

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***NEPETA SORGERAE* VE *NEPETA OBTUSICRENA* BİTKİLERİNİN
ANTİOKSİDAN VE ANTİ-ALZHEIMER BİLEŞENLERİNİN İZOLASYONU
VE YAPILARININ BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Anıl YILMAZ

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU

HAZİRAN 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***NEPETA SORGERAE VE NEPETA OBTUSICRENA BİTKİLERİNİN
ANTİOKSİDAN VE ANTİ-ALZHEIMER BİLEŞENLERİNİN İZOLASYONU
VE YAPILARININ BELİRLENMESİ***

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Anıl YILMAZ
(509091028)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 06 Mayıs 2011

Tezin Savunulduğu Tarih : 07 Haziran 2011

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Turan ÖZTÜRK (İTÜ)
Prof. Dr. Ufuk KOLAK (İÜ)**

HAZİRAN 2011

Herşeyimi borçlu olduğum canım aileme,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince her zaman yanımda olan, sonsuz bilgisiyle çalışmalarına ışık tutan, yön veren, kendisinden hem bilimsel anlamda hem de hayata bakış açısından çok şey öğrendiğim saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya bana kendisiyle çalışma fırsatı verdiği için teşekkürlerimi sunarım.

Çalıştığım bitkileri toplayan Doç. Dr. Tuncay Dirmenci'ye, engin bilgi ve yardımlarını esirgememiş olan Prof. Dr. Nezhun Gören ve Prof. Dr. Ufuk KOLAK'a, sıkıntılı zamanlarımda tavsiyelerini ve yardımlarını esirgememiş olan Yrd. Doç. Dr. Gönül YAPAR'a teşekkür ederim.

Aktivite çalışmalarında ve bilgisiyle her zaman yanımda olan Batman Üniversitesi Araştırma Görevlilerinden Mehmet Boğa'ya, HPLC çalışmaları ve spektroskopik ölçümlerde bıkmadan yardımlarını paylaşan Yıldız Teknik Üniversitesi Biyoloji Bölümü Uzmanlarından Pınar ÇAĞLAR'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Yüksek lisansıma başladığım andan itibaren daima yanımda olan, çalışmalarına yön veren, zorlu günlerimde tavsiyeleri ve yardımları ile manevi anlamda da destek olan Yüksek Kimyager Fatemeh BAHADORİ'ye, yüksek lisansım boyunca her zaman deneyimi ile bana destek olmuş olan Yüksek Kimyager Seda Damla HATİPOĞLU'na ve de aynı laboratuvarı paylaştığım ve benim için çok değerli olan laboratuvar arkadaşlarım; Burcu BÜTÜN ÇULHAOĞLU, Murat SARI, Begüm ÇAKAR, Tuba KUŞMAN, Demet DİNCEL, Tuba BAŞKAN, Kerem KARAKUŞ ve Hatice İmran GÜNGÖRDÜ' ye teşekkürü bir borç bilirim.

Benim için herşeyden değerli olan; maddi, manevi destek olarak bu günlere gelmemi sağlayan, herşeyimi borçlu olduğum aileme sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2011

Anıl YILMAZ

Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
KISALTMALAR.....	ix
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xv
SUMMARY.....	xvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Botanik Bilgiler	3
2.1.1 Lamiaceae (Labiatae) familyası	3
2.1.2 <i>Nepeta</i> cinsi.....	3
2.1.3 <i>Nepeta</i> türlerinin halk arasında kullanımı.....	4
2.1.4 <i>Nepeta sorgerae</i> (Hedge et Lamond)	4
2.1.5 <i>Nepeta obtusicrena</i> (Boiss. et Kotschy ex Hedge).....	6
2.2 Sekonder Metabolitler	7
2.2.1 Terpenler	9
2.2.1.1 Monoterpenler	10
2.2.1.2 İridoidler	12
2.2.1.3 Seskiterpenler	12
2.2.1.4 Diterpenler	13
2.2.1.5 Sesterterpenler	14
2.2.1.6 Triterpenler	15
2.2.1.7 Tetraterpenler	15
2.2.1.8 Steroidler.....	15
2.3 Antioksidanlar	16
2.3.1 Antioksidanların sınıflandırılması.....	17
2.3.1.1 Birincil antioksidanlar	17
2.3.1.2 İkincil antioksidanlar	18
2.3.2 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri	19
2.4 Antikolinesterazlar	20
2.4.1 Antikolinesteraz aktivite tayin yöntemleri.....	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	23
3.1 Bitkisel Materyaller	23
3.2 Ekstrelerin Hazırlanışı Ve İzolasyon Çalışmaları	23
3.3 Kimyasal Maddeler, Çözücüler Ve Çözeltiler	26
3.3.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler	26
3.3.2 Çözeltilerin hazırlanması	26
3.3.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler	26
3.3.2.2 Toplam flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler	26

3.3.2.3 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler	26
3.3.2.4 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler.....	27
3.3.2.5 İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi	28
3.4 Cihazlar Ve Gereçler.....	28
3.5 Ekstrelerin Toplam Fenolik Ve Toplam Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi	28
3.5.1 Toplam fenolik miktar tayini	28
3.5.2 Toplam flavonoid miktar tayini	29
3.6 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri.....	30
3.6.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi.....	30
3.6.2 Lipid peroksidasyonu inhibisyonu yöntemi (β -karoten-linoleik asit yöntemi)	30
3.7 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi	31
3.7.1 Ellman yöntemi.....	31
3.7.1.1 AChE inhibisyonu testi.....	32
3.7.1.2 BChE inhibisyonu testi.....	33
3.8 İstatiksel Hesaplamalar	34
3.9 Kromatografik Yöntemler	34
3.9.1 Kolon kromatografisi	34
3.9.2 İnce tabaka kromatografisi	34
3.10 Spektroskopik Yöntemler	35
3.10.1 UV spektroskopisi.....	35
3.10.2 IR spektroskopisi.....	35
3.10.3 NMR spektroskopisi.....	35
4. BULGULAR	37
4.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik Ve Toplam Flavonoid Miktar Sonuçları.....	37
4.2 Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	38
4.2.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları	38
4.2.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu (β -karoten renk açılım yöntemi) sonuçları	39
4.3 Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları	41
4.4 Saf Bileşiklerin İzolasyonu ve Yapı Tayini.....	42
4.4.1 N.O.DM-42-2 = Oleanolik asit = 3β -hidroksi-olean-12-en-28-oik asit	43
4.4.2 N.S.DM-89-3-2 ve N.O.DM-39-2 = Ursolik Asit = 3β -hidroksi-urs-12-en- 28-oik asit.....	45
4.4.3 N.S.DM-93-100-4-1 = 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi- <i>ent</i> -pimara-8,15 dien = Sorgeraolone	46
4.4.4 N.O.DM-58 = 2 α , 3 β , 19 α , 27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en.....	49
4.4.5 N.S.DM-50-4-7 = 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en = Obtusicrenone.....	50
4.5 Saf Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Sonuçları	54
4.5.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	54
4.5.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon (β -karoten renk açılımı) aktivitesi sonuçları	55
4.5.3 Saf maddelerin antikolinesteraz aktivite sonuçları	56
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	59
KAYNAKLAR.....	61
EKLER	69
ÖZGEÇMİŞ.....	105

KISALTMALAR

ABTS	: 2,2-Azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik Asit
Ace	: Aseton
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AcI	: Asetiltiyokolin iyodür
A•	: Antioksidan radikaller
AH	: Birincil antioksidanlar
APT	: Attached proton test
APP	: Amiloid beta prekürsör proteini
BCh	: Butirilkolin
BChE	: Butirilkolinesteraz enzimi
BcI	: Butiriltiyokolin iyodür
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
CH₃CN	: Asetonitril
COSY	: Correlation Spectroscopy
CUPRAC	: Cupric Reducing Antioxidant Capacity
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DCFH-DA	: 2',7'-dichlorofluorescein diacetate
DCM	: Dichloromethane
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
DTNB	: 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FCR	: Folin Ciocalteu fenol reaktifi
FDA	: Food and Drug Administration
FRAP	: Ferric Reducing Antioxidant Power
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	: Heteronuclear multiple quantum coherence (HSQC)
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IR	: Infrared spektroskopisi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi (TLC)
ln	: Doğal logaritma
MeOH	: Metanol
NADH	: Nikotinamitadenin dinükleotit
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
NMDA	: N-metil-D-aspartat
O₂•	: Süperoksit radikali
OH•	: Hidroksil radikali
PEs	: Pirokatekole eşdeğer
Q	: Kersetin
QEs	: Kersetine eşdeğer

R•	: Alkil radikalleri
RO•	: Alkoksi radikalleri
ROO•	: Peroksit radikalleri
ROOH	: Hidroperoksitler
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
RS•	: Tiyl radikalleri
RSO•	: Sülfenil radikalleri
RSO₂•	: Tiyl peroksit radikalleri
subsp	: Subspecies
TMS	: Tetrametilsilan
TOC	: α -Tokoferol
TOSC	: Total oxyradical scavenging capacity
TRAP	: Total Radical Absorption Potentials
Tween-40	: Polioksietilensorbitan monopalmitat
UV	: Ultraviyole spektroskopisi

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen ve azot türleri	17
Çizelge 4.1 : Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları	38
Çizelge 4.2 : Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	38
Çizelge 4.3 : Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları	40
Çizelge 4.4 : Ekstrelerin antikolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)	41
Çizelge 4.5 : 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi- <i>ent</i> -pimara-8,15-dien bileşiğinin ^1H ve ^{13}C -NMR verileri (CDCl_3)	48
Çizelge 4.6 : 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin ^{13}C -NMR verileri (CDCl_3)	50
Çizelge 4.7 : 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en bileşiğinin ^{13}C -NMR verileri (CDCl_3)	53
Çizelge 4.8 : 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en bileşiğinin HMQC korelasyonu	53
Çizelge 4.9 : 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en bileşiğinin HMBC korelasyonu	54
Çizelge 4.10 : Maddeler ve kodları.	54
Çizelge 4.11 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri	54
Çizelge 4.12 : İzole saf bileşiklerin lipid peroksidasyon % inhibisyonu	55
Çizelge 4.13 : Maddeler ve kodları	56
Çizelge 4.14 : İzole saf maddelerin antikolinesteraz (AChE) aktivitesi sonuçları	57
Çizelge 4.15 : İzole saf maddelerin antikolinesteraz (BChE) aktivitesi sonuçları	57

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : <i>Nepeta sorgerae</i> (Hedge et Lamond).....	5
Şekil 2.2 : <i>Nepeta obtusicrena</i> (Boiss. Et Kotschy ex Hedge)	6
Şekil 2.3 : Sekonder metabolitlerin oluşumu	8
Şekil 2.4 : İzopren uniteleri ve birleşme şekilleri	9
Şekil 2.5 : Asiklik monoterpenler	10
Şekil 2.6 : Monosiklik monoterpenler	10
Şekil 2.7 : Bisiklik monoterpenler.....	11
Şekil 2.8 : Düzensiz monoterpenler (İridoidler)	11
Şekil 2.9 : Uçucu yağlar.....	11
Şekil 2.10 : Bazı nepetalaktonlar (İridoidler)	12
Şekil 2.11 : Bazı seskiterpenler	12
Şekil 2.12 : Diterpen iskeletleri.....	13
Şekil 2.13 : Bazı önemli diterpenler	14
Şekil 2.14 : Sclarin	14
Şekil 2.15 : Triterpenler	15
Şekil 2.16 : β -Karoten bileşiği	15
Şekil 2.17 : Steroidlerin iskelet yapısı	16
Şekil 2.18 : Steroid	16
Şekil 2.19 : Birincil antioksidanlar	18
Şekil 2.20 : İkincil antioksidanlar	19
Şekil 2.21 : Sırasıyla, sağlıklı, orta derecede Alzheimer'lı ve ileri derecede Alzheimer'lı beyin	21
Şekil 3.1 : <i>Nepeta sorgerae</i> bitkisinin diklorometan ve metanol ekstralarının hazırlanması ve saflaştırılması	24
Şekil 3.2 : <i>Nepeta obtusicrena</i> bitkisinin diklorometan ve metanol ekstralarının hazırlanması ve saflaştırılması	25
Şekil 3.3 : Standart olan pirokatekol bileşiğin açık yapısı.....	29
Şekil 3.4 : Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kersetinin açık yapısı	29
Şekil 3.5 : Galantamin bileşiği	32
Şekil 3.6 : Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması.....	33
Şekil 4.1 : <i>N. sorgerae</i> ve <i>N. obtusicrena</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları.....	39
Şekil 4.2 : <i>N. sorgerae</i> ve <i>N. obtusicrena</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının lipid peroksidasyon % inhibisyonu.....	40
Şekil 4.3 : <i>N. sorgerae</i> ve <i>N. obtusicrena</i> bitki ekstralarının antikolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)	41
Şekil 4.4 : Oleanolik asit.....	43
Şekil 4.5 : Ursolik asit	45
Şekil 4.6 : 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-ent-pimara-8,15-dien	46
Şekil 4.7 : 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en	49
Şekil 4.8 : 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en	51

Şekil 4.9 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri.....	55
Şekil 4.10 : İzole saf bileşiklerin β -karoten renk açılım yöntemiyle lipid peroksidasyon inhibisyon aktiviteleri.....	56
Şekil 4.11 : İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu.....	57
Şekil 4.12 : İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu.....	58

NEPETA SORGERAE HEDGE ET LAMOND VE NEPETA OBTUSICRENA BOISS. ET KOTSCHY EX HEDGE BİTKİLERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİ-ALZHEIMER BİLEŞENLERİNİN İZOLASYONU VE YAPILARININ BELİRLENMESİ

ÖZET

Nepeta türleri, güzel kokulu bir ya da çok yıllık bitkileri kapsayan Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait bitkilerdir. Dünyada 250 yi aşkın tür ile geniş bir yayılım gösteren *Nepeta* cinsi ülkemizde 37 tür altında 22'si endemik olmak üzere 44 takson ile temsil edilmektedir.

Nepeta türlerinin sekonder metabolitleri; terpenler (monoterpen yapısındaki iridoidler, diterpenler, seskiterpenler, triterpenler) ve flavonoidlerdir. *Nepeta* cinsi bitkiler, sinir yatıştırıcı, antispazmodik etkilerinin yanı sıra böcek kovucu ve kedilerde sakinleştirici etkiye de sahiptir. *Nepeta* cinsi bitkiler halk arasında kedi otu ya da kedi nanesi olarak bilinmektedirler ve terlemeyi sağladığı için çoğu zaman bitkisel çay olarak kullanılırlar. Ayrıca öksürük ve bağırsak rahatsızlıklarında, bazen de lavman olarak kullanılır.

Bu çalışmada kimyasal olarak daha önce çalışılmamış olan *Nepeta sorgerae* (Hedge et Lamond) ve *Nepeta obtusicrena* (Boiss. et Kotschy ex Hedge) bitkilerinin sekonder metabolitlerinin izolasyonu ve karakterizasyonunun yanı sıra hem bitki ekstraktlarının hem de saf maddelerin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri *in vitro* olarak incelendi. Öncelikle her iki bitki diklorometan ile masere (7gün x 2) edilmiştir, diklorometan ile tüketilen bitkiler daha sonra metanol ile tüketildi (7gün x 2). Bu ekstraktların toplam fenolik miktarları pirokatekole ve toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildi ve antioksidan aktiviteleri lipid peroksidasyon inhibisyonu (β -karoten renk açılımı) ve DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi yöntemleriyle, antikolinesteraz aktivitesi ise Ellman yöntemi kullanılarak asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı belirlendi. Her iki bitkinin diklorometan ekstraktlarının orta derecede antioksidan aktivite göstermesi nedeniyle ekstraktlar kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı ve elde edilen fraksiyonlar preparatif ince tabaka kromatografisi ve gerektiğinde HPLC ile saflaştırıldı. Saf bileşiklerin yapıları çeşitli spektroskopik (başlıca NMR, kütle, IR) yöntemlerle belirlendi. Üçü yeni olmak üzere beş bileşik izole edildi. *N. sorgerae* bitkisinin diklorometan ekstresinden bilinen triterpen olarak ursolik asit ve pimaran iskeletine sahip yeni bir diterpen olarak 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-ent-pimara-8,15-dien (sorgeraolone), *N. obtusicrena* bitkisi diklorometan ekstresinden bilinen triterpenler olan oleanolik asit, ursolik asit, yeni bir triterpen olarak 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en ve abietan iskeletine sahip yeni bir diterpen olarak 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en (obtusicrenone) izole edildi. Saf maddelerin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri ise ekstraktlar için kullanılan yöntemler ile incelendi.

Bu alışma, İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34028

THE ISOLATION AND STRUCTURE ELUCIDATION OF THE CONSTITUENTS OF *NEPETA SORGERAE* HEDGE ET LAMOND AND *NEPETA OBTUSICRENA* BOISS. ET KOTSCHY EX HEDGE PLANTS WITH ANTIOXIDANT AND ANTI-ALZHEIMER ACTIVITIES

SUMMARY

Nepeta species are members of Lamiaceae family which has annual or perennial plants with nice aroma. The genus *Nepeta* has a worldwide distribution with over 250 species. In Turkey *Nepeta* species are represented by 44 taxa, which of 22 being endemic under 37 species.

Secondary metabolites of *Nepeta* species are namely terpenes (monoterpene type iridoids, diterpenes, sesquiterpenes, triterpenes) and flavonoids. *Nepeta* species have antidepressant and antispasmodic effects. Along with these properties these species are known as insecticide and have sedative effect on cats. In folk medicine, *Nepeta* members are known as ‘‘catnip’’ and are widely used as tea since their diaphoretic effect. These species are used in the treatment of cough, intestinal disorders, and sometimes as clyster.

In this master thesis, the chemical constituents of *Nepeta sorgerae* (Hedge et Lamond) and *Nepeta obtusicrena* (Boiss. et Kotschy ex Hedge) have determined besides anti-cholinesterase and anti-oxidant activity of the extracts and their isolated pure compounds *in vitro* for the first time. Primarily, these two plants have been extracted by using dichloromethane (7days x 2) and then with methanol (7days x 2). The total phenolic and total flavonoid constituents of the studied extracts are measured as pyrocatechol and quercetine equivalent, respectively. Antioxidant activity of these extracts has been determined by using DPPH radical scavenging and lipid peroxidation inhibition (β - carotene bleaching) methods. Anti-Alzheimer activity of the extracts has been studied by using the Ellman method via inhibition of acetylcholine esterase (AChE) and butyrylcholine esterase (BChE) enzymes. Since the dichloromethane extracts of both plants have moderate antioxidant activity they have been fractionated by using column chromatography, and the obtained fractions have been purified using thin layer chromatography (TLC) and high pressure liquid chromatography (HPLC). Structure identification of the isolated compounds has been achieved by using different spectroscopic methods (mainly NMR, MS and IR). Five terpenoids including three novel compounds have been isolated. From dichloromethane extract of *Nepeta sorgerae*, a known triterpene ursolic acid and a new pimarane diterpene 7-oxo-14 α -acetoxy-18-hydroxy-*ent*-pimara-8,15-diene (sorgeraolone) were obtained. From dichloromethane extract of *Nepeta obtusicrena* a new triterpenoid 2 α , 3 β , 19 α , 27-tetrahydroxy-11-oxoolean-12-ene, and a new abietane diterpene 6-oxo-14 α -acetoxy-abieta-7-ene (obtusicrenone) were obtained along with known triterpenoids oleanolic acid and ursolic acid. The antioxidant and anticholinesterase activity of the pure compounds have been investigated by using the same methods mentioned for the extracts.

The present work was supported by the Research Found of Istanbul Technical University. Project No: 34028.

1. GİRİŞ

İnsanların çeşitli bitkileri derman bulmak amacı ile kullanmaları çok eskilere dayanmaktadır. Bitkilerin bu bazı hastalıkları iyileştirici özellikleri ihtiva ettikleri aktif metabolitlerden kaynaklanmaktadır. Bu tez çalışması grubumuzun Lamiaceae familyası türleri üzerindeki sistematik çalışmalarının devamı niteliğinde ve daha önce farklı *Nepeta* türleri üzerinde gerçekleştirilen çalışmaları tamamlayıcı niteliktedir. Çalışmanın spesifik amacı ise *Nepeta sorgerae* ve *Nepeta obtusicrena* isimli bitkilerin sekonder metabolitlerinin izolasyonu, karakterizasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesidir.

Nepeta cinsi dünyada 250 cinsle temsil edilen Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait bitkilerden olup ülkemizde 37 tür altında 22'si endemik olmak üzere toplam 44 takson ile temsil edilmektedir. *Nepeta* türleri halk arasında genellikle 'kedi naneleri' olarak bilinir ve analjezik etkileri vardır. *Nepeta sorgerae* ve *Nepeta obtusicrena* bitkileri *Nepeta* cinsinin iki endemik türü olup bilim dünyasına 1980 ve 1962 yıllarında tanıtılmıştır. Literatürde *Nepeta sorgerae* ile ilgili sadece bir uçucu yağ çalışması bulunmakta olup, hem *Nepeta sorgerae* hem de *Nepeta obtusicrena* ile ilgili izolasyon çalışması bulunmamaktadır. Üzerinde çalışılan *Nepeta sorgerae* ; Malatya, Tepehan Beldesi-Nemrut Dağı arası, Büyük Uz Köyü üzeri 1645 m. yükseklikte 21.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından ve *Nepeta obtusicrena*; Bitlis, Nemrut Dağı, krater içi, 2450 m. yükseklikte 24.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından toplanmıştır. *Nepeta* türlerinin sekonder metabolitleri başlıca monoterpen iridoidler olmak üzere pimarane, labdan ve abietan iskeletine sahip diterpenler, triterpenler, glikozidler, uçucu yağlar ve diğer sekonder metabolitlerden oluşmaktadır.

Bu çalışmada daha önce kimyasal olarak çalışılmamış endemik iki tür olan *Nepeta sorgerae* ve *Nepeta obtusicrena* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstraktlarının ihtiva ettiği sekonder metabolitler çeşitli kromatografik yöntemlerle (kolon kromatografisi, prep. TLC., HPLC) izole edildikten sonra saflaştırılmıştır.

Saf bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle (NMR, IR, kütle) aydınlatılmış ve bu bitkilerin gerek ekstrelerinin, gerekse saf bileşiklerinin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri incelenerek ilaç olma potansiyelleri araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Botanik Bilgiler

2.1.1 Lamiaceae (Labiatae) familyası

Lamiaceae, çoğunlukla güzel kokulu, bir ya da çok yıllık otsular, nadiren çalılar veya ağaçları kapsayan bir çiçekli bitkiler familyasıdır. Yaprakları karşılıklı, çiçekleri iki kanatlı, tek bakışlı ve hemen her zaman erdişi, sapları dört köşelidir. Yapraklarında kokulu yağ salgılayan küçük salgı bezleri bulunur. Dolayısıyla başta nane, kekik ve lavanta çiçeği olmak üzere bu familyaya ait çiçekler bol ıtırılı olur. Familya üyeleri uçucu ve aromatik yağ içermelerinden dolayı farmakoloji ve parfüm sanayinde kullanılırlar. Türlerden eterik yağ elde edilir. Baharat olarak kullanılır ve süs bitkisi olarak yetiştirilir [1].

Lamiaceae, familyasının yeryüzünde 250 kadar cinsi ve 3200'ü aşkın türü mevcuttur. Yurdumuzda ise 46 cins ve bunlara ait 758 takson ile temsil edilen Lamiaceae familyası Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası olup ülkemizdeki endemizm oranı % 45'tir. Lamiaceae familyasındaki birçok türün hem süs bitkisi olarak hem de tıbbi özelliklerinden dolayı kültürü yapılmaktadır [2].

2.1.2 *Nepeta* cinsi

Lamiaceae familyasının bir üyesi olan *Nepeta* cinsinin 250 yi aşkın türü bulunmaktadır ve *Nepeta* cinsi bitkiler genellikle Avrupa, Asya, Kuzey Amerika, Kuzey Afrika ve Akdeniz bölgelerinde yayılış göstermektedir [3].

Nepeta türünün çoğu, ot cinsinden sürekli bitkilerdir, ama bazıları çok yıllık bitkidir. Çiçekler; beyaz, mavi, pembe veya leylak rengine olabilir. Sapların ucuna doğru birkaç kümede meydana gelir. Çiçekler boru biçiminde şekillidir ve küçük mor noktalarla seçilir. Genelde kedi naneleri olarak bilinir [4].

Nepeta cinsi bitkiler; başlıca monoterpen iridoidler olmak üzere bazı diterpenler (özellikle pimarane, labdan ve abietan iskeletine sahip diterpenler), tirterpenler, glikozidler ve uçucu yağları ihtiva etmektedirler [3,5-8].

2.1.3 *Nepeta* türlerinin halk arasında kullanımı

- *Nepeta* türleri halk arasında ekzema ve benzeri cilt hastalıklarına karşı, diüretik ve bakteriostatik etkilerden dolayı kullanılmaktadır. Toprak üstü kısımları, infüzyon halinde (% 2-3) midevi ve uyarıcı olarak kullanılmaktadır [9].
- *Nepeta*, terlemeyi sağladığı için çoğu zaman bitkisel çay olarak kullanılır. Orta yaştaki kişiler için sinirlilik, grip, ateşlenmelerin önlenmesinde kullanılır [4].
- Bunların dışında ağırlı mesane iltihabı sendromlarında, ishal, kolik ve bazı çocuk hastalıklarını iyileştirdiği, premature doğumlar ve sabah bulantılarını önlediği iddia edilir. Saçları kuvvetlendirdiği ve hızlı büyümesini sağladığı söylenmesine rağmen kanıtlanamamıştır. Bazen lavman olarak kullanılır [4].
- Bitkisel ilaç olarak catnip sinir yatıştırıcı müsekkin ve antispazmodik olarak kullanılır. Ayrıca uykusuzluk, stres, adetle ilgili kramplar, öksürük ve bağırsaklara ait rahatsızlıkları hafifletmek için kullanılır [4].
- Örneğin; *Nepeta cataria* bitkisi 17. yüzyıldan beri kuvvetlendirici, dezenfektan, soğuk algınlıkları tedavi edici olarak halk arasında kullanılagelmiştir [10].
- Iowa State Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada *Nepeta cataria*'nın bitki yağı olarak elde edilen saf Nepetalakton'nun haşere kovucu olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [4].
- *Nepeta hindostana*'nın alkol ekstresi serum lipid ve protein seviyelerini düşürücü olduğundan arterosklerozise karşı kullanılmaktadır [11].

2.1.4 *Nepeta sorgerae* (Hedge et Lamond)

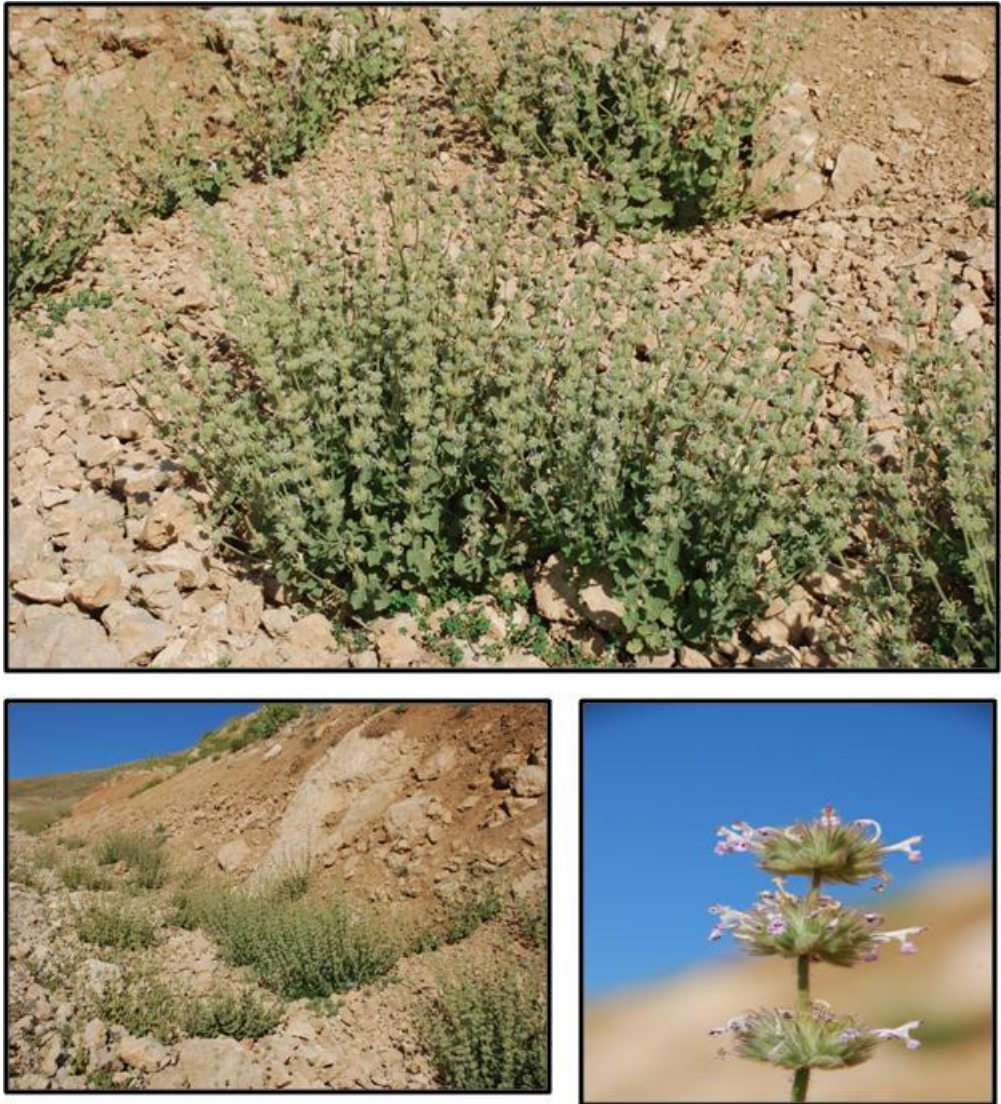
Nepeta sorgerae, bilim dünyasına ilk olarak 1980 yılında tanıtılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Nepeta sorgerae*, Malatya, Tepehan Beldesi-Nemrut Dağı arası, Büyük Uz Köyü üzeri, 1645 m. yükseklikten 21.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından toplanmıştır.

Nepeta sorgerae, çok yıllık, otsu bir bitkidir. Çiçeklenme mevsimi temmuz ayıdır, genellikle 2100-2300 m. yükseklikte dağ steplerinde yayılış gösterirler ve Türkiye'de Doğu Anadolu Bölgesi, Adıyaman (c7 bölgesi) endemik türüdür [12]. Uzun ömürlü olan bu bitkinin gövdesi dik, dallı ya da dalsız, 25-60 cm. boyunda, yaprakları yumurtamsı ve 1.5-4.0 × 1.2-3.8 cm. ebatlarında, koyu gri, kısa ve uzun tüylüdür.

Bitkinin alt kısmındaki yapraklar 1 cm. boyunda ve yaprak sapına sahip, üst kısımdaki yapraklar sapsızdır. Çiçekleri 9-11 mm. boyunda, düz veya hafif eğridir. Taç yapraklar soluk mor ve 10-13.5 mm. boyundadır [13].

Bu bitki insanların rahatlıkla ulaşabileceği bölgelerde yetiştiğinden ve de çok dar bir alanda yayılım gösterdiğinden soyu tükenme tehlikesi altındadır ve tehlike kategorisi LR (cd)'dir [13].

Literatürde bu bitki ile ilgili olarak uçucu yağ çalışması bulunmakla birlikte kimyasal bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürdeki çalışmada elde edilen uçucu yağlar β -pinene, α -terpineol, germacrene-D ve spathulenol'dür [14].



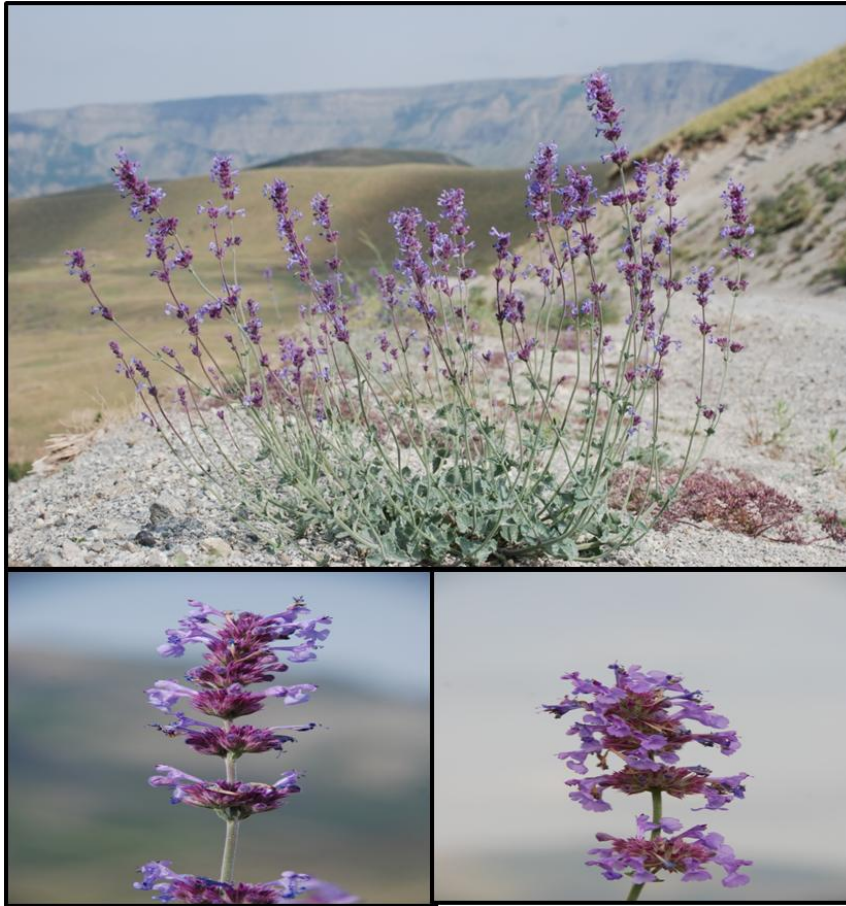
Şekil 2.1: *Nepeta sorgerae* (Hedge et Lamond)

Foto: Tuncay Dirmenci

2.1.5 *Nepeta obtusicrena* (Boiss. et Kotschy ex Hedge)

Nepeta obtusicrena, bilim dünyasına ilk olarak 1962 yılında tanıtılmıştır. Bu çalışmada kullanılan *Nepeta obtusicrena*, Bitlis, Nemrut Dağı, krater içi 2450 m. yükseklikten 24.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından toplanmıştır.

Nepeta obtusicrena, çok yıllık, otsu bir bitkidir. Çiçeklenme mevsimi Temmuz-Eylül ayları arasındır, genellikle 1830-2100 m. yükseklikte bozkır ve volkanik bölgelerde yayılış gösterirler ve Türkiye’de Güneydoğu Anadolu Bölgesi, Bitlis, Siirt (b9 bölgesi) endemik türüdür [12]. Uzun ömürlü, gövdesi dik, birkaç ya da çok dallı, 40-70 cm boyunda ve tüylü bir bitkidir. Yaprakları yumurtamsı, $0.9-4 \times 0.9-3$ cm. ebatlarında, çiçekleri tepede, kalp şeklinde, düz veya hafif eğik, 7-9 mm. ebatında üçgen veya dikdörtgendir. Çiçek ağzı eğik ve dudak ayrıktır. Taç yapraklar eflatun, mavi ve lavanta renginde ve 12-16 mm. çapındadır ve bu bitkinin tehlike kategorisi LR (cd)’dir [13]. Literatürde bu bitki ile ilgili kimyasal bir çalışma bulunmamaktadır.



Şekil 2.2: *Nepeta obtusicrena* (Boiss. et Kotschy ex Hedge)
Foto: Tuncay Dirmenci

2.2 Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler, bitkiler tarafından üretilen ve bitkinin temel yaşamsal işlevleri ile doğrudan ilişkisi olmayan, bitkide savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini devam ettirmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş mekanizmaların ürünleridir [15].

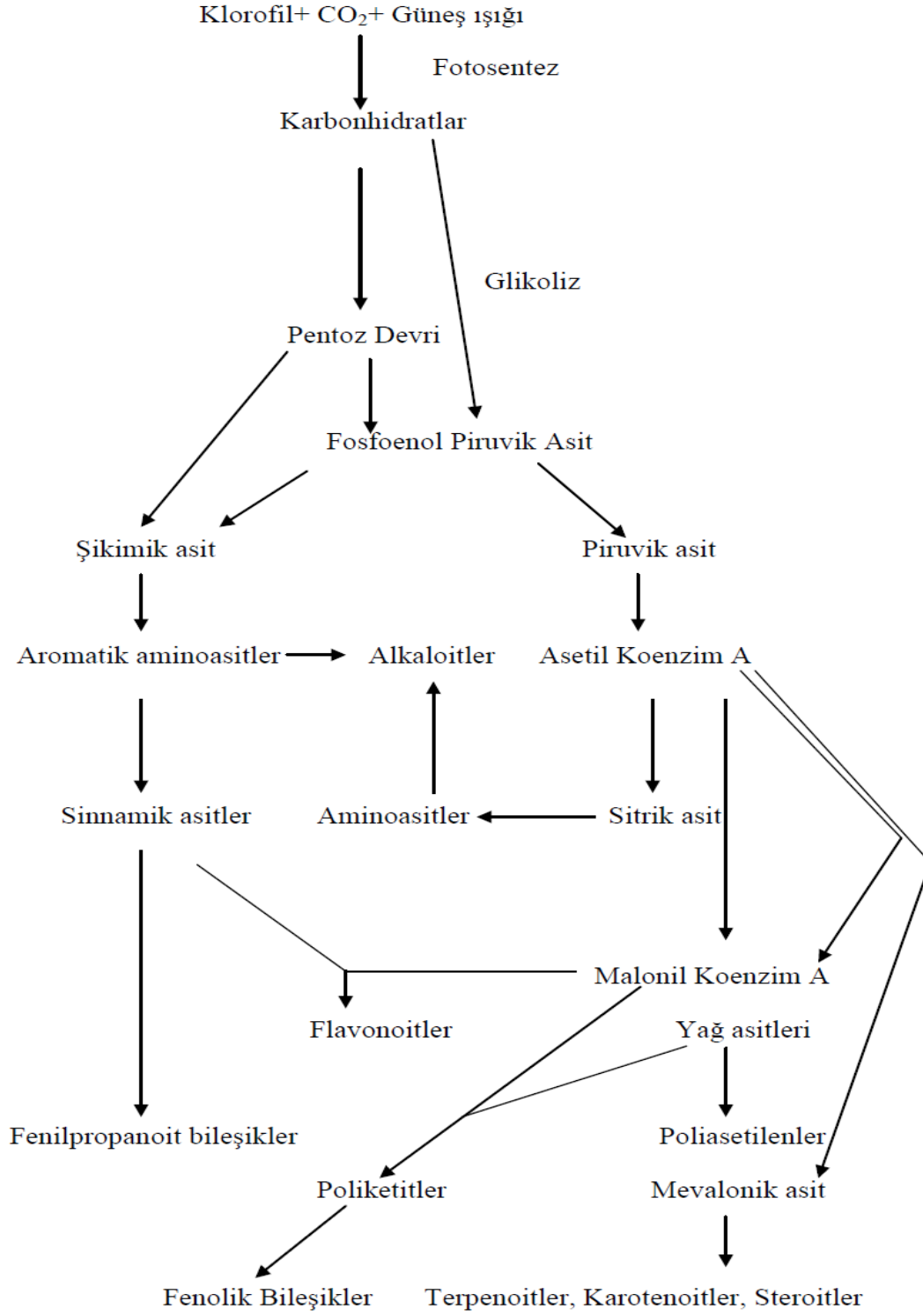
Bu maddelerin bitkideki önemli görevleri şunlardır [15]:

- 1) Kuraklık, tuzluluk, UV ışınları vs. gibi değişik çevre faktörlerinin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma,
- 2) Herbiyora (böcek, sürüngen vb.) karşı savunma,
- 3) Mikroorganizmalara (bakteri, mantar vb.) karşı savunma,
- 4) Bazı metabolik ve daha gelişmiş ekolojik işlevler (örneğin; tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbettirme gibi).

