

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

*Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr. TÜRÜNÜN  
BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN ELDE  
EDİLMESİ ve YAPILARININ  
AYDINLATILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KÜBRA ELİK

AĞUSTOS 2017

MUĞLA

**T.C.**  
**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

***Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr. TÜRÜNÜN**  
**BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN ELDE**  
**EDİLMESİ ve YAPILARININ**  
**AYDINLATILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KÜBRA ELİK**

**AĞUSTOS 2017**

**MUĞLA**

**MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ**  
**Fen Bilimleri Enstitüsü**

**TEZ ONAYI**

**Kübra ELİK** tarafından hazırlanan *Gyromitra esculenta (Pers.) Fr. Türünün Biyoaktif Bileşiklerinin elde edilmesi ve Yapılarının Aydınlatılması* başlıklı tezinin 08/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

**TEZ SINAV JURİSİ**

Prof. Dr. Mehmet Emin DURU (**Jüri Başkanı**)

Kimya Anabilim Dalı

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK (**Üye, Danışman**)

Kimya Anabilim Dalı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Doç. Dr. İbrahim TÜMEN (**Üye**)

Sağlık MYO, Bartın Üniversitesi, Bartın

İmza:

**ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI**

Prof. Dr. Mehmet Emin DURU

MSKÜ, Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı

Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK (**Danışman**)

Kimya Anabilim Dalı,

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

İmza:

Savunma Tarihi: 08/08/2017

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca; akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş, başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Kübra ELİK

08/08/2017



## ÖZET

### ***Gyromitra esculenta* (PERS.) FR. TÜRÜNÜN BİYOAKTİF BİLEŞİKLERİNİN ELDE EDİLMESİ VE YAPILARININ AYDINLATILMASI**

Kübra ELİK

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK

Ağustos 2017, 203 sayfa

Bu tez çalışmasında, Türkiye’de doğal olarak yetişen, çiğ tüketildiğinde zehirli olan ancak pişirildiğinde lezzetli bir gıda olan *Gyromitra esculenta* mantarı çalışıldı. Bu amaçla, *Gyromitra esculenta*, Muğla köylü pazarından 2015 yılında yağışların bol olduğu Aralık ayında satın alındı. Mantarın teşhisi yapıldıktan sonra 2 eşit parçaya ayrıldı. Mantarın bir kısmı çiğ halde kurutulurken, diğer kısmı 200 °C’de 20 dakika etüvde tutularak pişirildikten sonra kurutuldu. Kurutulan her iki örnek öğütülerek sırası ile petrol eteri, aseton ve metanol ile oda koşullarında ekstre edildiler. Ekstrelerin çözücüleri döner buharlaştırıcı yardımı ile uçurularak kuru ekstreler elde edildi. Buna ilaveten, metanol ekstraksiyonundan kalan mantarın 80 °C’de infüzyonu alındı. İnfüzyona hacminin üç katı kadar etil alkol eklenerek alkolde çözünmeyen maddelerin çökmesi sağlandı. Filtre edilerek elde edilen çökeltiye HWEP, etil alkol ile çözünen kısma HWES kodu verildi. Mantarın hem çiğ hem de pişirilmiş örneklerinden elde edilen aseton, metanol ve HWEP su ekstresinin antioksidan, antikolinesteraz, üreaz inhibisyon ve tirozinaz inhibisyon aktiviteleri belirlendi. Ayrıca tüm ekstrelerin sitotoksik aktivitesi rahim ağzı (HeLa) ve meme (MCF-7) kanser hücre hatlarına karşı test edildi. Antioksidan aktivite  $\beta$ -karoten-linoleik asit, DPPH serbest radikali giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC ve metal bağlama yöntemleri kullanılarak belirlendi. Asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, tirozinaz ve üreaz inhibisyon testleri spektrofotometrik metotlar kullanılarak belirlendi. Sitotoksik testler ise MTT metodu kullanılarak yapıldı. Antioksidan, enzim inhibisyon ve sitotoksik aktivite gösteren ekstreler silika jel kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elde edilen fraksiyonların miktarları ve ince tabaka kromatografisindeki temizlikleri dikkate

alınarak yapılan ileri fraksiyonlandırmalardan 17 adet madde saflaştırıldı ve yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı.

Antioksidan aktivite sonuçlarına göre, tüm ekstrelerin konsantrasyonlarının artışına paralel olarak antioksidan aktivitelerinin de arttığı izlendi. Hem çiğ hem de pişirilmiş metanol ve aseton ekstreleri, antioksidan aktivite yöntemlerinde yüksek aktivite göstererek antioksidan standartlara en yakın aktivite sergilediler. Üreaz ve tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitelerinde pişirilmiş metanol ekstresi (GEC3) standartlara en yakın sonuç verdi. Asetilkolinesteraz inhibisyonu aktivitesinde metanol (GEN3 ve GEC3) ekstrelerinde daha yüksek inhibisyon görülürken; bütirikolinesteraz inhibisyonu aktivitesinde aseton (GEN2 ve GEC2) ekstrelerinin inhibisyonlarının daha yüksek olduğu görüldü.

HeLa kanser hücre hattına karşı 75.0 µg/mL konsantrasyonda sırası ile çiğ ve pişirilmiş aseton ile çiğ ve pişirilmiş metanol ekstreleri %28-%38 ile %50-%35 canlılık oranı gösterirken; aynı sıra ve konsantrasyonda MCF-7 kanseri hücre hattına karşı %58-%60 ile %10-%28 canlılık oranı gösterdikleri belirlendi. Ekstrelerin biyoaktivitelerinin sonuçlarına göre kromatografik çalışmalarla GEN2, GEC2, GEN3 ve GEC3 ekstrelerinden maddelerin saflaştırılması yapıldı.

GEN2, GEC2, GEN3 ve GEC3 ekstrelerinden saf madde izolasyonu kolon kromatografisi yöntemiyle silika jel adsorban kullanılarak yapıldı. İnce tabaka kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi ve recycle preparatif HPLC-UV-RI cihazı ile uygun adsorbanlar kullanılarak toplamda 17 madde saflaştırıldı. *G. esculenta*'dan saflaştırılan GEN-A-1 (1), GEN-A-3 (2), GEN-A-5 (3), GEN-A-4 (4), GEC-A-4 (5), GEC-A-5 (6) GEC-A-6 (7), GEC-A-19 (8), GEN-M-18 (9), GEN-M-17 (10), GEN-M-20 (11), GEN-M-16 (12), GEC-M-8 (13), GEC-M-9 (14), GEC-M-11 (15), GEC-M-12 (16) ve GEC-M-13 (17) kodlu bileşiklerin yapılarını aydınlatmak için UV, IR, NMR ve MS teknikleri kullanıldı. Spektroskopik çalışmalar sonucu benzer yapılar göz önüne alındığında 12 farklı madde tayin edildi. Yapılan spektroskopik çalışmalarla, 1, 9, 12, 14 kodlu maddelerin ergosta-5,22-dien 3β-ol, 2 kodlu maddenin ergosta-5,22-dien 3-O-β-D-glukopiranozit, 3 ve 7 kodlu maddelerin ergosta-7,9,22-trien 3β-ol, 4 kodlu maddenin ergosta-7,9,22-trien 3-O-β-D-glukopiranozit, 5 kodlu maddenin N-[1,3,4-trihidroksi, oktadesil]-2'-hidroksi tetrakosanamit, 6 kodlu madde etanediyl, 1,2-bis[2-formil-2-metilhidrazon, 8 ve 16 kodlu maddelerin adenosin, 10 kodlu maddenin 1-(1'-hidroksisinnamoil)-2-asetoksi-3-metoksi inositol, 11 kodlu maddenin ergosterol endoperoksit, 13 kodlu maddenin 5α,8α-epoksi-ergosta-6,22-dien 3β-ol, 15 kodlu maddenin urasil ve 17 kodlu maddenin mannitol olduğu belirlendi. 5 kodlu madde ilk defa bu çalışma ile elde edildi. Elde edilen maddelerin antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri aynı metotlar ile belirlendi.

**Anahtar Kelimeler:** *Gyromitra esculenta*, Zehirli Mantarlar, Kromatografik Yöntemler, Antioksidan Aktivite, Sitotoksik Aktivite

## ABSTRACT

### ***Gyromitra esculenta* (PERS.) FR. OBTAINING AND ELUCIDATING STRUCTURES OF BIOACTIVE COMPOUNDS**

Kübra Elik

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK

August 2017, 203 pages

In this thesis, *Gyromitra esculenta* mushroom naturally growing in Turkey was studied. When the mushroom consumed raw it is poisonous. However, it is edible and consumed by the local people when cooked well. For this purpose, *Gyromitra esculenta* was purchased from Muğla local market during December 2015. After the identification of mushroom, it was divided into two parts. One part of the mushroom was dried directly using drier machine, while other part was baked at 200 °C for 20 minutes, and then dried. Both dried samples were ground, and were extracted using petroleum ether, acetone and methanol in room temperature, successively. The solvents were evaporated using rotary evaporator to obtain crude extracts. In addition, the infusion of remaining mushroom materials was obtained using 80 °C water after organic solvents extraction. After filtration, three times volume of ethyl alcohol was added to the cooled infusion. The precipitated part was filtered and coded as HWEP. The solvent of supernatant was removed under vacuum using rotary evaporator, and coded as HWES. Antioxidant, anticholinesterase, and urease and tyrosinase inhibitory activities of acetone, methanol and HWEP water extracts obtained from both raw and cooked samples were determined. In addition, cytotoxic activity of the all extracts against the cervical (HeLa) and breast (MCF-7) cancer cell lines were also tested. Antioxidant activity was determined using  $\beta$ -carotene-linoleic acid, DPPH free radical scavenging, ABTS cation radical scavenging, CUPRAC and metal chelating methods. The acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, tyrosinase and urease inhibition tests were determined using spectrophotometric methods. Anticancer tests were performed using the MTT method. The extracts exhibiting antioxidant, enzyme inhibitory and cytotoxic activity were fractionated on silica gel column. Seventeen compounds were purified from further fractions which are selected for their purity and their amounts on

thin layer chromatography. The structures of isolated compounds (**1-17**) were elucidated by spectroscopic methods.

The antioxidant activity of all extracts was increased in parallel to the increasing of concentrations. Both raw and cooked methanol and acetone extracts exhibited higher activity among the other extracts and demonstrated close activity to those of antioxidant standards. In the urease and tyrosinase enzyme inhibitory activities, cooked methanol extract (GEC3) gave close activity to those of standards. While both methanol (GEN3 and GEC3) extracts exhibited high inhibitory activity against acetylcholinesterase, the both acetone (GEN2 and GEC2) extracts indicated higher inhibitory activity against butyrylcholinesterase.

The cell viabilities (%) of raw and cooked acetone extracts at 75.0  $\mu\text{g/mL}$  were 28-38% against HeLa cancer cell lines while the cell viabilities of raw and cooked methanol extracts were 50-35% at the same conditions. Against MCF-7 cancer cell lines, however, the cell viabilities (%) of acetone extracts were 58-60% while the cell viabilities of methanol extracts were 10-28% at the same conditions, respectively. According to the bioactivity results, GEN2, GEC2, GEN3 and GEC3 extracts were decided to fractionation to obtain biologically active compounds.

Silica gel column chromatography was used to isolate biologically active compounds from GEN2, GEC2, GEN3 and GEC3 extracts. Totally 17 compounds were purified using thin layer chromatography, preparative thin layer chromatography and preparative recycle HPLC-UV-RI machine. UV, IR, NMR and MS techniques were used to elucidate the compounds coded as GEN-A-1 (**1**), GEN-A-3 (**2**), GEN-A-5 (**3**), GEN-A-4 (**4**), GEC-A-4 (**5**), GEC-A-5 (**6**), GEC-A-6 (**7**), GEC-A-19 (**8**), GEN-M-18 (**9**), GEN-M-17 (**10**), GEN-M-20 (**11**), GEN-M-16 (**12**), GEC-M-8 (**13**), GEC-M-9 (**14**), GEC-M-11 (**15**), GEC-M-12 (**16**) and GEC-M-13 (**17**).

Totally 11 different compounds were obtained after the all compounds were identified. The spectroscopic studies revealed that the compounds **1**, **9**, **12** and **14** were elucidated as ergosta-5,22-diene  $3\beta$ -ol, and **2** as ergosta-5,22-diene 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, **3** and **7** as ergosta-7,9,22-trien  $3\beta$ -ol, **4** as ergosta-7,9,22-trien 3-*O*- $\beta$ -*D*-glucopyranoside, **5** as *N*-[1,3,4-trihydroxy, octadecyl]-2'-hydroxy tetracosanamide, **6** as etanedial, 1,2-bis[2-formyl-2-methylhydrazone], **8** and **16** as adenosine, **10** as 1-(1'-hydroxycinnamoyl)-2-acetoxy-3-methoxyinositol, **11** as ergosterol endoperoxide, **13** as  $5\alpha$ ,  $8\alpha$ -epoxy-ergosta-6,22-diene  $3\beta$ -ol, **15** as uracil, and **17** as mannitol. Among them compound **5** is a new compound. The antioxidant and cytotoxic activities of the isolated compounds using same methods were also performed.

**Keywords:** *Gyromitra esculenta*, Poisonous mushrooms, Chromatographic methods, Antioxydant activity, Cytotoxic activity



*Kıymetli annem Kevkep ELİK ve değerli babam Hüseyin ELİK'e ithafen*

## ÖNSÖZ

Çok değerli bilgilerini benimle her zaman paylaşan, yalnızca laboratuvar tecrübelerini değil; bilgi, sabır ve desteğini de benden esirgemeyen, projesi sayesinde eşsiz bilgilere eriştiğim tez danışmanım sayın Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK'e teşekkürlerimi borç bilirim.

Eşsiz bilgi ve deneyimlerini her fırsatta, en verimli şekilde sunan, bizlere daima yol göstericiliği ile örnek olan, öğrencisi olmaktan onur ve gurur duyduğum sayın Prof. Dr. Mehmet Emin DURU'ya teşekkür ederim.

NMR spektrumlarımızın bir kısmının alınmasında yardımcı olan Karachi Üniversitesi, ICCBS Müdürü, Prof.Dr. Muhammad Iqbal Choudhary'ye teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen ve kendisinden pek çok bilgi ve destek gördüğüm, Arş. Gör. Erhan KAPLANER'e teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında yardımlarından ve deneyimlerinden faydalandığım çalışma arkadaşım Selçuk KÜÇÜKAYDIN'a, Zain ULLAH'a, Ebru EROL'a, Bihter ŞAHİN'e, Çiğdem KUŞ'a ve Meltem TAŞ'a teşekkür ederim.

Bu tez çalışması TUBİTAK-MHRS-114Z635 numaralı proje ile desteklenmiştir. Desteğinden dolayı TUBİTAK'a çok teşekkür ederim.

Daima başarılı olan eğitim-öğretim hayatımda ve hayatımın her aşamasında yanımda olan, bana sevgisini, ilgisini, emeğini iyi ya da kötü gün gözetmeksizin her zaman hissettiren canımdan çok sevdiğim annem Kevkep ELİK'e teşekkür ederim.

Ve bu başarıya ulaşmamda katkısı olan çok değerli ailem, arkadaşlarım ve öğretmenlerime çok teşekkür ederim.

Ağustos 2017

Kübra ELİK

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	x
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Amaç ve Kapsam .....	1
1.2. Kaynak Özetleri .....	5
1.2.1. Mantarların kullanılması .....	5
1.2.2. Mantarların yağ asitleri .....	6
1.2.3. Kanserin dünyada dağılımı .....	7
1.2.4. Zehirli mantarlar ve tarihçeleri .....	8
1.2.5. <i>Gyromitra esculenta</i> (Pers.) Fr.....	9
1.2.5.1. <i>Makroskobik özellikleri</i> .....	9
1.2.5.2. <i>Mikroskobik özellikleri</i> .....	10
1.2.6. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın kimyasal bileşimi ve tıbbi özellikleri.....	11
1.3. Antioksidanlar .....	12
1.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması.....	14
1.3.1.1. <i>Primer (Birincil) antioksidanlar</i> .....	14
1.3.1.2. <i>Sekonder (İkincil) antioksidanlar</i> .....	16
1.4. Asetilkolinesterazlar.....	17
1.5. Triterpenler.....	18
1.6. Steroidler .....	19
1.7. Glikozitler .....	20
<b>2. MALZEME VE YÖNTEM .....</b>	<b>22</b>
2.1. Mantar Materyali.....	22
2.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler .....	22
2.2.1. Kimyasal maddeler .....	22
2.3. Ekstrelerin Elde Edilmesi.....	23
2.4. Çözeltilerin Hazırlanması.....	23
2.4.1. $\beta$ -Karoten renk açılımı yönteminde kullanılan çözelti.....	23
2.4.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti..	24

2.4.3. ABTS <sup>+</sup> katyonu radikal giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti	24
2.4.4. CUPRAC yönteminde (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yönteminde kullanılan çözelti.....	24
2.4.5. Metal bağlama aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler .....	24
2.4.6. Antikolinesteraz aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler.....	25
2.4.7. Üreaz enzim inhibisyon aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler .....	25
2.4.8. Tirozinaz enzim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler .....	26
2.4.9. İnce tabaka kromatografisinde (İTK) kullanılan çözeltilerin hazırlanma	26
2.5. Aletler ve Diğer Gereçler .....	26
2.6. Aktivite Belirleme Yöntemleri.....	28
2.6.1. Antioksidan aktivite belirleme yöntemleri.....	28
2.6.1.1. Toplam antioksidan aktivite tayini ( $\beta$ -karoten renk açılımı yöntem)	28
2.6.1.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi.....	28
2.6.1.3. ABTS katyonu radikal giderim aktivitesi yöntemi .....	29
2.6.1.4. CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yönt.	29
2.6.1.5. Metal bağlama aktivitesi yöntemi .....	30
2.6.2. Enzim inhibisyonu aktivitesi belirleme yöntemleri .....	30
2.6.2.1. Üreaz enzim inhibisyonu aktivite yöntemi .....	30
2.6.2.2. Tirozinaz enzim inhibisyon aktivite yöntemi .....	31
2.6.2.3. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi .....	31
2.6.2.4. Bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi.....	31
2.7. Antikanser Aktivite Yöntemleri.....	32
2.7.1. Hücre kültürü .....	32
2.7.2. Sitotoksitenin belirlenmesi .....	32
2.8. İstatistik Hesaplamalar .....	33
2.9. Kromatografik Yöntemler .....	33
2.9.1. Kolon kromatografisi .....	33
2.9.2. İnce tabaka kromatografisi.....	34
2.9.2.1. Preparatif-recycle HPLC çalışma şartları .....	34
2.10. Spektroskopik Yöntemler.....	34
2.10.1. Gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi (GC-MS) yağ asidi analizi...	34
2.10.2. Gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi (GC-MS) şeker profili anali.	35

2.10.3. Nükleer manyetik rezonan spektroskopisi (NMR) .....	36
2.10.4. Kütle spektroskopisi.....	37
2.10.5. FTIR spektroskopisi .....	37
2.10.6. UV-VIS spektroskopisi .....	37
<b>3. BULGULAR ve İRDELEME .....</b>	<b>38</b>
3.1. Ekstraksiyon İşlemleri ve Verimleri .....	38
3.2. Biyoaktivite Sonuçları.....	38
3.2.1. Antioksidan aktivite sonuçları .....	38
3.2.1.1. <i>β</i> -Karoten-linoleik asit yöntemi sonuçları .....	38
3.2.1.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi sonuçları.....	39
3.2.1.3. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi sonuçları.....	40
3.2.1.4. CUPRAC yöntemi sonuçları .....	41
3.2.1.5. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın metal bağlama aktivite sonuçları.....	42
3.2.2. Enzim inhibisyonu aktivitesi sonuçları .....	43
3.2.2.1. Üreaz enzimi inhibisyonu aktivitesi sonuçları .....	43
3.2.2.2. Tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesi .....	44
3.2.2.3. Antikolinesteraz aktivitesi sonuçları .....	45
Asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon aktivitesi sonuçları.....	45
Bütirikolinesteraz enzimi inhibisyon aktivitesi sonuçları.....	45
3.2.3. Sitotoksik Aktivite Sonuçları .....	46
3.2.3.1. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın HeLa hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi.....	46
3.2.3.2. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi.....	47
3.3. Aktivite Sonuçlarının Genel Değerlendirilmesi.....	48
3.4. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın Aseton Ekstrelerinin Fraksiyonlandırılması .....	49
3.4.1. Çiğ aseton ekstresi üzerine yapılan kimyasal çalışmalar .....	50
3.4.2. Pişirilmiş aseton ekstresi üzerine yapılan kimyasal çalışmalar .....	52
3.5. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın Metanol Ekstrelerinin Fraksiyonlandırılması .....	54
3.5.1. Çiğ metanol ekstresi üzerine yapılan kimyasal çalışmalar .....	55
3.5.2. Pişirilmiş metanol ekstresi üzerine yapılan kimyasal çalışmalar.....	57
3.6. Yağımsı Fraksiyonların GC-MS ile Analiz Sonuçları .....	59

3.6.1. Çiğ aseton ekstresinden elde edilen GEN-A-21/GC ve GEN-A-42/GC kodlu fraksiyonların GC-MS analiz sonuçları.....	59
3.6.2. Pişirilmiş aseton ekstresinden elde edilen GEN-A-22/GC kodlu fraksiyonun GC-MS analiz sonuçları .....	62
3.6.3. Çiğ metanol ekstresinden elde edilen GEN-M-13/GC ve GEN-M-26/GC kodlu fraksiyonların GC-MS analiz sonuçları.....	64
3.6.4. Pişirilmiş metanol ekstresinden elde edilen GEC-M-11/GC kodlu fraksiyonun GC-MS analiz sonuçları .....	66
3.6.5. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın ekstralarında bulunan bazı yağ asitlerinin ve Azelaik asidin kimyasal yapısı .....	68
3.7. Çiğ Aseton Ekstresinden Elde edilen Saf Maddelerin n Yapı Tayini.....	69
3.7.1. GEN-A-1(1) = Ergosta- 5,22-dien 3 $\beta$ -ol.....	69
3.7.2. GEN-A-3 (2)= Ergosta 5,22-dien 3-O- $\beta$ -D-glukopiranozit .....	80
3.7.3. GEN-A-5 (3) = Ergosta-7,9,22-trien.....	90
3.7.4. GEN-A-4 (4) = Ergosta 7,9,22 trien 3-O- $\beta$ -D-glukozit .....	100
3.8. Pişirilmiş Aseton Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayini....	110
3.8.1. GEC-A-4 (5) = N-[1,3,4-trihidroksi,oktadesil]-2'-hidroksi tetrakosanamit .....	110
3.8.2. GEC-A-5 (6) = Etanediyal, 1,2-bis[2-formil-2-metilhidrazon.....	121
3.8.3. GEC-A-6 (7) = Ergosta-7,9,22-trien 3 $\beta$ -ol.....	128
3.8.4. GEC-A-19 (8) = Adenozin.....	130
3.9. Çiğ Metanol Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayini .....	138
3.9.1. GEN-M-18 (9) = Ergosta- 5,22-dien 3 $\beta$ -ol .....	138
3.9.2. GEN-M-17 (10) = 1-(1'-hidroksisinnamoil)-2-asetoksi-3-metoksi inositol .....	140
3.9.3. GEN-M-20 (11) = Ergosterol endoperoksit .....	149
3.9.4. GEN-M-16(12) = Ergosta- 5,22-dien 3 $\beta$ -ol .....	158
3.10. Pişirilmiş Metanol Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayini	160
3.10.1. GEC-M-8 (13) = 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoksi ergosta-6,22-dien 3 $\beta$ -ol .....	160
3.10.2. GEC-M-9 (14)= Ergosta- 5,22-dien 3 $\beta$ -ol .....	169
3.10.3. GEC-M-11 (15)= Urasil.....	171
3.10.4. GEC-M-12 (16)= Adenozin.....	175
3.10.5. GEC-M-13 (17) = Mannitol.....	177
<b>4. SONUÇLAR ve ÖNERİLER .....</b>	<b>187</b>

<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>192</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>202</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>202</b>



## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1-1. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre Türkiye'nin durumu.....	7
Çizelge 1-2. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri .....	12
Çizelge 2-1. GC-MS Analiz Şartları .....	36
Çizelge 3-1. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın çiğ ve pişirilmiş materyallerinden elde edilen ekstre verimleri.....	38
Çizelge 3-2. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın çiğ aseton ekstrelerinin fraksiyonları, miktarları ve % verimleri .....	51
Çizelge 3-3. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın pişirilmiş aseton ekstrelerinin fraksiyonları, miktarları ve % verimleri .....	52
Çizelge 3-4. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın çiğ metanol ekstrelerinin fraksiyonları, miktarları ve % verimleri .....	56
Çizelge 3-5. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın pişirilmiş metanol ekstrelerinin fraksiyonları, miktarları ve % verimleri .....	58
Çizelge 3-6. Çiğ aseton ekstresi fraksiyonu GEN-A-21 ve GEN-A-42 yağ asidi profili .....	60
Çizelge 3-7. Pişirilmiş aseton ekstresi fraksiyonu GEC-A-22 yağ asidi profili .....	62
Çizelge 3-8. Çiğ metanol ekstresi fraksiyonu GEN-M-13/GC ve GEN-M-26/GC fraksiyonlarının yağ asidi profili .....	64
Çizelge 3-9. Pişirilmiş metanol ekstresi fraksiyonu GEC-M-11/GC fraksiyonunun yağ asidi profili .....	66
Çizelge 3-10. GEN-A-1 (1) saf maddesinin NMR spektral değerleri.....	71
Çizelge 3-11. GEN-A-3 (2) saf maddesinin NMR spektral değerleri.....	82
Çizelge 3-12. GEN-A-5 (3) saf maddesinin NMR spektral değerleri.....	92
Çizelge 3-13. GEN-A-4 (4) kodlu saf maddesinin NMR spektral değerleri.....	102
Çizelge 3-14. GEC-A-4 (5) saf maddesinin NMR spektral değerleri.....	111
Çizelge 3-15. GEC-A-5 (6) kodlu saf maddesinin NMR spektral değerleri.....	122
Çizelge 3-16. GEC-A-6 (7) kodlu saf maddenin NMR spektral değerleri .....	129
Çizelge 3-17. GEC-A-19 (8) saf maddesinin NMR değerleri.....	131
Çizelge 3-18. GEN-M-18 (9) saf maddesinin NMR spektral değerleri.....	139



Çizelge 3-19. GEN-M-17 (10) saf maddesinin NMR spektral değerleri.....	142
Çizelge 3-20. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin NMR spektrumu.....	151
Çizelge 3-21. GEN-M-16 (12) saf maddesinin NMR spektral değerleri .....	159
Çizelge 3-22. GEC-M-8 (13) NMR spektral değerleri .....	162
Çizelge 3-23. GEC-M-9 (14) saf maddesinin NMR spektral değerleri .....	170
Çizelge 3-24. GEC-M-12 (16) saf maddesinin NMR spektral değerleri .....	176
Çizelge 3-25. GEC-M-13 (17) saf maddesinin NMR spektral değerleri .....	177
Çizelge 4-1. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın GEN2-GEC2 ile GEN3, GEC3 ekstraktlarından elde edilen saf maddeler.....	188
Çizelge 4-2. İzole edilen ve yapıları aydınlatılan bileşiklerin (1-17) antioksidan ve sitotoksik aktivitelerinin sonuçları <sup>a</sup> .....	189



## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. <i>Gyromitra esculenta</i> (Pers.) Fr. ....	10
Şekil 1.2 Giromitrin ve parçalanma ürünleri.....	11
Şekil 1.3. Birincil Antioksidanlar .....	16
Şekil 1.4. İkincil antioksidanlar .....	17
Şekil 1.5. D-Glukozun $\alpha,\beta$ -Piranoz ve $\alpha,\beta$ -Furanoz Yapıları .....	21
Şekil 3.1. <i>Gyromitra esculenta</i> ekstralarının ve standartların $\beta$ -karoten-linoleik asit yöntemiyle lipit peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi.....	39
Şekil 3.2. <i>Gyromitra esculenta</i> ekstralarının ve standartların DPPH yöntemiyle serbest radikali süpürme aktivitesi .....	40
Şekil 3.3. <i>Gyromitra esculenta</i> ekstralarının ve standartların ABTS katyon radikali süpürme aktivitesi .....	41
Şekil 3.4. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın ekstraları ve standartların $\text{Cu}^{+2}$ indirgeme gücü	42
Şekil 3.5. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın ekstraları ve standartların metal bağlama akti..	43
Şekil 3.6. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın ekstraları ve standartların üreaz enzimi inhibisyonu aktivitesi .....	44
Şekil 3.7. <i>Gyromitra esculenta</i> 'nın ekstraları ve standartların üreaz enzimi inhibisyonu aktivitesi .....	44
Şekil 3.8. <i>Gyromitra esculenta</i> ekstralarının ve standartların asetilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri.....	45
Şekil 3.9. <i>Gyromitra esculenta</i> ekstralarının ve kontrol gruplarının bütirikolinesteraz inhibisyonu aktiviteleri .....	46
Şekil 3.10. <i>Gyromitra esculenta</i> mantarının ekstralarının HeLa hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi .....	47
Şekil 3.11. <i>Gyromitra esculenta</i> mantarının ekstralarının MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi .....	48
Şekil 3.12. GEN-A-1 (1), GEN-A-3 (2), GEN-A-5 (3) ve GEN-A-4 (4) kodlu saf maddelerin izolasyonu şeması.....	50
Şekil 3.13. GEC-A-4 (5), GEC-A-5 (6), GEC-A-6 (7), GEC-A-19 (8) kodlu saf maddelerin izolasyonu şeması.....	50

Şekil 3.14. GEN-M-18 (9), GEN-M-17 (10), GEN-M-20 (11) ve GEN-M-16 (12) kodlu saf maddelerin izolasyonu şeması.....	54
Şekil 3.15. GEC-M-8 (13), GEC-M-9 (14), GEC-M-11 (15), GEC-M-12 (16) ve GEC-M-13 (17) kodlu maddelerin izolasyonu şeması.....	55
Şekil 3.16. <i>G. esculenta</i> 'nın GEN-A-21-GC ve GEN-A-42-GC kodlu fraksiyonlarının GC-MS kromatogramları .....	61
Şekil 3.17. GEN-A-21/GC ve GEN-A-42/GC kodlu fraksiyonların GC-MS kromatogramları.....	61
Şekil 3.18. <i>G. esculenta</i> 'nın GEC-22 kodlu fraksiyonunun GC-MS kromatogramı	63
Şekil 3.19. <i>G. esculenta</i> 'nın GEN-M-13/GC ve GEN-M-26/GC kodlu fraksiyonlarının GC-MS kromatogramları .....	65
Şekil 3.20. <i>G. esculenta</i> 'nın GEC-M-11/GC kodlu fraksiyonunun GC-MS kromatogramı .....	67
Şekil 3.21. Doymuş yağ asitleri formülleri .....	68
Şekil 3.22. Doymamış yağ asitleri formülleri .....	68
Şekil 3.23. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	69
Şekil 3.24. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin UV spektrumu.....	72
Şekil 3.25. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin FTIR spektrumu .....	73
Şekil 3.26. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	74
Şekil 3.27. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C NMR spektrumu .....	75
Şekil 3.28. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin APT spektrumu .....	76
Şekil 3.29. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu .....	77
Şekil 3.30. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu.....	78
Şekil 3.31. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu.....	79
Şekil 3.32. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	80
Şekil 3.33. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin UV spektrumu.....	83
Şekil 3.34. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin FTIR spektrumu .....	84
Şekil 3.35. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	85
Şekil 3.36 GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C spektrumu .....	86
Şekil 3.37 GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu .....	87
Şekil 3.38. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu.....	88
Şekil 3.39. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu.....	89

Şekil 3.40 GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	90
Şekil 3.41. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	93
Şekil 3.42. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C spektrumu .....	94
Şekil 3.43. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin DEPT90 spektrumu.....	95
Şekil 3.44. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu.....	96
Şekil 3.45. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu .....	97
Şekil 3.46. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu.....	98
Şekil 3.47. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu.....	99
Şekil 3.48 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	100
Şekil 3.49 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	103
Şekil 3.50 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C spektrumu .....	104
Şekil 3.51 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin DEPT90 spektrumu.....	105
Şekil 3.52 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu.....	106
Şekil 3.53 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu .....	107
Şekil 3.54 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu.....	108
Şekil 3.55 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumu.....	109
Şekil 3.56 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	110
Şekil 3.57 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumuna göre fragmanlarına ayrılması.....	112
Şekil 3.58 GEC-A-4 (5) kodlu maddenin FTIR spektrumu.....	113
Şekil 3.59 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin saf maddenin <sup>1</sup> H-NMR spektrumu...	114
Şekil 3.60 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C-NMR spektrumu .....	115
Şekil 3.61 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu.....	116
Şekil 3.62 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin COSY spektrumu .....	117
Şekil 3.63 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu .....	118
Şekil 3.64 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin HMBC spektumu .....	119
Şekil 3.65 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumu .....	120
Şekil 3.66 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	121
Şekil 3.67 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu .....	123
Şekil 3.68 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C NMR spektrumu .....	124
Şekil 3.69 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu.....	125
Şekil 3.70 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu .....	126

Şekil 3.71. GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumuna göre fragmanlarına ayrılması.....	127
Şekil 3.72. GEC-A-6 (7) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	128
Şekil 3.73. GEC-A-19 (8) kodlu maddenin kimyasal yapısı .....	130
Şekil 3.74. GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu .....	132
Şekil 3.75. GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C-NMR Spektrumu .....	133
Şekil 3.76. GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin DEPT 135 Spektrumu .....	134
Şekil 3.77. GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu .....	135
Şekil 3.78. GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu .....	136
Şekil 3.79 GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin MS spektrumu .....	137
Şekil 3.80. GEN-M-18 (9) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	138
Şekil 3.81. GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	140
Şekil 3.82. GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	143
Şekil 3.83. GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	144
Şekil 3.84. GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin DEPT-135 spektrumu.....	145
Şekil 3.85 GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu .....	146
Şekil 3.86 GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu .....	147
Şekil 3.87 GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumu .....	148
Şekil 3.88. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	149
Şekil 3.89. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	152
Şekil 3.90. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C NMR spektrumu .....	153
Şekil 3.91. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu .....	154
Şekil 3.92. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu .....	155
Şekil 3.93. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu .....	156
Şekil 3.94. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin MS spektrumu .....	157
Şekil 3.95. GEN-M-16 (12) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı.....	158
Şekil 3.96. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı .....	160
Şekil 3.97 GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	163
Şekil 3.98. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	164
Şekil 3.99. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin DEPT 135 spektrumu .....	165
Şekil 3.100 GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu.....	166
Şekil 3.101. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu .....	167

Şekil 3.102. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin MS spektrumu .....	168
Şekil 3.103 GEC-M-9 (14) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı .....	169
Şekil 3.104. GEC-M-11 (15) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı .....	171
Şekil 3.105 GEC-M-11 (15) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	172
Şekil 3.106 GEC-M-11 (15) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumu .....	173
Şekil 3.107 GEC-M-11 (15) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumuna göre fragmanlarına ayrılması .....	174
Şekil 3.108. GEC-M-12 (16) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı .....	175
Şekil 3.109. GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı .....	177
Şekil 3.110. Silillenmiş GEC-M-13 (17) ve standart silillenmiş mannitol'ün GC-MS kromotogramları.....	178
Şekil 3.111. Silillenmiş GEC-M-13 (17)'ün GC-MS spektrumu .....	179
Şekil 3.112. GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	180
Şekil 3.113 GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	181
Şekil 3.114. GEC-M-13 (16) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu .....	182
Şekil 3.115.GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin COSY spektrumu.....	183
Şekil 3.116. GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu.....	184
Şekil 3.117. GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu .....	185
Şekil 3.118 GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin ESI-MS spektrumu .....	186

## SEMBOLLER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
AcI	Asetilkolin iyodür
BuI	Bütirilkolin iyodür
L- DOPA	3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
BChE	Bütirilkolinesteraz
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi tolüen
DTNB	5,5-dithiobis(2-nitro-benzoik asit)
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
FCR	Folin Ciocalteu Fenol Reaktifi
FID	Alev İyonizasyon Dedektörü
GC	Gaz Kromatografisi
GC/MS	Gaz Kromatografisi kütle spektroskopisi
TOC	$\alpha$ - tokoferol
GEN-2	<i>Gyromitra esculenta</i> çiğ aseton ekstresi
GEC-2	<i>Gyromitra esculenta</i> pişirilmiş aseton ekstresi
GEN-3	<i>Gyromitra esculenta</i> çiğ metanol ekstresi
GEC-3	<i>Gyromitra esculenta</i> pişirilmiş metanol ekstresi
NMR	Nükleer mağnetik Resonan Spektroskopisi

BB	Broad band $^{13}\text{C}$ -NMR
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
COSY	Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear single Quantum Coherence
EI-MS	Elektron İyonisasyon Kütle Spektroskopisi
ESI-MS	Elektrospray İyonisasyon Kütle Spektroskopisi
FAB <sup>+</sup> MS	Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry
IR	Infrared Spektroskopisi
UV	Ultraviyole Spektroskopisi



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Amaç ve Kapsam

Son yıllarda yapılan araştırmalara göre, mantarlar tıbbi olarak kullanılabilen gıdalardır (Moradali vd., 2007). Tıbbi amaçla kullanılan mantarlar, kanseri önleyici ve bağışıklığı arttırıcı (immunomodler) zellikteki polisakkarit ve triterpenoid kaynaklarıdır. Yenilebilir mantar türlerinden elde edilen lektinlerin, polisakkaritlerin, polisakkarit-peptitlerin, polisakkarit-protein komplekslerinin, lanostan tipi triterpenoidlerin ve fenolik yapılı bileşiklerin antikanser, antioksidan, antitümör, antiviral, antibakteriyal, antifungal, antiinflamatuvar, immunomodulatr aktiviteleri ve kolesterol düşürücü etkileri ortaya çıkarılmıştır (Moradali vd., 2007). Bu bileşik sınıfları nedeniyle mantarlar modern tıp için destekleyici bir ilaç kaynağı potansiyeline sahiptirler. Genellikle doğal ürünler ve besin takviyeleri olarak dünyada çeşitli formülasyonlarda üretilmektedirler (Zhang vd. 2007). Örneğin, Japonya’da üretilen Krestin adı verilen kanser ilacı, dünya toplam kanser ilaç pazarının %25’ini oluşturmakta ve Japonya’ya milyarlarca dolar katkı sağladığı bilinmektedir (Mizuno vd., 1999).

Canlılarda biyokimyasal mekanizmalar sonucu oluşan serbest radikal türleri, yaşlanmayı hızlandırmakta ve nöronal hasar oluşurmaktadır (Sastre vd., 2000). Antioksidanlar ise, serbest radikal türlerinin yarattığı zararlı etkileri azaltırlar veya tamamen ortadan kaldıracırlar. Canlılarda, serbest radikal türlerinin meydana getirdiği zararları ortadan kaldırmak için çeşitli antioksidan savunma mekanizmaları mevcuttur. Bu mekanizmaların savunmada yetersiz kalması sonucunda ortaya çıkabilecek hastalıklardan korunmak için antioksidan etkiye sahip meyve, sebze ve şifalı bitkilerin tüketilmesinin insan sağlığı açısından faydalı olduğunu gösteren çok sayıda araştırma vardır (Hsu vd., 2003).

Alzheimer ve ülser tarzı hastalıklar için yan etkisi olmayan etken maddelerin bulunması beklenen bir durumdur. Antioksidan aktivite ile antikolinesteraz aktivite yapılan çalışmalar birbirleriyle ilişkilendirilmektedir (Papandreou vd, 2009; Agrawal vd., 2009), ve hatta antioksidanların kullanımlarının nöronal bozunmayı engellediği veya en aza indirdiği saptanmıştır (Atta-ur-Rahman ve Choudhary, 2001).

Alzheimer hastalığı, düşünce kontrolü, hafıza ve konuşma yetisi gibi bazı fonksiyonların yer aldığı beyin bölümünde, karmaşık mesajları milyonlarca sinir hücresi arasında taşıyan kimyasalların düzeyinin azalması ve hatta sinir hücrelerinin yok olması ile normal düşünme ve hafıza yetilerinin kaybolduğu bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Alzheimer hastalığının sebebi tam olarak aydınlatılamamasına rağmen, asetilkolin (ACh) seviyesinin azalması hastalık ile ilişkilendirilmektedir (Grossberg, 2003; Atta-ur-Rahman ve Choudhary, 2001). Bu nedenle asetilkolinesterazın (AChE) inhibisyonu Alzheimer hastalığına karşı en yaygın tedavi seçenekleri arasında yerini almıştır (Orhan vd, 2006).

Kanser hücreleri, hücrenin aşırı çoğalmasını ve dokuların işgalini önleyen kontrol sistemlerini devre dışı bırakır. Normalden farklı bu hücreler, büyüme ve bölünme için gerekli olan özel sinyallere ihtiyaç duymadan büyümeye ve bölünmeye devam ederler. Tümörler, klonal bir yapıya sahip olmasına rağmen, yüksek genotipik ve fenotipik heterojenite gösteren neoplastik hücre popülasyonu ile oluşmaktadır. Bu heterojenite zamanla değişebilen dinamiğe sahiptir (Baba, 2007). Bu hücreler gelişirken, hücre yapısında meydana gelen değişiklikler, yeni enzimlerin üretimi ve hücre adezyonunun azalması gibi yeni karakterlere de sahip olurlar. Bu kalıtsal değişiklikler, komşu hücrelerin büyümesini inhibe eden normal hücrelerin mevcudiyetinde bile kanserli hücrelerin bölünmesine ve büyümesine olanak sağlar. Bu tür değişiklikler kanser hücrelerinin yayılmasına ve diğer dokuların işgaline olanak sağlar (Cell Biology and Cancer, 2015).

Kanser hücrelerinde normal hücrelere göre hücre-hücre ve hücre-matris iletişimleri daha düzensizdir. Kanser hücrelerinde adezyon moleküllerinin üretiminin normal hücrelere nazaran daha az olması sonucu hücrelerin tutunma kabiliyeti azalır.

Meme kanseri, genetik, biyolojik, çevresel ve sosyal faktörleri içeren kompleks bir etolojiye sahiptir. Dünyada en sık görülen kanserler arasında akciğer kanserinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Kadınlar arasında görülen en ölümcül kanserlerden biri olup, kanserin sebep olduğu ölümler arasında beşinci sıradadır (Hutchinson, 2010). Batıda kadınlarda en sık görülen malign hastalıktır. Özellikle 50 yaşın altındaki kadınlarda meme kanseri görülme oranının arttığı görülmektedir (Lux vd, 2006). Memede kitle saptandığında kanser olup olmadığını anlamak için biyopsi yapılır. Meme kanseri tedavi açısından nispeten diğer kanserlere göre daha avantajlıdır. Tedavisinde birincil yöntem cerrahi müdahaledir, cerrahi tedavi genellikle meme dokusunun tümünün alınmasını teşkil eder. Koltuk altı lenf bezleri de çıkartılarak muhtemel yayılma engellenir. Tanıda koltuk altı (aksiller) lenf düğümü metastazlarının önemi büyüktür (Kierszenbaum, 2007; Matsen ve Neumayer, 2013).

MCF-7 hücre dizisi, 69 yaşındaki bir Kafkas kadından 1970 yılında izole edilmiş bir meme kanseri hücre dizisidir. MCF-7 hücre dizisinin ismi Herbert Soule ve arkadaşları tarafından 1973 yılında Detroit'te kurulan Michigan Kanseri Vakfı-7'nin kısaltmasından oluşmaktadır (Soule, Vazquez, Long, Albert ve Brennan, 1973).

MCF-7 östrojen bağımlı, iyi huylu ve adeziv meme kanseri hücre dizisidir. MCF-7 hücreleri in vivo ve in vitro olarak östrojen çalışmalarında model olarak kullanılmaktadır. Araştırmalarda MCF-7 hücre dizisinin en önemli katkılarından biri, östrojen reseptörü alfa için kullanılması olmuştur. MCF-7 hücrelerinin tek hücre klonları östrojen yokluğunda büyüebilmektedir. MCF-7 hücreleri östrojen reseptörü pozitifken, insan epitel büyüme faktörü 2 (HER2) reseptörü negatiftir. Progesteron reseptörü hem pozitif hem de negatif olabilmektedir. Kemoterapiye yanıt verebilen hücrelerdir (Holliday ve Speirs, 2011; Lee, Oesterreich ve Davidson, 2015).

Serviks kanseri, servikal kanser ya da halk arasında rahim ağzı kanseri olarak bilinen rahim ağzı alt bölgesinin (servikal alanın) habis kanseridir.

İnsan kanser hücreleri, ilk kez 1951 yılında servikal karsinomalı (rahim kanalı kanseri) bir hastadan alınarak hücre kültürü ortamında çoğaltılmış ve HeLa hücre serisi olarak adlandırılmıştır. Hücrelerin ait olduğu Henrietta Lacks isimli hasta 1951 yılında ölmesine rağmen, hastaya ait olan bu hücrelerinin ölümsüz olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen bu HeLa hücre serisi günümüzde hala kanser çalışmaları için sıklıkla tercih edilen ve yaygınlıkla kullanılan kültürü yapılmış en eski insan hücreleridir.

Serviks (rahim ağzı) kanseri, dünya üzerinde her 2 dakikada bir kadının ölümüne neden olan ve farklı birçok ülkede yapılan çalışmalar ile kadınlarda meme kanserinden sonra en sık görülen ikinci kanserdir (Ceyhan, 2007). Avrupa'da her yıl 50 bin, dünyada ise 500 bin kadına serviks kanseri tanısı konmakta, Avrupa'da yılda 25 bin, dünyada da 250 bin kadın bu nedenle ölmektedir (Bilir, 2007). Gelişmiş ülkelerde kadın kanserlerinin %3,6'sını, gelişmemiş ülkelerde kadın kanserlerinin %15'ini oluşturur (Ceyhan, 2007).

*Gyromitra esculenta* çiğ iken zehirli olmasına karşın, pişirildiğinde zehirli etkilerini kaybeden ve lezzetli olması dolayısıyla İskandinavya ve Kuzey Amerika'da ülkelerinde çokça tüketilen bir mantar türüdür. Çoğunlukla iğne yapraklı ormanlarda, çam ve kavak ağaçlarının altında rastlanan *Gyromitra esculenta*'nın gıda kaynağı olması ticari önemi artmaktadır. Muğla yöresinde doğal olarak yetişen bu mantar türünün biyolojik aktivite gösteren etken maddelerin izolasyonu üzerine yapılmış hiçbir çalışma bulunmaması bizi bu araştırmaya yöneltmiştir.

Bu tez çalışmasında daha önce üzerinde araştırma yapılmamış ve Anadolu'nun çeşitli bölgelerinde doğal olarak yayılış gösteren, pişirildiğinde yenilebilen ve ticari potansiyeli olan *Gyromitra esculenta* mantarının mikokimyası çalışıldı. Bu amaçla, hem pişirilmiş hemde çiğ materyallerinden elde edilen ekstrelerin antioksidan ve enzim inhibisyonu aktiviteleri ile göğüs kanseri (MCF-7) ve rahim ağzı kanseri (HeLa) hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivitelerinin belirlenmesi ve biyoaktivitesi yüksek çıkan ekstrelerden madde izolasyonlarının yapılması, izole edilen saf maddelerin yapılarının belirlenmesi ve aynı metotlar ile saf maddelerin biyoaktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı.

## 1.2. Kaynak Özetleri

### 1.2.1. Mantarların kullanılması

İnsanların mantarlara olan ilgisi antik çağlardan beri devam etmektedir. Eski Çin, Mısır, Roma ve Yunan uygarlıklarında mantarların besin ve ilaç yapımında kullanıldıkları bilinmektedir (Pekşen, 1988). Aztek ve Mayaların eserleri bugün incelendiğinde mantar figürlerine oldukça sık rastlanmaktadır. Eski Yunanlı hekim Pliniu'un *Historiae Naturalis* adlı eserinde zehirli ve zehirsiz mantarlara geniş bir şekilde yer verilmiştir.

Doğada organik maddelerin ayrıştırılması gibi önemli bir görevi üstlenen funguslar yaklaşık 125.000 tanımlanmış tür ile ayrı bir alemde toplanmış olup bu türlerden 10.000 tanesi makrofungustur (Allı, vd, 2007; Türkoğlu, vd, 2008). Dünyada yaklaşık 2.500 yenilebilir mantar türünün bulunduğu kaydedilmiştir. Ülkemizde yaklaşık 2.200 makromantar türü olduğu bilinmekte olup yaklaşık 300 tanesi yenilebilir özelliktedir (Pekşen, 1988).

Eski çağlardan beri birçok toplum, mantarları besin veya ilaç olarak kullanmıştır. Geçmişte 'bitki' olduğu söylenen, ancak daha sonra bazı farklı özellikleri sebebiyle hayvanlardan ve bitkilerden farklı ayrı bir âlem olarak kabul edilen mantarların mikroskopik ölçülerde hastalık yapanları olduğu gibi ilâç olanları da vardır. Şapkalı mantarlar olarak bilinen büyük türlerin bazıları ise, gıda olarak kullanılmaktadır (Çağlarım vd, 2004; Sürücüoğlu ve Hasipek, 1996).

Mantarlar içerdikleri yüksek protein, lif, vitamin, mineral ve düşük yağ seviyesine sahip olduklarından değerlidirler (Barros vd, 2008). Mantarlar gıda olarak kullanılmaktadır. Ayrıca içeriğinde A, C vitaminleri ve  $\beta$ -karoten taşımaları ile ve antioksidan aktivite göstermelerinden dolayı, koruyucu etkiye sahip olabileceği raporlandırılmıştır (Murcia vd, 2002). Günümüzde mantarlar yiyecek ve yeni farmasötik ürünlerin en geniş kullanılan kaynaklarından biridir (Tong vd, 2009). Çin ve Japonya gibi ülkelerde lingzhi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinus edodes*), ve (*Tremella fuciformis*) gibi mantarlar yenilebilir ve tıbbi kaynaklar olarak değerlendirilir (Zhang 2007). Birçok ülkede, kültür mantarlarını besin olarak kabul

eden bilinçli tüketiciler bulunmaktayken (*Agaricus bisporus*, *Pleurotus* sp., *Lentinus edodes*, *Volvarella volvacea*, *Auricularia* sp.) doğal ortamda yetişen mantarlar geleneksel olarak özel grup insanlar tarafından tüketilmektedir (lokal halk, mantar hayranları ve gurmeler) (Diez ve Alvarez, 2001). Buna rağmen günümüzde doğal mantarlar, besinsel (Breene, 1990; Coli vd, 1988), organoleptik (Maga, 1981) ve farmakolojik (Bobek vd, 1991) karakterleri sayesinde beslenme biçimimizde giderek çok önemli rol almaktadırlar (Diez ve Alvarez, 2001).

### **1.2.2. Mantarların yağ asitleri**

Mantarlar içerdikleri tıbbi aktivitelerinin yanı sıra, taşıdıkları proteinler, aminoasitler, vitaminler, mineraller ve yüksek oranda polidoymamış yağ asit bileşenleri içermektedir. Ortalama %5 oranında yağ taşıyan mantarlar, %75 kadar doymamış yağ asit bileşenlerine sahip olmaları ile beslenmede kendilerine daha geniş yer bulabilmektedirler. Sahip oldukları tıbbi aktiviteler ve kimyasal bileşenleri bakımından mantarlar, sağlıklı beslenmede önemli besin maddeleridir (Senatore, 1990; Agrahar-Murugkar ve Subbulakshmi, 2005; Manzi vd, 1998; Manzi vd, 2001; Sanmee vd, 2003; Yılmaz vd, 2006; Turkekul vd, 2004).

Mantarların yağ asit bileşimlerinin belirlenmesi mantarın besinsel özelliklerinin açığa çıkarılmasına katkı sağlamaktadır. Mantarlara olan ilginin artmasına paralel olarak yağ asitleri üzerine araştırmalarda artmıştır.

Mantarların içerdikleri yağ oranları düşük olmasına rağmen polidoymamış yağ asitlerinin oranı yüksektir. Mantarlarda genel olarak, C12-C20 arasındaki normal yağ asitleri (Weete vd, 1985; Kavishree vd, 2008; Senatore, 1990; Senatore vd., 1988) ve C16-C24 hidroksi grup taşıyan yağ asitleri bulunmaktadır (Kavishree vd., 2008). Mantar yağ asiti bileşimlerinde oleik, linoleik ve palmitik asit majör bileşenler olarak bulunmaktadır (Stancher vd, 1992; Yılmaz vd, 2006; Kavishree vd, 2008). Bugüne kadar yağ asitleri araştırılan bütün mantarlarda bulunan linoleik ve linolenik asit insanların beslenmesinde önemli iki bileşendir. Uzun zincirli polidoymamış yağ asitlerinin insan sağlığı üzerine olumlu ve faydalı etkilere sahip olduğu raporlanmıştır (Parikh vd, 2005).

### 1.2.3. Kanserin dünyada dağılımı

Dünyada kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada kanser hastalığı yer almaktadır. Türkiye’de kalp damar hastalıklarından ölen insan sayıları %38 iken; bu oran kanser hastalıkları için %29’dur. Sağlık Bakanlığı’nın 2014 yılındaki resmi verilerine göre, ülkemizde her yıl yaklaşık 97 bin erkek, 62 bin kadın ve toplamda 159 bin kişi kansere yakalanmaktadır (Anonim, Kanser istatistiği. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/1672-2012-2013-2014-kanser-istatistikleri.html>, Erişim Tarihi: 17.02.2015)

**Çizelge 1-1. Uluslararası Kansere Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre Türkiye’nin durumu (Deri dışında kalan kanserlerin yaşa göre standardize edilmiş hızları) (Anonim, <http://www.iacr.com.fr/>, Erişim Tarihi: 16.11.2015)**

	<b>KADIN*</b>	<b>ERKEK*</b>
<b>Dünya*</b>	205,4	165,3
<b>IARC’a üye 24 ülke</b>	236,4	192,5
<b>AB (28ülke)</b>	314,9	243,2
<b>ABD</b>	347,0	297,4
<b>Türkiye</b>	23,4	150,9

\*Yaşa göre standardize edilmiş hız 100.000 kişide \*\* Türkiye Birleşik Veri Tabanı

Yapılan çalışmalar sonucunda kanserin görülme sıklığı çevreden (kirlilik, kimyasal maddeler, X ve UV ışınları gibi), yaşama biçiminden (sigara ve alkol alışkanlığı gibi) ve beslenme şekline (antioksidan faktörlerin, vitaminlerin, lifli veya yağlı yiyeceklerin varlığı veya yokluğu gibi) etkilenmektedir (Bahçeci, 1999).

GLOBOCAN 2012 verilerine göre, 2012 yılında Dünya’da toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası gelişmiş ve 8,2 milyon kansere bağlı ölüm olmuştur (GLOBOCAN 2012). Dünyada en sık görülen kanser türleri sıklık sırasına göre; akciğer, meme, mide, kolon ve rektum, serviks ve orofarenks kanserleri iken (Kelle, 2007); Türkiye’de en sık görülen kanser çeşitleri; erkeklerde akciğer, prostat, kalın barsak, rektum, mide ve pankreas; kadınlarda meme, akciğer, kalın barsak, rektum, serviks, yumurtalık, mide ve pankreas kanseridir. Globocan (2012) verilerine göre Türkiye’de kadınlarda en sık görülen ve ölüme neden olan kanserler sırasıyla meme, kolorektal ve mide kanseri olarak bildirilmiştir (Hatipoğlu, 2007; Stewart vd, 2004).

Beş yıllık bir süre zarfında yapılan taramada meme kanserinin kadınlar arasında en sık görülen kanser olduğuna değinilmiştir (Stewart vd, 2004). Meme kanseri özellikle 30-59 yaşları arasındaki kadınlarda etkili olmaktadır ve kadınlarda ölümün en önemli nedenlerinden biridir (Sant vd, 2006). Uluslararası Kanser Ajansı özellikle meme kanserindeki artışa dikkat çekmiştir ve kadınlarda bu nedenle ölümlerin her geçen yıl arttığını belirtmiştir.

Rahim ağzı kanser hücreleri, ilk kez 1951 yılında servikal karsinomalı (rahim kanalı kanseri) bir hastadan alınarak hücre kültürü ortamında çoğaltılmış ve HeLa hücre serisi olarak adlandırılmıştır. Hücrelerin ait olduğu Henrietta Lacks isimli hasta 1951 yılında ölmesine rağmen, hastaya ait olan bu hücrelerinin ölümsüz olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu HeLa hücre serisi günümüzde hala kanser çalışmaları için sıklıkla tercih edilen ve yaygınlıkla kullanılan, kültürü yapılmış en eski insan hücreleridir (Akçalı, 2010).

#### **1.2.4. Zehirli mantarlar ve tarihçeleri**

Mantar zehirlenmelerinin tarihçesi eski Roma'ya kadar uzanmaktadır. Mantarlar içinde en lezzetli olan *Amanita caesarea* (imparator) mantarı adını Roma imparatorundan almıştır. Roma imparatoru II. Claudius'un karısı Agrippine, *Amanita caesarea* üzerine *Amanita phalloides* ekleyerek imparatoru öldürmüştür (Mısırlıoğlu ve Hızel Bülbül, 2009).

Şükrü Kaymakçalan'ın da verilerine göre mantar zehirlenmelerine bağlı ölüm vakaları tarihte çok eski zamanlardan bu yana görülmektedir. Milattan önce 5. yüzyılda yaşamış olan Atina'lı şair Euripides'in mantar zehirlenmesi yüzünden bir gün içinde karısını, kızını ve oğlunu kaybettiği bilgisi bulunmaktadır. Hindistan'da Budizm'in kurucusu Buddha'nın 80 yaşında iken bir ziyafette mantar zehirlenmesinden öldüğü söylenir. Mantar zehirlenmesinden ölen önemli kişiler arasında Papa VII. Clement, İmparator VI. Charles ve Çar Alexis'in eşi de yer almaktadır (Kaymakçalan, 1968).

Türkiye'de zehirlenmeler arasında özellikle ilkbahar ve sonbahar mevsimlerinde, mantar zehirlenmeleri ilk sırada yer almaktadır. Bunun sebebi ormanlarda yabancı



olarak yetişen mantarların, bu konuda bilgisi olmayan kişiler ve halk tarafından gıda olarak tüketilmek üzere toplanmasıdır. Zehirli ve ölümcül mantarların yenebilen mantarların yanında yetişmesi de toplayıcının hata yapmasına yol açmaktadır. Bazı zehirli mantarların yenebilen mantarlarla benzerlik göstermesi de tehlikeli sonuçlar doğurabilmektedir (Tümkor, 1994).

Yabani mantarlara bağlı zehirlenmeler özellikle yağmurlu günleri takiben güneş açması ile açık alanlardan toplanan mantarların yenilmesi ile meydana gelmektedir. Sosyoekonomik düzeyleri düşük kişilerin mantarları zehirli zehirsiz şeklinde ayırt etmeden tüketmeleri dolayısı ile mantar zehirlenmeleri sık sık görülmektedir (Işıoğlu vd, 1995).

Bu konuda yeterli bilgisi olmayan kişiler tarafından toplanan mantarların yenilmesi sonucu hafif gastrointestinal şikayetlerden, ölümcül karaciğer yetmezliğine kadar çeşitli rahatsızlıklar ortaya çıkabilmektedir (Akdur vd, 2007; Mısırlıoğlu ve Hızıl Bülbül, 2009).

#### **1.2.5. *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr.**

**Classis/Sınıf:** Ascomycetes

**Ordo/Takım:** Pezizales

**Family/Aile:** Helvellaceae

##### *1.2.5.1. Makroskobik özellikleri*

Şapka 3-8 cm çapında, küresele yakın şekilde ve düzensiz veya konik-obtus, bazen düzleşmiş, çoğunlukla boyundan biraz daha enlidir. Yüzeyi beyin şekilli kıvrımlara sahipse de çukur kısımları yoktur ve çok ince pudramsı görünüştedir. Renk kırmızımsı kahverengiden koyu kahverengine kadar değişir, nadiren sarımtırak kahverengi olabilir. Kenarları sap ile belirgin bir birleşim hattı oluşturmaz ve sanki sapın devamı olup sarkmış gibi gözükürler. Şapka içinde yer yer boşluklar vardır ve iç yüzeyi beyazdır (Mat, 2000).

Sap 2-6 x 1-3 cm genel olarak şapkaya göre kısa, sert, silindirik veya dip kısma doğru şişkin veya daha enli hale gelebilir, enine kesitte dairesel veya hafifçe ovaldir. İç kısmı tamamen oyuk veya birkaç kısmı odacıklı halde oyulmuştur. Sapın yüzeyi yünümsü veya keçemsi, sapın yüzeyi boydan boya bariz bir şekilde yivli veya oluklu, yivler düzensiz veya tam düzenli olabilir, sapın rengi beyaz veya beyazımsı bazen et renginde ya da kirli kahverengimsidir. Sap ve şapka düzensiz bir şekilde birleştiğinden sıklıkla şapka ve sap ayrımı yapılmayabilir (Mat, 2000).

Eti beyaz, mumsu, kırılgan, ince, uzel koku ve tadı yoktur (Mat, 2000).



Şekil 1.1. *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr.

#### 1.2.5.2. Mikroskopik özellikleri

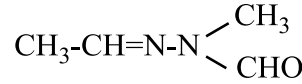
Sporları renksiz ve saydam, genellikle uçlarda 2 tane sarımsı yağ damlacığı mevcut, eliptik, uç kısımları bariz bir şekilde obtus, çeperleri düzgün, 15-22 x 9-12  $\mu$  dur. Spor baskısı krem renklidir. Askus silindirik, 100-200 x 15-20  $\mu$  ve 8 askosporludur. Parafizler silindirik, septat, bazıları tabandan çatallanmış, uçları biraz daha enli ve 6-8  $\mu$  kalınlıktadır (Mat, 2000).

Habitat olarak kumlu topraklarda çam ormanlarında, bazen bu ormanlar arasındaki açıklıklarda, traşlanmış orman alanlarında, ağaç kütükleri civarında, yine çam ormanlarında kabuk soyulup biriktirilen veya talaş biriktirilen yerlerin yakınında ya da çalılıkların altında yetiştirilirler. Genellikle ilkbaharın ortasından yaz başına kadar görülürler. Ülkemizde kuzugöbeği mantarının yetiştiği yerlerde yaygın olarak bulunurlar (Mat, 2000).

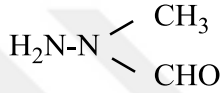
Yayıllığı Antalya, Balıkesir, Bolu, Denizli, Eskişehir, Isparta, İzmir, Muğla (Solak vd, 2007; Türkoğlu vd, 2007).

### 1.2.6. *Gyromitra esculenta*'nın kimyasal bileşimi ve tıbbi özellikleri

Giromitrinin parçalanma ürünleri olan monometilhidrazinler. Giromitrin ve parçalanma ürünlerinin formülleri Şekil 1.2.'de verilmiştir.



Giromitrin



N-Metil-N-Formilhidrazin



Metilhidrazin

Şekil 1.2 Giromitrin ve parçalanma ürünleri

Giromitrin bir metilhidrazin türevidir. Asetaldehitin *N*-metil *N*-formilhidrazonudur. Asit etkisiyle hızla hidroliz olarak asetaldehit ve *N*-metil *N*-formilhidrazin verir. Bu son madde daha ileri hidroliz ile formik asit ve metilhidrazine parçalanır. Bu hidroliz olayları sindirim sisteminde meydana gelerek açığa çıkan hidrazinler zehirlenmeye neden olur. Fizyolojik şartlarda, yani pH=4 ve 37°C'de, birkaç saniyede giromitrinden *N*-metil *N*-formilhidrazin açığa çıkar. Hidrolizin ikinci bölümü ise daha yavaş yürür. Mantar suyla kaynatıldığında giromitrin ve homologları parçalanarak suya geçse de, bir miktar toksik bileşiğin kaldığı ve zehirlenmelere neden olabileceği belirtilmiştir (Pyssalo vd, 1977). İlk defa List ve Luft tarafından *Gyromitra esculenta*' dan 1967' de izole edilmiştir ve yapısı 1976' da Pyssalo tarafından doğrulanmıştır (List ve Luft, 1968; Pyssalo, 1976).

Giromitrin ve homologlarının mide asiditesinde parçalanmasıyla açığa çıkan hidrazinler karaciğerde nekroz yapar. Gyromitrin sendromuna neden olur. Ayrıca açığa çıkan monometilhidrazinler santral sinir sistemi üzerine etki ederek piridoksin

fonksiyonunu ve kullanımını engeller (Mat, 2000). Giromitrinin letal dozu çocuklarda 10-30 mg/kg, yetişkinlerde 20-50 mg/kg'dır (Mat, 2000).

Zehirli olarak bilinen *G. esculenta*, sahip olduğu güçlü antimitojenik aktivite sayesinde; kanser oluşumunda öncü bir etkiye sahip olduğu bilinen mutasyonları engelleyecek etken madde eldesinde kullanılabilir (Alkan, 2013). Aynı zamanda *G. esculenta*, antimikrobiyal ve antitümör bileşik geliştirmede potansiyel kaynak olma niteliğindedir (Tül, 2012).

### 1.3. Antioksidanlar

Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilirler. Bu yüzden canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri meydana getirebilirler (Papas, 1996). Bu durum yaygın olarak "Oksidatif stres" olarak isimlendirilir. Oksidatif stres oluşumunda temel sorumlular reaktif oksijen ve azot türleridir (Aruoma ve Cuppet, 1997). Oluşan oksidasyon ürünlerinin bir dizi antioksidan savunma mekanizması tarafından bertaraf edildiği gerçeği 1970'lerde ortaya konmuştur. Kanser, dolaşım bozuklukları, yaşlanma gibi olumsuz etkileri olan serbest radikallerin oluşumunu önleyecek veya ortadan kaldıracak doğal veya sentetik ürünler arayışına gidilmiştir (Zaruelo ve Crespo, 2002).

Çizelge 1-2. Reaktif Oksijen ve Azot Türleri

Radikal Türler	Radikal Olmayan Türler
Süperoksit, $O_2^-$	Hidrojen peroksit, $H_2O_2$
Hidroksil, $\cdot OH$	Hipokloröz asit, $HOCl$
Peroksi, $RO_2^-$	Ozon, $O_3$
Alkoksi, $RO^-$	Singlet oksijen, $^1\Delta g^1O_2$
Hidroperoksi, $HO_2^-$	Nitröz asit, $HNO_2$
Azot oksit, $NO^-$	Nitrozil katyonu, $NO^+$
	Nitroksi anyonu, $NO^-$

Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda, aşağıdaki şekillerde ifade edildiği gibi oluşum gösterirler:

- Hücrenin normal solunumu sırasında yan ürün olarak reaktif oksijen ve azot türleri oluşur.
- Süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, bazı biyomoleküllerin (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, sitokrom P450 ve elektron transport zincirlerinin bazı bileşikleri) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonu ile artabilir (Fridovich, 1986; Halliwell, 1994).
- Vücudumuz, doğal ve insan kaynaklı radyasyona maruz kalabilir. Yüksek enerjili elektromagnetik ışın, suyu parçalayabilir ve hidroksi radikali oluşturabilir (Von-Sonntag, 1987).

Reaktif oksijen ve azot türleri organizmaya dışarıdan alınabilirler. Sigara dumanının ana bileşiği NO<sub>2</sub>'dir. NO<sub>2</sub>'in sigara olefinleri ile reaksiyona girmesiyle karbon merkezli radikallerin oluştuğu düşünülmektedir. Ayrıca sigara içimi nötrofilleri aktive ederek dolaylı olarak serbest radikal üretimini artırmaktadır (Papas, 1996).

Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikalleri etkin bir şekilde indirgeyerek düşük toksisiteli veya toksik olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu bileşiklerin varlığını inhibe edici özellikte olan antioksidanlar yaşam için önem teşkil etmektedir (Cao ve Prior, 1999).

Antioksidanlardan başlıca doğal olanları, gıdalarda mevcut olan ve insan vücudunu zararlı olan serbest radikallerden koruyan esas olarak vitaminler (C, E ve A vitaminleri), flavonoidler, karotenoidler ve polifenollerdir. Çoğu araştırmada meyve ve sebze tüketimi ile belirli kanser ve kalp hastalıklarının oluşumu arasında ters orantılı bir ilişki olduğu saptanmıştır (Rice-Evans vd, 1997).

Antioksidanlar besinlerde doğal olarak buldukları gibi, gıda sanayinde ürünlerin kalitesini ve besin değerlerini korumak için sonradan eklendikleri de görülmektedir. Besinlerin acılaşma ve çürümelerini geciktirici özelliğe sahip bir grup kimyasal maddelerdir. Özellikle yağlarda, havadaki oksijenin sebep olduğu otooksidasyonu yavaşlatmak için kullanılmaktadırlar. Bu şekilde yağların; tadını, kokusunu, rengini yani kalitesini ve raf ömrünü uzatırlar. Ortamda pek az miktarda bulunsalar bile etkin olan maddelerdir. Bir antioksidanın, besin maddelerinde kullanılmadan önce sağlığa zararı olmadığı kesin olarak saptanmalıdır. (Keskin ve Erkmen, 1987).

Antioksidanların kimyasal aktiviteleri yani hidrojen veya elektron yerine indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal giderici olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir. Bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır (Rice-Evans et al, 1997):

- ❖ Radikal süpürme yeteneği
- ❖ Hidrojen veya elektron yerine göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- ❖ Metal şelatlama potansiyeli
- ❖ Diğer antioksidanlarla olan etkileşim

### **1.3.1. Antioksidanların sınıflandırılması**

Antioksidanlar, reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılırlar. Bazı antioksidanlar ise birden fazla aktivite mekanizması gösterirler ve bunlar çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırılırlar (Reische vd, 2002).

#### *1.3.1.1. Primer (Birincil) antioksidanlar*

Birincil ya da zincir parçalayan antioksidanlar; elektron vererek serbest radikal zincir reaksiyonunu kıran ve çoğunlukla fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Serbest radikallerle reaksiyona girerek, daha kararlı ürünler oluşturup, hidroperoksit oluşumunu engellerler. Sentetik veya doğal yapıda olabilirler. Tokoferoller, flavonoidler, alkali gallatlar, BHA, BHT ve TBHQ en önemlileridir (Karademir, 2005).

Katı ve sıvı yağlarda antioksidan dimerlerin oluşumu göze çarpar ve bu oluşum fenolik antioksidan radikallerin kolayca sonlandırma reaksiyonlarına uğradığını gösterir. Antioksidan dimerler, radikal olmayan şekillerinde ne kadar uzun süre kalırlarsa otokatalitik serbest radikal zincir mekanizmasını o kadar etkili şekilde durdururlar (Reische vd, 2002).

