



Adınızı soyadınızı giriniz

**DİKKAT** Teziniz yazmaya başlamadan önce Tez Yazım Kılavuzu ekindeki “TEZ YAZIM ŞABLONUN KULLANIMI”nı okuyunuz.

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit cilt sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans’sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;  
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(DOKTORA TEZİ)**

***COLCHICUM BAYTOPIORUM* C.D. BRICKELL ÜZERİNDE  
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

**UZM.ECZ. SEVDA PIRILDAR**

**DANIŞMAN  
PROF.DR. NURHAYAT SÜTLÜPİNAR**

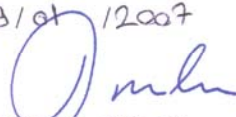
**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI**

**İSTANBUL-2006**



## TEZ ONAYI


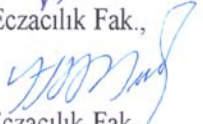
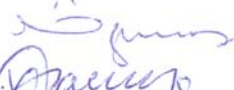


Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

09/01/2007  
  
 Prof. Dr. Emine Kökoğlu  
 Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
 Program Adı : Farmakognozi  
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans  Doktora   
 Anabilim Dalı : Farmakognozi Anabilim Dalı  
 Tez Sahibi : Uzm. Ecz. Sevda PIRILDAR  
 Tez Başlığı : Colchicum baytopiorum CD Brickell Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar  
 Sınav Yeri : Eczacılık Fakültesi, B Blok Seminer Salonu  
 Sınav Tarihi : 27 / 12 / 2006 Saat: 14.00

### Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1. "Prof. Dr. Nurhayat SÜTLÜPİNAR" (Tez Danışmanı), İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakognozi ABD. 
2. "Prof. Dr. Ali Hikmet MERİÇLİ" (Tez İzleme Komitesi Üyesi), İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakognozi ABD. 
3. "Prof. Dr. Neriman ÖZHATAY" (Tez İzleme Komitesi Üyesi), İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmasötik Botanik ABD. 
4. "Prof. Dr. Günay SARIYAR", İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Farmakognozi ABD. 
5. "Prof. Dr. Ertan TUZLACI", Marmara Üniv., Eczacılık Fak., Farmasötik Botanik ABD. 

## BEYAN

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

Sevda Pırıldar (İmza)



**İTHAF**

*Her zaman yanımda oldukları için,  
aileme...*

## TEŞEKKÜR

*Bu tezin yapılmasına olanak sağlayan, çalışmalarım sırasında ilgi ve desteğini her zaman gördüğüm Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr. Ali H. Meriçli'ye saygı ve teşekkürlerimi sunarım.*

*Bilgi ve deneyimleri ile çalışmalarımı yönlendiren, tezimin her aşamasında içten ilgi ve desteğini esirgemeyen, tez danışmanım Sayın hocam Prof.Dr. Nurhayat Sütlüpinar'a saygı ve en içten teşekkürlerimi sunarım.*

*Tez bitkimin doğadan toplanması aşamasında çok büyük yardımlarını gördüğüm değerli arkadaşım Yard.Doç.Dr. Olcay Dinç Düşen'e, değerli eşi Yard.Doç.Dr. Serdar Düşen'e, sevgili ağabeyim Kim.Müh. İsmet Pırıldar'a, Uzm.Dr. Gökhan Gökırmak ve her zaman desteğim olan ablam Uzm.Dr. S.Esra Gökırmak'a teşekkür ederim.*

*Çek Cumhuriyeti Palacky Üniversitesi'nde bazı standart maddeleri temin edebilme ve LC-MS yöntemi ile fenolik asit tayinlerinin yapılabilmesine olanak sağlayan Sayın Prof.Dr. Vilim Šimaneč'e ve analizleri yapan araştırma görevlisi Sayın Barbora Papoušková'ya teşekkür ederim.*

*MTT Yöntemi ile Sitotoksik Aktivite Tayini çalışmalarımı yürütmeme olanak sağlayan İ.Ü. Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Serap Erdem Kuruca'ya ve çalışmalarımızın her aşamasında içten ilgi ve yardımlarını gördüğüm Uzm.Bio. Belkıs Atasever'e teşekkürlerimi sunarım.*

*Doğtora tez çalışmalarının bir bölümünü Fransa'da sürdüren ama her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Uzm.Ecz. Tuba Şerbetçi'ye, çekilmesine olanak sağladığı bazı NMR ve Kütle spektrumları için en içten teşekkürlerimi sunarım.*

*Botanik bölümün hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Emine Akalın'a, farmakolojik bölüme olan katkılarından dolayı Sayın Yard.Doç.Dr. Alper Okyar'a, BSL testinin uygulanmasındaki yardımlarından dolayı Sayın Yard.Doç.Dr. Melek Ulusoylu Dumlu'ya ve tüm yardımları için Dr. Olcay Sağırlı'ya teşekkür ederim.*

*Çalışmalarım sırasında samimi destek ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Uzm.Ecz. Burçak Yeşiltepe'ye, Uzm.Ecz. Ulaş Sözer'e ve Farmakognozi Anabilim Dalı tüm öğretim üye ve yardımcılarına teşekkürlerimi borç bilirim.*

*Bu güne gelmemi sağlayan sevgili aileme her konudaki koşulsuz destekleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.*



Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-435/08032004 nolu proje olarak desteklenmiştir.



*Termessos*

*21.10.2004 - Antalya,*

*(Foto: Yard.Doç.Dr.O.Dinç Düşen)*



*Çiçek ve Yumrular (Ekim)*  
*(Foto: Prof. Dr. N. Sütülpınar)*



*Yaprak ve Meyva (Haziran)*  
*(Foto: Prof. Dr. N. Sütülpınar)*

*Colchicum baytopiorum* C.D.Brickell

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
BEYAN.....	<b>ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.</b>
İTHAF.....	V
TEŞEKKÜR .....	VI
İÇİNDEKİLER .....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	XVII
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	XX
ÖZET .....	XXII
ABSTRACT.....	XXIII
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER .....	5
2.1.Botanik Bölüm .....	5
2.1.1.Liliaceae .....	5
2.1.2. <i>Colchicum</i> L. ....	5
2.1.3. <i>Colchicum baytopiorum</i> C.D.Brickell .....	6
2.2.Kimyasal Bölüm: .....	8
2.2.1. <i>Colchicum</i> Alkaloitleri.....	8
2.2.2. <i>Colchicum</i> Alkaloitlerinin Sınıflandırılması.....	9
2.2.4. <i>Colchicum</i> Türlerinden Elde Edilen Alkaloitler .....	15
2.2.4.1.Nötral ve Nötral-fenolik Tropolon Alkaloitleri.....	15
2.2.4.2.Bazik ve Bazik-fenolik Tropolon Alkaloitleri .....	17
2.2.4.3.Farklı Yapıdaki Nötral, Bazik ve Fenolik Alkaloitler.....	18
2.2.4.4Tropolon Halkası Taşımayan Alkaloitler.....	19
2.2.4.4.Diğer Türevler.....	25
2.2.5.Tropolon Alkaloitlerinin Teşhisi .....	28
2.2.6.Tropolon Alkaloitlerinin Yapı-Aktivite İlişkileri .....	29
2.2.7. <i>Colchicum</i> Türlerinde Bulunan Fenolik asit ve Flavon Bileşikleri.....	32
2.3.Farmakolojik Bölüm .....	35
2.3.1.Farmakodinamik Özellikleri .....	35
2.3.1.1.Etki Mekanizması.....	35

2.3.2.Farmakokinetik Özellikleri .....	37
2.3.2.1.Emilim.....	37
2.3.2.2.Dağılım.....	38
2.3.2.3.Metabolizma.....	38
2.3.2.4.Atlım .....	39
2.3.3.Diğer Farmakolojik Özellikler .....	39
2.3.3.1.Toksisite ve Yan Etkiler.....	39
2.3.3.2.Gebelik ve Süt verme Döneminde Kullanım .....	40
2.3.3.3.Kontrendikasyonları ve İlaç etkileşimleri .....	40
2.3.3.4.Kullanım şekli .....	40
2.3.4.Tropolon Alkaloidlerinin Tedavide Kullanımı .....	41
2.3.4.1.Gut (Damla) Hastalığı .....	41
2.3.4.2.Ailevi Akdeniz Ateşi ve Amiloidoz.....	42
2.3.4.3.Behçet Hastalığı .....	43
2.3.5.Kolşisin ve Türevlerinin Etkileri Üzerine Yapılmış Diğer Çalışmalar.....	43
2.3.5.1.Karaciğer Sirozu.....	43
2.3.5.2.Diyabet .....	45
2.3.5.3.Alzheimer Hastalığı .....	46
2.3.5.4.Akut Perikardit.....	46
2.3.5.5.Antioksidan Özelliği .....	47
2.3.5.6.Kanser .....	48
2.4.Kanser ve Kanser Tedavisinde Bitkisel Kökenli Etken Maddeler.....	48
2.4.1.Kanser ve kemoterapi.....	49
2.4.2.Kanser kemoterapisinde doğal ürünlerin yeri .....	50
2.4.3.Mikrotübül ve Tubulin Polimerizasyonu .....	53
2.4.4.Antitubulin Ajanların Aydınlatılmasında Kullanılan Biyolojik Yöntemler .....	55
2.5.Bitkisel Kökenli Kemoterapötikler .....	56
2.5.1.Podofilotoksin .....	56
2.5.2.Kamptotesin .....	57
2.5.3.Steganacin .....	57
2.5.4.Vinca alkaloidleri.....	58
2.5.5.Taxol .....	58
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	60

3.2.Kimyasal Yöntemler .....	60
3.2.1.Fitokimyasal Ön Denemeler .....	60
3.2.1.1.Flavon Türevlerinin Aranması .....	60
3.2.1.2.Antrasen Türevlerinin Aranması .....	61
3.2.1.3.Saponin Aranması .....	61
3.2.1.4.Tanen Bileşiklerinin Aranması .....	61
3.2.1.5.Alkaloit Aranması .....	61
3.2.2.Miktar Tayini Yöntemleri .....	62
3.2.2.1.Su Miktar Tayini .....	62
3.2.2.2. Spektrofotometrik Total Alkaloit Miktar Tayini.....	62
3.2.3.Alkaloitlerin Tüketilmesi .....	64
3.2.3.1.Metanol Ekstrelerinin Hazırlanışı .....	64
3.2.3.2.Alkaloit Tüketmesi.....	64
3.2.3.3.Flavon Bileşikleri için Tüketme.....	65
3.2.4.Kromatografik Metotlar .....	66
3.2.4.1.İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) .....	66
3.2.4.2.Kromatotron (Santrifüjlü İnce Tabaka Kromatografisi) .....	67
3.2.4.3.Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi .....	68
3.2.4.4.Sütun Kromatografisi .....	69
3.2.4.5.Kağıt Kromatografisi (KK) .....	70
3.2.4.6.Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi (LC/MS) .....	70
3.2.5.Spektral Yöntemler .....	72
3.2.5.1.Kütle -Kütle Spektrumu (MS/MS).....	72
3.2.5.2.Ultraviyole Spektrumu (UV).....	72
3.2.5.3.İnfrared Spektrumu (IR).....	73
3.2.5.4.Nükleer Magnetik Rezonans Spektrumu (NMR).....	73
3.2.5.5.Kütle (Mass) Spektrumu (MS).....	73
3.2.6.Sitotoksik Aktivite Testlerinde Kullanılan Yöntemler .....	74
3.2.6.1.Brine Shrimp Letalite Testi .....	74
3.2.6.2.MTT Yöntemi ile Hücre Serileri Üzerinde Sitotoksik Aktivite Tayini .....	75
<i>Hücre Kültürlerinde Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması</i> .....	75
<i>Süspansiyon Kültürlerinin Hazırlanması</i> .....	75
<i>Lösemik Hücre Serilerinin Hazırlanması</i> .....	75

<i>Hücre Sayımı ve Canlılık Tayini</i> .....	76
<i>Kolorimetrik MTT Yönteminin Uygulanması</i> .....	76
4.BULGULAR.....	78
4.1. <i>Colchicum baytopiorum</i> Üzerinde Fitokimyasal Ön Deneme Bulguları.....	78
4.2.Miktar Tayini Bulguları .....	78
4.2.1.Su Miktar Tayini .....	78
4.2.2.Spektrofotometrik Total Alkaloit Miktar Tayini Bulguları .....	79
4.3. <i>C. baytopiorum</i> Alkaloitlerinin Ayrılması, Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloitlerin Yapılarının Aydınlatılması .....	82
4.3.1. <i>C.baytopiorum</i> M, A ve B ekstrelerinin İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi ile 3 Ayır Çözücü Sisteminde Karşılaştırılmaları .....	83
4.3.2.Alkaloitlerin Ayrılması ve Saflaştırılması .....	84
4.3.2.1.Ç-A Ekstresi .....	84
4.3.2.2.ÇS-A Ekstresi:.....	84
4.3.2.3.Yp-A Ekstresi:.....	86
4.3.2.4.T-A Ekstresi: .....	87
4.3.2.5.YH-A Ekstresi:.....	87
4.3.2.6.YE-A Ekstresi: .....	88
4.3.2.7.ÇS-B ekstresi:.....	89
4.3.3.Renk Reaksiyonları: .....	89
4.3.4.Alkaloitlerin Rf Değerleri: .....	90
4.3.5.Elde Edilen Maddelerin Yapılarının Aydınlatılması: .....	91
4.3.5.1. Kolşisin (Alkaloit TA-6).....	91
4.3.5.2. 2-Demetilkolşisin (Alkaloit YE-3).....	95
4.3.5.3. 3-Demetilkolşisin (Alkaloit Yp-31).....	99
4.3.5.4. N-Deasetil-N-Formil-3-Demetilkolşisin (Alkaloit Yp-61).....	103
4.3.5.5. 2-Demetil- $\gamma$ -Lumikolşisin (Alkaloit Yp-63).....	106
4.3.5.6. Kolşifolin (Alkaloit YE-4).....	109
4.3.5.7. 2-Demetilkolşifolin (Alkaloit Yp-21) .....	113
4.3.5.7. Demekolsin (Alkaloit TA-7).....	117
4.3.5.8. 2-Demetildemekolsin (Alkaloit ÇS-B2) .....	121
4.3.6.MS/MS Yöntemi ile Belirlenen Alkaloitler .....	125
4.4.Flavon Bileşiklerinin Ayrılması, Saflaştırılması ve Yapılarının Aydınlatılması	130

4.4.1.Flavon Bileşiklerinin Ayrılması.....	130
4.4.2.Flavon Bileşiklerinin Yapı Tayini.....	130
4.4.2.1.Renk Reaksiyonları .....	130
4.4.2.2.Luteolin (F1 Flavonu) .....	131
4.4.2.3.Apigenin (F2 Flavonu).....	133
4.5.Fenolik Asitlerin LC/MS Yöntemiyle Belirlenmesi .....	136
4.6.Sitotoksik Aktivite Testi Sonuçları.....	150
4.6.1.Brine Shrimp Letalite Testi.....	150
<i>LD<sub>50</sub> Değerleri:</i> .....	150
4.6.2.MTT Yöntemi ile Hücre Serileri Üzerinde Sitotoksik Aktivite Testleri .....	152
4.6.2.1.K562 Hücre Serisi Üzerinde Aktivite Tayini.....	152
4.6.2.2.HL60 Hücre Serisi Üzerinde Aktivite Tayini .....	156
5.TARTIŞMA .....	161
KAYNAKLAR .....	169
ÖZGEÇMİŞ .....	181



## TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Nötral ve fenolik tropolon alkaloitlerinin kimyasal formülleri.....	15
Tablo 2-2: Bazik ve fenolik tropolon alkaloitlerinin kimyasal formülleri.....	17
Tablo 2-3: Türkiye’de yetişen <i>Colchicum</i> türlerinden elde edilen alkaloitler .....	23
Tablo 2-4: <i>Colchicum</i> türlerinde bulunan flavon bileşikleri ve fenolik asitler.....	33
Tablo 3-1:Tropolon alkaloitleri için İTK’nde kullanılan çözücü sistemleri.....	66
Tablo 3-2: Flavon aglikonları için İTK’nde kullanılan çözücü sistemleri.....	66
Tablo 3-3: Flavon aglikonları için K.K.’inde kullanılan çözücü sistemleri .....	70
Tablo 3-4: LC/MS yöntemindeki çözücü sisteminin zamana göre oranı.....	71
Tablo 4-1: <i>Colchicum baytopiorum</i> bitkisine ait fitokimyasal ön deneme sonuçları.....	78
Tablo 4-2: <i>Colchicum baytopiorum</i> türünde yapılan su miktar tayini sonuçları .....	78
Tablo 4-3: Kolşisin standartının belirli konsantrasyonlarda alınan absorbans ortalamaları, S ve S <sub>R</sub> değerleri.....	79
Tablo 4-4: <i>C.baytopiorum</i> metanol ekstrelerine ait absorbans ortalamaları (A <sub>ort</sub> ) ve standart sapma (S) değerleri .....	80
Tablo 4-5. <i>C.baytopiorum</i> absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon.....	80
Tablo 4-6: <i>C.baytopiorum</i> metanol ekstrelerine ait S <sub>R</sub> , S <sub>x</sub> ve G.S. istatistik değerleri .....	81
Tablo 4-7: <i>C.baytopiorum</i> metanol ekstrelerinin hazırlanmasında kullanılan bitki miktarları .....	81
Tablo 4-8: <i>C.baytopiorum</i> metanol ekstrelerinin güven aralığında total alkaloit miktarları	81
Tablo 4-9: <i>C.baytopiorum</i> türüne ait ekstre miktarları ve % verimleri .....	82
Tablo 4-10: Sütun kromatografisinde kullanılan çözücü sistemi, oranları.....	85
Tablo 4-11: Kromatotronda kullanılan çözücü sistemi, oranları ve birleştirilen fraksiyonlara ait bakiyeler.....	88
Tablo 4-12. <i>C.baytopiorum</i> bitkisinden elde edilen alkaloitlere ait renk reaksiyonları .....	89
Tablo 4-13. <i>C.baytopiorum</i> bitkisinden elde edilen alkaloitlerin R <sub>f</sub> değerleri.....	90
Tablo 4-14: TA-6 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri.....	91
Tablo 4-15: YE-3 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri.....	95
Tablo 4-16: Yp-31 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri .....	99
Tablo 4-17: Yp-61 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri .....	103
Tablo 4-18: Yp-63 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri .....	106
Tablo 4-19: YE-4 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri.....	109

Tablo 4-20. Yp-21 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri .....	113
Tablo 4-21. TA-7 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri.....	117
Tablo 4-22.ÇS-B2 alkaloidine ait <sup>1</sup> H NMR değerleri.....	121
Tablo 4-23. Bitkinin ayrılan kısımlarında saptanan alkaloitler .....	129
Tablo 4-24: Elde edilen flavon bileşiklerinin renk reaksiyonları .....	130
Tablo 4-25: F1 flavonuna ait UV spektrumu değerleri ve değerlendirilmesi .....	131
Tablo 4-26: F2 flavonu UV spektrumu değerleri ve değerlendirilmesi .....	133
Tablo 4-27: Flavon bileşiklerinin çeşitli çözücü sistemlerindeki Rf değerleri.....	135
Tablo 4-28: Ekstrelerde saptanan fenolik asitler .....	136
Tablo 4-29. Fenolik asitlere ait retansiyon zamamı ve m/z değerleri.....	137
Tablo 4-30: 3 ayrı konsantrasyonda yapılan 3 paralel deney sonucu hayatta kalan larva sayısı .....	150
Tablo 4-31: K562 hücre serisi ile yapılan çalışmada <i>C. baytopiorum</i> ekstrelerinin 6 farklı konsantrasyondaki absorbans ortalamaları ( $A_{ort}$ ), standart sapmalar (S), kolşisin ve demekolsin şahitleri ile değerlendirilen Student- t testi sonuçları.....	154
Tablo 4-32: HL60 hücre serisi ile yapılan çalışmada <i>C. baytopiorum</i> ekstrelerinin 6 farklı konsantrasyondaki absorbans ortalamaları ( $A_{ort}$ ), standart sapmalar (S), kolşisin ve demekolsin şahitleri ile değerlendirilen Student-t testi sonuçları.....	158
Tablo 5-1: <i>C.baytopiorum</i> türünün farklı kısımlarında varlığı saptanan alkaloitler.....	163
Tablo 5-2: <i>C.baytopiorum</i> türünün farklı kısımlarında varlığı saptanan fenolik asitler....	166

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Battersby ve Leete'nin biyosentez çalışmaları.....	10
Şekil 2-2: <i>Colchicum</i> türlerinde meydana gelen alkaloitlerin genel biyosentezi.....	11
Şekil 2-3: Tropolon alkaloitlerinin biyosentezi aşamaları.....	13
Şekil 2-4: Tubulin topluluğundan oluşan mükrotübülün görünümü .....	54
Şekil 2-5: Hücre yaşam siklusu .....	54
Şekil 4-1: Kolşisinin standart eğrisi.....	79
Şekil 4-2: M, A ve B ekstrelerinin İTK ile karşılaştırılması.....	83
Şekil 4-3: TA-6 alkaloidi UV spektrumu .....	92
Şekil 4-4: TA-6 alkaloidi IR spektrumu .....	92
Şekil 4-5: TA-6 alkaloidi <sup>1</sup> H NMR spektrumu (Kolşisin).....	93
Şekil 4-6: TA-6 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (Kolşisin) .....	94
Şekil 4-7: YE-3 alkaloidi UV spektrumu .....	96
Şekil 4-8: YE-3 alkaloidi IR spektrumu .....	96
Şekil 4-9: YE-3 alkaloidi <sup>1</sup> H NMR spektrumu (2-demetilkolşisin) .....	97
Şekil 4-10: YE-3 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (2-demetilkolşisin).....	98
Şekil 4-11: Yp-31 alkaloidi UV spektrumu.....	100
Şekil 4-12: Yp-31 alkaloidi <sup>1</sup> H NMR spektrumu (3-demetilkolşisin).....	101
Şekil 4-13: Yp-31 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (3-demetilkolşisin) .....	102
Şekil 4-14: Yp-61 alkaloidi UV spektrumu.....	104
Şekil 4-15: Yp-61 alkaloidi <sup>1</sup> H NMR spektrumu (N-deasetil-N-formil-3-demetilkolşisin) .....	105
Şekil 4-16: Yp-63 alkaloidi UV spektrumu.....	107
Şekil 4-17: Yp-63 alkaloidi <sup>1</sup> H NMR spektrumu (2-demetil-γ-lumikolşisin).....	108
Şekil 4-18: YE-4 alkaloidi UV Spektrumu.....	110
Şekil 4-19: YE-4 alkaloidi IR spektrumu .....	110
Şekil 4-20: YE-4 alkaloidi <sup>1</sup> H NMR spektrumu (Kolşifolin).....	111
Şekil 4-21: YE-4 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (Kolşifolin).....	112
Şekil 4-22: Yp-21 alkaloidi UV spektrumu.....	114
Şekil 4-23: Yp-21 alkaloidi <sup>1</sup> H MNR spektrumu (2-demetilkolşifolin).....	115
Şekil 4-24: Yp-21 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (2-demetilkolşifolin).....	116
Şekil 4-25: TA-7 alkaloidi UV spektrumu .....	118

Şekil 4-26: TA-7 alkaloidi IR Spektrumu.....	118
Şekil 4-27: TA-7 alkaloidi <sup>1</sup> H NMR spektrumu (Demekolsin).....	119
Şekil 4-28: TA-7 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (Demekolsin) .....	120
Şekil 4-29: ÇS-B2 alkaloidi UV spektrumu .....	122
Şekil 4-30: ÇS-B2 alkaloidi IR Spektrumu .....	122
Şekil 4-31: ÇS-B2 alkaloidi <sup>1</sup> H NMR spektrumu (2-demetildemekolsin) .....	123
Şekil 4-32: ÇS-B2 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (2-demetildemekolsin).....	124
Şekil 4-33:ÇS ekstresinde saptanan 3-demetildemekolsin'e ait MS ve MS/MS spektrumları .....	126
Şekil 4-34:ÇS ekstresinde saptanan N-deasetil-N-formilkolşisin'e ait MS ve MS/MS spektrumları .....	127
Şekil 4-35: ÇS ekstresinde saptanan Kornigerin'e ait MS ve MS/MS spektrumları.....	128
Şekil 4-36: F1 flavonu ve luteolin şahidi IR spektrumu.....	131
Şekil 4-37: Kaydırma belirteçleri ile alınan F1 flavonu (Luteolin) UV spektrumları.....	132
Şekil 4-38: F2 flavonu ve apigenin şahidi IR spektrumu .....	133
Şekil 4-39: Kaydırma belirteçleri ile alınan F2 flavonu (Apigenin) UV spektrumları.....	134
Şekil 4-40: Ç ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum I).....	138
Şekil 4-41: Ç ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum II) .....	139
Şekil 4-42: ÇS ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum I) .....	140
Şekil 4-43: ÇS ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum II).....	141
Şekil 4-44: Yp ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum I) .....	142
Şekil 4-45: Yp ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum II).....	143
Şekil 4-46: T ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum I).....	144
Şekil 4-47: T ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum II).....	145
Şekil 4-48: YE ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum I).....	146
Şekil 4-49: YE ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum II).....	147
Şekil 4-50: YH ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum I).....	148
Şekil 4-51: YH ekstresine ait LC/MS spektrumu (Spektrum II) .....	149
Şekil 4-52: Kolşisin ve <i>C. baytopiorum</i> ekstrelerinin K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....	152
Şekil 4-53: Demekolsin ve <i>C. baytopiorum</i> ekstrelerinin K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi .....	153

Şekil 4-54: Kolşisin ve <i>C. baytopiorum</i> ekstrelerinin HL60 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi.....	156
Şekil 4-55: Demekolsin ve <i>C. baytopiorum</i> ekstrelerinin HL60 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi .....	157

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- A** : Absorbans  
**ACN** : Asetonitril  
**ATC** : American Type Culture Collection  
**BSL** : Brine Shrimp Letalite Testi  
**C** : Konsantrasyon  
**Ç** : Çiçek  
**ÇS** : Çiçek Sapı  
**D** : Demekolsin  
**DMSO** : Dimetilsülfoksit  
**ELISA** : Enzyme Linked Immunosorbent Assay  
**ESI** : Electron Spray Ionization  
**FCS** : Foetal Calf Serum  
**FMF** : Ailevi Akdeniz Ateşi  
**G.S.** : Güven Sınırları  
**GSH** : Redükte Glutasyon  
**GSHPx** : Glutasyon Peroksidaz  
**HL60** : Promiyeloid Lösemi Hücre Serisi  
**IMDM** : Iscove's Modified Dulbecco's Medium  
**IR** : Infrared Spektroskopisi  
**İSTE** : İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbariumu  
**İTK** : İnce Tabaka Kromatografisi  
**J** : Eşleşme Sabiti  
**K** : Kolşisin  
**K532** : Kronik Miyeloid Hücre Serisi  
**KK** : Kağıt Kromatografisi  
**LC** : Sıvı Kromatografisi  
**LK<sub>50</sub>** : % 50 Letal Konsantrasyon  
**M** : Metanol  
**MDA** : Malondialdehit

- MS** : Kütle (Mass) Spektroskopisi
- MTT** : 3-[4,5-dimetiltiyazol-2-yl]-2,5-difenil Tetrazolyum Bromit
- NA** : Naturstoffreagenz A: Difenil Borik Asit  $\beta$ -amino Etil Ester
- NADP** : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfataz
- NIDDM**: Non Insuline Dependent Diabetes Mellitus
- NMR** : Nükleer Magnetik Rezonans
- Rt** : Retansiyon (=Alıkonma) Zamani
- S** : Standart Sapma
- SI** : Sitotoksisite İndeksi
- SOD** : Superoksit Dismutaz
- S<sub>R</sub>** : Relatif Standart Sapma
- S<sub>x</sub>** : Standart Hata
- T** : Tohum
- t** : % 95 Güven Düzeyi İçin Verilen Sabite
- UV** : Ultraviyole (Spektrumu)
- YE** : Yumru (Ekim)
- YH** : Yumru (Haziran)
- Yp** : Yaprak
- $\delta$**  : Kimyasal kayma

## ÖZET

Pırıldar, S. (2006). Colchicum baytopiorum C.D.Brickell Üzerinde Farmakognozیک Araştırmalar. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, endemik bir tür olan Colchicum baytopiorum C.D.Brickell bitkisinin çiçek, çiçek sapı, yaprak, tohum ve yumruları (Haziran ve Ekim aylarında toplanan) kimyasal açıdan ve sitotoksik aktivite yönünden ayrı ayrı çalışılmış ve sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Sütun kromatografisi, kromatotron ve preparatif İTK yöntemleri uygulanarak elde edilip UV, IR, <sup>1</sup>H NMR ve ESI/MS spektral yöntemleri ile yapıları aydınlatılan kolşisin, 2-demetilkolşisin, 3-demetilkolşisin, 3-demetil-N-formil- N-deasetilkolşisin, 2-demetil-γ-lumikolşisin, kolşifolin, 2-demetilkolşifolin, demekolsin ve 2-demetil demekolsin isimli bilinen 9 adet alkaloidin varlığı saptanmıştır. Ayrıca, kornigerin, N-formil-N-deasetilkolşisin ve 3-demetildemekolsin alkaloidlerinin varlığı ise MS/MS yöntemi ile belirlenmiştir.

Çiçek sapı eter ekstresinden apigenin ve luteolin isimli flavon aglikonları elde edilmiş, yapı tayininde UV ve IR spektrofotometrisi yöntemleri kullanılmıştır. Diğer eter ekstrere sadece İTK yöntemi ile karşılaştırılmış, sonuçta yaprak ekstresinde apigenin ve luteolin, çiçek ekstresinde ise sadece apigenin varlığı saptanmıştır. Tohum ve yumrulara flavon bileşimi bulunamamıştır.

Metanol ekstrelerinde LC/MS yöntemi kullanılarak benzoik, kumarik, vanilik, sinnamik, ferulik, kafeik asitler, 2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit, 4-hidroksi-3-metoksi benzoik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 2-hidroksibenzoik asit ve 4-hidroksibenzoik olmak üzere toplam 11 adet fenolik asidin varlığı saptanmıştır.

Metanol ekstrere sitotoksik aktivite açısından öncelikle Brine Shrimp yöntemi ile incelenmiş ve ekstrere tümünün aktif olduğu görülmüştür. Bu doğrultuda ekstrere, MTT yöntemi kullanılarak K562 ve HL60 lösemi hücre serilerinde kolşisin ve demekolsin şahitleri ile karşılaştırılmış ve sonuçlar Student-t testi ile değerlendirilmiştir. Sonuçta, tohum hariç tüm ekstrere HL60 hücrelerine karşı K562 hücrelerinde olduğundan daha sitotoksik etkide oldukları ve spektrofotometrik total alkaloid miktar tayini sonucunda en yüksek alkaloid oranına sahip oldukları saptanan çiçek (% 5,27) ve çiçek sapı (% 2,96) metanol ekstrere, en yüksek aktiviteyi gösterdikleri belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Colchicum baytopiorum, kolşisin, tropolon alkaloidleri, fenolik asit, sitotoksik aktivite.

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-435/08032004 no'lu proje olarak desteklenmiştir.



## ABSTRACT

Pirildar, S. (2006). Pharmacognostical Investigations on *Colchicum baytopiorum* C.D. Brickell. Istanbul University Institute of Health Science, Department of Pharmacognosy. PhD Thesis. Istanbul.

In this study, flower, stem, leaf, seed and corms (collected in June and October) of *Colchicum baytopiorum* which is an endemic species, were studied in terms of plant chemistry and cytotoxic activity and the results were compared with each other.

Nine known alkaloids namely colchicine, 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine, 3-demethyl-N-formyl-N-deacetylcolchicine, 2-demethyl- $\gamma$ -lumicolchicine, colchifoline, 2-demethylcolchifoline, demecolcine, 2-demethyl demecolcine were isolated and purified by chromatotron, column and preparative thin layer chromatographic methods and their structures were identified using spectrometric methods such as UV, IR,  $^1\text{H}$  NMR and ESI/MS. Cornigerine, N-formyl-N-deacetylcolchicine and 3-demethyl demecolcine were detected by MS/MS spectrometer.

Two flavonoids, apigenine and luteoline were isolated from the ether extract of stem by preparative thin layer chromatography and their structures were identified by UV and IR spectroscopy. These flavonoids were also found in methanolic leaf and flower extracts. No flavonoids were found in seed and corms extracts.

In all methanolic extracts 11 phenolic acids namely; benzoic, coumaric, vanillic, cinnamic, ferulic, caffeic acids, 2-hydroxy-6-methoxybenzoic acid, 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid, 2-hydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid were detected using LC/MS.

All methanolic extracts were subjected to cytotoxicity assay by Brine Shrimp method and all extracts were found to be active. The cytotoxicities of the extracts were evaluated using K562 and HL60 cell lines by MTT test and all extracts were compared with colchicine and demecolcine using Student's *t* test. Except the seed extract, all extracts were found more cytotoxic on HL60 cell line than K562 cell line. The results also showed that methanolic extracts of flower (5.27 %) and stem (2.96 %), which have the richest alkaloid contents, were the most active extracts.

**Key Words:** *Colchicum baytopiorum*, colchicine, tropolone alkaloids, phenolic acid, cytotoxic activity.

This study was supported by The Research Support Unit of İstanbul University as the project no T-435/08032004.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doktora tezinin konusunu oluşturan *Colchicum baytopiorum* C.D. Brickell türü, Türkiye bitkileri özellikle soğanlı türler üzerindeki çalışmalarını ömrünce sürdürmüş olan rahmetli hocamız Prof.Dr. Turhan Baytop'un adının yaşatıldığı bir tür olması nedeniyle ayrı bir öneme sahiptir. Tez çalışmasına, hocamızın vefat ettiği 25.6.2002 tarihinden hemen sonra başlanmış olması, *C. baytopiorum* türünün seçilmesinde etken olmuş ve onun bizlere verdiği emeklere bir şükran borcunu yerine getirmek amacıyla bu tür üzerinde çalışma düşüncesi doğmuştur.

Liliaceae (Colchicaceae) familyasında yer alan *Colchicum* cinsinin, tedavideki önemi 2000 yıldan daha fazla bir süreden beri bilinmektedir (65). Eski Mısır'ın Ebers Papyrus'unda (M.Ö. 1550) yaklaşık 700 bitki listelenmiştir. Bu bitkilerden yirmi kadar günümüzde halen kullanılmakta ve *Colchicum* türleri de bu bitkiler arasında yer almaktadır (23, 114).

*Colchicum* ismi köken olarak Colchis (Doğu Karadeniz, Güney Kafkasya, Batum yöresi) kelimesinden gelir. Asırlardan beri Hermodactyl, Sürinjan ve *Colchicum* adlarıyla anılan bu bitkinin M.Ö 800'lerde Hindistan ile Arabistan arasında ticaret amacıyla taşındığı bilinmektedir (15, 41, 55).

*Colchicum* cinsinin botanik açıdan ilk tanımı 1.yy da Dioscorides tarafından yapılmış, (65) daha sonra Linne, Dioscorides'in vermiş olduğu ismi koruyarak Yunanca "kolchicon" olan ismi Latince "*Colchicum*" ismi ile değiştirmiştir (115). *Colchicum* ekstrelerinin gut tedavisinde kullanıldığını bildiren ilk kaynak, yine Dioscorides'e ait olan "Materia Medica" dır (65). 6.yy da Alexander of Trallis tarafından *Colchicum* ekstreleri ile gut tedavisinin yapıldığı bilinmektedir (73, 81). *Colchicum* yumrusu, yüksek toksisitesine rağmen ağrıyı çok çabuk geçirdiği için ilk defa 1618 de London Pharmacopoeia'de listelenmiş fakat daha sonra çıkarılmıştır. *Colchicum* bitkisi esas olarak 1763 de Viyana' da Anton Stoerck tarafından hazırlanan ekstre ve pilüllerin gut hastalığına karşı kullanılması ile modern tedavi alanına girmiş ve zamanla önemi artmıştır. Tohumlar ise ilk defa 1820 de Dr.Williams tarafından tıbbi tedavi alanında kullanılmış ve ardından 1824 de London Pharmacopoeia' de kabul edilmiştir (115).

*Colchicum* türlerinin kimyasal yapısı üzerindeki çalışmalar 20.yy' ın ikinci yarısında başlamıştır (48, 118). Yapılan ilk çalışmalar esnasında, 1820 yılında Pelletier ve Caventou, alkaloit yapısındaki "Kolşisin" isimli maddeyi ilk olarak izole etmiş ve ardından ana halka yapısı üzerindeki çalışmaları sürdürmüşlerdir (23). Daha sonraları Dewar, Gieger, Oberlin, Zeisel ve Houde kristalize kolşisinin yapısı üzerindeki çalışmalara devam etmiştir. Kolşisin üzerindeki modern kimyasal çalışmalar ise, Eigsti ve Dustin tarafından yapılan ve kolşisinin bitki ve hayvanlarda hücre bölünmesi üzerine olan güçlü etkisinin varlığının ortaya çıkmasının ardından başlamıştır ( 23, 45, 125).

Kolşisinin ana halkası benzosikloheptanotropolon yapısındadır ve bu halka yapısına sahip alkaloitlere genel olarak "tropolon alkaloidi" ismi verilmektedir. Bu sınıf alkaloitler Liliaceae familyasının bir alt familyası olan Wurbaoidae alt familyası bitkilerinde bulunur (6, 23, 45, 46, 107).

Kolşisin, hücre bölünmesini metafaz safhasında durdurur ve böylece güçlü bir antitümöral, antikanser etki oluşturur. Ancak bu etken maddenin tedavideki en büyük sorunu, sahip olduğu bu etki amacıyla kullanılmak istendiğinde, letal doz ve tedavi dozunun birbirine çok yakın olmasıdır (21). Bu nedenle yapılan çalışmalar; gerek izolasyon çalışmaları gerekse sentez kimyası çalışmaları olsun, hep kolşisine benzer etki gücünde ancak toksisitesi çok daha az olabilecek kolşisin türevlerinin bulunmasına yönelik olmuştur (29, 42, 126).

Kolşisin, kanser ve tümörler üzerine olan etkilerinin yanısıra sahip olduğu güçlü antienflamatuvar etki dolayısı ile gut, Behçet hastalığı ve ailevi Akdeniz ateşinin spesifik ilacıdır (8, 66, 68, 69, 82). Sentetik bir türev olan ve 3-demetiltiyokolşisinden hareketle hazırlanan tiyokolşikozit ise tedavide miyeroleksan (kas gevşetici) etkisi nedeniyle kullanılmaktadır (21, 87, 121) .

Türkiye'de kolşisin ve türevlerinden hazırlanmış olan ve günümüz tedavisinde kullanılan Colchicum-Dispert<sup>®</sup>, Kolsin<sup>®</sup>, MuscoRil<sup>®</sup>, Muscoflex<sup>®</sup>, Adeleks<sup>®</sup>, Thiospa<sup>®</sup>, gibi preparatlar mevcuttur.

Kolşisinin bir diğer önemli kullanım alanı ise bitki genetiği araştırmaları ve bitki yetiştiriciliğidir. Kolşisinin mitoz bölünme esnasında kromozom sayısını iki katına çıkarma özelliği sayesinde diploit ve ileri aşamalarda poliploit hücreler oluşturması özelliğinden yararlanılarak daha büyük çiçek ve meyva veren bitkiler elde edilebilmektedir (17, 64, 100).

*Colchicum* bitkisi ya da Colchici semen drogu denildiğinde akla ilk gelen *Colchicum autumnale* (güz çiğdemi) türüdür. Ülkemizde doğal olarak yetişmeyen sadece Avrupa'da doğal olarak yetişen bu tür, İkinci Dünya Savaşı'na kadar, tedavi alanında önem kazanmış tropolon alkaloitlerinin elde edilmesi açısından Dünya piyasalarında yararlanılan tek kaynaktı. Ancak daha sonraları bu drog alkaloit fabrikalarının ihtiyacını karşılayamaz duruma gelmiş, bu durumun bir sonucu olarak da Türkiye'nin Kuzey doğu Bölgesinde yetişen *Colchicum* türlerinden (özellikle *C.speciosum*) elde edilen tohumlar dış ülkelere satılmaya başlanmıştır.

Ülkemiz 15'i endemik olmak üzere toplam 41 (96) *Colchicum* türü ile *Colchicum* türleri açısından en zengin ülkelerden biridir (78). Anabilim dalımızda 1970 li yıllarda *Colchicum* türleri üzerinde çalışmalara başlanmış (14) ve daha sonra Sütlüpınar N tarafından devam edilmiştir (15a, 58, 59, 90-93, 111-116). Ülkemizde yetişen *Colchicum* türleri üzerinde yapılan çalışmalar, bir çok *Colchicum* türünün *C. autumnale* türüne yakın ya da daha yüksek oranda, tedavi açısından önemli tropolon alkaloitlerini taşıdığını göstermiştir. Bu çalışmalarda *C. baytopiorum* türünün de alkaloit içeriği açısından zengin olduğunu gösterilmiştir (113).

Anabilim dalımızda *Colchicum* türleri üzerinde 1970 yılından beri sürdürülmekte olan çalışmalar doğrultusunda, ülkemizde oldukça dar bir alanda yetişen ve endemik bir tür olan *C.baytopiorum* türünün alkaloit, flavon bileşikleri ve fenolik asit içeriğinin belirlenmesi bu çalışmanın esası olarak planlanmış; bitkinin çiçek, çiçek sapı, yaprak, tohum ve yumrularında (Haziran ve Ekim aylarına ait) bulunan alkaloitlerin izolasyonu ve izole edilen alkaloitlerin yapılarının aydınlatılması, aynı zamanda flavon bileşiklerinin izolasyonu ve yapılarının aydınlatılması ve fenolik asit içeriğinin ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

*C. baytopiorum* türü üzerindeki farmakognozic araştırmaların, botanik ve kimyasal açıdan yapılan incelemelerin yanı sıra biyolojik aktivite çalışmalarıyla sürdürülmesi amacıyla, bitkinin farklı kısımlarından elde edilen metanol ekstraktları üzerinde öncelikle Brine Shrimp yöntemi ile ve daha sonra K562 ve HL60 lösemi hücre serileri üzerinde kolorimetrik MTT yöntemi kullanılarak sitotoksosite tayini yapılması planlanmıştır. Sitotoksosite çalışmalarında şahit madde olarak kolşisin ve demekolsin kullanılması ve sonuçların Student-t testi uygulanılarak elde edilen istatistiksel veriler doğrultusunda değerlendirilmesi düşünülmüştür.

Bu alışma sırasında, bitkinin her bir kısmına ait ekstreler üzerinde yapılan farmakognozik analizlerden elde edilen sonuçların birbirleriyle karşılaştırılmaları amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1.Botanik Bölüm:

#### 2.1.1.Liliaceae (18)

Çok yıllık (nadiren tek yıllık) genellikle rizomlu, kormuslu, soğanlı ya da tuberli; nadiren de dikenli tırmanıcı bitkiler. Yapraklar tabanda ya da gövdede (nadiren sapsız karşılıklı iki sıra üzerinde ve tabanlarıyla birbirlerini örter vaziyette sık dizilişli), bazen de ovat ya da linear yaprağa benzer şekillerdeki gövdelerde (kladotlar) pullara indirgenmiş. Çiçek durumu birleşik salkım (panikula), salkım (rasem), şemsiye (umbella) ya da yalancı şemsiye (korimbus) şeklinde veya çiçekler tek. Periant iki sıralı (nadiren iç sıranın ortadan kalkması ile tek sıralı); segmentler (4 -) 6 ( - 8) adet, serbest ya da birleşik, genellikle petalimsi. Stamenler (4 -) 6 (- 10). Nektaryumlar sepallerde, tabanda ya da periant üzerinde. Ovaryum 3- gözlü, daima üst durumlu (nadiren perigin disk ile birlikte) stiluslar 1-3, nadiren 5, basit ya da loplu. Meyva bir kapsula ya da bakka. Tohumlar yuvarlak, üç yüzlü ya da tabla şeklinde.

#### 2.1.2.Colchicum L. (18)

Çok yıllık bitkiler. Toprakaltı gövdesi tunikalı bir kormus, bazen uzamış yatay rizoma benzer stolonlu çıkıntıları olan sürünücü gövdeler şeklinde (soboller); tunikalar zarımsı, kağıtsı veya derimsi, genellikle tüpsü, kalıcı bir 'boyun' içinde son bulur. Gelişen yapraklar ve çiçek durumu zarımsı bir kım içinde (katafil). Yapraklar tabanda, kısmen çiçek açma evresinde (sinantus) veya çiçeklenmeden sonra (histerantus), bazen çiçekler solduğunda (subsinantus) gelişir. Çiçeklerin her biri küçük bir brakteli ve çok kısa saplı tek veya demet halinde, sap kapsüllerin olgunlaştığı sırada uzar. Periant çan veya huni şeklinde, rotat ya da stellat, morumsu kırmızı, pembe veya beyaz, bazen teselat. Periant parçaları 6 adet, tabanda iki eşit veya hemen hemen eşit seriler halinde tüp şeklinde birleşmiş; parçaların tabanı kulakçıklı, boğaz bazen (filament tabanlarının oluşturduğu) bir 'filament kanalı' ile çıkıntılı, çıkıntılar çıplak veya kısa tüylü. Stamenler periant parçalarının tabanı ile birleşmiş, 1 veya 2 sıralı; filamentler ince,

bazen tabanda kalınlaşmış; anterler filamentlerin tepesine sırtından bağlı, oynak (Türkiye'deki türlerde), iç yüzünden açılır. Stiluslar 3 adet, serbest, stigmalar nokta şeklinde veya stilus boyunca tek taraflı olarak aşağıya doğru uzanır, ovaryum toprakaltında. Meyve septisit kapsül, 3 gözlü; tohumlar çok sayıda, yuvarlağa yakın veya yuvarlak.

### **2.1.3. *Colchicum baytopiorum* C.D.Brickell (18)**

Kormus 2.5–3.5x1.5-2.5 cm, dar ovattan hemen hemen yuvarlağa kadar değişen şekillerde, bazen gövdenin toprak altında sürünücü (sobolifer) horizontal veya olmayan, 4-6x1.3-2 cm çapında, düzensiz şekilde tabanı var; tunikalar kızıl-kahve, zarımsı veya kağıt şeklinde, genellikle çabuk düşücü. Yapraklar 3, çiçekler ile aynı zamanda meydana gelir (sinantus) ya da nadiren bitkinin çiçekleri ancak solarken meydana gelir (subsinantus), ilk oluştuğunda hemen hemen dik, sonra aşağıya doğru kıvrık, dar lanseolattan oldukça dar lanseolata kadar değişen şekillerde, spatula çiçek açma döneminde 1-5 (-8) cm den, olgunlukta (20 -) 22–32 cm x 24- 45 mm gelişir, tepesi obtus veya akut, tüysüz. Çiçekler 1-3 (-5) adet, çan ya da huni şeklinde. Periant segmentleri parlak morumsu pembe, (2.2 -) 2.5–3.5(- 4.2) cm x 5–8(-11) mm boyutlarında; eliptik, oblong eliptikten veya oblanseolat ve tepede obtus veya akut, tüysüz. Filamentler 10-14 mm boyunda, beyaz ve şişkin tabanlı, turuncu, tüysüz; anterler sarı, 5-7x1 mm boyutlarında, polenler limon sarısı. Stilus düz, stigmalar noktalı şekilde. Kapsüller dar elips şeklinde, 2-2.5 cm x 9-10 mm boyutlarında, açık ya da gümüşü kahve, belirsiz veya belirgin ağımsı damarlı şekilde ve koyu benekli, tüysüz, uç kısmı bir tepecik (apikulus) şeklinde.

Çiçeklenme zamanı: Ekim - Kasım

Yetiştirme ortamı: *Pinus* makilikleri, *Styrax officinalis*, *Quercus* ve *Pinus* ormanlarının açık alanlarındaki kayalıklar arasında, demirce zengin kızıl topraklar.

Tipus: Türkiye C3 Antalya: Termessos, 550 m, 7.XI.1976, T.Baytop ISTE 36255 (holo. ISTE, çiçek). yaprak ve kapsül Brickell tarafından tanımlanmış 1380 (K).

Türkiye'deki yayılışı:

Güney Batı Anadolu. C3 Antalya: Termessos yakınları, 550 m, T.Baytop&Leep (ISTE 33890, çiçek) ibid., 900-1000 m, Brickell 1380 (yaprak&meyva) ibid., 900 m, Pasche 73-4 (fotoğraf ), kültür Brickell 16.X.1976 (çiçek) d. Kemer, Kesmeboğazi'ndan Sumrakşehri'ne kadar olan bölge, 50-600 m, Peşmen&Güner 4768 (yaprak&meyva) Isparta: Anamas'ın yukarı kısmı, Siehe 1911: 87 (çiçek)

Endemik. Akdeniz elementi.

*Colchicum* türleri çiçeklenme zamanına göre 2 gruba ayrılmaktadır (115, 116).

a) **Sonbaharda çiçek açan türler;** bu türler sonbaharda çiçek açar, bu mevsimde yaprak oluşumu olmaz. Toprak üzerinde sadece çiçek vardır. Yapraklar ilkbahar sonuna doğru oluşur, meyva yaz mevsimi başında meydana gelir. Yapraklar genellikle geniş ve büyüktür (115) .

b) **İlkbaharda çiçek açan türler;** bu türlerde çiçek ilkbaharda oluşur. Çiçek ve yaprak aynı zamanda meydana gelir. Yapraklar darca lineardır.

Sonbaharda çiçek açan türlerin yumruları genellikle daha büyük ve tohum verimleri daha yüksektir.

Türkiye Florası'nın 2. ek cildinin yayımlanmasından bu yana görülen taksonomik değişikliklerle birlikte 27 *Colchicum* türünün (28 takson) sonbaharda çiçeklendiği, 8 *Colchicum* türünün ise erken ilkbaharda çiçek açtığı tespit edilmiştir. Cins toplam 35 türden (36 takson) oluşmaktadır ve bunların 15'i Türkiye için endemiktir (4, 18, 97).

Persson K. tarafından yapılan çalışmalarda *Colchicum* cinsinin dünya üzerinde yaklaşık 90 tür (123), Türkiye'de ise 41 tür ile temsil edildiği bildirilmiştir (96).

*C.baytopiorum* türü üzerinde morfolojik ve anatomik incelemeler yapılmıştır (38, 67).

**Not:** *Colchicum* cinsi son yayınlarda Colchicaceae familyasına dahil edilmektedir (124).



## 2.2.Kimyasal Bölüm:

### 2.2.1.Colchicum Alkaloitleri:

*Colchicum* alkaloitleri sadece Liliaceae familyasının Wurbacoideae alt familyası bitkilerinde bulunmaktadır (129). Bu alt familya bitkilerinden *Androcymbium*, *Bulbocodium*, *Camptorrhiza*, *Colchicum*, *Dipidax*, *Gloriosa*, *Iphigenia*, *Merendera*, *Littonia*, *Ornithoglossum*, *Kreysigia*, *Wurmbea* ve *Sandersonia* türlerinin *Colchicum* alkaloitleri taşıdıkları yapılan çalışmalarla belirlenmiştir (45, 126, 127, 129).

Ancak ilginç olarak, dünyadaki doğal ürünler açısından en geniş bilgi ağına sahip olan NAPRALERT kaynaklarında, kolşisinin Liliaceae familyasındaki 28 cins ve 91 türde bulunduğu, aynı zamanda Araceae familyasından *Arisaema curvatum* ve Asteraceae (Compositae) familyasından *Saussurea sacra* türlerinde de kolşisin varlığının saptandığı kayıtlıdır. Biyogenetik açıdan bakıldığında kolşisinin monokotil (Liliaceae, Araceae gibi) bitkiler dışında Asteraceae familyasındaki dikotil bir bitkide oluşumunun normal olmadığı ve bu konuda yapılmış kayıtlı sadece bir çalışmanın olduğuna dikkat çekilmiştir (137).

Son zamanlarda ilginç olarak *Ginkgo biloba* içeren besin takviyelerinde kolşisin varlığının saptandığını iddia eden bir çalışma yayınlanmıştır. Bunun üzerine *Ginkgo* içeren besin takviyeleri üzerinde bir çok çalışma yapılmış ve *Ginkgo biloba* ve besin takviyelerinin kolşisin içermediği açıklanmıştır (35, 74, 98).

*Colchicum* alkaloitleri üzerinde ilk çalışmalar 1820 yılında Pelletier ve Caventou tarafından kolşisinin izole edilmesi ile başlamıştır. Kolşisinin yapısı ise 1945'te Dewar tarafından aydınlatılmıştır (46, 87).

Sanayide *Colchicum* alkaloitleri *Colchicum* ve *Gloriosa* türlerinden elde edilmektedir.

Kapalı formülü [N-5,6,7,9-tetrahidro-1,2,3,10-tetrametoksi-9-oksobenzo (a) heptalen-7-il-(S)-asetamit] olan kolşisin ve analogları tropolon halkası taşırlar (23, 130).

*Colchicum* türleri üzerinde yapılan çalışmalar, bitkide tropolon alkaloitlerinin yanı sıra bunların lumi türevlerinin ve ayrıca tropolon halkası taşımayan alkaloitlerin bulunduğunu göstermiştir (45, 79, 107).

### **2.2.2. *Colchicum* Alkaloitlerinin Sınıflandırılması (107, 115)**

#### **I. Tropolon Alkaloitleri ve Lumi Türevleri**

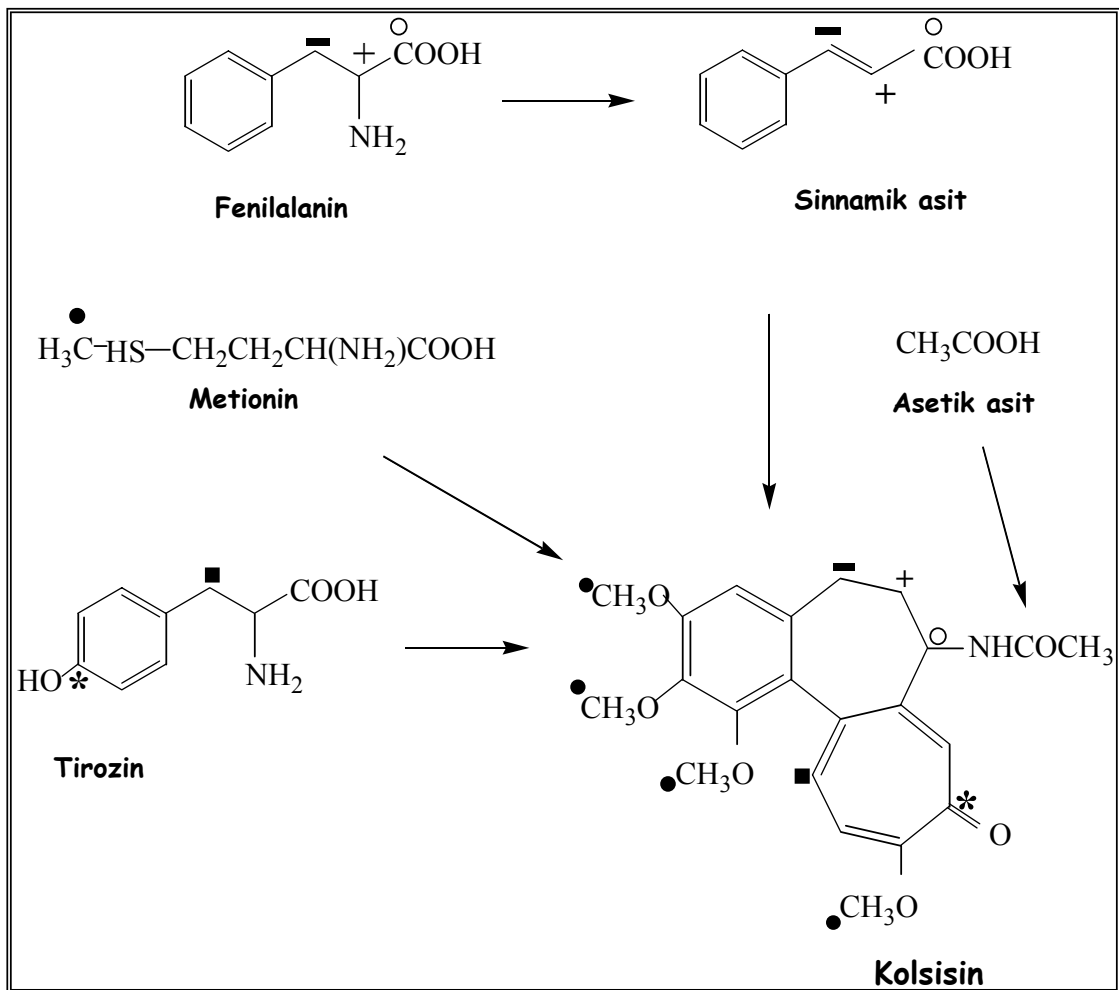
- a) Nötral ve Nötral - fenolik alkaloitler
- b) Bazik ve Bazik- fenolik alkaloitler
- c) Glikozidik alkaloitler

#### **II. Tropolon Halkası Taşımayan Alkaloitler**

- a) Feniltetrahidroizokinolin alkaloitleri
- b) Homopromorfinan alkalotleri
- d) Homoproaporfin alkaloitleri
- e) Homoaporfin alkaloitleri
- f) Aporfin alkaloitleri

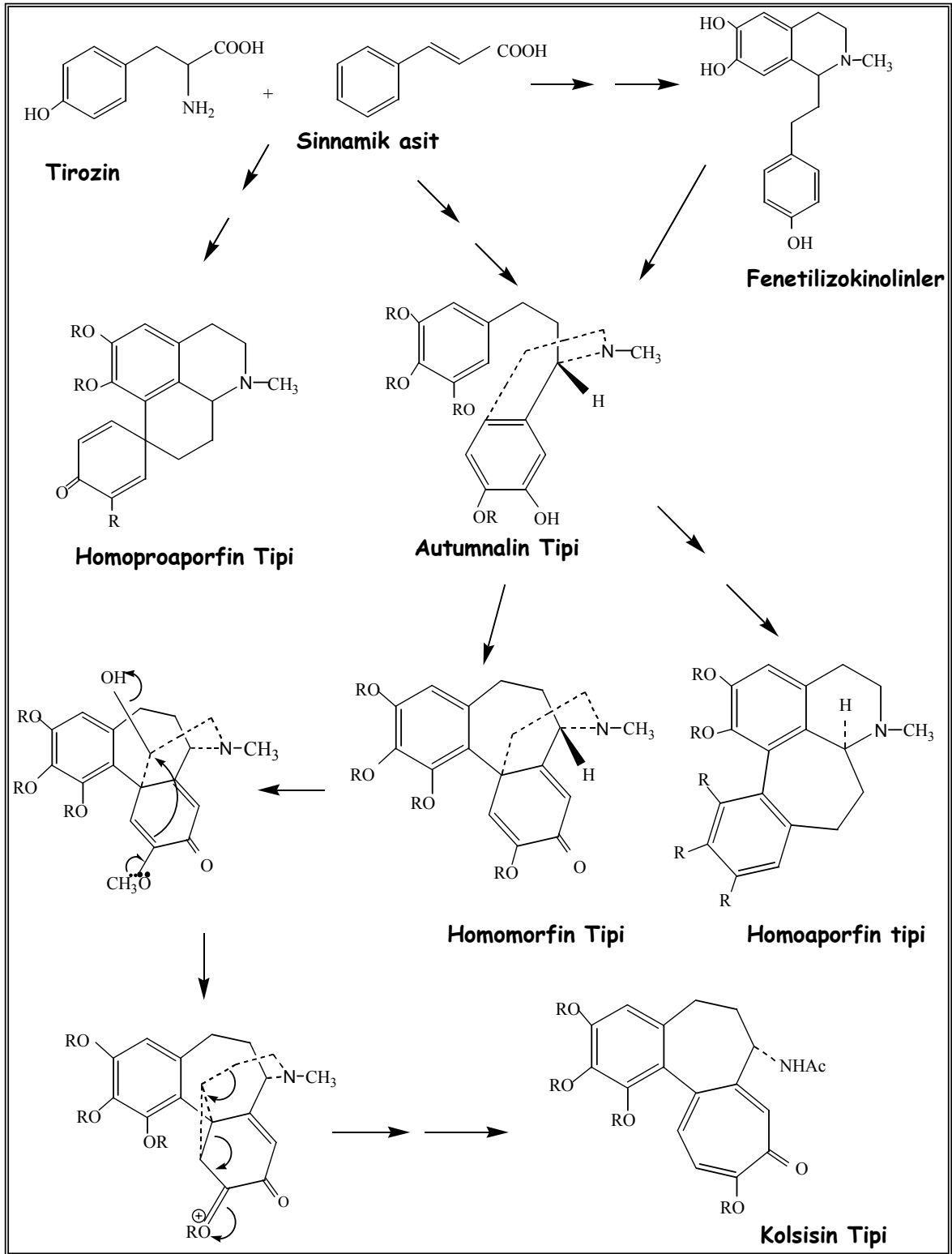
### 2.2.3. *Colchicum* Alkaloitlerinin Biyosentezi

*Colchicum* alkaloitlerinin biyosentezi üzerindeki ilk çalışmalar 1960 yılında Battersby ve Leete tarafından izotopla işaretlenmiş bileşikler üzerinde yapılmıştır (45, 72). Battersby ve Leete, fenilalanin, tirozin, metionin, asetik asit ve sinamik asit yardımıyla yapmış oldukları çalışmalar sonucunda, kolşisindeki asetamido grubunun asetik asitten, A halkası ve 5, 6, 7 ve 12 nolu karbon atomlarının fenilalanin ve sinamik asitten ve tropolon halkasının tirozinden meydana geldiğini göstermişlerdir (115). (Şekil 2-1)



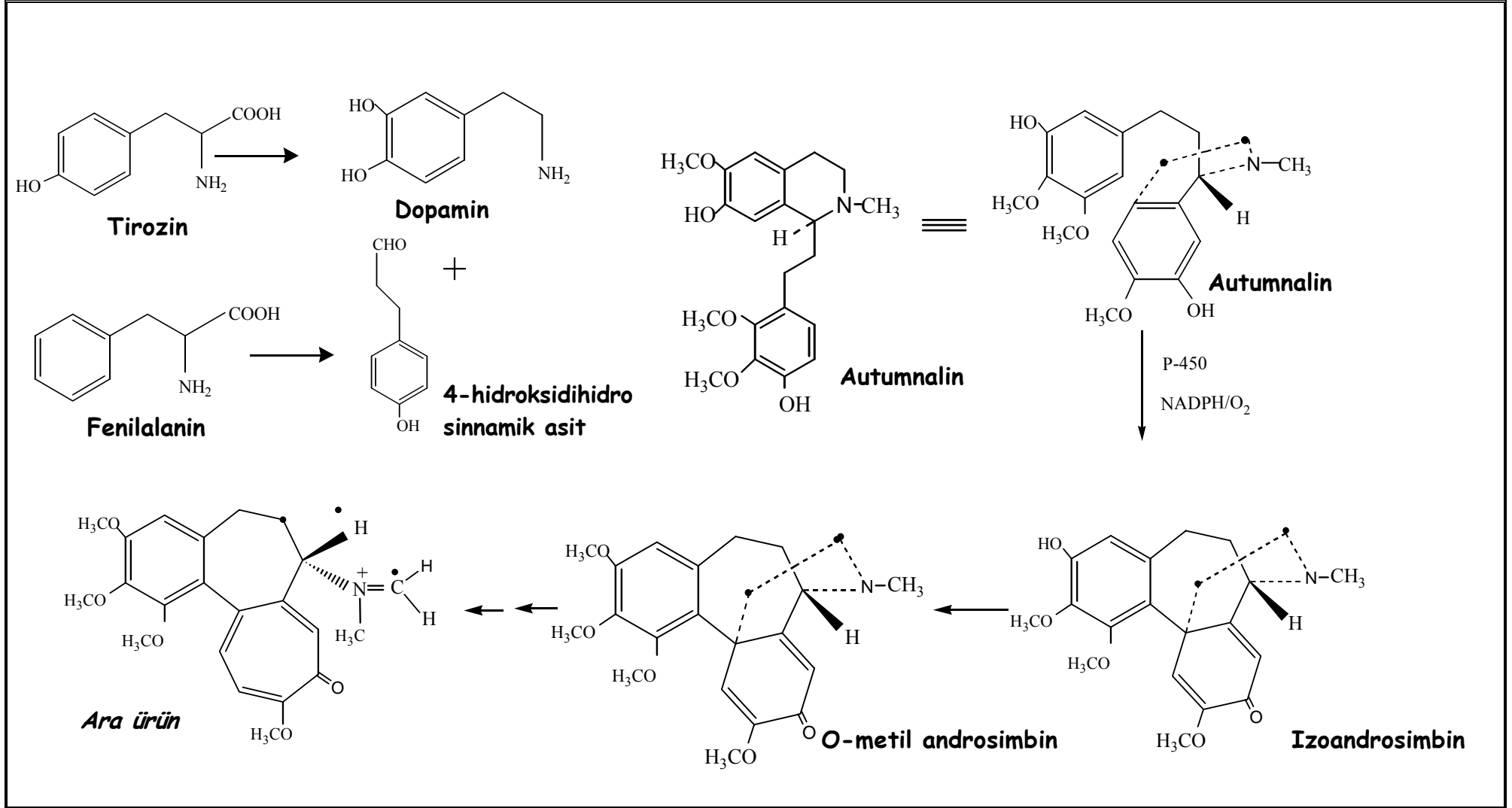
Şekil 2-1: Battersby ve Leete'nin biyosentez çalışmaları

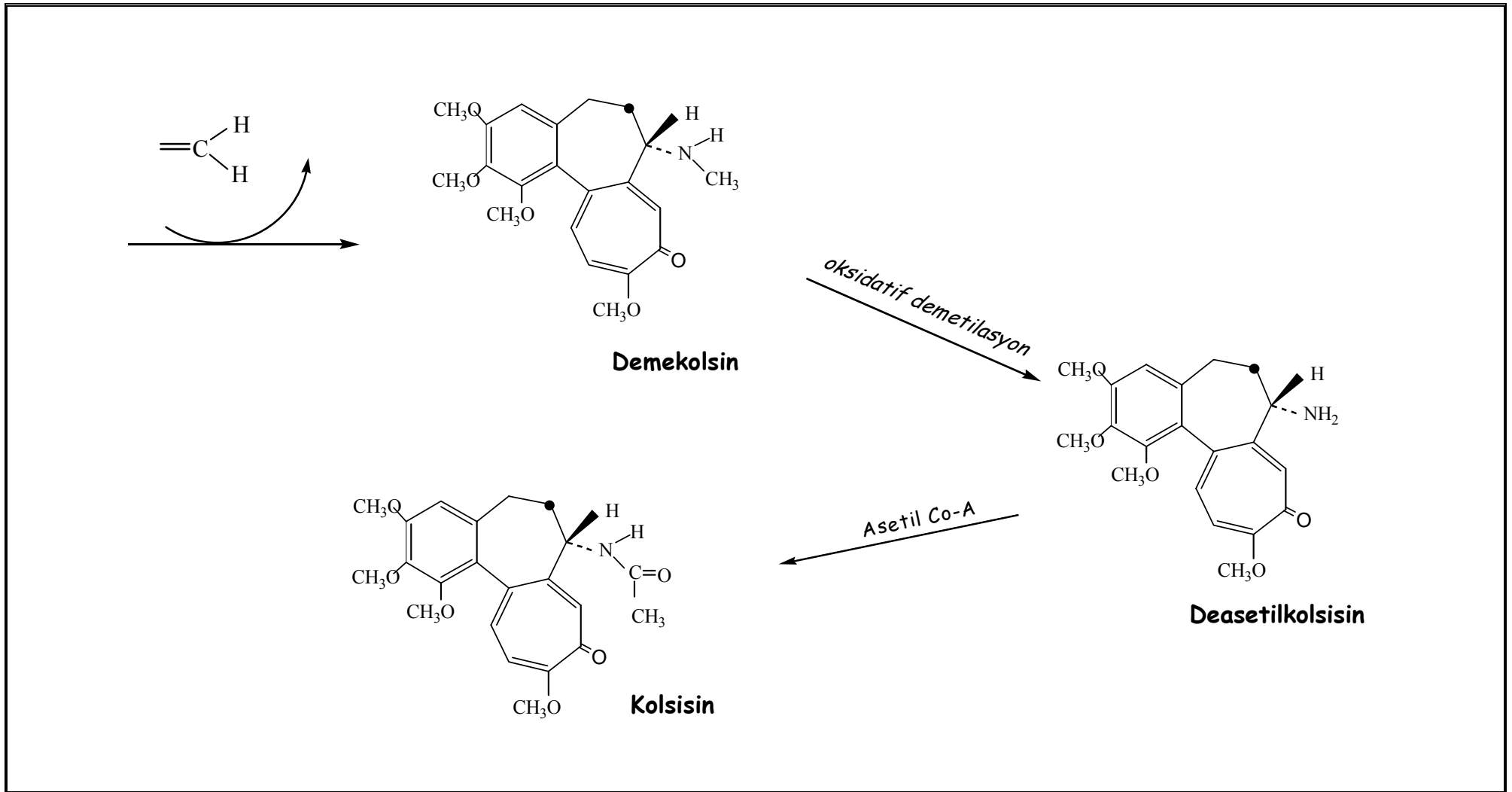
**Tropolon Halkası Taşıyan ve Taşımayan *Colchicum* Alkaloitlerinin Genel Biyosentezi(136)**



**Şekil 2-2: *Colchicum* türlerinde meydana gelen alkaloitlerin genel biyosentezi**

**Tropolon Halkası Taşıyan Alkaloidlerin Biyosentez Aşamaları (12,45, 56, 72, 76, 89, 105, 110)**



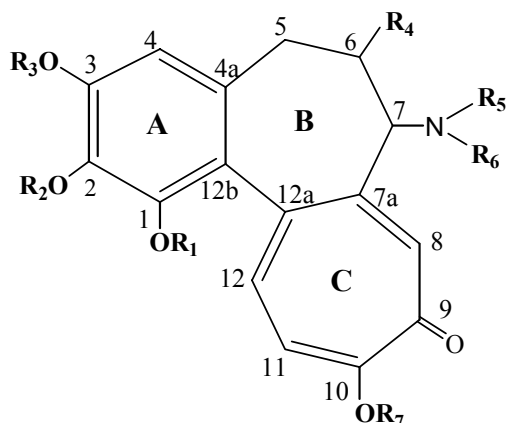


Şekil 2-3: Tropolon alkaloitlerinin biyosentez aşamaları

Fenetilzokinolin alkaloidi olan “Autumnalin”, kolşisin dolayısıyla da tropolon alkaloidleri biyosentezinin ara aşamasındaki en önemli yapıdır; biyosentezin ilerleyen aşamalarında tropolon halkasını oluşturacak olan isoandrosimbin gibi pek çok alkaloidal metabolitin prekürsörüdür. Kolşisin biyosentezinin dayanağı olan en önemli kimyasal olay ise “fenol-oksidatif eşleşme”dir. Bu kimyasal olayın gerçekleşmesinden Sitokrom P-450, NADPH ve oksijene bağlı enzim sistemleri sorumludur. Oksidatif eşleşme olayında bağlanmanın hangi konumdan meydana geldiği de biyosentez açısından önemlidir. Alkaloidlerde genel olarak *para-para* ya da *orto-para* konumlarından bağlanma meydana gelir. *Para-para* bağlanmanın özellikle autumnalinden isoandrosimbin oluşumu esnasında üç oksijenli halkada *orto-para* bağlanmaya bir alternatif olarak meydana geldiği düşünülmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar da, kolşisinde hem *orto-para* hem de *para-para* bağlanmanın gerçekleşiyor olabileceğini belirtmektedir (76).