Sekonder metabolitlerin günlük hayattaki önemine gelince bu kimyasallar başta ilaç sanayisinin hammaddesi olup kozmetik, besin katkı maddesi, zirai ilaç sanayiinde ve birçok kimya sektöründe kullanılmaktadır. Sekonder metabolitlerin kullanım alanlarını başlıklar altında sıralayacak olursak [15];

- 1) İlaç hammaddesi olarak kullanılan sekonder metabolitler (örneğin, aspirinin hammaddesi söğüt ağacının kabuklarından elde edilen asetilsalisilik asittir),
- 2) Besin katkı maddesi olarak kullanılan sekonder metabolitler. Besin endüstrisinde sekonder metabolitler tat ve koku verici maddeler olarak kullanılırlar.
- 3) Zirai ilaç olarak kullanılan sekonder metabolitler. Zirai mücadelede de sekonder metabolitlerin oldukça önemli yeri vardır. Bunun en önemli sebebine gelince sekonder metabolitler doğaldır. Diğer suni insektisitler (böcek öldürücü maddeler) gibi çevreye olumsuz etki yapmazlar.
- 4) Kozmetik sektöründe kullanılan sekonder metabolitler. Örneğin, bitkilerden elde edilen hoş kokulu bileşikler olan uçucu yağlar parfüm sanayinde kullanılır.

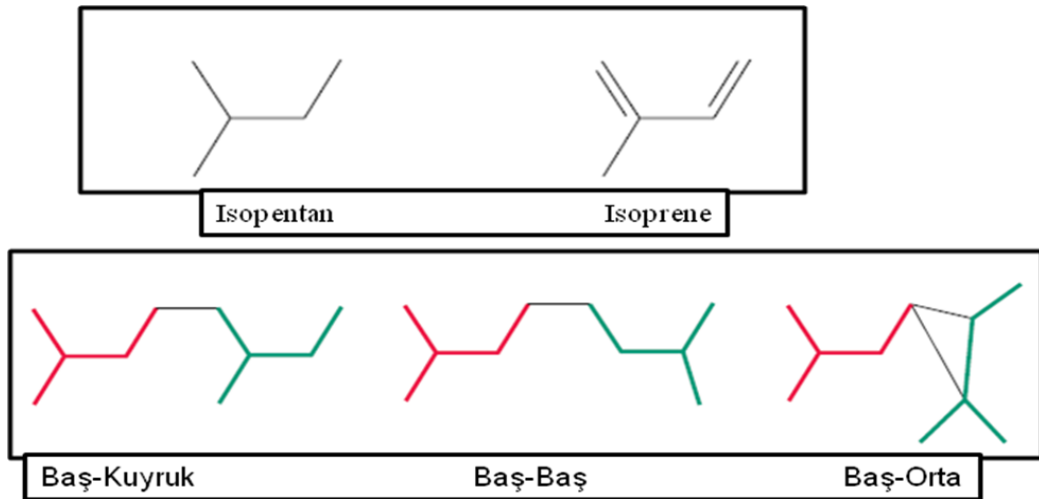
Başlıca sekonder metabolitler terpenler, fenolik bileşikler ve alkaloidlerdir.



Şekil 2.3: Sekonder metabolitlerin oluşumu

2.2.1 Terpenler

Terpenler; dallanmış, beş karbonlu bir yapı olan izopentan iskeletlerinin birleşmeleri ile meydana gelen bileşiklerdir. Bu izopentan monomerleri genellikle polimerleşerek çoklu yapı oluşturabilmek için konformasyonel olarak izopren yapısında olmayı tercih ederler ve bu izopren unitelerinin çeşitli şekillerde birleşmeleriyle terpenler oluşurlar. İzopren uniteleri aşağıdaki şekilde de görüldüğü gibi, bir izoprenin baş kısmının diğer izoprenin baş kısmıyla, bir izoprenin baş kısmının diğer izoprenin kuyruk kısmıyla ya da bir izoprenin baş kısmının diğer izoprenin orta kısmıyla birleşmesiyle olmak üzere üç şekilde birleşebilirler. Bunlardan doğada en yaygın olanları baş-baş ve baş-kuyruk birleşmeleridir [16].



Şekil 2.4: İzopren uniteleri ve birleşme şekilleri

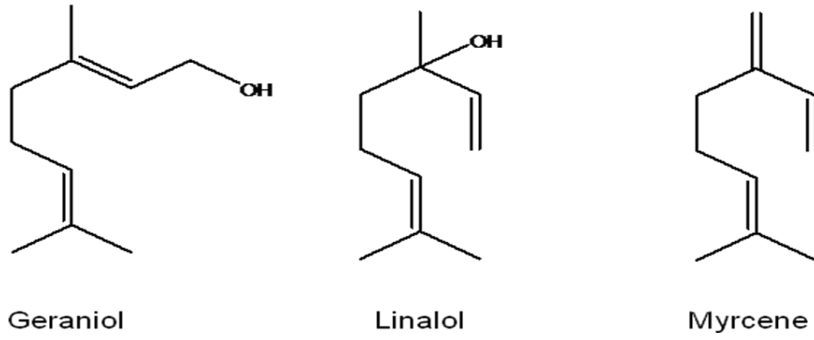
Terpenler kendilerini oluşturan izopren unitelerinin sayısına diğer bir deyişle karbon sayılarına göre sınıflandırılırlar.

- Bir izopren unitesi içeren (5 karbonlu) terpenler hemiterpenler (yarı-terpenler),
- İki tane izopren unitesi içeren (10 karbonlu) terpenler monoterpenler,
- Üç tane izopren unitesi içeren (15 karbonlu) terpenler seskiterpenler,
- Dört tane izopren içeren (20 karbonlu) terpenler diterpenler,
- Beş tane izopren içeren (25 karbonlu) terpenler sesterterpenler,
- Altı tane izopren içeren (30 karbonlu) terpenler triterpenler,
- Sekiz tane izopren içeren (40 karbonlu) terpenler tetraterpenler olarak adlandırılırlar.

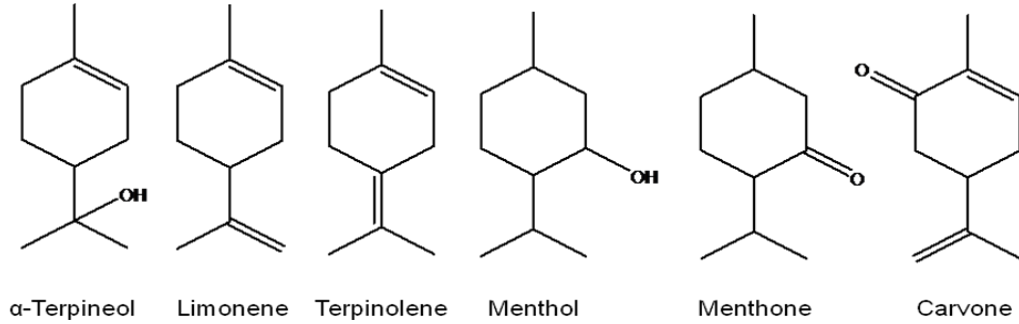
2.2.1.1 Monoterpenler

İki izopren unitesinden meydana gelen, 10 karbonlu terpenlere monoterpenler denir. Monoterpenler, bitkilerin uçucu özellikteki bileşenleridir ve distilasyon ve ekstraksiyon ile elde edilebilirler. Hoş kokuludurlar ve bu yüzden kozmetik sanayinde yaygın olarak kullanılırlar [16].

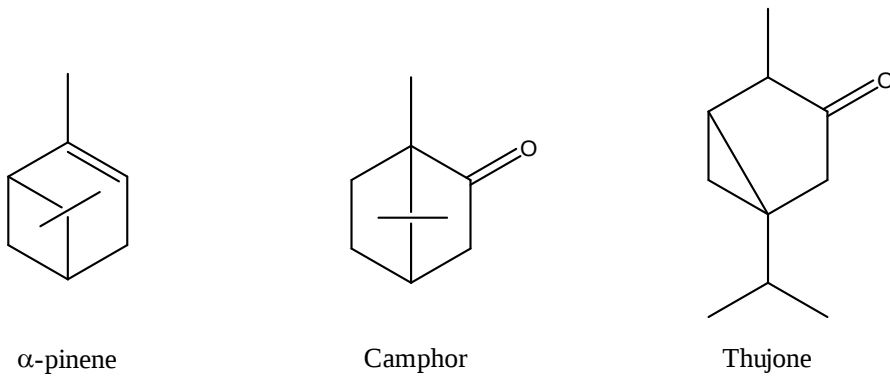
Aşağıda bazı asiklik, monosiklik, bisiklik ve düzensiz monoterpen ve uçucu yağlar görülmektedir [17].



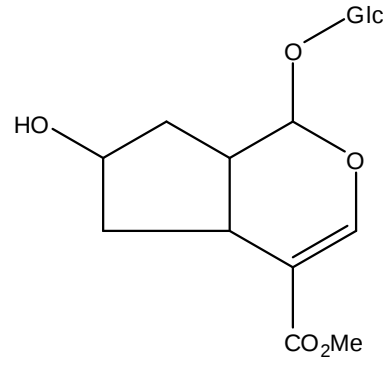
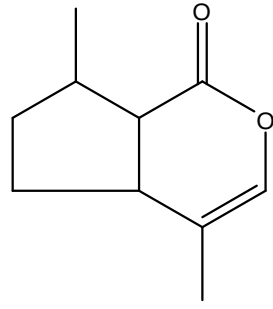
Şekil 2.5: Asiklik monoterpenler



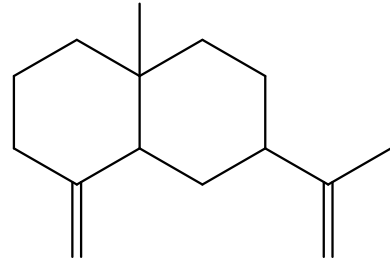
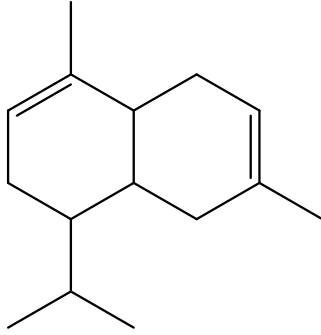
Şekil 2.6: Monosiklik monoterpenler



Şekil 2.7: Bisiklik monoterpenler

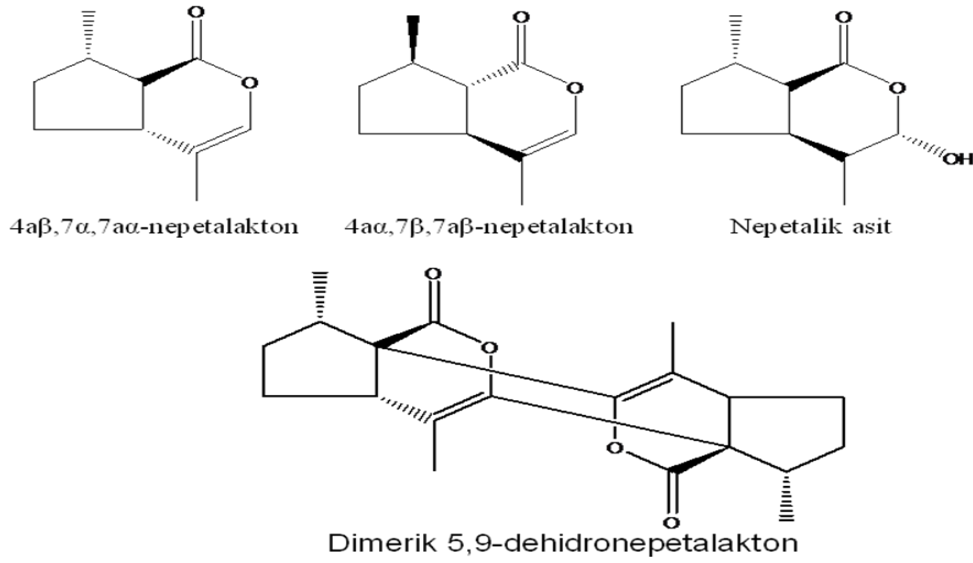


Şekil 2.8: Düzensiz monotерpenler (İridoidler)



Şekil 2.9: Uçucu yağlar

2.2.1.2 İridoidler



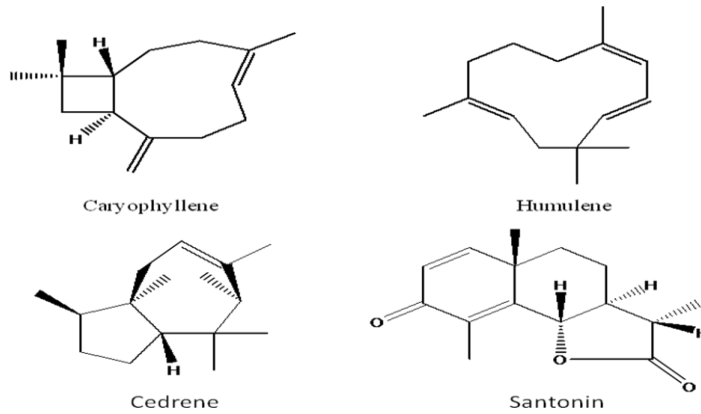
Şekil 2.10: Bazı nepetalaktonlar (iridoidler)

İridoidleri oluşturan iridan iskeleti monoterpen orjinli bir yapıdır ve genellikle altı üyeli ve oksijenli bir hetero halkaya kaynaşmış siklopentan halkasından oluşur. İridoid şeklindeki yapılar çoğunlukla *Nepeta* cinsi bitkilerde bulunur ve kedileri uyarıcı etkisi vardır [18].

Aşağıda bazı *Nepeta* cinsi bitkilerden izole edilen monoterpen iridoid yapıları görülmektedir [3,5-6].

2.2.1.3 Seskiterpenler

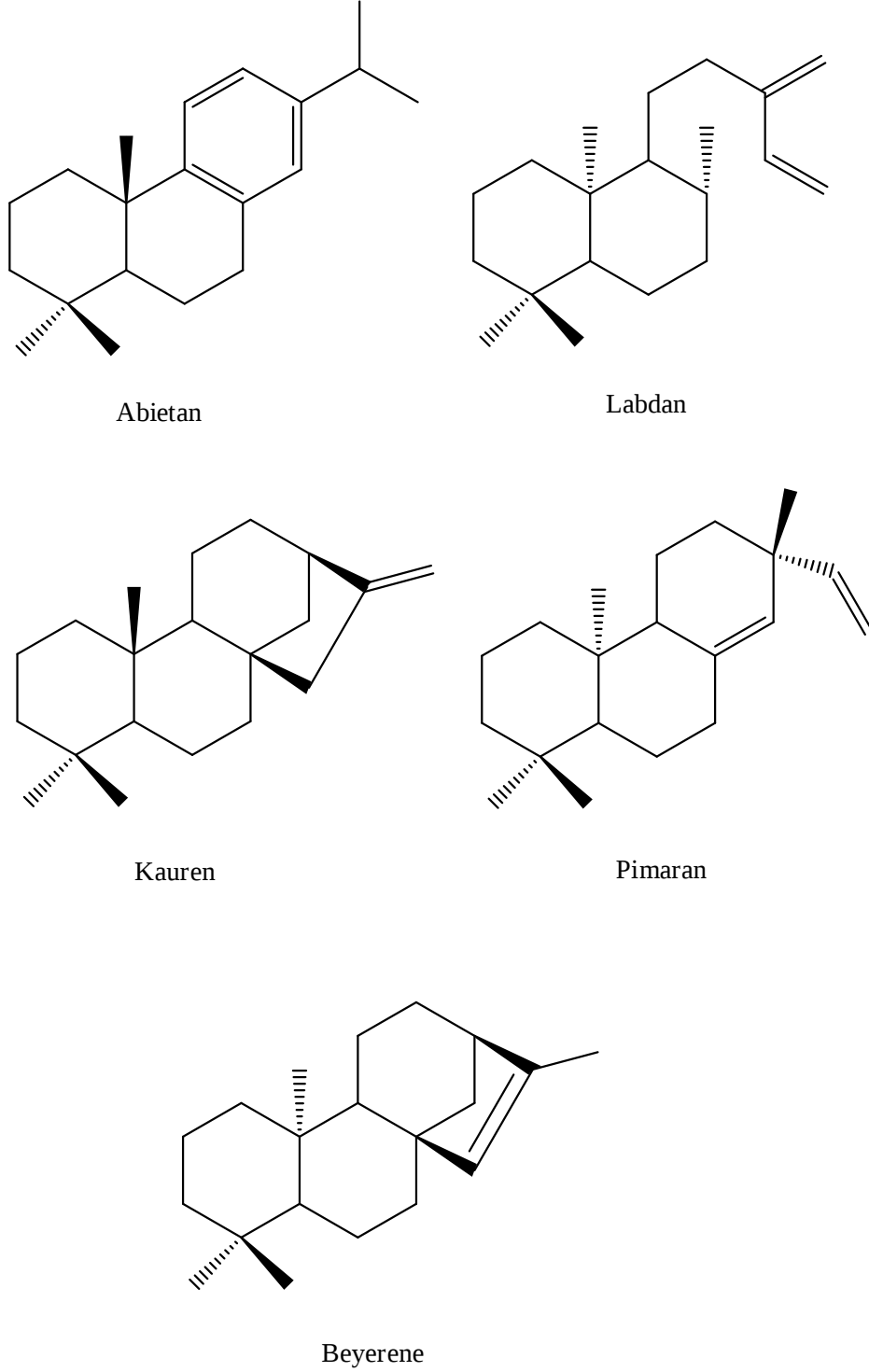
Seskiterpenler, 15 karbonlu terpenlerdir. Bazı seskiterpenler de monoterpenler gibi uçucudurlar ve kaynama noktaları monoterpenlere nazaran daha yüksektir [22].



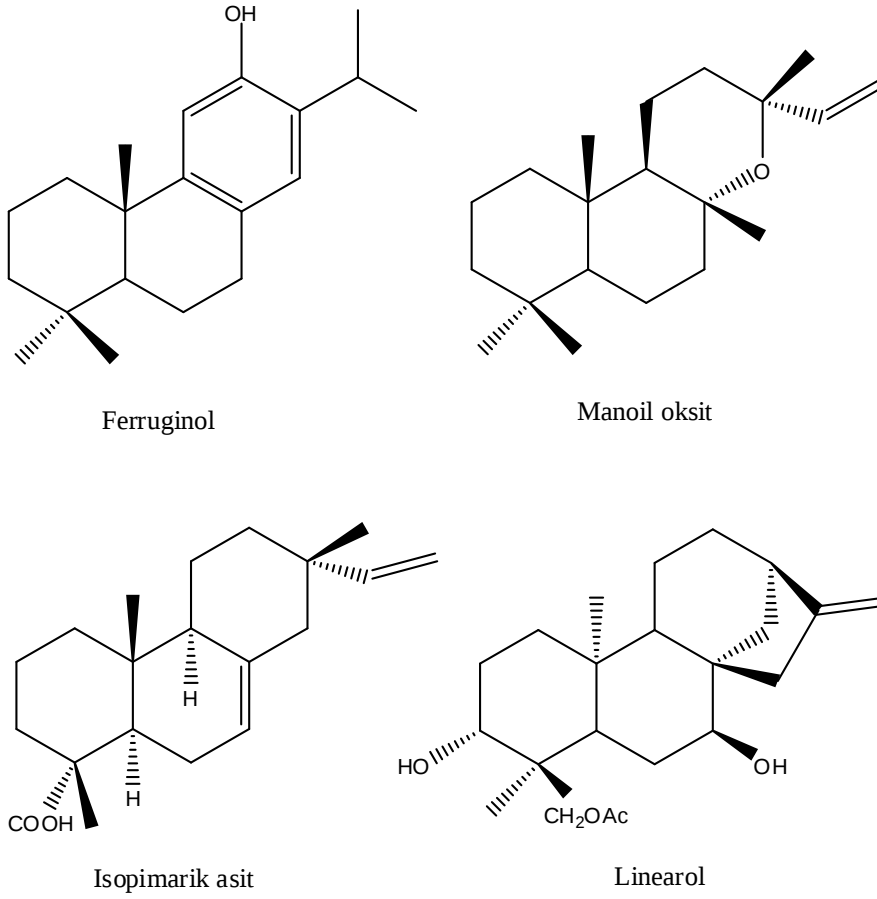
Şekil 2.11: Bazı seskiterpenler

2.2.1.4 Diterpenler

20 karbona sahip terpenlere diterpenler denir. Diterpenler taşıdıkları ana iskelete göre sınıflandırılırlar. Aşağıda şekil 2.12’de doğada çok bulunan bazı diterpen iskeletleri ve şekil 2.13’te de aşağıdaki iskeletlere örnek bazı önemli diterpenler gösterilmektedir [23-25].



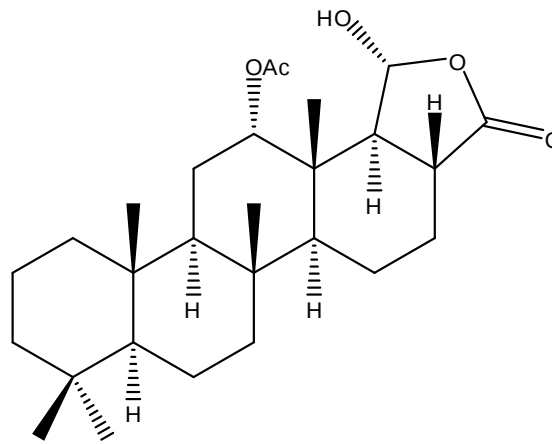
Şekil 2.12: Diterpen iskeletleri



Şekil 2.13: Bazı önemli diterpenler

2.2.1.5 Sesterterpenler

25 karbonlu terpenlere sesterterpenler denir. Daha çok mantar ve deniz canlılarında bulunurlar. Sesterterpenlere şekil 2.24'teki sclarin molekülü örnek olarak gösterilebilir [26].

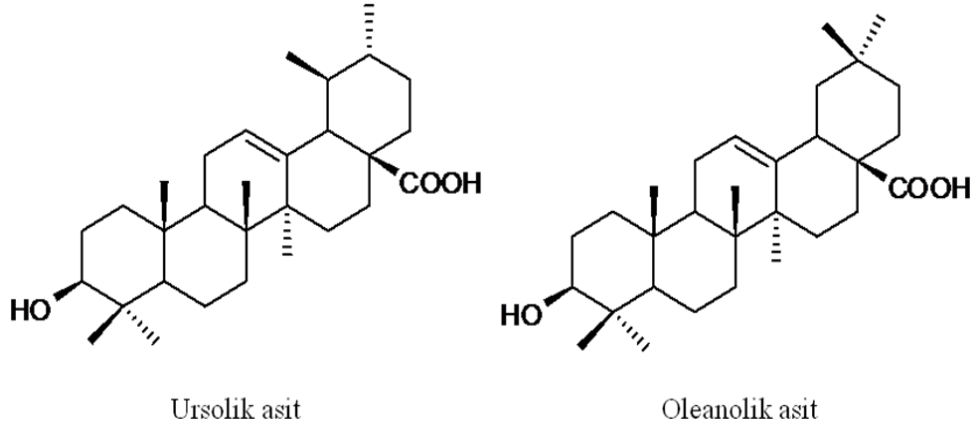


sclarin

Şekil 2.14: Sclarin

2.2.1.6 Triterpenler

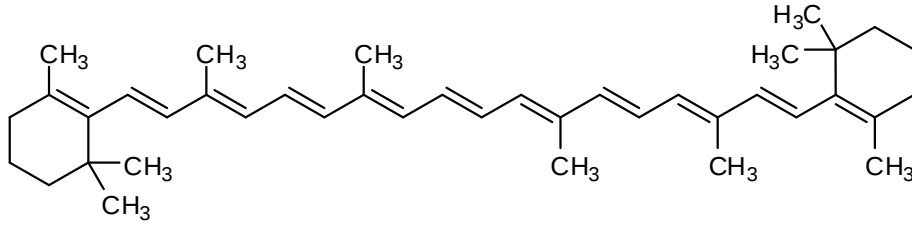
Triterpenler altı izopren biriminden oluşan karbon iskeletine sahip, biyosentetik olarak 30 karbonlu asiklik hidrokarbon squalenden elde edilen bileşiklerdir. Çoğu alkol, aldehit veya karboksilik asitten oluşan karmaşık siklik yapılardır. Renksiz, yüksek erime noktasına sahip, optikçe aktif ve kimyasal reaktifliğinin kısıtlılığından karakterizasyonu zor olan bileşiklerdir [27].



Şekil 2.15: Triterpenler

2.2.1.7 Tetraterpenler

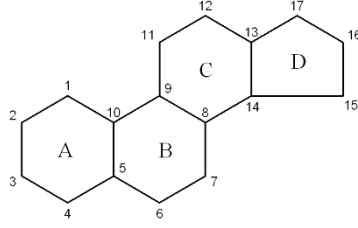
Tetraterpenler, 40 karbonlu terpenlerdir. Karotenoidler en önemli tetraterpenlerdir. Asiklik, monosiklik ve bisiklik tetraterpenler de mevcuttur [29].



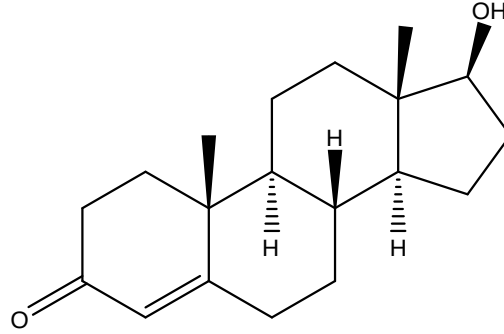
Şekil 2.16: β -Karoten bileşiği

2.2.1.8 Steroidler

Steroidler, tetrasiklik triterpenlerdir ve bitkilerde, hayvanlarda yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları steroid sınıfı bileşiklerdir. Steroidlerin karakteristik halka yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir [30].



Şekil 2.17: Steroidlerin iskelet yapısı



testosteron

Şekil 2.18: Steroid

2.3 Antioksidanlar

Oksijen canlılar için hayati derecede önem arz eden bir elementtir. Oksijen, havadan solunum ile alındıktan sonra mitokondrilerdeki elektron taşıma sisteminde aşamalı bir indirgenme işlemine girer ve suya metabolize olur [31]. Ancak bazı durumlarda oksijenin reaksiyonunu tamamlamadan vücuttan ayrıldığı ve geride reaktif ara ürünler bıraktığı gözlemlenmektedir. Bu reaktif ara ürünler genel olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak isimlendirilir [32].

Oldukça reaktif olan bu oksijen türleri vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitleri, proteinleri, karbonhidratlar ve nükleik asitleri oksidasyona uğratabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilirler. Bu yaygın olarak “Oksidatif Stres” şeklinde de ifade edilmektedir. Oksidatif strese neden olan başlıcaları ise reaktif oksijen ve azot türleridir [33].

Canlı organizmasında hasara yol açabilen bu reaktif ürünlere radikaller denir.

Çizelge 2.1 : Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen ve azot türleri.

Reaktif Türler	Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
	Hidroksi	$OH^{\cdot}$	Hipokloröz asit	$HOCl$
	Peroksi	$ROO^{\cdot}$	Hipobromöz asit	$HOBr$
	Alkoksı	$RO^{\cdot}$	Ozon	O_3
	Hidroperoksi	$HOO^{\cdot}$	Singlet oksijen	$^1\Delta_g \ ^1O_2$
Reaktif Azot Türleri (RNS)	Nitrik oksit	$NO^{\cdot}$	Nitröz asit	HNO_2
	Azot dioksit	$NOO^{\cdot}$	Nitrozil katyonu	NO^+
			Nitroksi anyonu	NO^-
			Diazot tetraoksit	N_2O_4
			Peroksinitrit	$ONOO^-$
			Peroksinitröz asit	$ONOOH$
			Nitronyum katyonu	NO_2^+
			Alkiperoksit nitritler	$ROONO$

Antioksidanlar; radikal oluşumunun sınırlandırılmasından, radikal reaksiyonlarının sona ermesinden, oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesinden ve hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu moleküllerdir.

2.3.1 Antioksidanların sınıflandırılması

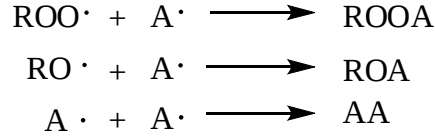
Antioksidanlar işleyiş mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler.

2.3.1.1 Birincil antioksidanlar

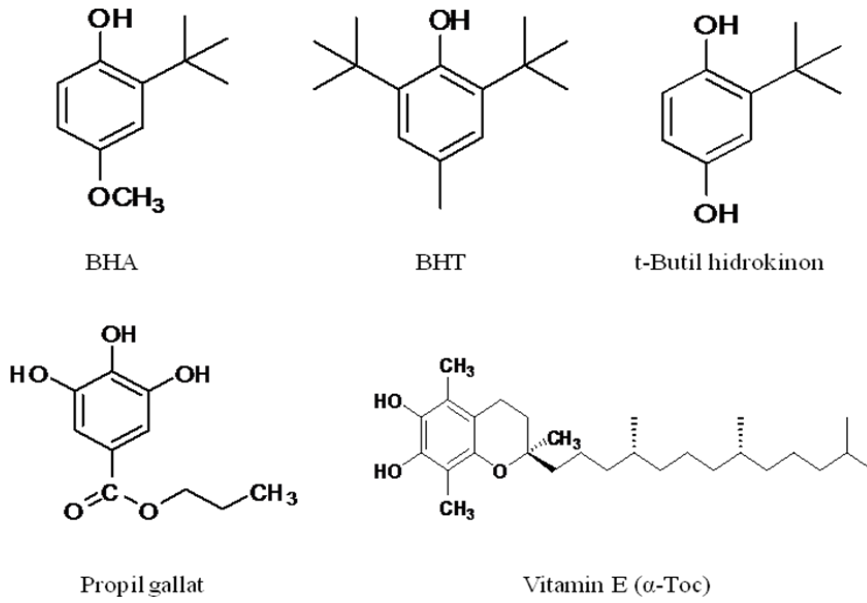
Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır.

Birincil antioksidanlar (AH) lipit radikali ($R^{\cdot}$) ve peroksi radikalleriyle ($ROO^{\cdot}$) reaksiyona girerler ve onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Birincil antioksidanlar lipit radikallerine hidrojen atomları verirler ve lipit türevleri ile antioksidan radikaller meydana getirirler ($A^{\cdot}$). Hidrojen verici olarak birincil antioksidanlar peroksi radikallerine lipitlerden daha çok ilgi gösterirler. Bu yüzden

otooksidasyon reaksiyonunda oluşan peroksi ($\text{ROO}\cdot$) ve oksi ($\text{RO}\cdot$) serbest radikalleri birincil antioksidanlar tarafından giderilirler. Antioksidanlar lipid radikalleriyle doğrudan da etkileşebilirler [34].



Sentetik birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat ve *t*-bütıl hidrokinon verilebilir. Tokoferoller ve karotenoitler doğal kaynaklı birincil antioksidanlardır [34].



Şekil 2.19: Birincil antioksidanlar

2.3.1.2 İkincil antioksidanlar

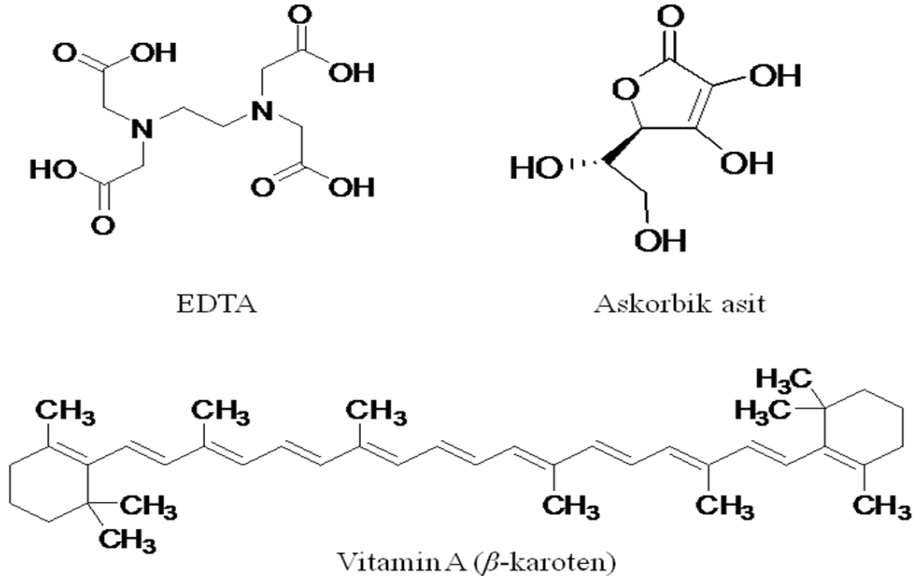
İkincil (tip-2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar çok çeşitli reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar, fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. İkincil antioksidanlar prooksidan metallerle kelat yapabilirler ve onları deaktive edebilirler, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan türlere parçalanmasını sağlayabilirler, singlet oksijeni deaktive edebilirler, ultraviyole radyasyonu absorbe edebilirler veya oksijen giderici olarak davranabilirler. Bu antioksidanlar, genellikle birincil antioksidanların aktivitesini arttırırlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil palmitat, lesitin, tartarik asit, EDTA ve β -karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilir.

İkincil antioksidanlar en önemli etki mekanizmalarına göre başlıca üç gruba ayrılabilirler:

a) Kelat yapıcılar: Sitrik asit, fosforik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), tartarik asit

b) Oksijen gidericiler ve indirgeme ajanları: Askorbik asit, askorbil palmitat, eritorbik asit, sodyum eritorbat, sülfidler.

c) Singlet oksijen gidericiler: Karotenoitler (β -Karoten, likopen ve lutein) [34].



Şekil 2.20: İkincil antioksidanlar

2.3.2 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

Antioksidan aktivitenin tayin edilmesi amacıyla kullanılan başlıca yöntemler kullanım sıklığına göre aşağıda verilmiştir.

- ✓ DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi [35].
- ✓ β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (β -Karoten renk açılım yöntemi) [36].
- ✓ ORAC (Oksijen radikal absorbands kapasitesi) yöntemi [37].
- ✓ ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi [38].
- ✓ Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi [39].
- ✓ FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) yöntemi [40].
- ✓ TRAP (Toplam radikal tutma parametresi) yöntemi [41].
- ✓ CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi [42].
- ✓ Metal bağlama yöntemi [43].
- ✓ Luminol yöntemi [44].

- ✓ DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi [45].
 - ✓ Fikoeritrin (PE) esaslı Yöntemler [46].
 - ✓ Krosin yöntemi [47].
 - ✓ TOSC (Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi) yöntemi [48].
 - ✓ Sıklık voltametri yöntemi [49].
- Ayrıca toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarlarını belirlemek amacıyla kullanılan Yöntemler de antioksidan aktivite tayin Yöntemleri arasında kabul edilmektedir.
- ✓ Folin Ciocalteu yöntemi [50].
 - ✓ Aluminyum nitrat yöntemi [51].

2.4 Antikolinesterazlar

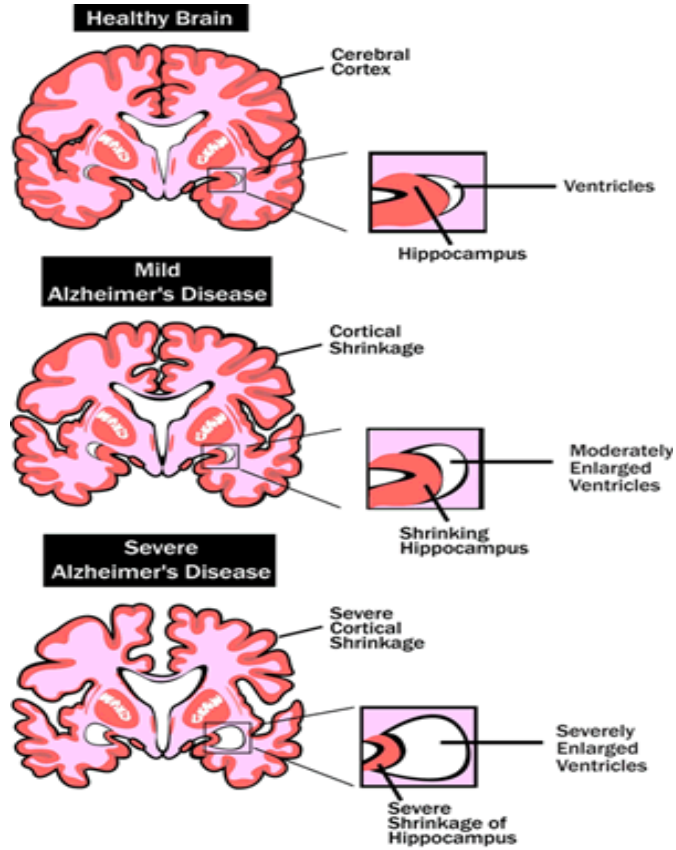
Alzheimer hastalığının nedeni günümüzde hala tam olarak bilinmemekle beraber ilk kez 1906'da Alman nöropsikiyatrist Alois Alzheimer tarafından düşünce kontrolü ve hafıza gibi bazı fonksiyonların yer aldığı beyin bölümünde, nörotransmitter düzeyinin azalması ve sinir hücrelerinin yok olması ile, normal düşünme ve hafıza yetilerinin kaybolduğu bir hastalık olarak tanımlanmıştır [52].

