T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

ECHINOPS MICROCEPHALUS SM. BİTKİSİNDEN TİYOFEN BİLEŞİKLERİNİN İZOLASYONU VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayla KENAR

Referans no: 10288919

EDİRNE-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
FARMASÖTİK NANOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

ECHINOPS MICROCEPHALUS SM. BİTKİSİNDEN TİYOFEN BİLEŞİKLERİNİN İZOLASYONU VE BİYOAKTİF ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Ayla KENAR

Destekleyen Kurum: TÜBAP-2018/342

Tez No:

Edirne-2019

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

ONAY

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Nanoteknoloji Anabilim Dalı yüksek lisans programı çerçevesinde ve Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN' ın danışmanlığında yüksek lisans öğrencisi Ayla KENAR tarafından tez başlığı "*Echinops microcephalus* Sm. Bitkisinden Tiyofen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Biyoaktif Özelliklerinin İncelenmesi" olarak teslim edilen bu tezin tez savunma sınavı 26/08/2019 tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından "Yüksek Lisans Tezi" olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN
JÜRİ BAŞKANI

Doç. Dr. Fatih GÖGER
ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Hakan KOLANCILAR
ÜYE

Yukarıda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, yol gösteren sevgili hocam Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN'a, araştırma çalışmamda labaratuvar olanaklarıyla destek veren Trakya Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine, bu süreçte yanımda olan arkadaşlarıma, beni yetiştiren ve her zaman yanımda olan anneme, babama ve biricik kardeşime teşekkür ediyorum. 2018/342 nolu proje desteği ile tez çalışmama maddi destek sağlayan Trakya Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimine (TÜBAP) teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ……1

GENEL BİLGİLER……3

İLAÇ ADAYI OLARAK DOĞAL ÜRÜNLERİN TARİHSEL SÜRECİ……...3

BİTKİSEL KAYNAKLI İLAÇ KEŞFİNDE KARŞILAŞILAN ZORLUKLAR……...4

BİTKİLERDE PRİMER VE SEKONDER METABOLİTLER……...……..6

BİTKİNİN FAMİLYASI VE TANITIMI…….....7

***ECHİNOPS* TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ……..9**

***ECHİNOPS* TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN SEKONDER METABOLİTLER….13**

ALZHEİMER HASTALIĞI…….26

AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA METODLARI…….....32

KROMOTOGRAFİK YÖNTEMLER…….33

YAPI AÇIKLAMA METODLARI……...…...36

GEREÇ VE YÖNTEMLER……39

BULGULAR……..44

TARTIŞMA……50

SONUÇLAR……...85

ÖZET……..87

SUMMARY……89

KAYNAKLAR……...91

ŞEKİLLER LİSTESİ……..……100

ÖZGEÇMİŞ……102

SİMGELER VE KISALTMALAR

2D NMR : İki Boyutlu Nükleer Manyetik Rezonans

ACh : Asetilkolin

AChE : Asetilkolinesteraz

AH : Alzheimer hastalığı

Al_2O_3 : Alüminyum oksit

ALT : Alanin aminotransferaz

APP : Amiloid öncü proteini

Asetil-CoA : Asetil koenzim A

AST : Aspartat aminotransferaz

Aβ : β-amiloid

BBT : 5-(but-3-en-1-inil)-2,2'-bitiyofen

BChE : Butirilkolinesteraz

BHT : Butilhidroksitoluen

C : Karbon

CAS : Katalitik anyonik bölge

$CDCl_3$: Dötörokloroform

$CHCl_3$: Kloroform

COSY : Korelasyon Spektroskopisi (Correlation Spectroscopy)

DCM : Diklormetan

DPPH : 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil

DTNB : 5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik) asit

EtOAc : Etil asetat

EMA : Avrupa İlaç Ajansı

FDA : Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi

Glu- : Glutamik asit

H : Hidrojen

H_2S : Hidrojen sülfür

H_2SO_4 : Sülfürik asit

HeLa : İnsan servikal kanser hücresi

His- : Histidin

HMBC : Heteronuclear Multi Bond Coherence

HSQC : Heteronuclear single quantum coherence

HTS : High Throughput Screening

KH_2PO_4 : Potasyumhidrojenfosfat

MeOH : Metanol

MHz : MegaHertz

nAchR : Nikotinik asetilkolin reseptörleri

NADH : Nikotinamid adenin dinükleotit

NADPH : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

Na_2HPO_4 : Sodyumhidrojenfosfat

NMDA: : N-metil-D-aspartat

NMR : Nükleer Manyetik Rezonans

NOESY : Nuclear Overhauser Effect Spektroscopy

PAS : Periferik anyonik bölge

pH : Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi (Power of Hydrogen)

ppm : Milyonda bir birim (parts per million)

PYE : Trideka 3,5,7,9,11 pentan-1-en

q : Kuartet

Rf : Tutunma faktörü (Retention factors)

SAM : S-Adenozil Metiyonin

Ser- : Serin

SiO_2 : Silikajel

ITK : : İnce tabaka kromatografisi

UV : Ultraviyole

WHO : Dünya Sağlık Örgütü

α : Alfa

β : Beta

GİRİŞ VE AMAÇ

Tıbbi bitkilerin, terapötik etkinliğe sahip ilaçların ham madde kaynağını oluşturması geçmişten günümüze devam etmektedir. İlacın oluşturulmasında kullanılan her türlü biyolojik veya anorganik kökenli hammaddeler olarak adlandırılan droglar, hastalıkların tedavi edici ya da hastalıkların önlenmesindeki etkinliğin moleküler kaynağı olarak gerek doğal gerek sentetik yollarla ilaç hammaddelerinin temelini oluşturmaktadır.

Bitki, hayvan veya mikroorganizmaların dahil olduğu biyolojik kaynaklardan elde edilen çok sayıda bileşik, ya oldukları gibi ilaç yapımında kullanılmakta ya da farmakolojik açıdan daha etkin ve sentezlenecek diğer ilaçlar için model teşkil etmektedir. Geçtiğimiz yıllarda, ilaç endüstrisi temel olarak ilaç keşfi kaynağı olarak üretimi ve verimi açısından sentetik bileşiklere yönelmiştir. Buna rağmen; bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin seçilmesi aşamasında biyoaktif bileşiğin tespiti, kaynaktan izole edilmesi ile ilaç molekülü haline getirilmesi ve klinik açıdan etkinliğinin ortaya çıkarılması ve pazarlanabilen bir ilaca dönüşebilmesi gibi bilinen pek çok zorluklara rağmen doğal kaynaklardan gelen ilaç keşiflerine olan bilimsel ilgi fazladır. Doğal ürün tabanlı ilaç keşifleri, disiplinlerarası yaklaşımları zorunlu kılarken, son teknolojik araştırmalar, doğal ürünlerin gelecekte de en önemli yeni ilaç kaynakları arasında yerini alacağını açıkça göstermektedir (1).

Türkiye'deki bitkilerin yaklaşık 500 kadarının tıbbi amaçlı kullanıldığı tahmin edilmekte, bunların 200'ünün tıbbi ve aromatik olarak ihraç potansiyeline sahip olduğu bilinmektedir (2-4).

Bitki kaynaklı tedavilere yönelim, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde ekonomik nedenlerle tıbbi bitkilerin, ilaçlara alternatif olarak kullanılmasının yanı sıra, ülkelerin kendi kültürel yapılarına uyumlu ve kendi doğal kaynakları ile üretilebilen sağlık teknolojisi oluşturabilmeleri ve dış ülkelere bağımlılığın azaltılması açısından da önemlidir (5).

Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) onaylı ilaçların yaklaşık dörtte biri, bitkilerden izole edilmiş olup, paklitaksel ve morfin gibi etken maddeler en bilinenlerindendir. Son 20 yılda FDA onaylı ilaçların yaklaşık üçte biri doğal ürünlere veya türevlerine dayanmaktadır. Penisilinin mantardan keşfedilmesi ile bitkilerin yanısıra, pek çok mikroorganizmanın da potansiyel antibiyotikler için araştırma alanı oluşturmuştur. Bu sayede *Streptomyces aureofacien*s'ten tetrasiklin, *Artemisia afra*'dan artemisinin, *Streptomyces peucetius*'tan doksorubisin ve *Tolypocladium inflatum*'dan siklosporin elde edilmiştir (6).

Yeni ilaçların kaynağı olarak bitkileri araştırmak için yoğun ilgiyi Japonya ve Çin göstermiştir. ABD'de 1980'e kadar reçetelerin %25'i bitki ekstrelerinden oluşmaktaydı. Her ne kadar geleneksel tıp, modern tıp tarafından gölgelense de son yıllarda, gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere birçok ülkede sağlığın iyileştirilmesi için tıbbi bitkilerin kullanımında bir artış görülmüştür. Aslında, birçok standardize tıbbi bitki ekstresi günümüzde, İngiltere, Almanya, Çin ve Fransa gibi çok sayıda gelişmiş ülkede reçeteli ilaçlar olarak kullanılmaktadır (4,7). Bitkiler; medikal tedavinin ya geleneksel hazırlanan ilaç formlarının ya da aktif üretilen ilaçların yaygın kaynağı durumundadır. Bundan dolayı, faydalı olabilecek mevcut bitki ve bitki ektrelerinin sınıflandırması ve bazı hazır farmasötik preparatların yerini alabilecek düzeyde olanların temini; aynı zamanda da güvenli, kararlı, standartlaştırılmış ve etkili galenik ürünlerin sağlanması ve ilaç olarak kullanılmak üzere aday olabilecek yeni, biyolojik olarak aktif bitki kaynaklı bileşenlerin keşfi konusunda çalışma yapılması gerekmektedir (8).

Türkiye, uygun iklim özellikleri, toprak yapısı itibariyle bitkilerin yetişmesinde önemli konumdadır. Avrupa ülkeleriyle karşılaştırıldığında toplam endemik takson sayısı yaklaşık 2750 iken, ülkemizdeki endemik tür sayısı, tür altı taksonlarıyla beraber 3750'den fazladır. Dünya çapında bitki türlerinin sayısı düşünüldüğünde bu oran farklı ilaç şekilleri için kaynak sağlayan bitkilerin daha fazla araştırılması gerektiğini işaret etmektedir. Bu açıdan ülkemiz büyük bir potansiyele sahiptir (4). *Astraceae* veya *Compositae* familyası, aster, papatya, ayçiçeği ailesi olarak bilinir ve 950 cins ile 20.000 türden oluşan, tür sayısı bakımından en büyük çiçekli bitki ailesidir (9). *Echinops* cinsi, *Astraceae* familyasına ait olup, ülkemizde de yapılan çalışmalara göre 19 türü bulunmaktadır (10).

Bu çalışmada *Echinops* (Asteraceae) cinsine ait *Echinops microcephalus* Sm. bitkisinin içerdiği bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılması, izole edilen bileşiklerin yapılarının açıklanması ve asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerin incelenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

İLAÇ ADAYI OLARAK DOĞAL ÜRÜNLERİN TARİHSEL SÜRECİ

Bitkilerin tıbbi uygulamaları ile ilgili ilk yazılı kayıtlar M.Ö. 2600'e kadar uzanır. Mezopotamya'da yaklaşık 1000 bitki kaynaklı ilaç içeren, tıbbi bir sistemin varlığı bilinmektedir. Mısır tıbbı M.Ö. 2900 yıllarına kadar dayanmaktadır. En yararlı ve korunan kayıtları, çoğunluğu bitki kökenli 700'den fazla drog içeren M.Ö. 1550 yıllarındaki Ebers Papirüsleridir. Geleneksel Çin tıbbı binlerce yıldan beri kapsamlı bir şekilde belgelenmiştir. Hint Ayurveda sisteminin belgelenmesi M.Ö. 1000 yıla kadar uzanmaktadır. Batı'da bitkilerin tıbbi uygulamaları hakkında bilgi, esas olarak Yunan ve Roma kültürüne dayanmaktadır. Bunlardan en önemlileri; Yunan doktor Dioscorides (MS 1. yüzyıl) ve Galen (MS 2. yüzyıl) tarafından yazılan özetlerdir (11). Araplar, Karanlık ve Orta çağlarda (5. ve 12. yüzyıllar) Greko-Romen bilgisinin büyük bir kısmını korumuştur ve kendi tıbbi uzmanlıklarıyla ve Çin ve Hindistan geleneksel ilaçlarından elde edilen şifalı bitkilerle tamamlamışlardır (12).

Yıllar boyunca, tıbbi bitkiler farmakolojik aktiviteleri veya aktif bileşenleri hakkında bilgiler olmadan yalnızca ampirik olarak uygulanmıştır. Sadece 18. yüzyılda, *Aconitum* ve *Colchicum* gibi zehirli bitkileri araştıran Anton Von Störck tıbbi bitkilerin rasyonel klinik araştırması için temel atmıştır (11).

Bitkilerden akılcı ilaç keşfi, 19. yüzyılın başında, Alman eczacı yardımcısı Friedrich Sertürner'in, Yunan rüyalar tanrısı Morpheus'tan esinlenerek morfinyum (morfin) olarak adlandırdığı analjezik ve sakinleştirici maddeyi izole etmeyi başardığı zaman başlamıştır. Bu keşif, diğer tıbbi bitkilerin incelenmesini tetiklemiş ve 19. yüzyılın sonralarında temel olarak alkaloitler (örneğin, kinin, kafein, nikotin, kodein, atropin, kolşisin, kokain, kapsaisin) gibi

birçok biyoaktif doğal ürünlere ulaşılmıştır. 1826'da morfin ve diğer alkaloitleri üretmeye başlayan Darmstadt (Almanya)'da bulunan H.E. Merck'tir. Daha sonra, daha kaliteli ve daha düşük maliyetlerle üretimi kolaylaştırmak için kimyasal sentez yoluyla doğal ürünler üretmek girişimde bulunulmuştur. Salisilik asit, 1853 yılında kimyasal sentez ile üretilen ilk doğal bileşiktir (1).

Penisilin keşfedildikten sonra (1928), 1930'larda, II. Dünya Savaşı'ndan sonra modern ilaç endüstrisinin bilimsel ve finansal temelini atan, mikrobiyal kaynaklardan bir ilaç keşfi dönemi başlatılmıştır. O zamanlar, özütlerin ve kısmen saflaştırılmış doğal ürünlerin terapötik kullanımı, saf bileşiklerin izolasyonu ile artan bir şekilde kullanılmaya başlandı (13,14). 1981 ve 2010 yılları arasında onaylanan küçük moleküller grubuna ait 1073 yeni kimyasal maddenin yalnızca %36'sı tamamen sentetik iken, yarısından fazlası doğadan elde edilmiş veya ilham alınarak sentezlenmiştir. (15). Bu bileşiklerin önemli bir kısmı daha yüksek yapıdaki bitkilerde keşfedilmiştir (16). Örneğin: *Taxus* türlerinden elde edilen paklitaksel; *Catharanthus roseus* L. dan elde edilen vinkristin ve vinblastin ve *Camptotheca acuminata* ağacında keşfedilen kamptotesin, antikanser tedavide etkinlik gösteren aktif bileşenlerdir. Diğer örnekler arasında, Alzheimer hastalığının tedavisi için onaylanmış ve *Galanthus nivalis* L.'den elde edilen kolinesteraz inhibitörü galantamin ve Çin bitkisi *Artemisia annua* L.'den elde edilen antimalaryal ve antikanser özellik gösteren artemisinin bulunmaktadır (17).

BİTKİSEL KAYNAKLI İLAÇ KEŞFİNDE KARŞILAŞILAN ZORLUKLAR

Bitkiler çoğu zaman doğal ortamlarından doğrudan toplandıkları için, doğru tanımlama ve isimlendirme önemlidir. Tanımlama için, morfolojik ve anatomik karakterizasyonun yanı sıra genetik ve kimyasal analiz gibi yöntemlerin de uygulanması gerekli olabilmektedir. Bitki materyalinin toplanması ve doğru dokümantasyonu, botanik açıdan tanımlanması ile herbaryum kaydının hazırlanması konusunda uzmanlara ihtiyaç duyulmaktadır (18).

Biyoaktif bileşiklerin tanımlanması sürecinde, bitkisel kaynakların kullanımıyla ilgili önemli zorluklar vardır. Bunlardan biri; başlangıç maddesine erişim zorluğudur. Genellikle mevcut doğal ürün miktarı düşüktür. Pek çok bitkiden elde edilen doğal ürün zaten izole edilmiş ve karakterize edilmiş olsa da, mevcut bileşik miktarları geniş bir biyolojik aktivite yelpazesi için test yapmada genellikle yetersizdir. İlk farmakolojik değerlendirme için genellikle küçük miktarlarda bitki materyali gerekmekle birlikte, bileşenlerinin farmakolojik aktivitesinin karakterizasyonu için daha büyük miktarlarda ihtiyaç duyulmaktadır. Diğer

yandan; bitkilerin, özellikle korunan türlerin habitatlarına, doğadan toplanırken özen gösterilmesi gerekir. Bitki materyalinin mevsimine bağlı kimyasal bileşimi, ilgili zamanda yapılacak işlemleri kısıtlayabilmektedir. Örneğin; bazı bitkiler için çiçeklenme mevsimi boyunca toplanması zorunludur. İthal edilen bitki materyali için savaşlar, doğal felaketler, bitki materyallerinin ihracatı için yasal düzenlemelerin değiştirilmesi gibi pek çok faktör bitkiye ulaşılabilirliği zorlamaktadır (14). Bunun dışında, ekolojik ve yasal hususlar bitkiye ulaşımı etkilemekte, menşei ülkelerdeki patent, süreci kısıtlamaktadır. Birleşmiş Milletlerin 1992'de Brezilya'nın Rio de Janeiro kentindeki uluslararası toplum tarafından imzalanan "Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi" ile biyoçeşitliliği korumak, genetik kaynakları sürdürülebilir ve adil şekilde kullanmak konusunda anlaşılmıştır.

Bitkisel materyalin erişilebilirliğinin yanı sıra kalitesi de çok önemlidir. Mevcut bitki materyali genellikle kaliteye ve bileşime göre değişir. Dolayısıyla terapötik açıdan değerlendirilmesini etkileyebilmektedir. Kimyasal bileşim sadece türlerin kimliğine ve hasat zamanına değil aynı zamanda toprak bileşimi, rakım, iklim, işleme ve depolama koşullarına da bağlıdır. Ayrıca, ekstraksiyon sırasında ve ayrıca izolasyon işlemleri sırasında, bileşiklerin transformasyonu ve bozunması meydana gelebilir (18,19). Başlangıçtaki bitki materyalinin kimyasal bileşimini belirleyen bir başka özellik, mantarlar ve bakteriler gibi organizmaların bitkilerde yaşayabileceği ve bu organizmaların metabolitlerinin bitki materyalini etkileyebildiğidir (14).

Biyoaktif doğal ürünlerin eldesi ile ilgili diğer zorluklar, doğal ürünlerin sentez veya türevlendirme yöntemlerinin geliştirilmesini engelleyen, çok sayıda oksijen atomlu substitüentler ile kiral merkezli kompleks kimyasal yapılara sahip olma ihtimalinden kaynaklanmaktadır. Buna karşılık, sentetik kaynaklı farmasötik öncüllerin, basit kimyasal yaklaşımlar kullanılarak üretilmesi ve değiştirilmesi genellikle nispeten kolaydır (20-22).

Çok sayıda bitki ekstrelerinin HTS (High Throughput Screening) tarafından araştırılması ve ardından biyoaktif bileşenlerin tanımlanması ve karakterizasyonu son derece zordur (23). Bitki ekstrelerinin biyoaktivite tespiti için HTS uygulamak ve bunların potansiyel saf bileşiklerini tanımlamak için numune hazırlama ve test tasarımlarının adaptasyonu ve değişiklikleri gereklidir. Genel olarak HTS, hücresiz veya hücre odaklı analizler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Yüksek tekrarlanabilirlik, doğruluk, sağlamlık ve güvenilirlik gerektirir. Test bileşikleri ayrışmamalı veya çökelmemeli, tahlil reaktifleriyle karışmamalı veya özgül olmayan etkiler göstermemelidir. Özellikle doğal ürünler genellikle bu gereklilikleri yerine getirmekte başarısız olmaktadır. Bitki özleri bütünlüğünün korunması, karmaşıklıkları

nedeniyle çok sorunlu olabilir. Ekstreler sıklıkla deney sonuçlarını etkileyebilecek yüksek viskozite gösterir. Doğal ürün ekstrelerinin ayrıca, floresan HTS uç nokta ölçümlerine müdahale eden floresan ya da floresan baskılayıcı bileşikler içermesi muhtemeldir; bu nedenle, renkli bileşiklerin varlığı, kolorimetrik HTS uç noktalarına da karışabilir. Bitki ekstreleri bazı deney tipleri için tıkayıcı olan ve yanlış pozitif veya yanlış negatif sonuçlara neden olabilen bileşik sınıfları içerebilir. Özellikle yağ asitleri gibi yaygın olarak bilinen yüksek apolar bileşikleri, polifenoller ve flavonoitler gibi genel polar bileşikler ve klorofil, özellikle farklı testlere müdahale edebildiklerinden özellikle sorunlu olabilir (24-27). Testten önce numunelerden bu bileşenlerin ayrılması için çok çaba sarf edilmektedir (28,29). Organik moleküllerin yanı sıra, metaller gibi bazı inorganik bileşenler de HTS'de yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir (30). Bu, ekstrelerin HTS'si için özellikle problemli olabilir, çünkü birçok bitki, metalleri ortamlarından absorbe edebilir ve metal safsızlıkları olarak bitki örneklerinde mevcut olabilmektedir (31,32). Ayrıca, sitotoksik bileşenler, hücre odaklı deneylerde sorunlara neden olabilir, çünkü diğer biyoaktivitelerin tespitini veya istenen etkinliğe sahip başka bileşiklerin varlığını maskeleyebilirler. Örneğin, deterjan etkisine sahip olan saponinler, hücrelerin parçalanmasına yol açabilir ve bu nedenle hücre odaklı analizlerin sonuçlarına müdahale edebilmektedir (21).

Doğal ürünlerin kesin şekilde moleküler etki mekanizmasının belirlenmesinin zorlu bir görev olduğu gerçeği ile başka zorluklar ortaya çıkmaktadır (örneğin, kurkumin, triptolid) Bununla birlikte, bir ilaç adayı bileşiğin moleküler hedefi ile etkileşimi hakkındaki bilgiler, ilaç geliştirme süreci için çok avantajlıdır (33).

Yukarıda açıklanan zorluklar nedeniyle, doğal ürün bazlı ilaç keşfine olan ilgi giderek azalmış gibi görünse de doğal ürün araştırmalarını büyük ölçüde akademik üniversiteler ve yeni kurulan şirketlerce yapılmakta ve zorluklara rağmen gelecek vaad etmektedir (13,14).

BİTKİLERDE PRİMER VE SEKONDER METABOLİTLER

Karbonhidratlar, yağlar, proteinler ve nükleik asitler canlı organizmaların yapı taşlarıdır. Primer metabolitler olarak adlandırılan bu yapıların sentezi ve yıkımı primer metabolizma sürecini oluşturur ve bitkilerde benzer şekilde gerçekleşmektedir (34). Glikoliz, trikarboksilik asit döngüsü ve yağ asitlerinin β-oksidasyonu birincil metabolizma örnekleridir.

Sekonder metabolitler ise; evrimsel süreçte bitkinin; kirlilik, stres, kuraklık, UV ışınlarına maruz kalma, patojenik saldırı gibi çevresel faktörlerden kendilerini korumak ya da çevreleriyle etkileşimleri sonucunda çeşitli yapısal ve kimyasal mekanizmalarını uyarlayarak

cevap oluşturması sonucunda oluşmaktadır. Bunlar tek bir türde veya türlere göre farklı ürünlerin meydana geldiği bir sürecin ürünüdür. Bitkiler biyokimyasal olarak çeşitlidir ve bitkiler tarafından geliştirilen doğal koruma mekanizmalarının çoğu, genellikle bitki sekonder metabolitleri veya doğal ürünler olarak adlandırılan küçük organik molekülleri içerir. Bunlar, hastalık ve hasara karşı korur ve bitkinin rengine, aromasına katkıda bulunur. 4.000'den fazla fitokimyasal madde ticari olarak mevcut olup, koruyucu fonksiyonlar, fiziksel özellikler ve kimyasal özellikleri bakımından sınıflandırılmış ve yaklaşık 150 fitokimyasal madde ayrıntılı olarak çalışılmıştır. Fitokimyasallar, bitki kökleri, gövdeleri, yaprakları, çiçekleri, meyveleri veya tohumları gibi farklı bitki kısımlarında birikirler. Pek çok fitokimyasal, özellikle de pigment molekülleri, çeşitli bitki dokularının dış katmanlarında yoğunlaşır.

Fitokimyasalların tam sınıflandırması, çok çeşitli olmaları nedeniyle, bugüne kadar yapılamamıştır. Son yıllarda fitokimyasallar, bitki metabolizmasındaki rollerine bağlı olarak primer veya sekonder metabolitler olarak sınıflandırılır. Birincil bileşenler, ortak şekerleri, aminoasitleri, proteinleri, nükleik asitlerin pürinleri ve pirimidinlerini, klorofilleri vb. içerir. Sekonder metabolitler, alkaloitler, terpenler, flavonoitler, lignanlar, bitki steroidleri, pirusinler, fenolikler, flavonoitler, glikozitler bitki kimyasallarıdır (35-37).

BİTKİNİN FAMİLYASI VE TANITIMI

Asteraceae (Papatyagiller)

Asteraceae, çiçekli bitkiler içerisindeki en büyük familyadır. Sınıf olarak iki çeneklilerden olup genellikle otsu, çok azı çalı, ağaç şeklindedirler. Familyanın ismi yıldız şeklinde çiçekleri bulunmasindan dolayı Aster'den gelmektedir. Bu bitkilerin çiçek durumunun kompozit yapısı, bu familyanın *Compositae* olarak anılmasına yol açmıştır. Yapraklar basit veya bileşik, stipulsuz, alternat, rozet şeklindedir. Çiçekler baş veya kapitulum durumlarındadır (38).

Asteraceae familyası, son yapılan sınıflandırmalara göre 3 alt familya ve 17 taksonda düzenlenmiş, 1535 cins ve 23000 civarında türden oluşmaktadır. Bu familya tüm dünyada geniş bir alana yayılmış olup özellikle Meksika ve Amerika Birleşik Devleti'nin güney batısında, Brezilya'nın güneyinde, Orta ve Güneybatı Asya'da, Güney Afrika'da ve Avustralya'da yaygın olarak bulunur. Filogenetik açıdan bu familyanın coğrafik orijininin ise Güney Amerika olduğu kabul edilmektedir. *Asteraceae* familyasına ait Türkiye Florası'nda toplam 1156 tür kaydedilmiş olup tür sayısı bakımından ilk sırada yer alır. Bu türlerin 430'u endemik olup, endemizm oranı %38'dir. Ülkemizde 138 cins ile temsil edilen bu familya cins

sayısı bakımından Türkiye Florası'nın ikinci büyük familyasını teşkil etmektedir. Son düzenlemelere göre *Asteraceae* Türkiye'de; 103 cins, 1336 tür ile temsil edilir (39-41).

***Echinops microcephalus* Sibth. & Sm Türünün Özellikleri**

Temmuz-Eylül aylarında çiçeklenme olur. Kurak kayalık yamaçlar, nadas tarlalar ve tarla kenarı, yol kenarlarında yetişmektedir. 0–900 m yükseltide yetişir. Endemik değildir. Balkanlar ve Güney Doğu Romanya. Akdeniz havzasında bulunur. Kromozom sayısı; 2n= 30 dir. Gövdesi tek olup, üst kısımlara gittikçe dallanma göstermektedir. 60 cm kadar ulaşan boyda ve 10 mm'ye yakın çapta otsu bir bitkidir. 6-12 adet batıcı dikenlere sahiptir. Oluklu, araknoid'ten tomentoza tüy örtüsüne ek olarak salgı tüberkülleri bulunur. Yaprak üst ve alt yüzeyi araknoid ve glandular tuberküllüdür. Çiçek durumu 2-4.5 cm arasında başlar. Çiçekleri mavidir. Kapitulum 1.5–2 cm boyunda, brush genelde seyrek, 2-5 mmdir. Fillariler 25-29 adet ve glabroz ya da salgı tüylü; en dıştakiler 2-5 mm, ortadakiler 8-13 mm, en içtekiler 11-15 mm, tabanda hafifçe birleşmiştir. Korolla açık ya da koyu mavi, tüp 3.5-5 mm, salgı tüylü, loplar 6-9 mm'dir. Papus pentagonal şekilli, tüyleri 1,5-2 mm, tabanda boylarının yarısına kadar birleşiktir. Meyveleri, 7-10 mm boyundadır. Yoğun şekilde dallanarak çok sayıda küçük başa sahip olması ile karakteristiktir. *Echinops ritro* ile benzerdir. Ancak sitriat yaprakları, araknoid tüy örtüsü, çok seyrek brusha sahip olması ve başların yapraklı saplarda bulunmasıyla kolayca ayrılır. *Echinops microcephalus* Şekil 1'de gösterilmiştir (42).



Şekil 1. *Echinops microcephalus'a* ait habitus fotoğrafı

ECHİNOPS TÜRLERİNİN BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ

Geleneksel tıbbi amaçlı kullanımlarının yanında, son zamanlarda Astareceae familyasına ait *Echinops* cinslerinin, farklı türleriyle yapılan çalışmalarda tiyofenler, diterpenoitler, flavonoitler, streoidler, kinolin alkoloidleri, seskiterpenler, lignanlar gibi çeşitli aktif moleküllerin varlığı ile biyolojik aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir.

Echinops cinsi bitkiler, yapılarındaki biyoaktif moleküller ile antifungal, antibakteriyel, antihelmintik, antioksidan, antikanser, antiinflamatuvar, hepatoprotektif gibi çok sayıda aktivite göstermiş olup, bu alanda araştırmalar devam etmektedir. *Echinops* türlerinde yapılmış araştırmalarda kullanılan bitki kısmı, çözücü ve gösterdiği biyolojik aktiviteler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Asteraceae familyasındaki *Echinops* cinsinin üyeleri, Etiyopya bitkisel ilaçlarında migren, diyare, kalp ağrısı, enfeksiyonlarda, bağırsak solucanı ve hemoroit gibi çeşitli hastalıklarda kullanılmaktadır. Hymete ve ark. (43) tarafından 2005 yılında yapılan çalışmada, *Echinops ellenbeckii* kök, çiçek, yaprak ve köklerinin hidroalkolik özleri *Echinops longisetus* kimyasal bileşenleri ve biyolojik aktiviteleri için araştırılmıştır. Antrakinonlar tespit edilmezken, bitkilerin farklı kısımlarında alkaloitler, saponinler, fitosteroller, polifenoller ve karotenoidlerin varlığı gözlenmiştir. Hem bitkilerin yaprak ekstreleri hem de *E. longisetus*'un kök ekstresi, *Staphylococcus aureus* kültürlerine karşı güçlü inhibe edici aktivite göstermiştir. Ekstrelerin hiçbiri gram pozitif organizmalara karşı aktif olarak bulunmamıştır. *E. ellenbeckii*'nin çiçeklerinden elde edilen ekstre, *Candida albicans'*a karşı güçlü inhibitördür. Araştırılan bitkilerin kök ve çiçek özleri, solucanlara karşı öldürücü aktivite göstermiştir.

Toroğlu ve ark. (44) 2012 yılında, *E. microcephalus* ve *E. viscosus subsp. Bithinicus* türlerinin yaprak ve çiçeklerinin metanol, etanol, etilasetat ve aseton ekstrelerinin antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri karşılaştırmış, ilaç tedavilerinde geliştirilebilecek nitelikte antimikrobiyal etkiye sahip olduğuna ulaşmışlardır.

Şapçı ve Vural'ın (45) 2017 yılında *E. phaeocephalus* bitkisinde yaptığı çalışmada bitkinin ilk kez antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi gösterilmiştir. Bitki, kurutulup, parçalayıcıdan geçirilerek; metanol, hekzan ve kloroform ekstrelerinin disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak antimikrobiyal testleri yapılmıştır. Hekzan ekstresinin *C. renale* üzerinde etki gösterdiği gözlenirken; kloroform ekstresinin *B. cereus* ve *C. renale* üzerinde etkili olduğu bulunmuştur. Metanol ekstresi ise *K. peumoniae, C. renale* ve *M. luteus* mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal etki göstermiştir. Yapılan antioksidan aktivite testlerinde, DPPH süpürme aktivitesi tayininde standart antioksidan olarak kullanılan BHT ile

kıyaslandığında özellikle metanol ve hekzan ekstrelerinin önemli ölçüde antioksidan aktivite gösterdiği görülmüştür.

E. kebericho Mesfin Etiyopya'da iyi bilinen bir endemik şifalı bitkidir. Geleneksel olarak bitki ateş, baş ağrısı, karın ağrısı, sıtma ve öksürük gibi farklı bulaşıcı ve bulaşıcı olmayan hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Ameya ve ark. (46) tarafından 2016 yılı çalışmasında, *E. kebericho* kökünden su, etanol ve metanol ekstreleri ile yaptıkları çalışmada bitkinin antimikrobiyal etkinliği belirtilmiştir.

Senejoux ve ark. (47) tarafından, geleneksel olarak Orta Asya'da hipertansiyonda kullanılan *E. integrifolius* türünde yaptığı ilk fitokimyasal çalışmada bitkinin bütün kısımlarının etanolle ekstre edilmesi sonucu 6-metoksiflavon, 6-metoksiflavonol ve umbelliferon kumarini ilk kez raporlanmıştır.

E. graecus yağından, % 42.5 oranında metil kavikol (estragol) elde edilmiş olup insektisit, anestezik, antikonvülsan, kas gevşetici, antiagregan ve kanseri önleyici aktiviteye sahip bir fenilpropanoid olarak tanımlanmıştır (48).

Jaisval ve ark. (49) tarafından *E. humilis* türündeki çalışmasında, UV'ye karşı korumada etkili olduğu ve patojenleri bitkilerden uzak tutmaya yaradığı tahmin edilen hidroksisinnamat adlı metabolitler elde edilmiştir.

Kuete ve ark. (50) tarafından yapılan bir çalışmaya göre *E. giganteus* var. Leyli türünün antimikrobiyal etkisi olduğu, kalp ve mide hastalıklarına karşı geleneksel olarak kullanıldığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmada bitkinin metanol ekstresinin insan pankreas kanseri hücre hattı MiaPaCa-2, lösemi CCRF-CEM hücresi üzerindeki *in vitro* sitotoksisite açısından incelenmesi sonucu anjiyogenezde inhibisyon sağladığı gösterilmiştir.

E. grijissi Hance köklerinin ham etanol ekstresinin diklorometan fraksiyonunda yapılan çalışmada izole edilen tiyofenler, HepG2, K562, HL60 ve MCF-7 insan kanser hücrelerinde sitotoksik etki yaparak anti-tümör aktivite göstermiştir (51).

E. latifolius Tausch Çin'in kuzeyinde yaygındır. Bu bitkinin kökleri, havayı temizlemek ve uzun süre süt salgısını uyarmak için kullanılmış ve Radix Echinopsis olarak Çin Farmakopesinde (2005) kaydedilmiştir. Bu bitki üzerinde yapılan önceki kimyasal araştırmalar, bakteri, virüs, mantar, böcek gibi organizmalara ve tümör hücrelerine karşı toksik ve fototoksik aktiviteye sahip tiyofenlerin var olduğunu belirtmiştir. %95 etanolle ektre edilmiş, bitkinin köklerindeki tiyofenlerin gösterdiği sitotoksik etkisi, insan malign melanoma hücrelerinde (A375-S2) ve insan servikal kanser hücreleri (HeLa) olmak üzere iki kanser hücresi hattında denenmiş ve başarılı bulunmuştur (52).

E. echinatus Roxb. bitkisinin kök kısımlarından metanol ekstraksiyonundan, karbonhidratlar, fenolikler ve tanenler; topraküstü kısımlarının metanol ekstraksiyonundan flavonoit, alkoloit ve karbonhidratlar elde edilmiştir. Yapılan çalışmada, bitkinin hem kök hem topraküstü kısımlarının metanol ekstraksiyonunda; furosemit referans alınarak albino farelerde Lipschitz testi uygulanmış ve diüretik etkinliğin varlığı belirtilmiştir (53).

E. spinosissimus Turra *subsp. spinosus* bitkisinin geleneksel olarak migren, diyare, kalp rahatsızlıkları, infeksiyonlarda, kurt düşürücü ve hemoroitte kullanımı mevcut olup, yapılan bir çalışmada çiçek başlarının hekzan ekstraksiyonundan asetilenmiş terpenoitler ve steroller açısından zengin olduğu ve fungal patojenlere göre bakterilere karşı daha etkili olduğu gösterilmiştir (54).

E. orientalis bitkisinin tohumları ve yaprakları ayrı ayrı metanolde ekstrakte edilmiş, izole edilmiş bileşiklere, antioksidan aktivite testleri uygulanması sonucunda tohum ve yaprak ekstrelerinin yüksek DPPH ve orta ABTS radikallerini arttırmasını sağladığı, elde edilen flavonların, yüksek katyon radikal temizleme aktivitesinin olduğu belirtilmiştir (55).

