T.C.

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HYPECOUM PROCUMBENS L. BİTKİSİNDEN ALKALOİDLERİN İZOLASYONU, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN (Anti-Alzheimer) İNCELENMESİ

Özlem GENÇAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

EDİRNE-2013

HYPECOUM PROCUMBENS L. BİTKİSİNDEN ALKALOİDLERİN İZOLASYONU, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN (Anti-Alzheimer) İNCELENMESİ

ÖZLEM GENÇAY

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2013

TRAKYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN
Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri: İmza

Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER

Yrd. Doç. Dr. Mesut BOZ

Yrd. Doç. Dr.Özlem DEMİRKIRAN

Tarih:

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ORGANİK KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

17 / 09 / 2013
Özlem GENÇAY

Yüksek Lisans Tezi
Hypecoum procumbens L. Bitkisinden Alkaloidlerin
İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve
Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz İnhibisyon Aktivitelerinin (Anti-Alzheimer)
İncelenmesi
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu tez çalışmasında *Hypecoum procumbens* L. bitkisinin kimyasal bakımdan incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bitki EtOH içinde 2 hafta bekletilmiştir. Daha sonra bitki ekstresi su ile seyreltilerek sırası ile hekzan, diklorometan ve etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen bu fraksiyonların ince tabaka kromatografileri yapılmıştır. Maddelerin bu fraksiyonlardan eldesinde çeşitli kromatografik yöntemlerden yararlanılmıştır.

H. procumbens bitkisinin diklorometan ekstresinden toplam dört alkaloid bileşiği izole edilmiştir. Bileşiklerin yapı tayininde IR, UV, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, HMBC, COSY, ESI-MS gibi spektroskopik tekniklerden yararlanılmıştır. Bileşikler literatür ile kıyaslanarak kesin sonuca varılmıştır. Bulgular ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

İzole edilen bileşikler (**1-4**) AChE ve BChE inhibisyon aktivitelerini tespit etmek üzere taranmıştır. AChE için test edildiğinde, 8-metoksi-11,12-metilen eter sanguinarin (**1**), 8-Asetonildihidrosanguinarin (**2**), oksohidrastin (**3**), ve protopin (**4**) sırası ile 1.13, 1.80, 0.92 ve 0.88 mM'lık IC_{50} değerleri göstermiştir. BChE inhibisyonu IC_{50} değerleri (**1-4**) nolu bileşikler için 6.81, 0.187, 4.9 ve 1.62 mM olarak tespit edilmiştir. Standart inhibitörün (galantamin) AChE ve BChE enzimlerine karşı IC_{50} değerleri sırası ile 3.5 μM ve 36.0 μM bulunmuştur.

Yıl **:** 2013
Sayfa Sayısı **:** 109
Anahtar Kelimeler **:** *Hypecoum procumbens*, Benzofenantridin alkaloid, Alzheimer, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolinesteraz

Master Thesis
The Isolation and Structure Elucidation of Alkaloids
From *Hypecoum procumbens* L. and Investigation of
Acetylcholinesterase and Butrylcholinesterase (Anti-Alzheimer) Inhibition Activities
Trakya University Institute of Natural Sciences
Departmant of Chemistry

ABSTRACT

In this study, the chemically investigation of *Hypecoum procumbens* L. was aimed. For this purpose, the plant material was soaked in EtOH for two weeks. Then EtOH extract was diluted with water and fractionated with hexane, dichloromethane, and ethyl acetate, respectively. TLC chromatography was performed these fractionated.

Four alkaloids were isolated from dichloromethane extract of *H. procumbens* the structure determination of the compounds achieved by spectral methods such as IR, UV, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, DEPT, HMBC, COSY, ESI-MS and also by comparing their spectral data to those of literature values. The results were discussed.

The isolated compounds (**1-4**), were screened against AChE and BChE inhibitory activity. When tested against the AChE, 8-methoxy-11,12-methylenether sanguinarine (**1**), 8-Asetonildihidrosanguinarine (**2**), oxohydrastine (**3**), and protopine (**4**) displayed IC_{50} values of 1.13, 1.80, 0.92 and 0.88 mM, respectively. The IC_{50} values for BChE inhibition by compounds (**1-4**) were 6.81, 0.187, 4.9 and 1.62 mM, respectively. Standard inhibitor (galanthamine) exhibited AChE and BChE inhibition with IC_{50} value of 3.5 μM and 36.0 μM, respectively.

Year : 2013
Number of Pages : 109
Keywords : *Hypecoum procumbens*, Benzophenanthridine alkaloid, Alzheimer, Acetylcholinesterase, Butrylcholinesterase

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Araştırma Laboratuarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada *H. procumbens* L. bitkisindeki biyoaktif bileşikler izole edilerek yapıları aydınlatılmış ve bunların asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir.

Tez çalışmam süresince çalışmalarımı titizlikle yönlendiren, her adımımda yanımda olan ve değerli bilgilerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN 'a teşekkürü bir borç bilirim.

Aldığım yüksek lisans derslerinde emeği geçen ve organik kimyaya bakış açımı genişleten değerli hocalarım Prof. Dr. Ömer ZAİM, Doç. Dr. Mesut KAÇAN Yrd. Doç. Dr. Hakan KOLANCILAR ve Yrd. Doç. Dr. Hayrettin BEYNEK' e teşekkür ederim.

Bileşiklerin NMR spektrumlarının alınmasında emeği geçen uzman Tahir BAKKAL' a teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım sırasında her türlü destek ve yardımları için başta Canan KARUNCULA olmak üzere H.Özlem KARAAĞAÇ, Nur SEYHAN, Pınar ALPASLAN ve diğer tüm laboratuar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bitkinin tanımlanmasında emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER' e teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hep yanımda olan canım aileme ve nişanlım Anıl DEVİREN' e sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Özet i

Abstract ii

Önsöz iii

Simgeler viii

Kısaltmalar viii

Şekiller Dizini x

Tablolar Dizini xiii

BÖLÜM 1. GİRİŞ 1

BÖLÜM 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI 3

2. 1. Bitkinin Tanımı ve Yayılışı 3

2. 1. 1. *Papaveraceae* Familyasının Özellikleri 3

2. 1. 2. *Hypecoum* L. Cinsinin Genel Özellikleri 4

2. 1. 3. *H. procumbens* L. Türünün Özellikleri 5

2. 1. 4. *Hypecoum* L. Cinsinin Biyolojik Aktivitesi 6

2. 2. Alzheimer Hastalığı Nedir? 7

2. 2. 1. Asetilkolin Metabolizması ve Kolinesterazlar 9

2. 2. 2. Alzheimer Hastalığının Tedavisi ve Kolinesteraz İnhibitörleri 11

2. 3. Alkaloid Bileşikleri 14

2. 3. 1. Genel Özellikler 14

2. 3. 2. Alkaloidlerin Bitkiler Aleminde Bulunuşu 14

2. 3. 3. Alkaloidlerin Bitkide Bulunduğu Yerler 15

2. 3. 4. Alkaloidlerin Bitkideki Rolü 16

2. 3. 5. Alkaloidlerin İlaç Olarak Keşfedilmesi ve Tıpta Kullanımı 17

2. 3. 6. Alkaloid Sınıfları 18

2. 3. 6. 1. Amino Alkaloidleri 19

2. 3. 6. 2. Piridin ve piperidin Alkaloidleri 20

2. 3. 6. 3. Tropan Alkalaoidleri 22

2. 3. 6. 4. Pirolizidin Alkaloidleri 23

2. 3. 6. 5. Kinolizidin Alkaloidleri 24
2. 3. 6. 6. İzokinolin Alkaloidleri 25
2. 3. 6. 6. 1. Protoberberin Alkaloidler 26
2. 3. 6. 6. 2. Benzilizokinolin Alkaloidler 27
2. 3. 6. 6. 3. Bisbenzilizokinolin alkaloidler 29
2. 3. 6. 7. Amaryllidaceae Alkaloidleri 31
2. 3. 6. 8. Benzofenantridin Alkaloidleri 32
2. 3. 6. 8. 1. Sanguinarin Biyosentezi 33
2. 3. 6. 9. Terpenoid tetrahidroizokinolin Alkaloidleri 37
2. 3. 6. 10. İndol Alkaloidler 37
2. 3. 6. 10. 1. Basit indol alkaloidler 38
2. 3. 6. 10. 2. Terpenoid indol alkaloidleri 39
2. 3. 6. 11. Kinolin Alkaloidleri 40
2. 3. 6. 12. İmidazol Alkaloidler 40
2. 3. 6. 13. Steroidal Alkaloidler 41
2. 3. 6. 14. Aconitum Alkaloidleri 42
2. 3. 6. 15. Guanidinyum Alkaloidleri 43
2. 4. Ayırma ve Saflaştırma Metodları 44
2. 4. 1. Ekstraksiyon Teknikleri 45
2. 4. 2. Alkaloidlerin Belirlenmesi ve İzolasyonu 45
2. 4. 3. Kromatografik Analiz Yöntemleri 47
2. 4. 3. 1. Kağıt Kromatografisi 47
2. 4. 3. 2. İnce Tabaka Kromatografisi 48
2. 4. 3. 3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi 48
2. 4. 3. 4. Kolon Kromatografisi 49
2. 4. 3. 5. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi) 50
2. 5. Yapı Açıklama Metodları 51
2. 5. 1. Ultraviyole Spektroskopisi 51
2. 5. 2. İnfrared Spektroskopisi 52
2. 5. 3. ^{1}H-NMR Spektroskopisi 52
2. 5. 4. ^{13}C-NMR Spektroskopisi 53
2. 5. 5. Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi (LC-MS) 53

BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD **54**

3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 54
3. 2. Kullanılan Yöntemler 55
3. 2. 1. Kolon kromatografisi 55
3. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi 55
3. 2. 3. Enzim İnhibisyon Aktivitesi Çalışmaları 55
3. 2. 3. 1. Ellman Metodu 55
3. 2. 3. 2. Enzim İnhibisyon Deneyi Reaktifleri 57
3. 3. Kromatografi İşlemlerinde Kullanılan Belirteçler 57
3. 4. Kullanılan Cihazlar 58
3. 5. Çözücüler 58

BÖLÜM 4. DENEYSEL KISIM **59**

4. 1. Bitkinin Ekstre Edilmesi 59
4. 2. Kromatografik Yöntemlerle Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri 62
4. 2. 1. Diklorometan Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması 62
4. 2. 2. Diklorometan Ekstresinden Elde Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri 63
4. 2. 2. 1 Numaralı Bileşik: 8-Metoksi-11,12-metilendietersanguinarin 63
4. 2. 2. 2 Numaralı Bileşik: 8-Asetonildihidrosanguinarine 65
4. 2. 2. 3 Numaralı Bileşik: Oksohidrastin 67
4. 2. 2. 4 Numaralı Bileşik: Protopin 69

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA **71**

5. 1. Kimyasal Bulgular 71
5. 1. 1. 1 Numaralı Bileşik: 8-Metoksi-11,12-metileneter sanguinarin 71
5. 1. 2. 2 Numaralı Bileşik: 8-Asetonildihidrosanguinarin 79

5. 1. 3. 3 Numaralı Bileşik: Oksohidrastin 88
5. 1. 4. 4 Numaralı Bileşik: Protopin 96
5.2. Elde Edilen Bileşiklerin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibisyon Aktiviteleri 104

BÖLÜM 6. KAYNAKLAR **105**

ÖZGEÇMİŞ **109**

SİMGELER DİZİNİ

$[\alpha]_D$: optik çevirme açısı

δ : kimyasal kayma

IC_{50} : % 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu

J : yarılma sabiti

λ : dalga boyu

m/z : kütle/yük

υ : frekans

w/w : ağırlıkça oran

v/v : hacimce oran

Kısaltmalar

ACE : Anjiotensin dönüştürücü enzim

ACh : Asetilkolin

AChE : Asetilkolinesteraz enzimi

AH : Alzheimer hastalığı

BChE : Butirilkolinesteraz

ChAT : Kolin asetiltransferaz

CoA : Asetilkoenzim A

d : dublet

dd : dubletin dubleti

DEPT : Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

ELISA : Enzym Linked Immunosorbent Assay

ESI : Elektrosprey İyonlaştırma

GC : Gaz kromatografisi

HMBC : Heteronuclear Multi Bond Coherence

HMQC : Heteronuclear Multiple Quantum Coherence

HPLC : Yüksek performans sıvı kromatografisi

Hz : Hertz

IC_{50} : İnhibitör konsantrasyonu

IR : İnfrared (Kızıl ötesi)

LC-MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometresi
m	: multiplet
MHz	: megahertz
MS	: Kütle spektroskopisi
nm	: nanometre
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
ppm	: per part million
Rt	: Retensiyon zamanı
t	: triplet
TLC	: İnce tabaka kromatografisi
UV	: Ultraviyole (Mor ötesi)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	**Sayfa**
Şekil 2. 1. *H. procumbens* bitkisi	5
Şekil 2. 2 *Hypecoum erectum'*dan elde edilen antimikrobiyal alkaloidler	7
Şekil 2. 3. Sağlıklı bireyde ve Alzheimer hastasında beyin yapısı	8
Şekil 2. 4. Asetilkolin metabolizması	9
Şekil 2. 5. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların kimyasal yapıları	13
Şekil 2. 6. Efedrin bileşiği	19
Şekil 2. 7. Amino alkaloid örnekleri	20
Şekil 2. 8. Koniin, Arekolin ve Lobelin bileşikleri	21
Şekil 2. 9. Nikotin bileşiği	21
Şekil 2. 10. Tropan bileşiği	22
Şekil 2. 11. Kokain bileşiği	23
Şekil 2. 12. Hiyosiyamin ve Skopolamin bileşikleri	23
Şekil 2. 13. Pirolizin ve Pirolizidin bileşikleri	24
Şekil 2. 14. Senesionin bileşiği	24
Şekil 2. 15. Kinolizin ve Kinolizidin bileşikleri	25
Şekil 2. 16. Sitisin bileşiği	25
Şekil 2. 17. İzokinolin bileşiği	26
Şekil 2. 18. Berberin bileşiği	26
Şekil 2. 19. Papaverin bileşiği	27
Şekil 2. 20. Morfin bileşiği	28
Şekil 2. 21. Kodein bileşiği	28
Şekil 2. 22. Noskapin bileşiği	29
Şekil 2. 23. Tubokürarin bileşiği	30
Şekil 2. 24. Galantamin bileşiği	32
Şekil 2. 25. Sanguinarin bileşiği	32
Şekil 2. 26. Sanguinarin alkaloidlerinin biyosentezi	35
Şekil 2. 27. Fizostigmin bileşiği	39
Şekil 2. 28. Liserjik asit dietilamit (LSD) bileşiği	39

Şekil 2. 29. Kinolin alkaloidlerine örnekler 40
Şekil 2. 30. Pilokarpin bileşiği 41
Şekil 2. 31. Rubijervin ve Veratramin bileşikleri 42
Şekil 2. 32. Akonitin bileşiği 43
Şekil 2. 33. Tetradotoksin bileşiği 44
Şekil 3. 1. Elmann metodu 56
Şekil 4. 1. Ana ekstrenin eldesi 60
Şekil 4. 2. Hegzan, diklorometan, etil asetat ve su fazlarının eldesi 61
Şekil 4. 3. 8-Metoksi,11,12 metileneter-sanguinarin 63
Şekil 4. 4. 8-Asetildihidrosanguinarin 65
Şekil 4. 5. Oksohidrastin 67
Şekil 4. 6. Deoksiprotopin 69
Şekil 5. 1. 8-Metoksi-11,12-metileneter sanguinarin bileşiğine ait HMBC korelasyonları 73
Şekil 5. 2. 8-Metoksi-11,12-metileneter sanguinarin bileşiğine ait ^{1}H-NMR (300 MHz, Acetone-d_6) spektrumu 74
Şekil 5. 3. 8-Metoksi-11,12-metileneter sanguinarin bileşiğine ait HMQC spektrumu 75
Şekil 5. 4. 8-Metoksi-11,12-metileneter sanguinarin bileşiğine ait HMBC spektrumu 76
Şekil 5. 5. 8-Metoksi,11,12 metileneter-sanguinarin bileşiğine ait COSYspektrumu 77
Şekil 5. 6. 8-Metoksi,11,12 metileneter-sanguinarin bileşiğine ait ESI-MS spekturumu 78
Şekil 5. 7. 8-Asetonildihirosanguinarin bileşiğine ait HMBC korelasyonları 81
Şekil 5. 8. 8-Asetonildihirosanguinarin bileşiğine ait ^{1}H-NMR (300 MHz Acetone-d_6,) spektrumu 82
Şekil 5. 9. 8-Asetonildihirosanguinarin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, Acetone-d_6) spektrumu 83
Şekil 5. 10. 8-Asetonildihirosanguinarin bileşiğine ait HMQC spektrumu 84
Şekil 5. 11. 8-Asetonildihirosanguinarin bileşiğine ait HMBC spekturumu 85

Şekil 5. 12. 8-Asetonildihirosanguinarin bileşiğine ait COSY spekturumu 86
Şekil 5. 13. 8-Asetonildihirosanguinarin bileşiğine ait ESI-MS spekturumu 87
Şekil 5. 14. Oksohidrastin bileşiğine ait HMBC korelasyonları 89
Şekil 5. 15. Oksohidrastin bileşiğine ait ^{1}H-NMR (300 MHz, Acetone-d_6) spektrumu 90
Şekil 5. 16. Oksohidrastin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, Acetone-d_6) spektrumu 91
Şekil 5. 17. Oksohidrastin bileşiğine ait HMQC spekturumu 92
Şekil 5. 18. Oksohidrastin bileşiğine ait HMBC spekturumu 93
Şekil 5. 19. Oksohidrastin bileşiğine ait COSY spekturumu 94
Şekil 5. 20. Oksohidrastin bileşiğine ait ESI-MS spekturumu 95
Şekil 5. 21. Protopin bileşiğine ait HMBC korelasyonları 97
Şekil 5. 22. Protopin bileşiğine ait ^{1}H-NMR (300 MHz,MeOD) spekturumu 98
Şekil 5. 23. Protopin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, Acetone-d_6) Spektrumu 99
Şekil 5. 24. Protopin bileşiğine ait HSQC spekturumu 100
Şekil 5. 25. Protopin bileşiğine ait HMBC spekturumu 101
Şekil 5. 26. Protopin bileşiğine ait COSYspekturumu 102
Şekil 5. 27. Protopin bileşiğine ait ESI-MS spekturumu 103

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo No **Sayfa No**

Tablo 2. 1. Alzheimer hastalığı ile normalde görülebilecek bellek bozuklukları arasındaki farklar. 8

Tablo 4. 1. 8-Metoksi,11,12-metileneter sanguinarin bileşiği için ^{1}H-NMR (300 MHz, Acetone-d_6), DEPT ve ^{13}C-NMR (75 MHz, Acetone-d_6) değerleri 64

Tablo 4. 2. 8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiği için ^{1}H-NMR (300 MHz, Acetone-d_6), DEPT ve ^{13}C-NMR (75 MHz, Acetone-d_6) değerleri 66

Tablo 4. 3. Oksohidrastin bileşiği için ^{1}H-NMR (300 MHz, Acetone-d_6), DEPT ve ^{13}C-NMR (75 MHz, Asetone-d_6) değerleri 68

Tablo 4. 4. Deoksiprotopin bileşiği için ^{1}H-NMR (300 MHz, MeOD), DEPT ve ^{13}C-NMR (75 MHz, MeOD) değerleri 70

Tablo 5. 1. İzole edilen bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri 104

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Doğal bileşikler, canlı organizmalardan çeşitli kimyasal, biyolojik ve fiziksel yöntemler kullanılarak elde edilebilen organik maddelerdir. Temel kaynakları arasında bitkiler, deniz canlıları, mikroorganizmalar ve diğer bazı hayvansal organizmalar en önemli yeri almaktadır. Çeşitli teknikler kullanılarak canlıların ürettikleri organik maddeler izole edilmekte, yapıları aydınlatılmakta ve farklı amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır.

Doğal bileşiklerle ilgili yapılan çalışmaların tarihçesi çok eski dönemlere dayanmaktadır. Bilhassa hastalıkların tedavisinde kullanılan bitkilerden faydalanma 5000 yıllık bir geçmişe sahiptir. İnsanoğlu önce yakın çevresindeki yabani bitkileri tanımış, deneme yanılma yöntemi ile yiyebileceklerini ve yememesi gerekenleri, zehirli olanları belirlemiş, daha sonra hastalıkları iyileştirmede yakın çevresindeki bitkilerden yararlanmaya başlamıştır.

Bilimin ilerlemesi ve eczacılık tekniklerine bağlı olarak 19. ve 20. yüzyıllarda bitkilerin tedavi edici etken maddelerinin saflaştırılması sağlanmış ve bunların çoğu sentetik yollarla elde edilmiştir. Son zamanlarda sentetik ilaçlarda meydana gelebilen ciddi yan etkilerin yol açtığı tıbbi ve ekonomik sorunlar ve sanayileşmiş ülkelerdeki çevre kirliliğinin arttırdığı ekolojik kirlilikler, tedavileri henüz mümkün olmayan pekçok hastalığın oluşturduğu tehdit, doğal olması ve yan etkilere yol açmadığı düşüncesi gibi pek çok faktöre bağlı olarak bitkilerle tedavi tekrar popüler hale gelmeye başlamıştır.

Yirminci yüzyılda, bilim ve teknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak dünya nüfusundaki artış hızlanmış, 1900 yılında 1,6 milyar olan dünya nüfusu 1950'de

2,5 milyara ulaşmıştır. Yaşam süresinin uzaması daha çok sayıda bireyin nörodejeneratif hastalıklar yönünden araştırılmasına yol açmıştır. Alzheimer hastalığı (AH) bütün demans vakalarının yarısından fazlasından sorumlu olan en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Ayrıca, dünya nüfusunun yaşlanmasıyla hastalığın yaygınlığının daha da artacağı beklenmektedir. Bu yüzden hastalığın tedavisinde daha etkin ve de daha az yan etkiye sahip yeni ilaçların keşfedilmesi her geçen gün önem kazanmaya devam etmektedir.

Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların kimyasal yapıları azot içeren heterosiklik yapılardır ve bu yapılar asetilkokinesteraz enzimini inhibe ederek etken madde özelliği kazanmış oldukları gözlemlenmiştir. *Hypecoum* bitkisi de bahsedilen ilaçlara benzer şekilde düzlemsel yapılı, aromatik ve heterohalka içeren alkaloid bileşikleri bulundurmaktadır. Bu nedenle bu tez çalışmasında *Hypecoum* türlerinden biri olan *H. procumbens* L. bitkisinin içerdiği bileşiklerin izole edilmeleri, yapılarının aydınlatılması, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerinin değerlendirilmesi ile Alzheimer hastalığındaki mümkün tedavi edici etkinliğinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

BÖLÜM 2

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2. 1. Bitkinin Tanımı ve Yayılışı

2. 1. 1. *Papaveraceae* Familyasının Özellikleri

Papaveraceae (haşhaşgiller) familyası (ailesi) 30 cins ve yaklaşık olarak 600 tür ile çiçekli bitkiler arasında oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Kozmopolit olan Papaveraceae ılıman ve subtropikal iklimlerde bulunur, ancak genelikle tropikal iklimde daha az görülür.

Bitkiler bir, iki ya da çok yıllık olabilir. Bütün kısımları gelişmiş boru sistemine sahip ve lateks üretir. Lateks sütlü veya sulu, beyaz, sarı veya kırmızı renkli veya yalındır. Genelde otsudurlar, ancak birkaç tür çalı veya herdem yeşil ağaçlar şeklindedir. Yapraklar genellikle veya bazen daire şeklinde sarmal dizilişmiş, tam, tüysü veya elsi parçalı, stipülsüzdür. Bazı bitkilerde birbirinden farklı olan iki tip yaprak bulunur: kış döneminde rozet şeklinde taban yaprakları, ilkbaharda yükselici ve ucunda çiçek taşıyan gövde üzerinde taban yapraklarına göre daha küçük olan gövde yaprakları yer alır. Genellikle saplıdır ve yaprak kını taşımazlar. Çiçekler erdişi, tek ve birçok türde terminal (uçta) olarak bulunur, çok nadir olarak panikula durumda çiçek durumları görülebilir, ışınsal simetrilidir, genellikle orta boyda veya geniş ve gösterişli yapıdadır. Periant 2 veya 3 serilidir. Genellikle belirgin kaliks (çanak yaprak)-korolla (taç yaprak) farklılaşması görülür (istisna olarak *Macleaya* cinsinde korolla yoktur). Kaliks 2-3 parçalı, sepaller (çanak yapraklar) serbest ve erken dökülücü; petaller (taç yapraklar) serbest 4-6 veya 8-12 parçalı, genellikle tomurcuk içinde buruşuktur. Stamenler çok sayıda veya bazen 4 ve birkaç dairede dizilmiştir. Filamentler nadiren kanatlıdır. Anterler boyuna yarıklarla açılır. Ginekeum üst durumlu, tek pistillidir. Ovaryum tek

lokuluslu (bazen yalancı bir bölmeyle ayrılmış iki lokuslu) ve çok karpellidir, saplı veya sapsızdır. Plasentasyon parietaldir. Ovüller çok sayıda, anatrop veya kampilotroptur. Meyve genellikle porisit (delikle açılan) kapsül, lomentum veya silikuvadır. Tomumlar küçük ve çok sayıda, besidoku yağlı ve unludur. Çiçekleri genellikle kokusuz ve nektar taşımamasına rağmen böceklerle (entomofil) veya çok azı rüzgarla (anemofil) tozlaşır. [1, 2, 3].

AGP III sisteminde eudicot kladında yer alan Ranunculales ordosuna (takımı) dahil edilen Papaveraceae familyası, Papaveroideae ve Fumarioideae olmak üzere altfamilya ve 6 tribeden oluşur. *Hypecoum* cinsi bazı araştırıcılar tarafından Fumariaceae familyasına (yaklaşık 20 cins, 575 tür içerir) ait olduğu kabul edilmiş, fakat APG III sistemi, bu familyayı Papaveraceae içinde Fumarioideae olarak bir alt familya olarak kabul eder ve Fumarieae ve Hypecoeae olmak üzere iki tribe ayırır. Fumarioideae altfamilyası birbirine benzemeyen bir çift petal taşımasıyla kolaylıkla ayrılır. Dıştaki petallerin biri veya her ikisi genellikle mahmuzludur ve içteki petaller uçta birleşiktir. Bir veya daha fazla dıştaki taç yaprakları mahmuzludur ve içteki taçyaprakları ucuna bağlıdır. Çalışma konumuz olan *Hypoceum* cinsi Fumarioideae alt familyası, Hypecoeae tribe'ında yer alır [4].

2. 1. 2. *Hypecoum* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Donuk mavimsi yeşil renkli, tek yıllık otsu bitkilerdir. Yapraklar 2-4-pinnatisekt, lobları linear (şeritsi) ile dar obovat (ters yumurtamsı) arası. Çiçek durumu ikiye dallanan kimoz (dikazyum) şeklinde. Sepaller 2, çiçeklenmeden kısa süre sonra dökülür, ovat ile lanseolat (mızraksı) şekilleri arasında. Petaller 4, iki seride dizilmiş, dıştaki 2 tanesi tam veya 3 loblu, içteki 2 tanesi üç parçalı, yan lonları linear, orta lobu kaşık şeklindedir. Stamenler 4, filamentleri kanatlıdır. Meyve çok tohumlu lomentum şeklindedir [5].

Türkiye'de *H. imberbe* Sibth. & Sm., *H. procumbens* L., *H. pendulum* L. ve *H. ponticum* Velen. olmak üzere 4 türü bulunmaktadır.

2. 1. 3. *H. procumbens* L. Türünün Özellikleri

Gövde dipten itibaren çok dallı, dekumbent veya yükselici tipde tek yıllık otsu bir bitkidir. Yapraklar donuk mavi yeşilimsi renkli olup, 2 x pinnatisekt tiptedir. Lacinialar linear veya linear lanseolatdır. Sepaller ovat veya ovat lanseolat tipde olup, çoğunlukla dentikulat kenarlıdır (uca doğru). Petaller yeşil, dıştakiler iki veya bazen de hafifçe 3 loplu olup, dış loplar, ortadakinden daha küçüktür. Meyva dik duruşlu ve genellikle kalınlaşmamış pediseller üzerinde gelişir. Lomentum bükük şekilli, uzunlamasına stiriat çizgili ve 4-6 cm uzunluğundadır (Şekil 2. 1) [5].

Çiçeklenme; 3-6. aylar arasındadır. Boş araziler, deniz kenarlarında, 300 m yüksekliğe kadar yayılış gösterir

Dağılım: Türkiye'deki dağılımı dağınık; Trakya'da, Kuzey, Güney ve Orta Anadolu'da yetişmektedir. Tekirdağ, İstanbul (Trakya), Kocaeli, Bursa, Ankara, İzmir, Burdur, İçel. Dünya da ise Akdeniz, Kuzey Irak ve Suriye Çölü'ünde yayılış gösterir [5,6].



Şekil 2. 1. *H. procumbens* L. bitkisi

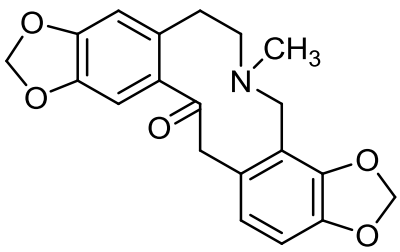
2. 1. 4. *Hypecoum* L. Cinsinin Biyolojik Aktivitesi

Hypecoum bitkisinden elde edilen izokinolin alkaloidlerinden olan protopin ve alokriptopin (alocriptopin) çok sayıda bitkisel ilaçın içeriğini oluşturmaktadır. Bu alkaloidlerin kardiyovasküler sistemlerde anti-trombotik (kan sulandırıcı), anti-spazm, anti-inflamatuar, nöroprotektif, (sinir hücresi koruyucu), anti-bakteriyel, anti-virüs, anti-fungus ve anti-parazit aktiviteler olmak üzere geniş çeşitlilikte biyolojik aktiviteleri gözlenmiştir [7].

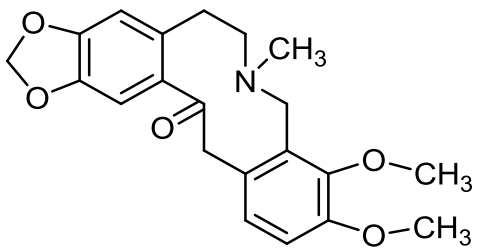
Bir başka çalışmada ise *H. erectum* L. bitkisinden elde edilen **protopinin** murin makrofajlarında (Raw 264.7 hücreleri) liposakkarid (LPS) kaynaklı inflamatuar tepkileri baskılayıp baskılamadığı incelenmiştir. Protopinin Raw 264.7 hücreleri tarafından üretilen nitrik oksit (NO), siklooksijenaz-2 (COX-2) ve prostaglandin E-2'yi (PGE-2) sitotoksik etki olmaksızın azalttığı bulunmuştur [8].

Raw 264.7 hücreleri protopinle birlikte pro-inflamatuar sitokinleri üretimini azaltmıştır. Bu inhibitör etkilerin, mitojen aktive eden protein kinaz (MAP kinaz)'ın fosforilasyonu ile bloklanması sonucu ortaya çıktığı bulunmuştur [8].

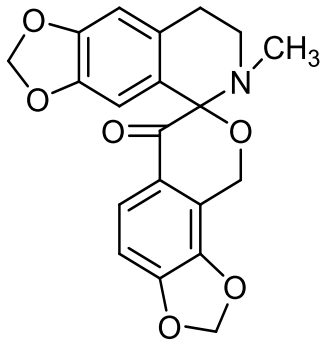
Yine *H. erectum* bitkisinden izole edilen yedi alkaloid bileşiğin *Bacilllus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Erwinia carotovora* olmak üzere altı mikroorganizmaya karşı disk difüzyon ve iki kat seyreltme metodu ile ve standart antibiyotik olarak streptomycin kullanarak antimikrobiyal aktiviteleri ölçülmüş ve minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC) belirlenmiştir. Bu alkaloidlerden protopin, allocryptopin, hypecorinine diğerlerine göre daha üstün bir anti-mikrobiyal aktive göstermiştir (Şekil 2. 2) [9].



Protopin



Allocrytopin



Hypecorinine

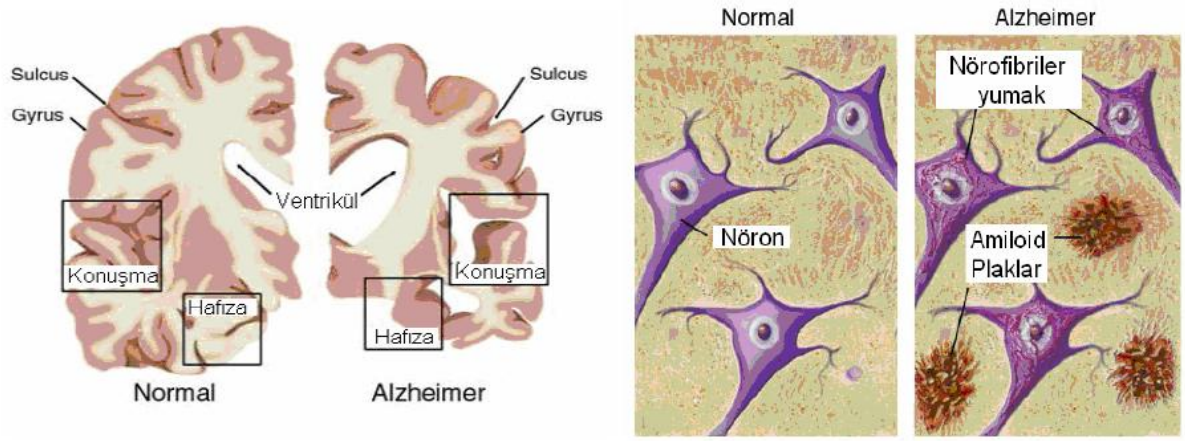
Şekil 2. 2. *H. erectum'*dan elde edilen atimikrobiyal alkaloidler

2. 2. Alzheimer Hastalığı Nedir?

Alzheimer hastalığı, bellekte ve öğrenme, konuşma, akıl yürütme, yargılama, iletişim ve günlük yaşam etkinliklerini sürdürme yetilerinde kademeli olarak yıkıma ve davranışlarda değişikliklere yol açan ilerleyici bir beyin hastalığıdır. Alzheimer hastalığı, halk arasında "bunama" diye adlandırılan demansın en sık nedenidir.

Alzheimer hastalığı adını, Alman doktor Alois Alzheimer'den almıştır. Dr. Alzheimer 1906 yılında Tübingen'de düzenlenen Güneybatı Alman Psikiyatristler Konferansında ilk kez bir demans vakasının sunulduğu çok çarpıcı bir ders vermiştir. Dr. Alzheimer bu konferansta Auguste D. adlı 51 yaşındaki kadın hastasını sunmuştur. Dr. Alzheimer ilk muayene sırasında bu hastada, ilerleyici zihinsel bozukluklar (hafıza, kavrama, konuşma ve yön bulma bozukluğu), işitsel halüsünasyonlar, hezeyanlar ve belirgin davranış bozuklukları saptamıştır. Daha sonra bu hastayı 1906 yılında ölene kadar yaklaşık 5 yıl boyunca izlemiştir. Hastanın ölümünden sonra yapılan otopside beyinde anormal kümeleşmeler (günümüzde amiloid plaklar olarak adlandırılmaktadır) ve lif yumakları (nörofibriler yumaklar) saptamıştır. Bugün beyindeki bu yumaklar ve plaklar Alzheimer hastalığının beyinde oluşturduğu ana değişiklikler olarak kabul edilmektedir. Bilim insanları daha sonraları Alzheimer hastalarının beyinlerinde başka değişiklikler de saptamıştır. Beynin, bellek ve diğer zihinsel yetiler açısından büyük önem taşıyan bölgelerindeki sinir hücreleri ölmekte ve sinir hücreleri arasındaki

bağlantılar bozulmaktadır. Ayrıca sinir hücreleri arasında mesajları taşıyan bazı kimyasal maddelerin düzeyleri de azalmaktadır (Şekil 2. 3) [10].



Şekil 2. 3. Sağlıklı bireyde ve Alzheimer hastasında beyin yapısı

Alzheimer hastalığı günümüzde milyonlarca kişiyi etkilemektedir. Alzheimer hastalığının yaşlanmanın normal bir sonucu olmadığının bilinmesi çok önemlidir. Çünkü hastalığı ortadan kaldıran bir tedavi olmamakla birlikte, hastalığın belirtilerini azaltabilen ve hastanın yaşam kalitesini iyileştirebilen tedaviler bulunmaktadır.

