

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HYPECOUM PROCUMBENS* L. SUBSP. *ATROPUNCTATUM* Å. E. DAHL**
BİTKİSİNİN KALİTE KONTROL AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Farmakognozi Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog

Erdem KAYNAR

1. Danışman: Prof. Dr. Nehir SOMER

2. Danışman: Prof. Dr. Mustafa Ali ÖNÜR

İZMİR

2014

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HYPECOUM PROCUMBENS L. SUBSP. *ATROPUNCTATUM* Å. E. DAHL
BİTKİSİNİN KALİTE KONTROL AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ

Farmakognozi Anabilim Dalı Programı

Yüksek Lisans Tezi

Biyolog

Erdem KAYNAR

1. Danışman: Prof. Dr. Nehir SOMER
2. Danışman: Prof. Dr. Mustafa Ali ÖNÜR

İZMİR

2014

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Nehir SOMER

.....

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Bijen KIVÇAK

.....

Üye : Yard. Doç. Dr. Zeynep SOYER

.....

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

ÖNSÖZ

Öncelikle sabır, anlayış ve güler yüzleri ile bana her konuda destek veren, çalışmamı çok değerli bilgi ve yardımları ile yöneten hocalarım Prof. Dr. Nehir SOMER'e ve Prof. Dr. Mustafa Ali ÖNÜR'e,

Her konudaki yardımlarından dolayı, Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bijen KIVÇAK'a ve Prof. Dr. Hüsniye KAYALAR'a

Çalışmalarım sırasında yardımlarını ve bilgilerini esirgemeyen Doç. Dr. G. İrem KAYA'ya ve Doç. Dr. Buket BOZKURT SARIKAYA'ya,

Araştırmalarımın özellikle Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi kısmında değerli bilgilerini benimle paylaşan Arş. Gör. Ahmet EMİR'e,

Çalışmalarım sırasında örnek toplama kısmından, tez yazım aşamasına kadar bütün süreçlerde yardımlarını gördüğüm Arş. Gör. Ceren EMİR'e, Arş. Gör. Burcu SÜMER TÜZÜN'e ve Bio. Rahmi TOKER'e,

Bitkinin tayin edilmesinde ve çalışmalarımın botanik kısımlarında yardımlarını gördüğüm Uzm. Bio. Volkan EROĞLU'na ve Uzm. Bio. Mehmet Emin GÜNGÖR'e

Çalışmalarına mali destek sağlayan E.Ü. Araştırma Fonu'na (Proje No: 13/ECZ/001)

Ve çalışmalarım süresince beni her türlü yardımlarıyla destekleyen aileme, en içten sevgi ve sonsuz teşekkürlerimle.

İzmir, 2014

Bio. Erdem KAYNAR

İçindekiler

ÖNSÖZ	III
İçindekiler	IV
Tablolar	X
Şekiller	XIII
Resimler	XIV
BÖLÜM I	1
GİRİŞ	1
1. GENEL BİLGİLER	3
1.1. BİTKİ HAKKINDA BOTANİK ÇALIŞMALAR	3
1.1.1. <i>Hypocoum</i> L. Cinsi	3
1.1.2. <i>Hypocoum procumbens</i> L.	4
1.1.3. <i>Hypocoum procumbens</i> L. subsp. <i>atropunctatum</i> Å. E. Dahl	5
1.2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ÇALIŞMALARI	8
1.2.1. Kalite Kontrol Çalışmaları	8
1.2.2. Alkaloid Miktar Tayini Çalışmaları	8
1.3. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE TAYİNİ	9
BÖLÜM II	17
1. GEREÇ VE YÖNTEM	17
1.1. BOTANİK ARAŞTIRMALAR	17
1.1.1. Materyal	17
1.1.2. Deneyler	20

1.2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ARAŞTIRMALARI	20
1.2.1. Materyal	20
1.2.2. Yöntemler	22
1.2.2.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini	22
1.2.2.2. Total Kül Miktar Tayini	22
1.2.2.3. Sülfat Külü Miktar Tayini	22
1.2.2.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini	23
1.2.2.5. Drogların İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K) ile Teşhis ve Kontrolü ..	24
1.2.2.5.1. Örnek ve Standart Çözeltilerin Hazırlanışı	24
1.2.2.5.2. İ.T.K ile Kontrol Çalışmaları	24
1.2.2.6. Total Alkaloid Miktar Tayini	25
1.2.2.6.1. Total Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı	25
1.2.2.6.2. Total Alkaloid Miktar Tayini Deneyinin Yapılışı	26
1.2.2.7. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Protopin Miktar Tayini	26
1.2.2.7.1. Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı	26
1.2.2.7.2. Standart Protopine ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	26
1.2.2.7.3. Deneyin Yapılışı	27
1.2.3. Deneyler	27
1.2.3.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini	27
1.2.3.2. Total Kül Miktar Tayini	28
1.2.3.3. Sülfat Külü Miktar Tayini	28
1.2.3.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini	29
1.2.3.5. Drogların İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K) ile Teşhis ve Kontrolü.	29
1.2.3.5.1. Örnek ve Standart Çözeltilerin Hazırlanışı	29

1.2.3.5.2. Deneyin Yapılışı	30
1.2.3.6. Total Alkaloid Miktar Tayini	30
1.2.3.6.1. Total Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı	30
1.2.3.6.2. Total Alkaloid Miktar Tayini Deneyinin Yapılışı	31
1.2.3.6.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Ayarlanması	32
1.2.3.6.3.1. 0.1 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	32
1.2.3.6.3.2. 0.02 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması	32
1.2.3.6.3.3. 0.02 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Ayarlanması	32
1.2.3.6.3.4. 0.1 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması	33
1.2.3.6.3.5. 0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması	33
1.2.3.6.3.6. 0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Ayarlanması	33
1.2.3.7. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Protopin Miktar Tayini	34
1.2.3.7.1. Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı	34
1.2.3.7.2. Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı	34
1.2.3.7.3. Standart Protopin Çözeltisinin Hazırlanışı	34
1.2.3.7.4. Standart Protopine ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	35
1.2.3.7.5. Deneyin Yapılışı	35
1.3. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE TAYİNİ	36
1.3.1. Yöntem	36
1.3.1.1. Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı	36
1.3.1.2. Deneyin Yapılışı	36
1.3.2. Deney	37
1.3.2.1. Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı	37
1.3.2.2. Deneyin Yapılışı	37

BÖLÜM III	38
BULGULAR	38
1. BOTANİK ARAŞTIRMALARIN BULGULARI	38
1.1. ANATOMİK BULGULAR	38
1.1.1. Köke ait İnceleme ve Bulgular	38
1.1.2. Gövdeye ait İnceleme ve Bulgular	40
1.1.3. Yaprğa ait İnceleme ve Bulgular	42
1.1.4. Meyveye ait İnceleme ve Bulgular	45
1.1.4.1. Tohumuz Kısım	45
1.1.4.2. Toumlu Kısım	46
1.1.5. Tohuma ait İnceleme ve Bulgular	49
1.1.6. Çiçeğe ait İnceleme ve Bulgular	50
1.1.7. Toz Droğa ait İnceleme ve Bulgular	52
1.2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	57
1.2.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini	57
1.2.2. Total Kül Miktar Tayini	58
1.2.3. Sülfat Külü Miktar Tayini	59
1.2.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini	61
1.2.5. Droğların İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K) ile Teşhis ve Kontrolüne ait Bulgular	64
1.2.6. Total Alkaloid Miktar Tayinine ait Bulgular	64
1.2.7. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Protopin Miktar Tayini .	66
1.2.7.1. Protopin Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	66

1.2.7.2. HP-1 Ekstresine ait Şekiller	68
1.2.7.3. HP-2 Ekstresine ait Şekiller	69
1.2.7.4. HP-3 Ekstresine ait Şekiller	69
1.2.7.5. HP-4 Ekstresine ait Şekiller	70
1.2.7.6. Ekstrelere ait Protopin Miktar Tayini Sonuçları	71
1.3. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE TAYİNİNE AİT	
BULGULAR	74
BÖLÜM IV	75
1. TARTIŞMA	75
1.1. BOTANİK ARAŞTIRMALAR	75
1.2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ARAŞTIRMALARI	77
1.2.1. Kurutmada Kayıp, Total Kül, Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül ve Sülfat Külü Miktar Tayini	78
1.2.2. İ.T.K. ile Teşhis ve Saflık Kontrolleri	78
1.2.3. Total Alkaloid Miktar Tayini	79
1.2.4. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Protopin Miktar Tayini	79
1.3. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE TAYİNİ	81
BÖLÜM V	82
SONUÇLAR VE ÖNERİLER	82
BÖLÜM VI	84
ÖZET	84
<i>HYPECOUM PROCUMBENS</i> L. SUBSP. <i>ATROPUNCTATUM</i> Å. E. DAHL BİTKİSİNİN KALİTE KONTROL AÇISINDAN DEĞERLENDİRİLMESİ	84
ABSTRACT	85

QUALITY CONTROL EVALUATION of <i>HYPECOUM PROCUMBENS</i> L.	
SUBSP. <i>ATROPUNCTATUM</i> Å. E. DAHL	85
BÖLÜM VII	86
YARARLANILAN KAYNAKLAR	86
ÖZGEÇMİŞ	101

Tablolar

Tablo 1. Çeşitli Bitkiler Üzerinde Yapılmış Olan Kantitatif Çalışmalarda Elde Edilen Protopin Miktarları	11
Tablo 2. Herba Hypecoi Droğlarına Ait Kodlar	21
Tablo 3. HP-1 Örneğinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları	57
Tablo 4. HP-2 Örneğinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları	57
Tablo 5. HP-3 Örneğinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları	58
Tablo 6. HP-4 Örneğinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları	58
Tablo 7. HP-1 Örneğinde Yapılan Total Kül Miktar Tayini Sonuçları	58
Tablo 8. HP-2 Örneğinde Yapılan Total Kül Miktar Tayini Sonuçları	59
Tablo 9. HP-3 Örneğinde Yapılan Total Kül Miktar Tayini Sonuçları	59
Tablo 10. HP-4 Örneğinde Yapılan Total Kül Miktar Tayini Sonuçları	59
Tablo 11. HP-1 Örneğinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları	60
Tablo 12. HP-2 Örneğinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları	60
Tablo 13. HP-3 Örneğinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları	60
Tablo 14. HP-4 Örneğinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları	60
Tablo 15. HP-1 Örneğinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktarı Tayin Sonuçları	61
Tablo 16. HP-2 Örneğinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktarı Tayin Sonuçları	61
Tablo 17. HP-3 Örneğinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktarı Tayin Sonuçları	62
Tablo 18. HP-4 Örneğinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktarı	

Tayin Sonuçları	62
Tablo 19. HP-1 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları	64
Tablo 20. HP-1 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	65
Tablo 21. HP-2 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları	65
Tablo 22. HP-2 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	65
Tablo 23. HP-3 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları	65
Tablo 24. HP-3 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	65
Tablo 25. HP-4 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları	66
Tablo 26. HP-4 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	66
Tablo 27. HPLC'ye Uygulanan Protopin Konsantrasyonuna Karşı Okunan Alan Değerleri	66
Tablo 28. HP-1 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçları ...	71
Tablo 29. HP-1 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	71
Tablo 30. HP-2 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçları ...	72
Tablo 31. HP-2 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	72
Tablo 32. HP-3 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçları ...	72
Tablo 33. HP-3 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	73
Tablo 34. HP-4 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçları ...	73

Tablo 35. HP-4 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi	73
--	----

Şekiller

Şekil 1 : Protopin Standart Ölçü Eğrisi Regresyon Denklemi	67
Şekil 2 : Standart Protopine ait HPLC Kromatogramı	67
Şekil 3 : Standart Olarak Kullanılan Protopine ait UV Spektrumu	67
Şekil 4 : HP-1 Ekstresine Ait HPLC Kromatogramı	68
Şekil 5 : HP-1 Ekstresine Ait Protopin Pikinin UV Spektrumu	68
Şekil 6 : HP-2 Ekstresine Ait HPLC Kromatogramı	69
Şekil 7 : HP-2 Ekstresine Ait Protopin Pikinin UV Spektrumu	69
Şekil 8 : HP-3 Ekstresine Ait HPLC Kromatogramı	69
Şekil 9 : HP-3 Ekstresine Ait Protopin Pikinin UV Spektrumu	70
Şekil 10 : HP-4 Ekstresine Ait HPLC Kromatogramı	70
Şekil 11: HP-4 Ekstresine Ait Protopin Pikinin UV Spektrumu	70

Resimler

Resim 1. <i>Hypocoum procumbens</i> L. subsp. <i>atropunctatum</i> Å. E. Dahl Bitkisinin Doğadaki Görünüşü	18
Resim 2. <i>Hypocoum procumbens</i> L. subsp. <i>atropunctatum</i> Å. E. Dahl Bitkisinin Doğadaki Görünüşü	18
Resim 3. <i>Hypocoum procumbens</i> L. subsp. <i>atropunctatum</i> Å. E. Dahl Bitkisinin Herbaryum Fotoğrafi	19
Resim 4. Kök Enine Kesitinin Genel Görünüşü	39
Resim 5. Kök Enine Kesiti	39
Resim 6. Gövde Enine Kesitinin Genel Görünüşü	41
Resim 7. Gövde Enine Kesiti	41
Resim 8. Gövde Epidermisinin Yüzeysel Görünüşü	42
Resim 9. Yaprak Enine Kesit	43
Resim 10. Yaprak Enine Kesitte Stoma	43
Resim 11. Yaprak Kenarındaki Papiller	44
Resim 12. Yaprak Üst Epidermisinin Yüzeysel Görünüşü ve Stoma	44
Resim 13. Yaprak Alt Epidermisinin Yüzeysel Görünüşü ve Stoma	45
Resim 14. Meyvenin Tohumuz Kısımının Enine Kesiti	47
Resim 15. Meyvenin Tohumlu Kısımının Enine Kesiti	47
Resim 16. Meyve Enine Kesitinde Stoma	48
Resim 17. Meyve Yüzeysel Kesiti ve Stoma	48
Resim 18. Tohum Enine Kesiti	49
Resim 19. Çiçek Üst Epidermisinin Yüzeysel Görünüşü ve Kütikula Noktacıkları	50
Resim 20. Çiçek Alt (Dış) Epidermisinin Yüzeysel Görünüşü	51

Resim 21. Çiçek Üst (İç) Epidermis ve Papiller.....	51
Resim 22. Polen Tanesi	52
Resim 23. Gövde Epidermisi ve Stoma	53
Resim 24. Meyve Eksokarpı ve Stoma	53
Resim 25. Çiçek İç Epidermisi ve Kutikula Noktacıkları	54
Resim 26. Yaprak Dış Epidermisi ve Stoma	54
Resim 27. Yaprak Kenarındaki Papiller	55
Resim 28. Toz Drogda Endosperma	55
Resim 29. Toz Drogda Polen Tanesi	56
Resim 30: Protopin Teşhisi için 254 nm UV Işık Altında Çekilen Fotoğraf	63
Resim 31: Protopin Teşhisi için 366 nm UV Işık Altında Çekilen Fotoğraf	63
Resim 32: Protopin Teşhisi İçin Dragendorff Belirteci Püskürtüldükten Sonra Çekilen Fotoğraf	64

BÖLÜM I

GİRİŞ

Hypocoum L. türleri, **Papaveraceae** familyasının dünyada mevcut olduğu bildirilen 40 (71) ve ülkemizde mevcut olduğu bilinen 7 genusu arasında yer alan, ülkemizde 5 tür ve 2 alt tür ile temsil edilen, Akdeniz bölgesi ile Çin'in kuzeybatısı ve Moğolistan'a kadar uzanan bir alanda yayılış gösteren tek yıllık, otsu bitkilerdir (2, 13, 14). *Hypocoum* genusuna ait türlerden birkaçının, az sayıda da olsa bazı ülkelerde halk hekimliğinde kullanıldığı bilinmektedir. Örneğin, *Hypocoum erectum* L. türünün Çin'de bütün halde veya köklerinin antipiretik ve antitussif olarak kullanıldığı, ayrıca akut farenjit ve göz kızarıklığı tedavisinde yararlanıldığı belirtilmiştir (77). Tibet ve Moğolistan'da ise *H. erectum* L. türünün antienflamatuar etkisi nedeniyle çok uzun yıllardır enfeksiyon ile ilgili rahatsızlıklarda kullanıldığı bildirilmiştir (4). *H. leptocarpum* Hook. F. Et Thoms. türünün ise Hindistan, Ladakh'da kök ekstresinin karın ağrılarında kullanıldığı (72) ve geleneksel Tibet ilaçları arasında yer aldığı (11) kaynaklarda belirtilmiştir. Ayrıca *H. erectum* L. türünün Çin'de sindirim sistemi hastalıklarında ve *H. leptocarpum* Hook. F. Et Thoms. türünün ise Tibet'te grip tedavisinde kullanılan preparatların bileşimine girdiğini gösteren 2 patent bulunmaktadır (5, 79).

Hypocoum türleri kimyasal içerikleri açısından incelendiğinde, farklı alt gruplara dahil izokinolin alkaloidleri içermektedir (46, 52, 54, 55). Bu alkaloidlerin

belirgin farmakolojik aktivitelere sahip oldukları bilinmektedir. *Hypecoum* türlerinde ana alkaloid olarak bulunan protopinin önemli aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. *Hypecoum* türleri de dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan elde edilmiş protopinin kullanılarak gerçekleştirilmiş biyolojik aktivite çalışmaları sonucunda bu alkaloidin antikolinesteraz (35, 94), antimikrobiyal (77, 37), antiinflamatuvar (4, 63, 94), hepatoprotektif (58, 64), antioksidan (99), antimalaryal (56, 94), antihelmintik (93), nematosidal (66), antidepresan (101), antispazmodik (30) ve antiplatelet (12) etki gibi değişik aktivitelere sahip olduğu saptanmıştır. Bunların dışında, protopinin antiaritmik, antihipertansif ve negatif inotrop etki olmak üzere kardiyovasküler sistem üzerinde farklı etkiler gösterdiği bulunmuştur (73). Ayrıca protopinin tubulin polimerizasyonunu indüklemek ve mitozu engellemek suretiyle antiproliferatif etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (9). Bütün bu etkiler söz konusu alkaloidin tedavi açısından önemini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada esas olarak, taşıdığı alkaloidler nedeniyle önemli ve Türkiye’de endemik olarak yetişen (53) *Hypecoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisinin çiçekli dönemde, farklı lokalitelerden toplanmış toprak üstü kısımlarından hazırlanan drog örneklerinin, bitkinin ilk defa tarafımızdan kapsamlı olarak incelenmesi sebebiyle, karşılaştırmalı olarak kalite kontrol özelliklerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda anatomik ve mikroskobik çalışmalar, kurutmada kayıp miktar tayini, kül miktar tayini, ince tabaka kromatografisi ile alkaloidlerin teşhis ve saflık kontrolü, total alkaloid miktar tayini ve bitkinin taşıdığı ana alkaloidlerden protopinin adlı alkaloidin miktar tayinin yapılması planlanmıştır. Bu şekilde, total alkaloid ve protopinin alkaloidi açısından zengin olan kaliteli bir droğun taşınması gereken temel özelliklerin saptanması hedeflenmiştir. Bunlara ilaveten,

hazırlanan drog örneklerinin antikolinesteraz aktivite açısından karşılaştırmalı olarak incelenmesi de amaç olarak belirlenmiştir.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. BİTKİ HAKKINDA BOTANİK ÇALIŞMALAR

Hypecoum L. cinsi, tek yıllık otsu bitkilerden oluşan bir cins olup, **Papaveraceae** familyasına dahildir (13). Aşağıda bitkinin cins seviyesinde morfolojik tanımına yönelik olarak verilen bilgiler, “Flora of Turkey and The East Aegean Islands” (13) adlı kaynaktan dilimize çevrilmek suretiyle ve hiçbir katkıda bulunulmaksızın derlenmiştir. Tür ve alttür seviyesinde tanımlara ilişkin bilgiler için ise ayrıca “Taxonomic and Morphological Studies in *Hypecoum* sect. *Hypecoum* (*Papaveraceae*)” (14) isimli çalışmadan da yararlanılmıştır.

1.1.1. *Hypecoum* L. Cinsi

Donuk mavimsi yeşil renkli, tek yıllık bitkiler. Yapraklar 2-4 pinnatisekt, loblar şeritsiden dar obovata kadar. Çiçek durumu dikasyal. Sepaller 2, çabuk düşücü, ovattan lanseolata kadar. Petaller 4, iki sıralı, dıştaki 2 tanesi tamdan üç lobluya kadar, içte kalan 2'si üç parçaya ayrılmış, şeritsi yanal loblu ve tek saplı, orta lob kaşık şeklinde. Stamenler 4, filamentler kanatlı. Meyve çok tohumlu bir lomentum (13).

1.1.2. *Hypocoum procumbens* L.

H. procumbens L., Sp. PL, 124 (1753). Ia: Reichenb., Ic. Fl. Germ., 3: t. 9, no. 4464 (1838-39) (13).

Taçtan çıkan birçok gövde, yatıktan yükseliciye kadar. Yapraklar donuk mavimsi yeşil. 2 x pinnatisekt, loblar şeritsiden şeritsi-lanseolata kadar. Sepaller ovattan ovat-lanseolata kadar, tepeye yakın yerler genellikle küçük dişli. Petaller sarı, dıştaki iki tanesi hafifçe üç loblu, dış lobları ortadakinden daha küçük. Meyveler, genellikle kalınlaşmamış sapçıklarda, dik olarak taşınır. Lomentum yay şekline kıvrılmış, boyuna çizgili, 4–6 cm (13).

Çiçeklenme zamanı. 3-6. Ekilmemiş boş araziler, deniz kıyıları, s.l.-300 m (13).

Ege Adaları, Narbonne (Fransa) ve Salamanca (İspanya), (Hb. Linn. 171/1!) (13).

Yayıliş. A1 Tekirdağ: Tekirdağ, *Stojanov*. A2(E) İstanbul: Florya, Azn.! A2(A) Kocaeli: Pendik, Azn.! Bursa: Bursa, *Friwaldsky*. A3 Bolu: 5 km NW of Seben, 300m, *Kühne* 2261! A4 Ankara: Ankara, *Krause*. B1 İzmir: İzmir, *Rögner*. C3 Burdur: Bucak, *Smith* 116! C4 İçel: Karadwar to Koşanlı, 5 m, *Markgraf*! C5 İçel: Corycos (Kerikos), 40 m, *Siehe* 1895: 15! Is.: Lesvos, *Kirk!*; Rodhos, *Bourgeau!* (13)

Akdeniz bölgesi, Kuzey Irak, Suriye Çölü genelinde. Akdeniz elemanı (13).

LINNAEUS, Sp. Pl. 1: 124 (1753). – Tip. “Prope Lunellam Gallia narbonensi spontae”, BURSER, Hortus siccus 9: 53, IDC no. 1.04 (lectotype, UPS!) (14).

Bitki 1 - 40 cm yüksekliğinde, yeşil ya da donuksu mavimsi yeşil renkte. En uçtaki yaprakçıklar lanseolat-obovat, bölünmemiş, bazen yaprak uçta sivri, bazen tek yanal dişli. Çiçek durumu yatıktan dike kadar, 1 - 14 çiçekli. Sepaller 2 - 7 x 1 - 2.5 mm, uçta bütün. Petaller limon sarısı veya sarımsı turuncu. Dış petaller 3.7 - 12.1 x

1.9 - 12.1 mm, bariz şekilde tırnaklı, baklavamsıdan bariz üç lobluya kadar, boyu enini genellikle geçer ya da eşit, yanal loblar düz, yuvarlaklağımsı ya da kama şeklinde. İç petaller siyah noktalı ya da noktasız (alt türler arasında farklılık gösterir), yanal loblar 2.5 - 9.3 x 0.7 - 3 mm, 2.2 - 6 x 1.1 - 3.1 mm boyutlarında olan fimbriat lobdan kısa, eşit ya da daha uzun, ucu kesik tabanlı, ve yaprak sapı 0.2 - 1.7 mm uzunluğunda, petal tabanından fimbriat lobun tepesine kadar olan uzunluğun % 10-20'si kadar. Orta stamenlerin filamentleri dar ovat, anterler 0.8 - 2.6 mm. Polen sarımsı beyaz. Meyve orta derecede kalınlaşmış bölmeli ya da değil, en geniş septa 1-3.5 mm genişliğinde. Üreme sistemi alt türler arasında farklılıklar gösterir. $2n = 16$ (14).

1.1.3. *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl

Dış petallerin yanal lobları 7 tane kama şeklinde, iç petallerin yanal lobları şeritsiden ovata kadar subakut tepeli; siyah noktalı (53).

Hypocoum procumbens L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl in Pl. Syst. Evol. 163: 255, f. 24 (1989) (53).

Çiçeklenme zamanı 2-4. Yol kenarlarında, ağaçlık alanlarda, ekili çam ormanlarında ve otlaklarda, bazen de kumlu sahillerde (53).

Tip: Türkiye, [B1] İzmir ili, Gümüşsu'nun doğusunda, tuzlu, kumlu kıyılar, 28. IV. 1983, RUNEMARK & CARLSTRÖM 49135 (holotip, LD!) (14, 53).

B. & GB. Anadolu. B1 İzmir: Çeşme, İçmeler yakını, 27 iii 1967, A. & T. Baytop (ISTE 10691!). C1 Muğla: Euromos, *Runemark & Carlström* 49 381. C2 Muğla, Milas-Yatağan yolu, *Runemark & Carlström* 49631. Is.: Sakız Adası. Agios Mina Manastırı. 3 v 1982, Dahl (53).

Endemik (53)

Bitki 1-35 cm yüksekliğinde. Çiçek durumu dik, 1-11 çiçekli. Sepaller 2-5.5 x 1.5 - 2.5 mm. Petaller limon sarısından sarımsı turuncuya kadar. Dış petaller 7.7 - 11.6 x 6 – 11 (12.1) mm, belirgin şekilde üç loblu, yanal loblar kama şeklinde. İç petaller siyah noktalı, yanal loblar 5.8 – 9.3 x 0.7 – 2.6 mm, şeritsiden ovata kadar, uçlar subakut, fimbriat lob 3.5 – 5.8 x 1.6 – 3.1 mm, yaprak sapı 0.7 – 1.6 mm uzunluğunda. Anterler 1.5 – 2.6 mm uzunluğunda. Meyve en geniş septada 1 – 3 mm genişliğinde. Kendi poleni tarafından döllenmez **(14)**.

Yayılı: Yunanistan (AE), Türkiye (An.)'nin batısı, Akdeniz bölgesi **(14)**.

Habitat: Sekonder habitatlarda, yol kenarlarında, ağaçlık alanlarda, ekili çam ormanlarında ve otlaklarda, bazen de kumlu sahillerde **(14)**.

Çiçeklenme zamanı. 2-4 **(14)**.

Sakız adasındaki bitkisel materyalin kültür örnekleri parlak limon renkli petallere sahipken, Kalimnos ve Lesvos'daki bitkilerin petalleri daha altın sarısı renginde. Bu alltür morfolojik olarak homojen görünse de çiçek boyutu ve dış petallerin tırnaklarının uzunluğu sürekli değişim gösterir **(14)**.

SCHWARZ (1934) *H. grandiflorum* subsp. *pseudograndiflorum* (PETROVIĆ) O. SCHWARZ kombinasyonunu yapmıştır. İzmir'in batısından topladığı ve *H. grandiflorum* subsp. *pseudograndiflorum* olarak tanımladığı birkaç örnek aslında *H. procumbens* subsp. *atropunctatum* taksonuna aittir **(14)**.