Radikal gidermelerine ek olarak birincil antioksidanlar, hidroperoksitleri hidroksi bileşiklerine indirgeyebilirler. Bununla beraber birincil antioksidanların esas antioksidatif mekanizması radikal gidermedir.

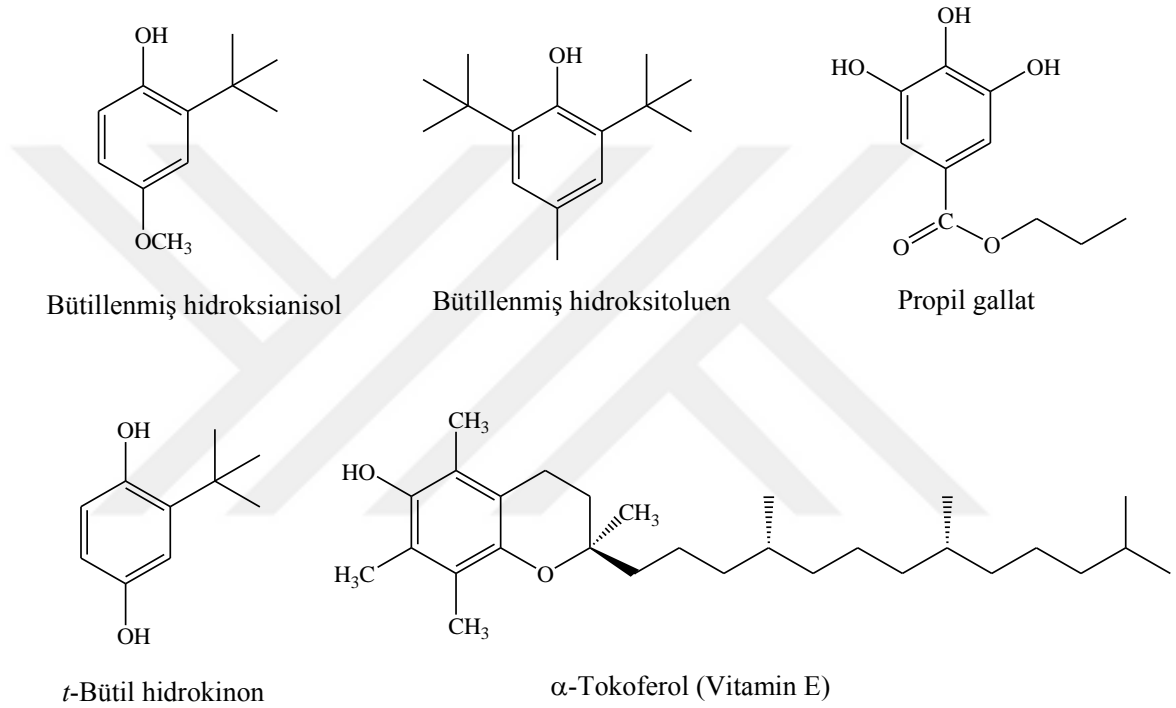
Birincil antioksidanlar, çeşitli halka süstitüsyonlarına sahip mono veya polihidroksi fenollerdir. Fenoldeki hidroksil grubuna göre orto ve para konumuna elektron veren grupların süstitüsyonundan oluşan indüktif etki bileşimin antioksidan aktivitesini artırır. Fenolik antioksidanlar, hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu artırarak onun reaktifliğini azaltır. Hidroksil grubuna göre para konumunda etil veya bütül grupların süstitüsyonu, antioksidan aktiviteyi artırır. Bununla beraber sterik engelleme nedeniyle para pozisyonlardaki uzun zincir veya dallanmış alkil gruplarının varlığı antioksidan etkiyi azaltabilir. Orto pozisyonlardaki dallanmış alkil gruplarının süstitüsyonları kararlı rezonans yapılar oluşturarak fenolik antioksidanın etkisini artırır ve antioksidan radikalinin reaksiyonlara katılma yeteneğini azaltırlar (Reische vd, 2002).

Doğada 8 farklı izomer yapısında bulunan tokoferoller doğal birincil antioksidanlara örnektir ve başlıca bitkisel ürünleri mevcuttur. Hayvan organizması pek az miktarda içerir. Özellikle bitkisel yağlarda, yeşil yapraklı sebzelerde, baklagillerde, ceviz, fındık, süt, yumurtada bulunurlar. Tokoferollerin kimyasal yapıları birbirine benzesede, bunların biyolojik etkileri oldukça farklıdır. 3 metil grubu taşıyan  $\alpha$ -tokoferol vitamin olarak en etkili olanıdır ve sadece "E vitamini" dendiğinde  $\alpha$ -tokoferol anlaşılır.  $\beta$  ve  $\gamma$  tokoferoller,  $\alpha$  izomerinin yarısı kadar,  $\delta$  izomeri ise ancak yüzde biri kadar etkilidir. Tokoferoller, monofenolik yapıdaki doğal antioksidanlardır. Antioksidan etkileri vitamin etkilerinin tersine olarak  $\alpha$ 'dan  $\gamma$ 'ya doğru artar (Keskin ve Erkmen, 1987).

Sentetik antioksidanlara örnek Butillenmiş hidroksi toluen ve Butillenmiş hidroksi anisoldür. Butillenmiş hidroksi toluen (BHT) hayvansal yağlarda ve etlerde çok, bitkisel yağlarda az etkilidir. BHA ile benzer özelliklere sahiptir. Gıdalara ilave edilme işlemleri sırasında uygulanan çok yüksek sıcaklıklara dayanıklı değildir. (Karademir, 2005).

Butillenmiş hidroksi anizol (BHA), bitkisel ve hayvansal yağlarda kolay çözünebilen etkili bir sentetik antioksidandır. Piyasada bulunan BHA başlıca iki izomer olan 3-*tert*-butil-4-hidroksi anizol ve 2-*tert*-butil 4-hidroksi anizol karışımıdır. Zehirli değildir ve katıldığı maddeye hiçbir koku aşlamaz. Anizolde benzen halkasındaki yer

değiştirenlerin, maddenin antioksidan etkisi bakımından rolü büyüktür. Hidroksi grubunu 5. veya 6. karbon atomunda taşıyan bileşikler antioksidan değilken 4 üzerinde taşıyanlar antioksidan özellik gösterir. Bunun haricinde diğer yer değişenlerin yer ve yapısı da rol oynar. Örneğin; 3-*tert*-butil 4-hidroksi anisol, 3-metil veya 3-*n*-butil türevlerinden daha etkilidir. Yer değişenin 3 no'lu karbon atomuna bağlı olması da etkiyi arttırır. BHA, gıdalarda %0,02 oranında kullanılır. Özellikle hayvansal yağlar, bu yağlarla yapılan bisküvi, pasta ve patates cipsinde etkili antioksidan olarak kullanılırlar (Karademir, 2005).



**şekil 1.3. Birincil Antioksidanlar**

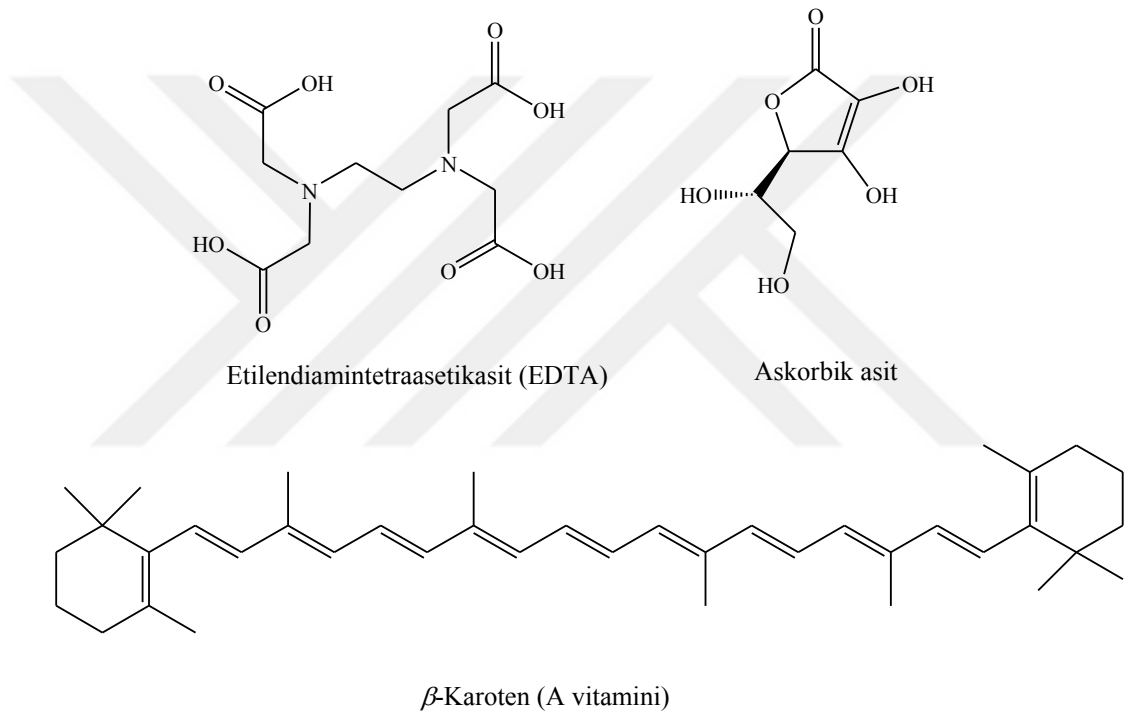
### 1.3.1.2. Sekonder (İkincil) antioksidanlar

İkincil antioksidanlar çok çeşitli reaksiyon mekanizmalarına sahiplerdir. Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar, fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. İkincil antioksidanlar prooksidan metallere kelat yapabilirler ve onları deaktive edebilirler, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan türlere parçalanmasını sağlayabilirler, singlet oksijeni deaktive edebilirler, ultraviyole



radyasyonu absorbe edebilirler veya oksijen giderici olarak davranabilirler. Bu antioksidanlar, genellikle birincil antioksidanların aktivitesini arttırırlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil palmitat, lesitin, tartarik asit, EDTA ve  $\beta$ -karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilir (Şekil 1.4) (Reische vd, 2002).

Organizmanın en çok gereksinim duyduğu C-vitamini, diğer adıyla askorbik asit, meyve ve sebzelerde bulunup, suda çözünebilen ve serbest radikalleri doğrudan söndürebilen güçlü bir antioksidan kaynağıdır. Ayrıca çeşitli besin maddelerinde acılaşıma ve ekşimeyi, meyvelerde renk değişimini önler. Doğal kaynaklardan elde edilebildiği gibi kimyasal olarak da sentezlenebilirler (Hudson, 1990).



Şekil 1.4. İkincil antioksidanlar

#### 1.4. Asetilkolinesterazlar

Asetilkolinesteraz (AChE), dokularda serbest ya da fosfolipidlerle bileşik halinde bulunan lipotropik etkiye sahip asetilkolini hidrolizleyen nonspesifik bir enzimdir.

Eritrositlerde, karaciğerde, dalakta, sinir uçlarında ve beyin gri cevherinde bulunduğu rapor edilmiştir (Aras, 1988).

Asetilkolin, biyolojik rolü önemli olan bir esterdir. Önceleri sinir uçlarından etkilendiği organa veya sinir ucundan ikinci sinir hücresine sinir impulsu taşıma görevi olduğu, ancak daha sonraki çalışmalarda bu görevinin yanında sinir ve kas lifleri boyunca biyoelektriksel akımın oluşmasında da görevli olduğu tespit edilmiştir (Wilson, 1954).

Alzheimer, ilk kez 1906'da Alman nöropsikiyatrist Alois Alzheimer tarafından düşünce kontrolü, hafıza ve konuşma yetisi gibi bazı fonksiyonların yer aldığı beyin bölümünde, karmaşık mesajları milyonlarca sinir hücresi arasında taşıyan kimyasalların düzeyinin azalması ve sinir hücrelerinin yok olması ile normal düşünme ve hafıza yetilerinin kaybolduğu bir hastalık olarak tanımlanmıştır.

Asetilkolinin (ACh) hafızadaki uyarıcı etkisi ve asetilkolinin sentezinden sorumlu enzim kolin asetiltransferazın hastalıkta belirgin bir azalmaya neden olması, hastalığın kolinerjik olduğunun düşünülmesine yol açmıştır. Alzheimer hastalarında asetil kolin seviyelerinin azalmasını önlemek için onaylanmış tek tedavi yöntemi asetilkolin esteraz (AChE) inhibitörlerinin kullanılması olmuştur. Bu nedenle asetilkolinesterazın inhibisyonu Alzheimer hastalığına karşı en yaygın kullanılan tedavi seçenekleri arasında yerini almıştır (Dökmeçi vd, 2000). AChE asetil kolini parçalayan bir enzimdir ve amiloid  $\beta$ -peptid oluşumunu da hızlandırdığı gözlenmiştir. AChE'nin Alzheimer hastalığında üstlendiği bu çift rol yeni AChE inhibitörlerini araştırmayı, şu anki tedavilerin mevcut yan etkilerinden dolayı daha gerekli hale getirmektedir.

## 1.5. Triterpenler

Triterpenler altı izopren biriminden oluşmuş 30 karbonlu halkalı yapılardır.

Bitkilerde serbest olarak bulunabildikleri gibi triterpenik saponinler olarak adlandırılan glikozitleri halinde de bulunabilirler. Serbest triterpenler, asit, alkol, aldehit, keton, epoksi ve lakton gruplarından bir ya da birkaçını bir arada taşıyabilirler.

Doğal triterpenik bileşiklerin iskelet yapıları Şekil 2.34'de verilmiştir. Taşıdııkları halka sayısı ve fonksiyonel gruplar da isimlendirmede etkindir. Triterpenler taşıdııkları halka sayılarına göre trisiklik, tetrasiklik ve pentasiklik olarak üç grupta toplanmaktadırlar.

Hiç sübstitüent taşımazlarsa triterpen hidrokarbonlar olarak adlandırılırlar. Triterpenlerin tanınmasında renk reaksiyonları önemlidir. Liebermann-Burchard en çok kullanılan renk reaksiyonudur. Mavi-yeşil renk triterpenlerin varlığını gösterirken, aynı reaksiyon steroidlerle yavaş yürür ve kızıl kahve bir renk verir (Boiteau vd, 1964).

## **1.6. Steroidler**

Steroidler, hayvan, mantar, yosun ve yüksek bitkilerde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Steroidler, siklopentan perhidrofenantren halka yapılı sistemlerdir ve genelde 29 karbon atomu ya da 27 karbon atomundan oluşur. Steroidler, tetrasiklik halka içeren lanostane tip triterpenlerden düzenlenmiştir. Ancak C4 ve C14 numaralı karbonlarda üç adet metil grubu eksiktir. Steroidler canlılarda hormon olarak işlev görmektedirler ve Asetil Koa'nın biyosentez yoluyla oluşurlar. Farklı steroidler bu halkaya bağlı olan fonksiyonel gruplar bakımından ayırt edilirler (Harborne, 1984).

Kolesterol steroidlerin temel yapısını teşkil eder ancak özellikle yan zincirdeki daha ileri değişiklikler, steroller, steroidal saponinler, kardiyoaktif glikozitler, kortikosteroidler gibi çok geniş biyolojik olarak önemli doğal ürünler elde etmeye yardımcı olur.

Bitkilerden elde edilen steroidler olduğu gibi, mantarlardan izole edilen steroidler bulunmaktadır. Farklı mantarlardan izole edilen çeşitli steroidler antikomplement, antimikrobiyal, antitüberkular, antiviral ve sitotoksik aktivite göstermektedir (Öztürk vd, 2015).

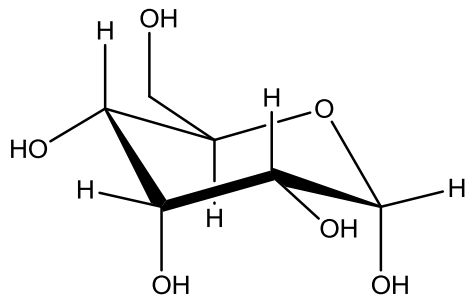
## 1.7. Glikozitler

Glikozitler şeker eterleri olarak bilinirler ve karbonhidrat sınıfındadırlar. Genel formülleri  $CH_2O$ 'dur. Monosakkaritler en basit karbonhidrat birimleridir. Doğada çok rastlanan monosakkaritler Şekil 1.5.'de verilmiştir. Glukoz, galaktoz gibi aldehit grubu içeren monosakkaritler "aldozlar" şeklinde tanımlanırken, fruktoz gibi keton grubu içeren monosakkaritlere ise ketozlar denir. Glikozitler  $\alpha$ - ve  $\beta$ - anomer olarak tüm bitki organlarında bulunabilirler. Doğada  $\beta$ - glikozitler yaygın,  $\alpha$ - glikozitler daha az bulunurlar. D-glukozun  $\alpha$ ,  $\beta$ -piranoz ve  $\alpha$ ,  $\beta$ -furanoz yapıları Şekil 1.5.'de gösterilmiştir.

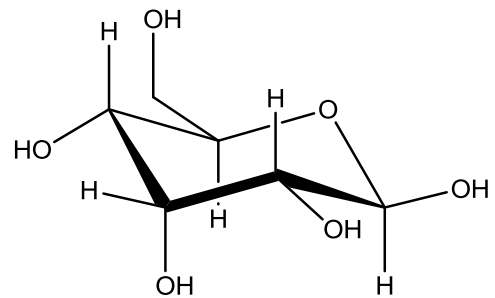
Monosakkaritler dimer, trimer ve polimer oluşturmak üzere birbirlerine bağlanabilirler. Dimerlere disakkaritler neder. Sakkaroz bir disakkarittir ve hidrolizlendiğinde glukoz ve fruktoza ayrılır. İkiiden sekize kadar monosakkarit birimi içeren karbonhidratlar oligosakkaritler olarak tanımlanırlar. Sekizden fazla monosakkarit birimi içerenler polisakkaritlerdir. Nişasta ve selüloz polisakkaritlere örnek olarak verilebilirler.

Kan şekeri, üzüm şekeri olarak da adlandırılan glukoz, en önemli monosakkaritlerden biridir. Polarize ışığı sağa çevirdiği için dekstroz olarak da adlandırılırlar.

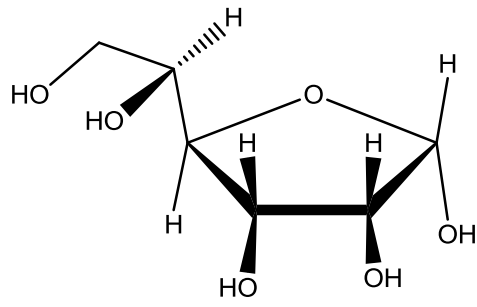
Memeliler tarafından sakkaroz, maltoz, laktoz ve nişasta glukozu dönüştürülebilir ve organizma tarafından enerji elde etmek için kullanılırlar. Fruktoz en tatlı doğal şekerdir, meyvelerde ve balda bulunur. Polarize ışığı sola çevirdiği için levuloz olarak da adlandırılırlar (Serin, 1995).



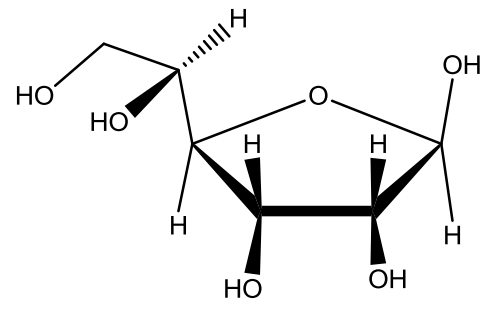
$\alpha$ -D- Glukopiranoz



$\beta$ -D- Glukopiranoz



$\alpha$ -D- Glukofuranoz



$\beta$ -D- Glukofuranoz

**Şekil 1.5. D-Glukozun  $\alpha$ ,  $\beta$ -Piranoz ve  $\alpha$ ,  $\beta$ -Furanoz Yapıları**



## 2. MALZEME VE YÖNTEM

### 2.1. Mantar Materyali

Tez çalışma materyalini oluşturan *Gyromitra esculenta* mantarı, Muğla köylü pazarından satın alındı.

Mantar satın alma işlemi 2015 yılının özellikle yağışların bol olduğu Aralık ayında gerçekleştirildi. Özel olarak hazırlanmış sepet, mumlu kağıtlar veya karton kutulara yerleştirilerek laboratuvara taşındıktan sonra burada spor toz baskıları, tadı, kokusu belirlenerek teşhisleri yapıldı. Mantarın teşhisini desteklemek için yukarıda yapılan çalışmalara ilaveten, laboratuvarda mantarın spor şekli, boyutu, rengi, yüzeylerinin düz veya pürüzlü oluşu, siğil ve apikulus taşıyıp taşımadığı gibi özellikleri ile liflerin konumları, gibi mikroskopik özellikleri belirlendi. Yukarıda belirtilen morfolojik, mikroskopik ve kimyasal ayıraç tepkimelerine göre özellikleri tespit edilerek ve teşhisleri desteklendi.

*Gyromitra esculenta* mantarının bir örneği Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Fungariumu'nda CK-2499 kodu ile saklanmaktadır.

### 2.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

#### 2.2.1. Kimyasal maddeler

$\beta$ -karoten, Tween-40, linoleik asit, MTT (3-[4, 5-dimetiltiazol-2-il] -2, 5-difeniltetrazolium bromit), BHA ve  $\alpha$ -tokoferol Sigma kimyasaldan 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH); ABTS, potasyum persülfat; ferrene, demir(II)klorür; bakır(II)klorür, amonyum asetat, neocuprin; sodium karbonat, 5,5-ditthiobis(2-nitrobenzoik asit) (DTNB), sodium dihidrojen fosfat, sodyum dihidrojen fosfat, fenol, sodyum nitropurissit, sodyum hidroksit, üre, sodyum karbonat, FCR, pirokatekol, aliminyum nitrat, potasyum asetat, asetilkolin iyodür (AcI), bütirilkolin iyodür BuI),

hekzan, metanol, etanol, aseton, kloroform ve kullanılan tüm çözücüler Merck'den temin edildi. Kullanılan diğer kimyasallar ve çözücüler ise analitik saflıktadır.

### 2.3. Ekstrelerin Elde Edilmesi

*Gyromitra esculenta* iki eşit parçaya ayrılarak bir kısmı çiğ halde kurutma aparatı ile kurutuldu. Diğer kısmı ise etüvde 200 °C de 20 dakika pişirildikten sonra kurutuldu. Kuru mantar örnekleri öğütülerek toz haline getirildi. Kurutulmuş ve öğütülmüş mantar örnekleri sırasıyla petrol eteri, aseton ve metanol ile oda koşullarında 5'er kez ekstre edildiler. Çözücüler döner buharlaştırıcı kullanılarak vakumda uzaklaştırıldı ve elde edilen kuru ekstrelerin verimleri hesaplandı. Su ekstrelerinin elde edilmesi amacıyla, organik çözücü ekstraksiyonundan arda kalan mantar örnekleri 80 °C'de sıcak su ile ekstre edildiler. Su ekstreleri süzöldükten sonra, süzöntünün üzerine hacimce 3 kat fazla etanol eklenerek moleköl ağırlığı yüksek olan polisakkaritlerin çökmesi sağlandı. Çökelek santrifüjlenerek alındı ve alkolde çöken polisakkaritlere "HWEP" kodu verildi. Çökelek santrifüj ile ayrıldıktan sonra supernatant [etanol:su, (3:1) karışımı] döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Bu yöntemle elde edilen alkolde çözünen polisakkaritlere "HWES" kodu verildi. Su ekstreleri böylelikle etanolde çözünen ve çözünmeyenler olarak büyük ölçüde ayrıldılar.

### 2.4. Çözeltilerin Hazırlanması

#### 2.4.1. $\beta$ -Karoten renk açılımı yönteminde kullanılan çözelti

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

#### **2.4.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti**

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

#### **2.4.3. ABTS<sup>+</sup> katyonu radikal giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti**

- ❖ 7 mM ABTS<sup>+</sup> çözeltisinin hazırlanması: 19,2 g ABTS tartıldı ve 5 ml saf suda çözülerek üzerine toz halinde 3,3 mg K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> ilave edildi, karıştırıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 12-16 saat bekletildi.

#### **2.4.4. CUPRAC yönteminde (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yönteminde kullanılan çözelti**

- ❖ 10 mM'lık Cu (II) çözeltisinin hazırlanması: 0,1705 g CuCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O tartılarak 100 ml deiyonize su ile çözüldü.
- ❖ 1 M pH=7 Amonyum asetat tamponunun hazırlanması: 7,708 g NH<sub>4</sub>Ac tartıldı. Saf su ile çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.
- ❖ 7,5 mM neocuprin çözeltisinin hazırlanması: 0,039 g neocuprin tartılarak 25 ml etanolde çözüldü.

#### **2.4.5. Metal bağlama aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler**

- ❖ 0,5 mM Ferrene çözeltisinin hazırlanması: 2,47 mg ferrene tartılarak 10 ml deiyonize suda çözüldü.
- ❖ 0,2 mM Fe<sup>+2</sup> (FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O) çözeltisinin hazırlanması: 4,00 mg FeCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O tartılarak 100 ml deiyonize suda çözüldü.



#### 2.4.6. Antikolinesteraz aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler

- ❖ Fosfat tamponu hazırlanması: 8,89 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  tartıldı. Bir miktar saf su ile çözüldü hacmi 500 mL'ye tamamlandı. 1,56 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100 mL'lik balon jofeye konuldu. Bir miktar saf su ile çözülerek hacme tamamlandı.
- ❖ pH=8 tamponu hazırlanması: Fosfat tamponu için hazırlanan  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'den 94,7 mL,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 'den de 5,3 ml alındı. pH-metre ile pH kontrol edildi ve 200 mL'ye seyreltildi.
- ❖ pH=7 tamponu hazırlanması:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 'den 39 mL,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'den de 61 mL alındı ve pH metre ile pH kontrol edilerek 200 mL ye seyreltildi.
- ❖ DTNB çözeltisinin hazırlanması: 16 mg DTNB pH=7 tamponunda çözüldü. 7,5 mg  $\text{NaHCO}_3$  1mL pH=7 tamponunda çözüldü. İkisi karıştırıldı ve 4 mL'ye pH=7 tamponuyla seyreltildi.
- ❖ AcI (Asetilkolin iyodür) Hazırlanması: 16 mg AcI tartıldı ve 4 mL deiyonize suda çözüldü.
- ❖ BuI (Bütirilkolin iyodür) Hazırlanması: 4 mg BuI tartıldı ve 4 mL deiyonize suda çözüldü.

#### 2.4.7. Üreaz enzim inhibisyon aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler

- ❖ pH=8.2 Tamponun hazırlanması:  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 'den 0,1560 tartılıp, 100 ml'de çözüldü.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 'den 0,1780 gram tartılıp, 100 ml'de çözüldü. Daha sonra  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  çözeltisinden 96 ml alınıp, üzerine 4 ml  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  çözeltisinden konuldu ve hacmi 200 ml'ye seyreltildi.
- ❖ Fenol reaktifinin hazırlanması: %1'lik fenol reaktifi için 0,8 gram Fenol 10 ml suda çözüldü. Daha sonra %0,005'lik sodyum nitropurissit için, 5 mg sodyum nitropurissit 10 ml suda çözüldü. Karışım 5 birim fenol, 4 birim sodyum nitropurissit çözeltisi ile hazırlanır.
- ❖ Alkali reaktifin hazırlanması: %0,5 sodyum hidroksit çözeltisi için, 0,285 gram sodyum hidroksit 10 ml suda çözüldü. %0,1 sodyum hipoklorit çözeltisi için, 0,47 ml sodyum hipoklorit 10 ml suda çözüldü. Karışım 1 birim sodyum hidroksit, 1 birim sodyum hipoklorit çözeltisi ile hazırlanır.

- ❖ Üre'nin hazırlanması: 0,25 gram üre 25 ml pH=8.2 tamponunda çözüldü.
- ❖ Üreaz enzim çözeltisinin hazırlanması: 1 miligram enzim, 1 ml pH=8.2 tamponunda çözüldü. 50 µl şeklinde 20 eşit parçaya ayrıldı. Kullanımda 2,5 mL pH=8.2 tamponunda çözüldü.

#### **2.4.8. Tirozinaz enzim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler**

- ❖ pH=6.8 tamponun hazırlanması: Antikolinesteraz enzim aktivitesi için hazırlanan Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> çözeltisinden 49 ml, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> çözeltisinden 51 ml alınarak hacmi 200 ml'ye seyreltildi. Hazırlanan çözelti tekrar yarıya seyreltilerek 50 mM'lık çözelti hazırlandı.
- ❖ Tirozinaz enzim çözeltisinin hazırlanması: 1 mg enzim tartılıp, 250 µL 50 mM'lık pH=6.8 fosfat tamponunda çözüldü. 50 µl'lik porsiyonlar halinde ayrıldı. Kullanımda alkol için 50 µl 2 ml tamponda, su için 50 µl 3 ml tamponda çözüldü.
- ❖ L-DOPA'nın hazırlanması: 8,4 mg DOPA 5 ml deiyonize suda çözüldü

#### **2.4.9. İnce tabaka kromatografisinde (İTK) kullanılan çözeltilerin hazırlanması**

- ❖ Serik sülfat belirtecinin hazırlanması: 2,0 g seryum (IV) sülfat 100 mL %10'luk H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>'de çözülerek hazırlandı. Belirteç, uygun çözücü sisteminde yürütülen ince tabaka plaklarına pulvarizatör kullanılarak püskürtüldü.
- ❖ Anisaldehit-sülfürik asit belirtecinin hazırlanması: 0,5 ml anisaldehit, 10 ml glasiyal asetik asit, 65 ml metanol ve 5 ml konsantre sülfürik asit belirtilen sırayla karıştırılarak hazırlanır. Reaktif kullanılmadan önce taze hazırlandı. Belirteç, uygun çözücü sisteminde yürütülen ince tabaka plaklarına pulvarizatör kullanılarak püskürtüldü.

#### **2.5. Aletler ve Diğer Gereçler**

- ❖ Döner buharlaştırıcı (Rotary evaporator)
- ❖ Gaz kromatografisi-Kütle spektroskopisi cihazı (GC/MS) (Varian 2100)

- ❖ Mikroplaka okuyucu (Eliza Reader)
- ❖ Recycle-preparatif analitik HPLC
- ❖ Liyofilizatör
- ❖ UV-IR spektrofotometresi
- ❖ UV lambası
- ❖ Otomatik pipetler (2-20 µL, 10-100µL, 20-200µL, 100-1000µL, 1-5mL)
- ❖ Azot ve Oksijen Tüpleri
- ❖ 96 kuyucuklu mikroplate
- ❖ 96-kuyucuklu mikroplate okuyucu (SpectraMax PC<sup>340</sup>, Molecular Devices, USA).
- ❖ Hassas terazi
- ❖ Buzdolabı
- ❖ Çeker ocak
- ❖ Kurutma etüvü
- ❖ Kromatografi tankı
- ❖ Cam kolonlar
- ❖ Cam pamuğu
- ❖ Vialler
- ❖ Kapiller tüpler
- ❖ Enjektör

## 2.6. Aktivite Belirleme Yöntemleri

### 2.6.1. Antioksidan aktivite belirleme yöntemleri

#### 2.6.1.1. Toplam antioksidan aktivite tayini ( $\beta$ -karoten renk açılımı yöntemi)

*Gyromitra esculenta* örneklerinin antioksidan aktiviteleri  $\beta$ -karoten renk giderim metoduna göre belirlendi (Miller, 1971; Öztürk vd, 2007). 1,00  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyondaki 1 mL'lik örnek içeren mantar ekstrelerinden 40  $\mu\text{L}$  96 well plate kuyucuğuna alındı. Üzerine 160  $\mu\text{L}$   $\beta$ -karoten reaktifi ilave edildi. Başlangıç absorbansları, emülsiyon ( $\beta$ -karoten reaktifi), 96 well plate konur konmaz 96 kuyucuklu mikroplate okuyucuda spektrofotometre kullanılarak 490 nm'de ölçüldü.

Kontrol olarak 40  $\mu\text{L}$  metanol ve 40  $\mu\text{L}$  su kullanıldı. 96 well plate 50 °C'de inkübasyona bırakıldı ve yarımşar saat aralarla okuma yapıldı. Kontrol olarak kullanılan tüpteki  $\beta$ -karotenin rengi kayboluncaya kadar (120 dk) inkübasyona devam edildi.  $\beta$ -Karoten renk açılım hızı (R) , aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t} \quad (2.1)$$

Burada; In= doğal logaritma, a= başlangıç absorbansı, b=  $t$  dakika inkübasyondan sonraki absorbans.  $t = 50$  °C'de ki inkübasyon süresi.

Antioksidan Aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA (\%) = \frac{R_{control} - R_{sample}}{R_{control}} \times 100 \quad (2.2)$$

#### 2.6.1.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi

*Gyromitra esculenta* örneğinden elde edilen ekstrelerin serbest radikal giderim aktivitesi 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) kullanılarak belirlendi (Blois, 1958). 4,00  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyondaki 1 mL'lik örnek içeren mantar ekstrelerinden 40  $\mu\text{L}$  96 well plate kuyucuğuna alındı. Üzerine 160  $\mu\text{L}$  DPPH reaktifi ilave edildi. Kontrol

olarak 40 µL metanol kullanıldı. 96 well plate oda sıcaklığına 30 dk inkübasyona bırakıldı. 30 dakika sonra 517 nm’de 96 kuyucuklu mikroplate okuyucuda absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH}^{\bullet} \text{ giderim aktivitesi (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2.3)$$

Burada;  $A_{\text{control}}$  kontrolün absorbansı  $A_{\text{sample}}$  örneğin absorbansıdır (Blois, 1958). Elde edilen bu absorbans değerlerinden % inhibisyon değerleri hesaplandı.

#### 2.6.1.3. ABTS kationu radikal giderim aktivitesi yöntemi

*Gyromitra esculenta* örneğinden elde edilen ekstrelerin kation radikal giderim aktivitesi, ABTS<sup>•+</sup> kullanılarak belirlendi (Re vd, 1989). ABTS<sup>•+</sup>, 7 mM hazırlanan sulu ABTS çözeltisi ile 2,4 mM potasyum persülfat (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) arasındaki reaksiyonla üretildi. Oda sıcaklığına 12-16 saat karanlıkta bekletildi. 4,00 µg/mL konsantrasyondaki 1 mL’lik örnek içeren mantar ekstrelerinden 40 µL 96 well plate kuyucuğuna alındı. Üzerine 160 µL ABTS<sup>•+</sup> reaktifi ilave edildi. Kontrol olarak metanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübasyondan sonra 734 nm de 96 kuyucuklu mikroplate okuyucuda absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbansları kontrole karşı değerlendirildi. ABTS<sup>•+</sup> giderim aktivitesi aşağıdaki verilen eşitlikle belirlendi:

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ giderim aktivitesi (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2.4)$$

Burada;  $A_{\text{control}}$  kontrolün absorbansı ve  $A_{\text{sample}}$  örneğin absorbansıdır (Re vd. 1999).

#### 2.6.1.4. CUPRAC (bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi

*Gyromitra esculenta* örneğinden elde edilen ekstrelerin bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi CUPRAC metoduna göre belirlendi (Apak vd, 2004). 4,00 µg/mL konsantrasyondaki 1 mL’lik örnek içeren mantar ekstrelerinden 40 µL 96 well

plate kuyucuğuna alındı, üzerine 50 µL 10 mM Cu (II), 50 µL 7,5 mM neokuprin ve 60 µL amonyum asetat tampunu (1M, pH 7,0) eklenerek karıştırıldı. Kontrol olarak metanol kullanıldı. 1 saat bekleme süresinden sonra 450 nm’de absorbanları ölçüldü.

#### 2.6.1.5. Metal bağlama aktivitesi yöntemi

*Gyromitra esculenta* örneğinden elde edilen ekstrelerin metal bağlama aktivitesi Fe(II)-ferrene metoduna göre belirlendi (Decker ve Welch). 40 µL etanol alınarak 96 well plate kuyucuğuna alındı, üzerine 4,00 µg/mL konsantrasyondaki 1 mL’lik örnek içeren mantar ekstrelerinden 40 µL ve üzerine 40 µL 0,2 mM FeCl<sub>2</sub> çözeltisi eklendi. 80 µL 0,5 mM ferene eklenmesiyle reaksiyon başladı. Kontrol olarak metanol kullanıldı. Karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 583 nm’de absorbanları ölçüldü. Metal bağlama aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{Metal Bağlama Aktivitesi (\%)} = \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (2.5)$$

Burada;  $A_{\text{control}}$  kontrolün absorbanı ve  $A_{\text{sample}}$  örneğin absorbanıdır.

#### 2.6.2. Enzim inhibisyonu aktivitesi belirleme yöntemleri

##### 2.6.2.1. Üreaz enzim inhibisyonu aktivite yöntemi

*Gyromitra esculenta* mantarından elde edilen ekstrelerin üreaz enzimi inhibisyonu aktivitesi spektroskopik olarak belirlendi (Khan vd., 2012; Weatherburn,1967). Bu amaçla, 2,00 µg/mL konsantrasyondaki 1 mL’lik örnek içeren mantar ekstrelerinden 10 µL 96 well plate kuyucuğuna alındı. Üzerine, 25 µL 0.01 M pH= 8.2 fosfat tamponundan hazırlanan üreaz enziminden ve üzerine 50 µL 0.01 M pH= 8.2 fosfat tamponundaki üre substrat olarak eklendi. Reaksiyon sonucunda oluşan amonyağın absorbanı Weatherburn (1967)’ün metoduna göre spektroskopik olarak belirlendi. Bunun için oluşan amonyağın üzerine fenol ve sodyumnitropurissit içeren 45 µL fenol

reaktifi ile sodyumhidroksit ve sodyumhipokloröz içeren 70 µL alkali reaktifi eklendi ve 50 dakika sonra 630 nm’de absorbansı ölçüldü (Khan vd., 2012).

#### 2.6.2.2. *Tirozinaz enzim inhibisyon aktivite yöntemi*

*Gyromitra esculenta* mantarından elde edilen ekstrelerin tirozinaz enzimi inhibisyonu aktivitesi L-DOPA substratı ile dopakrom metodu ile spektroskopik olarak belirlendi (Khatib vd, 2005). Bu amaçla 96 well plate kuyucuğuna, 120 µL pH=6,8 fosfat tamponu, 40 µL 2,0 µg/mL konsantrasyondaki mantar örneği, 20 µL tirozinaz enzim çözeltisi, 20 µL L-DOPA çözeltisi eklendi. 37°C’de 10 dakika inkübe edildi ve sonra örneklerin 475 nm’de absorbansları ölçüldü.

#### 2.6.2.3. *Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi*

*Gyromitra esculenta* mantarından elde edilen ekstrelerin asetilkolinesteraz enzimi inhibisyonu aktivitesi spektroskopik olarak belirlendi. Bu amaçla 96 well plate kuyucuğuna 2,0 µg/mL konsantrasyondaki mantar örneğinden 10 µL ilave edildi. Üzerine 0,1 M pH= 8 fosfat tamponundan 160 µL, AChE çözeltisinden 10 µL ilave edildi. Kontrol olarak 10 µL metanol kullanıldı. 25 °C de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 10 µL DTNB çözeltisi ve 10 µL AcI ilave edildi. 412 nm’de 10 dakika kinetik absorbansları ölçüldü (Ellman vd, 1961).

#### 2.6.2.4. *Bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi*

*Gyromitra esculenta* mantarından elde edilen ekstrelerin bütirilkolinesteraz enzimi inhibisyonu aktivitesi spektroskopik olarak belirlendi. Bu amaçla 96 well plate kuyucuğuna 2,0 µg/mL mantar ekstrelerinden 10 µL ilave edildi. Üzerine 0,1 M pH= 8,0 fosfat tamponundan 160 µL, BChE çözeltisinden 10 µL ilave edildi. Kontrol olarak 10 µL metanol kullanıldı. 25°C de 15 dk inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 10 µL DTNB çözeltisi ve 10 µL BuI ilave edildi. 412 nm de 10 dakika kinetik absorbansları ölçüldü (Ellman vd, 1961).

## 2.7. Antikanser Aktivite Yöntemleri

### 2.7.1. Hücre kültürü

-86 °C derecede saklanan HeLa (epithelial cervical cancer cell line) ve MCF-7 (meme kanseri hücre hattı) hücreleri flasklara ekim yapılmak üzere çözündürüldü. Kriyotüpte bulunan hücreler falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 1 ml medyum (HeLa için: %100 RPMI 1640 medium (Gibco) + 10% Fetal Bovine Serum + 2 mM L-glutamin; MCF-7 için: (%100 DMEM + %10 FetalBovine Serum + %1 Antibiyotik) ilave edildi. 3.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek, süpernatant ayrıldı. Dipte kalan hücrelerin üzerine her bir flask için 3,5 ml kendi medyumundan ilave edilip homojen hale getirildikten sonra flasklara ekim yapıldı. 37 °C'de %95 nemli ve %5 CO<sub>2</sub> ortamında 2 gün inkübe edildi. Hücrelerin yeterli sayıya ulaşip ulaşmadığını belirlemek için otomatik hücre sayım cihazından yararlanıldı.

### 2.7.2. Sitotoksitenin belirlenmesi

Sitotoksitenin belirlenmesi için MTT testi kullanıldı. Bileşiklerin *in vitro* koşullarda kanser hücrelerine toksisiteleri spektroskopik olarak 96-kuyucuklu düz tabanlı mikrotiplerde, hücre kültürünün MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium bromit) [Sigma-Aldrich] bileşiği kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, Minimum Essential Medium (MEM)'da hücre kültürü yapıldı ve %10 Fetal Calf Serum (FCS), 1 mmol/L sodyum piruvat, %1 (v/v) antibiyotik/ haftalık hazırlanan antimikotik ve T-75 hücre kültürü balonlarında [Iwaki, Japonya] %0.25 'lik tripsin/EDTA [Sigma-Aldrich] ilavesiyle kültürleri yapıldı. Absorbanslar mikro plaka okuyucusu Spectra Max ve yazılım SoftMax Pro 340 [Molecular Devices] kullanılarak 570 nm dalga boyunda alındı. MTT çözeltisi (5 mg/ ml in PBS) eklenmeden 72 saat önce, hücreler ( $3 \times 10^4$  cells/ml) 200 µL'lik 96 well plate kuyucuklarda mikrotiplerde büyütüldü. Pleytler CO<sub>2</sub> inkübatöründe 4 saat 37°C'de ikübe edildi. Kuyucuğun 180 µl medyumunu, 180 µl of DMSO/metanol (50:50) ile değiştirildi. Hücreleri içeren formazon kristalleri ile mikrotiplerde titratöründe çözeltiler karıştırıldı.



Bütün krisataller çözüldükten sonra 570 nm de okuma yapıldı (Elx 800 microplate reader).

## **2.8. İstatistik Hesaplamalar**

Aktivite test sonuçları 3 paralel testin ortalaması  $\pm$  standart hatası olarak verildi. Sonuçlar student-*t* testine göre % 95 güven sınırları içinde bulundu. Paralel ölçümler arasında anlamlı bir fark görülmedi. En küçük kareler yönteminin kullanıldığı doğrusal regresyon analizi eğim, intersept ve korelasyon katsayılarının değerlendirilmesiyle yapıldı.

## **2.9. Kromatografik Yöntemler**

### **2.9.1. Kolon kromatografisi**

*Gyromitra esculenta* türünün kimyasal olarak çalışmaya yeterli olan ekstrelerinden madde izolasyonu, çiğ aseton, pişirilmiş aseton, çiğ metanol ve pişirilmiş metanol ekstrelerinden silika jel kolon kromatografisi kullanılarak yapıldı. Öncelikle ekstreler fraksiyonlandırıldı. Elde edilen fraksiyonlar tekrar alt-fraksiyonlandırma yapılarak maddeler temizlenerek saflaştırıldı. Bu amaçla fraksiyonlar az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Silika jele emdirilmiş fraksiyon miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 3/5 oranında silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Elüsyona % 100 petrol eteri ile başlandı, ve sırasıyla %5 oranlarda artış ile %100 kloroforma, devamında %5 oranlarda artış ile %100 etilaseta'a ve devamında %10 oranlarda artış ile %100 metanol'e ulaşılarak elüsyon yapıldı. En son %20 su:%80 Metanol ile elüsyon tamamlandı.

## 2.9.2. İnce tabaka kromatografisi

Kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlardan benzer olanları İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemi kullanılarak birleştirildi. Bu amaçla çözücü sistemi olarak, uygun oranlarda hekzan:kloroform (50:50), hekzan:etil asetat (60:40); kloroform:aseton (70:30); kloroform:metanol (90:10); kloroform:toluen:metanol (10:15:2) karışımları halinde hazırlandı ve polariteye uygun karışım İTK'da kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel ve floresans katılmış İTK (Merck-5554) ile C<sub>18</sub> emdirilmiş adsorban (Merck – 105559, 60 RP-18 F<sub>254</sub>s) kullanıldı. Ayrıca, bazı maddeleri saflaştırmak için de preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

### 2.9.2.1. Preparatif-recycle HPLC çalışma şartları

*Gyromitra esculenta* mantarının pişirilmiş metanol ekstresinden elde edilen GEC3 37-39 ve GEC3 49-51 kodları verilen 10. ve 13. fraksiyonlarından madde saflaştırmak için laboratuvarımızda bulunan Preparatif-recycle HPLC cihazı kullanıldı.

Kolon: ODS–L–80, C<sub>18</sub> kolon (250 x 20 mm ID; partikül çapı 5 µM)

Dedektörler: UV ve Refraktif İndeks

Çözücü: Metanol-Su (8:2)

Kolon basıncı: 4 MPa

Toplam akış hızı: 4.00 mL/dk

Kolon akış hızı: 4.00 mL/dk

Enjeksiyon miktarı: 3 mL

## 2.10. Spektroskopik Yöntemler

### 2.10.1. Gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi (GC-MS) yağ asidi analizi

*Gyromitra esculenta* mantarından elde edilen ekstrelerin kromatografik olarak fraksiyonlandırılmalarıyla ortaya çıkan yağimsı özellik gösteren bazı fraksiyonların

yağ asidi içerikleri GC-MS ile çalışıldı. Bu amaçla, çiğ aseton ekstresinin yağimsı fraksiyonları olan GEN-A-21 (GEN2-20 ile GEN2-21 fraksiyonlarının birleştirilmesi ile elde edilmiş ve GEN-A-21 kodu verilmiş fraksiyon) ile GEN-A-42 (GEN2-42 ile GEN2-47 fraksiyonlarının birleştirilmesi ile elde edilmiş ve GEN-A-42 kodu verilmiş fraksiyon), çiğ metanol ekstresinin yağimsı fraksiyonları olan GEN-M-26 ve pişirilmiş metanol ekstresinin yağimsı fraksiyonu olan GEC-M-11 (GEC-M-11 ile GEC-M-13 fraksiyonlarının birleştirilmesi ile elde edilmiş ve GEC-M-11 kodu verilmiş fraksiyon)'in yağ asidi içeriklerinin belirlenmesi amacıyla GC-MS (Varian 2100T) kullanıldı. Bu amaçla, yukarıda kodları verilen fraksiyonların her birinden ayrı ayrı 1 g tartıldı ve 2 ml 0,5 N metanollü NaOH ile çözülülerek su banyosunda 50°C'de karıştırılarak ısıtıldı. Üzerine 2 ml BF<sub>3</sub>: MeOH reaktifi eklendi ve 80°C'de 2 dakika tutuldu. Daha sonra soğumaya bırakılarak doymuş NaCl çözeltisiyle 25 ml'ye tamamlandı. Hekzan ile ekstraksiyon işlemi yapılarak örnek GC-MS'e verilmek üzere analize hazır hale getirildi. Bileşenlerin aydınlatılmasında Nist 2005 kütüphane verileri kullanıldı. Ayrıca bileşenlerin alıkonma süreleri göz önüne alınarak ve kovats indeks değerleri hesaplanarak karakterizasyonları desteklendi. Buna ilave olarak, aynı şartlarda standart maddeler kolonda yürütüldü ve alıkonulma zamanları ile yağ asidi bileşenleri karşılaştırıldı. GC-MS analiz şartları Çizelge 2.1.'de verilmektedir.

### **2.10.2. Gaz kromatografisi- kütle spektroskopisi (GC-MS) şeker profili analizi**

GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin yapısını aydınlatabilmek amacıyla; bu maddeden 1 mg tartıldı. Üzerine 50 µl susuz piridin ve 75 µl bis(trimetilsilil)trifloroasetamit eklendi. Etüvde 80°C'de 30 dakika tutuldu. Çözünen madde üzerine 30 µl kadar hekzan eklenmesiyle GC-MS'e verilmek üzere hazır hale getirildi. GC-MS şartlar Çizelge 2.1'de verilmektedir.

**Çizelge 2-1. GC-MS Analiz Şartları**

Kolon	DB-5 kapiler kolon (30 m x 0,32mm- 0,25µm)
Taşıyıcı Gaz	He
Enjeksiyon sıcaklığı	250°C
Kolon sıcaklığı	<i>Yağ asitleri için:</i> Fırın sıcaklığı 100°C de 5 dakika bekletildi. 238°C' ye 3°C/dk hızla çıkarıldı ve 238°C'de 9 dakika bekletildi. <i>Şeker Analizleri için:</i> Fırın sıcaklığı 100°C de 5 dakika bekletildi. 150 °C' ye 5°C/dk hızla çıkarıldı ve 240 °C'de 20 dakika bekletildi.
Split Oranı	1:20
İyon Kaynağı sıcaklığı	180 °C
Elektron enerjisi	70 Ev
Kütle aralığı	28-650 m/z
Scan aralığı	0,01
Enjeksiyon miktarı	0,2 µL

### 2.10.3. Nükleer manyetik rezonan spektroskopisi (NMR)

Kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT, COSY, HMQC, HMBC, MS spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform (CDCl<sub>3</sub>), döterometanol (CD<sub>3</sub>OD) ve döterodimetilsülfoksit (CD<sub>3</sub>SOCD<sub>3</sub>) kullanıldı. Bu spektroskopik çalışmalar Çankırı Karatekin Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı Merkezi NMR Laboratuvarı ve International Center for Chemical Sciences - H.E.J. Research Institute of Chemistry, Karachi, Pakistan'da yapıldı.

#### **2.10.4. Kütle spektroskopisi**

Elektron impact (EI) ve hızlı atom bombardımanı-kütle spektroskopisi (FAB<sup>+</sup>MS) yöntemleri kullanılarak saf maddelerin spektrumları alındı. Bu spektrumlar International Center for Chemical Sciences - H.E.J. Research Institute of Chemistry, Karachi, Pakistan ve TUBITAK UME, Kimya Bölümünde alındı.

#### **2.10.5. FTIR spektroskopisi**

Saflaştırılmış olan maddelerin, 400-4000 dalga sayısı arasında, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kimya Bölümü'nde bulunan FTIR cihazı ile IR spektrumları çekildi.

#### **2.10.6. UV-VIS spektroskopisi**

Saflaştırılmış olan maddelerin, 200-800 dalga boyları arasında, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Kimya Bölümü'nde bulunan UV-VIS cihazı (Shimadzu UV-VIS 1601) ile UV spektrumları çekildi.

### 3. BULGULAR VE İRDELEME

#### 3.1. Ekstraksiyon İşlemleri ve Verimleri

Kurutulmuş çiğ ve pişirilmiş *Gyromitra esculenta* mantarı sırasıyla petrol eteri, aseton, metanol ile ekstre edildi. Geri kalan kalıntının sıcak su ile infüzyonu alındı. Soğutulan infüzyonun üzerine hacminin 3 katı kadar etanol eklenerek etanolde çözünmeyen maddeler çöktürüldü. Çöktürülen ekstreye HWEP, çözünen kısma ise HWES kodu verildi. Elde edilen ekstre verimleri Çizelge 3.1’de verilmektedir.

Çizelge 3-1. *Gyromitra esculenta*’nın çiğ ve pişirilmiş materyallerinden elde edilen ekstre verimleri

MANTAR EKSTRELERİ		Çiğ Mantar (1384,5 g)			Pişirilmiş Mantar (426,3 g)		
		Örnek KODU	Ekstre Miktarı (g)	% VERİM	Örnek KODU	Ekstre Miktarı (g)	% VERİM
Organik Ekstreler	Petrol eteri	GEN1	11,2	%0,81	GEC1	5,04	%0,36
	Aseton	GEN2	9,14	%0,66	GEC2	5,84	%1,37
	Metanol	GEN3	42,1	%4,80	GEC-3	25,1	%7,99
Su Ekstreleri	Su ekstreleri						
	HWEP	GEN-HWEP	47,7	%3,44	GEC-HWEP	24,6	%5,77
	HWES	GEN-HWES	34,1	%2,46	GEC-HWES	65,5	%15,4

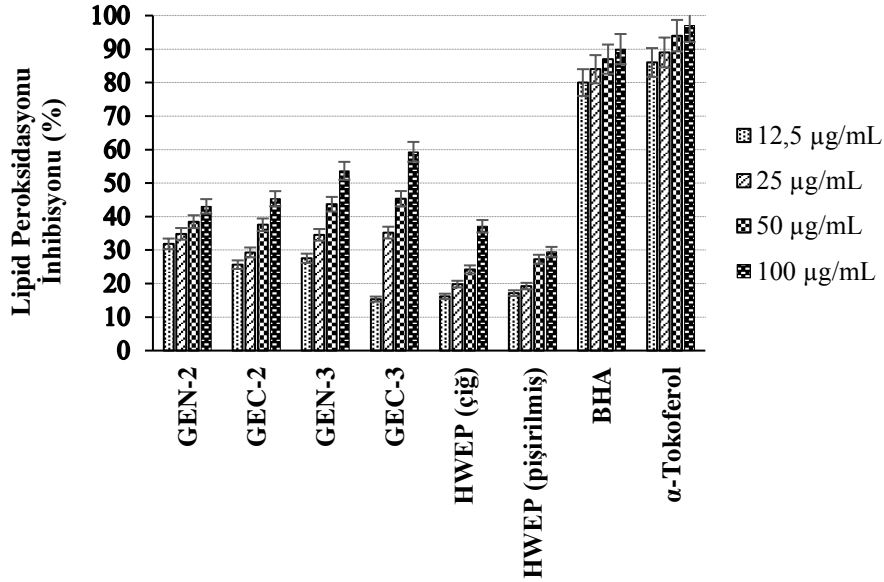
#### 3.2. Biyoaktivite Sonuçları

##### 3.2.1. Antioksidan aktivite sonuçları

###### 3.2.1.1. $\beta$ -Karoten-linoleik asit yöntemi sonuçları

*Gyromitra esculenta* 'dan artan polaritedeki çözücülerle elde edilen ekstreleri ile standart antioksidanların lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi  $\beta$ -karoten-linoleik asit sistemiyle belirlendi. Sonuçlar Şekil 3.1’de verilmektedir. Sonuçlara göre

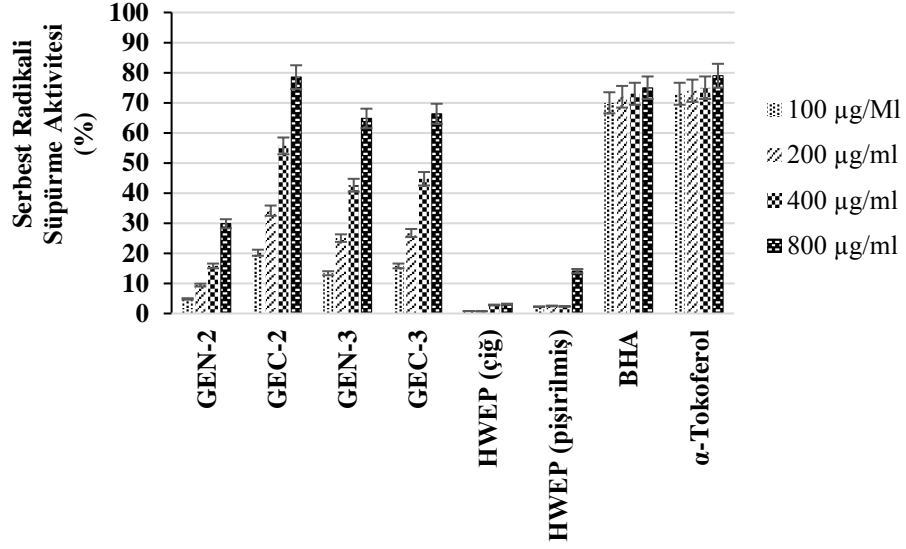
tüm ekstrelerin konsantrasyonlarının artışına paralel olarak antioksidan aktivitelerinin de arttığı görülmektedir. Çiğ ve pişirilmiş örneklerin metanol ekstreleri, 100 µg/ml konsantrasyonda %50'den fazla inhibisyon göstererek, standarda en yakın aktivite verdiler. Her iki aseton ekstresi de metanol ekstrelerinden sonra yüksek aktivite göstermektedir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. *Gyromitra esculenta* ekstrelerinin ve standartların β-karoten-linoleik asit yöntemiyle lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (% İnhibisyon, n=3, p<0,05)

### 3.2.1.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yöntemi sonuçları

*Gyromitra esculenta*'nın ekstrelerinin ve antioksidan standartların serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. Ekstre ve standartların serbest radikal giderim aktivitesi Şekil 3.2'de verilmektedir. Pişirilmiş aseton ekstresinin (GEC2) 800 µg/ml konsantrasyonda %78,53 inhibisyon gösterdi. Aynı konsantrasyonda standartlar ise (BHA ve α-tokoferol) %75,01- %79,02 inhibisyon aktivitesi gösterdiler. Çiğ ve pişirilmiş metanol ekstreleri aynı konsantrasyonda sırasıyla %64,81 ve %66,36 inhibisyon değerleri de standartlara yakın inhibisyon değerleri göstermektedir.

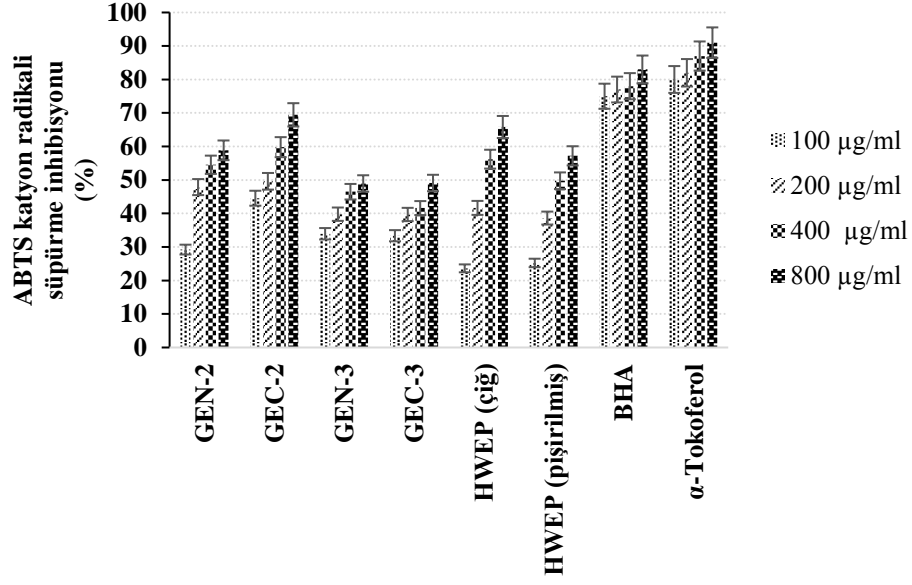


Şekil 3.2. *Gyromitra esculenta* ekstralarının ve standartların DPPH yöntemiyle serbest radikali süpürme aktivitesi (% İnhibisyon,  $n=3, p<0,05$ )

### 3.2.1.3. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi sonuçları

*Gyromitra esculenta*'dan elde ettiğimiz ekstraller ile kontrol gruplarının katyon radikali giderim aktivitesi, ABTS katyon radikali kullanılarak belirlendi. Ekstre ve standartların katyon radikali giderim aktivitesi Şekil 3.3'de verilmiştir. Sonuçlara göre tüm ekstrallerin konsantrasyonlarının artışına paralel olarak katyon radikali giderim aktivitesinin de arttığı görülmektedir. Özellikle pişirilmiş aseton ile elde edilen ekstrenin diğerlerine nazaran çok yüksek aktivite gösterdiği söylenebilmektedir. 400 µg/ml ve 800 µg/ml konsantrasyonlarda pişirilmiş aseton ekstresi %59,81 ve %69,45 inhibisyonlar vererek standartlara yakın bir katyon radikali giderim aktivitesi gösterdiler. Ayrıca çiğ ve pişirilmiş su ekstralleri ile çiğ aseton ekstresinin 800 µg/ml konsantrasyonda standarda yakın bir sonuç verdiği izlendi. Bu sonuçlar, *G. esculenta*'nın ABTS katyon radikali süpürme aktivitesinin yüksek olduğunu ortaya koymaktadır.

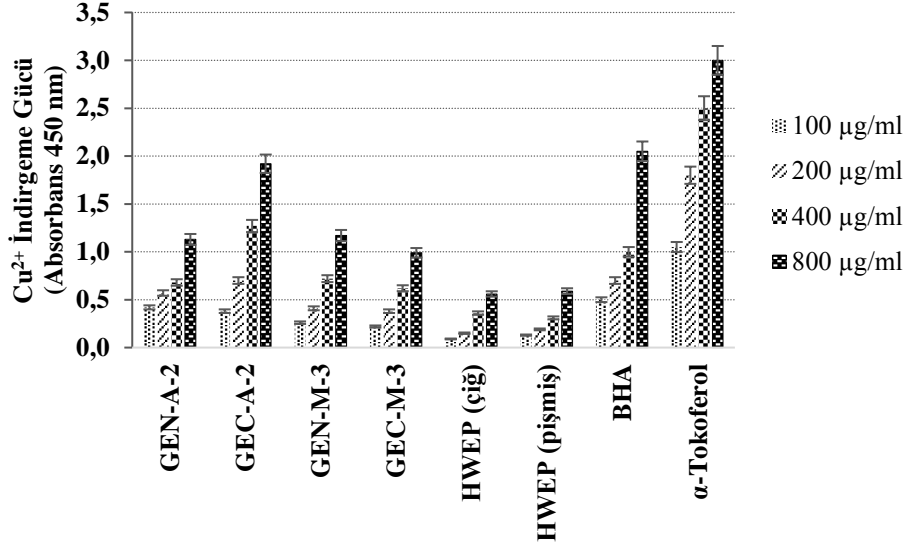




Şekil 3.3. *Gyromitra esculenta* ekstralarının ve standartların ABTS katyon radikali süpürme aktivitesi (% İnhibisyon,  $n=3, p<0,05$ )

#### 3.2.1.4. CUPRAC yöntemi sonuçları

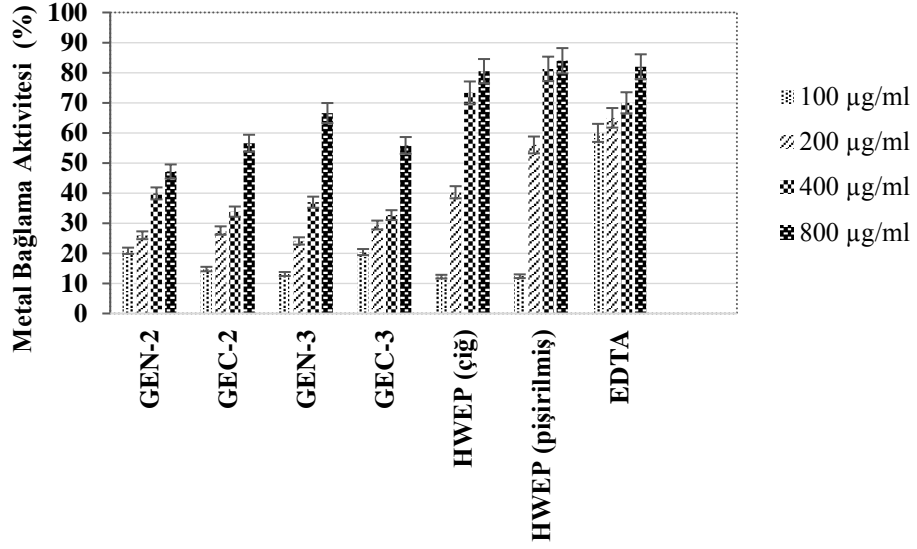
*Gyromitra esculenta*'nın ekstralarının ve antioksidan standartların indirgeme gücü CUPRAC yöntemi ile belirlendi. Bu yöntemde Cu (II)'nin indirgenmesiyle oluşan Cu (I)'in Neokuprin ile yaptığı kompleksin 450 nm dalga boyundaki absorbanı ölçülür. Yüksek absorban örneğin yüksek indirgeme gücüne dolayısı ile yüksek antioksidan kapasitesine sahip olduğunu gösterir. *Gyromitra esculenta*'nın tüm ekstre ve standartların aktiviteleri Şekil 3.4'de verilmiştir. Sonuçlara göre, çiğ aseton, çiğ metanol ve pişirilmiş metanol ekstraları aynı oranlarda indirgeme gücü gösterdiler. 800µg/ml konsantrasyonda pişirilmiş aseton ekstresi 1,92 absorban göstererek standarda en yakın aktivite verdi. Tüm ekstralar arasında en iyi antioksidan kapasitesi bu ekstreye aittir.



Şekil 3.4. *Gyromitra esculenta*'nın ekstreleri ve standartların  $\text{Cu}^{+2}$  indirgeme gücü (% İnhibisyon,  $n=3$ ,  $p<0,05$ )

#### 3.2.1.5. *Gyromitra esculenta*'nın metal bağlama aktivite sonuçları

*G. esculenta*'dan elde ettiğimiz ekstreler ve standartların metal bağlama aktivitesi Şekil 3.5'de verilmektedir. Buna göre çiğ ve pişirilmiş su ekstreleri 800 µg/ml konsantrasyonda sırasıyla %80,36 ve %83,25 inhibisyon göstererek standart olarak kullanılan EDTA ile yarışmaktadırlar. Daha yüksek oranda metal bağlama aktivitesi olduğu açıkça görülmektedir. Metanol ekstreleri de su ekstreleri kadar olmasa da metal bağlamada ikinci sırada gösterilmektedir.

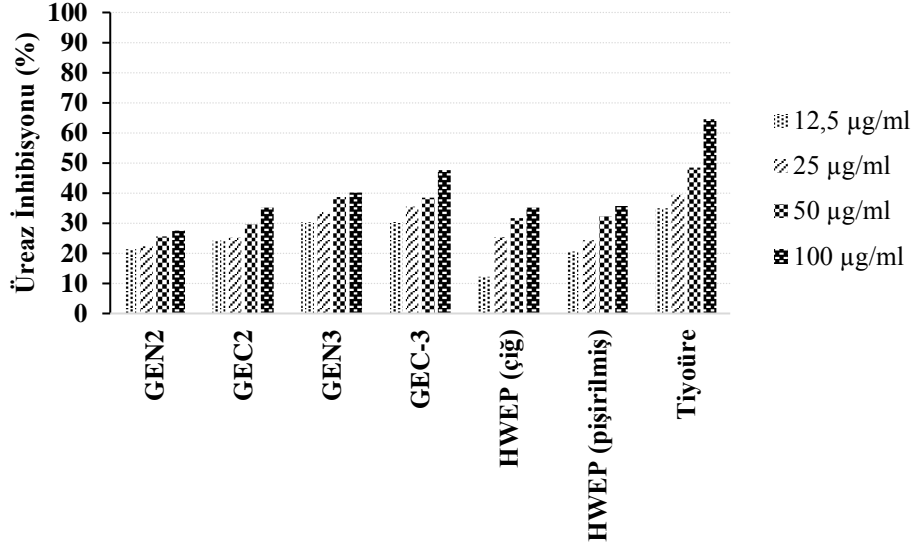


Şekil 3.5. *Gyromitra esculenta*'nın ekstreleri ve standartların metal bağlama aktivitesi (% İnhibisyon,  $n=3, p<0,05$ )

### 3.2.2. Enzim inhibisyonu aktivitesi sonuçları

#### 3.2.2.1. Üreaz enzimi inhibisyonu aktivitesi sonuçları

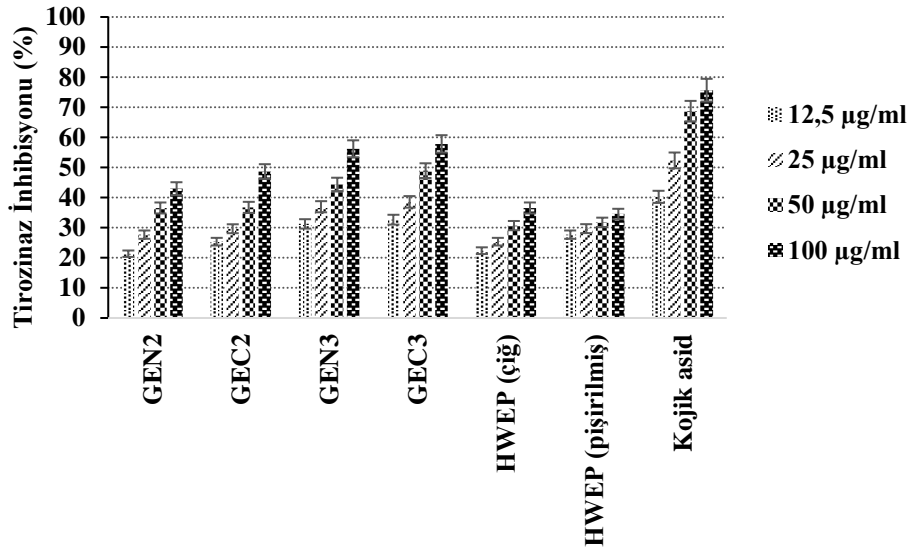
*G. esculenta*'nın çiğ ve pişirilmiş su, aseton ve metanol ekstrelerinin üreaz enzim inhibisyon aktivite sonuçlarına göre tüm ekstrelerin pişirilmiş halinin aktivitelerinin; çiğ ekstrelerin inhibisyon aktivitelerine göre daha yüksek olduğu görüldü. (Şekil 3.6) Standart tiyüre ile karşılaştırıldığında metanol ekstrelerinin, ekstreler arasında yüksek aktivite gösterdiği izlendi. Özellikle 25 µg/ml konsantrasyonda pişirilmiş metanol ekstresinin inhibisyonu %35,48 iken tiyürenin aynı konsantrasyonda %39,4 inhibisyon gösterdiği izlendi. Bu sırayı her iki aseton ekstresi takip etti.



Şekil 3.6. *Gyromitra esculenta*'nın ekstraları ve standartların üreaz enzimi inhibisyonu aktivitesi (% İnhibisyon,  $n=3, p<0,05$ )

### 3.2.2.2. Tirozinaz enzim inhibisyonu aktivitesi

*G. esculenta*'nın tirozinaz enzim aktivitesi sonuçları Şekil 3.7'de verilmektedir. Standart olarak kojik asit kullanıldı. Ekstreler arasında pişirilmiş metanol ekstresi (GEC3) en yüksek aktivite verdi. Bunu çiğ ve pişirilmiş metanol ekstraları izledi.