E. tenuisectus bitkisinde yapılan çalışmada; tohumunun sulu ekstresinin, hepatotoksik ajan olan CCl_4'e maruz kalan sıçanlardaki etkinliğine bakılmış, transaminazların (ALT ve AST) serum aktiviteleri, hepatotoksisitenin biyokimyasal belirteci olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak; sıçanların hepatotoksin ajanından (CCl_4) önce ekstre ile ön muamele edilmesinin, hepatoprotektif bir etki sunduğunu göstermiştir (56).

E. heterophyllus bitkisinde yapılan bir çalışmada, art arda 3 gün boyunca 20 mg/kg'lık bir dozda tavşanlara uygulanan metotreksat, belirgin bir karaciğer hasarına neden olurken; flavonoit fraksiyonu, metotreksat kaynaklı karaciğer hasarını önemli ölçüde iyileştirmiş ve hepatoprotektif etkinlik göstermiştir (57).

E. persicus yıllardır ateş düşürücü olarak ve kabızlık ile öksürüğün tedavisinde kullanılmaktadır. Metanol/etil asetat ekstratında yüksek oranda flavonoit konsantrasyonu bulunmuş, 1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) ile güçlü süpürme aktivitesi göstermiş olup, antioksidan kaynağı olarak umut vaad etmektedir (58).

Echinops türlerinden bazılarından araştırmalarda kullanılan bitki kısmı, çözücü ve gösterdiği biyolojik aktiviteler Tablo 1'de belirtilmiştir.

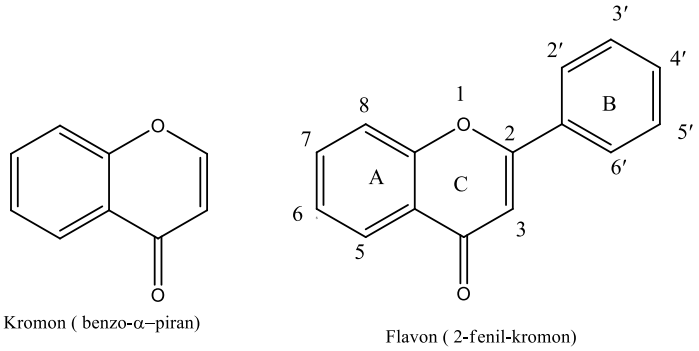
Tablo 1. *Echinops* türlerinden bazılarından araştırmalarda kullanılan bitki kısmı, çözücü ve gösterdiği biyolojik aktiviteler

Tür	Kullanılan Kısım / Çözücü	Biyolojik Aktivite
E. ellenbeckii	Kök, çiçek, yaprak	Antioksidan
E. longisetus	Yaprak ve kök	Antibakteriyel
E. microcephalus	Yaprak, çiçek /metanol, etanol, etilasetat ve aseton	Antibakteriyel, antifungal
E. viscosus subsp. Bithinicus	Yaprak, çiçek / Metanol, etanol, etilasetat ve aseton	Antibakteriyel, antifungal
E. phaeocephalus	Tüm bitki / Metanol, hekzan	Antimikrobiyal, antioksidan
E. phaeocephalus	Tüm bitki / Metanol, hekzan, kloroform	Antimikrobiyal, antioksidan
E. kebericho	Su, etanol ve metanol	Antimikrobiyal
E.integrifolius	-	Antihipertansif
E. graecus	Yağı	İnsektisit, anestezik, antikonvülsan, kas gevşetici, antiagregan ve antikanser
E. humilis	-	UV koruması
E. giganteus	Tüm bitki / Etilasetat, dilorometan	Sitotoksik, antikanser
E. grijissi	Etanol	Antitümör
E. latifolius	Kök / Petrol eteri	Antikanser, fototoksik
E. echinatus	Gövde / Metanol	Diüretik
E. spinosissimus	Çiçek / Hekzan	Antiinfektif

ECHİNOPS TÜRLERİNDEN ELDE EDİLEN SEKONDER METABOLİTLER

Flavonoitler

Flavonoitler, bitkilerden elde edilen doğal ürünler arasında geniş yer edinmiş önemli polifenol grubudur. 15 karbon atomlu (C_6- C_3- C_6) olup 2-fenil benzopiran (difenil propan) yapısında polifenolik bileşiklerdir. Kromon çekirdeği taşırlar. Kromon, piran halkası üzerinde edilmiş bir keto grubu ile bir benzopiran türevidir (Şekil 2)



Şekil 2. Flavonoit iskeleti

Fenilbenzopiran yapısı A, B, C halkalarından meydana gelmiştir. A halkası glikoz metabolizması sonucu asetil koenzim A'dan oluşan malonil koenzim A'nın 3 molekülün kondenzasyonu ile, B ve C halkaları ise glikoz metabolizması sonucu oluşan şikimik asit üzerinden sinnamik asit gibi fenil propanoid bileşiklerinden oluşmuştur. Fenilbenzopiran yapısındaki yerlere farklı hidroksil (-OH) gruplarının bağlanmasıyla çeşitli flavonoitler türetilmiştir. Bazı -OH gruplarına, şeker, metil, sülfat gibi grupların konjugasyonu ile bu flavonoitlerin konjugasyon ürünleri meydana gelmektedir. Çeşitli flavonoit sınıflarına ait örnekler Tablo 2.' de gösterilmiştir.

Tablo 2. Flavonoit sınıfları örnekleri

Flavonlar	**Flavonoller**	**Flavanonlar**	**Flavanol**
Krisin	Kersetin	Naringenin	Kateşin
Apigenin	Rutin	Eriodiktol	Epikateşin
Luteonin	Kampferol	Hesperidin	**Dihidroflavanoller**
	Ramnetin	**Biflavanoitler**	Taksifolin
		Amentoflavon	Silibin

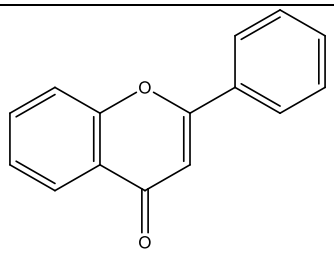
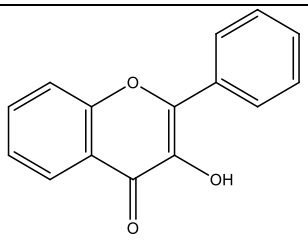
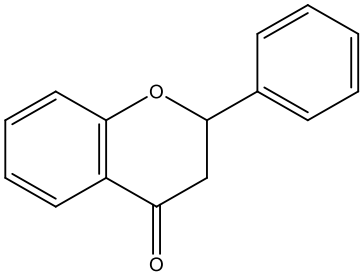
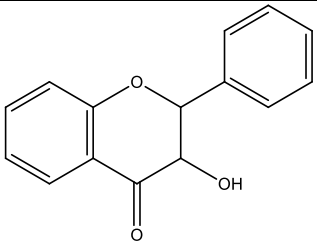
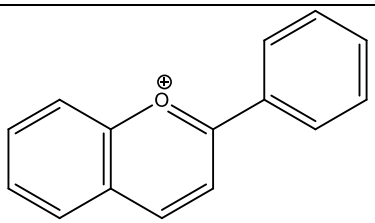
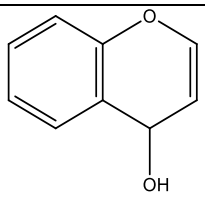
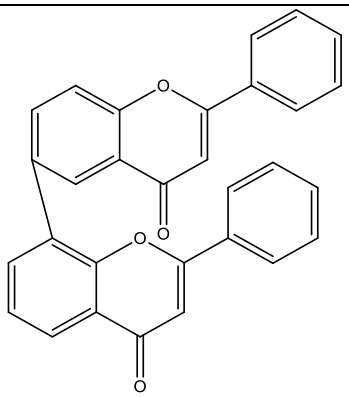
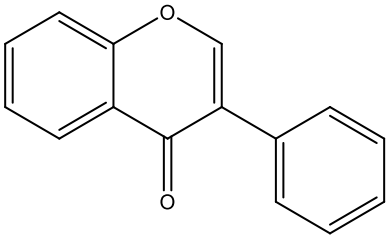
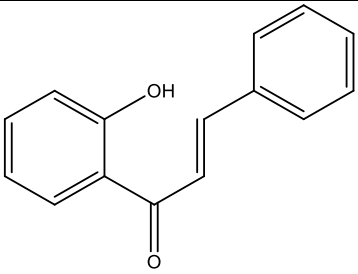
Biyolojik aktivite açısından, antioksidanlar veya serbest radikal temizleyicidirler. Bileşikler, flavanlar olarak bilinen ana bileşiklerden türetilir. Dört binden fazla flavonoit olduğu ve bazılarının yüksek yapıdaki bitkilerde pigment olduğu bilinmektedir. Kersetin, kampferol ve kersitrin, bitkilerin yaklaşık %70'inde bulunan yaygın flavonoitlerdir. Diğer flavonoit grupları, flavonlar, dihidroflavonlar, flavanlar, flavonoller, antosiyanidinler, proantosiyanidinler, kalkanlar ve kateşin ve lökoantosiyanidinlerdir. Tüm flavonoit sınıfları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Vasküler sisteme etki eden flavonoitler, tüm bitkilerde bulunur, ancak bazı sınıflar diğerlerinden daha yaygındır. Flavonlar ve flavonoller evrensel olmakla birlikte, izoflavonlar ve biflavoniller sadece birkaç bitki türünde bulunur.

Flavonoitler, bitkilerde karışım halinde bulunur ve bir bitki dokusunda sadece bir flavonoit bileşeni bulmak çok nadirdir. Ek olarak sıklıkla, farklı flavonoit sınıflarının karışımları vardır. Çiçek yapraklarındaki renkli antosiyaninlere neredeyse her zaman renksiz flavonlar veya flavonoller eşlik eder ve yakın tarihli bir araştırma, flavonların çiçek dokularındaki antosiyanin renginin tam ifadesi için gerekli olan önemli ortak pigmentler olduğunu ortaya koymuştur.

Bir bitki dokusunda flavonoit tipinin sınıflandırılması, başlangıçta çözünürlük özellikleri ve renk reaksiyonları üzerine yapılan çalışmaya dayanmaktadır. Bunu, bitki ekstrelerinin kromatografik incelemesi takip etmektedir (59-61).

Tablo 3. Flavonoit sınıfları

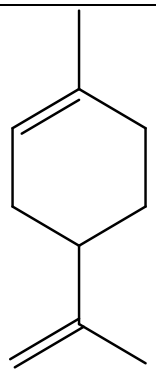
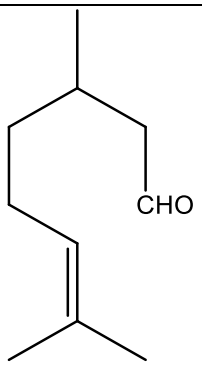
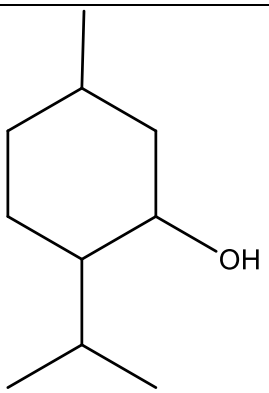
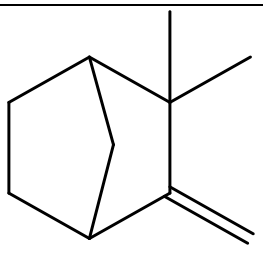
 Flavon	 Flavonol
 Flavanon	 Dihidroflavonol
 Antosiyanidin	 Neoflavon
 Biflavonoid	 Izoflavon
 Kalkon	

Terpenler

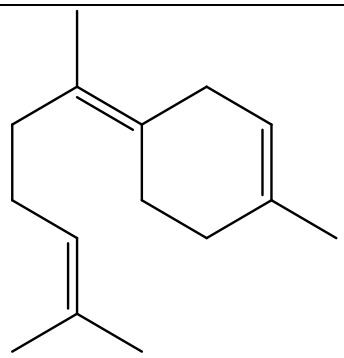
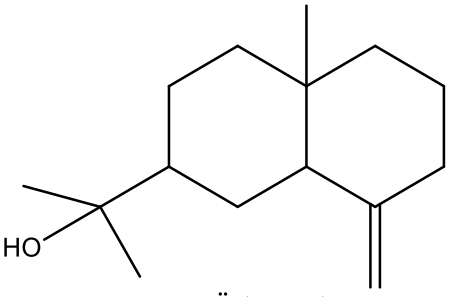
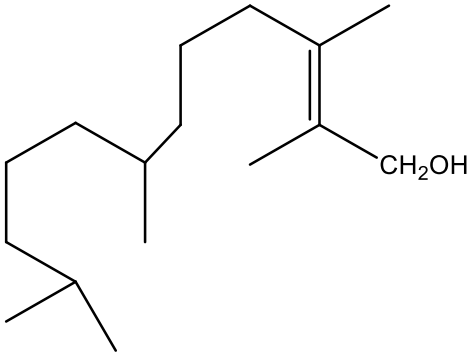
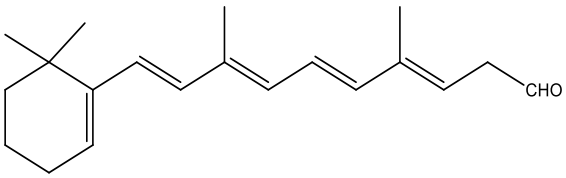
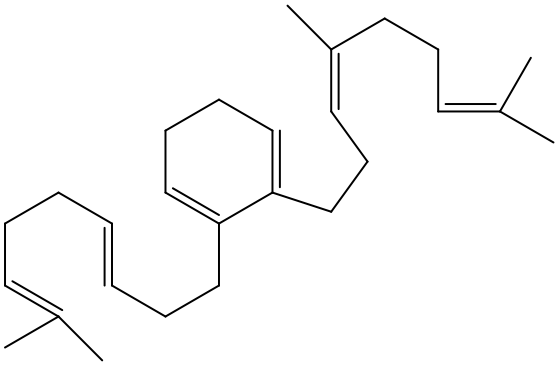
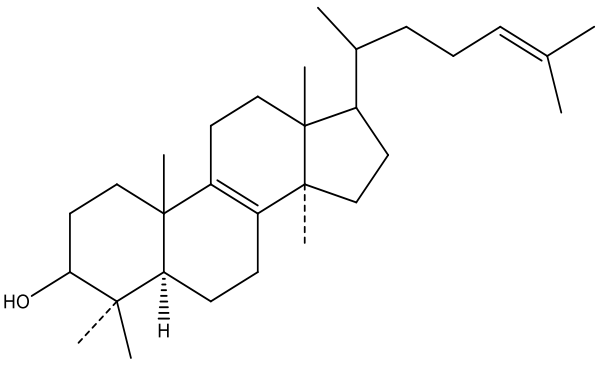
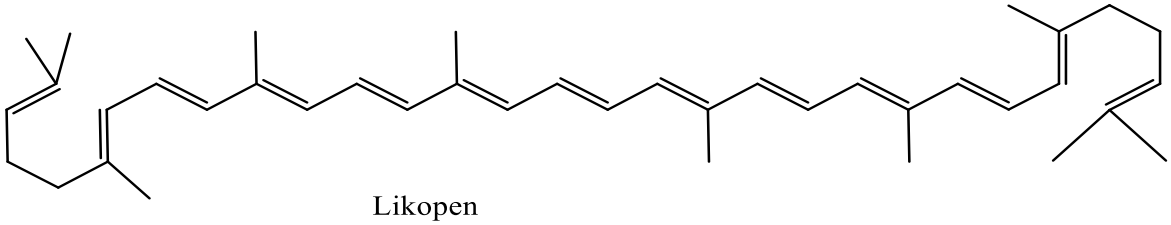
Terpenlerin tümü, $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$ izopren molekülü bazındadır. Karbon iskeletleri, bu C_5 birimlerinin iki veya daha fazlasının birleşmesinden oluşur. İçerdikleri, iki (C_{10}), üç (C_{15}), dört (C_{20}), altı (C_{30}) veya sekiz (C_{40}) karbon sayısına göre sınıflandırılırlar. Uçucu yağ bileşenlerinden uçucu mono- ve seskiterpenlere (C_{10} ve C_{15}), daha az uçucu diterpenlere (C_{20}), triterpenoitlere, sterollere (C_{30}) ve karotenoid pigmentlere (C_{40}) kadar çeşitlilik gösterir. Terpenoit sınıflarının her biri, bitki büyümesi, metabolizması veya ekolojisinde önemlidir. Terpen sınıfları ve her bir sınıfa ait örnekler Tablo 4'de gösterilmiştir.

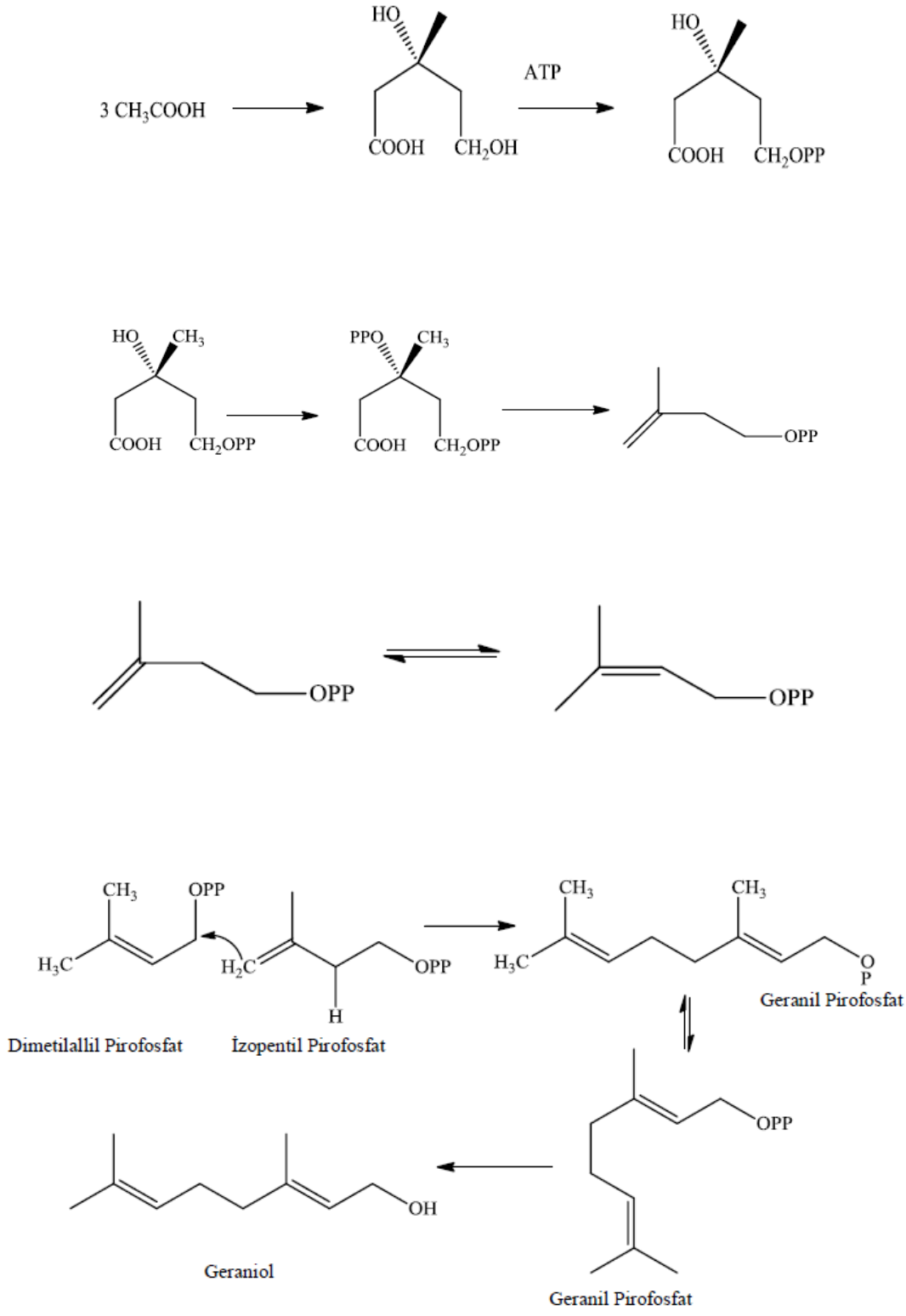
Terpenoitler biyosentetik olarak molekülden türetilmiş olsa da *Hamamelis* yaprağında doğal bir ürün olarak tespit edilen izopren, öncü molekül değildir. Bunun yerine, kendisini mevalonik asit, $CH_2OH-CH_2C(OH,CH_3)CH_2CO_2H$ yoluyla asetattan oluşturulan izopentenil pirofosfat'dır [$CH_2=C(CH_3)CH_2CH_2OPP$]. Biyosentezde bir izopentenil pirofosfat molekülü ve dimetilallil pirofosfattan biri, monoterpen oluşumunda anahtar ara ürün olan geranil pirofosfat (C_{10}) verecek şekilde birbirine bağlanır; geranil pirofosfat ve izopentenil pirofosfat, sırasıyla, seskiterpen sentezinin ana ara maddesi olan farnesil pirofosfat (C_{15})'a bağlanır. Bu C_5, C_{10} ve C_{15} birimlerinin farklı kombinasyonları daha yüksek terpenoitlerin sentezinde rol oynar. Triterpenoitler iki farnesil biriminden oluşurken iki geranilgeranil biriminin kondenzasyonu sonucu ise tetraterpenoitler oluşur. Çoğu doğal "terpenoit", bir veya daha fazla fonksiyonel gruba (hidroksil, karbonil, vb.) sahip siklik yapılara sahiptir, böylece sentezdeki son aşamalar, siklizasyon ve oksidasyon veya diğer yapısal modifikasyonları içerir (Şekil 3-4) (59).

Tablo 4. Terpen sınıfları ve her bir sınıfa ait örnekler

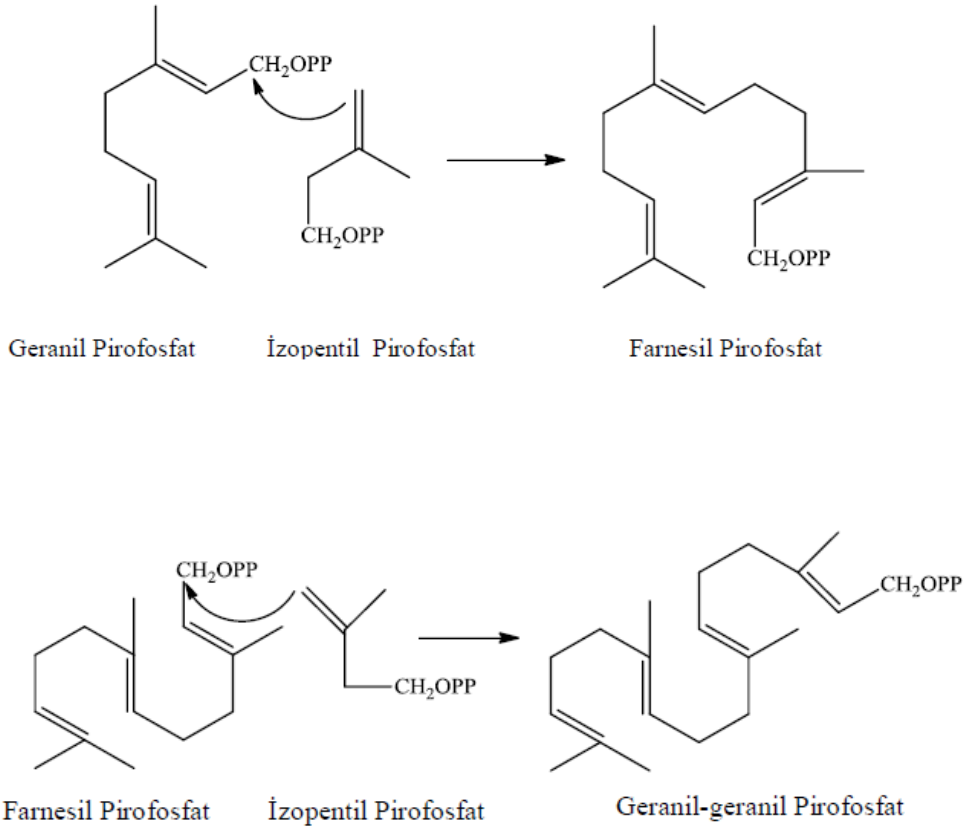
Monoterpenler			
 Limonen	 Sitronella	 Mentol	 Kamfen

Tablo 4. (Devam) Terpen sınıfları ve her bir sınıfa ait örnekler

Seskiterpenler	
 Bisabolen	 Ödesmol
Diterpenler	
 Fitol	 All- *trans*-retinal
Triterpenler	
 Skualen	 Lanosterol
Tetraterpenler	
 Likopen	



Şekil 3. Terpenlerin biyosentezi-1



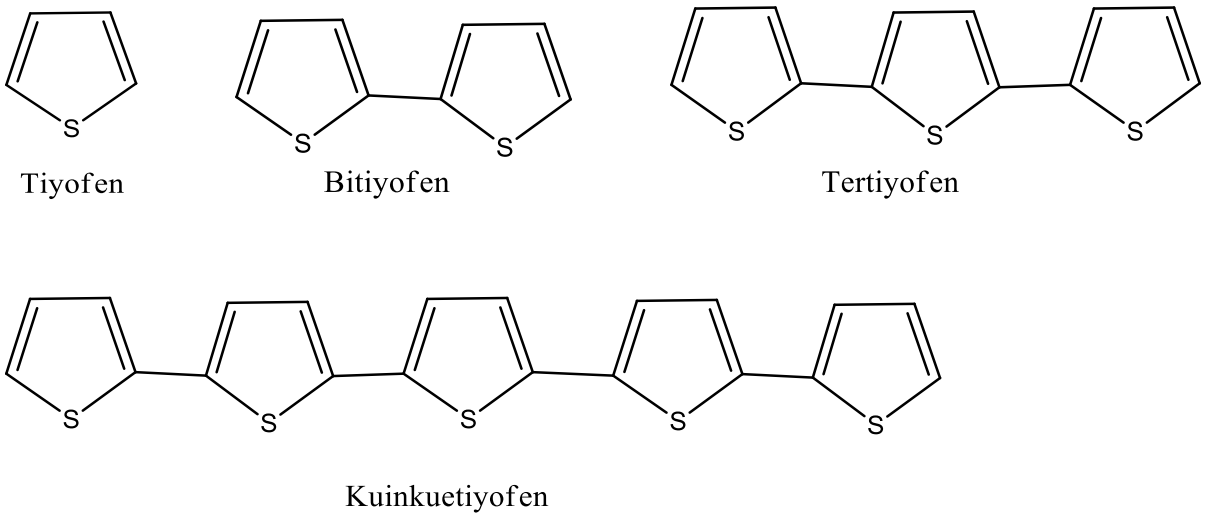
Şekil 4. Terpenlerin biyosentezi-2

Tiyofenler

Tiyofenler, bir C_4H_4S moleküler formülüne sahip kükürt ve dört karbon atomundan oluşan beş üyeli bir halka temelinde bir heterosiklik aromatik bileşik sınıfıdır. "Tiyofen" kelimesi, sırasıyla "kükürt ve parlama" anlamına gelen Yunanca "theion" ve "phaino" kelimelerinden gelmektedir.

Doğal olarak oluşan tiyofenler, *Tagetes, Echinops, Artemisia, Balsamorhiza, Blumea, Pluchea, Porophyllum* ve *Eclipta* gibi *Asteraceae* familyasına ait bitkilerden elde edilen karakteristik sekonder metabolitlerdir. Ayrıca, doğal olarak oluşan tiyofenler genellikle α-karbonları ile birbirine bağlanan ve *orto* pozisyonlarında serbest alkil zincirleri taşıyan beş tiyofen halkalarından oluşur ve Şekil 5'de belirtilmiştir.

Tiyofen içeren bileşikler, antimikrobiyal, antiviral, HIV-1 proteaz inhibitörü, antilayşmanyal, nematisit, böcek öldürücü, fototoksik ve antikanser aktiviteleri gibi çok çeşitli biyolojik özelliklere sahiptirler (62).



Şekil 5. Tiyofen yapıları

Tiyofen türevleri, petrolde bulunan organosülfür içeren bileşiklerin yanı sıra fosil yakıtlardan türetilen diğer bazı ürünlerin yanı sıra, petrol damıtmasından elde edilen yan ürünler olarak oluşur (63,64).

Doğal kaynaklardan izole edilen tiyofen türevleri, yapılarında tiyofenler (bir halka), bitiyofenler (iki halkalı), tertiyofenler (üç halkalı) ve kinketiyofenler (beş halkalı) dahil olmak üzere, yapılarındaki tiyofen halka sayısına göre sınıflandırılabilir.

Bitkilerin farklı bölümlerinde depolanan tiyofenler ve türevleri, birçok bitki türünde kimyasal savunma mekanizmasının bir parçası olarak üretilir. Bu bileşikler, yabancı etkenleri uzaklaştırıcı, haşeratları öldürücü etkide davranabilmektedir. Doğal tiyofenler, bitki dokularında depolanabilen poliasetilenlerden türetilerek veya tereyağından elde edilebilir (65). Bu bileşikler ayrıca güneş ışığı veya UV ışıması (300–400 nm) ile aktive edilen toksinler olarak da işlev görebilir. Bu bileşikler, nematodlar, böcekler, mantarlar ve bakteriler dahil olmak üzere birçok patojene karşı toksiktir (62).

Tiyofenlerin Biyosentezi

İlk olarak doğal olarak meydana gelen tiyofen türevi olan α-tertiyofen, 1947'de *Tagetes erecta*'dan izole edilmiştir (66). O zamandan beri, değişken sayıda çift veya üçlü bağ içeren bir, iki veya üç tiyofen halkası ve yan zincir içeren 150'den fazla tiyofen bazlı doğal ürüne ulaşılmıştır (67,68). *Asteraceae* familyası ve mantarlarda karakterizedir (69).

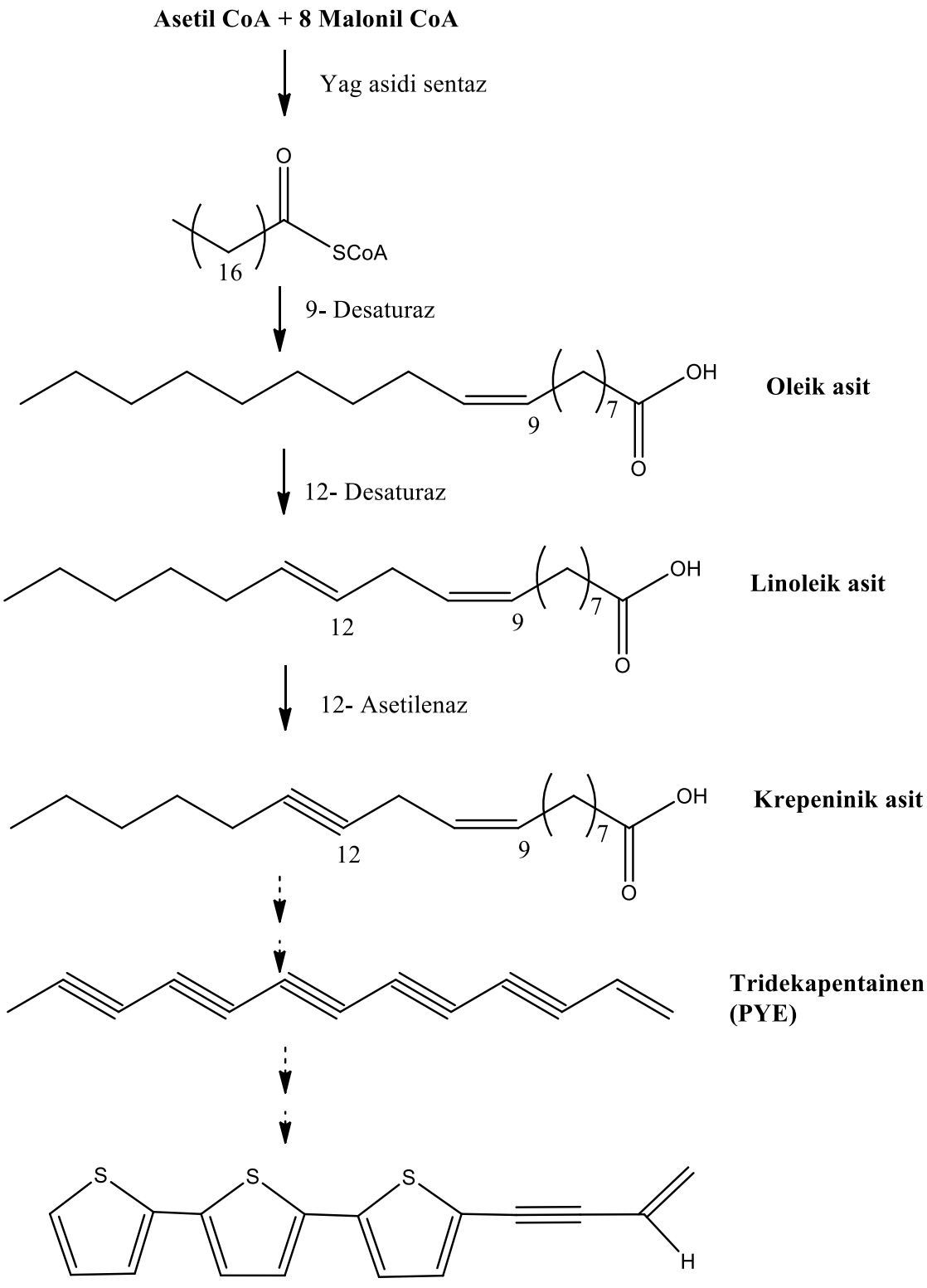
Oleik asit, asetilen ara maddeleri yoluyla tiyofenlerin biyosentezinde bir öncü olarak önerilmiştir (70). Asetilenik doğal ürünler, bir karbon-karbon üçlü bağı veya alkinil

fonksiyonel grubu içeren tüm bileşikleri içerir. Krepeninik asit, stearolik asit ve taririk asit dahil olmak üzere çoğu asetilenik doğal ürünün temel yapı taşları olarak üç yağ asidi tanımlanmıştır (71). Oleik asit, krepeninik asit ve zincir kısalma işlemlerini içeren tekrarlanan desatürasyon aşamaları vasıtasıyla trideka-3,5,7,9,11-pentain-l-ene (PYE) dönüştürülür (70). PYE daha sonra bitki dokusunda biriken çeşitli farklı tiyofenlere dönüştürülür (Şekil 6) (72).

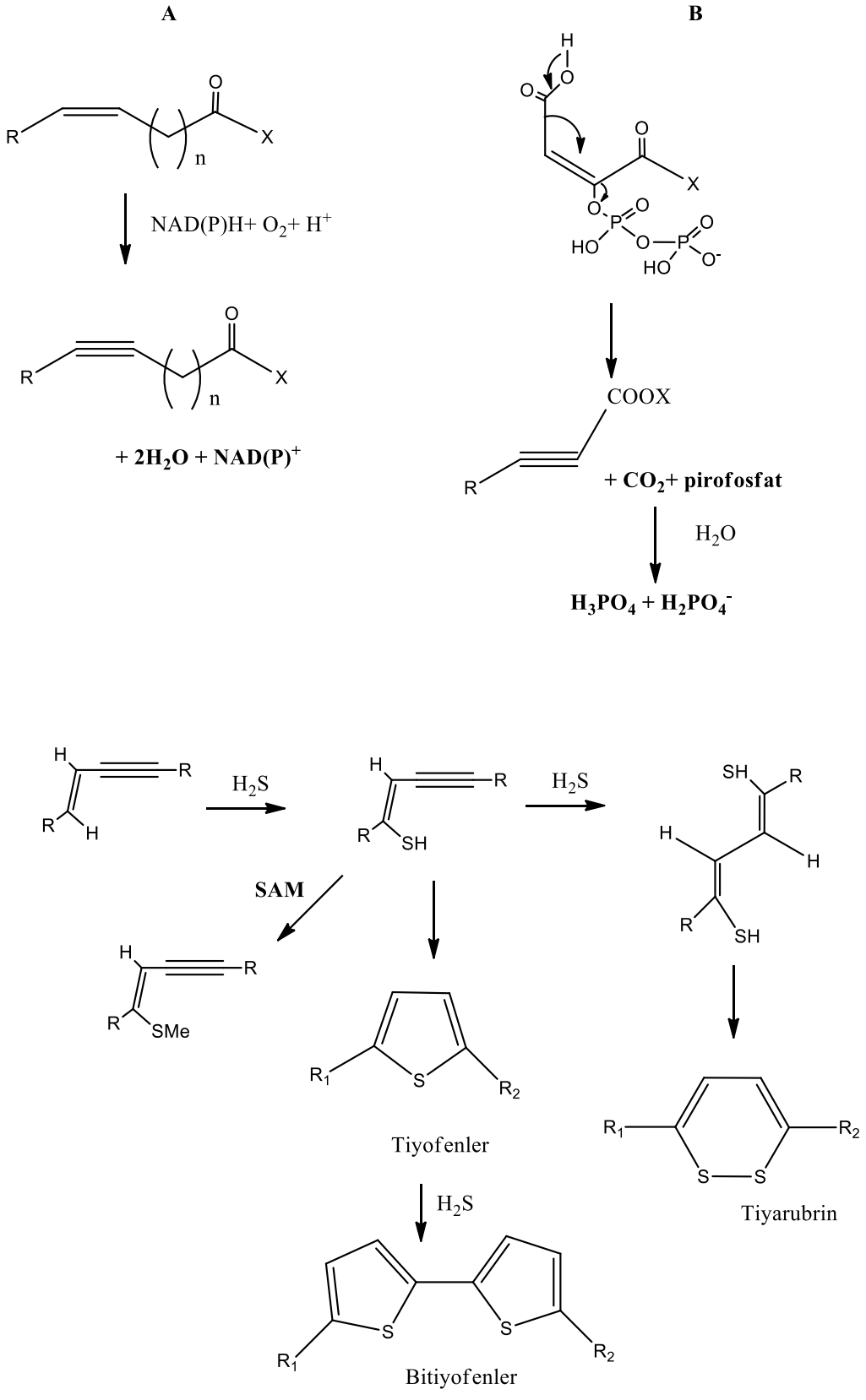
Poliasetilenlerin biyosentezi iki aşamada meydana gelir (Şekil 5). Birinci adım (A); bir oksidatif dehidrojenasyon (desatürasyon) mekanizmasıdır. Burada mevcut alken işlevselliği, moleküler oksijenle demir katalizli bir dehidrojenasyon yoluyla bir desatürasyon reaksiyonundan geçer. Bu reaksiyonun gerektirdiği elektronlar ya NADH ya da NADPH tarafından sağlanır. İkinci adım (B), ikinci π-bağının oluşumu için farklı bir yaklaşım kullanan dekarboksilatif bir enol çıkarma mekanizmasıdır. Aktifleştirilmiş bir enol karboksilat ara maddesinin ortadan kaldırılması, pirofosfatın hidrolizinin eşlik edebildiği CO_2 oluşumu ile termodinamik olarak tetiklenir. Orijinal hipotezlere göre, A yolu uzun zincirli açil lipidlerle çalışır. B yolu ise *de novo* yağ asidi biyosentezi sırasında asetilenik gruplar kurar. Her ne kadar mevcut paradigma, yağ asidi biyosentezi ile satüraz yolunu desteklese de, poliketit türevli asetilenik doğal ürünler için de geçerli olmaya devam etmektedir (71).