### 2.2.4. *Colchicum* Türlerinden Elde Edilen Alkaloitler:

(5, 23, 46, 58, 59, 73, 90-94, 103, 107)



#### 2.2.4.1. Nötral ve Nötral-fenolik Tropolon Alkaloitleri:

Tablo 2-1: Nötral ve fenolik tropolon alkaloitlerinin kimyasal formülleri

<i>Nötral ve Fenolik Alkaloitler</i>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>
<i>Kolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>2-demetilkolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>3-demetilkolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>2,3-didemetilkolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>N-deasetilformil kolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CHO	CH <sub>3</sub>
<i>2-demetil-N-formil-N-deasetilkolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CHO	CH <sub>3</sub>
<i>3-demetil-N-formil-N-deasetilkolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CHO	CH <sub>3</sub>
<i>2-asetil-2-demetil kolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>Kolşikozit</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> O <sub>5</sub>	H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>



<i>Nötral ve Fenolik Alkaloitler</i>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>	<b>R<sub>3</sub></b>	<b>R<sub>4</sub></b>	<b>R<sub>5</sub></b>	<b>R<sub>6</sub></b>	<b>R<sub>7</sub></b>
<i>N-metil kolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>N-deasetilmetil kolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<i>Kolşisein</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>3</sub>	H
<i>2-demetilkolşisein</i>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>3</sub>	H
<i>3-demetilkolşisein</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	COCH <sub>3</sub>	H
<i>N-deasetil-N-formil kolşisein</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CHO	H
<i>N-asetil demekolsin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>N-formildemekolsin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>Kolşifolin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
<i>2-demetilkolşifolin</i>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	COCH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
<i>3-demetilkolşifolin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	COCH <sub>2</sub> OH	CH <sub>3</sub>
<i>Kornigerin</i>	CH <sub>3</sub>	— CH <sub>2</sub> — (metilendioksi)		H	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>Kornigerein</i>	CH <sub>3</sub>	— CH <sub>2</sub> — (metilendioksi)		H	H	COCH <sub>3</sub>	OH
<i>Kolşisilin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>2-demetilkolşisilin</i>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	COCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>3-demetil-N-deasetil kolşisin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>

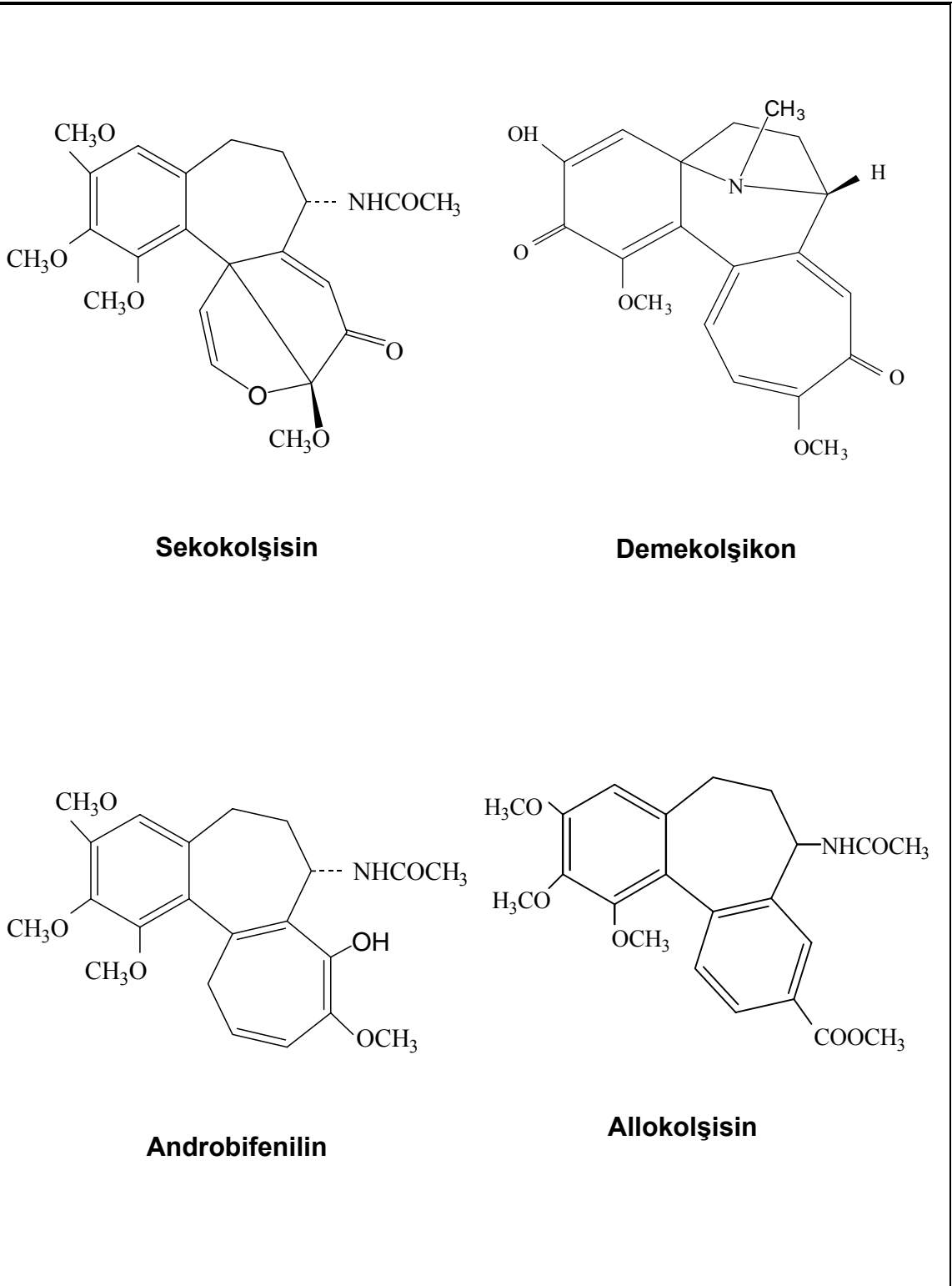
### 2.2.4.2. Bazik ve Bazik-fenolik Tropolon Alkaloitleri

Tablo 2-2: Bazik ve fenolik tropolon alkaloitlerinin kimyasal formülleri

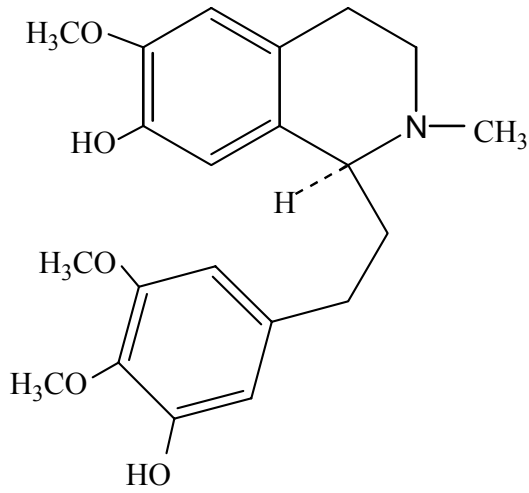
Bazik ve Fenolik Alkaloitler	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
<i>N</i> -deasetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>
<i>3</i> - demetil- <i>N</i> -deasetil kolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>
<i>2</i> - demetil- <i>N</i> -deasetil kolşisin	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>
<i>2,3</i> -didemetil- <i>N</i> -deasetilkolşisin	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -deasetil kolşisin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>
<i>N</i> -deasetilkolşisein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H
<i>Demekolsin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>3</i> -demetil demekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>2</i> -demetil demekolsin	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>Demekolsein</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	H	CH <sub>3</sub>	H
<i>N</i> -metil demekolsein	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H
<i>N</i> -metildemekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>2,3</i> -didemetil demekolsin	CH <sub>3</sub>	H	H	H	H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>N</i> -Formil demekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	CHO	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>Speciosin</i>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	2-hidroksi toluen	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>
<i>N</i> -etoksikarbonil demekolsin	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	H	COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>

### 2.2.4.3.Farklı Yapıdaki Nötral, Bazik ve Fenolik Alkaloitler:

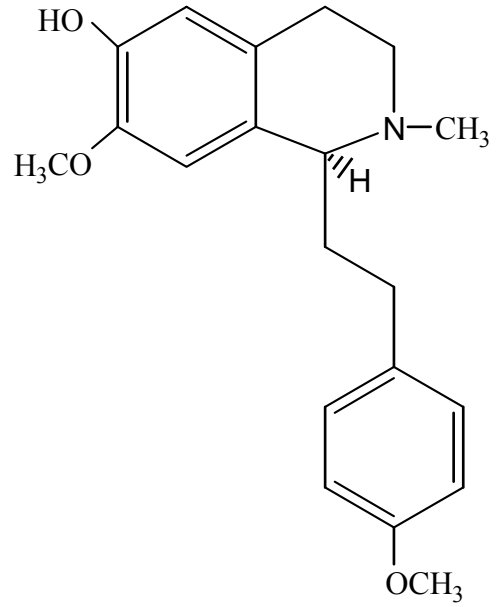
(1, 26, 27, 84, 85, 90-94, 107, 111-120)



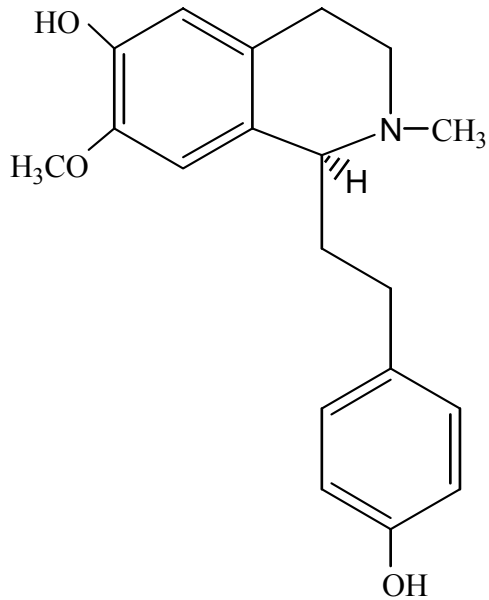
### 2.2.4.4 Tropolon Halkası Taşımayan Alkaloidler



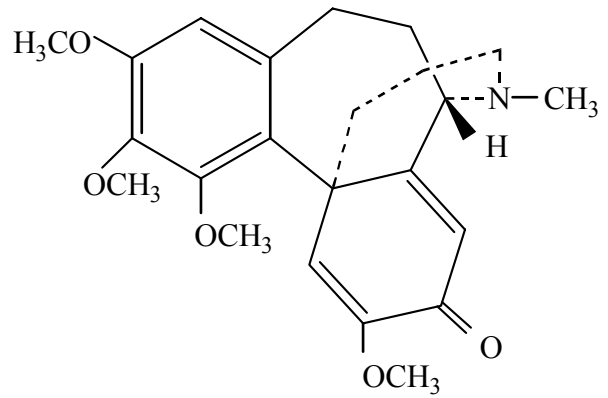
**Autumnalin**



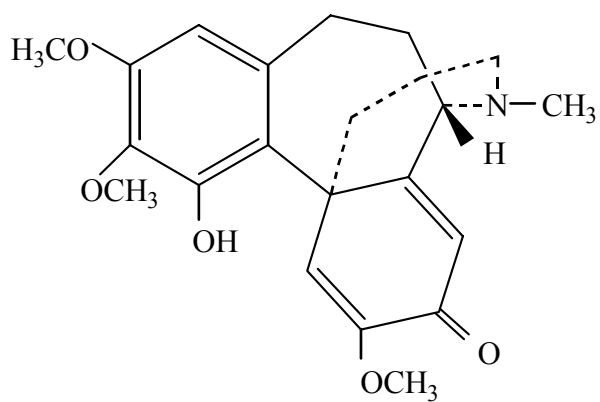
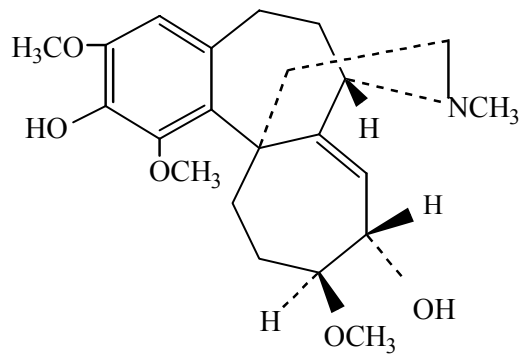
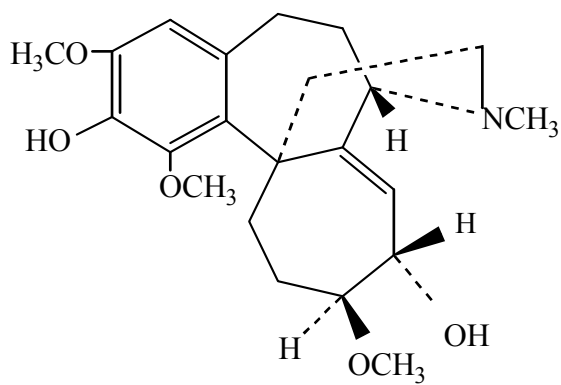
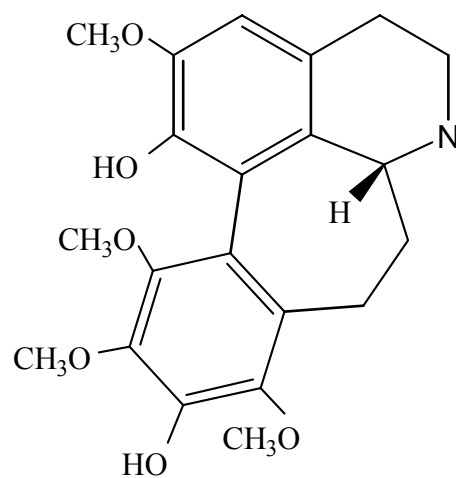
**Kolşietanamin**

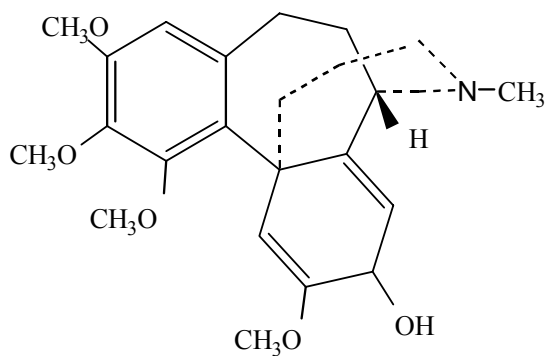
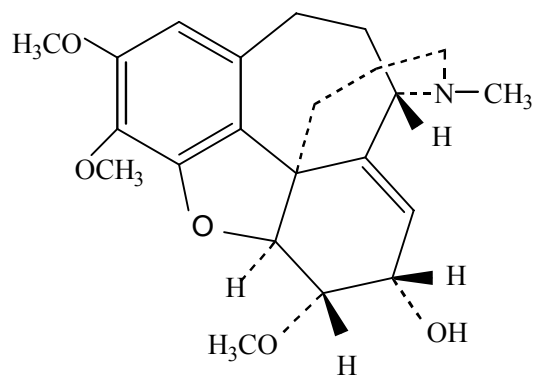
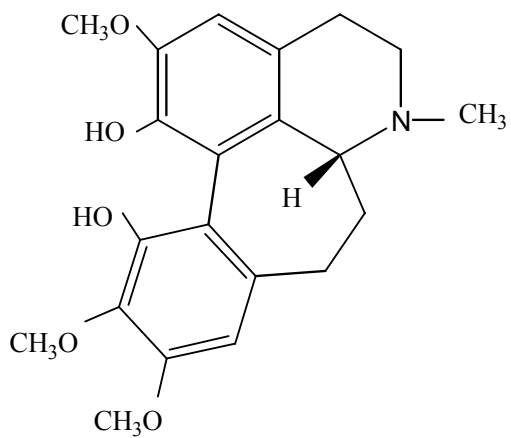
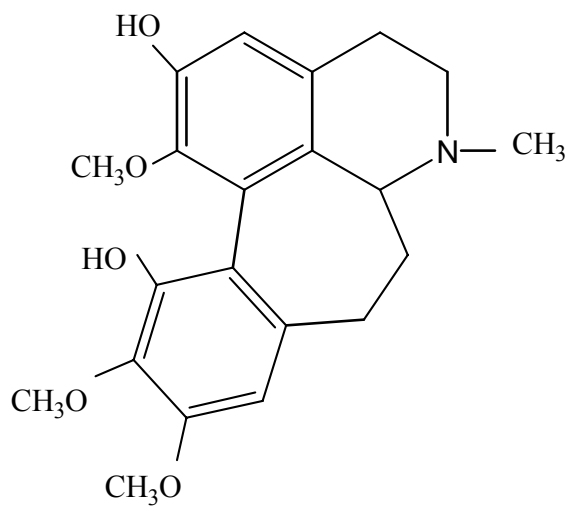


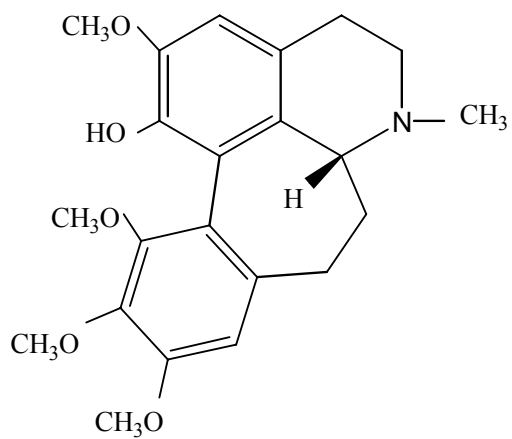
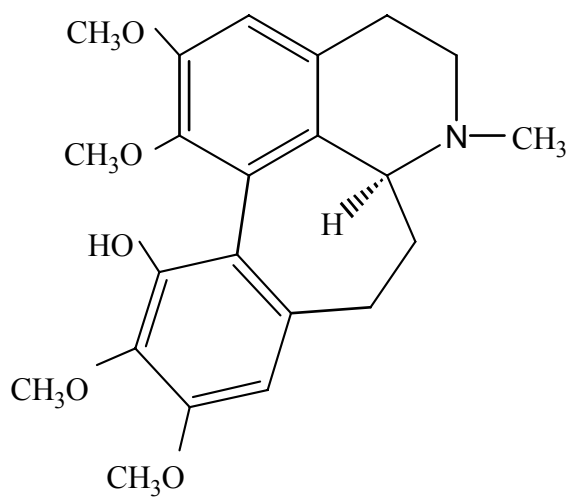
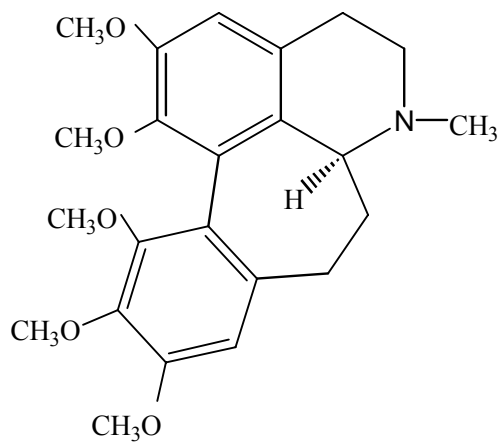
**Kolşietin**



**Krosiflorin**

**Kollutin****Androsimbin****Tetrahydroandrosimbin****Floramultin (Behuanin)  
(=Merenderin)**

**Szovitsidin****Kreysiginin****1,12-dihidroksi-2,10,11-trimetoksi  
homoaporfin****Szovitsinin**

**Kreysigin****Szovitsamin****O- metil kreysigin**

Tablo 2-3: Türkiye’de sonbaharda yetişen *Colchicum* türlerinden elde edilen alkaloidler (94, 113, 131)

MADDELER	<i>C.bivonae</i>	<i>bornmulleri</i>	<i>cilicicum</i>	<i>kotschyi</i>	<i>macrophyllum</i>	<i>speciosum</i>	<i>triphyllum</i>	<i>turcicum</i>
<b>Kolşisin</b>	+ (y,t)	+(ç,yp,t,k,y)	+(ç,çs,yp,t,y)	+(yp,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(ç,yp,k,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(ç,yp,t,y)
<b>2-demetilkolşisin</b>	+ (y,t)	+(ç,yp,t,k,y)	+(ç,çs)	+(yp,t,y)	+(ç,yp,t)	+(ç,yp,k,t,y)	+(ç,yp,t,y)	
<b>3-demetilkolşisin</b>	+ (y)	+(ç,yp,t,k,y)	+(ç,çs,yp,t)	+(yp,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(ç,yp,k,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(yp,t,y)
<b>β-Lumikolşisin</b>	+ (y)		+(ç,çs,yp,t,k)					+(y)
<b>γ-Lumikolşisin</b>	+ (y)		+(ç,çş,t,y)					
<b>Kornigerin</b>	+ (y)	+(ç,yp,t,k,y)	+(ç,çş,t,y)			+(ç,yp,k,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(t,y)
<b>Kolşifolin</b>		+(ç,yp,t,k,y)		+(yp,t,y)	+(ç,t)	+(ç,yp,k,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(yp,t,y)
<b>N-formil-N-deasetilkolşisin</b>	+(t)	+(ç,yp,t,k,y)	+(y,çş)		+(ç,yp,y)	+(ç,yp,k,t,y)	(ç,yp,t,y)	+(t)
<b>Demekolsin</b>	+(y,t)	+(ç,yp,t,k,y)	+(ç,çş,yp,t,y)	+(yp,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(ç,yp,k,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(ç,yp,t,y)
<b>2-demetil demekolsin</b>	+(t)	+(ç,yp,t,k,y)	+(ç)	+(yp,t,y)	+(ç,yp,t)	+(ç,yp,k,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+

\* ç=çiçek, çs=çiçek sapı, yp=yaprak, t=tohum, y=yumru



Tablo 2-3 (devamı)

MADDELER	<i>bivonae</i>	<i>bornmulleri</i>	<i>cilicicum</i>	<i>kotschyi</i>	<i>macrophyllum</i>	<i>speciosum</i>	<i>triphyllum</i>	<i>turcicum</i>
<b>3-demetildemekolsin</b>		+(ç,yp,t,k,y)	+(ç,çş,yp)	+(t,y)	+(ç,t,y)	+(ç,yp,k,t,y)	+(ç,yp,t,y)	+(ç,yp,t,y)
<b>N-metildemekolsin</b>			+(y)					
<b>β-Lumidemekolsin</b>			+(ç,çs,yp,y)					
<b>γ-Lumidemekolsin</b>			+(ç,çş,y)					
<b>O-metilkreysigin</b>	+(y)							
<b>Kolşisilin</b>	+(t)							
<b>N-deasetil-N-formil kolşisilin</b>	+(y)							
<b>N-etoksikarbonil demekolsin</b>			+(y)					
<b>N-deasetilkolşisin</b>	+(t)							
<b>2,3-didemetil kolşisin</b>	+(t)							

\* ç=çiçek, çs=çiçek sapı, yp=yaprak, t=tohum, y=yumru

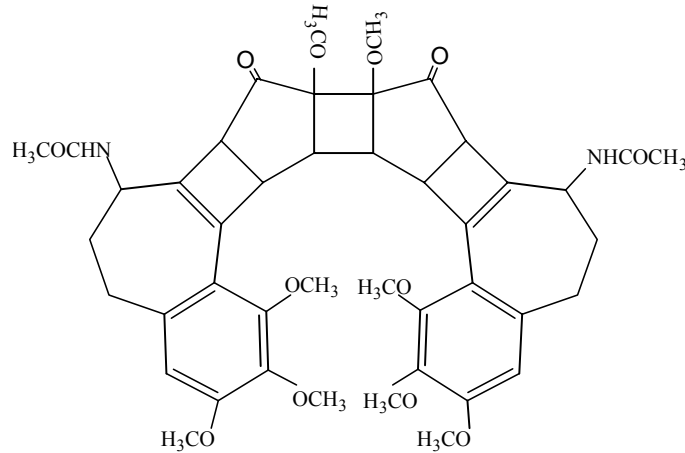
#### 2.2.4.4.Diğer Türevler:

##### *Lumi Türevleri:*

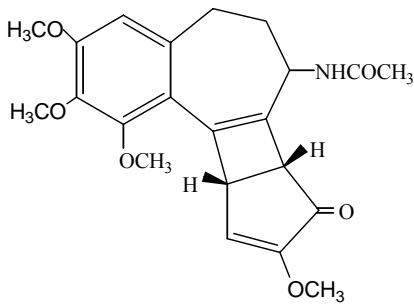
Tropolon halkasına sahip alkaloidler ışığa, özellikle de gün ışığına karşı hassastır. Bu alkaloidler ışık etkisi ile  $\alpha$ -,  $\beta$ - ve  $\gamma$ -lumi türevlerinden oluşan bir karışıma dönüşürler. Bu türevler tropolon alkaloidinin izomeridir. Işık etkisi ile meydana geldikleri için fotoizomer olarak adlandırılırlar. Bu türevler arasında en fazla oluşan  $\beta$ -lumi türevleridir.

Lumi türevleri doğal olarak bitkide bir miktar oluşur, ancak izolasyon çalışmalarında bunların bozunma ürünü olabileceği de düşünülmektedir. Lumi türevleri üzerinde yapılan biyolojik aktivite çalışmaları bu türevlerin tubuline bağlanmadığını dolayısıyla antimitotik etkiye sahip olmadıklarını göstermiştir (79, 127, 128).

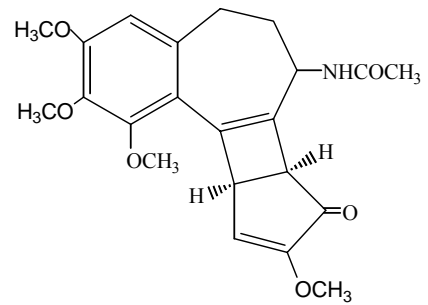
##### *Kolşisinin Lumi Türevleri*



##### $\alpha$ -Lumikolşisin



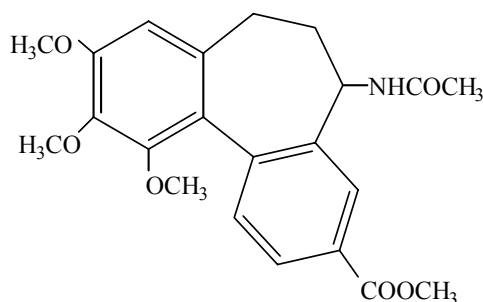
##### $\beta$ -Lumikolşisin



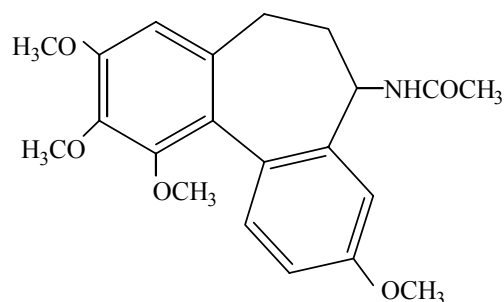
##### $\gamma$ -Lumikolşisin

### ***Allo Türevler:***

Allo türevler, tropolon alkaloitlerinin bifenil halka yapısına sahip olan izomerleridir. Bitkide doğal olarak bulunurlar. Ayrıca kolşisin ve izokolşisinin sodyum metoksitli ortamda muameleleri ile elde edilebilirler. Allo türevlerinin tubulin polimerizasyonu önleyici etkileri yüksektir ancak yapılan hayvan deneylerinde antitümöral ajan olarak çok kuvvetli bir aktiviteye sahip olmadıkları görülmüştür. Allo kolşisin ile yapılan *in vitro* çalışmalar tropolonik C halkasının 6 karbonlu bir halkaya dönüşmesinin antitubulin aktivitede bir azalmaya sebep olmadığını göstermektedir. Allo türevlerin sentetik olarak elde edilmeleri tropolon türevlerinden çok daha kolaydır. N-asetilkolşinil metil eter antitubulin aktivitenin ölçülmesi çalışmalarında standart olarak kullanılır (19, 21, 50).



**Allokolşisin**

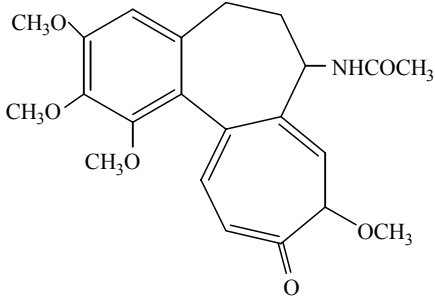


**N-metilkolşinil metil eter**

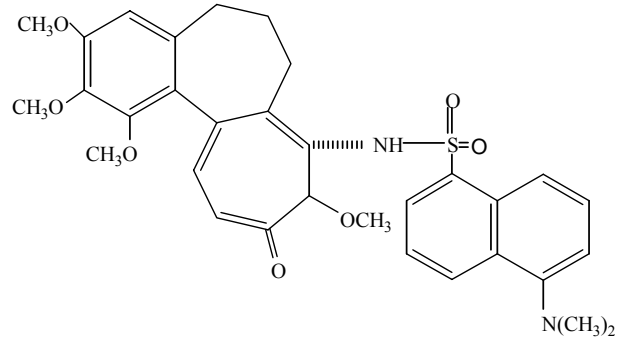
### ***İzokolşisinler:***

Bitkide doğal olarak bulunmazlar. İzokolşisin, kolşisinin diazometan ile O-metilasyonu sonucunda elde edilir (23). Tropolon alkaloitleri üzerinde yapılan yapı aktivite ilişkisinin aydınlatılmasına yönelik çalışmalarda özellikle A ve C halkalarının aktiviteden sorumlu olduğu görülmüştür. İzokolşisinlerin oluşumu esnasında C halkasındaki 9. ve 10. karbona bağlı metoksi ve okso gruplarının yer değiştirmesi aktivitenin ortadan kalkmasına sebep olmaktadır yani izokolşisinler biyolojik olarak inaktif izomerlerdir. Ancak son yıllarda yapılan sentez kimyası çalışmalarında, B halkasındaki 7 nolu karbon atomuna bağlı sübstituentler ve bunların yapı-etki ilişkisi

üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda ilk aktif isokolşisin türevi bulunmuş, bu doğrultuda yapılan çalışmalar sonucunda da tubulin polimerizasyonunu kolşisinden daha güçlü inhibe eden bir türev bulunmuştur (29).



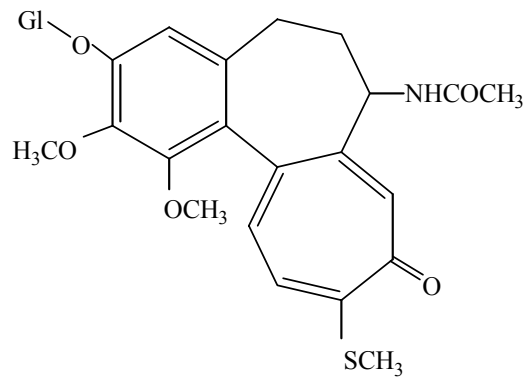
**İzokolşisin**  
( *İnaktif* )



**İzokolşisin bileşiği**  
( *Bulunan ilk aktif bileşik* )

### *Tiyo türevler:*

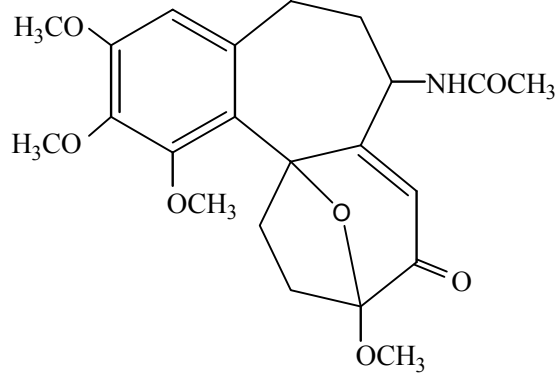
Sentetik olarak elde edilirler. Tubulin polimerizasyonunu güçlü bir şekilde inhibe etmelerinden dolayı tropolon türevleri üzerinde yapılan sentez çalışmalarında önemli bir yere sahiplerdir (47, 70, 87). 3-demetilkolşisinin glikoziti olan tiyokolşikozit sahip olduğu kas gevşetici etki dolayısıyla tedavide kullanılmaktadır (21).



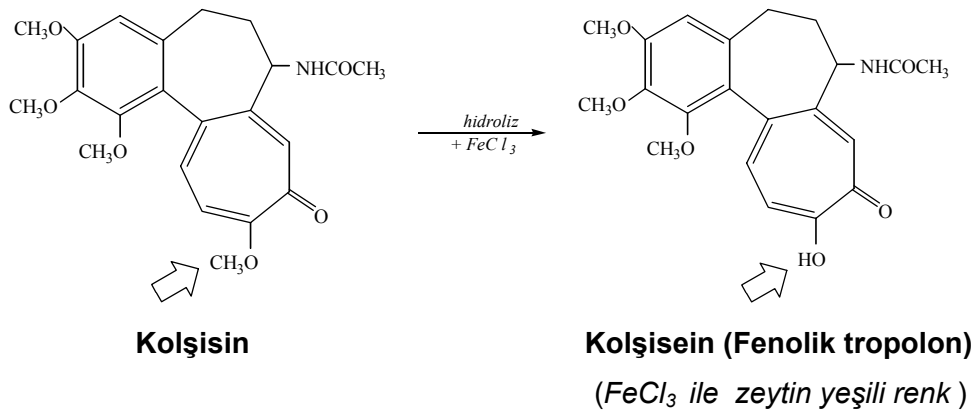
**Tiyokolşikozit**

**Oksikolşisinler:**

Biyolojik olarak inaktiftirler (45, 126).

**Oksikolşisin****2.2.5. Tropolon Alkaloitlerinin Teşhisi: (115)**

- Kristal halde iken tropolon halkası taşıyan alkaloitler açık sarı renklidir, fenolik yapı taşıyan tropolon alkalotleri ise koyu sarı renk verir. Lumi türevleri ve sekokolşisin renksizdir.
- Tropolon alkaloitleri, dilüe asit veya alkalilerle hidroliz sonucu kolşisein türevini meydana getirirler. Fenolik tropolon yapısında olan bu maddeler  $FeCl_3$  ile zeytin yeşili renk verirler. Kloroformda bu renk kırmızıdır, lumi türevleri ve sekokolşisin ise bu reaksiyonu vermez.

*Oberlin-Zeisel Reaksiyonu*

- Alkaloit çözeltisine birkaç damla mineral asit eklenirse koyu sarı renk oluşur, bu renk nitrik asitle önce yeşil-mavi sonra kırmızımsı sarı ve sonuçta renksiz olur (30, 45).
- Kolşisinin etanoldeki çözeltisine  $\text{FeCl}_3$  eklenirse kırmızı renk açığa çıkar (135).
- Tropolon alkaloitleri konsantre  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile 48 saat kalıcı sarı renk, lumi türevleri ise anında mor-kırmızı veya turuncu renk verirler (107).
- Tropolon alkaloitleri  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ile ısıtılınca kırmızıya dönüşen sarı renk verir.
- C-7'de amit grubu taşıyan tropolon alkaloitleri Dragendorff belirteci ile turuncu renk verir.  $\beta$ - ve  $\gamma$ - lumi kolşisinler ise bu belirteçle zamanla kızılkahveye dönen siyah renk alır (107).
- Tropolon alkaloitleri Carr-Price belirteci (antimontrikloritin kloroformdaki çözeltisi) ile sarı renk verir.
- Kolşisin, Wagner belirteci ( $\text{I}_2 / \text{KI}$ ) ile hafif asitli ortamda kahverengi bir çökelti verir.
- $\text{UV}_{254}$  nm'de tropolon alkaloitleri koyu menekşe renk verirler.  $\text{UV}_{366}$  nm'de kolşisin alkaloitleri bej, demekolsin alkaloitleri kahverengi ve lumi türevleri ise gri renk alır (107).
- C-2 ve C-3'te serbest fenolik grup içeren tropolon alkaloitleri, gün ışığında silikajelde sarı renk verirler.

#### 2.2.6. Tropolon Alkaloitlerinin Yapı-Aktivite İlişkileri: (23)

- Sadece a *S*-konfigürasyonlu biaril sisteme sahip bileşikler aktiftir. Konfigürasyonu a *R*'ye dönüştürmek bu etkiyi yok eder. Rasemik karışımlar saf a *S* izomerlerden daha düşük aktiviteye sahiptir (19, 88).
- Aromatik A halkasındaki substitüsyon aktivite açısından oldukça önemlidir. Örneğin, 3-demetilkolşisin kolşisine yakın etki gösterirken, 2-demetilkolşisinde aktivite azalmakta, 1-demetilkolşisinde ve kolşikozitte ise aktivite ortadan kalmaktadır (20, 87, 104, 108, 115, 134).

- A halkasında aromatik süstitüsyon biyolojik aktivite üstünde oldukça yüksek bir etkiye sahiptir (23).
- Yapılan bazı çalışmalar sonucu tübülüne bağlanmada 3-demetil kolşisinin oldukça aktif ve kolşisinden daha az toksik olabileceği gözlenmiştir (25).
- Kolşisinin A halkası analoğu olan meskalin ve N-asetilmeskalin de, mikrotübülleri kısmen inhibe etmektedir. Bundan yola çıkarak yapılan çalışmalarda, kolşisinin tübülüne C'nin yanı sıra, A halkasından da bağlandığı belirlenmiştir (9, 16, 31).
- Kolşisindeki C-1, C-2, C-3 ve C-10 ve N-asetilkolşisinil metil eterdeki C-1, C-2, C-3 ve C-9 metoksi grupları molekülün proteinlere bağlanmasında oldukça önemlidir. Bu metoksilerin çıkarılması veya fenolik gruplara dönüştürülmesi proteinlere bağlanma potansiyelinde düşmeye yol açar (88).
- C-7 de bulunan N süstitüsyonu aktivite açısından önemlidir. N-açıl bileşiklerin N-deasetil türevlerine göre hem tübülüne bağlanma hem de antitümör etki açısından daha aktif olduğu belirlenmiştir. N-açıl yerine N-aril bağlanması ise aktivitenin azalmasına sebep olur N de hiç süstitüsyon bulunmaması aktiviteyi etkilemez (23, 115).
- N-halojenizasyon aktivitede artışa neden olur (20).
- Kolişisitte olduğu gibi C-10 da hiç süstitüsyon bulunmaması aktiviteyi azaltmaz (20).
- C-7 amido grubunda asit artığı zincirinin uzaması aktiviteyi azaltır. En yüksek etkiyi N-deasetil-N-formilkolşisin gösterir. Amino grubunda bir asit artığı olan bileşikler ile azotta ayrıca bir metil grubu taşıyanların LD<sub>100</sub> ve terapötik indeksi birbirinin aynısıdır (109, 115).
- Kolşisinoit ve allo-türevlerindeki 7-asetamido grubu tübülüne bağlanmada etkisizdir (109).
- Demekolsinin açıl türevleri N-metildemekolsine göre daha aktiftir.
- B halkasının tübülüne bağlanmada etkili olmadığı söylenebilir. Fakat bununla ilgili bir çalışmada kolşisinin sadece B halkasında küçük süstitüentler bulunduğu zaman tübülüne bağlanmanın daha hızlı geliştiği gözlenmiştir (73, 102).

- Kolşifolinin N-metil, O-etil ve O-açilli türevleri de kolşifolin ve kolşisin kadar aktiftir (20, 23).
- Tropolon metil esterin tübülün molekülüne bağlandığı ve *in vitro* olarak tübülünün polimerizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (131).
- C-10'daki metoksi grubunun amino veya tiyo eter grupları ile yer değiştirmesi aktivitede önemli bir değişime sebep olmaz (88).
- Genel olarak izokolşisinler ve 10-CH<sub>3</sub> süstitüenti yerine 10-OH olan, keto enoller, yani kolşiseinler inaktiftir.
- Son yıllarda izokolşisinlerin B halkası süstitüsüyonu üzerinde yapılan çalışmalarda aktif izokolşisinler elde edilmiştir (29).
- Tropolon halkasının hidrojenasyonu aktivitenin tamamen ortadan kalkmasına sebep olur (115).
- Aktivite için C halkasının C-9 da keto grubu taşıyan bir tropolon halkası olması gereklidir, bu halkanın benzen halkasına dönüşmesi aktivitenin ortadan kalkmasına sebep olur (115).
- Oksikolşisin, epoksikolşisin ve lumikolşisin inaktiftir (109).

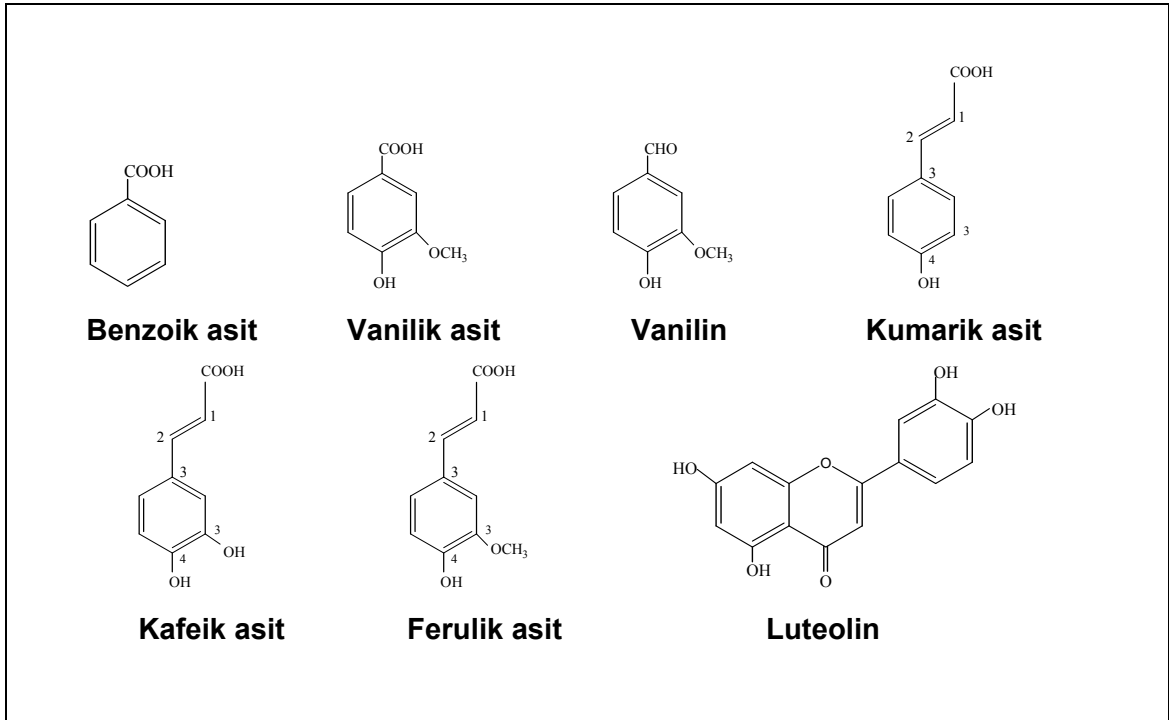
Tüm bu veriler kolşisinin etkisinin özellikle A ve C halkasına dayandığını göstermektedir (37, 73).



### 2.2.7. *Colchicum* Türlerinde Bulunan Fenolik asit ve Flavon Bileşikleri

Fenolik asit ve flavon bileşiklerinin *Colchicum* alkaloidlerinin biyosentezinde prekürsör rol oynadıkları düşünülmektedir. *Colchicum* türlerinde bulunan başlıca fenolik asit ve flavon bileşiklerinin, benzoik asit ve türevleri, vanilik asit (4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit), vanilin (4-hidroksi-3-metoksibenzaldehit), kumarik asit (3-(4-hidroksifenil)-2-propenoik asit), kafeik asit (3-(3,4-dihidroksifenil)-2-propenoik asit), ferulik asit 3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)-2-propenoik asit ve luteolin (3',4',5,7-tetrahidroksiflavon) olduğu görülmüştür. *Colchicum* türlerinde bulunmuş olan fenolik asit ve flavon bileşikleri Tablo 2-5'de verilmiştir (7, 59, 92, 99, 112). Çalışılan *Colchicum* türlerinde fenolik asit ve flavon bileşikleri açısından major bileşikler kafeik asit ve luteolindir. 2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit sadece Wurmbaeoideae alt familyası bitkilerinde meydana gelir, bu nedenle bu bileşik kemotaksonamik açıdan önemlidir (99).

Bazı *Colchicum* türlerinin fenolik fraksiyonlarının karaciğer hepatositleri üzerindeki sitoprotektif etkisi *in vivo* olarak incelenmiş ve özellikle luteolin içeren topraküstü kısımların bu etkiye sahip oldukları görülmüştür (121).



Tablo 2-4: *Colchicum* türlerinde bulunan flavon bileşikleri ve fenolik asitler

TÜR	MADDELER	Ç	Yp	T	Y	
<i>C. bornmuelleri</i> *	4-metoksi benzoik asit	+	-	-	-	
	vanillin	-	-	+	+	
	2,4-dihidroksi benzoik asit	-	+	-	-	
	2,5-dihidroksibenzoik asit	+	-	+	+	
	4-hidroksibenzoik asit	+	+	+	+	
	3,4- dihidroksibenzaldehit	-	+	+	+	
	Vanillik asit	-	+	+	+	
	3,4-dihidroksibenzoik asit	+	+	+	+	
	Kumarik asit	+	+	+	+	
	3-(3,4-dimetoksifenil)-2-propanoik asit	-	+	-	-	
	Ferulik asit	+	+	+	+	
	Kafeik asit	+	+	+	+	
	Luteolin	+	+	-	+	
	<i>C. speciosum</i> *	4-hidroksifenilmetanol	+	-	-	+
Vanillin		-	-	-	+	
Sinnamik asit		-	-	-	+	
2,5-dihidroksibenzoik asit		+	+	-	-	
2,6-dihidroksibenzoik asit		+	-	-	-	
4-hidroksibenzoik asit		+	+	+	+	
Vanilik asit		+	+	+	+	
3,4-dihidroksibenzoik asit		+	+	+	+	
Kumarik asit		+	+	+	+	
Kafeik asit		+	+	-	+	
Luteolin		+	+	-	+	
<i>C. kotschy</i> *		Vanilin	?	-	-	+
		2,5-dihidroksibenzoik asit	?	+	-	-
		4-hidroksibenzoik asit	?	+	+	-
	3,4- dihidroksibenzaldehit	?	-	+	-	
	3-(4-hidroksifenil)propanoik asit	?	-	+	-	
	Vanilik asit	?	+	+	+	
	3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propenol	?	-	-	+	
	3,4- dihidroksibenzaldehit	?	+	+	-	
	3-(4-hidroksi-3-metoksifenil)propanoik asit	?				
	Kumarik asit	?	+	+	+	
	Ferulik asit	?	-	-	+	
	Kafeik asit	?	+	+	+	
	Luteolin	?	+	-	-	

Ç=çiçek, Yp=yaprak, T=tohum, Y=yumru , ?= analiz edilmedi, \*=Türkiye'de yetişen türler

\* Türkiye'de yetişen türler

TÜR	MADDELER	Ç	Yp	T	Y
<i>C. macrophyllum*</i>	2,5-dihidroksibenzoik asit	+	+	-	+
	2,6-dihidroksibenzoik asit	+	+	-	+
	4-hidroksibenzoik asit	-	-	-	+
	3-(4-metoksifenil)propanoik asit	+	+	+	-
	Vanilik asit	+	+	-	-
	3,4-dihidroksibenzoik asit	+	-	+	-
	Kumarik asit	+	+	-	+
	Ferulik asit	+	+	+	-
	Kafeik asit	+	+	-	+
	Luteolin	+	+	+	+
<i>C. triphyllum*</i>	Vanilin	-	+	+	+
	2,5-dihidroksibenzoik asit	-	-	-	+
	2,6-dihidroksibenzoik asit	-	-	-	+
	Vanilik asit	+	+	-	+
	3,4-dihidrobenzoik asit	-	+	-	+
	Kumarik asit	-	-	-	+
	Ferulik asit	+	-	+	-
	Kafeik asit	+	+	-	+
<i>C. autumnale</i>	2-hidroksi benzoik asit	?	+	+	+
	Benzoik asit	?	+	+	+
	2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit	?	+	+	+
	2,6-dimetoksibenzoik asit	?	-	-	+
	4-hidroksi benzoik asit	?	-	-	+
	4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit	?	-	-	+
	Luteolin	?	+	-	+
	Saligenin	?	+	+	-
	Apigenin	?	+	-	-
<i>C. cilicicum*</i>	Apigenin	+	-	-	-
	Luteolin	-	-	-	+
<i>C. cornigerum</i>	Benzoik asit	?	?	?	+
	2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit	?	?	?	+
<i>C. cupani</i>	Benzoik asit	?	?	?	+
	2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit	?	?	?	+
	4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit	?	?	?	+
	3-hidroksi-4-metoksibenzoik asit	?	?	?	+
<i>C. libanoticum</i>	2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit	?	?	?	+
	4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit	?	?	?	+
	Luteolin	?	?	?	+
<i>C. luteum</i>	Benzoik asit	?	?	?	+
	4-hidroksibenzoik asit	?	?	?	+
<i>C. ritchii</i>	Benzoik asit	?	?	?	+
	2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit	?	?	?	+
	2,6-dimetoksibenzoik asit	?	?	?	+
	4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit	?	?	?	+
	3-hidroksi-4-metoksibenzoik asit	?	?	?	+

### 2.3.Farmakolojik Bölüm:

*Colchicum* türlerinin tedavi açısından önemleri, genel olarak başta kolşisin olmak üzere taşıdıkları tropolon sınıfı alkaloidlere dayanmaktadır. Tropolon sınıfı alkaloidler farmakolojik açıdan birbirine yakın aktivitelere sahiptir. Kimyasal yapıdaki bazı değişiklikler aktivitenin artmasına, azalmasına ya da tamamen ortadan kalkmasına sebep olur. Bölüm 2.2.6’da yapı-aktivite ilişkileri üzerinde durulmuştur. Bu bölümde özellikle, benzer etkilere sahip olmaları ve farmakolojik açıdan üzerinde en çok çalışma yapılmış tropolon alkaloidi olması nedeniyle *Colchicum* türlerinin major alkaloidi olarak bilinen “kolşisin” üzerinde durulmuştur. Kolşisin, günümüzde standart bir madde olarak biyolojik araştırmalarda olduğu kadar pek çok hastalığın tedavisinde de önemli bir yere sahiptir (11).

*Colchicum* türleri halk arasında haricen romatizma ağrılarına karşı kullanılmıştır. Bu amaçla, bir tutam acı çiğdem tohumu 2-3 diş sarımsak ile havanda iyice dövülür ve elde edilen sulu usare tülbente emdirilerek ağrıyan bölgeye sarılır ve pansuman hergün yenilenir (15).

Kolşisin üzerinde bugüne kadar yapılan çalışmalar gut, Ailevi Akdeniz Ateşi, amiloidoz, Behçet hastalığı, vaskülitler, ileri sistemik skleroz, primer safra sirozu, karaciğer sirozu, Hodgkin lenfoma, kronik lenfoit lösemi, sedef hastalığı, eklem kireçlenmesi, sarkoidoz, paget hastalığı üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu göstermektedir (61, 63, 68, 71).

#### 2.3.1.Farmakodinamik Özellikleri:

##### 2.3.1.1.Etki Mekanizması

Kolşisin etki mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır. Kolşisinin tubulin proteinlerinin mikrotübülleri oluşturacak şekilde bir araya toplanmalarını önlediği ve sürekli dinamik bir denge içerisinde olan tubulin-mikrotübül dengesini bozduğu ileri sürülmektedir (53, 68). Eritrositler dışında tüm hücrelerde hücre fonksiyonları ve bölünmesi için gerekli olan mikrotübüller bulunur. Mikrotübül-tubulin dengesinin bozulması ve biraraya gelemeyen mikrotübüllerin sayısının artması tubulin mRNA sınıfı

sentezinin durmasına sebep olur. Bu antimitotik etkinlik ilk olarak 1889 yılında Sicilyalı patalog Pernice tarafından ortaya konmuştur (68). Göstermiş olduğu bu etki nedeniyle kolşisin üzerinde antitümöral ajan olarak pek çok araştırma yapılmış ve bu çalışmalar sonunda kolşisinin tümör seçiciliğinin olmadığı görülmüştür. Demekolsin gibi kolşisin türevleri, kronik miyeloid lösemi ve malign lenfomada kullanılmıştır (5, 16, 68).

Tubulin inhibisyonu sonucu doğal olarak çok sayıda etki meydana gelir. Hücrelerin formunun ve ultra yapısının değişikliği, uyarılmaya bağlı ya da bundan bağımsız olarak hücre hareketinin inhibisyonu, mitokondriyal yapının değişikliğe uğraması, hücre bölünmesi esnasında iğ ipliklerinin oluşumunun engellenmesi, kromozom dağılımındaki düzenin bozulması, lökosit ve makrofajlarda reseptör hareketliliğinin inhibisyonu, pinositoz inhibisyonu, lizozom hareketliliğinin azalması ve böylece degranülasyon ve kemotaktik faktörlerin salınımının azalması, sekresyon azalmasına eşlik eden sekresyon granüllerinin hareketliliğinin azalması, kollajen sentezi ve kollajenaz stimülasyonunun inhibisyonu, siklik AMP artışı, prostaglandin sekresyonunun stimüle edilmesi, polimorf nükleer lökosit ve monositlerin kemotaksis ve hareketliliğinin azalmasına bağlı olarak fagositozun azalması, Arthus reaksiyonunun inhibisyonu, mast hücrelerinden histamin salınımının inhibisyonu gibi etkiler hep tubulin inhibisyonuna bağlı olarak gelişmektedir. Kolşisinin antienflamatuvar özelliği de lizozom degranülasyonunun ve Arthus reaksiyonunun durdurulması olaylarından kaynaklanır (68).

Kolşisinin mikrotübüller üzerinde sahip olduğu etkiden bağımsız olarak göstermiş olduğu etkiler de bulunmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda insülin ve parathormon salınmasının *in vitro* inhibisyonu (23, 68), aksonal taşınmanın inhibisyonu, sinaps morfolojisinin değişmesi, nörotransmitter inhibisyonu, kalsiyum ve amino asit transportundaki değişimlerden kaynaklanabilecek DNA sentezinin inhibisyonu, mitojenlerin varlığında lenfoblast ve lenfoit kökenli olmayan hücrelerin proliferasyonunun azalması, hücre füzyonunun (kaynaşma) inhibisyonu, kalsiyum akışındaki değişime bağlı olarak trombosit agregasyonunun azalması, membran bileşenlerinin yatay hareketliliğinin değişmesi ve membran akıcılığındaki azalma gibi etkiler mikrotübüller üzerindeki etkilerden farklı mekanizmalarla gerçekleşir (68).

Kolşisin bir kısmı aydınlatılmış ancak henüz tam olarak açıklanamamış pek çok kompleks etki mekanizmasına sahiptir ve çeşitli hastalıkların tedavisinde objektif olarak açıklanamamasına rağmen başarıyla kullanılmaktadır (68).

