İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRANGOS ILANAE VE *HERACLEUM PLATYTAENIUM* BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU, ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Demet DİNCEL

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

HAZİRAN 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PRANGOS ILANAE VE *HERACLEUM PLATYTAENIUM* BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU, ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Demet DİNCEL
(509081211)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06 Mayıs 2011
Tezin Savunulduğu Tarih : 07 Haziran 2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof.Dr.Turan ÖZTÜRK (İTÜ)
Prof.Dr. Ayhan ULUBELEN (İÜ)

HAZİRAN 2011

Canım aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda destek veren, tez çalışmam sırasında uygun ortam sağlayan ve yönlendiren, engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya bana olan desteği için teşekkür ederim.

Tezimde çalıştığım bitkilerin toplanması ve teşhis edilmesinde emeği geçen Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ'ye teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanmasında, tüm NMR spektral analizlerini yapan Boğaziçi Üniversitesi İleri Araştırmalar Laboratuarından Ayla TÜRKEKUL'a ve Burcu Selen Çağlayan'a teşekkür ederim.

Aktivite çalışmalarımda bana yardımcı olan Batman Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Araştırma Görevlilerinden Dr. Mehmet BOĞA'ya ve Yüksek Kimyager Seda Damla Hatipoğlu'na ilgisi ve desteği için çok teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince deneylerimde bana yol gösteren, bilgisini ve zamanını benimle paylaşan doktora öğrencisi Fatemeh Bahadori'ye, çalışmalarımın her aşamasında yardımları ve dostluklarıyla yanımda olan aynı laboratuvarı paylaştığım sevgili arkadaşlarım Tuba Kuşman, Burcu Çulhaoğlu, Anıl Yılmaz, Begüm Çakar, Tuba Başkan, İmran Güngördü ve Kerem Karakuş'a teşekkür ederim.

Dostluklarıyla her zaman yanımda olan, zorluklar karşısında beni teşvik eden sevgili arkadaşlarım Zeynep Beyazkılıç ve İpek Alşan'a destekleri ve ilgileri için teşekkür ederim.

Hayatımın tüm evrelerinde olduğu gibi tez çalışmam boyunca da benden maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, yanımda olduklarını her zaman hissettiğim sevgili aileme anlayışları ve destekleri için sonsuz kez teşekkür ederim.

Demet Dinçel

Mayıs 2011 Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
KISALTMALAR ..... **xi**
SEMBOLLER ..... **xvi**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xiv**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xvi**
ÖZET ..... **xıx**
SUMMARY ..... **xxi**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1 Botanik Bilgiler 3
2.1.1 Apiaceae (Umbelliferae) familyası ..... **Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
2.1.2 *Prangos* cinsi 4
2.1.3 *Prangos ilanae* 4
2.1.4 *Heracleum* cinsi 4
2.1.5 *Heracleum platytaenium* 5
2.2 *Prangos* ve *Heracleum* Türlerinin Halk Arasındaki Kullanılışı 5
2.2.1 *Prangos* cinsi 5
2.2.2 *Heracleum* cinsi 5
2.3 *Prangos* ve *Heracleum* Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Aktivite Çalışmaları 6
2.3.1 *Prangos* cinsi 6
2.3.2 *Heracleum* cinsi 8
2.4 Sekonder Metabolitler 10
2.4.1 Terpenler 10
2.4.1.1 Triterpenoidler(C-30) 11
2.4.2 Steroidler 12
2.4.3 Fenolik bileşikler ve flavonoidler 13
2.4.3.1 Fenoller ve fenolik asitler 13
2.4.3.2 Fenilpropanoidler 14
2.4.3.3 Flavonoidler 15
2.4.4 Kumarinler 15
2.4.4.1 Benzen halkası üzerinde substitüent taşıyan kumarinler 18
2.4.4.2 Piron halkası üzerinde substitüent taşıyan kumarinler 19
2.4.4.3 Hem benzen hem de piron halkası üzerinde substitüent taşıyan kumarinler 19
2.4.4.4 Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler 20

2.4.4.5 Piron halkası ile halkalı yapıların kondenzasyonu sonucu meydana gelen kumarinler 21
2.4.4.6 Dimer kumarinler 21
2.5 Antioksidanlar 21
2.6 Antikolinesterazlar 26
2.6.1 Alzheimer Hastalığı ve Nedenleri 26
2.6.2 AChE ve BChE 29
3. GEREÇ VE YÖNTEM 31
3.1 Bitkisel Materyaller 31
3.2 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler ..... 3**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler 31
3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması 31
3.2.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler 31
3.2.2.2 Toplam flavanoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler 32
3.2.2.3 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler 32
3.2.2.4 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler 32
3.2.2.5 Standart çözeltilerin hazırlanması 33
3.2.2.6 İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi 34
3.3 Cihaz ve Gereçler 34
3.4 Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçerik Miktar Tayinleri 34
3.4.1 Toplam fenolik miktar tayini 34
3.4.2 Toplam flavonoid miktar tayini 35
3.5 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 36
3.5.1 DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi yöntemi 36
3.5.2 β-karoten-linoleik asit yöntemi (lipid peroksidasyon inhibisyonu aktivitesi) 37
3.6 Antikolinesteraz Aktivite Yöntemi 37
3.6.1 Ellman yöntemi 37
3.7 İstatiksel hesaplamalar 38
3.8 Kromatografik Yöntemler 38
3.8.1 Kolon kromatografisi 38
3.8.2 İnce Tabaka Kromatografisi 39
3.9 Spektroskopik Yöntemler 40
3.9.1 NMR spektroskopisi 40
4. DENEYSEL BÖLÜM 41
4.1 Bitkilerin Ekstre Edilmesi 41
4.2 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavanoid Miktar İçeriklerinin Belirlenmesi 43
4.2.1 Toplam Fenolik Miktar Tayini 43
4.2.2 Toplam Flavaonoid Miktar Tayini 43
4.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 44
4.3.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesinin Belirlenmesi 44
4.3.2 Lipid Peroksidasyon Aktivitesinin Belirlenmesi 45
4.4 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi 45
4.4.1 AChE Aktivite Testi 45
4.4.2 AChE % inhibisyon testi 46
4.4.3 BChE aktivite testi 47
4.4.4 BChE % inhibisyon testi 47
4.5 *Prangos ilanae ve Heracleum platytaenium* Bitkilerinin İzolasyon ve

Saflaştırma Çalışmaları 48
4.5.1 *Prangos ilanae* bitkisinin metanol ekstresinin fraksiyonlandırılması..... 48
4.5.2 Heracleum platytaenium bitkisinin toprak üstü kısmının petrol eteri ve metanol ekstrelerinin fraksiyonlandırılması..... 48
5. BULGULAR 49
5.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavanoid Miktar Sonuçları 49
5.2 Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları 49
5.2.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları..... 49
5.2.2 Lipid Peroksidasyon İnhibisyon(β-karoten renk açılımı)Testi Sonuçları..50
5.2.3 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları..... 51
5.3 Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri 53
5.3.1 Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri 54
5.3.1.1 PIM-17-18-2-3 = α-amiril tetracosanoat..... 54
5.3.1.2 PIM-23-3 = α-amirin= Urs-12-en-3β-ol..... 55
5.3.1.3 PIM-55-2= 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en 56
5.3.1.4 HPE-35-1-3-1-2=Psoralen 56
5.3.1.5 HPE-38-KS-2-1-1=Bergapten=5-metoksipsoralen..... 57
5.3.1.6 HPE-46-48-3-2-1=Xanthotoxin=8-metoksipsoralen 59
5.3.1.7 HPE-KS-48-2-1=Pimpinellin..... 60
5.3.1.8 HPE-(49-50)-4=Isopimpinellin=5,8-dimethoxypsoralen..... 61
5.3.1.9 HPE-(51-56)-3-1=Sphondin..... 62
5.3.1.10 HPE-(46-48-4-3-2-2)= Stigmasterol 63
5.3.1.11 HPE-82-3=8-metoksi-oxypeucedanin hidrat 64
5.3.1.12 HPE-32-33-1-1= Apterin 66
5.4 İzole Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları..... 69
5.4.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları..... 69
5.4.2 β-Karoten-Linoleik Asit (Lipid Peroksidasyon % İnhibisyon) Toplam Antioksidan Aktivitesi Sonuçları 70
5.4.3 Antikolinesteraz Aktivitesi Sonuçları 71
6. SONUÇ VE TARTIŞMA.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
KAYNAKLAR .....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EKLER.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
ÖZGEÇMİŞ..... 117

KISALTMALAR

ACh: Asetilkolin
AChE: Asetilkolinesteraz enzimi
AcI: Asetikolin iyodür
A•: Antioksidan radikaller
AH: Birincil antioksidanlar
APT: Attached proton test
APP: Amiloid beta prekürsör proteini
BCh: Butirilkolin
BChE: Butirilkolinesteraz enzimi
BHA: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT: Bütillenmiş hidroksi toluen
DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dk: Dakika
DNA: Deoksiriboz nükleik asit
DPPH: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA: Etilendiamintetraasetik asit
FCR: Folin Ciocalteu fenol reaktifi
HMBC: Heteronuclear multiple bond coherence
HMQS: Heteronuclear multiple quantum coherence (HSQC)
HPE: *Heracleum platytaenium* petrol eteri ekstresi
HPM: *Heracleum platytaenium* metanol ekstresi
IR: Infrared spektroskopisi
İTK: İnce tabaka kromatografisi (TLC)
ln: Doğal logaritma
MeOH: Metanol
NADH: Nikotinamitadenindinükleotit
NMR: Nükleer magnetik rezonans
O2• : Süperoksit radikali
OH•: Hidroksil radikali
PE: Petrol eteri
PEs: Pirokatekole eşdeğer
PIM: Prangos ilanae metanol ekstresi
Q: Kersetin
QEs: Kersetine eşdeğer
R•: Alkil radikalleri
RO•: Alkoksi radikalleri
ROO•: Peroksit radikalleri
ROOH: Hidroperoksitler
ROS: Reaktif oksijen türleri
RNS: Reaktif azot türleri
RS•: Tiyil radikalleri
RSO•: Sülfenil radikalleri

RSO2•: Tiyil peroksit radikalleri
s: Saat
subsp: Subspecies
TMS: Tetrametilsilan
TOC: α-Tokoferol
Tween-40: Polioksietilensorbitan monopalmitat
UV: Ultraviyole spektroskopisi

SEMBOLLER

Cm	**:** Santimetre
ºC	**:** Santigrat derece
g	**:** Gram
L	**:** Litre
ln	**:** Doğal logaritma
M	**:** Metre
µg	**:** Mikrogram
µL	**:** Mikrolitre
Mg	**:** Miligram
mL	**:** Mililitre
Mm	**:** Milimetre
mM	**:** Milimolar
M	**:** Molar
Nm	**:** Nanometre
ppm	**:** Milyonda bir birim

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : *Prangos* türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları 7
Çizelge 2.2 : *Heracleum* türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları 9
Çizelge 2.3 : Terpenlerin sınıflandırılması 11
Çizelge 5.1 : Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktar sonuçları 49
Çizelge 5.2 : Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları 50
Çizelge 5.3 : Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları 51
Çizelge 5.4 : Ekstrelerin asetilkolinesteraz aktivite sonuçları(% İnhibisyon) 51
Çizelge 5.5 : Ekstrelerin butirilkolinesteraz aktivite sonuçları(% İnhibisyon) 52
Çizelge 5.6 : Saf bileşikler ve miktarları 53
Çizelge 5.7 : Psoralen bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri($CDCl_3$) 57
Çizelge 5.8 : Bergapten bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri ($CDCl_3$) 58
Çizelge 5.9 : Xanthotoxin bileşiği ^{1}H NMR verileri($CDCl_3$) 59
Çizelge 5.10: Pimpinellin bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri($CDCl_3$) 60
Çizelge 5.11: Isopimpinellin bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri($CDCl_3$) 62
Çizelge 5.12 : Sphondin bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri($CDCl_3$) 63
Çizelge 5.13 : 8-metoksi-oxypeucedanin hidrat bileşiğinin ^{1}H NMR verileri ($CDCl_3$) 66
Çizelge 5.14 : Apterin bileşiğinin ^{1}H NMR verileri 67
Çizelge 5.15 : İzole saf maddelerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi sonuçları 69
Çizelge 5.16 : İzole saf maddelerin lipid peroksidasyon % inhibisyonu aktiviteleri sonuçları 70
Çizelge 5.17 : İzole saf maddelerin antikolinesteraz % inhibisyonu aktivitelerinin sonuçları 71

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Bazı triterpen yapıları.....1**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
Şekil 2.2 : Bir steroidin iskelet yapısı..... 1**Hata! Yer işareti tanımlanmamış.**
Şekil 2.3 : Bazı sterol yapıları..... 13
Şekil 2.4 : Fenoller ve fenolik asitler..... 13
Şekil 2.5 : Hidrosinnamik asitler 14
Şekil 2.6 : Kumarinler..... 14
Şekil 2.7 : Lignanlar ve fenilpropenler..... 14
Şekil 2.8 : Flavonoid iskeletleri..... 15
Şekil 2.9 : α-piron,γ-piron ve kumarin bileşikleri..... 16
Şekil 2.10 : Kumarin ve Kromon..... 16
Şekil 2.11 : Mono-substitüe kumarinler 18
Şekil 2.12 : Di-substitüe kumarinler..... 18
Şekil 2.13 : Tri-substitüe kumarin 18
Şekil 2.14 : Piron halkası mono-substitüe kumarin..... 19
Şekil 2.15 : Piron halkası di-substitüe kumarin..... 19
Şekil 2.16 : Benzen ve piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan bazı kumarinler.. 19
Şekil 2.17 : Lineer ve angular furanokumarinler..... 20
Şekil 2.18 : Ksantiletin 20
Şekil 2.19 : 6,7-Benzokumarin..... 20
Şekil 2.20 : Piron halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile oluşan kumarinler 21
Şekil 2.21 : Dimer Kumarinler 21
Şekil 2.22 : Antioksidanların Sınıflandırılması 24
Şekil 2.23 : Normal bir beyin ile Alzheimer hastası beyni arasındaki fark..... 27
Şekil 3.1 : Standart olan pirokatekol bileşiğinin açık yapısı 35
Şekil 3.2 : Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kersetinin açık yapısı..... 35
Şekil 4.1 : *Prangos ilanae* bitkisinin metanol ekstresinin hazırlanması ve fraksiyonlandırılması..... 41
Şekil 4.2 : *Heracleum platytaenium* bitkisinin petrol eteri ve metanol ekstreleri hazırlanması ve fraksiyonlandırılması 42
Şekil 4.3 : Pirokatekolün ölçü grafiği.....43
Şekil 4.4 : Kersetinin ölçü grafiği.....44
Şekil 4.5 : Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması 46
Şekil 5.1 : *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* bitkilerinin petrol eteri ve metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivite sonuçları .. 50
Şekil 5.2 : *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* bitkilerinin petrol eteri ve metanol ekstrelerinin β-karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi sonuçları 51
Şekil 5.3 : *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin asetilkolinesteraz aktivitesi sonuçları.....52

Şekil 5.4 : *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin butirilkolinesteraz aktivitesi sonuçları..... 52
Şekil 5.5 : α-amiril tetracosanoat 54
Şekil 5.6 : α-amirin 55
Şekil 5.7 : 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en 56
Şekil 5.8 : Psoralen 57
Şekil 5.9 : Bergapten..... 57
Şekil 5.10: Xanthotoxin..... 59
Şekil 5.11: Pimpinellin 60
Şekil 5.12: Isopimpinellin..... 61
Şekil 5.13: Sphondin..... 62
Şekil 5.14: Stigmasterol..... 63
Şekil 5.15: 8-metoksi-oxypeucedanin hidrat ve HPE-82-3-B 64
Şekil 5.16: Apterin..... 66
Şekil 5.17: İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi 70
Şekil 5.18: İzole saf bileşiklerin β-karoten renk açılımı yöntemi ile lipid peroksidasyon % inhibisyon aktivitesi 71
Şekil 5.19: İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu 72
Şekil 5.20: İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu 72

PRANGOS ILANAE VE *HERACLEUM PLATYTAENIUM* BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU, ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Prangos ve *Heracleum* türleri aromatik (kokulu) çiçekli bitkiler familyalarından biri olan Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait bitkilerdendir. *Prangos* ve yakın türleri fark gözetilmeden yöresel isimleri olan 'Çakşır' ya da 'Çağşır' olarak anılmaktadır ve bu bitkilerin kökleri halk arasında afrodizyak olarak kullanılmaktadır. *Heracleum* türleri ise 'Baldırgan, Tavşancık otu' olarak bilinmekte ve halk arasında sindirim rahatsızlıkları, mide ve bağırsak üşütmesi ve ishale karşı, sara ve sinirsel rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılır. Üzerinde çalışılan *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* bitkileri daha önce çalışılmamış Kaz Dağlarının Türkiye'ye endemik türleri olup *Prangos ilanae* ilk defa 2005 yılında (Pimenov MG, Akalin E, Kljuykov E) ve *Heracleum platytaenium* ise 1884 yılında bilim dünyasına tanıtılmışlardır.

Bugüne kadar ülkemizde ve dünyada *Prangos* ve *Heracleum* türlerinin daha çok uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine çalışılmakta olup, genelde sekonder metabolitler üzerine yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında ilk aşamada *Prangos ilanae* bitkisinin metanol ve *Heracleum platytaenium* bitkisinin sırasıyla petrol eteri ve metanol ekstreleri hazırlandı. Bu ekstrelerin toplam fenolik miktarları pirokatekole ve toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildi ve antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi ve lipid peroksidasyonu inhibisyonu *β*-karoten renk açılımı yöntemleriyle, antikolinesteraz aktivitesi ise Ellman yöntemi kullanılarak asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı belirlendi. Ekstrelerin başlıca sekonder metabolitlerini oluşturan kumarinler, triterpenoitler ve steroit yapıdaki bileşikler izole edilerek saflaştırıldı, saf bileşiklerin yapıları çeşitli spektroskopik (başlıca NMR ve kütle) yöntemlerle belirlendi. *Prangos ilanae* metanol ekstresinden bir monoterpen 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en ve iki triterpen *α*-amirin ve α-amiril tetracosanoat elde edildi. *Heracleum platytaenium* bitkisinin petrol eteri ekstresinden ise stigmasterolün yanı sıra psoralen, bergapten, xanthotoxin, pimpinellin, isopimpinellin, sphondin ve 8-methoxy-oxypeucedanin furanokumarinleri izole edilirken aynı bitkinin metanol ekstresi şeker taşıyan bir furanokumarin olan apterini vermiştir. Elde edilen saf bileşiklerin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri ekstreler için kullanılan yöntemler ile incelendi.

Sonuç olarak izole edilen bileşikler genelde DPPH serbest radikalini yakalamada pek etki göstermezken *β*-karoten-linoleik asit sisteminde orta derecede lipid peroksidasyonunu inhibe edici etki göstermişler, AChE ve BChE enzimlerine karşı

ise galantaminle kıyaslandığında özellikle asetilkolinesteraz enzimine karşı orta-iyi derecede aktivite gösterdikleri saptanmıştır.

Bu çalışma, İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34417.

ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES OF *PRANGOS ILANAE* AND *HERACLEUM PLATYTAENIUM* PLANTS, INVESTIGATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES

SUMMARY

Prangos and *Heracleum* are members of aromatic and flowering plant family Apiaceae (Umbelliferae). *Prangos* and its close species generally are called 'Çakşır' or 'Çağşır' in folk medicine and are used as aphrodisiac. *Heracleum* species are called as 'Baldırgan, Tavşancık otu' and are used against stomach and intestinal colds, diarrhea and indigestion and in the treatment of neuronal disorders and epilepsy. *Prangos ilanae* and *Heracleum platytaenium* which are the subjects of our studies are being investigated for the first time. These two species are endemic for Turkey and Idea Mountains. *Prangos ilanae* has been identified for the first time at 2005 (Pimenov MG, Akalin E, Kljuykov E) while *Heracleum platytaenium* has been introduced to the world of science in 1884.

So far, studies on *Prangos* and *Heracleum* species have been focused on their volatile oils and the reports on their secondary metabolites are fairly rare.

In this master thesis, we primarily prepared methanol extract of *Prangos ilanae* and petroleum ether and methanol extracts of *Heracleum platytaenium*, and consequently we measured their total phenolic and total flavonoid constituents as pyrocathecol and quercetine equivalent, respectively. Antioxidant activity of these extracts has been determined by using the DPPH radical scavenging and lipid peroxidation inhibition (the β- carotene bleaching) methods. Anti-Alzheimer activity of these extracts has been investigated by using the Ellman method via inhibition of acetylcholine esterase (AChE) and butyrylcholine esterase (BChE) enzymes. The isolated and identified secondary metabolites of the studied two species consist of namely coumarins, triterpenes and steroids. Structure identification of the isolated compounds has been achieved by using various spectroscopic methods, mainly NMR and MS. The methanol extract of *Prangos ilanae* afforded a monoterpene 1,2-dihydroxy-4-isopropyl-cyclohexa-5-en, and two triterpenoids α-amyrin and α-amyriltetracosanoate. From the petroleum ether extract of *Heracleum platytaenium* furanocoumarins psoralen, bergapten, xanthotoxin, pimpinellin, isopimpinellin, sphondin, 8-methoxy-oxypeucedanin hydrate were isolated besides stigmasterol while the methanol extract of the same plant afforded only a furanocoumarin glycoside apterin.

The antioxidant and anticholinesterase activities of the pure compounds have been investigated by using the same methods mentioned for the extracts.

As a result, the DPPH radical scavenging activity of the isolated pure compounds is not significant although the lipid peroxidation inhibition properties in *β*-carotene-linoleic acid system were found to be moderate, in general. As anticholinesterase activity, the pure isolates exhibited fairly high activity, particularly against AChE enzyme in comparision with galanthamine.

This study has been supported by ‘’İstanbul Technical University Scientific Research Projects Unit’’Project No: 34417.

1. GİRİŞ

1.1 Tezin Amacı

Bitkiler insanlığın varoluşundan beri çeşitli biyolojik aktiviteleri sebebiyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılan materyallerdir. Aktiviteleri sayesinde tedavi amaçlı kullanılan bitkiler arasında *Prangos* ve *Heracleum* türleri de yer almaktadır. *Prangos* türü halk arasında "çakşır otu" olarak bilinir ve kökleri afrodizyak olarak kullanılır. *Heracleum* türü ise ''baldırgan, tavşancık otu'' olarak bilinmekte ve halk arasında sindirim rahatsızlıkları, sinirsel rahatsızlıklar, sara, mide ve bağırsak üşütmesi ve de ishale karşı kullanılır. *Prangos* ve *Heracleum* bitkileri aromatik kokulu bitkileri kapsayan bir çiçekli bitkiler familyası olan Apiaceae (Umbelliferae) familyasında yer alırlar. *Prangos* ve *Heracleum* türlerinin kimyasal yapısı gerek yurt dışı gerekse yurt içindeki bazı çalışma grupları tarafından incelenmektedir. Üzerinde çalışılan *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* bitkileri Türkiye'ye endemik türlerdir. *Prangos* ve *Heracleum* türlerinin sekonder metabolitleri başlıca kumarinler olmak üzere fenolik bileşikler ve diğer sekonder metabolitlerdir.

Bu tez çalışmasında daha önce kimyasal olarak çalışılmamış endemik iki tür olan *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* bitkileri Kaz Dağları'ndan toplanarak petrol eteri ve metanol ekstreleri hazırlanmış, içerdikleri sekonder metabolitler çeşitli kromatografik yöntemlerle (prep. TLC, kolon kromatografisi) izole edildikten sonra saflaştırılmıştır. Saf bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle (NMR, kütle, UV) aydınlatılarak, bu bitkilerin gerek ekstreleri, gerekse saf bileşikleri antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri için *in vitro* incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Botanik Bilgiler

2.1.1 Apiaceae (Umbelliferae) familyası

Prangos ve *Heracleum,* Apiaceae familyasına ait bitki türleridir. Apiaceae familyası, çoğu 2 yıllık olmak üzere, tek veya çok yıllık, genellikle otsu, nadiren çalımsı olan aromatik (kokulu) bitkileri kapsar. Büyük bir familya olup, yaklaşık 300 civarında cins ve 3,000'den fazla tür içermektedir. Familya üyeleri genellikle kuzey yarım kürede yaygın olmakla birlikte, Türkiye'de zengin bir tür sayısına sahiptir. Bitkilerin gövdelerinin içleri, kuruyunca boşalır. Yapraklar almaşık dizili olup, çoğu cinste tabanda toplanmışlardır. Çiçek yapısı genellikle basit veya bileşik şemsiye durumundadır. Apiaceae familyasındaki bitkilerin kendilerine has bir kokuları vardır. Bunun sebebi taşıdıkları uçucu yağ, reçine, zamk veya müsilaj karışımlarıdır. Bu karışımlar bitkinin özellikle meyve, petiol, gövde, yaprak ve köklerinde yer alan salgı kanallarında bulunurlar [1].

Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait birçok bitki türünün gastrointestinal sistem, solunum, dolaşım ve ürogenital sistemler üzerinde tıbbi etkilerinin olduğu bilinmektedir [2-3].

Kardio-vasküler rahatsızlıklarda kuvvetlendirici ve direnç artırıcı olarak kullanılmalarının yanı sıra uyarıcı, antispazmodik, afrodizyak etkilere sahip oldukları pek çoğunun da yaralar için topikal uygulamalarda, haşlanma, yanma, böcek sokmaları, ısırıklar ve deri döküntülerinde kullanıldıkları bilinmektedir. Ayrıca kellik, hıçkırık ve siğillere iyi geldiği, bazen akıl hastaları ve alkol bağımlıları üzerinde etkili olduğu gözlenmiştir [4].

Bu çalışmada da adı geçen Apiaceae familyasına ait bazı bitkilerin halk arasında ilaç olarak veya diğer amaçlarla kullanımları şu şekilde özetlenebilir:

▪*Angelica* (melek otu) türleri salatalarda sebze, gıda tatlandırıcısı ve katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Tıbbi olarak ise doğum kolaylaştırıcı olarak, baş dönmesine karşı, soğuk algınlığında, romatizmal rahatsızlıklarda ve kan basıncını düzenlemede

kullanılmaktadır.

▪Öksürük tedavisinde kullanılmasının yanı sıra, antispazmodik, diüretik, midevi, uyarıcı ve diaforetik özelliklere de sahip olduğu bilinmektedir [4].

▪Halk arasında iyi bilinen kişnişin (*Coriandrum sativum*) meyve ve yağları gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. İlaç olarak ise meyveleri midevi, diüretik ve afrodizyak özelliklere sahiptir [4].

2.1.2 *Prangos* cinsi

Prangos cinsi dünyada 30'dan fazla türle yaygın bir dağılım göstermektedir [5]. 14 Türü Türkiye'de yetişmekte olan Prangos bitkileri için Anadolu önemli bir merkezdir [6-9]. *Prangos* türleri, halk arasında tonik (kuvvet ilacı) olarak, mide gazı, hemoroid, yaralanma ve lökoplaki tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [10].

2.1.3 *Prangos ilanae* Pimenov & Akalin & Kljuykov

Prangos ilanae, yaprakları tabanda toplanmış, 3 cm'e kadar uzayan ipliksi foliolleri olan oldukça gösterişli bir bitkidir. İlk defa 2005 yılında bilim dünyasına tanıtılmıştır [11].

P. ilanae, Balıkesir'in Edremit ilçesinde halk arasında kökleri afrodizyak olarak kullanılmakta olup, 'çakşır otu' adı ile anılmaktadır [1].

Türkiye'de yetişen *Prangos* türlerinin meyveleri genellikle kanatlı olup Umbelliferae familyası içinde en büyük meyvelere sahip oldukları bilinmektedir [11].

2.1.4 *Heracleum* cinsi

Apiaceae familyasının geniş cins sınıflarından biri olan *Heracleum* cinsi, dünyada yaklaşık 125 türle temsil edilmektedir. *Heracleum* cinsi Asya'da 109 tür, Türkiye'de ise 9'u endemik 23 tür ile temsil edilmektedir [12].

Bazı *Heracleum* türleri halk arasında ağrı kesici, antipiretik (ateş düşürücü), diyaforetik [13], antiseptik, karminatif (bağırsak gazlarını giderici), sindirim kolaylaştırıcı olarak kullanılmaktadır. Bunun dışında yemeklerde tatlandırıcı ajan ve baharat şeklinde de tüketilmektedir [14].

2.1.5 *Heracleum platytaenium* BOISS.

Heracleum platytaenium, bir defa çiçek açıp meyve veren, 1-2 m boyunda, kaba yapılı, keskin aromatik kokulu bir bitkidir. Gövdesi en az 2 cm çapında olup, aşağıda derin oluklu, hemen hemen yumuşak tüylü ya da düzenli ince uzun yumuşak tüylü şeklindedir. Çiçekleri beyaz renkli, meyveleri geniş ters yumurtamsı ile böbreksi şeklinde olup, 8-14 x 6-11 mm ebatındadır.

Çiçeklenme mevsimi Mayıs-Ağustos ayları olup, Türkiye'ye endemik bir türdür. Ülkemizde Kaz dağları dışında Kuzeybatı ve Orta Anadolu'da da yayılış göstermektedir.

İlk defa 1884 'de bilim dünyasına tanıtılmıştır. Halk arasında 'baldırgan' ya da 'tavşancık otu' olarak bilinmektedir.

2.2 *Prangos* ve *Heracleum* Türlerinin Halk Arasındaki Kullanılışı

2.2.1 *Prangos* cinsi

❖*Prangos pabularia* Lindl. bitkisinin Van ve yöresinde çok eski zamanlardan beri süt mamüllerine katılarak ya da sebze olarak tüketildiği bilinmektedir [16].

❖*Prangos ferulacea* (L.) Lindley'in Erzurum'un Ilıca'ya bağlı köylerde sindirim kolaylaştırıcı ve antidiyabetik olarak kullanıldığı bilinmektedir [17].

P. tschimganica'nın Özbekistan'da halk arasında lökoplaki tedavisinde ilaç olarak kullanıldığı bilinmektedir [18].

2.2.2 *Heracleum* cinsi

❖*Heracleum rapula*'nın Çin'de halk arasında ağrı kesici, romatizmayı giderici ve kronik soluk borusu iltihabında kullanıldığı bilinmektedir[19].

❖*Heracleum candicans* Wall. bitkisinin Çin'in Yunnan ilinde halk arasında antipiretik, diyaforetik ajan olarak [20], aynı bitkinin Hindistan'da ise afrodizyak, sinirleri güçlendirici ve cilt hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir [21].

2.3 *Prangos* ve *Heracleum* Türleri İle Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Aktivite Çalışmaları

2.3.1 *Prangos* cinsi

Günümüze kadar ülkemizde ve dünyada *Prangos* türlerinin daha çok uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine çalışılmıştır.

Prangos türlerinin sekonder metabolitlerinin izolasyonu üzerine yapılan çalışmalar ise oldukça az sayıdadır. Bu çalışmalar aşağıda belirtildiği gibidir:

- *Prangos pabularia* türü ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalarda glucoside ve pabularinone içerdiği saptanmıştır [22-23].
- *Prangos uloptera* köklerinden 6-O-[beta-D-apiofuranosyl- (1 → 6)-beta-D-glucopyranosyl]-prenyletin, 3"-O-[beta-D-apiofuranosyl- (1→ 6)-beta-D-glucopyranosyl]-oxypeucedaninhydrat ve 2"-O-[beta-D-apiofuranosyl-(1→ 6)-beta-D-glucopyranosyl]-oxypeucedanin hydrate, 3"-O-[beta-D-apiofuranosyl-(1 → 6)-beta-D-glucopyranosyl]-heraclenol, 3"-O-(beta-D-glucopyranosyl)-heraclenol, tortuoside, 3"-O-(beta-D-glucopyranosyl)-oxypeucedanin hidrat, heraclenol ve oxypeucedanin hidrat, ayrıca başka bir çalışmada da bir furanocoumarin bileşiği olan 8-geranyloxy psoralen içerdiği tespit edilmiştir [24-25].
- *Prangos ferulacea*'nin köklerinden bir furokumarin olan gosferol ve pranferin içerdiği belirlenmiştir [26-27].
- *Prangos lophoptera'* nın, bir furokumarin bileşiği olan isogosferol içerdiği bulunmuştur [28].
- *Prangos biebersteini'*nin, prandiol içerdiği saptanmıştır [29].

Prangos türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir:

Çizelge 2.1: *Prangos* türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları

Bitki Adı	Yetiştiği yer	Uçucu Yağ Ana Bileşenleri	Biyolojik Aktivite
Prangos acaulis	İran	α-pinen(%12.5) cis-sesquisabinene hydrate(%25.6)[30]	–
Prangos uloptera DC	İran	α-pinene (%31.78) beta-bourbonene (%15.9); α -curcumene (%10.65); spathulenol (%9); m-cymene (%5.51); a-pinene (%14.98); P-bourbonene (%7.81); x-humulene (%7.74); n-tetracosane (%6.65)[31]	–
Prangos uloptera	İran	beta-caryophyllene (%27.1) caryophyllene oxide (%15.9); α-pinene (%12.4)[32]	–
Prangos uloptera DC	İran	beta-caryophyllene (%18.2) germacrene D (%17.2); limonene (%8.7) α-pinene (%41.9) β-cedrene (%4.0)33	–
Prangos denticulata Fisch et Mey. (L.) Lindl (gövde kısmı)	Türkiye	sabinene (%26.1) p-cymene (%19.7)[34] alpha-pinene (%10.3)[35]	–
Prangos ferulacea (L.) Lindl (çiçek kısmı)	İran	linalool (%19.0); lavandulyl acetate (%16.0); 1,8-cineole (14.5%) a-pinene (%12.4) geranyl isobutyrate (%12.2)[35]	Antibakteriyal [35]
Prangos asperula	İran	alpha-pinene (%13.6) limonene (%12.94) myrcene (%8.1) beta-pinene (%5.4) delta-3-carene (%25.54) alpha-terpinolene (%14.76) caryophylene (%2.98) gamma-curcumene (%2.65)[36]	–

Çizelge 2.1: *Prangos* türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları (devamı)

Prangos turcica	Türkiye	alpha-humulene; germacrene D; naphthalene; terpinolene; p-cymene; gamma-elemene; bornyl acetate [37]	–
Prangos heyniae	Türkiye	beta -bisabolenal (%53.3 ve %18.0) beta –bisabolenol (%14.6 ve %2.3) beta -bisabolene (%12.1ve %10.1) germacrene D (%13.5) germacrene B (%9.4)[38]	–

2.3.2 *Heracleum* cinsi

Bugüne kadar ülkemizde ve dünyada *Heracleum* türlerinin daha çok uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine çalışılmıştır. *Heracleum* türlerinin sekonder metabolitlerinin izolasyonu üzerine yapılan çalışmalar ise oldukça az sayıdadır. Bu çalışmalar aşağıda belirtildiği gibidir:

- *Heracleum crenatifolium* türü ile yapılan bir çalışmada umbelliferone, 4-methylumbelliferone, 4-hydroxycoumarin, scopoletin, 8-methoxypsoralen, bergapten, isobergapten ve iki antrokinon türevi olan rhein, aloe-emodine and one stilbene rhapontin, başka bir çalışmada ise pimpinellin, isopimpinellin, sphondin and byak-angelicol elde edilmiştir [39-40].
- *Heracleum candicans* türünün candibirin A [systematic name: 9,9'-(1,4-dioxane-2,5-diyldimethylenedioxy)di(7H-furo[3,2-g]chromen-7-one) içerdiği belirlenmiştir [41].
- *Heracleum rapula* türü üzerinde yapılan çalışmalarda ise; yeraltı kısmından furanokumarin olan rapultririn A ve köklerinden pek çok kumarin glikozitleri izole edilmiştir [42-44].

Heracleum türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları Çizelge 2.2'de gösterilmiştir:

Çizelge 2.2: *Heracleum* türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları

Bitki Adı	**Yetiştiği yer**	**Uçucu Yağ Ana Bileşenleri**	**Biyolojik Aktivite**
Heracleum crenatifolium Boiss	Türkiye	octyl acetate(%19-95) octanol (%0.6-5.0) octyl isovalerate (%0.8-6.4) decyl acetate (%0.5-4.3)45	–
Heracleum crenatifolium Boiss	Türkiye	octyl acetate (%93.7)[46]	Antikandidal [46]
Heracleum sphondylium L. subsp. *ternatum*	Türkiye	octyl butyrate (%34.6-41.0) apiole (%4.7-20.4), (Z)-4-octenyl acetate (%2.2-4.4) (Z)-4-octenyl butyrate (%2.6-3.0)[45]	–
Heracleum sphondylium	Türkiye	octyl acetate (%87.6)[46]	Antikandidal [46]
Heracleum sphondylium L. subsp. *ternatum*	Türkiye	1-octanol (%50.3); octyl butyrate (%24.6); octyl acetate (%7.3)[47]	–
Heracleum sphondylium L. subsp. *ternatum*	Türkiye	octanol (%39,2) octyl butyrate (%27,4) octyl acetate(%10,6)[48]	–
Heracleum antasiaticum	Azerbeycan	camphene (%3.92) phellandrene (%0.30); limonene (%4.04); terpinolene (%10.75); methylchavicol (%0.90); eugenol (%1.04); thymol (%0.47)[49]	–
Heracleum persicum (meyve kısmı)	İran	hexyl butyrate (%56.5); octyl acetate (%16.5); hexyl 2-methylbutanoate (%5.2) ; hexyl isobutyrate (%3.4)[50]	Anti inflamatuar, analjezik[50]
Heracleum persicum (tohum kısmı)	İran	hexylbutyrate (%37.7); hexylbutanoate (%36.7); octylacetate (%16.3) hexyl-2-methylbutanoate (%5.7); hexylisobutyrate (%4.7); hexylhexanoate (%4.3); heptyl-2-methylbutyrate (%2.3); n-butylbutanoate (%2.25); hexylvalerate (%1.9); octylbutanoate (%1.7); linalole (%1.5)[51]	–

Çizelge 2.2: *Heracleum* türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları (devamı)

Heracleum persicum (gövde kısmı)	İran	(E)-anethole (%60.2) terpinolene (%11.3) gamma-terpinene (%7.1)[52]	–
Heracleum persicum (tohum kısmı)	İran	hexyl butyrate (%22.5 ve %35.5) octyl acetate (%19 ve %27) hexyl isobutyrate (%9.1ve %3.2)[52]	–
Heracleum persicum (yaprak kısmı)	İran	(E)anethole (%47.5) 2-propanone, 1-(4-methoxy phenyl)- 2-propanone (%18.1) anisaldehyde (%8.9)[53]	–
Heracleum persicum (çiçek kısmı)	İran	(E)anethole (%38.6) gamma-terpinene (%17.8) myrcene (%13.5)[53]	–
H. paphlagonicum (meyve kısmı)	Türkiye	octyl acetate (%31.5); hexyl butyrate (%17.0); octyl hexanoate (%10.2)[54]	–
H. candolleanum (rizom kısmı)	Hindistan	alpha -pinene (%18.9) bornylene (%18.6); octyl acetate (%11.9)[55]	–

2.4 Sekonder Metabolitler

Bitkilerin savunma mekanizmasında, dış etkilerden korunmasında ve bitkiler arasındaki etkileşimin sağlanmasında sekonder metabolitleri önemli rol oynarlar. Bitkilerde bu özelliklere sahip organik bileşenler özellikle ilaç yapımında önemli bir yer oluşturmaktadır. Biyosentetik oluşumları göz önüne alındığında sekonder metabolitleri ana iskeletleri ve oluşumları itibarıyla terpenler, fenolik bileşikler ve flavonoitler ile alkaloidler olmak üzere 3 ana grupta sınıflandırabiliriz [56]. Bu çalışma sırasında her iki bitkiden de terpenoid/steroid ve özellikle *Heracleum platytaenium* bitkisinden Apiaceae familyasının karakteristik sekonder metabolitlerini oluşturan kumarinleri elde edildiği için kısmen terpenler ve ağırlıklı olarak kumarinler hakkında genel bilgi verilmiştir.

