

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***FERULAGO IDAEA* VE *FERULAGO TROJANA* BİTKİLERİNDEKİ
SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU, ANTİOKSİDAN VE
ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Begüm ÇAKAR**

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

HAZİRAN 2010

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***FERULAGO IDAEA* VE *FERULAGO TROJANA* BİTKİLERİNDEKİ
SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU, ANTİOKSİDAN VE
ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Begüm ÇAKAR
(509081207)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 Mayıs 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 09 Haziran 2010

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Oya ATICI (İTÜ)
Prof. Dr. Nezhun GÖREN (YTÜ)**

HAZİRAN 2010

Canım Aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü desteği sağlayıp,engin bilgi ve deneyimini benden esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülaçtı Topçu'ya bana olan güveni ve desteği için teşekkürlerimi sunarım.

Çalıştığım bitkileri toplayan Doç. Dr. Tuncay Dirmenci'ye, çalışmalarım da izole edilen bileşiklerin NMR spektrumlarının alınmasını sağlayan Doç. Dr. Ahmet Ceyhan Gören'e, kütle spektrumlarının alınmasını sağlayan Gökhan Bilsel'e, aktivite çalışmalarım da yardımcı olan İstanbul Üniversitesi Araştırma Görevlilerinden Mehmet Boğa'ya yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her aşamasında yardımları ve en önemlisi dostluklarıyla hep yanımda olup bana destek olan başta yüksek lisans öğrencisi Seda Damla Hatipoğlu olmak üzere aynı laboratuvarı paylaştığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Zorluklarla baş ederek, yüksek lisans eğitimimi tamamlamam konusunda beni teşvik edip, her zaman destekleyen sevgili aileme içtenlikle teşekkür ediyorum.

Haziran 2010

Begüm Çakar
Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	ix
ÇİZELGE LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xiii
SEMBOL LİSTESİ	xv
ÖZET	xvii
SUMMARY	xix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Bitkisel Bilgiler	3
2.1.1 Apiaceae (Umbelliferae) familyası.....	3
2.1.2 <i>Ferulago</i> cinsi	4
2.1.3 <i>Ferulago idaea</i>	5
2.1.4 <i>Ferulago trojana</i>	5
2.2 <i>Ferulago</i> Türlerinin Halk Arasındaki Kullanılışı	6
2.3 <i>Ferulago</i> Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar	6
2.4 Sekonder Metabolitler	9
2.4.1 Kumarinler	10
2.4.1.1 Benzen halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler	12
2.4.1.2 Piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler	12
2.4.1.3 Hem benzen, hem de piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler	13
2.4.1.4 Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler	13
2.4.1.5 Piron halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler	14
2.4.1.6 Dimer kumarinler	15
2.4.2 Fenolik bileşikler	15
2.5 Antioksidanlar	21
2.6 Alzheimer Hastalığı ve Nedenleri	26
2.6.1 AChE ve BChE	29
3. GEREÇ VE YÖNTEM	31
3.1 Bitkisel Materyaller	31
3.2 Ekstrelerin Hazırlanışı	31
3.3 Ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoid içeriklerinin belirlenmesi	34
3.3.1 Toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesi	34
3.3.2 Toplam flavonoid içeriklerinin belirlenmesi	35

3.4 Antioksidan Tayin Yöntemleri	35
3.4.1 DPPH (1,1- difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi	35
3.4.2 β -Karoten - linoleik asit yöntemi (Toplam antioksidan aktivite tayini)....	36
3.5 Antikolinesteraz Aktivite Yöntemleri	37
3.5.1 Ellman metodu	37
3.5.1.1 AChE aktivite testi	37
3.5.1.2 BChE aktivite testi	38
3.6 İstatistiksel Hesaplamalar	39
3.7 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	40
3.7.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler	40
3.7.2 Çözeltilerin hazırlanması	40
3.7.2.1 Fenolik/flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler	40
3.7.2.2 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler	41
3.7.2.3 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler	41
3.7.2.4 Standart çözeltilerin hazırlanması	42
3.7.2.5 Seriksülfat belirtecinin hazırlanması	43
3.8 Cihaz ve Gereçler	43
3.9 Kromatografik Yöntemler	43
3.9.1 Sütun kromatografisi	44
3.9.2 İnce tabaka kromatografisi	44
3.10 Spektroskopik Yöntemler	45
3.10.1 NMR spektroskopisi	45
3.10.2 Kütle spektroskopisi	45
4. BULGULAR	47
4.1 Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Miktar Tayini Sonuçları.....	47
4.2 Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları	48
4.2.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	48
4.2.2 β -karoten -linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi sonuçları	49
4.3 Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite Tayini Sonuçları.....	50
4.4 <i>Ferulago idaea</i> ve <i>Ferulago trojana</i> Bitkilerinin Diklorometan ve Metanol	
Ekstrelerinin Kimyasal İçeriği	51
4.4.1 <i>Ferulago idaea</i> bitkisinin diklorometan ekstresinin	
fraksiyonlandırılması	51
4.4.2 <i>Ferulago trojana</i> bitkisinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin	
fraksiyonlandırılması	52
4.4.3 Elde edilen saf bileşiklerin yapı tayini	53
4.5 Saf Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Tayini Sonuçları	63
4.5.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	63
4.5.2 β -karoten -linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi sonuçları	64
4.6 Saf Bileşiklerin Antikolinesteraz Aktivite Tayini Sonuçları	65
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
KAYNAKLAR	69
EKLER	75
ÖZGEÇMİŞ	107

KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AcI	: Asetilkolin iyodür
A·	: Antioksidan radikali
AA·	: Antioksidan dimer radikali
AH	: Birincil antioksidanlar
Al(NO₃)₃·9H₂O	: Alüminyum nitrat nona hidrat
APP	: Amiloid beta prekürsör proteini
α-Toc	: α-Tokoferol
ATCC	: Amerika hücre kültürü koleksiyonu
BCh	: Butirilkolin
BChE	: Butirilkolinesteraz enzimi
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
BuI	: Butirilkolin iyodür
CUPRAC	: Cupric reducing antioxidant capacity
CuSO₄	: Bakır (II) sülfat
COSY	: Correlation Spectroscopy
DCFH-DA	: Diklorofloresin-diasetat
DCM	: Diklorometan
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPPH	: 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FCR	: Folin-Ciocalteu reaktifi
FRAP	: Ferric reducing antioxidant power
<i>F. confusa</i>	: <i>Ferulago confusa</i>
<i>F. humilis</i>	: <i>Ferulago humilis</i>
<i>F. idaea</i>	: <i>Ferulago idaea</i>
<i>F. macrosciadia</i>	: <i>Ferulago macrosciadia</i>
<i>F. sandrasica</i>	: <i>Ferulago sandrasica</i>
<i>F. silaifolia</i>	: <i>Ferulago silaifolia</i>
<i>F. thirkeana</i>	: <i>Ferulago thirkeana</i>
<i>F. trachycara</i>	: <i>Ferulago trachycarpa</i>
<i>F. trojana</i>	: <i>Ferulago trojana</i>
GSH-Px	: Glutasyon peroksidaz
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HNO₂	: Nitröz asit
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen peroksit
HOO·	: Peroksi radikali

H₂PO₄⁻	: Dihidrojen fosfat anyonu
HPO₄²⁻	: Bifosfat anyonu
H₂SO₄	: Sülfürik asit
IC₅₀	: %50 İnhibisyon konsantrasyonu
IR	: İnfrared
MeOH	: Metanol
Na₂CO₃	: Sodyum karbonat
NaHCO₃	: Sodyumbikarbonat
NMDA	: N-Metil-D-aspartat
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
NO	: Azot monoksit
NO[•]	: Azot monoksit radikali
NO⁺	: Nitrozil katyonu
NO⁻	: Nitroksi anyonu
ORAC	: Oksijen radikali absorban kapasitesi
O₂⁻	: Süper oksit anyon radikali
¹O₂	: Singlet oksijen
O₃	: Ozon
OH[•]	: Hidroksil radikali
PEs	: Pirokatekole eşdeğer
PG	: Propil gallat
pH	: Hidrojen gücü
Q	: Kersetin
QEs	: Kersetine eşdeğer
R[•]	: Alkil radikali
Rf	: Alıkonma zamanı
RO[•]	: Alkoksi radikali
ROO[•]	: Peroksi serbest radikali
ROOH	: Hidroperoksit
RS[•]	: Tiyoil radikali
ROS	: Reaktif oksijen türleri
SOD	: Süperoksit dismutaz
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi
TBHQ	: <i>tersiyer</i> -Bütilhidrokinon
TOSC	: Toplam oksiradikal yöntemi
TRAP	: Toplam radikal yakalama parametresi
UV	: Ultraviyole

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1	: <i>Ferulago</i> türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları.	8
Çizelge 4.1	: Kuru bitki miktarları, ekstre miktarları ve % verimleri.	47
Çizelge 4.2	: <i>Ferulago idaea</i> ve <i>Ferulago trojana</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin fenolik ve flavonoid madde içerikleri.	48
Çizelge 4.3	: <i>Ferulago idaea</i> ve <i>Ferulago trojana</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi.	48
Çizelge 4.4	: <i>Ferulago idaea</i> ve <i>Ferulago trojana</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin β -karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi.	49
Çizelge 4.5	: <i>Ferulago idaea</i> ve <i>Ferulago trojana</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin antikolinesteraz aktivitesi.	50
Çizelge 4.6	: Saf bileşikler/kuru bitkiler % verimi.	54
Çizelge 4.7	: Bergapten bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri.	54
Çizelge 4.8	: İzimperatorin bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri.	55
Çizelge 4.9	: 3'- <i>Epidecursin</i> bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri.	57
Çizelge 4.10	: 3,6- Dimetoksi- 7- izopropilkumarin- 4- tetradeka- 13''-on bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri.	59
Çizelge 4.11	: İzomaltol bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri.	61
Çizelge 4.12	: İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri.	61
Çizelge 4.13	: Saf bileşikler için DPPH serbest radikal giderim aktivitesi.	63
Çizelge 4.14	: Saf bileşikler için β -karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi (% inhibisyon).	64
Çizelge 4.15	: Saf bileşikler için antikolinesteraz aktivitesi (% inhibisyon).	65

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1	: <i>Ferulago idaea</i> Ozhatay & E. Akalın.	2
Şekil 1.2	: <i>Ferulago trojana</i> E. Akalın & Pimenov.	2
Şekil 2.1	: α - piron, γ -piron ve kumarin bileşikleri.	10
Şekil 2.2	: Kumarin.	10
Şekil 2.3	: Kromon.	10
Şekil 2.4	: Mono-süstitüe kumarinler.	12
Şekil 2.5	: Di-süstitüe kumarinler.	12
Şekil 2.6	: Tri-süstitüe kumarin.	12
Şekil 2.7	: Piron halkası mono-süstitüe kumarin.	13
Şekil 2.8	: Piron halkası di-süstitüe kumarin.	13
Şekil 2.9	: Benzen ve piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan bazı kumarinler.	13
Şekil 2.10	: Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler.	14
Şekil 2.11	: Piron halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler.	14
Şekil 2.12	: Dimer kumarinler.	15
Şekil 2.13	: Fenoller ve fenolik asitler.	16
Şekil 2.14	: Hidroksisinnamik asitler.	16
Şekil 2.15	: Kumarinler.	17
Şekil 2.16	: Lignanlar ve fenilpropenler.	17
Şekil 2.17	: Farklı iskelet yapısına sahip flavonoidler.	17
Şekil 2.18	: Flavonol ve flavononlar.	19
Şekil 2.19	: Minör flavonoidler.	19
Şekil 2.20	: Antosiyanidinler.	20
Şekil 2.21	: Diğer fenolik bileşikler	21
Şekil 2.22	: Antioksidanların sınıflandırılması	24
Şekil 3.1	: <i>Ferulago idaea</i> bitkisinin diklorometan ve metanol ekstralarının hazırlanması ve fraksiyonlandırılması.	32
Şekil 3.2	: <i>Ferulago trojana</i> bitkisinin diklorometan ve metanol ekstralarının hazırlanması ve fraksiyonlandırılması.	33
Şekil 3.3	: Pirokatekolün ölçü grafiği	34
Şekil 3.4	: Kersetinin ölçü grafiği	35
Şekil 3.5	: Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonu	37
Şekil 4.1	: <i>Ferulago idaea</i> ve <i>Ferulago trojana</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyonu	49
Şekil 4.2	: <i>Ferulago idaea</i> ve <i>Ferulago trojana</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının β -karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi % inhibisyonu	50
Şekil 4.3	: <i>Ferulago idaea</i> ve <i>Ferulago trojana</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının antikolinesteraz aktivitesi % inhibisyonu.	51

Şekil 4.4 : Bergapten	54
Şekil 4.5 : İzimperatorin	55
Şekil 4.6 : 3'- <i>Epidecursin</i>	57
Şekil 4.7 : 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-tetradeka-13''-on.....	59
Şekil 4.8 : İzomaltol	60
Şekil 4.9 : İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit	61
Şekil 4.10 : Saf bileşikler için DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyonu.....	64
Şekil 4.11 : Saf bileşikler için β - karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi % inhibisyonu.....	65
Şekil 4.12 : Saf bileşikler için AChE % inhibisyonu.....	66
Şekil 4.13 : Saf bileşikler için BChE % inhibisyonu.....	66
Şekil A.1 : Bergapten ¹ H- NMR spektrumu 1	76
Şekil A.2 : Bergapten ¹ H- NMR spektrumu 2.....	77
Şekil A.3 : Bergapten MS spektrumu	78
Şekil B.1 : İzimperatorin ¹ H- NMR spektrumu 1.	79
Şekil B.2 : İzimperatorin ¹ H- NMR spektrumu 2.	80
Şekil B.3 : İzimperatorin ¹³ C - NMR spektrumu.....	81
Şekil B.4 : İzimperatorin APT NMR spektrumu.....	82
Şekil B.5 : İzimperatorin HSQC NMR spektrumu.....	83
Şekil B.6 : İzimperatorin HMBC NMR spektrumu.	84
Şekil B.7 : İzimperatorin COSY NMR spektrumu.	85
Şekil B.8 : İzimperatorin MS spektrumu.....	86
Şekil C.1 : 3'- <i>Epidecursin</i> ¹ H- NMR spektrumu 1.....	87
Şekil C.2 : 3'- <i>Epidecursin</i> ¹ H- NMR spektrumu 2	88
Şekil C.3 : 3'- <i>Epidecursin</i> MS spektrumu	89
Şekil D.1 : 3,6- Dimetoksi - 7- izopropilkumarin- 4- tetradeka-13'' -on ¹ H-NMR spektrumu.	90
Şekil D.2 : 3,6- Dimetoksi - 7- izopropilkumarin- 4- tetradeka-13'' -on ¹³ C-NMR spektrumu.....	91
Şekil D.3 : 3,6- Dimetoksi -7- izopropilkumarin- 4- tetradeka-13'' -on APT NMR spektrumu.....	92
Şekil D.4 : 3,6- Dimetoksi - 7- izopropilkumarin- 4- tetradeka-13'' - on HMBC NMR spektrumu.....	93
Şekil D.5 : 3,6- Dimetoksi - 7- izopropilkumarin- 4- tetradeka- 13'' -on COSY NMR spektrumu.	94
Şekil D.6 : 3,6- Dimetoksi - 7- izopropilkumarin- 4- tetradeka - 13'' - on MS spektrumu.	95
Şekil E.1 : İzomaltol ¹ H - NMR spektrumu 1.	96
Şekil E.2 : İzomaltol ¹ H - NMR spektrumu 2.	97
Şekil E.3 : İzomaltol APT NMR spektrumu.....	98
Şekil E.4 : İzomaltol MS spektrumu.....	99
Şekil F.1 : İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit ¹ H- NMR spektrumu 1	100
Şekil F.2 : İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit ¹ H - NMR spektrumu 2.	101
Şekil F.3 : İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit ¹³ C - NMR spektrumu	102
Şekil F.4 : İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit APT NMR spektrumu.....	103
Şekil F.5 : İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit HSQC spektrumu.....	104
Şekil F.6 : İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit HMBC spektrumu	105
Şekil F.7 : İzomaltol-3 β - <i>O</i> -glukozit MS spektrumu	106

SEMBOL LİSTESİ

cm	: Santimetre
°C	: 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

FERULAGO IDAEA VE FERULAGO TROJANA BİTKİLERİNİN SEKONDER METABOLİTLERİNİN İZOLASYONU, ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Ferulago türleri; bir aromatik (kokulu) çiçekli bitkiler familyası olan Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait bitkilerdir. Eski çağlardan beri *Ferulago* türleri, halk arasında sakinleştirici, sindirime yardımcı, uyarıcı ve afrodizyak olarak kullanılmaktadır. *Ferulago* türünün en çok yetiştiği yerlerden biri olan Anadolu’da, *Ferulago* ve yakın türleri fark gözetilmeden yöresel isimleri olan ‘Çakşır’ ya da ‘Çağşır’ olarak anılmaktadır ve bu bitkilerin kökleri halk arasında afrodizyak olarak kullanılmaktadır. Üzerinde çalışılan *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkileri daha önce çalışılmamış Kaz Dağları endemiği türler olup *Ferulago idaea* 2000 yılında (Ozhatay & E. Akalın), *Ferulago trojana* ise 2004 yılında (E. Akalın & Pimenov) bilim dünyasına tanıtılmışlardır.

Bugüne kadar ülkemizde ve dünyada *Ferulago* türlerinin daha çok uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine çalışılmıştır. *Ferulago* türlerinin diğer sekonder metabolitleri üzerine yapılan çalışmalar ise oldukça az sayıdadır.

Bu çalışmada iki bitkiden toplam altı bileşik izole edilmiştir. Bu bileşiklerden bergapten, izoimperatorin, 3'-epidecursin ve izomaltol bilinen bileşikler olup, izomaltol-3 β -O-glukozit ve 3,6-dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on ilk kez izole edilen bileşiklerdir. *Ferulago idaea* bitkisinden izoimperatorin ve 3'-epidecursin bileşikleri izole edilirken, *Ferulago trojana* bitkisinden bergapten, izoimperatorin, 3'-epidecursin, izomaltol, izomaltol-3 β -O-glukozit ve 3,6-dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on bileşikleri izole edilmiştir.

Canlılarda, kimyasal süreçler, özellikle oksitlenme, serbest radikallerin oluşmasına neden olur. Yüksek derecede reaktif olan serbest radikaller farklı moleküller ile kolayca reaksiyona girebilir ve böylece hücrelere zarar verebilir. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek (onlarla bağ kurarak) hücrelere zarar vermelerini önler. Sentetik antioksidanların ve oluşturdukları yan ürünlerin birçok toksik etkisi vardır, hatta çeşitli kanser hastalıklarına neden oldukları bile tespit edilmiştir. Bu nedenle doğal kaynaklardan, yeni antioksidanların bulunması için yapılan çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu amaçla çalışmalar biyolojik aktivite gösteren doğal bileşikler üzerine yoğunlaştırılmıştır. Apiaceae familyasına ait bitkilerden elde edilen sekonder metabolitlerle yapılan antioksidan aktivite çalışmaları sonucunda bu bileşiklerden bir kısmının yüksek antioksidan aktivite gösterdiği, bir kısmının ise kısmen antioksidan aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Bu çalışmada, Türkiye’de yetişen endemik iki *Ferulago* türünden (*Ferulago idaea* Ozhatay & E. Akalın ve *Ferulago trojana* E. Akalın & Pimenov) hazırlanan diklorometan ve metanol ekstraktlarının toplam fenolik miktarları pirokatekole,

toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildikten sonra antioksidan aktiviteleri β -karoten renk açılım yöntemi ve DPPH serbest radikal giderim yöntemi ile saptanmıştır.

Daha sonra ekstrelerden izole edilen saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri aynı iki yöntem ile tayin edilmiştir. Her iki bitkiye ait metanol ekstrelerinin iki yöntem sonucunda da orta derecede antioksidan aktivite gösterdiği, ancak diklorometan ekstrelerinin aktivite göstermediği belirlenmiştir.

Ekstrelerden elde edilen saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderim aktivite testine göre aktif olmadığı, bergapten, izoimperatorin, 3'-epidecursin, izomaltol bileşiklerinin β -karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi testine göre orta derecede aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

Oksidasyonun kanser ve bağışıklık sistemini çökerten hastalıklara, hatta Alzheimer gibi demans ve yaşlanma ile seyreden hastalıkların patojenezinde de önemli rolü olabileceği bilinmektedir. Günümüzde sıklıkla rastlanılan hastalıklardan biri haline gelen Alzheimer hastalığı dejeneratif nörolojik bir hastalık olup amiloid β -protein içeren senil (yaşlılık/bunama) plaklarının oluşumu ve kolinerjik nöromedyatörlerin kaybolması olarak nitelendirilir. Yapılan araştırmalarda beynin kenarında küremsi birikintiler (plak) veya liflerin (fibriller) oluştuğu tespit edilmiştir. Bu artık madde (plak) yığılmasına beta-A4 proteini (42 aminoasitten oluşur) ve APP proteinin (amyloid precursor protein) sebep olduğu belirtilmiştir. Beyindeki beta-A4 ve APP proteinlerine “amiloidler” denir. Amiloidler beyin hücreleri arasındaki haberleşmeyi önleyerek beyin hücrelerinin yavaş yavaş ölmesine neden olurlar. Alzheimer hastalarında rastlanılan en önemli biyokimyasal değişiklik hipokampus ve beyin korteksindeki asetilkolin (ACh) seviyesinin azalmasıdır. Alzheimer hastalığının tedavisi için asetilkolin hidrolizinden sorumlu olan asetilkolinesteraz enziminin (AChE) inhibisyonu yöntemi en çok kabul gören yaklaşımdır. Bu yaklaşım göz önünde bulundurularak antikolinesteraz aktivite testleri asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu odaklı gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada, Türkiye’de yetişen endemik 2 *Ferulago* türünden (*Ferulago idaea* Ozhatay & E. Akalın ve *Ferulago trojana* E. Akalın & Pimenov) hazırlanan diklorometan ve metanol ekstrelerinin ve bu ekstrelerden elde edilen saf bileşiklerin antikolinesteraz aktiviteleri Ellman metodu ile tayin edilmiştir. Her iki bitkinin diklorometan ve metanol ekstreleri için antikolinesteraz aktivite testi sonucunda ekstrelerin standart olarak kullanılan galantamine göre orta derecede aktif olduğu sonucuna varılmıştır. Saf maddelerden ise bergapten, izoimperatorin, 3'-epidecursin, 3,6-dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on, izomaltol ve izomaltol-3 β -O-glukozit in galantaminle kıyaslandığında özellikle asetilkolinesteraz enzimine karşı iyi derecede aktivite gösterdiği belirlenmiştir.

ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES OF *FERULAGO IDAEA* AND *FERULAGO TROJANA* PLANTS, INVESTIGATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES

SUMMARY

Ferulago species belong to one of the aromatic flowering plants families, Apiaceae (=Umbelliferae). Since ancient times *Ferulago* species have been traditionally used as sedative, digestive, stimulative and aphrodisiac. Anatolia, which is one of the widely growing places of *Ferulago* species where Turkish local names for *Ferulago* are known as 'Çakşır' or 'Çağşır', and their roots are used as aphrodisiac. *Ferulago idaea* and *Ferulago trojana*, which have not been studied yet chemically, are endemic to Mount Ida, *Ferulago idaea* was first identified in 2000 (Ozhatay & E. Akalın) and *Ferulago trojana* was first identified in 2004 (E. Akalın & Pimenov).

So far, in Turkey and as well as in the world *Ferulago* species have been studied mostly for their essential oils and some activities. There is a limited number of studies for other secondary metabolites of *Ferulago* species.

In this study, six compounds have been isolated from two plants. From these compounds bergapten, isoimperatorin, 3'-epidecursin and isomaltol are known compounds, isomaltol-3 β -O-glucoside and 3,6-dimethoxy-7-isopropilcoumarin-4-tetradeca-13''-one have been isolated for the first time.

Chemical processes, especially oxidation reactions cause to formation of free radicals in living cells. High reactive free radicals can easily react with different molecules and they can damage cells. Antioxidants react with free radicals and prevent the cell damage. Synthetic antioxidants and their byproducts can be toxic, and moreover it was established that they may cause various cancers. Therefore, researches to find new antioxidants from natural sources became more of an issue and for that purpose researches have been focused on biologically active natural compounds. Antioxidant activity studies with secondary metabolites isolated from plants of Apiaceae family showed that some of these compounds have high or partial antioxidant activity.

In this study, antioxidant activities of dichloromethane and methanol extracts of two endemic species grown in Turkey (*Ferulago idaea* Ozhatay & E. Akalın ve *Ferulago trojana* E. Akalın & Pimenov) were determined by two different methods. Antioxidant capacity were investigated by β -carotene-linoleic acid method and radical scavenging activity by DPPH test systems. In addition, total phenolics and total flavonoid contents of these extracts were determined as equivalent to pyrocatechol and quercetin, respectively.

Subsequently isolation and purification studies, antioxidant activities of pure compounds were determined by the two same methods. Based on the both antioxidant activity methods, methanol extracts of *Ferulago idaea* and *Ferulago*

trojana plants are found to be moderately active, but the dichloromethane extracts are not active. As isolated pure compounds, none of them are found to be active by DPPH radical scavenging activity test, however bergapten, isoimperatorin, 3'-epidecursin and isomaltol are active by β -carotene-linoleic acid method.

It is known that oxidation process may play important role in pathogenesis of cancer, and immune system diseases including Alzheimer and other age-related diseases with demans. Alzheimer's disease is a degenerative neurological disorder characterized by senile plaques containing amyloid β protein and loss of cholinergic neuromediators in the brain. It was confirmed that spheroidal plaques or fibrils arise near the brain and APP and beta-A4 proteins cause accumulation of these plaques. APP and beta-A4 proteins are named as 'amyloids' and they block the communication between the brain cells and cause them to die slowly. The most remarkable biochemical change in Alzheimer's disease patients is a reduction of acetylcholine (ACh) levels in the hippocampus and cortex of the brain. Therefore, inhibition of acetylcholinesterase (AChE), the enzyme responsible for hydrolysis of ACh at the cholinergic synapse, is currently the most established approach to treating Alzheimer's disease. In this direction, anticholinesterase activity tests were carried out by inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase.

In this study, anticholinesterase activities of dichloromethane and methanol extracts of two endemic species grown in Turkey (*Ferulago idaea* Ozhatay & E. Akalın ve *Ferulago trojana* E. Akalın & Pimenov) were determined by using Ellman Method. It was considered that both dichloromethane and methanol extracts of the two plants and their pure compounds are moderately active compared to the standard of galanthamine. As pure compounds bergapten, isoimperatorin, 3'-epidecursin, isomaltol, isomaltol-3 β -O-glucoside and 3,6-dimethoxy-7-isopropylcoumarin-4-tetradeca-13''-one and have anticholinesterase activity particularly against AChE enzymes

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bitkiler insanlığın varoluşundan beri çeşitli biyolojik aktiviteleri sebebiyle birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Aktiviteleri sayesinde tedavi amaçlı kullanılan bitkiler arasında *Ferulago* türleri de yer almaktadır. *Ferulago* bitkileri tür farkı gözetilmeksizin halk arasında “çakşırotu” olarak bilinir ve afrodizyak olarak kullanılır. Aromatik kokulu bitkileri kapsayan bir çiçekli bitkiler familyası olan Apiaceae (Umbelliferae) familyasında yeralan *Ferulago* cinsi dünyada 49 tür ile temsil edilir. Bunlardan 32’si ülkemizde de yetişmektedir. 17 tür ise sadece ülkemizde yayılış göstermektedir, yani endemiktir. *Ferulago* türlerinin kimyasal yapısı gerek yurt dışı gerekse yurt içindeki bazı çalışma grupları tarafından incelenmektedir. Üzerinde çalışılan *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkileri 2000 ve 2004 yıllarında ilk defa bilim dünyasına tanıtılmış olup Kaz Dağları endemiği türlerdir. *Ferulago* türlerinin sekonder metabolitleri başlıca kumarinler olmak üzere fenolik bileşikler ve diğer sekonder metabolitlerdir.

Bu çalışmada daha önce kimyasal olarak çalışılmamış endemik iki tür olan *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstraktları hazırlanarak, taşıdığı 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 ekstraktları, gerekse saf bileşikleri antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri incelenerek ilaç olma potansiyellerinin araştırılması amaçlanmıştır ve çalışmalar bu yönde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 1.1: *Ferulago idaea* Ozhatay & E. Akalın (*)



Şekil 1.2: *Ferulago trojana* E. Akalın & Pimenov (*)

(*) Fotoğraflar: Doç. Dr. Tuncay Dirmenci

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Bitkisel Bilgiler

2.1.1 Apiaceae (Umbelliferae) familyası

Apiaceae, çoğu 2 yıllık olmak üzere, tek veya çok yıllık, genellikle otsu, nadiren çalimsı olan aromatik (kokulu) bitkileri kapsayan bir çiçekli bitkiler familyasıdır. Büyük bir familya olup, yaklaşık 300 civarında cins ve 3,000'den fazla tür içerir. Familya üyeleri genellikle kuzey yarım kürede yaygın olup, Türkiye'de zengin bir tür sayısına sahiptir. Bitkilerin gövdelerinin içleri, özellikle kuruyunca boşalır. Yapraklar almaşık dizilişlidir. Çoğu cinsten tabanda toplanmışlardır. Çiçek kurulu genellikle basit veya bileşik şemsiye durumundadır. Apiaceae familyasındaki bitkiler genellikle kendilerine has bir kokuya sahiptirler. Bunun nedeni taşıdıkları uçucu yağ, reçine, zambak veya müsilaj karışımlarıdır. Bu karışımlar bitkinin özellikle meyve, petiol, gövde, yaprak ve köklerinde yer alan salgı kanallarında bulunmaktadır [1].

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

Bunun yanında uyarıcı, sedatif, 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 çalışmaya da konu olan 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 kullanılmakta, tıbbi olarak ise doğum kolaylaştırıcı olarak, baş dönmesine karşı, soğuk algınlığında, romatizmal rahatsızlıklarda, kan basıncını düzenlemede, öksürük tedavisinde kullanılırken, antispazmodik,

diüretik, midevi, uyarıcı ve diaforetik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [4].

- Halk arasında iyi bilinen kişnişin (*Coriandrum sativum*) meyve ve yağları gıdalarda tatlandırıcı olarak kullanılmakta, ilaç olarak ise meyvelerinin midevi, diüretik ve afrodizyak özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Nadir de olsa bazı sinir hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı bildirilmiştir [4].
- Özellikle Ege ve Akdeniz yörelerinde yetiştirilen rezene (*Foeniculum vulgare*), gıda, içki tatlandırıcısı ve sebze olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında parfümeri, çeşnicilik, likör, sabun ve ekmek sanayiinde kullanımları mevcuttur. İlaç olarak; uyarıcı, midevi, öksürük kesici özelliklere sahip olduğu bilinmektedir [4].
- *Laser trilobum*'un özellikle veteriner hekimliğinde karminatif olarak kullanıldığı, *Laserpitium* cinslerinin de deri hastalıklarında kullanıldığı kaydedilmiştir. Tıbbi kullanımı olan *Seseli* türleri diüretik, midevi, karminatif ve diaforetik özelliklere sahipken, bazı türleri de hayvan zehirlenmelerinde antidot olarak kullanılmaktadır [4].
- *Ferulago trojana*'nın Çanakkale'nin Çan ilçesine bağlı Alanköy'de ve Kumarlar Köyü'nde antihemoroidal olarak kullanıldığı bilinmektedir [1].
- *Ferulago trachycarpa*'nın Balıkesir'in Edremit ilçesinde olgun meyvelerinin toplanıp kurutulduktan sonra, öğütülüp toz haline getirilerek kimyon otu adıyla baharat olarak kullanıldığı bilinmektedir [2-3].
- *Prangos ilanae* bitkisinin köklerinin Balıkesir'in Edremit ilçesinde çakşır otu adıyla afrodizyak olarak kullanıldığı bilinmektedir [1].

2.1.2 *Ferulago* cinsi

Ferulago cinsi Avrupa, Asya ve Afrika'da dağılım göstermekle birlikte; dünyada 49 tür ile temsil edilir. Bunlardan 32'si ülkemizde de yetişmektedir. 17 tür ise sadece ülkemizde yayılış göstermektedir, yani endemiktir. *Ferulago* türlerinin sekonder metabolitleri başlıca kumarinler olmak üzere fenolik bileşikler ve diğer sekonder metabolitlerdir. Eski çağlardan beri *Ferulago* türleri, halk arasında sakinleştirici, sindirime yardımcı, uyarıcı ve afrodizyak olarak kullanılmaktadır [5].

2.1.3 *Ferulago idaea* Ozhatay & E. Akalın

Ferulago idaea, Kaz Dağı'nın diğer birçok nadir endemik türü (*Armeria trojana* Bokhari & Quezel, *Hypericum Kazdaghensis* Gemici & Leblebici and *Jasione idaea* Stoj) gibi sadece tek bir yerde yetişmektedir (Kaz Dağları - Sarıkız Tepesi).

Çiçeklenme dönemi Haziran ve Temmuz ayları olan *F. idaea* bitki taşları üzerinde yayılmış şekilde bulunmaktadır [6]. Boyu 5–25 cm arasında ve kırmızıya yakın bir renktedir. Bütün yapraklar tabanda, üçlü teleksi parçalı, dış hatlarında şeritsi, 6-18x0,5-2 cm, tüysüz, yeşil renklidir. Çiçek durumu bileşik şemsiye, ışınlar (2-) 3-7, 0,3-3,5 cm, eşit değil, şemsiyecikler 4-11, çiçek sapı 2-4 mm ve meyvedeyken kalınlaşmıştır. Çanak yapraklar; tüysüz, sarı, nadiren yeşil, şeritsi-mızraklı, taç yapraklar; sarı renkli, sırt kısmı kahverengimsi, yumurtamsı, tüsüzdür. Merikarp genellikle armut şeklinde, fakat nadiren eliptik, yumurtamsı, dikdörtgenimsi, 8-13x4-8 mm, sarı-kahverengi olup genç meyveler kırmızımsıdır.

Çok dar bir alanda yayıldığı için özellikle koruma altına alınması gereken bir türdür [7]. *Ferulago idaea*, Anadolu'da yetişen diğer 3 türe (*F. sandrasica* Peşmen & Quezel, *F. Macrosciadia* Boiss. & Balansa ve *F. Humilis* Boiss.) benzerlik göstermekle birlikte, çok kısa ve yere yatay olarak gelişen gövdesi ve armut şeklinde meyveleri ile kolaylıkla diğer *Ferulago* türlerinden ayrılır. *Ferulago idaea*'ya, Kaz Dağları'nın eski zamanlardaki adına ithafen "idaea" adı verilmiştir [7]. Halk arasında ise; 'kişniş' ya da 'kurt kulağı' olarak bilinmektedir [4]. *Ferulago idaea*, bilim dünyasına ilk kez 2000 yılında (Ozhatay & E. Akalın) tanıtılmıştır [7].

2.1.4 *Ferulago trojana* E. Akalın & Pimenov

Ferulago idaea'ya göre daha geniş bir yayılışa sahiptir. İlk toplandığı zaman daha önce toplanmış ve tayin edilmiş örnekler de göz önüne alınarak Avrupa'da yaygın olarak yetişen *Ferulago sylvatica* (Besser) Reichb. türü olarak tayin edilmiştir. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda Avrupa örnekleriyle karşılaştırma olanağı bulunmuş ve farklı olduğu görülmüştür. Çanakkale'nin Çan ilçesinden, Edremit Zeytinli'ye kadar uzanan bir alanda yaygın olarak bulunur. *Ferulago trojana*; *F. confusa*, *F. thirkeana* ve *F. silaifolia* türlerine benzer ancak onlardan yaprak ve meyve şekilleriyle kolaylıkla ayrılır. *Ferulago trojana*; 30-100 cm boyunda, tüysüz, çok yıllık bir bitkidir. Gövdesi tek, genellikle uzunluğunun orta kısmında ve yukarıda

dallanmış, oluklu ve köşelidir. Taban yaprakları birkaç tane, yaprak ayası mızraksı, 3-4 tüysü parçalı, yaprağın bütünü eliptik yada dar yumurtamsı, 13-55x1-1,15 cm, uçtaki loplar şeritsi yada ipliksi, 1,5-15x0,1-0,6 mm, tepeciklidir. Gövde yaprakları benzer fakat uca doğru küçülmektedir. Çiçeklenme mevsimi Mayıs-Haziran ayları olan *Ferulago trojana*'nın çiçek durumu yalancı şemsiye, geniş, birkaç dallı olup çiçek rengi sarıdır. *Ferulago trojana*; bilim dünyasına ilk kez 2004 yılında (E. Akalın & Pimenov) tanıtılmıştır [8].

2.2 *Ferulago* Türlerinin Halk Arasındaki Kullanılışı

- *F.trojana*'nın Çanakkale'nin Çan ilçesine bağlı Alanköy'de ve Kumarlar Köyü'nde antihemoroidal olarak kullanıldığı bilinmektedir [1].
- *F.trachycarpa*'nın Balıkesir'in Edremit ilçesinde olgun meyvelerinin toplanıp kurutulduktan sonra, öğütülüp toz haline getirilerek kimyon otu adıyla baharat olarak kullanıldığı bilinmektedir [2-3].

Ferulago türünün en çok yetiştiği yerlerden biri olan Anadolu'da, *Ferulago* ve yakın türleri olan *Ferula* L., *Cachyrs* L., *Glaucosciadium* Burt & Davis ve *Prangos* Lindl. türleri fark gözetilmeden yöresel isimleri olan 'Çakşır' yada 'Çağşır' olarak anılmaktadır ve bu bitkilerin kökleri halk arasında afrodizyak olarak kullanılmaktadır [7].

2.3 *Ferulago* Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar

Bugüne kadar ülkemizde ve dünyada *Ferulago* türlerinin daha çok uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine çalışılmıştır. *Ferulago* türlerinin diğer sekonder metabolitleri üzerine yapılan çalışmalar ise oldukça az sayıdadır. Bu çalışmalar aşağıda belirtilmiştir:

Nevşehir'den toplanan *Ferulago platycarpa*'nın metanol ekstresinin bir furanokumarin olan prantşimgin (prantschimgin) içerdiği tespit edilmiştir [9].

Sicilya'dan toplanan *Ferulago campestris* türünün grandivittin, agasillin (agasyllin), aegelinol benzoat ve felamidin kumarinlerini içerdikleri tespit edilmiştir [10]. İzole edilen aegelinol ve agasillin için yapılan antibakteriyel test sonucunda 9 ATCC'ye karşı aktif oldukları belirlenmiştir [11].

Manisa Spil Dağı'ndan toplanan *Ferulago asparagifolia*'dan ostenol (osthenol) ve prantşimgin kumarinleri ile ramnetin (rhamnetin), izoramnetin (isorhamnetin) ve rutin flavonoidleri izole edilmiştir. Ayrıca bitkinin etilasetat ekstresinin aegelinol, 3'-senesioylaegelinol (=grandivittin), 3'-angeloylaegelinol (=agasillin), prantşimgin, 8-metil prantşimgin ve umbelliferon içerdiği, metanol ekstresinin ise; rutarin, klorojenik asid, 3,5-di-(E,E)-kaffeoylkuinik asid ve (-)-angelikoidenol-2-O- β -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -glukopiranosid içerdiği belirlenmiştir [12].