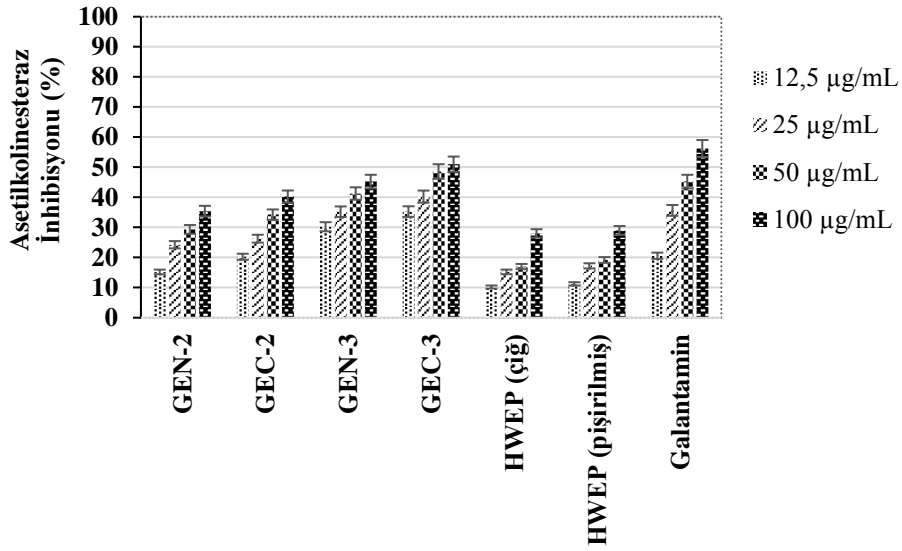


Şekil 3.7. *Gyromitra esculenta*'nın ekstraları ve standartların üreaz enzimi inhibisyonu aktivitesi (% İnhibisyon,  $n=3, p<0,05$ )

### 3.2.2.3. Antikolinesteraz aktivitesi sonuçları

#### Asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon aktivitesi sonuçları

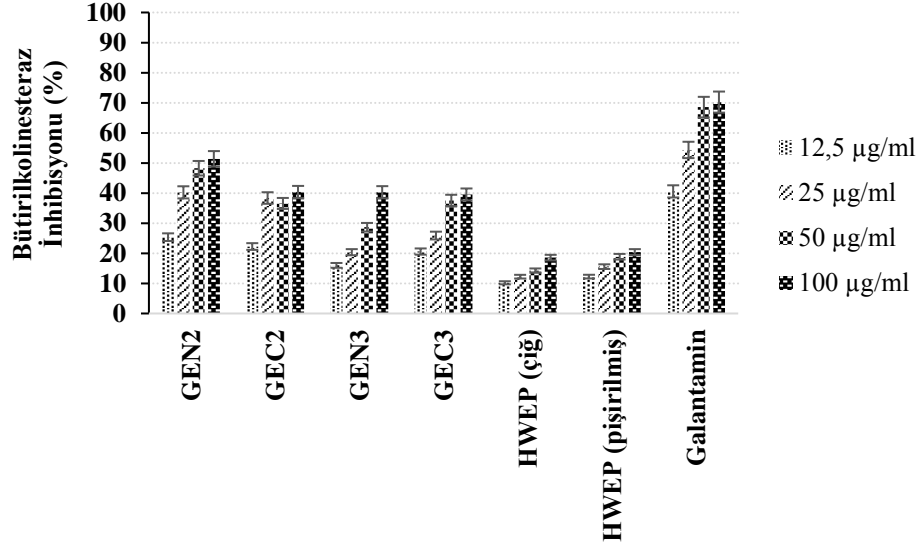
*G. esculenta*'nın ekstreleri ile standart galantaminin asetilkolinesteraz enzimi inhibisyon aktivitesi Şekil 3.8'de verilmektedir. Buna göre konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibisyon aktivitesinin de arttığı görüldü. Metanol ekstreleri tüm ekstreler arasında en iyi aktivite verdiler. Su ekstreleri düşük aktivite gösterdiler.



Şekil 3.8. *Gyromitra esculenta* ekstrelerinin ve standartların asetilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri (% İnhibisyon,  $n=3$ ,  $p<0,05$ )

#### Bütirilkolinesteraz enzimi inhibisyon aktivitesi sonuçları

*G. esculenta*'nın ekstreleri ile standart galantaminin bütirilkolinesteraz enzimi inhibisyon aktivitesi Şekil 3.9'de verilmektedir. Buna göre konsantrasyon artışına bağlı olarak inhibisyon aktivitesinin de arttığı görüldü. Çiğ aseton ekstresi tüm ekstreler arasında en iyi aktivite verdi (100 µg/ml'de %51,8). Her iki metanol ekstresi de ılımlı bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi gösterdi. Su ekstreleri düşük aktivite gösterdiler.

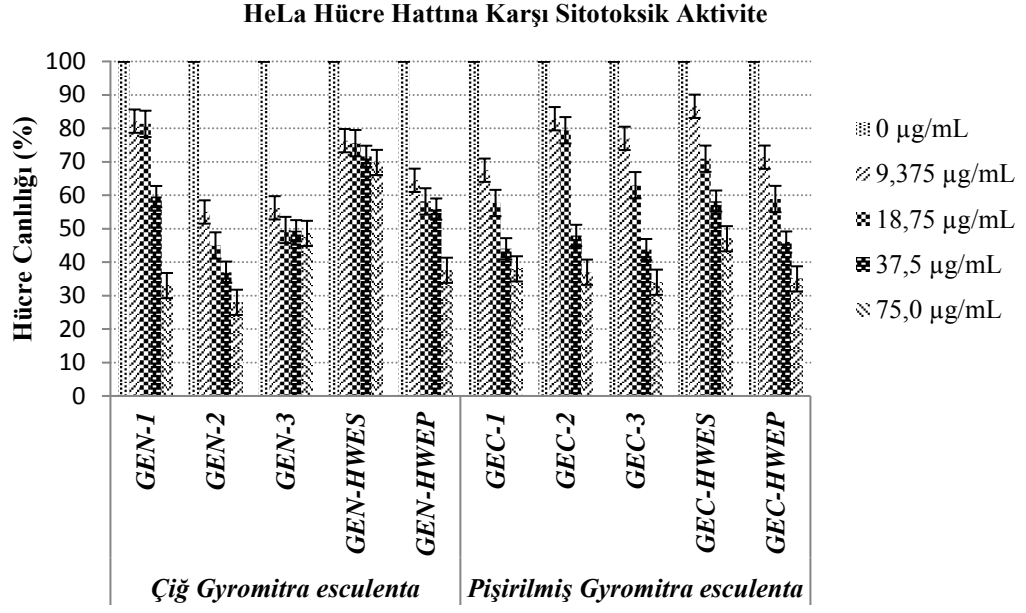


Şekil 3.9. *Gyromitra esculenta* ekstralarının ve kontrol gruplarının bütirikolinesteraz inhibisyonu aktiviteleri ( $n=3, p<0,05$ )

### 3.2.3. Sitotoksik Aktivite Sonuçları

#### 3.2.3.1. *Gyromitra esculenta*'nın HeLa hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi

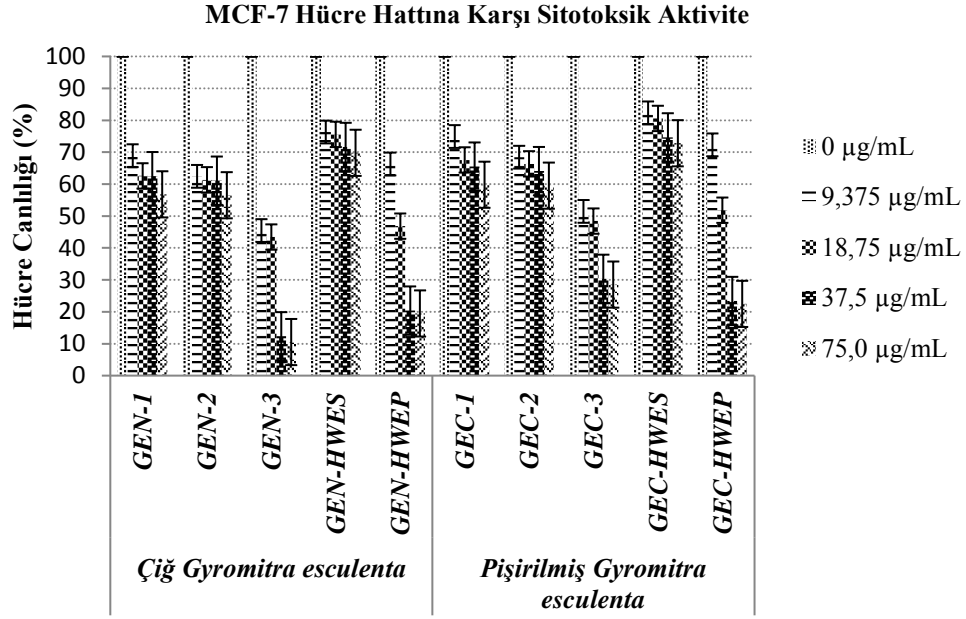
HeLa hücre hattına karşı tüm örneklerde artan konsantrasyonla hücre canlılığının azaldığı izlenmektedir. Aktivite sırası aseton > metanol > HWEP > petrol eteri > HWES olarak azalmaktadır. Aseton ve metanol ekstralarının  $IC_{50}$  değerleri sırası ile 11,98 ve 46,55 µg/ml bulundu (Şekil 3.10). Pişirilmiş mantarın aseton ekstresinin sitotoksik aktivitesi pişirilmemiş ekstrenin sitotoksik aktivitesinden daha düşük bulundu (Şekil 3.10). Ancak, metanol ekstralarında ise anlamlı farklılık görülmedi. Pişirilmiş olan mantarın aseton ve metanol ekstralarının  $IC_{50}$  değerleri sırası ile 51,28 ve 42,33 µg/ml hesaplandı.



Şekil 3.10. *Gyromitra esculenta* mantarının ekstralarının HeLa hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi (% Hücre canlılığı,  $n=3$ ,  $p<0,05$ )

### 3.2.3.2. *Gyromitra esculenta* 'nın MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi

*Gyromitra esculenta* mantarının ekstlerinin tümünde artan konsantrasyonla hücre canlılığının azaldığı izlenmektedir. Aktivite sırası metanol> HWEP> petrol eteri> aseton> HWES olarak azalmaktadır. Metanol ve HWEP ekstralarının  $IC_{50}$  değerleri sırası ile 7,98 ve 17,20 µg/ml bulundu (Şekil 3.11). Pişirilmiş mantarın metanol ve HWEP ekstresinin sitotoksik aktivitesi pişirilmemiş ekstraların sitotoksik aktivitesinden daha düşük olduğu görüldü (Şekil 3.11). Pişirilmiş olan mantarın metanol ve HWEP ekstralarının  $IC_{50}$  değerleri sırası ile 9,28 ve 24,41 µg/ml hesaplandı.



Şekil 3.11. *Gyromitra esculenta* mantarının ekstralarının MCF-7 hücre hattına karşı sitotoksik aktivitesi (% Hücre canlılığı,  $n=3, p<0,05$ )

### 3.3. Aktivite Sonuçlarının Genel Değerlendirilmesi

*G. esculenta*'dan elde edilen ekstralar üç farklı biyoaktivite ile incelendi. Bu biyoaktiviteler antioksidan aktivite, enzim inhibisyon aktivitesi ve sitotoksik aktivitedir. Ekstrelerin içerdikleri karmaşık bileşenlerin yapısı itibarıyla hatalı sonuçlar elde etmemek için aktivite bir kaç metotla denendi. Farklı metotlarla yapılan antioksidan aktivite sonuçlarına göre metanol ve aseton ekstraları, diğer ekstralara göre daha yüksek aktivite verdiler. Sadece metal bağlama aktivitesinde su ekstraları, diğer ekstralardan daha yüksek aktiviteye sahiptirler. Metal bağlama aktivitesi sekonder bir antioksidan aktivite metodu olduğundan ve diğer dört aktivitede birbirini desteklediğinden dolayı metanol ve aseton ekstralarının kimyasının çalışılması antioksidan aktivite sonuçlarına göre uygun bulundu.

Dört farklı enzime karşı test edilen ekstralardan aseton ve metanol ekstraları kimyalarının çalışılması için uygun bulundu. Bu enzim inhibisyon aktivitelerinde de sırasıyla metanol ve aseton ekstraları aktivite gösterdiler.

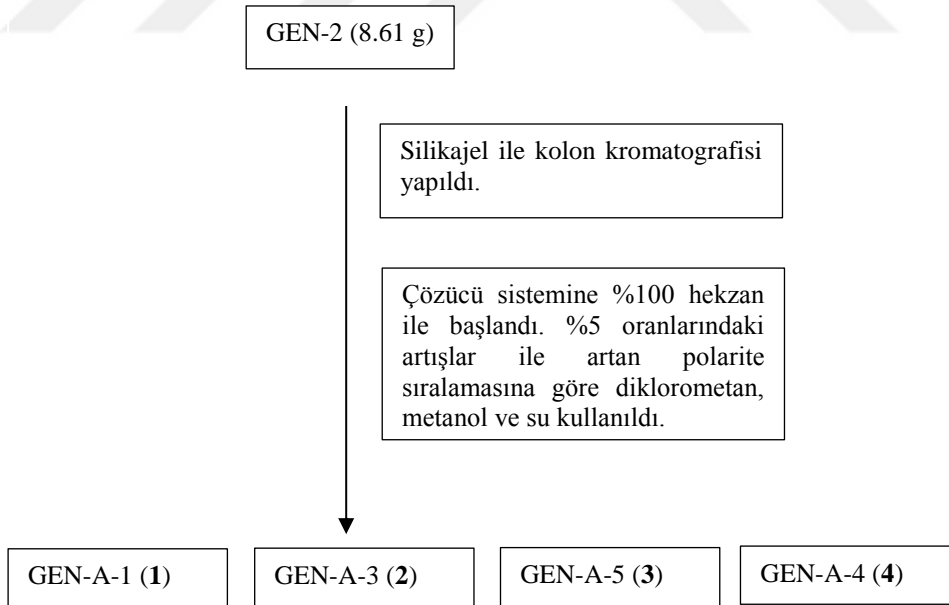


Antioksidan aktivite ve enzim inhibisyon aktiviteleri sonuçlarını sitotoksik aktivite de destekledi. Her iki kanser hücre hattına karşı yapılan test sonuçları sırası ile metanol ile aseton ekstrelerinden sitotoksik maddelerin izole edilebileceği kanısını oluşturdu.

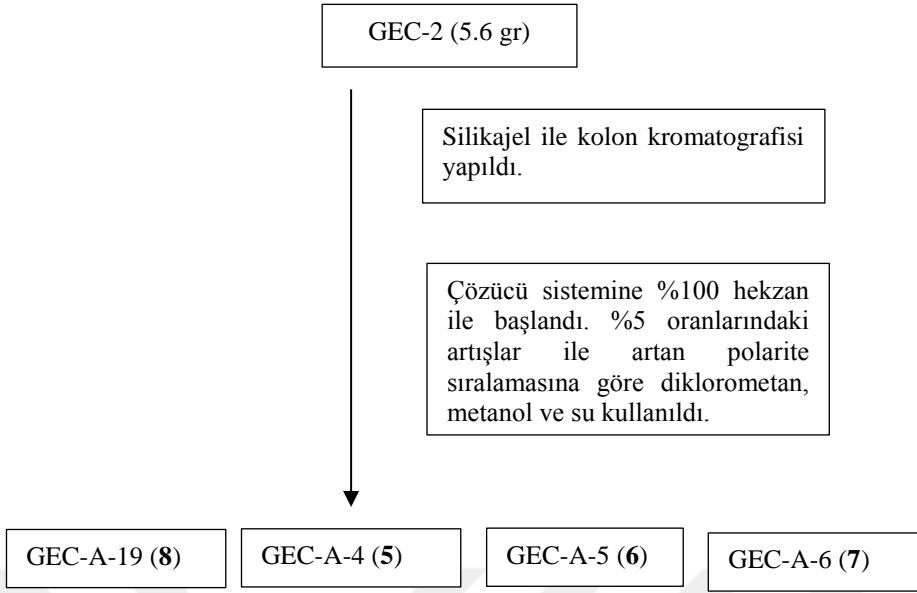
Tüm bu üç aktivite sonuçlarına göre, hem pişirilmiş hem de çiğ materyallerden elde edilen aseton ve metanol ekstrelerinin kimyasının çalışılması gerekliliği ortaya kondu.

### 3.4. *Gyromitra esculenta*'nın Aseton Ekstrelerinin Fraksiyonlandırılması

*Gyromitra esculenta* türünün çiğ materyalinin aseton ekstresi (GEN2) silika jel içeren kolonda fraksiyonlandırıldı. Elüsyona % 100 petrol eteri ile başlandı ve elüsyona % 5 çözücü polaritesi artırılarak sırasıyla kloroform, aseton ve metanol ile devam edildi, % 100 metanole ulaşıncaya elüsyon tamamlandı. İTK ile benzer fraksiyonlar birleştirildi ve 9 fraksiyon elde edildi (Çizelge 3.2) Pişirilmiş materyalin aseton ekstresi (GEC2) silika jel kolon ile fraksiyonlandırıldı ve benzer fraksiyonlar birleştirilerek 10 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonların miktarları ve verimleri Çizelge 3.3' de verilmektedir.



Şekil 3.12. GEN-A-1 (1), GEN-A-3 (2), GEN-A-5 (3) ve GEN-A-4 (4) kodlu saf maddelerin izolasyonu şeması



Şekil 3.13. GEC-A-4 (5), GEC-A-5 (6), GEC-A-6 (7) ve GEC-A-19 (8) kodlu saf maddelerin izolasyonu şeması

#### 3.4.1. Çiğ aseton ekstresi üzerine yapılan kimyasal çalışmalar

Çizelge 3.2’de *Gyromitra esculenta* türünün çiğ aseton ekstresinin fraksiyonlandırılması ile elde edilen fraksiyonların isimleri ve verimleri verilmektedir. Bu fraksiyonlardan maddeler aşağıda anlatıldığı gibi elde edildi.

Fraksiyonlardan madde izolasyonu için kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı. Fraksiyonlar az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Silika jele emdirilmiş fraksiyon miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 3/5 oranında silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla %5 oranlarda artış ile %100 kloroforma, devamında %5 oranlarda artış ile %100 etilasetat’a ve devamında %10 oranlarda artış ile %100 metanol’e ulaşılarak elüsyon yapıldı. En son %20su: %80 metanol ile elüsyon tamamlandı.

Çizelge 3-2. *Gyromitra esculenta*'nın çiğ aseton ekstralarının fraksiyonları, miktarları ve % verimleri

Çiğ <i>G. esculenta</i> (GEN-2) 8.61 gr				
	Fraksiyon Adı	Miktarı (mg)	% verim	Elde Edilen Maddeler
1	GEN2 1-21	31,5	0,36	GEN-A-21/GC kodu ile yağ asidi analizi için GC-MS'e verildi.
2	GEN2 22-26	274	0,31	GEN-A-1 (1) (78,6 mg)
3	GEN2 27	14,6	0,16	
4	GEN2 28	40,8	0,14	GEN-A-5 (3) (5 mg)
5	GEN2 29-32	8,2	0,08	
6	GEN2 33-39	12,1	0,13	
7	GEN2 40-47	23,9	0,27	GEN-A-42/GC kodu ile yağ asidi analizi için GC-MS'e verildi.
8	GEN2 48-65	37,4	0,43	GEN-A-3 (2) (30 mg) ve GEN-A-4 (4) (8,5 mg)
9	GEN 66-68	36,7	0,44	
10	GEN2 69-94	27,2	0,31	

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemleri kullanılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu amaçla çözücü sistemi olarak, uygun oranlarda hekzan: kloroform (50:50), hekzan: etilasetat (60:40); kloroform: aseton (70:30); kloroform: metanol (90:10); kloroform: toluen: metanol (10:15:2) karışımları hazırlanarak ve polariteye uygun karışım İTK'da kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel ve floresans katılmış İTK (Merck-5554) kullanıldı. *Gyromitra esculenta* türünün çiğ aseton ekstresinin (GEN2) silika jel kolon ile fraksiyonlandırılması ve benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucunda toplamda 9 fraksiyon (Çizelge 3.2) elde edildi.

Elüentler 10 ml hacimlerde viallere toplandı ve ince tabaka kullanarak saf maddeler tespit edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEN2 ekstresinin 2. fraksiyonunun (GEN2 22-26) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile GEN-A-1 (1) saf maddesi izole edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEN2 ekstresinin 4. fraksiyonun (GEN2 28) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile elde edilen fraksiyonlardan en temiz ve miktarı uygun olan GEN2 28 (21-22) kodlu alt fraksiyon tekrar silikajel kolon kromatografisi yapılarak GEN-A-5 (3) maddesi saflaştırıldı.

İTK'da net spotlar veren ve GEN2 ekstresinin 8. fraksiyonun (GEN2 48-65) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile GEN-A-3 (2) ve GEN-A-4 (4) saf maddeleri izole edildi.

Saflaştırılan 4 maddenin (1-4) yapıları <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT90, DEPT135, HMBC, HSQC ve MS analizleri yardımı ile aydınlatıldı.

### 3.4.2. Pişirilmiş aseton ekstresi üzerine yapılan kimyasal çalışmalar

Çizelge 3.3'de *Gyromitra esculenta* türünün pişirilmiş aseton ekstresinin fraksiyonlandırılması ile elde edilen fraksiyonların isimleri ve verimleri verilmektedir. Bu fraksiyonlardan maddeler aşağıda anlatıldığı gibi elde edildi.

Fraksiyonlardan madde izolasyonu için kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı. Fraksiyonlar az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Silika jele emdirilmiş fraksiyon miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 3/5 oranında silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla %5 oranlarda artış ile %100 kloroforma, devamında %5 oranlarda artış ile %100 etilasetat'a ve devamında %10 oranlarda artış ile %100 metanol'e ulaşılarak elüsyon yapıldı. En son %20 su: %80 Metanol ile elüsyon tamamlandı.

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemleri kullanılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu amaçla çözücü sistemi olarak, uygun oranlarda hekzan: kloroform (50:50), hekzan: etilasetat (60:40); kloroform: aseton (70:30); kloroform: metanol (90:10); kloroform: toluen: metanol (10:15:2) karışımları hazırlanarak ve polariteye uygun karışım İTK'da kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel ve floresans katılmış İTK (Merck-5554) kullanıldı. *Gyromitra esculenta* türünün pişirilmiş aseton

ekstresinin (GEC2) silika jel kolon ile fraksiyonlandırılması ve benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucunda toplamda 8 fraksiyon (Çizelge 3.3) elde edildi.

**Çizelge 3-3. *Gyromitra esculenta*'nın pişirilmiş aseton ekstraktlarının fraksiyonları, miktarları ve % verimleri**

<b>Pişirilmiş <i>G. esculenta</i> (GEC-2) 5.6 gr</b>				
<b>Fraksiyon Adı</b>		<b>Miktarı (mg)</b>	<b>% verim</b>	<b>Elde Edilen Madde</b>
1	GEC2 1-21	120	0,23	GEC-A-6 (7) (2,2 mg)
2	GEC2 22-26	142	0,25	GEC-A-22/GC kodu ile yağ asidi analizi için GC-MS'e verildi.
3	GEC2 26-28	510,5	0,91	GEC-A-4 (5) (1,6 mg) ve GEC-A-5 (6) (4,1 mg)
4	GEC2 28-30	610,1	1,09	
5	GEC2 31	133,5	0,23	
6	GEC2 32	114,7	0,20	
7	GEC2 33	68,7	0,12	
8	GEC2 34	421,3	0,75	
9	GEC2 35-41	808	0,14	GEC-A-19 (8) (1,52 mg)
10	GEC2 42-44	726	0,13	

Elüentler 10 ml hacimlerde viallere toplandı ve ince tabaka kullanarak saf maddeler tespit edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEC2 ekstresinin 3. fraksiyonunun (GEC2 26-28) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile GEC2 26-28'in 27. alt fraksiyonu içerdiği az miktardaki kirliliğin giderilmesi amacı ile CHCl<sub>3</sub> ile çözündürülüp çeker ocakta bir kısmı uçurulduktan sonra ince tabakaya 5 ml emdirilerek 100 DCM+3 damla MEOH solvent sistemi ile preparatif ince tabaka kromatografisi yapılarak temizlendi. GEC-A-4 (5) saf maddesi izole edildi. Bu sistem içerisinde net bir spot veren 2. bir madde GEC-A-5 (6) kodlu saf maddesi izole edildi.

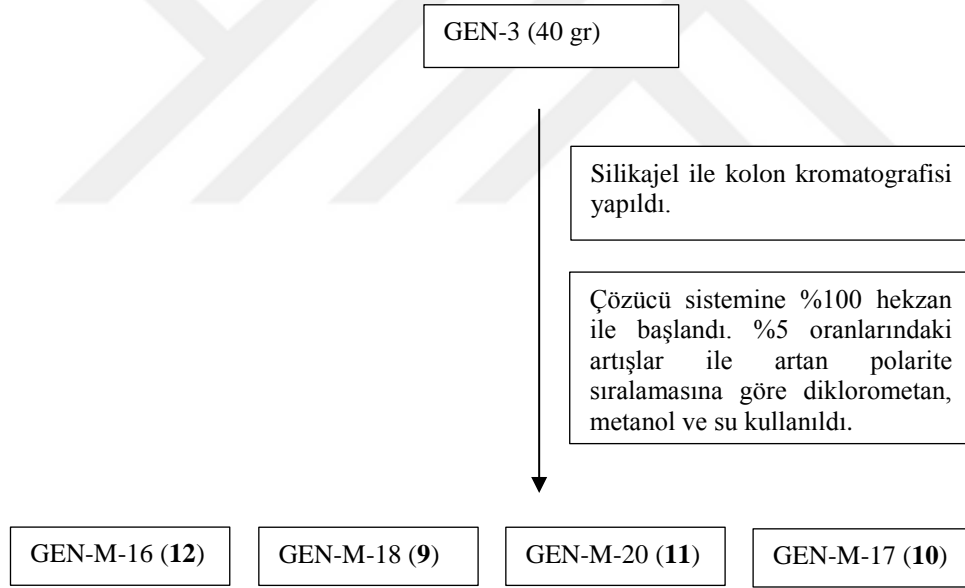
İTK'da net spotlar veren ve GEC2 ekstresinin 1. fraksiyonunun (GEC2 1-21) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile GEC A-6 (7) saf maddesi izole edildi.

İTK’da net spotlar veren ve GEC2 ekstresinin 9. fraksiyonun (GEC2 35-41) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile GEC A-19 (8) saf maddesi izole edildi.

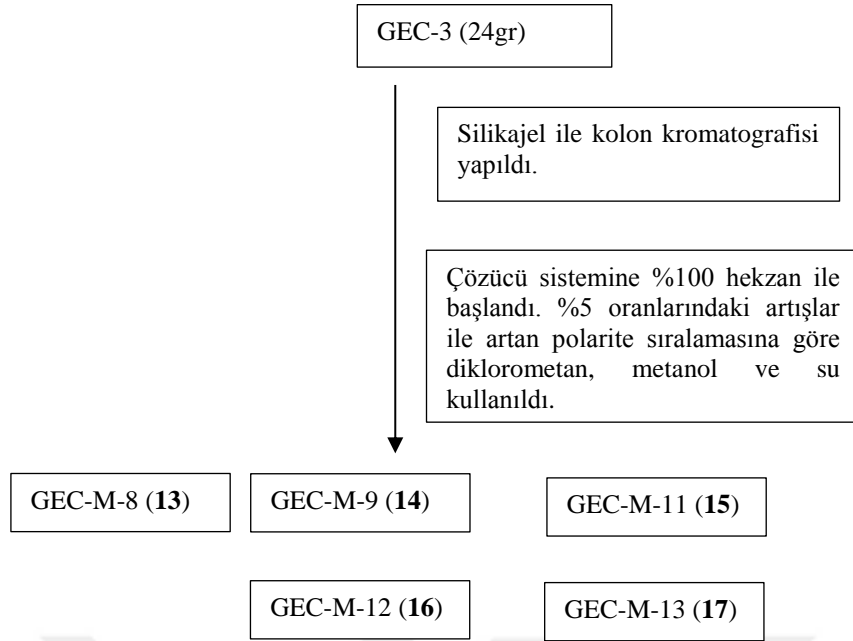
Saflaştırılan 4 maddenin (5-8) yapısı  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C NMR}$ , DEPT90, DEPT135, HMBC, HSQC ve MS spektrumlarıyla aydınlatıldı.

### 3.5. *Gyromitra esculenta*’nın Metanol Ekstrelerinin Fraksiyonlandırılması

*Gyromitra esculenta* materyalinin çiğ metanol ekstresi (GEN3) silika jel kolon ile fraksiyonlandırıldı ve benzer fraksiyonlar birleştirilerek 14 fraksiyon elde edildi. Pişmiş metanol ekstresi (GEC3) silika jel kolon ile fraksiyonlandırıldı ve benzer fraksiyonlar birleştirilerek 16 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonların miktarları ve verimleri Çizelge 3.4’de ve Çizelge 3.5’de verilmektedir.



Şekil 3.14. GEN-M-18 (9), GEN-M-17 (10), GEN-M-20 (11) ve GEN-M-16 (12) kodlu saf maddelerin izolasyonu şeması



Şekil 3.15. GEC-M-8 (13), GEC-M-9 (14), GEC-M-11 (15), GEC-M-12 (16) ve GEC-M-13 (17) kodlu maddelerin izolasyonu şeması

### 3.5.1. Çiğ metanol ekstresi üzerine yapılan kimyasal çalışmalar

Çizelge 3.4'de *Gyromitra esculenta* türünün çiğ metanol ekstresinin fraksiyonlandırılması ile elde edilen fraksiyonların isimleri ve verimleri verilmektedir. Bu fraksiyonlardan maddeler aşağıda anlatıldığı gibi elde edildi.

Fraksiyonlardan madde izolasyonu için kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı. Fraksiyonlar az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Silika jele emdirilmiş fraksiyon miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 3/5 oranında silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla %5 oranlarda artış ile %100 kloroforma, devamında %5 oranlarda artış ile %100 etilasetat'a ve devamında %10 oranlarda artış ile %100 metanol'e ulaşılarak elüsyon yapıldı. En son %20su: %80 metanol ile elüsyon tamamlandı.

**Çizelge 3-4. *Gyromitra esculenta*'nın çiğ metanol ekstralarının fraksiyonları, miktarları ve % verimleri**

<b>Çiğ <i>G. esculenta</i> (GEN-3) 40 gr</b>				
	<b>Fraksiyon Adı</b>	<b>Miktarı (mg)</b>	<b>% verim</b>	<b>Elde Edilen Madde</b>
1	GEN3 1-5	630	0,15	
2	GEN3 5-11	1,805	0,45	
3	GEN3 11-16	3,564	0,89	GEN-M-13/GC kodu verilerek yağ asidi analizi için GC-MS'e verildi.
4	GEN3 16-18	878	0,22	
5	GEN3 18-20	753	0,19	GEN-M-16 (12) (16 mg)
6	GEN3 21-26	2,685	0,67	GEN-M-20 (11) (3,4 mg) Alt fraksiyonlandırılması ile elde edilen yağimsı madde GEN-M-26/GC kodu ile yağ asidi analizi için GC-MS'e verildi.
7	GEN3 27-32	837	0,21	GEN-M-18 (9) (6,6 mg)
8	GEN3 33-38	1,880	0,30	
9	GEN3 39-41	765	0,19	GEN-M-17 (10) (1,2 mg)
10	GEN3 42-53	880	0,22	
11	GEN3 54-55	2,150	0,53	
12	GEN3 56-58	360	0,9	
13	GEN3 59-60	732	0,18	
14	GEN3 61-65	665	0,17	

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemleri kullanılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu amaçla çözücü sistemi olarak, uygun oranlarda hekzan: kloroform (50:50), hekzan: etilasetat (60:40); kloroform: aseton (70:30); kloroform: metanol (90:10); kloroform: toluen: metanol (10:15:2) karışımları hazırlanarak ve polariteye uygun karışım İTK'da kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel ve floresans katılmış İTK (Merck-5554) kullanıldı. *Gyromitra esculenta* türünün pişirilmiş metanol ekstresinin (GEN-3) silika jel kolon ile fraksiyonlandırılması ve benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucunda toplamda 14 fraksiyon elde edildi (Çizelge 3.4).

Elüentler 10 ml hacimlerde viallere toplandı ve ince tabaka kullanarak saf maddeler tespit edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEN3 ekstresinin 7. fraksiyonunun (GEN3 27-32) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile 11. alt fraksiyon olan GEN M-18 (9) saf maddesi izole edildi.



İTK'da net spotlar veren ve GEN3 ekstresinin 9. fraksiyonun (GEN3 37-41) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlarına ayrıldı. 8. alt fraksiyonu saf olan GEN-M-17 (**10**) saf maddesini verdi.

İTK'da net spotlar veren ve GEN3 ekstresinin 6. fraksiyonun (GEN3 21-26) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile GEN-M-20 (**11**) saf maddesi izole edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEN3 ekstresinin 5. fraksiyonun (GEN3 18-20) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile 20 adet alt fraksiyonu elde edildi. GEN3 18-20'nin 12. alt fraksiyonu (24 mg) içerisindeki az miktardaki kirliliğin giderilmesi için tekrar kolon kromatografisi yapıldı. Bu alt fraksiyonun 15. alt fraksiyonundan GEN-M-16 (**12**) saf maddesi izole edildi.

Saflaştırılan 4 maddenin (**9-12**) yapısı <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT90, DEPT135, HMBC, HSQC ve MS spektrumlarıyla aydınlatıldı.

### **3.5.2. Pişirilmiş metanol ekstresi üzerine yapılan kimyasal çalışmalar**

Çizelge 3.5'de *Gyromitra esculenta* türünün pişirilmiş metanol ekstresinin fraksiyonlandırılması ile elde edilen fraksiyonların isimleri ve verimleri verilmektedir. Bu fraksiyonlardan maddeler aşağıda anlatıldığı gibi elde edildi.

Fraksiyonlardan madde izolasyonu için kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı. Fraksiyonlar az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Silika jele emdirilmiş fraksiyon miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 3/5 oranında silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla %5 oranlarda artış ile %100 kloroforma, devamında %5 oranlarda artış ile %100 etilasetat'a ve devamında %10 oranlarda artış ile %100 metanol'e ulaşılarak elüsyon yapıldı. En son %20su: %80 Metanol ile elüsyon tamamlandı.

Çizelge 3-5. *Gyromitra esculenta*'nın pişirilmiş metanol ekstralarının fraksiyonları, miktarları ve % verimleri

Pişirilmiş <i>G. esculenta</i> (GEC-3) 24 gr				
	Fraksiyon Adı	Miktarı (mg)	% verim	Elde Edilen Maddeler
1	GEC3 1	650	0,27	
2	GEC3 2-5	385	0,16	
3	GEC3 6-9	586	0,24	
4	GEC3 10-13	1,980	0,82	GEC-M-8 (13) (5,4 mg) alt fraksiyonlandırılması ile elde edilen yağmsı madde GEC-M-11/GC kodu ile yağ asidi analizi için GC-MS'e verildi.
5	GEC3 14-16	850	0,35	
6	GEC3 17-19	675	0,28	
7	GEC3 20-25	586	0,24	
8	GEC3 26-29	1,685	0,70	GEC-M-9 (14) (50 mg)
9	GEC3 30-36	342	0,14	
10	GEC3 37-39	692	0,28	GEC-M-11 (15) (1,2 mg)
11	GEC3 40-43	258	0,10	
12	GEC3 44-48	863	0,35	
13	GEC3 49-51	586	0,24	GEC-M-12 (16) (6,2 mg)
14	GEC3 52-54	756	0,31	GEC-M-13 (17) (130 mg)
15	GEC3 55-61	684	0,28	
16	GEC3 62-64	562	0,23	

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemleri kullanılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu amaçla çözücü sistemi olarak, uygun oranlarda hekzan: kloroform (50:50), hekzan: etilasetat (60:40); kloroform: aseton (70:30); kloroform: metanol (90:10); kloroform: toluen: metanol (10:15:2) karışımları hazırlanarak ve polariteye uygun karışım İTK'da kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel ve floresans katılmış İTK (Merck-5554) kullanıldı. *Gyromitra esculenta* türünün pişirilmiş metanol ekstresinin (GEC3) silika jel kolon ile fraksiyonlandırılması ve benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucunda toplamda 14 fraksiyon elde edildi (Çizelge 3.3).

Elüentler 10 ml hacimlerde viallere toplandı ve ince tabaka kullanarak saf maddeler tespit edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEC3 ekstresinin 8. fraksiyonunun (GEC3 26-29) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile elde edilen 5. alt fraksiyonu GEC-M-9 (13) saf maddesi izole edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEC3 ekstresinin 10. fraksiyonunun (GEC3 37-39) recycle-preparatif-HPLC cihazında C<sub>18</sub> kolondan %80 MeOH- %20 H<sub>2</sub>O sistemi ile akış hızı 5 ml seçilerek alt fraksiyonlandırılması ile GEC-M-11 (**14**) saf maddesi izole edildi

İTK'da net spotlar veren ve GEC3 ekstresinin 13. fraksiyonunun (GEC3 49-51) recycle-preparatif-HPLC cihazında C<sub>18</sub> kolondan %80 MeOH- %20 H<sub>2</sub>O sistemi ile akış hızı 5 ml seçilerek alt fraksiyonlandırılması ile GEC-M-12 (**15**) saf maddesi izole edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEC3 ekstresinin 14. fraksiyonunun (GEC3 52-54) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile elde edilen 12. alt fraksiyonu GEC-M-13 (**16**) kodu ile saf olarak izole edildi.

İTK'da net spotlar veren ve GEC3 ekstresinin 4. fraksiyonunun (GEC3 10-13) tekrar kolon kromatografisi kullanılarak alt fraksiyonlandırılması ile elde edilen 4. alt fraksiyonu GEC-M-8 (**17**) kodu ile saf olarak elde edildi.

Saflaştırılan 5 (**13-17**) maddenin yapısını aydınlatmak için <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT90, DEPT135, HMBC, HSQC ve MS spektrumları alındı.

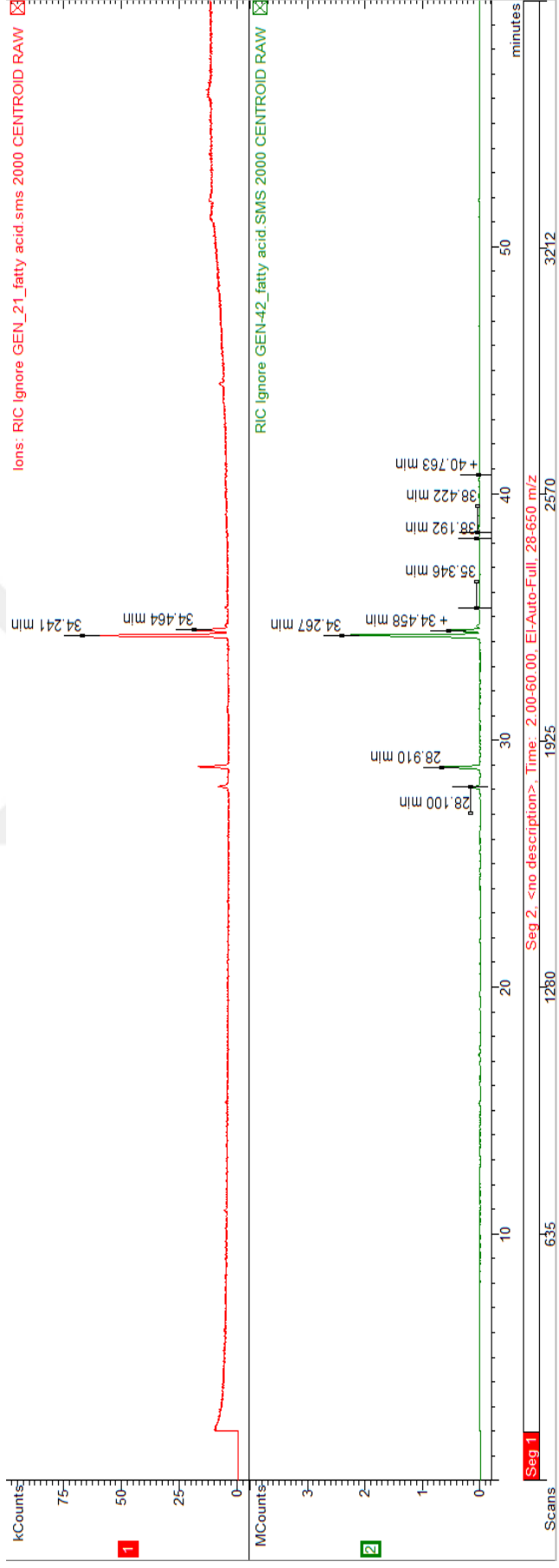
### **3.6. Yağimsı Fraksiyonların GC-MS ile Analiz Sonuçları**

#### **3.6.1. Çiğ aseton ekstresinden elde edilen GEN-A-21/GC ve GEN-A-42/GC kodlu fraksiyonların GC-MS analiz sonuçları**

Çiğ aseton ekstresinin ana kolonundan elde edilen fraksiyonlardan GEN2 1-21 görünüş itibariyle yağimsı bir özelliğe sahip olduğu için Bölüm 2.11.1.'de verildiği gibi GEN-A-21/GC koduyla metillenerek, Çizelge 2.1'de verildiği gibi GC-MS şartlarında analiz edildi. Benzer şekilde 7. fraksiyon olan GEN2 40-47 de görünüş olarak yağimsı olduğu için aynı şartlarda GEN-A-42/GC koduyla GC-MS ile analiz edildi. GC-MS'den elde edilen sonuçlar Çizelge 3.6'da verilmektedir. Ayrıca her iki fraksiyonun GC-MS kromatogramı Şekil 3.16'da verilmektedir. Bu sonuçlara göre GEN-A-21/GC kodlu fraksiyonunda 6 adet yağ asidi içeriği tespit edilirken; GEN-A-42/GC kodlu fraksiyonda 2 adet yağ asidi içeriği tespit edildi (Çizelge 3.6). Doymamışlık açısından her iki fraksiyonun zengin olduğu izlendi.

**Çizelge 3-6. Çiğ aseton ekstresi fraksiyonu GEN-A-21 ve GEN-A-42 yağ asidi profili**

No	Şekil No	RT (Dakika)	Bileşik Adı	GEN-A-21/GC fraksiyonu (%)	GEN-A-42/GC fraksiyonu (%)	Teşhis Yöntemi
1	3.20	28,1	Palmitoleik asit ( $\Delta^7$ C <sub>16:1</sub> )	11,02	-	GC-MS
2	3.21	28,9	Palmitik asit (C <sub>16:0</sub> )	20,20	-	GC-MS
3	3.20	34,3	Linoleik asit ( $\Delta^{6,9}$ C <sub>18:2</sub> )	28,37	54,37	GC-MS
4	3.20	34,4	Oleik asit ( $\Delta^9$ C <sub>18:1</sub> )	13,16	45,56	GC-MS
5	3.20	34,6	Linolelaidik asit (C <sub>18:2</sub> )	17,27	-	GC-MS
6	3.21	35,3	Stearik asit (C <sub>18:0</sub> )	9,97	-	GC-MS
TOPLAM				99,99	99,93	



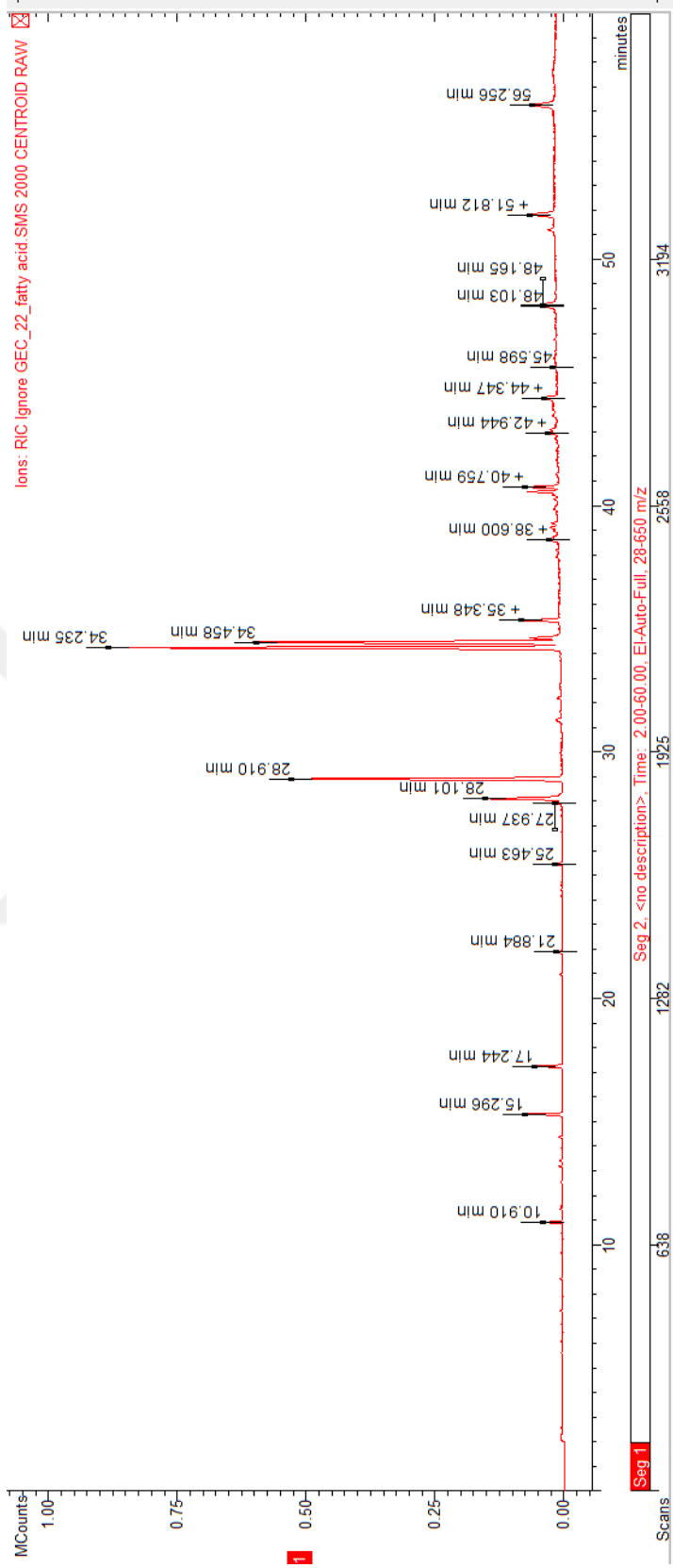
Şekil 3.16 G. esculenta'nın GEN-A-21-GC ve GEN-A-42-GC kodlu fraksiyonlarının GC-MS kromatogramları

### 3.6.2. Pişirilmiş aseton ekstresinden elde edilen GEN-A-22/GC kodlu fraksiyonun GC-MS analiz sonuçları

Piştirilmiş aseton ekstresinin ana kolonundan elde edilen fraksiyonlardan GEC2 22-26 görünüş itibariyle yağimsı bir özelliğe sahip olduğu için Bölüm 2.11.1.'de verildiği gibi GEC-A-22/GC koduyla metillenerek, Çizelge 2.1'de verildiği gibi GC-MS şartlarında analiz edildi. GC-MS'den elde edilen sonuçlar Çizelge 3.7'de verilmektedir. Ayrıca fraksiyonun GC-MS kromatogramı Şekil 3.17'de verilmektedir. Bu sonuçlara göre GEC-A-22/GC kodlu fraksiyonunda 7 adet yağ asidi içeriği tespit edildi (Çizelge 3.7). Doymamışlık açısından fraksiyonun zengin olduğu izlendi.

Çizelge 3-7. Piştirilmiş aseton ekstresi fraksiyonu GEC-A-22 yağ asidi profili

No	Şekil No	RT (Dakika)	Bileşik Adı	<i>G. esculenta</i> yağ asidi miktarı (%)	Teşhis Yöntemi
1	3.21	15,3	Azelaik asit	7,66	GC-MS
2	3.20	28,1	Palmitoleik asit ( $\Delta^7$ C <sub>16:1</sub> )	13,97	GC-MS
3	3.21	28,9	Palmitik asit (C <sub>16:0</sub> )	17,14	GC-MS
4	3.20	34,3	Linoleik asit ( $\Delta^{6,9}$ C <sub>18:2</sub> )	27,20	GC-MS
5	3.20	34,4	Oleik asit ( $\Delta^9$ C <sub>18:1</sub> )	24,57	GC-MS
6	3.20	34,6	Linolelaidik asit (C <sub>18:2</sub> )	4,34	GC-MS
7	3.21	35,3	Stearik asit (C <sub>18:0</sub> )	5,12	GC-MS
TOPLAM				99,99	



Şekil 3.18. *G. esculenta*'nin GEC-22 kodlu fraksiyonunun GC-MS kromatogramı

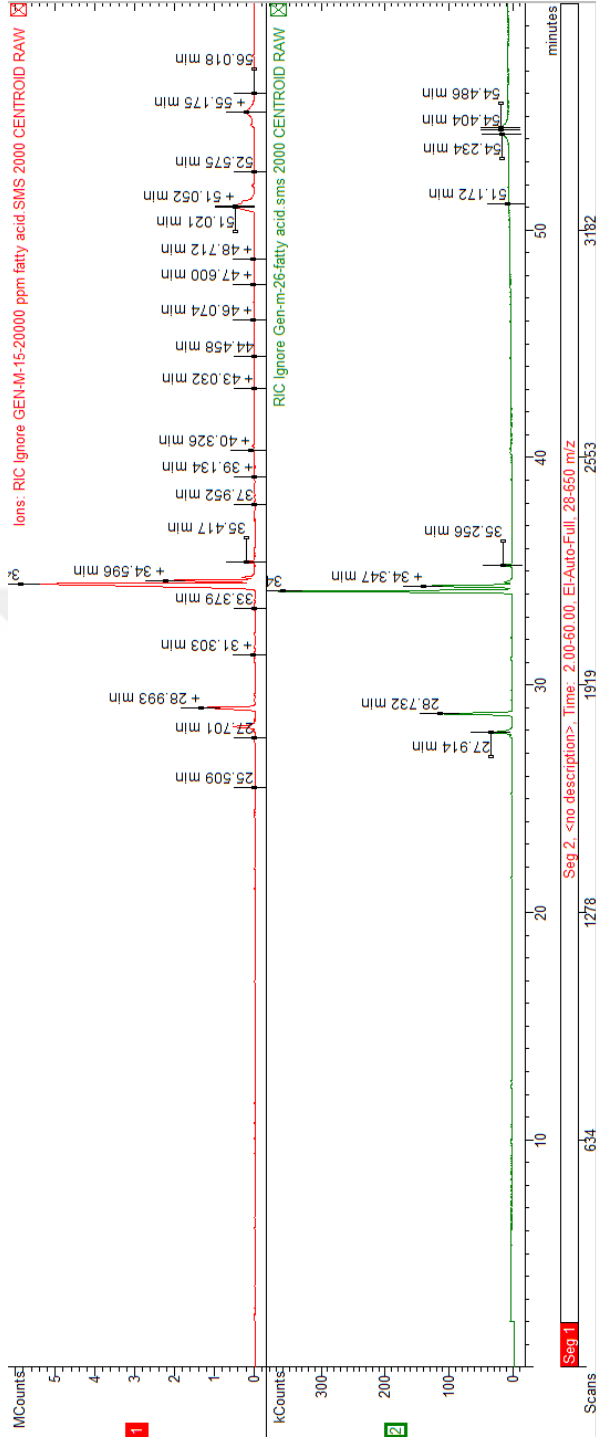
### 3.6.3. Çiğ metanol ekstresinden elde edilen GEN-M-13/GC ve GEN-M-26/GC kodlu fraksiyonların GC-MS analiz sonuçları

Çiğ metanol ekstresinin ana kolonundan elde edilen fraksiyonlardan GEN3 11-16 görünüş itibariyle yağimsı bir özelliğe sahip olduğu için Bölüm 2.11.1.'de verildiği gibi GEN-M-13/GC koduyla metillenerek, Çizelge 2.1'de verildiği gibi GC-MS şartlarında analiz edildi. Benzer şekilde 6. fraksiyon olan GEN3 21-26 da görünüş olarak yağimsı olduğu için aynı şartlarda GEN-M-26/GC koduyla GC-MS ile analiz edildi. GC-MS'den elde edilen sonuçlar Çizelge 3.8'de verilmektedir. Ayrıca her iki fraksiyonun GC-MS kromatogramı Şekil 3.18'de verilmektedir. Bu sonuçlara göre her iki fraksiyonda da 6 adet yağ asidi içeriği tespit edildi (Çizelge 3.8). Doymamışlık açısından her iki fraksiyonun zengin olduğu gözlemlendi.

Çizelge 3-8. Çiğ metanol ekstresi fraksiyonu GEN-M-13/GC ve GEN-M-26/GC fraksiyonlarının yağ asidi profili

No	Formül No	RT (Dakika)	Bileşik Adı	GEN-M-13/GC fraksiyonu (%)	GEN-M-26/GC fraksiyonu (%)	Teşhis Yöntemi
1	3.20	28,1	Palmitoleik asit ( $\Delta^7$ C <sub>16:1</sub> )	7,54	13,63	GC-MS
2	3.21	28,9	Palmitik asit (C <sub>16:0</sub> )	20,43	16,67	GC-MS
3	3.20	34,3	Linoleik asit ( $\Delta^{6,9}$ C <sub>18:2</sub> )	32,27	38,16	GC-MS
4	3.20	34,4	Oleik asit ( $\Delta^9$ C <sub>18:1</sub> )	25,65	19,65	GC-MS
5	3.20	34,6	Linolelaidik asit (C <sub>18:2</sub> )	8,47	1,96	GC-MS
6	3.21	35,3	Stearik asit (C <sub>18:0</sub> )	5,63	9,93	GC-MS
TOPLAM				99,99	99,99	





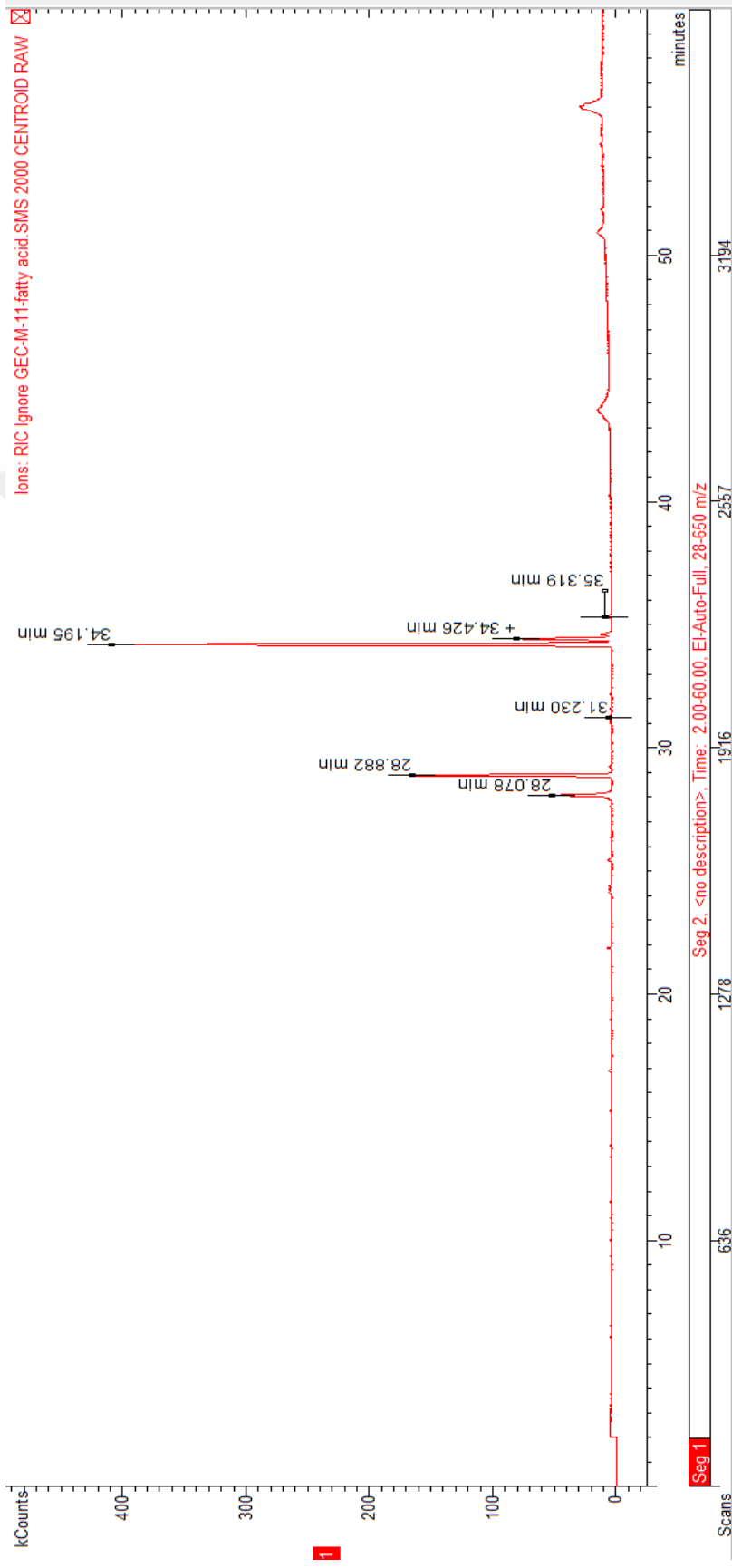
Şekil 3.19. *G. esculenta*'nin GEN-M-13/GC ve GEN-M-26/GC kodlu fraksiyonlarının GC-MS kromatogramları

### 3.6.4. Pişirilmiş metanol ekstresinden elde edilen GEC-M-11/GC kodlu fraksiyonun GC-MS analiz sonuçları

Piştirilmiş metanol ekstresinin ana kolonundan elde edilen fraksiyonlardan GEC3 10-13 görünüş itibariyle yağimsı bir özelliğe sahip olduğu için Bölüm 2.11.1.'de verildiği gibi GEC-M-11/GC koduyla metillenerek, Çizelge 2.1'de verildiği gibi GC-MS şartlarında analiz edildi. GC-MS'den elde edilen sonuçlar Çizelge 3.9'da verilmektedir. Ayrıca fraksiyonun GC-MS kromatogramı Şekil 3.19'da verilmektedir. Bu sonuçlara göre GEC-M-11/GC kodlu fraksiyonunda 5 adet yağ asidi içeriği tespit edildi (Çizelge 3.9). Doymamışlık açısından fraksiyonun zengin olduğu izlendi.

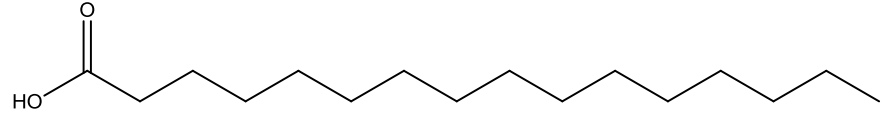
Çizelge 3-9. Piştirilmiş metanol ekstresi fraksiyonu GEC-M-11/GC fraksiyonunun yağ asidi profili

No	Şekil No	RT (Dakika)	Bileşik Adı	<i>G. esculenta</i> yağ asidi miktarı (%)	Teşhis Yöntemi
1	3.20	28,1	Palmitoleik asit ( $\Delta^7$ C <sub>16;1</sub> )	14,46	GC-MS
2	3.21	28,9	Palmitik asit (C <sub>16;0</sub> )	27,57	GC-MS
3	3.20	34,3	Linoleik asit ( $\Delta^{6,9}$ C <sub>18;2</sub> )	38,26	GC-MS
4	3.20	34,4	Oleik asit ( $\Delta^9$ C <sub>18;1</sub> )	18,27	GC-MS
5	3.20	34,6	Linolelaidik asit (C <sub>18;2</sub> )	1,44	GC-MS
TOPLAM				99,99	

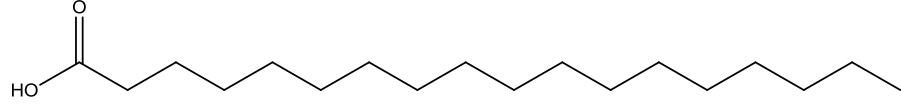


Şekil 3.20. *G. esculenta*'nın GEC-M-11/GC kodlu fraksiyonunun GC-MS kromatogramı

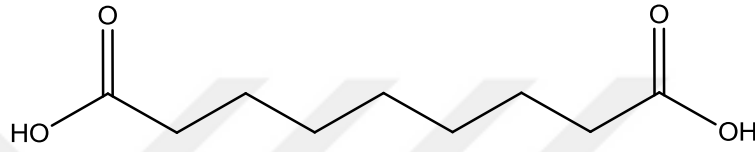
**3.6.5. *Gyromitra esculenta*'nın ekstralarında bulunan bazı yağ asitlerinin ve Azelaik asidin kimyasal yapısı**



Palmitik asit

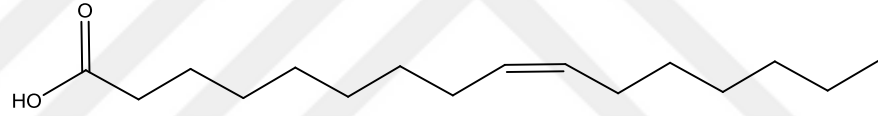


Stearik asit

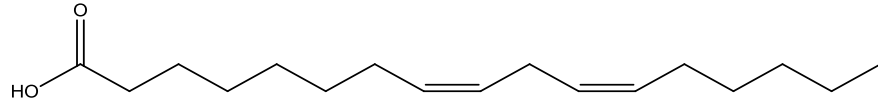


Azelaik asit

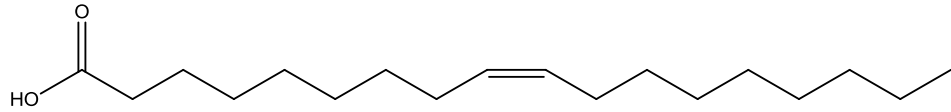
**Şekil 3.21. Doymuş yağ asitleri formülleri**



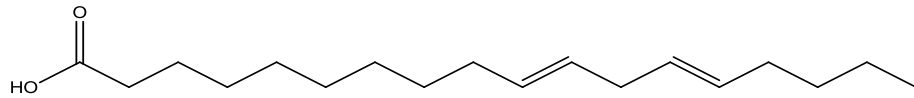
Palmitoleik asit



Linoleik asit



Oleik asit

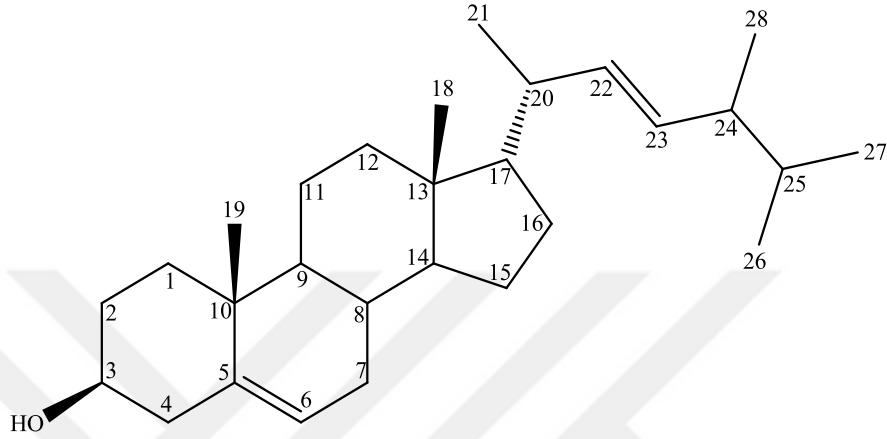


Linoleaidik asit

**Şekil 3.22. Doymamış yağ asitleri formülleri**

### 3.7. Çiğ Aseton Ekstresinden Elde edilen Saf Maddelerin n Yapı Tayini

#### 3.7.1. GEN-A-1(1) = Ergosta- 5,22-dien 3β-ol



Şekil 3.23. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEN-A-1 (1) maddesi (78,6 mg) bölüm 3.4.1.'de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı. Erime noktası 153-154 °C olarak tespit edildi (Bankova vd,1995).

Beyaz renkli olan GEN-A-1 (1) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisinde UV lamba (254 nm) altında görülmeyen ancak, serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu mor renk aldı.

Maddenin UV spektrumunda (Şekil 3.23) 203,5 nm'de bir maksimum absorbans ( $\lambda_{max}$ ) izlendi. Bu da göstermektedir ki maddede konjuge çift bağ, iyot, brom gibi halojenler ve karbonil bağı bulunmamaktadır.

IR spektrumunda (Şekil 3.24) maddenin hidroksil gerilmesi  $\bar{\nu}$  3436  $cm^{-1}$  ve vinilik gerilmeler  $\bar{\nu}$  2953  $cm^{-1}$  izlendi.

$^{13}C$ -NMR spektrumu (150 MHz, Şekil 3.26) ve APT (Şekil 3.27) spektrumları beraber değerlendirildiğinde 6 metil, 8 metilen, 11 metin ve 3 katerner karbon belirlendi. Aşağı

alanda  $\delta$  140.7, 135.8, 131.7 ve 121.7 ppm'de rezonans olan pikler sırası ile C-5, C-22, C-23 ve C-6 karbonlarına aittir.  $\delta$  71.8, 56.8, 55.0 ve 50.2 ppm'de rezonans olan sinyaller C-3, C-17.,C-14 ve C-9 pozisyonlarındaki karbonlara aittir.  $\delta$  20.9, 19.9, 19.6, 19.4, 17.6 ve 12.1 ppm'de rezonans olan pikler molekülde bulunan 6 adet metil sinyalidir.

$^1\text{H}$ - NMR spektrumunda (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , Şekil 3.25)  $\delta$  0.67 (*s*, H-18, 3H) ve 0.98 (*s*, H-19, 3H) ile  $\delta$  0.80 (*d*,  $J= 6.6$  Hz, H-27, 3H),  $\delta$  0.81 (*d*,  $J= 7.2$  Hz, H-26, 3H),  $\delta$  0.89 (*d*,  $J= 6.6$  Hz, H-28, 3H) ve  $\delta$  0.94 (*d*,  $J= 6.0$  Hz, H-21, 3H) ppm'de rezonans olan pikler karakteristik lanostan tipi steroide aittir.  $\delta$  5.32 (*t*,  $J= 2.4$  Hz, H-6, 1H) ppm ile  $\delta$  5.17 (*dd*,  $J= 15.0;7.8$  Hz, H-22, 1H) ve  $\delta$  5.19 (*dd*,  $J= 15.6;7.2$  Hz, H-23, 1H) ve  $\delta$  3.50 (*m*, H-3, 1H) ppm'de rezonans olan pikler lanostan tipi bir steroidi andırdı.  $\delta$  3.50 (*m*, H-3, 1H) ppm'de rezonans olan pik C-3 pozisyonunda hidrojenin  $\alpha$  konumunda olduğunu göstermektedir.

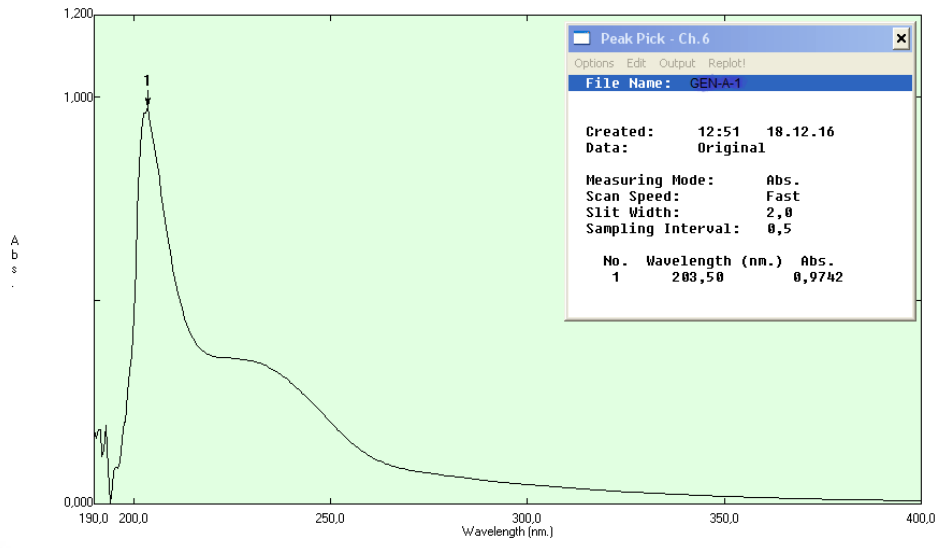
GEN-A-1 (**1**) maddesinin yapı tayini HSQC (Şekil 3.28), HMBC (Şekil 3.39) spektrumları ile doğrulandı. HMBC korelasyonları Çizelge 3.10'da verilmektedir.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.30), moleküler iyon piki 398,3  $[\text{M}]^+$  piki  $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}$  yapısını önerdi.  $m/z$  380  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$  bir molekül suyun ayrılmasını göstermektedir.

Yukarıda verilen spektral veriler ve fizikokimyasal özellikler kullanıldığında ve literatür ile karşılaştırıldığında GEN-A-1 (**1**) maddesinin ergosta-5,22-dien  $3\beta$ -OH (Şekil 3.23) (78,6 mg) olduğu belirlendi (Bankova vd, 1995).