Hastalarda beynin neokorteks ve hippocampus gibi mental fonksiyonlarından sorumlu bölgelerinde protein (β -amiloid plak) birikimi görülür. Ayrıca beynin bu bölgelerinde nöron kaybı da gözlenmektedir [53]. Bu plak oluşumuna beta-A4 proteini ve APP (amyloid percursor protein) sebep olduğu belirtilmiştir. APP, nöronlar tarafından üretilen normal proteinlerdir. Beyindeki bu beta-A4 ve APP proteinlerine amiloidler denir. Amiloidler beyin hücreleri arasındaki haberleşmeyi önler ve beyin hücrelerinin yavaş yavaş ölmesine neden olurlar [54]. Alzheimer'lı hastalarda olduğu gibi sağlıklı bireylerde de beta-amiloid üretilmektedir ancak Alzheimer'lı hastalarda beta-amiloidlerin dışarı atılmasında sorun yaşanmaktadır. Normal şartlarda beta-amiloidler hücrenin dışına çıktığı zaman erir, fakat bazen erime gerçekleşmeden adına fibril denilen birikimler oluştururlar. Bu fibriller birleşerek plakalar oluştururlar. Her insan yaşlandıkça plaka oluşturur, asıl sorun bu plakaların iltihaplanma ile sonuçlanan reaksiyonları tetiklemesidir [55].

Beyinde nöronlar arasında iletişimi sağlayan kimyasallara “nörotransmitter” denir. Temel olarak iki nörotransmitter madde bulunur:

Asetilkolin nörotransmitter

Dokulardaki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolin esteraz enzimi 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 [56].



Şekil 2.21: Sırasıyla; sağlıklı, orta derece Alzheimer'lı ve ileri derece Alzheimer'lı beyin

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 salgılaması frenlenirse sinir hücrelerinin ölümünün yavaşlayacağı ve Alzheimer hastasının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği düşünülmektedir [56].

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 asetilkolin'in parçalanmasını önlemektedir [57].

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri

Hafıza fonksiyonlarından sorumlu olan glutat'ı düzenleyici etkiye sahiptir [57]. Halen Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan FDA tarafından onaylanmış tek NMDA memantindir [58].

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 dentritik 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 [60].

Günümüzde Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde donepezil [61], galantamin [62], ve rivastigmin [63-64] kullanılmaktadır. Galantamin alkaloidinin hidrobromür tuzu şeklinde ve Nivalin ® adı ile piyasaya sunulan, ardından Reminyl® adı ile lisansı onaylanan ilacın [65] kaynağı *Galanthus* (kardelen) ve diğer bazı Amaryllidaceae familyası bitkileridir [66].

2.4.1 Antikolinesteraz aktivite tayin yöntemleri

- ✓ Michel Yöntemi [67].
- ✓ Ellman Yöntemi [68].
- ✓ De la Huerge Yöntemi [67].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bitkisel Materyaller

Nepeta sorgerae (Hedge et Lamond)

Nepeta sorgerae (Herbaryum No: Dirmenci (3705-a) & Akçiçek), Malatya, Tepehan Beldesi-Nemrut Dağı arası, Büyük Uz Köyü üzeri, 1645 m. yükseklikten, 21.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından toplanmıştır.

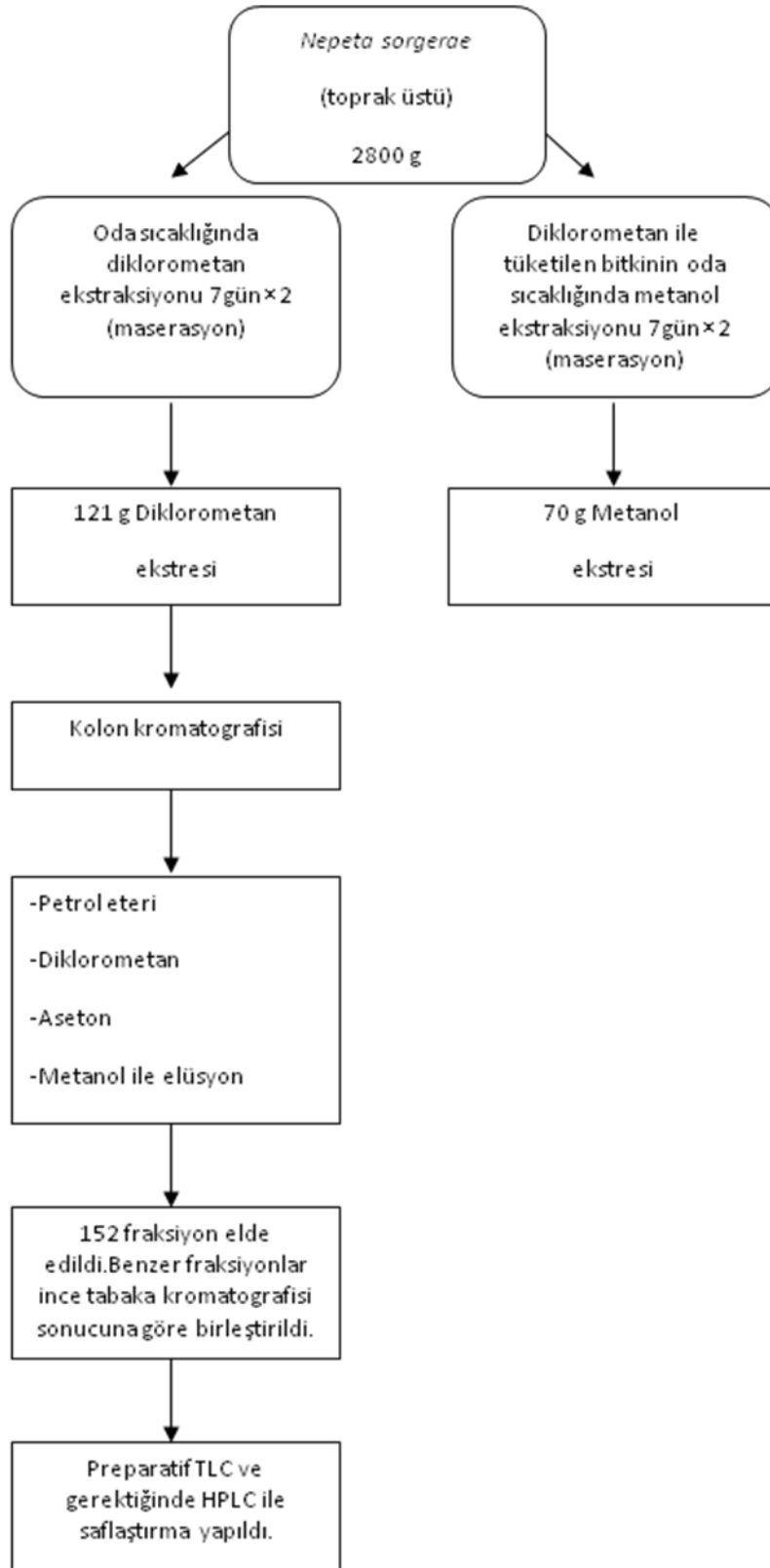
Nepeta obtusicrena (Boiss. et Kotschy ex Hedge)

Nepeta obtusicrena (Herbaryum No: Dirmenci (2723) & Akçiçek), Bitlis, Nemrut Dağı krater içi, 2450 m, yükseklikten, 24.07.2009 tarihinde Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından toplanmıştır.

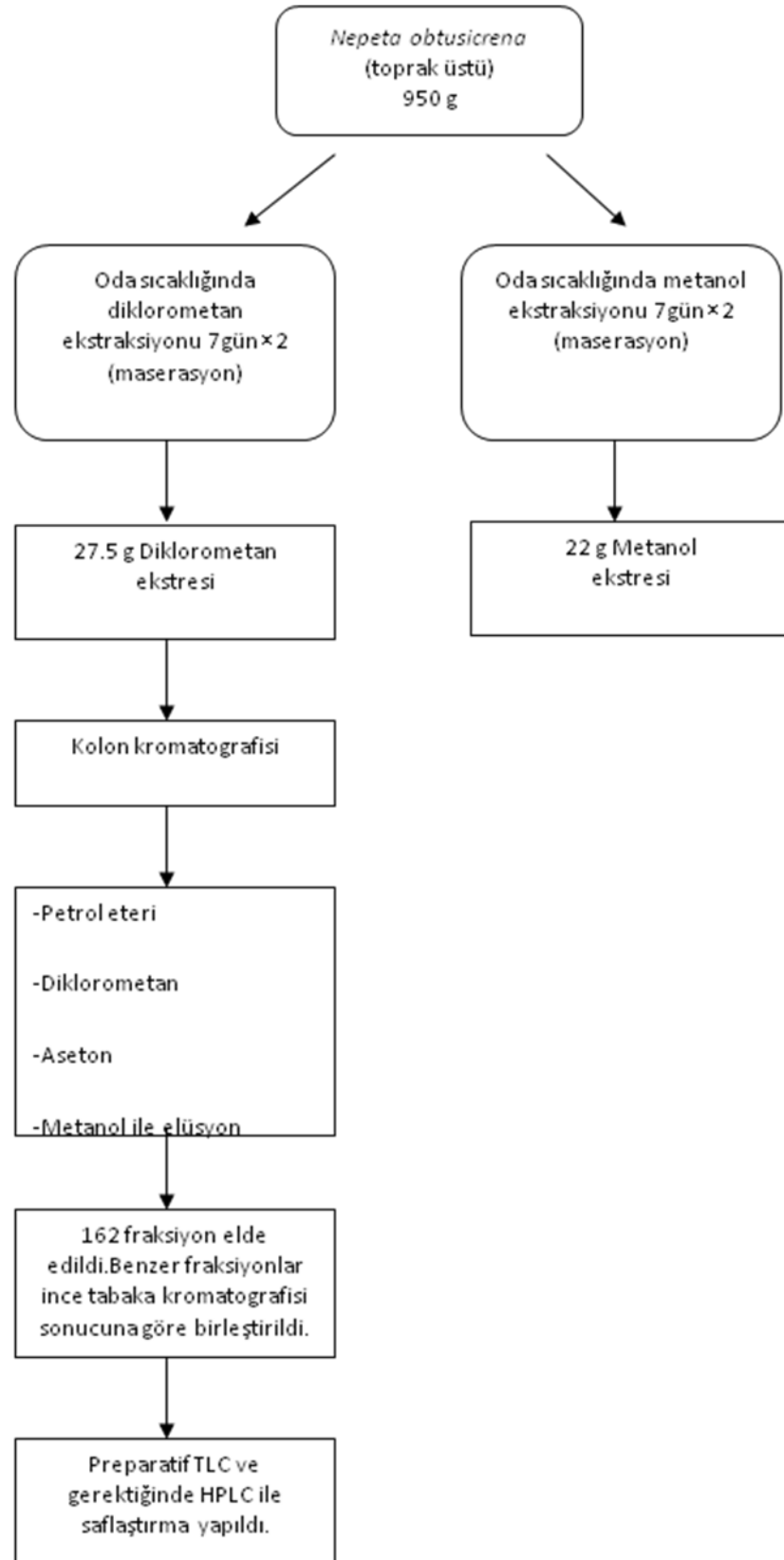
3.2 Ekstrelerin Hazırlanışı Ve İzolasyon Çalışmaları

Bitkiler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra öğütülerek toz hale getirildi. Toz hale getirilen bitkiler öncelikle diklorometan ile oda sıcaklığında ekstre (7 gün × 2) edildi. Diklorometan ile tüketilen bitkiler daha sonra metanol ile oda sıcaklığında ekstre edildi (7 gün × 2). Süzme ve çözücünün uçurulması işlemlerinden sonra katı ekstre elde edildi.

Ekstrelerin antioksidan ve anti-Alzheimer özellikleri incelendi. Elde edilen ekstreler kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı. Fraksiyonlar preparatif TLC ve HPLC ile ileri saflaştırma işlemlerine tabi tutuldu. Saf olarak elde edilen bileşikler bazı spektroskopik yöntemlerle (tek ve çift boyutlu NMR ve kütle) karakterize edildikten sonra, antioksidan ve antikolinesteraz özellikleri incelendi.



Şekil 3.1: *Nepeta sorgerae* bitkisinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin hazırlanması ve saflaştırılması



Şekil 3.2: *Nepeta obtusicrena* bitkisinin diklorometan ve metanol ekstraktlerinin hazırlanması ve saflaştırılması

3.3 Kimyasal Maddeler, Çözücüler Ve Çözeltiler

3.3.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler

Merck; 1.07734.1000 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm), BHT, BHA, sülfirik asit (%98), hekzan, petrol eteri, diklorometan, kloroform, etilasetat, aseton, metanol.

Sigma-Aldrich; Serium (IV) sülfat, DTNB(5,5'-Dithiobis (2-Nitro-benzoik asit)), Folin Ciocalteu reaktifi, α -Tokoferol, β - karoten, Tween-40, Linoleik asit, pirokatekol, kersetin, DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil), asetiltiyokolin iyodür, butiriltiyokolin iyodür, sodyumbifosfatdihidrat, sodyumdihidrojenfosfatdihidrat, asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz.

3.3.2 Çözeltilerin hazırlanması

3.3.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler

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

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

3.3.2.2 Toplam flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması: 1,76 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

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

3.3.2.3 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

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

0,1 mM β -Karoten çözeltisinin hazırlanması: 0,2 mg β -karoten 1 mL kloroformda çözüldü. 20 μg linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform

rotaevaporatörde uçurulduktan sonra 50 mL oksijen gazı ile doyurulmuş destile su ilave edilerek kuvvetlice karıştırıldı.

3.3.2.4 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

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

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

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

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

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

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

BuI: 4 mg BuI alınarak, 8 mL deiyonize su eklenir. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlanır.

AChE Enzimleri: 1,17 mg AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözülür ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrılır. Her biri için 0,235 mg/mL'lik konsantrasyon sağlanmış olur. 8 mL distile su eklenmesi sonucu 125 μ L'lik enzim çözeltileri elde edilir. Her bir 125 μ L'lik örnekte 0,02925 mg enzim bulunur. 125 μ L'lik enzim çözeltisine 460 μ L pH=8 tampon çözeltisi eklenir. 585 μ L çözelti 25 μ L'lik 23 küçük şişelere doldurulur ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletilir. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 3000 μ L'ye tamamlanır.

BChE Enzimleri: 1 mg BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözülür. Bu çözeltiden 300 μ L'lik stoklar oluşturularak küçük şişelere doldurulur ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletilir. Stok çözeltiler

kullanılmadan önce 1800 µL pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilir.

3.3.2.5 İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi

Serik sülfat belirtecinin hazırlanması: 2,0 g seryum (IV) sülfat tetrahidrat 100 mL % 10'luk H₂SO₄'de çözülerek hazırlandı. Belirteç, uygun çözücü sisteminde yürütülen ince tabaka plaklarına pulvarizatör kullanılarak püskürtüldü.

3.4 Cihazlar Ve Gereçler

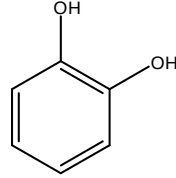
- Eliza Reader Molecular Devices Spectro Max340 PC
- Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı (NMR): Bruker AC (¹H: 250 MHz; ¹³C: 60 MHz), Varian Mercury (¹H: 400 MHz, ¹³C: 100 MHz), Varian Inova (¹H: 500 MHz, ¹³C: 100 MHz)
- FT-IR (Thermo, Nicolet 6700)
- Ultraviyole Spektrofometresi (UV-Vis) (Shimadzu UV-1601)
- Erime derecesi cihazı (Reichert firmasının Kofler model cihazı)
- Döner Buharlaştırıcı (Rota Evaporatör, Büchi ve Heidolph)
- Hassas terazi (Ohaus Adventurer-Pro)
- Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı (IKA RCT basic hot plate)
- Vortex IKA MS3 basic
- Ultrasonik Banyo (Fisher Scientific FB 15051)
- pH-metre (WTW Inolab pH 720)
- Etüv (Ecocell)
- UV kabin ve lamba (Camag)
- Azot Tüpü
- Shimadzu semi-preparatif HPLC

3.5 Ekstrelerin Toplam Fenolik Ve Toplam Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi

3.5.1 Toplam fenolik miktar tayini

Ekstre ve fraksiyonların toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi. Üç miligram olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlandı. 1000 ppm olarak hazırlanan

pirokatekol çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri etanolle 200 µL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu karışımlara su, FCR reaktifi ve 3 dk sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı ve örneklerin absorbensları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

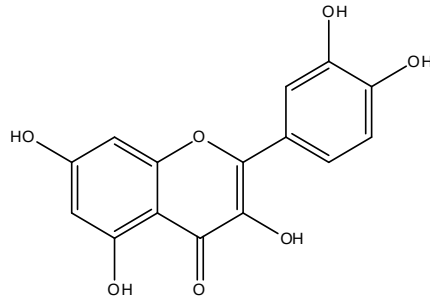


Pirokatekol

Şekil 3.3: Standart olan pirokatekol bileşiğinin açık yapısı

3.5.2 Toplam flavonoid miktar tayini

Ekstre ve fraksiyonların toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi [51]. Her bir örnekten 100 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Kersetinin 1000 ppm'lik çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Bu karışımlara 100 µL 1M potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µL %10'luk alüminyum nitrat çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de absorbensları okundu. Ekstrelerin toplam flavonoid miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.



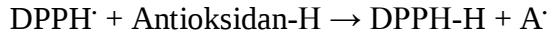
Kersetin

Şekil 3.4: Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kersetinin açık yapısı

3.6 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

3.6.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi

Antioksidanlar radikallere proton vererek absorpsiyonu azaltırlar [69]. Bu çalışmada serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının, fraksiyonların ve saf maddelerin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 517 nm’de karakteristik absorpsiyonu olan kararlı serbest bir radikaldır. DPPH’nın 517 nm’deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenir. Tepkime mekanizması aşağıdaki gibidir.



Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH[·] derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalinin rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal giderim aktivitesi olarak gösterilir.

Bu amaçla 50 µg ve 500 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL metanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm’de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% inhibisyon)} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

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

DPPH’nın rengi açıldığı için absorpsiyonda azalma olur.

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

3.6.2 Lipid peroksidasyonu inhibisyonu yöntemi (β -karoten-linoleik asit yöntemi)

Toplam antioksidan aktivite olarak da isimlendirilen lipid peroksidasyon inhibisyonu, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β -karoten-linoleik asit

yöntemiyle belirlendi [36]. Bu yöntem, β -karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. Antioksidan maddenin varlığında bu tepkimenin oluşumu engellendiğinden veya oluşan bozunma ürünleri antioksidan tür tarafından temizlendiğinden β -karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.

Linoleik asit + (O₂-H₂O) + β -karoten → Konjuge dienler ve diğer bozunma ürünleri

↓

β -karoten → renk açılımı

Linoleik asit + (O₂-H₂O) + β -karoten + antioksidan madde → rengin korunması

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

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t} \quad (3.2)$$

ln: doğal logaritma, a : başlangıç absorbansı, b : inkübasyondan sonraki absorbans, t : inkübasyon süresi (dk).

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA (\% \text{ inhibisyon}) = (R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (3.3)$$

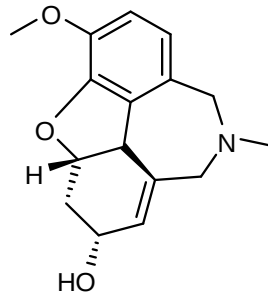
R_{kontrol} kontrolün renginin açılma hızı ve $R_{\text{örnek}}$ örneğin renginin açılma hızıdır.

3.7 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi

3.7.1 Ellman yöntemi

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu olarak [68] bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçüldü [70]. Enzim olarak elektrik balığından elde edilen asetilkolinesteraz ve at serumundan elde edilen bütirilkolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetilkolin iyodür ve bütirilkolin iyodür, aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5’-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB)

kullanıldı. 96 kuyucuklu mikropalakaların her bir kuyucuğuna 0,1 M pH=8 fosfat tamponundan 130 µL, 10 µL numune, AChE veya BChE çözeltisinden ise 20 µL ilave edildi. 25 °C de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 20 µL DTNB çözeltisi ve 20 µL asetilkolin iyodür veya bütirilkolin iyodür ilave edildi. Sırasıyla asetilkolin iyodür veya bütirilkolin iyodürün enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlendi. Kontrol olarak etanol, standart olarak ise Şekil 3.3’de açık yapısı gösterilen galantamin kullanıldı.



Şekil 3.5 : Galantamin bileşiği

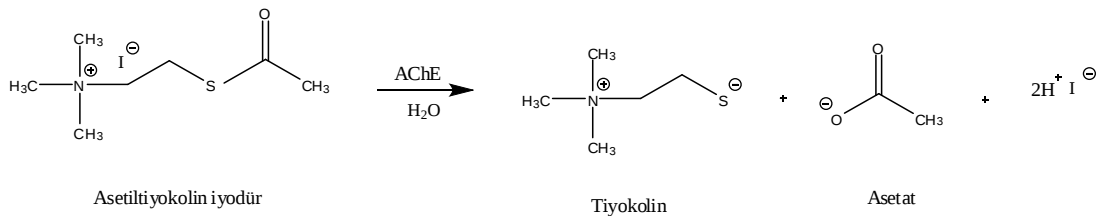
Antikolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

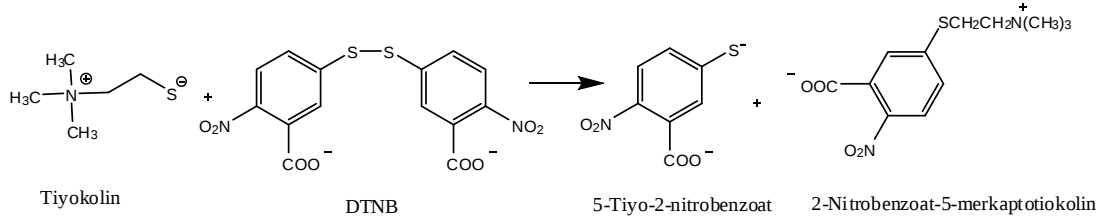
$$\% \text{ inhibisyon} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

(A= Absorbans)

3.7.1.1 AChE inhibisyonu testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Reaksiyon şematik olarak Şekil 3.6’te gösterilmektedir:





Şekil 3.6 : Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması

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

Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH=8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan 10 µL çözeltilerden ve asetil kolinesteraz (AChE) enzim çözeltisinden 20 µL konulur. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edilir. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve asetilkolin iyodür (AcI) 20 µL herbir kuyucuğa ilave edilir. Standart olarak *Galanthus* bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanılır. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbands okunur ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbandlardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edilir. Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM’dan 0.125 mM’a kadar seyreltilmiş solüsyonları hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplanır.

3.7.1.2 BChE inhibisyonu testi

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

Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), numunelerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden 10 µL ve Bütirilkolinesteraz (BChE) enzimi çözeltisinden 20 µL konulur. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edilir. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat olarak bütirilkolin iyodür (BuI) 20 µL herbir kuyucuğa ilave edilir. Standart olarak *Galanthus* bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanılır. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbands okunur ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbandlardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edilir. Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM’dan 0.125 mM’a kadar

seyreltilmiş solüsyonları hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplanır.

3.8 İstatiksel Hesaplamalar

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

3.9 Kromatografik Yöntemler

3.9.1 Kolon kromatografisi

Ekstreleri fraksiyonlandırmak ve bu fraksiyonlardan saf madde elde etmek amacıyla kolon kromatografisi yöntemi kullanıldı. Sütun dolgu maddesi olarak silikajel (Merck 1.07734) ve Sephadex LH-20 kullanıldı. Ekstreler az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş, ekstre miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silikajel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına yerleştirildi. Elüsyona nonpolar bir çözücü olan % 100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla diklorometan, aseton ve metanol ile polarite artırılarak elüsyona devam edildi, sonunda % 100 metanol ile elüsyon tamamlandı. Benzer fraksiyonlar birleştirildi ve saflaştırma için daha küçük boyuttaki kolonlarda adsorban olarak silikajel kullanıldı.

3.9.2 İnce tabaka kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde (İTK), hazır Alüminyum silikajel plaklardan (20 x 20 cm) (Merck 1.05554) ve cam plaklardan (20 x 20 ; 20 x 10) yararlanıldı. Cam plakları hazırlamada adsorban olarak Silikajel HF₂₅₄ kullanıldı. Ekstrelerin sütun kromatografisi ile ayrılmasıyla elde edilen fraksiyonların karşılaştırılmasında İTK plakları kullanıldı. Maddeleri saflaştırmak için preperatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

3.10 Spektroskopik Yöntemler

3.10.1 UV spektroskopisi

Saf maddeler metanolde çözülerek köre karşı 200–500 nm dalga boyları arasında UV spektrumları alındı.

3.10.2 IR spektroskopisi

Thermo FTIR Nicolet 6700 cihazında çalışılmıştır.

3.10.3 NMR spektroskopisi

Kromatografik Yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HMBC, HMQC spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform (CDCl_3), döterometanol (CD_3OD) ve döterodimetilsülfoksit (CD_3SOCD_3) kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *Nepeta sorgerae* Hedge et Lamond ve *Nepeta obtusicrena* Boiss. et Kotschy ex Hedge bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstraktları hazırlandı ve bu ekstraktların toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları da sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. Ayrıca bu ekstraktların antioksidan aktivite tayinleri, DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ve β -karoten renk açılım (Lipid peroksidasyon inhibisyonu) yöntemleriyle yapıldı. Antikolinesteraz aktivite tayinleri ise asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı Ellman metodu ile yapıldı.

Ekstraktların taşıdığı sekonder metabolitler kolon kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi ve HPLC teknikleri kullanılarak izole edildi. Saf olarak elde edilen maddeler bazı spektroskopik teknikler (1D, 2D-NMR, IR, kütle spektrometresi) kullanılarak karakterize edildi. Yapıları belirlenen maddelerin antioksidan aktiviteleri [DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ve β -karoten renk açılım (Lipid peroksidasyon inhibisyonu) metodları ile] ve antikolinesteraz aktiviteleri [Ellman metodu ile] incelendi.

4.1 Ekstraktların Toplam Fenolik Ve Toplam Flavonoid Miktar Sonuçları

Fenolik bileşikler serbest radikallerin giderimi aşamasında önemli rol oynamaktadır. Fenollerdeki hidroksil grupları, radikalleri yok ederler ve sistemin antioksidan etkisine doğrudan katkıda bulunurlar [71].

Toplam fenolik bileşik miktarları Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi, toplam flavonoid içerikleri ise kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi [72].

Çizelge 4.1’ de *Nepeta sorgerae* bitkisinin diklorometan (N.S.DCM) ve metanol (N.S.MeOH) ekstraktlarının ve *Nepeta obtusicrena* bitkisinin diklorometan (N.O.DCM) ve metanol (N.O.MeOH) ekstraktlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid miktar sonuçları gösterilmektedir.

Çizelge 4.1 : Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarları

	Toplam Fenolik (μg pirokatekol eşdeğer) /mg Ekstre	Toplam Flavonoid (μg kersetin eşdeğer) /mg Ekstre
N.S.DCM	26.90 $\pm$ 0.23	31.39 $\pm$ 0.34
N.S.MeOH	11.14 $\pm$ 2.45	24.65 $\pm$ 1.25
N.O.DCM	22.03 $\pm$ 0.98	19.76 $\pm$ 0.56
N.O.MeOH	24.11 $\pm$ 1.42	21.52 $\pm$ 0.88

Çizelge 4.1’ de görüldüğü gibi en yüksek toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarına sahip ekstre *Nepeta sorgerae* bitkisinin diklorometan ekstresidir.

4.2 Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.2.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları

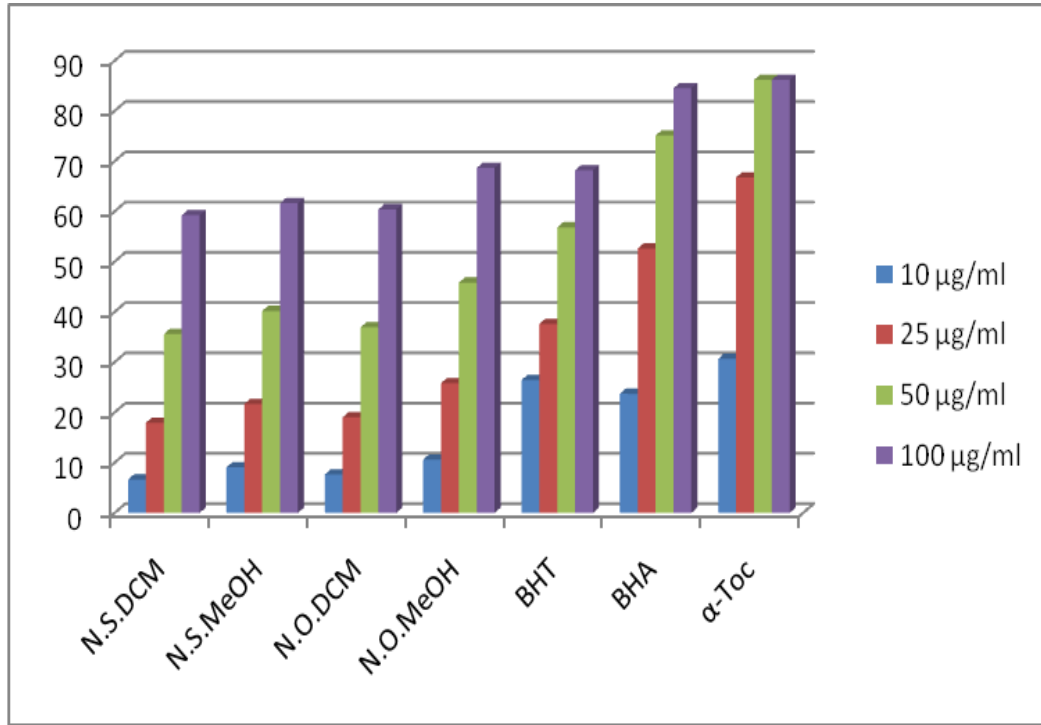
Nepeta sorgerae ve *Nepeta obtusicrena* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHT, BHA ve α -tokoferole göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı.

Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyon olarak Çizelge 4.2’ de verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

Ekstreler	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	25 $\mu\text{g}/\text{ml}$	50 $\mu\text{g}/\text{ml}$	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$
N.S.DCM	6.650	17.940	35.590	59.230
N.S.MeOH	9.050	21.680	40.180	61.640
N.O.DCM	7.630	19.020	36.940	60.410
N.O.MeOH	10.600	25.820	45.820	68.660
BHT*	26.430	37.610	56.820	68.195
BHA*	23.700	52.605	75.080	84.520
α-Toc*	30.665	66.750	86.150	86.175

*standart



Şekil 4.1: *N. sorgerae* ve *N. obtusicrena* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstraktlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

Şekil 4.1’de de görüldüğü gibi her iki bitkinin de hem diklorometan hem metanol ekstraktları standartlarla kıyaslandıklarında orta derecede aktivite göstermişlerdir.

4.2.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu (β -karoten renk açılım yöntemi) sonuçları

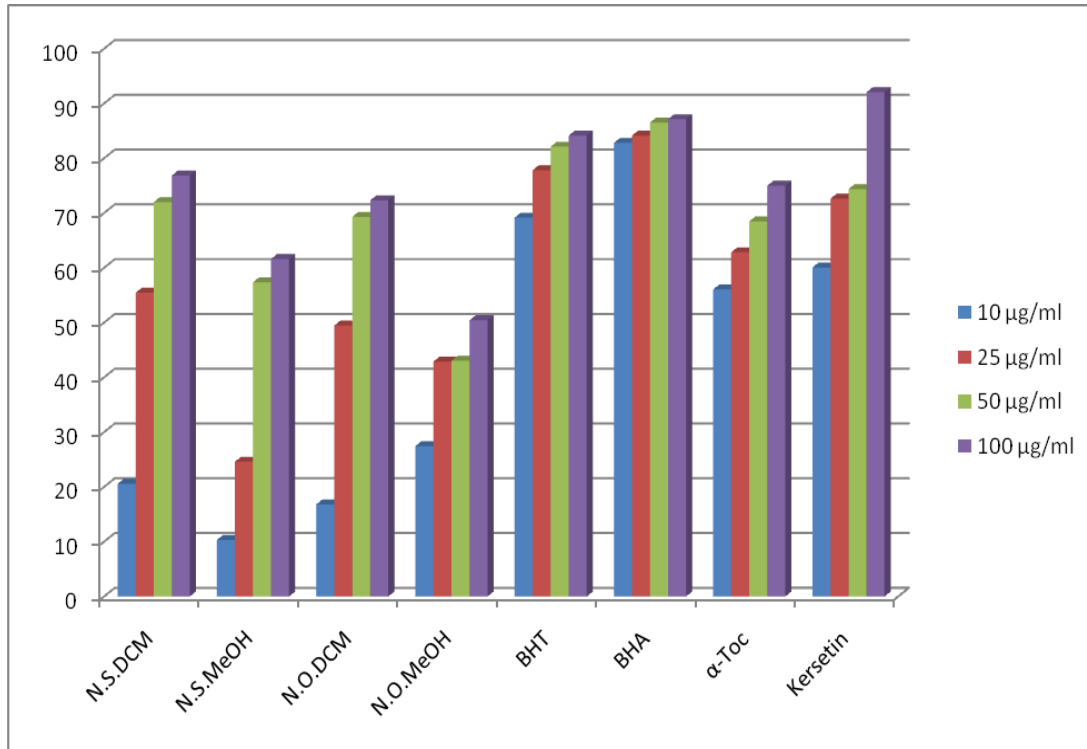
Nepeta sorgerae ve *Nepeta obtusicrena* bitkilerinden hazırlanan diklorometan ve metanol ekstraktları toplam antioksidan aktiviteleri β -karoten renk açılım yöntemine göre dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) yapıldı. Antioksidan aktivite karşılaştırmalarında standart olarak BHT, BHA, α -tokoferol ve kersetin kullanıldı.

Çizelge 4.3’te ekstraktların lipid peroksidasyon % inhibisyon değerleri verilmektedir.

Çizelge 4.3 : Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları

Ekstreler	10 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
N.S.DCM	20.580	55.460	72.000	76.840
N.S.MeOH	10.320	24.600	57.360	61.610
N.O.DCM	16.790	49.450	69.310	72.320
N.O.MeOH	27.450	42.880	43.030	50.430
BHT*	69.160	77.835	82.115	84.150
BHA*	82.815	84.135	86.530	87.140
α-Toc*	56.060	62.835	68.475	74.995
Kersetin*	60.050	72.620	74.380	92.060

*standart



Şekil 4.2: *N. sorgerae* ve *N. obtusirena* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin lipid peroksidasyon % inhibisyonu

Şekil 4.2’de de görüldüğü gibi *N. sorgerae* ve *N. obtusirena* bitkilerinin diklorometan ekstreleri metanol ekstrelerine nazaran daha yüksek lipid peroksidasyonu inhibisyonu göstermiştir.

4.3 Ekstrelerin Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

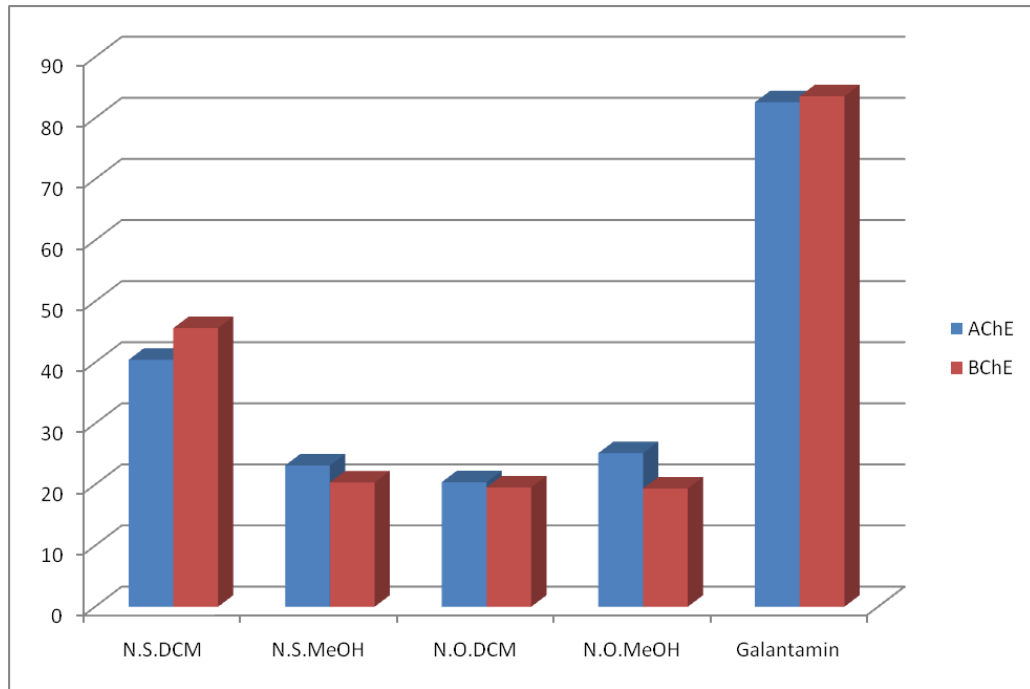
Nepeta sorgerae ve *Nepeta obtusicrena* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrilerinin antikolinesteraz aktiviteleri Ellman metoduyla *in vitro* olarak tayin edildi. Standart olarak doğal bir alkaloid olan ticari Galantamin kullanıldı.

Ekstrelerin AChE ve BChE % inhibisyon değerleri Çizelge 4.4’ de gösterilmektedir.