Ferulago isaurica'nın 4'-O-benzoyl rutaretin, 4'-O-3-metil-2-butenoyl rutaretin furanokumarinleri ve felamidin, prantşimgin, bergapten, ksantotoksin (xanthotoxin) ve izoimperatorin kumarinlerini içerdiği tespit edilmiştir [13]. Yapılan başka bir çalışmada *Ferulago isaurica*'nın felamedin (1.51) ve prantşimgin (1.17) miktarları belirlenmiştir [14]. Aynı çalışmada *Ferulago syriaca* için de felamedin (1.68) ve prantşimgin (0.91) miktarları belirlenmiştir [14].

Villarino de los Aires-Salamanca (İspanya)'dan toplanan *Ferulago capillaris*'in hekzan ekstresinin bergapten, 8-(1,1-dimetilallil) bergaptol, bergamotin, izoimperatorin, ($\pm$)-oksipeusedanin (oxypeucedanin), (-)-prantşimgin, (-)-izovalerilmarmesin (isovalerylarmesin) kumarinlerini, benzen ekstresinin ise; bergamotin, izoimperatorin, ($\pm$)-oksipeusedanin, ($\pm$)-prangol, alatol (=tert-O-metilprangol), (-)-pranferol, prantşimgin, ostol (osthol), (+)-senesioylprangol, (-)-(2'S,3'R)-3'-senecioyloksimarmesin, (+)-(2'S,3'R)-3'-hidroksi prantşimgin, (+)-2''-senesioyloksimarmesin içerdiği belirlenmiştir [15].

Aldea del Obispo, Salamanca (İspanya)'dan toplanan *Ferulago brachyloba*'nın benzen ekstresinin ($\pm$)-oksipeusedanin, ($\pm$)-prangol, (-)-prantşimgin, (+)-3'-hidroksiprantşimgin ve aurapten kumarinlerini içerdiği belirlenmiştir [15].

Syracuse, Ognina (Sicilya)'dan toplanan *Ferulago nodosa*'nın 4'-O-senesioat, grandivittin ve oktadeka-9(Z),17-dien-12,14-diyn-1-asetoksi-11,16-diol içerdiği belirlenmiştir [16].

Ferulago aucheri ile yapılan çalışmada; kloroform ekstresinin ostenol ve prantşimgin kumarinleri, izoramnetin 3-galaktozit ve 6-hidroksiapigenin 6-metil eter flavonoidleri, 1-asetilhidrokinon 4-galaktozit ve kuinol monoasetat aromatik bileşiklerini içerdiği tespit edilmiştir [17].

Ferulago türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları Çizelge 2.1’de gösterilmiştir:

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

Bitki Adı	Yetiştigi yer	Uçucu Yağ Ana Bileşenleri	Biyolojik Aktivite
<i>Ferulago campestris</i>	İtalya	α -pinen; mirsen; γ -terpinen; α -humulen; spatulenol; karyofillen	Antimikrobiyal ¹⁸
<i>Ferulago asparagifolia</i>	Türkiye (Antalya)	2,3,6-trimetilbenzaldehid (%38.9); mirsen (%18.2)	- ¹²
<i>Ferulago asparagifolia</i>	Türkiye(Efes)	2,3,6-trimetilbenzaldehid (%42); α -pinen (%11.4); trans krizantenil asetat (%5.2)	- ¹²
<i>Ferulago longistylis</i>	Türkiye	α -pinen (%17); 2,3,6-trimetil benzaldehid(%29); (Z)- β -osimen (%16); sabinen (%6); mircen (%6); bornil asetat (%4)	Antimikrobiyal ¹⁹
<i>Ferulago angulata</i>	İran	α -fellandren (%24.2); β - fellandren (%14.9); α -pinen (%14.7); p-cymen (%10.3); Δ -3-karen (6.7); (Z)- β -osimen (%5.8)	- ²⁰
<i>Ferulago isaurica</i> (kök kısmı)	Türkiye	α -pinen (31.5); limonen (%24.2); mirsen(%17)	- ²¹

Çizelge 2.1(devam): *Ferulago* türleri ile yapılan uçucu yağ ve aktivite çalışmaları

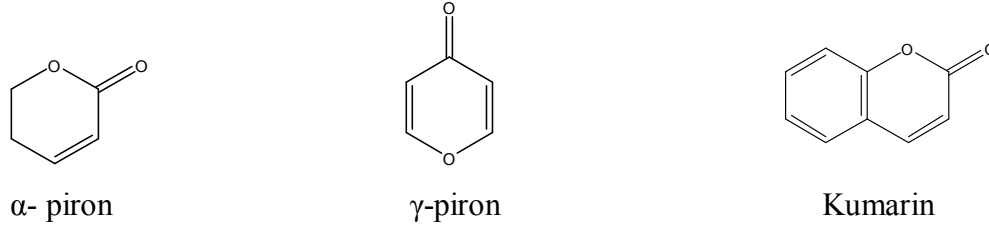
Bitki Adı	Yetiştigi yer	Uçucu Yağ Ana Bileşenleri	Biyolojik Aktivite	
<i>Ferulago isaurica</i> (meyve kısmı)	Türkiye	terpinolen (%42.1); mirsen (%27)	-	21
<i>Ferulago syriaca</i> (kök kısmı)	Türkiye	mirsen (%15.3); 4,6-guayadien (%10.7)	-	21
<i>Ferulago syriaca</i> (meyve kısmı)	Türkiye	bornil asetat (%69.4); terpinolen (%12.5)	-	21
<i>Ferulago carduchorum</i>		(Z)- β -osimen (%21.2); α - fellandren (%12.7); β - fellandren (%10.9)	-	22
<i>Ferulago phialocarpa</i>	İran	α -pinen (%40.9); α - fellandren (%14.2); β - fellandren (%9.6)	-	23
<i>Ferulago thirkeana</i>		ferulagon	-	24
<i>Ferulago nodosa</i>		α -pinen(%55.4) mirsen (%10.1) cis- β -osimen (%7) β - fellandren (5.6) sabinen (%4.5)	-	25

2.4 Sekonder Metabolitler

Bitkilerin sekonder metabolitleri; bitkinin büyüme ve gelişmesine katkıda bulunmamakla beraber bitkilerin savunma mekanizmasında, dış etkilerden korunmasında ve bitkiler arasındaki etkileşimin sağlanmasında önemli rol oynamaktadırlar. Bitkilerde bu özellikleri gösteren organik bileşenler özellikle ilaç yapımında önemli bir unsur oluşturmaktadırlar [26].

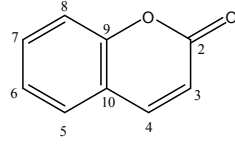
2.4.1 Kumarinler

Piron halkasının benzen halkası ile kondenzasyonu sonucu benzopiranlar olarak bilinen bir heterosiklik bileşik sınıfı oluşmaktadır, bu heterosiklik yapıya “kumarin” adı verilir [27].



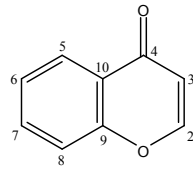
Şekil 2.1: α - piron, γ -piron ve kumarin bileşikleri.

Heterosiklik halkadaki karbonil grubunun pozisyonuna göre iki tür benzopiran bileşiği tanımlanır. Bir α -piron halkasının benzen halkasına kondanse olmasıyla oluşan bileşikler “kumarin” olarak adlandırılırlar [27].



Şekil 2.2: Kumarin

Bir γ -piron halkasının benzen halkasına kondanse olmasıyla oluşan bileşikler “kromon” olarak adlandırılırlar [27].



Şekil 2.3: 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 izole edilmiştir. Elde edilen bu bileşiğe ilk defa bu bitkiden izole edildiği için kumarin adı verilmiştir. Kumarin, 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 bulunmaktadır [27-29].

Kumarinler 1828'de laboratuvarında sentezlenerek parfüm ve tatlandırıcı yapımında kullanılmaya başlanmıştır ve o tarihten beri sanayide parfümeri kimyasalı olarak kullanılmaktadır [28]. Kumarin kimyasal yapısından dolayı, *o*-hidroksisinnamik asitten türetilmiş bir lakton grubudur. Kumarin vanilyaya benzeyen güzel kokulu bir madde olup, özellikle parfümeride ve pipo tütünleri ile Amerikan tipi tütünlerin kokulandırılmasında kullanılmaktadır. Benzo α -piron grubunun en yaygın sınıfı olan kumarinler, güçlü pigmentler oldukları için renkli bileşikler olarak oldukça yaygın kullanılmaktadırlar. Kumarinler aslında floresans özellik gösteren bileşikler değildirler. Ancak alkali çözeltileri UV'de yeşil renkte floresans verir. 7-hidroksi kumarinler, örneğin umbelliferone parlak mavi renkte floresan verirken, 6-hidroksi kumarinlerin derişik H₂SO₄ dışındaki çözeltileri floresans vermez [29].

Kumarin ve kumarin türevleri, bitkilerde serbest veya glikozitleri halinde yaygın olarak bulunan ve çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle son yıllarda önem kazanmış doğal bileşiklerdir. Kumarinlerin *in vivo* olarak birçok tümör türüne karşı etki gösterdiği, bazılarının anti-HIV aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [28].

Kumarinler ve türevleri antibiyotik, antikoagulan, antikanser, antienflamatuar ve bakteriyostatik etkilere sahip olmaları nedeniyle özellikle biyoloji ve tıp alanında araştırmalara konu olmaktadır [28].

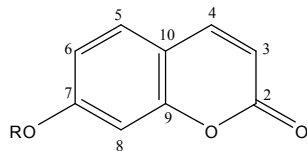
Kimyasal yapısı Strecker (1867) ve Fitting (1870) tarafından aydınlatılan kumarinlerin ilk kimyasal sentezi 1868 yılında Perkin reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir [27]. Kumarinler ilk kez benzoik asit türevi olarak adlandırılmışlarsa da Perkin'in *o*-hidroksi sinnamik asit ile salisil aldehiti etkileştirmesi sonucu bir lakton halkası olduğu anlaşılmıştır. Kumarinler ve türevleri, kimyasal yapılarından dolayı *o*-hidroksi sinnamik asitin lakton türevleri olarak adlandırılırken diğer yandan; benzen ve 1,2 piron halkasının etkileşimi sonucu oluştuğu da söylenebilir. Bu nedenle 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 prosesler uygulanarak izole edilirler [29].

Kumarin türevleri başlıca 6 sınıfta incelenebilir [27]:

1. Benzen halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler
2. Piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler
3. Hem benzen, hem de piron halkası üzerinde süstitüent 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

2.4.1.1 Benzen halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler

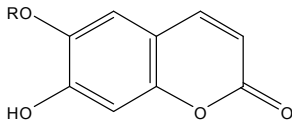
Kumarinlerin benzen halkasına değişik süstitüentlerin bağlanması sonucu mono-, di-, tri- süstitüe kumarinler meydana gelir [27].



R=H 7-Hidroksikumarin (Umbelliferone)

R=CH₃ 7-Metoksikumarin (Herniarin)

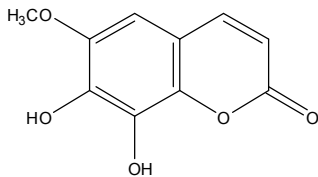
Şekil 2.4: Mono-süstitüe kumarinler



R=H 6,7-Dihidroksikumarin (Eskuletin)

R=CH₃ 7-Hidroksi-6-Metoksikumarin (Skopoletin)

Şekil 2.5: Di-süstitüe kumarinler

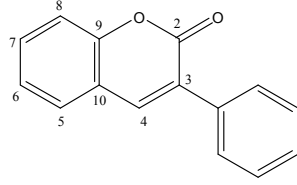


7,8-Dihidroksi-6-metoksikumarin (Fraksetin)

Şekil 2.6: Tri-süstitüe kumarin

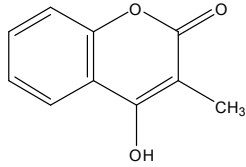
2.4.1.2 Piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler

Piron halkasının 3. ve 4. pozisyonuna hidroksil, alifatik veya aromatik grupların bağlanmasıyla oluşan kumarinlerdir [27].



3-Fenilkumarin

Şekil 2.7: Piron halkası mono-süstitüe kumarin

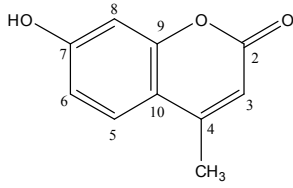


3-Metil-4-hidroksikumarin

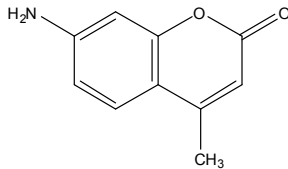
Şekil 2.8: Piron halkası di-süstitüe kumarin

2.4.1.3 Hem benzen, hem de piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan kumarinler

Bu grupta yer alan kumarinler florofor olarak kullanılırlar [27].



4-Metilumbelliferon



7-Amino-4-metilkumarin

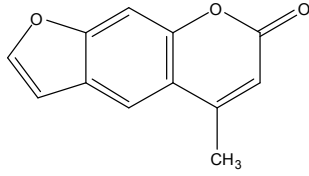
Şekil 2.9: Benzen ve piron halkası üzerinde süstitüent taşıyan bazı kumarinler

2.4.1.4 Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler

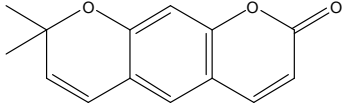
Bu grup;

- Kumarinin benzen halkasına beş üyeli furan halkasının kondanase olmasıyla oluşan “furanokumarinler”;
- Kumarinin benzen halkasına bir piron halkasının kondanase olmasıyla oluşan “piranokumarinler”;

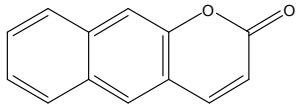
- Kumarinin benzen halkasına bir benzen halkasının kondanese olmasıyla oluşan “benzokumarinler” olmak üzere üç tür kumarin içermektedir [27].



Psoralen (Furanokumarin)



Xsantiletin (Piranokumarin)

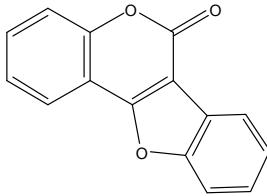


6,7-Benzokumarin

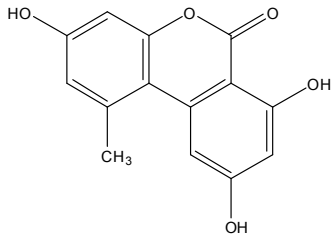
Şekil 2.10: Benzen halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler

2.4.1.5 Piron halkası ile halkalı yapıların kondenzasyonu sonucu meydana gelen kumarinler

Kumarinin piron halkasının 3. ve 4. pozisyonundaki karbon atomlarına halkalı yapıların kondenzasyonu sonucu meydana gelen kumarin türevleridir [27].



Kumestan

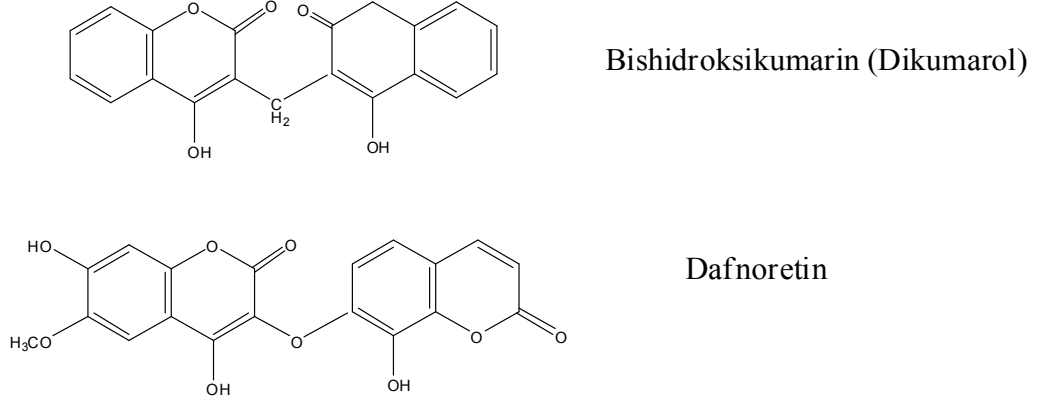


Aeterniyol

Şekil 2.11: Piron halkasına halkalı yapıların kondenzasyonu ile meydana gelen kumarinler

2.4.1.6 Dimer kumarinler

İki kumarinin piron halkalarının 3. pozisyonundaki karbon atomlarının farklı birleşmesiyle çeşitli yapılarda kumarin türevleri oluşmaktadır [27].



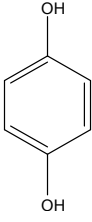
Şekil 2.12: Dimer Kumarinler

2.4.2 Fenolik bileşikler

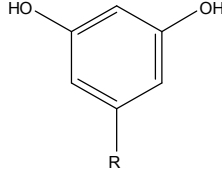
Fenolik bileşikler çok sayıda bitkide bulunan bir sekonder metabolit sınıfı olup genel olarak bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı bir ya da daha fazla sayıda hidroksil süstitüenti içermektedirler. Günümüzde binlerce fenolik bileşiğin yapısı aydınlatılmış olmakla birlikte flavonoidler bu sınıfın en geniş grubunu oluşturmaktadır. Fenilpropanoidler ve fenolik kinonlar da kayda değer sayıda bitkide yer alan fenolik bileşiklerdir. Bitkilerde bulunan ligninler, melaninler ve tanenler gibi önemli polimerik materyaller de polifenolik bileşiklerdir. Zaman zaman fenolik ünitelere proteinler, alkaloidler ve terpenoidlerde rastlanmaktadır. Fenolik bileşiklerin bazı sınıflarının işlevi açığa çıkarılmış olmakla birlikte bir kısım fenolik bileşiğin işlevi henüz netlik kazanmış değildir [30].

- a) Fenoller ve Fenolik Asitler:** Serbest fenoller ve fenolik asitler bitkilerden genellikle birlikte izole edildiklerinden birlikte anılmaktadırlar. Bitki dokularının asit hidrolizi sonucunda eterde çözünen çok sayıda fenolik asit açığa çıkmaktadır ve bu asitler çok geniş yayılışa sahiptir. *p*-Hidroksibenzoik asit, protokateşuik asit, vanilik asit, sirinjik asit, gentisik asit en yaygın olarak bulunan fenolik asitlerdir. Fenolik asitlere oranla daha nadir olarak bulunan serbest fenollerden hidrokinon en çok rastlanılan serbest fenoldür. Kateşol,

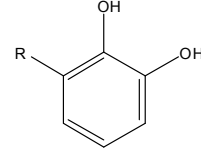
orsinol, floroglusinol ve pirogallol bitkilerde fazla yaygın bulunmamakla birlikte diğer önemli serbest fenollerdir [31].



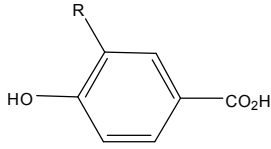
Hidrokinon



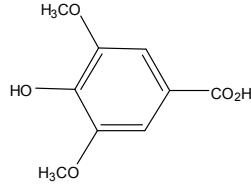
R=H, Rezorsinol
R=CH₃, Orsinol
R=OH, Floroglusinol



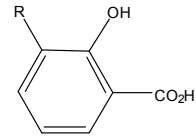
R=H, Kateşol
R=OH, Pirogallol



R=H, *p*-Hidroksibenzoik asit
R=OH, Protokateşuik asit
R=OCH₃, Vanilik asit



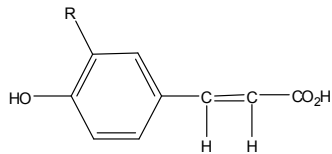
Sirinjik asit



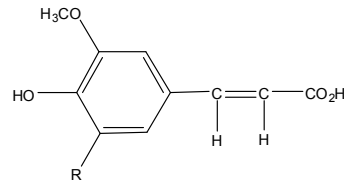
R=H, Salisilik asit
R=OH, *o*-Protokateşuik asit

Şekil 2.13: Fenoller ve fenolik asitler

b) Fenilpropanoidler: Fenilpropanoidler aromatik halkaya üç karbonlu yan zincir bağlanmasıyla oluşan bileşiklerdir. Biyosentetik olarak aromatik aminoasit proteini fenilalaninden türevlendirilirler. En yaygın olarak bulunan fenilpropanoidler hidroksisinnamik asitler (ferulik, sinapik, kafeik ve *p*-kumarik asitler) olmakla birlikte hidroksikumarinler, fenilpropenler ve lignanlar diğer önemli fenilpropanoidlerdir [32].

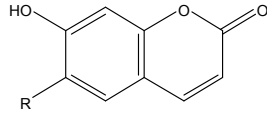


R=H, *p*-Kumarik asit
R=OH, Kafeik asit

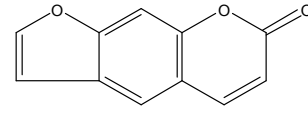


R=H, Ferulik asit
R=OCH₃, Sinapik asit

Şekil 2.14: Hidroksisinnamik asitler

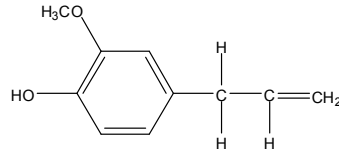


R=H, Umbelliferon
R=OH, Eskuletin (Aesculetin)
R=OCH₃, Skopoletin

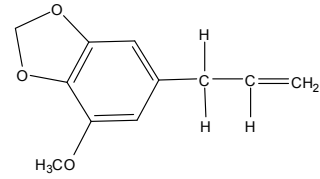


Psoralen

Şekil 2.15: Kumarinler



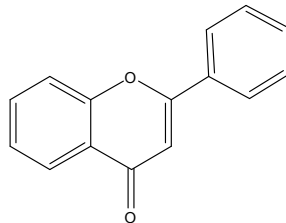
Öjenol (Eugenol)



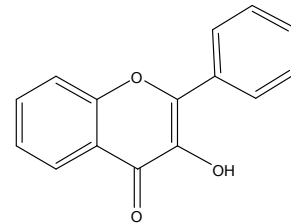
Miristisin (Myristicin)

Şekil 2.16: Lignanlar ve fenilpropenler

Flavonoidler: Flavonoidler bitki dokularında genellikle karışım halinde bulunurlar. Günümüzde bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır [33]. Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıdan korunma gibi bir dizi önemli özelliklere sahiptir [34]. Flavonoidlerin antioksidatif, antienflamatuar, antimikrobiyal, antiülserojen, antiviral, antimutajenik ve antikarsinojenik etki gibi çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir [35,36]. 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 belirtilmiştir:

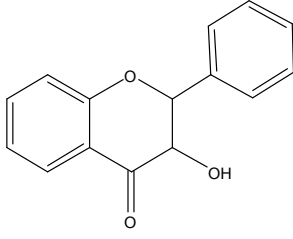


Flavon

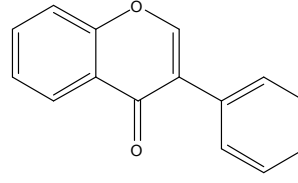


Flavonol

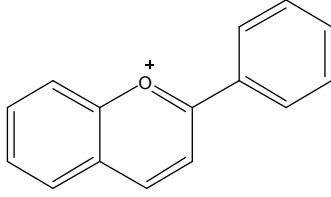
Şekil 2.17: Farklı iskelet yapısına sahip flavonoidler



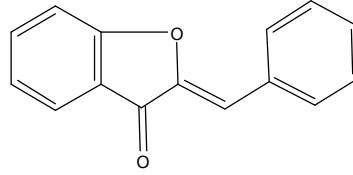
Flavonon



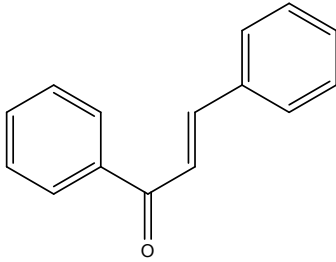
İzoflavon



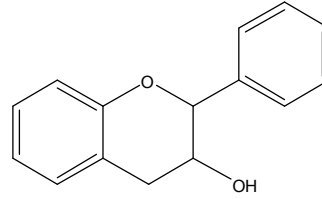
Antosiyanidin



Oron



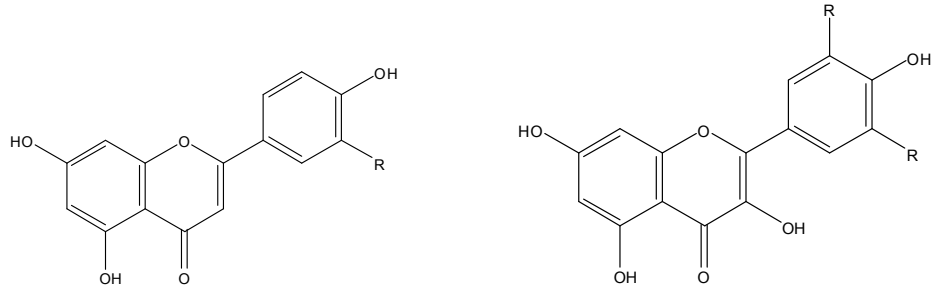
Kalkon



Kateşin

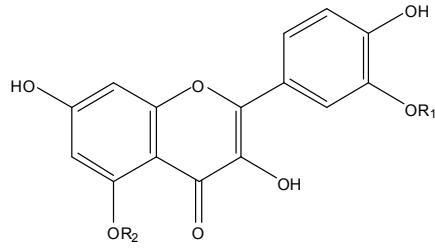
Şekil 2.17(devam): Farklı iskelet yapısına sahip flavonoidler

-Flavonol ve Flavononlar: Flavonların iskeletinde hetero halkasında iki ve üç numaralı karbon atomları arasında çift bağın bulunması karakteristiktir. Flavonlar bitkilerde hem serbest (aglikon), hem de glikozitleri halinde bulunurlar. Apigenin ve luteolin en çok rastlanılan flavonlardır. Flavonoller, C-3 pozisyonunda hidroksil grubu içeren 2-fenilbenzopiran çekirdeği içerirler. Bu nedenle, flavonollere 3-hidroksiflavonlar da denilebilir. Flavonoller, kristal veya amorf özellikli olup, flavonlar gibi açık sarı veya sarı renklidirler. Flavonolun hidroksil ve/veya metoksil grupları içeren türevleri bitki aleminde yaygındır. Çok sayıda flavonol yapısı aydınlatılmış olmasına rağmen sıklıkla rastlanılan flavonol sayısı az sayıdadır. Kamferol, kersetin, mirsetin en çok rastlanılan flavonollerdir [37].



R=H, Apigenin
R=OH, Luteolin

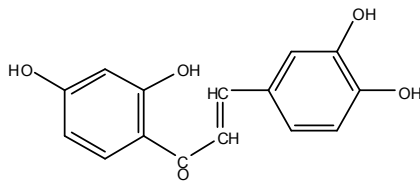
R=H, Kamferol
R=OH, Mirsetin



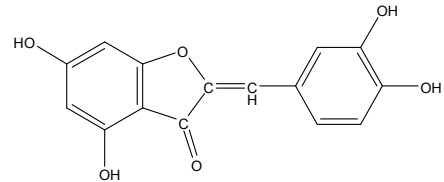
R₁=R₂=H, Kersetin
R₁=CH₃, R₂=H, İzoramnetin
R₁=H, R₂=CH₃, Azaletin

Şekil 2.18: Flavonol ve Flavononlar

-Minör Flavonoidler: Kalkonlar, oronlar, dihidrokalkonlar ve izoflavonlar bitkilerdeki sınırlı doğal yayılışları nedeniyle minör flavonoidler olarak adlandırılırlar. Butein en yaygın olarak bilinen kalkonlara örnek olarak verilebilirken, aureusidin en bilinen oronlardanır. Dihidroalkonlar ise kalkonlardan daha farklı bir yayılışa sahiptir. Floridzin en çok bilinen dihidroalkonlardanır. Daidzein ve genistein en bilinen izoflavon örneklerdir [38].

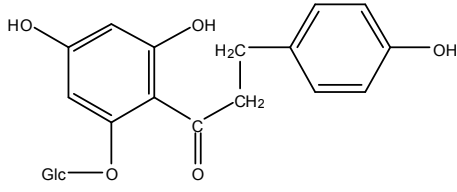


Butein (Kalkon)

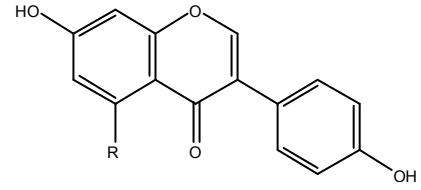


Aureusidin (oron)

Şekil 2.19: Minör flavonoidler



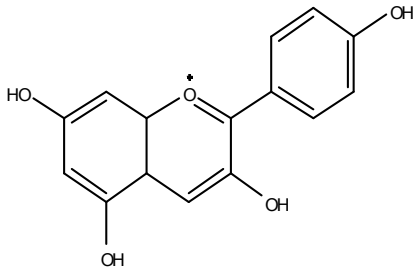
Phloridzin (Dihidrokalikon)



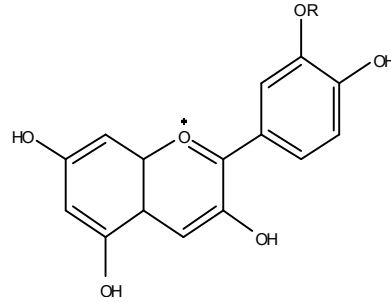
R=H, Daidzein (İzoflavon)
R=OH, Genistein (İzoflavon)

Şekil 2.19(devam): Minör flavonoidler

-Antosiyanidinler: Bitkilerde yaygın olarak bulunan renkli bileşiklerdendir. Suda çözünebilen bu bileşikler yüksek bitkilerin petal, yaprak ve meyve kısımlarının renklenmesinden sorumlu olmakla birlikte genellikle pembe, kırmızı, kırmızı, eflatun, mavi ve leylak rengindedirler [39].



Pelargonidin

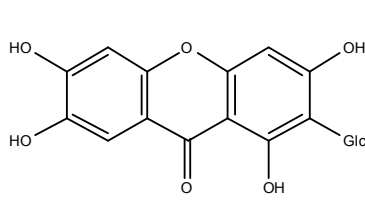


R=H, Siyanidin
R=CH₃, Peonidin

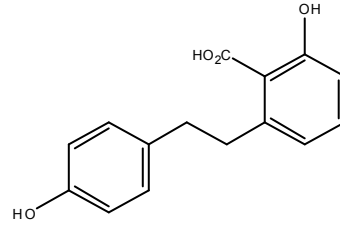
Şekil 2.20: Antosiyanidinler

d) **Diğer Fenolik Bileşikler:** Ksantonlar, stilbenler, tanenler ve kinonlar bu grupta yer almaktadır. Ksantonlar, sarı renkli fenolik pigmentler olup flavonoidlere benzer özellikte olmalarına rağmen karakteristik spektral özellikleriyle flavonoidlerden ayrılırlar. Mangiferin bitkilerde çok yaygın olarak bulunan bir ksantondur. Hidroksistilbenler, biyojenetik olarak kalkonlara benzer özellikte olmakla birlikte ana iskeletlerindeki karbon sayısı kalkonlardan bir karbon eksiktir. Lunularik asit en bilinen stilbenlerdendir [40]. Proteinler ve diğer makromoleküller ile güçlü kompleksler yapmalarını sağlayan hidroksil gruplarına sahip olan tanenler genellikle damarlı bitkilerde bulunmaktadır [41]. Kinonlar, açık sarıdan siyaha kadar geniş renk aralığına sahiptir. Çok geniş bir yayılışa sahip olan kinonlar yapısal

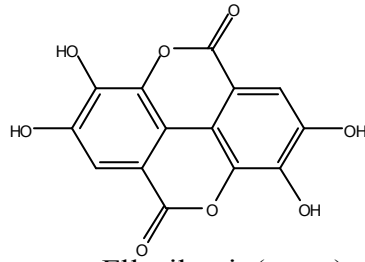
çeşitlilikleri çok fazla olmakla birlikte yüksek bitkilerde renklendirmeye çok az katkıda bulunmaktadır [42].



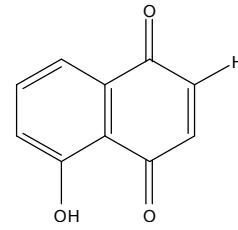
Mangiferin (Ksanton)



Lunularik asit (Dihidrostilben)



Ellagik asit (tanen)



Juglon (kinon)

Şekil 2.21: Diğer fenolik bileşikler

2.5 Antioksidanlar

Dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan moleküllere serbest radikaller denir. Bu tip moleküller eşleşmemiş elektronları olması sebebiyle oldukça reaktiftirler. Biyolojik sistemlerde serbest radikaller önemli role sahiptir. 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 verebilir.

Antioksidanlar ise radikal oluşumunu sınırlandırması, radikal reaksiyonlarının sona erdirilmesi, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesi ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu moleküllerdir. Reaktif oksijen türlerinin üretimi ve çeşitli antioksidan savunmaları arasındaki dengesizlik antioksidanların yetersizliğinden ve/veya reaktif oksijen türlerin artan oluşumundan kaynaklanan oksidatif stresle sonuçlanır [43]. Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilirler [44]. Bu durum yaygın olarak “Oksidatif Stres” şeklinde ifade edilir [45].

Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparırlar. Bu özellikleri, radikallerin kimyasal olarak aktif olmalarını sağlar ve bunların organizmadaki varlığı biyomoleküllerin modifikasyonuna sebep olur. Reaktif oksijen birikimi organizmada mevcut olan veya gıdayla alınan antioksidanlarla dengelenmediği takdirde; oluşan oksidatif stres koşulları altında kanser, koroner kalp yetmezliği, hücresel yıpranma ve yaşlanma, mutajenizm, bağışıklık sistemi hastalıkları ve lipoprotein oksidasyonu ile sonuçlanan, DNA ve hücre membranları gibi biyolojik yapıların oksidatif hasarına sebep olabilen radikalik zincir reaksiyonları meydana gelmektedir. Oksidatif stres, oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulması durumudur [46].

Oksidatif stresin baş sorumluları reaktif oksijen ve azot türleridir. Reaktif oksijen ve azot türleri radikalik ve radikalik olmayan türleri içermektedir [17]. Radikalik oksijen türlerine, süperoksit anyon ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$), peroksit ($HOO^{\cdot}$) ve alkoksi ($RO^{\cdot}$) radikalleri; azot türlerine, azot monoksit ($NO^{\cdot}$) radikalleri örnek verilebilir. Radikalik olmayan oksijen türlerine ise, hidrojen peroksit (H_2O_2), ozon (O_3) ve singlet oksijen (O_2); azot türlerine ise, nitroz asit (HNO_2), nitrozil katyonu (NO^+) ve nitroksi anyonu (NO^-) örnek olarak verilebilir [48]. Ayrıca bu radikallerin yanı sıra tiyol radikalleri ($RS^{\cdot}$) ve karbon merkezli radikaller de mevcuttur [49].

Reaktif oksijen ve reaktif azot türleri insan vücudunda değişik nedenlerle meydana gelmektedir. Bazıları, biyokimyasal döngü içerisinde olmaması gereken kimyasal reaksiyonlar neticesinde meydana gelmektedir. Örneğin, süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, bazı biyomoleküllerde (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat ile mitokondrial ve sitokrom P450) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonla artmaktadır. Yabancı organizmalara karşı koruyucu görev yapan fagositler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eosinofiller) yabancı organizmayı öldürmek için süperoksit ve hidrojen peroksit üretmektedirler. Bu önemli savunma sisteminin bozulması bazı hastalıklara sebep olmaktadır. Azot monoksit (NO) kan basıncının ve platelet fonksiyonun düzenlenmesi gibi birçok faydalı işleve sahiptir. Fakat aşırı azot monoksit üretimi kronik iltihaplanma, felç ve septik şoka sebep olmaktadır. Serbest radikaller dışarıdan da alınabilirler; sigara dumanı, iyonize olmuş radyasyon, organik çözücüler ve pestisitler örnek olarak verilebilir.

Serbest radikaller yiyeceklerde lipit peroksidasyonuna neden olurlar, bu da yiyeceklerin bozulmasına yol açar. Reaktif oksijen ve reaktif azot türleri DNA hasarına da neden olabilirler, DNA hasar gördüğünde mutasyon meydana gelebilir. Buna ek olarak reaktif oksijen ve reaktif azot türleri sıtma, kalp hastalıkları, arterio sklerosis, şeker ve kanser gibi 100'den fazla hastalığa yol açmaktadırlar.

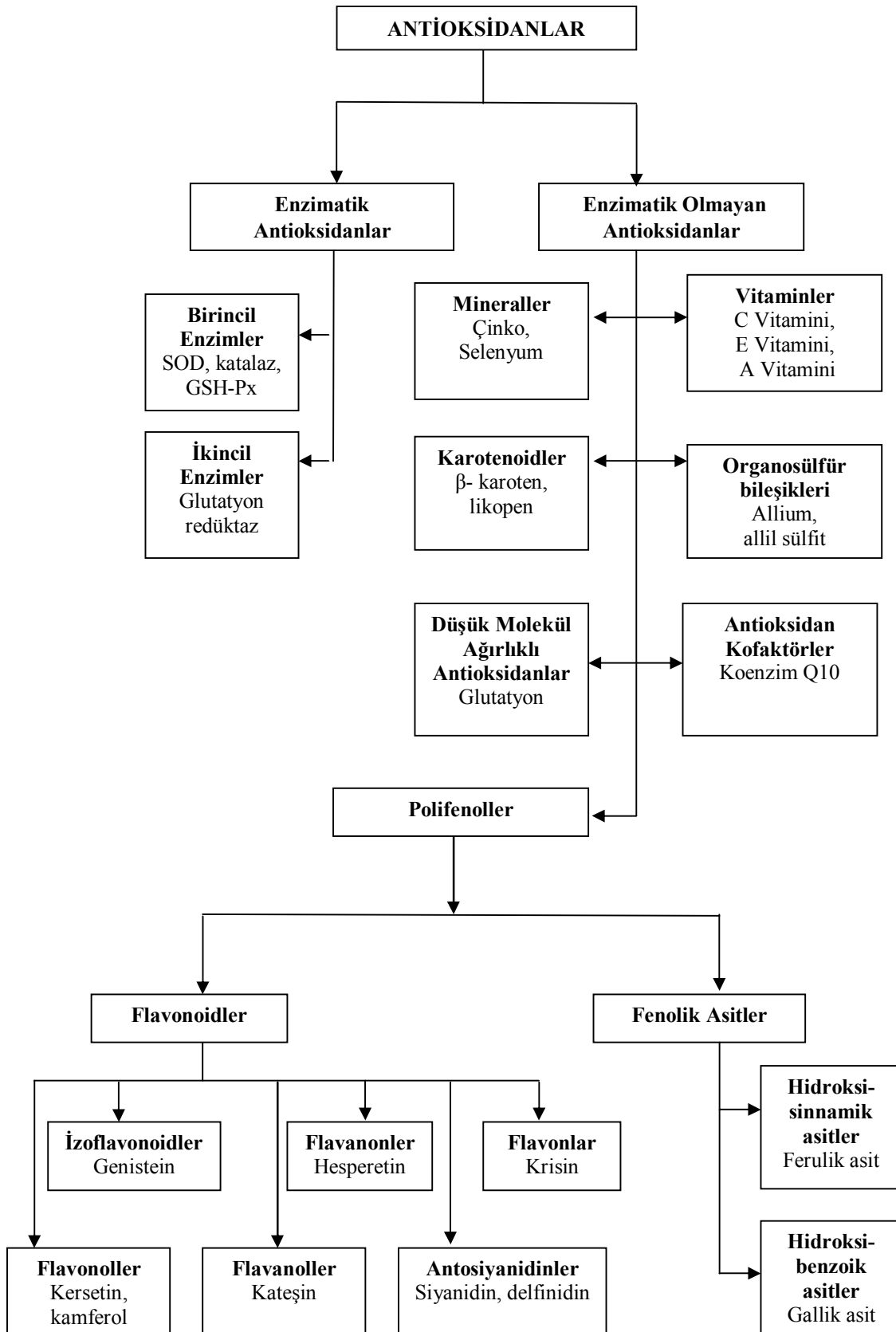
Prooksidanlar ise lipidler, proteinler ve nükleik asitlerde oksidatif hasara sebep olan ve bunun sonucunda çeşitli patolojik olaylara ve/veya hastalıklara yol açan zararlı maddelerdir. Prooksidan terimi, reaktif türler için kullanılan bir terimdir. Antioksidanlar, hücrelere zarar veren bu prooksidanları (reaktif oksijen ve azot türleri, serbest radikaller) etkin bir şekilde indirgeyerek az zararlı ve ya zararlı olmayan ürünlere dönüştürürler. Bu tehlikeli bileşiklerin varlığı sağlıklı bir yaşam için antioksidanları gerekli kılmaktadır [50].