Kolşisinin antienflamatuvar etki mekanizması üzerine 2005 yılında yapılan bir çalışmada kolşisinin antienflamatuvar etkisinin sadece mikrotübüller ile etkileşimi sonucunda meydana gelmeyip, transkripsiyonal seviyede değişikliklere sebep olarak da bu etkiyi meydana getirebileceği gösterilmiştir. Çalışmada kolşisin etkisinin HUVEC (Human Umbilical Vessel Endothelial Cell Line) hücrelerinin gen ekspresyonu üzerine etkilerinin analiz edilmesi yoluyla aydınlatılması amaçlanmıştır. Sonuç olarak, kolşisinin antienflamatuvar etkisinin transkripsiyonal seviyede değişimlere sebep olarak gösterebileceği ancak bu etkinin yüksek doz ve uzun süreli uygulama ile oluştuğu saptanmış, bu durumun belkide FMF (Familial Mediterranean Fever, Ailevi Akdeniz Ateşi) akut atakları esnasında neden kolşisinin hemen etki göstermediğini, ancak meydana gelme aşamasındayken etkili olabildiğini açıklayabileceği belirtilmiştir (28).

### **2.3.2.Farmakokinetik Özellikleri:**

Kolşisinin farmakokinetiğini tubulin proteini ve P-glikoprotein adındaki iki protein etkiler. Kolşisin için spesifik hücre içi reseptör olan tubulin proteini kolşisinin kandan eliminasyon yarı ömrünü düzenler. P-glikoprotein ise hücrel bir detoksifikasyon pompasıdır, bu şekilde kolşisinin dokulara dağılımı, safra ve böbreklerden eliminasyonu düzenlenir (68).

#### **2.3.2.1.Emilim :**

Kolşisinin emilimi, oran ve miktar açısından çeşitli farklılıklar gösterebilmektedir. Yapılan bir çalışmada 10 sağlıklı genç erkeğe 1 mg kolşisin oral yolla uygulanmış ve her biri için plazma düzeyleri belirlenmiştir. Kolşisinin 30. ve 120. dakikalar arasında verdiği pikler dikkate alındığında ortalama plazma konsantrasyonu yaklaşık 3 ng/ml'dir. Bununla birlikte bireyler arasında maksimum konsantrasyona ulaşma zamanı ( $t_{max}$ ) ve maksimum konsantrasyonda ( $C_{max}$ ) büyük farklar gözlenmiştir. Bu farklılıkların sebebi, emilim bölgesindeki pH farkları, midenin dolu ya da boş olması,

bağırsak motilitesi gibi faktörlerle açıklanabilmektedir. Diğer bir klinik çalışmada 1 mg kolşisin oral yolla deneklere uygulanmış ve alındıktan 2 saat sonra 6 ng/ml pik plazma konsantrasyonu belirlenmiştir (73).

Wallace ve Ertel sağlıklı gönüllülerde 1 mg i.v. uygulamadan sonra pik plazma konsantrasyonunun ortalama 3,2 ng/ml olarak göstermişlerdir (125). Yapılan farklı bir çalışmada solüsyon formun oral uygulamasından sonra pik plazma konsantrasyonları 6,5 ng/ml; bağıl biyoyararlanım ise % 47 olarak ölçülmüştür. Çoğu gönüllüde uygulandıktan sonra 6 saat içinde ikinci bir pik ortaya çıkmıştır, bu durum, ikinci bir absorpsiyon bölgesi olduğu veya ilacın enterohepatik sıklusa girdiğini göstermektedir. Bu ikinci absorpsiyon süreci ilkinden belirli bir biçimde daha uzundur (131).

Yapılan son çalışmalar kolşisinin oral bağıl biyoyararlanımının % 25-50 olduğunu göstermektedir (16).

#### **2.3.2.2.Dağılım:**

Kolşisinin non-kompartmental farmakokinetiği üzerinde rastgele yapılan, çapraz geçişli bir çalışmada oral yolla 3 farklı kolşisin dozundan (0,1, 0,5 ve 1,5 mg'lık) sonra 9 sağlıklı erkek gönüllü üzerinde farmakokinetik parametreler ölçülmüştür. Oral uygulamayı takiben dağılım hacmi ( $V_d$ ) 11,4 – 14,9 L/kg olarak bulunmuştur. Kolşisinin % 50'si plazma proteinlerine bağlanır. Radyoaktif kolşisinin dağılımı ile ilgili hayvan deneylerinde ilacın böbrek, dalak ve karaciğerde konsantrasyonları diğer dokulara oranla yüksek bulunmuş, kalp, iskelet kasları ve beyinde dokusunda kolşisin tesbit edilememiştir. İlacın, i.v. yoldan uygulanmasından 9 gün sonrasına kadar, kolşisin lökositlerde ve idrarda tespit edilmiştir (73).

#### **2.3.2.3.Metabolizma:**

Eski bir ilaç olmasına rağmen kolşisinin metabolizasyonu ve vücuttan atılması hakkındaki bilgiler azdır. Bu konudaki en genel bilgi, kolşisinin karaciğerde deasetilasyona uğradığıdır (73, 122). Bununla birlikte yapılan çalışmalar kolşisinin öncelikle karaciğerde oksidatif demetilasyon ile metabolizmaya uğradığını işaret etmektedir. Yapılan bir çalışma kolşisinin % 10'unun karaciğer mikrozomal enzimleri tarafından 3- ve 2-demetilkolşisin'e dönüştürüldüğünü göstermektedir (39, 130, 131).

Karaciğer ya da böbrek yetmezliği olan hastalarda ve bunun yanısıra ileri yaştaki hastalarda uygulanan dozun azaltılması gerekir. Renal klirensin 10 ml/dk'nın altında olduğu hastalarda kolşisine alternatif olabilecek bir ilacın kullanılması uygun olur (68).

#### **2.3.2.4. Atılım:**

Kolşisin, büyük oranda inaktif metabolitler halinde safra yolu ile elimine olur. Eliminasyon yarı ömrü, bunu değerlendirmek için kullanılan tekniğe ve ilacın veriliş zamanına göre değişir. Kolşisin ve metabolitlerinin büyük kısmı idrar ve safra yoluyla atılmaktadır. Sağlıklı bireylerde eliminasyon yarı ömrünün 14 ile 30 saat arasında değişmekte olduğu bildirilmiştir (68). Safrada yüksek konsantrasyonda bulunan kolşisin ve metabolitleri, kolşisinin enterohepatik siklusa girdiğini göstermektedir. Bu durum, yüksek dozda alımla görülen kolşisin zehirlenmelerinde ya da kolşisin kullanan hastalarda sık görülen gastrointestinal yan etkilerin nedeni olabilir. Kolşisinin safra yolu ile atılımını incelemek üzere farklı hayvan türleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır. [<sup>3</sup>H] kolşisin i.v. olarak sıçanlara verildiğinde % 68 oranında feçesle atıldığı saptanmış, 2 saat içinde % 50'si safrada bulunmuştur. Bunun yarısını kolşisin diğer kalan kısmını ise demekolsin ve diğer polar metabolitler oluşturmaktadır (73).

#### **2.3.3. Diğer Farmakolojik Özellikler:**

##### **2.3.3.1. Toksikite ve Yan Etkiler:**

Kolşisin özellikle gastrointestinal, hematolojik, kardiyovasküler, renal, solunum sistemi, sinir sistemi ve dermatolojik sistem üzerine toksisite gösterir. Kolşisin ile zehirlenme nadir görülür. Milne ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 21 yaşındaki bir bayanın intihar amaçlı 30 mg kolşisin aldığı kayıtlıdır. İlaç alımından 1 saat sonra hastaneye getirilen hastada, gastrointestinal şikayetler (bulantı, kusma, diyare gibi), metabolik asidoz, pansitopeni (kan eritrosit, lökosit ve trombosit değerlerinin düşmesi), hipotansiyon, solunum güçlüğü, rabdomiyoliz ve hipokalsemi bulguları tanımlanmıştır (81).



### **2.3.3.2.Gebelik ve Süt verme Döneminde Kullanım:**

Hayvan deneylerinde molekülün, çok yüksek dozlarda potansiyel teratojen etki gösterdiği saptanmıştır. Hamile hastalarda kullanımında yarar zarar oranı düşünülmelidir. Süt veren annelerin ilacı aldıktan 8 saat sonra emzirmeleri önerilir. Kolşisin çocuğun normal gelişimini önlemez ve FMF olup tedavi görmeyen çocuklara oranla tedavi görenler daha normal gelişirler (68).

### **2.3.3.3.Kontrendikasyonları ve İlaç etkileşimleri:**

Kolşisine karşı aşırı duyarlılığı, kan diskrazileri ve ciddi gastrointestinal, renal, hepatik veya kardiyak rahatsızlığı olanlarda kontrendikedir (51, 62).

Kolşisin sitokrom P450 inhibitörleri ile de etkileşime girer ve toksisite görülme riski artar. P-glikoproteini inhibe eden moleküllerin (ör:siklosporin) kolşisinle etkileşime girdiği bildirilmiştir (68).

Alkol ve kolşisinin birlikte kullanımı, özellikle alkoliklerde gastrointestinal toksisite riskini artırır. Non-steroidal antiinflamatuar ilaçlar, lökopeni, trombositopeni veya kemik iliği depresyonu riskini arttırabilir. Antineoplastik, bumetanid, diazoksit, tiyazit grubu diüretikler, etakrinik asit, furosemid, mekamilamin, pirazinamid veya triamteren serum ürik asit konsantrasyonunu arttırabilir ve proflaktik gut tedavisinin etkinliğini azaltabilir. İlaçların neden olduğu kan diskrazilerinin, kemik iliği depresyonlarının ve radyasyon tedavisinin sonucunda oluşan kemik iliği depresyonunu arttırıcı etkisi olabilir. Alkolle birlikte kullanımı, diğer toksik hematolojik etki riskini arttırabilir. Kolşisinin kronik olarak veya yüksek dozlarda uygulanması B<sub>12</sub> vitamininin emilimini azaltabilir (51).

### **2.3.3.4.Kullanım şekli:**

Akut gut artritinde akut krizin ilk belirtisinden itibaren kullanılmaya başlanır. Oral olarak kullanımda, başlangıç dozu 1-1,2 mg olup, ağrı geçene kadar veya mide bulantısı, kusma ya da diyare meydana gelene kadar her 1-2 saatte bir 0,5-1,2 mg

kullanılır (51). Oral yolla ilaç kullanımından 24-48 saat sonra ağrı ve iltihaba bağlı semptomlarda düzelme gözlenir (73).

İstenen cevabın daha çabuk olması ve gastrointestinal yan etkilerin daha az ortaya çıkmasından dolayı bazen intravenöz uygulama tercih edilir. i.v. uygulama, günde 2 mg olmak üzere 6 saatte bir 1'er mg uygulanacak şekilde yapılır. İlaça cevap 6-12 saatte oluşur (73).

Doz ayarlaması çocuklarda kiloya göre yapılır (73). Vücutta birikme özelliğine sebebiyle, uzun süreli kullanımında zehirlenmelere sebep olabilir. Maksimal dozu 2-5 mg'dır (52).

N-deasetil N-metil kolşisin yapısında olan demekolsin ise, deri kanserlerinde merhem halinde % 0.5 konsantrasyonda kullanılır. Bir defada 1,5 mg dan fazla merhem tatbik edilmemelidir (52).

### **2.3.4.Tropolon Alkaloitlerinin Tedavide Kullanımı:**

#### **2.3.4.1.Gut (Damla) Hastalığı (61)**

Gut, ürik asit metabolizmasının bozukluğu sonucu oluşan hiperürisemi hali ve akut artirit nöbetleri ile kendini gösteren kronik bir hastalıktır. Zamanla eklemlerde ve böbreklerde sodyum urat birikintileri (tofus) ve idrar yollarında urat taşı oluşumuna neden olabilir. Gutlu hastalar normal kişilere oranla 80 kat daha fazla taş oluşma riski altındadırlar.

Kolşisin gut tedavisinde çok eskiden beri kullanılan bir alkaloittir. Ürik asit metabolizmasını etkilemez ve ürikozürük (ürük asit itrahını arttıran) etkisi yoktur. Sadece gut artritinde antienflamatuvar etki gösterir, diğer tip artritlerde ise böyle bir etkisi yoktur.

Akut gut arriti urat kristallerinin granüositler tarafından fagosite edilmesi ile başlar, fagositoz sonucu lizozomlar parçalanır, proenflamatuvar maddeler ortama salıverilir ve fagositlerin metabolizmaları hızlı olduğu için fazla laktik asit oluşur. Dokunun asitleşmesi urat kristallerinin oluşumunu artırır, bu da fagositozun artmasına sebep olur. Böylece kısır bir döngü meydana gelir. Kolşisin, urat kristallerinin

fagositozunu engelleyerek dokunun asitleşmesini ve böylece yeniden kristal oluşumunu ve lökosit göçünü önler. Lökositlerin hareketinin önlenmesinde kolşisinin etkili olduğu ve etkisini hücre içindeki mikrotübülleri parçalayarak gösterdiği düşünülmektedir.

#### **2.3.4.2. Ailevi Akdeniz Ateşi ve Amiloidoz**

Ailevi Akdeniz ateşi (FMF); Akdeniz kökenli toplumlarda sık görülen, tekrarlayan ve kendi kendini sınırlayan, ateş ile birlikte karın ağrısı, plevrit, artrit ve deri lezyonları ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Türkler, Yahudiler, Araplar ve Ermenilerde sık görülür. Dünya literatüründe ilk defa 1908 yılında 16 yaşında Yahudi bir kız olgu ile tanımlanmıştır. Ailevi Akdeniz Ateşi ismi ise ilk defa 1958 yılında kullanılmıştır. Esas olarak çocukluk çağı hastalığıdır ve hastalığın % 90 nında şikayetler 20 yaşından önce başlar. Hastalık esnasında ateş ile birlikte vücudun bir ya da birkaç bölgesinde enflamasyona bağlı ağrı atakları görülür. Bu bölgeler karın, göğüs, eklemler, kaslar, deri ve skrotumdur. Hastalığın semptomatik olduğu dönem “atak” olarak adlandırılır ve ataklar dışında hasta kendini oldukça iyi hisseder. FMF’li hastalarda Behçet hastalığı görülme olasılığı normal popülasyondan çok daha fazladır. FMF’li hastalarda görülen renal tutulumun en iyi bilinen şekli ise amiloidozdur (63).

*Amiloidoz:* Amiloid, çeşitli hastalıklarda vücudun birçok doku ve organında depolanan anormal protein yapısında bir maddedir. Amiloidozis birçok doku ve organı tutan sistemik ya da tek doku ve organı tutan lokalize formu ile karşımıza çıkabilir. Etiyolojisi bilinmemektedir ve yavaş ilerleyen bir hastalıktır. Amiloidoz romatoid artrit ya da FMF gibi enflamatuvar hastalıklarda ortaya çıkabilir, bu tip amiloidoza “sekonder amiloidoz” adı verilmektedir (13, 95).

Günümüzde FMF hastalarına, atakların azalmasını sağlayan ve daha da önemlisi tüm hastalarda amiloidoz gelişimini önleyen kolşisin tedavisi uygulanmaktadır. İlk defa 1972 yılında Goldfinger uzun süreli kolşisin tedavisinin FMF’li hastalarda atakları engellediğini göstermiştir. Amiloidoz oluşumunu engelleyen en düşük etkin dozun 1 mg/gün olduğu bildirilmiştir (63).

Kolşisin, FMF’de amiloidoz gelişimini önleyerek ve hastalığın gerilemesini sağlayarak hastalık prognozunu çarpıcı bir şekilde değiştirmektedir. Bu etkilerinin yanında, kortikosteroid ve immünosupresanlar uygulaması sonucu meydana gelen hatalı tedavilerin düzeltilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (68).

### **2.3.4.3.Behçet Hastalığı**

Behçet hastalığı ilk defa 1937 yılında Türk araştırmacı Hulusi Behçet tarafından tanımlanan, çok farklı sistemler üzerine etki edebilen, nedeni tam olarak açıklanamamış bir hastalıktır. Tekrarlanan oral ve genital ülserler ve üveit ataklarının yanısıra, eklem, akciğer, sindirim sistemi ve sinir sistemini de etkileyen bir hastalıktır (10).

Yapılan çalışmalar, kolşisinin Behçet hastalığında özellikle göz üzerinde meydana gelen hasar ve mukozal lezyonlar üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Bu çalışmalardan biri, Behçet hastalığı olan 12 hasta üzerinde 2 yıl süreli olarak Matsumura ve Mizushima tarafından yapılmıştır. 12 hastaya günde 1 mg dozda kolşisin verilmiş ve 8-9 ay sonunda gözde meydana gelmiş olan semptomların hastaların 7'sinde ortadan kalktığı, hastaların büyük çoğunluğunda ise aft ve eklem ağrılarının hafiflediği görülmüştür. Başka bir çalışma ise, 1 yıldan daha uzun süreli olmak üzere günde 1 mg dozda kolşisin kullanan 24 hasta üzerinde yapılmıştır. Çalışma sonunda hastaların %83 nün göz lezyonlarında belirgin bir düşüş ve mukoza şikayetlerinde %58 oranında bir azalmanın meydana geldiği görülmüştür (82).

Bu hastalığın tedavisinde kolşisin başarıyla kullanılan bir ilaçtır ve tedavide immunosupresif ilaçlarla kombine olarak -özellikle üveit tedavisinde- kullanılmaları tavsiye edilmektedir. Kolşisin ayrıca, kortikosteroid ya da immunosupresiflerle yapılan hatalı tedavilerin düzeltilmesi amacıyla da kullanılmaktadır (68, 82).

### **2.3.5.Kolşisinin Etkileri Üzerine Yapılmış Diğer Çalışmalar**

#### **2.3.5.1.Karaciğer Sirozu**

Kolşisin, sitoplazmik mikrotübüllerin toplanmasını önleyici etkisi nedeniyle karaciğer koruyucusu olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra kollajenin hücreler arası hareketini inhibe eder, sinoviyal doku kültürlerinde kollajenaz üretimini stimule eder ve hepatositlerin plazma membranları üzerinde stabilizasyonu sağlamaya çalışır. CCl<sub>4</sub> verilerek karaciğer sirozu oluşturulmuş sıçanlarda geri dönüşümü sağlar. Ve yine CCl<sub>4</sub> ile

kronik olarak muamele edilen sıçanlarda kollojen sentezi ve depolanmasını inhibe eder. Sirozlu hastalara kolşisin verildiğinde, klinik durumlarının iyileştiği serum albumin ve bilirubin düzeylerinde düzelme meydana geldiği ve protrombin zamanının kısaldığı görülmüştür. Oluşturduğu tek istenmeyen etkisi ise, serum alkali fosfataz düzeyinin artmasına sebep olmasıdır (101).

Diğer açıdan, bir flavonolignan bileşiği olan silimarin deney hayvanlarında çeşitli hepatotoksik maddeye karşı koruyucu etki göstermiştir. Bu maddeler arasında falloidin, alfa-amanitin, tiyoasetamit, galaktozamin, etanol, karbontetraklorür ve parsetamol bulunmaktadır. Silimarin aynı zamanda insanda hepatoprotektif etkiye sahiptir. Silimarinin hepatoprotektif özelliği karaciğer hücreleri için toksik olan serbest radikalleri yakalama özelliğine ve hepatositlerin hücre membranını stabilize etmelerine, hücreleri osmotik liziz (erime) olayına karşı daha dayanıklı hale getirmelerine dayanır. Terapötik ajan olarak silimarin iyi tolere edilebilmekte ve yan etki göstermemektedir.

Favari L ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmada kolşisin ve silimarinin karaciğer üzerine olan etkilerini karşılaştırmışlardır. Kolşisin ( $10\mu\text{g gün}^{-1}$ , p.o) ve silimarin ( $50\text{ mg kg}^{-1}$ , p.o) sekiz hafta boyunca haftada 5 gün  $\text{CCl}_4$  ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda çalışılmıştır.  $\text{CCl}_4$  verilmesi ile plazma karaciğer membranlarında  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ve  $\text{Ca}^{2+}$  ATPazlarında, taşıyıcı, ya da silimarin ya da kolşisin ile karşılaştırıldığında belirgin bir azalma görülmüştür.  $\text{CCl}_4$  ile muamele edilmiş hayvanların karaciğer kollajen içerikleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yaklaşık 4 kat artmış olduğu gözlenmiş ve karaciğer örnekleri histolojik olarak incelendiğinde normal karaciğerden daha farklı tahrip olmuş bir kollajen yapısı gözlendi. Kolşisin ya da silimarin tedavisi uygulandığında  $\text{CCl}_4$  uygulanması sonucunda gözlenen tüm bu değişimlerin (lipit peroksidasyon,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ , ve  $\text{Ca}^{2+}$  ATPaz lar gibi) engellendiği görülmüştür. Sadece karaciğer kollajen içeriğinin % 55 oranında azaldığı görülmüştür.  $\text{CCl}_4$  + silimarin grubunda glikojen içeriğinin kaybı tamamen önlenmiştir. Bununla birlikte sıçanlara  $\text{CCl}_4$  + kolşisin uygulandığında karaciğer glikojen içeriği eski haline dönmemiştir. Kolşisin ya da silimarinin kronik karaciğer hasarına karşı hepatoprotektif etkisinin birbirine oldukça yakın olduğu söylenebilir (44).

Das ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada ise kolşisinin antioksidan ve antifibrotik özellikleri incelenmiştir. Ayrıntılı olarak kolşisin ve antioksidan bölümünde verilen bu çalışmada kolşisinin karaciğer üzerindeki etkilerinden de bahsedilmiştir.

Çalışmada, uzun süreli kolşisin uygulanması sonucunda yerleşmiş olan karaciğer sirozunun gerileyebileceği ve bu açıdan da bir değere sahip olduğu belirtilmiştir (32).

### 2.3.5.2.Diyabet

*invtro* olarak yapılan çalışmalar kolşisinin, izole perfüze pankreasta insülin sekresonu stimülasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir (23).

Das UN, 1993 yılında insüline bağımlı olmayan diyabet hastalığında kolşisinin etkisi üzerine bir çalışma yapmıştır. Asetilsalisilik asit gibi antienflamtuvar etkili ilaçların bu diyabet türü üzerinde olumlu etkilerinin olması bu çalışmanın dayanağını oluşturmuş; NIDDM (Non-Insuline Dependent Diabetes Mellitus) hastalarına günde 3 defa 0.5 mg dozda kolşisin verildiğinde hem açlık hem de tokluk kan şekeri düzeyinde belirgin bir azalma olduğu görülmüş ve herhangi bir yan etki görülmemiştir. Bu çalışma kolşisinin antidiyabetik özelliklere sahip olabileceğini göstermektedir (34).

Açık ve kontrolsüz diğer bir çalışma, ilk faz diyabetik nöropatisi bulunmayan 50 hasta üzerinde yapılmıştır. Bu hastalara 1 ay süresince insülin tedavisinin yanısıra diyet uygulanmış, çalışmanın ikinci fazında hastalardan 25 inde başlangıçta uygulanan diyete devam edilmiş, diğer 25 hastaya ise günde 1 mg olmak üzere 1 ay süresince sadece kolşisin verilmiştir. Daha sonraki 5 ay süresince de gün aşırı 1 mg dozda kolşisin uygulamasına devam edilmiş, 6 ayın sonunda insülin ve diyet tedavisi uygulanan grupta herhangi bir gelişme gözlenmezken, kolşisin uygulanan gruptan 17 hastanın kişisel şikayetlerinin ortadan kalktığı 8 hastada ise bunun daha zayıf etkide olduğu gözlenmiştir. Bu grup hastada sinir iletilerinin hızında ise bir artış gözlenmiştir.

İnsüline bağımlı olmayan 12 diyabet hastası üzerinde açık olarak yapılan diğer bir çalışmada ise 15 gün plasebo uygulamasının ardından 15 gün boyunca günde 1,5 mg dozda kolşisin verilen hastaların kan şekeri seviyelerinde düşme görülmüştür.

İnsülin cevabındaki bu düşmenin, prostaglandin seviyesinin azalması ya da immün sistemin düzene girmesi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir. İnsülin sekresyonunun azalmasına ilişkin etkilerinin saptanması için daha detaylı çalışmalara gereksinim olduğu belirtilmektedir (68).

### 2.3.5.3. Alzheimer Hastalığı

Aisen ve arkadaşları, Alzheimer hastalığında antienflamatuvar etkili ilaçların etkili olabileceğini düşünerek bu etkiye sahip olan iki madde; hidrosiklorokin ve kolşisin üzerinde pilot tolerans testleri yapmışlardır. Pilot fizibilite testleri olarak adlandırdıkları bu deneylerde sadece hidrosiklorokin ve bu maddenin kolşisin ile kombinasyonu kullanılmıştır.

20 Alzheimer hastasına 11 hafta süresince günde iki defa 200 mg hidrosiklorokin ve 200 mg hidrosiklorokin + kolşisin kombinasyonu 12 hafta süresince verilmiş, hastalar yan etkiler ve davranış açısından gözlenmiştir. Sadece hidrosiklorokin alan grupta belirgin bir yan etki gözlenmemiş ancak kombine halde ilaç kullanan grupta iki hastada diyare meydana geldiği görülmüştür. Çalışma sonunda sistemli bir şekilde uygulanacak olan bu antienflamatuvar terapinin Alzheimer hastaları tarafından iyi tolere edilebildiği görülmüştür (3).

Histopatolojik çalışmalar, Alzheimerlı hastalarda nörotik plak alanlarına ait enflamasyonlarda gözlenen enflamatuvar sitokinler, akut faz proteinler, tamamlayıcı proteinler ve aktive olmuş mikroglyal hücrelerin varlığını göstermiştir. Hayvan ve hücre kültürü çalışmaları bu enflamatuvar medyatörlerin nörotik kayıplara yol açabileceğini düşündürmektedir. Bu doğrultuda Alzheimer hastalarının tedavisinde anti- enflamatuvar ilaçların etkili olabileceği hipotezinden yola çıkılarak antienflamatuvar etkili 3 ilaç (prednisone, hidrosiklorokin ve colchicine) üzerinde çalışılmıştır. Pilot çalışma sonuçları bu ilaçların Alzheimer hastalarında iyi tolere edilebildiğini göstermiştir (2).

### 2.3.5.4. Akut Perikardit

Kolşisinin tekrarlayan perikarditli hastalarda etkili olabileceği ve güvenle kullanılabilmesine dair kanıtlar bulunmaktadır. Imazoi ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, kolşisinin tekrarlayan akut perikarditli hastalarda hastalığın ilk evresinde, geleneksel tedaviye yardımcı olarak kullanılabilmesini tespit etmiştir. Çalışma İtalya'da Ocak 2002 ve Ağustos 2004 tarihleri arasında 120 ilk evre akut perikarditli hastalar üzerinde rastgele olarak yapılmıştır. % 55'i kadın olan 120 hastanın yaş ortalaması 56,9 dur. Rastgele seçilen hastalara kiloları ile orantılı olarak ilk gün 1-2 mg, daha sonraki 3 ay boyunca 0,5-1 mg dozda kolşisin verilmiştir. Bütün gönüllüler 7-10 gün boyunca 800 mg dozda aspirin almıştır. 18 ay sonra sonuçlar değerlendirildiğinde, kolşisin kullanan

grupta hastalığın tekrarlama oranının %10.7 iken kontrol grubunda bu oranın %32.3 olduğu görülmüştür.

Bu çalışma sonucunda da kolşisin ile birlikte uygulanan aspirin tedavisinin ilk evre akut perikarditli hastalarda hastalığın tekrarlama oranını düşürdüğü görülmüştür (77).

### 2.3.5.5. Antioksidan Özelliği

$CCl_4$  verilerek akut karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda kolşisinin antioksidan özelliği ve siroz hastalığındaki rolü üzerine Das ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, kolşisinin antioksidan ve antifibrotik özellikleri araştırılmıştır.  $CCl_4$  verilmeden önce kolşisin uygulanmış ve  $CCl_4$  verilmesi ile oluşan oksidan stres incelemiştir. Böbrek ve karaciğer malondialdehit ve böbrek glutatyon seviyelerinin  $CCl_4$  uygulanmasının ardından arttığı görülmüş, fakat sadece böbrek malondialdehit düzeyinin kolşisin uygulanmasının etkisiyle artışının önlendiği belirgin bir şekilde görülmüştür. Öncelikle kolşisin verilen grupta, serum total antioksidan seviyesinin belirgin olarak yüksek olduğu saptanmış,.  $CCl_4$  ile karaciğer hasarı oluşturulan sıçanlarda uzun süreli etkinliğine histolojik ve biyokimyasal markırlar ile bakılmıştır (long term etki) .

*in vitro* olarak kolşisinin antioksidan etkilerinin, diğer plazma antioksidanlarına göre daha yüksek dozlarda gerçekleştiği görülmüştür (33).

Çalışmada kolşisinin zayıf bir antioksidan etkinliğinin bulunduğu fakat oksidatif stresten koruyucu etkinliğinin olduğu belirtilmiştir. Daha da önemli olarak; uzun süreli uygulanma (long-term) sonucunda yerleşmiş olan karaciğer sirozunun gerileyebileceği ve bu açıdan da bir değere sahip olduğu belirtilmiştir.

Kolşisinin ve öldürücü dozun altında  $CCl_4$  ün 10 hafta boyunca birlikte verilmesi siroz gelişimini engellememiş ancak tekrarlanan doz  $CCl_4$  ile siroz yapılan sıçanlar hemen ardından 12 ay boyunca kolşisinle tedavi edildiklerinde hepsinde siroz dokusu oluşumunda gerileme görülmüştür.

Kolşisin ve antioksidan sistemler üzerine diğer bir çalışma ise Canacankatan N. ve arkadaşları tarafından 2003 yılında yapılan bir kongrede sunulmuştur. Bu çalışma kolşinin serbest radikal düzeyinde artışın gözleendiği Behçet hastalığı, siroz, ailesel Akdeniz ateşi gibi birçok hastalığın tedavisindeki olumlu etkilerine dayanmaktadır.



Çalışmada kolşisin ve antioksidan sistem arasında bir bağlantı olup olmadığı araştırılmıştır. Antioksidan etkinin gözlenmesi amacıyla eritrositlerde ve karaciğer dokularında redukte glutatyon (GSH) miktarı ile glutatyon peroksidaz (GSHPx) ve superoksit dismutaz (SOD) enzim düzeyleri ölçülmüş. Lipit peroksidasyonunun göstergesi olarak da malondialdehit (MDA) düzeyi saptanmıştır.

Çalışma 3 grup üzerinde yapılmıştır. 1. grupta bulunan 6 sıçana 40 µg, 2.grupta bulunan 8 sıçana 100 µg ve 3.grupta bulunan 6 sıçana 200 µg kolşisin/ağırlık olmak üzere 9 hafta süresince haftada 3 kez gavaj yoluyla oral olarak verilmiş, kontrol grubunda yer alan 8 sıçanda ise uygulama saf su ile sürdürülmüştür. 9. hafta sonunda servikal dislokasyon ile sıçanlar sakrifiye edilmiş, GSH, GSHPx ve karaciğer MDA değerleri ölçülüp kontrol değerleri ile karşılaştırıldığında aralarındaki farkın doza bağlı bir değişiklik gösterdiği görülmüş, SOD düzeyinde ise anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Patoloji sonuçlarında 1.grupta hepatositlerinde önemli bulgu saptanmazken 2. ve 3. grup hepatositlerinde doza bağlı olarak artan nonspesifik değişiklikler gözlenmiştir (22).

### **2.3.5.6.Kanser**

Kanser tedavisi amacıyla radyoterapi gören gutlu hastalarda kolşisinin kanser üzerindeki olumlu etkileri bildirilmiştir. Ancak kolşisin kanser tedavisi için istenilen dozlarda oldukça toksiktir. Radyoterapi ve cerrahi müdahalede bulunulmuş meme kanserli 90 kadın hasta üzerinde yapılan bir çalışma sonucunda, cerrahi girişim öncesi ve sonrasında kolşisin türevlerini kullanmış olan ve her 6 ayda bir kolşisin preparatı kullanan 55 hastanın, kolşisin uygulaması yapılmayan hastalara göre daha iyi durumda oldukları görülmüştür. Kolşisinin yüksek dozlarda göstermiş olduğu yüksek toksisite nedeniyle daha az toksisite gösteren N-deasetilkolşisin veya trimetil kolşisinik asit türevleri kanser tedavisinde daha umut verici görünmektedir (68).

### **2.4.Kanser ve Kanser Tedavisinde Bitkisel Kökenli Etken Maddeler**

Kolşisin ve türevleri çeşitli kanserlerin tedavisinde olduğu olduğu kadar bu alanda yapılan çalışmalarda da standart madde olarak oldukça önemli bir yere sahiptir. Bitkisel kökenli bir etken maddenin kanser üzerindeki bu etkinliği, araştırmacıları günümüzün en büyük sağlık sorunlarından olan kanser için etkili olabilecek bitkisel kökenli etken

maddeleri araştırmaya yöneltmiştir. Çalışmalar doğrultusunda kolşisin dışında pek çok antikanser etkinliğe sahip maddeler bulunmuş (Vinca alkaloidleri, podofilotoksin, taksol ve türevleri gibi.) ve tedavideki yerlerini almışlardır.

#### 2.4.1.Kanser ve kemoterapi

Bu hastalığın tanımlanmasında en bilinen isim olan “kanser” ismi, eski Romalılar döneminde şu 3 özelliği ile tanımlanan bir grup hastalık için kullanılmıştır.

- Kontrolsüz hücre proliferasyonu
- Hücresel farklılaşmanın kaybı
- Çevre dokulara hücum etmek ve daha sonra yenilerinin oluşumunu sağlamak

Kanseri daha farklı ve özel olarak tanımlayan terimler de vardır; örneğin “tümör”, “neoplazm” ya da “onko-” köküne sahip terimler gibi. Bu terimler dokudaki bir şişliği tanımlamak için kullanılırken, “karsinoma” terimi organ dokularını saran ya da çevrelerinde bulunan dokularda gelişen kanser türlerinin tanımlanması için kullanılır; örneğin: cilt, ağız mukozası ya da intestinal mukoza kanserleri gibi. Diğer kullanılan bir terim ise “sarkoma”dır, bu terim ise vücudun kemik, kas, yağ gibi bağ ve destek dokularında gelişen kanser türleri için kullanılır. Kanser vücudun her kısmında gelişebilir.

Kanser hastalığı, toplumda kardiyovasküler sistem hastalıklarının ardından gelen en önemli ölüm sebeplerindedir. 1850’ lerde dünyada görülen kanser oranı % 0,5 iken, 1946’da % 11, 1970’ te % 16 ve 1994 yılında yaklaşık % 20 olduğu kayıtlıdır. Kanser nedeniyle ölüm oranlarının her geçen yıl hızla artması nedeniyle, 2000 li yıllarda bu hastalığın kardiyovasküler hastalıkların önüne geçebileceği tahmin edilmektedir. İstatistiksel sonuçlar, şaşırtıcı olarak toplumun üçte birinin hayatlarında bir defa kanser hastalığı ile karşılaşacağını göstermektedir (11).

**Kemoterapi**, 19.yy sonunda Paul Erlich tarafından ortaya atılmış bir deyimdir. Vücudu istila eden mikroorganizmaları veya parazitleri konakçıya zarar vermeksizin öldürebilen ilaçlarla yapılan tedavi şekli demektir. Vücuda giren ve hastalık etkeni olan organizmalar çok çeşitli olduğundan (ör: bakteri, virüs, helmint, amip vs.) kemoterapide kullanılan ilaçlar da o oranda çeşitlilik gösterirler. Vücut için malinite göstermesi, çabuk çoğalması ve normal vücut hücresinden kısmen farklı biyokimyasal özelliklere sahip

olması bakımından neoplastik hücreler de bakteri ve diğer patojen mikroorganizmalara benzetilebilirler. Bu noktadan hareketle farmakolojide, kanser kemoterapisinden de söz edilir (61).

### ***Kemoterapötik ilaçların sınıflandırılması***

- Antibakteriyel ilaçlar
- Antihelmintik ilaçlar
- Antimalaryal ilaçlar
- Antiamibik ilaçlar
- Antiriketziyal ilaçlar
- Antiviral ilaçlar
- Antineoplastik ilaçlar

### **2.4.2.Kanser kemoterapisinde doğal ürünlerin yeri (132)**

Kanser tedavisinde birçok yöntem kullanılmaktadır. Cerrahi, radyoterapi (ışın tedavisi), kemoterapi ve immünoterapi tedavide en çok kullanılan yöntemlerdir. Bu yöntemler içerisinde kemoterapi en yeni olanıdır. Tümör tedavisinde cerrahi yöntem 100 yılı aşkın bir süredir uygulanmaktadır, radyoterapi de yine yaklaşık 80 yıldır kullanılır. Sistemik kemoterapinin uygulanması ise 2. Dünya Savaşı sırasında 1940 yılında Faber' in çocuklarda görülen lösemiye karşı metotraksatı kullanması ile başlamıştır. Bundan sonra bu alanda, özellikle son 10 yıl içerisinde ilaçlar ve tedavi sırasında görülen yan etkilerin hafifletilmesi üzerine büyük gelişmeler kaydedilmiştir. Gerçekten de kemoterapi, kanserin yayılmasını önlemek açısından umut vericidir. Çünkü kemoterapötik ilaçlar, yeni hücre oluşturmak üzere bölünen hücrelere müdahale ederek etkisini gösterir. Bu ilaçlar kan dolaşımına girerek vücuda dağılır böylece kanserli hücreleri oluştukları bölgelerin yanı sıra yayıldıkları diğer dokularda da (metastaz) öldürür. Bu da vücudun sadece lokal bir bölgesinde uygulanabilen avantajlı bir tedavi yöntemi olmasını sağlar.

Bu arada önemli olan diğer bir nokta da, kemoterapötik ajanların kanserli hücrelere zarar verirken aynı zamanda normal hücrelere de zarar vermesidir. Çünkü kanserli hücreler, büyüme ve çoğalma mekanizmalarının kontrolünü kaybetmiş olması

gibi ancak çok ince bir farkla normal hücrelerden ayrılır. Diğer yandan biyolojik davranışları ve kimyasal yapıları hemen hemen aynıdır. Kemoterapötik ilaçlarla tedavi esnasında genellikle belirli periyotlarda tedaviye ara verilir. Bu bekleme döneminde normal hücreler kanserli hücrelerden daha çabuk kendini yeniler ve bu küçük farklılık, pratikte kemoterapinin güvenilirliğini sağlar.

Diğer kanser terapisi metotları gibi, kanser kemoterapisi de kendi sınırlarını kendisi belirler. Bunun içerisinde, büyük tümörlerde tüm hücrelere yeterli harabiyet verememesi, ilaç rezistansının gelişmesi ve mide bulantısı, kusma, diyare, saç dökülmesi ve enfeksiyona duyarlılığın artması gibi yan etkileri yer alır. Bu yan etkilerin en önemli sebebi tedavi esnasında normal hücrelerin de zarar görmesidir.

Kanser tedavisinde kemoterapinin en etkili rolünün, cerrahi, radyoterapi ve immünoterapi ile ve bunlarla olduğu kadar da diğer kemoterapötik ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılması olduğu açıktır. Bununla birlikte özellikle de selektif kemoterapötik ajanların kullanılabilir olduğu bazı kanser türlerinde kemoterapi tek başına da uygulanabilir.

Yeni ve daha etki antikanser ajanların bulunmasına yönelik çalışmalarda, doğal ürünler oldukça önemli, üretken bir yer edinmiştir. Gerçekten, dünya üzerinde yetişen bitkiler binlerce yıldır hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmaktadır, buna rağmen birçok bitkinin etkileri tam olarak açıklanamamış ya da bilinmiyor durumdadır. Son bilgilere göre Amerika’da 87 kanser ilacı vardır ve bunların % 62’si ya tamamen doğal ya da doğal maddeler model alınarak yapılmıştır. 1989-1995 yılları arasında 300’den fazla yeni antikanser etkili olabilecek ilaç başvurusundan % 61’inin doğal kaynaklı olduğu saptanmıştır.

Günümüzde, kemoteropatik kanser ajanları etki mekanizmalarına göre 6 sınıfa ayrılmaktadır:

- ***Alkilleyici ajanlar:*** DNA replikasyonunu ve hücre bölünmesini önlerler ve DNA sarmalının açılmasını önleyerek hücre ölümüne sebep olurlar. Nitrojen gazı, aziridinler, metanosülfürik asit esterleri, kükürbitasinler gibi (41, 132).
- ***Antimetabolitler:*** Bunlar doğal metabolitlere benzer yapıya sahiptirler ve nükleik asit sentezine DNA/RNA'nın biyosentetik prekürsörleri için yanlış süstitüsyon yaparlar ya da normal prekürsör sentezini inhibe ederler. Folik asit, purin ve pirimidin antagonistleri bu grup ajanlara örnektir.

- ***Karsinolitik antibiyotikler:*** DNA ya bağlanarak DNA ve RNA sentezini inhibe ederler. Ör: Aktinomisin (Cosmogen ®), çocuklarda böbreklerde gelişen Wilm's tümörünün tedavisinde kullanılır.
- ***Hormonal Ajanlar:*** Over tümörleri, göğüs ve prostat gibi östrojen ve/veya androjenik hormonlarla ilgili olarak hormonal gereksinimi olan dokularda gelişen kanser türlerinin tedavisinde kullanılır. Östrojenik ve androjenik bileşikler ve son zamanlarda antiöstrojenler hormonal tedavide kullanılmaktadır. Bu ajanlar hormonal mekanizmalarının olması sebebiyle toksisite ve ölüm oranı açısından diğer ajanlardan daha avantajlıdır.
- ***Mitotik inhibitörler:*** Mitoz bölünme sırasında mikrotübülleri etkileyerek hücre bölünmesini inhibe ederler. *Catharantus roseus* bitkisinden izole edilen vinkristin (Oncovin ®) gibi. Bu ilaç çok çeşitli kanser türlerinin tedavisinde diğer ajanlarla kombinasyon şeklinde kullanılmaktadır. Lösemi, mesane kanseri, testiküler kanser gibi. Hodgkin hastalığında da kullanılır. Teniposide (Vumon®), doğal ürün olan podofillotoksinin kimyasal analogudur. Hodgkin hastalığı, diğer malign lenfomalarda, yetişkinlerde görülen kronik nöroblastomada kullanılır. Kamptotesin *Camptotheca acuminata* ağacından izole edilir. Çeşitli kanser türlerine karşı laboratuvar çalışmalarında etkili olduğu gözlenmiştir fakat klinik uygulamada çözünürlüğün çok düşük olması sorunlara neden olmaktadır, klinik kullanım için Topotecan gibi suda çözünen türevleri hazırlanmıştır. *Colchicum autumnale* bitkisinden elde edilen kolşisin de bu grupta yer almaktadır (11, 36, 53).
- ***Diğer kemoterapötik ajanlar:*** Bu grupta yer alan ajanlar diğer 5 sınıftan hiçbirinde yer almazlar. Procarbazin (Matulanc®) ve L- asparaginaz bu sınıfta yer alır.

Yeni antikanser ilaçların bulunması yönünde yapılan çalışmalar açısından, doğal ürünler zengin ve öncülük eden bileşiklerdir. Çeşitli hastalıkların, özellikle de kanser hastalığının tedavisinde doğal kaynaklı ilaçların keşfi en baskın rolü oynamaktadır (132).

### 2.4.3. Mikrotübül ve Tubulin Polimerizasyonu

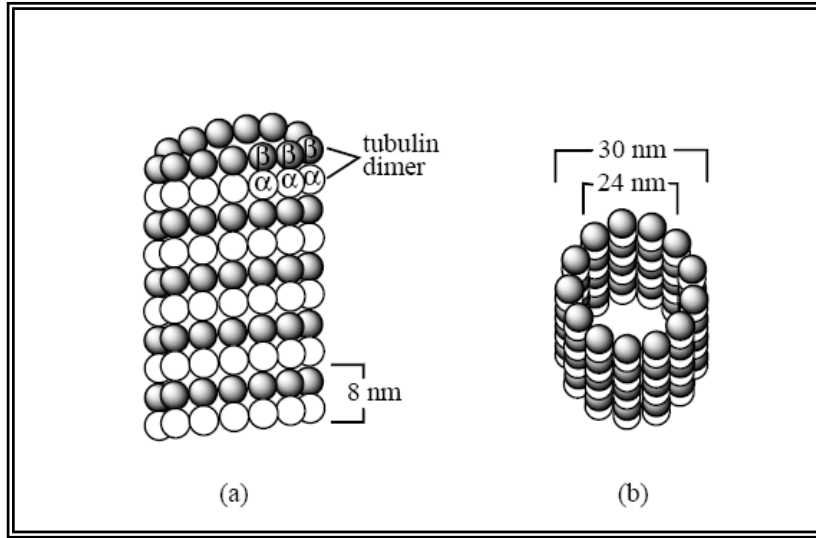
Mikrotübüller tubulin proteininden yapılan hücreler arası organellerdir. Bu organeller hücre ile ilgili çok sayıda önemli fonksiyonda (kromozom ayrılması, hücre şeklinin korunması, transport, hareket ve organellerin dağılması gibi) rol oynar.

Tubulin hücrede iki formda bulunur; serbest protein olarak ya da mikrotübüller olarak bilinen protein topluluğu şeklinde. Mikrotübüller mitotik iğ ipliklerinin şekillenmesi gibi birçok hücreyel oluşumda da önemli rol oynar. (36, 53).

Mikrotübüller polar karakterdedir ve tubulin proteinlerinin non- kovalant olarak bağlanması ile oluşurlar. Hücre bölünmesi esnasında mikrotübüller mitotik iğ iplikleri, kromozom çiftinin ayrılması ve ayrılma aşamasının yönlendirilmesi gibi fonksiyonlara sahiptir. Bölünmeyen hücrelerde ise sitoplazma, hücre çekirdeğinin pozisyonu, organelleri organize eder, kamçı ve silialarda asıl element olarak görev alırlar. Aktin filamentleri ve orta filamentler ile sitoplazmayı güçlendirerek şeklini sağlayan iskeleti oluştururlar.

Mikrotübüller, benzer yapıda iki protein ünitesinden oluşmuşlardır. Bunlar  $\alpha$  ve  $\beta$  tubulin üniteleridir. Bu tubulinler 80 Å luk açı ile baş-kuyruk şeklinde düzenlenirler ve linear protofilament formunu alırlar. Bir mikrotübül 13 adet protofilamentten oluşur ve çapı 240 Å olan bir halka oluşturur. Her bir tubulin monomeri ise 440 aminoasitten oluşmuştur.

Topluluğun oluşması çeşitli ajanların  $\beta$ - tubulin ünitesine bağlanmaları ile bloke edilebilir. *in vitro* da, mikrotübül fonksiyonuna zarar verecek ajanlar hücredeki mitoz aşamasını tutarlar, sonuçta nekroz ya da apoptosiz ile hücre ölümü gerçekleşir. Tubuline bağlanmada 3 bağlanma bölgesi belirlenmiştir. Kolşisinin bağlanma kısmı  $\alpha/\beta$  ara yüzeyine yakındır. Vinca alkaloidleri de kolşine oldukça benzer şekilde bağlanma gösterirler. Taksanların tubulinle etkileşimleri ise oldukça farklıdır.  $\beta$  ünitesinden bağlanma gösterir ve tubulin topluluğunun oluşumunu destekler ancak fonksiyonu olmayan polimerler meydana gelir (53).

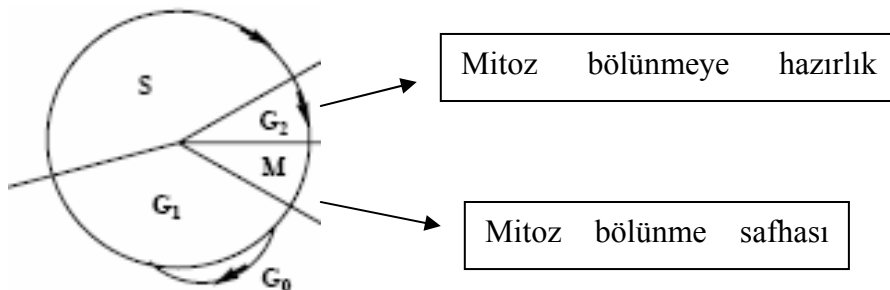


**Şekil 2-4: Tubulin topluluğundan oluşan mükrotübülün görünümü (132)**

- a)** Mikrotübülün uzunlamasına görünümü  
**b)** Mikrotübülün enine kesiti

### ***Hücre yaşam siklusu***

Normal olarak, insan hücre siklusu proliferasyon (çoğalma), farklılaşma ve hücrenin ölümü şeklinde olmaktadır. Hücrede çoğalmayı sağlayan siklus  $G_1$ , S,  $G_2$ , M olmak üzere 4 fazdan oluşmaktadır.  $G_0$  ise hareketsiz faz olarak adlandırılır.  $G_1$  fazında nükleositler ve enzimler sentezlenir. S fazında DNA sentezi başlar. DNA sentezinden topoizomeraz isimli enzim sorumludur. Daha sonraki faz olan  $G_2$  fazında hücre mitoz için hazırlıklarını yapar. M fazı mitoz bölünmenin gerçekleştiği ve iki yeni eş hücrenin meydana geldiği dönemdir (86).



**Şekil 2-5: Hücre yaşam siklusu (11)**

#### 2.4.4. Antitubulin Ajanların Aydınlatılmasında Kullanılan Biyolojik Yöntemler: (86)

Antimitotik ajanlar, insan neoplastik hastalıklarının tedavisinde oldukça önemlidir. Yeni antitubulin ajanların aydınlatılması için çeşitli biyolojik araştırmalar yapılmaktadır. Bunların biyolojik etkinliklerinin ölçülmesi amacıyla yeni teknikler geliştirilmekte aynı zamanda moleküler düzeyde çalışmalar da yapılmaktadır.

Hücre kültürü: Bu tür çalışmalar, incelenen maddelerin hücreleri çoğaltma ya da çoğalmalarını önleme etkilerinin olup olmadığının veya bu maddelerin bu tür bir etki göstermediklerinin belirlenmesi açısından bilgi vericidir. MTT ve sulforhodamine B miktar tayini yöntemleri bu açıdan antikanser etkide olabilecek drogların incelenmesinde özel bir öneme sahiptir. Antimitotik ajanlar kanser hücre serilerinin proliferasyonunu inhibe ederler.

Flow sitometri : Propidium iyod ile boyanmanın ardından ökaryotik hücrelerin ölçümüne dayanan bir yöntemdir. Flow sitometri çalışmaları, antitubulin ajanlarla muamele olmuş hücreleri, hücre siklusunun G<sub>2</sub>/M fazında yakalamasına dayanır.

İndirekt immünofloresans: Denenen ilaçlarla muameleyi takiben mikrotübüllerin intraselüler dağılımının belirlenmesi bu yöntem kullanılarak sağlanabilir. Paklitaksel benzeri ilaçlar ile muamele edildiğinde karakteristik geniş mikrotübül topluluğunun geliştiği görülür ve geniş oranda sitoplazmada bu durum gözlenir. Kolşisin benzeri ilaçlarda ise mikrotübüller sitoplazmada dağılmış halde obulduğundan gözlenmez.

Tubulin izolasyonu ve purifikasyonu: Tubulin domuz ya da inek beyninden 37°C de GTP (Guanozin trifosfat) varlığında toplanarak mikrotübülleri oluşturur ve soğukta (4°C) ise kalsiyum iyonları varlığında bir araya toplanmaz ve  $\alpha$  ve  $\beta$  tubulin dimerleri rejenere olur. Bu yöntem aynı zamanda tubulinin ortamda bulunan diğer proteinlerden temizlenmesi amacıyla da kullanılmaktadır.

Tubulin topluluğu tayini: Antitubulin ajanların etkilerini mikrotübül topluluğunun oluşumunu engelleyerek mi yoksa destekleyerek mi gösterdiklerini belirleyen bir yöntemdir.

Sedimentasyon tayini: Tubulin topluluğu tayini esnasındaki mikrotübül sayısının santrifüj işleminden önce ve sonra supernatant protein konsantrasyonuyla karşılaştırılmasına dayanır.



Seçici bağlanma tayini: İlacın tubuline bağlanma bölgesi üç sınıfa ayrılır; kolşisin, paklitaksel ve vinblastin. İncelenen maddenin hangi tip bağlanmaya yatkın olduğu belirlenir.

Elektron mikroskopu: Tubulin polimerleri mikrotübül stabilize edici ajanlarla elektron mikroskopunda incelenebilir.

Cytoblot tayini: Hücre siklusuna etki eden, hücreye geçebilen maddelerin kimyasal ve genetik bir yaklaşımla aydınlatılması olayına dayanır.

## **2.5.Bitkisel Kökenli Kemoterapötikler**

Bu bölümde günümüz tedavi sisteminde en çok kullanımı olan ve kolşisine benzer şekilde antimitotik özellikleriyle etkilerini oluşturan maddeler hakkında kısa genel bir bilgi verilmiştir.

### **2.5.1.Podofillotoksin:**

Lignanlar farklı bitki türlerinde geniş oranda yayılımı olan ve çok eski zamanlardan beri bilinen doğal ürünlerdir. Günümüze kadar 200 den fazla lignan tanımlanmış durumdadır. Bazı lignanların antineoplastik etki göstermeleri, son yıllarda bu alandaki çalışmalar açısından oldukça ilgi çekici olmalarının nedenidir. En az 30 lignanın sitotoksik ya da antitümöral etkili olduğu bulunmuştur. Bunlardan en önemlisi *Podophyllum* (Berberidaceae) reçinesi bileşikleridir. *Podophyllum peltatum* ve *P. emodi* gibi *Podophyllum* türlerinin reçinelerinde podofillotoksin major bileşenlerdir.

Podofillotoksin ve bu maddeden semisentetik olarak hazırlanan türevleri iki farklı mekanizma ile sitotoksik etkilerini göstermektedir. Podofillotoksinden semisentetik olarak hazırlanan etoposid ve teniposid isimli türevlerin de *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda antikanser maddeler açısından umut verici olduğunu göstermiştir.

Etki mekanizmaları açısından ele alındıklarında, podofillotoksinin etkisini mikrotübül polimerizasyonu inhibe etmek; etiposid ve teniposidin ise DNA topoizomerez II enzimini inhibe etmek suretiyle oluşturdukları ortaya çıkmıştır. Podofillotoksin ve  $\alpha$ -peltatin sırasıyla % 0 ve % 20 oranında DNA topoizomerez II'yi inhibe etmekte asıl etkisini ise mikrotübül polimerizasyonunu engelleyerek göstermektedir (86).

Podofillotoksinin etki mekanizması, tubulin proteinine aynı bölgeden bağlanması nedeniyle kolşisine oldukça benzer. Ancak podofillotoksin kolşisine göre daha hızlı bir şekilde tubulin proteinine bağlanır (36). Etoposit ve teniposit ise % 88'den daha yüksek bir oranda DNA topoizomeraz II'yi inhibe etmekte, mükrotübül polimerizasyonu üzerine ise etki göstermemektedir. Bu iki madde S fazı sonu ve G<sub>2</sub> fazında etkilerini göstererek tümör hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır (86).

### 2.5.2.Kamptotesin:

Kamptotesin, *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae) bitkisinden 1966 yılında izole edilen ve antikanser aktivite açısından umut verici kinolin alkaloidi yapısında bir maddedir. Yapısında bulunan 9-amino ve 10-hidroksi süstitüsyonuna sahip türevleri DNA topoizomeraz enzimini inhibe etmek suretiyle antikanser etki göstermektedir. Aktivitesi açısından 5'li lakton halkası ve 20- hidroksil yapısının da önemli olduğu bilinmektedir.

*in vitro* olarak yapılan çalışmalar lösemi hücreleri üzerinde kuvvetli inhibitör etkisi olduğunu göstermektedir. *in vivo* olarak L1210, P388 lösemi ve B16 melanokarsinom hücrelerinde etkili olduğu bilinmektedir.

Kamptotesinden hareketle hazırlanan topotekan ve irinotekan tedavide kullanılmaktadır. Günümüzde topotekan içeren Hycamtin® isimli preparat ovaryum kanserlerinin ve irinotekan içeren Camptosar® isimli preparat kolon ve rektum kanserlerinin tedavisinde kullanılmaktadır (86).

### 2.5.3.Steganacin:

*Steganotaenia araliace* (Umbelliferae) bitkisinin gövde kabukları ve odunundan elde edilen dibenzosiklooptadien yapısındaki lignanlar, kolşisin ve podofillotoksine benzer şekilde, hücre bölünmesi esnasında tubuline bağlanarak mitotik iğ ipliklerinin oluşumunu engeller ve bu şekilde sitotoksik etki oluşturur. *in vivo* olarak P388 lenfotik lösemide belirgin bir antilösemik etki oluşturmuştur. Yapılan çalışmalarda 11 farklı türdeki kanser hücresine karşı sitotoksik etki oluşturmuştur (36, 86, 126).

#### 2.5.4.Vinca alkaloidleri:

Apocynaceae familyası bitkisi olan *Catharanthus roseus* G.Don (Syn: *Vinca rosea* Linn.) üzerinde Kanada'lı ve Amerika'lı bilim adamlarının yapmış olduğu sistematik çalışmalar sonucunda bu bitkinin antineoplastik etkisi keşfedilmiştir. Daha sonraki çalışmalarda başlıca aktif bileşenleri olan Vinblastin ve Vinkristin alkaloidleri izole edilmiş ve bu maddelerin antikanser etkileri ortaya konmuştur.

Vinca alkaloidleri 40 yıldan fazla bir süredir kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Etkinlikleri kanıtlanmıştır ve çok sayıda kanser tipinde, tümör tedavisinde kullanılmaktadır; Lenfositik lösemi, Hodgkin hastalığı, testiküler kanser, baş ve boyun kanserleri, renal, küçük hücreli akciğer kanseri gibi. Ek olarak, solid tümörlerin tedavisinde hafifletici olarak (palyatif) kullanılmaktadır. Bu ilaçlar tubulin proteinini hedef alır. Vinca alkaloidleri mikrotübül harabiyetine sebebiyet vererek tubulin – mikrotübül dengesini bozar ve bu şekilde etki gösterir (53). Etki mekanizmaları kolşisine benzer şekilde mikrotübül topluluğunun oluşumunu engellemek yönündedir (86).

Sentetik bir türev olan 5-nonanhidrovinblastin ise vinblastinden daha iyi aktiviteye sahip olması yanında daha az toksik olması açısından önemlidir ve Fransa'da antikanser ilaç olarak tanıtılmaktadır (86).

#### 2.5.5.Taxol:

Paclitaxel, *Taxus brevifolia* (Taxaceae) bitkisinin gövde kabuklarında doğal olarak bulunan ve izole edilen diterpen yapısında bir maddedir. *Taxus* türleri üzerindeki ilk çalışmalar 19.yy ortalarında yapılmaya başlanmış ve 1856 yılında Alman eczacı Lucas tarafından karışım halde taksanlar elde edilmiştir. Paklitaksel çok sayıdaki klinik öncesi tümör modelinde denenmiş ve oldukça aktif olduğu görülmüştür. Bunun üzerine 1981 yılında Faz I ve 1985 yılında Faz II çalışmaları başlatılmış ve bu çalışmalar sonucunda ovaryum kanseri ve daha bir çok kanser türüne karşı yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Günümüzde ovaryum ve göğüs kanserlerinin klinik tedavisinde kullanılan en önemli kemoterapötik ajandır. Son zamanlarda yapılan klinik deneyler, paklitakselin aynı zamanda küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş ve boyun kanserleri ve diğer kanser türlerinin tedavisinde potansiyel olabileceğini göstermektedir (132).

1980 lerde taxol ilacının heyecan verici klinik sonuçları alınana kadar, iğ ipliklerine etki göstererek etkili olan maddelerin bilinmesine rağmen bu alandaki çalışmalar pek gündemde değildi. Başlangıçta *Taxus brevifolia* bitkisinden elde edilen paclitaxel klavuz bir madde olmuştur. Paclitaxel ilaçları etkilerini tubulin-mikrotübül dengesini bozarak göstermektedir ancak kolşisin ve Vinca alkaloidlerinin aksine bu dengeyi mikrotübüllerin toplanması (mikrotübül stabilizasyonu) yönünde bozar (36, 53, 86).

Bu maddelerin tümünün ortak özelliği, güncel olmaları ve kolşisin gibi antimitotik özellikleri ile sitotoksik etkilerini ortaya çıkarmalarıdır. Ancak Vinca alkaloidleri ve taxol, combrestatin ve semisentetik podofillotoksin türevleri etki mekanizmaları açısından yukarıda da bahsedildiği üzere bazı farklılıklar taşımaktadır. Podofillotoksin, steganasin tubulin proteinine kolşisin ile aynı bölgeden bağlanmak suretiyle çok benzer bir etki mekanizması göstermektedir. Bu maddelerin kimyasal yapılarına bakıldığında da kolşisinin A ve C halkaları ile benzer halka sistemleri taşımakta oldukları göze çarpmaktadır (54, 86).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

*Colchicum baytopiorum* C.D. Brickell bitkisine ait materyal bitkinin meyvalı olduğu 10.07.2003 ve 05.07.2005 (ISTE 81438) ile çiçekli olduğu dönem 20.10.2003 ve 21.10.2004 (ISTE 81439) tarihlerinde olmak üzere dört ayrı tarihte Antalya -Termessos yöresinden toplandı.

Her bir dönemde toplamış olduğumuz bitkisel materyalin çiçek, çiçek sapı, yumru, tohum ve yaprak kısımları birbirinden ayrıldı ve önce oda ısısında, sonra 60 °C ye ısıtılmış havalı etüvde kurutuldu, toz edildi. Bitkinin çiçekli olduğu dönemde ve meyvalı olduğu dönemde toplanmış olan yumrular ayrı ayrı çalışıldı. Çalışma, esas olarak 2003 yılında toplanan bitkisel materyalden elde edilen ekstreler üzerinde sürdürüldü.

#### 3.2.Kimyasal Yöntemler

##### 3.2.1.Fitokimyasal Ön Denemeler

5 g kaba toz edilmiş materyal üzerine 100 ml sıcak su konuldu ve karışım 5 dk sıcak su banyosunda tutuldu, soğuduktan sonra süzüldü. Hazırlanan infüzyonda flavon, antrasen, saponin, alkaloid ve tanen türevleri arandı.

##### 3.2.1.1.Flavon Türevlerinin Aranması:

5 ml infüzyon üzerine 5 ml hidroklorik asitli etanol (Shibata belirteci: 1k derişik hidroklorik asit + 1k su + 1k etanol) ve yeterli miktar magnezyum talaşı ilave edildi. Pembe, turuncu veya mor bir rengin meydana gelip gelmediği gözlemlendi. (*Shibata Reaksiyonu= Siyanidin Reaksiyonu*)

### **3.2.1.2.Antrasen Türevlerinin Aranması:**

10 ml infüzyon üzerine 5 damla derişik sülfürik asit ilave edildi. Karışım 15 dakika sıcak su banyosunda tutulup glikozitler hidroliz edildi. Karışım soğuduktan sonra 5 ml toluen ile çalkalandı. Toluenli tabaka bir pipet yardımı ile başka bir tübe aktarıldı ve üzerine 3 ml % 10' luk amonyak çözeltisi ilave edildi. Pembe-kırmızı bir rengin meydana gelip gelmediği gözlemlendi.

### **3.2.1.3.Saponin Aranması :**

10 ml infüzyon bir deney tübüne konuldu. Tüp baş parmak ile sıkıca kapatılıp yatay olarak 30 saniye kuvvetle çalkalandı ve 15 dakika dinlenmeye bırakıldı. Bu sürenin sonunda tüpte en az 1 cm yüksekliğinde kalıcı köpük oluşup oluşmadığına bakıldı.

