

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tricholoma imbricatum (Fr.) P. Kumm. ve *Tricholoma
anatolicum* H.H. Doğan & Intini TÜRLERİNİN
ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK AKTİVİTE
GÖSTEREN BİLEŞİKLERİNİN HPLC İLE
İZOLASYONU VE YAPILARININ AYDINLATILMASI

DOKTORA TEZİ

ERHAN KAPLANER

AĞUSTOS 2017

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

***Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm. ve *Tricholoma*
anatolicum H.H. Doğan & Intini TÜRLERİNİN**
ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK AKTİVİTE
GÖSTEREN BİLEŞİKLERİNİN HPLC İLE
İZOLASYONU VE YAPILARININ AYDINLATILMASI

DOKTORA TEZİ

ERHAN KAPLANER

AĞUSTOS 2017

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

ERHAN KAPLANER tarafından hazırlanan *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P.Kumm. ve *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini TÜRRLERİNİN ANTİOKSİDAN VE SİTOTOKSİK AKTİVİTE GÖSTEREN BİLEŞİKLERİNİN HPLC İLE İZOLASYONU VE YAPILARININ AYDINLATILMASI başlıklı tezinin, 17/08/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı'nda Doktora için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Prof. Dr. Mehmet Emin DURU* (Jüri Başkanı)
Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK** (Danışman)
Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Doç. Dr. Hüseyin ÇELİKKAN (Üye)
Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi, Ankara

İmza:

Yrd. Doç. Dr. Mehmet Ali ÖZLER (Üye)
Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Yrd. Doç. Dr. Mehmet BOĞA (Üye)
Dicle Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Diyarbakır

İmza:

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Mehmet Emin DURU
Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK
Danışman, Kimya Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

İmza:

Savunma Tarihi: 17/08/2017

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Erhan KAPLANER

17/08/2017



ÖZET

***Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm. ve *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini TÜRLERİNİN ANTIOKSİDAN VE SİTOTOKSİK AKTİVİTE GÖSTEREN BİLEŞİKLERİNİN HPLC İLE İZOLASYONU VE YAPILARININ AYDINLATILMASI**

Erhan KAPLANER

Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK

Ağustos 2017, 225 sayfa

Bu tez kapsamında kimyası çalışılan *Tricholoma* türleri tıbbi özellikleri olan Matsutake mantarının ailesinden gelmektedir. *Tricholoma matsutake* dünyada hem gıda hem de tıbbi olarak kullanılmaktadır. Tıbbi olarak özellikle kanser hastalıklarının tedavisinde ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde tercih edilen türlerden bir tanesidir. *Tricholoma anatolicum* türü *T. matsutake*'ye en çok benzeyen türdür ve Japon'ların kutsal mantarı olarak bilinir. Anadoluda doğal olarak yayılış gösteren ve yenilebilen *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini ve *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm. mantar türlerinin sekonder metabolitleri antioksidan aktivite kontrollü çalışıldı. Öncelikle, kurutulmuş örnekler oda sıcaklığında sırasıyla petrol eteri, aseton ve metanol ile ekstre edildiler. Geri kalan kalıntının 80 °C'de infüzyonu alındı ve üzerine hacminin üç katı kadar etanol eklenerek yüksek molekül ağırlığına sahip maddeler çöktürüldü. Çöktürülen kısım HWEP ekstresi; çökmeden kalan diğer kısım ise HWES ekstresi olarak kodlandı. Geri kalan mantar kalıntıları 0,1 N NaOH ile aynı sıcaklıkta ekstre edilerek tekrar üzerine hacminin üç katı kadar etanol eklendi. Çöktürülen alkali kısım HWEP (NaOH) ekstresi; çökmeden kalan diğer alkali kısım ise HWES (NaOH) ekstresi olarak kodlandı. Elde edilen 7 adet ekstrenin β -karoten-linoleik asit, DPPH serbest radikali giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC ve metal bağlama yöntemlerine göre antioksidant aktivitesi test edildi. Aynı ekstrelerin sitotoksik aktiviteleri fibroblast (L929), akciğer kanser hücresi (H1299) ve meme kanser hücresi (MCF-7) hatlarına karşı WST-1 metoduyla test edildi. Ayrıca, ikili boyama ve kaspaz-3 immunositokimyasal yöntemleriyle apoptozun ve nekrozun belirlenmesi çalışmaları yapıldı. Bunlara ilaveten, gerçek zamanlı hücre proliferasyonları aynı hücre hatlarına karşı belirlendi. Biyoaktif bileşenlerin izolasyonu DPPH• ve ABTS•⁺ giderimi kontrollü olarak

yapıldı. Biyoaktif ekstre ve fraksiyonlardan izolasyon çalışmaları sonucunda 2 si yeni olan 8 adet steroid ile birlikte 1 adet organik asit, 6 adet mono-, di-, ve tetra-şeker olmak üzere toplamda 15 madde saflaştırıldı ve yapıları NMR, MS, IR, GC-MS gibi spektroskopik tekniklerle belirlendi. Kristal halde saflaştırılan maddenin tanımlanmasında spektroskopik tekniklerin yanında ayrıca X-RAY de kullanıldı. *Tricholoma* türlerinden ergosterol peroksit (**1**), 5 α ,9 α -epoksiergosta-7,22-dien 3 β ,6 α -diol (**2**), 5 α ,9 α -epoksiergosta-7,22-dien 3 β ,6 β –diol (**3**), 5 α ,6 α -epoksi ergosta-7,22-dien, 3 β -ol (**4**), 5 α ,6 α -epoksiergosta-7,22-dien, 3 β -ol (**5**), ergosta-5,7,22-trien, 3 β -ol (**6**), 5 α ,6 α -epoksiergosta-7,22-dien, 3 β -ol (**7**), 3,5-dihidroksi, (5 β -H) 2-furanone (**8**), mannitol (**9**), α -D-Glucopyranoside, α -D-glucopyranosyl (**10**), maleik asit (**11**), tetra-mannitol (**12**), dimannitol (**13**), mannitol (**14**) ve ergosta-5,7,22-trien, 3 β -ol (**15**) elde edilen maddelerdir. Yapı tayini çalışmalarında 2 yeni madde (**2** ve **3**) ilk defa bu çalışma elde edilmiş ve yapısı aydınlatılmış oldu. Yapısı aydınlatılan maddelerin antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri aynı metodlar ile belirlendi.

Anahtar Kelimeler: *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini, *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm., İzolasyon, Spektroskopi, Yapı tayini, Antioksidan aktivite, Sitotoksik aktivite, MCF-7, H1299, L929.

ABSTRACT

ISOLATION and STRUCTURE ELUCIDATION of ANTIOXIDANT and ANTICANCER COMPOUNDS of *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm. and *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini via HPLC

Erhan KAPLANER

Doctor of Philosophy (Ph.D.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet ÖZTÜRK

August 2017, 225 pages

The *Tricholoma* species studied in this thesis belongs to Matsutake family having medicinal properties. *Tricholoma matsutake* is particularly used for food and medicine in all over the world. It is particularly used in the treatment of cancer diseases and strengthening of the immune system. *Tricholoma anatolicum* species is the most similar species to *T. matsutake* and is known as holy mushroom of the Japanese. *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm and *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini, which are naturally distributed in Anatolia and consumed as foods, were studied to isolate secondary metabolites by antioxidant activity guided fractionation. Dried mushroom samples were extracted with petroleum ether, acetone and methanol, successively, at room temperature. Then the remaining mushroom material was extracted with hot water at 80 °C. After filtration, the hot water infusion was added three times volume of ethanol. The precipitated extract was coded HWEP while the soluble part was HWES. Lastly, the remaining part from infusion was extracted with 0.1 N NaOH at 80 °C. After filtration, the alkaline water infusion was added three times volume of ethanol. The precipitated extract was coded HWEP (NaOH) while the soluble part was HWES (NaOH). The obtained 7 extracts were tested for their antioxidant activity according to β -carotene-linoleic acid, DPPH free radical scavenging, ABTS cation radical scavenging, CUPRAC and metal chelating methods. The cytotoxic activity of the same extracts was tested against fibroblast (L929), lung cancer (H1299) and breast cancer (MCF-7) cell lines by the WST-1 method. In addition, double staining and caspase-3 immunocytochemical methods were used to determine the apoptosis and necrosis index. Moreover, real-time cell proliferations were determined against the same cell lines. The antioxidant activity of the fractions was performed using DPPH[•] and ABTS^{•+} scavenging activity methods to isolate bioactive compounds. The isolation studies afforded totally 15 compound which 8 of them were steroid including 2 new steroids, 1 of them was organic acid,

and remaining were mono-, di-, and tetra- sugar. The structures were elucidated using NMR, MS, IR, GC-MS etc spectroscopic techniques. The X-RAY was also used for the crystallized compound. Ergosterol peroxide (**1**), 5 α ,9 α -epoxyergosta-7,22-dien 3 β ,6 α -diol (**2**), 5 α ,9 α -epoxyergosta-7,22-dien 3 β ,6 β –diol (**3**), 5 α ,6 α -epoxyergosta-7,22-dien, 3 β -ol (**4**), 5 α ,6 α -epoxyergosta-7,22-dien, 3 β -ol (**5**), ergosta-5,7,22-trien, 3 β -ol (**6**), 5 α ,6 α -epoxyergosta-7,22-dien, 3 β -ol (**7**), 3,5-di hydroxy, (5 β -H) 2-furanone (**8**), mannitol (**9**), α -D-Glucopyranoside, α -D-glucopyranosyl (**10**), maleic acid (**11**), tetra-mannitol (**12**), di-mannitol (**13**), mannitol (**14**) and ergosta-5,7,22-trien, 3 β -ol (**15**) were isolated from the *Tricholoma* species. The compounds **2** and **3** were isolated and elucidated for the first time in this thesis study. The antioxidant and cytotoxic activities of the isolated compounds (**1-15**) were determined using the same methods.

Keywords: *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini, *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm., Isolation, Spectroscopy, Structure elucidation, Antioxidant activity, Cytotoxic activity, MCF-7, H1299, L929.



Aileme ...

ÖNSÖZ

Tricholoma anatolicum bir Matsutake grubu mantar olduğundan ve dünyada tüketildiğinden ve ülkemiz için ekonomisi yüksek olan bir mantar türü olduğundan ve bu türlerin kanser tedavisinde kullanıldığı bilindiğinden, bu ilk kimyasal çalışmanın yapılmış olması Ülkemiz adına çok anlam taşımaktadır. Bu nedenle;

Bilimsel bilgi birikimlerini paylaştığı, her zaman yol gösterici olduğu, hem akademiye hem hayata dair değerli tecrübelerini benimle paylaştıkları için değerli danışman hocam Doç. Dr. Mehmet ÖZTÜRK'e,

Çalışmalarımı sabırla takip edip gerektiğinde desteğini esirgemeyen ve zamanını benim için ayıran değerli hocam Prof. Dr. Mehmet Emin DURU'ya,

Tez İzleme Komite toplantılarında ve Tez Savunmasında yer alan değerli hocalarıma,

Tez çalışmalarımı yapmak üzere International Center for Chemical and Biological Sciences, H.E.J Kimya Enstitüsü'nün tüm imkânlarını bana sunan değerli hocam Prof. Dr. Muhammad Iqbal CHOUDHARY'ye,

Laboratuvarında çalışmayı daha kolay ve keyifli hale getiren bir ekip arkadaşlığından daha ötesinde bulunan Mehmet Hüseyin SİNGEÇ, Selçuk KÜÇÜKAYDIN ve diğer arkadaşlarıma,

Ayrıca çalışmamın tüm aşamalarında sabırla beni destekleyen ve yalnız bırakmayan, her zaman yanımda olan sevgili eşim Gizem ÇOBAN KAPLANER, değerli annem, babam, kardeşim ve tüm aileme,

T. imricatum mantarının bulunması ve araştırılmasında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projelerine BAP-14-004 nolu proje desteği için,

teşekkürü borç bilirim.

Bu tez çalışması, **TUBITAK** 1001 - Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Projelerini Destekleme Programı - **113R012** numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Erhan KAPLANER

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1. Botanik Bilgiler	5
1.1.1. <i>Tricholoma imbricatum</i> (Fr.) P. Kumm.....	5
1.1.2. <i>Tricholoma anatolicum</i> H.H. Doğan & Intini	5
1.2. Mantarların Halk Arasında Kullanımı.....	6
1.3. Mantar Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	6
1.3.1. Mantarların kimyasal bileşimleri ve aktiviteleri.....	6
1.3.2. <i>Tricholoma anatolicum</i> ve <i>Tricholoma imbricatum</i> üzerine yapılmış kimyasal çalışmalar	12
1.3.2.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> üzerine yapılmış çalışmalar.....	12
1.3.2.1. <i>Tricholoma imbricatum</i> üzerine yapılmış çalışmalar	13
1.4. Antioksidan Aktivite ve Oksidasyon.....	14
1.4.1. Antioksidanlar	14
1.5. Sitotoksik Aktivite ve Mantarlar	15
1.6. Steroidler	15
1.7. Glikozitler.....	18
1.7.1. Steroit glikozitleri	20
2. MATERYAL VE METOD.....	21
2.1. Mantar Materyalleri.....	21
2.2. Kimyasal maddeler ve Çözeltiler	21
2.2.1. Kimyasallar.....	21
2.2.2. Kullanılan Çözeltiler.....	22
2.2.2.1. β -Karoten renk açılımı yönteminde kullanılan çözelti.....	22
2.2.2.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti	22

2.2.2.3. <i>ABTS kation radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler</i>	22
2.2.2.4. <i>Demir iyonları şelatlama aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler</i>	22
2.2.2.5. <i>CUPRAC yönteminde kullanılan çözeltiler</i>	22
2.3. Kullanılan Aletler ve Diğer Gereçler	22
2.4. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlandırma İşlemleri	23
2.4.1. Kolon Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromatografisi ile bileşenlerin izolasyonu	24
2.4.1.1. <i>Petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının fraksiyonlandırılması</i> ..	24
2.4.1.2. <i>Su Ekstrelerinin Fraksiyonlandırılması</i>	25
2.4.2. Preparatif HPLC-UV-RI kullanarak biyoaktif bileşenlerin fraksiyonlandırılması.....	25
2.5. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri	26
2.5.1. Toplam Antioksidan Aktivite Tayini (β -karoten-linoleik asit yöntemi) ..	26
2.5.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Tayini	27
2.5.3. ABTS Kation Radikali Giderim Aktivitesi.....	28
2.5.4. Metal Bağlama Aktivitesi	29
2.5.5. CUPRAC İndirgeme Gücü	29
2.6. Hücre kültürüyle Antikanser Aktivitenin Belirlenmesi.....	29
2.6.1. Hücre kültürü	29
2.6.2. WST-1 ile sitotoksitenin belirlenmesi	30
2.6.3. İkili boyama metodu ile apoptozun ve nekrozun belirlenmesi.....	30
2.6.3.1. <i>İkili boyama solüsyonunun hazırlanışı</i>	31
2.6.4. Kaspaz-3 İmmunositokimyasal metod ile apoptosiz belirlenmesi	31
2.6.5. Hücre proliferasyonunun belirlenmesi	32
2.7. GC-MS kullanılarak şekerlerin tanımlanması	33
2.7.1. Silillenme işleminin yapılması	34
2.7.2. GC-MS analiz şartları	34
2.8. Preparatif HPLC-UV-RI Kullanarak Biyoaktif Bileşenlerin İzolasyonu	34
2.8.1. Preparatif HPLC çalışma şartları	34
2.9. Diğer Kromatografik Yöntemler	35
2.9.1. Kolon kromatografisi.....	35
2.9.2. İnce tabaka kromatografisi	36
2.10. Spektroskopik Yöntemler	36
2.10.1. NMR spektroskopisi	36

2.10.2. Kütle spektroskopisi	36
2.10.3. FTIR Spektroskopisi	37
2.10.4. Spektrofotometre ile toplam karbonhidrat tayini	37
2.11. İstatistik Hesaplamalar	37
3. BULGULAR	38
3.1. Ekstraksiyon sonuçları	38
3.2. Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları	39
3.2.1. β -Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları (lipit peroksidasyon inhibisyon aktivitesi)	39
3.2.1.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> mantarının lipit peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi sonuçları:	40
3.2.1.2. <i>Tricholoma imbricatum</i> mantarının lipit peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi sonuçları	40
3.2.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Sonuçları	40
3.2.2.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> mantarının DPPH radikalini giderme aktivitesi sonuçları	41
3.2.2.2. <i>Tricholoma imbricatum</i> mantarının DPPH radikalini giderme aktivitesi sonuçları	41
3.2.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Sonuçları	42
3.2.3.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> mantarının ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi sonuçları	42
3.2.3.2. <i>Tricholoma imbricatum</i> mantarının ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi sonuçları	43
3.2.4. Cu (II) indirgeme Aktivitesi (CUPRAC) Yöntemi Sonuçları	43
3.2.4.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> mantarının CUPRAC aktivitesi sonuçları ..	44
3.2.4.2. <i>Tricholoma imbricatum</i> mantarının CUPRAC sonuçları	44
3.2.5. Metal Bağlama Aktivitesi Yöntemi Sonuçları	45
3.2.5.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> mantarının metal bağlama aktivitesi sonuçları	45
3.2.5.2. <i>Tricholoma imbricatum</i> mantarının metal bağlama aktivitesi sonuçları	45
3.3. Sitotoksik Aktivite Sonuçları	46
3.4. Apoptotik–Nekrotik İndeks Çalışmalarının Sonuçları	50
3.4.1. Apoptoz ve nekroz sonuçları	50
3.4.1.1. Mantar ekstrelerinin fibroblast hücrelerindeki (L929) apoptoz ve nekroz sonuçları	51
3.4.1.2. Mantar ekstrelerinin meme kanseri hücre hatlarındaki (MCF-7) apoptoz-nekroz sonuçları	52

3.4.1.3. Mantar ekstralarının akciğer kanseri hücre hatlarındaki (H1299) apoptoz-nekroz sonuçları	53
3.5. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi Sonuçları	59
3.5.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> 'un ekstralarının hücre proliferasyonları.....	59
3.5.2. <i>Tricholoma imbricatum</i> 'un ekstralarının hücre proliferasyonları	69
3.6. <i>Tricholoma anatolicum</i> 'un Aseton Ekstresinden Madde İzolasyon Çalışmaları	79
3.6.1. <i>T. anatolicum</i> 'un aseton ekstresinin fraksiyonlandırılması.....	79
3.6.2. <i>T. anatolicum</i> 'un aseton ekstresinin fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi	79
3.6.3. <i>T. anatolicum</i> 'un aseton ekstresinin aktif fraksiyonlarından maddelerin elde edilmesi	81
3.6.3.1. TA2-5-6 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini.....	82
3.6.3.2. TA2-8-9 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini.....	92
3.6.3.3. TA2-7 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini	103
3.7. <i>Tricholoma anatolicum</i> 'un Metanol Ekstresinden Madde İzolasyonu Çalışmaları	129
3.7.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> 'un metanol ekstresinin fraksiyonlandırılması..	129
3.7.2. <i>T. anatolicum</i> 'un metanol ekstresinin fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi.....	129
3.7.3. <i>T. anatolicum</i> 'un metanol ekstresinin aktif fraksiyonlarından maddelerin elde edilmesi	131
3.7.3.1. TA3-9-10 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini.....	132
3.7.3.2. TA3-11 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini	142
3.7.3.3. TA3-7-8 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini.....	151
3.7.3.4. TA3-12 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini.....	161
3.8. <i>Tricholoma anatolicum</i> 'un HWES Ekstresinden Madde İzolasyonu çalışmaları	183
3.8.1. <i>T. anatolicum</i> 'un HWES ekstresinin fraksiyonlandırılması.....	183
3.8.2. <i>T. anatolicum</i> 'un HWES fraksiyonlarından elde edilen saf maddenin yapı tayini	185
3.9. <i>Tricholoma imbricatum</i> 'un Aseton ve Metanol Ekstresinden Madde İzolasyonu Çalışmaları.....	193
3.9.1. <i>Tricholoma imbricatum</i> 'un birleştirilen ekstresinin fraksiyonlandırılması	193
3.9.1.1. TİM ekstralarından elde edilen saf maddenin yapı tayini	194
4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	197
KAYNAKLAR	202

EKLER.....	214
Ek A. Tez çalışması materyallerinin toplanmasında kullanılan izin belgesi.....	214
Ek B.Turnitin Raporu	215



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> ve <i>T. imbricatum</i> mantarların ekstraksiyon verileri	38
Çizelge 3.2. <i>T. anatolicum</i> ekstrelerinin L929 fibroblast hücrelerindeki % apoptoz-nekroz etkisi	51
Çizelge 3.3. <i>T. imbricatum</i> ekstrelerinin L929 fibroblast hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi	51
Çizelge 3.4. <i>T. anatolicum</i> ekstrelerinin MCF-7 hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi	52
Çizelge 3.5. <i>T. imbricatum</i> ekstrelerinin MCF-7 hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi	52
Çizelge 3.6. <i>T. anatolicum</i> ekstrelerinin H1299 hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi	53
Çizelge 3.7. <i>T. imbricatum</i> ekstrelerinin H1299 hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi	53
Çizelge 3.8. TA2-5PA (1) maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY Değerleri.....	83
Çizelge 3.9. TA2-8 (4)B (2) saf maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY değerleri.....	93
Çizelge 3.10. TA2-7-C4PB (3) saf maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY değerleri	105
Çizelge 3.11. TA2-7C5-C2 (4) maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY değerleri.....	116
Çizelge 3.12. TA2-7C5 (5) maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY değerleri.....	126
Çizelge 3.13. RHJ-1 (6) saf maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY değerleri.....	134
Çizelge 3.14. RHJ-5 (7) saf maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY değerleri.....	144
Çizelge 3.15. TA3-7F3WS (8) saf maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY değerleri	153
Çizelge 3.16. TA3-12F2 (9) saf maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC değerleri	162
Çizelge 3.17. TA3-12F3C1 (10) saf maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC ve COSY değerleri	170
Çizelge 3.18. TA3-12F3C1C1 (11) saf maddesinin ¹³ C-NMR, ¹ H-NMR, HMBC değerleri.....	179

Çizelge 4.1. Tez çalışmasında izole edilen ve yapıları aydınlatılan maddelerin (1-15) antioksidan ve sitotoksik aktivitelerinin sonuçları.....	199
---	-----



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Tezde çalışılan <i>Tricholoma</i> türleri	5
Şekil 1.2. a) Genel steroid yapısı ve b) siklopenta[<i>a</i>]fenantren	16
Şekil 1.3. Şekil. Estran ve östrojen yapısı	16
Şekil 1.4. Androstan ve testosteron'un yapıları	17
Şekil 1.5. Kolestan yapısı	17
Şekil 1.6. Ergostan iskeleti	18
Şekil 1.7. Doğada çok bulunan monosakkaritler	19
Şekil 1.8. <i>D</i> -Glukozun α,β -piranoz ve α,β -furanoz yapıları	19
Şekil 1.9. Steroit Glikozit	20
Şekil 2.1. Mantarlardan biyoaktivite kontrollü aktif maddelerin izolasyonu ve yapı tayinleri	28
Şekil 3.1. <i>Tricholoma anatolicum</i> ve <i>T. imbricatum</i> , mantar türlerinin β -karoten renk açılımı yöntemiyle lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)	39
Şekil 3.2. <i>Tricholoma anatolicum</i> ve <i>T. imbricatum</i> mantar türlerinin DPPH yöntemiyle serbest radikal giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)	41
Şekil 3.3. <i>Tricholoma anatolicum</i> ve <i>T. imbricatum</i> mantar türlerinin ABTS yöntemiyle radikal giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)	42
Şekil 3.4. <i>Tricholoma anatolicum</i> ve <i>T. imbricatum</i> mantar türlerinin CUPRAC yöntemiyle Cu^{2+} indirgeme gücü aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)	44
Şekil 3.5. <i>Tricholoma anatolicum</i> ve <i>T. imbricatum</i> mantar türlerinin Fe^{2+} -Ferrin yöntemiyle metal bağlama aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)	45
Şekil 3.6. <i>T.anatolicum</i> 'un ekstrelerinin fibroblast hücre hattı (L929) üzerindeki sitotoksisiteleri	46
Şekil 3.7. <i>T. imbricatum</i> mantarı ekstrelerinin hücre hattı (L929) üzerindeki sitotoksisiteleri	47
Şekil 3.8. <i>T. anatolicum</i> 'un ekstrelerinin meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki sitotoksisiteleri	47
Şekil 3.9. <i>T. imbricatum</i> 'un ekstrelerinin meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki sitotoksisiteleri	48
Şekil 3.10. <i>T.anatolicum</i> 'un ekstrelerinin akciğer kanseri hücre hattı (H1299) üzerindeki sitotoksisiteleri	49
Şekil 3.11. <i>T. imbricatum</i> 'un ekstrelerinin akciğer kanseri hücre hattı (H1299) üzerindeki sitotoksisiteleri	49

Şekil 3.12. Apoptotik hücrelerin ikili boyama metodu ile gösterilmesi	54
Şekil 3.13. Nekrotik hücrelerin ikili boyama metodu ile gösterilmesi	55
Şekil 3.14. Kaspaz-3 immunositokimyasal boyama fotoğrafları (L929).....	56
Şekil 3.15. Kaspaz-3 immunositokimsal boyama fotoğrafları (MCF-7)	57
Şekil 3.16. Kaspaz-3 immunositokimsal boyama fotoğrafları (H1299)	58
Şekil 3.17. <i>T. anatolicum</i> petrol eteri ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	59
Şekil 3.18. <i>T. anatolicum</i> petrol eteri ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	59
Şekil 3.19. <i>T. anatolicum</i> petrol eteri ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	60
Şekil 3.20. <i>T. anatolicum</i> aseton ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	60
Şekil 3.21. <i>T. anatolicum</i> aseton ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	61
Şekil 3.22. <i>T. anatolicum</i> aseton ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)	61
Şekil 3.23. <i>T. anatolicum</i> metanol ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (.....)	62
Şekil 3.24. <i>T. anatolicum</i> metanol ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	62
Şekil 3.25. <i>T. anatolicum</i> metanol ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	63
Şekil 3.26. <i>T. anatolicum</i> HWEP ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	63
Şekil 3.27. <i>T. anatolicum</i> HWEP ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	64
Şekil 3.28. <i>T. anatolicum</i> HWEP ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	64

Şekil 3.29. <i>T. anatolicum</i> HWEP (NaOH) ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	65
Şekil 3.30. <i>T. anatolicum</i> HWEP (NaOH) ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	65
Şekil 3.31. <i>T.anatolicum</i> HWEP (NaOH) ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	66
Şekil 3.32. <i>T. anatolicum</i> HWES ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	66
Şekil 3.33. <i>T. anatolicum</i> HWES ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	67
Şekil 3.34. <i>T. anatolicum</i> HWES ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	67
Şekil 3.35. <i>T. anatolicum</i> HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	68
Şekil 3.36. <i>T. anatolicum</i> HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	68
Şekil 3.37. <i>T. anatolicum</i> HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)	69
Şekil 3.38. <i>T. imbricatum</i> aseton ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	69
Şekil 3.39. <i>T.imbricatum</i> aseton ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	70
Şekil 3.40. <i>T. imbricatum</i> aseton ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	70
Şekil 3.41. <i>T. imbricatum</i> metanol ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	71
Şekil 3.42. <i>T. imbricatum</i> metanol ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	71

Şekil 3.43. <i>T. imbricatum</i> metanol ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	72
Şekil 3.44. <i>T. imbricatum</i> HWEP ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	72
Şekil 3.45. <i>T. imbricatum</i> HWEP ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	73
Şekil 3.46. <i>T. imbricatum</i> HWEP ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	73
Şekil 3.47. <i>T. imbricatum</i> HWEP (NaOH) ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	74
Şekil 3.48. <i>T. imbricatum</i> HWEP (NaOH) ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	74
Şekil 3.49. <i>T. imbricatum</i> HWEP (NaOH) ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	75
Şekil 3.50. <i>T. imbricatum</i> HWES ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	75
Şekil 3.51. <i>T. imbricatum</i> HWES ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	76
Şekil 3.52. <i>T. imbricatum</i> HWES ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	76
Şekil 3.53. <i>T. imbricatum</i> HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	77
Şekil 3.54. <i>T. imbricatum</i> HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği	77
Şekil 3.55. <i>T. imbricatum</i> HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği.....	78
Şekil 3.56. <i>T. anatolicum</i> türünün aseton ekstresinin fraksiyonlarının DPPH radikali giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)	80
Şekil 3.57. <i>T. anatolicum</i> türünün aseton ekstresinin fraksiyonlarının ABTS katyon radikali giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)	81

Şekil 3.58. TA2-7 fraksiyonundan Recyle-HPLC profili	82
Şekil 3.59. TA2-5PA (1) saf maddesinin yapısı	82
Şekil 3.60. TA2-5PA (1)'nin ^1H -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 500 MHz).....	85
Şekil 3.61. TA2-5PA (1)'nin ^{13}C -NMR Spektrumu (CDCl_3 , 125 MHz).....	86
Şekil 3.62. TA2-5PA (1)'nin DEPT135 Spektrumu	87
Şekil 3.63. TA2-5PA (1)'nin COSY Spektrumu	88
Şekil 3.64. TA2-5PA (1)'nin HSQC Spektrumu	89
Şekil 3.65. TA2-5PA (1)'nin HMBC Spektrumu	90
Şekil 3.66. TA2-5PA (1)'nin EI-MS Kütle Spektrumu	91
Şekil 3.67. TA2-8 (4)B (2) saf maddesinin yapısı	92
Şekil 3.68. TA2-8(4)B (2)'nin FTIR Spektrumu	95
Şekil 3.69. TA2-8(4)B (2)'nin ^1H -NMR Spektrumu ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 600 MHz) 96	
Şekil 3.70. TA2-8(4)B (2)'nin ^{13}C -NMR Spektrumu ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 150 MHz 97	
Şekil 3.71. TA2-8(4)B (2)'nin DEPT 135 Spektrumu.....	98
Şekil 3.72. TA2-8(4)B (2)'nin COSY Spektrumu	99
Şekil 3.73. TA2-8(4)B (2)'nin HSQC Spektrumu	100
Şekil 3.74. TA2-8(4)B (2)'nin HMBC Spektrumu	101
Şekil 3.75. TA2-8(4)B (2)'nin EI-MS Kütle Spektrumu	102
Şekil 3.76. TA2-8(4)B (2)'nin EI-HRMS sonucu.....	103
Şekil 3.77. TA2-7C4-PB (3) saf maddesinin yapısı.....	103
Şekil 3.78. TA2-7C4-PB (3)'ni FTIR Spektrumu.....	107
Şekil 3.79. TA2-7C4-PB (3)'nin ^1H -NMR Spektrumu (CD_3OD , 500 MHz).....	108
Şekil 3.80. TA2-7C4-PB (3)'nin ^{13}C -NMR Spektrumu (CD_3OD , 125 MHz).....	109
Şekil 3.81. TA2-7C4-PB (3)'nin DEPT 135 Spektrumu	110
Şekil 3.82. TA2-7C4-PB (3)'nin COSY Spektrumu.....	111
Şekil 3.83. TA2-7C4-PB (3)'nin HSQC Spektrumu.....	112
Şekil 3.84. TA2-7C4-PB (3)'nin HMBC Spektrumu	113
Şekil 3.85. TA2-7C4-PB (3)'nin EI-MS Kütle Spektrumu	114
Şekil 3.86. TA2-7-C4PB (3)'ün EI-HRMS sonucu	115
Şekil 3.87. TA2-7C5-C2 (4) saf maddesinin yapısı.....	115
Şekil 3.88. TA2-7C5-C2 (4)'nin ^1H -NMR Spektrumu ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$, 500 MHz)	118
Şekil 3.89. TA2-7C5-C2 (4)'nin ^{13}C -NMR Spektrumu ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$, 125 MHz)	119
Şekil 3.90. TA2-7C5-C2 (4)'nin DEPT 135 Spektrumu	120

Şekil 3.91. TA2-7C5-C2 (4)'nin COSY spektrumu	121
Şekil 3.92. TA2-7C5-C2 (4)'nin HSQC Spektrumu.....	122
Şekil 3.93. TA2-7C5-C2 (4)'nin HMBC Spektrumu.....	123
Şekil 3.94. TA2-7C5-C2 (4)'nin EI-MS Kütle Spektrumu.....	124
Şekil 3.95. TA2-7C5 (5) saf maddelerinin yapısı	125
Şekil 3.96. TA2-7C5 (5)'nin ¹ H-NMR Spektrumu (CD ₃ OD, 600 MHz)	127
Şekil 3.97. TA2-7C5 (5)'nin EI-MS Kütle Spektrumu.....	128
Şekil 3.98. <i>T. anatolicum</i> türünün metanol ekstresinin fraksiyonlarının DPPH radikali giderim aktivitesi ($n=3, p<0,05$)	130
Şekil 3.99. <i>T. anatolicum</i> türünün metanol ekstresinin fraksiyonlarının ABTS katyon radikali giderim aktivitesi ($n=3, p<0,05$)	131
Şekil 3.100. RHJ-1 (6) saf maddesinin yapısı.....	132
Şekil 3.101. RHJ-1 (6)'nın ¹ H-NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 300 MHz)	135
Şekil 3.102. RHJ-1 (6)'nın ¹³ C-NMR Spektrumu (CDCl ₃ , 75 MHz)	136
Şekil 3.103. RHJ-1 (6)'nın DEPT 135 spektrumu	137
Şekil 3.104. RHJ-1 (6)'nin COSY Spektrumu.....	138
Şekil 3.105. RHJ-1 (6)'nin HSQC Spektrumu.....	139
Şekil 3.106. RHJ-1 (6)'nin HMBC Spektrumu.....	140
Şekil 3.107. RHJ-1 (6)'nin EI-MS Spektrumu.....	141
Şekil 3.108. RHJ-5 (7) saf maddesinin yapısı.....	142
Şekil 3.109. RHJ-5 (7)'nin ¹ H-NMR Spektrumu (CDCl ₃ + CD ₃ OD, 600 MHz) ..	145
Şekil 3.110. RHJ-5 (7)'nin ¹³ C-NMR Spektrumu (CDCl ₃ + CD ₃ OD, 150 MHz) .	146
Şekil 3.111. RHJ-5 (7)'nin DEPT 135 Spektrumu	147
Şekil 3.112. RHJ-5 (7)'nin COSY Spektrumu.....	148
Şekil 3.113. RHJ-5 (7)'nin HSQC Spektrumu.....	149
Şekil 3.114. RHJ-5 (7)'nin HMBC Spektrumu.....	150
Şekil 3.115. RHJ-5 (7)'nin EI-MS Kütle Spektrumu.....	151
Şekil 3.116. TA3-7F3WS (8) saf maddesinin yapısı	152
Şekil 3.117. TA3-7F3WS (8)'nin ¹ H-NMR Spektrumu (D ₂ O, 500 MHz)	154
Şekil 3.118. TA3-7F3WS (8)'nin ¹³ C-NMR Spektrumu (D ₂ O, 125 MHz)	155
Şekil 3.119. TA3-7F3WS (8)'nin DEPT 135 Spektrumu	156
Şekil 3.120. TA3-7F3WS (8)'nin COSY Spektrumu	157
Şekil 3.121. TA3-7F3WS (8)'nin HSQC Spektrumu	158
Şekil 3.122. TA3-7F3WS (8)'nin HMBC Spektrumu	159
Şekil 3.123. TA3-7F3WS (8)'nin EI-MS Kütle Spektrumu	160

Şekil 3.124. TA3-12F2 (9) saf maddesinin yapısı	161
Şekil 3.125. TA3-12F2 (9)'nin ¹ H-NMR Spektrumu (D ₂ O, 600 MHz)	163
Şekil 3.126. TA3-12F2 (9)'nin ¹³ C-NMR Spektrumu (D ₂ O, 150MHz)	164
Şekil 3.127. TA3-12F2 (9)'nin HSQC spektrumu	165
Şekil 3.128. TA3-12F2 (9)'nin HMBC spektrumu	166
Şekil 3.129. TA3-12F2 (9)'nin ESI-MS Spektrumu	167
Şekil 3.130. TA3-12F2 (9)'nin ve standart mannitol'ün GC-MS Kromatogramları	167
Şekil 3.131. Silillenmiş TA3-12F2 (9)'nin GC-MS Spetrumu	168
Şekil 3.132. TA3-12F3C1 (10) saf maddesinin yapısı	169
Şekil 3.133. TA3-12F3C1 (10)'nin ¹ H-NMR Spektrumu (D ₂ O, 500 MHz)	171
Şekil 3.134. TA3-12F3C1 (10)'nin ¹³ C-NMR Spektrumu (D ₂ O, 125 MHz)	172
Şekil 3.135. TA3-12F3C1 (10)'nin DEPT 135 Spektrumu	173
Şekil 3.136. TA3-12F3C1 (10)'nin COSY Spektrumu	174
Şekil 3.137. TA3-12F3C1 (10)'nin HSQC Spektrumu	175
Şekil 3.138. TA3-12F3C1 (10)'nin HMBC Spektrumu	176
Şekil 3.139. TA3-12F3C1 (10)'nin önemli HMBC korelasyonları	177
Şekil 3.140. TA3-12F3C1 (10)'nin X- Ray'i	177
Şekil 3.141. TA3-12F3C1 (10)'nin ESI-MS spektrumu	178
Şekil 3.141. TA3-12F3C1 (11) saf maddesinin yapısı	178
Şekil 3.143. TA3-12F1C1 (11)'nin ¹ H-NMR Spektrumu (D ₂ O, 500 MHz)	180
Şekil 3.144. TA3-12F1C1 (11)'nin ¹³ C-NMR Spektrumu (D ₂ O, 125 MHz)	181
Şekil 3.145. TA3-12F1C1 (11)'nin HMBC Spektrumu	182
Şekil 3.146. TA3-12F1C1 (11) 'in ESI-MS spektrumu	183
Şekil 3.147. <i>T. anatolicum</i> 'un HWES (TA6) ekstresinin profili	184
Şekil 3.148. TA6-F2-C4 (12) saf maddesinin yapısı	185
Şekil 3.149. TA6_F2_C4 (12)'ün 1H NMR spektrumu (600 MHz ; D ₂ O)	186
Şekil 3.150. TA6-F2-C4 (12)'ün ESI-MS Spektrumu	187
Şekil 3.151. TA6-F2-C4 (12)'ün ve standart mannitol'ün GC-MS Kromatogramları	187
Şekil 3.152. TA6_SPMc_C2 (13) saf maddesinin yapısı	188
Şekil 3.153. TA6_SPMc_C2 (13)'nin ¹ H NMR spektrumu (600 MHz ; D ₂ O)	189
Şekil 3.154. TA6_SPMc_C2 (13)'nin ESI-MS Spektrumu	189
Şekil 3.155. TA6_SPMc_C2 (13)'nin ve standart mannitol'ün GC-MS Kromatogramları	190
Şekil 3.156. TA6SPW_C3 (14) saf maddesinin yapısı	191

Şekil 3.157. TA6SPW_C3 (14)'ün ^1H NMR spektrumu (600 MHz ; D_2O)	192
Şekil 3.158. TA6SPW_C3 (14)'ün ESI-MS Spektrumu.....	192
Şekil 3.159. TA6SPW_C3 (14)'ün ve standart mannitol'un GC-MS Kromatogramları	193
Şekil 3.160. RHJ-4 (15) saf maddesinin yapısı.....	194
Şekil 3.161. RHJ-4 (15)'ün ^1H NMR spektrumu (500 MHz ; CDCl_3)	195
Şekil 3.162. RHJ-4 (15)'ün EI-MS Kütle Spektrumu.....	196



SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A _{0,5}	0,5 Absorbansa karşılık gelen değer
ABTS	2,2'-Azinobis(3-etilbenzotrazolin-6-sülfat)
BHA	Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	Bütillenmiş hidroksi toluene
CUPRAC	Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DPPH	1,1-difenil-2-pikrilhidrazin
H1299	Akciğer kanser hücresi
IC ₅₀	%50 inhibisyon gösteren konsantrasyon
IR	Kızıl ötesi
L929	Fibroblast hücresi
MCF-7	Meme kanser hücresi
PBS	Phosphate buffered saline
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
FITC	fluorescein isothiocyanate
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EI-MS	Elektron iyonizasyon kütle spektroskopisi
FAB ⁺ MS	Hızlı atom bombardımanı kütle spektroskopisi
GC	Gaz Kromatografisi
GC/MS	Gaz kromatografisi kütle spektroskopisi
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
İTK	İnce tabaka kromatografisi
NMR	Nükleer magnetik rezonans

1. GİRİŞ

Eski çağlardan beri birçok toplum mantarları besin veya ilaç olarak kullanmıştır. Geçmişte 'bitki' olduğu söylenen, ancak daha sonra bazı farklı özellikleri sebebiyle hayvanlardan ve bitkilerden farklı ayrı bir âlem olarak kabul edilen mantarların mikroskopik ölçülerde hastalık yapanları olduğu gibi tıbbi olanları da vardır. Şapkalı mantarlar olarak bilinen türlerin bazıları da gıda olarak kullanılmaktadır. (Çağlarımak vd., 2002)

Mantarlar iyi bir vitamin ve mineral kaynağıdır. Özel lezzeti ve aroması nedeniyle birçok ülkede olduğu gibi Türkiye’de de tercih edilir (De Pinho vd., 2008). Dünya nüfusundaki artışa paralel olarak mantarların da tüketimi artmakta ve dengeli beslenmeye katkı sağlamaktadır (Ünal vd., 1996; Çağlarımak vd., 2002). Mantarlar hipertansiyon, hiperkolesterol ve kanser gibi hastalıkların önlenmesinde faydalı olan terapötik (tedavi edici) yiyecekler olarak tanımlanırlar (Ribeiro vd., 2006).

Tıbbi mantarların içinde dikkat çeken ticari potansiyeli olan mantarlar da vardır. Bu mantarlar düşük oranda yağ içeriği, yüksek miktarda protein, karbonhidrat, mineral ve vitaminleri içerdiklerinden besleyici gıda olarak bilinmektedirler (Hernández vd., 2003; Barros, vd., 2008; Kalmış vd., 2008). Antioksidant, antiviral, antiinflamatuvar, antibakterial, kolesterol düşürücü ve immunomodülatör gibi aktivitelerinden dolayı dünya çapında bilinmektedirler (Wang vd., 2000; Jayakumar vd., 2006; 2007; Regina vd., 2008; Tong vd., 2009).

Globocan 2002 verilerine göre, Türkiye’de kadınlarda en sık görülen ve en sık ölüme neden olan kanserin meme kanseri olduğu bildirilmiştir (Hatipoğlu, 2007). WHO (World Health Organization) ve IARC’ın (International Agency for Research on Cancer) ortak raporuna göre Dünyada meme kanseri görülme sıklığı yıllık ortalama %0,5 oranında artmaktadır. Her yıl dünyada 1.000.000 kadında meme kanseri gelişmekte ve 370.000 kadın ise bu hastalıktan ölmektedir. Sadece Avrupa’da her yıl 340.000 yeni meme kanseri olgusu gözlenmektedir. A.B.D’de ise yılda 184.000 yeni

meme kanseri gözlenmekte olup, akciğer kanserinden sonra tüm kanser ölümleri arasında %18 ile ikinci ölüm nedeni olarak bildirilmektedir (WHO; IARC, 2008). Spratt ve arkadaşlarının raporuna göre gelişmiş ülkelerden olan Amerika Birleşik Devletleri'nde 1993 yılında meme kanseri nedeni ile 46.300 ölüm saptanmıştır. Ayrıca her yeni yıl yeni 180.000 meme kanseri tanısı konmaktadır. Aslında teknolojinin gelişmesiyle 1974 yılından itibaren meme tarama programlarıyla, erken evre meme kanseri teşhisi olasılığı artırmış, ancak 1930 yılından beri meme kanserine bağlı ölüm oranında bir değişim gözlenmemiştir (Spratt vd., 1995).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) raporuna göre akciğer kanseri tüm dünyada kanser türleri arasında, erkeklerde en sık ölüme neden olan birinci, kadınlarda ise ikinci kanser türüdür (WHO, 2004) ve tüm dünyada her yıl yaklaşık 1,3 milyon ölüme neden olmaktadır (WHO, 2008). Nitekim A.B.D.'de hem kadın hem de erkeklerde ölüme sebep olan kanser türleri arasında birinci sıradadır (Jemal vd., 2004). Ancak A.B.D'de sigara içiminin azalması ile akciğer kanseri sıklığı da azalmaya başlamıştır. Buna karşılık Türkiye'de sigara içimi arttığı için akciğer kanseri riski artmaya devam etmektedir. Ancak, başka yönlerden sağlıklı olan ve hayatı boyunca sigara kullanmamış olan insanlar da akciğer kanserine yakalanabilmektedir. Türkiye'de akciğer kanserinin bölgelere göre görülme sıklığı sırasıyla; Akdeniz Bölgesi % 41, Ege Bölgesi % 39,5, Marmara Bölgesi % 26,9, İç Anadolu Bölgesi % 23, Doğu Anadolu Bölgesi % 21, Güneydoğu Anadolu Bölgesi % 18,2 oranındadır. Türkiye'de, akciğer kanserinden ölüm oranını da kesin olarak bilinmemekle beraber, her yıl tütün ile ilgili hastalıklardan 35.000 kişinin kaybedildiği düşünülürse, yaklaşık 25.000 kişinin akciğer kanserinden öldüğü tahmin edilmektedir (Hazar, 2006). Günümüzde tedavi erken teşhis ile sağlanabilmektedir. Sıklıkla uygulanan tedavi yöntemleri cerrahi, kemoterapi ve radyoterapidir.

Günümüzde tıp, eczacılık, gıda ve fermentasyon alanlarında yaygın şekilde kullanılan makrofunguslar (mantarlar) üzerine yapılan araştırmalarda, mantarların özellikle immunomodulator ve antitumor ajanı oldukları ve bunların yanı sıra antiviral, antimikrobiyal, antitumör, antihipertansiyon, antiinflamatuvar, antiallerjik gibi aktiviteleri gösterdikleri de tespit edilmiştir (Zhang vd., 2007). Bu nedenden dolayı mantarlar genellikle doğal ürünler ve besin takviyeleri olarak görülmekle birlikte dünyada çeşitli formülasyonlarda üretilmektedirler. Mantarlarda

lektin, polisakkaritler, polisakkarit-peptitler, polisakkarit-protein kompleksleri de izole edilmiş olup bu maddelerin bir çoğunda immunomodulator, antikanser ve antioksidan etkiler tespit edilmiştir (Zhang vd., 2002; Moradali vd., 2007; Huang vd., 2007; Rout and Banerjee, 2007; Tong vd., 2009). Biyolojik aktiviteleri ve tedavi edici özellikler ile bilinen triterpenoidler, makrofungusların temel terpenik bileşiklerindendir. Bazı triterpenoid yapısında olan ganoderik asit, ganoderenik asit, ganodermik asit, applanoksidik asit, ganoderal, ganoderol, lusidon, ganodermanontriol ve ganodermanondiol bileşiklerinin antiinfektif, sitotoksik ve immunomodulator gibi çok farklı biyolojik aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir (Wasser vd., 1997; Gao vd., 2003; Moradali vd., 2007).

Tricholoma türlerinde yapılan araştırmalarda çok sayıda metabolit içerdiğine ve özellikle bu metabolitlerin terpenoid türevlerinden oluştuğu rapor edilmiştir (Zhang vd., 2009). Bu sebeple son yıllarda *Tricholoma* cinsi üzerinde yapılan fitokimyasal çalışmalarla özellikle çeşitli terpenoidler: diterpenler (Benevelli vd., 1995; Tsukamoto vd., 2003), triterpenler (De Bernardi vd., 1991; De Bernardi vd. 1988; Yoshikawa vd., 2002; Yoshikawa vd., 2004), fenolik monoterpeneoidler (Kawagishi vd., 2004; Sakai vd., 2005) gibi maddeler izole edilmiştir. “White matsutake” veya “giant” mantarı olarak bilinen *Tricholoma giganteum* yenebilen, oldukça değerli ve nadir bulunan bir mantardır. Yapılan çalışmalarda antikanser etki gösteren polisakkaritler ihtiva ettiği tespit edilmiştir (Mau vd., 2002). *Tricholoma giganteum* türünden antioksidan polisakkarit hazırlanarak gıda, ilaç, kozmetik gibi endüstrilerde kullanılmaktadır (Chen vd., 2012; Choi, 2012).

Tricholoma matsutake Sing. (Pine-mushroom), dünya üzerinde en değerli mantar türlerinden biridir (Cho vd., 2008). Özellikle anti-aging kozmetik ürünlerinin elde edilmesinde kullanılması bu mantar üzerindeki dikkatleri daha da arttırmaktadır (Kang vd., 2012). Bu mantardan elde edilen bir ekstreye bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde kullanılmak suretiyle antiviral bir ajan olarak değerlendirilmektedir (Kwon vd., 2012). Buna ilaveten bu mantar türü kozmetik sanayinde anti-inflamatuar ve antioksidan (Jang vd., 2008; Ito ve Harada, 2010; Kang vd., 2011) gıda sektöründe nitrit radikalini gideren antioksidan ve anti-hipertansiyon olarak (Kwon vd., 2010); tıpta nörotropik ve kanser gibi çeşitli hastalıkları önlemek için patentlenmiştir (Danishefsky vd., 2010). *Tricholoma*

matsutake mantarı kültüründen elde edilen fukoidan (molekül ağırlığı 20.000 Da olan bir polisakkarit) antioksidan, antidiyabetik, hipoglisemik ve immunositimulan olarak satılmaktadır (Kim vd., 2010; Wang vd., 2012b). Ayrıca, bu mantardan elde edilen karışımlar, gıdaların raf ömrünü arttırmak için de kullanılmaktadır (Kobayashi, 1998).

Tricholoma cinsinin 587 türü tespit edilmiştir. Doğada bu kadar yaygın olan bu türün üzerine yapılan çalışmalar, bu mantar türlerinin bugüne kadar bilinen tıbbi aktiviteleri düşünüldüğünde oldukça yetersizdir. Özellikle ülkemizde yaygın olarak yetişen ve bazı türlerinin ticari potansiyeli olmasına karşın bu türler üzerine biyoaktif bileşenlerin izolasyonuna ve yapıların aydınlatılmasına yönelik araştırmalar bulunmamaktadır. Mantarlar lezzetli bir gıda olmasının ötesinde tıbbi olarak kullanılması ve son yıllarda mantarlardan elde edilen etken maddelerin çeşitli biyolojik aktivite göstermesi ve özellikle kanser gibi hastalıklarda kullanılabilmesi, birçok bilim insanını mantarların bu gizemli dünyasını araştırmaya yönlendirmektedir. Ülkemiz doğal mantar açısından oldukça zengin olmasına rağmen, ülkemizde yetişen mantarların biyolojik aktivite gösteren etken maddelerinin izolasyonu üzerine fazla bir çalışma yapılmamış olması, bizi bu araştırmaya yöneltmiştir.

Tez çalışmasında ülkemizde doğal olarak yetişen *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini, *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm türleri üzerine mikokimyasal araştırmalar hedeflendi. Bu mantarların ülkemizde doğal olarak yetişmesi, kolay ulaşılabilmesi, ticari potansiyeli olması ve bugüne kadar mikokimyasal araştırmaların bu türler üzerinde yapılmamış olması bizi bu araştırmaya sevk etti. Tez çalışmasında antikanser aktivite gösteren maddeler ile antioksidan aktivite gösteren maddelerin izolasyonlarının antioksidan aktivite kontrollü olarak yapılması ve aktif fraksiyonlardan elde edilen bileşiklerin yapılarının NMR, MS, IR, UV gibi spektroskopik yöntemlerle aydınlatılması ve elde edilen saf maddelerin antioksidan aktiviteleri ve antikanser aktivitelerinin araştırılması amaçlandı.

1.1. Botanik Bilgiler

1.1.1. *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P. Kumm

Habitat: Çam ormanlarında kumlu toprak üzerinde özellikle asidik topraklarda yetişir. Konifer ormanlarında ibreler içinde sonbahar döneminde yoğun olarak yetişir.

Yayılış Yerleri: Muğla, Denizli, Afyon, Kayseri, Karaman (Solak vd., 2007).

1.1.2. *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini

Tricholomataceae familyasına ait *Tricholoma anatolicum* sedir (katran) ağaçlarının bulunduğu yerlerde yetişmektedir. Şapka önce sapa birleşik topuz şeklinde, sonra açılarak kubbe şeklinde düzleşir. Gençken beyaz-krem, olgunlaşınca sarımsı kreme döner. Yüzeyi ince yünümsü tüylüdür. Etli kısım 2-4 cm kalınlığında, beyaz, sıkı yapılı, katran kokusunda ve tatlımsıdır. Lameller krem, sapa girinti yaparak birleşir. Gelişme ilerlediğinde rengi kırmızımsı kahverengi lekelidir. Önce beyaz, sonra krem beyazdan krem sarıya döner. Üzeri ince yünümsü yapıdadır ve annulus bulunur. Mikroskopik özelliklerine bakıldığında *Tricholoma anatolicum* geniş eliptik veya subgloboz, renksiz, yüzeyi düzgün, $6-7,5 \times 4-5\mu\text{m}$ boyutlarında sporlara sahiptir. (Beitenbach ve Kranzlin, 1986; Intini vd., 2003).