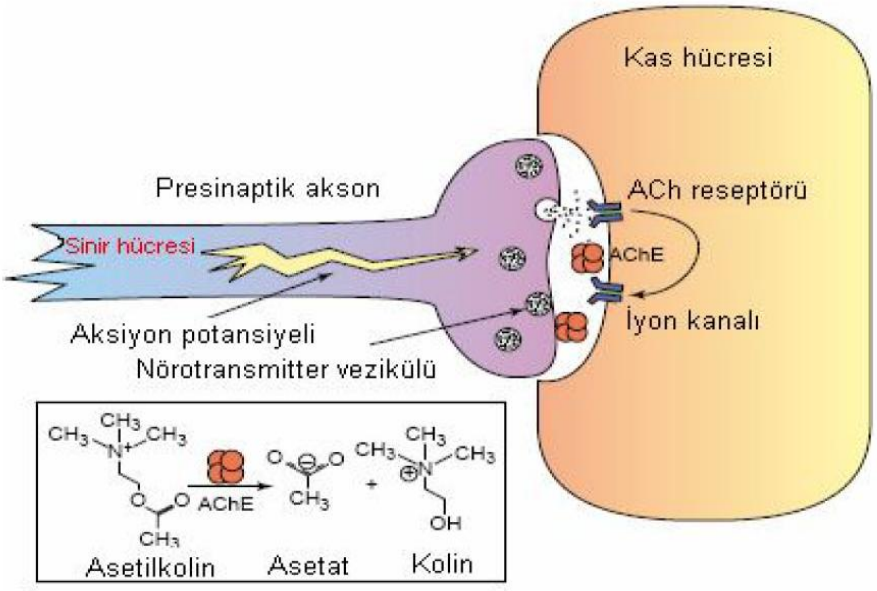
Tablo 2. 1. Alzheimer hastalığı ile normalde görülebilecek bellek bozuklukları arasındaki farklar.

Alzheimer hastalığı	**Normal olabilecek bellek bozuklukları**
Yaşanan bir olayın tümü unutulur.	Yaşanan bir olayın bir parçası unutulur.
Nadir olarak daha sonra hatırlanır	Çoğunlukla daha sonra hatırlanır.
Giderek yazılı/sözlü talimatlar izlenemez hale gelir.	Yazılı/sözlü talimatlar izlenebilir.
Giderek özbakım bozulur.	Özbakım sürdürülür.

2. 2. 1. Asetilkolin Metabolizması ve Kolinesterazlar

Alzheimer hastalığı beyindeki nörotransmiterlerin azalması ile karakterizedir. Hastalık temel olarak asetilkolin azalması, kolinesteraz metabolizmasındaki değişim ve dejenerasyon ile ilişkilidir.

Asetilkolin beynin bellek ile ilgili bölgelerinde önemli bir nörotransmiterdir. ACh (asetilkolin) kolinerjik nöronların gövdesinde asetilkoenzim A (CoA)' dan gelen asetil ve kolinin kolin asetiltransferaz (ChAT) tarafından birleştirilmesi ile oluşur. Asetil koenzim A glikoliz ürünüdür. Kolinin besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışındaki en önemli kaynağı ise ACh hidrolizi sonucu açığa çıkan ve yeniden asetilkolin sentezinde kullanılan kolindir. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik boşluğa döker. Sinaptik boşluğa dökülen ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir (Şekil 2. 4).



Şekil 2. 4. Asetilkolin metabolizması

Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Substrat özgüllüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki sınıfa ayrılmışlardır. AChE veya gerçek kolinesteraz (AChE: E.C.3.1.1.7, asetilkolin asetilhidrolaz) ve bütirilkolinesteraz (BChE: E.C.3.1.1.8 açilkolin açilhidrolaz) spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak bilinir. AChE beyin ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, BChE ise serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur.

AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim güçlü bir nükleofil rolü oynar. İkinci basamakta ise enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığıyla mükemmel bir parçalayıcı grup işlevi görür. AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır fakat asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir.

Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden olur. Daha düşük konsantrasyondaki nörotransmiter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak ve sonuç olarak bilgilerin aktarımı daha güç bir hal alır. Bu durumu düzeltmek için uygulanacak yöntemlerden biri sinir hücrelerine asetilkolin benzeri maddelerin verilmesidir. Asetilkolin düzeyini arttırmak için uygulanacak diğer bir yöntem ise asetilkolini yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyi artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif defisiti iyileştirebileceğini göstermiştir. Asetilkolinin sinaptik boşlukta daha uzun kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın tedavisinde en sık uygulanan stratejidir. Bu amaca yönelik olarak çoğunlukla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır [11].

2. 2. 2. Alzheimer Hastalığının Tedavisi ve Kolinesteraz İnhibitörleri

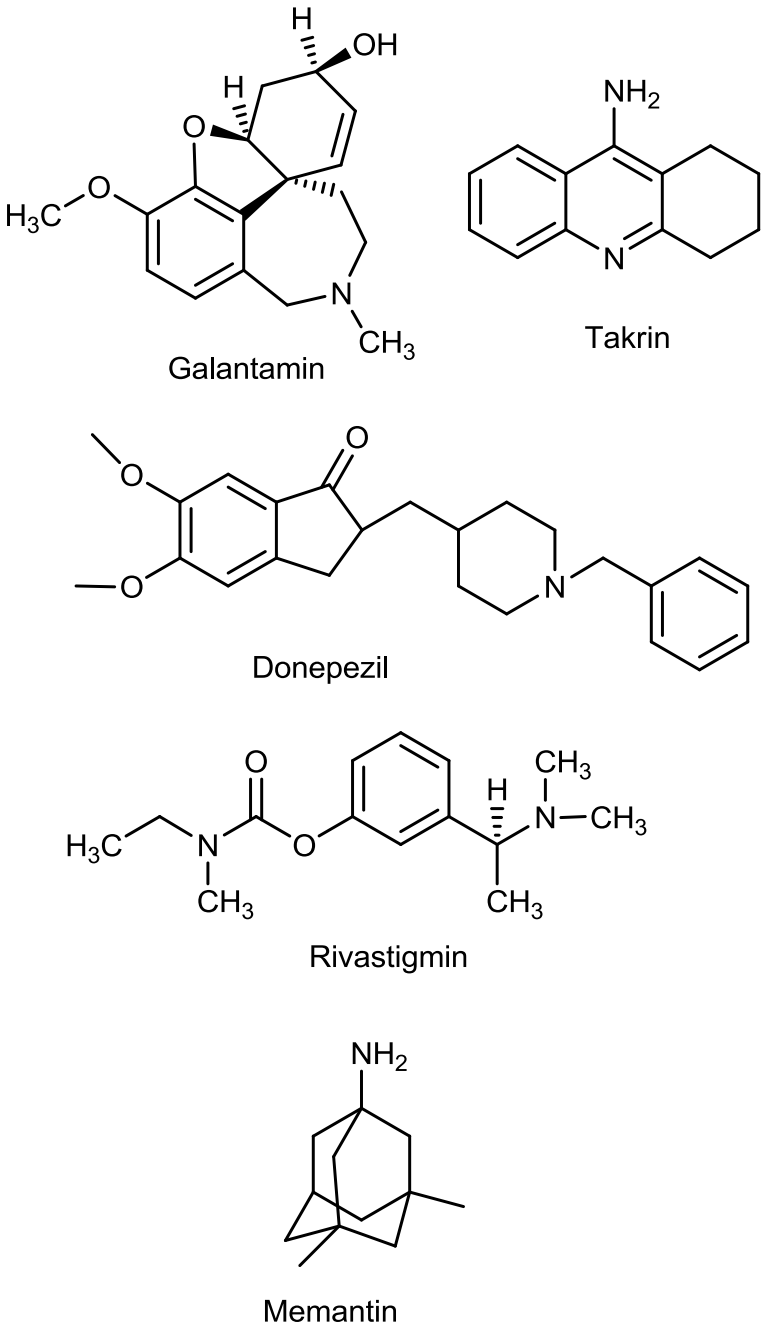
Alzheimer hastalığında kolinerjik kayıp olduğu bilgisi 1970'lerden itibaren tedavi için bir umut ışığı haline gelmiştir. Parkinson hastalığında dopamin eksikliğinin giderilmesi ile hastalığın belirtilerinin tedavi edilir hale gelmesi ile parallellik kurulmuş ve Alzheimer hastalarında da kolinerjik sistemin güçlendirilmesinin hastalığı tedavi edebileceğinden yola çıkılmıştır. Ancak zamanla araştırmalar göstermiştir ki Alzheimer hastalığının karmaşık yapısı sadece kolinerjik eksikliği değil, hem belirgin hücre kaybını, hem de diğer beyin kimyasallarının dengesinde kayda değer bir bozulmayı içermektedir.

Kolinesteraz inhibitörleri 1990'larda Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanıma sunulmuştur. Etki mekanizmaları asetilkolin adı verilen kimyasal habercinin yıkımını azaltarak kolinerjik etkinliği arttırabilmelerine dayalıdır. Ülkemizde bu ilaçlardan üç tanesi bulunmaktadır: Donepezil ve Rivastigmine 1998'den beri, Galantamin ise 2003'den beri reçete edilebilmektedir (Şekil 2. 5). Dünyada ilk çıkan antikolinesteraz olan Tacrine kullanım güçlüğü ve yan etkileri nedeniyle ülkemizde kullanıma hiç sunulmamıştır ve diğer ülkelerde de artık pek kullanılmamaktadır. Bu ilaçların hepsi asetilkolinin yıkımını engellerler. Asetilkolin dikkat ve bellek süreçlerinde özellikle önemli rol oynayan bir kimyasal habercidir. Yıkımının azalmasının, beyinde kullanılabilirliği artırması ve yukarda söz edilen zihinsel süreçleri iyileştirmesi beklenir. Yapılan klinik çalışmalarda erken ve orta evre Alzheimer hastalarında bu ilaçların zihinsel işlevlerde kısmen iyileştirici ya da zihinsel yıkımı yavaşlatıcı etkisinin görüldüğü bildirilmiştir [12].

Diğer bir ilaç yaklaşımı Alzheimer hastalarının beyinlerinde artmış bir madde olan glutamatı azaltmaya yönelik olarak kullanılan Memantin'dir (Şekil 2. 5).Bu ilaç kolinesteraz inhibitörü olmayan ve Alzheimer hastalığı tedavisi için dünyada onaylanan ilk farklı mekanizmalı ilaçtır. Ülkemizde 2003 sonu piyasaya verilmiştir. Bu ilaç 1982'den beri Almanya'da farklı nörolojik hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Memantin, glutamat adı verilen kimyasal habercinin aktivitesini düzenler. Glutamat, NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri denilen hücre algılayıcılarını uyararak bilgi işleyişinde ve bellek işlevlerinde önemli rol oynadığı düşünülen, uyarıcı etkili bir maddedir. Aşırı glutamat NMDA reseptörlerini aşırı uyaracak ve bu yüklenmenin

sonucunda hücreler yıkıma uğrayabilecektir (glutamat toksisitesi). Nörodejeneratif hastalıkların (sinir hücrelerinin yıkımı ile seyreden) birçoğunda glutamatın bu olası zararlı etkisi bir faktör olarak düşünülmektedir. Memantin NMDA reseptörlerini kısmen bloke ederek glutamatın aşırı uyarıcı etkisini ve bundan kaynaklanan hücre hasarını önleyebilir. Memantin'in etkisi hücre hasarını önlemeye yönelik olduğu için daha çok orta ve ileri evre Alzheimer hastalığında kullanımı önerilmektedir [12].

Klinik çalışmalar Memantin'in zihinsel işlevleri iyileştirmekten çok hastanın bakıma bağımlılık derecesini azalttığını ya da ilerleyişi yavaşlatabildiğini düşündürmektedir. Bazı klinisyenler Memantin ve kolinesteraz inhibitörlerini birlikte kullanmaktadırlar. Ancak henüz birlikte kullanımın klinik üstünlüğü kanıtlanmamıştır.



Şekil 2. 5. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçların kimyasal yapıları

2. 3. Alkaloid Bileşikleri

2. 3. 1. Genel Özellikler

Alkaloidler aminoasitlerden oluşur, ancak terpenler ve steroidler de çoğu zaman alkaloid iskeletini oluşturan diğer öncü bileşiklerdendir. Bu nedenle, alkaloidlerin biyosentezi daha önce tanımlanan ana biyosentez yollarının herhangi birine dahil edilemez. Ancak çoğunlukla iki biyosentetik yolun kombinasyonu ile oluşurlar. Bu yüzden alkaloidler kendi yapılarının temel kısmını oluşturan halka sistemleri göz önüne alınarak sınıflandırılırlar [13].

"Alkaloid" terimi genellikle "canlılarda fizyolojik etkileri olan azotlu bazik bitki bileşenleri için kullanılır. Ancak birçok farklı durumlar söz konusudur. Örneğin kolşisin, bazik karakterde olmamasına rağmen bir alkaloid olarak kabul edilir ve çok sayıda hayvansal kökenli ve fizyolojik olarak aktif, azot içeren bileşikler de alkaloid olarak adlandırılır. Bu sorunları önlemek için şu tanım önerilmiştir: "Bir alkaloid canlı organizmalarda sınırlı bir dağılım gösteren, azot içeren halkalı bir bileşiktir". Bu tanım aminler, aminoasitler, peptidler, proteinler, nükleikasitler, nükleotidler, porfinler, vitaminler, nitro ve nitroz bileşikleri gibi azotlu bileşikler hariç bugüne kadar alkaloidler olarak kabul edilen tüm bileşikleri kapsamaktadır [14].

2. 3. 2. Alkaloidlerin Bitkiler Alemininde Bulunuşu

Alkaloidler tüm bitki familyalarında bulunmazlar. Bakteri, yosun, mantar ve likenlerde çok nadirdir ve genellikle eğrelti otları ve kozaklarda bulunmazlar. Cordell ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre tek çeneklilerde, çift çeneklilerde ve açık tohumlularda bulunan alkaloidlerin toplam sayısı 21.120'dir. Alkaloidler 186 bitki familyası içinde 1730 cinsi kapsayan yaklaşık 7231 türde dağılım göstermektedirler. 35 familya içinde alkaloidlerin bulunduğu tespit edilmiştir ama henüz izole edilmemişlerdir. 20 bitki familyasında ise henüz hiç alkaloid tespit edilmemiştir. Tek çenekliler arasında, *Amaryllidaceae*, *Liliaceae* ve *Poaceae*

(buğdaygil) familyaları alkaloid açısından zengindir ve birçok orkide türünde daha önce bu tip bileşiklerin olmadığı kabul edilmesine rağmen şimdi alkaloid içerdiği bulunmuştur. Alkoidlerin çoğu dikotiledon olarak adlandırılan embriyosunda iki çenek yaprağı bulunan bitkilerde oluşur, özellikle bu familyalar *Annonaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Beberidaceae, Boraginaceae, Buxaceae, Celastraceae, Fabaceae, Luaraceae, Loganiaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae ve Ranunculaceae*'dir. En çok sayıda alkaloid başlıca 5 farklı familyadaki bitkilerden izole edilmiş ve karakterize edilmişlerdir. Bu familyalar: *Apocynaceae s. lat.* (2844), *Rutaceae* (1730), *Ranunculaceae* (1559), *Fabaceae* (1452) ve *Papaveraceae*(1309)*'* dir [15].

2. 3. 3. Alkaloidlerin Bitkide Bulunduğu Yerler

Alkaloidler bir bitkinin her bölümünde oluşabilir ama genellikle bir ya da daha fazla organı diğerlerinden daha fazla içeriğe sahiptir. Genellikle kabukları, yaprakları ve meyveleri alkaloid açısından zengindir ki, bunların da belirli bir doku ya da hücrelerinde oluşabilir. *Opium* (Afyon) alkaloidlerine haşhaş bitkisinin özellikle lateks borularında rastlanmaktadır. *Datura* türlerinin tropan alkaloidlerine yaprağın orta damarına bitişik dokudaki yaprak sapında rastlanılmıştır. Hücrede, alkaloidler genellikle vakuollerde oluşurlar, protoplazma ve hücre duvarında oluşmazlar.

Fazla alkaloid içeren organın, alkaloidlerin oluştuğu yer olması gerekmez. Birçok bitkide bir organdan diğer organa aktif taşıma gözlenmiştir. Bu süreçler aşılama deneyleri ile incelenmiştir. Özellikle *Solanaceae* familyasına ait bitkiler dikkate alınmıştır: Bir domates bitkisinin toprak üstü kısımlarından tropan alkaloidleri üreten bir bitki olan öldürücü köpek üzümünün (*Atropa belladonna*) köküne aşılanma yapılmıştır. Bir süre sonra aşı domatesinden tropan alkaloidleri izole edilmiştir. Tersine, domates bitkisinin köküne, *Atropa*'nın toprak üstü kısımlarından aşılama yapıldığı zaman ise tropan alkaloidleri *Atropa*'da yavaş yavaş kaybolmuştur. Bu deneyler gösteriyor ki *A. belladonna*'daki tropan alkaloidleri kökte oluşur ve depolamak için yapraklara taşınır. Benzer deneyler göstermiştir ki *Lupin* (acıbakla) alkaloidler için de tersi geçerlidir. Lupin alkaloidleri gövdede sentezlenir ve daha sonra köklere taşınır.

Radyoaktif olarak etiketlenmiş alkaloidlerin öncüleri kullanılarak da nikotin alkaloidinin çoğunun tütün bitkisinin kökünde oluştuğu ve yapraklara taşındığı gözlenmiştir. Ancak çok az bir miktarda alkaloid gövdede sentezlenmiştir.

Köklerde sentezlenen alkaloidlerin taşınması çoğunlukla damarlar yoluyla gerçekleştiriliyor çünkü bitki içindeki su taşınması çok aktif olduğu zaman yaprak uçlarından damlayan sıvıda ve damarlarda da alkaloidler tespit edilmiştir. Yine de bu alkaloidlerin taşınması, yapraklarda ve gövdede oluşması ile ilgili bilinenler oldukça azdır [15].

2. 3. 4. Alkaloidlerin Bitkideki Rolü

Alkaloidin bitkide bulunmasının bitkiye nasıl bir avantaj sağladığı konusunda pek çok tahmin olmasına rağmen bu konu hakkında bilinen çok az şey vardır. Üstelik aynı durum bitkilerdeki sekonder metabilitler için de geçerlidir. Sekonder metabolitler terimi bitkide oluşan bileşikleri ifade etmek için kullanılır. Fakat bunlar bitkinin ömrü ve gelişimi için gerekli olan metabolik yöntemlerde görev almamaktadırlar. İlaç üretiminde en çok kullanılan bitki bileşenleri sekonder metabolitlerdir.

Alkaloidlerin bitkideki varlığı onları otlayan hayvanlardan koruyabilir. Çünkü bazı alkaloidlerin acı bir tadı vardır ve hayvanlar bu alkaloidleri içeren bitkileri tecrübe ettikleri için onlardan uzak durmaktadır. Hemen hemen her şey çevremizde tükenmek üzere iken hala yeşilliğin bol olduğu otlak alanlarda el değmemiş keşfedilmemiş alkaloid içeren bitkilerin olduğu tespit edilmektedir. Sonuç olarak bitki çeşitliliği azalmış olsa da, bu durumun etkisinin alkaloidlerin tükenmesine neden olacağını söylemek mümkün değildir. Alkaloid içeren bitkilerin otlak alanlarda hayatta kalabilmelerinin nedeni içerdiği alkaloidlerdir. Bitkinin alkaloid sentezi için kaynaklarını geliştirmesinin sebebi hayvanlar değildir, çünkü bu kaynakların gelişimi hayvanlar var olmadan milyonlarca yıl öncesine dayanır.

Alkaloidlerle ilgili diğer hipotez önerileri ise alkaloidlerin normal bir metabolizmada zehir üreten organizmaların ürettikleri zehrin arındırılması için oluşan maddeler olduğu ya da alkaloidlerin bitkilerin azot depolamasını sağlayan maddeler olduğu ve besin rezervini oluşturduğu hipotezidir [16].

2. 3. 5. Alkaloidlerin İlaç Olarak Keşfedilmesi ve Tıpta Kullanımı

Alkaloidler farmolojik etkilere sahiptir, geniş kapsamlı biyolojik etki göstermektedirler. Bugün alkaloidlerin çoğu hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Örneğin; vincristin ve vinblastin kanser tedavisinde, morfin ise ağrı kesici olarak kullanılır. Eroin, kokain gibi alkaloidler uyuşturucu olarak yasal olmayan yollar ile kullanılmaktadır. Aconitin ve prolizidin alkaloidleri ise kuvvetli toksin özelliği göstermektedir. Alkaloid içeren bitkiler bilinen doğal ürünlerin % 15,6'sını oluşturmaktadır. Fakat farmasötik ve biyolojik öneme sahip alkaloidler bitki kaynaklı doğal ürünlerin % 50'sini oluşturmaktadır. Alkaloidler yeni ilaçlar üzerindeki gelişmelerde çok büyük bir payı temsil etmektedir. Ancak kimyagerler ve farmakologlar arasında alkaloidlerin isolasyonu ve yapısının belirlenmesi konusunda çok az ilgilenen vardır ve bu konuda çok az işbirliği yapılmaktadır. Bu yüzden birçok alkaloidin izolasyonu yapılarak yapısı belirlenmiş ancak biyolojik ve farmalojik özellikleri incelenmemiştir. Cordell ve arkadaşlarının yazdığı bir derlemeye göre şu ana kadar elde edilen alkaloidlerin % 75'i *in vitro* ve *in vivo* biyolojik aktivite analizlerine tabi tutulmamış ve farmokolojik etkileri test edilmemiştir. 2291 numune sadece bir teste, 1995'i 2-5 arası teste, sadece 167'si 20' den fazla teste tabi tutulmuştur. En çok sayıda test edilen bu 167 alkaloidin %35'i farmasötik açıdan önemli bulunmuştur. Asetat yolu ile türeyen terpenoidler ve fenilpropanaidler ile karşılaştırıldığında alkaloidler zengin bir iskelet yapısına sahiptir ve fonksiyonel grup çeşitliliği gösterir. Bilinen 21.120 alkaloid içinde alkaloidlere ait 1872 farklı iskelet yapısı vardır. Bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin sayısı 135.500' dür, bunlar arasında 5750 tane farklı iskelet yapısı vardır. Yani alkaloidler bitkilerden elde edilen bileşiklerin %15,6' sını temsil ederken, toplam iskelet sayısının % 32,5'lik bir kısmını oluştururlar. Düz zincirli, halkalı ya da küresel yapıdaki çeşitli alkaloidler hareketli ya da sabit konformasyonel yapıların büyük bir kısmını kapsamaktadır. Alkaloidler tek veya birden fazla kiral merkez bulundururlar ve nadiren rasemik karışım halindedirler. Ama genellikle bir enantiyomerik formu yüksek derecede optikçe saf olarak elde edilmektedir. Bu yüzden alkaloidlerin ve enzimlerin etkileşebilmesi için pek çok olasılık vardır ve alkaloid içeren bitkilere ilaç keşif sürecinde önemli bir bütçe ayrılmaktadır [17].

2. 3. 6. Alkaloid Sınıfları

Alkaloidler 15 grupta sınıflandırılabilirler.

1. Amino alkaloidler

2. Piridin ve piperidin alkaloidleri

3. Tropan alkalaoidleri

4. Pirolizidin alkaloidleri

5. Kinolizidin alkaloidleri

6. İzokinolin alkaloidleri

7. Amaryllidaceae alkaloidleri

8. Benzofenantridin alkaloidleri

9. Terpenoidtetrahidroizokinolin alkaloidleri

10. İndol alkaloidler

11. Kinolin alkaloidleri

12. İmidazol alkaloidler

13. Steroidal alkaloidler

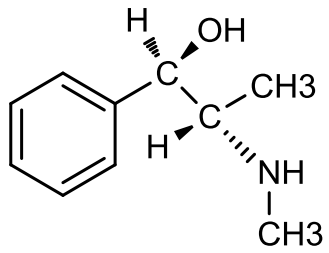
14. Aconitum alkaloidleri

15. Guanidinyum alkaloidleri

2. 3. 6. 1. Amino Alkaloidler

Amino alkaloidlerin azot atomu amino grubunda bulunur, diger alkaloidlerin ortak özelliği olan bir heterosiklik halka üyesi değildir. Alifatik seride çok az alkaloid vardır ve bunlar genellikle aminlerden sayılır. Hordenin, meskalin, efedrin, galegin bunlara örnek olarak verilebilir [18].

Efedrin (Şekil 2. 6) *Ephedra sinicia* ve benzer türlerinden elde edilir. L-efedrin doğal bir üründür ama metilamin ve 1-hidroksi-1-fenilasetondan da sentezlenebilir. 1-hidroksi-1-fenilaseton bira mayası ile benzaldehitin fermantasyonu ile hazırlanır. Efedrin, bir benzen halkasına bağlı 3 karbonlu yan zincirde bir hidroksil ve bir de sübstitüe amin grubu içermektedir [19].

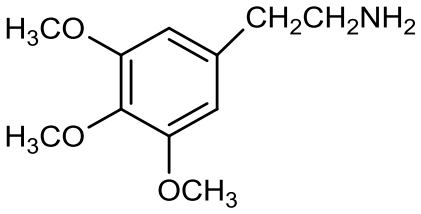


Şekil 2. 6. (1R, 2S)-(-)- Efedrin bileşiği

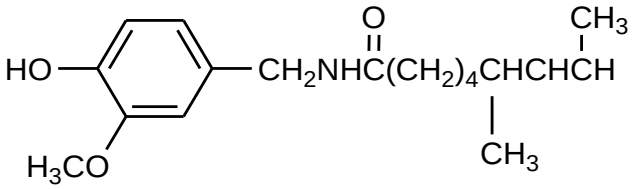
Efedrin, astım hastalığında kullanılan bir alkaloidtir. Tansiyon yükseltici bir etkisi olduğundan hipotansiyonda da tavsiye edilir [18].

Ephedra, *Ephedrae sinicia* Stapf. (Gnetaceae)'nin toprak üstü kısımlarında bulunur. Bitki 60-90 cm yüksekliğindeki bir çalıdır. *E. sinicia* Çin'den gelir ve orada binlerce yıldır "ma huang" adı altında, soğuk algınlığı semptomlarının tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde bitkinin ana kaynakları Hindistan ve Pakistan'dır. Alkaloid miktarı sonbaharda en yüksek olduğundan dallar bu mevsimde toplanır ve havada kurutularak drog elde edilir. *Ephedra* türleri en fazla % 0.5–2 kadar alkaloid içerirler. Alkaloid karışımın %30 – 90'ını efedrin oluşturmaktadır [20].

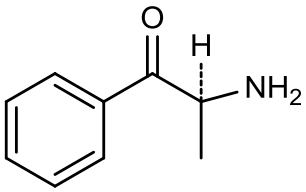
Meskalin, kapsaisin, katinon, kolşisin amino alkaloidlere verilebilecek diğer örneklerdir (Şekil 2. 7).



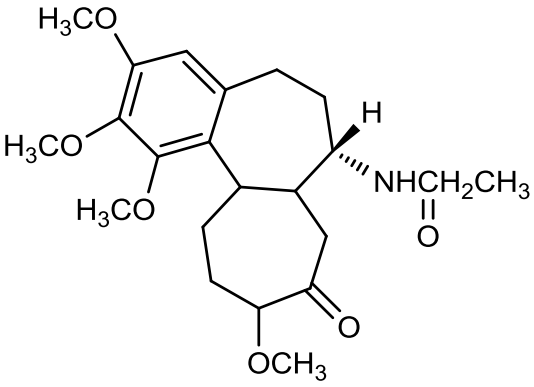
Meskalin



Kapsaisin



Katinon

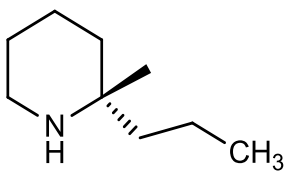


Kolşisin

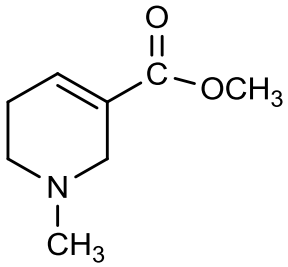
Şekil 2. 7. Amino alkaloid örnekleri

2. 3. 6. 2. Piridin ve piperidin Alkaloidleri

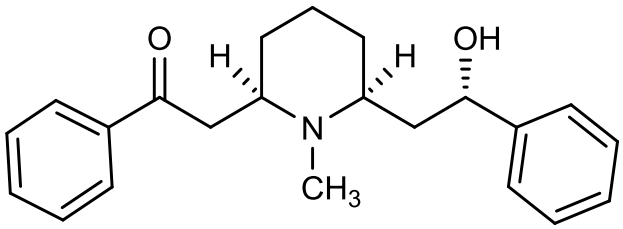
Piridin ya da piperidin halkası içeren alkaloidlerdir. Koniin, arekolin, lobelin, nikotin bu gruba verilebilecek örneklerdir (Şekil 2. 8).



(+) – Koniin



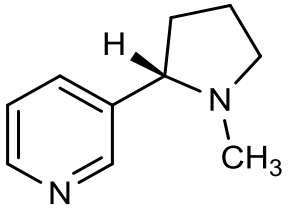
Arekolin



Lobelin

Şekil 2. 8. Koniin, Arekolin ve Lobelin bileşikleri

Nikotin (Şekil 2. 9) *Nicotiana tabacum* tütün bitkisinin ana alkaloididir ve tütün kullanma alışkanlığına neden olan bileşiktir. Bir yağ olan nikotin, birçok farmakolojik etkilere sahiptir. Düşük dozlarda, örneğin sigara içilirken alınan miktarlarda nikotin çeşitli bezlerden salgı uyarısı ve solunum uyarısı ile hipertansiyona neden olur. Ayrıca merkezi sinir sitemini uyarıcı etkisi vardır. Nikotin nikotinik asetilkolin reseptörleri ile etkileşen güçlü bir zehirdir. Sigarada nikotinin çoğu ısı ile yok olur ve havaya dağılır. Düşük dozdaki etkisinin aksine, toksik dozlar hipertansiyona ve solunumun durması sonucu ölüme neden olur.



Şekil 2. 9. Nikotin bileşiği

Nikotin tütün atıklarından izole edilerek bahçelerde böcek ilacı olarak kullanılır. Tıbbi amaçlar için ise nikotin sakız içinde, burun spreyinde ve sigara içme alışkanlığı olan insanların bu alışkanlığını bırakabilmesi için nikotin emdirilmiş bantlarda mevcuttur.

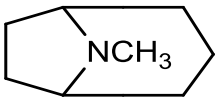
Tütün kurutulmuş ve fermente edilmiş *Nicotiana tabacum* L.'in yapraklarından oluşur. *N. rustica L.* benzer türlerdendir. Nicotiana türleri Kuzey Amerika'da tütün yapımında kullanılmıştır ve oradaki yerliler (kızılderililer) yaprakların uyarıcı olarak

nasıl kullanılacağını bilmekteydiler. Yeni dünyanın keşfinden sonra tütün kullanımı dünyanın geri kalanına yayılmıştır ve bitki şimdi hem tropikal hem de subtropikalde aynı zamanda ılıman bölgelerde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Tütün 'curing' tekniği olarak adlandırılan yavaş kurutma ve fermantasyon ile gerçekleşen bir teknik ile hazırlanır. Bunun sonucunda kahve renkli ve kokulu drog oluşur. Ürünün kalitesi kısmen kökene (tür, cins, melez) ve kısmen de hangi yolla kurutulduğuna ve fermantasyonun nasıl gerçekleştiğine bağlıdır. Tütündeki nikotin içeriği oldukça geniş bir aralıkta değişiklik gösterir (% 0.05 – 9).

Tütün sağlık için önemli bir risk içerir. Nikotin damar sertliğine ve kalp hastalıklarına neden olur. Sigara dumanı 3000'den fazla bileşik içerir. Bunların bazıları güçlü kanserojen maddelerdir. Sigara içenlerde özellikle akciğer kanseri belirgin bir risk teşkil etmektedir [21].

2. 3. 6. 3. Tropan Alkalaoidleri

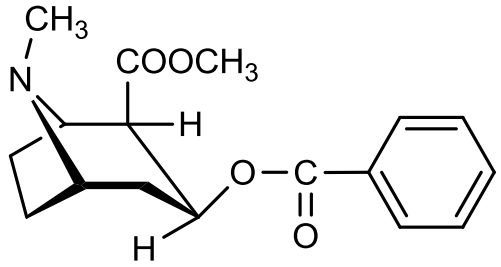
Bu alkaloid gruplarının en önemli temsilcileri hiyosiyamin, skopolamin ve kokaindir. Tropan (Şekil 2. 10) iskeleti iki karbon ve bir azot atomunun ortak kullanıldığı bir piperidin ve bir pirolidin halkasından oluşur [22].



Şekil 2. 10. Tropan bileşiği

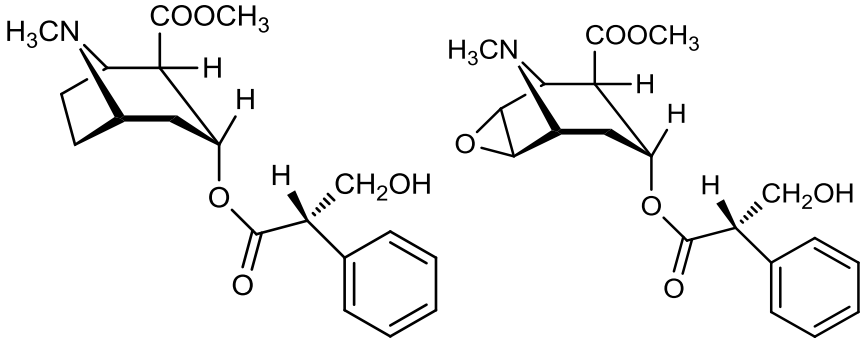
Kokain (Şekil 2. 11) *Erythuroxylum coca*'da oluşmaktadır. Kokain alkaloidi bir ecgonin esteridir. Kokain, C-2'deki karboksil grubunun metanol ile esterleşmesi ve hidroksil grubunun ise benzoik asit ile esterleşmesi sonucu oluşmuştur. Kokain özellikle oftalmik (göz) uygulamada lokal anestezik olarak kullanılır, ancak bileşik aynı zamanda merkezi bir uyarıcı olduğundan narkotik olarak yanlış kulanımından dolayı uygulamada sınırlıdır. Ancak kokain bileşiği prokain bileşiğinin sentezlenmesinde bir model olarak

kullanılmıştır ve aynı şekilde diğer lokal anesteziklerin gelişiminde önemli bir rol oynamıştır [23].



Şekil 2. 11. Kokain bileşiği

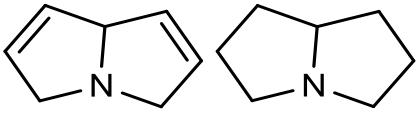
Hiyosiyamin ve skopolamin tropan alkaloidlere örnek olarak verilebilir (Şekil 2. 12).



Şekil 2. 12. Hiyosiyamin ve Skopolamin bileşikleri

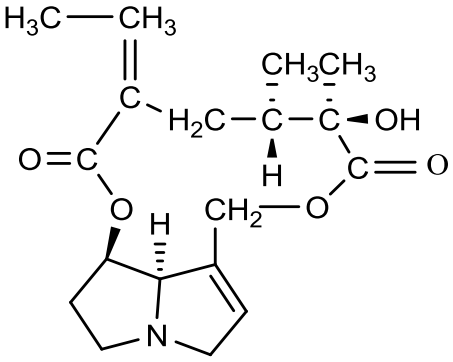
2. 3. 6. 4. Pirolizidin Alkaloidleri

Pirolizidin alkaloidleri ornitin aminoasitinden biyosentetik yolla türeyen alkaloid gruplarından biridir. Pirolizin iki pirol halkasının azotlarının ortak olarak kondensasyonundan oluşur. Bunun hidrojenlenmiş türevine de pirolizidin denir (Şekil 2. 13). Bazı pirolizidin alkaloidlere örnek olarak senesionin (Şekil 2. 14), monosirotalin ve lasiosarpin verilebilir.



Şekil 2. 13. Pirolizin ve Pirolizidin bileşikleri

Senesionin (Şekil 2. 14) pirolizidin sınıfının bir üyesidir ve hepatotoksik özelliği sayesinde tanınmıştır. Bu bileşikler reaktif bir karbona sahiptirler. Reaktif karbon karaciğerde bulunan birçok enzimdeki reaktif tiol grupları tarafından kolayca alkillenir ve toksik bir madde oluşur. Bu durum uzun zamandır tıbbi bir bitki olarak kullanılan *Sympytum officinale* bitkisinin piyasadan çekilmesine neden olmuştur. Senesionin kanarya otunda (*Senecio vulgaris, Asteraceae*) meydana gelmektedir. Bu bileşik çiftliklerde ve küçük otlak alanlarda problem yaratabilir çünkü çiftlik hayvanları ve atların zehirlenmelerine neden olabilir [24].