Çizelge 4.4 : Ekstrelerin antikolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	AChE	BChE
N.S.DCM	40.43	45.62
N.S.MeOH	23.14	20.35
N.O.DCM	20.40	19.54
N.O.MeOH	25.16	19.37
Galantamin*	82.59	83.58

*standart



Şekil 4.3: *N. sorgerae* ve *N. obtusicrena* bitki ekstrilerinin antikolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)

Şekil 4.3’te de görüldüğü gibi her iki bitkinin de hem diklorometan hem de metanol ekstrileri galantamin standardıyla kıyaslandıklarında düşük antikolinesteraz aktivite göstermişlerdir. *N. sorgerae* bitkisinin diklorometan ekstresi ise diğer ekstrelerle kıyasla daha yüksek antikolinesteraz aktivite göstermiştir.

4.4 Saf Bileşiklerin İzolasyonu ve Yapı Tayini

Nepeta sorgerae bitkisi diklorometan ekstresinden bilinen bir triterpen olan ursolik asidin yanı sıra yeni bir pimarane diterpen olarak 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-*ent*-pimara-8,15-dien (sorgeraolone) izole edilirken, *Nepeta obtusicrena* bitkisi diklorometan ekstresinden bilinen iki triterpen olan oleanolik asit ve ursolik asidin yanı sıra yeni bir triterpen olarak 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en ve yeni bir abietan diterpen olarak 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en (obtusicrenone) bileşikleri elde edildi.

NODM-42-2 = Oleanolik Asit

Nepeta obtusicrena bitkisi diklorometan ekstresi kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı. Kolondan DCM:Ace (8:2) sisteminde elde edilen fraksiyonun 35.4 mg' ı preparatif TLC yöntemi ile DCM:Ace (9:1) oranında yürütücü fazda ayrıldı. TLC ile saf olduğu anlaşılan maddenin (15 mg) yapısı spektroskopik yöntemlerle oleanolik asit olarak tayin edildi.

NSDM-89-3-2 = NODM-39-2= Ursolik Asit

Nepeta sorgerae bitkisi diklorometan ekstresi kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırıldı. Kolondan DCM:Ace (9:1) sisteminde elde edilen fraksiyonun 49.4 mg' ı preparatif TLC yöntemi ile DCM:Ace (8:2) oranında yürütücü faz yardımıyla ayrıldı. TLC ile saf olup olmadığı kontrol edildi ve ileri bir saflaştırma için DCM:Ace (9:1) oranında yürütücü fazda ikinci bir preparatif TLC ile ayrıldı. TLC ile saf olduğu anlaşılan maddenin (7 mg) yapısı spektroskopik (Ağırlıklı olarak 1-D ve 2-D-NMR, Kütle, IR) yöntemlerle ursolik asit olarak tayin edildi.

NSDM-93-100-4-1 = 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-*ent*-pimara-8,15-dien = Sorgeraolone

Kolondan DCM:Ace (8:2) sisteminde elde edilen 93-100 arası fraksiyonlar, TLC de R_f değerleri ve yanma şekilleri aynı oldukları için birleştirildiler. Bu fraksiyonun 100 mg' ı HPLC ile terz faz kolonda CH₃CN:MeOH (9:1) oranındaki yürütücü faz ile akış hızı 7 ml/dk olacak şekilde ayrıldı. Elde edilen maddenin saf olduğu TLC ile belirlendi. Spektroskopik teknikler kullanılarak saf maddenin yapısı 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-*ent*-pimara-8,15-dien olarak belirlendi. Yapılan literatür

çalışmaları sonucunda bu maddenin yeni bir pimarane diterpen olduğu anlaşıldı ve özel adı sorgeraolone olarak konuldu.

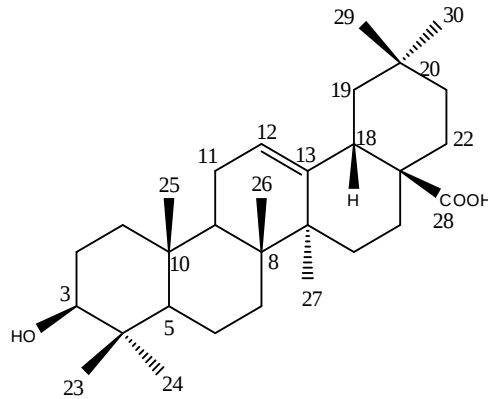
NODM-58 = 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en

Kolondan DCM:Ace (4:6) sisteminde elde edilen fraksiyonun 75 mg'ı preparatif TLC yöntemi ile DCM:Ace (5:5) oranında yürütücü fazda ayrıldı. TLC ile saf olduğu anlaşılan maddenin (15 mg) yapısı spektroskopik yöntemlerle 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en olarak tayin edildi. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda bu maddenin yeni bir triterpen olduğu anlaşıldı.

NODM-50-4-7 = 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en = Obtusicrenone

Kolondan DCM:Ace (7:3) sisteminde elde edilen fraksiyonun 45 mg' ı HPLC ile ters faz kolonda % 100 MeOH yürütücü fazı ile akış hızı 4 ml/dk olacak şekilde ayrıldı. TLC ile saf olduğu belirlenen maddenin yapısı spektroskopik tekniklerle 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en olarak belirlendi. Yapılan literatür çalışmaları sonucunda bu maddenin yeni bir abietan diterpen olduğu anlaşıldı ve özel adı obtusicrenone olarak konuldu.

4.4.1 N.O.DM-42-2 = Oleanolik asit = 3 β -hidroksi-olean-12-en-28-oik asit



Şekil 4.4: Oleanolik asit

Beyaz renkli olan bu bileşik katı halde (15 mg) elde edildi ve erime derecesi 304-306°C olarak belirlendi. Silika jel kaplı plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında pembe-mor renk aldı.

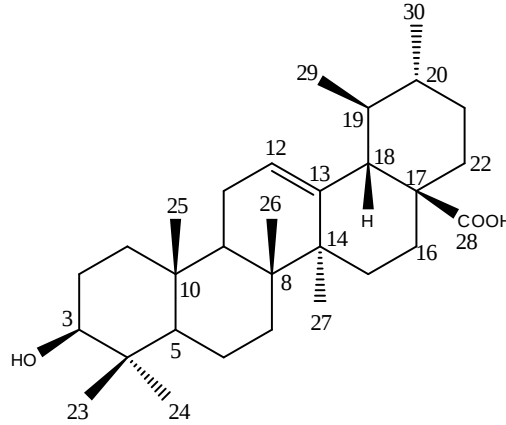
¹H NMR spektrumunda 0.77-1.16 ppm arasında izlenen 7 metil sinyali ve ¹³C-NMR spektrumunda izlenen 30 karbon sinyali bileşiğin bir triterpen olabileceğine işaret

etmiştir. Tüm metillerin singletler halinde izlenmesi bileşiğin oleanan iskeletine sahip olduğuna işaret etmiştir. 3.24 ppm deki dublet dublet ($J= 4,25$ ve $11,15$ Hz) hidroksile komşu alfa protona, 5.30 ppm deki triplet ($J=3,5$ Hz) ise bir olefinik protona (vinilik protona) işaret etmektedir. Ayrıca 2.84 ppm de izlenen $J=4.3$ ve $J=13.81$ Hz'lik dd etkileşim gösteren pikin ise H-18 protonuna ait olduğu belirlenmiş ve hatta bu sinyalin bu kadar aşağı alanda izlenmesi C-17'ye bağlı bir (-COOH) asit grubunun varlığını düşündürmüştür. Lamiaceae familyası bitkilerinde yaygın olarak bulunan triterpen asitlerden ilk akla gelenler oleanolik asit ve bunun isomeri olan ursolik asittir, fakat bu iki triterpenik asiti birbirinden ^1H NMR da ayıran en karakteristik pikler H-19 ve H-20 ye bağlı metil sinyallerinin dupletler halinde izlenmesi ve H-19 protonu ile etkileşen H-18 sinyalinin verdiği bölünme ve kayma değeridir. Tabii ki APT tekniğiyle alınan ^{13}C -NMR spektrumuyla ursolik asitdeki C-19 ve C-20 den ileri gelen iki fazla metin grubunun üst üste 39-40 ppm civarında izlenmesi de bu iki bileşiği kolaylıkla ayırt etmenin en iyi yoludur. Oleanolik asitde H-18 beta sinyali bu bileşikte de izlendiği gibi karakteristik dublet dubletler halinde 2.8 ppm civarında izlenir.

Nitekim ^{13}C NMR'ında da asit karbonili 182.77 ppm de, çifte bağ karbonları (C-12 ve C-13) 122.66 ve 143.58 da, hidroksil taşıyan karbon (C-3) ise 79.03 de izlenmiştir. Tüm spektral ve literatür verilerine dayanarak yapının 3β -hidroksiolean-12-en-28-oik asit (oleanolik asit) olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca standart örnekle de İTK da farklı çözücü sistemlerinde kıyaslanarak yapının kesin olarak oleanolik asit olduğu ispatlanmıştır.

4.4.2 N.S.DM-89-3-2 ve N.O.DM-39-2 = Ursolik asit = 3 β -hidroksi-urs-12-en-28-oik asit



Şekil 4.5 : Ursolik asit

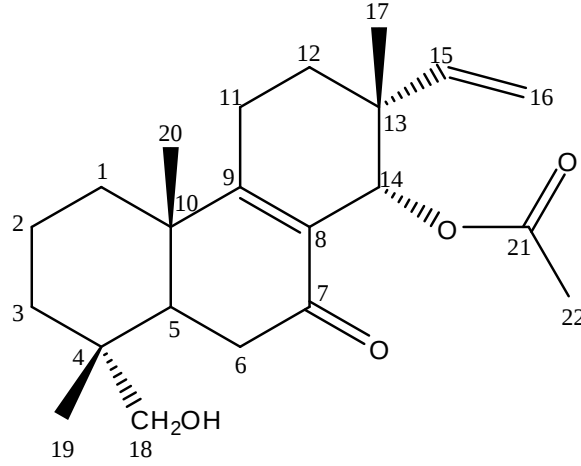
Beyaz renkli kokusuz olan bu bileşik katı halde (7 mg) elde edildi ve erime noktası 290 °C olarak bulundu. Silikajel plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında pembe-mor renk aldı.

¹H NMR spektrumunda 0.70-1.02 ppm ler arasında izlenen beş metil singletinin yanı sıra 0.88 ppm de ve 0.79 ppm de *J* değerleri 6,25 Hz olan iki dublet metilinin varlığı bileşiğin ursan yapısında olduğunu göstermektedir.

Oleanolik asit ve ursolik asit bileşiklerinin IR ve kütle spektral bulguları hemen hemen aynı olduklarından bu spektrumlara dayanarak bu bileşik ayırt edilemez, ancak saflaştırma işlemleri sonucu bileşiğin ¹H NMR spektrumunda C-19 ve C-20 deki metil gruplarının dubletler şeklinde ve dolayısıyla ¹³C NMR da metilen (CH₂) ve metin (CH) sayılarının oleanolik asitten farklı olarak gözlenmesi (ursolik asit de 7 CH grubunun ve özellikle yukarıda bahsedildiği gibi 39-40 ppm de oleanolik asitde gözlenmeyen C-19 ve C-20 ye ait 2 CH karbonunun izlenmesi) bu bileşiğin ursan yapısında olduğunu göstermektedir.¹³C spektrumunda asit karbonilinin karbonu 182.5 ppm de, hidroksil taşıyan karbon (C-3) ise 79.07 ppm de, çifte bağ karbonları (C-12 ve C13) ise 137.91 ve 125.87 ppm de izlenmiştir.

Yapılan literatür taraması ve bileşiğin ince tabaka kromatografisinde standart ursolik asit bileşiği ile aynı R_f değerinde izlenmesi yapının ursolik asit (3 β -hidroksi-urs-12-en-28-oik asit) olduğunu kanıtlamıştır.

4.4.3 N.S.DM-93-100-4-1 = 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-*ent*-pimara-8,15-dien = Sorgeraolone



Şekil 4.6 : 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-*ent*-pimara-8,15-dien

Sarı renkli olan bu bileşik katı halde (9 mg) elde edildi. UV ışık altında (254 nm) koyu renkte gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de 5 dakika yakıldığında koyu sarı-kahverengi olarak gözlendi.

Bileşiğin ^1H NMR spektrumunda 4 metil grubu ve APT spektrumunda 22 karbon izlenmesi bileşiğin diterpen iskeletine sahip bir molekül olabileceğine işaret etmiştir. Ayrıca ^1H NMR spektrumunda bir ABX spin sistemine sahip etilenik yan zincire karşılık gelen karakteristik etkileşme sabitleri (A ile B’ nin geminal, A ile X’ in cis ve B ile X’ in trans konumda) bileşiğin pimaran iskeletine sahip bir diterpen olabileceği fikrini kuvvetlendirmiştir. Nitekim bileşiğin APT (^{13}C NMR) spektrumunda bu çifte bağa ait bir uç metilenin 112.63 ppm de ve metin sinyalinin 143.84 ppm de izlenmesi ve yapının metil grupları ile karbon iskeletine ait tüm karbon pikleri birarada değerlendirildiğinde bu diterpenin pimaran iskeletine sahip olduğu kesinlik kazanmıştır.

Protonlarla bunları taşıyan karbonlar bileşiğin direkt ^1H - ^{13}C korelasyonunu veren HSQC, proton taşımayan karbonlar ise protonlarla karbonlar arasında 2 veya 3 bağ üzerinden (hatta bazen 4 bağ üzerinden) etkileşimi gösteren HMBC spektrumuyla belirlenmiştir.

HSQC spektrumunda pimaran diterpen bileşiğinin karakteristik olefinik C-15 sinyali (δ 143.84) ^1H NMR spektrumunda 5.91 ppm deki dublet dublet (J =10.93; 17.65 Hz,

H-15) pikine karşılık gelirken, 5.02 ve 4.99 ppm de izlenen ve ilki H-15 proton sinyali ile cis, sonuncusu ise trans etkileşim gösteren protonlar ise δ 112.63 de izlenen metilen C'a karşılık gelerek saptanmışlardır. ^1H NMR spektrumunda 3.15 ve 3.43 ppm de dublet ($J= 10.95$ Hz) olarak izlenen piklerin hidroksile komşu bir karbona ait oldukları öngörülmüştür. Nitekim HSQC tekniği ile her iki protonun 70.60 ppm de izlenen metilen karbonu ile korelasyon verdiği izlenmiştir.

^1H NMR spektrumunda 5.78 ppm de singlet olarak izlenen pikin, HSQC tekniği ile 68.34 ppm de izlenen metin karbonuna ait olduğu saptanmıştır. Bu bilgidan bu karbonun oksijene komşu bir karbon olabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca APT spektrumunda 170.02 ppm de izlenen katerner karbonil piki ve ^1H NMR spektrumunda 1.94 ppm de izlenen 3 protonluk metil piki yapıda bir asetil grubu olduğunu doğrulamıştır. HMBC tekniği ile 5.78 ppm deki proton ile 170.02 ppm deki karbonil karbonu arasında ve 1.94 ppm deki metil ile 170.02 ppm deki karbon arasında korelasyonun görülmesi ile asetil grubunun varlığı kesinlik kazanmıştır.

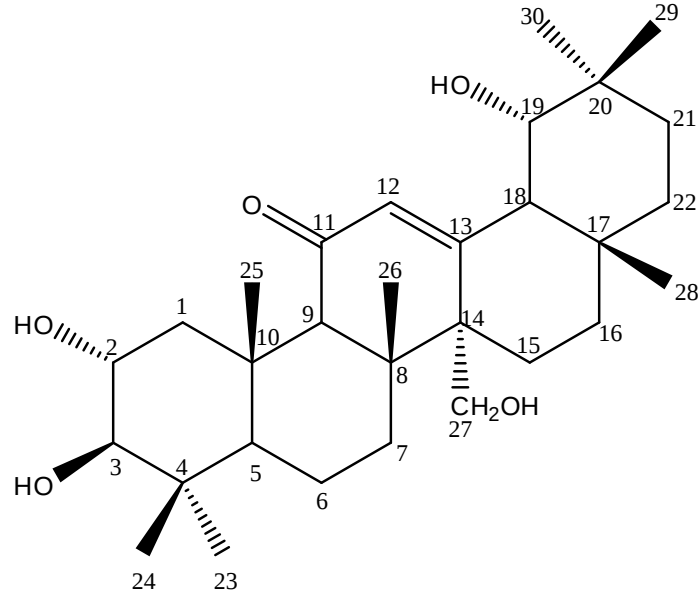
Bileşiğin ^{13}C -NMR spektrumunda δ 170.58 ve 128.66 da izlenen katerner karbonlar yapıda bir çift bağ varlığına, δ 197.52 de izlenen katerner karbon ise bir karbonil grubunun (keto karbonili) varlığına işaret etmektedir. Çift bağ karbonlarından birinin 170.58 ppm gibi alt alanda izlenmesi çift bağ ile karbonil grubunun komşu olduğuna işaret etmiştir. Bu bilgiler ışığında çifte bağ grubunun böyle bir yapıda olabileceği yegane yer C-8 ve C-9 dur, karbonil grubunun ise çift bağa konjuge bir durumda konumlanabileceği iki yer C-7 ile C-14 dır. ^1H NMR ında asetil grubu taşıyan karbon protonunun singlet olarak izlenmesi asetil grubunun C-14 de yerleşmesi ihtimalini kuvvetlendirmiş ve gHMBC spektrumunda asetil grubunun bağlı olduğu karbonun protonu ile C-12 nin etkileşim göstermesi de bunu doğrulamıştır. Bu durumda asetil grubu C-14 de, keto grubu ise C-7 de yer almak durumundadır. APCI tekniği ile alınan kütle spektrumunda moleküler pikin 361.1 $[\text{M}+1]$ iyonu şeklinde izlenmesi ile yapı doğrulanmıştır. Ayrıca moleküler pikden bir molekül su çıkışıyla 342.6 $[\text{M}-18]$ (%19.74) piki, etilenik yan zincirin kopmasıyla 334.1 $[\text{M}-27]$ (%25) piki, -Ac grubuna ait çıkış ile 318.2 $[\text{M}-43]$ (%37.5) piki, -OAc grubuna ait çıkış ile 301.1 $[\text{M}-\text{OAc}]$ (%75) pikleri ve temel pik olarak m/z 263 piki izlenmiştir. Yapılan literatür taramasında benzer iskeletler görülmesine rağmen [73-75] bu bileşiğin daha önce literatüre geçmemiş yeni bir diterpen olduğu tespit edilmiştir.

Tüm spektral bulgular ve özellikle HMBC spektrumu yapıdaki sübstitüentlerin yerinin belirlenmesini sağlayarak yapının yeni bir pimaran diterpen olan 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-*ent*-pimara-8,15-dien olduğunu saptamıştır ve sorgeraolone adı verilmiştir.

Çizelge 4.5: 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-*ent*-pimara-8,15-dien bileşiğinin ^1H ve ^{13}C -NMR verileri (CDCl_3)

Pozisyon	^1H	^{13}C	Pozisyon	^1H	^{13}C
1	2.27, m ; 2.08, m	34.88	13	-	38.51
2	1.70, m ; 1.66, m	17.97	14	5.78, s	68.34
3	2.57, m ; 1.87, m	34.38	15	5.91, dd, (J=10.93 ; 17.65 Hz)	143.84
4	-	37.76	16	H-16a - 4.99, dd, (J=0.90 ; 17.65 Hz)	112.63
5	2.19, dd, (J= 4.25, 5.60 Hz)	41.83	16	H-16b -5.02, dd, (J= 0.90 ; 10.93 Hz)	112.63
6	2.49, d, 4 Hz ; 1.82, d, 5.35 Hz	35.33	17	1.18, s	21.42
7	-	197.52	18	H-18a - 3.43, d, (J=10.95 Hz)	70.60
8	-	128.66	18	H-18b - 3.15, d, (J=10.95 Hz)	70.60
9	-	170.58	19	0.88, s	19.65
10	-	39.48	20	0.90, s	17.38
11	2.60, m ; 2.52, m	22.02	21	-	170.02
12	1.85, m ; 1.48, m	25.94	22	1.94, s	21.26

4.4.4 N.O.DM-58 = 2 α , 3 β , 19 α , 27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en



Şekil 4.7: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en

Sarı kahverengi olan bileşik katı halde (15 mg) elde edildi. UV ışık altında (254 nm) koyu renkte gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de 5 dakika yakıldığında turuncu-kahve (karamel) rengi olarak gözlendi. Bileşiğin ^1H NMR spektrumunda 0.85-1.35 ppm aralığında 7 metil grubunun izlenmesi ve APT spektrumunda 30 karbon izlenmesi bileşiğin triterpen iskeletine sahip bir molekül olabileceğine işaret etmiştir.

^1H NMR spektrumunda ayrıca, 3.92 ppm’ de multiplet, 3.83 ppm’ de singlet ve 3.20 ppm’ de dublet (9,60 Hz) sinyalleri izlenmiştir. HSQC tekniği ile bu protonların sırasıyla; 69.03, 73.5 ve 85.27 ppm’ deki oksijen taşıyan karbonlara bağlı oldukları anlaşılmıştır. COSY tekniği ile 3.92 protonu ile 3.20 protonunun 3 bağ mesafeden etkileşim yaptıkları belirlenmiştir.

^1H NMR spektrumunda ayrıca, 4.15 ve 3.41 ppm’de bir AB çifti olarak izlenen dubletlerin ($J= 11.18$ Hz) primer hidroksile komşu bir karbona ait sinyaller oldukları anlaşılmıştır. Nitekim HSQC tekniği ile bu iki protonun 65.50 ppm’ de izlenen metilen karbonuna ait olduğu belirlenmiştir.

^1H NMR spektrumunda 5.70 ppm’ de singlet olarak izlenen pik yapıda bir çift bağ olduğuna işaret etmektedir. HSQC tekniği ile bu protonun 118.54 ppm’ de izlenen karbona bağlı olduğu anlaşılmıştır. Çifte bağın diğer karbonu ise 169.50 ppm’de

izlenen katerner karbondur ve bu karbonun kimyasal kayma değerinin bu kadar alt alanda izlenmesi yapıda çift bağa komşu bir keto grubunun varlığını göstermektedir ki; bu karbonil karbonu 199.02 ppm’ de izlenmiştir.

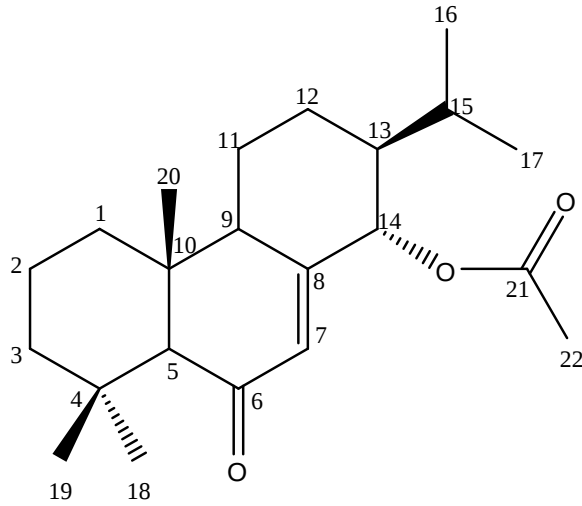
Çizelge 4.6: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin ¹³C-NMR verileri (CDCl₃)

¹³ C-NMR DEĞERLERİ (ppm)					
Pozisyon		Pozisyon		Pozisyon	
1	46.16	11	199.02	21	32.19
2	69.03	12	118.54	22	34.42
3	85.27	13	169.50	23	28.21
4	37.80	14	43.20	24	16.90
5	47.01	15	22.97	25	17.03
6	18.42	16	23.60	26	17.33
7	33.32	17	29.20	27	65.50
8	49.50	18	51.50	28	24.98
9	56.02	19	73.50	29	22.90
10	38.29	20	41.20	30	24.46

Spektral veriler ve benzer yapıların literatür verilerine [76-89] dayanarak yapının yeni bir triterpen olan 2 α , 3 β , 19 α , 27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en olduğuna karar verilmiştir.

4.4.5 N.S.DM-50-4-7 = 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en = Obtusicrenone

Sarı kahverengi olan bileşik katı halde (6 mg) elde edildi. UV ışık altında (254 nm) koyu renkte gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de 5 dakika yakıldığında sarı-kahverengi olarak gözlemlendi.



Şekil 4.8: 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en

Bileşiğin ^1H NMR spektrumunda biri asetil metili olmak üzere toplam 6 metil sinyalinin ve APT spektrumunda 22 karbon sinyalinin izlenmesi bileşiğin asetil grubuna sahip bir diterpen olabileceğine işaret etmiştir. ^1H NMR spektrumunda iki metil dubletler halinde 0.92 ve 0.94 ppm de izlenirken diğer metiller singlet olarak 0.93, 1.26, 1.46 ppm de ve asetil metili 2.04 ppm de yine singlet olarak izlenmiştir.

Daha alt alanda gözlenen sinyaller ise başlıca 3.02 ppm de bir singlet, 5.68 ppm de bir genişlemiş singlet ve 6.06 ppm de bir dar dublet ($J = 3$ Hz) den ibarettir.

5.68 ppm de izlenen proton sinyalinin HSQC tekniği ile 73.31 ppm de izlenen metin karbonuna karşılık gelmesi oksijen taşıyan bir sübstitüentin varlığına işaret etmiştir. Bileşikte bir asetil grubunun varlığı ise 2.04 ppm de izlenen 3 protonluk metil sinyalinin yanı sıra ^{13}C NMR spektrumunda 169.64 ppm de izlenen katerner karbonil piki ile doğrulanmıştır. 5.68 ppm de izlenen proton ile 169.64 ppm de izlenen karbon arasında ve 2.04 ppm de izlenen metil ile 169.64 ppm de izlenen karbon arasında HMBC etkileşiminin izlenmesi bu asetil grubunu taşıyan karbona ait protonun 5.68 ppm de rezonans olduğunu ispatlamaktadır. Asetil grubunun bağlı olduğu karbon protonunun HMBC spektrumunda δ 49.17 (C-9) ve 129.10 (C-7) da izlenen karbon sinyalleri ile korelasyon vermesi asetilin C-14' e bağlı olduğuna işaret etmiştir. Nitekim böyle bir yapıda asetil grubunun bağlı olduğu karbon protonunun multiplisitesinin genişleşmiş singlet olarak izlenebileceği yegane pozisyon C-14' tür.

Stereokimyası için yapılan 2D-NOESY spektrumu fazla bilgi vermemesine rağmen literatürde benzer birkaç yapı bulunmuş ve C-14 e bağlı protonun kimyasal kayma ve

multiplisitesinin literatürde yer alan netidiol B 14 α -monoasetat, 14- α -asetoksi-abieta-7-en-18-oik asit ve 14,18-di- α -asetoksi-abieta-7-en [90] bileşiklerindeki H-14' ün kimyasal kayma ve multiplisitesi ile aynı özellikler göstermesi bu bileşikteki H-14 ün beta pozisyonunda yerleştiğini göstermektedir.

Bileşiğin APT spektrumunda H-14 alifatik metin karbonunun dışında dört alifatik metin karbonu izlenmiştir. Bunlar 28.57, 47.41, 49.17 ve 59.08 ppm de izlenmiş, bunlardan ilkinin her iki dublet metili ile HMBC vermesi ve bu iki dublet metilinin ayrıca 47.41 ppm (C-13) de izlenen karbon ile HMBC vermesi yapıda bir izopropil grubunun varlığını göstererek diterpenin abietan iskelet sahip olduğuna işaret etmiştir. Bu iskelette 49.17 ve 59.08 ppm de izlenen karbonların C-9 ve C-5'e ait oldukları açıktır.

¹H NMR spektrumunda 3.02 ppm de singlet olarak izlenen protonun (59.08 ppm de izlenen C-5' e bağlı proton) keto karbonu ile HMBC spektrumunda korelasyon göstermesi bu sinyalin H-5 protonuna ait olması gerektiğini ve karbonilin C-6 konumunda olduğunu göstermektedir. Nitekim bu protonun 3.02 ppm gibi alt alanda izlenmesi ve C-4 (39.38 ppm), C-6 (198.89 ppm), C-9 (49.17 ppm), C-10 (42.72 ppm), C-19 (17.43 ppm) ve C-20 (15.33 ppm) sinyallerinin hepsi ile HMBC korelasyonu göstermesi bu protonun H-5' e ait olduğunu doğrulamıştır.

Bileşiğin APT spektrumunda 129.10 ppm de metin karbonu ve 155.59 ppm de katerner karbonu olarak izlenen pikler yapıda bir çifte bağ olduğunu göstermiştir. ¹H NMR spektrumunda 6.06 ppm de dublet (3 Hz) olarak izlenen olefinik protonun 59.08 ppm de izlenen metin karbonu (C-5) ve 49.17 ppm de izlenen metin karbonu (C-9) ile HMBC etkileşimi gösterdiği saptanmış ve böylece çifte bağın C-7 ile C-8 arasında konumlandığı belirlenmiştir.

Tüm spektral bulgular ışığında yapının bir abietan diterpen olan 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en olduğu saptanmış ve obtusicrenone adı verilmiştir. APCI tekniği ile alınan kütle spektrumunda moleküler pikin 347.3 [M+1] iyonu şeklinde izlenmesi yapıyı doğrulamıştır.

Çizelge 4.7: 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en bileşiğinin ^{13}C -NMR verileri (CDCl_3)

C-13 NMR DEĞERLERİ (ppm)					
Pozisyon		Pozisyon		Pozisyon	
1	37.45	9	49.17	17	20.77
2	17.59	10	42.72	18	20.66
3	37.84	11	22.54	19	15.33
4	39.38	12	23.91	20	17.43
5	59.08	13	47.41	21	169.64
6	198.89	14	73.31	22	21.33
7	129.10	15	28.57		
8	155.59	16	20.77		

Çizelge 4.8: 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en bileşiğinin HMQC korelasyonu

^1H-^{13}C KORELASYONLARI			
Pozisyon		Pozisyon	
1	37.45 (1.74, m ; 1.76, m)	16	20.77 (0.92, d, 6.6 Hz)
2	17.59 (1.60, m; 1.62, m)	17	20.77 (0.94, d, 6.6 Hz)
3	37.84 (1.82, m ; 1.84, m)	18	20.66 (1.26, s)
5	59.08 (3.02, s)	19	15.33 (0.93, s)
7	129.10 (6.06, d, 3.0 Hz)	20	17.43 (1.46, s)
9	49.17 (2.48, m)	22	21.33 (2.04, s)
12	23.91 (1.30, m; 1.32, m)		
14	73.31 (5.68, brs)		

Çizelge 4.9: 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en bileşiğinin HMBC korelasyonu

¹ H	¹³ C
6.06 (H-7)	73.31 (C-14) ; 59.08 (C-5) ; 49.17 (C-9)
5.68 (H-14)	49.17 (C-9) ; 129.10 (C-7)
3.02 (H-5)	15.33 (C-19) ; 17.43 (C-20) ; 39.38 (C-4) ; 42.72 (C-10) ; 49.17 (C-9) ; 198.89 (C-6)
2.04 (H-22)	169.64 (C-21)

4.5 Saf Bileşiklerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

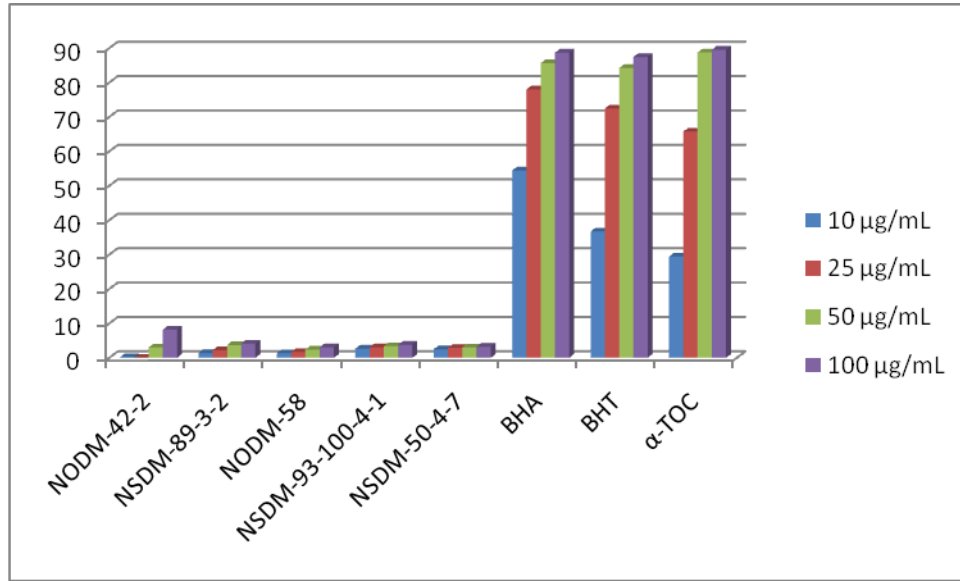
Çizelge 4.10: Maddeler ve kodları

KODLAR	MADELER
NODM-42-2	Oleanolik Asit
NSDM-89-3-2 = NODM-39-2	Ursolik Asit
NODM-58	2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en
NSDM-93-100-4-1	7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-ent-pimara-8,15-dien
NODM-50-4-7	6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en

4.5.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

Çizelge 4.11: İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri

	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL
NODM-42-2	0,19	0.41	3,02	8,19
NSDM-89-3-2	1,38	2,22	3,71	4,13
NODM-58	1,31	1,71	2,38	3,06
NSDM-93-100-4-1	2,67	3,03	3,39	3,79
NSDM-50-4-7	2,5	2,89	3,01	3,22
BHA	54,44	77,99	85,65	88,71
BHT	36,69	72,47	84,22	87,42
α -TOC	29,43	65,74	88,74	89,55



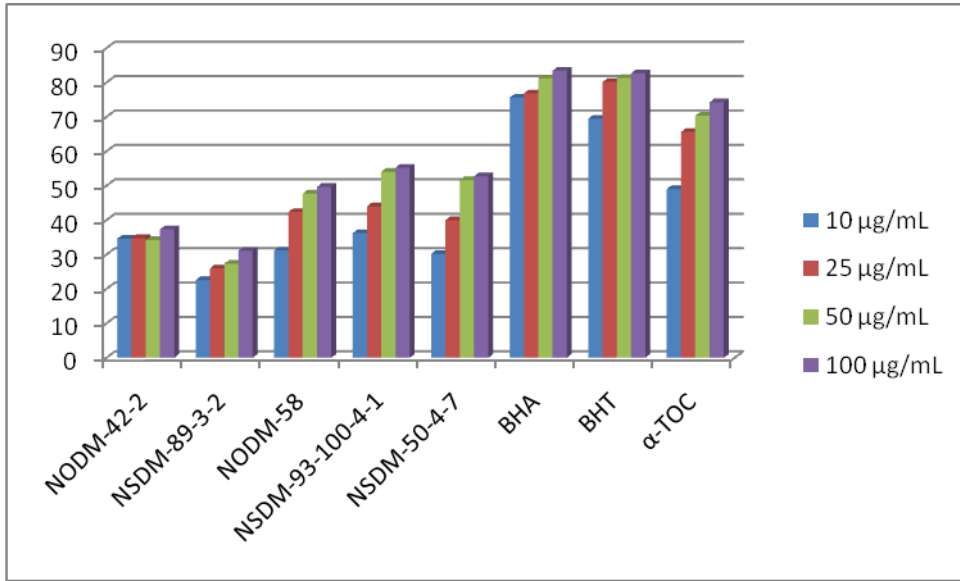
Şekil 4.9: İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri

Şekil 4.9’ de de görüldüğü gibi izole edilen saf maddeler DPPH serbest radikali giderim aktivitesi göstermemektedirler.

4.5.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon (β -karoten renk açılımı) aktivitesi sonuçları

Çizelge 4.12: İzole saf bileşiklerin lipid peroksidasyon % inhibisyonu

	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
NODM-42-2	34,61	34,81	34,23	37,35
NSDM-89-3-2	22,6	26,01	27,36	31,14
NODM-58	31,23	42,38	47,72	49,71
NSDM-93-100-4-1	36,24	44	54,07	55,24
NSDM-50-4-7	30,21	40,03	51,66	52,77
BHA	75,64	76,86	81,2	83,45
BHT	69,49	80,17	81,29	82,69
α-TOC	49,05	65,66	70,37	74,29



Şekil 4.10: İzole saf bileşiklerin β-karoten renk açılım yöntemiyle lipid peroksidasyon inhibisyon aktiviteleri

Şekil 4.10’da da görüldüğü gibi saf bileşikler standartlarla kıyaslandığında orta derecede aktivite gösterdikleri görülmüştür.