“Flora of Turkey and the East Aegean Islands” isimli kaynağın 1. cildine göre, ülkemizde yabani olarak yetişen 4 adet *Hypocoum* türünün olduğu bildirilmiştir. Bunlar, *H. procumbens* L., *H. imberbe* Sibth. & Sm., *H. pendulum* L., *H. ponticum* Velenovsky'dir **(13)**.

Aynı kaynağın 11. cildinde ise Türkiye’de 5 tür ve 2 alt tür bulunduğu belirtilmiştir (53). Bu 5 türün ve 2 alt türün isimleri aşağıda yer almaktadır.

1. *H. procumbens* L.
2. *H. trullatum* Å. E. Dahl
3. *H. pseudograndiflorum* PetrovičAddit.
4. *H. dimidiatum* Delile
5. *H. torulosum* Å. E. Dahl
6. *H. procumbens* L. subsp. *procumbens* Ic.
7. *H. procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl

“Taxonomic and Morphological Studies in *Hypecoum* sect. *Hypecoum* (*Papaveraceae*)” (14) isimli kaynakta *Hypecoum* sect. *Hypecoum*’un Akdeniz bölgesi ve Orta Doğu’da 8 tür ve 3 alttürünün yetiştiği bildirilmiştir. Bu türler: *H. procumbens* L., *H. trullatum* Å. E. Dahl, *H. pseudograndiflorum* Petr., *H. angustilobum* Å. E. Dahl, *H. dimidiatum* Delile, *H. imberbe* Sm., *H. duriaei* Pomel, *H. torulosum* Å. E. Dahl, *H. procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl, *H. procumbens* L. subsp. *procumbens* Ic., *H. procumbens* L. subsp. *fragrantissimum* Å. E. Dahl.

Bu türlerden beş tanesi (*Hypecoum procumbens* L. subsp. *fragrantissimum* Å. E. Dahl, *H. procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl, *H. trullatum* Å. E. Dahl, *H. angustilobum* Å. E. Dahl ve *H. torulosum* Å. E. Dahl) ilk kez tanımlanmıştır. Genellikle *H. imberbe* Sm. türüne dahil edilen *H. dimidiatum* Delile ve *H. pseudograndiflorum* Petr. taksonomik açıdan ayrı türler olarak sınıflandırılmıştır.

Literatürde *Hypecoum* türleri üzerinde anatomik ve mikroskopik çalışmalar

az sayıda yer almaktadır. Tibet kaynaklı *Hypocoum leptocarpum* Hook. F. Thoms. bitkisi hakkında yazılmış bir monografda bu bitkiye ait makroskobik ve mikroskobik özellikler bulunmaktadır (36).

İspanya'da yabani olarak yetişen *Hypocoum imberbe* Sm. türü üzerinde polen duvarının gelişimini inceleyen bir çalışma yapılmıştır (62).

1.2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ÇALIŞMALARI

1.2.1. Kalite Kontrol Çalışmaları

Çalışmamızın konusunu oluşturan *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisinden elde edilen Herba Hypocoi droğu ile ilgili bir monograf herhangi bir farmakopede yer almamaktadır. Literatürde *Hypocoum* türlerinden hazırlanmış olan droğların kalite kontrolü için kurutmada kayıp, kül miktar tayini ile teşhis ve saflık kontrollerine yönelik kromatografik deneylere ait araştırmalara rastlanmamıştır. Bununla birlikte, *Hypocoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms bitkisi üzerinde atomik absorpsiyon spektrometrisi kullanılarak iz element tayini yapılmıştır (50). Kalite kontrol deneyleri için Avrupa Farmakopesi (21) ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi (3) incelenmiş, bu kaynaklardan yararlanılarak çalışmamız gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgu ve sonuçların, ileride *Hypocoum* türlerinden hazırlanacak olan Herba Hypocoi droğu hakkında yazılabilecek monografa esas oluşturabileceği düşünülmüştür.

1.2.2. Alkaloit Miktar Tayini Çalışmaları

Literatürde *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisi üzerinde total alkaloit ile protopin miktar tayini için yapılmış bir araştırmaya

rastlanmamıştır. Ancak *Hypocoum pendulum* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarında alkaloidlerin bromokrezol yeşili ile reaksiyona girmek suretiyle sarı renkli kompleks oluşturmasına dayalı spektrofotometrik esaslı total alkaloid miktar tayini ile ilgili bir çalışma bulunmaktadır (67). Ayrıca Tibette kullanılışı bulunan *Hypocoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms bitkisinin kalite kontrolü için RP-HPLC yöntemi kullanılarak protopin miktar tayini yapılmıştır (95).

Bunların dışında farklı familyalara dahil bitkiler üzerinde protopin miktar tayini için yapılmış olan araştırmalar mevcuttur. Bu çalışmalar, literatürden saptanarak tablo halinde verilmiştir. Tablo 1’de (Sayfa 11-16) protopin miktar tayinine yönelik kantitatif çalışmalardan elde edilmiş olan bulgular yer almaktadır.

Tablo 1’de yer verilen çalışmalar dışında Çin tıbbında kullanılışı bulunan çeşitli bitkisel ürünler ve preparatlarda yapılan protopin miktar tayini çalışmaları mevcuttur (25, 28, 48, 69, 70, 76, 98, 100, 102-105, 107-109). Ayrıca sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen bazı çalışmalarda plazmadaki protopinin miktarı ve farmakokinetiği incelenmiştir (31, 39, 97).

1.3. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE TAYİNİ

Alzheimer hastalığı (AH) yaşlı nüfusta görülen demansın en sık rastlanan tipi olup, günlük yaşamsal aktivitelerde azalma ve bilişsel yeteneklerde bozulma ile karakterizedir ve zihinsel fonksiyonların zaman içinde geri dönüşümsüz bir şekilde harap olmasına neden olmaktadır. Alzheimer hastası olan kişilerin beyinlerinde asetilkolin miktarının oldukça azaldığı bilindiğinden, günümüzde asetilkolinesteraz inhibitörü bileşiklerin kullanımı, Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinin temelini oluşturmaktadır. Asetilkolinesteraz inhibitörleri asetilkolinin biyokimyasal

parçalanmasını yavaşlatır ve kolinerjik transmisyonu uzatırlar. Bu şekilde hastalığın ilerlemesi yavaşlar (29, 32, 96). AH tedavisinde kullanılan kolinesteraz inhibitörlerinden galantamin ve rivastigmin doğal kaynaklıdır (19, 65, 89). Dolayısıyla son yıllarda doğal kaynaklardan özellikle de bitkilerden yeni kolinesteraz inhibitörlerinin elde edilmesi için yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Bitkilerde, kolinesteraz inhibitör etkiye sahip farklı yapıda sekonder metabolitler bulunsa da bu bileşiklerin büyük çoğunluğunu alkaloidler oluşturmaktadır (33).

Literatürde asetilkolinesteraz inhibitör aktivite tayini için çeşitli yöntemler bulunmaktadır (18, 34, 40, 42, 44, 47, 60, 61). Bu araştırmada *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisinden hazırlanan alkaloid ekstralarının asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi *in vitro* Ellman yöntemine dayalı mikropilaka deneyi ile saptanmıştır (18, 42).

Bitki Adı	Bitkinin Çalışılan Kısmı	Miktar Tayini Yöntemi*	Protopin	Literatür No
<i>Chelidonium majus</i> L.	Toprak Üstü Toprak Üstü **	UPLC HPLC HPLC	0.69 - 2.42 mg/g ** **	26 27 24
<i>Corydalis cava</i> L. Schweigg. & Körte	Yumru	NACE-ESI-MS	0.03 – 0.06 g/100g	75
<i>Corydalis decumbens</i> (Thunb.) Pers.	Tüm Bitki	LC-MS/MS	1.05 - 1.63 g/kg	68
<i>Corydalis impatiens</i> (Pall.) Fish	Tüm Bitki	HPLC	219.09-367.20 µg/g	49
<i>Corydalis intermedia</i> L. Merat	Yumru	NACE-ESI-MS	0.54 g/100g	75
<i>Corydalis pumila</i> Host Reichenb.	Yumru	NACE-ESI-MS	0.11 g/100g	75
<i>Corydalis solida</i> L. Clairv.	Yumru	NACE-ESI-MS	0.22 – 0.26 g/100g	75
<i>Corydalis yanhusuo</i> W. T. Wang,	Tüm Bitki Yumru	HPLC LC-MS/MS	%0.0042 – 0.0185 0.32 – 0.53 mg/g	88 17
<i>Dicentra paucinerchia</i> K. R. Stern	Yumru	HPTLC	**	1
<i>Eschscholtzia californica</i> Cham.	Toprak Üstü	HPLC	10.1 – 17.5 mg/100 g	59

Tablo 1. Çeşitli Bitkiler Üzerinde Yapılmış Olan Kantitatif Çalışmalarda Elde Edilen Protopin Miktarları

Bitki Adı	Bitkinin Çalışılan Kısmı	Miktar Tayini Yöntemi*	Protopin	Literatür No
<i>Fumaria asepala</i> Boiss.	Toprak Üstü	HPLC d.p.p.-HPLC	%0.16 %0.17-0.18	86 87
<i>Fumaria capreolata</i> L.	Toprak Üstü	HPLC	%0.11	84
	Toprak Üstü	d.p.p.-HPLC	%0.11-0.12	87
	Tüm Bitki	HPLC	% 72.9***	90
<i>Fumaria cilicica</i> Boiss.	Tüm Bitki	İzotakoforez	%73.5***	90
	Toprak Üstü	d.p.p.-HPLC	%0.19-0.21	87
<i>Fumaria cilicica</i> Hausskn.	Toprak Üstü	HPLC	%0.19	85
<i>Fumaria densiflora</i> DC.	Toprak Üstü	d.p.p.-HPLC	%0.29-0.27	87
		Spektrofotometrik	%0.3644 – 0.3676	51
		Optik Dansitometrik	%0.0350 – 0.0351	51
<i>Fumaria gaillardotii</i> Boiss.	Toprak Üstü	d.p.p.-HPLC	%0.11-0.12	87
		HPLC	%0.11	80
<i>Fumaria indica</i> Pugsley	%50'lik Etanol Ekstresi		0.08 mg/g	
	Hekzan Fraksiyonu	HPTLC	-	
	Kloroform Fraksiyonu Butanol Fraksiyonu		0.12 mg/g 0.2 mg/g	58

Tablo 1'in devamı. Çeşitli Bitkiler Üzerinde Yapılmış Olan Kantitatif Çalışmalarda Elde Edilen Protopin Miktarları

Bitki Adı	Bitkinin Çalışılan Kısmı	Miktar Tayini Yöntemi*	Protopin	Literatür No
<i>Fumaria judaica</i> Boiss.	Toprak Üstü	HPLC	%0.18	82
		d.p.p.-HPLC	%0.18-0.19	87
		Spektrofotometrik	%0.1285 – 0.1320	41
		Optik Dansitometrik	%0.1291 – 0.1324	41
<i>Fumaria kralikii</i> Jordan.	Toprak Üstü	Optik Dansitometrik	%0.0888 – 0.1783	22
		d.p.p.-HPLC	%0.38-0.40	87
<i>Fumaria macrocarpa</i> Parl.	Toprak Üstü	HPLC	%0.38	81
		HPLC	%0.16	83
<i>Fumaria microcarpa</i> Boiss.	Toprak Üstü	d.p.p.-HPLC	%0.16-0.18	87
		d.p.p.-HPLC	%0.31-0.33	87
<i>Fumaria officinalis</i> L.	Toprak Üstü	HPLC	%0.17	85
		Spektrofotometrik	%0.1104 – 0.1191	22
		Optik Dansitometrik	%0.1105 – 0.1330	22
		Spektrofotometrik	%0.0926 – 0.1277	41
		Optik Dansitometrik	%0.1121 – 0.1310	41
		Spektrofotometrik	%0.1104 – 0.1310	6

Tablo 1'in devamı. Çeşitli Bitkiler Üzerinde Yapılmış Olan Kantitatif Çalışmalarda Elde Edilen Protopin Miktarları

Bitki Adı	Bitkinin Çalışılan Kısmı	Miktar Tayini Yöntemi*	Protopin	Literatür No
<i>Fumaria officinalis</i> L.	Toprak Üstü	Optik Dansitometrik	%0.1145 - 0.1460	6
		d.p.p.-HPLC	%0.17 - 0.19	87
		CE-MS	0.104 g/100g	74
<i>Fumaria parviflora</i> Lam.	Toprak Üstü	d.p.p.-HPLC	%0.41 - 0.45	87
		Spektrofotometrik	%0.0615 - 0.0694	6
	Toprak Üstü	Optik Dansitometrik	%0.0661 - 0.0849	6
		HPLC	%0.42	81
	Tüm Bitki	HPLC	%1.0 - 40.7***	90
	Tüm Bitki	Izotakofrez	%1.26 - 38.8***	90
	Tüm Bitki	HPLC	%0.1457 - 0.1298	38
	Tüm Bitki	Izotakofrez	**	91
<i>Fumaria petteri</i> Reichb. subsp. <i>thuretii</i> Boiss.	Toprak Üstü	d.p.p.-HPLC	%0.43 - 0.47	87
	Toprak Üstü	HPLC	%0.43	81
<i>Fumaria Sp.</i>	Toprak Üstü	Santrifugal İ.T.K.	%0.024***	23
<i>Fumaria vaillantii</i> Loisl.	Toprak Üstü	d.p.p.-HPLC	%0.27 - 0.30	87
	Toprak Üstü	Kromatopolarografik	%0.07 - 0.19	57

Tablo 1'in devamı. Çeşitli Bitkiler Üzerinde Yapılmış Olan Kantitatif Çalışmalarda Elde Edilen Protopin Miktarları

Bitki Adı	Bitkinin Çalışılan Kısmı	Miktar Tayini Yöntemi*	Protopin	Literatür No
<i>Glaucium flavum</i> Crantz	Kök Toprak Üstü	HPLC-DAD HPLC-DAD	%0.84 %0.08	8 8
<i>Macleaya cordata</i> (Willd.) R. Br.	Meyve	HPLC-ESI/MS	6.98 - 8.53 mg/g	43
	Kök	HPLC-DAD-ESI/MS	2.67 - 6.70 mg/g	10
	Gövde	HPLC-DAD-ESI/MS	1.73 - 1.98 mg/g	10
	Yaprak	HPLC-DAD-ESI/MS	11.11 - 13.45 mg/g	10
	Çiçek	HPLC-DAD-ESI/MS	31.62 - 40.53 mg/g	10
Meyve	HPLC-DAD-ESI/MS	9.40 - 11.45 mg/g	10	
<i>Meconopsis</i> Sp.	**	HPLC-ESI/MS	**	106
<i>Papaver somniferum</i> L.	**	HPLC	**	92
<i>Sarcocapnos baetica</i> (Boiss. & Reuter) Nyman subsp. <i>ardalii</i>	Toprak Üstü	GC-MS	%3.8***	78
<i>Sarcocapnos baetica</i> (Boiss. & Reuter) Nyman subsp. <i>baetica</i>	Toprak Üstü	GC-MS	% 29.5***	78
<i>Sarcocapnos crassifolia</i> subsp. <i>Atlantis</i> (Boiss.)	Toprak Üstü	GC-MS	%6.6***	78

Tablo 1'in devamı. Çeşitli Bitkiler Üzerinde Yapılmış Olan Kantitatif Çalışmalarda Elde Edilen Protopin Miktarları

Bitki Adı	Bitkinin Çalışılan Kısmı	Miktar Tayini Yöntemi*	Protopin	Literatür No
<i>Sarcocapnos crassifolia</i> subsp. <i>Crassifolia</i> (Desf.)	Toprak Üstü	GC-MS	%16.5***	78
<i>Sarcocapnos enneaphylla</i> L.	Toprak Üstü	GC-MS	%19.6 - 41.6***	78
<i>Sarcocapnos integrifolia</i> Boiss.	Toprak Üstü	GC-MS	%5.1***	78
<i>Sarcocapnos pulcherrima</i> Morales & Romero	Toprak Üstü	GC-MS	%5.9***	78
<i>Sarcocapnos saetabensis</i> Mateo & Figuerola	Toprak Üstü	GC-MS	%8.9 - 22.9***	78
<i>Sarcocapnos speciosa</i> Boiss.	Toprak Üstü	GC-MS	%15.0***	78

Tablo 1'in devamı. Çeşitli Bitkiler Üzerinde Yapılmış Olan Kantitatif Çalışmalarda Elde Edilen Protopin Miktarları

* UPLC: Ultra Performans Sıvı Kromatografisi, NACE-ESI-MS: Susuz Ortam Elektroferez-Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometrisi, LC-MS/MS: Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi, HPTLC: Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi , d.p.p.-HPLC: Diferansiyel Puls Polarografisi-Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi, GC-MS: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi, CE-MS: Kapiller Elektroferez-Kütle Spektrometrisi

** Mevcut imkanlar dahilinde özetlerine ulaşılabilen kaynaklarda belirtilmemiştir.

*** Farklı pH'larda yapılan ekstraksiyonlar sonucunda elde edilen ekstraktlere veya bitkilerden elde edilen çeşitli fraksiyonlara ait sonuçlar.

BÖLÜM II

1. GEREÇ VE YÖNTEM

1.1. BOTANİK ARAŞTIRMALAR

1.1.1. Materyal

Hypocoum procumbens L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisi 23.03.2012, 22.04.2012, 23.04.2012 ve 03.05.2012 tarihlerinde sırasıyla İzmir ili, Bornova ilçesi, Ege Üniversitesi Lojmanları çevresinden, İzmir ili, Aliağa ilçesi, Yenişakran beldesinden, Uşak ili, Yapağılar köyünden ve İzmir ili, Ödemiş ilçesi, Birgi-Bozdağ yolundan olmak üzere dört farklı lokaliteden çiçekli halde toplanmış ve Uzman Biolog Volkan Eroğlu (Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi) tarafından tayin edilmiştir. Çalışmamıza konu olan bitkiye ait hazırlanan herbarium örnekleri Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı Herbariumu'nda sırasıyla 1453, 1454, 1455 ve 1456 numaraları altında kayıtlı bulunmaktadır. Bitkinin doğadaki görünüşüne ait fotoğraflarına Resim 1 ve Resim 2'de yer verilmiştir. Bitkinin herbarium örneğine ait bir fotoğraf ise Resim 3'de görülmektedir.

Bitkinin dört farklı yerde yetişen muhtelif fertlerinden kök, gövde, yaprak ile meyveye ait çeşitli örnekleri içeren alkol materyali 70°'lik etanol kullanılarak ayrı ayrı hazırlanmış ve anatomik çalışmalarda kullanmak amacıyla saklanmıştır.



Resim 1. *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl Bitkisinin Doğadaki Görünüşü



Resim 2. *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl Bitkisinin Doğadaki Görünüşü

Bitkisel materyal öncelikle toprak üstü ve toprak altı olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Toprak üstü kısmı, istenmeyen organik ve anorganik, gözle görülebilen bütün yabancı maddelerden ve kurumuş, lekelenmiş veya bozulmuş bütün kısımlarından ayıklanarak temizlendikten sonra ufak parçalara bölünerek gölgede ve oda sıcaklığında kurutularak drog örnekleri hazırlanmıştır. Drog hazırlamak için yapılan işlemlerde örneklerin yabancı maddeler açısından saf ve farmakope standartlarına uygun olabilecek birer örnek olmaları amaçlanmıştır.



Resim 3. *Hypecoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl Bitkisinin Herbaryum Örneği

1.1.2. Deneyler

Mikroskopik inceleme için kullanılacak toz materyal, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanmış olan drogdan bir miktar alınarak, tunç bir havan yardımıyla mekanik olarak, orta incelikte toz haline getirilmesi suretiyle hazırlanmıştır.

Anatomik kesit çalışmaları için ise daha önce bahsedilen alkol materyali kullanılmıştır. Alkol materyalinde bulunan bitkinin kök, gövde, yaprak ve meyveye ait çeşitli örneklerinden enine ve yüzeysel kesitler alınmıştır. Bu kesitler Sartur ve Kloralhidrat reaktifleri (7) kullanılarak, mikroskopik inceleme preparatları halinde, Carl Zeiss Jena marka araştırma mikroskopunda, anatomik yapılar açısından karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

Bu incelemeler sırasında, bitkilerin kök, gövde, çiçek durum sapı, yaprak ve meyveye ait sabit ve karakteristik yapılarının fotoğrafları Carl Zeiss Jena marka araştırma mikroskobu üzerine bağlanmış olan Celestron marka, 44421 model numaralı mikroskop görüntüleyici yardımıyla alınmıştır.

1.2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ARAŞTIRMALARI

1.2.1. Materyal

Hypocoum procumbens L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisi dört farklı lokaliteden ve bitki çiçekli haldeyken toplanmıştır. Bitkinin farklı örneklerinin toplandıkları yerler, toplanma tarihleri, herbaryum numaraları ve toplanan bitkisel örneklerden hazırlanan Herba Hypocoi droglarına ait kodlar Tablo 2’de verilmiştir.

Toplanan bitkilerden hazırlanan herbaryum örnekleri Uzman Biolog Volkan Eroğlu (Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi) tarafından tayin edilmiş olup Ege

Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı Herbaryumunda saklanmaktadır.

Kod	Toplanma Yeri ve Tarihi	Herbaryum No
HP-1	Ege Üni. Lojmanları, Bornova, İzmir 23.03.2012	1453
HP-2	Yenişakran, Aliğa, İzmir 23.04.2012	1454
HP-3	Yapağılar Köyü, Uşak 22.04.2012	1455
HP-4	Birgi-Bozdağ Yolu, Ödemiş, İzmir 03.05.2012	1456

Tablo 2. Herba Hypecoi Droğlarına Ait Kodlar

Herba Hypecoi droğ örneklerini hazırlamak için taze bitkisel materyalin öncelikle toprak üstü kısımları, toprak altı kısımlarından dikkatlice ayrılmış, istenmeyen organik ve anorganik, gözle görülebilen bütün yabancı maddelerden ve kurumuş, lekelenmiş veya bozulmuş bütün kısımlarından ayıklanarak temizlendikten sonra ufak parçalara bölünerek gölgede ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Kurutma işlemini takiben, hazırlanan örnekler Retsch GmbH SK 1 marka elektrikli değirmende toz (elek çapı 1mm) haline getirilmiştir.

İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K.) ve Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) deneylerinde kullandığımız protopin referans maddesi anabilim dalımızda *Hypecoum* türleri üzerinde daha önce yapılmış olan çalışmalarda (46), saf halde izole edilmiş olup, bu bileşiğe ait spektral bulgular (1D ve 2D NMR, UV, IR, MS) anabilim dalımızda mevcuttur. Protopin, desikatörde fosfor (V) oksit üzerinde sabit ağırlığa gelinceye kadar kurutulduktan sonra kullanılmıştır.

1.2.2. Yöntemler

1.2.2.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini

Kurutmada kayıp miktar tayini için önceden sabit ağırlığa getirilmiş cam tartım kabı içine tam olarak tartılmış 1g civarı drog örneği konur. 100-105 °C'lik etüvde 1 saat süreyle bekletilir. Etüvden çıkartılarak desikatörde belirli bir süre soğuması için tutulur ve ardından tartılır. Bu tartımlardan son ikisi arasındaki fark 0,5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vevne gelinceye kadar, ısıtma, soğutma ve tartma işlemlerine devam edilerek, droğun yüzde kurutmada kayıp miktarı hesaplanır (3, 21).

1.2.2.2. Total Kül Miktar Tayini

Deney şartlarında önceden yakma fırınında 1 saat süreyle yakılıp soğutularak sabit ağırlığa getirilen porselen kröze içerisine 1g civarında drog tam olarak tartılarak konur. Drog içeren kröze, öncelikle 100-105 °C'lik etüvde bir saat süreyle bekletilir. Daha sonra 600 ± 25 °C'lik yakma fırınında 1 saat yakılır. Yakma fırınından çıkartılarak desikatörde belirli bir süre soğuması için tutulur ve ardından tartılır. Bu tartımlardan son ikisi arasındaki fark 0,5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vevne gelinceye kadar, ısıtma, soğutma ve tartma işlemlerine devam edilerek, droğun içerdiği kül miktarı yüzde olarak hesaplanır (3, 21).

1.2.2.3. Sülfat Külü Miktar Tayini

Deney şartlarında önceden yakma fırınında 1 saat süreyle yakılıp soğutularak sabit ağırlığa getirilen porselen kröze içerisine 1g civarında drog tam olarak tartılarak konur. Üzerine % 10'luk sulu sülfürik asit çözeltisinden 2 ml damla damla ilave

edilir. Önce su banyosunda kuruluğa kadar bekletilir ve ardından tablalı ısıtıcıda duman çıkışı bitene kadar yakılır. Daha sonra 600 ± 25 °C'lik yakma fırınında 1 saat yakılır. Yakma fırınından çıkartılarak desikatörde belirli bir süre soğuması için tutulur. Soğumasını takiben üzerine birkaç damla % 10'luk sülfürik asit eklenir, benzer şekilde ısıtılıp, yakılır. Soğumasının ardından % 15.8'lik amonyum karbonat çözeltisi ilave edilir ve aynı işlem tekrarlanır. Sülfat külü içeren kröze sabit vezne gelinceye kadar yakma, soğutma ve tartma işlemlerine devam edilir. Buradan droğun içerdiği sülfat külü miktarı yüzde olarak hesaplanır (3, 21).

1.2.2.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

Deney şartlarında önceden yakma fırınında 1 saat süreyle yakılıp soğutulmuş sabit ağırlığa getirilen porselen kröze içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartılarak konur. Öncelikle $100-105$ °C'lik etüvde 1 saat süreyle kurutulur. Daha sonra 600 ± 25 °C'lik yakma fırınında 1 saat yakılır. Yakma fırınından çıkartılarak desikatörde belirli bir süre soğuması için tutulur ve ardından tartılır. Bu tartımlardan son ikisi arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar, ısıtma, soğutma ve tartma işlemlerine devam edilir. Krözede kalan bakiye üzerine, distile su ve hidroklorik asit konulur. Krözenin üzeri saat camı ile kapatıldıktan sonra tablalı ısıtıcı kullanılarak kaynatılır. Soğuduktan sonra kül bırakmayan süzgeç kağıdından (589¹ Black ribbon), süzülür. Süzüntü nötr olana kadar sıcak distile su ile süzgeç kağıdı yıkanır. Üzerinde kalan bakiyeye birlikte süzgeç kağıdı tekrar krözenin içerisine konur ve son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar yakma, soğutma ve tartma işlemlerine devam edilir. Böylece droğun % olarak hidroklorik asitte

çözünmeyen kül miktarı hesaplanır (3, 21).

1.2.2.5. Drogaların İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K) ile Teşhis ve Kontrolü

1.2.2.5.1. Örnek ve Standart Çözeltilerinin Hazırlanışı

Önceden 100-105 °C'lik etüvde sabit vezne getirilen drog örneklerinden 1 g civarında toz drog örneği tam olarak tartılır. Metanol ile geri çeviren soğutucu altında, kaynar halde bir süre bekletilir. Soğumasını takiben filtre edilir ve elde edilen filtrat, örnek çözeltisi olarak kullanılır (15).

Standart çözelti : Protopinin, kloroform içerisinde belirli konsantrasyonda çözeltisi hazırlanır.