Şekil 2. 14. Senesionin bileşiği

2. 3. 6. 5. Kinolizidin Alkaloidleri

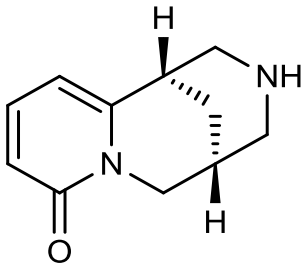
Kinolizin iki piridin halkasının azotlarının ortak olarak kullanılmasından oluşmaktadır. Hidrojenlenmiş şekline de kinolizidin denir (Şekil 2. 15).



Şekil 2. 15. Kinolizin ve Kinolizidin bileşikleri

Kinolizin alkaloidlerine pek çok familyada rastlanmaktadır. Bunların birçoğunda kinolizin veya daha çok kinolizidin iskeleti, diğer azotlu halka sistemiyle bir arada bulunur [19]. Sitisin bu alkaloid gruplarına verilebilecek bir örnektir.

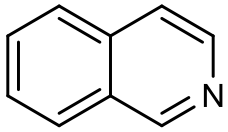
Sitisin (Şekil 2. 16) *Laburnum anagyroides* Medic. ve *L. alpinum* J. Presl. (Fabaceae) süs ağaçlarında oluşur. İlkbaharda sarı çiçekler verir ve büyük çiçek salkımı şeklinde bir bitkidir. Meyvesi bezelyeye benzer bir baklagildir. Bitkinin tüm bölümleri sitisin içerir. Özellikle tohumunda %3 kadar sitisin içermektedir. Sitisinin farmakolojik etkileri nikotine benzemektedir. Bu bileşik ilaç olarak kullanılmaz çünkü sarısalkım (*Laburnum*) meyvesi yiyen çocuklarda bazen zehirlenmelere neden olmuştur. Bu alkaloid zehirli bir alkaloidtir [25].



Şekil 2. 16. Sitisin bileşiği

2. 3. 6. 6. İzokinolin Alkaloidleri

İzokinolin, azotu β konumunda olan bir benzopiridindir. İzokinolin iskeleti çok sayıda alkaloidte mevcuttur (Şekil 2. 17).

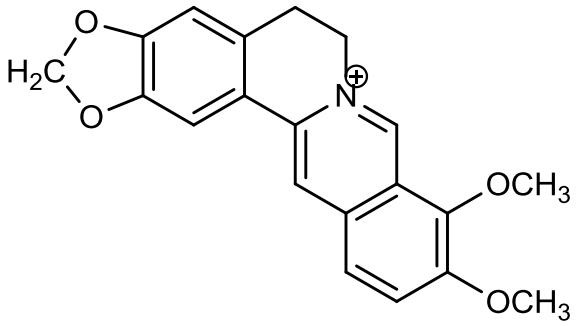


Şekil 2. 17. İzokinolinbileşiği

Tirozin aminoasiti izokinolin alkaloidlerinin biyosentetik öncüsüdür. Tetrahidroizokinolin alkaloidlerinin biyosentezi de tirozinden başlar ve bu alkaloidler indirgenmiş izokinolin iskeleti içerirler oysa bu gruptaki akaloidler daha karmaşık yapılara sahiptirler ve daha fazla halka içermektedirler [26].

2. 3. 6. 6. 1. Protoberberin Alkaloidler

Berberin (Şekil 2. 18) sarı bir alkaloidtir. *Berberidaceae* (*Berberis, Hydrastis*) ve *Ranunculaceae* (*Loptis, Thalictrum* ve diğer cinsler) gibi birkaç familyada bulunmaktadır. Berberin antiamoebik (*Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu bir bağırsak enfeksiyonu hastalığı), antibakteriyel ve antienflamatuar (iltihap sökücü) özelliklere sahiptir. Bu alkaloid ilaç olarak Asya'da yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Orada insanlar bunu genellikle ham bitki özü şeklinde kullanırlar. Japonya'da ise bu alkaloid *Coptis orientalis*'in hücre kültürlerinde üretilmektedir [27].



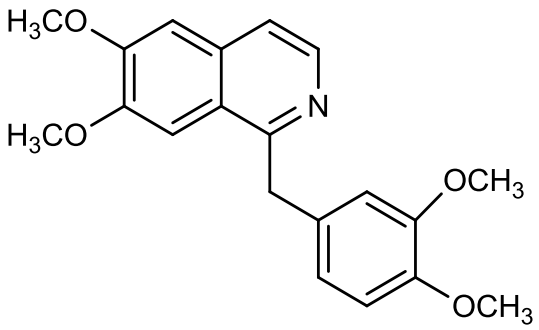
Şekil 2. 18. Berberin bileşiği

2. 3. 6. 6. 2. Benzilizokinolin Alkaloidler

İzokinolinde 1. karbona benzil grubunun bağlanmasıyla benzilizokinolin oluşur [26].

Opium alkaloidleri afyonun ham madde kaynağı olan haşhaş *(Papaver somniferum)*'dan izole edilirler. Çok sayıda alkaloid içermektedir. Bilinen opium alkaloidlerinden 4'ü tıbbi alanda kullanılmaktadır. Bunlar benzilizokinolinden türeyen papaverin, fenantrenden türeyen morfin ve kodein ve de ftalidizokinolinden türeyen noskapin (narkotin)'dir.

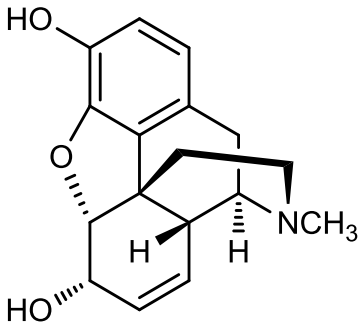
Papaverin (Şekil 2. 19) yapısal olarak basit afyon alkaloidlerinden biridir ve benzilizokinolin alkaloid grubuna girmektedir. Bu alkaloid haşhaştan elde edilmektedir. Haşhaşta bu alkaloid %1 oranında bulunmaktadır. Papaverin antispazmodik (spazm giderici) olarak tıpta kullanılmaktadır [25].



Şekil 2. 19. Papaverin bileşiği

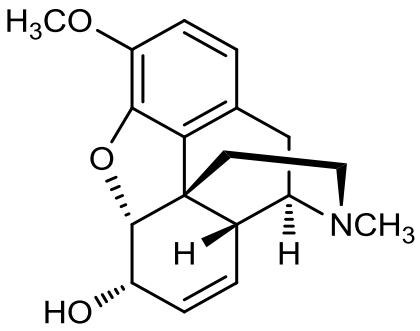
Morfin (Şekil 2. 20) yapısal açıdan bakıldığında, bir fenantren türevi olarak kabul edilebilir ancak biyosentez çalışmaları göstermiştir ki bu alkaloid tirozinden benzilizokinolin alkaloid olan retikulin yoluyla oluşmuştur. Morfin afyonun ana alkaloididir ve % 10-20 arasında miktar olarak bitkide bulunmaktadır. Fenolik karakteri sayesinde diğer alkaloidlerden nispeten daha kolay ayrılabilmektedir. Morfin çok etkili bir analjezik (ağrı kesici) olarak kullanılan ve bağımlılık yapma riski olduğu için büyük bir dikkatle alınması gereken bir alkaloidtir. Morfin bir narkotik olarak sınıflandırılabilir. Morfin, analjezik etkisine ek olarak aşırı mutluluğa neden olur ve

bağımlılık yapar. Tekrar kullanımda aynı etkiyi meydana getirmek için alım dozunun arttırılması gerekir ve hasta ilaç olmadan yapamaz hale gelir. İlaç alınmazsa vücut yoğun tepki verir. Kişi yaşamak için ne pahasına olursa olsun ilacı almak ister [28, 29].



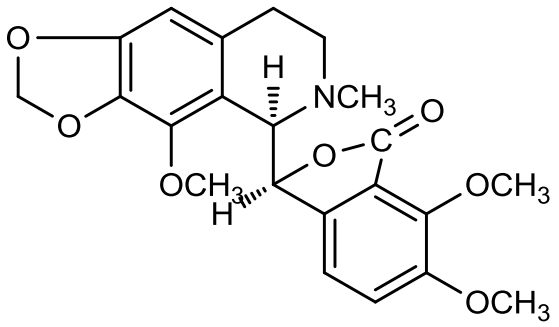
Şekil 2. 20. Morfin bileşiği

Kodein (Şekil 2. 21) afyonun başka bir bileşenidir ve % 0.8 – 2.5 oranında miktar olarak bulunmaktadır fakat kodein morfinin metilasyonu ile hazırlanmaktadır. Kodein aynı zamanda bir analjeziktir (ağrı kesici) ama morfinden çok daha zayıf etkisi vardır. Kodeinin analjezik etkisini arttırmak için asetil salisilik asit gibi diğer analjezik bileşikler kullanılır ve kodeinin büyük çoğunluğu bu amaç için kullanılır. Kodein aynı zamanda bir anti-tussif (öksürük ilacı)'dir. Bağımlılık riski morfinden çok daha azdır [25].



Şekil 2. 21. Kodein bileşiği

Noskapin (Şekil 2. 22) % 4 – 8 oranında afyon bitkisinde bulunmaktadır. Bu alkaloid öksürük refleksini durdurup, öksürüğü azaltmak için kullanılır. Noskapinin eforik (mutluluk verici) etkisi yoktur [25].



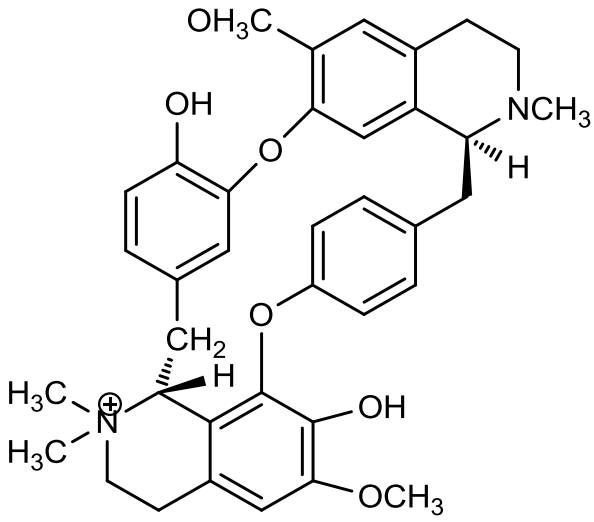
Şekil 2. 22. Noskapin bileşiği

2. 3. 6. 6. 3. Bisbenzilizokinolin Alkaloidler

Bu grup alkaloidlere çoğunlukla *Menispermaceae* familyasındaki bitkilerde rastlanmıştır. Benzilizokinolin oksidatif dimerizasyon ile oluşan bu grup alkaloidlerde bazen 1, bazen 2 ve bazen de 3 eter bağı bulunmaktadır. Alkaloidlerin bu sınıfının 270'den fazla üyesi bilinmektedir. Birçoğu kas gevşetici, antihipertansif ilaçlar, antimalaryaller (sıtma ilaçları), sitotoksin (hücre zehirleyici) gibi farmakolojik açıdan aktif maddelerdir. Yapısal değişimler fenil halkası üzerindeki substitüent değişimleri ile olur [18, 30].

Tubokürarin (Şekil 2. 23) bu alkaloid sınıfına girmektedir veilaç olarak kullanılan bir alkaloiddir. Bu alkaloid Güney Amerika'da yerliler tarafından ok zehiri olarak kullanılan kürardan izole edilebilir. Kürar % 2–7 oranında alkaloid içermektedir.

Tubokürarindeki isokinolin halka sistemindeki iki azot atomundan biri kuarternerdir. Bu alkaloid motor sinir hücresi uçlarındaki asetilkolin reseptörlerinin bloke edilmesi ile (anestetik madde ile sinirsel iletimin kesilmesi) kasların gevşemesine neden olur. Etkisi sınırlı bir süre içindir ve bu bileşik cerrahi operasyon sırasında kasların gevşemesi için kullanılmaktadır [30].



Şekil 2. 23. Tubokürarin bileşiği

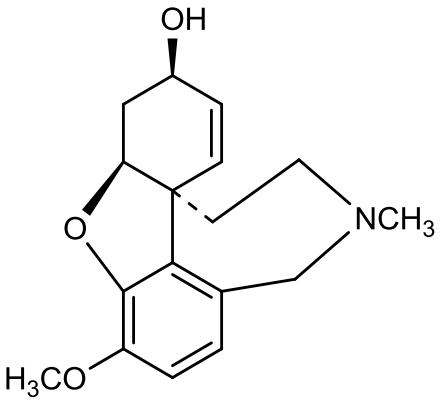
Kürar Güney Amerika'da yerlilerin kullandığı çoğu bitkisel ve bazen de hayvansal zehirleri içeren bir ekstredir. Yerliler tarafından ok zehiri olarak kullanılmaktadır. Bu drogun hazırlanmasında başlıca kullanılan bitkiler *Loganiaceae* ve *Menispermaceae*'dir. Yukarı Amazon (Brezilya ve Peru) bölgesinde elde edilen kürarlarda başlıca *Menispermaceae* bitkisi bulunur. Bu bitkilerden elde edilen başlıca alkaloid ise tübokürarindir.

Drogun elde edilmesi için bitkiler taze halde iken toplanır ve gövde kabukları, bazen de kök kabuğu soyulur, yılan, karınca gibi o bölgede yetişen zehirli bazı hayvanların zehirleri de buna ilave edilir ve soğuk su ile maserasyon (ıslatarak yumuşatma) yapılır. Bu maserat hafif ateşte yoğunlaştırılır ve böylece yumuşak ekstre hazırlanmış olur [18].

2. 3. 6. 7. Amaryllidaceae Alkaloidleri

Amaryllidaceae (Nergisgiller) familyasına ait bitkilerde bulunan alkaloidler bu sınıfa girer. Birçoğu nergis ve kardelen türevi süs bitkileridir. Yüzden fazla alkaloid bu familyadan izole edilmiştir. Bu alkaloidler toksik özellik gösterirler. Yalnızca galantaminin ilaç özelliği keşfedilmiştir. Galantamin ilk olarak kardelen çiçeğinin (*Galanthus nivalis*) soğanından izole edilmiş ve *Amaryllidaceae* familyasının cinsine ait bir alkaloidtir. Galantamin *Leucojum astevium* bitkisinin çiçek ekstresinde % 2 oranında bulunur. *Calendula arvensis* (Nergis bitkisi) galantaminin ticari kaynağıdır. 1997 yılında % 18 verimle sentezlenerek patenti alınmıştır fakat sentetik olarak üretimi henüz gerçekleşmemiştir [31].

Galantamin (Şekil 2. 24) Alzheimer hastalığında kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Alzheimer yaşa bağlı hafıza kaybı, anlama yargılama yeteneğinin bozulması dâhil birden çok bilişsel davranış bozukluğuna neden olan nörodejeneratif bir hastalıktır. Hafıza kaybının nedeninin beynin korteks ve hippokampus bölgesinde yer alan kolinerjik nöronlarla alakalı olduğu bilinmektedir. Kolinerjik transferin bozulması asetilkolin miktarının ve dolayısıyla nörotransmitterlerin eksikliği ile sonuçlanmaktadır. Alzheimer hastaları üzerine yapılan mevcut çalışmalarda sadece AChE inhibitörleri gelişme göstermiştir. Galantamin tersinir yarışlı asetilkolinesteraz inhibitörüdür ve potansiyel olarak iki hareket mekanizması vasıtası ile beyinde kolinerjik fonksiyonu geliştirir. İlki enzimi inhibe ederek olur, ikincisi ise asetilkolin reseptörlerini etkileyerek gerçekleşir. Doğu Avrupa'da galantamin anestezik uygulamalarda hastayı ayıltmak için kullanılır çünkü tubokarinin anestezik etkisini nötralize etmektedir. Ayrıca galantaminin hafif derecede güçlendirici ve morfin gibi analjezik etkisi olduğu görülmüştür. Göz ameliyatlarında göz içindeki basıncı düşürdüğü bilinmektedir [32].

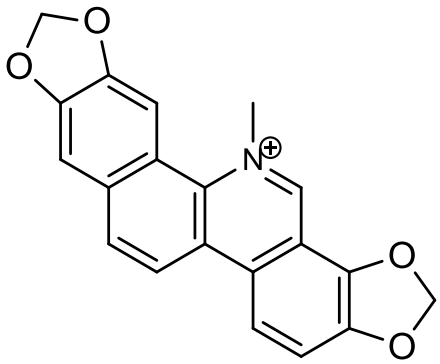


Galantamin

Şekil 2. 24. Galantamin bileşiği

2. 3. 6. 8. Benzofenantridin Alkaloidleri

Sanguinarin antibakterial özellikte bir alkaloidtir (Şekil 2. 25). Diş macununda ve diğer oral hijyen ürünlerinde plak oluşumunu önlemek için kullanılmaktadır. Sanguinarin haşhaş, gelincik, Kaliforniya haşhaşından elde edilmektedir.



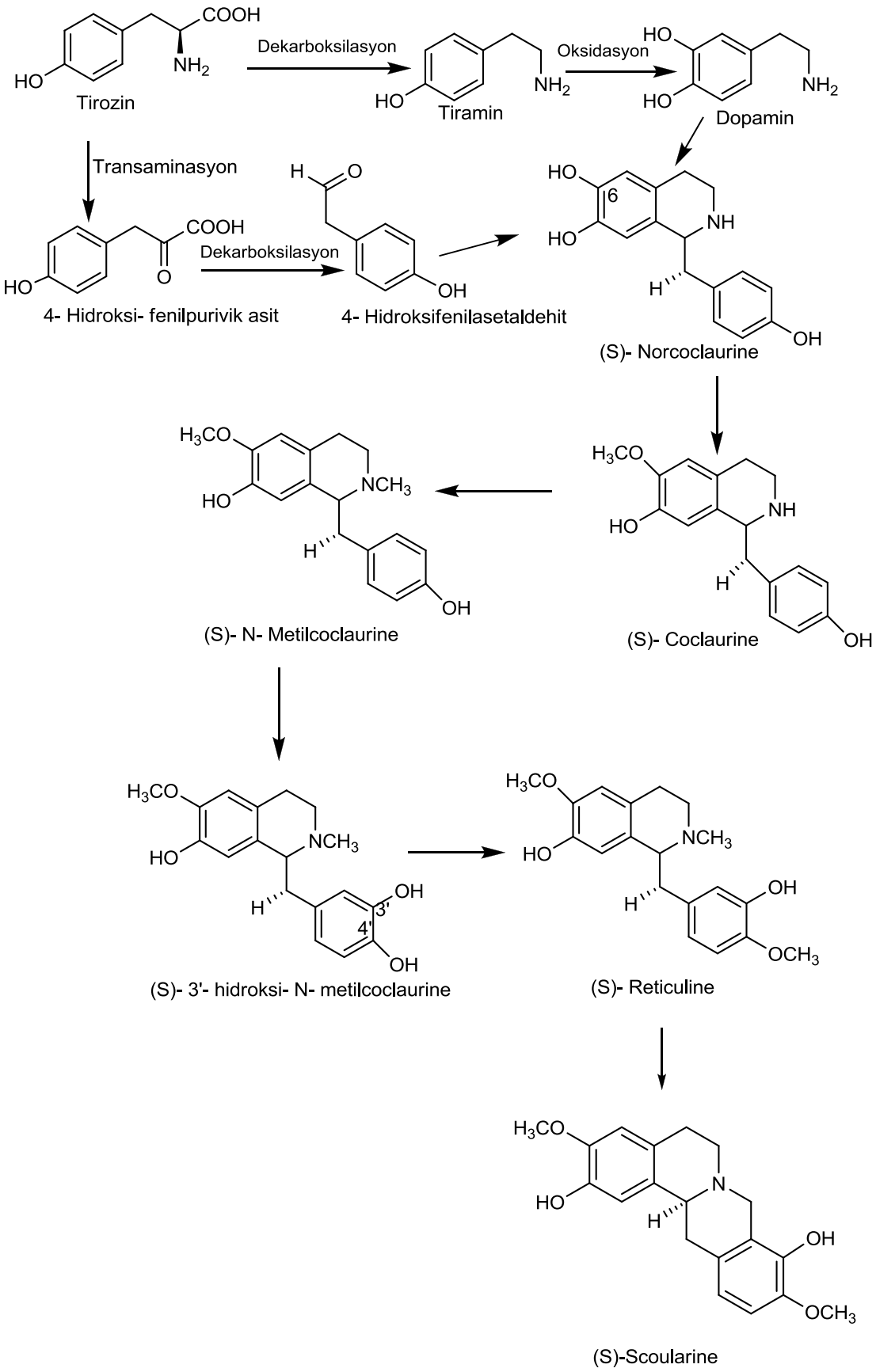
Şekil 2. 25. Sanguinarin bileşiği

2. 3. 6. 8. 1. Sanguinarin Biyosentezi

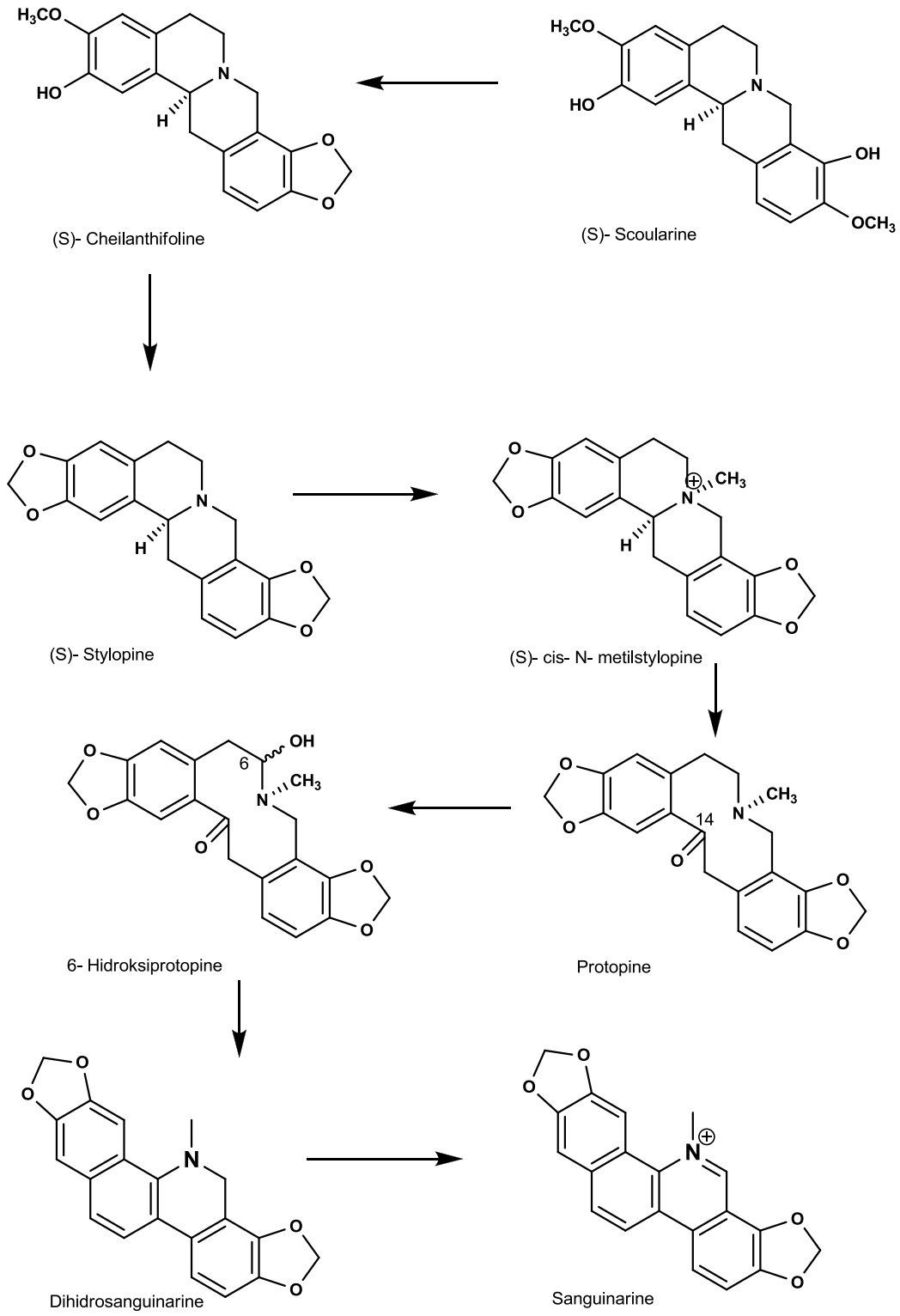
Sanguarin biyosentezi tirozin ile başlar ve ilk 10 adımı (S)-scoulerine'in oluşumu ile sonuçlanan berberinin biyosentezi ile aynıdır.

Bir tirozin molekülünden dopamin oluşumu iki enzim (tirozin dekaeboksilaz ve fenolaz) sayesinde gerçekleşir. L-tirozin transaminaz enzimi α-ketoglutarik asit ve ikinci bir tirozin molekülü arasındaki reaksiyonu katalizler ve olan 4-hidroksifenilpurivik asit oluşur. Bu asit ise 4-hidroksifenilpiruvat dekarboksilaz tarafından dekarboksillenerek 4-hidroksifenil asetaldehit oluşur. (S)-norcoclaurine sentaz, dopamin ve 4-hidroksifenil asetaldehitin stereo seçici kondenzasyonunu katalizler ve (S)-norcoclaurine oluşur. Norcoclaurine bileşiğinin 6-OH kısmı (R,S)-norcoclaurine-6-O-metiltransferaz (=6-OMT) enzimi tarafından katalizlenerek (S)-coclaurine bileşiği oluşur. Coclaurinenin N-metilasyonu, (S)-coclaurine-N-metiltransferaz aracılığıyla (S)-N-metilcoclaurine bileşiğini oluşturur. Daha sonra bu yapı da fenolaz tarafından oksitlenerek (S)-3'-hidroksi-N-metilcoclaurine oluşur. Bu bileşiğin 4 numaralı karbonundaki OH'ın (S)-3'-hidroksi-N-metil-(S)- coclaurine- 4'- O-metiltransferaz (= 4'-OMT) tarafından katalizlenen metilasyonu (S)-(+)- reticuline bileşiğini verir. Bu alkaloid diğer bensilisokinolin alkaloidlerinin de biyosentezinde anahtar bir bileşiktir [33]. Berberine köprü enzimi metil grubunun oksidatif halka oluşumunu katalizler ve bunun sonucunda (S)-scoulerine oluşur [34]. (S)-scoulerine yüksek derecedeki substrat-spesifik ve stereoseçici enzim kompleksleri içeren sitokrom P450 tarafından katalizlenen iki reaksiyonda (S)-stylopine'e dönüşür. Bu reaksiyonlar moleküler oksijen ve NADPH'ın varlığında gerçekleşirler. Bir N-metiltransferaz enzimi S- adenosilmetionin'den (S)-stylopinin azotuna bir metil grubunu transfer etmesi ile (S)- cis-N-metilstylopine oluşumu gerçekleşir. Bu enzim yüksek stereoseçici özelliktedir ve sadece (S)- konfigürasyonu verecek şekilde tetrahidroberberine alkaloidlerini metiller. (S)- scoulerine bu enzim tarafından metillenemezken (S)-stylopine bir substrat olarak iyi bir aktivite gösterir. Bir sonraki adımda NADPH ve O_2'ye bağımlı enzim kompleksi içeren mikrozomal sitokrom P450, 14. karbonu stereo ve bölge seçicilik olarak hidroksiller ve böylelikle ardından bağın pozitif yüklü azot atomuna doğru kırılması ile protopin oluşur. Protopinin 6. karbonu O_2 ve NADPH monooksijenaz tarafından hidroksillenir 6-hidroksiprotopini verir. Bu bileşik kendi

içinde yeniden düzenlemeye uğrayarak dihidrosanguinarine oluşur (Şekil 2. 26). Tirozinden sanguinarine kadar tüm biyosentez yolu karakterize edilmiş 16 enzim içermektedir [35].



Şekil 2. 26. Sanguinarin alkaloidinin biyosentezi



Şekil 2. 26. Sanguinarin alkaloidinin biyosentezi (devam)

2. 3. 6. 9. Terpenoid tetrahidroizokinolin Alkaloidleri

Bu alkaloidler *Rubiaceae* (kökboyası) familyasının *Cephaelis* cinsi bitkisinde rastlanan alkaloidlerdir. Terpenoid kısmı iki tetrahidroizokinolin halkasını birleştiren kısımdır. Emetin, sefalin *Cephaelis ipecacuanha* ve *C. acuminata* bitkilerinden elde edilmektedir. Emetin amiplerin neden olduğu dizanterinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalığın nedeni tropikal bölgede yaşayan *Entamoeba histoliytica* isimli tek hücrelidir. Emetin ciddi yan etkilerinden dolayı günümüzde az kullanılmaktadır. Emetin ve sefalin kusturucu ilaçlardır. *C. ipecacuanha* bitkisi Brezilyanın Mato Grosso eyaletinde yetişir. Kökleri yağmurlu günler hariç tüm yıl boyunca toplanır. Ancak en iyi ilaç bitkinin 3-4 yaşındaki halinden elde edilmektedir. *C. ipecacuanha*'nın Hindistan'daki çeşidi *Rio ipecacuanha* adını alır, Kuzey Kolombiya, Nikaragu ve Panama'da yetişeni *Cartagena ipecacuanha* adını almaktadır. *Rio ipecacuanha* % 2 oranında alkaloid içerir ve emetinin, sefaline oranı 2:1 dir. *Cartagena ipecacuanha* % 2-2,5 oranında alkaloid içerir ve emetinin sefaline oranı 1:2 dir. *C. ipecacuanha* ise emetinin ekstraksiyonu için kullanılır [36].

2. 3. 6. 10. İndol Alkaloidler

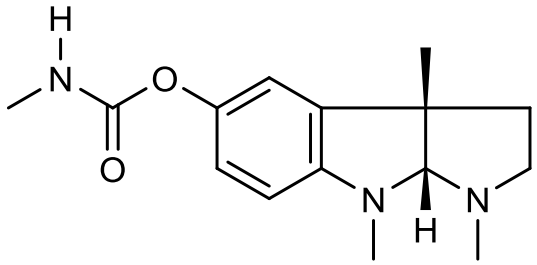
İndol iskeleti taşıyan alkaloidler bu sınıfa girerler. Triptofan türevi bileşiklerdir, triptofan dışında kalan 5 karbonlu ya da 9 karbonlu kısımların biyosentezi ise mevalonik asit aracılığı ile olmaktadır [37].

2. 3. 6. 10. 1. Basit indol Alkaloidler

Psilobisin ve psilosin alkaloidleri bunlara örnektir ve *Psilocybe* türü halusinojen mantardan izole edilmişleridir. Orta Amerika'da yaşayan yerliler çok eskiden beri dini inançlarını kültür ve geleneklerini sürdürmüşlerdir. Yerliler mantarı dinsel törenlerde Tanrılar ile iletişim kurmak amacıyla ayrıca çeşitli hastalıkların tedavisinde ve alkol zehirlenmelerinde kullanmaktadırlar. 3000 yıllık geçmişi olan Guatemala'daki halusinojenik mantarın dinsel törenlerde büyük rolü olduğu kesinleşmiştir. Bu mantara taş mantar denir ve zehirli, şapkalı mantarlardır. Üzerlerinde oyulmuş tanrı ya da iblise benzer figürler yer almaktadır. Meksika'nın güneyindeki bazı eldeğmemiş bölgelerde halen yerlilerin büyü ayinlerinde *Psilocybe* mantarı kullanılmaktadır.

Psilosibin ve psilosinin farmokolojik etkilerinin benzer olduğu ancak kimyasal olarak psilobisinin daha kararlı olduğu görülmüştür. Bu alkaloidler ilaç olarak kullanılmamaktadır. Ancak LSD (Liserjik asit dietilamit) de olduğu gibi psilosibin psikiyatride terapötik olarak test edilmiş vebazı model ruh hastalıklarında araştırma amaçlı incelenmiştir [36].

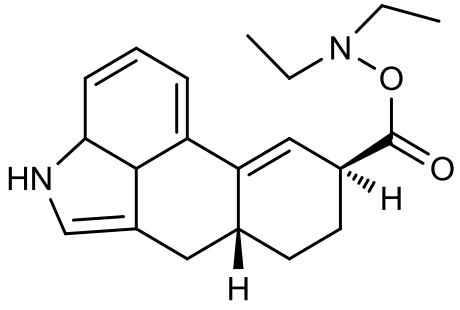
Fizostigmin (Şekil 2. 27) kalaba fasulyesi denilen *Physostigma venenosum*'dan elde edilir, kararsızdır, ışıksız ve hava geçirmeyen ortamda saklanmalıdır. Tersinir AChE inhibitörüdür, glukom hastalığında ortaya çıkan ağız kuruluğunu giderici olarak pilokarpin adı altında kullanılmaktadır. Hiyosiyamin, atropin ve skopolamin gibi antikolinerjik zehirlere karşı panzehir olarak kullanılır. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılır ancak başarı sınırlıdır [36].



Şekil 2. 27. Fizostigmin bileşiğ

2. 3. 6. 10. 2. Terpenoid indol Alkaloidleri

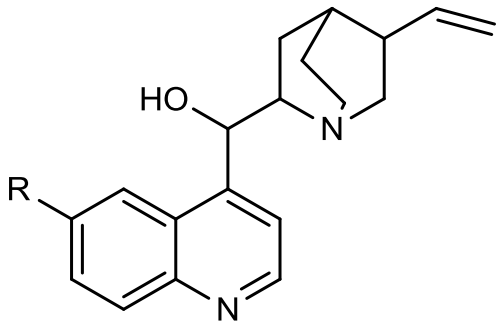
Ergot alkaloidleri *Claviceps purpurea* (çavdarmahmuzu) adındaki mantardan izole edilen indol türevi D-liserjik asitin amidleri olan alkaloidlerdir. Bu asit kolayca D-isoliserjik aside dönüşür bu yüzden mantar D-liserjik asit ve D-isoliserjik asitten türeyen iki grup alkaloid içerir. Liserjik asit alkaloidleri *Claviseps* cinsi mantardan ve *Araliaceae* (Sarmaşıkgiller) familyasının üyelerinden örneğin; çan çiçeği denen *İpomoea violacea*'dan ve yılbaşı sarmaşığı olarak bilinen *Rivea corymbosa'*dan izole edilir. Bu tür bitkilerin tohumları liserjik asit amid (ergine) içerdiklerinden LSD (Şekil 2. 28) gibi uyuşturucu olarak kötüye kullanılmaktadır. Ancak LSD ye göre etkisi azdır. Ergotamin, ergokristin, α ve β-ergokriptin ve ergokornin alkaloidleri amino asit içeren halkalı tripeptitlerdir [38].



Şekil 2. 28. Liserjik asit dietilamit (LSD) bileşiği

2. 3. 6. 11. Kinolin Alkaloidleri

Kınakına ağacından elde edilen alkaloidlerdir. Kinidin ve kinin alkaloidleri merkezde kinolin halkası bulundurmaktadır. Monoterpenoid iskeleti ve triptofan aminoasitinden üretilen alkaloidlerdir. Kınakına ağacının kabukları yaklaşık 25 alkaloid içerir. Bunlar kinin ve kinidinin stereoizomerleridir. Diğer iki stereoizomer sinkonin ve sinkonidindir. Yapısına bakıldığında merkezde kinolin vardır, kinin ve kinidinden farklı olarak 6. karbonda bir metoksi grubu eksiktir. Kinin ve kinidin ile sinkonin ve sinkonidinin farkı ise OH grubunun stereoizomerik olarak farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2. 29). Kinin sıtma tedavisinde kullanılır, kinidin de sıtmaya karşı aktiftir ancak daha çok kalpteki ritim bozukluğunda tedavi amaçlı kullanılır [39].