2.4.1 Terpenler

Terpenler doğal ürünlerin en büyük sınıfını oluşturmaktadır [57]. Bu bileşikler genellikle uzun bitkilerin her bölgesinde (çiçek, tohum, yaprak, kök, gövde gibi),

yosunlarda, yabani otlarda, alglerde ve likenlerde, hatta mikrobiyal orijinli bazı böceklerde bile bulunmaktadır [58].

Çizelge 2.3: Terpenlerin Sınıflandırılması

Karbon sayısı	İsim	İzopren sayısı
5	Hemiterpenler	1
10	Monoterpenler	2
15	Seskiterpenler	3
20	Diterpenler	4
25	Sesterterpenler	5
30	Triterpenler	6
40	Tetraterpenler (Karotenler)	7
$(5)_n$	Politerpenler	n

Yalnızca hidrokarbon içeren terpenler olabileceği gibi, oksijen içeren yani alkol, keton, aldehit ve asit grubu taşıyan terpenler de çok yaygındır. Oksijen içeren terpenler terpenoitler olarak da isimlendirilmektedirler [59].

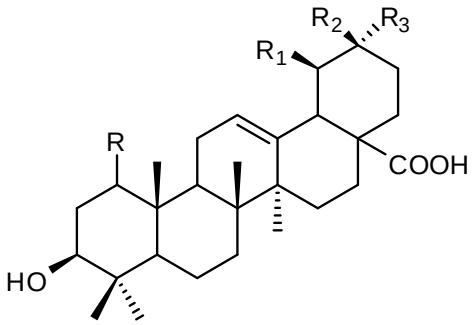
Terpenoitler izopren birimlerinin sayısına göre sınıflandırılmaktadırlar. Ruzicka tarafından ortaya atılmış olan 'İzopren Kuralına' göre bütün terpenik bilesiklerin karbon iskeletleri izopren birimlerinin iki ya da daha fazlasının birleşmesiyle meydana gelmiştir [60].

2.4.1.1 Triterpenoitler (C_{30})

Altı izopren biriminden oluşan karbon iskeletine sahip triterpenler, biyosentetik olarak 30C'lu asiklik hidrokarbon squalenden elde edilen bileşiklerdir. Çoğu alkol, aldehit veya karboksilik asit taşıyan siklik yapılardır. Renksiz, yüksek erime noktasına sahip, optikçe aktif ve kimyasal reaktifliğinin kısıtlılığından yapı karakterizasyonu zor olan bileşiklerdir [61].

Triterpenler gerçek triterpenler, steroidler, saponinler ve kardiyak glikozitler olmak üzere en az dört gruba ayrılmaktadırlar. Bütün triterpenlerin izolasyonu için temel ayırma teknikleri olarak genelde kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi, GC ve GC-MS kullanılmaktadır. Yapıları ise erime noktası, optik çevirme dereceleri

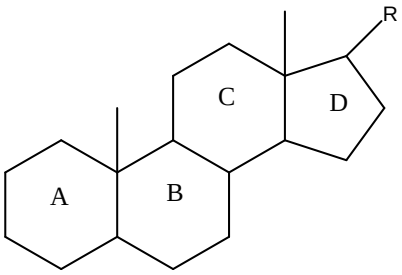
NMR, kütle spektrumu, UV, IR ve X-ray gibi spektroskopik teknikleri ile aydınlatılır [61].



Ursolik asit**;** R=H, R_1=R_2=Me, R_3=H
Oleanolik asit; R=R_1=H, R_2=R_3=Me
Virgatik asit; R=O, R_1=H, R_2=R_3=Me
Şekil 2.1 : Bazı triterpen yapıları

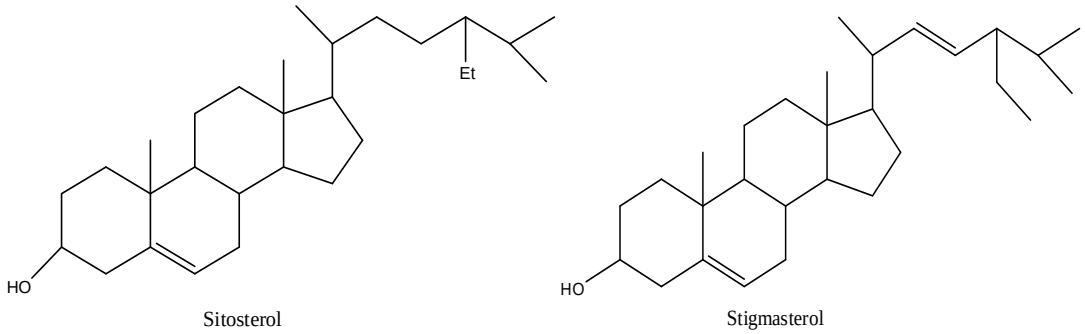
2.4.2 Steroitler

Bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları steroit sınıfı bileşiklerdir. Steroitlerin karakteristik halka yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir.



Şekil 2.2 : Bir steroidin iskelet yapısı

Bitkisel steroitler genellikle, C-3'te OH, C-5'te çifte bağ, C-17'de yan zincir taşırlar. C-3'teki OH grubu, halkadaki metil gruplarıyla dik açı yaparsa A ve B halkaları *cis* şeklinde birleşmişlerdir. Bu konumdaki OH grubu düzlemin üstündedir yani β şeklindedir. OH grubu metil gruplarına paralel ise A ve B halkaları *trans* yapıda olup OH grubu α şeklindedir. Yan zincirin konfigürasyonu ise steroitlerde genellikle β şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle *trans* birleşirler [62].



Sitosterol Stigmasterol

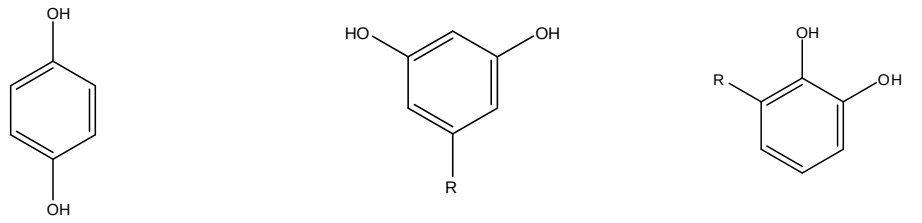
Şekil 2.3 : Bazı sterol yapıları

2.4.3 Fenolik Bileşikler ve Flavonoidler

Fenolik bileşikler genel olarak bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir ya da daha fazla sayıda hidroksil sübstitüenti içeren bir sekonder metabolit sınıfıdır. Flavonoidler bu sınıfın en geniş grubunu oluşturmakla beraber fenilpropanoidler ve fenolik kinonlar da kayda değer sayıda bitkilerde yer alan fenolik bileşiklerdir. Bitkilerde bulunan ligninler, melaninler ve tanenler gibi polimerik bileşenlerde polifenolik bileşiklerdendir [63].

2.4.3.1 Fenoller ve Fenolik Asitler

Serbest fenoller ve fenolik asitler bitkilerden genellikle beraber izole edildikleri için birlikte anılmaktadırlar. Bitki dokularının asit hidrolizi eterde çözünen çok sayıda fenolik asit açığa çıkarır. *p*-Hidroksibenzoik asit, protokateşuik asit, vanilik asit, sirinjik asit, gentisik asit en yaygın olarak bulunan fenolik asitlere örnektir. Fenolik asitlere oranla daha nadir olarak bulunan serbest fenollerden en çok rastlanılan serbest fenol hidrokinondur. Kateşol, orsinol, floroglusinol ve pirogallol bitkilerde fazla yaygın bulunmamakla beraber diğer önemli serbest fenollerdendir [64].



Hidrokinon

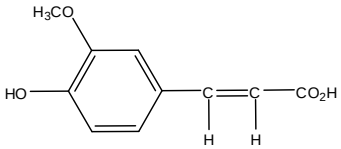
R=H, Rezorsinol
R=CH_3, Orsinol
R=OH, Floroglusinol

R=H, Kateşol
R=OH, Pirogallol

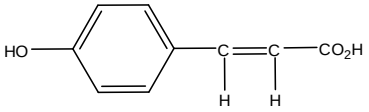
Şekil 2.4: Fenoller ve fenolik asitler

2.4.3.2 Fenilpropanoidler

Fenilpropanoidler aromatik halkaya üç karbonlu yan zincir bağlanmasıyla meydana gelen bileşiklerdir. Biyosentetik olarak aromatik aminoasit proteini fenilalaninden türevlendirilmektedirler. En yaygın olarak bulunan fenilpropanoidler hidroksisinnamik asitlerdir. Bunların dışında hidroksikumarinler, fenilpropenler ve lignanlar diğer önemli fenilpropanoidlerdir [65].

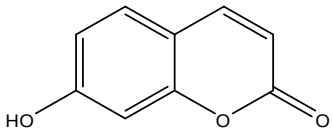


p-Kumarik asit

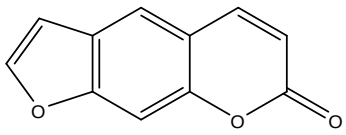


Ferulik asit

Şekil 2.5: Hidroksisinnamik asitler

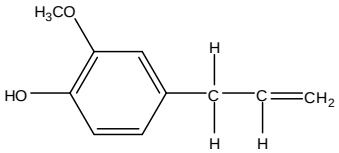


Umbelliferone

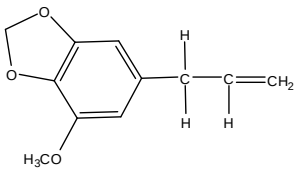


Psoralen

Şekil 2.6: Kumarinler



Eugenol



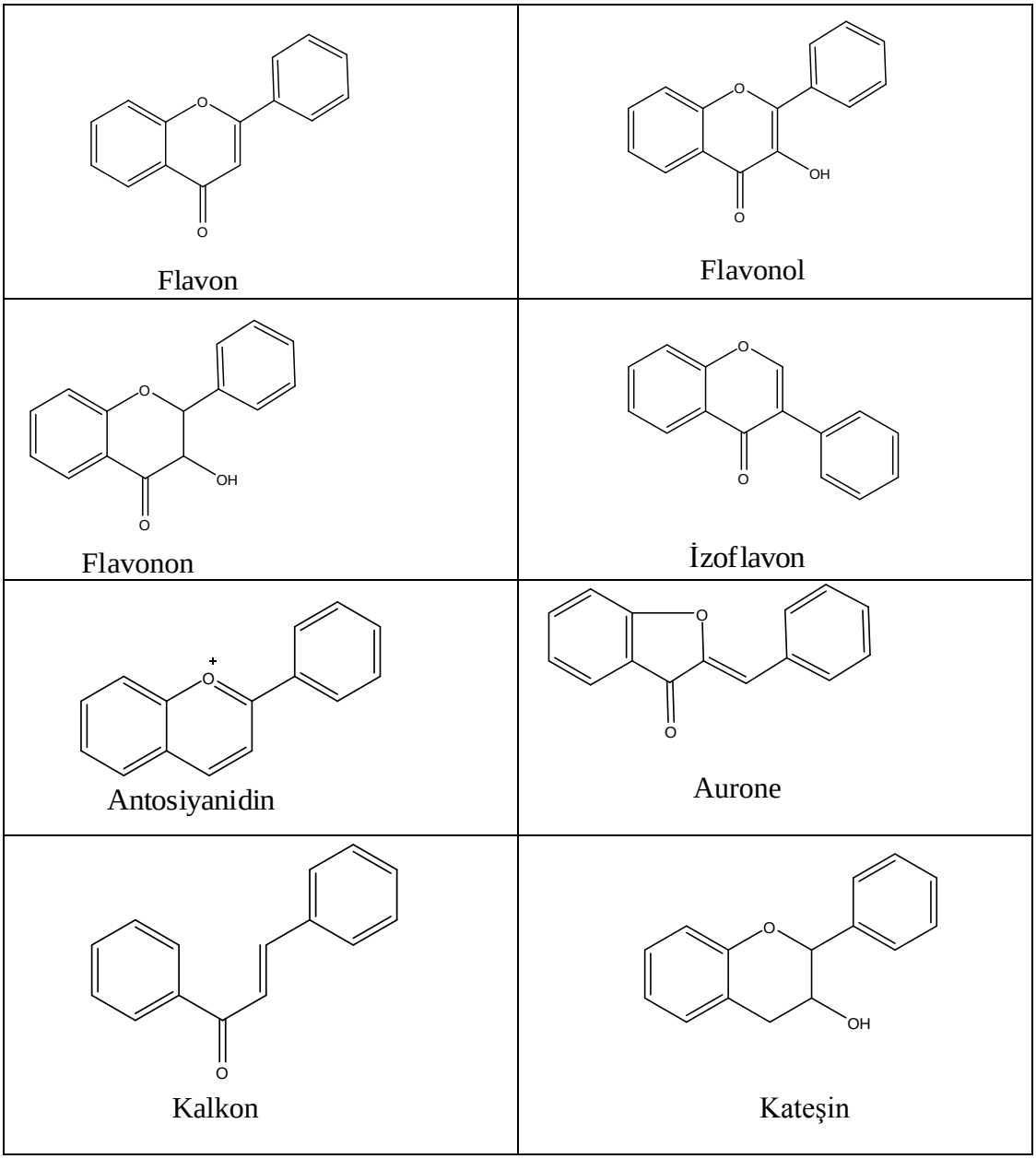
Miristisin (Myristicin)

Şekil 2.7: Lignanlar ve fenilpropenler

2.4.3.3 Flavonoidler

Bitki dokularında genellikle karışım halinde bulunurlar. Şimdiye kadar bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır [66]. Flavonoidlerin bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışından koruma gibi bir dizi önemli özellikleri vardır [67]. Flavonoidlerin antioksidatif, antienflamatuar, antimikrobiyal, antiülserojen, antiviral, antimutajenik ve antikarsinojenik etki gibi çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktiviteler gösterdikleri bilinmektedir [68-69]. UV ışınlarından koruma özelliklerine sahip olmaları sebebiyle kozmetik ürünlerde katkı maddesi olarak kullanılmaktadırlar.

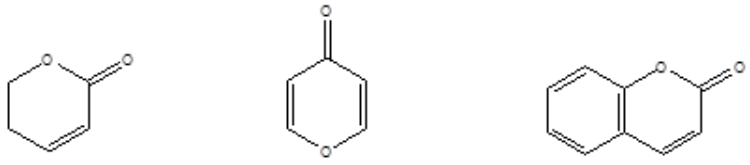
Flavonoidler çok geniş bir grup olup çok sayıda sınıfa ayrılmaktadır. Farklı iskelet yapısına sahip flavonoidler aşağıda gösterilmiştir:



Şekil 2.8: Flavonoid iskeletleri

2.4.4 Kumarinler

Piron halkasının benzen halkası ile yaptığı kondenzasyon sonucu benzopiranlar olarak bilinen bir heterosiklik bileşik sınıfı oluşmaktadır ve bu heterosiklik yapıya "kumarin" adı verilmektedir [70].



α- piron γ-piron Kumarin

Şekil 2.9: α- piron, γ-piron ve kumarin bileşikleri.

Heterosiklik halkadaki karbonil grubunun pozisyonuna göre iki tür benzopiran bileşiği adlandırılır. Bir α-piron halkasının benzen halkasına kondanse olmasıyla oluşan bileşikler "kumarin" olarak, bir γ-piron halkasının benzen halkasına kondanse olmasıyla oluşan bileşikler "kromon" olarak isimlendirilirler [70].



Şekil 2.10: Kumarin ve Kromon

Benzo α-piron grubunun ana bileşiği olan kumarinler ilk kez 1820'de Vogel tarafından tonka baklası (*semen tonka*) adı verilen ve Fabaceae familyasından *Dipteryx odorato (Coumarouna odorato)* isimli ağacın hoş kokulu tohumlarından elde edilmiştir. İlk defa bu bitkiden izole edildiği için kumarin adı verilmiştir. Kumarinler, özellikle Orchidaceae, Leguminoseae, Rutaceae, Apiaceae ve Lamiaceae familyalarında bulunmaktadır. *Dipteryx odorato* ve diğer *Dipteryx* çeşitlerinden sıklıkla elde edilmekle birlikte *Melilotus alba* (Fabaceae familyası), *Hierochloe odorata* (Poaceae familyası), *Glycyrrhiza glabra* (meyan kökü), tatlı yonca ve lavanta gibi bitkilerde ve vişne, çilek, şeftali gibi meyvelerde de önemli miktarda tespit edilmiştir [71-73].

Kumarinler bitkilerde, tohum kabuğunda, köklerde, meyvelerde, çiçek kısmında,yapraklarda ve gövdesinde bulunmakla beraber, genellikle, en çok toplandığı yerler meyve ve çiçek kısımlarıdır. Bitkilerdeki rolleri, korunma ile ilgili olup, bitkiye antimikrobiyel, UV perdeleme etkisi, çimlenme inhibisyonu gibi özellikler kazandırırlar.

Kumarinlerin bilinen en iyi özelliği, dolaylı olarak bitki savunmasındaki rolüdür. Yonca gibi bitkinin yenilebilen kısmındaki kumarinler, memelilerde güçlü iç kana-

malara sebep olabilirler. Bu keşif en sonunda rodentisitlerin (rat zehiri) gelişimine ve ilgili bileşiklerinde inme tedavisinde ve önlenmesinde kullanımına yol açmıştır. Aynı şekilde, *Heracleum mantegazzianum* (giant hogweed), 'un yaprak dokusunda bulunan ışığa duyarlı bileşik olan 8-methoxypsoralen, deri veya uzun dalga ultraviyole (UV-A 320-380 nm) radyasyonu teması ile açığa çıkan fitofotodermatit (deri fototoksik inflamatuar erüpsiyonu) hastalığına yol açar. Bununla birlikte, Psoralen şimdilerde başarılı bir şekilde, ağız yoluyla tedavi ve UV-A fototerapi tedavisi karışımıyla çeşitli deri hastalıklarının (egzema, sedef hastalığı) tedavisinde kullanılmaktadır.

Kumarin ve türevleri, bitkilerde serbest veya glikozitleri halinde yaygın olarak bulunan ve çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle son yıllarda önemi artan doğal bileşiklerdir. Kumarinlerin *in vivo* olarak birçok tümör türüne karşı etkili olduğu, bazılarının anti-HIV aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [72].

Kumarinler ve kumarin türevleri antibiyotik, antikoagülan, antikanser, antienflamatuar ve bakteriostatik etki göstermeleri sebebiyle özellikle biyoloji ve tıp alanındaki araştırmalara konu olmaktadır [72].

Kumarinler 1828'de laboratuvarda sentezlenerek parfüm ve tatlandırıcı yapımında kullanılmaya başlanmıştır ve o zamandan beri sanayide parfümeri kimyasalı olarak kullanılmaktadır [72]. Kumarin vanilyaya benzeyen hoş kokulu bir maddedir ve bu özelliğinden dolayı parfümeride ve pipo tütünleri ile Amerikan tipi tütünlerin kokulandırılmasında kullanılmaktadır [73].

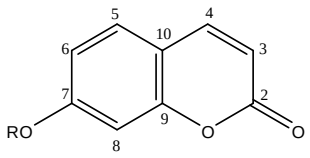
Strecker (1867) ve Fitting (1870) tarafından yapısı aydınlatılan kumarinlerin ilk kimyasal sentezi 1868 yılında Perkin reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir [71]. Kumarinler ilk kez benzoik asit türevi olarak isimlendirilmiş olsalar da Perkin'in *o*-hidroksi sinnamik asit ile salisil aldehiti etkileştirmesi sonucu bir lakton halkası olduğu anlaşılmıştır. Kumarinler ve türevleri, kimyasal yapılarından dolayı *o*-hidroksi sinnamik asitin lakton türevleri olarak isimlendirilirken diğer bir yandan da benzen ve 1,2 piron halkasının etkileşimi sonucu oluştuğu söylenebilir. Bu sebeple de kumarinler; oksijen içeren heterosiklik bileşiklerin bir türüdür. Kumarinler kumaron gibi diğer heterosiklik bileşiklere de dönüştürülmesi oldukça kolay olan bileşiklerdir. Bitkilerden uygun çözücülerle ekstraksiyon sonucu, farklı metodlar uygulanarak izole edilebilirler [73].

Kumarin türevleri başlıca 6 sınıfta incelenebilir [71]:

1. Benzen halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler
2. Piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler
3. Hem benzen, hem de piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler
4. Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler
5. Piron halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler
6. Dimer kumarinler

2.4.4.1 Benzen halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler

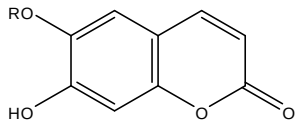
Kumarinlerin benzen halkasına farklı sübstitüentlerin bağlanması sonucu mono-, di-, tri- sübstitüe kumarinler oluşur [71].



R=H 7-Hidroksikumarin (Umbelliferone)

$R=CH_3$ 7-Metoksikumarin (Herniarin)

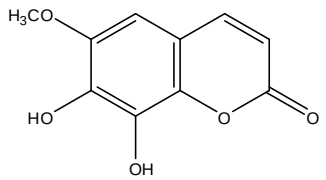
Şekil 2.11: Mono-sübstitüe kumarinler



R=H 6,7-Dihidroksikumarin (Eskuletin)

$R=CH_3$ 7-Hidroksi-6-Metoksikumarin (Skopoletin)

Şekil 2.12: Di-sübstitüe kumarinler

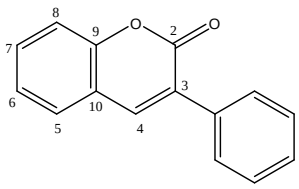


7,8-Dihidroksi-6-metoksikumarin (Fraksetin)

Şekil 2.13: Tri-sübstitüe kumarin

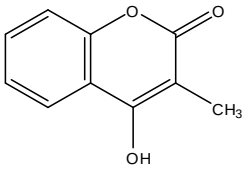
2.4.4.2 Piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler

Piron halkasının 3. ve 4. pozisyonuna hidroksil, alifatik veya aromatik grupların bağlanmasıyla meydana gelen kumarinlerdir [71].



3-Fenilkumarin

Şekil 2.14: Piron halkası mono-sübstitüe kumarin

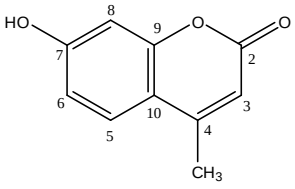


3-Metil-4-hidroksikumarin

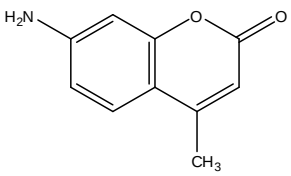
Şekil 2.15: Piron halkası di-sübstitüe kumarin

2.4.4.3 Hem benzen, hem de piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan kumarinler

Bu sınıfta yer alan kumarinler florofor olarak kullanılırlar [71].



4-Metilumbelliferon



7-Amino-4-metilkumarin

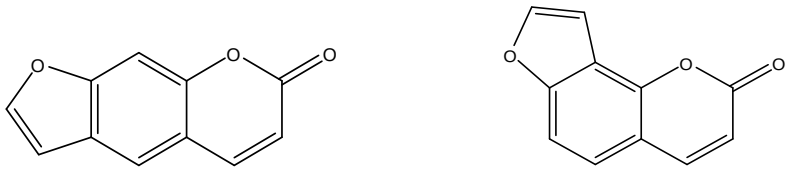
Şekil 2.16: Benzen ve piron halkası üzerinde sübstitüent taşıyan bazı kumarinler

2.4.4.4 Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler

Kumarinin benzen halkasına beş üyeli furan halkasının kondanse olmasıyla "furanokumarinler" oluşur. Bu sınıfın birçok üyeleri lineer bir furanokumarin olan psoralenin veya onun daha kararlı açısal izomeri anjelisinin türevleridir [71].

Lineer Furokumarin: Furan halkası ile benzen halkası aynı düzlemde bulunurlar.

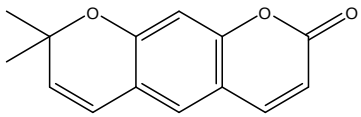
Açısal (Angular): Furan halkası ile benzen halkası farklı düzlemde yer alırlar.



Psoralen Angelicin

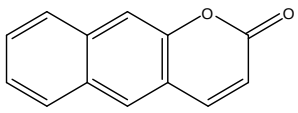
Şekil 2.17: Lineer ve angular furanokumarinler

Kumarinin benzen halkasına bir piron halkasının kondanse olmasıyla "piranokumarinler" oluşur.



Şekil 2.18: Ksantiletin

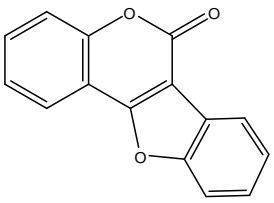
Kumarinin benzen halkasına bir benzen halkasının kondanse olmasıyla "benzokumarinler" meydana gelir [71].



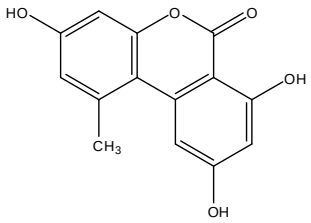
Şekil 2.19: 6,7-Benzokumarin

2.4.4.5 Piron halkası ile halkalı yapıların kondenzasyonu sonucu meydana gelen kumarinler

Kumarinin piron halkasının 3. ve 4. pozisyonundaki karbon atomlarına halkalı yapıların kondenzasyonu sonucu oluşan kumarin türevleridir [71].



Kumestan

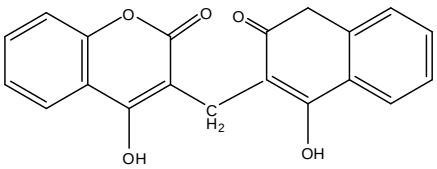


Aeterniyol

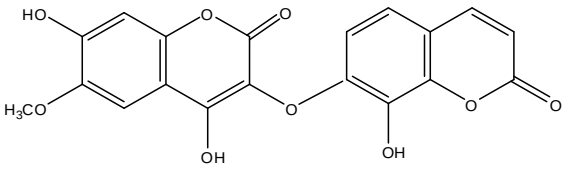
Şekil 2.20: Piron halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile oluşan kumarinler

2.4.4.6 Dimer kumarinler

İki kumarinin piron halkalarının 3. pozisyonundaki karbon atomlarının birleşmesiyle değişik yapılarda kumarin türevleri meydana gelmektedir [71].



Dafnoretin



Bishidroksikumarin(Dikumarol)

Şekil 2.21: Dimer Kumarinler

2.5 Antioksidanlar

Serbest radikaller dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllere denir. Bu tip moleküller eşleşmemiş elektronları olmasından dolayı oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerde önemli rol oynarlar. Serbest radikaller herhangi bir etkileşime girerek elektron alır veya verirler. Bu nedenle pozitif, negatif veya nötral olabilirler. Oksijen türevi serbest radikaller proteinlere, yağlara, karbonhidratlara ve nükleik asitlere zarar verebilirler.

Radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, radikal oluşumunu sınırlandırması, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından

sorumlu moleküller ise antioksidanlardır. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve çeşitli antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik oksidatif stresle sonuçlanır [76]. Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluştururlar [77]. Bu durum yaygın olarak "Oksidatif Stres" şeklinde ifade edilir [78]. Oksidatif stres; yaşlanma, kanser, kalp hastalıkları, diyabet ve diyabetin komlikasyonları başta olmak üzere pek çok patolojik tablonun ve de yaşlanmanın patogenezi ile yakın ilişkidedir [79].

Reaktif oksijen ve azot türleri oksidatif stresin baş sorumluları olup, radikalik ve radikalik olmayan türleri içermektedir [80]. Radikalik oksijen türlerine, süperoksit anyon ($O^{\cdot}{}_2^-$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksit ($HOO^{\cdot}$) ve alkoksi ($RO^{\cdot}$) radikalleri; azot türlerine, azot monoksit ($NO^{\cdot}$) radikalleri örnektir. Radikalik olmayan oksijen türlerine ise, hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3) ve singlet oksijen (O_2); azot türlerine ise, nitröz asit (HNO_2), nitrozil katyonu (NO^+) ve nitroksi anyonu ($NO-$) örnek gösterilebilir [81]. Ayrıca bu radikallerin yanı sıra tiyol radikalleri ($RS^{\cdot}$) ve karbon merkezli radikaller de mevcuttur [82].

Yiyeceklerde veya vücutta antioksidanlar düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli ölçüde engelleyen veya geciktiren maddelerdir [83].

Antioksidanlar insan vücudunda reaktif oksijen türlerinin verebileceği zararları yok ederler veya en aza indirgerler [84]. Antioksidan içeriği zengin olan sebze ve meyvelerin tüketilmesi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu doku hasarına bağlı hastalıklardan insanları korumaktadır [85-86].

Diğer taraftan işlenmiş gıdaların bozunmasını önlediği ve raf ömrünü uzattığı için gıdalarda katkı maddesi olarak sentetik antioksidanlar kullanılmaktadır. Günümüzde BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol), BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (*t*-bütilhidrokinon) en fazla kullanılan sentetik antioksidan maddelerdir. Fakat sentetik antioksidanlar ve oluşturdukları yan ürünlerin çeşitli kanser hastalıklarına neden oldukları belirlenmiştir [87,88].

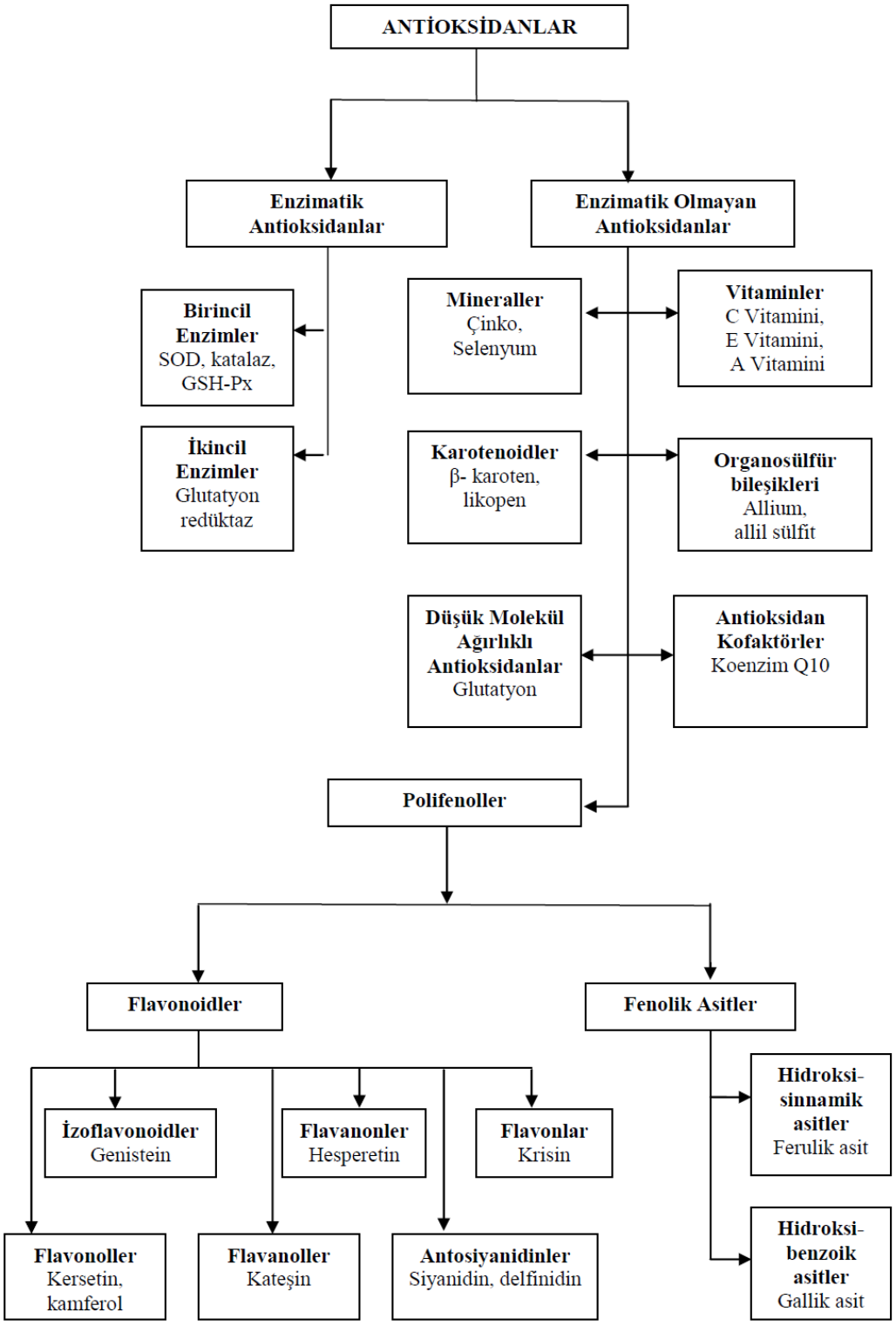
Bu sebeple doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidanların bulunması için yapılan çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu alanda yapılan çalışmalar artmıştır. Ticari amaçla kullanılan en önemli doğal antioksidanlar askorbik asit ve tokoferollerdir. Karotenoitler, fenolik bileşikler, flavonoitler,

amino asitler ve enzimatik antioksidanlar (glukoz oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz) diğer doğal antioksidan kaynaklarıdır [89].

Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında doğal bir şekilde meydana gelmektedir. Bunlar karotenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoitler, glutatyon ve endojen metabolitleri içerir. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar singlet ve triplet oksijen söndürücüsü, serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon görürler. Sebze ve meyveler de birçok antioksidan içerirler. Doğal antioksidan bileşikler; sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır. Bundan dolayı bol miktarda sebze ve meyve tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azalttığı gibi, kanserde ve ölüm oranında düşüş meydana getirmekte olduğunu belirtilmiştir. En önemli doğal antioksidanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve skualen sayılabilir. Askorbik asit, bitkilerde ve bazı memelilerin karaciğerinde glukozdan sentezlenir. Askorbik asit bazı enzimlerde kofaktör olarak görev yapar. Bunlardan en önemlisi, kollagenin biyosentezinde yer alan prolinin hidroksiproline enzimatik hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarına katılmasıdır. Ayrıca askorbik asit dopamin-β-hidroksilaz aktivitesi için de gereklidir. Askorbik asitin en önemli özelliği indirgeyici bir molekül olmasıdır. Askorbik asit Fe^{3+}'ü Fe^{2+}'ye indirgeyebilir. İnvivo olarak indirgeyici özelliğinden dolayı, bazı organik radikallerin söndürülmesinde de önemli rolü vardır.

Flavonoitler ise, bitkiler tarafından sentezlenen fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Fenolik yapılarından dolayı antioksidan özellik göstermektedirler. Bazı flavonoitler, etkili bir şekilde hücreleri ve dokuları reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerinden korur.

Gıdalarda ve biyolojik yapılarda bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:



Şekil 2.22: Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar dört farklı biçimde etki ederler:

1)Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif yeni bir moleküle çevirmeye "toplayıcı" etki denir.

2)Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürmesi "bastırıcı" etkidir.

3)Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etkiye "zincir kırıcı" etki denir.

4)Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması ise "onarıcı" etkidir.

Antioksidanlar yükseltgenebilen maddeler olduğundan zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu sebeple antioksidanlar sadece sınırlı bir zaman için yükseltgenebilen maddeyi koruyabilir ve belli bir noktadan sonra madde, ortamda hiç antioksidan yokmuş gibi yükseltgenmeye devam eder.

Antioksidanların kimyasal aktiviteleri, diğer bir deyişle hidrojen veya elektron donör olarak indirgeme potansiyelleri onların serbest radikal yutucu olarak göstermiş oldukları potansiyel ile ifade edilir [90]. Bir antioksidanın aktivitesi şu esaslara bağlıdır:

- ❖ Radikal süpürme yeteneği
- ❖ Hidrojen veya elektron donör olarak göstermiş olduğu reaktivite (redüksiyon potansiyeline bağlı olan)
- ❖ Metal kelatlama potansiyeli
- ❖ Diğer antioksidanlarla olan iletişim şekli

Antioksidan aktivite tayininde kullanılan metotlar ise iki temel başlıkta incelenmektedir:

1) Elektron transferine dayanan yöntemler
2) Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler

1)Elektron transferine dayanan yöntemler: Oksidan maddenin indirgenmesi sonucu oluşan rengin değişiminin ölçülmesi ile antioksidan maddenin ölçümü yapılır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan maddenin konsantrasyonuna bağlıdır [91].

Elektron transferine dayanan yöntemler:

- ❖ DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest radikal giderim yöntemi
- ❖FRAP-ferric reducing antioxidant power- (Demir iyonu indirgeme gücü metodu)
- ❖ CUPRAC-Cupric reducing antioxidant capacity- yöntemi
- ❖ TEAC/ABTS-Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi

2)Hidrojen atomu trasferine dayanan yöntemler: Antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı reaksiyonlar gerçekleşir. Genelde azotlu grup taşıyan maddelerin bozulup peroksil radikalleri oluşumu esasına dayanır [91].

Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler:

- ❖ Düşük dansiteli lipoprotein otooksidasyonunun neden olduğu inhibisyon
- ❖ Oksijen radikali absorbans kapasitesi (ORAC)
- ❖ Toplam radikal yakalama parametresi (TRAP)
- ❖ Luminol yöntemi
- ❖ Fikoeritrin esaslı yöntemler
- ❖ DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi
- ❖ Krosin yöntemi
- ❖ TOSC (Toplam oksiradikal) yöntemi

2.6 Antikolinesterazlar

2.6.1 Alzheimer Hastalığı ve Nedenleri

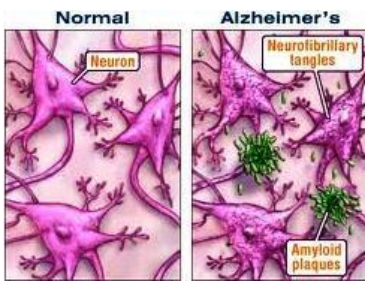
Alzheimer hastalığı ilk kez Alman psikiyatrist Aloist Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmıştır. Hastalığın ortaya çıkışına dair ilk belirti genellikle hafıza kaybıdır. Hastalık, daha sonra beynin öğrenme, bilgiyi değerlendirme, mantıklı hale getirme ve diğer fonksiyonlarını da etkileyecek biçimde ilerleme gösterir [92]. Alzheimer hastalığı; dejeneratif, nörolojik bir hastalık olup amiloid β protein içeren (yaşlılık/bunama) plaklarının oluşumu ve kolinerjik nöromedyatörlerin kaybolması olarak tanımlanır [93]. Alzheimer hastalığına sahip kişilerde yapılan otopsilerin sonucuna göre; bu hastalarda karakteristik plak ve düğüm oluşumunun yanında mitokondrial işlev bozukluğu, iltihaplanma, astrogliyoz, mikrogliyal aktiflenme, sinaptik hasar, nöron tahribatı ve apoptosis (programlanmış hücre ölümü) bulguları da gözlenmiştir [94]. Başlangıç evresinde bu hafıza kaybını yaşlılıkla birlikte gelişen unutkanlıktan ayırmak güç olabilir. Fakat unutkanlığı olanlar bu durumun farkındadır

ve günlük yaşam aktiviteleri minimal düzeyde etkilenir [95]. Yeni bilgilerin çabuk unutulması, yakın geçmişi hatırlarken zorlanmak ya da hatırlayamamak, buna karşılık uzak geçmişi çok iyi hatırlamak belirgin bir özelliktir. Alzheimer hastalarında konuşma bozukluğu sıkça rastlanır, cümle kurarken zorlanırlar. Hastalık ilerledikçe bellek problemleri artar. Zamanla özel bakım işleri bozulur, psikiyatrik semptomla başlar ve hasta yatağa bağımlı kalır [95,96].