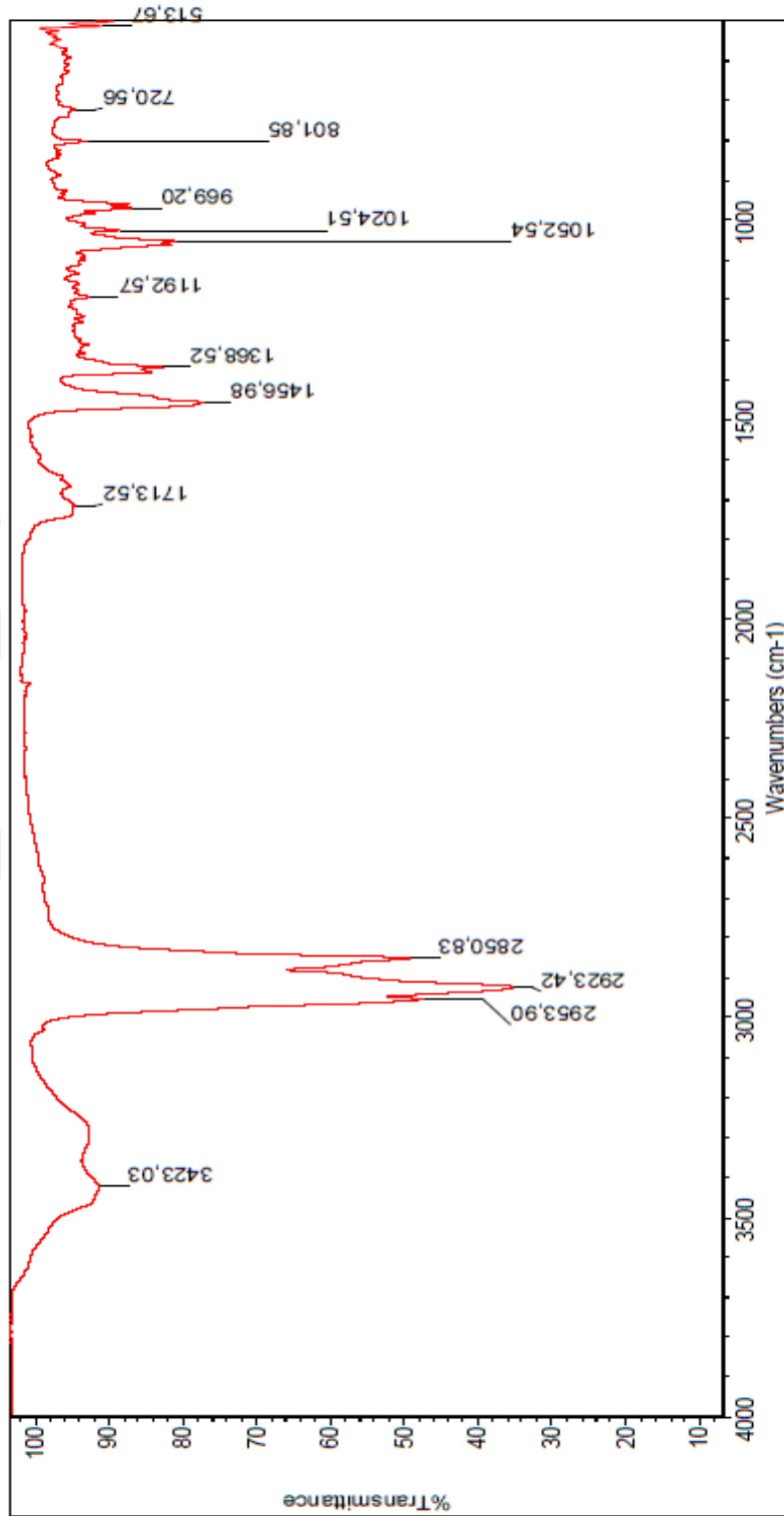
Çizelge 3-10. GEN-A-1 (1) saf maddesinin NMR spektral değerleri (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

C.no.	<sup>13</sup> C-NMR (δ)	<sup>1</sup> H-NMR (δ)	HMBC
1	37.2	1.82 (1H, <i>m</i> ), 1.06 (1H, <i>m</i> )	H-19
2	31.9	1.80 (2H, <i>m</i> )	
3	71.8	3.50 (1H, <i>m</i> )	H-1, H-2, H-4
4	42.3	2.27 (1H, <i>m</i> ), 1.82 (1H, <i>m</i> )	
5	140.7	-	H-1, H-4, H-19
6	121.7	5.32 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2.4 Hz)	H-4, H-8
7	31.7	1.95 (2H, <i>m</i> )	
8	31.9	1.44 (1H, <i>m</i> )	
9	50.2	0.91 (1H, <i>m</i> )	H-7, H-8, H-19
10	36.5	-	
11	21.1	1.46 (2H, <i>m</i> )	
12	39.7	1.97 (1H, <i>m</i> ), 1.15 (1H, <i>m</i> )	
13	42.2	-	
14	56.0	1.11 (1H, <i>m</i> )	H-7, H-18
15	24.3	1.51 (1H, <i>m</i> ), 1.00 (1H, <i>m</i> )	
16	28.5	1.65 (1H, <i>m</i> ), 1.23 (1H, <i>m</i> )	
17	56.8	0.98 (1H, <i>m</i> )	H-20
18	12.1	0.67 (3H, <i>s</i> )	H-12, H-14
19	19.4	0.98 (3H, <i>s</i> )	H-1
20	40.1	1.97 (1H, <i>m</i> )	H-21, H-22, H-23
21	20.9	0.94 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz)	H-20, H-22
22	135.8	5.17 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.0, 7.8 Hz)	H-20, H-21, H-28
23	131.7	5.19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.6, 7.2 Hz)	H-20, H-22, H-24
24	42.8	0.87 (1H, <i>m</i> )	H-22, H-27
25	33.1	1.43 (1H, <i>m</i> )	H-27, H-28
26	19.9	0.81 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz)	H-24, H-25
27	19.6	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	H-24, H-25
28	17.6	0.89 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	H-25

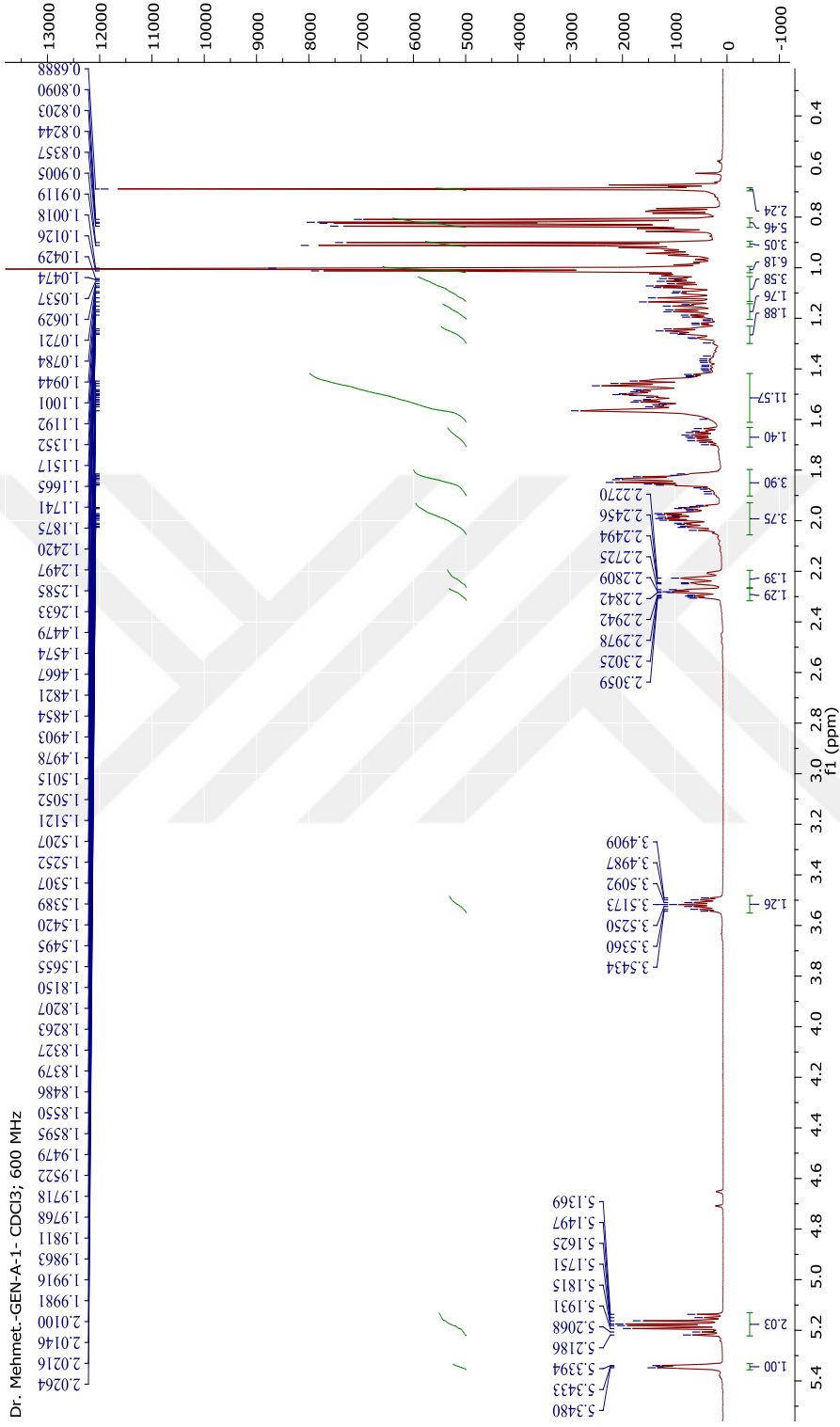


Şekil 3.24. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin UV spektrumu

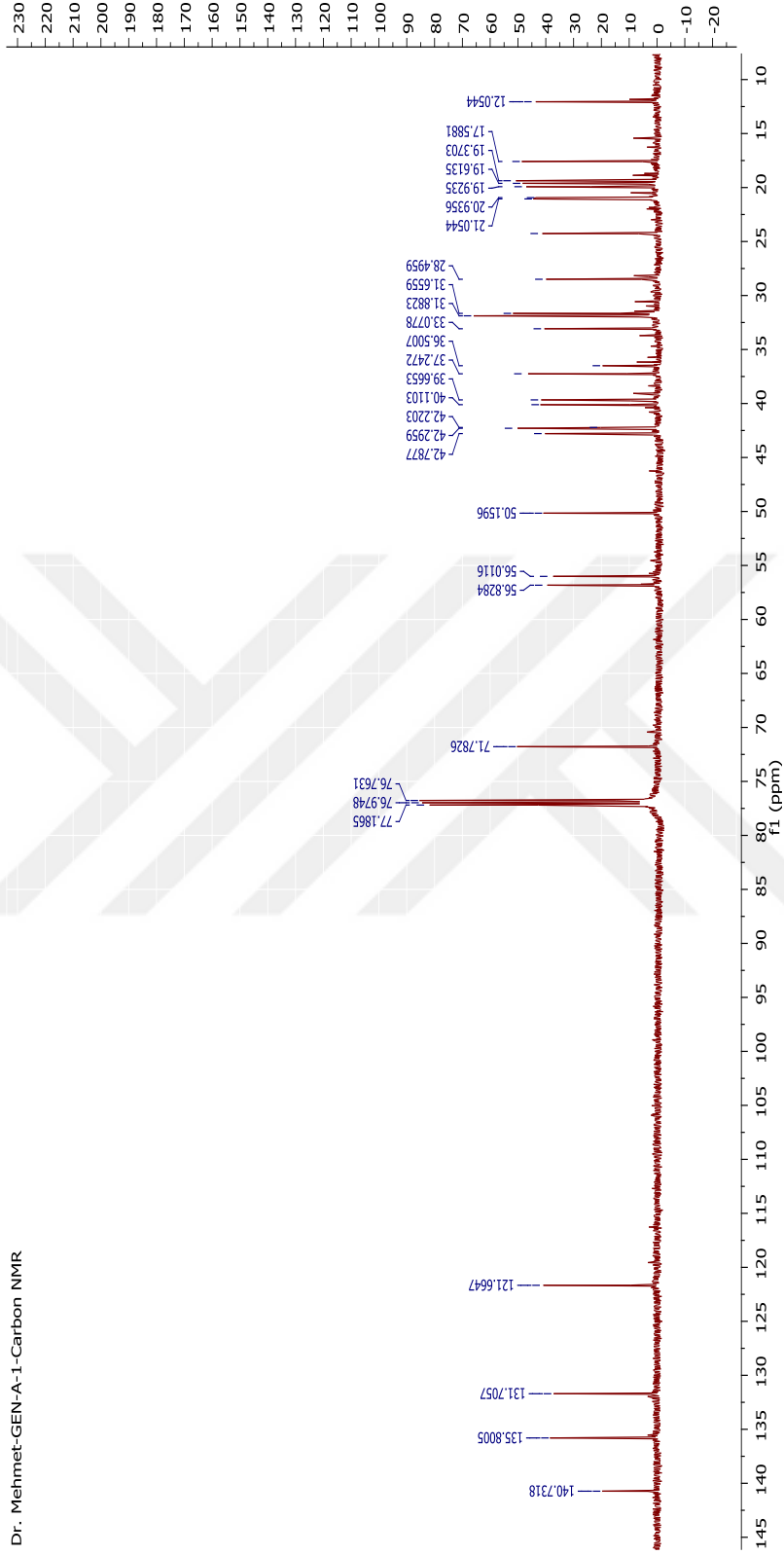




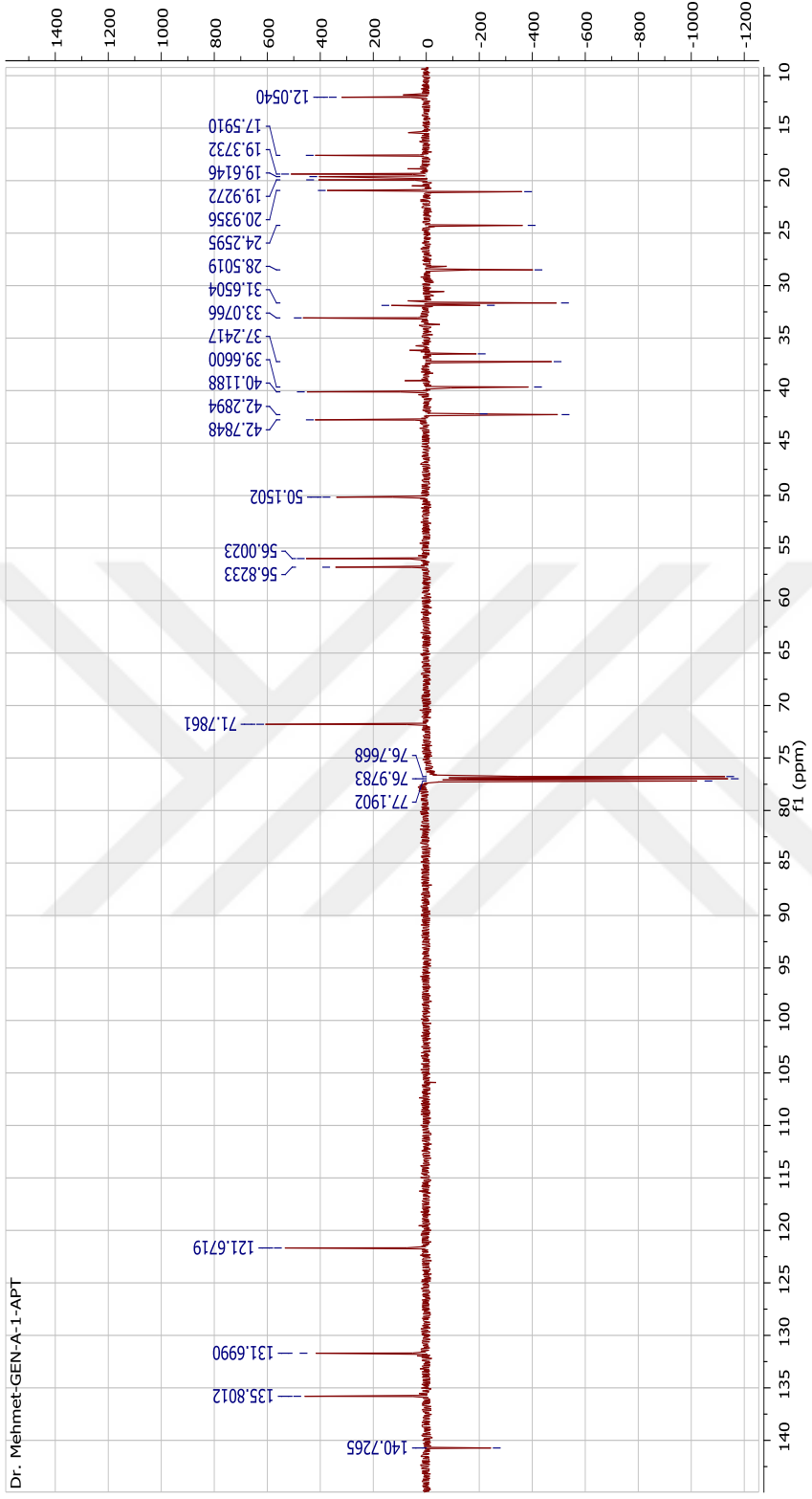
Şekil 3.25. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin FTIR spektrumu



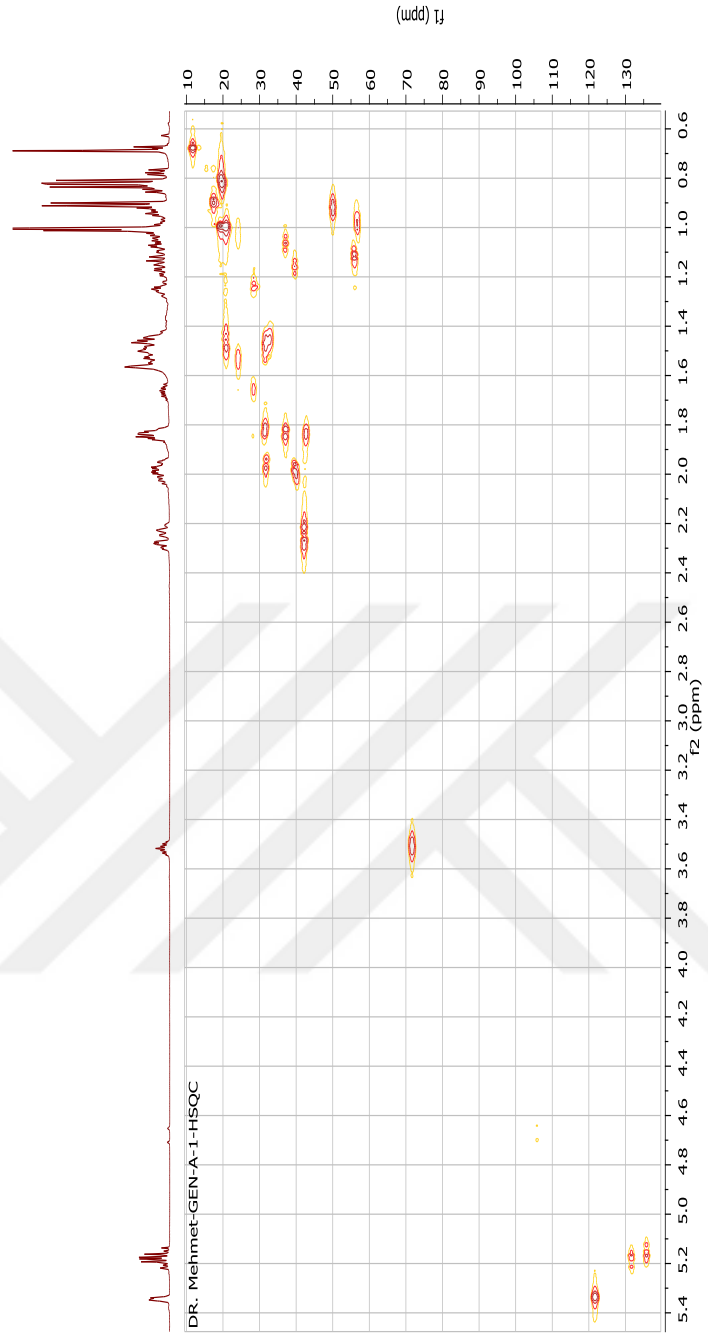
Şekil 3.26. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



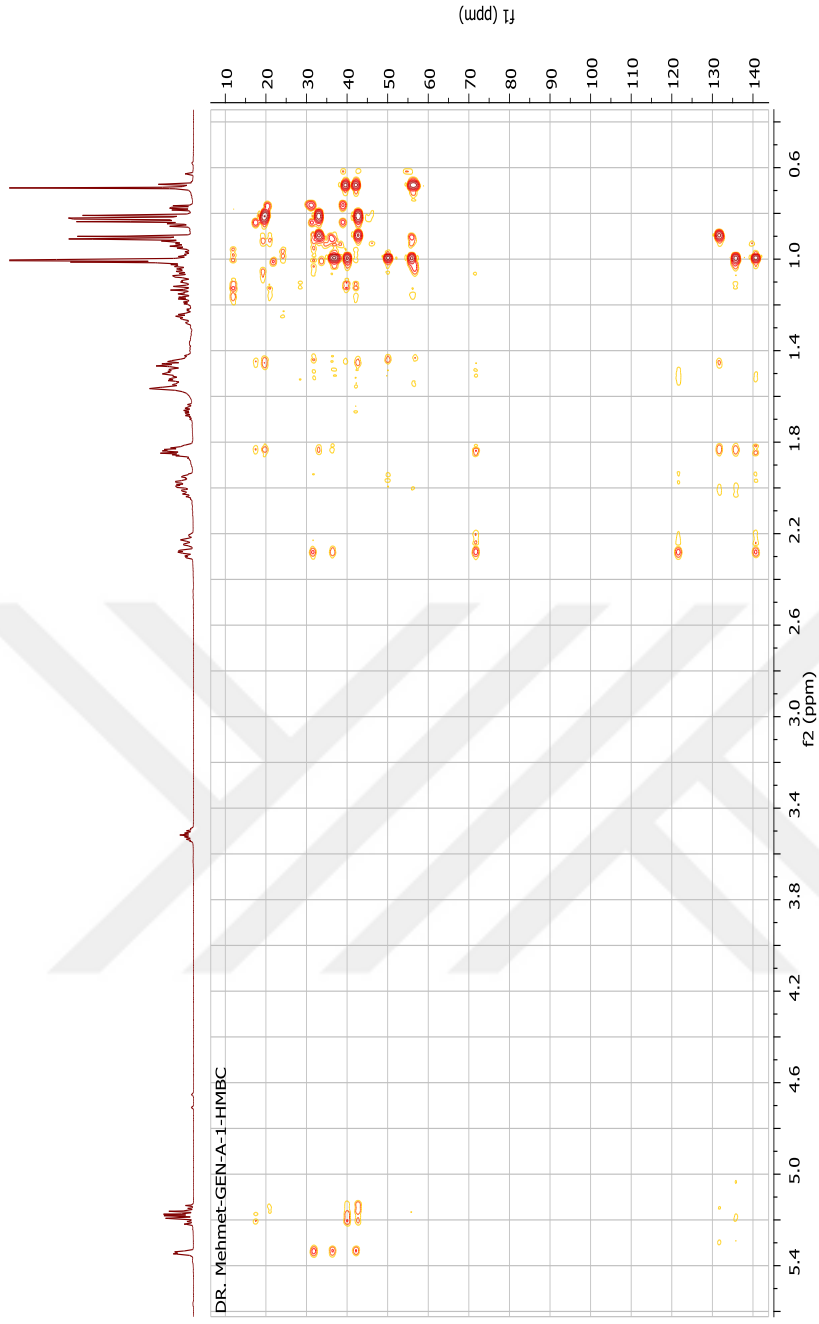
Şekil 3.27. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin <sup>13</sup>C NMR spektrumu (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>)



Şekil 3.28. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin APT spektrumu



Şekil 3.29. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu



Şekil 3.30. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu

HEJ-ICCBS  
2/15/2017 10:21:12 AM

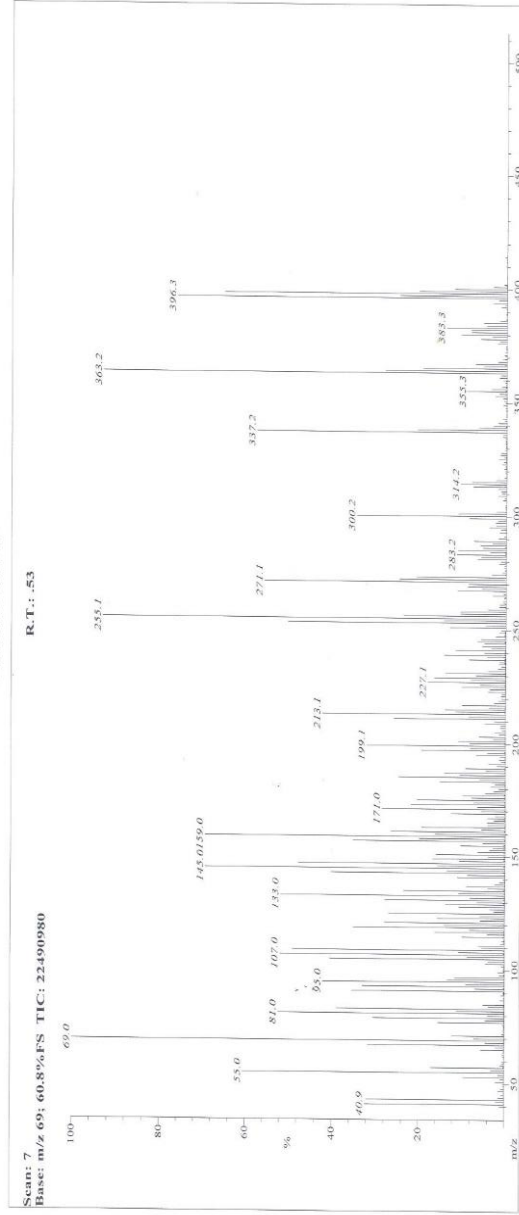
Date Run: 02-15-2017 (Time Run: 10:10:35)

Sample: GEN-A-1  
Instrument: JECOL MS 600H-1

Ionization mode: EI+

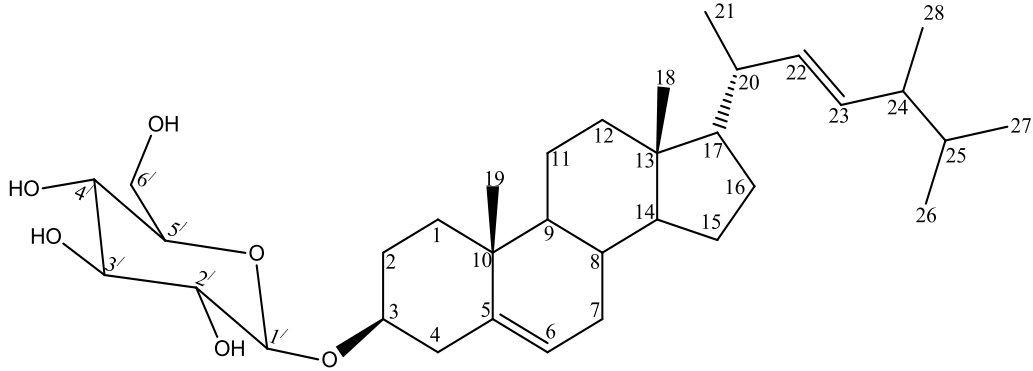
R.T.: .53

Scan: 7  
Base: m/z 69; 60.8%FS TIC: 22490980



Şekil 3.31. GEN-A-1 (1) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu

### 3.7.2. GEN-A-3 (2)= Ergosta 5,22-dien 3-*O*- $\beta$ -*D*-glukopiranozit



Şekil 3.32. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEN-A-3 (2) maddesi (30 mg) bölüm 3.4.1.'de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEN-A-3 (2) bileşiği amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında görülmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) erguvan renk aldı.

Maddenin UV spektrumunda (Şekil 3.32) 203,5 nm'de bir maksimum absorbans ( $\lambda_{max}$ ) izlendi. Bu da göstermektedir ki maddede konjuge çift bağ, iyot, brom gibi halojenler ve karbonil bağı bulunmamaktadır.

IR spektrumunda (Şekil 3.33) maddenin hidroksil gerilmesi  $\bar{\nu}$  3370  $cm^{-1}$  ve OH bandı gerilmeleri  $\bar{\nu}$  2955  $cm^{-1}$  CH olefinik gerilmeler izlendi.

$^{13}C$ -NMR spektrumu (150 MHz, Şekil 3.35) HSQC (Şekil 3.36) spektrumu ile birlikte değerlendirildiğinde 6 metil, 9 metilen, 16 metin ve 3 katerner karbon gözlemlendi. Aglikon kısmı  $\delta$  140.1 (C-5),  $\delta$  135.7 (C21),  $\delta$  122.1 (C-6) ve 79.1 (C-3) karakteristik piklerini vererek lanostan tipi steroid olduğunu belirtti. Şeker kısmında 101.1 ppm ile 61.6 ppm arasında rezonans olan 6 adet karakteristik şeker piki de izlendi.  $\delta$  20.6, 19.5, 19.2, 18.9, 17.2 ve 11.7 ppm'de rezonans olan pikler molekülde bulunan 6 adet metil sinyaline aittir.

$^1H$ - NMR spektrumunda (600 MHz,  $CD_3OD$ , Şekil 3.34)  $\delta$  0.67 (s, H-18, 3H) ve 0.98 (s, H-19, 3H) ile  $\delta$  0.81 (d,  $J= 6.8$  Hz, H-27, 3H),  $\delta$  0.79 (d,  $J= 7.1$  Hz, H-26, 3H),  $\delta$



0.83 (*d*, *J*= 6.9 Hz, H-28, 3H) ve  $\delta$  0.97 (*d*, *J*= 6.5 Hz, H-21, 3H) ppm'de rezonans olan pikler karakteristik lanostan tipi steroide ait metillere aittir.  $\delta$  5.33 (*br.s.*, H-6, 1H) ppm ile  $\delta$  5.19 (*dd*, *J*= 14.8;7.3 Hz, H-22, 1H) ve  $\delta$  5.12 (*dd*, *J*= 15.3; 7.7 Hz, H-23, 1H) ve  $\delta$  3.56 (*m*, H-3, 1H) ppm'de rezonans olan pikler lanostan tipi bir steroid yapısını destekledi.  $\delta$  3.56 (*m*, H-3, 1H) ppm'de rezonans olan multipl pik C-3 pozisyonunda hidrojenin  $\alpha$  konumunda olduğunu da göstermektedir.  $\delta$  4.35 (*d*, *J*=7.8 Hz, H-1') ppm'de rezonans olan H-1', şekerin anomerik protonuna ait olup, şekerin  $\beta$  olduğunu ispatlamaktadır.

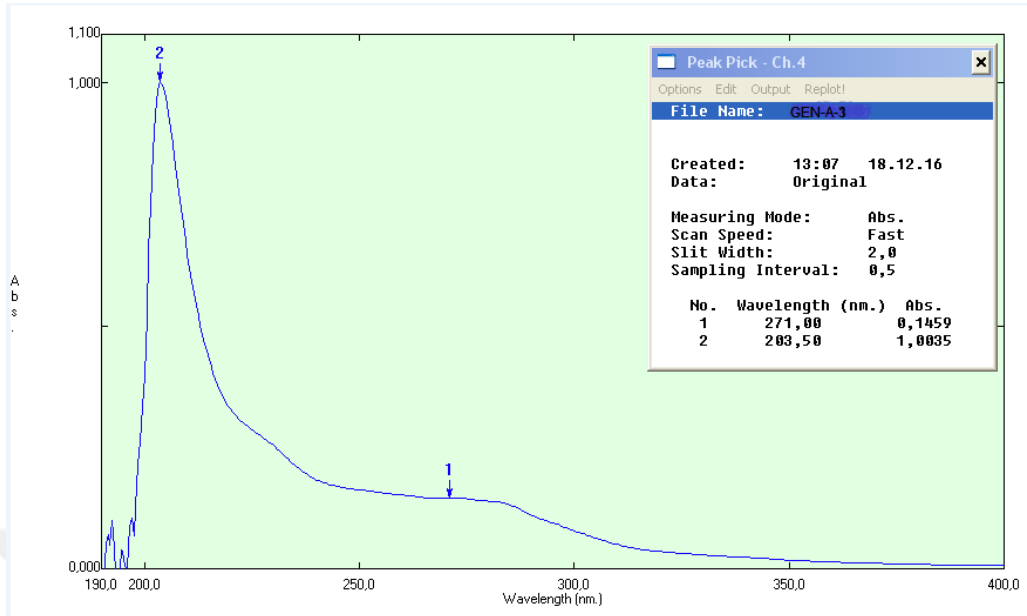
GEN-A-3 (**2**) maddesinin yapı tayini HSQC (Şekil 3.36), HMBC (Şekil 3.37) spektrumları ile doğrulandı. HMBC ve COSY korelasyonları Çizelge 3.11'de verilmektedir. HMBC spektrumunda  $\delta$  4.35 (*d*, *J*=7.8 Hz, H-1') ppm'de rezonans olan H-1', 78.8 ppm'de rezonans olan C-3 ile etkileşmesi şekerin anomerik protonunun, aglikonun C-3 pozisyonuna bağlı olduğunu gösterdi.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.38), moleküler iyon piki  $[M]^+$  izlenemedi. Ancak *m/z* 396 [M-şeker]<sup>+</sup> piki ve *m/z* 380 [C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>]<sup>+</sup> piki C<sub>34</sub>H<sub>56</sub>O<sub>6</sub> kapalı formülünü önerdi. *m/z* 163 [M-C<sub>28</sub>H<sub>46</sub>O]<sup>+</sup> ve *m/z* 179 [M-C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>]<sup>+</sup> pikleri glukoz şekerinin yapıda varlığını ayrıca göstermektedir (Mattias v, 2008).

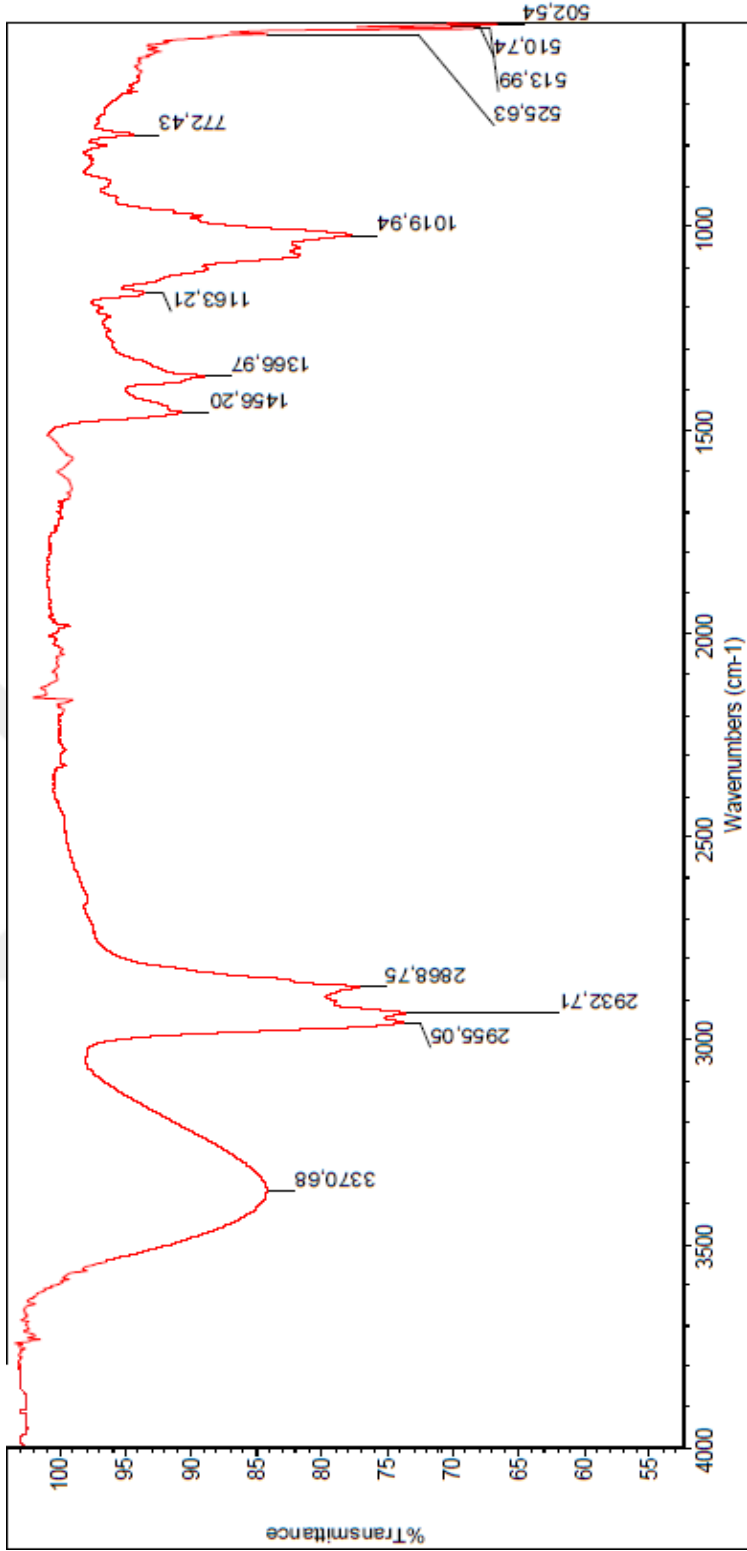
Yukarıda verilen spektral veriler ve fizikokimyasal özellikler kullanıldığında ve literatür ile karşılaştırıldığında GEN-A-3 (**2**) maddesinin ergosta 5,22-dien 3-*O*- $\beta$ -*D*-glukopiranozit (Şekil 3.31) (30 mg) olduğu belirlendi (Mattias v, 2008).

Çizelge 3-11. GEN-A-3 (2) saf maddesinin NMR spektral değerleri (600MHz, CD<sub>3</sub>OD)

C.no.	<sup>13</sup> C-NMR (δ)	<sup>1</sup> H-NMR (δ)	HMBC	COSY
1	37.2	1.77 (1H, <i>m</i> ), 0.96 (1H, <i>m</i> )	H-19	
2	20.1	1.50 (1H, <i>m</i> ), 1.47 (1H, <i>m</i> )		H-3
3	78.8	3.56 (1H, <i>m</i> )	H-1'	H-2, H-4
4	38.5	2.37 (1H, <i>m</i> ), 2.23 (1H, <i>m</i> )		H-3
5	140.3	-	H-19	
6	121.7	5.33 (1H, <i>br.s</i> )		
7	31.8	1.49 (1H, <i>m</i> ), 1.17 (1H, <i>m</i> )	H-6	
8	31.7	1.75 (1H, <i>m</i> )		
9	50.2	0.84 (1H, <i>m</i> )		
10	36.6	-	H-19	
11	20.9	1.50 (1H, <i>m</i> ), 1.37 (1H, <i>m</i> )	H-19	
12	39.6	1.93 (1H, <i>m</i> ), 1.11 (1H, <i>m</i> )	H-18	
13	42.1	-	H-18	
14	55.9	1.05 (1H, <i>m</i> )	H-17	
15	28.1	1.86 (1H, <i>m</i> ), 1.21 (1H, <i>m</i> )	H-17	
16	28.3	1.77 (1H, <i>m</i> ), 1.17 (1H, <i>m</i> )		
17	56.8	0.97 (1H, <i>m</i> )	H-18	
18	11.7	0.67 (3H, <i>s</i> )	H-14	
19	19.2	0.98 (3H, <i>s</i> )		
20	40.1	1.85 (1H, <i>m</i> )	H-22	
21	20.6	0.97 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.5 Hz)	H-22	
22	135.7	5.12 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.3; 7.7 Hz)		
23	131.6	5.19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 14.80; 7.3 Hz)	H-28	H-24
24	42.8	1.77 (1H, <i>m</i> )	H-22, H-26, H-27, H-28	H-23, H-28
25	33.0	1.39 (1H, <i>m</i> )	H-26, H-27, H-28	H-26
26	18.9	0.79 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.14 Hz)		H-25
27	19.5	0.81 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.78 Hz)		
28	17.2	0.83 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.9 Hz)	H-24, H-25	H-24
1'	101.1	4.35 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7,8 Hz)		H-2'
2'	73.6	3.18 (1H, <i>m</i> )	H-3', H-4'	H-1', H-3'
3'	76.5	3.32 (1H, <i>m</i> )	H-1', H-2', H-4'	H-2'
4'	60.2	3.38 (1H, <i>m</i> )	H-3'	
5'	76.1	3.25 (1H, <i>m</i> )		H-6'
6'	61.6	3.69 (1H, <i>m</i> ), 3.81 (1H, <i>m</i> )		H-5'

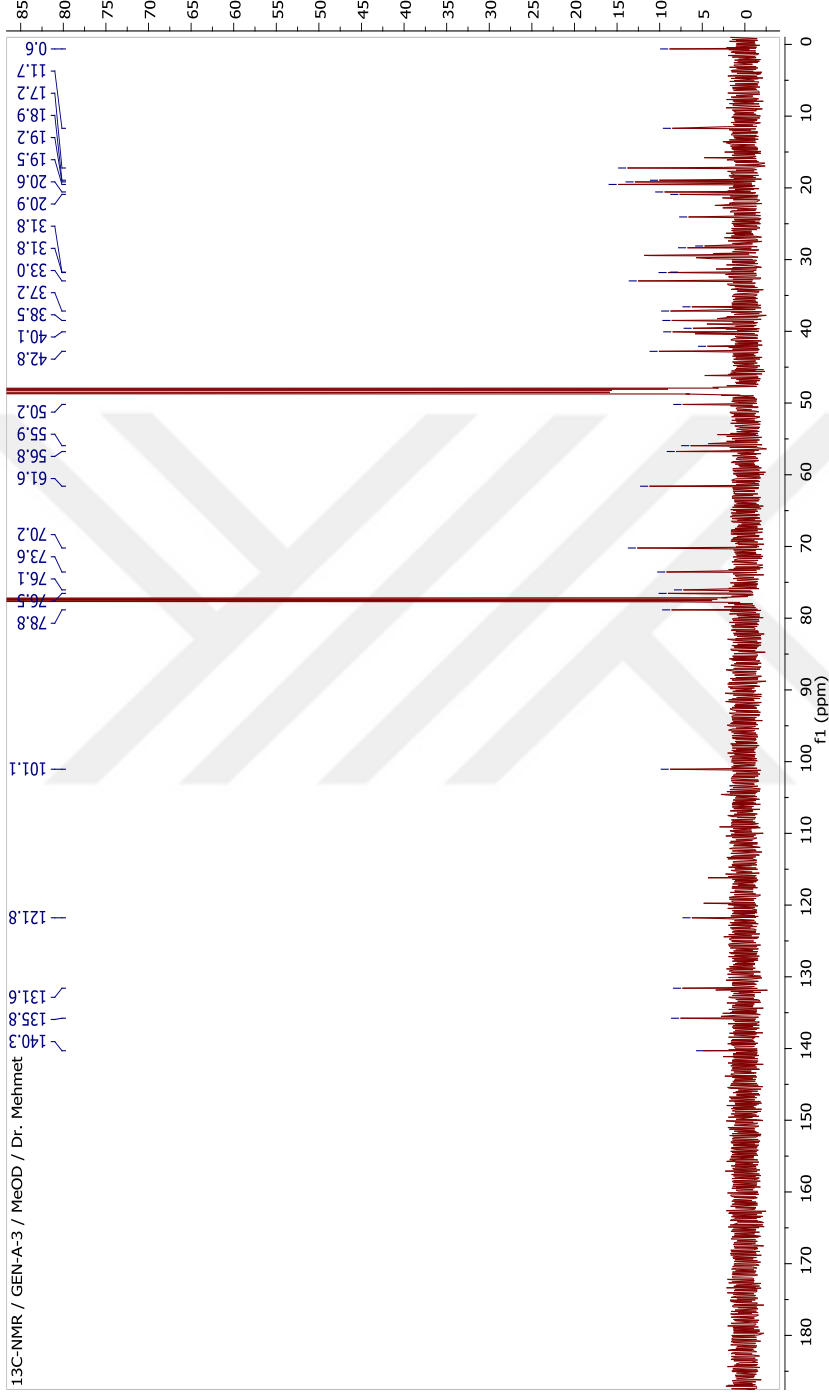


Şekil 3.33. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin UV spektrumu

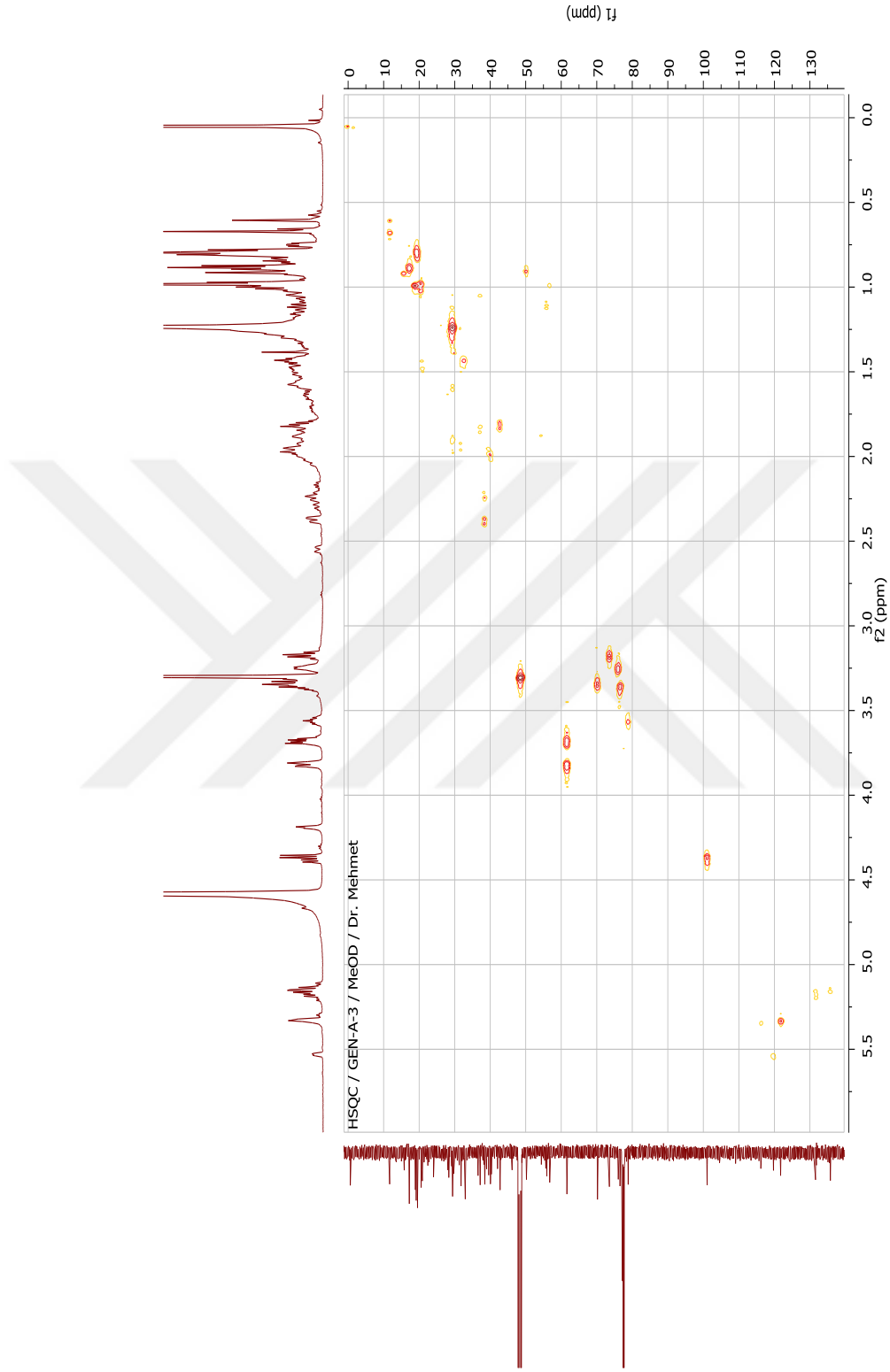


Şekil 3.34. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin FTIR spektrumu





Şekil 3.36 GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin <sup>13</sup>C spektrumu (150 MHz; CD<sub>3</sub>OD)



Şekil 3.37 GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu



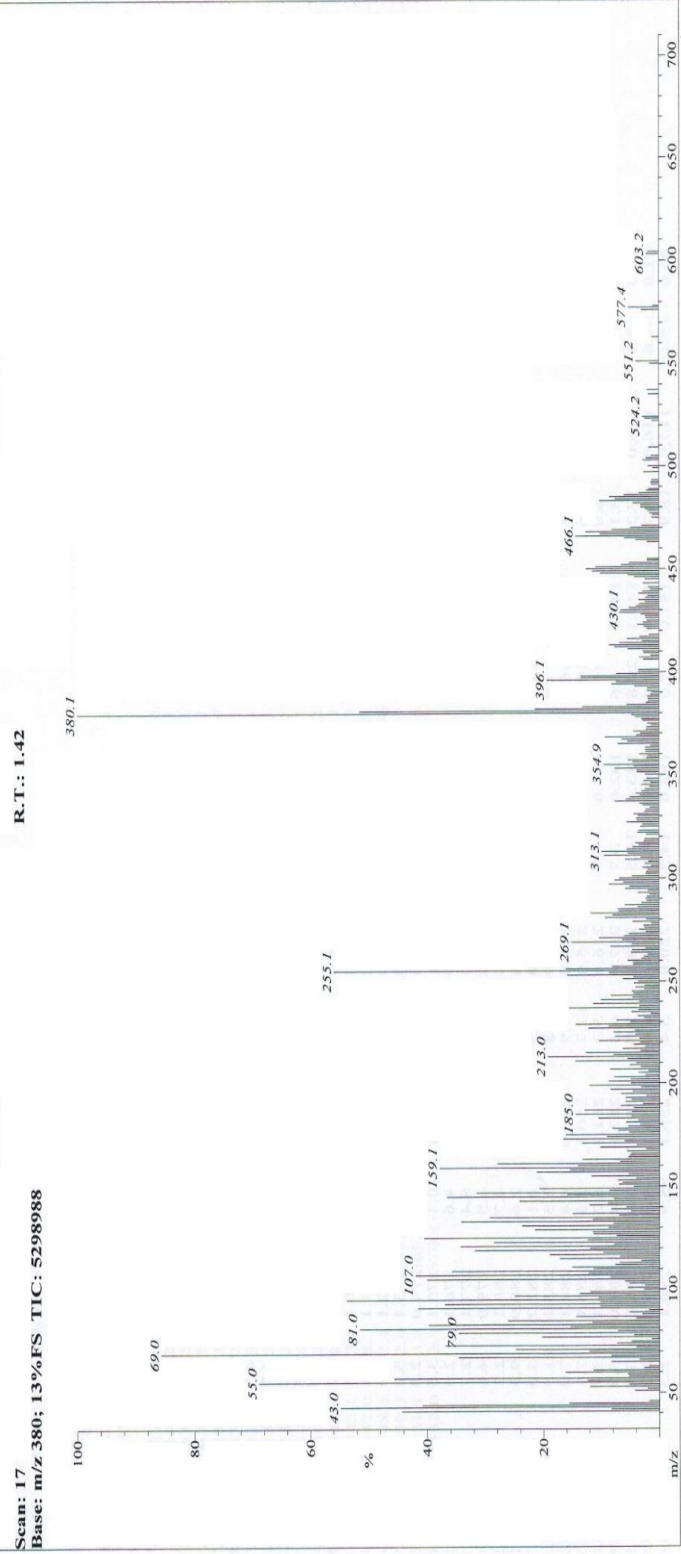
Şekil 3.38. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu



Sample: DR. MEHMET /DR. IQBAL  
Instrument: JEOL MS 600H-1

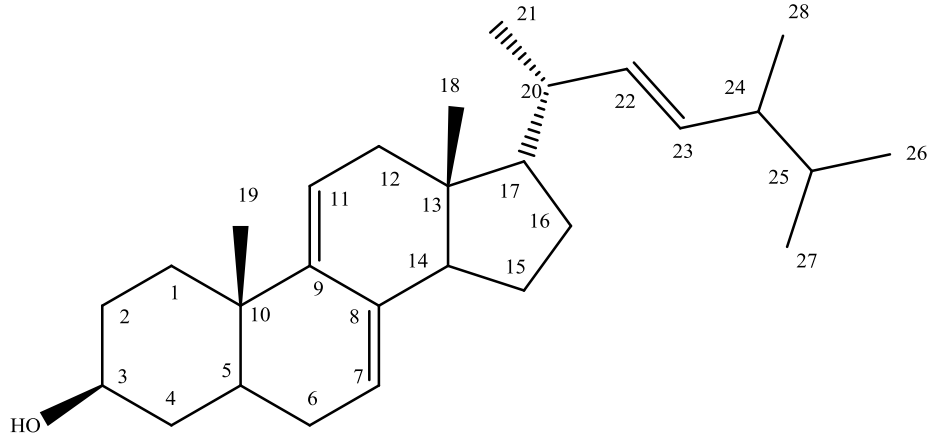
Ionization mode: EI+

Scan: 17  
Base: m/z 380; 13%FS TIC: 5298988



Şekil 3.39. GEN-A-3 (2) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu

### 3.7.3. GEN-A-5 (3) = Ergosta-7,9,22-trien



Şekil 3.40 GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEN-A-5 (3) (5 mg) maddesi bölüm 3.4.1.'de ifade edildiği gibi elde edilmiş olup yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEN-A-5 (3) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisinde, UV lamba (254 nm) altında koyu bir halka şeklinde görülen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) mor renk aldı.

<sup>13</sup>C-NMR spektrumu (150 MHz, Şekil 3.41) ve DEPT 135 (Şekil 3.43) spektrumları beraber değerlendirildiğinde 6 metil, 7 metilen, 11 metin ve 4 katerner karbon belirlendi. Aşağı alanda  $\delta$  141.4, 139.8, 135.5, 131.9, 119.6 ve 116,3 ppm'de rezonans olan pikler sırası ile C-9, C-8, C-23, C-22, C-11 ve C-7 karbonlarına aittir.  $\delta$  70.4, 55.7 ve 54.5 ppm'de rezonans olan sinyaller sırası ile C-3, C-17 ve C-14 pozisyonlarındaki karbonlara aittir.  $\delta$  21.9, 19.9, 19.6, 17.6, 16.3 ve 12.0 ppm'de rezonans olan pikler molekülde bulunan 6 adet metil sinyalleridir.

<sup>1</sup>H- NMR spektrumunda (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Şekil 3.40)  $\delta$  0.61 (s, H-18, 3H) ve 0.92 (s, H-19, 3H) ile  $\delta$  0.80 (d,  $J= 7.2$  Hz, H-27, 3H),  $\delta$  0.81 (d,  $J= 7.2$  Hz, H-26, 3H),  $\delta$  0.89 (d,  $J= 6.6$  Hz, H-28, 3H) ve  $\delta$  1.02 (d,  $J= 6.0$  Hz, H-21, 3H) ppm'de rezonans olan pikler karakteristik lanostan tipi steroide aittir.  $\delta$  5.36 (t,  $J= 2.4$  Hz, H-7, 1H) ile  $\delta$  5.55 (t,  $J= 3.6$  Hz, H-11, 1H) ppm'de rezonans olan hidrojenler halka içindeki çift bağ karakteristiğini taşımaktadırlar. Buna ilaveten  $\delta$  5.20 (dd,  $J= 15.0;7.2$  Hz, H-22, 1H) ve  $\delta$  5.15 (dd,  $J= 15.6;7.2$  Hz, H-23, 1H) ppm'de rezonans olan hidrojenler

lanostan tipi steroidin yapısının zincirindeki çifte bağa ait hidrojenlerin karakteristiklerini taşımaktadırlar.  $\delta$  3.60 (*m*, H-3, 1H) ppm'de rezonans olan pik lanostan tipi steroidin C-3 pozisyonundaki hidrojenine ait olup multiplet yarılması hidrojenin  $\alpha$ , dolayısıyla hidroksilin  $\beta$  konumunda olduğunu göstermektedir.

GEN-A-5 (**3**) maddesinin yapı tayini HSQC (Şekil 3.44), HMBC (Şekil 3.45) spektrumları ile doğrulandı. HMBC ve HSQC korelasyonları Çizelge 3.12'de verilmektedir.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.46), moleküler iyon piki 396,3 [M]<sup>+</sup> piki C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O yapısını önerdi. *m/z* 271,2 [M-C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>]<sup>+</sup> steroidin zincirinin ayrılmasıdır. Buradan da 1 molekül su ayrıldığı zaman *m/z* 253,1 [271,2-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> piki izlendi.

Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında GEN-A-5 (**3**) maddesinin 3- $\beta$ -*O*-ergosta-7,9,22-trien (Şekil 3.39) (5 mg) olduğu belirlendi (Abraham vd, 1974).

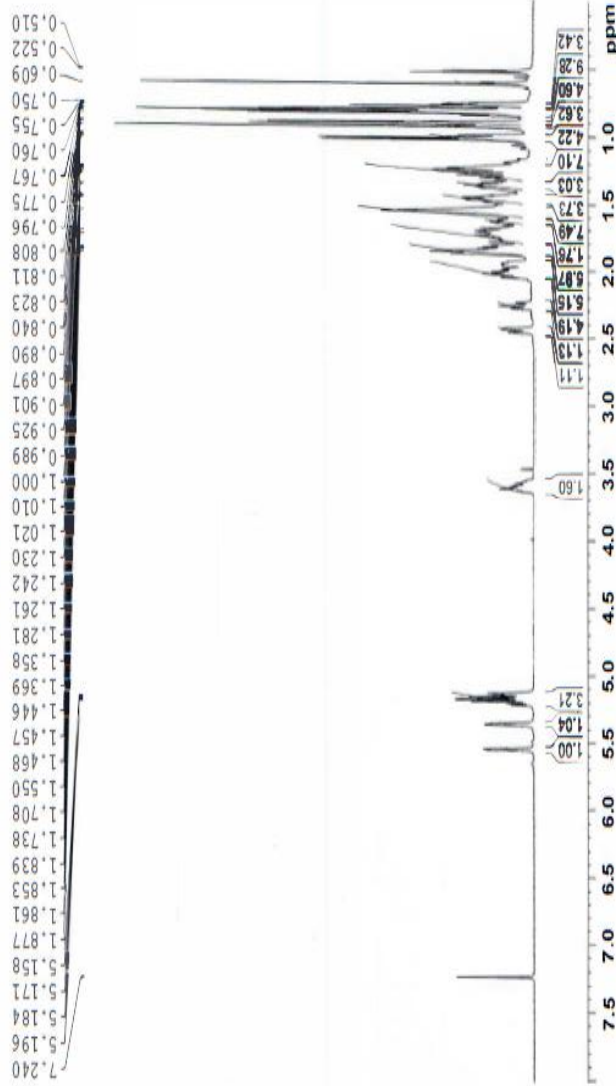
Çizelge 3-12. GEN-A-5 (3) saf maddesinin NMR spektral değerleri (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Pozisyon	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	HMBC	COSY
1	31,4	1,55 (1H, <i>m</i> )	H-6	H-2
2	32,0	1,86 (1H, <i>m</i> ); 1,47 (1H, <i>m</i> )	H-8; H-3, H-19	
3	70,4	3,60 (1H, <i>m</i> )		
4	40,8	2,43 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =14,4; 1,8 Hz); 2,26 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =13,2 Hz)	H-2; H-6; H-7; H-11	H-5
5	40,2	1,37 (1H, <i>m</i> )	H-14	H-1
6	38,4	1,88 (1H, <i>m</i> ); 1,28 (1H, <i>m</i> )	H-2; H-3; H-19	H-7
7	116,3	5,36 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =2,4 Hz)	H-11; H-14	H-6
8	139,8	-	H-2; H-7	
9	141,4	-	H-5; H-11	
10	34,0	-		
11	119,6	5,55 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =3,6 Hz)	H-7; H-12; H-6	H-12
12	39,1	2,04 (1H, <i>m</i> ); 1,23 (1H, <i>m</i> )		H-11
13	37,0	-	H-15	
14	54,5	1,86 (1H, <i>m</i> )	H-7	
15	23,0	1,35 (1H, <i>m</i> ); 1,63 (1H, <i>m</i> )	H-16	
16	28,9	1,73 (1H, <i>m</i> ); 1,28 (1H, <i>m</i> )	H-12; H-17	
17	55,7	1,23 (1H, <i>m</i> )	H-16; H-21; H-20	H-20
18	12,0	0,61 (3H, <i>s</i> )	H-12; H-14	
19	17,6	0,92 (3H, <i>s</i> )	H-5; H-6	
20	40,4	2,01 (1H, <i>m</i> )	H-22; H-23; H-14	H-17
21	21,09	1,02 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,0 Hz)	H-17; H-20; H-22; H-23	
22	131,9	5,20 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,0; 7,2 Hz)	H-24; H-28	H-23
23	135,5	5,15 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,6; 7,2 Hz)	H-16; H-24	H-22
24	42,8	1,83 (1H, <i>m</i> )	H-21; H-23	H-25
25	33,1	1,45 (1H, <i>m</i> )	H-22; H-23; H-26; H-27; H-28	H-24
26	19,9	0,81 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,2 Hz)	H-24; H-27; H-28	
27	19,6	0,80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,2 Hz)	H-24; H-26; H-28	
28	16,3	0,89 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	H-24; H-26; H-27; H-22	

DR. MEHMET / DR. İQBAL / GEC-A-5 /  
CDCl<sub>3</sub> 1H

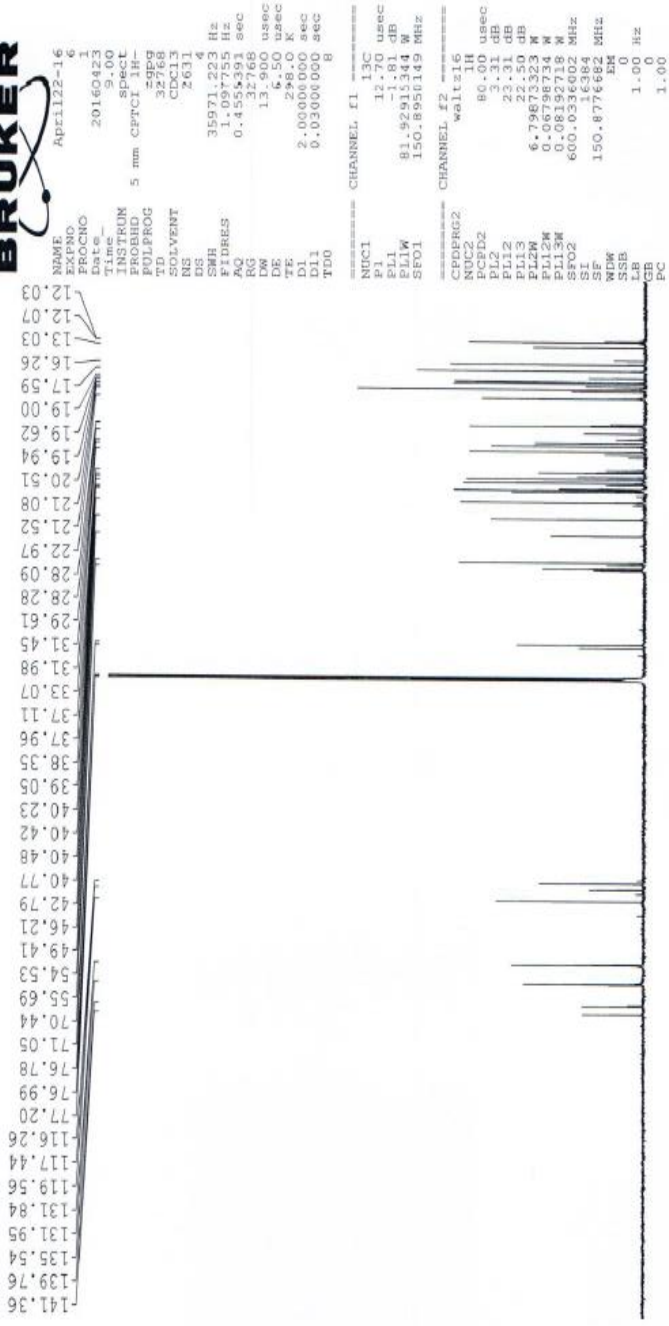
Avance 600MHz  
Cryo-Probe (LC)

NAME April128-16  
EXPNO 1  
PROCNO 1  
FILE 20160408  
TITLE  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm CPTCI 1H-  
TDUPROG zgpg30  
SOLVENT CDCl<sub>3</sub>  
NS 8  
SWH 12019.230 Hz  
FIDRES 0.366798 Hz  
AQ 1.3632704 sec  
RG 41.600 usec  
DE 6.50 usec  
TE 300.2 K  
D1 2.00000000 sec  
TDO 1  
CHANNEL f1 1H  
NDC1 1H  
P1 8.00 usec  
PL1 0.00 dB  
PL12 6.79873323 dB  
SFO1 600.0348002 MHz  
SI 32768  
WDW 64  
SSB 0  
LB 0.50 Hz  
PC 1.40

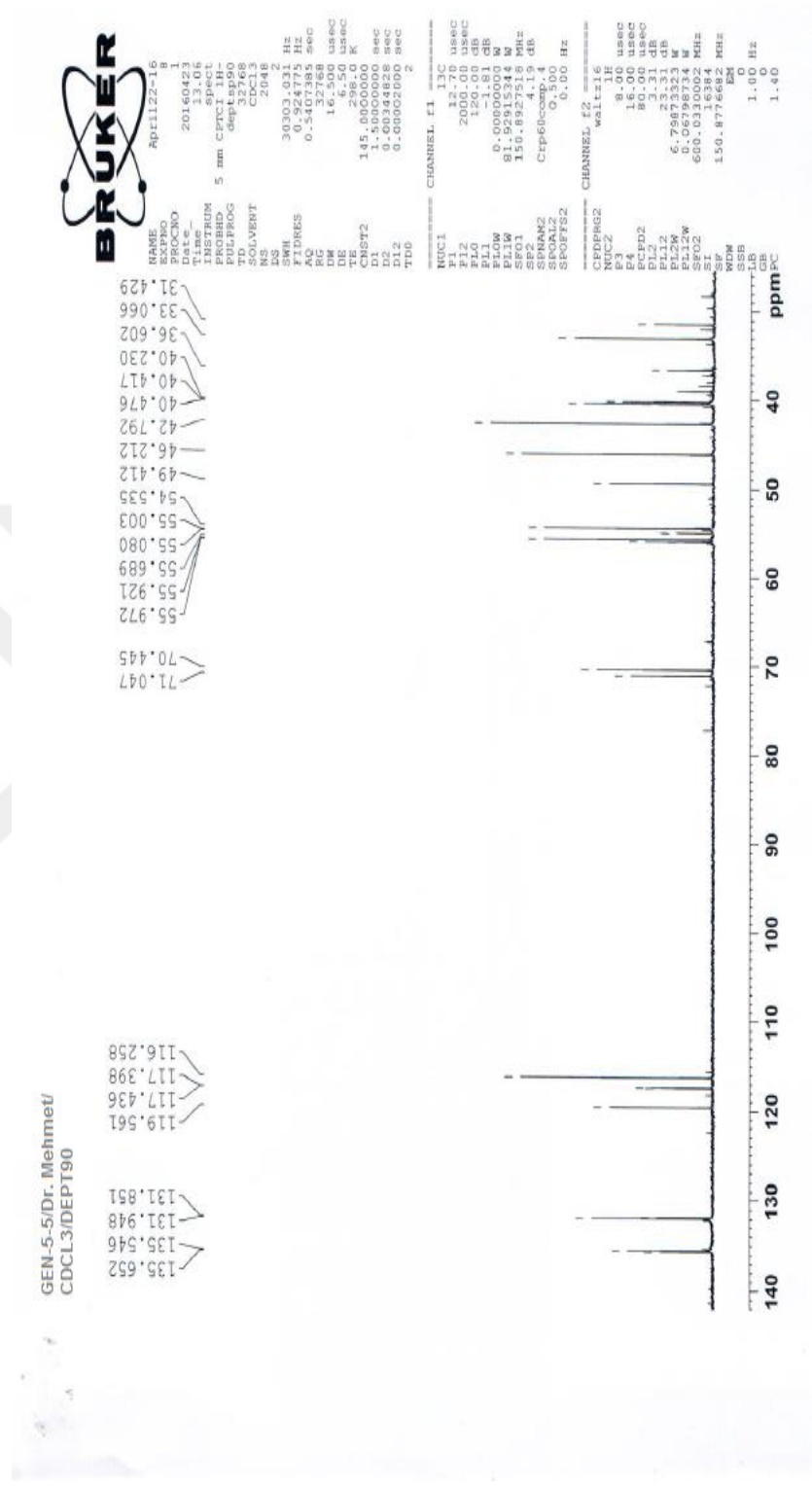


Şekil 3.41. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

GEN-A-5/ Dr. Mehmet/ BB



Şekil 3.42. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin <sup>13</sup>C spektrumu (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

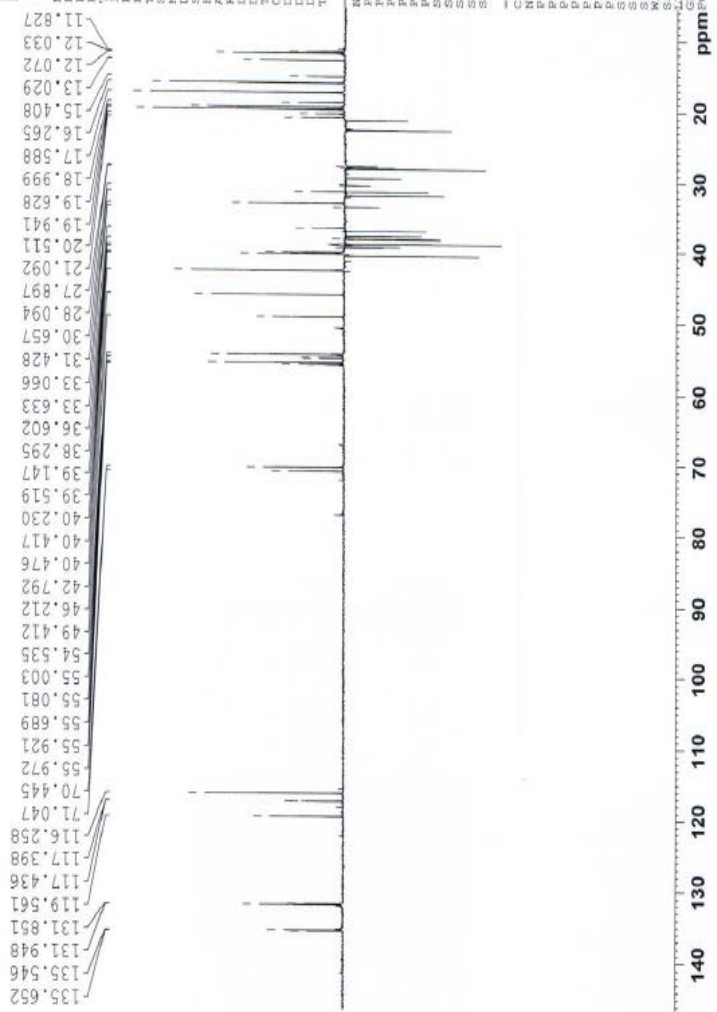


Şekil 3.43. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin DEPT90 spektrumu

GEN-A-5/Dr. Mehmet/ CDCI3/  
DEPT135



NAME Apr1122-16  
EXPNO 7  
PROCNO 1  
Date\_ 20160423  
Time 10.43  
PROBHD 5 mm CPTCP135  
PULPROG deptcp135  
TD 32768  
CQ 4096  
NS 4096  
DS 2  
SWH 30303.031 Hz  
F2 2000.00 MHz  
RG 0.5407185 sec  
AQ 32768  
SFO1 150.8927518 MHz  
WDW 16.000 usec  
SSB 0.0000000 sec  
B0 298.1 K  
CHST2 145.0000000 sec  
D2 0.08344928 sec  
D12 0.08344928 sec  
D12 0.08002000 sec  
TDD 4



Şekil 3.44. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu







HEJ-ICCBS  
2/15/2017 10:21:12 AM

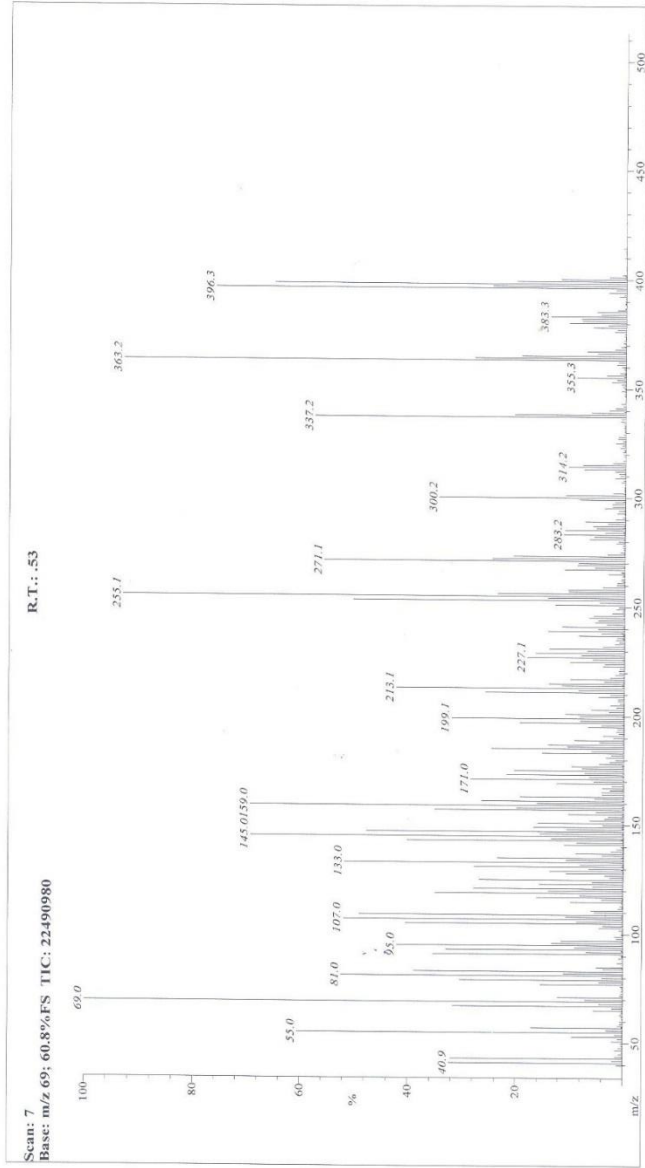
Date Run: 02-15-2017 (Time Run: 10:10:35)

File: GEN-A51  
Sample: SADIA SIDDIQ /DR. IQBAL  
Instrument: JEOL MS 600H-1

Ionization mode: EI+

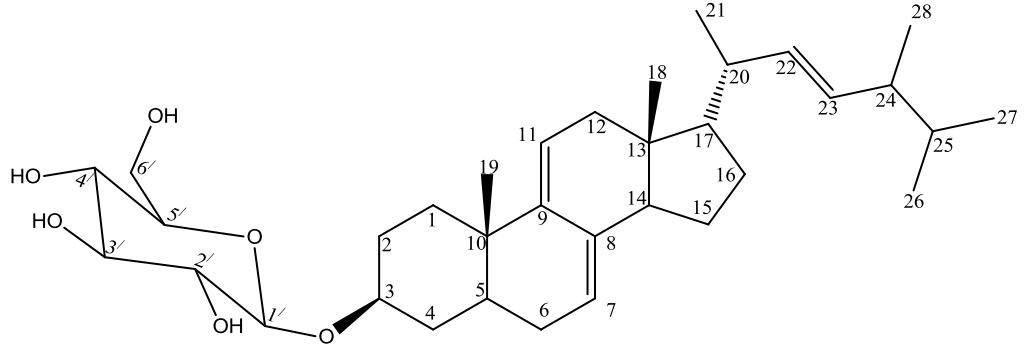
R.T.: .53

Scan: 7  
Base: m/z 69; 60.8%FS TIC: 22.490980



Şekil 3.47. GEN-A-5 (3) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu

### 3.7.4. GEN-A-4 (4) = Ergosta 7,9,22 trien 3-O- $\beta$ -D-glukozit



Şekil 3.48 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEN-A-4 (4) maddesi (8,5 mg) bölüm 3.2.1.'de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEN-A-4 (4) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka plakta UV lamba (254 nm) altında görülmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) kahverengi olarak görüldü.