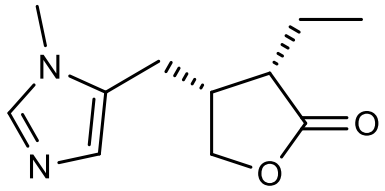
R: OCH_3 kinin ve kinidin
R: H sinokinin ve sinokinidin bileşikler

Şekil 2. 29. Kinolin alkaloidlerine örnekler

2. 3. 6. 12. İmidazol Alkaloidler

Pilokarpin *Pilokarpus* türünün yapraklarında bulunmaktadır (Şekil 2. 30). Kolinerjik bir madde olup hidrokülorür yada nitrat halinde glokom hastalığı tedavisinde göz damlası olarak kullanılmaktadır. Pilokarpinin biyosentezi bilinmemektedir ancak imidazol kısmının histidin aminoasidinden elde edilmiş olma olasılığı vardır. Jaborandi *Pilokarpus* türlerinin genel adıdır. Bu bitkinin ağaçları Orta ve Güney Amerika'da ve Batı Hindistan'da doğal olarak yetişmektedir. Pilokarpinin elde edildiği en önemli tür olan *P. microphyllus* Brezilya'da yetişmektedir ve "Maranham jaborandi" adı altında

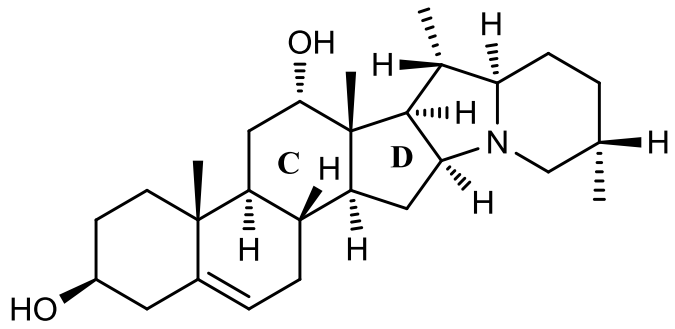
ilaç olarak satılmaktadır. İlaç % 0.7- 0.8 oranında pilokarpin içerir, pilokarpin kaynağı olarak kullanılır. Jaborandinin diğer çeşitleri daha büyük yapraklıdır ve piyasada mevcuttur. Fakat diğer ilaca göre daha az miktara, % 0.5-0.7 oranında alkaloid içerir [39].



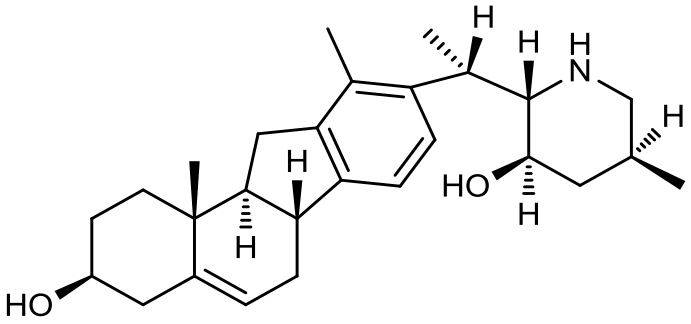
Şekil 2. 30. Pilokarpin bileşiği

2. 3. 6. 13. Steroidal Alkaloidler

Veratrum alkaloidleri *Veratrum album* ve *Veratrum viride* bitkilerinden elde edilen alkaloidlerdir. Bazılarında normal steroid iskeleti vardır bazıları da modifiye olmuş C ya da D halkası ile farklı bir steroid iskeletine sahiptirler. Rubiverjin normal steroid iskeletine sahip alkaloidlerden biridir. Veratramin ise steroid iskeleti değişime uğramış alkaoidlere örnek verilebilir (Şekil 2. 31) [39].



A



B

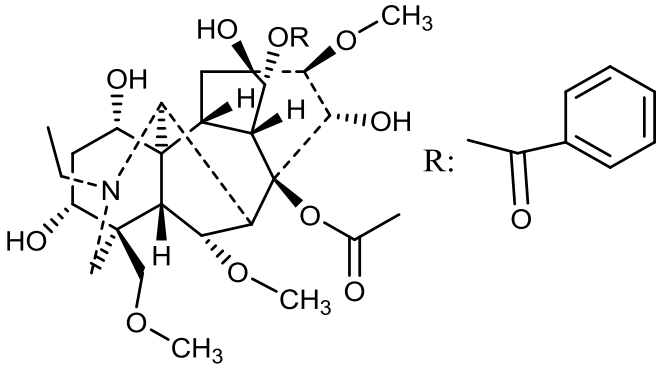
Şekil 2. 31. Rubijervin (A) ve veratramin (B) bileşikleri

2. 3. 6. 14. Aconitum Alkaloidleri

Aconitum alkaloidleri *Aconitum*, *Delphinium*, *Garrya* ve *Inula* türlerinde bulunan diterpen yapısındaki alkaloidlerdir [39].

Akonitin bu alkaloid sınıfına ait alkaloidler arasında tıbbi açıdan ilginç olan tek alkaloidtir (Şekil 2. 32). Akonitin alkamin aconine bileşiğinin asetik ve benzoik asit ile esterleştiği bir ester alkaloididir ve oldukça toksik özelliktedir. Bir insan için ölümcül dozu 3-6 mg'dır. Etkisi merkezi ve çevresel sinir sisteminedir. Önce uyarıcı etkisi vardır sonra felç eder. Bu etkisi yüzünden bitkinin kökleri, yüzde anlık, bıçak saplanır gibi

ağrılara neden olan trigeminal nevralji hastalığının tevdisinde harici ağrı kesici merhem olarak kullanılmaktadır [39].



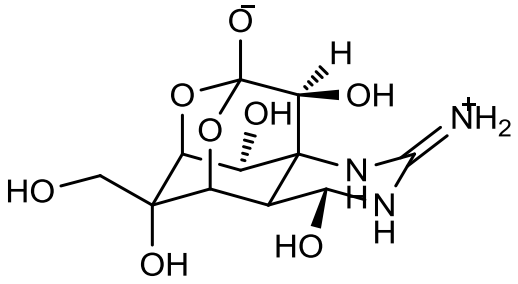
Şekil 2. 32. Akonitin bileşiği

Aconite kökü Türkçesi bıldırcın otu köküdür. 0.5-2 metre boyundadır. Avrupa'da dağlık bölgelerde yetişir. Bahçede süs bitkisi olarak kullanılır. % 0.5-1.5 oranında alkaloid içerir.

2. 3. 6. 15. Guanidinyum Alkaloidleri

Bu alkaloidler yapılarında protone olmuş bir guanidin kısmı bulundururlar.

Tetradotoksin (Şekil 2. 33) ilk kez Japon kirpi balığı *Takifugu'*dan izole edilmiştir. Hayvanın karaciğerinde, yumurtalık veya testisinde oluşur. Bu organlar balık tüketilmeden önce dikkatlice çıkarılmalıdır. Ancak bu balık türünün tüketimi ciddi bir tehlike oluşturur, zehirlenmeyle birlikte çoğunlukla ölümlere yol açmaktadır. Tetradotoksinin aynı zamanda yengeç, amfibian, salamander, kurbağa gibi diğer birçok deniz canlısında da bulunur. Tetradotoksinin biyosentezi bilinmemektedir. Ancak arginin aminoasidinin öncü molekül olduğu ve isopentil difosfat yolu ile oluştuğu tahmin edilmektedir [39].



Şekil 2. 33. Tetradotoksin bileşiği

2. 4. Ayırma ve Saflaştırma Metodları

Üzerinde çalışılacak molekül grubunu diğer moleküllerden ayırıp saf şekilde elde etmeye yönelik bir seri işlem uygulanır. Bu işlemler, karışımdaki molekül gruplarının genellikle çözünme özelliklerine, yoğunluk, elektriksel yük gibi fiziksel karakteristiklerine veya diğer moleküllere ilgisine göre birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan yöntemleri kapsar.

Bitki kimyası çalışmalarında izlenen yöntem aşağıdaki gibi özetlenebilir:

— Bitkilerin çiçeklenme döneminde toplanması ve teşhisi.

— Bitkilerin gölgede kurutulması ve toz edilmesi.

— Bitkilerin uygun çözücülerle ekstraksiyonu.

—Hazırlanan ekstrelerden çeşitli kromotografik (kolon, ince tabaka vepreperatif ince tabaka) yöntemlerle kimyasal organik maddelerin izolasyonu.

— Elde edilen maddelerin çeşitli spektroskopik yöntemlerle (IR,^{1}H-NMR,^{13}C-NMR, MS) yapılarının tayini.

— Gerek bitki ekstrelerinin gerekse ekstrelerden elde edilen saf maddelerin aktivite (antibakteriyel, antiviral, antifungal, sitotoksik, anti tümör v.b.) tayini.

2. 4. 1. Ekstraksiyon Teknikleri

Bitki örneklerinden bileşiklerin izolasyonu çoğunlukla seçici ekstraksiyon yöntemiyle yapılır. Bu yöntemle bileşikler bitki örneğinden farklı çözücülerle, polaritenin artış sırası ile ardarda ekstraksiyon yapılarak izolasyon gerçekleştirilir. Böyle bir ekstraksiyon yapılırken, bitki örneğini lipofil karakterli bileşiklerden (klorofil, karotenoidler, steroller, yağlar, vakslar vb.) arıtmak için önce petrol eteri veya hekzanla işlem yapılması gerekir. Daha sonra bitki kalıntısı artan polaritede çözücülerle; dietil eter, etil asetat, etanol veya metanol ve bunların farklı konsantrasyonlarla sulu çözeltileri ile ardarda ekstre edilir.

Başka bir yöntem ise şöyle açıklanabilir**:** Bitki örneği önce apolar çözücü ile muamele edilerek lipofil bileşiklerden arındırılır. Sonra ise düşük molekül ağırlıklı alkolle (metanol veya etanol) veya bunların sulu çözeltileriyle birkaç kez ekstre edilir [40].

Elde edilen ekstrelerin ön saflaştırılması, bileşiklerin birbirinden ayrılması ve bileşiklerin belli miktarda saf halde elde edilmesi için, perperatif kağıt, ince tabaka, kolon kromatografisi ve HPLC kullanılır.

2. 4. 2. Alkaloidlerin Belirlenmesi ve İzolasyonu

Çoğu alkaloid bitkilerde tuz formunda bulunurlar. Su ya da sulu etanol içerisinde nispeten çözünse de kloroform, toluen, eter gibi organik çözücüler içerisinde çözünmezler. Ancak baz formunda çözünürlüğü tam tersidir. Alkaloid bazları suda çözünmez, etanolde kısmen çözünürler, organik çözücülerde ise kolaylıkla çözünürler. Çözünürlükteki bu fark bitkilerde alkaloidlerin tespiti ve izolasyonu için kullanılmaktadır. Bitkide alkaloid varlığını belirlemek için yapılan testte bitkinin su ya da etanol ekstresine amonyak veya NaOH gibi bir baz ilave ederek kloroform gibi su ile karışmayan bir çözücü ile ekstrakte edilmektedir. Evoporatör yardımıyla çözücü uzaklaştırıldıktan sonra kalan tortu seyreltik asit ile çözülerek birkaç damla Mayer’s reaktifi ilave edilir bu işlem sonunda çökelme gözlenmesi alkaloidlerin varlığını gösterir. Organik ekstreden TLC üzerine bir noktaya ekilerek uygun çözücü karışımı ile

yürütülür ve Dragendroff's reaktifi ile boyanarak kurutulur. Alkaloidler TLC tabakası üzerinde turuncu spotlar olarak gözlenmektedir. Kafein gibi pürin bazlarında alkaloid çökeltme reaktifleri tarafından çökelme olmaz. Bu tür alkaloidler mureksid testi ile tespit edilir. Az miktarda potasyum klorat ve bir damla hidroklorik asit ilave edilerek baz ile karıştırılır oluşan karışımın çözücüsü kuruyana dek evoperatörde uçurulur. Oluşan tortu amonyak buharına maruz bırakılır ve mor bir renk verir.

Yapısında kuarterner azot bulunduran alkaloidler genellikle bazik pH değerine sahip sulu çözeltiden bile organik bir çözücü ile ekstrakte edilemez. Bu gibi alkaloidler yukarıdaki yönteme göre tespit edilemezler ancak doğrudan sulu ya da etanolik ekstre Mayers' reaktifi ya da amonyum reinecke tuzu ile çökelir. Ancak ekstrakt aynı zamanda çökelti verecek bir protein içeriyorsa yanlış sonuçlar elde edilebileceği dikkate alınmalıdır. Proteinleri ortadan kaldırmak için önceden denaturasyon sıcaklığını test etmek gerekir. Kolin içeren pek çok bitki ekstresi de bu reaktifler ile çökebilmektedir.

Alkaloidler bitkiden izole edilen doğal ürünlerdir ve diğer gruplara göre elde edilmesi nispeten daha kolay olduğu için üzerinde daha fazla çalışılmaktadır. Alkaloidlerin izolasyonu içeriğinin saptanması için yukarıda tarif edildiği gibi aynı prensibe göre gerçekleşir: Toz haline getirilmiş bitki materyali su ile nemlendirilir ve kalsiyum hidroksit ile karıştırılır ve alkaloid tuzları oluşur sonra tuzlar serbest bazlara dönüştürülür. Alkaloidler organik çözücü ile karışımdan ekstrakte edildikten sonra, elde edilen saf haldeki ekstre seyreltik asit ile asitlendirilerek alkaloidler tuzları haline getirilir. Bir sonraki aşamada aynı işlem tekrarlanarak sulu faza daha fazla alkaloid geçmesi sağlanır ve tekrar organik çözücü ile ekstraksiyon yapılır. Evoperatör yardımı ile çözücü uçurulur. Bu metodta alkaloidlerin serbest bazlara dönüştürülmesi için amonyak ya da sodyum karbonat kullanılır. Kullanılacak organik çözücünün seçimini etkileyen çeşitli faktörler vardır. Alkaloidler için en iyi çözücüler; kloroform, eter, etilasetat, benzen, toluen, petrol eteridir. Kloroform çoğu alkaloid bileşiği için mükemmel bir çözücüdür fakat istenmeyen maddeleri çözer ve diğer çözücülere göre daha pahalıdır. Bu yüzden ekstraksiyon işlemi sırasında çok az tercih edilir. Sonraki aşamada alkaloid tuzları baz ile sulu faza geçerler ayrıca bu aşamada alkaloidlerin büyük bir kısmı ve alkaloide benzer maddeler sulu faza geçer. Bu metod ile alkaloidlerin büyük bir kısmı az miktarda çözücü kullanılarak elde edilmiş olur. Bir sonraki basamakta alkaloid ekstresi bileşenlerine ayrılır. Bu işlem oldukça zordur çünkü

karışım oldukça kompleks bir yapıdadır. Endüstriyel ölçekli çalışıldığında alkaloidlerin bazları ya da tuzları ham ekstreden fraksiyonlar halinde izole edilebilmektedir. Bu sırada kromotografik ayırma metodlarına başvurmak gerekir. Kuarterner azot içeren alkaloidlerin dışında fenolik, N-oksit alkaloidler bu yöntem ile izole edilemezler. Fenolik alkaloidler yüksek pH değerine sahiptir ve fenolatlara dönüştürülürler. Organik çözücü ile ekstrakte edilemezler. Güçlü bazların ilavesi ile tuzları elde edilir. Fenolatların yapılarının bozulmaması için ekstraksiyondan önce pH değerinin azaltılması gerekir. N-oksit alkaloidler benzerlerine göre daha polardır, organik çözücü ile ekstraksiyonu oldukça zordur. Etil asetat ya da kloroformla ekstrakte edilirler fakat dietileter gibi daha az polar çözücü ile edilemezler [41].

2. 4. 3. Kromatografik Analiz Yöntemleri

2. 4. 3. 1. Kağıt Kromatografisi

Kromatografik incelemelerde kullanılan kağıt türünün özelliğinin büyük önemi vardır. Bu nedenle kağıt kromatografisi tekniğinde özel saflığa sahip, selüloz filtre kağıdı kullanılır.

Yüksek kaliteli kromatografik kağıt türlerinden biri Whatman No:4'dür. Bu kağıt türü saflığına ve ayırma yeteneğine göre Whatman No:1'e yakındır. Ancak Whatman No:1'e göre yoğunluğu fazladır ve bu nedenle yüzeyine daha fazla miktar karışım uygulanabilir. Aynı zamanda bu kağıt türünde ayrılma diğer türlere göre daha çabuk ve etkili olur.

Kağıt kromatografisi ile analizlenen karışımın bileşenlerine ayrılmasına etki eden faktörlerden birisi de çözücü sisteminin özellikleridir.

Renkli bileşikler kağıt kromatografisi ile karışımdan ayrıldıktan sonra, kromatogramda belirgin lekeler halinde görünürler. Renksiz bileşiklerin çoğu kromatogramda floresans yapar veya floresansı bastırırlar. Bileşenler bahsedilen yöntemlerle teşhis edilemezse, bu bileşiklerle renkli kompleks oluşturan reaktifler kağıda püskürtülür veya kağıt reaktif çözeltisine daldırılır. Kromatogram kurutularak lekeler açığa çıkartılır.

Kromatograma önce UV ışığında ve sonra NH_3 buharları ile muamele edildikten sonra tekrar UV ışığında bakılması lekelerin yerlerinin belirlenmesini sağlar. Alkaloidlarin çoğunluğu UV ışığın etkisinde floresans yapar veya floresansı absorblarlar. UV ışığında alkaloid lekeleri mor renkte görünür, kromatogram NH_3 buharlarına tutulduktan sonra turuncu renge dönüşürler.

2. 4. 3. 2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi, yapılış tekniğine göre kağıt kromatografisine benzer. Bu kromatografi türünde sabit faz olarak silikajel (SiO_2), alüminyumoksit (Al_2O_3), toz selüloz gibi maddeler kullanılır. Burada etkin mekanizma adsorbsiyondur. TLC de özel olarak hazırlanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Bu levhaların üzeri silikajel, alümina gibi bir adsorbanla kaplanır. Bu plakalar hazır olarak satılabildiği gibi laboratuarda da hazırlanabilir. Cam levhaların boyutları 5x20 cm ile 20x20 cm arasında değişir. Adsorblayıcı tabakanın kalınlığı yapılacak analizin cinsine göre değişir, bu kalınlık 0.25-2 mm arasındadır. Plakalar kullanılmadan önce 120^oC'deki etüvde 2 saat kurutularak aktifleştirilir ve hemen kullanılır.

Örneklerin plakalara uygulanması ve geliştirme kağıt kromatografisinde olduğu gibidir. İnce tabaka kromatografisinde geliştirme aşağıdan yukarıya doğru yapılır. Plakanın tanka yerleştirilmesinden önce tank atmosferinin çözücü buharıyla doymuş olmasına dikkat edilir. Ayrılan maddelerin lekelerinin belirlenmesi ve kullanılan reaktifler kağıt kromatografisinde olduğu gibidir.

2. 4. 3. 3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Silikajel kaplı alüminyum plaklar miktarı az olan fraksiyonları ayırmak için kullanır. Karışım halde bulunan fraksiyonlar miktarlarına göre (1 plağa ortalama 15-20 mg) plaklara tatbik edilirler veuygun çözücü sistemleri ile bileşenlerine ayrılırlar. Her farklı fraksiyon için gerektiğinde farklı denemeler yapılarak her birinin en iyi ayrıldığı sistem bulunur. UV (254 nm) ışık altında maddelere ait bantlar işaretlenir ve kazınarak

erlenlere aktarılır. Uygun çözücü ile erlende 15–30 dakika bekletilen maddeler süzülerek alınır ve çözücüleri uçurularak saflaştırılırlar.

2. 4. 3. 4. Kolon Kromatografisi

Bitkilerden elde edilen ekstrelerin ön saflaştırılması, bileşenlerin birbirinden ayrılması ve aynı zamanda bileşiklerin mg miktarlarda saf halde elde edilmesi için kolon kromatografisi kullanılır. Kolon kromatografisinde, selüloz, iyon değiştirici reçineler, silikajel, poliamid ve sefadeks gibi adsorbanlar kullanılır. Kolon kromatografisinde kullanılan bazı adsorbanların özellikleri aşağıda verilmiştir.

Silika jel: Başlıca katı dolgu maddeleri (hareketsiz faz) silika jeldir. Genellikle nötür ve asidik yapıdaki bileşikler için uygundur. Kolon kromatografisi için en sık kullanılan dolgu maddelerinden biri silika jeldir. Silika jel polar dolgu maddesidir ve polar olmayan bileşenlerin öncelikle kolondan ayrılmalarını sağlar. Silika jel, çeşitli polaritelere sahip maddelerin ayrılmasını sağlar. Ayrıca diğer dolgu maddelerine göre kimyasal reaksiyon verme olasılığı daha azdır. Silika jel ile genel olarak alkol, keton, ester, azo bileşikleri, aminler, karboksilli asitler ayrılabilir. Düşük polariteye sahip çözücülerin kullanılması tavsiye edilir. En yaygın olarak kullanılan silika jel adsorban Kieselgel 60, 70-230 mesh (Merck) tir [42].

Selüloz: Selüloz kolonda solvent kullanımına bağlı olarak adsorbsiyon ve partisyon kromatografisi uygulanabilir. Selüloz kolonun sınırlı ayırma kapasitesini arttırmak için silika jel-selüloz (1**:**1; w/w) karışımı kullanılabilir [43]. Selüloz kolondan elüsyon kağıt kromatografisinde uygulanan çözelti sistemleri ile yürütülebilir. Ya da farklı oranlarda metanol ve su içeren çözücü sistemleri kullanılır. Selüloz adsorbanların en yaygın olanları mikrokristal selüloz (Merck, Macheray ve Nagel) ve Whatman CF-11' dir.

Poliamid: Poliamid kolonlar ise fenolik alkaloidlerin diğer bitki metabolitlerinden ayrılmasında kullanılan diğer bir seçenektir. Polikaprolaktam, polihekzametilen diamidoadipinat, polivinilpirolidon gibi poliamid reçineler kullanılır. Poliamid adsorbanların diğer adsorbanlar karşısındaki bazı üstünlükleri yüksek adsorban yeteneği ve elüsyonda basit çözücü sistemlerinin kullanılmasıdır. Genellikle

ilk sırada su, sonra su-alkol karışımları ve sonunda saf alkoller kullanılır. Bu kolonların tek dezavantajı kolon kullanımdan önce yıkanmaz ise çözünebilir poliamid fraksiyona bulaşabilir. Poliamid kolonlar kullanımdan sonra da yıkanarak tekrar kullanılması sağlanabilir [44]. Poliamid kolonlar ikinci aşama saflaştırmada da kullanılabildikleri gibi ilk basamakta fraksiyonlandırma amacı ile de kullanılabilir [45].

Poliamid absorbanların kullanışlı ticari türleri şunlardır: Polyclar AT, Polupenco 66D ve Poliamid (Woelm).

Sefadeks jel: Genellikle sefadeks LH-20 kullanılır fakat LH-60 ve G-25 sefadekslerin kullanımı da yaygındır. Kolon kromatografisi, TLC veya kagıtkromatografisi yoluyla izole edilen maddeler genellikle adsorbandan kaynaklanan kirlilikleri de taşırlar. Fakat sefadeks LH-20 kolonlar elüsyon sırasında kirlilik taşımazlar bu yüzden son saflaştırma işlemleri için uygundurlar [46].

Sefadeks LH-20 sadece organik çözücülerle de çalısma imkanı verdiği için suda çözünmeyen maddelerin ayrılması için uygundur. LH harfleri bu jelin hem lipofil hemde hidrofil çözeltilerde şişmesini gösteren bir simgedir.

2. 4. 3. 5. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulaması gerekir. Bu yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, element türlendirilmesinde en yaygın biçimde uygulanan kromatografi türüdür.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur.

HPLC'nin sıvı kromatografisinin diğer türlerden üstünlükleri şunlardır. HPLC kolonu rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir. Böylece kolonlarda

gerçekleştirilen ayırma, eski yöntemlerle elde edilenlerden çok daha çeşitlidir. Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir. Nicel analiz amaçları için de kullanılabilir. Analiz süresi çok daha kısadır.

2. 5. Yapı Açıklama Metodları

2. 5. 1. Ultraviyole Spektroskopisi

Görünür bölge ve mor ötesi (UV-VIS) spektroskopisi moleküllerdeki elektronik geçişlerin verdiği spektrumları konu alır ve ikisi birden elektronik spektroskopi olarak adlandırılır. Elektronik spektrum 100-700 nm aralığını kapsar; 100-200 nm aralığı Vakum UV, 200-400 nm aralığı UV (veya yakın UV) ve 400-700 nm aralığı görünür bölgedir. Bir bileşik görünür bölgede absorbsiyon yaparsa renklidir ve absorbladığı rengin tamamlayıcı renginde görünür [47].

Beş üyeli heteroaromatik bileşiklerin ultraviyole spektrumları siklopentadieninkiyle karşılaştırıldığında, siklopentadien spektrumu ile 200 nm deki kuvvetli absorbsiyon ile 238 nm deki orta şiddetli absorbsiyonun furan, pirol ve tiyofende sırasıyla, furandan tiyofene doğru gidildikçe daha büyük dalga boylarına kaydıkları görülür. Altı üyeli heteroaromatik bileşiklerden piridinin ultraviyole spektrumu, 257 ve 270 nm lerde olmak üzere başlıca iki absorbsiyon maksimumu gösterir. 5 ve 6 üyeli heteroaromatik bileşiklerin aksine doymuş türevleri 200 nm' den daha uzun dalga boylarında absorbsiyon yapmazlar [48].

Ultraviyole spektroskopisi alkaloid yapıların belirlenmesi ve yapı özellikleri hakkında önemli bilgiler verir. Genelde alkaloid bileşikler UV bölgede 230-290 nm'de bir veya daha fazla karakteristik absorbsiyon gösterirler.

2. 5. 2. İnfrared Spektroskopisi

İnfrared spektroskopisi, görünür ve mikrodalga bölgeleri arasındaki infrared bölgede, elektromanyetik dalganın moleküller ya da kimyasal gruplar tarafından soğurulmasını inceler. Bu yöntemle, bir organik bileşiğin yapısının buna bağlı olarak, kimyasal özelliklerinin aydınlatılması, yapı tayini, bağ titreşimleri ve ayrıca hidrojen bağlarının bulunması, bağ uzunlukları ve bağ açılarının bulunması mümkündür. Infrared spektroskopisi tekniği, belirli dalga boylarında örnek hücresine giren ve çıkan ışınların şiddetlerinin karşılaştırılması ve dalga boylarına göre grafiğe geçirilmesi prensibine dayanır. İnfrared ışık soğurulması durumunda bir molekülün titreşim ve dönme enerji düzeylerinde değişiklikler meydana gelir [49].

2. 5. 3. ^{1}H-NMR Spektroskopisi

^{1}H-NMR spektroskopisi için 5-10 mg örnek gereklidir. Çözücünün seçimi bileşiğin polaritesine bağlı olmalıdır.

$CDCl_3$ düşük polariteli bileşikler için ideal çözücüdür. Genellikle C_5D_5N, DMSO-d_6, CD_3OD, D_2O, aseton gibi çözücüler polar alkaloid bileşikleri çözmek için daha uygundur.

^{1}H-NMR spektrumu alkaloid bileşiklerin aromatik halka protonlarını ve sübstitüentlerin durumunu gösterir. Aromatik halka protonları 5.00- 8.00 ppm arasında gözlenirler. Orto etkilesimlerde J=8-9 Hz, meta etkileşimlerde J=2-3 Hz'dir. Metoksi grupları 3.8-3.9 ppm civarında singlet olarak görülür. Azota bağlı metil grubunun proton sinyali ise 2-3 ppm arasında singlet olarak görülür.

2. 5. 4. ^{13}C-NMR Spektroskopisi

^{13}C-NMR spektroskopisi, özellikle glikozidlerde, şekerlerin sırası ve bağlanma noktaları ya da glikozil grubundaki açil gruplarının cinsi ve yerlerini incelemede yararlıdır. 250 ppm'lik geniş bir alanda karbon sinyalleri gözlenir.

Spektrumda; sp^3 karbonları ortalarda 76.8-67.1 ppm arasında, oksijene bağlı olmayan sp^2 karbonları daha aşağıda bir alanda çıkarlar. Oksijene komşu sp^3 karbonları ise 101.5-100.7 ppm arasında çıkarlar. Azota bağlı olan metil karbonunun sinyali ise 40-45 ppm aralığında gözlenir.

2. 5. 5. Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi (LC-MS)

Kütle spektroskopisi, uçucu olmayan bileşenler içeren numunelerin analizi için sıvı kromatografisi ile birleştirilmiştir. GC'den farklı olarak burada hareketli faz sıvıdır ve bu sıvı faz analit moleküllerini içinde bulundukları çözelti fazından, belli uzunluk ve çaptaki kolon yardımı ile ayırır.

İyonlaştırma kaynağı olarak kullanılan yöntemlerden biri, elektrosprey iyonlaştırmadır (ESI). ESI, atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşir. Numune çözeltisi, paslanmaz çelikten iğne şeklinde bir kapiler ile dakikada birkaç mikrolitre hız sağlanarak pompalanır. İğneye, etrafındaki silindirik elektroda göre birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük ve elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir çözücü giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır ve elektrik yükleri analit moleküllerine tutunur. Çözücü buharlaşıp damlacıklar küçülürken yük yoğunluğu artar ve iyonlar, gaz fazına desorbe olur [50].

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hekzan (Teknik)

Aseton (Teknik)

Metanol (Teknik)

Metilenklorür(Teknik)

Etil asetat(Teknik)

Su (Grade)

Silikajel (Kiesel G, E. Merck Type 60)

$Ce(SO_4)_2.4H_2O$

Dragendroff's belirteci

BChE

AChE

Asetiltiyokolin iyodür

Bütiriltiyokolin klorür

DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit)

Sodyum fosfat tamponu (pH:8)

Galantamin

3. 2. Kullanılan Yöntemler

3. 2. 1. Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisi gerek ekstrelerin fraksiyonlandırılarak ayrılması gerekse saflaştırılması aşamasında kullanıldı. Adsorban olarak Merck silika jel (70-230 mesh), dolgu maddesi kullanıldı. Silika jel adsorban, diklorometan ile şişirildikten sonra dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş cam kolona yerleştirildi.

Ekstreler, miktarına uygun adsorbanla -silika jel ile- karıştırıldı ve çözücüsü tamamen uçurulduktan sonra kolonun üst kısmına yerleştirildi.

3. 2. 2. İnce tabaka kromatografisi

Kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlar miktarlarına göre silikajel kaplı hazır alüminyum plakalara (DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 Merck) tatbik edilerek uygun çözücü sistemlerinde yürütüldü. Kolonda saflaştırılan maddelerin kontrolü ve preperatif-TLC yöntemi ile kolondan alınan fraksiyonların ayrılıp saflaştırılmasında kullanıldı.

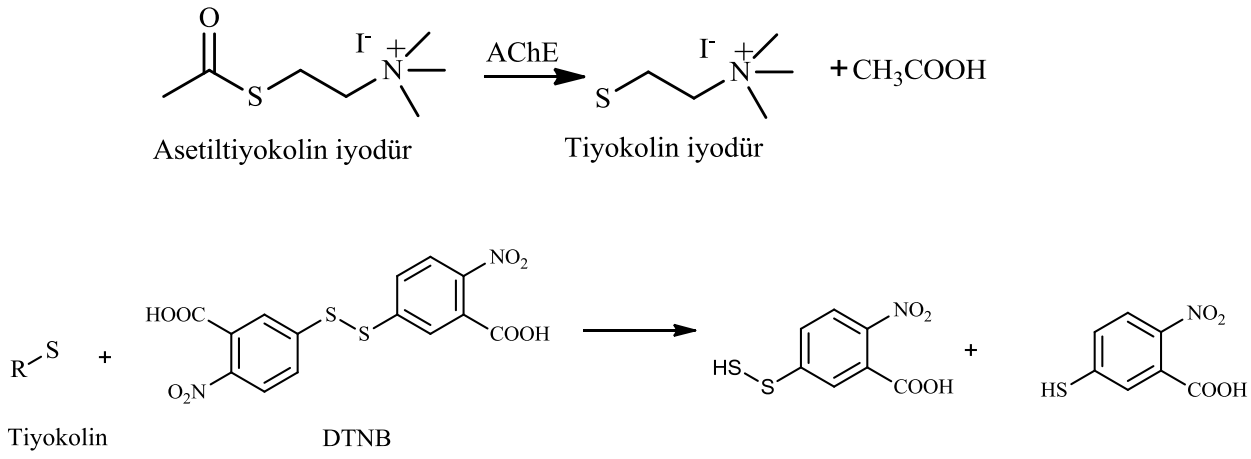
3. 2. 3. Enzim inhibisyon aktivitesi çalışmaları

3. 2. 3. 1. Ellman metodu

Asetil ve bütirilkolinesteraz inhibitör aktiviteleri Ellman tarafından geliştirilmiş olan spektrofotometrik metodun uygulanmasıyla ölçülmüştür [51]. Elektrik balığından elde edilen AChE ve at serumundan elde edilen BChE enzim kaynağı olarak, asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin klorür ise reaksiyonun substratları olarak kullanılmıştır. DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit) kolinesteraz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılmıştır. Kontrol ve test bileşiklerini çözmek amacı ile etanol

çözücü olarak kullanılmıştır. 150 µL 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH:8) farklı konsantrasyonlarda 10 µL etanolde çözünmüş örnek çözeltisi ve 20 µL AChE ($5.32x10^{-3}$U) veya BChE ($6,85x10^{-3}$U) çözeltileri karıştırılmış ve 25 ºC de 15 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 µL asetiltiyokolin iyodür (0.7 mM) veya bütiriltiyokolin klorür (0.2 mM) eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Bu substratların hidrolizi ile oluşan tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonu sonucu sarı renkli 5-tiyo -2-nitrobenzoat anyonunun oluşumu 412 nm dalgaboyunda absorbansın ölçülmesi ile spektrofotometrik olarak gözlenmiştir (Şekil 3. 1).

96 kuyucuklu mikroplaka okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan Go) spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. AChE ve BChE inhibisyon yüzdeleri (E-S)/E x 100 formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu formülde E: test bileşiği olmaksızın enzimin aktivitesi ve S: test bileşiği ile enzimin aktivitesini ifade etmektedir. Deneyler üç kez tekrarlanmış olup galantamin referans bileşiği olarak kullanılmıştır.



Şekil 3. 1. Ellman metodu

3. 2. 3. 2. Enzim inhibisyon deneyi reaktifleri

Fosfat Tamponu (pH 8) : İki çözelti hazırlandı.

A Çözeltisi: 8.75 g sodyum fosfat dihidrat ($NaH_2PO_4.2H_2O$) 500 mL destile suda çözüldü.

B Çözeltisi: 13.6 g di-potasyum hidrojen fosfat ($K_2HPO_4.7.H_2O$) 250 mL destile suda çözüldü.

Bu iki çözelti karıştırıldı ve pH 8'e ayarlandı.

5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi: 16 mg DTNB ve 7.5 mg $NaHCO_3$'ın4 mL fosfat tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

Substrat (Asetiltiyokolin iyodür ve Bütiriltiyokolin klorür): 16 mg asetiltiyokolin iyodür veya bütiriltiyokolin klorürün 4 mL destile suda çözülmesiyle hazırlandı.

Enzim (Asetilkolin esteraz ve Bütirilkolin esteraz): 0.2 mg enzimin 4 mL fosfat tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

3. 3. Kromatografi işlemlerinde kullanılan belirteçler

Dragendroff's Belirteci: Öncelikle iki çözelti hazırlanır.

A Çözeltisi: 0.17 g Bizmut nitrat 2 mL asetikasitte çözünür ve daha sonra 8 mL su ile karıştırılır.

B Çözeltisi: 4 g Potasyum iyodür 10 mL asetik asitte çözünür ve daha sonra 20 mL su ile karıştırılır.

Hazırlanan bu iki karışım daha sonra birleştirilir ve üzerine su ilavesi ile 100 mL' ye tamamlanır.

3. 4. Kullanılan Cihazlar

NMR Spektrometresi: ^{1}H- NMR ve ^{13}C-NMR spektrumları Varian Oxford 300 MHz cihazında alınmıştır. Çözücü olarak asetonve CD_3OD kullanılmıştır**.**

Kütle Spektroskopisi: Kütle spektrometresi ölçümlerinde Zivak Technologies, Tandem Gold LC-MS kullanılmıştır.

HPLC: Shimadzu Prominence LC-8A preperatif geri-döngülü HPLC (C-18 kolon) kullanılmıştır.

Infrared Spektrofotometresi: Mattson 1000 FTIR Spektrometresi ve Shimadzu IR 470 Infared Spektrometresi kullanılmıştır.

Ultraviyole Spektrofotometresi: Spektrumlar Shimadzu UV-160A cihazında alınmıştır.

3. 5. Çözücüler

Ekstraksiyon işlemlerinde, kolon kromatografisinde ve ön ayırma işlemlerinde teknik çözücüler tekrar destile edildikten sonra kullanılmış, madde saflaştırılmasında Merck çözücüler, spektral analizler için uygun çözücüler kullanılmıştır.