### **3.2.1.4.Tanen Bileşiklerinin Aranması :**

10 ml infüzyon üzerine 2 ml tuzlu jelatin çözeltisi (sodyum klorür ile doyurulmuş % 1' lik jelatin çözeltisi) ilave edildi. Krem renkli bir çökeltinin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

**Gallik ve kateşik tanenin ayrılması :** 5 ml infüzyon üzerine 3 damla % 5' lik demir-III-klorür çözeltisi ilave edildi. Mavi siyah (gallik tanen) veya esmer zeytin yeşili (kateşik tanen) rengin oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

### **3.2.1.5.Alkaloit Aranması :**

1 g toz edilmiş numune, 10 ml % 3'lük H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> çözeltisiyle bir müddet ısıtılarak tüketildi. Soğuduktan sonra süzöldü. Süzöntü 5 ml % 10'luk amonyak çözeltisiyle kalevilendirildi ve ayırma hunisinde 10 ml eterle tüketildi. Eterli çözelti su banyosu üzerinde yoğunlaştırıldı.

Bakiye 10 ml % 3'lük H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile çözüldü. Bu asitli çözeltide alkaloit teşhisi özel belirteçlerle yapıldı.

- **Bouchardat Belirteci** : Esmer- kırmızı çökelek
- **Dragendorff Belirteci** : Turuncu-kırmızı çökelek
- **Mayer Belirteci** : Süt rengi çökelek

oluşup oluşmadığı gözlemlendi.

### 3.2.2.Miktar Tayini Yöntemleri

#### 3.2.2.1.Su Miktar Tayini :

Etüvde ısıtılarak sabit vevne getirilmiş bir cam tartı kabı içine 1 g toz haldeki bitki materyali konulup tam olarak tartıldı. 2 saat 100-105°C' lik etüvde kurutuldu ve desikatörde soğuduktan sonra tartıldı.

#### 3.2.2.2. Spektrofotometrik Total Alkaloit Miktar Tayini: (115)

Bitkinin farklı kısımlarına ait materyaller tam olarak tartıldı ve her birinin ayrı ayrı Soxhlet aparatında metanolle (Merck) 6 saat tüketilmesi suretiyle ekstraktları hazırlandı. Ekstraktların çözücüsü, alçak baskıda kuruluğa kadar distillendi ve bakiye ultrasonik banyoda metanolde çözündürülüp kantitatif siyah bantlı süzgeç kağıdından süzülerek balon jofede 100 ml'ye tamamlandı. 100 ml'ye tamamlanmış metanollü ekstraktan 100 µl alınıp 10 ml'ye seyreltildi ve bu çözeltilerin 352 nm'de UV spektrofotometresinde absorbansları ölçülerek standart kolşisin eğrisi yardımıyla kolşisin üzerinden hesaplanmış total tropolon alkaloitleri konsantrasyonu saptandı. Total alkaloit yüzdesi her örnek için 5 kez tekrarlanan absorbans ölçümlerinin ortalama değerleri alınarak hesaplandı.

2 mg kolşisin (Fluka 27650) 400 µl metanolde çözündürülerek % 0,5'lik stok kolşisin çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35'er µl (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 µg/ml maddeye karşılık gelen değerler) alınarak saf metanolla hepsi 10'ar ml'ye tamamlandı ve 352 nm'de absorbansları ölçülerek standart kolşisin eğrisi hazırlandı.

### ***Total Alkaloid Miktar Tayininde Kullanılan İstatistiksel Bilgiler***

Belirli konsantrasyonlarda 5 defa tekrarlanarak alınan ölçümler için ortalama değer, standart sapma, standart hata ve % 95 güven düzeyi için güven sınırları aşağıda belirtilen denklemler yardımıyla hesaplanmıştır.

$$S = \frac{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2}}{n - 1}$$

$\bar{x}$  = Ortalama değer

**S** = Standart sapma

$$S_R = \frac{S}{\bar{x}}$$

**n** = Deney sayısı

**S<sub>R</sub>** = Relatif standart sapma  
(=Değişme katsayısı)

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}}$$

**S <sub>$\bar{x}$</sub>**  = Standart hata

**t** = % 95 güven düzeyi için verilen sabite  
(Bu sabite 5 deney için 2,78'dir.)

$$G.S. = \bar{x} \pm t.S_{\bar{x}}$$



### 3.2.3. Alkaloitlerin Tüketilmesi

#### 3.2.3.1. Metanol Ekstrelerinin Hazırlanışı :

Kurutulup toz edilmiş bitkisel materyal çiçek, çiçek sapı, tohum, yaprak, yumru (Haziran) ve yumru (Ekim) kısımlarının her biri, ayrı ayrı Soxhlet apareyinde metanol ile tüketildi. Ancak tohumlar metanol ile tüketilmeden önce, yağlı maddelerinden kurtarılmak amacıyla Soxhlet apareyinde petrol eteri ile tüketildi. Elde edilen metanol ekstreleri alçak baskıda rotavaporda, 30-35 °C de yoğunlaştırıldı.

Bu şekilde elde edilen metanol ekstrelerine verilen kodlar:

- Çiçek.....Ç
- Çiçek sapı.....ÇS
- Yaprak.....Yp
- Tohum..... T
- Yumru (Haziran).....YH
- Yumru (Ekim).....YE

#### 3.2.3.2. Alkaloit Tüketmesi :

Hazırlanan metanol ekstresi su ile alındı ve süzüldü. Süzüntünün pH'sı % 3'lük H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH=3-4' e ayarlandı ve ayırma hunisinde kloroformla tüketildi (Kloroformla tüketme işlemleri Dragendorff Belirteci ile kontrol edilerek sonlandırıldı).

Kloroformlu kısım susuz sodyum sülfat ile suyundan kurtarıldıktan sonra süzüldü ve alçak baskıda 30-35 °C de yoğunlaştırıldı. Böylece nötral-fenolik ekstre (A ekstresi) elde edildi.

Sulu asitli kısmın pH sı % 10'luk NH<sub>4</sub>OH çözeltisi ile pH=8-9'a ayarlandı ve ayırma huniinde yeniden kloroformla tüketildi. Kloroformlu kısmın sodyum sülfat ile suyu alındı, süzüldü ve alçak baskıda yoğunlaştırıldı. Bazik ekstre (B ekstresi) elde edildi.

Kalan sulu bazik kısım nötralleştirildi ve bu defa kloroform:metanol (4:1) ile tüketildi. Kloroform:metanol (4:1) kısmı sodyum sülfat ile muamele edilip süzüldü, alçak baskıda yoğunlaştırıldı. Bu tüketme sonucunda ise glikozidik ekstre (C ekstresi) elde edildi.

Rotovapordaki yoğunlaştırma işlemleri 30-35 °C de yapıldı ve çalışma esnasında ekstreler mümkün olduğunca direkt ışıktan korundu.

Bitkinin ayrılan her bir kısmı için yapılan alkaloid tüketmesi sonucunda çiçek, çiçek sapı, yaprak tohum, yumrulara (Haziran ve Ekim) ait **A, B, C** ekstreleri elde edildi. Miktarları az olduğundan C ekstreleri üzerinde çalışılmadı.

Bu şekilde elde edilen A ve B ekstrelerine verilen kodlar:

- Çiçek.....Ç-A ve Ç-B
- Çiçek sapı.....ÇS-A ve ÇS-B
- Yaprak.....Yp-A ve Yp-B
- Tohum.....T-A ve T-B
- Yumru (Haziran).....YH-A ve YH-B
- Yumru (Ekim).....YE-A ve YE-B

### 3.2.3.3.Flavon Bileşikleri için Tüketme:

Daha önce hazırlanan ve alçak baskıda kuruluğa kadar uçurulmuş olan metanol ekstresi hacminin 3 katı suyla seyreltildi. % 3'lük H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile pH'sı 3-4'e ayarlanarak ayırma hunisinde 6 kez eterle tüketildi. Eterli ekstre kuruluğa kadar yoğunlaştırıldı.

Bu yöntemle çiçek sapın metanol ekstresinden (3 g) 183 mg eter ekstresi elde edildi ve bu ekstre üzerinde flavon bileşiklerinin izolasyonu yapıldı.

Bitkinin diğer kısımlarından elde edilen metanol ekstrelerinin 150 mg'ı aynı yöntemle tüketilerek eter ekstreleri elde edildi.

Bu yöntemle elde edilen eter ekstrelerine verilen kodlar:

- Çiçek.....Ç-E
- Çiçek sapı.....ÇS-E
- Yaprak.....Yp-E
- Tohum.....T-E
- Yumru (Haziran).....YH-E
- Yumru (Ekim).....YE-E

Her bir eter ekstresi çeşitli çözücü sistemlerinde İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ve Kağıt Kromatografisi (KK) yöntemleri kullanılarak şahit maddeler, ÇS-E ekstresinden elde edilen maddeler ve birbirleriyle karşılaştırılarak E ekstralarının flavon bileşikleri belirlendi.

### 3.2.4.Kromatografik Metotlar

#### 3.2.4.1.İnce Tabaka Kromatografisi (İTK):

**Hazır Plaklar:** Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck 0.5554)

Aluminiumoxid 60 F<sub>254</sub> neutral (Merck 0.5550)

#### Kullanılan Çözücü Sistemleri ve Oranları:

**Tablo 3-1:Tropolon alkaloidleri için İTK’nde kullanılan çözücü sistemleri**

No	ÇÖZÜCÜ SİSTEMİ	ÇÖZÜCÜ ORANLARI
1	Kloroform:Aseton:% 25 Amonyum hidroksit	50:50:1
2	Benzen:Etil asetat:Dietilamin: Metanol	50:40:10:8
3	Kloroform:Aseton:Amonyak	40:60:10
4	Etil asetat:İzopropanol:% 25Amonyum hidroksit	85:15:5
5	Kloroform:Aseton:Dietilamin	7:2:1
6	Benzen:Etil asetat:Dietilamin	50:40:10

**Tablo 3-2: Flavon aglikonları için İTK’nde kullanılan çözücü sistemleri**

No	ÇÖZÜCÜ SİSTEMİ	ÇÖZÜCÜ ORANLARI
7	Kloroform:Aseton:Formik asit	9:2:1
8	Toluen:Etil asetat:Formik asit	5:4:1
9	Benzen:Etanol	8 : 2

### **Kullanılan Belirteçler:**

#### ▪ **Alkaloitler için kullanılan belirteçler:**

##### ***Carr-Price Belirteci:***

25 g antimon triklorür, 75 g kloroform içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

##### ***Dragendorff Belirteci:***

Çözelti A: 0.85 g bazik bizmut nitratın 10 ml asetik asit ve 40 ml sudaki çözeltisi

Çözelti B: 8 g potasyum iyodürün 20 ml sudaki çözeltisi

Stok Çözelti: A ve B çözeltilerinden eşit hacimde alınarak karıştırıldı.

10 ml stok çözelti, 20 ml glasiyal asetik asit ve 100 ml distile su ile karıştırıldı.

#### ▪ **Flavon aglikonları için kullanılan belirteçler:**

##### ***Potasyum Hidroksit Çözeltisi:***

1 g KOH 100 ml etanolde çözülerek hazırlandı.

##### ***Amonyak Buharı***

##### ***NA Belirteci ( Naturstoffreagenz A:Difenil borik asit $\beta$ -amino etil ester):***

100 mg NA tozu 100 ml saf metanolde çözülerek hazırlandı.

### **3.2.4.2.Kromatotron (Santrifüjlü İnce Tabaka Kromatografisi):**

Kromatotron santrifüjle hazırlanan, radyal, preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemidir. İyi rezolüsyon sağlaması ve kolay uygulanabilir olması nedeniyle tercih edilmektedir.

***Kromatotron Plaklarının Hazırlanması:*** 50 g silikajel (Kieselgel PF-254 Merck 7749) 100 ml 0-5 °C' daki distile su ile hazırlanan homojen karışım hızla döndürülen plağın

merkezine döküldü. Laboratuvar ısısında 1 saat plağın üzeri kapatılarak ardından 24 saat üstü açık bırakılarak bekletildi, 3 saat 70 °C' daki etüvde aktive edildi. Aktive edilen plaklar 1 mm kalınlıkta olacak şekilde özel bıçaklar yardımıyla kazınarak üst yüzeyi düzeltildi

***Kromatotronun uygulanması:*** Üzeri uygun kalınlıkta adsorban ile kaplanmış ve ısıya dayanıksız camdan yapılmış olan plak bir motor tarafından sabit hızla döndürülür. Örnek uygulanmadan önce adsorban tabakası çözücü ile tamamen doyurulur ve 5 dakika daha çözücü ile alet çalıştırılır, ardından örnek kabine uygun hacimde örnek az miktardaki uygun çözücüde çözülerek verilir ve damla damla çözücü ilavesiyle ayırım yapılır. Çözücünün akış hızı adsorbanın kalınlığına göre, adsorbanın kalınlığı ise uygulanacak ekstre miktarına göre ayarlanır. 1-4 mm kalınlığındaki plaklarla 0,25-1,5 mg ekstrenin ayırımı sağlanabilir. Alet çalışırken plağın üzeri teflon kapakla kapatılır ve ayırım süresince inert bir gaz (azot gazı) kullanılır.

### **3.2.4.3.Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi:**

**Hazır Plaklar:** Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck 0.5554)

**Laboratuvar Ortamında Hazırlanan Plaklar:**

30 g Kieselgel 60HF<sub>254</sub> (Merck 7739) ya da Silicagel DS-O (bağlayıcısız, Camag 760701) 60 ml distile su ile hazırlanan homojen karışım 20x20 cm boyutlarındaki 5 adet cam plağa 0,5-1 mm kalınlığında Desaga plak yayıcısı kullanılarak yayıldı. 24 saat laboratuvar ortamında kurumaya bırakıldıktan sonra 1 saat 100-105 °C' daki etüvde aktive edildi.

**Uygulanması:** Çözücü olarak ince tabaka kromatografisinde en iyi sonuç alınan sistemler kullanıldı. Sürükleme işlemi tamamlandıktan sonra, plak kurutuldu. Oluşan bantlar uygun dalga boyundaki UV ışık altında incelendi. Bantların yerinin tam olarak belirlenememesi durumunda plağın kenerında çok ince bir şerit halinde alkaloid

belirteçleri püskürtüldü. Bantlar plaktan kazandıktan sonra, adsorbanın miktarına göre Pasteur pipetlerinden ve ya 0,5-2 cm çapında sütunlardan Kloroform-Metanol karışımının değişen oranları ile elüe edildi. Elüatlar, filtre kağıdından süzüldü, alçak baskıda kuruluğa kadar distillendi, uygun bir çözücü veya çözücü karışımında çözüldü, tekrar süzülerek kristallenmeye bırakıldı.

#### **3.2.4.4.Sütun Kromatografisi**

Adsorban olarak Aluminiumoxide Aktive Neutral, Aktivitätsstufe I (Merck 1078) kullanıldı.

Aktivitesi I olan alüminyum okside % 3 oranında distile su ilave edilip bir havanda iyice karıştırılarak Aktivitesi II haline getirildi.

**Uygulanması:** Eksre çok az miktarda kloroformda çözüldü ve kuru haldeki ekstre miktarının 3 katı kadar alüminyum oksit ile iyice karıştırıldı ve kurutuldu. Ekstre miktarı göz önünde bulundurularak seçilen uygun boyutlardaki bir cam sütun içerisine, yine ekstre miktarı ve sütun ebatları için uygun olan miktarda adsorban konuldu. Hazırlanan ekstre, adsorbanın üzerine, düzgün olmasına dikkat edilerek ilave edildi. Sütundan değişen oranlarda sırasıyla Eter-Kloroform-Metanol geçirildi. Toplanan fraksiyonlar alçak baskıda yoğunlaştırıldı, ince tabaka kromatografisi ile incelendi. Aynı alkaloit veya alkaloit karışımını içeren fraksiyonlar birleştirildi, alçak baskıda kuruluğa kadar distillendi. Karışım halinde olan fraksiyonlar yeniden preparaif İTK yöntemi uygulanarak saflaştırıldı.

### 3.2.4.5.Kağıt Kromatografisi (KK):

**Kullanılan Kağıt:** Whatmann No:1.

**Kullanılan çözücü sistemleri:**

**Tablo 3-3: Flavon aglikonları için K.K.'inde kullanılan çözücü sistemleri**

No	ÇÖZÜCÜ SİSTEMİ	ÇÖZÜCÜ ORANLARI
10	n-butanol:Asetik asit:Su	4:1:5
11	Asetik asit:Su	60:40
12	Asetik asit:Su	40:60

**Kullanılan Belirtec:**

*NA Belirteci ( Naturstoffreagenz A:Difenil borik asit  $\beta$ -amino etil ester):*

100 mg NA tozu 100 ml saf metanolde çözülerek hazırlandı.

### 3.2.4.6.Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi (LC/MS):

**LC özellikleri**

***Kullanılan Alet:*** Microcolumn Liquid Chromatography, Waters, Cap LC XE System (Milford, USA).

***Kolon Özellikleri:*** Reverse phase Microcolumn Geminy, Phenomenex, C-18 (150 mm x 300  $\mu$ m I.D.)

***Kullanılan Yöntem, Çözücü Sistemleri ve Oranları:***

3 farklı çözücü kullanıldı ve *gradient yöntemle* çalışıldı.

**A çözücüsü=** 5,7 mM NH<sub>4</sub>OH + %5 ACN (Asetonitril)

**B çözücüsü=** 5,7 mM CH<sub>3</sub>COOH + %5 ACN

**C çözücüsü=** ACN

**Tablo 3-4: LC/MS yöntemindeki çözücü sisteminin zamana göre oranı**

<b>Süre (dk)</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>	<b>% C</b>
0,00	90	10	5
5,00	90	10	5
25,00	70	30	5
40,00	10	90	5
45,00	90	10	5
60,00	90	10	5

***Analiz süresi:*** 60 dk

***Basınç:*** 4000 psi

***Örnek hacmi:*** 5 µl

**MS özellikleri**

***MS spektrumu için kullanılan alet:*** MS, QTOF Premier, Waters, USA

***Analiz süresi:*** 60 dk



### 3.2.5.Spektral Yöntemler

#### 3.2.5.1.Kütle -Kütle Spektrumu (MS/MS):

Bu analizler MassLynx v.4.0, Waters, USA aletinde ESI-MS (pozitif mod) yöntemi kullanılarak yapıldı.

*Analiz süresi : 60 dk*

#### 3.2.5.2.Ultraviyole Spektrumu (UV):

Jasco 530V UV-Vıs spektrofotometresi kullanıldı. Spektrumlar, 1 cm'lik kuvarz küvetler kullanılarak maddenin metanolde hazırlanmış çözeltisi ile alındı.

##### Alkaloitler için:

Alkaloitlerin spektrumları direkt olarak metanolle hazırlanmış çözeltileri ile alındı.

##### Flavon Bileşikleri için:

Flavon bileşiklerinin UV spektrumları aşağıda belirtilen kayma belirteçleri kullanılarak alındı. Alınan spektrumlarla yapı tayini için bantlarda meydana gelen kaymalar değerlendirildi. Flavon bileşiklerinin UV spektrumu 3 aşamada alındı (75).

##### *I.Aşama:*

- Maddenin metanoldeki çözeltisinin spektrumu alındı
- Metanol üzerine 3 damla NaOMe çözeltisi damlatılarak spektrum alındı.

##### *II.Aşama:*

- Maddenin metanoldeki çözeltisine 6 damla  $AlCl_3$  çözeltisi ilave edilerek spektrum alındı.
- $AlCl_3$  içeren çözelti üzerine 3 damla HCl çözeltisi damlatılarak spektrum alındı.

### *III.Aşama:*

- Maddenin metanoldeki çözeltisine küvette 2 mm kalınlığında NaOAc tabakası çözünmeden kalıncaya kadar NaOAc ilave edildi ve spektrum alındı.
- NaOAc içeren metanol çözeltisine spektrumun özelliğine göre katı ya da çözelti halinde H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ilave edildi ve spektrum alındı.

### **3.2.5.3.İnfrared Spektrumu (IR):**

Perkin Elmer 1600 Series FTIR aleti kullanıldı. IR spektrumlarının alınabilmesi için maddeler spektroskopik KBr ile karıştırılıp tablet halinde basıldı.

### **3.2.5.4.Nükleer Magnetik Rezonans Spektrumu (NMR):**

Maddelerin <sup>1</sup>H NMR spektrumları Varian Unity Inova 500MHz NMR aletinde alındı.

### **3.2.5.5.Kütle (Mass) Spektrumu (MS):**

Maddelerin kütle spektrumları 2 farklı alette alındı.

- Termo Finnigan <sup>TM</sup>LCQ<sup>TM</sup>, ESI (+)
- Masse ZQ 2000 Watres (Source:Z Spray) ESI (+)

### 3.2.6.Sitotoksik Aktivite Testlerinde Kullanılan Yöntemler

#### 3.2.6.1.Brine Shrimp Letalite Testi (24, 80)

Bitkinin her bir kısmından hazırlanmış olan metanol ekstreleri (Ç, ÇS, Yp,T, YE, YH) ve şahit madde olarak kullanılan kolşisinden (K), 1, 10, 100 µg/ml (ppm) olmak üzere hazırlanan 3 ayrı konsantrasyonda çalışıldı.

- 3,8 g deniz tuzu 100 ml distile su içerisinde çözündürüldü.
- Hazırlanan tuzlu suyun 25 ml'si orta kısmında bulunan bir bölme ile iki kısma ayrılarak bir tarafı aydınlık, diğer tarafı karanlık olması sağlanan özel tanka konuldu.
- Tank üzerine karides larvaları (*Artemia salina*) ekildi.
- Maddeler önce 1000, 100, 10 ppm olmak üzere 3 ayrı konsantrasyonda hazırlandı. Ancak bu konsantrasyonda tüm larvalar öldüğü için, sitotoksik aktivitenin hesaplanabilmesi için deney 100, 10 ve 1 ppm konsantrasyonlarda hazırlanarak yapıldı.
- 48 saat kesintisiz ışık kaynağı altında bekletilen larvalar yeterli olgunluğa eriştiğinde belirli konsantrasyonda ekstrelerin bulunduğu şişelere 5 ml deniz tuzu çözeltisi eklendi.
- Herbir şişeye pastör pipeti yardımıyla 10 adet karides konuldu.
- Bu şekilde karidesler ekstrelerin de bulunduğu şişeler içinde 24 saat daha kesintisiz ışık kaynağı altında bekletildi.
- 24 saat sonunda yaşayan karidesler sayıldı ve kaydedildi.
- Sonuçlar Finneya bilgisayar programında  $LC_{50}$  değeri olarak % 95 güvenilirlikle hesaplandı.

### **3.2.6.2.MTT Yöntemi ile Hücre Serileri Üzerinde Sitotoksik Aktivite Tayini**

Oda sıcaklığında kurutulan metanol ekstreleri liyofilize edilip desikatörde bekletildikten sonra 10'ar mg tartılarak 1'er ml dimetilsülfoksitte (DMSO, Sigma D-5879) çözüldü ve % 10 FCS (Foetal Calf Serum, Sigma Cat. No: F 4135) içeren IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma Cat.No: I 2510) ile dilüe edilerek farklı konsantrasyonlar (500, 100, 50, 10, 1, 0,1 µg/ml) hazırlandı.

#### ***Hücre Kültürlerinde Kullanılan Besiyerinin Hazırlanması***

17,7 g IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Sigma Cat. No: I 2510) 100 ml distile suda çözümlenerek üzerine 100 ml distile suda çözülmüş 3,024 g sodyum bikarbonat (Sigma Cat. No: S 5761) ve 100 ml distile suda çözülmüş 0,3 g L-glutamin (Sigma Cat. No: G 3226) eklendi. Toplam hacim 1000 ml olacak şekilde distile su eklenerek 0,45 µm çapında steril filtreden (Millipore Cat. No: XX1004704) geçirildi. Hazırlanan stok medyuma 50 mg/litre olacak miktarda Gentamisin (Genta®) eklendikten sonra küçük hacimlere (100-200 ml) ayrılarak deneyler süresince +4 °C' de saklandı ve kullanılacağı zaman % 10 FCS (Foetal Calf Serum, Sigma Cat. No: F 4135) eklendi.

#### ***Süspansiyon Kültürlerinin Hazırlanması***

Süspansiyon kültürleri için 50 ve 250' ml lik kültür flaskları (Nunc®) kullanıldı. Besi ortamı olarak % 10 FCS ilave edilmiş IMDM kullanıldı. Kültür flaskları % 5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde, (NuAire US) nemli ortamda, 37 °C' de belli aralıklarla pasaj yapılarak inkübe edildi.

#### ***Lösemik Hücre Serilerinin Hazırlanması***

Bu çalışmada, ATCC'den (American Type Culture Collection) ve farklı laboratuarlardan elde edilen lösemik hücre serileri (K562 ve HL60), laboratuarda birkaç kez % 10 FCS içeren IMDM ile pasaj yapıldıktan sonra kullanıldı.

### ***Hücre Sayımı ve Canlılık Tayini***

Bu amaçla her bir örnekten 10 µl alınıp üzerine, sadece ölü hücreleri boyama özelliğine sahip olan Trypan-blue (Sigma Cat. No: T 8154) maddesinin % 4'lük çözeltisinden 10 µl eklendikten hemen sonra Neubauer lamında 10 x 40 büyütme ile sayım yapıldı. Özellikle kültür çalışmalarında sadece canlı hücrelerin sayısı dikkate alınacağından, hem kültür öncesi hem de süspansiyon kültüründen alınan hücrelerin sayımında, boya almamış ve düzenli hücre morfolojisi gösteren hücreler dikkate alındı.

### ***Kolorimetrik MTT Yönteminin Uygulanması (48, 83).***

Bu çalışmada her bir metanol ekstresinin 6 ayrı konsantrasyonu (500, 100, 50, 10, 1, 0,1 µg/ml), 96 kuyucuklu kültür plaklarına, her bir konsantrasyondan üçer kuyucuk olacak şekilde, 10'ar µl konuldu. Ayrıca kontrol grubu olarak 3 kuyucuğa 10'ar µl ekstre içermeyen medyum konuldu.

Bütün kuyucuklara hazırlanan hücre süspansiyonundan 90'ar µl ekildi. İşlem sonunda bütün kuyucuklarda toplam 100 er µl hücre süspansiyonu oldu. Bu şekilde hazırlanan hücre kültür plakları iki gün, 37 °C'da nemlendirilmiş % 5 CO<sub>2</sub> li steril etüvde saklandı. Bu süre sonunda, plaktaki bütün kuyucuklara 10'ar µl MTT (5 mg MTT/ml PBS) eklendi (Başlangıçta rengi sarı olan MTT, metabolik olarak aktif olan hücrelerin mitokondrilerinde değişime uğrayarak mor renk vereceğinden sadece canlı hücreler boyanır) ve tekrar aynı etüvde 4 saat bekletildi. Daha sonra kültür plağı etüvden sarsmadan çıkarıldı ve kuyucukların diplerinde çökmüş olarak bulunan hücrelere zarar vermeden kuyucukların üst kısmından 80'er µl süpernatant mikropipetle çekilip atılarak yerine 180 µl isopropanol solusyonu (pH:5,5) eklendi. Mikrokültür plakları, formazanın daha iyi çözülebilmesi için, bir gece karanlık odada bekletildi. ELISA pleyt okuyucuda 620 nm referans dalga boyuna göre 540 nm' de okundu. Deney ve kontrol gruplarının ortalama absorbans (OA) değerleri karşılaştırılarak, aşağıdaki formül ile sitotoksosite indeksi (SI) hesaplandı.

$$SI = 1 - [OA (\text{deney}) / OA (\text{kontrol})] \times 100$$

Sitotoksisite indeksi, sitotoksisite değişimlerinin %'si olarak da ifade edilebileceği için grafiklerde “% sitotoksisite” ifadesi kullanılmıştır.

Ekstre konsantrasyonlarının sitotoksik etkilerinin güvenilir olduğunu test etmek amacıyla konsantrasyonları hazırlarken kullanılan DMSO'nun ekstreler ile tamamen aynı şekilde altışar konsantrasyonları hazırlandı ve aynı yöntemle sitotoksik etkileri ölçüldü.

Ayrıca hücrelerin % 50'sini öldüren letal konsantrasyonu (LK) hesaplamak için grafiklerdeki % 50 sitotoksisite indeksine en yakın ekstre konsantrasyonları baz alınarak orantı ile  $LK_{50}$  değerleri hesaplandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *Colchicum baytopiorum* Üzerinde Fitokimyasal Ön Deneme Bulguları

Gölgede kurutulduktan sonra toz edilen, bitkinin çeşitli kısımlarına ait materyaller üzerinde yapılan fitokimyasal ön deneme sonuçları Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

**Tablo 4-1: *Colchicum baytopiorum* bitkisine ait fitokimyasal ön deneme sonuçları**

	Ç	ÇS	Yp	T	YH	YE
<b>Alkaloit</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Flavon</b>	+	+	+	-	-	-
<b>Gallik</b>	-	-	-	-	+	-
<b>Tanen</b>						
<b>Kateşik</b>	-	-	+	-	+	+
<b>Antrasen</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Saponin</b>	-	-	-	-	+	+

Ç=Çiçek, ÇS=Çiçek sapı, Yp= Yaprak, T= Tohum, YH= Yumru (Haziran), YE= Yumru (Ekim)

### 4.2. Miktar Tayini Bulguları

#### 4.2.1. Su Miktar Tayini

**Tablo 4-2: *Colchicum baytopiorum* türünde yapılan su miktar tayini sonuçları**

	Ç	ÇS	Yp	T	YH	YE
<b>Su (%)</b>	7,17	6,79	6,93	7,00	7,88	8,27

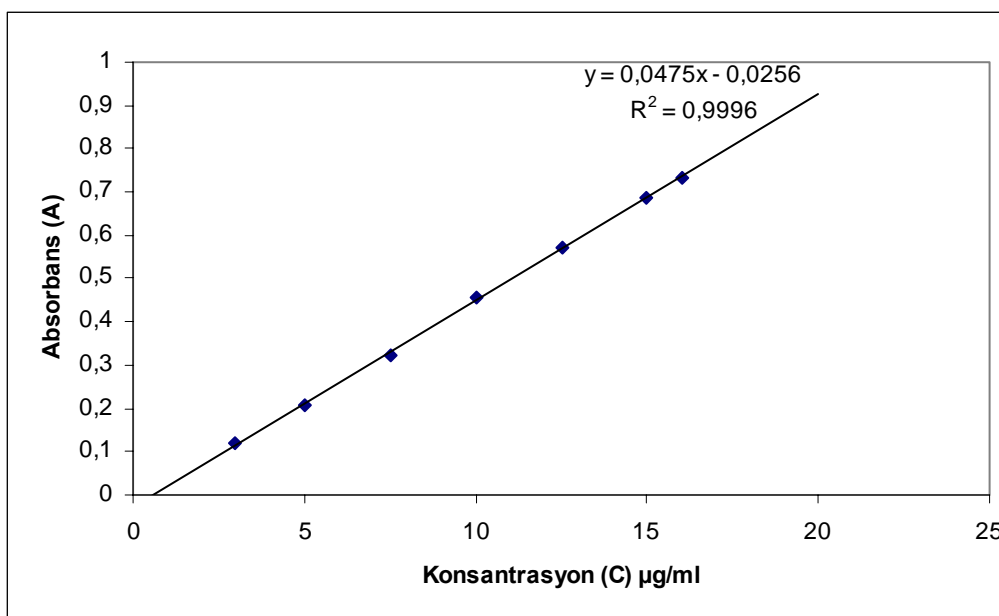
#### 4.2.2. Spektrofotometrik Total Alkaloit Miktar Tayini Bulguları:

*Colchicum baytopiorum* bitkisinin çalışılan kısımlarından elde edilen metanol ekstralarının, 352 nm dalga boyundaki absorbans değerleri Jasco UV visible spektrofotometrisinde total alkaloit miktar tayini yapılmak amacıyla ölçülmüştür. Ekstrele ait absorbans değerleri hesaplanırken, yapılan 5 ölçümün ortalaması alınmıştır (Tablo 4-3).

**Tablo 4-3: Kolşisin standartının belirli konsantrasyonlarda alınan absorbans ortalamaları, S ve S<sub>R</sub> değerleri**

*C (µg/ml)	*A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>	A <sub>4</sub>	A <sub>5</sub>	A <sub>ort</sub>	S	S <sub>R</sub>
3	0,12	0,121	0,123	0,118	0,127	0,122	0,003421	2,808314
5	0,215	0,212	0,213	0,203	0,202	0,209	0,006042	2,890681
7.5	0,321	0,320	0,316	0,328	0,326	0,322	0,004817	1,494922
10	0,452	0,450	0,461	0,449	0,463	0,455	0,006519	1,432792
12.5	0,579	0,571	0,568	0,579	0,554	0,570	0,010281	1,803060
15	0,693	0,691	0,689	0,683	0,678	0,687	0,006181	0,899915
16	0,737	0,735	0,728	0,743	0,725	0,734	0,007197	0,981083

\*C= Konsantrasyon, A= 352nm deki absorbans, S= Standart sapma, S<sub>R</sub>=Relatif standart sapma



**Şekil 4-1: Kolşisinin standart eğrisi**



Kolşisin standartının belirli konsantrasyonlarda 352 nm’de vermiş olduğu adsorbans değerleri ile hazırlanan kolşisinin standart eğrisine (Şekil 4-1) göre konsantrasyon hesabı;  $y = 0.0475x - 0.0256$  ( $R^2 = 0.9996$ ) formülü ile yapılmıştır.

Metanol ekstralarının ortalama adsorbans değerleri y değeri olarak bu formüldeki yerine konularak x (konsantrasyon) değerleri hesaplanmıştır.

**Tablo 4-4: *C.baytopiorum* metanol ekstralarına ait adsorbans ortalamaları ( $A_{ort}$ ) ve standart sapma (S) değerleri**

Ekstre	$A_1$	$A_2$	$A_3$	$A_4$	$A_5$	$A_{ort}$	SD
Ç	0,229	0,227	0,231	0,225	0,230	0,228	0,002408
ÇS	0,378	0,430	0,410	0,422	0,412	0,410	0,017728
Yp	0,241	0,281	0,267	0,267	0,287	0,269	0,015870
T	0,097	0,099	0,099	0,100	0,097	0,098	0,001211
YH	0,075	0,077	0,072	0,076	0,072	0,074	0,002066
YE	0,042	0,048	0,049	0,049	0,050	0,048	0,002875

**Tablo 4-5. *C.baytopiorum* adsorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon ve ortalama değerleri**

Ekstre	$C_1$	$C_2$	$C_3$	$C_4$	$C_5$	$C_{ort}$
Ç	5,360	5,317	5,402	5,275	5,381	5,347
ÇS	8,497	9,592	9,171	9,423	9,213	9,179
Yp	5,613	6,455	6,160	6,160	6,581	6,194
T	2,581	2,623	2,623	2,644	2,581	2,610
YH	2,118	2,160	2,055	2,139	2,055	2,105
YE	1,423	1,549	1,571	1,571	1,592	1,541

Hesaplamalarda güvenilir sonuç aralığının belirlenmesi için istatistiksel değerlendirmeler yapılarak sonuçları Tablo 4-6 da verilmiştir.

**Tablo 4-6: *C. baytopiorum* metanol ekstrelerine ait  $S_R$ ,  $S_{\bar{x}}$  ve G.S. istatistik değerleri**

Ekstre	$S_R$	$S_{\bar{x}}$	G.S	G.S. Aralığı
Ç	1,056140	0,0011	$5,275 \pm 0,003$	5,272-5,278
ÇS	4,323902	0,0079	$9,179 \pm 0,022$	9,151-9,201
Yp	5,899628	0,0072	$6,194 \pm 0,200$	5,994-6,394
T	1,235714	$5,4158 \times 10^{-5}$	$2,610 \pm 1,506 \times 10^{-3}$	2,608-2,612
YH	2,791891	$9,2394 \times 10^{-4}$	$2,105 \pm 2,567 \times 10^{-3}$	2,103-2,107
YE	5,989583	0,0013	$1,541 \pm 0,0036$	1,537-1,545

Bitkinin herbir kısmına ait metanol ekstresinin içerdiği total alkaloid miktarının hesaplanmasında, bu ekstrelerin hazırlandığı bitki kısımlarının miktarı (Tablo 4-7) üzerinden hareket edilmiş ve güven sınırları dahilinde sonuçlar Tablo 4-8 de verilmiştir.

**Tablo 4-7: *C. baytopiorum* metanol ekstrelerinin hazırlanmasında kullanılan bitki miktarları**

Ekstreler	Ç	ÇS	Yp	T	YH	YE
Bitki Miktarı ( g)	0,8290	3,0895	3,0641	3,0334	3,0442	3,0162

**Tablo 4-8: *C. baytopiorum* metanol ekstrelerinin güven aralığında total alkaloid miktarları**

Ekstreler	Ç	ÇS	Yp	T	YH	YE
Alkaloid Miktarı (%)	5,27-5,28	2,96-2,97	1,96-2,09	0,85-0,86	0,69-0,70	0,50-0,51

#### 4.3. *C. baytopiorum* Alkaloitlerinin Ayrılması, Saflaştırılması ve Elde Edilen Alkaloitlerin Yapılarının Aydınlatılması:

Bitkinin her bir kısmına ait kurutulup toz edilmiş materyal Bölüm 3'te anlatıldığı şekilde tüketildi. Tüketme sonucunda elde edilen metanol (M), nötral-fenolik ekstre (A), bazik ekstre (B) ve glikozidik ekstre (C) miktarları ve % verim Tablo 4-9 da verilmiştir.

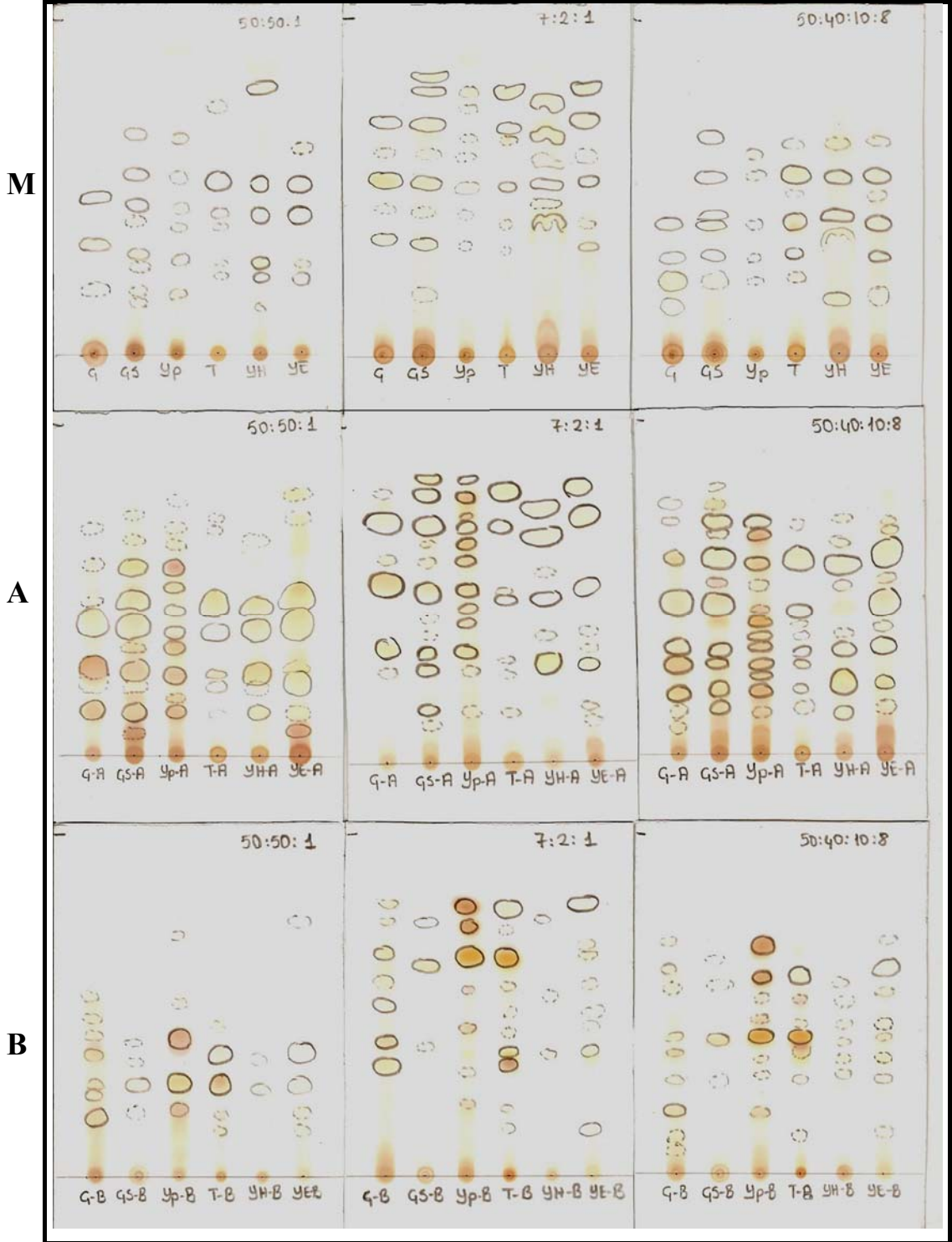
**Tablo 4-9: *C. baytopiorum* türüne ait ekstre miktarları ve % verimleri**

	Bitki miktarı		M	A	B	C
Çiçek	11,71 g	Ekstre miktarı	5,20 g (4 g)*	162 mg	16,7 mg	13,4 mg
		Verim	% 44,41	% 4,5	% 0,42	% 0,34
Çiçek Sapı	16,60 g	Ekstre miktarı	5,80 g (4 g)*	290 mg	37,5 mg	11,3 mg
		Verim	% 34,94	% 7,25	% 0,94	% 0,28
Yaprak	60 g	Ekstre miktarı	6,88 g (4 g)*	153,9 mg	34,5 mg	23 mg
		Verim	% 11,47	% 3,85	% 0,86	% 0,58
Tohum	30 g	Ekstre miktarı	2,70 g (2 g)*	310,5 mg	21,4 mg	4,6 mg
		Verim	% 9	% 15,53	% 1,07	% 0,23
Yumru (Ekim)	100 g	Ekstre miktarı	12 g (7 g)*	200 mg	10 mg	2,7 mg
		Verim	% 12	% 2,86	% 0,14	% 0,04
Yumru (Haziran)	30 g	Ekstre miktarı	3,511 g (2 g)*	107 mg	10,8 mg	21,5 mg
		Verim	% 11,70	% 5,35	% 0,54	% 1,08

\*A, B ve C ekstralarının tüketmeleri bu miktarlar üzerinden yapıldı.

4.3.1.C. *baytopiorum* M, A ve B ekstralarının İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi ile 3 Ayrı Çözücü Sisteminde Karşılaştırılmaları:

Karşılaştırma 1, 2 ve 5 nolu çözücü sistemlerinde yapılmıştır.



Şekil 4-2: M, A ve B ekstralarının İTK ile karşılaştırılması

### 4.3.2. Alkaloitlerin Ayrılması ve Saflaştırılması:

Bitkinin farklı kısımlarından elde edilen A ekstreleri ayrı ayrı çalışıldı. Alkaloitler Sütun Kromatografisi, Kromatotron ve Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi yöntemlerinden uygun olanları yardımı ile ayrıldı ve gerekli olduğu durumda saflaştırma işlemi yine preparatif İTK yöntemi kullanılarak yapıldı.

Ekstrelerden izole edilen ve saflaştırılan alkaloitlerin miktar ve saflık açısından en uygun olanlarının UV, IR, <sup>1</sup>H NMR ve Mass Spektrumları yardımıyla yapıları aydınlatıldı. Elde edilen diğer alkaloitler, şahit maddeler ve yapıları aydınlatılan alkaloitler ile çeşitli çözücü sistemlerinde İTK yöntemi ile karşılaştırıldı. Bu şekilde bitkinin farklı kısımlarından elde edilen alkaloitler belirlendi.

#### 4.3.2.1. Ç-A Ekstresi:

110 mg Ç-A ekstresi 2 nolu çözücü sisteminde Kieselgel kaplı plaklar kullanılarak preparatif İTK yapıldı. 1, 2, 3, 4 ve 7 nolu bantlar, diğer ekstreler ve şahit maddeler ile çeşitli çözücü sistemlerinde İTK ile karşılaştırıldı.

Ayrılan ÇA-1 (3.3 mg), ÇA-2 (2.5 mg), ÇA-3 (5.2 mg), ÇA-4 (11.3 mg) ve ÇA-7 (1,3 mg) alkaloitlerinin çeşitli sistemlerde İTK yöntemleri ve <sup>1</sup>H NMR ile karşılaştırılması sonucunda bu maddelerin sırasıyla “**2-demetilkolşifolin, 3-demetil kolşisin, kolşifolin, kolşisin ve demekolsin**” oldukları saptandı.

#### 4.3.2.2. ÇS-A Ekstresi:

150 mg ÇS-A ekstresi Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Aktivite I) ile sütun kromatografisi yapıldı.

Kullanılan çözücü sistemi, oranları ve benzer fraksiyonların birleştirilmesi ile elde edilen bakiye miktarları Tablo 4-10’da verilmiştir.

**Tablo 4-10: Sütun kromatografisinde kullanılan çözücü sistemi, oranları ve bakiye miktarları**

Birleştirilen Fraksiyonlar (Fr)	Çözücü	Bakiye Miktarı
1-38	Eter (%100) Eter:Kloroform (9:1) Eter:Kloroform (2:1) Eter:Kloroform (1:1) Kloroform (%100)	13.4 mg
38-140	Kloroform:Metanol (99:1) Kloroform:Metanol (98:2) Kloroform:Metanol (96:4) Kloroform:Metanol (92:8) Kloroform:Metanol (84:16) Kloroform:Metanol (70:30) Kloroform:Metanol (40:60) Kloroform:Metanol (30:70) Kloroform:Metanol (20:80) Kloroform:Metanol (10:90) Metanol (%100)	48.4 mg

Fr<sub>1-38</sub> ve Fr<sub>38-140</sub> 1 nolu çözücü sisteminde kieselgel plakta tekrar preparatif İTK yapıldı. Fr<sub>1-38</sub>'in preparatif İTK'sı sonucunda ayrılan 1 ve 2 nolu bantlardan elde edilen ve en az 3 sistemde İTK ile saflık kontrolleri yapılan ÇŞA-1 (1.5 mg) ve ÇSA-2 (2.3 mg) maddeleri, İTK yönteminde şahit maddeler ile çeşitli çözücü sistemlerinde karşılaştırıldı ve alınan <sup>1</sup>H NMR spektrumlarının da değerlendirilmesi ile bu maddelerin sırasıyla “**demekolsin**” ve “**kolşisin**” oldukları belirlendi.

Fr<sub>38-140</sub>'ın preparatif İTK sından ayrılan 5 nolu banttan elde edilen ÇS-A5 maddesinin (3,1 mg) “**kolşifolin**” olduğu yapılan İTK karşılaştırmaları ve <sup>1</sup>H NMR, kütle spektrumları ile saptanmıştır.

#### 4.3.2.3.Yp-A Ekstresi:

125 mg Yp-A ekstresi 5 nolu çözücü sisteminde bağlayıcısız silikajel ile kaplanan cam plaklarda preparatif İTK yapıldı.

Bu preparatif ayırımdan elde edilen 2 nolu bant (19.8 mg) ve 3 nolu bant (8.6 mg) 1 nolu çözücü sisteminde ve 6 nolu bant (13 mg) 5 nolu çözücü sisteminde tekrar preparatif İTK yapıldı.

2 nolu bantın (19,8 mg) tekrarlanan preparatif İTK'sinden ayrılan 1 nolu banttan Yp-21 (5,5 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H NMR ve kütle spektrumu analizleri sonucunda bu maddenin "**2-demetilkolşifolin**" olduğu belirlenmiştir.

3 nolu bantın (8,6 mg) preparatifinden ayrılan 1 nolu banttan Yp-31 (3,8 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H NMR ve kütle spektrumu analizleri sonucunda bu maddenin "**3-demetilkolşisin**" olduğu belirlenmiştir.

6 nolu bantın (15,1 mg) preparatifinden ayrılan 1 nolu banttan Yp-61 (1,5 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H NMR analizleri sonucunda bu maddenin "**N-deasetil-N-formil-3-demetilkolşisin**" olduğu belirlenmiştir.

6 nolu bantın (15,1 mg) preparatif İTK'sinden ayrılan 3 nolu banttan Yp-63 (2,5 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H proton NMR ve kütle spektrumu analizleri sonucunda bu maddenin "**2-demetil-γ-lumikolşisin**" olduğu belirlenmiştir.

Kirli olduğu görülen 10 nolu bant (51,4 mg) 5 nolu çözücü sisteminde tekrar preparatif İTK yapıldı. 1 nolu banttan elde edilen Yp-101 (2 mg) maddesinin "**kolşisin**" olduğu İTK ve <sup>1</sup>H NMR yöntemleri ile, Yp-102 (0,7 mg) maddesinin ise "**demekolsin**" olduğu İTK yöntemiyle yapılan karşılaştırmalar ile saptandı.

#### 4.3.2.4.T-A Ekstresi:

215 mg T-A ekstresi 5 nolu çözücü sisteminde kieselgel plaklarda preparatif İTK yapıldı.

Preparatif İTK'den ayrılan 6 nolu banttın TA-6 (7.1 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H NMR ve kütle spektrumu analizleri sonucunda bu maddenin “**kolşisin**” olduğu belirlenmiştir.

7 nolu banttın ise TA-7 (4.8 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H NMR ve mass spektrumu analizleri sonucunda bu maddenin “**demekolsin**” olduğu belirlenmiştir.

Şahit maddeler ve yapılarını aydınlatmış olduğumuz maddelerle İTK yöntemi kullanılarak çeşitli çözücü sistemlerinde yapılan karşılaştırmalar sonucunda T-A ekstresinden elde edilen T-A1 (1,3 mg) maddesinin “**2-demetilkolşisin**” ve T-A3 (2,2 mg) “**kolşifolin**” olduğu saptanmıştır.

#### 4.3.2.5.YH-A Ekstresi:

50 mg YH-A ekstresi 1 nolu çözücü sisteminde preparatif İTK yapıldı.

1 nolu bant (24,3 mg) aynı sistemde tekrar preparatif İTK yapılmış ve elde edilen YH-A11 (6,1 mg) ve YH-A12 (5,1 mg) maddelerinin, şahit maddeler ve yapısı aydınlatılan maddelerle İTK yöntemi ile çeşitli çözücü sistemlerinde yapmış olduğumuz karşılaştırmaları sonucunda bu maddelerin sırasıyla “**kolşisin**” ve “**demekolsin**” oldukları saptanmıştır.



#### 4.3.2.6.YE-A Ekstresi:

800 mg YE-M ekstresi Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> plakta kromatotron ile ayrıldı

**Tablo 4-11: Kromatotronda kullanılan çözücü sistemi, oranları ve birleştirilen fraksiyonlara ait bakiyeler**

Birleştirilen Fraksiyonlar (Fr)	Çözücü	Bakiye
1-5	Eter (%100)	37 mg
6-21	Eter:Kloroform (9:1) Eter:Kloroform (2:1) Eter:Kloroform (1:1) Kloroform (%100) Kloroform:Metanol (99:1)	10 mg
22-38	Kloroform:Metanol (98:2) Kloroform:Metanol (96:4) Kloroform:Metanol (92:8) Kloroform:Metanol (84:16) Kloroform:Metanol (70:30)	21.8 mg
39-57	Kloroform:Metanol (40:60) Kloroform:Metanol (30:70) Kloroform:Metanol (20:80) Kloroform:Metanol (10:90) Metanol (%100)	63.4 mg

Fr<sub>1-5</sub> (37 mg) 2 nolu çözücü sisteminde kieselgel plaklarda preparatif İTK yapıldı. Bu preparatiftten ayrılan 1 nolu banttın YE-1 (3.4 mg), 2 nolu banttın ise YE-2 (2,0 mg) kodlu maddeler elde edildi. Şahit maddeler ve yapısını aydınlatmış olduğumuz maddeler ile 5 ayrı sistemde yapılan kontroller sonucunda bu maddelerin sırasıyla “**kolşisin**” ve “**demekolsin**” oldukları saptanmıştır.

Fr<sub>22-38</sub> (21.8 mg) 2 nolu çözücü sisteminde kieselgel plakta preparatif İTK yapıldı. Preparatiftten ayrılan 1 nolu banttın YE-3 (1.4 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H NMR ve kütle spektrumu analizleri sonucunda bu maddenin “**2-demetilkolşisin**” olduğu belirlenmiştir.

Preparatiftten ayrılan 2 nolu banttın YE-4 ( 2.9 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H proton NMR ve kütle spektrumu analizleri sonucunda bu maddenin “**kolşifolin**” olduğu belirlenmiştir.

#### 4.3.2.7.ÇS-B ekstresi:

B ekstreleri içerisinde verimi en yüksek olan ÇS-B ekstresinin 32,5 mg'ı 2 nolu çözücü sisteminde kiesjelgel kaplı plaklar kullanılarak preparatif İTK yapıldı.

Preparatiften İTK ile ayrılan 2 nolu bant (19,2 mg) 5 nolu çözücü sisteminde tekrar preparatif İTK yöntemi ile saflaştırılarak ÇS-B2 (9,5 mg) kodlu madde elde edildi. UV, <sup>1</sup>H NMR ve kütle spektrumu analizleri sonucunda bu maddenin “**2-demetildemekolsin**” olduğu belirlenmiştir.

İlk preparatif İTK'den ayrılan ÇS-B5 (2,0 mg) kodlu maddenin ise çeşitli çözücü sistemlerinde şahit maddeler ile yapılan karşılaştırmaları sonucunda “**demekolsin**” olduğu belirlenmiştir.

5 farklı sistemde İTK yöntemi ile yapılan karşılaştırmalar sonucunda Ç-B, Yp-B, T-B, YE-B ve YH-B ekstrelerinde de “**2- demetildemekolsin**” varlığı saptanmıştır.

#### 4.3.3.Renk Reaksiyonları:

**Tablo 4-12. *C.baytopiorum* bitkisinden elde edilen alkaloidlere ait renk reaksiyonları**

Elde Edilen Maddeler	Carr-Price	Dragendorff	UV 254 nm
Kolşisin (TA-6)	Parlak Sarı	Turuncu	Mor
2-Demetilkolşisin (YE-3)	Sarı	Sarı-Turuncu	Mor
3- Demetilkolşisin (Yp-31)	Sarı	Sarı-Turuncu	Mor
N-Asetil-N-formil-3- demetil kolşisin (Yp-61)	Sarı	-	Mor
2-Demetil-γ- lumikolşisin (Yp-63)	Açık Sarı	-	Mor
Kolşifolin (YE-4)	Parlak Sarı	Sarı-Turuncu	Mor
2-Demetilkolşifolin (Yp-21)	Sarı	Sarı-Turuncu	Mor
Demekolsin (TA-7)	Parlak sarı	Turuncu	Mor
2-Demetildemekolsin (ÇS-B2)	Parlak sarı	-	Mor

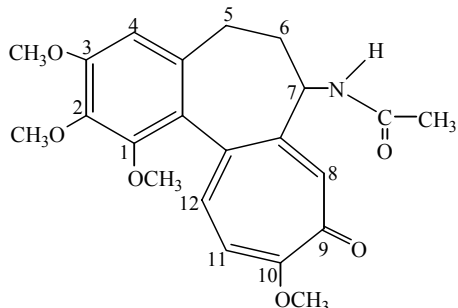
#### 4.3.4. Alkaloitlerin Rf Değerleri:

**Tablo 4-13. *C. baytopiorum* bitkisinden elde edilen alkaloitlerin Rf değerleri.**

Elde Edilen Maddeler	Çözücü Sistemleri				
	1	2	3	4	5
Kolşisin (TA-6)	0,32	0,48	0,57	0,41	0,64
2-Demetilkolşisin (YE-3)	0,18	0,21	0,29	0,23	0,14
3- Demetilkolşisin (Yp-31)	0,18	0,29	0,31	0,25	0,39
N-Asetil-N-formil-3- demetilkolşisin (Yp-61)	-	0,21	-	-	0,26
2-Demetil- $\gamma$ - lumikolşisin (Yp-63)	-	0,35	-	-	0,27
Kolşifolin (YE-4)	0,15	0,36	0,30	0,24	0,30
2-Demetilkolşifolin (Yp-21)	0,07	0,20	0,14	0,13	0,14
Demekolsin (TA-7)	0,41	0,73	0,73	0,52	0,73
2-Demetildemekolsin (ÇS-B2)	0,27	0,46	0,56	0,32	0,56

### 4.3.5. Elde Edilen Maddelerin Yapılarının Aydınlatılması:

#### 4.3.5.1. Kolşisin (Alkaloit TA-6)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: Tablo 4-13

UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-3)

$\lambda_{\max}$  (MeOH) 348, 256 nm

IR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-4)  $\nu_{\max}$  3426, 2925, 2851, 1704, 1653, 1614, 1544, 1490, 1458, 1350, 1321, 1255, 1194, 1094, 1048, 1017, 920  $\text{cm}^{-1}$

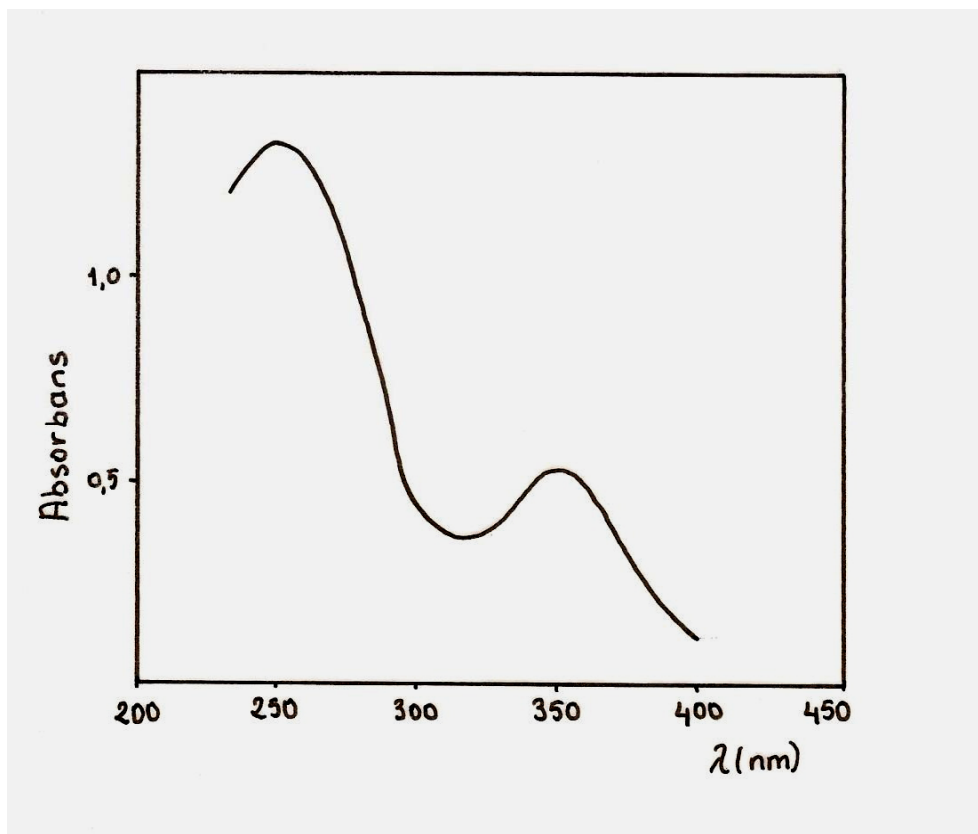
$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-5)

**Tablo 4-14: TA-6 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri**

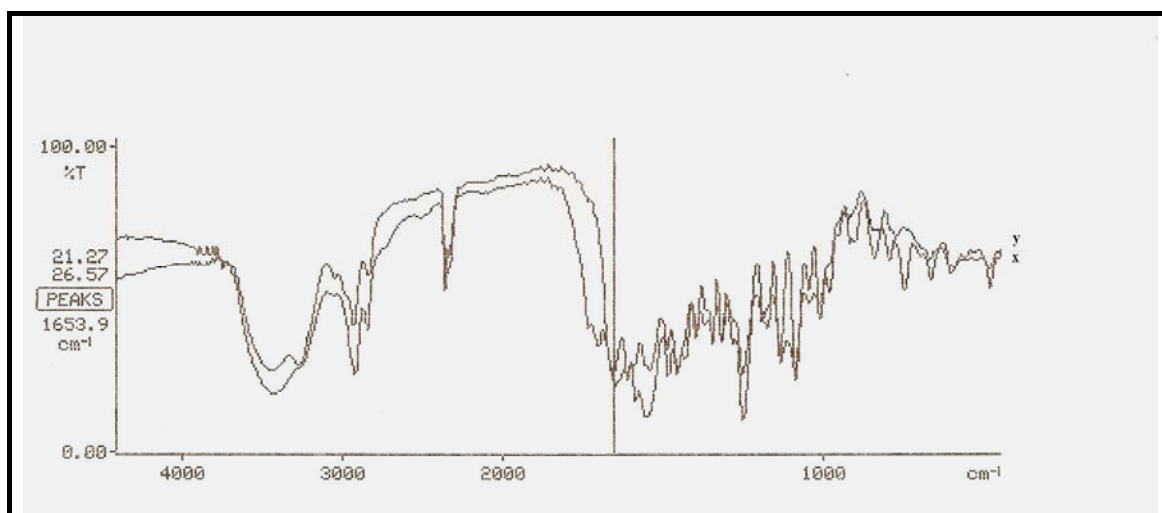
Konum ve Grup	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,65 (3H, s)	
2 (-OCH <sub>3</sub> )	3,91 (3H, s)	
3 (-OCH <sub>3</sub> )	3,94 (3H, s)	
4	6,55 (1H, s)	
5	2,5 (m), 2,3 (m)	
6	2,4 (m), 1,99 (m)	
7 (-NCOCH <sub>3</sub> )	2,00 (3H, s)	
7	4,65 (m)	
8	7,53 (1H, s)	
10 (-OCH <sub>3</sub> )	4,00 (3H, s)	
11	7,34 - 7,36 (d)	J=10 Hz
12	6,87 - 6,89 (d)	J=10 Hz

Mass Spektrumu değerleri: (Şekil 4-6)