1980'li yılların başında yapılan araştırmalara göre beynin kenarında küremsi birikintiler (plak) veya liflerin (fibriller) oluştuğu tespit edilmiştir. Bu plak yığılmasına beta-A4 proteini (42 aminoasitten oluşur) ve APP proteinin (amyloid precursor protein) sebep olduğu belirtilmiştir. Beyindeki beta-A4 ve APP proteinleri "amiloidler" olarak adlandırılmaktadır. Amiloidler beyin hücreleri arasındaki haberleşmeyi önleyerek beyin hücrelerinin yavaş yavaş ölmesine sebep olmaktadırlar [97].

APP, sağlıklı nöronlar tarafından üretilmekte olup normal proteinlerdir. APP'nin tanımlanmasıyla vücudumuzun en az üç çeşit enzim ürettiği ortaya çıkmıştır. Bunlar alfa, beta ve gama salgıları olarak adlandırılırlar. Alfadan farklı olarak, beta ve gama enzimleri, birlikte hareket ederek, adına beta amiloid (A-beta) denilen daha kısa, daha yapışkan bir protein üretirler [97].

Alzheimer hastalarında beta amiloid (A-beta) üretimi sağlıklı bir birey ile aynı olup sorun beta amiloidlerin dışarı atılmasında yaşanmaktadır. Normalde beta amiloidler hücrenin dışına çıktığı zaman erir, ancak bazen erimesi mümkün olmayan ve adına "fibril" denilen birikintiler oluştururlar [98]. Bu fibriller birbirine yapışarak plakaları meydana getirir. Her insan yaşlandıkça plaka üretmektedir. Gerçek sorun, bu plakaların iltihaplanma ile sonuçlanan reaksiyonları tetiklemesidir. Beyin, genel olarak, enfeksiyonlarla savaşırken serbest radikal denilen toksik ajanlar üretmektedir. Bu fibriller de benzer reaksiyonlara zemin hazırlarlar [97]



Şekil 2.23: Normal bir beyin ile Alzheimer hastası beyni arasındaki fark

Oksidatif stresin hücre tahribatıyla sonuçlanan biyomoleküllerin oksitlenmesine neden olduğu bilinmektedir [93]. Toksik beta amiloidlerin yavaş yavaş birikimi, sürekli oksidatif stres ve benzeri olaylarla birleştiğinde nöronlarda yapısal bozukluk oluşumuna sebep olmaktadır. Bu süreç; fonksiyonel aksaklıklara, kavramsal ve davranışsal bozukluklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Beyindeki beta amiloid birikimini hızlandıran patofizyolojik durumlar Alzheimer riskini arttırmaktadır [99].

Sonuç olarak; oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk basamaklarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynamaktadır [97].

Beyinde nöronlar arasında veya bir nöron ile başka bir (tür) hücre arasında iletişimi sağlayan kimyasallara "nörotransmitter" denilmektedir. Sinir sistemi boyunca sinirsel sinyaller bu kimyasal taşıyıcılar aracılığıyla iletilir. Temel olarak iki nörotransmitter madde bulunur:

1)Asetilkolin nörotransmitter: Dokulardaki bilgiyi ve ya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolin esteraz isimli enzim tarafından parçalanır. Bir sonraki bilgi aktarımı için yeniden asetilkolin üretilmelidir. Alzheimer hastalarında yeterince asetilkolin üretilememektedir. Asetilkolini parçalamakla görevli olan asetilkolinesteraz enziminin frenlenmesi ile Alzheimer hastalığının ilerlemeyeceği düşünülmektedir [100].

2)Glutamat nörotransmitter: Sinir hücrelerinde % 70 oranında bulunmaktadır. Görevi; öğrenme ve hafıza ile ilgilidir. Alzheimer hastalarında glutamat çok aşırı şekilde salgılanmakta ve bu durum sinir hücrelerinin tahrip olmasına sebep olmaktadır. Glutamat salgılanması frenlenirse sinir hücrelerinin ölümünün yavaşlayacağı ve Alzheimer hastasının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği düşünülmektedir [100].

Alzheimer hastalığında kullanılan iki önemli tedavi seçeneği "kolinesteraz inhibitörler" ve "N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir":

Kolinesteraz inhibitörleri bellek ve düşünce ile ilgili bir nörotransmitter olan asetilkolinin parçalanmasını engellemeye yardımcı olmaktadırlar [99].

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri ise öğrenme ve bellek fonksiyonları açısından önem taşıyan bir transmitter olan glumat'ı düzenleyici etki gösterirler [99].

Alzheimer hastalarında karşılaşılan en önemli biyokimyasal değişiklik hipokampüs ve beyin korteksindeki asetilkolin (ACh) seviyesinin azalmasıdır. Alzheimer hastalığının tedavisi için asetilkolinin hidrolizinden sorumlu olan asetilkolinesteraz enziminin (AChE) inhibisyonu yöntemi en çok kabul gören yaklaşımdır [99]. Bu yaklaşım göz önünde bulundurularak anti-Alzheimer aktivite testleri asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu odaklı gerçekleştirilmiştir. Anti-Alzheimer aktivite testlerinde Ellman metodu kullanılmıştır.

2.6.2 AChE ve BChE

Vücutta asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) olmak üzere iki tane kolinesteraz enzimi vardır [99]. Normal erişkin beyninde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır [101]. Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, butirikolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferal sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır [99]. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE, geriye kalan %20 sinden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir. AChE'nin kolinerjik iletimdeki rolü oldukça iyi bilinmekle beraber BChE'nin rolü yeterince anlaşılamamıştır. Normal beyinde sinaptik asetilkolin hidrolizinin esas olarak AChE tarafından yapıldığı, BChE'nin buna çok az katkısının olduğu kabul edildiğinden [99], bu çalışmada Ellman metodu ile gerçekleştirilen antikolinesteraz aktivite testleri; hem asetilkolinesteraz hem de butirilkolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu incelenerek gerçekleştirilmiştir.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bitkisel Materyaller

- *Prangos ilanae* Pimenov MG & Akalin E & Kljuykov E (Herbaryum No: Dirmenci 3694) Balıkesir Edremit, Kazdağı, Eşek deresi yolu, 14.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay Dirmenci tarafından teşhis edildi ve toplandı.
- *Heracleum platytaenium* BOISS. (Herbaryum No: Dirmenci 3686) Balıkesir Edremit, Kazdağı, Yayla-Kapıkule arası, 1100 m'den, 14.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay Dirmenci tarafından teşhis edildi ve toplandı.

3.2 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler

- Merck: 1.07730.1000 Silica gel 60 GF254, 1.07734.1000 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm), Merck 1.05554.0001 TLC Silica gel 60 F_{254}, BHT, BHA, sodyumbikarbonat, petrol eteri, sülfirik asit (%98), diklorometan, kloroform, aseton, etanol, metanol.
- Sigma-Aldrich: Serium (IV) sülfat, DTNB(5,5'-Dithiobis (2-Nitro-benzoik asit), Folin Ciocalteu reaktifi, α-Tokoferol, *β*- karoten, Tween-40, Linoleik asit, pirokatekol, kersetin, DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil), asetiltiyokolin iyodür, butiriltiyokolin iyodür, sodyumbifosfatdihidrat, sodyumdihidrojenfosfatdihidrat, asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz, etil asetat.
- Carlo Erba: Alüminyumnitratnonahidrat.

3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması

3.2.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 1 g Na_2CO_3 50 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra deiyonize su ile hacmine tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + $CuSO_4$): Satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.2.2.2 Toplam flavonoit miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması: 1,76 g $Al(NO_3)_3.9H_2O$ 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Daha sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

1 M Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması: 0,98150 g CH_3COOK 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldükten sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

3.2.2.3 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

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

0,1 mM *β*–Karoten çözeltisinin hazırlanması: 0,2 mg *β*-karoten 1 mL kloroformda çözüldü. 20 µg linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform rotaevaporatörde uçurulduktan sonra 50 mL oksijen gazı ile doyurulmuş destile su ilave edilerek kuvvetlice karıştırıldı.

3.2.2.4 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

0,1 M $H_2PO_4^-$ Çözeltisinin Hazırlanması: 1,56 g $H_2PO_4^-$ tartılıp, 100 mL distile suda çözüldü.

0,1 M HPO_4^{2-} Çözeltisinin Hazırlanması: 3,556 g $H_2PO_4^{2-}$ tartılıp, 200 mL distile suda çözüldü.

0,1 M pH=8 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 94,7 mL HPO_4^- ve 5,3 mL $H_2PO_4^{2-}$ çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

0,1 M pH=7 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 3,9 mL $H_2PO_4^-$ ve 6,1 mL HPO_4^{2-} çözeltilerinden alındıktan sonra 10 mL distile su eklenerek hazırlandı.

DTNB Çözeltisinin Hazırlanması: 16 mg DTNB 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde ve 7,5 mg $NaHCO_3$ 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırılır. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlanır. Kullanma aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi.

AcI: 32,8 mg AcI alınarak, 8 mL deiyonize su eklendikten sonra kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

BuI: 4 mg BuI alınarak, 8 mL deiyonize su eklendikten sonra kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

AChE Enzimleri: 1,17 mg AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözülerek ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrıldı. Böylece her biri için 0,235 mg/mL'lik konsantrasyon sağlanmış oldu. 8 mL distile su eklenmesi sonucu 125 µL'lik enzim çözeltileri elde edildi. Her bir 125 µL'lik örnekte 0,02925 mg enzim bulunur. 125 µL'lik enzim çözeltisine 460 µL pH=8 tampon çözeltisi eklendikten sonra toplamda 585 µL olan çözelti 25 µL'lik 23 küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 3000 µL'ye tamamlandı.

BChE Enzimleri: 1 mg BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra 300 µL'lik stoklar oluşturularak küçük şişelere dolduruldu ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletildi. Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1800 µL pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirildi.

3.2.2.5 Standart çözeltilerin hazırlanması

a. Kersetin çözeltisinin hazırlanması

   25,8 mg kersetin 25 mL etil alkolde çözülerek 1000 ppm'lik konsantrasyonda kersetin çözeltisi hazırlandı.

b. Pirokatekol çözeltisinin hazırlanması

   10 mg pirokatekol 100 mL su ile çözülerek 100 ppm'lik pirokatekol çözeltisi hazırlandı.

c. BHT (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksitoluen) çözeltisinin hazırlanması

   10 mg BHT 10 mL etanol içide çözülerek 1000 ppm'lik BHT çözeltisi hazırlandı.

d. BHA (2,6-di-*t*-bütil-1-hidroksianisole) çözeltisinin hazırlanması

   10 mg BHA 10 mL etanol içinde çözülerek 1000 ppm'lik BHA çözeltisi hazırlandı.

e. α-Tokoferol çözeltisinin hazırlanması

%97'lik 10,31 mg α-tokoferol 10 mL etanolde çözülerek 1000 ppm'lik α-tokoferol çözeltisi hazırlandı.

f. Galantamin çözeltisinin hazırlanması

4 mg galantamin 1 mL etil alkolde çözülerek 4000 ppm'lik konsantrasyonda galantamin çözeltisi hazırlandı.

3.2.2.6 İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi

Serik sülfat belirtecinin hazırlanması: 2,0 g seryum (IV) sülfat tetrahidrat 100 mL % 10'luk H_2SO_4'de çözülerek hazırlandı. Belirteç, uygun çözücü sisteminde yürütülen ince tabaka plaklarına püskürteç kullanılarak püskürtüldü.

3.3 Cihazlar ve Gereçler

- Eliza Reader Molecular Devices Spectro Max340 PC
- Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı (NMR): Bruker AC (^{1}H: 250 MHz; ^{13}C: 60 MHz), Varian Mercury (^{1}H: 400 MHz, ^{13}C: 100 MHz), Varian Inova (^{1}H: 500 MHz, ^{13}C: 100 MHz)
- Döner Buharlaştırıcı (Rota Evaporatör, Büchi ve Heidolph)
- Hassas terazi (Ohaus Adventurer-Pro)
- Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı (IKA RCT basic hot plate)
- Vortex IKA MS3 basic
- Ultrasonik Banyo (Fisher Scientific FB 15051)
- pH-metre (WTW Inolab pH 720)
- Etüv (Ecocell)
- UV kabin ve lamba (Camag)
- Otomatik tekli ve çoklu pipetler (0,5-10 μL, 20–200 μL, 100–1000 μL, 1000–5000 μL) (Eppendorf)
- Azot Tüpü

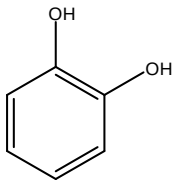
3.4 Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçerik Miktar Tayinleri

3.4.1 Toplam fenolik miktar tayini

Numunelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak standart olan pirokatekole eşdeğer olarak belirlenmektedir. Toplam fenolik ayıracı olarak bilinen Folin-Ciocalteu ayıracı (FCR) bazlı yöntem, örneğin indirgeme kapasitesini

ölçmektedir. FC reaktifi sadece fenolik bileşenleri değil, birçok fenolik yapıda olmayan bileşenleri de indirgeme yeteneği vardır[98-99]

Bu yöntemde kullanılan $CuSO_4$ (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfo molibdik fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II)'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat ayıracını heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbansları ölçülür.

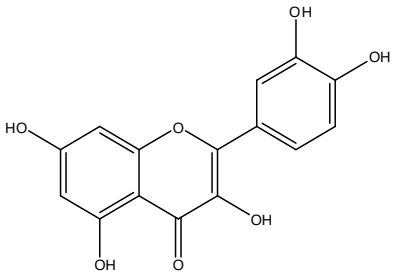


Pirokatekol

Şekil 3.1 : Standart olan pirokatekol bileşiğinin açık yapısı

3.4.2 Toplam flavonoit miktar tayini

Bu yöntemde numunelerin toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi. Standart flavonoit bileşik olarak kersetin kullanılmaktadır.



Kersetin

Şekil 3.2: Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kersetinin açık yapısı

3 mg olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlandı. Her bir örnekten 100 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Standart olarak kullanılan kersetinin 1000 ppm'lik çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Daha sonra bu karışımlara 100 µL 1M potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µL

%10'luk alüminyum nitrat çözeltisinden ilave edilerek karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildi ve 415 nm'de absorbansları okundu.

3.5 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

3.5.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi

Bu yöntem; antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin süpürücü etkilerini ölçmeye dayanan bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Mor renkli DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorpsiyon vermektedir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla rengi mordan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların süpürme kabiliyetlerini değerlendiren basit ve geçerli yöntemdir. Ancak bazı bileşenlerin (özellikle karotenoidler) 517 nm'de DPPH ile çakışık spektrum vermesi analizin yorumunu güçleştirir. Ayrıca çoğu sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş tepkimeye girer. Bu yüzden yöntem; DPPH ile tepkimeye giren antioksidanların antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir değerlendirme vermez. Bunlara ek olarak DPPH'ın rengi; ışık, hava oksijeni, nem ve pH'a fazla duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçların eldesi güçtür [100].

Tepkime mekanizması aşağıdaki gibidir.

$DPPH^{\cdot}$ + Antioksidan-H → DPPH-H + $A^{\cdot}$

DPPH serbest radikali kullanılarak bitki ekstrelerinin ve saf maddelerin serbest radikal giderim aktiviteleri belirlendi. 50 µg ile 500 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1'er mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

DPPH Giderim Aktivitesi (% İnhibisyon) = (Akontrol – Aörnek) / Akontrol x 100

$A_{kontrol}$ kontrolün absorbansı, $A_{örnek}$ örneğin absorbansıdır.

Reaksiyon karışımının düşük absorbsiyon göstermesi serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu belirtir.

3.5.2 β-Karoten-linoleik asit yöntemi (lipid peroksidasyon inhibisyonu aktivitesi)

Toplam antioksidan aktivite olarak da adlandırılan yöntem, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesine yöneliktir. β-karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. Antioksidan maddenin varlığında oluşan bozunma ürünleri antioksidan tür tarafından temizlendiğinden veya bu tepkimenin oluşumu engellendiğinden β-karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.

Linoleik asit + (O_2-H_2O) + β-karoten → Konjuge dienler ve diğer bozunma ürünleri

↓

β-karoten→ renk açılımı

Linoleik asit + (O_2-H_2O) + β-karoten + antioksidan madde → rengin korunması

3.6 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemleri

3.6.1 Ellman yöntemi

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivite testleri Ellman metodu olarak bilinen spektrofotometrik yöntem esas alınarak ölçüldü. Enzim olarak elektrik balığından elde edilen asetilkolinesteraz ve at serumundan elde edilen bütirilkolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetilkolin iyodür ve bütirilkolin iyodür, aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanıldı. Sırasıyla asetilkolin iyodür veya bütirilkolin iyodürün enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu meydana gelen sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlendi. Kontrol olarak etanol, standart olarak ise galanthus bitkisinden elde edilen alkaloid yapıda olan galantamin kullanıldı.

Antikolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\%\ inhibisyon = \left(\frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}}\right) \times 100 \qquad \textbf{(3.4)}$$

(A= Absorbans)

3.7 İstatistiksel Hesaplamalar

Aktivite sonuçlarında elde edilen veriler 3 paralel testin ortalama ± standart sapması olarak verildi. Sonuçlar Student-*t* testine göre % 95 güven sınırları içinde bulundu. Konsantrasyon ile absorbanslar arasında ölçü eğrileri çizildi ve ilgili regresyon denklemleri bulundu. En küçük kareler yönteminin kullanıldığı doğrusal regresyon analizi eğim, intersept ve korelasyon katsayılarının değerlendirilmesiyle yapıldı.

3.8 Kromatografik Yöntemler

Maddeler karışımının bir hareketli faz yardımıyla, bir sabit faz üzerinden geçirilerek bileşenlerine ayrılması işlemi kromatografi olarak adlandırılır. Kromatografik ayırım; karışımı oluşturan bileşenlerden her birinin sabit fazda tutunma ve hareketli faz ile sürüklenme eğilimlerinin birbirinden farklı olması ilkesine dayanmaktadır. Bileşenlerin her biri kromatografik sistemde farklı hızlarla ilerler ve birbirinden ayrılırlar. Kromatografik yöntem ilk kez 1850'li yıllarda Runge, 1890'lı yıllarda Reed ve 1900'lü yıllarda Amerikalı petrol kimyacısı D. T. Day tarafından geliştirilmiş olmasına rağmen, 'kromatografinin babası' ünvanı genellikle Polonyalı botanikçi M. S. Tswett için kullanılmaktadır. Tswett 1906 yılında bir cam boru içine doldurulan adsorbanlar üzerinden bitki ekstraktlarını geçirmiş ve klorofil, ksantofil, karoten gibi pigmentlerin kolonun farklı yerlerinde renkli halkalar halinde ilerlediğini gözlemlemiştir. Bu nedenle renklerin grafiği ya da renklerin ayrılması anlamına atfen, kromatografi deyimi günümüze kadar kullanılagelmiştir.

Bu tez çalışması sırasında hazırlanan ekstrelerin fraksiyonladırılması, saf maddelerin izolasyonu ve analizi için kolon kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi teknikleri kullanılmıştır [101].

3.8.1 Kolon kromatografisi

Ekstrelerin fraksiyonlandırılması ve bu fraksiyonlardan saf madde izolasyonu için kolon kromatografisi kullanıldı. Bu amaçla madde miktarına bağlı olarak farklı genişlik ve uzunluklarda cam kolonlar kullanıldı. Kolon dolgu maddesi olarak silikajel (Merck 1.07734) kullanıldı. Ekstreler az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra toz kıvamına getirilen karışım dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş, ekstre

miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silikajel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına dolduruldu. Bu işlem sonucunda adsorban ve üzerine doldurulan maddenin üst yüzeyinin düzgün olmasına dikkat edildi. Elüsyona nonpolar bir çözücü olan % 100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla diklorometan, aseton ve metanol ile polarite arttırılarak elüsyona devam edildi, sonunda % 100 metanol ile elüsyon tamamlandı. Bileşiklerin renkli olması durumunda ise bu bileşikler renkli halkalar halinde kolonda gözlenip, farklı kaplarda toplandı. Maddelerin renkli olmaması durumunda ise; bileşenleri saf halde elde edebilmek için toplama kabı olabildiğince sık aralıklarla (100'er ml'lik erlenlerde) değiştirildi. Benzer fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi yardımıyla birleştirildikten sonra saflaştırma için preparatif ince tabaka kromatografisinden veya daha küçük boyuttaki kolonlardan yine adsorban olarak silikajel kullanılarak faydalanıldı.

3.8.2 İnce tabaka kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde (İTK), arkası Aluminyum kaplı hazır silikagel plaklardan (20 x 20 cm) (Merck 1.05554) ve cam plaklardan (20 x 20 ; 20 x 10) yararlanıldı. Cam plakları hazırlamada adsorban olarak Silikagel 60 GF254(Merck 1.07730) kullanıldı. Tatbik edilen maddelerin uygun çözücü sistemleriyle ilerlemesi sağlandı. Çözücü ile yürütme işleminin ardından ortaya çıkan lekeler UV ışık altında işaretlendikten sonra özel bir belirteç olan serik sülfat belirteci ile etüvde 105 ^{o}C'de 5 dakika bekletilerek belirgin lekeler gözlenmesi sağlandı. İnce tabaka kromatografisinde maddelere özgü Rf değerleri sayesinde farklı maddeler ayırt edilebildi.

Ayrıca maddeleri saflaştırmak için preperatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı. Önce analitik çalışılıp uygun çözücü sistemleri belirlendi. Bu yöntemde içindeki bileşikleri ayrı ayrı izole etmek istediğimiz madde; plaklara başlangıç çizgisi boyunca düzgün bir şekilde tatbik edildikten sonra maddelerin ayrılmasına olanak verecek uygun polariteye sahip daha önceden belirlediğimiz çözücü sistemi belirlenerek yürütüldü. UV ışık altında birbirinden ayrılmış çizgiler halinde maddeler tespit edilerek, ayrı ayrı erlenlere alındıktan sonra uygun çözücülerle maddeler saf halde geri kazanıldı.

3.9 Spektroskopik Yöntemler

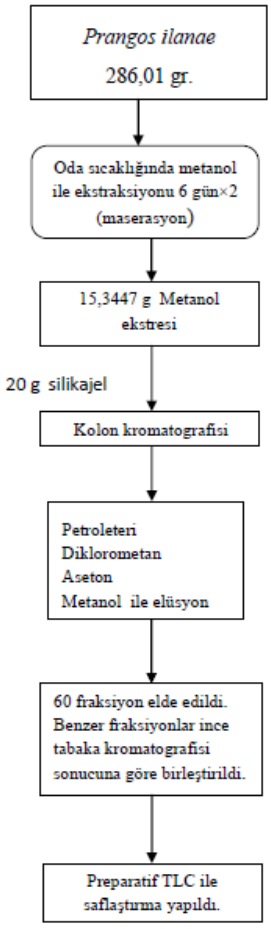
3.9.1 NMR spektroskopisi

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin ^{1}H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, ^{1}H-^{1}H COSY (proton-proton etkileşimi için), HSQC (direkt proton-karbon korelasyonu için), HMBC (iki ve üç bağ uzaklıktaki proton-karbon korelasyonu için), spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform ($CDCl_3$), döterometanol (CD_3OD) kullanıldı. Saf bileşiklerin ^{1}H NMR analizleri 600 MHz ve 400 MHz, ^{13}C NMR analizleri 150 MHz ve 100 MHz Varian ID-6508 invers problu NMR spektrometrelerinde UME-TÜBİTAK'ta ve Boğaziçi Üniversitesi'nde yapılmıştır.

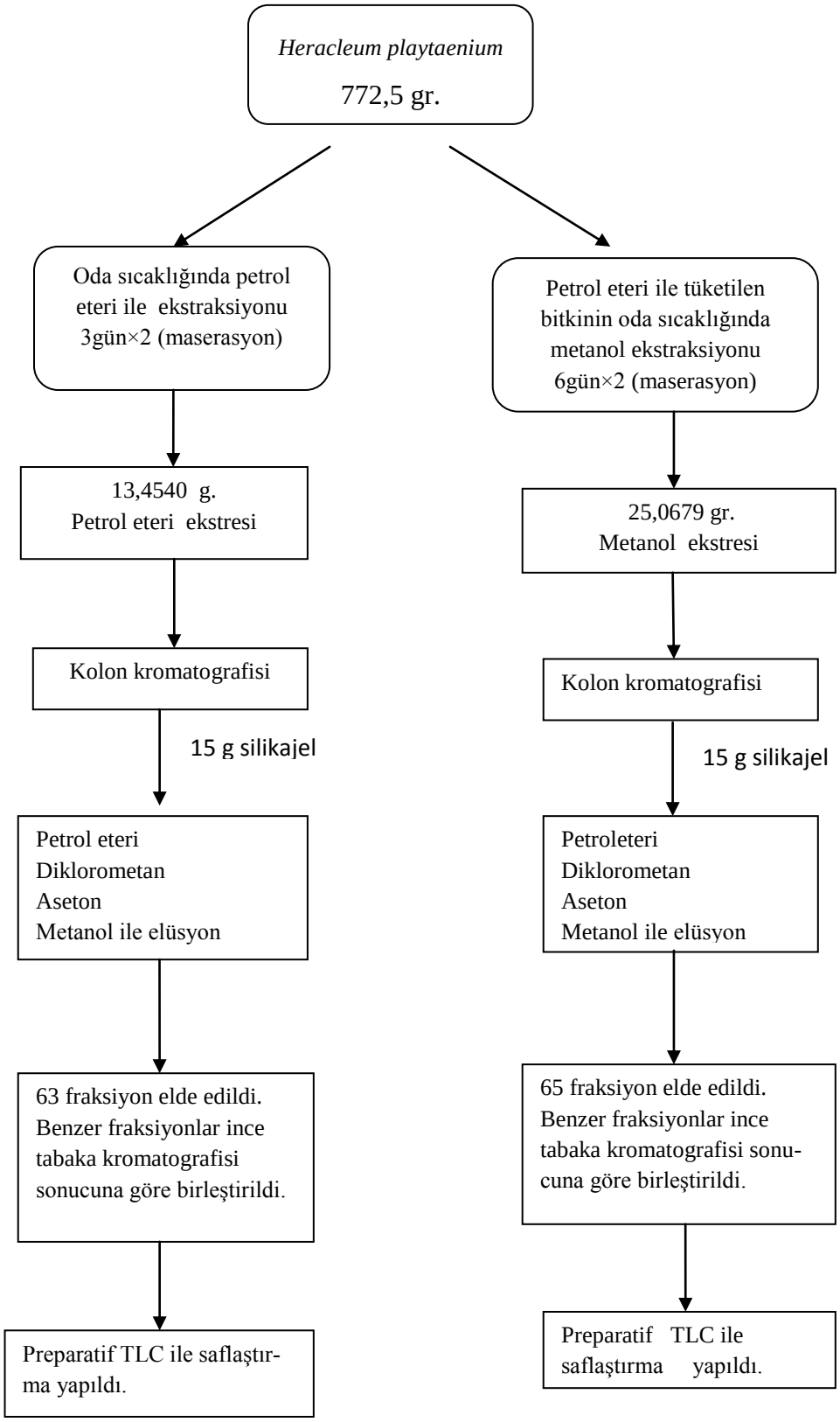
4. DENEYSEL BÖLÜM

4.1 Bitkilerin Ekstre Edilmesi

Her iki bitkide gölgede kurutulduktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan *Prangos ilanae* (286,01 gr.) oda sıcaklığında metanol ile iki kez masere edildi. *Heracleum platytaenium* (772,5 gr.) bitkisi ise oda sıcaklığında öncelikle petrol eteri ile iki kez masere edildi. Petrol eterinde tüketilen bitki daha sonra metanol ile iki kez masere edildi. Rotaevaporatörde çözücüleri uçurularak ekstreler elde edildi.



Şekil 4.1: *Prangos ilanae* bitkisinin metanol ekstresinin hazırlanması ve fraksiyonlandırılması



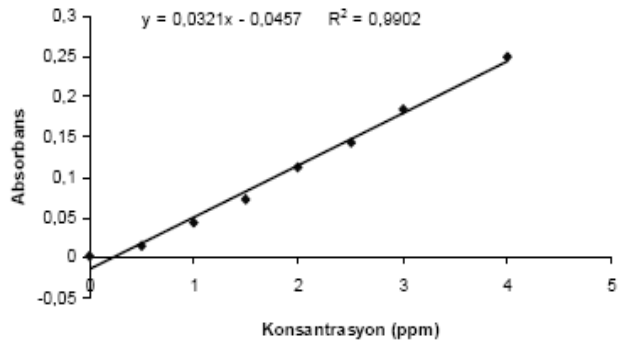
Şekil 4.2: *Heracleum platytaenium* bitkisinin petrol eteri ve metanol ekstreleri hazırlanması ve fraksiyonlandırılması

4.2 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi

4.2.1 Toplam fenolik miktar tayini

Ekstre ve fraksiyonların toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi. 3 mg olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlandı. 1000 ppm olarak hazırlanan pirokatekol çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri etanolle 200 µL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu karışımlara su, FCR reaktifi ve 3 dk sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı ve örneklerin absorbansları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

$$Absorbans = 0{,}0148\, pirakatekol\ (\mu g) + \ 0{,}0225\ (R^2 = 0{,}9953)$$

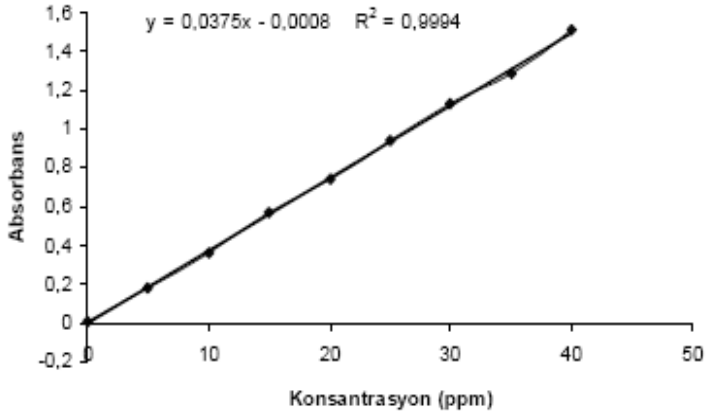


Şekil 4.3: Pirokatekolün ölçü grafiği

4.2.2 Toplam flavonoit miktar tayini

Ekstre ve fraksiyonların toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi (Moreno ve diğ,. 2000). Örneklerden 100 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Kersetinin 1000 ppm'lik çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Bu karışımlara 100 µL 1M potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µL %10'luk aluminyum nitrat çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de absorbansları okundu.

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı. $Absorbans = 0{,}1574\ kersetin\ (\mu g) - \ 0{,}1239\ (R^2 = 0{,}9968)$



Şekil 4.4: Kersetinin ölçü grafiği

4.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

4.3.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi

Ekstreler, fraksiyonlar ve saf maddelerin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 517 nm'de karakteristik absorbsiyonu olan kararlı serbest bir radikaldir. DPPH'ın 517 nm'deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlendi. Örneklerin 50 µg ile 500 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL etanol kullanıldı. Oda sıcaklığında karanlıkta 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$DPPH\ Giderim\ Aktivitesi\ (\%\ inhibisyon) = \left(\frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}}\right) \times 100$$

$A_{kontrol}$ kontrolün absorbansı, $A_{örnek}$ örneğin absorbansıdır.

4.3.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu aktivitesinin belirlenmesi

Örneklerin toplam antioksidan aktivite olarak da adlandırılan bu yöntemde, standart olarak kullanılan α-Toc, BHT, BHA kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 10, 25, 50, 100 µg/mL olacak şekilde, 4 mL β-karoten çözeltisi ilave edildi. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Kontrol olarak etanol kullanıldı. Tüpler 50°C'de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki β-karotenin rengi kayboluncaya kadar (yaklaşık 120 dk) inkübasyona devam edildi. Absorbans yine 490 nm'de ölçüldü. β-karoten renk açılım oranı (R), aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t}$$

ln: doğal logaritma, a: başlangıç absorbansı, b: inkübasyondan sonraki

absorbans, t: inkübasyon süresi (dk).

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

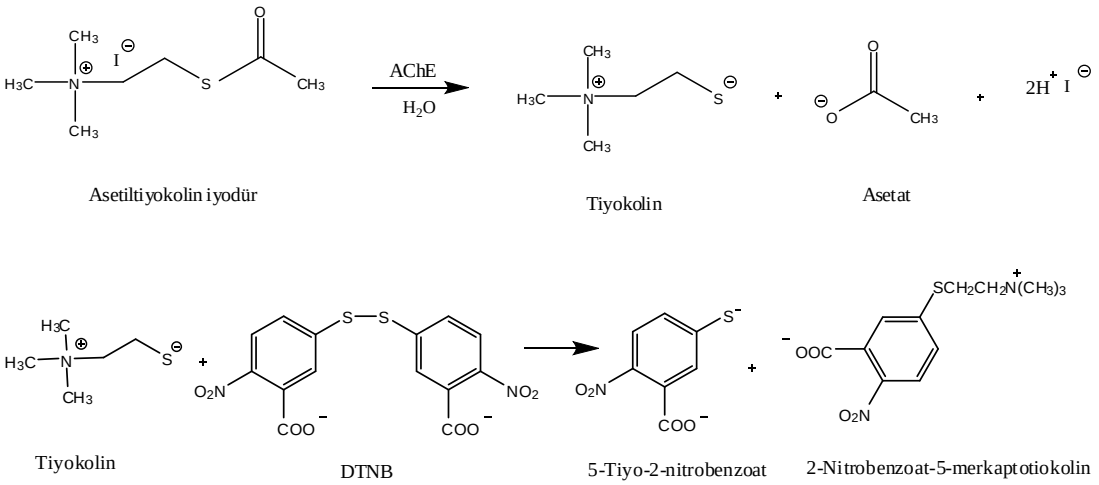
$$AA\ (\%\ inhibisyon) = (R_{kontrol} - R_{örnek})/R_{kontrol}\ ) \times 100$$

$R_{kontrol}$ kontrolün renginin açılma hızı ve $R_{örnek}$ örneğin renginin açılma hızıdır.

4.4 Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi

4.4.1 AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Reaksiyon şematik olarak Şekil 4.5'te gösterilmektedir:



Şekil 4.5 : Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması

Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmektedir.

Reaktiflerin Hazırlanışı

- DTNB: 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7,5 mg $NaHCO_3$ 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 ml pH=7 tamponu ile hacmi 4 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 mL pH=8 tamponu eklendi.
- Substrat: 32,8 mg asetilkolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.
- Enzim Çözeltisi: 0,2 mg asetilkolinesteraz enzimi 3 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözülerek hazırlandı.

4.4.2 AChE % inhibisyon testi

- Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu.
- Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25ºC de inkübe edildi.
- 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (20 µL) herbir kuyucuğa ilave edildi.
- Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile

absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.

- Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM dan 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak IC_{50} değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

4.4.3 BChE aktivite testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak butirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanılmaktadır.

Reaktiflerin Hazırlanışı

- DTNB: 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7,5 mg $NaHCO_3$ 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 mL pH=7 tamponu ile hacmi 4 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 mL pH=8 tamponu eklendi.
- Substrat: 4 mg butirilkolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.
- Enzim Çözeltisi: 0,2 mg butirilkolinesteraz enzimi 1,8 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözülerek hazırlandı.

4.4.4 BChE % inhibisyon testi

- Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu.
- Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25ºC de inkübe edildi
- 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (20 µL) herbir kuyucuğa ilave edildi.
- Standart olarak galantamin kullanıldı.
- Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.

- Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak IC_{50} değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı**.**

4.5. *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* Bitkilerinin İzolasyon ve Saflaştırma Çalışmaları

4.5.1 *Prangos ilanae* bitkisinin metanol ekstresinin fraksiyonlandırılması

Prangos ilanae bitkisinin toprak üstü kısımlarının tamamı gölgede kurutulduktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan bitki (286,01g) oda sıcaklığında iki kez metanol ile masere edildi. Rotaevaporatörde çözücüsü uçurulduktan sonra metanol ekstresi elde edildi. Metanol ekstresi kurutulduktan sonra silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlayarak ve polariteyi belli oranda arttırarak %100 diklorometana; diklorometandan yine polarite arttırılarak %100 asetona ve ardından %100 metanole kadar devam edilmiştir. İnce tabaka kromatografisi yapılarak benzer fraksiyonların birleştirilmesi ile toplam olarak 15 adet fraksiyon elde edilmiştir.

4.5.2 *Heracleum platytaenium* bitkisinin toprak üstü kısmının petrol eteri ve metanol ekstresinin fraksiyonlandırılması

Heracleum platytaenium bitkisinin toprak üstünden elde edilen petrol eteri ekstresi (13.4540 g) kurutulduktan sonra silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyon sistemine nonpolar bir çözücü olan %100 petrol eteri ile başlanmış ve polarite belli oranda arttırılarak sırasıyla diklorometan, aseton ve %100 metanole kadar devam edilmiştir. İTK sonuçlarına göre benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucu 20 fraksiyon elde edilmiştir.

Bitkinin petrol eteri ile tüketilmesinin ardından metanol ile tüketilerek elde edilen ekstre (25.0679g) adsorban maddesi silikajel olan bir kolonda fraksiyonlarına ayrıldı. Bu işlem sırasında çözücü sistemi olarak %100 diklorometan ve ardından sırasıyla artan polaritede aseton ve metanol ilave edilmiştir. Her bir çözücü sistemiyle alınan fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek benzerlik gösteren fraksiyonlar birleştirilmiş ve toplamda 23 fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlardan preparatif ince tabaka kromatografisi ve kristallendirme ile elde edilen saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

5. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *Prangos ilanae* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan metanol ekstresinin ve *Heracleum platytaenium* bitkisinin toprak üstü kısımlarının petrol eteri ve metanol ekstrelerinin antioksidan aktivite tayinleri; başlıca iki yöntem DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ve *β*-karoten renk açılım yöntemleriyle incelendi. Antikolinesteraz aktivite tayinleri ise asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolin esteraz (BChE) enzimlerine karşı Ellman metodu ile yapıldı. Ayrıca tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları da sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. *Prangos ilanae'*den elde edilen metanol ekstresinin ve *Heracleum platytaenium'*dan elde edilen petrol eteri ve metanol ekstrelerinin taşıdığı sekonder metabolitler izole edilerek saflaştırılan bileşiklerin yapıları 1D- ve 2D-NMR ve kütle spektroskopik yöntemleriyle belirlendi.

5.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Sonuçları

Tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi.

Çizelge 5.1: Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktar sonuçları

Ekstreler	**Toplam Fenolik Miktarı (µg pirokatekol eşdeğer)/mg Ekstre**	**Toplam Flavonoid Miktarı (µg quercetin eşdğer)/mgEkstre**
Prangos ilanae MeOH ekstresi	19,55 ± 0,58	36,29 ± 2,38
Heracleum platytaenium PE ekstresi	10,75 ± 0,38	24,19 ± 3,17
H.platytaenium MeOH ekstresi	34,32 ± 0,64	42,27 ± 1,55

5.2 Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

5.2.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları

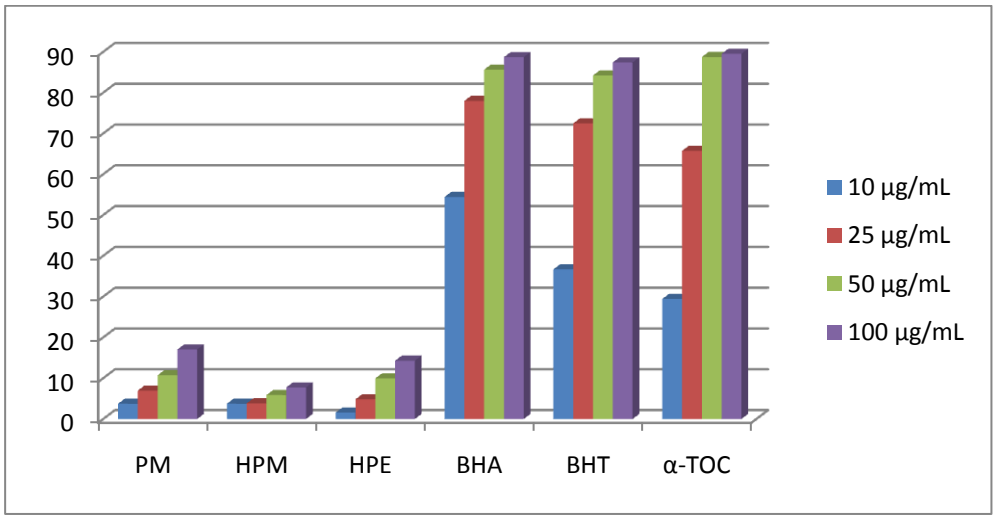
Prangos ilanae metanol ekstresi ile *Heracleum platytaenium* petrol eteri, metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHT, BHA ve

α-tokoferole göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı. Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyon olarak Çizelge 5.2 de verilmiştir.