1.2.2.5.2. İ.T.K ile Kontrol Çalışmaları

Hazırlanan örnek ve standart çözelti, silika jel hazır kromatografi plağına (Merck 5715) uygulanır. Plak, ön deneylerle saptanmış olan uygun bir çözücü sisteminde sürüklenir. Plak, kromatografi tankından çıkarıldıktan sonra kurutulur ve ardından 254 ve 366 nm dalga boylarındaki UV ışık altında incelenir. Daha sonra plağa Dragendorff reaktifi püskürtülerek tekrar değerlendirilir. Dragendorff reaktifi püskürtülmeden önce ve sonra plağın fotoğrafları çekilir (15).

1.2.2.6. Total Alkaloit Miktar Tayini

1.2.2.6.1. Total Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

Önceden 100-105⁰ C'lik etüvde sabit vezne getirilen toz drog örneği tam olarak tartılır. 5 kısım % 17'lik amonyak çözeltisi, 10 kısım % 96'lık etanol ve 30 kısım peroksitsiz eter kullanılarak hazırlanan karışım ile beher içinde muamele edilerek nemlendirilir ve iyice karıştırılır.

Hazırlanan karışım küçük bir perkolatöre alınır. Amonyak – etanol – eter çözelti karışımı ile kap ve karıştırma aleti yıkanır ve yıkama sıvısı, perkolatördeki karışıma ilave edilir. Bu şekilde masere edilmek amacıyla drog, bir süre perkolatör içerisinde bekletilir. Daha sonra peroksitsiz eterle tüketilir. Alkaloit ekstraksiyonunun bitip bitmediğini saptamak için perkolatörden alınan perkola, kuruluğa kadar distillendikten sonra bakiye %2'lik H₂SO₄ ile çözülerek, alkaloit varlığı Mayer ve Dragendorff belirteçleri (21) ile kontrol edilir. Perkola, rotavaporda belirli bir miktar kalana kadar yoğunlaştırılıp, ayırma hunisi içerisine alınır. 5 kez 0.5N H₂SO₄ ile çalkalanır. Asit fraksiyonlar % 17'lik amonyak çözeltisi ile pH 9-9.5 olana kadar alkalilendirildikten sonra 5 defa, peroksitsiz eter ile ekstre edilir. Elde edilen eterli kısımlar birleştirildikten sonra su ile yıkanır ve su atılır. Eterli kısım, alçak basınç altında rotavaporda kuruluğa kadar distillenir. Bu şekilde total alkaloit ekstresi elde edilmiş olur (15).

1.2.2.6.2. Total Alkaloit Miktar Tayini Deneyinin Yapılışı

Hazırlanan total alkaloit ekstresi, su banyosunda ısıtıldıktan sonra 10 ml peroksitsiz eter ile çözüdürülür ve üzerine, 0.02 N ayarlı H₂SO₄ ilave edilir. Eter, rotavaporda geri distillenir. Çözeltiye metil kırmızısı-karışım belirteci (3) eklenir. Asidin fazlası 0.02 N ayarlı NaOH ile önceden pembe olan renk yeşile dönene kadar titre edilir (15).

1.2.2.7. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Protopin Miktar Tayini

1.2.2.7.1. Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

200 mg civarında drog, tam olarak tartılır. Üzerine 5 ml % 2'lik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek 5 saat süreyle 40 °C'de ultrasonik banyoda maserasyona bırakılmak suretiyle ekstre edilir. Bu işlemi takiben derişik amonyum hidroksit çözeltisi ile alkalilendirilir ve üzerine distile su eklenir. 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilir. Üstte kalan sıvı faz başka bir tübe aktarılarak, distile su ile 10 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltiden 3 ml alınarak Extrelut-N (Merck) kolonuna yüklenir ve 10 dk bekletilir. Bunu takiben Extrelut-N içerisinde kloroform geçirmek suretiyle elüsyon yapılır. Kloroform, alçak basınç altında kuruluğa kadar distillenir. Bu şekilde alkaloit ekstresi elde edilmiş olur (26).

1.2.2.7.2. Standart Protopine Ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Standart madde metanol kullanılarak çözüdür. Standart alkaloit çözeltisinden seyreltmek suretiyle farklı konsantrasyonlarda hazırlanılan çözeltiler filtreden

süzülür. Bu çözeltilerin her birinden uygun miktarlarda, enjektöre alınıp, HPLC'ye uygulanır. Belirli dalga boyunda ilgili alkaloide ait sinyalin alan değeri ölçülür. Uygulanan miktara karşı okunan alan değerini gösteren bir ölçü eğrisi hazırlanır ve denklem hesaplanır (26).

1.2.2.7.3. Deneyin Yapılışı

Her bir örnek için üç paralel olacak şekilde, miktar tayini için hazırlanan alkaloit ekstraları, metanolde çözülür. Çözeltiler filtreden (Syringe 100x 13 mm, 0.45 µm) süzildükten sonra, Hamilton enjektör yardımıyla HPLC'ye uygulama yapılır. Belirli bir dalga boyunda okunan alan değerlerine karşılık gelen miktar, ölçü eğrisinden yararlanılarak hesaplanır. Bu miktar tayini sonuçları, kuru drog üzerinden % miktar olarak hesaplanır (26).

1.2.3. Deneyler

1.2.3.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini

Önceden deney şartlarında 100-105 °C'lik etüvde sabit vezne getirilmiş cam tartım kabı içerisine 1 g civarında drog örneği tam olarak tartıldı. Isıtma işlemi için 1 saat süre ile 100-105 °C'lik etüvde bekletildikten sonra desikatöre alınıp, 30 dakika soğutuldu ve ardından tartıldı. Isıtma, soğutma ve tartma işlemlerine, tartımlardan son ikisi arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar, devam edilerek, droğun içerdiği yüzde kurutmada kayıp miktarı hesaplandı.

1.2.3.2. Total Kül Miktar Tayini

Deney şartlarında önceden 600 ± 25 °C'lik Heraeus marka yakma fırınında sabit ağırlığa getirilen bir porselen kröze içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartılarak kondu. Drog içeren kröze, önce 100-105 °C'lik etüvde 1 saat bekletildi ardından 600 ± 25 °C'lik yakma fırınında 1 saat süreyle yakıldı. 30 dakika desikatör içerisinde soğutulmaya bırakıldıktan sonra tartım işlemi gerçekleştirildi. Yakma, soğutma ve tartma işlemlerine, tartımlardan son ikisi arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar, devam edilerek, droğun içerdiği yüzde total kül miktarı hesaplandı.

1.2.3.3. Sülfat Külü Miktar Tayini

Deney şartlarında önceden 600 ± 25 °C'lik Heraeus marka yakma fırınında sabit ağırlığa getirilen bir porselen kröze içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartılarak kondu. Üzerine 2 ml % 10'luk sülfürik asit çözeltisi damla damla ilave edildikten sonra önce su banyosunda kuruluğa kadar, ardından tablalı ısıtıcıda duman çıkışı bitene kadar ısıtıldı ve son olarak 600 ± 25 °C'lik yakma fırınına konularak, 1 saat süreyle yakıldı. Desikatörde 30 dk soğutulduktan sonra birkaç damla % 10'luk sülfürik asit çözeltisinden tekrar ilave edildi, yukarıda bahsedilen şekilde tekrar ısıtıldı ve yakıldı. Desikatörde 30 dk soğutulmasının ardından, birkaç damla % 15.8'lik amonyum karbonat çözeltisi ilave edilerek aynı şekilde ısıtılıp, yakıldı. Desikatörde 30 dk soğutulduktan sonra tartıldı. Drog içeren krözenin ağırlığı sabit vezne gelinceye kadar, yakma ve soğutma işlemlerine devam edildi. Buradan droğun içerdiği sülfat külü bulunarak, yüzde olarak hesaplandı.

1.2.3.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

Deney şartlarında önceden 600 ± 25 °C'lik Heraeus marka yakma fırınında sabit ağırlığa getirilen bir porselen kröze içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartılarak kondu. Drog içeren kröze, önce 100-105 °C'lik etüvde 1 saat bekletildi ardından 600 ± 25 °C'lik yakma fırınında 1 saat süreyle yakıldı. 30 dakika desikatör içerisinde soğutulmaya bırakıldıktan sonra tartım işlemi gerçekleştirildi. Yakma, soğutma ve tartma işlemlerine, külü içeren krözenin ağırlığı sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. Krözenin içine 15 ml distile su ve 10 ml derişik hidroklorik asit konuldu. Krözenin ağız saat camı ile kapatılarak, plak ısıtıcı üzerinde 10 dk süreyle ısıtıldı. Soğuduktan sonra kül bırakmayan süzgeç kağıdından (589¹ Black ribbon) süzülerek, süzüntü nötr oluncaya kadar sıcak distile suyla süzgeç kağıdı yıkandı. Üzerinde kalan bakiyeye birlikte süzgeç kağıdı tekrar krözenin içerisine konuldu ve son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar ısıtma ve yakma işlemlerine devam edildi. Böylece droğun % olarak hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı hesaplandı.

1.2.3.5. Drogların İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K) ile Teşhis ve Kontrolü

1.2.3.5.1. Örnek ve Standart Çözeltilerin Hazırlanışı

Önceden 100-105 °C'lik etüvde sabit vezne getirilen drog örneklerinden 1 g civarında toz drog örneği tam olarak tartıldı. 10 ml metanol ile geri çeviren soğutucu altında, kaynar halde 2 dakika süreyle bekletildi. Soğumasını takiben filtre edildi ve elde edilen filtrat, örnek çözelti olarak kullanıldı.

Standart çözelti : 5 mg protopin, 5 ml kloroformda çözüldü. Bu çözeltiye Sp kodu verildi.

1.2.3.5.2. Deneyin Yapılışı

0.25 mm kalınlığında 20x20 cm boyutlarındaki Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) hazır kromatografi plağına HP-1, HP-2, HP-3, HP-4 kodlu örnek çözeltilerden 60'ar µl Hamilton marka enjektör kullanılarak, 2 cm uzunlukta ve bant şeklinde tatbik edildi. Plak üzerinde ilk ve son örnek çözeltilerinin yanlarına protopin referans çözeltisi de yine Hamilton marka enjektör kullanılarak 1 cm uzunlukta bant şeklinde tatbik edildi. Kromatografi plağı toluen-kloroform-metanol-%26'luk amonyum hidroksit (5:3:1:1 damla) çözücü sisteminde 1 kez developpe edildi. Plak, kromatografi tankından çıkarıldıktan sonra kurutularak üzerindeki mobil fazın uzaklaştırılması sağlandı. Ardından 254 ve 366 nm dalga boylarındaki UV ışık altında incelendi. Daha sonra plağa Dragendorff reaktifi püskürtülerek tekrar değerlendirildi. Dragendorff reaktifi püskürtülmeden önce ve sonra plağın fotoğrafları çekildi.

1.2.3.6. Total Alkaloit Miktar Tayini

1.2.3.6.1. Total Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

Önceden 100-105 °C'lik etüvde sabit vazne getirilen drog örneklerinden 10 g civarında toz drog örneği tam olarak tartıldı. 35 ml'lik bir karışım (5 kısım % 17'lik amonyak çözeltisi, 10 kısım % 96'lık etanol ve 30 kısım peroksitsiz eter) ile beher içinde muamele edilerek nemlendirildi ve iyice karıştırıldı.

Hazırlanan karışım küçük bir perkolatöre alındı. 10 ml amonyak – etanol – eter

karişımı ile kap ve kariştırma aleti yıkandı ve yıkama sıvısı, perkolatördeki karişıma ilave edildi. Bu şekilde drog, 4 saat süre ile perkolatör içerisinde bekletilerek masere edildi. Daha sonra 250 ml peroksitsiz eterle tüketildi. Alkaloit ekstraksiyonun bitip bitmediğini saptamak için perkolatörden 1 ml perkola alınarak, kuruluğa kadar distillendi. Bakiye 0.5 ml H₂SO₄ ile çözölerek, alkaloit varlığı Mayer ve Dragendorff belirteeri (21) ile kontrol edildi. Perkola, rotavaporda 150 ml'ye kadar yoğunlaştırılıp, ayırma hunisi içerisine alındı. 5 kez 25 ml'lik 0.5N H₂SO₄ ile çalkalanmak suretiyle ekstre edildi. Asit fraksiyonlar % 17'lik amonyak çözeltisi ile pH 9-9,5 olana kadar alkalilendirildikten sonra 5 defa, 20 ml peroksitsiz eter ile yine ayırma hunisinde çalkalanmak suretiyle ekstre edildi. Elde edilen eterli kısımlar birleştirildikten sonra 10 ml su ile yıkandı ve su atıldı. Eterli kısım alçak basınç altında rotavaporda kuruluğa kadar distillendi. Bu şekilde total alkaloit ekstresi elde edilmiş oldu.

1.2.3.6.2. Total Alkaloit Miktar Tayini Deneyinin Yapılışı

Hazırlanan total alkaloit ekstresi, 15 dakika su banyosunda ısıtıldıktan sonra 10 ml peroksitsiz eter ile çözündürüldü ve üzerine, 20 ml 0.02 N ayarlı H₂SO₄ ilave edildi. Eter, rotavaporda geri distillendi. Çözeltiye 30 damla metil kırmızı-sı-karişım belirteci (3) eklendi. Asidin fazlası 0.02 N ayarlı NaOH ile önceden pembe olan renk yeşil renge dönene kadar titre edildi.

1.2.3.6.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Ayarlanması

1.2.3.6.3.1. 0.1 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Kaynatılmış, soğutulmuş, distile su 1000 ml'lik balon jojeye konuldu. 2.8 ml % 98'lik derişik sülfürik asit (Riedel-de Haen) büret yardımı ile üzerine ilave edildi. 1000 ml'ye kaynatılmış soğutulmuş distile su ile tamamlandı. Böylece 0.1 N sülfürik asit çözeltisi hazırlanmış oldu (20).

1.2.3.6.3.2. 0.02 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Hazırladığımız 0.1 N sülfürik asit çözeltisinden büret yardımıyla 200 ml alınarak, 1000 ml'lik balon joje içerisine aktarıldı. 1000 ml'ye kaynatılmış soğutulmuş distile su ile tamamlandı. Böylece 0.02 N sülfürik asit çözeltisi hazırlanmış oldu (20).

1.2.3.6.3.3. 0.02 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Ayarlanması

270 °C'lik etüvde 1 saat kuruluğa kadar ısıtılarak, sabit vevne getirilen, susuz sodyum karbonattan (Riedel-de Haen) yaklaşık 30 mg civarında tam tartım alındı. 30 ml kaynatılmış soğutulmuş distile suda çözüldü. Üzerine 0.1 ml metil oranj reaktif çözeltisi (3) ilave edilerek, hazırlanan 0.02 N sülfürik asit çözeltisi ile kırmızı-sarı renk oluşana kadar titre edildi. Titre edilmiş çözelti dikkatle ısıtılarak karbondioksit ortamdan uzaklaştırıldı. Soğumasını takiben kırmızı-sarı renk tekrar ortaya çıkıncaya kadar titrasyona devam edildi.

1 ml 0.02 N sülfürik asit çözeltisi 1.0598 mg susuz sodyum karbonata eşdeğer olup, faktör = Teorik sarfiyat/Pratik sarfiyat formülünden yararlanılarak hesaplandı.

(16, 20)

1.2.3.6.3.4. 0.1 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması

Yaklaşık 4.2 g sodyum hidroksit (Riedel-de Haen) tartıldı. Birkaç ml kaynatılmış soğutulmuş distile su ile 1000 ml'lik bir balon jöje içerisinde yıkanarak, karbonatından kurtarıldı. Daha sonra kaynatılmış soğutulmuş distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı (20).

1.2.3.6.3.5. 0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması

Hazırlanmış olan 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisinden 200 ml'si büret yardımıyla 1000 ml'lik bir balon jöjeye alındı. Kaynatılmış soğutulmuş distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Bu şekilde 0.02 N sodyum hidroksit çözeltisi hazırlanmış oldu (20).

1.2.3.6.3.6. 0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Ayarlanması

0.02 N sodyum hidroksit çözeltisinin ayarlanması için, daha önce hazırlanan ayarlı 0.02 N sülfürik asit çözeltisinden 25 ml büret ile ölçülerek bir erlenmayere alındı. Üzerine 3 damla metil kırmızısı karışım reaktif çözeltisi damlatıldı. Oluşan kırmızı-viyole renk, yeşile dönüncüye kadar 0.02 N sodyum hidroksit çözeltisi ile titre edildi. Çözeltinin faktörü;

$25 \times f_{\text{sülfürik asit}} = f_{\text{sodyum hidroksit}} \times t$, formülünden yararlanarak hesaplandı (20).

$t =$ sarfedilen 0.02 N sodyum hidroksit miktarı (ml olarak).

1.2.3.7. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Protopin Miktar Tayini

1.2.3.7.1. Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

200 mg civarında tam olarak tartılan drog, santrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 5 ml % 2'lik hidroklorik asit çözeltisi ilave edildi. Ultrasonik banyoda, 40 °C'de 5 saat süre ile maserasyona tabi tutuldu. Bu işlemi takiben 1 ml derişik amonyum hidroksit ve 4 ml distile su eklenerek, 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Toz droğa ait partiküller çöktükten sonra üstte toplanan sıvı faz başka bir tübe aktarıldı. Distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 3 ml alınarak Extrelut-N (Merck) kolonuna yüklendi. 10 dk bekletildikten sonra Extrelut-N kolonu içerisinden 3x15 ml olacak şekilde kloroform geçirmek suretiyle elüsyon yapıldı. Ele geçen kloroformlu çözelti alçak basınç altında kuruluğa kadar distillendi.

1.2.3.7.2. Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı

200 mg drogdan hareketle ekstraksiyonu yapılan HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodları verilen örneklere ait alkaloit ekstreleri, 1 ml metanolde çözüldü. Çözeltiler Sem Concept Syringe 0.45 µm, 100x13 mm (teflon) filtreden süzöldü.

1.2.3.7.3. Standart Protopin Çözeltisinin Hazırlanışı

Bir balon joje içerisinde, 2 mg saf protopin örneği tam olarak tartıldı. Metanol ile 10 ml'ye tamamlanarak içerisinde bulunan protopin çözündüröldü. Çözelti Sem Concept Syringe 100x13 mm, 0.45 µm filtreden süzöldü. Bu örneğe Ps kodu verildi.

1.2.3.7.4. Standart Protopine Ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Ps kodlu çözeltilerden 15 µg/ml, 30 µg/ml, 45 µg/ml, 60 µg/ml, 90 µg/ml, 120 µg/ml olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı. Her birinden üç sefer 20'şer µl uygulanarak, alan değerleri ölçüldü (Tablo 27). Uygulanan miktara karşı okunan alan değerleriyle protopine ait bir ölçü eğrisi ve regresyon denklemi hazırlandı (Şekil 1). Standart protopine ait kromatogram ve UV spektrumu ise sırasıyla Şekil 2 ve 3'de verilmiştir.

1.2.3.7.5. Deneyin Yapılışı

Hazırlanan çözeltilerden üç paralel uygulama olacak şekilde her birinden üç kez Hamilton enjektör yardımıyla 20 µl uygulama yapıldı. Okunan alan değerlerine karşılık gelen miktarlar, ölçü eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. Protopin miktar tayini sonuçları kuru drog üzerinden % miktar olarak tespit edildi.

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi Analiz Şartları:

Cihaz: Hewlett Packard 1100 [Katerner pompa, vakum degas, termostatlı kolon kompartmanı, manuel enjektör (20 µl lup, Rheodyne 7725i)]

Kolon: Hichrom C₁₈ (250 mm x 4.6 mm ID, 5 µm)

Mobil Faz: Asetonitril-amonyum asetat (10 mM, asetik asitle pH 3'e ayarlanmıştır, 20:80)

Akış Hızı: 1ml/dk

Dedektör: Agilent DAD-1200

Dalga Boyu: 240 nm

Kolon Sıcaklığı: 35°C

Elde edilen verilerin analizi "Agilent Chem Station Software" ile yapıldı.

1.3. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE TAYİNİ

Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite tayini için *in vitro* Ellman yöntemine dayalı mikropılaka deneyinden yararlanılır (18, 42).

1.3.1. Yöntem

1.3.1.1. Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

Toz edilmiş 5g civarında bitkisel materyal, 3 defa metanolla ultrasonik banyoda, oda sıcaklığında maserasyona bırakılmak suretiyle ekstre edilir. Metanol alçak basınç altında kuruluğa kadar distillendikten sonra bakiye üzerine % 2'lik H₂SO₄ çözeltisi ilave edilerek çözülür. Asitli çözelti dietileterle yıkanır. Sulu asitli çözelti, pH 9-10 olana kadar baziklendirilir ve kloroformla ekstre edilir. Birleştirilen kloroformlu kısımlar susuz sodyum sülfat kullanılarak suyundan kurtarıldıktan sonra süzülür ve organik çözücü rotavaporda kuruluğa kadar distillenir.

1.3.1.2. Deneyin Yapılışı

Hazırlanan ekstrenin metanolde uygun konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlandıktan sonra çözeltilerin absorbanları 405 nm dalga boyunda mikropılaka okuyucu yardımıyla ölçülür ve ekstrelerin IC₅₀ değerleri hesaplanır.

1.3.2. Deney

1.3.2.1. Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

Tam olarak tartılmış 5 g civarında toz haldeki bitkisel materyal, 3 defa 5 ml metanolle ultrasonik banyoda 30 dk süreyle oda sıcaklığında ekstre edildi. Metanol alçak basınç altında kuruluğa kadar distillendikten sonra bakiye 10 ml % 2 lik H₂SO₄ çözeltisi ilave edilerek çözüldü. Asitli çözelti dietileterle (3x 10 ml) yıkandı. Sulu asitli çözelti, derişik amonyum hidroksit çözeltisi ile pH 9-10 olana kadar baziklendirildi ve kloroformla (3x 10 ml) ekstre edildi. Birleştirilen kloroformlu kısımlar susuz sodyum sülfat kullanılarak suyundan kurtarıldıktan sonra süzöldü ve organik çözücü rotavaporda kuruluğa kadar distillenecek şekilde hazırlandı.

1.3.2.2. Deneyin Yapılışı

Alkaloit ekstrelerinin metanolde 0.006-600 µg/ml konsantrasyon aralığında çözeltileri hazırlandı. Standart olarak daha önce *Galanthus woronowii* Losinsk. bitkisi üzerinde çalışma grubumuz tarafından yürütölen araştırmalarda (65) saf olarak elde edilen ve spektral bulguları (1D ve 2D NMR, UV, IR, MS) anabilim dalımızda bulunan galantamin (0.003-300 µg/ml) kullanıldı. Standart ve örnek çözeltileri mikropalakaya (96 kuyucuklu) uygulandı. 405 nm dalga boyunda mikropalaka okuyucu kullanılarak çözeltilerin absorbanları saptandı. Sonuç olarak IC₅₀ değerleri GraphPad Prism V3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) programı kullanılarak hesaplandı.

BÖLÜM III

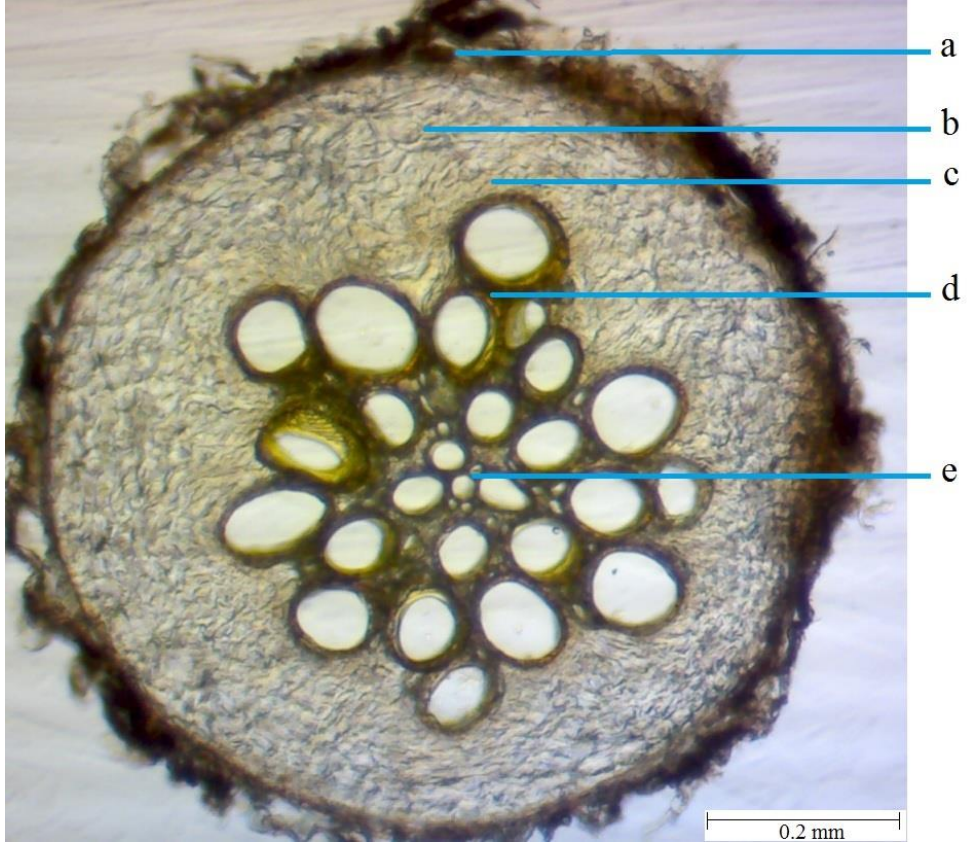
BULGULAR

1. BOTANİK ARAŞTIRMALARIN BULGULARI

1.1. ANATOMİK BULGULAR

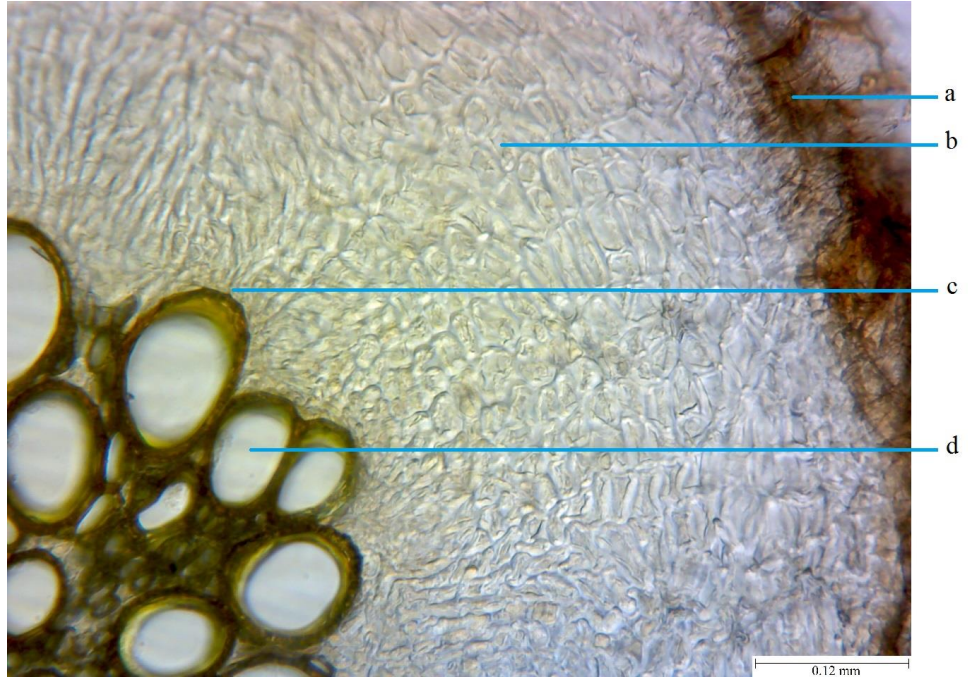
1.1.1. Köke ait İnceleme ve Bulgular

Kök enine kesitleri anatomik olarak incelendiğinde, en dışta epidermis ile kabuk parenkiması hücre çeperlerinin sübrinleşmesiyle meydana gelen eksodermisin bulunduğu görülmektedir. Endodermis, eksodermise birleşik haldedir ve net bir ayırım yapılamamaktadır. Primer korteks bulunmayıp, kök korteksi kalın çeperli parenkimatik hücrelerden meydana gelen sekonder korteksten ibarettir. Bu korteks hücrelerinin dıştan içe gidildikçe çeperleri kalınlaşmaktadır. Özellikle dış kısımda bulunan bazı korteks hücrelerinin süberinleşmiş olduğu gözlenmiş olup mantar teşekkülü bulunmamaktadır. Etrafi floem tabakası ile kaplı olan ksilem bir daire üzerine radyal olarak dizilmiş trake ve trakeitlerden oluşmaktadır. Ksilem ile floem arasında bariz bir kambiyum tespit edilememiş olup, kambiyum bölgesi ayırt edilebilmektedir. İletim demetleri kolateral olup, parenkimatik hücreler içerisine yerleşmiştir.