Genellikle poliasetilenlere eklenen bir heteroatom olan kükürt, ekolojik olarak önemli tiyofenler ve bitiyofenlerde geniş bir yelpazede bulunur. Bu bileşiklerin yapıları, tiyofen halkalarının sayısı (1-3) ve yan zincirlerindeki doymamışlık derecesi (en/in) bakımından büyük ölçüde değişmektedir (70). Sistein ve H_2S'in her ikisi de potansiyel kükürt kaynakları olarak önerilmiştir (69,73-74). PYE'nin tiyofenlere dönüştürülmesindeki kilit adım, H_2S veya bunun bir konjüge üçlü bağına biyokimyasal eşdeğeri ilavesi, ardından muhtemelen iki aşamalı bir reaksiyon olan bir halka oluşumu reaksiyonu ilavesidir (74). İki veya üç tiyofen halkası içeren bileşiklerin oluşumuna ek olarak, bitki dokularında biriken çeşitli tiyofenleri elde etmek için bir terminal metil grubunun çıkarılması ve bir vinil grubunun modifikasyonu gereklidir.

Bir diin ünitesine kükürt eklenmesi, aşamalı bir işlemle tiyofen halkasının oluşumuna yol açar. H_2S ilavesi, daha sonra tiyoeter üretmek üzere bazı Asteraceae türlerinde rastlanan vinil tiyolleri üretir. Daha sonra halka kapanması, tiyofenleri oluşturur ve disülfür bağlarında oksidasyon bitiyofenlerin oluşumu ile sonuçlanır (Şekil 7).



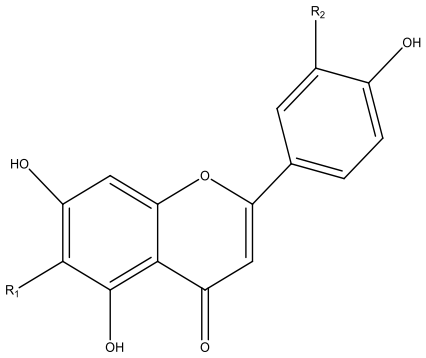
Şekil 6. Tiyofen sentezi-1



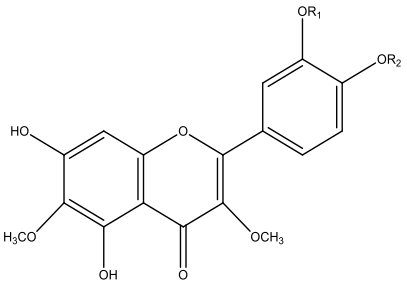
Şekil 7. Tiyofen biyosentezi -2

Bir bitkinin farklı kısımlarında bulunan tiyofenlerin oranı, türüne bağlı olarak önemli ölçüde değişebilir. Örneğin, sürgünlerde tiyofenlerin bulunmadığı halde, bitiyeniller ve 5-(but-3-en-1-inil)-2,2'-bitiyofen (BBT) ana bileşen olarak bulunmuştur. Söz konusu bitkilerin sürgünlerinde bulunmayan fakat köklerinde bulunabilen α-tertiyenil, çiçeklerde birikir. Birçok deney olmasına rağmen, tiyofen metabolitlerinin sadece köklerde ortaya çıkıp çıkmadığı ve spesifik tiyofenlerin bitkinin farklı kısımlarında tercihen birikmiş olup olmadığı veya tiyofen yolağının enzimatik bileşenlerinin dokuya özgü bir şekilde ifade edilip edilmediği araştırılmaya devam etmektedir. Metil ayrılmasının, ikinci tiyofen halkasının oluşumundan önce meydana geldiği bildirilmiştir (62).

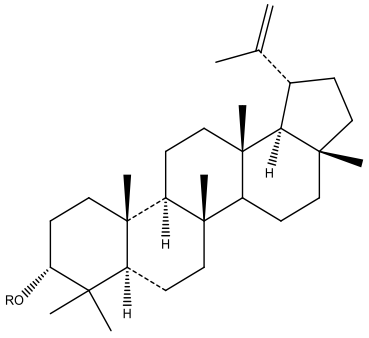
Echinops türlerinden elde edilen bileşiklere örnekler belirtilmiştir (Şekil 8). Yapılar; flavonoit, terpen ve tiyofen içermektedir.



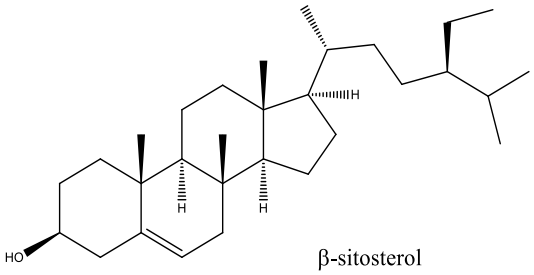
R_1= H **R_2** = OCH_3 Krizoeriol
R_1=R_2= H Apigenin
R_1= OCH_3 **R_2**=H Hispidulin



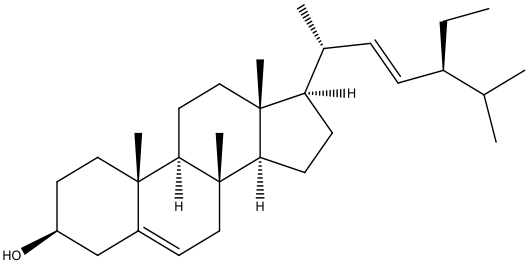
R_1= CH_3 **R_2**= H Yaseidin
R_1= H **R_2**= CH_3 Sentaureidin
R_1= **R_2**= H Aksillarin



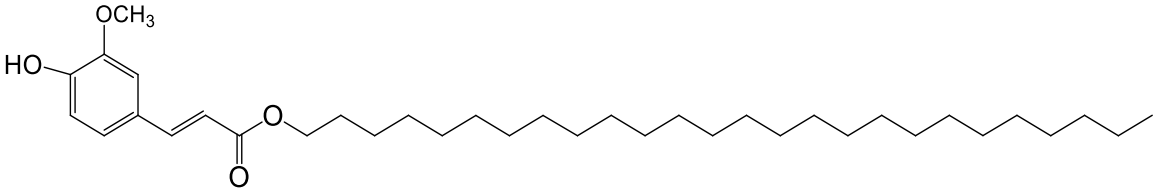
1 R= $COCH_3$ Lupeol asetat
2 R= H Lupeol



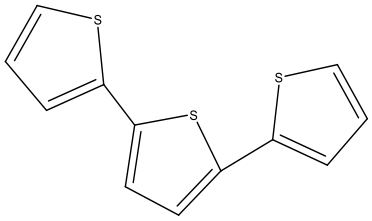
β-sitosterol



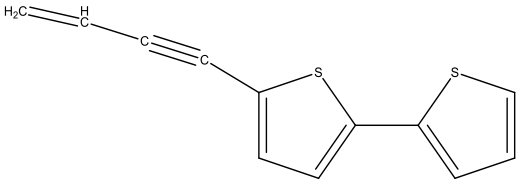
Stigmasterol



Hekzakosil- (E)-ferulat



α- tertiyofen



5- (3-buten-1-inil)-2,2'-bitiyofen

Şekil 8. *Echinop*s türlerinden elde edilen bileşikler

ALZHEİMER HASTALIĞI

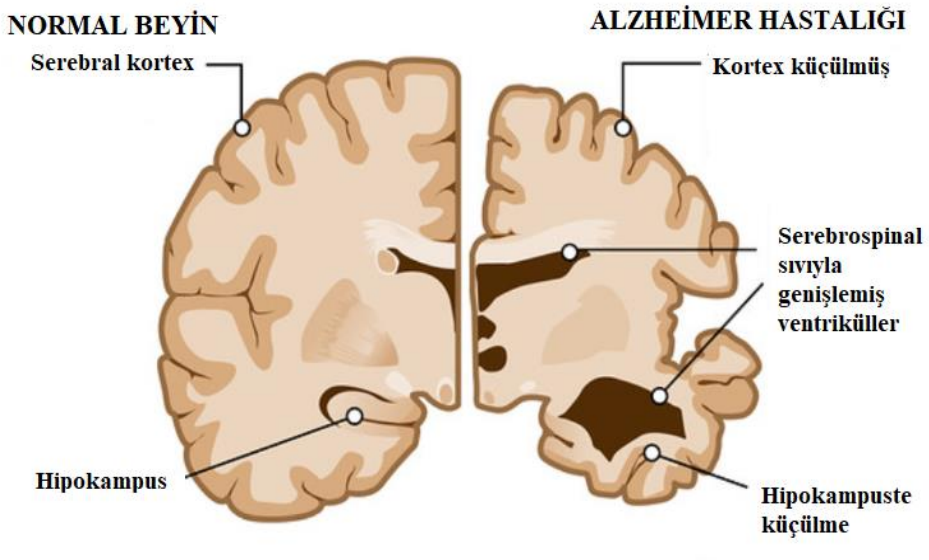
İnsanın günlük yaşamını etkileyecek kadar zihinsel yeteneklerinin azalmasına demans denir. Bilişsel işlev bozukluğuyla kendini gösterir. Dikkat, konsantrasyonda güçlük, problem çözmede zorluk, öğrenme ve bellek faaliyetlerinde zayıflık gibi bilişsel bozuklarla kişilerin sosyal yaşamını etkiler. Halk sağlığı sorunlarından biri olup cinsiyet, ırk ya da sosyoekonomik farklılıklar gözetilmeden her insan da ortaya çıkabilen; yaşla insidansında artış gözlenen bir hastalıktır. 85 yaş ve üzeri kişilerin %30-50'sinde demans görülmektedir. Alzheimer hastalığı (AH), en sık görülen demans nedenidir ve ilerleyicidir. Alzheimer hastalığı 65 yaş üzeri topluluğun %10'undan fazlasını etkilemektedir (75-77).

Hastalık, Alman psikiyatrist Alois Alzheimer tarafından, 51 yaşındaki bir hastanın beyninde, ekstraselüler senil plaklar ve intrasellüler nörofibriler yumaktan oluşan nöropatolojik bulguları ile hastalık semptomları arasındaki ilişkiyi, 1906 yılında ilk kez tanımlamıştır. Hastalık, Alzheimer adını almış olup, 20-30 yılda tüm toplumlarda artan bir ilgi doğurmuştur (78). Dünya genelinde her yedi saniyede bir meydana gelen yeni bir vaka ile hastalık yavaş bir salgın haline gelmektedir (79). Her 85 kişiden birinin, 2050 yılına kadar Alzheimer hastalığına yakalanması beklenmektedir (80). Hastalık, tedavi maliyetlerinin yüksek olması, tedavi süresinin uzun ve hasta kaybı oluşturması nedeniyle başta hasta yakınlarına olmak üzere prevalansının yüksek olduğu toplumlara da ciddi yük getirmektedir.

Hastalık, başlangıç yaşı itibariyle; erken başlangıçlı ve geç başlangıçlı olarak sınıflandırılabilir. Erken başlangıçlı AH, tüm vakaların yaklaşık %1-%6'sını oluşturur ve yaklaşık 30 ile 60 yaşındaki kişiler arasında meydana gelir. Vakaların yaklaşık %90'ını oluşturan geç başlangıçlı formu, 60 yaşın üstünde bir başlangıç yaşı ile seyretmektedir.

AH'nın etiyolojisi, genetik, çevresel, davranışsal ve gelişimsel bileşenlerin rol oynadığı çok etkenlidir. En büyük risk faktörü ilerleyen yaştır; aile öyküsü, bilinç kaybı oluşturan kafa travması, ileri anne yaşı, Down sendromu, depresyon, alkol kullanımı, atrial fibrilasyon, diabetes mellitus, hiperlipidemi ve vasküler faktörler gibi çok sayıda durum etken oluşturmaktadır (81,82). Birinci derece akrabaları Alzheimer olan kişilerde hastalığın oluşma ihtimalinin arttığı gözlenmiştir. Amiloid prekürsör protein (APP), presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2), apolipoprotein E (ApoE) ilişkili başlıca genlerdir. 21. kromozomda yer alan APP ve 1. kromozomda yer alan PS2 genlerinin mutasyonları sonucunda, amiloid beta (Aβ) peptid seviyelerinin arttığı bildirilmiştir. 14. kromozomda bulunan PS1 genindeki değişimler APP'nin hatalı bölünmesine ve toksik Aβ üretimine neden olmaktadır. Diğer taraftan bu gendeki mutasyonlar Tau proteinlerinin hiperfosforilasyonuna neden olup,

nörofibril yumak oluşumuna zemin hazırlamaktadır. 19. kromozomdaki ApoE geni için; ε2 koruyucu aleldeki mutasyanlar hastalığı azaltırken, ε4 alelindeki değişimlerin amiloid plak ve nörofibril yumak oluşumunda artış yaparak hastalığa neden oluşturmaktadır (Şekil 9) (82).

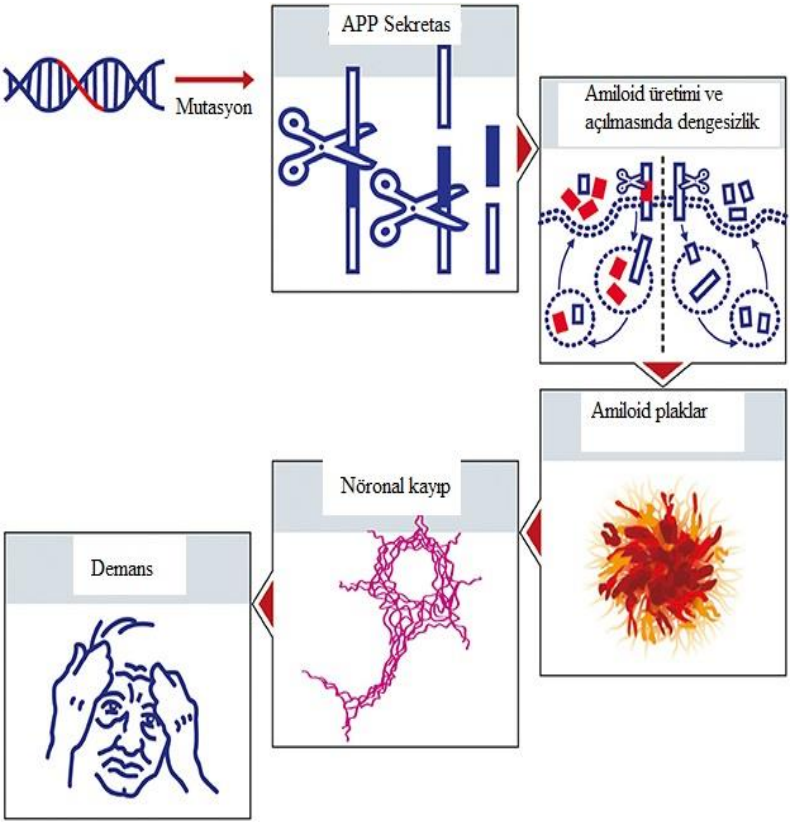


Şekil 9. Normal ve Alzhemir hastalığındaki beyin

Amiloid, Tau ve kolinerjik hipotez olmak üzere üç ana Alzheimer hipotezi bulunmaktadır (83).

Amiloid hipotezi

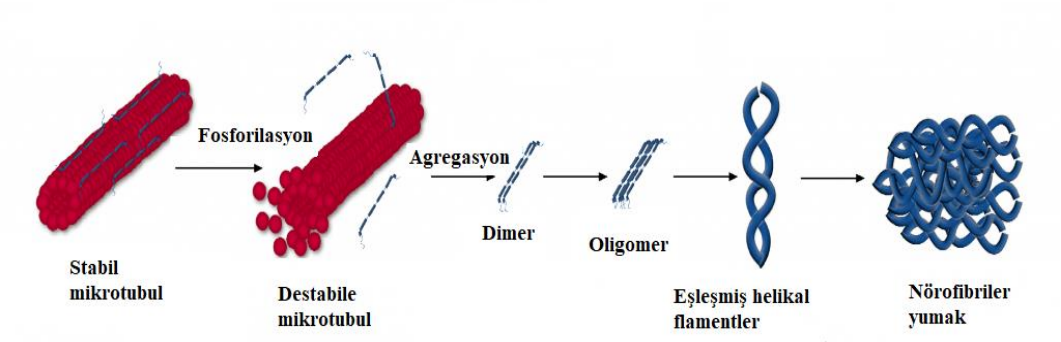
Protein metabolizmasında görevli olan ve mutasyona uğramış genlerin aktivitesi sonucu beyindeki β-amiloid (Aβ) protein fragmentlerinin birikmesi ve beyin hücresi iltihabı ve ölümü ile ilgilidir (84-86) Bu hipotezde normal koşullarda, amiloid öncü proteini (APP) α-sekretazlar tarafından nöroprotektif fonksiyonlara sahip "C83" C-terminali ve "APPsα" N-terminalini serbest bırakarak metabolize edilir. Ardından ayrılma meydana gelir fakat Aβ fragmenti birikme riski yoktur (87). Ancak, Alzheimer hastalarında, Aβ fragmentlerinin nöritik plaklarda birikmesiyle anormal APP bölünmesi ve beyin bulanıklığı gözlenir (Şekil 10).



Şekil 10. Amiloid hipotezi ile yığılmış Aβ fragmentlerinin oluşumu

Tau hipotezi

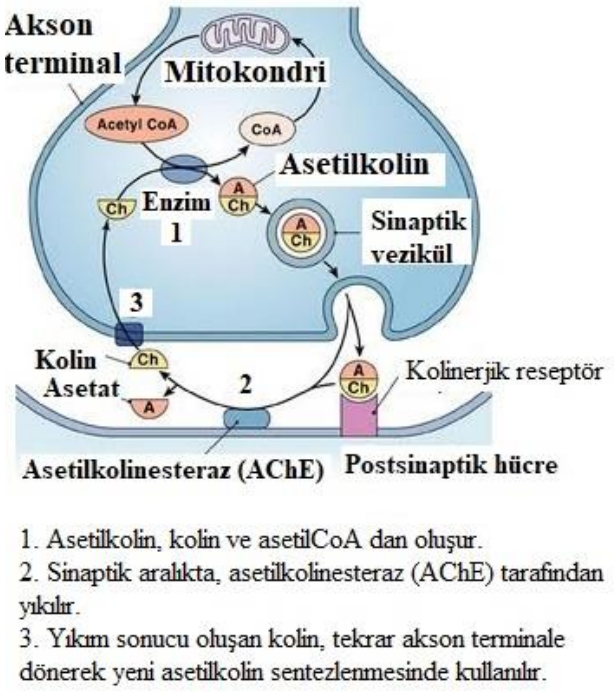
Tau hipotezi, nörofibrillerin kümelenmesi temellidir. Hücrelerin fosforilasyonu sonucunda mikrotübüllere olan bağlantılarını kaybetmiş ve yığılma yapmış proteinleri ve artışlarını açıklar (87). Çözünebilir fragmentler, Tau plaklarından daha toksiktir. Kurkumin gibi doğal ürün bazlı mikrotübül stabilizasyonunda yer alan enzimleri düzenleyen ilaçlar geliştirilmesine odaklanılmıştır. (88) Nörofibrilerin oluşumunun ana nedeni olan Tau protein kümelenmesidir (Şekil 11).



Şekil 11. Tau hipotezi ile yığılmış Tau proteinin oluşumu.

Kolinerjik hipotez

Asetilkolin biyosentezinin metabolik yolu (Şekil 12)'de gösterilmiştir (89).



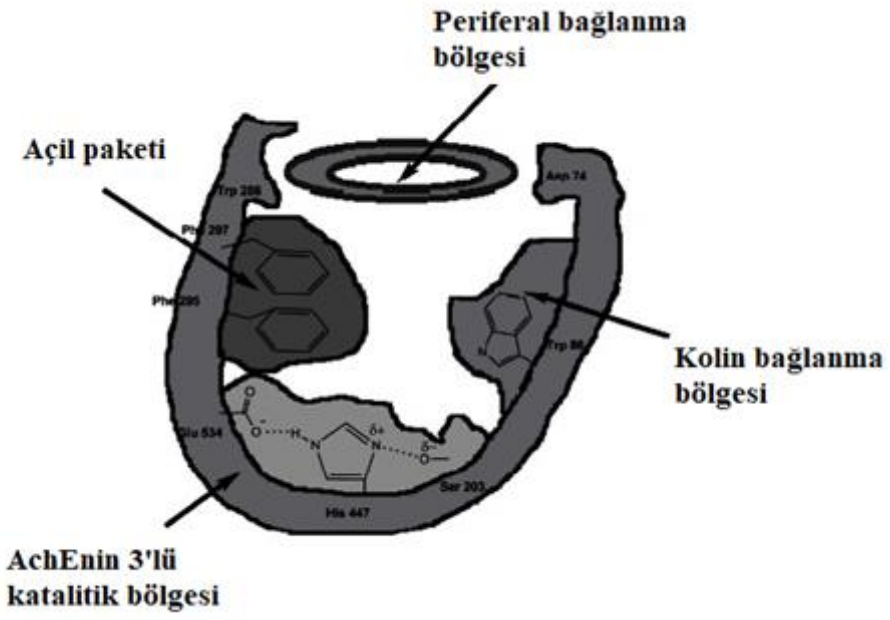
Şekil 12. Kolinerjik hipotez.

Asetilkolin Metabolizması ve Kolinesterazlar

Alzheimer hastalarında kolinerjik sinapslarda asetilkolin üretiminde azalma sağlıklı bireylere kıyasla % 73'lük orandadır (90). Kolinerjik nöronlar, sadece motor nöronları içermekle kalmayan aynı zamanda hafıza ve öğrenmeyle ilgili bilişsel aktiviteler gösteren ön beyin nöronlarını içeren çok karmaşık bir sistemin bir parçasıdır (91). Sinir terminallerinde salınan bir nörotransmitter olan asetilkolin, asetil koenzim A (asetil-CoA) ve kolinden sentezlenen kolinasetil transferaz reaksiyonunun ürünü olarak elde edilir. Asetilkolin sinaptik boşluğa salınır ve daha sonra asetilkolinesteraz (AChE) tarafından kolin ve asetata bozulur. Böylece sinaptik boşlukta asetilkolin miktarı azalır (92).

Kolinerjik nöronlar, mitokondriye göre daha fazla asetil-CoA'ya ihtiyaç duyar, ancak mitokondrinin bozulmuş enerji metabolizması, asetil-CoA eksikliğinden kaynaklanan asetilkolin sentezinin eksikliğine neden olur. Nöronal hücrelerin kaybı, amiloid protein fragmanlarının birikmesi, nörofibriler karışma ve düşük asetilkolin üretimi sinaptik kaybın nedenleri olarak gösterilmiştir (93).

Alzheimer tedavilerin birçoğu, sinaptik yarıktaki asetilkolin bozunmasını hafifletmek ve dolayısıyla düşük üretimine rağmen etki süresini arttırmak amacıyla AChE inhibisyonuna dayalı olarak geliştirilmiştir. AChE, asetilkolinin hidrolize edildiği anyonik bir bölgeye ve bir hidrofobik siteye sahip bir serin hidrolazdır. Bu enzim esas olarak kolinerjik sinapslarda ve kas kavşaklarında bulunur (Şekil 13) (89).



Şekil 13. Asetilkolinesteraz enziminin yapısı (Glu-glutamik asit; His-histidin; Ser-serin)

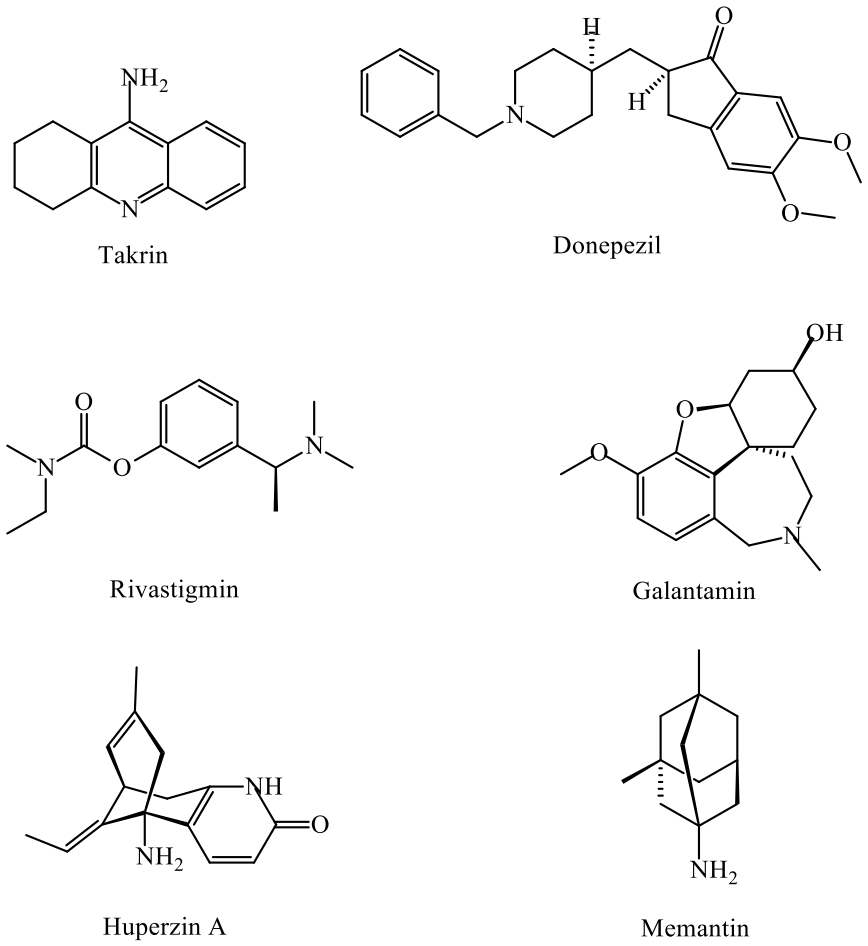
Bununla birlikte, AChE bir glutamat artığına sahiptir, aspartat ise genellikle diğer serin hidrolazlarda bulunur. Yapısal olarak, AChE, katalitik bölgesini içeren derin bir geçide sahiptir. Ayrıca anyonik bölge kolin bölgesi ile etkileşime girmektedir çünkü amin grubuna afinitesi vardır, katyonik bölge korunmuş aromatik artıklar bakımından zengindir (94).

Alzheimer Hastalığının Tedavisi ve Kolinesteraz İnhibitörleri

Alzheimer için onaylanan farmakolojik tedavi, patolojik gelişimi tersine çevirmeden veya engellemeden bilişsel fonksiyonları geliştirir veya düzenler. Henüz yeni ve palyatif olan bu tedavide ilaçların birincil etki mekanizması AChE'nin inhibisyonudur (95). 1990'lı yıllardan itibaren kolinerjik hipoteze dayalı Alzheimer tedavisinde kullanımı olan ilaçlar bulunmaya başlanmıştır. Takrin, 1993'te Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan ilk ilaçtır (96).

Takrinden sonra geliştirilen diğer AChE inhibitörleri, ikinci kuşak ilaçlar adını alır. Şekil 14'de gösterilen donepezil, rivastigmin, galantamin ve Huperzin A ikinci kuşak ilaçlardır. Bu ilaçlar, asetilkolini parçalayan ve asetilkolinin nikotinik ve muskarinik

reseptörleri uyarma kabiliyetini arttıran enzimleri inhibe eder. Memantin, NMDA (N-metil-D-aspartat) reseptörlerini bloke ederek glutamaterjik sistemi bloke eden non-kompetitif bir antagonisttir (88,97,98).



Şekil 14. Asetilkolinesteraz inhibitörleri

Takrin

Takrin asetilkolinin seçici olmayan bir inhibitörü olarak görev yapar. Asetilkolinin sentezi ve salımını uyarır ve NMDA reseptörleri tarafından aktive edilen kortikal kalsiyum kanallarını bloke eder (99).

Donepezil

Donepezil, piperidin bazlı ve geri dönüşümlü AChE inhibitörüdür. Hafif-orta şiddette Alzheimer hastalarının tedavisi için donepezil hidroklorür önerilmektedir, ancak iştah, kusma ve ishal gibi periferik kolinerjik sistemde yan etkiler görülebilir (100). Donepezil, AChE'nin

aktif bölgeleri olan periferik anyonik bölge (PAS) ve katalitik anyonik bölge (CAS)'ye bağlanır (101).

Rivastigmin

Rivastigmin, AChE ve butirilkolinesteraz (BChE)'ın hidrolitik aktivitesinin inhibe edilmesi ve katalitik bölgelere bağlanması ile etkisini gösterir (94, 102-104).

Galantamin

Galantamin, nikotinik reseptörlere allosterik olarak bağlanan, kolinerjik cevabı arttıran, tersinir bir AChE inhibitörüdür. Bu reseptörlerin hafıza ve öğrenmede önemli bir rol oynaması galantamini diğer inhibitörlerden ayırır (105). Galantamin, sadece AChE'yi değil aynı zamanda nikotinik asetilkolin reseptörlerini (nAchR'ler) inhibe eden ve Alzheimer hastalarında merkezi kolinerjik nörotransmisyonu azaltan çift etki mekanizmasına sahiptir (106).

Huperzin A

Huperzin A, Çin tıbbında kullanılan ve AChE'ı ters yönde inhibe eden *Huperzia serrata* bitkisinden elde edilen doğal bir etkin maddedir (107,108). Yapısal olarak asetilkolin ile benzerlik gösterir ve diğer inhibitörlerden farklı olarak AChE'ın periferik anyonik bölgesine bağlanır (109).

Memantin

Memantin, diğer ilaçların aksine, bir AChE inhibitörü değildir. Aksine, NMDA reseptörlerinin bir antagonisti olarak (NMDA ekstrasinaptik reseptörleri boyunca kalsiyum akışını azaltmak ve nörodejenerasyonu geciktirmek için iyon kanallarına bağlanır) işlev görerek Alzheimer tedavisi için kullanılır (97).

AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Ekstraksiyon, tıbbi bitkilerin analizinde ilk önemli adımdır, çünkü ayırma ve karakterizasyon için, istenen kimyasal bileşenleri bitki materyallerinden çıkarmak gerekir. Temel işlemler; bitkinin ön yıkanması, bitki malzemesinin kurutulması ya da dondurarak kurutulması, öğütme ile homojenizasyonun sağlanması, analitik yöntem geliştirilmesi ve

uygun çözücü sisteminin tasarlanarak, materyal yüzeyinin temasının arttırılması gibi aşamaları içerir.

Bitki örneklerinden ekstrelerininin hazırlanması sırasında potansiyel aktif bileşenlerin kaybolmaması, bozulmaması veya tahrip edilmemesi için uygun önlemler alınmalıdır. Çözücü sisteminin seçimi büyük ölçüde hedeflenen biyoaktif bileşiğin kendine özgü doğasına bağlıdır. Biyoaktif bileşiği doğal ürünlerden çıkarmak için farklı çözücü sistemleri kullanılır. Hidrofilik bileşiklerin ekstraksiyonunda metanol, etanol veya etil-asetat gibi polar çözücüler; daha fazla lipofilik bileşikler için, diklorometan veya (1:1) oranında diklorometan/metanol karışımı kullanılır.

Hedef bileşikler polar-apolar ve ısı ile kararsız olabileceğinden, ekstraksiyon yöntemlerinin uygunluğu önemlidir. Sonikasyon, refluks sokshlet ekstraksiyonu gibi çeşitli yöntemler yaygındır. Diğer modern ekstraksiyon teknikleri arasında katı fazlı mikro ekstraksiyon, süper kritik akışkan ekstraksiyonu, basınçlı sıvı ekstraksiyonu, mikrodalga destekli ekstraksiyon, katı faz ekstraksiyonu ve surfaktan (yüzey aktif madde) aracılı teknikler sayılabilmektedir. Bunlar; organik çözücü tüketimindeki ve numune bozulmasındaki azalma, örnek temizleme ve kromatografik analiz öncesi konsantrasyon adımlarının ortadan kaldırılması, seçicilik ve ekstraksiyon kinetiğinde iyileşme gibi pek çok avantaja sahiplerdir. Çözücüler ile yapılan ekstraksiyon yöntemlerinden biri, seçici ekstraksiyon yöntemidir. Bu yöntemde farklı çözücülerle polaritenin artış sırasına göre bitkinin ardarda ekstraksiyonu yapılır. Öncelikle hekzan, petrol eteri gibi bir çözücü ile ekstraksiyon ile lipofil karakterli bileşiklerin çözücüye geçmesi sağlanır. Daha sonra çeşitli çözücüler ile polarite artış sırasına göre diklorometan, etil asetat, metanol gibi çözücüler ile bunların çeşitli oranlarıyla ekstraksiyon yapılır. Kullanılan diğer yol ise bitkisel materyalin etanol ve sulu etanol gibi bir çözücü ile maserasyonunun yapılmasıdır. Daha sonra çözücüsü uzaklaştırılmış ekstrenin su ile seyreltikten sonra artan polaritede hekzan, kloroform, etilasetat ve butanol gibi çözücülerle ekstraksiyonu yapılır (110).

KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER

Kromatografi, karışımdaki moleküllerin yüzeye veya katıya uygulandığı ve akışkanın durağan fazının (kararlı faz) bir mobil fazın yardımıyla hareket ederken birbirlerinden ayrılması prensibine dayanmaktadır. Bu ayırma işleminde etkili olan faktörler, adsorpsiyon (sıvı-katı), ayrılma (sıvı-katı) ve moleküler ağırlıkları arasındaki afinite veya farklılıklar ile ilgili moleküler karakteristikleri içerir. Bu farklılıklar nedeniyle, karışımın bazı bileşenleri

durağan fazda daha uzun süre kalır, diğerleri kromatografi sisteminde yavaş hareket eder, diğerleri ise hızlıca mobil faza geçer ve sistemi daha hızlı bırakırlar.

Bu yaklaşıma dayanarak, üç bileşen kromatografi tekniğinin temelini oluşturur.

• Sabit faz: Bu faz daima katı bir fazdan veya yüzeyde katı bir destek adsorbe edilmiş bir sıvı katmanından oluşur.

• Mobil faz: Bu faz daima sıvı veya gazlı bir bileşenden oluşur.

• Ayrılmış moleküller

Durağan faz, hareketli faz ve karışımdaki maddeler arasındaki etkileşimin türü, moleküllerin birbirlerinden ayrılmasında etkili olan temel bileşendir. Partisyona dayalı kromatografi yöntemleri, ayırma ve küçük moleküllerin amino asitler, karbonhidratlar ve yağ asitleri olarak tanımlanmasında çok etkilidir. Bununla birlikte, afinite kromatografileri (iyon değişimi kromatografisi), makromoleküllerin nükleik asitler ve proteinler olarak ayrılmasında daha etkilidir. Kağıt kromatografisi, proteinlerin ayrılmasında ve protein sentezi ile ilgili çalışmalarda kullanılır; Gaz-sıvı kromatografisi, alkol, ester, lipid ve amino gruplarının ayrılmasında ve enzimatik etkileşimlerin gözlemlenmesinde kullanılır.