BÖLÜM 4

4. DENEYSEL KISIM

4. 1. Bitkinin Ekstre Edilmesi

Hypecoum procumbens L. (Papavaraceae) bitkisi 23 Nisan 2011'de Edirne Söğütlük alanından Özlem GENÇAY, Canan KARUNCULA, Pınar ALPASLAN ve Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN tarafından toplandı. Bitkinin tanımlanması Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER tarafından yapıldı (EDTU Herbaryumu, No:7520-7521). Bitki gölgede kurutulup, toprak üstü ve kök kısımları ayrılmadan çalışılmak üzere ufak parçalar halinde kesildi.

597 g kuru bitki oda şartlarında, büyük cam kavanozlarda haftada bir süzülmek koşuluyla üç hafta maserasyon yöntemi ile ekstrakte edildi (Şekil 4. 1). Çözücü rotaevaporatörde buharlaştırıldıktan sonra elde edilen ham ekstre % 10'luk HCI ile asitlendirildi (pH 1-2). Sonra hekzan ile ekstrakte edilerek alkaloid dışında kalan yağlar, vakslar vb. maddelerin uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Kalan ekstre pH 9-10 olana kadar % 25'lik NaOH ile bazikleştirilerek ekstre içerisinde bulunan alkaloidlerin serbest hale gelmesi sağlandı ve elde edilen sulu faz diklormetan ve etilasetat ile ekstrakte edildi (Şekil 4. 2).

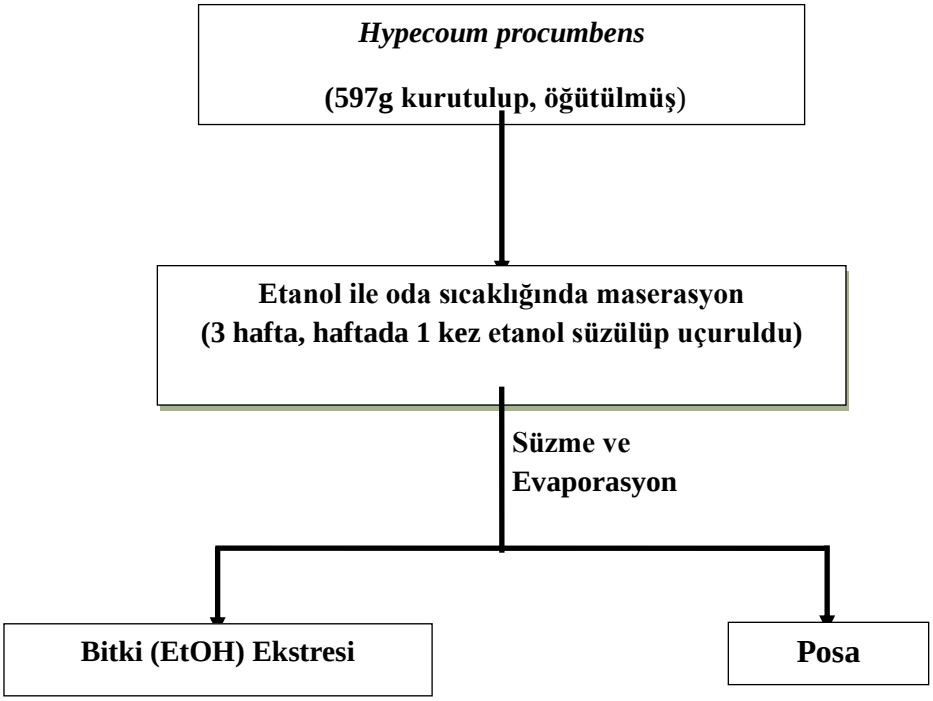
Bu fazlar rotaevaporatörde yoğunlaştırılarak hekzan, diklorometan, etil asetat ve su fazına ait ekstreler elde edildi. Elde edilen ekstrelerin miktarları aşağıdaki gibidir:

Hegzan fazı: 34.02 g

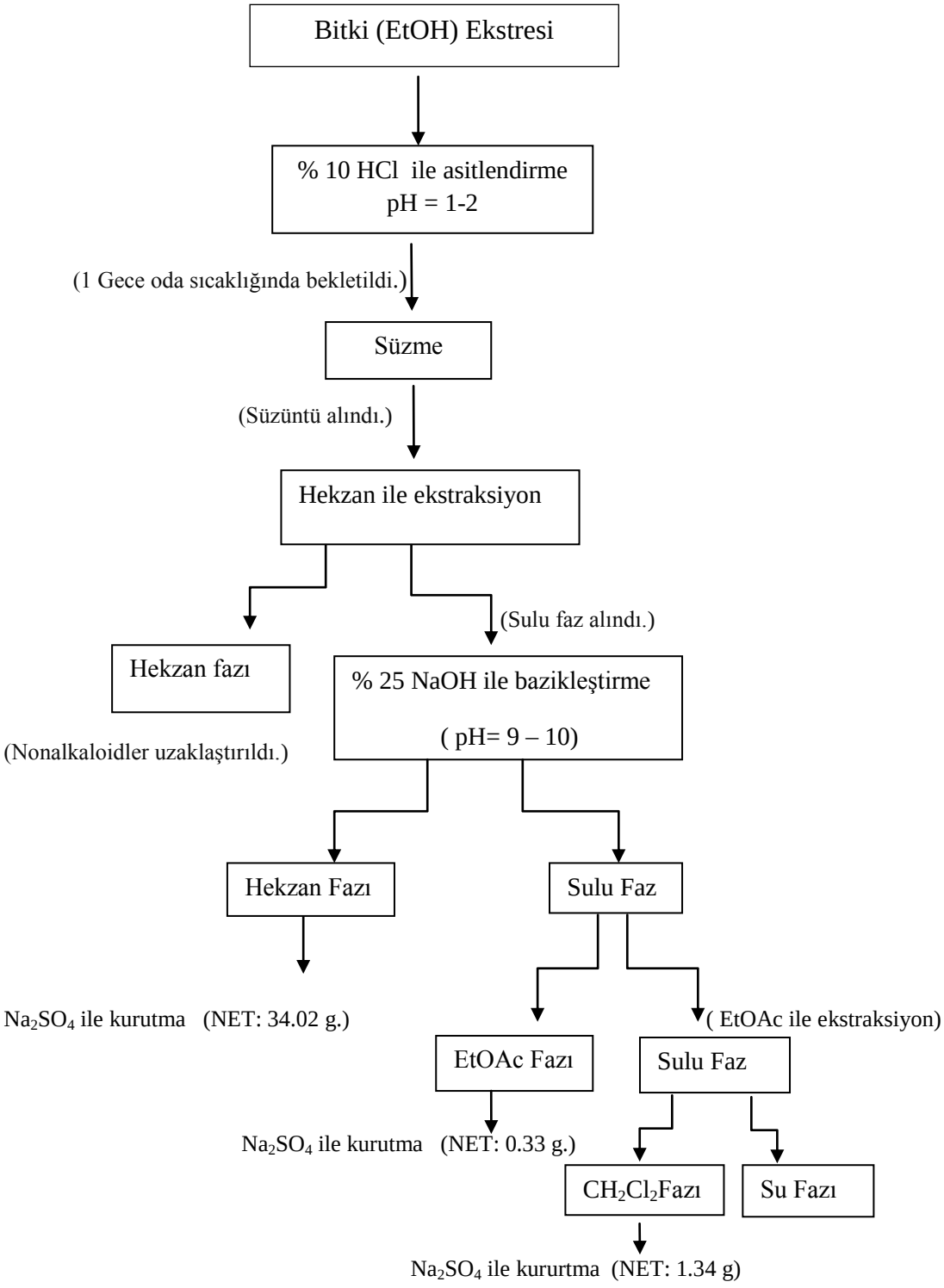
Diklorometan fazı: 1.34 g

Etil asetat fazı: 0.33 g

Daha sonra her bir ekstreye ince tabaka kromatografisi uygulandı. Diklorometan ekstresinde, UV ışık altında mor, Dragendroff's belirteci ile yakıldığında turuncu renk veren bileşenlerin alkaloidler olabileceği sonucuna varıldı.



Şekil 4. 1. Ana ekstrenin eldesi



Şekil 4. 2. Hekzan, diklorometan, etil asetat ve su fazlarının eldesi

4. 2. Kromatografik Yöntemlerle Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri

4. 2. 1. Diklorometan Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Diklorometan ekstresine silika jel kolon kromotografisi uygulandı. Diklorometan ve artan oranda metanol ilavesi ile kolon fraksiyonlandırılarak 281 tüpte toplandı. Her bir tüpün içeriğine ince tabaka kromatografisi (TLC) uygulanmıştır. Yapılan ince tabaka kromatografileri incelendiğinde 2. tüpte birden fazla sayıda alkaloid geldiği gözlenmiştir. 2. tüpün miktarının çok fazla olmamasından dolayı preparatif TLC uygulanarak **1** numaralı bileşik olan **8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin** bileşiği elde edilmiştir. Preperatif TLC'den elde edilen diğer alkaloidler, miktarlarının çok az olmasından dolayı yapıları aydınlatılamamıştır.

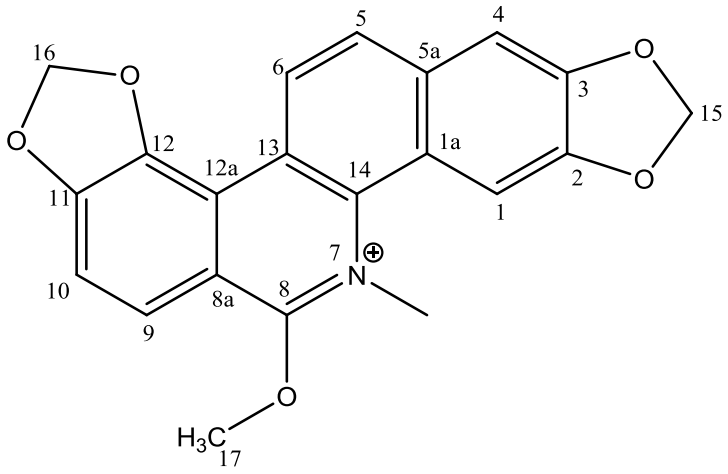
Kolondan gelen 4. tüpde TLC sonuçlarına göre tek madde olduğu görüldüğünden NMR spekroskopisi alınmış ve **2** numaralı bieşik olan **8-asetonildihidro sanguinarine** bileşiği elde edilmiştir.

Benzer şekilde kolondan toplanan 19. tüpte de tek bir madde gözlenmiş ve **3** numaralı bileşik olan **oksohidrastin** bileşiği elde edilmiştir.

% 4'lük MeOH**:**DCM çözücü sistemi ile kolondan toplanan 83-95 tüpleri arasında ince tabaka kromatografisi sonuçlarına göre tek bir maddenin geldiği gözlenmiş ve **4** numaralı bileşik olan **protopin** bileşiği olduğu spektroskopik teknikler sonucunda belirlenmiştir.

4. 2. 2. Dikloro metan Ekstresinden Elde Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

4. 2. 2. 1 Numaralı Bileşik: 8-Metoksi-11,12-metilendieter sanguinarine



Şekil 4. 3. 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarine

8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin bileşiği diklorometan ekstraktının silika jel kolona tatbik edilip diklorometan çözücü sistemi ile elüe edilmesi sonucunda 2. tüpte toplanan maddeye pereparatif TLC yapılması sonucunda elde edilmiştir. Kahverengi renkte olan bu bileşik 2.9 mg'dır. UV ışık altında mor renkte gözlenen spot Dragendroff's reaktifi püskürtülüp yakıldığında turuncu renk vermiştir.

UV λ_{max} (nm) MeOH: 286 (0.524), 236.5 (0.647), 201.0 (0.645)

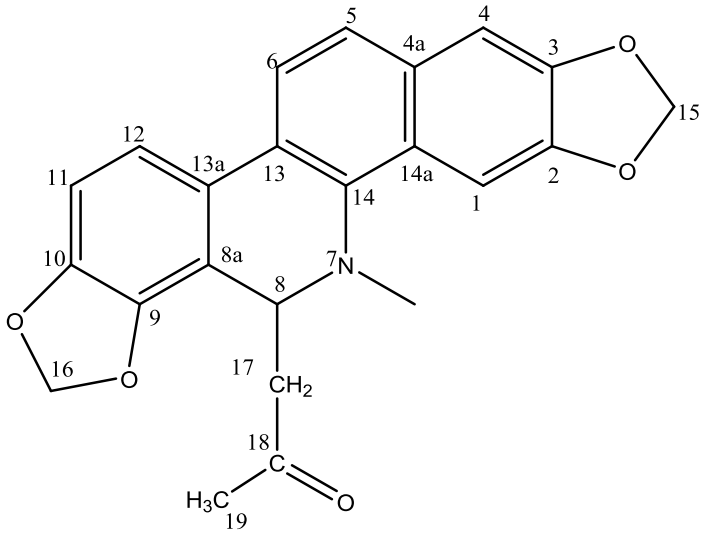
IR υ_{max}(KBr) cm^{-1}: 3350, 1647, 1603, 1557, 1510, 1327, 1263, 1198

ESI-MS *m/z*: 364.1 $[M+H]^+$

Tablo 4. 1. 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin bileşiği için ^{1}H-NMR(300 MHz, Aseton-d_6), ve ^{13}C-NMR (75 MHz, Aseton-d_6) değerleri

C No	^{1}H- NMR	^{13}C-NMR
1	7.47, s	100.3
1a	—	126.0
2	—	149.0
3	—	148.0
4	7.08, s	104.5
5	7.43, d (*J*=8.4 Hz)	101.3
5a	—	131.0
6	7.64 d (*J*=8.4 Hz)	102.0
7	2.46, s	41.2
8	—	145.0
8a	—	113.8
9	6.76, d (*J*=8.0 Hz)	107.3
10	7.27, d (*J*=8.0 Hz)	97.8
11	—	145.0
12	—	147.0
12a	—	126.4
13	—	124.2
14	—	142.0
15	6.02, s	101.8
16	5.98, s	102.0
17	4.02, s	48.3

4. 2. 2. 2 Numaralı Bileşik: 8-Asetonildihidrosanguinarine



Şekil 4. 4. 8-Asetildihidrosanguinarine bileşiği

8-Asetildihidrosanguinarin bileşiği diklorometan ekstraktının silika jel kolona tatbik edilip diklorometan çözücü sistemi ile elüe edilmesi sonucunda elde edilmiştir. kahverengimsi bir renktedir ve 17.9 mg elde edilmiştir. UV ışık altında mor renkli gözlenen spot Dragendroff's belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra turuncu renk vermiştir.

UV λ_{max} (nm) MeOH: 324 (0.193), 286 (0.463), 237 (0.483), 202.5 (0.407)

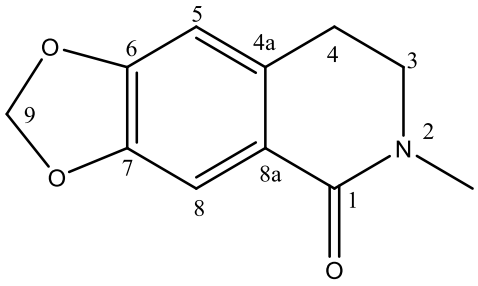
IR υ_{max}(KBr) cm^{-1}: 1676, 1586, 1436

ESI-MS *m/z*: 390.1 $[M+H]^+$

Tablo 4. 2. 8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiği için ^{1}H-NMR (300 MHz, Aseton-d_6), DEPT ve ^{13}C-NMR (75 MHz, Aseton-d_6) değerleri

C No	^{1}H- NMR	^{13}C-NMR	DEPT
1	7.32, s	100.2	-CH
2	—	148.7	—
3	—	148.0	—
4	7.08, s	104.4	-CH
4a	—	131.5	—
5	7.43, d (*J*=8.7 Hz)	124.4	-CH
6	7.67, d (*J*=8.7 Hz)	120.2	-CH
7	2.49, s	42.6	-CH_3
8	4.73, dd (*J*=3.9 ve 4.1 Hz)	54.5	-CH
8a	—	116.1	—
9	—	144.8	—
10	—	148.0	—
11	6.78, d (*J*=8.1 Hz)	107.8	-CH
12	7.32, d (*J*=8.1 Hz)	116.8	-CH
13	—	123.5	—
13a	—	126.0	—
14	—	139.5	—
14a	—	127.5	—
15	5.97, (d, J=3,6 Hz, 2H)	101.9	-CH_2
16	5.98, (d, J=3,6 Hz, 2H)	101.6	-CH_2
17α	2.39, dd (*J*=10.8 ve 3.9Hz)	46.4	-CH_2
17β	2.19, dd (*J*=10.8 ve 4.1Hz)	46.4	-CH_2
18	—	190.0	—
19	1.95, s	30.0	-CH_3

4. 2. 2. 3 Numaralı Bileşik: Oksohidrastin



Şekil 4. 5. Oksohidrastin bileşiği

Oksohidrastin diklorometan ekstraktının silika jel kolona tatbik edilip diklorometan çözücü sistemi ile elüe edilmesi sonucunda elde edilmiştir. Kahverengi görünümlü bu bileşik 2.9 mg elde edilmiştir. UV ışık altında mor renkli gözlenen spot Dragendroff's belirteci püskürtülüp yakıldığında turuncu renk vermiştir.

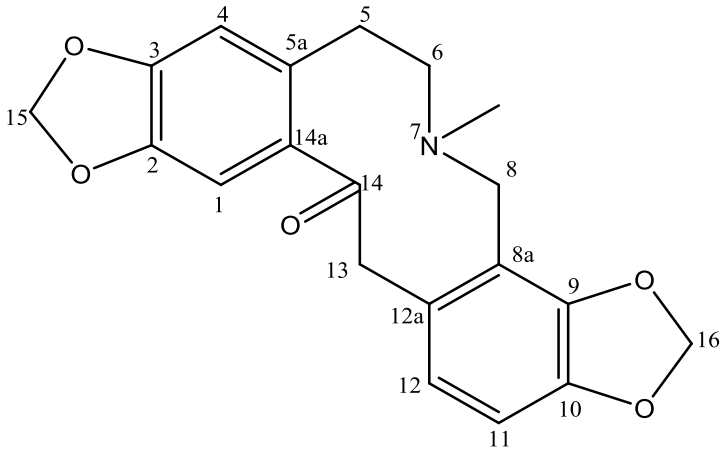
UV λ_{max} (nm) MeOH: 304 (0.873), 261.5 (0.777), 223 (3.010)

ESI-MS *m/z*: 206.0 $[M+H]^+$

Tablo 4. 3. Oksohidrastin bileşiği için ^{1}H-NMR (300 MHz, Aseton-d_6), DEPT ve ^{13}C-NMR (75 MHz, Aseton-d_6) değerleri

C No	^{1}H- NMR	^{13}C-NMR	DEPT
1	—	164.0	—
2	3.00, s	34.2	-CH_3
3	3.53, t (*J*=7.0 Hz)	48.0	-CH_2
4	2.89, t (*J*=7.0 Hz)	28.0	-CH_2
4a	—	134.0	—
5	6.73, s	107.0	-CH
6	—	151.0	—
7	—	147.0	—
8	7.36, s	107.4	-CH
8a	—	124.0	—
9	6.03, s	101.8	-CH_2

4. 2. 2. 4 Numaralı Bileşik: Protopin



Şekil 4. 6. Protopin bileşiği

Protopin bileşiği diklorometan ekstraktının silika jel kolona tabik edilip diklorometan – metanol (%4 MeOH) çözücü sistemi ile elüe edilmesi sonucunda 83. ve 95. tüpler arasında gelmesi ile elde edilmiştir. TLC yapıldığında tek madde olarak görünmüştür. Kahverengi renge sahip olan bileşik 31.5 mg'dır. UV ışık altında mor renkte gözlenen spot Dragendroff's belirteci püskürtülüp yakıldığında turuncu renk vermiştir.

UV λ_{max} (nm) MeOH: 290 (0.399), 207.5 (2.364)

ESI-MS *m/z*: 354.1 $[M+H]^+$

Tablo 4. 4. Protopin bileşiği için ^{1}H-NMR(300 MHz, CD_3OD), DEPT ve ^{13}C-NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri

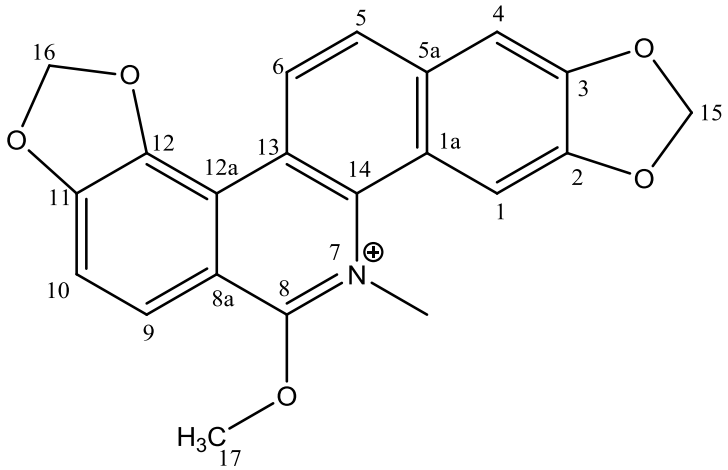
C No	H^{1}- NMR	C^{13}-NMR	DEPT
1	7.14, s	105.5	-CH
2	—	148.2	—
3	—	149.5	—
4	6.77, s	108.3	-CH
5α	3.15, m	25.0	$-CH_2$
5β	3.25, m	25.0	$-CH_2$
5a	—	124.4	—
6α	3.85, m	54.0	$-CH_2$
6β	3.60, m	54.0	$-CH_2$
7	3.07, s	42.2	$-CH_3$
8	4.60, s	55.0	$-CH_2$
8a	—	122.6	—
9	—	144.1	—
10	—	146.5	—
11	6.86, d (*J*=8.1 Hz, 1H)	108.8	-CH
12	6.82, d (*J*=8.1 Hz, 1H)	122.1	-CH
12a	—	122.4	—
13	3.30 (MeOH ile örtüşmüş)	30.0	$-CH_2$
14	—	194.0	—
14a	—	126.6	—
15	6.00, s	102.1	$-CH_2$
16	6.02, s	102.4	$-CH_2$

BÖLÜM 5

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5. 1. Kimyasal Bulgular

5. 1. 1. 1 numaralı bileşik: 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarine



8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarine

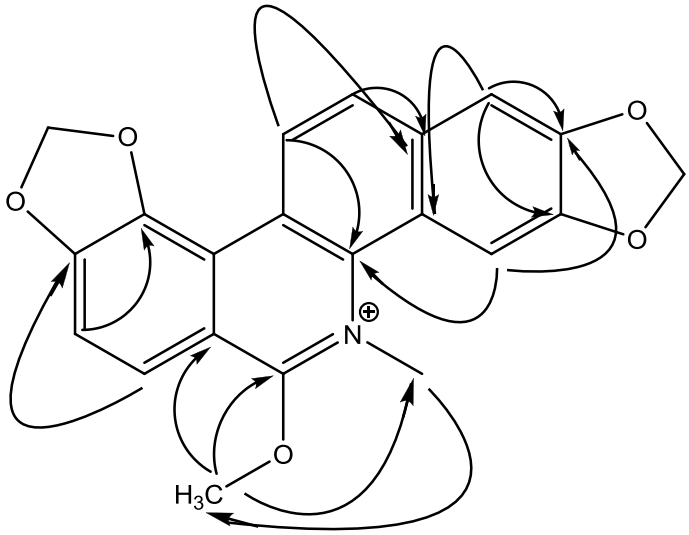
Bileşiğin ^{1}H-NMR spekturumunda aromatik halkalardaki protonlardan (H-1) 7.47, (H-4) ise 7.08 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. Aromatik halkadaki diğer protonlar (H-5) 7.43 ppm'de (d, *J*=8.4 Hz, 1H), (H-6) 7.64 ppm'de (d, *J*=8.4 Hz, 1H) gözlenmiştir. 8.4 Hz'lik dubletlere ait *J* değerleri bu iki protonun birbiri ile *orto* konumda olduklarını göstermektedir. Benzer bir AB sistemi, H-9 (δ_H 6.76, d, *J*=8.0 Hz, 1H) ve H-10 (δ_H 7.27, d, *J*=8.0 Hz, 1H) protonları için gözlenmiştir. H-15 ve H-16 (-OCH_2O-) protonları 6.02 ve 5.98 ppm'de aşağı alanda singlet sinyal vermişlerdir. Azot atomuna bağlı metil grubu (H-7) 2.46 ppm'de singlet sinyal olarak görülmüştür. Azot atomuna komşu karbonda bulunan metoksi grubunun protonları (H-17) 4.02 ppm'de singlet sinyal vermiştir.

HMQC spektrumunda aromatik halkada bulunan protonların karbonları (C-1) 100.3, (C-4) 104.5, (C-5) 101.3, (C-6) 102.0, (C-9) 107.3 ve (C-10) 97.8 ppm'de gözlenmişlerdir. Aromatik halkaların kuarterner karbonları ise C-1a (δ_C 126.0), C-2 (δ_C 149.0), C-3 (δ_C 148.0), C-5a (δ_C 131.0), C-8 (δ_C 145.0), C-8a (δ_C 113.8), C-11 (δ_C 145.0), C-12 (δ_C 147.0), C-12a (δ_C 126.4) ve C-13 (δ_C 124.2) ppm'de HMBC korelasyonları sayesinde tespit edilebilmiştir. Bunlar arasında elektronegatif oksijen atomuna komşu durumdaki karbonlar C-2, C-3, C-11 ve C-12 diğer karbon atomlarına göre aşağı alanda gözlenmişlerdir. İki elektronegatif okjijen atomu arasında bulunan C-15 (δ_C 101.8) ve C-16 (δ_C 102.0) karbonları da bu sebepten dolayı daha aşağı alanda gözlenmiştir. Azot atomuna bağlı olan metil grubunun karbonu (C-7) 41.2 ppm'de, metoksi karbonu (C-17) ise 48.3 ppm'de gözlenmiştir.

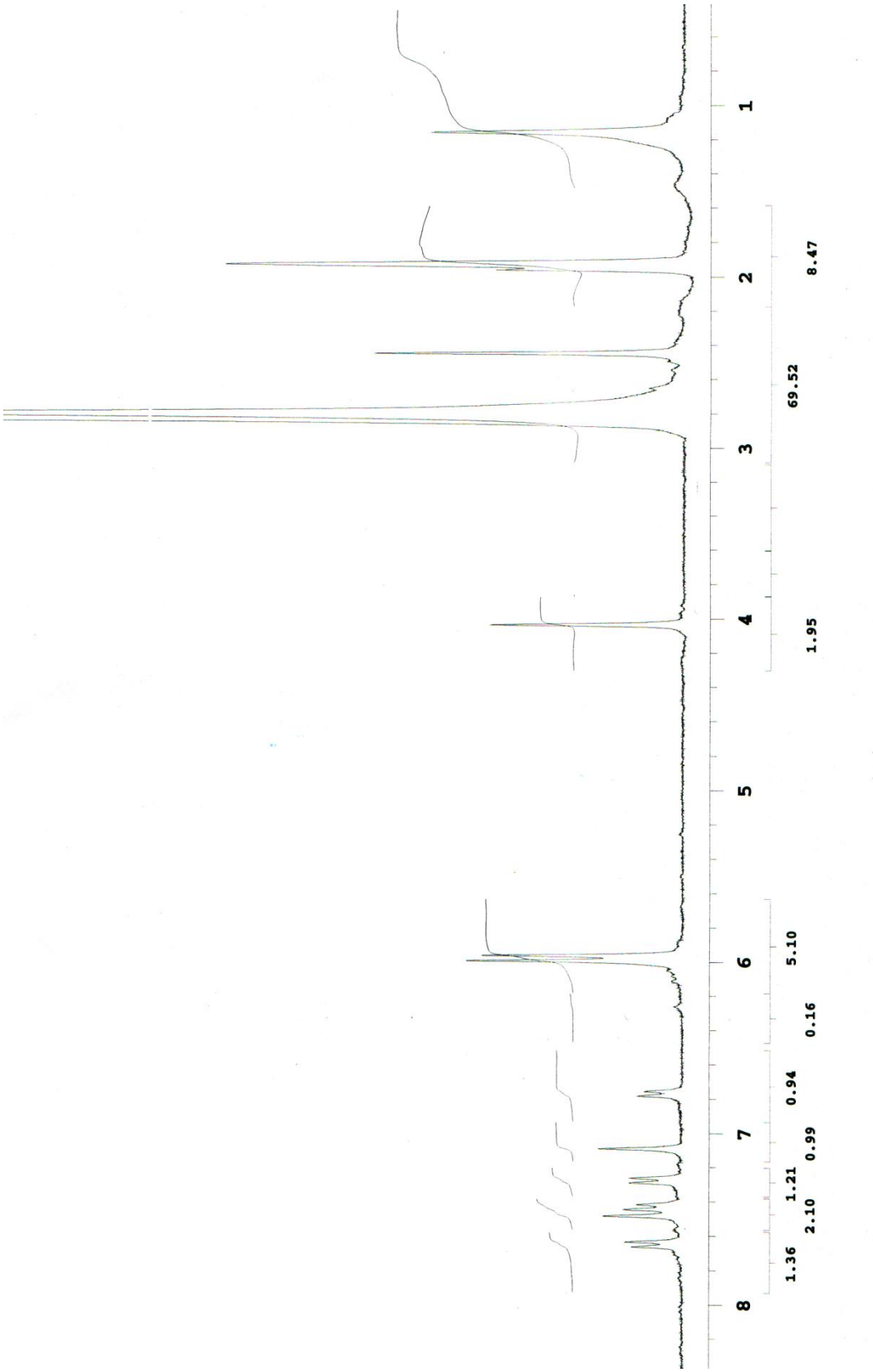
HMBC spekturumunda önemli eşleşmeler singlet olarak gözlenen H-1 (δ_H 7.47) ve H-4 (δ_H 7.08)'ün sırasıyla C-3 (δ_C 148.0), C-14 (δ_C 142.0) ve C-2 (δ_C 149.0), C-1a (δ_C 126.0) ile gösterdikleri eşleşmelerdir. Dublet sinyal veren protonlardan H-5 (δ_H 7.43) C-5a (δ_C 131.0) ile, H-6 (δ_H 7.64) ise C-5a (δ_C 131.0) ve C-14 (δ_C 142.0) ile eşleşme göstermiştir. H-10 (δ_H 7.27) protonunun C-12 (δ_C 147.0) ile, H-9 (δ_H 6.76) protonunun ise C-11 (δ_C 145.0) ile eşleşmesi gözlenmiştir. -N-CH_3 (H-7) ve -OCH_3 (H-17) de birbirlerinin karbonları ile eşleşme göstermişlerdir. Metoksi protonu H-17 (δ_H 4.02) C-7 (δ_C 41.2), C-8 (δ_C 145.0), C-14 (δ_C 142.0) ve C-8a (δ_C 113.8) ile korelasyonlar göstermiştir.

COSY spekturumunda birbirine komşu olan protonlar H-5 (δ_H 7.43) ile H-6 (δ_H 7.64) arasında ve H-9 (δ_H 6.76) ile H-10 (δ_H 7.27) arasında eşleşme gözlenmiştir. Metoksi protonu H-17'nin H-9 (δ_H 6.76) ve H-10 (δ_H 7.27) ile eşleşmeleri görülmüştür. Azot atomuna bağlı olan metil protonu H-7 (δ_H 2.46) ile metoksi protonu H-17 (δ_H 4.02) arasında eşleşme bu iki grubun komşuluğunu kanıtlar niteliktedir.

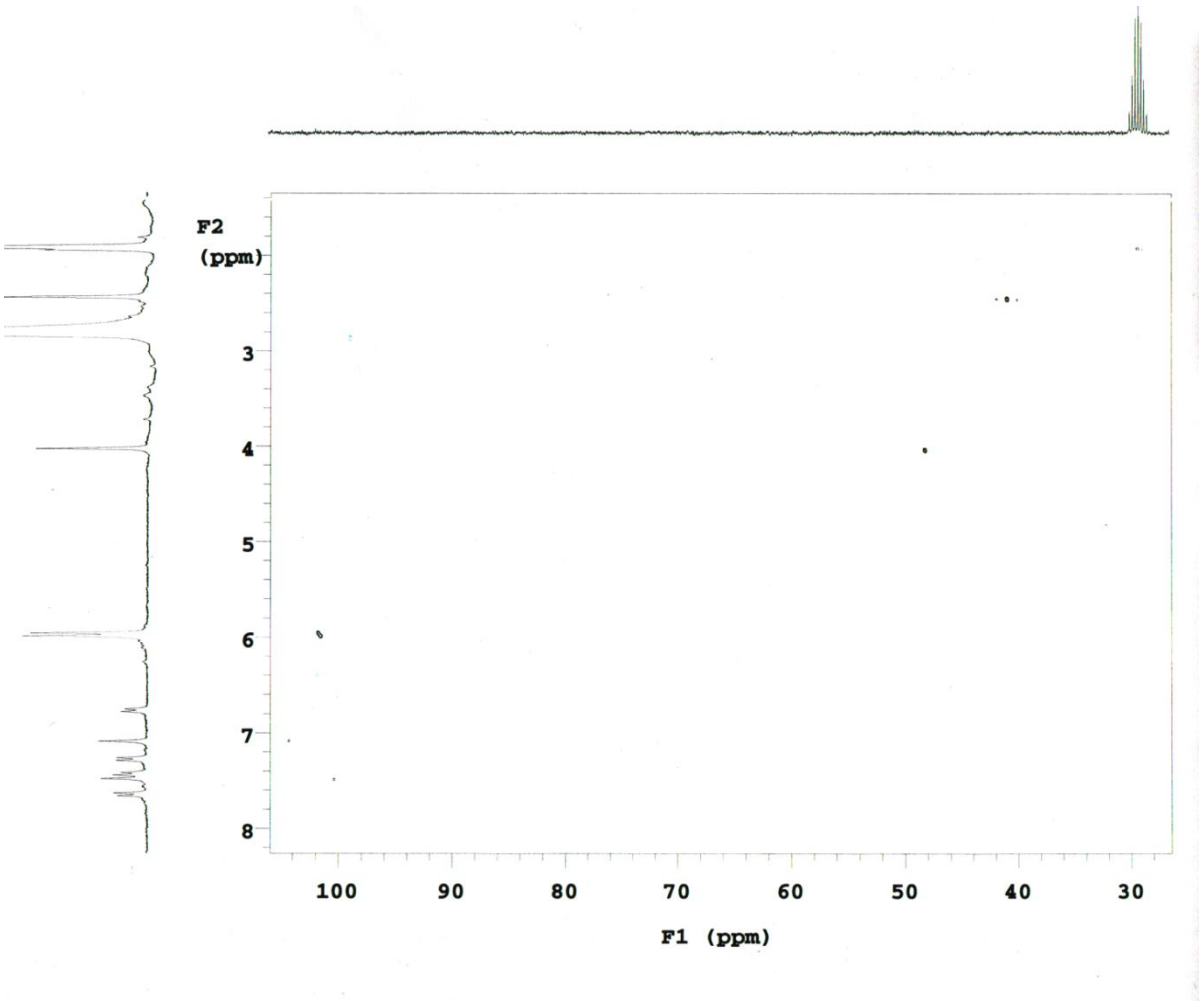
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğin 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin olduğu doğrulanmıştır [52].