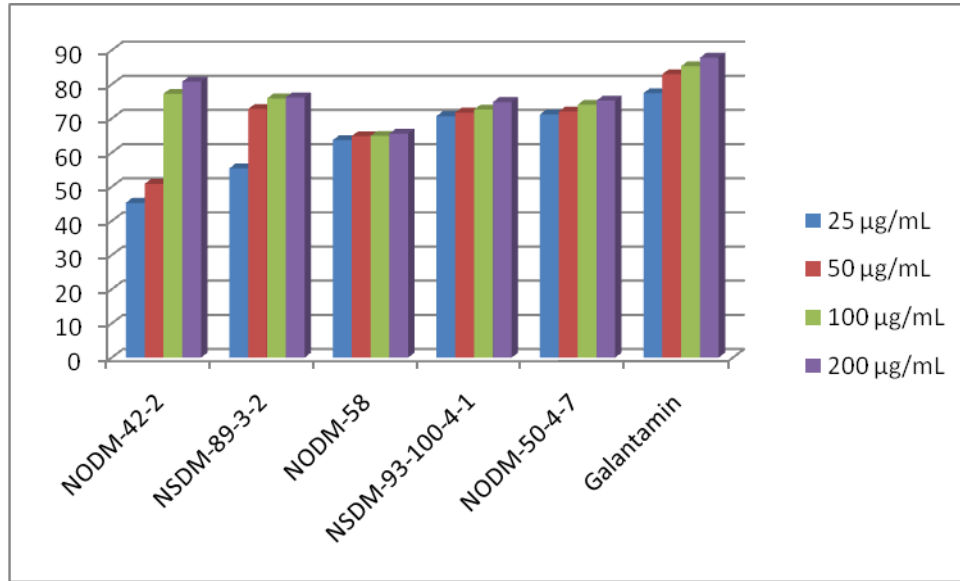
4.5.3 Saf maddelerin antikolinesteraz aktivite sonuçları

Çizelge 4.13: Maddeler ve kodları

KODLAR	MADDELER
NODM-42-2	Oleanolik Asit
NSDM-89-3-2 = NODM-39-2	Ursolik Asit
NODM-58	2α,3β,19α,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en
NSDM-93-100-4-1	7-okso-14α-asetoksi-18-hidroksi-ent-pimara-8,15-dien
NODM-50-4-7	6-okso-14α-asetoksi-abieta-7-en

Çizelge 4.14: İzole saf maddelerin antikolinesteraz (AChE) aktivitesi sonuçları

	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
NODM-42-2	45,32	50,86	77,26	80,81
NSDM-89-3-2	55,43	72,8	75,87	76,22
NODM-58	63,68	64,83	64,9	65,56
NSDM-93-100-4-1	70,7	71,73	72,62	74,82
NODM-50-4-7	71,2	72,05	74,01	75,23
Galantamin	77,43	82,98	85,31	87,81

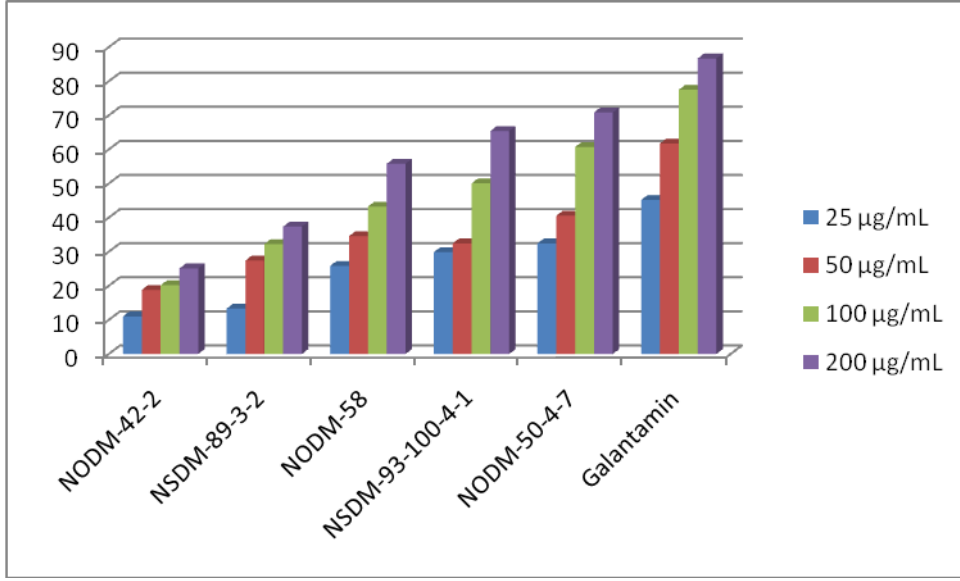


Şekil 4.11: İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu

Şekil 4.11’de de görüldüğü gibi izole edilen saf maddeler Galantamin standardı ile kıyaslandıklarında iyi derecede AChE inhibisyonu göstermişlerdir.

Çizelge 4.15: İzole saf maddelerin antikolinesteraz (BChE) aktivitesi sonuçları

	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	200 µg/mL
NODM-42-2	11,02	18,8	20,16	25,11
NSDM-89-3-2	13,29	27,42	32,21	37,35
NODM-58	25,84	34,57	43,22	55,79
NSDM-93-100-4-1	29,88	32,45	50,06	65,41
NODM-50-4-7	32,45	40,55	60,72	70,85
Galantamin	45,17	61,73	77,49	86,66



Şekil 4.12: İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu

Şekil 4.12’ de de görüldüğü gibi iki yeni diterpen (7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-*ent*-pimara-8,15-dien ve 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en) yüksek BChE inhibisyonu göstermişlerdir.

5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada Türkiye' nin Doğu Anadolu Bölgesine endemik iki *Nepeta* türünden (*Nepeta sorgerae* Hedge et Lamond ve *Nepeta obtusicrena* Boiss. et Kotschy ex Hedge) hazırlanan ekstrelerden sekonder metabolitlerinin izolasyonu, ve karakterizasyonu, antioksidan ve antikolinesteraz aktivite odaklı olarak incelenmiştir.

Nepeta türleri üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda *Nepeta* türlerinin sekonder metabolitlerinin başlıca iridoidler olmak üzere terpenler ve diğer sekonder metabolitlerden oluştuğu belirlenmiştir. *Nepeta* türünün ait olduğu Lamiaceae (Labiatae) 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 ekstrelerin hazırlanması ve aktivite tayinleri ile başladı, aktif ekstrelerden saf bileşiklerin izole edilmesi ve yapı tayinlerinin ardından saf bileşiklerin antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi ile devam etmiştir.

Hazırlanan diklorometan ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik miktarları pirokatekole, toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildi. Gerek ekstrelerin gerekse saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikal giderim yöntemi ve lipid peroksidasyonunu inhibisyona dayanan β -karoten renk açılım yöntemi ile belirlenmiştir. Antikolinesteraz aktiviteleri ise Ellman metodu ile incelenmiştir.

Aktivite testleri sonucunda elde edilen verilere göre; her iki bitkinin hem diklorometan hem de metanol ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri (Hem DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri hem de β -karoten renk açılım yöntemi ile lipid peroksidasyon inhibisyon aktiviteleri) standartlarla kıyaslandığında orta derecede sonuçlar gösterdikleri belirlenmiştir.

Aktivite testleri sonucunda elde edilen verilere göre; her iki bitkinin hem diklorometan hem de metanol ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri (Hem DPPH

serbest radikali giderim aktiviteleri hem de β -karoten renk açılım yöntemi ile lipid peroksidasyon inhibisyon aktiviteleri) standartlarla kıyaslandığında orta derecede sonuçlar gösterdikleri belirlenmiştir.

Aktivite testleri sonucuna göre her iki bitkinin hem diklorometan hem de metanol ekstralarının antioksidan aktiviteleri standartlarla kıyaslandığında orta derecede aktif oldukları belirlenmiştir. Beklendiği gibi her iki bitkinin metanol ekstraları diklorometan ekstralarına oranla daha yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Her iki bitkinin hem diklorometan hem de metanol ekstralarının genelde zayıf antikolinesteraz aktivite gösterdikleri belirlenmiş olmasına rağmen göreceli olarak *N. sorgerae* diklorometan ekstresi daha yüksek antikolinesteraz aktivite göstermiştir.

İzolasyon işlemine aktif ekstraların kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılmasını takiben fraksiyonların küçük kolonlarla veya preparatif ince tabaka kromatografisiyle saflaştırılması ile ve gerektiğinde HPLC ile devam edildi. Elde edilen bileşiklerin yapıları 1D, 2D-NMR ve kütle spektral analizleri ile saptandı. Yapılan çalışmalar sonucunda *Nepeta sorgerae* bitkisi diklorometan ekstresinden bilinen triterpen ursolik asidin yanı sıra yeni bir pimaran diterpen 7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-ent-pimara-8,15-dien (sorgeraolone) izole edilirken, *Nepeta obtusicrena* bitkisi diklorometan ekstresinden bilinen iki triterpen olan oleanolik asit ve ursolik asit ve yeni bir triterpen 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en ve yeni bir abietan diterpen 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en (obtusicrenone) bileşikleri elde edilmiştir.

İzole edilen saf bileşikler ise orta derecede lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi göstermelerine karşın, DPPH serbest radikal giderim aktivitesi gösterememişlerdir. Buna karşın, saf bileşiklerin tümü yüksek AChE inhibisyonu gösterirken, BChE enzimini inhibe etmede sadece iki yeni diterpen (7-okso-14 α -asetoksi-18-hidroksi-ent-pimara-8,15-dien ve 6-okso-14 α -asetoksi-abieta-7-en) yüksek aktivite göstermişlerdir.

Bu iki endemik *Nepeta* türünden bir yeni triterpen ve iki yeni diterpenin elde edilerek bilim dünyasına sunulması fitokimyasal açıdan önemlidir ve bu iki yeni diterpenin diğer izole edilen saf bileşiklerden farklı olarak bütiril kolinesteraz enzimini yüksek oranda inhibe etmeleri ve ayrıca lipid peroksidasyonu inhibisyonunda ise her üç yeni bileşiğin orta-iyi derecede aktivite göstermesi kayda değerdir.

KAYNAKLAR

- [1] <<http://tr.wikipedia.org/wiki/Lamiaceae>>, alındığı tarih 29.10.2010
- [2] Başer, K., H., C., Kırmır N., 2006. Essential Oils of Lamiaceae Plants of Turkey. *Acta Horticulturae*, **723**, 163–171.
- [3] Dinesh, S., B., Rajendra, C., P., Lalit, S., Veena, P., Priyanka, L., Chandra, S., M., 2010. Constituents and antimicrobial activity of the essential oils of six Himalayan *Nepeta* species. *Journal of the Serbian Chemical Society*, **75** (6), 739–747.
- [4] <<http://tr.wikipedia.org/wiki/Nepeta>>, alındığı tarih 29.10.2010
- [5] Topçu, G., Kökdil, G., Yalçın, M., S., 2000. Constituents of *Nepeta caesarea*, *Journal of Natural Products*, **63**, 888-890.
- [6] Takeda, Y., Kiba, Y., Masuda, T., Otsuka, H., Honda, G., Tagawa, M., Sezik, E., Yesilada, E., 1999. Nepetaracemosides A and B, Iridoid Glucosides from *Nepeta racemosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **47**(10), 1433—1435.
- [7] Gkinis, G., Tzakou, O., Iliopoulou, D., Roussis, V., 2003. Chemical Composition and Biological Activity of *Nepeta parnassica* Oils and Isolated Nepetalactones. *Z. Naturforsch.* **58c**, 681-686.
- [8] Alim, A., Goze, I., Cetin, A., Atas, A., D., Cetinus, S., A., Vural, N., 2009. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil of *Nepeta nuda* L. subsp. *Albiflora* (Boiss.) gams. *African Journal of Microbiology Research*, **3** (8), 463-467.
- [9] Baytop, T., 1984. *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*. İstanbul Üniversitesi Yayınları, syf.340.
- [10] Cotrium, H., C., Barroso, J., G., Figueiredo, A., C., Pais, M., S., S., Scheffer, J., J., C., 2006. Composition of the essential oil from inflorescences of *nepeta tuberosa* L. ssp. *tuberosa*. *Flavour and Fragrance Journal*, **9** (2), 71-73.
- [11] Bourrel, C., ve diğ., 1993. Chemical composition and antifungal activity of essential oil of *Chrysactinia mexicana* Gray. *Journal Essantial Oil Research*. **5** (2), 159-167.
- [12] <[http://www.weski.tubitak.gov.tr/tubives/index.php?com=18000&id=Nepeta sorgerae](http://www.weski.tubitak.gov.tr/tubives/index.php?com=18000&id=Nepeta_sorgerae)>, alındığı tarih 29.10.2010.
- [13] Dirmenci, T., Yıldız, B., Tümen, G., 2004. Threatened Categories of Four *Nepeta* L. (Lamiaceae) Species Endemic to the East Anatolia. *Turk. J. Bot.*, **28**, 221-226.
- [14] Baser, KHC., Kırmır, N., Kurkcuoglu, M., Demirci, B., 2000. Essential oils of *Nepeta* species growing in Turkey. *Chemistry of Natural Compounds*, **36** (4), 356-359.

- [15] <<http://www.genbilim.com/content/view/3904/75>>, alındığı tarih 05.11.2010.
- [16] **Croteau, R., Kutchan, MT., Lewis, GN.,** 2000. *Natural Products (Secondary Metabolites)*, syf.1252.
- [17] **Harborne, J.B.,** 1998. *Pythochemical Methods-A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, syf. 112-113.
- [18] **Dewick, P.M.,** 2002. *Medicinal Natural Products:A Biosynthetic Approach*, Second Edition, syf. 187-188.
- [19] **Dewick, P.M.,** 2002. *Medicinal Natural Products:A Biosynthetic Approach*, Second Edition, syf. 188-188.
- [20] **Dewick, P.M.,** 2002. *Medicinal Natural Products:A Biosynthetic Approach*, Second Edition, syf. 343-350.
- [21] **Dewick, P.M.,** 2002. *Medicinal Natural Products:A Biosynthetic Approach*, Second Edition, syf. 190-191.
- [22] **James, R.H,** 2003. *Natural Products: The Secondary Metabolities*, syf. 8-9.
- [23] **Sönmez, U.,** 1995. *Salvia napifolia Jacq. Bitkisinden Elde Edilen Yeni Diterpenoit Bileşiklerin Yapı Araştırması*, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı (Doktora Tezi).
- [24] **Hatipoğlu, S.D.,** 2010. *Salvia adenophylla ve Salvia verticillata subsp. amasiaca Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin Aktivite Odaklı İzolasyonu ve Yarı Sentetik Türevlerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin İncelenmesi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü (Yüksek Lisans Tezi).
- [25] **Karabacak, Ç.,** 2007. *Bazı Scutellaria Orientalis Türlerinin İçerisindeki Ekstraktif Bileşiklerin Araştırılması*, Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilimdalı (Yüksek Lisans Tezi).
- [26] **Dewick, P.M.,** 2002. *Medicinal Natural Products:A Biosynthetic Approach*, Second Edition, syf. 212-213.
- [27] **Harborne J. B.,** 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 129, Chapman&Hall, London.
- [28] **Croteau, R., Kutchan, MT., Lewis, GN.,** 2000. *Natural Products (Secondary Metabolites)*, syf.1262.
- [29] **Spurgeon, S.L., ve diğ.,** 1981. Biosynthesis of Isoprenoid Compounds, *Protein Sci.*, 3 (4), 600-607.
- [30] **A Cram, D. J., Hammond, G. S.,** 1964. *Organic Chemistry*. New York: McGraw-Hill Book Company, 671-673.

- [31] **Cadenas, E., and Davies, K. J. A.,** 2000. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, And Aging, *Free Radical Biology & Medicine*, **29**, 222–230.
- [32] **Gülçin, İ., Oktay, M., Kireçci, E., Küfrevioğlu, Ö. İ.,** 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, *Food Chemistry*, **83**, 371-382.
- [33] **Papas, A. M., ve diğ.,** 1996. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, **31**, 77–82.
- [34] **Reische, D. W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R. R., Akoh, C. C., Min, D. B.,** 2002. *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 489-516.
- [35] **Blois, M. S., ve diğ.,** 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1199-1200.
- [36] **Miller, H. E., ve diğ.,** 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **48**, 91.
- [37] **Prior, R. L., Cao, G.** 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**, 1173-1181.
- [38] **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.,** 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.
- [39] **Liu, F., Ooi, V. E. C. ve Chang, S. T.** 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, **60**, 763-771.
- [40] **Benzie, I. F. F. and Strain, J. J.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
- [41] **Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Locke, S.** 1985. Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, **187**, 33-37..
- [42] **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E.,** 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7970-7981.
- [43] **Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. ve Almeida, L. M.** 1994. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **315**, 161-169.

- [44] **Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G. ve Maxwell, S. R. J.**, 1992. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, **266**, 265-277.
- [45] **Valkonen, M., Kuusi, T.** 1997. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research*, **38**, 823-833.
- [46] **Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A.** 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**, 29-36.
- [47] **Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F.** 1998. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*, **24**, 1228-1234.
- [48] **Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A.**, 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, **24**, 480-493.
- [49] **Kohen, R., Beit-Yannai, E., Berry, E. M., Tirosh, O.** 1999. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. *Methods in Enzymology*, **300**, 285-296.
- [50] **Singleton, V. L., Orthofer, R. ve 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.
- [51] **Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A.** 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of *Propolis* from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 109-114.
- [52] **Alzheimer A., ve diğ.**, 1906. Über einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde. *Zentralbl Nervenkrankheiten*, **25**, 1134.
- [53] **Mann, D. M., ve diğ.**, 1989. The pathogenesis and progression of the pathological changes of Alzheimer's disease, *Ann Med*, **21**, 133-136.
- [54] **Daniel, S. A. ve diğ.**, 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategie, *Neurobiology*, **68** , 209-245.
- [55] **Lanari, A., ve diğ.**, 2006. Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, **127**, 158-165.

- [56] **Dane, R. L. ve diğ.,** 2004. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease, *European Journal of Pharmacology*, **486**, 9– 17.
- [57] **John, B., Standridge, M. D.,** 2004. Pharmacotherapeutic Approaches to the Treatment of Alzheimer's Disease, *Clinical Therapeutics*, **26**, 5.
- [58] **Xilong Z. ve diğ.,** 2006. In vitro galantamine-memantine co-application: Mechanism of beneficial action, *Neuropharmacology*, **51**, 1181-1191.
- [59] **Hartman, R. E.,** Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology. *Taylor& Francis Group, LLC*, 2010, chapter 16.
- [60] **Demans Dergisi** 2002. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri, **2**, 5-9.
- [61] **Kelly, C.A., Harvey, R.J., Cayton, H.,** 1997. Drug treatments for Alzheimer's disease. *Br. Med. J.* **314**, 693–694.
- [62] **Scott, L.J., Goa, K.L.,** 2000. Galantamine: a Review of Its Use in Alzheimer's Disease, *Drugs*, **60**, 1095–1122.
- [63] **Gottwald, M. D., Rozanski, R. I.,** 1999, Rivastigmine a brainregion selective acetylcholinesterase inhibitor for treating Alzheimer's disease: review and current status, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **8**, 1673-1682.
- [64] **Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J.,** 2007, Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants, *Phytomedicin*, **14**, 289–300.
- [65] **Orhan, İ., Şener, B.,** 2003. Bioactivity-directed Fractionation of Alkaloids from some Amaryllidaceae Plants and Their Anticholinesterase Activity, *Chemistry of Natural Compounds*, **39 (4)**, 383-386.
- [66] **Lopez, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C.,** 2002, Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Amaryllidaceae Alkaloids and *Narcissus* Extracts, *Life Sciences*, **71**, 2521–2529.
- [67] **Jamshidzadeh A, Niknahad H, Mohammadi-Bardbori A., Talati, M.,** 2008. Comparative measurement of serum acetyl cholinesterase enzyme using three different methods. *Toxicology Letters*, **180**, 237.
- [68] **Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M.,** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol*, **7**, 88-95.
- [69] **Turkoglu A, Kivrak I, Mercan N, Duru ME, Gezer K, Turkoglu H.** 2006. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Morchella conica* Pers.. *Afr J Biotechnol*; **5 (11)**, 1146-1150.

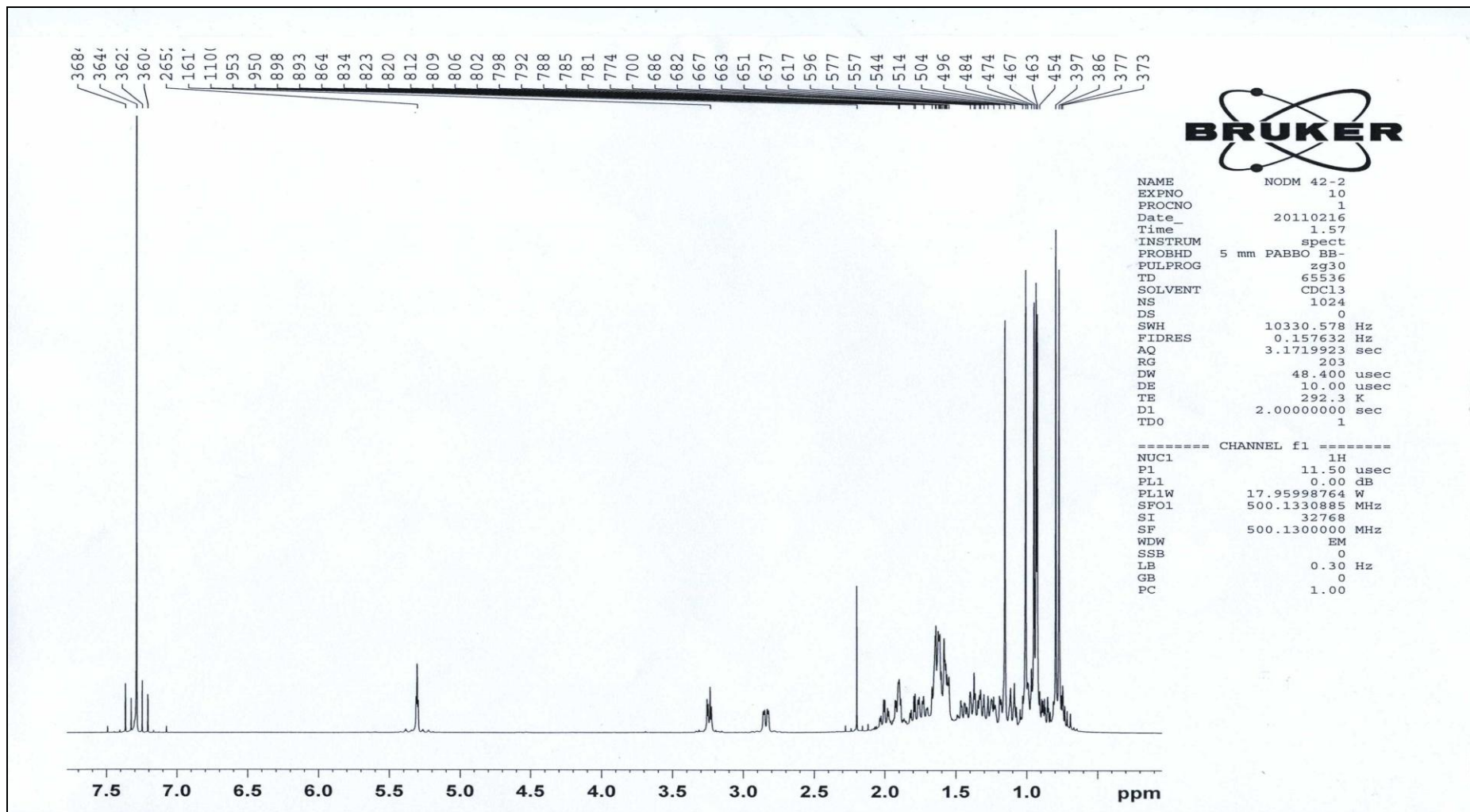
- [70] **Kivrak, I., a, Duru M. E., Ozturk M., Mercan N., Harmandar M., Topcu, G.,** 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia potentillifolia*. *Food Chemistry*, **116**, 470–479.
- [71] **Topçu, G., Ay. M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A.,** 2007: A New Flavone From Antioxidant Extracts of *Pistacia terebinthus*. *Food Chem*, **103**(3): 816-822.
- [72] **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.
- [73] **Rasoamiaranjanahary, L., ve diğ.,** 2003. Antifungal isopimaranes from *Hypoestes serpens*, *Phytochemistry*, **64**, 543-548.
- [74] **Braulio, M., ve diğ .,** 2003. Microbial Transformation of 18-Hydroxy-9,13-*epi-ent-pimara-7,15-diene* by *Gibberella fujikuroi*, *Journal of Natural Products*, **66**, 3.
- [75] **Giorgos, G., ve diğ .,** 2008. Parnapimarol and Nepetaparnone from *Nepeta parnassica*, **71**, 926-928.
- [76] **Belsner K., ve diğ.,** 2003: Structural analysis of pentacyclic triterpenes from the gum resin of *Boswellia serrata* by NMR spectroscopy, *Magn. Reson. Chem.* **41**, 115-122.
- [77] **Bruno, M., ve diğ.,** 1987: Ursane and Oleanane Triterpenoids from *Salvia argentea*, *Phytochemistry*, **26**, 497-501.
- [78] **Cheng, J. J., ve diğ.,** 2010: Cytotoxic Hexacyclic Triterpene Acids from *Euscaphis japonica*, *J. Nat. Prod.* **73**, 1655-1658.
- [79] **De La Torre, M. C. ve diğ.,** 1990: Terpenoids from *Salvia willeana* and *Salvia virgata*, *Phytochemistry*, **29**, 668-670.
- [80] **Fourie, T. G. Ve Snyckers, F. O.,** 1989: A Pentacyclic Triterpene with Anti-Inflammatory and Analgesic Activity from the Roots of *Commiphora merkeri* , *J. Nat. Prod.*, **52**, 1129-1131.
- [81] **Gu, X. J., ve diğ.,** 2007: Triterpenoid Saponins from the Spikes of *Prunella vulgaris*, *Helvetica Chimica Acta*, **90**, 72-78.
- [82] **Mehmood S., ve diğ.,** 2006: New Butyrylcholinesterase Inhibitory Triterpenes from *Salvia santolinifolia*, *Arch. Pharm. Res.* **3**, 195-198.
- [83] **Seebacher, W., ve diğ.,** 2003: Complete Assignments of ¹H and ¹³C NMR Resonance of Oleanolic Acid, 18- α -Oleanolic Acid, Ursolic Acid and Their 11-Oxo Derivatives. *Magn. Reson. Chem.*, **41**, 636-638.
- [84] **Topçu G., Ulubelen A.,** 1999: Terpenoids from *salvia kronenburgii*, *J. Nat. Prod.* **62**: 1605-1608.

- [85] **Topçu, G., ve diğ.,** 2004: Highly Hydroxylated Triterpenes from *Salvia kronenburgii*, *J. Nat. Prod.***67**, 118-121.
- [86] **Zeng, N., ve diğ.,** 2011: Anti-Inflammatory Triterpenes from the Leaves of *Rosa laevigata*, *J. Nat. Prod.***74**, 732-738.
- [87] **Zhang, Y., ve diğ.,** 2005: Cyclooxygenase-2 Enzyme Inhibitory Triterpenoids from *Picrorhiza kurroa* Seeds, *Life Sciences*, **77**, 3222-3230.
- [88] **Xin, X. L., ve diğ.,** 2010: Structural Determination of Two New Triterpenoids Biotransformed from Glycyrrhetic Acid by *Mucor polymorphosporus*, *Magn. Reson. Chem.*,**48**, 164-167.
- [89] **Xu, Y. X., ve diğ.,** 2010: Two new Triterpenoids From the Roots of *Actinidia Chinensis*, *Fitoterapia*, **81**, 920-924.
- [90] **Braulio, M.F., ve diğ.,** 1998. Abietane Diterpenes From *Nepeta teydea*, *Phytochemistry*, **47**, 2, 251-254.

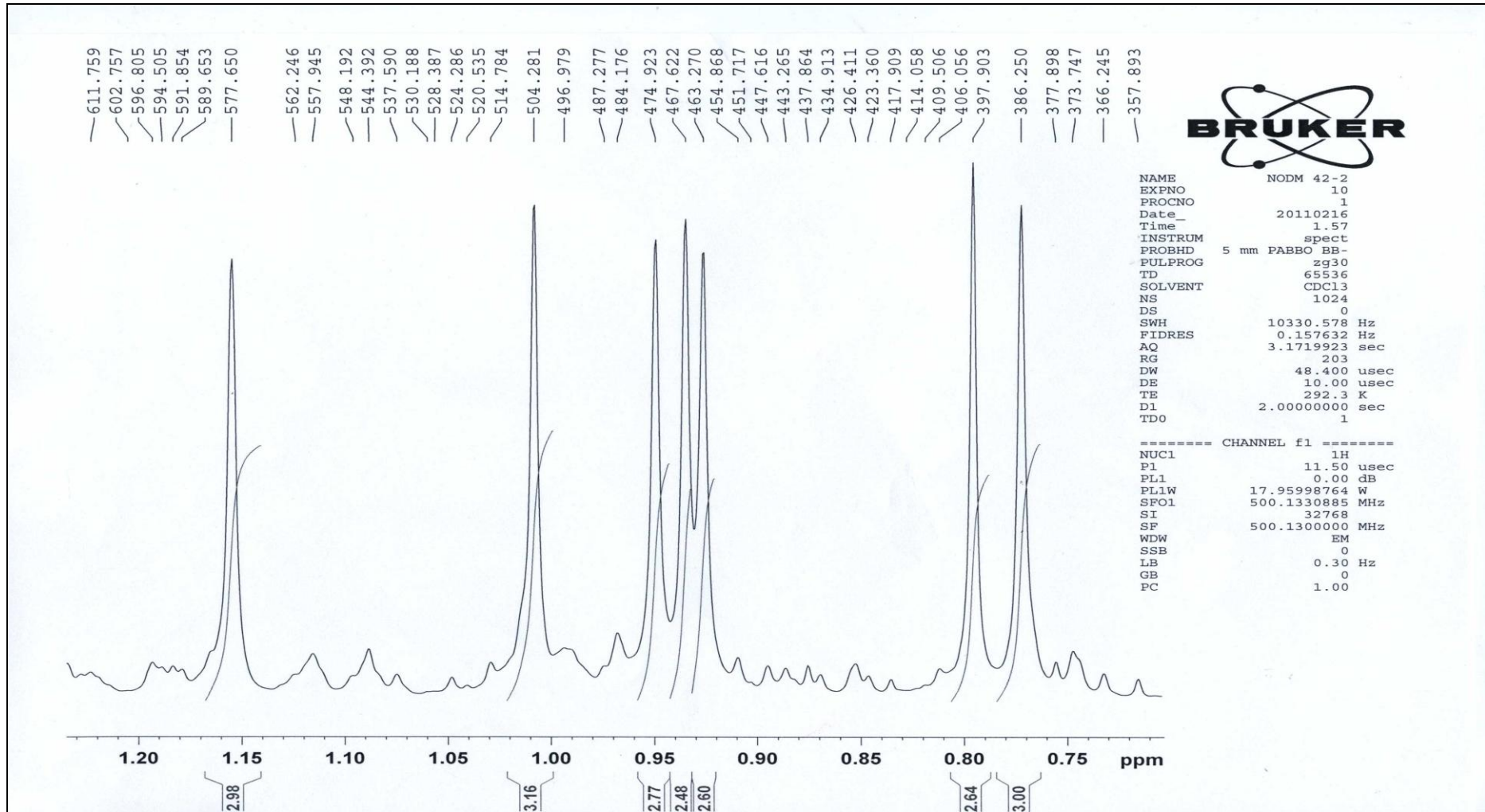
EKLER

- EK A.1:** Olenolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK A.2: Olenolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (0.7-1.2 ppm aralığı)
EK A.3: Olenolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (2.7-5.4 ppm aralığı)
EK A.4: Olenolik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu
EK B.1: Ursolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK B.2: Ursolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (0.6-1.10 ppm aralığı)
EK B.3: Ursolik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu
EK B.4: Ursolik asit bileşiğinin IR spektrumu
EK C.1: Sorgeraolone' nün ^1H NMR spektrumu
EK C.2: Sorgeraolone' nün ^1H NMR spektrumu (0.75-1.5 ppm aralığı)
EK C.3: Sorgeraolone' nün ^1H NMR spektrumu (3.0-6.0 ppm aralığı)
EK C.4: Sorgeraolone' nün ^{13}C -NMR (APT) spektrumu
EK C.5: Sorgeraolone' nün HSQC spektrumu
EK C.6: Sorgeraolone' nün HMBC spektrumu
EK C.7: Sorgeraolone' nün COSY spektrumu
EK C.8: Sorgeraolone' nün MASS spektrumu
EK D.1: $2\alpha,3\beta,19\alpha,27$ -tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK D.2: $2\alpha,3\beta,19\alpha,27$ -tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (0.8-1.55 ppm aralığı)
EK D.3: $2\alpha,3\beta,19\alpha,27$ -tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (2.8-5.7 ppm aralığı)
EK D.4: $2\alpha,3\beta,19\alpha,27$ -tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin ^{13}C - NMR (APT) spektrumu (15-75 ppm aralığı)
EK D.5: $2\alpha,3\beta,19\alpha,27$ -tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin ^{13}C - NMR (APT) spektrumu (80-210 ppm aralığı)
EK D.6: $2\alpha,3\beta,19\alpha,27$ -tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin HSQC spektrumu
EK D.7: $2\alpha,3\beta,19\alpha,27$ -tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin HMBC spektrumu
EK D.8: $2\alpha,3\beta,19\alpha,27$ -tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin COSY spektrumu
EK E.1: Obtusicrenone bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK E.2: Obtusicrenone bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (0.9-1.7 ppm aralığı)
EK E.3: Obtusicrenone bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (1.8-3.4 ppm aralığı)
EK E.4: Obtusicrenone bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (5.6-6.3 ppm aralığı)
EK E.5: Obtusicrenone bileşiğinin ^{13}C - NMR (APT) spektrumu
EK E.6: Obtusicrenone bileşiğinin HMQC spektrumu
EK E.7: Obtusicrenone bileşiğinin HMBC spektrumu
EK E.8: Obtusicrenone bileşiğinin COSY spektrumu
EK E.9: Obtusicrenone bileşiğinin MASS spektrumu
EK E.10: Obtusicrenone bileşiğinin HPLC Kromatogramı

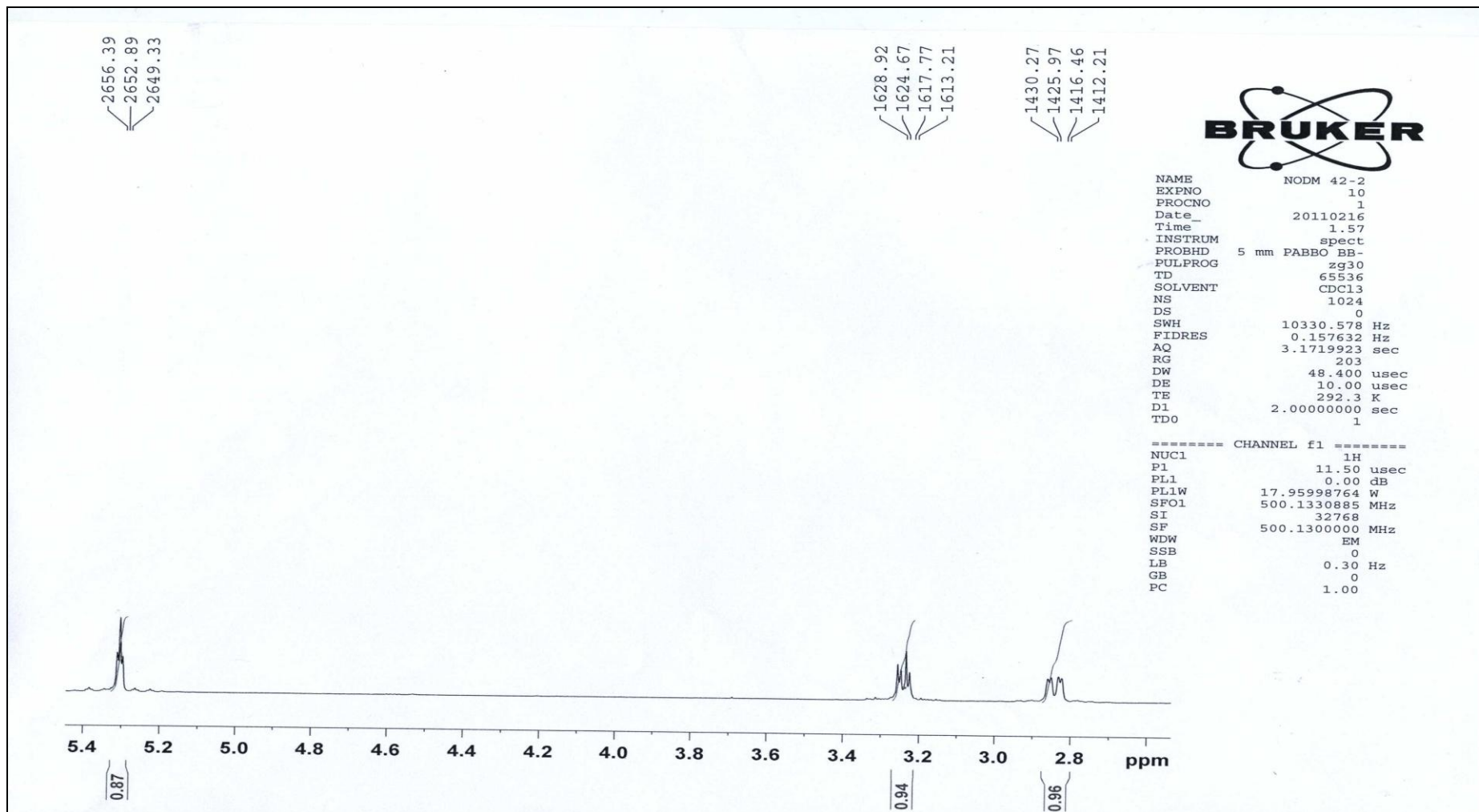
EK A.1: Olenolik asit bileşğinin ^1H NMR spektrumu



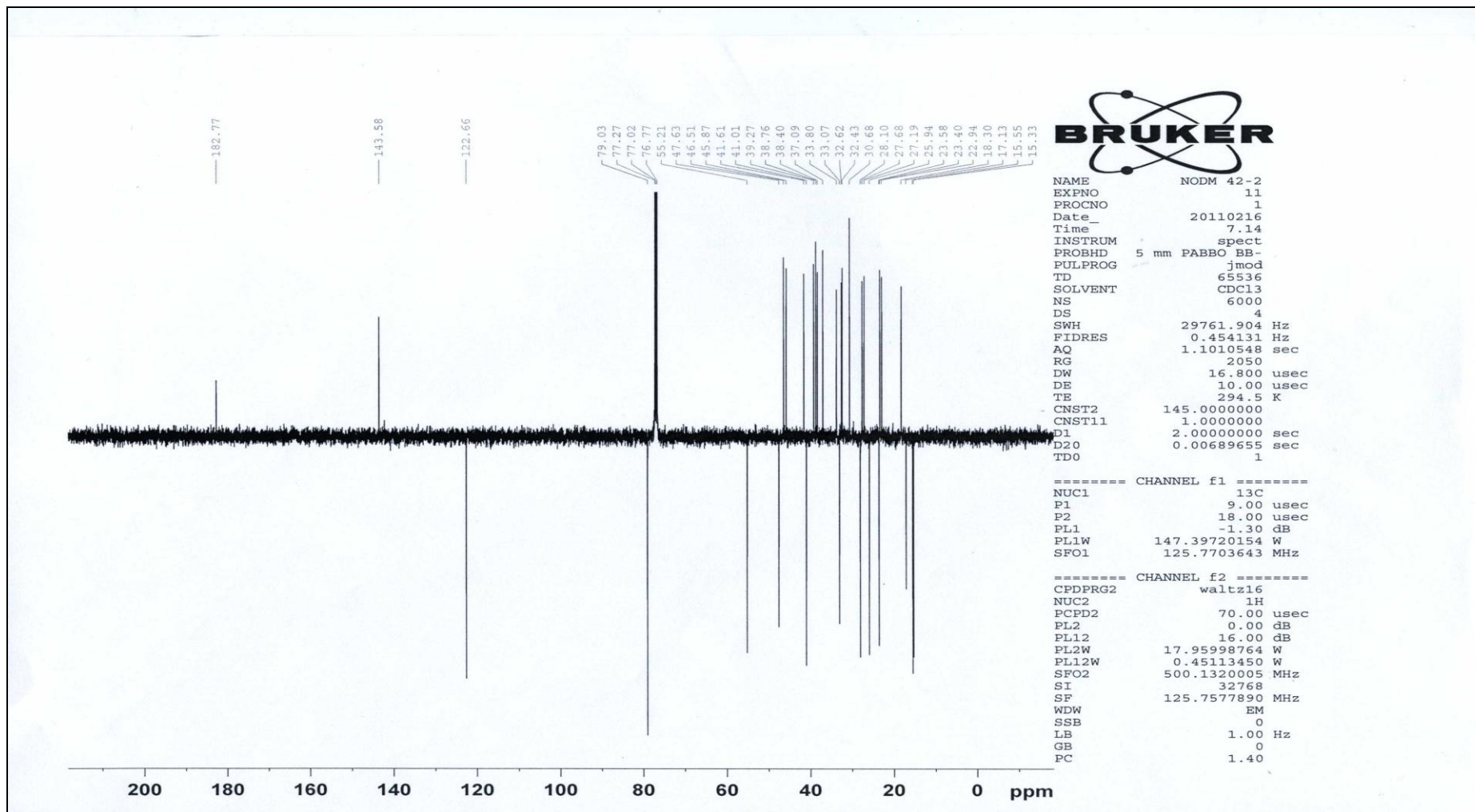
EK A.2: Olenolik asit bileşığının ^1H NMR spektrumu (0.7-1.2 ppm aralığı)