Resim 4. Kök Enine Kesitinin Genel Görünüşü;

a- Eksodermis, b- Kök Korteksi, c- Floem, d- Parenkimatik Hücreler, e- Ksilem



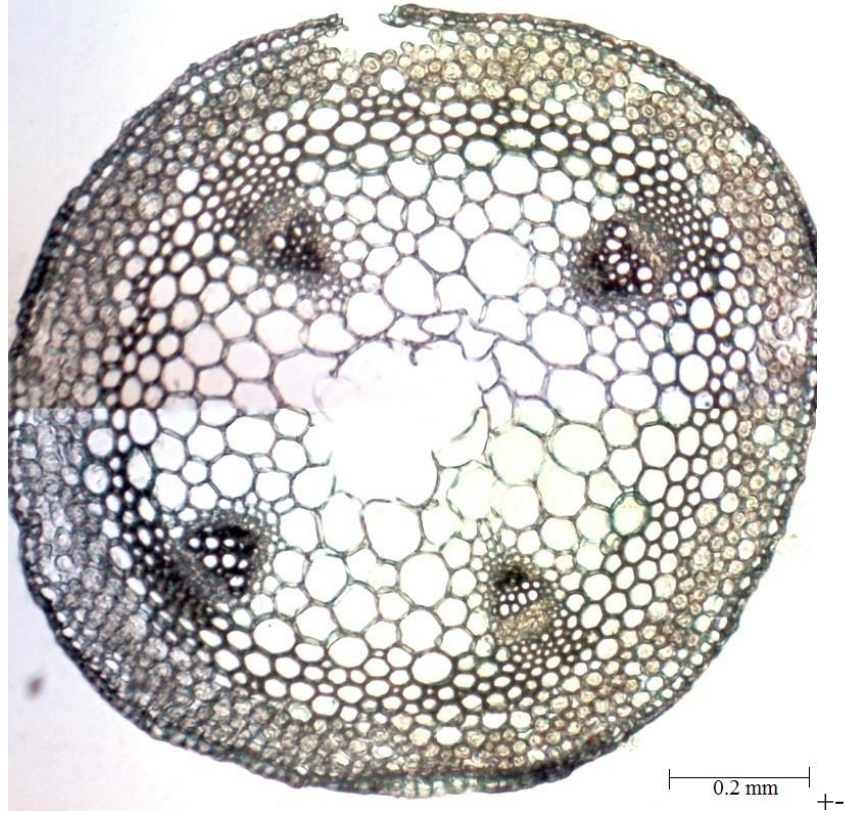
Resim 5. Kök Enine Kesiti;

a- Eksodermis, b- Kök Korteksi, c- Floem, d- Trake

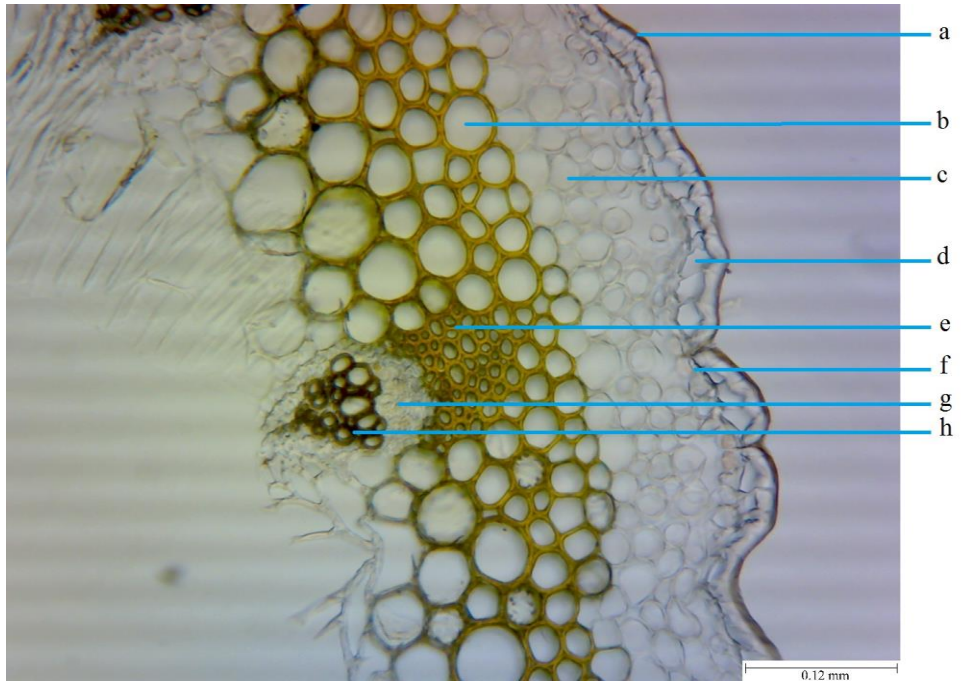
1.1.2. Gövdeye ait İnceleme ve Bulgular

Gövde enine kesitleri anatomik olarak incelendiğinde, gövdenin dairesel ve epidermis hücrelerinin dış yüzeyinin ince bir kutikula ile örtülü olduğu görülmektedir. Epidermis hücrelerinin dorsal çeperleri çok kalın, ventral çeperleri ince, lateral çeperleri ise ventral çeperlere göre çok daha incedir. Epidermis hücrelerinin arasında yer alan stomalar kseromorf tiptedir. Gövde epidermis hücrelerinin altında yer alan, ince çeperli ve kloroplast taşıyan parenkimatik mezofil hücreleri 2-5 hücre sırasından oluşmaktadır. Bu mezofil hücreleri dıştan merkeze doğru büyümekte ve çeperleri incelmektedir. Hücreler arası boşluklar belirgin ve dıştan merkeze doğru nispeten azalmaktadır. Bunların iç kısmında çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış kollenkima hücreleri bulunmaktadır. Bu dıştan merkeze doğru çapları büyüyen kollenkima hücrelerinin çeperleri incelmektedir. Gövdenin merkezi, buradaki hücrelerin parçalanmasından dolayı boşluk oluşturmuştur. Bu kollenkima hücrelerinin içerisinde, kapalı kolateral iletim demetleri yer almaktadır. Bu iletim demetleri dış kısımlarından sklerankima demetleri ile desteklenmektedir. İletim demetleri bu doku içerisinde bir daire şeklinde, geniş aralıklarla dizilmiştir ve gövdenin kalınlığına göre sayıları 5-9 arasında değişmektedir.

Gövde epidermisi yüzeysel olarak incelendiğinde, epidermis hücreleri uzun, uçları sivri, çeperleri ince ve stomalar anomositik tiptedir.

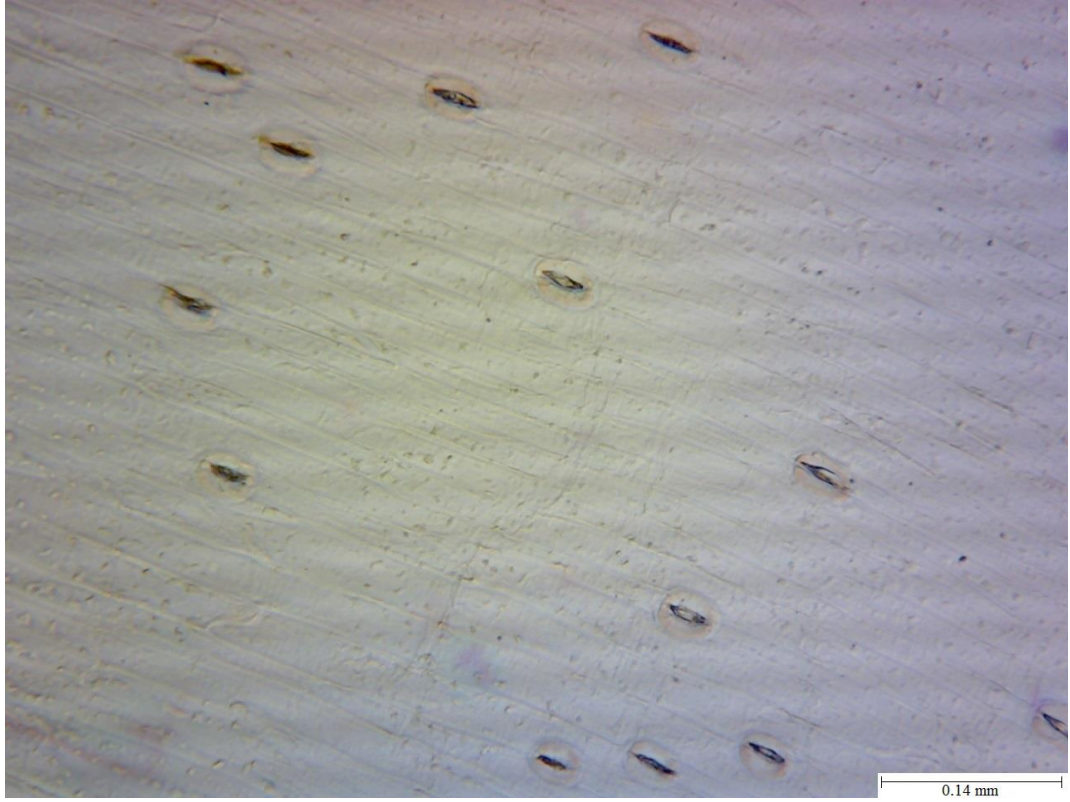


Resim 6. Gövde Enine Kesitinin Genel Görünüşü



Resim 7. Gövde Enine Kesiti

a- Kutikula, b- Kollenkima, c- Mezofil Hücresi, d- Epidermis e- Sklerankima Demeti, f- Stoma, g- Floem, h- Ksilem

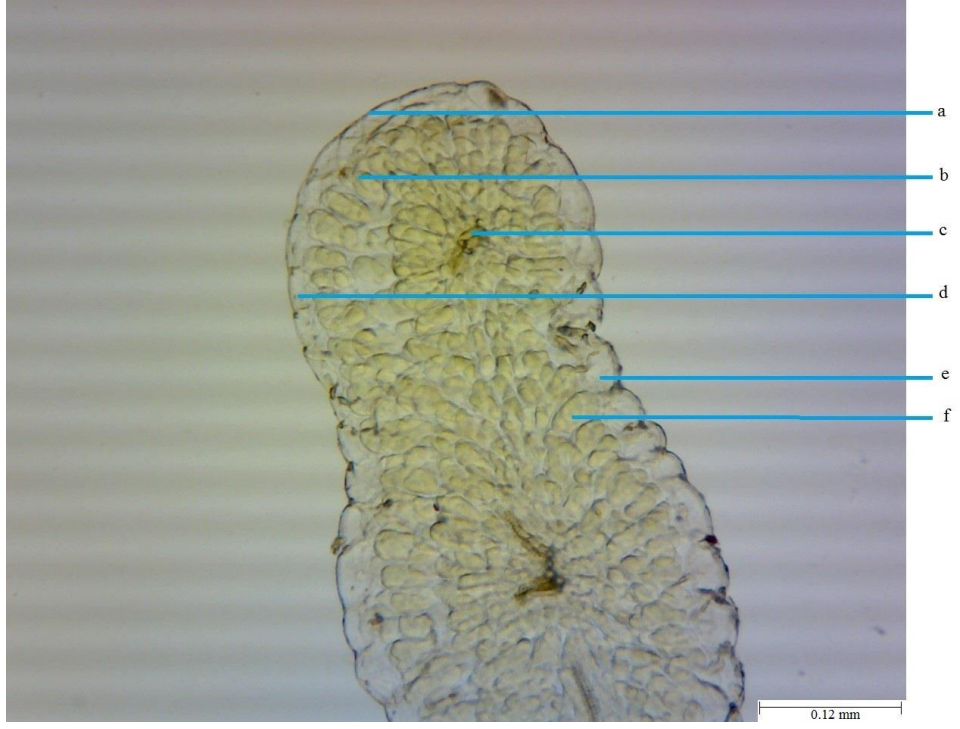


Resim 8. Gövde Epidermisinin Yüzeysel Görünüşü

1.1.3. Yaprğa ait İnceleme ve Bulgular

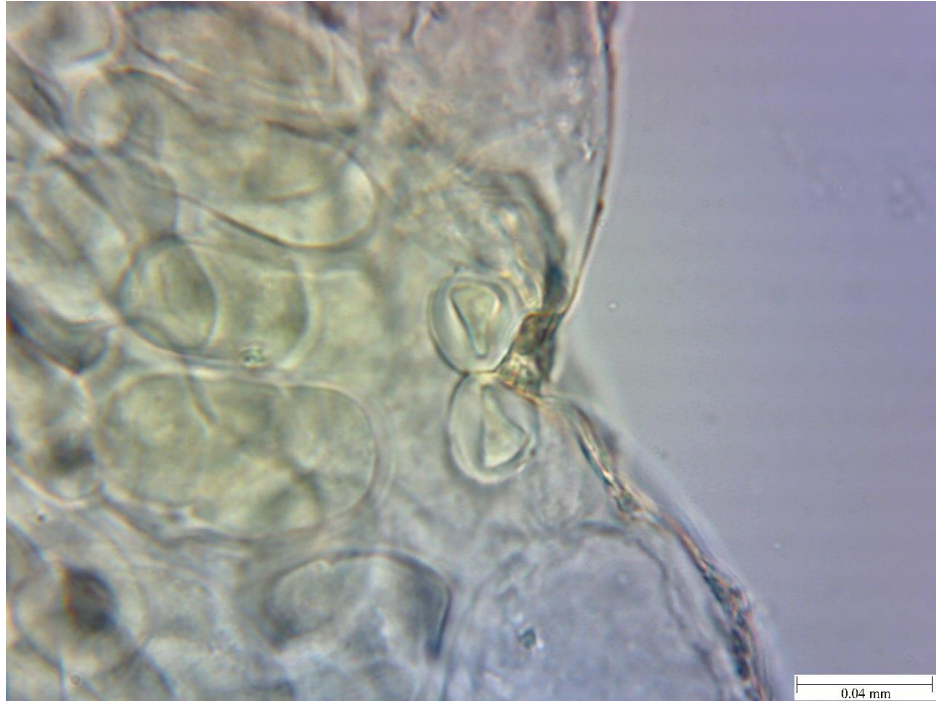
Yaprak bifasiyal olup, palisat parenkiması tek, sünger parenkiması 4-5 hücre sırasından oluşmaktadır. Alt ve üst epidermis hücreleri kutikula ile örtülüdür. Hem alt, hem de üst epidermiste yer alan stomalar kseromorf tiptedir. Her hangi bir tüy yapısına rastlanmamıştır. İletim demeti kolateral tiptedir. Yaprak kenarlarındaki epidermis hücreleri dış yüzeye doğru çıkıntı yaparak konik şekilde papil oluşturmaktadır.

Yaprak yüzeysel kesitlerinde, üst epidermisin az dalgalı olduğu ve stoma komşu hücre sayısının 3-6 arası değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. 3-5 arasında değişen stoma komşu hücrelerine sahip alt epidermisin ise çok dalgalı olduğu ve her iki epidermiste bulunan stomaların anomositik tipte olduğu dikkat çekmektedir.

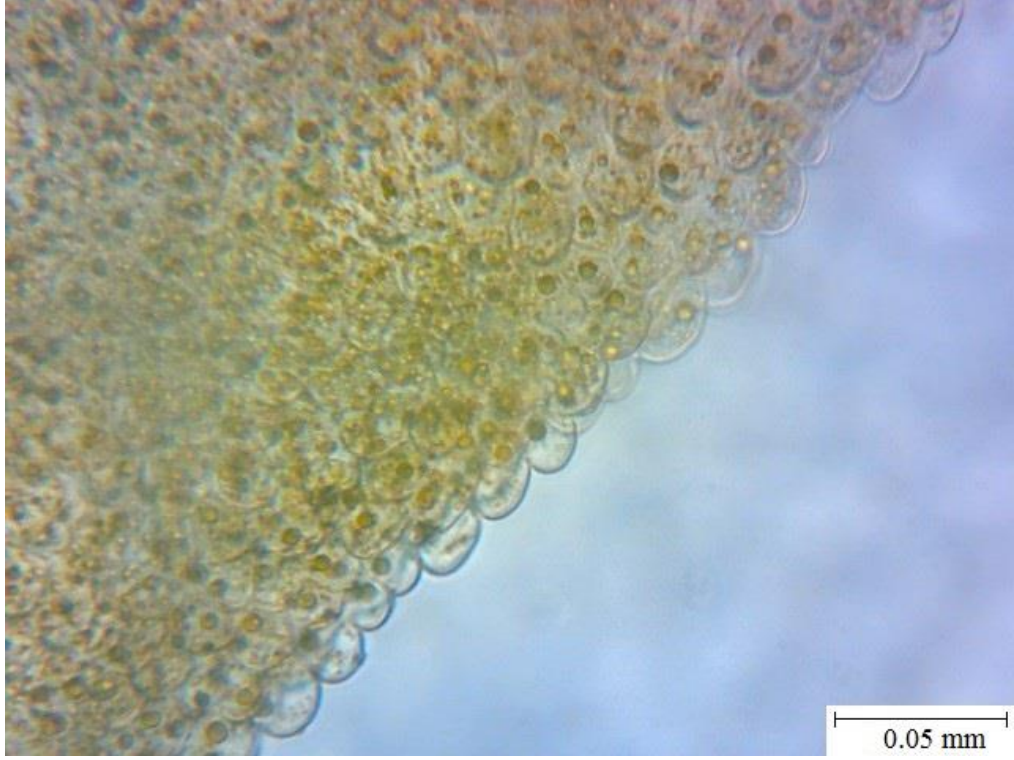


Resim 9. Yaprak Enine Kesit

a- Kutikula, b- Palisat Parenkiması, c- İletim Demeti, d- Üst Epidermis, e- Alt Epidermis, f- Sünger Parenkiması



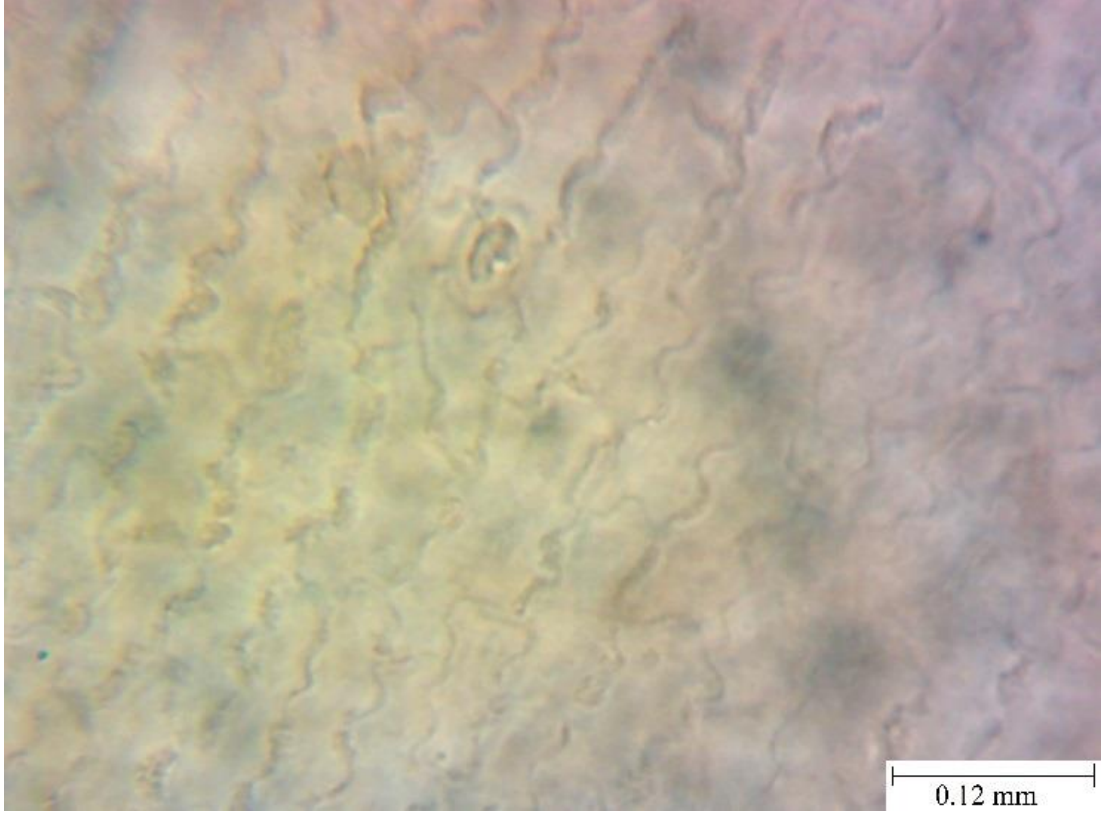
Resim 10. Yaprak Enine Kesitte Stoma



Resim 11. Yaprak Kenarındaki Papiller



Resim 12. Yaprak Üst Epidermisinin Yüzeysel Görünüşü ve Stoma



Resim 13. Yaprak Alt Epidermisinin Yüzeysel Görünüşü ve Stoma

1.1.4. Meyveye ait İnceleme ve Bulgular

Meyvenin boğumlu yapısından dolayı, meyve enine kesitleri tohumlu kısım ve tohumsuz kısım olmak üzere iki parça halinde incelenmiştir.

1.1.4.1. Tohumsuz Kısım

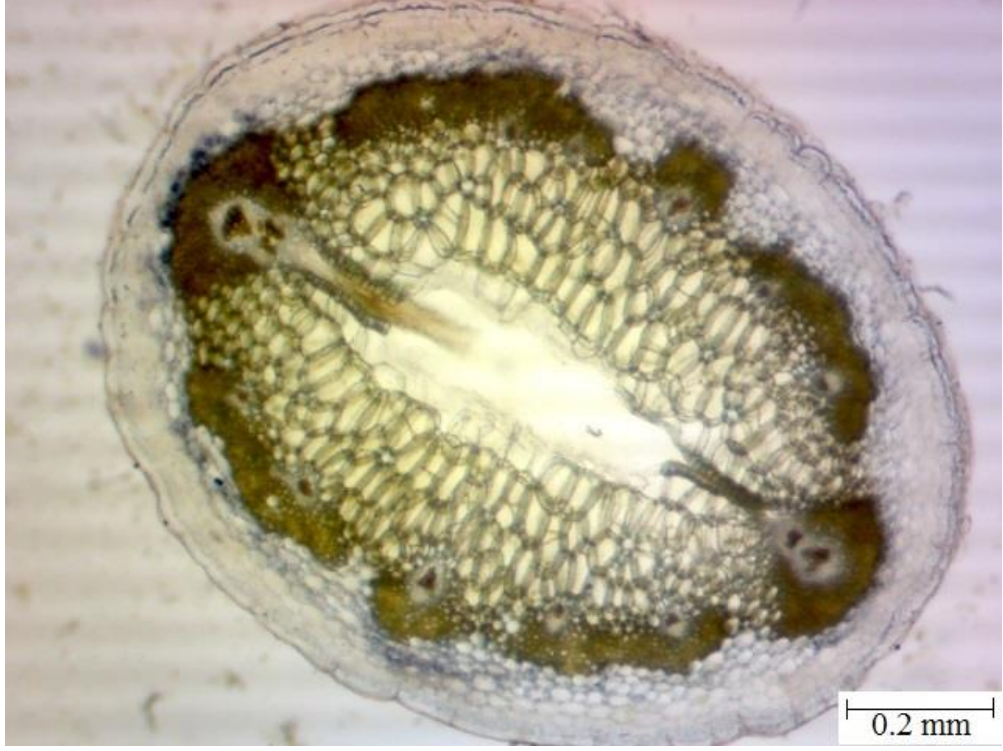
Eksokarp hücrelerinin dış yüzeyinde ince bir kutikula bulunmaktadır. Dorsal çeper kalın, ventral çeper ince, lateral çeper daha ince. Eksokarp hücrelerinin altında 2-5 sıra ince çeperli kloroplast taşıyan parenkimatik hücreler şeklinde mezokarp hücreleri bulunmaktadır. Bunların altında bulunan mezokarp hücrelerinin çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış olup, basit geçitleri belirgindir. İletim demetleri çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış olan bu mezokarp hücreleri arasında görülmektedir. Bu iki mezokarp hücre sırasının altında diğer hücelere göre daha büyük, çeperlerinde

kalınlaşma görülmeyen, kloroplast içermeyen hücreler yer almaktadır. Stomalar kseromorf tiptedir. Tohumuz kısımlardan alınan enine kesitlerde endokarp yapısına rastlanmamıştır.