Tricholoma anatolicum H.H. Doğan & Intini



Tricholoma imbricatum (Fr.) P. Kumm

Şekil 1.1. Tezde çalışılan *Tricholoma* türleri

1.2. Mantarların Halk Arasında Kullanımı

Mantarların gıda olarak tüketimi ya da halk tababetinde ilaç olarak kullanımı insanlık tarihi kadar eskidir (Tong vd., 2009). Yenilebilir mantarlar, iki bin yıldan fazladır toksik olmayan tıbbi özellikleri olduğu kadar besin oldukları için de Asyalıların araştırma konusu olmuştur (Zhang vd., 2007). Dünya nüfustaki artışa paralel olarak mantarların tüketimi artmakta ve dengeli beslenmeye katkı sağlamaktadır (Garcha vd., 1993; Ünal vd., 1996; Çağlarırnak vd., 2002). Mantarlar gıda olarak kullanılmasının yanı sıra oldukça büyük miktarda A, C vitaminleri ve β -karoten taşımaları, hepsinin de antioksidan aktivite göstermesinden dolayı, koruyucu etkiye sahip olabileceği rapor edilmiştir (Murcia vd., 2002). Günümüzde mantarlar yiyecek ve yeni farmasötik ürünlerin en geniş kullanılan kaynaklarından biridir (Tong vd., 2009).

Bir çok ülkede, kültür mantarlarını (*Agaricus bisporus*) besin olarak kabul eden bilinçli tüketiciler bulunmaktayken doğal ortamda yetişen mantarlar (*Pleurotus* spp., *Lentinus edodes*, *Volvariella volvacea*, *Auricularia* spp. v.s.) geleneksel olarak yerel halk, mantar severler ve gurmeler tarafından tüketilmektedir (Diez ve Alvarez, 2001). Buna rağmen günümüzde doğal mantarlar, besinsel (Crisan ve Sands, 1978; Breene, 1990), organoleptik (Maga, 1981) ve farmakolojik (Bobek vd., 1991) özellikleri sayesinde beslenmemizde giderek çok önemli rol almaktadır (Diez ve Alvarez, 2001). Çin ve Japonya gibi ülkelere lingzhi (*Ganoderma lucidum*), shiitake (*Lentinus edodes*), and yiner (*Tremella fuciformis*) gibi mantarlar, yenilebilir gıdalar ve tıbbi kaynaklar olarak değerlendirilmektedir (Zhang vd., 2007).

1.3. Mantar Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

1.3.1. Mantarların kimyasal bileşimleri ve aktiviteleri

Bugüne kadar mantarlar üzerine yapılan çalışmalarda, mantar ekstraktlarının antioksidan, antitümör, antiviral, antibakteriyal, antifungal, anti-inflamatuar aktiviteleri, immunomodulator ve kolesterol düşürücü etkileri rapor edilmiştir (Wang vd., 2000; Mau vd., 2004; Mercan vd., 2006; Gezer vd., 2006; Jayakumar vd., 2006,

2007; Türkoğlu vd., 2007; Regina vd., 2008; Öztürk vd., 2011). Mantarlarda lektin, polisakkaritler, polisakkarit-peptitler, polisakkarit-protein kompleksleri de izole edilmiş olup bu maddelerin bir çoğunun immunomodulator, antikanser ve antioksidan etkiler tespit edilmiştir (Zhang vd., 2002; Huang vd., 2007; Moradali vd., 2007; Rout and Banerjee, 2007; Tong vd., 2009). Yapılan araştırmalar göstermektedir ki kanser, Alzheimer ve AIDS gibi tedavisi henüz tam olarak yapılamayan hastalıkların tedavisinde mantarlar umut verici olmuş ve son yıllarda gıda olarak tüketimlerinin yanı sıra tedavi ajanı olarak izlenmektedirler. Bu nedenle, gelişmiş ülkelerdeki araştırmacılar mantarlardan çeşitli aktivite gösteren bileşenlerin belirlenmesi konusunda araştırmalar yapmaktadırlar. Tez çalışmasında, ülkemizde doğal olarak yayılış gösteren ve ticari potansiyeli olan *Tricholoma* türlerinden antioksidan aktiviteli, maddelerin izolasyonları antioksidan aktivite kontrollü olarak yapılarak saflaştırılan bileşiklerin yapıları spektroskopik metotlarla ilk kez bu çalışma ile belirlendi.

Mantarlar üzerine bugüne kadar ülkemizde yapılan araştırmalar daha çok onların besinsel özellikleri yada onlardan elde edilen ekstraktların tıbbi aktivitelerinin belirlenmesi üzerinedir. Bu güne kadar mantarlar üzerine yapılan aktivite çalışmalarında mantarlardan elde edilen ekstraktların antioksidan, antitümör, antiviral, antibakteriyel, antifungal, anti-inflamatuar aktiviteleri ve immunomodulator ve kolesterol düşürücü etkileri ortaya çıkarılmıştır (Wang vd., 2000; Türkoğlu vd., 2006; 2007; Mercan vd., 2006; Jayakumar vd., 2006, 2007; Regina vd., 2008; Gezer vd., 2006; Mau vd., 2004). Son yıllarda Japonya, Çin, İsrail ve Amerika Birleşik Devletleri gibi gelişmiş ülkelerde mantarların aktif bileşenlerinin belirlendiği çalışmalar da dikkat çekmektedir (Wasser vd., 1997; Hernández vd., 2003; Gao vd., 2003; Moradali vd., 2007; Regina vd., 2008; Tong vd., 2009). Yenilebilir mantar türlerinden lektin, polisakkaritler, polisakkarit-peptitler, polisakkarit-protein kompleksleri, lanostan tipi triterpenoidler, fenolik ve flavonoid yapıları bileşikler izole edilmiş, ve bunlardan bir çoğunun immunomodulator, antikanser, antioksidan aktiviteleri de tespit edilmiştir (Wang vd., 2000; Zhang vd., 2002; Moradali vd., 2007; Huang vd., 2007; Rout ve Banerjee, 2007; Regina vd., 2008; Tong vd., 2009).

Polisakkaritler mantarların majör bileşenlerindendir. Polisakkaritler, β -glukanları içeren hetero- β -glukanlar, heteroglukanlar, α -manno- β -glukanlı farklı kimyasal

bileşimleri kapsar. Ksiloglukan *Polyporus confluens* mantarından (Mizuno, 1999), galaktoglukomannan *Lentinus edodes*'den (Fujii vd., 1979), ksilogalaktomannan *Inonotus obliquus*'dan (Mizuno, 1999), galaktomannoglukan *Flammulina velutipes*'den (Ikekawa vd., 1982), glukogalakktan ve arabinoglukan *Ganoderma tsugae*'den (Zhuang vd., 1994), galaktoksiloglukan, mannoglukoksilan, glukoksilan ve ksilan *Hericium erinaceum*'dan (Mizuno, 1999), ksiloglukan, mannogalaktoğlukan, mannogalakktan ve glukoksilan *Pleurotus pulmonarius*'dan (Gutiérrez vd., 1996), mannoksiloglukan, ksiloglukan, β -(1→6); β (1→3)-glukan ve mannogalaktofukan *Grifola frondosa*'dan (Zhuang vd., 1994), mannogalaktoğlukan, β -(1→6); α -(1→3)-glukan, α -(1→4); β -(1→6)-glukan, α -(1→6); α -(1→4)-glukan, riboglukan, glukomannan, β -(1→2), β -(1→3)-glukomannan, β -(1→6) ve β -(1→3)-glukan *Agaricus blazei*'den, (Mizuno, 1999) izole edilen ve yapısı aydınlatılan polisakkarit yapıları biyoaktif bileşiklerdir.

Lezzetli tadı ve yüksek miktarda protein, karbonhidrat, mineral ve vitaminleri için olduğu kadar düşük yağ içeriği ile ünlü olan *Pleurotus ostreatus*, istridye mantarı olarak bilinen ticari olarak önemli, yenilebilir mantardır (Hernandez vd., 2003; Kalmış vd., 2008). *P. ostreatus*'un, antioksidan aktivitesi, immunomodülatör, antiviral, anti-inflamatör, antibakterial ve kolesterol düşürücü etkileri gibi tıbbi etkileri dünya çapında çok iyi bilinmektedir (Wang vd., 2000; Jayakumar vd., 2006; 2007; Regina vd., 2008). *Pleurotus ostreatus*, *Agaricus bisporus* ve *Lentines edodes* gibi diğer yenilebilir mantarlardan daha yüksek konsantrasyonda sistin, metionin ve aspartik asit içerdiği tespit edilmiştir (Mattila vd., 2002).

Tricholoma türlerinde yapılan araştırmalarda çok sayıda metabolit içerdiğine ve özellikle bu metabolitlerin terpenoid türevlerinden oluştuğu rapor edilmiştir (Zhang vd., 2009). Bu sebeple son yıllarda *Tricholoma* cinsi çeşitlerinin fitokimyasal çalışmaları sonucunda, özellikle çeşitli terpenoidler: diterpenler (Benevelli vd., 1995; Tsukamoto vd., 2003), triterpenler (De Bernardi vd. 1988; De Bernardi vd., 1991; Yoshikawa vd., 2002; Yoshikawa vd., 2004), polioksitlenmiş steroidler (Ohnuma vd., 2006), fenolik monoterpenoidler (Kawagishi vd., 2004; Sakai vd., 2005), geranil sikloheksenonlar ve diğer indol türevleri gibi bileşenler karakterize edilmiştir (Garlaschelli vd., 1994, 1995).

“Pine-mushroom” (*Tricholoma matsutake* Sing.) dünya üzerinde en değerli mantar türlerinden biridir (Cho vd., 2008). Cho ve arkadaşları, *T. matsutake* Sing. türünün sap ve şapka kısmının uçucu bileşenlerini ve aroma maddelerini belirlemişlerdir (Cho vd., 2006a; Cho vd., 2006b; Cho vd., 2007; Cho vd., 2008). Şapka kısmında uçucu bileşenlerden metil sinamat, 1-okten-3-ol, [E]-linalol oksit, [E]-2-okten-1-ol ve 3-oktanol sırasıyla majör bileşenler olarak belirlenirken, sap kısmında da 1-okten-3-ol majör bileşenken onu metil sinamat, [E]-2-okten-1-ol ve linalol takip etmektedir (Cho vd., 2008).

Shiitake (*Lentinula edodes*) Japonya ve Çin'de hayat iksiri, uzun hayatın sırrı olarak bilinmektedir. Bu mantar; beyin kanamalarının, damar sertliğinin ve daha birçok hastalığın önlenmesinde tesirli olduğu gibi, antitümör aktivitesinden dolayı kanser tedavisinde kullanılmak üzere araştırılmaktadır. Nitekim yapısında bulunan 'lentinan' adlı bir polisakkaritin, 'Sarcoma 180' denilen katı tip tümörlerin gelişmesini durdurabilmesi bu mantara verilen önemi artırmıştır (Chihara vd., 1970). Bu yüzden kemoterapi sırasında hastaların Shiitake'yi gıda olarak tüketmeleri tavsiye edilmektedir. Japonya'da Shiitake'den 50 kadar enzim elde edilmiştir. Bunlardan pepsin ve tripsin bazı mide hastalıklarının; asparaginase ise, çocuklarda görülen kan kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır (Nimura vd., 2006). Bu mantar protein, vitamin ve mineral bakımından zengin bir mantar türüdür. 100 gram taze mantar yendiğinde, ancak 28 kalori alınır ki, bu da fazla enerji almadan besleyici madde almanın iyi bir yolu olarak görülmektedir. Az miktarda A ve E vitamini ihtiva eden mantarda bol miktarda bulunan ergosterol (provitamin D2), güneş ışığının veya suni ışığın tesiriyle D2 vitaminine dönüşmektedir. D2 vitamini ise, fosfor ve kalsiyum seviyesini dengeleyerek kemik ve kas gelişmesine yardım etmekte, dolayısıyla raşitizm hastalığının gelişmesine engel olucu bir rol sergilemektedir. Bu mantarda bulunan 'Eritadenine' adlı madde, kan kolesterolünü azaltmaya sebep olmuştur (Enman vd., 2007).

Litratürde *Tricholoma* ve antioksidan aktivite ile ilgili patent çalışmaları şöyle özetlenebilir:

Tricholoma giganteum türünden antioksidan polisakkarit hazırlamak için bir metot önerilmiş ve bu ürünün gıda, ilaç, kozmetik gibi endüstrilerde kullanılabilirlikleri

ifade edilmiştir (Chen vd., 2012). Yine kozmetikte kullanılmak üzere bal çözücü olarak kullanılmış ve yeni kozmetik ürünleri hazırlanmıştır (Choi, 2012).

Diğer mantarların yanında, *Tricholoma matsutake* mantarı da kullanılarak anti-aging kozmetik ürünlerinin elde edildiği belirtilmiştir (Kang vd., 2012). *Tricholoma matsutake* mantarı, virüslere karşı etkili olan bir bal karışımının hazırlanmasında, diğer doğal ürünlerin yanında kullanılmıştır. Bu karışım bağışıklık sistemini güçlendirmektedir (Kwon vd., 2012). Bu mantar türü anti-inflammatuar ve antioksidan kozmetik preperatlarının hazırlanmasında kullanılmıştır (Jang vd., 2008; Kang vd., 2011). Yine aynı mantar türünün de kullanıldığı, yenilebilir mantar türlerinden anti-inflammatuar içerikli fraksiyonların ve ergotiyonein antioksidan bileşimini içeren yeni preperatların elde edildiği belirtilerek patent alınmıştır (Ito ve Harada, 2010). Gıda sektöründe kullanılmak üzere hazırlanan, nitrit radikalini gideren, antioksidan ve anti-hipertansiyon özellikli preperat *Tricholoma* türlerinden Kwon ve arkadaşları tarafından hazırlanmıştır (Kwon vd., 2010). Yine bu mantar türü kullanılarak hazırlanan toksisiteyi düşürmek ve çeşitli hastalıkları önlemek için düşünülen bir metot patentlenmiştir. Bu patentte mantardan elde edilen panaksitriol gibi bileşiklerinde karışımda olduğu bir preparat nörotropik ve kanser gibi hastalıklara karşı kullanılabilmektedir (Danishefsky vd., 2010). *Tricholoma matsutake* mantarı kültürünün de içinde bulunduğu antioksidan, antidiyabetik, hipoglisemik ve immunositimulan etki gösteren düşük molekül ağırlıklı fukoidan (molekül ağırlığı 20.000 Da olan bir polisakkarit) hazırlamışlardır (Kim vd., 2010; Wang vd., 2012b). Gıda, beslenme, kozmetik ve ilaç için kullanılan doğal bir antioksidan ekstre, *Tricholoma matsutake* mantar türünde içinde olduğu, yenilebilir diğer mantarın basidomiseillerinden hazırlanmıştır. Üretimi yapılan gıdaların uzun süreli kullanımları için hazırlanan bir karışımda Japonyalı Kobayashi tarafından 1998 yılında önerilmiştir (Kobayashi, 1998).

Önemli bir bileşik olan *ergothioneine* *Tricholoma* türlerini de içeren çeşitli mantarlardan hazırlanması ile patent haline getirilmiştir (Osawa vd., 2008). Bunlara ilaveten, prezervatif olarak, antioksidan olarak, antikanser olarak kullanılan karışımlar, *Tricholoma matsutake* mantarı da kullanılarak hazırlanmıştır (Kwon, 2006). Bu patentlerde göstermektedir ki, *Tricholoma* türleri tıbbi değeri yüksek olduğundan hem tıbbi hem de kozmetik açıdan patentlenmektedir.

Literatürde *Tricholoma* ve antioksidan aktivite ile ilgili şimdiye kadar yayınlanan makaleler aşağıdakiler gibi özetlenebilir.

Antioksidan etkili polisakkaritlerin *Tricholoma matsutake*'den eldesi için bir optimizasyon çalışmasında çeşitli ekstraksiyon yöntemleri kullanılmış ve bu polisakkaritlerin bileşimleri ve molekül ağırlıkları belirlenerek, antioksidan aktiviteleri, oksijen radikal absorban kapasite metoduyla belirlenmiştir (You vd., 2013). Ayrıca antioksidan polisakkaritler elde edilmiştir (Ding vd., 2010; Tong vd., 2013). *Tricholoma matsutake* mantarından izole edilen yeni polisakkaritlerin yapısı aydınlatılmış ve antioksidan ve PC12 kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir (Ding vd., 2010; Lim vd., 2007).

Tricholoma giganteum mantar türünün basidokarplarından farklı fraksiyonlandırma yöntemleri kullanılarak hazırlanan ekstraktların antioksidan aktiviteleri incelenmiştir (Mau vd., 2002; Chatterjee vd., 2011;). Bu türün immunomodülatör ve antitümör farmakolojik aktiviteleri Ooi ve Vincet tarafından çalışılmıştır (Ooi ve Vincent., 2001). *Tricholoma lobayense* mantar türünden elde edilen üç farklı polisakkaritin antioksidan aktivitesi üç farklı yöntem ile analiz edilmiştir. Bu yöntemlerde hidrojen peroksitli ortamda fare malondialdehit ve eritrosit hemolizlerinin inhibisyonu ve 2,2-azobis(2-amidinopropan)dihidroklörür (AAPH) ile etkileştirilmiş insan serum albüminlerinin oksidatif modifikasyonlarının incelenmesi araştırılmıştır (Wang vd., 2012a). Jiang ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada oksidatif stres ile AIDS arasındaki bir bağlantı olduğu ve antioksidanların AIDS hastalığı tedavide çok önemli bir rol oynadıkları belirtilmektedir. Bu amaçla, bir *Tricholoma* türü üzerine yapılan çalışmada, *Tricholoma monogolicum* türünün hemolizasyon aktivitesi %39 bulunarak, bu hastalığın tedavisinde kullanılabileceği tartışılmıştır (Jiang vd., 2011).

Reis vd (2011), Kuzey Portekiz'den toplanan *Tricholoma ustale* üzerine antioksidan aktivite çalışmaları ile mantarın şeker, yağ, askorbik asit, fenolik bileşik ve tokoferol miktarlarını belirlemişlerdir. Portekizde 17 mantar türünün protokateşik, *p*-hidroksibenzoik, *p*-kumarik ve sinnamik asit içerikleri antioksidan aktivitelerinin yanında araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada, yenilebilir bir mantar olan *Tricholoma atrosquamosum* ve yenmeyen *T. sulphureum* mantar türleri de konu olmuş ve protokateşik, *p*-kumarik ve sinnamik asit, bu mantar türlerinde nicel olarak belirlenmiştir (Vaz vd., 2010). *T. sulphureum* mantar türü üzerinde α -tokoferol

miktarını belirleyen çalışma da yapılmıştır (Heleno vd., 2009a). Barros ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, HPLC-DAD-ESI/MS sistemi kullanılarak Portekiz’de yetişen 16 farklı mantar türünde protokateşik, *p*-hidroksibenzoik, *p*-kumarik ve iki adet vanilik asit bileşikler araştırılmış ve *Tricholoma acerbum* türünde protokateşik ve *p*-kumarik asit miktarlarını tespit etmişlerdir (Barros vd., 2009). Aynı grup 2008 yılında *Tricholoma acerbum* türünün’de içlerinde bulunduğu bir seri mantar türünün, tokoferol miktarlarını, şekerlerini ve yağ asidi içeriklerini belirleyip, antioksidan ve antimikrobiyal aktivite testleri yapmışlardır (Barros vd., 2008). Portekiz’de yetişen *Tricholoma portentosum* mantar türünün sap ve şapka kısımlarının antioksidan aktivitesi incelenmiş ve *Lactarius delicious* ile karşılaştırılmıştır (Ferreira vd., 2007). *Tricholoma nudum* yenilebilir mantar türünün farelerde toksik olmadığı, aminoasit, vitaminler ve diğer besinsel özellikleriyle zengin olduğu ve güçlü antioksidan aktivite gösterdiği çok eski yıllarda rapor edilmiştir (Bell vd., 1958). Ülkemizde yapılan bir antioksidan aktivite çalışması *Tricholomaceae* familyasında bulunan mantarlarda enzimler kullanılarak yapılmıştır (Ersel ve Cavas, 2008).

1.3.2. *Tricholoma anatolicum* ve *Tricholoma imbricatum* üzerine yapılmış kimyasal çalışmalar

1.3.2.1. *Tricholoma anatolicum* üzerine yapılmış çalışmalar

Tricholoma anatolicum mantar türü sadece ülkemizde sedir ağaçlarının altında ve Batı Toroslar (Fethiye-Koruköyü) ve Kozan yaylalarında bulunan sedir ağaçlarının altında doğal olarak yetişmektedir. Sedir ağacının altında yetişmesinden dolayı “sedir mantarı” olarak da bilinir. Bu mantar yetiştiği mevsimde bölgedeki orman köylüleri tarafından toplanmakta ve ticareti yapılmaktadır. Her yıl sadece Japonya’ya ortalama 50 ton kadar ihraç edildiği rapor edilmektedir (Doğan ve Akata, 2011). Şimdiye kadar bu tür üzerinde yapılan çalışmalar aşağıdaki gibi özetlenebilir. Kalmış ve arkadaşlarının 2011 yılında yapmış olduğu bir çalışmada *Tricholoma anatolicum*’un besinsel değerleri ön plana çıkartılmıştır. Bu amaçla mantarın, nem, kül, toplam protein, yağ miktarı, total karbonhidrat miktarları tespit edilip buradan da enerji değerleri belirlenmiştir. Bunlara ilaveten mantarın mineral ve ağır metal içeriği

toplam 8 adet metal için araştırılmıştır (Kalmış vd., 2011). Kaya ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptıkları bir makalede makro metaller ve eser elementler atomik absorpsiyon cihazı kullanılarak araştırılmıştır (Kaya vd., 2011). Bunlara ilaveten yeni bir çalışmada Mn, Fe, K, Na ve P miktarları ICP-AES cihazı ile belirlenmiştir (Doğan vd., 2012). Yukarıda da belirtildiği gibi bu tez çalışmasında hedeflenen aktivite çalışmaları ile aktif bileşiklerin izolasyonlarına dair de herhangi bir araştırma şimdiye kadar yapılmamıştır.

1.3.2.1. *Tricholoma imbricatum* üzerine yapmış çalışmalar

Bazı *Tricholoma* türlerinin potansiyel antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerini araştırılmıştır (Tel vd., 2012). Elde edilen sonuçlara göre özellikle, *Tricholoma* türlerinin asetilkolinesteraz enzim inhibitörü ve doğal antioksidan olarak değerlendirilebilir nitelikte olduğu görülmüştür. Bu nedenle ekstrelerin aktivite kontrollü olarak araştırılması daha ileri bir yaklaşım olarak düşünülmektedir. Bir başka araştırmada da 26 farklı mantar türünün içinde bulunan *Tricholoma imbricatum* türünün koku veren bileşenleri GC-MS cihazı kullanılarak belirlenmiştir (Fons vd., 2006; Talou vd., 2000).

Tricholoma imbricatum türü üzerine besinsel özelliklerinin açığa çıkartılması için mineral, ağır metal ve vitamin içeriğinin belirlendiği çalışmalar da mevcuttur (Sesli ve Tüzen, 2006; Sesli, 2007). Bu mantar türü ile yapılan diğer bir kimyasal çalışmada meroterpenoitler ve steroidler elde edilmiş ve izole edilen yapıların hiçbir aktivitesi incelenmemiştir (Zhang vd., 2009). Başka bir çalışma Heleno ve arkadaşları tarafından 2009 yılında yapılmış ve bu çalışmada mantarın makro besinsel özellikleri ile *Tricholoma imbricatum* mantarında bulunan şekerin nitel ve nicel tayinlerini ve mantarın yağ asit bileşenleri HPLC ve GC-MS kullanarak aydınlatmışlardır (Heleno vd., 2009b). *T. imbricatum* türünde sitotoksik aktiviteden sorumlu bileşenlerin tayini hakkında şimdiye kadar bir araştırma yapılmamıştır.

1.4. Antioksidan Aktivite ve Oksidasyon

1.4.1. Antioksidanlar

Vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler oksidasyona uğrayabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilirler (Papas, 1996). Bu durum yaygın olarak “Oksidatif Stres” şeklinde ifade edilir. Oksidatif stresin baş sorumluları reaktif oksijen ve azot türleridir (Aruoma ve Cuppett, 1997)

Reaktif oksijen ve azot türleri insan vücudunda çeşitli şekillerde meydana gelirler:

- Hücrenin normal solunumu sırasında yan ürün olarak reaktif oksijen ve azot türleri oluşur.
- Süperoksit ve hidrojen peroksit miktarı, bazı biyomoleküllerin (adrenalin, dopamin, tetrahidrofolat, sitokrom P450 ve elektron transport zincirlerinin bazı bileşikleri) oksijen tarafından doğrudan oksidasyonu ile artabilir (Fridovich, 1986; Halliwell, 1994).
- Vücudumuz, doğal ve insan kaynaklı radyasyona maruz kalabilir. Yüksek enerjili elektromagnetik ışın, suyu parçalayabilir ve hidroksi radikali oluşturur (Von-Sonntag, 1987).

Yabancı organizmalara karşı koruyucu görev yapan fagositler (nötrofiller, monositler, makrofajlar, eosinofiller) yabancı organizmayı öldürmek için süperoksit ve hidrojen peroksit üretirler. Bu önemli savunma sisteminin bozukluğu, doku hasarıyla sonuçlanan aşırı fagosit aktivitesinin eşlik ettiği romatoid artirit ve iltihaplı bağırsak hastalığı gibi bazı hastalıklara sebep olur (Babior ve Woodman, 1990; Moncada vd., 1991; Anggård, 1994).

Reaktif oksijen ve azot türleri DNA bazlarını hasara uğratarak mutasyona sebep olur. $O_2^{\bullet-}$, $OH^{\bullet}$ (Takeuchi vd., 1994; Floyd vd., 1988) ve $ONOO^-$ (Floyd vd., 1988; Yermilov vd., 1995) DNA hasarının sebebi olarak bilinir. DNA hasarı kanserden sorumlu olan baş faktördür (Guyton ve Kensler, 1993) Hücrede DNA tamir mekanizmaları mevcut olmasına rağmen bu mekanizmalar bazen yetersiz kalabilirler.

Doğal kaynaklı antioksidanlar, bitkilerde bulunan fenolik bileşikler (tokoferoller, flavonoidler, fenolik asitler), azotlu bileşikler (alkaloitler, klorofil türevleri,

proteinler, aminler), organik asitler ve karotenoitlerdir (Larson, 1988; Hudson, 1990). Sistein, metiyonin, histidin, triptofan ve lizin (Taylor ve Richardson, 1980) gibi aminoasitler ile sülfürlerce zengin olan tiyoredoksin (Buchanan vd., 1994) proteinini de antioksidan özellik gösterirler.

Diğer taraftan sentetik antioksidanlar gıdaların bozunmasını önlemek ve raf ömrünü uzatmak için kullanılmaktadırlar. Günümüzde BHA (bütillenmiş hidroksi- anisol), BHT (bütillenmiş hidroksitoluen), PG (propil gallat) ve TBHQ (*t*-bütillhidrokinon) en çok kullanılan sentetik antioksidanlardır. Ancak sentetik antioksidanlar ve oluşturdukları yan ürünlerin çeşitli hastalıklara yol açabileceğini ortaya koyan çalışmalar vardır (Yamazaki vd., 2007; Tepe vd., 2007). Bu nedenle doğal kaynaklardan, sentetik antioksidanların yerini tutabilecek yeni antioksidan maddelerin bulunmasına yönelik çalışmalar giderek önem kazanmış ve bu alanda yapılan araştırmalar artmıştır.

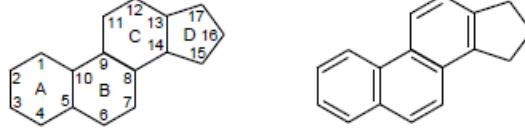
1.5. Sitotoksik Aktivite ve Mantarlar

Yenilebilir mantarlardan çeşitli bileşikler izole edilmiştir. Mantarlardan izolasyonu yapılan lektin, polisakkarit, polisakkarit-peptit, polisakkarit-protein, lanosten tipi triterponoit, fenolik ve flavonoit gibi bileşiklerin antikanser, antioksidan, antitümör, antiviral, antibakteriyal, antifungal , antiinflamatuvar, immunomodulator aktiviteleri ve kolesterol düşürücü etkileri tespit edilmiştir (Tong vd., 2009). Benzer yaklaşımla belki de en meşhur olanlarından biri olan *Ganoderma lucidum* mantarının infüzyonu dünyada kullanılmaktadır. Diğer sık kullanılan ürünler ise şu şekilde sıralanabilir; Lentinan (*Lentinus edodes*) krestin (*Trametes versicolor*) ticari olarak kullanılan patentli ürünlerin birkaçıdır. Bu konuda patentlenmiş daha farklı ürünler de bulunmaktadır (Zaidman vd., 2005; Moradali vd., 2007).

1.6. Steroidler

Steroid iskeleti siklopenta[*a*]fenantren halkası şeklinde sıralanmış dört karbosiklik halkadan oluşur. Genelde kısmi veya tamamı indirgenmiş şekilde bulunabildiklerinde

sınırlı doymamışlık görülür. Dörtlü steroid halkaları genelde aşağıdaki gibi numaralandırılmaktadır.

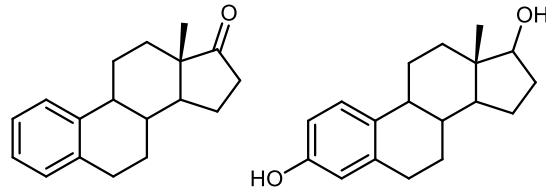


Şekil 1.2. a) Genel steroid yapısı ve b) siklopenta[a]fenantren

Çoğu steroid yapısında 10 ve 13 pozisyonlarında 2 tane metil grubu bulunmaktadır ve sırasıyla 19 ve 18 olarak numaralandırılmaktadır.

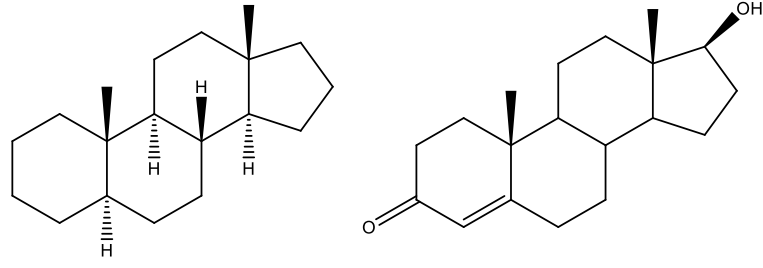
Steroidlerin birçok türünden biri de sterollerdir. Steroller karakteristik olarak C-3 pozisyonunda hidroksil grubu bulundurmaktadırlar. Hayvanlarda ve bitkilerde sıklıkla görülmektedirler. Steroller membran bileşeni ve biyosentetik yollarda yer alarak steroidal hormonlarla birlikte diğer biyoaktif bileşiklerin sentezlenmesinde rol almaktadırlar.

A halkası aromatik olan 18 karbonlu Estran (genelde östrojen olarak kullanılır), kadınlık hormonu olarak da bilinir.



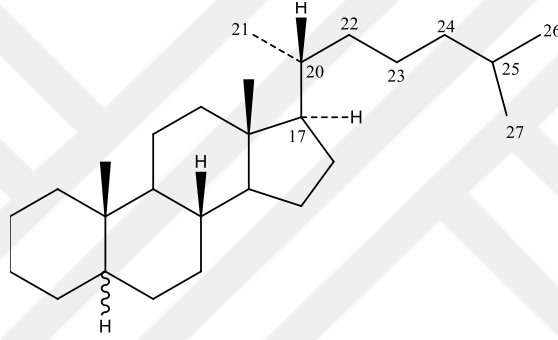
Şekil 1.3. Şekil. Estran ve östrojen yapısı

19 karbonlu olan androstan erkeklik hormonu olan testosteronun temel iskeletini oluşturan bir steroiddir. Androstan halka yapısı 10 ve 13 pozisyonlarında metil grubu diğer steroid iskeletlerinde olduğu gibi burada da yaygın olarak görülmektedir.



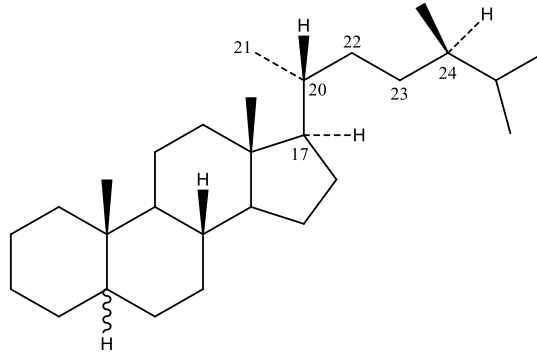
Şekil 1.4. Androstan ve testosteron'un yapıları

Kolestan tipi (C27) steroidler en çok bilinen iskeleti kolestroiden türeyen steroidlerden oluşmaktadır.



Şekil 1.5. Kolestan yapısı

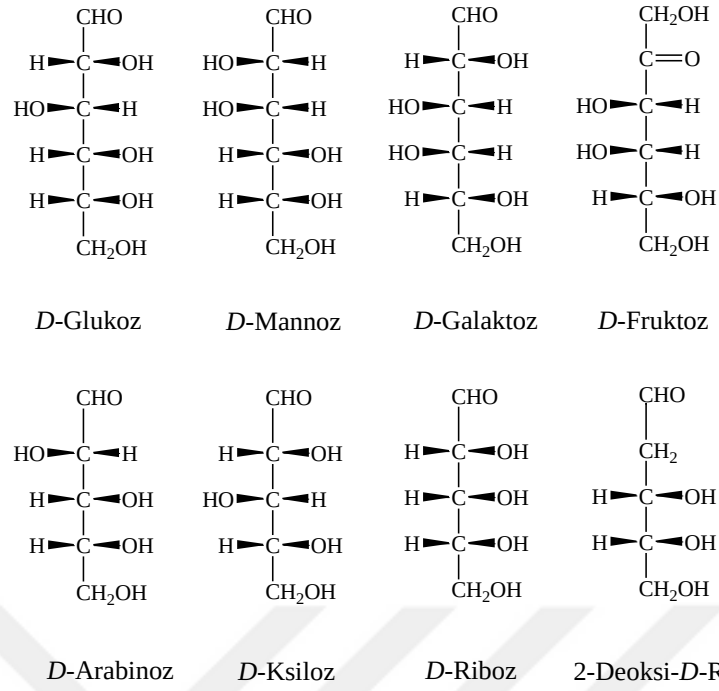
24-metilkolestan, C-24 pozisyonunun durumuna göre ergostan ya da kampestan olarak adlandırılmaktadır. 24R olduğu zaman kampestan, 24S olduğu zaman ergostan olarak adlandırılmaktadır.



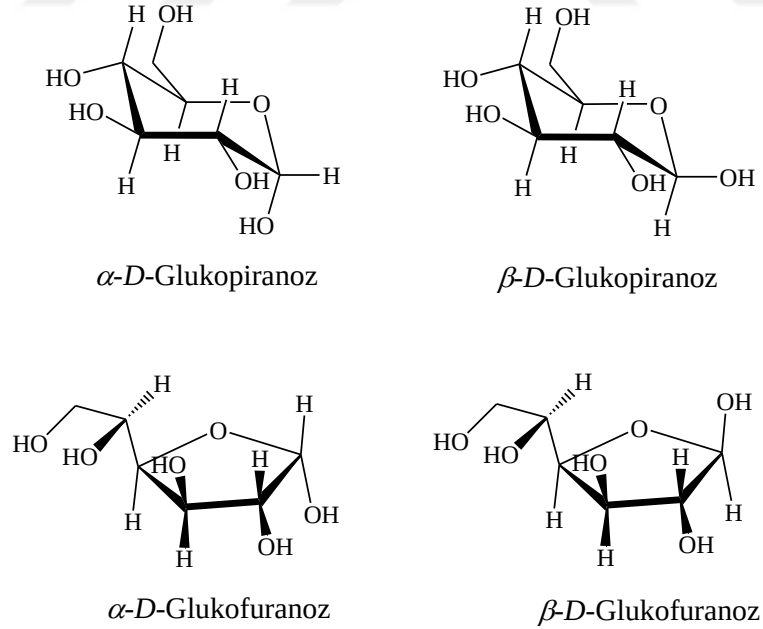
Şekil 1.6. Ergosteran iskeleti

1.7. Glikozitler

Glikozitler karbonhidrat sınıfında olup şeker eterleridir. Genel formülleri CH_2O 'dur. Monosakkaritler en basit karbonhidrat birimleridir. Doğada çok rastlanan monosakkaritler Şekil 1.7'de verilmektedir. Galaktoz, glukoz, gibi aldehit grubu içeren monosakkaritler "aldozlar"; fruktoz gibi keton grubu içeren monosakkaritlere ise ketozlar olarak tanımlanırlar. Glikozitler α - ve β - anomer olarak tüm bitki organlarında bulunabilirler. Doğada β - glikozitler yaygın, α - glikozitler daha az bulunurlar. D-glukozun α,β -piranoz ve α,β -furanoz yapıları Şekil 1.8'de gösterilmiştir. Monosakkaritler dimer, trimer ve polimer oluşturmak üzere birbirlerine bağlanabilirler. Dimerlere disakkaritler nedir. Sakkaroz bir disakkarittir ve hidrolizlendiğinde glukoz ve fruktoza ayrılır. İki'den sekize kadar monosakkarit birimi içeren karbonhidratlar oligosakkaritler olarak tanımlanırlar. Sekizden fazla monosakkarit birimi içerenler polisakkaritlerdir. Nişasta ve selüloz polisakkaritlere örnek olarak verilebilirler. Kan şekeri, üzüm şekeri olarak da adlandırılan glukoz en önemli monosakkaritlerden biridir. Polarize ışığı sağa çevirdiği için dekstroza olarak da anılır. Sakkaroz, maltoz, laktoz ve nişasta memeliler tarafından glukozla dönüştürülebilir ve organizma tarafından enerji elde etmek için kullanılırlar. Fruktoz en tatlı doğal şekerdir, meyvelerde ve balda bulunur. Polarize ışığı sola çevirdiği için levuloz olarak da adlandırılır (Öztürk, 2008).



Şekil 1.7. Doğada çok bulunan monosakkaritler

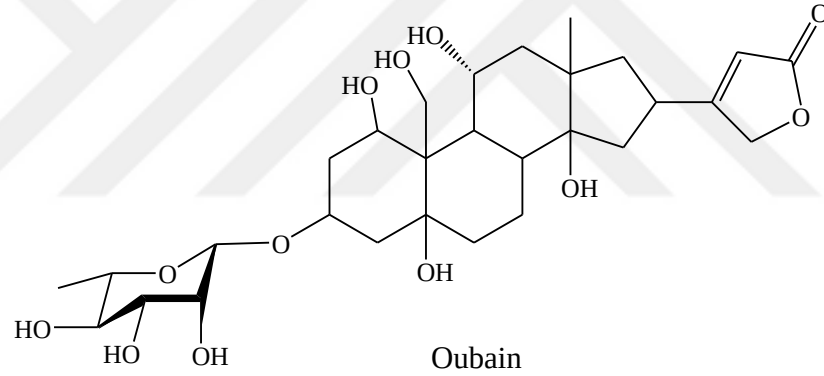


Şekil 1.8. *D*-Glukozun α,β -piranoz ve α,β -furanoz yapıları

Glikozitler genel olarak katı, kristalize, renksiz ve acı lezzeti olan bileşiklerdir. Çok farklı yapılara sahip olduklarından stabiliteleri, çözünürlükleri ve polarize ışığa karşı olan etkileri değişiktir. Sudaki çözünürlük dereceleri değişik olmakla birlikte genellikle alkolde de çözünürler. Şeker ile aglikonu bağlayan atomun cinsine göre glikozitler O-, C-, N- ve S- glikozitleri olarak sınıflandırılırlar:

1.7.1. Steroit glikozitleri

En bilinenleri kalp glikozitleridir. Aglikonları steroit ya da triterpen iskeleti olabilir. Steroit glikozitine örnek olarak oubain verilebilir (Şekil 1.9) (Öztürk, 2008).



Şekil 1.9. Steroit Glikozit

2. MATERİYAL ve METOD

2.1. Mantar Materyalleri

Tez kapsamında çalışılan mantar türlerinden *T. imbricatum* Kasım-Aralık 2013 ayları arasında Muğla'nın Yaraş ve Ula yörelerinden ve *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini ise Mart-Nisan 2014 ayları arasında Muğla-Fethiye-koru köyünden temin edilip laboratuvara getirildi. Teşhisleri Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Trüf Uygulama ve Araştırma Merkezinde yapıldı. Mantar örnekleri; Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Fen Fakültesi Fungaryumunda sırası ile CK-01181 ve AT-1825 kodları ile saklanmaktadır.

2.2. Kimyasal maddeler ve Çözeltiler

2.2.1. Kimyasallar

β -karoten, linoleik asit, α - tokoferol ve sigma kimyasaldan; Asetonitril Carlo Erba kimyasaldan; Asetik Asit Merck kimyasaldan; 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH), Folin Ciocalteu Reaktifi ve Bütillenmiş Hidroksi Anisol (BHA) fluka kimyasaldan; Tween-40 [polioksietilen sorbitan monopalmitat], ferene, demir klorür, bakır klorür, neokuprin, amonyumasetat, ABTS, sodyum karbonat, alüminyum nitrat, potasyum asetat, sodyum dihidrojen fosfat, pirokatekol, kloroform ve kullanılan tüm çözücüler Merck'den temin edildi. Kullanılan diğer kimyasallar ve çözücüler analitik saflıktadır.

2.2.2. Kullanılan Çözeltiler

2.2.2.1. β -Karoten renk açılımı yönteminde kullanılan çözelti

1 mL kloroformda 0,5 mg β -karoten çözüldü. 20 μ L lineloik ve 200 mg Tween-40 hazırlanan çözeltiye eklendi ve iyice karıştırıldı. Döner buharlaştırıcı ile kloroform uçuruldu ve 50 mL oksijene doyurulmuş saf su eklendi ve şiddetli şekilde karıştırıldı. sonra üzerine daha önceden ile doyurulmuş su ilave edildi ve kuvvetlice çalkalandı.

2.2.2.2. DPPH serbest radikal giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözelti

DPPH çözeltisi 100mL/4 mg konsantrasyon olacak şekilde etanolde hazırlandı.

2.2.2.3. ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler

(ABTS⁺, 7 mM): 5 mL suda 19,2 mg ABTS çözüldü. Üzerine K₂S₂O₈ son konsantrasyon 2,45 mM olacak şekilde eklendi, karıştırıldı. 12-16 saat oda sıcaklığında bekletildi.

2.2.2.4. Demir iyonları şelatlama aktivitesi yönteminde kullanılan çözeltiler

0,5 mM Ferren: 2,5 mg Ferrene 10 ml suda çözüldü.

0,2 mM FeCl₂: 4 mg FeCl₂.4H₂O 100 ml suda çözüldü.

2.2.2.5. CUPRAC yönteminde kullanılan çözeltiler

10 mM Cu(II): 17,05 mg CuCl₂.2H₂O 10 ml suda çözüldü.

Amonyum asetat tamponu (1M, pH=7): 0,77 g NH₄Ac 10 ml suda çözüldü

7,5 mM Neokuprin: 39 mg Neokuprin 25 ml etanolde çözüldü.

2.3. Kullanılan Aletler ve Diğer Gereçler

Döner Buharlaştırıcı (Heidolph)

Gaz Kromatografisi (GC) Cihazı (Shimadzu GC-17AAF,V3,230V LV)

Gaz Kromatografisi- Kütle Spektrometresi Cihazı (GC/MS) (Varian 2100)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Shimadzu)

Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı (NMR), (Bruker Avance, 300 MHz, 400 MHz, 500 MHz ve 600 MHz (Cryo-cooled Probu))

Preperatif HPLC (Preperatif HPLC, JAI, Japan Analytical Industry Co., Ltd.).

HR-MS , Yüksek çözünürlüklü Kütle Spektrometresi (JEOL HX-110)

Kütle Spektrometresi (EI için: JEOL MSRoute çözünürlük: 1.000)

ESI-MS (Elektron sprey iyonizasyonlu, kütle spektrometresi.)

FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) ATR aparatı ile, (Thermo)

Ultraviyole Spektrofometresi (UV-Vis), (Shimadzu UV-1601)

Hassas terazi (Sartorius, Cubis)

pH-metre (Thermo)

Ultra saf su cihazı (Merck Milipore Q)

Hesap makinesi (Casio fx-3650P Super FX, Japonya), pulvarizatör, balon jojeler, yuvarlak dipli cam balonlar, magnetler, azot ve oksijen tüpleri, manyetik karıştırıcı (Heidolph MR 3001), otomatik pipetler (20–200µL, 100–1000µL, 50–5000µL) (Eppendorf).

2.4. Ekstraksiyon ve Fraksiyonlandırma İşlemleri

Kurutulmuş ve öğütülmüş mantar örnekleri sırasıyla petrol eteri, aseton, metanol çözücülerini ile oda koşullarında (24 saat x 9 kez) ekstraksiyonları yapıldı ve elde edilen petrol eteri, aseton ve metanol ekstraktlarının çözücülerini döner buharlaştırıcı yardımıyla uzaklaştırılarak ham ekstraktlar elde edildi.

Metanol ekstresi alınan mantar kalıntıları kurutulduktan sonra 80 °C sıcak su ile ekstre edildi, su ekstresi süzöldökten sonra, süzüntünün üzerine hacimce 3 kat fazla etanol eklenerek molekül ağırlığı yüksek olan polisakkaritlerin çökmesi sağlandı. Çökelek santriföjlenerek alındı ve alkolde çöken polisakkaritlere “HWEP” kodu verildi. Çökelek santriföj ile ayrıldıktan sonra, supernatant [etanol:su, (3:1) karışımı] döner buharlaştırıcı ile uzaklaştırıldı. Bu yöntemle elde edilen alkolde çözünen polisakkaritlere “HWES” kodu verildi. Böylece su ekstresinde bulunan polisakkaritler henüz fraksiyonlandırma işlemleri başlamadan önce etanolde çözünen ve çözünmeyenler olarak büyük ölçüde ayrıldılar. Geri kalan mantar artığı 0,1 M NaOH ile çözeltisiyle ekstrakte edildi. Filtre kağıdından süzöldökten sonra süzüntünün üzerine hacimce 3 kat etanol eklendi ve süpernatant kısmı alınarak, döner buharlaştırıcıda çözücüsü uçuruldu. Elde edilen polisakkarit ekstresine “HWES-NaOH” kodu verildi.

2.4.1. Kolon Kromatografisi ve İnce Tabaka Kromatografisi ile bileşenlerin izolasyonu

2.4.1.1. Petrol eteri, aseton ve metanol ekstrelerinin fraksiyonlandırılması

Ekstreler kolon kromatografisi ve ince tabaka kromatografisi teknikleri kullanılarak silikajel adsorban üzerinden fraksiyonlandırıldılar. Bu amaçla petrol eteri (%100) ile kromatografiye başlanarak %5’lik oranlarda kloroform artırıldı ve %100 kloroforma ulaşıldı. Devamında, %100 kloroform ile yıkanan aynı kolon %5’lik oranlarda aseton artırılarak %100 aseton olana kadar devam edildi. Akabinde, %100 aseton ile yıkanan aynı kolon %10’luk oranlarda metanol artırılarak %100 metanol olana kadar devam edildi. %100 metanole ulaşınca elüsyona son verildi. Silikajel adsorbana ilaveten gerektiğinde izole edilen maddenin doğasına ve yapısına bağlı olarak Sephadex-LH20’ de izokrotik organik çözücü karışımı (hekzan:kloroform:metanol; 7:4:1) ve %100 metanol ile kullanıldı.

İnce Tabaka Kromatografisi yöntemleri kullanılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu amaçla çözücü sistemi olarak, uygun oranlarda hekzan:kloroform (50:50), hekzan:etilasetat (60:40); kloroform:aseton (70:30); kloroform:metanol (90:10); kloroform:toluen:metanol (10:15:2) karışımları ve polariteye göre uygun

karışımlar kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel ve floresans katılmış ince tabaka (Merck-5554) kullanıldı. Gerektiğinde fraksiyonun miktarının az olması durumunda preperatif ince tabaka kromatografisi de kullanıldı.

2.4.1.2. Su Ekstrelerinin Fraksiyonlandırılması

Su ekstresi yani polisakkaritlerin bulunduğu ekstre, G-15, G-50, Sepharose 6B ve Sepharose CL-6B sabit fazları kullanılarak molekül ağırlıklarına göre ayrıldı. Bu amaçla demineralize su (%100) ve su:metanol (90:10) karışımları kullanıldı. Elde edilen fraksiyonların benzer olanları ters faz ince tabaka kromatografisi ile tespit edildi ve benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu amaçla çözücü olarak ters faz ince tabaka kromatografisinde su:metanol (50:50) ve Su:asetonitril (60:40) sistemleri kullanıldı.

Aktif ekstrelerin fraksiyonlandırılması ile elde edilen fraksiyonların da antioksidan aktivitesi DPPH ve ABTS radikal giderimi yöntemleriyle belirlendi. En yüksek antioksidan aktivite gösteren fraksiyonlardan madde izolasyonları yapıldı. Ayrıca izole edilen saf maddelerin de antioksidan aktiviteleri belirlenip yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı.

Özetle, izolasyonlar, ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi ve preparatif HPLC sistemleri kullanılarak uygun adsorbanlar yapıldı. Elde edilen saf maddelerin yapı tayinleri IR, UV, NMR [^1H -NMR, ^{13}C -NMR, 2D-NMR (COSY, HMQC ve HMBC)], kütle spektrometresi yöntemleri (EI-MS, CI-MS, FAB⁺MS ve HRMS) ve X ışınları spektroskopik yöntemleri kullanılarak yapıldı.

2.4.2. Preperatif HPLC-UV-RI kullanarak biyoaktif bileşenlerin fraksiyonlandırılması

Su ekstresinden polar maddelerin ayrılmasında Preperatif HPLC-UV-RI ile izolasyonda öncelikle moleküler elek kromatografisi kolonu daha sonra C₁₈ ters faz kolonu kullanılarak ayırma işlemi yapıldı. Preperatif HPLC’de moleküler elek kromatografisi (GPC: Gel permation chromatography) için %70 polivinil alkol ve %30 C₁₈ içeren (ID: 20φ x500mm) boyutlarında HPLC kolonu ile sadece C₁₈ içeren

ters faz HPLC kolonu (ID: 20φx250mm, partikül büyüklüğü 5μm) kullanıldı. Preperatif HPLC’de moleküler elek kolonunda su:metanol (80:20) ve su:metanol (90:10) çözücü karışımlarından uygun olan çözücü sistemi kullanıldı. Preperatif HPLC’de C₁₈ kolonunda ise su:asetonitril (60:40) ve su:metanol (50:50) çözücü karışımlarından uygun olan çözücü sistemi kullanıldı. Kromatogramın rezolusyonuna göre metanol su oranları ayarlandı. Akış hızı kromatogramdaki rezolusyona göre dakikada 3-4 ml olarak ve dedektör 254 nm olarak ayarlandı, UV aktif olmayan maddeler ise sadece RI dedektörde izlendi.

Metanol ekstresinden elde edilen fraksiyonların preperatif HPLC-UV-RI ile izolasyonunda kolon boyutları (ID: 20φ x250mm, partikül büyüklüğü 5μ) olan, C₁₈ ters faz Prep.HPLC kolonu kullanıldı. Bu amaçla izokrotik çözücü sistemi metanol:su seçildi. Kromatogramın rezolusyonuna göre metanol su oranları değiştirildi. Akış hızı kromatogramdaki rezolusyona göre dakikada 3-4 ml olarakve dedektör 254 nm olarak ayarlandı, UV aktif olmayan maddeler ise sadece RI dedektörde izlendi.