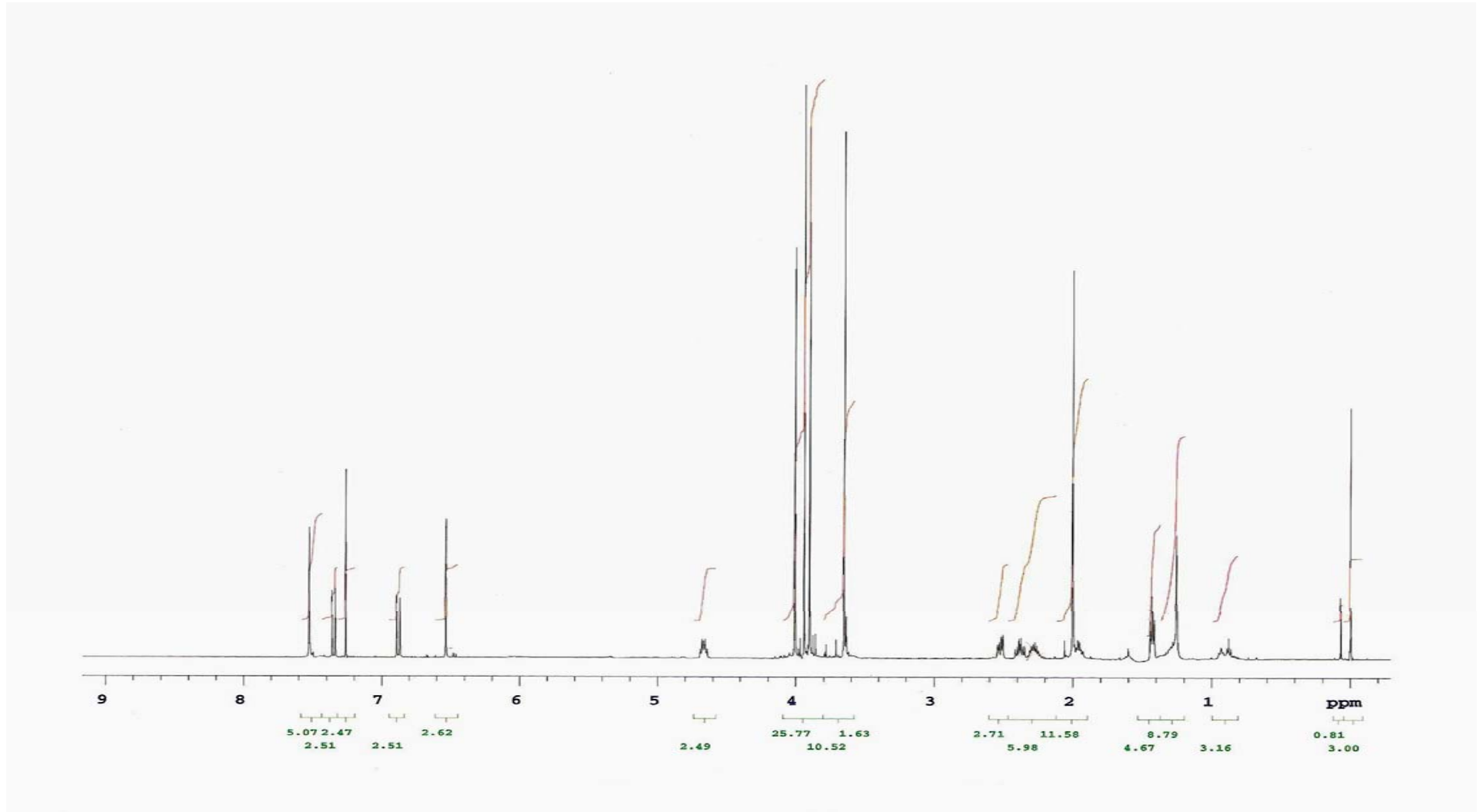
**ESI-MS (pozitif mod) m/z (intense) :**  $[\text{M}+1]^+ = 400.19$  (% 70)



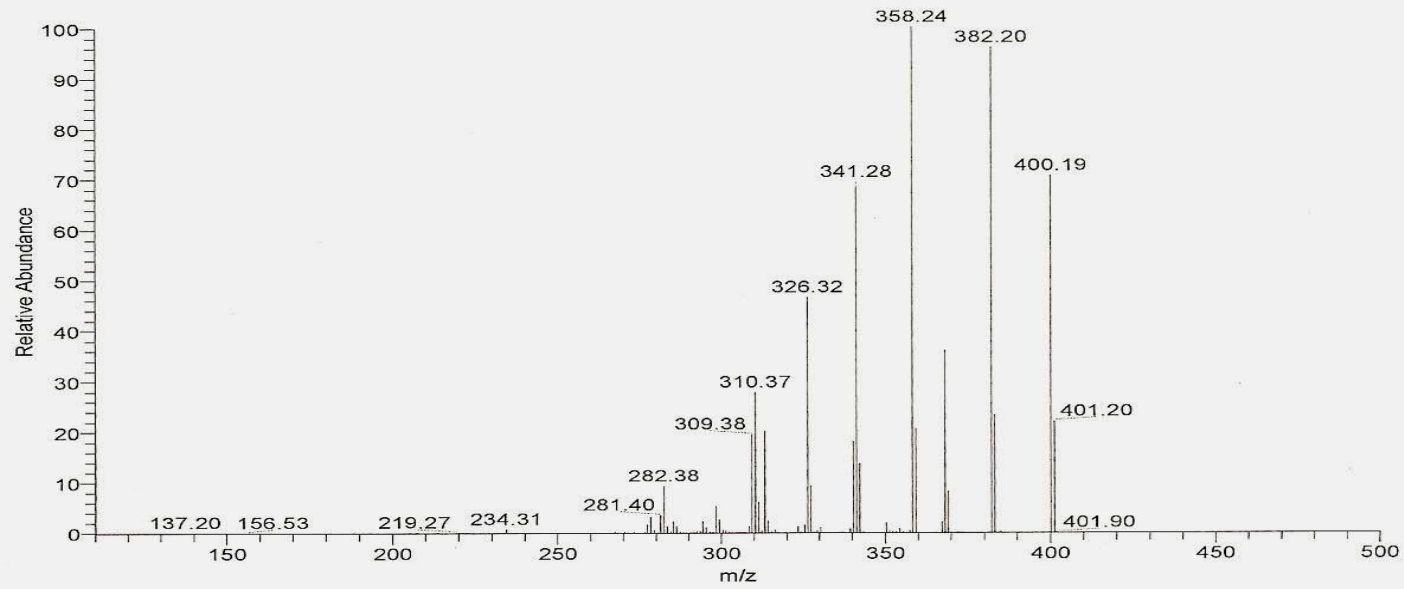
Şekil 4-3: TA-6 alkaloidi UV spektrumu



Şekil 4-4: TA-6 alkaloidi IR spektrumu (x= madde, y=şahit)

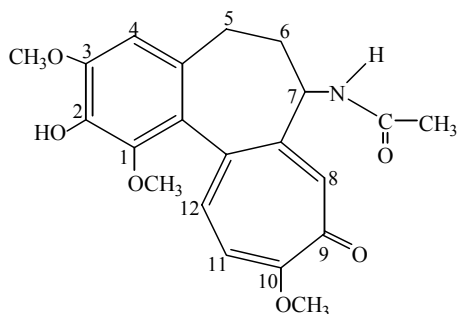


Şekil 4-5: TA-6 alkaloidi  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (Kolşisin)



Şekil 4-6: TA-6 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (Kolşisin)

### 4.3.5.2. 2-Demetilkolşisin (Alkaloid YE-3)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: Tablo 4-13

UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-7)

$\lambda_{\max}$  (MeOH) 350, 252

IR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-8)  $V_{\max}$  3446, 2925, 2854, 1734, 1653, 1612, 1560, 1508, 1458, 1380, 1259, 1203, 1170, 973  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-9)

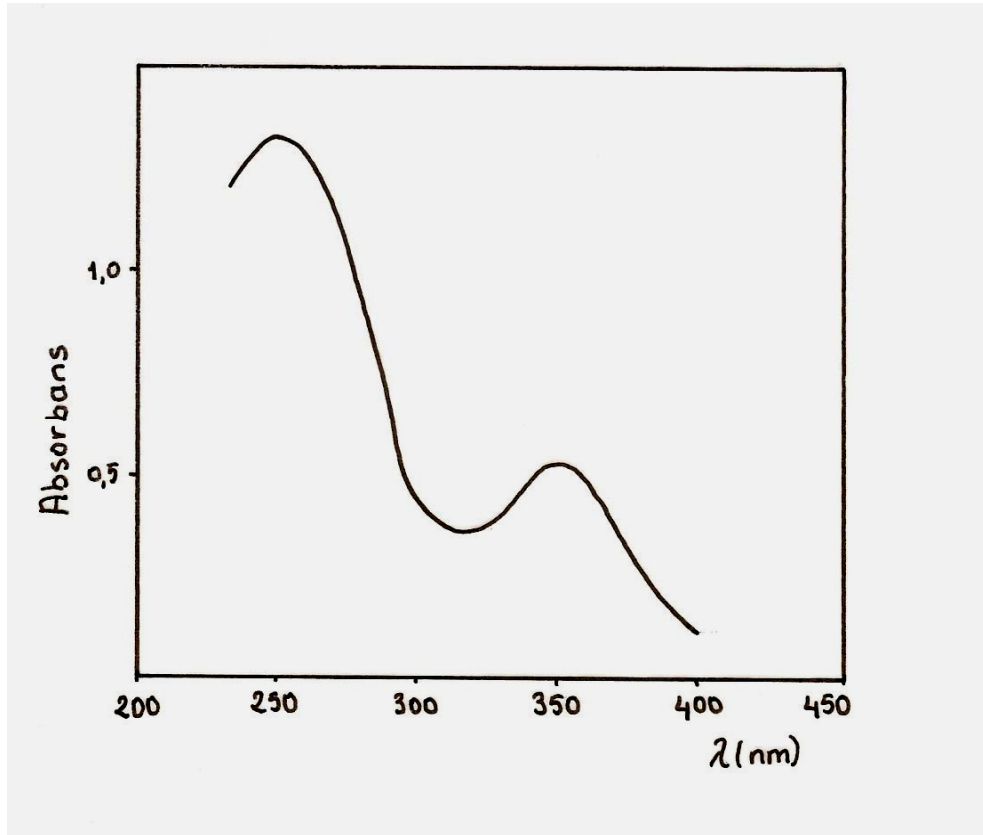
**Tablo 4-15: YE-3 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri**

Konum ve Grup	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,57 (3H, s)	
3 (-OCH <sub>3</sub> )	3,93 (3H, s)	
4	6,52 (1H, s)	
5	2,42 (m), 2,25 (m)	
6	2,17 (m), 1,78 (m)	
7 (-NCOCH <sub>3</sub> )	1,94 (3H, s)	
7	4,59 (m)	
8	7,32 (1H, s)	
10 (-OCH <sub>3</sub> )	3,95 (3H, s)	
11	6,77 – 6,79 (d)	J=10 Hz
12	6,27 – 6,29 (d)	J=10 Hz

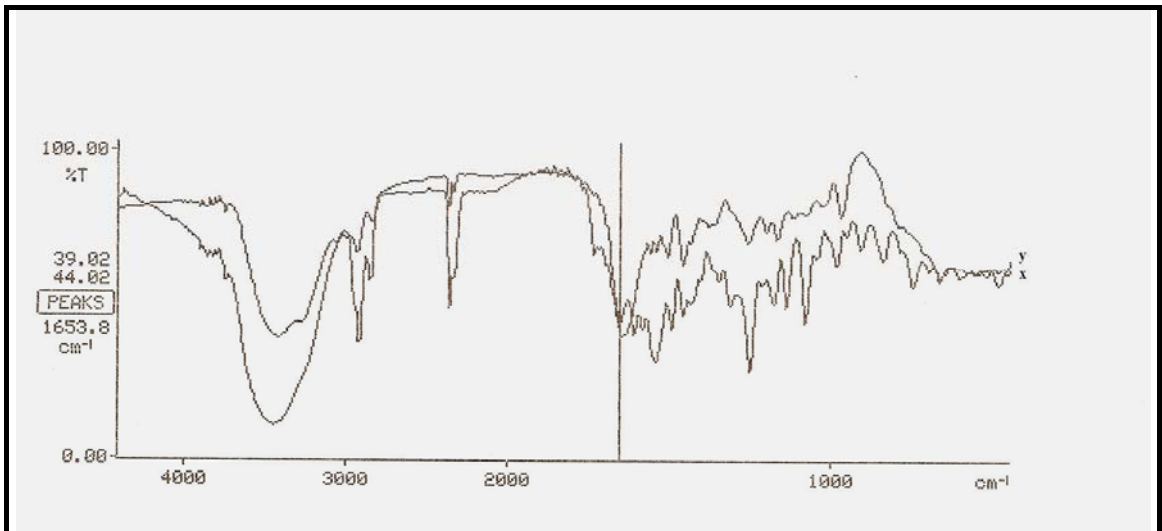
Mass Spektrumu değerleri: (Şekil 4-10)

**ESI-MS (pozitif mod) m/z (intensite) :**  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 408$  (% 100)

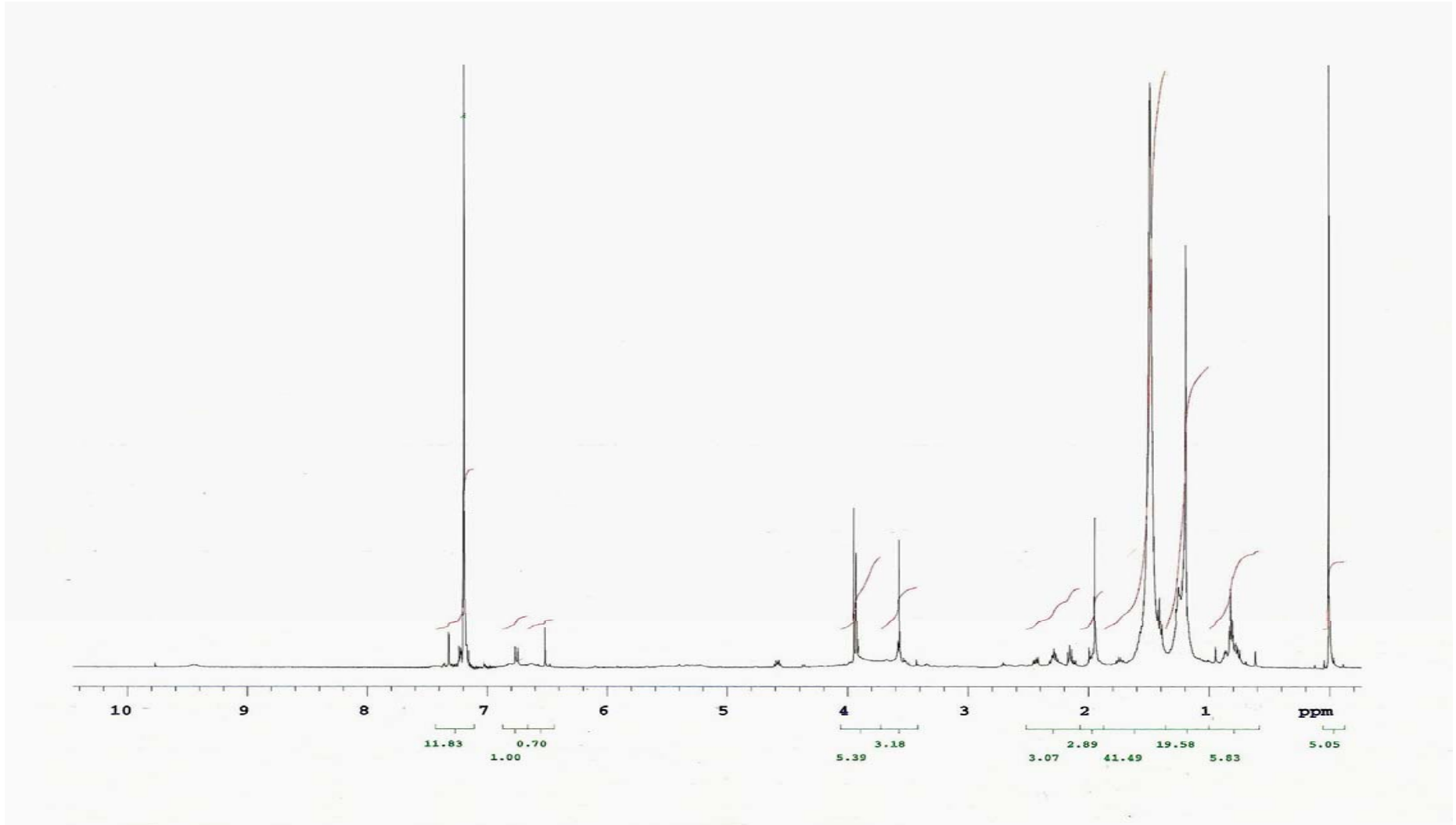




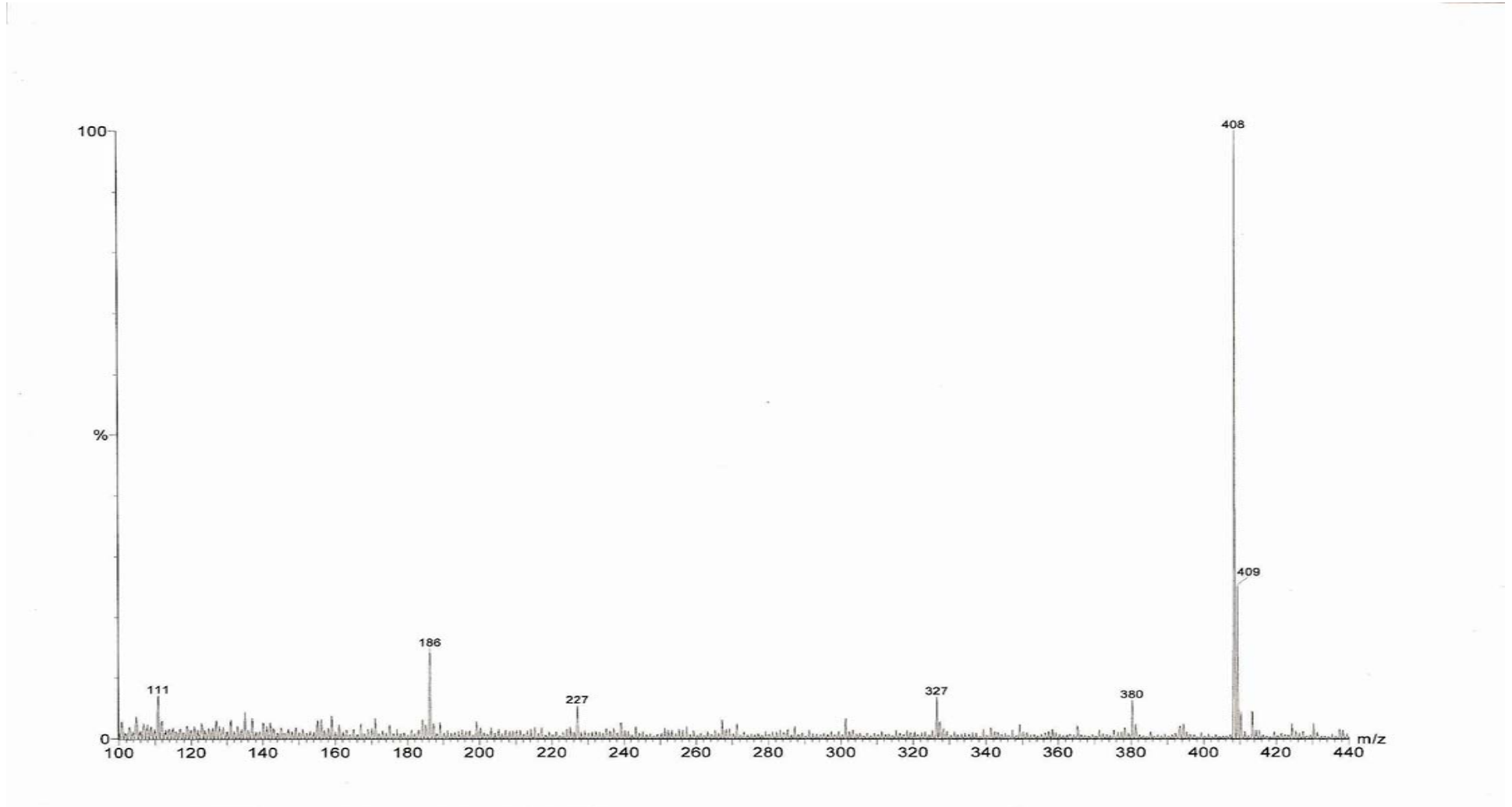
Şekil 4-7: YE-3 alkaloidi UV spektrumu



Şekil 4-8: YE-3 alkaloidi IR spektrumu (x= madde, y= şahit)

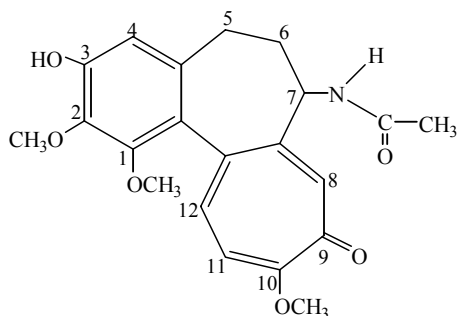


Şekil 4-9: YE-3 alkaloidi  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (2-demetilkolşisin)



Şekil 4-10: YE-3 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (2-demetilkolşisin)

### 4.3.5.3. 3-Demetilkolşisin (Alkaloid Yp-31)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: (Tablo 4-13)

UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-11)

$\lambda_{\max}$  (MeOH) 353 nm, 235 nm

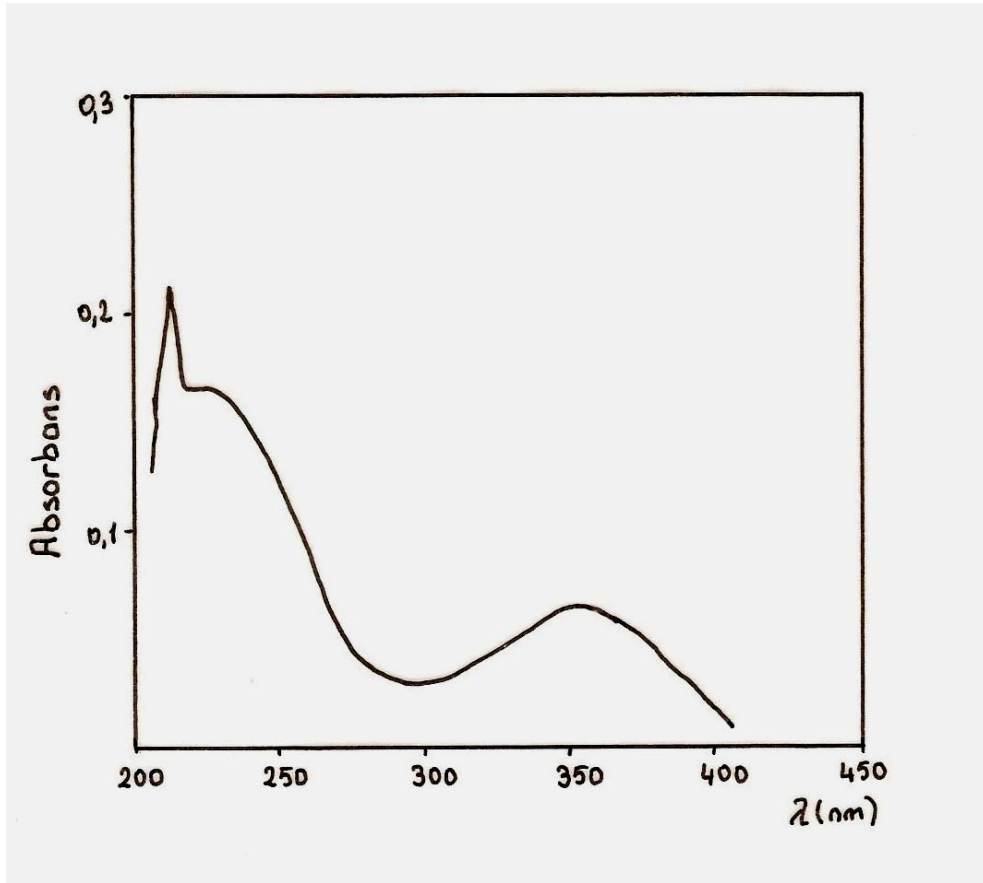
$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-12)

**Tablo 4-16: Yp-31 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri**

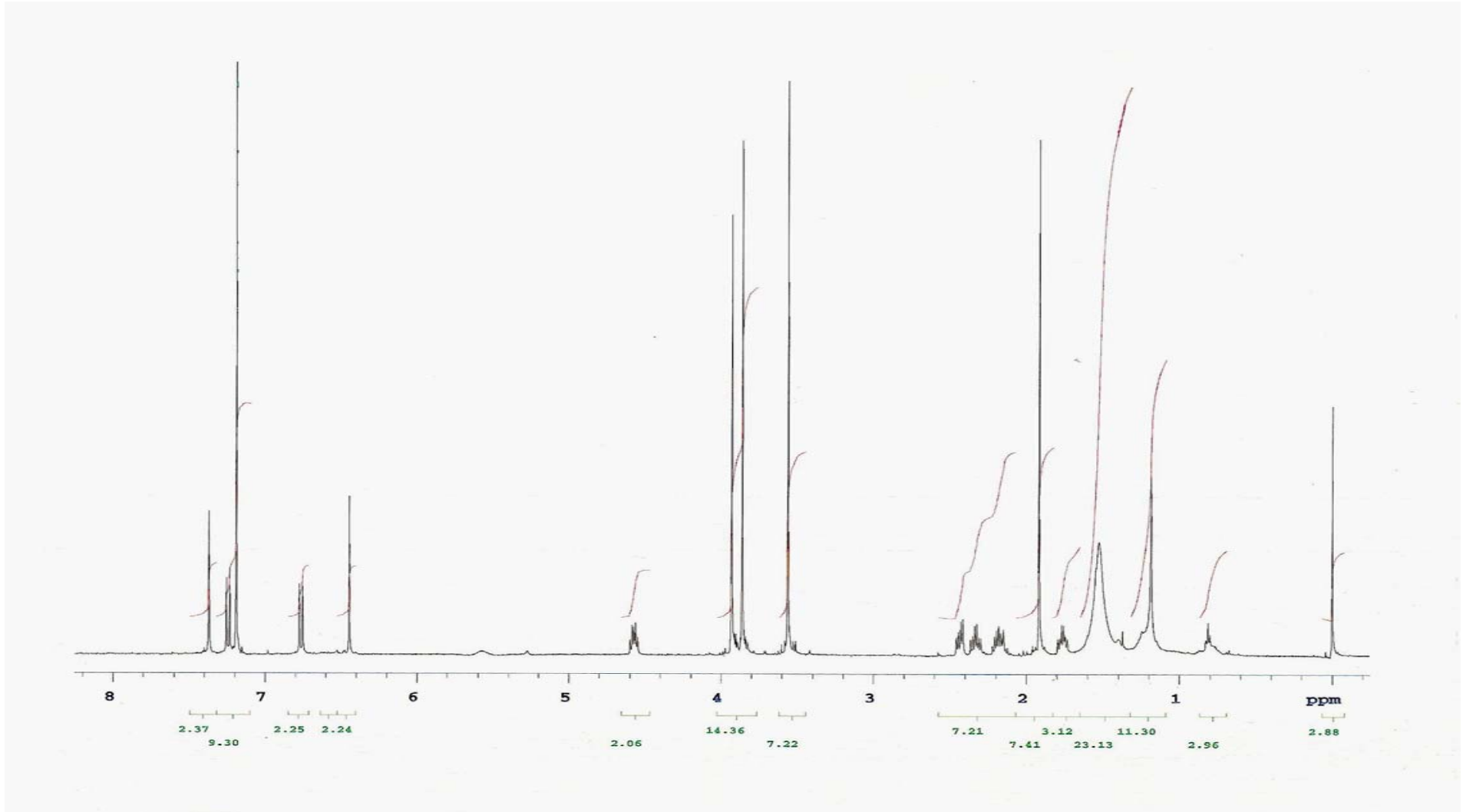
Konum ve Grup	$\delta$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,57 (3H, s)	
2 (-OCH <sub>3</sub> )	3,87 (3H, s)	
4	6,45 (1H, s)	
5	2,42 (m), 2,32 (m)	
6	2,15 (m), 1,79 (m)	
7 (-NCOCH <sub>3</sub> )	1,92 (3H, s)	
7	4,58 (m)	
8	7, 37 (1H, s)	
10 (-OCH <sub>3</sub> )	3,94 (3H, s)	
11	7,24– 7,26 (d)	J=10 Hz
12	6,74 – 6,76 (d)	J=10 Hz

Mass Spektrumu değerleri: (Şekil 4-13)

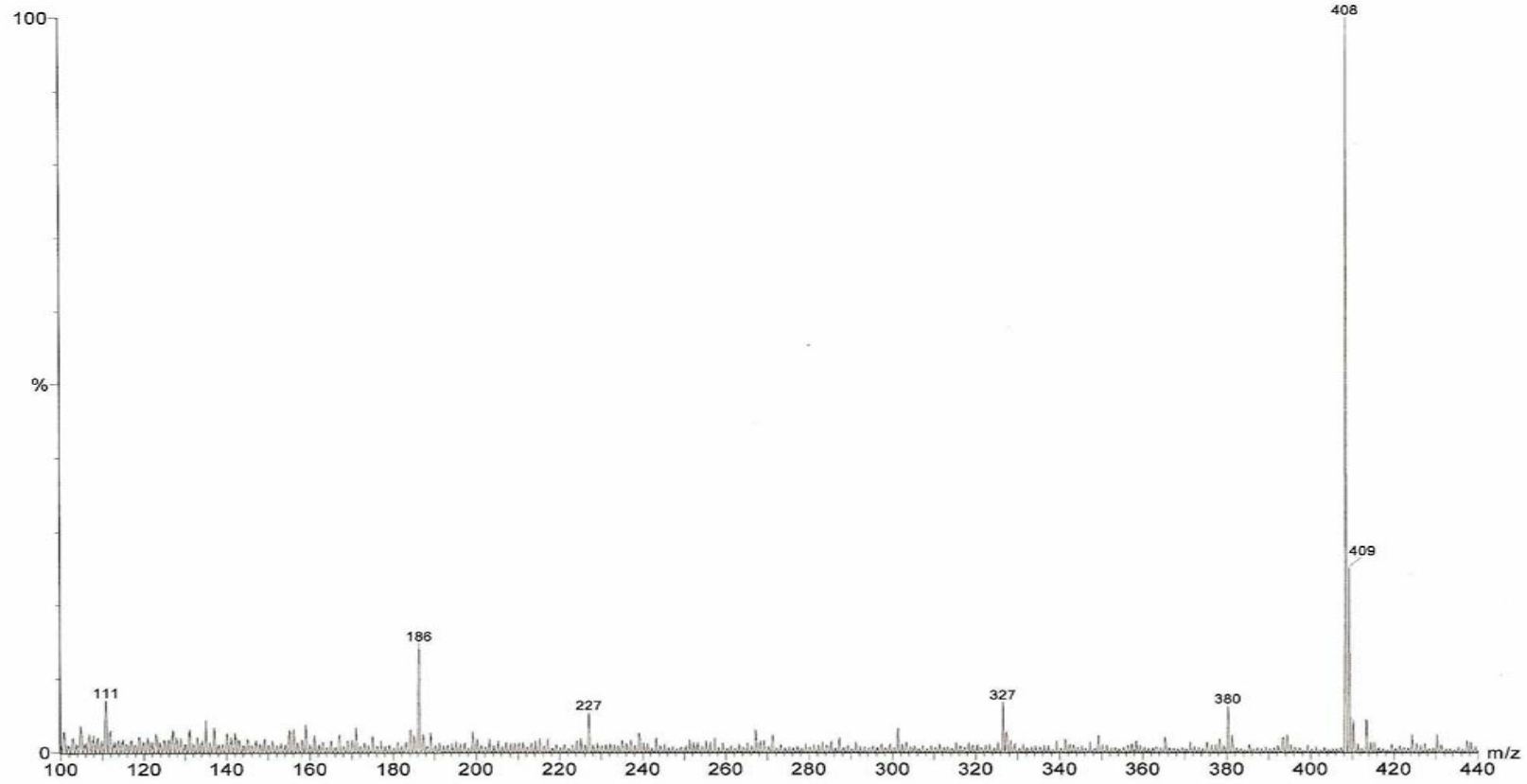
**ESI-MS (pozitif mod) m/z (intense) :**  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 408,39$  (% 100)



Şekil 4-11: Yp-31 alkaloidi UV spektrumu

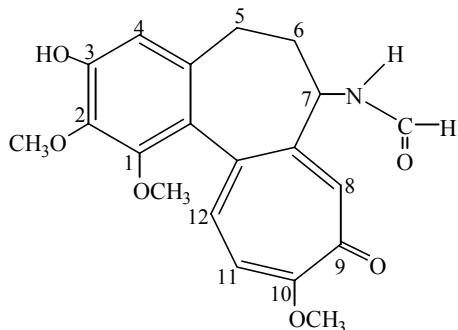


Şekil 4-12: Yp-31 alkaloidi  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (3-demetilkolşisin)



Şekil 4-13: Yp-31 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (3-demetilkolşisin)

#### 4.3.5.4. N-Deasetil-N-Formil-3-Demetilkolşisin (Alkaloit Yp-61)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: Tablo 4-13

UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-14)

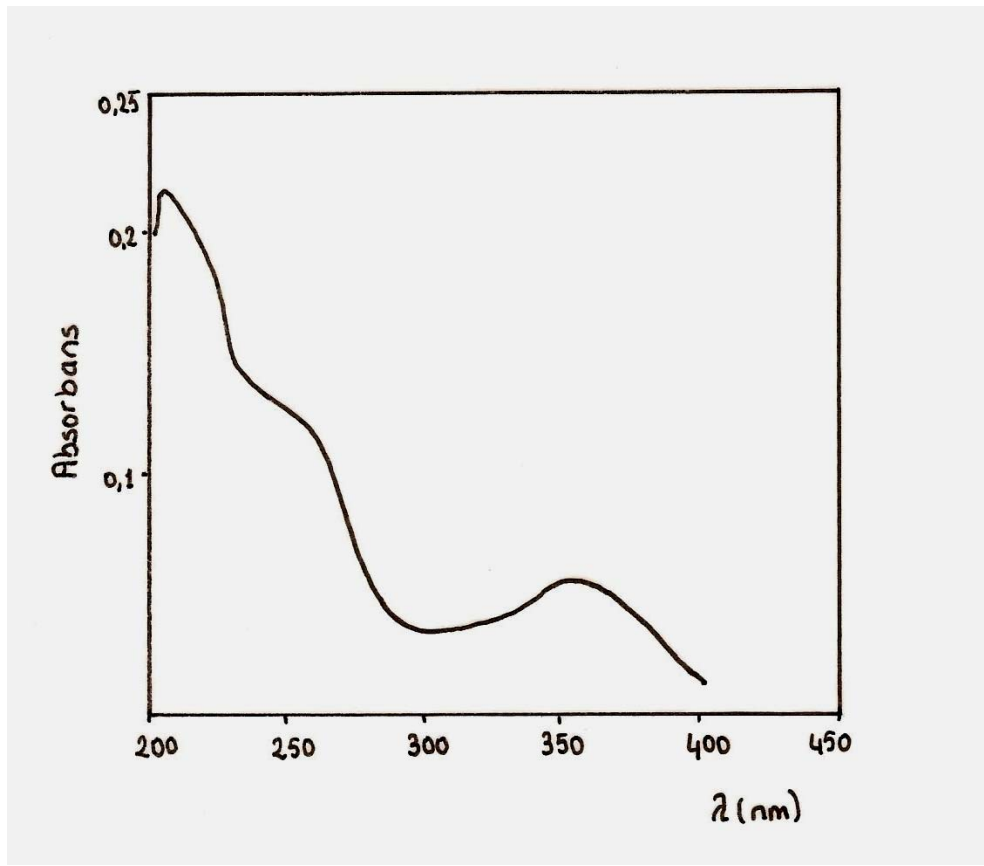
$\lambda_{\max}$  (MeOH) 350 nm, 248 nm

$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-15)

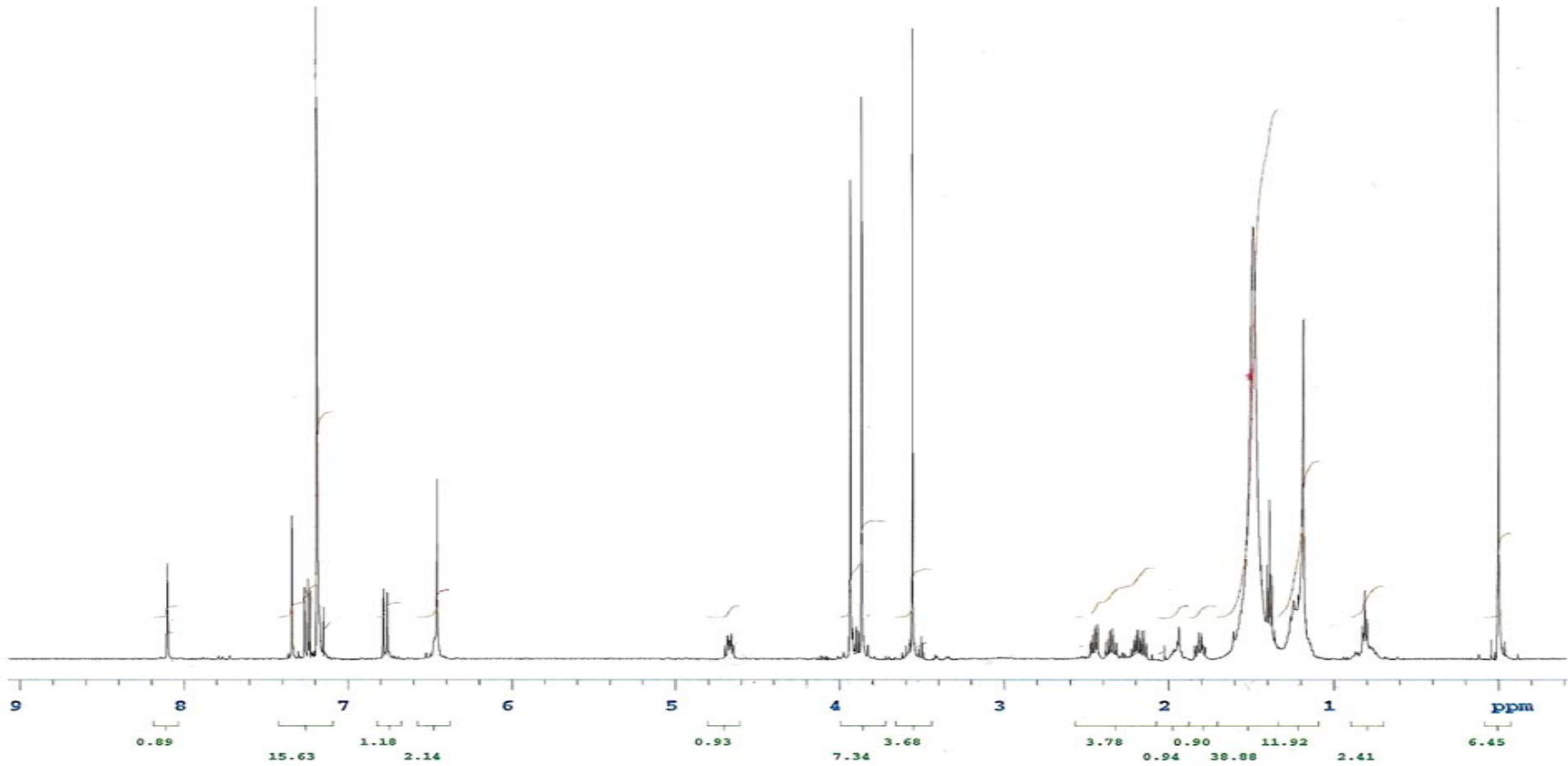
**Tablo 4-17: Yp-61 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri**

Konum ve Grup	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,56 (3H, s)	
2 (-OCH <sub>3</sub> )	3,87 (3H, s)	
4	6,46 (1H, s)	
5	2,46 (m), 2,34 (m)	
6	2,18 (m), 1,96 (m)	
7 (-NCOH)	8,11 (1H, s)	
7	4,65 (m)	
8	7,34(1H, s)	
10 (-OCH <sub>3</sub> )	3,94 (3H, s)	
11	7,24– 7,26 (d)	J=10 Hz
12	6,74 – 6,76 (d)	J=10 Hz



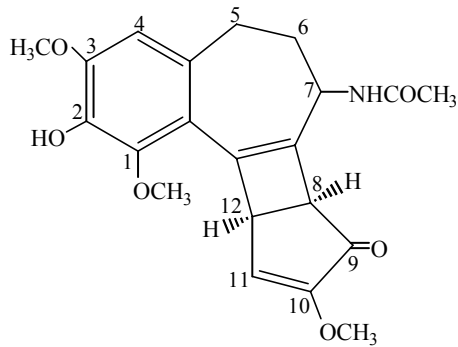


Şekil 4-14: Yp-61 alkaloidi UV spektrumu



Şekil 4-15: Yp-61 alkaloidi  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (N-deasetil-N-formil-3-demetilkolşisin)

#### 4.3.5.5. 2-Demetil- $\gamma$ -Lumikolşisin (Alkaloit Yp-63)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: (Tablo 4-13)

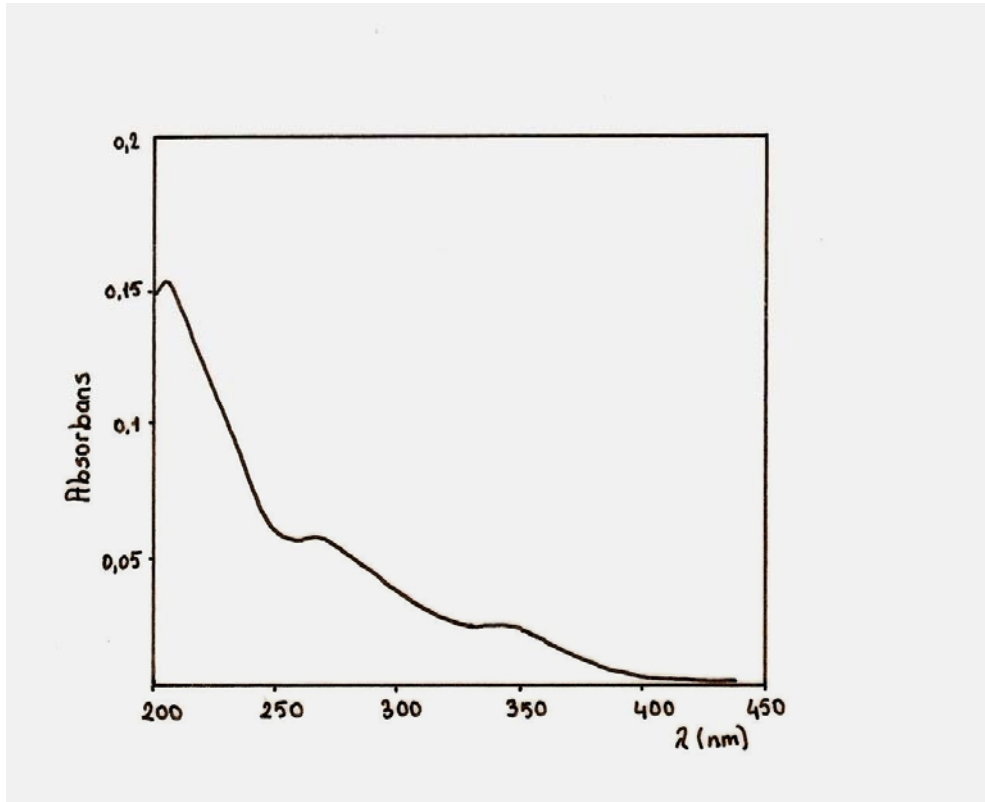
UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-16)

$\lambda_{\max}$  (MeOH) 342 nm, 264 nm

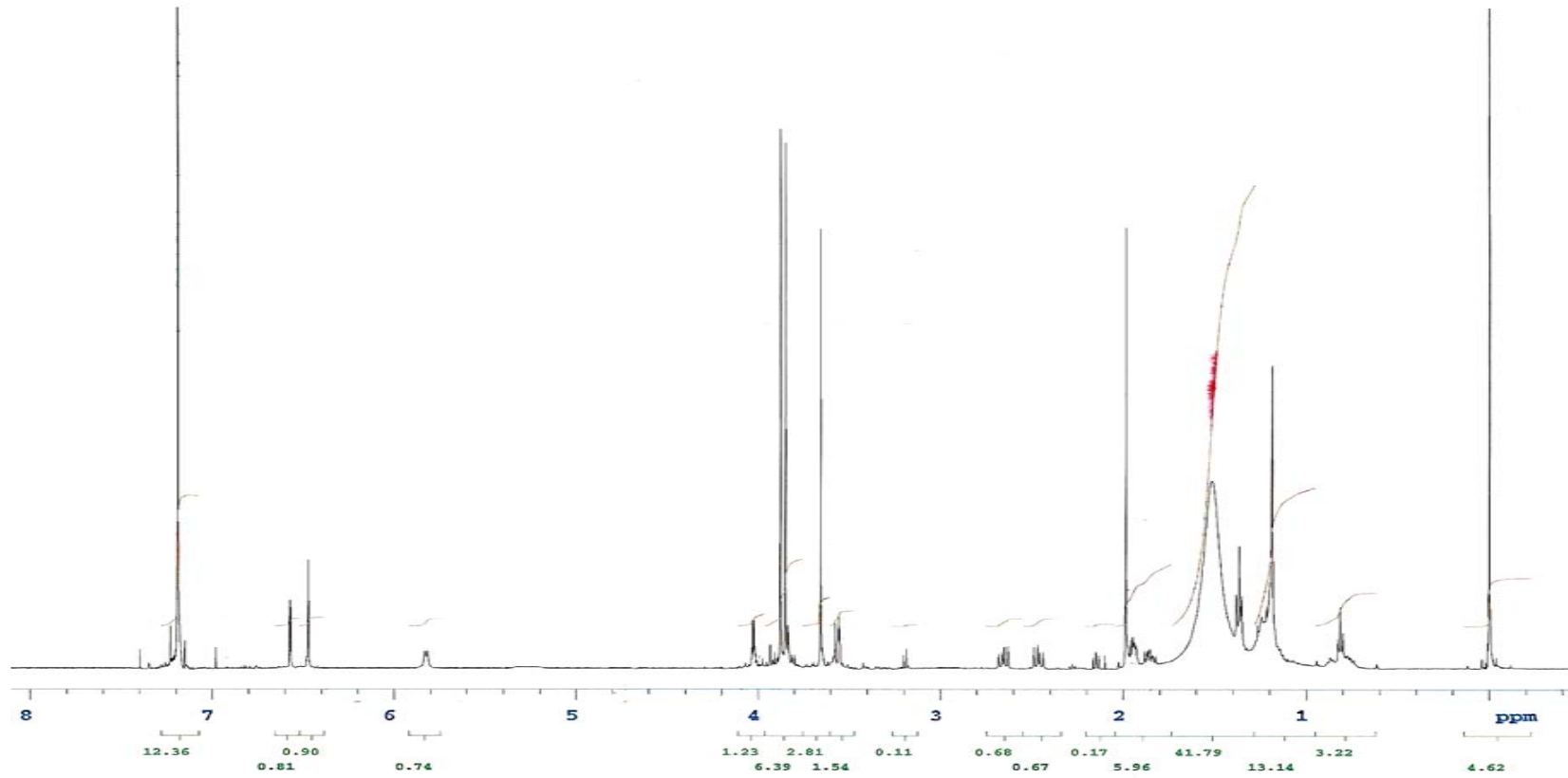
$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-17)

**Tablo 4-18:** Yp-63 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri

Konum ve Grup	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,65 (3H, s)	
3 (-OCH <sub>3</sub> )	3,85 (3H, s)	
4	6,47 (1H, s)	
5	2,46 (m), 2,66 (m)	
6	2,16 (m), 1,85 (m)	
7 (-NCOCH <sub>3</sub> )	1,99 (3H, s)	
7	4,75 (m)	
8	3,59 (d)	J=1 Hz
10 -(OCH <sub>3</sub> )	3,88 (3H, s)	
11	6,56– 6,57 (d)	
12	4,06 (d)	J=1 Hz

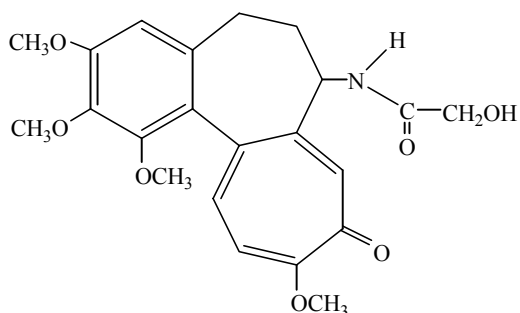


Şekil 4-16: Yp-63 alkaloidi UV spektrumu



Şekil 4-17: Yp-63 allkaloidi <sup>1</sup>H NMR spektrumu (2-demetil-γ-lumikolşisin)

#### 4.13.5.6. Kolşifolin (Alkaloit YE-4)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: Tablo 4-13

UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-18)

$\lambda_{\max}$  (MeOH) 349 nm, 246 nm

IR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-19)  $V_{\max}$ . 3420, 2924, 2853, 1702, 1654, 1615, 1542, 1459, 1350, 1321, 1255, 1197, 1092, 1018, 977  $\text{cm}^{-1}$

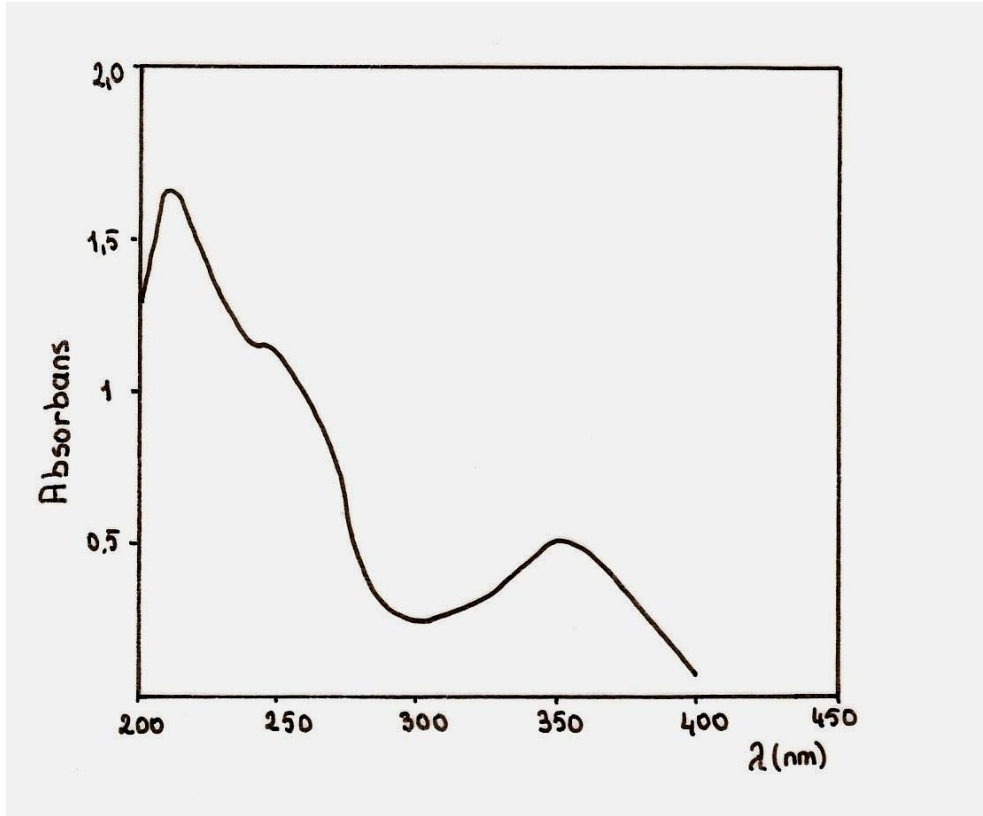
$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-20)

**Tablo 4-19: YE-4 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri**

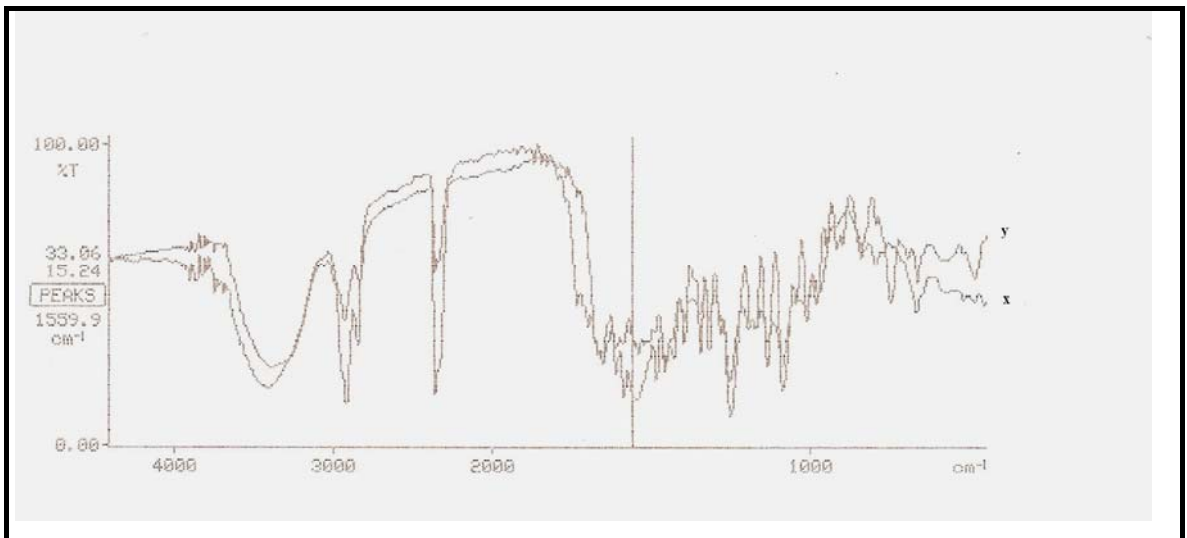
Konum ve Grup	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,58 (3H, s)	
2 (-OCH <sub>3</sub> )	3,84 (3H, s)	
3 (-OCH <sub>3</sub> )	3,87 (3H, s)	
4	6,48 (1H, s)	
5	2,48 (m), 2,35 (m)	
6	2,22 (m), 1,96 (m)	
7	4,65 (m)	
8	7,40 (1H, s)	
10 (-OCH <sub>3</sub> )	3,93 (3H, s)	
11	7,33 - 7,35 (d)	J=10 Hz
12	6,79 - 6,81 (d)	J=10 Hz

Mass Spektrumu değerleri: (Şekil 4-21)

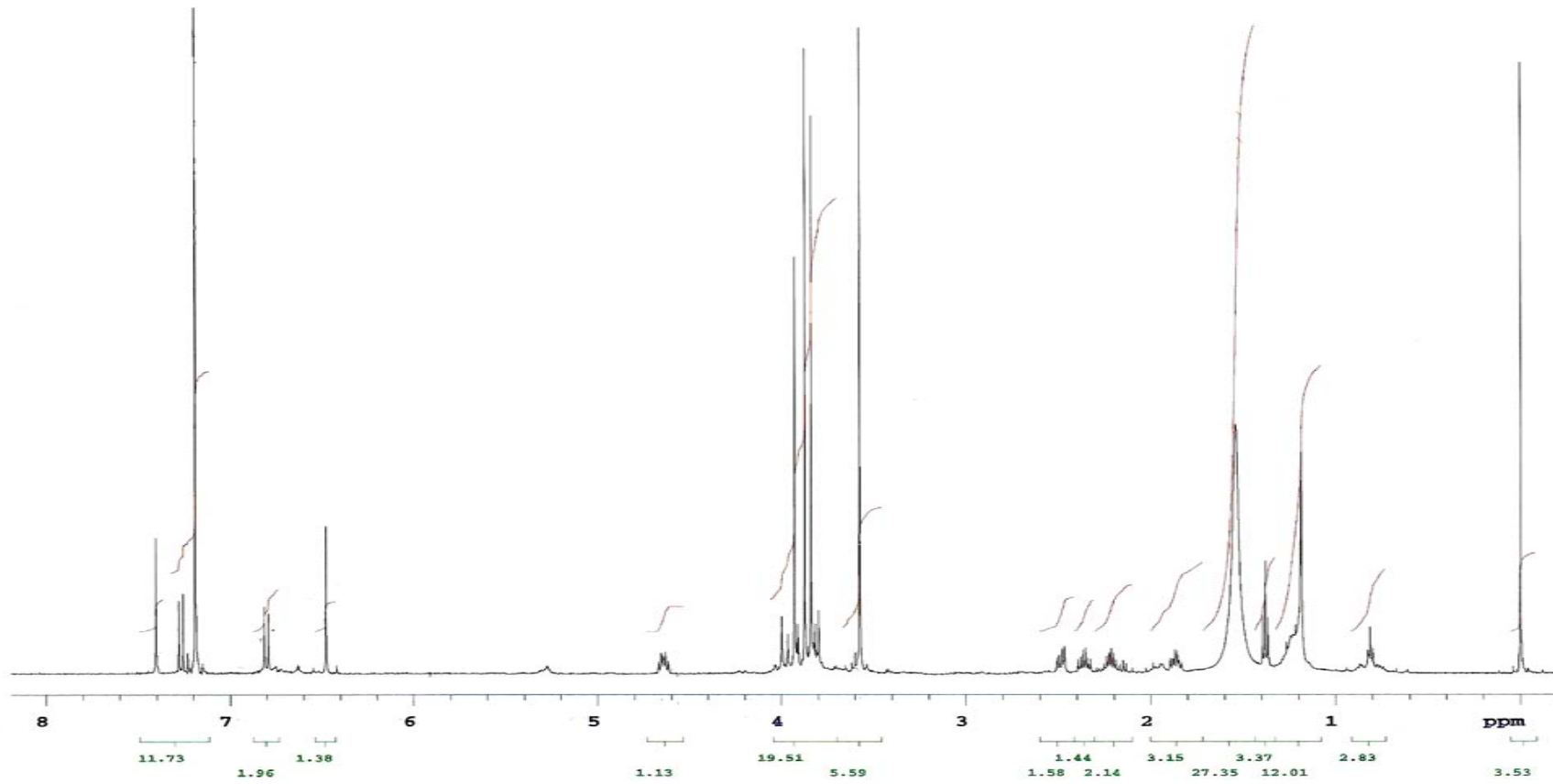
**ESI-MS (pozitif mod) m/z (intensite) :**  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 410,14$  (% 84)



Şekil 4-18: YE-4 alkaloidi UV Spektrumu

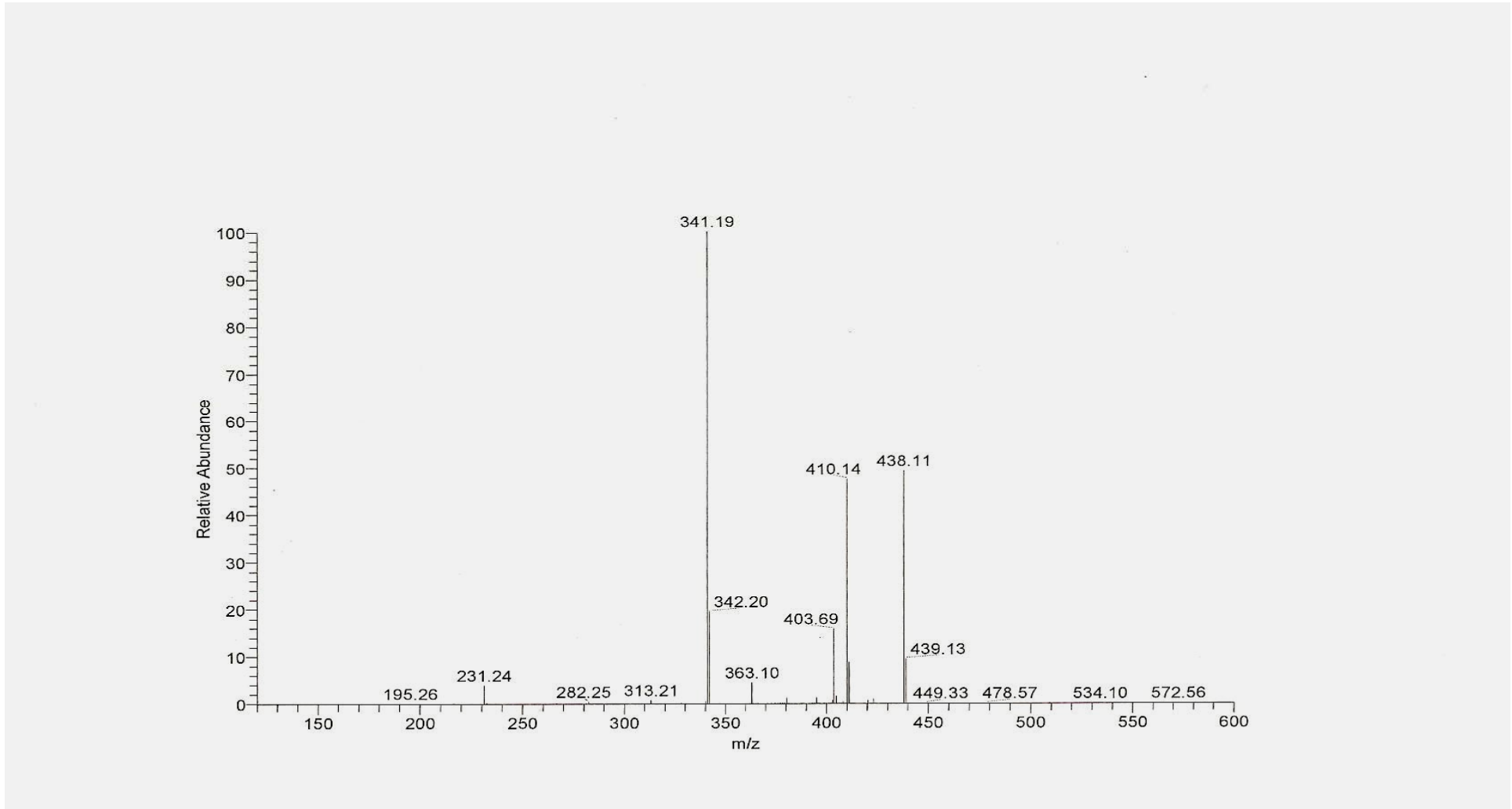


Şekil 4-19: YE-4 alkaloidi IR spektrumu (x=madde, Y= şahit )



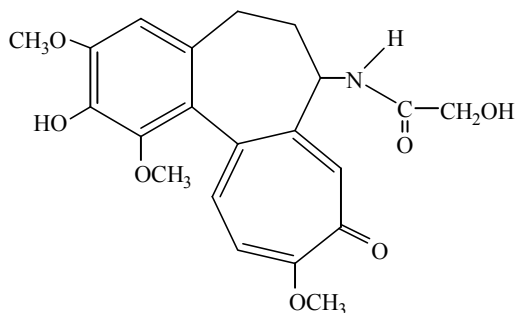
Şekil 4-20: YE-4 alkaloidi  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (Kolşifolin)





Şekil 4-21: YE-4 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (Kolşifolin)

#### 4.3.5.7. 2-Demetilkolşifolin (Alkaloit Yp-21)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: Tablo 4-13

UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-22)