Antioksidanlar yiyeceklerde veya vücutta düşük derişimlerde bulunduğu zaman, oksidasyonu önemli derecede engelleyen veya geciktiren maddelerdir [51].

Antioksidanlar insan vücudunda reaktif oksijen türlerinin verebileceği zararları yok ederler veya en aza indirgerler [45-48]. Antioksidan madde bakımından zengin olan sebze ve meyvelerin tüketilmesi reaktif oksijen türlerinin neden olduğu doku hasarına bağlı hastalıklardan insanları korumaktadır [52-53].

Diğer taraftan işlenmiş gıdaların bozunmasını önlediği ve raf ömrünü uzattığı için sentetik antioksidanlar gıdalarda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Günümüzde BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol), BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (*t*-bütildidrokinon) en çok kullanılan sentetik antioksidan maddelerdir. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdıkları yan ürünlerin çeşitli kanser hastalıklarına neden oldukları tespit edilmiştir [54-55].

Bu nedenle doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidanların bulunması için yapılan çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu alanda yapılan araştırmalar artmıştır. Askorbik asit ve tokoferoller ticari amaçla kullanılan en önemli doğal antioksidanlardır. Karotenoitler, fenolik bileşikler, flavonoitler, amino asitler ve enzimatik antioksidanlar (glukoz oksidaz, süperoksit dismutaz, katalaz) diğer doğal antioksidan kaynaklarıdır [49]. Biyolojik yapılarda ve gıdalarda bulunan enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlar aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:



Şekil 2.22: Antioksidanların Sınıflandırılması

Antioksidanlar dört farklı şekilde etki ederler:

1. Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma veya daha az reaktif yeni bir moleküle çevirme “toplayıcı” etkidir. Antioksidan enzimler (SOD, katalaz vb.) bu şekilde etki ederler.
2. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma veya inaktif şekle dönüştürme “bastırıcı” etkidir. Askorbik asit (C Vitamini), α - tokoferol (E Vitamini), flavonoidler (kersetin, kateşin vb.) bu tarz etkiye sahiptirler.
3. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak zincir reaksiyonlarını kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki “zincir kırıcı” etkidir. Hemogloblin, albumin gibi bileşikler bu şekilde etki ederler.
4. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması “onarıcı” etkidir.

Antioksidanlar yükseltgenen maddeler olduğundan zincirleme reaksiyonu koparmaları sırasında kendileri yükseltgenerek bozunurlar. Bu nedenle antioksidanlar yalnız sınırlı bir zaman için yükseltgenen 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 [56]. 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 yöntemler ise iki temel başlıkta incelenmektedir:

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

1. Elektron transferine dayanan yöntemler: Antioksidan maddenin ölçümü oksidan maddenin indirgenmesi sonucu oluşan rengin değişiminin ölçülmesi ile yapılır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan madde konsantrasyonuna bağlıdır [46]. 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 transferine dayanan yöntemler: Antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı reaksiyonlar gözlenir. Genelde azotlu grup taşıyan maddelerin bozulup peroksil radikalleri oluşumuna dayanır [46].

Hidrojen atomu transferine dayanan yöntemler:

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

2.6 Alzheimer Hastalığı ve Nedenleri

Alzheimer hastalığının 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 [57]. Alzheimer hastalığı; dejeneratif, nörolojik bir hastalık olup amiloid β protein içeren senile (yaşlılık/bunama) plaklarının oluşumu ve kolinerjik nöromedyatörlerin kaybolması olarak nitelendirilir [58]. Alzheimer hastalığına sahip kişilerde yapılan otopsilerin sonucuna göre; bu hastalarda karakteristik plak ve düğüm oluşumunun yanı sıra mitokondrial işlev bozukluğu, iltihaplanma, astroglizasyon, mikrogliyal aktiflenme,

sinaptik hasar, nöron tahribatı ve apoptosis (programlanmış hücre ölümü) bulgularına da rastlanmıştır [59].

1980’li yılların başında yapılan araştırmalarda beynin kenarında küremsi birikintiler (plak) veya liflerin (fibriller) oluştuğu tespit edilmiştir. Bu artık madde (plak) yığılmasına beta-A4 proteini (42 aminoasitten oluşur) ve APP proteinin (amyloid precursor protein) sebep olduğu belirtilmiştir. Beyindeki beta-A4 ve APP proteinlerine “amiloidler” denir. Amiloidler beyin hücreleri arasındaki haberleşmeyi önleyerek beyin hücrelerinin yavaş yavaş ölmesine neden olurlar [57].

APP, sağlıklı nöronlar tarafından üretilen normal proteinlerdir. APP’nin tanımlanmasıyla vücudumuzun en az üç çeşit enzim ürettiği belirlenmiştir. Bunlara alfa, beta ve gama salgıları adı verilir. Alfadan farklı olarak, beta ve gama enzimleri, birlikte hareket ederek, adına beta amiloid (A-beta) denilen daha kısa, daha yapışkan bir protein üretirler. Beta amiloidler, nöronların etrafındaki sıvının içinde birikerek plakalar oluştururlar [57].

Alzheimer hastalarında beta amiloid (A-beta) üretimi sağlıklı bir birey ile aynı olmakla birlikte, beta amiloidlerin dışarı atılmasında sorun yaşanmaktadır. Normal olarak beta amiloidler hücrenin dışına çıktığı zaman erir, ancak bazen erimesi mümkün olmayan ve adına “fibril” denilen birikintiler oluştururlar [58].

Bu fibriller birbirine yapışarak plakalar haline gelir. Her insan yaşlandıkça plaka üretir. Gerçek sorun, bu plakaların iltihaplanma ile sonuçlanan reaksiyonları tetiklemesidir. Beyin, genel olarak, enfeksiyonlarla mücadele ederken serbest radikal denilen toksik ajanlar üretir. Bu fibriller de benzer reaksiyonlara zemin hazırlar [57].

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stresin hücre tahribatıyla sonuçlanan biyomoleküllerin oksitlenmesine neden olduğu bilinmektedir [57]. Toksik beta amiloidlerin yavaş yavaş birikimi, sürekli oksidatif stres ve benzeri olaylarla birleştiğinde nöronlarda yapısal bozukluğa neden olmaktadır. Bu süreç; fonksiyonel aksaklıklara, kavramsal ve davranışsal bozukluklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Beyindeki beta amiloid birikimini hızlandıran patofizyolojik durumlar Alzheimer riskini arttırmaktadır [59].

Sonuç olarak; oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk adımlarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynama durumuna sahiptir [57].

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

1. **Asetilkolin nörotransmitter:** Dokulardaki bilgiyi ve ya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolin esterase isimli enzim tarafından parçalanır. Bir sonraki bilgi aktarımı için yeniden asetilkolin üretmek gerekir. Asetilkolin, Alzheimer hastalarında yeterince üretilmemektedir. Asetilkolini parçalayan asetilkolinesteraz enziminin frenlenmesi ile Alzheimer hastalığının ilerlemeyeceği düşünülmektedir [61].
2. **Glutamat:** Sinir hücrelerinde % 70 oranında bulunur. Görevi; öğrenme ve hafızadır. Alzheimer hastalarında glutamat çok aşırı şekilde salgılanır ve bu durum sinir hücrelerinin tahrip olmasına sebep olur. Glutamat salgılanması frenlenirse sinir hücrelerinin ölümünün yavaşlayacağı ve Alzheimer hastasının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği düşünülmektedir [61].

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 önlemeye yardımcı olurlar [59].
- **N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri** ise öğrenme ve bellek fonksiyonları açısından önem taşıyan bir transmitter olan glutamat’ı düzenleyici etkiye sahiptir [59].

Alzheimer hastalarında rastlanılan en önemli biyokimyasal değişiklik hipokampus 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 [59]. Bu yaklaşım göz önünde bulundurularak anti-Alzheimer aktivite testleri asetilkolinesteraz ve butirilkinesteraz enzimlerinin inhibisyonu odaklı gerçekleştirilmiştir. Anti-Alzheimer aktivite testlerinde Ellman metodu kullanılmıştır.

2.6.1 AChE ve BChE

Vücutta asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) olmak üzere iki tane kolinesteraz enzimi bulunmaktadır [59]. Normal erişkin beyinde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır [60]. Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, butirilkolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferik sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır [59]. Kolinerjik nöronlarda AChE, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dendritik uzantıların proksimalinde yer alır. BChE ise hücre gövdesinde ve dendritlerde bulunur. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE, geriye kalan %20 sinden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir. AChE'nin kolinerjik iletimdeki rolü oldukça iyi bilinmekle birlikte BChE'nin rolü yeterince anlaşılmış değildir. Sinir sistemi gelişiminin erken dönemlerinde BChE düzeyleri yüksektir, ilerleyen evrelerde ise bu düzey düşmektedir. Normal beyinde sinaptik asetilkolin hidrolizinin esas olarak AChE tarafından yapıldığı, BChE'nin buna çok az katkısının olduğu kabul edilmektedir [59]. Bu çalışmada Ellman metodu ile gerçekleştirilen antikolinesteraz aktivite testleri; hem asetilkolinesteraz hem de butirilkolinesteraz enzimlerinin inhibisyonu incelenerek gerçekleştirilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

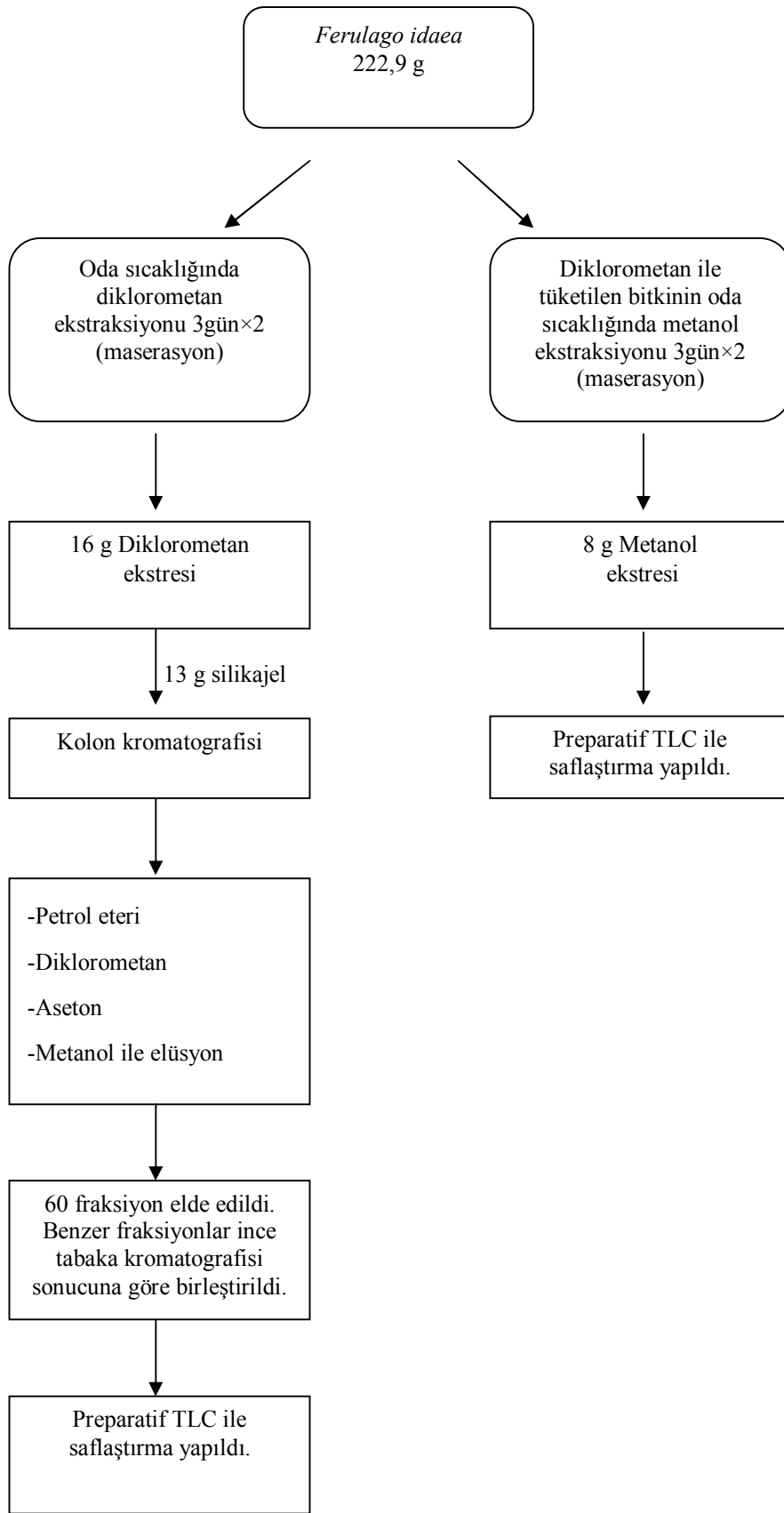
3.1 Bitkisel Materyal

Ferulago idaea Ozhatay & E. Akalın sp. nov. (Herbaryum No: Dirmenci 3693) Balıkesir, Edremit, Kazdağı, Mehmetalan köyü üzeri, Sarıkız tepe civarı düzlükler, 1720 m'den 14.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay Dirmenci tarafından toplandı ve teşhis edildi.

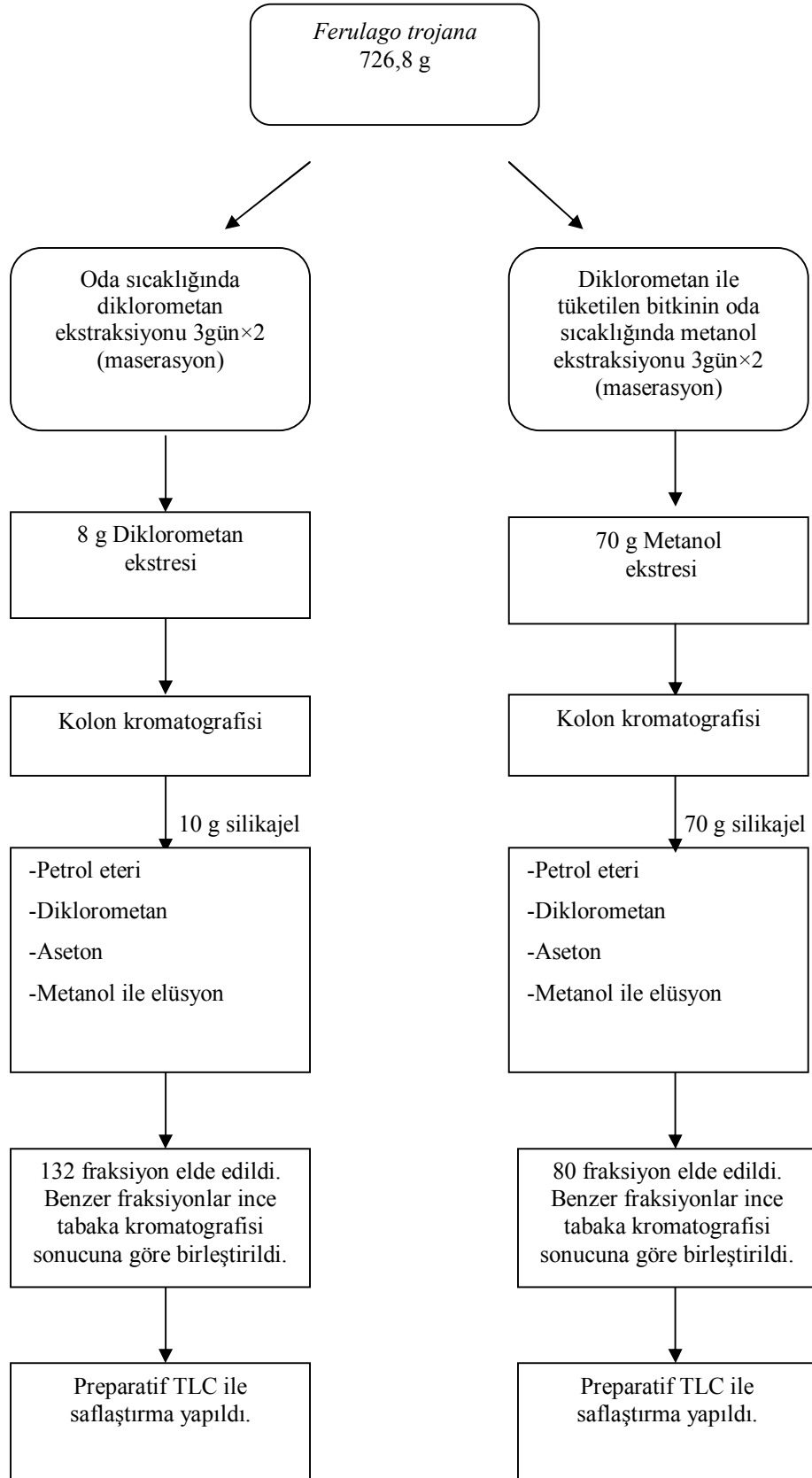
Ferulago trojana E. Akalın & Pimenov sp. nov (Herbaryum No: Dirmenci 3691) Balıkesir, Edremit, Kazdağı, Mehmetalan köyü üzeri, 300 m'den 14.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay Dirmenci tarafından toplandı ve teşhis edildi.

3.2 Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkiler gölgede kurutulduktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan *Ferulago idaea* (222,9 g) ve *Ferulago trojana* (726,8 g)'nın öncelikle oda sıcaklığında diklorometan ile ekstraksiyonları (3 gün × 2) yapıldı. Daha sonra diklorometan ile tüketilen bitkilerin oda sıcaklığında metanol ekstraksiyonları (3 gün × 2) yapıldı. Rotaevaporatörde çözücüleri uçurulduktan sonra ekstreler elde edildi.



Şekil 3.1: *Ferulago idaea* bitkisinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin hazırlanması ve fraksiyonlandırılması



Şekil 3.2: *Ferulago trojana* bitkisinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin hazırlanması

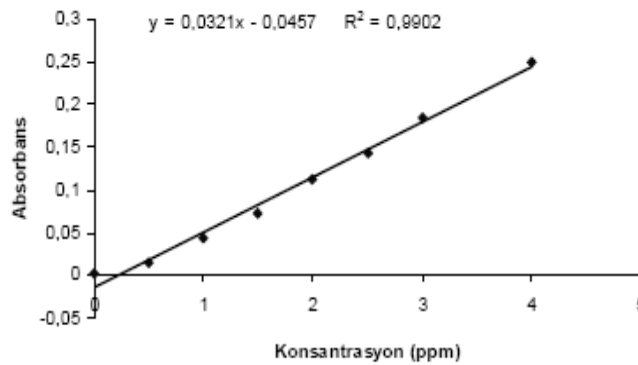
3.3 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi

3.3.1 Toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesi

Folin Ciocalteu Yöntemi olarak adlandırılan bu yöntem; Singleton ve arkadaşları tarafından toplam fenolik içeriği ölçmek için geliştirilmiştir. Toplam fenolik ayırıcı olarak bilinen Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) bazlı yöntem, örneğin indirgeme kapasitesini tayin etmektedir. FC reaktifi sadece fenolik bileşenlere özgü değil, birçok fenolik yapıda olmayan bileşenleri de indirgeme yeteneğine sahiptir. 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 ayırıcını heteropoli mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlanınca 750 nm'de örnek absorbanları ölçülür.

Fenolik bileşikler FCR ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verirler. Fenolik protonun dissosiasyonu, ayırıcı indirgeme yeteneği bu nedenle artan fenolat anyonunun oluşumunu sağlar [62-63].

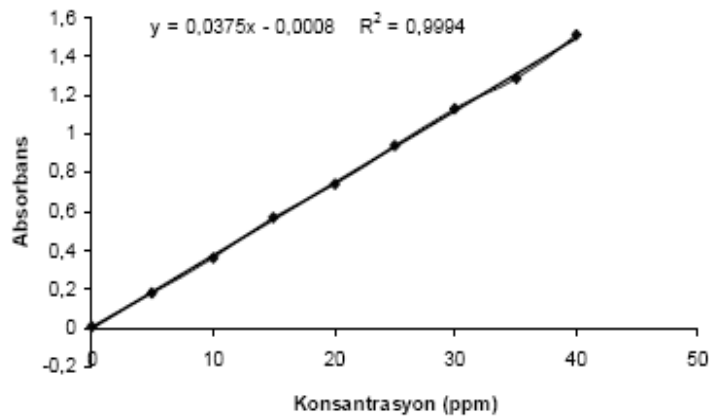
Numunelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi [64]. 1 mg numune içeren örnek çözeltileri distile su ile 46 mL'ye tamamlandı. Bu karışıma 1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ve 3 dakika sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden 3 mL ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı. Numunelerin absorbanları 760 nm'de okunarak toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi [64].



Şekil 3.3: Pirokatekolün ölçü grafiği

3.3.2 Toplam flavonoid içeriklerinin belirlenmesi

Hazırlanan numunelerin toplam flavonoid içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi. 1000 ppm'lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 µL alınarak hacimleri %80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. 0,1 mL 1 M potasyum asetat eklendi ve bir dakika sonra 0,1 mL %10'luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm'de kontrole karşı UV spektrofotometresinde absorbansları okundu [65].



Şekil 3.4: Kersetinin ölçü grafiği

3.4 Antioksidan Tayin Yöntemleri

3.4.1 DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi

Sanchez ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem; antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalının süpürücü etkilerini ölçmeye dayanan bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Mor renkli DPPH radikali 517 nm'de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla rengi mordan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli yöntemdir. Yöntem hızlı ve basittir. 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. Bundan dolayı yöntem; DPPH ile tepkimeye giren antioksidanların antioksidan kapasitesi

hakkında doğru bir değerlendirme vermez. Bunlara ek olarak DPPH'nin rengi; ışık, hava oksijeni, nem ve pH'a fazla duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçların eldesi güçtür [66].

Bitki ekstraktlarının ve saf maddelerin serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak 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 metanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.4.2 β-Karoten-linoleik asit yöntemi (toplam antioksidan aktivite tayini)

β-Karoten-linoleik asit yöntemi, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem, β-karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. α-Toc, BHT, kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 20, 40, 80 µg/mL olacak şekilde, 4 mL β-karoten çözeltisi ilave edildi. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez UV-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 dakika) inkübasyona devam edildi. Bu süre sonunda absorbans tekrar 490 nm'de ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi [67]. β-Karotenin renk açılım oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı [68].

$$R = \ln (a/b)/t \quad (3.2)$$

ln=doğal logaritma

a=başlangıç absorbansı

b= t zaman (dakika) inkübasyonundan sonraki absorbans.

Toplam antioksidan aktivite, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Antioksidan Aktivite (\% İnhibisyon)} = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.3)$$

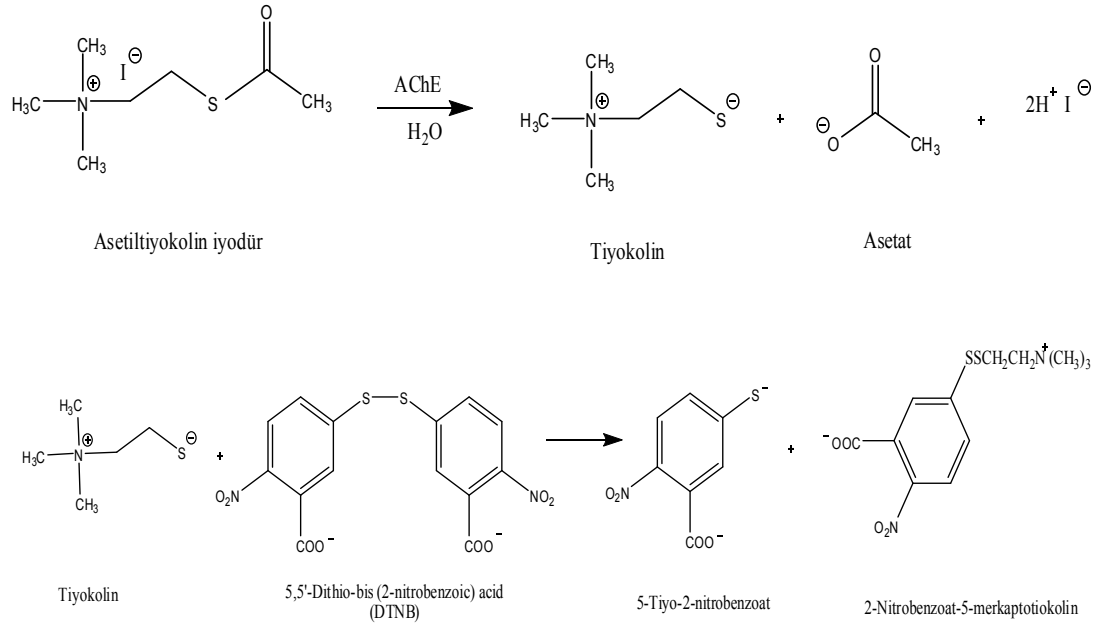
3.5 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemleri

3.5.1 Ellman metodu

Asetilkolinin AChE tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra, tiyokolinin sarı renkli 5- tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu vermek üzere 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon verdiği kolorimetrik bir yöntem olan Ellman metodu, 96 kuyucuklu mikropalakalarda gerçekleştirilmektedir.

3.5.1.1 AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Reaksiyon şematik olarak şekil 3.5'te gösterilmektedir:



Şekil 3.5: Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonu

Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmektedir [69].

Reaktiflerin Hazırlanışı

- DTNB: 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözöldü, 7.5 mg NaHCO₃ 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözöldü ve iki çözöltü 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.

Deneyin Yapılışı

- 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 25°C de inkübe edildi.
- 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (20 µL) herbir kuyucuğa ilave edildi.
- Standart olarak (antikolinesteraz) Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan 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 IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

3.5.1.2 BChE aktivite testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanılmaktadır.

Reaktiflerin Hazırlanışı

- DTNB: 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7.5 mg NaHCO₃ 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.

Deneyin Yapılışı

- Mikroplakadaki kuyucuklara 130 μ L fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 μ L ve enzim çözeltisinden 20 μ L konuldu.
- Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi.
- 10 dakika sonra 20 μ L DTNB reaktifi ve substrat (20 μ L) herbir kuyucuğa ilave edildi.
- Standart olarak (antikolinesteraz) Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galanthamin 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 IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

3.6 İstatistiksel Hesaplamalar

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

3.7 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.7.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler

- Merck 1.07734.1000 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm)
- Merck 1.05554.0001 TLC Silica gel 60 F₂₅₄
- Sigma-Aldrich metanol
- Sigma-Aldrich aseton
- Sigma-Aldrich etanol
- Merck petrol eteri
- Riedel-de Haen diklorometan
- Riedel-de Haen kloroform
- Aldrich Chemistry Serium (IV) sülfat
- Sigma-Aldrich DTNB(5,5'-Dithiobis (2-Nitro-benzoik asit))
- Sigma-Aldrich Folin Ciocalteu reaktifi
- Sigma-Aldrich α -Tokoferol
- Merck BHT (Bütillenmişhidroksi toluen)
- Fluka BHA (Bütillenmişhidroksi anisol)
- Sigma-Aldrich β - karoten
- Sigma-Aldrich Tween-40
- Sigma-Aldrich Linoleik asit
- Sigma-Aldrich pirokatekol
- Sigma-Aldrich Kersetin
- Riedel-de Haen sodyum karbonat
- Merck sodyumbikarbonat
- Carlo Erba alüminyumnitratnonahidrat
- Merck potasyum asetat(susuz)
- Sigma-Aldrich DPPH(2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil)
- Sigma-Aldrich asetiltiyokolin iyodür
- Sigma-Aldrich butiriltiyokolin iyodür
- Sigma-Aldrich asetilkolinesteraz
- Sigma-Aldrich butirilkolinesteraz
- Sigma-Aldrich sodyumbifosfatdihidrat
- Sigma-Aldrich sodyumdihidrojenfosfatdihidrat

3.7.2 Çözeltilerin hazırlanması

3.7.2.1 Fenolik/flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler

a. %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinin hazırlanması

2 g Na₂CO₃ su ile 100 mL'ye tamamlanarak %2'lik Na₂CO₃ çözeltisi hazırlandı.

b. %10'luk alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması

1,76 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ bileşiği su ile 10 mL'ye tamamlandı. Böylece %10'luk alüminyum nitrat çözeltisi hazırlandı.

c. 1 M potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması

0,9615 g potasyum asetat 10 mL suda çözülerek potasyum asetat çözeltisi hazırlandı.

3.7.2.2 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

a. β -Karoten-linoleik asit çözeltisinin hazırlanması

β -Karoten çözeltisi için 0,2 mg β -karoten 1 mL kloroformda çözüldü. Bu çözeltiye 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.

b. 0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması

4 mg DPPH 100 mL etanolde çözülerek DPPH çözeltisi hazırlandı.

3.7.2.3 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

a. 0,1M H_2PO_4^- çözeltisinin hazırlanması

1,56 g H_2PO_4^- tartılıp, 100 ml distile suda çözüldü.

b. 0,1 M HPO_4^{2-} çözeltisinin hazırlanması

3,556 g $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ tartılıp, 200 ml distile suda çözüldü.

c. 0,1 M pH=8 tampon çözeltisinin hazırlanması

94,7 mL HPO_4^- ve 5,3 ml $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

d. 0,1 M pH=7 tampon çözeltisinin hazırlanması

3,9 mL H_2PO_4^- ve 6,1 mL HPO_4^{2-} çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlandı.

e. DTNB çözeltisinin hazırlanması

16 mg DTNB 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde ve 7,5 mg NaHCO_3 pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırıldı. Hazırlanan bu

çözelti, 2 ml pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlandı. Kullanma aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edildi.

f. AcI çözeltisinin hazırlanması

32,8 mg AcI alınarak, 8 mL deiyonize su eklendi. Kullanma aşamasında pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

g. BuI çözeltisinin hazırlanması

4 mg BuI alınarak, 8 mL deiyonize su eklendi. Kullanma aşamasında 8 ml fosfat tamponu (pH=8) ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

h. AChE enzim çözeltisinin hazırlanması

1,17 mg AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrıldı. Her biri için 0,235 mg/1 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 eklendi. 585 µL 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.

i. BChE enzim çözeltisinin hazırlanması

1 mg BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözüldü. Bu çözeltiden 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.

3.7.2.4 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.

3.7.2.5. Seriksülfat belirtecinin hazırlanması

2 g Seryum(IV) sülfat üzerine 11,2 mL %98'lik derişik H₂SO₄ eklenip distile suyla 100 mL'ye tamamlanarak hazırlandı.

3.8 Cihaz ve Gereçler

- Eliza Reader Molecular Devices Spectro Max340 PC
- Camag UV lamba
- Ecocell etüv
- Buchi Rotary Evaporatör
- Heidolph Rotary Evaporatör
- Fisher Scientific FB 15051 ultrasonikatör
- Ohaus Adventurer-Pro hassas terazi
- IKA RCT basic hot plate
- Eppendorf tekli ve çoklu pipetler (2-10 μ l/20-200 μ l /100-1000 μ l/1000-5000 μ l)
- Vortex IKA MS3 basic
- Camag tanklar (20×20 / 20×10)
- Ph metre
- WTW inolab pH 720

3.9 Kromatografik Yöntemler

Maddeler karışımının bir hareketli faz yardımıyla, bir sabit faz üzerinden geçirilerek bileşenlerine ayrılması işlemine kromatografi denir. Kromatografik ayırım; karışımı oluşturan bileşiklerden her birinin sabit fazda tutunma ve hareketli faz ile sürüklenme

eğilimlerinin birbirinden farklı olması ilkesine dayanır. Bileşenlerin her biri kromatografik sistemde farklı hızlarla ilerler ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanır [70].

Bu tez çalışmasında hazırlanan ekstrelerin fraksiyonlandırılması, saf maddelerin eldesi ve analizi için kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi teknikleri kullanılmıştır.

İnce tabaka kromatografisinde, alüminyum üzerine silikagel kaplı hazır plaklardan (20 x 20 cm) (Merck 1.05554) ve cam plaklardan (20 x 20 ; 20 x 10) yararlanıldı. Cam plakları hazırlamada adsorban olarak Silikagel HF₂₅₄ kullanıldı. Ekstrelerin sütun kromatografisi ile ayrılmasıyla elde edilen fraksiyonların karşılaştırılmasında ince tabaka kromatografisi plakları kullanıldı. Maddeleri saflaştırmak için preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

3.9.1 Kolon (Sütun) Kromatografisi

Kolon kromatografisi özellikle ekstrelerin fraksiyonlandırılması için ve ayrıca bazı fraksiyonların birleştirilerek saf madde izolasyonu için kullanıldı. Bu amaçla madde miktarına bağlı olarak çeşitli genişlik ve uzunluklarda cam kolonlar kullanıldı. Ayırımın gerçekleşmesi için ise silikajel (Merck 1.07734) adsorban olarak kullanıldı. Bir miktar adsorban ile bileşenlerine ayrılması istenilen madde karıştırılıp toz kıvamına getirildikten sonra kolona dolduruldu. Bu işlem sonucunda adsorban ve üzerine doldurulan maddenin üst yüzeyinin düzgün olmasına dikkat edildi. Kolon kullanılmaya hazır hale geldikten sonra elüsyona (bileşiklerin kolon boyunca ilerlemesi) başlandı. Elüsyona nonpolar bir çözücü olan % 100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla diklorometan, aseton ile polarite arttırılarak elüsyona devam edildi, sonunda % 100 metanol ile elüsyon tamamlandı. Bileşiklerin renkli olması durumunda bu bileşikler renkli halkalar halinde kolonda gözlenip, farklı kaplarda toplandı. Maddelerin renkli olmaması durumunda ise; bileşenleri saf halde elde edebilmek için toplama kabı sık aralıklarla (100'er ml'lik erlenlerde) değiştirildi. Benzer fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi yardımıyla birleştirildi.

3.9.2 İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde, alüminyum üzerine silikagel kaplı hazır plaklardan (20 x 20 cm) (Merck 1.05554) ve cam plaklardan (20 x 20 ; 20 x 10) yararlanıldı.

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 °C'de 5 dakika bekletilerek belirgin lekeler gözlenmesi sağlandı. İnce tabaka kromatografisinde maddelere özgü Rf değerleri sayesinde farklı maddeler ayırt edilebildi.

Ayrıca preparatif ince tabaka kromatografisi; az miktardaki karışımlardan istenilen maddeyi ayırt etmek için uygulandı. Önce analitik çalışılıp uygun koşullar belirlendi. Bu yöntemde içindeki bileşikler ayrı ayrı izole etmek istediğimiz madde; plaklara başlangıç çizgisi boyunca düzgün bir şekilde tatbik edildikten sonra maddelerin ayrılmasına olanak verecek uygun polariteye sahip 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.

3.10 Spektroskopik Yöntemler

3.10.1 NMR (Nükleer Magnetik Rezonans) Spektroskopisi

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, ^1H - ^1H 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) ve döterodimetilsülfoksit (CD_3SOCD_3) kullanıldı. Saf bileşiklerin ^1H NMR analizleri 600 MHz, ^{13}C NMR analizleri 150 MHz Varian ID-6508 indirect problu cihazlarda UME-TÜBİTAK'ta yapılmıştır.

3.10.2 KÜTLE SPEKTROSKOPİSİ

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin NMR sonuçları değerlendirildikten sonra kütle spektroskopisi yardımıyla kesin sonuçlar elde edildi. Kütle spektrumları (+) APCI (Positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization) metoduyla LCQ-Deca Ion Trap cihazıyla UME-TÜBİTAK'ta alınmıştır.

Ayrıca bileşiklere ait erime noktaları tayini Buchi (Dr. Tottoli) cihazında UME-TÜBİTAK'ta tayin edilmiştir.

4. BULGULAR

Bitki örneklerinin tamamı gölgede kurutulduktan sonra küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan *Ferulago idaea* (222,9 g) ve *Ferulago trojana* (726,8 g)'nın öncelikle oda sıcaklığında diklorometan ile ekstraksiyonları (3 gün × 2) yapıldı. Daha sonra diklorometan ile tüketilen bitkilerin oda sıcaklığında metanol ekstraksiyonları (3 gün × 2) yapıldı. Rotaevaporatörde çözücüleri uçurulduktan sonra ekstreler elde edildi. Çizelge 4.1'de kuru toz halindeki bitki örneklerinin ve bunlardan hazırlanan ekstrelerin miktarları ve % verimleri verilmiştir:

Çizelge 4.1: Kuru bitki miktarları, ekstre miktarları ve % verimleri

<i>Ferulago</i> Türleri	Kuru Toz Bitki	Ekstreler	Ekstre Miktarları	% Verim
<i>Ferulago idaea</i>	222,9 g	<i>F. idaea</i> DCM <i>F. idaea</i> MeOH	16 g 8 g	% 7,18 % 3,59
<i>Ferulago trojana</i>	726,8 g	<i>F. trojana</i> DCM <i>F. trojana</i> MeOH	8 g 70 g	% 1,1 % 9,63

4.1 Toplam Fenolik ve Flavonoid Miktar Tayini Sonuçları

Fenolik bileşikler serbest radikallerin giderimi aşamasında önemli rol oynamaktadır. Fenollerdeki hidroksil grupları, radikalleri yok ederler ve sistemin antioksidan etkisine doğrudan katkıda bulunurlar [65].

Toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi, toplam flavonoit içerikleri ise kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi [64].

Ferulago idaea ve *Ferulago trojana* bitkilerinin metanol ekstreleri diklorometan ekstrelerine göre daha yüksek flavonoid ve fenolik madde içermektedir.

Çizelge 4.2: *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının fenolik ve flavonoid madde içerikleri^a

Ekstreler	Fenolik içerik (µg PEs/mg ekstre) ^b	Flavonoid içerik (µg QEs/mg ekstre) ^c
<i>F. idaea</i> DCM	16,50±2,33	20,94±0,40
<i>F. idaea</i> MeOH	33,22±0,91	42,70±1,45
<i>F. trojana</i> DCM	16,72±1,84	16,95±0,30
<i>F. trojana</i> MeOH	40,37±1,26	31,83±2,58

^a Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması şeklinde verilmiştir.