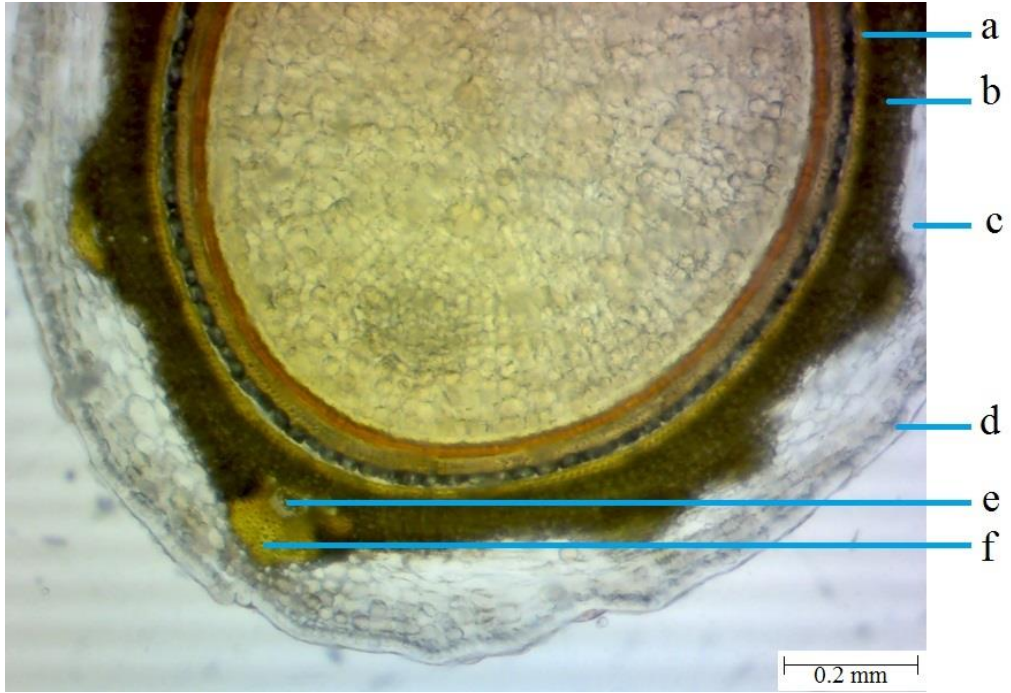
1.1.4.2. Toumlu Kısım

Eksokarp hücrelerinin dış yüzeyinde ince bir kutikula bulunmaktadır. Perikarpı oluşturan eksokarp hücrelerinin dorsal çeperleri oldukça kalın, ventral çeperleri hafif kalın, lateral çeperleri ise incedir. Mezokarpta ağsı kalınlaşma görülmektedir. Mezokarp hücreleri iki kısımdan ibaret olup, dıştan merkeze doğru ilk kısım eksokarpın iç kısmında yer alan 5-7 sıra ince çeperli, kloroplast taşıyan parenkimatik hücreler şeklindedir. Dıştan merkeze doğru gidildikçe hücrelerin boylarının arttığı, taşıdıkları kloroplast miktarlarının azaldığı ve bazı hücrelerde kloroplast bulunmadığı saptanmıştır. Endokarpın dışında kalan ikinci kısım mezokarp hücrelerinin ise boylarının diğer hücrelerden küçük ve hücre çeperlerinin lignifiye olduğu tespit edilmiştir. Mezokarp hücreleri içerisinde, kapalı kolateral iletim demetleri yer almaktadır ve bunlar dış yüzeyine bakan kısımlarında bulunan sklerankima demetleri ile desteklenmektedir. Stomalar kseromorf tiptedir. Endokarp yapısı bulunmaktadır ve endokarpı oluşturan hücrelerin sklerankima lifi şeklinde bütün çeperlerinde kalınlaşma ve odunlaşma tespit edilmiştir. Mezokarp hücreleri arasında tohumdan geldiğini tahmin ettiğimiz yağ damlaları görülmektedir.

Meyva eksokarpı yüzeysel olarak incelendiğinde eksokarp hücreleri uzun, uçları sivri, çeperleri ince ve stomalar anomositik tiptedir.



Resim 14. Meyvenin Tohumsuz Kısımının Enine Kesiti

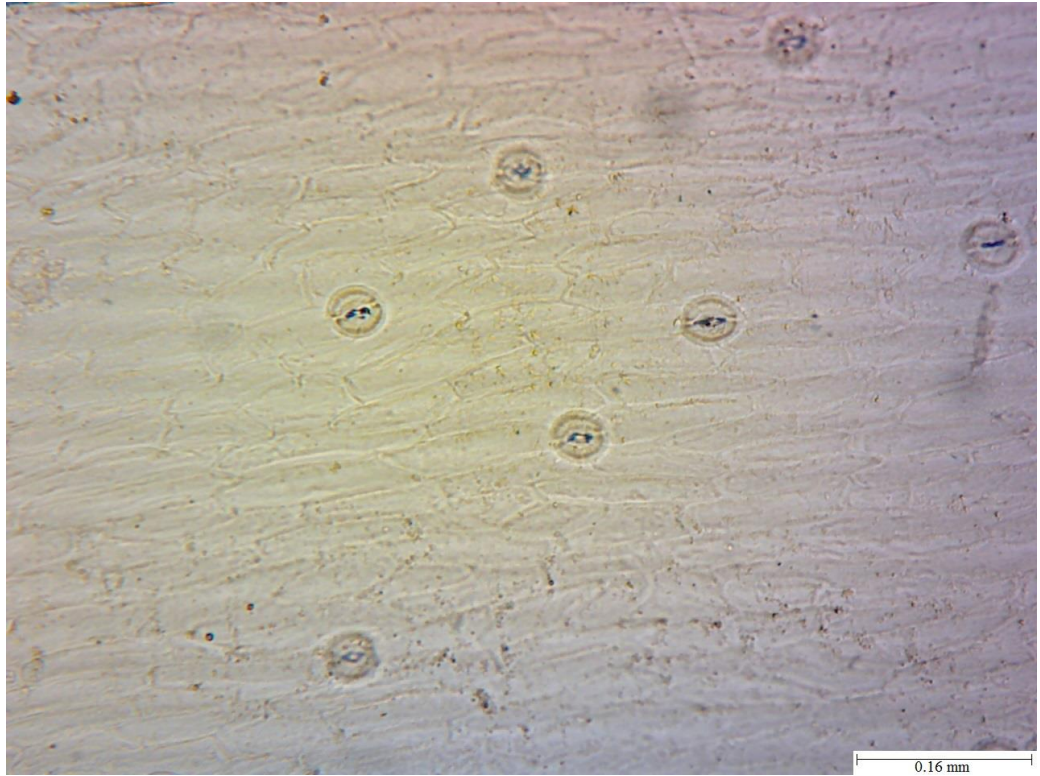


Resim 15. Meyvenin Tohumlu Kısımının Enine Kesiti

- a- Endokarp, b- Lignifiye olmuş mezokarp hücresi, c- İnce çeperli mezokarp hücresi
d- Eksokarp, e- İletim Demeti, f- Sklerankima Demeti



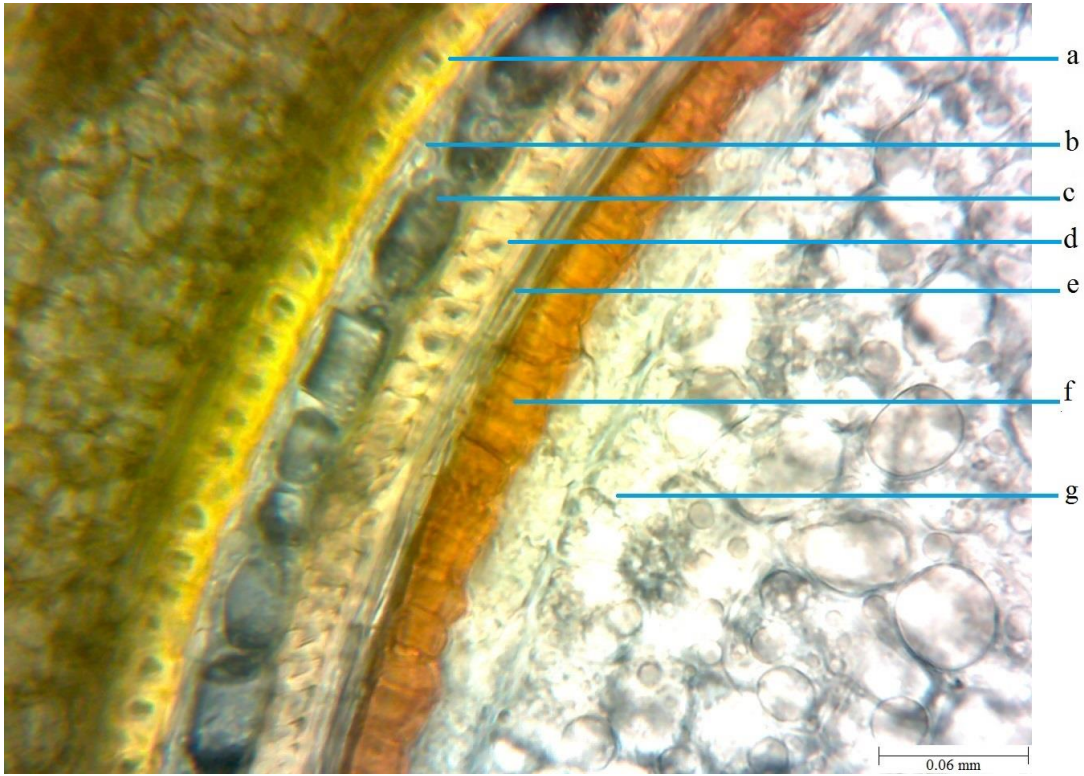
Resim 16. Meyve Enine Kesitinde Stoma



Resim 17. Meyve Yüzeysel Kesiti ve Stoma

1.1.5. Tohuma ait İnceleme ve Bulgular

Perikarpın iç kısmında yer alan tohum genel olarak testa, ezilmiş besi doku, pigment tabakası, endosperma ve embriyodan meydana gelmektedir. Testa ince çeperli bir kaç hücre sırasından oluşmaktadır. Testa epidermisi içerisinde basit prizmatik billurlar dikkat çekmektedir. Teste epidermisinin altında çeperleri kalınlaşmış malpighi hücreleri bulunmaktadır. Ezilmiş besi doku şeffaf, uzun ve yassılaştırılmış hücrelerden oluşmaktadır. Ezilmiş besi dokunun altında pigment tabakası belirgin bir şekilde ayırt edilebilmektedir. Pigment tabakasının iç kısmında yağ ve aleron içeren endosperma hücreleri yer almaktadır.



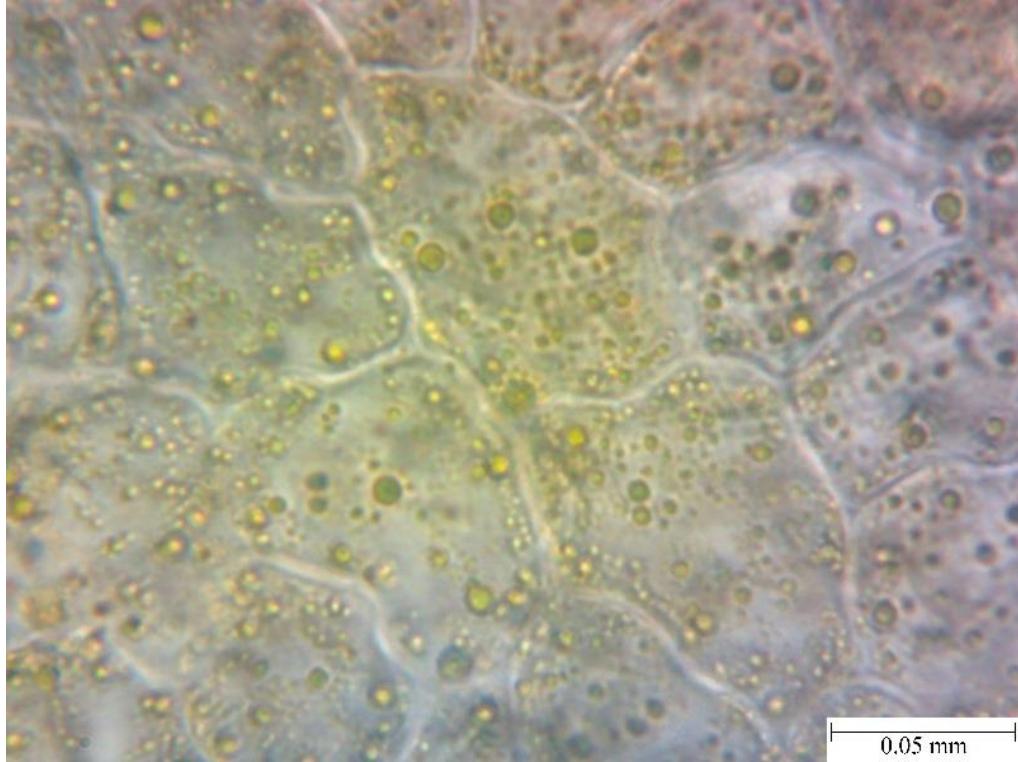
Resim 18. Tohum Enine Kesiti;

a- Endokarp b- Testa Epidermisi, c- Basit Prizmatik Billur, d- Malpighi Hücreleri e- Ezilmiş Besi Doku, f- Pigment Tabakası, g- Endosperma

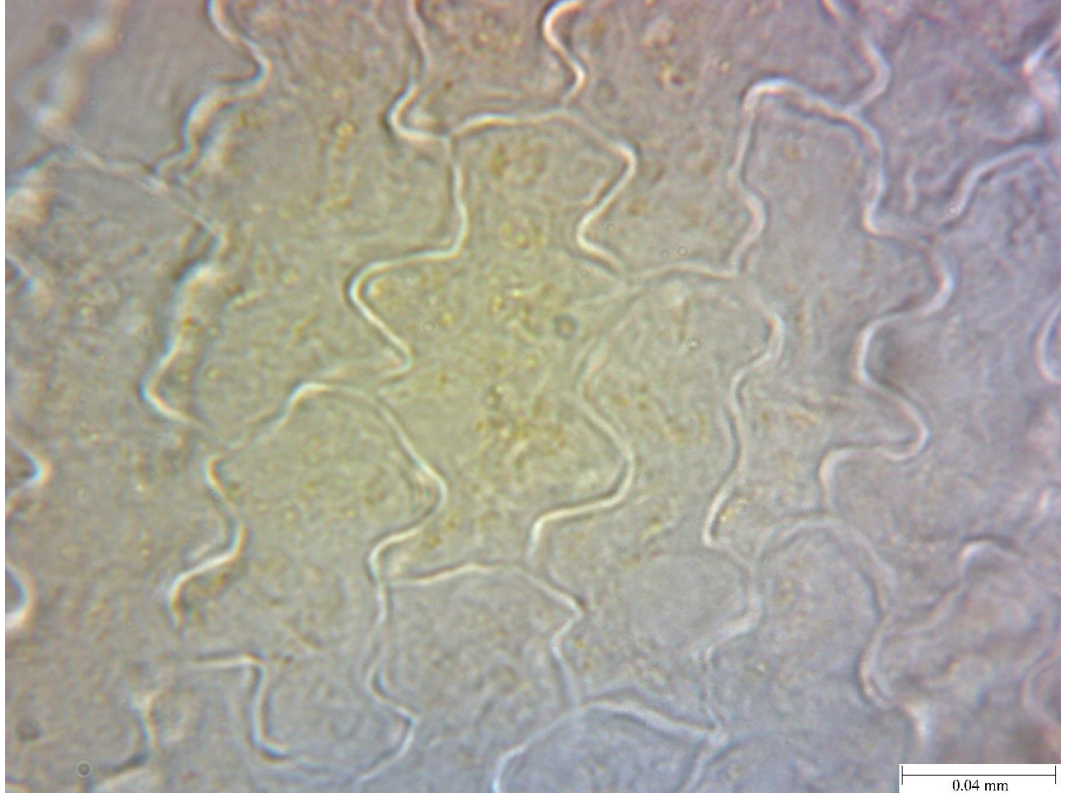
1.1.6. Çiçeğe ait İnceleme ve Bulgular

Çiçek petallerinden alınan yüzeysel kesitler anatomik olarak incelendiğinde, petalin uç kısımlarında üst epidermisin az dalgalı, alt (dış) epidermisin çok dalgalı olduğu tespit edilmiştir. Üst (iç) epidermis hücreleri dış yüzeye doğru çıkıntı yaparak papil oluşturmaktadır. İç endospermanın papilli hücreleri içerisinde bulunan pigment noktacıkları çok sayıda ve belirgindir. Her iki epidermiste yer alan stomalar az sayıda ve anomositik tipte olup, komşu hücre sayıları 3-6 arası değişkenlik göstermektedir. Petalin dip kısımlarında stoma tespit edilememiştir. Alt ve üst epidermisi oluşturan hücrelerin boyları petalin uç kısmındaki hücelere nazaran uzun ve dikdörtgenimsidir. Pigment noktacıkları az sayıdadır.

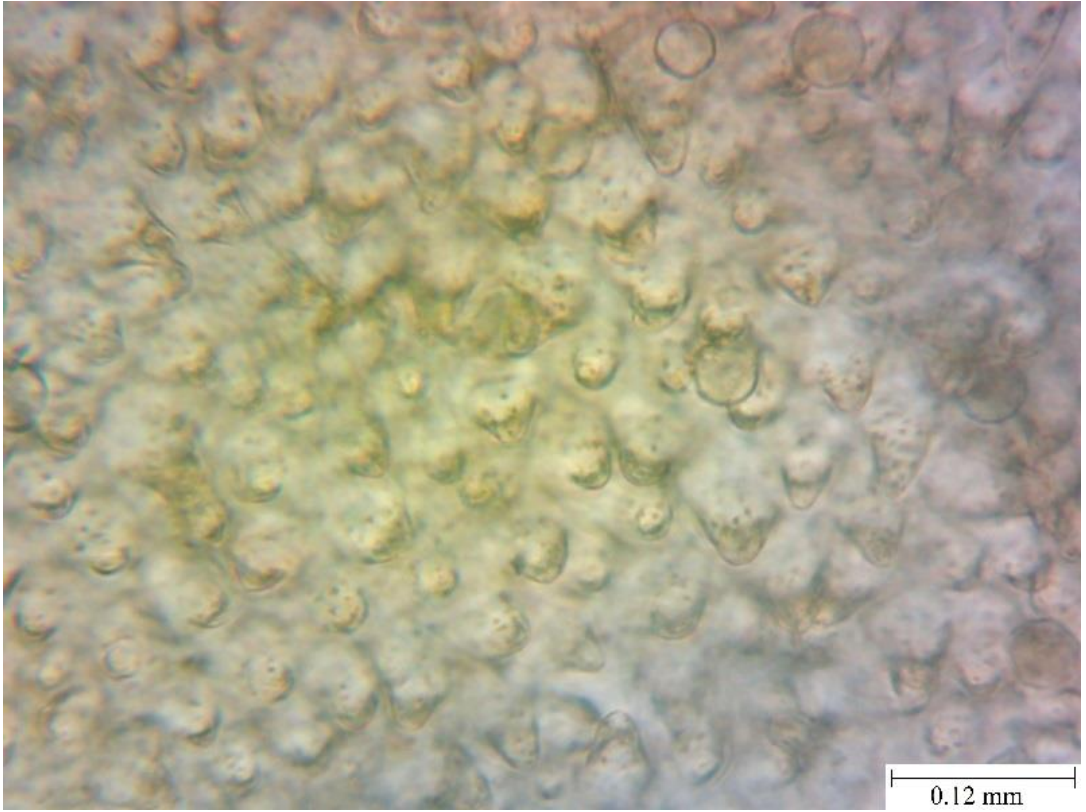
Düz eksin zarı bulunan polenler küremsi-yayvan şekilde olup, bikolpat yapıdadır.



Resim 19. Çiçek Üst Epidermis Yüzeysel Görünüş ve Kutikula Noktacıkları



Resim 20. Çiçek Alt (Dış) Epidermis Yüzeysel Görünüş



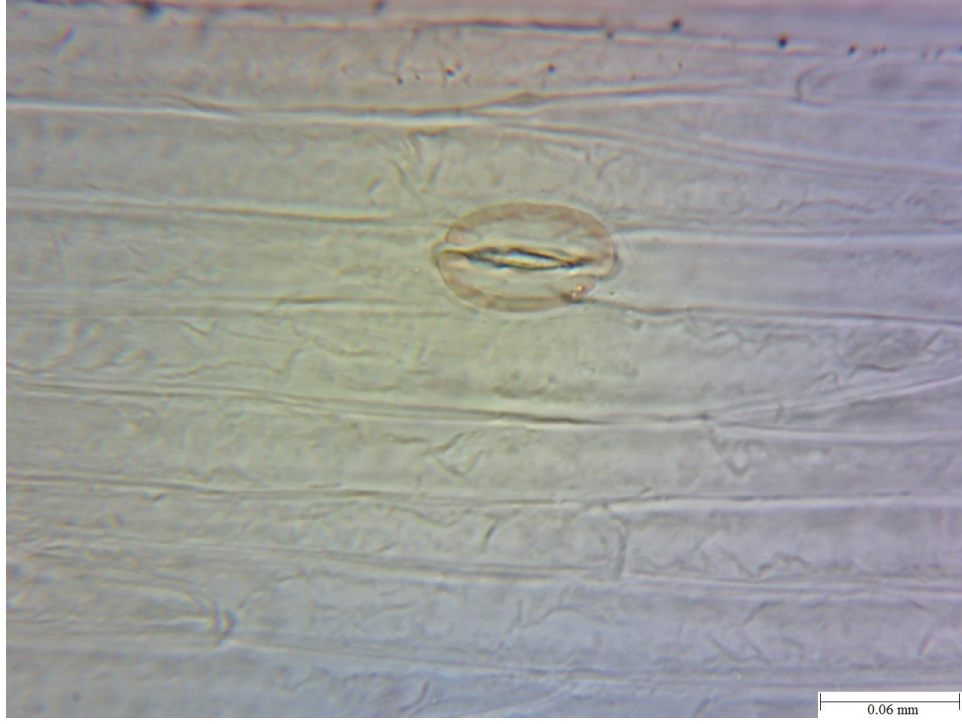
Resim 21. Çiçek Üst (İç) Epidermis ve Papiller



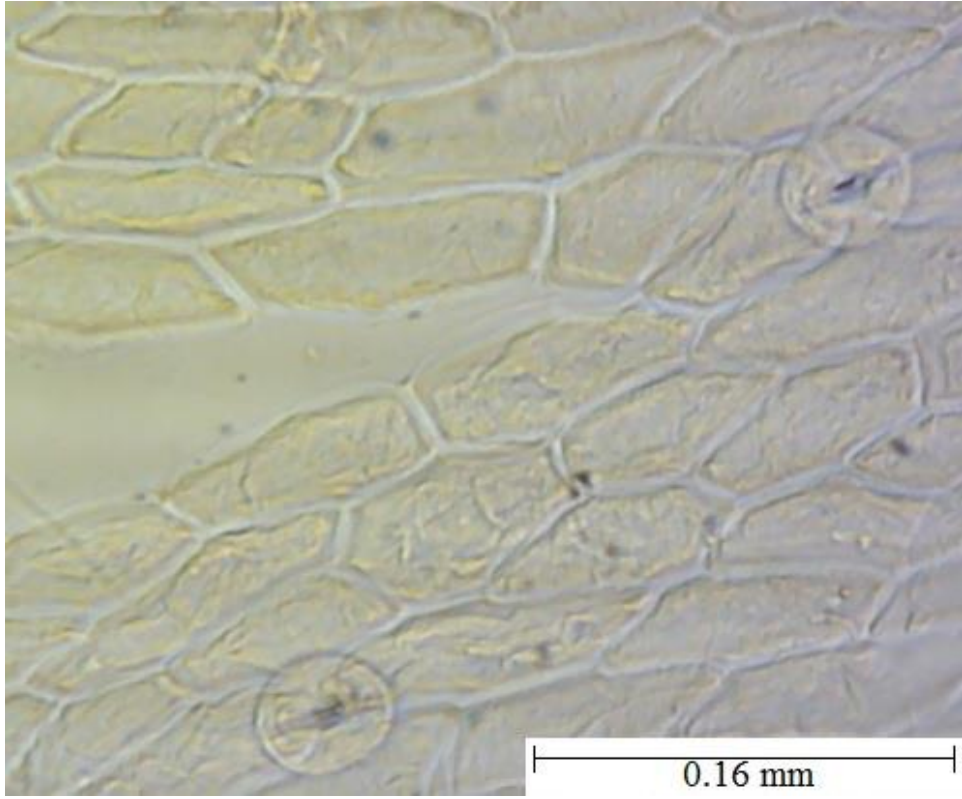
Resim 22. Polen Tanesi

1.1.7. Toz Droğa ait İnceleme ve Bulgular

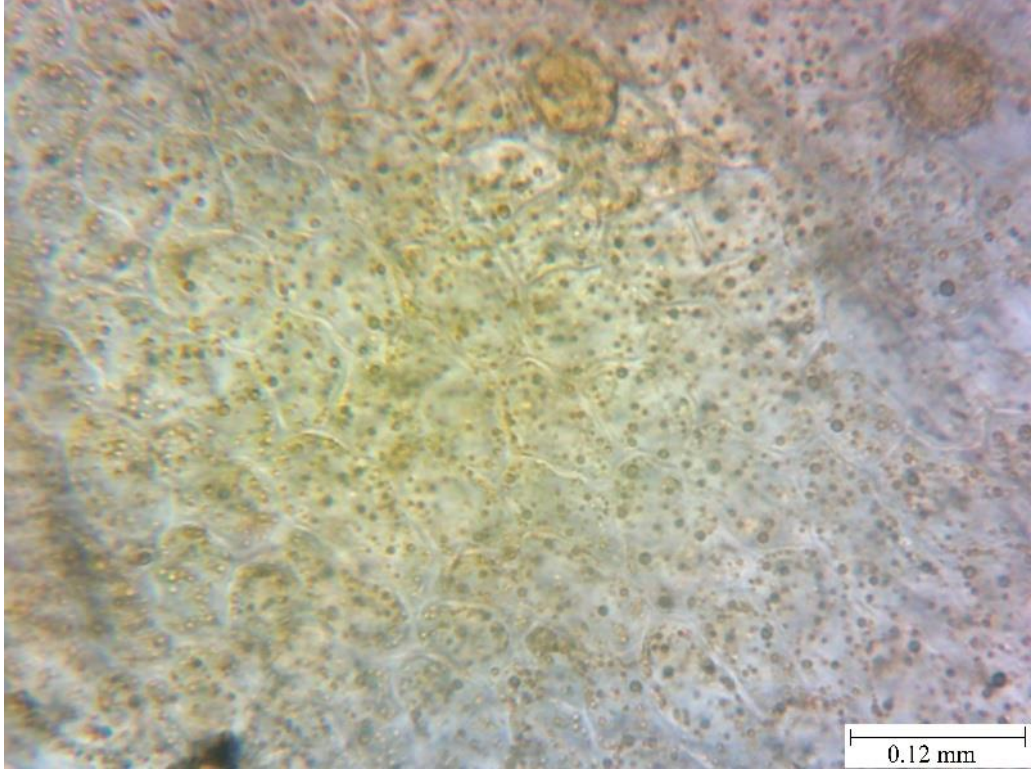
Toz droğun mikroskopik incelenmesinde, yeşil renkli yaprak ve gövde parçalarına, stomalı ve stomasız gövde, meyve, iek ve yaprak epidermis hücrelerine, bikolpat yapıdaki, oval şekilli, düz eksin zarı bulunan polenlere ve yaprağa ait papil yapısına rastlanmaktadır. Ayrıca çok sık olmasa da bol miktarda yağ damlası içeren endosperma parçaları görülebilmektedir.