$\lambda_{\max}$  (MeOH) 352 nm, 232 nm

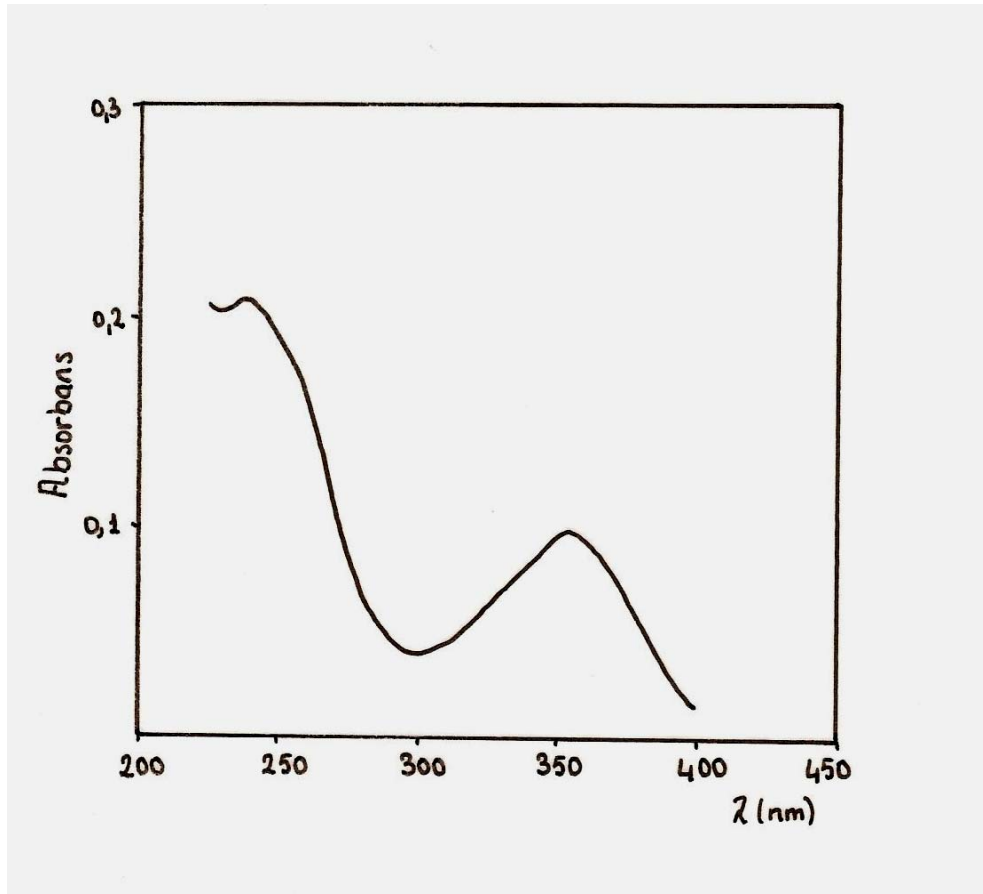
$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-23)

**Tablo 4-20. Yp-21 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri**

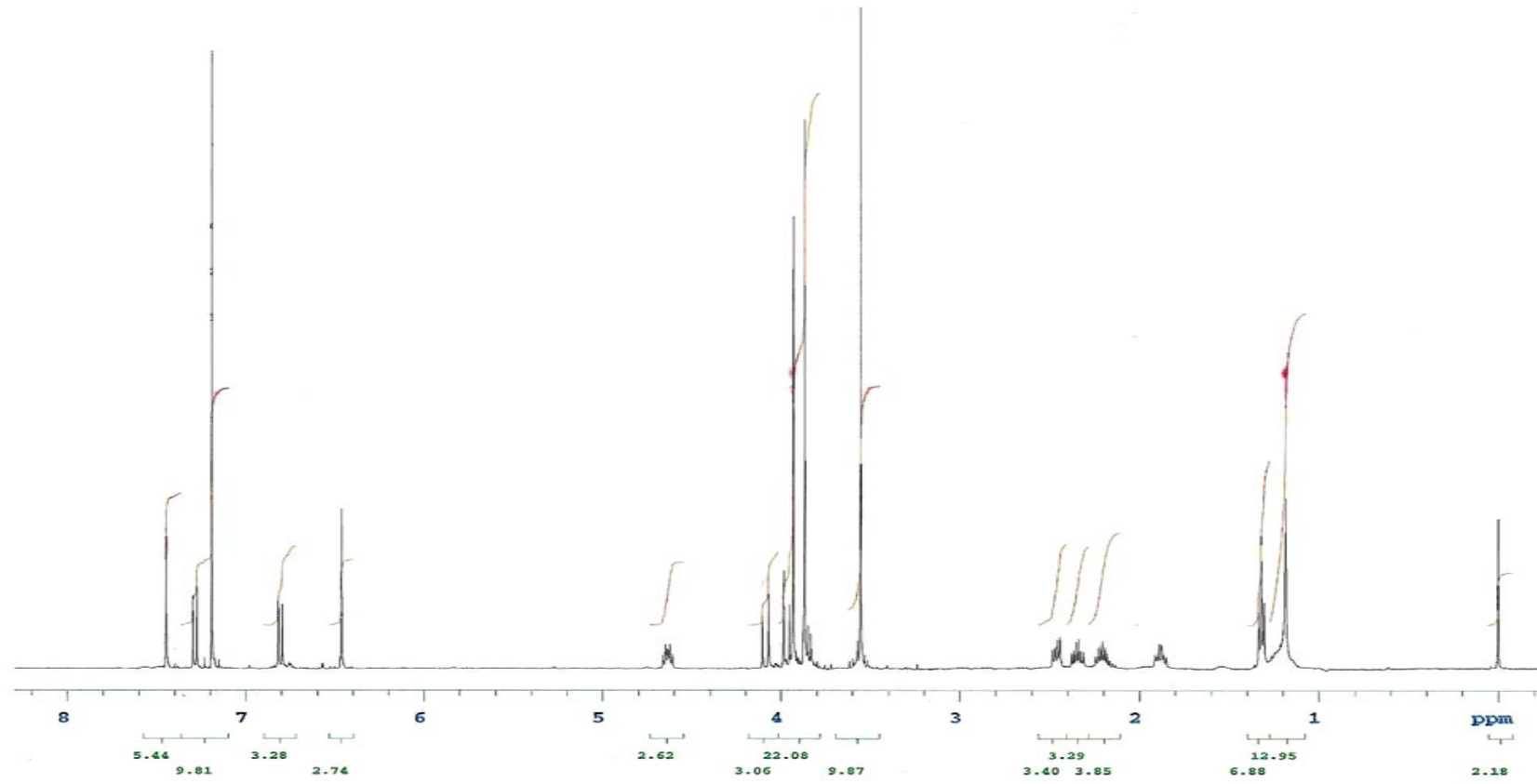
Konum ve Grup	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,56 (3H, s)	
3 (-OCH <sub>3</sub> )	3,87 (3H, s)	
4	6,47 (1H, s)	
5	2,46 (m), 2,35 (m)	
6	2,22 (m), 1,96 (m)	
7	4,65 (m)	
8	7,45 (1H, s)	
10 (-OCH <sub>3</sub> )	3,93 (3H, s)	
11	7,28 - 7,30 (d)	J=10 Hz
12	6,80 - 6,82 (d)	J=10 Hz

Mass Spektrumu değerleri: (Şekil 4-24)

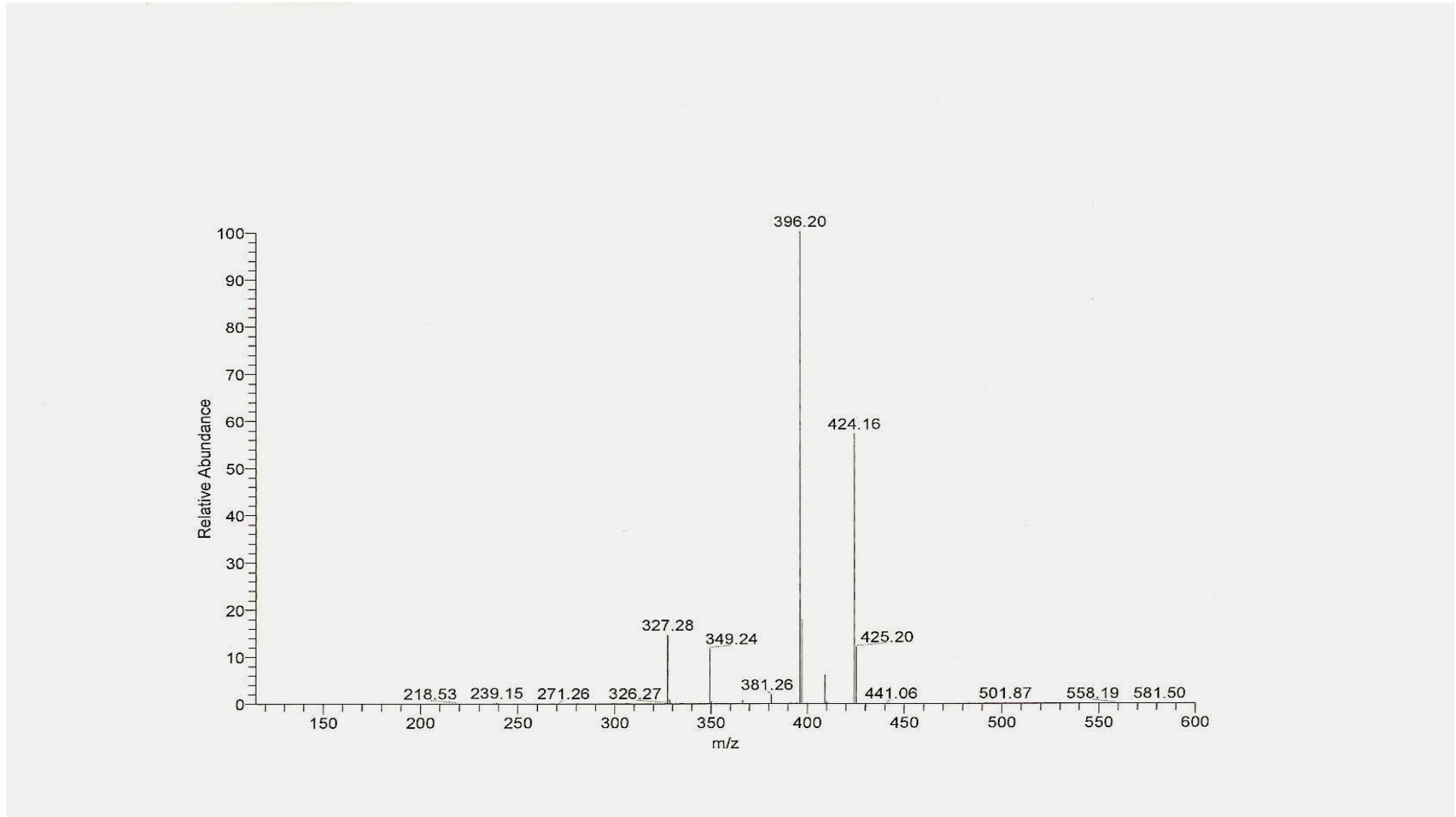
**ESI-MS (pozitif mod) m/z (intense) :**  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 396,20$  (% 100)



Şekil 4-22: Yp-21 alkaloidi UV spektrumu

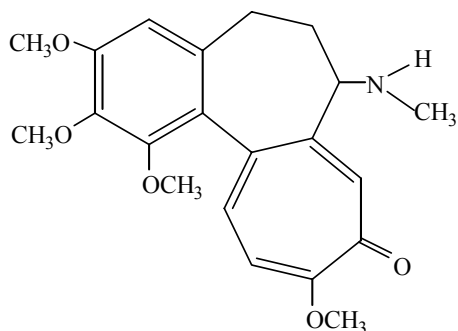


Şekil 4-23: Yp-21 alkaloidi  $^1\text{H}$  MNR spektrumu (2-demetilkolşifolin)



Şekil 4-24: Yp-21 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (2-demetilkolşifolin)

#### 4.3.5.7. Demekolsin (Alkaloit TA-7)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: Tablo 4-13

UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-25)

$\lambda_{\max}$  (MeOH) 350, 246 nm

IR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-26)  $\nu_{\max}$  3424, 2934, 2846, 1701, 1613, 1588, 1561, 1486, 1319, 1283, 1249, 1192, 1136, 1092, 1018, 923  $\text{cm}^{-1}$

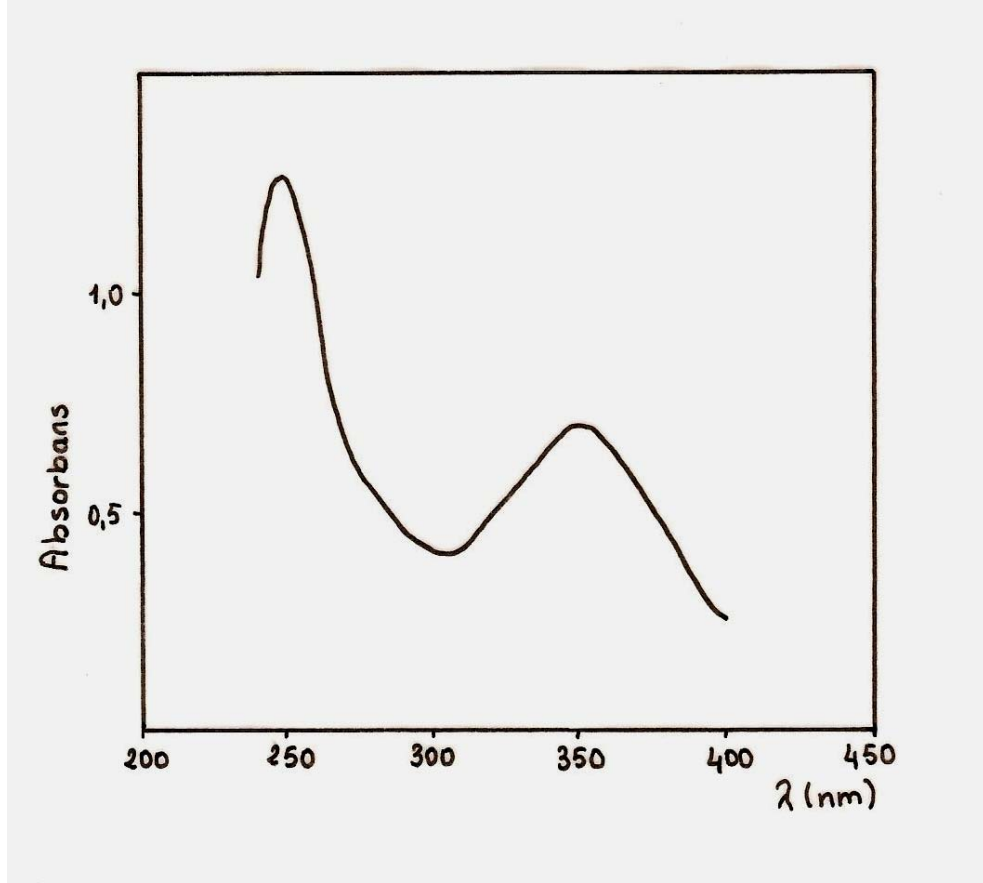
$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-27)

**Tablo 4-21. TA-7 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri**

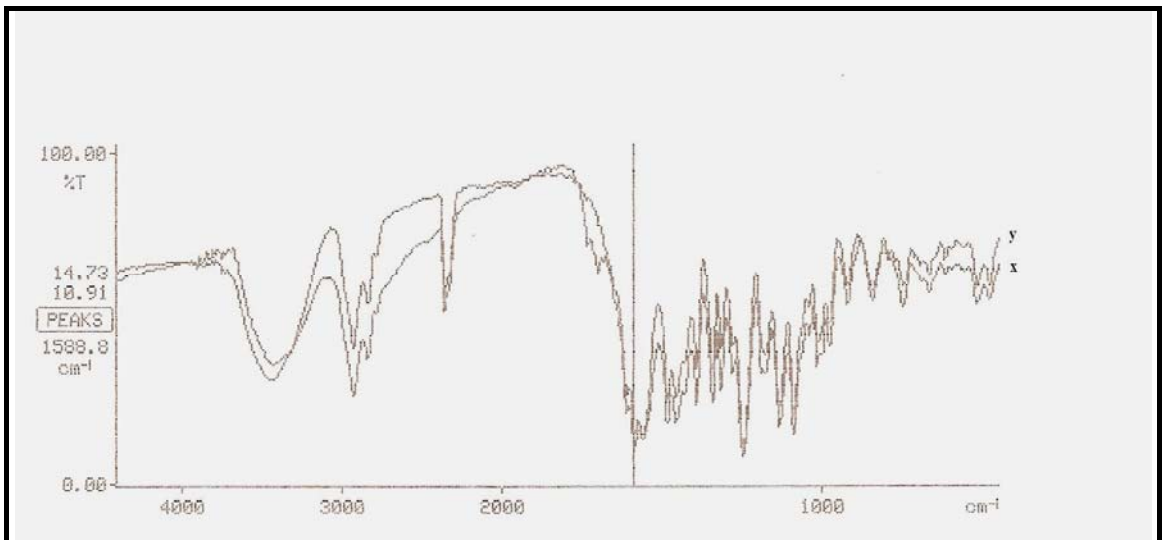
Konum ve Grup	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,55 (3H, s)	
3 (-OCH <sub>3</sub> )	3,93 (3H, s)	
4	6,61 (1H, s)	
5	2,42 (m), 2,38 (m)	
6	1,65 (m)	
7 (-NCH <sub>3</sub> )	2,21 (3H, s)	
7	3,29 (m)	
8	7,71 (1H, s)	
10 (-OCH <sub>3</sub> )	4,00 (3H, s)	
11	7,23– 7,25 (d)	J=10 Hz
12	6,78 – 6,80 (d)	J=10 Hz

Mass Spektrumu değerleri: (Şekil 4-28)

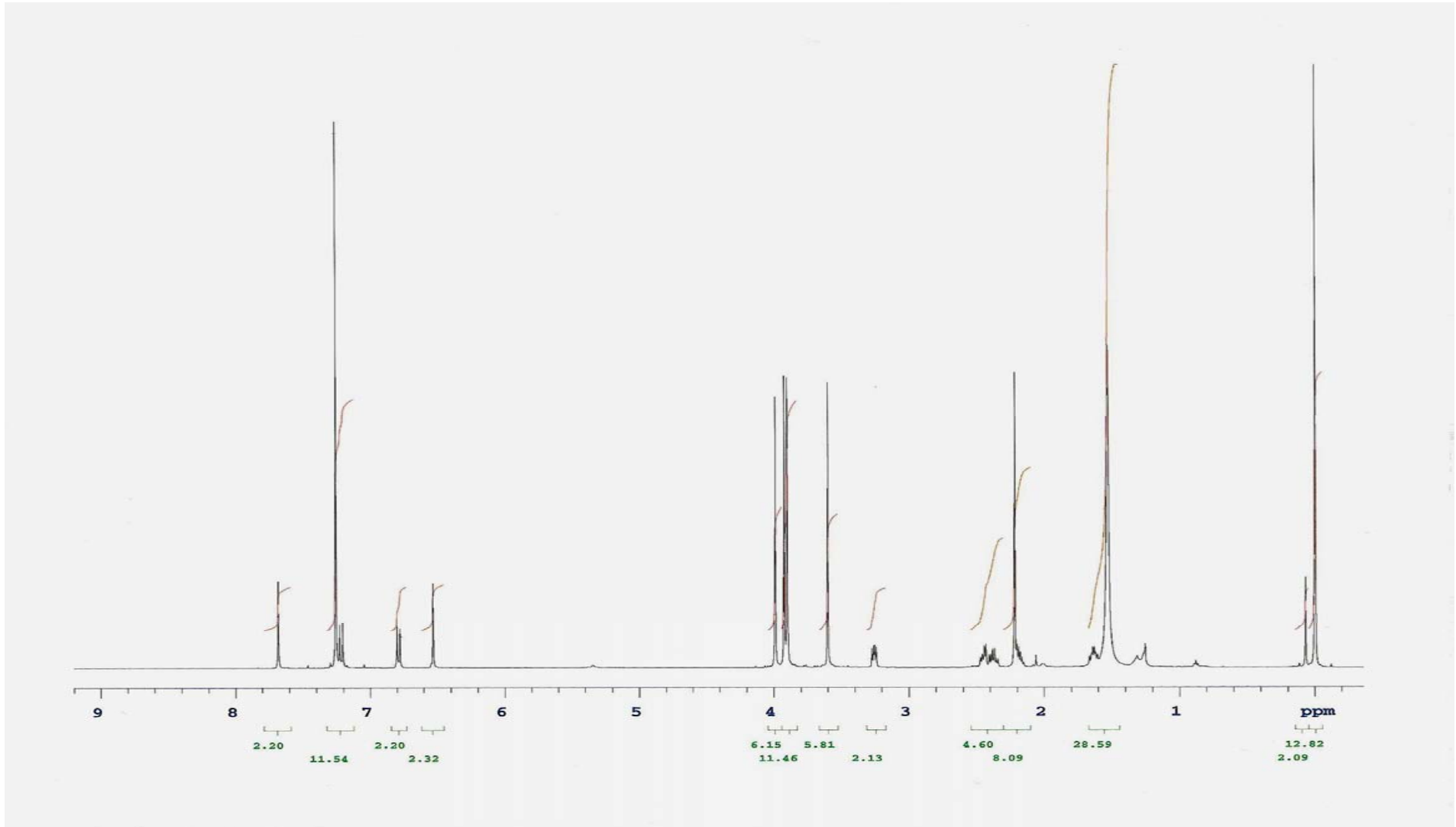
**ESI-MS (pozitif mod) m/z (intensite) :**  $[\text{M}+1]^+ = 373,28$  (% 100)



Şekil 4-25: TA-7 alkaloidi UV spektrumu

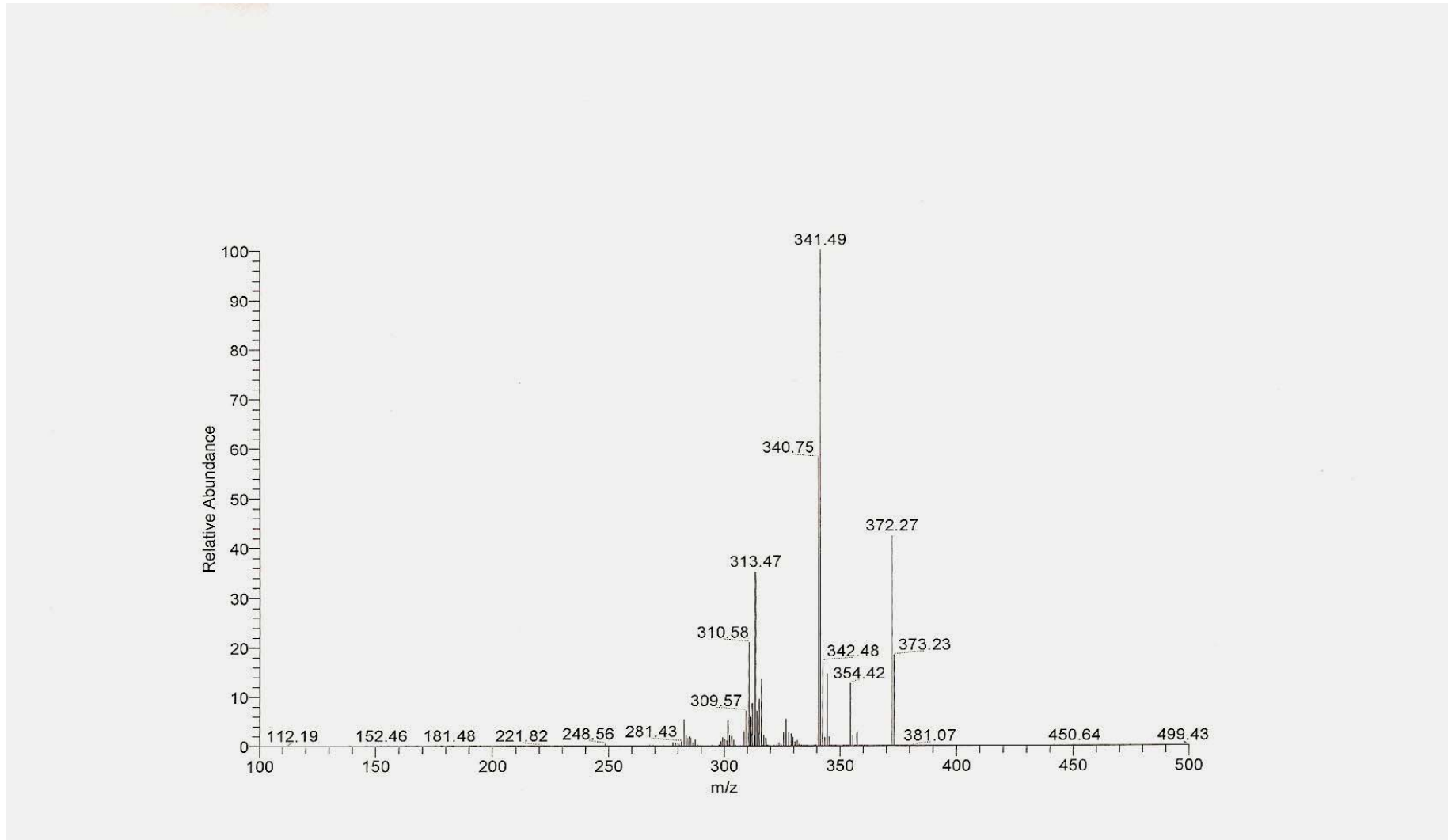


Şekil 4-26: TA-7 alkaloidi IR Spektrumu (x=madde, y= şahit)



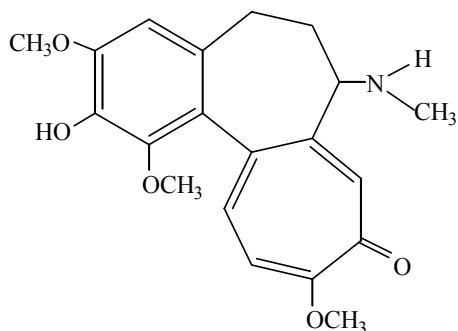
Şekil 4-27: TA-7 alkaloidi  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (Demekolsin)





Şekil 4-28: TA-7 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (Demekolsin)

#### 4.3.5.8. 2-Demetildemekolsin (Alkaloit ÇS-B2)



Renk Reaksiyonları: Tablo 4-12

Rf değerleri: Tablo 4-13

UV Spektrumu değerleri: (Şekil 4-29)

$\lambda_{max}$  (MeOH) 349, 246 nm

IR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-30)  $\nu_{max}$  3402, 2960, 2850, 1734, 1701, 1611, 1559, 1496, 1460, 1347, 1315, 1257, 1182, 1086, 1018, 984, 917  $\text{cm}^{-1}$

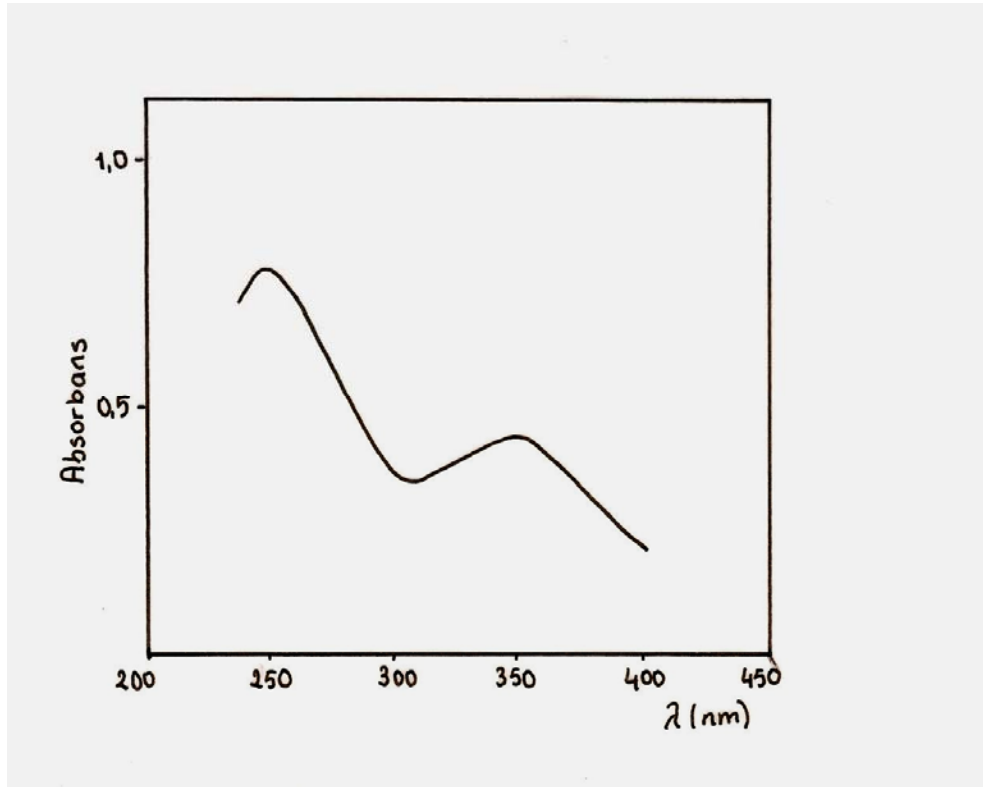
$^1\text{H}$  NMR Spektrumu değerleri: (Şekil 4-31)

Tablo 4-22.ÇS-B2 alkaloidine ait  $^1\text{H}$  NMR değerleri

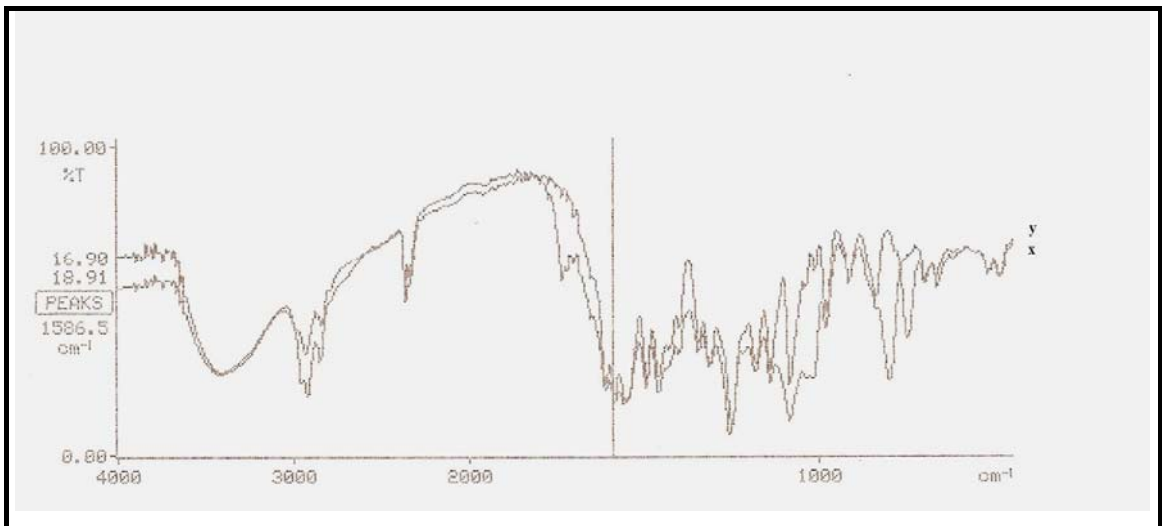
Konum ve Grup	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	J değeri (Hz)
1 (-OCH <sub>3</sub> )	3,55 (3H, s)	
3 (-OCH <sub>3</sub> )	3,93 (3H, s)	
4	6,61 (1H, s)	
5	2,42 (m), 2,38 (m)	
6	1,65 (m)	
7 (-NCH <sub>3</sub> )	2,21 (3H, s)	
7	3,29 (m)	
8	7,71 (1H, s)	
10 (-OCH <sub>3</sub> )	4,00 (3H, s)	
11	7,23– 7,25 (d)	J=10 Hz
12	6,78 – 6,80 (d)	J=10 Hz

Mass Spektrumu değerleri: (Şekil 4-32)

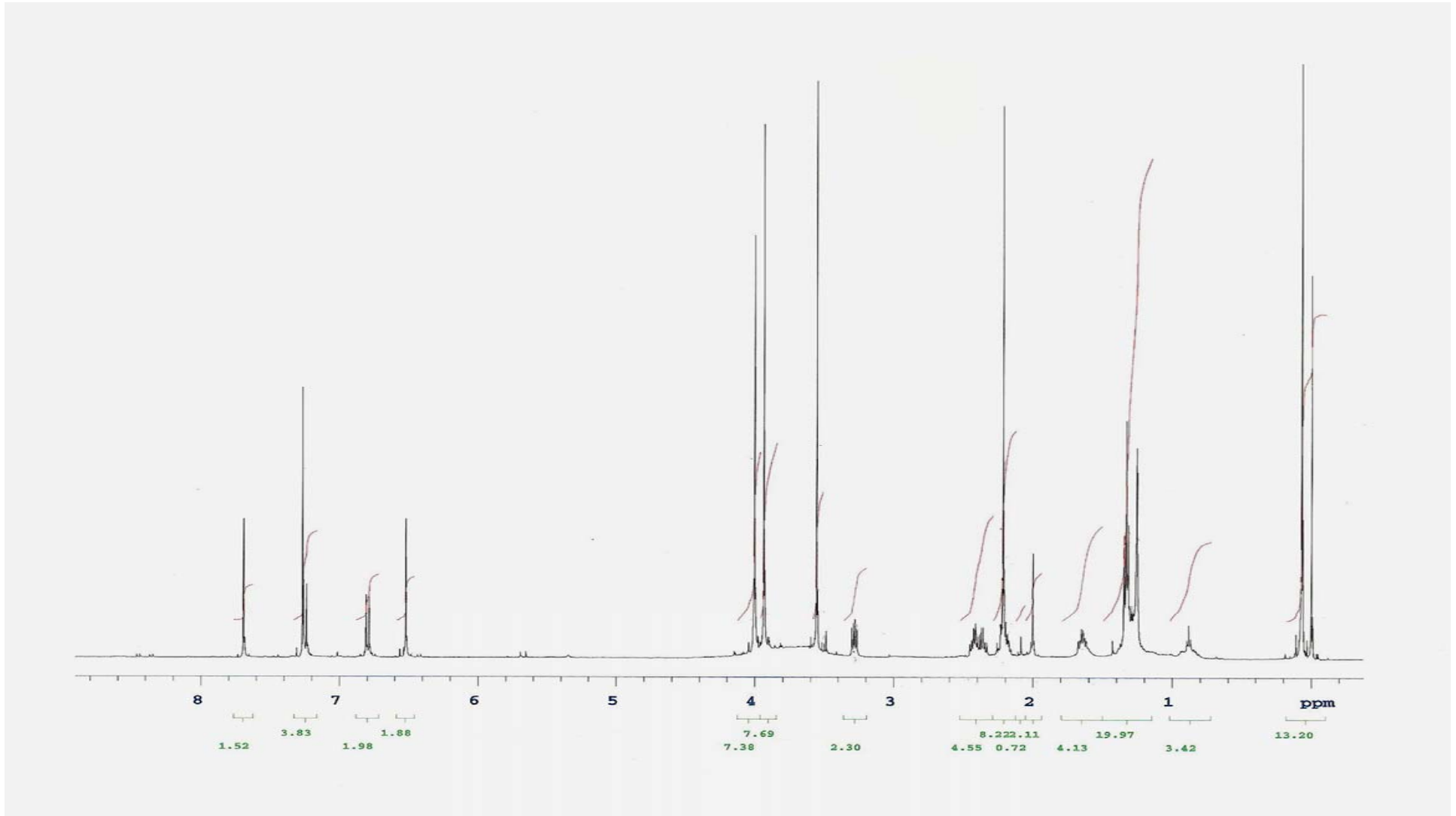
**ESI-MS (pozitif mod) m/z (intense) :**  $[\text{M}+\text{Na}]^+ = 380$  (% 100)



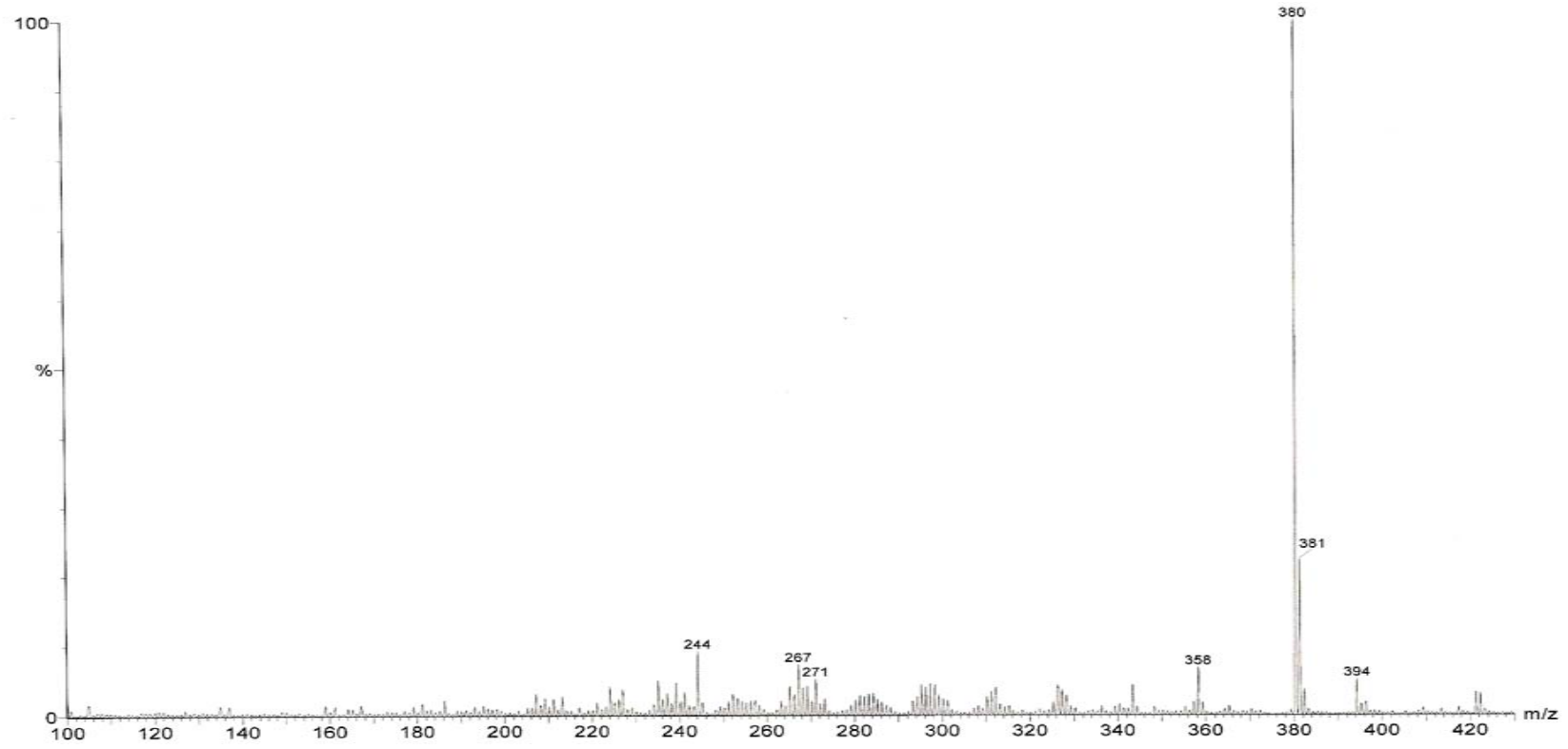
Şekil 4-29: ÇS-B2 alkaloidi UV spektrumu



Şekil 4-30: ÇS-B2 alkaloidi IR Spektrumu (x=madde, Y= şahit)



Şekil 4-31: ÇS-B2 alkaloidi  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (2-demetildemekolsin)



Şekil 4-32: ÇS-B2 alkaloidi ESI/MS (+) spektrumu (2-demetildemekolsin)

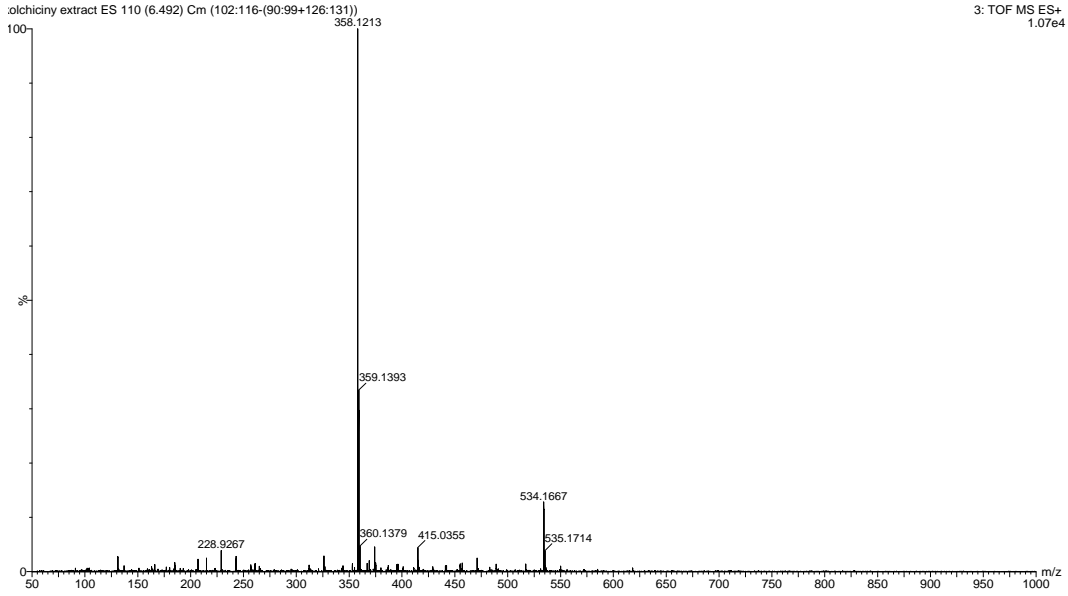
**4.3.6.MS/MS Yöntemi ile Belirlenen Alkaloitler:**

Ç, ÇŞ, Yp, T, YH ve YE ekstralarında diğer yöntemlerle saptanamamış olan, N-deasetil- N-formilkolşisin, kornigerin ve 3- demetildemekolsin alkaloitlerinin varlığı ise karşılaştırmalı olarak MS/MS yöntemi ile saptandı.

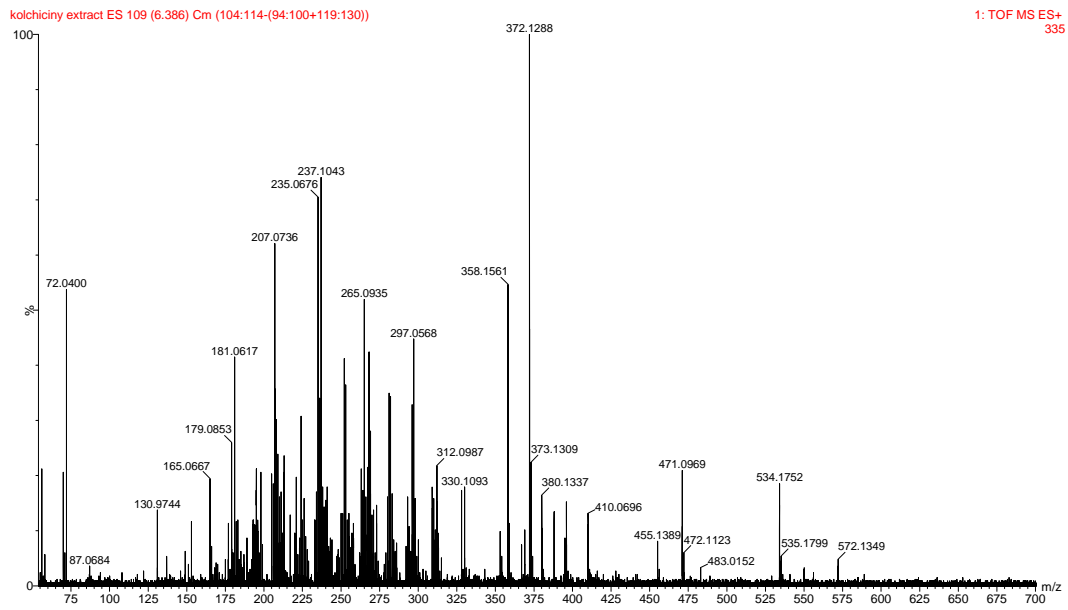
MS/MS analizleri sonucunda bulunan maddeler için, ekstralardan sadece ÇS ekstresine ait spektrumlar verilmiştir (Şekil 4-36, 4-37 ve 4-38).

**ÇS ekstresi- 3-Demetildemekolsin**  
**(m/z: [M+1]<sup>+</sup> 358)**

**3-Demetildemekolsin MS Spektrumu**



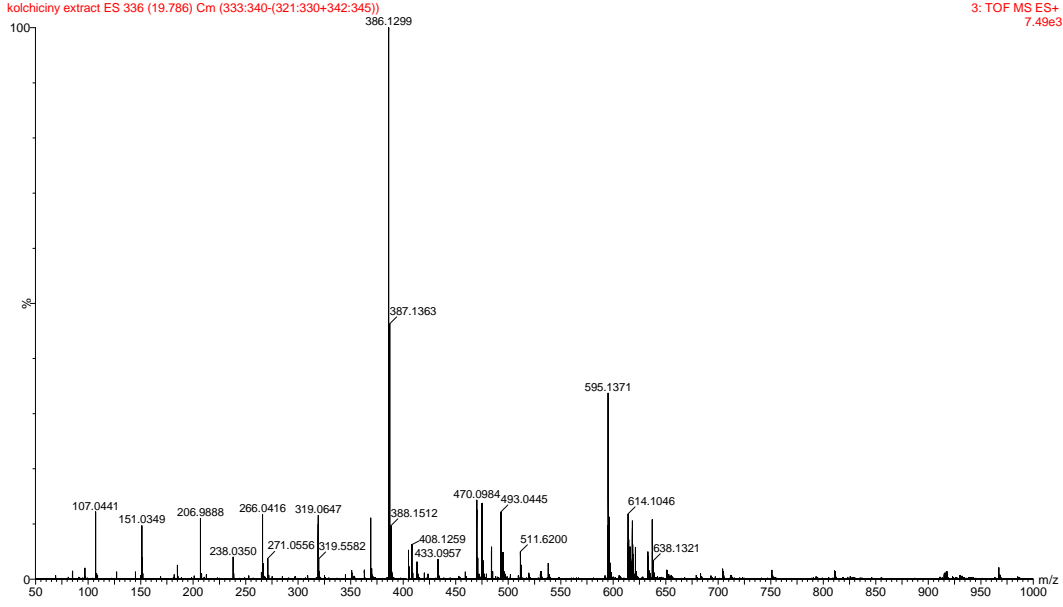
**MS/MS Spektrumu**



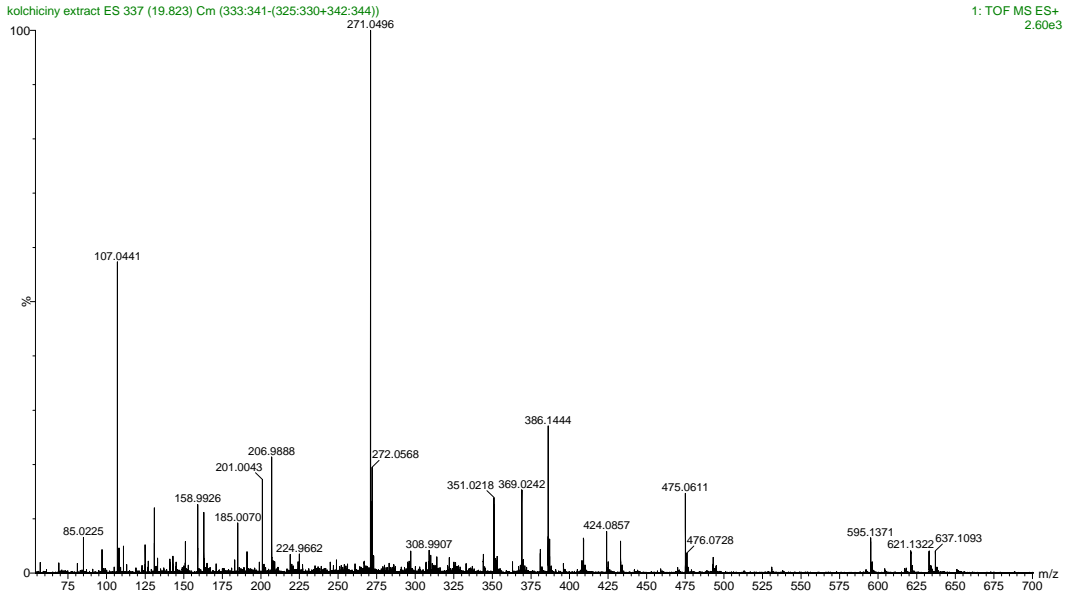
**Şekil 4-33:ÇS ekstresinde saptanan 3-demetildemekolsin'e ait MS ve MS/MS spektrumları**

**ÇS Ekstresi – N-Deasetil-N-Formilkolşisin**  
**(m/z: [M+1]<sup>+</sup> 386)**

**N-Deasetil-N-formilkolşisin MS Spektrumu**



**MS/MS**

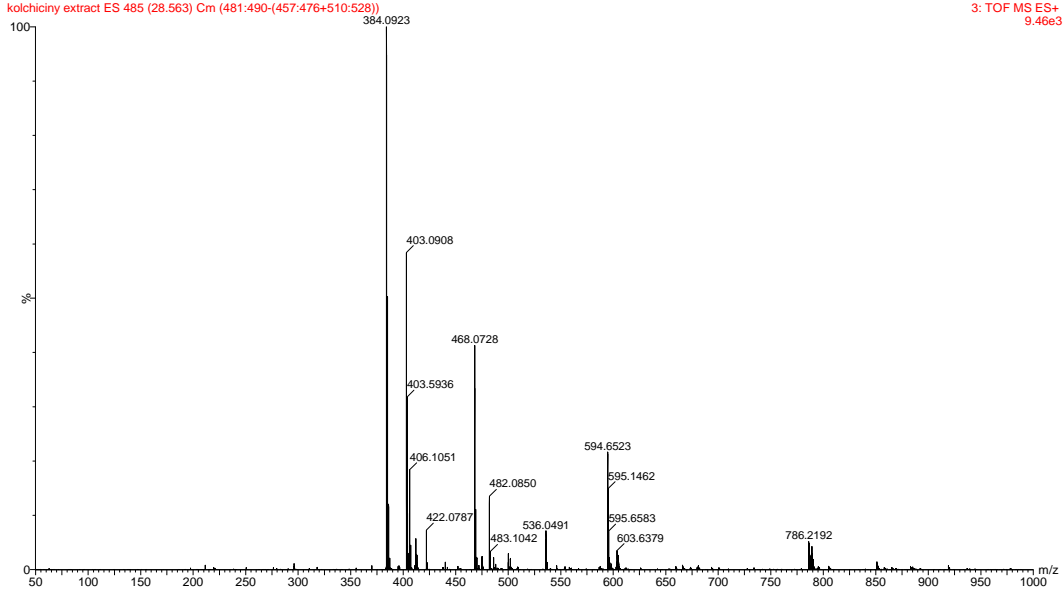


**Şekil 4-34:ÇS ekstresinde saptanan N-deasetil-N-formilkolşisin'e ait MS ve MS/MS spektrumları**

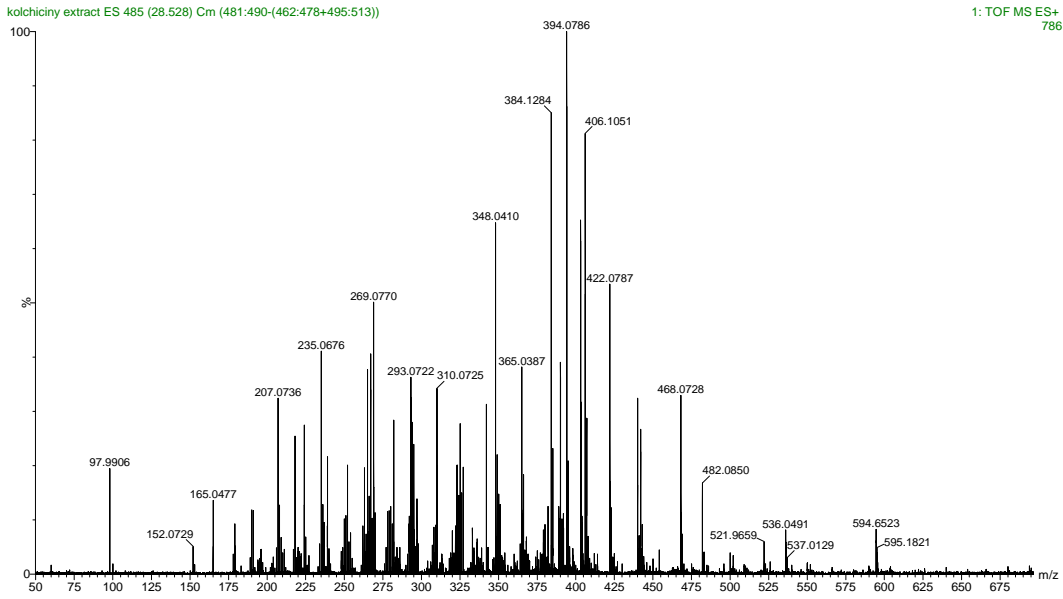


**ÇS Ekstresi-Kornigerin**  
(m/z: [M+1]<sup>+</sup> 384)

**Kornigerin MS Spektrumu**



**MS/MS**



**Şekil 4-35: ÇS ekstresinde saptanan Kornigerin'e ait MS ve MS/MS spektrumları**

*Colchicum baytopiorum* bitkisinde varlığı saptanan alkaloidler:

**Tablo 4-23. Bitkinin ayrılan kısımlarında saptanan alkaloidler**

Ç	ÇS	Yp
Kolşisin	Kolşisin	Kolşisin
3-demetilkolşisin	N-deasetil-N-formilkolşisin	3-demetilkolşisin <sup>+</sup>
Kolşifolin	Kolşifolin	N-formil-N-deasetil-3-demetilkolşisin <sup>+</sup>
2-demetilkolşifolin	Kornigerin*	2-demetil- $\gamma$ -lumikolşisin <sup>+</sup>
Demekolsin	Demekolsin	Kornigerin*
2-demetildemekolsin	2-demetildemekolsin <sup>+</sup>	2-demetilkolşifolin <sup>+</sup>
3-demetildemekolsin*	3-demetildemekolsin*	Demekolsin
		2-demetildemekolsin
		3-demetildemekolsin*
T	YH	YE
Kolşisin <sup>+</sup>	Kolşisin	Kolşisin
2-demetilkolşisin	Kornigerin*	2-demetilkolşisin <sup>+</sup>
Kolşifolin	Demekolsin	Kolşifolin <sup>+</sup>
Kornigerin*	2-demetildemekolsin	Kornigerin*
Demekolsin <sup>+</sup>	3-demetildemekolsin*	Demekolsin
2-demetildemekolsin		2-demetildemekolsin
3-demetildemekolsin*		3-demetildemekolsin*

\* MS/MS analizleri ile belirlendi.

<sup>+</sup> Elde edildi ve yapıları aydınlatıldı.

Diğer maddelerin teşhisleri en az 5 farklı çözücü sisteminde şahit maddeler ile karşılaştırılarak İTK yöntemi ile yapıldı.

#### 4.4.Flavon Bileşiklerinin Ayrılması, Saflaştırılması ve Yapılarının Aydınlatılması

##### 4.4.1.Flavon Bileşiklerinin Ayrılması:

3 g ÇS metanol ekstresi üzerinde Bölüm 3'te anlatıldığı şekilde pH 3-4'e ayarlanarak Eter ile tüketme yapıldı. Elde edilen 183 mg eter ekstresi (ÇS-E)'nin 150 mg'ı ayırım açısından en uygun görülen 7 nolu çözücü sistemi kullanılarak Kieselgel kaplı plaklarda preparatif İTK yapıldı. Preparatiftan alınan bantlar elue edildikten sonra Shibata Reaksiyonu yapılarak pozitif reaksiyon veren bantlar üzerinde çalışıldı.

Shibata reaksiyonu ile Bant 5 (30 mg), Bant 7 (25 mg) ve Bant 8 (37 mg) pozitif reaksiyon verdi.

Bant 5 Sephadex LH-20 sütundan metanol geçirilerek saflaştırıldı.

Bant 7 nin İTK ve KK ile yapılan incelemelerinde saf olduğu görüldü. Ancak Bant 8 oldukça kirli olduğu için bu banttan izolasyon yapılamadı.

Bu şekilde ÇS-E ekstresinden **F1** (8,2 mg) ve **F2** (11,7 mg) olmak üzere 2 adet flavon bileşiği elde edildi.

##### 4.4.2.Flavon Bileşiklerinin Yapı Tayini:

###### 4.4.2.1.Renk Reaksiyonları:

**Tablo 4-24: Elde edilen flavon bileşiklerinin renk reaksiyonları**

Flavon Bileşiği	Shibata Reaksiyonu	UV 366 nm	UV/NH <sub>3</sub> 366 nm	UV/NA 254 nm
<b>F1</b> (Luteolin)	Turuncu	Mor	Sarı	Turuncu
<b>F2</b> (Apigenin)	Turuncu	Mor	Yeşil-Sarı	Yeşil-Sarı

#### 4.4.2.2.Luteolin (F1 Flavonu)

Renk Reaksiyonları: Tablo 4-24

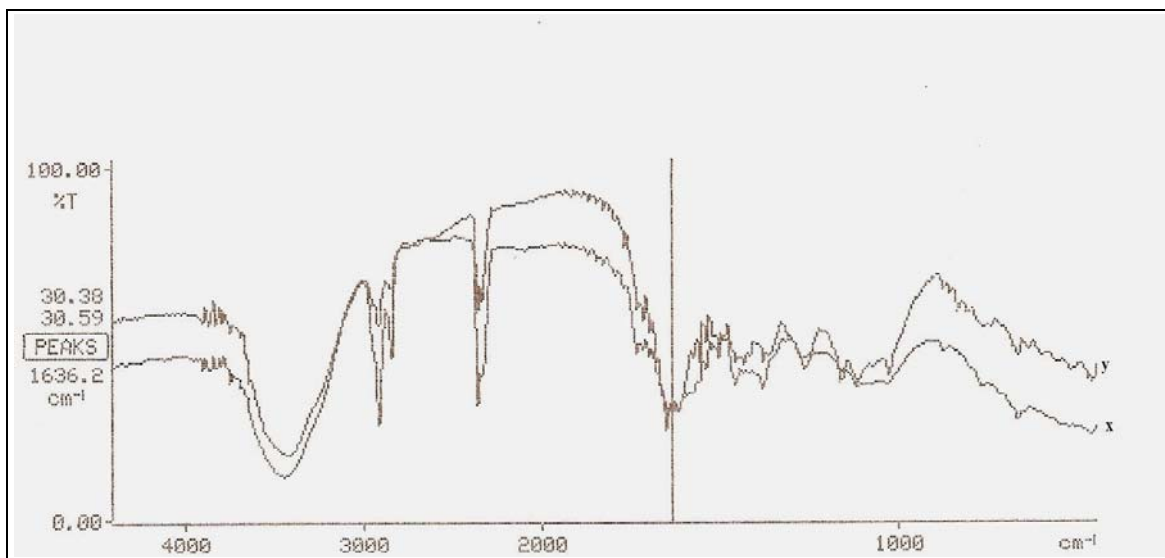
Rf Değerleri: Tablo 4-27

UV Spektrumu ( $\lambda$  max, nm): (Şekil 4-40) Değerlendirme Tablo 4-25'te yapılmıştır.

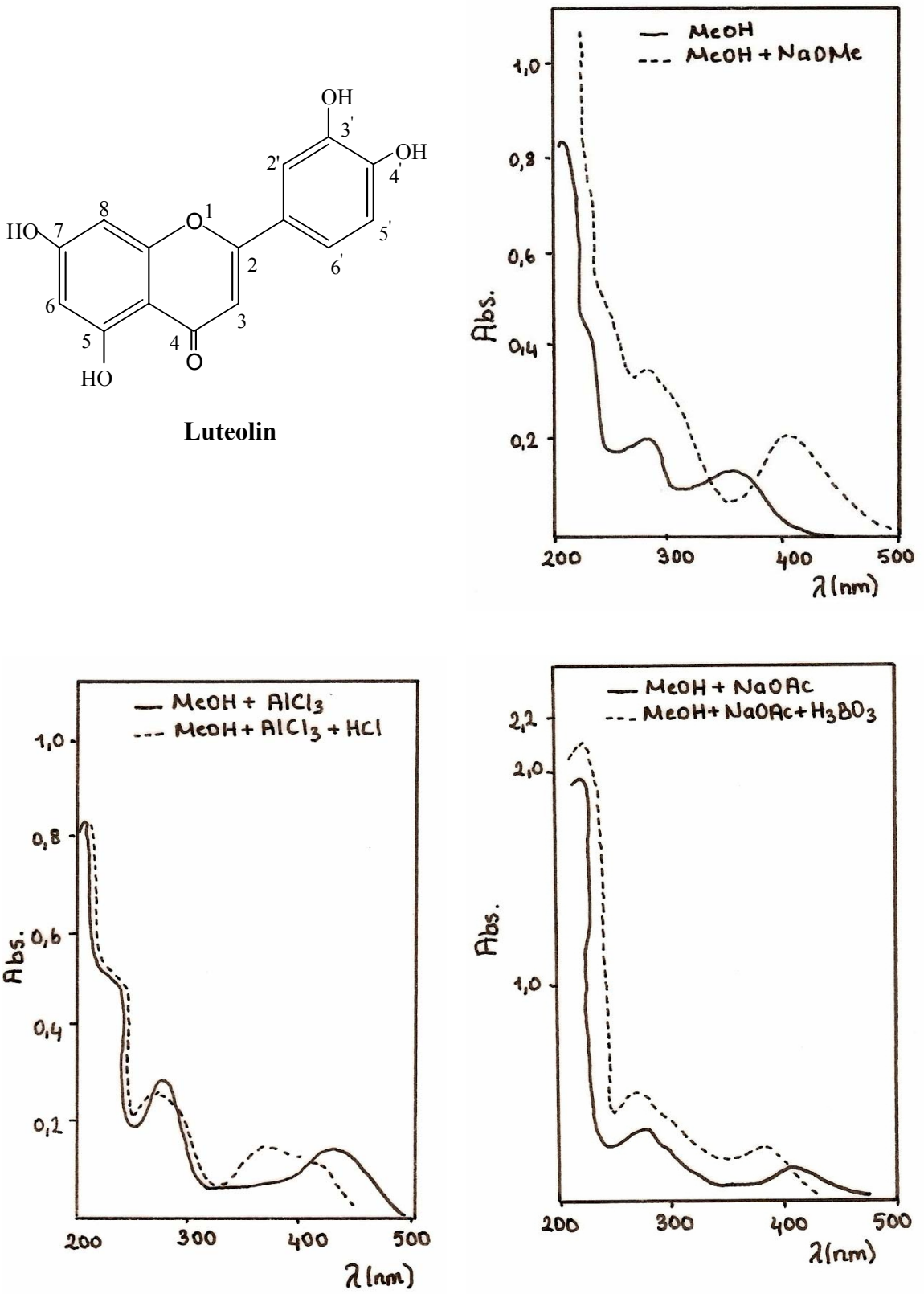
**Tablo 4-25: F1 flavonuna ait UV spektrumu değerleri ve değerlendirilmesi (75)**

	Bant I	Bant II	Değerlendirme
MeOH	348, 283 nm	274 nm	Flavon
MeOH + NaOMe	↑ 398, 295 nm	273 nm	4'-OH, 7-OH
AlCl <sub>3</sub>	423, 392 nm	275 nm	5-OH
AlCl <sub>3</sub> + HCl	395, 357 nm	277 nm	o-dihidroksi var
NaOAc	403, 335 nm	287, 273 nm	7-OH
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	375, 320 nm	276 nm	o-dihidroksi var

IR Spektrumu: (Şekil 4-39)  $V_{max}$  3903, 3821, 3751, 3675, 3650, 3446, 2920, 1735, 1654, 1636, 1459, 1383, 1115, 669  $cm^{-1}$



**Şekil 4-36: F1 flavonu ve luteolin şahidi IR spektrumu (x= madde, y= şahit)**



Şekil 4-37: Kaydırma belirteçleri ile alınan F1 flavonu (Luteolin) UV spektrumları

#### 4.4.2.3. Apigenin (F2 Flavonu)

Renk Reaksiyonları: Tablo 4-24

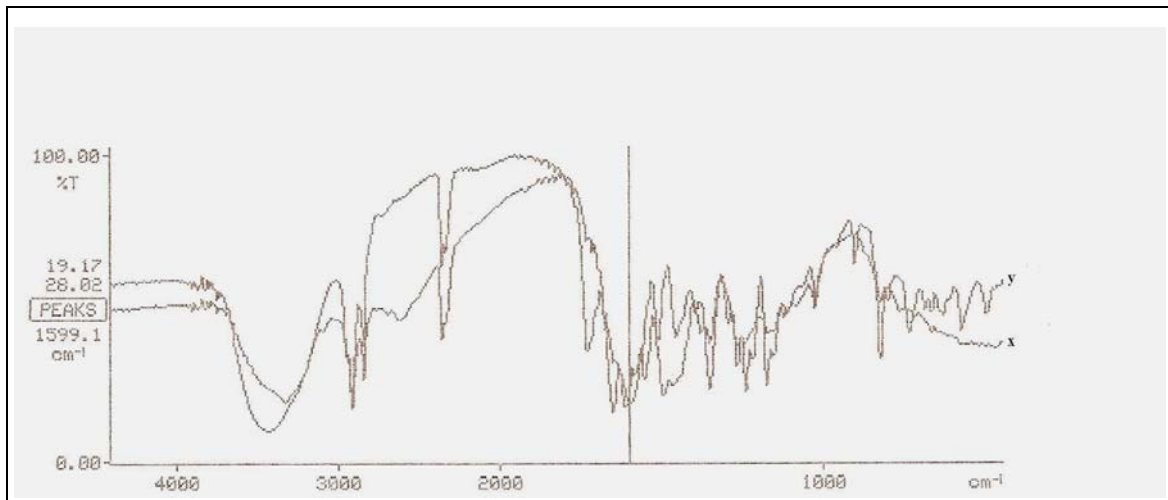
Rf Değerleri: Tablo 4-27

UV Spektrumu ( $\lambda_{max}$ , nm): (Şekil 4-42) Değerlendirme Tablo 4-26'da yapılmıştır.