Çizelge 5.2: Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

DPPH Serbest radikal Giderimi Aktivitesi (%İnhibisyon)				
Ekstreler	**10 µg/mL**	**25 µg/mL**	**50 µg/mL**	**100 µg/mL**
Prangos ilanae MeOH ekstresi	3,74	6,97	10,73	17,05
H. platytaenium PE ekstresi	1,59	4,84	9,97	14,3
H. platytaenium MeOH ekstresi	3,74	3,85	5,87	7,74
BHT*	36,69	72,47	84,22	87,42
BHA*	54,44	77,99	85,65	88,71
α-Toc*	29,43	65,74	88,74	89,55

*standart



Şekil 5.1 : *Prangos ilanae ve Heracleum platytaenium* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivite sonuçları

Her üç ekstrede hemen hemen hiç DPPH radikal giderim aktivitesi göstermedi.

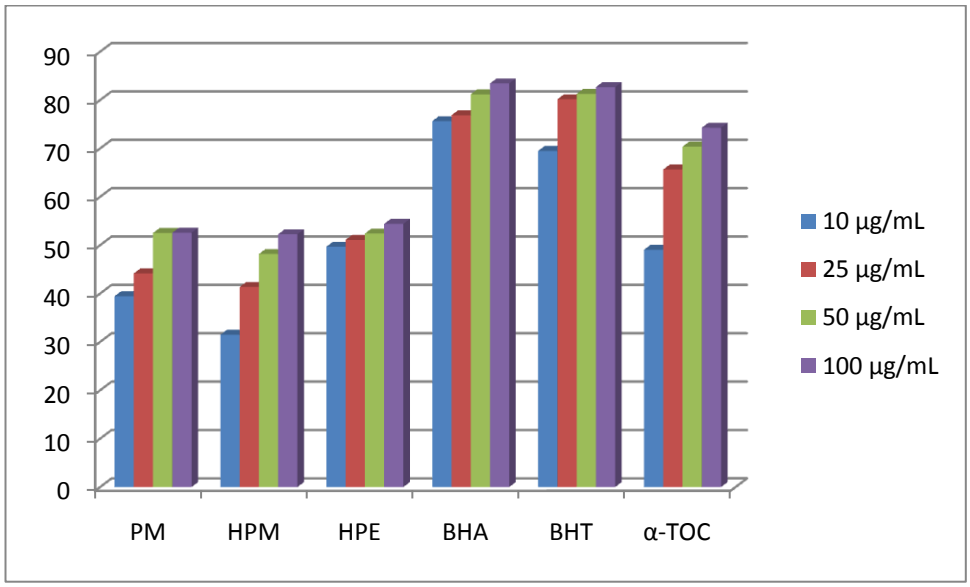
5.2.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon (*β*-karoten renk açılım) testi sonuçları

Prangos ilanae ve *Heracleum platytaenium* bitkilerinden hazırlanan petrol eteri ve metanol ekstreleri toplam antioksidan aktiviteleri *β*-karoten renk açılım yöntemine göre dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) incelendi. Antioksidan aktivite sonuçlarının karşılaştırmasında standart olarak BHT, BHA, α-tokoferol ve kersetin kullanıldı.

Çizelge 5.3: Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları

Lipid Peroksidasyon % İnhibisyonu				
Ekstreler	**10µg/mL**	**25µg/mL**	**50µg/mL**	**100 µg/mL**
Prangos ilanae MeOH ekstresi	39,46	44,17	52,52	52,58
H. platytaenium PE ekstresi	49,68	51,1	52,4	54,41
H. platytaenium MeOH ekstresi	31,5	41,37	48,19	52,27
BHT*	69,49	80,17	81,29	82,69
BHA*	75,64	76,86	81,2	83,45
α-Toc*	49,05	65,66	70,37	74,29

*standart



Şekil 5.2: *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* bitkilerinin petrol eteri ve metanol ekstrelerinin β-karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi

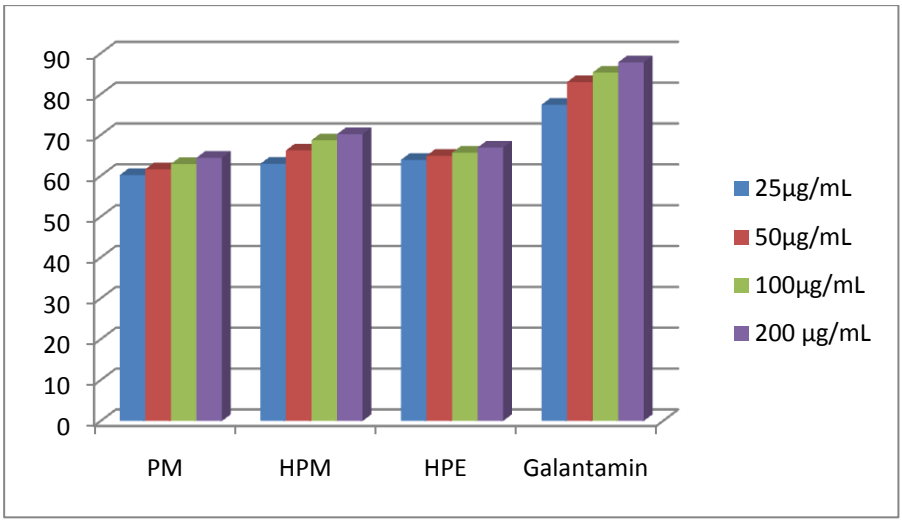
Sonuç olarak her üç ekstrede orta derecede lipid peroksidasyonu inhibe etmiştir.

5.2.3 Antikolinesteraz aktivite sonuçları

Prangos ilanae ve *Heracleum platytaenium* toprak üstü petrol eteri ve metanol ekstrelerinin AChE ve BChE % inhibisyon değerleri Çizelge 5.4' de verilmiştir.

Çizelge 5.4: Ekstrelerin asetilkolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	**25µg/mL**	**50µg/mL**	**100µg/mL**	**200 µg/mL**
Prangos ilanae MeOH ekstresi	60,21	61,63	62,92	64,44
H.platytaenium PE ekstresi	62,97	66,25	68,74	70,22
H.platytaenium MeOH ekstresi	63,92	64,93	65,68	66,95
Galantamin	77,43	82,98	85,31	87,81

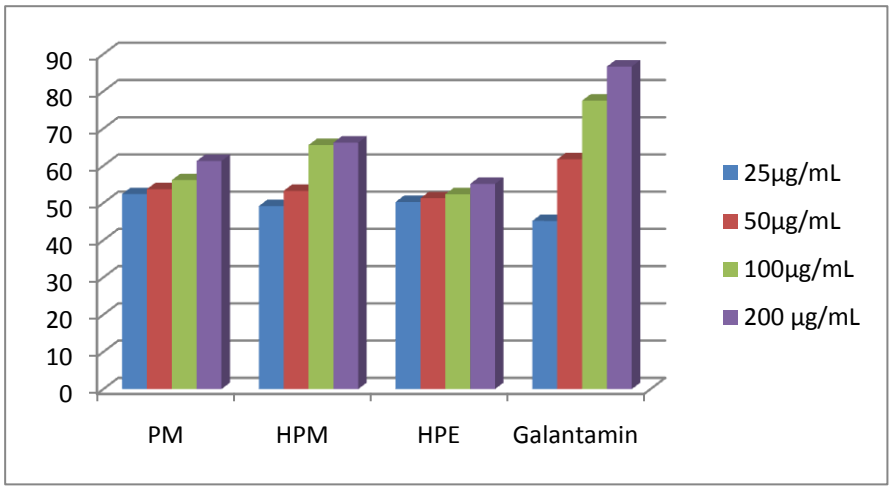


Şekil 5.3 : *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* ekstrelerinin PE ve MeOHekstrelerinin asetilkolinesteraz aktiviteleri

İlginç bir şekilde her üç ekstrede hemen her konsantrasyonda aynı oranda asetilkolineserazı inhibe etmiştir.

Çizelge 5.5 : Ekstrelerin butirilkolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL	200 µg/mL
Prangos ilanae MeOH ekstresi	52,38	53,72	56,14	61,27
H. platytaenium PE ekstresi	49,15	53,26	65,56	66,21
H. platytaenium MeOH ekstresi	50,26	51,27	52,36	55,13
Galantamin	45,17	61,73	77,49	86,66



Şekil 5.4: *Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium* ekstrelerinin butirilkolinesteraz aktiviteleri

Her üç ekstre butirilkolinesteraza karşı daha düşük olmakla birlikte, asetilkolinesteraza benzer aktivite göstermişlerdir.

5.3 Elde Edilen Saf Bileşiklerin Yapı Tayinleri

Prangos ilanae'den izole edilen saf bileşikler elde ediliş sırasına göre aşağıda verilmektedir;

- *α*- amiril tetracosanoat
- *α*- amirin
- 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en

Heracleum platytaenium'dan elde edilen saf bileşikler;

- Psoralen
- Bergapten
- Xanthotoxin
- Pimpinellin
- Isopimpinellin
- Sphondin
- Stigmasterol
- 8-metoksi-oxypeucedanin hidrat
- Apterin

Çizelge 5.6: Saf bileşikler ve miktarları

Saf Bileşikler	**Elde Edildiği Bitki**	**İzole Edilen Saf Bileşik Miktarı**
α- amiril tetracosanoat	*Prangos ilanae*	5,3 mg.
α- amirin	*Prangos ilanae*	5,9 mg
1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en	*Prangos ilanae*	5,5 mg.
Psoralen	*Heracleum platytaenium*	3,5 mg.
Bergapten	*Heracleum platytaenium*	7,8 mg.
Xanthotoxin	*Heracleum platytaenium*	6,2 mg.
Pimpinellin	*Heracleum platytaenium*	7,2 mg.
Isopimpinellin	*Heracleum platytaenium*	7,5 mg.

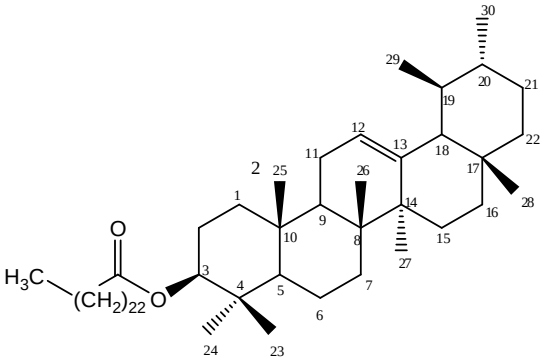
Çizelge 5.6: Saf bileşikler ve miktarları (devamı)

Sphondin	*Heracleum platytaenium*	6,8 mg.
Stigmasterol	*Heracleum platytaenium*	4,3 mg.
8-metoksi-oxypeucedanin hidrat	*Heracleum platytaenium*	9,0 mg.
Apterin	*Heracleum platytaenium*	5,1 mg.

5.3.1 Saf bileşiklerin yapı tayinleri

5.3.1.1 PIM-17-18-2-3 = *α*-amiril tetracosanoate = Urs-12-en-3ol, tetracosanoat

Bu bileşik beyaz renkli katı toz halinde elde edilmiştir. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) izlenmeyen (366 nm'de mor renkli) bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C'de yakıldığında turuncu renk aldı.



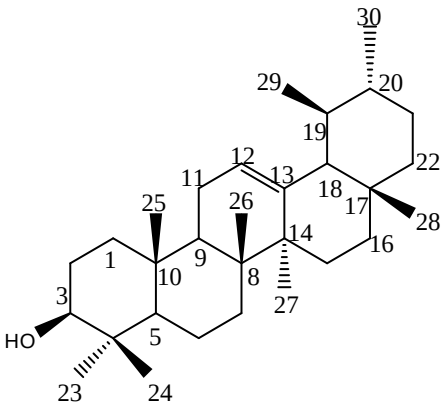
Şekil 5.5: *α*-amiril tetracosanoate

^{1}H NMR spektrumunda 8 metil sinyalinin ikisinin dubletler 0.92 (3H,d, *J* = 6,8 Hz) ve 0,86 (3H, d, *J* = 6,5 Hz), diğerlerinin ise singletler halinde *δ* 1.07, 1,01, 0.97, 0.91, 0.83 ve 0,80 ppm'de izlenmesi bileşiğin ursan tipi bir triterpen olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca triplet metil sinyalinin 0,87 ppm'de izlenmesi yapıda bir zincir uç metili grubunun varlığına işaret etmiştir. ^{1}H NMR spektrumunda bileşikte bir çifte bağın varlığı dar bir triplet *(J* = 2,5 Hz) olarak 5.12 ppm'de izlenen sinyal ile anlaşılmıştır, konumu ise *J* değerine dayanılarak Δ^{12} olarak belirlenmiştir, nitekim ursan ve oleanan triterpenlerde ilk çift bağın bulunduğu yer biyogenetik olarak genelde C-12 ile C-13 arasındadır. ^{1}H NMR spektrumunda 4,50 ppm'de dubletin dubleti (*J* = 5,6 ; 10,2 Hz) şeklinde izlenen proton sinyali ise bileşikte bir OH grubunun ya da bir ester grubunun varlığına işaret etti. Bileşiğin ^{13}C-NMR (APT)

spektrumunu incelediğimizde ise 173,72 ppm'deki katerner karbon sinyali bileşikte bir karbonil grubu varlığını, ve bu karbonilin bir ester karboniline ait olduğu ise 2.29'ppm de izlenen ve bir ester veya asite komşu olabilecek karakteristik metilen protonlarının HMBC spektrumunda iki bağ üzerinden karbonil grubuyla korelasyon göstermesiyle anlaşılmıştır. Ayrıca 2,23 sinyalinin de 80,61 ppm de izlenen karbon sinyali (C-3) ile dört bağ üzerinden HMBC'de korelasyon vermesi ester grubunun varlığını doğrulamış ve C-3'den bağlı olduğunu göstermiştir. Nitekim ilk oksijenlenmiş substitüent biyogenetik olarak ursan tipi triterpenlerde C-3'de yer almaktadır. Bu ester grubunun uzun zincirli yapısı 1,25 ppm civarındaki uzun boylu proton sinyali ile ^{1}H NMR sinyali ve buna karşılık gelen 29 ppm civarında izlenen karbonlarla ^{13}C spektrumunda saptanmış, kütle spektrumu ile bu zincirin 22 karbonlu tetracosanoate esterine ait olduğu kesinlik kazanmıştır. Çünkü APCI tekniğiyle alınan kütle spektrumunda moleküler iyon piki m/z 776'da izlenmiş, bu esterin C-3 den kopması ile 409 piki temel pik olarak izlenmiştir. Literatür verileri de bunu doğrulamıştır [102].

5.3.1.2 PIM-23-3 = *α*-amirin = Urs-12-en-3*β*-ol

Bu bileşik parlak beyaz renkte katı halinde elde edilmiştir. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) izlenmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.



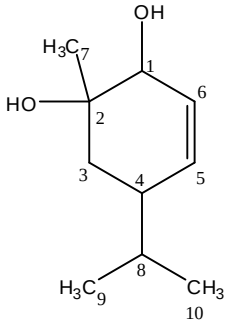
Şekil 5.6: *α*-amirin

^{1}H NMR spektrumunda gözlenen 8 metil sinyalinin ikisinin dubletler *δ* 0.87(d, *J* =7,2 Hz) ve 0,86 (d, *J*= 6,6 Hz), diğerlerinin singletler halinde *δ* 1,01(s), 0.99(s), 0.95(s), 0.91(s), 1.07(s) ve 0.79 (s)'da izlenmesi bileşiğin ursan tipi bir triterpen olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca APT tekniğiyle alınan ^{13}C-NMR spektrumunda 39,68 ve 39,63

ppm'de gözlenen C-19 ve C-20' ye ait CH piklerinin varlığı ile toplam yedi metin karbonun izlenmesi bileşiğin ursan iskeletini doğrulamıştır. Bileşiğin ^{13}C (BB) NMR spektrumu 30 C atomu taşıdığını, APT NMR spektrumu ise bunların 8'inin metil, 9'unun metilen, 7'sinin metin ve 6 sının katerner karbondan ibaret olduğunu göstermiştir.^{1}H NMR spektrumunda bileşikteki tek bir hidroksil grubunun varlığı 3,23 ppm'de (dd, J = 5,4 ; 12 Hz) izlenen pik ile belirlenmiştir. Hidroksil grubunun ursan ve oleanan tipi triterpenlerde ilk yerleşeceği yer biyogenetik olarak C-3 konumu olduğundan öncelikle bu grup C-3'e yerleştirildi. Bileşikte bir olefinik protonun varlığı 5,12 ppm'de izlenen dar triplet (J = 2,5 Hz) sinyali (H-12) ile anlaşılmıştır. Tüm spektral değerleri amirinin literatür değerleri ile karşılaştırıldığında bileşiğin α-amirin (3β-hydroxy-urs-12-en) olduğu saptanmıştır.

5.3.1.3 PIM-55-2 = 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en

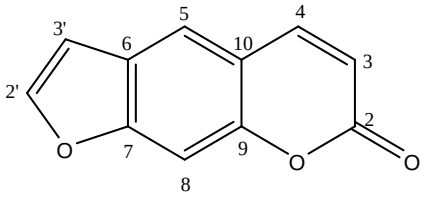
Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda 0,92 ve 0,95 ppm'de iki metil dubleti ve 1,31 ppm'de bir CH_3 sinyali izlenmiştir. Ayrıca 3,8 ppm'de bir OH grubuna komşu olduğu düşünülen bir proton sinyali ve 5,62 ppm ve 5,72 ppm'de birer protonluk AB çifti oluşturan dublet dublet sinyalleri izlenmiştir.



Şekil 5.7: 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en

5.3.1.4 HPE 35-1-3-1-2 = Psoralen

Beyaz renkli katı toz olarak elde edilen bileşik UV ışık altında (254 nm) parlak mavi renkli olarak görülmüş, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C'de yakıldığında açık pembe renkte gözlenmiştir. Kumarinlerin UV ışık altında parlak mavi renkte izlenmesi nedeniyle izole edilen bu bileşiğin kumarin olabileceği düşünüldü.



Şekil 5.8: Psoralen

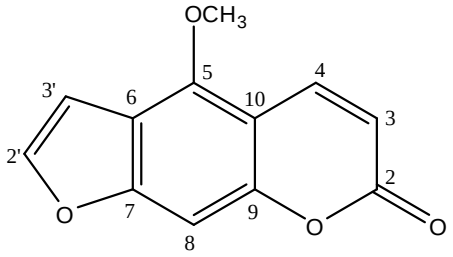
Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda 7,73 ppm ve 6,30 ppm'de izlenen J = 9,3 Hz'lik dubletler yapının kumarin olabileceği izlenimini kuvvetlendirmiştir. Bileşiğe ait iki aromatik proton sinyali 7,62 ppm ve 7,42 ppm'de singletler halinde izlenmiştir. Ayrıca 7,63 ve 6,77 ppm'lerde dubletler halinde sinyaller izlenmiştir. Bu dubletlerin J = 2,34 Hz'lik etkileşim sabiti göstermesi kumarin halkasına bir furan halkasının kondanse olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan literatür araştırmaları sonucu yapının daha önce *Heracleum* türlerinden izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan furanokumarin yapısındaki psoralen olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 5.7: Psoralen bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri ($CDCl_3$)

Pozisyon	**^{1}H (δ, J=Hz)**
3	6,30 (d, J=9,3 Hz)
4	7,73(d, J=9,3 Hz)
5	7,62 , s
8	7,42 , s
2'	7,63(d, J=2,34 Hz)
3'	6,77(d, J= 2,34 Hz)

5.3.1.5 HPE 38-KS-2-1-1 = Bergapten = 5-metoksipsoralen

Bileşik renksiz iğne şeklinde kristaller halinde elde edilmiştir. UV ışık altında (254 nm) parlak mavi renkli olarak görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C'de yakıldığında sarı renkte gözlendi. Kumarinlerin UV ışık altında parlak mavi renkte izlenmesi nedeniyle bu bileşiğin kumarin olabileceği düşünüldü.



Şekil 5.9 : Bergapten

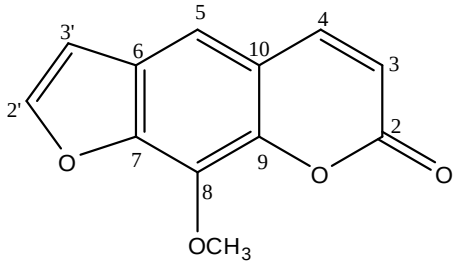
Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda 6,26 ppm ve 8,14 ppm'de 9.76 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği izlenimini arttırmıştır. Ayrıca bileşiğe ait ^{13}C- NMR spektrumu incelendiğinde 161,0 ppm'de izlenen ve konjuge karbonil karbonuna ait olabileceğine işaret eden karbon sinyali kumarin yapısını doğrulamıştır. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 7,13 ppm'de singlet ve 7,59 ve 7,01 ppm'lerde 2,3 Hz'lik dubletler olarak izlenmiştir. 4,26 ppm'de ise singlet olarak gözlenen üç protonluk sinyal ise molekülde bir metoksi grubunun varlığını ortaya koymuştur. Basit bir kumarin halkasına bu üç proton ve bir metoksi grubu yerleştirilemeyeceğinden ve iki dublet sinyalinin *J* değerlerinin 2,3 Hz olması yapıya bir furan halkasının kondanse olabileceğini düşündürmüştür. HSQC NMR spektrumu da direkt proton-karbon ilişkisini göstererek bu durumu doğrulamıştır. Yapıdaki metoksi grubunun biyogenetik olarak C-5 ya da C-8 den hangisine yerleşmiş olabileceği bileşiğin NMR verileri ve özellikle HMBC spektrumu ile araştırıldı. HMBC spektrumunda 8,14 ppm'deki H-4 protonunun üç bağ uzaklıktaki 149,57 ppm'de izlenen C-5 ile ve ayrıca C-5'in aynı zamanda 4,26 ppm'de çıkan OCH_3 grubuyla üç bağ üzerinden korelasyon göstermesi yapının bergapten olduğunu belirtmiştir. Literatür verileri de bunu doğrulamıştır.

Çizelge 5.8: Bergapten bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri ($CDCl_3$, ppm)

Pozisyon	**^{1}H (δ, *J*= Hz)**	**^{13}C (δ)**
2	_	161,40
3	6,26(d, *J*= 9,76 Hz)	112,50
4	8,14(d, *J*= 9,76 Hz)	139,20
5	_	149,57
6	_	112,51
7		158,32
8	7,13 , s	93,85
9	_	152,71
10	_	106,02
2'	7,59(d, *J*=2,3 Hz)	144,53
3'	7,01(d, *J*=2,3 Hz)	105,02
(C_5-OCH_3)	4,26 ,s	60,08

5.3.1.6 HPE 46-48-3-2-1=Xanthotoxin = 8-Metoksipsoralen

Bileşik renksiz iğne şeklinde kristaller halinde elde edilmiştir. UV ışık altında 254 nm'de parlak mavi, 366 nm'de ise fosforlu sarı renkli olarak görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C'de yakıldığında açık turuncu renkte gözlendi. UV ışık altında parlak mavi renkte izlenmesi nedeniyle bu bileşiğin de bir kumarin olabileceği düşünüldü.



Şekil 5.10: Xanthotoxin

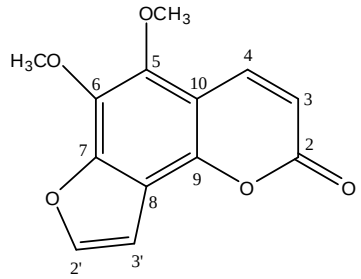
Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda 6,36 ppm ve 7,76 ppm'de 9.37 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller ise bu yapının kumarin olabileceğini göstermiştir. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 7,34 ppm'de singlet, 7,69 ppm ve 6,82 ppm'lerde dubletler olarak izlenmiştir. 4,27 ppm'de ise singlet olarak gözlenen üç protonluk sinyal ise molekülde yine bir metoksi grubunun varlığını ortaya koymuştur. Spektral veriler ve literatür bulguları incelenerek bu bileşiğin bazı *Heracleum* türlerinden daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan xanthotoxin (8-metoksipsoralen) olduğu anlaşılmıştır.

Çizelge 5.9: Xanthotoxin bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri ($CDCl_3$)

Pozisyon	**^{1}H (δ, *j*=Hz)**
2	_
3	6,36 (d, *J*=9,37 Hz)
4	7,76 (d, *J*=9,37 Hz)
5	7,34 ,s
6	_
7	_
8	
9	_
10	_
2'	7,69 (d, *J*=2,34 Hz)
3'	6,82 (d, *J*=2,34 Hz)
(C_8-OCH_3)	4,27, s

5.3.1.7 HPE KS-48-2-1=Pimpinellin

Bileşik iğne şeklinde renksiz kristaller halinde elde edilmiştir. UV ışık altında 254 nm'de parlak mavi renkli, 366 nm'de ise koyu sarı renkte görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C'de yakıldığında koyu gri renkte gözlendi. UV ışık altında parlak mavi renkte izlenmesi nedeniyle izole edilen bu bileşiğin de kumarin olduğu düşünüldü.



Şekil 5.11: Pimpinellin

Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda 6,37 ppm ve 8,08 ppm'de 9.6 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği izlenimini doğrulamıştır. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 7,66 ppm ve 7,08 ppm'lerde dubletler olarak izlenmiştir. 4,03 ppm'de ve 4,14 ppm'de singlet olarak gözlenen üç protonluk sinyal ise molekülde sübstitüent olarak iki metoksi grubunun varlığını ortaya koymuştur.

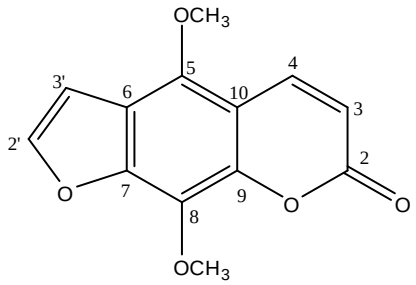
Çizelge 5.10: Pimpinellin bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri ($CDCl_3$)

Pozisyon	**^{1}H (*j*=Hz)**	**^{13}C**
2	_	160,83
3	6,37 (d, *J*=10 Hz)	113,73
4	8,08 (d , *J*= 9,6 Hz)	139,9
5	_	144,45
6	_	135,12
7	_	149,81
8	_	114,11
9	_	143,25
10	_	109,44
2'	7,66 (d, *J*=2,0 Hz)	145,37
3'	7,08 (d, *J*=2,4 Hz)	104,31
(C_5-OCH_3)	4,03, s	62,37
(C_6-OCH_3)	4,14 , s	61,22

Kumarin bileşiğine furan halkasının düzlemsel ya da açısal olarak kondanse olma ihtimali olduğundan tek ve çift dimensiyonlu NMR teknikleriyle alınan spektrumların, özellikle HMBC spektrumunun incelenmesiyle furan halkasının yapıya açısal olarak kondanse olduğu belirlenmiştir. Çünkü HMBC spektrumunda furan halkasına ait 7,66 ppm'de çıkan H-2' protonu ile 114,11 ppm'de gözlenen C-8 karbonunun üç bağ üzerinden etkileşimi ve 7,08 ppm'de çıkan H-3' protonunun ise iki bağ üzerinden C-8 ile etkileşim göstermesi yapının açısal olarak kondanse olduğunu kesinleştirmiş ve yapı pimpinellin olarak belirlenmiştir.

5.3.1.8 HPE (49-50)-4= Isopimpinellin= 5,8-Dimethoxypsoralen

Bileşik sarı renkli katı toz halinde elde edilmiştir. UV ışık altında (254 nm) parlak mavi renkli, 366 nm'de koyu sarı olarak görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C'de yakıldığında sarı renkte gözlendi.



Şekil 5.12: Isopimpinellin

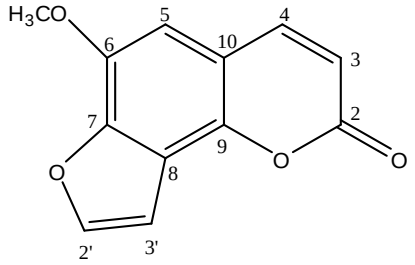
Bitkiden izole edilen diğer bileşikler gibi UV ışık altında parlak mavi renkte izlenen bu bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda 6,22 ve 8,06 ppm'de 9.8 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği izlenimini göstermiştir. Ayrıca bileşiğe ait ^{13}C- NMR spektrumu incelendiğinde 160,46 ppm'de izlenen ve konjuge karbonil karbonuna ait olabileceğine işaret eden karbon sinyali kumarin yapısını doğrulamıştır. Bileşiğe ait iki aromatik proton sinyali 7,56 ppm ve 6,94 ppm'lerde 2,3 Hz'lik dubletler olarak izlenmiştir. 4,10 ppm'de ve 4,11 ppm'de singlet olarak gözlenen üç protonluk sinyaller ise molekülde sübstitüent olarak iki metoksi grubunun varlığını ortaya koymuştur. Alınan spektrumlara dayanarak bu bileşiğinin yapısının *Heracleum* türlerinden daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan isopimpinellin olduğu saptanmıştır.

Çizelge 5.11: Isopimpinellin bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri ($CDCl_3$)

Pozisyon	**^{1}H (*j*=Hz)**	**^{13}C**
2	_	160,46
3	6,224 (d, *J*=9,8 Hz)	112,89
4	8,059 (d, *J*=9,8 Hz)	139,38
5	_	144,01
6	_	114,83
7	_	150,03
8	_	128,22
9	_	143,01
10	_	107,67
2’	7,562 (d, *J* = 2,3 Hz)	145,12
3’	6,935 (d, *J* = 2,3 Hz)	105,07
(C_5-OCH_3)	4,098 ,s	61,71
(C_8-OCH_3)	4,105 ,s	60,83

5.3.1.9 HPE (51-56)-3-1= Sphondin

Beyaz renkli katı toz halinde elde edilmiştir. UV ışık altında 254 nm’de mor renkli, 366 nm’de beyaz-mavi renkli olarak görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C’de yakıldığında koyu kahve-sarı renkte gözlendi.



Şekil 5.13: Sphondin

UV ışık altında parlak mavi renkte izlenen bileşiğin izole edilen bu bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda 6,33 ve 7,69 ppm’de 9.5 Hz’lik dubletler halinde gözlenen sinyaller yapının kumarin olabileceğini göstermiştir. Ayrıca bileşiğe ait ^{13}C- NMR spektrumu incelendiğinde 161,03 ppm’de izlenen karbon sinyali kumarin yapısını doğrulamıştır. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 6,72 ppm’de singlet, 7,64 ppm ve 7,06 ppm’lerde *J* = 2,1 Hz’lik dubletler olarak izlenmiştir. 3,98 ppm’de singlet olarak gözlenen üç protonluk sinyal ise molekülde sübstitüent olarak bir metoksi grubunun varlığını ortaya koymuştur.

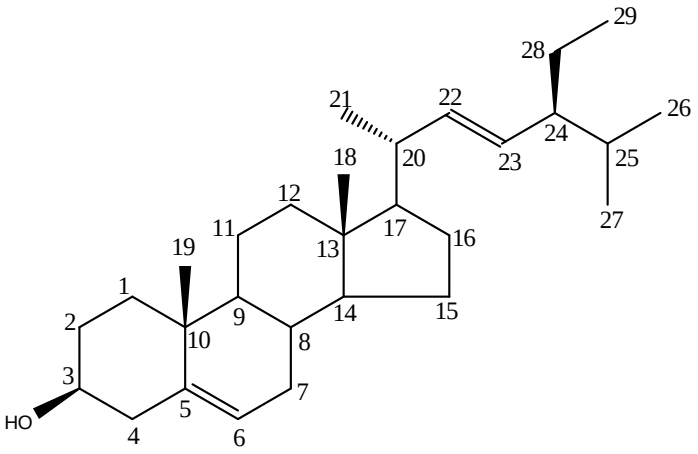
Kumarin bileşiğine furan halkasının düzlemsel ya da açısal olarak kondanse olma ihtimali olduğundan tek ve çift dimensiyonlu NMR teknikleriyle (APT, HSQC ve HMBC) alınan spektrumların araştırılması sonucu furan halkasının yapıya açısal olarak kondanse olduğu belirlenmiştir. Yapılan literatür araştırmaları sonucu singlet olarak izlenen 6,72 ppm sinyalinin açısal furano kumarinlerdeki H-6 protonu için çok karakteristik olması bileşiğin sphondin olduğunu göstermiştir.

Çizelge 5.12: Sphondin bileşiği ^{1}H ve ^{13}C NMR verileri ($CDCl_3$)

Pozisyon	**^{1}H (δ, *j*=Hz)**	**^{13}C (δ)**
2	_	161,03
3	6,33 (d, *J* = 9,5 Hz)	114,49
4	7,69 (d, *J* = 9,5 Hz)	144,35
5	6,72 ,s	104,58
6	_	143,02
7	_	146,96
8	_	118,58
9	_	143,13
10	_	113,60
2’	7,639(d, *J* = 2,1 Hz)	145,99
3’	7,064 (d, *J* = 2,1 Hz)	103,70
(C_6-OCH_3)	3,978 ,s	56,50

5.3.1.10 HPE (46-48-4-3-2-2) = Stigmasterol

Bileşik beyaz katı halinde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C’de yakıldığında mavi-mor bir renk aldı.

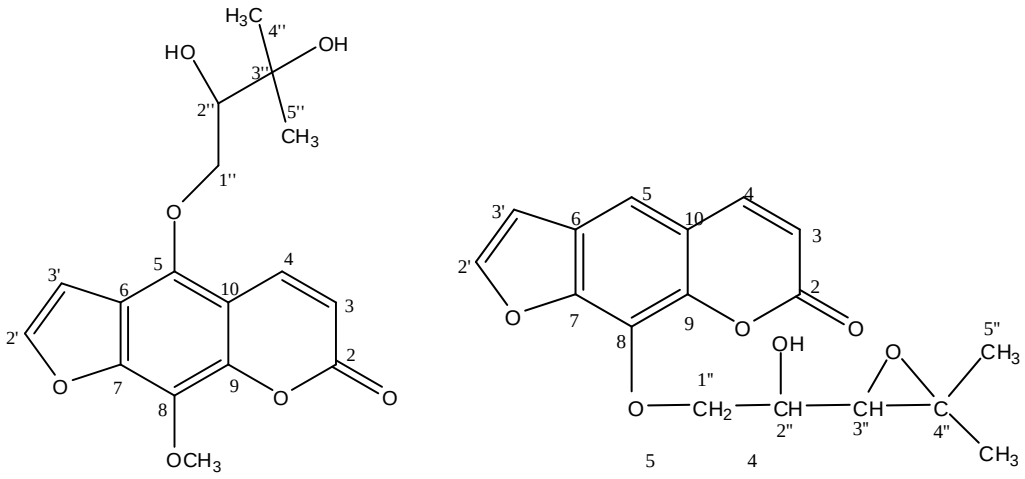


Şekil 5.14: Stigmasterol bileşiği

^{1}H NMR spektrumunda proton sinyalleri *β*-sitosterol ile çok büyük benzerlikler göstermiştir, hatta metil proton sinyallerinin tamamen aynı ppm lerde izlenmesi bu bileşiğinde bir steroit olduğuna işaret etmiştir. Bir hidroksil grubu taşıyan C-3'ün proton sinyali benzer şekilde 3.53 ppm de izlenmiştir. C-5 ve C-6 arasındaki çifte bağın varlığı 5.34 ppm'de izlenen olefinik proton sinyali ile belirlenmiştir. Bu çifte bağın yanısıra yapıda ikinci bir çifte bağın varlığı δ 5.05 (dd, J = 16 ve 5 Hz) ve 5.16 (dd, J = 16 ve 7 Hz) de izlenen sinyaller ile anlaşılmıştır. Bu olefinik protonların komşu protonlarla olan etkileşimi ve birbirleriyle olan 16 Hz'lik trans etkileşimi göz önüne alındığında Δ^5 stigmastan iskeleti üzerinde bu bağın yerleşebileceği yerin sadece yan zincirdeki Δ^{22} konumunda olabileceği anlaşılmıştır. Sonuç olarak bu steroidin stigmasterol (stigmasta-5,22-dien-3-ol) olduğu kesinlik kazanmıştır. Literatür değerleri ve İTK mukayesesi ile yapı doğrulanmıştır.

5.3.1.11 HPE 82-3 = 8-methoxy-oxypeucedanin hidrat

Bileşik sarı renkli iğne kristaller şeklinde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba altında 254 nm'de sarı renkte gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C'de yakıldığında kahverengi bir renk aldı.



Şekil 5.15: 8-methoxy-oxypeucedanin hidrat ve HPE 82-3-B

Çok güzel kristaller halinde elde edilen bu bileşiğin ^{1}H NMR'ına bakıldığında yapının önce dimer bir furokumarin olduğunu düşünülmüşse de, piklerin integral boyları karşılaştırıldığında dimer bir furokumarin değil, birbirinin izomeri veya çok benzeri olan iki maddenin karışımı olduğu anlaşılmıştır. Bu sebeple karışımın

saflaştırılma işlemine devam edilmiş ve yapılar kısmen saflaştırılarak NMR spektrumlarındaki piklerin intensitelerine bakılarak yorumlanmıştır.

Yüzde oranı daha büyük olan maddenin ^{1}H NMR spektrumunda 8,12 ve 6,29 ppm'de 9,77 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller yapının kumarin olduğunu açıkça göstermiştir. Diğer bir dublet çifti ise 7,63 ve 7,05 ppm'de karakteristik 2,34 Hz'lik etkileşim sabiti vermesi kumarin halkasına bir furan halkasının kondanse olduğunu göstermiştir. 4,18 ppm'de bir OCH_3 grubuna işaret eden üç protonluk singlet sinyali ve buna karşılık gelen karbon sinyali de 60 ppm'de izlenmiştir. Aromatik sinyallerin dışında ayrıca 4,60 ve 4,26 ppm'deki kimyasal kaymalarıyla oksijene komşu olduğu anlaşılan AB çifti protonları, dubletin dubleti olarak 10,15 Hz'lik geminal etkileşimlerinin yanı sıra daha küçük *J* değerli visinal etkileşim göstermişlerdir. 3,83 ppm'deki dubletin dubleti olarak izlenen protonun *J* değerlerinin de bu daha küçük etkileşim sabitleriyle aynı olması AB protonları ile visinal (komşu) olduğunu göstermiştir. CH_2 grubuna karşılık gelen bu AB protonlarının kumarin halkasına oksijen üzerinden bağlı olduğu aşikardır, aksi takdirde daha üst alanda rezonansa gelmeleri gerekirdi. ^{13}C NMR(BB ve APT) spektrumunda oksijenli karbonların izlendiği 55-80 ppm arasında 77,3 ppm'de CH_2O grubunun karbonu izlenirken, bir 3,83 ppm'e karşılık gelen karbon ise 76 ppm'de izlenmiştir. Ayrıca bir oksijenli katerner karbon atomu 77,0 ppm'de ve iki metil karbonu ise 26,71 ppm'de izlenmiştir. ^{1}H NMR'da bu metil grupları 1,28 ve 1,32 ppm'de izlenmiştir. 3,46 ppm'de izlenen genişletilmiş singletin (brs) NMR tüpüne D_2O ilavesi ile (D_2O exchange) bir OH pikine ait olduğu anlaşılmıştır. Bu hidroksilin de metil grupları ile aynı karbon atomuna bağlı olduğu saptanmıştır. Tüm spektral veriler benzer kumarinlerle karşılaştırıldığında bileşiğin 8-methoxy-oxypeucedanin hidrat olduğu belirlenmiştir [103-104].