Kromatografideki sabit faz, bir katı faz veya katı fazın yüzeyi üzerine kaplanmış bir sıvı fazdır. Sabit faz boyunca akan hareketli faz, gaz halinde veya sıvı bir fazdır. Mobil faz sıvı kromatografi (LC) ve gaz-gaz kromatografi (GC) olarak adlandırılır. Gaz kromatografisi, gazlar ve uçucu sıvıların ve katıların karışımları için uygulanır. Sıvı kromatografi özellikle termal kararsız ve uçucu olmayan numuneler için kullanılır. Ayrı bir nicel analiz yöntemi olarak kullanılan kromatografi uygulamasının amacı ayrılması, uygun bir zaman aralığında tatmin edici bir ayrılma sağlamaktır. Bu amaç için çeşitli kromatografi yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi (İTK), kağıt kromatografi, gaz kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, jel geçirgenlik kromatografisi yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve afinite kromatografisidir (111).

Kolon kromotografisi

Tekniğin ilk kullanımı, 1903 yılında Tswett tarafından bitki pigmentlerini ayırmada olmuştur. Kolon kromatografisi, hem katıların hem de sıvıların ayrılması ve saflaştırılması için en faydalı yöntemlerden biridir. Ayrılma kolon kromatografisinde sıvı/katı (adsorpsiyon) veya sıvı / sıvı (partisyon) olabilir. Adsorban olan sabit faz, genellikle dikey, alttan musluklu bir cam kolona yerleştirilir ve hareketli faz, üstten eklenir ve yerçekimi veya dış basınç ile kolondan aşağı akması sağlanır. Bu işlem için, çeşitli büyüklüklerde altta musluklu silindirik

sinterli cam veya plastik kolonlar kullanılır. Hareketsiz faz kolon içerisine yerleştirilmiştir. Hareketli faz, maddelerle birlikte kolon içerisinde sürüklenerek, bileşenlerin birbirinden ayrılması sağlanır.

Kolon, süspansiyon haline getirilmiş adsorban madde ile doldurulur. Adsorban, geçen moleküllerin veya iyonların partiküllerinin yüzeyine yapışmasına neden olan bir maddedir. Bu esnada musluk alttan kapatılır, elüsyon işleminde kullanılacak çözücünün bir miktarı geçilir. Aynı çözücüyle hazırlanmış adsorbanla doldurulur. İçerisinde hava boşluğu, çatlak olmaması için, devamlı olarak hareketli faz olan çözücü ilave edilir. Elüsyon esnasında bileşenlerin çözücüdeki çözünürlükleri ve adsorpsiyon gücü oranında kolondan aşağıya inmeye başlarlar. Eğer ayrım yapılan maddeler renkli ise, farklı genişliklerde bantlaşmalar meydana getirirler. Musluk açılarak damla damla fraksiyonlar toplanır. Kolonun içerisinden geçirilen çözücü veya çözücü karışımının polaritesi arttırılarak ayrım sağlanır. Toplanan fraksiyonlar yoğunlaştırılır ve ince tabaka kromotografisi ile maddelerin yürüme mesafeleri kontrol edilir. Yürüme mesafeleri yakın bileşenler için daha uzun kolonlar kullanılır.

Kolonda dolgu maddesi olarak çeşitli adsorbanlar kullanılır. Bunlar, inorganik oksitler (özellikle silika), gözenekli organik polimerler, gözenekli grafitik karbon, selülozlar, hidroksiapatit ve çeşitli polisakkaritlerdir. Gözenekli inorganik oksitler, polimerler ve grafitik karbon, küçük moleküllerin ve inert makromoleküllerin ayrışmasında egemendir. Silika jel (SiO_2) ve alümina (Al_2O_3), sütun kromatografisi için organik kimyacılar tarafından yaygın olarak kullanılan iki adsorbandır. Bu adsorbanlar, şişe etiketinde bir numara ile belirtilen farklı ağ boyutlarında satılmaktadır: “Silika jel 60” veya “silika jel 230-400”. Bu sayı, silisin boyutlandırılması için kullanılan elek ağını, özellikle ham silika parçacık karışımının imalat işleminde geçirildiği ağ veya elek içindeki deliklerin sayısını belirtir. Birim alan başına daha fazla delik varsa, bu delikler daha küçüktür, bu nedenle sadece daha küçük silika parçacıklarının eleği geçmesine izin verilir. Ağ boyutu büyüdükçe, adsorban parçacıkları küçülür. Adsorban partikül boyutu, çözücünün kolondan akma şeklini etkiler. Flaş kromatografisi için daha küçük parçacıklar (daha yüksek mesh değerleri) kullanılır; gravite kromatografisi için daha büyük parçacıklar (daha düşük mesh değerleri) kullanılır. Alümina, kendisine bağlı su miktarına karşı oldukça hassastır; su içeriği ne kadar yüksek olursa, organik bileşikleri o kadar az kutupsal bölgeye bağlamak zorunda kalır ve dolayısıyla daha az yapışkan olur. Bu yapışkanlık veya aktivite, en aktif olan I, II veya III olarak belirlenir. Alüminanın üç ticari formu mevcuttur : Asidik, nötr ve baziktir. (112).

Silikajel çok değişik maddelerin ayrımında kullanılırken, aluminyum oksit; alkaloit ve pigmentlerin, poliamid; fenolik maddelerin, aktif kömür; karbonhidratların kromatografisinde tercih edilmektedir. (113).

İnce Tabaka Kromotografisi

Alüminyum plaka ya da cam gibi destekleyici bir yapı üzerine Silika jel (SiO_2) ve alümina (Al_2O_3) gibi adsorban başka bir maddenin homojen kaplanmasıyla elde edilen materyalin üzerine uygulanan madde karışımlarının çözücü ya da çözücü karışımlarıyla ayrılması tekniğidir. Kolon kromotografisinde yukarıdan aşağıya doğru çözücü sistemi geçirilirken, bu kromotografi tekniğinde aşağıdan yukarıya doğru yürür. Çözücü sistemi, kapalı bir tank içerisinde, plak üzerinde yukarıya doğru sürüklenir ve lekelenmeler meydana getirir. Lekelenmelerin görüntülenmesi, gün ışığında, UV kısa (254 nm) ya da uzun (365 nm) dalga boyunda olabildiği gibi renklendirici reaktiflerle de olabilmektedir.

YAPI AÇIKLAMA METODLARI

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{18}O, ^{19}F ve ^{31}P gibi bazı çekirdekler manyetik alana girdiklerinde küçük birer mıknatıs gibi davranırlar. Bu çekirdeklerin spinleri manyetik alanda biri alana paralel, biri zıt yönlü iki enerji düzeyine ayrılırlar. Aralarındaki enerji farkı belli radyo frekanslarında yayılır ve absorblanır. Çekirdeğin tipine ve kullanılan cihaza göre sabit değerli frekanslar çevrelerindeki atomların elektronegatifliklerindeki çok küçük farklar ve içerdikleri bağın çeşidi gibi nedenlerle spektrumda farklı kaymaların görülmesine neden olur (114).

^{1}H-NMR Spektroskopisi

^{1}H-NMR spekroskopisi, molekülün sahip olduğu protonların türü, sayısı ve komşu bağlı grupların durumu hakkında spektrum bölgesinde görülen pikler yardımıyla bilgi verir. Proton sinyallerine ait kimyasal kaymalar, 0-14 ppm'lik bir aralıkta gözlenir. Doymuş hidrokarbonların protonları 1.0 ppm civarında sinyal verirken, olefinik protonların rezonansları 4.5-5.5 ppm, aromatik halka protonları ise 6.0-9.0 ppm aralığında ortaya çıkmaktadır (115).

^{1}H-NMR spektroskopisi için 5-10 mg örnek gereklidir. Çözücü olarak düşük polariteli bileşikler için dötörokloroform ($CDCl_3$) kullanılır. Piridin-d_5, dimetil sülfoksit-d_6, döteryumoksit, aseton gibi çözücüler de kullanılan diğer çözücülerdendir.

Güçlü manyetik alan içerisinde kalmış molekülün atom çekirdeklerinin elektromanyetik ışınları soğurması olayının gözlenmesine dayanan yapı aydınlatma yöntemidir. Hidrojen atomunun dışarıdan uygulanan manyetik alanda rezonansa gelmesiyle spektrumlar oluşur. Ölçülecek numune bir çözücü içerinde muhakkak çözülmelidir. Ölçülecek numunenin 10-50 mg arasında olması ve bu miktarın 0.5 mL çözücü de çözülmesi gerekir. Çözücü içerisinde herhangi bir safsızlık, spekturumlarda görünümü değiştirir, pikler genişler ve ince yarılmalar gözlenmez. Bu yüzden numunelerin ölçülmeden önce filtreden geçirilmesi önerilir. Ayrıca çözelti vizkositesinin artması da piklerin genişlemesi neden olacağından uygun miktarda numune alınması önemlidir.

Hazırlanan numune, 18 cm boyunda 0.5 cm çapındaki özel camdan üretilen NMR tüpüne konur. İyi bir ölçüm yapılması için, 4-5 cm civarında yüksekliği olmalıdır. Kullanılan çözücüler, ya proton içermemeli (karbontetraklorür, tetrakloroetilen, karbondisülfür gibi) ya da çözücü protonları döteryum ile değiştirilmelidir. Aksi takdirde, çözücü protonları da spekturumda görülecek ve pik şiddetleri, numune piklerinin 10-100 katı olacaktır. En yaygın kullanılan döteryumlu polar çözücüler; kloroform ($CDCl_3$) ve sudur (D_2O) (114).

^{13}C-NMR Spektroskopisi

Sinyallerin gözlendiği spektrum aralığı 0-250 ppm'dir. ^{13}C-NMR spektrumda; doymuş hidrokarbonların karbonları 5-50 ppm, vinilik karbonlar 100-150, aromatik karbonlar 120-145 ppm, karbonil karbonları ise karbonil türüne bağlı olarak 165- 220 ppm aralığında gözlenir.

^{13}C-NMR ile birlikte, ^{1}H-NMR moleküler yapı karakterizasyonu için güçlü bir veri kaynağı sağlamaktadır. Ancak kompleks yapıya sahip sekonder metabolitlerin yapısını aydınlatmak için iki boyutlu (2D) NMR teknikleri gereklidir (116).

İki Boyutlu (2D) NMR Spektroskopisi

Puls NMR teknolojisi ile 2D-NMR Spektroskopisi geliştirilmiştir. 2D-NMR spektroskopisi hakkında yapmış olduğu çalışmalar nedeniyle İsviçreli kimyacı Richard E. Ernst 1991 yılında Nobel Ödülü almıştır. İki boyutlu NMR spektroskopisinde sıklıkla kullanılan teknikler, COSY (Correlation Spectroscopy), HSQC (Heteronuclear single quantum coherence), HMBC (Heteronuclear Multi Bond Coherence) ve NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spektroscopy) gibi tekniklerdir.

COSY çapraz-pik ilişkilendirme tekniği : Homonükleer korelasyon yöntemi olan COSY spektrumuna bakılarak hangi H atomlarının birbirleriyle eşleştikleri hakkında bilgi verir.

Spektrum üzerinde molekülün karbon iskeletinin takibi ile komşuluk ilişkileri hakkında yorum yapılabilir (117).

HSQC tekniği : Farklı iki çekirdek (^{13}C ve ^{1}H çekirdekleri) arasındaki etkileşimi gösterir. ^{13}C atomuna bağlı bulunan ^{1}H çekirdeği hakkında bilgi vermektedir.

HMBC tekniği : Uzun mesafede proton ve karbon etkileşimlerinin korelasyonunu gösteren ölçüm tekniğidir. HMBC spektrumları ^{1}H çekirdeğinin ve iki ve üç bağ mesafedeki ^{13}C olan korelasyonları hakkında bilgi sunmaktadır.

NOESY Tekniği : Molekülün sahip olduğu tüm protonların arasındaki ilişki, protonların uzaydaki konumları ve komşulukları hakkında bilgi vermektedir.

Sıvı Kromotografisi - Kütle Spektoroskopisi (LC-MS)

Kütle spektroskopisi, sıvı kromotografisiyle birleştirilmiş olup, uçucu olmayan bileşenlerin analizi için kullanılan yöntemdir. Hareketli fazı gaz kromotografisinden farklı olarak sıvıdır ve bu sıvı analit moleküllerini, içindeki çözelti fazından, belli uzunluk ve çaptaki kolon sayesinde ayırır.

Elektrosprey iyonlaştırmadır (ESI), iyonlaştırma kaynağı olarak kullanılan yöntemlerden biri olup, oda sıcaklığında ve atmosfer basıncında gerçekleşir. Örnek moleküllerin sıvı çözeltisi, yüksek voltajda tutulan ince bir metal uçtan, binlerce voltluk düz metal bir plakaya akarsa, yüklü damlacıklardan ince bir sprey oluşur. Azot gazı akımı, çözücünün uzaklaşmasına yardım eder ve yüklü damlacık küçülür. Bir noktada yük, çok yoğun hale gelir ve itici kuvvetler damlacığı daha küçük damlacıklara böler. Buharlaşma, büzülme ve damlacık kırılmaları yüklü molekül kalıncaya kadar sürer. Daha sonra iyonlar gaz fazına desorbe olurlar (115).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- H_2SO_4
- Hekzan (Tekkim)
- Etil asetat (Sigma-Aldrich)
- Diklorometan (DCM) (Merck)
- Metanol (Merck)
- Etanol (Tekkim) ve (Merck)
- Silikajel Hazır Plakalar (Merck ITK Silica gel 60 F_{254})
- Silikajel (Merck 60 (0.063-0.200 mm)
- Aseton (Merck)
- Dietil eter (Merck)
- Dötero kloroform ($CDCl_3$) (Merck)
- Galantamin hidrobromür (Sigma)
- Asetiltiyokolin hidrobromür (Sigma)
- Sodyum bikarbonat (Assay)
- Sodyum fosfat dibazik (Riedel-deHaen)
- Potasyum fosfat monobazik (Riedel-deHaen)

KULLANILAN YÖNTEMLER

Maserasyon
Kolon kromatografisi
İnce tabaka kromatografisi (ITK)

Maserasyon

Maserasyon, drogun uygun boyuta getirilip (drog kuru ise toz edilerek, taze ise parçalanarak) ufalanıp uygun çözücü ile karıştırarak kapalı bir kap içerisinde uygun süre bekletilmesi işlemidir. Kurutulup öğütülmüş bitki materyali %95 etanolde bekletildi.

Kolon Kromotografisi

Kolon kromotografisi ekstrelerin fraksiyonlara ayrılmasında ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan bir metottur. Adsorban olarak silika dolgu maddesi kullanıldı. Bir miktar, toz halindeki silika jel hekzanda bekletilerek, şişmesi sağlandı. Diğer yandan, tatbik edilecek ekstre için, uygun bir çözücü eklenerek çözünmesi sağlandı. Daha sonra miktarına uygun olarak, bir miktar toz halindeki silika eklendi ve silikanın şişerek absorsiyon sağlaması için kurumaya bırakıldı. Kolonun kurulması aşamasında önce ayrı yerde şişen silika-hekzan karışımı kolona dolduruldu. Üzerine ekstre-silika karışımı kuru halde konuldu. Kolon üzerinden, düşük polariteden yüksek polariteye doğru değişen oranlarda çözücü karışımı geçirilerek, gradient kolon yapılmış oldu.

İnce Tabaka Kromotografisi

Alüminyum üzerine silika çekilmiş hazır Merck marka silikajel GF 254 İTK plakları kullanılarak saflık kontrolü yapıldı.

KULLANILAN CİHAZLAR

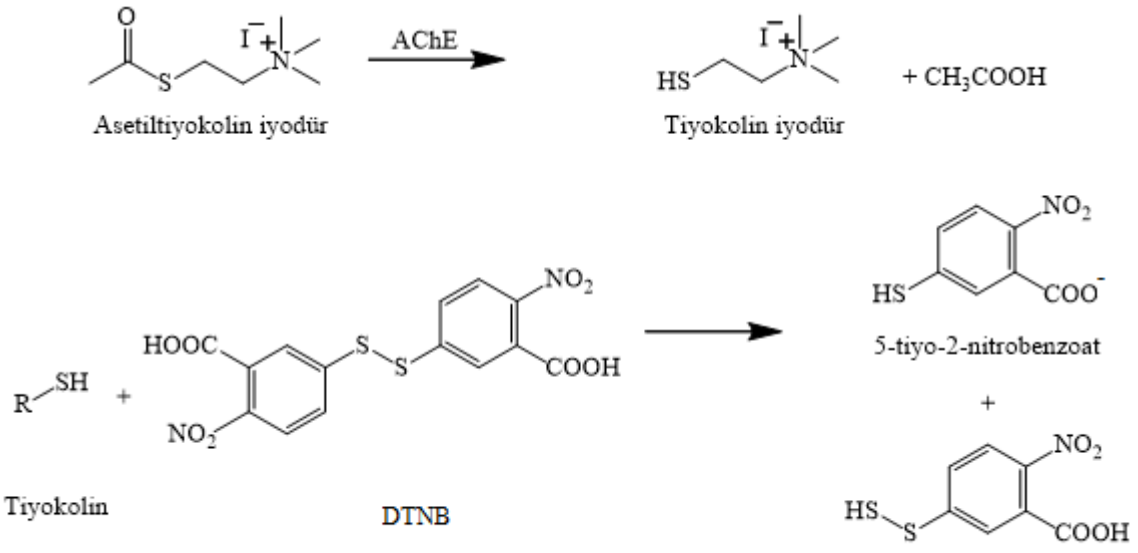
- Ultraviyole Lamba: Desaga Sarstedt-Gruppe Min UV-Vis 254/336 nm
- Döner Buharlaştırıcı (Rotaevaporatör): Buchi Labortechnik AG, R-114a29 B480 Heidolph 0-100 °C, 0-1000 mbar
- Etüv: Memmert 0-300 °C

- Dört Haneli Hassas Analitik Terazi: Pioneer Ohaus, Precisa
- NMR Spektrometresi: Bruker 500 MHz Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi
- Ph metre –WTW
- UV Spektrofotometre: Thermoscientific-Multiscan Go
- LC-HRMS Thermo Q Exactive

ENZİM İNHİBİSYON AKTİVİTESİ ÇALIŞMALARI

Ellman Metodu

İnhibitör maddeler kullanılarak asetilkolinesteraz enziminin asetilkolini parçalaması engellenir ve bir miktar asetilkolin serbest halde kalır. Ortamda asetilkolinesteraz (AChE) bulunması halinde asetiltiyokolin iyodür ile etkileşir ve tiyokolin iyodür ve asetik asit açığa çıkar (Şekil 15). DTNB (5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik) asit) çözeltisi ile tiyokolinin reaksiyonu sonucu sarı renge sahip 5-tiyo-nitrobenzoat oluşur (119).



Şekil 15. Ellman Metodu.

Enzim İnhibisyon Deneyi Reaktifleri

Fosfat tamponu (pH 8): pH değerini 8'e ayarlamak için A çözeltisi (18.5 mL) ile B çözeltisinin (481.5 mL) karıştırılması ile hazırlandı.

A çözeltisi: 0,1 M çözelti için, 500 mL distile suda 7.1 g disodyumfosfat (Na_2HPO_4) çözülerek hazırlandı.

B çözeltisi: 250 mL distile suda 3.4 g potasyumfosfat (KH_2PO_4) çözündürülmesi ile hazırlandı.

5,5'-ditiyobis(2-nitrobenzoik) asit (DTNB) çözeltisi: 16 mg DTNB ve 7.5 mg sodyum bikarbonatın ($NaHCO_3$) 4 mL fosfat tamponunda çözündürülmesi ile hazırlandı.

Substrat (Asetiltiyokolin iyodür) çözeltisi: 16 mg asetilkolin iyodür ve 4 mL deiyonize su kullanılarak hazırlandı.

Enzim (Asetilkolinesteraz): 2150 µL fosfat tamponunda 0.1 mg asetilkolinesterazın çözündürülmesi ile hazırlandı.

Enzim İnhibisyon Deneyi

Asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi Ellman tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemle belirlendi. Elektrik balığından elde edilen AChE enzim kaynağı olarak, asetiltiyokolin iyodür ise reaksiyonun substratıdır. DTNB (5,5'-ditiyo-bis (2-nitrobenzoik) asit) kolinesteraz aktivitesinin ölçülmesi için kullanıldı. Kontrol ve test bileşiklerini çözmek için etanol çözücü olarak kullanıldı. 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) karıştırıldı ve 25 °C de 15 dakika inkübe edildi. Reaksiyon 10 µL asetiltiyokolin iyodür (0.7 mM) eklenmesiyle başlatıldı. Bu substratların hidrolizi ile oluşan tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonu sonucu sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun oluşumu 412 nm dalga boyunda absorbansın ölçülmesi ile spektrofotometrik gözlendi.

96 kuyucuklu mikroplaka okuyucuda (Thermo Scientific Multiscan Go) spektroskopik ölçümler gerçekleştirildi AChE inhisyon yüzdeleri (E-S) / E x 100 formülü ile hesaplandı. Formülde, E: test bileşiği olmaksızın enzim aktivitesini, S: test bileşiği ile enzim aktivitesini ifade etmektedir. Galantamin referans bileşiği olarak kullanılmış olup, deneyler 3 kez tekrarlandı.

ÇÖZÜCÜLER

Ekstraksiyon işlemlerinde, kolon kromotografisinde kullanılan çözücüler destile çözücüler kullanıldı. Saflaştırma işlemlerinde ise Merck çözücüler kullanıldı. Kullanılan

çözücüler; n-hekzan, diklorometan, etilasetat, su, metanoldür. Spektral analizlerde ise $CDCl_3$ve d_6-aseton kullanıldı.

BELİRTEÇLER

Serik Sülfat Belirteci: 2 g $Ce(SO_4)_2.4H_2O$ 100 mL, %10'luk H_2SO_4 içinde çözülmesi ile hazırlandı. Öncesinde uygun çözücü sisteminde yürütülmüş ince tabaka plaklarına, belirtecin uygulaması yapıldıktan sonra plak, 100°C'de lekeler oluşuncaya kadar bekletildi.

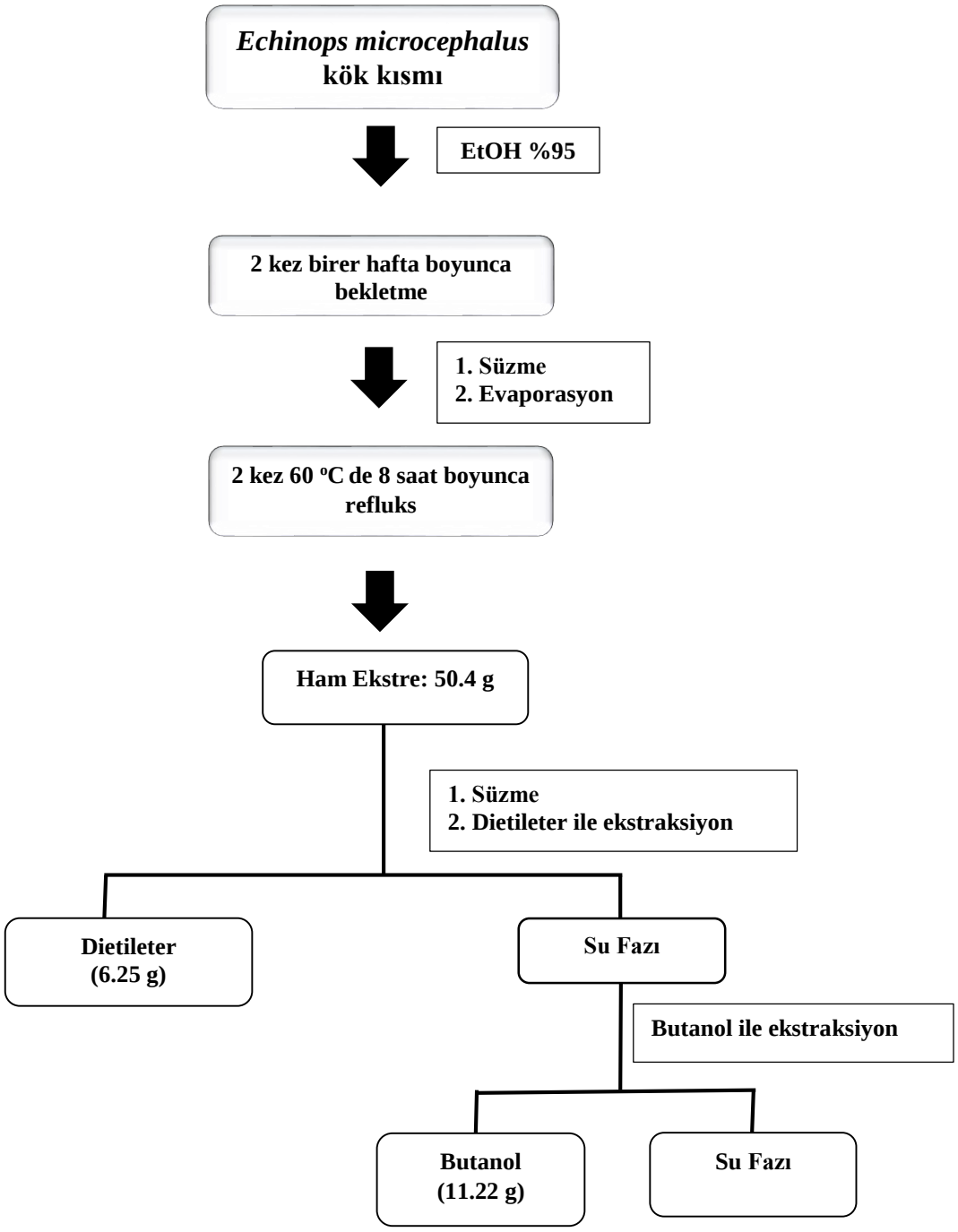
BULGULAR

BİTKİNİN EKSTRAKTE EDİLMESİ

Echinops microcephalus Sm. bitkisi 2013 yılında Haziran-Temmuz ayları arasında Silivri, Küçüksinekli köyünden toplandı. Bitkinin tanımlanması Trakya Üniversitesi, Biyoloji bölümü, Botanik Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirildi.

Bitkinin kökleri ve topraküstü kısımları birbirinden ayrılıp gölgede kurutuldu. Öğütülerek tartıldı. 559.97 g kuru *Echinops microcephalus* bitkisinin kök kısmı %95 lik etanolde 2 kez birer hafta boyunca bekletildikten sonra 2 kez de 60 °C'de 8 saat boyunca refluks yapıldı. Çözücü evaporatörde buharlaştırıldıktan sonra 50.4 g ham ekstre elde edildi.

Etanol ekstresi su ile seyreltilip dietileter, ardından butanol ile ekstraksiyonu sonucunda sırası ile 6.25 g dietileter ve 11.22 g butanol ekstresi elde edildi (Şekil 16).



Şekil 16. Fraksiyon ve izolasyon şeması

KROMOTOGRAFİK YÖNTEMLERLE AYIRMA VE SAFLAŞTIRMA İŞLEMLERİ

Kuru haldeki, 6.25 g dietileter ekstresi, etilasetat ile çözündürülerek, silikajele emdirildi ve kolon kromotografisi uygulaması için hazırlandı. Kolonda hareketli faz olarak farklı oranlarda çözücü sistemi kullanıldı. Kolondaki ayrıma %100 hekzan ile başlandı. Önce etilasetat, ardından metanol oranı arttırılarak kolon sonlandırıldı. Kolondan toplam 612 fraksiyon toplandı (Tablo 5).

Tablo 5. Dietileter ekstresinin fraksiyonlandırılmasından kullanılan çözücü sistemleri ve fraksiyon numaraları

Çözücü Oranı (1)	Fraksiyon numarası	Çözücü Oranı (2)	Fraksiyon numarası
%100 Hekzan	1-20	% 55 Etilasetat / Hekzan	449-458
%2 Etilasetat / Hekzan	21-112	% 60 Etilasetat / Hekzan	459-467
%3 Etilasetat / Hekzan	113-119	% 70 Etilasetat / Hekzan	468-477
% 5 Etilasetat / Hekzan	120-157	% 80 Etilasetat / Hekzan	478-480
% 6 Etil asetat / Hekzan	158-160	% 90 Etilasetat / Hekzan	481-489
% 8 Etilasetat / Hekzan	161-210	% 100 Etil asetat	490-496
% 10 Etilasetat / Hekzan	211-238	% 5 Metanol / Etilasetat	497-505
% 12 Etilasetat / Hekzan	239-245	% 10 Metanol / Etilasetat	506-517
% 14 Etilasetat / Hekzan	246-258	% 15 Metanol / Etilasetat	518-523
% 16 Etilasetat / Hekzan	259-275	% 20 Metanol / Etilasetat	524-534
% 18 Etilasetat / Hekzan	276-300	% 25 Metanol / Etilasetat	535-545
% 20 Etilasetat / Hekzan	301-316	% 30 Metanol / Etilasetat	546-556
% 22 Etilasetat / Hekzan	317-329	% 35 Metanol / Etilasetat	557-563
% 24 Etilasetat / Hekzan	330-337	% 40 Metanol / Etilasetat	564-578
% 26 Etilasetat / Hekzan	338-347	% 45 Metanol / Etilasetat	579-589
% 30 Etilasetat / Hekzan	348-355	% 50 Metanol / Etilasetat	590-596
% 35 Etilasetat / Hekzan	356-371	% 60 Metanol / Etilasetat	597-603
% 40 Etilasetat / Hekzan	372-404	% 80 Metanol / Etilasetat	604-611
% 45 Etilasetat / Hekzan	405-417	%100 Metanol	612
% 50 Etilasetat / Hekzan	418-448		

Toplanan fraksiyonlar ITK plağına uygulanarak, %100 hekzan ya da (1/3), (1/2), (1/1) diklorometan/ hekzan gibi farklı çözücü karışımında tank içerisinde yürütülmüş, 254 nm ve 366 nm dalga boylarındaki UV lamba altında lekelerin rengi ve plak boyunca yürüme durumuna göre, Rf değerleri gözönüne alınarak değerlendirildi. Serik sülfat belirteciyle boyanan plaklar daha sonra 100 °C'de yakılarak lekelerin rengi karşılaştırıldı ve fraksiyonların birleştirilmesi için değerlendirildi.

ITK plaklarındaki Rf değerleri aynı olan fraksiyonlar birleştirildi. Saf maddelerin izolasyonunu gerçekleştirmek üzere birleştirilmiş olan fraksiyonlar için tekrar silikajel kolon kromotografisi yapıldı (Şekil 17).

- 1. kolon (1-14. Fraksiyonlar)
- 2. kolon (25-31. Fraksiyonlar)
- 3. kolon (32-39. Fraksiyonlar)
- 4. kolon (48-56. Fraksiyonlar)
- 5. kolon (75-91. Fraksiyonlar)
- 6. kolon (125-132. Fraksiyonlar)

1. Kolon:

1 kolonu; 1 cm çaplı kolonda %100 hekzan çözücü sistemiyle başlayıp sırasıyla; %2, %4, %5, %10, %15, %20, %30, %40 etil asetat / hekzan çözücü sistemi geçirilerek sonlandırıldı. 200 mL civarında toplanan fraksiyonlar balonlara aktarılıp çözücüleri döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Toplanan her bir fraksiyon içeriği ITK ile incelendi. 1 kolonundan; % 100 hekzan çözücü sistemiyle gelen bir bileşik (**1**) izole edildi. Madde miktarı, 240 mg olup serik sülfat belirteci ile siyah renk verdi.

2. Kolon:

2 kolonu için; aynı şekilde 1 cm çaplı kolonda %100 hekzan çözücü sistemiyle başlayıp sırasıyla; %2, %4, %5, %10, %15, %20, %30, %40 etil asetat / hekzan çözücü sistemi geçirilerek sonlandırıldı. Bu kolondan %100 hekzan ile gelen (**2**) numaralı bileşik izole edildi. Serik sülfat belirteci ile siyah renk verdi.

3. Kolon:

3 kolonundan toplam 358 fraksiyonu aynı şekilde 1 cm çaplı kolonda %100 hekzan çözücü sistemiyle başlayıp sırasıyla; %2, %4, %5, %10, %15, %20, %30, %40 etil asetat /

hekzan çözücü sistemi geçirilerek toplandı. UV ışık altında ve serik sülfat belirteci ile yakıldıktan sonraki görüntüsü benzer olan 232-358 arasındaki fraksiyonlar birleştirilerek tekrar kolon kromatografisine uygulandı. %10 etilasetat /hekzan çözücü sistemi ile gelen bir bileşik izole edildi ardından %20 etilasetat / hekzan sistemi ile toplanan fraksiyondan da başka bir bileşik bileşik izole edildi. Bu bileşiklerin plastik bidon materyallerine katılan esneklik verici ftalik asit türevleri olduğu, yapılan 1D ve 2D NMR teknikleri ile anlaşıldı.

4. Kolon:

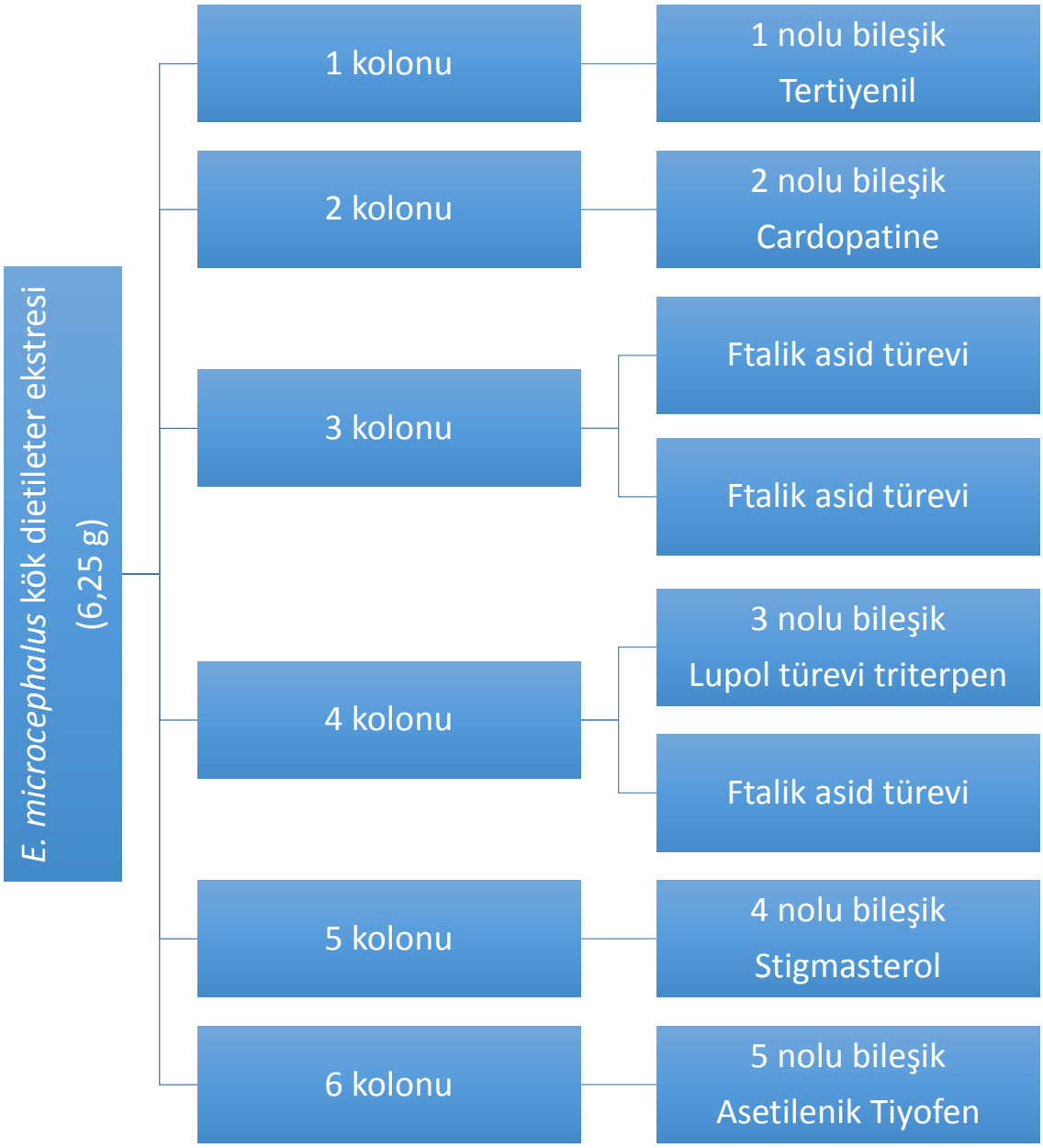
Hekzandan başlayıp etil asetata doğru artan gradient sistem 4 kolonu için de uygulandı ve toplam 493 fraksiyon toplandı. %1 etilasetat/hekzan çözücü sistemi ile gelen 51-61 arası fraksiyonların saf olduğu serik sülfat belirteci ile yakıldıktan sonraki görüntüsü ile anlaşıldı ve birleştirilerek (**3**) nolu bileşik izole edildi. Bu bileşik UV inaktif olduğundan bir triterpen olduğu düşünüldü.