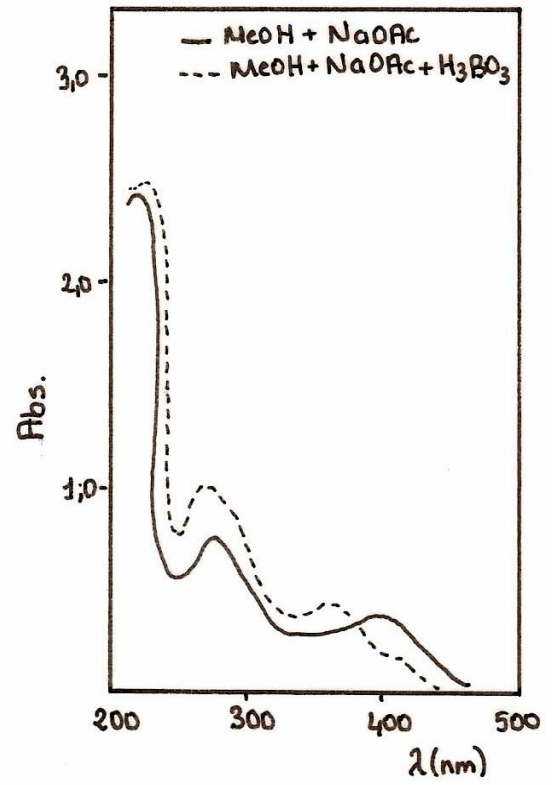
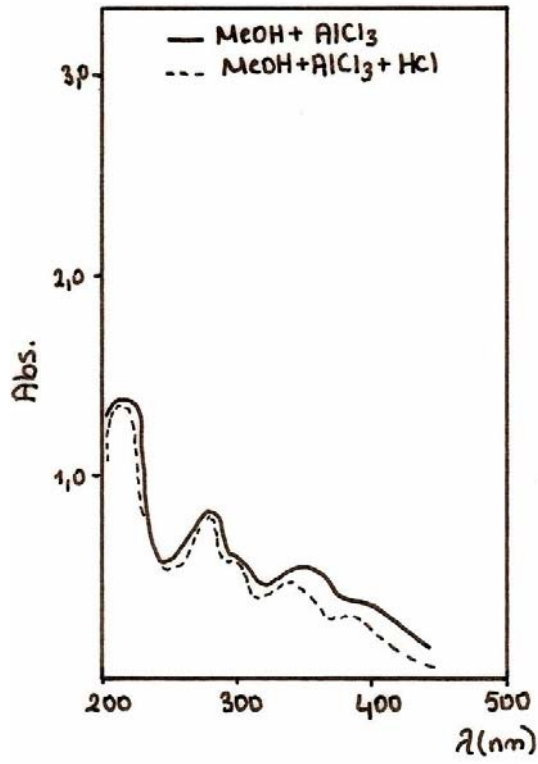
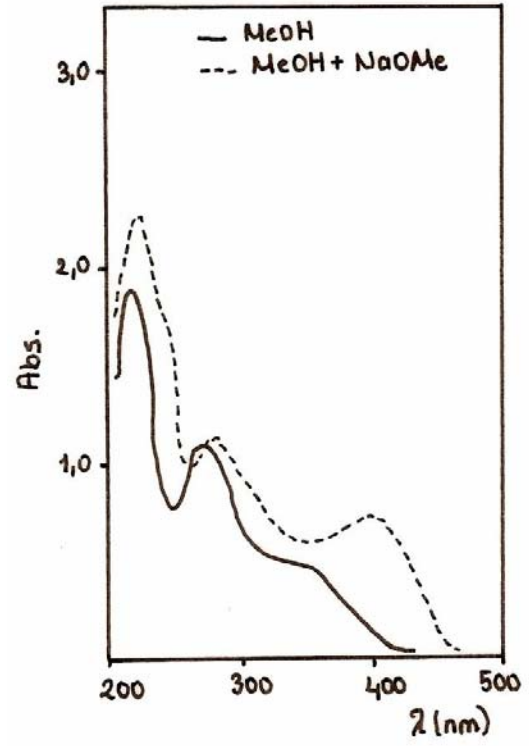
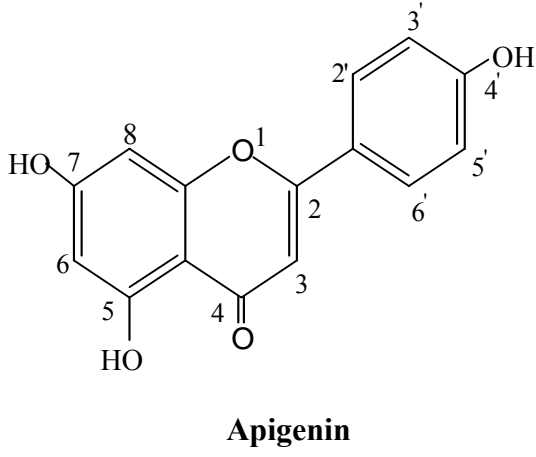
**Tablo 4-26: F2 flavonu UV spektrumu değerleri ve değerlendirilmesi (75)**

	Bant I	Bant II	Değerlendirme
MeOH	350, 295 nm	271 nm	Flavon
MeOH + NaOMe	↑ 395, 325 nm	277 nm	4'-OH, 7-OH
AlCl <sub>3</sub>	391, 337, 301 nm	276 nm	5-OH
AlCl <sub>3</sub> + HCl	388, 336, 302 nm	276 nm	o-dihidroksi yok
NaOAc	390, 315 nm	276 nm	7-OH
NaOAc + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	345 nm	273 nm	o-dihidroksi yok

IR Spektrumu: (Şekil 4-41)  $V_{max}$  3854, 3750, 3675, 3445, 2922, 2363, 1734, 1653, 1599, 1515, 1458, 1383, 668  $cm^{-1}$



**Şekil 4-38: F2 flavonu ve apigenin şahidi IR spektrumu (x= madde, y= şahit)**



Şekil 4-39: Kaydırma belirteçleri ile alınan F2 flavonu (Apigenin) UV spektrumları

#### 4.4.2.4.Flavon Bileşiklerinin Rf Değerleri:

**Tablo 4-27: Flavon bileşiklerinin çeşitli çözücü sistemlerindeki Rf değerleri**

Elde Edilen Maddeler	Çözücü Sistemleri					
	6	7	8	9	10	11
Luteolin	0,61	0,42	0,31	0,77	0,52	0,58
Apigenin	0,68	0,57	0,46	0,89	0,62	0,65

Elde edilen F1 ve F2 flavon bileşikleri yapılarının tayin edilmesi amacıyla şahit maddeler ile çeşitli çözücü sistemlerinde İTK yöntemiyle karşılaştırılmış ve belirteçler ile renk reaksiyonları yapılmıştır (Tablo 4-24). Yapılan analizler sonucunda bu maddelerin F1= Luteolin ve F2= Apigenin olabileceği görülmüş ve ardından çeşitli kaydırma belirteçleri ile UV spektrumları alınmış ve spektrum değerlendirmesi literatüre göre yapılmıştır (75). Ayrıca şahit maddeler ile üst üste çekilen IR spektrumlarının da birbiriyle uyduğu görülmüştür.



#### 4.5.Fenolik Asitlerin LC/MS Yöntemiyle Belirlenmesi

Bitkinin her bir kısmından elde edilen metanol ekstraktları (Ç, ÇS, Yp, T, YH, YE), LC/MS yönteminde şahit maddeler ile karşılaştırıldı; her bir metanol ekstresinde bulunan fenolik asitler, sıvı kromatografisindeki (LC) retansiyon zamanları (Rt) ve kütle spektrumundaki (MS) m/z değerleri üzerinden belirlendi.

Ekstrelerde varlığı saptanan fenolik asitler Tablo 4-28'de, MS spektrumlarına ait m/z değerleri ve LC kromatogramalarına ait retansiyon zamanları Tablo 4-29'da verilmiştir.

Her bir ekstreye ait LC/MS kromatogramları 2 kromatogram (I ve II) halinde gösterilmektedir (Şekil 4-43 –Şekil 4-54).

**Tablo 4-28: Ekstrelerde saptanan fenolik asitler**

Fenolik asitler	Ç	ÇS	Yp	T	YE	YH
Vanilik asit	-	-	?	?*	-	-
Kumarik asit	-	+	-	+	+	?
Ferulik asit	-	?	-	+	-	?
Kafeik asit	-	+	?	-	+	+
Sinamik asit	?	?	?	?	?	?
Benzoik asit	-	+	+	+	+	+
2-hidroksibenzoik asit	?*	?*	?*	?*	?*	?*
4-hidroksibenzoik asit	?*	?*	?*	?*	?*	?*
2,5-dihidroksi benzoik asit	-	-	+	+	+	+
2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit	-	-	?	?*	-	-
4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit	-	-	?	?*	-	-

(+) = var, (-) = yok, ? = doğrulanamadı, ?\* = bir ya da daha fazla türevi halinde

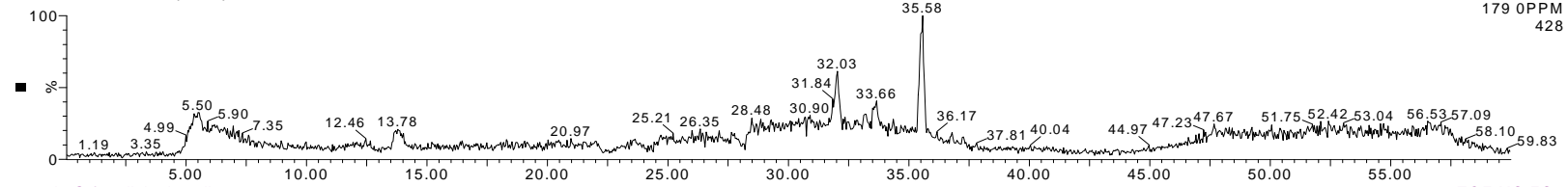
**Tablo 4-29. Fenolik asitlere ait retansiyon zamanı ve m/z değerleri**

Fenolik asitler	m/z	Retansiyon zamanı (Rt, dakika)					
		Ç	ÇS	Yp	T	YE	YH
Vanilik asit	167				24,71		
Kumarik asit	163		22,87		23,14	21,20	
Ferulik asit	193				18,69		
Kafeik asit	179		22,04			21,20	23,64
Sinnamik asit	147				21,25		
Benzoik asit	121		18,65	21,51	21,76	20,21	21,79
2-hidroksibenzoik asit	137	33,73	33,19		38,12	35,73	35,42
4-hidroksibenzoik asit	137	33,73	33,19		38,12	35,73	35,42
2,5-dihidroksi benzoik asit	153			20,31	19,37	19,00	23,33
2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit	167				24,71		
4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit	167				24,71		

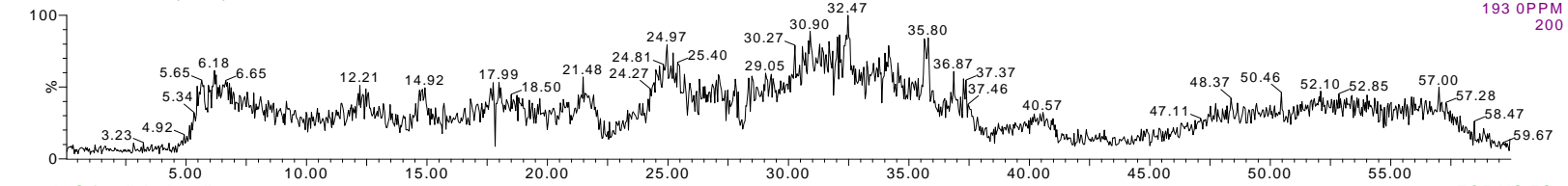
## Ç Metanol Ekstresi (Spektrum I)

2 mg/ 5 ml pufuru

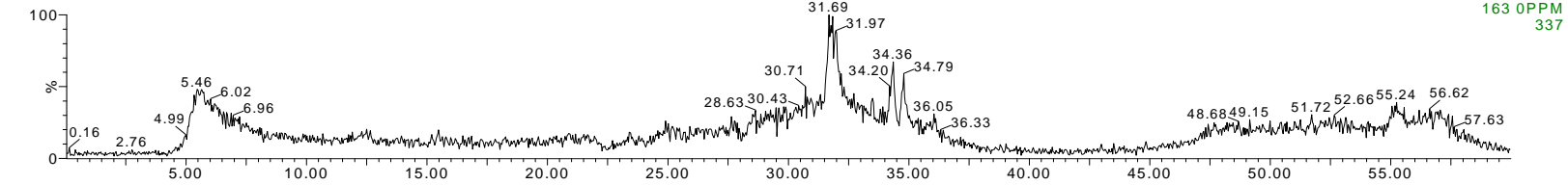
ekstrakt G fenolicke kyseliny



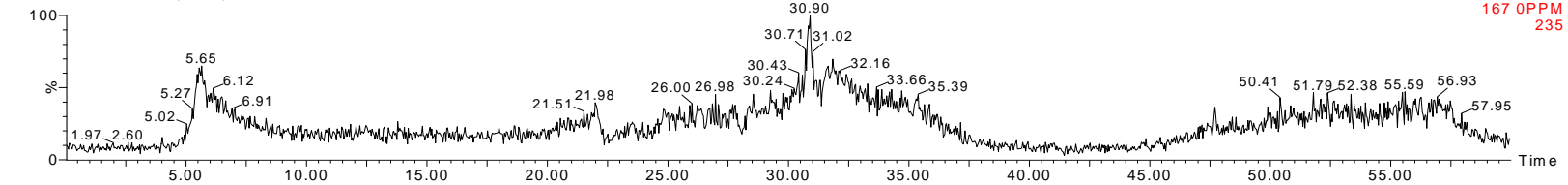
ekstrakt G fenolicke kyseliny



ekstrakt G fenolicke kyseliny



ekstrakt G fenolicke kyseliny

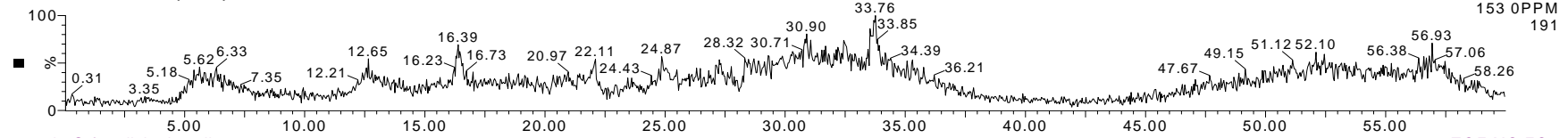


Şekil 4-40: Ç ekstresine ait LC/MS kromatogramı (I)

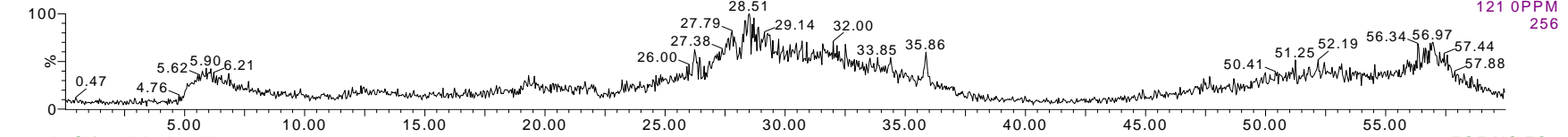
## Ç Metanol Ekstresi (Spektrum II)

2 mg/ 5 ml pufru

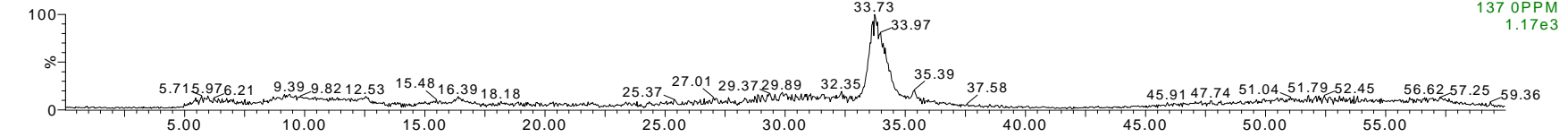
ekstrakt G fenolicke kyseliny



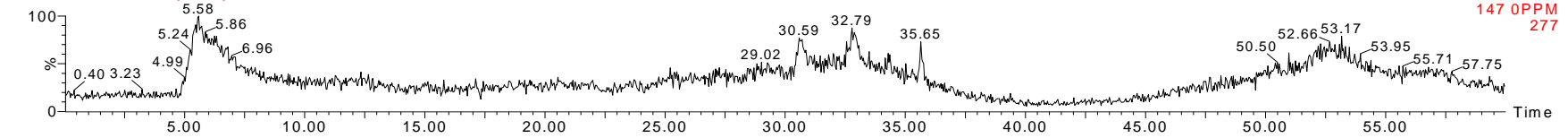
ekstrakt G fenolicke kyseliny



ekstrakt G fenolicke kyseliny



ekstrakt G fenolicke kyseliny

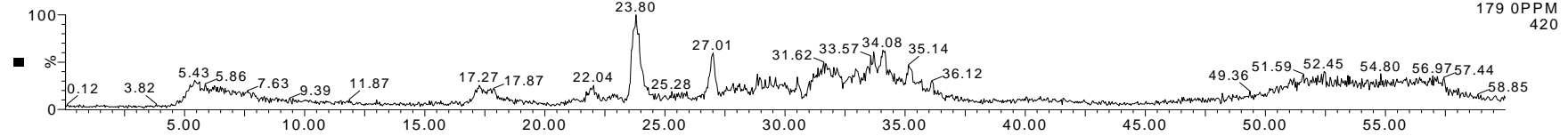


Şekil 4-41: Ç ekstresine ait LC/MS kromatogramı (II)

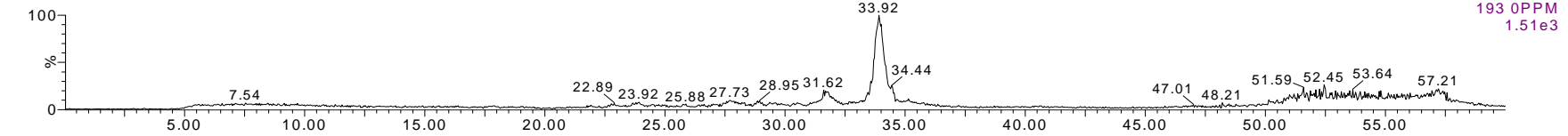
## ÇS Metanol Ekstresi (Spektrum I)

2 mg/ 5 ml pufu

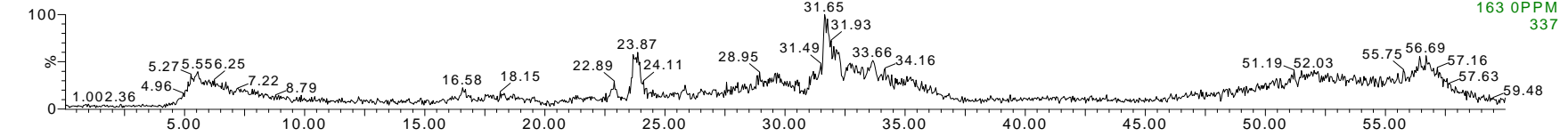
ekstrakt ES fenolicke kyseliny



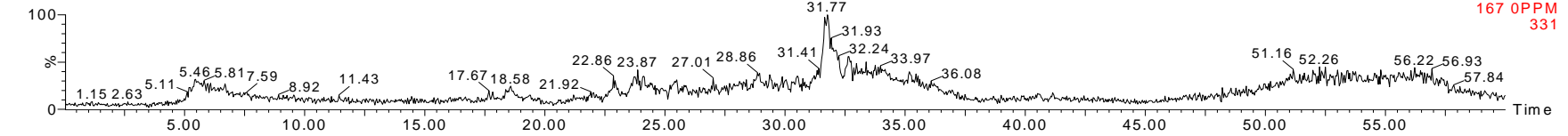
ekstrakt ES fenolicke kyseliny



ekstrakt ES fenolicke kyseliny



ekstrakt ES fenolicke kyseliny

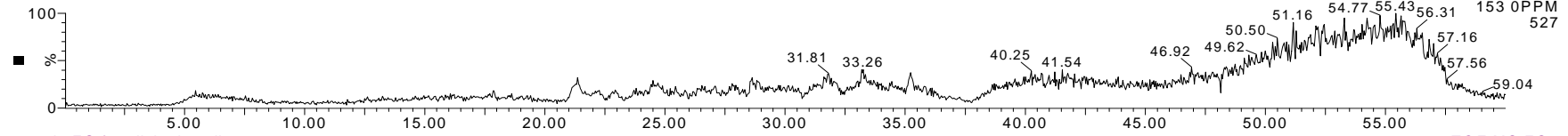


Şekil 4-42: ÇS ekstresine ait LC/MS kromatogramı (I)

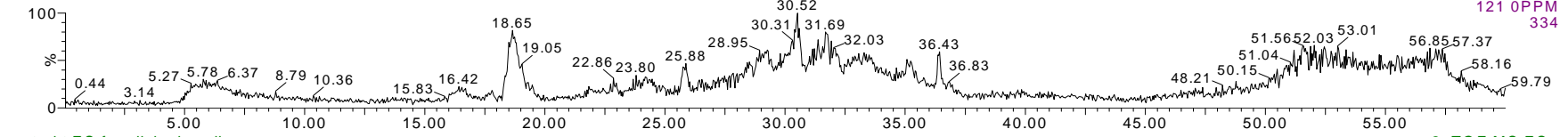
## ÇS Metanol Ekstresi (Spektrum II)

2 mg/ 5 ml pufru

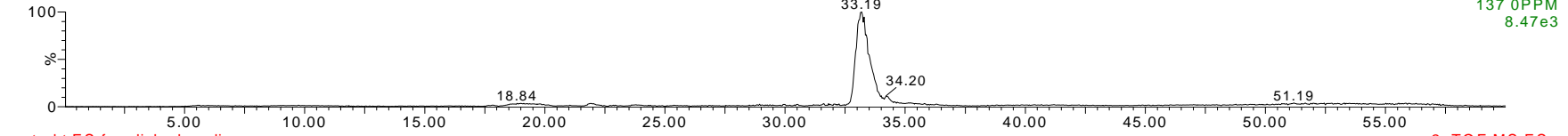
ekstrakt ES fenolicke kyseliny



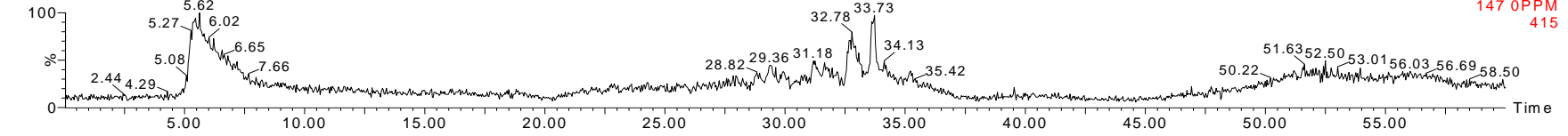
ekstrakt ES fenolicke kyseliny



ekstrakt ES fenolicke kyseliny



ekstrakt ES fenolicke kyseliny

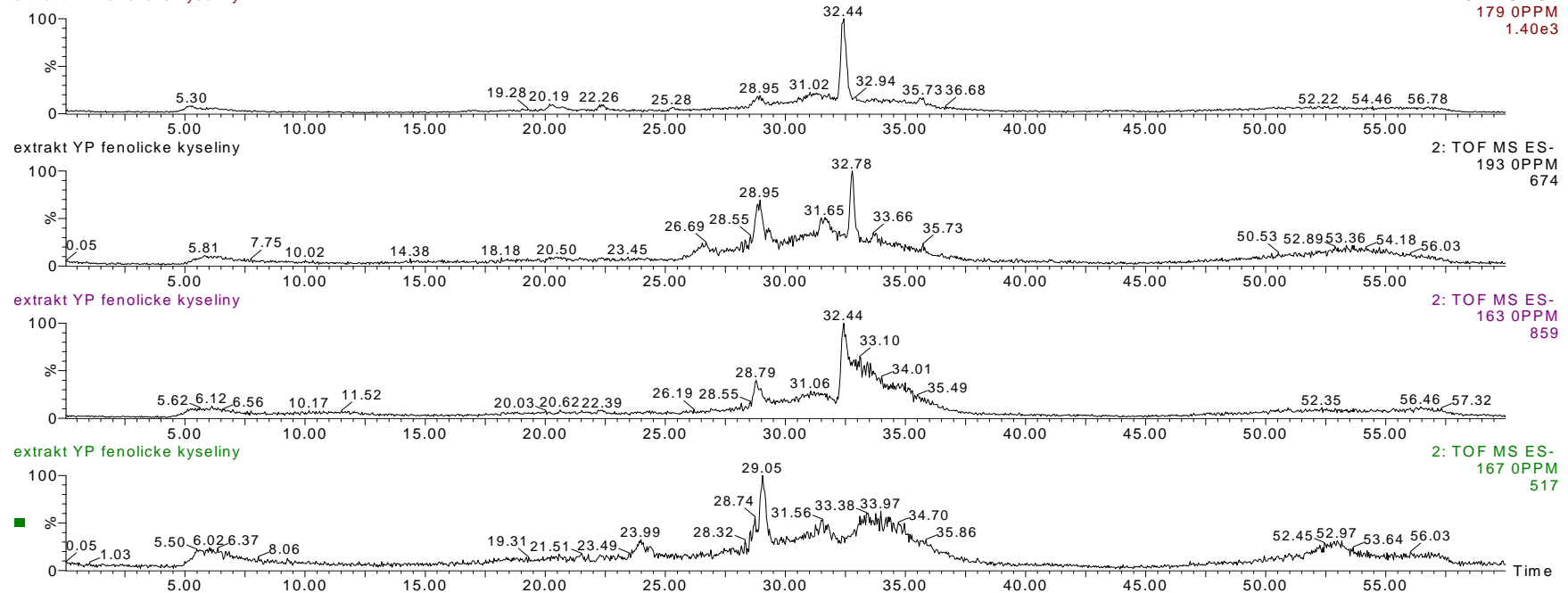


Şekil 4-43: ÇS ekstresine ait LC/MS kromatogramı (II)

## Yp Metanol Ekstresi (Spektrum I)

2 mg/ 5 ml pufu

ekstrakt YP fenolicke kyseliny

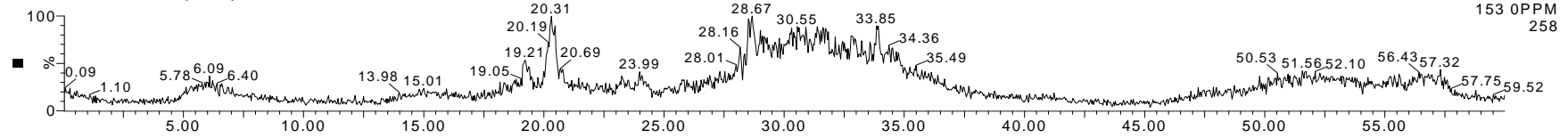


Şekil 4-44: Yp ekstresine ait LC/MS kromatogramı (I)

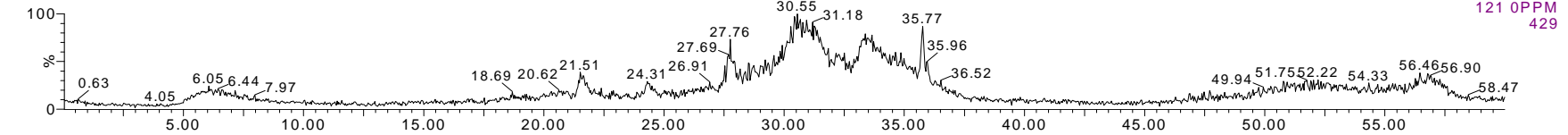
## Yp Metanol Ekstresi (Spektrum II)

2 mg/ 5 ml pufu

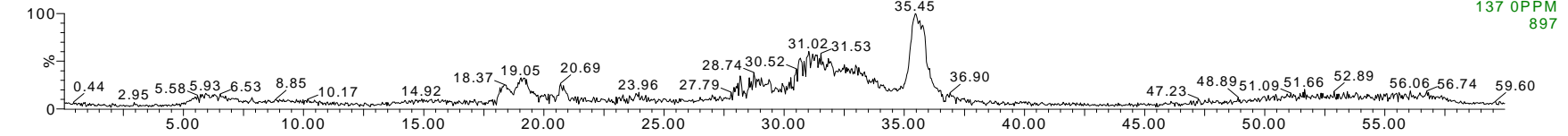
ekstrakt YP fenolicke kyseliny



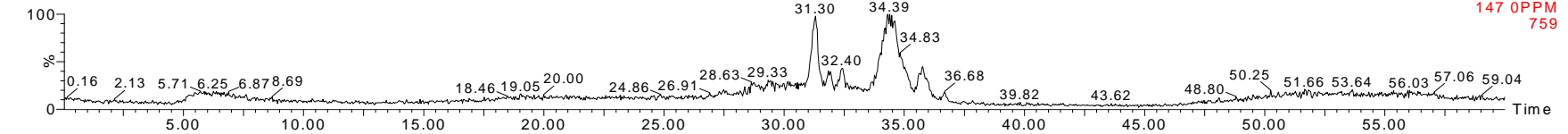
ekstrakt YP fenolicke kyseliny



ekstrakt YP fenolicke kyseliny



ekstrakt YP fenolicke kyseliny



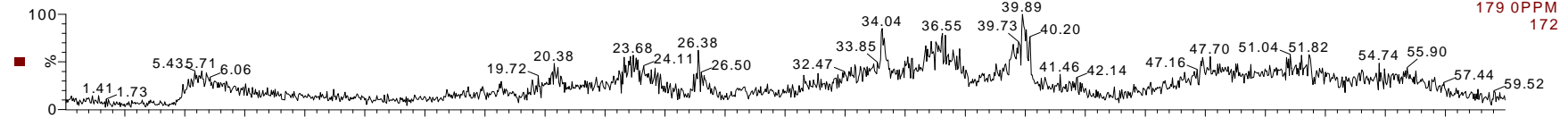
Şekil 4-45: Yp ekstresine ait LC/MS kromatogramı (II)



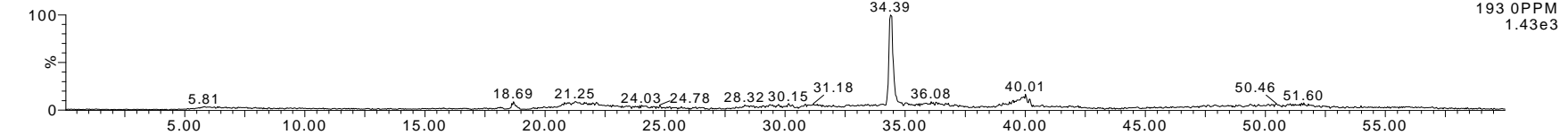
## T Metanol Ekstresi (Spektrum I)

2 mg/ 5 ml pufru

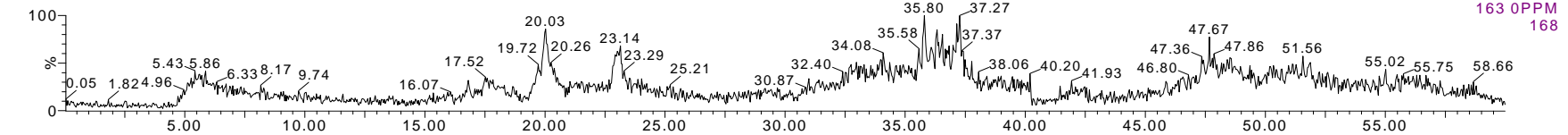
ekstrakt T fenolicke kyseliny



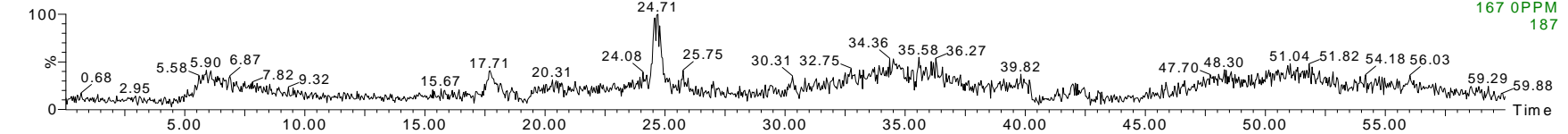
ekstrakt T fenolicke kyseliny



ekstrakt T fenolicke kyseliny



ekstrakt T fenolicke kyseliny

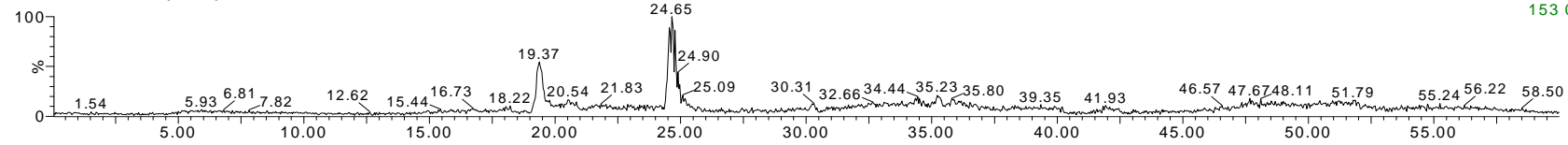


Şekil 4-46: T ekstresine ait LC/MS kromatogramı (I)

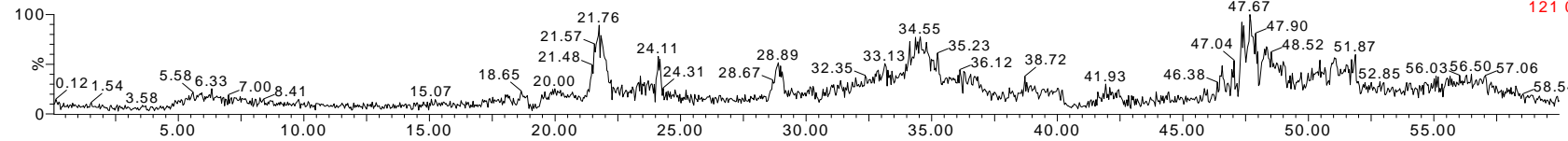
## T Metanol Ekstresi (Spektrum II)

2 mg/ 5 ml pufu

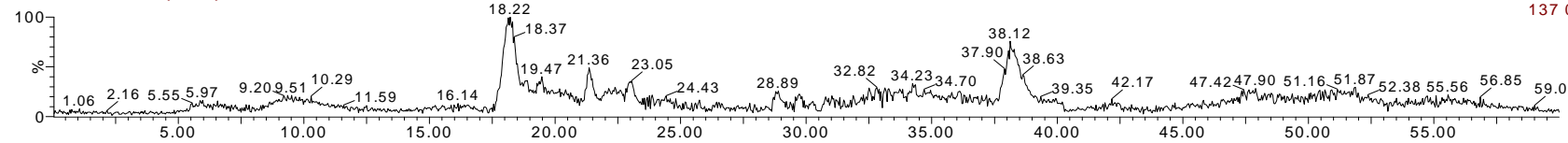
ekstrakt T fenolicke kyseliny



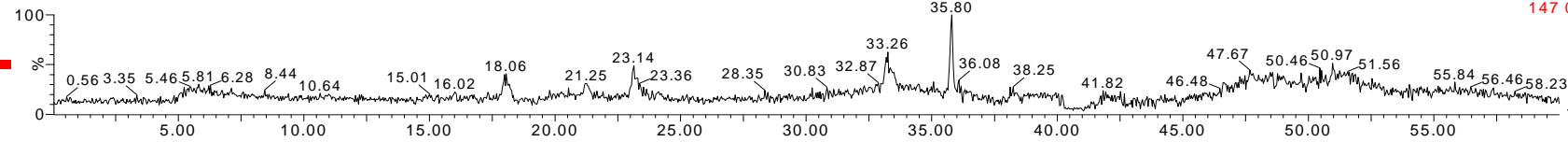
ekstrakt T fenolicke kyseliny



ekstrakt T fenolicke kyseliny



ekstrakt T fenolicke kyseliny

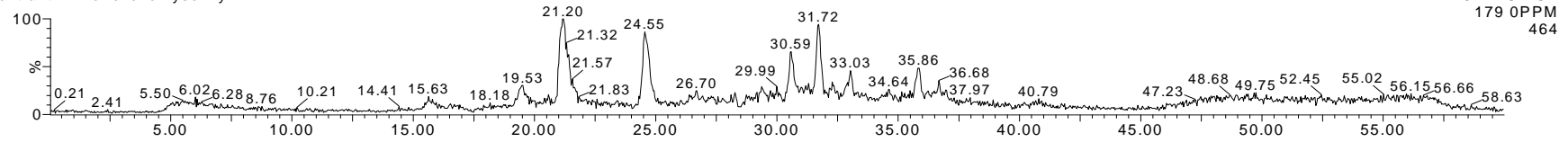


Şekil 4-47: T ekstresine ait LC/MS kromatogramı (II)

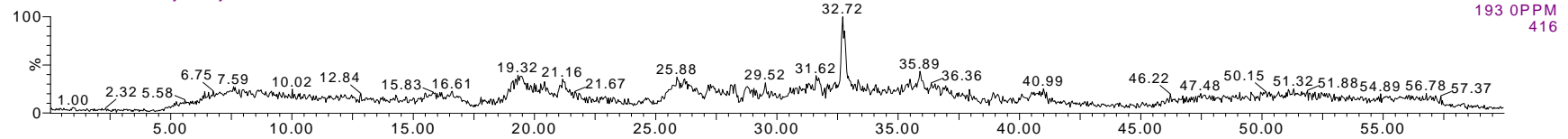
## YE Metanol Ekstresi (Spektrum I)

2 mg/ 5 ml pufuru

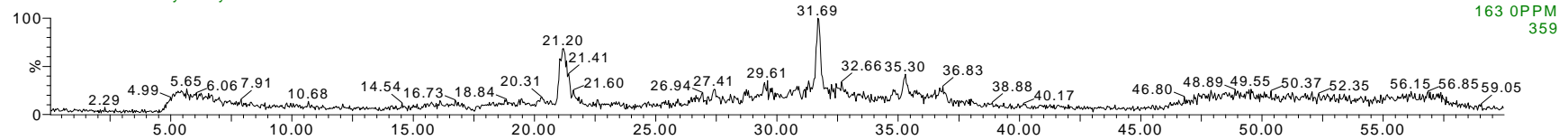
ekstrakt YE fenolicke kyseliny



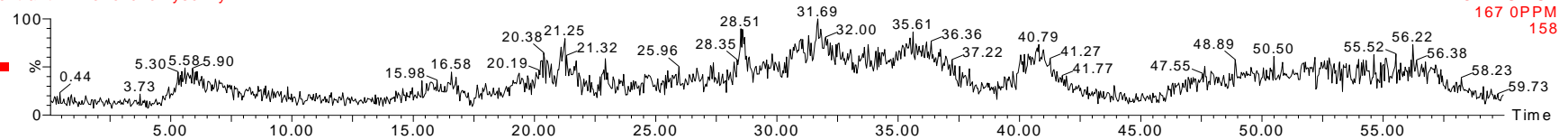
ekstrakt YE fenolicke kyseliny



ekstrakt YE fenolicke kyseliny



ekstrakt YE fenolicke kyseliny

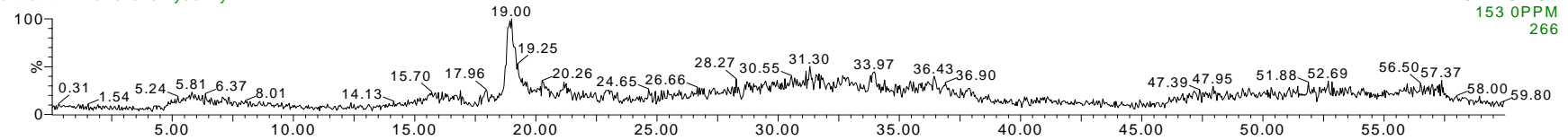


Şekil 4-48: YE ekstresine ait LC/MS kromatogramı (I)

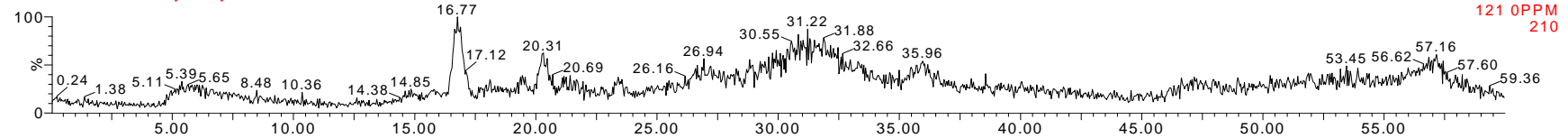
## YE Metanol Ekstresi (Spektrum II)

2 mg/ 5 ml pufu

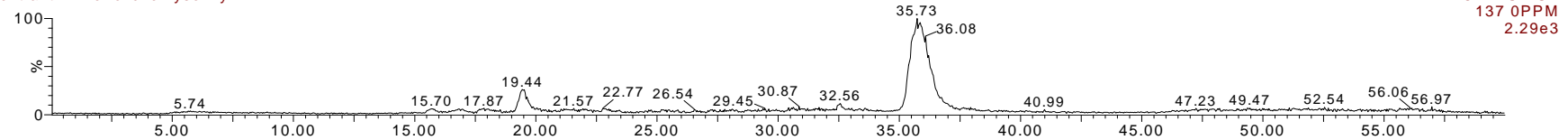
ekstrakt YE fenolicke kyseliny



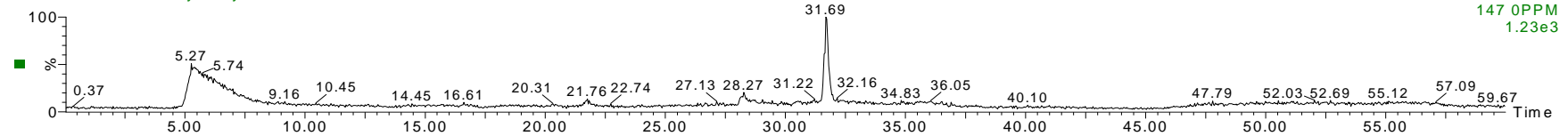
ekstrakt YE fenolicke kyseliny



ekstrakt YE fenolicke kyseliny



ekstrakt YE fenolicke kyseliny

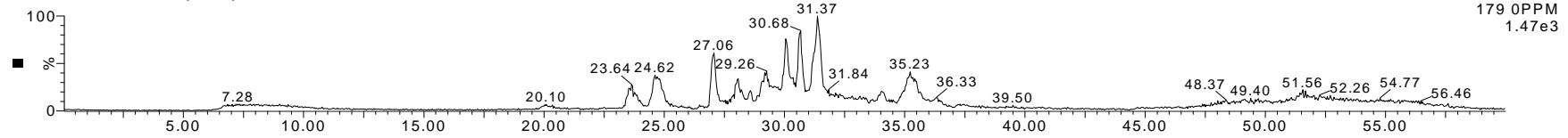


Şekil 4-49: YE ekstresine ait LC/MS kromatogramı (II)

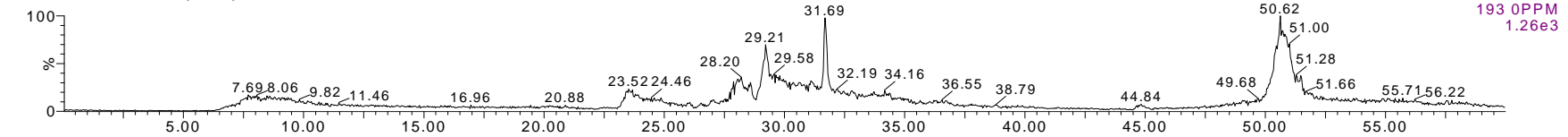
## YH Metanol Ekstresi (Spektrum I)

2 mg/ 5 ml pufu

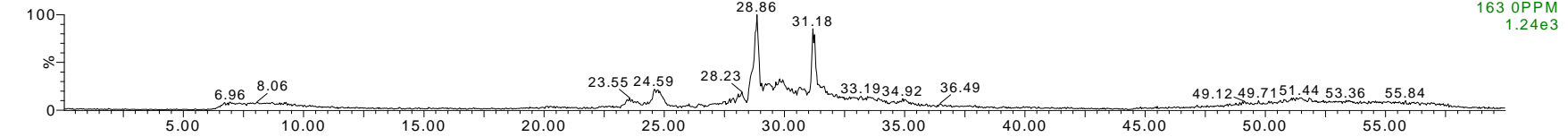
ekstrakt YH fenolicke kyseliny



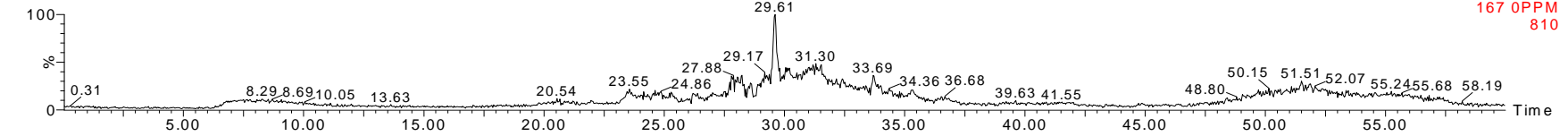
ekstrakt YH fenolicke kyseliny



ekstrakt YH fenolicke kyseliny



ekstrakt YH fenolicke kyseliny



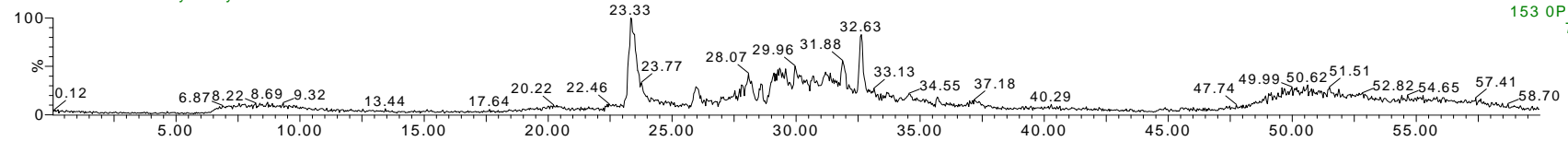
Şekil 4-50: YH ekstresine ait LC/MS kromatogramı (I)

## YH Metanol Ekstresi (Spektrum II)

2 mg/ 5 ml pufu

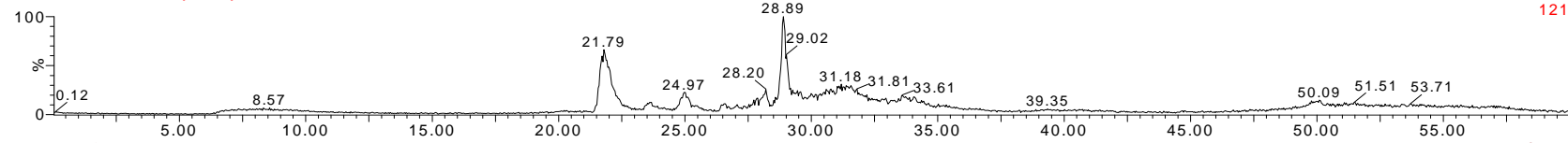
ekstrakt YH fenolicke kyseliny

2: TOF MS ES-  
153 0PPM  
740



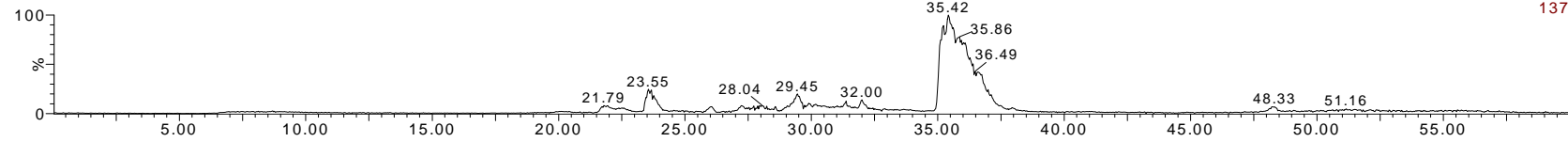
ekstrakt YH fenolicke kyseliny

2: TOF MS ES-  
121 0PPM  
1.58e3



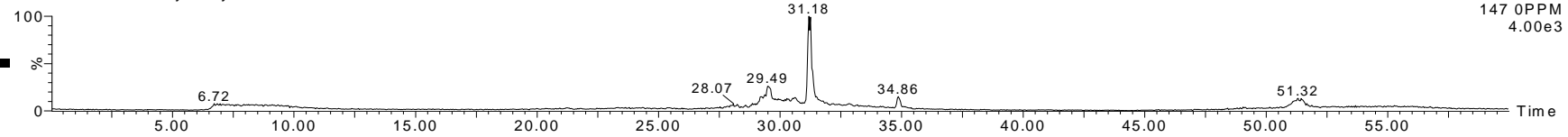
ekstrakt YH fenolicke kyseliny

2: TOF MS ES-  
137 0PPM  
5.78e3



ekstrakt YH fenolicke kyseliny

2: TOF MS ES-  
147 0PPM  
4.00e3



Şekil 4-51: YH ekstresine ait LC/MS kromatogramı (II)

## 4.6.Sitotoksik Aktivite Testi Sonuçları

### 4.6.1.Brine Shrimp Letalite Testi

Brine Shrimp Letalite Testinin değerlendirilmesi amacıyla her bir numune ve standart madde (kolşisin) için LD<sub>50</sub> değerleri hesaplanmıştır. Numunelerin her biri 3 ayrı konsantrasyonda hazırlanarak (100, 10 ve 1 µg/ml) 3 paralel deney yapılmıştır. LD<sub>50</sub> değerleri, hayatta kalan larva sayısı üzerinden “Finneya bilgisayar programı” kullanılarak hesaplanmıştır. Tablo 4-30’da her bir konsantrasyon için hayatta kalan larva sayıları belirtilmektedir.

**Tablo 4-30: 3 ayrı konsantrasyonda yapılan 3 paralel deney sonucu hayatta kalan larva sayısı**

	100 µg/ml			10 µg/ml			1 µg/ml		
<b>Kolşisin (K)</b>	0	0	0	0	0	1	2	3	1
<b>Ç</b>	3	4	2	10	9	10	10	10	10
<b>ÇS</b>	1	0	0	8	10	9	10	10	10
<b>Yp</b>	8	9	8	10	10	10	10	10	10
<b>T</b>	1	0	0	10	10	10	10	10	10
<b>YH</b>	0	2	3	8	7	6	10	10	10
<b>YE</b>	3	5	1	10	10	10	10	10	10

### **LD<sub>50</sub> Değerleri:**

$$LD_{50}(\mathbf{K}) = 0,1406 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{Ç}) = 57,9792 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{ÇS}) = 24.8582 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{Yp}) > 100 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{T}) = 36,2251 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{YH}) = 23,1961 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{YE}) = 65,5610 \mu\text{g/ml}$$

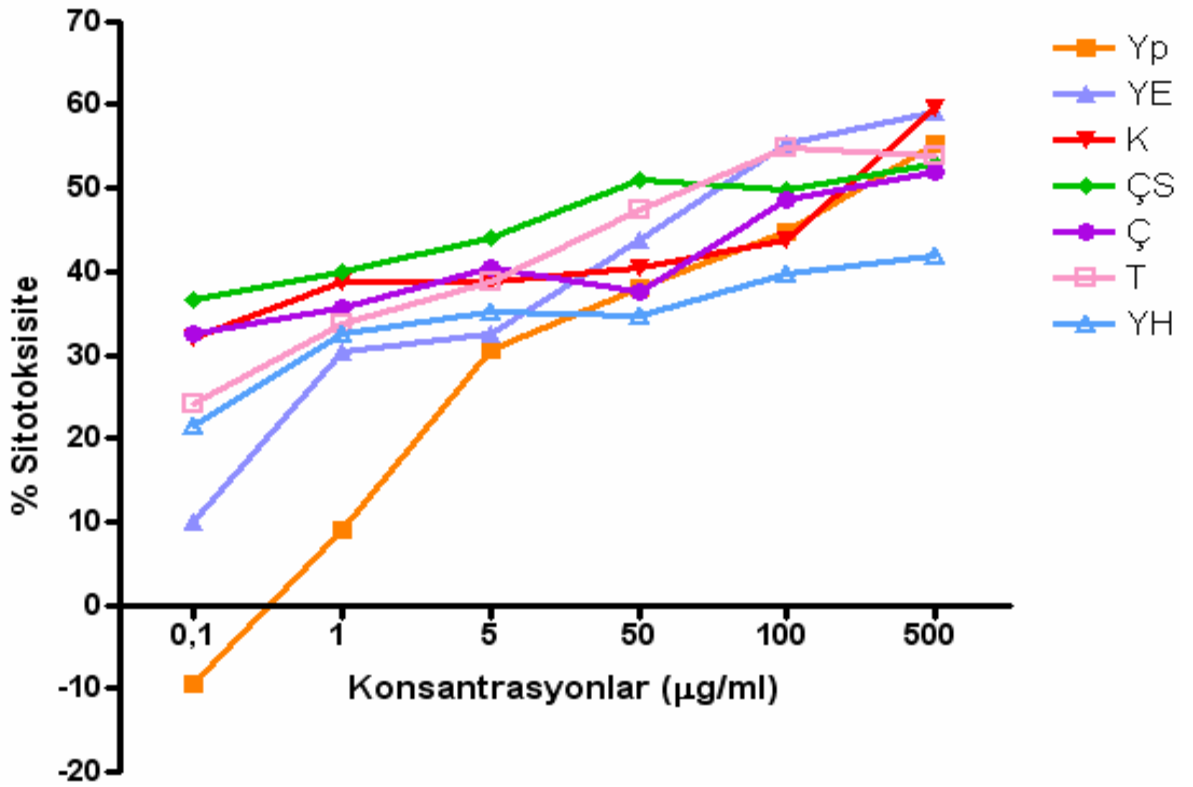
Hesaplanan LD<sub>50</sub> değerlerine göre tüm numunelerin sitotoksik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; sitotoksik aktivitesi en yüksek olan numunenin **YH**, en düşük olanın ise **Yp** olduğu görülmektedir.



#### 4.6.2.MTT Yöntemi ile Hücre Serileri Üzerinde Sitotoksik Aktivite Testleri

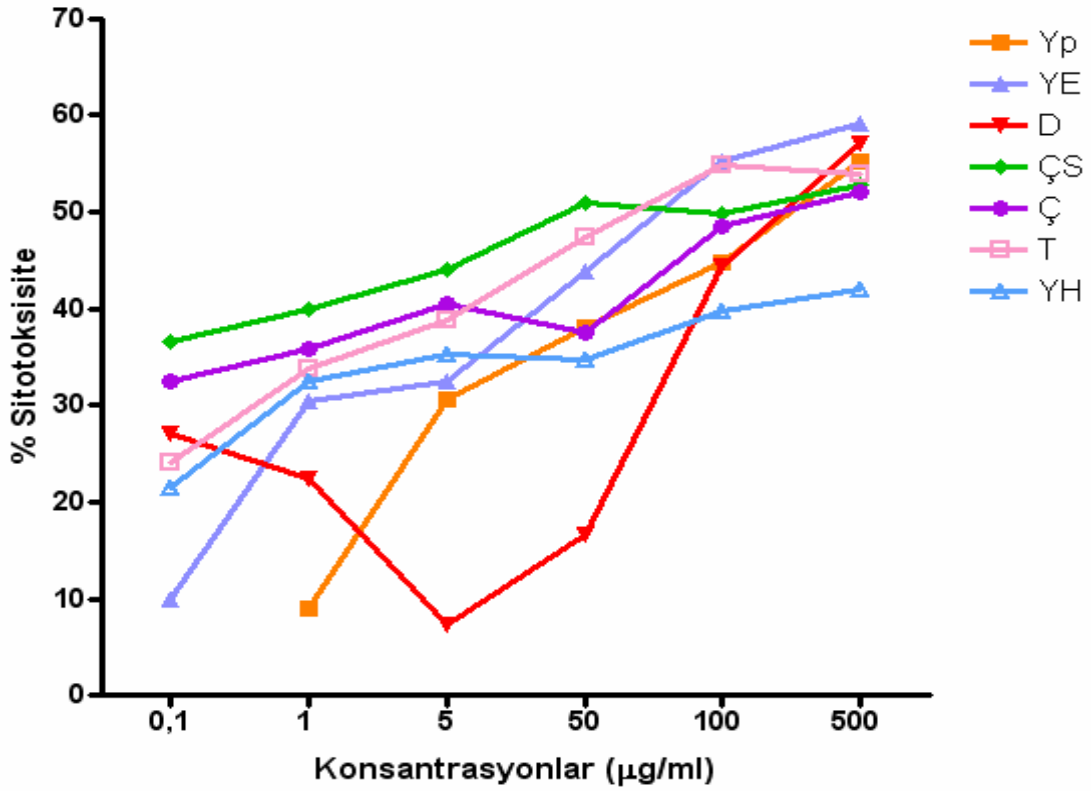
##### 4.6.2.1.K562 Hücre Serisi Üzerinde Aktivite Tayini

6 farklı konsantrasyondaki (500, 100, 50, 5, 1 ve 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) Ç, ÇS, Yp, T, YH, YE ekstreleri ile “kolşisin” ve “demekolsin” standartlarının K562 hücre serisi üzerinde doza bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik aktiviteleri Şekil 4-55 ve Şekil 4-56’de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-52: Kolşisin ve *C. baytopiorum* ekstrelerinin K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Ç= Çiçek, ÇS= Çiçek sapı, Yp= Yaprak, T= Tohum, YH=Yumru (Haziran), YE= Yumru (Ekim)



Şekil 4-53: Demekolsin ve *C. baytopiorum* ekstralarının K562 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Ç= Çiçek, ÇS= Çiçek sapı, Yp= Yaprak, T= Tohum, YH=Yumru (Haziran), YE= Yumru (Ekim)

Sitotoksik aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla, ELISA pleyt okuyucuda 540 nm dalga boyunda absorbans değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı, aynı zamanda ekstralardan alınan sonuçlar istatistiksel olarak Student-t testinde kolşisin ve demekolsin ile alınan sonuçlarla karşılaştırıldı. Bu değerlendirme ile ekstraların hangi konsantrasyonlarda kolşisinden ve demekolsinden istatistiksel açıdan anlamlı olarak daha yüksek (tabloda **koyu renkli** karakterler ile belirtildi) veya daha düşük etki (tabloda *italik* karakterler ile belirtildi) gösterdiği saptandı. Bu değerler Tablo 4-31’de verilmiştir.