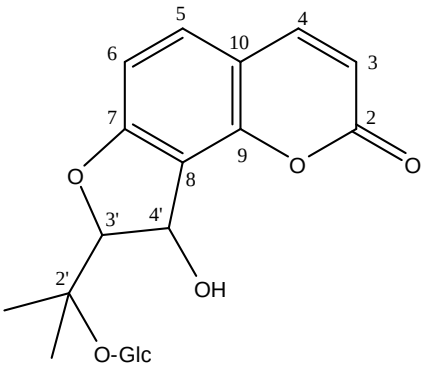
İkinci maddenin en büyük farkı ise OCH_3 grubuna sahip olmayışıdır. Fakat C-3 ve C-4'deki hidrojenlerin farklı ppm'e kayması yan zincirin C-5' de değilde, C-8'de yer aldığına işaret etmiştir. Yapının kesinlik kazanabilmesi için çift dimensiyonlu NMR teknikleriyle spektrumları alınmaktadır.

Çizelge 5.13: HPE 82-3 bileşiğinin ^{1}H NMR verileri.

Pozisyon	**^{1}H (δ, *J*=Hz) 8-methoxy-oxypeucedanin hidrat**	**1H (δ, J=Hz) HPE-82-3-B**
3	6,29 (d, *J* = 9,77 Hz)	6,37 (d, *J* = 9,37 Hz)
4	8,12 (d, *J* = 9,76 Hz)	7,77 (d, *J* =9,38 Hz)
5	_	7,40 , s
8	_	_
2’	7,63 (d, *J* = 2,34 Hz)	7,70 (d, *J* = 2,35 Hz)
3’	7,05 (d, J = 2,34 Hz)	6,83 (d, *J* = 2,34 Hz)
1’’$_a$	4,60 (dd, *J* = 2,73 ve 10,15 Hz)	4,75 (dd, *J* =2,73 ve 10,15 Hz)
1’’$_b$	4,26 (dd, *J* =7,81 Hz ve 10,15 Hz)	4,41 (dd, *J*=7,81 ve 10,15 Hz)
2’’	3,83 (dd, *J* =2,73 Hz ve 7,81 Hz)	3,8(dd, *J*=2,34 ve 7,81 Hz)
3’’	3,46 , brs (OH)	2,60 , brs (OH)
4’’	_	_
5’’	1,32 , s	1,33 ,s
6’’	1,28 , s	1,29 ,s
(C_8-OCH_3)	4,18 , s	_

5.3.1.12 HPE 32-33-1-1 = Apterin

Bileşik açık sarı renkte katı halinde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba altında 254 nm’de turkuaz mavisi renginde gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105^{o}C’de yakıldığında pembe renkte gözlendi. UV ışık altındaki mavi rengi nedeniyle izole edilen bu bileşiğin de bir kumarin olabileceği düşünüldü.



Şekil 5.16: Apterin

Bileşiğin ^{1}H NMR spektrumunda (CD_3OD) kumarin halkasının H-3 ve H-4'üne karşılık gelen 7,80 ve 6,19 ppm'de izlenen 9,5 Hz'lik karakteristik dubletlerinin izlenmesi yapının bir kumarin olabileceğini kuvvetle işaret etmiştir. Spektrumdaki diğer bir dublet çiftinin ise 6,80 ve 7,46 ppm'de 8,59 Hz'lik etkileşim gösterdiği izlenmiştir. Bileşiğin broad band (BB) ve APT tekniğiyle alınan ^{13}C NMR spektrumları yapının 20 karbon taşıdığını ve bu karbonlardan 11'inin CH, 1'inin CH_2, 2'sinin CH_3 ve 6'sının katerner karbondan ibaret olduğu saptanmıştır. Yapıda bir şeker grubunun varlığı 70-77 ppm arasında izlenen 5 CH karbonu ve yine 98 ppm'de izlenen anomerik CH karbonu ile anlaşılmıştır. Yapıda ilaveten iki oksijenli substituentin varlığı 78 ppm'de bir katerner ve 69 ppm'de izlenen CH sinyali ile anlaşılmıştır. gHSQC spektrumunda 69 ppm'e karşılık olarak 5,5 ppm'de 6,63 Hz'lik bir dublet izlenmiş olup bir OH veya OAc grubunun varlığına işaret etmiştir. Fakat yapının ^{1}H NMR'ında asetil metili mevcut olmadığından ilave bir hidroksil substituenti olduğu kesinlik kazanmıştır. ^{1}H NMR'da iki metil grubunun 1,502 ve 1,504 ppm'de izlenmesi bunların oksijenli bir substituent taşıyan karbona bağlı olduğunu düşündürmüştür. Nitekim HMBC spektrumuna bakıldığında 78,0 ppm'de izlenen katerner karbon atomu (C-2') ile 3 bağ üzerinden etkileşim göstermeleri bunu doğrulamıştır.

Çizelge 5.14: Apterin bileşiğinin ^{1}H NMR verileri.

Pozisyon	**^{1}H (δ, *J* = Hz)**	**13C (δ)**
2	_	162,0
3	6,20 (d, J = 9,50 Hz)	112,3
4	7,80 (d, J = 9,50 Hz)	145,0
5	7,46 (d, J = 8,59 Hz)	131,0
6	6,8 (d, J = 8,59 Hz)	108,1
7	_	163,2
8	_	117,5
9	_	152,6
10	_	114,5
2'	_	78,3
3'	4,4 (d, J =6,25 Hz)	92,4
4'	5,5 (d, J = 6,25 Hz)	69,6

Çizelge 5.14: Apterin bileşiğinin ^{1}H NMR verileri (devamı)

GLC-1	4,68 (d, J = 7,81 Hz)	98,2
GLC-2	3,03 (dd, J = 7,81 ; 9,6 Hz)	73,3
GLC-3	3,06 (dd, J = 9,6 ; 9,8 Hz)	76,5
GLC-4	3,26 (dd, J = 9,6 ; 9,8 Hz)	70,1
GLC-5	3,24; m	77,6
GLC-6	3,38 (dd, J =12 ; 4,3 Hz) 3,09 (dd, J = 12 ; 2,5 Hz)	60,3
$C_{2'}$ - CH_3	1,502 ; s	23,2
$C_{2'}$ - CH_3	1,504 ; s	23,5

Şekerin anomerik protonu olan 4,68 ppm'deki dubletin (J = 7,8 Hz) 78,0 ppm'deki (C-2') ile 3 bağ üzerinden korelasyonu bize şekerin (C-2') den bağlı olması gerektiğini göstermiştir.

Bu tez çalışmasında bir seri furokumarin izole edilmesi nedeniyle spektral veriler bu kumarininde bir furokumarin türevi olabileceğini düşündürdü, furokumarinler için karakteristik olan 7,0 ppm civarında izlenen (1,5-2,5 Hz) dar dubletlerin izlenmemesi furan halkasının doymuş olabileceğini dolayısıyla yapının bir dihidrofuranokumarin ya da doymuş bir piranokumarin olabileceğini gösterdi. Nitekim 8,59 Hz'lik orto etkileşim yapan 7,4 ve 6,8 ppm'de izlenen proton çiftini kumarin halkasına yerleştirmeyi düşündüğümüzde yapının angular olarak kondense olması gerektiğini gösterdi. Benzer dihidropiranokumarinlerle yapıyı karşılaştırdığımızda ^{1}H NMR'ı göz önüne alındığında ve ^{13}C NMR'ında 92 ppm'de izlenen karbonu yerleştirecek bir konum bulunamadığından yapının bir angular dihidrofuranokumarin olduğu saptanmıştır. Ayrıca ^{13}C NMR'da 69 ppm'de izlenen (C-4') karbona ait 5,5 ppm'deki proton sinyalinin H-3' ile (δ 4,4,d) 6,25 Hz'lik etkileşim göstermesi ve HMBC korelasyonları değerlendirilerek yapının ilk kez *Zizia aptera* bitkisinden elde edilen apterin olduğu [105] ve daha sonra ise yine Umbelliferae familyasına ait bir bitki olan *Peucedanum japonicum* türünden [106] elde edildiği saptanmıştır. Taşıdığı şekerin tüm NMR spektral değerlerinin de glukoz ile aynı olması nedeniyle yapı glukoz olarak belirlenmiştir.

5.4 İzole Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

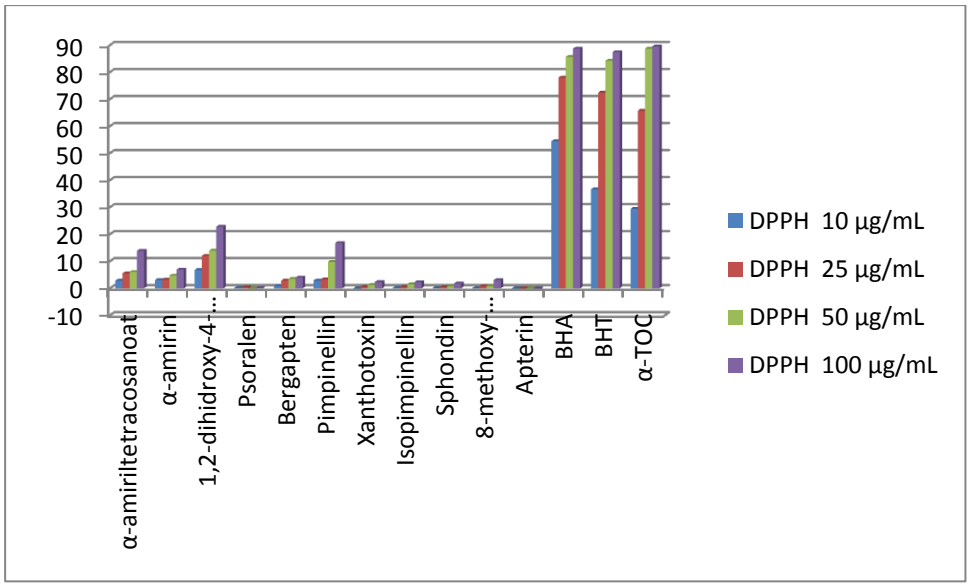
5.4.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları

İzole saf bileşiklerinin DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi Çizelge 5.15'de gösterilmiştir.

Çizelge 5.15: İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi sonuçları

DPPH Serbest Radikal Giderimi % İnhibisyon Aktivitesi				
Saf Bileşikler	**10µg/mL**	**25µg/mL**	**50µg/mL**	**100µg/mL**
α-amiril tetracosanoat	2,86	5,56	6,06	13,88
α-amirin	3,10	3,23	4,72	6,96
1,2-dihidroxy-4-izopropil-sikloheksa-5-en	6,83	12,04	13,97	22,82
Psoralen	0,22	0,41	-0,33	0,15
Bergapten	0,88	2,86	3,49	4,00
Pimpinellin	2,91	3,33	9,78	16,78
Xanthotoxin	-0,20	0,57	1,27	2,36
Isopimpinellin	0,21	0,55	1,57	2,31
Sphondin	0,14	0,45	0,77	1,82
8-methoxy-oxypeucedanin hidrat	-0,01	0,76	0,80	3,05
Apterin	-0,08	-0,47	-0,22	-0,39
BHA	54,44	77,99	85,65	88,71
BHT	36,69	72,47	84,22	87,42
α-Toc	29,43	65,74	88,74	89,55

*standart



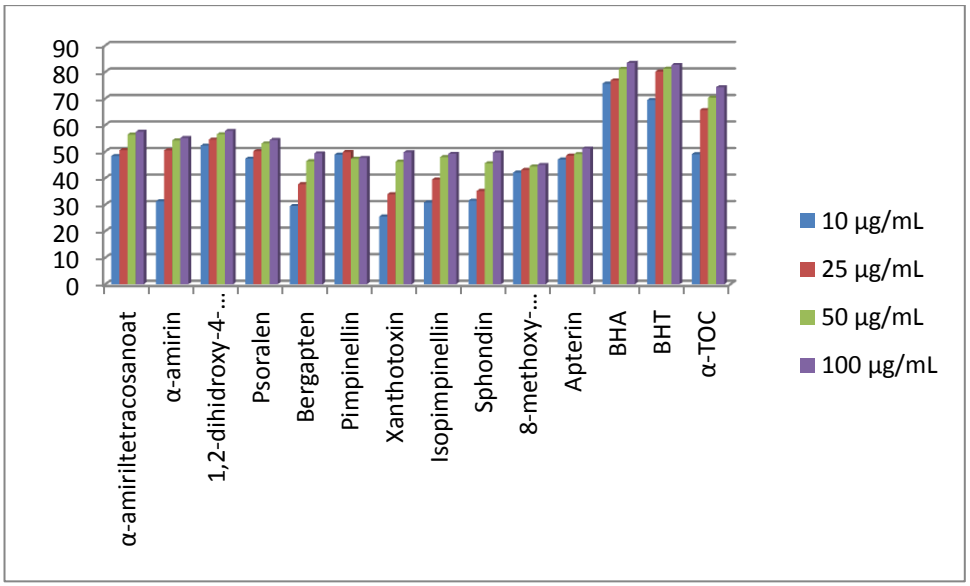
Şekil 5.17: İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi

5.4.2 *β*-Karoten-Linoleik Asit (Lipid Peroksidasyon % İnhibisyon) Toplam Antioksidan Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 5.16: İzole saf maddelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon aktiviteleri sonuçları

Saf Maddeler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
α-amiril tetracosanoat	48,34	50,55	56,42	57,48
α-amirin	31,27	50,48	54,25	55,17
1,2-dihidroxy-4-izopropil-sikloheksa-5-en	52,26	54,55	56,56	57,83
Psoralen	47,35	50,18	53,08	54,39
Bergapten	29,52	37,74	46,39	49,36
Pimpinellin	48,87	49,85	47,3	47,62
Xanthotoxin	25,55	33,9	46,21	49,77
Isopimpinellin	30,82	39,48	47,96	49,19
Sphondin	31,5	35,17	45,61	49,69
8-methoxy-oxypeucedanin hidrat	42,12	43,11	44,41	44,99
Apterin	47,05	48,49	49,1	51,17
BHA	75,64	76,86	81,2	83,45
BHT	69,49	80,17	81,29	82,69
α-Toc	49,05	65,66	70,37	74,29

*standart



Şekil 5.18 : Saf maddelerin *β*-karoten renk açılım yöntemi ile lipid peroksidasyon % inhibisyon aktiviteleri

Bu yöntemlerde 10, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarda 3 paralel çalışma yapıldı. α-TOC, BHA ve BHT standart olarak kullanıldı.

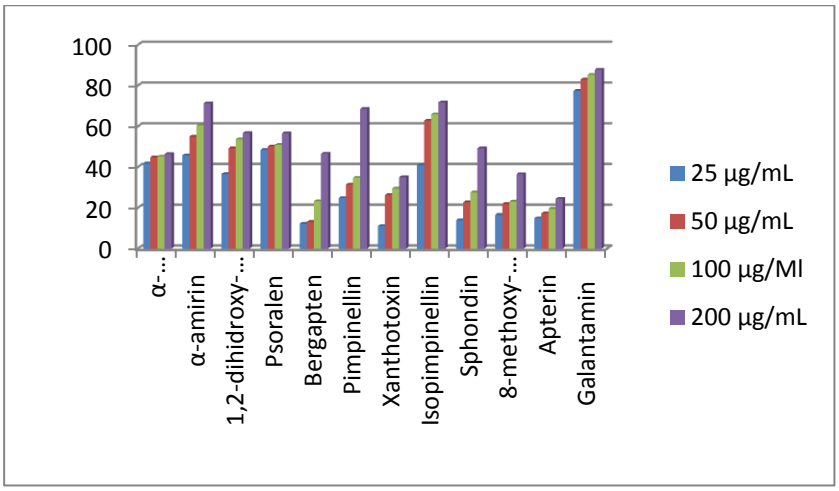
5.4.3 Antikolinesteraz aktivitesi sonuçları

Çizelge 5.17 : İzole saf maddelerin antikolinesteraz % inhibisyon aktivitelerinin sonuçları

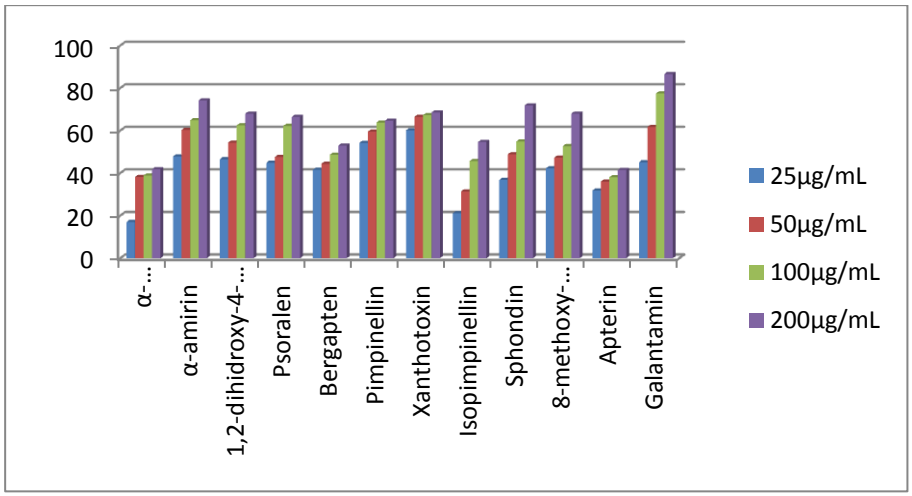
	AChE				**BChE**			
	Konsantrasyon (µM)							
Saf Maddeler	**25**	**50**	**100**	**200**	**25**	**50**	**100**	**200**
α-amiril tetracosanoat	41,80	44,81	45,19	46,39	17,04	38,18	38,89	41,85
α-amirin	45,77	54,96	60,50	71,36	47,92	60,34	64,89	74,21
1,2-dihidroxy-4-izopropil-sikloheksa-5-en	36,56	49,27	53,60	56,70	46,56	54,39	62,50	67,97
Psoralen	48,46	50,15	50,92	56,61	44,87	47,65	62,24	66,47
Bergapten	12,19	13,09	23,26	46,58	41,65	44,40	48,71	52,98
Pimpinellin	24,79	31,42	34,74	68,58	54,28	59,57	63,81	64,70
Xanthotoxin	11,06	26,32	29,49	35,03	60,18	66,55	67,34	68,58

Çizelge 5.17 : İzole saf maddelerin antikolinesteraz % inhibisyon aktivitelerinin sonuçları (devamı)

Isopimpinellin	41,01	62,83	65,88	71,73	21,14	31,43	45,71	54,71
Sphondin	13,91	22,71	27,54	49,24	36,86	48,85	54,89	71,86
8-methoxy-oxypeucedanin hidrat	16,58	21,90	23,06	36,52	42,26	47,35	52,70	67,99
Apterin	14,84	17,32	19,54	24,37	31,89	36,06	38,12	41,49
Galantamin	77,43	82,98	85,31	87,81	45,17	61,73	77,49	86,66



Şekil 5.19: İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu



Şekil 5.20: İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Türkiye'de yetişen iki endemik Apiaceae (*Prangos ilanae* ve *Heracleum platytaenium*) bitkisinden hazırlanan ekstrelerin sekonder metabolitlerinin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bugüne kadar *Prangos* ve *Heracleum* türlerinin daha çok uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar mevcut olup, sekonder metabolitlerinin izolasyonuna dayanan çalışmalar özellikle Türkiye'de sınırlı sayıdadır. Yapılan çalışmalara göre bu iki cinsin sekonder metabolitlerinin başlıca kumarinler, triterpenler ve diğer fenolik bileşiklerden ibaret olduğu anlaşılmıştır. Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait sekonder metabolitlerle yapılan aktivite çalışmaları sonucunda birçok sekonder metabolitin antibakteriyel aktivite başta olmak üzere antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda çalışmalarımız saf bileşiklerin izole edilmesinin ardından antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin tayin edilmesi sürecini takip etmiştir.

İzolasyon işlemine ekstrelerin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması ile başlanmış, fraksiyonların küçük kolonlarla veya preparatif ince tabaka kromatografisiyle saflaştırılması ile devam edilmiştir. Elde edilen bileşiklerin saflığı öncelikle ince tabaka kromatografisi ile kontrol edildikten sonra saf bileşiklerin spektral analizleri (NMR ve MS) yapıldı. Bu tez çalışmasında *Prangos ilanae* bitkisinden elde edilen bilinen üç saf bileşik terpenik yapıdaki 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en, α-amirin ve α-amiril tetracosanoate'dır. *Heracleum platytaenium* bitkisinden ise biri glikozit yapısında toplam 8 furanokumarin ve sadece bir steroit (stigmasterol) elde edilmiştir. Furanokumarinlerin yapıları psoralen, bergapten, pimpinellin, isopimpinellin, xanthotoxin, sphondin, 8-metoksi-oxypeucedanin hidrat, ve apterin olarak tek ve çift dimensiyonlu NMR teknikleri ile belirlenmiştir.

Hazırlanan petrol eteri ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik miktarları pirokatekole, toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildikten

sonra antioksidan aktiviteleri β-karoten renk açılım yöntemi ve DPPH serbest radikal giderim yöntemi ile belirlenmiştir. Bu iki antioksidan aktivite testi sonucunda her iki bitkiye ait ekstrelerde hemen hemen hiç DPPH serbest radikal giderim aktivitesi gözlenmemesine rağmen, β-karoten renk açılım yöntemi ile orta derecede lipid peroksidasyon inhibisyonu göstermiştir. Daha sonra ekstrelerden izole edilen saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri de bu iki yöntem ile tayin edilmiştir. Bu bileşiklerin düşük derecede DPPH serbest radikal giderim aktivitesine sahip oldukları belirlenmiştir, kumarinlerin yapısında serbest radikal süpürücü grupların olmayışı bunun nedeni olarak düşünülebilir. Buna karşın, β-karoten renk açılım yöntemi ile incelenen tüm bileşikler lipid peroksidasyonunu orta derecede inhibe etmişlerdir.

Hazırlanan petrol eteri ve metanol ekstrelerinin ve bu ekstrelerden elde edilen saf bileşiklerin antikolinesteraz aktiviteleri Ellman metodu ile in vitro olarak tayin edilmiştir. İzole edilen bileşikler genelde orta/iyi derecede antikolinesteraz aktivite göstermişlerdir. Test edilen triterpenlerden α-amirin, ve kumarinlerden ise isopimpinellin iyi derecede AChE inhibisyonu göstermiştir. BChE enzimi inhibisyonunda ise α-amirin, sphondin, xanthotoxin, pimpinellin bileşiklerinin iyi derecede aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Her iki antikolinesteraz aktivite testi sonucunda *α*-amirin bileşiğinin en aktif bileşik olarak izlenmesi ilgi çekicidir.

Sonuç olarak, kumarinlerin genelde yüksek antioksidan aktivite göstermesi ve son yıllardaki bazı çalışmalarda kayda değer antikolinesteraz aktivitelerinin bildirilmesi kumarin taşıma potansiyeline sahip bitkilerden gerek antioksidan gerekse antikolinesteraz bileşiklerin izole edilebileceği ve hatta daha aktif furanokumarin türevlerinin sentezlenmesi ile yeni potansiyel ilaçların keşfine katkı sağlıyabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

[1] **Sacli, S. ve Akalin, E**., 2001: "Preliminary Ethnobotanical Study From Kaz Dağı (Balıkesir/Çanakkale) I: Uses And Vernacular Names", *Turkey-J. Fac.Pharm.*, **34(2)**, 9-16.

[2] **Kubeczka, K.H**., 1982: "*Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects*", (eds:Margaris, N., Koedam, N., Vokou, D.), Netherland, pp. 165-167.

[3] **Akalın, E.,** 1999: "Türkiye'nin Batısında Yetişen *Ferulago* Türleri Üzerinde Farmasotik Botanik Araştırmalar", Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[4] **French, D.H**., 1971: "*Ethnobotany of the Umbelliferae*", (Ed: Heywood V.H.), Academic Press., London, England, pp. 385-402.

[5] **Eshbakova, A.K. ve diğ.,** 2006: "Furocoumarins From *Prangos ferulacea'', Chemistry of Natural Compounds*, **42**, pp. 102-103.

[6] **Hernstadt, I. ve diğ.,** 1977: "A monographic study of the genus *Prangos* (Umbelliferae)" , *Boissiera,* **26**, pp. 1-91.

[7] **Davis, P. ve diğ.,** 1988: " *Prangos* Lindl. , *Flora of Turkey and the East Aegean Islands",* Edinburgh Univ. Press, Edinburgh , **10**, pp. 151

[8] **Duman, H. ve diğ.,** 1999: "*Ekimia,* a new genus of Umbelliferae and two new Taxa of *Prangos* Lindl. (Umbelliferae) from southern Turkey" , *J.Bot.* , Edinburgh, **56,** pp. 199-209.

[9] **Duman, H. ve diğ..** 2000: *"Prangos* Lindl., *Flora of Turkeyand the East Aegean Islands",* Edinburgh Univ. Press, Edinburgh , **11**, pp. 141-142.

[10] **Dokoric, D. ve diğ.,** 2004: "3,5-Noadiyne isolated from the rhizome of *Cachrys ferulacea* inhibits endogenous nitric oxide release by rat periteneal macrophages" , *Chem. Pharmaceut. Bull.* , **52**, pp. 853-854.

[11] **Pimenov, M. G. ve diğ..** 2005: "Prangos ilanae (Umbelliferae), a new species from Western Turkey", *Candollea,* **60**, pp. 379-385.

[12] **Pimenov, M. G. ve diğ.,** 2004: "The Asian umbelliferae biodiversity database(ASIUM) with particular reference to south-west Asian taxa", *Turkish Journal of Botany,* **28**, pp. 139-145.

[13] **Taniguichi, M. ve diğ.,** 2005: "Four coumarins from *Heracleum yunngningense*", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin,* **53**, pp. 701-704.

[14] **Souri, E. ve diğ.,** 2004: "Antioxidant activity of some furanocoumarins isolated from *Heracleum persicum*", *Pharmaceutical Biology,* **42**, pp. 396- 399.

[15] **Sonboli, A. ve diğ.** 2007: "Volatile constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Tetrataenium lasiopetalum* (Apiaceae) from Iran", *Flavour and Fragrance Journal,* **22**, pp. 119-122.

[16] **Özçelik H. ve diğ.,** 1989: "Van ve Yöresinde Süt Mamullerinin Hazırlanmasında Yararlanılan Bitkilerin Kullanılışları Üzerine Bir Araştırma", VAN.

[17] **Özgen, U. ve diğ.,** 2000: "Ilıca (Erzurum) İlçesine Bağlı Köylerde Halk İlacı Olarak Kullanılan Bitkiler", XIII. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul, pp. 135-143.

[18] **Shikishima, Y. ve diğ.,** 2001: "Terpenoids and γ-pyrone derivatives from *Prangos tschimganica* " , *Phytochemistry, **57,*** pp. 135-141.

[19] **Zhang, C. ve diğ.,** 2009: "A new trimeric furanocoumarin from *Heracleum rapula*'' , *Chinese Chemical Letters,* **20 ,** pp. 1088-1090.

[20] **Nakamori, T. ve diğ.,** 2008: "Chemical studies on the root of *Heracleum candicans* WALL'' , *J. Nat. Med. ,* **62**, pp. 403–412.

[21] **Govindarajan, R. ve diğ.,** 2007: "A Validated HPLC Method for Quantification and Optimization of Furocoumarins in Different Extracts of Fruits of *Heracleum candicans*'' , *Chromatographia* , **66 ,** pp. 401–405.

[22] **Koul, S. K. ve diğ.,** 1979: "New coumarin glucoside from *Prangos pabularia*", *Phytochemistry,***18**, pp. 1762-1763.

[23] **Basa, S. C ve diğ..** 1970: "Extractives of Umbelliferae - Pabularinone, a new furocoumarin from Prangos pabularia Lindl. ", *Chemistry & Industry,* **23**, pp.746-&.

[24] **Razavi, S. M. ve diğ.,** 2008: " Coumarins from the roots of *Prangos uloptera*", *Phytochemistry Letters,* **1**, pp. 159-162.

[25] **Razavi, S. M. ve diğ.,** 2009: "A furanocoumarin from *Prangos uloptera* roots, biological effects", *Natural Product Research* ,**23**, pp. 1522-1527.

[26] **Abyshev, A. Z. ve diğ.,** 1972: "Gosferol - New furocoumarin from roots of *Prangos ferulacea* ", *Khımıya Prırıdnykh Soedınenıı*, **1,** pp. 49-&.

[27] **Nikonov, G. K. ve diğ.,** 1971: "Constituion of Pranferin, a new coumarin from of *Prangos ferulacea*", *Khımıya Geterosıklıcheskıkh Soedınenıı ,* **3**, pp. 255-&.

[28] **Abyshev, A. Z. ve diğ.,** 1974: " Isogosferol – A new furocoumarin from *Prangos Lophoptera* roots ", *Khımıya Prırıdnykh Soedınenıı,* **1**, pp. 83-84.

[29] **Abyshev, A. Z. ve diğ.,** 1974: " Prandiol – A new dihydrofurocoumarin from roots of *Prangos Bıebersteınıı*", *Khımıya Prırıdnykh Soedınenıı,* **5**, pp. 574-577.

[30] **Rustaiyan, A. ve diğ.,** 2006: "Volatile oils of *Ducrosia assadii Alava.* and *Prangos acaulis (DC.) Bornm.* from Iran", *Journal of Essential Oil Research,* **18,** pp. 682-684.

[31] **Nazemiyeh, H. ve diğ.,** 2007: "Essential oil composition of the umbels and fruit of *Prangos uloptera DC*", *Natural Product Communications,* **2** , pp. 89-91.

[32] **Mazloomifar, H. ve diğ.,** 2004: "Essential oil of *Prangos uloptera DC.* from Iran", *Journal of Essential Oil Research,* **16**, pp. 415-416.

[33] **Sefidkon, F. ve diğ.,** 2001: "Chemical composition of the oil of *Prangos uloptera DC.*", *Journal of Essential Oil Research,* **13**, pp. 84-85.

[34] **Kilic, C. S. ve diğ.,** 2010: "Comparison of the Essential Oils From Fruits andRoots of *Prangos denticulata* Fisch et Mey. growing in Turkey", *Journal of Essential Oil Research,* **22**, pp. 170-173.

[35] **Akbari, M. T. ve diğ.,** 2010: "Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves, stems and flowers of *Prangos ferulacea* (L.) Lindl. grown in Iran", *Bulgarian Chemical Communications,* **42**, pp. 36-39.

[36] **Mirzaei, H. H. ve diğ.,** 2008: " Volatile components of the essential oil *Prangos asperula* from west of Iran" , *Asian Journal of Chemistry,* **20**, pp. **:** 3763-3766.

[37] **Ozek, G. ve diğ.,** 2006: "Comparison of the essential oils of *Prangos turcica* A. Duran, M. Sagiroglu et H. Duman fruits obtained by different isolation techniques", *Journal of Essential Oil Research,* **18**, pp. 511-514.

[38] **Baser, K. H. C. ve diğ.,** 2000: "Composition of the essential oil of *Prangos heyniae* H. Duman et M. F. Watson, a new endemic from Turkey", *Flavour and Fragrance Journal*, **15**, pp. 47-49.

[39] **Orhan, I. ve diğ.,** 2008: "Coumarin, anthroquinone and stilbene derivatives with anticholinesterase activity" , *Zeitschrift Fur Naturforschung Section C- A Journal Of Biosciences,* **63**, pp. 366-370.

[40] **Tosun, F. ve diğ.,** 2008: "Anticonvulsant activity of furanocoumarins and the essential oil obtained from the fruits of *Heracleum crenatifolium*", *Food Chemistry,* **107**, pp. 990-993.

[41] **Doi, M. ve diğ.,** 2004: "Candibirin A, a furanocoumarin dimer isolated from Heracleum candicans WALL", *Acta Crystallographica Section C-Crystal Structure Communications*, **60**, pp. 2004.

[42] **Zhang, C. ve diğ.,** 2009: "A new trimeric furanocoumarin from *Heracleum rapula*" , *Chinese Chemical Letters*, **20**, pp. 1088-1090.

[43] **Xiao, W. L. ve diğ.,** 2005: "Four new coumarin glucosides from the roots of *Heracleum rapula*" , *Heterocycles,* **65**, pp. 1189-1196.

[44] **Niu, X. M. ve diğ.,** 2004: "Two new coumarin derivatives from the roots of *Heracleum rapula*", *Planta Medica***, 70**, pp. 578-581.

[45] **Ozek, T. ve diğ.,** 2005: "Comparison of the essential oils of three endemic Turkish *Heracleum* species obtained by different isolation techniques", *Journal of Essential Oil Research,* **17**, pp. 605-610.

[46] **Iscan, G. ve diğ.,** 2004: "Essential oils of three species of *Heracleum.* Anticandidal activity", *Chemistry of Natural Compounds,* **40**, pp. 544-547.

[47] **Iscan, G. ve diğ.,** 2003: "The bioactive essential oil of *Heracleum sphondylium* L. subsp. *ternatum* (Velen.) Brummitt", *A Journal of Biosciences* , **58**, pp. 195-200.

[48] **Ozek, T. ve diğ.,** 2002: "Comparative study of the essential oils of *Heracleum sphondylium* ssp. *ternatum* obtained by micro- and hydro-distillation methods" , *Chemsitry of Natural Compounds,* **38**, pp. 48-50.

[49] **Ibadullaeva, S. D. ve diğ.,** 2000: "Essential oil of *Heracleum antasiaticum*", *Chemistry of Natural Compounds* , **36**, pp. 218-218.

[50] **Valiollah, H. ve diğ.,** 2009: "Anti-inflammatory and analgesic properties of *Heracleum persicum* essential oil and hydroalcoholic extract in animal models", *Journal of Ethnopharmacology,* **124**, pp. 475-480.

[51] **Taherpour, A. ve diğ.,** 2008: "Chemical composition of the essential oil of *Heracleum persicum* seeds of Iran" , *Asian Journal of Chemistry*, **20**, pp. 3345-3348.

[52] **Sefidkon, F. ve diğ.,** 2004: "Analysis of the oil of *Heracleum persicum* L. (seeds and stems) ", *Journal of Essential Oil Research,* **16**, pp. 296-298.

[53] **Sefidkon, F. ve diğ.,** 2002: "Analysis of the oil of *Heracleum persicum* L. (leaves and flowers) " , *Journal of Essential Oil Research,* **14**, pp. 295-297.

[54] **Baser, K. H. C. ve diğ.,** 2000: "Composition of the essential oil of *Heracleum paphlagonicum Czeczott* " , *Journal of Essential Oil Research,* **12**, pp. 385-386.

[55] **George, V. ve diğ.,** 2001: "Chemical composition of the essential oil from the rhizomes of *Heracleum candolleanum*", *Journal of Essential Oil Research,* **13**, pp. 80-81.

[56] **Hanson, R. J..** "Tutorial Chemistry Texts, Natural Products: The Secondary Metabolites", *Royal Society of Chemistry*, pp. 1-2.

[57] **Mann, J ve diğ..** 1994. Natural Products, First Edition, Pearson Education, London, 289.

[58] **Topçu, G ve diğ..** 2001: *Private Communication,* 1078, Chambridge Crystallographic Data Centre.

[59] **Boiteau, P ve diğ..** 1969: "Triterpenoides", *Gauthier-Villars,* 3.

[60] **Harborne J. B. ve diğ..** 1988. *Phytochemical Methods, A Guıde to Modern Techniques of Plant Analysis,* Third Edition, 129, Chapman&Hall, London.

[61] **Harborne, J. B. ve diğ..** 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 42-43.

[62] **Cram, D. J. ve diğ..** 1964: "*Organic Chemistry"*, McGraw-Hill Book Company, New York.

[63] **Harborne, J. B. ve diğ..** 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 40-41.

[64] **Harborne, J. B. ve diğ..** 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 49-50.

[65] **Guliyev, V.B. ve diğ..** 1999: *Flavonoidler*, Bakanlar Matbaacılık, İstanbul.

[66] **Harborne, J. B. ve diğ..** 1982: *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall, London.

[67] **Deschner, E.E. ve diğ.,** 1991: "Quercetin and Rutin as Inhibitors of Azoxymethanol-Induced Colonic Neoplasia", *Carcinogenesis.* Vol. **12:**1193-1196.

[68] **Verma, A.K. ve diğ,** 1988: "Inhibition of 7,12-Dimethylbenz(A)Anthracene-Induced and N-Nitrosomethylurea-Induced Rat Mammary-Cancer by Dietary Flavonol Quercetin", *Cancer Research*. Vol. **48:** 5754-5758.

[69] **Boğa, M.,** 2005: "Kumarin Türevi Yeni 14:4 Taç Eter Bileşiklerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması", Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[70] **El-Khatib, R. M., Nassr, L. A. E.,** 2007: "Reactivity Trends of The Base Hydrolysis of Coumarin and Thiocoumarin an Binary Aqueous Methanol Mixtures at Different Temperature". *Spectrochimica Acta*, **67:** 643-648.

[71] **Kavran, G.,** 1998. "Bazı Kumarin Türevlerinin Sentezleri ve UV Spektrumları", Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[72] **Thomson, R. H.,** 1993. *The Chemistry of Natural Products*, Second Edition, Cahpman& Hall, Suffolk, 106.

[73] **Boğa, M.,** 2005. Kumarin Türevi Yeni 14:4 Taç Eter Bileşiklerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması, Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.

[74] **El-Khatib, R. ve diğ..** 2007: "Reactivity Trends of The Base Hydrolysis of Coumarin and Thiocoumarin an Binary Aqueous Methanol Mixtures at Different Temperature". *Spectrochimica Acta*, **67:** 643-648.

[75] **Guliyev, V.B., Harmandar, M.,** 1999: *Flavonoidler*, Bakanlar Matbaacılık, İstanbul.

[76] **Gönenç, A. ve diğ..** 2002: "Lipid Peroxidation and antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients", *Dialysis and Transplantation*, **31**, pp. 88-96.

[77] **Papas, A. M.,** 1996: Determinants of antioxidant status in humans, *Lipids*, **31**, pp. 77–82.

[78] **Zhao, G. R. ve diğ..** 2006: "Antioxidant Activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*", *Food Chem*, **99**, pp. 767-771.

[79] **Atalay, M. ve diğ.,** 2002: ‘’Diabetes, Oxidative Stress and Physical Exercise’’, *Journal of Sports Science and Medicine,* **1**, pp. 1-14.

[80] **Ulubelen, A. ve diğ..** 1991: “1-Acetylhydroquinone 4-galactoside from *Ferulago aucheri*”, *Phytochemistry.* **30**, pp. 2803-2805.

[81] **Özgen, U. ve diğ..** 2006: “Antioxidant Properties of Some Medicinal Lamiaceae (Labiatae) Species”, *Pharm Biol*, **44** , pp.107-112.

[82] **Reische, D. ve diğ..** 2002: *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, New York: Marcel Dekker Inc., pp. 489-516.

[83] **Halliwell, B. ve diğ..** 1995: “The Characterization of Antioxidants”, *Food and Chemical Toxicology*, **33**, pp. 601-617.

[84] **Rang, R. Y. ve diğ..** 2006: Distribution of 127 Edible Plant Species for Antioxidant Activities by Two Assays. *J Sci Food Agric*, **86**, pp. 2395-2403.

[85] **Acuna, U. ve diğ..** 2002: “Antioxidant Activity of Ten Edible North American Plants”. *Phytother Res*, **16**, pp. 63-65.

[86] **Topçu, G**. **ve diğ..** 2007: “ Antioxidant Activity of Stem and Root Extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An Edible Medicinal Plant”. *Food Chem*, **103**, pp. 623–630.