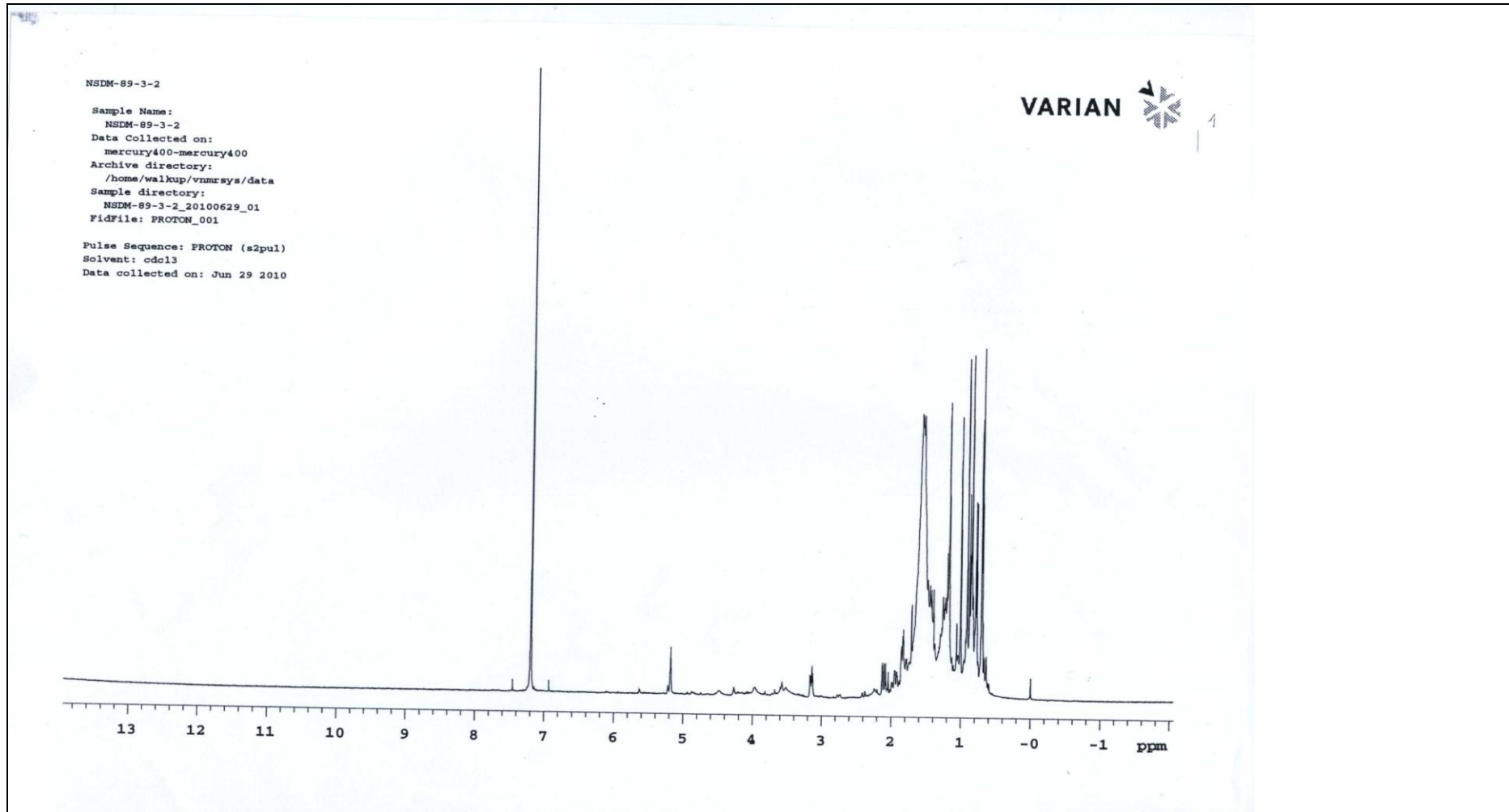
EK A.3: Olenolik asit bileşığının ^1H NMR spektrumu (2.7-5.4 ppm aralığı)



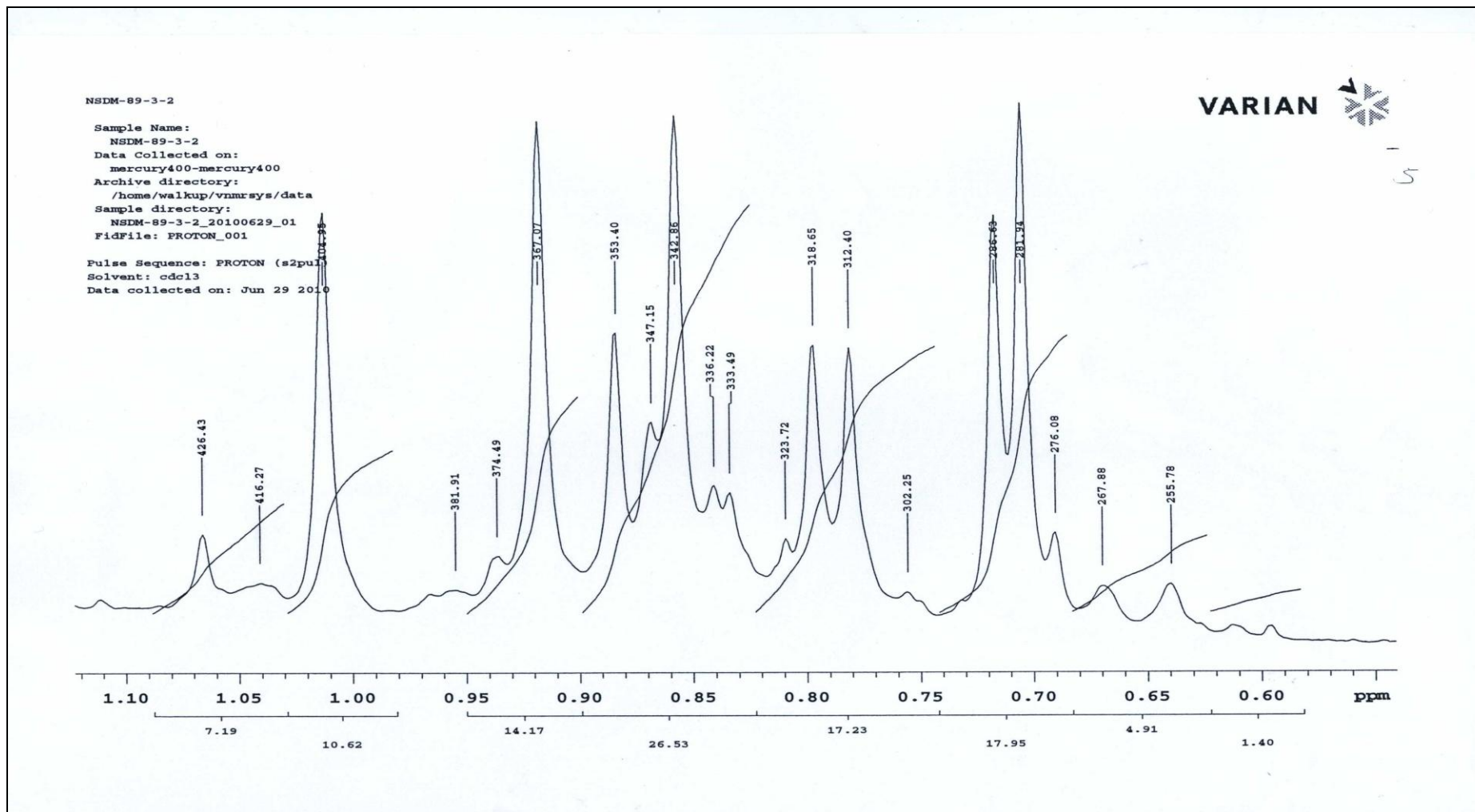
EK A.4: Olenolik asit bileşığının ^{13}C -NMR (APT) spektrumu



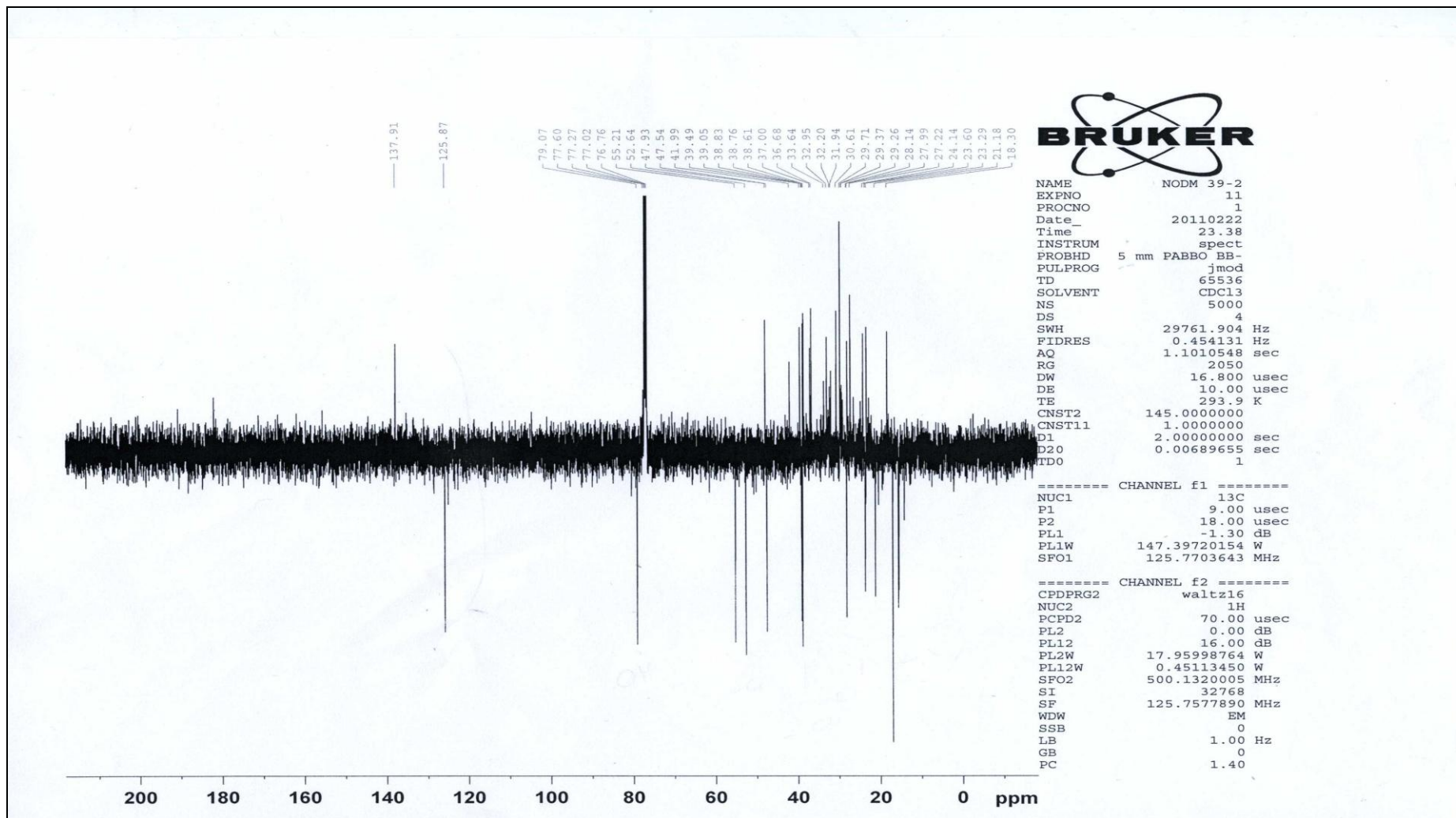
EK B.1: Ursolik asit bileşığının ^1H NMR spektrumu



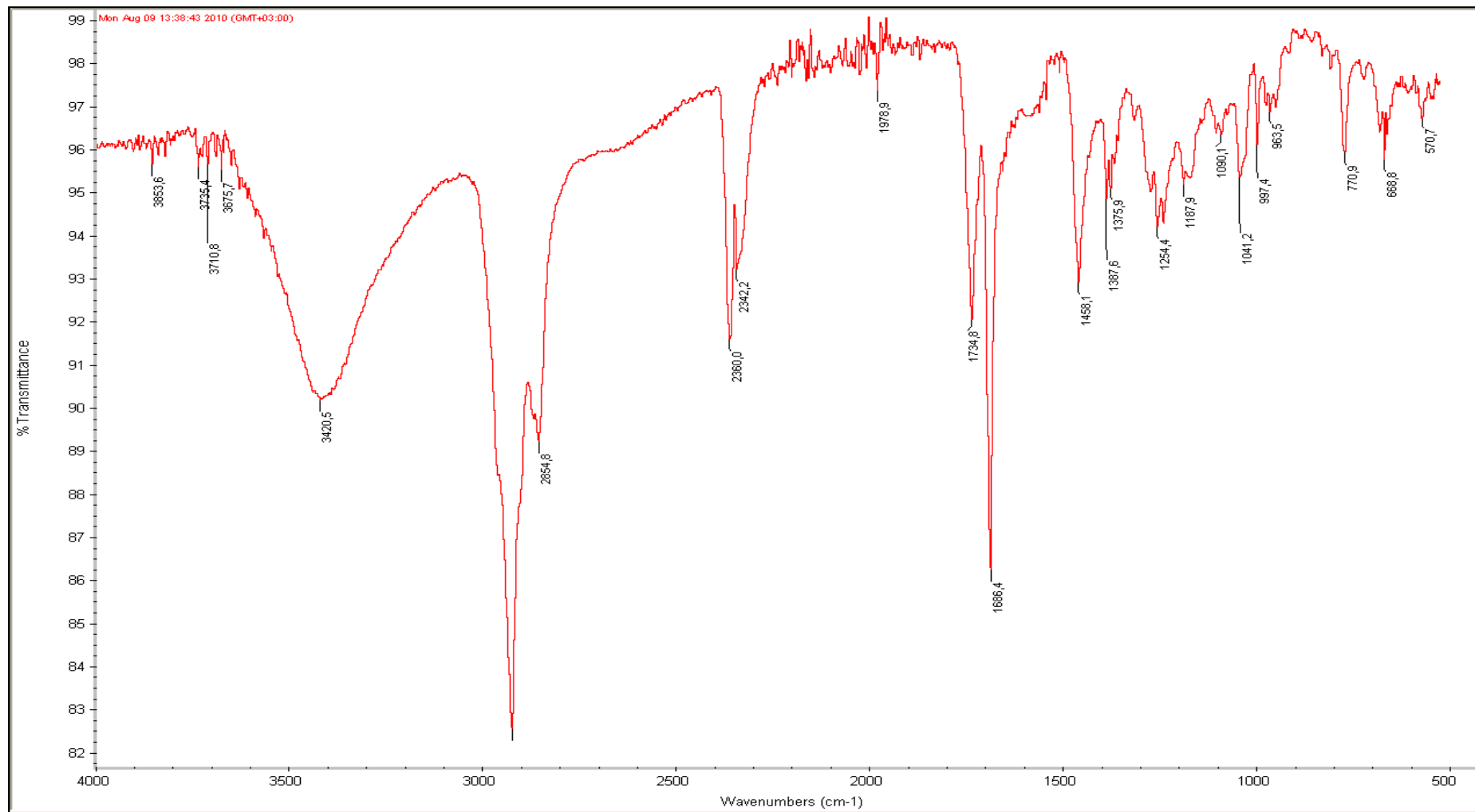
EK B.2: Ursolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (0.6-1.10 ppm aralığı)



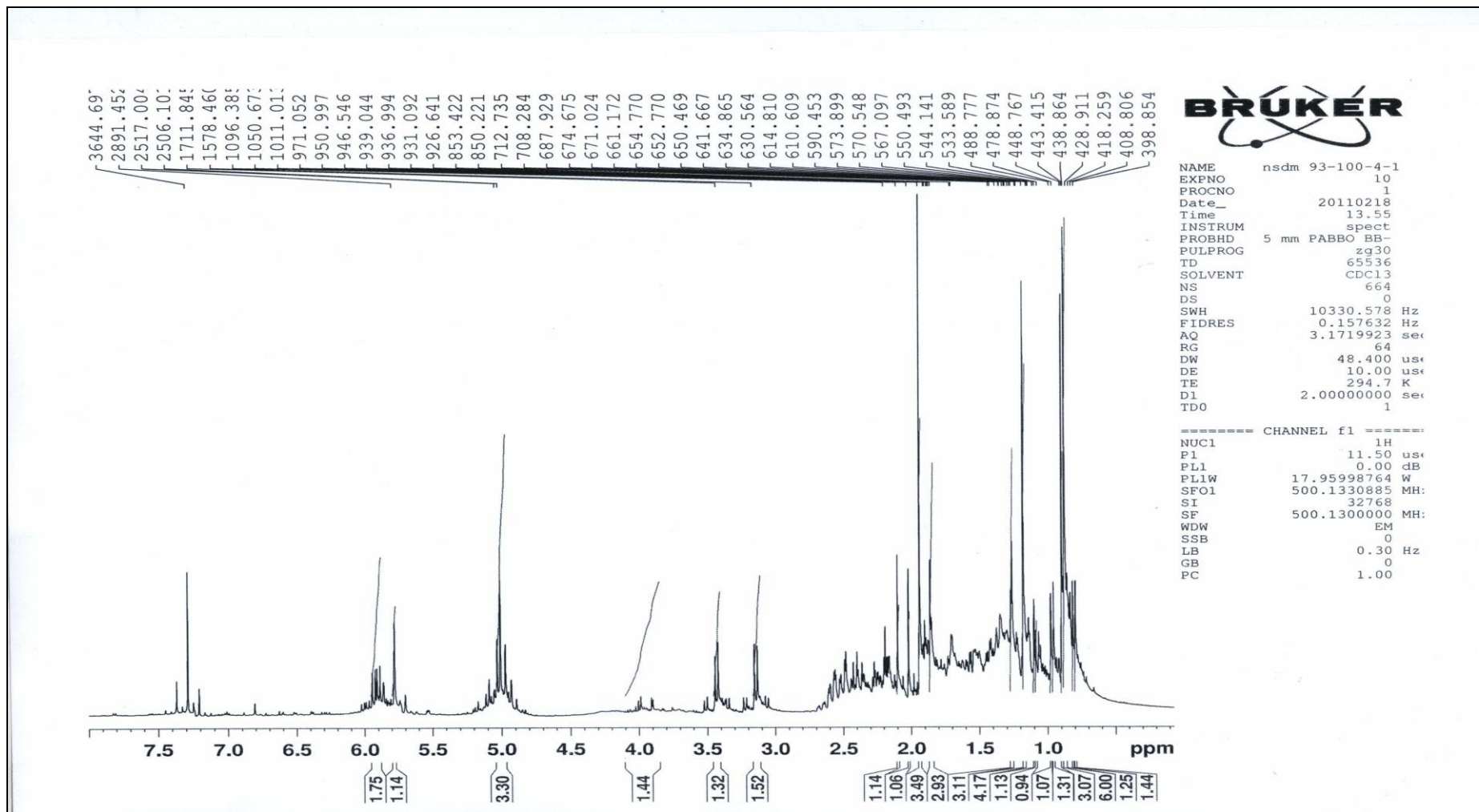
EK B.3: Ursolik asit bileşiminin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu



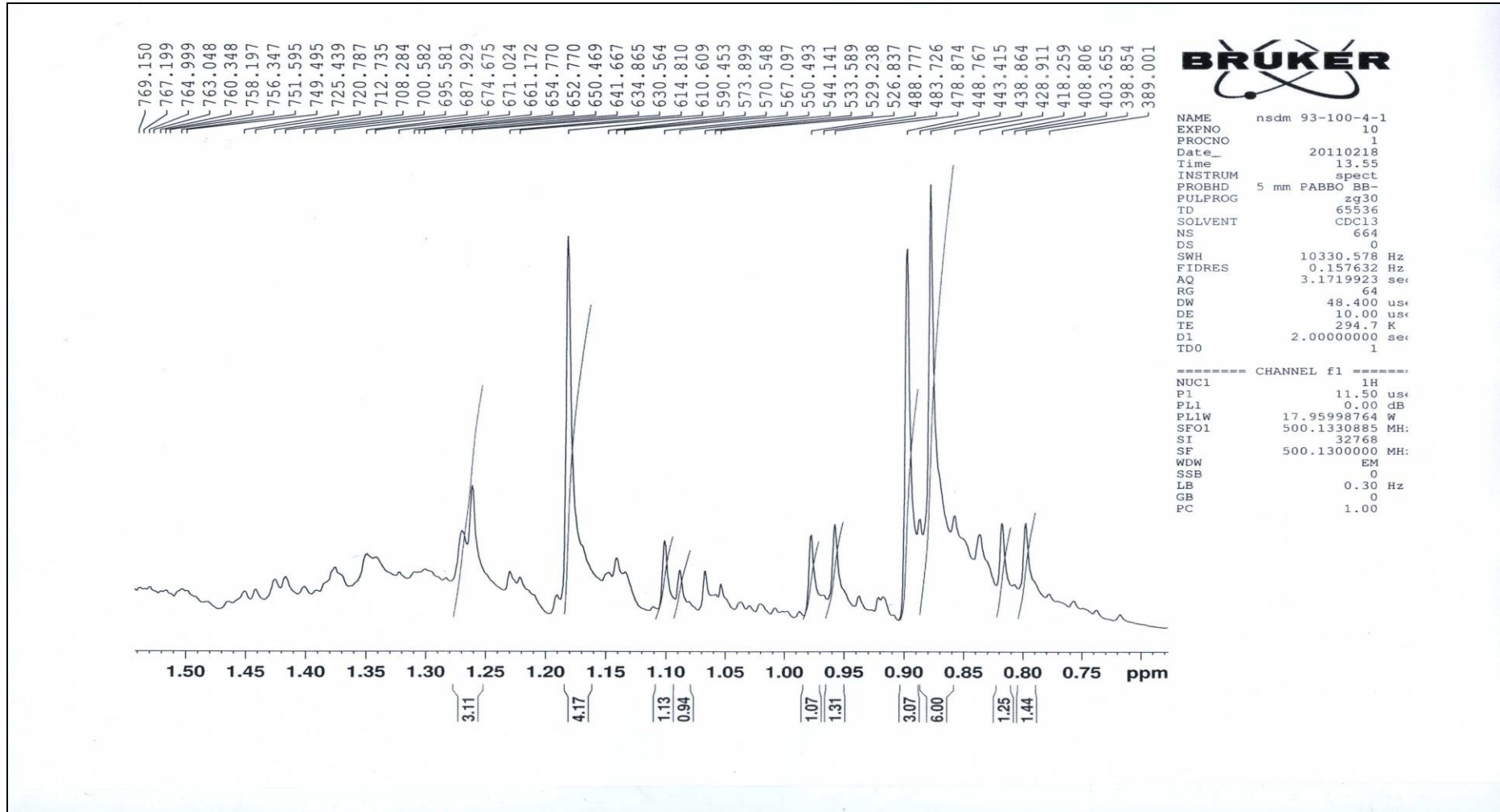
EK B.4: Ursolik asit bileşiminin IR spektrumu



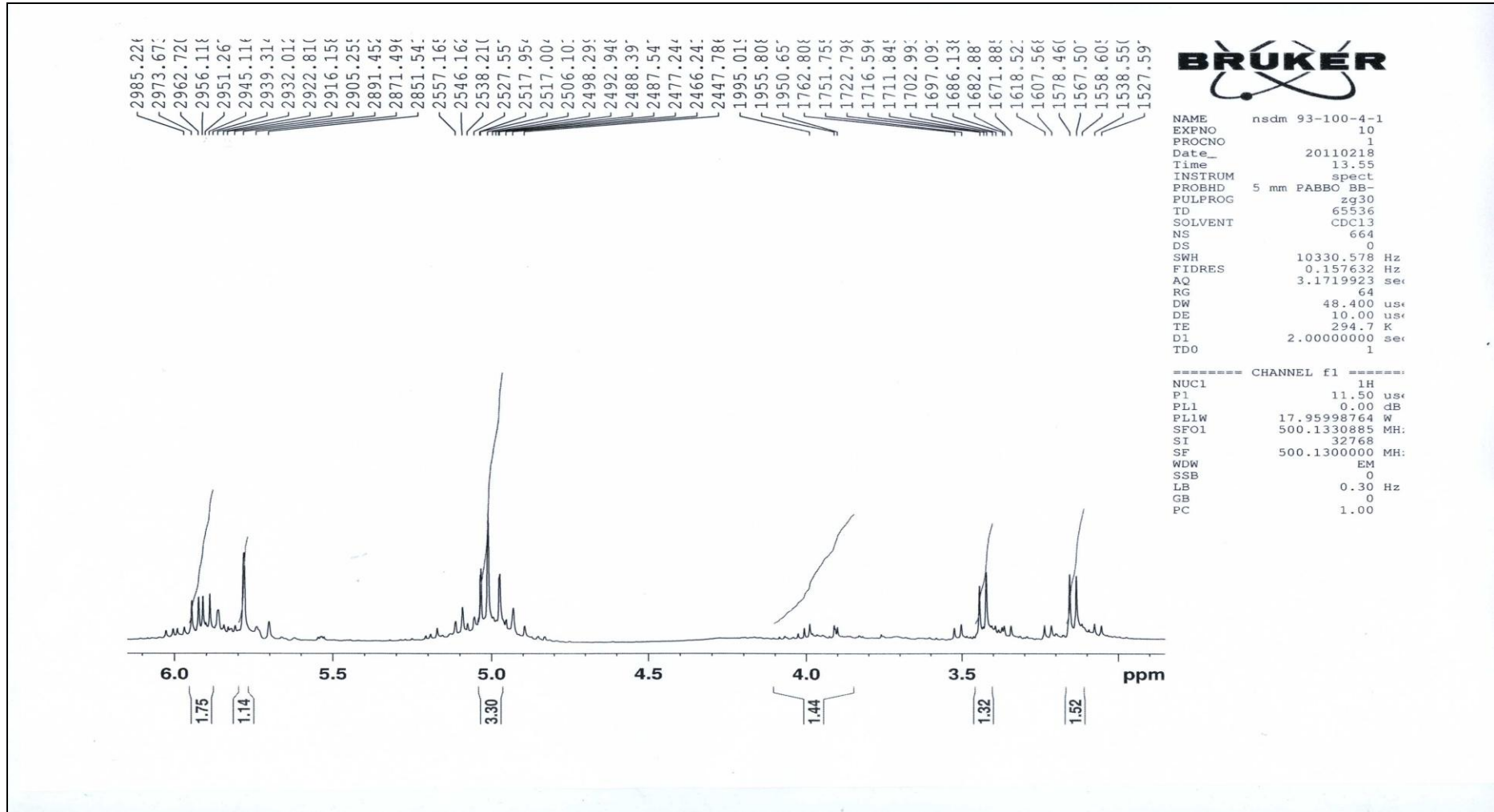
EK C.1: Sorgeraolone'nün ^1H NMR spektrumu



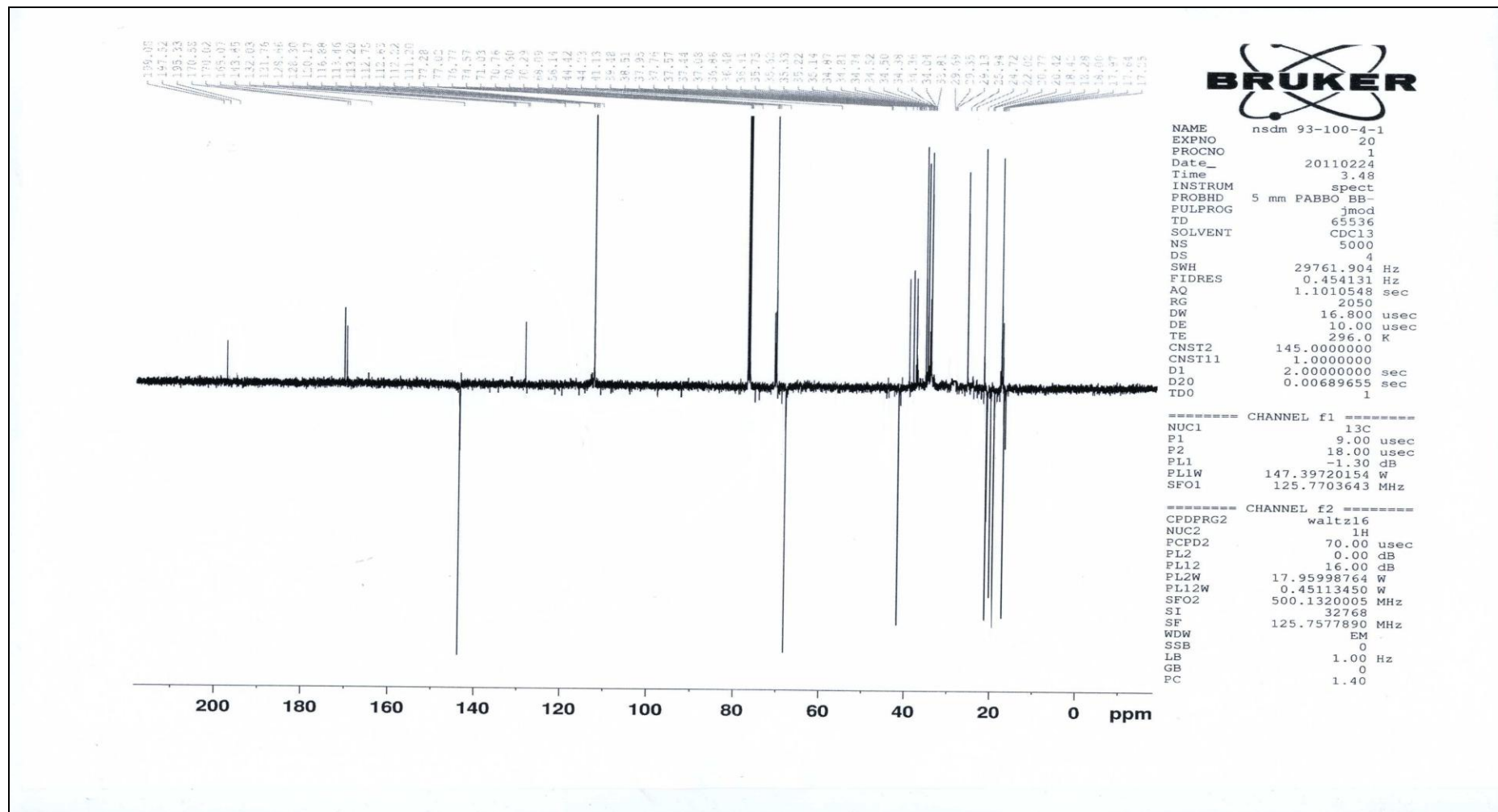
EK C.2: Sorgeraolone'nün ^1H NMR spektrumu (0.75-1.5 ppm aralığı)



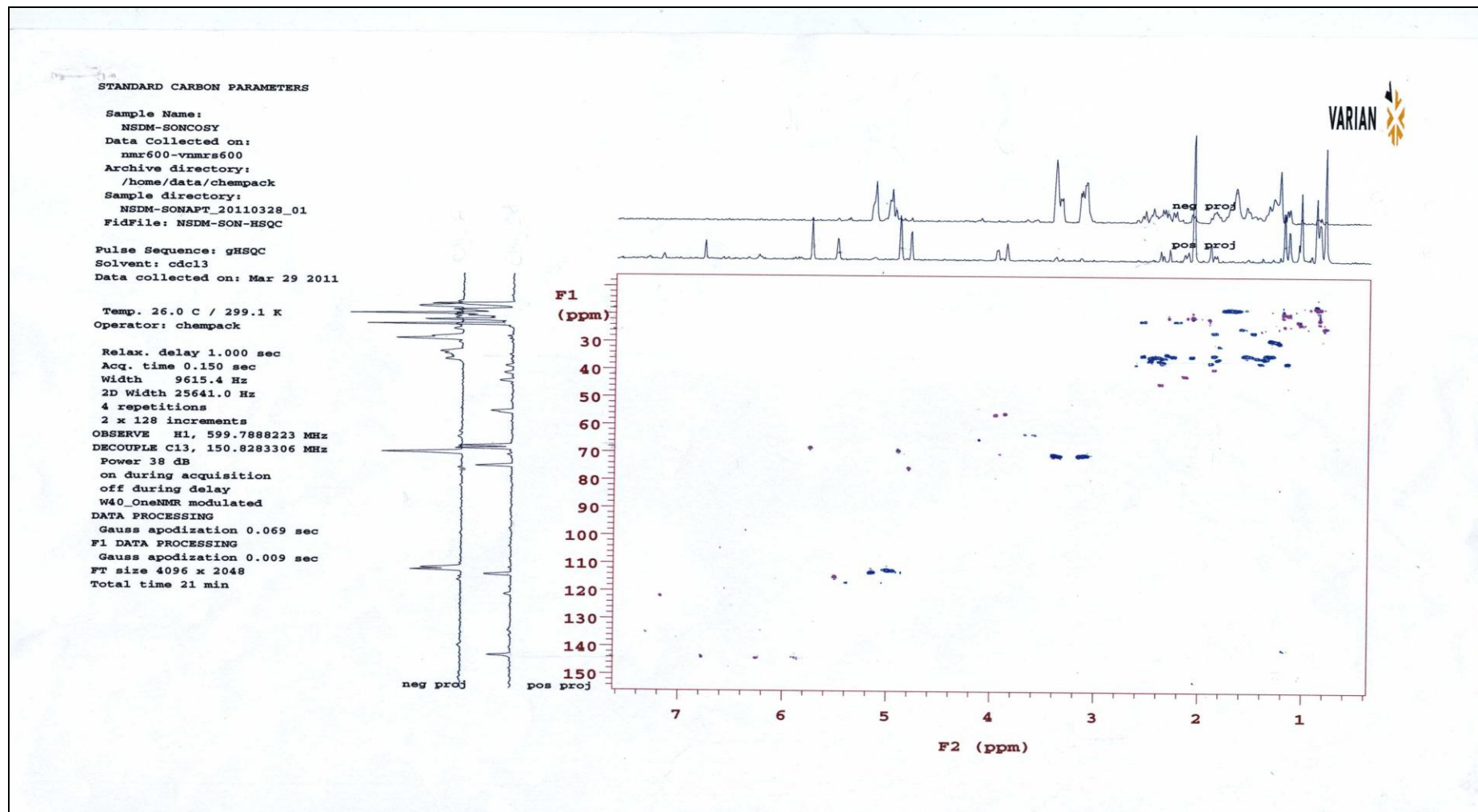
EK C.3: Sorgeraolone'nün ^1H NMR spektrumu (3.0-6.0 ppm aralığı)



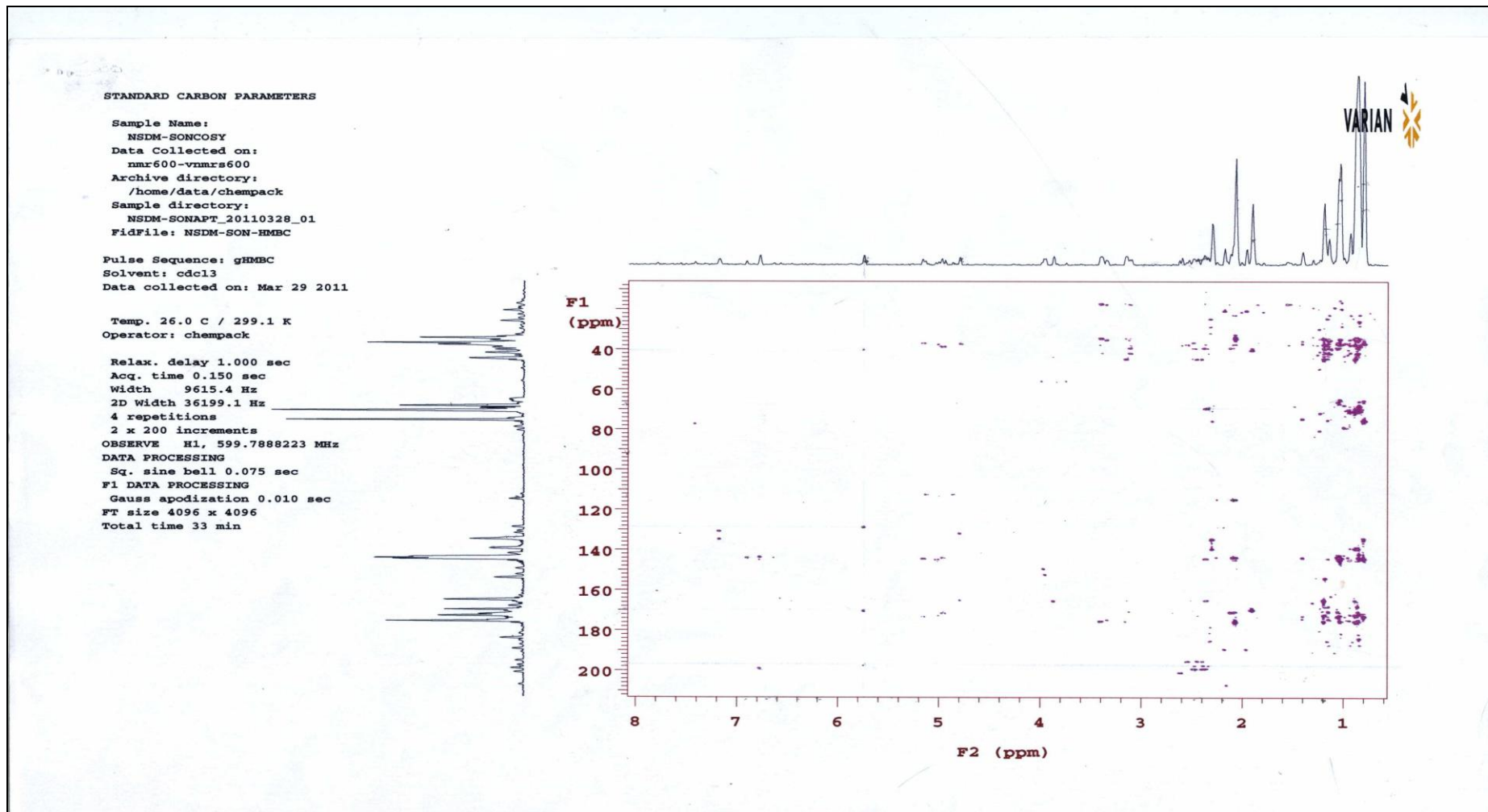
EK C.4: Sorgeraolone'nün ^{13}C -NMR (APT) spektrumu