5. Kolon:

5 kolonu için toplam 98 fraksiyon toplanmış olup; %7.5 etilasetat / hekzan çözücü sistemi ile gelen 15-19 arası fraksiyonların saf olduğu serik sülfat belirteci ile yakıldıktan sonraki görüntüsü ile anlaşıldı ve birleştirilerek (**4**) nolu bileşik izole edildi. İzole edilen bileşiğin Stigmasterol olduğu spektral analizler sonucunda anlaşıldı.

6. Kolon:

6 kolonunda %10 etilasetat/hekzan çözücü sisteminden gelen 35-42 arasındaki fraksiyonlar İTK'da benzer saf madde içerikleri nedeniyle birleştirilmiş ve **(5)** nolu bileşik izole edildi. Bu bileşiğin tiyofen yapısında olduğu yapılan 1D ve 2D NMR teknikleri ile anlaşıldı.

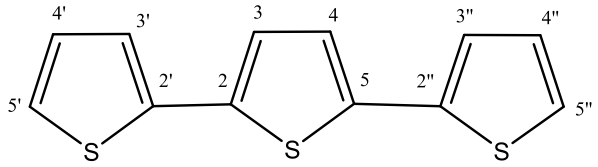


Şekil 17. Dietileter ekstresindeki bileşiklerin izolasyon şeması

TARTIŞMA

İZOLE EDİLEN BİLEŞİKLERİN FİZİKSEL ÖZELLİKLERİ VE SPEKTRAL DEĞERLERİNİN İNCELENMESİ

1 Numaralı Bileşik:



Şekil 18. α-tertiyenil

1 kolonundan elde edilen **1** nolu bileşik, %100 hekzan çözücü sistemiyle elüe edilmiştir. ITK kromatogramında UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik serik sülfat ile yakma işlemi sonucunda siyah yanmıştır. Bileşiğin yapısı yapılan 1D ve 2D NMR spektroskopik teknikleri sonucunda , α-tertiyenil olarak belirlenmiştir (62) (Şekil 18).

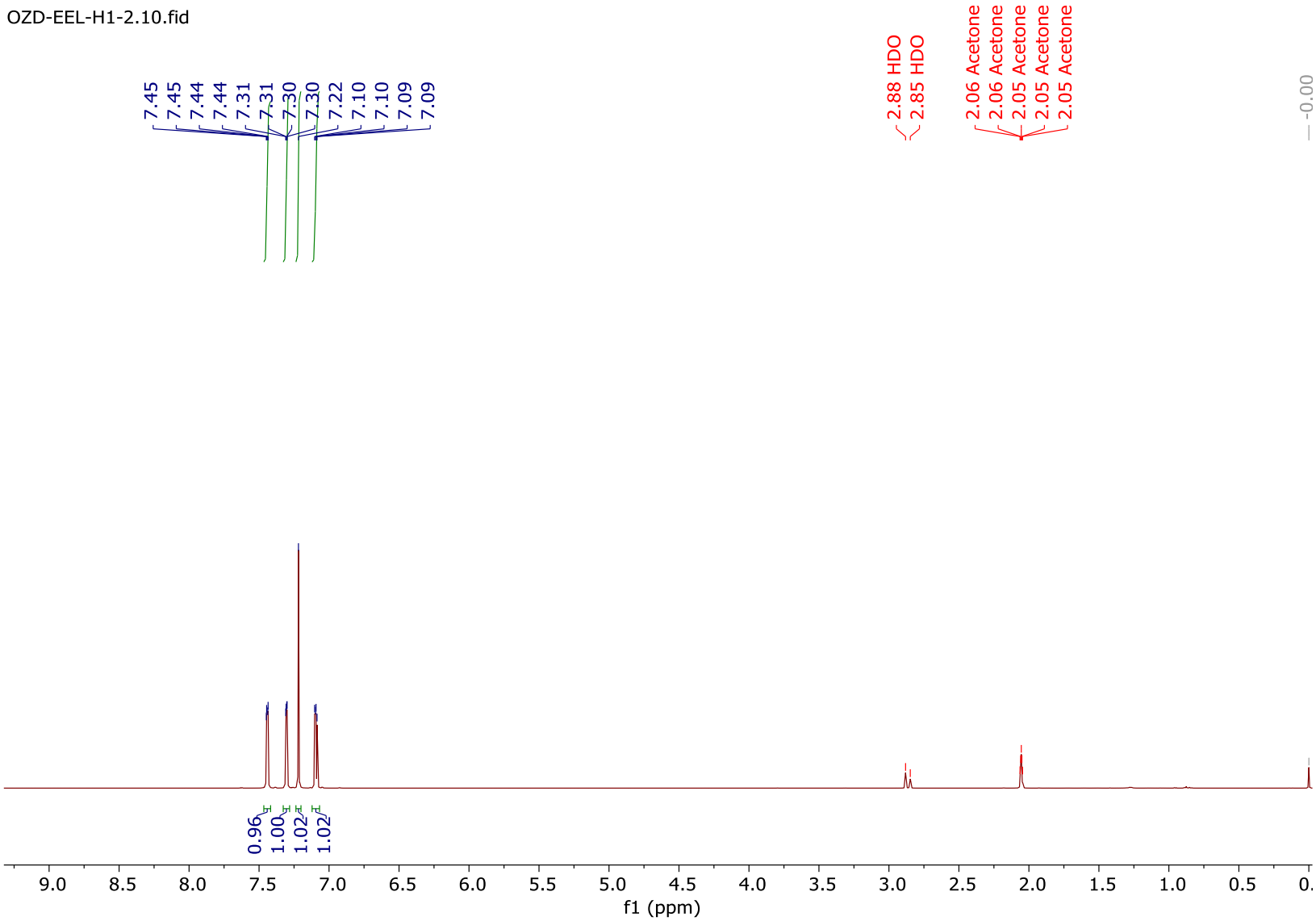
^{1}H-NMR (aseton-d_6, δ, 500 MHz, ppm) : 7.22 (s, 2H, H-3 ve H-4), 7.10 (dd, 2H, H-4’ ve H-4’’), 7.30 (dd, 2H, H-5’ ve H-5’’), 7.45 (dd, 2H, H-3’ ve H-3’’).

^{13}C-NMR (aseton-d_6, δ, 125 MHz, ppm) : 128.18 (C-3 ve C-4), 123.96-125.03 ppm (aromatik CH), 135.98-136.62 (kuaterner aromatik karbonlar).

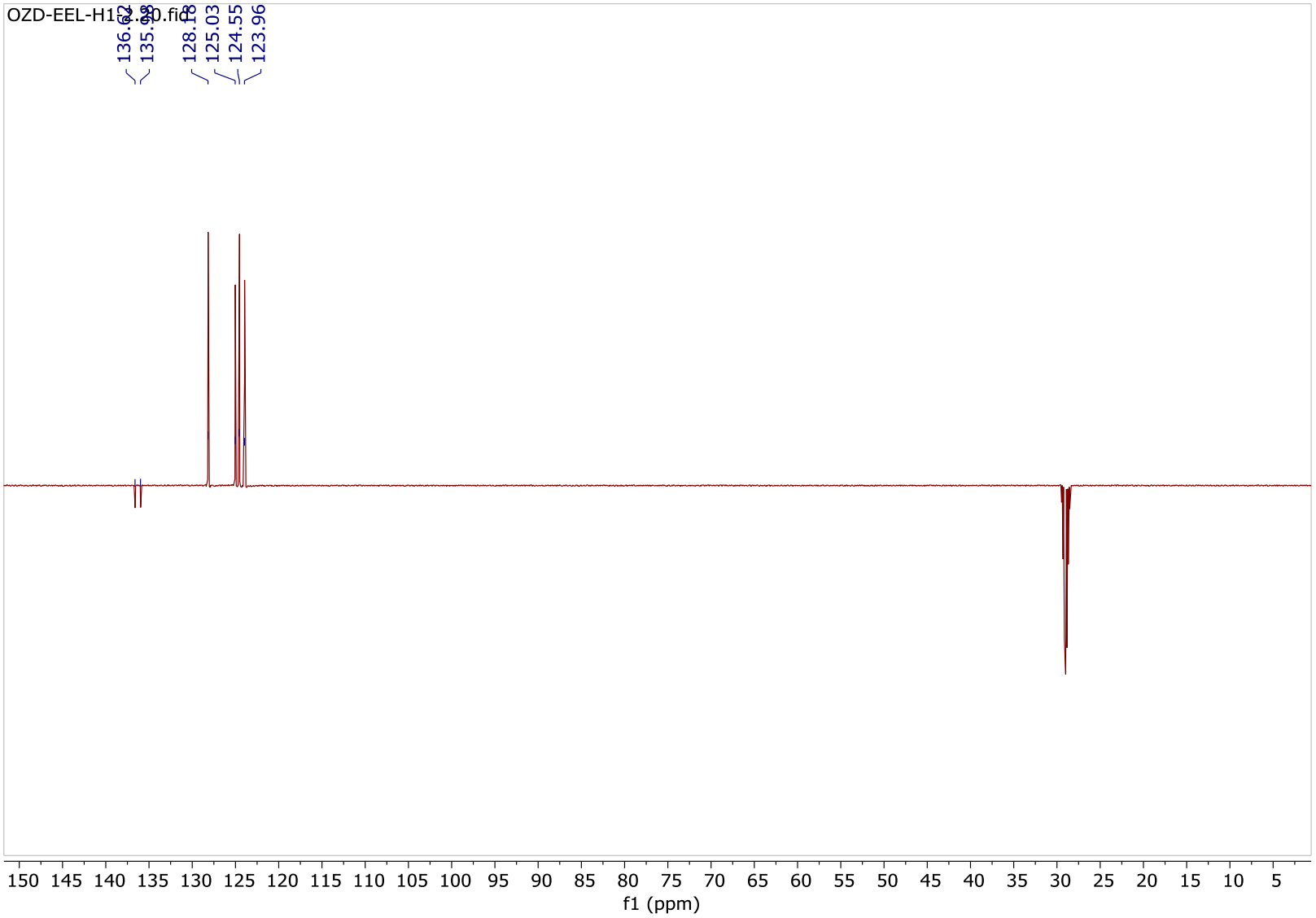
^{1}H-NMR spektrumunda toplam 4 adet hidrojen integraline sahip aromatik protonlar 7.10 ppm’de dubletin dubleti (dd, 1H), 7.22 ppm’de singlet (s, 1H), 7.30 ppm’de dubletin dubleti (dd, 1H) ve 7.44 ppm’de dubletin dubleti (dd, 1H) olarak gözlenmiştir (Şekil 19).

^{13}C-NMR APT spektrumunda 4 adet aromatik CH ve 2 adet kuaterner karbonları (qC) gözlenmiştir. Molekülün simetrik yapısından dolayı, C-4' ve C-4" eşdeğer karbonları 128.18 ppm'de sinyal verirken diğer eşdeğer karbonlar (C-3' ve C-3'', C-5' ve C-5'', C-3 ve C-4) karbonları 123-125 ppm aralığında gözlendiler (Şekil 20).

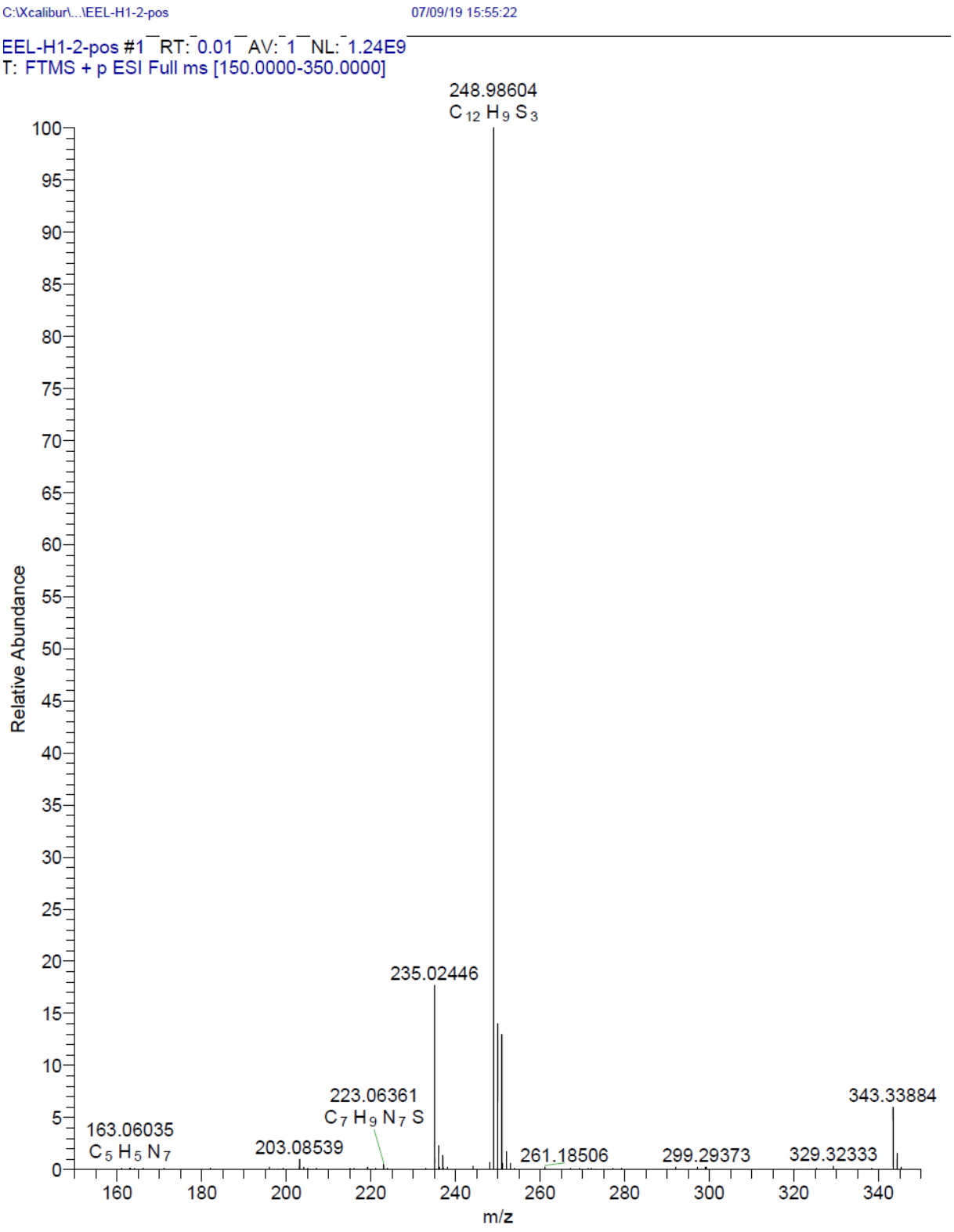
1 nolu bileşik ESI-MS kütle spektoroskopisinde $C_{12}H_9S_3$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 248.98604 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{12}H_9S_3$ için 248.98609 olarak bulunmuştur (Şekil 21).



Şekil 19. (1) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu

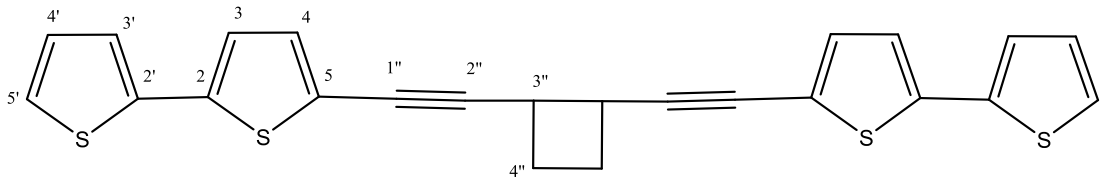


Şekil 20. (1) numarali bileşiğe ait ^{13}C-NMR spektrumu



Şekil 21. (1) numarali bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu

2 Numaralı Bileşik:



Şekil 22. (2) numaralı bileşik

2 kolonundan elde edilen **2** nolu bileşik, %100 hekzan çözücü sistemiyle elüe edilmiştir. ITK kromatogramında UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik serik sülfat ile yakma işlemi sonucunda siyah renk vermiştir. Bileşiğin yapısı yapılan 1D ve 2D NMR spektroskopik teknikleri sonucunda açıklanmıştır (62).

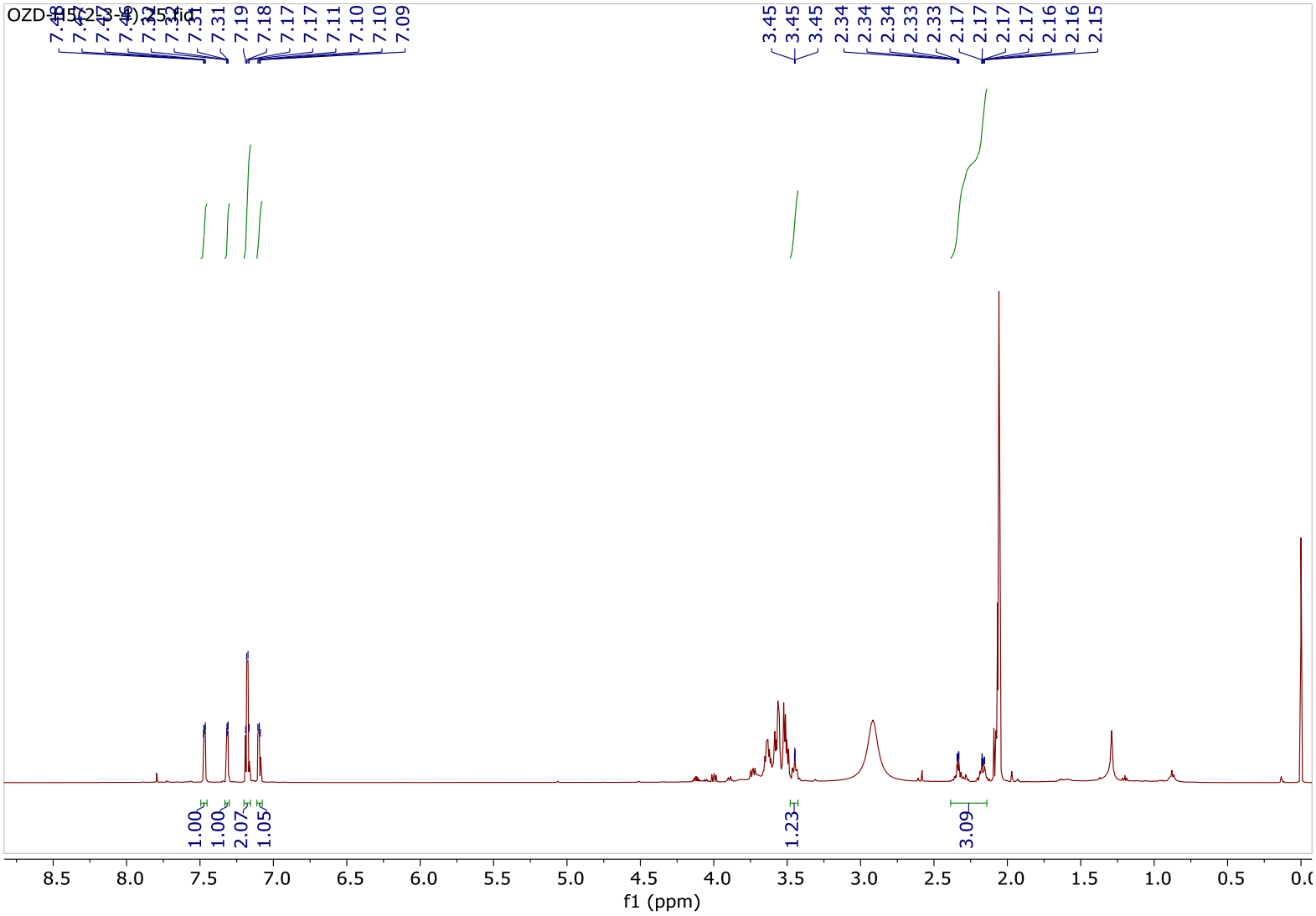
^{1}H-NMR (aseton-d_6, δ, 500 MHz, ppm) : 7.09-7.48 (aromatik C<u>H</u>, 10H), 3.46 (dd, H-3'', 2H), 2.17 ve 2.35 (dd, H-4a'' ve H-4b'', 4H).

^{13}C-NMR (aseton-d_6, δ, 125 MHz, ppm) : 123-133 (aromatik <u>C</u>H), 121.85 (qC), 136.17 (qC), 138.08 (qC), 75.8 (C-1''), 95.6 (C-2''), 33.5 (C-3''), 26.5 (C-4'').

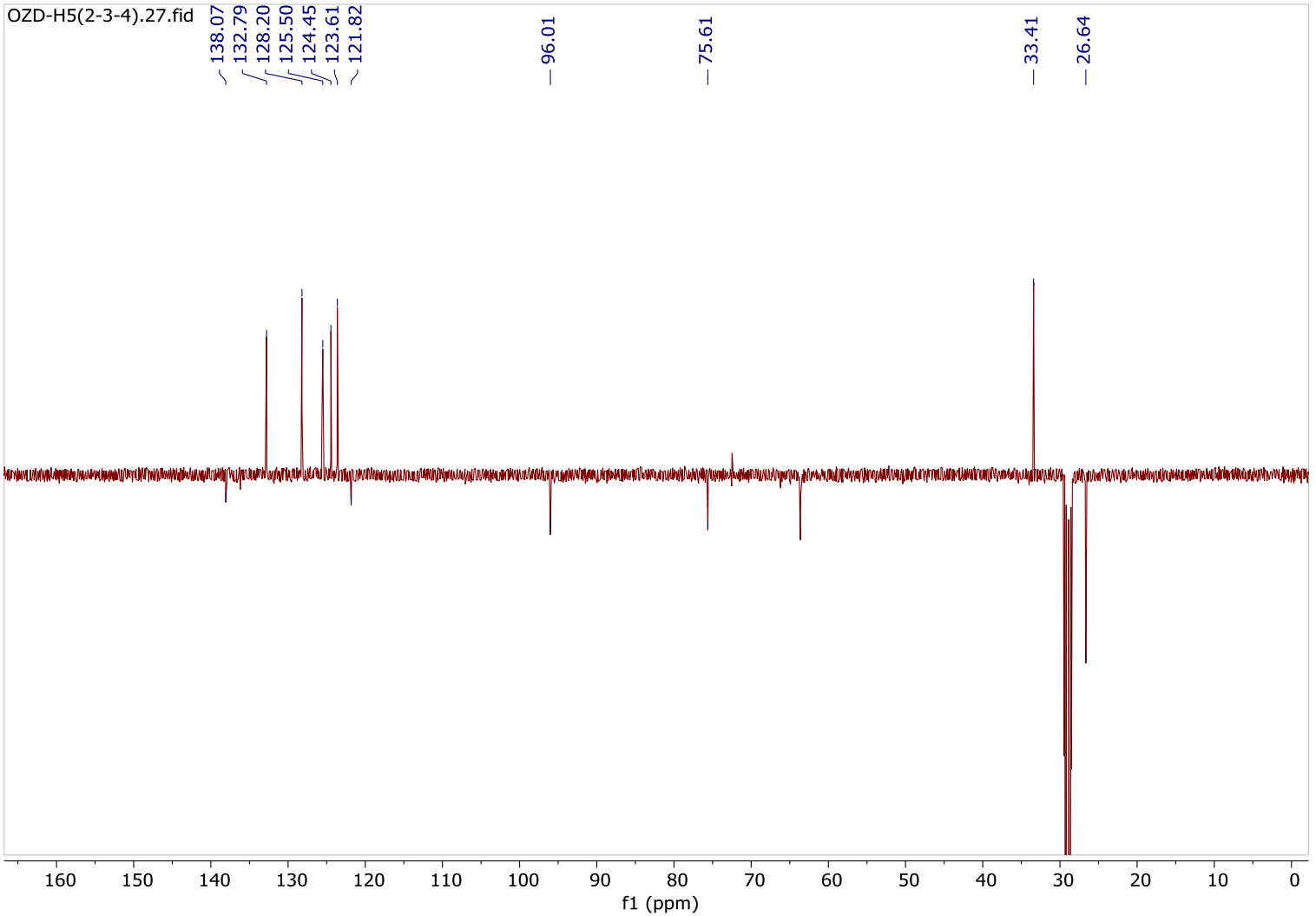
^{1}H-NMR spektrumunda 7.09-7.48 ppm aralığında 5 proton integraline sahip aromatik protonlar gözlenmiştir. 7.18 ppm'de dd olarak gözlenen H-4 proton sinyali HMBC spektrumunda kuaterner C-1'' karbonu (75.8 ppm) ile korelasyon göstermiştir. Diğer bir kuaterner karbon sinyali 95.6 ppm'de (C-2'') gözlenmiş olup asetilenik karbonlar olabileceği konusunda ip ucu vermiştir. HMBC spektrumunda göze çarpan diğer bir korelasyon, 3.46 ppm'de dd olarak gözlenen H-3'' protonunun C-2'' ile verdiği çapraz pik eşleşmesidir. HSQC spektrumunda bu protonun karbon değeri 33.5 ppm olarak bulunurken, bir metin (CH) piki olduğu tespit edilmiştir. H-3'' protonunun 3.46 ppm'deki sinyali, 2.17 ve 2.35 ppm'de gözlenen metilen protonları (H-4'') ile COSY eşleşmesi göstermiştir.

^{13}C-NMR, APT ve 2D NMR tekniklerinin detaylı incelemesi sonucunda bileşiğin daha önce *Echinops* türlerinden izole edilmiş bir bileşik olan Cardopatine bileşiği olduğu sonucuna varılmıştır (Şekil 22-27).

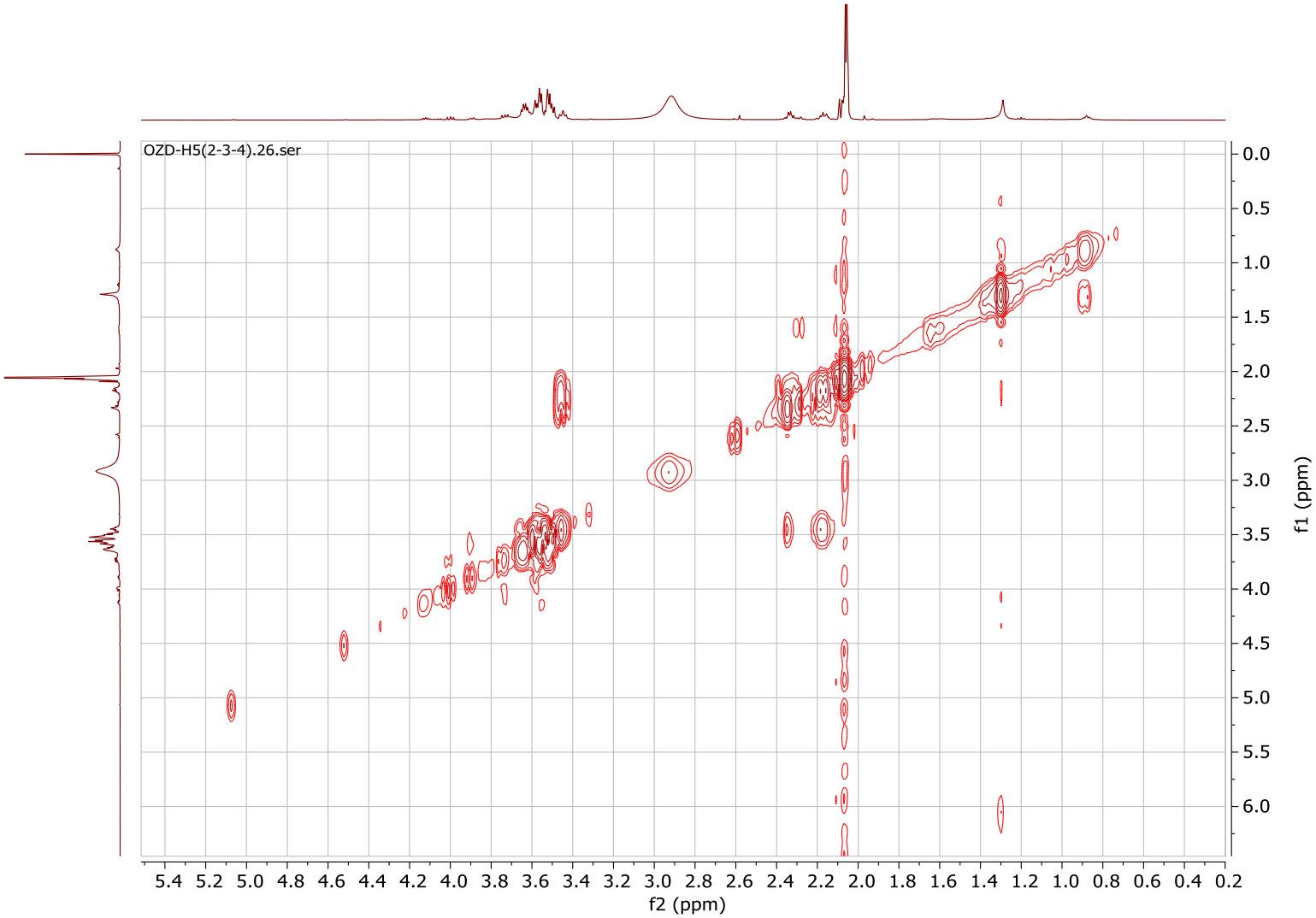
2 nolu bileşik ESI-MS kütle spektoroskopisinde $C_{24}H_{17}S_4$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 433.02148 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{24}H_{17}S_4$ için 433.02131 olarak bulunmuştur (Şekil 28).



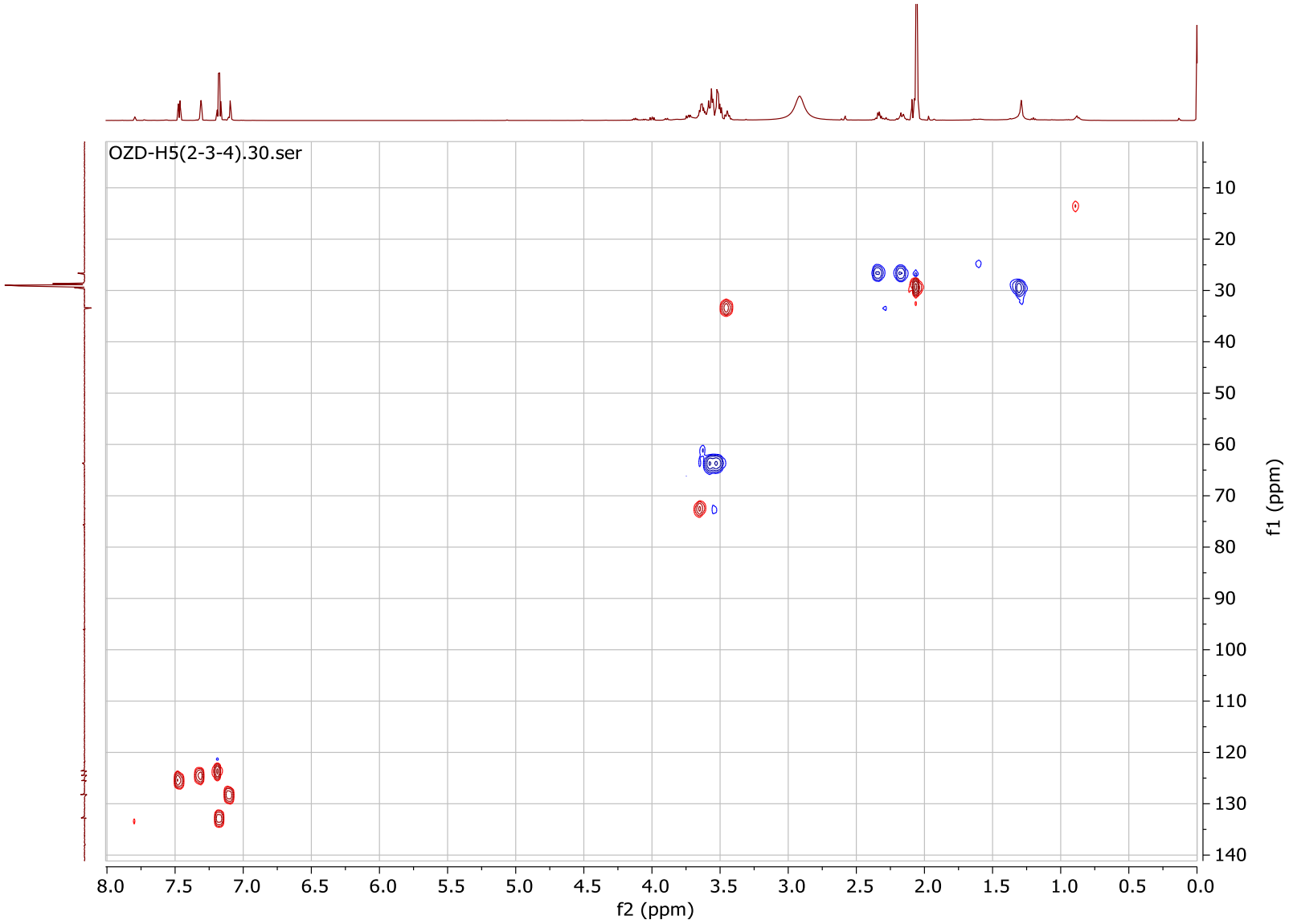
Şekil 23. (2) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu.



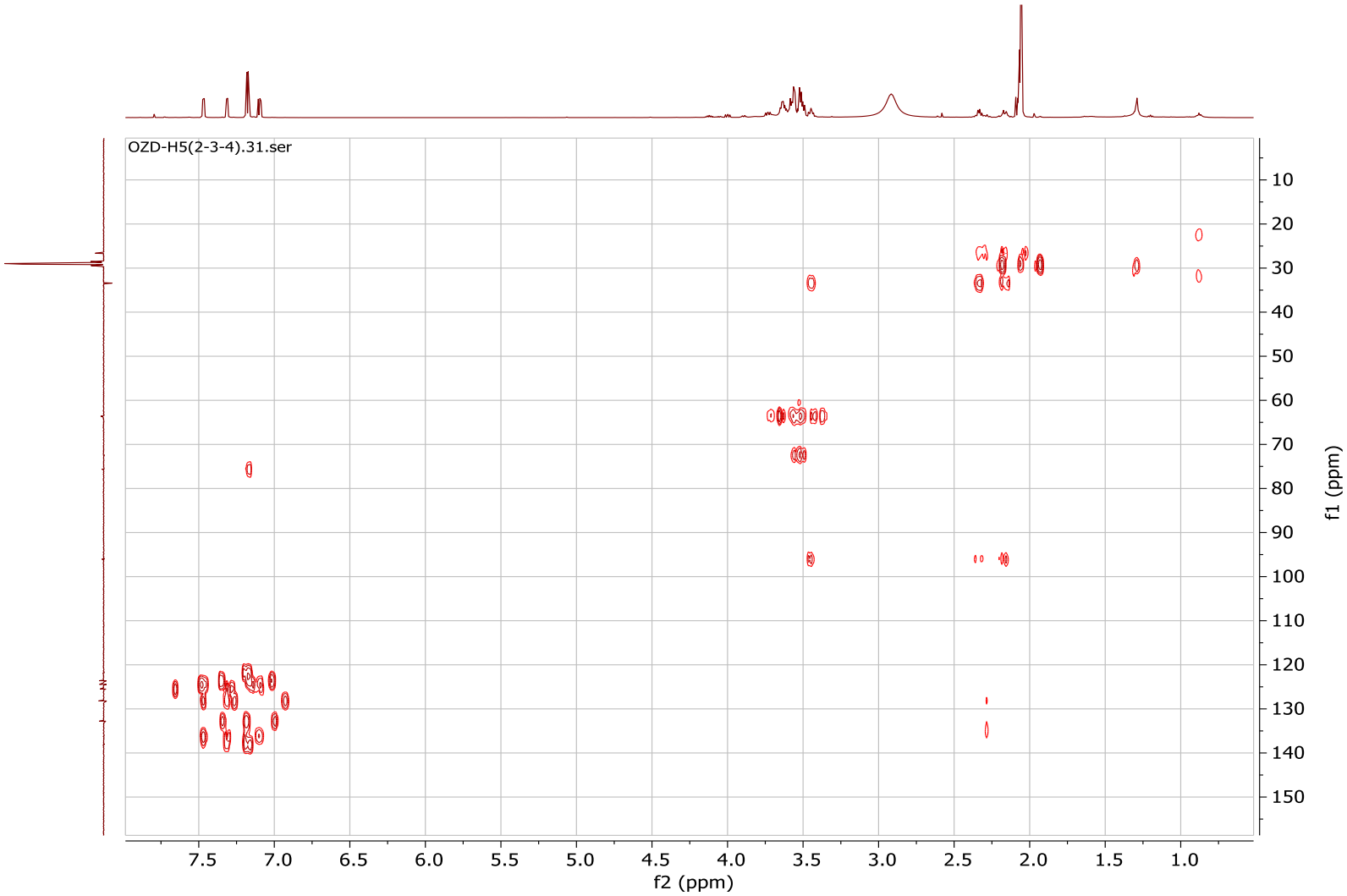
Şekil 24. (2) numaralı bileşiğe ait ^{13}C-NMR APT spektrumu.