Resim 23. Gövde Epidermisi ve Stoma



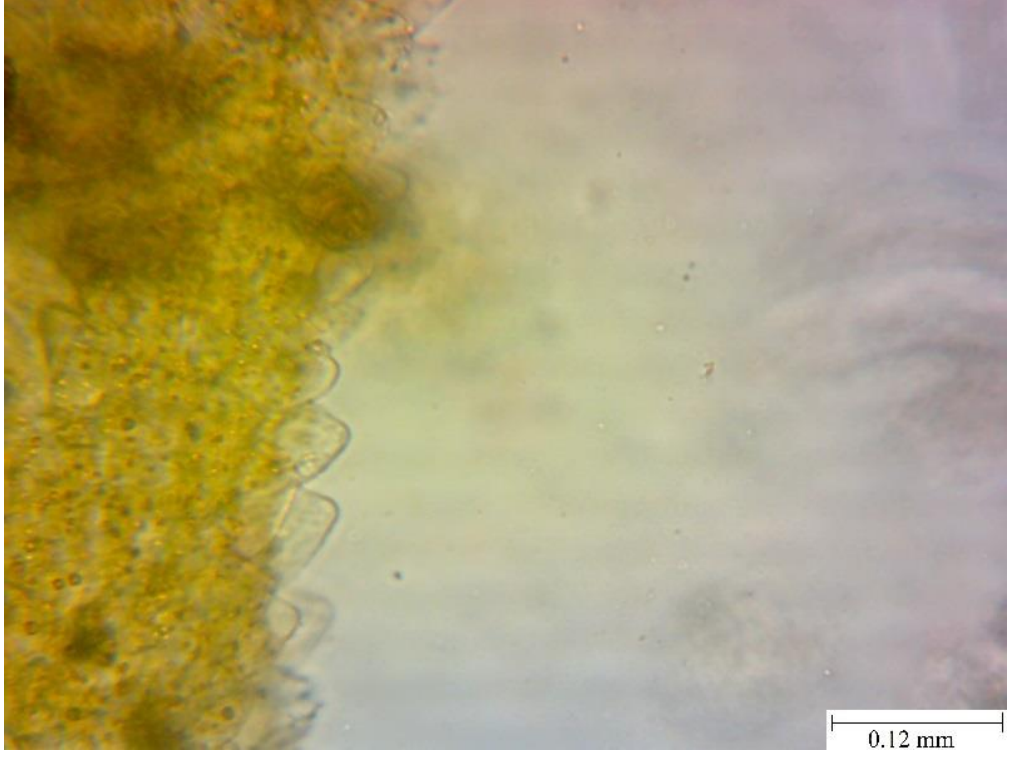
Resim 24. Meyve Eksokarpı ve Stoma



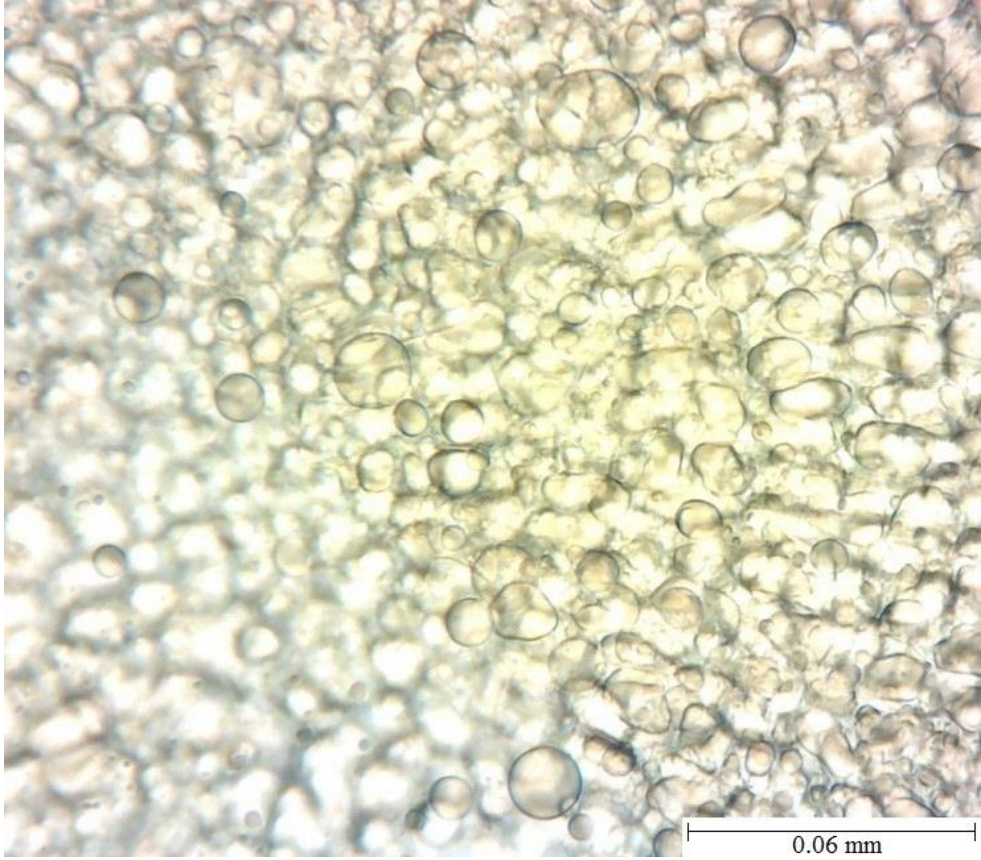
Resim 25. Çiçek İç Epidermisi ve Kutikula Noktacıkları



Resim 26. Yaprak Epidermisi ve Stoma



Resim 27. Yaprak Kenarındaki Papiller



Resim 28. Toz Drogda Endosperma



Resim 29. Toz Drogda Polen Tanesi

1.2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

1.2.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini

HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu örnekler üzerinde 3 paralel halinde, Avrupa Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde (3, 21) yer alan yöntem kullanılarak kurutmada kayıp miktar tayini deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler aşağıda yer almaktadır. (Tablo3-6).

Tablo 3. HP-1 Örneğinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
1.0000	9.5200
1.0003	9.4071
1.0010	9.5304
Ortalama: % 9.4858	

Tablo 4. HP-2 Örneğinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
1.0044	7.2481
1.0054	7.3205
1.0076	7.8106
Ortalama: % 7.4597	

Tablo 5. HP-3 Örneğinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
1.0054	8.0664
1.0009	7.8629
1.0027	7.9186
Ortalama: % 7.9493	

Tablo 6. HP-4 Örneğinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
1.0000	6.7400
1.0041	6.8818
1.0043	6.7808
Ortalama: % 6.8009	

1.2.2. Total Kül Miktar Tayini

HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu örnekler üzerinde 3 paralel halinde, Avrupa Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde (3, 21) yer alan yöntem kullanılarak total kül miktar tayini deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler aşağıda yer almaktadır (Tablo 7-10).

Tablo 7. HP-1 Örneğinde Yapılan Total Kül Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Total Kül Miktarı
1.0031	11.8233
1.0049	11.7823
1.0023	11.6931
Ortalama: % 11.7662	

Tablo 8. HP-2 Örneğinde Yapılan Total Kül Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Total Kül Miktarı
1.0033	11.6615
1.0015	11.4928
1.0025	11.6110
Ortalama: % 11.5884	

Tablo 9. HP-3 Örneğinde Yapılan Total Kül Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Total Kül Miktarı
1.0025	18.5736
1.0003	18.5044
1.0037	18.6410
Ortalama: % 18.5730	

Tablo 10. HP-4 Örneğinde Yapılan Total Kül Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Total Kül Miktarı
1.0029	14.0193
1.0027	14.0221
1.0008	13.9888
Ortalama: % 14.0101	

1.2.3. Sülfat Külü Miktar Tayini

HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu örnekler üzerinde 3 paralel halinde, Avrupa Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde (3, 21) yer alan yöntem kullanılarak sülfat külü miktar tayini deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler aşağıda yer almaktadır (Tablo11-14).

Tablo 11. HP-1 Örneğinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
1.0011	15.3231
1.0025	15.6807
1.0017	15.3938
Ortalama: % 15.4659	

Tablo 12. HP-2 Örneğinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
1.0059	15.2798
1.0055	15.2416
1.0063	15.4129
Ortalama: % 15.3114	

Tablo 13. HP-3 Örneğinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
1.0074	21.9476
1.0013	21.4321
1.0029	22.1059
Ortalama: % 21.8285	

Tablo 14. HP-4 Örneğinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
1.0064	17.1701
1.0004	17.1032
1.0036	17.2579
Ortalama: % 17.1771	

1.2.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu örnekler üzerinde 3 paralel halinde, Avrupa Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde (3, 21) yer alan yöntem kullanılarak hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini deneyleri yapılmıştır. Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler aşağıda yer almaktadır (Tablo15-18).

Tablo 15. HP-1 Örneğinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktarı Tayin Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% HCl de Çözünmeyen Kül Miktarı
1.0060	1.6103
1.0017	1.5574
1.0041	1.5437
Ortalama: % 1.5705	

Tablo 16. HP-2 Örneğinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktarı Tayin Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% HCl de Çözünmeyen Kül Miktarı
1.0020	1.5868
1.0036	1.6042
1.0027	1.5258
Ortalama: % 1.5723	

Tablo 17. HP-3 Örneğinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktarı
Tayin Sonuçları

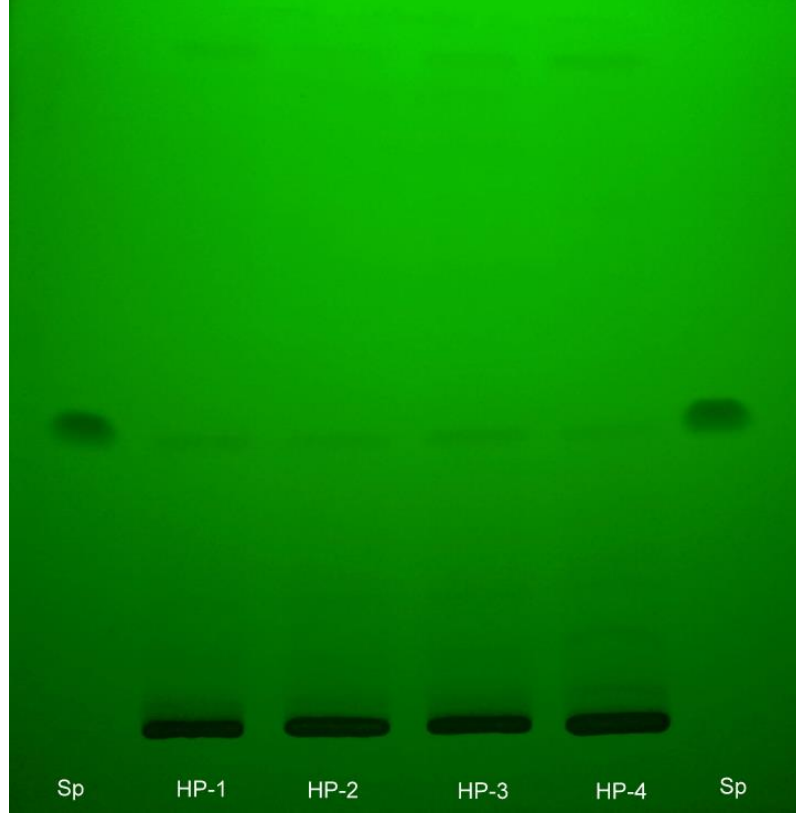
Drog Miktarı (g)	% HCl de Çözünmeyen Kül Miktarı
1.0025	3.6316
1.0003	3.5065
1.0037	3.5967
Ortalama: % 3.5783	

Tablo 18. HP-4 Örneğinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktarı
Tayin Sonuçları

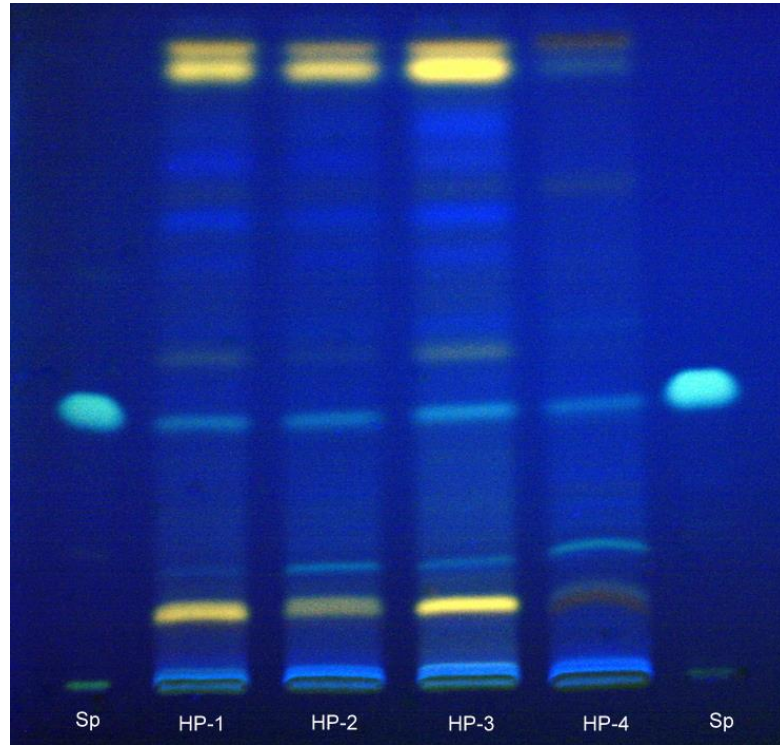
Drog Miktarı (g)	% HCl de Çözünmeyen Kül Miktarı
1.0029	3.5497
1.0027	3.4806
1.0008	3.2974
Ortalama: % 3.4426	

1.2.5. Drogların İnce Tabaka Kromatografisi (İ.T.K) ile Teşhis ve Kontrolüne Ait Bulgular

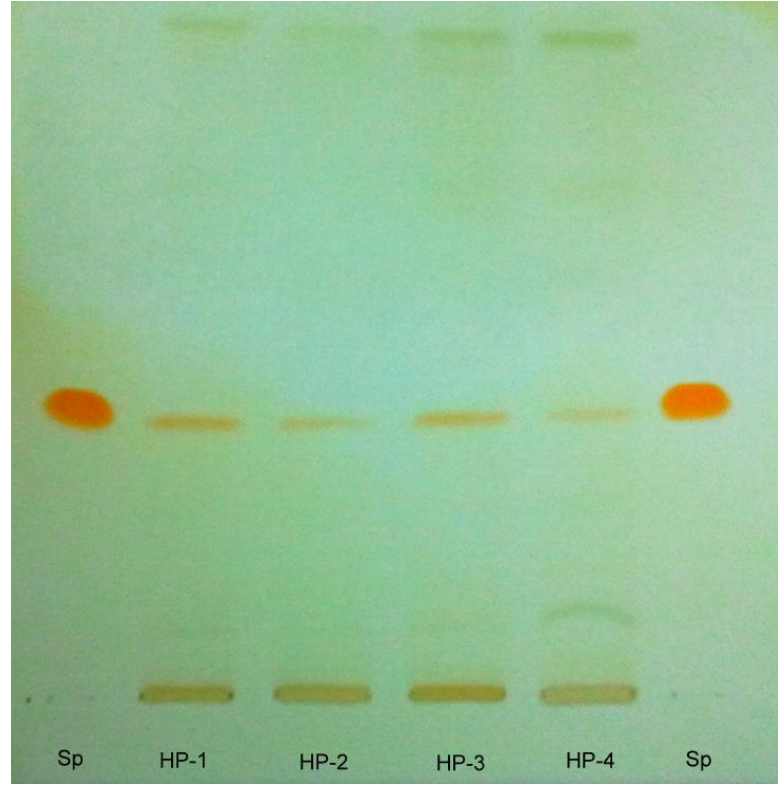
Solvan sistemi olarak toluen-kloroform-metanol-amonyum hidroksit (5: 3: 1: 1 damla) çözücü sistemi kullanılan ve 0.25 mm kalınlığında 20x20 cm boyutlarındaki Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck 5715) hazır kromatografi plağına uygulama yapılan kromatografik çalışmalarda, başlangıç çizgisinden itibaren, çözücü 17 cm yükselecek şekilde develope edilen kromatografi plağının, 254 ve 366 nm dalga boylarındaki UV ışık altında çekilen fotoğrafları Resim 30 ve 31’de, Dragendorff reaktifi püskürtüldükten sonra çekilen fotoğrafı ise Resim 32’de görülmektedir.



Resim 30. Protopin Teşhisi için 254 nm UV Işık Altında Çekilen Fotoğraf



Resim 31. Protopin Teşhisi için 366 nm UV Işık Altında Çekilen Fotoğraf



Resim 32. Protopin Teşhisi İçin Dragendorff Belirteci Püskürtüldükten Sonra Çekilen Fotoğraf

1.2.6. Total Alkaloit Miktar Tayinine Ait Bulgular

HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu örnekler üzerinde 3 paralel halinde, DAB 10'da (15) yer alan yöntem kullanılarak total alkaloit miktar tayini deneyi yapılmıştır. Sonuçlar protopin ve kuru drog üzerinden yüzde olarak verilmiştir.

Tablo 19. HP-1 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Total Alkaloit Miktarı
10.0015	0.1239
10.0011	0.1037
10.0004	0.0904

Tablo 20. HP-1 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Mean	St. Sapma	Min	Max
3	0.1060	0.0193	0.0904	0.1239

Tablo 21. HP-2 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Total Alkaloit Miktarı
10.0021	0.1015
10.0017	0.0951
10.0002	0.0822

Tablo 22. HP-2 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Mean	St. Sapma	Min	Max
3	0.0929	0.0111	0.0822	0.1015

Tablo 23. HP-3 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Total Alkaloit Miktarı
10.0033	0.2396
10.0013	0.2205
10.0007	0.2200

Tablo 24. HP-3 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Mean	St. Sapma	Min	Max
3	0.2267	0.0113	0.2200	0.2396

Tablo 25. HP-4 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları

Drog Miktarı (g)	% Total Alkaloit Miktarı
10.0002	0.0886
10.0041	0.1090
10.0035	0.1079

Tablo 26. HP-4 Örneğine Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Mean	St. Sapma	Min	Max
3	0.1018	0.0111	0.886	0.1090

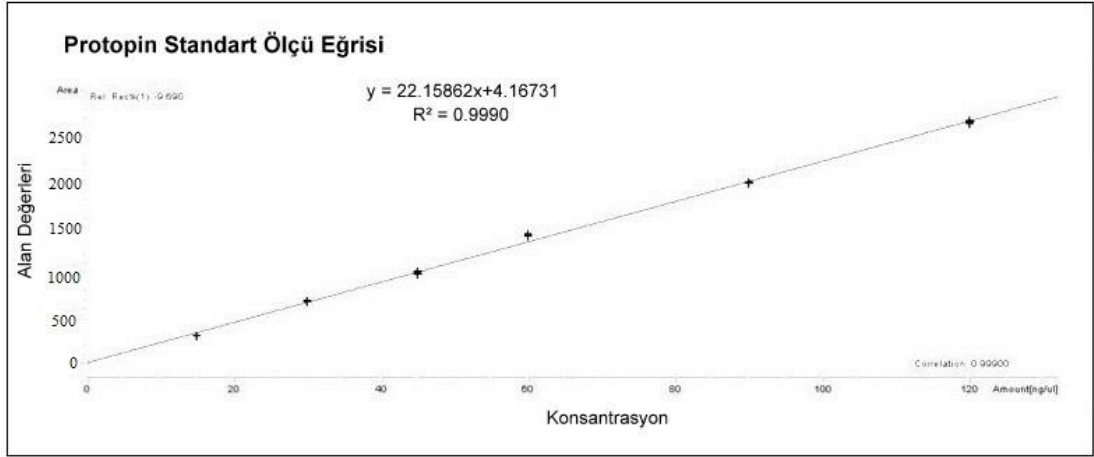
1.2.7. YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE PROTOPİN MİKTAR TAYİNİ

1.2.7.1. Protopin Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Protopin miktar tayini için gerekli olan, standart olarak protopin kullanılan ölçümler sonucunda bulunan değerler Tablo 27’de, bu değerlerle çizilen ölçü eğrisi ve regresyon denklemi Şekil 1’de verilmiştir.

Tablo 27. HPLC’ye Uygulanan Protopin Konsantrasyonuna Karşı Okunan Alan Değerleri

Konsantrasyon (µg/ml)	Ortalama Alan Değerleri
15	301.28707
30	680.73458
45	988.01420
60	1409.38387
90	1973.80864
120	2650.26619

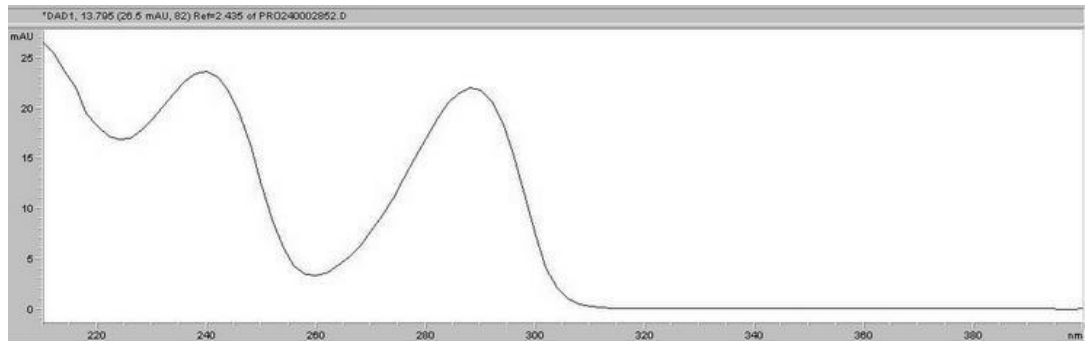


Şekil 1 : Protopin Standart Ölçü Eğrisi Regresyon Denklemi

Standart olarak kullanılan protopinin kromatogramı ve UV spektrumu Şekil 2 ve Şekil 3’de yer almaktadır.



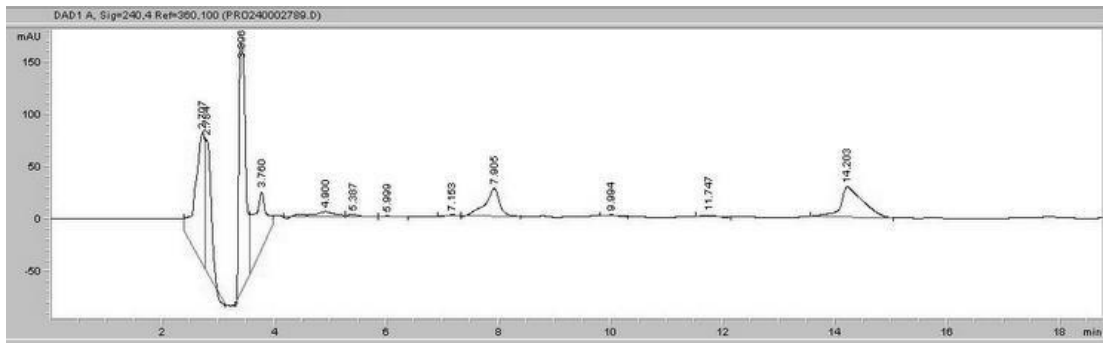
Şekil 2 : Standart Protopine ait HPLC Kromatogramı ($R_T=13.868$)



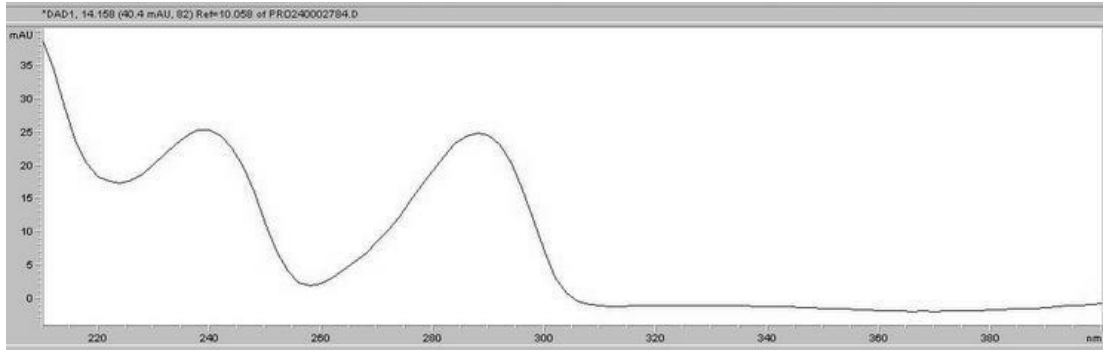
Şekil 3 : Standart Olarak Kullanılan Protopine ait UV Spektrumu

HPLC ile miktar tayini çalışmalarında DAD (Diode Array Detector) dedektörü kullanılmıştır. UV spektrumları karşılaştırıldığında, 1000 üzerinden 999 uyum tespit edilmiştir. HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4, kodlu örneklerden hazırlanan ekstrelerin HPLC kromatogramları ve UV spektrumları şekil (4-11) de görülmektedir.