2.5. Antioksidan Aktivite Belirleme Yöntemleri

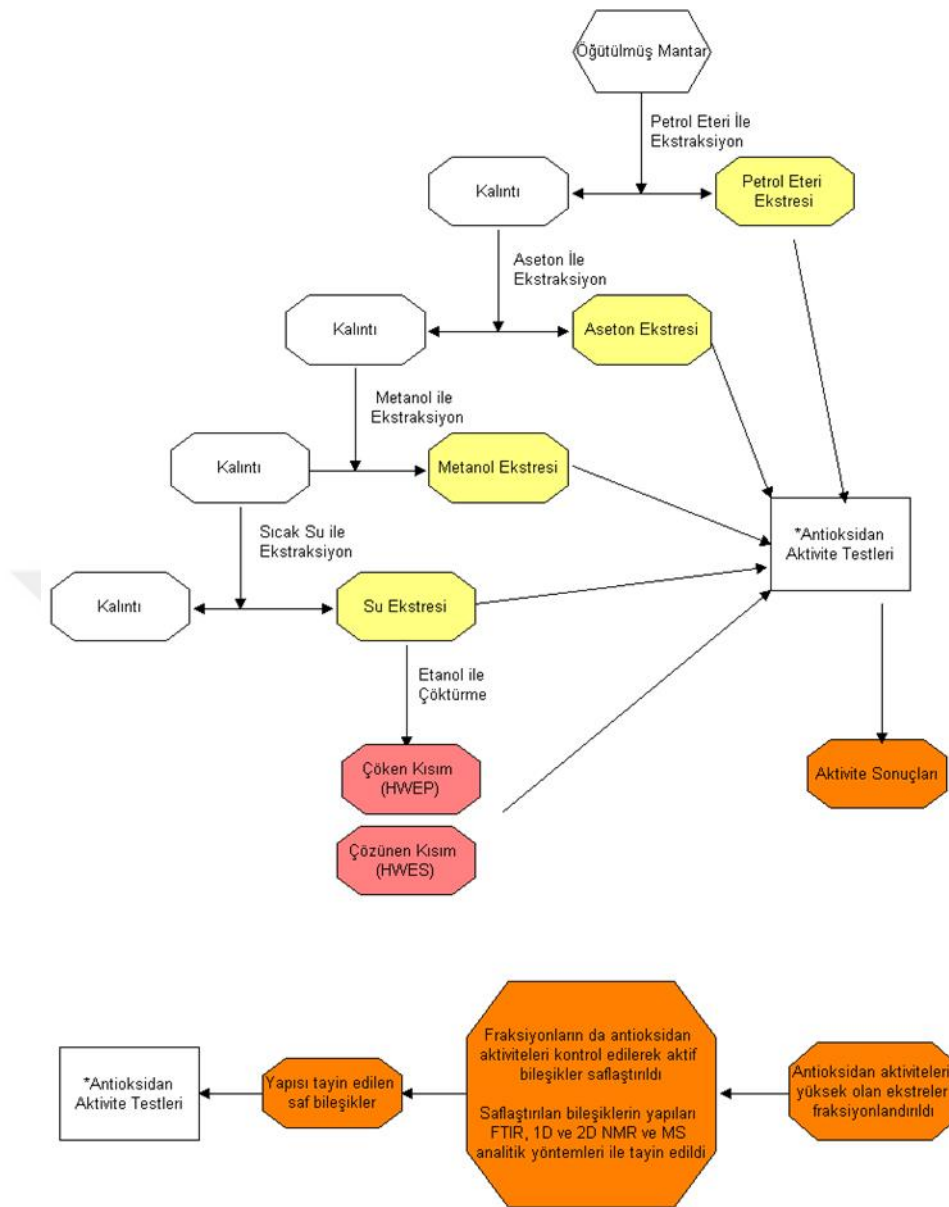
2.5.1. Toplam Antioksidan Aktivite Tayini (β-karoten-linoleik asit yöntemi)

Analiz örneklerinin antioksidan aktiviteleri β-karoten renk giderim metoduna göre belirlendi. Bu işlem için örneklerin 4000 ppm’lik stok çözeltileri hazırlandıktan sonra farklı konsantrasyonlarda 96 well plateye 40 μL alındı üzerine 160 μL β-karoten-linoleik asit emülsiyonu eklenir eklenmez 470 nm’de ardından 50⁰C’de inkübasyon yapıldı. Kontrol olarak etanol ile β-karoten-linoleik asit emilsiyonu kullanıldı. Her 30 dakikada bir, 470 nm’de spektrofotometre ile köre karşı absorbansları alındı. İnkübasyon, kontrolün minimum absorbansa ulaşmasıyla sonlandırıldı (Miller, 1971; Öztürk vd., 2007).

2.5.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Tayini

Analiz örneklerinin antiradikal aktivitesi DPPH serbest radikali giderim yöntemine göre belirlendi. Bu işlem için örneklerin stok çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda 40 µL örnekler 96 well plate alınarak üzerelerine 160 µL DPPH radikali çözeltisi eklendi. 30 dakika karanlıkta bekletilen karışımın 517 nm’de spektrofotometre ile köre karşı absorbansı okundu. (Blois, 1958).





Şekil 2.1. Mantarlardan biyoaktivite kontrollü aktif maddelerin izolasyonu ve yapı tayinleri

2.5.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi

Analiz örneklerinin ABTS katyon radikali giderim aktivitesi ABTS'nin potasyum persülfat ile muamelesinden oluşan $ABTS^{+}$ ile belirlendi. Bu işlem için örneklerin stok çözeltilerinden farklı konsantrasyonlarda 40 μ L örnekler 96 well plate alınarak üzerelerine 160 μ L $ABTS^{+}$ radikali çözeltisi eklendi ve 10 dakika inkübasyon

yapıldıktan sonra 734 nm’de spektrofotometre ile köre karşı absorbansı okundu (Re vd., 1989).

2.5.4. Metal Bağlama Aktivitesi

Metal bağlama aktivitesi ferrin-Fe²⁺ metoduna göre belirlendi (Decker ve Welch, 1990). Bu işlem için örneklerin farklı konsantrasyonlardaki stok çözeltilerinden 80 µL 96 well plate ye alındı ve 40 µL 0,2 M FeCl₂ ve 80 µL 0,5M ferren reaktifleri eklendi. 10 dakika inkübasyondan sonra 562 nm’de absorbansları okundu.

2.5.5. CUPRAC İndirgeme Gücü

Analiz örneklerinin Cu(II) indirgeme gücü Apak vd., (2004) metoduna göre belirlendi. 40 µL örneklerin stok çözeltilerinden alındı üzerine 1M pH=7.0 olan amonyum asetat tampon eklendi. Daha sonra 50 µL pH=7.0’de 7.49 mM neokuprin ile 50 µL pH=7.0’de 10mM Cu(II) eklendi ve 30 dakika sonra 450 nm’de köre karşı absorbansı okundu (Öztürk vd., 2007).

2.6. Hücre kültürüyle Antikanser Aktivitenin Belirlenmesi

2.6.1. Hücre kültürü

-86°C’lik derin dondurucu da saklanan östrojen reseptörlü fibroblast (L929) ile meme (MCF-7) ve akciğer (H1299) kanser hücreleri flasklara ekim yapılmak üzere çözüldü. Kriyotüpte bulunan hücreler falkon tüpe aktarıldı. Üzerine 1 ml medyum (%100 DMEM+%10 FetalBovine Serum+%1 Antibiyotik) ilave edildi. 3000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı. Dipte kalan hücrelerin üzerine her bir flask için 3,5 ml medyum ilave edilip homojen hale getirildikten sonra flasklara ekim yapılarak 37°C’de 2 gün inkübe edildi. Hücrelerin yeterli sayıya ulaşım ulaşmadığını belirlemek için otomatik hücre sayım cihazı (İnvitrogen-Countess) kullanıldı.

2.6.2. WST-1 ile sitotoksisitenin belirlenmesi

Sitotoksisiteyi belirlemek için WST-1 testi kullanıldı. Bu prosedürde WST-1 tetrazolyum tuzu, yalnızca canlı hücrelerde aktif olan ve mitokondrial respiratuar zincirde yer alan süksinat-tetrazolyum redüktaz tarafından suda çözünebilen formazan boyasına dönüştürüldü. Bu yöntemde bir örnekteki bu mitokondrial dehidrogenazın total aktivitesi, canlı hücrelerin artmasıyla yükseldi. Enzimin aktivitesinin artması, kültür medyumundaki metabolik olarak aktif hücrelerin sayısı ile doğru orantılı olarak formazan boyasının üretiminde ve miktarında artışa neden olmaktadır. Elisa-Reader kullanılarak absorpsiyon okundu.

Toksisite deneyi için 96 wellplate kullanıldı. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her kuyucukta 10×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama ayarlandı. 96 well plate'de her kuyucuğa 100 μ L hücre- medyum süspansiyonundan koyulup, 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda kuyucuklardaki vasatlar boşaltıldı. İlk kuyucuklar boş kalacak şekilde diğer kuyucuklara 150 μ L medyum koyuldu. Mantar ekstralarının medyum içerisinde hazırlanan 1mg/mL'lik stok çözeltiden 9.3, 18.7, 37.5, 75.0 μ g/mL konsantrasyonlarında (3 tekrarlı) yukarıda bahsedilen hücrelere uygulandı. Kontrol grubuna sadece medyum eklenip, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda fenol-red'siz medyum kullanılarak hazırlanan DMEM/F-12 medyumdan 200 μ L kuyucuklara koyulup, üzerine 10 μ L WST-1 çözeltisi ilave edildi. 37 °C de 4 saat inkübe edildikten sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 96 kuyucuklu plate'in absorbans yoğunluk değerleri mikroparka okuyucuda 420-480 nm'de okundu (Elkady AI. 2014). WST-1 toksisite testinde yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmedi. Kontrol grubunun canlılığı (absorbans değeri) %100 kabul edilerek diğer örneklerin canlılık yüzdeleri hesaplandı.

2.6.3. İkili boyama metodu ile apoptozun ve nekrozun belirlenmesi

İkili boyama metodu çekirdeği boyamakta ve bu sayede apoptozu ve nekrozu göstermektedir. Ribonükleaz A alınarak – 20°C'de saklanır (Sigma R-500). Ribonükleaz A sitoplazmik RNA'yı parçalamakta kullanılarak artifect boyanmalar ortadan kaldırılır. Hoechst boyaması +4 °C'da saklanır (33342) ve Apoptotik

hücrelerin çekirdeklerinin boyaması amaçlı kullanıldı. Bu sayede gerçek apoptotik hücreler belirlendi. Propidyumiyodür: +4 °C’de saklanır ve DNA’yı kırmızıya boyayarak nekrozu gösterir.

2.6.3.1. İkili boyama solüsyonunun hazırlanışı

Ribonükleaz A’dan 1ml PBS’de 10 mg RNA olacak şekilde hazırlandı. Hoechst ise 1 ml PBS’de 200 mikrogram olacak şekilde hazırlandı. PropidiumIodide 1mL PBS’de 100 µg olacak şekilde hazırlandı. Çalışma solüsyonunun hazırlanması: 10 mL PBS içine RNAaz stoktan 100 µL Hoechst stoktan 500 µL propidyumiyodür stoktan 100 µL ilave edilerek hazırlandı.

İkili boyama için 48 wellplate kullanıldı. Hücre sayımından sonra canlı hücre sayısına göre her kuyucukta 10×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapıldı. 48 wellplate’de her kuyucuga 100 µL hücre koyulur ve 24 saat süre ile inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltıldı. İlk kuyucuklar boş kalacak şekilde diğer kuyucuklara 150 µL medyum koyuldu. Mantar alkol ve su ektrelerinden 1mg/mL’lik stok çözeltilerden 9.3, 18.7, 37.5, 75 µg/mL konsantrasyonlarında (3 tekrarlı) alınarak L929 ile H1299 ve MCF-7 hücrelerine uygulandı. Kontrol grubuna sadece medyum eklenip, 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki medyum boşaltılıp ve her kuyucuga 70 µL ikili çalışma solüsyonu (doublestaining çalışma solüsyonu) eklenip, 48wellplate hiç ışık görmeyecek şekilde kapatılıp 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonunda floresan mikroskopta DAPI filtresi kullanılarak apoptoza uğramış hücrelerin ve FITC (480-520nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapıldı.

2.6.4. Kaspaz-3 İmmunositokimyasal metod ile apoptosiz belirlenmesi

Normalde apoptoza uğramayan kanser hücrelerinde kaspaz-3 proteini oluşmazken, apoptoza girmiş hücrelerde kaspaz-3 oluşur. Bu nedenle yapılan immünositokimyasal boyama ile kaspaz-3 proteinleri spesifik kaspaz antikoru ile boyanarak uygulama sonucu apoptoza girip girmedikleri belirlendi. Boyama işlemi sonucunda apoptoza girmemiş hücrelerin sitoplazmaları berrak, soluk mavi renkte

görünürken, apoptoza uğramış kanser hücrelerinin sitoplazması kahverengiye boyandı.

Yukarıda belirtilen 24 saat uygulama sonucunda öncelikle süpernatandaki yüzen kalkmış hücreler 15 mL'lik Falcon tüpe toplandı. Plate yüzeyinde yapışık olan hücreler süpernatanın alımını takiben, kuyucuklar 1 mL PBS ile 2 kez yıkandı, ardından 200 µL tripsin-EDTA eklenir, 5 dakika beklendi ve hücreler toplanıp aynı Falcon'a ilave edildi. 3000 devir/ daksantrifüj edilerek hücreler elde edildi. Santrifüj bittikten sonra süpernatanın aspire edilmesini takiben, pellet 1 mL PBS ile tek hücre süspansiyonu oluşturacak şekilde hazırlandı. Sitosantrifüjlam'ları (poli L lizinli) etiketlendi, hücrelerin toplanacağı bölge işaretlendi, santrifüj içine yerleştirildi, ardından 1 mL'lik hücre süspansiyonunun tamamı eklendi. 2.200 rpm'de 4 dakika sitosantrifüj edildi. Lam'lar çıkartılıp ve oda ısısında bir gece kurumaya bırakıldı. Formalin ile fikse edildi. Lamalar önce %0,2'lik Triton X 100 ile daha sonra PBS'de çözülmüş %8'lik BSA ile 1 saat muamele edildi. BSA hafifce lamellerin kenarından aspire edildi. Üzerine yıkama yapılmadan primer antikor (10 µL sulanmış kaspaz 3 alıp buna 990 µL PBS eklendi.) 100'ül pipetlendi. Buz üzerinde 1 saat bekletildi. Sekonder antikor uygulaması için her bir lamel üzerine Biotinden (link şişesi) 100 µL uygulandı ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. 2 mL PBS ile 2x3 dk. yıkanarak PBS aspire edildi. Her bir lamel üzerine Streptavidin HRP şişesinden 100 µL uygulandı ve oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Lamellerin kenarından Streptavidin dikkatlice aspire edildi. 2 mL PBS ile 2x3 dk yıkandı ve PBS aspire edildi. 100 µL DAB ile lameller muamele edildi (karanlıkta). Reaksiyon mikroskopta saat tutarak gözlendi. Kahverengi renkli boyanma gözlendiği zaman (yaklaşık 4-5 dk) DAB lı lameller distile su ile yıkandı (2-3 dk). Lameller üzerine 100 µL Hematoxilen uygulandı, 3-4 saniye kadar bekletip hemen önce çeşme suyu ile yıkandı ve daha sonrada 2x3 dk distile su ile yıkandı. Gliserol damlatıp mikroskop altında incelendi.

2.6.5. Hücre proliferasyonunun belirlenmesi

Flaskta çoğaltılan H1299 akciğer kanser, MCF-7 meme kanser ve L929 fibroblast hücrelerinin yeterli sayıya ulaştığı mikroskobik incelemeyle belirlendikten sonra içerisindeki medyum atıldı. 0,5 ml tripsin-EDTA eklenerek flask 3-4 dakika inkübatörde bekletildi. İnkübasyon sonrasında mikroskobik olarak hücrelerin flask

yüzeyinden ayrılıp ayrılmadıkları kontrol edildi. Hücrelerin yüzeyden ayrıldıkları mikroskopik olarak gözlemlendikten sonra, flaska medyum eklenerek hücreler falkon tüpe aktararak 3500 rpm’de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant kısmı uzaklaştırıldı ve tüpün dibinde kalan hücre pelleti üzerine 1 mL DMEM/F-12 medyum eklenerek ve süspanse edilerek hücre sayımı yapıldı. 96 well-plate’in her kuyucuğunda 5×10^3 hücre olacak şekilde hesaplama yapılarak ekildi. Well-plate’in her well’ine 100’er μ L medyum koyuldu. Well-plate etüvde bulunan xCELLigence’e yerleştirildikten sonra plate ile cihazın aynı sıcaklığa ulaşması için 10 dakika beklendi. 1 dakika cihazda background okuması yapıldıktan sonra well-plate çıkarıldı. Tüm kuyucuklara 100’er μ L hücre eklendi. Tekrar well-plate etüve yerleştirilip 10 dakika beklendi. 10 dakika sonunda okuma başlatıldı. Hücrelerin plate’e tutunması ve çoğalması için 24 saat bekletildi. 24 saat sonunda hücrelerin büyüme fazına geçtiği belirlendi. Well-plate etüvden çıkarıldı. Kuyucuklardaki medyumlar boşaltıldı. Kuyucuklara, 37,5 ve 18,75 μ g/mL konsantrasyonlarında örneklerin her biri ayrı ayrı eklendi. Örnekler 3 tekrarlı olarak çalışıldı. Plate’teki son 4 kuyucuk kontrol grubu olarak belirlendi ve sadece medyum eklendi. Well-plate etüve yerleştirilip 100 saat inkübe edildi. Bu çalışmada mantar ekstraktlarının daha önceki çalışmalarda etkin dozları belirlenerek minimum doz çalışıldı. Belirtilen süre içerisinde kontrol grubu ile karşılaştırmalı olarak zamana karşı empedans ölçümü ile proliferasyonu ölçüldü.

2.7. GC-MS kullanılarak şekerlerin tanımlanması

Üzerine çalıştığımız mantarlardan elde edilen ve ^1H -NMR spektrumu alınarak şeker olduğu tespit edilen saf maddeleri tanımlamak amacıyla GC-MS, NIST/WILEY 2005 kütüphanesi ve şahit maddeler kullanıldı. Bu amaçla saf maddeler piridin ile çözülerek silillendi. Silil türevine dönüştürülen maddeler GC-MS’e verildi.

2.7.1. Silillenme işleminin yapılması

1 mg madde 10 µL susuz piridinde çözüldü, üzerine 15 µL Bis(trimetisilil)trifloroasetamit eklendi ve 20 dk 80 °C de etüvde bekletildi. 100 µL Kloroform eklenerek seyreltildi ve GC-MS'e 0,2 µL injeksiyon yapıldı.

2.7.2. GC-MS analiz şartları

Kolon	: DB-1 kapiler kolon (0,25mm I.D. x 30 m, 0,25 µm)
Taşıyıcı Gaz	: Yüksek saflıkta He (%99.999)
Enjeksiyon sıcaklığı	: 280°C
Kolon sıcaklığı	: Fırın sıcaklığı 100°C de 10 dakika bekletildi. Daha sonra 300°C ye 4°C/dk hızla çıkarıldı ve 300°C'de 10 dakika bekletildi (Toplam 70 dakika).
Split Oranı	: 1:20
İyon Kaynağı sıcaklığı	: 150 °C
Elektron enerjisi	: 70 eV
Kütle aralığı	: 28-650 <i>m/z</i>
Scan aralığı	: 0.01
Enjeksiyon miktarı	: 0,2 µL

2.8. Preperatif HPLC-UV-RI Kullanarak Biyoaktif Bileşenlerin İzolasyonu

Ekstrelerin fraksiyonlandırılmasından elde edilen ve antioksidan aktivite gösteren fraksiyonlardan madde saflaştırılması için Preperatif Recycle HPLC kullanıldı. Preperatif HPLC şartları aşağıda verilmektedir.

2.8.1. Preparatif HPLC çalışma şartları

Kolonlar: Maddenin polaritesine göre Farklı tip kolon sistemleri kullanıldı

Kolon 1: ODS–L–80, C₁₈ kolon (250 x 20 mm ID; partikül çapı 5 µM)

Kolon 2: GS-320 (Size elution Chromatography Limit, 40.000 Da; İçerik: %70 polivinil alkol ve %30 C₁₈; 500 x 20 mm ID)

Kolon 3: W-253 (Size elution Chromatography Limit, 50.000 Da; İçerik: %70 methacrylate polymer ve %30 C₁₈; 500 x 20 mm ID)

Kolon 4: W-254 (Size elution Chromatography Limit, 400.000 Da; İçerik: %70 methacrylate polymer ve %30 C₁₈; 500 x 20 mm ID)

Dedektörler: UV (254 nm) ve Refraktif İndeks

Çözücüler: Maddenin polaritesine göre Farklı tip çözücü sistemleri kullanıldı

Çözücü 1: Metanol: Su (1:1)

Çözücü 2: Metanol: Su (1:9)

Çözücü 3: Metanol: Su (2:8)

Çözücü 4: Metanol: Su (1:0)

Çözücü 5: Metanol: Su (0:1)

Çözücü 6: Metanol: Su (7:3)

Çözücü 7: Metanol: Su (9:1)

Enjeksiyon miktarı: 3 mL (maksimum 50 mg)

2.9. Diğer Kromatografik Yöntemler

2.9.1. Kolon kromatografisi

Antioksidan aktivite gösteren ekstreleri fraksiyonlandırmak ve bu fraksiyonlardan saf maddeler elde etmek amacıyla üç çeşit dolgu maddesi kullanıldı. Bu dolgu maddeleri silika jel, Sepherose 6CLB ve Sephadex LH-20'dir.

Antioksidan aktivite gösteren ekstreleri fraksiyonlandırmak için kolon kromatografisinde silika jel 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 silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi.

Elüsyona %100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla kloroform, 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 silika jelin yanı sıra poliamit ve Sephadex LH-20 adsorban olarak kullanıldı.

Antioksidan aktivite gösteren fraksiyonlardan saf madde elde etmek için Sephadex LH-20 içeren kolonlar kullanıldı. Bu yöntemde karışımın polaritesine göre iki çözücü sistemi kullanıldı: apolar özellik gösteren fraksiyonlar için hekzan: kloroform:metanol (7:4:1) çözücü sistemi, polar özellik gösteren fraksiyonlar için ise % 100 metanol kullanıldı. Fraksiyonlar kolonda kullanılacak çözücü sisteminde çözülerek sıvı halde Sephadex LH-20 ile doldurulmuş kolonun üst kısmından tatbik edildi. Elüsyon tek bir çözücü sistemi kullanılarak sonlandırıldı. Bazı fraksiyonlar ise poliamitin adsorban olarak kullanıldığı kolonlarda ayrıldı.

2.9.2. İnce tabaka kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde (İTK), silika jel hazır plaklardan (20 x 20 cm) yararlanıldı. Antioksidan aktivite gösteren ekstraların kolon kromatografisi ile ayrılmasıyla elde edilen fraksiyonların karşılaştırılmasında İTK plakları kullanıldı. Maddeleri saflaştırmak için preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

2.10. Spektroskopik Yöntemler

2.10.1. NMR spektroskopisi

Kromatografik yöntemlerle saflaştırılan maddelerin ^1H NMR, ^{13}C NMR, DEPT, COSY, HMBC, HSQC spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform (CDCl_3), döterometanol (CD_3OD), döterosu (D_2O) ve döterodimetilsülfoksit ($\text{DMSO-}d_6$) kullanıldı.

2.10.2. Kütle spektroskopisi

Elektron impact (EI), elektron spin ionization (ESI), Fast Atom Bombardment (FAB) yöntemleri kullanılarak saf maddelerin spektrumları alındı.

2.10.3. FTIR Spektroskopisi

Thermo marka FTIR cihazı kullanılarak saf maddelerin kızıl ötesi spektrumları elde edildi.

2.10.4. Spektrofotometre ile toplam karbonhidrat tayini

Polisakkarit ekstralarının fraksiyonlarını birleştirmek amacıyla fenol-sülfirik asit metodu kullanıldı. 2 ml örnek üzerine 1 ml % 5 lik fenol çözeltisi ve takibinde 5 ml konsantre asit çözeltisi eklendi. 2 dakika vortexlendikten sonra renk oluşumu için 20 dakika oda sıcaklığındaki su banyosunda inkubasyonu yapıldı. Daha sonra UV-Vis ile 490 nm de absorbansı okundu (DuBois vd., 1956)

2.11. İstatistik Hesaplamalar

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

3. BULGULAR

3.1. Ekstraksiyon sonuçları

Petrol eteri, aseton, methanol ve su ekstraktlarının miktarları ve verimleri Çizelge 3.1’de verilmektedir. Elde edilen ekstraktların antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri belirlenerek aktif ekstraktlardan madde elde etmek için fraksiyonlandırıldılar.

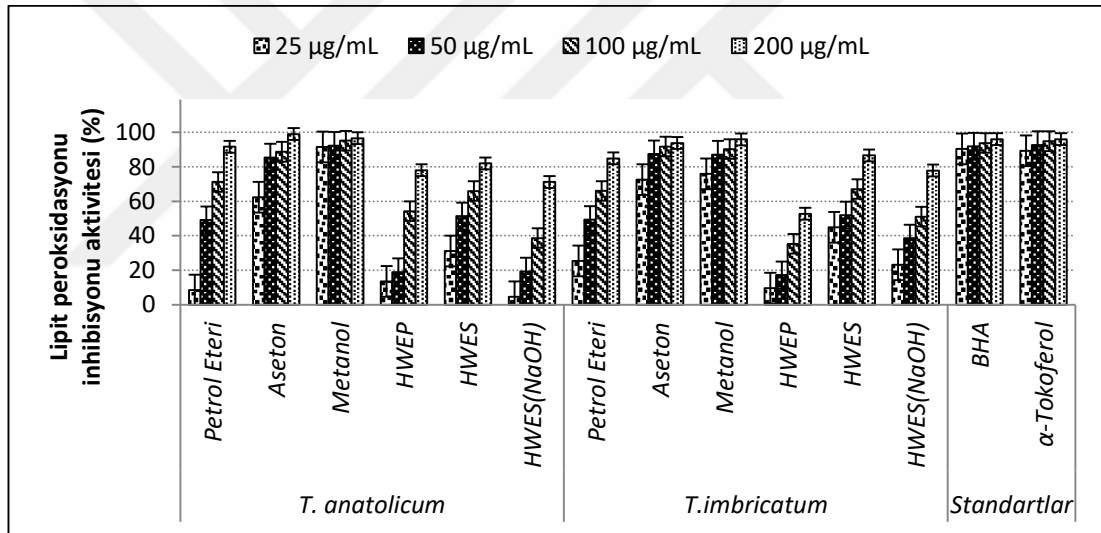
Çizelge 3.1. *Tricholoma anatolicum* ve *T. imbricatum* mantarların ekstraksiyon verileri

	Mantar Ekstresi	Ekstre Miktarı (Gram)	% Verim
<i>T. anatolicum</i> (1418 g)	Petrol eteri	19,1	1,35
	Aseton	22,2	1,56
	Metanol	122	8,62
<i>T. anatolicum</i> Su Ekstraksiyonu (150 g)	HWEP	10,5	6,98
	HWEP (NaOH)	1,69	1,13
	HWES	23,9	16,0
	HWES (NaOH)	5,73	3,82
<i>T. imbricatum</i> (83 g)	Petrol eteri	2,34	2,82
	Aseton	1,32	1,6
	Metanol	14,6	17,6
<i>T. imbricatum</i> Su Ekstraksiyonu (52 g)	HWEP	3,99	7,71
	HWEP (NaOH)	1,44	2,77
	HWES	14,6	28,2
	HWES (NaOH)	2,77	5,33

3.2. Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

3.2.1. β -Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları (lipit peroksidasyon inhibisyon aktivitesi)

Mantarların petrol eteri, aseton ve metanol ekstreleri ve su ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi (lipit peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi) β -karoten renk açılımı yöntemi kullanılarak belirlendi. *Tricholoma anatolicum* aseton ve metanol ekstreleri standartlara göre daha yüksek, *Tricholoma imbricatum* mantarlarının aseton ve metanol ekstralarının toplam antioksidan aktivitesi standartlara yakın değerlere sahip olduğu görüldü. Su ekstralarında ise aynı konsantrasyonlarda HWES ekstresinin daha yüksek lipid peroksidasyonu inhibisyonuna rastlandı. En düşük inhibisyon aktivitesi *Tricholoma anatolicum* HWES (NaOH) ekstresinde bulundu.



Şekil 3.1. *Tricholoma anatolicum* ve *T. imbricatum*, mantar türlerinin β -karoten renk açılımı yöntemiyle lipit peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)

3.2.1.1. *Tricholoma anatolicum* mantarının lipit peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi sonuçları:

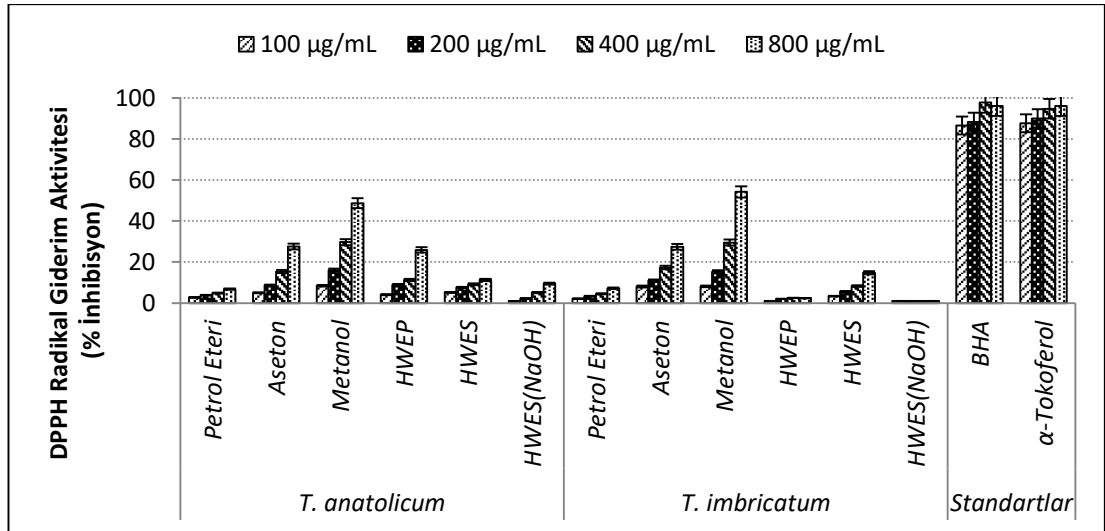
Bu yöntemde aseton ve metanol ekstreleri ile petrol eteri ekstresi ve HWES lipit peroksidasyonunu kayda değer biçimde inhibe etti. Tüm örneklerde artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlendi. İnhibisyon aktivitesi sırası metanol>aseton>petrol eteri>HWES>HWEP>HWES (NaOH) olarak azaldığı izlendi. Metanol ve aseton ekstrelerinin IC₅₀ değerleri 25 µg/ml'nin altında bulundu. Petrol eteri ve HWES ekstrelerinin ise IC₅₀ değerleri 50 µg/mL'nin altında bulundu (Şekil 3.1). Bu nedenle bu aktivite sonuçlarına göre Metanol, Aseton ve HWES ekstrelerinin öncelikle çalışılması düşünüldü.

3.2.1.2. *Tricholoma imbricatum* mantarının lipit peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi sonuçları

Bu yöntemde petrol eteri, aseton ve metanol ekstreleri ile HWES ve HWES(NaOH) ekstresi lipit peroksidasyonunu kayda değer biçimde inhibe ettiği görüldü. Tüm örneklerde artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlendi. İnhibisyon aktivitesi sırası metanol > aseton > HWES > petrol eteri >HWES (NaOH) >HWEP olarak azaldı. Bu nedenle bu aktivite sonuçlarına göre metanol ve aseton ile HWES, ekstrelerinin öncelikle çalışılması düşünüldü.

3.2.2. DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Sonuçları

Mantarların petrol eteri, aseton ve metanol ekstreleri ve su ekstrelerinin serbest radikal giderim aktivitesi DPPH• giderim yöntemi kullanılarak belirlendi. *Tricholoma anatolicum* ve *T. imbricatum*, mantarlarının ekstrelerinin serbest radikal giderim aktivitesi karşılaştırıldığında metanol ekstrelerinin en iyi radikal süpürücü etkiye sahip oldukları belirlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. *Tricholoma anaticum* ve *T. imbricatum* mantar türlerinin DPPH yöntemiyle serbest radikal giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)

3.2.2.1. *Tricholoma anaticum* mantarının DPPH radikalini giderme aktivitesi sonuçları

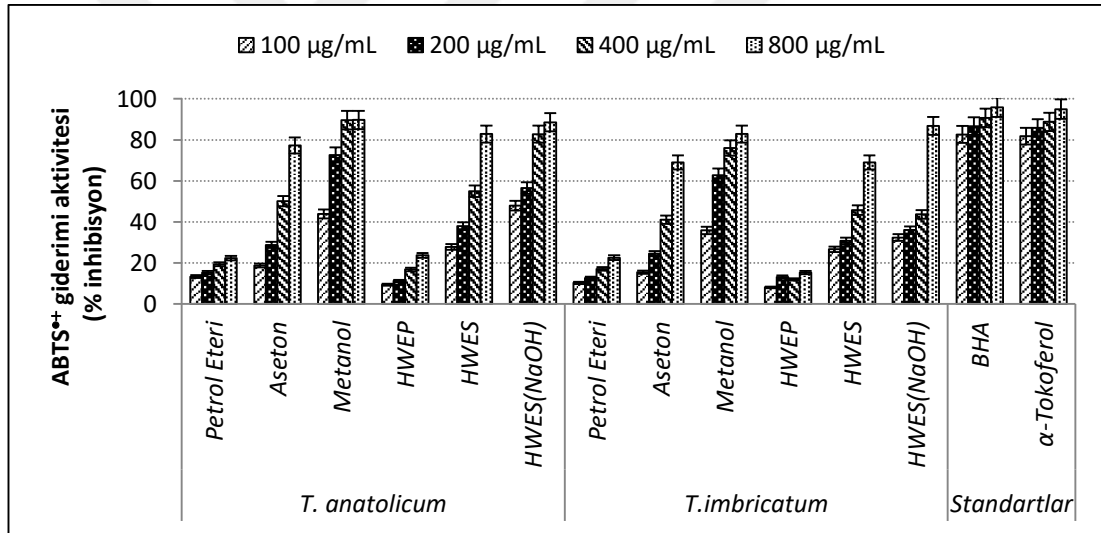
Bu yöntemde aseton ve metanol ekstraktları ve HWEP kayda değer biçimde aktivite gösterdi. Antioksidan standartlar kadar aktivite gösterememelerine rağmen, tüm örneklerde artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlenen serbest radikal giderim aktivitesi sırasıyla metanol>aseton> HWEP> HWES>petrol eteri>HWES (NaOH) olarak izlendi (Şekil 3.2). Bu nedenle bu aktivite sonuçlarına göre metanol, aseton ve HWES ekstraktlarının öncelikle çalışılması düşünülmüştür. Ekstre miktarları yeterlidir (Çizelge 3.1).

3.2.2.2. *Tricholoma imbricatum* mantarının DPPH radikalini giderme aktivitesi sonuçları

Bu yöntemde *T. imbricatum*'un metanol ekstresi DPPH serbest radikalini kayda değer biçimde inhibe etmektedir. Antioksidan standartlar kadar aktivite gösterememesine rağmen artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlenen serbest radikal giderim aktivitesi metanol > aseton > HWES> petrol eteri > HWEP > HWES (NaOH) olarak sıralandı (Şekil 3.2).

3.2.3. ABTS Katyon Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi Sonuçları

Çalışılan her mantarın petrol eteri, aseton ve metanol ekstreleri ve su ekstrelerinin serbest radikal giderim aktivitesi ABTS⁺ giderim yöntemi kullanılarak belirlendi. *Tricholoma anatolicum*'un metanol ekstresinin, *Tricholoma imbricatum*'un metanol ve HWES (NaOH) ekstrelerinin aynı konsantrasyonlarda antioksidan standartlar olan BHA ve α -tokoferol ile yarıştıkları görüldü. *Tricholoma anatolicum* ve *Tricholoma imbricatum* mantarlarının ekstrelerinin serbest radikal giderim aktivitesi karşılaştırıldığında *T. anatolicum*'un metanol ekstresi, *T. imbricatum*'un metanol ve HWES (NaOH) ekstreleri en iyi ABTS⁺ radikali süpürücü etkiye sahip oldukları belirlendi. Su ekstrelerinde ise aynı konsantrasyonlarda tüm mantarların HWES ekstresinde daha yüksek aktiviteye rastlandı. En düşük aktivite ise HWEP ekstrelerinde bulundu (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. *Tricholoma anatolicum* ve *T. imbricatum* mantar türlerinin ABTS yöntemiyle radikal giderim aktivitesi (n=3, p<0,05)

3.2.3.1. *Tricholoma anatolicum* mantarının ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi sonuçları

Bu yöntemde başta metanol ve aseton ekstreleri ile HWES ekstresi kayda değer biçimde aktivite gösterdi. Antioksidan standartlar kadar aktivite gösterememelerine rağmen, tüm örneklerde artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlenen katyon radikal giderim aktivitesi metanol>HWES>aseton>HWES (NaOH) >HWEP>

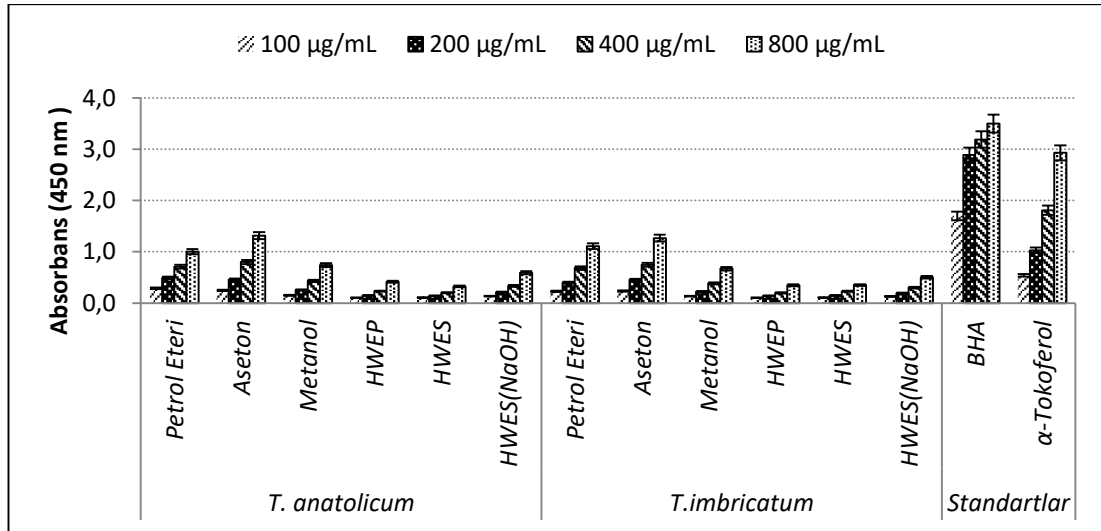
petrol eteri olarak sıralandı (Şekil 3.3). Bu nedenle bu aktivite sonuçlarına göre metanol, aseton ve HWES ekstralarının öncelikle çalışılması düşünüldü.

3.2.3.2. *Tricholoma imbricatum* mantarının ABTS katyon radikalini giderme aktivitesi sonuçları

Bu yöntemde *T. İmbricatum*'un metanol ekstresi ile HWES(NaOH) su ekstresinin ABTS^{•+} giderim aktivitesi kayda değer biçimde inhibe etmektedirler. Tüm örneklerde artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlenen katyon radikal giderim aktivitesi sırasıyla, HWES(NaOH) > metanol > aseton > HWES > petrol eteri > HWEP olarak azaldı (Şekil 3.3). Bu nedenle bu aktivite sonuçlarına göre HWES ve metanol ekstralarının öncelikle çalışılması düşünüldü.

3.2.4. Cu (II) indirgeme Aktivitesi (CUPRAC) Yöntemi Sonuçları

Mantaların petrol eteri, aseton ve metanol ekstraları ve su ekstralarının indirgeme gücü, CUPRAC yöntemi kullanılarak belirlendi. *Tricholoma anatolicum* ve *T. imbricatum* aseton ve metanol ekstralarının aynı konsantrasyonlarda yarıştıkları izlendi. *Tricholoma anatolicum* ve *T. imbricatum* mantarlarının ekstralarının indirgeme güçleri karşılaştırıldığında *T. anatolicum*'un aseton ekstresinin, *T. imbricatum*'un aseton ve petrol eteri ekstralarının en iyi indirgeme gücüne sahip oldukları belirlendi. Su ekstralarında ise aynı konsantrasyonlarda tüm mantarların HWES ekstresinde izlenen indirgeme gücü daha önceki testleri de destekledi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. *Tricholoma anaticum* ve *T. imbricatum* mantar türlerinin CUPRAC yöntemiyle Cu^{2+} indirgeme gücü aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)

3.2.4.1. *Tricholoma anaticum* mantarının CUPRAC aktivitesi sonuçları

Bu yöntemde aseton ve metanol ekstraları kayda değer aktivite gösterdi. Antioksidan standartlar kadar aktivite gösterememelerine rağmen, tüm örneklerde artan konsantrasyonla absorbanslarının da arttığı izlenen indirgeme gücü sırasıyla aseton> petrol eteri> metanol> HWES> HWES (NaOH) >HWEP olarak azaldı (Şekil 3.4). Bu nedenle bu aktivite sonuçlarına göre önceki metotları desteklercesine aseton, metanol ve HWES ekstralarının öncelikle çalışılması düşünüldü.

3.2.4.2. *Tricholoma imbricatum* mantarının CUPRAC sonuçları

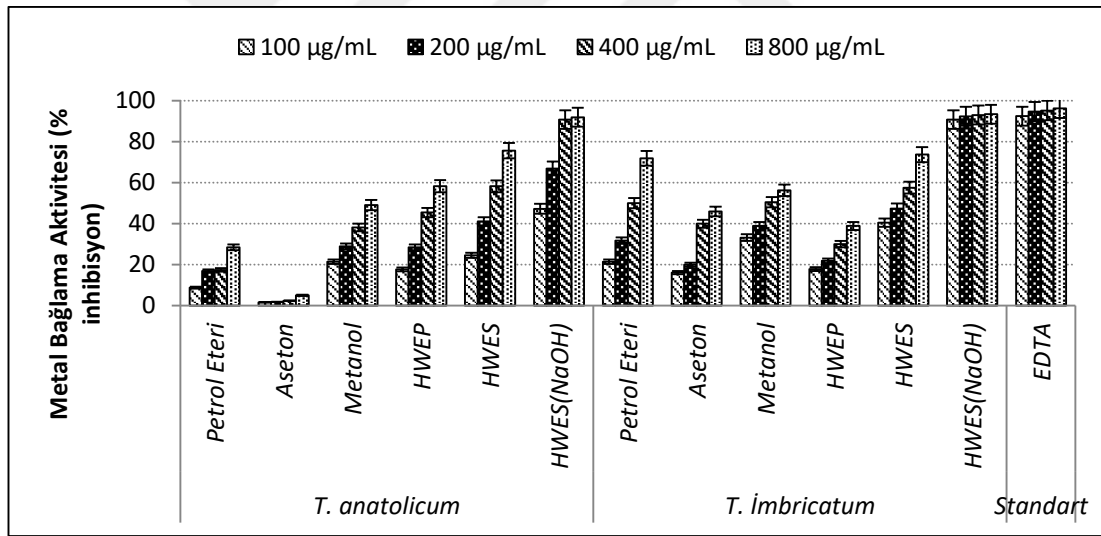
Bu yöntemde mantarın aseton, petrol eteri ve metanol ekstralarının indirgeme gücü kayda değer biçimde yüksektir. Tüm örneklerde artan konsantrasyonla absorbanslarının da arttığı izlenen indirgeme gücü aktivitesi, sırasıyla aseton>petrol eteri>metanol>HWES (NaOH)>HWES>HWEP olarak azaldı (Şekil 3.4). Bu aktivite sonuçlarına göre önceki aktivite metotlarını desteklercesine aseton, metanol ile HWES ekstralarının öncelikle çalışılması düşünüldü.

3.2.5. Metal Bağlama Aktivitesi Yöntemi Sonuçları

Mantaların petrol eteri, aseton ve metanol ekstreleri ve su ekstrelerinin metal bağlama aktivitesi Fe(II) iyonunu bağlama kabiliyetini ölçen Ferrin-Fe(II) yöntemi kullanılarak belirlendi. su ekstrelerinde ise aynı konsantrasyonlarda tüm mantarların HWES ekstrelerinde daha yüksek aktiviteye rastlandı (Şekil 3.5).

3.2.5.1. *Tricholoma anatolicum* mantarının metal bağlama aktivitesi sonuçları

Bu yöntemde başta metanol ekstresi ile HWES ekstreleri ve HWEP ekstresi kayda değer biçimde aktivite gösterdi. EDTA kadar aktivite gösterememelerine rağmen, tüm örneklerde artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlenen metal bağlama aktivitesi HWES (NaOH)>HWES>HWEP>metanol>petrol eteri>aseton olarak sıralandı (Şekil 3.5). Bu nedenle bu aktivite sonuçlarına göre metanol ve HWES ekstrelerinin öncelikle çalışılması düşünüldü.



Şekil 3.5. *Tricholoma anatolicum* ve *T. imbricatum* mantar türlerinin Fe²⁺-Ferrin yöntemiyle metal bağlama aktivitesi (n=3, p<0,05)

3.2.5.2. *Tricholoma imbricatum* mantarının metal bağlama aktivitesi sonuçları

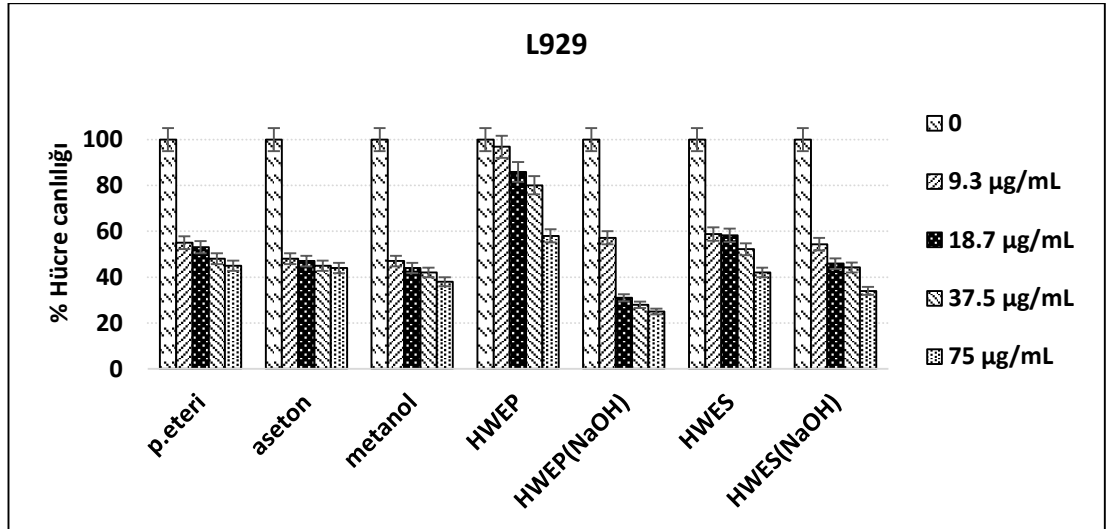
Bu yöntemde petrol eteri, metanol ve HWES ekstrelerinin metal bağlama aktivitesi kayda değer biçimde yüksek olduğu izlendi. EDTA kadar aktivite gösterememelerine rağmen, tüm örneklerde artan konsantrasyonla inhibisyonların da arttığı izlenen

metal bağlama aktivitesi sırasıyla HWES(NaOH)>HWES>petrol eteri>metanol>aseton>HWEP olarak azaldı (Şekil 3.5). Bu nedenle bu aktivite sonuçlarına göre metanol ile HWES ekstralarının öncelikle çalışılması düşünüldü.

3.3. Sitotoksik Aktivite Sonuçları

L929 (fibroblast), MCF-7 (meme) ve H1299 (akciğer) kanser hücre hatlarında ekstraların sitotoksik etkileri WST-1 ile tayin edildi. Sonuçlar incelendiğinde; ekstraların L929 ile MCF-7 ve H1299 kanser hücre hatlarında toksik etkiye sahip olduğu belirlendi. Toksisitenin konsantrasyona bağlı olarak değiştiği ve konsantrasyon arttıkça toksisitenin arttığı görüldü. Özellikle, 50 µg/mL üzerinde hücre canlılığının MCF-7 hücre hattında % 10'lara kadar düştüğü gözlemlendi. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda hücrelerde morfolojik değişikliklerin 4. saatten itibaren başladığı gözlemlendi. Yüksek konsantrasyonlarda (75 µg/mL) hücrelerin tamamına yakınının 14. saatte plate tabanından kalktığı, fakat mitekondrial aktivitelerinin 24 ve üzerinde devam ettiği gözlemlendi.

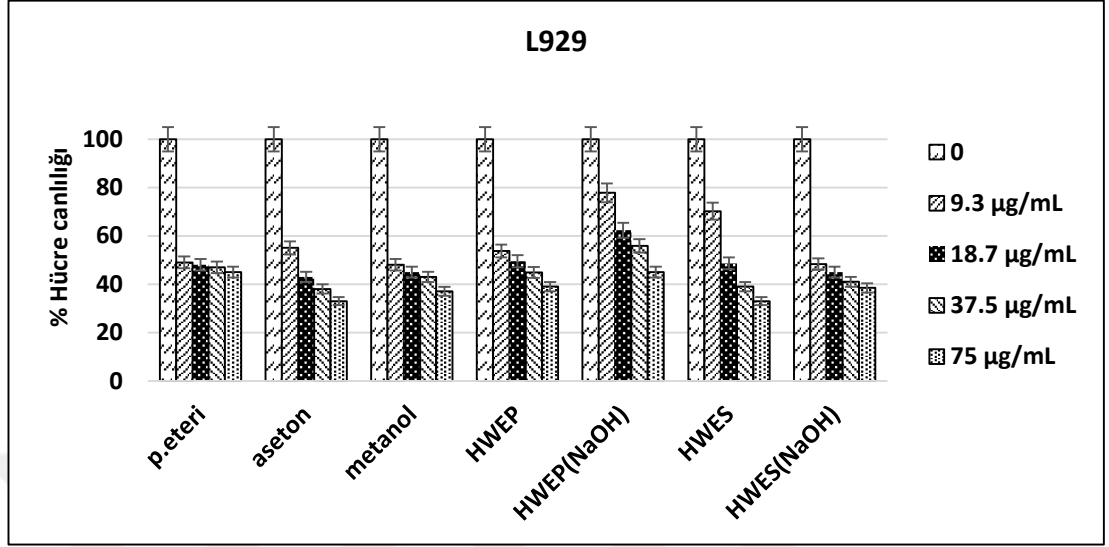
Mantar ekstralarının, L929 hücrelerine sitotoksikite sonuçları Şekil 3.6 ve 3.7'de verilmektedir.



Şekil 3.6. *T.anatolicum* 'un ekstralarının fibroblast hücre hattı (L929) üzerindeki sitotoksik etkileri

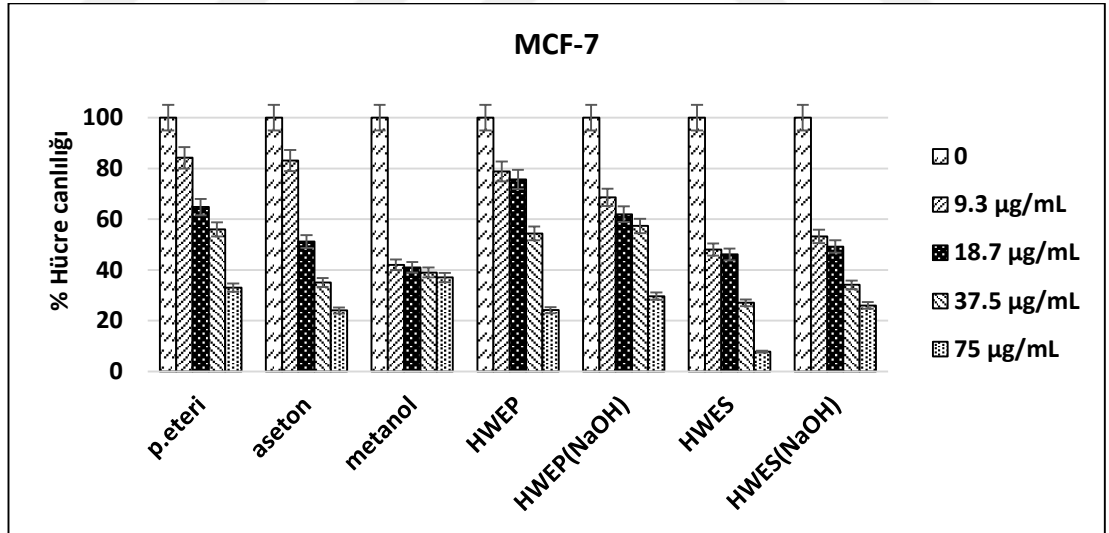
Şekillerde görüldüğü gibi toksik etkisinin 9,3 µg/mL konsantrasyondan itibaren başladığı görülmekte olup bu konsantrasyonda hücre canlılığının %50-90 arasında

değiştii görüldü. Fakat yüksek konsantrasyonlarda 37,5-75,0 µg/mL hücre canlılığı %15-40 arasında değişti.



Şekil 3.7. *T. imbricatum* mantarı eksterelerinin hücre hattı (L929) üzerindeki sitotoksiteleri

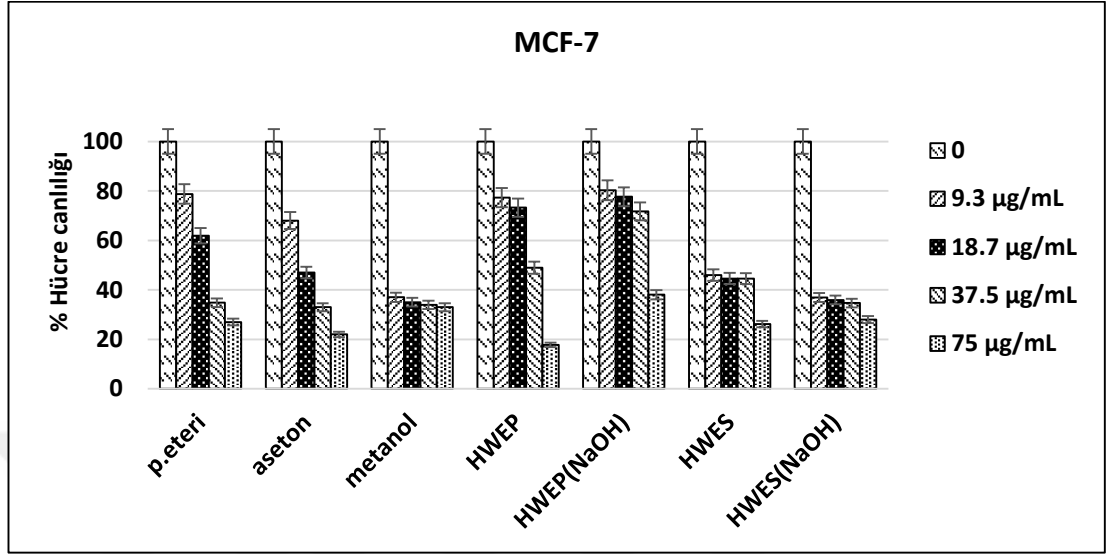
Mantar ekstrelerinin MCF-7 meme kanseri hücre hatlarına karşı sitotoksiste sonuçları Şekil 3.8 ve 3.9’da verilmektedir.