^b Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik miktarı

^c Kersetine eşdeğer flavonoid içerik miktarı

4.2 Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

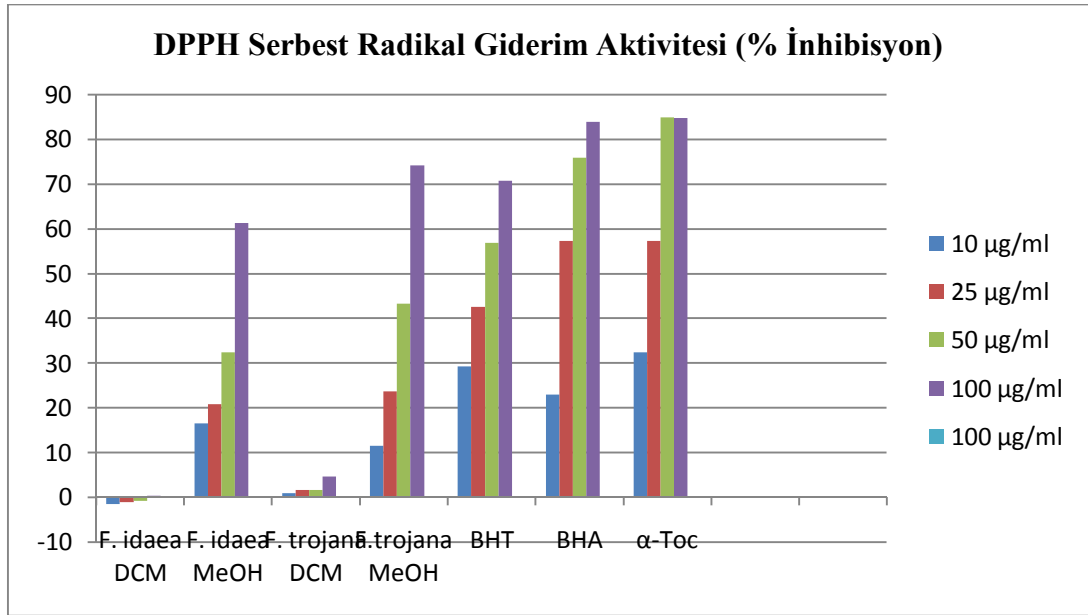
4.2.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları

Ferulago idaea ve *Ferulago trojana* bitkilerinin DPPH serbest radikali 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.

Çizelge 4.3: *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon)

Ekstreler/Standartlar	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
<i>F. idaea</i> DCM	-1,45	-1,07	-0,72	0,36
<i>F. idaea</i> MeOH	16,52	20,81	32,45	61,26
<i>F. trojana</i> DCM	0,97	1,69	1,67	4,74
<i>F. trojana</i> MeOH	11,6	23,63	43,34	74,14
BHT*	29,22	42,57	56,87	70,77
BHA*	23,03	57,31	75,95	83,9
α-Toc*	32,36	57,24	84,83	84,71

*Standart



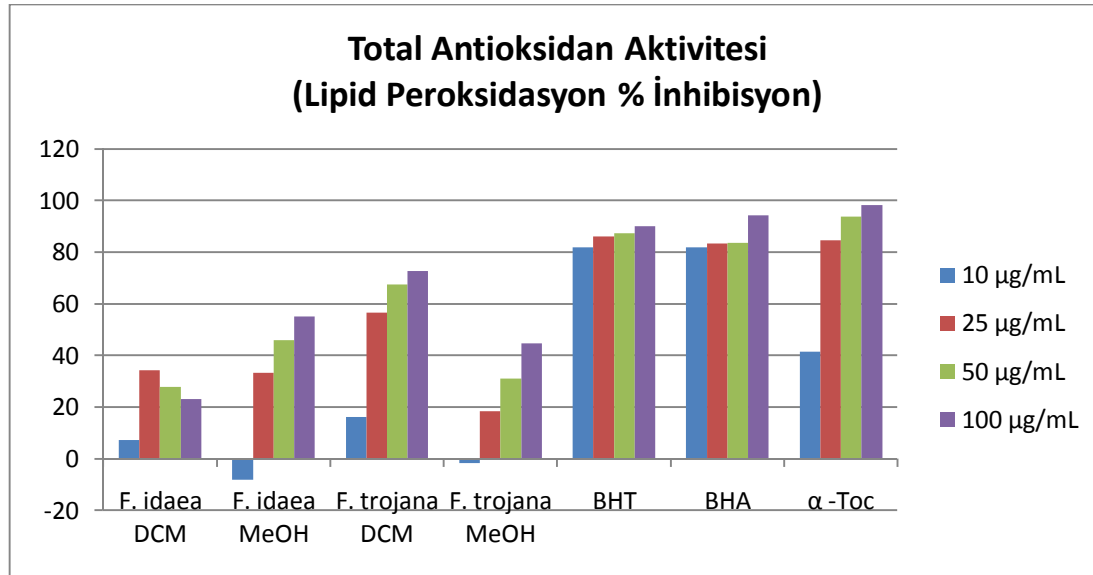
Şekil 4.1: *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% İnhibisyon)

4.2.2 β-Karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi sonuçları

Ferulago idaea ve *Ferulago trojana* bitkilerinin hazırlanan diklorometan ve metanol ekstrlerinin toplam antioksidan aktiviteleri β-karoten renk açılım yöntemine göre dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) yapıldı. Antioksidan aktivite karşılaştırmalarında standart olarak BHT, BHA, α-tokoferol kullanıldı. Bu yöntemde *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin metanol ekstrlerinin antioksidan aktivitelerinin standart olarak kullanılan BHT, BHA ve α-tokoferole kıyaslandığında nispeten iyi oldukları gözlemlendi. Tüm ekstrlerde konsantrasyonun artmasıyla antioksidan etki de artmaktadır.

Çizelge 4.4: *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrlerinin β-karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi (%inhibisyon)

Ekstreler/Standartlar	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
<i>F. idaea</i> DCM	7,21	23,16	27,86	34,40
<i>F. idaea</i> MeOH	-8,12	33,31	46,01	55,00
<i>F. trojana</i> DCM	16,16	56,56	67,62	72,82
<i>F. trojana</i> MeOH	-1,54	18,51	31,04	44,74
BHT*	81,8288	85,973353	87,248577	90,074196
BHA*	81,9063	83,287132	83,513079	94,348613
α –Toc*	41,5804	84,480891	93,687104	98,297602



Şekil 4.2: *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrlerinin β-karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi

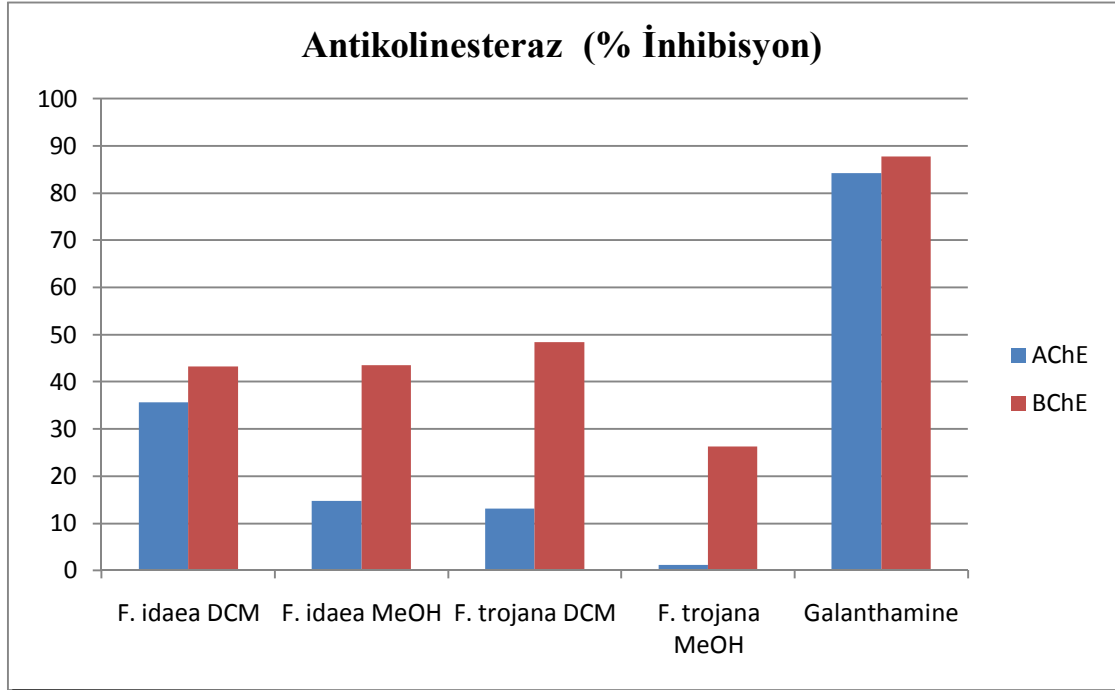
4.3 Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite Tayini Sonuçları

Ferulago idaea ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrlerinin antikolinesteraz aktiviteleri Ellman metoduyla tayin edildi.

Çizelge 4.5: *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrlerinin antikolinesteraz aktivitesi (% inhibisyon)

Ekstreler	AChE	BChE
<i>F. idaea</i> DCM	35,71±1,50	43,23±0,55
<i>F. idaea</i> MeOH	14,77±1,94	43,47±0,15
<i>F. trojana</i> DCM	13,11±0,28	48,38±0,03
<i>F. trojana</i> MeOH	1,14±0,48	26,29±2,81
Galanthamine*	84,24±0,73	87,72±0,80

*Standart



Şekil 4.3: *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının antikolinesteraz aktivitesi (% inhibisyon)

4.4 *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* Bitkilerinin Diklorometan ve Metanol Ekstrelerinin Kimyasal İçeriği

4.4.1 *Ferulago idaea* bitkisinin diklorometan ekstresinin fraksiyonlandırılması

Ferulago idaea (222,9 g) bitkisinin tamamı küçük parçalara ayrıldıktan sonra üçer gün ardarda iki kez oda sıcaklığında diklorometan ile masere edildi. Çözücüsü uçurulduktan sonra elde edilen ekstre kısmı 16 g olarak belirlendi. Ekstre; 3 cm çaplı ve 86 cm boyundaki kolonda silikajelin adsorban olarak kullanıldığı kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı. Fraksiyonlandırma işlemine %100 petrol eteriyle başladıktan sonra polarite gittikçe artırılarak önce %100 diklorometan, sonra %100 aseton ve daha sonra %100 metanol çözücü sistemlerinin ardından kolon kromatografisi sonlandırıldı. Benzer fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi kullanılarak birleştirildi.

İzole edilen bileşiklerden izoimperatorin bileşiği; *Ferulago idaea* bitkisinin diklorometan ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde %20 diklorometan-%80 petrol eteri çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyona küçük kolon kromatografisi uygulandığında %20 diklorometan-%80 petrol eteri çözücü sistemi ile izole edilmiştir.

İzole edilen bileşiklerden 3'-*epidecursin* bileşiği; *Ferulago idaea* bitkisinin diklorometan ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde %30 diklorometan-%70 petrol eteri çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyonun preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılması sırasında elde edilen 7. bileşiğe yeniden preparatif ince tabaka kromatografisi uygulandığında 3. bileşik olarak izole edilmiştir.

4.4.2 *Ferulago trojana* bitkisinin diklorometan ve metanol ekstralarının fraksiyonlandırılması

Ferulago trojana (726,8 g) bitkisinin tamamı küçük parçalara ayrıldıktan sonra üçer gün ardarda iki kez oda sıcaklığında diklorometan ile masere edildi. Çözücüsü uçurulduktan sonra elde edilen ekstre kısmı 8 g olarak belirlendi. Ekstre; 3,5 cm çaplı ve 67 cm oyundaki kolonda silikajelin adsorban olarak kullanıldığı kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı. Fraksiyonlandırma işlemine %100 petrol eteriyle başladıktan sonra polarite gittikçe artırılarak önce %100 diklorometan, sonra %100 aseton ve daha sonra %100 metanol çözücü sistemlerinin ardından kolon kromatografisi sonlandırıldı. Benzer fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi kullanılarak birleştirildi.

Diklorometan ile tüketilen *Ferulago Trojana* bitkisi üçer gün ardarda iki kez oda sıcaklığında metanol ile masere edildi. Çözücüsü uçurulduktan sonra elde edilen ekstre kısmı 70 g olarak belirlendi. Ekstre; 3 cm çaplı ve 86 cm boyundaki kolonda silikajelin adsorban olarak kullanıldığı kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı. Fraksiyonlandırma işlemine %100 diklorometan ile başladıktan sonra polarite arttırılarak %100 aseton ve daha sonra %100 metanol çözücü sistemlerinin ardından kolon kromatografisi sonlandırıldı. Benzer fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi kullanılarak birleştirildi.

İzole edilen bileşiklerden bergapten bileşiği; *Ferulago trojana* bitkisinin metanol ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde %5 aseton-%95 diklorometan çözücü sistemi ve %15 aseton-%85 diklorometan çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyonların preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılması sonucu izole edilmiştir.

İzole edilen bileşiklerden izoimperatorin bileşiği; *Ferulago trojana* bitkisinin diklorometan ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde %100 diklorometan çözücü sistemi elde edilen fraksiyona küçük kolon kromatografisi uygulanması

sonucunda %75 petrol eteri-%25 diklorometan çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyonun preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılması sonucu izole edilmiştir.

İzole edilen bileşiklerden 3'-epidecursin bileşiği; *Ferulago trojana* bitkisinin diklorometan ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde %100 diklorometan çözücü sistemi elde edilen fraksiyona küçük kolon kromatografisi uygulanması sonucunda %45 petrol eteri-%55 diklorometan çözücü sistemi ile elde edilen fraksiyonun preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılması sonucu izole edilmiştir.

İzole edilen bileşiklerden 3,6-dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on bileşiği; *Ferulago trojana* bitkisinin diklorometan ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde %30 diklorometan-%70 petrol eteri çözücü sistemi elde edilen fraksiyonun preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılması sonucu izole edilmiştir.

İzole edilen bileşiklerden izomaltol bileşiği; *Ferulago trojana* bitkisinin metanol ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde %2 aseton-%98 diklorometan çözücü sistemi elde edilen fraksiyonun preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılması sonucu izole edilmiştir.

İzole edilen bileşiklerden izomaltol-3 β -O-glukozit bileşiği; *Ferulago trojana* bitkisinin metanol ekstresine uygulanan kolon kromatografisinde %2 metanol-%98 aseton çözücü sistemi elde edilen fraksiyonun preparatif ince tabaka kromatografisi ile saflaştırılması sonucu izole edilmiştir.

4.4.3 Elde edilen saf bileşiklerin yapı tayini

***Ferulago idaea*'dan Elde Edilen Saf Bileşikler**

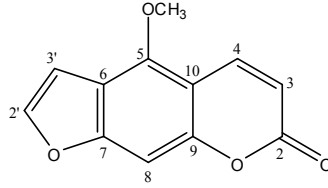
- İzimperatorin
- 3'-Epidecursin

***Ferulago trojana*'dan Elde Edilen Saf Bileşikler**

- Bergapten
- İzimperatorin
- 3'-Epidecursin
- 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on
- İzomaltol
- İzomaltol-3 β -O-glukozit

Çizelge 4.6: Saf bileşikler/Kuru bitkiler % verimi

Saf Bileşikler	Kuru Bitki Miktarları	İzole Edilen Saf Bileşik Miktarı	% Verim
Bergapten	<i>F. trojana</i> =726,8 g	2,5 mg	$3,43 \times 10^{-4}$
İzoimperatorin	<i>F. idaea</i> =222,9 g <i>F. trojana</i> =726,8 g	5 mg 35 mg	$2,24 \times 10^{-3}$ $4,81 \times 10^{-3}$
3'- <i>Epidecursin</i>	<i>F. idaea</i> =222,9 g <i>F. trojana</i> =726,8 g	1 mg 6,5 mg	$4,48 \times 10^{-4}$ $8,94 \times 10^{-4}$
3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on	<i>F. trojana</i> =726,8 g	10 mg	$1,37 \times 10^{-3}$
İzomaltol- 3 β -O-glukozit	<i>F. trojana</i> =726,8 g	2 g	0,274
İzomaltol	<i>F. trojana</i> =726,8 g	7,1 mg	$1,03 \times 10^{-3}$

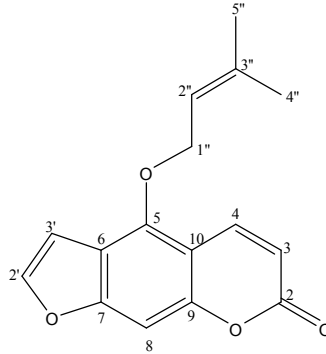
Bergapten; 5-metoksipsoralen**Şekil 4.4:**Bergapten**Çizelge 4.7:** Bergapten bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri (CDCl_3)

Pozisyon	H (J=Hz)
3	6.275 (d, 9.4,1H)
4	8.164 (d, 9.4,1H)
8	7.161 (s, 1H)
2'	7.598 (d, 2.4,1H)
3'	6.959 (d, 2.4,1H)
-OCH ₃	4.28 (s, 3H)

Beyaz renkli iğne şeklinde kristaller halinde elde edilmiştir, erime noktası 186 ° olarak bulunmuştur. UV ışık altında (254 nm) parlak mavi renkli olarak görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında sarı renkte gözlendi. Kumarinlerin UV ışık altında parlak mavi renkte izlenmesi nedeniyle izole edilen bu bileşiğin kumarin olabileceği düşünüldü. Bileşiğin ^1H NMR spektrumunda

6,275 ppm ve 8,164 ppm'de 9.4 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği izlenimini arttırmıştır. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 7,161 ppm'de singlet, 6,959 ve 7,598 ppm'lerde dubletler olarak izlenmiştir. 4,28 ppm'de ise singlet olarak gözlenen üç protonluk sinyal ise molekülde bir sübstitüent olarak bir metoksi grubunun varlığını ortaya koymuştur. Basit bir kumarin halkasına bu üç proton ve bir metoksi grubu yerleştirilemeyeceğinden dubletlerin *J* değerlerinin 2,4 Hz olması yapıya bir furan halkasının kondanse olabileceğini düşündürmüştür. UV max absorpsiyon bantları 310 ve 250 nm de izlendi. Yapıdaki metoksi grubunun C-5 ya da C-8 den hangisine yerleşmiş olabileceği literatür araştırması sonucunda C-5 olarak belirlendi, kütle spektrumunda moleküler piki m/z 216 da ($[M^+]$ ($C_{12}H_8O_4$)) izlendi. Metoksi grubunun çıkışı ise M-31 piki m/z 185te izlendi. Alınan spektrumlara ve fiziksel özelliklerine dayanarak bu bileşiğin yapısının *Ferulago* türlerinden daha önce de izole edilen [15] ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan bergapten olduğu anlaşılmıştır [71].

İzoimperatorin; 5-İzopenteniloksipsoralen



Şekil 4.5: İzoimperatorin

Çizelge 4.8: İzoimperatorin bileşiği 1H - ve ^{13}C NMR verileri ($CDCl_3$)

Pozisyon	H (<i>J</i> =Hz)	C
2	-	161.322
3	6.275 (d, 9.4, 1H)	112.556
4	8.164 (d, 9.4, 1H)	139.823
5	-	148.956
6	-	114.226
7	-	158.129
8	7.161 (s, 1H)	94.239
9	-	152.660
10	-	107.537
2'	7.598 (d, 2.4, 1H)	144.881
3'	6.959 (d, 2.4, 1H)	105.025
1''	4.922 (d, 7, 2H)	69.749

Çizelge 4.8(devam): İzomerin bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri (CDCl_3)

Pozisyon	H ($J=\text{Hz}$)	C
2''	5.539 (qt, 7, 1H)	119.088
3''	-	139.586
4''	1.803 (s, 3H)	25.795
5''	1.701 (s, 3H)	18.202

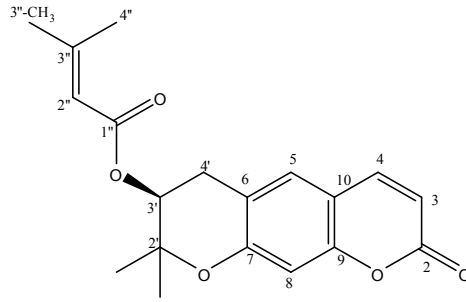
Sarı renkli kristaller şeklinde elde edilen bu bileşiğin erime noktası 108° bulunmuştur. UV ışık altında (254 nm) parlak mavi renkte gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C 'de 5 dakika yakıldığında sarı renkte gözlemlendi. Kumarinlerin UV ışık altında parlak mavi renkte görünmesi bu bileşiğin de bir kumarin olma olasılığını akla getirmiştir.

Bileşiğe ait ^1H - NMR spektrumunda 6,275 ppm ve 8,164 ppm'de 9.4 Hz'lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği izlenimini kuvvetlendirmiştir. Ayrıca bileşiğe ait ^{13}C - NMR spektrumu incelendiğinde 161,322 ppm'de izlenen ve konjuge karbonil karbonuna ait olabileceğine işaret eden karbon sinyali kumarin yapısını doğrulamıştır. Bileşiğe ait üç aromatik proton sinyali 7,161 ppm'de singlet, 6,959 ve 7,598 ppm'lerde dubletler olarak izlenmiştir. Bu dubletlerin J değerlerinin 2,4 Hz olması yapıda bir furan halkasının olabileceğini düşündürmüş, HSQC NMR spektrumu da direkt proton-karbon ilişkisini göstererek bu durumu doğrulamıştır.

Kumarin bileşiğine furan halkasının düzlemsel ya da açısallık olarak kondanse olma ihtimali olmakla birlikte tek ve çift boyutlu NMR teknikleriyle alınan spektrumların üzerinde olası yapıların araştırılması sonucu furan halkasının yapıya doğrusal olarak kondanse olduğu belirlenmiştir. Singlet olarak izlenen 7,161 sinyali de doğrusal furano kumarinlerdeki H-8 protonunun kimyasal kayması için çok karakteristik olduğundan bileşiğin ana iskeletinin furanokumarin olduğu kesinleştirilmiştir. 222, 250, 259, 267 ve 310 nm de gözlenen UV absorpsiyon bantları [(MeOH) λ_{max} 222 (ϵ 21700); 250 (ϵ 16000); 259 (ϵ 14300); 267 (ϵ 13900); 310 (ϵ 12400)] furanokumarinlerin absorpsiyon bantları ile uyumluluk göstermiştir. Ayrıca yapıda 5 karbonlu bir sübstitüentin varlığı ^1H - ve ^{13}C -NMR verisiyle anlaşılmıştır. 5,539 ppm'de qt olarak rezonans olan olefinik proton (^{13}C δ 119.088) ve buna allilik konumdaki metillerin 1,7 ve 1,8 ppm'de izlenmesi (^{13}C δ 18.202 ve 25.795) ve ayrıca iki protonluk 7 Hz'lik dublet olarak izlenen oksimetilen grubuna ait sinyaller yan zincirin oksizopentil grubu olduğuna işaret etmiştir.

Bu durumda sübstitüentin yerleşebileceği yer ya C-5 veya C-8 olmakla birlikte biyojenetik olarak sübstitüentin C-5 te olduğu NMR verileri ve özellikle HMBC spektrumuyla (hem 4.9 ppm de izlenen oksimetilen protonlarının hem de 8.164 deki H-4 protonunun üç bağ uzaklıktaki C-5 ile korelasyon yapması nedeniyle) ve literatürdeki [70] değerlerle karşılaştırılarak kesinleştirilmiştir. ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC spektrumları ve MS sonuçları değerlendirildiğinde yapının moleküler piki 270 ($[\text{M}^+]$ ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$)) olan ve *Ferulago* türlerinden daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan izoimperatorin olduğu anlaşılmıştır.

3'-Epidecursin; Dihydroxanthyletin=Aegelinol



Şekil 4.6: 3'-Epidecursin

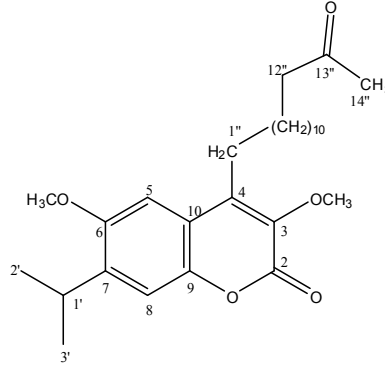
Çizelge 4.9: 3'-Epidecursin bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri (CDCl_3)

Pozisyon	H ($J=\text{Hz}$)	C
2	-	161.2
3	6.21 (d, 9.5, 1H)	113.1
4	7.59 (d, 9.5, 1H)	143.1
5	7.21 (s, 1H)	128.6
6	-	115.9
7	-	156.4
8	6.74 (s, 1H)	104.6
9	-	154.1
10	-	112.7
2'	-	76.7
3'	5.07 (t, 4.8, 1H)	69.0
4'	-	27.8
4' _a	3.18 (dd, 17.1 ve 4.7, 1H)	27.8
4' _b	3.25 (dd, 17.1 ve 4.7, 1H)	
1''	-	165.7
2''	5.55 (m, 1H)	115.5
3''	-	158.4
3''-CH ₃	2.1 (s, 3H)	20.3
4''	1.85 (s, 3H)	27.4
2'-CH _{3a}	1,18(s,3H)	24,1
2'-CH _{3b}	1,20(s,3H)	24,4

Sarı renkli iğne şeklinde kristaller halinde elde edilen bu bileşiğin erime noktası 111-112°C bulunmuştur. UV ışık altında (254nm) parlak mavi olarak gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de 5 dakika yakıldığında sarı renkte gözlendi, dolayısıyla bu bileşiğin de bir kumarin olabileceği düşünüldü. Bileşiğe ait NMR spektrumları incelendiğinde, ¹H NMR spektrumunda 6,21 ppm ve 7,59 ppm’de 9.5 Hz’lik dubletler halinde gözlenen sinyaller bu yapının kumarin olabileceği ihtimalini kuvvetlenmiştir. Ayrıca bileşiğe ait ¹³C NMR spektrumu incelendiğinde 161,2 ppm’de izlenen ve karbonil karbonuna ait olabileceğini işaret eden karbon sinyali kumarin yapısını doğrulamıştır. ¹H NMR spektrumunda ayrıca iki singlet sinyali 7,21 ve 6,74 ppm’lerde gözlenmiştir, bu durum kumarinin 5 ve 8 nolu karbonlarında herhangi bir süstitüent taşımadığını ve ancak 6 ve 7 numaralı karbonlarından süstitüe olabileceğini düşündürmüştür. ¹³C NMR spektrumu bileşiğin 19 carbon atomu taşıdığını göstermiştir ve kumarin halkasının karakteristik karbonilinin yanısıra 165,7 ppm’de gözlenen sinyal bileşikte bir ester karbonil grubunun (veya 5 li lakton halkalarının) varlığına işaret etmiştir. Bileşikte 3.18 ve 3.25 de izlenen proton çifti (AB protonları) yapıda ya oksijene komşu ya da benzilik bir metilen grubunun varlığına işaret etmiştir. HSQC spektrumu bu protonların 27.8 ppm de rezonans olan karbona bağlı olduğunu, dolayısıyla benzilik metilen grubunun varlığını ispatlamıştır. Ayrıca ¹H NMR spektrumunda izlenen iki metil grubunun 1,18 ve 1.20 ppm de rezonans olması bu metillerin oksijen taşıyan bir karbona bağlı olabileceğini düşündürmüş, nitekim bu metillerin gerek 76.7 ppm gerekse 69.0 ppm’de çıkan karbonlarla HMBC gösterdiği izlenmiştir. Bu iki metil protonunun bağlı olduğu karbon olarak saptanan C-2’(δ 76.7) nin 27.8 ppm deki benzilik protonlarla HMBC korelasyonu kumarin halkasına C-6 ve C-7 den bağlı grubun piran halkası olduğunu ve süstitüentlerin dizilişinin belirlenmesini sağlamıştır. Oksijene bağlı C-2’ ye iki metil grubunun bağlı olduğu belirlenmişti, yanı sıra bileşiğin taşıdığı diğer süstitüentin yapısını belirlemek için öncelikle ¹H NMR, ¹³C NMR ve HSQC spektrumlarındaki direk H-C korelasyonları saptandı. Olefinik protonun 5,55 ppm’de ve buna allilik konumdaki metillerin 2,1 ve 1,8 ppm’de gözlenmesi yapıda bir izobütillen grubunun varlığını gösterdi. Daha sonra HSQC spektrumuyla bu protonların bağlı olduğu karbonlar belirlendi, ve takiben ¹³C NMR spektrumunda ester grubuna ait 165.7 ppm’deki H-3’ (δ 5.07) ile ester karbonili arasında 3 bağık HMBC korelasyonunun izlenmesi C-3’ dan bağı yan zincirin

izobutilen ester grubu olarak saptanmasını sağladı. Tüm 1D- and 2D- NMR (^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC) spektrumları ve kütle spektrumu sonuçları değerlendirildiğinde [72-73] moleküler piki m/z 328'de ($[\text{M}^+]$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{O}_5$)) izlenen yapının *Ferulago* türlerinden daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan 3'-*Epidecursin* olduğu belirlenmiştir.

3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on



Şekil 4.7: 3,6-Dimetoksi-7-izopropil-tetradeka-13''-on

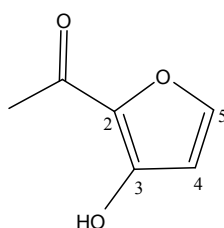
Çizelge 4.10: 3,6-Dimetoksi-7-izopropil-4-tetradekakumarin-13''-on bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri (CD_3OD)

Pozisyon	H ($J=\text{Hz}$)	C
2	-	168.258
3	-	130.234
4	-	124.210
5	6.68 (s, 1H)	114.193
6	-	151.825
7	-	135.109
8	6.72(s, 1H)	109.264
9	-	150.492
10	-	114.193
3-OCH ₃	3.803 (s, 3H)	56.203
6- OCH ₃	3.780 (s, 3H)	56.341
1'	3.29 (septet, 1H)	26.778
2'	1.21 (d, 7.1, 3H)	22.892
3'	1.21(d, 7.1, 3H)	22.892
-(CH ₂) _{1''}	2,28 (m, 2H)	37.416
-(CH ₂) _{2''}	2,05 (m, 2H)	31.938
-(CH ₂) _{3'', 11''}	1,62 (m, 4H)	29.603
-(CH ₂) _{4''-10''}	1,25-1,30 (14H)	29.428-29.345
C=O	-	202.993
(CH ₃) _{14''}	2,2 (s, 3H)	16.042

Beyaz-sarı renkli olan bu bileşik katı halde elde edildi. UV ışık altında (254 nm) koyu renkte gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de 5

dakika yakıldığında kahverengi olarak gözlemlendi. Bileşiğin ^1H NMR spektrumunda iki metoksi grubu izlendi ve kimyasal kayma değerlerinden bu grupların aromatik halkaya bağlı olduğu anlaşıldı. Ayrıca HMBC NMR spektrumunda 6-OCH₃ grubu protonları 151.825 ppm'deki C-6 (δ 151.825) ile üç bağ uzaklıktan korelasyon göstererek bunu doğruladı. Aromatik halkaya direkt bağlı bir izopropil grubunun varlığı ise 3,29 ppm'de bir metin ve iki dublet metiliyle septet olarak izlendi. İzopropil grubunun 3,29 ppm'de rezonans olan metin protonunun (H-1') C-7'den aromatik halkaya bağlı olduğu C-6 (δ 151.825) ve C-8 (δ 109.264) ile üç bağ uzaklıktaki etkileşimlerinin yanı sıra C-7 (δ 135.109) ile iki bağ uzaklıktaki etkileşiminin ve metil dubletlerinin C-7 (δ 135.109) ile üç bağ etkileşiminin HMBC spektrumu ile izlenmesiyle belirlendi. Dolayısıyla 6,68 ve 6,72 ppm'de izlenen singletlerin C-5 ve C-8 protonlarına ait olduğu belirlendi. Nitekim 6,72 singleti 124 ppm'deki C-4 ile üç bağ ve 6,68 singleti ise C-7 (δ 135.109) ve C-9 (δ 150.492) sinyalleri ile iki bağ uzaklıktan HMBC korelasyonu vererek bunu doğruladı. Kumarinler için karakteristik NMR sinyalleri olan 3 ve 4 numaralı 9,5 Hz'lik dublet protonlarının izlenmemesi yapının bir kumarin halkası olmasına rağmen 3 ve 4 numaralı karbonlardan süstitüe olduğuna işaret etti. C-4'ten bağlı bir yan zincirin varlığı ise gerek ^1H , gerekse kütle spektrumundan anlaşıldı. Kütle spektrumunda moleküler pikinin m/z 459'da ($[\text{M}^+]$ (C₂₈H₄₂O₅)) izlenmesi, bu yan zincirin molekül ağırlığının 211 olması gerektiğine işaret etti ve kütle spektrumunda 209 hatta 211 piklerinin izlenmesi bunu doğruladı. Yan zincirin 12 metilen grubu ve uçta bir asetil grubundan ibaret olduğu ^1H ve ^{13}C spektrumlarından izlendi. Karboksimetil grubunun 2,2 ppm'de singlet olarak izlenmesi ve buna karşılık gelen karbonun da 16,042 ppm'de izlenmesiyle belirlendi. Karbonil sinyali ise 202.993 ppm'de izlendi. Tüm NMR ve kütle spektrum verileri yapının 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on olduğunu gösterdi.

İzomaltol; 2-asetil-3-hidroksifuran



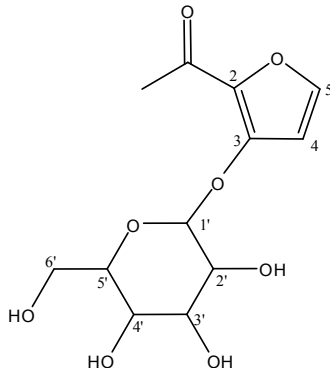
Şekil 4.8: İzomaltol

Çizelge 4.11: İzomaltol bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri (CDCl_3)

Pozisyon	H ($J=\text{Hz}$)	C
2	-	149.588
3	-	143.012
4	6,36 (d, 5.5, 1H)	112.821
5	7,64 (d, 5.5, 1H)	154.424
-C=O	-	172.589
-CH ₃	2,35 (s, 3H)	14.415

Turuncu renkli olan bu bileşik katı halde elde edildi. UV ışık altında (254nm) koyu renkte gözlenen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C 'de yakıldığında sarı renkte gözlemlendi. Bileşiğin erime noktasının $100\text{-}103^\circ$ aralığında olduğu tespit edilmiştir. ^1H NMR spektrumu incelendiğinde 6,36 ve 7,64 ppm'lerde 5,5 Hz'lik dubletler olarak gözlenen sinyaller yapıda furan halkası olduğunu düşündürmüştür. 2,35 ppm de üç protonluk bir singlet şeklinde gözlenen sinyal asetil metil grubunun varlığı anlaşılmıştır. Kütle spektrumunda moleküler piki $[\text{M}+1]$ olarak 127'de izlenmiştir. ^{13}C NMR spektrumuyla altı karbon içerdiği belirlenen bileşiğin HSQC NMR spektrumuyla proton taşıyan karbonları ayırt edilerek literatür bulguları ile karşılaştırılarak izomaltol olduğuna karar verilmiştir [74-75].

İzomaltol-3 β -O-glukozit; 3 β -O-Glukozilizomaltol



Şekil 4.9: İzomaltol-3 β -O-glukozit

Çizelge 4.12: İzomaltol-3 β -O-glukozit bileşiği ^1H - ve ^{13}C NMR verileri (CD_3OD)

Pozisyon	H ($J=\text{Hz}$)	C
2	-	164.714
3	-	143.767
4	6,443 (d, 5.9, 1H)	117.470
5	8.0 (d, 5.9, 1H)	157.294
-C=O	-	177.322
-CH ₃	2,462 (s, 3H)	15.909
1'	4,805 (d, 7.7, 1H)	105.606
2'	3,41 (t, 9, 1H)	78.152

Çizelge 4.12(devam): İzomaltol-3β-O-glukozit bileşiği ¹H- ve ¹³C NMR verileri

Pozisyon	H (J=Hz)	C
3'	3,38 (t, 1H)	75.553
4'	3,34 (dd, 8.4, 10.8, 1H)	71.238
5'	3,25 (ddd, 2.5, 5.3, 9.6, 1H)	78.688
6'	3.665 (dd, 5.2, 12, 1H)	62.669
	3.823 (dd, 2.4, 12, 1H)	

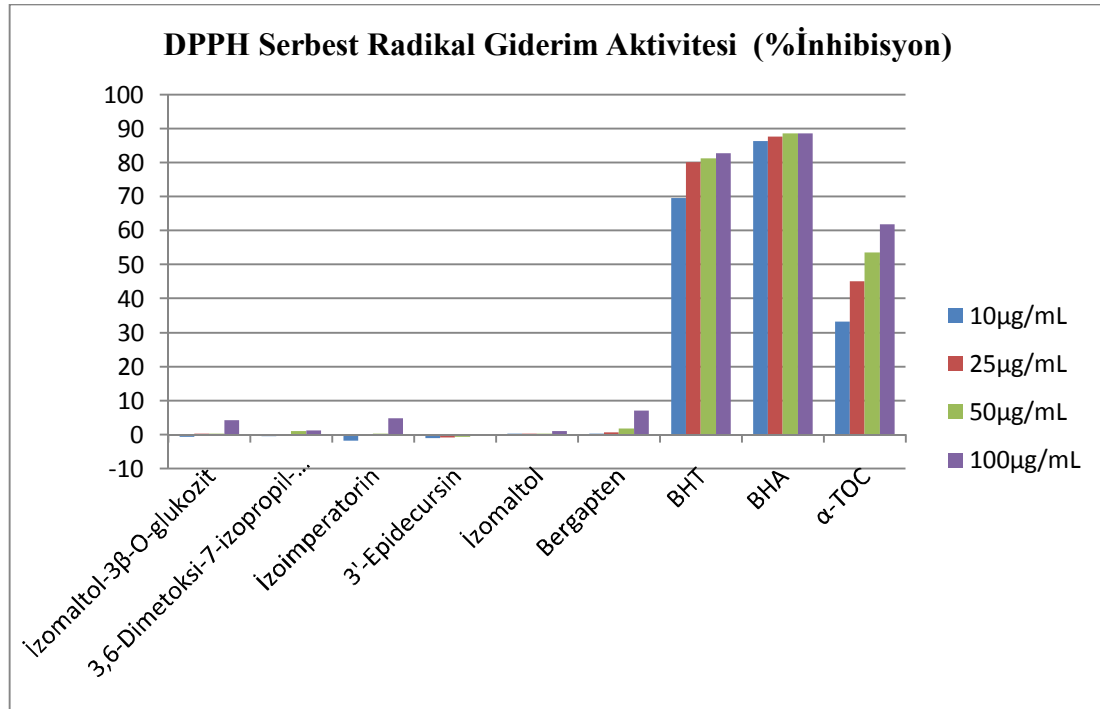
Sarı renkli piramidal kristaller halinde elde edilen bu bileşiğin erime noktası 158-160° olarak bulunmuştur. UV ışık altında (254 nm) sarı-kahverenkli görünümdeki bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında kahverengi olarak izlendi. Bileşiğin ¹H NMR spektrumu incelendiğinde 6,443 ve 8.0 ppm de gözlenen 5,9 Hz'lik sinyaller yapıda furan halkasının olduğunu düşündürmüştür. Bileşiğin COSY spektrumu H-4 (δ 6,443) ve H-5 (δ 8.0) protonlarının etkileşim içinde olduğunu, HMBC spektrumu H-5 (δ 8.0) ile C-4 (δ 117.470)'ün iki bağ, H-5 (δ 8.0) ile C-2 (δ 164.714)'nin üç bağ, H-4 (δ 6,443) ile C-5 (δ 157.294)'in iki bağ ve H-4 (δ 6,443) ile C-3 (δ 143.767)'ün iki bağ etkileşimi göstererek yapıda bir furan halkasına olduğuna işaret etmiştir. ¹³C NMR spektrumu incelendiğinde 177,322 ppm'de gözlenen sinyal yapıda bir karbonil grubu olması ihtimalini ortaya çıkarmıştır. Bileşiğe ait HMBC spektrumu incelendiğinde 8.0 ppm deki protonun karbonil karbonu ile dört bağ, 6.443 ppm deki protonun ise karbonil karbonu ile dört bağ etkileşim içinde olması karbonil grubunun furan halkasına C-2 pozisyonundan bağlanmış olduğunu göstermiştir. ¹H NMR spektrumunda 2.462 ppm de singlet olarak gözlenen sinyal ile yapıda metil grubunun varlığı anlaşılmıştır. HMBC spektrumu incelendiğinde metil grubuna ait protonların C-2 (δ 164.714) ile iki bağ ve C-3 (δ 143.767) ile 4 bağ etkileşim içinde olduğu ve böylece metil grubunun karbonil karbonuna bağlı olduğunu göstermiştir. Nitekim bileşiğin furan kısmının bir önceki izomaltol bileşiği ile aynı olabileceği ¹H- ve ¹³C NMR spektrumundan izlenmiştir. Bileşikte anomerik bir karbon ve buna bağlı protonun varlığı ise ¹H NMR spektrumunda 4,805 ppm'de 7,7 Hz'lik bir dublet ve ¹³C NMR spektrumunda ise 105,606 ppm'de gözlenen metin sinyalleri ile belirlenmiştir. HMBC spektrumunda H-1' (δ 4,805) protonunun C-3 (δ 143.767) ile üç bağ etkileşim ve COSY spektrumunda H-2' ile etkileşim içinde olduğu gözlemlendiğinden furan halkasına C-3 pozisyonundan bir şeker grubu bağlı olduğunu düşündürmüştür. COSY spektrumunda 3,665 ve 3.823 ppm'deki protonların geminal etkileşiminin

izlenmesi bu protonların glukoz grubuna ait sekonder alkol ($-\text{CH}_2\text{OH}$) protonları olduğunu göstermiştir. H-5' (δ 3,25)'in C-4' (δ 71.238) ile iki bağ, C-3' (δ 75.553) ile üç bağ etkileşim, H-4' (δ 3,34)'ın C-5' (δ 78,688) ile iki bağ, C-3' (δ 75.553) ile iki bağ, C-2' (δ 78,152) ile üç bağ etkileşim, H-2' (δ 3,41)'in C-3' (δ 75.553) ile iki bağ, C-4' (δ 71.238) ile üç bağ etkileşim içinde olması nedeniyle furan halkasına bağlı altı karbonlu bir şeker (heksoz) olduğu anlaşılmıştır. Bileşiğin kütle spektrumunda moleküler piki m/z 288 de ($[\text{M}^+]$ ($\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_8$)) izlenmiştir. Literatür taraması sonucu bu bileşiğin daha önce elde edilmiş izomaltol- α -glukoz olabileceğine düşündürmüş fakat anomerik protonun 7.7 Hz'lik bir etkileşim sabiti vermesi şekerin α -glukoz değil, β -glukoz olduğuna işaret etmiştir[74-75]. Tüm spektral veriler yapının izomaltol-3 β -O-glukozit olduğunu göstermiştir.