$^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (125 MHz, Şekil 3.49) HSQC (Şekil 3.52) spektrumu ile birlikte değerlendirildiğinde 6 metil, 8 metilen, 16 metin ve 4 katerner karbon gözlemlendi. Aglikon kısmı  $\delta$  141.2 (C-9),  $\delta$  138.9 (C-8),  $\delta$  135.3 (C-22),  $\delta$  131.6 (C-23),  $\delta$  119.6 (C-11),  $\delta$  115.9 (C-7) piklerini vererek lanostan tipi steroid olduğunu belirtti. Şeker kısmında 100.8 ppm ile 61.4 ppm arasında rezonans olan 6 adet karakteristik şeker piki de izlendi.  $\delta$  20.7, 19.5, 19.2, 17.2, 15.7 ve 11.6 ppm'de rezonans olan pikler molekülde bulunan 6 adet metil sinyaline aittir.

$^1\text{H}$ - NMR spektrumunda (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ , Şekil 3.48)  $\delta$  0.46 (s, H-18, 3H) ve 0.77 (s, H-19, 3H) ile  $\delta$  0.74 (d,  $J= 7.0$  Hz, H-28, 3H),  $\delta$  0.66 (d,  $J= 7.0$  Hz, H-26, 3H),  $\delta$  0.65 (d,  $J= 7.0$  Hz, H-27, 3H) ve  $\delta$  0.86 (d,  $J= 6.5$  Hz, H-21, 3H) ppm'de rezonans olan pikler karakteristik lanostan tipi steroide ait metiller pikleridir.  $\delta$  5.40 (t,  $J= 3.5$  Hz, H-7, 1H) ile  $\delta$  5.20 (q  $J= 3.0$  Hz, H-11, 1H) ppm'de rezonans olan hidrojenler halka içindeki çift bağ karakteristiğini taşımaktadırlar. Buna ilaveten  $\delta$  5.00 (dd,  $J= 15.5; 7.5$  Hz, H-23, 1H) ve  $\delta$  5.05 (dd,  $J= 15.0; 7.0$  Hz, H-22, 1H) ppm'de rezonans olan hidrojenler lanostan tipi steroidin yapısının zincirindeki çifte bağa ait

hidrojenlerin karakteristiklerini taşımaktadırlar.  $\delta$  3.52 (*m*, H-3, 1H) ppm'de rezonans olan pik lanostan tipi steroidin C-3 pozisyonundaki hidrojenine ait olup multiplet yarılanması hidrojenin  $\alpha$  konumunda olduğunu göstermektedir.  $\delta$  2.41 (*dt*,  $J=14.5$ ; 11.5 Hz, H-4a) ile 2.15 (*t*,  $J=14.5$  Hz, H-4b) ppm'de rezonans olan hidrojenler C-4 karbonuna aittir. Buradaki yarılmalara göre H-3 protonu  $\alpha$  konumunda olduğundan H-5 protonu da  $\alpha$  konumundadır.  $\delta$  4.25 (*d*,  $J=7.5$  Hz, H-1') ppm'de rezonans olan H-1', şekerin anomerik protonuna ait olup, şekerin  $\beta$  olduğunu göstermektedir.

GEN-A-4 (**4**) maddesinin yapı tayini HSQC (Şekil 3.52), HMBC (Şekil 3.53) spektrumları ile doğrulandı. HMBC ve COSY korelasyonları Çizelge 3.13'de verilmektedir. HMBC spektrumunda  $\delta$  4.35 (*d*,  $J=7.5$  Hz, H-1') ppm'de rezonans olan H-1', 77.3 ppm'de rezonans olan C-3 ile etkileşmesi şekerin anomerik protonunun, aglikonun C-3 pozisyonuna bağlı olduğunu gösterdi.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.54), moleküler iyon piki  $[M]^+$  558,4'de izlendi ve  $C_{34}H_{56}O_6$  kapalı formülünü önerdi. Ayrıca  $m/z$  396,2  $[M\text{-şeker}(C_6H_{11}O_5)]^+$  piki ve  $m/z$  378,2  $[C_{28}H_{42}]^+$  pikleri  $C_{34}H_{56}O_6$  kapalı formülünü destekledi.  $m/z$  179,0  $[M\text{-}C_{28}H_{42}]^+$  pikleri glukoz şekerinin yapıda varlığını ayrıca göstermektedir.

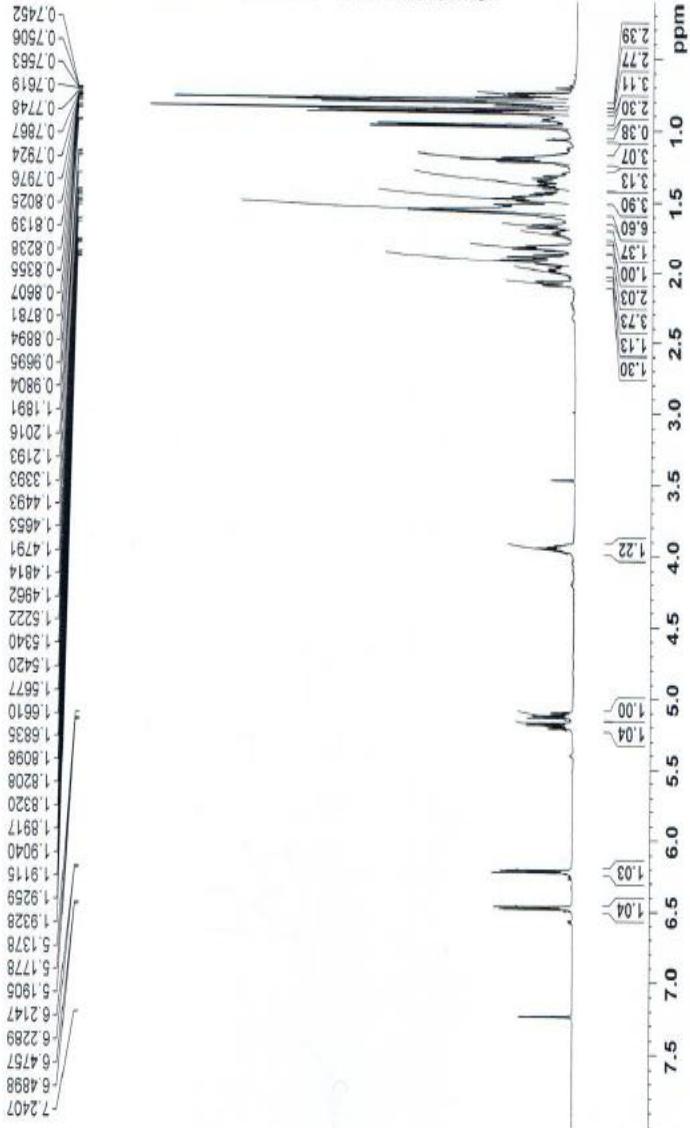
Yukarıda verilen spektral veriler ve fizikokimyasal özellikler kullanıldığında ve literatür ile karşılaştırıldığında GEN-A-4 (**4**) maddesinin ergosta 7,9,22 trien 3-*O*- $\beta$ -*D*-glukopiranozit (Şekil 3.47) (8,5 mg) olduğu belirlendi (Bei-Bei Zhang vd, 2013).

Çizelge 3-13. GEN-A-4 (4) kodlu saf maddesinin NMR spektral değerleri (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

Pozisyon	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	HMBC	COSY
1	28.0	1,15 (1H, <i>m</i> ); 1,59 (1H, <i>m</i> )	H-6; H-2	H-2
2	29.6	1,44 (1H, <i>m</i> ); 1,81 (2H, <i>m</i> )	H-3; H-19	H-1
3	77.3	3,3 (1H, <i>m</i> )	H1'	
4	36.9	2,15 (1H, <i>m</i> ); 2,41 (1H, <i>m</i> )	H-2; H-6; H-7; H-11	H-5
5	45.9	1,78 (1H, <i>m</i> )	H-14	H-4, H-6
6	38.0	1,13 (1H, <i>m</i> ); 1,74 (1H, <i>m</i> )	H-2; H-3; H-5; H-19	H-7
7	115.9	5,4 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =3,5 Hz)	H-11; H-14	H-6
8	138.9	-	H-6; H-7	
9	141.2	-	H-5; H-11	
10	36.9	-		
11	119.6	5,20 (1H, <i>q</i> , <i>J</i> =3,0)	H-7; H-12	H-12
12	38.7	1,10 (1H, <i>m</i> ); 1,91 (1H, <i>m</i> )		H-11
13	42.4	-	H-15	
14	55.4	1,09 (1H, <i>m</i> )	H-7	
15	22.6	1,20 (1H, <i>m</i> ); 1,50 (1H, <i>m</i> )	H-16	
16	27.9	1,18 (1H, <i>m</i> ); 1,59 (1H, <i>m</i> )	H-12; H-17	
17	54.2	1,73 (1H, <i>m</i> )	H-16; H-21; H-20	
18	11.6	0,46 (3H, <i>s</i> )	H-12; H-14	
19	15.7	0,77 (3H, <i>s</i> )	H-5; H-6	
20	40.1	1,86 (1H, <i>m</i> )	H-22; H-23; H-14	H-17
21	20.7	0,87 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,5 Hz)	H-17; H-20; H-22; H-23	
22	135.3	5,0 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,5 Hz)	H-24; H-28	H-23
23	131.6	5,04 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7 Hz)	H-16; H-24	H-22
24	42.5	1,68 (1H, <i>m</i> )	H-21; H-23	H-25
25	32.7	1,3 (1H, <i>m</i> )	H-22; H-23; H-26; H-27; H-28	H-24
26	19.2	0,63 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> =7,0 Hz)	H-24; H-27; H-28	
27	19.5	0,65 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> =7,0 Hz)	H-24; H-26; H-28	
28	17.2	0,45, <i>s</i>	H-24; H-2; H-27; H-22	
1'	100.8	4,25 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,5 Hz)	H-2'; H-3	
2'	73.2	3,07 (1H, <i>m</i> )	H-3'	
3'	76.1	3,24 (1H, <i>m</i> )	H-1'; H-4'	
4'	69.8	3,25 (1H, <i>m</i> )	H-3'; H-5'	
5'	75.5	3,12 (1H, <i>m</i> )	H-4'	
6'	61.4	3,58 (1H, <i>m</i> ); 3,67 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =12,0;3,0 Hz)	H-5'	

GEN-A-4/DR.Mehmet/CDCI3

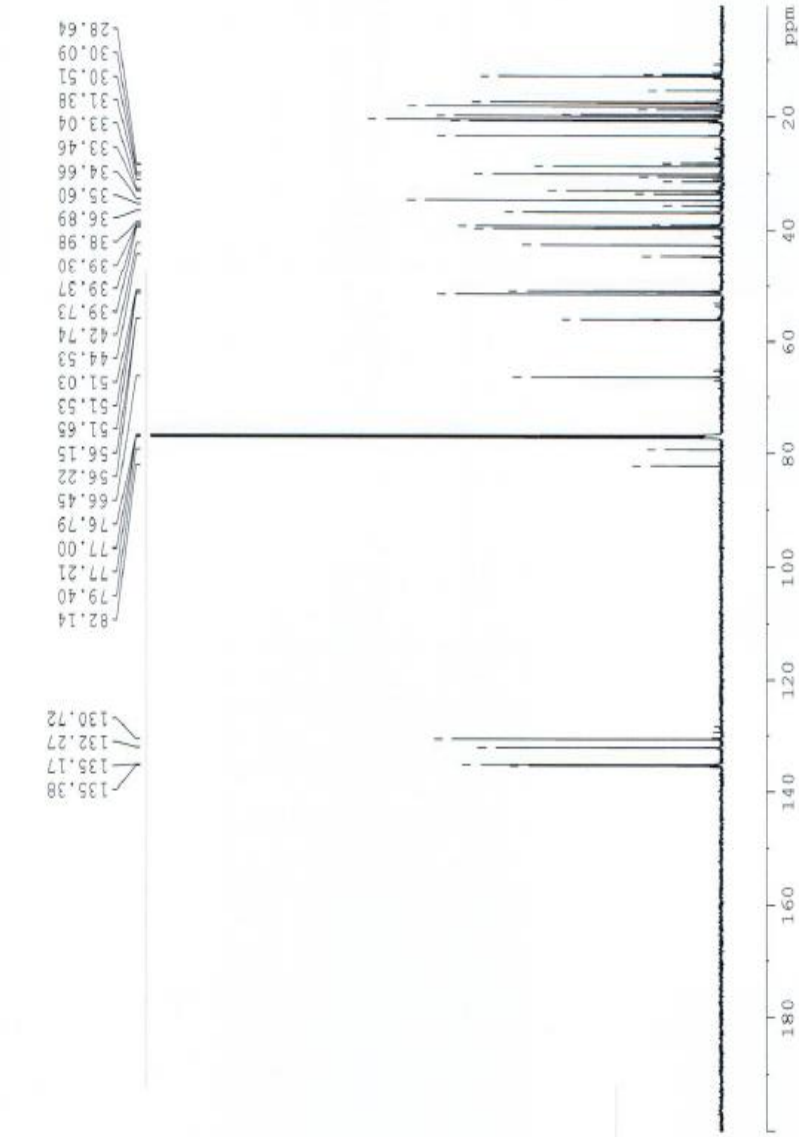
AVANCE AV-600  
CRYO PROBE  
LAB NO: 108



Şekil 3.49 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>)

GEN-A-4/DR.Mehmet/CDCl3

BB



AVANCE AV-600  
CRYO PROBE  
LAB NO: 108

NAME April17-16  
EXPRO  
PROCNO 1  
Date 20160411  
Time 8.06  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm CPTCI LR-  
PULPROG zgpg30  
SOLVENT CDCl3  
NS 2609  
DS 3591.27 Hz  
SWH 1.997755 Hz  
FIDRES 0.4555391 sec  
AQ 32768  
RG 13.50 usec  
DE 6.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 1.50000000 sec  
D11 0.03000000 sec  
T00 12

CHANNEL F1  
NUC1 13C  
P1 13.00 usec  
PL1 0.00 dB  
FELW 83.60149384 MHz  
SFO1 150.9453107 MHz

CHANNEL F2  
NAME walzig  
NUC2 1H  
P2 65.00 usec  
PL2 0.00 dB  
FEL2 27.06 MHz  
FLL2 27.06 MHz  
PL13 27.00 dB  
PL14 27.00 dB  
PL15 9.1630078 W  
PL16 0.03000000 W  
PL17 0.03000000 W  
SFO2 600.2336014 MHz  
SI 16384  
SF 150.95279576 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 0.50

Şekil 3.50 GEN-A-4(4) kodlu saf maddenin <sup>13</sup>C spektrumu (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>)





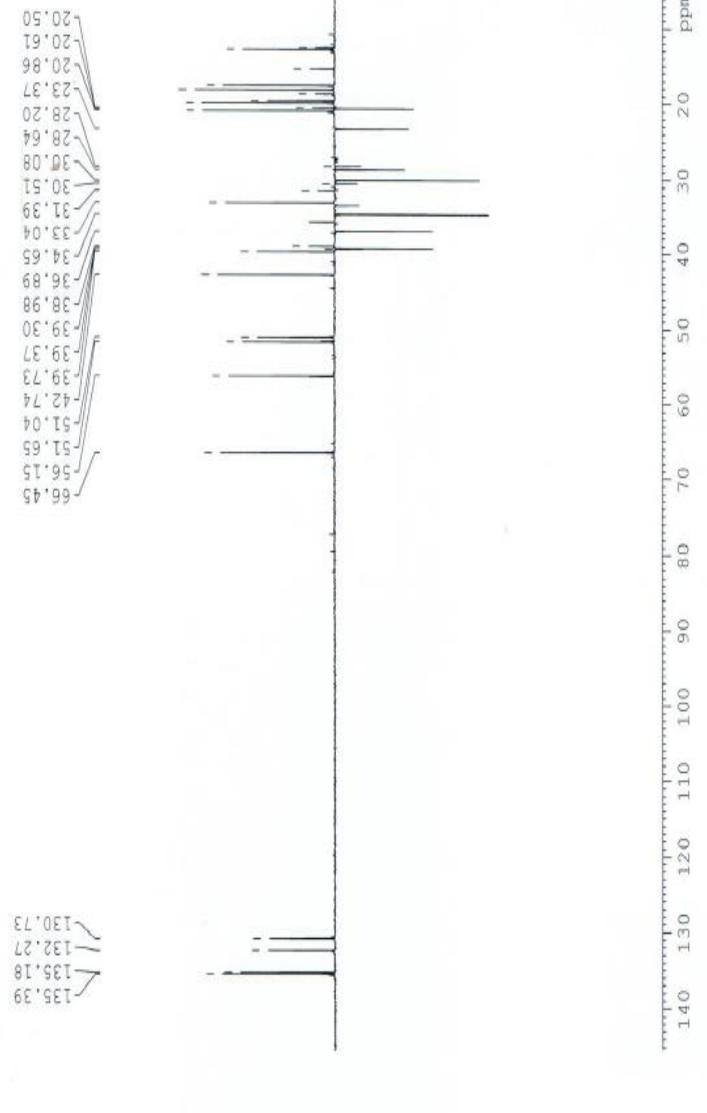
GEN-A-4(DR.Mehmet)/CDCI3  
DEPT135



NAME Apr1117-6  
EXPNO 1  
PROCNO 2016041  
Time 9.35  
INSTRUM Spect  
PULPROG zgpg30  
TD 65536  
SOLVENT CDCl3  
NS 2732  
DS 2  
SWH 30303.031 Hz  
F2 125.761 MHz  
AQRES 0.5403105 Hz  
RG 32768 sec  
LW 16.500 usec  
TE 298.2 K  
CWST2 145.0000000 sec  
D1 0.0034828 sec  
D2 0.0034828 sec  
D12 0.00002000 sec  
TDS 7

CHANNEL F1  
NUC1 13C  
P1 15.00 usec  
PL1 2000.00 dB  
PL2 120.00 dB  
PL3 10.00 dB  
PL4 10.00 dB  
PL5 10.00 dB  
PL6 10.00 dB  
PL7 10.00 dB  
PL8 10.00 dB  
PL9 10.00 dB  
PL10 10.00 dB  
PL11 10.00 dB  
PL12 10.00 dB  
PL13 10.00 dB  
PL14 10.00 dB  
PL15 10.00 dB  
PL16 10.00 dB  
PL17 10.00 dB  
PL18 10.00 dB  
PL19 10.00 dB  
PL20 10.00 dB  
PL21 10.00 dB  
PL22 10.00 dB  
PL23 10.00 dB  
PL24 10.00 dB  
PL25 10.00 dB  
PL26 10.00 dB  
PL27 10.00 dB  
PL28 10.00 dB  
PL29 10.00 dB  
PL30 10.00 dB  
PL31 10.00 dB  
PL32 10.00 dB  
PL33 10.00 dB  
PL34 10.00 dB  
PL35 10.00 dB  
PL36 10.00 dB  
PL37 10.00 dB  
PL38 10.00 dB  
PL39 10.00 dB  
PL40 10.00 dB  
PL41 10.00 dB  
PL42 10.00 dB  
PL43 10.00 dB  
PL44 10.00 dB  
PL45 10.00 dB  
PL46 10.00 dB  
PL47 10.00 dB  
PL48 10.00 dB  
PL49 10.00 dB  
PL50 10.00 dB  
PL51 10.00 dB  
PL52 10.00 dB  
PL53 10.00 dB  
PL54 10.00 dB  
PL55 10.00 dB  
PL56 10.00 dB  
PL57 10.00 dB  
PL58 10.00 dB  
PL59 10.00 dB  
PL60 10.00 dB  
PL61 10.00 dB  
PL62 10.00 dB  
PL63 10.00 dB  
PL64 10.00 dB  
PL65 10.00 dB  
PL66 10.00 dB  
PL67 10.00 dB  
PL68 10.00 dB  
PL69 10.00 dB  
PL70 10.00 dB  
PL71 10.00 dB  
PL72 10.00 dB  
PL73 10.00 dB  
PL74 10.00 dB  
PL75 10.00 dB  
PL76 10.00 dB  
PL77 10.00 dB  
PL78 10.00 dB  
PL79 10.00 dB  
PL80 10.00 dB  
PL81 10.00 dB  
PL82 10.00 dB  
PL83 10.00 dB  
PL84 10.00 dB  
PL85 10.00 dB  
PL86 10.00 dB  
PL87 10.00 dB  
PL88 10.00 dB  
PL89 10.00 dB  
PL90 10.00 dB  
PL91 10.00 dB  
PL92 10.00 dB  
PL93 10.00 dB  
PL94 10.00 dB  
PL95 10.00 dB  
PL96 10.00 dB  
PL97 10.00 dB  
PL98 10.00 dB  
PL99 10.00 dB  
PL100 10.00 dB

CHANNEL F2  
NUC2 13C  
P1 15.00 usec  
PL1 2000.00 dB  
PL2 120.00 dB  
PL3 10.00 dB  
PL4 10.00 dB  
PL5 10.00 dB  
PL6 10.00 dB  
PL7 10.00 dB  
PL8 10.00 dB  
PL9 10.00 dB  
PL10 10.00 dB  
PL11 10.00 dB  
PL12 10.00 dB  
PL13 10.00 dB  
PL14 10.00 dB  
PL15 10.00 dB  
PL16 10.00 dB  
PL17 10.00 dB  
PL18 10.00 dB  
PL19 10.00 dB  
PL20 10.00 dB  
PL21 10.00 dB  
PL22 10.00 dB  
PL23 10.00 dB  
PL24 10.00 dB  
PL25 10.00 dB  
PL26 10.00 dB  
PL27 10.00 dB  
PL28 10.00 dB  
PL29 10.00 dB  
PL30 10.00 dB  
PL31 10.00 dB  
PL32 10.00 dB  
PL33 10.00 dB  
PL34 10.00 dB  
PL35 10.00 dB  
PL36 10.00 dB  
PL37 10.00 dB  
PL38 10.00 dB  
PL39 10.00 dB  
PL40 10.00 dB  
PL41 10.00 dB  
PL42 10.00 dB  
PL43 10.00 dB  
PL44 10.00 dB  
PL45 10.00 dB  
PL46 10.00 dB  
PL47 10.00 dB  
PL48 10.00 dB  
PL49 10.00 dB  
PL50 10.00 dB  
PL51 10.00 dB  
PL52 10.00 dB  
PL53 10.00 dB  
PL54 10.00 dB  
PL55 10.00 dB  
PL56 10.00 dB  
PL57 10.00 dB  
PL58 10.00 dB  
PL59 10.00 dB  
PL60 10.00 dB  
PL61 10.00 dB  
PL62 10.00 dB  
PL63 10.00 dB  
PL64 10.00 dB  
PL65 10.00 dB  
PL66 10.00 dB  
PL67 10.00 dB  
PL68 10.00 dB  
PL69 10.00 dB  
PL70 10.00 dB  
PL71 10.00 dB  
PL72 10.00 dB  
PL73 10.00 dB  
PL74 10.00 dB  
PL75 10.00 dB  
PL76 10.00 dB  
PL77 10.00 dB  
PL78 10.00 dB  
PL79 10.00 dB  
PL80 10.00 dB  
PL81 10.00 dB  
PL82 10.00 dB  
PL83 10.00 dB  
PL84 10.00 dB  
PL85 10.00 dB  
PL86 10.00 dB  
PL87 10.00 dB  
PL88 10.00 dB  
PL89 10.00 dB  
PL90 10.00 dB  
PL91 10.00 dB  
PL92 10.00 dB  
PL93 10.00 dB  
PL94 10.00 dB  
PL95 10.00 dB  
PL96 10.00 dB  
PL97 10.00 dB  
PL98 10.00 dB  
PL99 10.00 dB  
PL100 10.00 dB

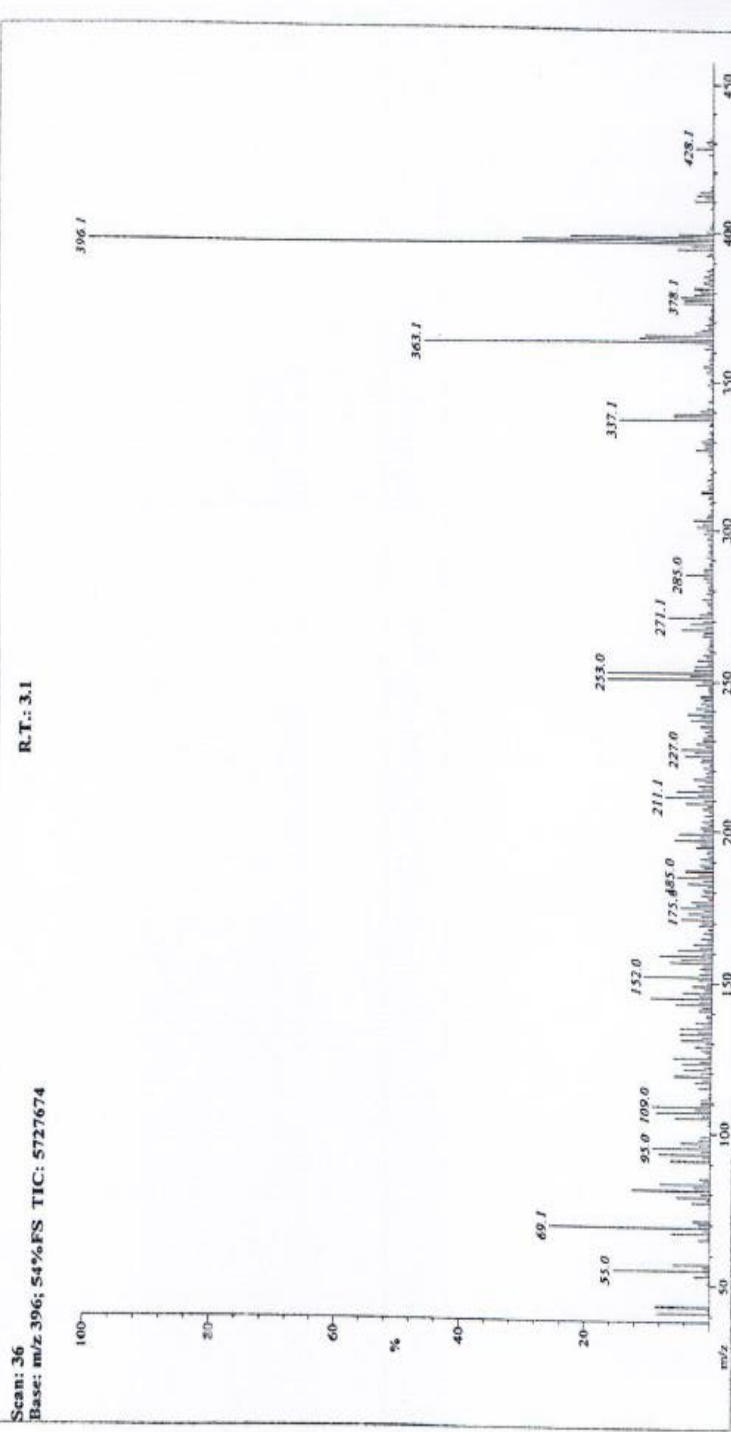


Şekil 3.52 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu





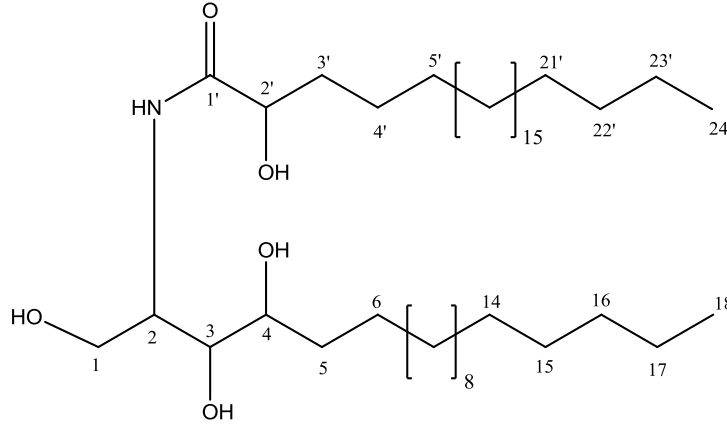
Ionization mode: EI+



Şekil 3.55 GEN-A-4 (4) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu

### 3.8. Pişirilmiş Aseton Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayini

#### 3.8.1. GEC-A-4 (5) = *N*-[1,3,4-trihidroksi, oktadesil]-2'-hidroksi tetrakosanamit



Şekil 3.56 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

Beyaz renkli olan GEC-A-4 (5) bileşiği amorf halde 7.5 mg olarak elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülmeyen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu sarımsak bir renk aldı.

<sup>13</sup>C-NMR spektrumu (150 MHz, Şekil 3.60) ve DEPT 135 (Şekil 3.61) spektrumları beraber değerlendirildiğinde 2 metil, 1 katerner karbon, 4 metin ve 12 metilen belirlendi. Ayrıca sayısı kütle spektrumu (Şekil 3.65) ile belirlenebilen 29 ppm de rezonans olan 25 adet diğer metilenler de belirlendi. Toplam metilen sayısı 37 adet olarak belirlendi. Aşağı alanda  $\delta$  175.6 ppm de rezonans olan pik amit karbonil karbonuna (C-1'). Diğer aşağı alanda rezonans olan  $\delta$  75.0, 71.9 ve 71,6 ve 60.6 ppm'de rezonans olan pikler sırası ile C- 3, C-2', C-4, C-1 pozisyonlarında bulunan karbonlardır.  $\delta$  51.2 ppm de rezonans olan metinin hidrojeni  $\delta$  3.86 ppm de rezonans olması bir azot hetero atomuna bağlı olduğunu göstermektedir.

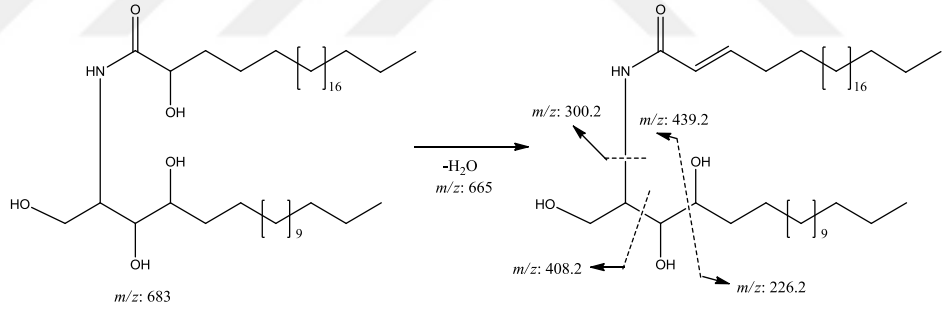
Çizelge 3-14 GEC-A-4 (5) saf maddesinin NMR spektral değerleri (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

C.no.	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	HMBC	COSY
1	60.6	3.30 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 4.8 Hz)	H-2	H-2
2	51.1	3.81 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10.2; 4.8 Hz)	H-1; H-3; H-1'	H-1; H-3
3	75.1	3.56 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =10.6; 3.7Hz)		
4	72.1	3.51 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =14.6;4.7 Hz)		H-5
5	31.7	1.04 (2H, <i>br.s</i> )		H-4
6-15	29.1- 29.5	1.04 (2H, <i>br.s</i> )	H-4,H-5, H- 10	H-7; H-5
16	31.5	1.04 (2H, <i>br.s</i> )		
17	22.5	1.04 (2H, <i>br.s</i> )		
18	13.7	0.64 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 6.7 Hz)	H-16; H-17	H-17
1'	175.6	-	H-2',H-3'	H-3
2'	71.6	3.87 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =10.7; 3.7Hz)	H-1'	H-3'
3'	34.2	1.55 (1H, <i>m</i> );1.71 (1H, <i>m</i> )	H-1'; H-4'	H-2'
4'-21'	29.1- 29.5	1.04 (2H, <i>br.s</i> )		
22'	31.5	1.04 (2H, <i>br.s</i> )		
23'	22.5	1.04 (2H, <i>br.s</i> )		
24'	13.7	0.64 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 6.7 Hz)	H-22'; H-23'	H-23'

<sup>1</sup>H- NMR spektrumunda (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Şekil 3.59)  $\delta$  0.64 (*t*, *J*=6.7 Hz, H-18 ve H-24', 6H) ppm'de rezonans olan pikler moleküldeki iki adet metile aittir.  $\delta$  3.87 (*dd*, *J*= 10.8; 3.6 Hz H-2'),  $\delta$  3.56 (*dd*, *J*= 10.6; 3.6 Hz H-3, 1H),  $\delta$  3.30 (*d*, *J*= 4.8 Hz H-1, 2H), ve  $\delta$  3.51 (*dd*, *J*= 11.4 ;4.8 Hz H-4, 1H) ppm'de rezonans olan hidrojenler bir heteroatoma bağlıdır.

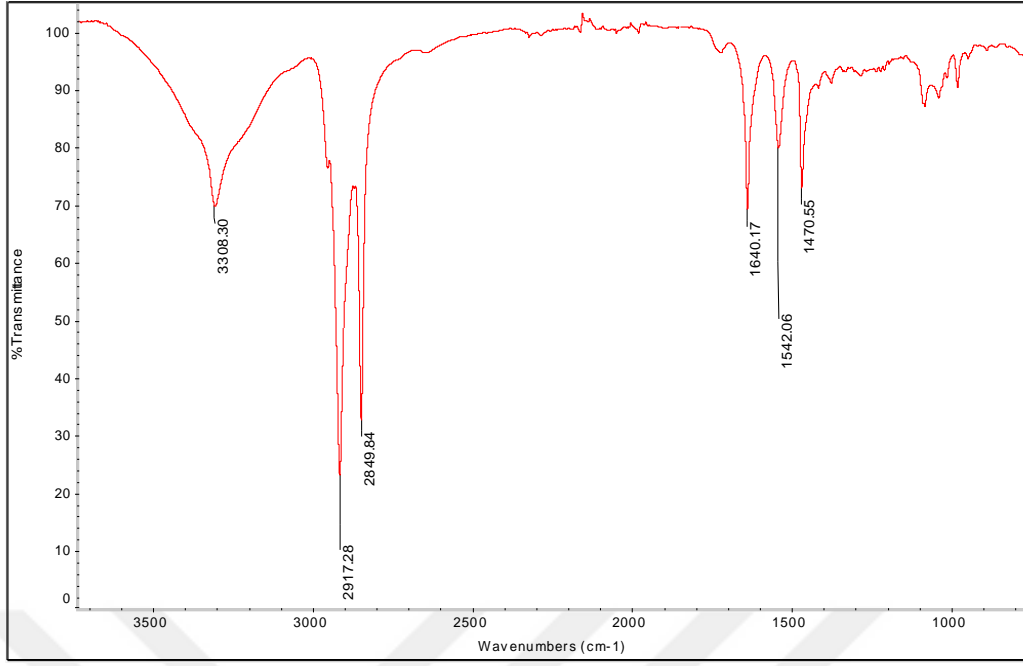
GEC-A-4 (**5**) maddesinin yapısı COSY (Şekil 3.62), HSQC (Şekil 3.63), HMBC (Şekil 3.64) spektrumları ile doğrulandı. HMBC ve COSY korelasyonları Çizelge 3.14'de verilmektedir. Bu spektrumlar beraber değerlendirildiğinde yapının 5 hetero atom içeren bir seramid yapısında olduğunu önerdi.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.65), moleküler iyon piki *m/z* 683 [M]<sup>+</sup> piki C<sub>42</sub>H<sub>85</sub>NO<sub>5</sub> yapısını ve seramid tipi bir madde olabileceğini doğrular. Bir molekül su ayrılmasıyla *m/z* 665.2 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> piki izlendi. EI MS parçalanmaları Şekil 3.218'de verilmektedir. Tüm spektral ve fiziksel veriler değerlendirildiğinde yapının seramid yapısında olan yeni bir madde olduğu tespit edildi (Şekil 3.56). *N*-[1,3,4-trihidroksi, oktadesil]-2'-hidroksi tetrakosanamit (**5**) olarak isimlendirildi.



Şekil 3.57 GEC-A-4 (**5**) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumuna göre fragmanlarına ayrılması

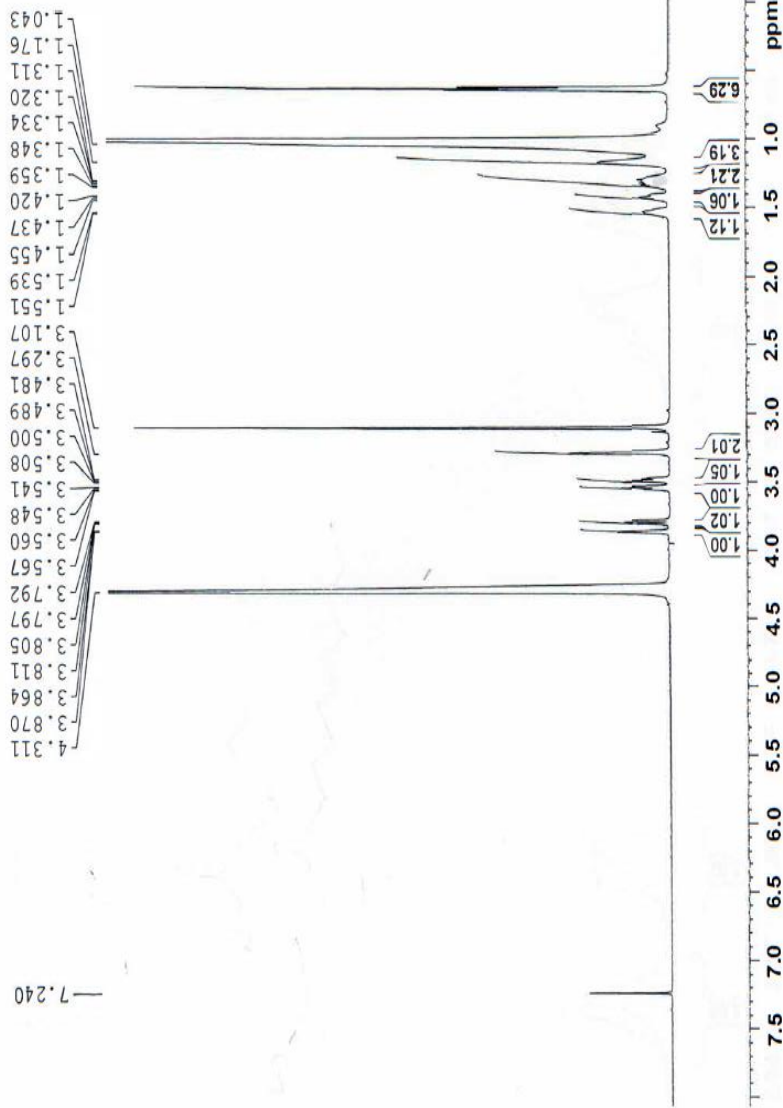




Şekil 3.58 GEC-A-4 (5) kodlu maddenin FTIR spektrumu

DR. MEHMET / DR. IQBAL / GEC-A-4 /  
CDCl<sub>3</sub>+MeOD 1H

Avance AV-600 MHz  
CRYOBROBE (LC)  
Lab No: 108

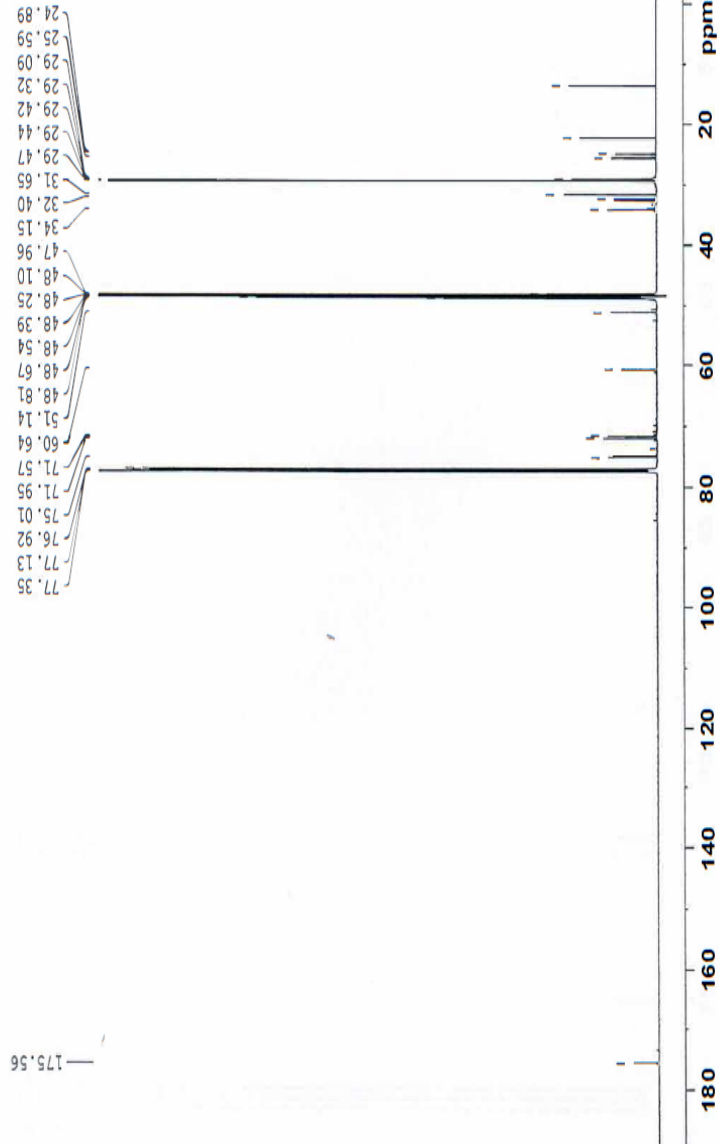


NAME March 16-17  
EXPNO 1  
PROCNO 20170316  
Date  
Time  
PULPROG 5 mm CPTCI  
PROBHD 1H-32768  
PULPROG zg30CDC13  
TD 8  
SOLVENT 0  
NS 0  
DS  
SWH 12019.23 Hz  
FIDRES 0.25404 Hz  
RG 1.365271  
RC 7.1  
DM 41.600 usec  
DE 6.50 usec  
TE 300.5 K  
D1 2.0000000 sec  
TDO 1  
===== CHANNEL f1 =====  
NUC1 1H  
P1 8.00 usec  
PL1 3.31 dB  
PL1W 6.79873323 W  
SFO1 600.0348002 MHz  
SI 32768  
SF 600.0300252 MHz  
WDW EM  
SSB 0  
GB 0  
PC 1.40

Şekil 3.59 GEC-A-4 (S) kodlu saf maddenin saf maddenin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)

DR.MEHMET / DR.IQBAL / GEC-A-4 / CDCL3+MeOD BB

### Avance 600MHz Cryo-Probe (LC)



```
NAME March17-17
EXPNO 6
PROCNO 6
Date_ 20170317
Time 4.20
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CPTCI 1H-
PULPROG zgpg
SOLVENT CDCl3
NS 10240
DS 4
SWH 35971.223 Hz
AQ 0.455391 sec
RG 32768
DM 13.900 usec
DE 6.50 usec
TE 300.2 K
D1 2.0000000 sec
D11 0.0300000 sec
TDO 10
===== CHANNEL f1 13C =====
NUC1 13C
P1 12.70 usec
PL1 -1.81 dB
PL1W 81.92915344 W
SFO1 150.8950149 MHz
===== CHANNEL f2 1H =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 23.31 dB
PL2W 6.79873323 W
PL3 22.50 dB
PL3W 6.79873323 W
PL4 0.06798734 W
PL4W 0.08132718 W
SI 02 600.0316382 MHz
SF 150.8776682 MHz
WDW EM
SFB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.00
```

Şekil 3.60 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin <sup>13</sup>C-NMR spektrumu (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)

DR.MEHMET / DR.IQBAL / GEC-A-4 / CDCL3+MeOD  
DEPT135

75.01  
71.95  
71.58  
60.64  
51.14  
34.15  
29.48  
29.44  
29.42  
29.37  
29.32  
29.24  
29.09  
25.59  
24.90  
22.39  
13.67

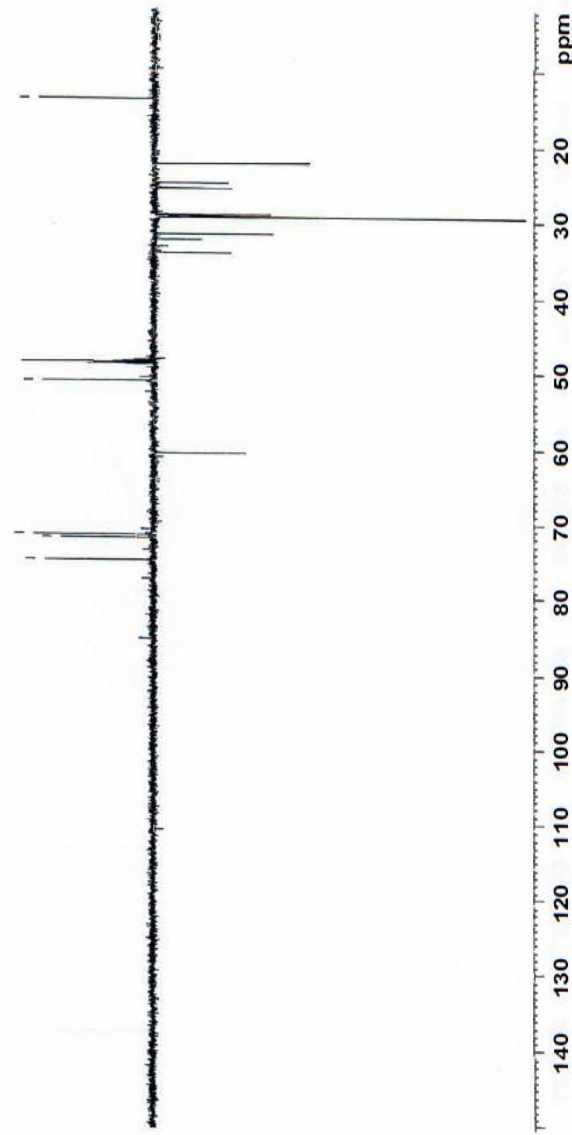
Avance 600MHz  
Cryo-Probe (LC)

```

NAME      March.17-17
EXPNO     1
PROCNO    7
Date_     20170317
Time      11.02
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm CPTCI 1H-
PULPROG   deptspi35
TD        32768
SOLVENT   CDC13
NS        417
DS        4
SWH        30303.031 Hz
FIDRES    0.924775 Hz
AQ        0.5407385 sec
RG        32768
DE        16.500 usec
DELTA     6.50 usec
TE        300.2 K
CHST2     145.0000000
D1        1.500000000 sec
D2        0.00344828 sec
D12       0.00002000 sec
TDO       5

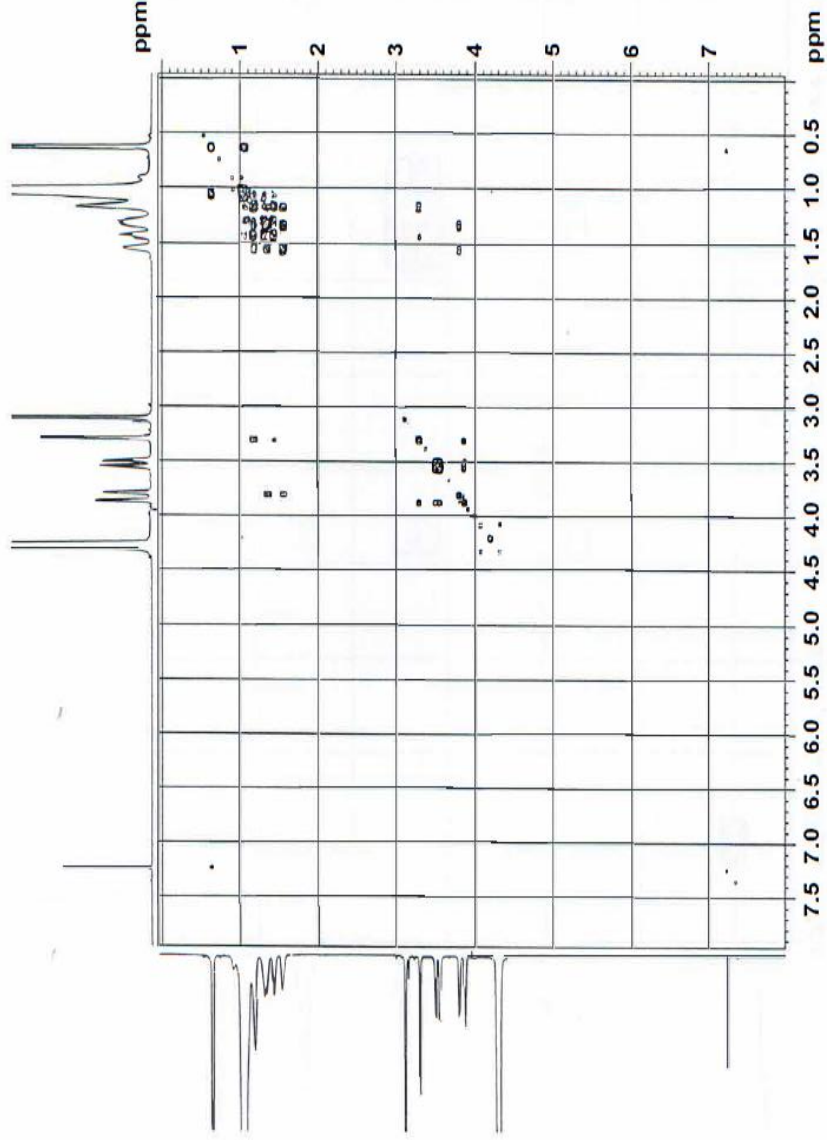
===== CHANNEL f1 13C =====
NUC1      13C
P1        12.70 usec
P2        2000.00 usec
P3        120.00 dB
PL1       0.000000000 W
PL2       -1.81 dB
PL1W      81.92913340 W
SFO1      150.8927518 MHz
SFO2      4.19 dB
SFOAL2    C1p60Comp.4
SFOFFS2   0.500 Hz

===== CHANNEL f2 1H =====
CPDPRG2   waltz16
NUC2      1H
P3        8.00 usec
P4        16.00 usec
PCPD2     80.00 usec
PL12      3.31 dB
PL1W      3.31 dB
PL2W      6.79873323 W
PL12W     0.06798734 W
SFO2      600.0330002 MHz
SI        16384
SF        150.8776682 MHz
SFOFFS    0.00 Hz
LB        1.00 Hz
GB        1.40
PC        1.40
  
```



Şekil 3.61 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu

DR.MEHMET / DR.IQBAL / GEC-A-4 / CDCL3+MeOD  
COSY



Avance 600MHz  
Cryo-Probe (LC)

```

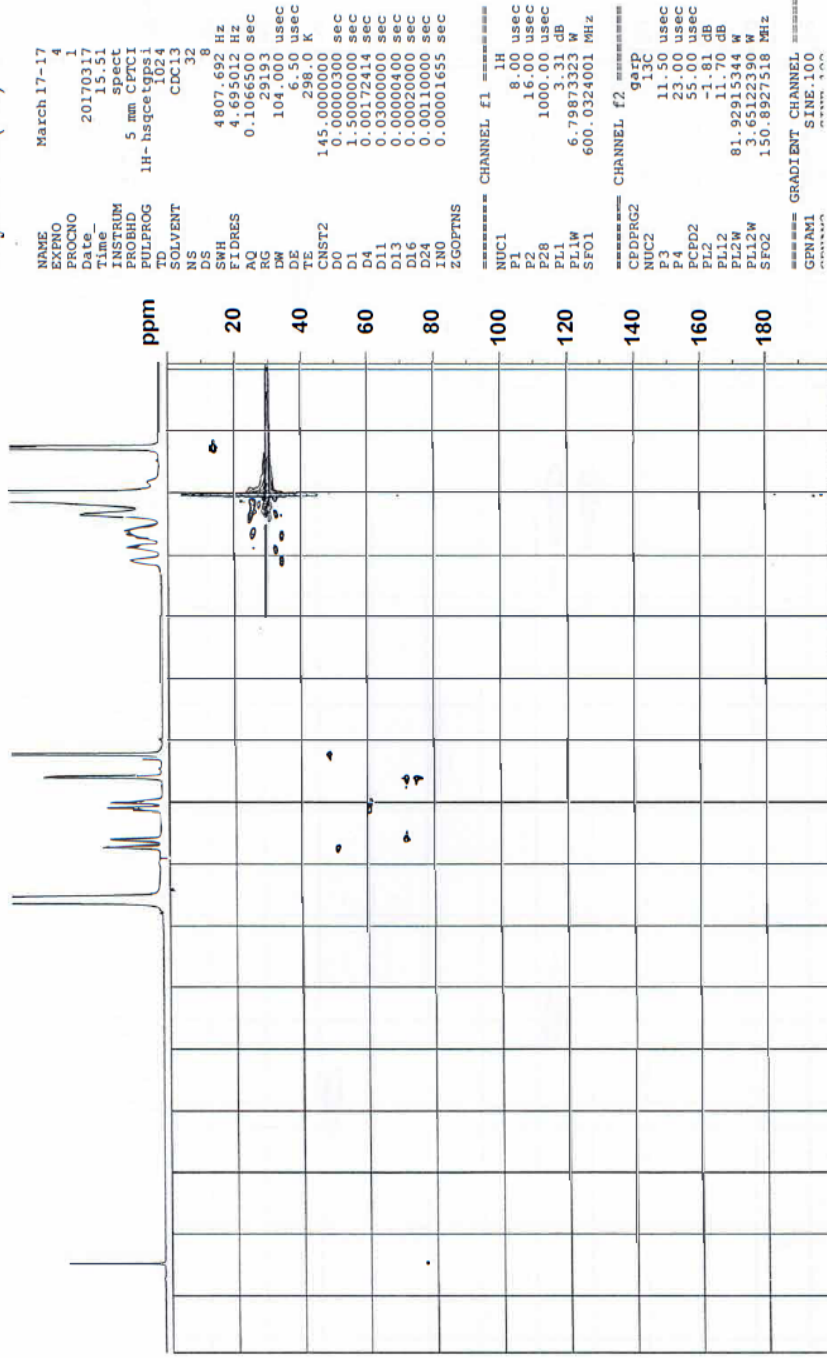
NAME March 17-17
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20170317
Time 11.23
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CFC1 LH-
PULPROG cosyfqf
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 8
DS 4
SWH 4807.692 Hz
FIDRES 2.347506 Hz
AQ 0.2131460 sec
RG 35.9
DE 104.000 usec
TE 311.6 K
DO 0.0000300 sec
D1 1.5000000 sec
D13 0.0000400 sec
D20 0.0000200 sec
INO 0.00020800 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PL1 0.00 dB
SFO1 600.0324001 MHz
TD 256
SF01 600.0324 MHz
FIDRES 18.780046 Hz
SW 8.012 ppm
FMODE OF
SI 1024
SF 600.0300252 MHz
WDW QSINE
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 4.00
SI 1024
MC2 CF
SF 600.0300252 MHz
WDW QSINE
LB 0
GB 0.00 Hz
    
```

Şekil 3.62 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin COSY spektrumu

DR.MEHMET / DR.IQBAL / GEC-A-4 / CDCL3+MeOD  
HSQC

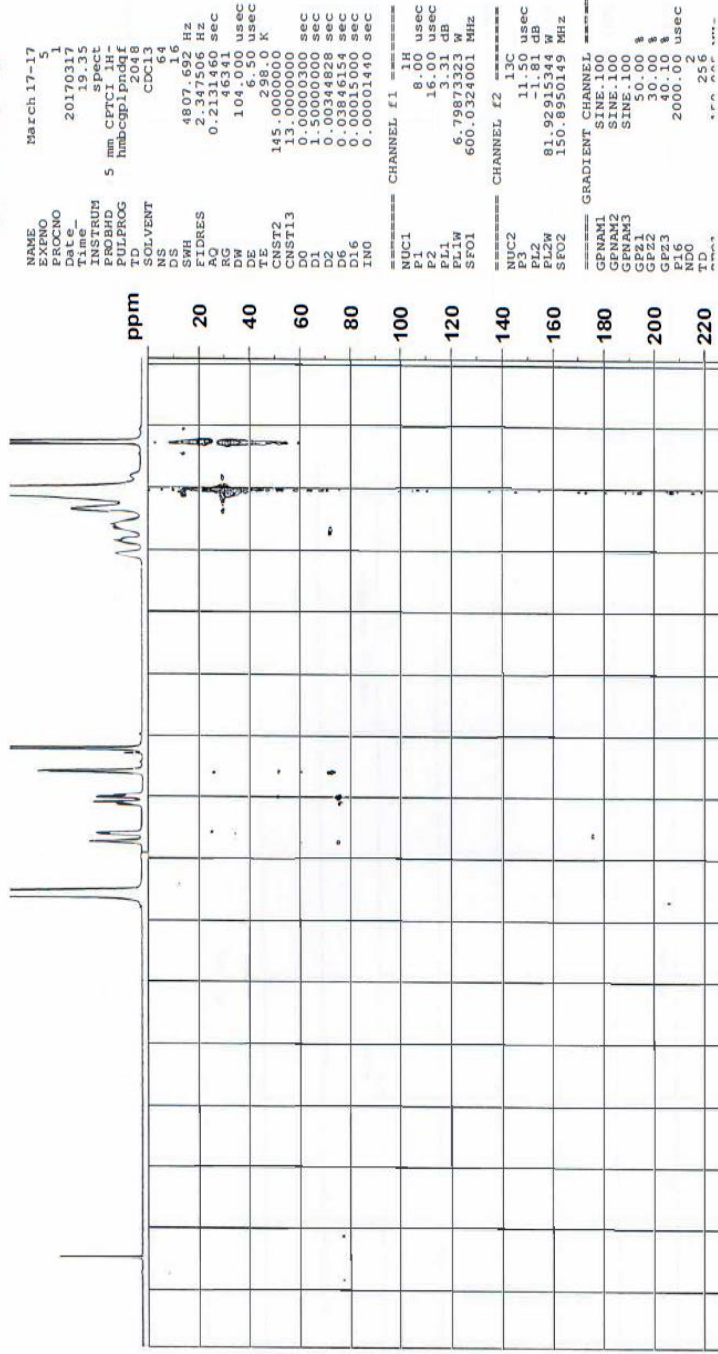
Avance 600MHz  
Cryo-Probe (LC)



Şekil 3.63 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu

DR.MEHMET / DR.IQBAL / GEC-A-4 / CDCL3+MeOD  
HMBC

Avance 600MHz  
Cryo-Probe (LC)



Şekil 3.64 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin HMBC spektumu

03/19/2017 10:54:11 AM

File: GEC-A-4

Sample: DR. MEHMET / DR. M.  
IQBAL Instrument: JEOL MS  
600H-1

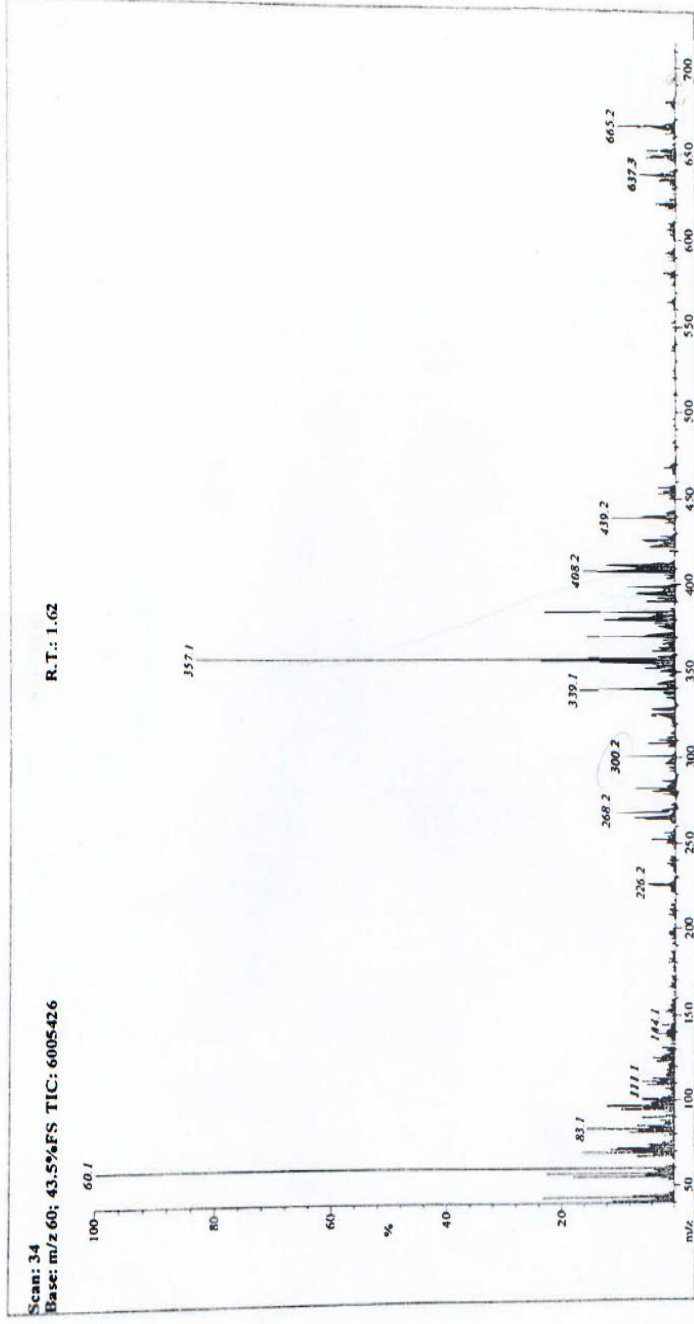
Date Run: 03-19-2017 (Time Run: 10:54:11)

Ionization mode: EI+

Scan: 34

Base: m/z 60; 43.5%FS TIC: 6005426

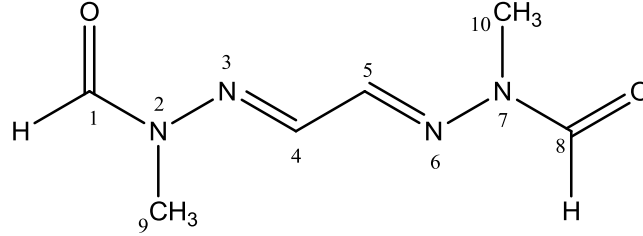
R.T.: 1.62



Şekil 3.65 GEC-A-4 (5) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumu



### 3.8.2. GEC-A-5 (6) = Etanediyal, 1,2-bis[2-formil-2-metilhidrazon



Şekil 3.66 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEC-A-5 (6) maddesi (4,1 mg) bölüm 3.2.1.'de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEC-A-5 (6) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka plakta UV lamba (254 nm) altında görülmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) kahverengi olarak görüldü.

<sup>13</sup>C-NMR ve DEPT 135 spektrumları (200 MHz, Şekil 3.68 ve Şekil 3.69) spektrumu değerlendirildiğinde azota bağlı 1 adet metil ve 2 adet metin karbon gözlemlendi.  $\delta$  165.3 (C-1, C-8),  $\delta$  139.7 (C-4, C-5) ve  $\delta$  27.3 (C-9, C-10) piklerini vererek metil hidrazon türevi olduğunu belirtti.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD, Şekil 3.67)  $\delta$  3.21 (s, H-9 ve H-10, 3H), 7.56 (s, H-4 ve H-5, 1H) ve  $\delta$  8.67 (s, H-1 ve H-8, 1H) ppm'de rezonans olan pikler maddeye ait metil ve metin pikleridir.

GEC-A-5 (6) maddesinin yapı tayininde kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.70), moleküler iyon piki [M]<sup>+</sup> 170,0067'de izlendi ve C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> kapalı formülünü önerdi. Ayrıca  $m/z$  142,0258 [M-(CHO)]<sup>+</sup> piki ve  $m/z$  111,9833 [M-2(CHO)]<sup>+</sup> pikleri C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub> kapalı formülünü destekledi. Daha ilerisi,  $m/z$  68,9960 [C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> ve  $m/z$  42,9846 [CH<sub>3</sub>N<sub>2</sub>]<sup>+</sup> pikleri yapıyı desteklemektedir (Şekil 3.71).

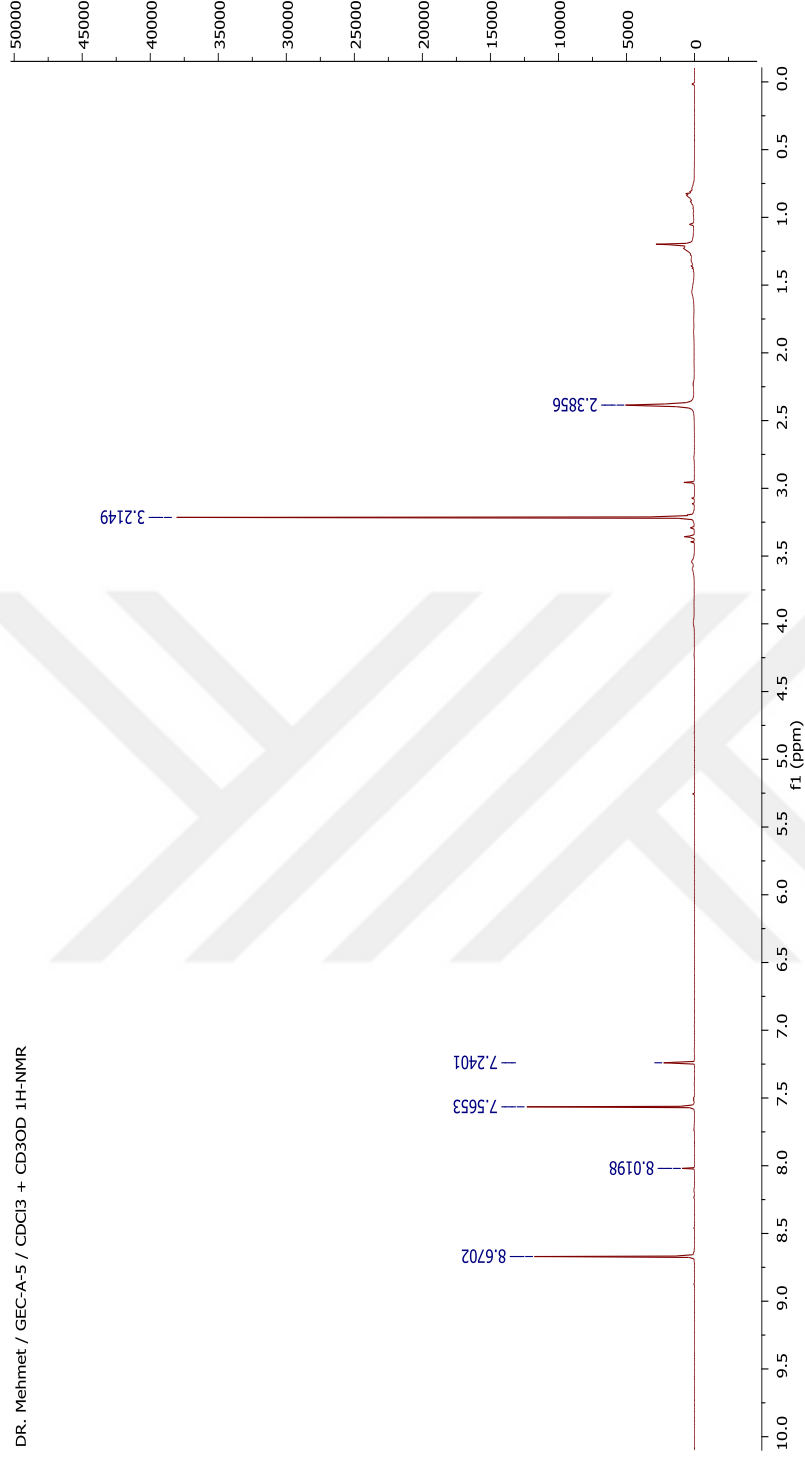
Yukarıda verilen spektral veriler ve fizikokimyasal özellikler kullanıldığında ve literatür ile karşılaştırıldığında GEC-A-5 (6) maddesinin ethanedial, 1,2-bis[2-formil-

2-metilhidrazon] (Şekil 3.66) (4,1 mg) olduğu belirlendi. Bu madde Clark ve diğerleri tarafından sentezlenmiştir. Ancak, mantarlardan ilk defa izole edildi (Clark vd, 1969).