Şekil 3.8. *T. anatolicum*’un eksterelerinin meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki sitotoksiteleri

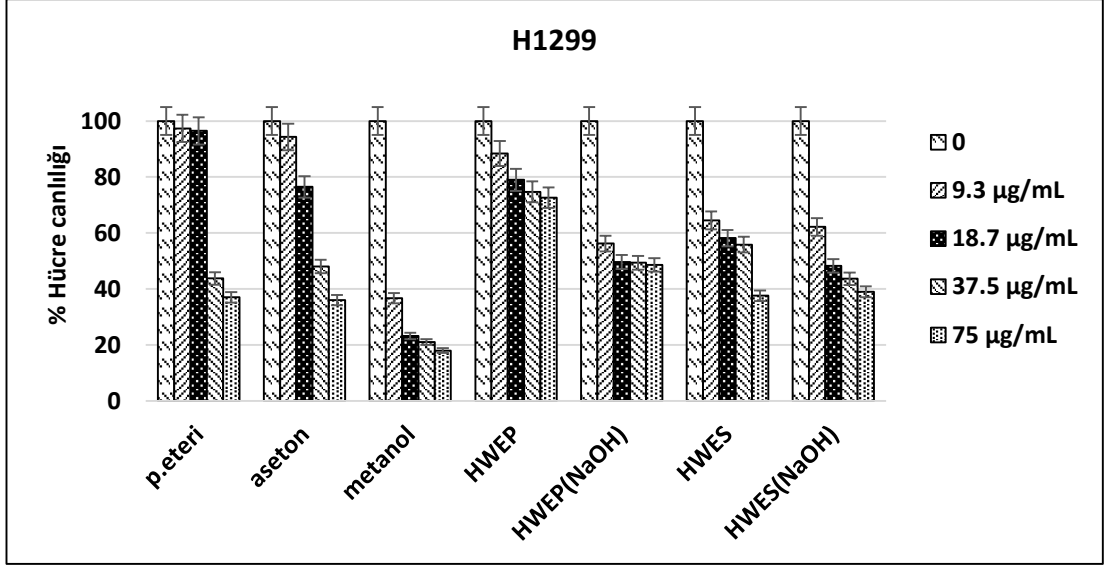
Toksik etki 37,5 µg/mL konsantrasyonda genel olarak başlarken toksik etkinin yüksek konsantrasyonlarda % 20’lere kadar düştüğü gözlemlendi. Genel olarak

bakıldığında fibroblastlara göre toksik etkinin çok daha yüksek olduğu görüldü. Özellikle metanol, HWES ve HWES(NaOH) ekstrelerinin toksik etkisinin diğerlerine göre daha yüksek olduğu izlendi.



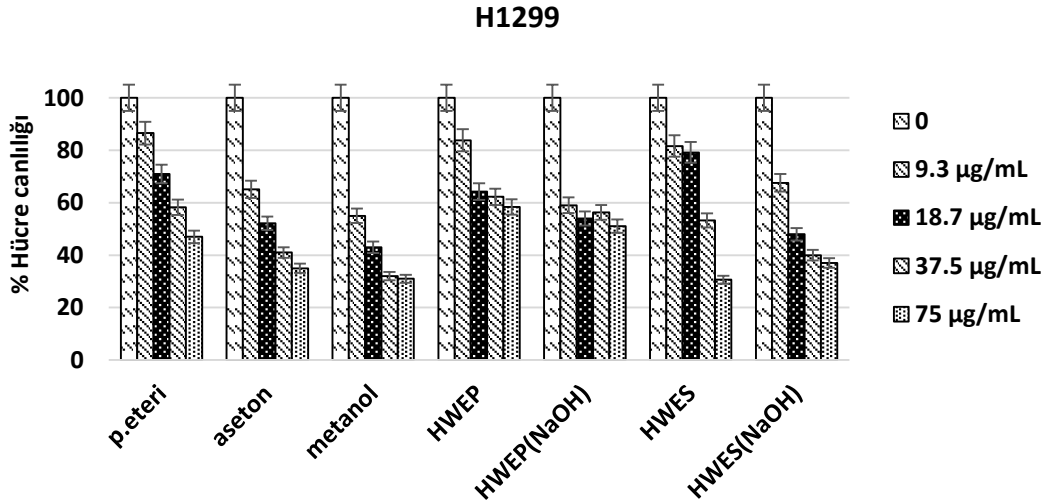
Şekil 3.9. *T. imbricatum*'un ekstrelerinin meme kanseri hücre hattı (MCF-7) üzerindeki sitotoksiteleri

Mantar ekstrelerinin H1299 akciğer kanser hücre hattına karşı sitotoksite sonuçları Şekil 3.10 ve 3.11'de verilmektedir. Genel olarak bakıldığında toksisitenin diğer hücre hatlarına göre daha düşük olduğu görüldü. Fakat metanol ekstrelerinin H1299'a karşı toksik etkisinin en yüksek olduğu söylenebilir. H1299 hücre hattı adriamycin kanser ilacına karşı dirençli bir hücre hattı olduğu düşünülürse elde edilen sonuçların oldukça başarılı olduğu görüldü. Özellikle metanol ekstrelerinin 18,75 µg/mL konsantrasyondan itibaren hücre canlılığı %40'ın altına düşmektedir (Şekil 3.10 ve 3.11). Ayrıca petrol eteri, aseton ve HWES(NaOH)'ın yüksek konsantrasyonlarında toksik etkinin yüksek olduğu görüldü. Bunların dışındaki ekstrelerin H1299 hücre hattına çok etkili olduğu söylenememektedir.



Şekil 3.10. *T.anatolicum*'un ekstrlerinin akciğer kanseri hücre hattı (H1299) üzerindeki sitotoksiteleri

Sonuç olarak ekstrlerin en fazla toksik etkiyi MCF-7 hücre hattına karşı, ikinci olarak yüksek konsantrasyonlarda fibroblast hücrelerine karşı toksik etki gösterdikleri söylenebilir. Buna ilaveten methanol ekstrlerinin ilaç dirençli H1299 akciğer kanser hücre hattına karşı yüksek toksik etki gösterdiği görüldü.



Şekil 3.11. *T. imbricatum*'un ekstrlerinin akciğer kanseri hücre hattı (H1299) üzerindeki sitotoksiteleri

3.4. Apoptotik–Nekrotik İndeks Çalışmalarının Sonuçları

3.4.1. Apoptoz ve nekroz sonuçları

Mantar ekstralarının (Çizelge 3.1) L929 fibroblast ile MCF-7 ve H1299 kanser hücre hatlarındaki % apoptotik etkisi ikili boyama ve kaspaz-3 immünohistokimyasal yöntem olmak üzere iki farklı yöntem ile belirlendi. Nekrotik etki (%) ise ikili boyama metodu ile belirlendi. Apoptotik yüzdelere hesaplanırken ikili boyama ve kaspaz-3 boyama sonuçlarının ortalaması alındı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2 ile Çizelge 3.7’de verilmektedir. Apoptoz ve nekroz boyamaları ise Şekil 3.12 - 3.16 arasında verilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre; apoptotik oranın genel olarak konsantrasyona bağlı olarak arttığı gözlenmekle birlikte bütün ekstraların sonuçlarının aynı olmadığı görüldü. Hücre bazında bakıldığında genel olarak MCF-7 hücre hattında diğerlerine göre apoptotik oranın dağılımının daha yüksek olduğu görülmektedir. Fakat genel olarak bakıldığında H1299 hücre hattında apoptotik oranların yüksek olmadığı görülmektedir. Bu aslında normal bir sonuç olarak görülebilir, çünkü bu hücre hattı kanser ilaçlarına karşı dirençli bir hattır. Buna rağmen, özellikle HWES (NaOH) örneğinde %40’dan fazla oranda apoptoz görülmüş olup bu oranın % 68’lere kadar arttığı izlendi. Elde edilen bu sonuç oldukça ilginç bir sonuçtur. Diğer taraftan ekstraların normal hücre hattı olan fibroblast hücrelerinde de %36’ya yakın apoptoz ve yine yüksek oranda nekroz görülmesi istenilen bir sonuç değildir. Buna ilaveten nekrotik etki değerlendirildiğinde toksisiteye paralel, konsantrasyona bağlı arttığı izlenmektedir. Özellikle yüksek konsantrasyonlarda yüksek nekrotik etki, apoptotik etkinin düşmesine neden olmaktadır.

3.4.1.1. Mantar ekstralarının fibroblast hücrelerindeki (L929) apoptoz ve nekroz sonuçları

Çizelge 3.2. *T. anaticum* ekstralarının L929 fibroblast hücrelerindeki % apoptoz-nekroz etkisi

Konsantrasyon		0	9,3	18,7	37,5	75,0
petrol eteri	%apoptoz	1±0,5	7±1	13±0,2	23±0,3	23±0,3
	%nekroz	1,5±0,5	15	21	23,1	23,1
aseton	%apoptoz	1±0,5	6±0,7	15±1	27±1,4	31±2
	%nekroz	1,5±0,5	23	25	28	32
metanol	%apoptoz	1±0,5	12±0,5	23±1	38±0,2	24±1
	%nekroz	1,5±0,5	45	47,5	49	51
HWEP	%apoptoz	1±0,5	3,5±1	11±1,5	15±2	26±1
	%nekroz	1,5±0,5	25	28,5	31,5	33
HWEP (NaOH)	%apoptoz	1±0,5	7±2	15±1	27±0,5	33±0,1
	%nekroz	1,5±0,5	21,5	22	24	26
HWES	%apoptoz	1±0,5	2,5±2	11±1	19±0,5	25±0,1
	%nekroz	1,5±0,5	25	27	28	32
HWES (NaOH)	%apoptoz	1±0,5	6±2	11±1	20±0,5	25±0,1
	%nekroz	1,5±0,5	21,5	23	27	31,5

Çizelge 3.3. *T. imbricatum* ekstralarının L929 fibroblast hücrelerindeki % apoptoz-nekroz etkisi

Konsantrasyon (µg/mL)		0	9,3	18,7	37,5	75
petrol eteri	%apoptoz	1±0,5	5±1	20±0,7	22±1,4	36±2
	%nekroz	1,5±0,5	13	16	21	33
aseton	%apoptoz	1±0,5	4±0,5	18±1	22±0,3	31±0,1
	%nekroz	1,5±0,5	22	23	25,5	37
metanol	%apoptoz	1±0,5	8±0,1	18±1	27±0,2	30±2
	%nekroz	1,5±0,5	42,5	43	46	48,5
HWEP	%apoptoz	1±0,5	12,5±1	28±1,5	36±1	39±2
	%nekroz	1,5±0,5	23	24,5	36	37
HWEP (NaOH)	%apoptoz	1±0,5	9±0,7	18±1	27±1	34±1
	%nekroz	1,5±0,5	22	24,5	26	27
HWES	%apoptoz	1±0,5	4±0,7	13 ±1	23±0,2	34±1
	%nekroz	1,5±0,5	16	25	27	31
HWES (NaOH)	%apoptoz	1±0,5	4±1	9±1,4	18±1	23±0,5
	%nekroz	1,5±0,5	24	27	28,5	31

3.4.1.2. Mantar ekstralarının meme kanseri hücre hatlarındaki (MCF-7) apoptoz-nekroz sonuçları

Çizelge 3.4. *T. anaticum* ekstralarının MCF-7 hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi

	Konsantrasyon (µg/mL)	0	9,3	18,7	37,5	75
petrol eteri	%apoptoz	1,5±1	2,5±1	7±0,4	11±1	15±0,1
	%nekroz	1±0,5	12	14	17	21
aseton	%apoptoz	1,5±1	2±0,5	7±2	9±1	17±0,1
	%nekroz	1±0,5	13	20	25	27,5
metanol	%apoptoz	1,5±1	8±0,3	14±2	25±0,2	44±1
	%nekroz	1±0,5	25	26,5	34	35
HWEP	%apoptoz	1,5±1	8±0,1	14±1,4	25±1	39±0,7
	%nekroz	1±0,5	21,5	23	28	41
HWEP (NaOH)	%apoptoz	1,5±1	3±0,5	9±1	15±2	26±1
	%nekroz	1±0,5	25	26,5	29	33,5
HWES	%apoptoz	1,5±1	4±0,5	13±1	15±0,1	17±2
	%nekroz	1±0,5	21	23	35	37,5
HWES (NaOH)	%apoptoz	1,5±1	4,5±0,1	8±1,4	17±1	19±0,5
	%nekroz	1±0,5	25	28	32	33

Çizelge 3.5. *T. imbricatum* ekstralarının MCF-7 hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi

	Konsantrasyon (µg/mL)	0	9,3	18,7	37,5	75
petrol eteri	%apoptoz	1,5±1	3±1,5	10±1	21±1,4	35±0,1
	%nekroz	1±0,5	21	23	24	28,5
aseton	%apoptoz	1,5±1	2±0,7	9±1	17±0,5	28±2
	%nekroz	1±0,5	15	27,5	31	41
metanol	%apoptoz	1,5±1	7±0,1	12±1	23±0,5	35±1
	%nekroz	1±0,5	27,5	29	31	33
HWEP	%apoptoz	1,5±1	7±0,7	14±1	21±2	42±0,5
	%nekroz	1±0,5	19	25	29	39,5
HWEP (NaOH)	%apoptoz	1,5±1	3,5±1	13±0,1	24±2	32±1
	%nekroz	1±0,5	22,5	23	26	38,5
HWES	%apoptoz	1,5±1	4±1	9±2	15±0,8	17±0,7
	%nekroz	1±0,5	11	23	27	34,5
HWES (NaOH)	%apoptoz	1,5±1	3,5±2	9±0,7	15±0,5	29±1
	%nekroz	1±0,5	17	27	33,5	38,5

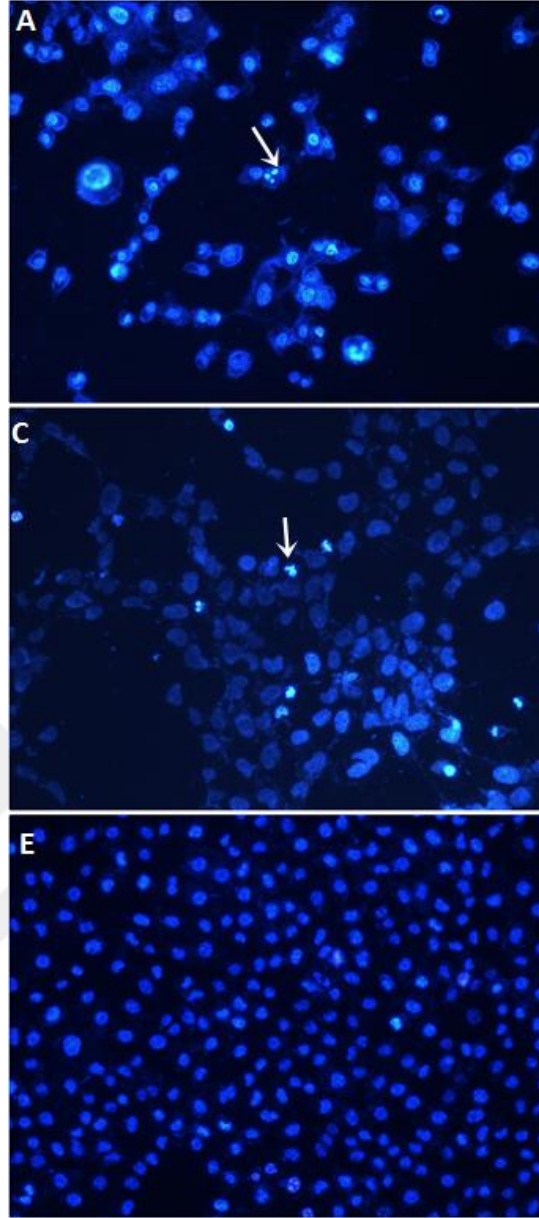
3.4.1.3. Mantar ekstralarının akciğer kanseri hücre hatlarındaki (H1299) apoptoz-nekroz sonuçları

Çizelge 3.6. *T. anaticum* ekstralarının H1299 hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi

	Konsantrasyon (µg/mL)	0	9,3	18,7	37,5	75
petrol eteri	%apoptoz	1,5±1	5±0,7	6±0,3	7,5±1	10±0,1
	%nekroz	1±0,5	18	21	22,5	24
aseton	%apoptoz	1,5±1	5±0,5	7±2	7,5±1	9±0,1
	%nekroz	1±0,5	23	24	27,5	31
metanol	%apoptoz	1,5±1	6±0,3	14±2	25±0,2	33±1
	%nekroz	1±0,5	28	36,5	39	42
HWEP	%apoptoz	1,5±1	6±0,1	6,5±1	7±1,4	9±0,5
	%nekroz	1±0,5	23	24	27,5	30
HWEP (NaOH)	%apoptoz	1,5±1	5,5±1	6,5±2	8±1,4	9±0,5
	%nekroz	1±0,5	26,5	29	31,5	34
HWES	%apoptoz	1,5±1	5,5±1	6±2	7,5±1	11±0,5
	%nekroz	1±0,5	27,5	29	31	33
HWES (NaOH)	%apoptoz	1,5±1	13±0,1	19±2	32±1	44±0,5
	%nekroz	1±0,5	29	32,5	33	35

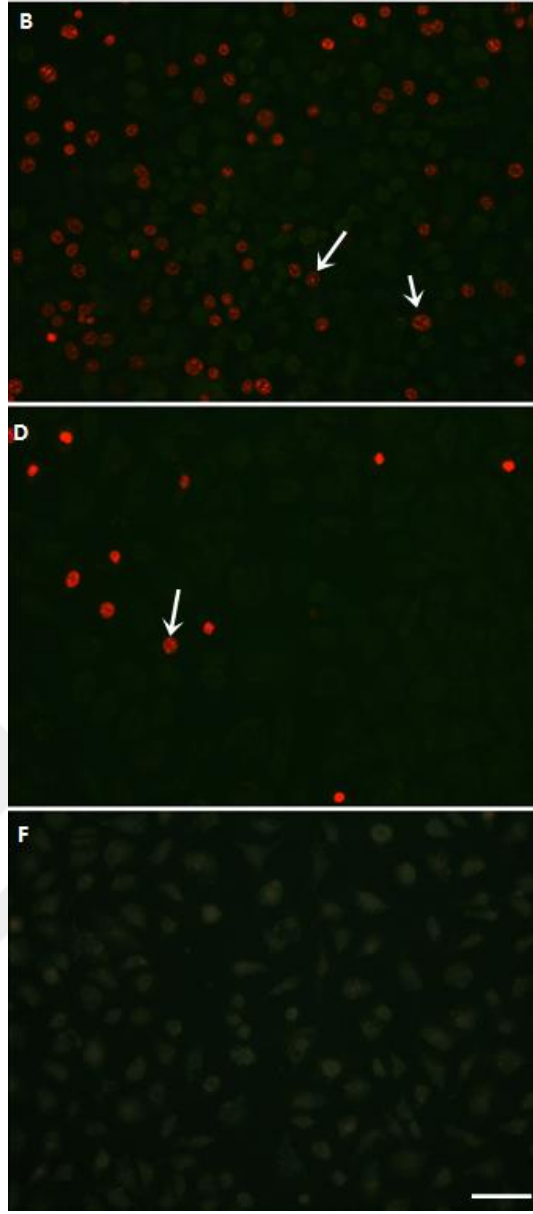
Çizelge 3.7. *T. imbricatum* ekstralarının H1299 hücrelerindeki %apoptoz-nekroz etkisi

	Konsantrasyon (µg/mL)	0	9,3	18,7	37,5	75
petrol eteri	%apoptoz	1,5±1	4±1,5	5,5±1	7±1,4	8±0,1
	%nekroz	1±0,5	15	21	24,5	27
aseton	%apoptoz	1,5±1	6±0,5	6,5±1	7±0,3	8,5±0,1
	%nekroz	1±0,5	19	21,5	23,5	28
metanol	%apoptoz	1,5±1	4,5±0,3	7±1	13±1	28±0,1
	%nekroz	1±0,5	21	23	24	35,5
HWEP	%apoptoz	1,5±1	4±0,7	4,5±1	6,5±2	8±0,5
	%nekroz	1±0,5	26,5	29	32,5	35
HWEP (NaOH)	%apoptoz	1,5±1	5±0,7	6±1	7±2	8±0,5
	%nekroz	1±0,5	22,5	24	26,5	27
HWES	%apoptoz	1,5±1	5±0,7	6,5±1	7±2	14±0,5
	%nekroz	1±0,5	18	19,5	22	25,5
HWES (NaOH)	%apoptoz	1,5±1	15±0,7	27±1	36±2	68±1
	%nekroz	1±0,5	21	23	26,5	32,5



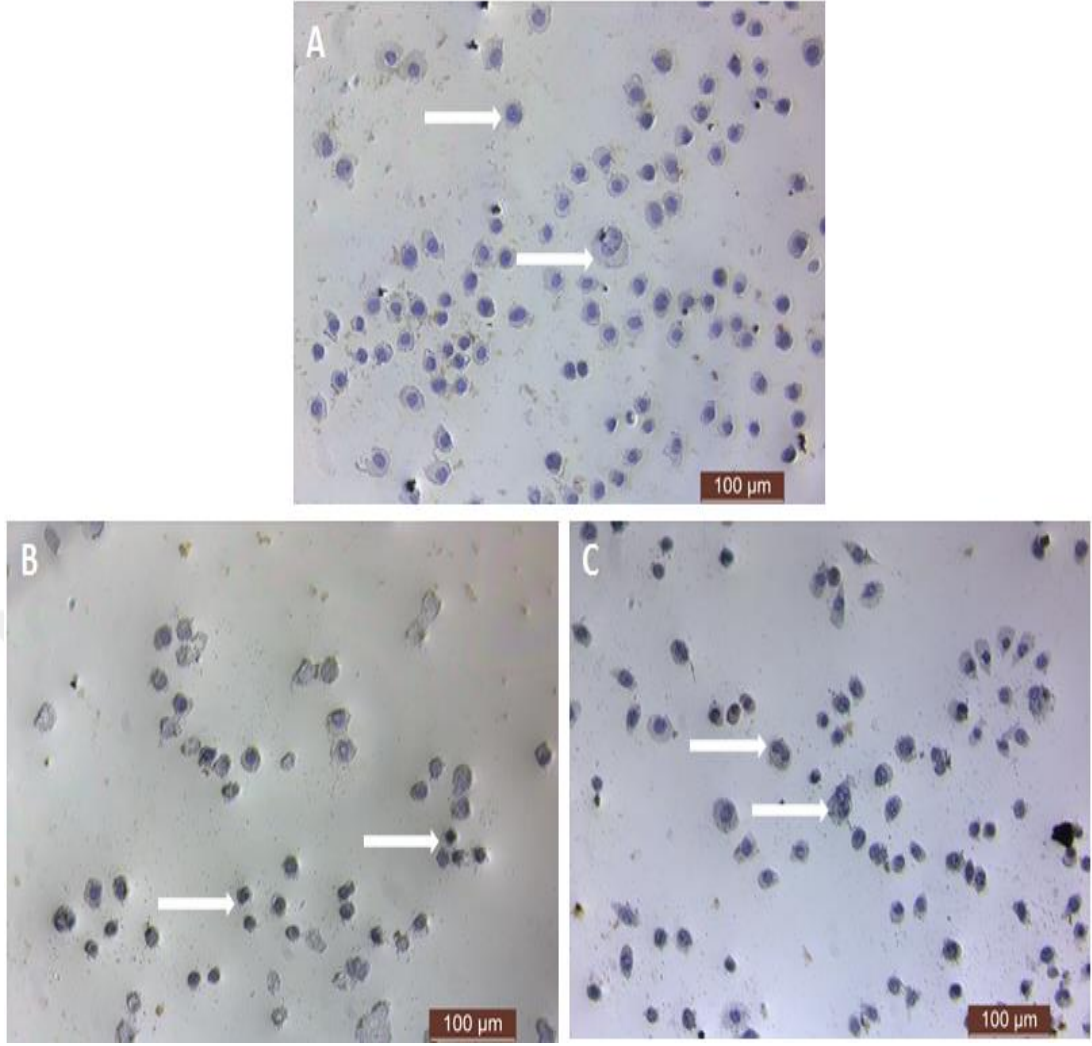
Şekil 3.12. Apoptotik hücrelerin ikili boyama metodu ile gösterilmesi

A), 75 µg/mL *T.anatolicum* HWES (NaOH) ekstresi ile etkileştirilmiş, hoechst 33342 ile boyanmış apoptotik MCF-7 hücrelerinin görüntüsüdür. C), 9,3 µg/mL *T.anatolicum* HWES ile etkileştirilmiş, apoptotik H1299 hücrelerinin görüntüsü. E), Hoechst 33342 ile boyanmış, DAPI filtresinde görüntülenen kontrol grubu hücrelerine aittir. Hücre çekirdekleri mavi görünmektedir. Fotoğraflar LEICA DMI 6000B mikroskopta 200X büyütme, Bar 100 µm'yi göstermektedir.



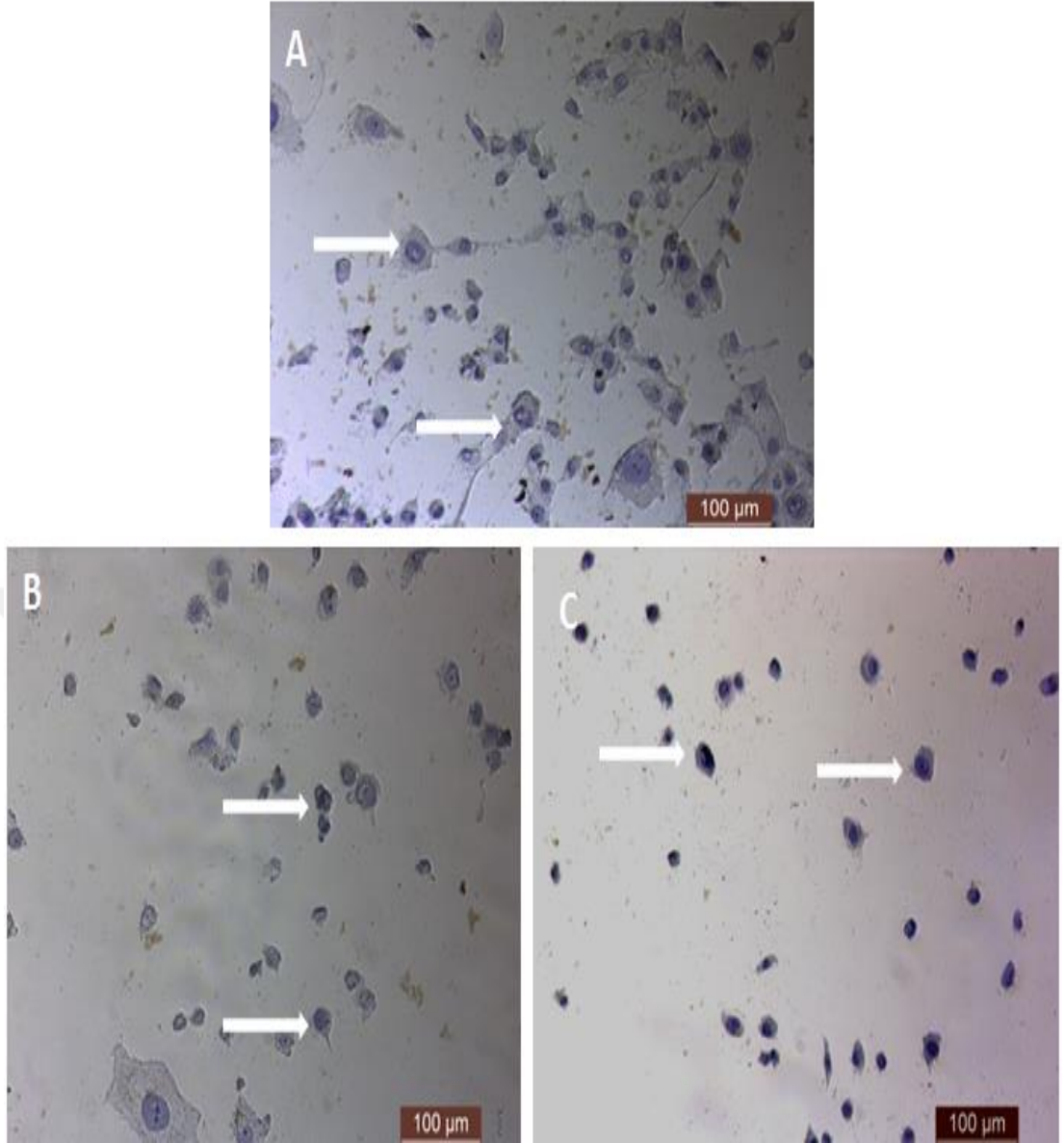
Şekil 3.13. Nekrotik hücrelerin ikili boyama metodu ile gösterilmesi

B) 75 µg/mL *T. imbricatum* HWES (NaOH) ekstresi ile etkileştirilmiş, nekrotik MCF-7 hücrelerinin görüntüsü. D) 9,3 µg/mL *T. imbricatum* petrol eteri ile etkileştirilmiş, nekrotik L929 fibroblast hücrelerinin görüntüsü. F) Sadece besiyeri olan kontrol grubu hücreleri. Fotoğraflar LEICA DMI 6000B mikroskopta 200X büyütme, bar 100 µm'yi göstermektedir.



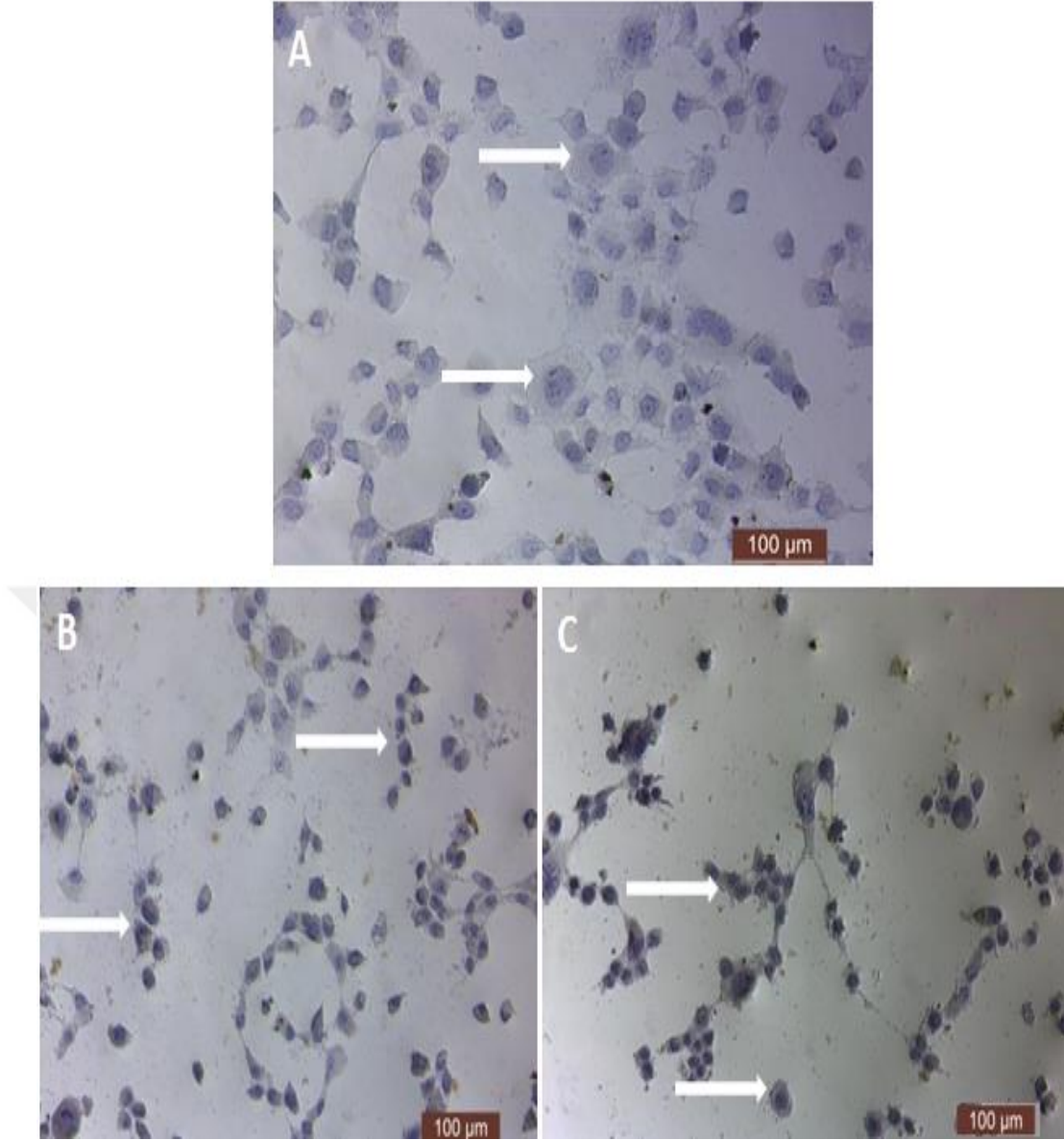
Şekil 3.14. Kaspaz-3 immunositokimyasal boyama fotoğrafları (L929)

A) Ekstre uygulanmamış fibroblast hücreleri (kontrol grubu), ok kaspaz-3 antikoruna ile boyanmamış hücreleri göstermektedir, B) *T.anatolicum* HWP 18,7 µg/mL konsantrasyonda fibroblastlarla etkileşimi, oklar kaspaz-3 ile boyanmış(kahverengi, apoptoza girmiş hücre) hücrelerden birkaçını göstermektedir, C) *T.anatolicum* HWP 37,5 µg/mL konsantrasyonda fibroblast hücreleri, oklar; kaspaz-3 ile boyanmış (kahverengi, apoptoza girmiş hücre) hücrelerden birkaçını göstermektedir. Fotoğraflar 200X büyütmede leicainverted mikroskop ile çekilmiştir. Barlar resim üzerinde gösterilmektedir.



Şekil 3.15. Kaspaz-3 immunositokimsal boyama fotoğrafları (MCF-7)

A) Ekstre uygulanmamış MCF-7 kanser hücreleri(kontrol grubu),ok kaspaz-3 antikoru ile boyanmamış hücreleri göstermektedir B) *T.anatolicum* HWP 18,7 µg/mL konsantrasyonda MCF-7 kanser hücreleri ile etkileşimi, oklar kaspaz-3 ile boyanmış(kahverengi, apoptoza girmiş hücre) hücrelerden birkaçını göstermektedir, C) *T.anatolicum* HWP 37,5 µg/mL konsantrasyonda MCF-7 kanser hücreleri ile etkileşimi, oklar; kaspaz-3 ile boyanmış(kahverengi, apoptoza girmiş hücre) hücrelerden birkaçını göstermektedir. Fotoğraflar 200X büyütmede leicainverted mikroskop ile çekilmiştir. Barlar resim üzerinde gösterilmektedir.



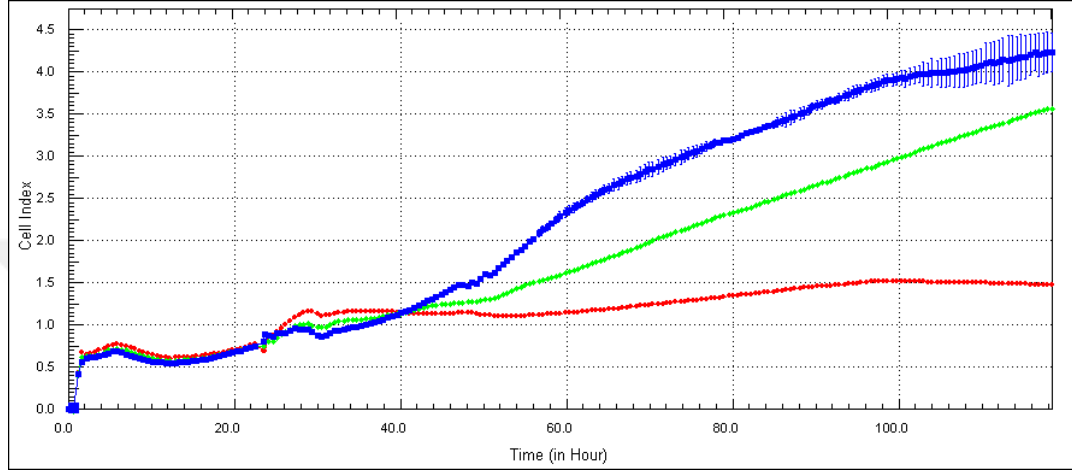
Şekil 3.16. Kaspaz-3 immunositokimsal boyama fotoğrafları (H1299)

A) Ekstre uygulanmamış H1299 kanser hücreleri(kontrol grubu), ok kaspaz-3 antikoruna ile boyanmamış hücreleri göstermektedir, B) *T. anatolicum* HWEP 18,7 konsantrasyonda H1299 kanser hücreleri ile etkileşimi, oklar kaspaz-3 ile boyanmış(kahverengi, apoptoza girmiş hücre) hücrelerden birkaçını göstermektedir, C) *T. anatolicum* HWEP 37,5 konsantrasyonda H1299 kanser hücreleri ile etkileşimi, oklar; kaspaz-3 ile boyanmış(kahverengi, apoptoza girmiş hücre) hücrelerden birkaçını göstermektedir. Fotoğraflar 200X büyütmede leicainverted mikroskop ile çekildi ve barlar resim üzerindedir.

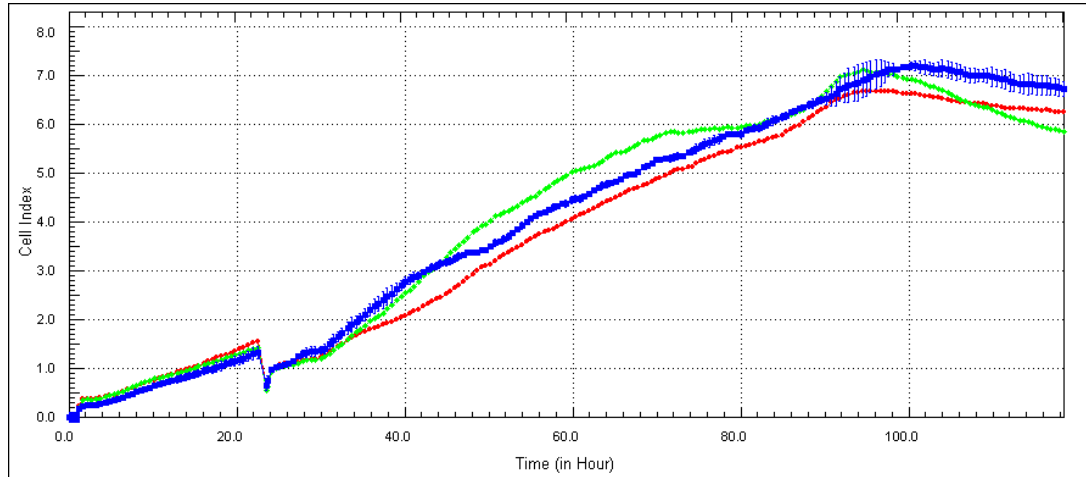
3.5. Hücre Proliferasyonunun Belirlenmesi Sonuçları

3.5.1. *Tricholoma anatolicum*'un ekstrelerinin hücre proliferasyonları

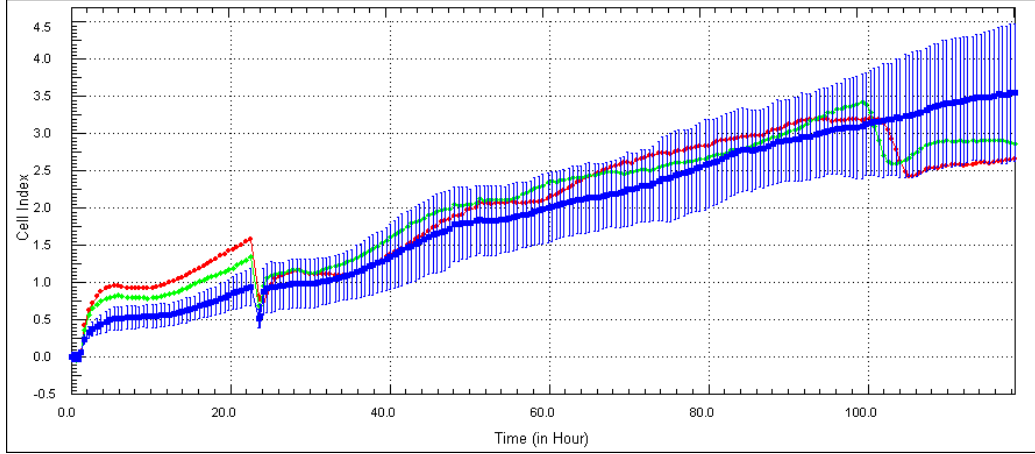
Tricholoma anatolicum arklı hücre hatlarında gerçek zamanlı olarak kanser ve normal hücelere etkileri zaman profiline bakılarak belirlendi. Sonuçlar Şekil 3.17 ile Şekil 3.37 arasında verildi.



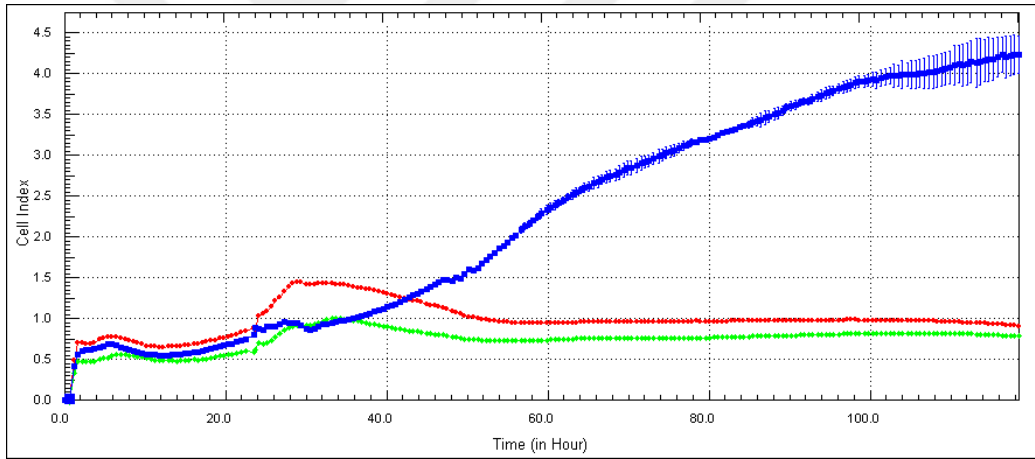
Şekil 3.17. *T. anatolicum* petrol eteri ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



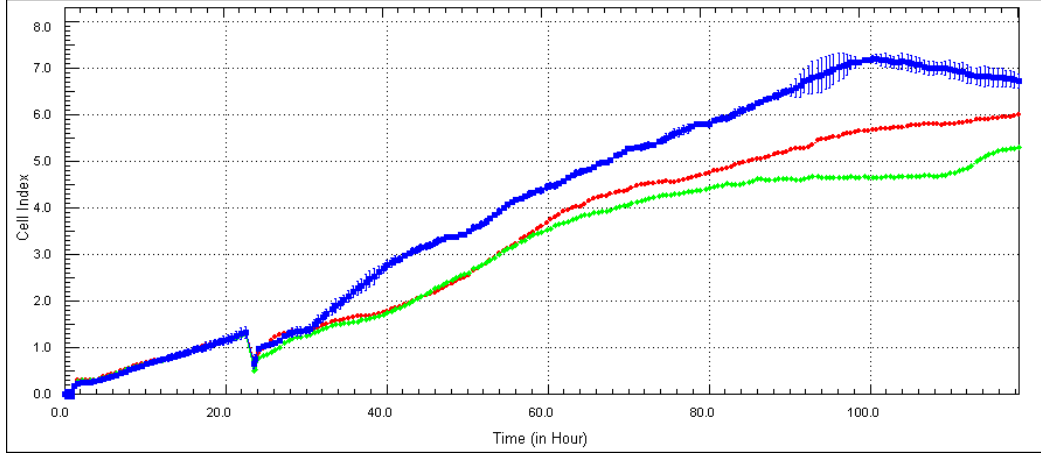
Şekil 3.18. *T. anatolicum* petrol eteri ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



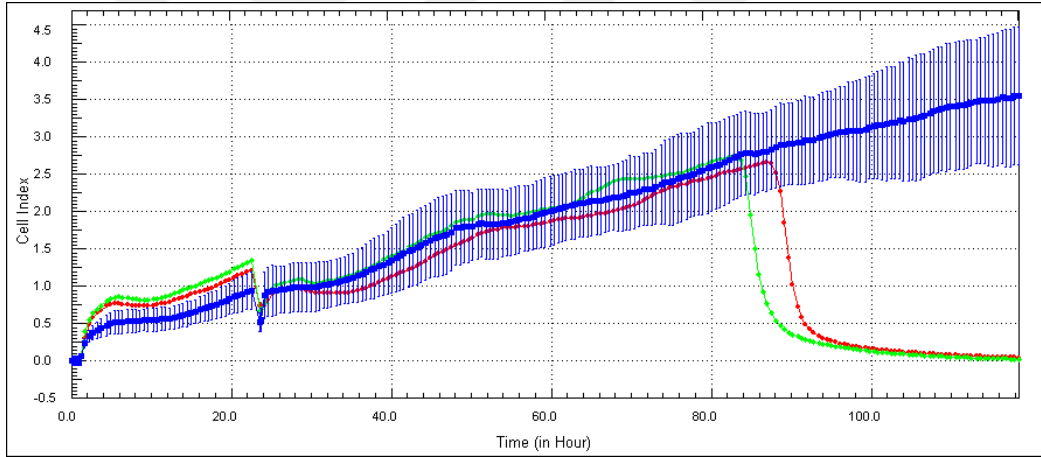
Şekil 3.19. *T. anaticum* petrol eteri ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



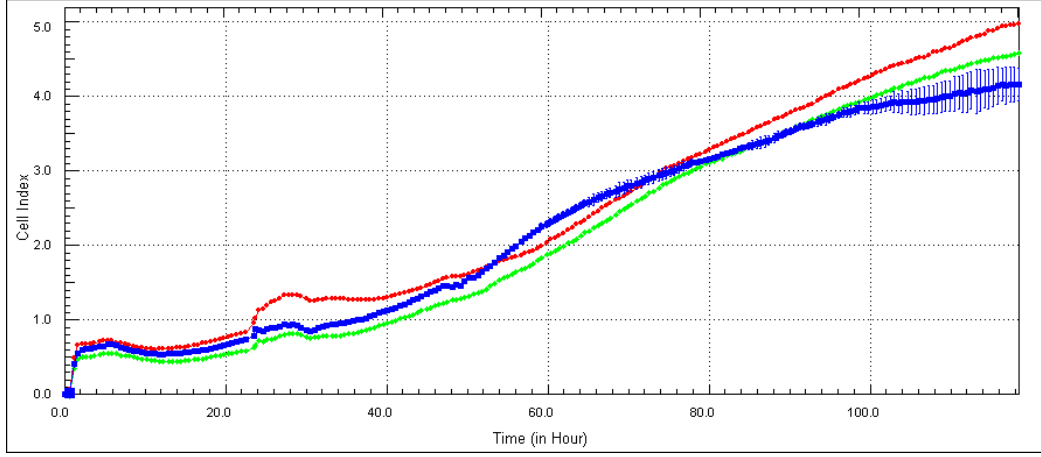
Şekil 3.20. *T. anaticum* aseton ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



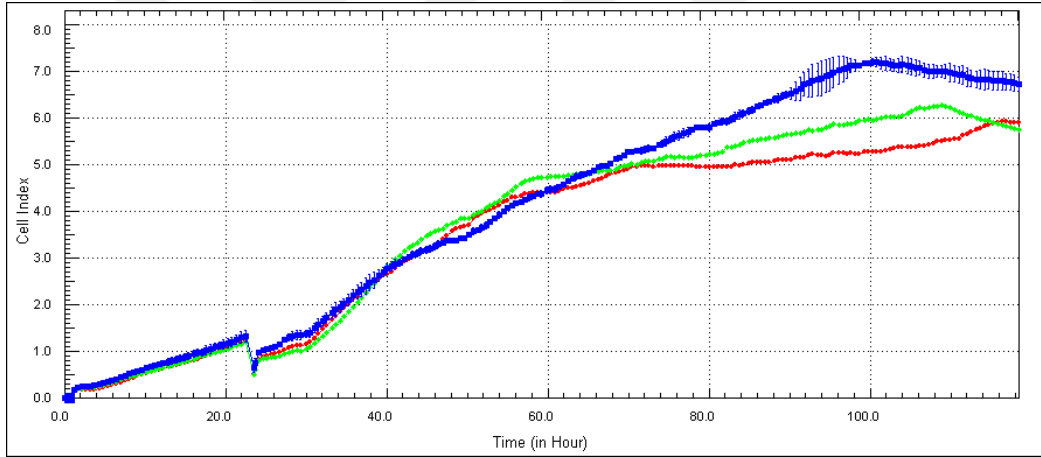
Şekil 3.21. *T. anatolicum* aseton ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



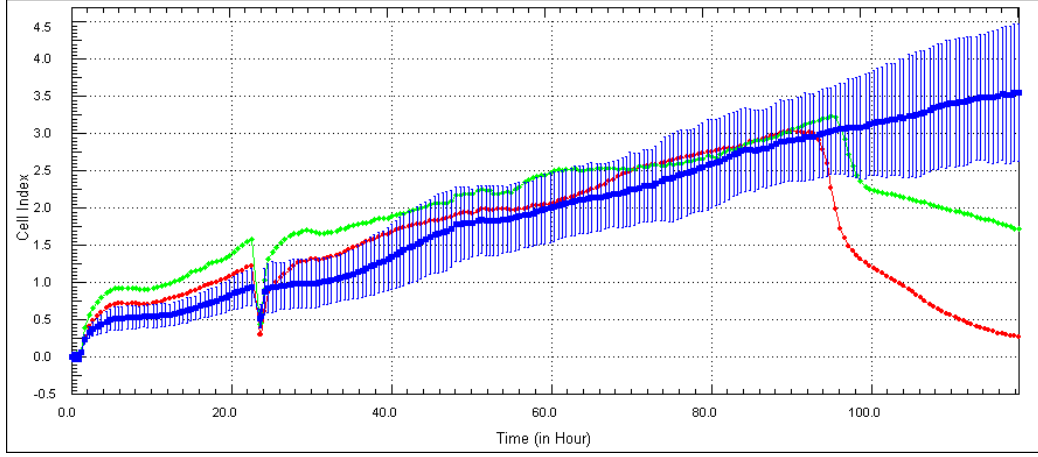
Şekil 3.22. *T. anatolicum* aseton ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



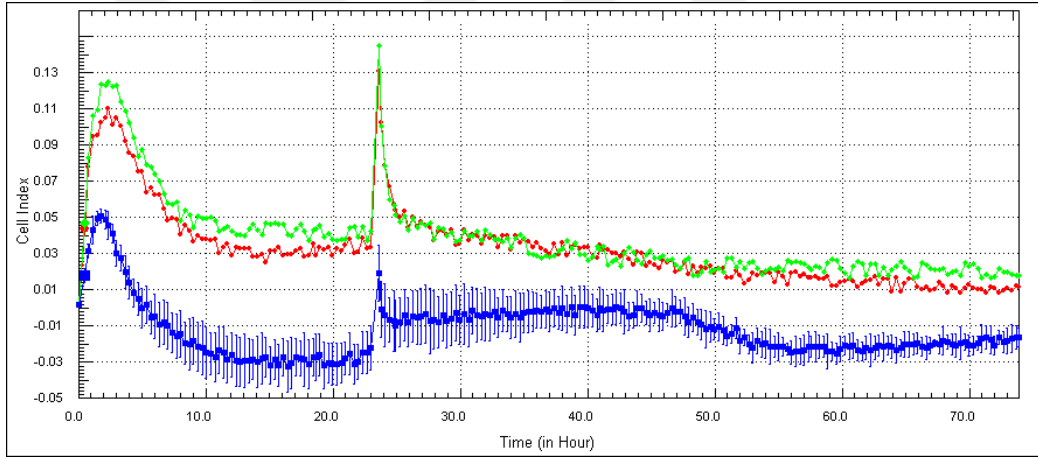
Şekil 3.23. *T. anaticum* metanol ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



