type 1. **Planta Medica** **56(5)**, 439-443.
69. DE RODRIGUEZ, D. J., CHULIA, J., SIMOES, C. M. O., AMOROS, M., MARIOTTE, A. M., GIRRE, L. (1990): Search for Antiviral Activity of a New Isoflavonic Glycoside from *Ulex europaeus*. **Planta Medica** **56(1)**, 59-62.
70. KASHIWADA, Y., NISHIZAWA, M., YAMAGISHI, T., TANAKA, T., NONAKA, G-I., COSENTINO, L.M., SNIDER, J.V., LEE, K-H. (1995): Anti-AIDS Agents, 18. Sodium and Potassium Salts of Caffeic Acid Tetramers from *Arnebia euchroma* as Anti-HIV Agents. **Journal of Natural Products** **58(3)**, 392-400.
71. LAMAISON, J. L., PETITJEAN-FREYTET, C., CARNAT, A. (1991): Lamiacées Médicinales A Propriétés Antioxydantes, Sources Potentielles d'Acide Rosmarinique. **Pharm. Acta. Helv.** **66(7)**, 185-188.
72. PETERSEN, M. (1992): New Aspects of Rosmarinic Acid Biosynthesis in Cell Cultures of *Coleus Blumei*. **Abstracts of Short Lectures and Poster Presentations of the 40th Annual Congress on Medicinal Plant Research**, Trieste, Thieme Medical Publishers, Inc., New York.
73. KURAKAWA, M., NAGASAKA, K., HIRAYABASHI, T., UYAMA, S., SATO, H., KAGEYAMA, T., KADOTA, S., OHYAMA, H., HOZUMI, T., NAMBA, T., SHIRAKI, K. (1995): Efficiency of Traditional Herbal Medicines in Combination with Acyclovir Against Herpes Simplex Virus Type 1 Infection *in vitro* and *in vivo*. **Antiviral Research** **27(1-2)**, 19-37.
74. RAGETLI, H.W.J., WEINTRAUB, M. (1962): Purification and Characteristics of a Virus Inhibitor from *Dianthus caryophyllus* L. 1. Purification and Activity. **Virology** **18**, 232-240.
75. RAO, G.P., BAGHEL, A.K.S., SINGH, R.K., CHATTERJI, K.S. (1984): Antiviral Activity of Coralloid Root of *Cycas revoluta* Extract Against Some Viruses of Tomato Plant. **Experientia** **40(11)**, 1257-1258.

VII. KISALTMALAR

| | |
|-------------------|--|
| A | Adenin |
| AcOH | Asetik asit |
| APT | Attached Proton Technique |
| Ar-COOH | Aromatik karboksilli asit |
| Ara (ara) | Arabinoz |
| BSA | Bovine Serum Albumin |
| CE ₅₀ | Efektif konsantrasyon (Concentration Efficace) |
| Ci | Curie |
| 2,4-D | 2,4-Diklorofenoksiasetik asit |
| DMSO | Dimetil sülfoksit |
| DPPH | 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil |
| dT | Deoksi timidin |
| EGTA | Etilenglikol-O,O'-bis-(2-aminoetil)-N, N,N',N'-tetraasetik asit |
| EI-MS | Electron Impact-Mass Spectrometry |
| Et ₂ O | Dietileter |
| EtOAc | Etil asetat |
| EtOH | Etil alkol |
| FAB-MS | Fast Atom Bombardment- Mass Spectrometry |
| Glu (glu) | Glukoz |
| Glu.a. (glu.a.) | Glukuronik asit |
| Herb. No. | Herbaryum Numarası |
| HETCOR | Heteronucler Correlation |
| HIV | Human Immunodeficiency Virus |
| HIV-RT | Human Immunodeficiency Virus-Reverse Transcriptase |
| Hz | Hertz |
| IC ₅₀ | Ortalama inhibisyon konsantrasyonu (Inhibition Concentration) |
| IR | Infrared (kızılötesi) |
| İTK | İnce Tabaka Kromatografisi |
| J | Etkileşim sabiti |
| L. | Linnaeus (Linné) |
| m | Ağırlık |
| M | Molar konsantrasyon |

| | |
|--------------------|---------------------------------------|
| Me ₂ CO | Aseton |
| β-ME | 2-Merkaptoetanol |
| MeOH | Metil alkol |
| MPLC | Medium Pressure Liquid Chromatography |
| MS | Murashige-Skoog |
| N | Normal konsantrasyon |
| n-BuOH | 1-Butanol |
| NB | Nutrient Broth |
| NMR | Nükleer Manyetik Rezonans |
| ppm | Part per million |
| PVP | Polivinilpirolidon |
| PVX | Potato Virus X |
| PVY | Potato Virus Y |
| R _f | Retention factor |
| RP | Reversed Phase |
| RT | Revers Transkriptaz |
| subsp. | Sub-species |
| TCA | Triklorasetik asit |
| TMV | Tütün Mozaik Virüsü |
| Tris | Tris(hidroksimetil)amino metan |
| TTP | Timidin trifosfat |
| UV | Ultraviyole |
| v | Volum (hacim) |

VIII. ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında Ankara'da doğdum. İlk öğrenimimi Bahçelievler İlkokulu'nda, orta ve lise eğitimimi ise İstanbul Özel Moda Koleji'nde tamamladım. 1980 yılında İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde üniversite öğrenimime başladım ve 1985'de Kimya Mühendisi olarak mezun oldum. 1986 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nın Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programında öğrenime hak kazandım. "Yaşlanmakta Olan Soya Fasulyesi (*Glycine max cv. Coles*) Kotiledonlarında Peroksidaz ve Laktik Dehidrogenaz Enzimleri ile Total Protein Düzeyleri Üzerine Elektroforetik İncelemeler" başlıklı tezimi 1988 yılında tamamlayarak, Yüksek Lisans derecemi aldım. Aynı yıl, İ.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı'nda Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. 1989 yılında Moleküler Biyoloji-Biyokimya Doktora Programına kabul edildim. 1991'de Doktora Yeterlik sınavında başarılı olduktan sonra, "Sanicula europaea L. Bitkisinden Antiviral Bir Maddenin Saflaştırılması ve Kimyasal Karakterizasyonu" başlıklı doktora tezime başladım. 1993 yılından itibaren, TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi (MAM), Temel Bilimler Araştırma Enstitüsü (TBAE), Kimya Bölümü'nde, Doç. Dr. Nezhun Gören yönetiminde, tez konum ile ilgili çeşitli araştırmalar yaptım. Tez çalışmalarım sırasında, TÜBİTAK MAM TBAE tarafından düzenlenen "NMR" konulu Yaz Okulu (1992) ile Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı tarafından düzenlenen "Biyokimyasal Ayırma Yöntemleri" kursuna (1994) katıldım. 1994 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda Prof. Dr. İhsan Çalış denetiminde araştırmam ile ilgili çalışmalar gerçekleştirdim. Şu anda, İ.Ü. Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü'ndeki görevime ve akademik çalışmalarına devam etmekteyim.

Nazlı ARDA