4.5.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

Çizelge 4.13: Saf maddeler için DPPH serbest radikal giderim aktivitesi

Saf Maddeler için DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi				
Saf Maddeler/Standartlar	10 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
İzomaltol-3 β -O-glukozit	-0,65	0,03	0,29	4,16
3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on	-0,51	-0,03	1,04	1,25
İzoimperatorin	-1,79	-0,20	0,20	4,77
3'-epidecursin	-1,08	-0,88	-0,59	-0,13
İzomaltol	0,12	0,12	0,31	1,00
Bergapten	0,29	0,60	1,69	6,96
BHT	69,49	80,17	81,29	82,69
BHA	86,33	87,63	88,52	88,49
α -TOC	33,24	45,12	53,48	61,81

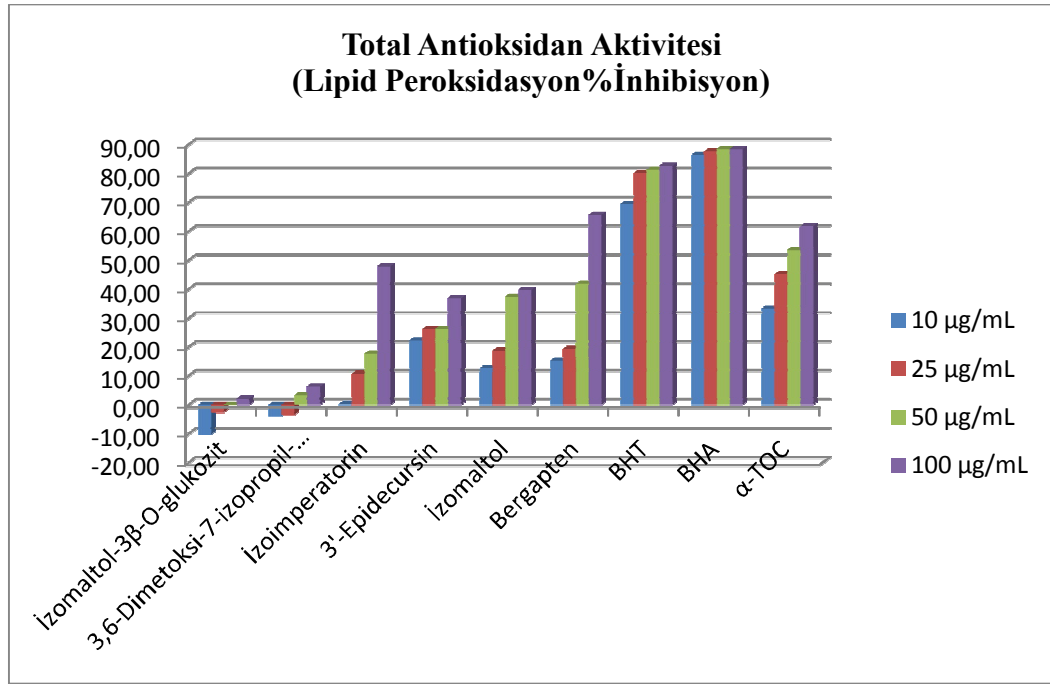


Şekil 4.10: Saf bileşikler DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (% inhibisyon)

4.5.2 β-Karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi

Çizelge 4.14: Saf bileşikler için β-karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi (% inhibisyon)

Saf Maddeler için β-Karoten-Linoleik Asit Toplam Antioksidan Aktivitesi				
Saf Maddeler/Standartlar	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
İzomaltol-3β-O-glukozit	-10,24	-2,62	-0,07	2,12
3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on	-3,97	-3,51	3,24	6,30
İzoioperatorin	0,24	10,76	17,74	47,88
3'-Epidecursin	22,22	26,12	26,28	36,89
İzomaltol	12,68	18,76	37,39	39,80
Bergapten	15,32	19,38	41,87	65,75
BHT	69,49	80,17	81,29	82,69
BHA	86,33	87,63	88,52	88,49
α-TOC	33,24	45,12	53,48	61,81

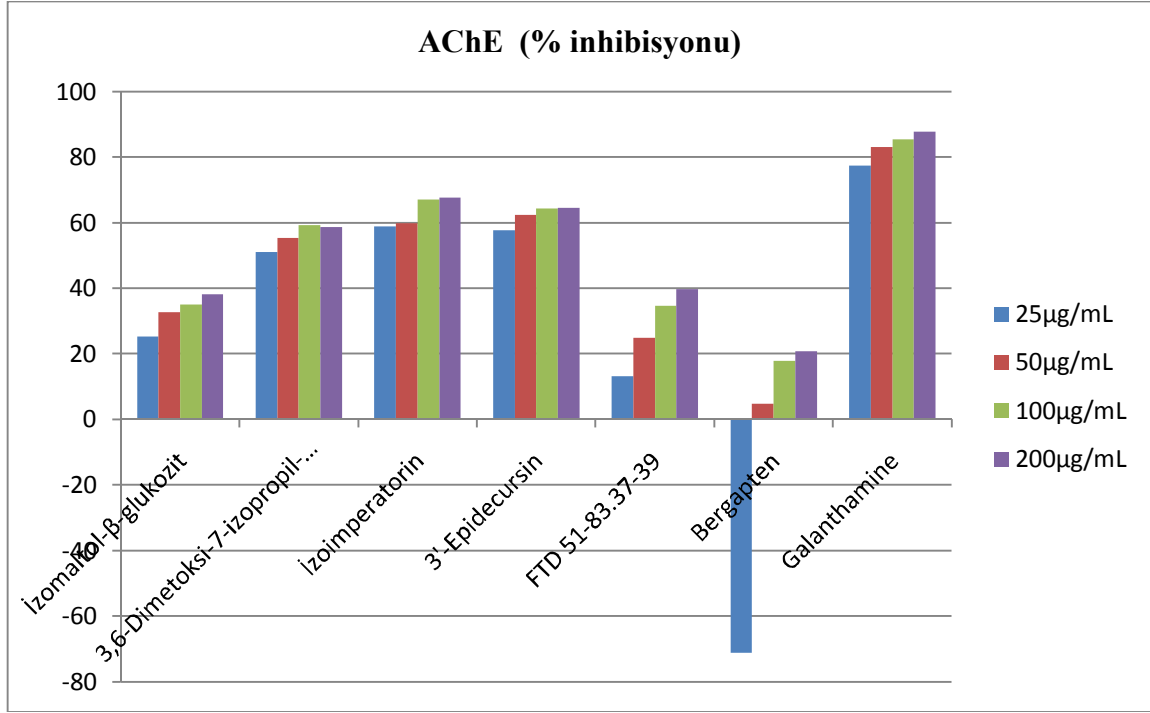


Şekil 4.11: Saf bileşikler için β -karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi (% inhibisyon)

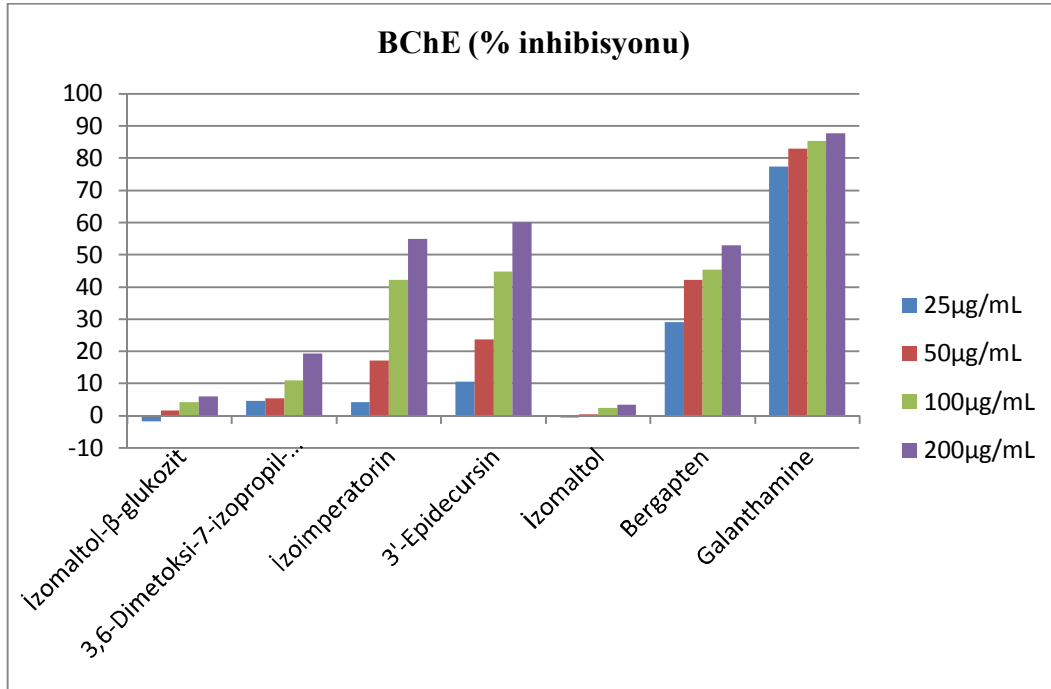
4.6 Saf Bileşiklerin Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Çizelge 4.15: Saf bileşiklerin antikolinesteraz aktivite sonuçları

Saf Maddeler	AChE				BChE			
Derişim	25µg/ mL	50µg/ mL	100µg/ mL	200µg/ mL	25µg/ mL	50µg/ mL	100µg/ mL	200µg/ mL
İzomaltol-3β-O-glukozit	34,95	38,21	32,66	25,31	-1,69	1,59	4,21	6,06
3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on	50,99	59,18	55,43	58,67	4,63	5,37	10,96	19,29
İzoiimperatorin	59,90	67,56	67,13	58,88	4,18	17,20	42,21	54,90
3'-Epidecursin	64,35	64,48	62,37	57,67	10,64	23,73	44,68	60,07
İzomaltol	39,70	34,72	13,23	24,81	-0,63	3,50	2,44	0,39
Bergapten	4,85	17,91	20,87	-71,13	29,04	45,34	52,98	42,19
Galanthamine	77,43	82,98	85,31	87,81	77,43	82,98	85,31	87,81



Şekil 4.12: Saf bileşikler için AChE (% inhibisyon)



Şekil 4.13: Saf bileşikler için BChE (% inhibisyon)

5.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Türkiye’de yetişen endemik iki *Ferulago* türünden (*Ferulago idaea* Ozhatay & E. Akalın ve *Ferulago trojana* E. Akalın & Pimenov) hazırlanan ekstrelerin sekonder metabolitlerinin izolasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Bugüne kadar *Ferulago* türlerinin sekonder metabolitleri, uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda *Ferulago* türlerinin sekonder metabolitlerinin başlıca kumarinler olmak üzere fenolik bileşikler ve diğer sekonder metabolitlerden ibaret olduğu anlaşılmıştır. *Ferulago* türünün ait olduğu Apiaceae (Umbelliferae) familyasına ait sekonder metabolitlerle yapılan aktivite çalışmaları sonucunda bu familyaya ait 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 başladıktan sonra, fraksiyonların küçük kolonlarla veya preparatif ince tabaka kromatografisiyle saflaştırılması ile devam edildi. Elde edilen bileşiklerin saflığı öncelikle ince tabaka kromatografisi ile kontrol edildikten sonra spektral analizleri (NMR ve MS) yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda *Ferulago idaea* bitkisinden bilinen iki saf bileşik (izoimperatorin ve 3'-epidecursin) izole edilirken, *Ferulago trojana* bitkisinden ise bilinen beş saf bileşik (izoimperatorin, 3'-epidecursin, bergapten, izomaltol ve izomaltol-3 β -glukozit) ve ilk kez izole edilen 3,6-dimetoksi-7-izopropilkumarin-tetradeka-13''-on bileşikleri elde edildi.

Hazırlanan diklorometan 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. Daha sonra ekstrelerden izole edilen saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri bu iki yöntem ile tayin edilmiştir. Bu iki

antioksidan aktivite testi sonucunda *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* bitkilerine ait metanol ekstreleri β -karoten renk açılım yöntemi ile yüksek lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi göstermemesine rağmen DPPH sisteminde her iki bitkinin metanol ekstresi iyi derecede aktivite göstermiştir. İzole edilen saf bileşiklerin ise DPPH sisteminde serbest radikal giderim aktivitesine sahip olmadıkları belirlenmiştir. Metanol ekstresinin aksine *F. trojana* bitkisinin diklorometan ekstresi kuvvetli toplam antioksidan kapasitesi (lipid peroksidasyonu inhibisyonu) göstermiştir, bu aktivite ekstrenin kumarinlerce zengin olmasına atfedilmiştir. Nitekim izolasyon sonucu elde edilen kumarinlerin hepsi bu ekstreden elde edilmiştir ve bunlardan bergaptenin en yüksek lipid peroksidasyonu inhibe edici özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir.

Hazırlanan diklorometan ve metanol ekstrelerinin ve bu ekstrelerden elde edilen saf bileşiklerin antikolinesteraz aktiviteleri Ellman metodu ile tayin edilmiştir. İzole edilen bileşikler genelde orta/iyi derecede antikolinesteraz aktivite göstermişlerdir. Bunlardan izomaltol-3 β -*O*-glukozit, edilen 3,6-dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on, izoimperatorin, 3'-*epidecursin* bileşiklerinin iyi derecede AChE inhibisyonu göstermiştir. BChE enzimi inhibisyonunda ise izoimperatorin, bergapten ve 3'-*epidecursin* bileşiklerinin orta derecede aktivite gösterdiği belirlenmiştir. Her iki antikolinesteraz aktivite testi sonucunda 3'-*epidecursin* bileşiğinin en aktif bileşik olduğu belirlenmiştir, nitekim bu bileşik lipid peroksidasyon inhibisyonu (β -karoten renk açılım yöntemi) testinde de oldukça iyi aktivite göstererek lipid peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi ile antikolinesteraz aktivitesi arasındaki paralellığe işaret etmiştir. Fakat bergapten en yüksek lipid peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi göstermesine rağmen, AChE'ye karşı hiç aktivite göstermemiş, buna karşın BChE'ye karşı farklı davranarak en yüksek aktiviteyi göstermiştir.

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 edilmesi ve hatta daha aktif türevlerinin sentezlenmesi ile yeni ajanlar bulunmasına katkısı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Saċli, 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] **Akalin, 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] **Erdemoglu, N., Akalin, E., Akgoc, M., Cikrikci, S., Bilsel, G.**, 2008: “Comparison of the Seed Oils of *Ferulago trachycarpa* Boiss. Different Localities with Respect to Fatty Acids”, *Martinus Nijhoff Publishers Rec. Nat. Prod.* **2:1**, 13-18.
- [6] <http://www.balikesir-cevreorman.gov.tr/endemik_detay.asp?kd_end_ID=2> alındığı tarih 13.04.2010.
- [7] **Ozhatay, N., Akalin, E.**, 2000: “A New Species of *Ferulago* W. Koch (Umbelliferae) From North-west Turkey”, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **133**: 535-542.
- [8] **Akalin, E., Pimenov, M.**, 2004: “*Ferulago trojana* (Umbelliferae), a new species from western Turkey”, *Botanical Journal of the Linnean Society*, **146**: 499-504.
- [9] **Satır, E., Kılıc, C. S., Coskun, M.**, 2009: Prantschimgin Content of Methanolic Extract of Roots of *Ferulago Platycarpa*. *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. **45**, Number 6, 872-873.
- [10] **Rosselli, S., Maggio, A. M., Faraone, N.**, 2009: The Cytotoxic Properties of Natural Coumarins Isolated from Roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae) and of Synthetic Ester Derivatives of Aegelinol. *Natural Product Communications*. Vol. **4**, issue 12, 1701-1706.
- [11] **Basile, A., Sorbo, S., Spadaro, V., Bruno, M., Maggio, A., Faraone, N., Rosselli, S.**, 2009: Antimicrobial and Antioxidant Activities of Coumarins from the Roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). *Molecules*. Vol. **14**, issue 3, 939-952.
- [12] **Alkhatib, R., Hennebelle, T., Raummy, V.**, 2009: Coumarins, Caffeoyl Derivatives and a Monoterpenoid Glycoside from *Ferulago*

asparagifolia. *Biochemical Systematics and Ecology*. Vol. **37**, issue 3, 230-233.

- [13] **Kılıc, C. S., Okada, Y., Coskun, M., Okuyama, T.**, 2006: New Furanocoumarins Isolated from Roots of *Ferulago isaurica* Pesmen Growing in Turkey. *Heterocycles*. Vol. **69**, issue 1, 489-+.
- [14] **Kılıc, C. S., Coskun, M.**, 2006: Felamedin and Prantschimgin contents of Chloroform Fractions of *Ferulago isaurica* and *F. syriaca* Growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*. Vol. **42**, issue 3, 351-352.
- [15] **Jimenez, B., Gr, G., Cannizzo, S., Amico, V., Bizzini, M., Piattelli, M., ande, M. C., Anaya, J., Torres, P., Grade, M.**, 2000: Coumarins from *Ferulago capillaris* and *F. brachyloba*. *Phytochemistry*, **53**, 1025-1031.
- [16] **Ruberto**, 1994: Chemical Constituents of *Ferulago nodosa*. *Journal of Natural Products-Lloydia*. Vol. **57**, issue 12, 1731-1733.
- [17] **Doganca, S., Ulubelen, A., Tuzlacı, E.**, 1991: 1-Acetylhydroquinone 4-galactoside from *Ferulago aucheri*. *Phytochemistry*. Vol. **30**, issue 8, 2803-2805.
- [18] **Maggi, F., Trillini, B., Papa, F.**, 2009: Chemical Composition and Antimicrobial Activity of The Essential Oil of *Ferulago Campestris* (Besser) Grecescu Growing in Central Italy. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. **24**, issue 6, 309-315.
- [19] **Ozkan, A. M. G., Demirci, B., Demirci, F., Baser, K. H. C.**, 2008: Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Ferulago longistylis* Boiss. Fruits. *Journal of Essential Oil Research*. Vol. **20**, issue 6, 569-573.
- [20] **Aklaghi, H.**, 2008: Chemical Composition of The Essential Oil from The Aerial Parts of *Ferulago angulata* (Schlecht) Boiss. From Northeast Iran. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. Vol. **11**, issue 5, 544-547.
- [21] **Erdurak, C. S. Coskun, M., Demirci, B., Baser, K. H. C.**, 2006: Composition of The Essential Oil of Fruits and Roots of *Ferulago isaurica* Peşmen and *F. syriaca* Boiss.(Umbelliferae) from Turkey. *Flavour and Fragrance Journal*. Vol. **21**, issue 1, 118-121.
- [22] **Samiee, K., Akhgar, M. R., Rustaiyan, A., Masoudi, S.**, 2006: Composition of The Volatiles of *Ferulago carduchorum* Boiss. Et Hausskn. And *Levisticum officinale* Koch. Obtained by Hydrodistillation and Extraction. *Journal of Essential oil Research*. Vol. **18**, issue 1, 19-21.
- [23] **Masoudi, S., Rustaiyan, A., Ameri, N.**, 2004: Volatile Oils of *Ferulago phialocarpa* Rech. F. et. H. Reidl and *Leutea elbursensis* Mozaffarian from Iran. *Journal of Essential oil Research*. Vol. **16**, issue 2, 143-144.

- [24] **Baser, K. H. C., Demirci, B., Demirci, F., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Noma, Y.,** 2002: Ferulagone: A New Monoterpene Ester from *Ferulago thirkeana* Essential Oil. *Planta Medica*. Vol. **68**, issue 6, 564-567.
- [25] **Ruberto, G., Biondi, D., Renda, A.,** 1999: The Composition of The Volatile oil of *ferulago nodosa* Obtained by Steam Distillation and Supercritical Carbondioxide Extraction. *Phytochemical Analysis*. Vol. **10**, issue 5, 241-246.
- [26] **Hanson, R. J.,** “Tutorial Chemistry Texts, Natural Products: The Secondary Metabolites”, *Royal Society of Chemistry*, pp. 1-2.
- [27] **Boğa, M.,** 2005. Kumarin Türevi Yeni 14:4 Taç Eter Bileşiklerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması, Yüksek Lisans Tezi. Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [28] **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.
- [29] **Kavran, G.,** 1998. Bazı Kumarin Türevlerinin Sentezleri ve UV Spektrumları, Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [30] **Harborne, J. B.,** 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 40-41.
- [31] **Harborne, J. B.,** 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 42-43.
- [32] **Harborne, J. B.,** 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 49-50.
- [33] **Guliyev, V.B., Harmandar, M.,** 1999: *Flavonoidler*, Bakanlar Matbaacılık, İstanbul.
- [34] **Harborne, J. B., Mabry, T. J.,** 1982: *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall, London.
- [35] **Deschner, E.E., Ruperto J., Wong G., et al.,** 1991: Quercetin and Rutin as Inhibitors of Azoxymethanol-Induced Colonic Neoplasia, *Carcinogenesis*. Vol. **12**:1193-1196.
- [36] **Verma, A.K., Johnson, J.A., Gould, M.N., et al.,** 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.
- [37] **Harborne, J. B.,** 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 74-76.

- [38] **Harborne, J. B.**, 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 83-85.
- [39] **Harborne, J. B.**, 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 66-67.
- [40] **Harborne, J. B.**, 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 83-85.
- [41] **Harborne, J. B.**, 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 90-91.
- [42] **Harborne, J. B.**, 1998: *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis* Third Edition, Chapman and Hall, London, 96-97.
- [43] **Gönenç, A., Atak, Y., Orman, M. N., Şimşek, B.**, 2002: Lipid Peroxidation and antioxidant Systems in Hemodialyzed Patients, *Dialysis and Transplantation*, **31**:88-96.
- [44] **Papas, A. M.**, 1996: Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, **31**: 77-82.
- [45] **Zhao, G-R., Xiang, Z-J., Ye, T-X., Yuang, Y-J., Guo, Z-X.**, 2006: Antioxidant Activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chem*, **99**: 767-771.
- [46] **Özyürek, M.**, 2008:Reaktif Oksijen Türleri Süpürücü Antioksidan Aktivitenin Ölçümünde Modifiye Cuprac Yöntemlerinin Geliştirilmesi, İstanbul Üniversitesi, Doktora tezi, İstanbul.
- [47] **Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., Codina, C.**, 2002: Comparison Between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants. *J Agric Food Chem*, **50**: 6882-6890.
- [48] **Özgen, U., Mavi, A., Terzi, Z., Yıldırım, A., Coşkun, M., Houghton, P. J.**, 2006: Antioxidant Properties of Some Medicinal Lamiaceae (Labiatae) Species. *Pharm Biol*, **44**(2):107-112.
- [49] **Reische, D. W., Lillard, D. A., Eitenmiller, R. R., Akoh, C. C., Min, D. B.** editör., 2002: *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, New York: Marcel Dekker Inc., pp.489-516.
- [50] **Cao, G., Prior, R. I.**, 1999: The Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in Biological Samples, *Methods in Enzymology*, **299**: 50-62.

- [51] Halliwell, B., Aeschbach, R., Löliger, J., Aruoma, O. I., 1995: The Characterization of Antioxidants, *Food and Chemical Toxicology*, **33**: 601-617.
- [52] Rang, R-Y., Tsou, S. C. S., Lee, T-C., Wu, W-J., Hanson, P. M., Kuo, G., Engle, L. M., Lai, P. Y., 2006: Distribution of 127 Edible Plant Species for Antioxidant Activities by Two Assays. *J Sci Food Agric*, **86**:2395-2403.
- [53] Acuna, U. M., Atha,D. E., Ma, J.,Nee, M.H. Kennelly, E. J., 2002: Antioxidant Activity of Ten Edible North American Plants. *Phytother Res*, **16**: 63-65.
- [54] Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk F., Duru M. E., Topçu, G., 2007: Antioxidant Activity of Stem and Root Extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An Edible Medicinal Plant. *Food Chem*, **103**: 623–630.
- [55] Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O., Inoue, T., 2007: Antioxidant Activity of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum*) Fruit. *Food Chem*, **100**: 171-177.
- [56] Rice-Evans, C., A., Miller, N. J., Paganga, G., 1997: Antioxidant Properties of Phenolic Compounds, *Trends in Plant Science*, **2**: 152-159.
- [57] Piazzzi, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M., Mancini, F., Recanatini, M., Andrisano, V. and Rampa, A., 2008: Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **8**, 423–426.
- [58] Castellani, R. J., Nunomura, A., Lee, H., Zhu, X., Perry, G., Smith, M. A., 2006: Amyloid- β and τ in Alzheimer Disease: What is the Neuropathology Trying to Tell Us? *Taylor& Francis Group, LLC*, chapter 6.
- [59] Hartman, R. E., 2010: Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology. *Taylor & Francis Group, LLC*, chapter 16.
- [60] Demans Dergisi 2002: 2: 69-73 Appleyard ME, 1992 Trends Neurosci, **15**: 485-490.
- [61] Orhan, İ., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yılmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., Şener, B., Choudhary, M. I., 2007: Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish Salvia species. *Food Chemistry*, **103**, 1247–1254.
- [62] Singleton, V. L.,Rossi, J. A., 1965: Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolibdic-phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**:144-158.
- [63] Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999: Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, **299**:152-178.

- [64] **Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M. E., Topçu, G.,** 2007: Antioxidant Activity of Stem and Root Extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An Edible Medicinal Plant. *Food Chem*, **103**: 623–630.
- [65] **Topçu, G., Ay. M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A.,** 2007: A New Flavone From Antioxidant Extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem*, **103**(3): 816-822.
- [66] **Sanchez, M. C., Larrauri, J. A., Saura, C. F. A.,** 1998: Procedure to Measure The Antiradical Efficiency of Polyphenols, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, **76**: 270-276.
- [67] **Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., Linssen, P. H.,** 1998: Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures From Some Aromatic Herbs Grown in Lithuania. *J Sci Food Agric* ,**77**: 140-146.
- [68] **Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C.,** 2003: Antioxidant Activity and Total Phenolics of Edible Mushroom Extracts. *Food Chem*, **81**: 249–255.
- [69] **Ellman et al,** *Biochemistry and Pharmacolo.* Vol. **7**, 88–95.
- [70] **Poole, C. F., Poole, S. K.,** “*Chromatography Today*” Elsevier Science B.V. pp: 649-726.
- [71] **Masuda, T. et al.,** 1998, *Phytochemistry*, **47**:13-16.
- [72] **Nemoto, T. et al.,** 2000, *Tet. Lett.*, **41**, 9569-9574.
- [73] **Kang, S.Y. et al.,** 2005, *J. Nat. Prod.*, **68**, 56-59.
- [74] **Goodwin, J.C. et al.,** 1983, *Carbohydr. Res.*, **115**, 281-287.
- [75] **Guerra-Hernndez, E. et al.,** 2002, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 7282-7287.

EKLER

SAF BİLEŞİKLERE AİT NMR SPEKTRUMLARI

- Ek A.1:** Bergapten ^1H - NMR spektrumu 1
Ek A.2: Bergapten ^1H - NMR spektrumu 2
Ek B.1: İzimperatorin ^1H - NMR spektrumu 1
Ek B.2: İzimperatorin ^1H - NMR spektrumu 2
Ek B.3: İzimperatorin ^{13}C - NMR spektrumu
Ek B.4: İzimperatorin APT NMR spektrumu
Ek B.5: İzimperatorin HSQC NMR spektrumu
Ek B.6: İzimperatorin HMBC NMR spektrumu
Ek B.7: İzimperatorin COSY spektrumu
Ek C.1: 3'-*Epidecursin* ^1H - NMR spektrumu 1
Ek C.2: 3'-*Epidecursin* ^1H - NMR spektrumu 2
Ek D.1: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on ^1H - NMR spektrumu
Ek D.2: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on ^{13}C - NMR spektrumu
Ek D.3: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on APT NMR spektrumu
Ek D.4: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on HMBC NMR spektrumu
Ek D.5: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on COSY NMR spektrumu
Ek E.1: İzomaltol ^1H - NMR spektrumu 1
Ek E.2: İzomaltol ^1H - NMR spektrumu 2
Ek E.3: İzomaltol APT NMR spektrumu
Ek F.1: İzomaltol-3 β -*O*-glukozit ^1H - NMR spektrumu 1
Ek F.2: İzomaltol-3 β -*O*-glukozit ^1H - NMR spektrumu 2
Ek F.3: İzomaltol-3 β -*O*-glukozit ^{13}C - NMR spektrumu
Ek F.4: İzomaltol-3 β -*O*-glukozit APT spektrumu
Ek F.5: İzomaltol-3 β -*O*-glukozit HSQC spektrumu
Ek F.6: İzomaltol-3 β -*O*-glukozit HMBC spektrumu

SAF BİLEŞİKLERE AİT MS SPEKTRUMLARI

- Ek A.3:** Bergapten MS spektrumu
Ek B.8: İzimperatorin MS spektrumu
Ek C.3: 3'-*Epidecursin* MS spektrumu
Ek D.6: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on MS spektrumu
Ek E.4 : İzomaltol MS spektrumu
Ek F.7 : İzomaltol-3 β -*O*-glukozit MS spektrumu

ftm-6-8-4

Sample Name:

ftm-6-8-4

Data Collected on:

mercury400-mercury400

Archive directory:

/home/walshup/vnmrsys/data

Sample directory:

ftm-6-8-4_20100414_02

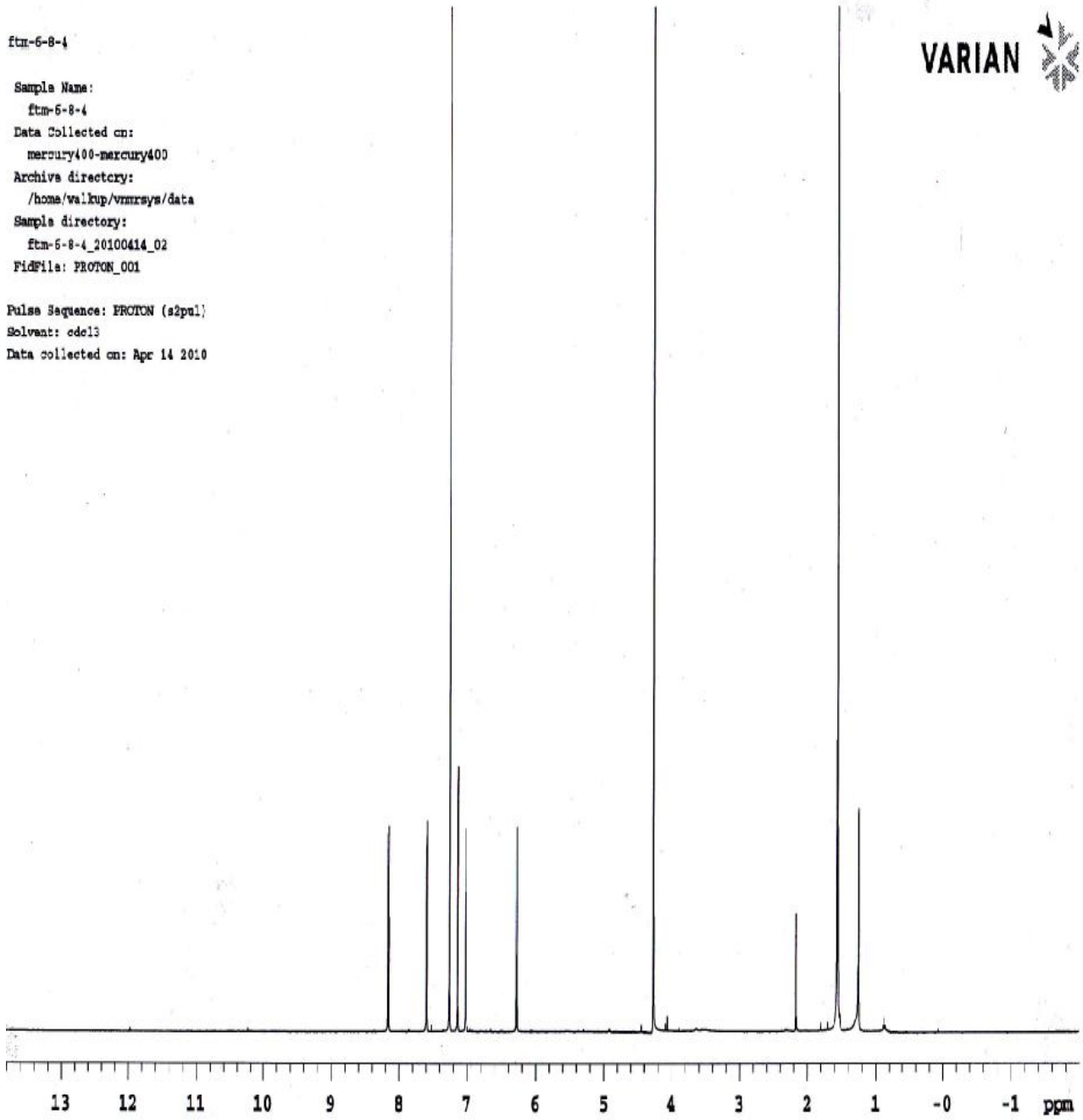
FidFile: PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul1)