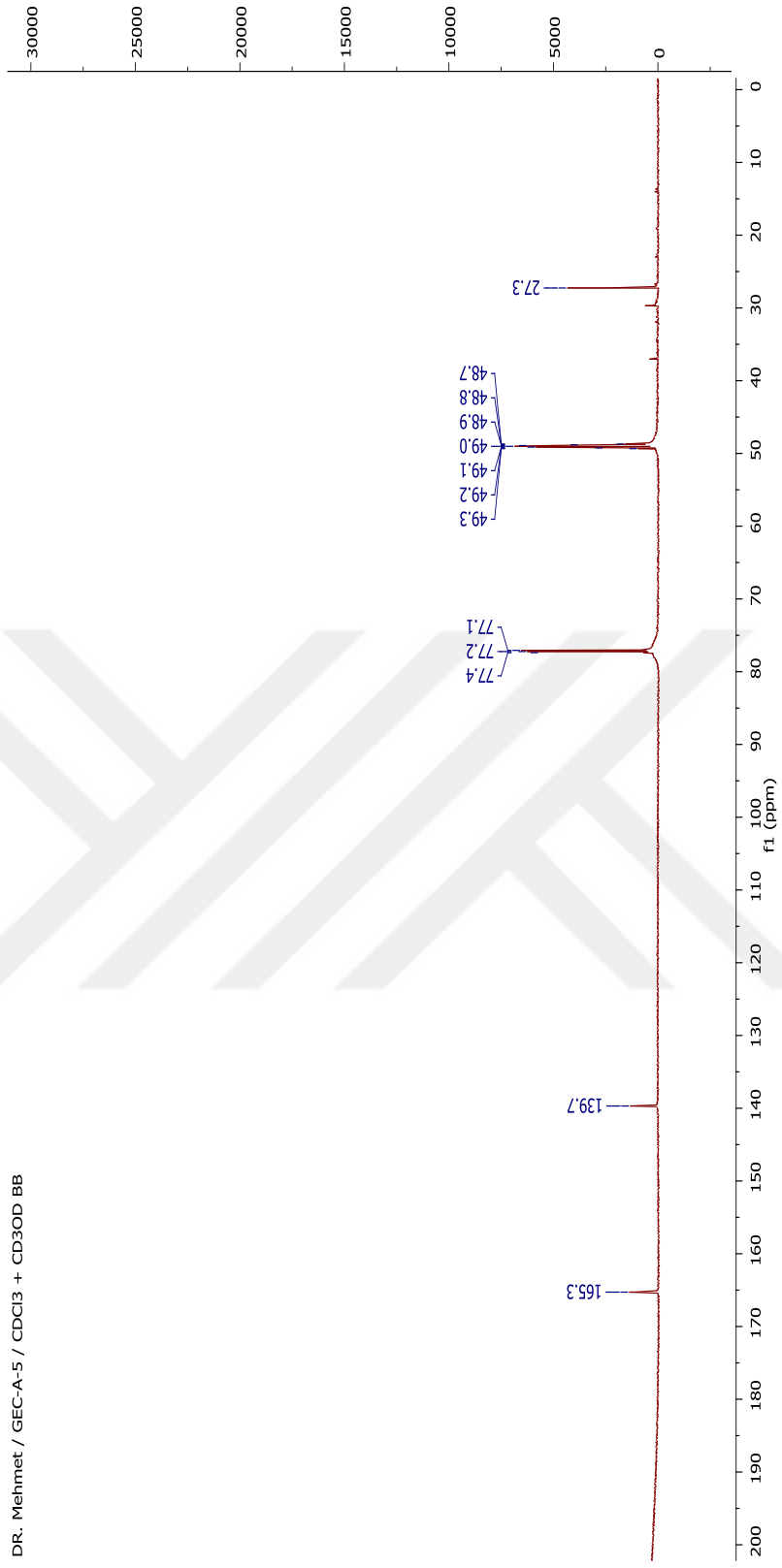
**Çizelge 3-15. GEC-A-5 (6) kodlu saf maddesinin NMR spektral değerleri (<sup>1</sup>H-NMR 500 MHz <sup>13</sup>C-NMR 800 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)**

Pozisyon	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR
1, 8	165,3	8,67 (1H, <i>s</i> )
4, 5	139.7	7,56 (1H, <i>s</i> )
9, 10 (N-CH <sub>3</sub> )	27.3	3,21 (3H, <i>s</i> )

DR. Mehmet / GEC-A-5 / CDCl<sub>3</sub> + CD<sub>3</sub>OD 1H-NMR

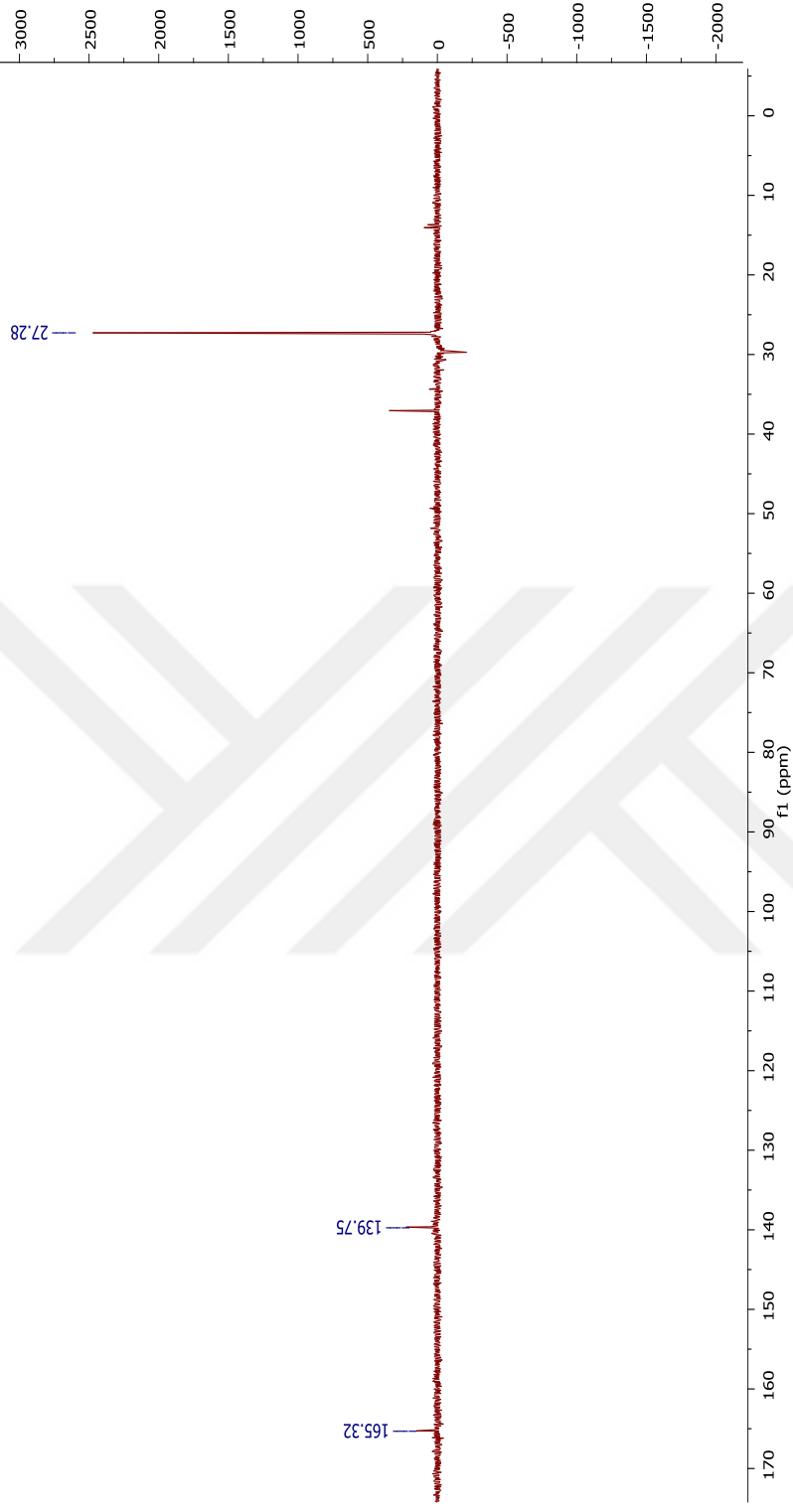


Şekil 3.67 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (500 MHz; CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)



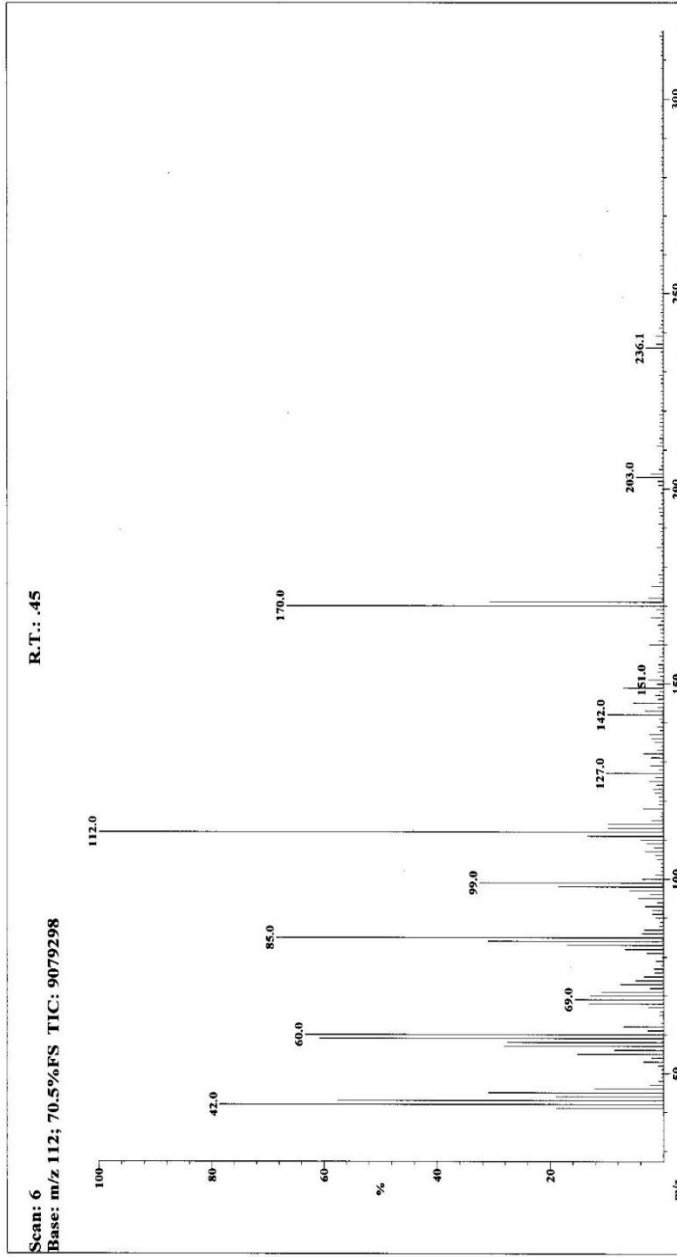
Şekil 3.68 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin <sup>13</sup>C NMR spektrumu (200 MHz; CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)

Dr. Mehmet / GEC-A-5 / CDCl3 + CD3OD / DEPT135

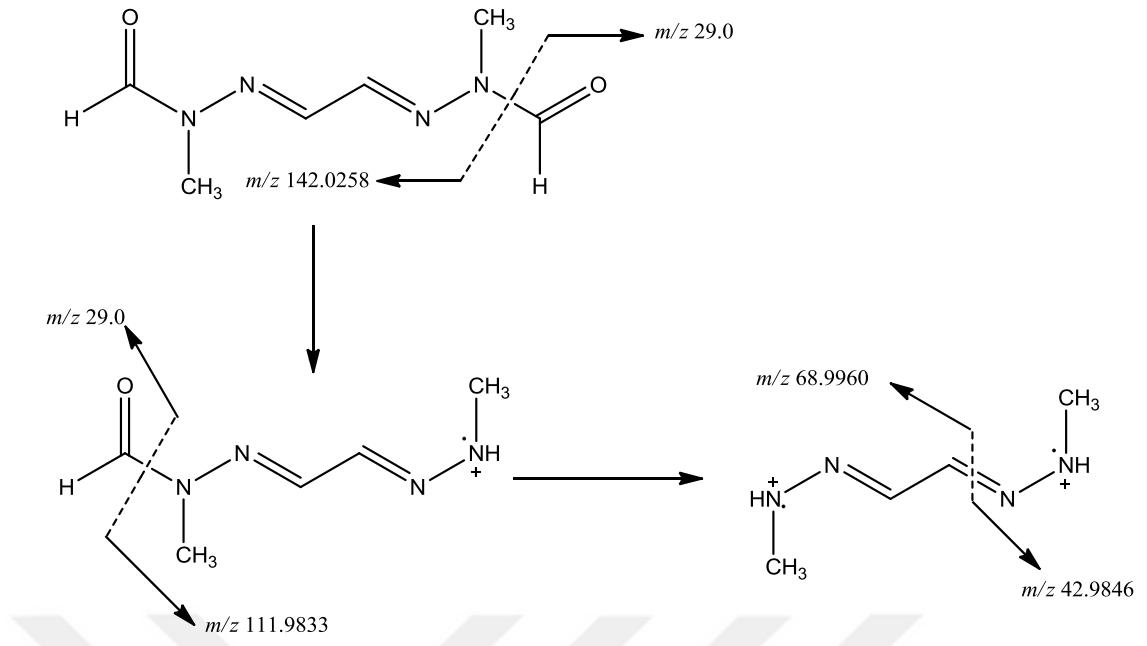


Şekil 3.69 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin DEPT135 spektrumu

File: GEC-A-5  
Date Run: 03-24-2017 (Time Run: 12:40:52)  
Sample: SADIYA / DR. IQBAL  
Instrument: JEOL 600 MSRoute  
Inlet: Direct Probe  
Ionization mode: EI+

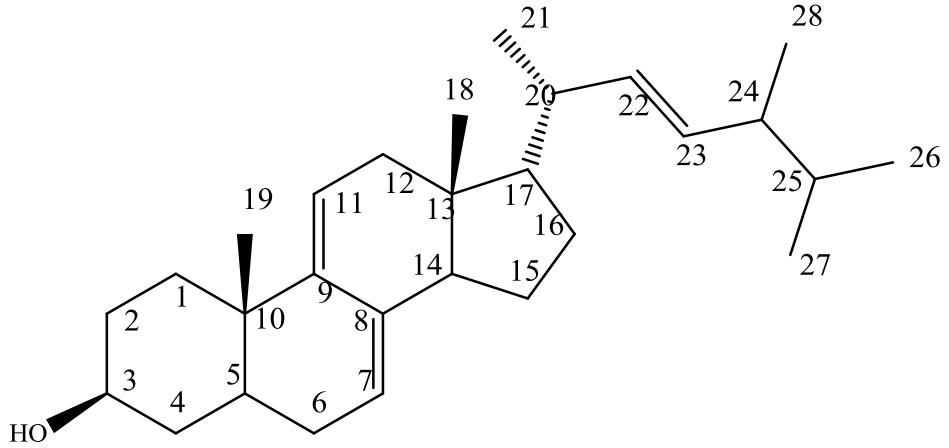


Şekil 3.70 GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin EI- MS spektrumu



Şekil 3.71. GEC-A-5 (6) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumuna göre fragmanlarına ayrılması

### 3.8.3. GEC-A-6 (7) = Ergosta-7,9,22-trien 3 $\beta$ -ol



Şekil 3.72. GEC-A-6 (7) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEC-A-6 (7) (8,5 mg) maddesi bölüm 3.4.2.'de ifade edildiği gibi elde edilmiş olup yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEC-A-6 (7) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisinde, UV lamba (254 nm) altında koyu bir halka şeklinde görülen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) mor renk aldı.

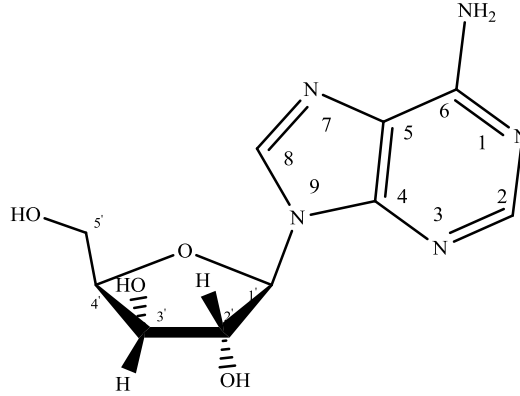
GEC-A-6 (7) kodlu saf maddesinin IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC ve HMBC NMR spektrumları incelendiğinde GEN-A-5 (3) kodlu saf madde ile aynı kimyasal yapıda olduğu belirlendi. Bölüm 3.7.2.'de GEN-A-5 (3) kodlu madde için verilen spektrumlar nedeniyle bu madde için tekrar spektrum konulmadı. GEC-A-6 (7) maddesi için NMR spektral değerleri Çizelge 3.16'da verilmektedir.



Çizelge 3-16. GEC-A-6 (7) kodlu saf maddenin NMR spektral değerleri (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Pozisyon	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	HMBC	COSY
1	31,3	1,56 (1H, <i>m</i> )	H-6	H-2
2	32,1	1,87 (1H, <i>m</i> ); 1,47 (1H, <i>m</i> )	H-8; H-3, H-19	
3	70,5	3,61 (1H, <i>m</i> )		
4	40,7	2,44 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =14,4; 1,8 Hz); 2,25 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =13,2 Hz)	H-2; H-6; H-7; H-11	H-5
5	40,3	1,36 (1H, <i>m</i> )	H-14	H-1
6	38,5	1,87 (1H, <i>m</i> ); 1,28 (1H, <i>m</i> )	H-2; H-3; H-19	H-7
7	116,4	5,37 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> =2,4 Hz)	H-11; H-14	H-6
8	139,9	-	H-2; H-7	
9	141,2	-	H-5; H-11	
10	34,1	-		
11	119,7	5,54 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =3,6 Hz)	H-7; H-12; H-6	H-12
12	39,2	2,05 (1H, <i>m</i> ); 1,24 (1H, <i>m</i> )		H-11
13	37,1	-	H-15	
14	54,6	1,87 (1H, <i>m</i> )	H-7	
15	23,1	1,34 (1H, <i>m</i> ); 1,62 (1H, <i>m</i> )	H-16	
16	28,8	1,72 (1H, <i>m</i> ); 1,27 (1H, <i>m</i> )	H-12; H-17	
17	55,8	1,22 (1H, <i>m</i> )	H-16; H-21; H-20	H-20
18	12,1	0,62 (3H, <i>s</i> )	H-12; H-14	
19	17,7	0,91 (3H, <i>s</i> )	H-5; H-6	
20	40,5	2,02 (1H, <i>m</i> )	H-22; H-23; H-14	H-17
21	21,08	1,01 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,0 Hz)	H-17; H-20; H-22; H-23	
22	131,8	5,21 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,0; 7,2 Hz)	H-24; H-28	H-23
23	135,4	5,14 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,6; 7,2 Hz)	H-16; H-24	H-22
24	42,7	1,84 (1H, <i>m</i> )	H-21; H-23	H-25
25	33,0	1,44 (1H, <i>m</i> )	H-22; H-23; H-26; H-27; H-28	H-24
26	19,8	0,80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,2 Hz)	H-24; H-27; H-28	
27	19,5	0,81 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,2 Hz)	H-24; H-26; H-28	
28	16,2	0,88 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	H-24; H-26; H-27; H-22	

### 3.8.4. GEC-A-19 (8) = Adenozin



Şekil 3.73. GEC-A-19 (8) kodlu maddenin kimyasal yapısı

GEC-A-19 (8) maddesi (1,52 mg) bölüm 3.5.2.'de ifade edildiği gibi elde edilmiş olup yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEC-A-19 (8) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisi plağında UV lamba (254 nm) altında renksiz iken bileşik anis aldehit belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) açık mor bir halka şeklini aldı.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (500MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Şekil 3.74)  $\delta$  8.17 (1H, *s*, H-2) ve  $\delta$  8.30 (1H, *s*, H-8) ppm'de rezonans olan iki adet singlet ile 3-5 ppm arasında rezonans olan oksijene bağlı karbonlara ait hidrojen sinyalleri yapının adenozin olabileceği kanaatini oluşturdu.  $\delta$  5,95 (1H, *d*, *J*=6.5 Hz, H-1') ppm'de rezonans olan pik anomerik hidrojene aittir. Şekerin diğer pikleri  $\delta$  4.15 (1H, *q*, H-4'),  $\delta$  4,31 (1H, *dd*, *J*=2,5; 5,0 Hz, H-3') ve  $\delta$  4.73 (1H, *dd*, *J*=5,5; 6,5 Hz, H-2') ppm'de rezonans oldukları görüldü.  $\delta$  3.87 (1H, *dd*, *J*=2,5; 12,5 Hz, H-5'a) ve 3,73 (1H, *dd*, *J*= 2,5; 13,0 Hz, H-5'b) ppm'de rezonans olan pikler ise şekerin metilen pikine aittir.

<sup>13</sup>C-NMR (Şekil 3.75) ve DEPT 135 (Şekil 3.76), spektrumları beraber değerlendirildiğinde 3 adet katerner, 6 adet metil ve 1 adet metilen olduğu izlendi.  $\delta$  153.5 (C-2) ve  $\delta$  142.0 (C-8) ppm'de rezonans olan karbonlar iki adet elektronegatif atom arasında bulduklarını düşündürdü.  $\delta$  147.0,  $\delta$  121.0,  $\delta$  158.2 katerner karbonları ile değerlendirildiğinde aglikonun adenin yapısında olduğunu önerdi.

$\delta$  5.95 ppm'de rezonans olan anomerik proton 147 (C-4) ve 142.0 (C-8) karbonları ile HMBC korelasyonu gösterdiğinden 9 numaralı pozisyondan C-1' anomerik karbona bağlı olduğu görüldü. Ayrıca anomerik protonu 5.95 ppm'de rezonans olması şekerin aglikona göre  $\alpha$  pozisyonunda olduğunu kanıtladı (Ciuffreda vd., 2007). Diğer HMBC ve COSY korelasyonları Çizelge 3.17'de verilmektedir.

Kütle spektrumu incelendiğinde (EI-MS) (Şekil 3.79)  $m/z$  283  $[M]^+$  piki 7 doymamışlık ile  $C_{11}H_{17}N_5O_4$  kapalı formülünü önerdi.

Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.16'de verilen maddenin adenzin (1,52 mg) olduğu tespit edildi (Ciuffreda vd., 2007).

**Çizelge 3-17. GEC-A-19 (8) saf maddesinin NMR değerleri (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)**

Pozisyon	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	HMBC	COSY
2	152,4	8,13 (1H, s)	C-4; C-6	
4*	149,0	-		
5*	119,0	-		
6*	156,2	-		
8	140,0	8,30 (1H, s)	C-1'	
1'	87,9	5,87 (1H, d, J=6,2 Hz)	C-2'	H-2'
2'	73,4	4,00 (1H, ddd, J=5,1; 6,2; 6,3 Hz)	C-3'; C-4'	H-1'; H-3'
3'	70,6	4,14 (1H, ddd, J=3; 4,6; 5,1 Hz)	C-1'; C-5'	H-2'; H-4'
4'	85,9	3,96 (1H, ddd, J=3,00; 3,6; 3,7 Hz)	C-3'	H-3'; H-5'
5'a	61,6	4,45 (1H, dd, J=11.8 Hz)	C-3'; C-4'	H-4'
5'b	61,6	4,37 (1H, dd, J=11.9 Hz)		H-4'

\*HMBC'e göre belirlendi.



BB

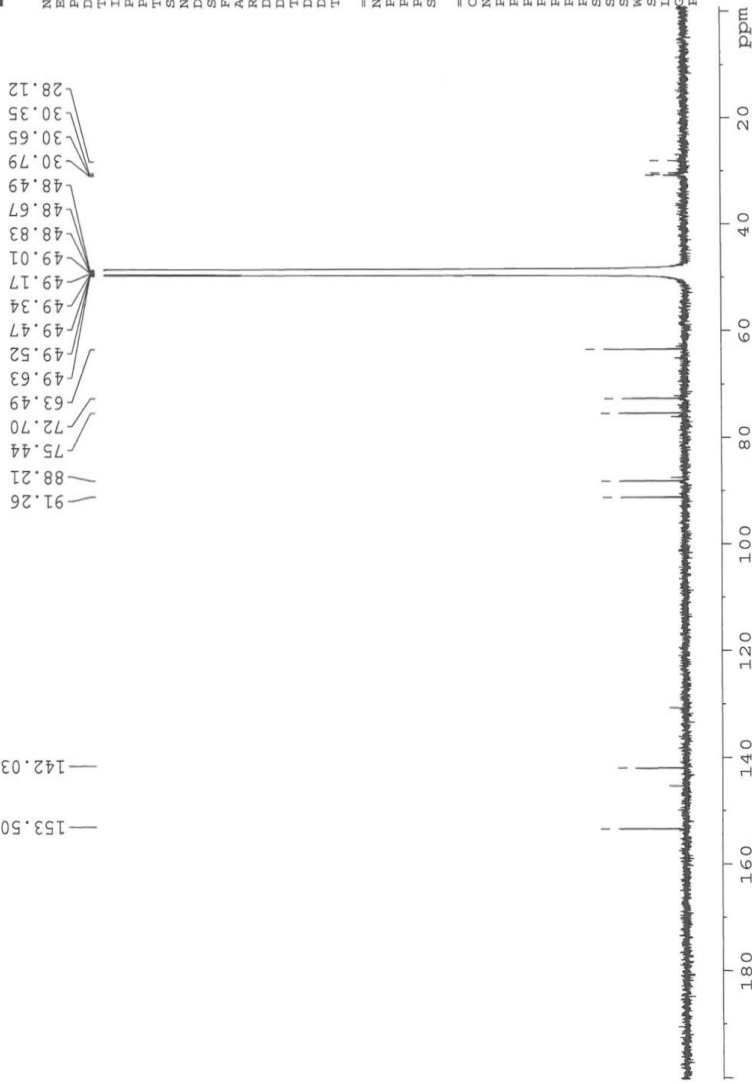


```

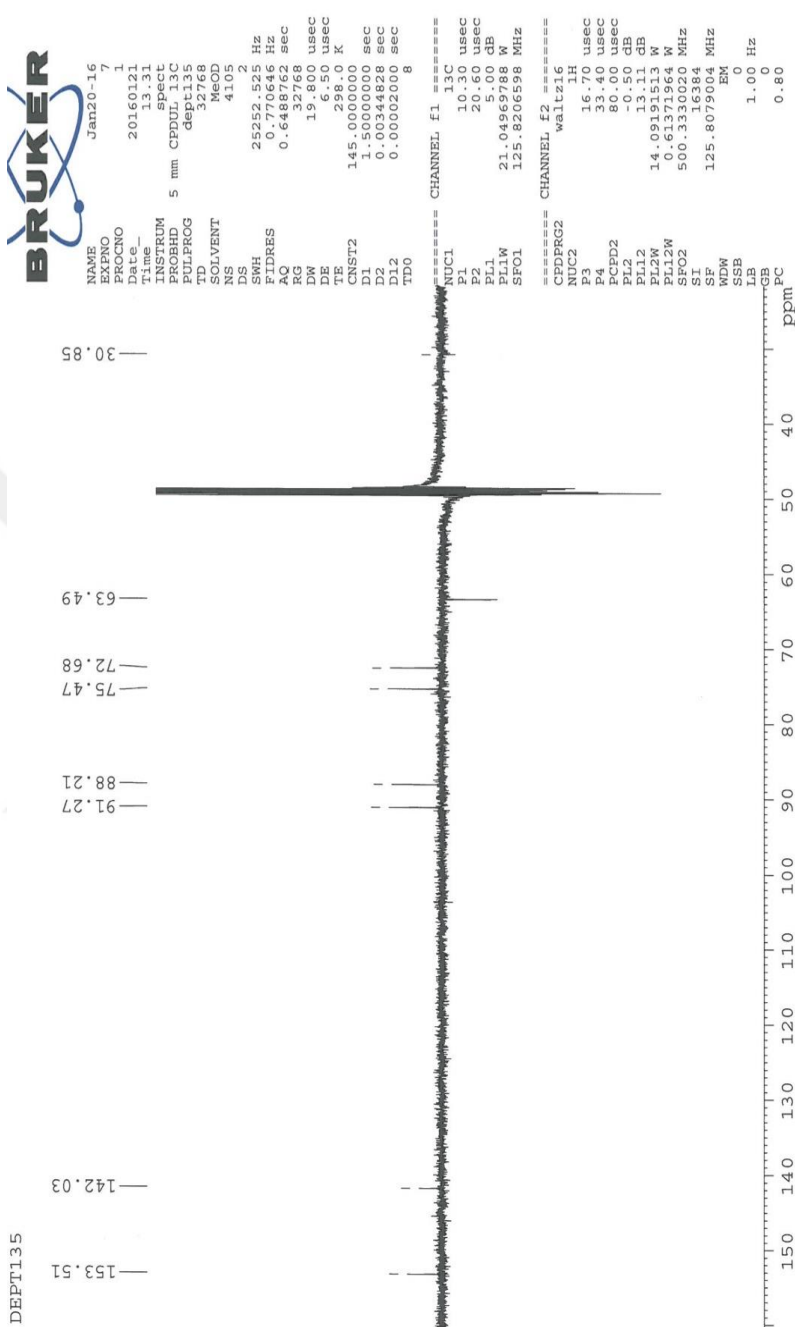
NAME          Jan20-16
EXPNO         1
PROCNO        1
Date_         20160121
Time          4.38
INSTRUM       spect
PROBHD        5 mm CPDUL 13C
PULPROG       zgpg
TD            32768
SOLVENT       MeOD
NS            15150
DS            2
SWH           30303.031 Hz
FIDRES       0.924775 Hz
AQ           0.5407385 sec
RG           2700
DM           16.500 usec
DE           6.50 usec
TE           291.7 K
D1           1.5000000 sec
D11          0.0300000 sec
TDO          16

===== CHANNEL f1 =====
NUC1         13C
P1           10.30 usec
PL1          5.00 dB
PL1W        21.0469788 W
SFO1        125.8226727 MHz

===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2      waitz16
NUC2         1H
P2           80.00 usec
PL2          -0.50 dB
PL12        13.11 dB
PL13        14.0912400 dB
PL14        14.0912400 dB
PL15        0.63371924 W
PL16        0.0500000 W
SFO2        500.3335023 MHz
SI           16384
SF          125.8079004 MHz
WDW          EM
SSB          0
GB          1.50
PC           1.00
  
```



Şekil 3.75. GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin <sup>13</sup>C-NMR Spektrumu (CD<sub>3</sub>OD, 125 MHz)



Şekil 3.76. GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin DEPT 135 Spektrumu





HMBC

NAME: Jan10-16

PROCNO: 1

Time: 19.09

PROBHD: 5 mm cryoProbe

PULPROG: hmcgprbprgd

MECO: 4

DS: 4

SWH: 4807.632 Hz

AQ: 0.4241380 sec

RG: 104.000 usec

DE: 26.50 usec

CHST2: 145.0000000

CHST1: 0.0000000

DI: 0.0000000

D2: 0.0000000

DE: 0.0846154 sec

IN0: 0.0001730 sec

===== CHANNEL f1 =====

NUC1: 13C

PC1: 16.10 usec

PF1: 33.00 usec

PL1M: 14.0919131 M

SFO1: 500.3324516 MHz

===== CHANNEL f2 =====

PC2: 10.250 usec

PL2M: 21.04965788 M

SFO2: 125.8225469 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====

GENM2: SINE: 100

GENM3: SINE: 100

GR21: 30.00 %

GR22: 30.00 %

P16: 2000.00 usec

P17: 2000.00 usec

TD: 256

SFO3: 125.8225469 MHz

SM: 230.000 KPPM

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

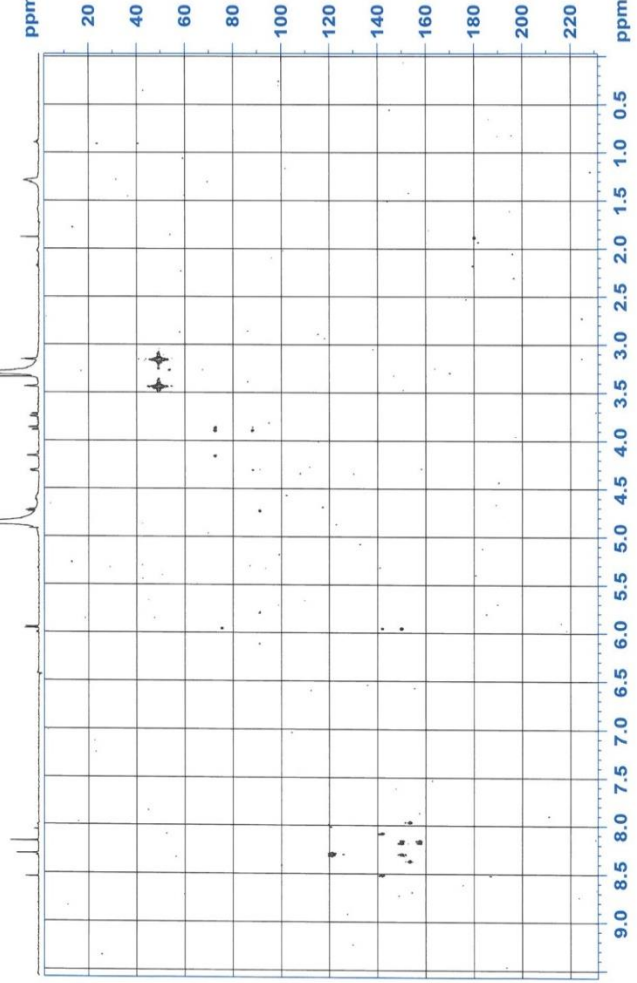
SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048

SI: 2048



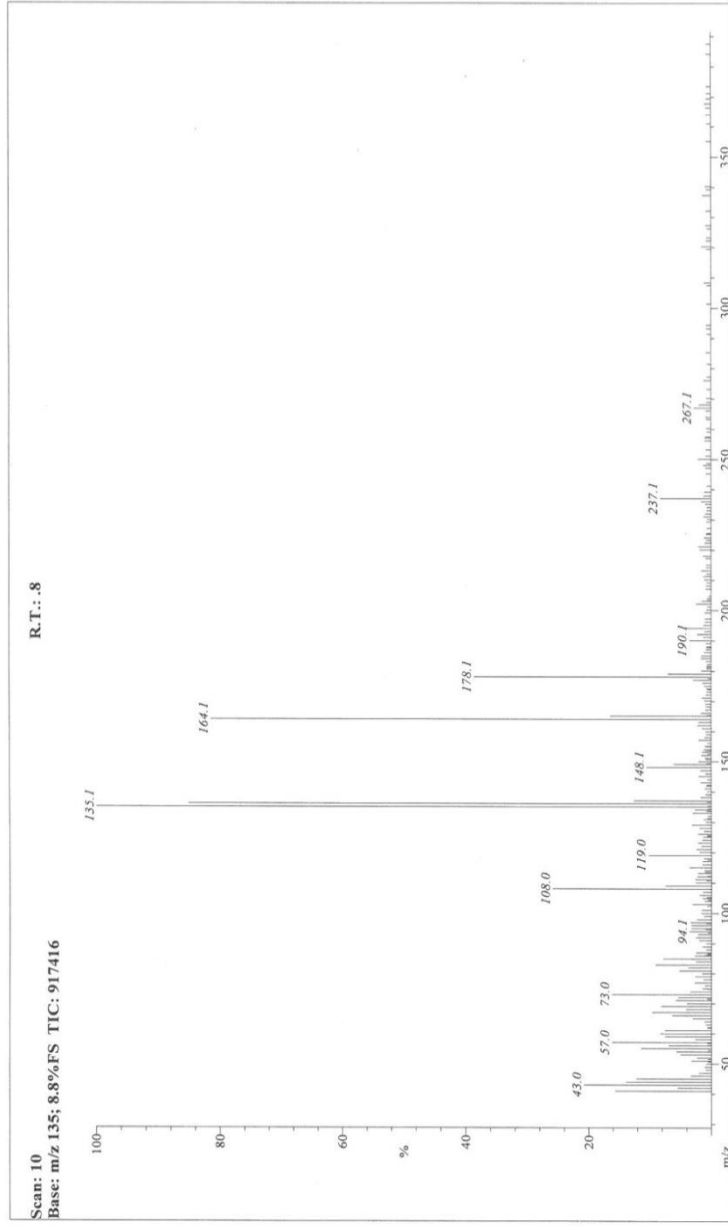
Şekil 3.78. GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu





Instrument: JEOL MS 600H-1

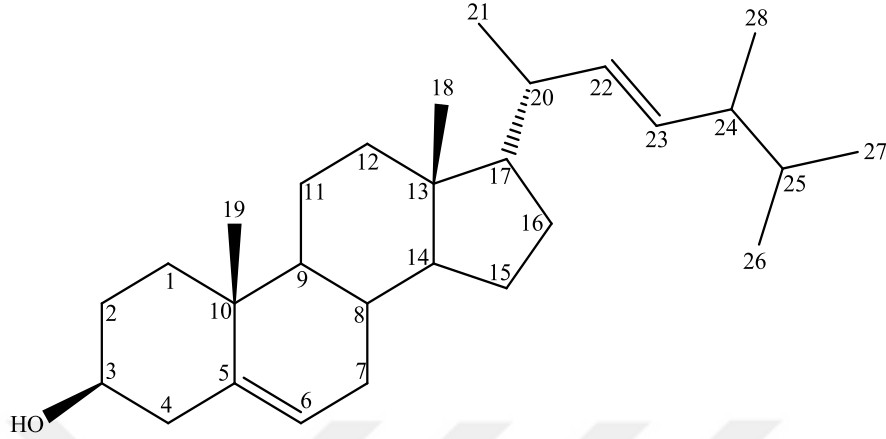
Ionization mode: EI+



Şekil 3.79 GEC-A-19 (8) kodlu saf maddenin MS spektrumu

### 3.9. Çiğ Metanol Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayini

#### 3.9.1. GEN-M-18 (9)= Ergosta- 5,22-dien 3 $\beta$ -ol



Şekil 3.80. GEN-M-18 (9) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEN-M-18 (9) maddesi (78,6 mg) bölüm 3.5.2.'de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı. Erime noktası 153-154 °C olarak tespit edildi.

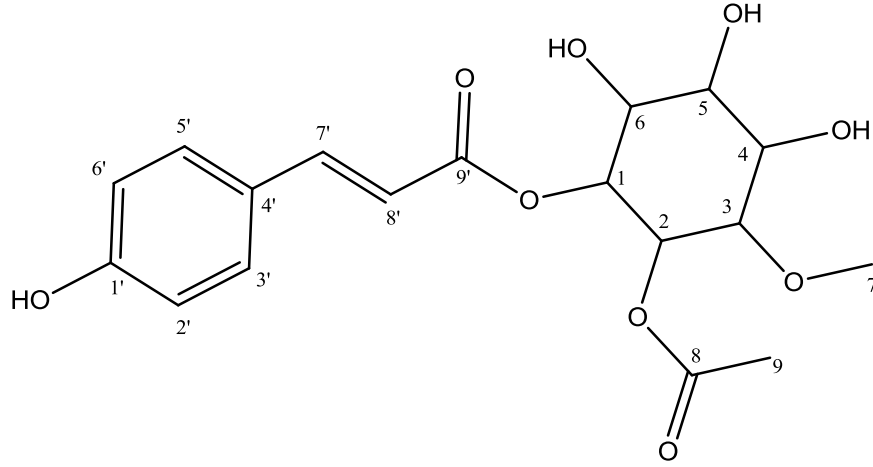
Beyaz renkli olan GEN-M-18 (9) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisinde UV lamba (254 nm) altında görülmeyen ancak, serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu mor renk aldı.

GEN-M-18 (9) kodlu saf maddesinin IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC ve HMBC NMR spektrumları incelendiğinde GEN-A-1 (1) kodlu saf madde ile aynı kimyasal yapıda olduğu belirlendi. Bölüm 3.7.1.'de GEN-A-1 (1) kodlu madde için verilen spektrumlar nedeniyle bu madde için tekrar spektrum konulmadı. GEN-M-18 (9) maddesi için NMR spektral değerleri Çizelge 3.18'de verilmektedir.

Çizelge 3-18. GEN-M-18 (9) saf maddesinin NMR spektral değerleri (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

C.no.	<sup>13</sup> C-NMR (δ)	<sup>1</sup> H-NMR (δ)	HMBC
1	37.2	1.82 (1H, <i>m</i> ), 1.06 (1H, <i>m</i> )	H-19
2	31.9	1.80 (2H, <i>m</i> )	
3	71.8	3.50 (1H, <i>m</i> )	H-1, H-2, H-4
4	42.3	2.27 (1H, <i>m</i> ), 1.82 (1H, <i>m</i> )	
5	140.7	-	H-1, H-4, H-19
6	121.7	5.32 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2.4 Hz)	H-4, H-8
7	31.7	1.95 (2H, <i>m</i> )	
8	31.9	1.44 (1H, <i>m</i> )	
9	50.2	0.91 (1H, <i>m</i> )	H-7, H-8, H-19
10	36.5	-	
11	21.1	1.46 (2H, <i>m</i> )	
12	39.7	1.97 (1H, <i>m</i> ), 1.15 (1H, <i>m</i> )	
13	42.2	-	
14	56.0	1.11 (1H, <i>m</i> )	H-7, H-18
15	24.3	1.51 (1H, <i>m</i> ), 1.00 (1H, <i>m</i> )	
16	28.5	1.65 (1H, <i>m</i> ), 1.23 (1H, <i>m</i> )	
17	56.8	0.98 (1H, <i>m</i> )	H-20
18	12.1	0.67 (3H, <i>s</i> )	H-12, H-14
19	19.4	0.98 (3H, <i>s</i> )	H-1
20	40.1	1.97 (1H, <i>m</i> )	H-21, H-22, H-23
21	20.9	0.94 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz)	H-20, H-22
22	135.8	5.17 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.0, 7.8 Hz)	H-20, H-21, H-28
23	131.7	5.19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.6, 7.2 Hz)	H-20, H-22, H-24
24	42.8	0.87 (1H, <i>m</i> )	H-22, H-27
25	33.1	1.43 (1H, <i>m</i> )	H-27, H-28
26	19.9	0.81 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz)	H-24, H-25
27	19.6	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	H-24, H-25
28	17.6	0.89 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	H-25

### 3.9.2. GEN-M-17 (10) = 1-(1'-hidroksisinnamoil)-2-asetoksi-3metoksi inositol



Şekil 3.81. GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEN-M-17 (10) maddesi (1,2 mg) bölüm 3.5.1’de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı. Erime noktası 153-154 °C olarak tespit edildi.

Beyaz renkli olan GEN-M-17 (10) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisinde UV lamba (254 nm) altında görülmeyen ancak, serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) kahverengine dönüştü.

<sup>13</sup>C-NMR spektrumu (150 MHz, Şekil 3.83) ve DEPT 135 (Şekil 3.84) spektrumları beraber değerlendirildiğinde 6 metil, 8 metilen, 11 metin ve 3 katerner karbon belirlendi. Aşağı alanda  $\delta$  140.7, 135.8, 131.7 ve 121.7 ppm’de rezonans olan pikler sırası ile C-5, C-22, C-23 ve C-6 karbonlarına aittir.  $\delta$  71.8, 56.8, 55.0 ve 50.2 ppm’de rezonans olan sinyaller C-3, C-17, C-14 ve C-9 pozisyonlarındaki karbonlara aittir.  $\delta$  20.9, 19.9, 19.6, 19.4, 17.6 ve 12.1 ppm’de rezonans olan pikler molekülde bulunan 6 adet metil sinyalidir.

<sup>1</sup>H- NMR spektrumunda (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Şekil 3.82)  $\delta$  0.67 (s, H-18, 3H) ve 0.98 (s, H-19, 3H) ile  $\delta$  0.80 (d, J= 6.6 Hz, H-27, 3H),  $\delta$  0.81 (d, J= 7.2 Hz, H-26, 3H),  $\delta$  0.89 (d, J= 6.6 Hz, H-28, 3H) ve  $\delta$  0.94 (d, J= 6.0 Hz, H-21, 3H) ppm’de rezonans olan pikler karakteristik lanostan tipi steroide aittir.  $\delta$  5.32 (t, J= 2.4 Hz, H-6, 1H) ppm ile  $\delta$  5.17 (dd, J= 15.0;7.8 Hz, H-22, 1H) ve  $\delta$  5.19 (dd, J= 15.6;7.2 Hz, H-23, 1H) ve

$\delta$  3.50 (*m*, H-3, 1H) ppm'de rezonans olan pikler lanostan tipi bir steroidi andırdı.  $\delta$  3.50 (*m*, H-3, 1H) ppm'de rezonans olan pik C-3 pozisyonunda hidrojenin  $\alpha$  konumunda olduğunu göstermektedir.

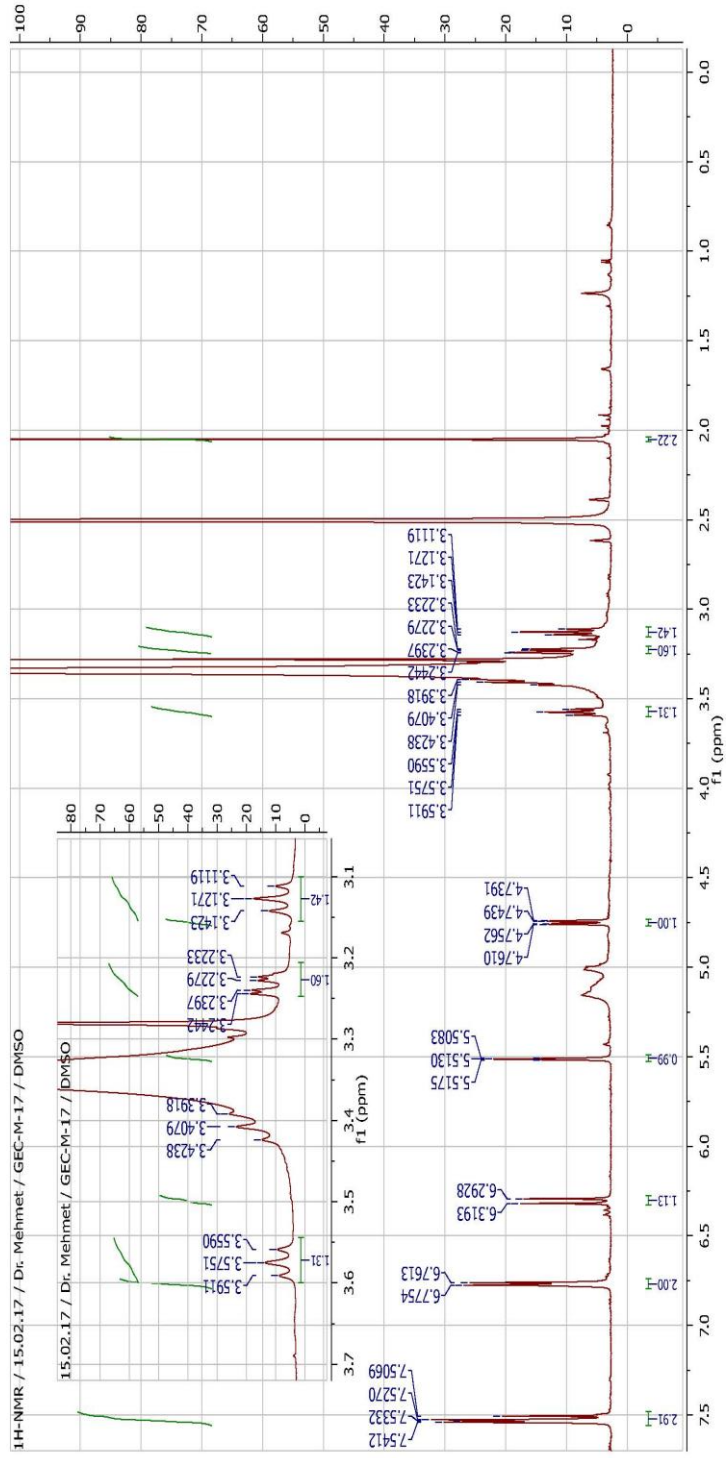
GEN-M-17 (**10**) maddesinin yapı tayini HSQC (Şekil 3.85), HMBC (Şekil 3.86) spektrumları ile doğrulandı. HMBC korelasyonları Çizelge 3.19'de verilmektedir.

Kütle spektrumunda (ESI-MS) (Şekil 3.87), moleküler iyon piki  $m/z$  405,2  $[M+Na]^+$  piki ve  $m/z$  383,2  $[M+1]^+$   $C_{18}H_{22}O_9$  kapalı formülünü destekledi.  $m/z$  146,9 piki [hidroksisinnamoil]<sup>+</sup> kısmını gösterdi.  $m/z$  365,2  $[M-H_2O]^+$  piki de görüldü.

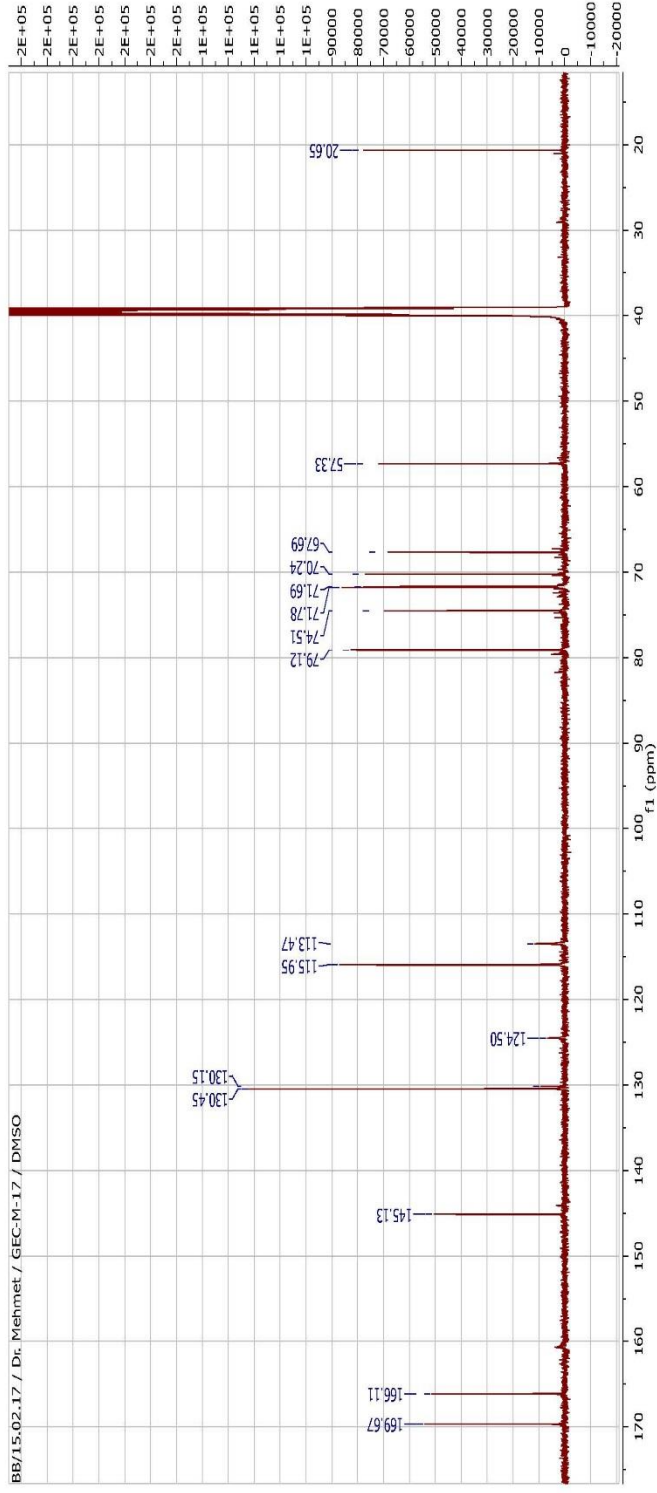
Yukarıda verilen spektral veriler ve fizikokimyasal özellikler kullanıldığında ve literatür ile karşılaştırıldığında GEN-M-17 (**10**) maddesinin 1-(1'-hidroksisinnamoil)-2-asetoksi-3metoksi inositol (Şekil 3.81) (1,2 mg) olduğu belirlendi (Mostafa vd., 2014)

Çizelge 3-19. GEN-M-17 (10) saf maddesinin NMR spektral değerleri (600 MHz, DMSO)

Pozisyon	$\delta$ <sup>13</sup> C-NMR	$\delta$ <sup>1</sup> H-NMR	HMBC C→H	COSY
1	79,11	3,22, <i>dd</i> , <i>J</i> = 9,6;2,6 Hz	H-2'; H-6'; H-7'	H-6'; H-2'
2	67,68	5,50, <i>t</i> , <i>J</i> =2,6 Hz	H-1'	H-3'; H-1'
3	71,77	4,73, <i>dd</i> , <i>J</i> = 10,3; 2,8 Hz	H-2'	H-2'; H-4'
4	70,23	3,56, <i>t</i> , <i>J</i> =9,7 Hz	H-3'; H-5'; H-1'	H-3'; H-5'
5	74,51	3,11, <i>t</i> , <i>J</i> =9,1 Hz	H-4'; H-6'	H-6'; H-4'
6	71,69	3,39, <i>t</i> , <i>J</i> =9,7 Hz	H-2'	H-1'; H-5'
7	57,33	3,27, <i>s</i>	H-1'; H-6'	
8	169,67	-	H-2'; H-9'	
9	20,64	2,03, <i>s</i>		
1'	161,20	-	H-2; H-3; H-5; H-6	
2'	130,45	7,52, <i>d</i> , <i>J</i> =8,5 Hz	H-7	H-3
3'	115,95	6,75, <i>d</i> , <i>J</i> =8,3 Hz	H-2; H-6	H-2
4'	124,00	-	H-2; H-3; H-5; H-6; H-7; H-8	
5'	115,95	6,75, <i>d</i> , <i>J</i> =8,3 Hz	H-2; H-6	H-6
6'	130,45	7,52, <i>d</i> , <i>J</i> =8,5 Hz	H-7	H-5
7'	145,13	7,50, <i>d</i> , <i>J</i> =15,7 Hz	H-2; H-6	H-8
8'	113,10	6,29, <i>d</i> , <i>J</i> =15,6 Hz	H-2; H-6; H-7	H-7
9'	166,12	-	H-7; H-8; H-3'	

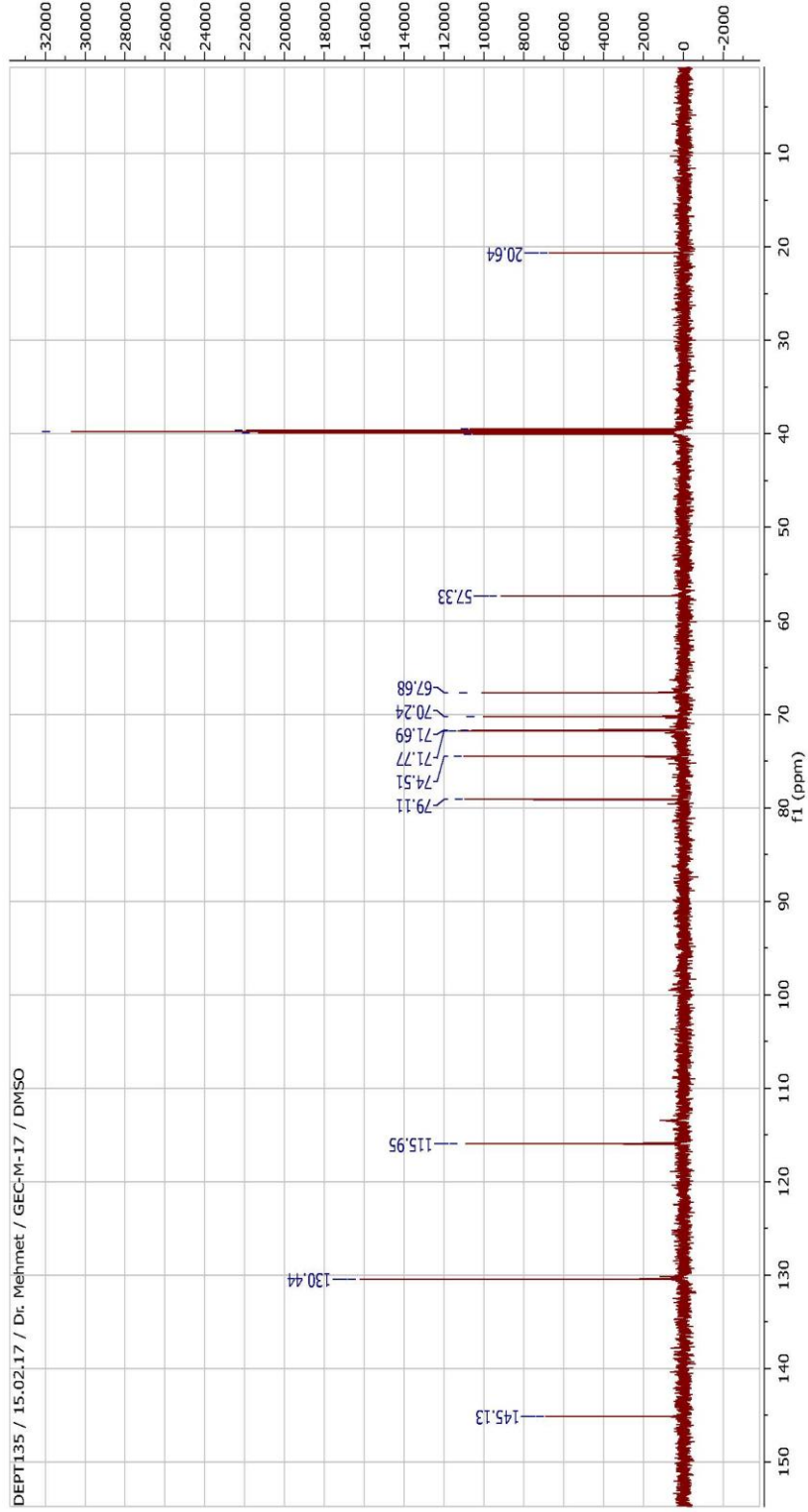


Şekil 3.82. GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (600 MHz, DMSO)

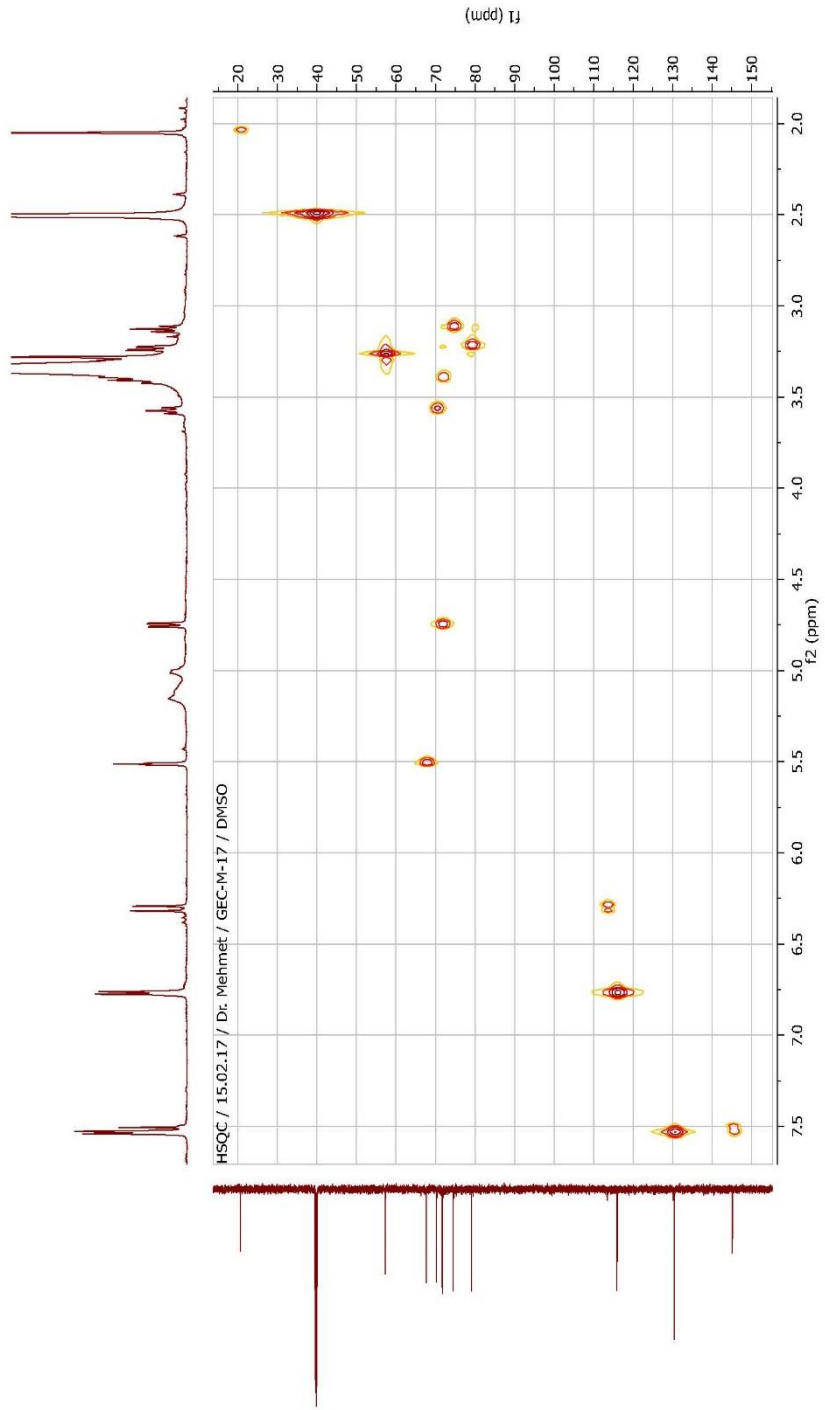


Şekil 3.83. GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu (150 MHz, DMSO)

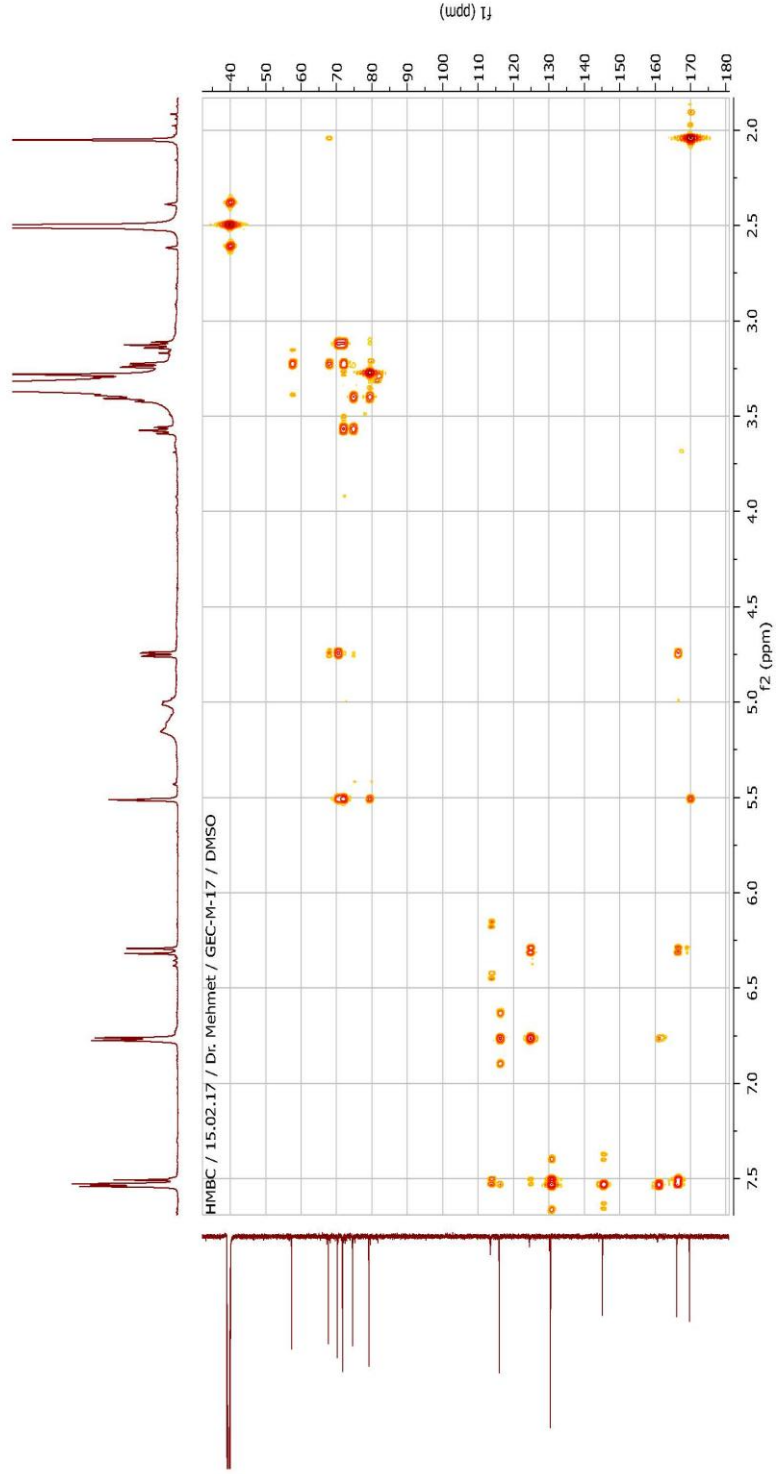




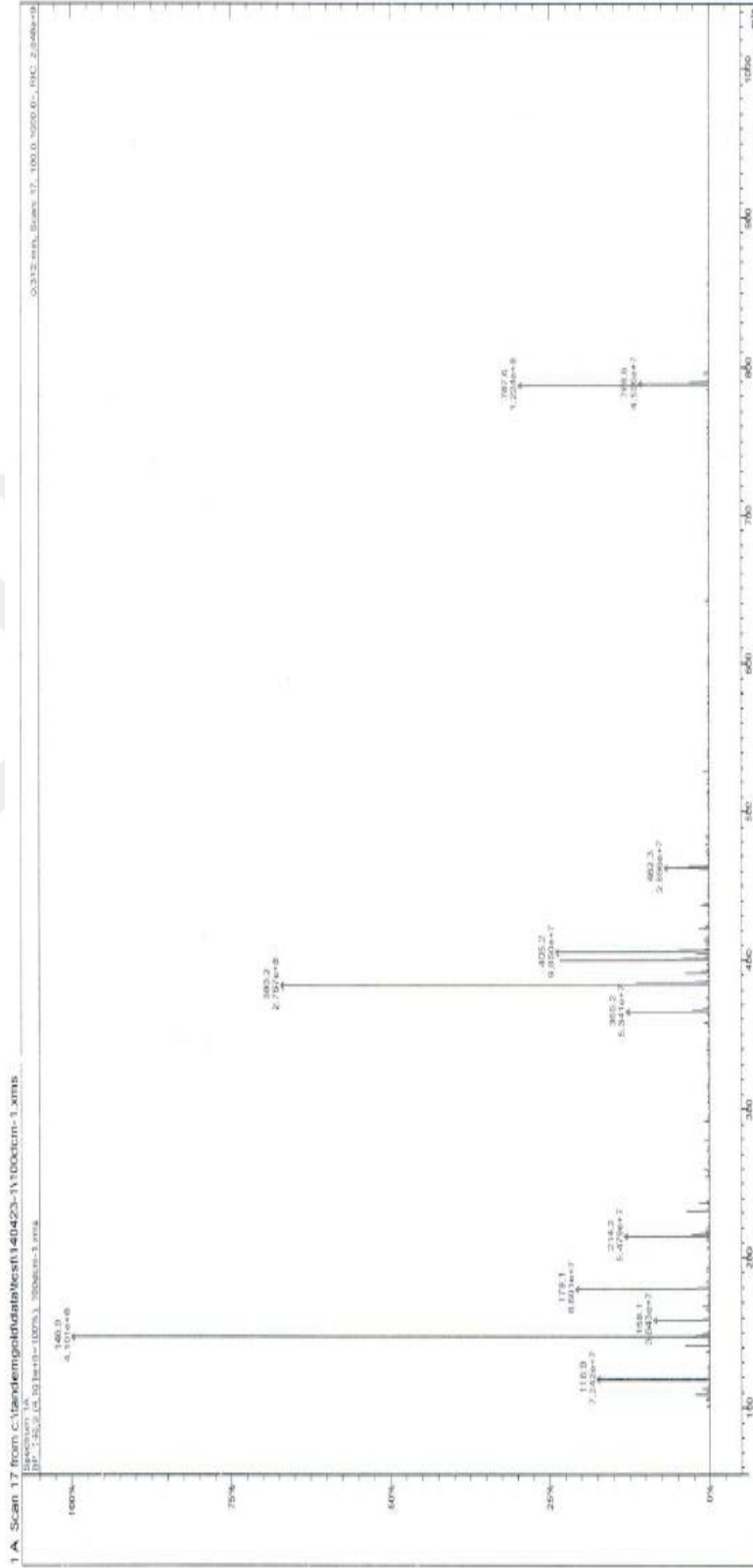
Şekil 3.84. GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin DEPT-135 spektrumu



Şekil 3.85 GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu

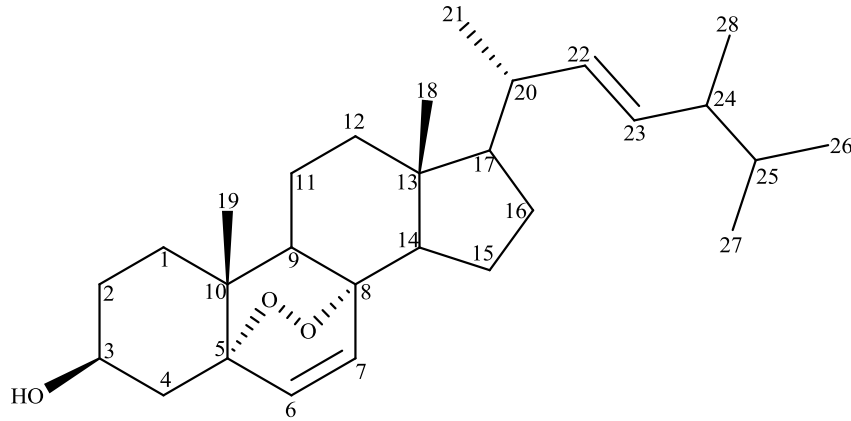


Şekil 3.86 GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu



Şekil 3.87 GEN-M-17 (10) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumu

### 3.9.3. GEN-M-20 (11) = Ergosterol endo peroksit



Şekil 3.88. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEN-M-20 (11) maddesi (3,4 mg) bölüm 3.5.1’de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEN-M-20 (11) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisi plağında UV lamba (254 nm) altında mor görünen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) lila rengini almaktadır.