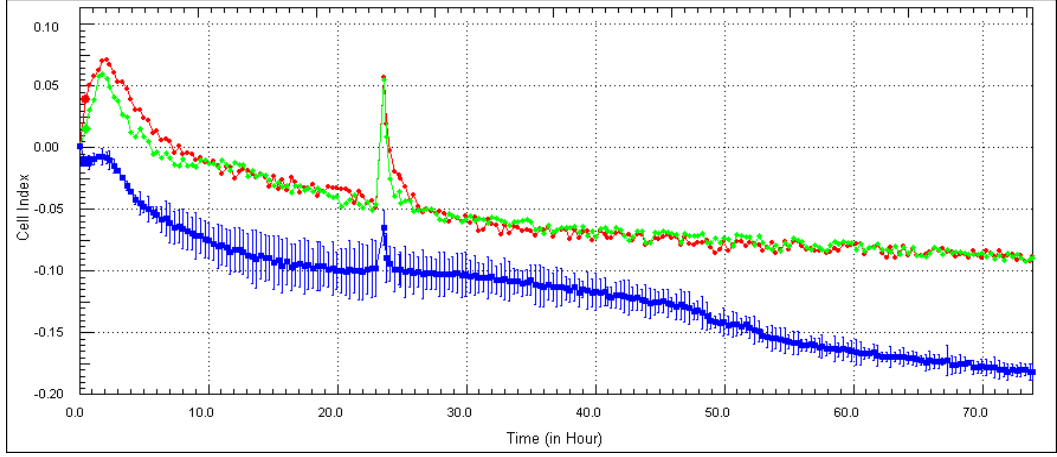
Şekil 3.24. *T. anaticum* metanol ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



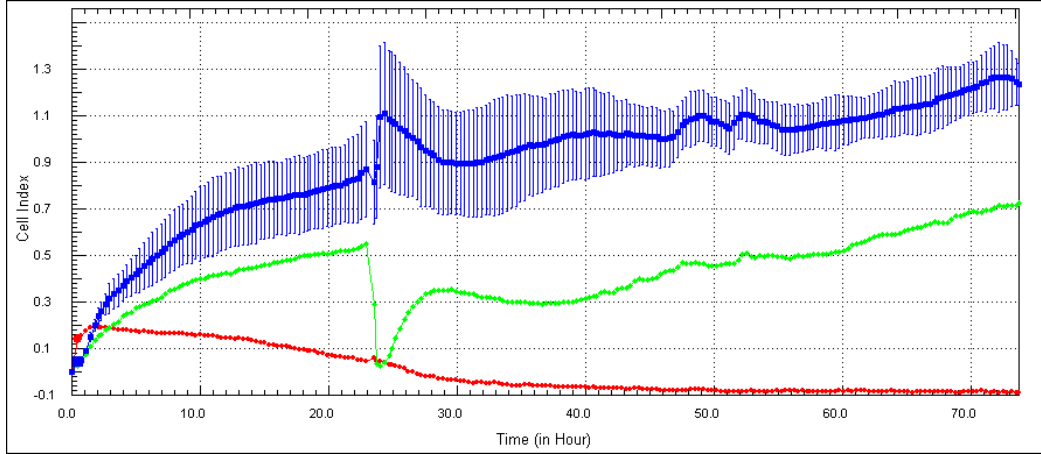
Şekil 3.25. *T. anatolicum* metanol ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



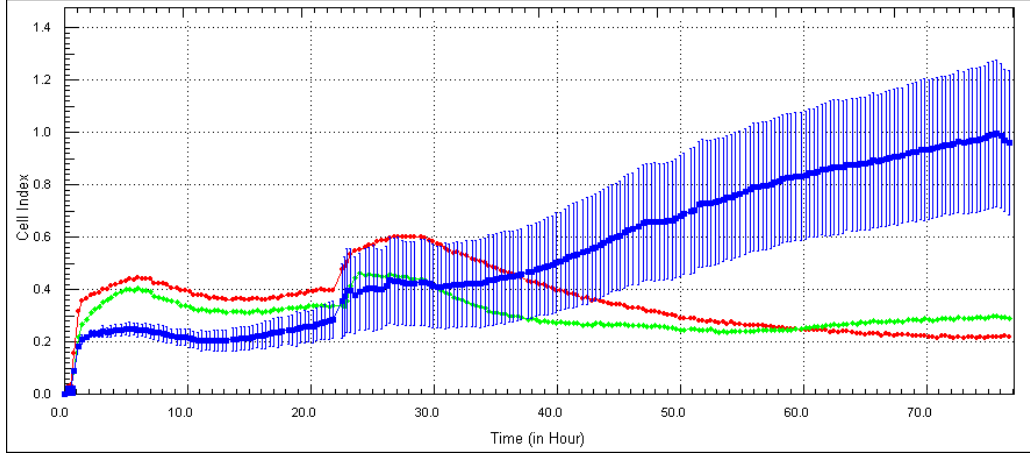
Şekil 3.26. *T. anatolicum* HWEF ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



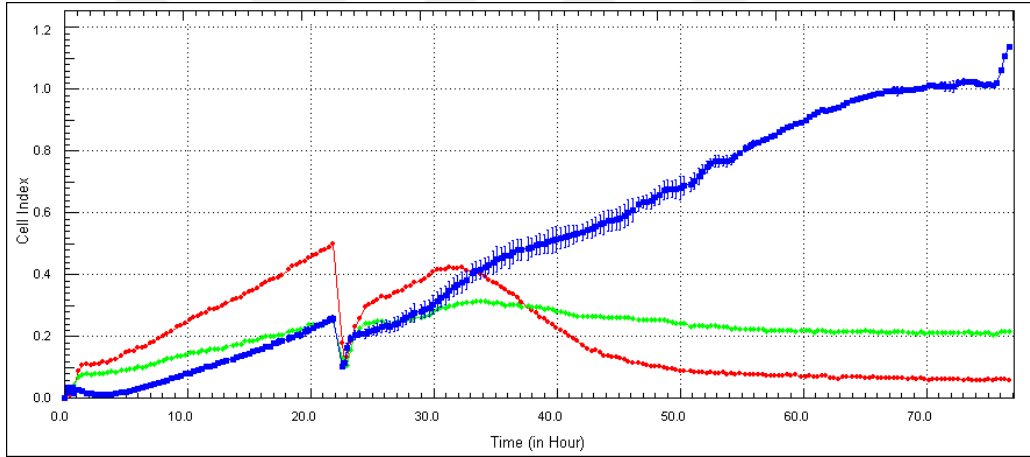
Şekil 3.27. *T. anaticum* HWP ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



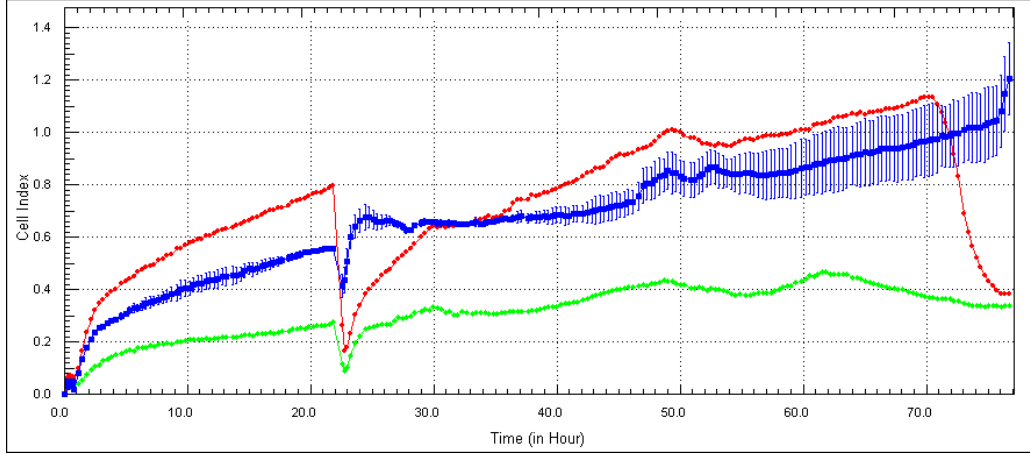
Şekil 3.28. *T. anaticum* HWP ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



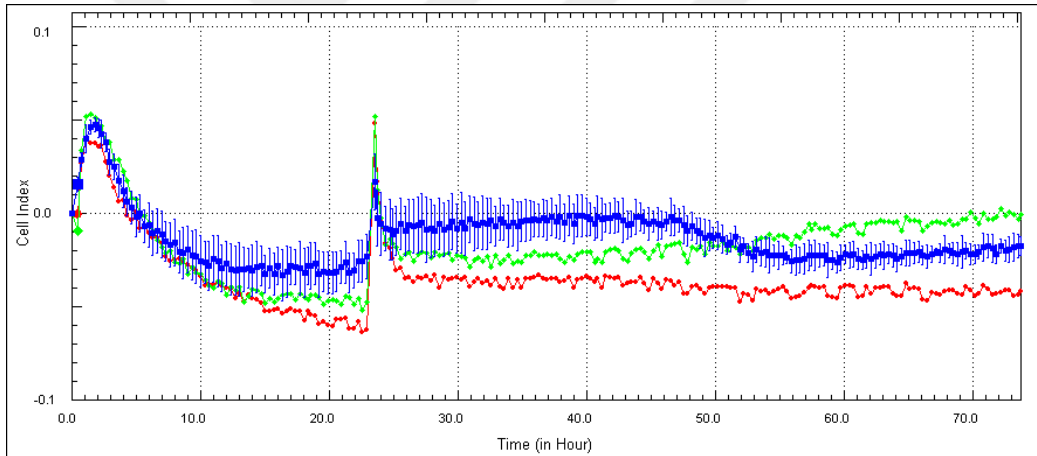
Şekil 3.29. *T. anatolicum* HWEP (NaOH) ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



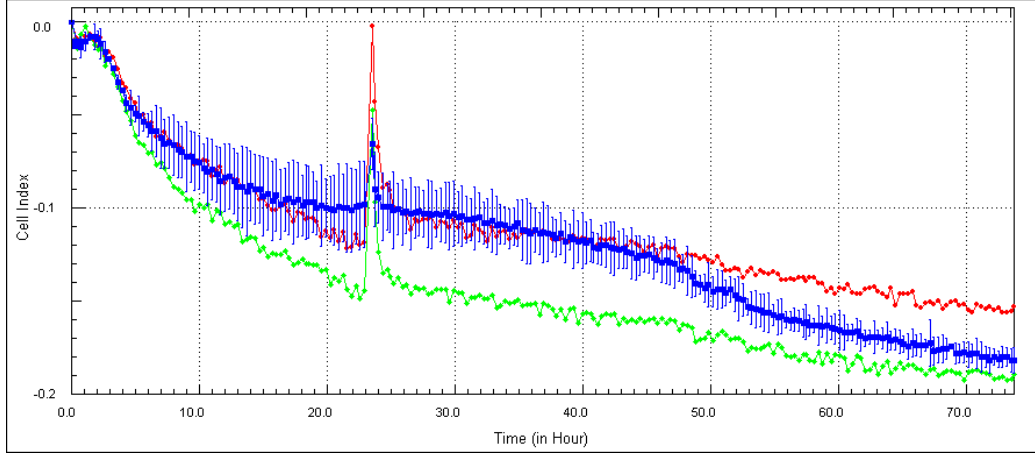
Şekil 3.30. *T. anatolicum* HWEP (NaOH) ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



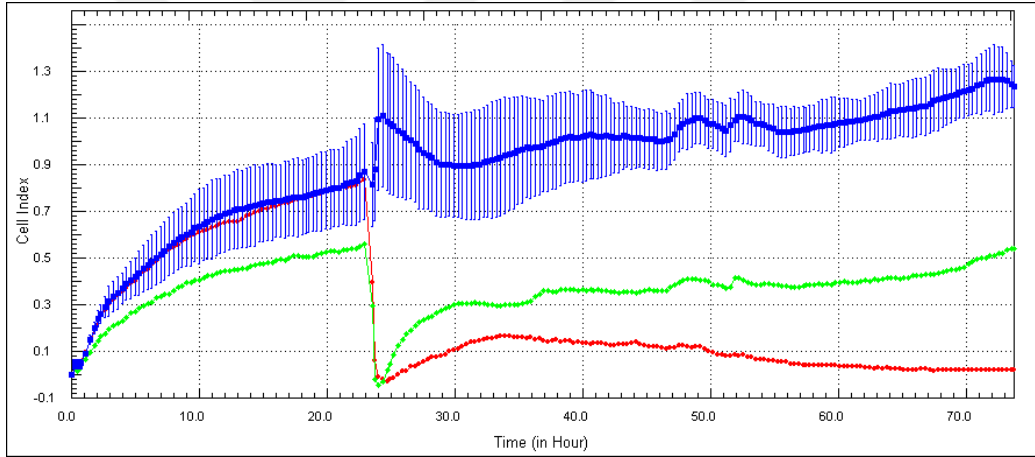
Şekil 3.31. *T.anatolicum* HWE (NaOH) ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



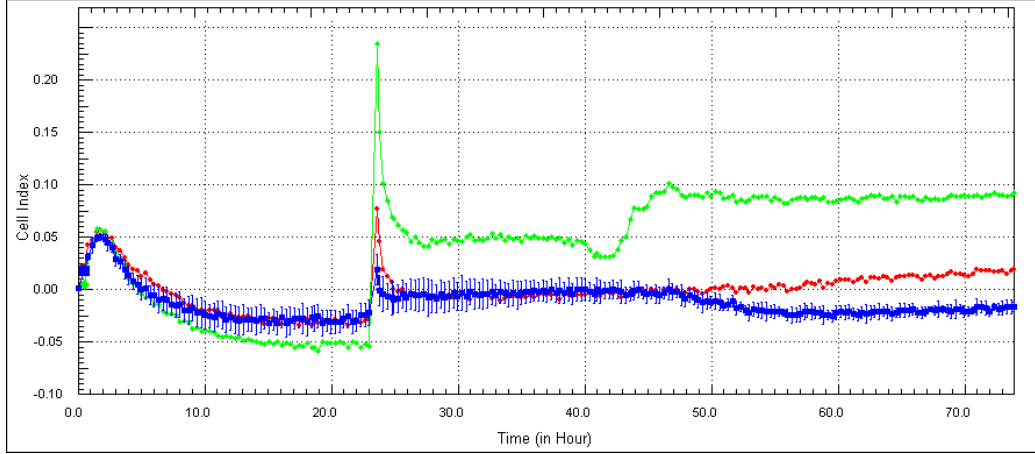
Şekil 3.32. *T. anatolicum* HWES ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



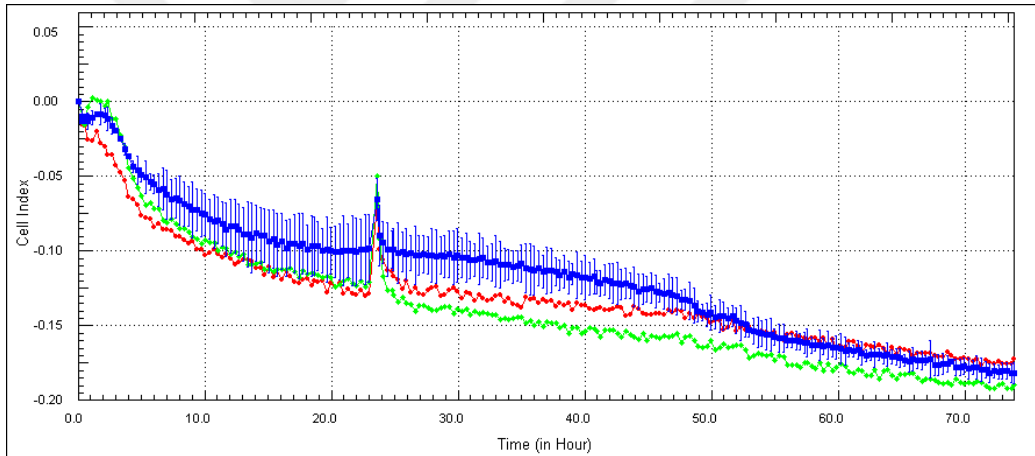
Şekil 3.33. *T. anatolicum* HWES ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



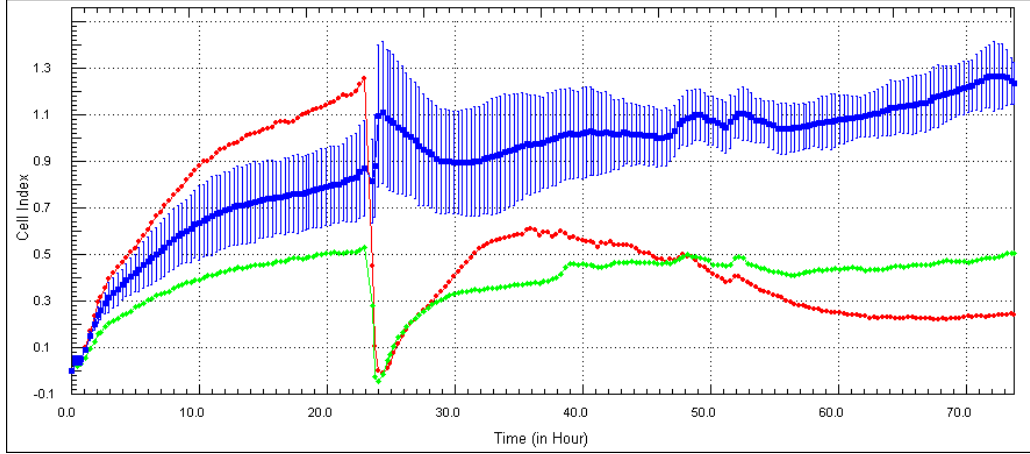
Şekil 3.34. *T. anatolicum* HWES ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



Şekil 3.35. *T. anaticum* HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



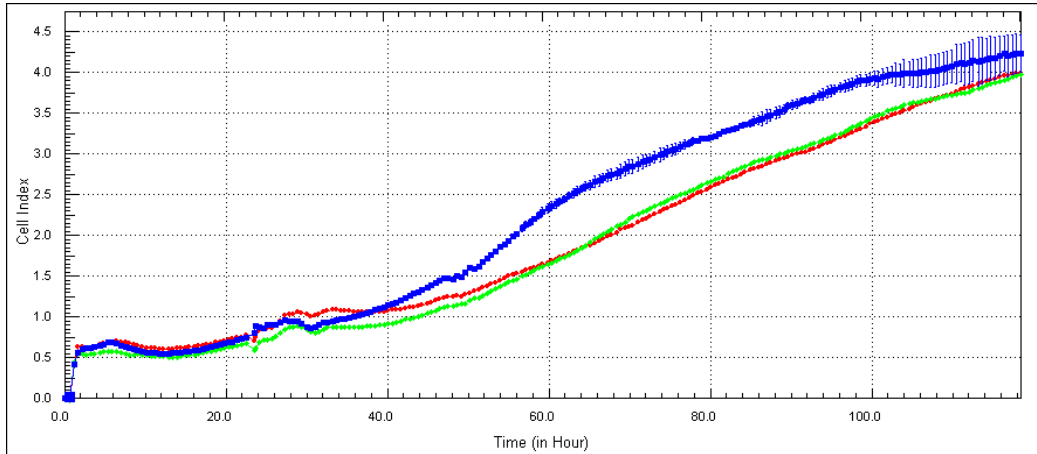
Şekil 3.36. *T. anaticum* HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



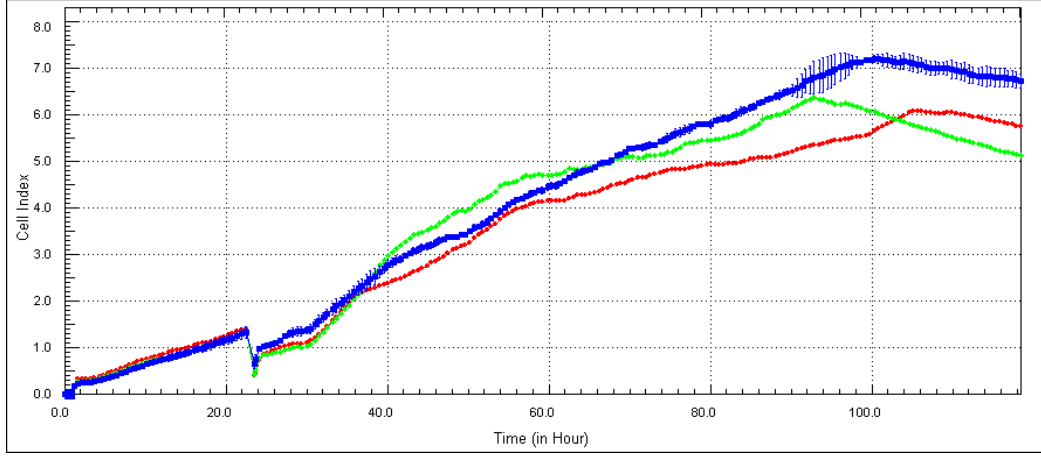
Şekil 3.37. *T. anatolicum* HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)

3.5.2. *Tricholoma imbricatum*'un ekstrelerinin hücre proliferasyonları

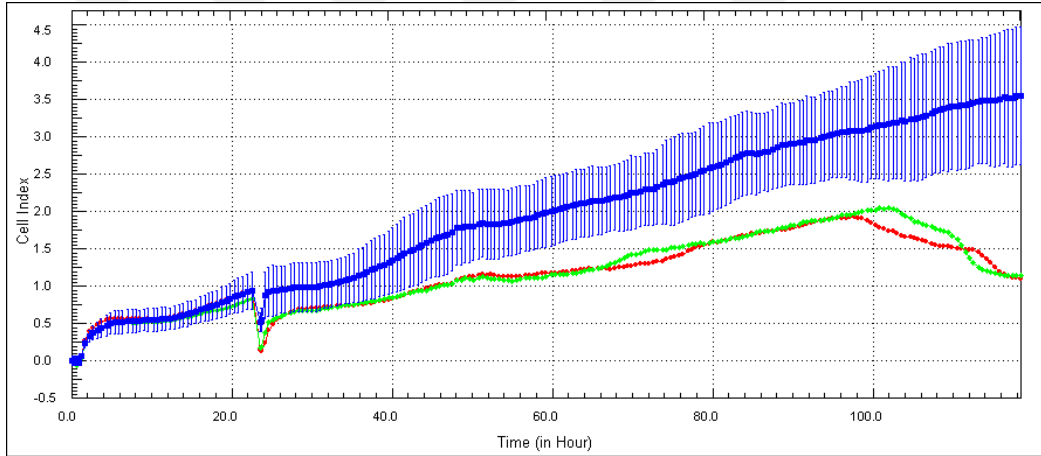
Tricholoma imbricatum ekstrelerinin farklı hücre hatlarında gerçek zamanlı olarak kanser ve fibroblast hücrelere etkileri zaman profiline bakılarak belirlendi. Sonuçlar Şekil 3.38 ile Şekil 3.55 arasında verildi.



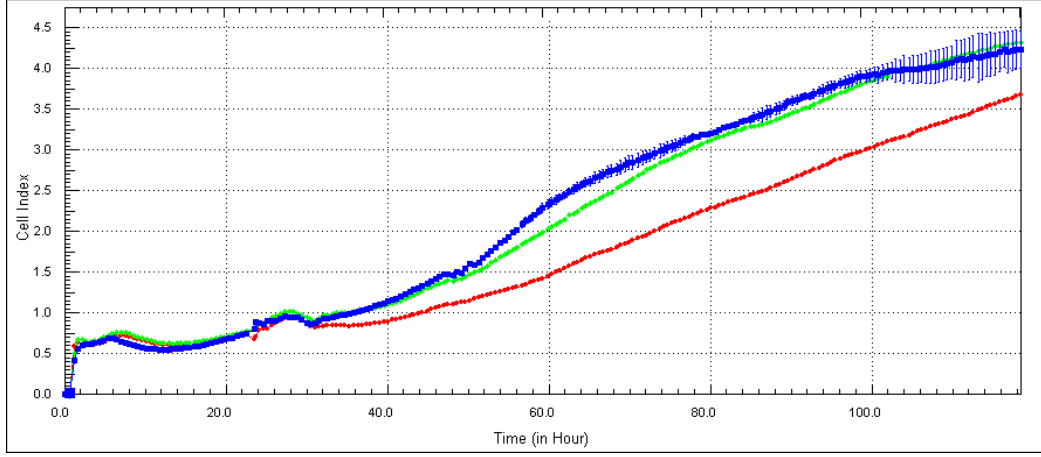
Şekil 3.38. *T. imbricatum* aseton ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



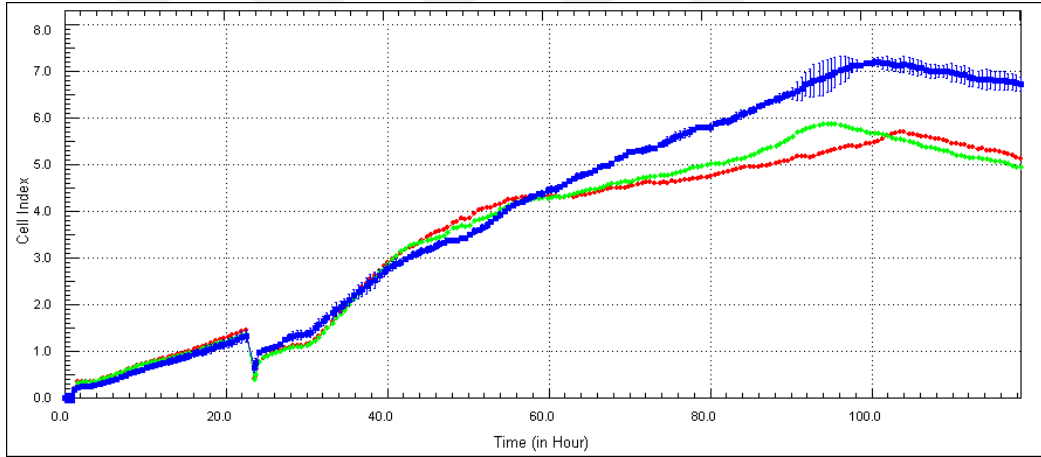
Şekil 3.39. *T.imbricatum* aseton ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



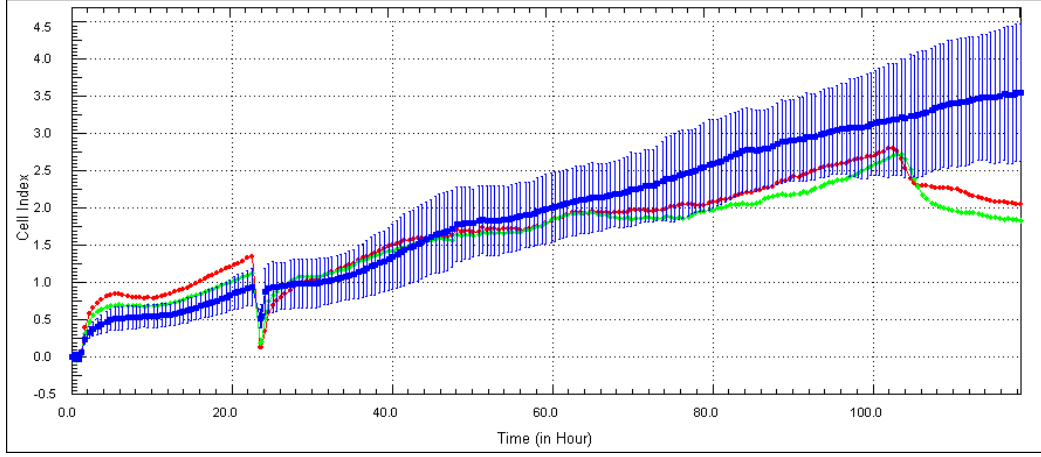
Şekil 3.40. *T. imbricatum* aseton ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



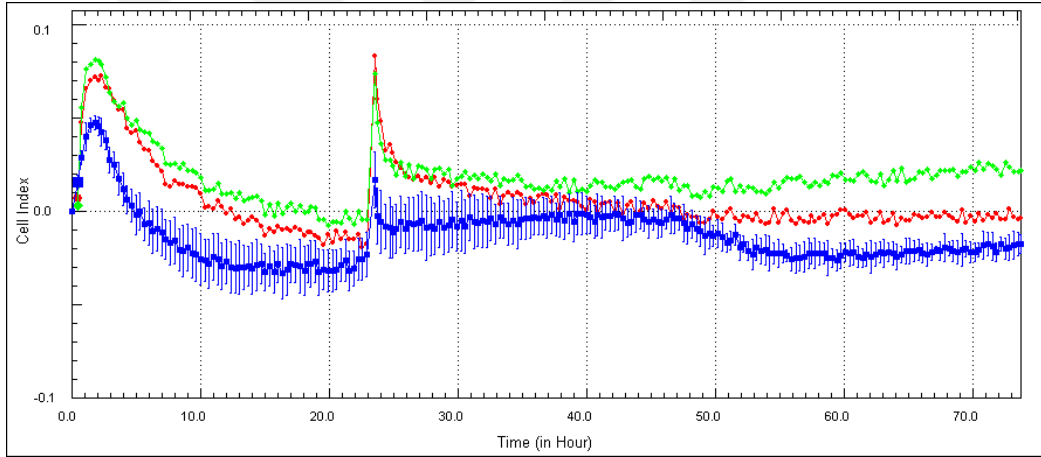
Şekil 3.41. *T. imbricatum* metanol ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



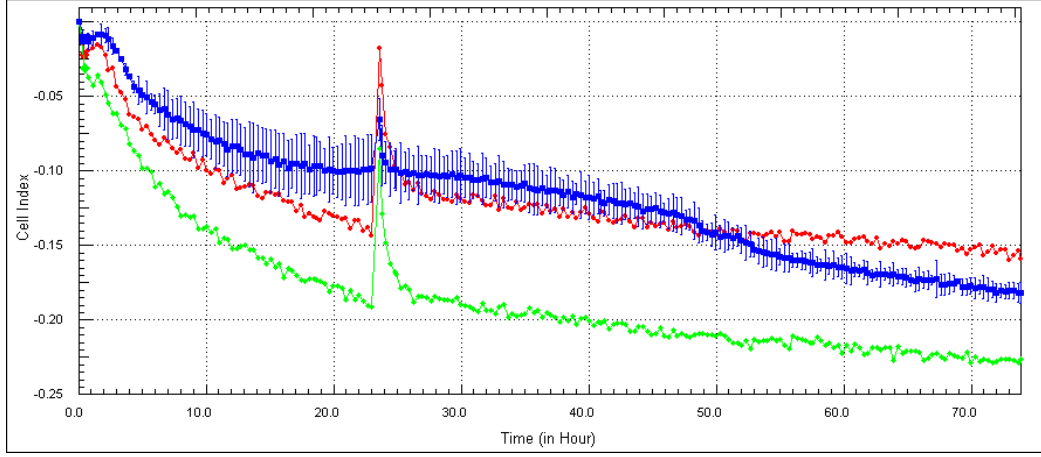
Şekil 3.42. *T. imbricatum* metanol ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



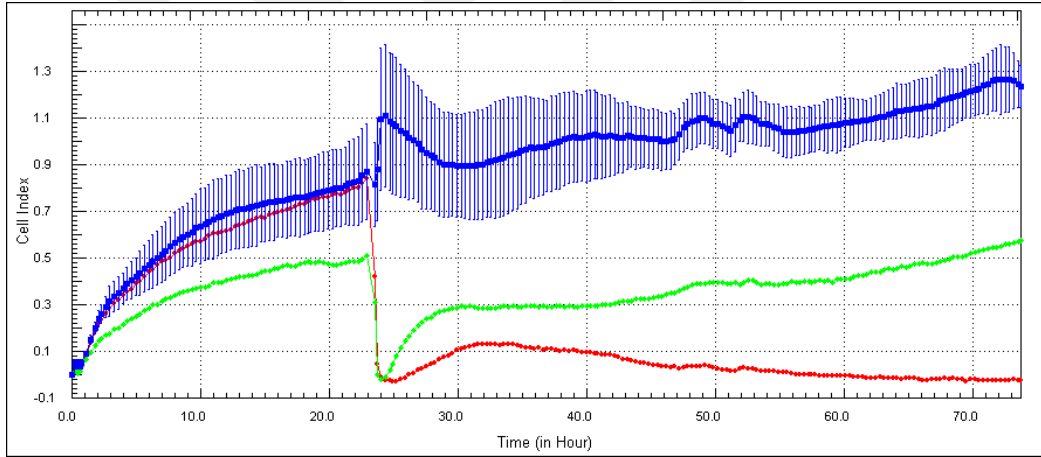
Şekil 3.43. *T. imbricatum* metanol ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



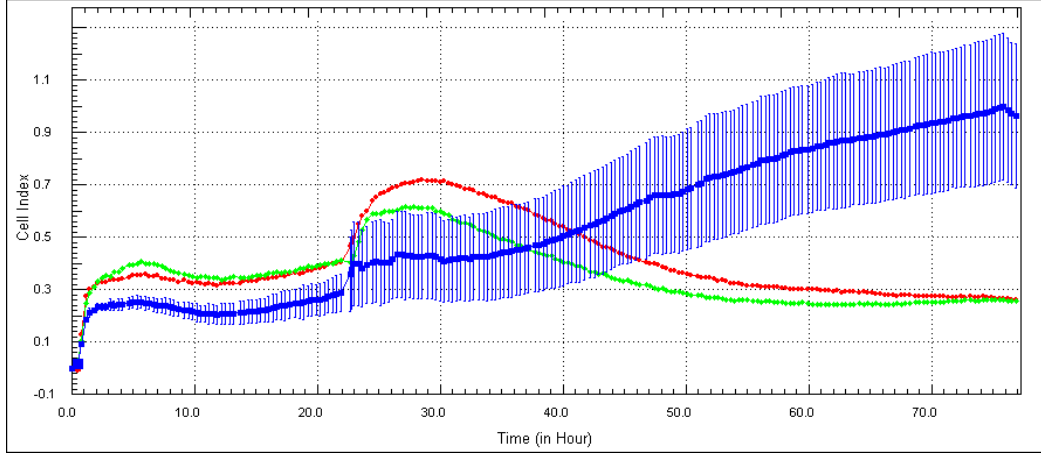
Şekil 3.44. *T. imbricatum* HWEF ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



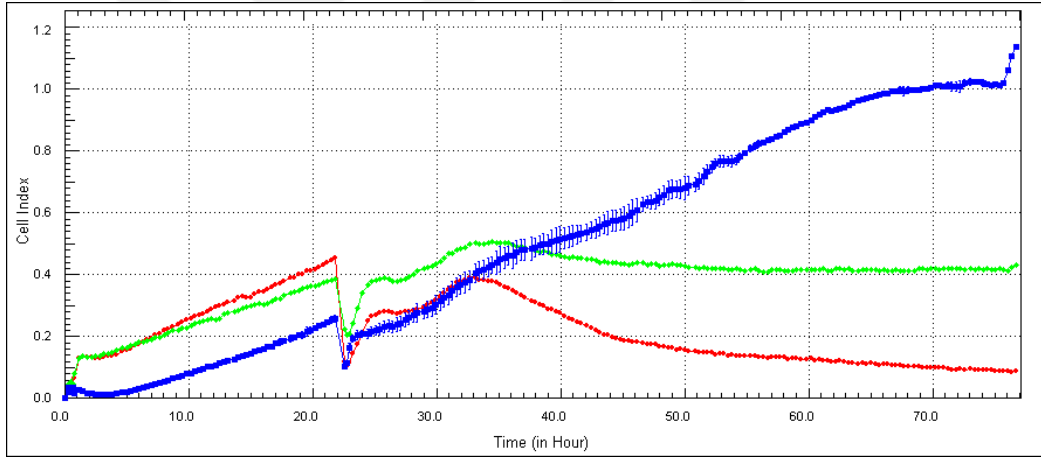
Şekil 3.45. *T. imbricatum* HWP ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



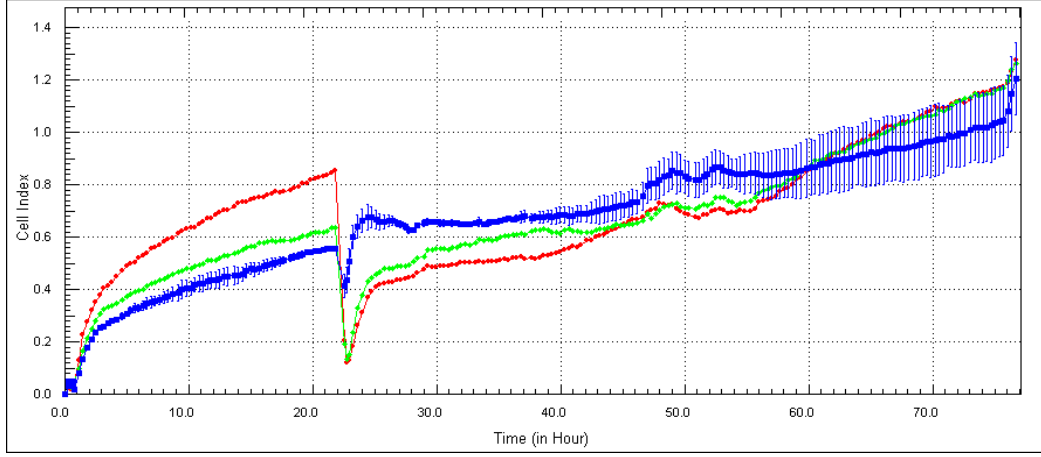
Şekil 3.46. *T. imbricatum* HWP ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



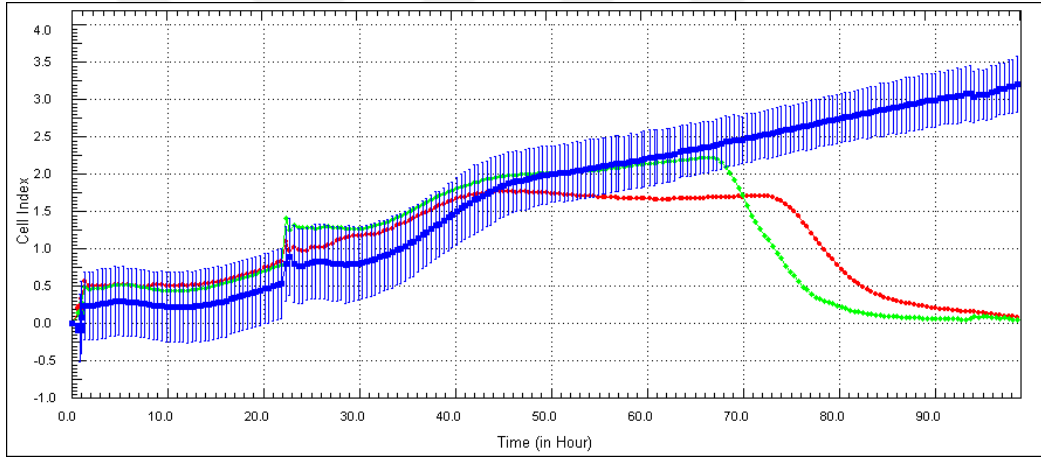
Şekil 3.47. *T. imbricatum* HWP (NaOH) ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



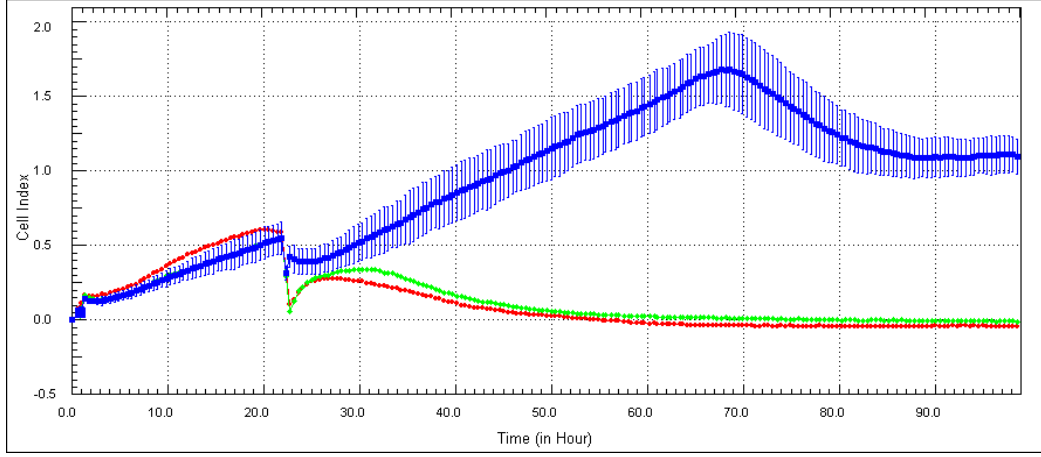
Şekil 3.48. *T. imbricatum* HWP (NaOH) ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



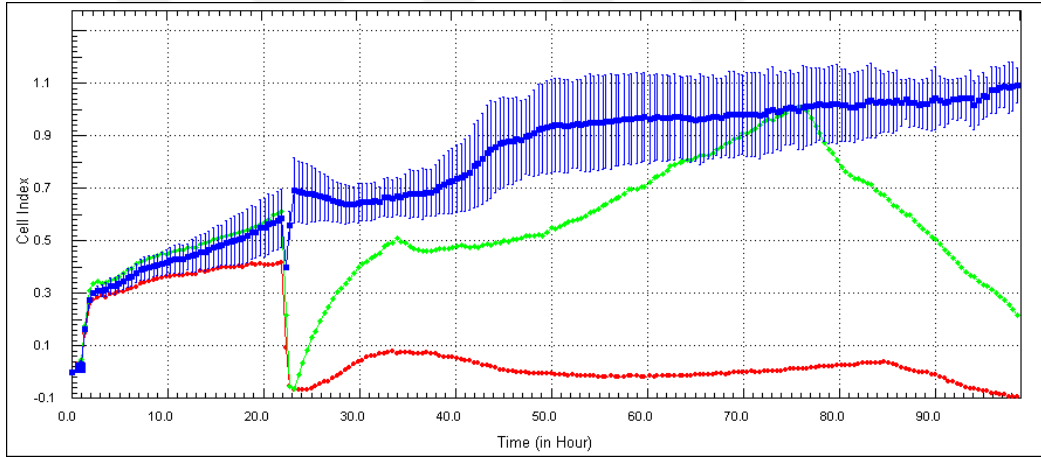
Şekil 3.49. *T. imbricatum* HWEF (NaOH) ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeksi grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



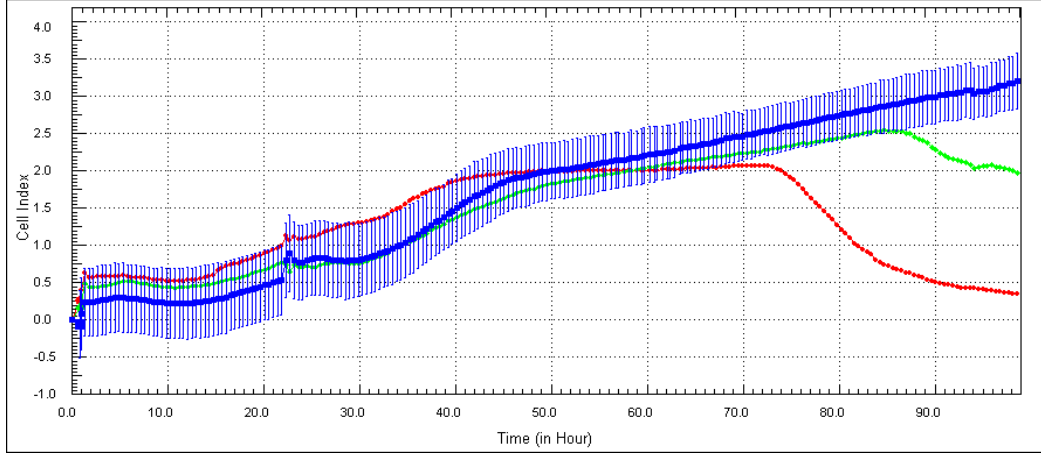
Şekil 3.50. *T. imbricatum* HWES ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeksi grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



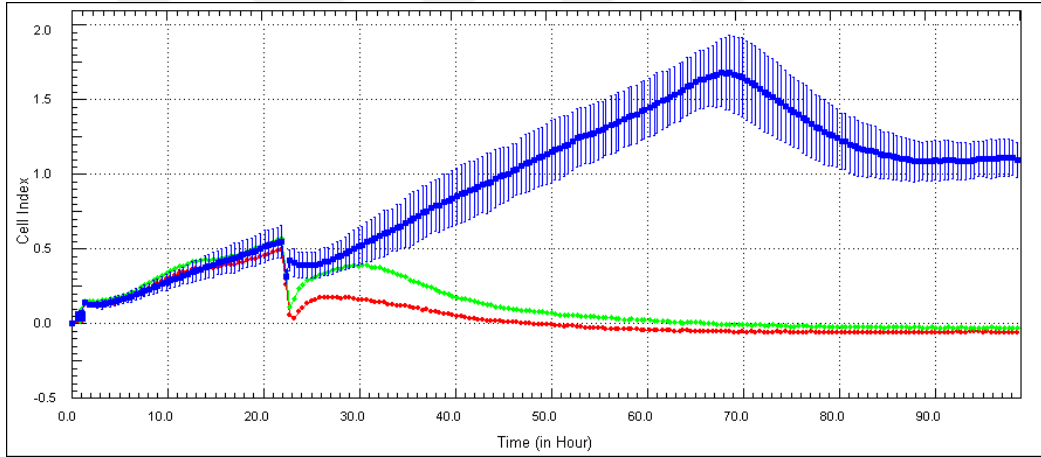
Şekil 3.51. *T. imbricatum* HWES ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



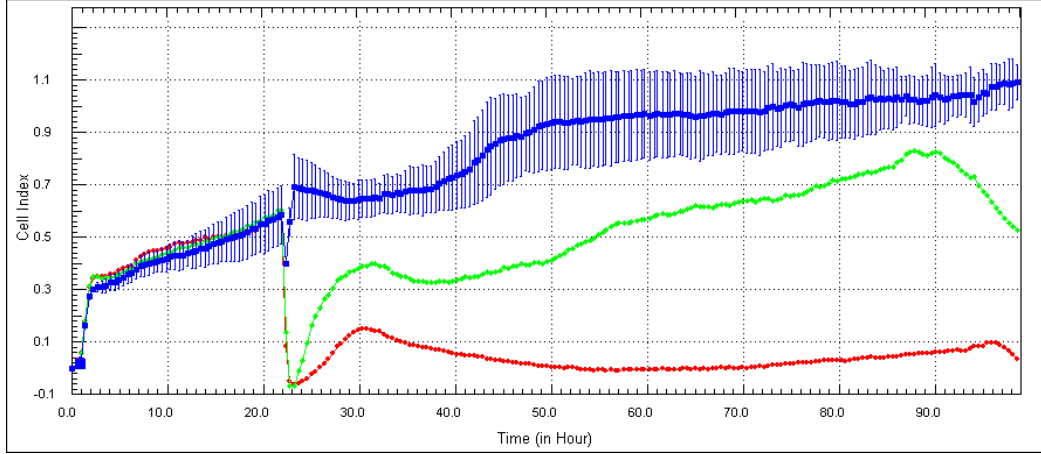
Şekil 3.52. *T. imbricatum* HWES ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



Şekil 3.53. *T. imbricatum* HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış fibroblast (L929) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



Şekil 3.54. *T. imbricatum* HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış akciğer kanseri (H1299) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeks grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)



Şekil 3.55. *T. imbricatum* HWES (NaOH) ekstresi uygulanmış meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin zamana karşı proliferasyonunu gösteren gerçek zamanlı hücre indeksi grafiği (Mavi: Kontrol Grubu, Kırmızı: 37.5 µg/mL, Yeşil: 18.75 µg/mL)

Elde edilen sonuçlara göre; mantarların farklı çözücülerle elde edilen ekstralarının bir kısmı normal hücre olan fibroblast hücrelerine karşı proliferasyonu durdurduğu ve hatta hücrelerin tamamını öldürdüğü gözlemlendi. Özellikle, *T. anatolicum* ekstralarının farklı sürelerde hücre indeksini düşürdüğü ve proliferasyonu durdurduğu izlendi. Bir kısmının ise sadece hücre proliferasyonunu durdurduğu ve grafiklerden görüldüğü gibi hücreleri tamamen öldürmediği görüldü.

Ekstreler H1299 ilaç dirençli kanser hücrelerine uygulandığında, *T. anatolicum* ekstralarının proliferasyonu durdurmadığı görüldü. Fakat su ekstralarının bu ilaç dirençli hücre hattında hücre proliferasyonunu durdurduğu izlendi. *T. anatolicum* HWEP ve HWEP (NaOH) ekstralarının kısa sürelerde H1299 ilaç dirençli hücre hattında proliferasyonu durdurduğu gözlemlendi. Bu testte özellikle ekstre konsantrasyonunun düşük tutularak ilaç olarak kullanılabilirlikleri test edildi.

Ekstreler MCF-7 kanser hücrelerine uygulandığında çoğunun bu hücrelerde proliferasyonu durdurduğu ve bir kısmının ise tamamen hücreleri öldürdüğü görüldü. *T. anatolicum* HWEP (NaOH) ekstresinin MCF-7 hücrelerinde herhangi bir etkinliği ise görülmedi.

Sonuç olarak gerçek zamanlı düşük dozlarda RTCA-exelligentsystem ile ekstrelerin etkinlikleri araştırıldı, kanser ve normal hücreler üzerindeki etkinlikleri ortaya konuldu.

3.6. *Tricholoma anatolicum*'un Aseton Ekstresinden Madde İzolasyon Çalışmaları

3.6.1. *T. anatolicum*'un aseton ekstresinin fraksiyonlandırılması

Antioksidan aktivite gösteren ekstreleri fraksiyonlandırmak için kolon kromatografisinde silika jel 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 silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Elüsyona % 100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla %5 oranlarda artış ile %100 kloroforma, devamında %5 oranlarda artış ile %100 aseton'a ve devamında %10 oranlarda artış ile %100 metanol'e ulaşılarak elüsyon yapıldı. En son %20 su: %80 Metanol ile elüsyon tamamlandı.

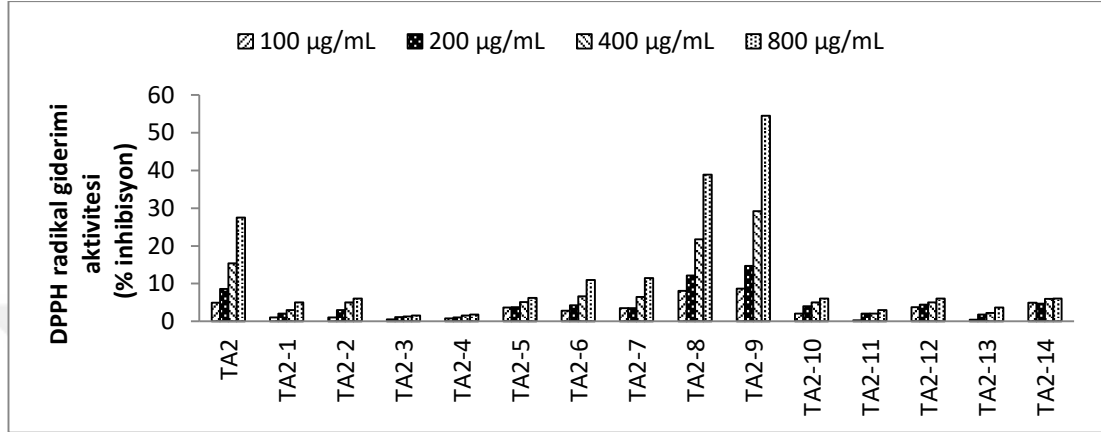
İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemleri kullanılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu amaçla çözücü sistemi olarak, uygun oranlarda hekzan:kloroform (50:50), hekzan:etilasetat (60:40); kloroform:aseton (70:30); kloroform:metanol (90:10); kloroform:toluen:metanol (10:15:2) karışımları hazırlanarak ve polariteye uygun karışım İTK'da kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel ve floresans katılmış İTK (Merck-5554) kullanıldı. *T. anatolicum* türünün aseton ekstresinin (TA2) silika jel kolon ile fraksiyonlandırılması ve benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucunda toplamda 14 fraksiyon (TA2-1 ile TA2-14) elde edildi.

3.6.2. *T. anatolicum*'un aseton ekstresinin fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi

T. anatolicum türünün aseton ekstresinin 14 fraksiyonunun (TA2-1 ile TA2-14) radikal giderim aktiviteleri hem DPPH serbest radikali hemde ABTS katyon radikali giderim aktiviteleri yöntemlerine göre test edildi.