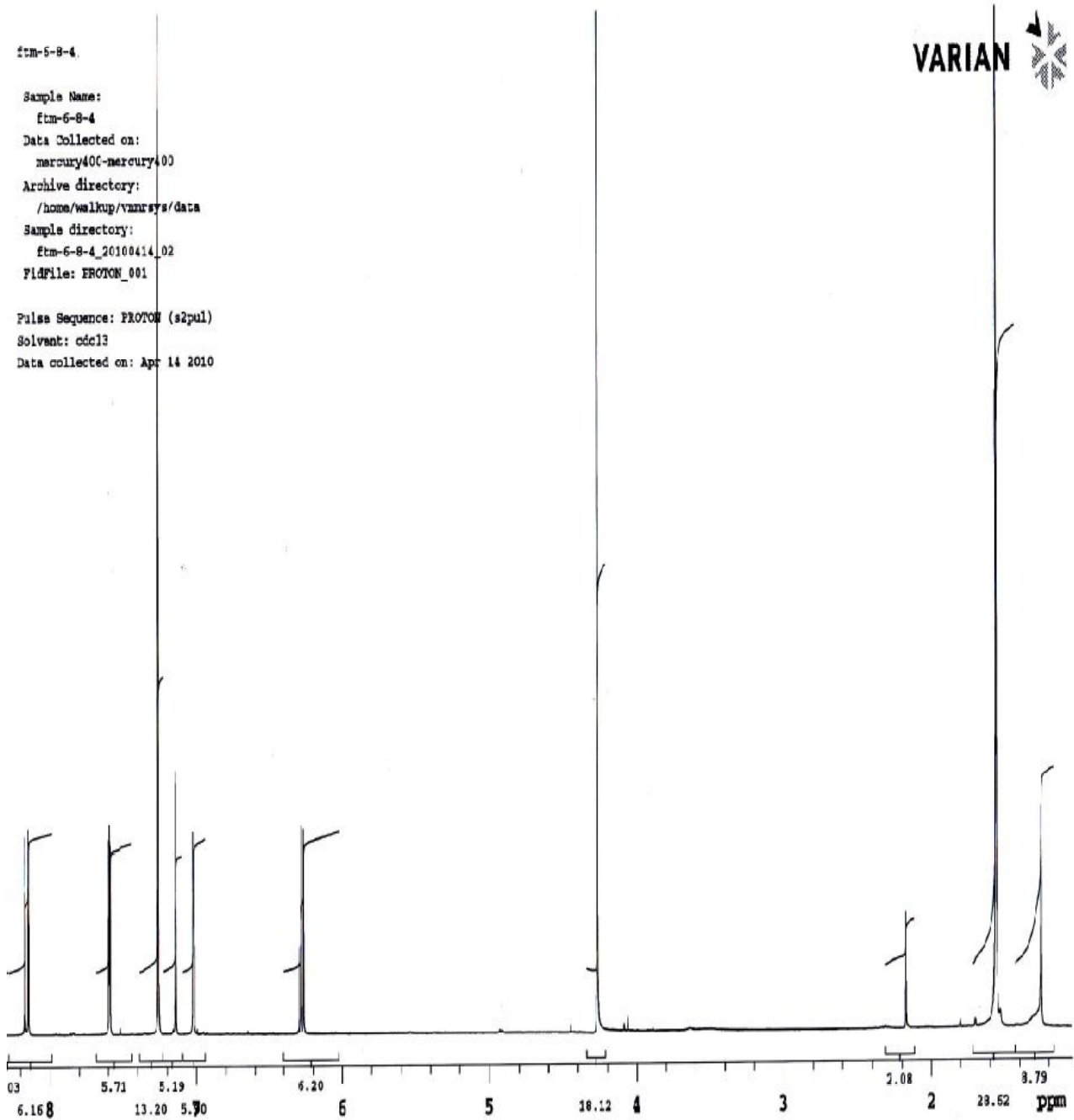
Solvent: cdcl3

Data collected on: Apr 14 2010

VARIAN

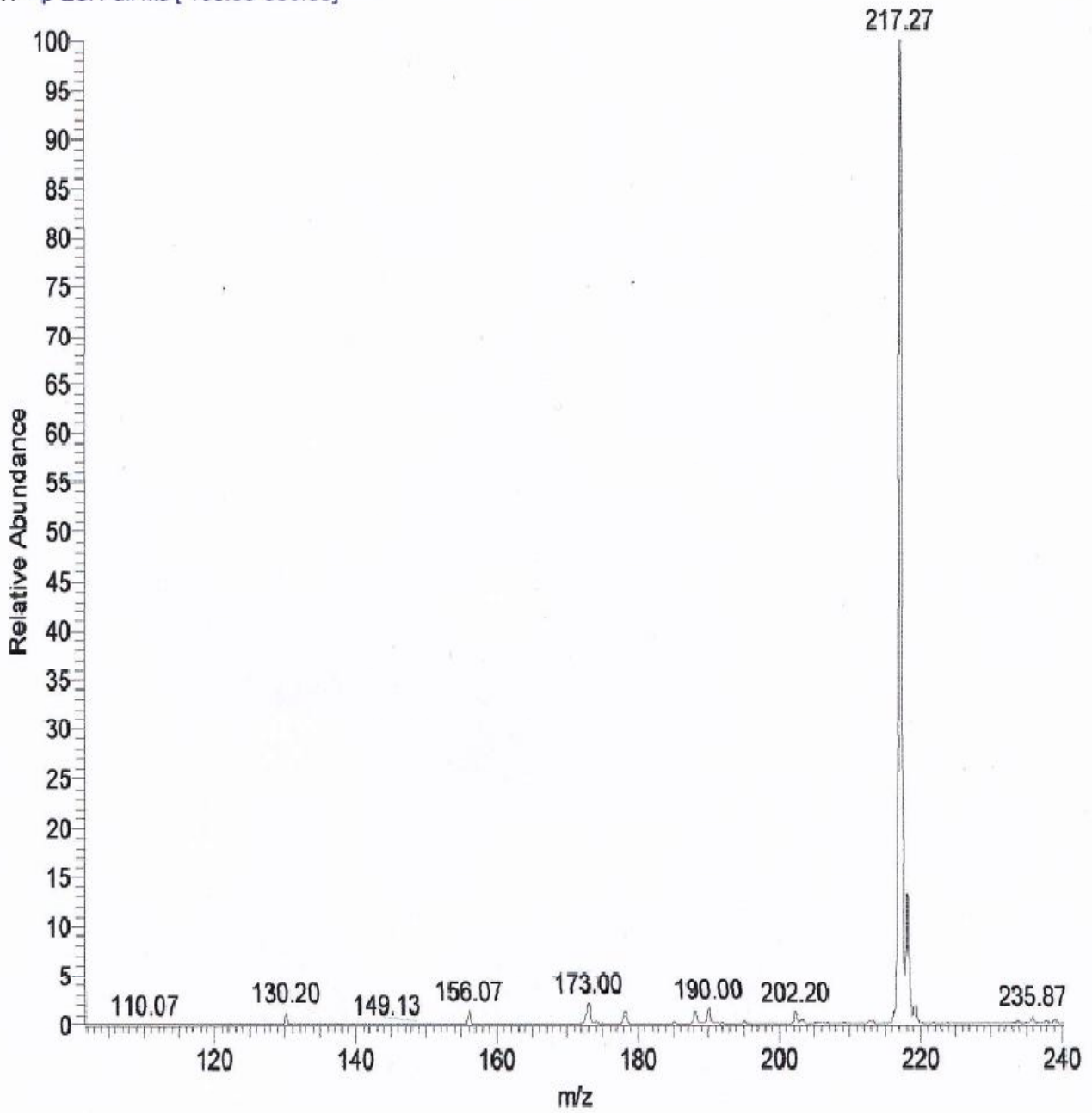


Şekil A.1: Bergapten ¹H-NMR spektrumu I



Şekil A.2: Bergapten ^1H -NMR spektrumu 2

ftm6-8-4 #3-42 RT: 0.02-0.28 AV: 40 NL: 2.92E7
T: +p ESI Full ms [100.00-300.00]



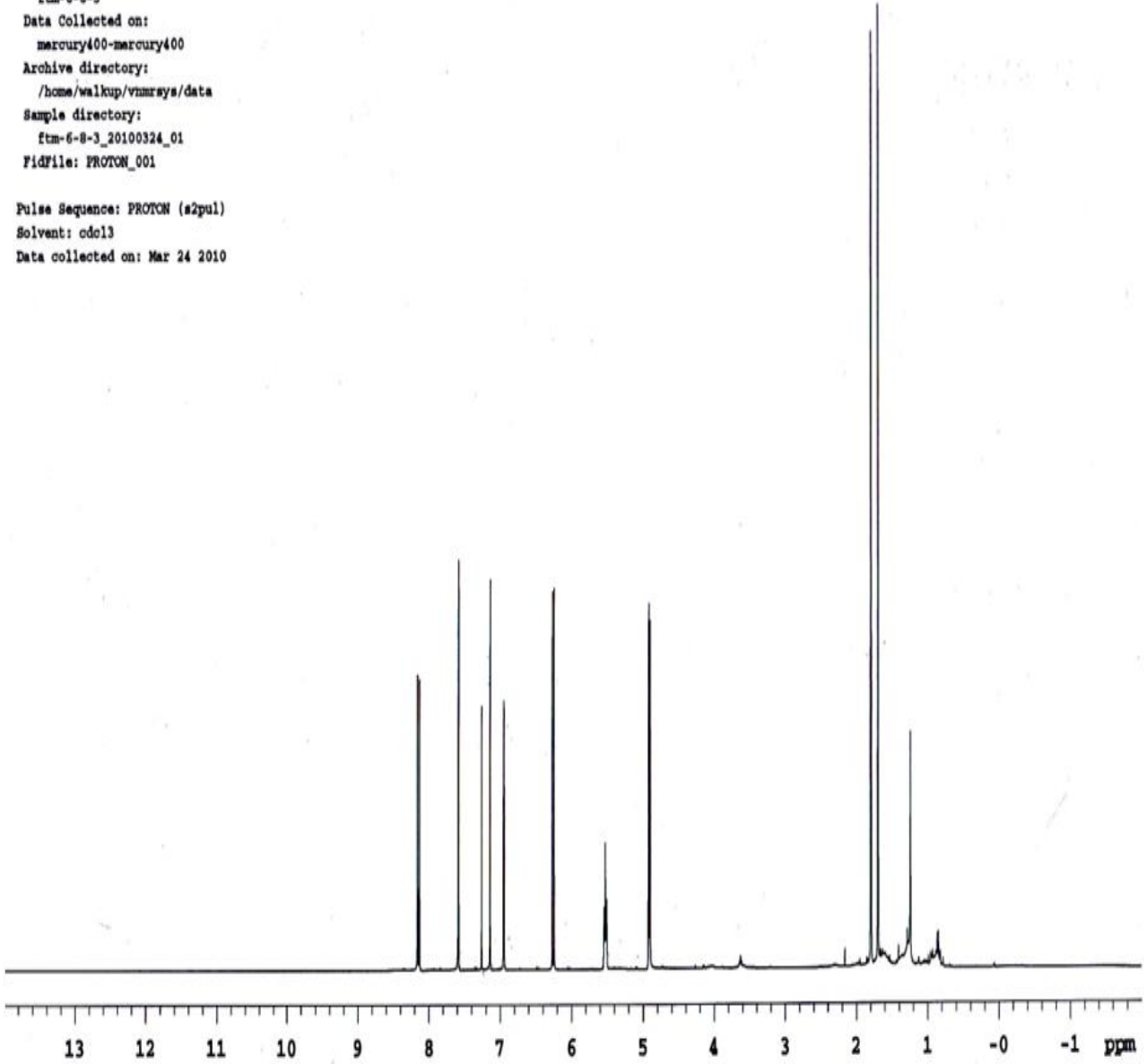
Şekil A.3: Bergapten MS spektrumu

ftm-6-8-3



Sample Name:
ftm-6-8-3
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/walkup/vnmrsws/data
Sample directory:
ftm-6-8-3_20100324_01
FidFile: PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 24 2010



Şekil B.1: Izoimperatorin ^1H -NMR spektrumu 1

ftm-6-8-3



Sample Name:

ftm-6-8-3

Data Collected on:

mercury400-mercury400

Archive directory:

/home/walkup/vnmrsws/data

Sample directory:

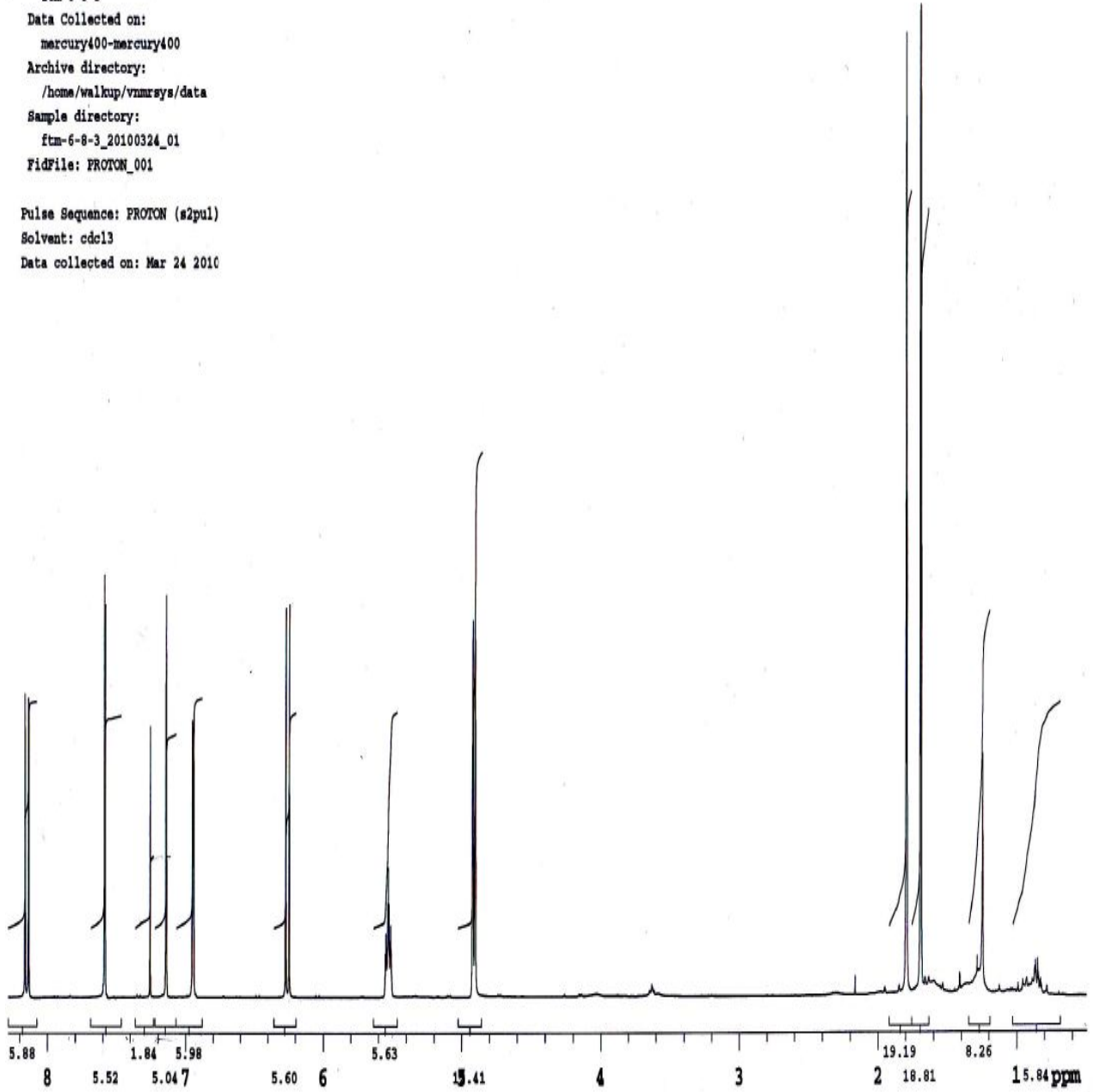
ftm-6-8-3_20100324_01

FidFile: PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul1)

Solvent: cdcl3

Data collected on: Mar 24 2010



Şekil B.2: Izoimperatorin ¹H- NMR spektrumu 2

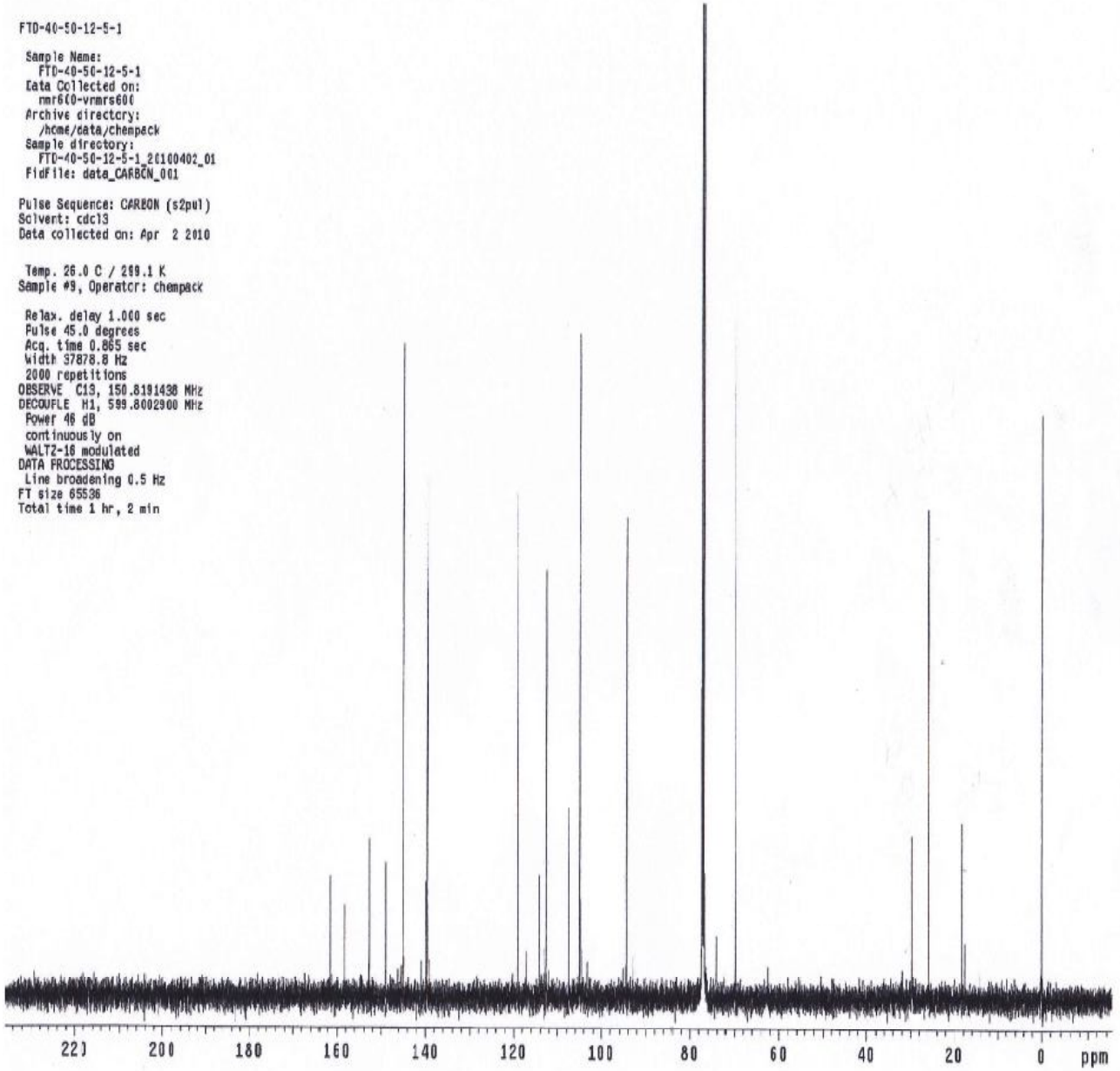
FTD-40-50-12-5-1

Sample Name:
FTD-40-50-12-5-1
Data Collected on:
nmr600-vnmr600
Archive directory:
/home/data/chempack
Sample directory:
FTD-40-50-12-5-1_20100402_01
Fidfile: data_CARBON_001

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 2 2010

Temp. 26.0 C / 299.1 K
Sample #9, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 0.865 sec
Width 37878.8 Hz
2000 repetitions
OBSERVE C13, 150.8191438 MHz
DECOUPLE H1, 599.8002900 MHz
Power 46 dB
continuously on
WALTZ-16 modulated
DATA PROCESSING
Line broadening 0.5 Hz
FT size 65536
Total time 1 hr, 2 min



Şekil B.3: İzoimperatorin ¹³C- NMR spektrumu

nmr600-vnmr600
Archive directory:
/home/data/chempack
Sample directory:
FTD_40-50-13_7_1_20100325_01
FidFile: data_APT_002

Pulse Sequence: APT
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 25 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K
Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

1st pulse 90.0 degrees

2nd pulse 45.0 degrees

Acq. time 0.865 sec

Width 37878.8 Hz

5000 repetitions

OBSERVE C13, 150.8220972 MHz

DECOUPLE H1, 599.8120159 MHz

Power 46 dB

on during acquisition

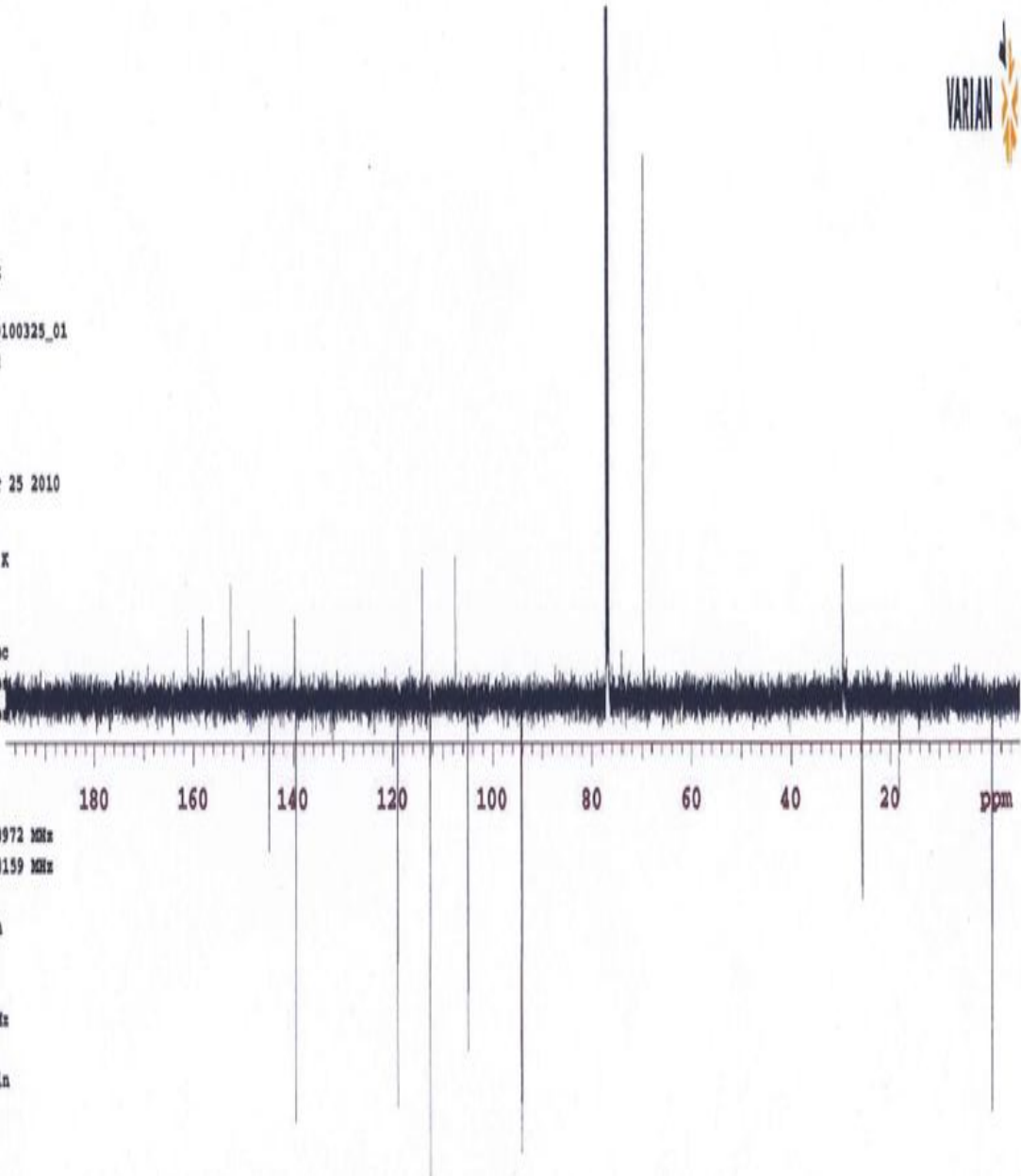
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 0.5 Hz

FT size 65536

Total time 2 hr, 37 min



Şekil B.4: Izoimperatorin APT NMR spektrumu

FTD-40-50-12-5-1

Sample Name:

FTD-40-50-12-5-1

Data Collected on:

msr400-vnmr400

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

FTD-40-50-12-5-1_20100402_01

File(s): data_gHQC_001

Pulse Sequence: gHQC

Solvent: nde13

Data collected on: Apr 2 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Sample #2, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.150 sec

Width 9615.4 Hz

2D Width 25541.0 Hz

4 repetitions

4 x 256 increments

OBSERVE H1, 599.7572887 MHz

DECOUPLE C13, 150.0004592 MHz

POWER 35 dB

on during acquisition

off during delay

W10_autoK modulated

DATA PROCESSING

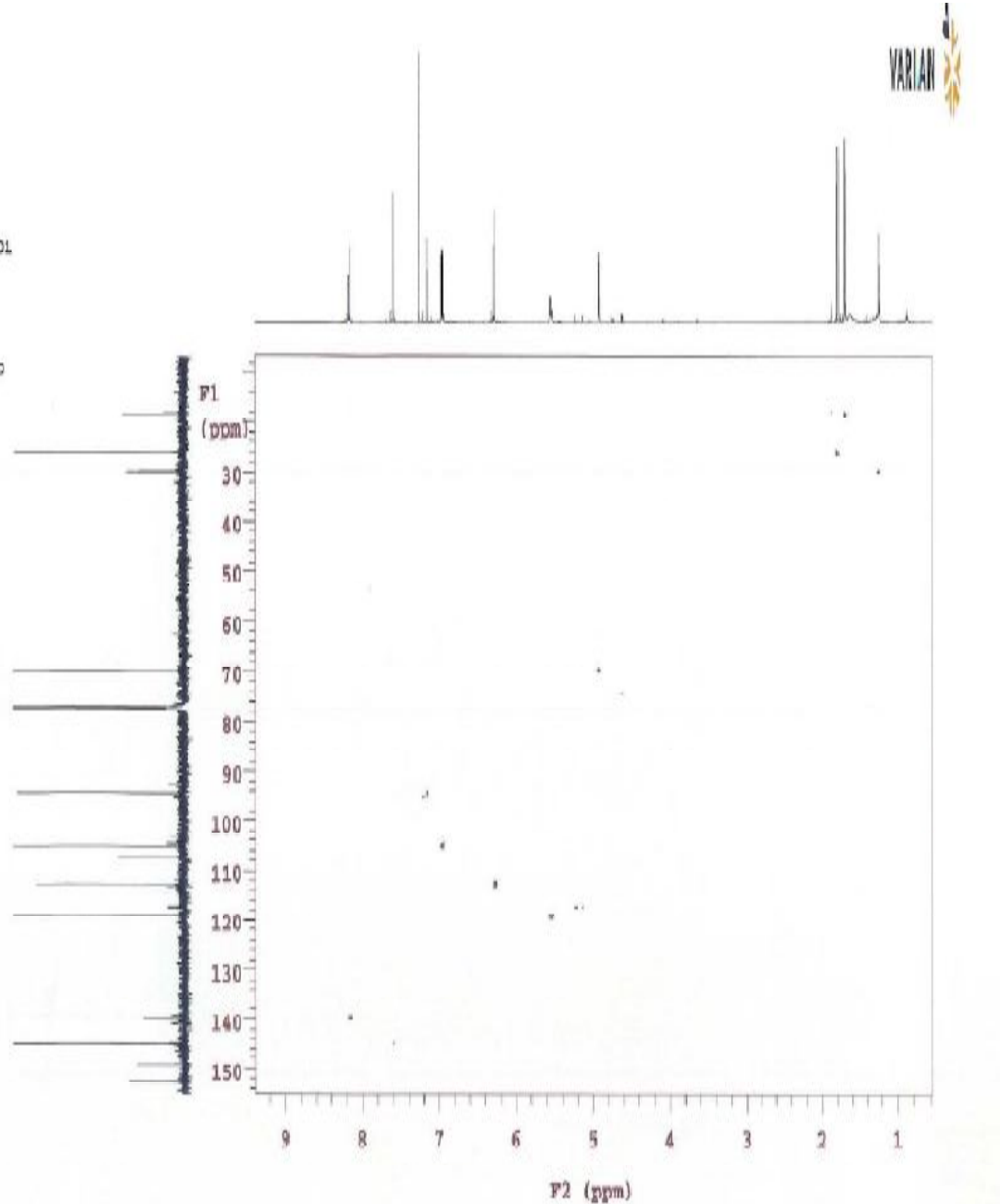
Gauss apodization 0.069 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.018 sec

FT size 4096 x 4096

Total time 41 min



Şekil B.5: İzimperatorin HSQC NMR spektrumu

FTD-49-50-12-5-1

Sample Name:

FTD-49-50-12-5-1

Data Collected on:

mmr600-mmre500

Archive directory:

/home/data/chemack

Sample directory:

ftd-49-50-12-5-1_20130403_01

Filename: Data_gmmr600_001

Pulse Sequence: gpmuc

Solvents: cdcl3

Date collected on: Apr 3 2013

Temp: 26.0 C / 299.1 K

Sample #9, Operator: chemack

NOISE: GAIN 1.000 040

Acq. time 1.150 sec

Width 9815.6 Hz

2D Width 36199.1 Hz

4 repetitions

2 x 512 increments

OBSERVE M1, 559.7971887 MHz

DATA PROCESSING

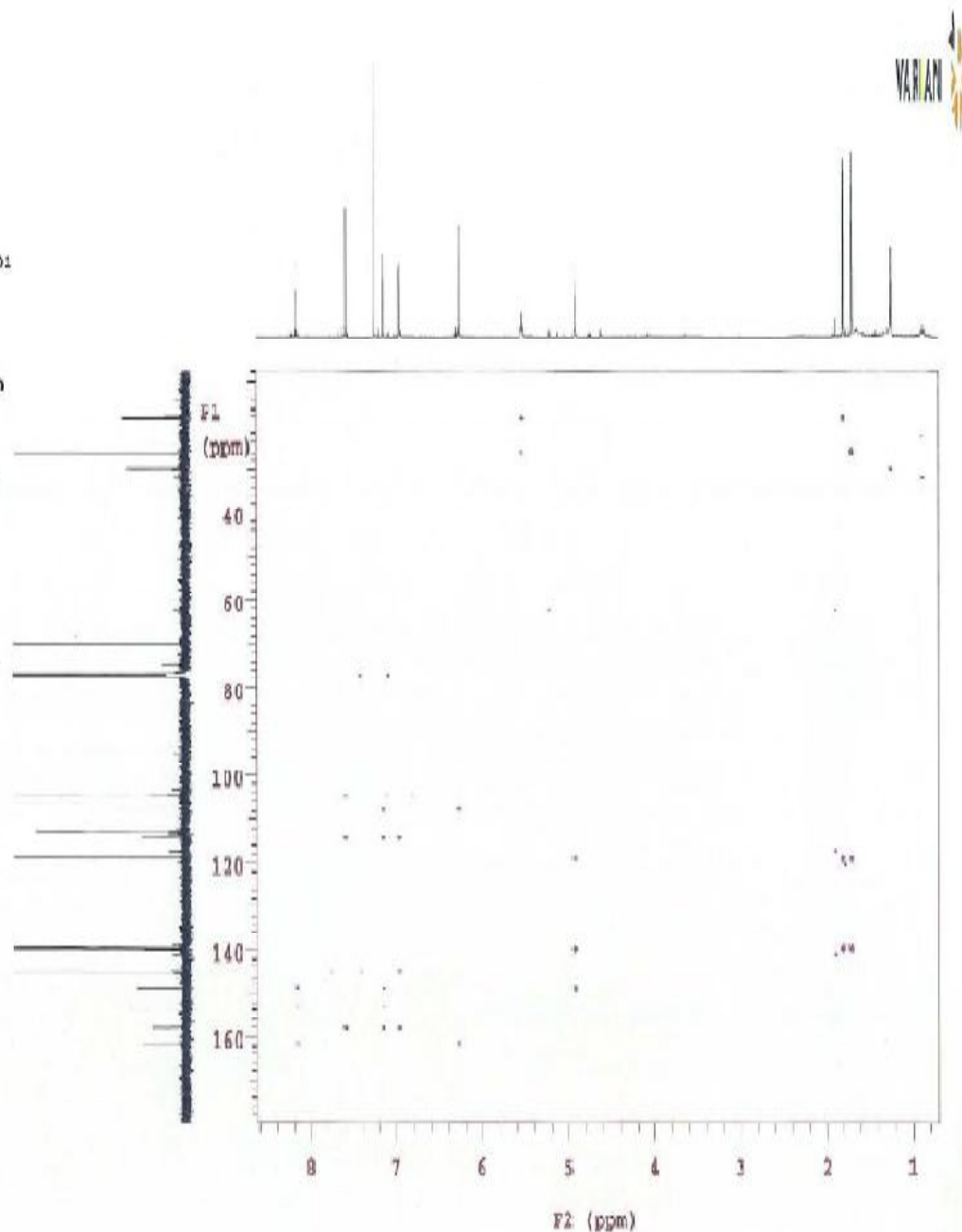
Sq. sine bell 0.075 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss resolution 0.013 sec

FT sine 4096 x 4096

Total time 1 hr, 36 min



Şekil B.6: Izoimperatorin 1H/13C NMR spektrumu

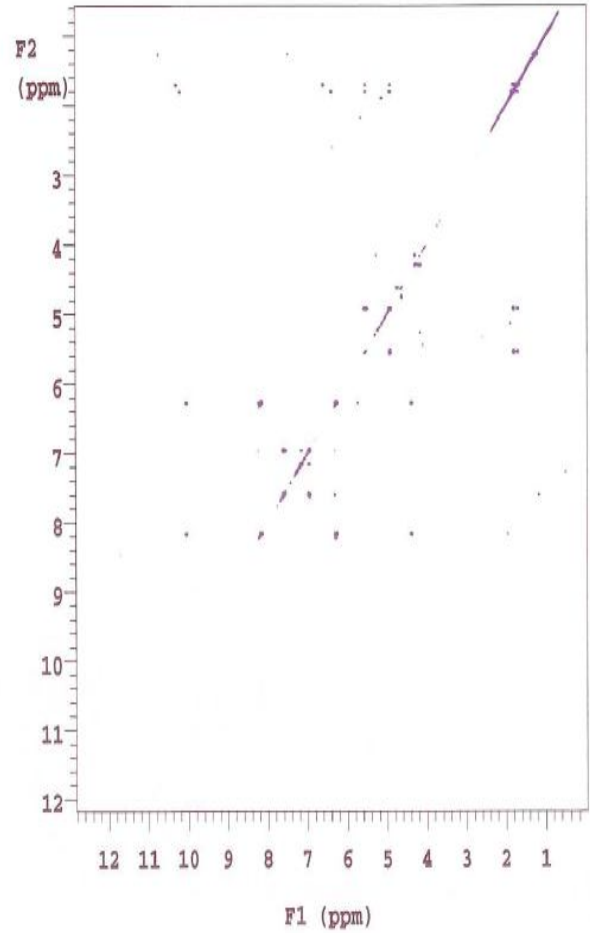
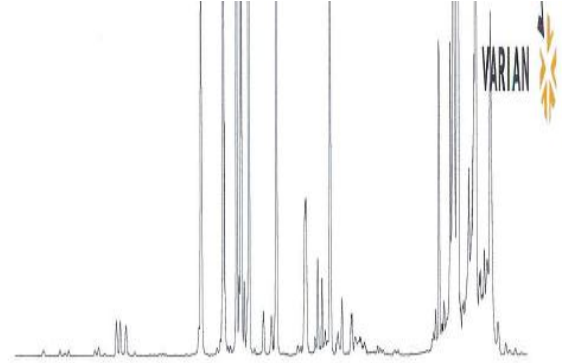
FTD_40-50-13-7-1

Sample Name:
FTD_40-50-13-7-1
Data Collected on:
nmr600-vnmrs600
Archive directory:
/home/data/chempack
Sample directory:
FTD_40-50-13-7-1_20100402_01
FidFile: data_COSY_001

Pulse Sequence: COSY
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 2 2010

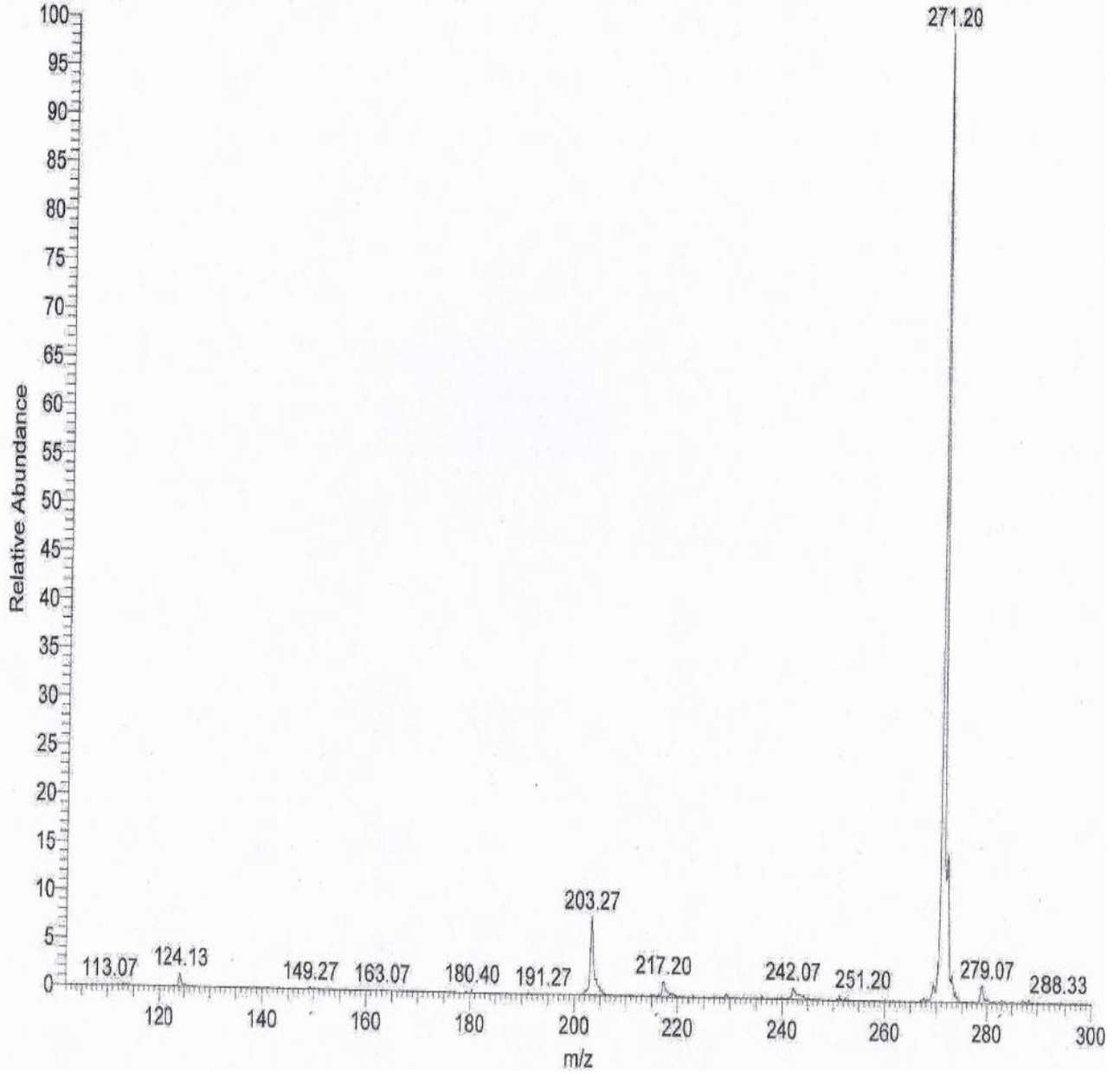
Temp: 25.0 C / 299.1 K
Sample #1, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec
Mixing 0.080 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 9615.4 Hz
2D Width 9615.4 Hz
2 repetitions
512 increments
OBSERVE H1, 599.7972910 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.053 sec
FT size 4096 x 4096
Total time 21 min



Şekil B.7: İzoinperatorin COSY spektrumu

ftm9111 #5-8 RT: 0.05-0.07 AV: 4 NL: 5.55E7
T: + p APCI corona Full ms [100.00-500.00]



Şekil B.8: İzoimperatorin MS spektrumu

FTD-40-50-19-24-3

VARIAN 

Sample Name:

FTD-40-50-19-24-3

Data Collected on:

mercury400-mercury400

Archive directory:

/home/walkup/vnmrSYS/data

Sample directory:

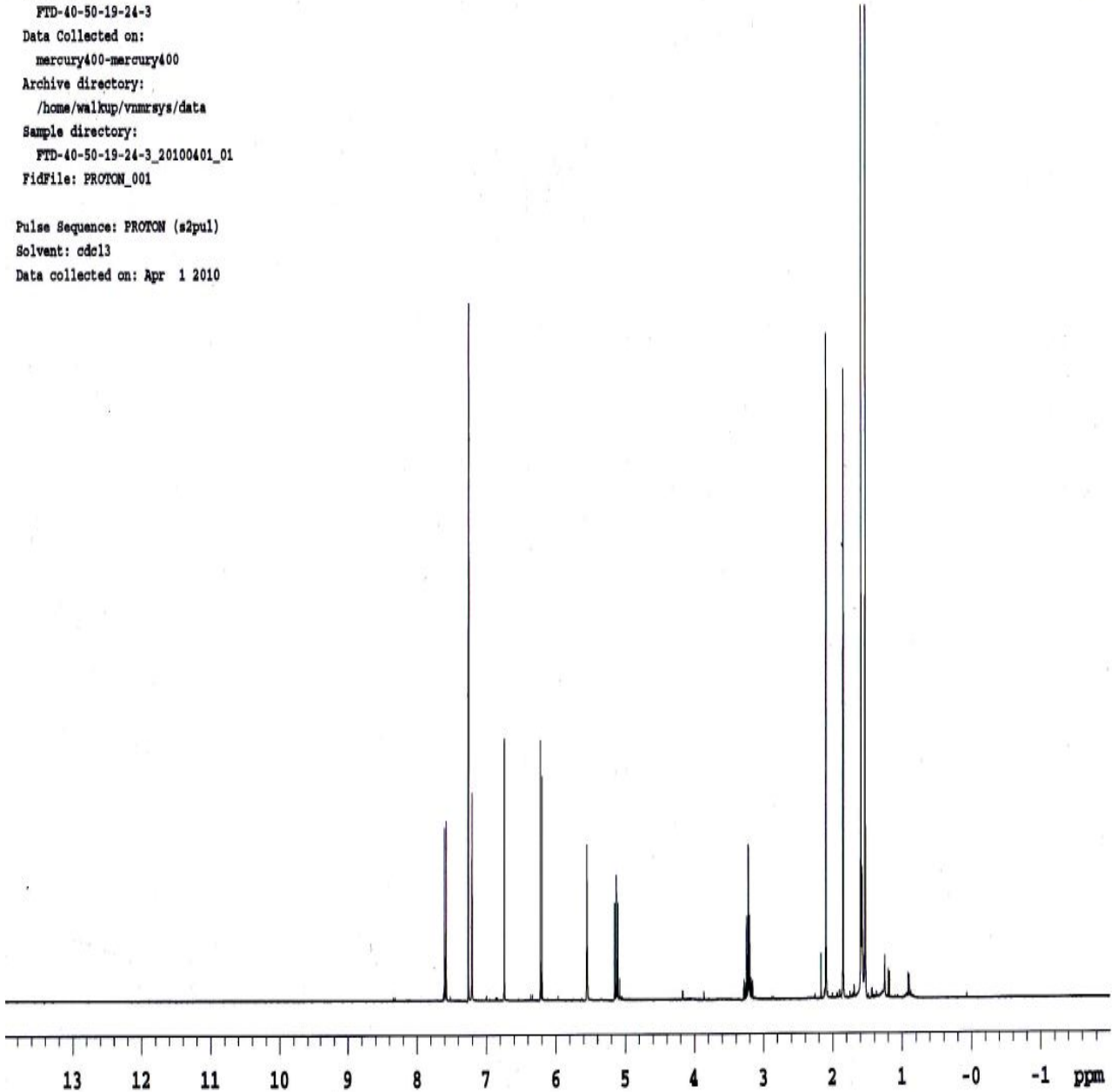
FTD-40-50-19-24-3_20100401_01

FidFile: PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: cdc13

Data collected on: Apr 1 2010



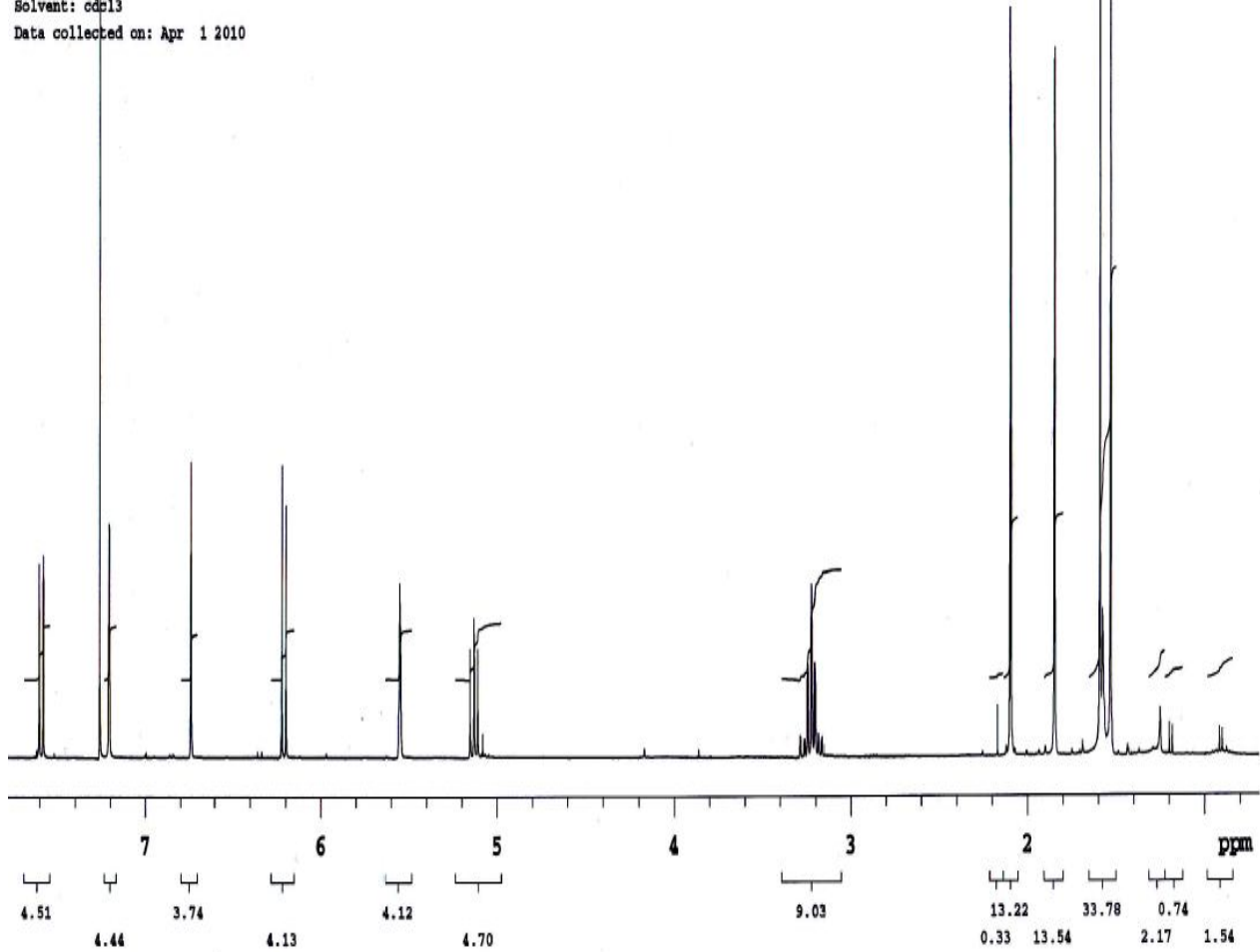
Şekil C.1: 3'-Epidescursin ¹H-NMR spektrumu 1

FTD-40-50-19-24-3

VARIAN 

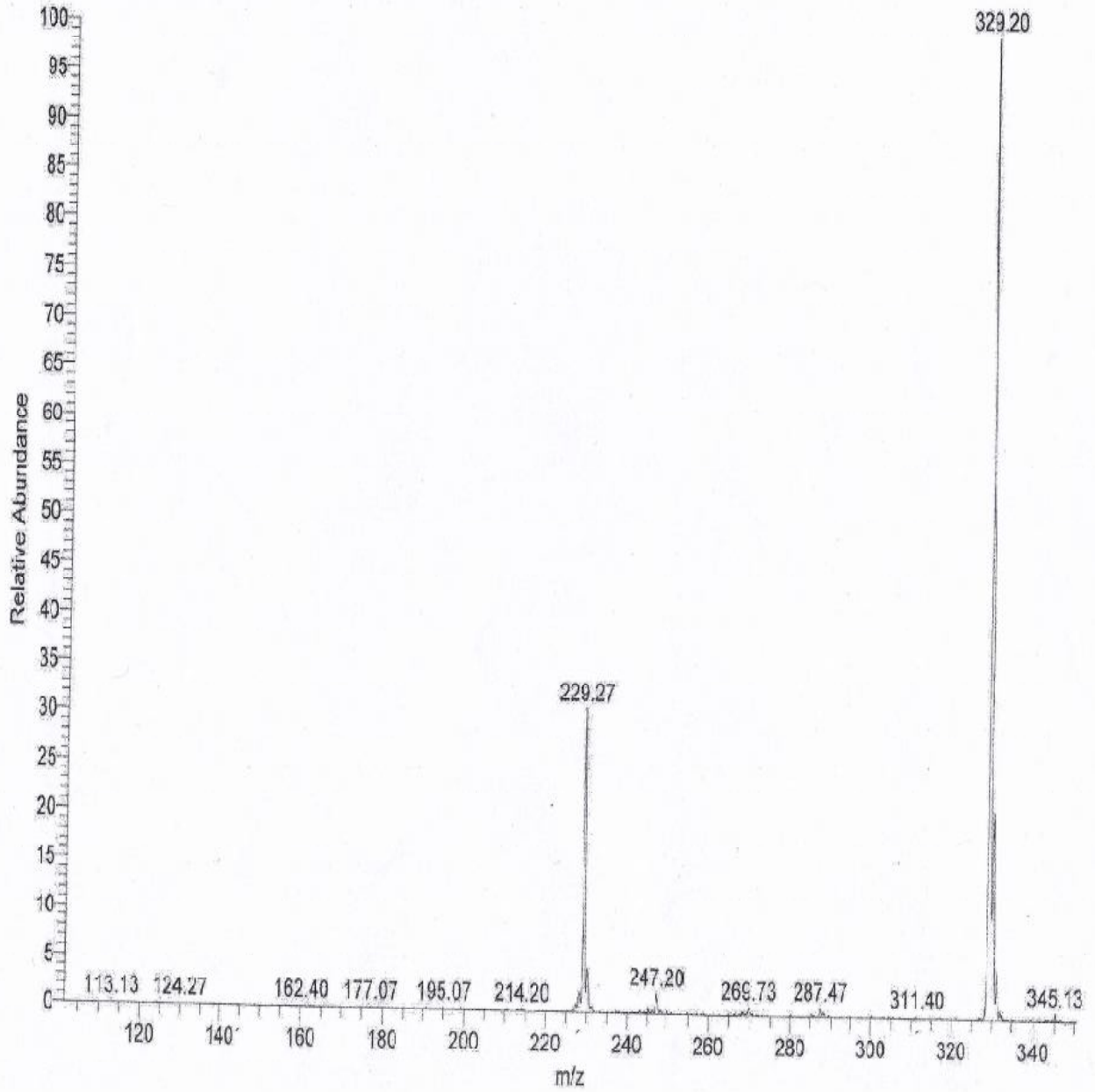
Sample Name:
FTD-40-50-19-24-3
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/walkup/vnmrsws/data
Sample directory:
FTD-40-50-19-24-3_20100401_01
FidFile: PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 1 2010



Şekil C.2: 3'-Epidecursin ^1H - NMR spektrumu 2

405019243 #12-13 RT: 0.11-0.12 AV: 2 NL: 2.95E8
T: + p APCI corona Full ms [100.00-500.00]



Şekil C.3: 3'-Epidecursin MS spektrumu

FTD_15-16

Sample Name:

FTD_15-16

Data Collected on:

nmr600-vnmr600

Archive directory:

/home/data/champack

Sample directory:

FTD_15-16_20100211_01

FidFile: data_PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: cdcl3

Data collected on: Feb 11 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Sample #11, Operator: champack

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.704 sec

Width 9615.4 Hz

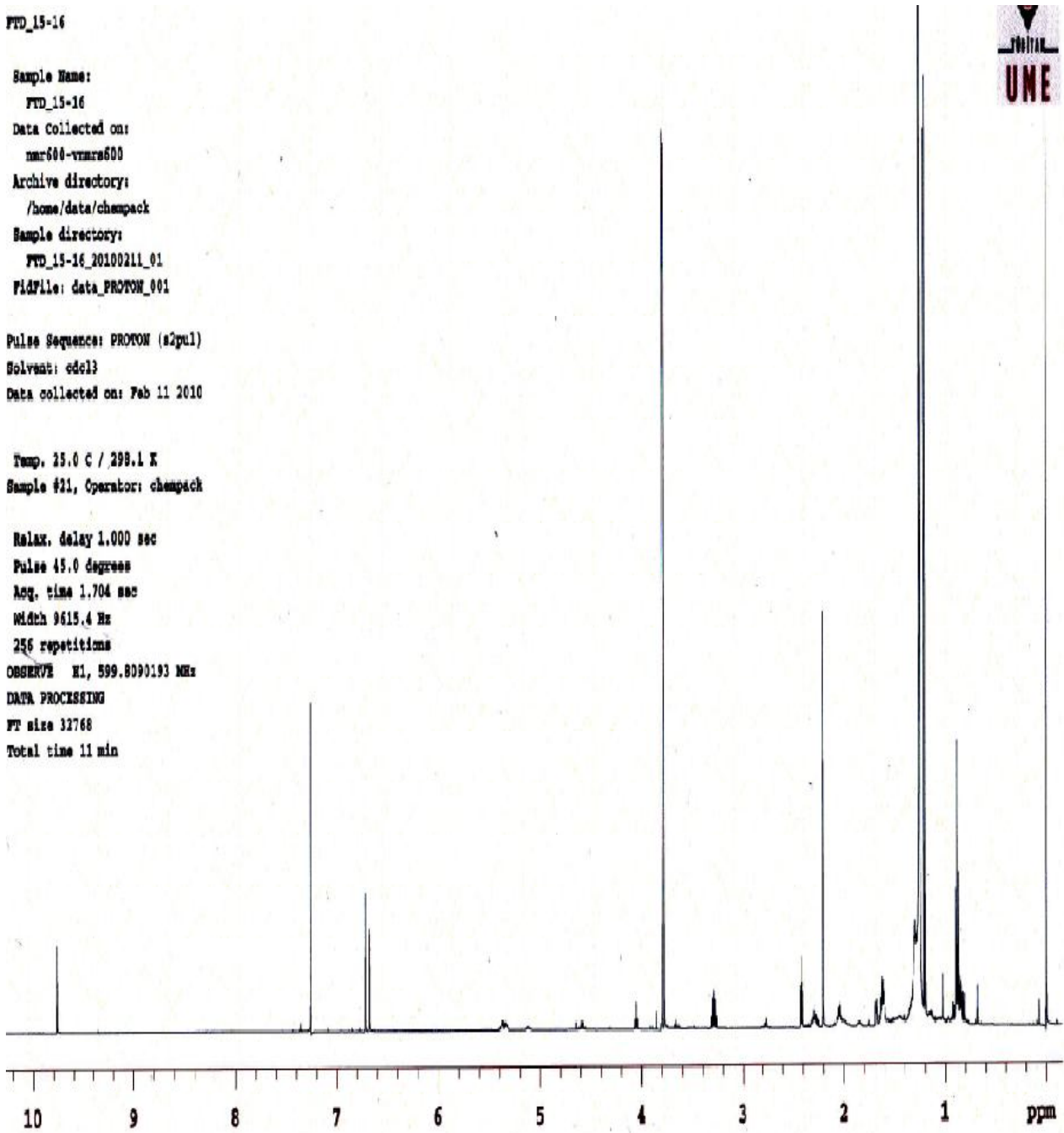
256 repetitions

OBSERVE H1, 599.8090193 MHz

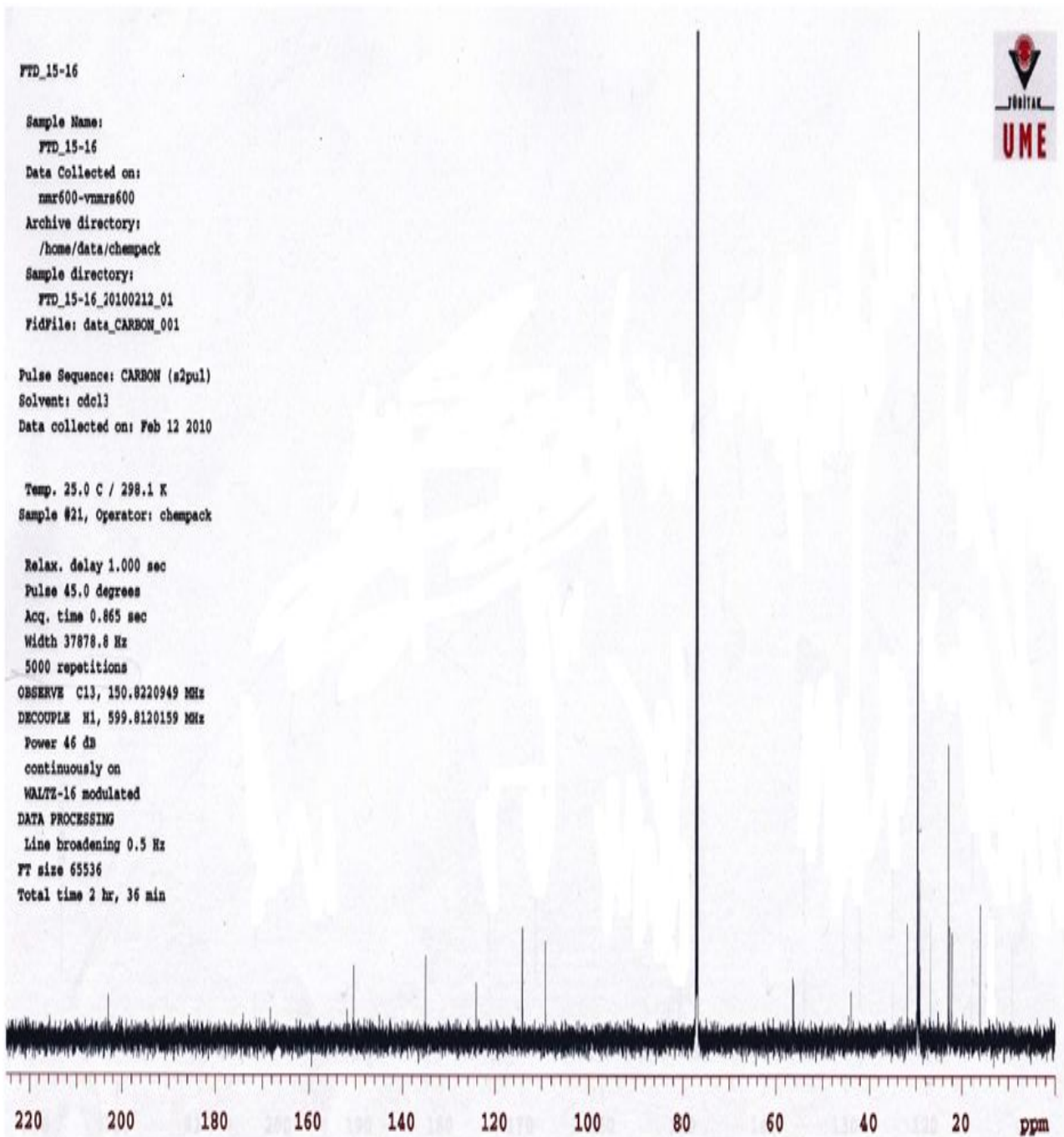
DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 11 min



Şekil D.1: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on ¹H- NMR spektrumu



Şekil D.2: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on ^{13}C -NMR spektrumu

FTD_15-16

Sample Name:

FTD_15-16

Data collected on:

nmr600-vnmr600

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

FTD_15-16_20100403_01

FidFile: data_APT_001

Pulse Sequence: APT

Solvent: cdcl3

Data collected on: Apr 3 2010

Temp. 26.0 C / 299.1 K

Sample #6, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

1st pulse 90.0 degree

2nd pulse 45.0 degree

Acq. time 0.865 sec

Width 37878.8 Hz

1024 repetitions

OBSERVE C13, 150.8191488 MHz

DECOUPLE H1, 599.8002900 MHz

Power 46 dB

on during acquisition

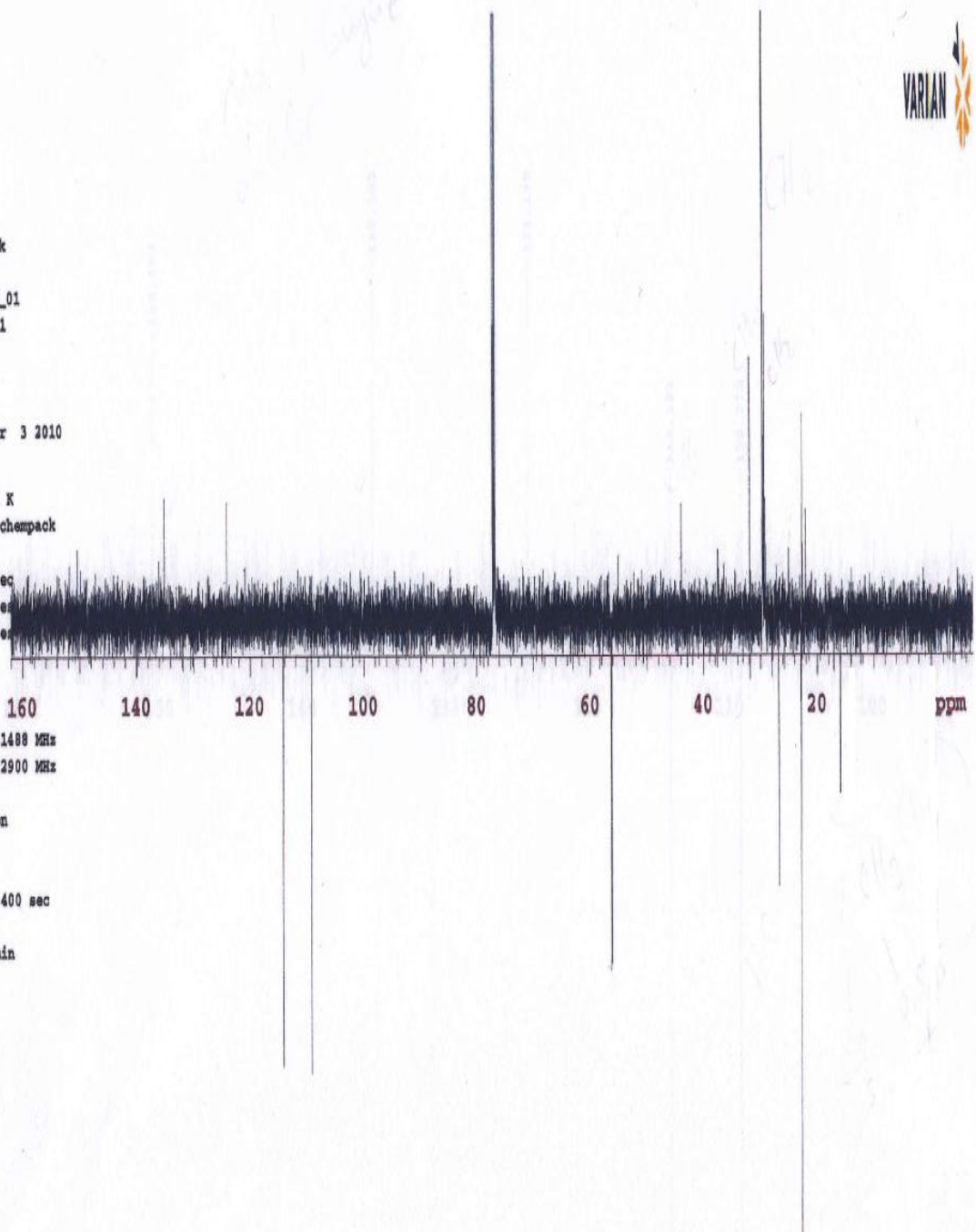
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.400 sec

FT size 65536

Total time 5 hr, 15 min



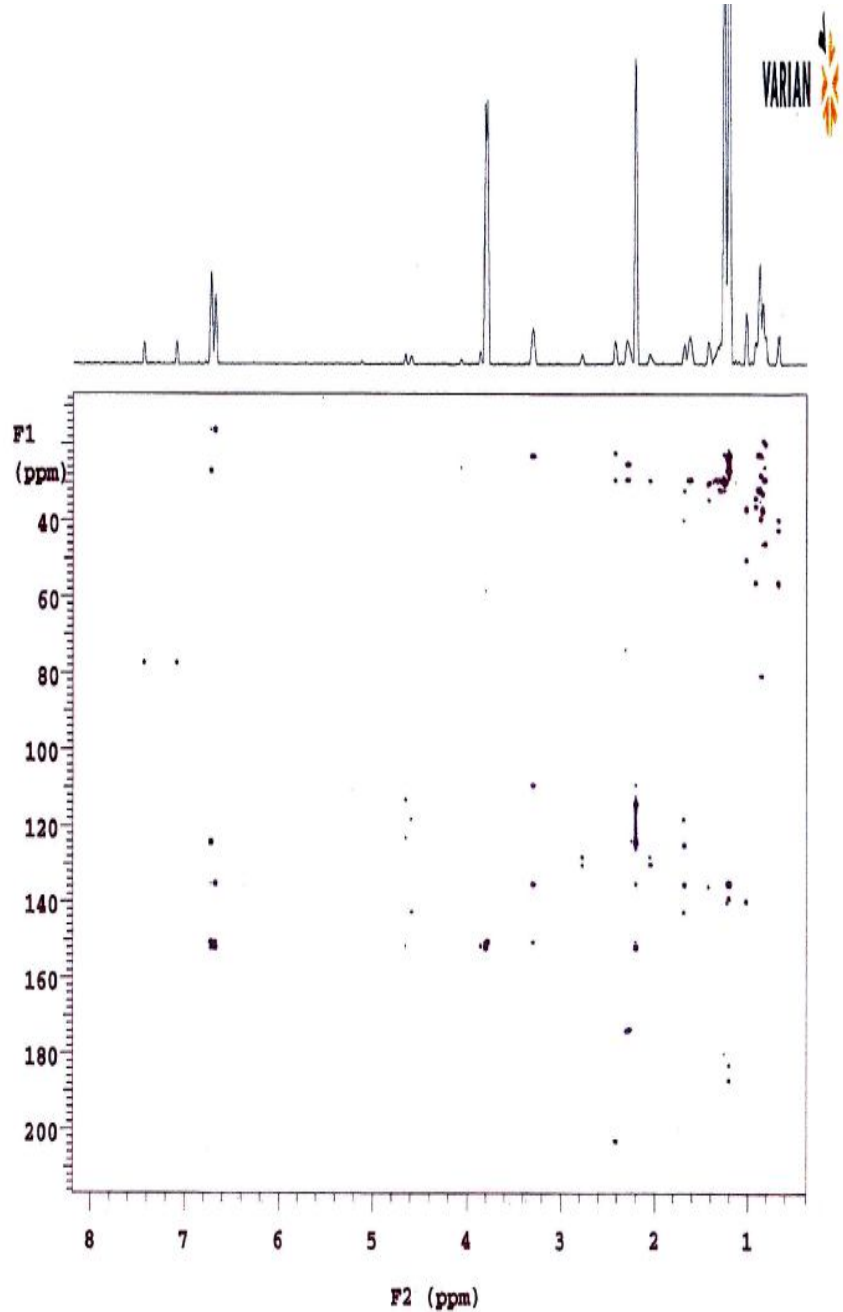
Şekil D.3: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on APT NMR spektrumu

Sample Name:
FTD_15-16
Data Collected on:
nmr600-vnmrs600
Archive directory:
/home/data/chempack
Sample directory:
FTD_15-16_20100403_01
Fidfile: data_gHMSC_001

Pulse Sequence: gHMSC
Solvent: cdcl3
Data collected on: Apr 3 2010

Temp. 26.0 C / 299.1 K
Sample #6, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 9615.4 Hz
2D Width 36199.1 Hz
32 repetitions
2 x 200 increments
OBSERVE H1, 599.7972910 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.005 sec
FT size 4096 x 4096
Total time 4 hr, 26 min

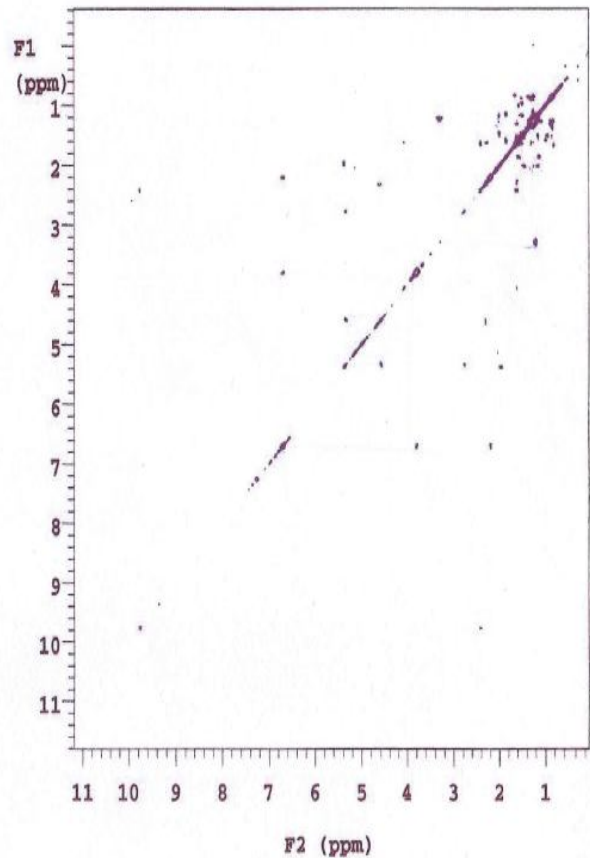
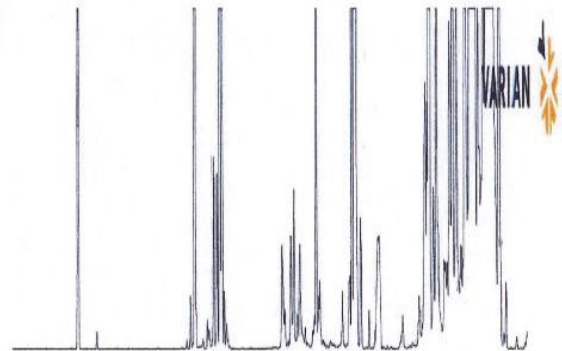


Şekil D.4: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on HMBC NMR spektrumu

Sample Name:
 FTD_15-16
 Data Collected on:
 nmr600-vnmrs600
 Archive directory:
 /home/data/chempack
 Sample directory:
 FTD_15-16_20100403_01
 FidFile: data_COSY_001

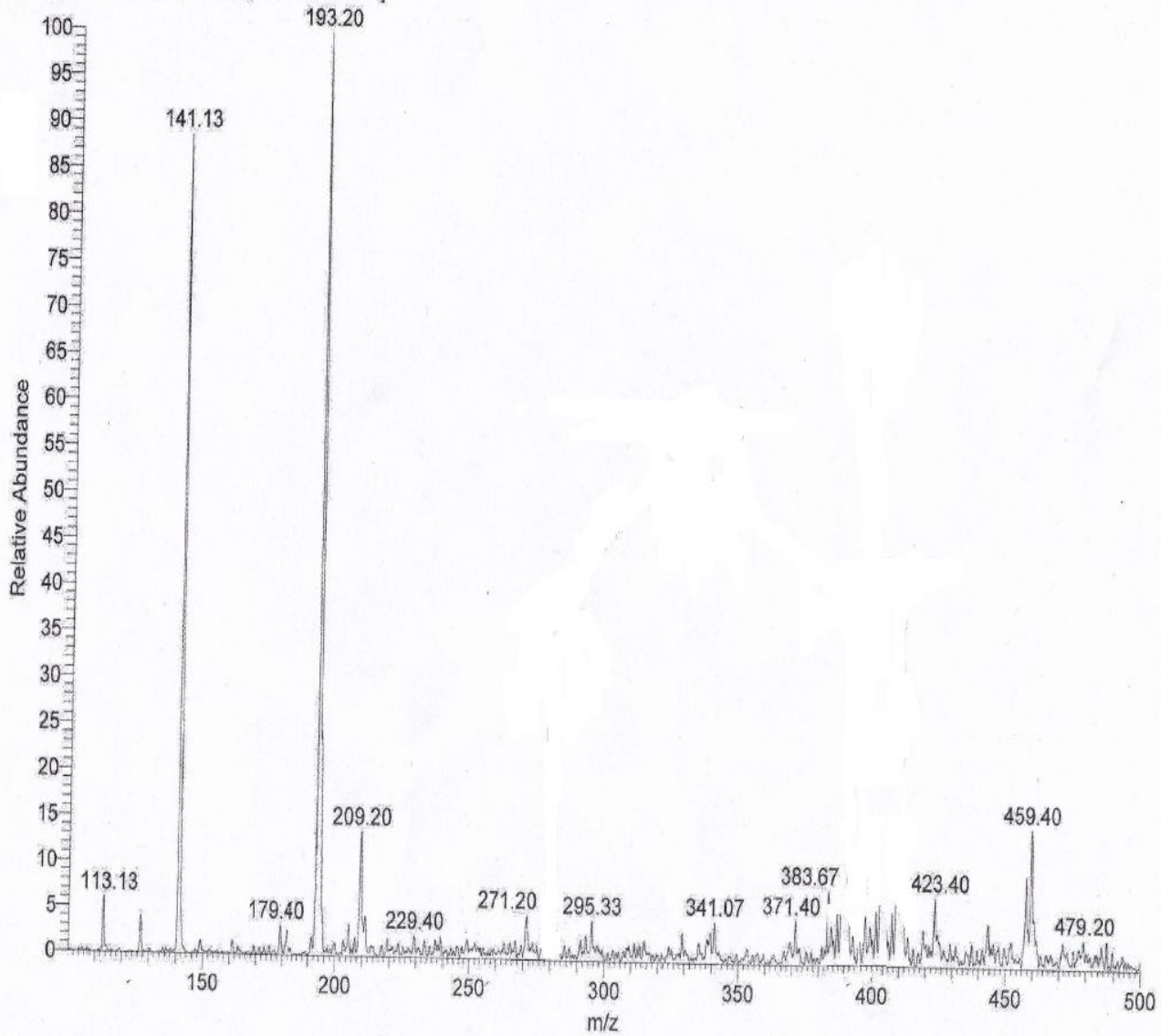
Pulse Sequence: CCSY
 Solvent: cdcl3
 Data collected on: Apr 3 2010

Temp. 25.0 C / 289.1 K
 Sample #6, Operator: Champack
 Relax. delay 1.000 sec
 Mixing 0.080 sec
 Acq. time 0.150 sec
 Width 9615.4 Hz
 2D Width 9615.4 Hz
 2 repetitions
 512 increments
 OBSERVE H1, 599.7972910 MHz
 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.075 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Sq. sine bell 0.053 sec
 F1 Size 4096 x 4096
 Total time 21 min



Şekil D.5: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on COSY NMR spektrumu

ftd1516 #9-13 RT: 0.08-0.12 AV: 5 SM: 9B NL: 3.93E6
T: + p APCI corona Full ms [100.00-500.00]



Şekil D.6: 3,6-Dimetoksi-7-izopropilkumarin-4-tetradeka-13''-on MS spektrumu

FTD-51-83-37-39-4-3

Sample Name:

FTD-51-83-37-39-4-3

Data Collected on:

mercury400-mercury400

Archive directory:

/home/wakup/vnmrsys/data

Sample directory:

FTD-51-83-37-39-4-3_20100406_01

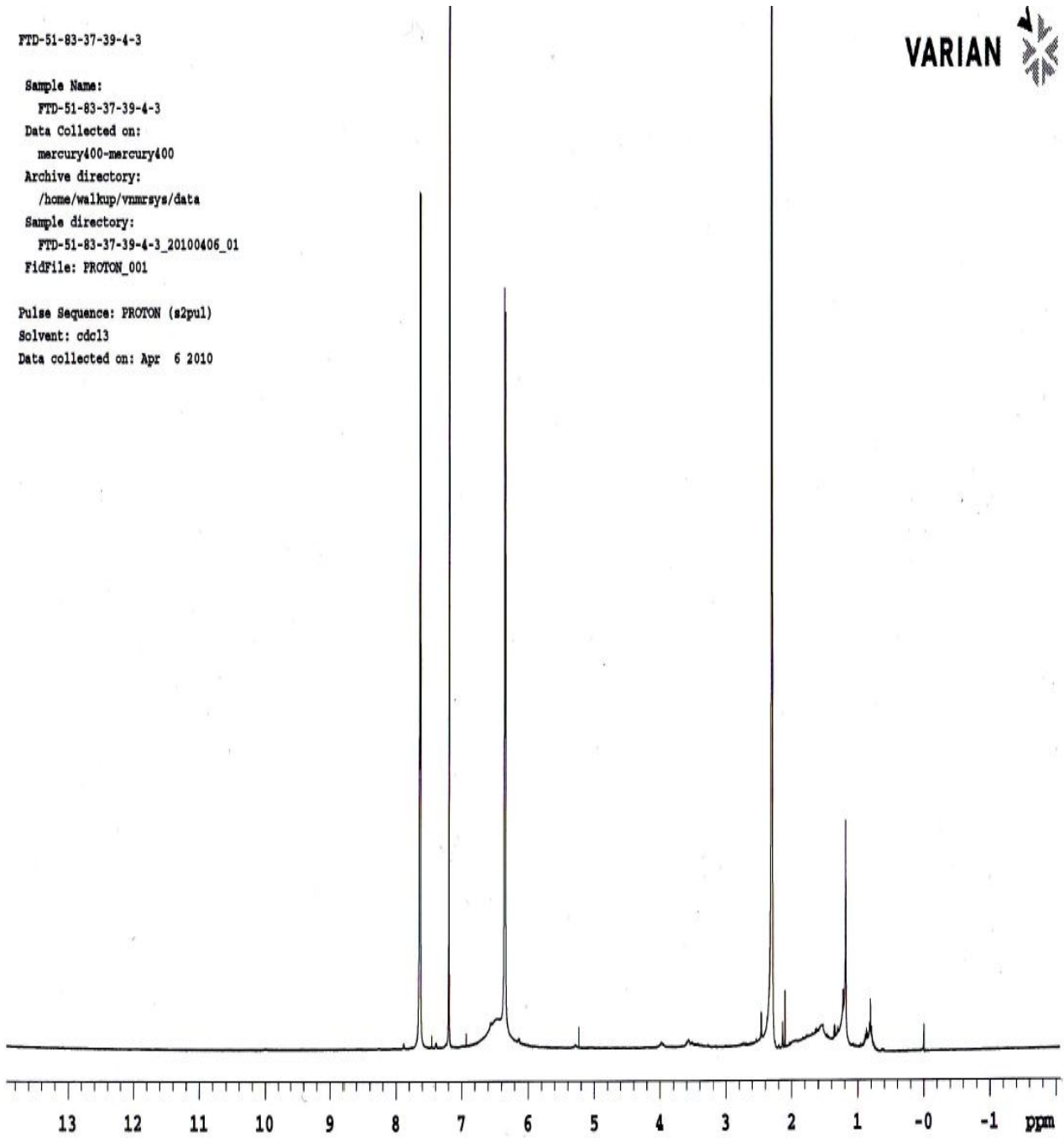
FidFile: PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: cdcl3

Data collected on: Apr 6 2010

VARIAN 



Şekil E.1: İzomaltol ^1H -NMR spektrumu 1

FTD-51-63-37-39-4-3

Sample Name:

FTD-51-63-37-39-4-3

Data Collected on:

mercury400-mercury400

Archive directory:

/home/walkup/vmrsys/data

Sample directory:

FTD-51-63-37-39-4-3_20100406_01

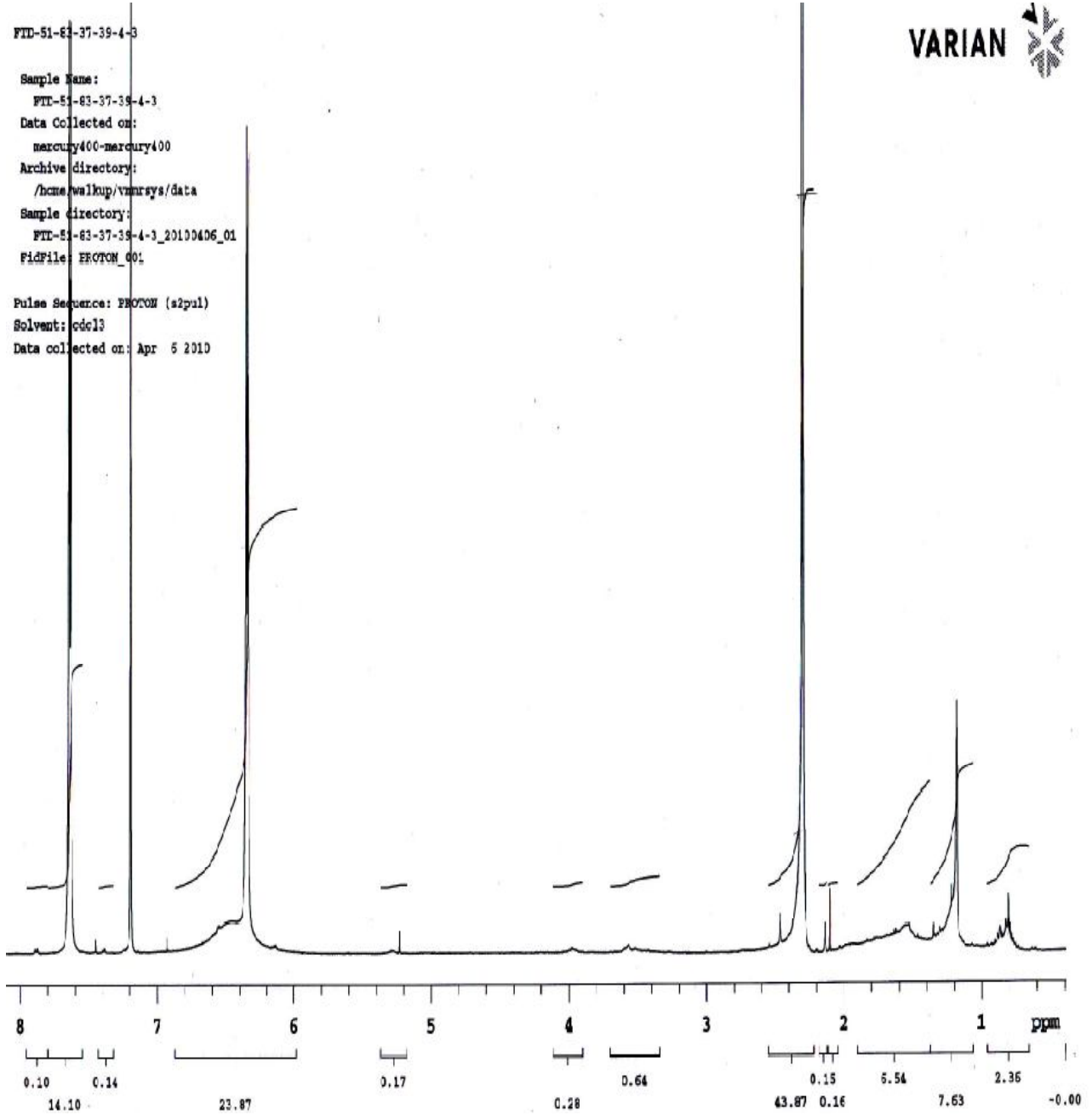
FidFile: FIDTON_001

Pulse Sequence: FIDTON (s2pul)

Solvent: cdcl3

Data collected on: Apr 5 2010

VARIAN



Şekil E.2: İzomalto 1 ^1H - NMR spektrumu 2

FTD_51-83-37-39-4-3

Sample Name:

FTD_51-83-37-39-4-3

Data Collected on:

nmr600-vnmr600

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

FTD_51-83-37-39-4-3_20100504_01

FidFile: data_APT_001

Pulse Sequence: APT

Solvent: cdcl3

Data collected on: May 4 2016

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Sample #0, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

1st pulse 90.0 degrees

2nd pulse 45.0 degrees

Acq. time 0.885 sec

Width 27878.8 Hz

34000 repetitions

OBSERVE C13, 150.8191488 MHz

DECOUPLE H1, 500.8002900 MHz

Power 46 dB

on during acquisition

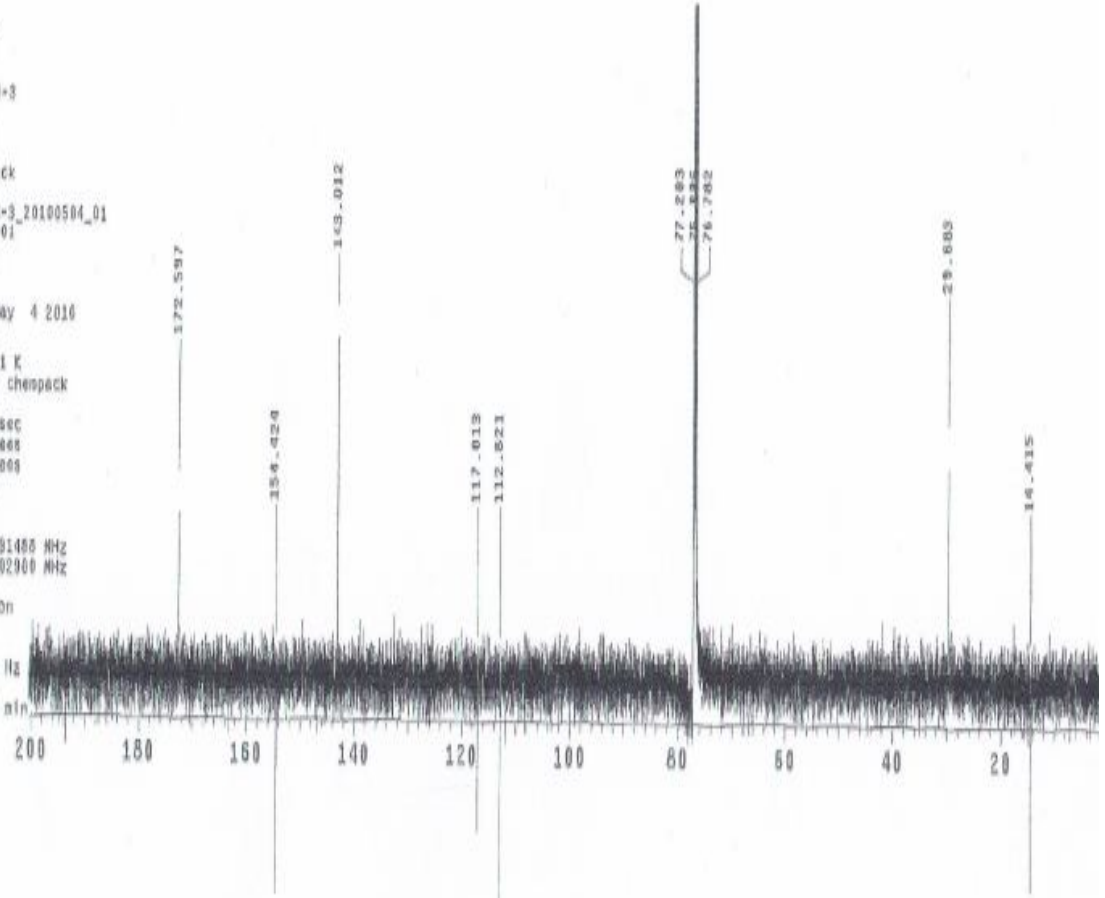
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 0.5 Hz

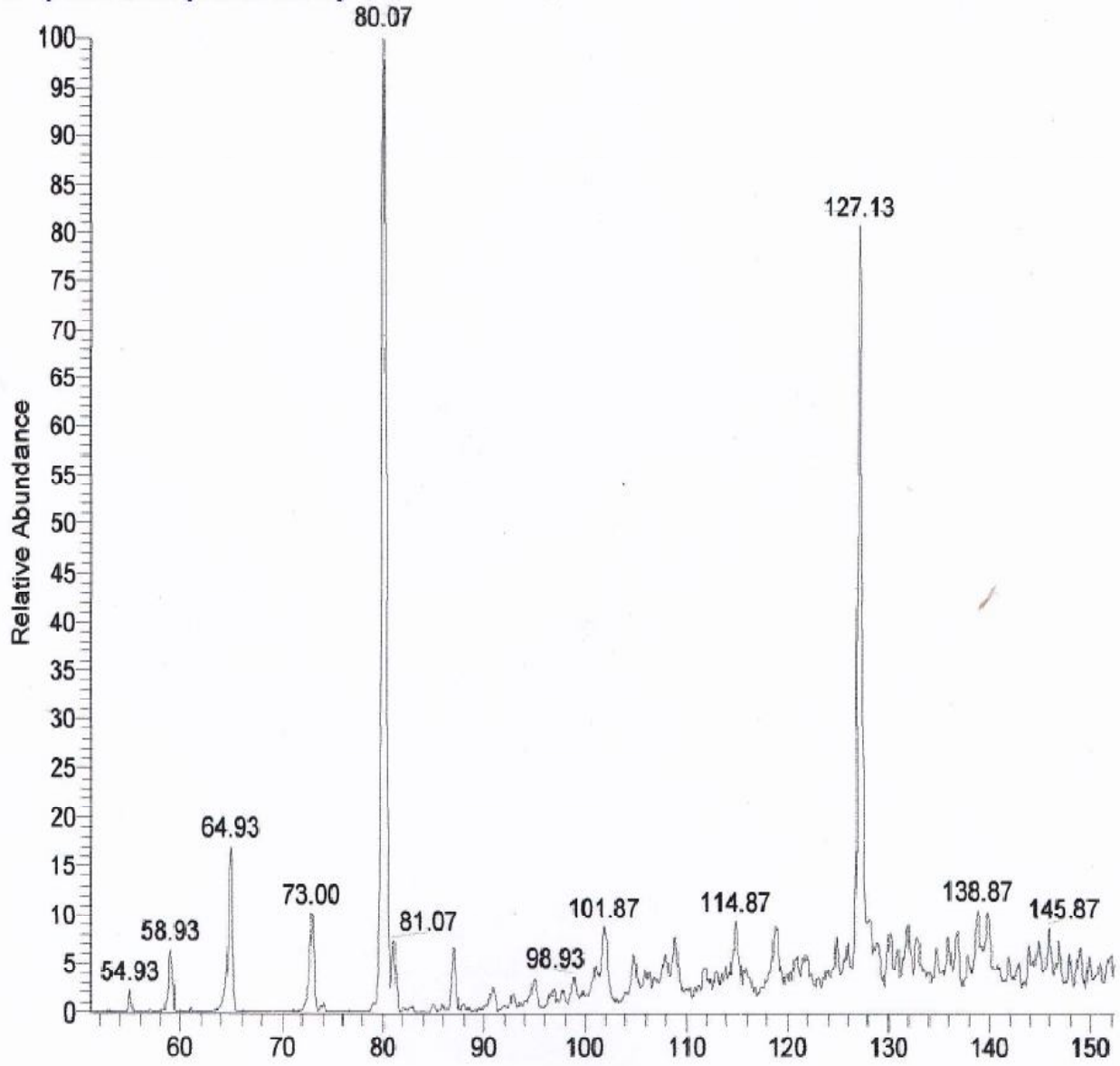
FT size 65536

Total time 15 hr, 46 min



Şekil E.3: İzomaltol APT NMR spektrumu

ftm51-83-37-39-4-3- #16-29 RT: 0.09-0.17 AV: 14 NL: 1.81E6
T: + p ESI Full ms [50.00-200.00]



Şekil E.4 : İzomaltol MS spektrumu

FTM-46

Sample Name:

FTM-46

Data Collected on:

nmr500-vnmr500

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

FTM-46_20100211_01

FidFile: data_PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: cd3od

Data collected on: Feb 11 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Sample #11, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.704 sec

Width 9615.4 Hz

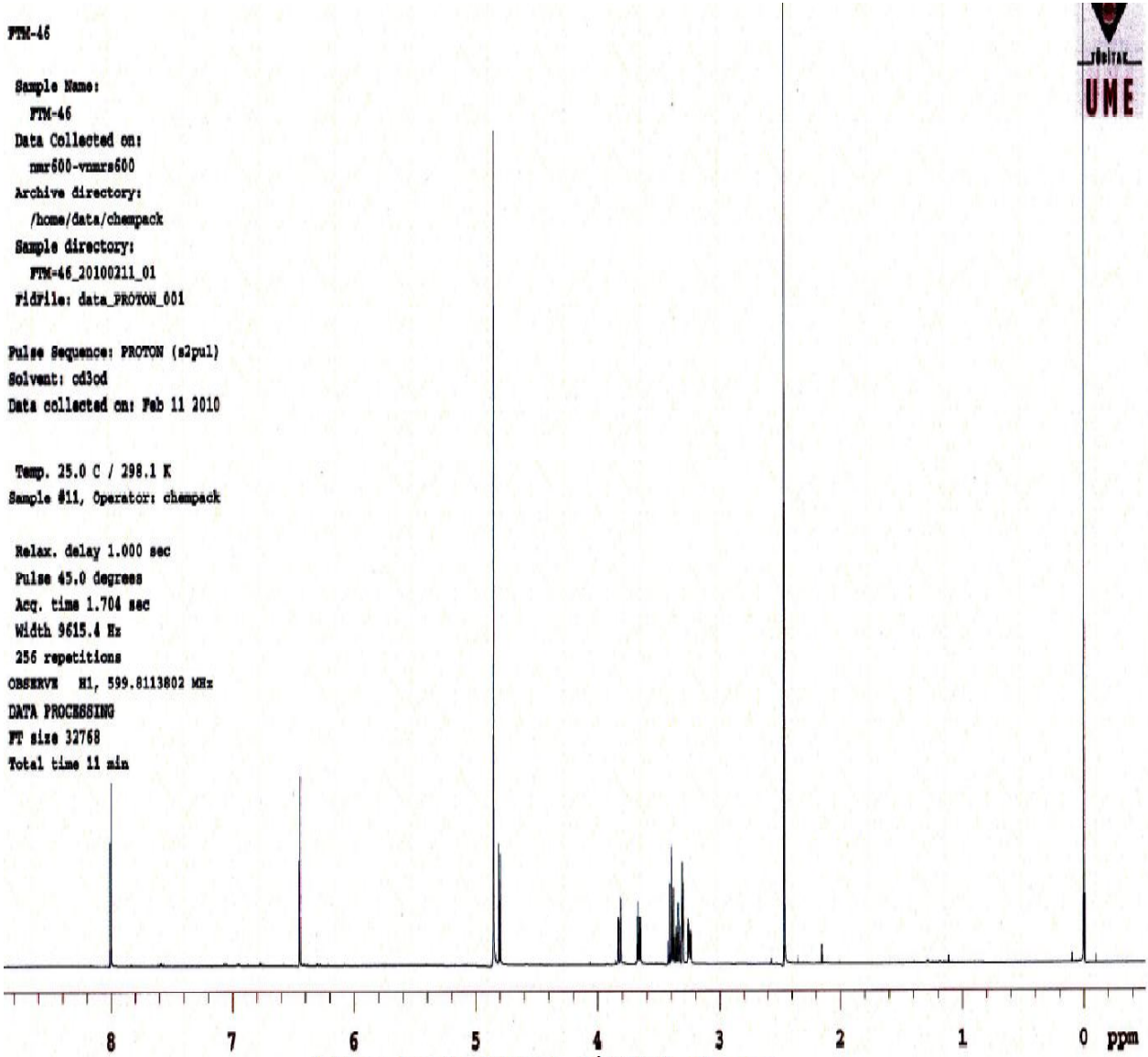
256 repetitions

OBSERVE H1, 599.8113802 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 11 min



Şekil F.1: İzomaltol-3β-O-glukozit ¹H-NMR spektrumu 1

FTM-46

Sample Name:

FTM-46

Data Collected on:

mar600-vnmrs600

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

FTM-46_20100211_01

FidFile: data_PROTON_001

Pulse Sequence: PROTON (s2pul)

Solvent: cd3od

Data collected on: Feb 11 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Sample #11, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 1.704 sec

Width 9615.4 Hz

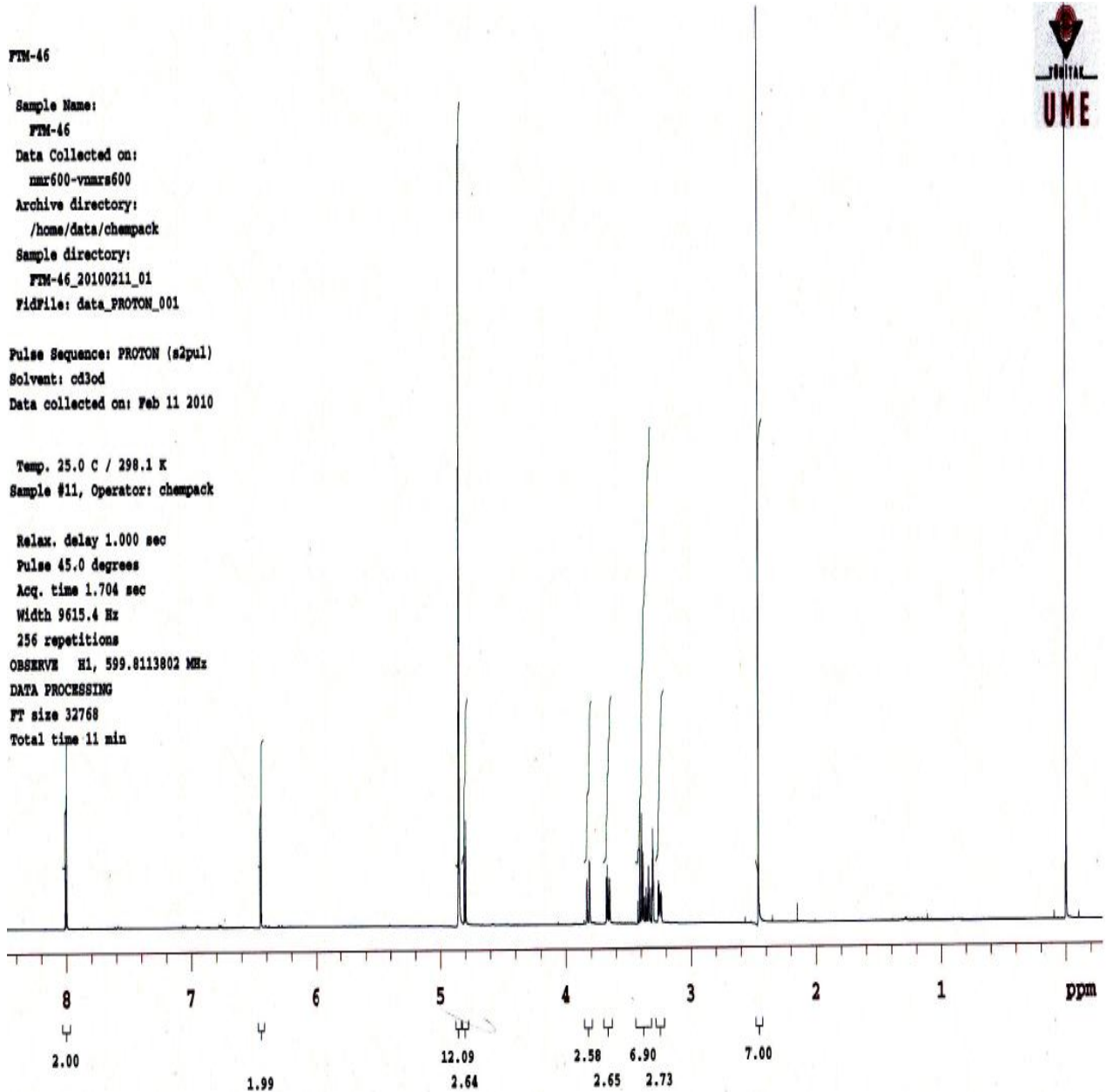
256 repetitions

OBSERVE H1, 599.8113802 MHz

DATA PROCESSING

FT size 32768

Total time 11 min



Şekil F.2: İzonialtol-3β-O-glukozit ¹H-NMR spektrumu 2

FTM-46

Sample Name:

FTM-46

Data Collected on:

nmr600-vnmrs600

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

FTM-46_20100212_01

FidFile: data_CARBON_001

Pulse Sequence: CARBON (s2pul)

Solvent: cd3od

Data collected on: Feb 12 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Sample #11, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

Pulse 45.0 degrees

Acq. time 0.865 sec

Width 37878.8 Hz

5000 repetitions

OBSERVE C13, 150.8224562 MHz

DECOUPLE H1, 599.8143791 MHz

Power 46 dB

continuously on

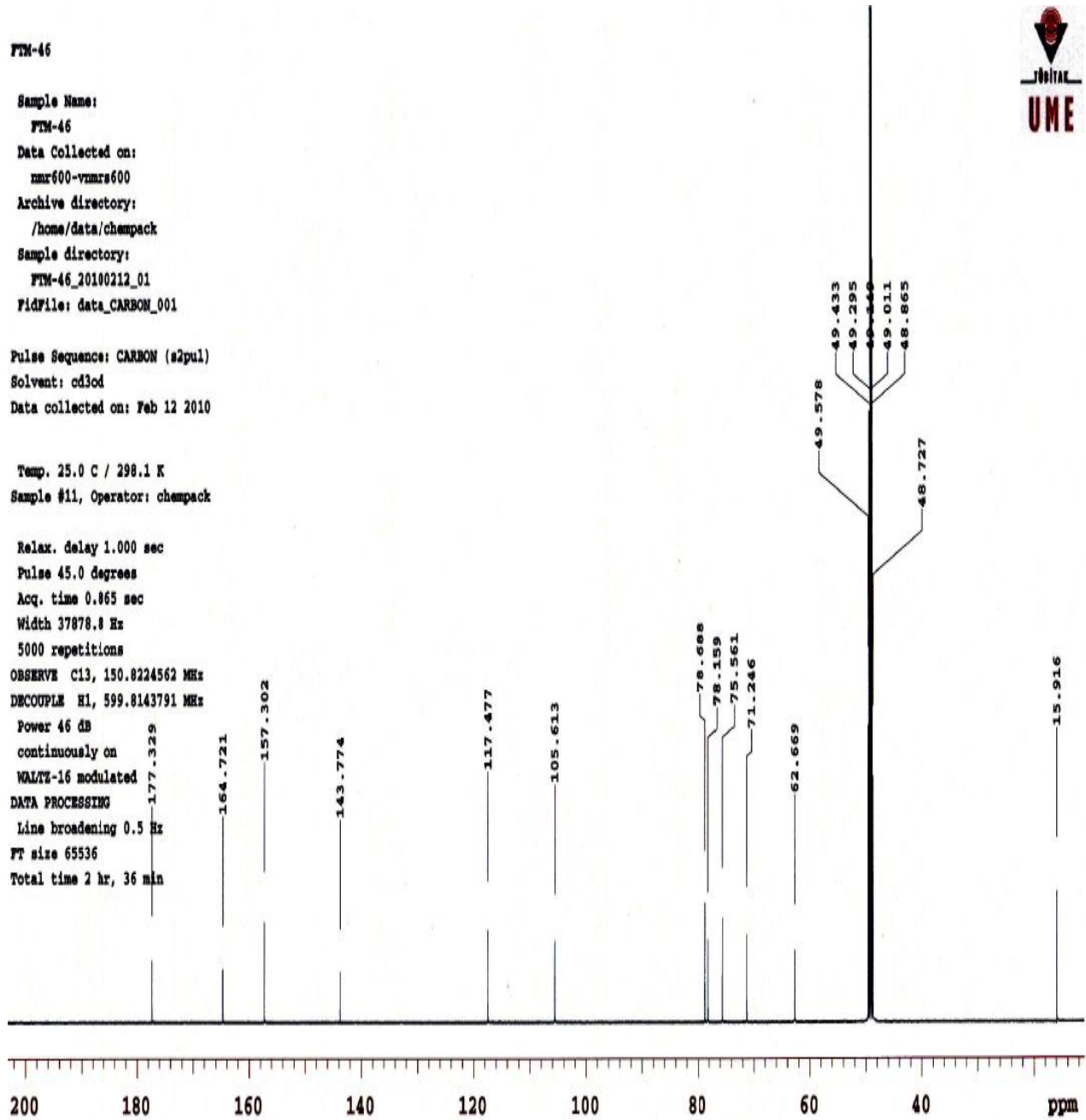
WALTZ-16 modulated

DATA PROCESSING

Line broadening 0.5 Hz

FT size 65536

Total time 2 hr, 36 min



Şekil F.3: İzomaltol-3β-O-glukozit ¹³C-NMR spektrumu

FTM-46

Sample Name:

FTM-46

Data Collected on:

nmr500-vnmr500

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

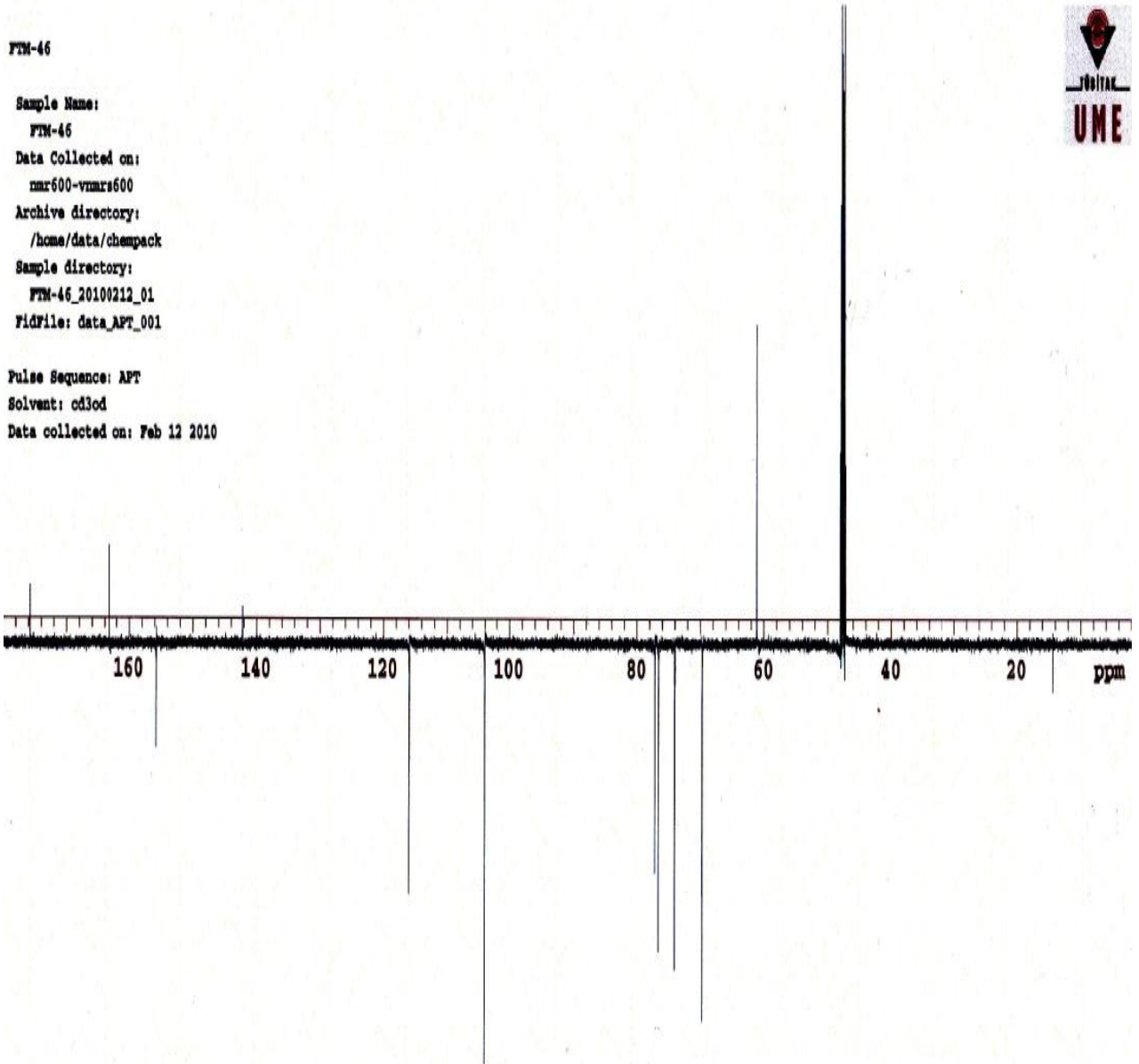
FTM-46_20100212_01

FidFile: data_APT_001

Pulse Sequence: APT

Solvent: cd3od

Data collected on: Feb 12 2010



Şekil F.4: İzomaltol-3β-O-glukozit APT spektrumu

TM-46

Sample Name:

FTM-46

Data Collected on:

nmr600-vnmr600

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

FTM-46_20100212_01

FidFile: data_gHSQCAD_001

ulse Sequence: gHSQCAD

olvent: cd3od

ata collected on: Feb 12 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K

ample #11, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.150 sec

Width 9615.4 Hz

2D Width 30165.9 Hz

4 repetitions

2 x 512 increments

OBSERVE H1, 599.8113801 MHz

DECOUPLE C13, 150.8362655 MHz

Power 36 dB

on during acquisition

off during delay

W40_autoX modulated

DATA PROCESSING

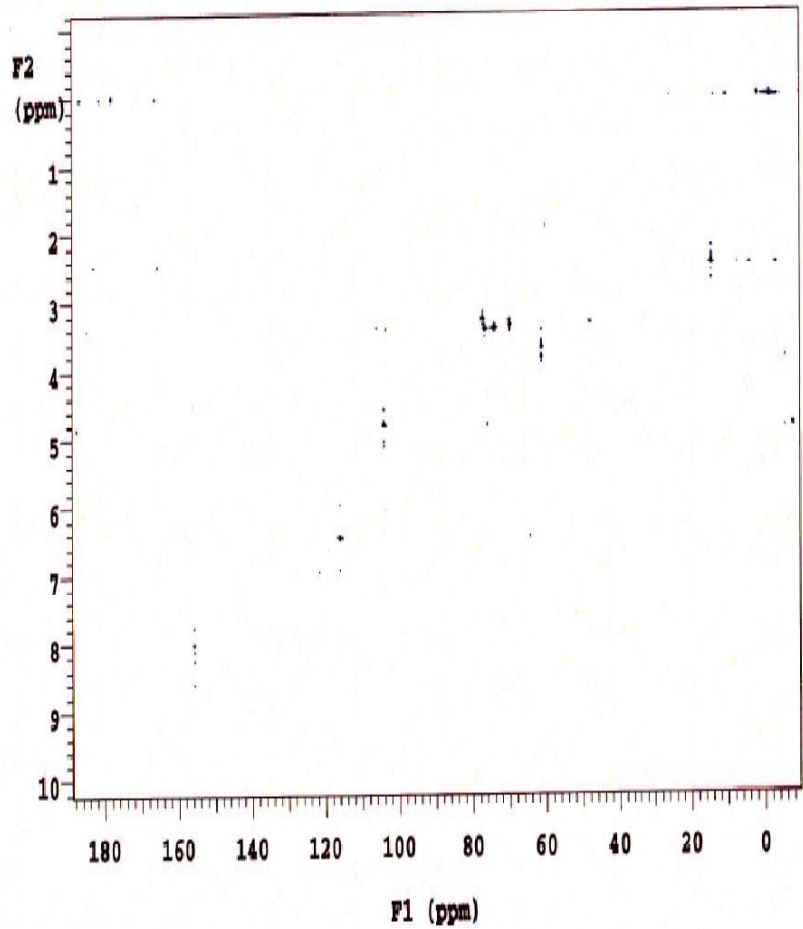
Gauss apodization 0.069 sec

F1 DATA PROCESSING

Gauss apodization 0.016 sec

FT size 4096 x 4096

Total time 1 hr, 23 min



Şekil F.5: İzomaltol-3β-O-glukozeit HSQC spektrumu.

FTM-46

Sample Name:

FTM-46

Data Collected on:

nmr600-vnmr600

Archive directory:

/home/data/chempack

Sample directory:

FTM-46_20100212_01

FidFile: data_gHBC_001

Pulse Sequence: gHBC

Solvent: cd3od

Data collected on: Feb 12 2010

Temp. 25.0 C / 298.1 K

Sample #11, Operator: chempack

Relax. delay 1.000 sec

Acq. time 0.150 sec

Width 9615.4 Hz

2D Width 36199.1 Hz

4 repetitions

2 x 512 increments

OBSERVE H1, 599.8113801 MHz

DATA PROCESSING

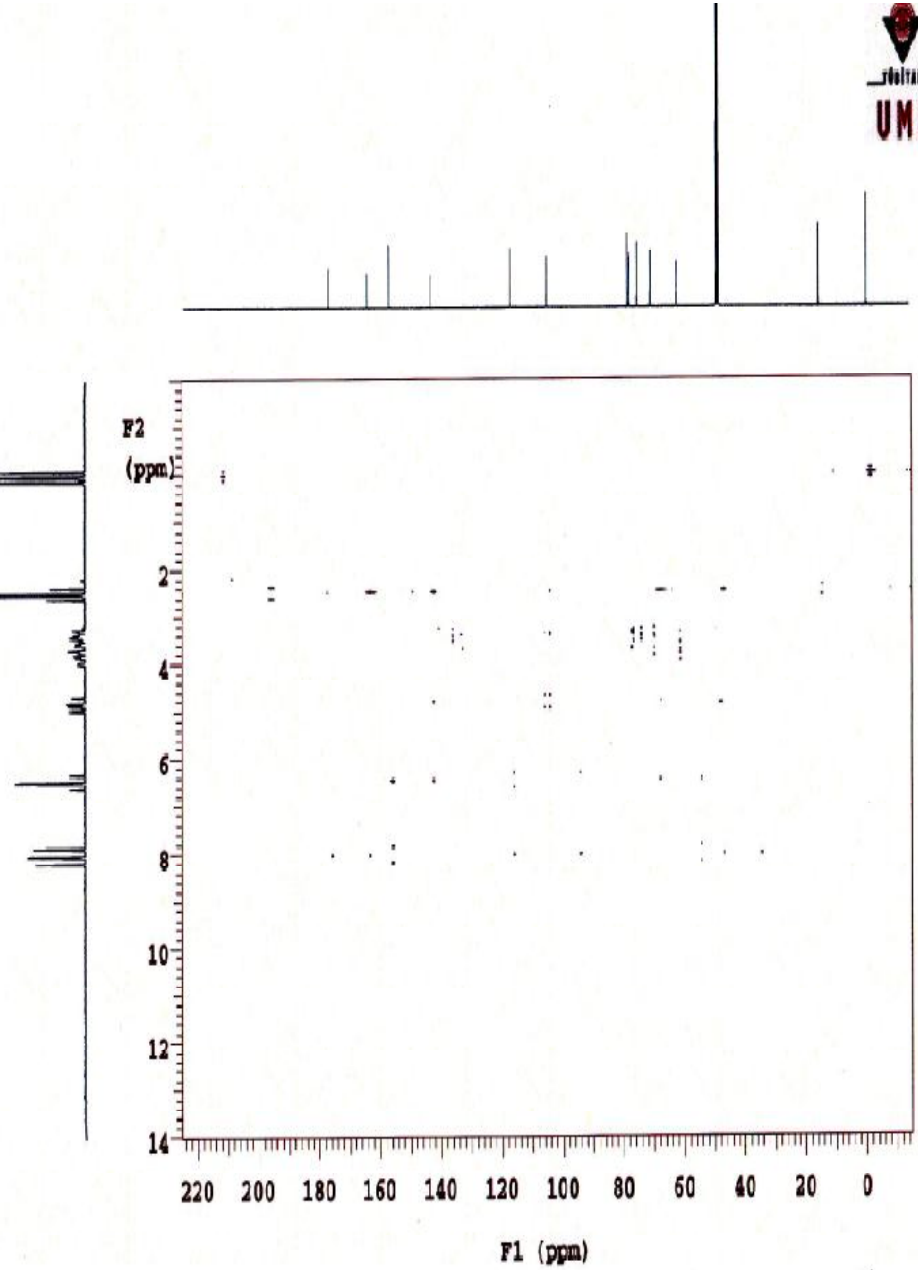
Sq. sine bell 0.075 sec

F1 DATA PROCESSING

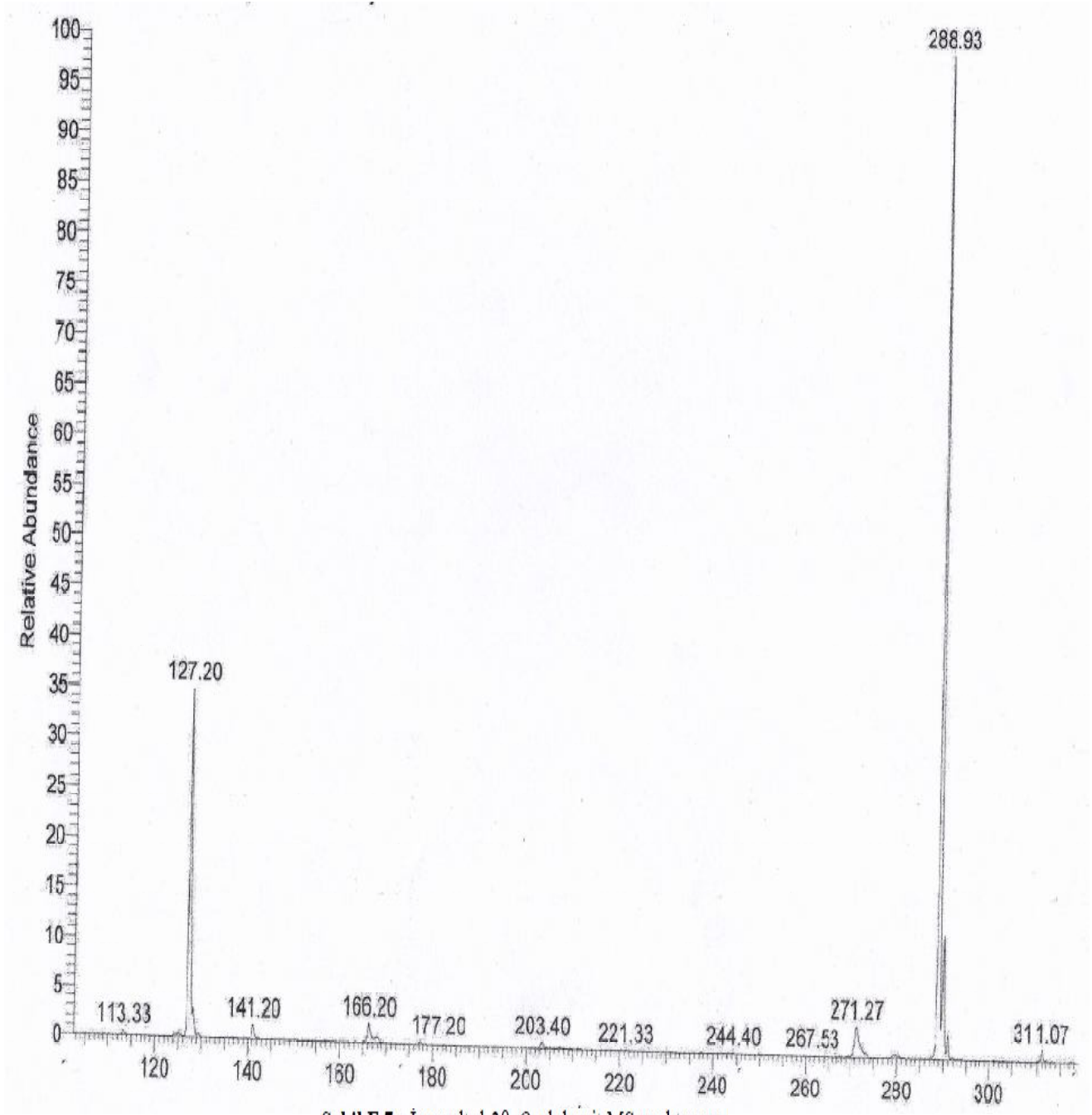
Gauss apodization 0.013 sec

FT size 4096 x 4096

Total time 1 hr, 26 min



Şekil F.6: İzomaltol-3β-O-glukozit HMBC spektrumu



Şekil F.7 : İzomaltol-3β-O-glukozit MS spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Begüm ÇAKAR

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul, 21.11.1985

Adres: Büyükturyolu Sok. Batu Apt. 55/8 İdealtepe/Maltepe

Lisans Üniversitesi: Yıldız Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü (2008)