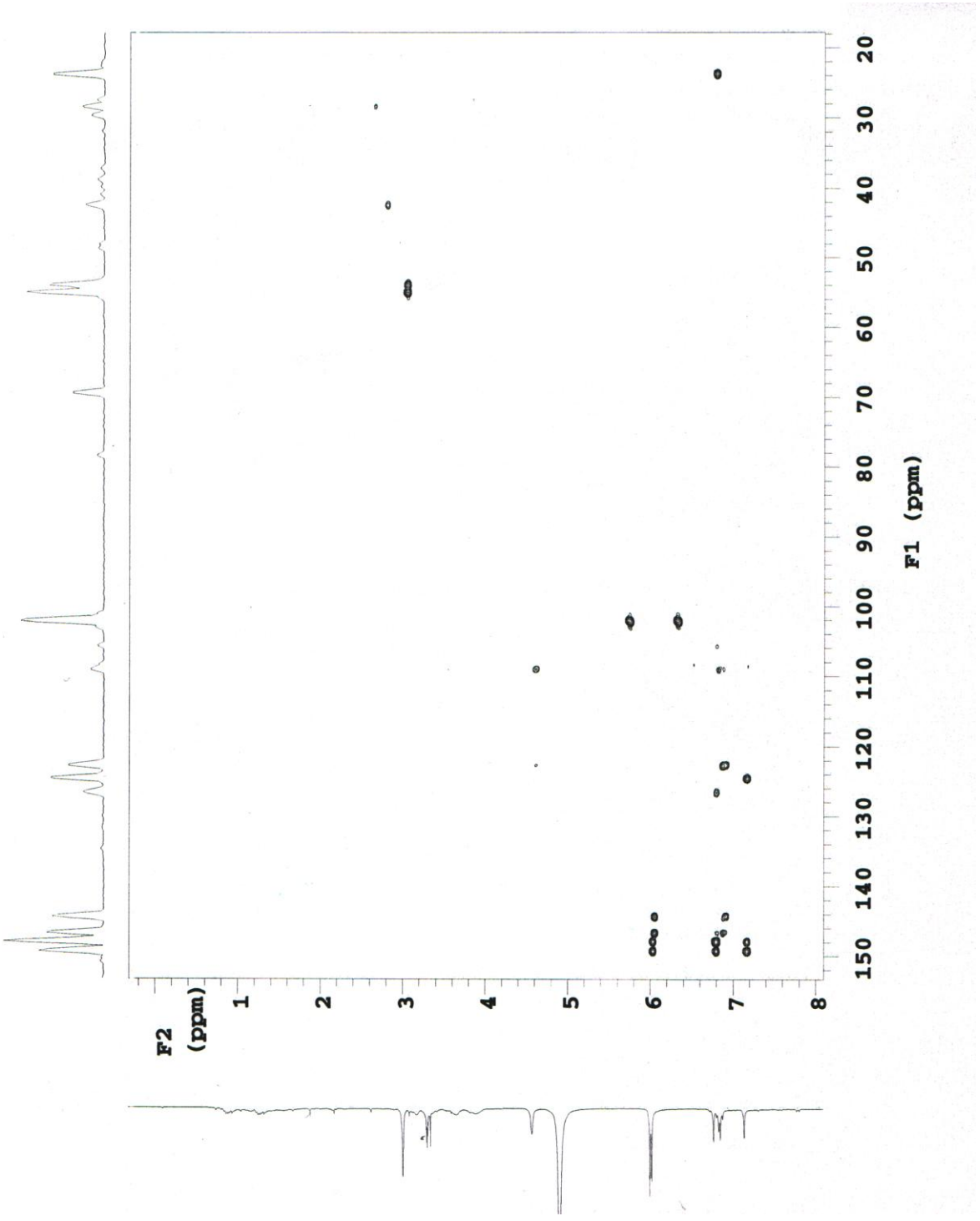
Şekil 5. 1. 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin bileşiğine ait HMBC korelasyonları



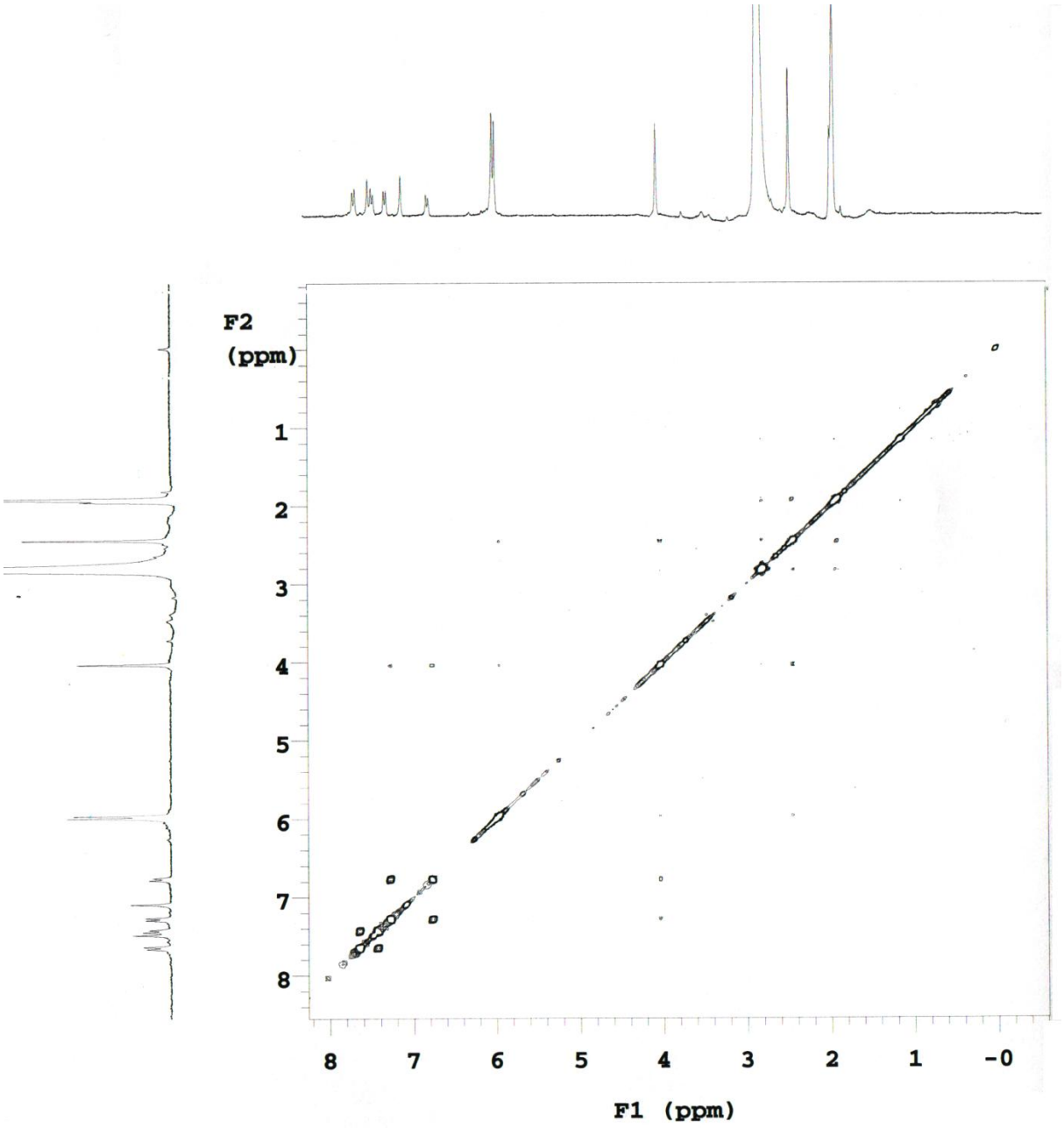
Şekil 5. 2. 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin bileşiğine ait ^{1}H-NMR (300 MHz, Aseton-d_6) spektrumu



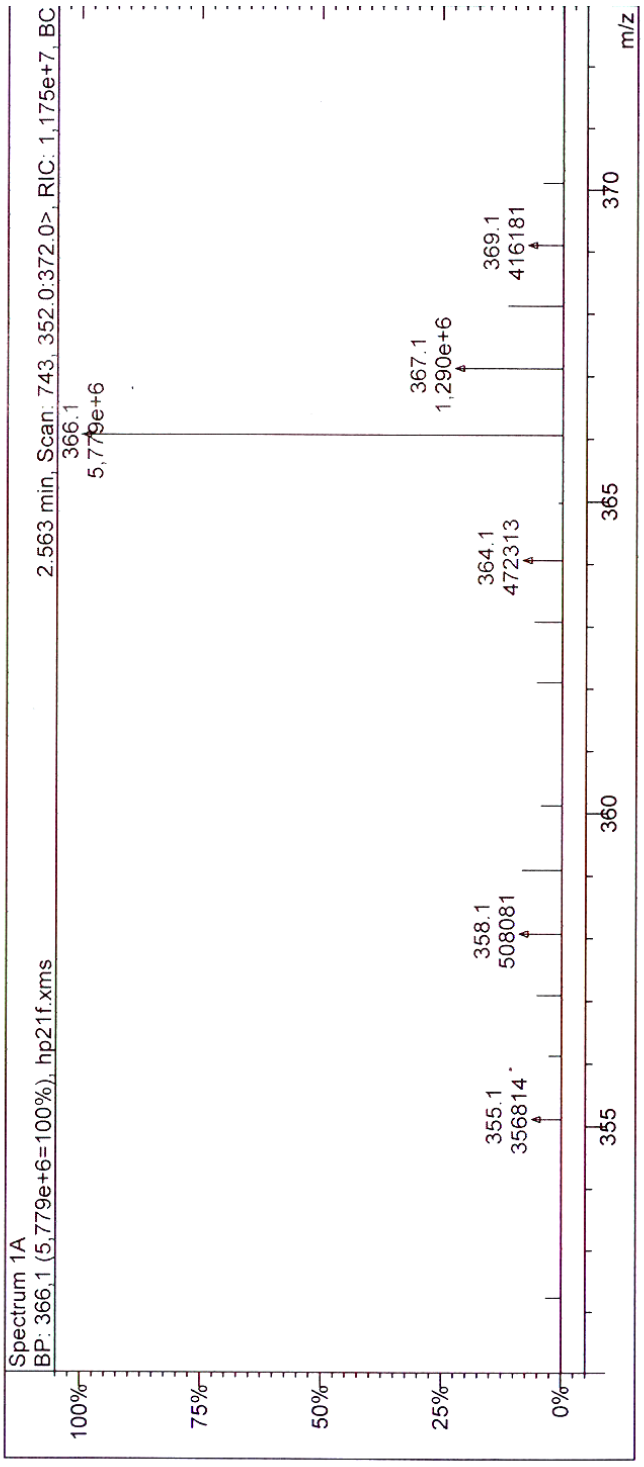
Şekil 5. 3. 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin bileşiğine ait HMQC spektrumu



Şekil 5. 4. 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin bileşiğine ait HMBC spektrumu

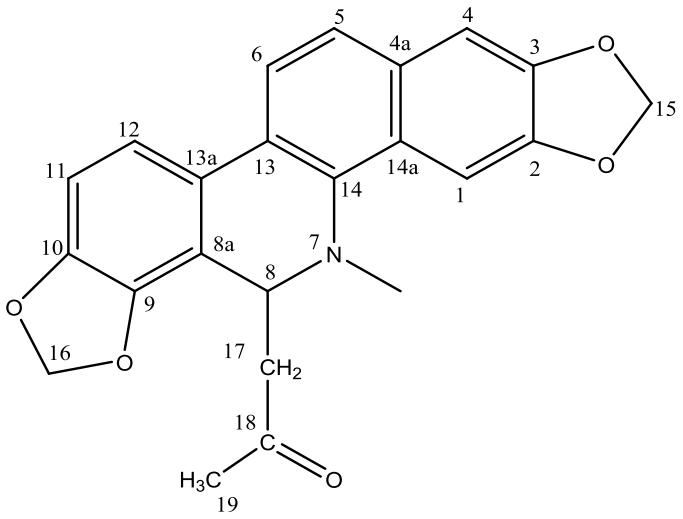


Şekil 5. 5. 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 5. 6. 8-metoksi-11,12-metilendieter sanguinarin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

5. 1. 2. 2 numaralı bileşik: 8-Asetonildihidrosanguinarine



8-Asetonildihidrosanguinarine

8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiği çeşitli *Hypecoum* türlerinden izole edilmiştir [47].

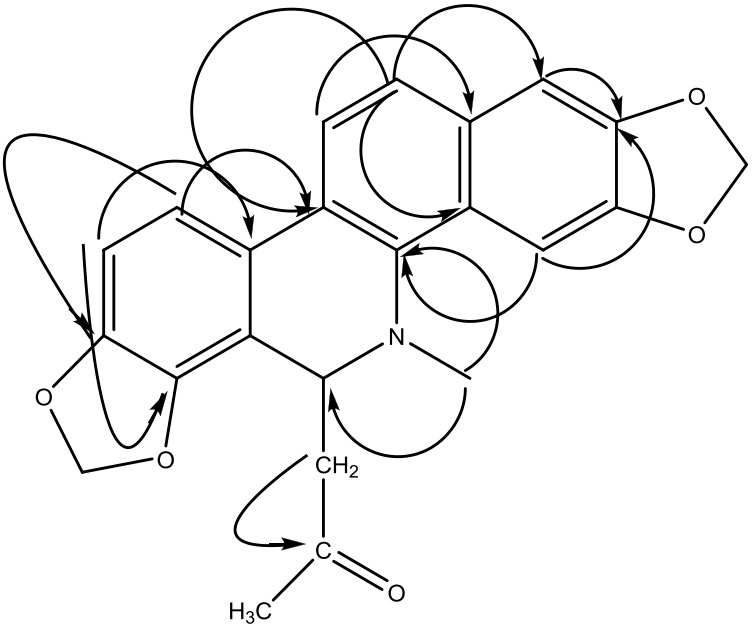
Bileşiğin ^{1}H-NMR spekturumunda aromatik halkada *para* konumundaki protonlardan H-1, 7.32 ppm'de (s, 1H), H-4 ise 7.08 ppm'de (s, 1H) gözlenmişlerdir. H-5 (δ_H 7.43) ve H-6 (δ_H 7.67) protonlarının 8.1 Hz değerine sahip yarılma sabitleri ile verdikleri dubletler birbirleri ile *orto* konumda olduklarını göstermektedir. Benzer bir AB sisteminde, H-11 (δ_H 6.78, d, *J*=8.1 Hz, 1H) ve H-12 (δ_H 7.32, d, *J*=8.1 Hz, 1H) birbirlerinden etkilenerek yarılma göstermişlerdir. H-15 ve H-16 protonları iki tane elektronegatif oksijen atomu arasında kaldıklarından dolayı düşük manyetik alanda sırasıyla 5.97 (d, *J*=3.6 Hz, 2H) ve 5.98 (d, *J*=3.6 Hz, 2H) ppm'de gözlenmişlerdir. Aynı nedenden dolayı HMQC spektrumunda bu protonların karbonları, 101.9 (C-15) ve 101.6 (C-16) ppm'de gözlenmiştir. İzokinolin halkasındaki azot atomuna bağlı olan metil grubu (H-7) 2.49 ppm'de (s, 3H) gözlenmiştir. 4.73 ppm'de gözlenen izokinolin halkasındaki azot atomuna komşu olan H-8 protonu ise H-17α ve H-17β protonlarından etkileşerek dd (*J*=4.1 ve 3.9 Hz, 1H) olarak gözlenmiştir. Hem azot atomu ve aromatik halkaya komşu olduğu için de aşağı alanda çıkmıştır. Bu protonun karbonu HMQC spekturumunda 54.5 ppm olarak bulunmuştur. (H-17α) 2.39 ppm'de (dd, *J*=10.8 ve 3.9

Hz, 1H) ve (H-17β) 2.19 ppm'de (dd, *J*=10.8 ve 4.1Hz, 1H) gözlenmiştir. Burada gözlenen dd sinyalinde büyük *J* değeri aynı karbon atomundaki (H-17) hidrojenlerin birbirleri ile yaptığı geminal etkileşimlerden, küçük *J* değeri ise visinal proton (H-8) ile yaptığı etkileşimden kaynaklanmaktadır. HMQC'de H-17 protonlarının karbonu 46.4 ppm olarak bulunmuştur. H-19 (δ_H 1.95, s, 3H) protonu ise karbonil atomuna komşu olduğu için singlet gözlenmiştir.

Bileşiğin DEPT spektrumu alınmış ve 6 tanesi aromatik halkada olmak üzere 7 tane metin karbonu, 4 tane metilen karbonu ve 2 tane de metil karbonu gözlenmiştir. Aromatik halkanın metin karbonları (C-1) 100.2, (C-4) 104.4, (C-5) 124.4, (C-6) 120.2, (C-11) 107.8 ve (C-12) 116.8 ppm'de azota komşu diğer metin karbonu C-8 ise 54.5 ppm'de gözlenmişlerdir. (C-17) karbonu 46.4, (C-15) ve (C-16) karbonları ise 101.9 ve 101.6 ppm'de metilen olarak tespit edilmiştir. Azot atomuna bağlı olan metil karbonu (C-7) 42.6, karbonile bağlı olan metil karbonu (C-19) ise 30.0 ppm'de gözlenmiştir.

Aromatik halkadaki kuarterner karbonlar ise HMBC spektrumundan (C-2) 148.7, (C-3) 148.0, (C-4a) 131.5, (C-8a) 116.1, (C-9) 144.8, (C-10) 148.0, (C-13a) 126.0, (C-14) 139.5, (C-14a) 127.5 ve (C-13) 123.5 ppm olarak tespit edilmiştir. Bu kuarterner karbonlardan (C-2), (C-3), (C-9) ve (C-10) karbonlarının diğer karbon atomlarına göre aşağı alanda çıkmalarının nedeni elektronegatif oksijene komşu olmalarından dolayıdır.

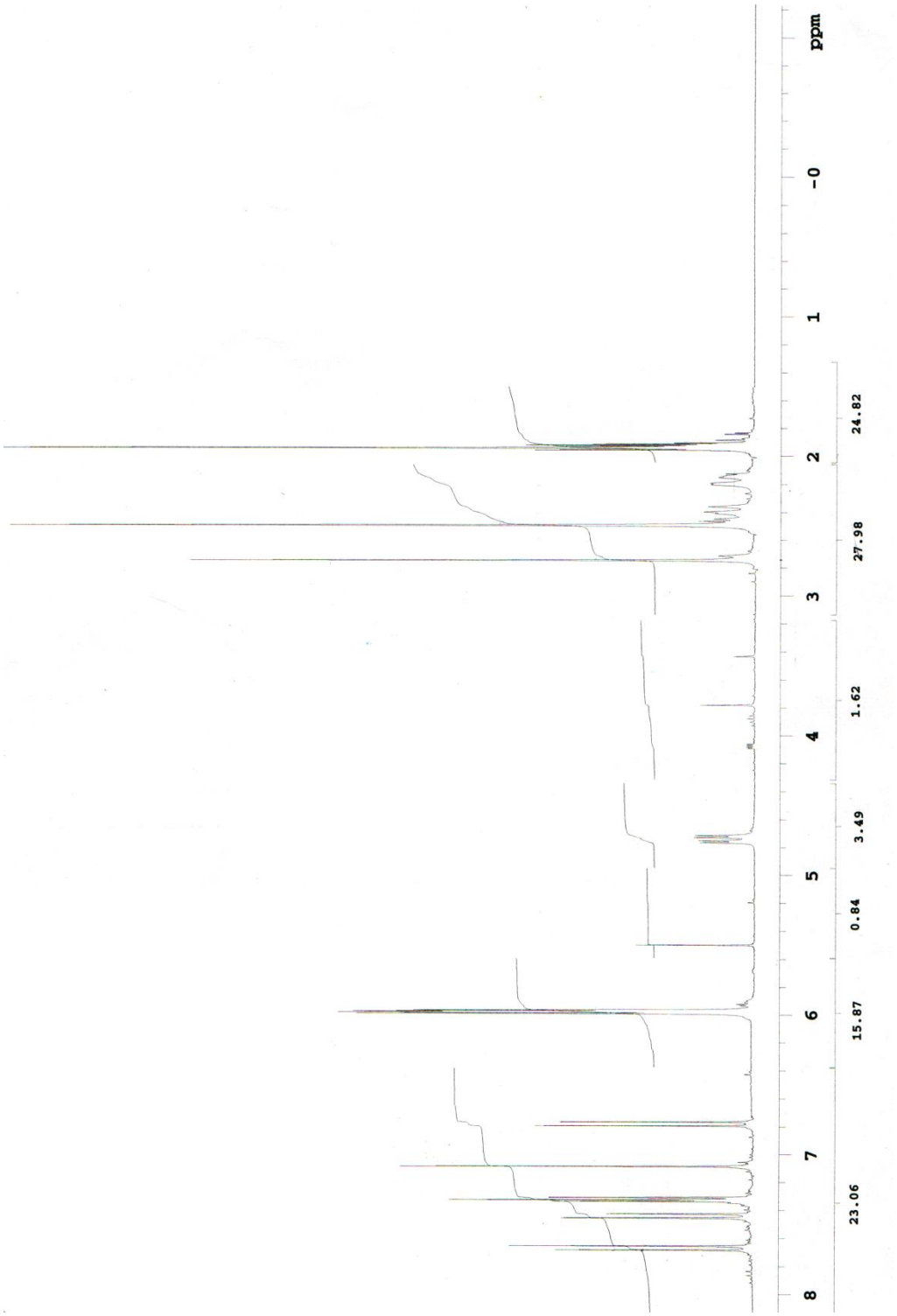
HMBC spekturumunda önemli eşleşmelerden biri H-11 (δ_H 6.78) ile kuarterner karbon atomları olan C-9 (δ_C 144.8) ve C-13a (δ_C 126.0) arasında gözlenmiştir. Ayrıca H-12'nin (δ_H 7.32) C-10 (δ_C 148.0) ile eşleşmesi gözlenmiştir. H-6'nın (δ_H 7.67) C-14 (δ_C 139.5) ve C-4a (δ_C 131.5) ile H-5'in (δ_H 7.43) ise C-14a (δ_C 127.5) ve C-13 (δ_C 123.5) ve C-4 (δ_C 104.4) ile gözlenmiştir. H-4 (δ_H 7.08) protonunun C-5 (δ_C 124.4), C-14a (δ_C 127.5) ve C-2 (δ_C 148.7) ile gözlenmiştir. H-1 (δ_H 7.32) ise C-3 (δ_C 148.0) ve C-4a (δ_C 131.5) ile korelasyon göstermiştir. Azot atomuna bağlı olan metil grubunun protonu H-7 (δ_H 2.49) , C-8 (δ_C 54.5) ve C-14 (δ_C 139.5) ile eşleşme göstermiştir. H-12 (δ_H 7.32) ve H-5 (δ_H 7.43) protonları da C-13 (δ_C 123.5) karbonu ile eşleşme göstermiştir. δ_H 2.19 ve 2.39 ppm'de gözlenen H-17 protonlarının karbonil karbonu C-18 (δ_C 190.0) ile korelasyonu gözlenmiştir. Bu veriler yardımıyla **2** nolu bileşiğin iskelet yapısı doğrulanmıştır.



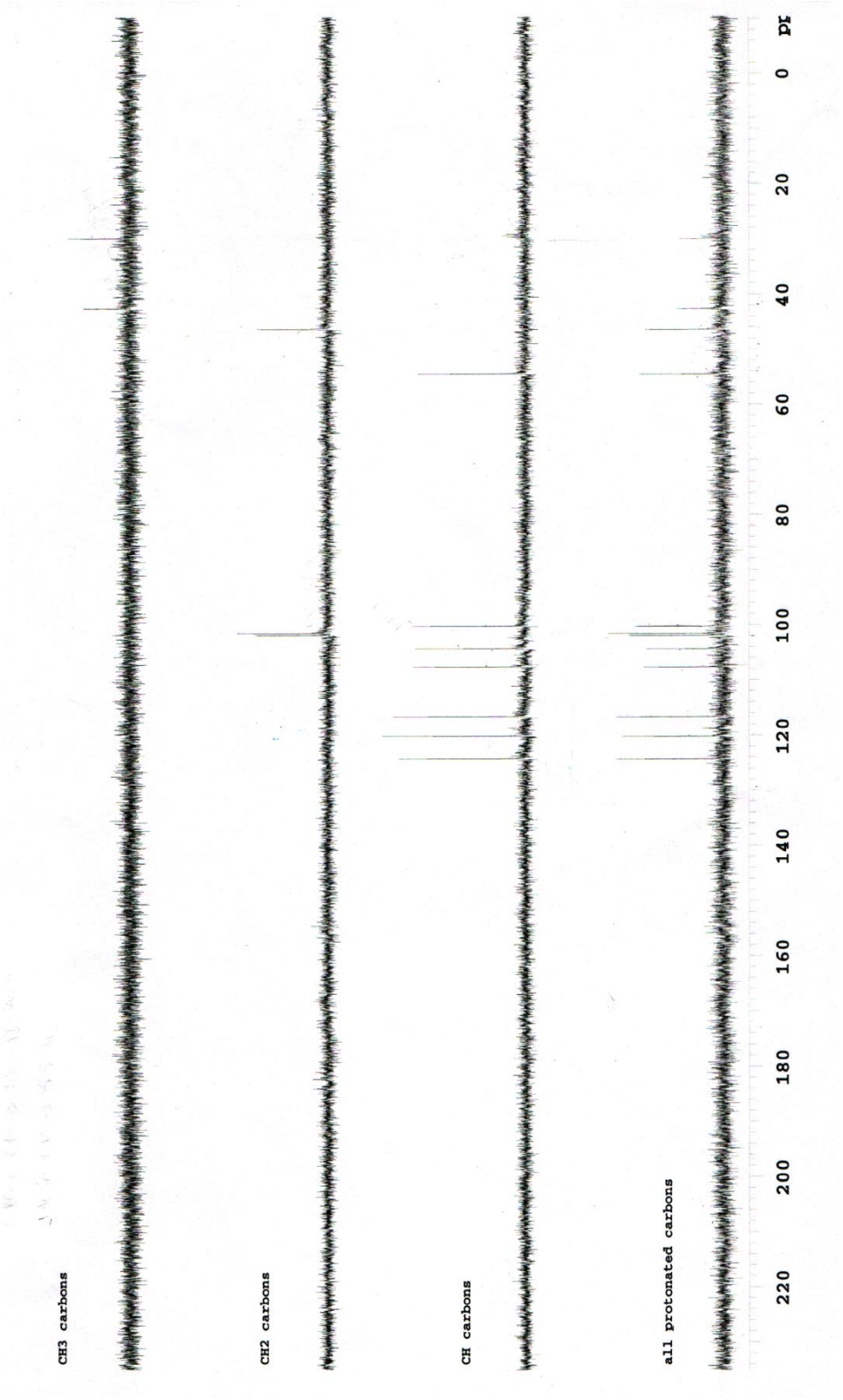
Şekil 5. 7. 8-Asetonildihidrosanguinarine bileşiğine ait HMBC korelasyonları

COSY spekturumunda aromatik halkada birbirlerine komşu olan protonlar ve H-5 ve H-6 arasında, yine aynı durumda bulunan protonlar H-11 ve H-12 arasında eşleşme gözlenmiştir. H-16 ile H-19 protonları arasında da eşleşme komşu olmamalarına rağmen uzayda yakın konumda olduklarını destekler niteliktedir.

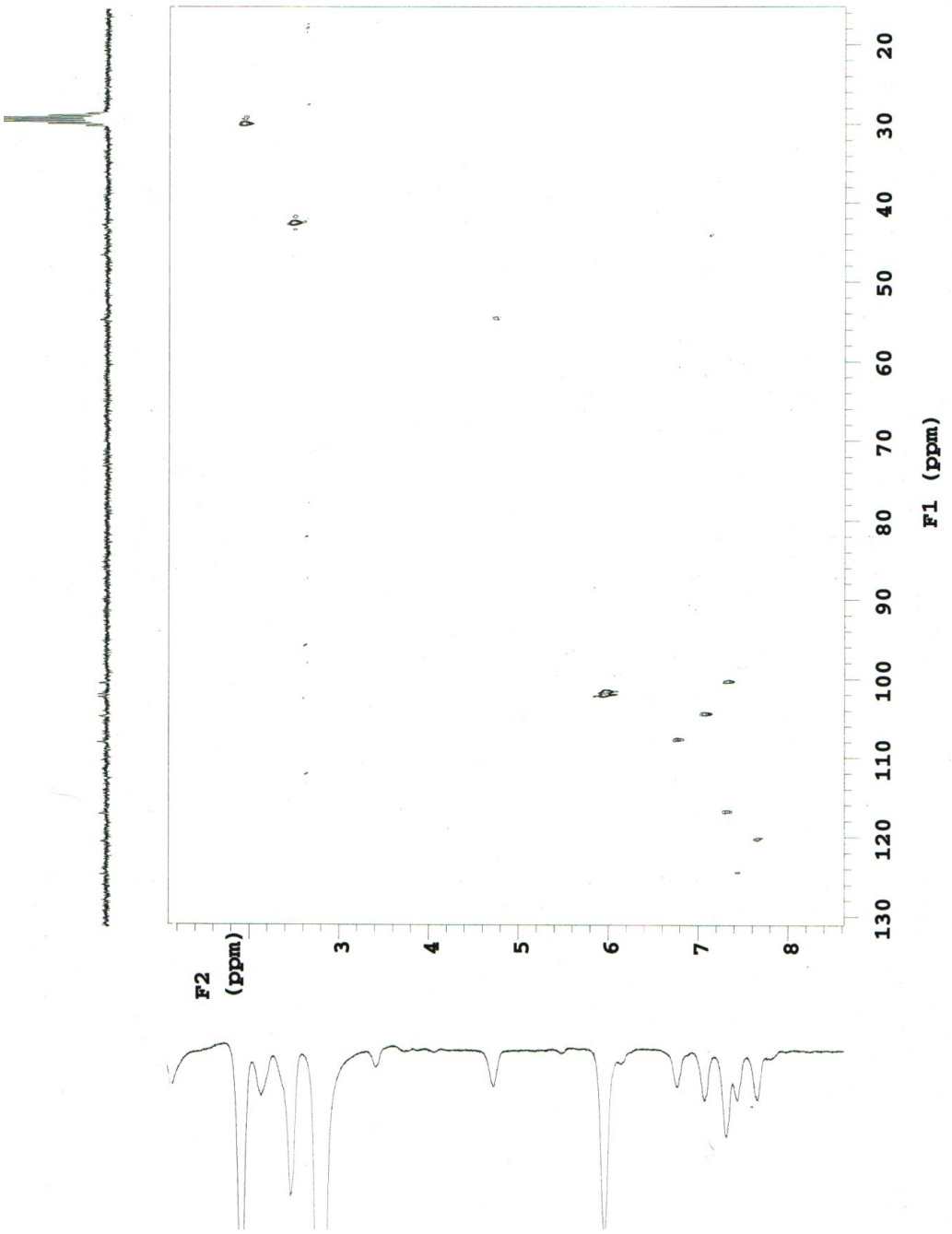
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğin 8-Asetonildihidrosanguinarin olduğu doğrulanmıştır [53].



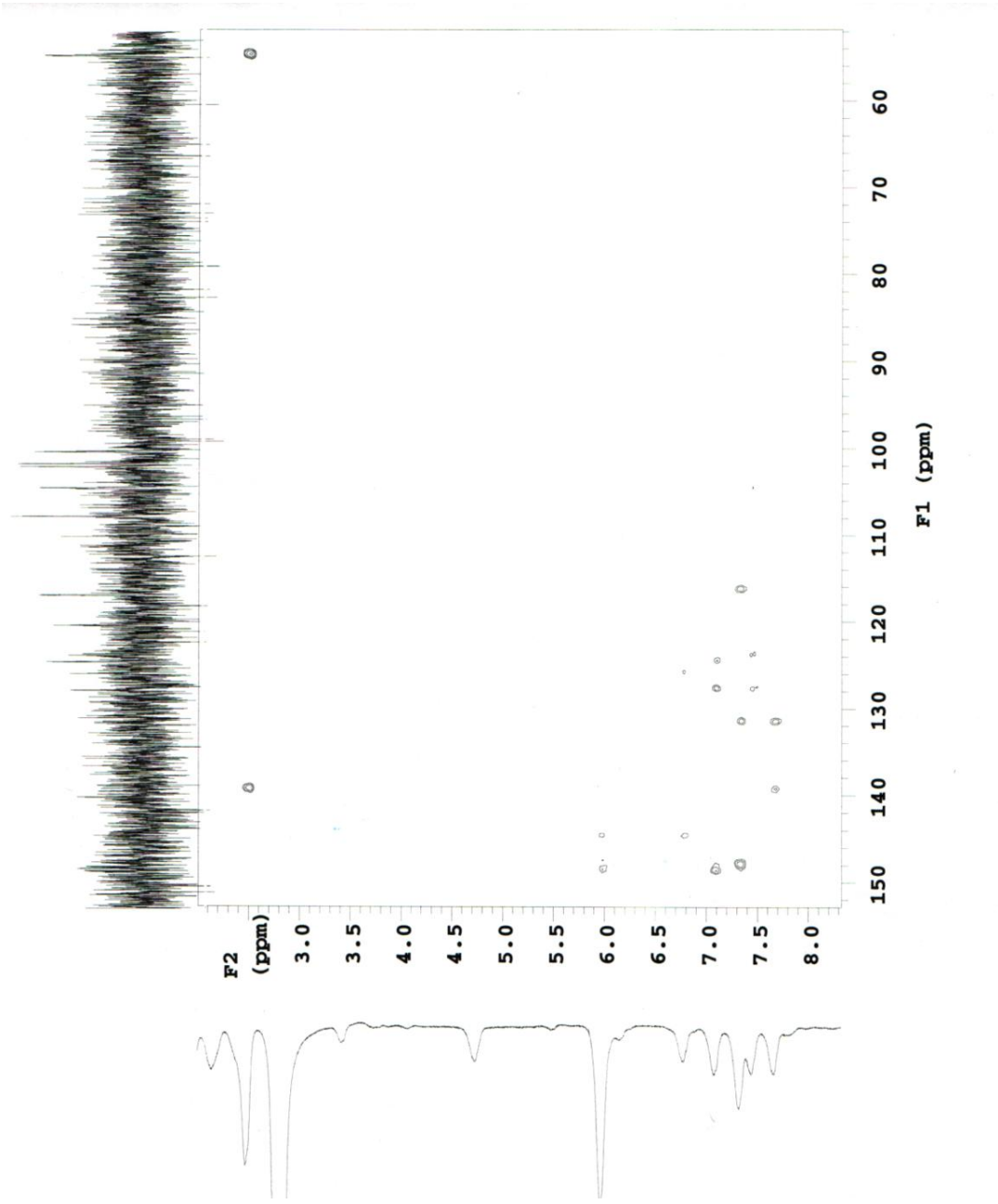
Şekil 5. 8. 8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiğine ait ^{1}H-NMR (300 MHz, Aseton-d_6) spektrumu



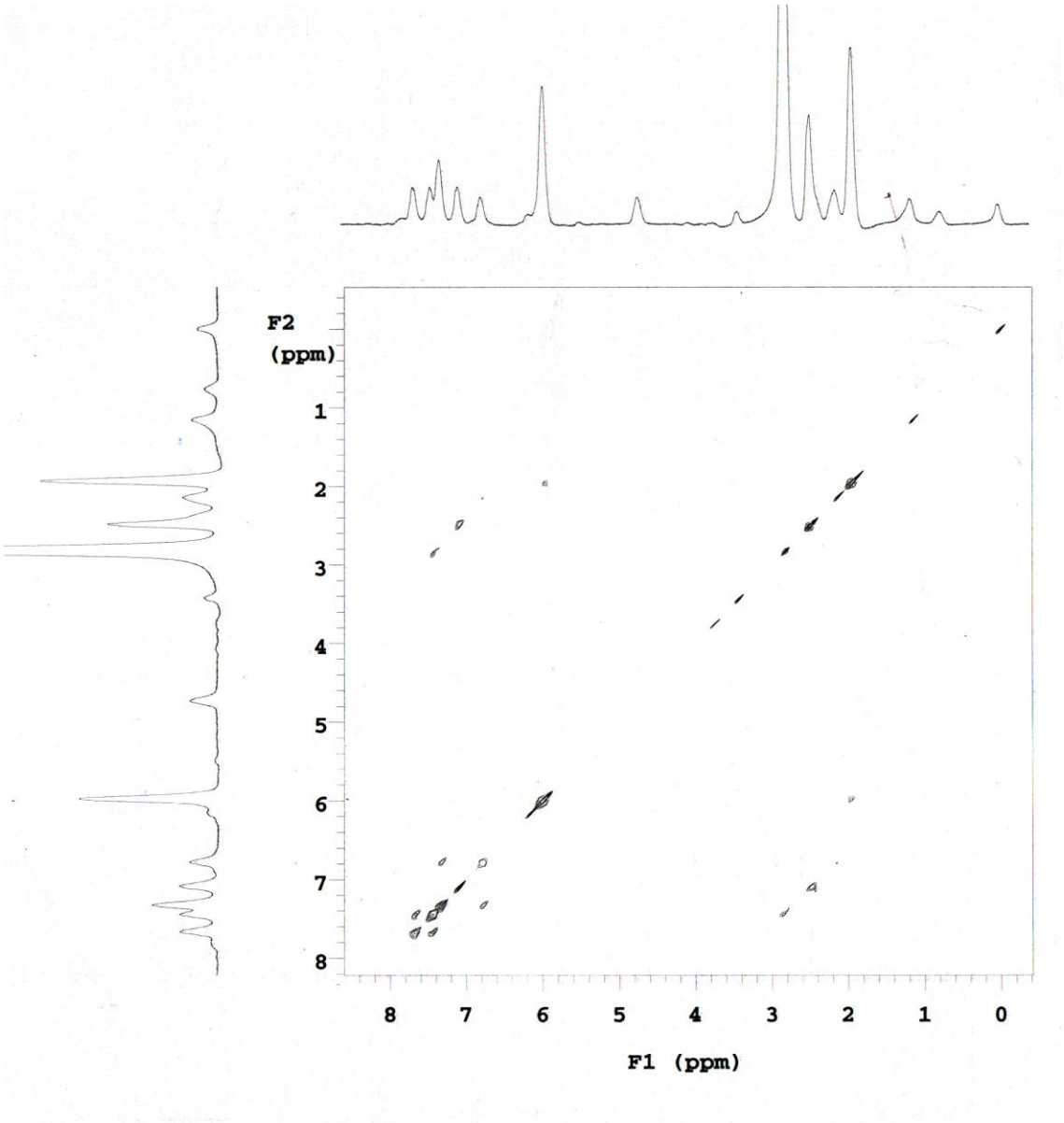
Şekil 5. 9. 8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, Aseton-d_6) spektrumu