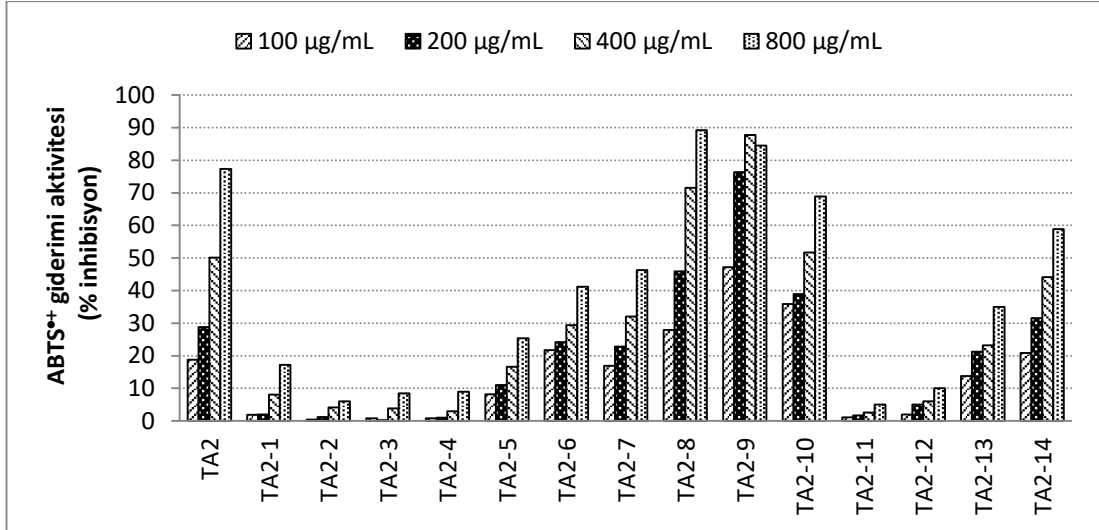
T. anaticum mantarının aseton ekstresinin fraksiyonlarının DPPH serbest radikali giderim aktivitesine göre aktivite sonuçları Şekil 3.56’de verilmektedir.

Bu sonuçlara göre TA2-8 ve TA2-9 fraksiyonları ana ekstreden daha fazla aktivite gösterdi. Bununla birlikte TA2-5, TA2-6 ve TA2-7 fraksiyonları da kayda değer aktivite gösterdi.



Şekil 3.56. *T. anaticum* türünün aseton ekstresinin fraksiyonlarının DPPH radikali giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)

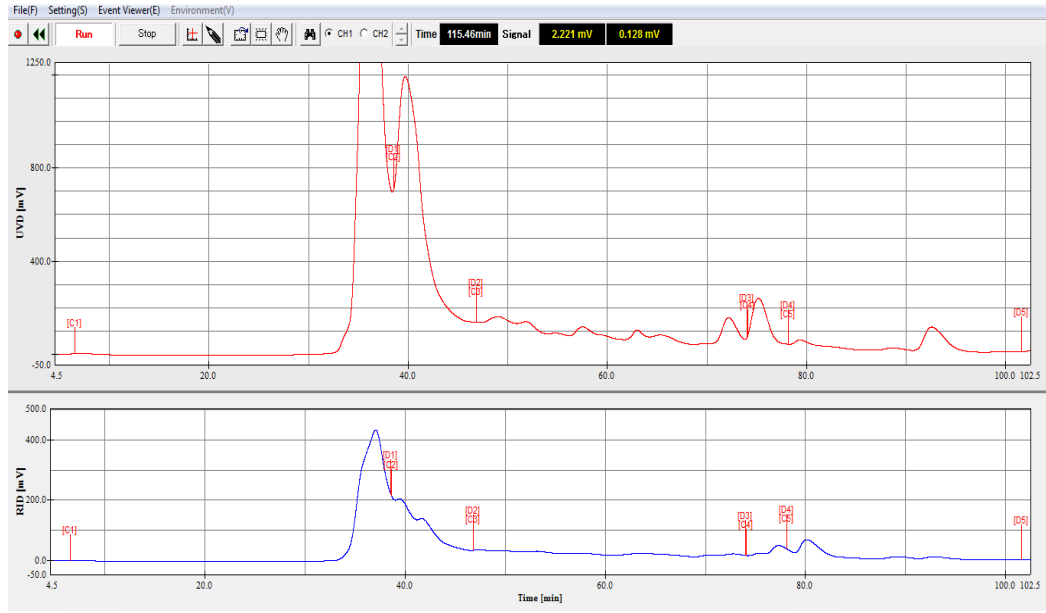
T. anaticum mantarının aseton ekstresinin fraksiyonlarının ABTS katyon radikali giderim aktivitesi sonuçları DPPH yöntemini desteklemektedir. Şöyleki bu aktivite yöntemine göre de TA2-8 ve TA2-9 fraksiyonlarının ana ekstreden daha fazla aktivite gösterdiği bulundu (Şekil 3.57). DPPH yönteminde olduğu gibi ABTS yönteminde de TA2-5, TA2-6 ve TA2-7 fraksiyonlarının da orta derecede aktivite gösterdiği görüldü. Bu nedenle birbirini destekleyen antiradikal aktiviteleri sonuçlarına bakarak, TA2-8 ve TA2-9 fraksiyonları İTK da çok benzerlik gösterdiğinden ve yakın fraksiyonlar olduğundan madde miktarını da arttırmak için birleştirildi ve TA2-8-9 ismi verildi. Benzer şekilde TA2-5 ve TA2-6 birleştirilerek ve TA2-5-6 adı verildi. TA2-7 fraksiyonu ise birleştirilmeden çalışıldı.



Şekil 3.57. *T. anaticum* türünün aseton ekstresinin fraksiyonlarının ABTS katyon radikali giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)

3.6.3. *T. anaticum*'un aseton ekstresinin aktif fraksiyonlarından maddelerin elde edilmesi

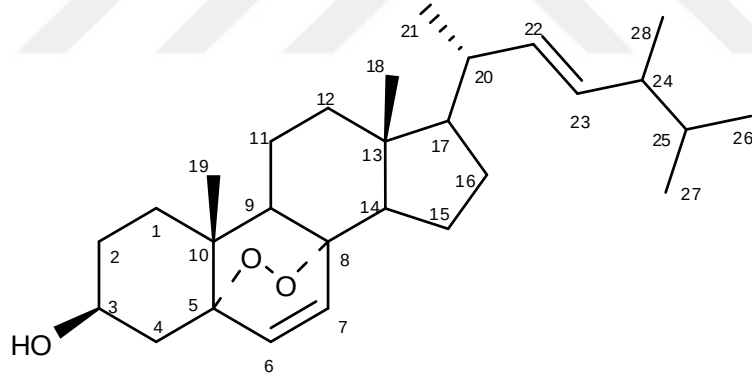
Antioksidan aktivite gösteren fraksiyonlardan madde izolasyonu için kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı. Fraksiyonlar az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Silikajele emdirilmiş fraksiyon miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Bölüm 2.4.1'de anlatıldığı gibi fraksiyonlandırma yapıldı. Elüentler 10 ml hacimlerde viallere toplandı ve ince tabaka kullanarak saf maddeler tespit edildi. TA2-5-6 fraksiyonundan TA2-5PA (1), TA2-8-9 fraksiyonundan TA2-8(4)B (2) saf maddeleri izole edildi. TA2-7 fraksiyonu Bölüm 2.8'de verilen şartlarda Recycle Prep. HPLC ile Kolon 1 ve Çözücü 6 sistemi kullanılarak çalışıldı. Buradan TA2-7C4PB (3), TA2-7-C5C2 (4) ve TA2-7-C5 (5) maddeleri saflaştırıldı (Şekil 3.58). aseton ekstresinden saflaştırılan 5 maddenin yapılarını aydınlatmak amacıyla ^1H -NMR, ^{13}C NMR, DEPT135, DEPT90, HMBC, HSQC ve MS spektrumları alındı.



Şekil 3.58. TA2-7 fraksiyonundan Recycle-HPLC profili

3.6.3.1. TA2-5-6 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ TA2-5PA (1) = Ergosterol peroksit



Şekil 3.59. TA2-5PA (1) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan TA2-5PA (1) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahve renk aldı.

^1H - ve ^{13}C -NMR (Şekil 3.60 ve Şekil 3.61), DEPT 135 (Şekil 3.62), COSY (Şekil 3.63), HSQC (Şekil 3.64), HMBC (Şekil 3.65), spektrumları değerlendirildiğinde TA2-5PA (1) maddesinin lanostan tipi steroid olduğu tespit edildi. Çifte bağın yeri

HMBC spektrumu ile belirlendi. Ayrıca, C-5 ve C-8 arasında bir peroksit köprüsünün olduğu HMBC ve ^{13}C -NMR spektrumu ile belirlendi. ^{13}C -NMR, DEPT135, HMBC, COSY spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı.

^1H -NMR spektrumunda (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.79 (3H, s, H-18), δ 0.79 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-27), δ 0.81 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-26), δ 0.86 (3H, s, H-19), δ 0.88 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-28) ve δ 0.97 (3H, d, $J=6.5$, H-21) ppm'de rezonans olan 6 tane metil piki görüldü. δ 3.95 (1H, m, H-3) ppm'de hidroksil grubuna geminal proton, δ 5.12 (1H, dd, $J=15.0$; 7.5, H-22) ve δ 5.20 (1H, dd, $J=15.0$; 7.5, H-23) ppm'de rezonans olan vinilik hidrojen pikleri, δ 6.49 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-7) ve δ 6.2 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-6) olefinik hidrojen pikleri izlendi.

^{13}C -NMR ve DEPT135 spektrumları beraber değerlendirildiğinde yapıda 6 metil, 7 metilen, 11 metin ve 4 katerner karbon izlendi. Bunların arasında 3 adet oksijene bağlı, 4 adet vinilik karbon atomu görüldü.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.66), m/z 428.3 $[\text{M}]^+$ piki $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ yapısını onayladı. Su molekülünün ayrılmasıyla m/z 410.3 $[\text{428-H}_2\text{O}]^+$ piki verdi.

Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.8'de verilen TA2-5PA (1) maddesinin ergosterol peroksit (Şekil 3.59) (130.0 mg) olduğu belirlendi (Chen vd., 2010; Noh vd., 2015).

Çizelge 3.8. TA2-5PA (1) maddesinin ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, HMBC ve COSY Değerleri

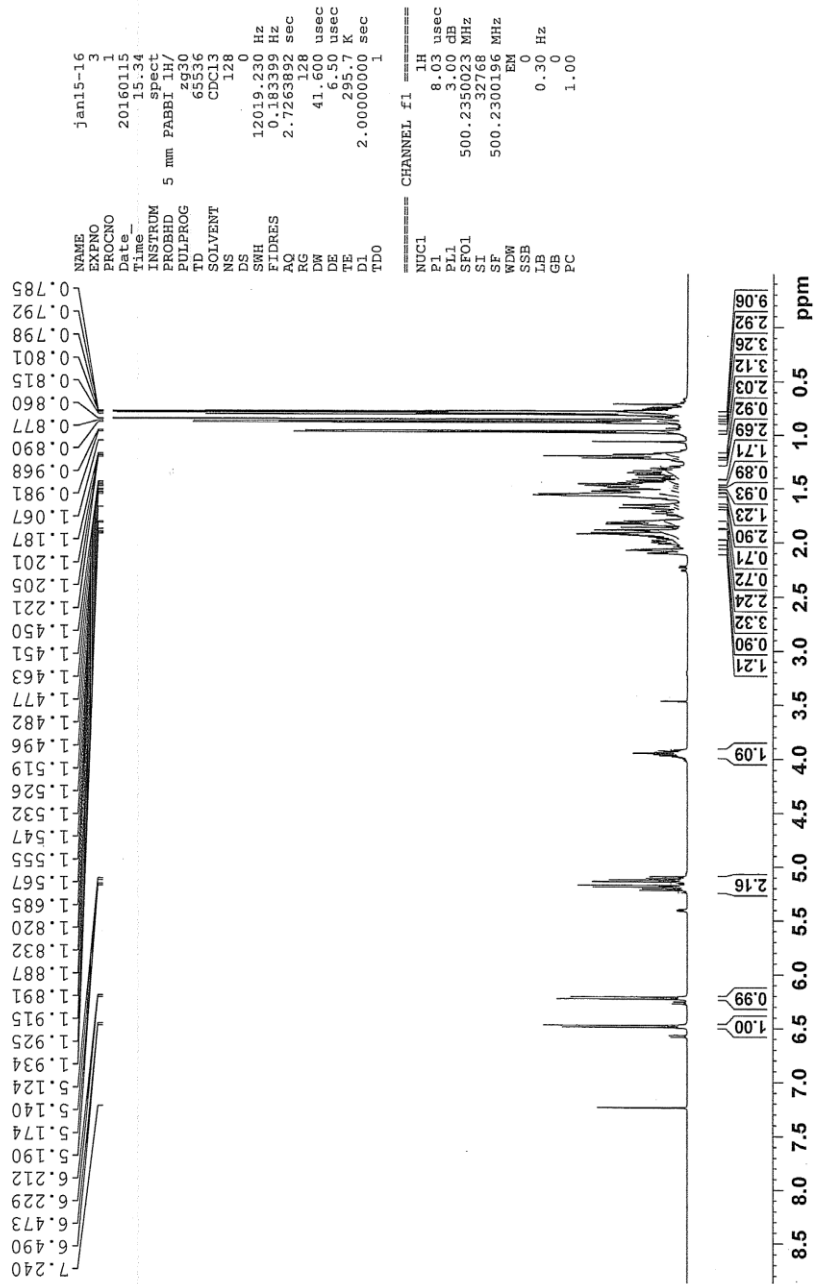
Pozisyon	^{13}C -NMR	^1H -NMR	HMBC	COSY
1	36,9	2,07; 1,91 (2H, <i>bm</i>)		
2	28,6	1,75; 1,33 (2H, <i>m</i>)		
3	66,4	3,95 (1H, <i>m</i>)		
4	30,1	1,84; 1,53 (2H, <i>m</i>)		
5	82,1	-		
6	135,4	6,22 (1H, <i>d</i> , $j=8,5$ Hz)	C-10, C-8, C-5	H-6
7	130,7	6,49 (1H, <i>d</i> , $j=8,5$ Hz)	C-14, C-8, C-5	
8	79,4	-		
9	39,7	2,01 (1H, <i>brm</i>)		
10	36,9	-		
11	23,3	1,50; 1,22 (2H, <i>m</i>)		H-9
12	39,3	1,94; 1,24 (2H, <i>m</i>)		

Çizelge 3.8 (Devam)

13	44,5	-		
14	51,1	1,55 (1H, <i>bm</i>)	C-13, C-18, C-8, C-15	
15	34,7	1,69; 1,93 (2H, <i>m</i>)		H-16
16	23,6	1,44;1,21 (2H, <i>bm</i>)		H-17
17	56,2	1,21 (1H, <i>bm</i>)	C-12, C-13, C-14, C-18	
18	12,8	0,79 (3H, <i>s</i>)	C-12, C-13, C-17	
19	18,2	0,86 (3H, <i>s</i>)	C-10, C-5, C-1, C-9	
20	39,8	2,01 (1H, <i>m</i>)	C-22, C-23	
21	20,9	0,97 (3H, <i>d</i> , <i>j</i> =6,5 Hz)	C-17, C-22	
22	135,2	5,12 (1H, <i>dd</i> , <i>j</i> =7,5; 15 Hz)	C-23, C-21, C-20, C-24	H-23
23	132,3	5,20 (1H, <i>dd</i> , <i>j</i> =7,5; 15 Hz)	C-22, C-20, C-24,	
24	42,7	1,84 (1H, <i>m</i>)	C-22,C-23,C- 25,C-26,C-27	H-28
25	33,1	1,47 (1H, <i>bm</i>)		
26	19,9	0,81 (3H, <i>d</i> , <i>j</i> =7,0 Hz)	C-25, C-24, C-27	H-27
27	19,7	0,79 (3H, <i>d</i> , <i>j</i> =6,5 Hz)	C-25, C-24, C-26	
28	17,5	0,88 (3H, <i>d</i> , <i>j</i> =6,5 Hz)	C-25, C-24, C-23	

DR. MEHMET /DR. IOBAL/TA2-5PA/CDCl3

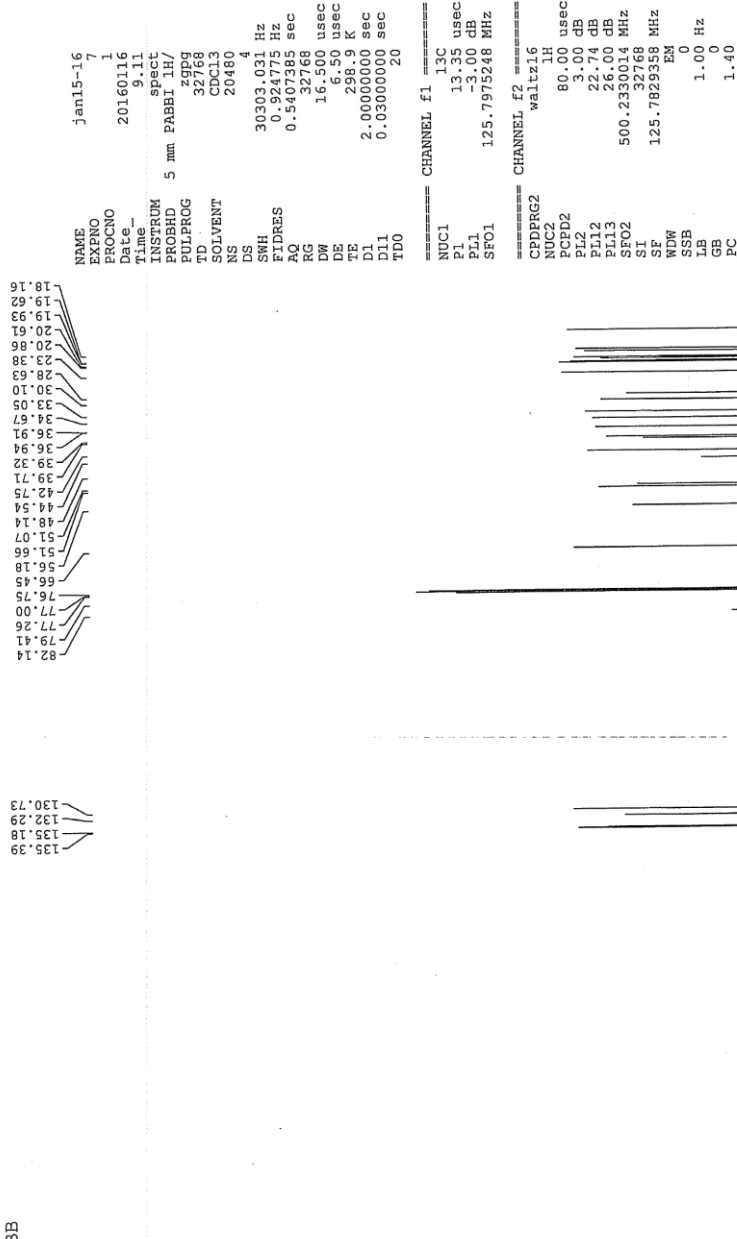
AVANCE AV-500
LAB NO:118



Şekil 3.60. TA2-5PA (1)¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 500 MHz)

AVANCE AV-500
LAB NO:118

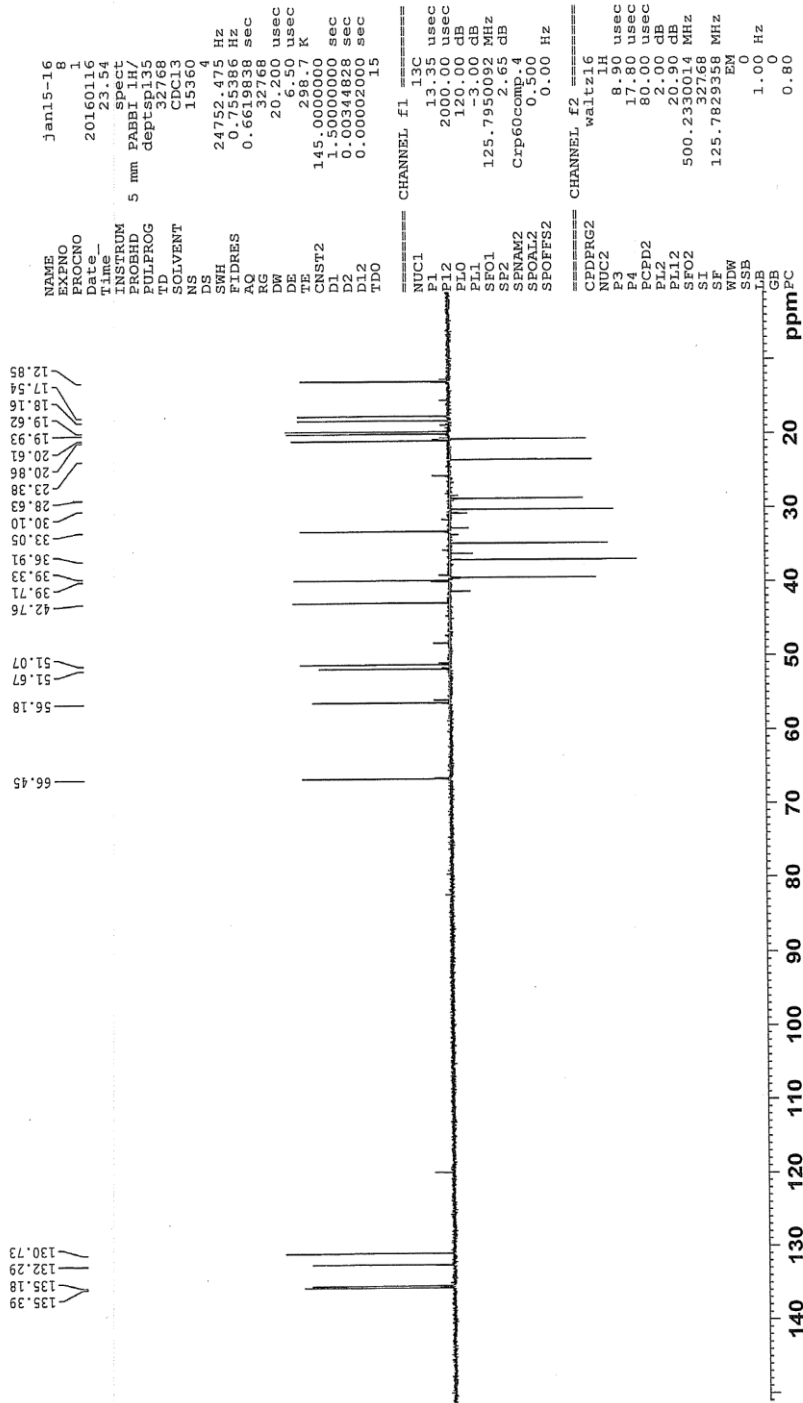
DR. MEHMET/DR. IQBAL/TA2-5PA/CDCl₃
BB



Şekil 3.61. TA2-5PA (1)'nin ¹³C-NMR Spektrumu (CDCl₃, 125 MHz)

DR. MEHMET / DR. IQBAL / TA2-5PA / CDCL3
DEPT-135

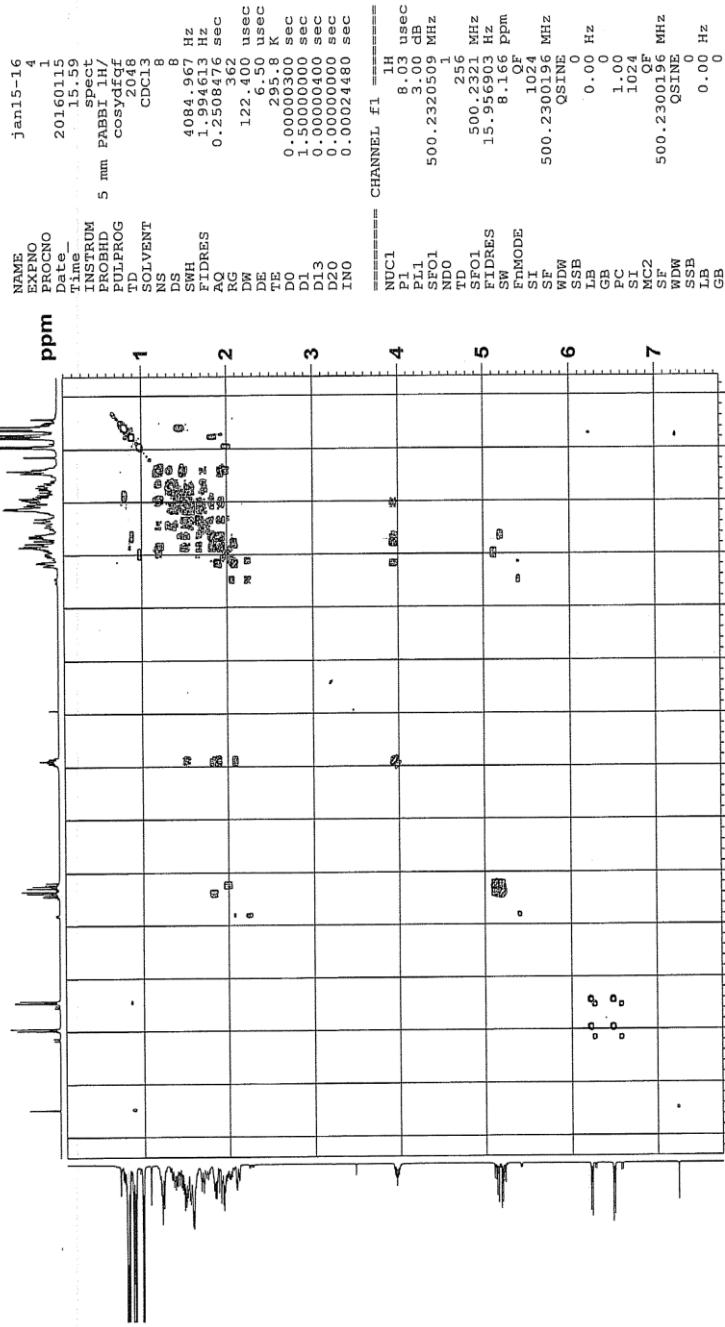
AVANCE AV-500
LAB NO: 118



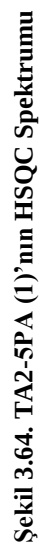
Şekil 3.62. TA2-5PA (1)'nn DEPT135 Spektrumu

DR. MEHMET/DR. IQBAL/TA2-5PA/CDCl3
ICCBS/U.O.K
COSY

AVANCE AV-500
LAB NO:118

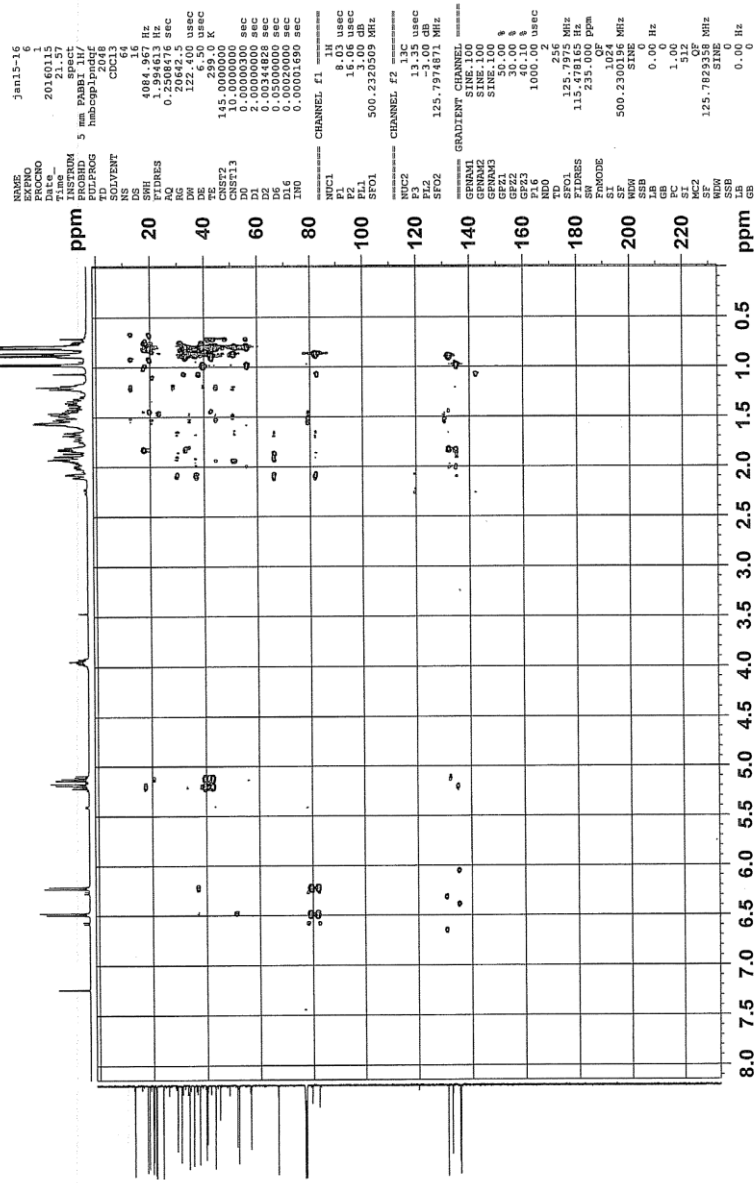


Şekil 3.63. TA2-5PA (1)'nm COSY Spektrumu



DR. MEHMET / DR. IQBAL / TA2-5PA / CDCL3
 HMBC

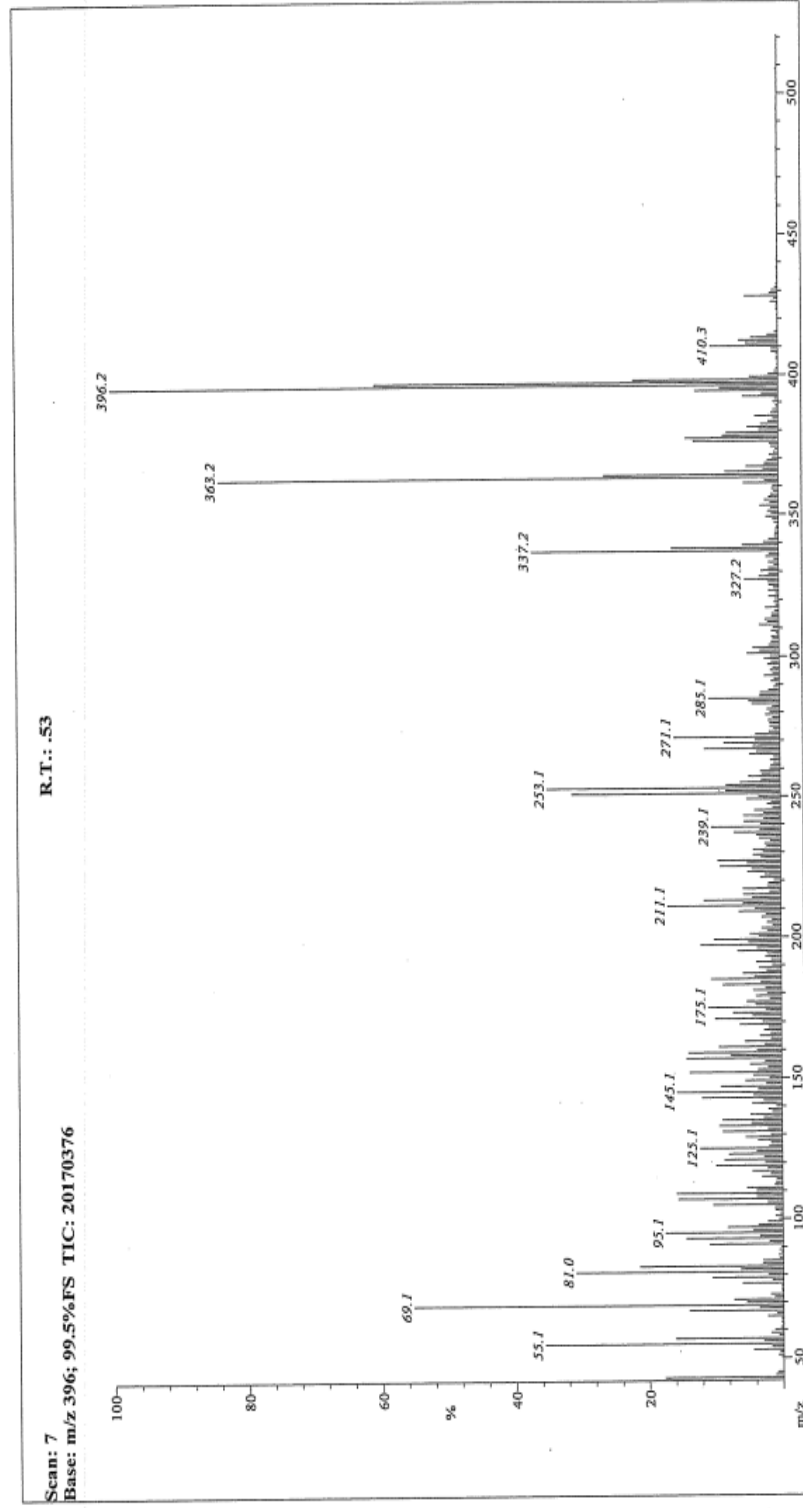
AVANCE AV-500
 LAB NO:118



Şekil 3.65. TA2-5PA (1)'nın HMBC Spektrumu

ALL INFORMATION CONTAINED
HEREIN IS UNCLASSIFIED
DATE 12/30/2015 BY 9:08:21 AM

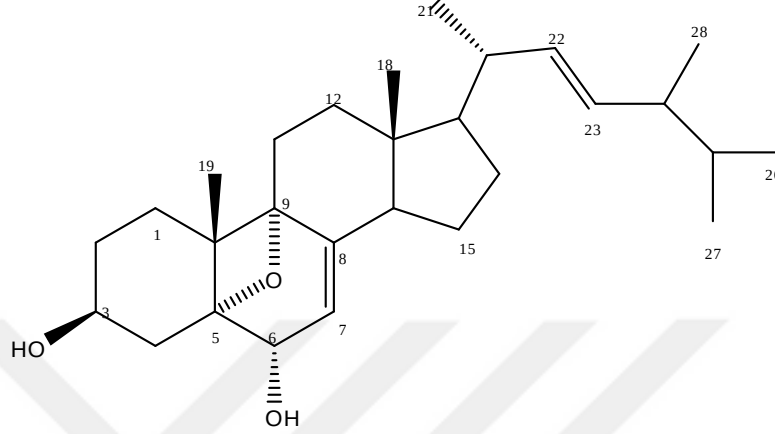
File: TA2-SPA
Sample: DR. MEHMET / DR. M. IQBAL
Instrument: JEOL MS 600H-1
Date Run: 12-30-2015 (Time Run: 09:02:05)
Ionization mode: EI+



Şekil 3.66. TA2-SPA (1)'nin EI-MS Kütle Spektrumu

3.6.3.2. TA2-8-9 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ TA2-8 (4)B (2) = 5 α ,9 α -epoksi ergosta-7,22-dien 3 β , 6 α -diol



Şekil 3.67. TA2-8 (4)B (2) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan TA2-8(4)B (2) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görünmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahve-yeşilimsi renk aldı (Şekil 3.67).

IR spektrumunda (Şekil 3.68) $\bar{\nu}$ 3268 da O-H gerilme piki, $\bar{\nu}$ 1565 civarındaki pik B halkasında bulunan C-C arasındanki çifte bağı (eğer B halkasında OH grubu var ise görülmektedir) (Kasal vd., 2010). $\bar{\nu}$ 1041 de ise C-O gerilmesine ait titreşim piki ve $\bar{\nu}$ 2922 de vinilik CH gerilmesi izlendi.

^1H - ve ^{13}C -NMR (Şekil 3.69 ve Şekil 3.70), DEPT 135 (Şekil 3.71), COSY (Şekil 3.72), HSQC (Şekil 3.73), HMBC (Şekil 3.74), spektrumları değerlendirildiğinde TA2-8(4)B (2) maddesinin lanostan tipi bir steroid olduğu tespit edildi. Çifte bağıın yeri HMBC spektrumu ile belirlendi. Ayrıca, ^{13}C -NMR spektrumunda δ 67,0 (C-3) ile δ 72,7 (C-6) ppm'de rezonans olan pikler yapıda iki adet hidroksilin olduğunu ve δ 77,9 (C-5) ile δ 74,6 (C-9) ppm'de rezonans olan pikler C-5 ile C-9 pozisyonları arasında oksijen köprüsünün olduğunu önerdi. HMBC ile ^{13}C -NMR spektrumları beraber değerlendirildiğinde öneri doğrulandı.

¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD + CDCl₃, 600MHz) δ 0.54 (3H, s, H-18), δ 0.74 (3H, d, *J*= 6.6 Hz, H-27), δ 0.76 (3H, d, *J*= 6.6 Hz, H-26), δ 0.84 (3H, d, *J*= 6.6 Hz, H-28), δ 0.95 (3H, d, *J*= 6.6 Hz, H-21), ve δ 1.04 (3H, s, H-19) ppm'de rezonans olan pikler moleküldeki 6 adeti metil pikini gösterdi. δ 3.95 (1H, *m*, H-3) ppm'de görülen multipliket yapıda ki 3-OH'ın β olduğunu gösterdi. δ 3.59 (1H, d, *J*=8,0 Hz, H-6) ppm'de hidroksil grubuna geminal proton, ve δ 5.29 (1H, d, *J*=7,9 Hz, H-7) ppm'de olefinik hidrojen piki izlendi. Buda C-6 pozisyonundaki hidrojenin α olduğunu ispatlamaktadır. Ayrıca, δ 5.11 (1H, *dd*, *J*= 15,9; 8,4Hz, H-22) ve δ 5.14 (1H, *dd*, *J*=15,9; 7,2 Hz, H-23) ppm'de zincirdeki vinilik hidrojen pikleri görüldü.

¹³C-NMR ve DEPT135 spektrumları beraber değerlendirildiğinde yapıda 6 metil, 7 metilen, 10 metin ve 5 katerner karbon izlendi. Bunların arasında 4 adet oksijene bağlı, 3 adet vinilik karbon atomu izlendi.

HRMS spektrumunda *m/z* 428,3299 [M]⁺ piki C₂₈H₄₄O₃ yapısını belirtti (Hesaplanan. 428,3290) (Şekil 3.76). Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.75), *m/z* 428,1 [M]⁺ pikini doğrulamaktadır. NMR spektrumlarının yanyana değerlendirilmesi sonucu da elde edilen bu kapalı formüle göre C-5 ile C-9 arasındaki köprünün bir adet oksijen içerdiği kütle spektrumu ile tespit edildi. EI-MS spektrumunda su molekülünün ayrılmasıyla *m/z* 410.2'deki pik [428-H₂O]⁺, ikinci su molekülünün ayrılmasıyla *m/z* 392.2 pik [428-2H₂O]⁺ izlenmektedir. ¹³C-NMR, DEPT135, HMBC, COSY, EI-MS spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı (Şekil 3.67).

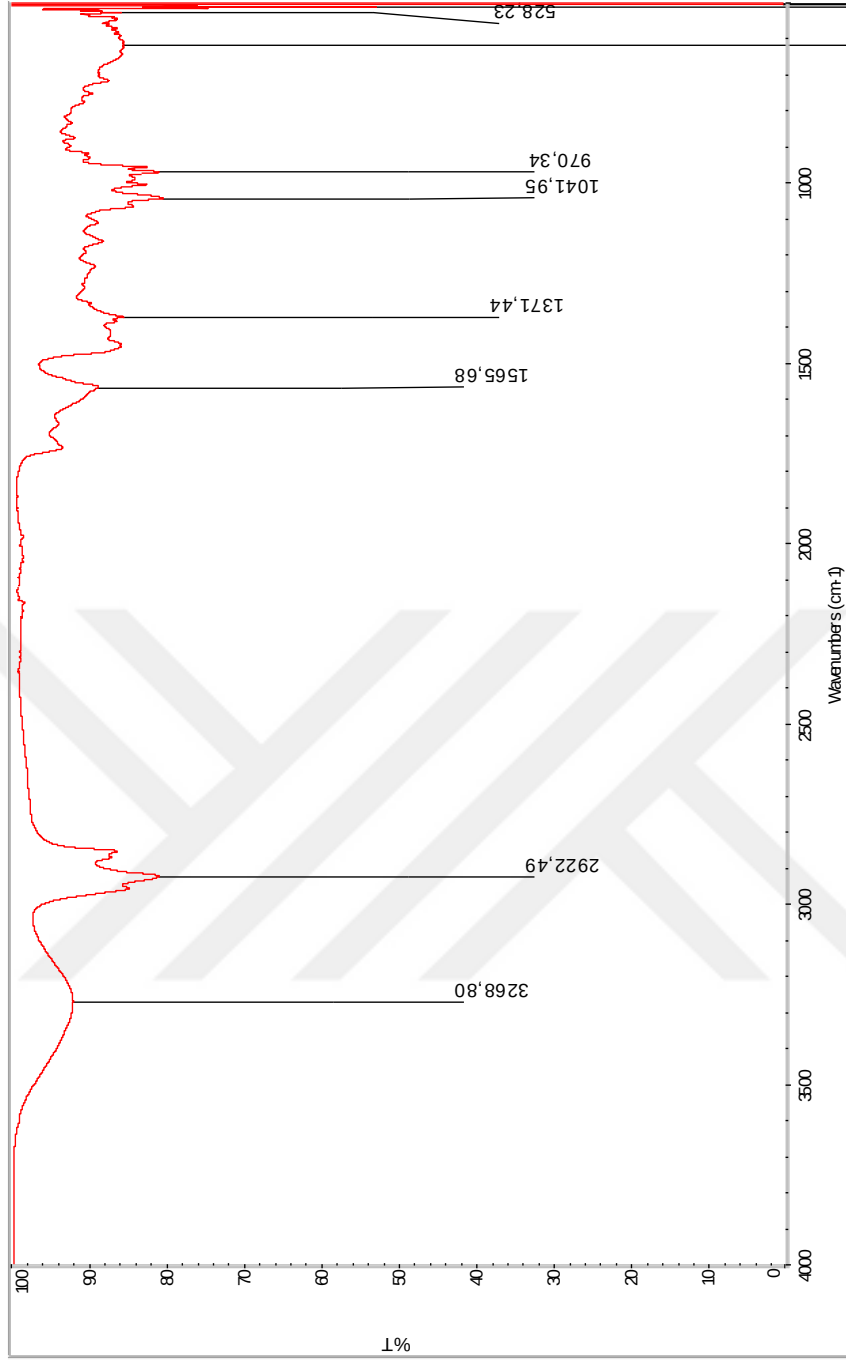
Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.9'da verilen TA2-8 (4)B (2) maddesinin yeni bir steroid (Şekil 3.67) (2.0 mg) olduğu ispat edildi ve ismi 5 α ,9 α -epoksi-ergosta-7,22-dien 3 β ,6 α -diol olarak belirlendi (Yaoita vd., 1998).

Çizelge 3.9. TA2-8 (4)B (2) saf maddesinin ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC ve COSY değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	HMBC	COSY
1	26,8	2,10; 1,28 (2H, <i>m</i>)	C-3	H-2
2	30,3	1,83; 1,43 (2H, <i>m</i>)		H-3
3	67,0	3,95 (1H, <i>m</i>)		H-4
4	39,4	1,54; 2,02 (2H, <i>m</i>)	C-3, C-10, C-2, C-5	
5	78,0	-		

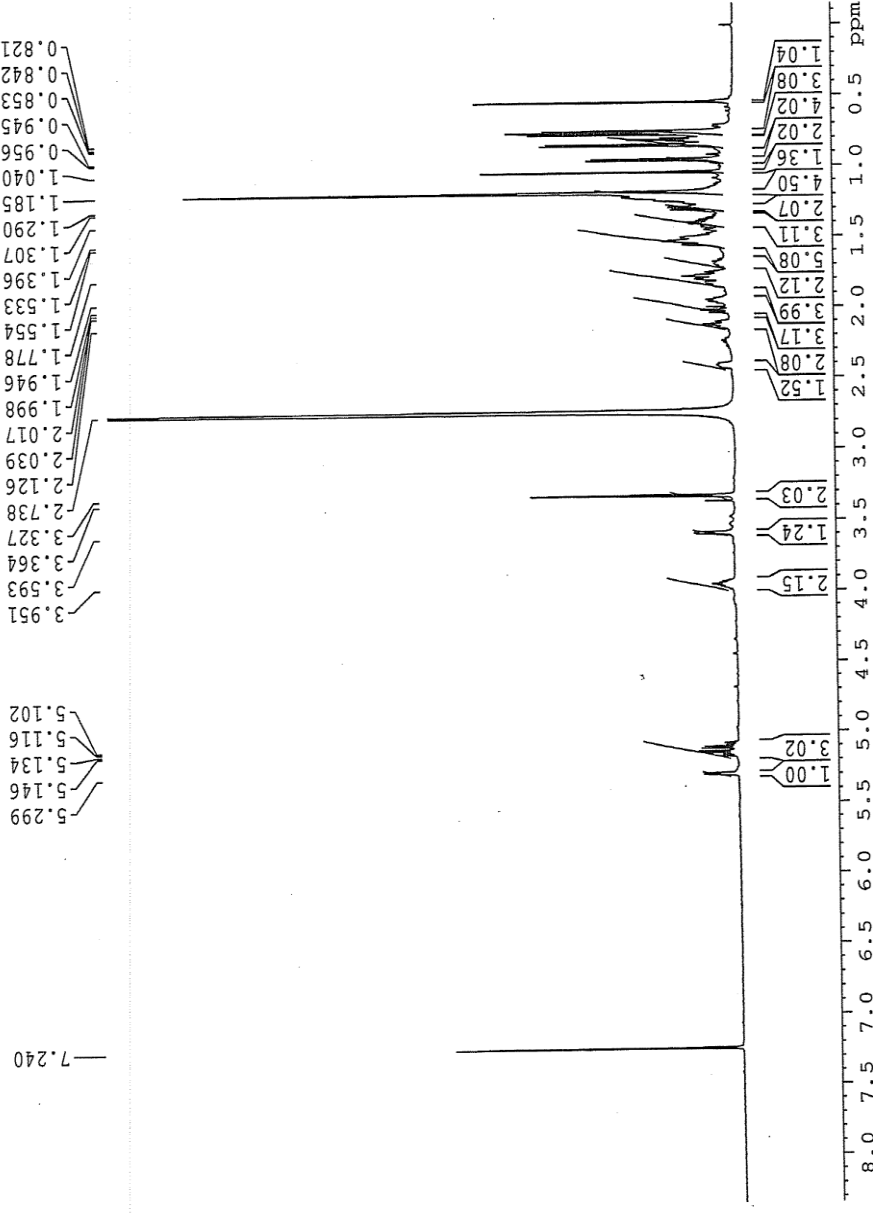
Çizelge 3.9 (devam)

6	72,8	3,59 (<i>d</i> , <i>J</i> =8,0 Hz)	C-8	H-7
7	119,3	5,29 (<i>d</i> , <i>J</i> =7,9 Hz)	C-14, C-9, C-5	
8	143,1	-		
9	74,6	-		
10	40,1	-		
11	28,3	1,52 (2H, <i>m</i>)		H-12
12	35,0	1,76; 1,53 (2H, <i>m</i>)		
13	43,6	-		
14	50,6	2,41 (1H, <i>m</i>)	C-8	H-15
15	22,8	1,49;1,20 (2H, <i>m</i>)	C-13, C-8	H-16
16	27,9	1,80;1,68 (2H, <i>m</i>)		H-17
17	55,8	1,29 (1H, <i>m</i>)	C-13, C-20, C-16, C-18, C-22	H-20
18	11,6	0,54 (3H, <i>s</i>)	C-12, C-13, C-14, C-17	
19	21,6	1,04 (3H, <i>s</i>)	C-1, C-10, C-9, C-5	
20	40,4	1,95 (1H, <i>m</i>)	C-22, C-23	H-22
21	20,9	0,95 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz)	C-20, C-22, C-17,	H-21
22	135,4	5,11 (dd, <i>J</i> = 15,9; 8,4Hz)	C-23, C-20	H-23
23	131,9	5,14 (dd, <i>J</i> = 15,9; 7,2Hz)	C-22, C-24	H-24
24	42,7	1,79 (1H, <i>m</i>)	C-22, C-23, C-25, C-28	H-28
25	32,9	1,40 (1H, <i>m</i>)	C-23, C-24, C-26, C-27	H-24
26	19,8	0,76 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	C-24, C-25, C-27, C-28	H-25; H-26
27	19,5	0,74 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	C-24, C-25, C-26, C-28	H-25
28	17,48	0,84 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,6 Hz)	C-23, C-24, C-25, C-26, C-27	



Şekil 3.68. TA2-8(4)B (2)'nin FTIR Spektrumu

Dr. Mehmat / Dr. Iqbal / TA2-8(4)B / CDCl₃+CD₃OD



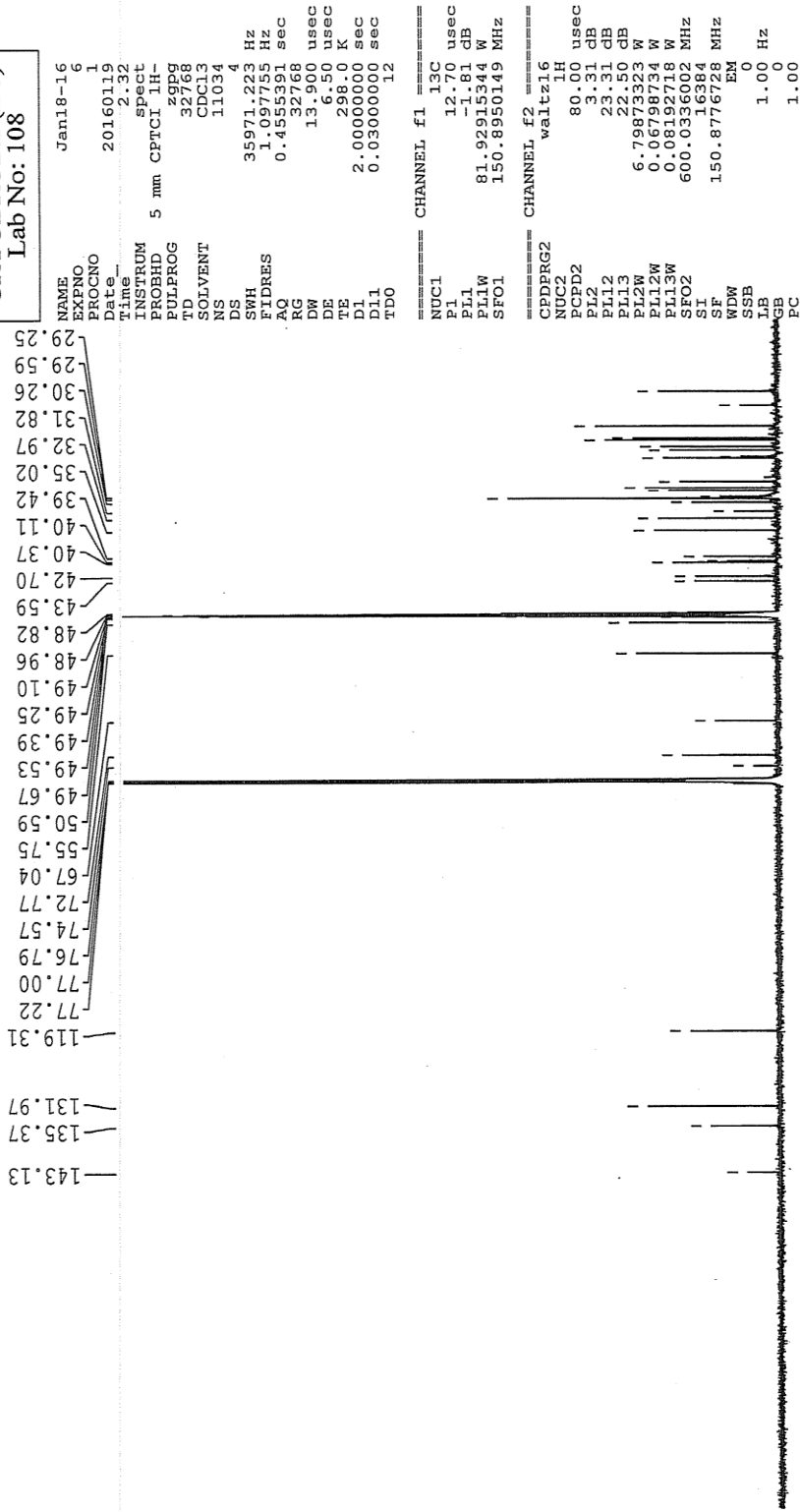
NAME Jan18-16
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20160118
Time_ 11.25
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CPTCl 1H-
PULPROG 2930
TD 32768
SOLVENT CDCl₃
NS 16
DS 0
SWH 12019.230 Hz
FIDRES 0.366798 Hz
AQ 1.3632404 sec
RG 8
DW 41.600 usec
DE 6.50 usec
TE 297.9 K
D1 2.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 8.00 usec
PL1 3.31 dB
PL1W 6.79873323 W
SFO1 600.0348002 MHz
SI 32768
SF 600.0300266 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.40

Şekil 3.69. TA2-8(4)B (2)'nin ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃+CD₃OD, 600 MHz)