1.2.7.2. HP-1 Ekstresine Ait Şekiller



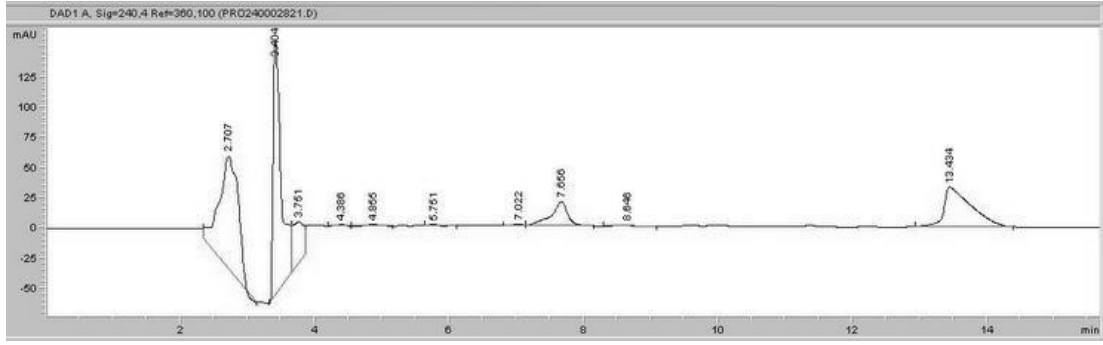
Şekil 4 : HP-1 Ekstresine Ait HPLC Kromatogramı ($R_T=14.203$)



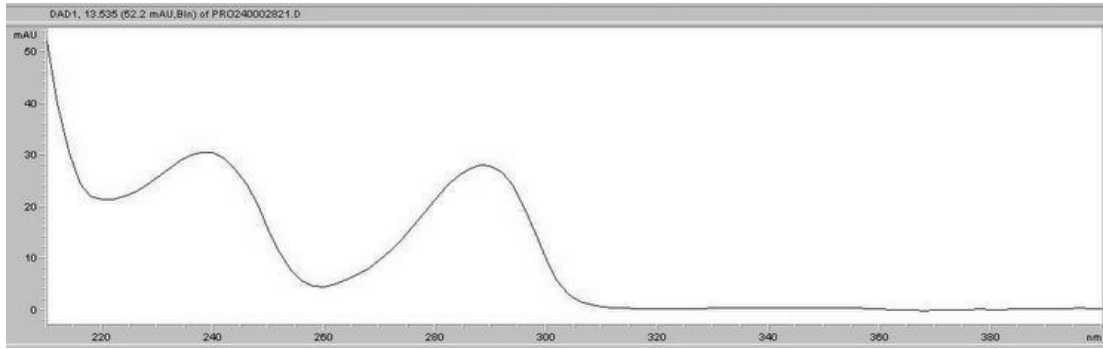
Şekil 5 : HP-1 Ekstresine Ait Protopin Pikinin UV Spektrumu

($R_T=14.203$, Standart Protopin ile Uyumu=999.247)

1.2.7.3. HP-2 Ekstresine Ait Şekiller



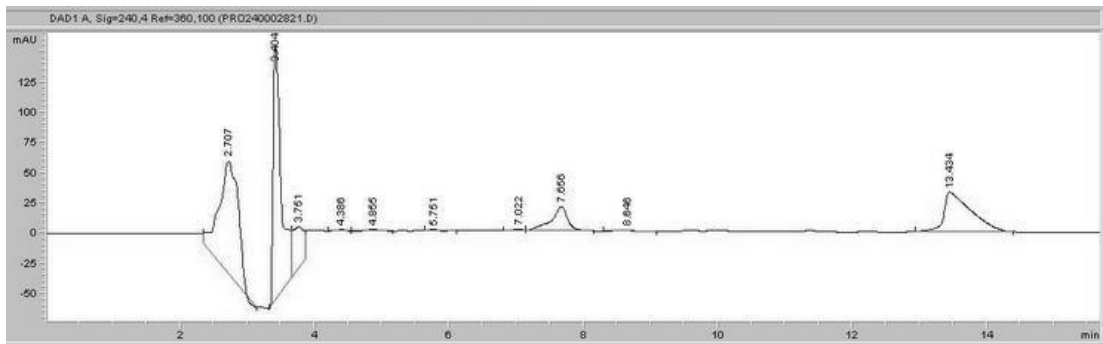
Şekil 6 : HP-2 Ekstresine Ait HPLC Kromatogramı ($R_T=13.434$)



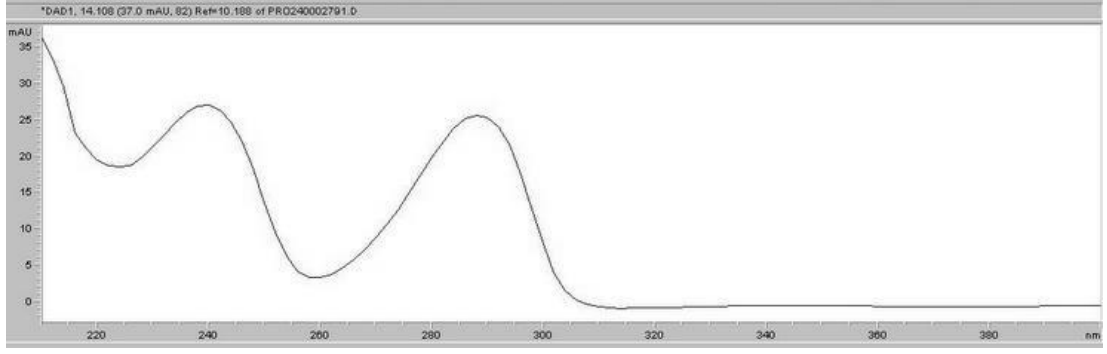
Şekil 7 : HP-2 Ekstresine Ait Protopin Pikinin UV Spektrumu

($R_T=13.434$, Standart Protopin ile Uyumu=999.451)

1.2.7.4. HP-3 Ekstresine Ait Şekiller

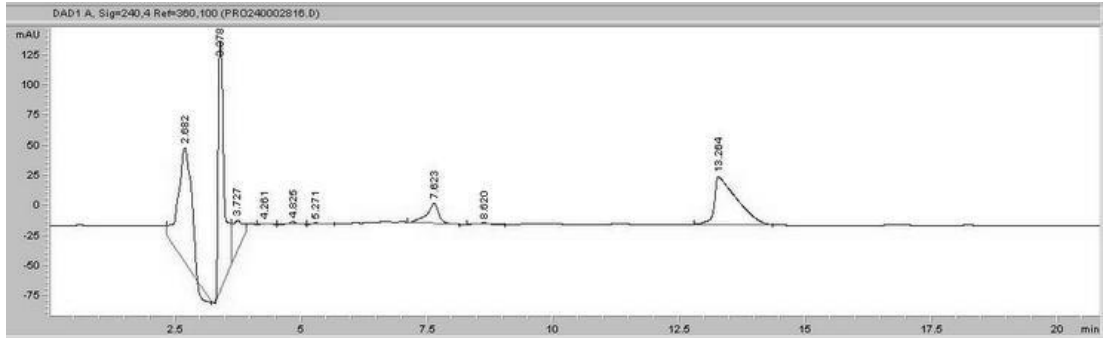


Şekil 8 : HP-3 Ekstresine Ait HPLC Kromatogramı ($R_T=14.177$)

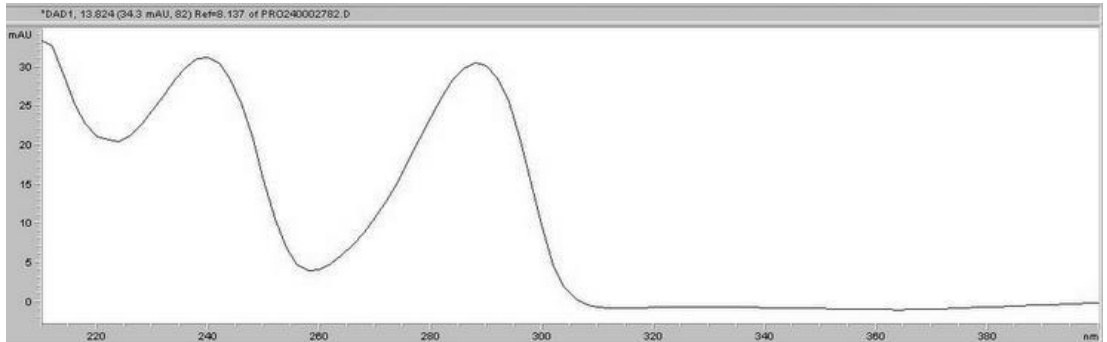


Şekil 9 : HP-3 Ekstresine Ait Protopin Pikinin UV Spektrumu
($R_T=14.177$, Standart Protopin ile Uyumu=999.252)

1.2.7.5. HP-4 Ekstresine Ait Şekiller



Şekil 10 : HP-4 Ekstresine Ait HPLC Kromatogramı ($R_T=13.264$)



Şekil 11: HP-4 Ekstresine Ait Protopin Pikinin UV Spektrumu
($R_T=13.264$, Standart Protopin ile Uyumu=999.613)

1.2.7.6. Ekstrelelere Ait Protopin Miktar Tayini Sonuçları

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile kuru drog üzerinden, daha önce belirtilen yöntemle hesaplanmış protopin miktar tayini sonuçları aşağıda verilmiştir. Her bir örnek için 3 ayrı paralel çalışma yapılmıştır (Tablo 28-35).

Tablo 28. HP-1 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçları

Drog	Drog Miktarı (mg)	Uygulanan Miktar (µl)	Okunan Alan Değeri	% Protopin Miktarı
HP-1	200 mg	20	799.52313	0.05982
		20	792.48480	0.05929
		20	799.02112	0.05978
HP-1	200 mg	20	816.49847	0.06109
		20	824.83746	0.06173
		20	818.04700	0.06122
HP-1	200 mg	20	798.67767	0.05976
		20	808.46735	0.06050
		20	805.06732	0.06024

Tablo 29. HP-1 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Mean	St. Sapma	Min	Max
9	0.06038	0.00088	0.05929	0.06173

Tablo 30. HP-2 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçları

Drog	Drog Miktarı (mg)	Uygulanan Miktar (µl)	Okunan Alan Değeri	% Protopin Miktarı
HP-2	200 mg	20	935.95856	0.07008
		20	931.67493	0.06976
		20	940.31329	0.07041
HP-2	200 mg	20	911.67212	0.06826
		20	924.12653	0.06919
		20	919.17010	0.06882
HP-2	200 mg	20	924.49286	0.06922
		20	928.26965	0.06951
		20	921.62103	0.06901

Tablo 31. HP-2 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Mean	St. Sapma	Min	Max
9	0.06936	0.00067	0.06826	0.07041

Tablo 32. HP-3 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçları

Drog	Drog Miktarı (mg)	Uygulanan Miktar (µl)	Okunan Alan Değeri	%Protopin Miktarı
HP-3	200 mg	20	1799.43030	0.13503
		20	1809.05242	0.13575
		20	1807.11011	0.13561
HP-3	200 mg	20	1807.88684	0.1367
		20	1795.16345	0.13471
		20	1805.36914	0.13548
HP-3	200 mg	20	1818.68274	0.13648
		20	1835.91321	0.13778
		20	1839.70728	0.13806

Tablo 33. HP-3 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Mean	St. Sapma	Min	Max
9	0.13606	0.00120	0.13471	0.13806

Tablo 34. HP-4 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçları

Drog	Drog Miktarı (mg)	Uygulanan Miktar (µl)	Okunan Alan Değeri	% Protopin Miktarı
HP-4	200 mg	20	1240.14758	0.09296
		20	1250.73132	0.09376
		20	1256.33997	0.09418
HP-4	200 mg	20	1251.01733	0.09378
		20	1236.96558	0.09273
		20	1263.28210	0.09470
HP-4	200 mg	20	1247.02502	0.09348
		20	1264.98535	0.09483
		20	1266.50574	0.09495

Tablo 35. HP-4 Örneğinde HPLC Yöntemiyle Protopin Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Mean	St. Sapma	Min	Max
9	0.09393	0.00043	0.09273	0.09495

1.3. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE TAYİNİNE

AİT BULGULAR

HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu örnekler üzerinde, *in vitro* Ellman yöntemine dayalı mikropilaka deneyinden yararlanılarak asetilkolinesteraz inhibitör aktivite tayini deneyi gerçekleştirilmiştir. Örneklerden hazırlanan alkaloit ekstraktlarına, standart olarak kullanılan protopine ve pozitif kontrol olarak kullanılan galantamine ait IC₅₀ değerleri Tablo 36’da yer almaktadır.

Tablo 36. Asetilkolinesteraz İnhibitör Aktivite Tayini Sonuçları

Kod	IC₅₀
HP-1	21.20 µg/ml
HP-2	15.14 µg/ml
HP-3	29.05 µg/ml
HP-4	14.14 µg/ml
Protopin	23.59 µg/ml
Galantamin	0.043 µg/ml

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

1. BOTANİK ARAŞTIRMALAR

Çalışmamızda Ege Bölgesi'ndeki farklı lokalitelerden, çiçekli halde iken toplanan *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisinin tayininde yardımcı olmak amacıyla, hazırlanan alkol materyalinden yararlanılarak kök, gövde, yaprak, meyve, tohum ve çiçeğe ait anatomik karakterler belirlenmiştir. Ayrıca ileride Herba Hypocoi droğuna ait bir monografin hazırlanmasına yardımcı olmak amacıyla, toz drog örnekleri de anatomik olarak incelenmiştir.

Bu çalışmalarda, yaprağın bifasiyal olduğu, yaprak kenarlarındaki epidermis hücrelerinin dış yüzeye doğru çıkıntı yaparak konik şekilde papil oluşturduğu ve her iki epidermiste, içe gömük halde bulunan stomaların anomositik tipte olduğu belirlenmiştir. Yaprakta her hangi bir tüy yapısına rastlanmamıştır.

Köke ait enine kesit incelendiğinde, endodermisin, eksodermise birleşik halde olduğu ve net bir ayırım yapılamadığı belirlenmiştir. Ksilem, bir daire üzerine radyal olarak dizilmiş trake ve trakeitlerden oluşmaktadır ve etrafı floem tabakası ile kaplıdır. İletim demetleri kolateral tiptedir ve parenkimatik hücreler içerisine yerleşmiştir.

Gövdeden alınan enine kesitte, gövdenin dairesel olduğu ve epidermis

hücrelerinin dış yüzeyinin ince bir kutikula ile kaplı olduğu görülmüştür. Epidermis hücrelerinin dorsal çeperlerinin çok kalın, ventral çeperlerinin ince ve lateral çeperlerin ise ventral çeperlere göre çok daha ince olduğu saptanmıştır. Çeperleri kalınlaşmış ve odunlaşmış kollenkima hücreleri mezofil hücrelerinin iç kısmında yer almaktadır ve dış kısımlarından sklerankima demetleri ile desteklenen kapalı kollateral iletim demetleri bu kollenkima hücrelerinin içerisinde bulunmaktadır.

Meyveye ait incelemeler, meyvenin boğumlu yapısından dolayı tohumlu kısım ve tohumsuz kısım üzerinde ayrı ayrı yapılmıştır. Tohumsuz kısımda, meyveye ait incelemelerde eksokarp hücrelerinin dış yüzeyinde ince bir kutikula bulunduğu, bu hücrelerin altında yer alan mezokarp hücrelerinin ise çeperlerinin ince olduğu ve bol kloroplast içerdiği görülmektedir. Tohumlu kısımda ise tohumsuz kısımdan farklı olarak, mezokarpta ağsı kalınlaşma ve endokarp yapısı görülmektedir. Endokarpı oluşturan hücrelerin sklerankima lifi şeklinde bütün çeperlerinde kalınlaşma ve odunlaşma tespit edilmiştir. Stomalar içe gömülmüş ve anomositik tiptedir.

Çiçek petallerinden alınan yüzeysel kesitlerde, üst epidermis hücrelerinin dış yüzeye doğru çıkıntı yaparak papil oluşturduğu ve iç endospermanın papilli hücreleri içerisinde bulunan pigment noktacıklarının çok sayıda ve belirgin olduğu görülmüştür. Ayrıca düz eksin zarı bulunan polenler küremsi-yayvan şekilde olup, bikolpat yapıdadır.

Tohum enine kesitleri incelendiğinde testa epidermisi içerisinde bulunan basit prizmatik billurlar dışında karakteristik özellikte bir yapıya rastlanmamıştır.

Genel olarak çalışmamız sonucunda elde edilen bulguların literatür ile uyum gösterdiği saptanmıştır (36, 45, 62). İncelediğimiz kaynaklarda bitkinin yaprak orta damarı etrafında, çiçek sepallerinde ve meyve mezokarpında süt borularının bulunduğu belirtilmiştir (36, 45). Ancak çalışmalarımız sırasında farklı lokalitelerden

toplanmış örneklerden alınan enine ve boyuna kesitler ile toz drog örneklerinde süt boruları mevcut imkanlar dahilinde tespit edilememiştir.

1.2. KALİTE KONTROL VE MİKTAR TAYİNİ ARAŞTIRMALARI

Tezimizin konusunu oluşturan *Hypecoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisine ait Herba Hypecoi drogları üzerinde kalite kontrolleri için esas olabilecek bazı temel deneyler gerçekleştirilmiştir.

Kalite kontrol deneyleri için, Avrupa Farmakopesi (21) ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde (3) yer alan bazı ana yöntemler esas alınmıştır. Bu amaçla farmakopede yer alan, gravimetrik esaslı kurutmada kayıp, total kül, sülfat külü, hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini yöntemleri uygulanmıştır.

Drogların teşhis ve saflık kontrolleri için, ince tabaka kromatografisi (İ.T.K.) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Drog örneklerindeki total alkaloit miktarı, DAB 10'da (15) Herba Fumariae drog monografisinde yer alan total alkaloit miktar tayini yönteminden yararlanılarak gerçekleştirilmiş olup, titrimetrik esaslı bir yöntemle tayin edilmiştir.

Ayrıca fizyolojik ve farmakolojik etkileri nedeniyle, bitkinin taşıdığı ana alkaloitlerden biri olan protopinin miktar tayini hazırlanan drog örneklerinde yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle (HPLC) gerçekleştirilmiştir.

1.2.1. Kurutmada Kayıp, Total Kül, Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül ve Sülfat Külü Miktar Tayini

Hypocoum procumbens L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisinden hazırlanan droglar üzerinde gerçekleştirilen nem miktar tayini denemelerinde, ortalama değerler olarak, HP-1 kodlu örnek için % 9.4858, HP-2 kodlu örnek için % 7.4597, HP-3 kodlu örnek için % 7.9493, HP-4 kodlu örnek için ise % 6.8009 nem oranı saptanmıştır.

Total kül miktar tayini deneyleri sonucunda, ortalama değer olarak HP-1 kodlu örnek için % 11.7662, HP-2 kodlu örnek için % 11.5884, HP-3 kodlu örnek için % 18.5730, HP-4 kodlu örnek için ise % 14.0101 total kül oranı tespit edilmiştir.

Hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini deneylerinde ise ortalama değer olarak HP-1 kodlu örneğin % 1.5705, HP-2 kodlu örneğin % 1.5723, HP-3 kodlu örneğin % 3.5783, HP-4 kodlu örneğin ise % 3.4426 hidroklorik asitte çözünmeyen kül oranına sahip olduğu bulunmuştur.

Sülfat külü miktar tayini deneylerinin total kül miktar tayinine göre daha sabit sonuçlar verebileceği düşüncesiyle yaptığımız çalışmalarda, ortalama değerler olarak, HP-1 kodlu örnek için % 15.4659, HP-2 kodlu örnek için % 15.3114, HP-3 kodlu örnek için % 21.8285, HP-4 kodlu örnek için ise % 17.1771 oranında sülfat külü saptanmıştır.

Bu çalışmalarda elde edilen sonuçların, ileride hazırlanabilecek Herba *Hypecoi* droğuna ait bir monograf oluşumuna katkıda bulunabileceği belirtilebilir.

1.2.2. İ.T.K. ile Teşhis ve Saflık Kontrolleri

Drogların İ.T.K ile saflık ve kalite kontrolü için yapılan çalışmalarda çözücü sistemi olarak, anabilim dalımızda farklı *Fumaria* türlerinden hazırlanan ve protopin

ihativa eden Herba Fumariae drogları üzerinde daha önce gerçekleştirilen çalışmalarda yararlanılan toluen-kloroform-metanol-amonyum hidroksit (5:3:1:1 damla) kullanılmıştır (6, 22, 41, 51). Developmandan sonra kromatografi plakları önce 254 ve 366 nm dalga boylarındaki UV ışık altında ve daha sonra Dragendorff reaktifi püskürtülerek incelenmiştir. İncelenen drog örneklerinin hepsinde protopin varlığı tespit edilmiştir (Resim 32).

1.2.3. Total Alkaloit Miktar Tayini

Bitkinin içermiş olduğu total alkaloit miktarını tespit etmek amacıyla DAB 10'da (15) yer alan titrimetrik esaslı total alkaloit miktar tayini yöntemi kullanılmıştır. Total alkaloit içeriği, kuru drog ve protopin üzerinden hesaplanmış olup, HP-1 kodlu örneğin % 0.1060, HP-2 kodlu örneğin % 0.0929, HP-3 kodlu örneğin % 0.2267 ve HP-4 kodlu örneğin % 0.1018 oranında total alkaloit içerdiği saptanmıştır. İncelenen örnekler arasında en fazla total alkaloit içeriğine, Yapağılar, Uşak'dan toplanmış olan HP-3 kodlu örneğin sahip olduğu bulunmuştur. Daha önce *Hypocoum pendulum* L. bitkisinin toprak üstü kısımlarında alkaloitlerin bromokrezol yeşili ile reaksiyona girmesi suretiyle sarı renkli kompleks oluşturmasına dayalı spektrofotometrik esaslı total alkaloit miktar deneyi sonucunda %0.0390 oranında total alkaloit tespit edilmiştir (67).

1.2.4. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisiyle (HPLC) Protopin Miktar Tayini

Protopin, göstermiş olduğu fizyolojik ve farmakolojik etkileri nedeniyle izokinolin alkaloitleri arasında önemli bir yere sahiptir. Bu nedenle bu alkaloidin bitkideki miktarının tayin edilmesi kalite kontrol çalışmaları açısından önem

taşımakta ve dolayısıyla araştırmacıların ilgisini çekmektedir. Literatürde protopinin miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi başta olmak üzere farklı yöntemlerin kullanıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Tablo 1, Sayfa 11-16). Protopin içeren bitkilerden, yoğun olarak araştırılan *Fumaria* L. türlerinde % 0.11-0.47 aralığında protopinin miktarı tespit edilmiştir (80, 84, 87). *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms bitkisinde protopinin RP-HPLC yöntemiyle miktar tayini yapılmış ve incelenen iki farklı örneğin % 0.10 ve % 2.37 protopinin içerdiği bildirilmiştir (95).

Hypecoum procumbens L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisinden hazırladığımız örnekler üzerinde söz konusu alkaloidin varlığı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilmiştir. Bu uygulamanın sonucunda elde edilen kromatogramlar ve UV spektrumları, “Bulgular” kısmında yer almaktadır.

Yapılan çalışmada kuru drog üzerinden hesaplanmak suretiyle HP-1 kodlu örnekte % 0.06038, HP-2 kodlu örnekte % 0.06936, HP-3 kodlu örnekte % 0.13606, HP-4 kodlu örnekte % 0.09393 oranında protopinin varlığı bulunmuştur. En yüksek protopinin miktarının Yapağılar, Uşak’dan toplanmış olan HP-3 kodlu örnekte, en düşük protopinin miktarının ise Bornova, İzmir’den toplanan HP-1 kodlu örnekte olduğu görülmüştür. İncelenen örneklerin protopinin miktarı açısından farklılık göstermesinin, bitkinin genetik yapısına, yetişme ortamına ve toplama zamanındaki vejetasyon döneminin farklı olmasına bağlı olabileceği belirtilebilir. Çalışmamız neticesinde elde edilen sonuçların, Tablo 1’de (Sayfa 11-16) görülen *Papaveraceae* familyası bitkilerinin bazılarının içerdiği protopinin miktarlarına eşit veya genel olarak da düşük olduğu görülmektedir.

1.3. ASETİLKOLİNESTERAZ İNHİBİTÖR AKTİVİTE TAYİNİ

Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite tayini için *in vitro* Ellman yöntemine dayalı mikrolaka deneyinden yararlanılmıştır. Alkaloit ekstralarının ve protopin alkaloidinin uygun konsantrasyonlarda (0.006-600 µg/ml) çözeltileri hazırlandıktan sonra absorbansları 405 nm dalga boyunda mikrolaka okuyucu yardımıyla ölçülmüş ve IC₅₀ değerleri GraphPad Prism V3.0 software (GraphPad Software San Diego, CA) kullanılarak hesaplanmıştır (18, 42). Galantaminin pozitif kontrol olarak (IC₅₀=0.043 µg/ml) kullanıldığı çalışmada, HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu alkaloit ekstralarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 21.20 µg/ml, 15.14 µg/ml, 29.05 µg/ml ve 14.14 µg/ml, protopinin ise 23.59 µg/ml olarak bulunmuştur. Protopinin asetilkolinesteraz inhibitör aktiviteye sahip olduğu literatürde kayıtlıdır (35). Çalışmalarımız *Hypecoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl drog örneklerinin belirgin aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir.

BÖLÜM V

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Araştırmamızda ilk olarak, ülkemizde yabani olarak yetişen *Hypecoum* türlerinden biri olan *Hypecoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisinin tayinine yardımcı kök, gövde, yaprak, meyve, tohum ve çiçeğe ait anatomik karakterler belirlenmiştir. Ayrıca Herba Hypecoi droğuna ait ilerde hazırlanabilecek monografin yazılmasına kaynak oluşturabilmek amacıyla, toz drog örnekleri üzerinde mikroskopik incelemeler yapılmıştır. Türkiye’de yetişen *Hypecoum* türleri üzerinde benzer çalışmalar yapılmasının ve bu araştırmaların sonuçlarının karşılaştırılmasının amaçlanan hedefler doğrultusundaki önemini ortaya koymaktadır.

Araştırmamızın ikinci aşamasında *Hypecoum procumbens* bitkisinin kaynak olarak seçildiği Herba Hypecoi droğu için yazılacak monografda yer alabilecek kalite kontrol deneylerine yönelik bazı araştırmalar yapılmıştır. Bu çerçevede, farklı lokalitelerden toplanmış HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu örnekler üzerinde kurutmada kayıp, total kül, sülfat külü ve hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarları Avrupa Farmakopesi’nde yer alan yöntemler esas alınarak tayin edilmiştir. Elde edilen bulgulardan, ileride hazırlanabilecek bir monografda söz konusu deneylere ait sınır değerlerin saptanmasında yararlanılabilir.

Teşhis amaçlı İ.T.K. deneyinde, protopin varlığını araştırmak için, toluen-kloroform-metanol-amonyum hidroksit (5:3:1:1 damla) çözücü sistemi tek developman olarak uygulanmıştır. Kromatogramın değerlendirilmesinde, protopin için 254 ve 366 nm dalga boylarındaki UV ışığı altında inceleme yapılmış ve ayrıca her ikisi için de Dragendorff püskürtme belirtecinden yararlanılmıştır.

Herba Hypecoi droğunun kalitesinin saptanmasında total alkaloit miktar tayini önemli bir deneydir. Bu amaçla tarafımızdan uygulanan titrimetrik esaslı yöntem kullanılmıştır. Buna ilaveten, diğer başka modern yöntemlerin de araştırılıp, uygulanabilirliği değerlendirilmelidir.

Protopin eldesi için bir kaynak söz konusu olduğu takdirde, protopin elde edilmesi için Yapağılar, Uşak civarından toplanan bitkilerden yararlanılması gerektiği belirtilebilir.

Asetilkolinesteraz inhibitör aktivite deneyinde ise HP-1, HP-2, HP-3 ve HP-4 kodlu bitkisel örneklerden hazırlanan alkaloit ekstralarının IC₅₀ değerleri sırasıyla 21.20 µg/ml, 15.14 µg/ml, 29.05 µg/ml ve 14.14 µg/ml olarak bulunmuştur. İncelenen Herba Hypecoi örneklerinin hepsinde belirgin aktivite gözlenmiştir.

BÖLÜM VI

ÖZET

***HYPECOUM PROCUMBENS* L. SUBSP. *ATROPUNCTATUM* Å. E.**

DAHL BİTKİSİNİN KALİTE KONTROL AÇISINDAN

DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada, Türkiye’de yabani olarak yetişen bir *Hypocoum* türü olan *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E. Dahl bitkisi çeşitli açılardan ele alınarak ayrıntılı olarak incelenmiştir.

Bitki üzerinde yürütülen botanik çalışmalarda, bitkinin tayininde yararlanılabilecek ve muhtemel monografilerde yer alabilecek anatomik ve mikroskobik özellikler araştırılmıştır.

Kalite kontrol çalışmaları kapsamında, çiçekli ve meyveli dönemde farklı lokalitelerden toplanan bitkilerden ayrı ayrı hazırlanan drog örneklerinde kurutmada kayıp, total kül, hidroklorik asitte çözünmeyen kül ve sülfat külü deneyleri yapılmıştır. Drogların teşhis ve saflık kontrollerinde yararlanmak amacıyla ince tabaka kromatografisi (İ.T.K.) kullanılmıştır. Drogların total alkaloid miktar tayinleri titrimetrik bir yöntemle tayin edilmiştir. İlave olarak, drog örneklerinde protopin miktarı, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile tayin edilmiştir. En yüksek protopin miktarı Yapağılar, Uşak’dan toplanan örneklerde bulunmuştur.

Bunlara ilaveten, drog örneklerinden hazırlanan alkaloid ekstralarının asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi *in vitro* Ellman yöntemine dayalı mikropilaka deneyinden yararlanılarak saptanmıştır.

ABSTRACT

QUALITY CONTROL EVALUATION of *HYPECOUM PROCUMBENS*

L. SUBSP. *ATROPUNCTATUM* Å. E. DAHL

In this study, *Hypocoum procumbens* L. subsp. *atropunctatum* Å. E., which is a wild-growing *Hypocoum* species of Turkey, has been thoroughly investigated by several approaches.

In botanical investigations carried out on the plant, anatomical and microscopical features, which may be used in the determination of the species and may be included in a prospective monograph, were investigated.

In the course of the quality control studies, assays for loss on drying, total ash, acid-insoluble ash and sulphated ash were carried out for the drug specimens prepared from plants in flowering and fruiting period and collected from different localities. Thin Layer Chromatography (TLC) was used for the identification and purity control of the drug specimens. The total alkaloidal contents of the drugs were determined by a titrimetric method. Moreover, the drug specimens were quantitatively analyzed for protopine, by using High Pressure Liquid Chromatography (HPLC). The highest content of protopine was detected in the samples collected from Yapağılar, Uşak.

Moreover, acetylcholinesterase inhibitory activity of the alkaloidal extracts prepared from drug specimens were determined by using microplate assay based on *in vitro* Ellman method.