[87] **Yamazaki, E. ve diğ..** 2007: “Antioxidant Activity of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum*) Fruit”. *Food Chem*, **100**, pp. 171- 177.

[88] **Rice-Evans, C. A. ve diğ..** 1997: “Antioxidant Properties of Phenolic Compounds”, *Trends in Plant Science*, **2**, pp. 152-159.

[89] **Özyürek, M.,** 2008: “Reaktif Oksijen Türleri Süpürücü Antioksidan Aktivitenin Ölçümünde Modifiye Cuprac Yöntemlerinin Geliştirilmesi”, İstanbul Üniversitesi, Doktora tezi, İstanbul.

[90] **Piazzi, L. ve diğ..** 2008: **“**Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds”. *Bio-organic & Medicinal Chemistry Letters,* **8**, pp. 423–426.

[91] **Castellani, R. J. ve diğ..** 2006: Amyloid-β and τ in Alzheimer Disease: What is the Neuropathology Trying to Tell Us? *Taylor& Francis Group, LLC*, chapter 6.

[92] **Hartman, R. E.,** 2010: **“**Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer’s Disease Pathology”. *Taylor & Francis Group, LLC*, chapter 16.

[93] **Akalın, H., Ü.,** 2003. “Alzheimer Hastalarının Lenfositlerinde rRNA İfadelenmesinin Araştırılması”, *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitisü, Kayseri.

[94] **Yamantürk, P.,** 2000. Alzheimer Hastalığı, Sendrom, **12**, pp. 72-81.

[95] **Orhan, İ. ve diğ..** 2007: “Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish Salvia species”. *Food Chemistry,* **103**, pp. 1247–1254.

[96] **Demans Dergisi** 2002: “Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri”, **2**, pp. 5-9.

[97] **Singleton, V. L. ve diğ..** 1965: "Colorimetry of Total Phenolics with Phosp homolibdic-phosphotungstic Acid Reagents", *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, pp. 144-158.

[98] **Singleton, V. L. ve diğ..** 1999: " Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent", *Methods in Enzymology*, **299**, pp. 152-178.

[100] **Sanchez, M. C. ve diğ..** 1998: " Procedure to Measure The Antiradical Efficiency of Polyphenols", *Journal of The Science of Food and Agriculture*, **76**, pp. 270-276.

[101] **Poole, C. F. ve diğ..** "*Chromatography Today*" Elsevier Science B.V. pp**.** 649-726.

[102] **A. dos Santos Pereira ve diğ..** 2002: "High-temperature gas chromatography–mass spectrometry with glass capillary columns for the screening of natural products" , *Journal of Chromatography A,* **947**, pp. 255–265.

[103] **Bergendorff, O. ve diğ..** 1997: "Furanocoumarins and brain benzodiazepine receptors" , *Phytochemistry*, **44**, pp. 1121-1124.

[104] **Ulubelen, A. ve diğ..** 1995: "Biological activities of a Turkish medicinal plant, *Prangos platychlaena*" , *Journal of Ethnopharmacology*, **45**, pp. 193-197.

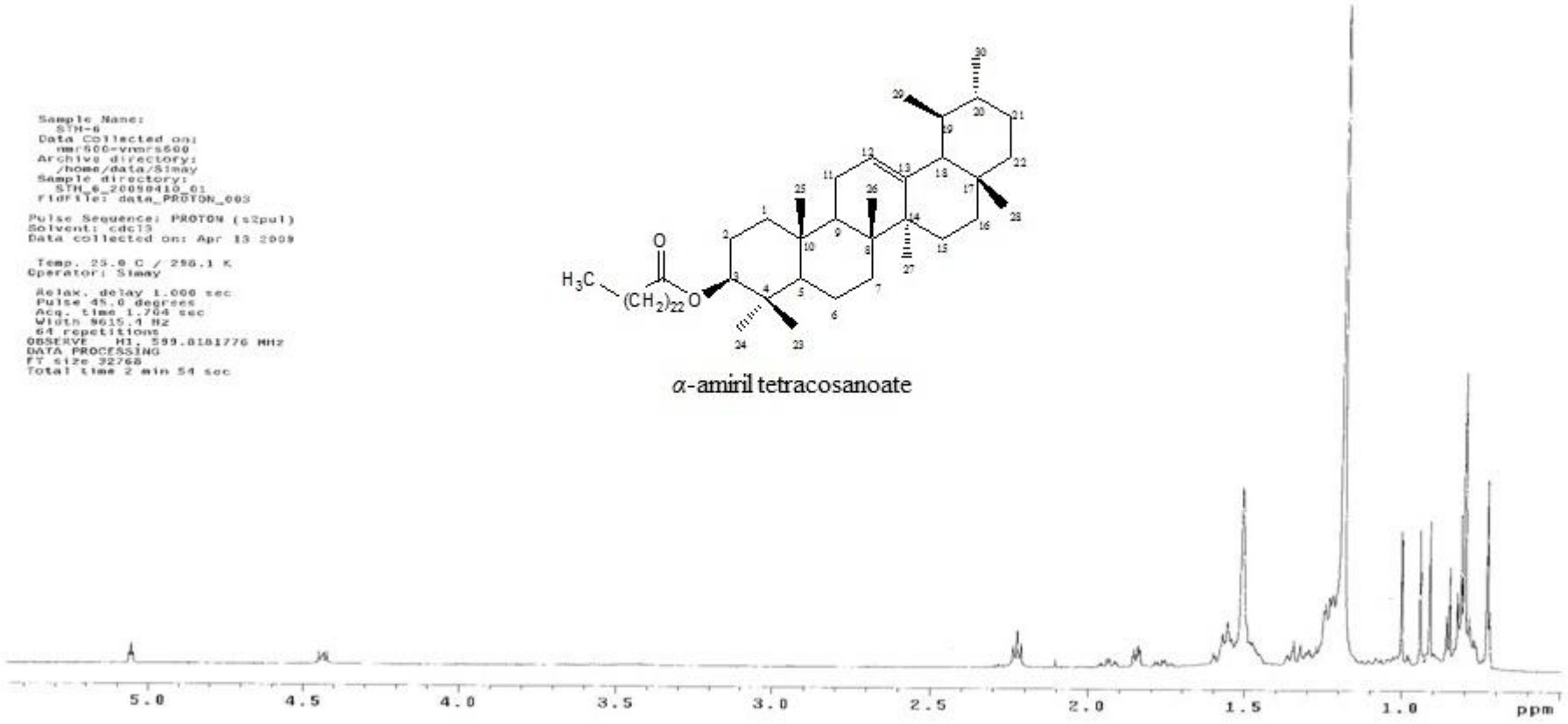
[105] **Steck, W. ve diğ..**1974: "Apterin, an unusual glucoside of *Zizia aptera"* , *Phytochemistry*, **13**, pp. 1925-1927.

[106] **Hisamoto, M. ve diğ..**2003: "Antioxidant compounds from the leaves of *Peucedanum japonicum Thunb", Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51,** pp. 5255-5261.

EKLER

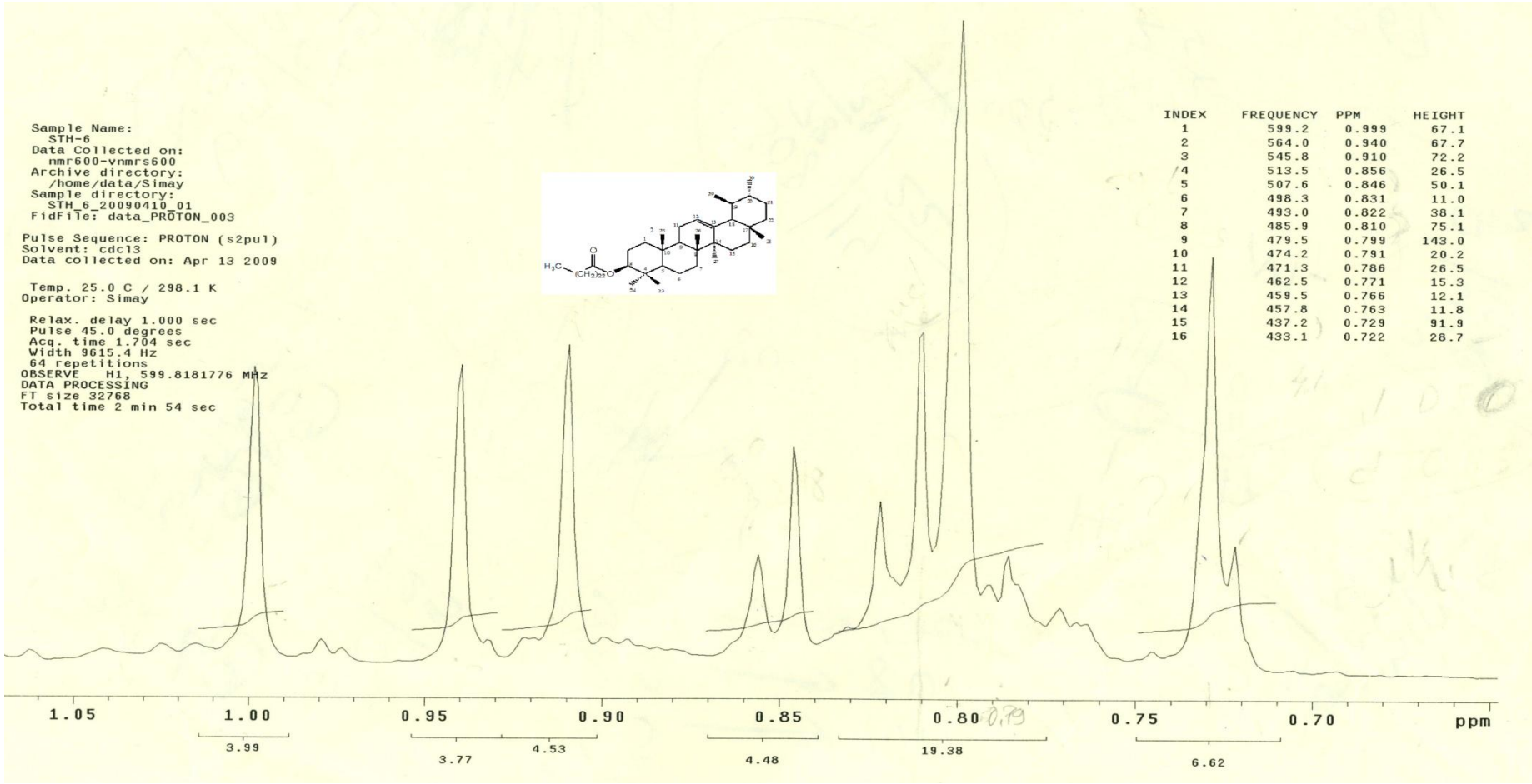
EK A.1: *α*-amiril tetracosanoat bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK A.2:*α*-amiril tetracosanoat bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK A.3: *α*-amiril tatracosanoat bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spektrumu
EK A.4: *α*-amiril tetracosanoat bileşiğinin HMBC NMR spektrumu
EK A.5: *α*-amiril tetracosanoat bileşiğinin MASS spektrumu
EK B.1: α-amirin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK B.2: α-amirin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK B.3: α-amirin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu
EK C.1:1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK C.2:1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK C.3:1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en bileşiğinin ^{13}C(APT)NMR spektrumu
EK D.1: Psoralen bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK E.1: Bergapten bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK E.2: Bergapten bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu(alifatik bölge açılımı)
EK E.3: Bergapten bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spektrumu
EK E.4: Bergapten bileşiğinin HSQC spektrumu
EK F.1: Xanthotoxin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK F.2: Xanthotoxin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK G.1: Pimpinellin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK G.2: Pimpinellin bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spektrumu
EK G.3: Pimpinellin bileşiğinin HMBC spektrumu
EK H.1: Isopimpinellin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK H.2: Isopimpinellin bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spektrumu
EK I.1: Sphondin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK I.2: Sphondin bileşiğinin ^{13}C (APT)NMR spektrumu
EK I.3: Sphondin bileşiğinin HMQC spektrumu
EK I.4: Sphondin bileşiğinin HMBC spektrumu
EK J.1: Stigmasterol bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK J.2: Stigmasterol bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu
EK K.1: HPE-82-3 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu
EK L.1: HPE-32-33-1-1 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK A.1



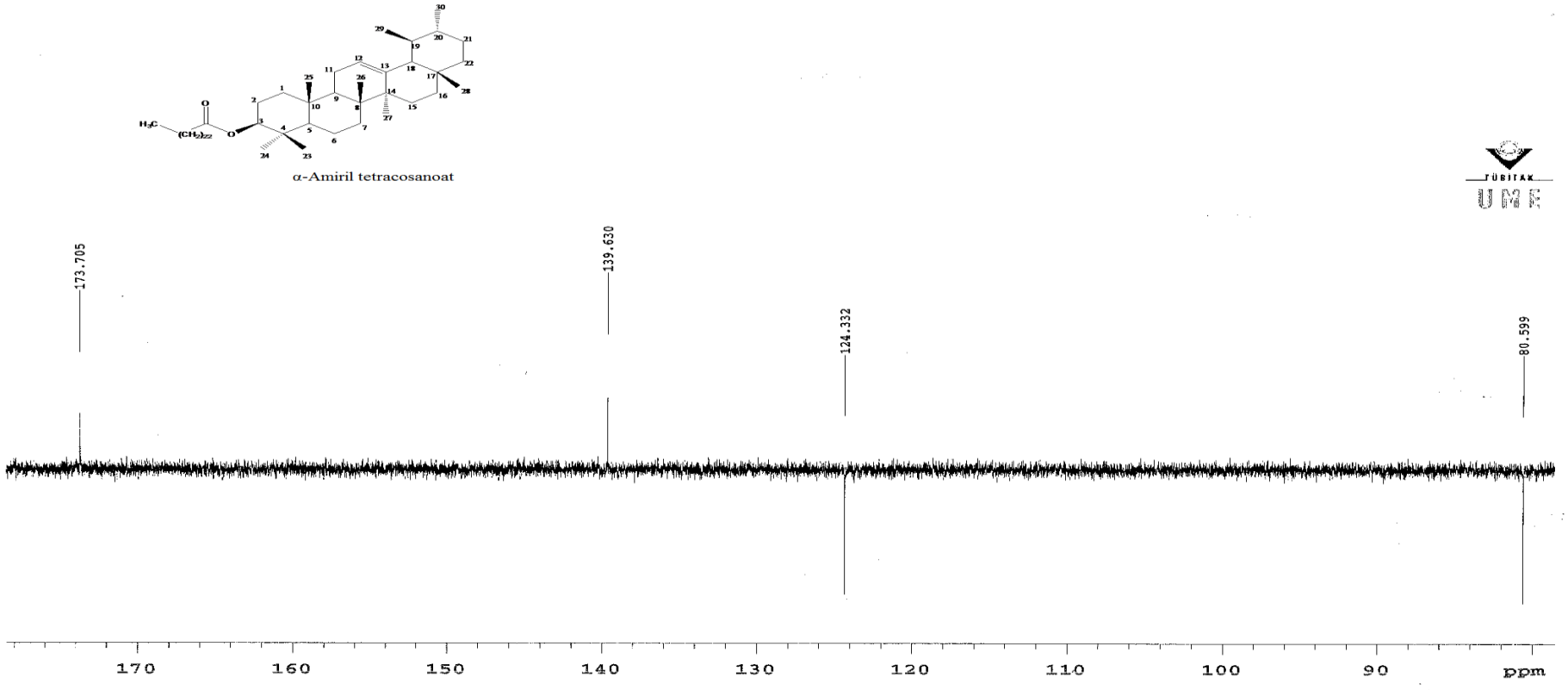
Şekil A.1 : α-amiril tetracosanoat bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK A.2



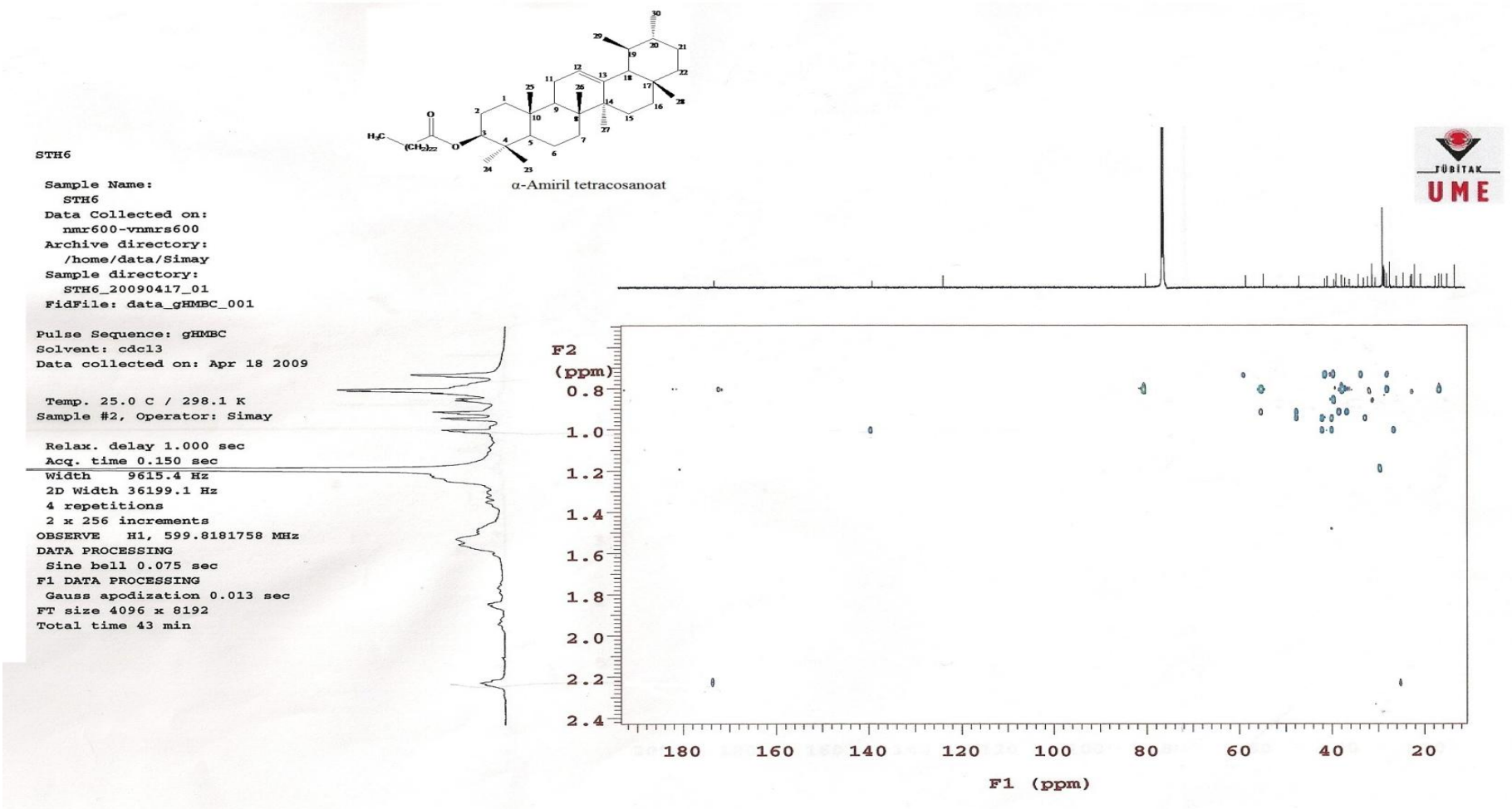
Şekil A.2 : α-amiril tetracosanoat bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK A.3



Şekil A.3 : α-amiril tatracosanoat bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spektrumu

EK A.4



Şekil A.4 : α-amiril tetracosanoat bileşiğinin HMBC NMR spektrumu

EK A.5

Mass Spectrum Molecular Formula Report

Analysis Info

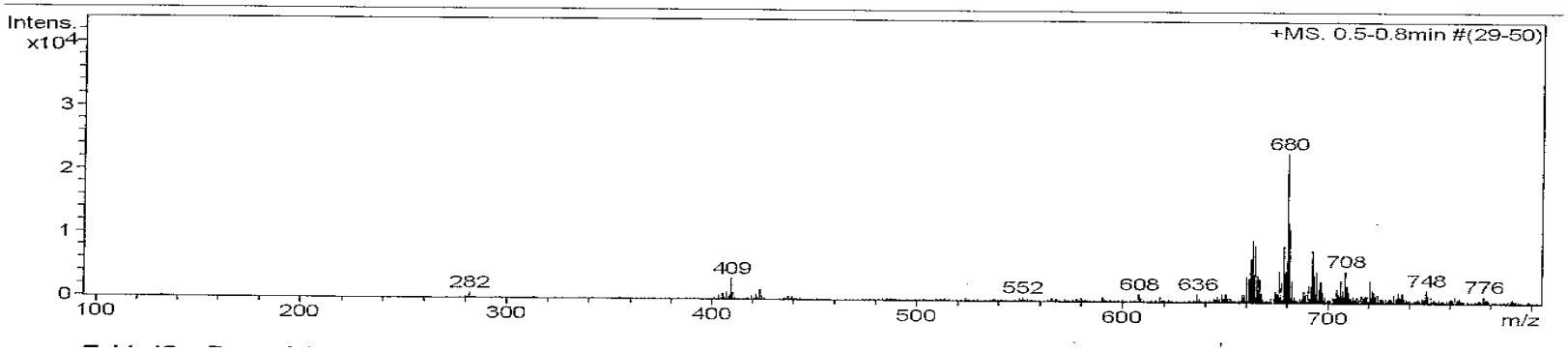
Analysis Name	D:\Data\data\std	Acquisition Date	5/7/2009 1:15:23 PM
Method	reserpine.m		
Sample Name		Operator	bruker customer
Comment		Instrument / Ser#	micrOTOF-Q 36

Acquisition Parameter

Source Type	APCI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	2.0 Bar
Focus	Not active	Set Capillary	4000 V	Set Dry Heater	200 °C
Scan Begin	100 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	800 m/z	Set Collision Cell RF	600.0 Vpp	Set Divert Valve	Waste

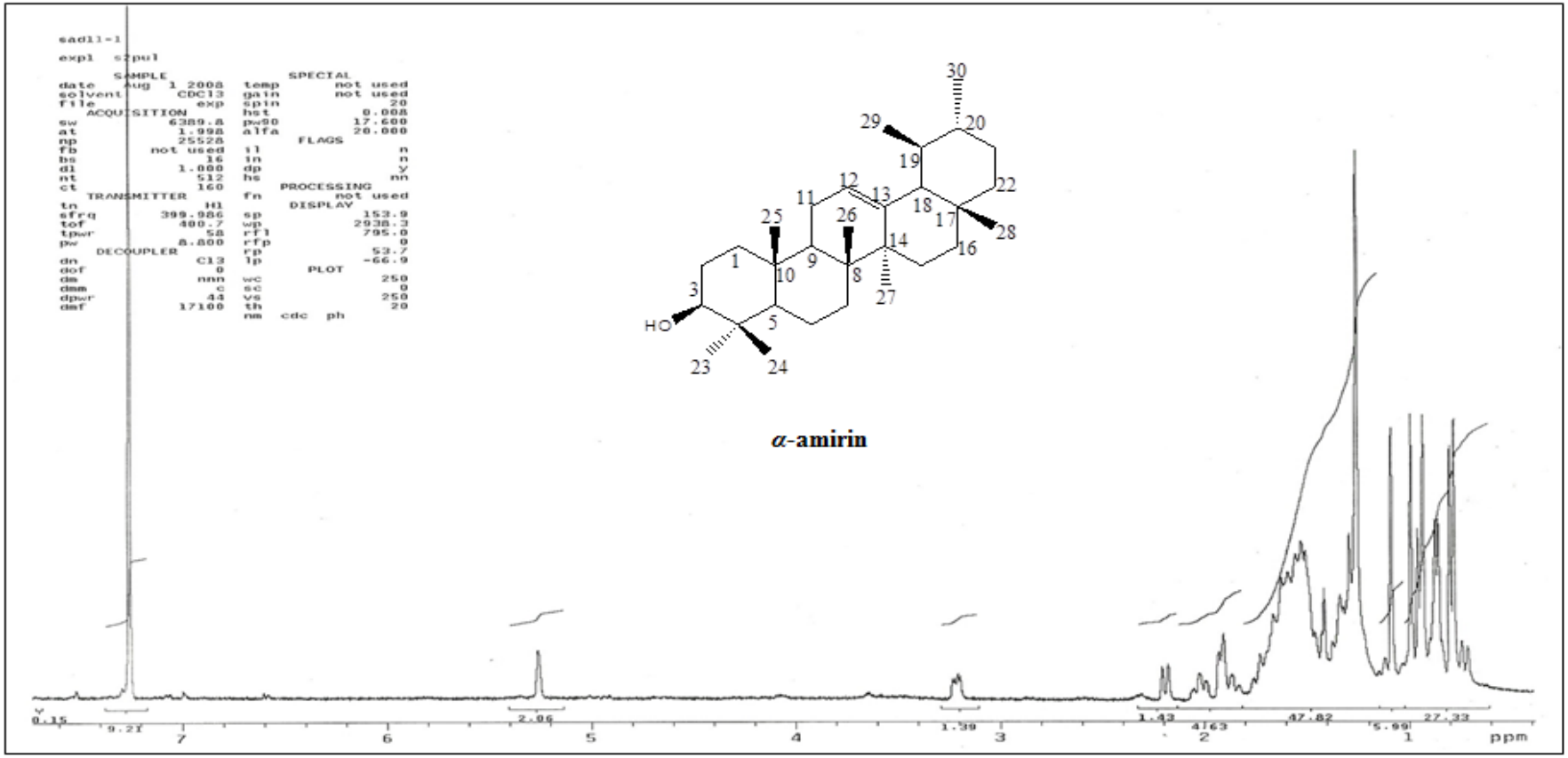
Generate Molecular Formula Parameter

Formula, min.			
Formula, max.			
Measured m/z		Tolerance	Charge
Check Valence		Minimum	Maximum
Nirogen Rule		Electron Configuration	
Filter H/C Ratio		Minimum	
Estimate Carbon			Maximum



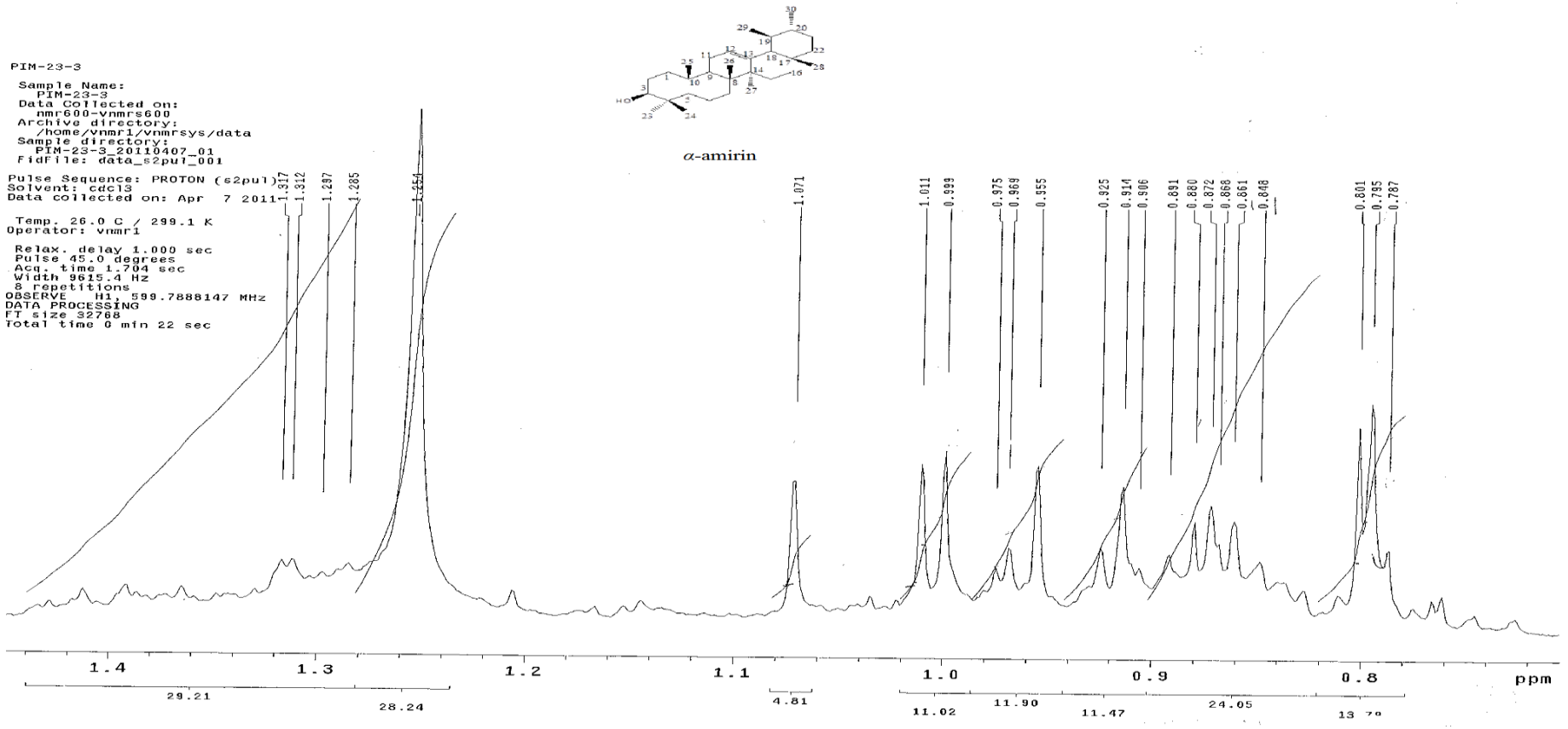
Şekil A.5 : α-amiril tetracosanoat bileşiğinin MASS spektrumu

EK B.1



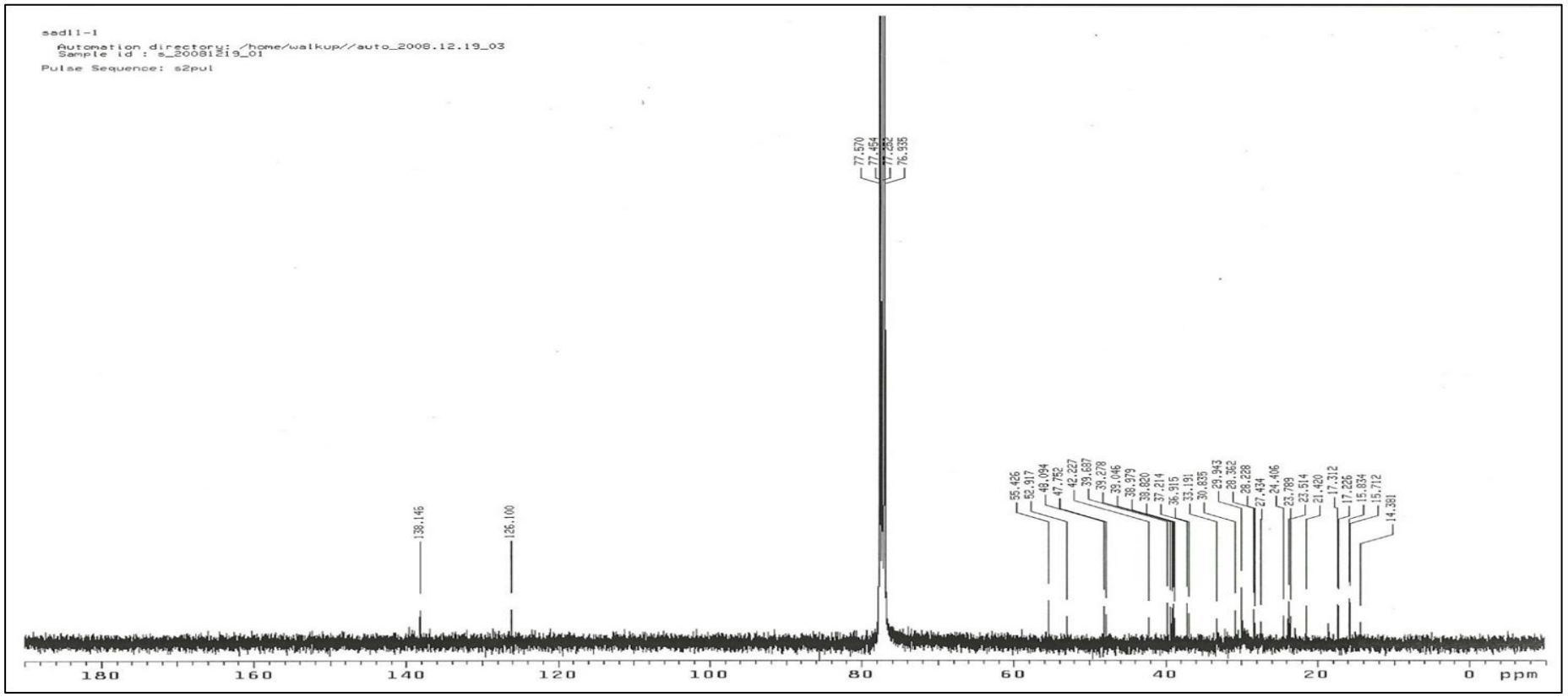
Şekil B.1 : α-amirin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK B.2



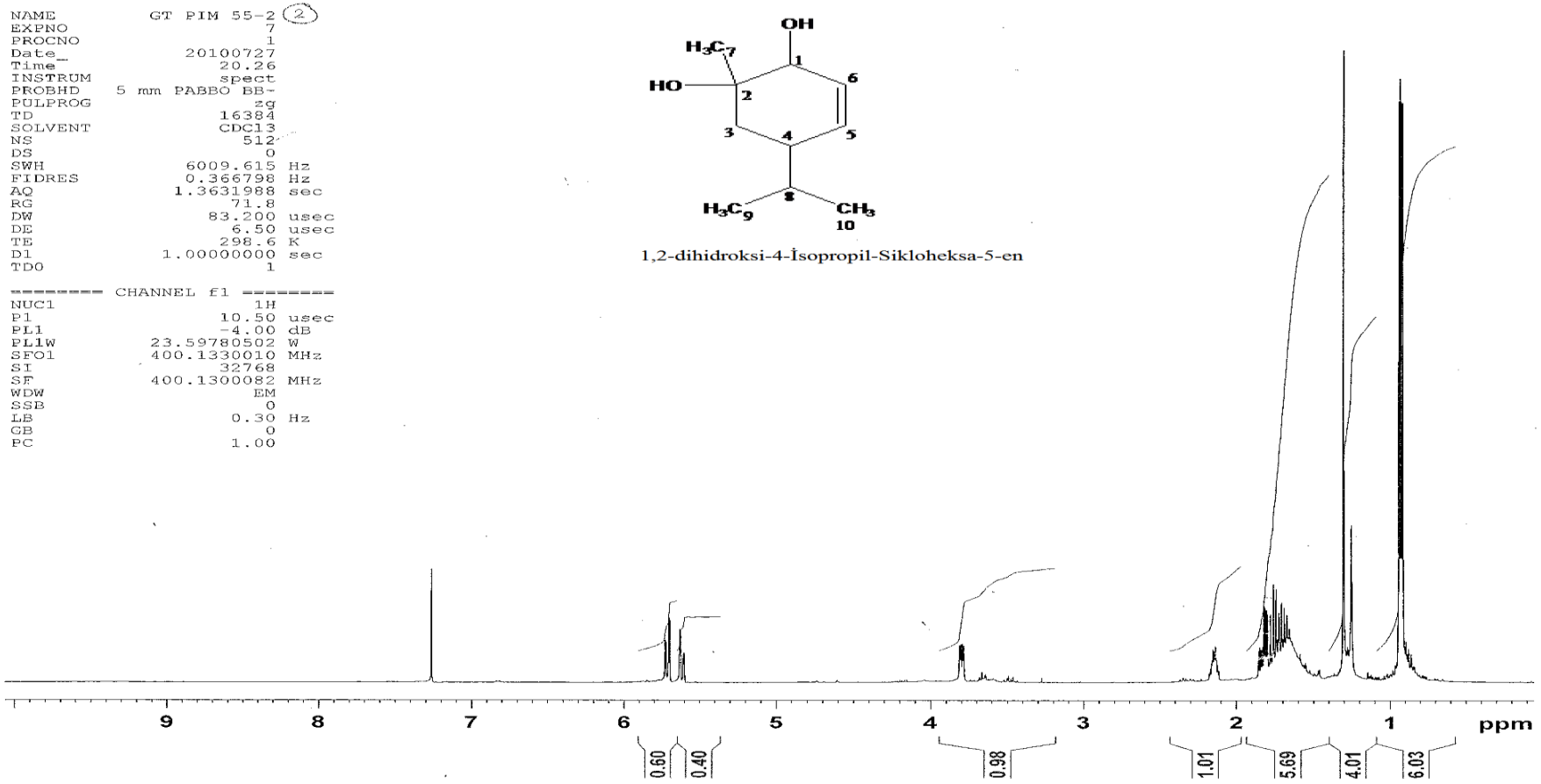
Şekil B.2 : α-amirin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK B.3



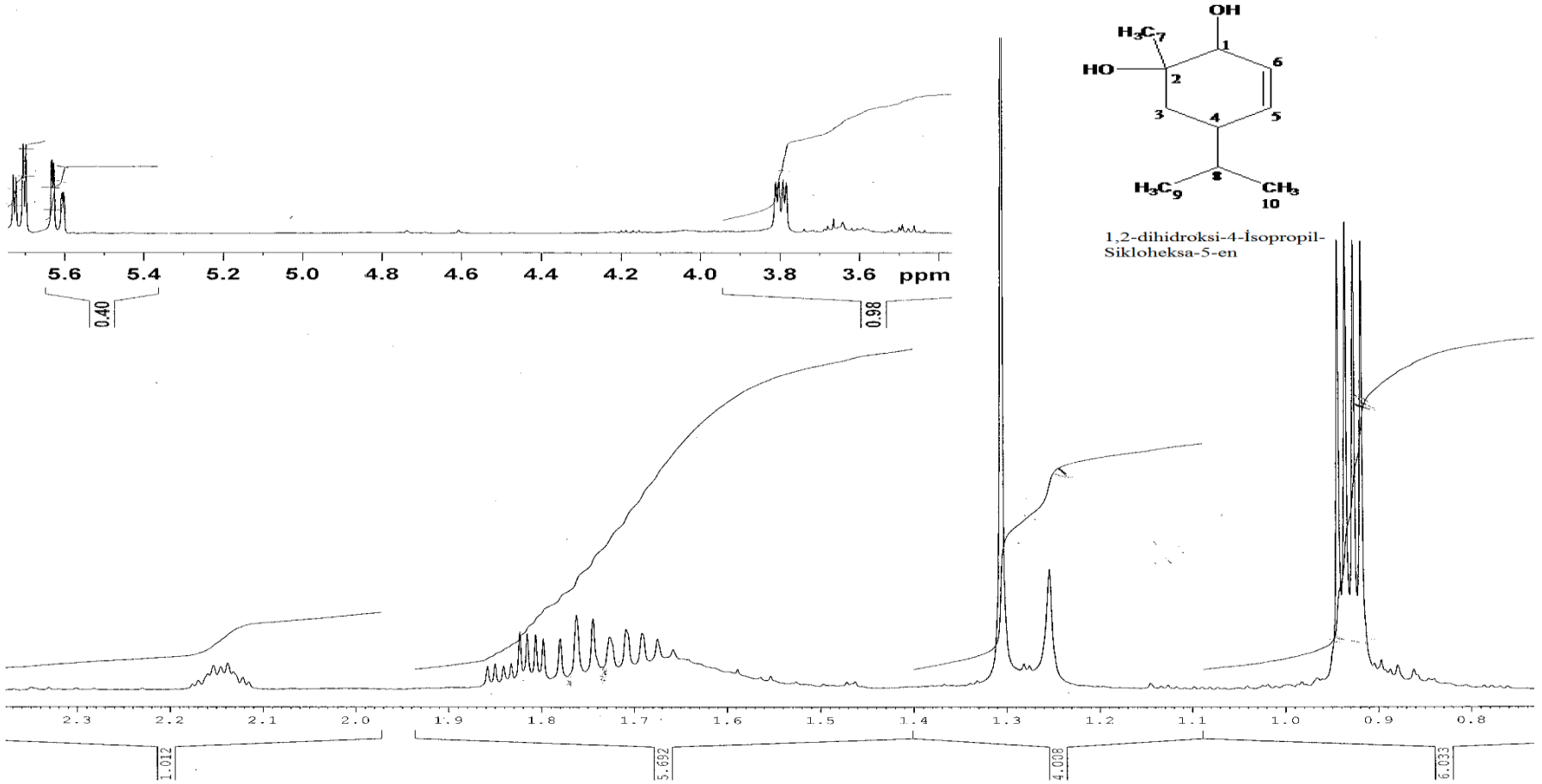
Şekil B.3 : α-amirin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu

EK C.1



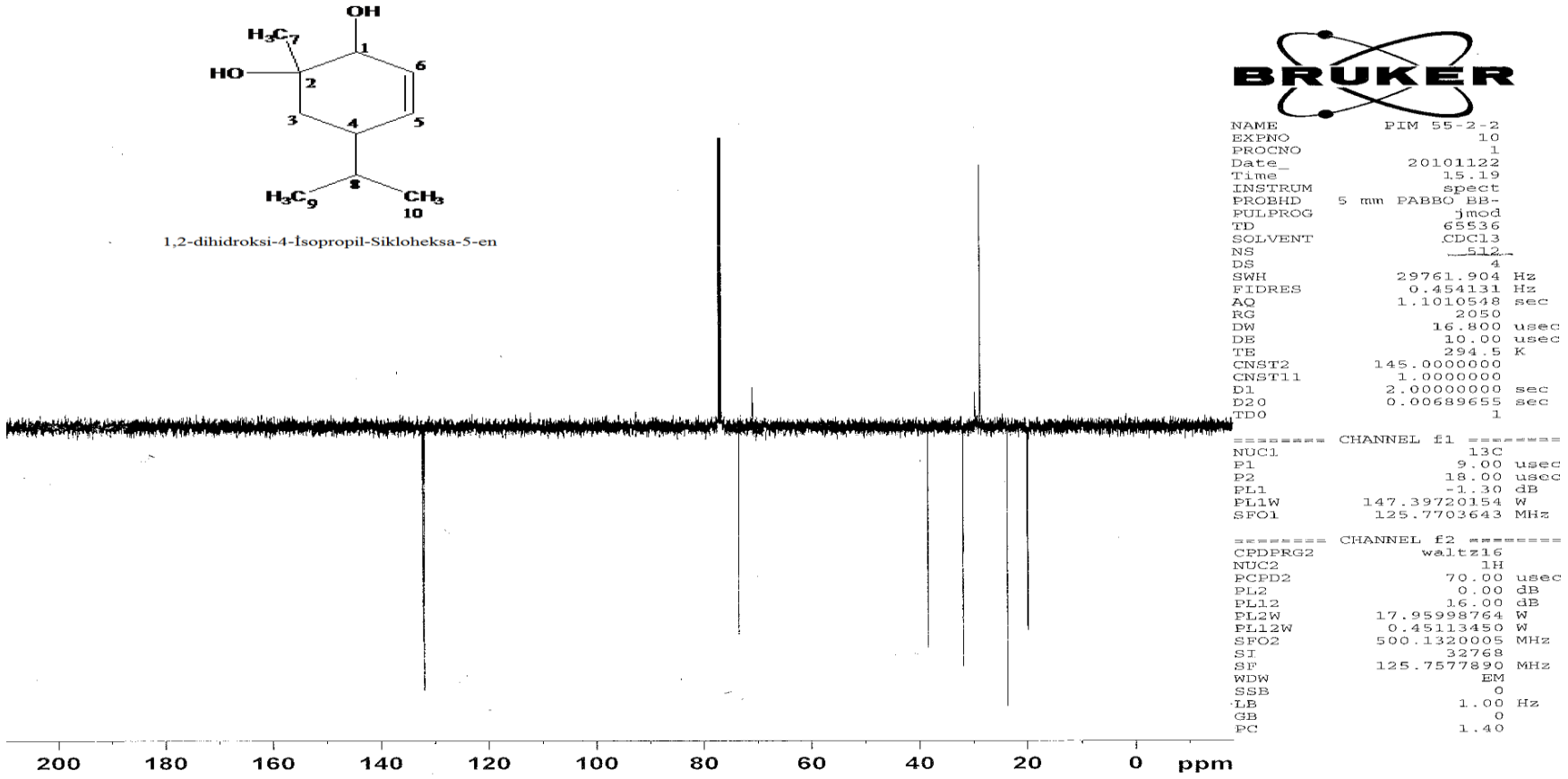
Şekil C.1 : 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK C.2



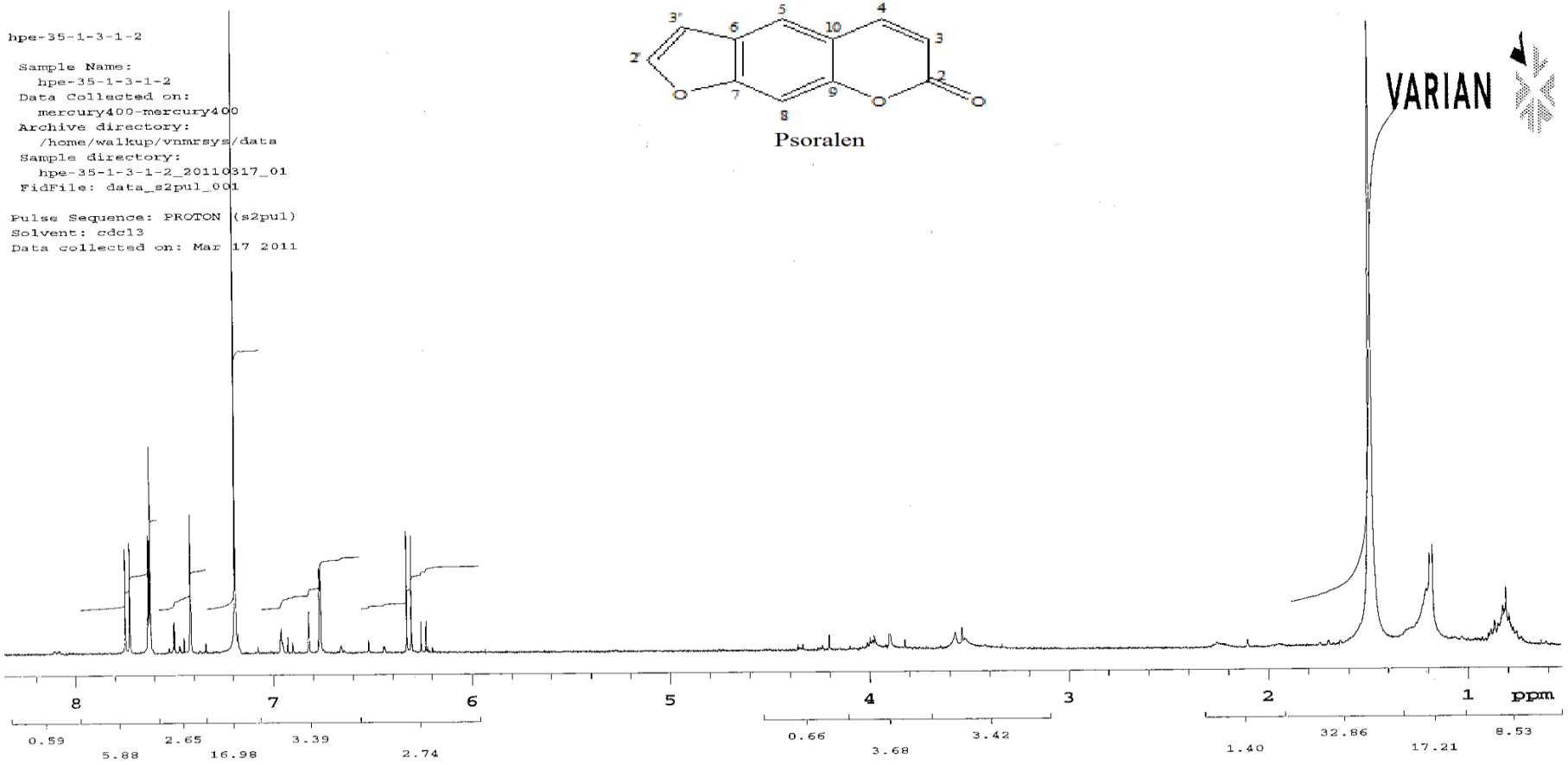
Şekil C.2 : 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK C.3



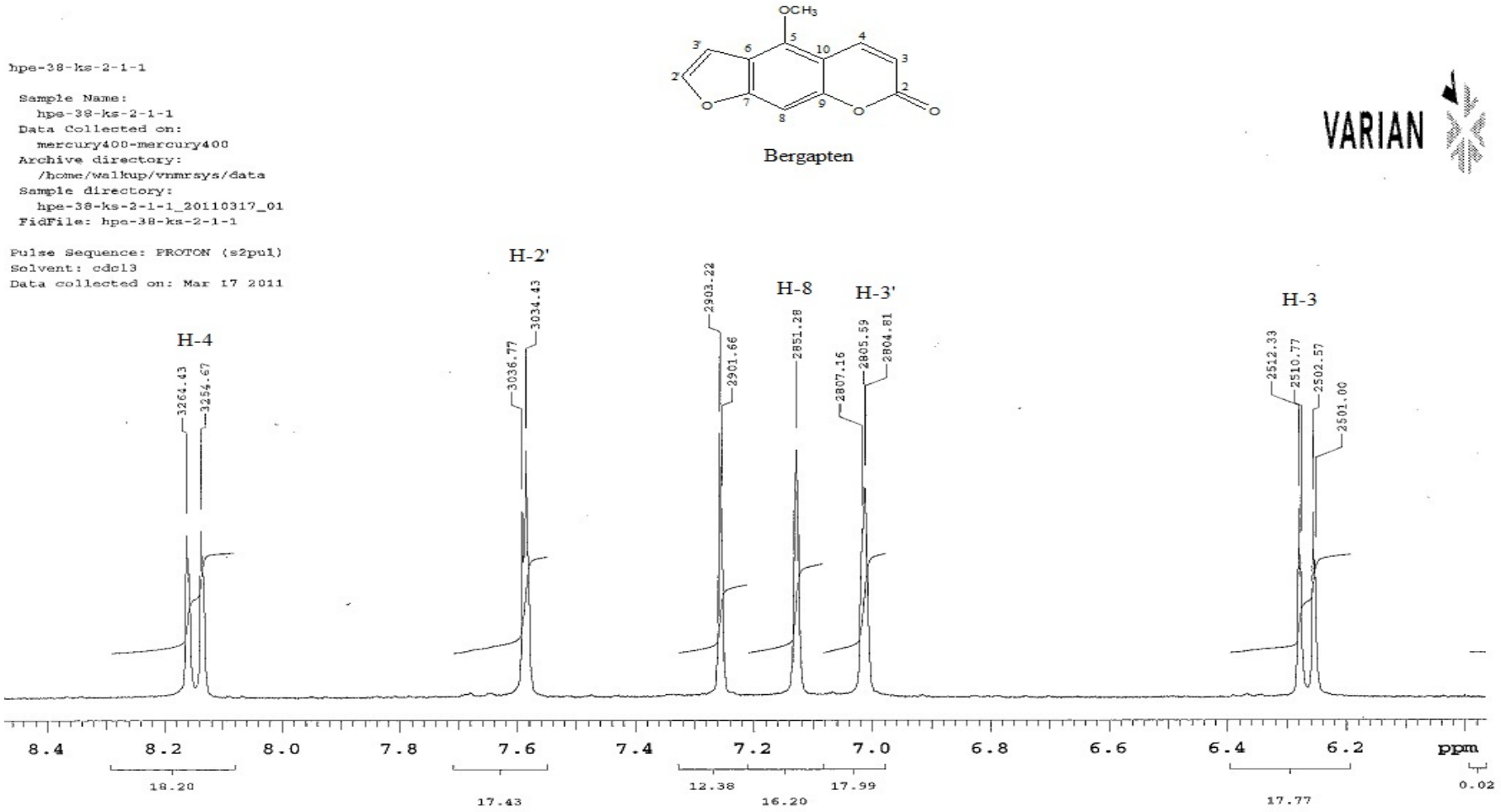
Şekil C.3 : 1,2-dihidroksi-4-izopropil-sikloheksa-5-en bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu

EK D.1



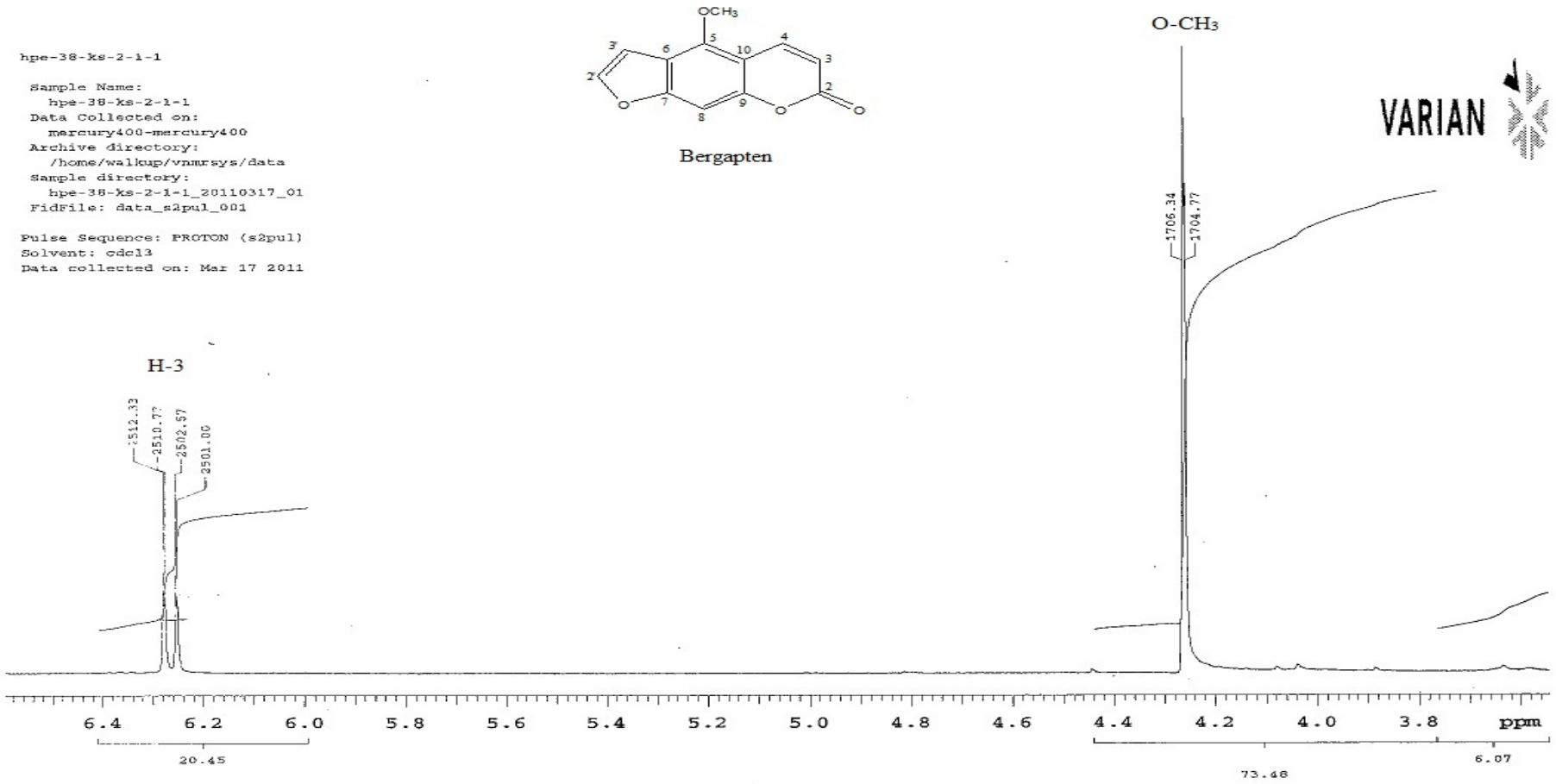
Şekil D.1 : Psoralen bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK E.1



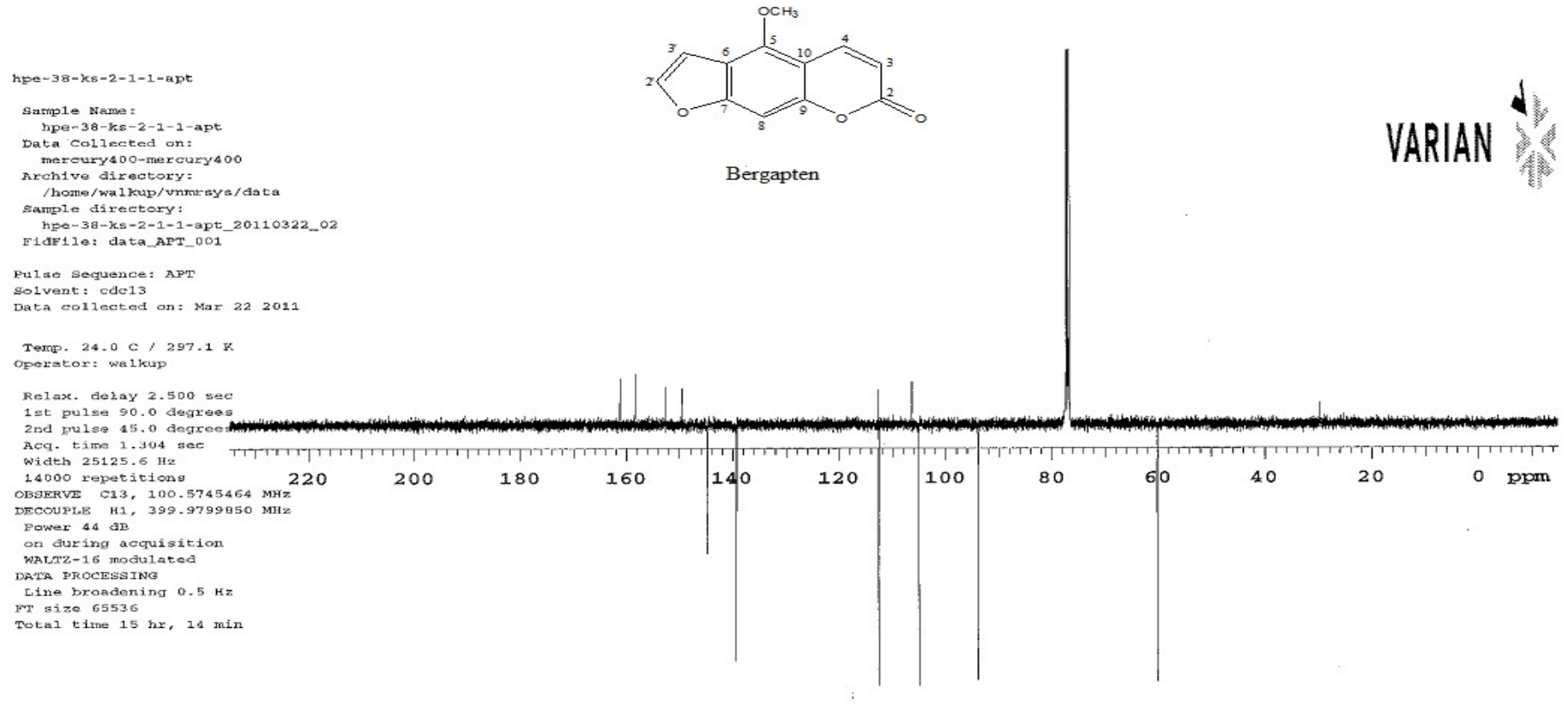
Şekil E.1 : Bergapten bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK E.2



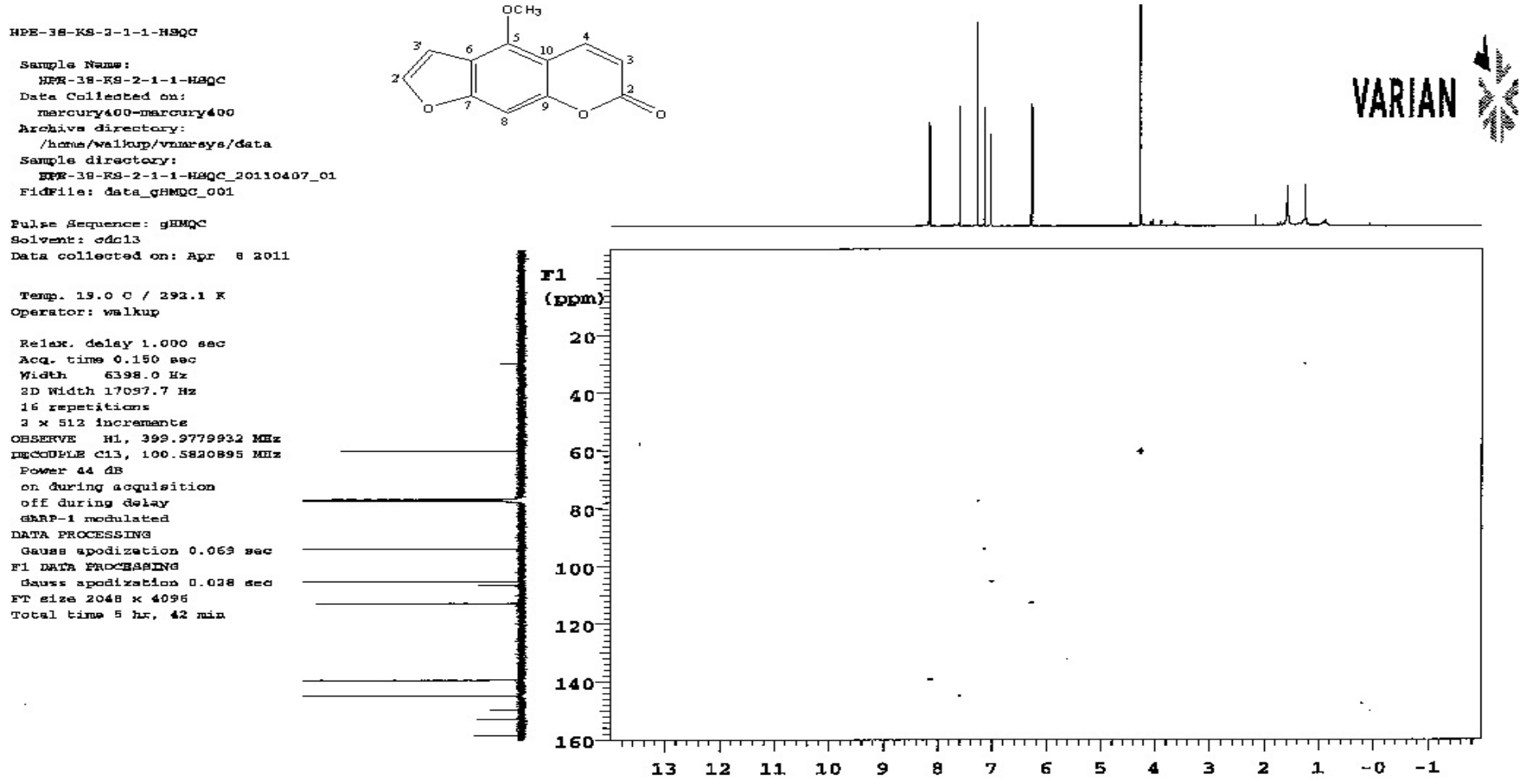
Şekil E.2 : Bergapten bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu(alifatik bölge açılımı)

EK E.3



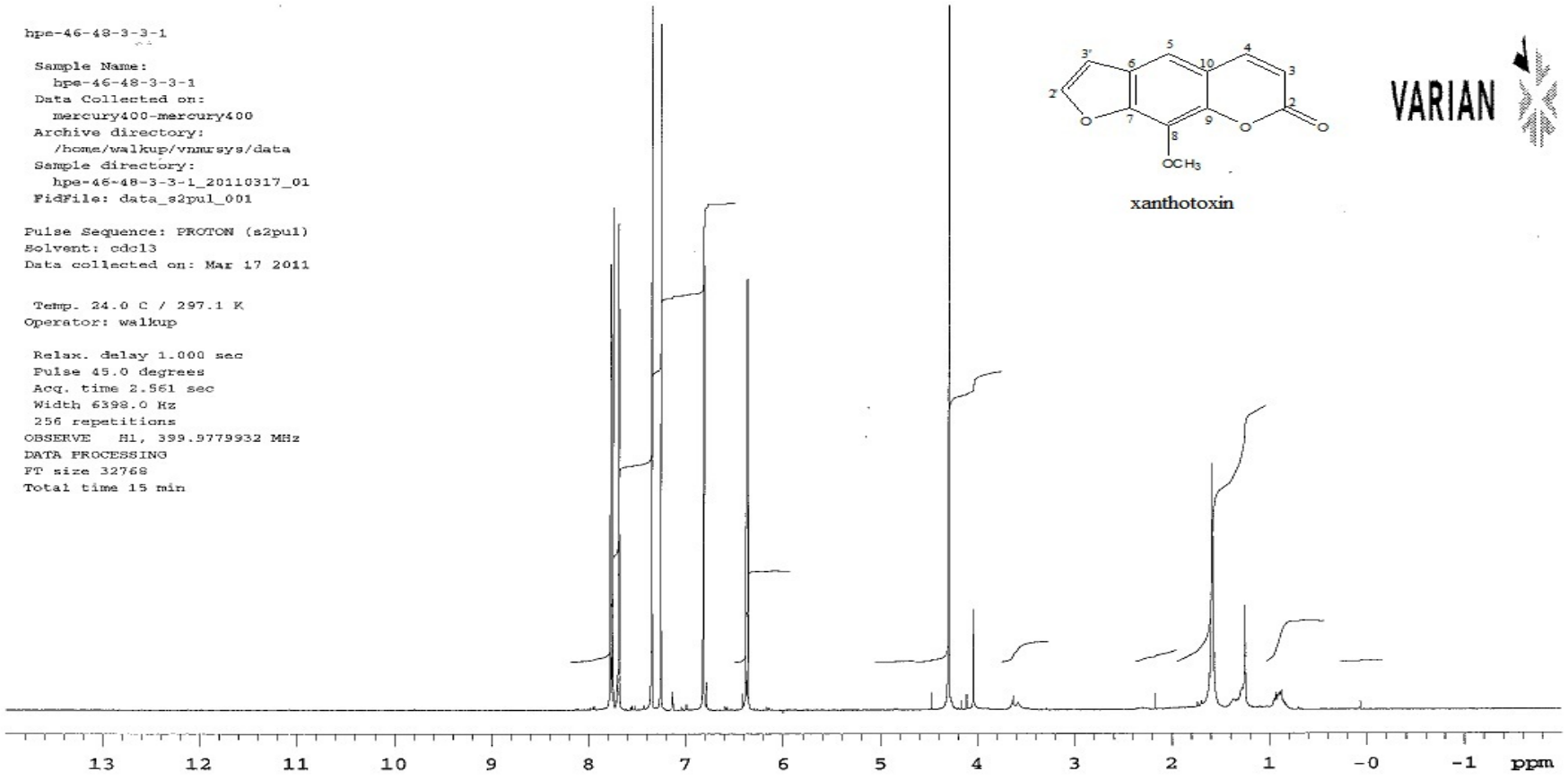
Şekil E.3 : Bergapten bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spektrumu

EK E.4



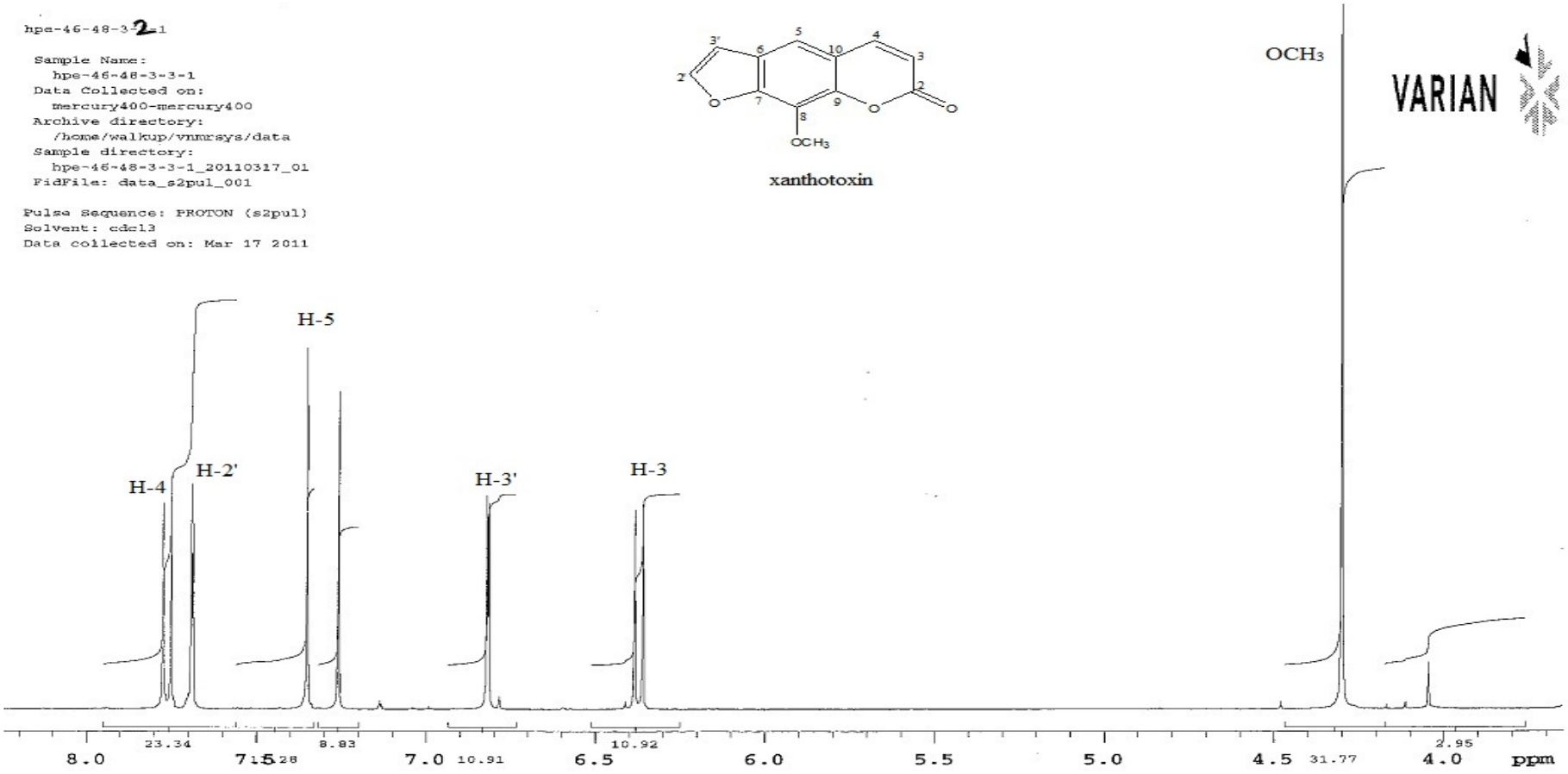
Şekil E.4 : Bergapten bileşiğinin HSQC spektrumu

EK F.1



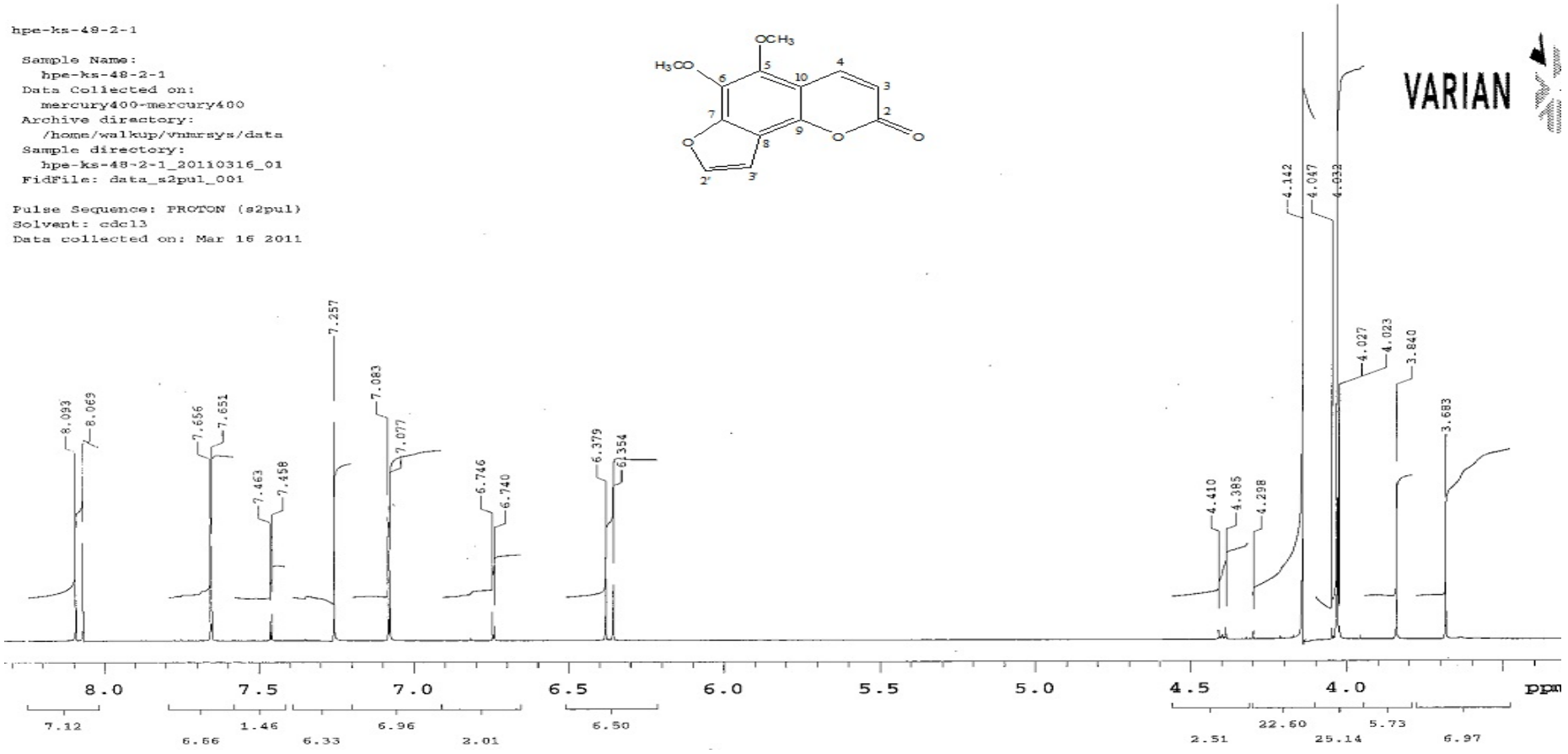
Şekil F.1 : Xanthotoxin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK F.2



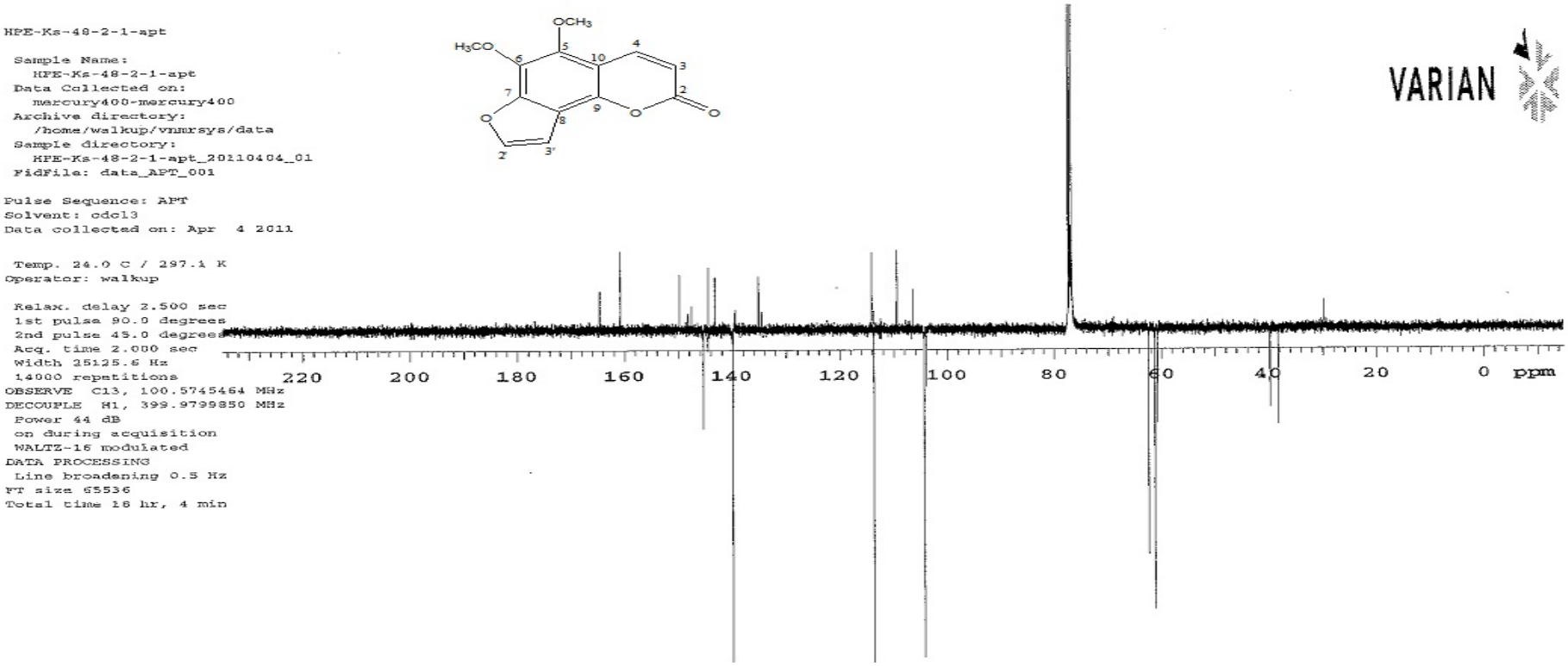
Şekil F.2 : Xanthotoxin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK G.1