Dr. Mehmat / Dr. Iqbal / TA2-8(4)B / CDCL3+CD3OD

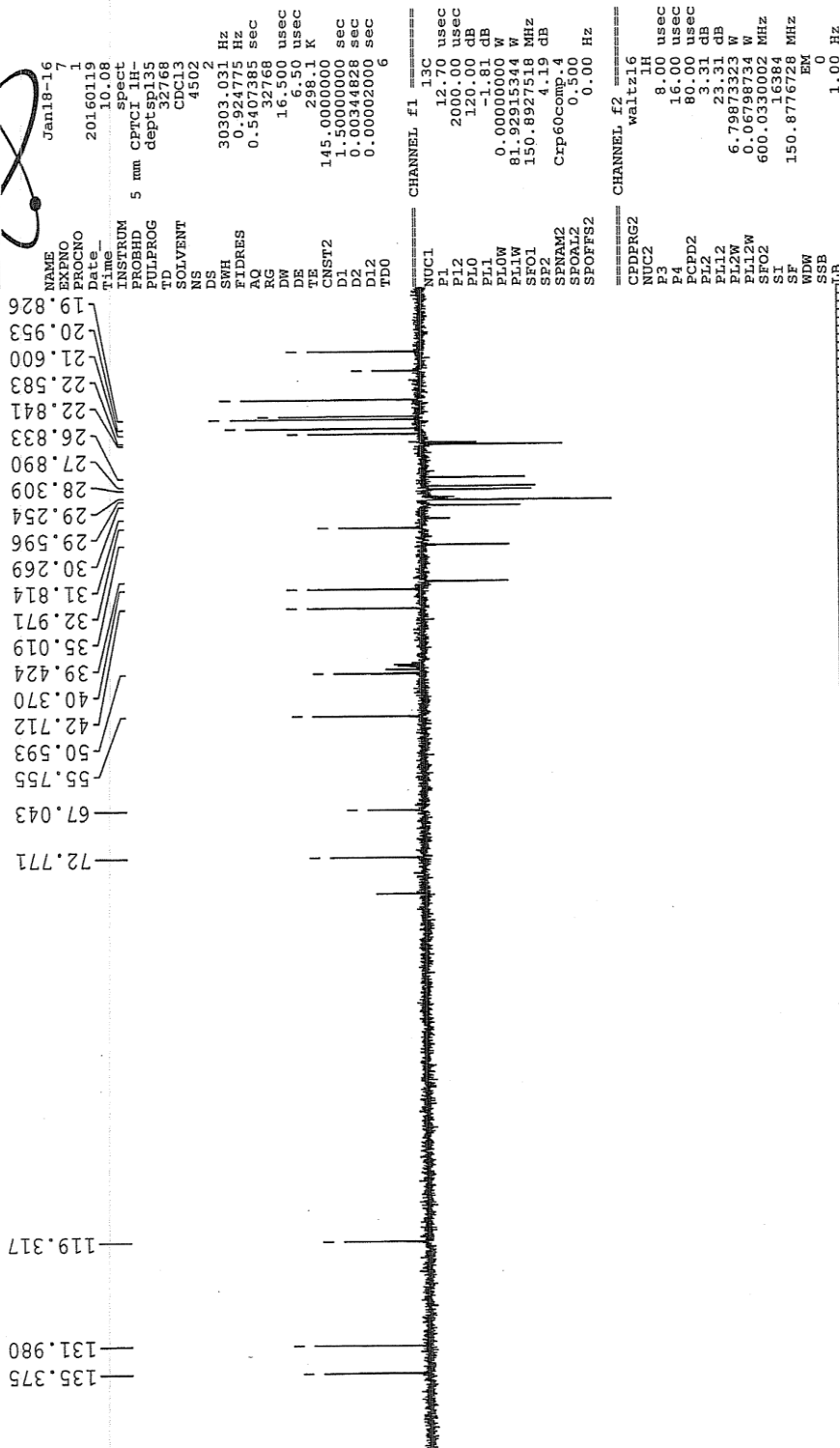
Avance AV-600 MHz
CRYOBROBE (LC)
Lab No: 108



Şekil 3.70. TA2-8(4)B (2)'nin ¹³C-NMR Spektrumu (CDCl₃ +CD₃OD, 150 MHz)



Dr. Mehnat / Dr. Iqbal / TA2-8(4)B / CDCL3+CD3OD
dept135

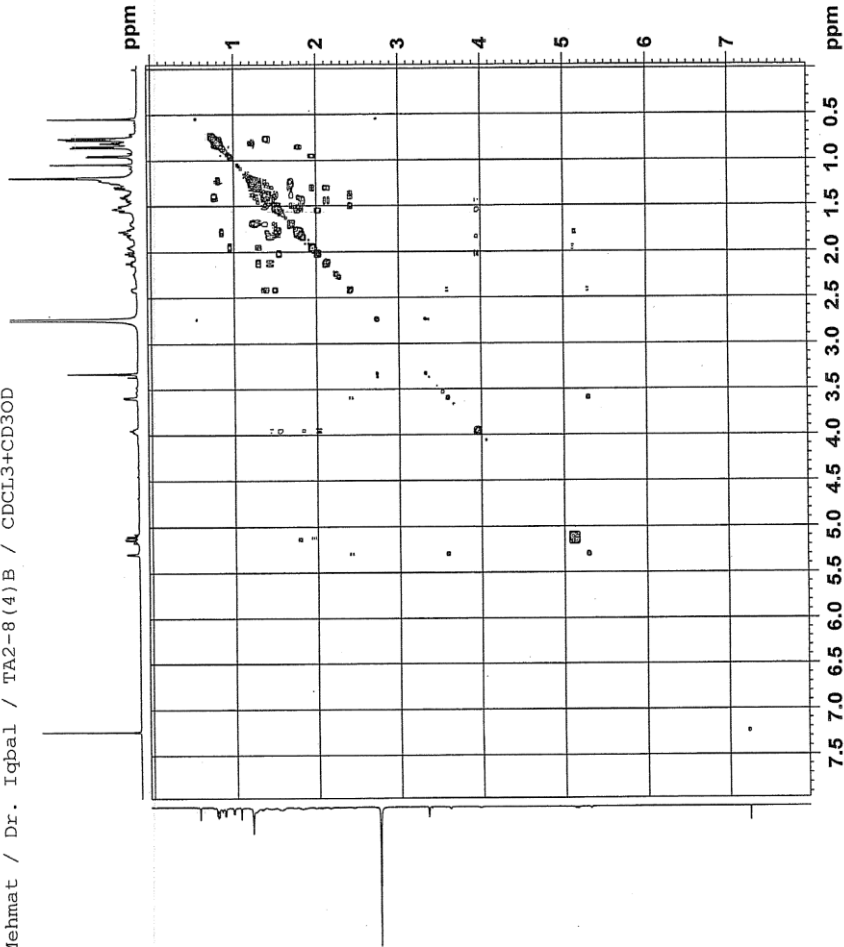


Şekil 3.71. TA2-8(4)B (2)'nin DEPT 135 Spektrumu



NAME	Jan18-16
EXENO	1
PROCN	20160118
Time	11:38
INSTRUM	spect
PROBHD	5 mm CFTCl 1H-
PULPROG	cosydfg
TD	2048
SOLVENT	CDCl3
NS	8
DS	4
SWH	4807.692 Hz
FIDRES	2.347506 Hz
AQ	0.2131460 sec
RG	202
DM	104.000 usec
DE	6.50 usec
TE	298.4 K
TD1	0.0000300 sec
D1	2.00000000 sec
D13	0.00000400 sec
D20	0.00000200 sec
IN0	0.00020800 sec

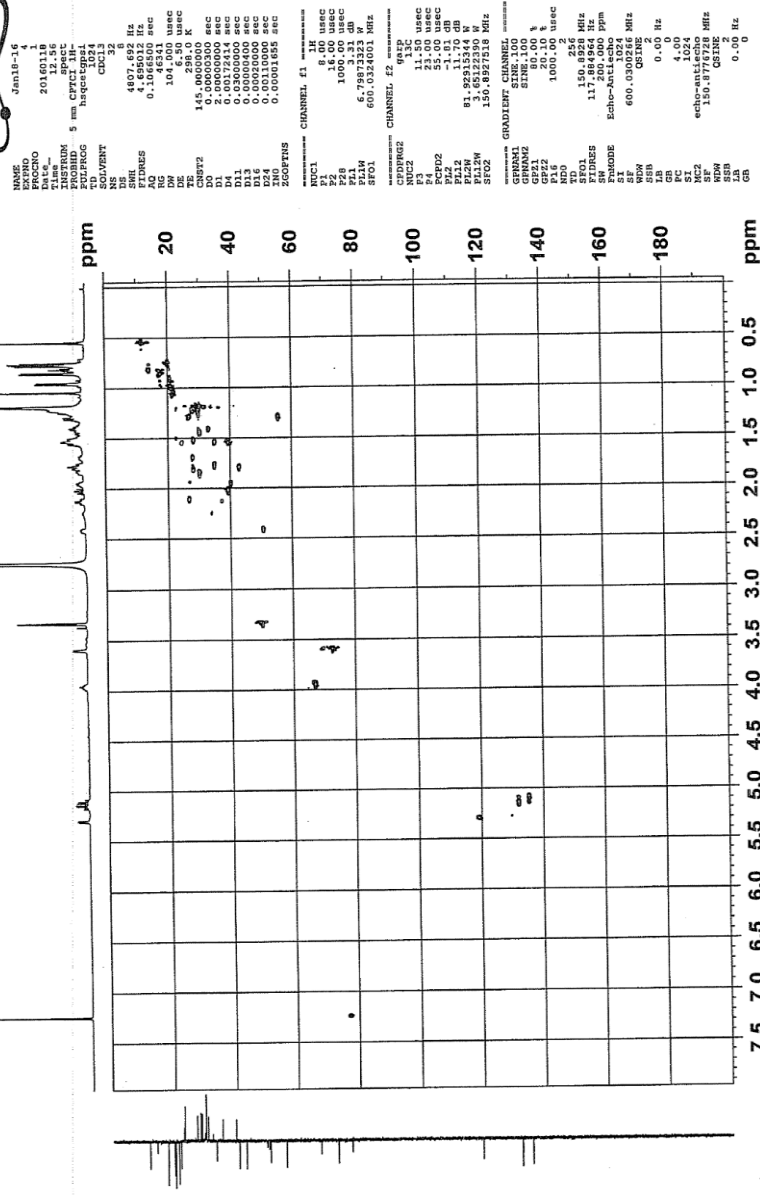
NAME	CHANEL f1	lh
NUC1	8.00 usec	
P1	3.51 dB	
FL1	6.79873200 MHz	
FLW	600.0324001 MHz	
NFO1	256	
NU0	1	
TD	256	
SFO1	600.0324 MHz	
FIDRES	18.779959 Hz	
SW	8.012 ppm	
FNMODE	QF	
SI	1024	
SF	600.0300266 MHz	
WDW	QSINE	
LB	0	
GB	0.00 Hz	
GB1	0	
SC	4.0	
EC	1024	
MC2	QF	
SF2	600.0300266 MHz	
WDW	QSINE	
LB	0	
GB	0.00 Hz	
GB1	0	



99

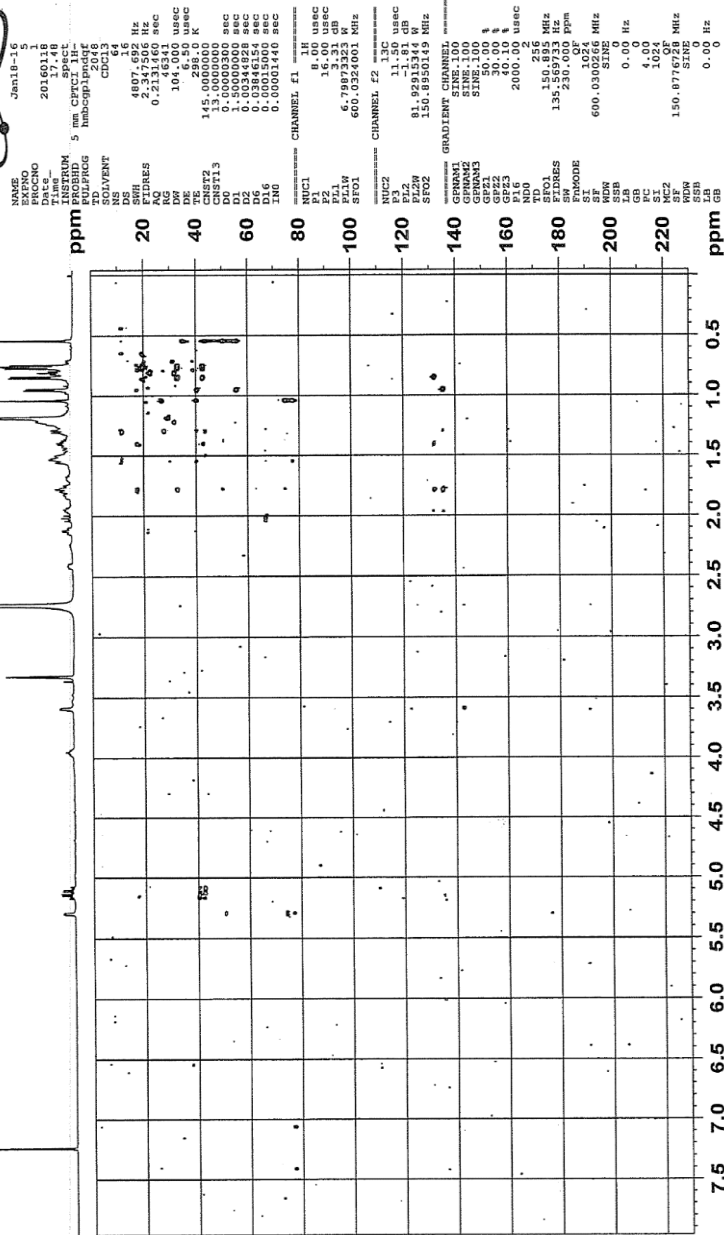


Dr. Mehmat / Dr. Iqbal / TA2-8(4)B / CDCL3+CD3OD
HSQC



Şekil 3.73. TA2-8(4)B (2)'nin HSQC Spektrumu

Dr. Mehmat / Dr. Iqbal / TA2-8(4)B / CDCL3+CD3OD
 HMBC



Şekil 3.74. TA2-8(4)B (2)'nin HMBC Spektrumu

12/30/2015 11:24:38 AM

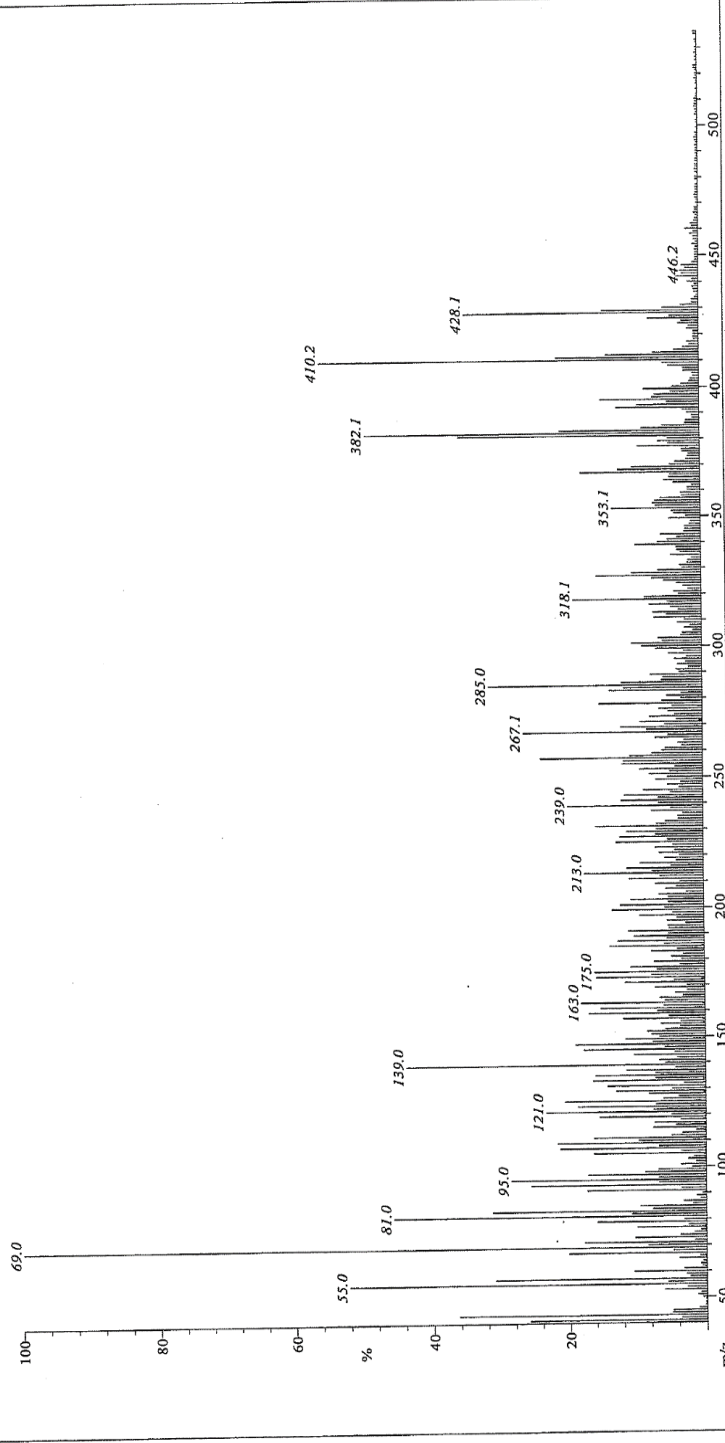
Date Run: 12-30-2015 (Time Run: 11:14:42)

File: TA2-8(4)B
Sample: DR. MEHMET / DR. M. IQBAL
Instrument: JEOL MS 600H-1

Ionization mode: EI+

R.T.: 1.07

Scan: 13
Base: m/z 69; 45.5%FS TIC: 15184043



Şekil 3.75. TA2-8(4)B (2)'nin EI-MS Kütle Spektrumu

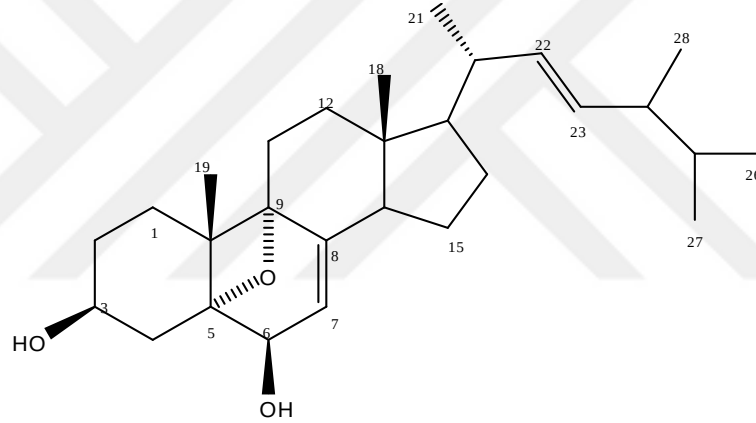
JEOL HX 110 MASS SPECTROMETER (EI-HR)			
STUDENT NAME	Erhan	SAMPLE CODE	DATED
SUPERVISOR NAME	Dr. Şenol	TA2-8(4)B	20/1/17

Mass	Theoretical Mass	Delta [ppm]	Delta [mmu]	RDB	Composition
428.3299	428.3290	2.0	0.9	7.0	C ₂₈ H ₄₄ O ₃
410.3177	410.3185	-1.9	-0.8	8.0	C ₂₈ H ₄₂ O ₃

Şekil 3.76. TA2-8(4)B (2)'nin EI-HRMS sonucu

3.6.3.3. TA2-7 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ TA2-7-C4PB (3) = 5 α ,9 α -epoksiergosta-7,22-dien 3 β , 6 β -diol



Şekil 3.77. TA2-7C4-PB (3) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan TA2-7C4-PB (3) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görünmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahve-yeşilimsi renk aldı (Şekil 377).

IR spektrumunda (Şekil 3.78) $\bar{\nu}$ 3300 civarında da O-H gerilme piki, $\bar{\nu}$ 1640 civarındaki yayvan pik olefinik hidrojen varlığı $\bar{\nu}$ 1040 civarında de ise C-O gerilmesine ait titreşim piki ve $\bar{\nu}$ 2928 deki vinilik C-H gerilme piki izlendi.

¹H- ve ¹³C-NMR (Şekil 3.79 ve Şekil 3.80), DEPT 135 (Şekil 3.81), COSY (Şekil 3.82), HSQC (Şekil 3.83), HMBC (Şekil 3.84), spektrumları değerlendirildiğinde TA2-7C4-PB (3) maddesinin lanostan tipi bir steroid olduğu tespit edildi. Çifte bağın

yeri HMBC spektrumu ile belirlendi. Ayrıca, ^{13}C -NMR'ında δ 67,8 (C-3) ve δ 71,2 (C-6) ppm'de rezonans olan sinyaller yapıda iki adet hidroksilin olduğunu, ve δ 78,6 (C-5) ve δ 75,8 (C-9) ppm'de rezonans olan pikler C-5 ile C-9 pozisyonları arasında oksijen köprüsünün olduğunu önerdi. HMBC ile ^{13}C -NMR spektrumları bu öneriyi doğruladı.

^1H -NMR spektrumunda (CD_3OD 500 MHz) δ 0.60 (3H, s, H-18), δ 0.84 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-27), δ 0.85 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-26), δ 0.93 (3H, d, $J=7.0$ Hz, H-28), δ 1.02 (3H, d, $J=6.5$ Hz, H-21), ve δ 1.04 (3H, s, H-19) ppm'de 6 tane metil piki izlenerek 28 karbonlu bir steroidi çağrıştırdı. δ 3.92 (1H, m, H-3) ppm'de görülen multipliket yapıda ki pikler 3-OH'ın β olduğunu gösterdi. δ 3.89 (1H, t, $J=2,5$ Hz, H-6) ppm'de hidroksil grubuna geminal proton, ve δ 5.04 (1H, t, $J=2,5$, H-7) olefinik hidrojen piki görüldü. Buda C-6 pozisyonundaki hidrojenin β olduğunu ispatlamaktadır. Ayrıca, δ 5.18 (1H, dd, $J=15,0$; $7,5$ Hz, H-22) ve δ 5.24 (1H, dd, $J=15,0$; $7,5$ Hz, H-23) ppm'de zincirdeki vinilik hidrojen pikleri izlendi.

^{13}C -NMR ve DEPT135 spektrumları beraber değerlendirildiğinde yapıda 6 metil, 7 metilen, 10 metin ve 5 katerner karbon izlendi. Bunların arasında 4 adet oksijene bağlı, 3 adet vinilik karbon atomu görüldü.

HRMS spektrumunda (Şekil.3.86) m/z 428,3280 $[\text{M}]^+$ piki $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ yapısını onayladı (Hesaplanan. 428,3290). Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil.3.85), m/z 428,2 $[\text{M}]^+$ pikini doğrulamaktadır. NMR spektrumlarının yanyana değerlendirilmesi sonucu da elde edilen bu kapalı formüle göre C-5 ile C-9 arasındaki köprü'nün bir adet oksijen içerdiği kütle spektrumu ile tespit edildi. EI-MS spektrumunda su molekülünün ayrılmasıyla m/z 410.2'deki piki $[428-\text{H}_2\text{O}]^+$, ikinci su molekülünün ayrılmasıyla m/z 392.3 piki $[428-2\text{H}_2\text{O}]^+$ izlenmektedir. ^{13}C -NMR, DEPT135, HMBC, COSY, EI-MS spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı (Şekil 3.77).

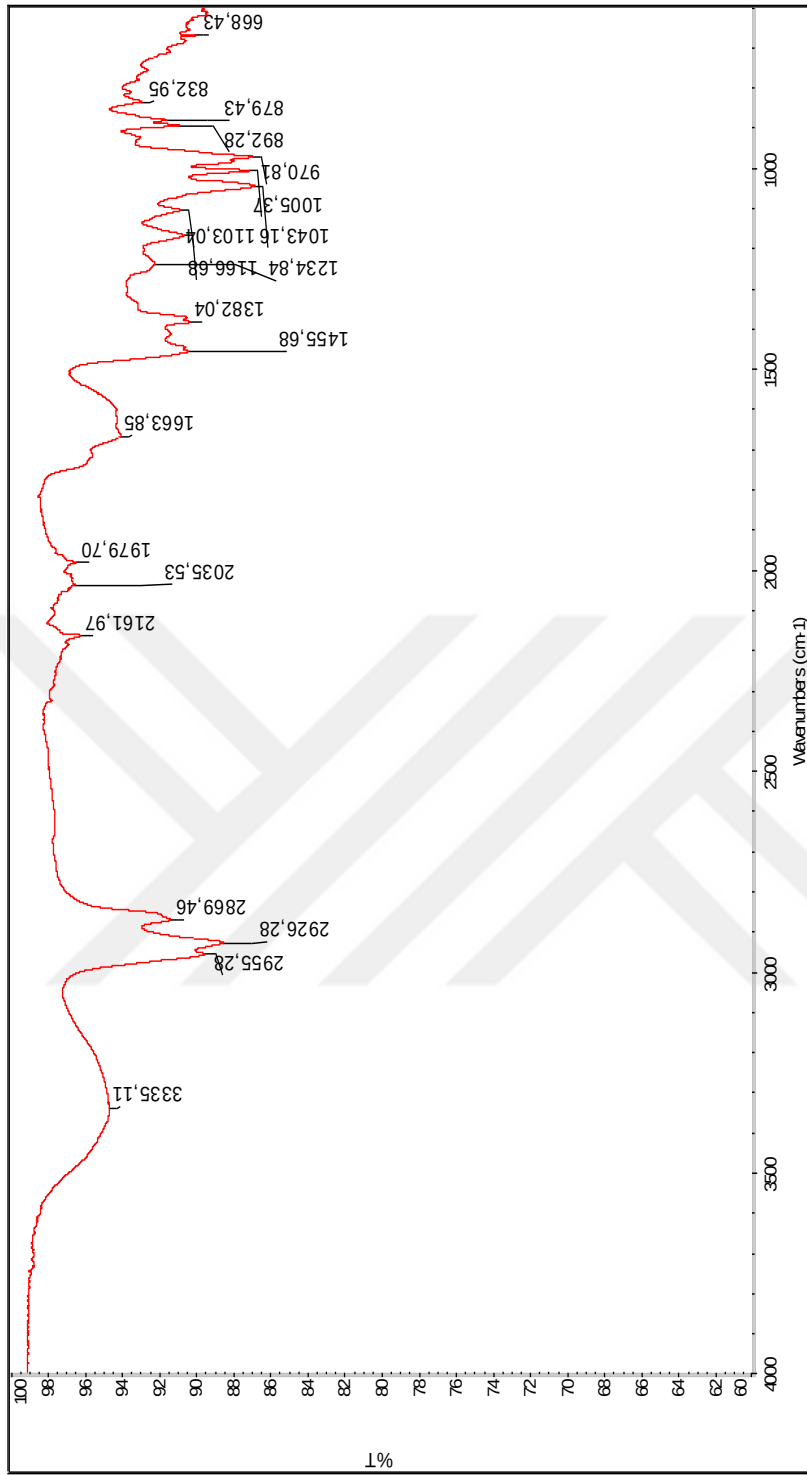
Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.10'da verilen TA2-7C4-PB (3) maddesinin yeni bir steroid (Şekil 3.77) (4.0 mg) olduğu ve TA2-8 (4)B (2) maddesinden C-6 pozisyonundaki bağlanma şekillerine göre farklılığı ispat edildi ve ismi $5\alpha,9\alpha$ -epoksiergosta-7,22-dien $3\beta,6\beta$ -diol olarak belirlendi (Chiang vd.,1991).

Çizelge 3.10. TA2-7-C4PB (3) saf maddesinin ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC ve COSY değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	HMBC	COSY
1	27,7	2,22; 1,39 (2H, <i>m</i>)	C-1, C-5, C-2, C-19, C-10	
2	31,2	1,85; 1,47 (2H, <i>m</i>)	C-3	H-3
3	67,8	3,92 (1H, <i>m</i>)		H-4
4	40,6	2,12; 1,46 (2H, <i>m</i>)	C-5, C-3, C-10, C-2	
5	78,6	<i>q</i>		
6	71,2	3,89 (1H, <i>brm</i>)	C-7, C-8	H-7
7	122,0	5,04 (1H, <i>m</i>)	C-14, C-9, C-5	
8	144,2	<i>q</i>		
9	75,8	<i>q</i>		
10	42,2	<i>q</i>		
11	28,2	1,81; 1,56 (2H, <i>m</i>)	C-13, C-9, C-14, C-12	H-12
12	36,4	1,81; 1,59 (2H, <i>m</i>)	C-13, C-14, C-9	
13	44,8	<i>q</i>		
14	51,6	2,50 (1H, <i>bm</i>)	C-13, C-19, C-7, C-8	H-15
15	23,8	1,43; 1,53 (2H, <i>m</i>)	C-8, C-9, C-13	
16	29,4	1,78; 1,33 (2H, <i>m</i>)	C-17	
17	57,2	1,34 (1H, <i>m</i>)	C-16, C-20	H-20
18	12,1	0,60 (3H, <i>s</i>)	C-12, C-13, C-14, C-17	
19	20,8	1,04 (3H, <i>s</i>)	C-10, C-1, C-5, C-9	
20	41,9	2,03 (1H, <i>s</i>)	C-17, C-22, C-23,	H-22
21	21,6	1,02 (3H, <i>d</i> , <i>j</i> =6,5Hz)	C-20, C-17, C-22	

Çizelge 3.10 (devam)

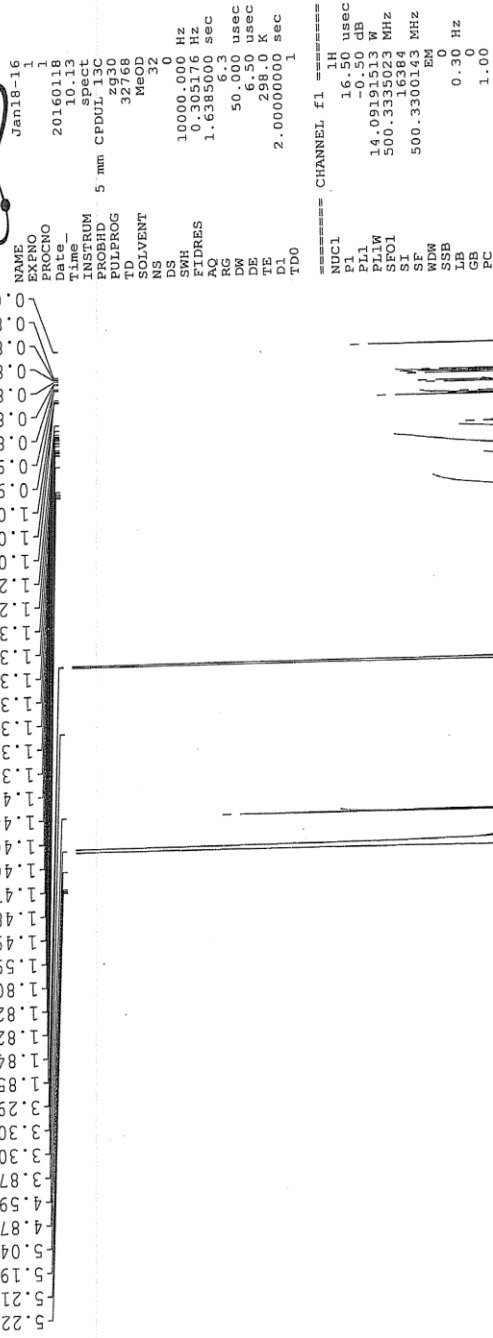
22	137,0	5,18 (1H, <i>dd</i> <i>j</i> =15,0; 7,5 Hz)	C-20, C-24	H-23
23	133,3	5,24 (1H, <i>dd</i> <i>j</i> =15,0; 7,5 Hz)	C-20, C-24	
24	44,4	1,84 (1H, <i>m</i>)	C-22, C-23, C-25, C-26, C-27, C-28	H-25
25	34,4	1,46 (1H, <i>m</i>)	C-23, C-24, C-26, C-27, C-28	H-26; H-27
26	20,5	0,85 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,0 Hz)	C-27, C-25, C-24	H-27
27	20,1	0,84 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,5 Hz)	C-26, C-25, C-24	
28	18,2	0,93 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,0 Hz)	C-24, C-25, C-23	



Şekil 3.78. TA2-7C4-PB (3)'ni FTIR Spektrumu



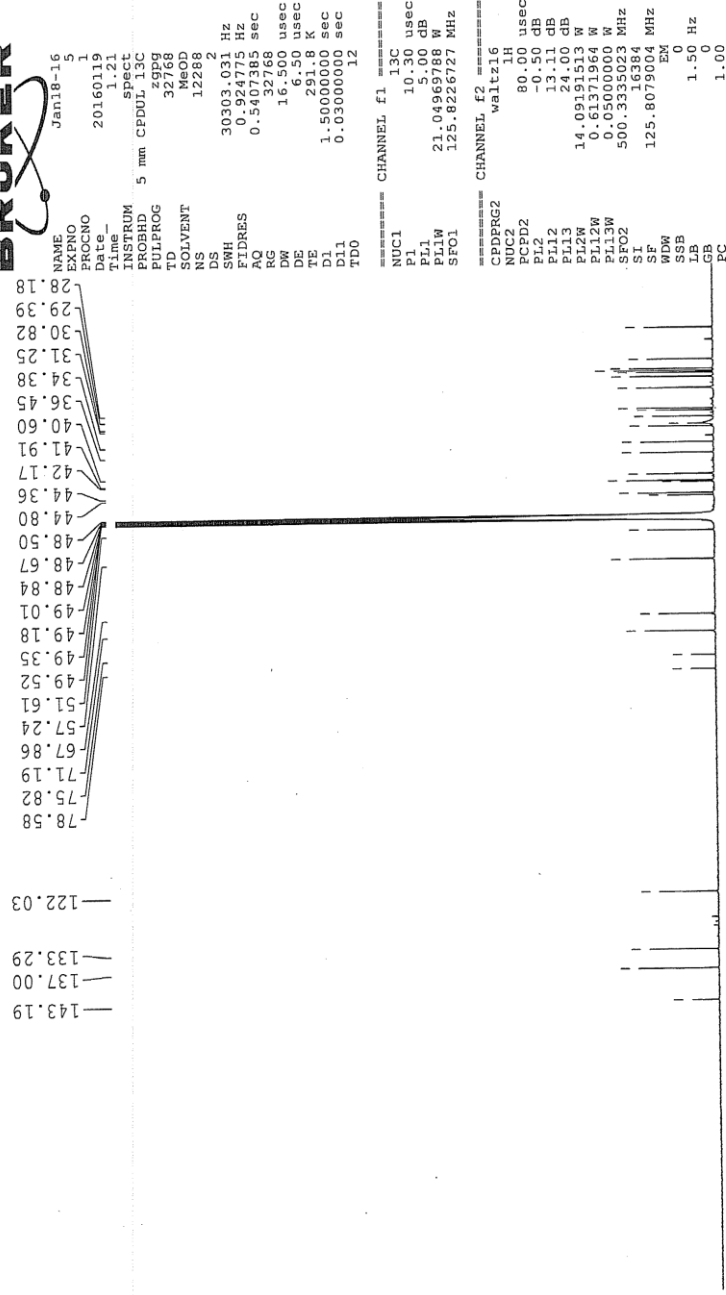
Dr. Mehmat / TA2-7C4PB / CD3OD
¹H



Şekil 3.79. TA2-7C4-PB (3)'nin ¹H-NMR Spektrumu (CD₃OD, 500 MHz)

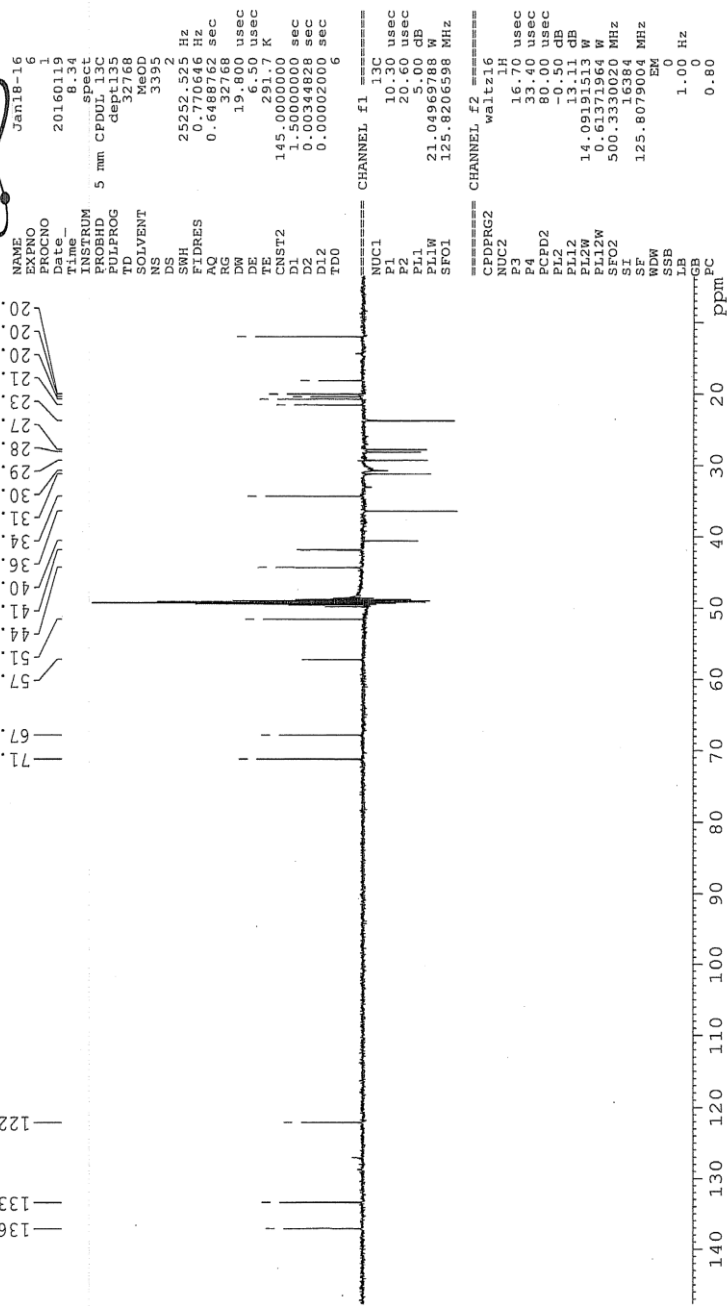


Dr. Mehmet / TA2-7C4PB / CD3OD
BB



Şekil 3.80. TA2-7C4-PB (3)'nin ¹³C-NMR Spektrumu (CD₃OD, 125 MHz)

Dr. Mehmat / TA2-7C4PB / CD3OD
DEPT135

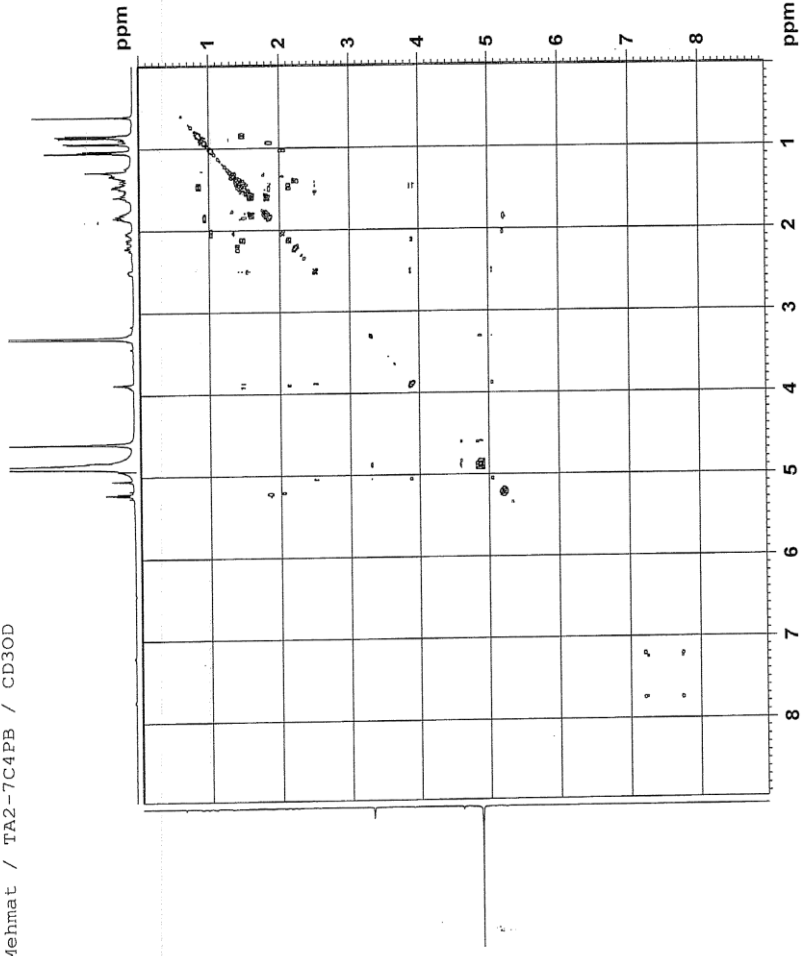


Şekil 3.81. TA2-7C4-PB (3)'nin DEPT 135 Spektrumu

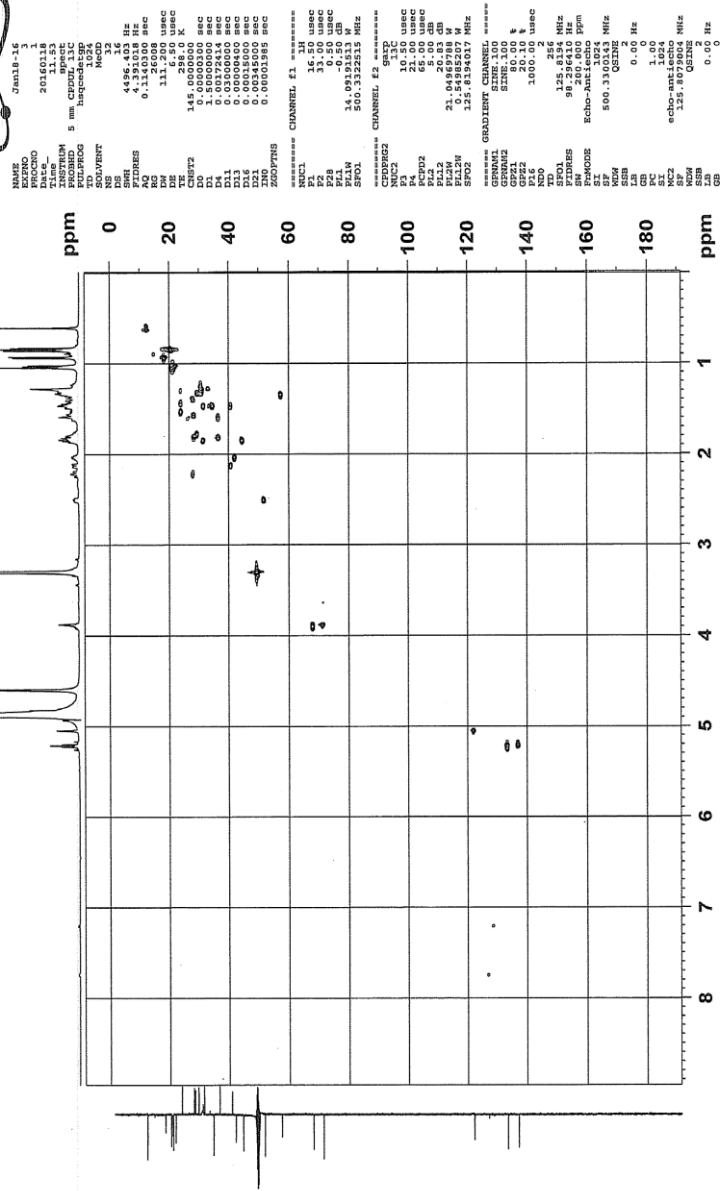
Dr. Mehmet / TA2-7C4PB / CD3OD
COSY



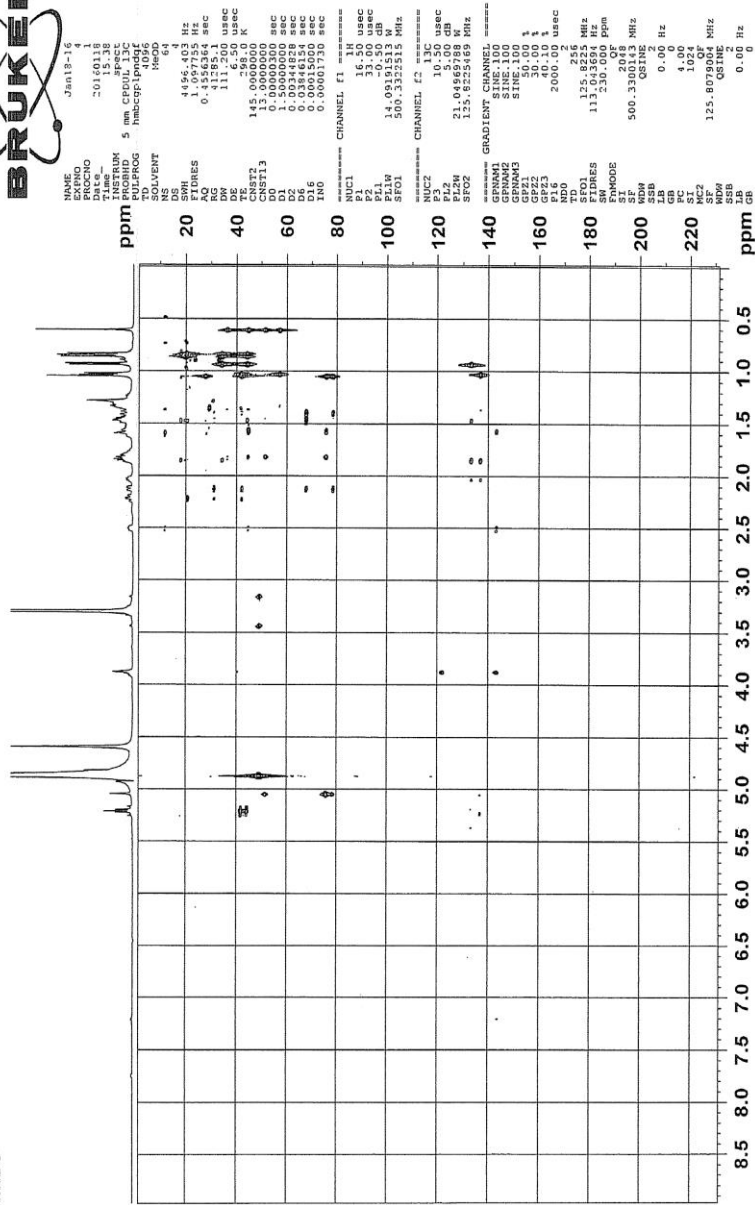
NAME Jan18-16
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20160118
Time_ 10.35
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CPDUL 13C
PULPROG cosydrg
TD 2048
SOLVENT MeOD
NS 8
DS 2
SWH 4496.403 Hz
FIDRES 2.195509 Hz
AQ 0.2275988 sec
RG 111.718 usec
DE 111.650 usec
TE 297.9 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D13 0.00000400 sec
D20 0.00000400 sec
INO 0.0002240 sec
CHANNEL f1 1H
NUC1 1H
P1 16.50 usec
PL1 -0.50 dB
FLLW 14.09132513 MHz
SFO1 500.332513 MHz
NU0 256
TD 256
SFO1 500.3323 MHz
SW 17.564074 Hz
FIDRES 8.987 ppm
FMODE QF
SI 2048
WDW 500.3300143 MHz
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
FC 4.00
SI2 2048
WDW 500.3300143 MHz
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0



Şekil 3.82. TA2-7C4-PB (3)'nin COSY Spektrumu



Şekil 3.83. TA2-7C4-PB (3)'nin HSQC Spektrumu



Şekil 3.84. TA2-7C4-PB (3)'nin HMBBC Spektrumu

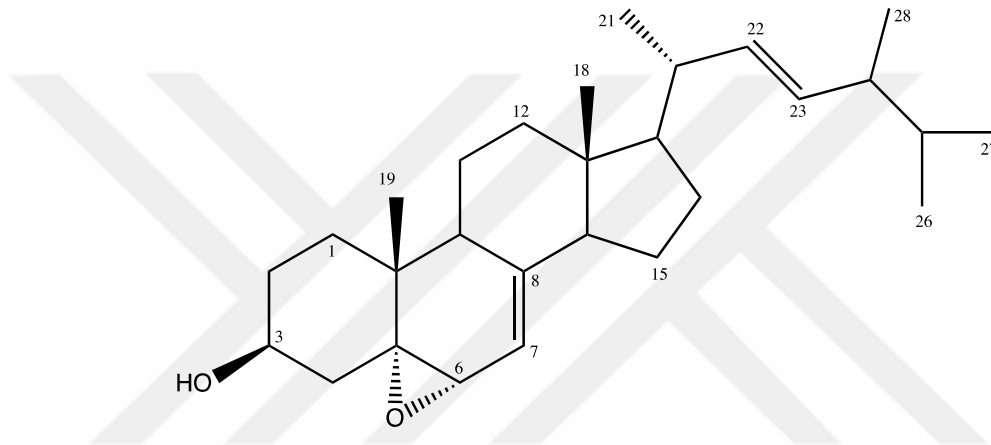
Date Run: 12-30-2015 (Time Run: 09:23:48)

JEOL HX 110 MASS SPECTROMETER (EI-HR)			
STUDENT NAME	Erhan/Dr. Mehmet	SAMPLE CODE	DATED
SUPERVISOR NAME	Dr. İqbal	TA2-7C4PB	19/1/17

Mass	Theoretical Mass	Delta [ppm]	Delta [mmu]	RDB	Composition
428.3280	428.3290	-2.4	-1.0	7.0	C ₂₇ H ₄₄ O ₂
410.3168	410.3185	-4.1	-1.7	8.0	C ₂₇ H ₄₄ O ₂
382.3210	382.3236	-6.7	-2.6	7.0	C ₂₇ H ₄₄ O ₂

Şekil 3.86. TA2-7-C4PB (3)'ün EI-HRMS sonucu

❖ TA2-7C5-C2 (4) = 5 α ,6 α epoksi-ergosta-7,22-dien 3 β -ol



Şekil 3.87. TA2-7C5-C2 (4) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan TA2-7C5-C2 (4) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görünen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahve renk aldı (Şekil 3.87).

¹H- ve ¹³C-NMR (Şekil 3.88 ve Şekil 3.89), DEPT 135 (Şekil 3.90), COSY (Şekil 3.91), HSQC (Şekil 3.92), HMBC (Şekil 3.93), spektrumları değerlendirildiğinde TA2-7C5-C2 (4) maddesinin steroid olduğu tespit edildi. Çifte bağın yeri HMBC spektrumu ile belirlendi. Ayrıca, ¹³C-NMR'ında δ 67,1 ppm'de rezonans olan pik C-3 pozisyonunda bir adet hidroksilin olduğunu gösterdi. HMBC ile ¹³C-NMR spektrumları beraber değerlendirildiğinde δ 75,7 (C-5) ve δ 72,9 (C-6) ppm'de rezonans olan sinyaller C-5 ile C-6 pozisyonları arasında oksijen köprüsünün olduğunu gösterdi.

¹H-NMR spektrumunda (CD₃OD + CDCl₃ 500 MHz) δ 0.47 (3H, s, H-18), δ 0.69 (3H, d, J = 7.5 Hz, H-26), 0.70 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-28), δ 0.78 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-28), δ 0.89 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21), ve δ 0.92 (3H, s, H-19) ppm'de 6 tane metil piki bize 28 karbonlu lanostan tipi steroidi çağrıştırdı. δ 3.85 (1H, *m*, H-3)'de görülen multipler yapıda ki pik 3-OH'in β olduğunu gösterdi. δ 3.44 (1H, br. s, H-6) ppm'de rezonans olan pikden C-6 karbonuna serbest olmayan oksijenin bağlandığı anlaşılmaktadır. Buda ¹³C-NMR ile değerlendirildiğinde oksijen köprüsünün bir ayağının C-6 karbonunda olduğunu işaret etti. δ 5.18 (1H, *t*, J =2,5, H-7) olefinik hidrojen piki görüldü. Ayrıca, δ 5.03 (1H, *dd*, J = 8,0; 15,0 Hz, H-22) ve δ 5.09 (1H, *dd*, J = 7,5; 15,0 Hz, H-23)'de vinilik hidrojen pikleri görüldü.

¹³C-NMR ve DEPT135 spektrumları beraber değerlendirildiğinde yapıda 6 metil, 7 metilen, 11 metin ve 4 katerner karbon izlendi. Bunların arasında 3 adet oksijene bağlı, 3 adet vinilik karbon atomu görüldü.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.94), m/z 412,1 [M]⁺ piki görüldü. NMR spektrumlarının yanyana değerlendirilmesi sonucu da elde edilen bu kapalı formüle göre C-5 ile C-6 arasındaki köprünün bir adet oksijen içerdiği kütle spektrumu ile tespit edildi. ¹³C-NMR, DEPT135, HMBC, COSY, EI-MS spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı (Şekil 3.87).