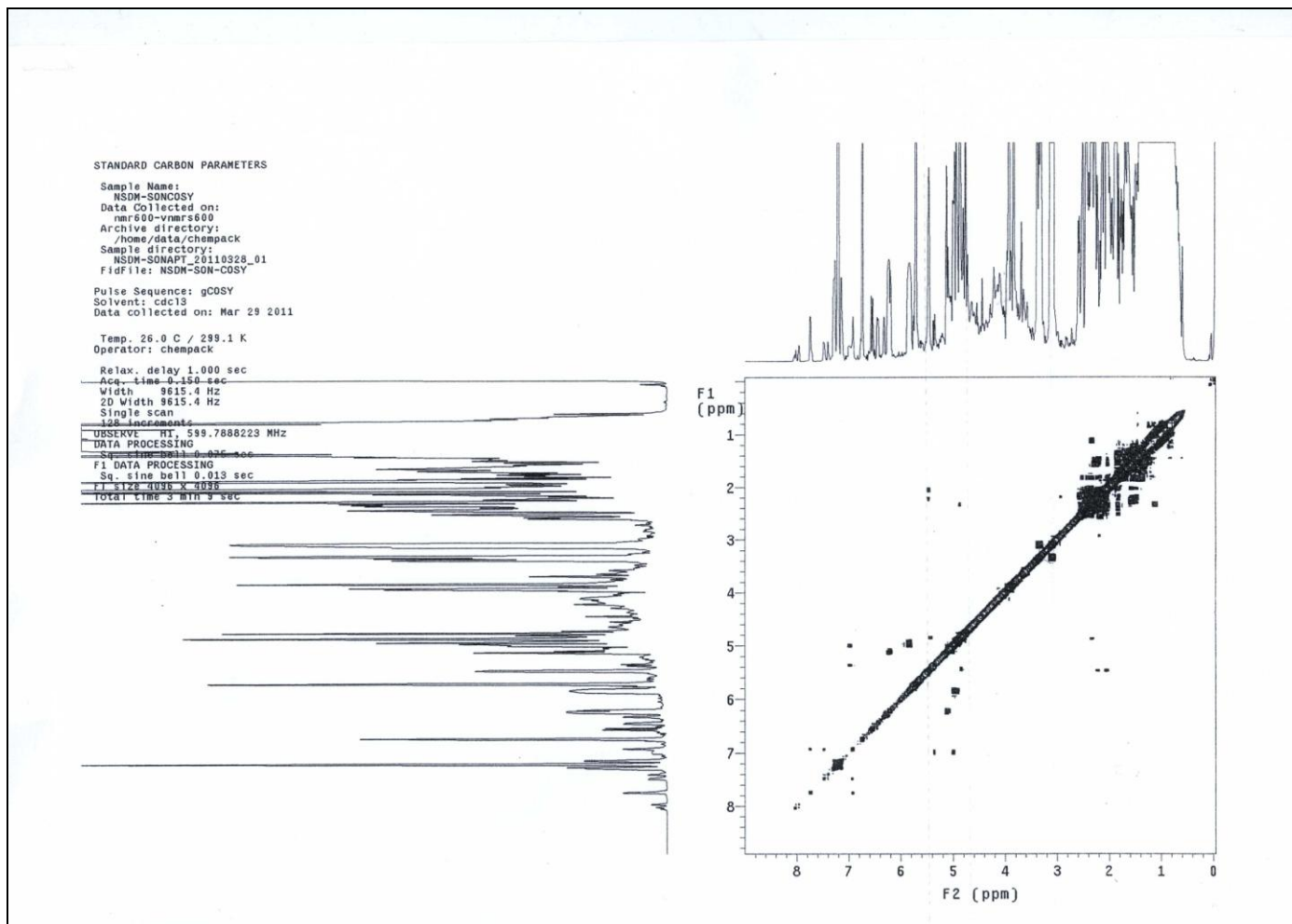
EK C.5: Sorgeraolone'nün HSQC spektrumu



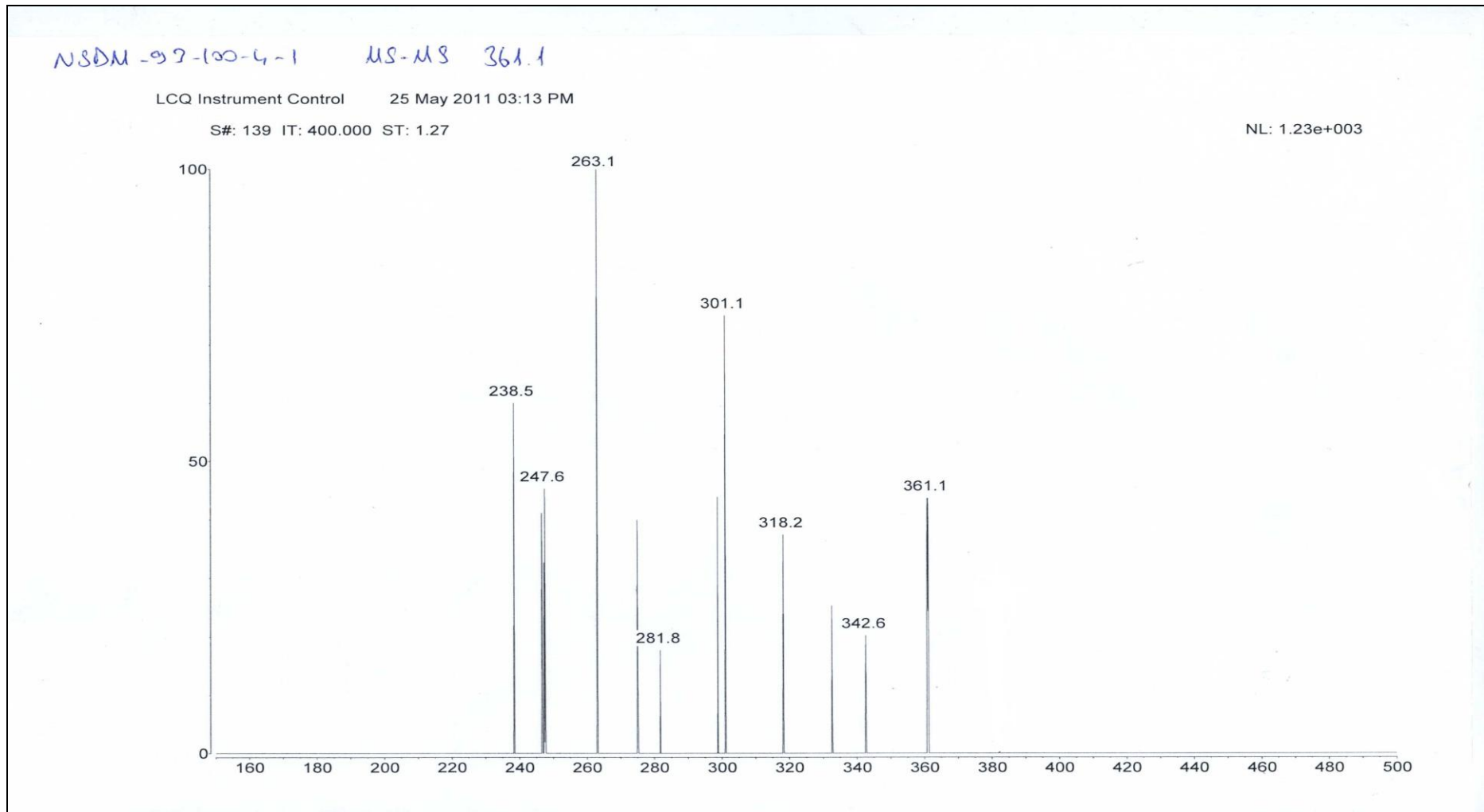
EK C.6: Sorgeraolone'nün HMBC spektrumu



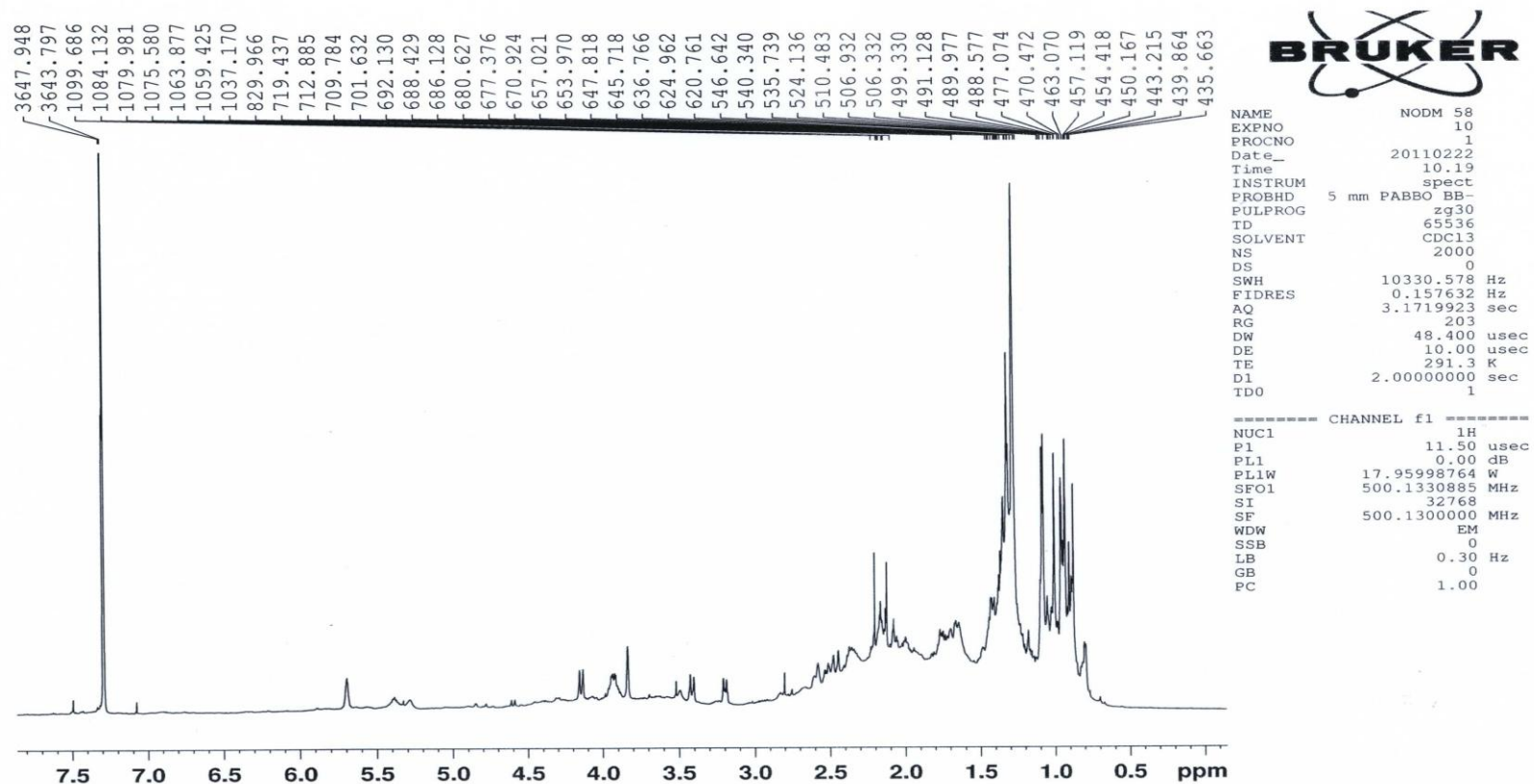
EK C.7: Sorgeraolone'nün COSY spektrumu



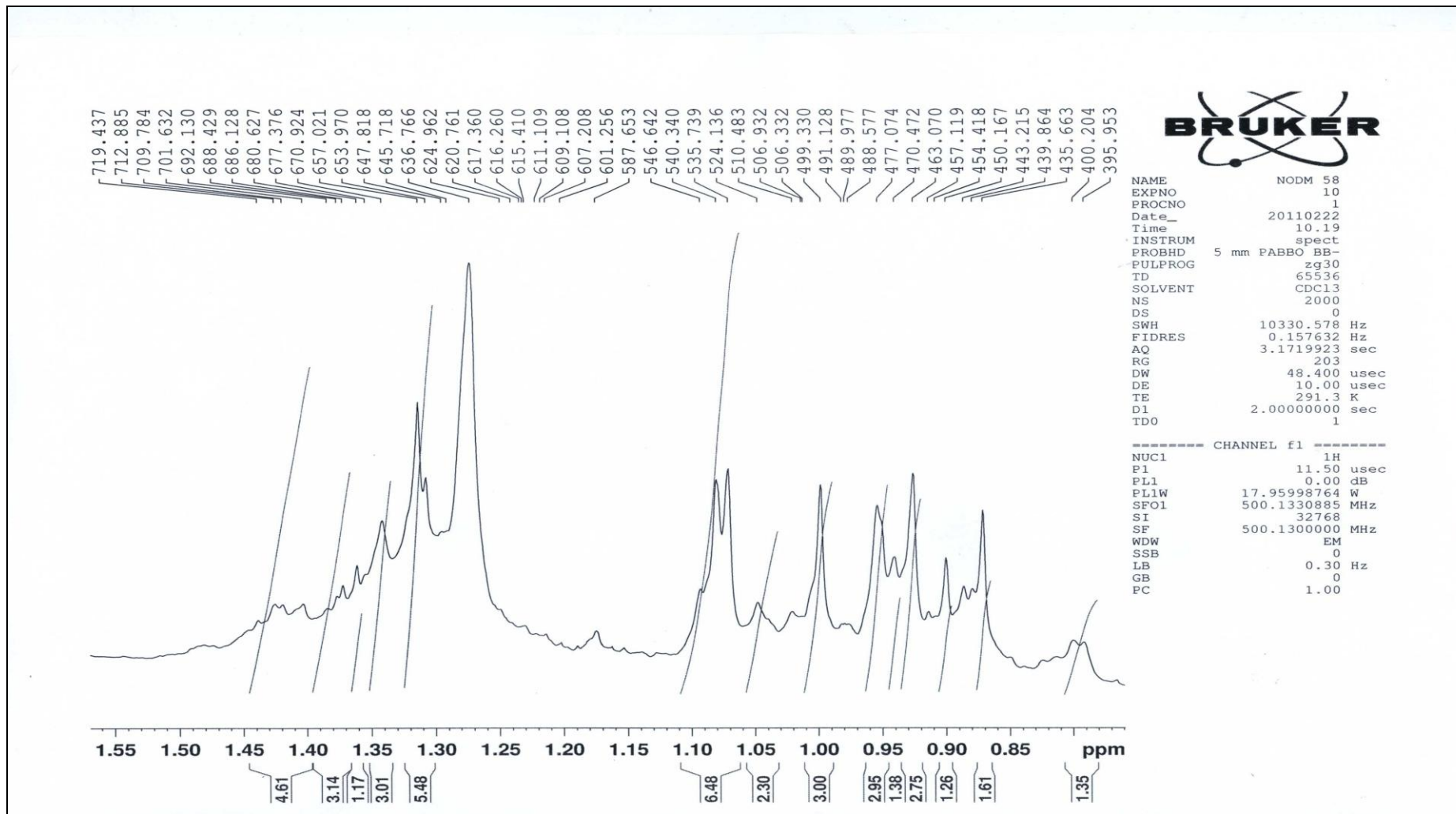
EK C.8: Sorgeraolone' nün MASS spektrumu



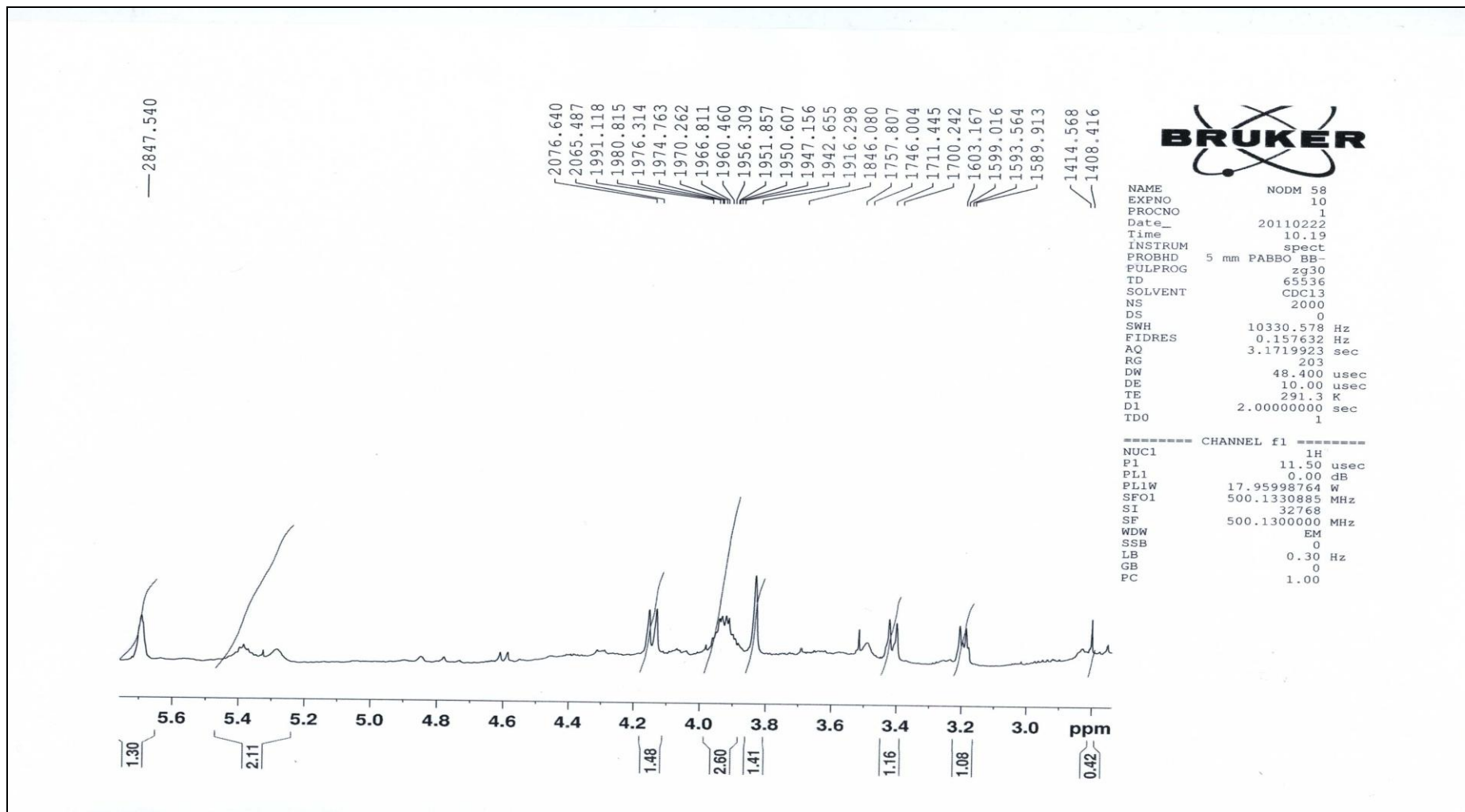
EK D.1: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşığının ¹H NMR spektrumu



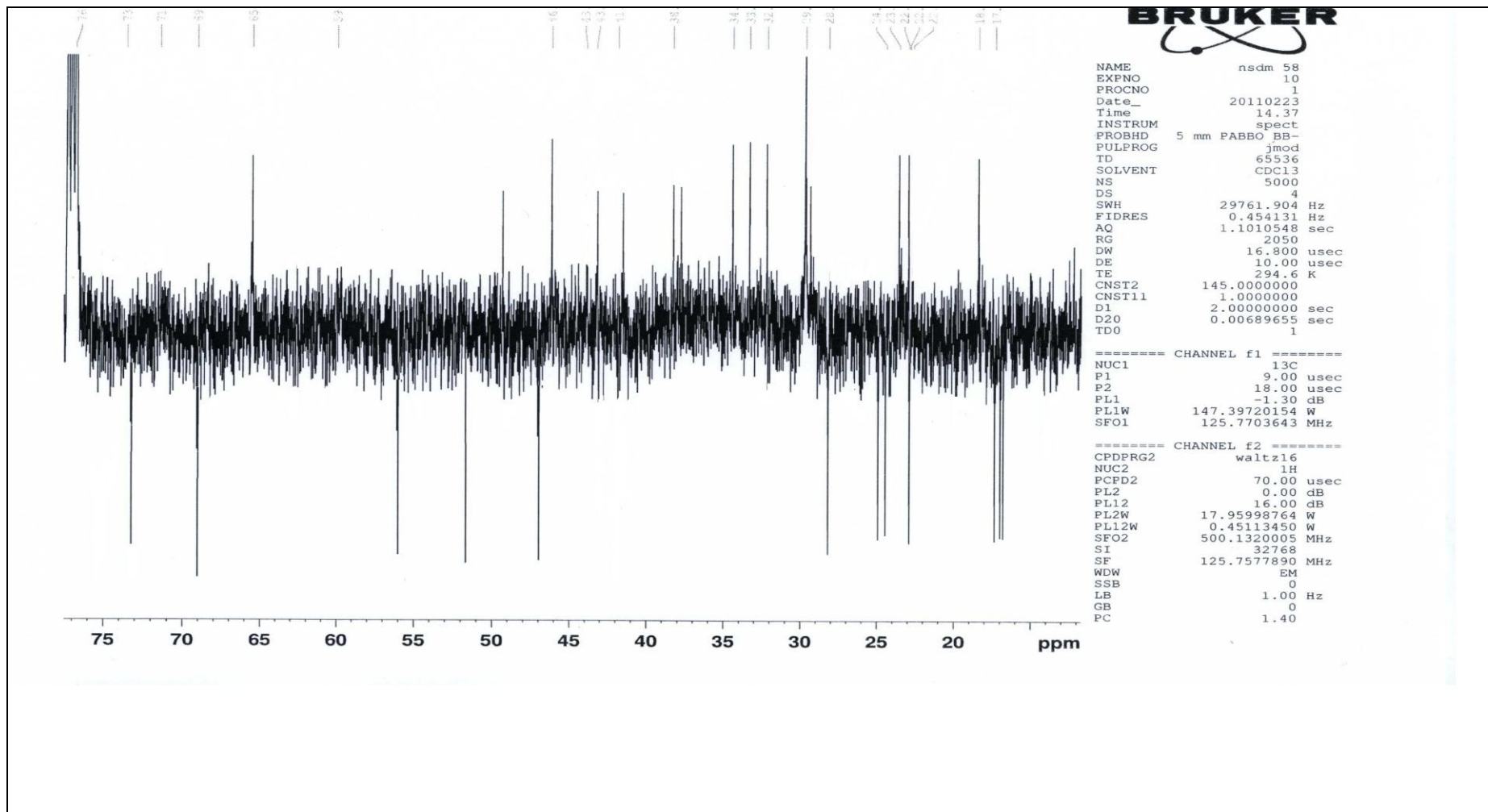
EK D.2: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşığının ^1H NMR spektrumu (0.8-1.55 ppm aralığı)



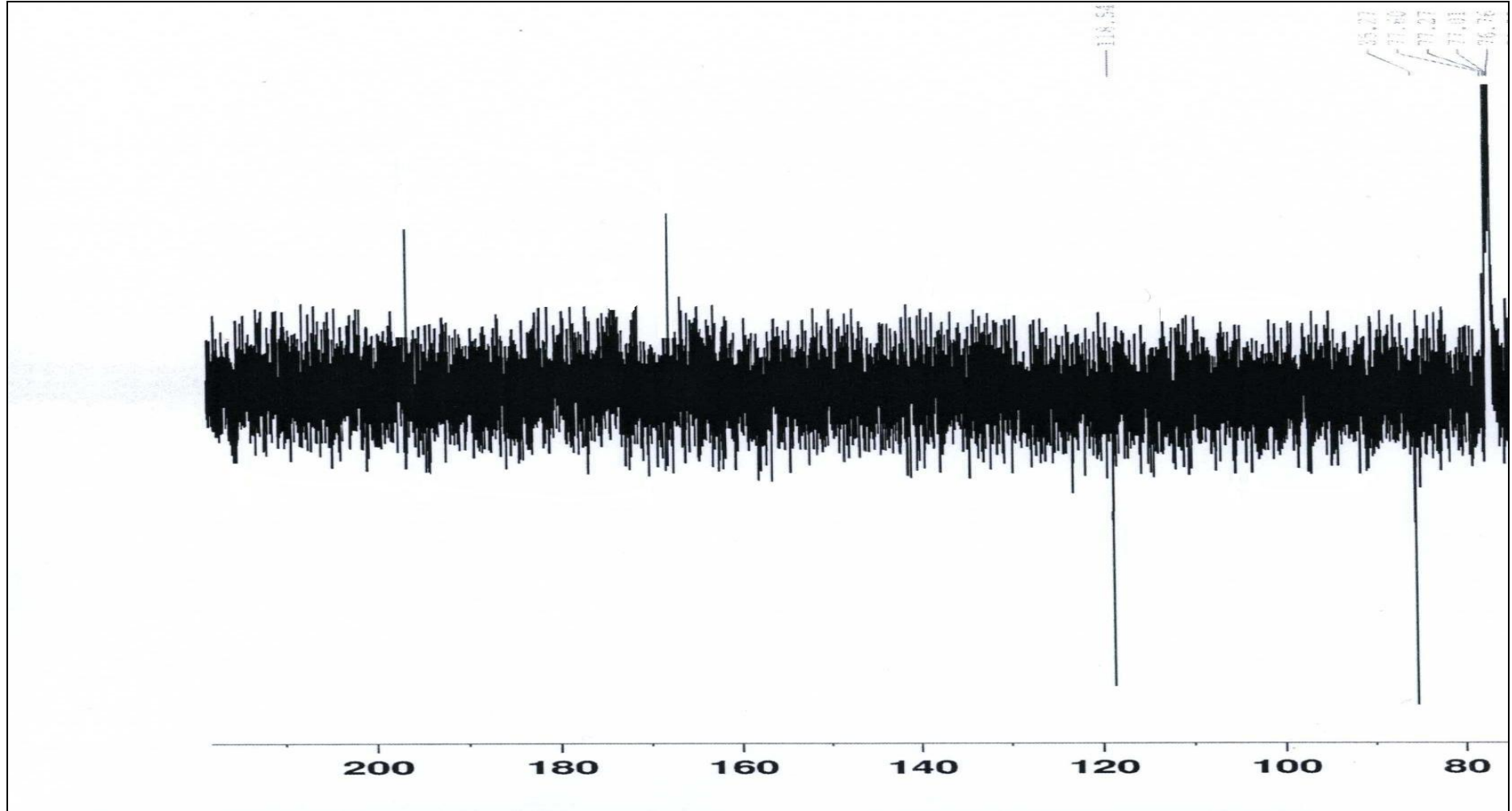
EK D.3: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşığının ¹H NMR spektrumu (2.8-5.7 ppm aralığı)



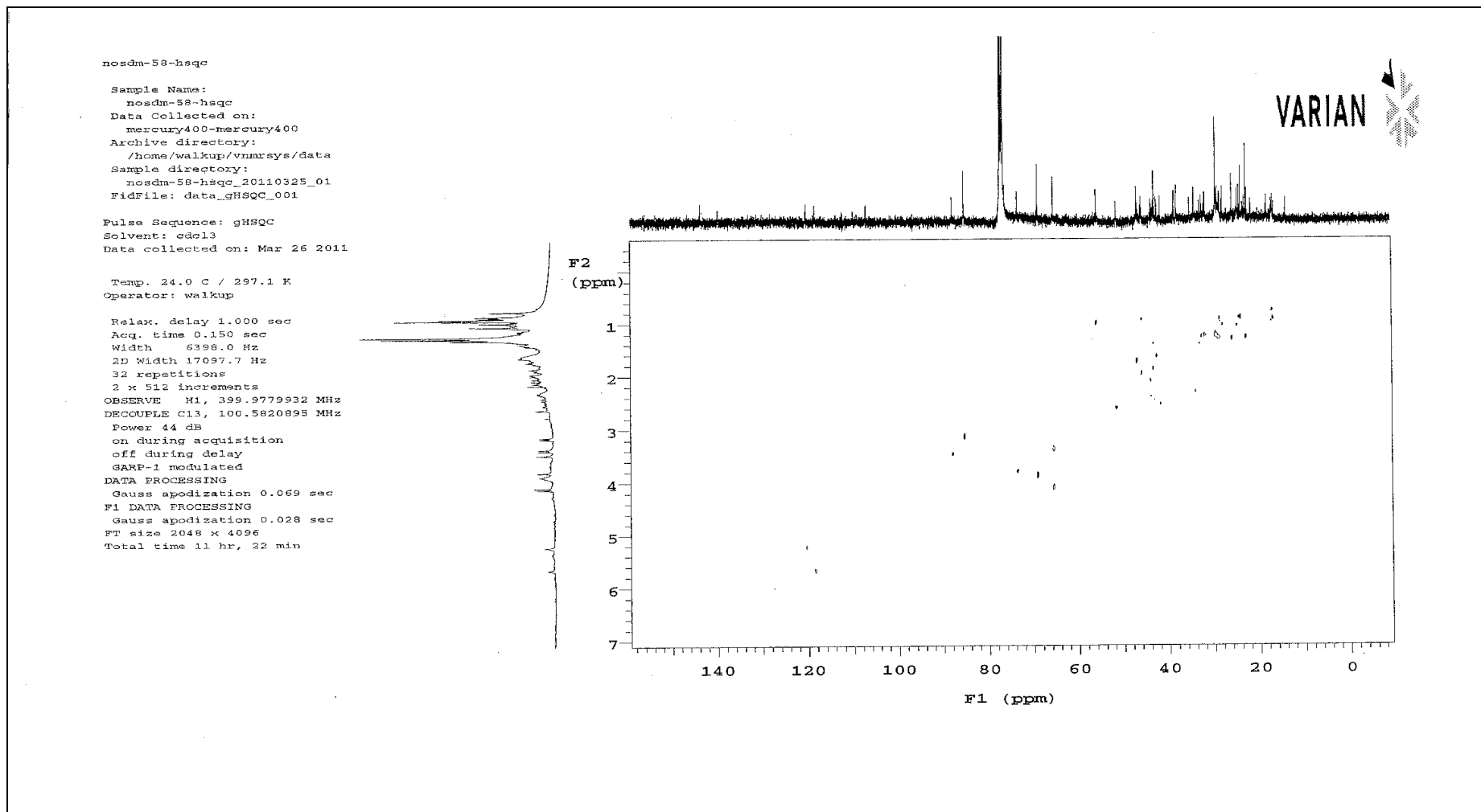
EK D.4: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin ¹³C- NMR (APT) spektrumu (15-75 ppm aralığı)



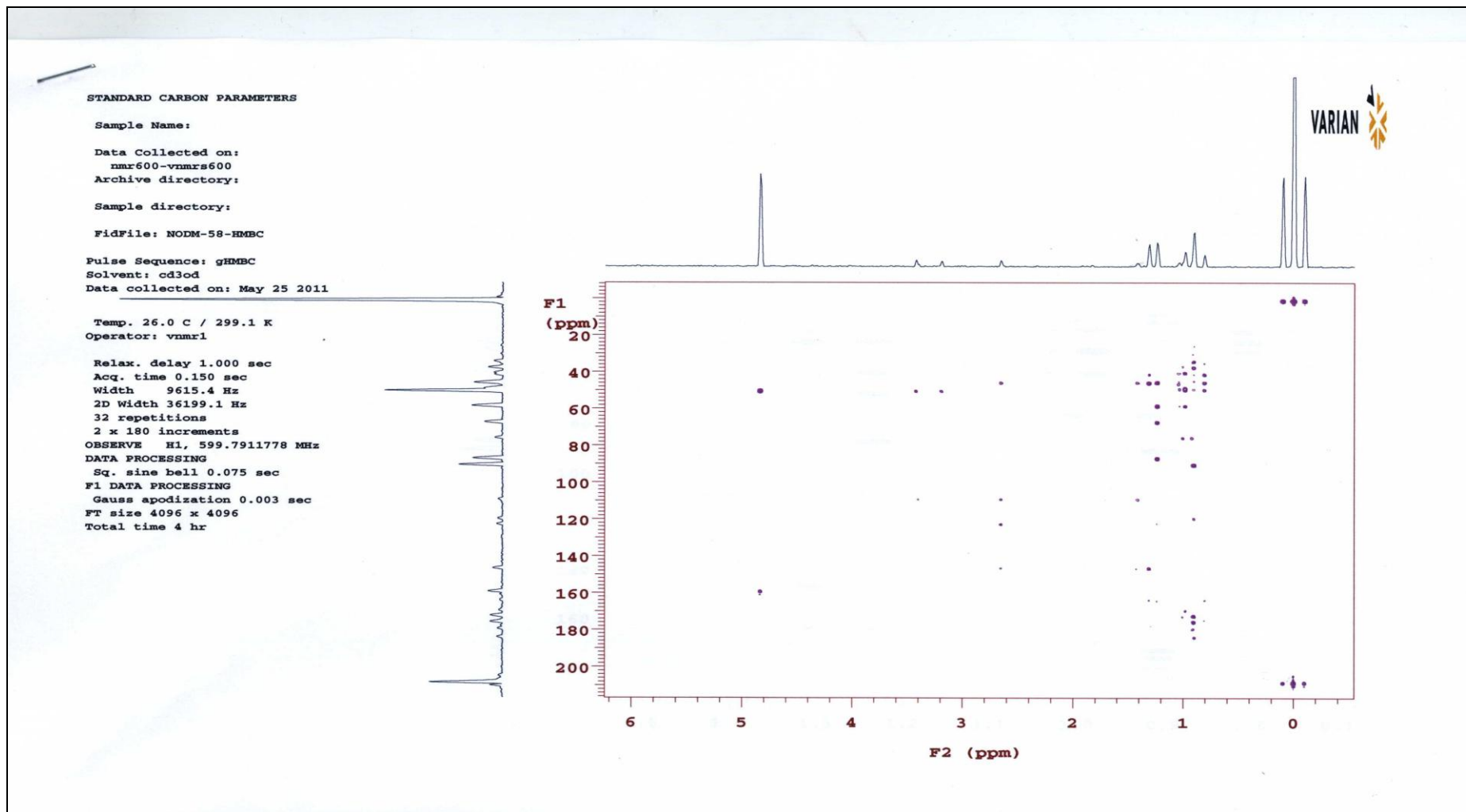
EK D.5: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşığının ^{13}C - NMR (APT) spektrumu (80-210 ppm aralığı)



EK D.6: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin HSQC spektrumu



EK D.7: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşiğinin HMBC spektrumu



EK D.8: 2 α ,3 β ,19 α ,27-tetrahidroksi-11-oksoolean-12-en bileşığının COSY spektrumu

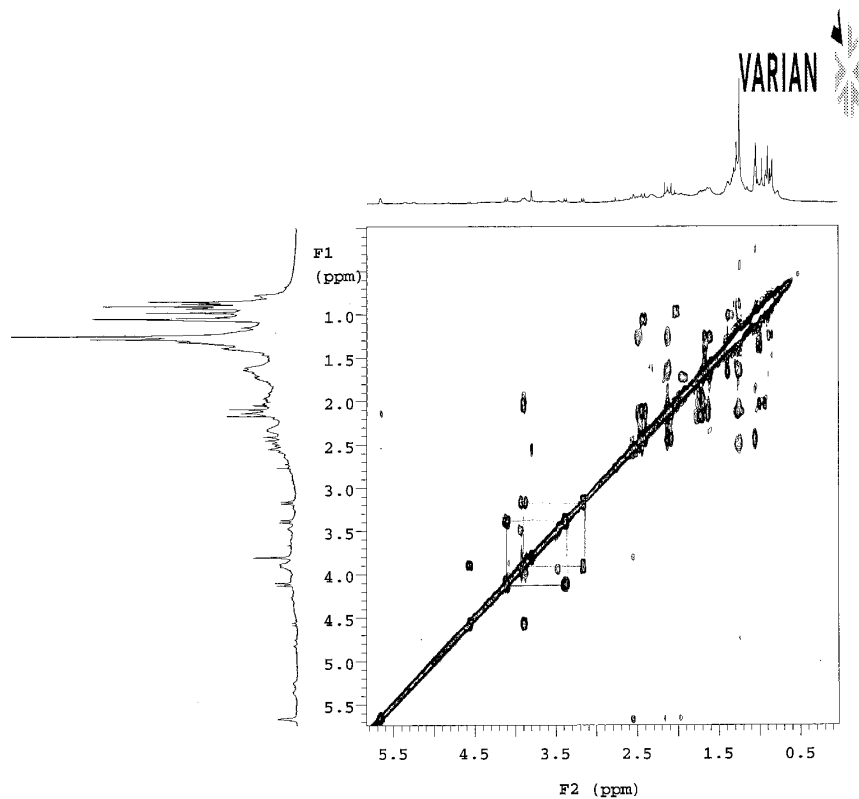
nodm-58-cosy

Sample Name:
nodm-58-cosy
Data Collected on:
mercury400-mercury400
Archive directory:
/home/walkup/vnmrsws/data
Sample directory:
nodm-58-cosy_20110315_01
Fidfile: data_gCOSY_001