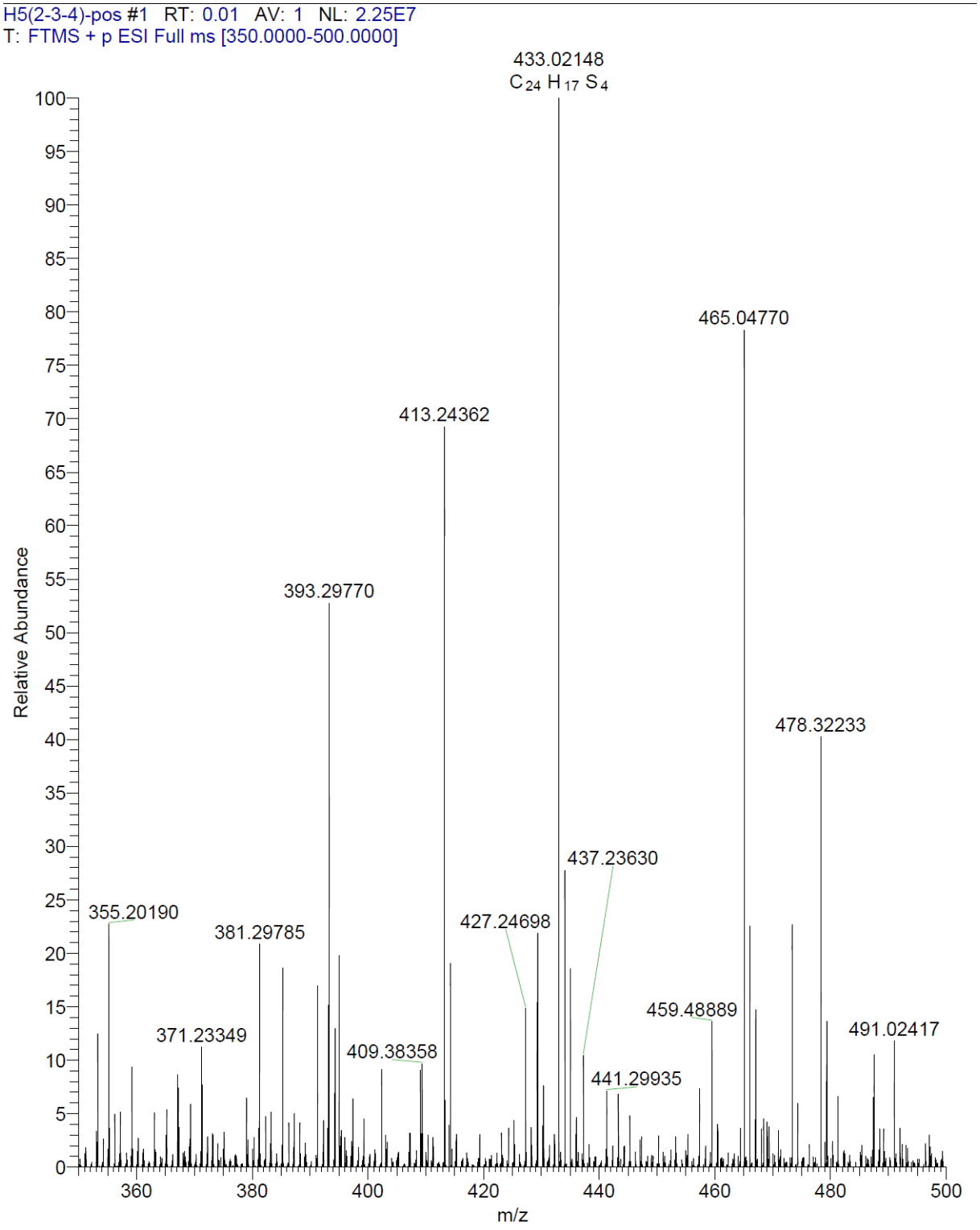
Şekil 25. (2) numaralı bileşiğe ait COSY spektrumu.



Şekil 26. (2) numaralı bileşiğe ait HSQC spektrumu.

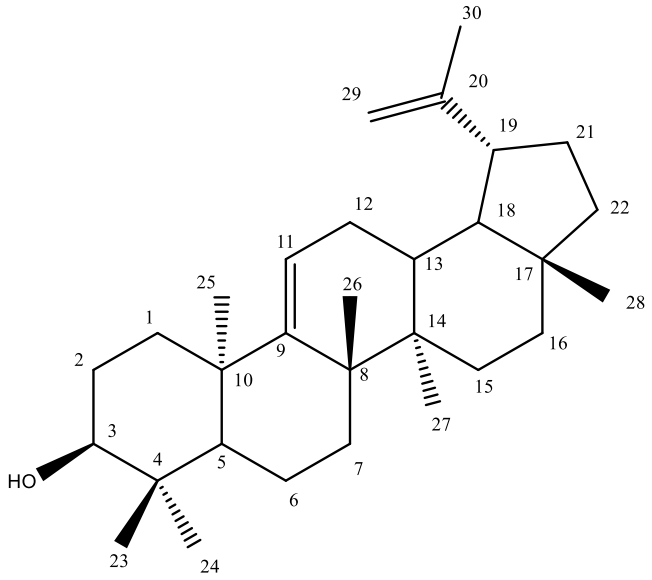


Şekil 27. (2) numaralı bileşiğe ait HMBC spektrumu



Şekil 28. (2) numaralı bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu

3 Numaralı Bileşik:



Şekil 29. (3) numaralı bileşik

3 kolonundan izole edilen **3** numaralı bileşik, kolondan %1 etilasetat / hekzan çözücü sistemiyle elüe edilmiştir. İTK kromatogramında UV ışıkta gözlenmeyen bileşik, serik sülfat ile yakıldığında pembe renk vermiştir.

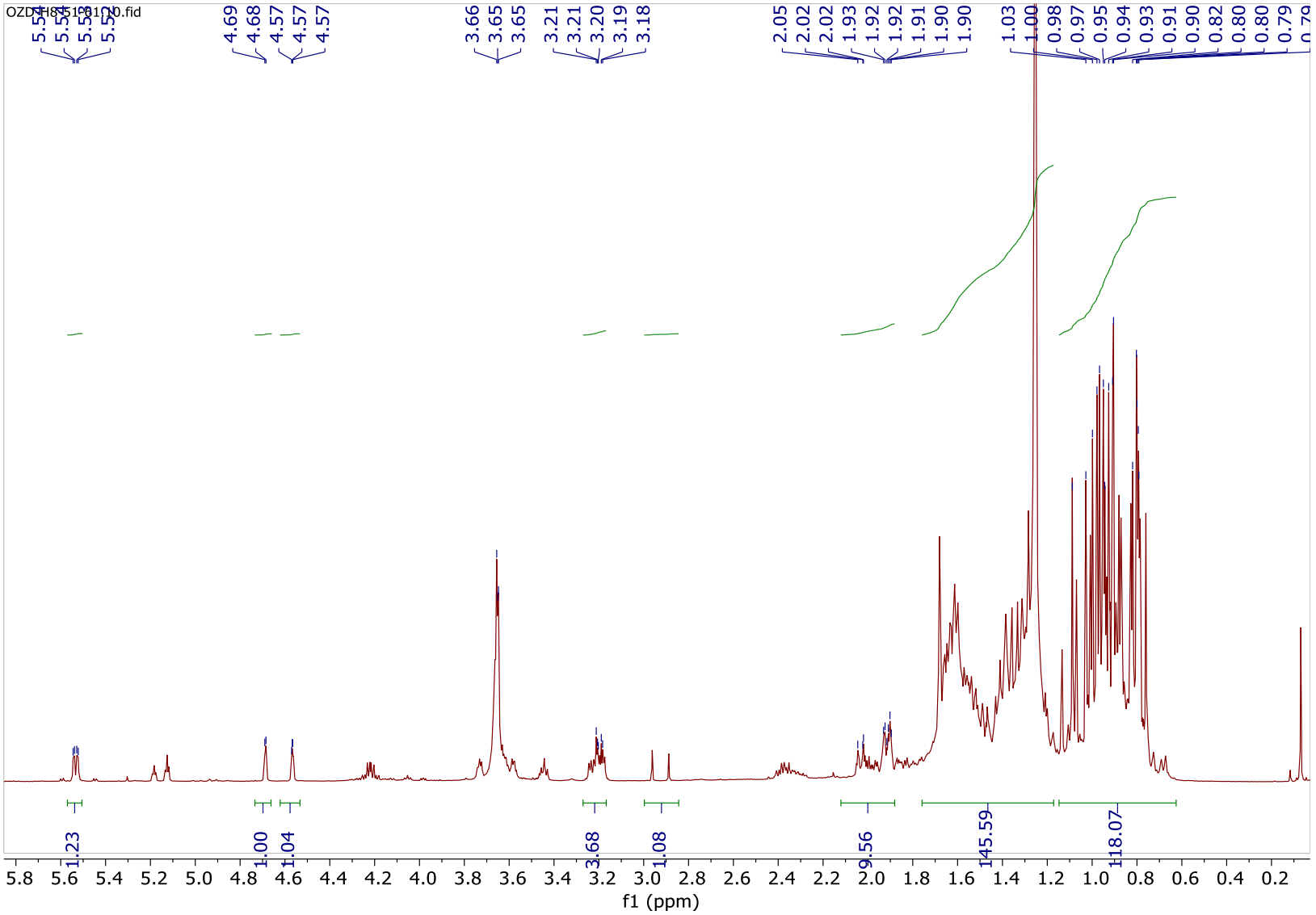
^{1}H-NMR ($CDCl_3$, δ, 500 MHz, ppm) : 3.22 (m, H-3, 1H), 5.53 (dd, H-11, 1H), 0.80 ve 0.98 (d, H-23 ve H-24, 6H), 0.91 (m, H-25, 3H), 1.09 (m, H-26, 3H), 4.57 ve 4.68 (d, H-29a ve H-29b, 2H), 1.68 (m, H-30, 1H), 1.1-1.7 (m, CH_2 protonları, 18H).

^{13}C-NMR ($CDCl_3$, δ, 125 MHz, ppm) : 78.9 (C-3), 158.0 (C-9), 37.2 (C-10), 116.9 (C-11), 48.2 (C-19), 109.0 (C-29), 19.1 (C-30).

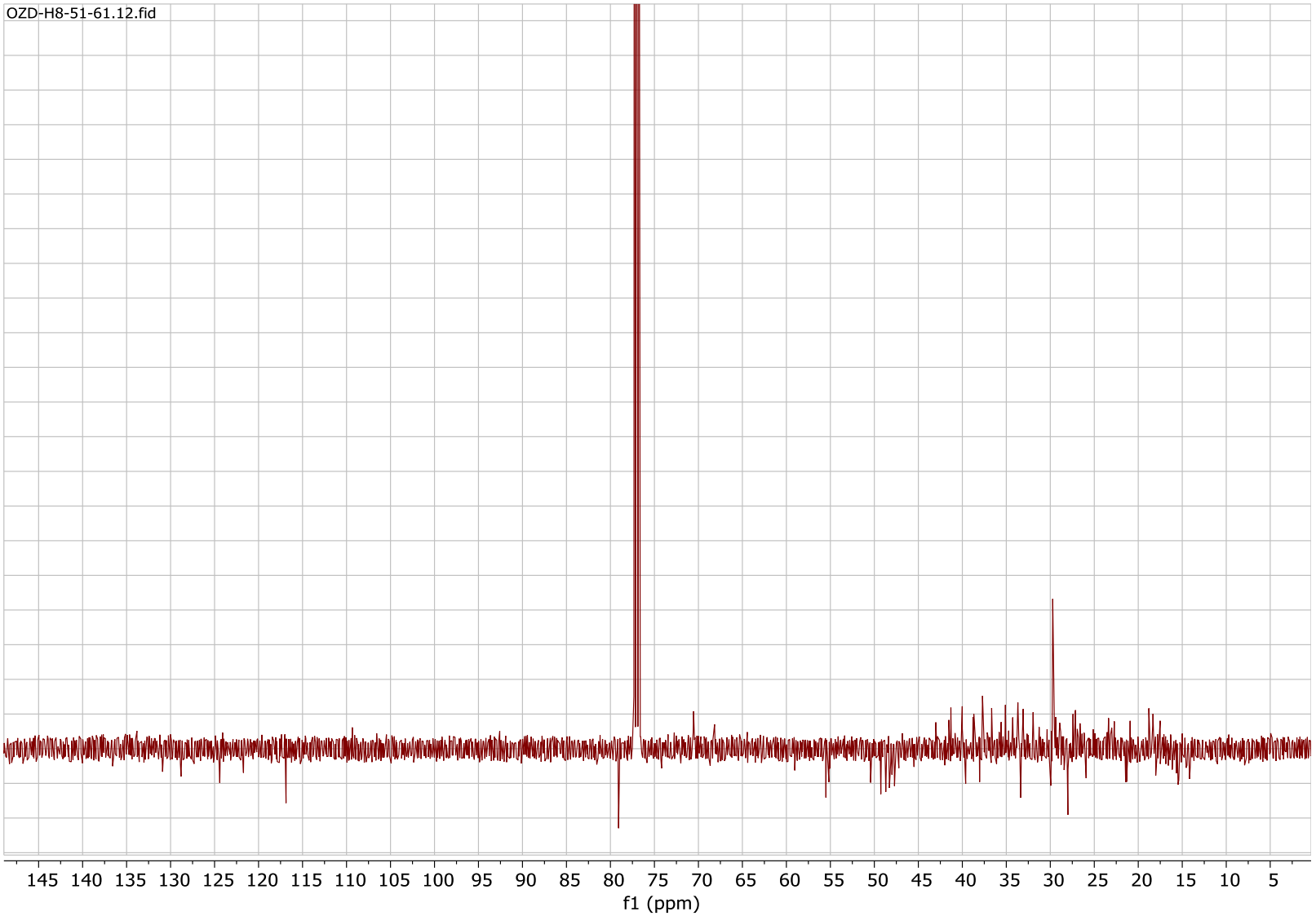
^{1}H-NMR spektrumunda, 5.53 ppm'de dd olarak gözlenen olefinik protonun (H-11) karbon atomu HSQC spektrumundan 116.9 (C-11) ppm olarak bulunmuştur. 4.68 ve 4.57 ppm'de gözlenen diğer iki olefinik protonun (H-29) ise 109.07 ppm'de gözlenen karbon atomuna (C-29) bağlı olduğu yine HSQC spektrumundan anlaşılmış olup, bu protonların geminal hidrojenler olduğu sonucuna varılmıştır. Bu protonların C-30 karbonu (19.1 ppm) ve C-19 (48.2 ppm) karbonları ile HMBC spektrumunda verdiği korelasyonlar C-19'da izopropilen ünitesinin varlığını kanıtlamıştır. Aynı şekilde H-30 (1.68 ppm) protonları da C-29 karbonu (109.07 ppm) ile korelasyon göstermiştir. 3.22 ppm'de gözlenen oksijene komşu H-3 protonunun karbonu HSQC spektrumundan 78.9 (C-3) ppm olarak bulunmuştur. H-23 ve H-24 (0.80 ve 0.98 ppm) protonlarının C-3 ile yaptığı korelasyonlar C-4 karbonunda dimetil

bağlı olduğunu kanıtlamıştır. Diğer olefinik protonun (5.53 ppm) C-10 (37.2 ppm) karbonu ile yaptığı korelasyon ve H-25 (0.91 ppm) ve H-26 (1.09) protonlarının C-9 (158.08) ile yaptığı korelasyon çift bağın yerinin C-9−C-11'de olduğunu işaret etmektedir. Dolayısı ile molekülün yapısı triterpen yapısındaki bir Lupol türevi olarak belirlenmiştir (Şekil 29-34).

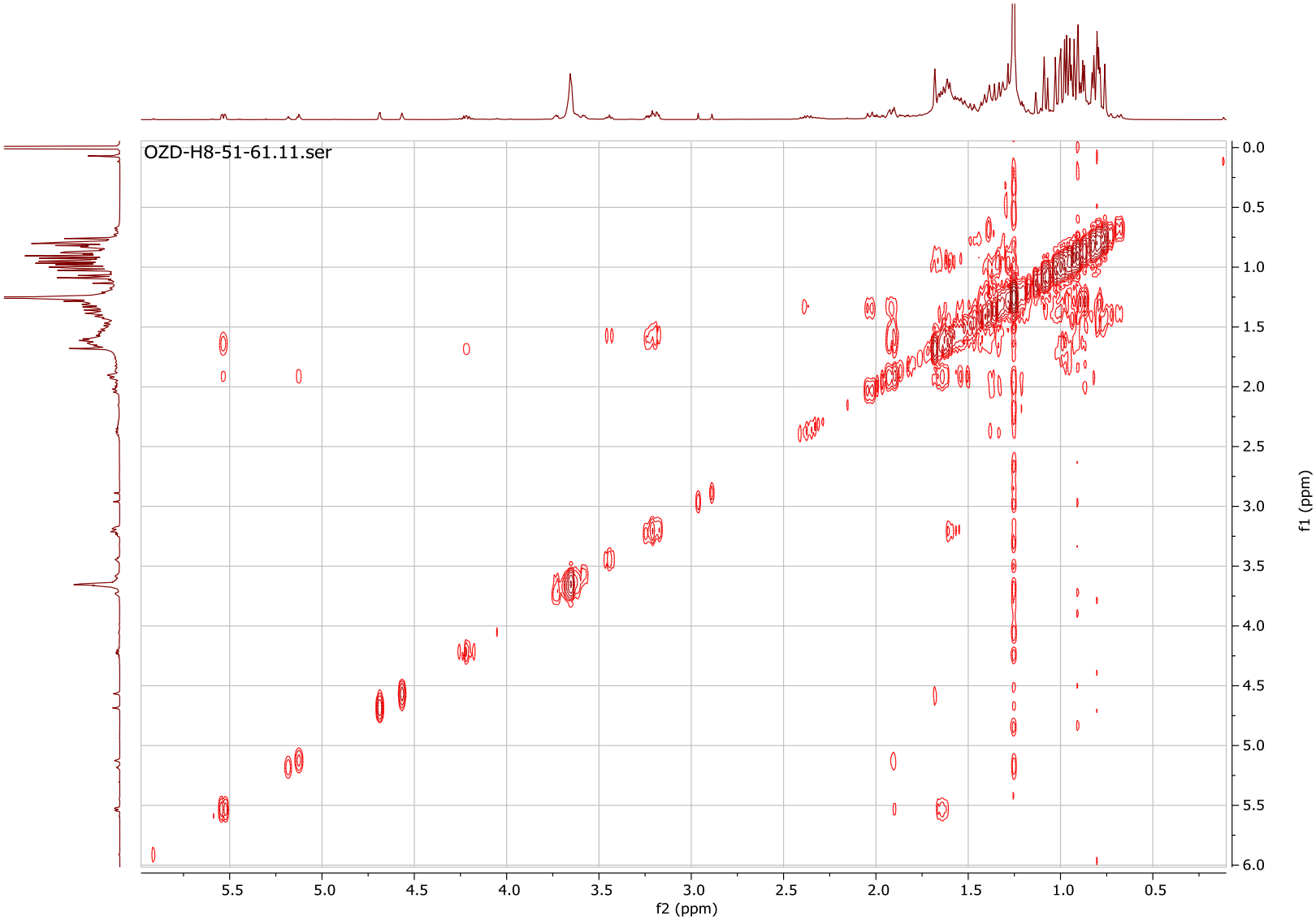
3 nolu bileşik ESI-MS kütle spektoroskopisinde $C_{30}H_{49}O$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 425.37628 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{30}H_{49}O$ için 425.37780 olarak bulunmuştur (Şekil 35).



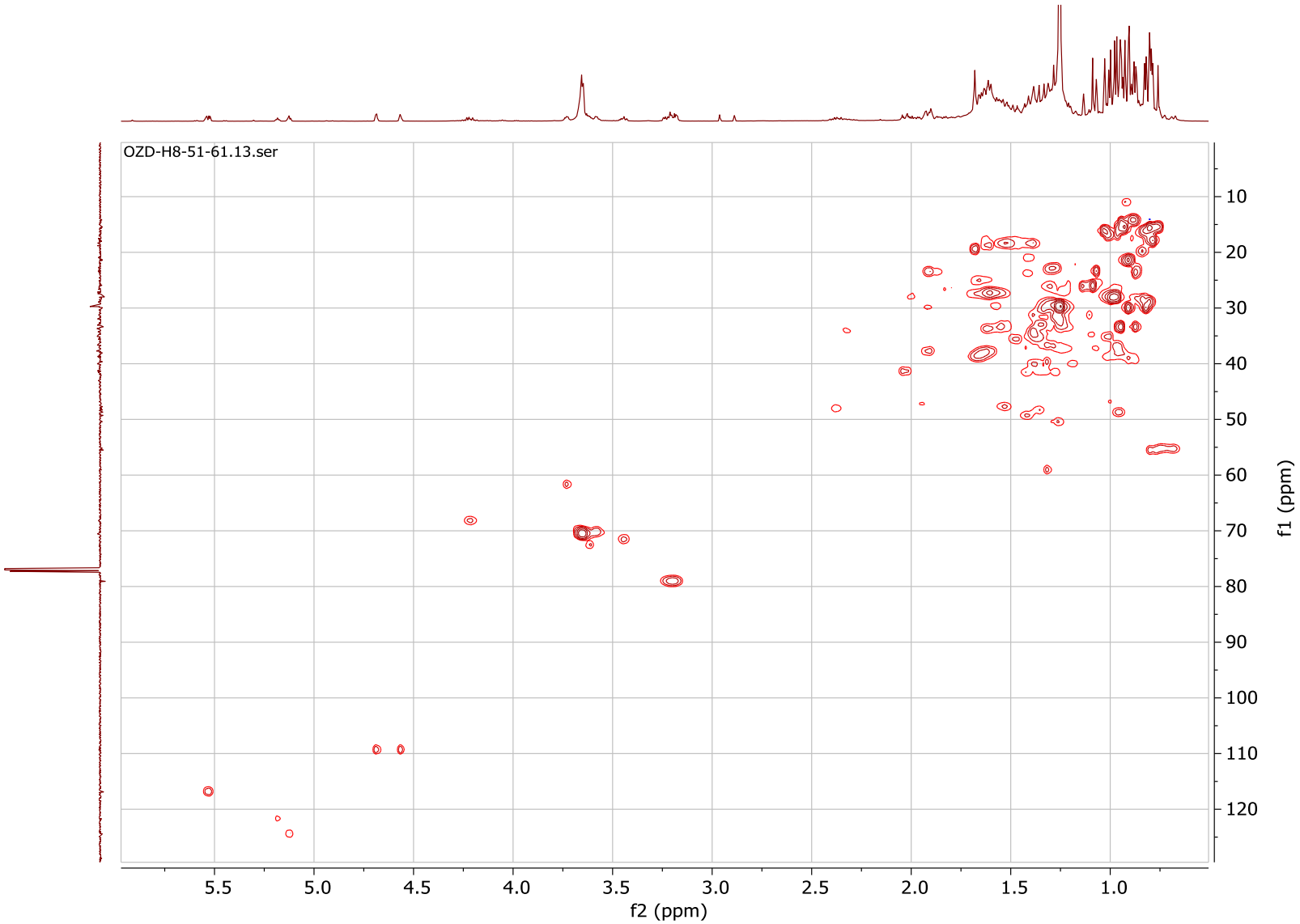
Şekil 30. (3) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu



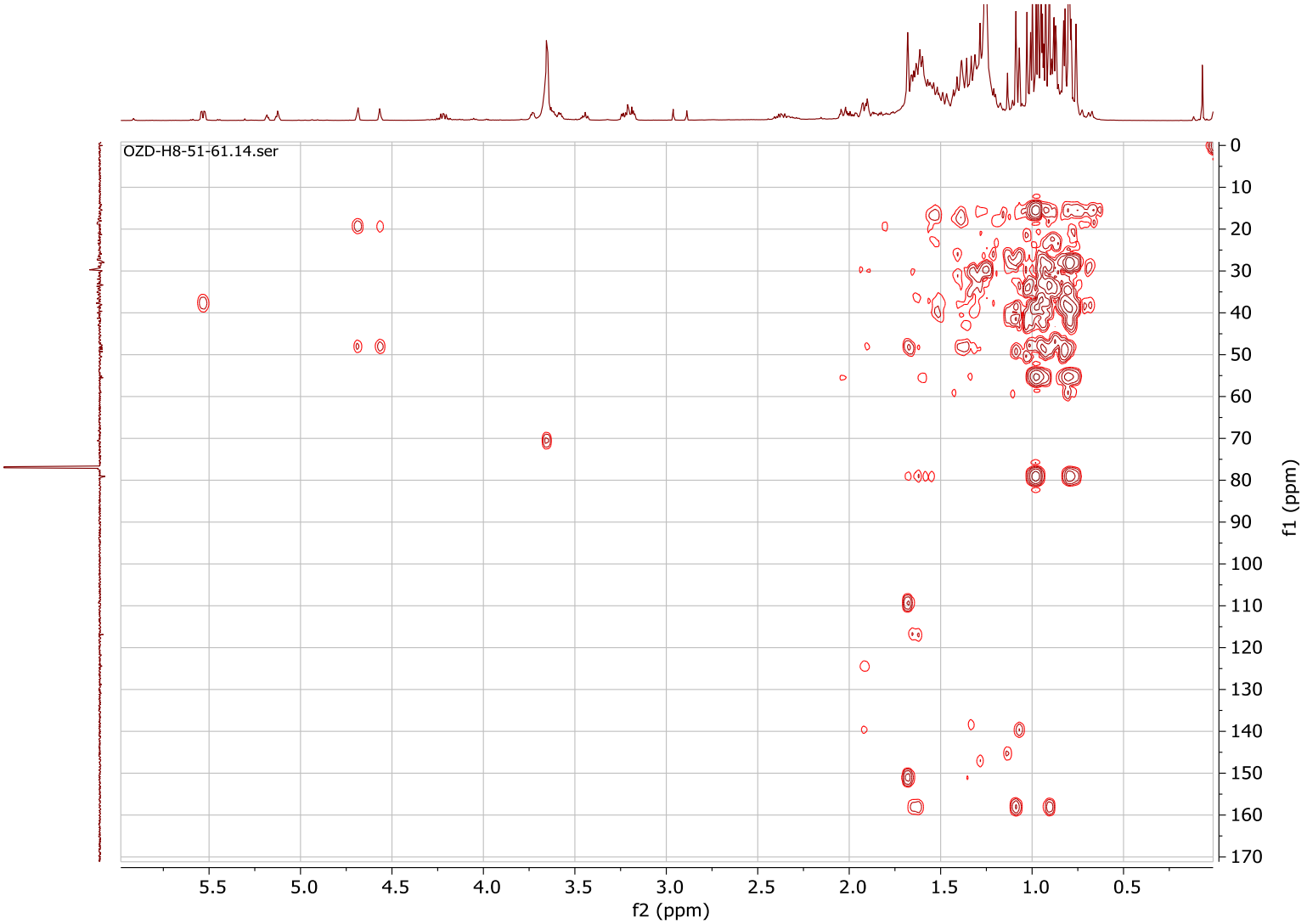
Şekil 31. (3) numaralı bileşiğe ait ^{13}C-NMR spektrumu



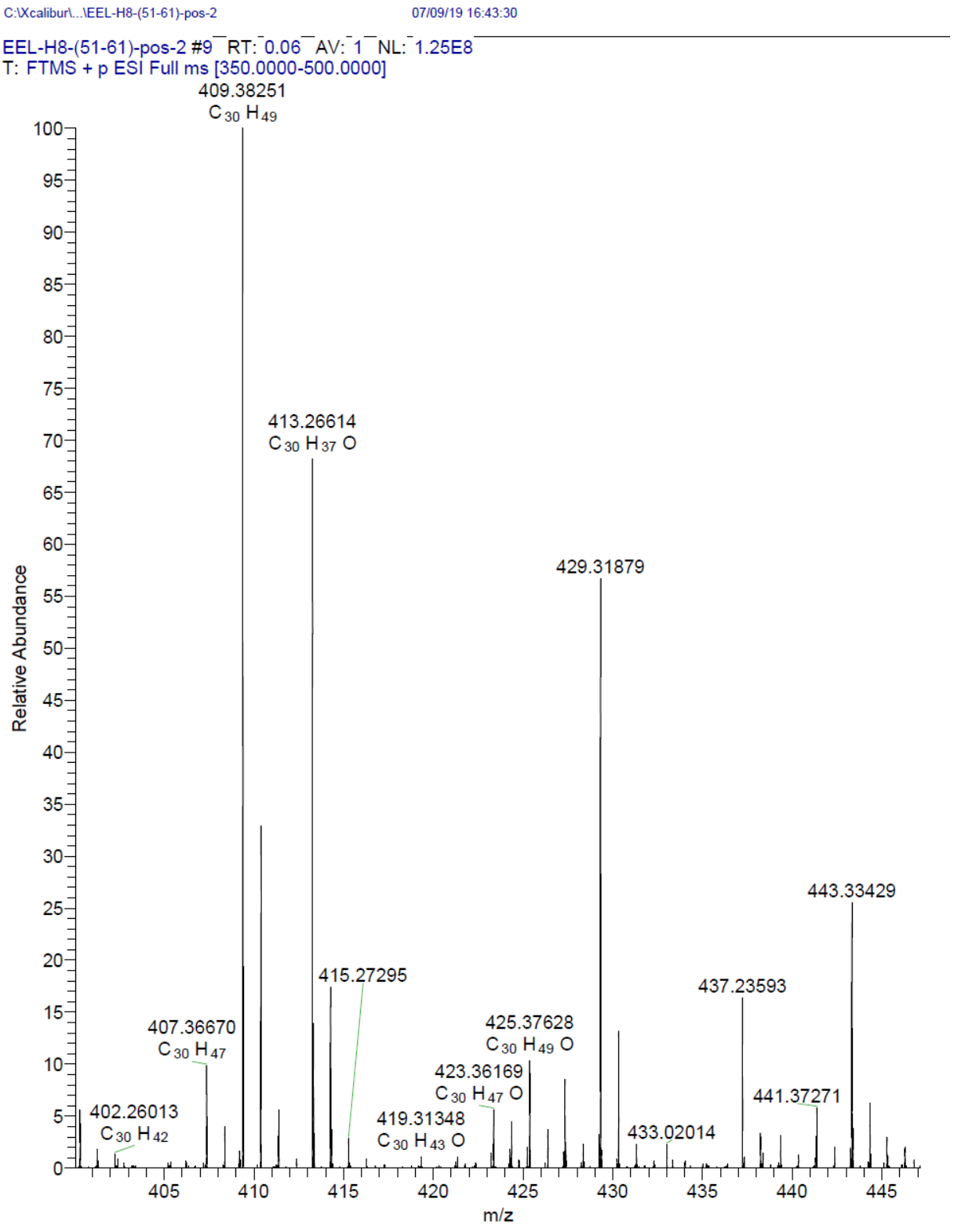
Şekil 32. (3) numaralı bileşiğe ait COSY spektrumu



Şekil 33. (3) numaralı bileşiğe ait HSQC spektrumu

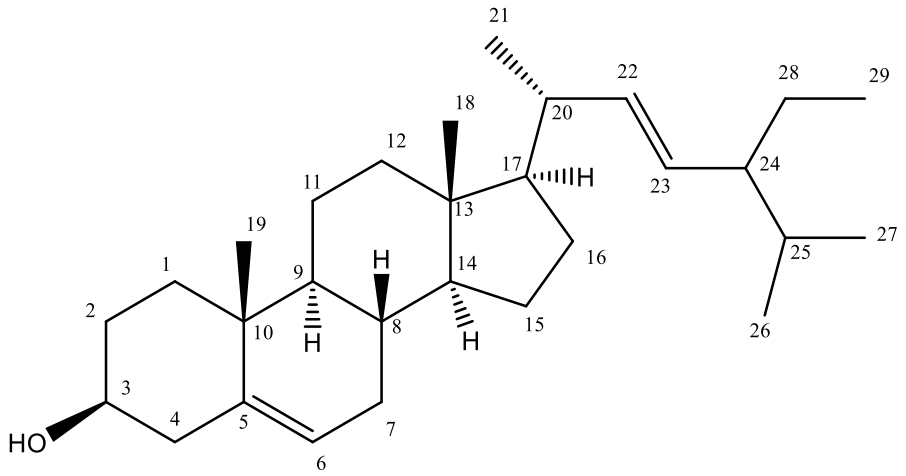


Şekil 34. (3) numaralı bileşiğe ait HMBC spektrumu



Şekil 35. (3) numaralı bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu

4 Numaralı Bileşik:



Şekil 36. (4) numaralı bileşik.

4 kolonundan elde edilen **4** nolu bileşik, %7.5 etilasetat / hekzan çözücü sistemiyle gelmiştir. ITK kromatogramında UV ışıkta gözlenmeyen bileşik, serik sülfat ile yakıldığında pembe renk vermiştir.

^{1}H-NMR ($CDCl_3$, δ, 500 MHz, ppm) : 3.54 (m, H-3, 1H), 5.38 (brs, H-6, 1H), 1.0 (s, Me-19, 3H), 5.17 (dd, H-22, 1H), 5.03 (dd, H-23, 1H), 0.69 (d, Me-26, 3H), 0.92 (d, Me-27, 3H), 0.82 (t, Me-29, 3H), 1.05-2.20 (m, metilen protonları, 18H).

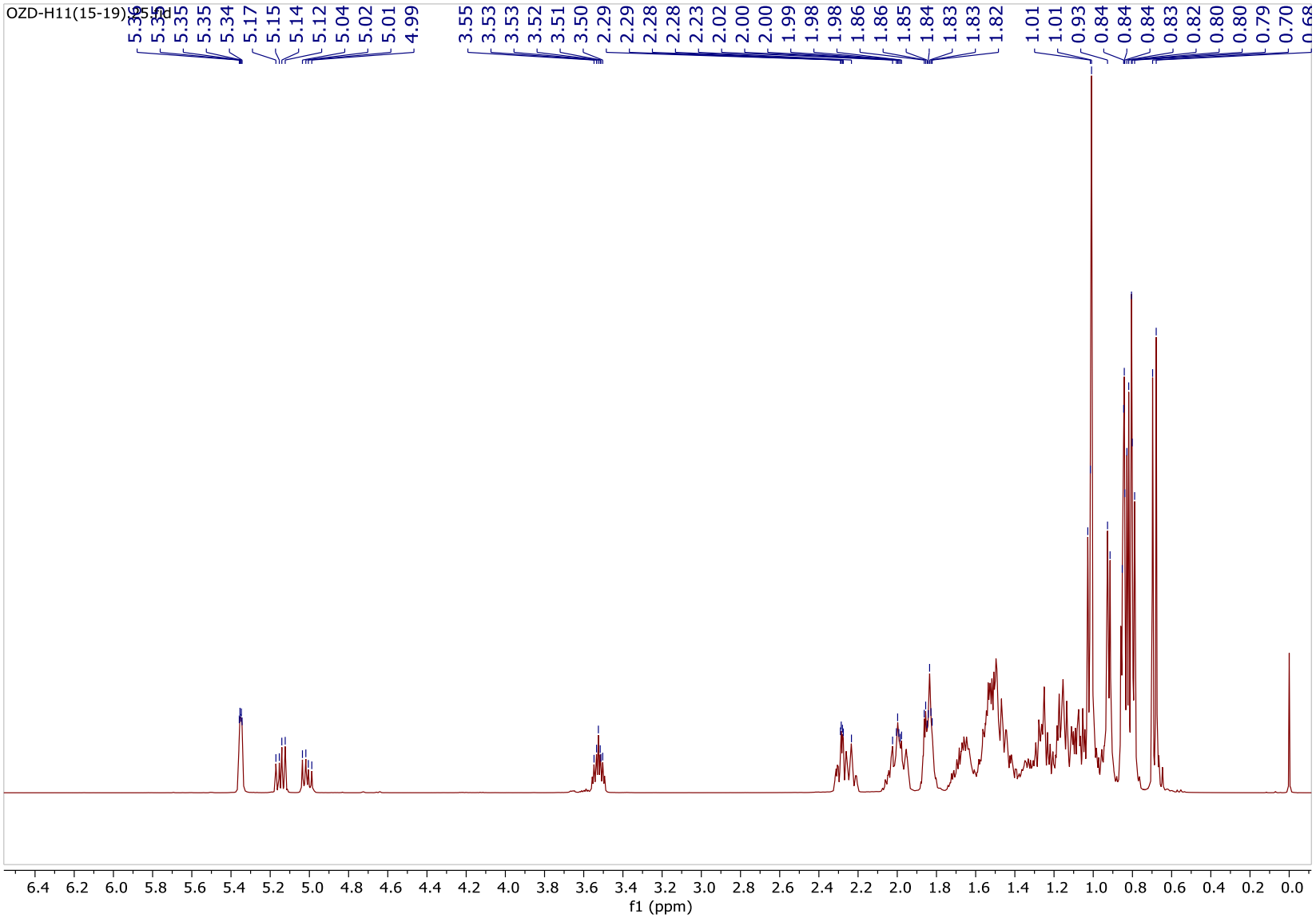
^{13}C-NMR ($CDCl_3$, δ, 125 MHz, ppm) : 71.7 (C-3), 31.5 (C-4), 121.5 (C-6), 35.9 (C-7), 41.8 (C-10), 21-42 ppm (CH_2 karbonları).