<sup>13</sup>C-NMR spektrumu (150 MHz, Şekil 3.90) ve DEPT 135 (Şekil 3.91) spektrumları beraber değerlendirildiğinde 6 metil, 7 metilen, 11 metin ve 4 katerner karbon belirlendi. Aşağı alanda  $\delta$  135.4, 135.2, 132.3 ve 130.8 ppm’de rezonans olan pikler sırası ile C-6, C-22, C-23 ve C-7 karbonlarına aittir. 3 oksijenlenmiş karbon sinyali  $\delta$  82.1 (C-8), 79.4 (C-5), 66.4 (C-3) ppm’de gözlemlendi.  $\delta$  20.8 (C-21), 19.9 (C-26), 19.7 (C-27), 18.1 (C-28), 17.5 (C-19) ve 12.8 (C-18) ppm’de rezonans olan pikler molekülde bulunan 6 adet metil sinyalidir.

<sup>1</sup>H- NMR spektrumunda (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>, Şekil 3.89)  $\delta$  0.79 (s, H-18) ve 0.86 (s, H-19) ile  $\delta$  0.81 (d,  $J$ = 6.5 Hz, H-27),  $\delta$  0.81 (d,  $J$ = 6.6 Hz, H-26),  $\delta$  0.88 (d,  $J$ = 7.2 Hz, H-28) ve  $\delta$  0.98 (d,  $J$ = 6.0 Hz, H-21) ppm’de rezonans olan pikler karakteristik lanostan tipi stereoide aittir.  $\delta$  6.49 (d,  $J$ = 8.4 Hz, H-6, 1H) ppm ile  $\delta$  6.22 (d,  $J$ = 8.4 Hz, H-7, 1H) sinyalleri halkadaki çifte bağa ait olan hidrojenlere aittir. Ayrıca  $\delta$  5.14 (dd,  $J$ = 15.0;9.0 Hz, H-22, 1H) ve  $\delta$  5.19 (dd,  $J$ = 15.6;7.8 Hz, H-23, 1H) ppm’de vinilik

pikler izlendi. Buna ilaveten,  $\delta$  3.95 (*m*, H-3, 1H) ppm'de multiplet olarak rezonans olan pik C-3 pozisyonunda hidrojenin  $\alpha$  konumunda olduğunu göstermektedir.

GEN-M-20 (**11**) maddesinin yapı tayini HSQC (Şekil 3.92), HMBC (Şekil 3.93) spektrumları ile doğrulandı. HMBC korelasyonları Çizelge 3.20'de verilmektedir.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.94), moleküler iyon piki 428.0 [M]<sup>+</sup> piki C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>3</sub> yapısını önerdi. *m/z* 410 [M-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> bir molekül suyun ayrılmasını göstermektedir.

Yukarıda verilen spektral veriler ve fizikokimyasal özellikler kullanıldığında ve literatür ile karşılaştırıldığında GEN-M-20 (**11**) maddesinin ergosterol endo peroksit (Şekil 3.88) (3,4 mg) olduğu belirlendi (Ming vd, 2013).

Çizelge 3-20. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin NMR spektrumu (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

C.no.	<sup>13</sup> C-NMR (δ)	<sup>1</sup> H-NMR (δ)	HMBC (H → C)	COSY
1	36.9	2.10 (1H, <i>m</i> ), 1.91 (1H, <i>m</i> )	C-3, C-4	
2	28.6	1.75 (1H, <i>m</i> ), 1.33 (1H, <i>m</i> )		
3	66.4	3.95 (1H, <i>m</i> )		
4	30.1	1.81 (1H, <i>m</i> ), 1.50 (1H, <i>m</i> )		
5	79.4	-		
6	135.4	6.49 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.4 Hz)	C-5, C-8,	H-6
7	130.8	6.22 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.4 Hz)	C-5, C-8	
8	82.1	-		
9	39.7	2.01 (1H, <i>m</i> )		
10	35.6	-		
11	23.4	1.49 (1H, <i>m</i> ), 1.20 (1H, <i>m</i> )		H-9
12	28.6	1.94 (1H, <i>m</i> ), 1.24 (1H, <i>m</i> )	C-13	
13	44.6	-		
14	51.0	1.55 (1H, <i>m</i> )	C-13, C-18, C-8, C-15	
15	34.6	1.93 (1H, <i>m</i> ), 1.69 (1H, <i>m</i> )		H-16
16	23.6	1.44 (1H, <i>m</i> ), 1.21 (1H, <i>m</i> )		H-17
17	56.1	1.21 (1H, <i>m</i> )	C-12, C-13, C-14, C-18	
18	12.8	0.79 (3H, <i>s</i> )	C-12, C-13, C-17	
19	17.5	0.86 (3H, <i>s</i> )	C-10, C-5, C-1, C-9	
20	39.8	2.01 (1H, <i>m</i> )	C-22, C-23	
21	20.8	0.98 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	C-17, C-22	
22	135.2	5.14 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 9 Hz)	C-23, C-21, C-20, C-24	H-23
23	132.3	5.19 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.8 Hz)	C-20, C-24	
24	42.7	1.83 (1H, <i>m</i> )	C-23	H-28
25	33.1	1.44 (1H, <i>m</i> )		
26	19.9	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.0 Hz)	C-25, C-24, C-27	H-27
27	19.7	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.5 Hz)	C-25, C-24, C-26	
28	18.1	0.88 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.5 Hz)	C-25, C-24, C-23	

GEN-M-20/DR. Mehmet/ CDCI3

AVANCE AV-600  
CRYO PROBE  
LAB NO: 108



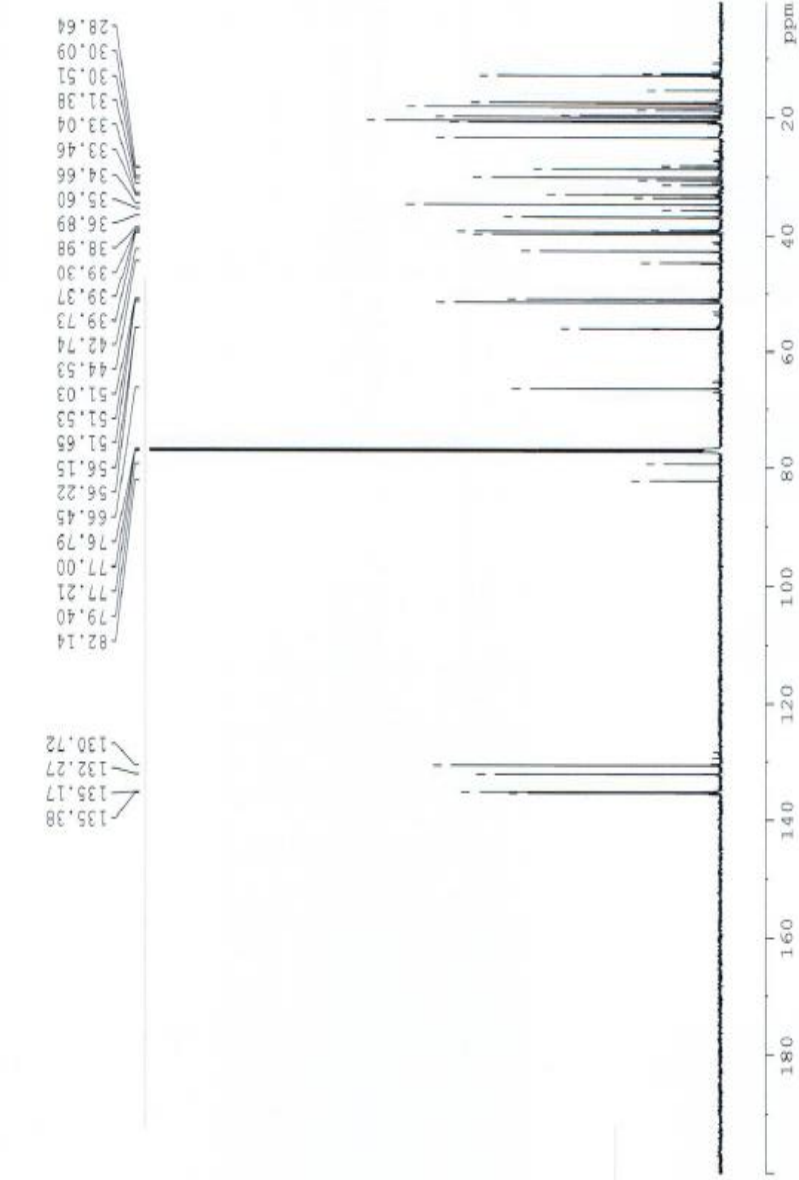
NAME April11-16  
EXPNO 1  
PROCNO 1  
Date\_ 20160417  
Time 10:17  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm CETCI-1H-  
PULPROG zgpg30  
TD 32768  
SOLVENT CDCl3  
NS 16  
DS 0  
SWH 12019.230 Hz  
FIDRES 0.366798 Hz  
AQ 1.3632404 sec  
RG 12.07  
DE 412.07 usec  
EE 5.50 usec  
TE 298.0 K  
D1 1.5000000 sec  
T20 1

CHANNEL f1  
NUC1 1H 7.00 usec  
P1 1.00 usec  
PL1 3.30 dB  
PL2 3.30 dB  
PL3 3.30 dB  
PL4 3.30 dB  
PL5 3.30 dB  
PL6 3.30 dB  
PL7 3.30 dB  
PL8 3.30 dB  
PL9 3.30 dB  
PL10 3.30 dB  
PL11 3.30 dB  
PL12 3.30 dB  
PL13 3.30 dB  
PL14 3.30 dB  
PL15 3.30 dB  
PL16 3.30 dB  
PL17 3.30 dB  
PL18 3.30 dB  
PL19 3.30 dB  
PL20 3.30 dB  
PL21 3.30 dB  
PL22 3.30 dB  
PL23 3.30 dB  
PL24 3.30 dB  
PL25 3.30 dB  
PL26 3.30 dB  
PL27 3.30 dB  
PL28 3.30 dB  
PL29 3.30 dB  
PL30 3.30 dB  
PL31 3.30 dB  
PL32 3.30 dB  
PL33 3.30 dB  
PL34 3.30 dB  
PL35 3.30 dB  
PL36 3.30 dB  
PL37 3.30 dB  
PL38 3.30 dB  
PL39 3.30 dB  
PL40 3.30 dB  
PL41 3.30 dB  
PL42 3.30 dB  
PL43 3.30 dB  
PL44 3.30 dB  
PL45 3.30 dB  
PL46 3.30 dB  
PL47 3.30 dB  
PL48 3.30 dB  
PL49 3.30 dB  
PL50 3.30 dB  
PL51 3.30 dB  
PL52 3.30 dB  
PL53 3.30 dB  
PL54 3.30 dB  
PL55 3.30 dB  
PL56 3.30 dB  
PL57 3.30 dB  
PL58 3.30 dB  
PL59 3.30 dB  
PL60 3.30 dB  
PL61 3.30 dB  
PL62 3.30 dB  
PL63 3.30 dB  
PL64 3.30 dB  
PL65 3.30 dB  
PL66 3.30 dB  
PL67 3.30 dB  
PL68 3.30 dB  
PL69 3.30 dB  
PL70 3.30 dB  
PL71 3.30 dB  
PL72 3.30 dB  
PL73 3.30 dB  
PL74 3.30 dB  
PL75 3.30 dB  
PL76 3.30 dB  
PL77 3.30 dB  
PL78 3.30 dB  
PL79 3.30 dB  
PL80 3.30 dB  
PL81 3.30 dB  
PL82 3.30 dB  
PL83 3.30 dB  
PL84 3.30 dB  
PL85 3.30 dB  
PL86 3.30 dB  
PL87 3.30 dB  
PL88 3.30 dB  
PL89 3.30 dB  
PL90 3.30 dB  
PL91 3.30 dB  
PL92 3.30 dB  
PL93 3.30 dB  
PL94 3.30 dB  
PL95 3.30 dB  
PL96 3.30 dB  
PL97 3.30 dB  
PL98 3.30 dB  
PL99 3.30 dB  
PL100 3.30 dB

Şekil 3.89. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>)



GEN-M-20/ DR. Mehmet/ CDCl<sub>3</sub>  
BB



AVANCE AV-600  
CRYO PROBE  
LAB NO: 108

NAME April17-16  
EXPRO 6  
PROCNO 1  
DATE\_ 20160411  
Time 8.06  
INSTRUM spect  
PROBHD 5 mm CPTCI IR-  
P1PRPG 32769  
TD 32769  
SOLVENT CDCl<sub>3</sub>  
NS 2609  
SMI 35971.22 Hz  
FIDRES 1.957755 Hz  
AQ 0.4355391 sec  
RG 32768  
DE 13.650 usec  
TE 298.0 K  
D1 1.50000000 sec  
T1 0.03000000 sec  
TD0 12

CHANNEL F1  
NUC1 <sup>13</sup>C  
PL1 15.00 usec  
PL2 1.00 dB  
PL1W 83.60149384 N  
SFO1 150.9453107 MHz

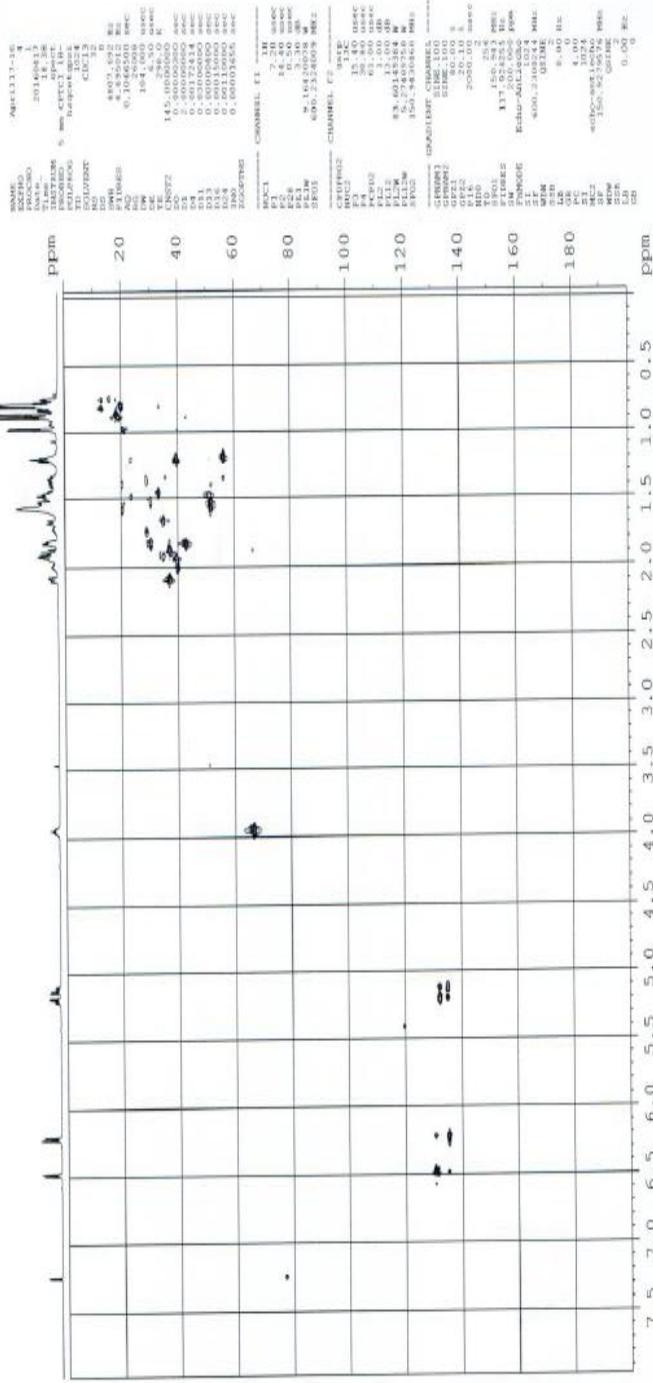
CHANNEL F2  
NAME walz16  
NUC2 <sup>1H</sup>  
PL2 65.30 usec  
PL3 0.00 dB  
PL12 22.06 dB  
PL13 27.00 dB  
PL1W 9.16430078 W  
PL2W 0.03405260 W  
PL3W 0.03405260 W  
SFO2 600.2336014 MHz  
SI 16384  
MEM 0  
SSB 0  
LB 1.00 Hz  
GB 0  
PC 0.90

Şekil 3.90. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin <sup>13</sup>C NMR spektrumu (150 MHz; CDCl<sub>3</sub>)



GEN-M-20/DR.Mehmet/CDCI3  
HSQC

AVANCE AV-600  
CRYO PROBE  
LAB NO: 108

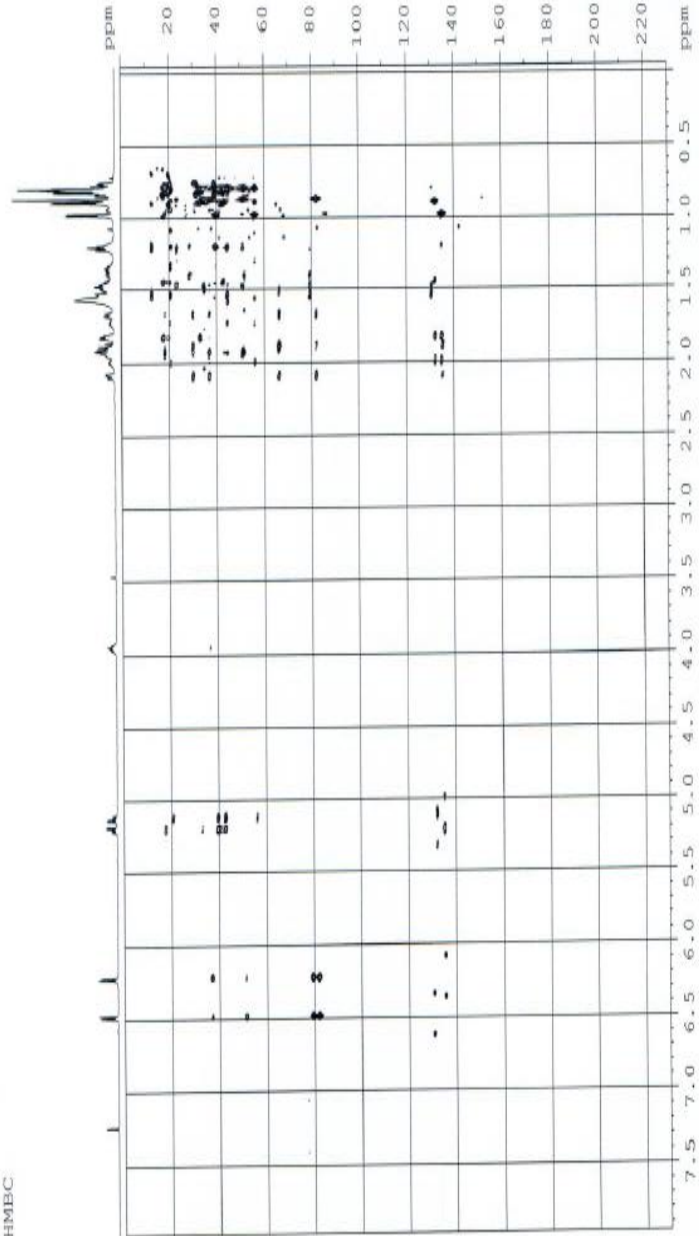


Şekil 3.92. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu

GEN-M-20/DR.Mehmet/CDCI3  
HMBC

AVANCE AV-600  
CRYO PROBE  
LAB NO: 108

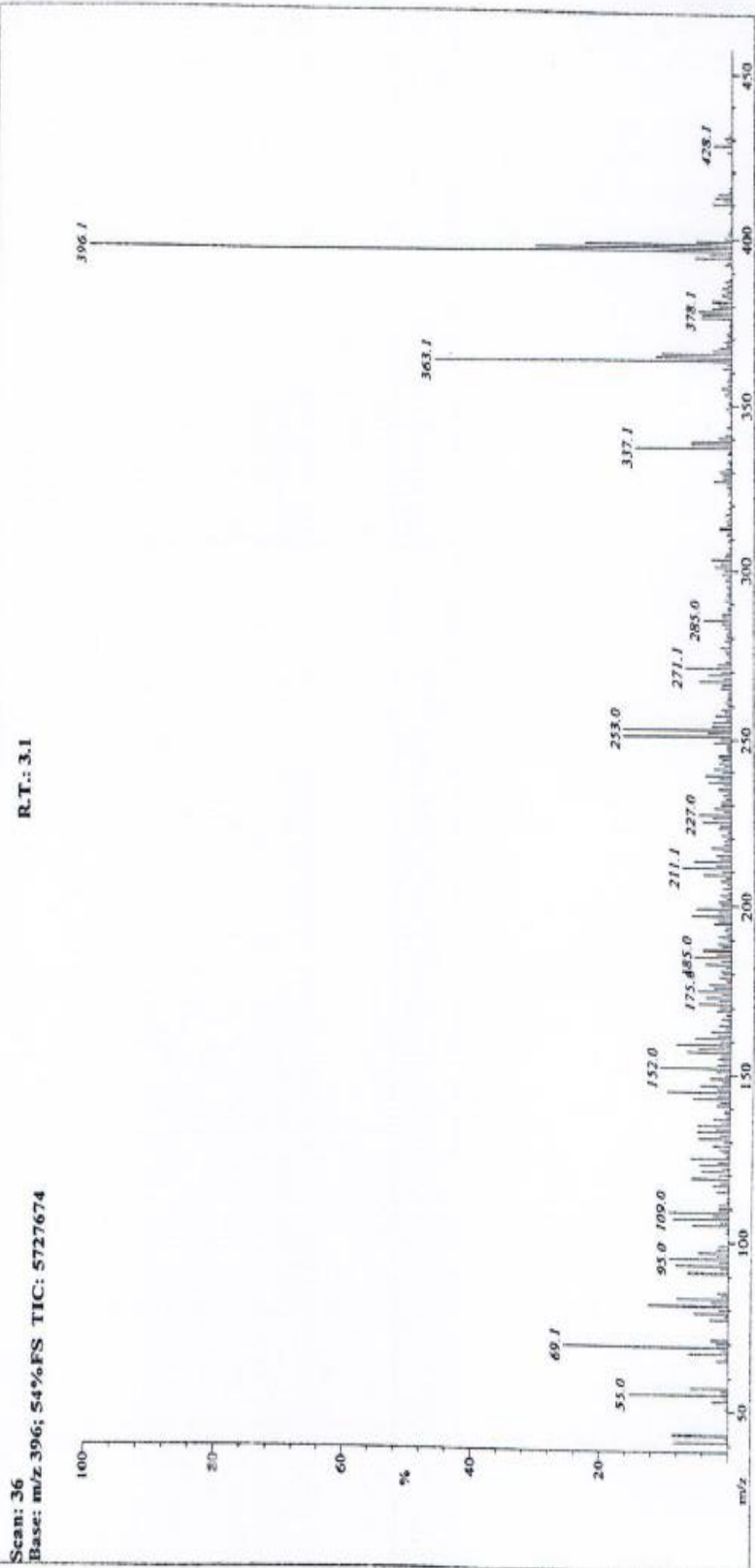
NAME: 20X1317-16  
EXTRNO: 3  
DAE: 20160417  
INSTRUM: spect  
PULPROG: zgpg30  
SOLVENT: CDCl3  
NS: 518  
DS: 4  
SWH: 5817.676 Hz  
AQ: 0.2131460 sec  
RG: 655  
FIDRES: 0.0001000 Hz  
AQRES: 0.0001000 Hz  
TE: 300.2 K  
C13: 125.7628000 MHz  
C132: 125.7628000 MHz  
C131: 125.7628000 MHz  
C130: 125.7628000 MHz  
C129: 125.7628000 MHz  
C128: 125.7628000 MHz  
C127: 125.7628000 MHz  
C126: 125.7628000 MHz  
C125: 125.7628000 MHz  
C124: 125.7628000 MHz  
C123: 125.7628000 MHz  
C122: 125.7628000 MHz  
C121: 125.7628000 MHz  
C120: 125.7628000 MHz  
C119: 125.7628000 MHz  
C118: 125.7628000 MHz  
C117: 125.7628000 MHz  
C116: 125.7628000 MHz  
C115: 125.7628000 MHz  
C114: 125.7628000 MHz  
C113: 125.7628000 MHz  
C112: 125.7628000 MHz  
C111: 125.7628000 MHz  
C110: 125.7628000 MHz  
C109: 125.7628000 MHz  
C108: 125.7628000 MHz  
C107: 125.7628000 MHz  
C106: 125.7628000 MHz  
C105: 125.7628000 MHz  
C104: 125.7628000 MHz  
C103: 125.7628000 MHz  
C102: 125.7628000 MHz  
C101: 125.7628000 MHz  
C100: 125.7628000 MHz  
C99: 125.7628000 MHz  
C98: 125.7628000 MHz  
C97: 125.7628000 MHz  
C96: 125.7628000 MHz  
C95: 125.7628000 MHz  
C94: 125.7628000 MHz  
C93: 125.7628000 MHz  
C92: 125.7628000 MHz  
C91: 125.7628000 MHz  
C90: 125.7628000 MHz  
C89: 125.7628000 MHz  
C88: 125.7628000 MHz  
C87: 125.7628000 MHz  
C86: 125.7628000 MHz  
C85: 125.7628000 MHz  
C84: 125.7628000 MHz  
C83: 125.7628000 MHz  
C82: 125.7628000 MHz  
C81: 125.7628000 MHz  
C80: 125.7628000 MHz  
C79: 125.7628000 MHz  
C78: 125.7628000 MHz  
C77: 125.7628000 MHz  
C76: 125.7628000 MHz  
C75: 125.7628000 MHz  
C74: 125.7628000 MHz  
C73: 125.7628000 MHz  
C72: 125.7628000 MHz  
C71: 125.7628000 MHz  
C70: 125.7628000 MHz  
C69: 125.7628000 MHz  
C68: 125.7628000 MHz  
C67: 125.7628000 MHz  
C66: 125.7628000 MHz  
C65: 125.7628000 MHz  
C64: 125.7628000 MHz  
C63: 125.7628000 MHz  
C62: 125.7628000 MHz  
C61: 125.7628000 MHz  
C60: 125.7628000 MHz  
C59: 125.7628000 MHz  
C58: 125.7628000 MHz  
C57: 125.7628000 MHz  
C56: 125.7628000 MHz  
C55: 125.7628000 MHz  
C54: 125.7628000 MHz  
C53: 125.7628000 MHz  
C52: 125.7628000 MHz  
C51: 125.7628000 MHz  
C50: 125.7628000 MHz  
C49: 125.7628000 MHz  
C48: 125.7628000 MHz  
C47: 125.7628000 MHz  
C46: 125.7628000 MHz  
C45: 125.7628000 MHz  
C44: 125.7628000 MHz  
C43: 125.7628000 MHz  
C42: 125.7628000 MHz  
C41: 125.7628000 MHz  
C40: 125.7628000 MHz  
C39: 125.7628000 MHz  
C38: 125.7628000 MHz  
C37: 125.7628000 MHz  
C36: 125.7628000 MHz  
C35: 125.7628000 MHz  
C34: 125.7628000 MHz  
C33: 125.7628000 MHz  
C32: 125.7628000 MHz  
C31: 125.7628000 MHz  
C30: 125.7628000 MHz  
C29: 125.7628000 MHz  
C28: 125.7628000 MHz  
C27: 125.7628000 MHz  
C26: 125.7628000 MHz  
C25: 125.7628000 MHz  
C24: 125.7628000 MHz  
C23: 125.7628000 MHz  
C22: 125.7628000 MHz  
C21: 125.7628000 MHz  
C20: 125.7628000 MHz  
C19: 125.7628000 MHz  
C18: 125.7628000 MHz  
C17: 125.7628000 MHz  
C16: 125.7628000 MHz  
C15: 125.7628000 MHz  
C14: 125.7628000 MHz  
C13: 125.7628000 MHz  
C12: 125.7628000 MHz  
C11: 125.7628000 MHz  
C10: 125.7628000 MHz  
C9: 125.7628000 MHz  
C8: 125.7628000 MHz  
C7: 125.7628000 MHz  
C6: 125.7628000 MHz  
C5: 125.7628000 MHz  
C4: 125.7628000 MHz  
C3: 125.7628000 MHz  
C2: 125.7628000 MHz  
C1: 125.7628000 MHz



Şekil 3.93. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu

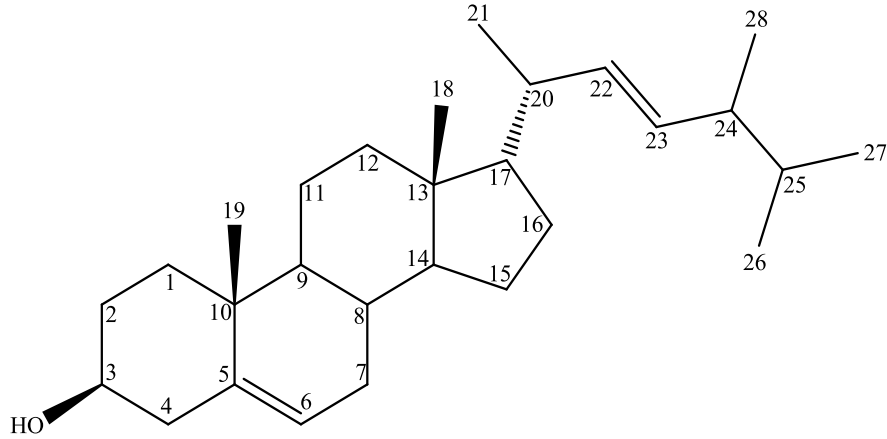
Ionization mode: EI+

Scan: 36  
Base: m/z 396; 54%FS TIC: 5727674



Şekil 3.94. GEN-M-20 (11) kodlu saf maddenin MS spektrumu

### 3.9.4. GEN-M-16(12) = Ergosta- 5,22-dien 3 $\beta$ -ol



Şekil 3.95. GEN-M-16 (12) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEN-M-16 (12) maddesi (78,6 mg) bölüm 3.5.1.'de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı. Erime noktası 153-154 °C olarak tespit edildi.

Beyaz renkli olan GEN-M-16 (12) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisinde UV lamba (254 nm) altında görülmeyen ancak, serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu mor renk aldı.

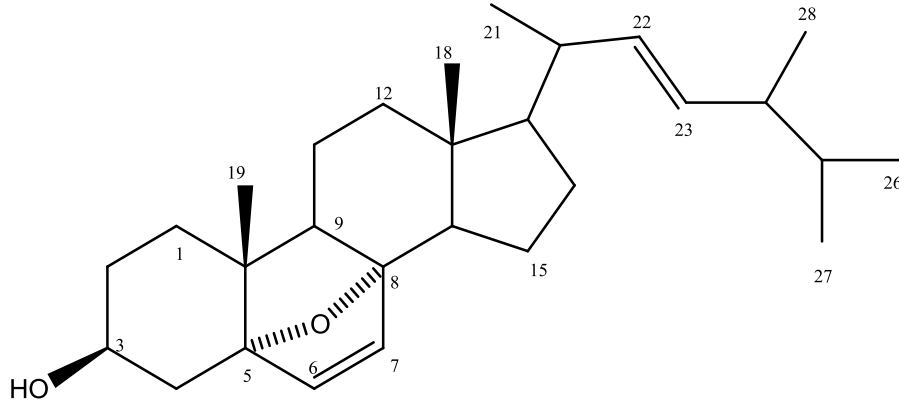
GEN-M-16 (12) kodlu saf maddesinin IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC ve HMBC NMR spektrumları incelendiğinde GEN-A-1 (1) kodlu saf madde ile aynı kimyasal yapıda olduğu belirlendi. Bölüm 3.7.1.'de GEN-A-1 (1) kodlu madde için verilen spektrumlar nedeniyle bu madde için tekrar spektrum konulmadı. GEN-M-16 (12) maddesi için NMR spektral değerleri Çizelge 3.21'de verilmektedir.

Çizelge 3-21. GEN-M-16 (12) saf maddesinin NMR spektral değerleri (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

C.no.	<sup>13</sup> C-NMR (δ)	<sup>1</sup> H-NMR (δ)	HMBC
1	37.2	1.82 (1H, <i>m</i> ), 1.06 (1H, <i>m</i> )	H-19
2	31.9	1.80 (2H, <i>m</i> )	
3	71.8	3.50 (1H, <i>m</i> )	H-1, H-2, H-4
4	42.3	2.27 (1H, <i>m</i> ), 1.82 (1H, <i>m</i> )	
5	140.7	-	H-1, H-4, H-19
6	121.7	5.32 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2.4 Hz)	H-4, H-8
7	31.7	1.95 (2H, <i>m</i> )	
8	31.9	1.44 (1H, <i>m</i> )	
9	50.2	0.91 (1H, <i>m</i> )	H-7, H-8, H-19
10	36.5	-	
11	21.1	1.46 (2H, <i>m</i> )	
12	39.7	1.97 (1H, <i>m</i> ), 1.15 (1H, <i>m</i> )	
13	42.2	-	
14	56.0	1.11 (1H, <i>m</i> )	H-7, H-18
15	24.3	1.51 (1H, <i>m</i> ), 1.00 (1H, <i>m</i> )	
16	28.5	1.65 (1H, <i>m</i> ), 1.23 (1H, <i>m</i> )	
17	56.8	0.98 (1H, <i>m</i> )	H-20
18	12.1	0.67 (3H, <i>s</i> )	H-12, H-14
19	19.4	0.98 (3H, <i>s</i> )	H-1
20	40.1	1.97 (1H, <i>m</i> )	H-21, H-22, H-23
21	20.9	0.94 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz)	H-20, H-22
22	135.8	5.17 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.0, 7.8 Hz)	H-20, H-21, H-28
23	131.7	5.19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.6, 7.2 Hz)	H-20, H-22, H-24
24	42.8	0.87 (1H, <i>m</i> )	H-22, H-27
25	33.1	1.43 (1H, <i>m</i> )	H-27, H-28
26	19.9	0.81 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz)	H-24, H-25
27	19.6	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	H-24, H-25
28	17.6	0.89 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	H-25

### 3.10. Pişirilmiş Metanol Ekstresinden Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayini

#### 3.10.1. GEC-M-8 (13) = 5 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -epoksi ergosta-6,22-dien 3 $\beta$ -ol



Şekil 3.96. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEC-M-8 (13) maddesi bölüm 3.5.2.'de ifade edildiği gibi elde edilmiş olup yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEC-M-8 (13) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka plağında UV lamba (254 nm) altında görülmezken; bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahverengi renk aldı.

$^1\text{H-NMR}$  ve  $^{13}\text{C-NMR}$  (Şekil 3.97 ve Şekil 3.98), DEPT 135 (Şekil 3.99), HSQC (Şekil 3.100), HMBC (Şekil 3.101) spektrumları değerlendirildiğinde GEC-M-8 bileşiğinin lanostan tipi steroid oksit olduğu tespit edildi. Çifte bağın yeri HMBC spektrumu ile belirlendi. Ayrıca,  $^{13}\text{C-NMR}$ 'ında  $\delta$  67,0'da rezonans olan pik yapıda, C-3 pozisyonunda bir adet hidroksilin olduğunu ve  $\delta$  83,4 (C-5)'de ve  $\delta$  81,0 (C-8)'de rezonans olan katerner pikler bir oksijen köprüsünün olduğu HMBC ile  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumları değerlendirildiğinde görüldü.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600MHz)  $\delta$  0,83 (3H, *d*,  $J=6,6$  Hz, H-26),  $\delta$  0,85 (3H, *s*, H-18),  $\delta$  0,86 (3H, *d*,  $J=6,6$  Hz, H-27),  $\delta$  0,90 (3H, *s*, H-19),  $\delta$  0,93 (3H, *d*,  $J=6,6$  Hz, H-28) ve  $\delta$  1,02 (3H, *d*,  $J=6,6$  Hz, H-21)' da 6 tane metil piki görüldü.  $\delta$  3,78 (1H, *m*, H-3) ppm'de multipllet yarılma hidroksil grubuna komşu protonun  $\alpha$



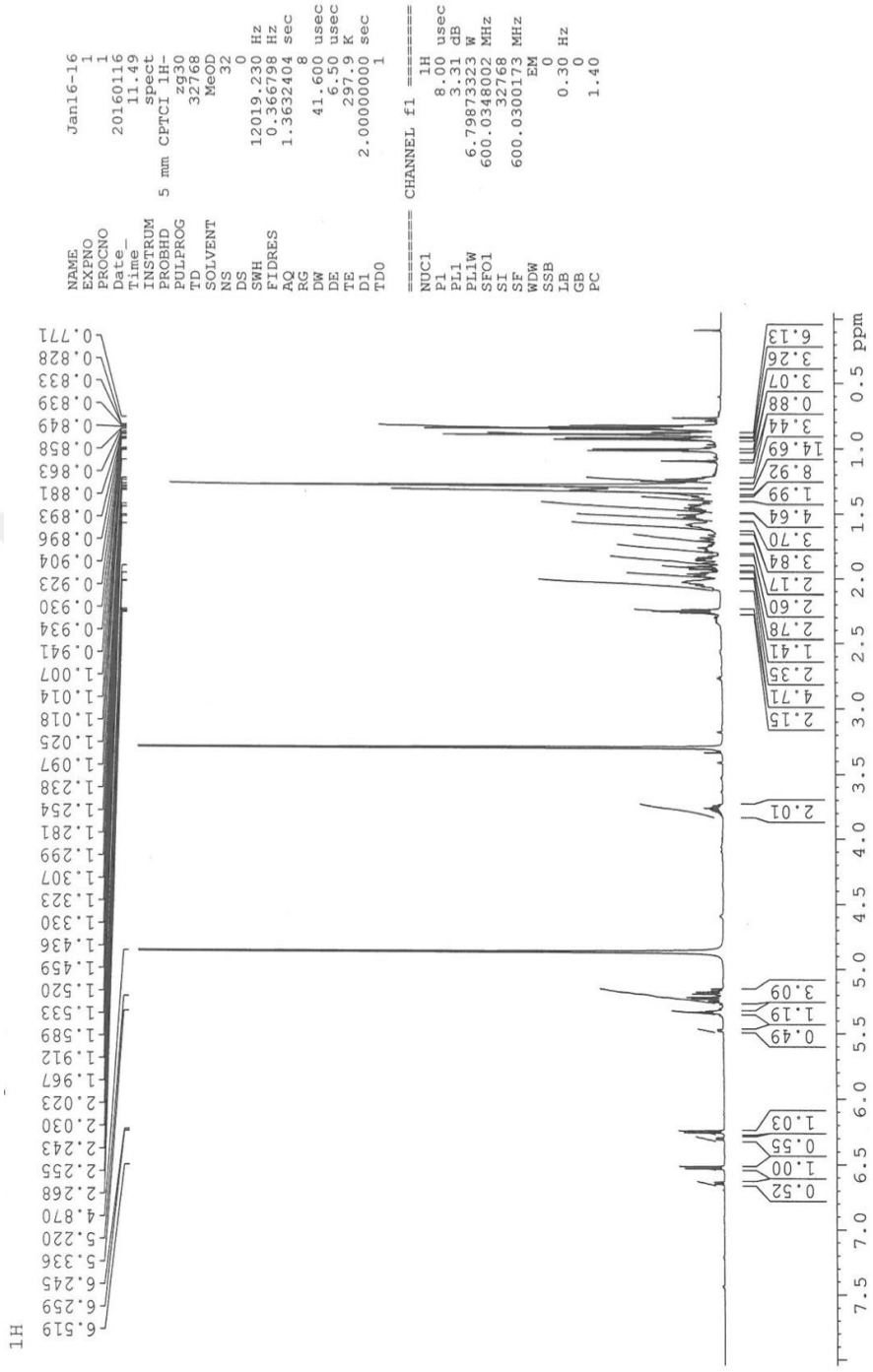
pozisyonunda olduğunu önerdi.  $\delta$  5,18 (1H, *dd*,  $J=8,4$ ; 15,4 Hz, H-22) ve  $\delta$  5,23 (1H, *dd*,  $J=7,2$ ; 15,4 Hz, H-23)'de 5 li halkaya bağlı zincirdeki vinilik hidrojen pikleri ve  $\delta$  6,25 (1H, *d*,  $J=8,4$  Hz, H-6) ile  $\delta$  6,52 (1H, *d*,  $J=8,4$  Hz, H-7) ppm'de olefinik hidrojen pikleri izlendi.

EI-MS (Şekil 3.102) spektrumunda  $m/z$  412,3  $[M]^+$  piki yapıda 7 doymamışlık ile  $C_{28}H_{44}O_2$  kapalı formülünü önerdi. NMR spektrumlarının yan yana değerlendirilmesi sonucu da elde edilen bu kapalı formüle göre C-5 ile C-8 arasındaki köprünün bir adet oksijen içerdiği kütle spektrumu ile de tespit edildi.  $^{13}C$ -NMR, DEPT135, HSQC, HMBC ve EI-MS spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı.

Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.22'de verilen GEC-M-8 (**13**) bileşiğbir steroid (Şekil 3.96) (5,4 mg) olduğu belirlendi ve ismi  $5\alpha$ - $8\alpha$  epoksi ergosta-6,22-dien  $3\beta$ -ol olarak belirlendi (Dauben vd, 1958).

Çizelge 3-22. GEC-M-8 (13) NMR spektral değerleri (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

C.No	<sup>13</sup> C-NMR(δ)	<sup>1</sup> H-NMR(δ)	H→C HMBC	H→H COSY
1	35,9	2,25 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> =7,2; 7,8 Hz)	C-5; C-9	H-2
2	37,5	1,96 (2H, <i>m</i> )	C-3; C-4; C-5	H-1; H-3
3	66,9	3,78 (1H, <i>br.s</i> , <i>m</i> )		H-2; H-4
4	29,8	1,87 (2H, <i>m</i> )		H-3
5	83,5	-		
6	136,8	6,25 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8,4 Hz)	C-8; C-5; C-10	H-7
7	131,7	6,52 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8,4 Hz)	C-8; C-5; C-14	H-6
8	80,7	-		
9	50,2	0,84 (1H, <i>m</i> )		
10	37,0	-		
11	21,1	1,50 (1H, <i>m</i> ); 1,37 (1H, <i>m</i> )	C-6	H-12
12	40,7	1,96 (1H, <i>m</i> ); 1,11 (1H, <i>m</i> )		
13	45,7	-		
14	53,1	1,53 <i>m</i> (1H, <i>m</i> )	C-7; C-8; C-13; C-15	
15	21,6	1,69 (2H, <i>m</i> )	C-13; C-8; C-7	H-16
16	26,2	1,59 (2H, <i>m</i> )		
17	57,6	1,25 (1H, <i>m</i> )	C-18; C-15; C-12; C-13	H-20
18	13,28	0,85 (3H, <i>s</i> )	C-17; C-14; C-13; C-12	
19	18,6	0,90 (3H, <i>s</i> )	C-1; C-5; C-10	
20	41,1	2,05 (1H, <i>m</i> )	C-23	H-17
21	21,4	1,02 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	C-17; C-22	
22	136,8	5,18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8,4; 15,4 Hz)		H-20
23	133,5	5,23 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =7,2; 15,4 Hz)		H-24
24	44,3	1,835 (1H, <i>m</i> )	C-22; C-23	H-23
25	34,4	1,47 (1H, <i>m</i> )	C-23; C-24	H-26
26	20,5	0,86 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	C-24; C-25; C-28	
27	20,1	0,83 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	C-24; C-25; C-27	
28	18,2	0,93 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	C-23; C-24; C-25	



Şekil 3.97 GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (600 MHz; CDCl<sub>3</sub>)





dept135

NAME Jan16-16  
 EXPNO 6  
 PROCNO 1  
 Date\_ 20160117  
 Time 12.04  
 INSTRUM spect  
 PROBHD 5 mm CpTci 1H  
 PULPROG zgpg30  
 DEPT 135  
 MeOD  
 SOLVENT MeOD  
 NS 5120  
 DS 2  
 SWH 30303.031 Hz  
 FIDRES 0.924775 Hz  
 AQ 0.5407385 sec  
 RG 32768  
 DW 16.500 usec  
 DE 6.50 usec  
 TE 298.0 K  
 CNST2 145.000000 sec  
 D1 1.50000000 sec  
 D2 0.00344828 sec  
 D12 0.00002000 sec  
 TD0 5

CHANNEL f1 13C  
 NUC1 13C  
 P1 12.70 usec  
 P12 2000.00 usec  
 PL0 120.00 dB  
 PL1 16.61 dB  
 PL2 0.00000000 dB  
 PLW 81.92915344 W  
 SFO1 150.8927518 MHz  
 SE2 4.19 dB  
 SFNAM2 Crp60comp.4  
 SFOAL2 0.500  
 SFOFFS2 0.00 Hz

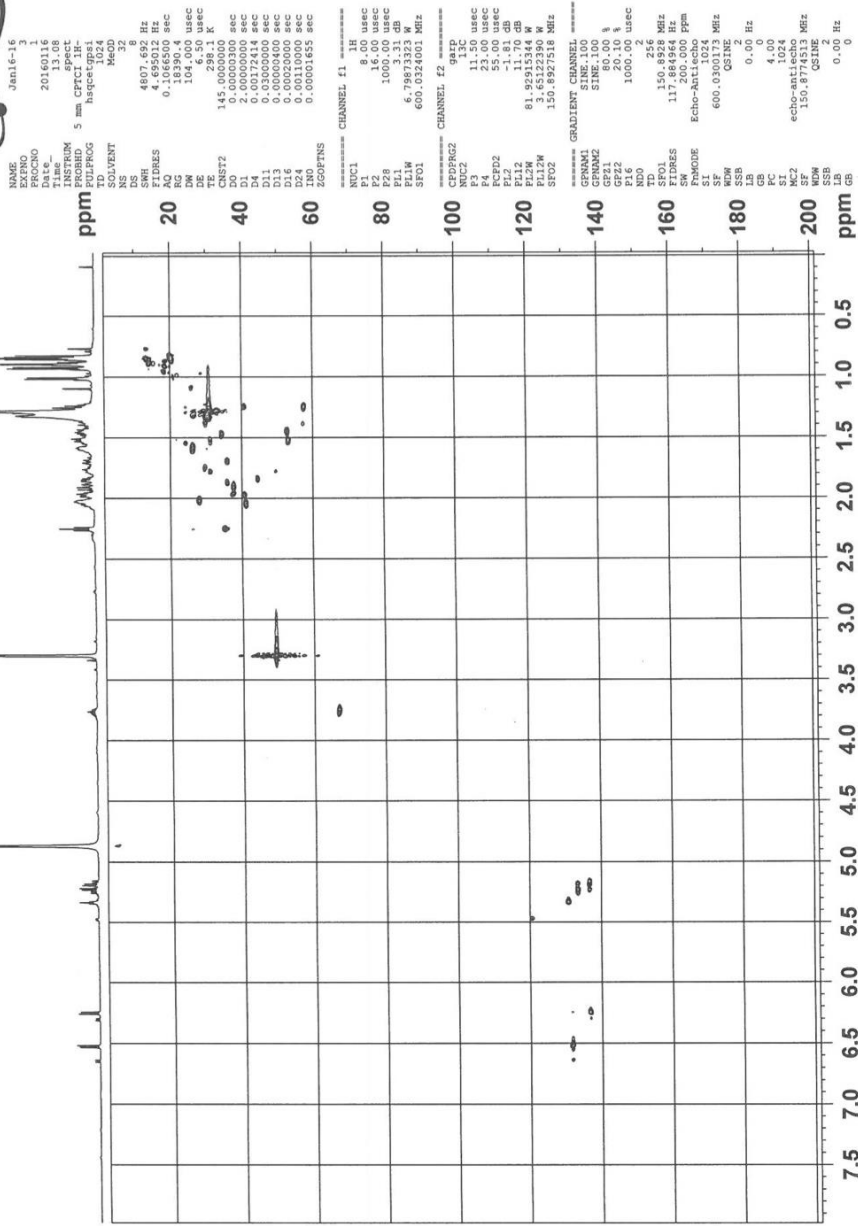
CHANNEL f2 waitz16  
 CPDPRG2 waitz16  
 NUC2 1H  
 F3 18.00 usec  
 F4 60.00 usec  
 F4BD2 60.00 usec  
 PL2 3.31 dB  
 PL12 23.31 dB  
 PL2W 6.79873323 W  
 PL12W 0.06798734 W  
 SFO2 600.0330002 MHz  
 SI 16384  
 SF 150.8774513 MHz  
 M1W EM  
 SSB 0  
 GB 1.00 Hz  
 ppmFC 1.40



Şekil 3.99. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin DEPT 135 spektrumu



HSQC



NAME Jan16-15  
 EXPNO 1  
 PROCNO 1  
 Date\_ 20160116  
 Time 13:08  
 INSTRUM spect  
 F2PROBHD 5 mm CPTCI 1H-  
 PULPROG zgpg30  
 SOLVENT MeOD  
 NS 32  
 DS 4  
 SWH 4807.692 Hz  
 FIDRES 4.695012 Hz  
 AQ 0.103909 sec  
 RG 655  
 DW 104.000 usec  
 DE 98.50 usec  
 TE 300.2 K  
 CNUF2 145.0000000  
 D0 0.0000000 sec  
 D1 0.0300000 sec  
 D2 0.0000000 sec  
 D3 0.0000000 sec  
 D4 0.00172418 sec  
 D5 0.0300000 sec  
 D6 0.0000000 sec  
 D7 0.0000000 sec  
 D8 0.0000000 sec  
 D9 0.0000000 sec  
 D10 0.0000000 sec  
 D11 0.0300000 sec  
 D12 0.0000000 sec  
 D13 0.0000000 sec  
 D14 0.0000000 sec  
 D15 0.0000000 sec  
 D16 0.0000000 sec  
 D17 0.0000000 sec  
 D18 0.0000000 sec  
 D19 0.0000000 sec  
 D20 0.0000000 sec  
 D21 0.0000000 sec  
 D22 0.0000000 sec  
 D23 0.0000000 sec  
 D24 0.00110000 sec  
 D25 0.0000000 sec  
 D26 0.0000000 sec  
 D27 0.0000000 sec  
 D28 0.0000000 sec  
 D29 0.0000000 sec  
 D30 0.0000000 sec  
 D31 0.0000000 sec  
 D32 0.0001655 sec  
 ZDELTA 0.0000000 sec

===== CHANNEL f1 =====  
 NUC1 1H  
 P1 8.00 usec  
 F2 16.00 usec  
 F3 100.625000 MHz  
 F4 100.625000 MHz  
 F1 3.31 dB  
 F2 3.31 dB  
 F3 3.31 dB  
 F4 3.31 dB  
 PL1 6.79673323 W  
 PL2 6.79673323 W  
 PL3 6.79673323 W  
 PL4 6.79673323 W  
 SFO1 600.024001 MHz

===== CHANNEL f2 =====  
 NUC2 13C  
 P1 9.00 usec  
 F2 125.760000 MHz  
 F3 125.760000 MHz  
 F4 125.760000 MHz  
 F1 11.50 usec  
 F2 11.50 usec  
 F3 11.50 usec  
 F4 11.50 usec  
 PL1 -1.81 dB  
 PL2 -1.81 dB  
 PL3 -1.81 dB  
 PL4 -1.81 dB  
 SFO1 101.626125 MHz  
 SFO2 150.8927518 MHz

===== GRADIENT CHANNEL =====  
 GPNM1 SINE-100  
 GPNM2 SINE-100  
 GPC1 20.10 %  
 GPC2 20.10 %  
 GPC3 1000.00 usec  
 GPC4 1000.00 usec  
 TD 256

SFO1 150.8924 MHz  
 SFO2 111.200000 MHz  
 SFO3 111.200000 MHz  
 SFO4 200.000000 MHz  
 SW 200.000 Ppm  
 FWHM Echo-AntiEcho  
 SF 600.0300173 MHz  
 SF 111.200000 MHz  
 SF 111.200000 MHz  
 SF 200.000000 MHz  
 OSINE  
 SSB 0.00 Hz  
 GB 0  
 EC 100  
 FC 100  
 KC2 echo-antiEcho  
 MC2 150.874513 MHz  
 SF 150.874513 MHz  
 SF 150.874513 MHz  
 SSB  
 LB 0.00 Hz  
 GB 0

Şekil 3.100 GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu

HMBC



NAME Jan16-16

EXPNO 1

PROCNO 1

Time 18.01

INSTRUM spect

PROBHD 5 mm Cryo

PULPROG hmbcsp1hbr

TD 2048

SOLVENT MeOD

DS 16

SWH 4807.592 Hz

AQ 0.211460 sec

RG 46341

DE 104.60 usec

TE 298.0 K

CN2 113.000000

CN3 113.000000

DO 0.0000300 sec

D2 0.0034498 sec

D6 0.03846154 sec

D16 0.00015000 sec

AW 0.0001490 sec

CHANNEL F1

NUC1 1H

F1 8.00 usec

F2 16.00 usec

PL1 6.79873233 W

PL2 6.79873233 W

SFO1 600.0324001 MHz

CHANNEL F2

NUC2 13C

F1 113.00 usec

F2 11.81 usec

PL2W 81.92915344 W

SFO2 150.8950149 MHz

GRADIENT CHANNEL

GENM1 SINE.100

GENM2 SINE.100

GENM3 SINE.100

GPZ1 50.00 usec

GPZ2 40.10 usec

P16 2000.00 usec

TD 256

SFO1 150.895 MHz

SFO2 150.8950149 MHz

SWH 230.000 ppm

FMODE

SI 600.030073 MHz

SSB 0 Hz

GB 0 Hz

PC 4.00

MC2 100F

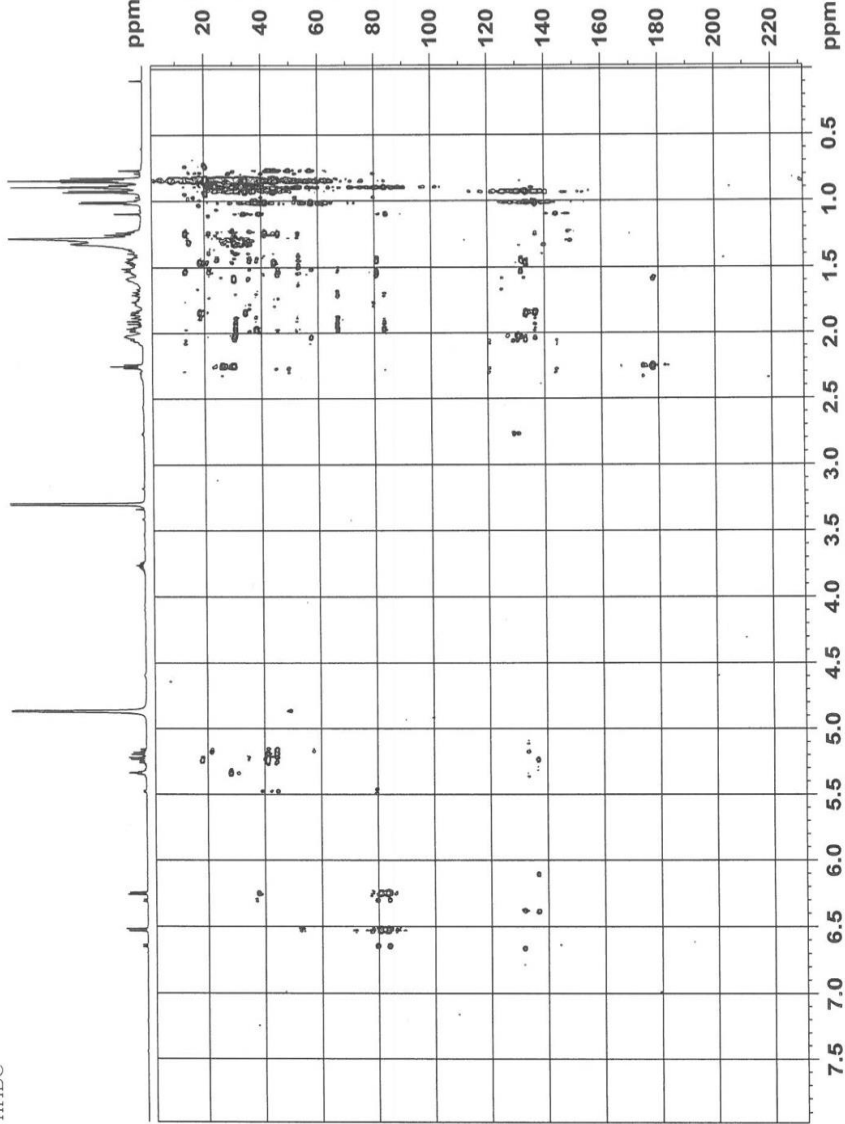
SFO 150.8774513 MHz

SI 0

SSB 0 Hz

LB 0.00 Hz

GB 0



Şekil 3.101. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu

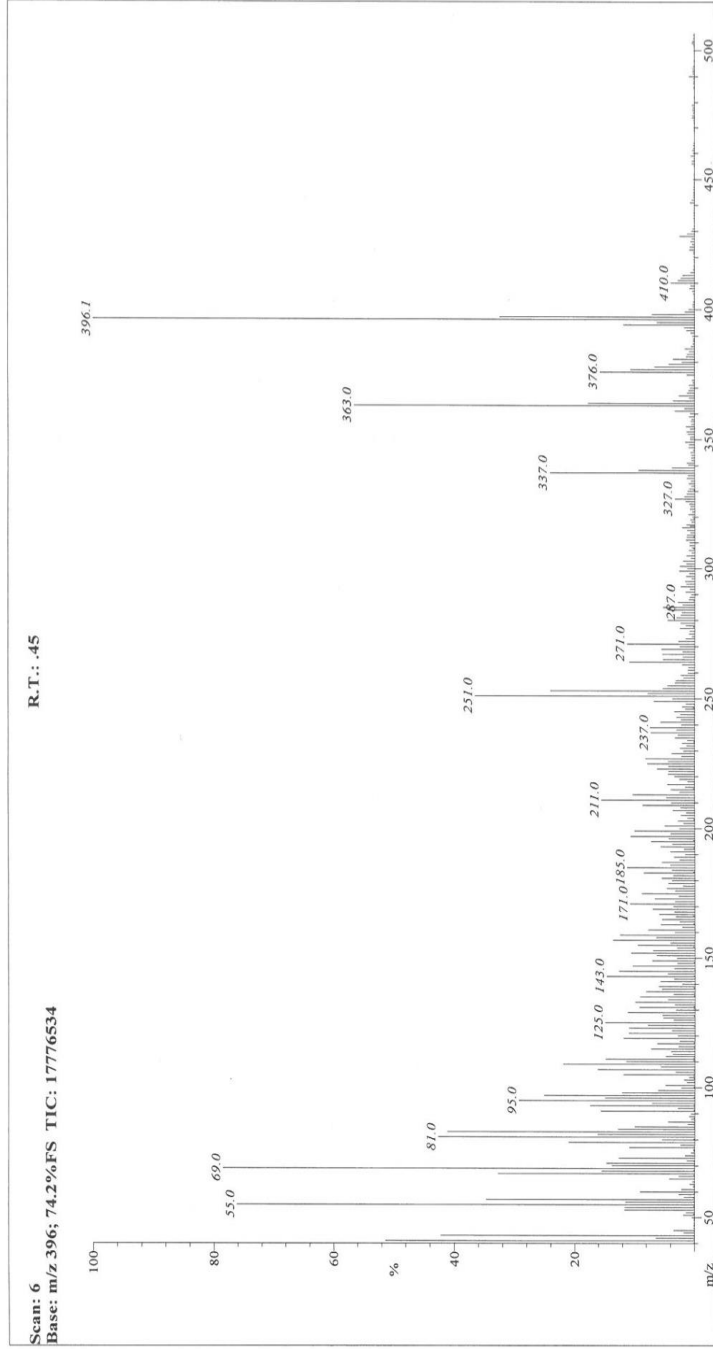
Date Run: 12-30-2015 (Time Run: 10:07:45)

File: TFC2-1-5-2  
Sample: DR. MEHMET / DR. M. IQBAL  
Instrument: JEOL MS 600H-1

Ionization mode: EI+

R.T.: .45

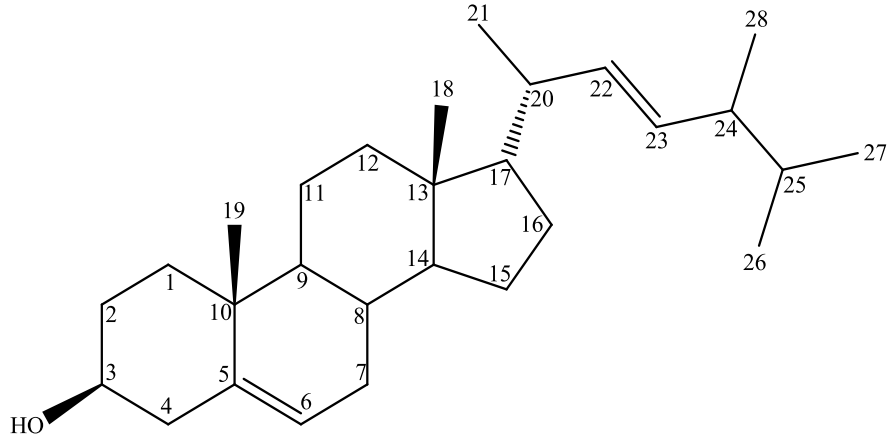
Scan: 6  
Base: m/z 396; 74.2%FS TIC: 17776534



Şekil 3.102. GEC-M-8 (13) kodlu saf maddenin MS spektrumu



### 3.10.2. GEC-M-9 (14)= Ergosta- 5,22-dien 3 $\beta$ -ol



Şekil 3.103 GEC-M-9 (14) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEC-M-9 (14) maddesi (56 mg) bölüm 3.5.2.'de ifade edildiği gibi elde edilip yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı. Erime noktası 153-154 °C olarak tespit edildi.

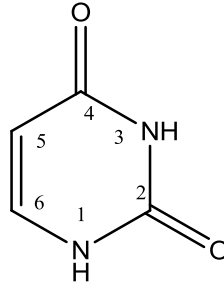
Beyaz renkli olan GEC-M-9 (14) bileşiği amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisinde UV lamba (254 nm) altında görülmeyen ancak, serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu mor renk aldı.

GEC-M-9 (14) kodlu saf maddesinin IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC ve HMBC NMR spektrumları incelendiğinde GEN-A-1 (1) kodlu saf madde ile aynı kimyasal yapıda olduğu belirlendi. Bölüm 3.7.1.'de GEN-A-1 (1) kodlu maddenin NMR spektrumları verilmektedir. Bölüm 3.7.1.'de GEN-A-1 (1) kodlu madde için verilen spektrumlar nedeniyle bu madde için tekrar spektrum konulmadı. GEC-M-9 (1) maddesi için NMR spektral değerleri Çizelge 3.23'de verilmektedir.

Çizelge 3-23. GEC-M-9 (14) saf maddesinin NMR spektral değerleri (600MHz, CDCl<sub>3</sub>)

C.no.	<sup>13</sup> C-NMR (δ)	<sup>1</sup> H-NMR (δ)	HMBC
1	37.2	1.82 (1H, <i>m</i> ), 1.06 (1H, <i>m</i> )	H-19
2	31.9	1.80 (2H, <i>m</i> )	
3	71.8	3.50 (1H, <i>m</i> )	H-1, H-2, H-4
4	42.3	2.27 (1H, <i>m</i> ), 1.82 (1H, <i>m</i> )	
5	140.7	-	H-1, H-4, H-19
6	121.7	5.32 (1H, <i>t</i> , <i>J</i> = 2.4 Hz)	H-4, H-8
7	31.7	1.95 (2H, <i>m</i> )	
8	31.9	1.44 (1H, <i>m</i> )	
9	50.2	0.91 (1H, <i>m</i> )	H-7, H-8, H-19
10	36.5	-	
11	21.1	1.46 (2H, <i>m</i> )	
12	39.7	1.97 (1H, <i>m</i> ), 1.15 (1H, <i>m</i> )	
13	42.2	-	
14	56.0	1.11 (1H, <i>m</i> )	H-7, H-18
15	24.3	1.51 (1H, <i>m</i> ), 1.00 (1H, <i>m</i> )	
16	28.5	1.65 (1H, <i>m</i> ), 1.23 (1H, <i>m</i> )	
17	56.8	0.98 (1H, <i>m</i> )	H-20
18	12.1	0.67 (3H, <i>s</i> )	H-12, H-14
19	19.4	0.98 (3H, <i>s</i> )	H-1
20	40.1	1.97 (1H, <i>m</i> )	H-21, H-22, H-23
21	20.9	0.94 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6 Hz)	H-20, H-22
22	135.8	5.17 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.0, 7.8 Hz)	H-20, H-21, H-28
23	131.7	5.19 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 15.6, 7.2 Hz)	H-20, H-22, H-24
24	42.8	0.87 (1H, <i>m</i> )	H-22, H-27
25	33.1	1.43 (1H, <i>m</i> )	H-27, H-28
26	19.9	0.81 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.2 Hz)	H-24, H-25
27	19.6	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	H-24, H-25
28	17.6	0.89 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	H-25

### 3.10.3. GEC-M-11 (15)= Urasil



Şekil 3.104. GEC-M-11 (15) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

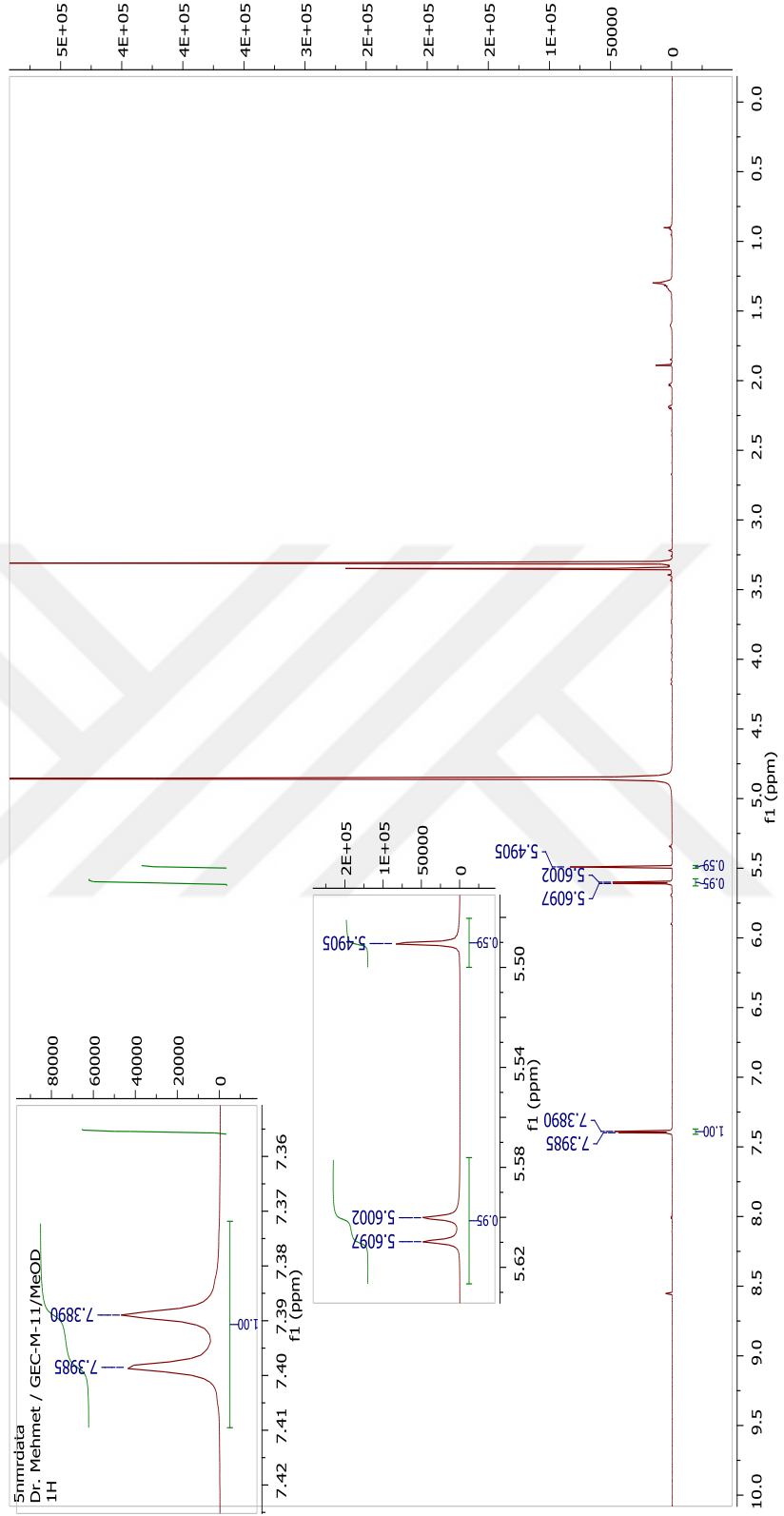
GEC-M-11 (15) bölüm 3.2.4.'de ifade edildiği gibi elde edilmiş olup yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEC-M-11 (15) bileşiği amorf halde elde edildi. Ters faz ince tabaka plakta, UV lamba (366 nm) altında halka şeklinde koyu renkli görülürken; serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) maddenin rengi kayboldu.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (800 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Şekil 3.105) aromatik bölgede  $\delta$  7.39 (1H, *d*, *J*=7.6 Hz, H-6),  $\delta$  5.61 (1H, *d*, *J*=7.6 Hz, H-5) ve  $\delta$  5.49 (1-NH) ile  $\delta$  8.54 (3-NH) pikleri izlendi. Başka bir hidrojen piki izlenmedi.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.106), *m/z* 112 [M]<sup>+</sup> piki C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kapalı formülünü önerdi. Doymamışlık 4 olarak hesaplandı. EI-MS spektrumunda *m/z* 97,0 [M-3-NH]<sup>+</sup> ayrılması, ve sırasıyla *m/z* 69,0 iki numaralı karbonilin ayrılması, *m/z* 42,0 dört numaralı karbonilin ayrılması olarak izlendi. (Şekil 3.107)

İTK'de standart madde ile ve literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında GEC-M-11 (15) kodlu maddenin urasil (Şekil 3.104) (1,24 mg) olduğu belirlendi (Sakairi vd, 1988).