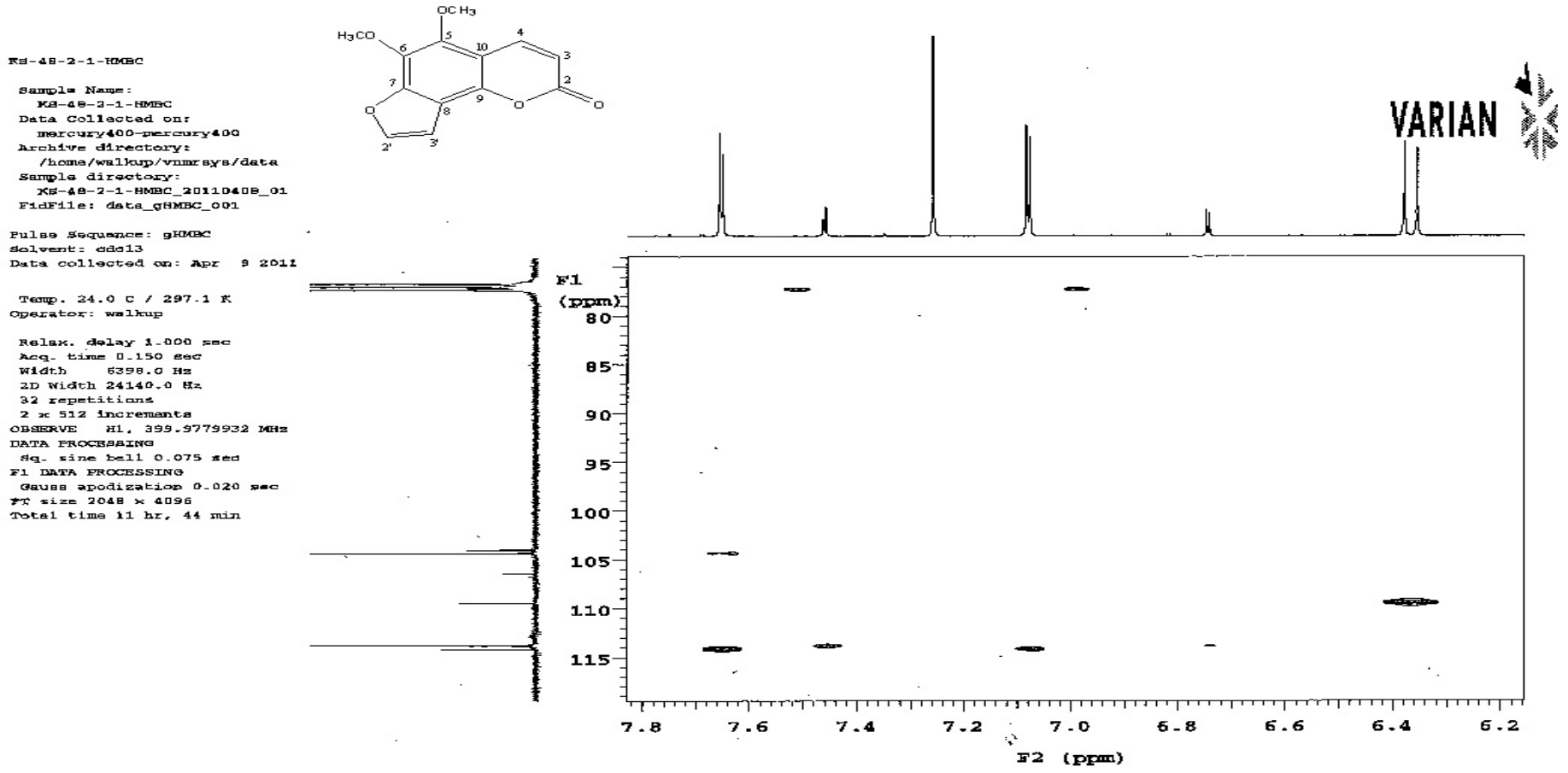
Şekil G.1 : Pimpinellin bileşiğinin ^{1}H NMR spekrumu

EK G.2



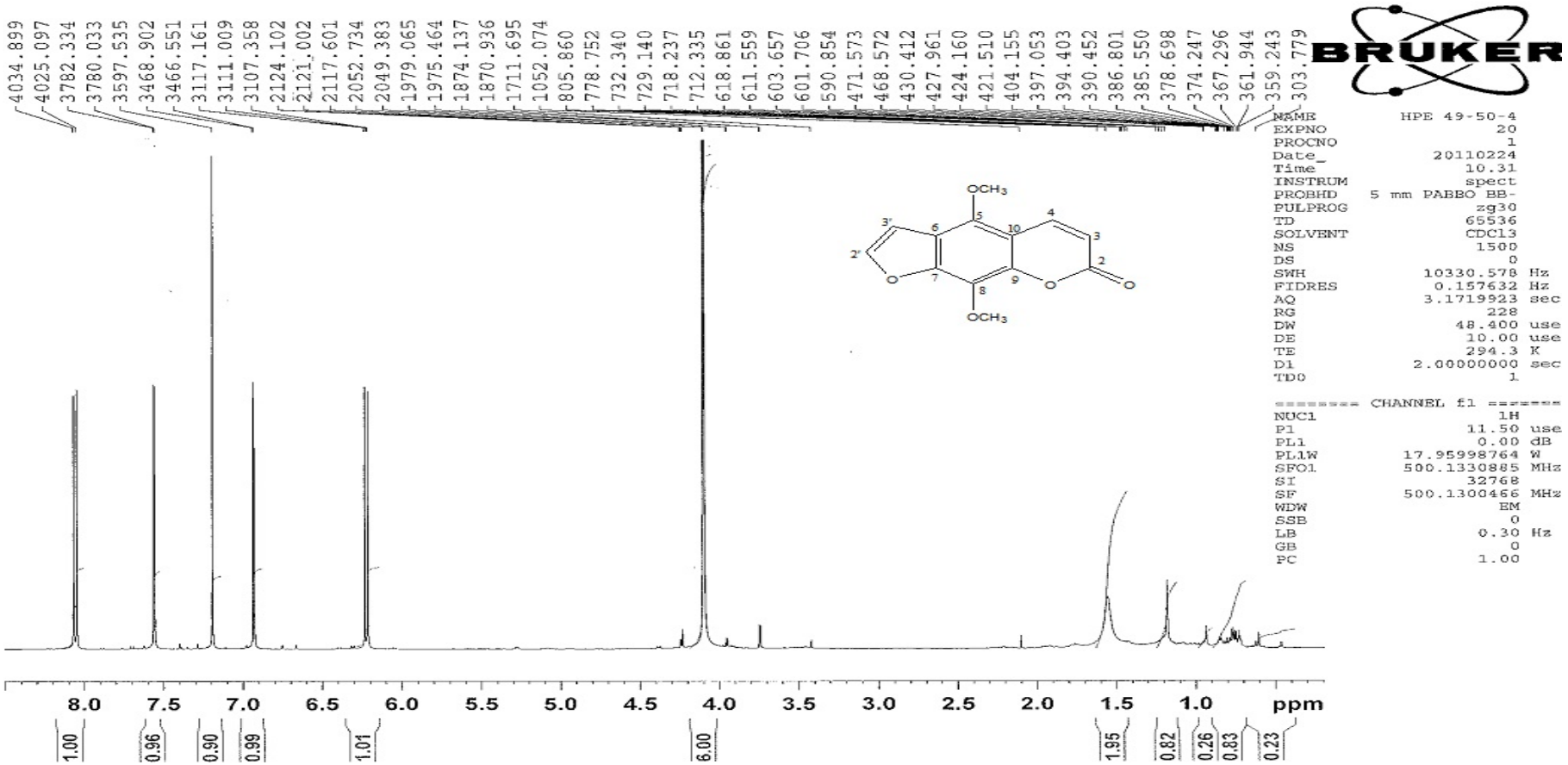
Şekil G.2 : Pimpinellin bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spekrumu

EK G.3



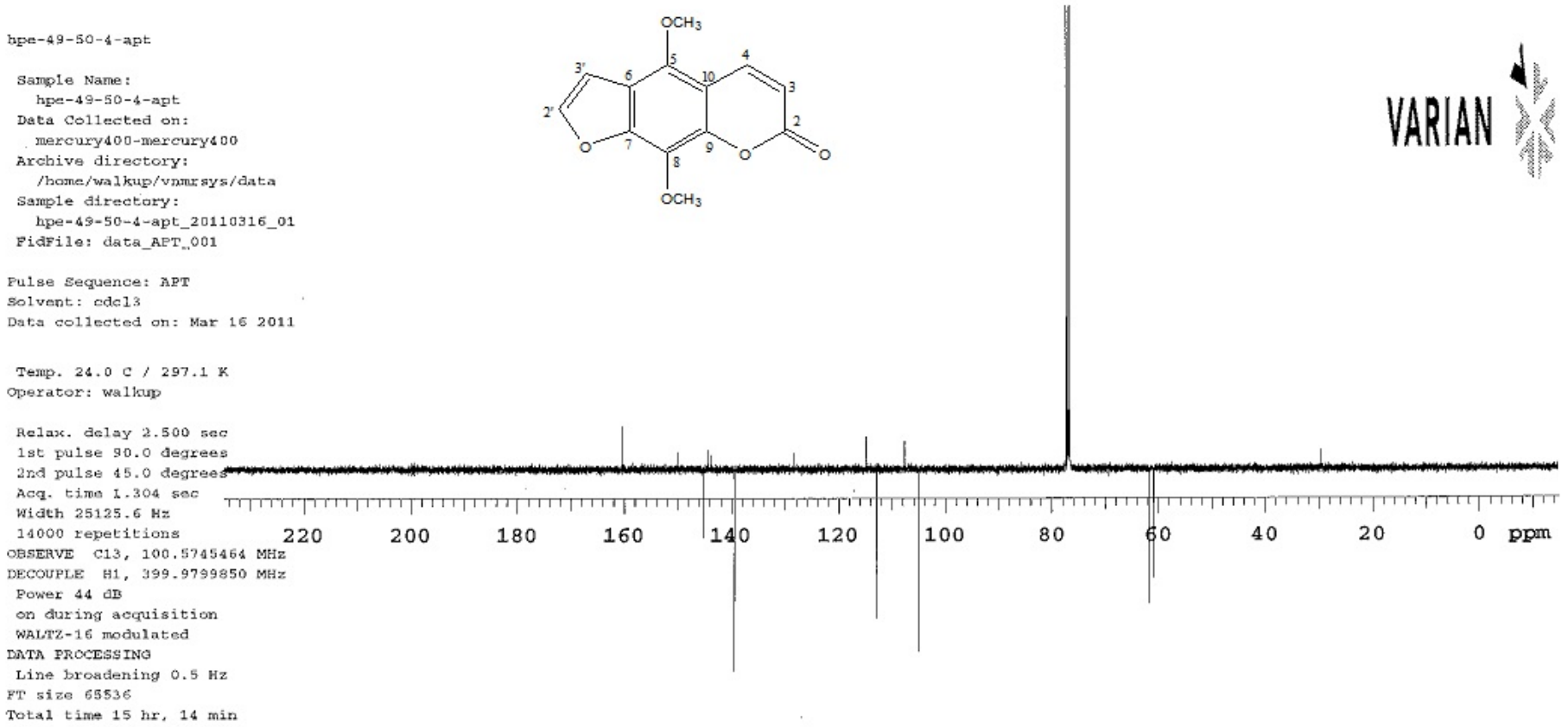
Şekil G.3 : Pimpinellin bileşiğinin HMBC spektrumu

EK H.1



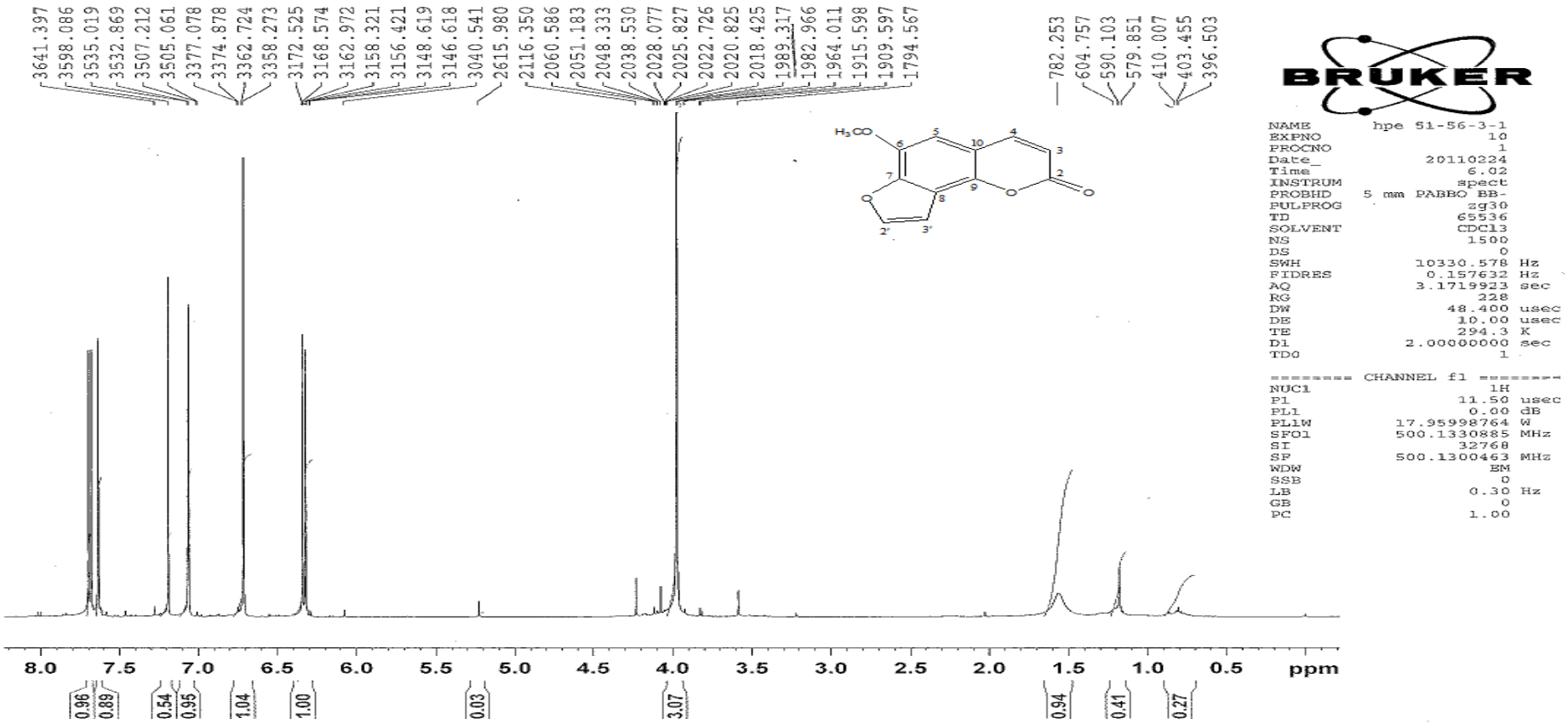
Şekil H.1 : Isopimpinellin bileşiğinin ^{1}H NMR spekrumu

EK H.2



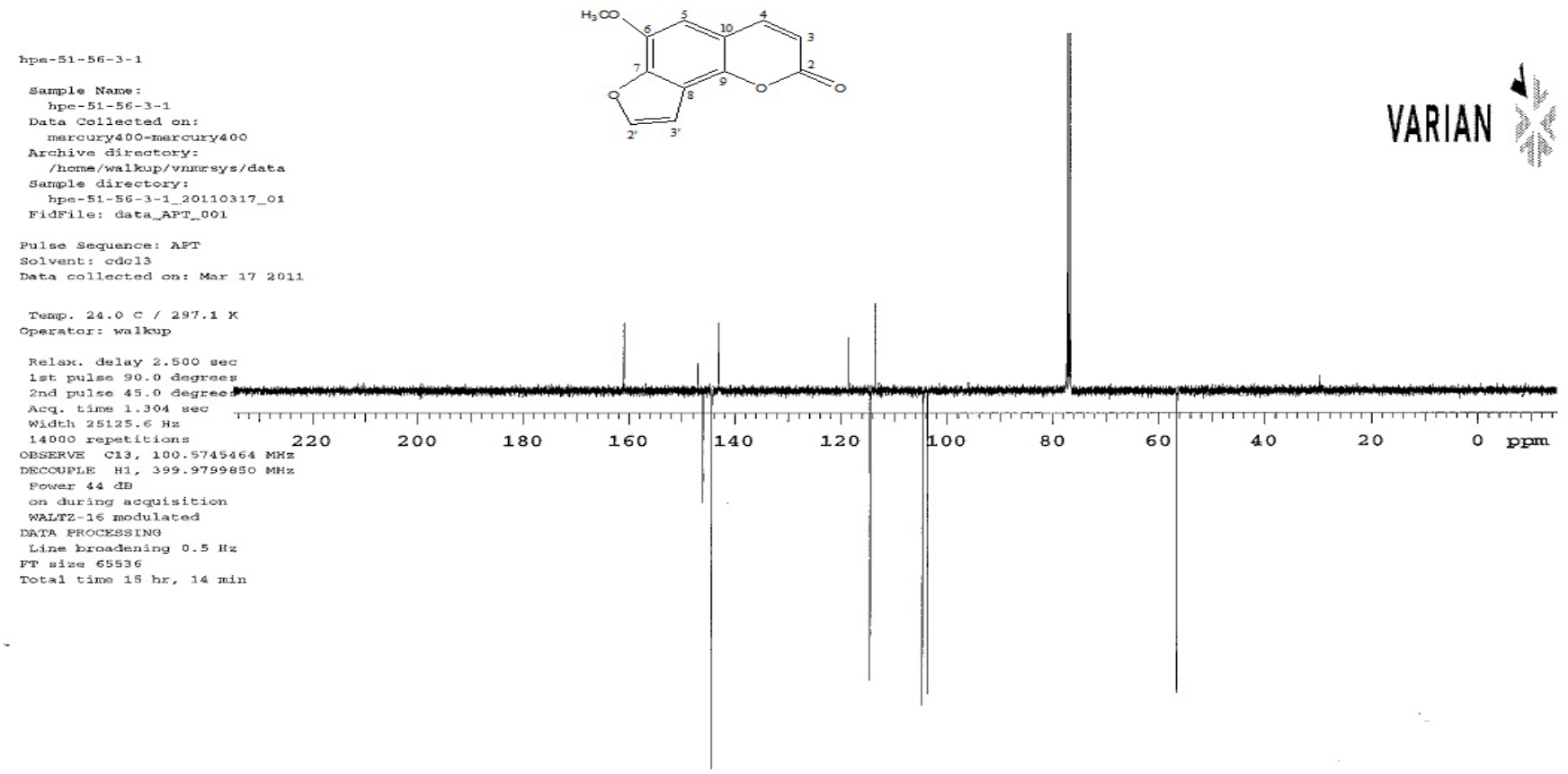
Şekil H.2 : Isopimpinellin bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spekrumu

EK I.1



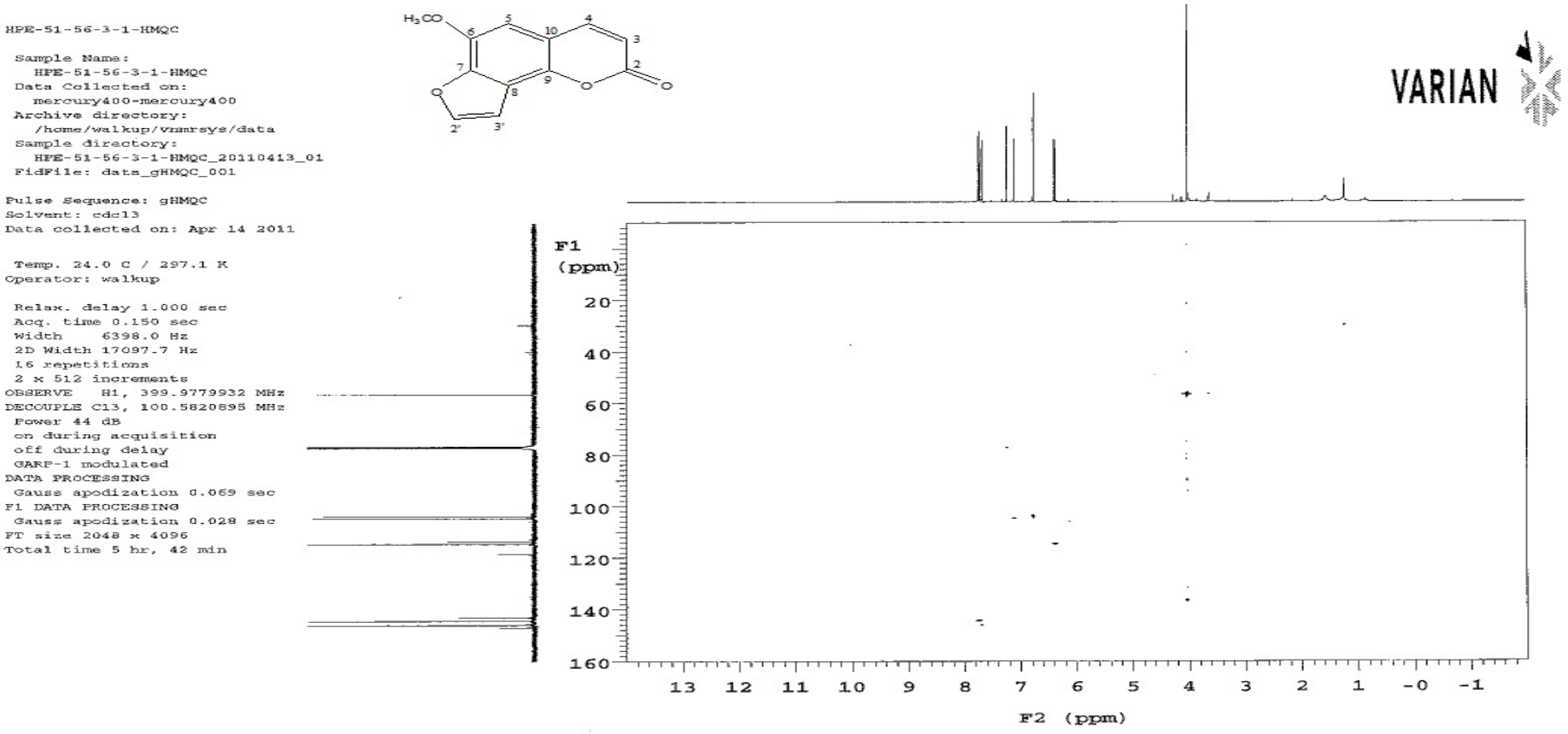
Şekil I.1 : Sphondin bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK I.2



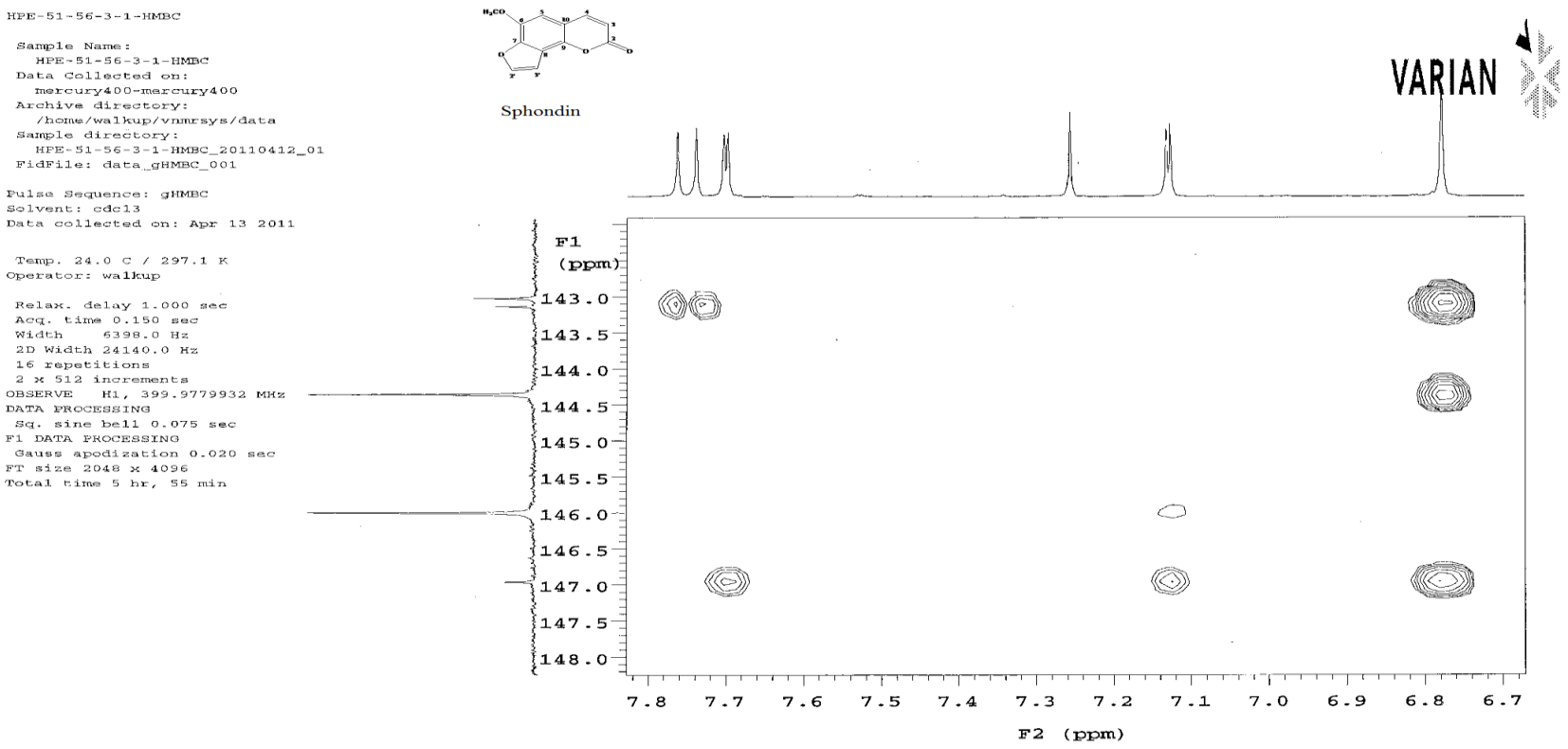
Şekil I.2: Sphondin bileşiğinin ^{13}C NMR(APT) spektrumu

EK I.3



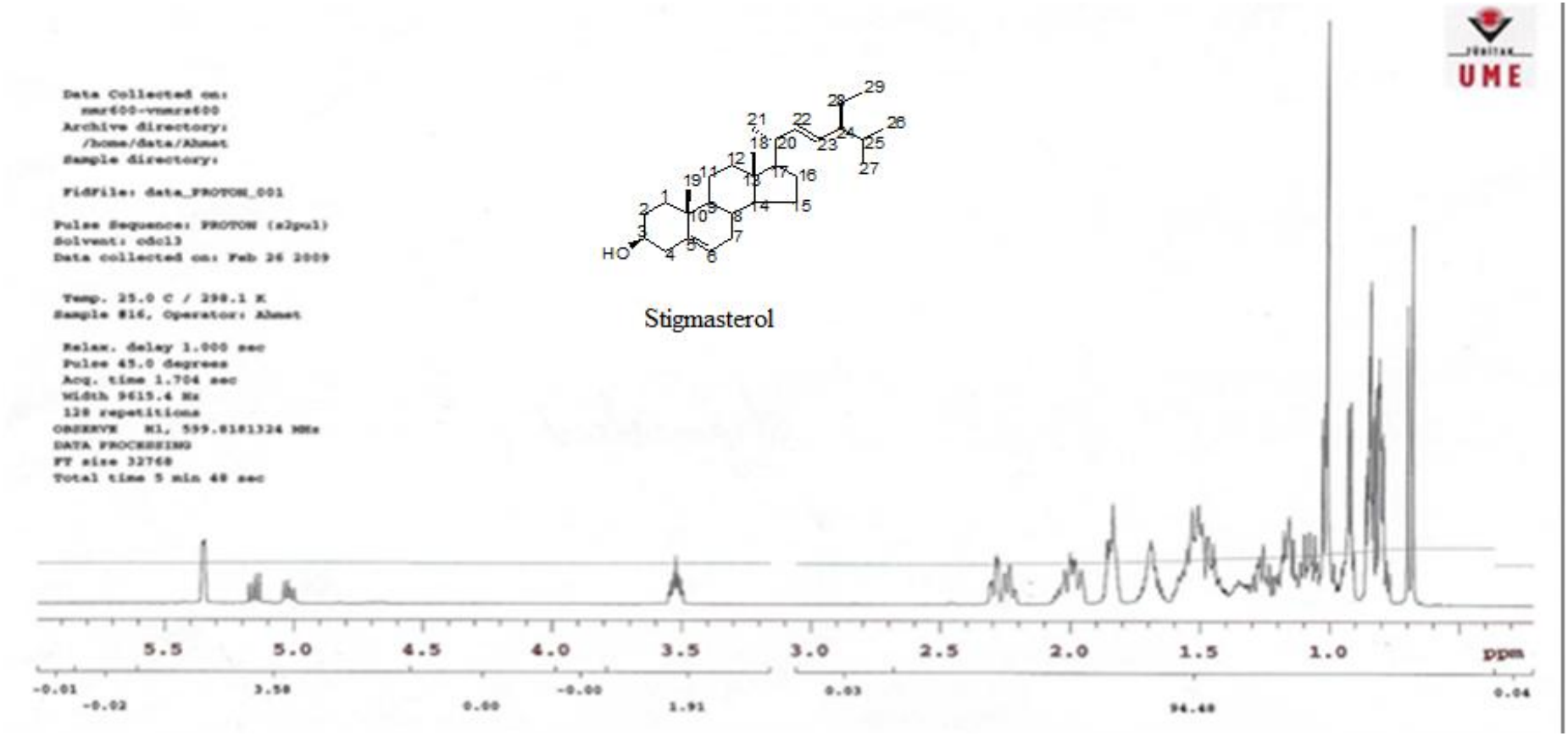
Şekil I.3 : Sphondin bileşiğinin HMQC spektrumu

EK I.4



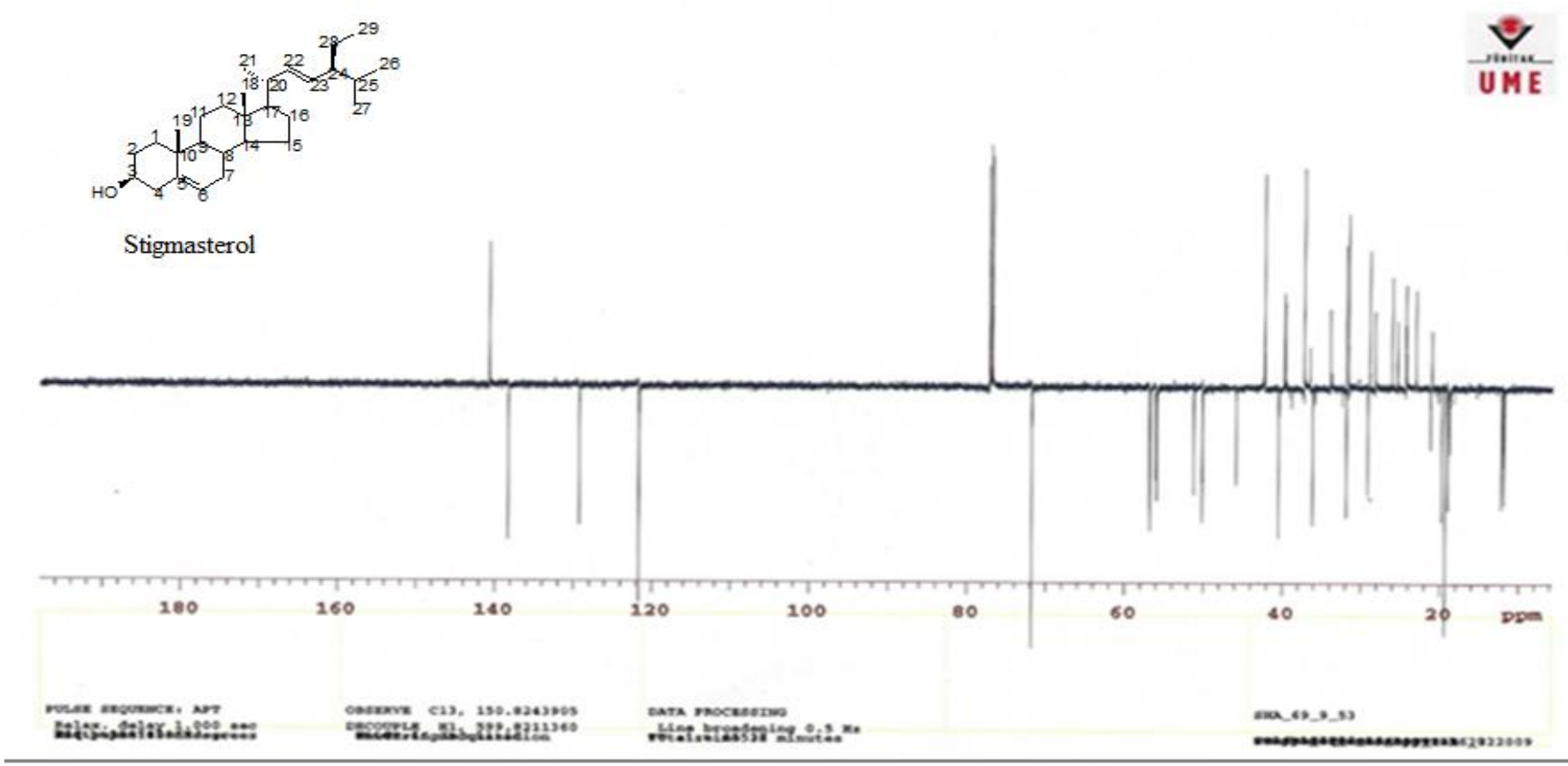
Şekil I.4 : Sphondin bileşiğinin HMBC spektrumu

EK J.1



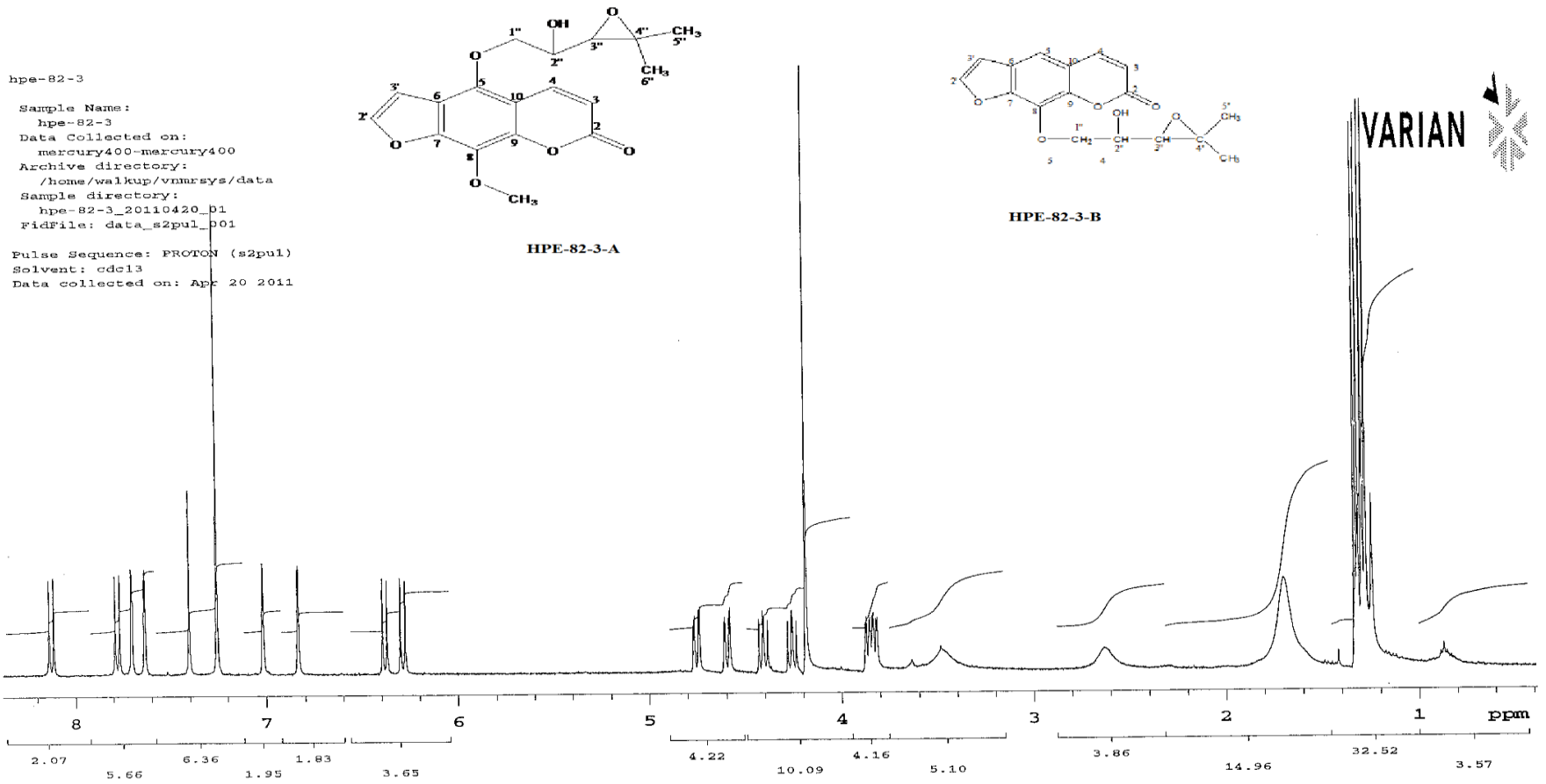
Şekil J.1 : Stigmasterol bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK J.2



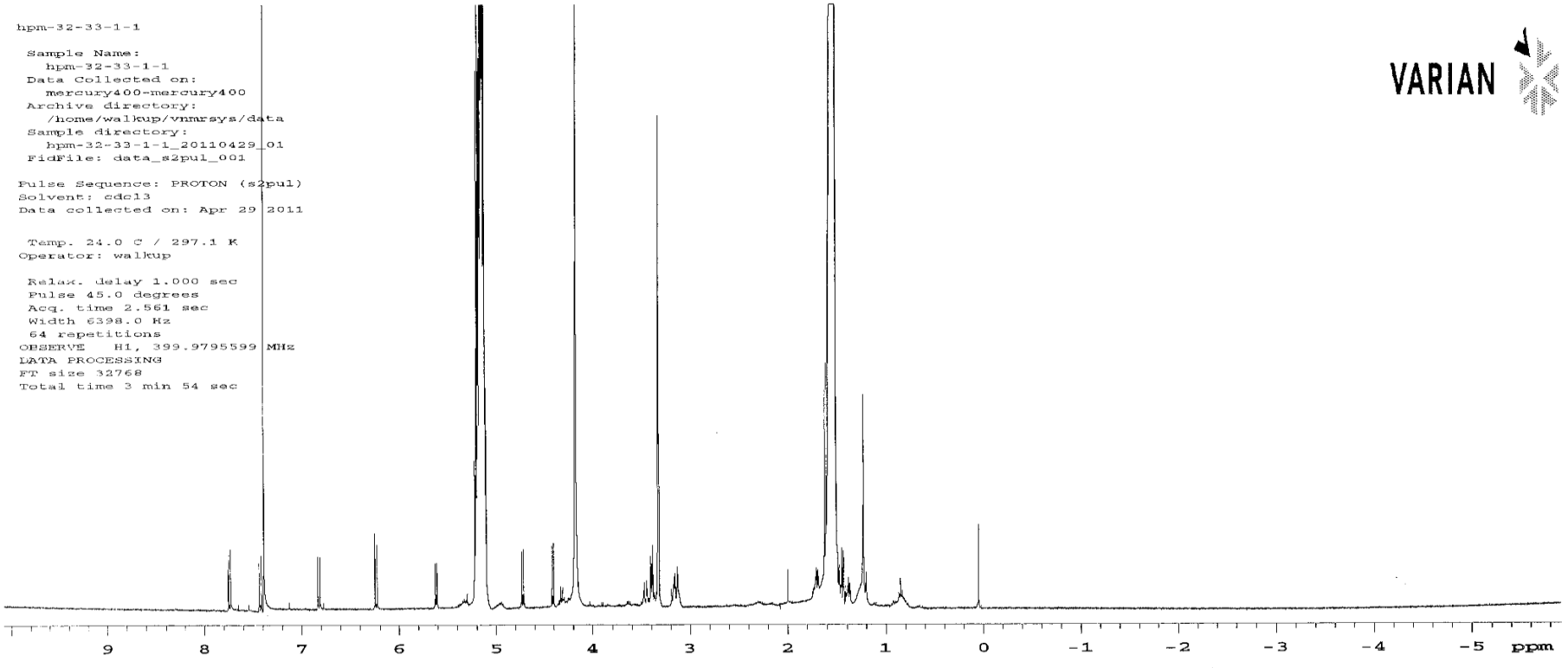
Şekil J.2 : Stigmasterol bileşiğinin ^{13}C NMR spektrum

EK K.1



Şekil K.1 : HPE-82-3 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

EK L.1



Şekil L.1 : HPE-32-33-1-1 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Demet DİNCEL

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul/1985

Adres:

Lisans Üniversite: Kocaeli Üniversitesi, Kimya Bölümü (2008)