^{1}H-NMR spektrumunda 3 adet olefinik proton sinyali gözlenmiştir. Bunlardan 5.38 ppm'de gözlenen protonun (H-6) karbonu HSQC spektrumundan 121.5 ppm (C-6) olarak bulunmuştur. HMBC spektrumunda, H-6 protonu C-10 (41.80 ppm), C-4 (31.5) ve C-7 (35.9) karbonları ile korelasyon göstermiştir. β-OH grubunu taşıyan C-3'teki proton sinyali 3.54 ppm'de karbonu ise 71.7 ppm'de gözlenmiştir. 5.17 ve 5.03 ppm'de dd olarak gözlenen sinyallerin H-22 ve H-23 protonlarına ait olduğu ve *trans* etkileşimde oldukları yarılma sabitlerinden anlaşılmıştır. HMBC spektrumunda H-22 protonu C-20, C-23 ve C-24 karbonları ile, H-23 protonu ise C-20, C-22 ve C-24 karbonları ile korelasyon yaptığı görülmüştür.

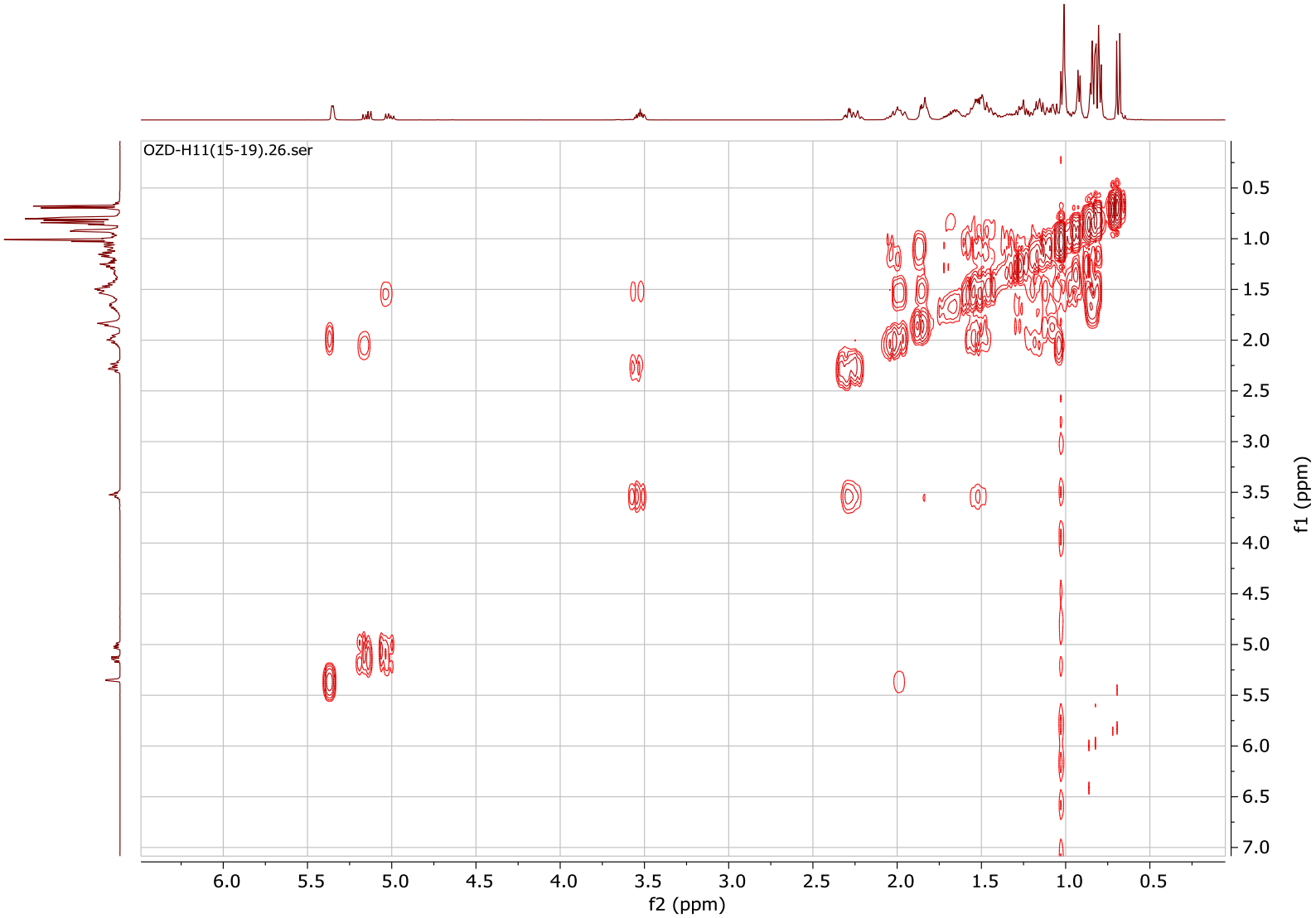
Kapsamlı bir ^{13}C-NMR APT analizi, molekülün yapısında 9 adet metilen, 3 adet kuarterner karbon, 3 adet CH olefinik karbonu ve 6 adet metil grubu taşıdığını göstermiştir

(Şekil 36). 1D ve 2D NMR spektral verilerinin değerlendirmesi bileşiğin yapısının stigmasterol olduğunu kanıtlamıştır (Şekil 36-41).

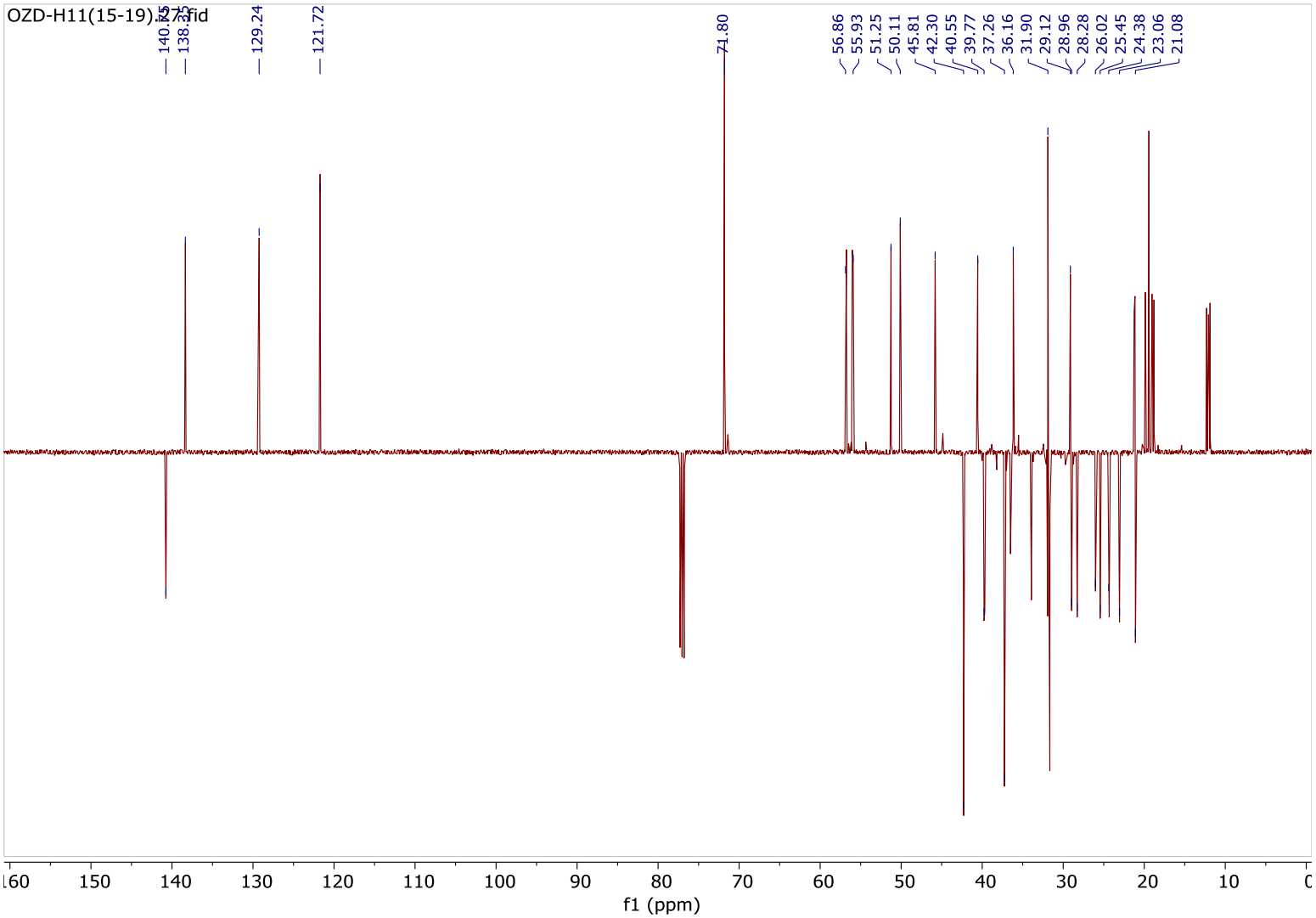
4 nolu bileşik ESI-MS kütle spektoroskopisinde $C_{29}H_{49}O$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 413.37720 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{29}H_{49}O$ için 413.37779 olarak bulunmuştur (Şekil 42).



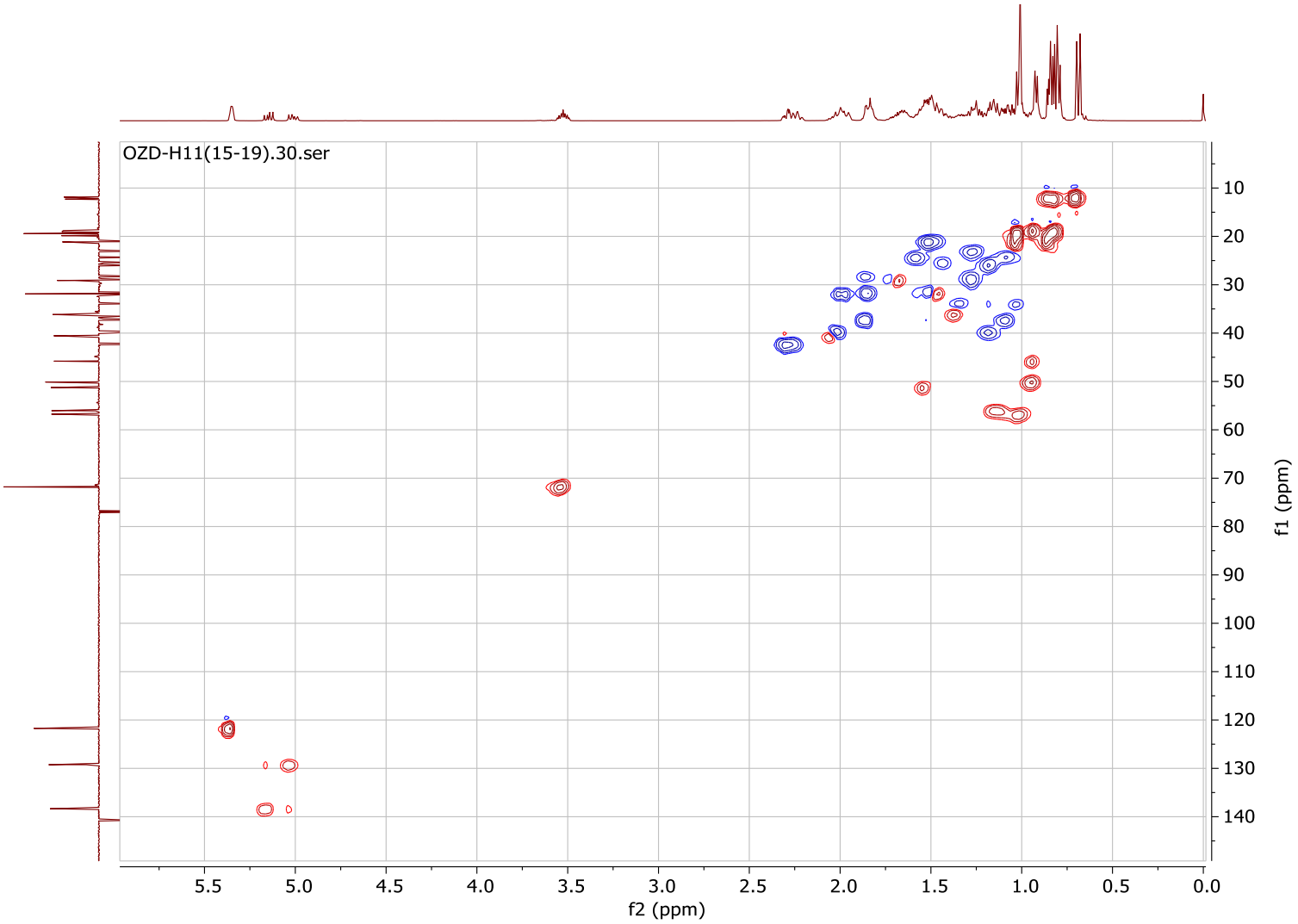
Şekil 37. (4) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu



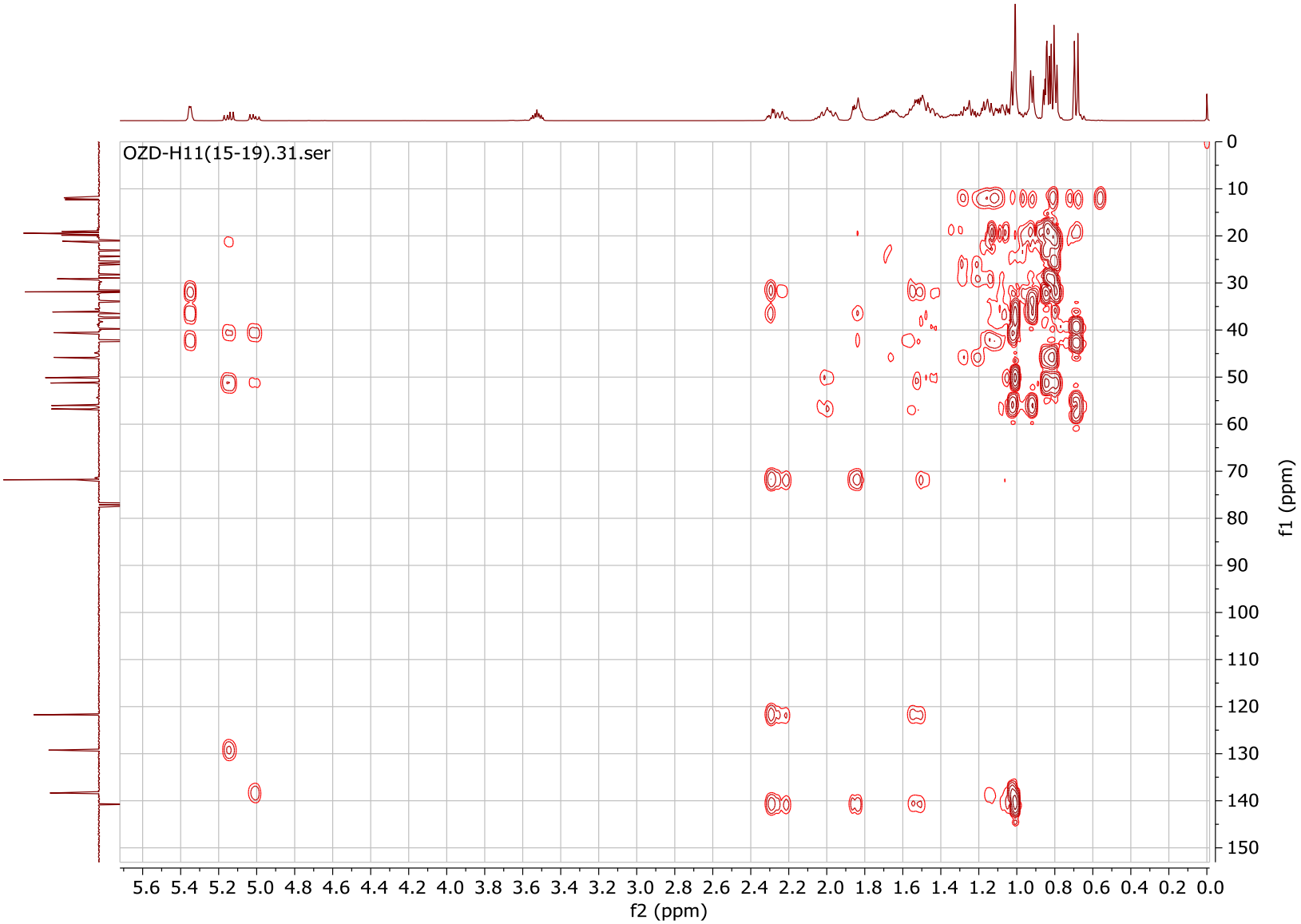
Şekil 38. (4) numaralı bileşiğe ait COSY spektrumu



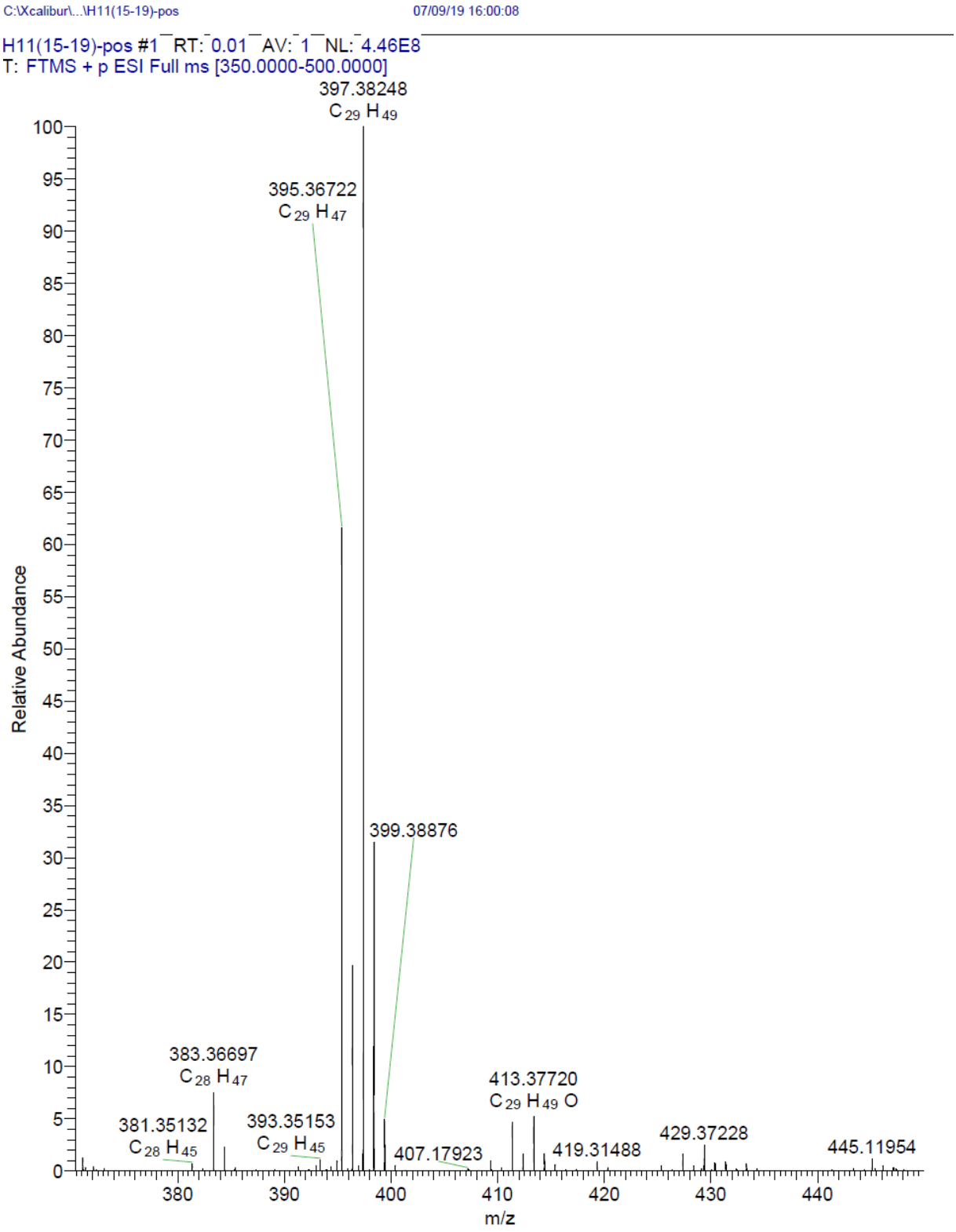
Şekil 39. (4) numaralı bileşiğe ait ^{13}C-NMR APT spektrumu



Şekil 40. (4) numaralı bileşiğe ait HSQC spektrumu

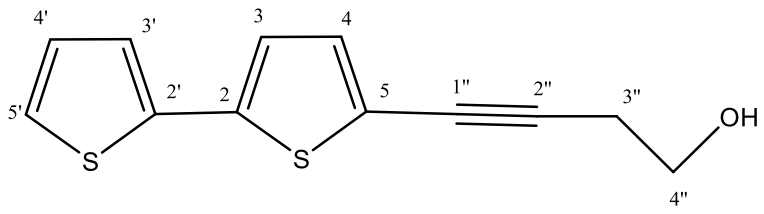


Şekil 41. (4) numaralı bileşiğe ait HMBC spektrumu



Şekil 42. (4) numaralı bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu

5 Numaralı Bileşik:



Şekil 43. (5) numaralı bileşik

5 kolonundan %10 etilasetat / hekzan çözücü sistemi ile toplanan **5** nolu bileşik, yapılan ITK incelemesinde UV ışık altında mor renkli gözlenirken, serik sülfat belirteci uygulanıp yakılınca siyah renk vermiştir.

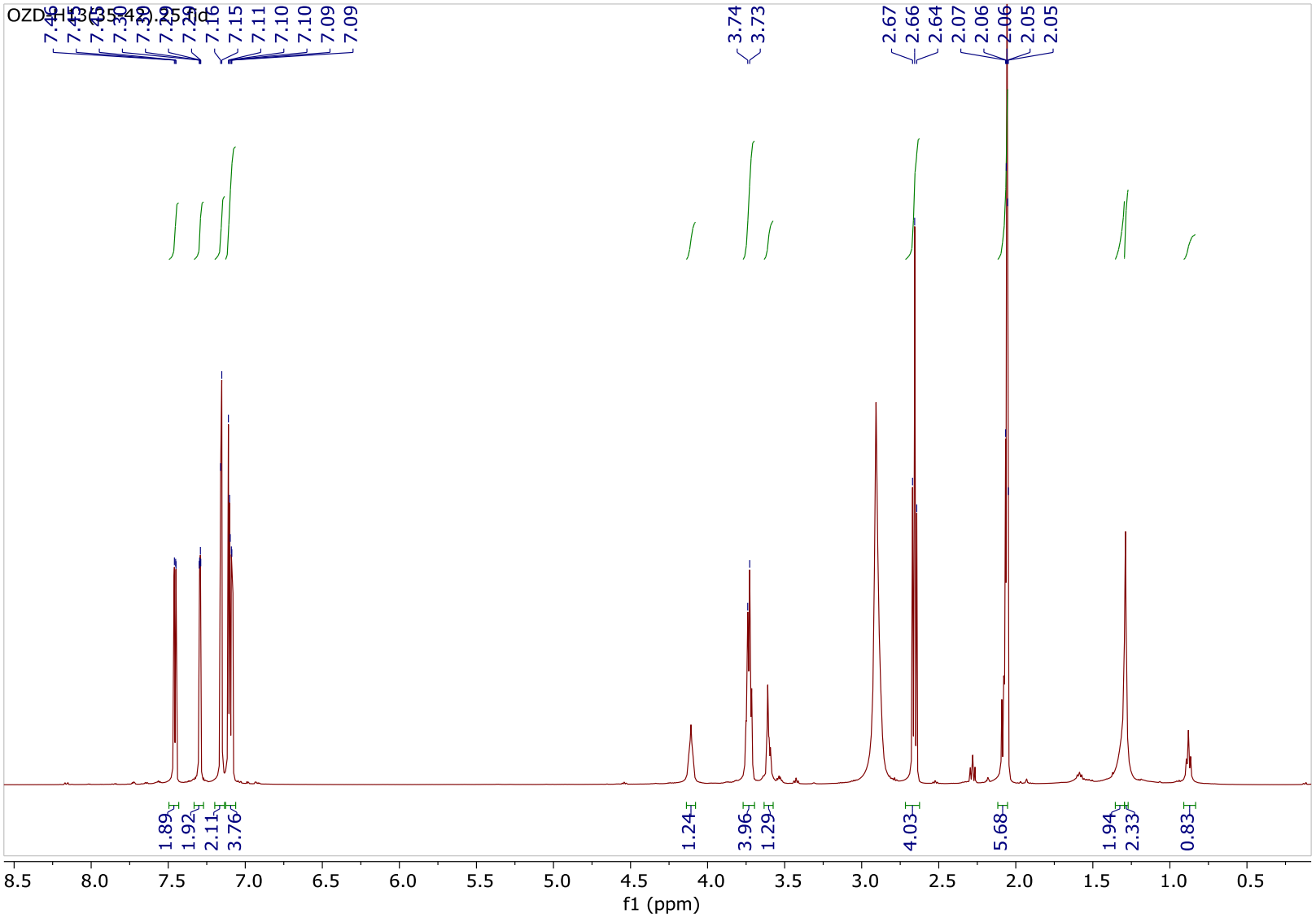
^{1}H-NMR (aseton-d_6, δ, 500 MHz, ppm) : 7.08-7.46 (aromatik C<u>H</u>, 5H), 2.67 (t, H-3'', 2H), 3.73 (dd, H-4'', 2H).

^{13}C-NMR (aseton-d_6, δ, 125 MHz, ppm) : 123-132 (aromatik <u>C</u>H), 73.8 (C-1''), 93.0 (C-2''), 23.6 (C-3''), 60.4 (C-4'').

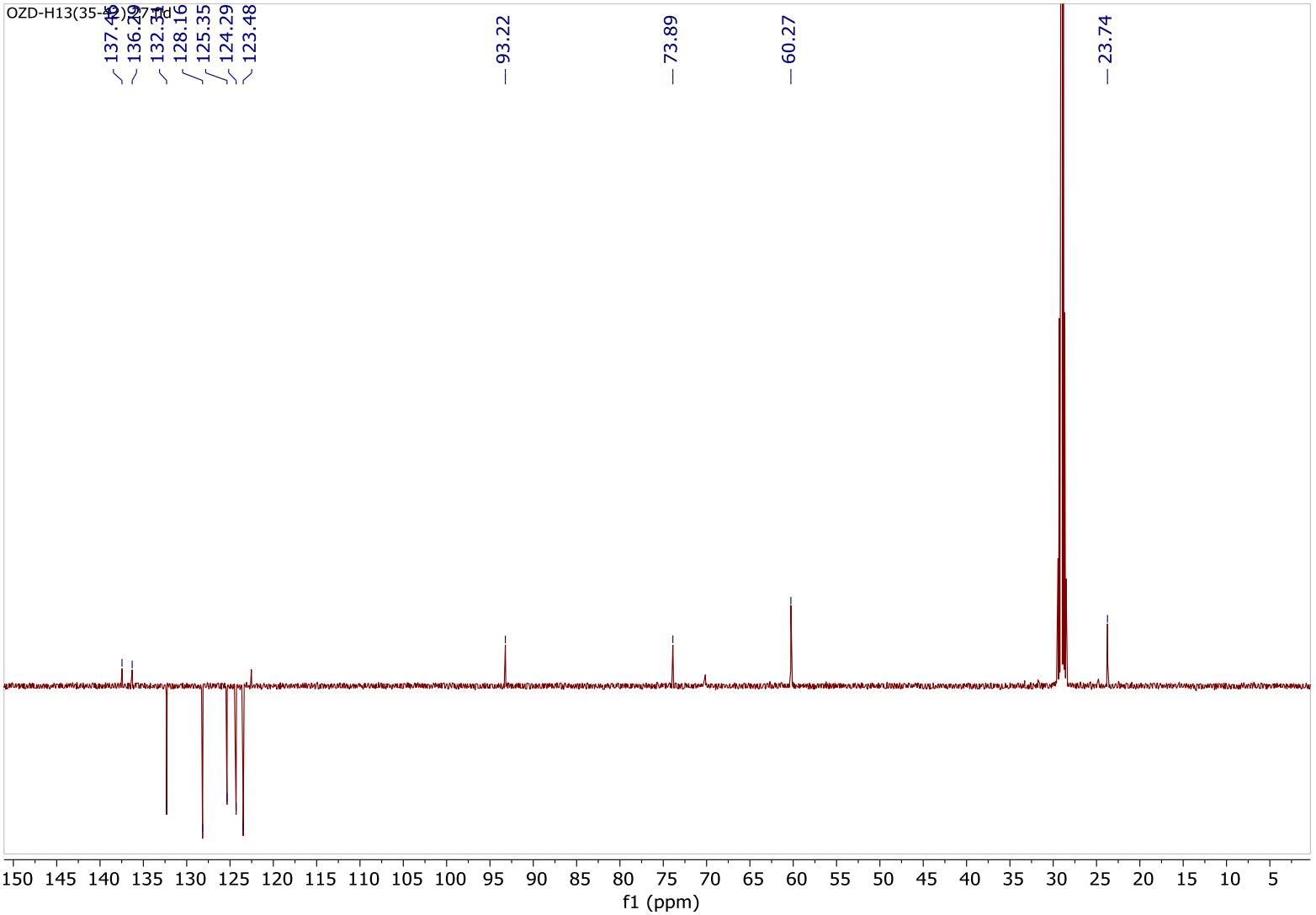
^{1}H-NMR spektrumunda 7.08-7.46 ppm aralığında 5 proton integraline sahip aromatik protonlar gözlenmiştir. 7.10 ppm'de dd olarak gözlenen H-4 proton sinyali HMBC spektrumunda kuaterner C-1'' karbonu (73.8 ppm) ile korelasyon göstermiştir. Diğer bir kuaterner karbon sinyali 93.0 ppm'de (C-2'') gözlenmiş olup asetilenik karbonlar olabileceği konusunda ip ucu vermiştir. 3.73 ppm'de gözlenen oksijene komşu bir metilen protonu sinyali (H-4'') HMBC spektrumunda 93.0 ppm'de (C-2'') ile korelasyon vermiştir. 3.73 ppm'deki metilen protonları 2.67 ppm'de triplet olarak gözlenen H-3'' metilen protonları ile eşleşmiştir. H-3'' protonları HMBC spektrumunda C-1'' (73.8 ppm) karbonu ile korelasyon göstermiştir (Şekil 43-48).

Kapsamlı bir ^{13}C-NMR APT analizi, molekülün yapısında 2 adet metilen, 5 adet kuarterner karbon, 5 adet CH aromatik karbonu taşıdığını göstermiştir. 1D ve 2D NMR spektral verilerinin değerlendirmesi bileşiğin yapısının 5-(4-hidroksibut-1-inil)-2,2'-bitiyofen olduğunu kanıtlamıştır (62).

5 nolu bileşik ESI-MS kütle spektoroskopisinde $C_{12}H_{11}OS_2$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini *m/z* 235.02454 $[M+H]^+$ olarak vermiştir. Hesaplanan değer $C_{12}H_{11}OS_2$ için 235.02458 olarak bulunmuştur (Şekil 49)



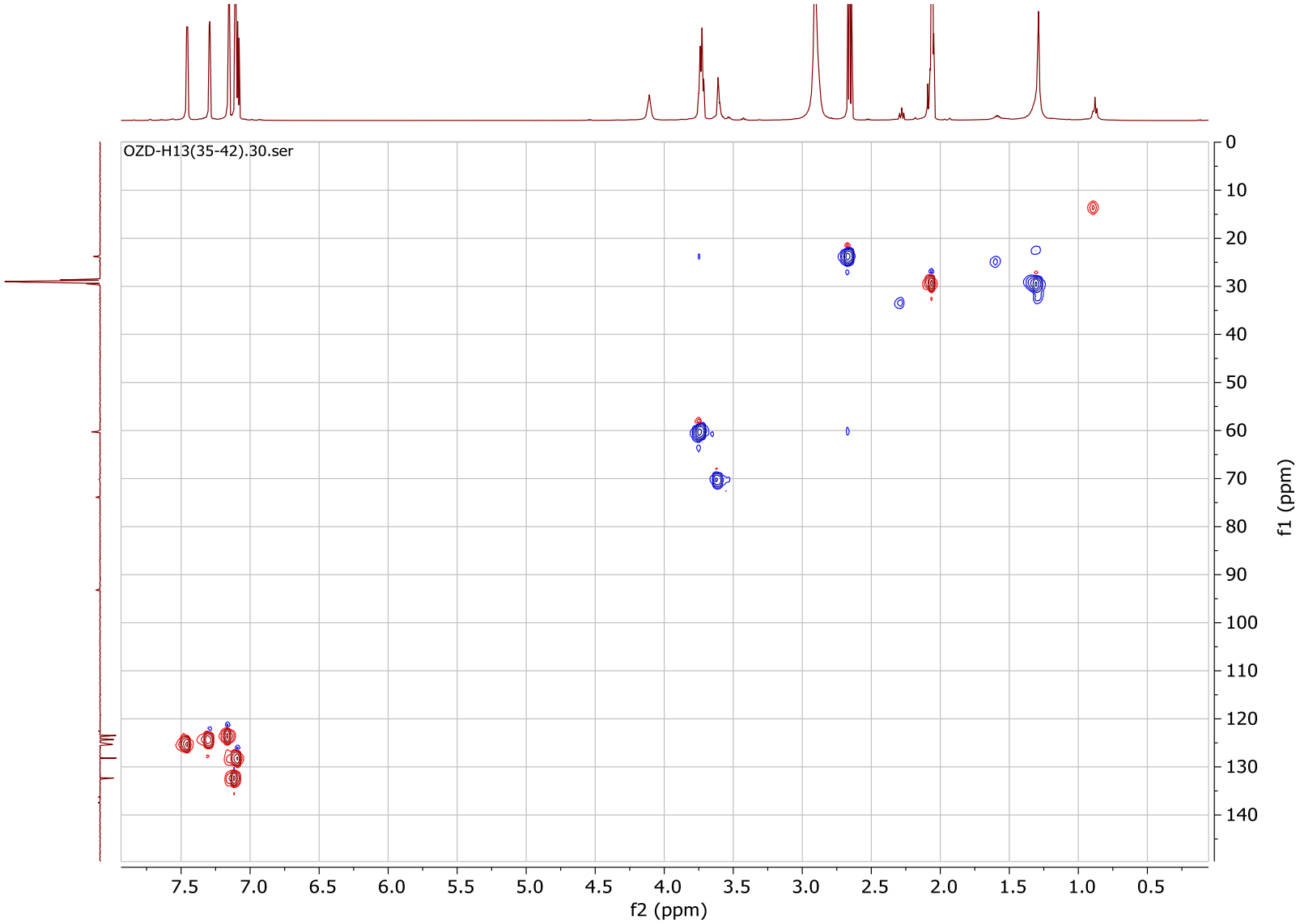
Şekil 44. (5) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu



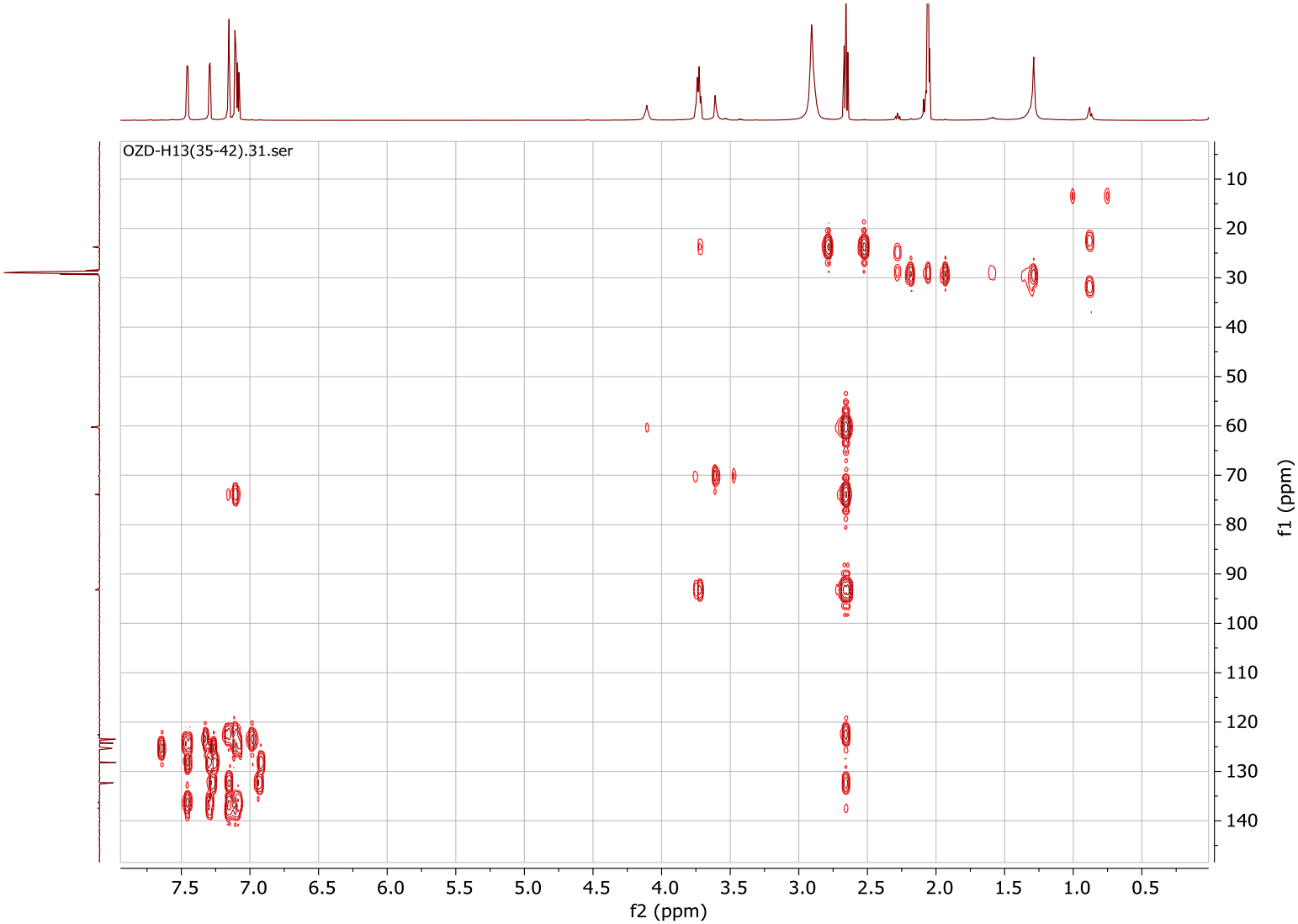
Şekil 45. (5) numaralı bileşiğe ait ^{13}C-NMR APT spektrumu



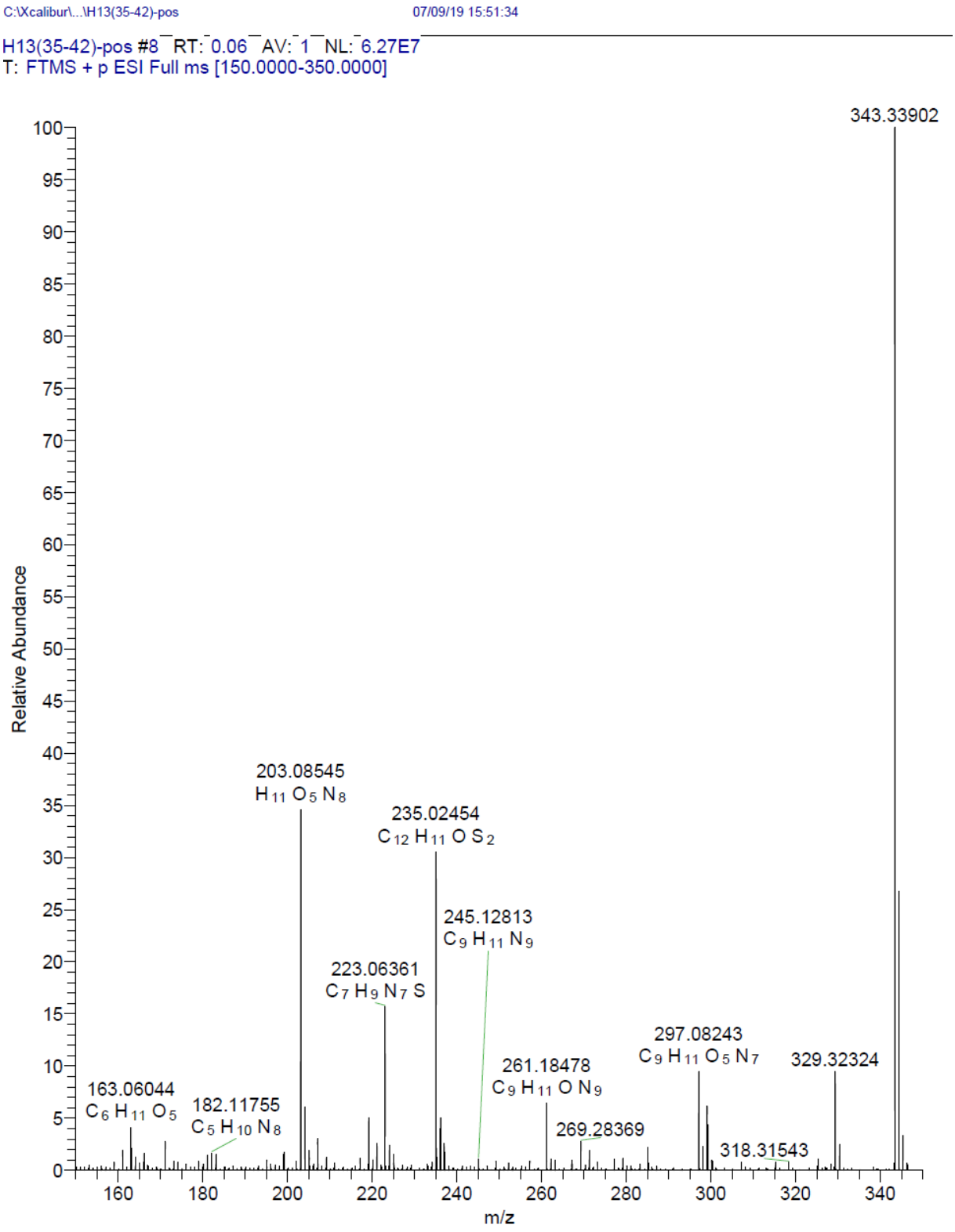
Şekil 46. (5) numaralı bileşiğe ait COSY spektrumu



Şekil 47. (5) numaralı bileşiğe ait HSQC spektrumu



Şekil 48.(5) numaralı bileşiğe ait HMBC spektrumu



Şekil 49. (5) numaralı bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu

SONUÇ

Echinops microcephalus bitkisinin kurutulup öğütülmüş kök kısımları %95 etanolde maserasyon yapılmıştır. Etanol ekstresi su ile seyreltilip dietileter, ardından butanol ile ekstrakte edilmiştir. 6.25 g dietileter ekstresine silika jel dolgu maddesi içeren kolon kromotografisi uygulanmıştır. Farklı polaritelerde toplanan fraksiyonlara tekrar uygulanan kolon kromatografilerinden 5 adet bileşik izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, 2D-NMR ve ESI-MS teknikleri kullanılarak α-tertienil (**1**), Cardopatine (**2**), 3β-OH-(9-11)en-lupeol (**3**), Stigmasterol (**4**), 5-(4-hidroksibut-1-inil)-2,2'-bitiyofen (**5**) olarak aydınlatılmıştır.

Bitkiden izole edilen bileşiklerin AChE enzim aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan Galantamin etken maddesi standart madde olarak kullanılmıştır.

İzole edilen bileşiklerin AChE inhibisyonu sırasıyla α-tertiyenil **(1)** için 0.52 mM; Cardopatine **(2)** için 0.18 mM; 3β-OH-(9-11)en-Lupeol **(3)** için 10.96 mM; Stigmasterol **(4)** için 3.97 mM; 5-(4-hidroksibut-1-inil)-2,2'-bitiyofen **(5)** için ise 0.23 mM IC_{50} değerleri göstermiştir. Standart olarak testte yer alan galantamin bileşiğinin IC_{50} değeri 0.06 mM bulunmuştur.

E. microcephalus bitkisinden izole edilen 5 bileşik içerisinde asetilkolinestaraz enzimini en iyi inhibe etme niteliği taşıyan (**2)** numaralı bileşik olan Cardopatine'dir. Standart olan galantamine kıyasla 3 kat daha az inhibisyon aktivitesine sahiptir. Bunu takiben **(5)** numaralı bileşik olan 5-(4-hidroksibut-1-inil)-2,2'-bitiyofen, galantamine oranla yaklaşık 4 kat az aktivite göstermiştir (Tablo 6).

Tablo 6. İzole edilen bileşiklerin asetilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri

BİLEŞİKLER	AChE IC_{50} (mM)
1	**0.52**
2	**0.18**
3	**10.96**
4	**3.97**
5	**0.23**
Galantamin *	**0.06**

* Standart bileşik

Sonuç olarak; *E. microcephalus* Sm. bitkisinden izole edilmiş üçü tiyofen yapısında, ikisi triterpen yapısında olan beş adet bileşiğin asetilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir. Yapılan testlerde, Galantamin standart bileşiği ile kıyaslandığında Cardopatine (**2**) ve 5-(4-hidroksibut-1-inil)-2,2'-bitiyofen (**5**) sırası ile 0.18 ve 0.23 mM IC_{50} değerleri göstermiş olup orta seviyede AChE inhibisyon aktivitesi sergilemişlerdir.

ÖZET

Günümüzde gelişen teknolojiyle beraber yeni ilaç kaynaklarına yönelim hız kazanmıştır. Bu bağlamda bitkilerden elde edilen bileşikler önemli potansiyel oluşturmaktadır. Son zamanlarda *Echinops* türleriyle yapılan çalışmalarda antimikrobiyal, antioksidan, antikanser gibi etkinliklerinin olduğu görülmüştür. Astaraceae familyasının üyesi olan *Echinops microcephalus* Sm. bitkisinden izole edilen sekonder metabolitlerden olan başlıca tiyofen bileşiklerinin yanı sıra terpenik bileşiklerin yapılarının açıklanması ve biyolojik aktivitenin belirlenmesi amacıyla asetilkolinesteraz inhibisyonu etkinliğinin incelenmesi, bu çalışmanın amacını oluşturmuştur.

2013 yılı Temmuz ayında İstanbul, Silivri mevkinden toplanan *Echinops microcephalus* kurutulmuş sonra öğütülmüş ardından kök kısımları %95 etanolde maserasyon yapılmıştır. Etanol ekstresi su ile seyreltilip dietileter, ardından butanol ile ekstrakte edilmiştir. 6.25 g dietileter ekstresine silikajel dolgu maddesi içeren kolon kromotografisi uygulanmıştır. Farklı polaritelerde toplanan fraksiyonlara tekrar uygulanan kolon kromatografilerinden 5 adet bileşik izole edilmiştir. Bu bileşiklerin yapıları, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, 2D-NMR ve ESI-MS teknikleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Bu bileşiklerden üçünün tiyofen diğer ikisinin triterpen yapısında olduğu anlaşılmıştır.

E. microcephalus bitkisinden izole edilen 5 bileşik içerisinde asetilkolinestaraz enzimini en iyi inhibe etme niteliği taşıyan (**2)** numaralı bileşik olan Cardopatine olup standart galantamine kıyasla 3 kat daha az inhibisyon aktivitesi göstermiştir. Bunu takiben **(5)** numaralı bileşik olan 5-(4-hidroksibut-1-inil)-2,2'-bitiyofen, galantamine oranla yaklaşık 4 kat az aktivite göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Echinops*, tiyofen, triterpen, asetilkolinesteraz inhibisyonu, α-tertiyenil, stigmasterol.

ISOLATION OF THIOPHENE COMPOUNDS FROM *ECHINOPS MICROCEPHALUS* SM. AND INVESTIGATION OF BIOACTIVE PROPERTIES

SUMMARY

Nowadays, with the developing technology, the trend towards new drug sources has accelerated. In this context, compounds isolated from plants constitute significant potential. In recent studies with *Echinops* species, antimicrobial, antioxidant, anticancer activities were found to be. As a member of the family Astaraceae *Echinops microcephalus* Sm. secondary metabolites isolated from the plant; The purpose of this study was to elucidate the structure of thiophened as well as terpenic compounds and to determine the anticholinesterase inhibition activity of the isolated compounds.

Echinops microcephalus collected from Istanbul, Silivri in July 2013 was dried, then ground and macerated in 95% ethanol. The crude extract obtained by maceration was extracted with diethyl eter and butanol, respectively. 6.25 diethyl eter extract was subjected to column chromatography on silica gel. Fractions were obtained by using solvents of different polarity was then subjected to column chromatography to isolate 5 compounds. The structure elucidation of these compounds was achieved using ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, 2D-NMR and ESI-MS techniques. Three of these compounds were thiophenes and the other two were triterpenes.

Acetylcholinestarase inhibition activities of the isolated compounds have been investigated. The investigation showed that the best inhibitor of acetylcholinestarase among five compounds isolated from *E. microcephalus* is Cardopatine (**2**), revealed 3 times less

inhibition activity compared to standard galantamine. Subsequently, compound (**5**), 5- (4-hydroxybut-1-ynyl)-2,2'-bithiophene, showed about 4-fold less activity than galantamine.

Key words: *Echinops*, thiophene, triterpene, acetylcholinesterase inhibition, α-terthienyl, stigmasterol.

KAYNAKLAR

1. Atanasov AG, Waltenberger B, Wenzig EMP, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products. J Biotech Adv 2015;(33):1582–1614.

2. Baytop T. Türkiye'de bitkiler ile tedavi, geçmişte ve bugün. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;1999. s.1-480.

3. Ekim T, Koyuncu M, Erik S, İlarslan R. Türkiye'nin tehlike altındaki nadir ve endemik bitkileri. Ankara:Türkiye Tabiatını Koruma Derneği Yayınları;1989.

4. Faydaoğlu E, Sürücüoğlu MS. Geçmişten günümüze tıbbi ve aromatik bitkilerin kullanılması ve ekonomik önemi. Kastamonu Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi 2011;11(1):52-67

5. http://www.turktob.org.tr/dergi/makaleler/dergi17/TTOB_Dergi17_WEB-66_69.pdf (Erişim tarihi: 12.05.2019)

6. Thomford NE, Dimakatso ID, Senthebane A, Rowe A, Munro D, Seele P, Maroyi A, Dzobo K. Natural products for drug discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. Int J Mol Sci 2018;19:1578.

7. World Health Organization (WHO). Traditional Medicine Strategy 2002-2005. Geneva;2002;1.

8. Farnsworth NR, Akerele O, Bıngel AS, Soejarto DD, Zhengang GuO. Medicinal plants in therapy. Bulletin of the World Health Organization 1985;63(6):965-981.

9. Rahman AHMM, Alam MS, Hossain MB, Nesa MN, Rafiul Islam AKM, Matiur Rahman M. Study of species diversity on the family *Asteraceae (Compositae*) of the Rajshahi Division. Res. J. Agric. Biol. Sci 2008;4(6):794-797.

10. Vural C, Şapcı H. Five new records of the genus *Echinops(Asteraceae)* from Turkey. Turk J Bot 2012;(36):151-160.

11. Sneader W, Drug discovery: A History. Wiley. West Sussex, 2005.

12. Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads. Biochim Biophys Acta 2013;(1830):3670–3695.

13. Beutler JA, Natural products as a foundation for drug discovery. Curr Protoc Pharmacol 2009;46:(9-11,1–9,21).

14. David B, Wolfender JL, Dias DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. Phytochem 2015;14(2):299–315.

15. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. J Nat Prod 2012;(75):311–335.

16. Kinghorn AD, Pan L, Fletcher JN, Chai H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. J Nat Prod 2011;(74):1539–1555.

17. Klayman DL, Lin AJ, Acton N, Scovill JP, Hoch JM, Milhous, WK. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. J Nat Prod 1984;47: 715–717.

18. Bucar F,Wube A, Schmid M. Natural product isolation: How to get frombiological material to pure compounds. Nat Prod Rep 2013;30:525–545.

19. Jones WP, Kinghorn AD. Extraction of plant secondary metabolites methods. Mol Biol 2012;864:341–366.

20. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. J Nat Prod 2004;67:2141–2153.

21. Henrich CJ, Beutler JA. Matching the power of high throughput screening to the chemical diversity of natural products. Nat Prod Rep. 2013;30:1284–1298.

22. Li JW, Vederas JC. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier Sci 2009;325:161–165.

23. Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. Nat Rev Drug Discov 2005;4:206–220.

24. Balunas MJ, Su B, Landini S, Brueggemeier RW, Kinghorn AD. Interference by naturally occurring fatty acids in a noncellular enzyme-based aromatase bioassay. J Nat Prod 2006;69:700–703.

25. Zhu M, Phillipson JD, Greengrass, PM, Bowery, NE, Cai Y. Plant polyphenols: biologically active compounds or non-selective binders to protein Phytochem 1997;44: 441–447.

26. Zou L, Harkey MR, Henderson GL. Effects of intrinsic fluorescence and aquenching on fluorescence-based screening of natural products. Phytomed 2002;9:263–267.

27. Henrich CJ, Bokesch HR, Dean M, Bates SE, Robey RW, Goncharova EI, et al. A high-throughput cell-based assay for inhibitors of ABCG2 activity. J Biomol Screen. 2006;11:176–183.

28. Cardellina JH, Munro MH, Fuller RW, Manfredi KP, McKee TC, Tischler M. A chemical screening strategy for the dereplication and prioritization of HIV-inhibitory aqueous natural products extracts. J Nat Prod 1993;56:1123–1129.

29. Collins RA, Ng TB, Fong WP, Wan CC, Yeung HW. Removal of polyphenolic compounds from aqueous plant extracts using polyamide minicolumns. Biochem Mol Biol. Int 1998;45:791–796.

30. Hermann JC, Chen Y, Wartchow C, Menke J, Gao L, Gleason SK. Metal impurities cause false positives in high-throughput screening campaigns. ACS Med Chem Lett 2013;4:197–200.

31. Fernando DR, Marshall AT, Forster PI, Hoebee SE, Siegele R. Multiple metal accumulation within a manganese-specific genus. Am J Bot 2013;100:690–700.

32. Eisenberg DM, Harris ES, Littlefield BA, Cao S, Craycroft JA, Scholten R, et al. Developing a library of authenticated Traditional Chinese Medicinal (TCM) plants for systematic biological evaluation: rationale, methods and preliminary results from a Sino-American collaboration. Fitoterapia 2011;82:17–33.

33. Corson TW, Crews CM. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: triumphs and trials. J Cell 2007;130(5):769–774.

34. Dewick PM. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. John Wiley and Sons, New York:1997.p.1-306.

35. Bernards MA. Plant natural products: a primer. Can J Zool 2010;88:601–614.

36. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci 2001;161:839–851.

37. Saxena M, Saxena J, Nema J, Singh D, Gupta A. Phytochemistry of medicinal plants. J Pharmacog and Phytochem 2013;(1):6.

38. Baytop, A. Farmasötik Botanik Kitabı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları; 1996.s.58.

39. Davis PH, Mill RR, Tan K. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Vol.10, Edinburgh: Edinburgh University Press; 1988. p.1-600.

40. Güner A, Özhatay N, Ekim T, Baser KHC. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Supplement II Vol 11. Edinburg: Edinburg University Press; 2000.

41. Pınar SM. *Centaurea sintenisiana* Gand. A new record for the family *Asteraceae (Compositae*) from Turkey. Int Res J Nat Appl Sci 2016;21(2):75-82.

42. Vural C, Dadandı MY. Türkiye *Echinops* L. (*asteraceae*) türlerinin taksonomik revizyonu. Erciyes Üniv Fen Bilm Derg; Kayseri, 2010.

43. Hymete A, Iversen TH, Rohloff J, Erko B. Screening of *Echinops ellenbeckii* and *Echinops longisetus* for Biological activities and chemical constituents. Phytomed 2005;12:675-679.

44. Toroğlu S, Keskin D, Vural C. Comparison of antimicrobial activity of *Echinops viscosus subsp. bithynicus* and *E.microcephalus* leaves and flowers extracts from Turkey. Int J Agric Biol 2012;14(4):637- 640.

45. Şapçı H, Vural C. *Echinops phaeocephalus* (*Asteraceae*) türünün antimikrobiyal ve antioksidan aktivitesi. J Nat Sci 2017;20(4):355-360.

46. Ameya G, Gure A, Dessalegn E. Antimicrobial activity of *Echinops kebericho* against human pathogenic bacteria and fungi. Afr J Tradit Complement Altern 2016;13(6):199-203.

47. Senejoux F, Demougeot C, Karimov U, Muyard F, Kerramb P, Aisa HA, et al. Chemical constituents from *Echinops integrifolius* Biochem Syst Ecol 2013;47:42–44.

48. Papadopoulou P,Couladis M, Tzakou O. Essential oil composition of two Greek *Echinops* species: *E. graec*us Miller and *E. ritro* L. J Essent Oil Res 2006;18:242-243.

49. Jaiswal R, Kiprotich J, Kuhnert N. Determination of the hydroxycinnamate profile of 12 members of the Asteraceae family. Phytochem 2011;72:781–790.

50. Kuete V, Krusche B, Youns M, Voukeng I. Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts. J Ethnopharmacol 2011;134:803–812.

51. Jin W, Shi Q, Hong C, Cheng Y. Cytotoxic properties of thiophenes from *Echinops grijissi* Hance. Phytomed 2008;15:768–774.

52. WangY, Li X, Li LH, Meng DH, Li ZL, Li N. Two new thiophenes from *Echinops latifolius* and their phototoxic activities. Planta Med 2007;73(7):696-698.

53. Patel AJ, Patel AM, Patel AA, Patel J, Patel S. Comparative diuretic activity of root and aerial part methanolic extracts of *Echinops echinatus* Roxb. Der Pharmacia Lettre 2011;3(5):168-172.

54. Bouattour E, Fakhfakh J, Dammak DF, Jabou K, Damak M, Jarraya RM. Hexane extract of *Echinops spinosissimus* Turra subsp. spinosus from Tunisia: a potential

source of acetylated sterols - investigation of its biological activities. Chem Biodivers 2016;13(12):1674-1684.

55. Erenler R, Yilmaz S, Aksit H, Sen O, Genc N, Elmastas M, Demirtas I. Antioxidant activities of chemical constituents isolated from *Echinops orientalis Trauv*. Rec Nat Prod 2014;8:32–36.

56. Abdulrazzaq MF, Khadeem EJ, Al- Muhammadi SS. Hepatoprotective effect of *Echinops tenuisectus* (*Composi*tae) on CCl_4 induced hepatic damage in rats. Iraqi J Pharm Sci 2008;17-1.

57. Abdulmohsin H, Raghif AA, Manna MJ. The protective effects of *Echinops heterophyllus* aqueous extract against methotrexate-induced hepatotoxicity in rabbits Asian J Pharm Clin Res 2019;12-1.

58. Mohseni S, Sani AM, Tavakoli M, Raoufi AM. Effect of extraction conditions on antioxidant activities of *Echinops persicus*. J Essent Oil Bear Pl 2017;20(6):1633-1644.

59. Harborne JB. Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis Chapman and Hall in association with Methuen, Inc. 733 Third Avenue, New York; 1973. p.33-119.

60. Kahraman A, Serteser M, Koken T. Flavonoidler. The Medical Journal of Kocatepe 2002;3: 01-08.

61. Hamuel J. Phytochemicals: extraction methods, basic structures and mode of action as potential chemotherapeutic agents. Phytochem 2012;1-34.

62. Sabrin RM, Hossam MA, El-Halawany AM, Mohamed GA. Naturally occurring thiophenes: isolation, purification, structural elucidation, and evaluation of bioactivities. Phytochem 2016;15:197–220.

63. Chaudhary A, Jha K, Kumar S. Biological diversity of thiophene: A review. J Adv Sci Res 2012;3:3–10.

64. Mishra R, Jha K, Kumar S, et al. Synthesis, properties and biological activity of thiophene: A review. Der Pharma Chemica 2011;3:38–54.

65. Tang C, Wat C, Towers G. Thiophenes and benzofurans in the undisturbed rhizosphere of *Tagetes patula* L. Plant Soil 1987;98:93–97.

66. Zechmeister L, Sease J. A blue-fluorescing compound, terthienyl, isolated from marigolds. J Biol Chem 1947;69:273–275.

67. Bohlmann F, Zdero C. Naturally occurring thiophenes. In: Weissberger A, Taylor EC (Eds.) Thiophene and its derivatives. New York: Wiley; 1985. p.261.

68. Kagan J. Naturally occurring di- and trithiophenes. Progress in the chemistry of organic natural products. Vienna: Springer;1991.p.1-68.

69. Bohlmann F. Naturally-occurring acetylenes. In: Lam J, Breteler H, Arnason T, Hansen L (Eds.) Naturally occurring acetylenes and related compounds. Amsterdam: Elsevier;1998. p.1.

70. Margl L, Eisenreich W, Adam P. Biosynthesis of thiophenes in *Tagetes patula*. Phytochem 2001;58:875–881.

71. Minto RE, Blacklock BJ. Biosynthesis and function of polyacetylenes and allied natural products. Prog Lipid Res 2008;47:233–306.

72. Jacobs JJ, Arroo RR, De Koning EA. Isolation and characterization of mutants of thiophene synthesis in *Tagetes erecta*. Plant Physiol 1995;107:807–814.

73. Jente R, Richter E, Bosold F, Olatunji GA. Experiments on biosynthesis and metabolism of acetylenes and thiophenes. In: Lam J, Breteler H, Arnason T, Hansen L (Eds.) Naturally occurring acetylenes and related compounds. Amsterdam: Elsevier; 1988. p.187.

74. Bohlmann F, Burkhardt T, Zdero C. Distribution of acetylenes. I. Compositae. In: Naturally occuring acetylenes. London: Academic Press; 1973;340.

75. Erek E, Süleymanlılar G. Temel iç hastalıkları. İliçin G (Editör). Ankara: Güneş Kitabevi; 1996. s.3997.

76. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji (12. Baskı). Türkiye: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti 2009. s.915-916.

77. Morris JC. Alzheimer hastalığının klinik sunum ve seyri: Alzheimer hastalığı. Terry RD, ABD, 1999;11-24 11S.

78. Shen ZX. Brain cholinesterases: II. the molecular and cellular basis of Alzheimer's disease. J Mehy 2004;63:308-321.

79. Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. Lancet 2005;366.

80. Brookmeyer R, Johnson E, Ziegler-Graham K, Arrighi HM. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease. J Jalz 2007;3.

81. Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K et al. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. J Bio Med 2001;322.

82. Özkay ÜD, Öztürk Y, Can ÖD. Yaşlanan dünyanın hastalığı: Alzheimer hastalığı. SDÜ. Tıp Fak Derg 2011;18(1):35-42.

83. Alzheimer's Association 2019. Alzheimer's disease facts and figures, 2019;15(3):321–387.

84. Cahill MK, Huang EJ. Testing the amyloid hypothesis with a humanized ad mouse model. J Neuron 2017;93(5):987–989.

85. Ryan NS, Rossor MN. Correlating familial Alzheimer's disease gene mutations with clinical phenotype. Biomark Med 2010;4:99-112.

86. Sanabria-Castro A, Alvarado-Echeverrıá I, Monge-Bonilla C. Molecular pathogenesis of Alzheimer's disease: an update. Ann Neuroci 2017;24:46–54.

87. Simic G, Babic LM, Wray S, Harrington C, Delalle I, Jovanov-Milosevic N et al. Tau protein hyperphosphorylation and aggregation in Alzheimer's disease and other tauopathies, and possible neuroprotective strategies. Biom 2016;6:1–28.

88. Calcul L, Zhang B, Jinwal UK, Dickey CA, Baker BJ. Natural products as a rich source of tau-targeting drugs for Alzheimer's disease. Future Med Chem 2012;4(13):1751-1761.

89. Takahashi JA, Sande D, Silva Lima G, Moura MAF, Lima MTNS. Fungal metabolites as promising new drug leads for the treatment of Alzheimer's disease. In: Rahman AU (Eds). Studies in Natural Products Chemistry. Amsterdam: Elsevier; 2019;62:1–39.

90. Tohgi H, Abe T, Hashiguchi K, Saheki M, Takahashi S. Remarkable reduction in acetylcholine concentration in the cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer type dementia. Neurosci Lett 1994;177:139–142.

91. Schliebs R, Arendt T. The significance of the cholinergic system in the brain during aging and in Alzheimer's disease. J. Neural Transm 2006;113:1625–1644.

92. Mufson EJ, Counts SE, Perez SE, Ginsberg SD. Cholinergic system during the progression of Alzheimer's disease: therapeutic implications, Expert Rev. Neurother 2008;8:1703-1718.

93. Serrano-Pozo A, Frosch MP, Masliah E, Hyman BT. Neuropathological alterations in Alzheimer disease. Cold Spring Harb. Perspect. Med 2011;1.

94. Colovic MB, Krstic DZ, Lazrevic-Pasti TD, Bondzic AM, Vasic VM. Acetylcholinesterase inhibitors. Curr Neuropharmacol 2013;11:315–335.

95. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. Curr Neuropharmacol 2006;25:1-102.

96. Watkins PB, Zimmerman HJ, Knapp MJ, Gracon SI, Lewis KW. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with alzheimer's disease, J Am Med Assoc 1994;271:992-998.

97. Simoni E, Daniele S, Bottegoni G, Pizzirani D, Trincavelli ML, Goldoni L et al. Combining galantamine and memantine in multitargeted, new chemical entities potentially useful in alzheimer's disease. J Med Chem 2012;55:9708-9721.

98. Homma A, Atarashi H, Kubota N, Nakai K, Takase T. Efficacy and safety of sustained release donepezil high dose versus immediate release donepezil standard dose in

japanese patients with severe Alzheimer's disease: a randomized, double-blind trial. J Alzheimers Dis 2016;52:345–357.

99. De Ferrari GV, Von Bernhardi R, Caldero´n FH, Luza SC, Inestrosa NC. Responses induced by tacrine in neuronal and non-neuronal cell lines. J Neurosci Res 1998;52:435-444.

100. Cacabelos R. Donepezil in Alzheimer's disease: from conventional trials to pharmacogenetics. Neuropsychiatr Dis Treat 2007;3:303-333.

101. Seltzer B, Zolnouni P, Nunez M, Goldman R, Kumar D, Ieni J et al. Efficacy of Donepezil in Early-Stage Alzheimer Disease: A Randomized Placebo-Controlled Trial. Arch Neurol 2004;61:1852-1856.

102. Schneider LS. A critical review of cholinesterase inhibitors as a treatment modality in Alzheimer's disease, Dialogues Clin. Neurosci 2000;2:111–128.

103. Srinivas NR. Transdermal rivastigmine delivery for alzheimer disease: amenability of exposure predictions of rivastigmine and metabolite, by linear regression model using limited samples. Clin Neuropharmacol 2016;39:169–177.

104. Onor ML, Trevisiol M, Aguglia E, Rivastigmine in the treatment of Alzheimer's disease: an update, Clin Interv Aging, 2007;2:17–32.

105. Raskind MA, Peskind ER, Wessel T, Yuan W. Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension, Neurology 2000;54:2261–2268.

106. Lilienfeld S. Galantamine-a novel cholinergic drug with a unique dual mode of action for the treatment of patients with Alzheimer's disease. CNS Drug Rev 2002;8:159-176.

107. Holzgrabe U, Kapkova P, Alptuzun V, Scheiber J, Kugelmann E. Targeting acetylcholinesterase to treat neurodegeneration. Expert Opin. Ther. Targets 2007;11:161–179.

108. Ashani Y, Peggins J, Doctor BP. Mechanism of inhibition of cholinesterases by Huperzine A. Biochem Biophys Res Commun 1992;84:719–726.

109. Kitisripanya N, Saparpakorn P, Wolschann P, Hannonqbua S. Binding of Huperzine A and galanthamine to acetylcholinesterase, based on ONIOM method, J Nano 2011;7:60–68.

110. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Latha LY. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants. Extracts Afr J Tradit Complement Altern Med 2011;8(1):1-10.

111. Coskun O. Separation techniques: chromatography. J Nci 2016;3(2):156–60.

112. Poole CF. The column in liquid chromatography the essence of chromatography. Michigan Elsevier; 2003, p. 267-429.

113. http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/296.pdf (Erişim tarihi:10.05.2019)

114. Balcı M, Basic ^{1}H- and ^{13}C-NMR Spectroscopy, Elsevier, Amsterdam, 2005:3-75.

115. Williamson KL, Minard RD, Masters KM (Çeviri: T. Uyar, ÖA. Çalışkan). Büyük Ölçekli ve Küçük Ölçekli Organik Kimya Deneyleri. Ankara: Palme Yayıncılık;2013. s.172-292.

116. Solomons G, Fryhle C (çeviri: G. Okay, Y. Yıldırır). Organik Kimya. İstanbul: Literatür Yayıncılık;2002. s.366-428.

117. Targett NM, Kilcoyne JP, Green B. Vacuum liquid chromatography: an alternative to common chromatographic methods. J Org Chem 1979;44(26):4962–4964.

118. Ellman GL, Courtney KD, Andrea V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinerase activity. Biochem Pharmacol 1961;7:88-95.

ŞEKİLLER

Şekil 1. *Echinops microcephalus'a* ait habitus fotoğrafı……8
Şekil 2. Flavonoit iskeleti…….13
Şekil 3. Terpenlerin biyosentezi-1……18
Şekil 4. Terpenlerin biyosentezi-2……19
Şekil 5. Tiyofen yapıları……...20
Şekil 6. Tiyofen biyosentezi -1…….22
Şekil 7. Tiyofen biyosentezi- 2…….....23
Şekil 8. Echinops türlerinden izole edilen bileşikler……25
Şekil 9. Normal ve Alzheimer hastalığındaki beyin……...……..27
Şekil 10. Amiloid hipotezi ile yığılmış Aβ fragmentlerinin oluşumu……..28
Şekil 11. Tau hipotezi ile yığılmış Tau proteinin oluşumu……..…….28
Şekil 12. Kolinerjik hipotez……..29
Şekil 13. Asetilkolinesteraz enziminin yapısı (Glu-glutamik asit; His-histidin; Ser-serin)….30
Şekil 14. Asetilkolinesteraz inhibitörleri……..31
Şekil 15. Ellman metodu……...41
Şekil 16. Fraksiyon ve izolasyon şeması……..45
Şekil 17. Dietileter ekstresindeki bileşiklerin izolasyon şeması……...49
Şekil 18. α-tertiyenil…….50
Şekil 19. (1) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu……...52
Şekil 20. (1) numarali bileşiğe ait ^{13}C-NMR spektrumu……..53
Şekil 21. (1) numarali bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu……54

Şekil 22. (2) numaralı bileşik……55
Şekil 23. (2) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu……...56
Şekil 24. (2) numaralı bileşiğe ait ^{13}C-NMR APT spektrumu……..57
Şekil 25. (2) numaralı bileşiğe ait COSY spektrumu……...58
Şekil 26. (2) numaralı bileşiğe ait HSQC spektrumu……...59
Şekil 27. (2) numaralı bileşiğe ait HMBC spektrumu……..60
Şekil 28. (2) numarali bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu……61
Şekil 29. (3) numaralı bileşik……62
Şekil 30. (3) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu……...64
Şekil 31. (3) numaralı bileşiğe ait ^{13}C-NMR spektrumu……..65
Şekil 32. (3) numaralı bileşiğe ait COSY spektrumu……...66
Şekil 33. (3) numaralı bileşiğe ait HSQC spektrumu……...67
Şekil 34. (3) numaralı bileşiğe ait HMBC spektrumu……..68
Şekil 35. (3) numarali bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu……69
Şekil 36. (4) numaralı bileşik……70
Şekil 37. (4) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu……...72
Şekil 38. (4) numaralı bileşiğe ait COSY spektrumu……...73
Şekil 39. (4) numaralı bileşiğe ait ^{13}C-NMR APT spektrumu……..74
Şekil 40. (4) numaralı bileşiğe ait HSQC spektrumu……...75
Şekil 41. (4) numaralı bileşiğe ait HMBC spektrumu……..76
Şekil 42. (4) numarali bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu……77
Şekil 43. (5) numaralı bileşik……78
Şekil 44. (5) numaralı bileşiğe ait ^{1}H-NMR spektrumu……...79
Şekil 45. (5) numaralı bileşiğe ait ^{13}C-NMR APT spektrumu……..80
Şekil 46. (5) numaralı bileşiğe ait COSY spektrumu……...81
Şekil 47. (5) numaralı bileşiğe ait HSQC spektrumu……...82
Şekil 48. (5) numaralı bileşiğe ait HMBC spektrumu……..83
Şekil 49. (5) numarali bileşiğe ait ESI-MS kütle spektrumu……84

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Kırklareli'nde doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Kırklareli'nde tamamladım. Liseyi, 2007 yılında Kırklareli Fen Lisesi'nde bitirdim. Lisans eğitimimi Eskişehir Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde 2013 yılında tamamladım. Daha sonra aynı üniversitede Açıköğretim Programı İşletme Fakültesi İşletme bölümünü bitirdim. Halen Trakya Üniversitesi Eğitim Uygulama ve Araştırma Hastanesi'nde Eczacı olarak görev yapmaktayım.