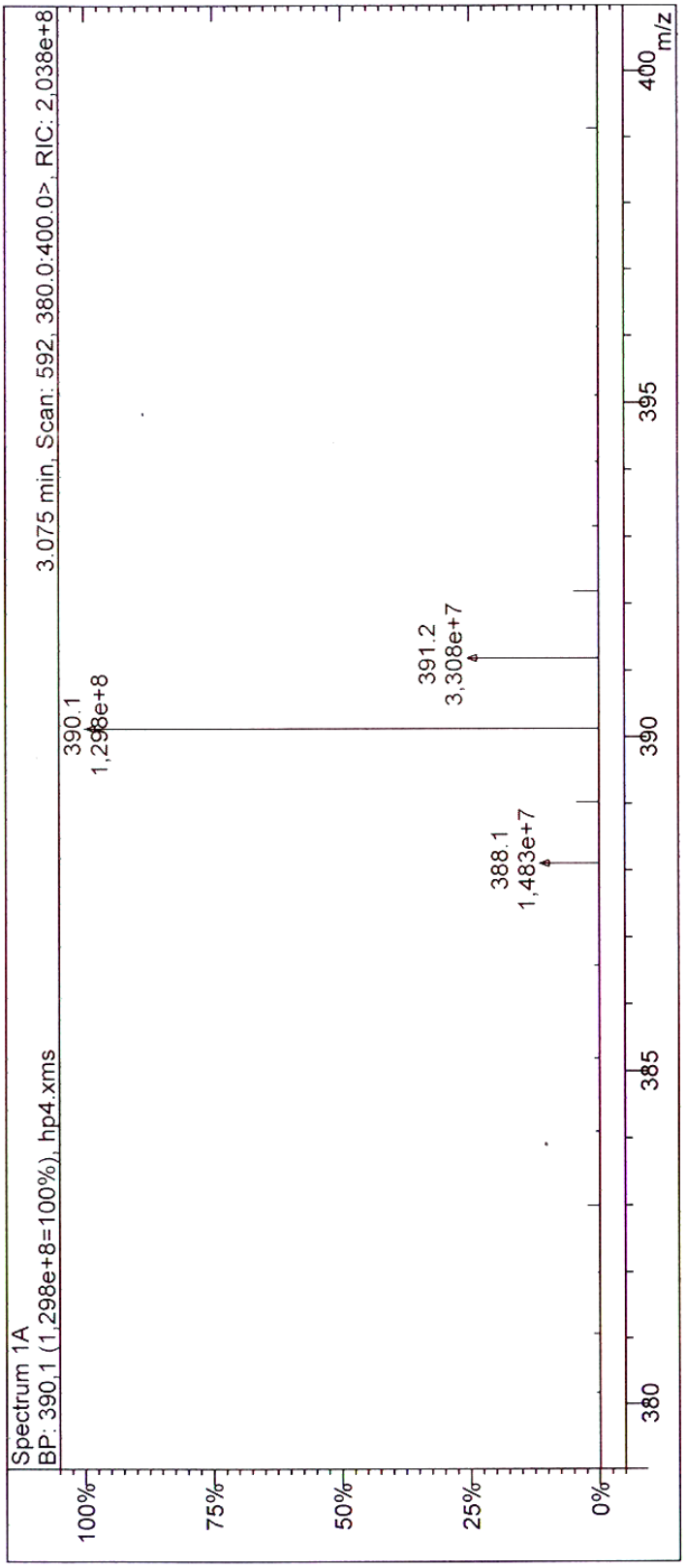
Şekil 5. 10. 8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiğine ait HMQC spektrumu



Şekil 5. 11. 8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiğine ait HMBC spektrumu

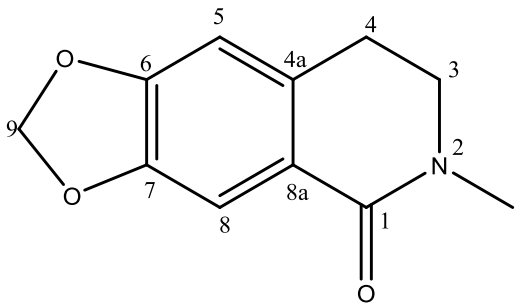


Şekil 5. 12. 8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 5. 13. 8-Asetonildihidrosanguinarin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

5. 1. 3. 3 numaralı bileşik: Oksohidrastin



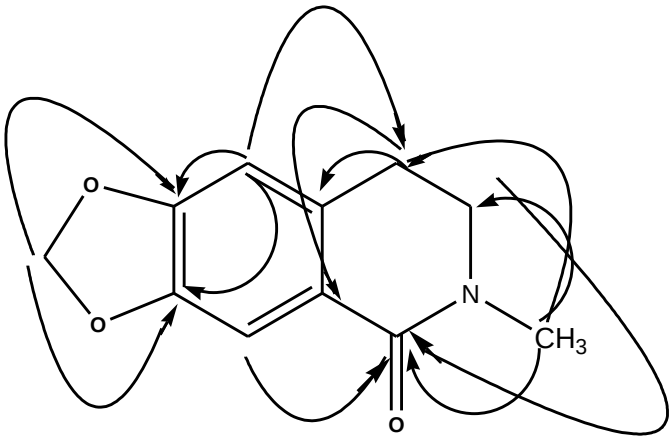
Oksohidrastin

Bileşiğin ^{1}H-NMR spekturumunda aromatik halkadaki H-8 protonu izokinolin halkasındaki karbonilin rezonananslа elektron çekmesinden dolayı aşağı alanda 7.36 ppm'de (s, 1H) singlet sinyal vermiş ve aromatik halkadaki diğer protonun H-5 6.73 (s, 1H) ppm'de singlet sinyal verdiği gözlenmiştir. Bu protonların karbonları HMQC spekturumundan sırasıyla 107.0 ve 107.4 olarak tespit edilmiştir. İzokinolin halkasının metilen protonları H-3, δ_H 3.53 (t, *J*=7.0 Hz, 2H) ve H-4, δ_H 2.89 (t, *J*=7.0 Hz, 2H) olarak gözlenmiştir. İzokinolin halkasındaki hidrojenlerden H-3 elektronegatif azot ile komşu olduğu için aşağı alanda 3.53 ppm'de (t, 2H) sinyal vermiştir. Azota bağlı metil protonları (H-2) ise 3.0 ppm'de (s, 3H) gözlenmiştir.

Bileşiğin DEPT spekturumu alınmış ve 2 metin karbonu, 3 metilen karbonu ve 1 metil karbonu piki çıkmıştır. İzokinolin halkasındaki azot atomuna komşu olan metilen karbonunun (C-3) 48.0 ppm'de ve halkadaki diğer metilen karbonunun da (C-4) 28.0 ppm'de olduğu HMQC spektrumundan tespit edilmiştir. Azot atomuna bağlı olan metil karbonu (C-2) ise 34.2 ppm'de, beşli halkadaki karbon atomu (-OCH_2O-, C-9) 101.8 ppm'de gözlenmiştir. HMQC'de bu karbonun protonu 6.03 ppm'de singlet olarak belirlenmiştir.

Kuarterner karbonların varlığı HMBC spektrumu sayesinde tespit edilebilmiştir. Aromatik halka protonlarından H-8 protonu karbonil karbonu C-1 (δ_C 164.0), C-6 (δ_C 151.0) ve C-4a (δ_C 134.0) ile, H-5 protonu ise C-7 (δ_C 147.0), C-8a (δ_C 124.0), C-4 (δ_C 28.0) ile korelasyon vermişlerdir. (C-6) 151.0 ppm'de, (C-7) 147.0ppm'de, (C-4a) 134.0

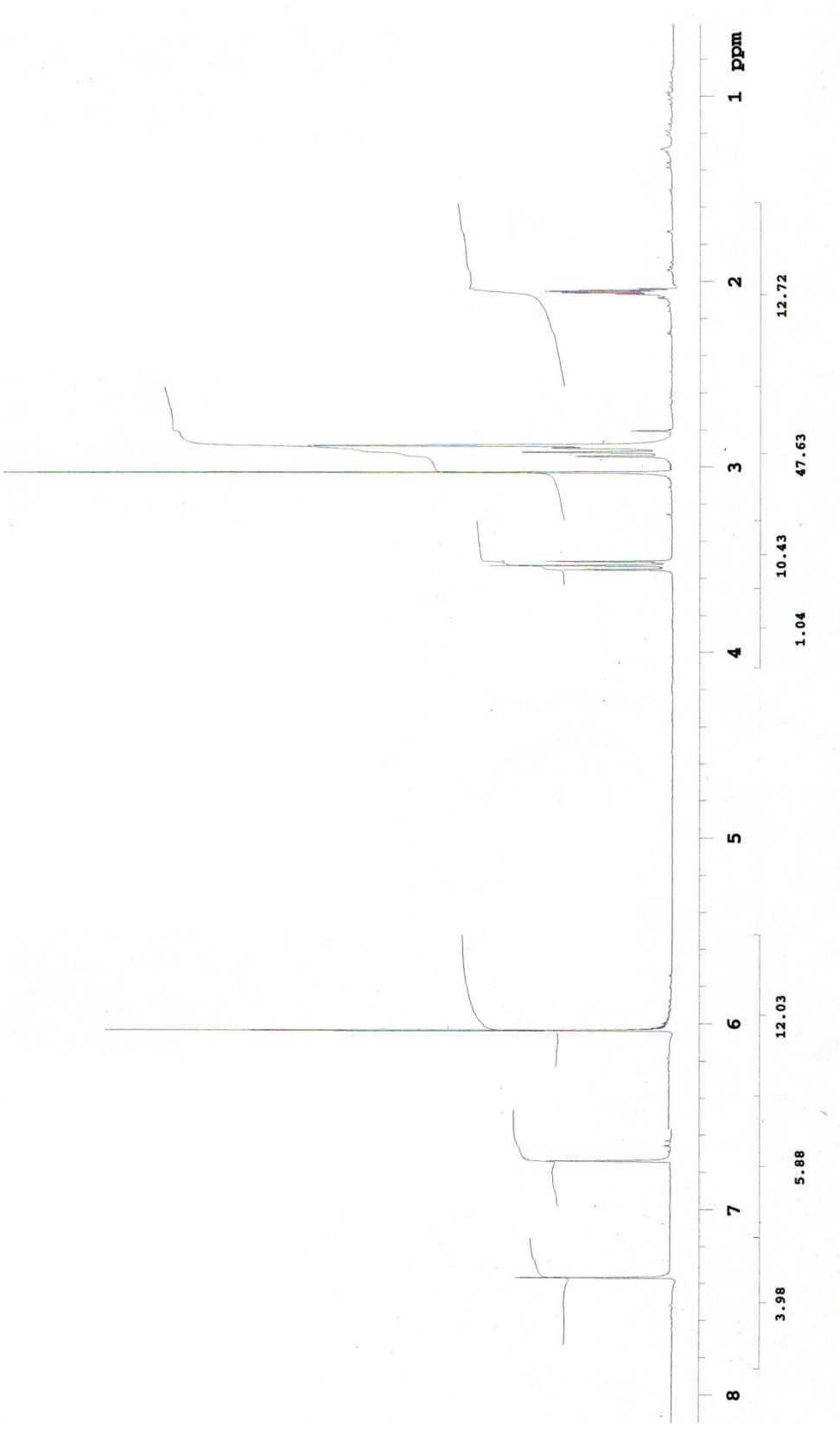
ppm'de ve (C-8a) 124.0 ppm'de sinyal vermişlerdir. HMBC spekturumundaki diğer önemli eşleşmeler N-CH_3 (δ_H 3.0) ile, C-1 (δ_C 164.0) ve C-3 (δ_C 48.0) karbonları arasında gözlenmiştir. C-4a (δ_C 134.0), C-8a (δ_C 124.0) ve C-3 (δ_C 48.0) karbonları H-4 (δ_H 2.89) ile eşleşme göstermiştir. H-3 (δ_H 3.53) protonları da C-4 (δ_C 28.0) C-4a (δ_C 134.0) ve C-1 (δ_C 164.0) karbonları ile eşleşme göstermiştir. H-9 metilen protonları (δ_H 6.03) ise C-6 (δ_C 151.0) ve C-7 (δ_C 147.0) karbonları ile korelasyon göstermişlerdir.



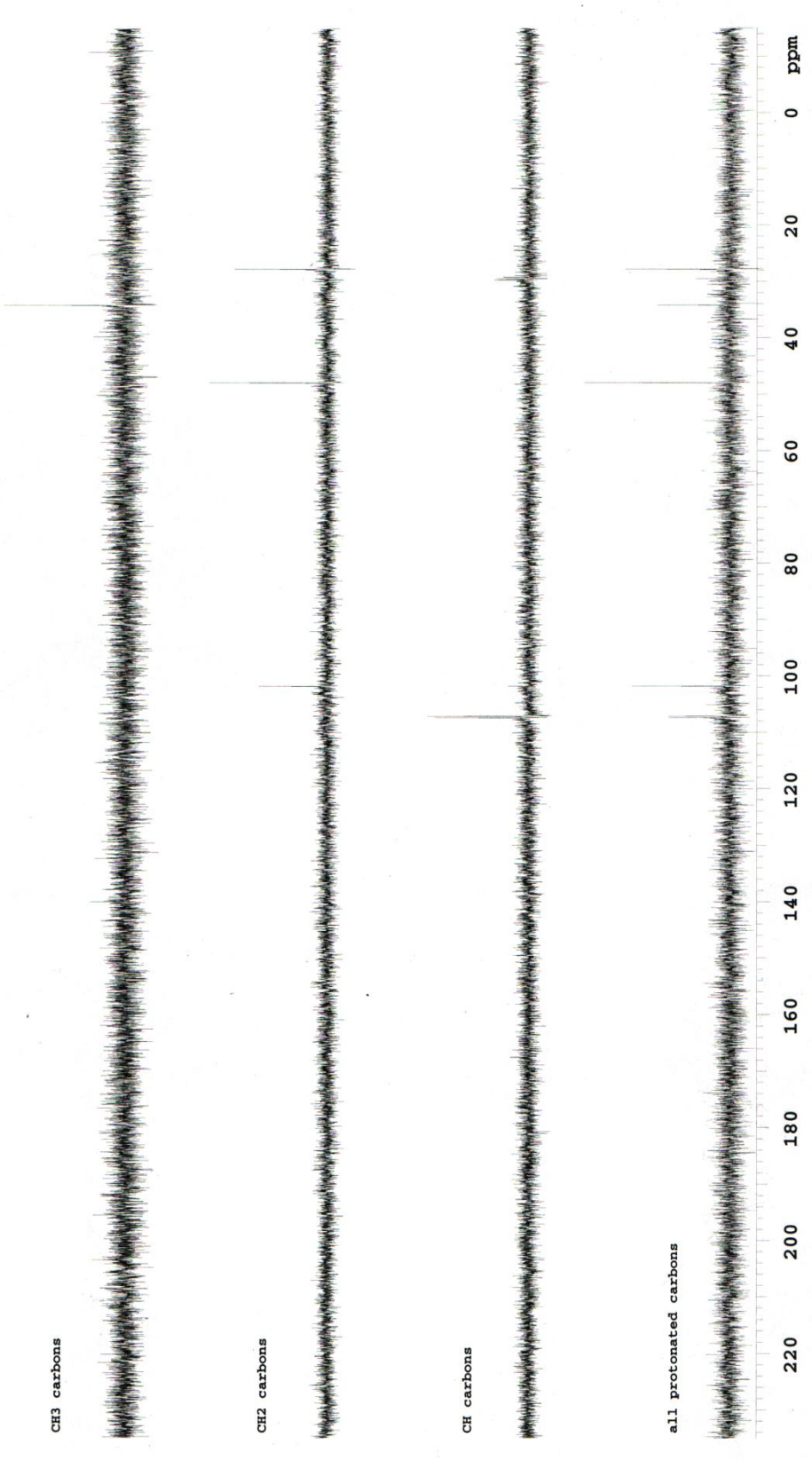
Şekil 5. 14. Oksohidrastin bileşiğine ait HMBC korelasyonları

COSY spekturumunda H-3 (δ_H 3.53) ve H-4 (δ_H 2.89) protonları arasında komşu olmalarından kaynaklanan bir eşleşme gözlenirken, H-9 (δ_H 6.03) protonlarının H-5 (δ_H 6.73) ve H-8 (δ_H 7.36) ile uzayda yakınlaşmalarından kaynaklanan bir eşleşme yaptığı belirlenmiştir.

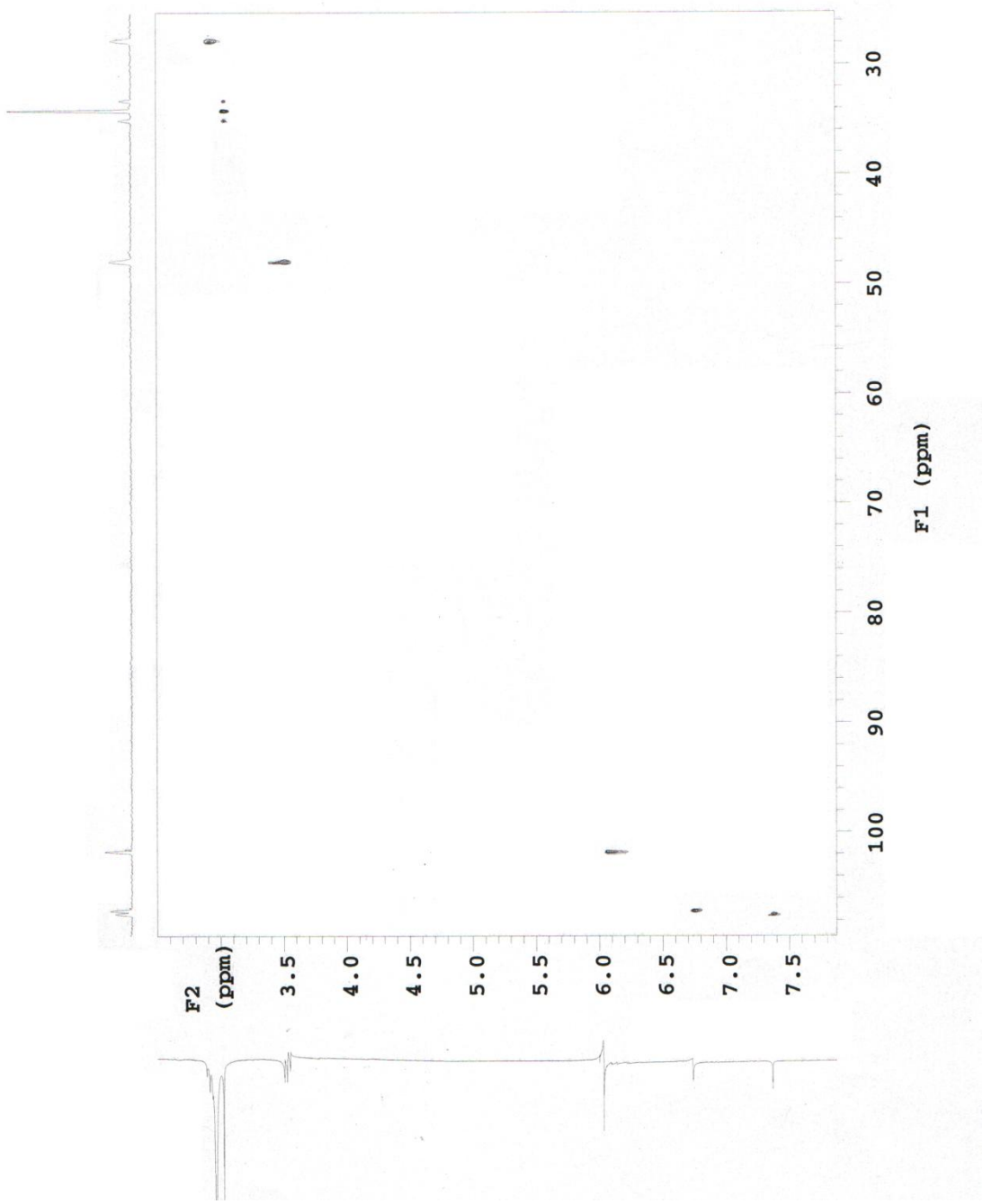
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğin Oksohidrastin olduğu doğrulanmıştır [9].



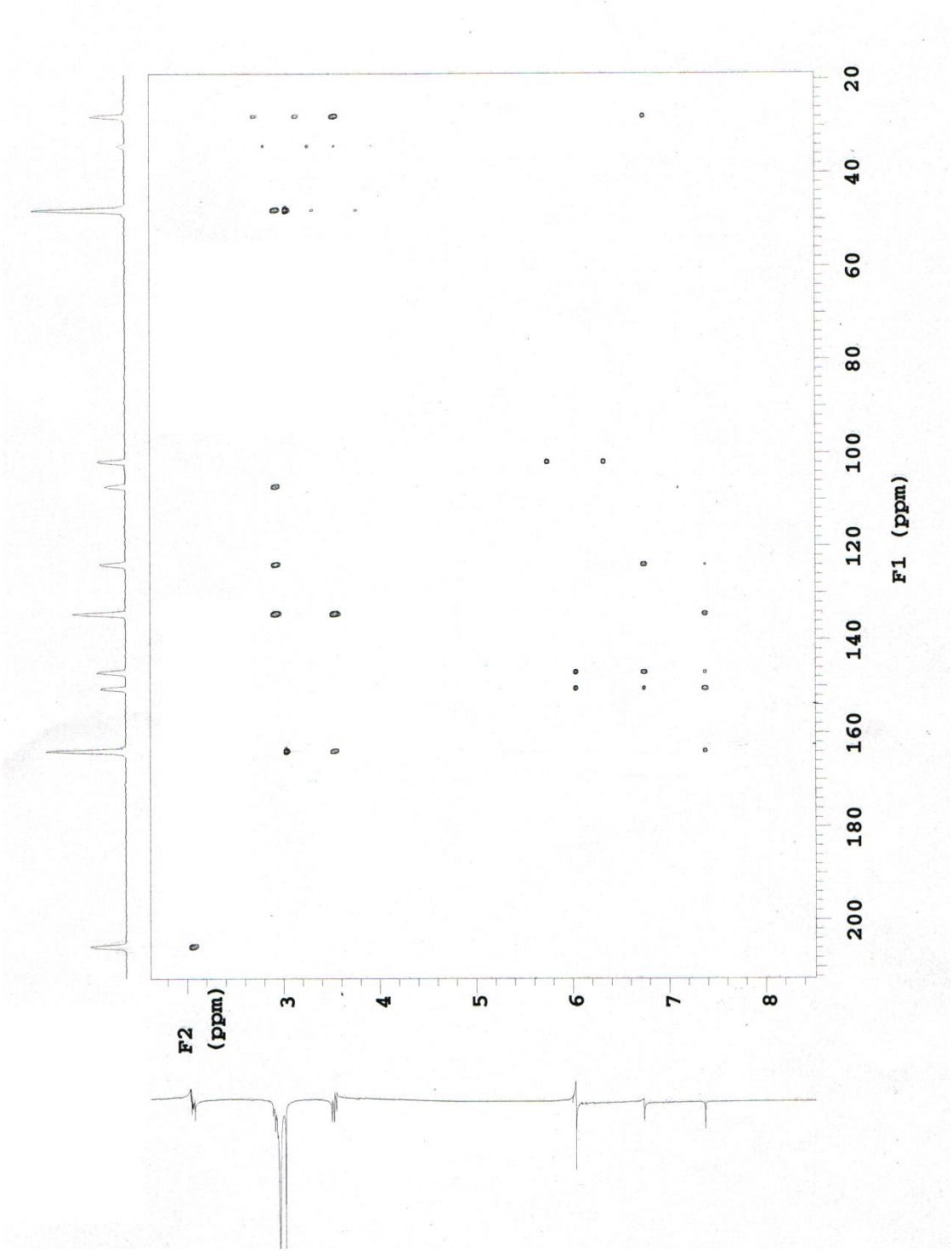
Şekil 5. 15. Oksohidrastin bileşiğine ait ^{1}H-NMR (300 MHz, Aseton-d_6) spektrumu



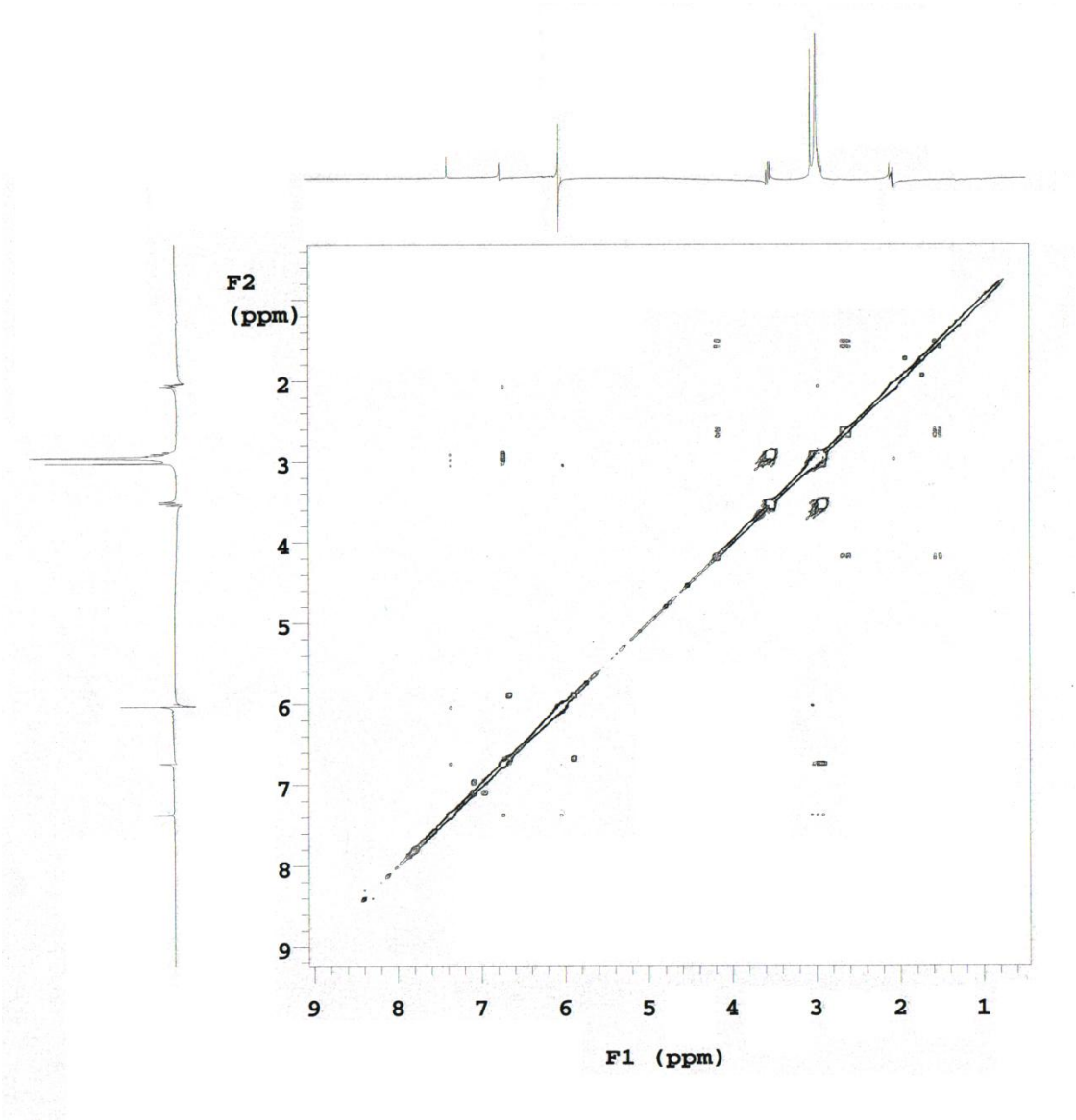
5. 16. Oksohidrastin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, Aseton-d_6) spektrumu



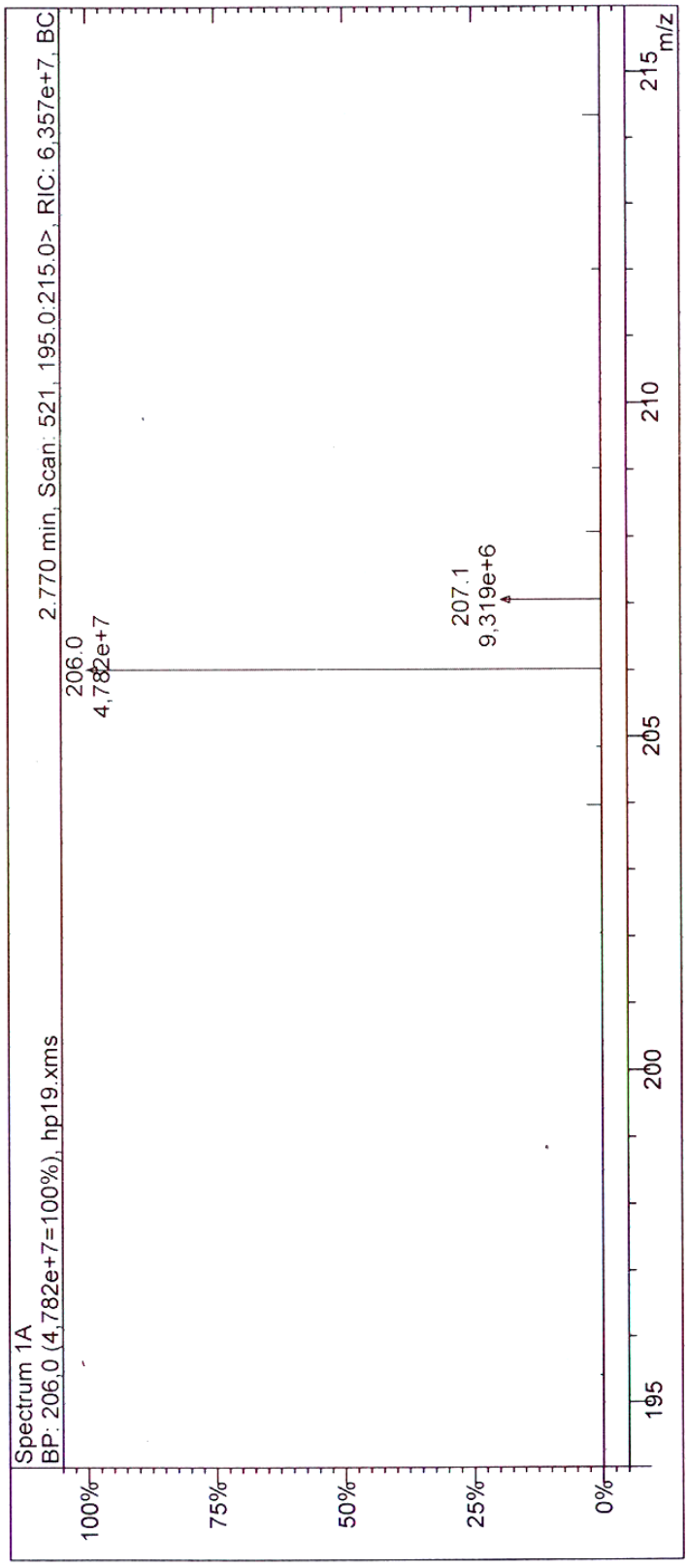
Şekil 5. 17. Oksohidrastin bileşiğine ait HMQC spektrumu



Şekil 5. 18. Oksohidrastin bileşiğine ait HMBC spektrumu

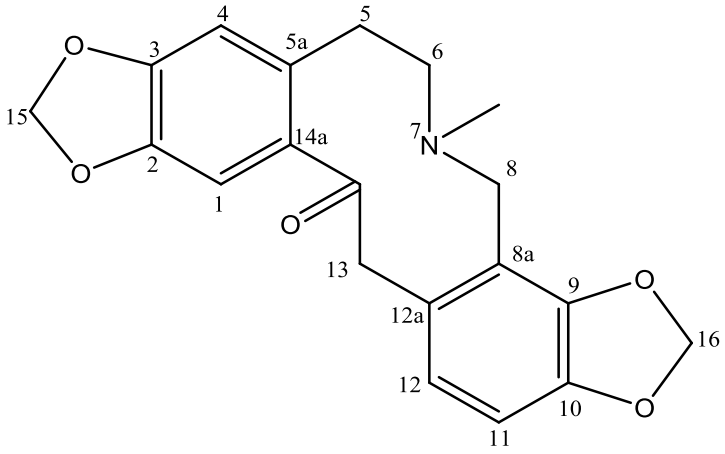


Şekil 5. 19. Oksohidrastin bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 5. 20. Oksohidrastin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

5. 1. 4. 4 numaralı bileşik: Protopin



Protopin

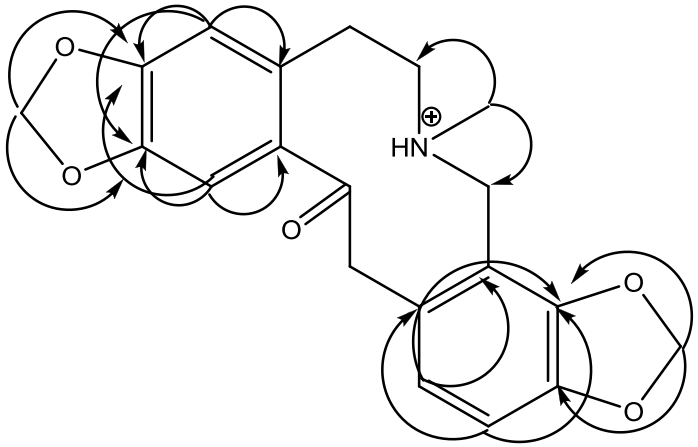
Bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda 7.14 (H-1) ve 6.77 (H-4) ppm'de gözlenen singlet sinyaller iki aromatik halka protonunun birbiri ile *para* konumda olduğunu göstermektedir. 6.86 (d, J=8.1 Hz, 1H, H-11) ve 6.82 (d, J=8.1 Hz, 1H, H-12) ppm'de gözlenen dubletler ise 8.1 Hz'lik yarılma sabitleri nedeniyle biribiri ile *orto* konumdaki hidrojenleri göstermektedir. H-15 ve H-16 (2x $-OCH_2O-$) protonları ise sırasıyla 6.00 ve 6.02 ppm'de singlet sinyal göstermişlerdir. Azot atomuna bağlı olan metilin protonları (H-7) 3.07 ppm'de singlet sinyal olarak gözlenmiş, HSQC spektrumunda karbonu (C-7) 42.2 ppm olarak tespit edilmiştir.

Azota komşu metilen protonları H-6α, H-6β ve H-8 sırasıyla 3.60 (m, 1H), 3.85 (m, 1H) ve 4.60 (m, 2H) ppm'de gözlemlenmişlerdir. HSQC spekturumunda bu protonların karbonları sırasıyla 54.0 (C-6) ve 55.0 (C-8) ppm'de gözlemlenmiştir. Diğer metilen protonları H-5α, H-5β ve H-13 sırasıyla 3.15 (m, 1H), 3.25 (m, 1H) ve 3.30 (m, MeOH ile örtüşmüş) gözlemlenmişlerdir. Bu protonların karbonları DEPT spekturumunda metilen karbonları olarak 25.0 (C-5) ve 30.0 (C-13) ppm'de gözlemlenmiştir.