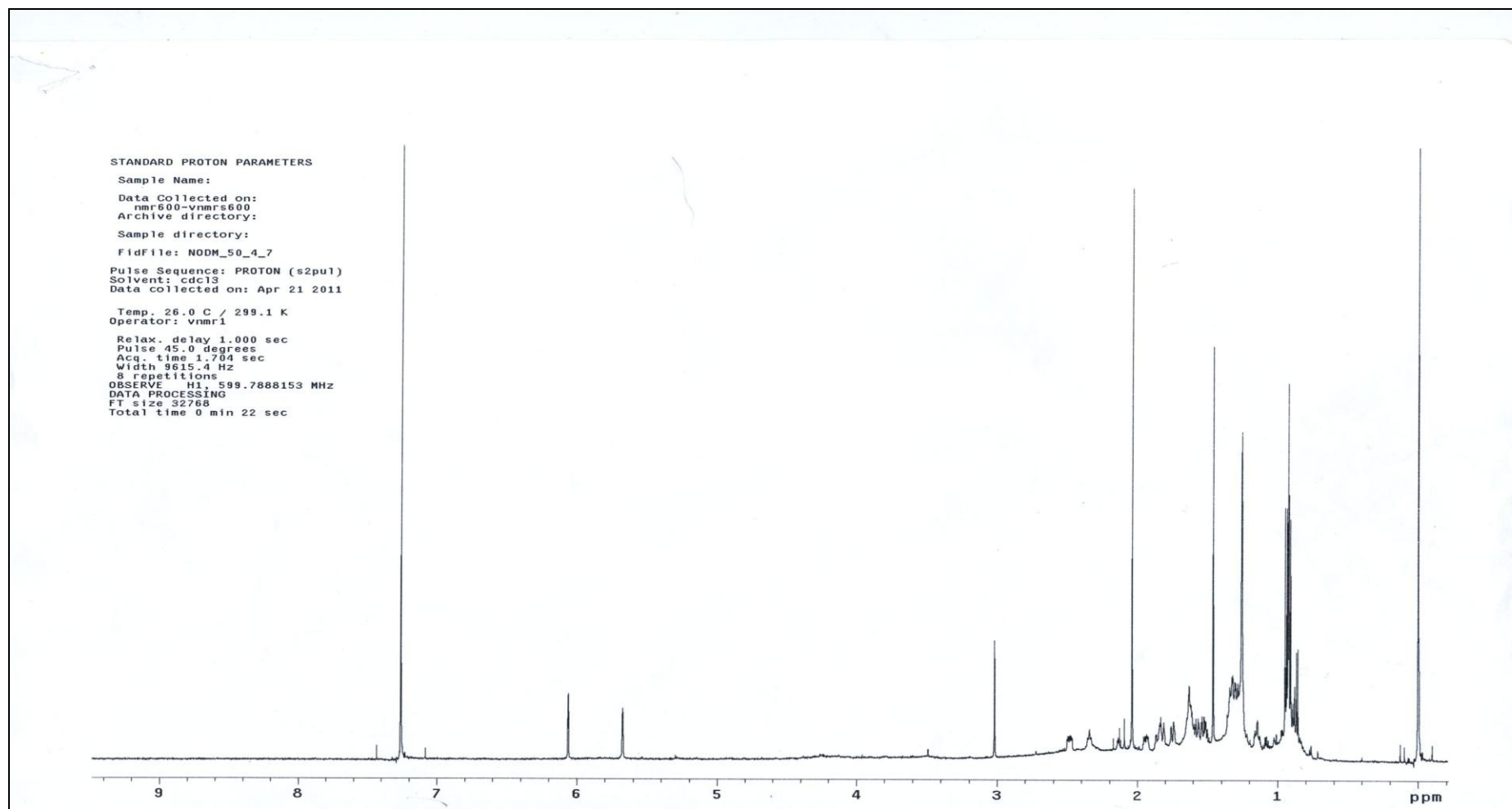
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: cdcl3
Data collected on: Mar 15 2011

Temp. 24.0 C / 297.1 K
Operator: walkup

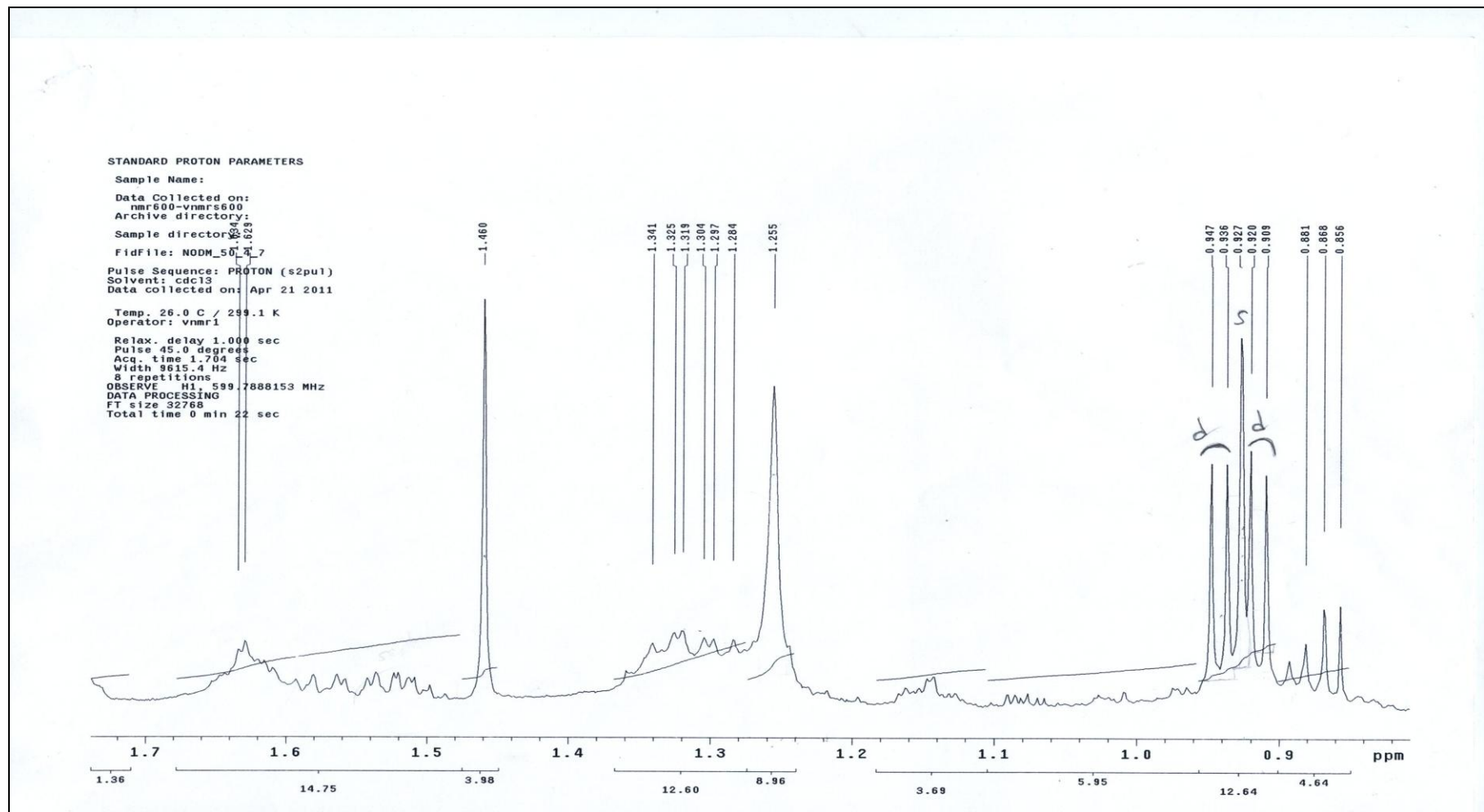
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.150 sec
Width 6398.0 Hz
2D Width 6398.0 Hz
16 repetitions
256 increments
OBSERVE H1, 399.977932 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.075 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.040 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 1 hr, 26 min



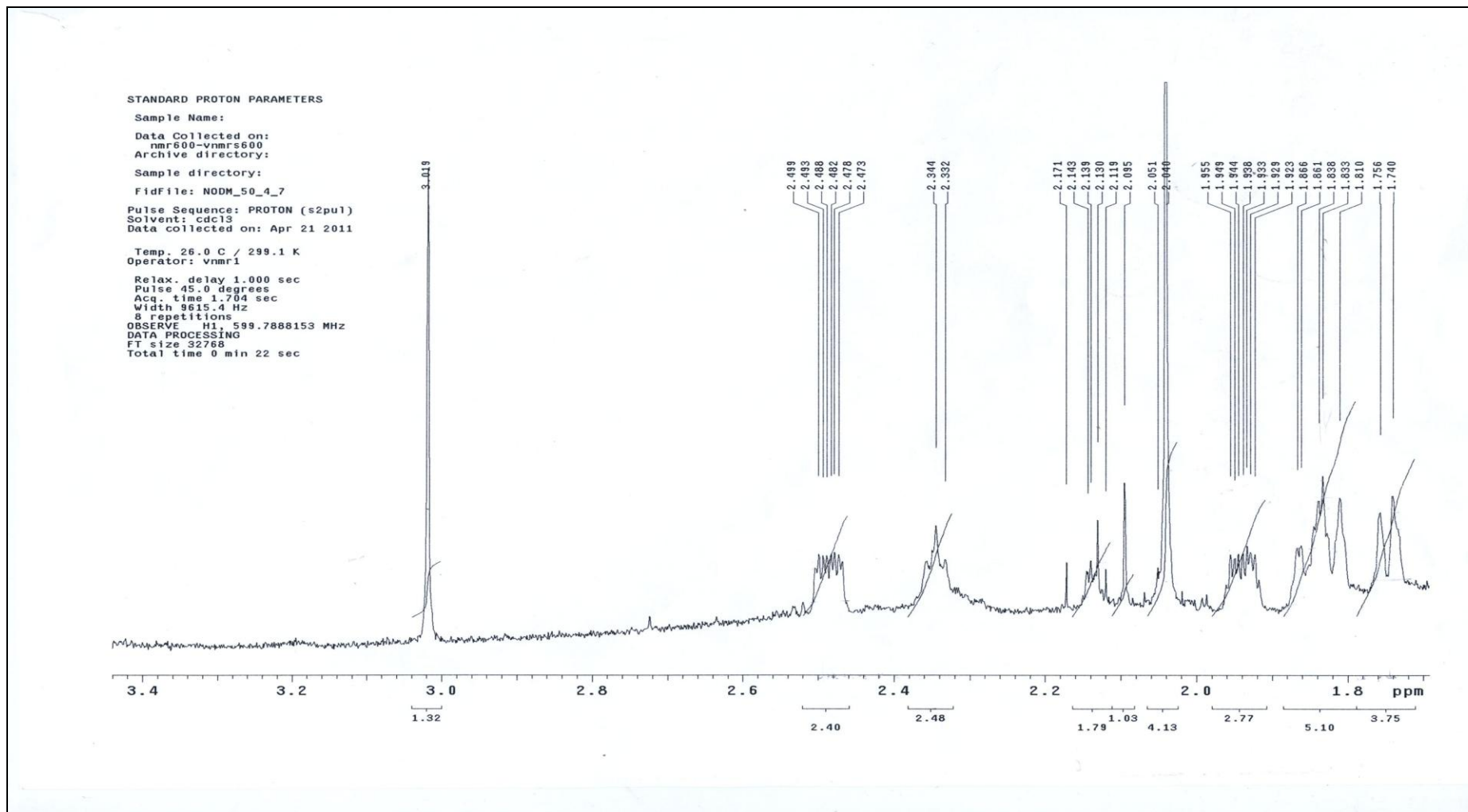
EK E.1: Obtusicrenone bileşiğinin ^1H NMR spektrumu



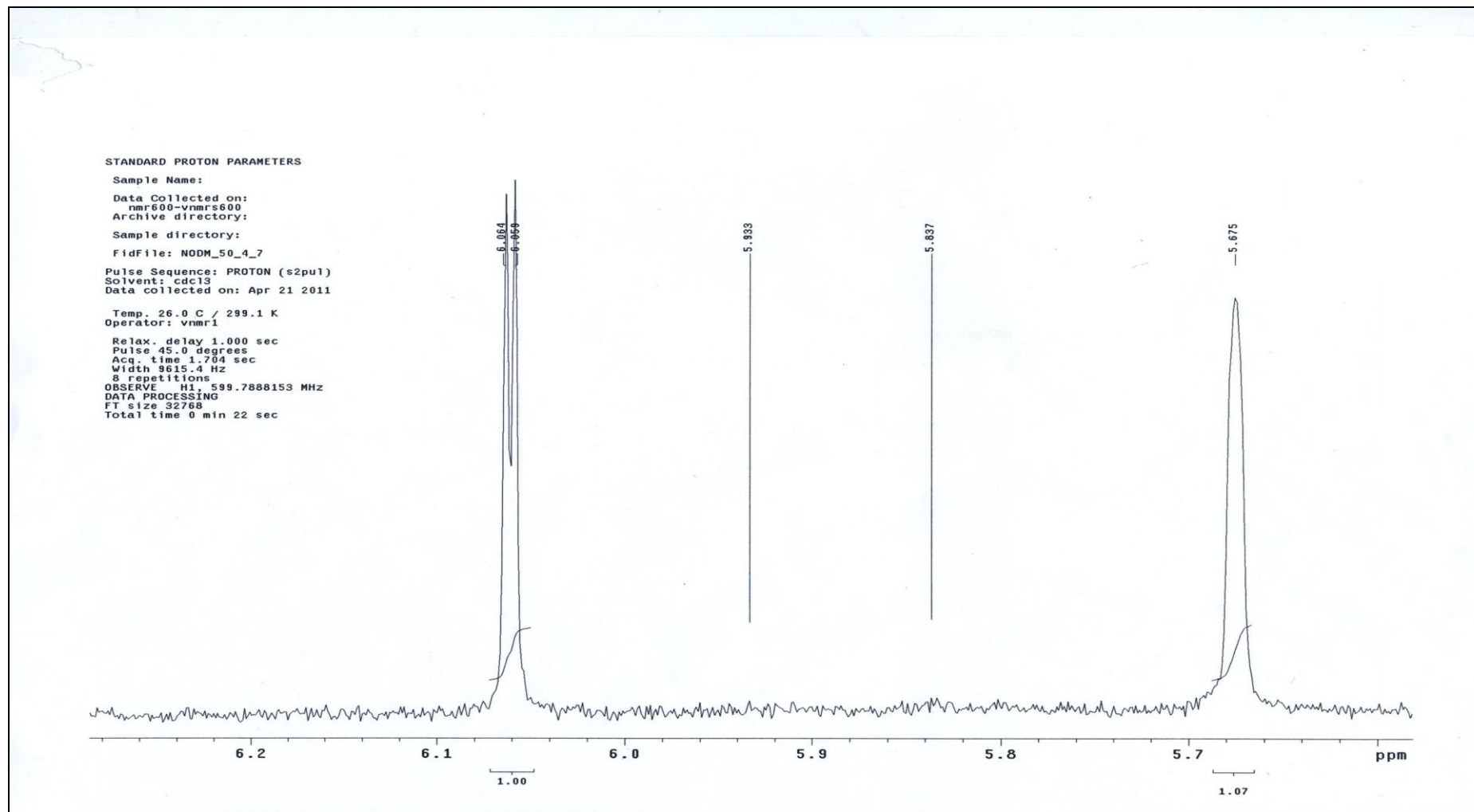
EK E.2: Obtusicrenone bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (0.9-1.7 ppm aralığı)



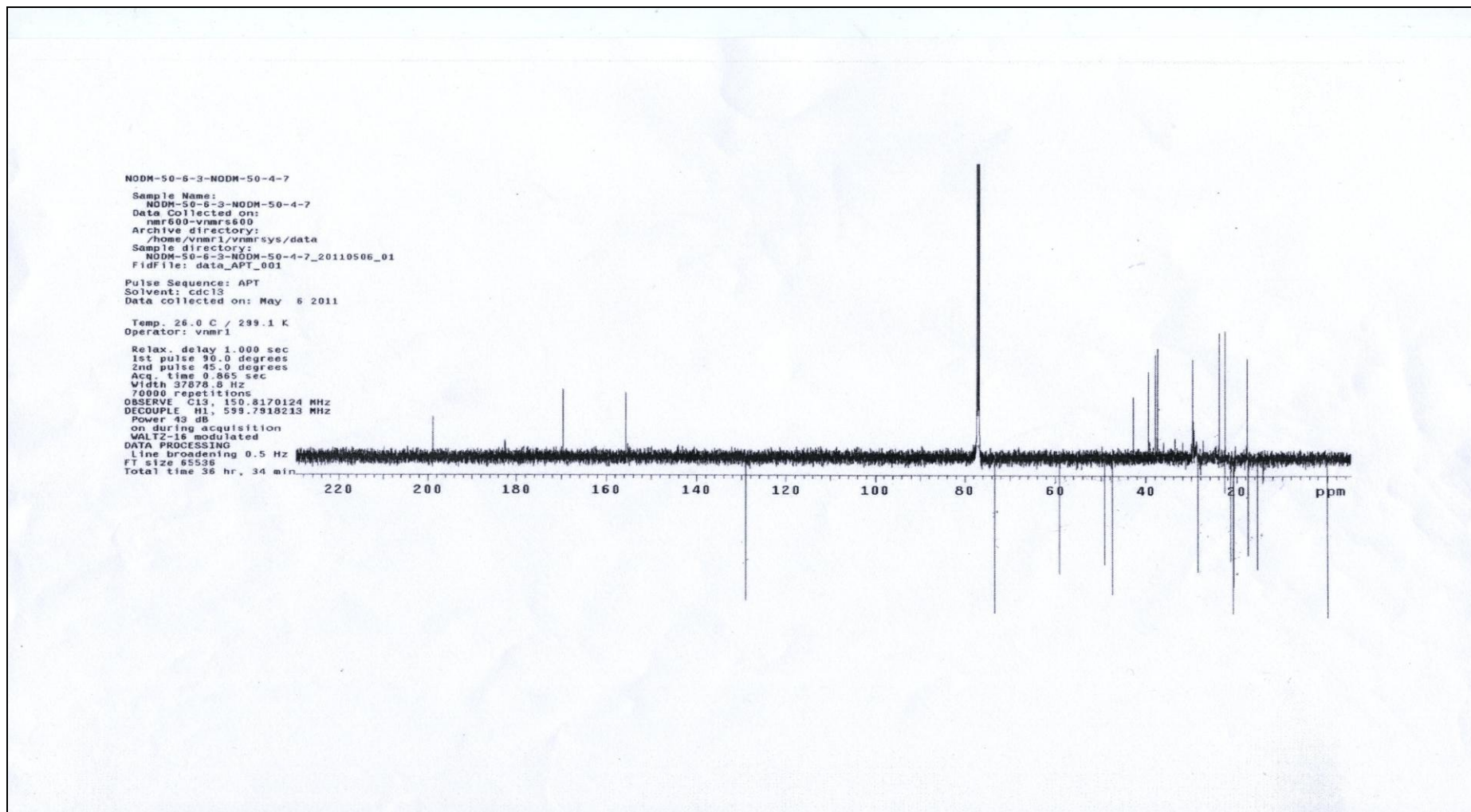
EK E.3: Obtusicrenone bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (1.8-3.4 ppm aralığı)



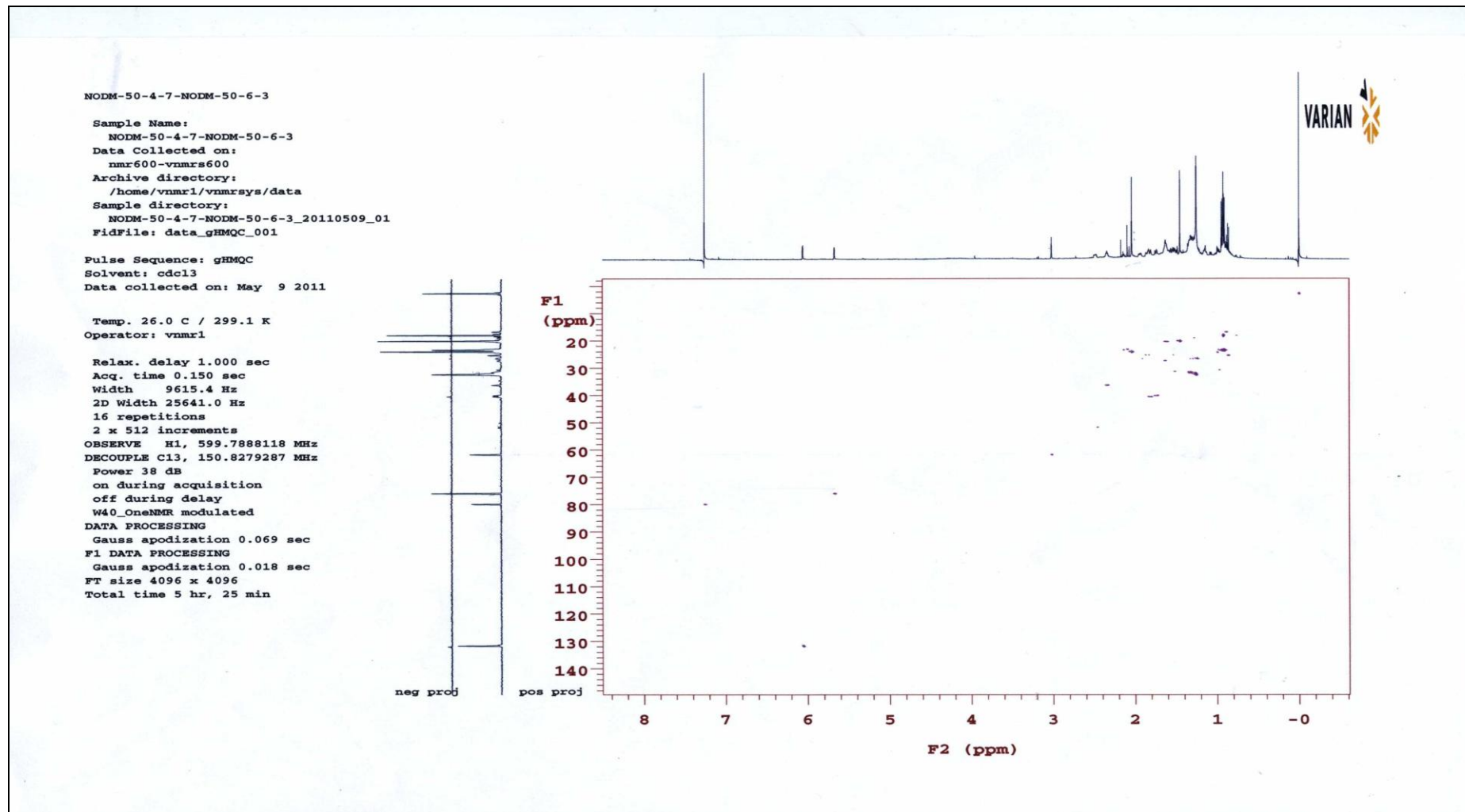
EK E.4: Obtusicrenone bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (5.6-6.3 ppm aralığı)



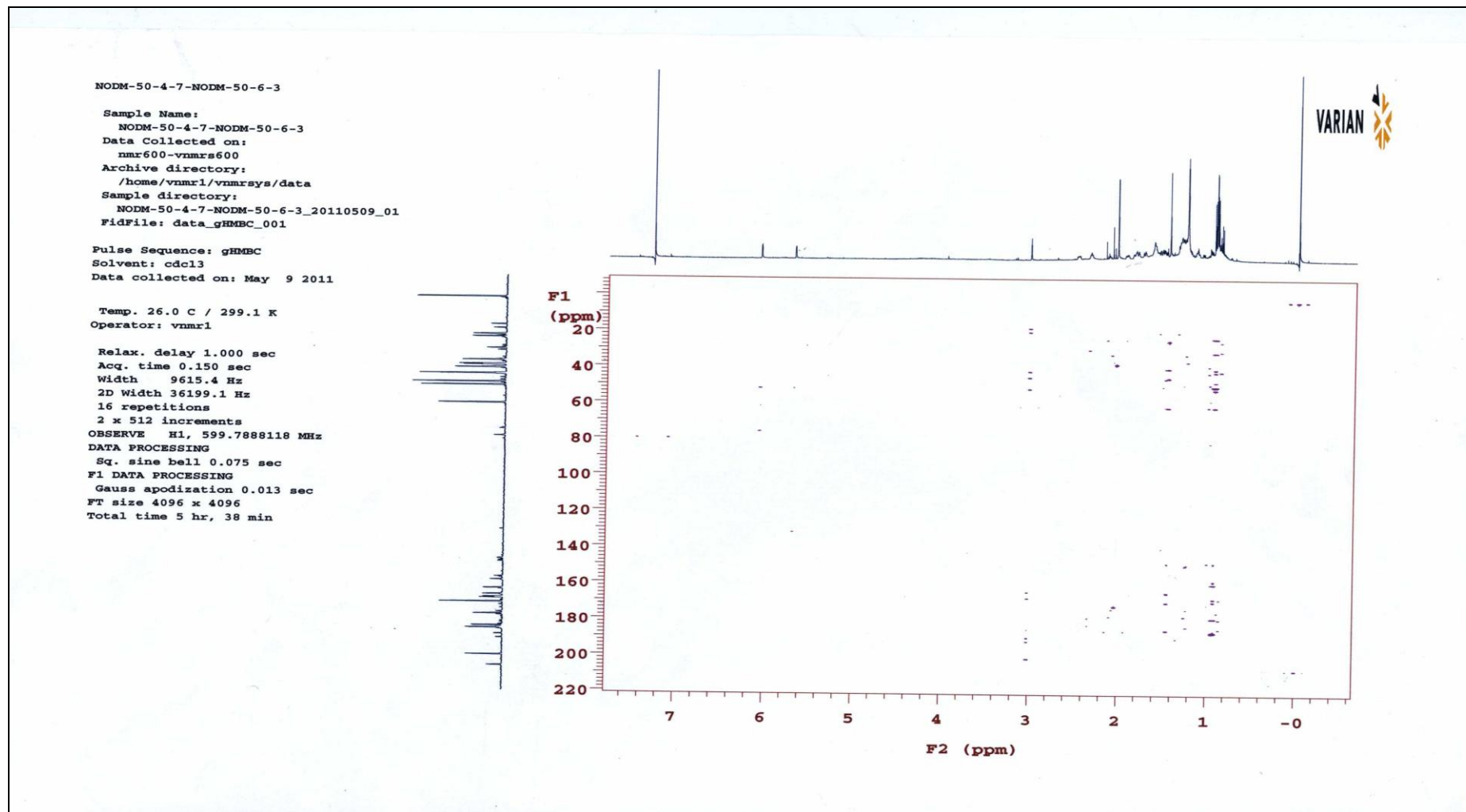
EK E.5: Obtusicrenone bileşiğinin ^{13}C - NMR (APT) spektrumu



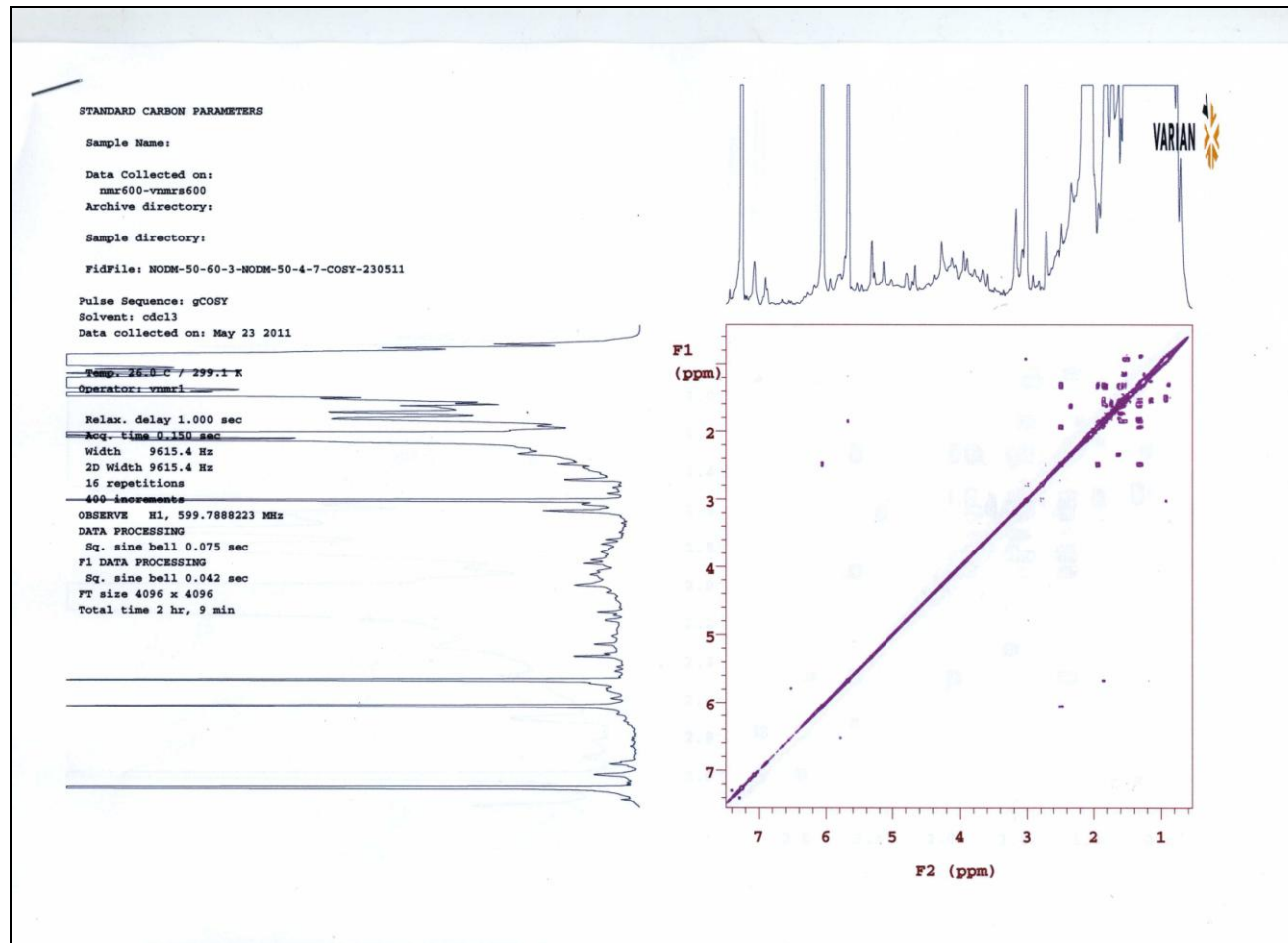
EK E.6: Obtusicrenone bileşiğinin HMQC spektrumu



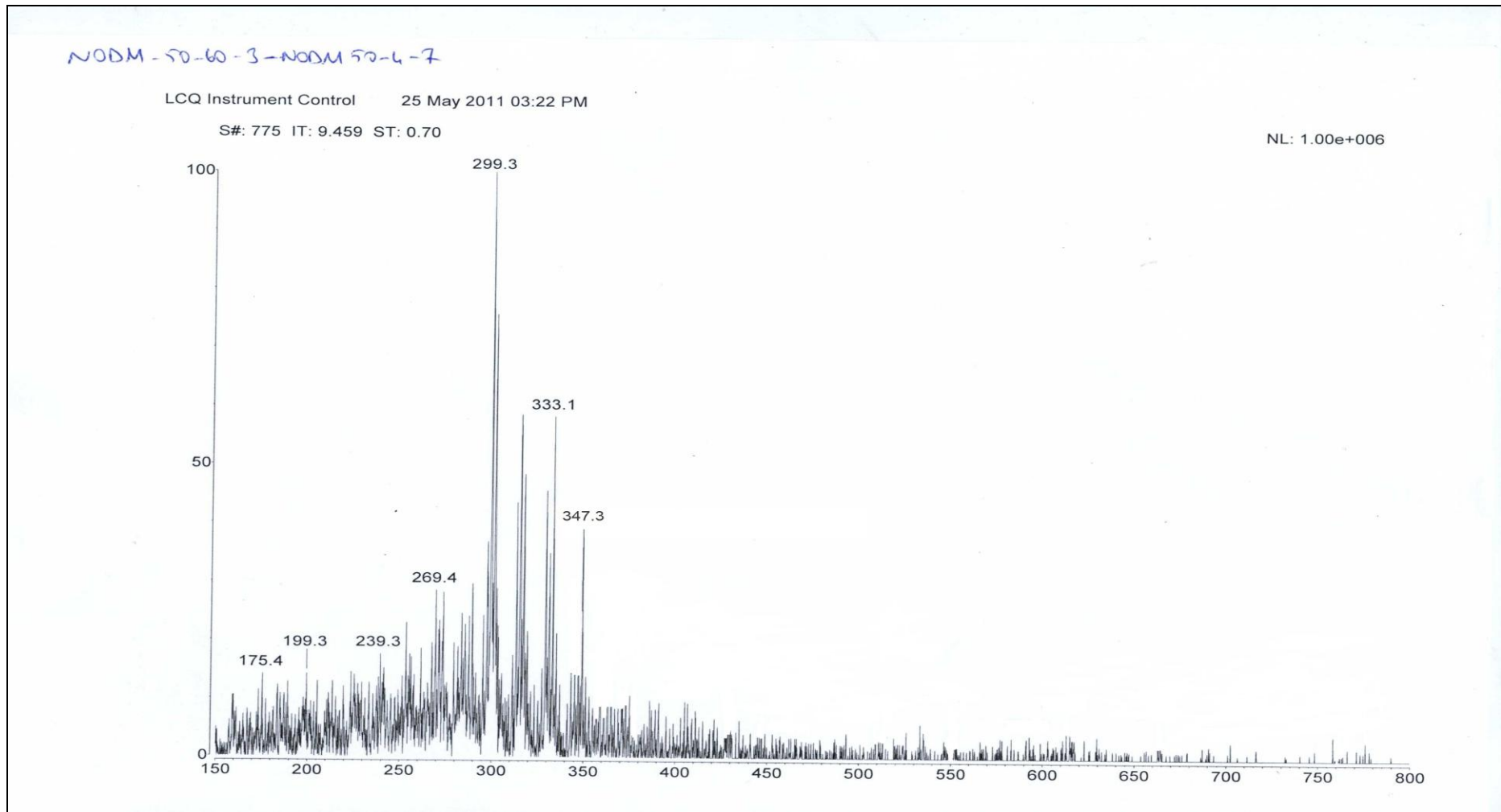
EK E.7: Obtusicrenone bileşiğinin HMBC spektrumu



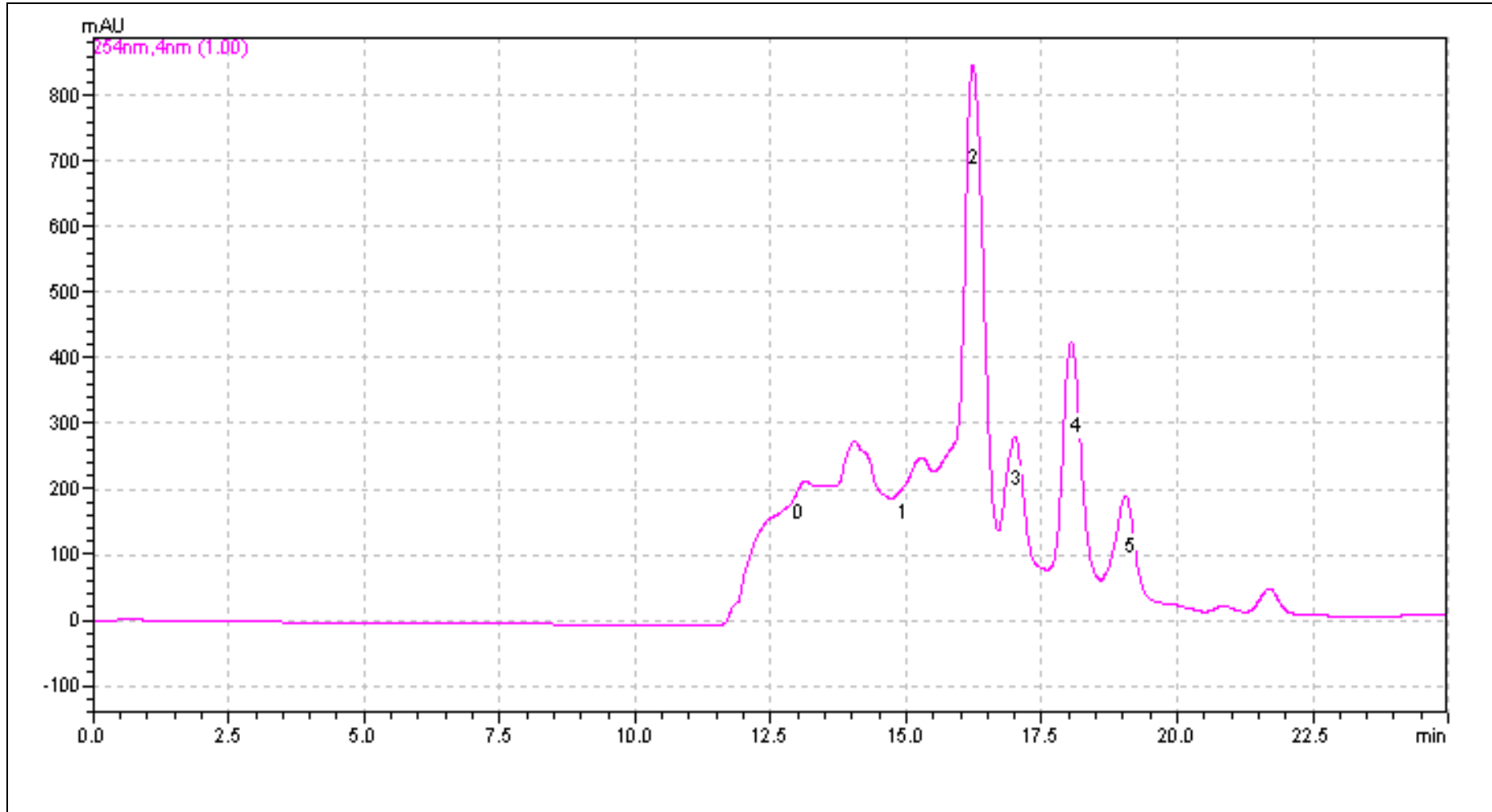
EK E.8: Obtusicrenone bileşığının COSY spektrumu



EK E.9: Obtusicrenone bileşığının MASS spektrumu



EK E.10: Obtusicrenone bileşığının HPLC Kromatogramı



ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Anıl YILMAZ

Doğum Yeri ve Tarihi: Bakırköy – 28.07.1987

Adres:

Lisans Üniversitesi: Selçuk Üniversitesi