**Tablo 4-31: K562 hücre serisi ile yapılan çalışmada *C. baytopiorum* ekstralarının 6 farklı konsantrasyondaki absorbanans ortalamaları ( $A_{ort}$ ), standart sapmalar (S), kolşisin ve demekolsin şahitleri ile değerlendirilen Student- t testi sonuçları**

Numune ve Konsantrasyonları		$A_{ort}$	S	t-testi Kolşisin	t-testi Demekolsin	Numune ve Konsantrasyonları		$A_{ort}$	S	t-testi Kolşisin	t-testi Demekolsin
Ç	1.	52,02	22,03	p>0,050	p>0,050	Yp	1.	55,25	2,51	p>0,050	p>0,050
	2.	48,57	15,00	p>0,050	p>0,050		2.	44,81	15,19	p>0,050	p>0,050
	3.	37,53	18,63	p>0,050	<b>p=0,020</b>		3.	38,14	17,78	p>0,050	<b>p=0,014</b>
	4.	40,56	21,59	p>0,050	<b>p=0,004</b>		4.	30,58	26,01	p>0,050	<b>p=0,017</b>
	5.	35,73	21,46	p>0,050	p>0,050		5.	8,95	19,45	<i>p=0,024</i>	p>0,050
	6.	32,41	25,96	p>0,050	p>0,050		6.	-9,46	22,87	<i>p=0,030</i>	<i>p=0,024</i>
ÇS	1.	52,83	26,65	p>0,050	p>0,050	T	1.	53,92	17,42	p>0,050	p>0,050
	2.	49,82	15,95	p>0,050	p>0,050		2.	54,83	18,08	p>0,050	p>0,050
	3.	50,90	19,99	p>0,050	<b>p=0,002</b>		3.	47,35	26,62	p>0,050	<b>p=0,018</b>
	4.	44,11	22,93	p>0,050	<b>p=0,003</b>		4.	38,75	21,68	p>0,050	<b>p=0,005</b>
	5.	40,01	14,32	p>0,050	<b>p=0,013</b>		5.	33,75	14,47	p>0,050	p>0,050
	6.	36,56	13,38	p>0,050	p>0,050		6.	24,03	20,45	p>0,050	p>0,050

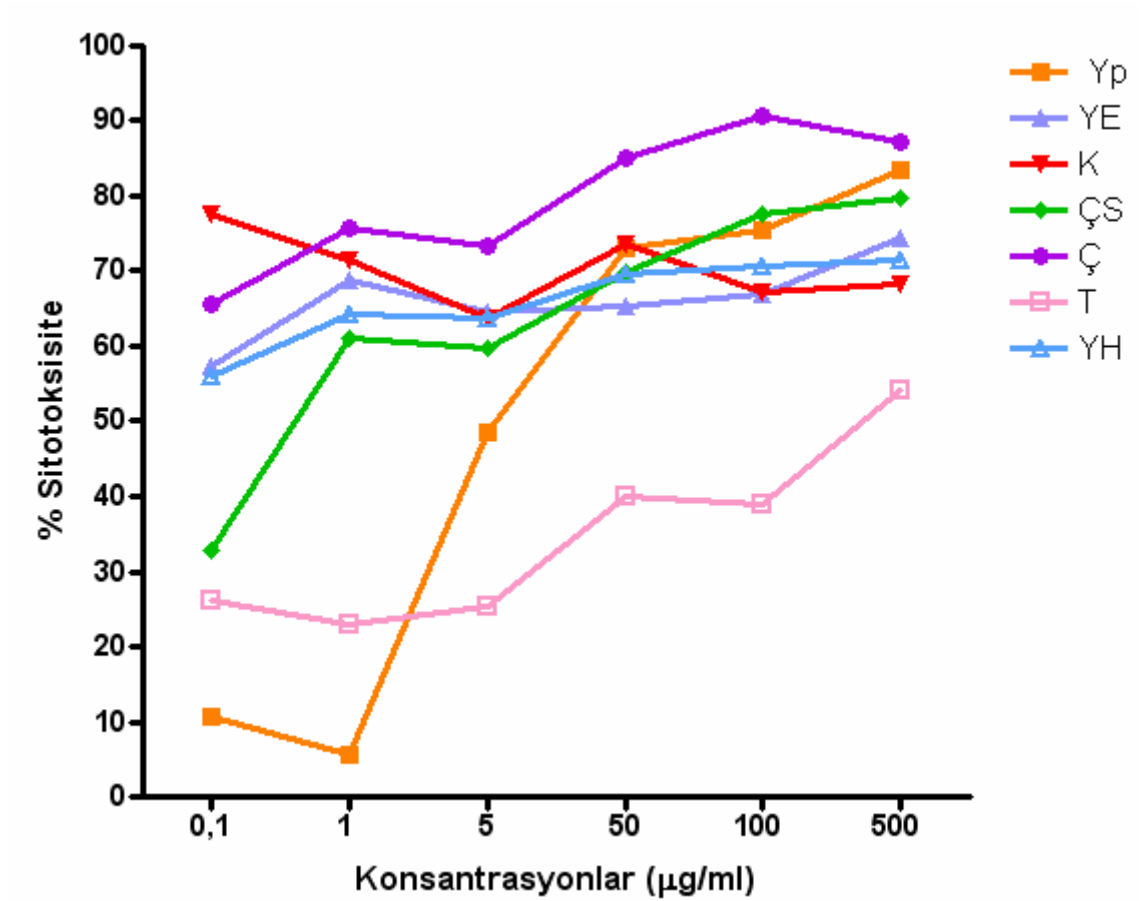
Numune ve Konsantrasyonları		A <sub>ort</sub>	S	t-testi Kolşisin	t-testi Demekolsin	Numune ve Konsantrasyonları		A <sub>ort</sub>	S
YE	1.	59,19	15,01	p>0,050	p>0,050	K	1.	59,57	9,39
	2.	52,27	9,55	p>0,050	<b>p=0,019</b>		2.	43,84	16,74
	3.	43,79	8,62	p>0,050	<b>p&lt;0,001</b>		3.	40,42	15,35
	4.	32,52	14,03	p>0,050	<b>p=0,001</b>		4.	38,68	14,78
	5.	30,47	11,98	p>0,050	p>0,050		5.	38,66	15,00
	6.	9,92	19,76	p>0,050	p>0,050		6.	32,02	20,00
YH	1.	41,96	23,63	p>0,050	p>0,050	D	1.	57,14	0,00
	2.	39,81	25,11	p>0,050	p>0,050		2.	44,40	18,08
	3.	34,72	17,05	p>0,050	<b>p=0,026</b>		3.	16,60	0,00
	4.	35,27	8,05	p>0,050	<b>p&lt;0,001</b>		4.	7,34	0,00
	5.	32,59	14,13	p>0,050	p>0,050		5.	22,39	0,00
	6.	21,49	10,59	p>0,050	p>0,050		6.	27,03	0,00

Tablo 4-31 (devamı)

**Koyu renkli karakterler anlamlı olarak yüksek, italik karakterler anlamlı olarak düşük konsantrasyonları ifade etmektedir.**

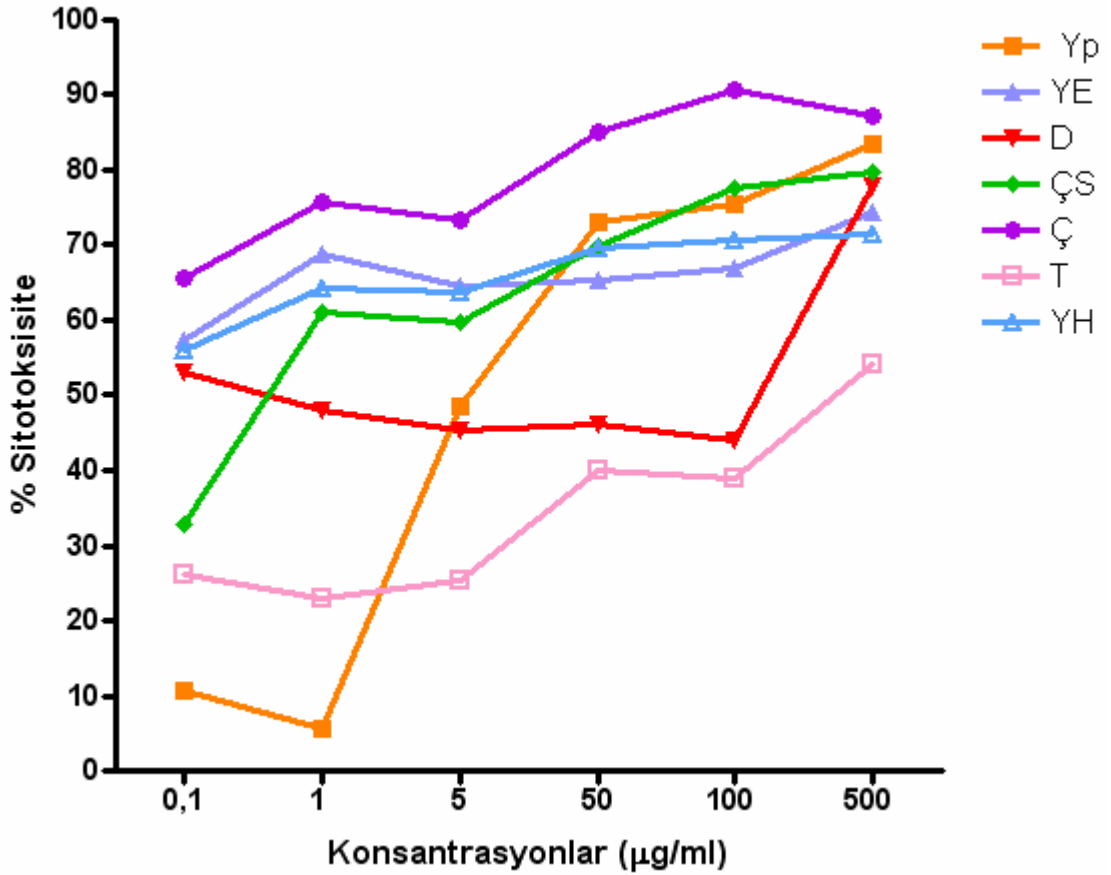
#### 4.6.2.2.HL60 Hücre Serisi Üzerinde Aktivite Tayini

6 farklı konsantrasyondaki (500, 100, 50, 5, 1 ve 0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) Ç, ÇS, Yp, T, YH, YE ekstreleri ile “kolşisin” ve “demekolsin” standartlarının HL60 hücre serisi üzerinde doza bağlı olarak göstermiş oldukları sitotoksik aktiviteleri Şekil 4-57 ve Şekil 4-58’de grafik olarak gösterilmiştir.



Şekil 4-54: Kolşisin ve *C. baytopiorum* ekstrelerinin HL60 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Ç= Çiçek, ÇS= Çiçek sapı, Yp= Yaprak, T= Tohum, YH=Yumru (Haziran), YE= Yumru (Ekim)



Şekil 4-55: Demekolsin ve *C. baytopiorum* ekstralarının HL60 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi

Ç= Çiçek, ÇS= Çiçek sapı, Yp= Yaprak, T= Tohum, YH=Yumru (Haziran), YE= Yumru (Ekim)

Sitotoksik aktivitenin değerlendirilmesi amacıyla, ELISA pleyt okuyucuda 540 nm dalga boyunda okunan absorbans değerlerinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı, aynı zamanda ekstralardan alınan sonuçlar istatistiksel olarak Student-t testinde kolşisin ile alınan sonuçlarla karşılaştırıldı. Bu değerlendirme ile ekstraların hangi konsantrasyonlarda kolşisinden anlamlı olarak daha yüksek ve ya daha düşük etki gösterdiği saptandı. Bu değerler Tablo 4-32’de verilmiştir.

Tablo 4-32: HL60 hücre serisi ile yapılan çalışmada *C. baytopiorum* ekstralarının 6 farklı konsantrasyondaki absorbans ortalamaları ( $A_{ort}$ ), standart sapmalar (S), kolşisin ve demekolsin şahitleri ile değerlendirilen Student-t testi sonuçları

Numune ve Konsantrasyonla		$A_{ort}$	S	t-testi Kolşisin	t-testi Demekolsin	Numune ve Konsantrasyonları		$A_{ort}$	S	t-testi Kolşisin	t-testi Demekolsin
Ç	1.	87,14	2,97	$p>0,050$	$p>0,050$	Yp	1.	83,29	5,49	<b><math>p=0,050</math></b>	$p>0,050$
	2.	90,56	4,01	<b><math>p&lt;0,001</math></b>	<b><math>p&lt;0,001</math></b>		2.	75,38	6,34	$p>0,050$	<b><math>p&lt;0,001</math></b>
	3.	84,93	6,12	<b><math>p=0,023</math></b>	<b><math>p&lt;0,001</math></b>		3.	73,12	3,11	$p>0,050$	<b><math>p&lt;0,001</math></b>
	4.	73,21	5,14	<b><math>p=0,022</math></b>	<b><math>p=0,006</math></b>		4.	48,52	4,27	$p=0,001$	$p>0,050$
	5.	75,74	5,29	$p>0,050$	$p>0,050$		5.	5,68	8,93	$p<0,001$	$p<0,001$
	6.	65,65	10,18	$p>0,050$	$p>0,050$		6.	10,77	10,86	$p=0,017$	$p>0,050$
ÇS	1.	79,69	9,69	$p>0,050$	$p>0,050$	T	1.	37,21	18,60	$p>0,050$	$p<0,001$
	2.	77,45	5,43	<b><math>p=0,029</math></b>	<b><math>p&lt;0,001</math></b>		2.	31,06	10,11	$p=0,006$	$p>0,050$
	3.	69,75	4,81	$p>0,050$	<b><math>p&lt;0,001</math></b>		3.	43,85	6,20	$p=0,001$	$p>0,050$
	4.	59,67	4,81	$p>0,050$	$p>0,050$		4.	30,90	8,31	$p=0,002$	$p>0,050$
	5.	70,00	6,72	$p=0,047$	<b><math>p=0,014</math></b>		5.	34,88	13,82	$p<0,001$	$p=0,001$
	6.	32,69	5,27	$p<0,001$	$p<0,001$		6.	28,41	4,37	$p<0,001$	$p<0,001$

Numune ve Konsantrasyonlar		A <sub>ort</sub>	S	t-testi Kolşisin	t-testi Demekolsin	Numune ve Konsantrasyonlar		A <sub>ort</sub>	S
YE	1.	74,63	4,46	p>0,050	p>0,050	K	1.	68,21	14,49
	2.	66,84	5,06	p>0,050	<b>p=0,001</b>		2.	67,10	5,04
	3.	65,40	5,82	p>0,050	<b>p=0,001</b>		3.	73,44	3,99
	4.	64,42	1,43	p>0,050	<b>p=0,024</b>		4.	63,78	2,41
	5.	68,62	4,27	p>0,050	<b>p&lt;0,001</b>		5.	71,33	3,92
	6.	57,18	16,59	p>0,050	p>0,050		6.	77,67	2,35
YH	1.	71,39	2,31	p>0,050	<i>p=0,007</i>	D	1.	77,71	2,55
	2.	70,53	2,41	p>0,050	<b>p&lt;0,001</b>		2.	44,04	6,56
	3.	69,55	5,41	p>0,050	<b>p&lt;0,001</b>		3.	46,01	4,29
	4.	63,57	3,25	p>0,050	<b>p=0,033</b>		4.	45,40	17,38
	5.	64,24	5,63	p>0,050	<b>p=0,002</b>		5.	47,85	1,43
	6.	55,88	6,12	<i>p&lt;0,001</i>	p>0,050		6.	53,03	2,10

Tablo 4-33 (devamı)

Koyu renkli karakterler anlamlı olarak yüksek, italik karakterler anlamlı olarak düşük konsantrasyonları ifade etmektedir.



***LD<sub>50</sub> Değerleri:******K562 Hücre Serisinde Saptanan LD<sub>50</sub> Değerleri***

Kolşisin ve demekolsin şahitleri ve ekstrelerin K562 hücreleri üzerindeki LD<sub>50</sub> değerleri hesaplanarak aşağıda belirtilmiştir.

$$LD_{50}(\mathbf{K}) = 247 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{Yp}) = 300 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{D}) = 286 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{T}) = 70 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{Ç}) = 233,3 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{YE}) = 76,6 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{ÇS}) = 44 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{YH}) > 500 \mu\text{g/ml}$$

***HL60 Hücre Serisinde Saptanan LD<sub>50</sub> Değerleri***

Kolşisin ve demekolsin şahitleri ve ekstrelerin HL60 hücreleri üzerindeki LD<sub>50</sub> değerleri hesaplanarak aşağıda belirtilmiştir.

$$LD_{50}(\mathbf{K}) < 0,1 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{Yp}) = 6,5 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{D}) = 180 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{T}) = 394 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{Ç}) < 0,1 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{YE}) < 0,1 \mu\text{g/ml}$$

$$LD_{50}(\mathbf{ÇS}) = 0,6 \mu\text{g/m}$$

$$LD_{50}(\mathbf{YH}) < 0,1 \mu\text{g/ml}$$

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, 10.07.2003 ve 20.10.2003 tarihlerinde Antalya Termessos'tan toplanan ve endemik bir tür olan *Colchicum baytopiorum* C.D.Brickell [Liliaceae (Colchicaceae)] bitkisi, anabilim dalımızda *Colchicum* türleri üzerinde ilki 1970 yılında Prof.Dr. T Baytop ve G (Özcöbek) Sarıyar tarafından başlatılan ve N Sütlüpinar tarafından sürdürülen çalışmaların devamı doğrultusunda kimyasal ve biyolojik aktivite açısından araştırılmıştır. Bitkinin çiçek, çiçek sapı, yaprak, tohum ve yumruları (Haziran ve Ekim) ayrı ayrı çalışılmış ve her bir kısım için elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

Daha önce *Colchicum baytopiorum* türünün de aralarında yer aldığı Türkiye'de yetişen 10 *Colchicum* türünün tohum ve yumruları üzerinde spektrofotometrik yöntem ile total alkaloit miktar tayini ve HPLC (Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi) yöntemi ile kolşisin, kolşikozit ve demekolsin miktar tayini çalışması yapılmıştır (114). Bizim çalışmamızın bir bölümünde de bitkinin her bir kısmı için spektrofotometrik yöntemle total alkaloit miktar tayini yapılmıştır. Total alkaloit miktar tayini sonuçları, daha önceki çalışmalarla uyumlu olmakla birlikte tohumların içerdiği alkaloit miktarının % 0,3 yumrunun (Haziran) ise % 0,18 daha düşük olduğu görülmüştür. Bu durum bitki gelişiminin alkaloitlere olan etkisi ile açıklanabilir. Çünkü *Colchicum* türlerinin içermiş olduğu alkaloitlerin miktar ve çeşitliliğinin yükseklik ve mevsimle farklılık gösterdiği, aynı bitki topluluğundan toplanan fertlerde bile etken madde miktarlarında farklılıkların görüldüğü literatürde kayıtlıdır (115). Genel olarak *Colchicum* türlerinde yaprakların, çiçeklerden yaklaşık 15 kat daha az kolşisin içerdiği, yumruların en yüksek alkaloit verimine yaprakların belirlediği zamanda ulaştığı bilinmektedir (41, 115). Yapılan miktar tayini sonuçlarında en yüksek alkaloit miktarının çiçek, en düşük miktarın ise Yumru (Ekim) olması bu bilgilerle uyusmaktadır. Alkaloit miktar tayini sonuçlarına göre bitkinin çiçeklerinin % 5,27, çiçek sapının % 2,96, yapraklarının % 1,96, tohumlarının % 0,85, Haziran dönemi yumrularının % 0,69 ve Ekim dönemi yumrularının % 0,50 oranında alkaloit içerdiği saptanmıştır.

Bitkinin her bir kısmından ayrı metanol ekstresi hazırlanmıştır. Metanol ekstralarının bir kısmı üzerinde alkaloid tüketmesi yapılarak A (nötral fenolik), B (bazik) ve C (glikozidik) ekstraları elde edilmiş diğer kısım ise fenolik asitlerin ayırımı ve biyolojik aktivite deneylerinin yapılmasında kullanılmıştır. Miktarları çok düşük olan C ekstraları çalışılmamıştır. Alkaloid izolasyonu sadece, A ekstraları başta olmak üzere miktarı en yüksek olan Çiçek Sapı B (ÇS-B) ekstresinde yapılmıştır. İzole edilen maddelerin miktarca uygun olanlarının UV, IR, <sup>1</sup>H NMR, ve Mass spektrumları ile yapıları aydınlatılmıştır. Miktarca çok düşük olan bazı maddeler ise sadece İTK yöntemi ile karşılaştırılmış, böylece bitkinin her bir kısmında bulunan alkaloidler belirlenmiştir.

*Colchicum baytopiorum* türünden toplam olarak 9 bilinen alkaloid elde edilmiştir. Bu alkaloidler; kolşisin, 2-demetilkolşisin, 3-demetilkolşisin, N-formil-N-deasetil-3-demetilkolşisin, 2-demetil-γ-lumikolşisin, kolşifolin, 2-demetilkolşifolin, demekolsin ve 2-demetildemekolsin olarak teşhis edilmiştir. Bunların yanı sıra elde edilen metanol ekstralarının MS/MS analizleri sonucunda bitkide kornigerin, N-formil-N-deasetil kolşisin ve 3-demetildemekolsin alkaloidlerinin varlığı da saptanmıştır. Daha önce yumru ve tohumların miktar tayini üzerinde yapılan çalışmada kolşikozit varlığı saptanmışsa da (117), C ekstraları üzerinde izolasyon çalışması yapılmadığından bu çalışmada kolşikozit elde edilememiştir. Sonuç olarak bu türde, daha önce yapılan çalışmalar da değerlendirilerek, 12 adet tropolon ve 1 adet lumi türevi olmak üzere 13 adet alkaloidin varlığı saptanmıştır.

Bitkinin her bir kısmında bulunan alkaloidler Tablo 5-1’de gösterilmektedir.

**Tablo 5-1: *C.baytopiorum* türünün farklı kısımlarında varlığı saptanan alkaloidler**

Ç	ÇS	Yp
Kolşisin	Kolşisin	Kolşisin
3-demetilkolşisin	N-deasetil-N-formilkolşisin	3-demetilkolşisin
Kolşifolin	Kolşifolin	N-formil-N-deasetil-3-demetil kolşisin
2-demetilkolşifolin	Kornigerin	2-demetil-γ-lumikolşisin
Demekolsin	Demekolsin	Kornigerin
2-demetildemekolsin	2-demetildemekolsin	2-demetilkolşifolin
3-demetildemekolsin	3-demetildemekolsin	Demekolsin
		2-demetildemekolsin
		3-demetildemekolsin
T	YH	YE
Kolşisin	Kolşisin	Kolşisin
2-demetilkolşisin	Kornigerin	2-demetilkolşisin
Kolşifolin	Demekolsin	Kolşifolin
Kornigerin	2-demetildemekolsin	Kornigerin
Demekolsin	3-demetildemekolsin	Demekolsin
2-demetildemekolsin	Kolşikozit	3-demetildemekolsin
3-demetildemekolsin		
Kolşikozit		

Ç= Çiçek, ÇS= Çiçek sapı, Yp= Yaprak, T= Tohum, YH=Yumru (Haziran), YE= Yumru (Ekim)

Tüm bu bulgular sonucunda bitkide alkaloid çeşitliliğinin en fazla olduğu kısmın yaprak olduğu görülmüştür.

Tropolon alkaloidi yapısındaki maddelerin UV spektrumlarında 350 ve 256 nm civarındaki absorpsiyon pikleri lumi türevlerinde 340 nm ve 263 nm'de gözlenmektedir. (43, 106).

Tropolon yapısında olan alkaloidlerin <sup>1</sup>H NMR spektrumlarında kolşisin, demekolsin, lumi, kolşifolin ve türevleri gösterdikleri bazı küçük farklılıklarla birbirlerinden ayrılırlar. 1, 2, ve 10. karbonlara bağlı bulunan – OCH<sub>3</sub> pikleri 3,55-4,00 ppm de 3 protonluk singlet verirler. Genel olarak 1. karbona bağlı –OCH<sub>3</sub> en

yukarı alanda, 10. karbona bağlı – OCH<sub>3</sub> ise en aşağı alanda gözlenmektedir. 2. karbona bağlı bulunan – OCH<sub>3</sub> ise, 3. karbona bağlı bulunandan daha yukarı alanda yer alır. 4. ve 8. karbona bağlı protonlar aromatik sahada 1 protonluk singlet verirler. 8. karbonun protonunu belirten pik daha aşağı alanda gözlenir. 7. karbona ait proton 4,65 ppm civarında multipler verir. Azot 7. karbona bağlıdır ve asetamid yapısındaki – CH<sub>3</sub> den dolayı 1,90-2,00 ppm de 3 protonluk bir singlet görülür. 11 ve 12. karbona bağlı protonlar, aromatik sahada verdikleri (J=10) dubletlerle tanınırlar. 12. karbona ait dublet daha yukarı alanda gözlenir (1, 5, 7, 79).

2- ve 3-demetil türevlerinde 2. ve 3. karbona bağlı – OCH<sub>3</sub> pikleri görülmez ve spektrumda 3,55-4,00 ppm'de gözlenen 3 protonluk singletlerden birinin eksik olduğu dikkati çeker. N-deasetil-N-formil türevlerinde ise, kolşisin türevlerinde 1,90-2,00 ppm de gözlenen 3 protonluk pik görülmez. Ancak N'a aldehit grubu bağlandığından 8,10-8,15 ppm civarında 1 protona karşılık gelen singlet dikkati çeker.

Kolşifolin ve türevlerinde C-7 protonu kolşisin türevlerinde olduğu gibi 4,65 ppm civarında multipler verir, ancak 1,90-2,00 ppm de gözlenen 3H singlet ortadan kalkmıştır.

Demekolsin türevlerinin NMR spektrumunda göze çarpan ilk özellik -NCH<sub>3</sub> grubunun metilinden kaynaklanan 2,20 ppm civarına kaymış 3H singlettir. C-7 ye bağlı protonun vermiş olduğu multipler ise kolşisin ve kolşifolinden farklı olarak 4,65 ppm de değildir ve 3,30 ppm'e kaymıştır.

Lumi türevlerinin <sup>1</sup>H NMR spektrumlarında ise tropolon halkası bulunmadığından C-12 de yer alan proton 4,05 ppm (J=1 Hz) civarında dublet verir. C-8 de bulunan proton 3,59 ppm (J=1 Hz) civarında yine dublet olarak görülür. Aromatik sahadaki C-11 protonu bir dublet, C-4 protonu ise 1H singlet vermektedir (79).

IR spektrumu alınan tropolon alkaloidlerinde 3440 cm<sup>-1</sup> de gözlenen N-H piklerinin yanı sıra 2945-2845 cm<sup>-1</sup>de metilen ve metoksi gruplarını işaret eden frekanslar görülür (43). 1715-1675 cm<sup>-1</sup> pikleri amide bağlı karbonili (40, 43) ve 1602-1617 cm<sup>-1</sup> pikleri tropolon karbonilini göstermektedir (43). Şahit maddeler ile üst üste alınan IR spektrumları birbiriyle ve literatür verileri ile uyumludur (57).

ESI/MS spektrumu alınan maddelerden sadece kolşisin ve demekolsinin spektrumlarında  $[M+1]^+$  piki gözlenirken diğer maddelerde  $[M+Na]^+$  pikleri görülmüştür.

Bitkinin her bir kısmından hazırlanan eter ekstreleri üzerinde, flavon bileşiklerinin saptanması amacıyla çalışılmıştır. Shibata deneyi ve İTK uygulamaları sonucunda flavon izolasyonu açısından ÇS eter ekstresinin kullanılmasına karar verilmiş, *C. baytopiorum* çiçek sapından apigenin ve luteolin isimli iki flavon bileşiği elde edilmiştir. Bitkinin diğer kısımlarından hazırlanan eter ekstreleri ile elde etmiş olduğumuz maddeler çeşitli çözücü sistemlerinde ince tabaka ve kağıt kromatografisi yöntemleri ile karşılaştırılmış ve yaprak ekstresinde de her iki flavon bileşiğinin varlığı tespit edilmiştir. Çiçek ekstresinde ise sadece apigenin varlığı saptanmış, Tohum ve Yumru (Haziran ve Ekim) ekstrelerinde flavon bileşiği bulunamamıştır.

Elde edilen flavon bileşiklerinin yapısı, kaydırma belirteçleri ile alınan UV spektrumları, şahit maddeleri ile çeşitli çözücü sistemlerinde ince tabaka ve kağıt kromatografisinde karşılaştırılmaları ve şahitlerle üst üste alınan IR spektrumları sonucunda aydınlatılmıştır. Kaydırma belirteçleri ile alınan UV spektrumları literatür verileri ile uygunluk göstermektedir (75). IR spektrumlarında  $1653\text{ cm}^{-1}$  karbonil ve  $3445\text{-}3446\text{ cm}^{-2}$  hidroksi piklerinin varlığı görülmektedir (40). Şahit maddeler ile üst üste alınan spektrumlar birbiriyle uyumludur.

Fenolik asitlerin varlığı LC/MS yöntemi ile belirlenmiş ve bitkinin her bir kısmında benzoik, kumarik, vanilik, sinnamik, ferulik, kafeik asitler, 2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit, 4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit, 2,5-dihidroksibenzoik asit, 2-idroksibenzoik asit ve 4-hidroksibenzoik asit olmak üzere toplam 11 fenolik asidin varlığı saptanmıştır.

*C. baytopiorum* türünün ayrılan kısımlarında saptanan fenolik asitler Tablo 5-2' de gösterilmiştir.

**Tablo 5-2: *C.baytopiorum* türünün farklı kısımlarında varlığı saptanan fenolik asitler**

Fenolik asitler	Ç	ÇS	Yp	T	YE	YH
Vanilik asit	-	-	?	?*	-	-
Kumarik asit	-	+	-	+	+	?
Ferulik asit	-	?	-	+	-	?
Kafeik asit	-	+	?	-	+	+
Sinamik asit	?	?	?	?	?	?
Benzoik asit	-	+	+	+	+	+
2-hidroksibenzoik asit	?*	?*	?*	?*	?*	?*
4-hidroksibenzoik asit	?*	?*	?*	?*	?*	?*
2,5-dihidroksibenzoik asit	-	-	+	+	+	+
2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit	-	-	?	?*	-	-
4-hidroksi-3-metoksibenzoik asit	-	-	?	?*	-	-

(+) = var, (-) = yok, ?= doğrulanamadı , ?\*= bir ya da daha fazla türevi halinde

Kolşisinin kuvvetli antitümoral etkiye sahip olmasına rağmen terapötik indeksinin çok düşük olmasının tedavide bu amaçla kullanımını engellediği bilinmektedir. Demekolsin ise kolşisinden daha az toksiktir ve özellikle miyeloid lösemi ve Hodgkin hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır.

Kolşisin ve türevleri üzerinde bir çok sitotoksik aktivite çalışması bulunmasına rağmen ekstre bazında böyle çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada bitkinin her bir kısmı kendi içinde bir bütün olarak incelendiği için, her kısmın göstermiş olduğu sitotoksik etkinin de belirlenmesi düşünülmüştür. Bu doğrultuda öncelikle her kısımdan elde edilen metanol ekstraları üzerinde Brine Shrimp deneyi ile bir ön inceleme yapılmış ve tüm ekstraların aktif olduğu gözlenmiştir. Bu deney sonucunda ekstraların LD<sub>50</sub> değerleri hesaplanmış ve veriler kolşisin şahidinin değeri ile karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak, ekstraların tümünün kolşisinden daha düşük olmakla birlikte yüksek sitotoksik aktiviteye sahip olduğu, en sitotoksik ekstre YH, düşük sitotoksikite gösterenin ise Yp ekstresi olduğu görülmüştür.

Daha ileriki aşamada K562 (miyeloid lösemi) ve HL60 (promiyeloid lösemi) hücre serilerinde tüm ekstraların göstermiş oldukları sitotoksikite, kolşisin ve demekolsin şahitleri ile ve birbirleriyle karşılaştırılmış; saptanan bulguların

istatistiksel verileri kolşisin ve demekolsin şahitleri ile ayrı ayrı Student-t testi ile değerlendirilmiş ve sonuçlar karşılaştırılarak istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek aktivite gösteren ekstreler ve konsantrasyonları belirlenmiştir. K562 hücreleri üzerinde yapılan çalışmada ekstreler kolşisin ile karşılaştırıldığında, ekstrelerden hiçbirinin istatistiksel açıdan anlamlı olarak kolşisinden daha yüksek bir aktivite göstermediği saptanmıştır. Ancak LD<sub>50</sub> değerleri ve grafik göz önüne alındığında ÇS ekstresinin en yüksek aktiviteyi gösterdiği görülmektedir. Grafik ve LD<sub>50</sub> değerleri incelendiğinde en düşük aktiviteyi pek çok konsantrasyonda Yp ve YH ekstresinin gösterdiği görülmektedir.

Yine K562 hücrelerinde tüm ekstrelerin aktivitesi demekolsin şahidi ile karşılaştırıldığında Student-t testi sonuçları Ç ekstresinin 3. ve 4., ÇS ekstresinin 3.,4. ve 5., T ekstresinin 3. ve 4., YE ekstresinin 2., 3., 4. ve YH ekstresinin 3., 4. konsantrasyonlarının istatistiksel açıdan anlamlı olarak demekolsin şahidinden daha yüksek aktiviteye sahip olduklarını göstermiştir. LD<sub>50</sub> değerleri ve grafik incelendiğinde yüksek aktiviteyi yine ÇS ekstresinin, en düşük aktiviteyi ise Yp ve YH ekstrelerinin gösterdiği görülmektedir.

HL60 hücre serisinde ekstreler, kolşisin ve demekolsin şahitleri ile yine Student-t testi ile değerlendirilmiştir ve kolşisin ile yapılan Student-t testi verilerine göre, Ç ekstresinin 2., 3. ve 4., ÇS ekstresinin 2., Yp ekstresinin 1. konsantrasyonu anlamlı olarak kolşisinden daha yüksek aktivite göstermiştir. Demekolsin şahidi ile t-testinde karşılaştırıldıklarında ise Ç ve ÇS ekstrelerinin 2., 3. ve 4., Yp ekstresinin 2., 3., YE ve YH ekstrelerinin 2., 3., 4., ve 5. konsantrasyonları anlamlı olarak demekolsinden daha yüksek sitotoksikite göstermiştir. LD<sub>50</sub> değerleri ve grafik incelendiğinde de en yüksek aktiviteyi Ç ekstresinin en düşük aktiviteyi ise yine T ekstresinin gösterdiği görülmektedir.

Sonuçta ekstrelerin, genel olarak HL60 hücrelerine karşı K562 hücrelerine göre daha sitotoksik oldukları, T ve Yp hariç tüm ekstrelerin HL60 hücreleri üzerinde kolşisine benzer aktivite gösterdikleri; K562 hücreleri üzerinde ise ekstrelerin hepsinin kolşisine yakın, demekolsinden daha sitotoksik aktivite gösterdikleri saptanmıştır.

Biyolojik aktivite sonuçları, alkaloitler üzerinde yapılan kimyasal çalışmalarla birlikte değerlendirildiğinde, total alkaloit miktarı açısından zengin olan Ç ve ÇS



ekstrelerinin hem K562 hem de HL60 hücreleri üzerinde en yüksek aktiviteyi göstermeleri normaldir. Yp ekstresinin de her iki hücre türüne karşı düşük aktivite göstermesi total alkaloid miktarının çok fazla olmaması, kolşisin miktarının genellikle yaprakta çiçekten çok daha az olması ve alkaloid çeşitliliğinin fazla olması ile açıklanabilir. Bu durum yaprak ekstresinde çeşitliliğin fazla ancak kolşisin miktarının düşük olduğunu ve bulunan diğer alkaloidlerin de kolşisinden düşük etkili olabileceğini düşündürmektedir. Tohum ekstresinden elde edilen sonuçlar ise ilginçtir. Çünkü diğer ekstrelerin aksine T ekstresi K562 hücrelerine karşı daha etkilidir. Total alkaloid açısından yumru ekstrelerine yakın olmasına ve içermiş olduğu demekolsin miktarının yüksek olmasına rağmen K562 hücrelerine karşı kolşisine yakın bir etki göstermiş olması bu ekstrede bulunan diğer maddeler ile etkileşimi sonucunda böyle bir etkinin meydana gelebileceğini düşündürmektedir. T metanol ekstresi saptanan fenolik asitler açısından da çeşitliliğin en fazla olduğu ekstrelerdir.

Kemotaksonomik açıdan bir değerlendirme yapıldığında, bitkiden sadece tropolon sınıfı alkaloidler elde edilmiş; bunun dışında, bir flavon bileşiği olan luteolin ile fenolik asitlerden kafeik asit ve sadece Wurmbaeoideae alt familyası bitkilerinde bulunan 2-hidroksi-6-metoksibenzoik asit veya türevlerinin varlığı saptanmıştır. Elde edilen diğer bir alkaloid olan 2-demetil- $\gamma$ -lumikolşisin'in ise bozunma ürünü olma ihtimali bulunduğundan kemotaksonomik açıdan öneme sahip değildir (92, 99).

Elde edilen sonuçlar, *C. baytopiorum* türünün alkaloid çeşitliliği ve miktarı açısından zengin bir tür olduğunu göstermektedir. Bitkinin çalışılan farklı kısımları bu açıdan değerlendirildiğinde, çiçek ve çiçek sapı en yüksek total alkaloid miktarına sahipken, alkaloid çeşitliliği açısından en zengin kısmın yapraklar olduğu saptanmıştır.

## KAYNAKLAR

1. Abu-Zarga MH, Sabri SS, Al-Tel TH, Atta-ur-Rahman ZS, Feroz M. New natural dibenzocycloheptylamine alkaloids: a possible catabolic route for colchicine alkaloids. *J Natl Prod* 1991; **54** (4): 936-940.
2. Aisen PS, Marin D, Davis KL. Anti-inflammatory drug studies in Alzheimer's disease. *Biological Psychiatry* 1996; **39** (7): 563.
3. Aisen PU, Marin DB, Brichtman AM, Santoro J, Fuscú M. Pilot tolerability studies of hydroxychloroquine and colchicine in Alzheimer disease. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 2001; **15** (2): 96-101. [CA 135:266855]
4. Akan H, Eker İ. Check-list of the genus *Colchicum* in the Flora of Turkey. *Turk J Bot* 2005, **29**: 327-331.
5. Alali FQ, El-Elimat T, Li C, Qandil A, Alkofahi A, Tawaha K ve ark. New colchicinoids from a native Jordanian meadow saffron *Colchicum brachyphyllum* isolation of the first naturally occurring dextrorotatory colchicinoid. *J Nat Prod* 2005; **68**: 173-178.
6. Al-fayyad M, Alali F, Alkofahi A, Tell A. Determination of colchicine content in *Colchicum hierosolymitanum* and *Colchicum tunicatum* under cultivation. *Nat Prod Lett* 2002; **16** (6): 395-400.
7. Al-Tel TH, Zarga MHA, Sabri SS, Feroz M, Fatima N, Shah Z ve ark. Phenolics from *Colchicum decaisnei*. *Phytochemistry* 1991; **30** (9): 3081-3085.
8. Al-waitz MM, Sharquie KE, A-Qaissi MH, Hayani R. Colchicine and benzathine penicillin in treatment of Behçet disease: a case comparative study. *Dermatology Online Journal* 2005; **11** (3).
9. Andreu JM, Timasheff SN. Interaction of tubulin with single ring analogues of colchicine. *Biochemistry* 1982; **21** (3): 534-43.

10. Atasoy AH, Ünal AE, Emre U, Sümer M, Koca R, Kılıçarslan MD. Gastrocnemius H reflex responses and nerve conduction studies in patients with Behçet's disease. *J Neurological Sciences* 2005; **22** (2): 186-194.
11. Baloglu E. *Synthesis and biological evaluation of paclitaxel analogs*. Blacksburg Virginia: Doctor of Philosophy in Chemistry (PhD Thesis); 2001.
12. Barker AC, Julian DR, Ramage R, Woodhouse RN, Hardy G, McDonald E ve ark. Biosynthesis. Part 28. Colchicine: definition of intermediates between O-methylandrocybine and colchicine and studies on speciosine. *J Chem Soc Perkin Trans* 1998; **1**: 2983-2989.
13. Basut O, Coşkun H, Erişen L, Tezel İ, Onart S. Bir larengal amiloidozis olgusu. *Türk Otolarengoloji Arşivi* 2003; **41** (3): 164-168.
14. Baytop T, Özcöbek G. Recherches sur les alkaloides de *Colchicum chalconicum*, *micranthum*, *szovitsii* et *turcicum*. *J Fac Pharm İstanbul* 1970; **6**: 21-26.
15. Baytop T. *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi*. 2. ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999. pp. 139.
- 15a. Baytop T, Sütülpınar N, Phillipson JD. Alkaloids from *Colchicum turcicum*. *Planta Med* 1980; **38** (3): 273-274.
16. Ben-Chetrit E, Levy M. Colchicine: 1998 Update. *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 1998; **28** (1): 48-59.
17. Bodoki E, Oprean R, Vlase L, Tamas M, Sandulescu R. Fast determination of colchicine by TLC-densitometry from pharmaceuticals and vegetal extracts. *J Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2004; **37** (5): 971-971.
18. Brickell CD. *Colchicum L.* İçinde Davis PH, editor *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 8*. Edingburgh: Edingburgh University Press; 1984. pp. 329-351.
19. Brossi A, Boye O, Muzaffar A, Yeh HJC, Toome V, Wegrzynski B ve ark. a S, 7S-absolute configuration of natural (-)-colchicine and allo-congeners. *Febs Lett* 1990; **262** (1): 5-7.

20. Brossi A, Sharma PN, Atwell L, Jacobson AE, Iorio MA, Molinari M. Biological effects of modified colchicines. 2. Evaluation of catecholic colchicines, colchifolines, colchicide and novel N-acyl- and N-aryledeacetylcolchicines. *J Med Chem* 1983; **26**: 1365-1369.
21. Brossi A. Bioactive alkaloids. 4. Results of recent investigation with colchicine and physostigmine. *J Med Chem* 1990; **33** (9): 2311-2318.
22. Canacankatan N, Doran F, Atilla G, Dağlıoğlu YK, Kayrın L. *Kolşisin ve antioksidan sistem*. Serbest Radikaller ve Antoksidanlar Araştırma Derneği III. Ulusal Kongresi, Afyon 2003.
23. Capraro HG, Brossi A. Tropolonic Colchicum Alkaloids. *The Alkaloids* 1984; **23**: 1-65.
24. Carballo JL, Hernández-Inda ZL, Perez P, Garcia-Gravalos MD. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnology* 2002; **2**: 17.
25. Cernoch M, Malinsky J, Telupilova, Santavy F. Biological effect of colchicine derivatives in relation to their structure; principles of Colchicum and their derivatives. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1954; **99**: 141-62.
26. Chammadov B, Yusupov MK, Sadykov AS. Structure of the alkaloid L-5 from Colchicum luteum. *Khim Prir Soedin* 1970; **6** (1): 82-88. [SciFinder CAN 73:45635]
27. Chammadov B, Yusupov MK. Alkaloids of Colchicum luteum. *Khim Prir Soedin* 1985; **6**: 810-815. [SciFinder CAN 105:187563].
28. Cherit EB, Bergmann S, Sood R. Mechanism of the anti-inflammatory effect of colchicine in rheumatic diseases: a possible new outlook through microarray analysis. *Rheumatology* 2006; **45** (3): 274-282.
29. Cifuentes M, Schilling B, Ravindra R, Winter J, Janik ME. Synthesis and biological evaluation of B-ring modified colchicine and isocolchicine analogs. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; **16**: 2761-2764.
30. Cook JW, Loudon JD. Colchicine. *The Alkaloids* 1952; **2**: 261-329.

31. Cortese F, Bhattacharyya B, Wolff J. Podophyllotoxin as a probe for the colchicine binding site of tubulin. *J Biol Chem* 1977; **252**: 1134-1140.
32. Cross AD, Syntex SA, Mexico DF, Santavy F. Substances from the Plants of the Sub-family Wurmbaeoideae and Their Derivatives LXI. Ultraviolet-, Infrared-, and NMR-Spectroscopy of Colchicine Alkaloids and Some of Their Derivatives. *Beiträge Biochemie* 1965: 97-112.
33. Das D, Pemberton PW, Burrows PC, Gordon C, Smith A, McMahon RFT, Warnes TW. Antioxidant properties of colchicine in acute carbon tetrachloride induced rat liver injury and its role in the resolution of established cirrosis. *Biochim Biophys Acta* 2000; **1502** (3): 351-362. [CA 134:188153]
34. Das UN. Colchicine in diabetes mellitus. *J Assoc Physicians India* 1993; **41** (4): 213. [PMID: 8270561]
35. Dentali S. *The industry perspective. Toxicology of dietary supplements*. Society of Toxicology Symposium 2004, Bethesda.
36. Desbene S, Giorgi-Renault. Drugs that Inhibit Tubulin Polymerization: The particular case of podophyllotoxin and analogues. *Curr Med Chem-Anti Cancer Agents* 2002; **2**: 71-90.
37. Dumortier C, Potenziano JL, Bane S, Engelborghs Y. The mechanism of tubulin-colchicine recognition. *Eur J Biochem* 1997; **249**: 265-269.
38. Düşen DO. *Akdeniz bölgesinde yayılış gösteren Colchicum L. (Liliaceae) cinsine ait türlerin taksonomik yönden araştırılması*. Antalya: Akdeniz Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi, 2004 .
39. Dvorak Z, Ulrichova J, Modriansky M, Maurel P. Effect of colchicine and its derivatives on the expression of selected isoforms of cytochrome P450 in primary cultures of human hepatocytes. *Acta Univ Olomuc, Fac Med* 2000; **143**: 47-50.
40. Erdik E. *Organik kimyada spektroskopik yöntemler*. Ankara: 2.ed., Gazi Kitabevi; 1998.
41. Evans WC. *Trease and Evans Pharmacognosy*. 15. ed. Edinburgh: W B Saunders; 2002. pp. 369-370, 401.

42. Evans DA, Tanis SP, Hart DJ. A convergent Total synthesis of ( $\pm$ ) colchicine and ( $\pm$ ) desacetamidoisocolchicine. *J Am Chem Soc* 1981; **103**: 5813-5821.
43. Fabian J, Delaroff V, Poirier P, Legrand M. Etude spectrale ultraviolette et infrarouge des colchicines et apparentes. *Bull Soc Chim Fr* 1955: 1455-1463.
44. Favari L, Perez-Alvarez V. Comparative effects of colchicine and silymarin on CCl<sub>4</sub>-chronic liver damage in rats. *Arch Med Res* 1997; **28** (1):11-17.
45. Fell KR, Ramsden D. Colchicum: A review of Colchicums and the sources, chemistry, biogenesis and assay of colchicine and its congeners. *Lloydia* 1967; **30** (2): 123-140.
46. Fell KR, Ramsden D. Phytochemical investigations of some species of Colchicum. *J Pharm Pharmac* 1966; **18**: 126-132.
47. Forni GP. Thiocolchicoside determination by HPLC in pharmaceutical formulations. *Fitoterapia* 1982; **1** (2): 3-8.
48. Geriler D, Thomasset N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 1986; **94** (1-2): 57-63.
49. Gordaliza M, Castro MA, Del-corrall JM ve ark. Antitumoral properties of podophyllotoxin and related compounds. *Curr Pharm Des* 2000; **6** (18): 1811-1839.
50. Guan J, Zhu XK, Brossi A, Tachibana Y, Bastow KF, Verdier-Pinard P ve ark. Antitumor agents.192. Antitubulin effect and cytotoxicity of C(7)-oxygenated allicolchicinoids. *Collect Czech Chem Commun* 1999; **64**: 217-228.
51. Güneş B. *Vademecum*. Ankara: Farma Tıp Yayıncılık; 2006.
52. Güven K. *Tıbbi formüller. 11. ed.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2006. pp.100-101.
53. Hadfield JA, Ducki S, Hirst N, McGown T. Tubulin and microtubules as targets for anticancer drugs. *Progress in Cell Cycle Research* 2003; **5**: 309-325.
54. Hamel E, Ho HH, Kang GJ, Lin CM. Cornigerine, a potent antimetabolic Colchicum alkaloids of unusual structure. *Biochem Pharmacol* 1988; **37** (12): 2445-2449.
55. Havas L. Colchicine chronology. *Jour Hered* 1940; **31**: 115.

56. Herbert RB, Kattah AE, Knagg E. The biosynthesis of the phenethylisoquinoline alkaloid colchicine. Early and intermediate stages. *Tetrahedron* 1990; **46**: 7119-7138.
57. Holubek J, Strouf O. *Spectral data and physical constants of the alkaloids I*, London: Hyden and Son Ltd; 1965.
58. Husek A, Sütülpınar N, Potesilova H, Dvorackova VH, Hanus V, Sedmera P ve ark. Alkaloids and phenolics of three Merendera species. *Phytochemistry* 1989; **28** (11): 3217-3219.
59. Husek A, Sütülpınar N, Sedmera P, Voegelein F, Valka I, Simanek V. Alkaloids and phenolics of *Colchicum turcicum*. *Phytochemistry* 1990; **29** (9): 3058-3060.
60. Karakoç Y, Dalkılıç E, Güllü M, Yavuz M, Ersoy A, Dilek K ve ark. Romatizmal hastalıklarda renal amiloidoz. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1999; **3**: 143-146.
61. Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 8. ed. Ankara: Hacettepe Taş Kitapçılık; 1998. pp. 1051-1052.
62. Kim KY, Schumacher HR, Hunsche E, Wertheimer AI, Kong SX. A literature review of the epidemiology and treatment of acute gout. *Clin Ther* 2003; **25** (6): 1593-1617.
63. Koşan C. Ailevi Akdeniz ateşine tanısal yaklaşım. *AÜTD* 2003; **35**: 1-6.
64. Koutoulis A, Roy AT, Price A, Sherriff L, Legget G. DNA ploidy level of colchicine-treated hops (*Humulus lupulus* L.). *Sci Horti-Amsterdam* 2005; **105**: 263-268.
65. Körner A, Kohn S. Development and optimization of a stability indicating method on a monolithic reversed phase column for *Colchicum* dry extract. *J Chromatogr A* 2005; **1089**: 148-57.
66. Kupchan M, Britton RW, Chiang CK, Noyanalpan N, Ziegler MF. Tumor inhibitors. 88. The antileukemic principles of *Colchicum speciosum*. *Lloydia* 1973; **36** (3): 338-340.
67. Küçüker O. Studies on the endemic *Colchicum* taxa of Turkey: *C. baytopiorum* C.D. Brickell. *Doğa-Tr J of Botany* 1990; **14**: 1-11.

68. Le Hello C. The pharmacology and therapeutic aspects of colchicine. *The Alkaloids* 2000; **53**: 288-352.
69. Lee K H. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. *J Biomed Sci* 1999; **6**: 236-250.
70. Lee SH, Park SK, Kim JM, Kim MH, Kim KH, Chun KW ve ark. New synthetic thiocolchicine derivatives as low-toxic anticancer agents. *Arch Pharm Chem Life Sci* 2005; **338**: 582-589.
71. Lee SJ, Kim YG, Kang KW, Kim CW, Kim SG. Effects of colchicine on liver functions of cirrhotic rats: beneficial effects result from stellate cell inactivation and inhibition of TGF  $\beta$  1 expression. *Chem- Biol Interac* 2004; **147**: 9-21.
72. Leete E, Nemeth PE. The biogenesis of the alkaloids of *Colchicum* L. The incorporation of phenylalanine into colchicine. *J Am Chem Soc* 1960; **82** 6055-7.
73. Levy M, Spino M, Read S. Colchicine: a state-of-the-art review. *Pharmacotherapy* 1991; **11** (3): 196-211.
74. Li W, Sun Y, Fitzloff JF, Van Breemen RB. Evaluation of commercial Ginkgo and Echinacea dietary supplements for colchicine using liquid chromatography. *Chem Res Toxicol* 2002; **15** (9): 1174-1178.[CA 137:316158]
75. Mabry TJ, Mahram KR, Thomas BB. *The systemic identification of flavonoids*. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag, New York; 1970.
76. Maier U, Zenk MH. Colchicine is formed by para-para phenol coupling from autumnaline. *Tetrahedron Lett* 1997; **38** (42): 7357-7360.
77. Maisch B, Singh D. Adding colchicine to aspirin may prevent recurrence of acute pericarditis. *Evidence-based Cardiovascular Medicine* 2006; **10**: 64-66.
78. Mathew B, Baytop T. *The Bulbous Plants of Turkey*. London: B.T. Batsford Ltd; 1984. pp. 70-75.
79. Meksuriyen D, Lin LJ, Cordell GA. NMR studies of colchicine and its photoisomers,  $\beta$ - and  $\gamma$ - lumicolchicines. *J Nat Prod* 1988; **51** (1): 88-93.



80. Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine Shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med* 1982; **45**: 31-34.
81. Milne ST, Meek PD. Fatal colchicine overdose: report of a case and review of the literature. *Am J Emerg Med* 1998; **16** (6): 603-608.
82. Mizushima Y, Matsumura N, Mori M, Shimizu T, Fukushima B, Mimura Y ve ark. Colchicine in Behcet's disease. *Lancet* 1977; **2**: 1037.
83. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; **65**: 55-63.
84. Mukhamedyarova NL, Yusupov MK, Levkovich ML, aslanov KA. Structure of lutein. *Khim Prir Soedin* 1976; **6**: 801-804. [SciFinder CAN 86:190283]
85. Mukhamedyarova NL, Yusupov MK, Aslanov KA, Sadykov AS. Structure and absolute configuration of collutine. *Chem Nat Compd* 1976; **11** (6): 781-783.
86. Mukherjee A, Basu S, Sarkar N, Ghosh AC. Advances in cancer therapy with plant based natural products. *Curr Med Chem* 2001; **8**: 1467-1486.
87. Muzaffar A, Brossi A, Lin CM, Hamel E. Antitubulin effects of derivatives of 3-demethylthiocolchicine, methylthio eters of natural colchicinoids, and thioketons derived from thiocolchicine. Comparison with colchicinoids. *J Med Chem* 1981;**24**: 257-261.
88. Muzaffar A, Brossi A. Chemistry of Colchicine. *Pharmacotherapy* 1991; **49**: 105-9.
89. Nasreen A, Gundlach H, Meinhart HZ. Incorporation of phenethylisoquinolines into colchicine in isolated seeds of *Colchicum autumnale*. *Phytochemistry* 1997; **46** (1): 107-115.
90. Ondra P, Simanek V. Alkaloids and phenolics of *Colchicum bornmuelleri*. *Fitoterapia* 1995; **LXVI** (4): 375.
91. Ondora P, Simanek V. Alkaloids and phenolics of *Colchicum speciosum*. *Fitoterapia* 1995; **LXVI** (4): 380.

92. Ondra P, Valka I, Vicar J, Sütlüpinar N, Simanek V. Chromatographic determination of constituents of genus *Colchicum* (Liliaceae). *J Chromatogr A* 1995; **704**: 351-356.
93. Ondra P, Vicar J, Simanek V. Alkaloids and phenolics of *Colchicum macrophyllum*. *Fitoterapia* 1994; **LXV** (4): 375.
94. Orhon B. *Colchicum bivonae* Guss. yumrularının alkaloitleri üzerinde araştırmalar. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Kürsüsü Doktora Tezi; 1981.
95. Örün E, Yalçınkaya F. Türk tıbbında ailevi Akdeniz hastalığı ve amiloidoz. *Türk nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 2003; **12** (1): 1-7.
96. Persson K. A new Turkish species of *Colchicum* (Colchicaceae) related to *C.boissieri*. *Edinburgh J Bot* 2005; **62** (3): 181-192.
97. Persson K. *Colchicum* L. İçinde Güner A, Özhatay N, Ekim T, Başer KHC, Hedge IC, editors. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands Volume 11*. Edinburgh: Edinburgh University Press; 2000. pp. 246-265.
98. Petty HR, Fernando M, Kindzelskii AL, Zarewyc BN, Ksebati MB, Hryhorczuk LM ve ark. Identification of colchicine in placental blood from patients using herbal medicines. *Chem Res Toxicol* 2001; **14** (9): 1254-1258. [CA 135:267190]
99. Potesilova H, Dolejs L, Santavy F. Chromatography of hydroxy, methoxy, and methylenedioxy derivatives of benzoic acid and cinnamic acids, aromatic acids, phenols, and flavones from the plans of the subfamily Wurmbaeoideae and their chemotaxonomic significance. *Acta Univ Palacki Olomuc Fac Med* 1976; **79**: 29-46.
100. Poulev A, Deus-Neumann B, Bombardelli E, Zenk MH. Immunoassays for the quantitative determination of colchicine. *Planta Med* 1994; **60**: 77-83.
101. Rambaldi A, Gluud C. Colchicine for alcoholic and non-alcoholic liver fibrosis or cirrhosis. *Liver* 2001; **21**(2): 129-136. [CA 135:236097]
102. Ray K, Bhattacharyya B, Biswas BB. Role of B-ring of colchicine in its binding to tubulin. *J Biol Chem* 1981; **256**: 6241-6244.

103. Rosso A, Zuccaro S. Determination of alkaloids from the colchicines family by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1998; **825**: 96-101.
104. Rösner M, Capraro HG, Jacobson AE, Atwell L, Brossi A. Biological effects of modified colchicines. Colchicines, improved preparation of 2-demethylcolchicine, 3-demethylcolchicine, and (+)-colchicine and reassignment of the position of the double bond in dehydro-7-deacetamidocolchicines. *J Med Chem* 1981; **24**: 257-261.
105. Rueffer M, Zenk MH. Microsome-mediated transformation of O-methyandrocymbine to demecolcine and colchicine. *Febs Lett* 1998; **438**: 111-113.
106. Sangster AW, Stuart KL. Ultraviolet spectra of alkaloids. *Chem Reviews* 1965; **65**: 69-78.
107. Santavy F, Dvorackova S, Simanek V, Potesilova H. Isolation and identification of alkaloids of the subfamily Wurmbaeoideae. *Acta Univ Olomuc Fac Med* 1983; **105**: 63-110.
108. Santavy F. Aduct of colchicine acetate and ethyl acetate. *Acta Univ Olomuc Fac Med* 1990; **90** (15): 15-44.
109. Santavy F. Colchicum alkaloids and related substances-their chemistry and biology. *Acta Univ Olomuc Fac Med* 1979; **90**: 15-44.
110. Sheldrake KE, Woodhouse RN ve ark. Biosynthesis. Part 30. Colchicine: studies on the ring expansion step focusing on the fate of the hydrogens at C-4 of autumnaline. *J Chem Soc Perkin Trans* 1998; **1**: 3003-3009.
111. Simanek V, Husek A, Valka I, Sütülpınar N. Phytochemical studies of Turkish Colchicum and Merendera species. *Herba Hungarica* 1990; **29** (3): 64-8.
112. Sütülpınar N, Husek A, Potesilova H, Dvorackova S, Hanus V, Sedmera P. Alkaloids and phenolics of Colchicum cilicicum. *Planta Med* 1988; **54** (3): 243-245.
113. Sütülpınar N. Investigations on Turkish Colchicum and Merendera species. *Acta Pharm Turc* 2002; **44**: 175-181.

114. Sütlüpinar N. The evaluation of Turkish autumn flowering Colchicum species. *J Fac Pharm İstanbul* 1998; **32**: 1-7.
115. Sütlüpinar N. *Türkiye'nin sonbahar Colchicum türlerinin demekolsin, kolşikozit ve kolşisin yönünden değerlendirilmesi*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Doçentlik tezi; 1985.
116. Sütlüpinar N. Türkiye'nin sonbaharda çiçek açan Colchicum türleri üzerinde araştırmalar. *Doğa Bilim Dergisi* 1983; **7**: 355-358.
117. Timbekov EK, Sadykov AS. *Khim Prir Soedin* 1985; **1**:3-11. [SciFinder CAN 104:19707].
118. Tojo E, Önür MA, Freyer AJ, Shamma M. Two trioxygenated phenethylisoquinoline alkaloids from Colchicum szovitsii. *J Nat Prod* 1990; **53** (3): 634-637.
119. Tojo E. The homoaporphine alkaloids. *J Nat Prod* 1989; **52** (5): 909-921.
120. Turdikulov K, Yusupov MK, Aslanov K, Sadykov AS. Structure of crociflorine. *Khim Prir Soedin* 1974; **6**: 810-811. [SciFinder CAN 82:171256]
121. Ulrichova J, Ondra P, Simanek V, Sütlüpinar N. Cytoprotective effect of phenolics from Colchicum on rat hepatocytes. *Fitoterapia* 1995; **LXVI** (5): 339-402.
122. Ulrichova J, Walterova D, Lukie V, Cernachova D, Romcova I, Simanek V. Biochemical evaluation of colchicine and related analogs. *Planta Med* 1993; **59** (2): 144-147.
123. Vassiliades D, Persson K. A new winter-flowering species of Colchicum from Greece. *Preslia Praha* 2002; **74**: 57-65.
124. Vinnersten A. *Tracing history phylogenetic, taxonomic and biogeografic research in the Colchicum family*. Sweden: Department of Systematic Botany, Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Doctor of Philosophy Thesis; 2003.
125. Wallace SL, Ertel NH. Plasma levels of colchicine after administration of a single dose. *Metabolism* 1978; **22**: 749-53.

126. Wickramarante DBM, Pengsuparp T, Mar W, Chai HB, Chagvedera TE, Fransworth NR. Novel antimitotic dibenzocyclo-octadiene lignan constituents of the stem bark of *Steganotaenia araliaceae*. *J Nat Prod* 1993; **56** (12): 2083-2090.
127. Wildman WC, Pursey BA. Colchicine and related compounds. *The Alkaloids* 1968; **11**: 407-455.
128. Wildman WC. Colchicine and related compounds. *The Alkaloids* 1960; **6**: 247-288.
129. Willaman JJ, Hui-lin I. Alkaloid bearing plants and their contained alkaloids. *Lloydia* 1970; **33**: 117-127.
130. Wyatt DK, Grady LT, Sun S. Colchicine. *Analytical Profiles of Drug Substances* 1981; **10**: 139-182.
131. Yeşiltepe B. *Colchicum bivonae Guss. tohumlarının alkaloitleri üzerinde araştırmalar*. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2006.
132. Yuan H. *Studies on the chemistry of paclitaxel*. Doctor of Philosophy Thesis, Blacksburg, Virginia, 1998.
133. Yusupov MK, Mukhamedyarova NL, Aslanov KA. Structure of luteicine. *Khim Prir Soedin* 1976; **3**: 359-363. [SciFinder CAN 86:43864]
134. Zweig MH, Chignell CF. Interaction of some colchicine analogs, vinblastine and podophyllotoxin with rat brain microtubule protein. *Biochem Pharmacol* 1973; **22**: 2142-2150.
135. *British Pharmacopoeia*. London: London Her Majesty's Stationery Office; 1980. pp.124.
136. *Dictionary of Natural Products on CD-ROM*. Erişim 21.08.2006, [www.weizmann.ac.il/InfoUnit/dnp.pdf](http://www.weizmann.ac.il/InfoUnit/dnp.pdf)
137. *Suspected toxic chemical colchicine is not found in Ginkgo* (2005). Erişim 15.08.2006, [www.herbalgram.org](http://www.herbalgram.org)

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Sevda	<b>Soyadı</b>	PIRILDAR
<b>Doğ.Yeri</b>	Sakarya	<b>Doğ.Tar.</b>	17.09.1976
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>TC Kim No</b>	22691024578
<b>Email</b>	sevdapirildar@hotmail.com	<b>Tel</b>	0 212 440 00 00/13581

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>		
<b>Yük.Lis.</b>	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı	2001
<b>Lisans</b>	İ.Ü.Eczacılık Fakültesi	1997
<b>Lise</b>	Özel Tansel Lisesi	1993

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma görevlisi	İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü	1999-2006
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Orta	İyi	61	
Almanca	Zayıf	Zayıf	Zayıf	-	-

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	58	59	58
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Mikrosoft Word	Çok iyi
Mikrosoft Power Point	Çok iyi
Chem Draw	Çok iyi

### Yayımları/Tebliğleri /Sertifikaları/Ödülleri

- Pırıldar S, Sütlüpinar N. Investigations on the antidiabetic drugs sold in herb dealers. *J Fac Pharm Istanbul* (2002-2003); **35-36** (1): 45-56.
- Uzun E, Sarıyar G, Andersen A, Karakoc B, Otuk G, Oktayoglu E, Pirildar S. Traditional medicine in Sakarya province (North-West Anatolia) and antimicrobial activities of selected species. *J Ethnopharmacol* 2004; **95**: 287-296.
- Suzgeç S, Bitis L, Pirildar S, Ozcelik H, Zapp J, Becker H, Mericli F, Mericli A. Diterpenoid alkaloids of *Delphinium schmalhauseni*. *Chem Nat Compd* 2006; **42** (1): 75-77.
- Meriçli AH, Pırıldar S, Süzgeç S, Bitiş L, Meriçli F, Özçelik H, Zapp J, Becker H. Norditerpenoid alkaloids from the aerial parts of *Aconitum cochlearae* Woroschin. *Helv Chim Acta* 2006; **89**: 210-217.
- Pirildar S, Atasever B, Yesiltepe B, Erdem-Kuruca S, Sutlupinar N. *Cytotoxic effects of seeds of Colchicum baytopiorum and Colchicum bivonae on K562 cells*. Chemistry, Pharmacology and Biosynthesis of Alkaloids- International Symposium-Belek, Antalya, Turkey, April 25-29 2006. (Poster)
- Pirildar S, Atasever B, Yesiltepe B, Erdem-Kuruca S, Sutlupinar N. *Cytotoxic effects of different parts of Colchicum baytopiorum on K562 and HL60 cells*. Future Trends in Phytochemistry a young Scientist Symposium-Olomouc-Czech Republic, June 28-July 2006. (Poster)
- Yeşiltepe B, Atasever B, Pırıldar S, Erdem-Kuruca S, Sütlüpinar N. *Colchicum bivonae ve Colchicum baytopiorum tohumlarının HL60 hücre serisi üzerindeki sitotoksik etkileri*. XVI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Erzurum, 28-30 Haziran 2006. (Poster)
- Meriçli F, Meriçli AH, Süzgeç S, Bitiş L, Pırıldar S, Sözer U. *Türkiye'de doğal olarak yetişen bazı Consolida ve Delphinium türlerinin diterpen alkaloitleri üzerinde çalışmalar*. İ.Ü. Bilim Günleri, İstanbul, 13-14 Nisan 2006. (Poster)

- İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, *Deney Hayvanları Eğitim Sertifikası*, 23-24 Mayıs 2005.
- Phytochemical Society of Europe Travel Award, 2006.

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

- Tarih
- Edebiyat
- Resim