DEPT spekturumunda 4 tane metin, 6 tane metilen ve 1 tane metil karbonu gözlenmiştir. HSQC spektrumunda H-1 ve H-4'ün karbonları (C-1) 105.5 ve (C-2) 108.3 ppm'de gözlenmişlerdir. Diğer aromatik halka protonları H-11 ve H-12'nin

karbonları ise (C-11) 108.8 ppm'de ve (C-12) 122.1 ppm'de gözlenmişlerdir. H-15 ve H-16 (2x-OCH_2O-)'nın karbonları ise sırası ile 102.1 ve 102.4 ppm'de gözlenmişlerdir. Protonu olmayan kuarterner karbonlar (C-2) 148.1, (C-3) 149.5, (C-5a) 124.4, (C-8a) 122.6, (C-9) 144.1, (C-10) 146.5, (C-12a) 122.6 ve (C-14a) 126.6 ppm'de HMBC korelasyonları ile tespit edilebilmişlerdir.

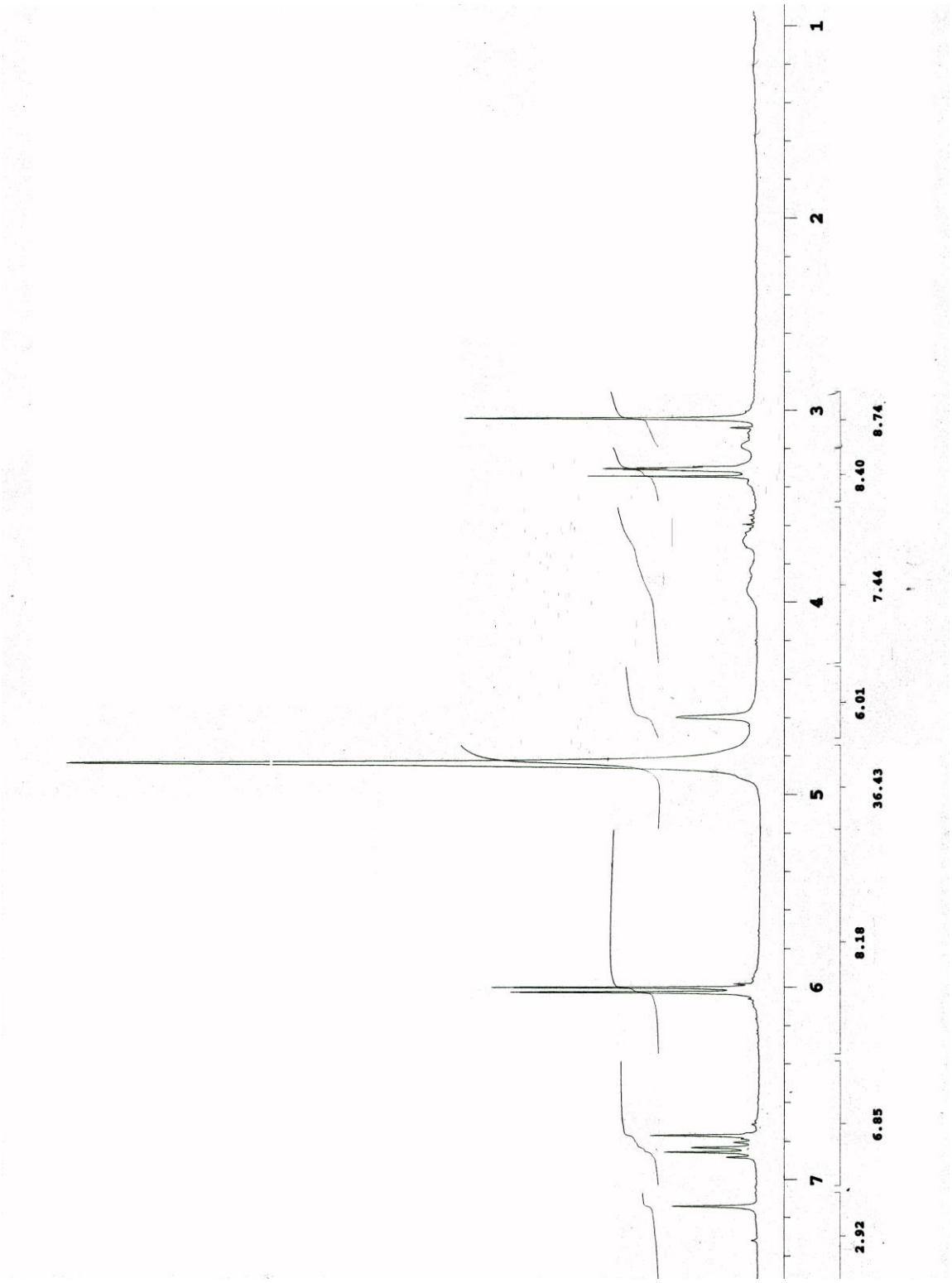
HMBC spekturumundaki önemli eşleşmeler H-1 (δ_H 7.14) protonu ile C-2 (δ_C 148.2), C-3 (δ_C 149.5) ve C-5a (δ_C 124.4) karbonları arasında, H-4 (δ_H 6.77) ile C-3 (δ_C 149.5), C-2 (δ_C 148.2), C-14a (δ_C 126.6) karbonları arasında gözlenmiştir. H-11 (δ_H 6.86) protonu ise C-9 (δ_C 144.1)ve C-12a (δ_C 122.4) karbonları ile, H-12 (δ_H 6.82) protonu ise C-8a (δ_C 122.6) ve C-10 (δ_C 146.5) karbonları ile eşleşme göstermiştir. H-15 (δ_H 6.00) protonları C-2 (δ_C 148.2) ve C-3 (δ_C 149.5) karbonları ile, H-16 (δ_H 6.02) protonları C-9 (δ_C 144.1) ve C-10 (δ_C 146.5) karbonları ile eşleşme göstermiştir. Azot atomuna bağlı olan metil grubunun protonları H-7 (δ_H 3.07) ise C-6 (δ_C 54.0) ve C-8 (δ_C 55.0) karbonları ile eşleşmiştir.



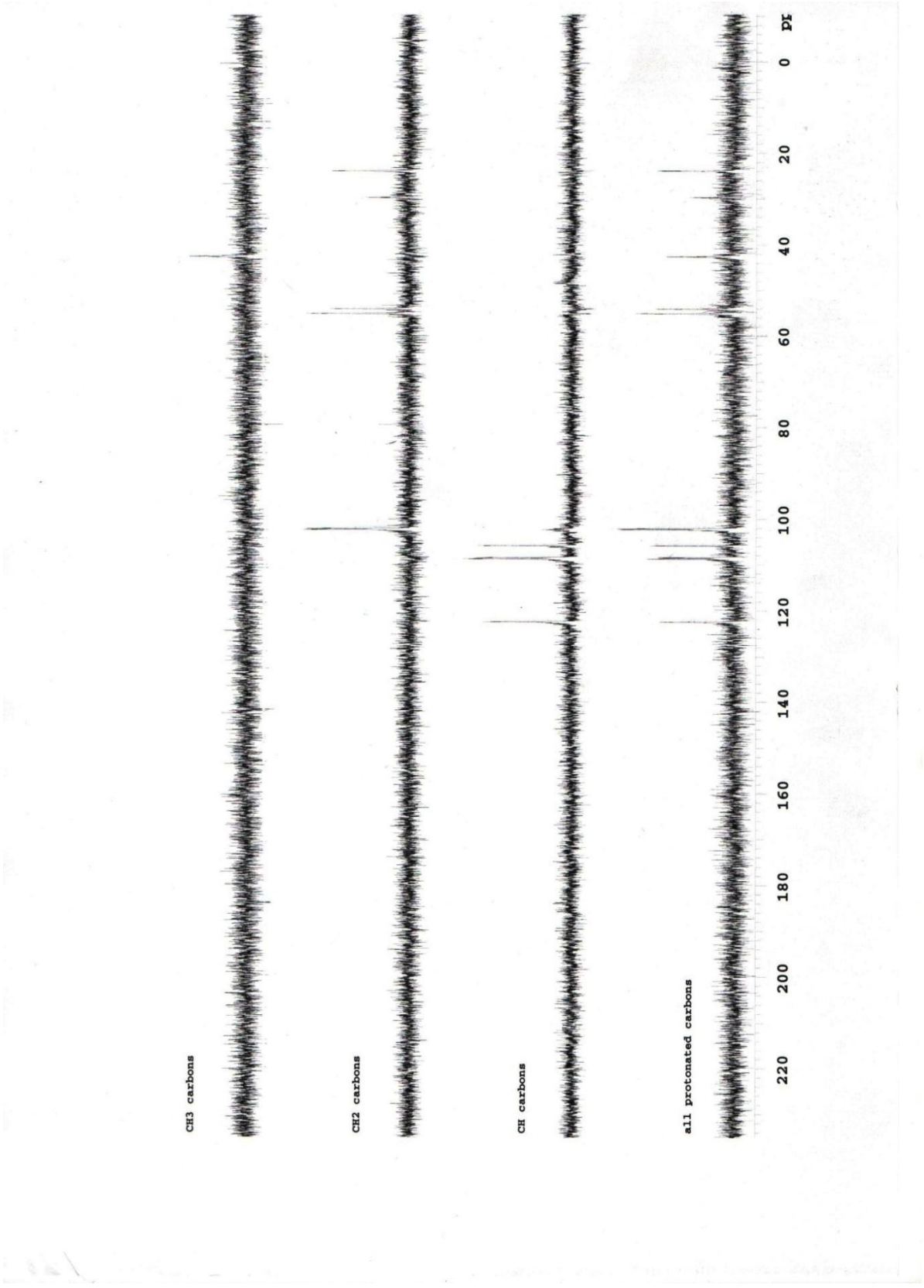
Şekil 5. 21. Protopin bileşiğine ait HMBC korelasyonları

COSY spekturumunda H-15, H-1 ve H-4 ile eşleşme göstermiştir. H-7 protonu ise H-6 ve H-8 protonu ile eşleşme göstermiştir.

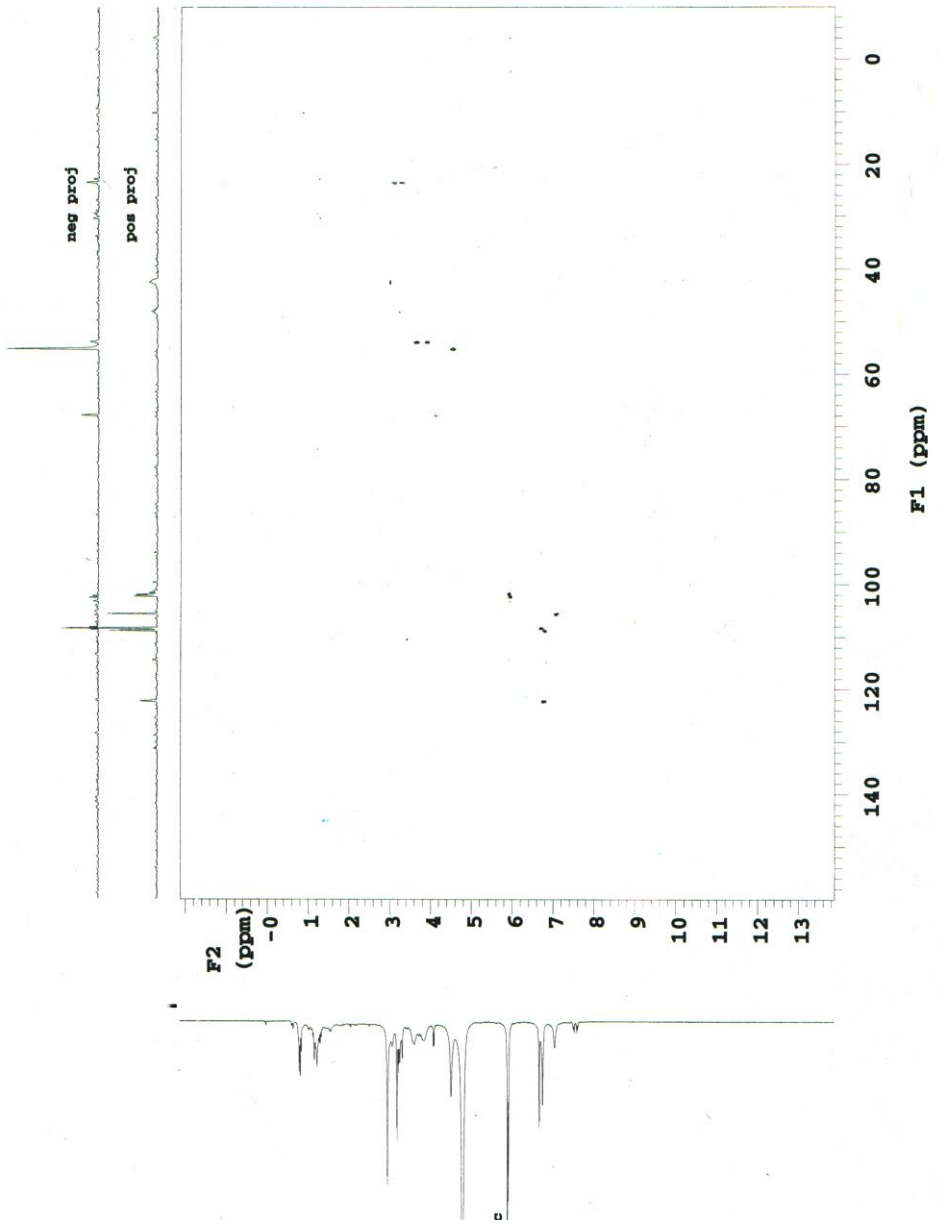
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerler literatürlerdeki protopin bileşiğine verilen değerler ile özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğindeoksiprotopinolduğu doğrulanmıştır [9, 54].



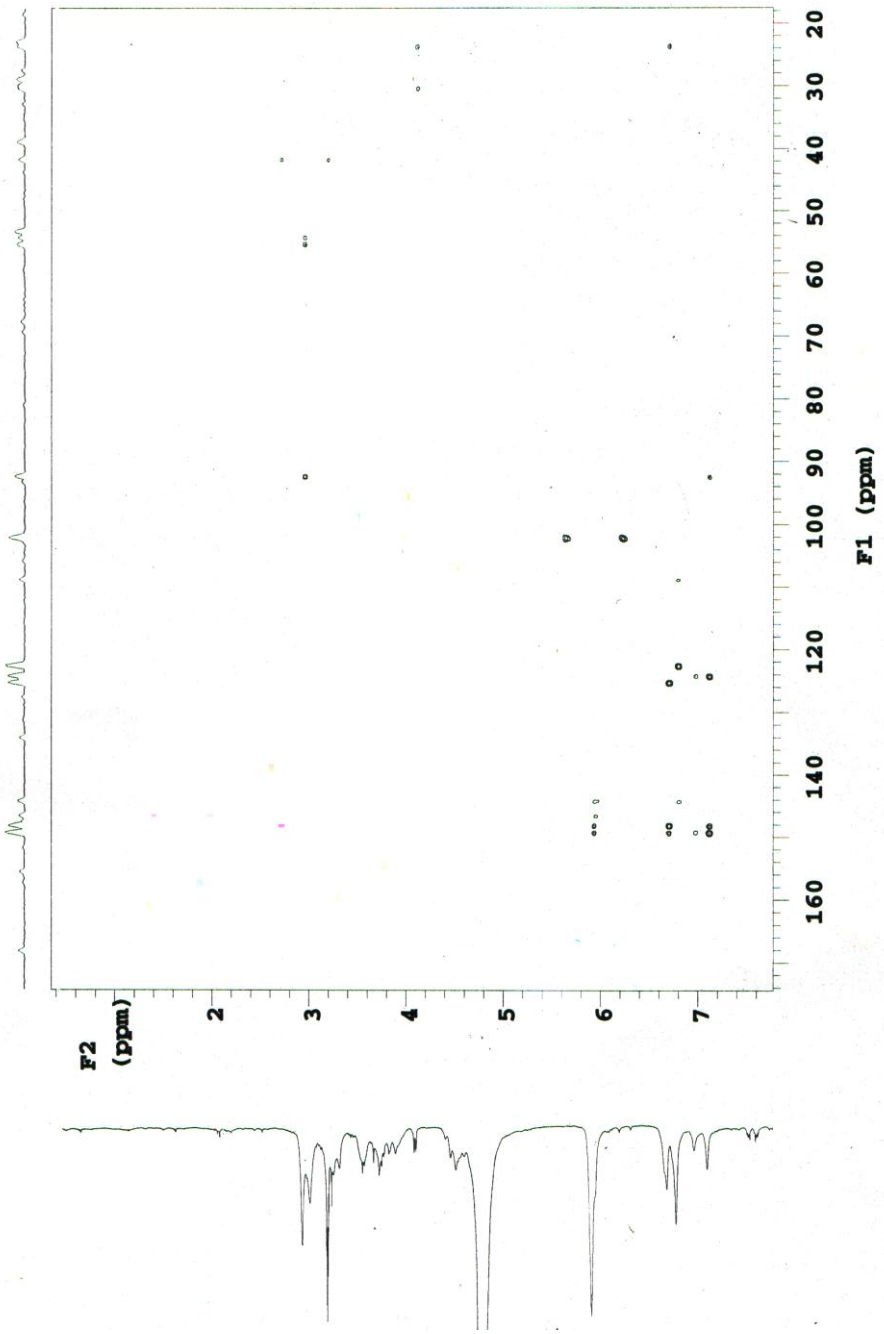
Şekil 5. 22. Protopin bileşiğine ait ^{1}H-NMR (300 MHz, MeOD) spektrumu



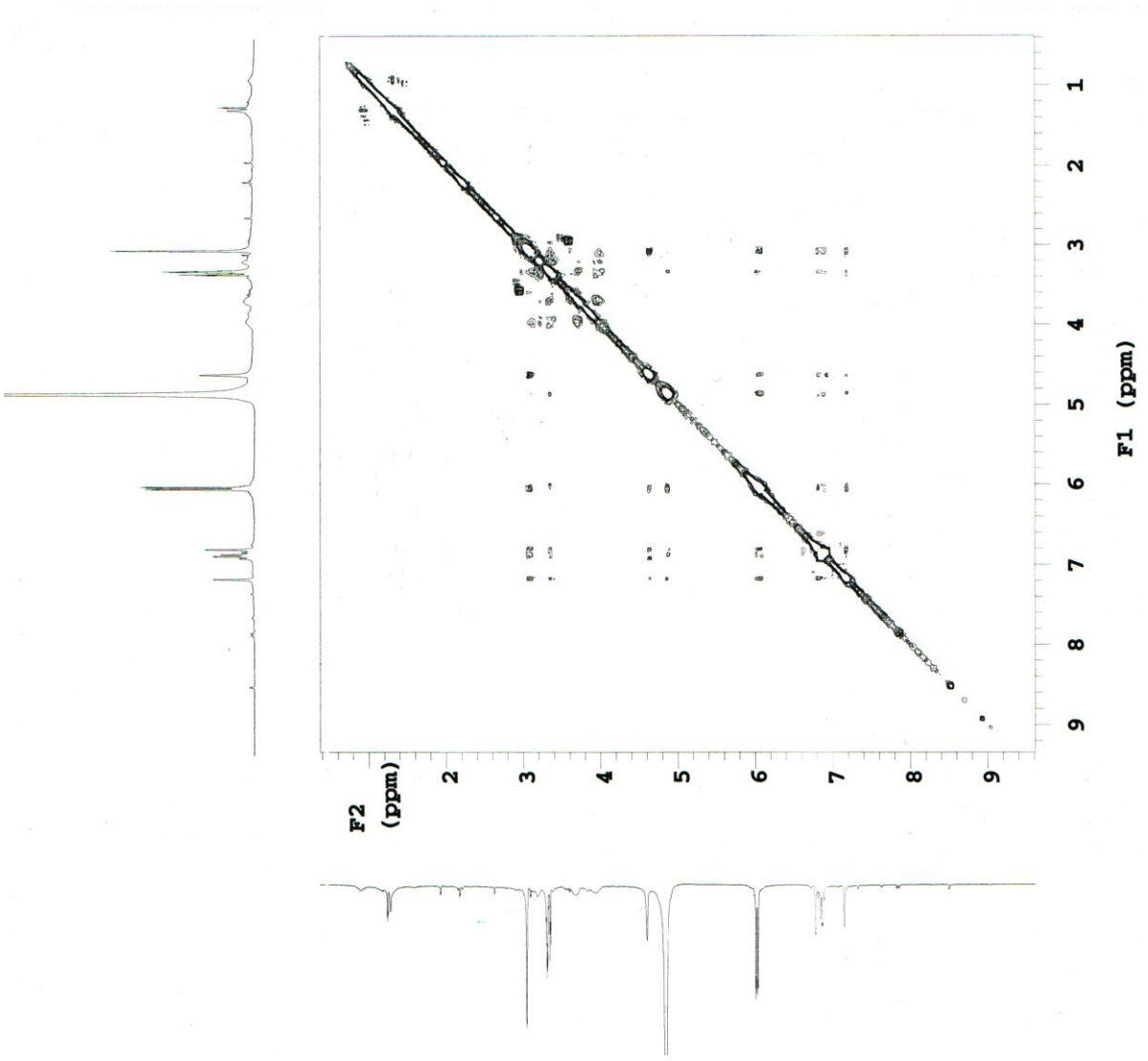
Şekil 5. 23. Protopin bileşiğine ait DEPT(300 MHz, MeOD) spektrumu



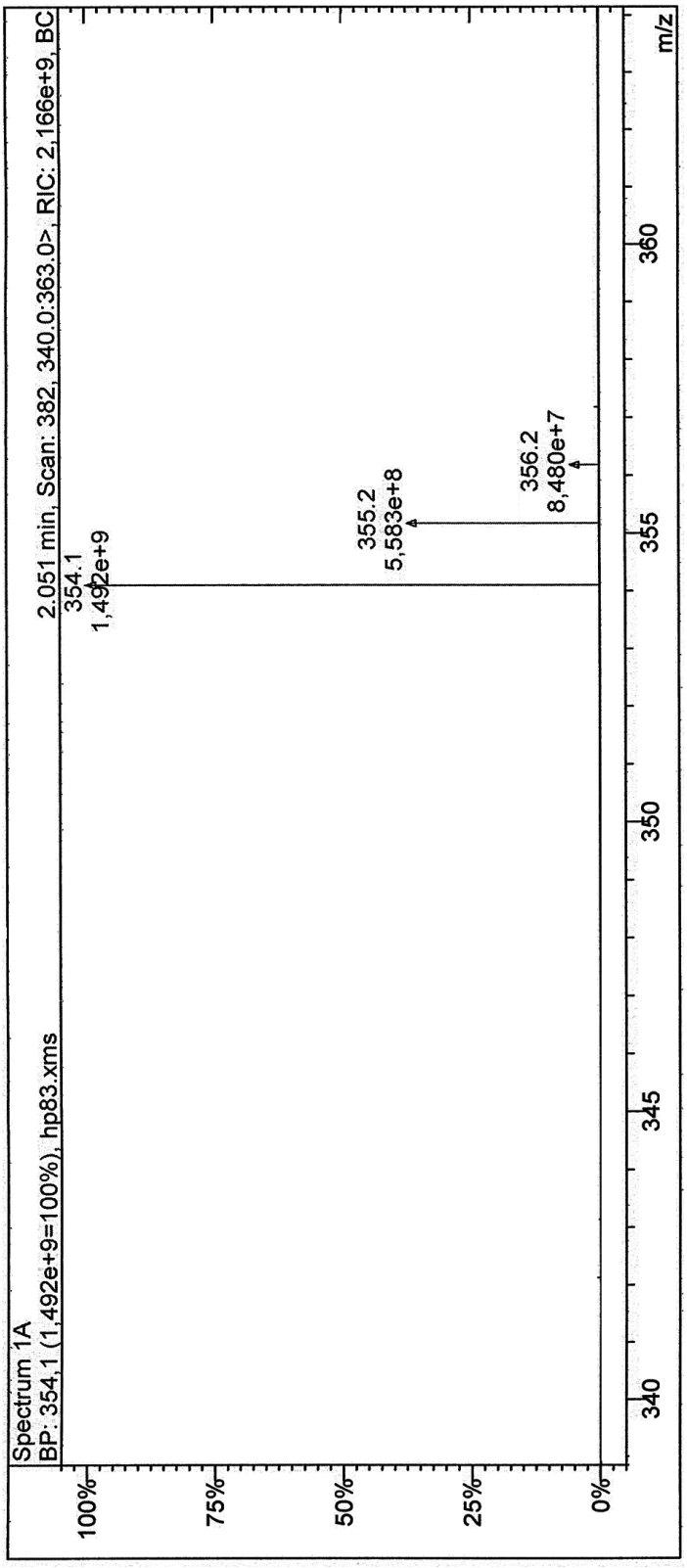
Şekil 5. 24. Protopin bileşiğine ait HSQC spektrumu



Şekil 5. 25. Protopin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 5. 26. Protopin bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 5. 27. Protopin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

5.2. İzole Edilen Bileşiklerin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibisyon Aktiviteleri

Bileşiklerin AChE ve BChE enzim aktivitelerini belirleyebilmek için Alzheimer ilacı olarak kullanılan Galantamin bileşiği referans madde olarak kullanmıştır.

Yapılan AChE ve BChE inhibisyon aktivite testleri sonucunda 8-metoksi,11,12-metilendieter sanguinarin (**1**), 8-asetonildihidrosanguinarin (**2**), oksohidrastin (**3**) ve deoksiprotopin (**4**) bileşiklerinin galantamin ile aktiviteleri kıyaslanmıştır.

AChE için test edildiğinde, 8-metoksi-11,12-metilen eter sanguinarin (**1**), 8-Asetonildihidrosanguinarin (**2**), oksohidrastin (**3**), ve protopin (**4**) sırası ile 1.13, 1.80, 0.92 ve 0.88 mM'lık IC_{50} değerleri göstermiştir. BChE inhibisyonu IC_{50} değerleri (**1-4**) nolu bileşikler için 6.81, 0.187, 4.9 ve 1.62 mM olarak tespit edilmiştir. Standart bileşik olarak kullanılan galantaminin inhisyon aktivitesi AChE için 3.5 μM, BChE için ise 36.0 μM bulunmuştur.

AChE enzimi için yapılan testte, *H. procumbens* bitkisinden izole edilen bileşikler arasında, diğer bileşiklere göre enzimi en iyi inhibe edebilen bileşiğin protopin (**4**) olduğu gözlenmiş yine de galantaminden 250 kat daha az aktivite gösterdiğinden Alzheimer hastalığı için potansiyel bir ilaç olabilme özelliğine sahip değildir. BChE enzimi için ise 8-asetonildihidrosanguinarin (**2**) bileşiğinin diğer bileşiklere göre enzimi daha iyi inhibe edebilen bileşik olduğu gözlemlenmiştir. Bu bileşik galantamin ile kıyaslandığında 5 kat daha az inhibisyon aktivitesi göstermesi açısından izole edilen bileşikler arasında önem kazanmaktadır.

Tablo 5. 1. İzole edilen bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri

Örnekler	**AChE IC_{50} (mM)**	**BChE IC_{50} (mM)**
1	1.13	6.81
2	1.80	0.187
3	0.92	4.9
4	0.88	1.62
Galantamin[a]	3.5 μM	36.0 μM

[a] Standart bileşik

6. KAYNAKLAR

[1] Ö. Seçmen, Y. Gemici, E. Leblebici, G. Görk ve L. Bekat, ***Tohumlu Bitkiler Sistematiği***, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi kitaplar serisi No:116, (1989).

[2] J. C. Carolan, I. I. Hook, M. W. Chase, J. W. Kadereit, T. R. Hodkinson, ***Phylogenetics of Papaver and Related Genera Based on DNA Sequences from ITS Nuclear Ribosomal DNA and Plastid trnL Intron and trnL–F Intergenic Spacers***, Annals of Botany, 98(1), 141-155, (2006).

[3] F. R. Blattner, J. W. Kadereit, ***Morphological evolution and ecological diversification of the forest-dwelling poppies (Papaveraceae: Chelidonioideae) as deduced from a molecular phylogeny of the ITS region***, Plant Systematics and Evolution, Volume 219, Numbers 3-4 / September, 181-197, (1999).

[4] ***en.wikipedia.org/wiki/Fumariaceae***

[5] J. Cullen, ***Hypecoum* L., *Papaveraceae — in: Davis, P.H. (ed.) Flora of Turkey and the East Aegean Islands,*** Univ. Press, Edinburgh, Vol. 1, pp.236-237, (1965).

[6] **turkherb.ibu.edu.tr/index.**

[7] J.Vacek, D. Walterova, E. Vrublova, V. Simanek***, The Chemical and biological properties of protopine and allocryptopine***, Heterocycles, 81, (8), 1773-1789, (2010).

[8] D. S. Bae, Y. H. Kim, C. H. Pan, C. W. Nho, J. Samdan, J. Yansan, J. K. Lee, ***Protopine reduces the inflammatory activity of lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages***, BMB Reports, 45, (2), 108-113, (2012).

[9] Y. Su, S. Li, N. Li, L. Chen, J. Zhang, J. Wang, ***Seven alkaloids and their antibacterial activity from Hypecoum erectum L.***, Journal of Medicinal Plants Research, 5, (22), 5428-5432, (2011).

[10] **http: // www. alzheimernedir.com**

[11] H. E. Temel, Doktora Tezi; ***Demanslı Hastalarda Asetilkolinesteraz Aktivitesi ve Oksidatif Stresin Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri İle Değişimi***, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı, (2008).

[12] **http: // www. Alzheimer.web.tr**

[13]T. Hashimoto, Y. Yamada, ***Alkaloid biogenesis: molecular aspects***, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 45, 257 – 285, (1994).

[14] S. William Pelletier, ***The Nature and Definition of an Alkaloid. In S. William Pelletier (Ed.) Alkaloid,*** Chemical and Biological Perspectives. John Wiley, New York, pp. 1 – 31, (1983).

[15] G. Samuelsson, ***Drugs of Natural Origins***, 473-478,(Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, 2004).

[16] R. B. Herbert, ***The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites***, Natural Product Reports, **18**, 50 – 65, 2001, **14**, 359 – 372, 1997, **13**, 45-58, 1996, **12**, 445-464, (1995 and older reviews in the same journal).

[17] G. A. Cordell, M. L. Quinn-Beattie, N. R. Fransworth, ***The potential of alkaloids in drug discovery***, Phytotherapy Research. 15, 183-205, (2001).

[18] M. Tanker, N. Tanker***, Farmakognozi***, Ankara Üniversitesi Eczalık Fakültesi, (Ankara Üniversitesi, 2003).

[19] G. Grue-Sorensen, I. D. Spenser, ***The biosynthesis of ephedrine***, Canadian Journal of Chemistry, 67, 998-1009, (1989).

[20] G. Grue-Sorensen, I. D. Spenser, ***Biosynthetic route to the Ephedra alkaloids***, Journal of the American Chemical Society, 116, 6195-6200, (1994).

[21] G. Samuelsson, ***Drugs of Natural Origins***, 491-496, (Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, 2004).

[22] A. Humphrey, D. O'Hagan***, Tropane alkaloid biosyntesis. A century old problem unresolved***, Narural Products Report, 18, 494-502, (2001).

[23] M. N. Huang, T. W. Abraham, S. H. Kim, E. Leete, ***1-Methylpyrrolidine-2-acetic acid is not a precursor of tropane alkaloids***, Phytochemistry, 41 (3), 767-773, (1996).

[24] J. D. Phillipson, D. Maizels, ***Funda mentals of pharmacognosy and phytotheraphy***, chapter 6, natural product chemistry, (2004).

[25] G. Samuelsson***, Drugs of Natural Origins***, 512-516, (Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, 2004).

[26] M. Rueffer, M. H. Zenk, ***Distant precursors of benzylisoquinoline alkaloids and their enzymatic formation***, Zeitschrift für Naturforcshung, 42c, 319-332, (1987).

[27] N. Okada, A. Shinmyo, H. Okada, Y. Yamada, ***Purification and characterization of (S)–tetrahydroberberine oxidase from cultered Coptis japonica cells,*** Phytochemistry, 27, (4), 979 -982, (1988).

[28] B. H. Novak, ***Morphine synthesis and biosynthesis-an update***, Current Organic Chemistry,4, 343-362, (2000).

[29] S. Hosztafi, Z. Fürst, ***Endogenous morphine***, Pharmacological Research, 32(1), 15-20, (1995).

[30] G. Samuelsson, ***Drugs of Natural Origins***, 527-529, (Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, 2004).

[31] G. Samuelsson, ***Drugs of Natural Origins***, 530-531, (Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, 2004).

[32] L. J. Scott, K. L. Goa, ***Galantamine***, A review of its use in Alzheimer's disease. Drugs, 60 (5), 1095-1122, (2000).

[33] T. Frenzel, M. H. Zenk, ***S-adenosyl-L-methionine: 3' – hydroxy- N- methyl- (S)- coclaurine- 4'- O- methyl transferase, a regio- and stereoselective enzyme of the S- reticulice pathway***, Phytochemistry, 29 (11),3305-3511, (1990).

[34] H. Dittrich, T. M. Kutchan, ***Molecular cloning, expression, and induction of berberine bridge enzyme, an enzyme essesntial to the formation of benzophenanthridine alkaloids in the response of plants to pathogenic attack***, Biochemistry, 88, 9969-9973, (1991).

[35] T. M. Kutchan, H. Dittrich, D. Bracher, M. H. Zenk***. Enzymology and molecular biology of alkaloid biosynthesis***, Tetrahedron, 47 (31), 5945-5954, (1991).

[36] G. Samuelsson, ***Drugs of Natural Origins***, 535-537, (Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, 2004).

[37] J. P. Kutney, ***Biosynthesis and synthesis of indole and bisindole aklaoids in plant cell cultures: a personal overview***, Natural Product Reports, 7, 85-103, (1990).

[38] H. von Döhren, U. Keller, J. Vater, R. Zocher, ***Multifunctional peptide synthetases***, Chemical Reviews, 97, 2675-2705, (1997).

[39] G. Samuelsson, ***Drugs of Natural Origins***, 557-570, (Swedish Pharmaceutical Society, Swedish Pharmaceutical Press, 2004).

[40] M. Harmandar, G. V. Bilaloğlu, ***Flavonoidler,*** 190,(Aktif Yayınevi, Ankara, (1999).

[41] M. Kutchan, ***Alkaloid biosynthesis- the basis for metabolic engineering of medicinal plants***, The Plant Cell, , 1059-1070, (1995).

[42] **mf.hitit.edu.tr/kim/Laboratuvarlar/Organik/Organik_Deney3.pdf**

[43] Van de Catelle, De Pooter, H. Van Sumere, ***J. Chromatogr***.,121, 49-63, (1976).

[44] K. R. Markham, ***Techniques of Flavonoid Identification***, (Academic Press, London, 1982).

[45] E. Wollenweber, ***Biology and Chemistry of Plant Trichomes***, Plenum Press, New York, (1984).

[46] M. Cormick, S. Robson, K. Bohm, ***Flavonoids from Wyethia glabra***, Phytochemistry, 24, 1614-1616, (1985).

[47] **biyokure.org/uv-gorunur-bolge-spektroskopisi/5276**

[48] S. Özden, R. Ertan, E. Akı-Şener, İ. Yalçın, D. Nebioğlu, E. Büyükbingöl, ***Farmasötik Kimya Pratikleri***, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 46, (Ankara, 2004).

[49] P.M.Dey, J. B.Harborne, ***Methods in Plant Biochemistry***, 1, Academic Press, London, (1989).

[50] D. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nıeman***, Enstrümantal Analiz İlkeleri,*** 253-258,330,331,332,335,499,500,502,509,512,524-528, (Bilim Yayıncılık, Ankara, (1998).

[51] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr. ve R. M.Featherstone, ***A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholınesterase Activity***, Biochemical Pharmacology, 7, 88-95, (1961).

[52]G. L. Zhang, G. Rücker, E. Breitmaier, R. Mayer, ***Alkaloids from Hypecoum leptocarpum***, Phytochemistry, 40, No 6, pp. 1813-1816, (1995).

[53] A. P. K. Nissanka, V. Karunaratne, B. M. R. Bandara, V. Kumar, T. Nakanishi, M. Nishi, A. Inada, L. M. V. Tillekeratne, D. S. A. Wijesundara, A. A. L. Gunatilika, ***Antimicrobial alkaloids from Zanthoxylum tetraspermum and caudatum***, Phytochemistry, 56, 857-861, (2001)

[54] S. Philipov, R. Istatkova, P. Denkova, S. Dangaa, J. Samdan, M. Krosnova, C. MunkH-Amgalan, ***Alkaloids from Mongolian species Hypecoum lactiflorum*** Kar. et Kir. Pazij, Natural Product Research, 23, no 11, 982-987, (2009).

ÖZGEÇMİŞ

1987 yılında Kırklareli'de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Kırklareli'de tamamladıktan sonra 2007 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimime başladım. Kimya bölümünden 2011 yılında mezun oldum ve aynı yıl Organik Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.