Şekil 3.105 GEC-M-11 (15) kodlu saf maddenin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )

Mass Lab (104)  
3/24/2017 4:36:33 PM

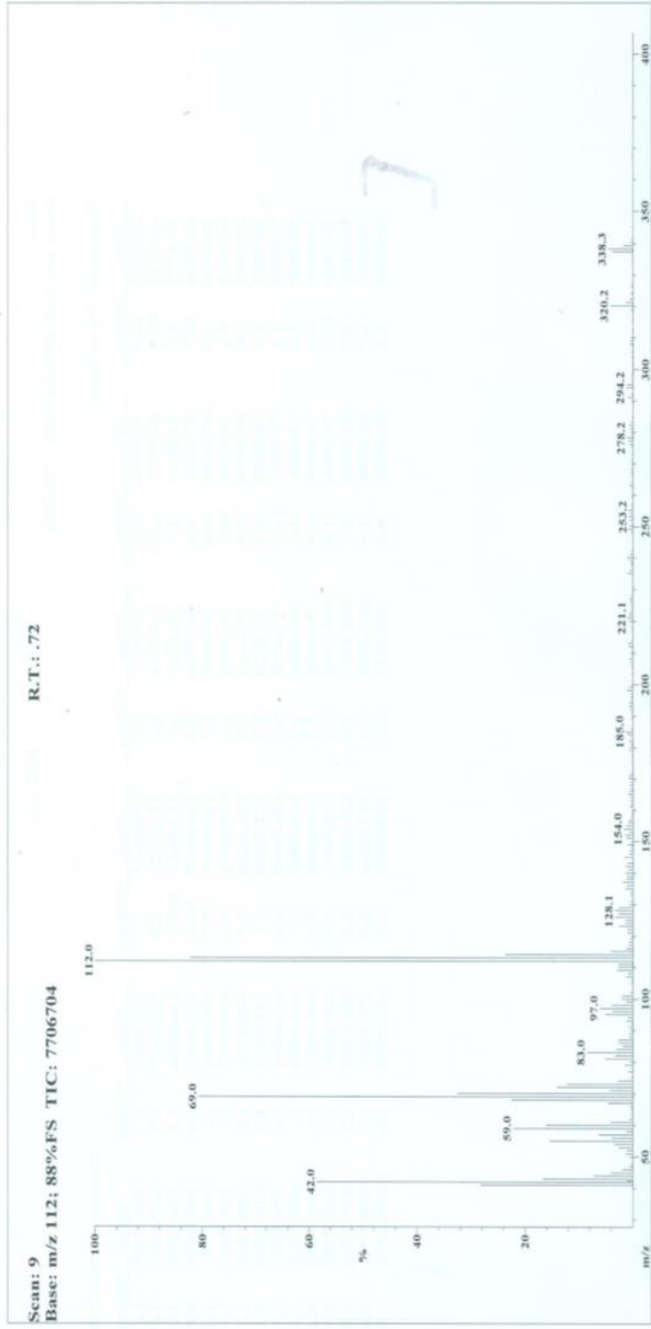
Date Run: 03-24-2017 (Time Run: 16:16:52)

File: GEC-M-11  
Sample: SADIA / DR. IQBAL  
Instrument: JEOL 600 MSRoute  
Inlet: Direct Probe

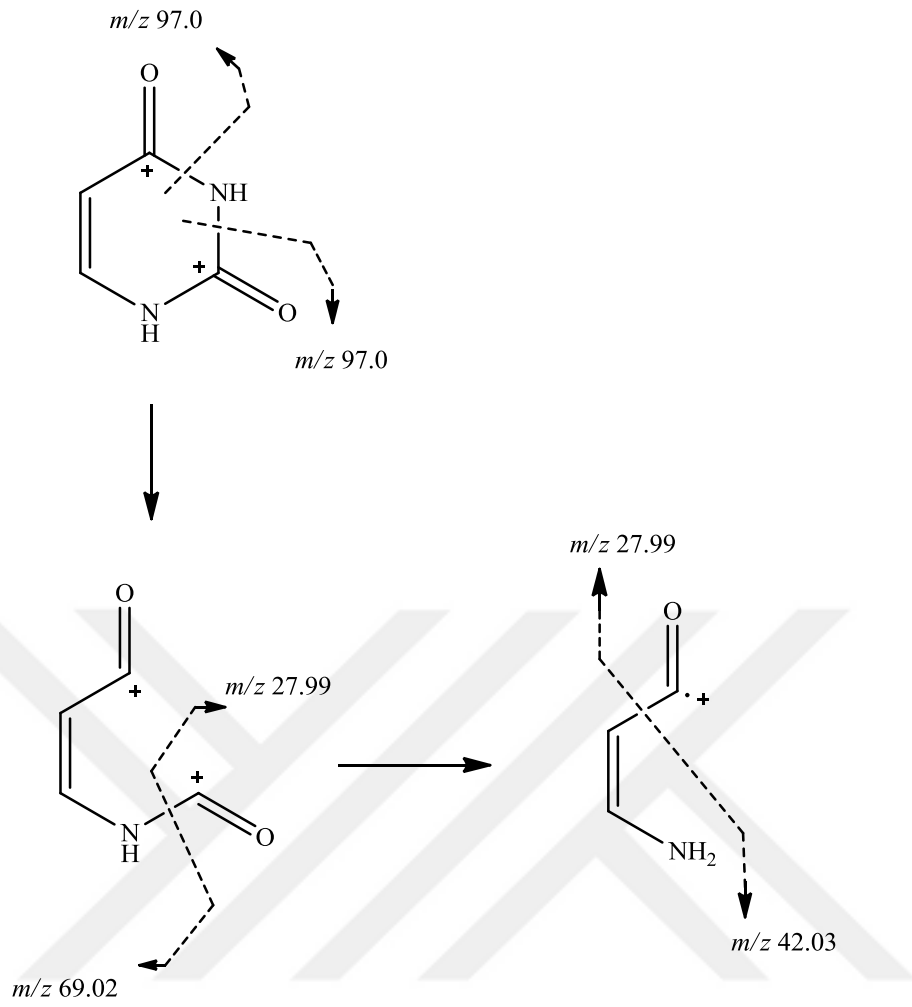
Ionization mode: EI+

R.T.: .72

Scan: 9  
Base: m/z 112; 88%FS TIC: 7706704

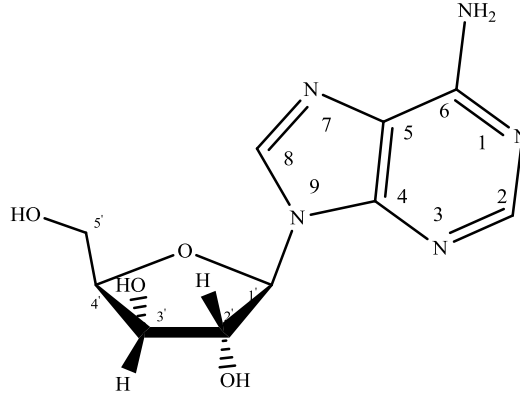


Şekil 3.106 GEC-M-11 (15) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumu



Şekil 3.107 GEC-M-11 (15) kodlu saf maddenin EI-MS spektrumuna göre fragmanlarına ayrılması

#### 3.10.4. GEC-M-12 (16)= Adenozin



Şekil 3.108. GEC-M-12 (16) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEC-M-12 (16) (6,2 mg) maddesi bölüm 3.5.2.'de ifade edildiği gibi elde edilmiş olup yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

Beyaz renkli olan GEC-M-12 (16) bileşiği amorf halde elde edildi. Ters faz silikajel plakta UV lamba (366 nm) altında renksiz, yalnızca bir halka biçiminde görülürken bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) açık yeşil bir halka şeklini aldı.

GEC-M-12 (16) kodlu saf maddesinin IR, <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, HSQC ve HMBC NMR spektrumları incelendiğinde GEC-A-19 (8) kodlu saf madde ile aynı kimyasal yapıda olduğu belirlendi. Bölüm 3.8.1.'de GEC-A-19 (8) kodlu madde için verilen spektrumlar nedeniyle bu madde için tekrar spektrum konulmadı. GEC-M-12 (16) maddesi için NMR spektral değerleri Çizelge 3.24'de verilmektedir.

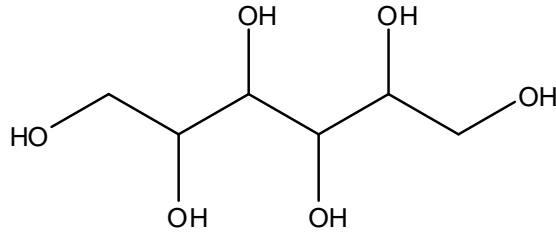
Çizelge 3-24. GEC-M-12 (16) saf maddesinin NMR spektral değerleri (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

Pozisyon	<sup>13</sup> C-NMR	<sup>1</sup> H-NMR	HMBC	COSY
2	152,4	8,13 (1H, <i>s</i> )	C-4; C-6	
4*	149,0	-	C-2; C-1'; C-8	
5*	119,0	-	C-8	
6*	136,2	-	C-2	
8	140,0	8,30 (1H, <i>s</i> )	C-1'	
1'	87,9	5,87 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,2 Hz)	C-2'	H-2'
2'	73,4	4,00 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =5,1; 6,2; 6,3 Hz)	C-3'; C-4'	H-1'; H-3'
3'	70,6	4,14 (1H, <i>ddd</i> , <i>J</i> =3; 4,6; 5,1 Hz)	C-1'; C-4'	H-2'; H-4'
4'	85,9	3,96 (1H, <i>ddd</i> , 3,00; 3,6; 3,7 Hz)		H-3'; H-5'
5'a	61,6	4,45 (1H, <i>dd</i> )		H-4'
5'b	61,6	4,37 (1H, <i>dd</i> )		H-4'

\*HMBC'e göre belirlendi.



### 3.10.5. GEC-M-13 (17) = Mannitol



Şekil 3.109. GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin kimyasal yapısı

GEC-M-13 (17) (130 mg) maddesi bölüm 3.5.2.'de ifade edildiği gibi elde edilmiş olup yapısı spektroskopik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı.

GEC-M-13 (17) maddesi beyaz renkte ve amorf halde elde edildi. İnce tabaka kromatografisi plağında UV lamba (254 nm) altında görünmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) yeşilimsi siyah bir renk aldı.

<sup>1</sup>H- NMR (Şekil 3.112) GEC-M-13 (17) maddesinin anomerik protonu olmayan lineer bir şeker olduğunu önerdi.

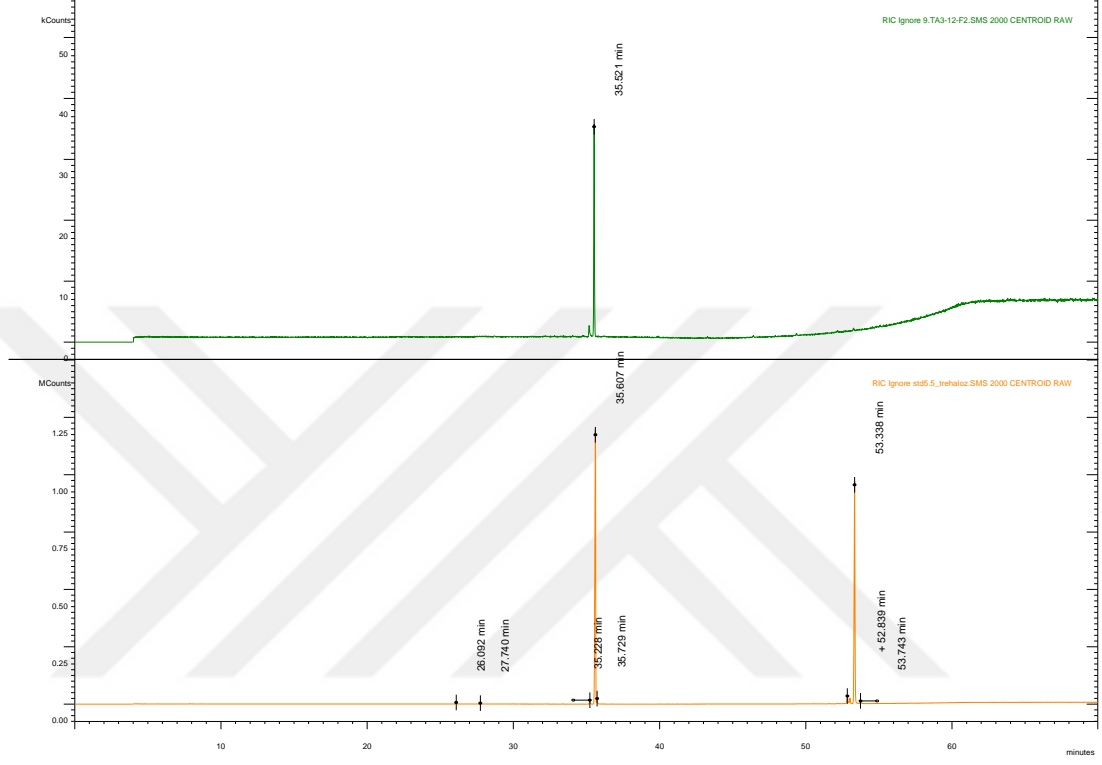
Kütle spektrumunda (ESI-MS) (Şekil 3.112),  $m/z$  205,0  $[M+Na]^+$  piki  $C_6H_{14}O_6$  monomer yapısını belirtti. Bölüm 2.11.2.'de verilen GC-MS şartlarında standartlar ile karşılaştırıldı. Şekil 3.99'de verilen GC-MS kromatogramları ve Şekil 3.100'de verilen MS spektrumunun Wiley 2008 kütüphanesi ile karşılaştırılması sonucu yapının Mannitol (Şekil 3.109) (130 mg) olduğu doğrulandı. (Gaidamauskas vd, 2005). <sup>13</sup>C-NMR (Şekil 3.113), DEPT135 (Şekil 3.114), HSQC (Şekil 3.116), HMBC (Şekil 3.117) spektrumları da değerlendirildi.

Çizelge 3-25. GEC-M-13 (17) saf maddesinin NMR spektral değerleri (500 MHz, D<sub>2</sub>O)

S. No	<sup>13</sup> C NMR	<sup>13</sup> C NMR	<sup>1</sup> H NMR	HMBC	COSY
1	65.78	CH <sub>2</sub>	3.77, 3.58, <i>dd</i> , 2.5, 6.5 Hz	C-2, C-3	C-2
2	73.27	CH	3.65, <i>m</i>	C1, C-3	C-3
3	71.70	CH	3.69, <i>m</i>	C-1, C-6	C-4
4	71.70	CH	3.65, <i>m</i>	C-5, C-6	C-5
5	73.27	CH	3.69, <i>m</i>	C-4, C-6	C-6
6	65.78	CH <sub>2</sub>	3.77, 3.58, <i>dd</i> , 2.5, 6.5 Hz	C-4, C-5	C-5

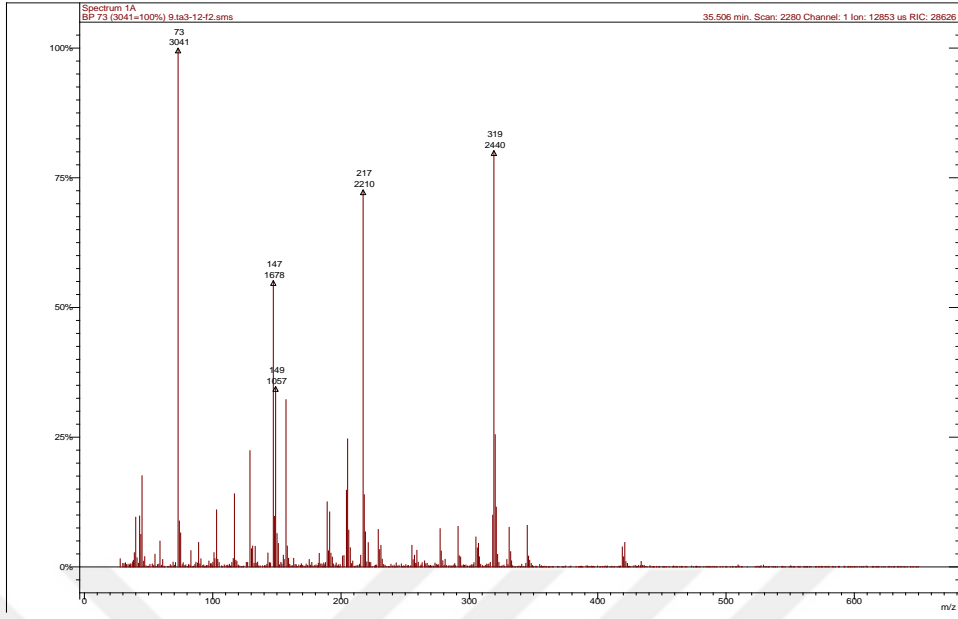
### Chromatogram Plots

Plot 1: ...23032016\sugar ifc-ta14042016\9.ta3-12-f2.sms RIC Ignore  
Plot 2: ... & mhs\seker std 23032016\std5.5\_trehaloz.sms RIC Ignore

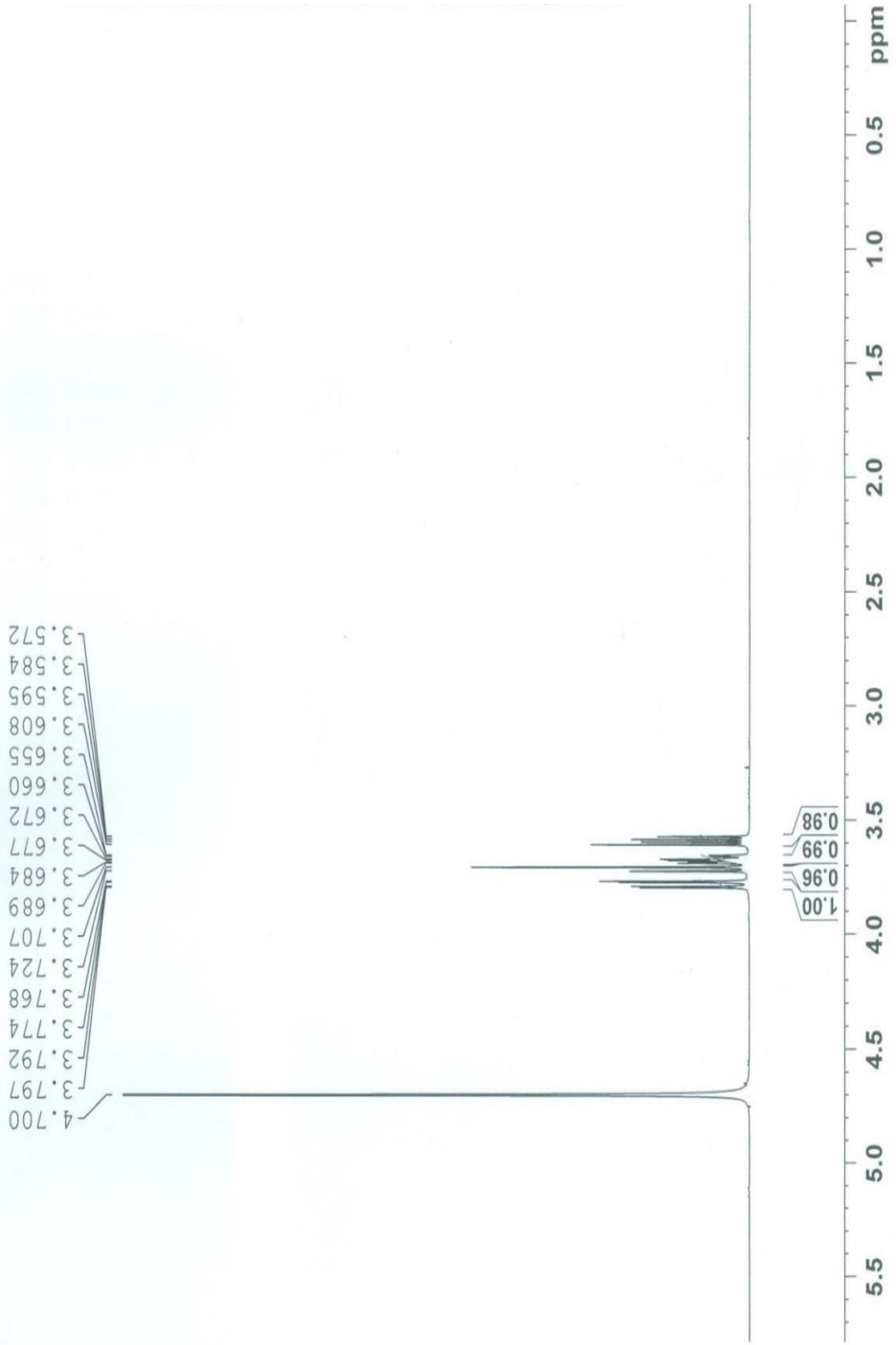


**Şekil 3.110. Sililenmiş GEC-M-13 (17) ve standart sililenmiş mannitol'ün GC-MS kromotogramları**

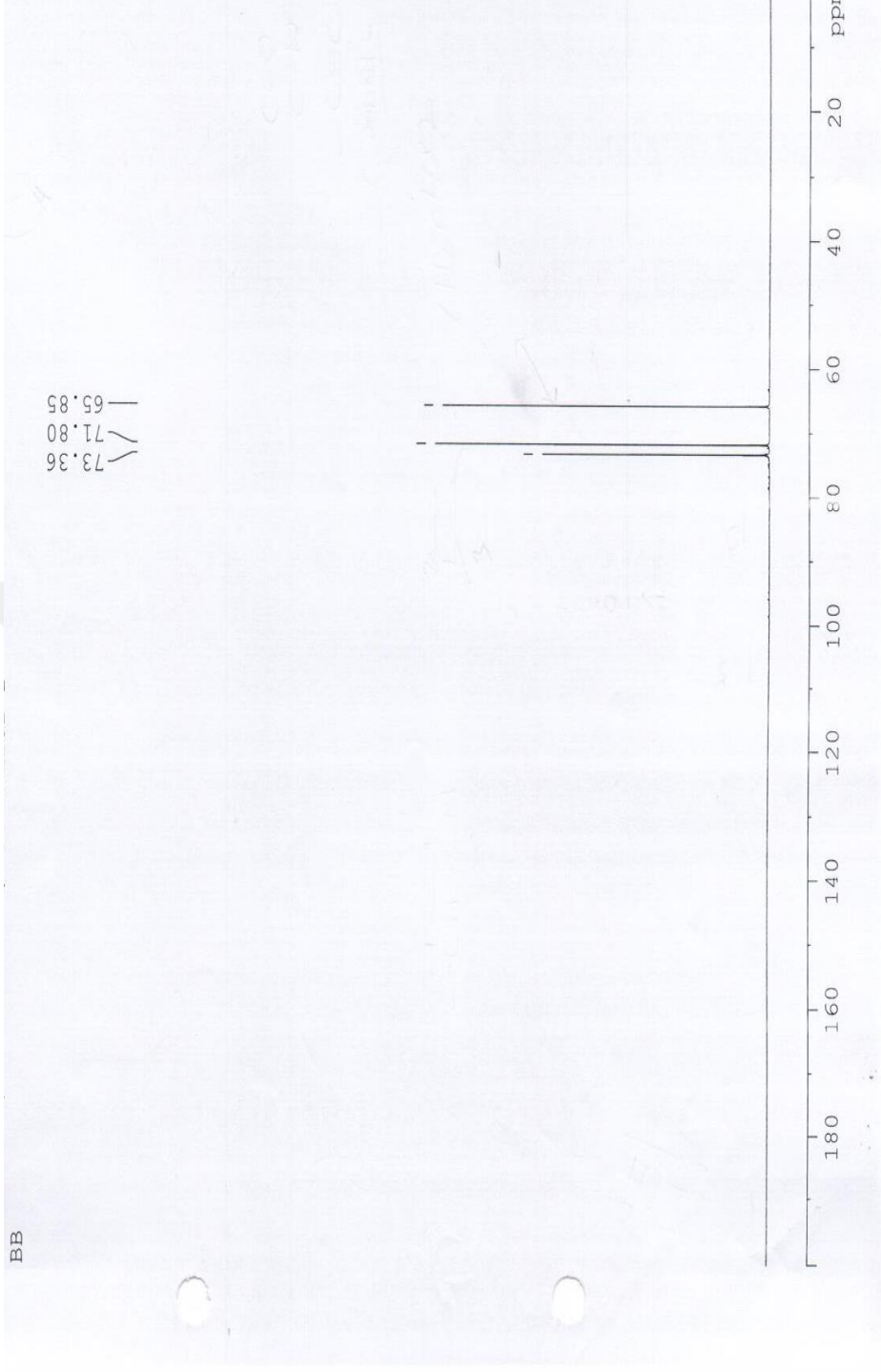
Spectrum Plot - 6.6.2016 18:20



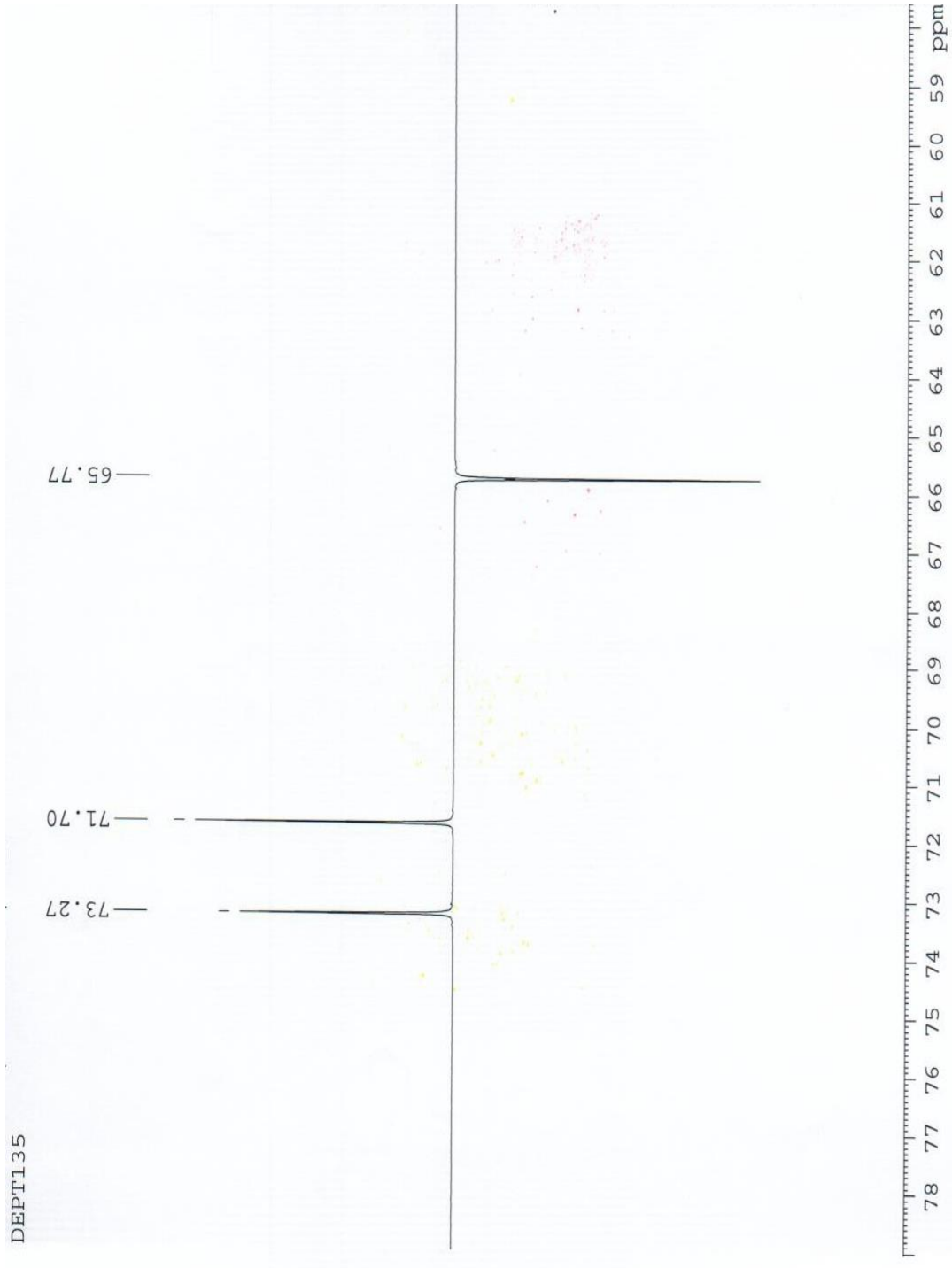
Şekil 3.111. Sililenmiş GEC-M-13 (17)'ün GC-MS spektrumu



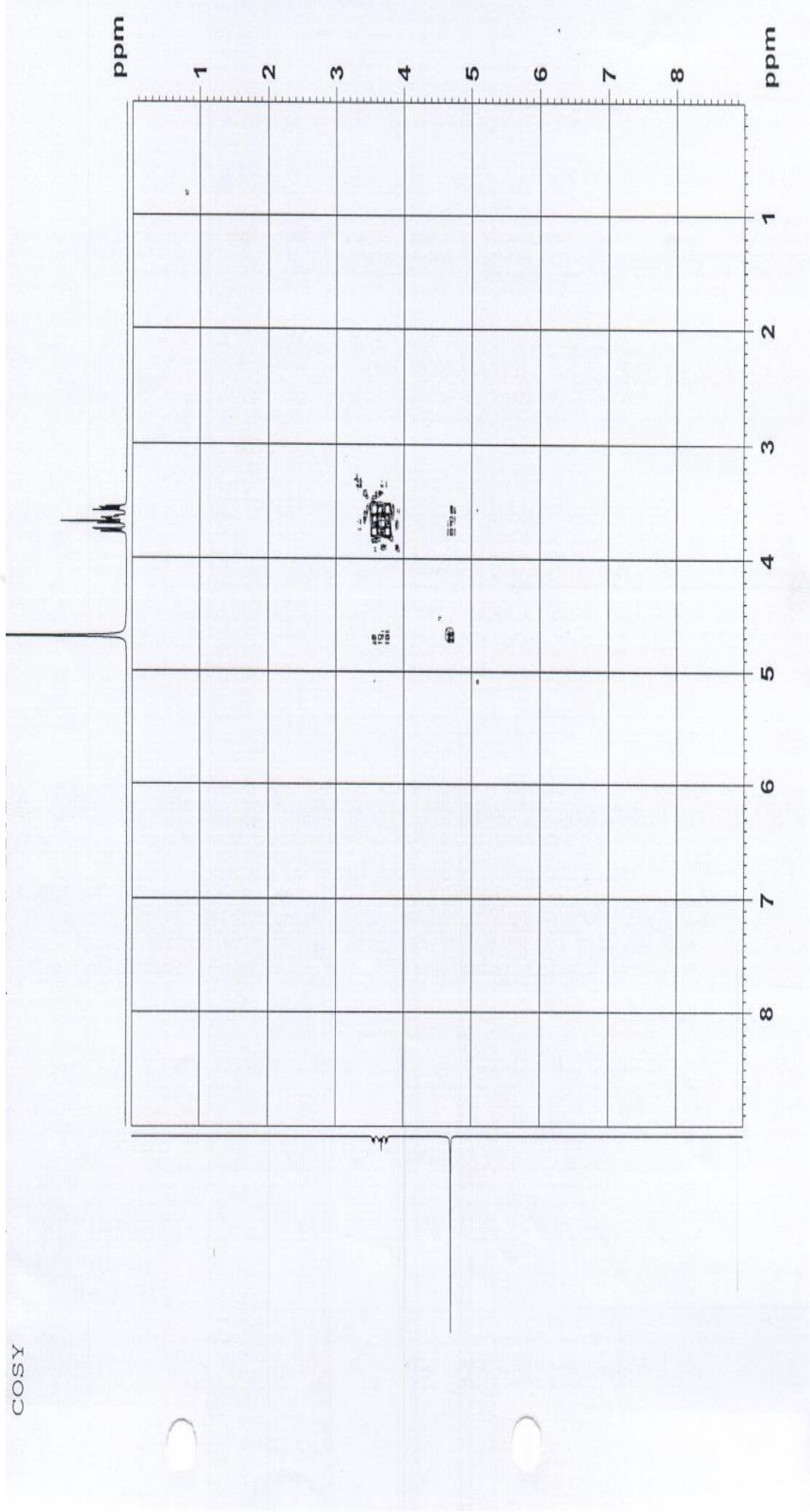
Şekil 3.112. GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (500 MHz; D<sub>2</sub>O)



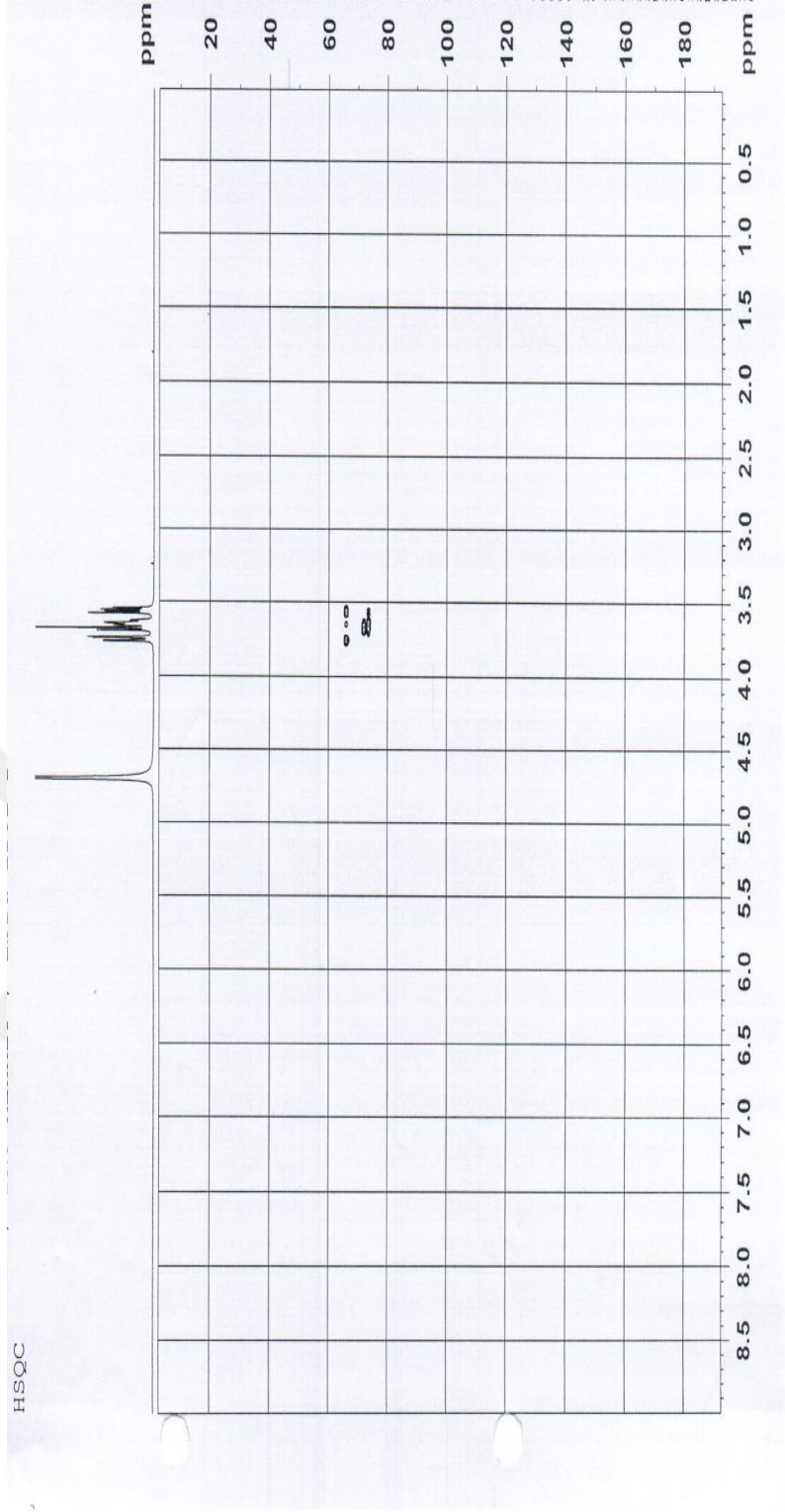
Şekil 3.113 GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu (600 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )



Şekil 3.114. GEC-M-13 (16) kodlu saf maddenin DEPT 135 spektrumu

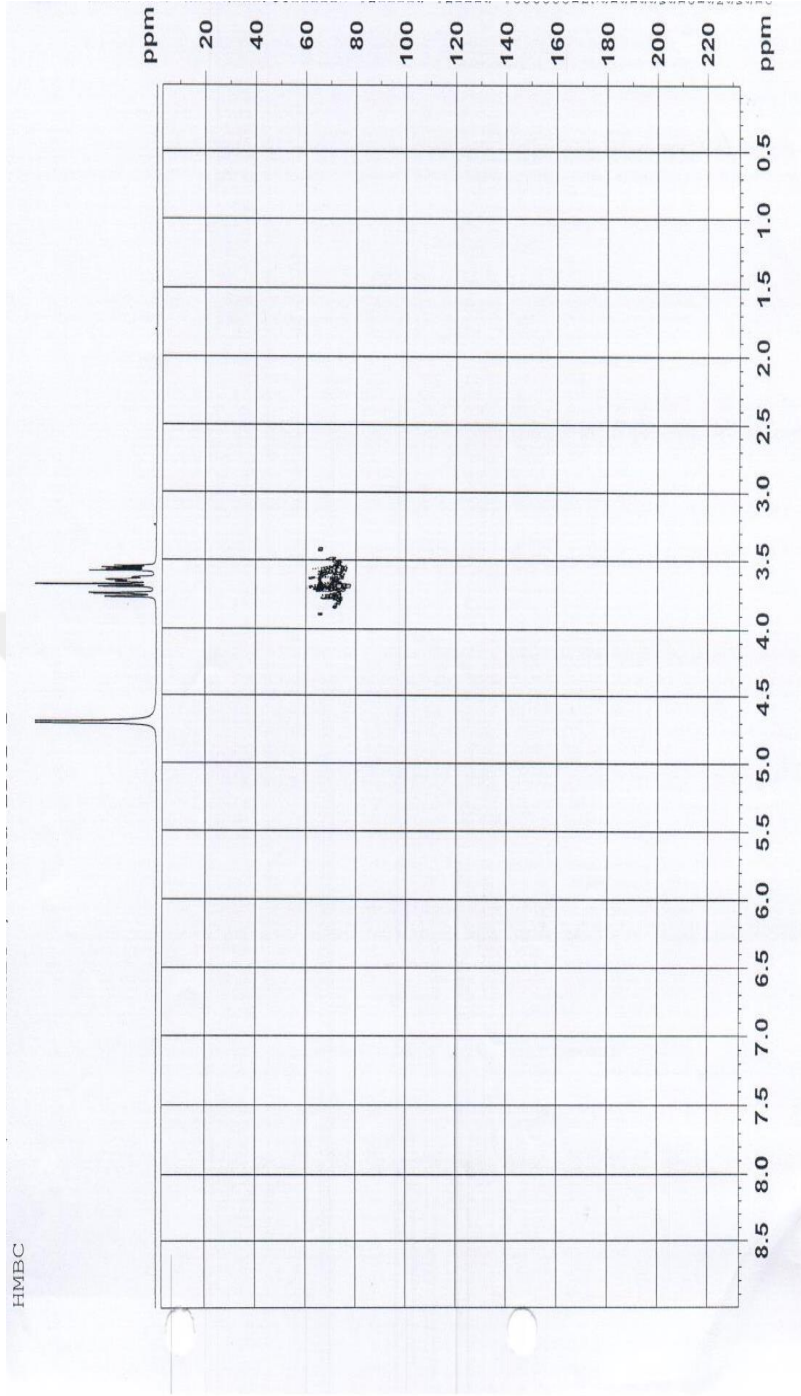


Şekil 3.115.GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin COSY spektrumu



Şekil 3.116. GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin HSQC spektrumu





Şekil 3.117. GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin HMBC spektrumu



**Şekil 3.118 GEC-M-13 (17) kodlu saf maddenin ESI-MS spektrumu**

## 4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

*Gyromitra esculenta* kumlu toprakta yetişen ılıman iğne yapraklı ormanlarda kozalaklı ağaçlar arasında; çoğunlukla çamların (*Pinus* spp.), bazen de kavak (*Populus* spp.) altında da bulunur. Türkiye’de yetiştirme zamanı Şubat- Nisan arasındadır. Özellikle Ege Bölgesi, Muğla yöresinde Ekşi Memet ya da Kuzu Göbeği Ebesi olarak da bilinen *Gyromitra esculenta*, çiğ olarak tüketildiğinde 100 gr. bile öldürmeye yetecek bir mantar türüdür. Kısa vadede böbreklerde ciddi tahribatlara neden olmaktadır. Hatta kaynatılırken buharına maruz kalındığında bile zehirden etkilenme ihtimali olduğu not edilmiştir.

*Esculenta*, leziz anlamına gelir. Eski devirde tüketildiği bilinmektedir. Aslına bakılırsa kurallara uygun pişirildiğinde zehirli maddelerin büyük bir kısmı bertaraf edildiğinden yenilebilir. *Gyromitra esculenta* çiğken zehirli olmasına rağmen İskandinavya, Kuzey Amerika ülkelerinde yasalar doğrultusunda bir pişirme talimatı ile satılır ve oldukça çok tüketilen bir mantardır. Omlet, çorba, salata ve diğer yaygın yiyeceklerle birlikte tüketilir. Ancak bilim insanlarının görüşlerine göre düzenli olarak yenildiğinde kalan zehirli maddeler, vücutta birikirse 10 yıl gibi kısa bir sürede yine ölümcül etki yapabilmektedirler, insanlarda ve köpeklerde hemolitik bir toksin özelliği taşır.

Zehirli etkilere sahip olan bu mantarın aktif bileşeni pişirme esnasında hidrolize edilen monometilhidrazin olan giromitrindir. Bu toksin karaciğer, merkezi sinir sistemi ve bazen böbrekleri etkiler. Kolon kanserine sebep olur.

*Gyromitra esculenta*, *Morchella delicia* türleriyle oldukça benzer görünüme sahiptir ve bu iki tür birbirleriyle karıştırılıp az pişirilirse toksisiteye sebep olmasından dolayı bu iki tür üzerinde farkındalığı arttırmak diğer bir amacımızdır.

*Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr. türünün hem pişirilmiş hemde çiğ örneklerinden elde edilen petrol eteri, aseton ve metanol ile su ekstraktlarının antioksidan, antikolinesterase, üreaz inhibisyon ve tirozinaz inhibisyon aktiviteleri ile rahim ağzı (HeLa) ve meme (MCF-7) kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri belirlendi. Antioksidan aktivite  $\beta$ -karoten-linoleik asit, DPPH serbest radikali giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC ve metal bağlama yöntemleri kullanılarak belirlendi.

Asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz, tirozinaz ve üreaz inhibisyonları testleri spektrofotometrik metotlar kullanılarak belirlendi. Antikanser testler ise rahim ağzı kanser hücresi (HeLa) ve meme kanser hücresi (MCF-7) hücre hatlarına karşı MTT metodu kullanılarak yapıldı. Antioksidan, enzim inhibisyon ve sitotoksik aktivite gösteren ekstreler silika jel adsorban üzerinden fraksiyonlandırıldılar. Elde edilen fraksiyonların miktarları ve ince tabaka kromatografisindeki temizlikleri dikkate alınarak yapılan ileri fraksiyonlandırmalardan 15 adet madde saflaştırıldı ve yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı. Bu maddelerin, miktarları elverdiği durumlarda, saf maddelerin antioksidan ve sitotoksikite testleri de yapıldı.

Çiğ ve pişirilmiş mantar örneklerinden elde edilen bileşiklerin kodları, yapıları, isimleri ve antioksidan ile sitotoksik aktivite sonuçları Çizelge 4.2’de verilmektedir.

Çizelge 4.1’e göre çiğ aseton ekstresinden elde edilen **1** kodlu maddenin yapısının bozunmaya uğramayarak çiğ metanol ekstresinden tekrar elde edildiği ve hatta pişirilmiş metanol ekstresinde de sıcaklık ile yapısında bozunma olmadan tekrar elde edildiği görülmektedir. Çiğ aseton ekstresinden alınan **3** kodlu maddeninde pişirildikten sonra sıcaklıkla bozunmaya uğramadan tekrar elde edildiği görülmektedir. Pişirilmiş aseton ekstresinden elde edilen **8** kodlu madde ise pişirilmiş metanol ekstresinde de elde edilerek, mantar pişirildiğinde; dolayısıyla sıcaklık ile ortaya çıkan bir yapıya sahip olduğunu gözler önüne sermektedir.

Ekstrelerin biyoaktivite sonuçlarına göre hem çiğ hemde pişirilmiş örneklerin aseton ve metanol ekstrelerinden toplamda 16 madde olmak üzere, 11 farklı maddenin yapı tayini yapıldı. Bu maddelerin arasında 8 adet lanostan tipi steroid, 2 adet lanostan tipi steroid glikozit, 2 adet DNA bazı, 1 adet inositol, 1 adet hidrazon türevi ve 1 adet mono şeker sınıfı madde bulunmaktadır. Etanediyal, 1,2-bis[2-formil-2-metilhidrazon (**6**) maddesi daha önceden sentetik olarak elde edilmiş ancak mantarlardan ilk defa tarafımızdan izole edildi. Çizelge 4.2 izole edilen bileşiklerin ve onların aktivitelerini özetlemektedir.

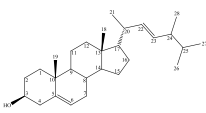
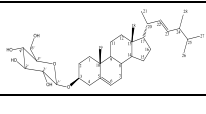
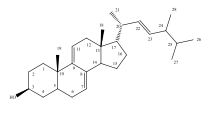
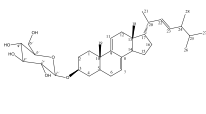
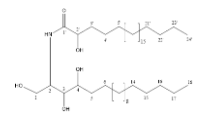
Çizelge 4-1. *Gyromitra esculenta*'nın GEN2-GEC2 ile GEN3, GEC3 ekstrelerinden elde edilen saf maddeler

Aseton Ekstresi		Metanol Ekstresi	
GEN2	GEC2	GEN3	GEC3
**GEN-A-1 (1)	GEC-A-4 (5)	**GEN-M-18 (9)	GEC-M-8 (13)
GEN-A-3 (2)	GEC-A-5 (6)	GEN-M-17 (10)	**GEC-M-9 (14)
*GEN-A-5 (3)	*GEC-A-6 (7)	GEN-M-20 (11)	GEC-M-11 (15)
GEN-A-4 (4)	***GEC-A-19 (8)	**GEN-M-16 (12)	***GEC-M-12 (16)
			GEC-M-13 (17)

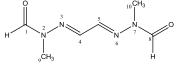
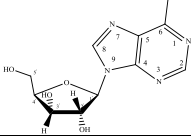
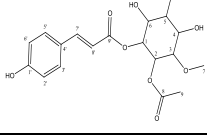
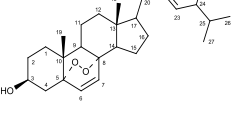
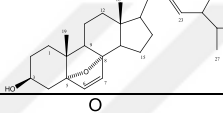
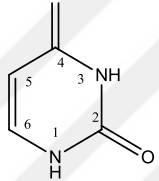
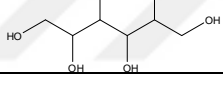
Üzerinde \*, \*\* ve \*\*\* bulunan maddeler aynı kimyasal yapıya sahip olan maddelerdir.

#### 4.1.1.1.

Çizelge 4-2. İzole edilen ve yapıları aydınlatılan bileşiklerin (1-17) antioksidan ve sitotoksik aktivitelerinin sonuçları<sup>a</sup>

NO	Kod	Yapı	Antioksidan Aktivite		Sitotoksik Aktivite		
			β-karoten- linoleik asit	ABTS	pdf <sup>b</sup>	HeLa <sup>c</sup>	MCF-7 <sup>d</sup>
1, 9, 12 , 14	Ergosta- 5,22- dien 3β-ol		>100	>100	85	48	45
2	Ergosta 5,22- dien 3-O-β-D- glukopiranozit		>100	>100	>100	>100	>100
3, 7	Ergosta-7,9,22- trien 3β-ol		190	>100	65	49	48
4	Ergosta 7,9,22 trien- 3-O-β-D- glukozit		>100	>100	>100 (%88, 8 ±3,7) *	>100 (%55, 7± 1,1)*	>100 (%61,4 ± 1,1)*
5	N-[1,3,4- trihidroksi, oktadesil]-2'- hidroksi tetrakosanamit		180	>100	15	19	NT

**Çizelge 4.2. Devam**

6	Etanediyal, 1,2-bis[2-formil-2-metilhidrazon		>100	>100	>100	>100	>100
8-16	Adenozin		>100	>100	>100	>100	>100
10	1-(1'-hidroksisinnamil)-2-asetoksi-3metoksi inositol		NT**	NT**	NT**	NT**	NT**
11	Ergesterol endoperoksit		>100	>100	>100 (%85,9±1,1)*	>100 (%56,9±1,8)*	>100 (%85,9±1,1)*
13	5α-8α epoksi ergosta-6,22-dien 3β-ol		NT**	NT**	NT**	NT**	NT**
15	Urasil		>100	>100	>100	>100	>100
17	Mannitol		>100	>100	>100	>100	>100

<sup>a</sup> Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ± standart hatası olarak verildi.  $p < 0.05$ .

<sup>b</sup> Primer Dermal Fibroplast serisi hücre hattı.

<sup>c</sup> Rahim ağzı (servikal) kanser serisi hücre hattı.

<sup>d</sup> Meme kanser serisi hücre hattı.

\* 100 µg/mL konsantrasyondaki % değerler

NT\*\* : test edilmedi.

Bu tez çalışması, *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr. türünün sekonder metabolitleri ile onların antioksidan ve antikanser kapasitelerinin belirlendiği ilk araştırma olması açısından oldukça önemlidir. Elde ettiğimiz sonuçlar bugüne kadar yapılan diğer araştırma sonuçlarına bilgi katmaktadır. Sitotoksik aktivitesi yüksek olan maddelerin etkin kullanılabilmesi için ileri araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## KAYNAKLAR

- Abraham, Raymond J.; Monasterios, Jose R. From Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2: Physical Organic Chemistry (1972-1999). (1974).6. (662-5).
- Agrahar-Murugkar D, Subbulakshmi G. Nutritional value of edible wild mushrooms collected from the Khasi hills of Meghalaya. *Food Chemistry* 89, 599–603, 2005.
- Agrawal R, Tyagi E, Shukla R, Nath C. A study of brain insulin receptors, AChE activity and oxidative stress in rat model of ICV STZ induced dementia. *Neuropharmacology* 56, 779–787, 2009.
- Akçalı, A. 2010. Araştırmalarda tanımlanmış hücre hatlarının kullanılmasının önemi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 25(3): 119-123.
- Akdur O, Durukan P, Özkan S, Avşaroğulları L, İkizceli İ. Mantar zehirlenmesi sebebiyle acil servise bir gün içerisinde başvuran olguların değerlendirilmesi. *Erciyes Tıp Dergisi*. 2007; 29(5): 381-386.
- Alkan, N. 2013, Bazı makrofungusların biyolojik aktivitelerinin araştırılması , Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla.
- Allı H, Işıloğlu M, Solak MH. Macrofungi of Aydın Province, Turkey. *Mycotaxon* 99, 163–165, 2007.
- Anonim, 2015. Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre Türkiye'nin durumu. <http://www.iacr.com.fr/>. Erişim Tarihi: 16.11.2015.
- Anonim, 2015. Kanser istatistiği. <http://kanser.gov.tr/daire-faaliyetleri/kanser-istatistikleri/1672-2012-2013-2014-kanser-istatistikleri.html>., Erişim Tarihi: 17.02.2015.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E., Erçağ, E., 2006, The CUPRAC antioxidant capacity and polyphenolics content of some herbal teas, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 57, 292-304.

- Aras, K., Erşen, G., 1988. Tıbbi Biyokimya Teorik ve Klinik Enzimoloji. Ankara Üniv Basımevi. Ankara. 198-203.
- Aruoma, O.I., Cuppet SL., 1997. Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. Champaign, Illinois, *AOCS Press*. pp: 241.
- Atta-ur-Rahman, Choudhary, M.I., 2001. Bioactive Natural Products as a Potentialm Source of New Pharmacophores, A Theory of Memory. *Pure and Applied Chemistry*; 73: 555–560.
- Baba, A. I., ve Catoi, C. (2007). *Comparative Oncology*. Romania: The Publishing House of the Romanian Academy.
- Bahçeci, Z. 1999. Moleküler Biyoloji. Öğrenci Kitabevi Yayınları, Kırşehir.
- Bankova, V.; Ivanova, P.; Christov, R.; Popov, S.; Dimitrova-Konaklieva, St. From *Hydrobiologia* (1995), 316(1), 59-61
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., Ferreira, I. C. F. R., Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 2742-2747, 2008.
- Bei-Bei Z., Xue-Lian H., Qian J., Zhi-Xin L., Heng-Shan W., Cytotoxic cholestane-type and ergostane-type steroids from the aerial parts of *Euphorbia altotibetic*, *Steroid* (78) 38-43,2013.
- Bilir, N. 2007. Serviks kanseri kontrolü çalışmaları ve HPV aşısı. Halk sağlığı uzmanları derneği teknik raporları: 3.
- Blois MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199–1200, 1958.
- Bobek, P., Ginter, E., Jurcovicova, M., Kunia, K., Cholesterol- lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Ann. Nutr. Metab.*, 35: 191–195, 1991.



- Boiteau P, Pasich B, Ratsimamanga AR. Les Triterpenoids. Paris: Gauthier-Villards; 1964. pp.: 3, 32, 184, 469.
- Breene, W. M., 1990. Nutritional and medicinal value of specially mushrooms. *J. Food Protect.*, 53(10): 883–894.
- Cao, G., Prior, R.L., 1999. In vivo antioxidant capacity: comperison of different analytical methods, *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.
- Ceyhan, M. 2007. İnsan papilloma virusu (HPV) aşısı uygulamasında ülkemizde mevcut problemler. *ANKEM Dergisi*, 21(2): 102-104.
- Ciuffreda, P., Casati, S., Manzocchi A. *Magn. Reson. Chem.* 2007; 45: 781–784  
Published online 19 July 2007 in Wiley InterScience
- Clark, J; Neath, G; Smith, C. Heterocyclic studies. VII. Action of methoxyamine and methylhydrazines on 4-hydroxypteridine and its methyl derivatives. *Journal of the Chemical Society [Section] C: Organic* (1969), (9), 1297-301.
- Coli, R., Maurizi, A., Granetti, B., Damiani, P., 1988. Valore Nutritionale e qualita' Proteica dei carpoforesi di *Boletus aereus*, *B. edulis*, *B. pinicolae*, *B. reticolatus*. *Annali Fac. Agr. Univ. Perugia*, XLII, 873–884.
- Çağlarımak N, Ünal K, Ötleş S. Nutritive value of edible wild mushrooms grown in Black Sea region of Turkey. *Mycology Applicada International* 14, 1–5, 2002.
- Dauben I., Gerhar JD. Fonken. The Structure of Photoisopyrociferol and Photopyrociferol 11-3. 1958
- Decker, E.A., & Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J. Agr. Food Chem.*, 38:674-677.
- Diez, V.A., Alvarez, A., Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain. *Food Chem.*, 75: 417–422, 2001.

Dünya Sağlık Örgütü ve Uluslararası Kanser Araştırma Ajansının verilerine göre 2008.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherston, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*; 7: 88–95.

Fridovich, I., 1986. Superoxide Dismutases. *Meth. Enzymol*; 58: 61-97.

Gaidamauskas, E., Norkus, E., Vaičiunien, J., Crans, D.C., Vuorinen, T., Jačiauskien, J. and Baltrūnas, G. (2005) Evidence of two-step deprotonation of D-mannitol in aqueous solution, *Carbohydr Res*, 340 (8): 1553–1556.

Gökçe, Ö., Yılmaz, A., Gürbüz, V., Konaç, E., Ekmekçi, A. 2011. İnsan servikal kanser Hela hücrelerinde Vinorelbin'in apoptotik etkisi. *DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 25 (1): 05-14.

GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.

Grossberg, G.T., 2003. Cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease: Getting on and staying on. *Current Therapeutic Research*; 64: 216–235.

Harborne, JB. (1984) *Phytochemical methods*, Published in the USA by Chapman and Hall, Newyork.

Hatipoğlu, A.A. 2007. Kanser erken tanı ve tarama problemleri. *Tuncer AM. Türkiye'de Kanser Kontrolü*.1. Baskı. Ankara: Onur Matbaacılık, 381-388.

Hatfield GM. Toxic mushrooms in: Kinghorn AD, editor. *Toxic plants*: Columbia University Press; 1979. 7-58.

Howell, A., Anderson, A. S., Clarke, R. B., Duffy, S. W., Evans, D. G., Garcia-Closas, M., Harvie, M. N. (2014). Risk determination and prevention of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 16(5), 446.

Hsu TY, Sheu SC, Liaw ET, Wang TC, Lin CC. Antioxidant activity and effect of *Pinus morrisonicola* on the survival of leukemia cell line U937, *Phytomedicine* 2005; 12: 663–669.

Hudson, B.J.F., 1990. Food Antioxidants. Elsevier *Applied Science, London and New York*; pp: 1-316.

Hutchinson, L. (2010). Breast Cancer: Challenges, controversies, breakthroughs. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 7, 669-670.

I. Dauben ve Gerharj D. Fonken (1958), The Structure of Photoisopyrociferol and Photopyrociferol 11-3.

Işıloğlu M, Gücin F, Mat A. Kasım 1994'te İstanbul'da meydana gelen mantar zehirlenmeleri. *Ekoloji Çevre Dergisi*. 1995; 14: 22-28.

Karademir, S. E., 2005. *Bazı polifenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin tayini*. Yüksek Lisans Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Kavishree S, Hemavathy J, Lokesh BR, Shashirekha MN, Rajarathnam S, Fat and fatty acids of Indian edible mushrooms. *Food Chemistry* 106, 597–602, 2008

Kaymakçalan Ş. Besinlerle husule gelen kimyasal zehirlenmeler. *Ankara Üniv. Tıp Fak. Mec.* 1968; 21(4): 1213-1239.

Kelle, İ. 2007. Kanser Tedavisinde Biyotoksinler. *Dicle Tıp Dergisi*, 34(3): 226-232.

Kelly CA, Harvey RJ, Cayton H. Drug treatments for Alzheimer's disease. *British Medicinal Journal* 314, 693–694, 1997.

Keskin, H., Erkmen, G. Besin Kimyası. T.C..İstanbul Üniversitesi Sıra no:3450, Mühendislik Fakültesi No:72. Güray Matbaacılık Tic. Lmt. Sti., İstanbul, (1987), 270-274.

- Khan, M.T.H. (2012). Novel Tyrosinase inhibitors from natural resources- their computational studies. *Curr Med Chem*, 19: 2262-2272.
- Khatib, S., Nerya, O., Musa, R., Shumel, m., Tamir, S. Ve Vaya, J. (2005) Chalcones as Potent Tyrosinase Inhibitors: The Importance of 2,4- disubstituted Resorcinol Moiety. *Bioorg Med Chem*, 13 (13) : 433-441.
- Kierszenbaum, A. L. (2007). Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology: Mosby Elsevier
- List PH, Luft P. Gyromitrin, the toxin of the spring lorchel. *Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges.* 1968; 301(4): 294-305.
- Lux, M. P., Fasching, P. A., ve Beckmann, M. W. (2006). Hereditary breast and ovarian cancer: review and future perspectives. *Journal of Molecular Medicine*, 84(1), 16-28.
- Maga, A., 1981. Mushroom flavor. *J. Agr. Food Chem.*, 29: 1–4.
- Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry* 73, 321–325, 2001.
- Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry* 73, 321–325, 2001.
- Mat A. *Türkiye'de mantar zehirlenmeleri ve zehirli mantarlar*. 2.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 2000.
- Mattias, U. Roslund, Pethi Tahtinen, Matthias Niemitz, Rainer Sjöholm. *Carbonhydrate Research* 343 (2008) 101-112.
- Matsen CB., Neumayer LA, (2013). Breast cancer: a review for the general surgeon. *JAMA Surg*, 148(10), 971-979. doi: 10.1001/jamasurg.2013.3393.
- Mısırlıoğlu ED, Hızal Bülbül S. Mantar zehirlenmeleri. *TAF Preventive Medicine Bulletin*. 2009; 8(3): 281-284.

- Ming-Sheng Bai, M.S., Wang, C., Zong, S.C., Lei, M. and Gao, J.M. (2013) Antioxidant polyketide phenolic metabolites from the edible mushroom *Cortinarius purpurascens*, *Food Chem*, 141: 3424–3427.
- Miller, H.M., 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists Society*; 48, 91.
- Mizuno, T. 1999. "The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan [Review]", *International Journal of Medicinal Mushroom*, 1, 9-30.
- Moradali, M.F., Mostafavi, H., Ghods, S., Hedjaroude, G.A. "Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi)", *International Immunopharmacology*, 7, 701-724, 2007.
- Mostafa, Ahmad E.; El-Hela, Atef A.; Mohammad, Abd-Elsalam I.; Jacob, Melissa; Cutler, Stephen J.; Ross, Samir A. *Phytochemistry Letters*, Volume: 8, Pages: 10-15.
- Murcia MA, Martinez-Tome, M, Jimenez AM, Vera AM, Honrubia M, Parras P. Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing. *J. Food Prot.* 10, 1614–1622, 2002.
- Orhan, G., Orhan, I., Sener, B. 2006. Recent developments in natural and synthetic drug research for Alzheimer's disease. *Letters in Drug Design and Discovery*; 3: 268–274.
- Orhan, I., Aslan, M., 2009. Appraisal of scopolamine-induced anti-amnesic effect in mice and in vitro antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of some traditionally used Lamiaceae plants. *Journal of Ethnopharmacology*; 122: 327-332.
- Öztürk, M., Tel-Cayan, G., Muhammed, A., Terzioglu, P. Ve Duru, ME. (2015) Mushrooms: a source of exciting bioactive compounds, Atta-ur-Rahman (editör), *Studies in Natural Product Chemistry*, vol. 45. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, pp. 363-456.

- Papandreou MA, Dimakopoulou A, Linardaki ZI, Cordopatis P, Klimis-Zacas D, Margarity M, Lamari FN. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. *Behavioural Brain Research* 198, 352–358, 2000
- Papas, A.M., 1996. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*; 31:77-82.
- Parikh, P., McDaniel, M.C., Ashen, D., Miller, J.I., Sorrentino, M., Chan, V., Blumenthal, R.S., Sperling, L.S., Diets and cardiovascular disease: an evidence-based assessment. *J. Am. Coll. Cardiol.* 45: 1379–1387, 2005.
- Pekşen A. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Samsun 1988.
- Pyssalo H, Niskanen A. On the occurrence of N-methyl-N-formylhydrazones in fresh and processed false morel *Gyromitra esculenta*. *J Agric Chem.* 1977; 25: 644-647.
- Pyssalo H. Test for gyromitrin a poisonous compound in false morel *Gyromitra esculenta*. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 1976; 160: 325-330.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio Med*, 26, 1231–1237, 1989.
- Reische, D.W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R.R., 2002. Oxidation. İçinde. Akoh CC, Min DB. editör. *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, New York: Marcel Dekker Inc. pp.: 335-542.
- Sakairi, Minoru; Kambara, Hideki. 1988. *Anlitical Chemistry*. 60 (8). 774-80
- Sanmee R, Dell B, Lumyong P, Izumori K, Lumyong S. Nutritive value of popular wild edible mushrooms from northern Thailand. *Food Chemistry* 84, 527.
- Sant, M., Francisci, S., Capocaccia, R. 2006. "Time trends of breast cancer survival in Europe in relation to incidence and mortality", *International Journal of Cancer*, 119, 2417-2422.

- Sastre, J., Pallardo, F. V., Vina, J., 2000. Mitochondrial oxidative stress plays a key role in aging and apoptosis. *IUBMB Life*; 49: 427–435
- Senatore F, Dini A, Marino A. Chemical constituents of some basidiomycetes. *Journal of Science of Food and Agriculture* 45, 337–345, 1988.
- Serin S., *Centaurea ptosimopappoides* Wagenitz Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1995.
- Solak MH, Işıloğlu M, Kalmış E, Allı H. *Macrofungi of Turkey Checklist*. volume I. İzmir: Üniversiteler Ofset; 2007.
- Stancher B, Procida G, Calabrese M. Characteristics of the most common mushrooms cultivated in Italy. IV. Lipids: Determination of the content of free and bound fatty acids. *Industria Alimentari* 31, 744-750, 1992.
- Stewart, S.L., King, J.B., Thompson, T.D., Friedman, C., Wingo, P.A. 2004. "Cancer mortality surveillance- United States, 1990-2000", *MMWR Surveillance Summary*, 53, 1-108.
- Sürücüoğlu, M., Hasipek, S., Kültür Mantarının Kan Lipid Düzeylerine Etkisi, Türkiye V. Yemeklik Mantar Kongresi Bildirileri, 5-7 Kasım 1996, Yalova, Bildiriler: 307-317, 1996.
- Tong H, Xia N, Feng K, Sun G, Gao X, Sun L, Jiang R, Tian D, Sun X. Structural characterization and *in vitro* antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of *Pleurotus ostreatus*. *Bioresource Technology* 100, 1682–1686, 2009.
- Tül, B., 2012, *Bazı mantar türlerinin antimikrobiyal ve antitümör etkilerinin araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla
- Tümkor Z., 1994, *İstanbul çevresinde yetişen Amanita phalloides mantarında HPLC ile  $\alpha$ -amanitin miktar tayini*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmakognozi Anabilim Dalı. 1994.

- Turkekul I, Elmastas M, Tuzen M. Determination of iron copper, manganese, zinc, lead, and cadmium in mushroom samples from Tokat, Turkey. *Food Chemistry* 82, 382–392, 2004.
- Türkoğlu A, Kanlık A, Gezer K. Macrofungi of Çameli District (Denizli-Turkey). *Turk J Bot.* 2007; 31: 551-557.
- Turkoğlu A. Macrofungal Diversity of Babadag (Denizli, Turkey). *African Journal of Biotechnology* 7, 192–200, 2008.
- Weete JD, Furthe R, Haenseler E, Rast DM. Cellular and chitosomal lipids of *Agaricus bisporus* and *Mucor rousii*. 31, 1120–1126, 1985.
- Weatherburn, MW. (1967) Phenol- hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analy Chem*, 39:971-974.
- Wilson, I.B. and Nachmanason, D. 1954. In Ion transport across membrans (HT Clarke Ed) Academic Press. New York. 35.
- Yılmaz N, Solmaz M, Türkekul Ş., Elmastas M. Fatty acid composition in some wild edible mushrooms growing in the middle Black Sea region of Turkey. *Food Chemistry* 99, 168–174, 2006.
- Zhang M, Cui SW, Chueng PC, Wang KQ. Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. *Trends in Food Science and Technology* 18, 4–19, 2007.



## EKLER

### Ek A. *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr. Türünün Resimleri



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Kübra ELİK  
Uyruk : T.C.  
Doğum Yeri ve Tarihi: 14/10/1993- Marmaris  
Medeni Hali : Bekar  
E-posta : kubra\_elikk@hotmail.com

### Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Nurettin Gençaliolu Anadolu Lisesi	2011
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2015
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2017

### Eserler

Muhammad Akhtar, **Elik Kübra**, Singeç Mehmet Hüseyin, Kaplaner Erhan, Mansour Riadh Ben, Öztürk Mehmet (2016). Secondary Metabolites of *Rhizopogon roseolus* with Cytotoxic Activity. 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 9th International Conference on Biodiversity” (ISCNP-29 & ICOB-9) (Özet Bildiri/Poster)

**Kübra Elik**, Zain Ullah, Riadh Ben Mansour, Mehmet Öztürk (2016). Cytotoxic Activity Evaluation of Various Fractions of *Gyromitra esculenta*. 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 9th International Conference on Biodiversity” (ISCNP-29 & ICOB-9) (Özet Bildiri/Poster)

Grina Fatiha, Ullah Zain, Kaplaner Erhan, **Elik Kübra**, Moujahid Abderrahman, Essamad Abdel Khalid, Öztürk Mehmet (2016). Screening of Antioxidant Activity of Selected Seaweeds Collected from Morocco. Symposium on Euroasian Biodiversity SEAB-2016 (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)(Yayın No:3064013)

Yusuf Sıcak, **Kübra Elik**, Selçuk Küçükaydın, Erhan Kaplaner, Mehmet Öztürk, Mehmet Emin Duru, Muhammed Iqbal Choudhary (2016). Screening of Anti-Inflammatory Activity of Mugla Pine Honey Collected from Various Regions. 5<sup>th</sup> International Muğla Beekeeping and Pine Honey Congress (Özet Bildiri/Poster)

**Kübra Elik**, Erhan Kaplaner, Zain Ullah, Yusuf Sıcak, Abdulsalam Ertaş, Riadh Ben Mansour, Mehmet Öztürk, Mehmet Emin Duru (2017). Comparison of Antioxidant Activity of Baked and Raw Materials of *Gyromitra esculenta*. I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants “Natural and Healty Life” (TABKON) (Özet Bildiri/Poster)

**Kübra Elik**, Mehmet Öztürk (2017). Nitrogenized Compounds from Cytotoxic Extract of *Gyromitra esculenta*. I. International Congress on Medicinal and Aromatic Plants “Natural and Healthy Life” (TABKON) (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

**Kübra Elik**, Mehmet Öztürk (2016) *Gyromitra esculenta* (Pers.) Fr. Türünün Biyoaktif Bileşiklerinin Elde Edilmesi ve Yapılarının Aydınlatılması. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, IV. Fen Bilimleri Araştırma Sempozyumu (Özet Bidiri/Poster)

**Kübra Elik**, Mehmet Öztürk (2016) Enginarın Halk Arasında Kullanımı, Tıbbi Aktiviteleri ve İçerdiği Majör Bileşenlerin Elde Edilmesi konulu seminer.