BÖLÜM VII

YARARLANILAN KAYNAKLAR

1. Aggarwal, P., Varshney, V., K., Dayal, R., Puni, L., (2009). Isoquinoline Alkaloids from Ethno Botanically Important *Dicentra paucinervia*, *International Journal of Chemical Sciences*, 7(3): 1841-1850
2. Armen, T. (2009). Floweing Plants. Second Edition, Springer, 94
3. Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi (2004), 117-265
4. Bae, D. S., Kim Y. H., Pan, C. H., Nho C. W., Samdan, J., Yansan, J., Lee, J. K. (2011). Protopine Reduces the Inflammatory Activity of Lipopolysaccharide-Stimulated Murine Macrophages, *BMB Reports*, 45(2): 108 – 13
5. Bao, X., Laguo, C. (2009). A Tibetan Medicinal Preparation for Treating Influenza, And Its Quality Control Method, *Faming Zhuanli Shenqing*, 996 - 968
6. Barış, T., (2001). *Fumaria parviflorae* (*Fumariaceae*) Türünden Hazırlanan Herba Fumariae Parviflorae Droğunun Kalite Kontrol Çalışmaları, *T.C. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*
7. Baytop, A. (1972). Bitkisel Droğların Anatomik Yapısı, Baha Matbası, İstanbul, 26-27
8. Bournine, L., Bensalem, S., Wauters, J. N., Ouada, M. I., Benabdesselam, F. M., Bedjou, F., Castronova, V., Bellahcène, A., Tits, M., Frédéricich, M.,

- (2013). Identification and Quantification of the Main Active Anticancer Alkaloids from the Root of *Glaucium flavum*, *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (12): 23533-23544
9. Chen, C. H., Liao, C. H., Chang, Y. L., Guh, J. H., Pan, S. L., Teng, C. M. (2012). Protopine, A Novel Microtubule-Stabilizing Agent, Causes Mitotic Arrest and Apoptotic Cell Death in Human Hormone-Refractory Prostate Cancer Cell Lines, *Cancer Letters*, 315 (1): 1-11
 10. Chen, Y. Z., Liu, G. Z., Shen, Y., Chen, B., Zeng, J. G. (2009). Analysis of Alkaloids in *Macleaya cordata* (Willd.) R. Br. Using High-Performance Liquid Chromatography With Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216: 2104 - 2110
 11. Chen, Z. B., Fang, Q. C. (1985). Chemical Study On A Traditional Tibetan Drug *Hypecoum leptocarpum*, *Yao Xue Xue Bao* 20 (9): 658 – 61
 12. Chia, Y. C., Chang, F. R., Wu, C. C., Teng, C. M., Chen, K. S., Wu, Y. C. (2006). Effect of Isoquinoline Alkaloids of Different Structural Types on Antiplatelet Aggregation *in Vitro*, *Planta Medica* 72 (13): 1238-1241
 13. Cullen, J. (1965). *Hypecoum* L., in Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Davis, P. H. (Ed.), Vol 1, Edinburgh University Press, Edinburgh, 236-238
 14. Dahl, Å. E. (1989). Taxonomic and Morphological Studies in *Hypecoum* sect. *Hypecoum* (*Papaveraceae*), *Plant Systematics and Evolution*, 163 (3-4): 227-280
 15. Deutsches Arzneibuch 10, Frankfurt: Govi-Verlag-GmbH., 1997

16. Dikman, E., Kantitatif Analiz, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kitaplar Serisi, 79, 1977, 86-7
17. Ding, B., Zhou, T., Fan, G., Hong, Z., Wu, Y., (2007). Qualitative and Quantitative Determination of Ten Alkaloids in Traditional Chinese Medicine *Corydalis yanhusuo* W.T. Wang by LC-MS/MS and LC-DAD, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (2): 219-226
18. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, Jr., V., Featherstone, R.M. (1961). A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity, *Biochemical Pharmacology*, 7: 88 - 95
19. Ercan, Z., S., (2002). Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri, *Demans Dergisi*, 2(1): 5-9
20. Ergenç, N., İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini, İstanbul Üniversitesi Yayınları No: 3566, Eczacılık Fakültesi No:55, IV. Baskı, İstanbul 1989
21. European Pharmacopoeia, Sixth Edition (2007), 1261-1266
22. Evrenosoğlu, A. E., (2002). *Fumaria kralikii* (Fumariaceae) Türünden Hazırlanan Herba Fumariae kralikii Droğunun Kalite Kontrol Çalışmaları, *T.C. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*
23. Ferrari, M., Verotta, L., (1988). Centrifugal Thin-Layer Chromatography of Alkaloids from Vegetable Sources Using An Aluminium Oxide Layer, *Journal of Chromatography*, 437: 328-332
24. Freytag, W., E., Stapf, W., (1993). Greater Celandine-*Chelidonium majus* L. Quantitative HPLC Determination of *Chelidonium* Alkaloids, *PZ Wissenschaft*, 6(5-6): 126-33
25. Fu, X., Liang, W., Tu, G., (1985). Chemical Studies On the Alkaloids from Yuanhu (*Corydalis turtschaninovii* Bess. f. *yanhusuo* y. H. Chou et C. C.

- Hsu). III. Quantitative Determination of the Tertiary Alkaloids in Yuanhu by TLC-Densitometry, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 5(4): 194-8
26. Gu, Y., Qian, D., Duan, J., Wang, Z., Gua, J., Tang, Y., Guo, S., Sep, J. (2010). Simultaneous Determination of Seven Main Alkaloids of *Chelidonium majus* L. by Ultra-Performance LC With Photodiode-Array Detection, *Journal of Separation Science*, 33 (8): 1004-1009
27. Haeberlein, H., Tschiersch, K., P., Boonen, G., Hiller, K., O., (1996). *Chelidonium majus*. Components With in Vitro Affinity for the GABAA Receptor. Positive Cooperation of Alkaloids, *Planta Medica*, 62(3): 227-231
28. He, L., Zhang, Y., (1985). TLC Separation and Densitometric Determination of Six Isoquinoline Alkaloids in *Corydalis bungeana*, *Yaoxue Xuebao*, 20(5): 377-82
29. Heinrich, M., Teoh, H. L. (2004). Galanthamine from Snowdrop-the Development of a Modern Drug Against Alzheimer's Disease from Local Caucasian Knowledge, *J. Ethnopharm.*, 92: 147-162
30. Hiller, K. O., Ghorbani, M., Schilcher, H. (1998). Antispasmodic and Relaxant Activity of Chelidonine, Protopine, Coptisine, and *Chelidonium majus* Extracts on Isolated Guinea-Pig Ileum, *Planta Medica*, 64 (8): 758-60
31. Hongda, M., Yongjun, W., Guo, T., He, Z., Chang, X., Pu, X., (2009). Simultaneous Determination of Tetrahydropalmatine, Protopine, and Palmatine in Rat Plasma by LC-ESI-MS and Its Application to A Pharmacokinetic Study, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49: 440-446

32. Howes, M-J. R., Perry, N.S.L., Houghton, P. J. (2003). Plants with Traditional Uses and Activities, Relevant to the Management of Alzheimer's Disease and Other Cognitive Disorders, *Phytotherapy Research*, 17(1) : 1 - 18
33. José, M., B., F., Karina, C., P., M., Margareth, F., F., M., Diniz, L., M., B., Petrônio, F., A., F., Marcelo, S., S., Emidio, V., L., C., Jackson, R., G., S., A., Lucindo, J., Q., J., (2006). Natural Products Inhibitors of The Enzyme Acetylcholinesterase, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 16(2): 258-285
34. Kiely, J., S., Moos, W., H., Pavia, M., R., Schwarz, R., D., Woodard, G., L. (1991). A Silica Gel Plate-Based Qualitative Assay For Potential Inhibitors, *Analytical Biochemistry*, 196 : 439 – 442
35. Kim, D., K., Lee, K., T., Baek, N., I., Kim, S., H., Park, H., W., Lim, J., P., Shin, T., Y., Eom, D., O., Yang, J., H., Eun, J., S., (2004). Acetylcholinesterase inhibitors from the aerial parts of *Corydalis speciosa*, *Archives of Pharmacal Research*, 27(11):1127-31
36. Kletter C., Kriechbaum M., (2001). Tibetan Medicinal Plants, *Medpharm Scientific Publishers*, Stuttgart
37. Kosina, P., Gregorova, J., Gruz, J., Vacek, J., Kolar, M., Vogel, M., Roos, W., Naumann, K., Simanek, V., Ulrichova, J. (2010). Phyrochemical and Antimicrobial Characterization of *Macleaya cordata* herb, *Fitoterapia* 81 (8): 1006-1012
38. Kumar, K. N., Karunakar, A., Gunesh, G., Mukkanti, K., (2009). Quantitation of Protopine in *Fumaria parviflora* L. Whole Plant Powder by High-Performance Liquid Chromatography, *Asian Journal of Chemistry*, 21 (9): 6695-6700

39. Liao, C., Chang, S., Yin, S., Wang, Z., Meng, Y., (2014). A HPLC-MS/MS Method for the Simultaneous Quantitation of Six Alkaloids of *Rhizoma Corydalis Decumbentis* in Rat Plasma and Its Application to a Pharmacokinetic Study, *Journal of Chromatography B*, 944: 101-106
40. Lin, H., Q., Ho, M., T., Lau, L., S., Wong, K., K., Shaw, P., C., Wan, D., C., C., (2008). Anti-acetylcholinesterase Activities of Traditional Chinese medicine for Treating Alzheimer's Disease, *Chemical-Biological Interactions*, 175 : 352-354
41. Liyon, D., (2001). *Fumaria judaica (Fumariaceae)* Türünden Hazırlanan Herba Fumariae Droğunun Kalite Kontrol Çalışmaları, *T.C. Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*
42. López, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C. (2002). Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Amaryllidaceae Alkaloids and *Narcissus* Extracts, *Life Sciences*, 71 : 2521 – 2529
43. Luo, X., Chen, B., Yao, S., (2006). Rapid Determination of Protopine, Allocryptopine, Sanguinarine and Chelerythrine in Fruits of *Macleaya cordata* by Microwave-assisted Solvent Extraction and HPLC-ESI/MS, *Phytochemical Analysis*, 17 (6): 431-438
44. Marston, A., Kissling, J., Hostettmann, K., (2002). A Rapid TLC Bioautographic Method For The Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors In Plants, *Phytochemical Analysis*, 13 : 51 - 54
45. Metcalfe, C. R., Chalk, L., (1950). *Anatomy of the Dicotyledons: Leaves, Stem, and Wood in Relation to Taxonomy with Notes on Economic Uses*, Oxford at the Clarendon Press, London, 74-78

46. Mete, I., E., Gözler, T., (1988). (+)-Oxoturkiyenine: an Isoquinoline-Derived Alkaloid from *Hypecoum pendulum*, *Journal of Natural Products*, 51(2): 272-274
47. Mroczek, T. (2009). Highly Efficient, Selective and Sensitive Molecular Screening of Acetylcholinesterase Inhibitors of Natural Origin by Solid-Phase Extraction-Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation-Octopole-Orthogonal Acceleration Time-of-Flight-Mass Spectrometry and Novel Thin-Layer Chromatography-based Bioautography, *Journal of Chromatography A*, 1216: 2519 – 2528
48. Niu, C., Q., He, L., Y., (1992). HPTLC Separation and Fluorodensitometric Determination of Isoquinoline Alkaloids in *Chelidonium majus* L., *Yaouxue Xuebao*, 27(1): 69-73
49. Niu, X., Li, W., Xu, H., Liu, X., Qi, L. (2013). Simultaneous Quantification of 11 Isoquinoline Alkaloids in *Corydalis imptiens* (Pall.) Fisch by HPLC, *Journal of Separation Science*, 36 (13): 2090-2095
50. Niu, Y., Shao, Y., Tao, Y. Mei, L., (2009). Determination of Eight Trace Elements in Seven Tibetan Medicines, *Yaowu Fenxi Zazhi Bianji Weiyuanhui*, 29 (6): 915-918
51. Önür, M., A., Fafal, T., (2007). Determination of Protopine in *Fumaria densiflora* DC. By TLC-Densitometric and Spectrophotometric Method, *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 36 (4): 223 – 235
52. Önür, M., A., Gözler, T., (1986). Hypecumine – A New 3-Arylisoquinoline from *Hypecoum procumbens*, *Planta Medica*, 1: 70-71

53. Özhatay, N. (2001). *Hypocoum* L., in Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Güner, A. (Ed.), Vol 11, Edinburgh University Press, Edinburgh, 20-22
54. Pabuçcuoğlu, V., Arar, G., Tekant, G., Freyer, A., J., Shamma M., (1989). Nitrotyrasanguinarine: An Unusual Nitrated Benzophenantridine Alkaloid from *Hypocoum* Species, *Journal of Natural Products*, 52: 716-719
55. Philipov, S., Istatkova, R., Denkova, P., Dangaa, S., Samdan, J., Krosnova, M., Munkh-Amgalan, C., (2009). Alkaloids from Mongolian species *Hypocoum lactiflorum* Kar. Et Kir. Pazij, *Natural Product Research*, 23 (11): 982-987
56. Phurpa, W., Keller, P. A., Pyne, S. G., Lie, W., Willis, A. C., Rattanajak, R., Kamchonwongpaisan, S. (2013). A New Protoberberine Alkaloid from *Meconopsis simplicifolia* (D. Don) Walpers with Potent Antimalarial Activity Against a Multidrug Resistant *Plasmodium falciparum* Strain, *Journal of Ethnopharmacology* 150 (3): 953-959
57. Rakhimova, D, A., Dobronravova, E, K., Shakirov, T, T., (1977). Method for the Quantitative Determination of Protopine in *Fumaria vaillantii*, *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 3:376-7
58. Rathi, A., Srivastava, A. K., Shirwaikar, A., Rawat, A. K. S., Mehrotra, S. (2008). Hepatoprotective Potential of *Fumaria indica* Pugsley Whole Plant Extracts, Fractions and an Isolated Alkaloid Protopine, *Phytomedicine* 15 (6): 470-477
59. Rey, J., P., Levesque, J., Pousset, J., L., Roblot, F., (1991). Analytical and Quantitative Studies of Californin and Protopin in Aerial Part Extracts of

- Eschscholzia californica* Cham. with High-Performance Liquid Chromatography, *Journal of Chromatography*, 587(2): 314-17
60. Rhee, I., K., Appels, N., Lujendijk, T., Irth, H., Verpoorte, R., (2003). Determining Acetylcholinesterase Inhibitory Activity In Plant Extracts Using A Fluorimetric Flow Assay, *Phytochemical Analysis*, 14: 145-149
61. Rhee, K, I., Meent, M., Ingkaninan, K., Verpoorte, R. (2001). Screening for Acetylcholinesterase Inhibitors from Amaryllidaceae Using Silica Gel Thin-Layer Chromatography in Combination with Bioactivity Staining, *Journal of Chromatography A*, 915: 217 – 223
62. Romero, A. T., Salinas M. J., Fernández, M. J., (2003). Pollen Wall Development in *Hypocoum imberbe* Sm. (Fumariaceae), *Grana*, 42(2): 91-101
63. Saeed, S. A., Gilani, A. H., Majoo, R. U., Shah, B. H. (1997). Anti-Thrombotic and Anti-Inflammatory Activities of Protopine, *Pharmacological Research*, 36 (1): 1-7
64. Saeed, S. A., Gilani, A. H., Majoo, R. U., Shah, B. H. (1998). An Assessment of the Potential of Protopine to Inhibit Microsomal Drug Metabolising Enzymes and Prevent Chemical-induced Hepatotoxicity in Rodents, *Pharmacological Research*, 38 (3): 215-9
65. Sarikaya, B, B., Kaya, G, I., Onur, M, A., Bastida, J., Somer, N, U., (2013). Phytochemical Investigation of *Galanthus woronowii*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 51: 276 - 279
66. Satou, T., Koga, M., Matsushashi, R., Koike, K., Tada, I., Nikaido, T. (2002). Assay of Nematocidal Activity of Isoquinoline Alkaloids Using Third-Stage

- Larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*, *Veterinary Parasitology* 104 (2): 131-138
67. Shamsa, F., Monsef, H., Ghamooshi, R., Verdian-rizi, M., (2008). Spectrophotometric Determination of Total Alkaloids in Some Iranian Medicinal Plants, *Thai J. Pharm. Sci.*, 32: 17-20
68. Shen, Y., Han, C., Jiang, Y., Zhou, X., Zhu, Z., Lei, X., (2011). Rapid Quantification of Four Major Bioactive Alkaloids in *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. by Pressurised Liquid Extraction Combined with Liquid Chromatography-Triple Quadrupole Linear Ion Trap Mass Spectrometry, *Talanta*, 84 (4): 1026-1031
69. Shen, Y., Han, C., Liu, C., Zhou, Y., Xia B., Zhu, Z., Liu, A., (2011). Simultaneous Determination of Four Alkaloids in *Corydalis decumbens* (Thunb) Pers by High Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Sepu*, 29(2): 176-179
70. Shen, Y., Han, C., Xia, B., Zhou, Y., Liu, C., Liu, A., (2011). Determination of Four Alkaloids in *Corydalis decumbens* by HPLC, *Zhongguo Zhong*, 36(15): 2110-2
71. Simson, M. G. (2006). Plant Systematics. Elsevier Academic Press, California, 230-233
72. Singh, V., Kapahi, B. K., Srivastava, T. N. (1996). Medicinal Herbs of Ladakh Especially Used in Home Remedies, *Fitoterapia*, 67 (1): 38 - 48
73. Song, L. S., Ren, G. J., Chen, Z. L., Chen, Z. H., Zhou, Z. N., Cheng, H. (2000). Electrophysiological Effects of Protopine in Cardiac Myocytes: Inhibition of Multiple Cation Channel Currents, *British Journal of Pharmacology*, 129 (5): 893-900

74. Strum, S., Strasser, E. M., Stuppner, H., (2006). Quantification of *Fumaria officinalis* Isoquinoline Alkaloids by Nonaqueous Capillary Electrophoresis-Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1112: 331-338
75. Sturm, S., Seger, C., Stuppner, H., (2007). Analysis of Central European *Corydalis* Species by Nonaqueous Capillary Electrophoresis-Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1159(1-2): 42-50
76. Su, S., Cui, W., Zhou, Wei., Duan, J., Shang, E., Tang, Y., (2013). Chemical Fingerprinting and Quantitative Constituent Analysis of Siwu Decoction Categorized Formulae by UPLC-QTOF/MS/MS and HPLC-DAD, *Chinese Medicine*, London, United Kingdom, 5-8
77. Su, Y., Li, S., Li, N., Chen, L., Zhang, J., Wang, J. (2011). Seven Alkaloids and Their Antibacterial Activity from *Hypecoum erectum* L., *Journal of Medicinal Plants Research*, 5 (22): 5428-5432
78. Suau, R., Cabezudo, B., Valpuesta, M., Posadas, N., Diaz, A., Torres, G. (2005). Identification and Quantification of Isoquinoline Alkaloids in the Genus *Sarcocapnos* by GC-MS, *Phytochemical Analysis*, 16: 322 – 327
79. Suolang, B. (2008). Traditional Chinese Medicinal Composition for Treating Digestive System Diseases and Its Preparation Method, *Faming Zhuanli Shenqing*, 1169703
80. Şener, B., (1983). Turkish Species of *Fumaria* L. And Their Alkaloids II. Alkaloids of *Fumaria gaillardotti* Boiss., *Int. J. Crude Drug Res.*, 21 (3): 135-139

81. Şener, B., (1983). Turkish Species of *Fumaria* L. And Their Alkaloids IX. Alkaloids of *Fumaria parviflora* L., *F. petteri* Reichb. subsp. *thuretii* (Boiss.) Pugsley and *F. kralikii* Jordan, *Int. J. Crude Drug Res.*, 21 (3): 135-139
82. Şener, B., (1984). Turkish Species of *Fumaria* L. And Their Alkaloids III. Alkaloids of *Fumaria judaica* Boiss., *Int. J. Crude Drug Res.*, 22 (4): 181-183
83. Şener, B., (1984). Turkish Species of *Fumaria* L. And Their Alkaloids IV. Alkaloids of *Fumaria macrocarpa* Parlatores., *Int. J. Crude Drug Res.*, 22 (4): 185-187
84. Şener, B., (1985). Turkish Species of *Fumaria* L. And Their Alkaloids VI. Alkaloids of *Fumaria carpreolata* L., *Int. J. Crude Drug Res.*, 23 (4): 161-163
85. Şener, B., (1985). Turkish Species of *Fumaria* L. And Their Alkaloids VII. Alkaloids of *Fumaria officinalis* L. and *F. cilicica* Hausskn., *J. Fac. Pharm. Gazi*, 2 (1): 45-49
86. Şener, B., (1986). Turkish Species of *Fumaria* L. And Their Alkaloids VIII. Alkaloids of *Fumaria aspela* Boiss., *Int. J. Crude Drug Res.*, 24 (2): 105-106
87. Temizer, A., Kır, S., Şener, B., Orbey, M, T., (1987). Determination of Alkaloids by Differential Pulse Polarography II. *Fumaria* L. Alkaloids, *J. Pharm, Belg.*, 42 (6): 382-388
88. Tingting, S., Zhijie, Z., Raorao, L., Qianfeng, G., Hailin, Q., (2013). Quantitative Determination and Variation Trends of Six Alkaloids in Crude and Processed *Corydalis yanhusuo*, 46: 2542-2556
89. Topçuoğlu, E., S., Selekler, K., (1998). Alzheimer Hastalığı, *Turkish Journal of Geriatrics*, 1(2): 63-67

90. Valka, I., Simanek, V., (1988). Determination of alkaloids of *Fumaria parviflora* and *Fumaria capreolata* by High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Isotachophoresis, *Journal of Chromatography*, 445: 285-263
91. Valka, I., Walterova, D., Popova, M, E., Preininger, V., Simanek, V., (1985). Isolation Chemistry and Biology of Alkaloids from Plants of Papaveraceae, Part XCIX. Separation and Quantification of Some Alkaloids from *Fumaria Parviflora* by Capillary Isotachophoresis, *Planta Medica*, 51(4): 319-22
92. Vincent, P., G., Engelke, B., F., (1979). High Pressure Liquid Chromatographic Determination of the Five Major Alkaloids in *Papaver somniferum* L. and Thebaine in *Papaver bracteatum* Lindl. Capsular Tissue, *Journal – Association of Official Analytical Chemists*, 62(2): 310-14
93. Wang, G. X., Zhou, Z., Jiang, D. X., Han, J., Wang, J. F., Zhao, L. W., Li, J. (2010). In vivo Anthelmintic Activity of Five Alkaloids from *Macleaya microcarpa* (Maxim) Fedde Against *Dactylogyrus intermedius* in *Carassius auratus*, *Veterinary Parasitology* 171 (3-4): 305-313
94. Wangchuk, P., Keller, P. A., Pyne, S. G., Sastraruji, T., Taweechotipatr, M., Rattanajak, R., Tonsomboon, A., Kamchonwongpaisan, S. (2012). Phytochemical and Biological Activity Studies of the Bhutanese Medicinal Plant *Corydalis crispera*, *Natural Product Communications*, 7 (5): 575-580
95. Wen, H. X., Shao, Y., Tao, Y. D., Mei, L. J., (2009). RP-HPLC Determination of Protopine in Tibet medicine *Hypecoum leptocarpum* Hook. f. et Thoms, *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 01
96. Williams, P., Sorribas, A., Howes, M.-J.R., (2011). Natural Products as a Source of Alzheimer's Drug Leads, *Natural Product Reports*, 28: 48-77

97. Wu, C., Yan, R., Zhang, R., Bai, F., Yang, Y., Wu, Z., Wu, A., (2013). Comparative Pharmacokinetics and Bioavailability of Four Alkaloids in Different Formulations from *Corydalis decumbens*, *Journal of Ethnopharmacology*, 149(1): 55-61
98. Wu, Y., Chen, Z., Lu, X., Chen, J., Shu, Y., Cai, B., (2012). RP-HPLC Simultaneous Determination of Five Major Active Components in Jinlingzi Decoction, *Yaowu Fenxi Zazhi Bianji Weiyuanhui*, 32 (5): 779-782
99. Xiao, X., Liu, J., Hu, J., Zhu, X., Yang, H., Wang, C., Zhang, Y. (2008). Protective Effects of Protopine on Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Injury of PC12 Cells Via Ca²⁺ Antagonism and Antioxidant Mechanisms, *European Journal of Pharmacology*, 591 (1-3): 21-27
100. Xu, F., Luo, Y., Weikang, C., Xiong, W., (2008). HPLC Determination of Three Effective Ingredients in *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. Injection, *Yaowu Fenxi Zazhi Bianji Weiyuanhui*, 28 (9): 1494-1496
101. Xu, L. F., Chu, W. J., Qing, X. Y., Li, S., Wang, X. S., Qing, G. W., Fei, J., Guo, L. H. (2006). Protopine Inhibits Serotonin Transporter and Noradrenaline Transporter and has the Antidepressant-Like Effect in Mice Models, *Neuropharmacology*, 50 (8): 934-940
102. Yuan, J., Gu, G., Zeng, W., Wang, S., Yang, D., Guo, D., (2013). Determination of 11 alkaloids in *Corydalis decumbens* with HPLC, *Zhongyaocai*, 36 (8): 1283-1287
103. Zeng, W., Liang, W., Tu, G., (1987). Quantitative Determination of the Tertiary Alkaloids in *Corydalis bungeana* Turcz. by TLC Densitometry, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 7(6): 323-7

104. Zhang, Y., Xu, H., Chen, X., Chen, C., Wang, H., Meng, F., Yang, H., Huang, L., (2011). Simultaneous Quantification of 17 Constituents from Yuanhu Zhitong Tablet Using Rapid Resolution Liquid Chromatography Coupled With A Triple Quadrupole Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(3): 497-504
105. Zhong, M., Huang, K., Zeng, J., Li, S., She, J., Zhang, Li., (2011). Rapid Determination of Main Alkaloids from Organs of *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. by UPLC-ESI-MS, *Zhongnan Daxue Xuebao*, 42(7): 1899-1905
106. Zhou, Y., Song, J., Z., Choi, F., F., K., Wu, H., F., Qiao, C., F., Ding, L., S., Gesang, S.,L., Xu, H., X., (2009). An Experimental Design Approach Using Response Surface Techniques to Obtain Liquid Chromatography and Mass Spectrometry Conditions to Determine the Alkaloids in *Meconopsis* Species, *Journal of Chromatography A*, 1216(42): 7013-7023
107. Zhu, C., Fan, Q., Xiong, S., Yao, M., Yu, H., Wei, D., (2005). Determination of Protopine Content in Xiatianwu Injection by HPLC, *Zhongcaoyao Zazhi Bianjibu*, 36(5): 699-700
108. Zhu, M., (1985). Study on the Quantitative Analysis of Alkaloids in *Corydalis* by HPTLC densitometry, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 5(3): 139-42
109. Zhu, M., Xiao, P., (1990). Quantitative Analysis of Benzylisoquinoline Alkaloids in *Thalictrum* by TLC-Densitometry, *Yaowu Fenxi Zazhi*, 10(2): 72-7

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında İstanbul, Fatih'te doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Neyyir Turhan İlköğretim okulunda, lise öğrenimimi İstanbul Pertevniyal Anadolu Lisesi'nde tamamladım. 2011 yılında Ege Üniversitesi Biyoloji bölümünden mezun oldum ve aynı yıl E. Ü. Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimime başladım.