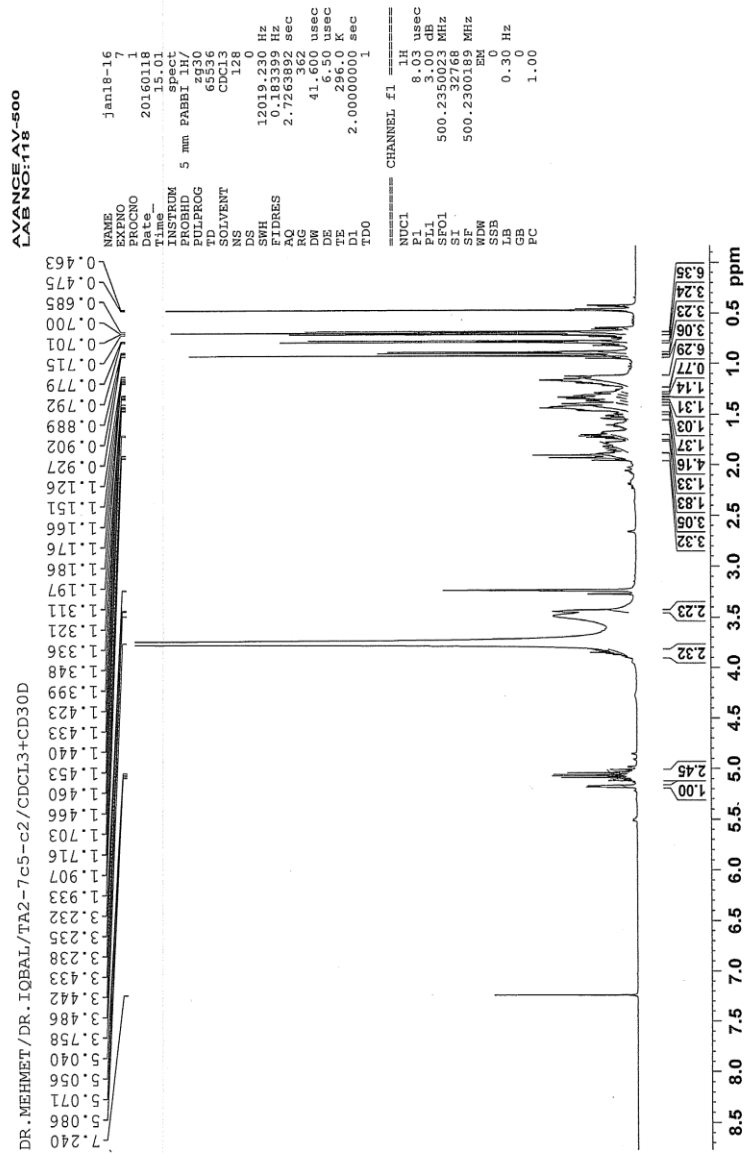
Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.11'de verilen TA2-7C5-C2 (4) maddesinin lanostan tipi bir steroid (Şekil 3.87) (6.4mg) olduğu ispat edildi ve ismi 5 α ,6 α -epoksi-ergosta-7,22-dien 3 β -ol olarak belirlendi (Xiao vd., 2001).

Çizelge 3.11. TA2-7C5-C2 (4) maddesinin ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC ve COSY değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	HMBC	COSY
1	32,5	1,39; 1,37 (2H, <i>m</i>)	C-1, C-3, C-5, C-10	H-2
2	30,2	1,68;1,29 (2H, <i>m</i>)		H-3
3	67,1	3,85 (1H, <i>m</i>)		H-4
4	38,7	1,94;1,92 (2H, <i>m</i>)		
5	75,7	<i>q</i>		
6	72,9	3,44 (1H, <i>m</i>)	C-7, C-8, C-5, C-10	H-7
7	117,3	5,18 (1H, <i>m</i>)	C-14, C-5, C-6	

Çizelge 3.11 (devam)

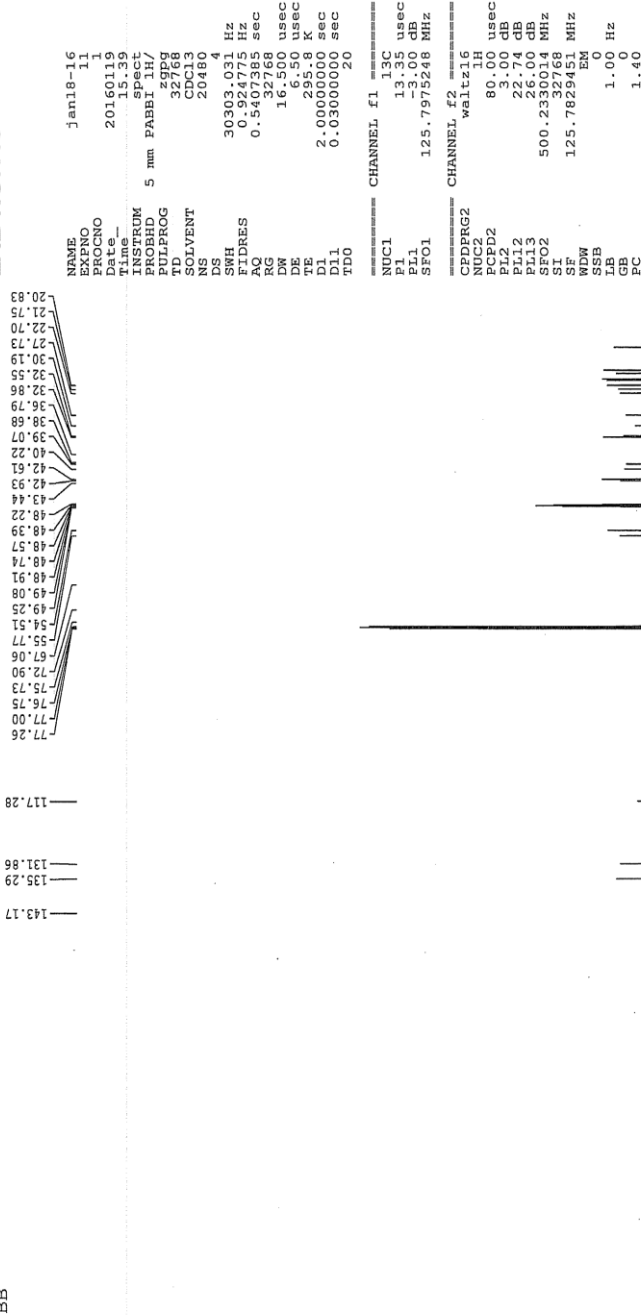
8	143,2	q		
9	42,9	1,82 (1H, m)		H-11
10	36,8	q		
11	21,7	1,40; 1,44 (2H, m)	C-8, C-10, C-11	H-12
12	39,1	1,17; 1,53 (2H, m)		
13	43,4	q		
14	54,5	1,78 (1H, m)	C-8, C-13	H-15
15	22,7	1,40; 1,50 (2H, m)		H-16
16	27,7	1,61; 1,14 (2H, m)	C-20	H-17
17	55,8	1,55 (1H, m)	C-13, C-14, C-16	
18	11,9	0,47 (3H, s)	C-12, C-13, C-14, C-17	
19	18,0	0,92 (3H, s)	C-1, C-5, C-9, C-10	
20	40,2	1,92 (1H, m)	C-13, C-16	H-22
21	20,8	0,89 (d , $J=6,5\text{Hz}$)		H-21
22	135,3	5,03(1H, dd , $J=8,0;15,0\text{ Hz}$)	C-23, C-20, C-21	H-23
23	131,8	5,09(1H, dd , $J=7,5;15,0\text{ Hz}$)	C-22, C-24, C-25, C-28,	H-24
24	42,6	1,70 (1H, m)	C-23, C-25, C-26, C-27, C-28	H-28
25	32,8	1,33 (1H, m)	C-26, C-27	H-24;H-26;H-27
26	19,6	0,69 (3H, d , $J=7,5\text{Hz}$)	C-24, C-25, C-27	H-27
27	19,3	0,70 (3H, d , $J=7\text{Hz}$)	C-24, C-25, C-26	
28	17,3	0,78 (3H, d , $J=6,5\text{Hz}$)	C-23, C-24, C-25	



Şekil 3.88. TA2-7C5-C2 (4)'nin ^1H -NMR Spektrumu ($\text{CD}_3\text{OD} + \text{CDCl}_3$, 500 MHz)

AVANCE AV-500
LAB NO:118

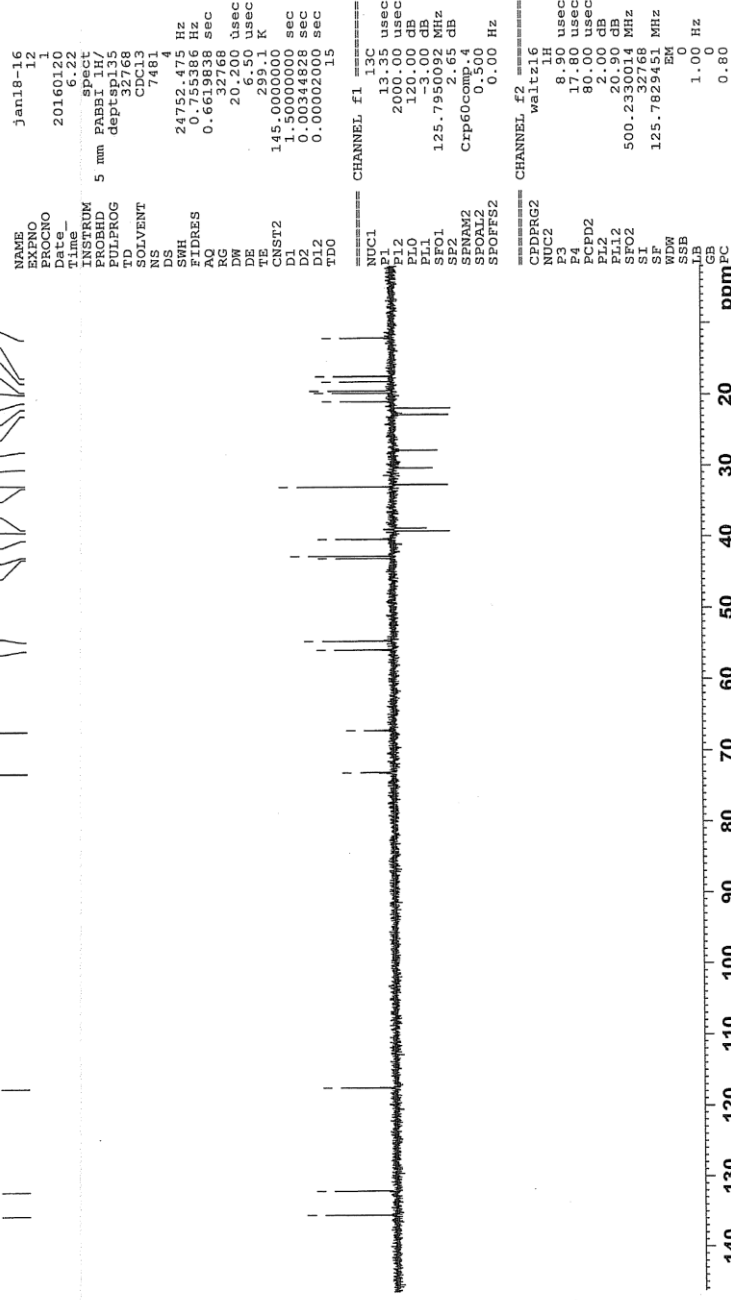
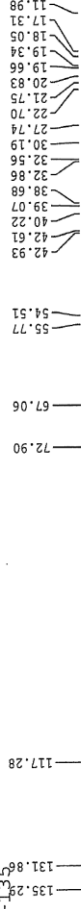
DR. MEHMET/DR. IQBAL/TA2-7c5-c2/CDCl3+CD3OD
BB



Şekil 3.89. TA2-7C5-C2 (4)'nin ¹³C-NMR Spektrumu (CD₃OD + CDCl₃, 125 MHz)

AVANCE AV-500
LAB NO:118

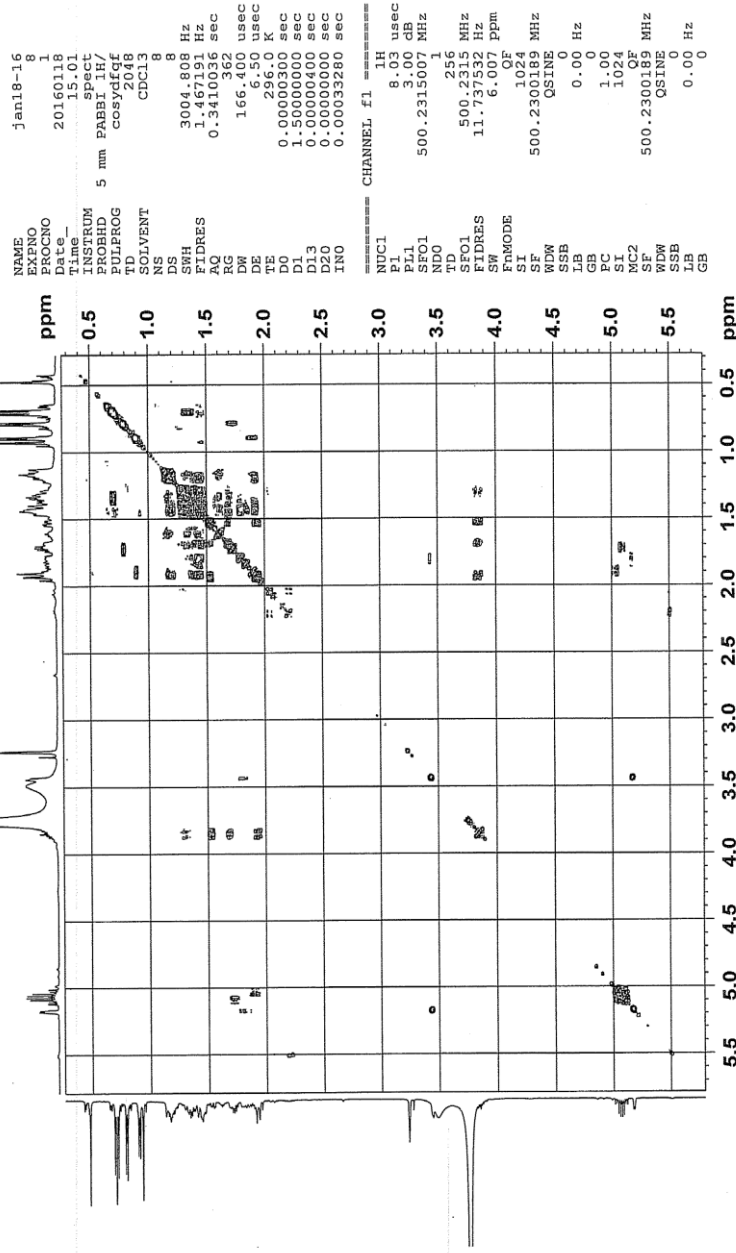
DR. MEHMET/DR. IQBAL/TA2-7C5-C2/CDCL3+CD30D
DEPT-135



Şekil 3.90. TA2-7C5-C2 (4)'nin DEPT 135 Spektrumu

DR. MEHMET/DR. IQBAL/TA2-7c5-c2/CDCL3+CD30D
ICCB5/U.O. K
COSY

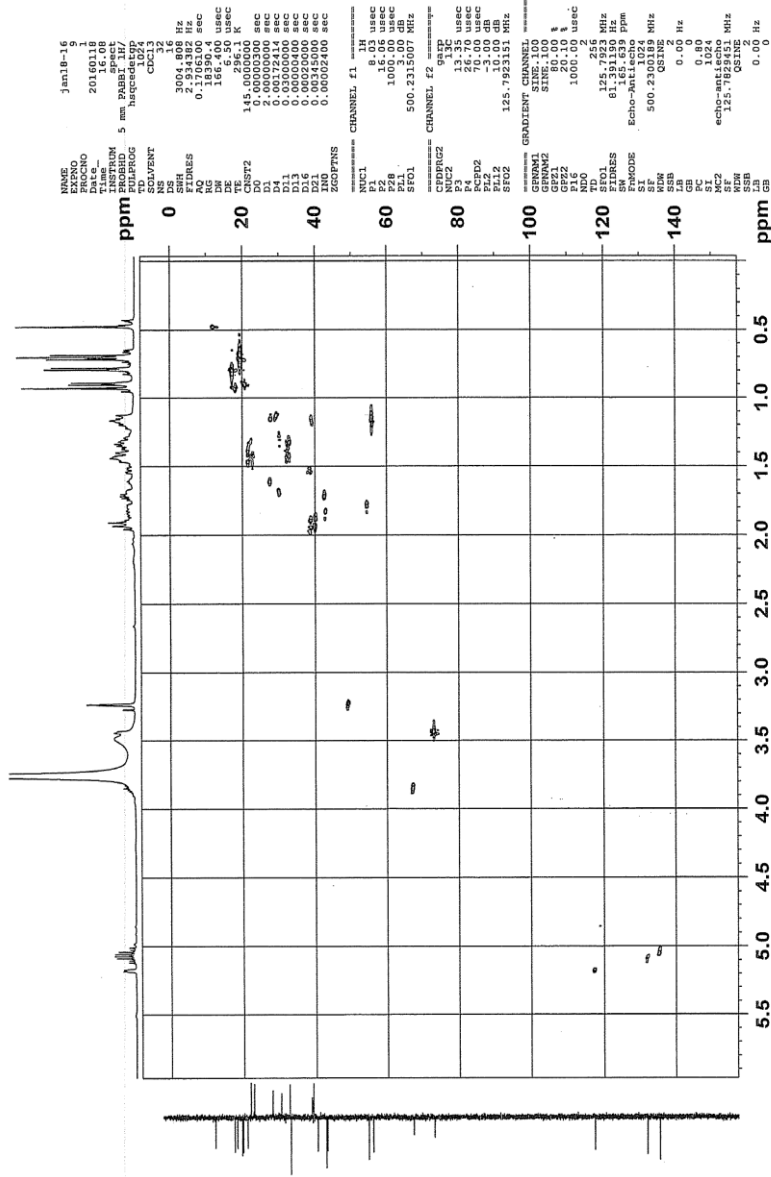
AVANCE AV-500
LAB NO:118



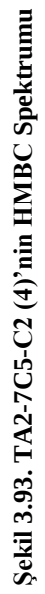
Şekil 3.91. TA2-7C5-C2 (4)'nin COSY spektrumu

DR. MEHMET /DR. IQBAL/TA2-7c5-c2/CDCL3+CD30D

AVANCE AV-500
LAB NO:118



AVANCE AV-500
LAB NO:118

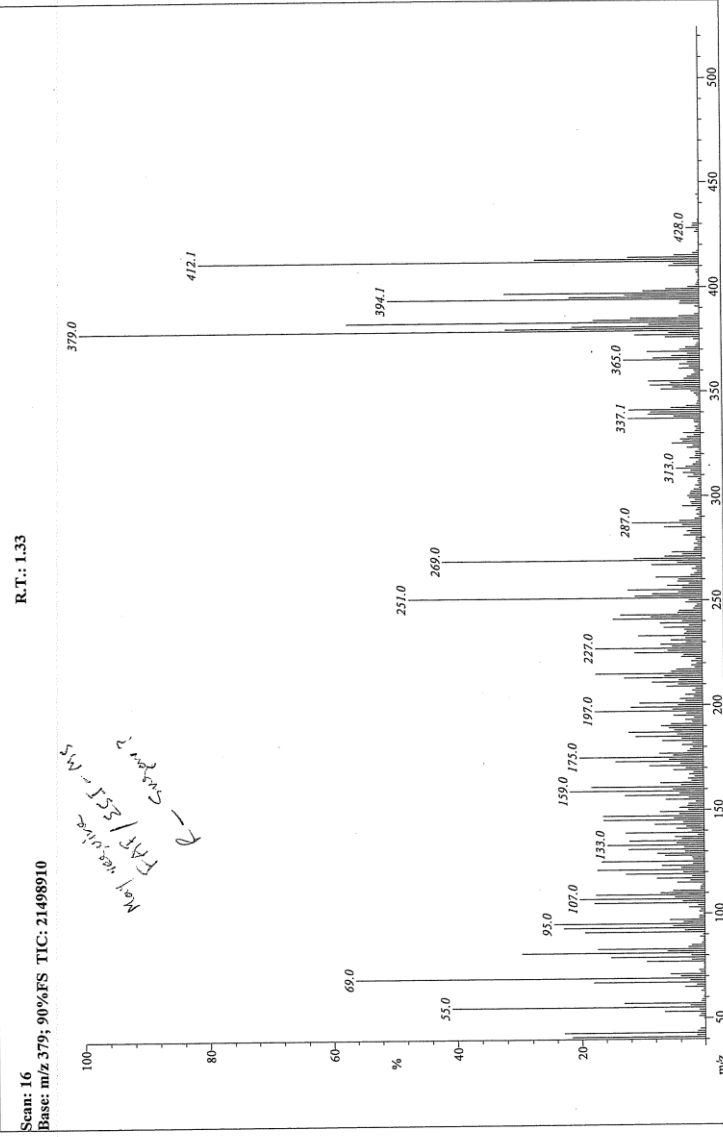


12/30/2015 9:40:52 AM

Date Run: 12-30-2015 (Time Run: 09:33:17)

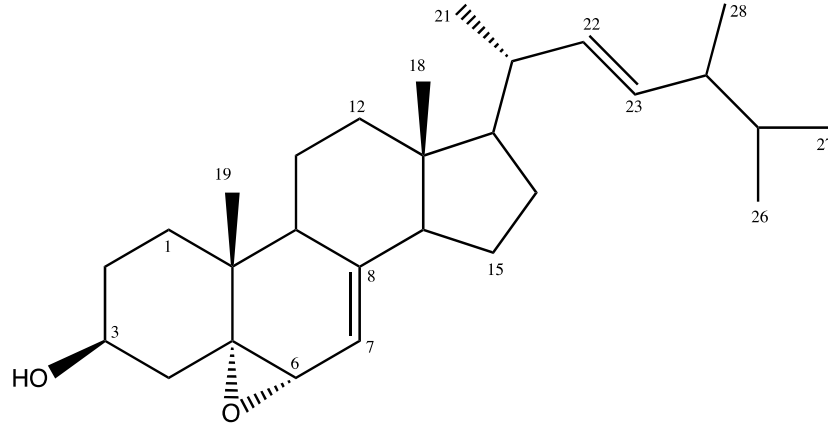
File: TA2-7C5C2
Sample: DR. MEHMET / DR. M. IQBAL
Instrument: JEOL MS 600H-1

Ionization mode: EI+



Şekil 3.94. TA2-7C5-C2 (4)'nin EI-MS Kütle Spektrumu

❖ TA2-7C5 (5) = 5 α ,6 α epoksi-ergosta-7,22-dien 3 β -ol



Şekil 3.95. TA2-7C5 (5) saf maddelerinin yapısı

Beyaz renkli olan TA2-7C5 (5) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görünen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahve renk aldı (Şekil 3.95).

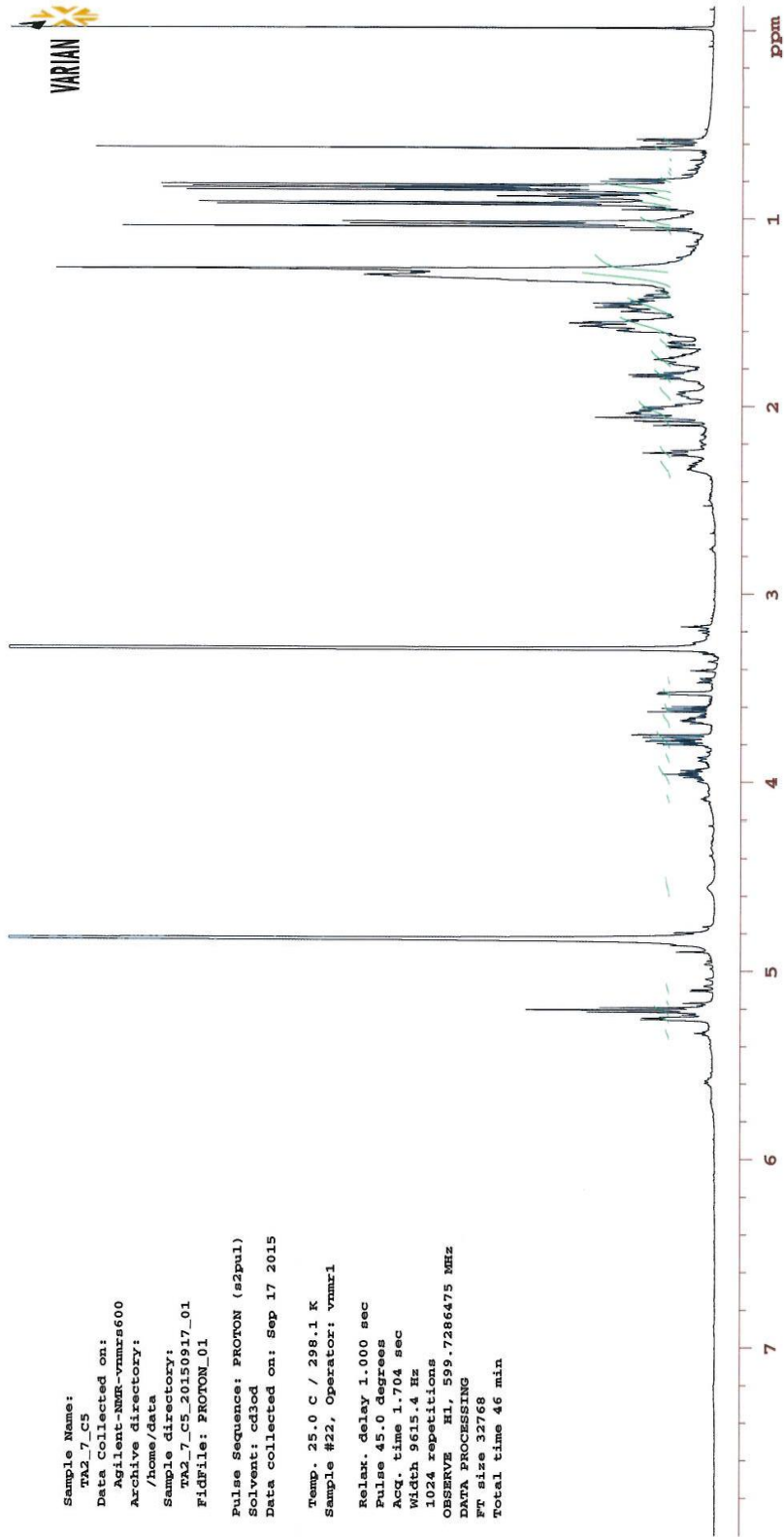
^1H (Şekil 3.96) ve ^{13}C -NMR ile DEPT 135, COSY, HSQC, HMBC spektrumları değerlendirildiğinde TA2-7C5 (5) maddesinin lanosta steroid olduğu (Şekil 3.95) ve TA2-7C5-C2 (4) maddesi ile yapısının uyduğu tespit edildi.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.97), m/z 412,1 $[\text{M}]^+$ pikini $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_2$ yapısını doğrulamaktadır. NMR spektrumlarının yanyana değerlendirilmesi sonucu da elde edilen bu kapalı formüle göre C-5 ile C-6 arasındaki köprünün bir adet oksijen içerdiği kütle spektrumu ile tespit edildi. ^{13}C -NMR, HMBC, COSY, EI-MS spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı (Şekil 3.95).

Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.12’de verilen TA2-7C5 (5) maddesinin daha önceden izole edilen bir steroid (Şekil 3.100) (2.0 mg) olduğu belirlendi ve ismi 5 α ,6 α epoksi-ergosta-7,22-dien 3 β -ol olarak belirlendi (Yaoita vd., 1998; Li vd., 2015).

Çizelge 3.12. TA2-7C5 (5) maddesinin ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC ve COSY değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	HMBC	COSY
1	32,5	1,39; 1,37 (2H, <i>m</i>)	C-1, C-3, C-5, C-10	H-2
2	30,2	1,68; 1,29 (2H, <i>m</i>)		H-3
3	67,1	3,85 (1H, <i>m</i>)		H-4
4	38,7	1,94;1,92 (2H, <i>m</i>)		
5	75,7	-		
6	72,9	3,44 (1H, <i>m</i>)	C-7, C-8, C-5, C-10	H-7
7	117,3	5,18 (1H, <i>m</i>)	C-14, C-5, C-6	
8	143,2	-		
9	42,9	1,82 (1H, <i>m</i>)		H-11
10	36,8	-		
11	21,7	1,40; 1,44 (2H, <i>m</i>)	C-8, C-10, C-11	H-12
12	39,1	1,17; 1,53 (2H, <i>m</i>)		
13	43,4	-		
14	54,5	1,78 (1H, <i>m</i>)	C-8, C-13	H-15
15	22,7	1,40; 1,50 (2H, <i>m</i>)		H-16
16	27,7	1,61; 1,14 (2H, <i>m</i>)	C-20	H-17
17	55,8	1,55 (1H, <i>m</i>)	C-13, C-14, C-16	
18	11,9	0,47 (3H, <i>s</i>)	C-12, C-13, C-14, C-17	
19	18,1	0,92 (3H, <i>s</i>)	C-1, C-5, C-9, C-10	
20	40,2	1,92 (1H, <i>m</i>)	C-13, C-16	H-22
21	20,8	0,89 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,5Hz)		H-21
22	135,3	5,03 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =8,0; 15,0 Hz)	C-23, C-20, C-21	H-23
23	131,9	5,09 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =7,5; 15,0 Hz)	C-22, C-24, C-25, C-26	H-24
24	42,6	1,70 (1H, <i>m</i>)	C-23, C-25, C-26, C-27, C-28	H-28
25	32,8	1,33 (1H, <i>m</i>)	C-26, C-27	H25, H26, H27
26	19,6	0,69 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,5Hz)	C-24, C-25, C-27	H-27
27	19,3	0,70 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7,0Hz)	C-24, C-25, C-26	
28	17,31	0,78 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,5Hz)	C-23, C-24, C-25	



Şekil 3.96. TA2-7C5 (5)'nin ^1H -NMR Spektrumu (CD_3OD , 600 MHz)

HEJ MASS SECTION
12/30/2015 9:50:52 AM

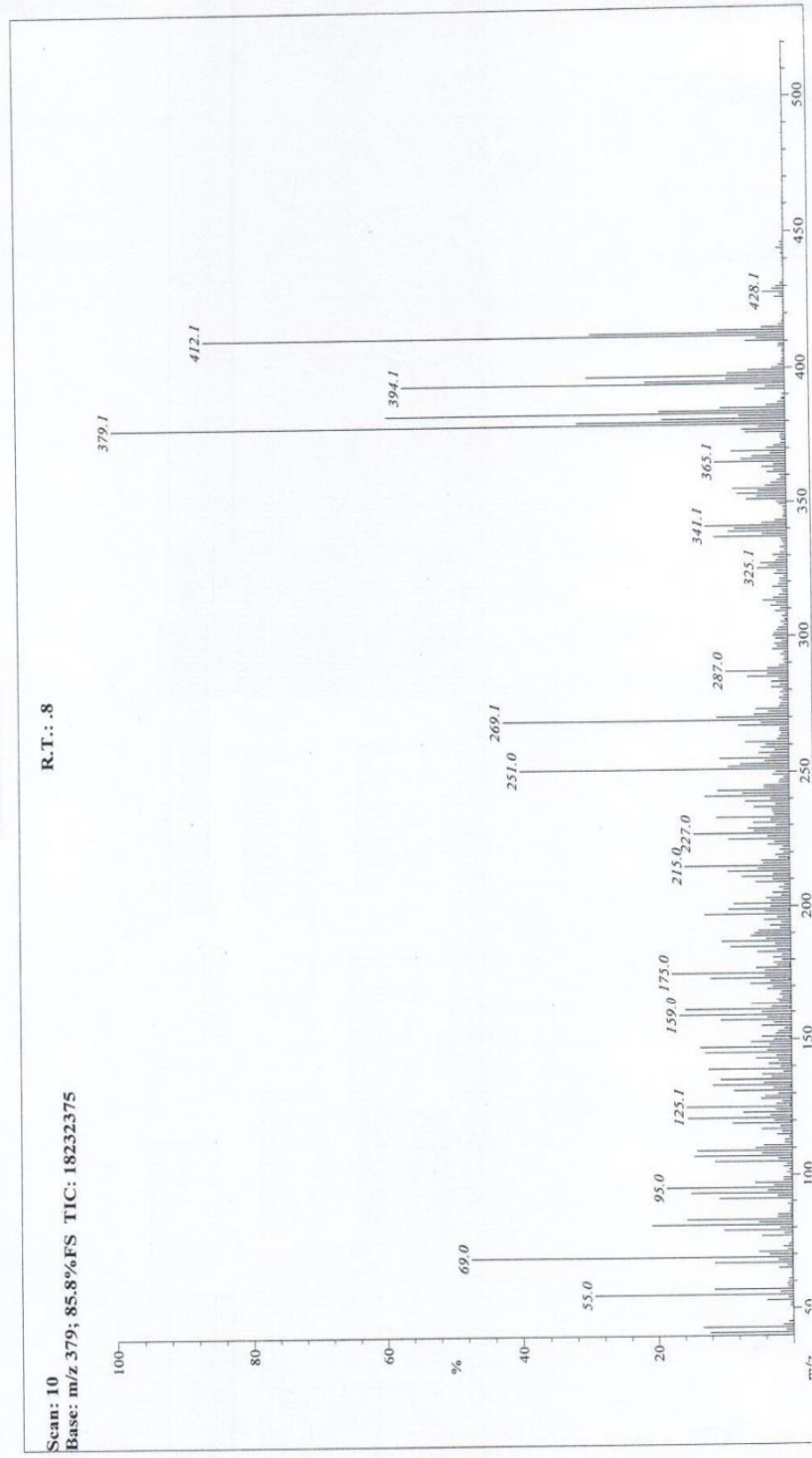
Date Run: 12-30-2015 (Time Run: 09:43:50)

File: TA2-7C5
Sample: DR. MEHMET / DR. M. IQBAL
Instrument: JEOL MS 600H-1

Ionization mode: EI+

R.T.: .8

Scan: 10
Base: m/z 379; 85.8%FS TIC: 18232375



Şekil 3.97. TA2-7C5 (5)'nin EI-MS Kütle Spektrumu

3.7. *Tricholoma anatolicum*'un Metanol Ekstresinden Madde İzolasyonu Çalışmaları

3.7.1. *Tricholoma anatolicum*'un metanol ekstresinin fraksiyonlandırılması

Antioksidan aktivite gösteren metanol ekstresini fraksiyonlandırmak için kolon kromatografisinde silika jel adsorban 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 silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Elüsyona % 100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla %5 oranlarda artış ile %100 kloroforma, devamında %5 oranlarda artış ile %100 aseton'a ve devamında %10 oranlarda artış ile %100 metanol'e ulaşılarak elüsyon yapıldı. En son %20 su:%80 Metanol ile elusyon tamamlandı.

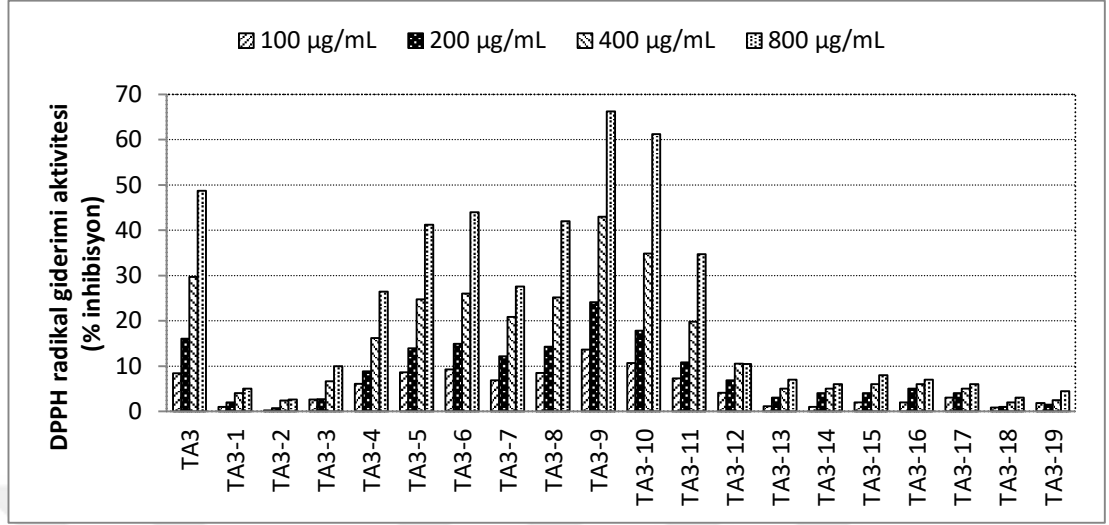
İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) yöntemleri kullanılarak benzer fraksiyonlar birleştirildi. Bu amaçla çözücü sistemi olarak, uygun oranlarda hekzan:kloroform (50:50), hekzan:etilasetat (60:40); kloroform:aseton (70:30); kloroform:metanol (90:10); kloroform:toluen:metanol (10:15:2) karışımları hazırlanarak ve polariteye uygun karışım İTK'da kullanıldı. Adsorban olarak normal faz silika jel ve floresans katılmış İTK (Merck-5554) kullanıldı. *T. anatolicum* türünün metanol ekstresinin (TA3) silika jel kolon ile fraksiyonlandırılması ve benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucunda toplamda 19 fraksiyon (TA3-1 ile TA3-19) elde edildi.

3.7.2. *T. anatolicum*'un metanol ekstresinin fraksiyonlarının antioksidan aktivitesi

Metanol ekstresinden elde edilen 19 adet fraksiyonun radikal giderim aktiviteleri hem DPPH serbest radikali hemde ABTS katyon radikali giderim aktiviteleri yöntemlerine göre test edildi.

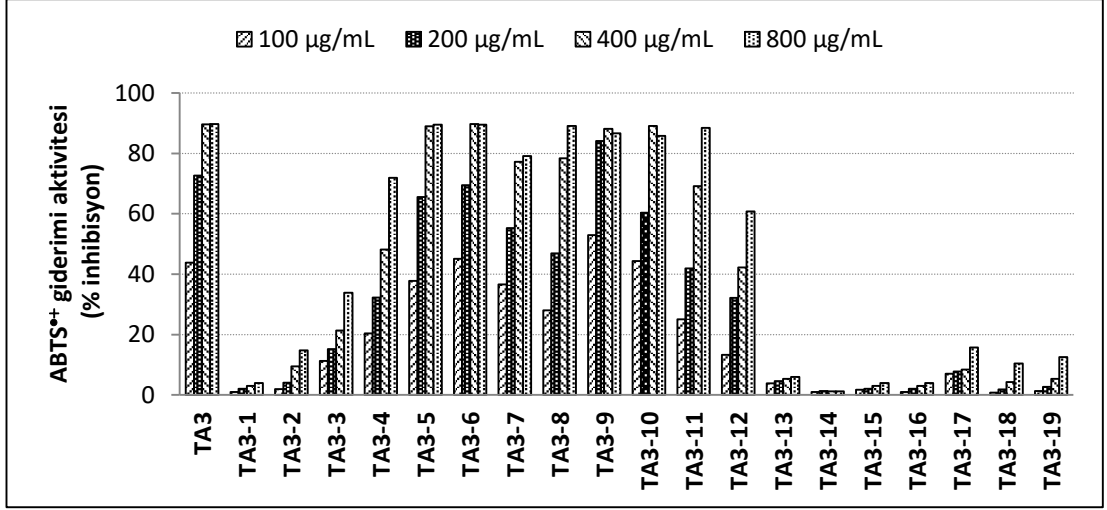
T. anatolicum mantarının metanol ekstresinin fraksiyonlarının DPPH serbest radikali giderim aktivitesine göre aktivite sonuçları Şekil 3.98'de verilmektedir. Bu sonuçlara göre TA3-9 ve TA3-10 fraksiyonlarının ana ekstreden daha fazla aktivite gösterdiği bulundu. Bu nedenle bu iki fraksiyondan maddeler saflaştırılması için çalışıldı. Buna

ilaveten TA3-7, TA3-8 ve TA3-11, TA3-12 fraksiyonlarından da madde elde edilmesi için çalışıldı.



Şekil 3.98. *T. anatolicum* türünün metanol ekstresinin fraksiyonlarının DPPH radikali giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)

T. anatolicum mantarının metanol ekstresinin fraksiyonlarının ABTS katyon radikali giderim aktivitesine göre aktivitesi DPPH yöntemini desteklemektedir. Şöyleki bu aktivite yöntemine göre de TA3-9 ile TA3-10 en yüksek aktiviteyi verdiler. Bazı konsantrasyonlarda TA3-5 ve TA3-6 fraksiyonları da ana ekstreden daha fazla aktivite gösterdiği bulundu (Şekil 3.99). Ancak DPPH yönteminde önerildiği gibi TA3-7 ve TA3-8 fraksiyonları ile TA3-11 ve TA3-12 fraksiyonları da maddelerin saflaştırılmasında kullanıldı.



Şekil 3.99. *T. anaticum* türünün metanol ekstresinin fraksiyonlarının ABTS katyon radikali giderim aktivitesi ($n=3$, $p<0,05$)

Bu amaçla birbirini destekleyen radikal süpürme aktiviteleri sonuçlarına bakarak, TA3-7 ve TA3-8 fraksiyonları İTK da çok benzerlik gösterdiğinden ve yakın fraksiyonlar olduğundan madde miktarını arttırmak için birleştirildi. Benzer şekilde TA3-9 ve TA3-10 fraksiyonları da birleştirildi. Sırası ile yeni fraksiyonlar TA3-7-8 ve TA3-9-10, TA2-8-9 kodları verildi. TA3-11 ve TA3-12 fraksiyonları ise birleştirilmeden çalışıldı.

3.7.3. *T. anaticum*'un metanol ekstresinin aktif fraksiyonlarından maddelerin elde edilmesi

Antioksidan aktivite gösteren fraksiyonlardan madde izolasyonu için kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı. Fraksiyonlar az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Silikajele emdirilmiş fraksiyon miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. Bölüm 2.4.1'de anlatıldığı gibi fraksiyonlandırma yapıldı. Elüentler 10 ml hacimlerde viallere toplandı ve ince tabaka kullanarak saf maddeler tespit edildi.

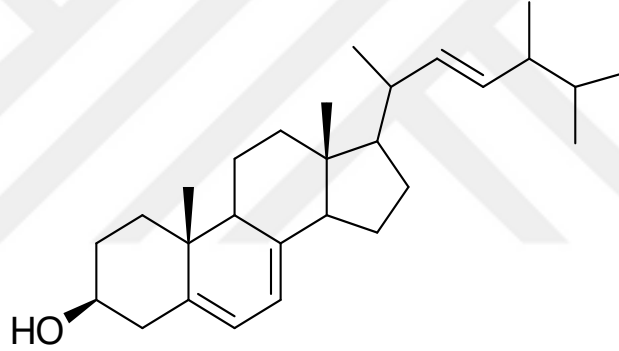
TA3-9-10 fraksiyonundan Bölüm 2.4.1'deki çözücü sistemi ile RHJ-1 (6), TA3-11 fraksiyonundan ise RHJ-5 (7) saf maddeleri izole edildi. Her iki maddenin ileri derecede saflaştırılması için Bölüm 2.8'de verilen şartlarda Recycle Prep. HPLC ile

Kolon 1 ve Çözücü 6 sistemi kullanıldı. Birleştirilmiş TA3-7-8 fraksiyonunları Recycle Prep. HPLC ile Bölüm 2.8’de verilen şartlarda Kolon 2 ve Çözücü 4 sistemi kullanılarak çalışıldı. Buradan TA3-7WS (**8**) elde edildi. TA3-12 fraksiyonu da Recycle Prep. HPLC ile Bölüm 2.8’de verilen şartlarda Kolon 2 ve Çözücü 6 sistemi kullanılarak çalışıldı. Buradan TA3-12F2 (**9**), TA3-12F3C1 (**10**) ve TA312F3C1 (**11**) maddeleri elde edildi.

Saflaştırılan 6 maddenin yapılarını aydınlatmak amacıyla öncelikle ^1H -NMR, ve devamında ^{13}C NMR, DEPT135, HMBC, HSQC ve MS analizleri yapıldı. Gerekliğinde yapı tayini için sililleme yapılarak GC-MS analizleri de yapıldı.

3.7.3.1. TA3-9-10 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ **RHJ-1 (6) = Ergosta-5,7,22-trien 3β -ol**



Şekil 3.100. RHJ-1 (6) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan RHJ-1 (**6**) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahve renk aldı.

^1H - ve ^{13}C -NMR (Şekil 3.101 ve Şekil 3.102), DEPT 135 (Şekil 3.103), COSY (Şekil 3.104), HSQC (Şekil 3.105), HMBC (Şekil 3.106), spektrumları değerlendirildiğinde RHJ-1 (**6**) maddesinin lanostan steroid olduğu tespit edildi. Çifte bağın yeri HMBC spektrumu ile belirlendi. ^{13}C -NMR, DEPT135, HMBC, COSY spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı (Çizelge 3.13).

¹H-NMR spektrumunda (CDCl₃, 300 MHz) δ 0.61 (3H, s, H-18), δ 0.80 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), δ 0.82 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-27), δ 0.89 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-28), δ 0.92 (3H, s, H-19) ve δ 1.00 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-21) ppm'de 6 tane metil piki görüldü. δ 3.63 (1H, m, H-3) ppm'de görülen multiplet yarılma hidroksil grubunun β konumunda olduğunu önerdi. δ 5.55 (1H, d, J =8.5 Hz, H-6) ve δ 5.36 (1H, d, J =8.5 Hz, H-7) olefinik hidrojen pikleri izlendi. δ 5.17 (1H, dd, J =15.3; 7.5, H-23) ve δ 5.18 (1H, dd, J =15.3; 6.9, H-22) ppm'de yan zincirdeki vinilik hidrojen pikleri izlendi.

¹³C-NMR ve DEPT135 spektrumları beraber değerlendirildiğinde yapıda 6 metil, 7 metilen, 11 metin ve 4 katerner karbon izlendi.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.107), m/z 396.3 [M]⁺ piki C₂₈H₄₄O kapalı formülünü onayladı. Su molekülünün ayrılmasıyla m/z 378 [396-H₂O]⁺ piki de izlenmektedir.

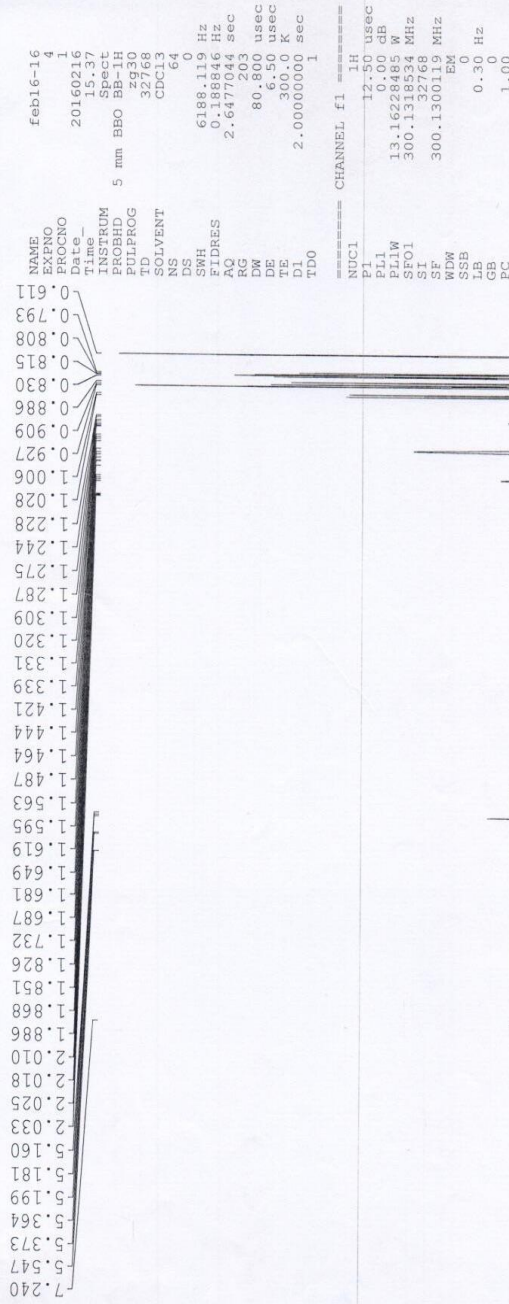
Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.13'de verilen RHJ-1 (6) maddesinin daha önceden izole edilen ergosta-5,7,22-trien 3 β -ol (Şekil 3.100) (120.0 mg) olduğu belirlendi (Seo vd., 2009).

Çizelge 3.13. RHJ-1 (6) saf maddesinin ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC ve COSY değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	HMBC	COSY
1	38.3	1,23; 1,28 (2H, <i>m</i>)	C-1, C-2	
2	31.9	1,85; 1,43 (2H, <i>m</i>)	C-4, C-5, C-10, C-19,	
3	70.2	3.63 (1H, <i>m</i>)		H-4
4	40.7	2.46; 2.26 (2H, <i>m</i>)	C-5, C-6, C-3, C-2, C-10	
5	139.7	-		
6	119.6	5.55 (<i>dd</i> , <i>J</i> =2,1; 5,4 Hz)	C-4, C-10, C-7, C-8	H-7
7	116.3	5.36, (<i>dd</i> , <i>J</i> =2,9; 5,4 Hz)	C-5, C-9, C-6	
8	141.3	-		
9	46.2	1,95 (1H, <i>m</i>)	C-8	
10	37.1	-		
11	21.1	1,57 (2H, <i>m</i>)	C-8, C-9, C-12, C-13	
12	39.1	1,88; 1,84 (2H, <i>m</i>)		
13	42.9	-		
14	54.6	1.86 (1H, <i>m</i>)	C-8, C-13	
15	22.9	1,64; 1,62 (2H, <i>m</i>)	C-13, C-14	
16	28.2	1,76; 1,72 (2H, <i>m</i>)	C-15, C-17	
17	55.7	1,25 (1H, <i>m</i>)	C-16, C-18, C-20	
18	12.0	0.61 (3H, <i>s</i>)	C-12,C-13,C-14, C-17	
19	16.2	0.92 (3H, <i>s</i>)	C-1,C-5,C-9, C-10	
20	40.4	2,02 (1H, <i>m</i>)	C-17, C-21, C-22,C-23	
21	21.2	1,00 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,0 Hz)	C-17,C-20,C-22	
22	135.5	5,18 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,3; 6,9 Hz)	C-21, C-23, C-24	H-23
23	131.9	5,17 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15,3; 7,5 Hz)	C-22, C-24, C-28	H-22
24	42.8	1,82 (1H, <i>m</i>)	C-26, C25, C-27, C-28,	H-23
25	33.1	1,45 (1H, <i>m</i>)	C-26, C24, C-27, C-28,C-23	H-25
26	19.6	0.80 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	C-24,C-25,C-27	H-27
27	19.9	0.82 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> = 6.6 Hz)	C-24,C-25,C-26	H-26
28	17.6	0.89 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6,0 Hz)	C-23,C-24,C-25	

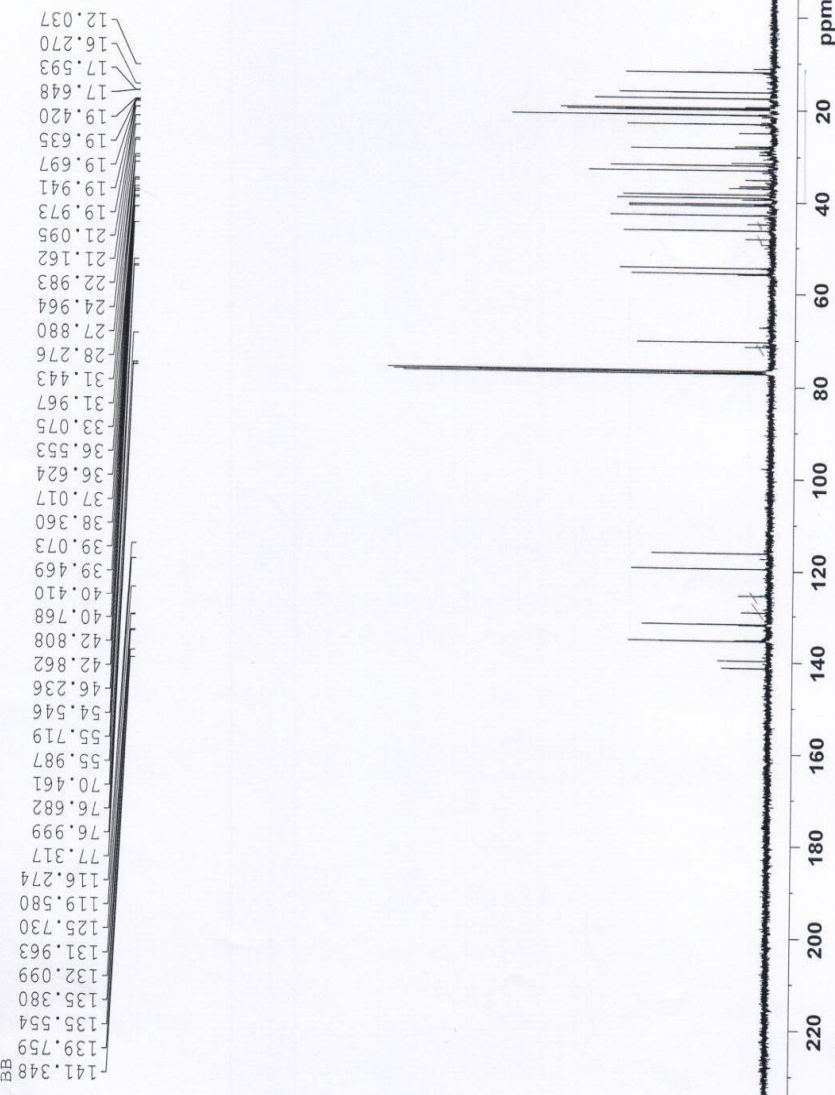
Erhan / Dr. Iqbal / RH-J-1
1H

AVANCE AV-III
300 MHz, LAB #116



Şekil 3.101. RHJ-1 (6)'nm ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃, 300 MHz)

ERHAN/DR.IQBAL/RHJ.1/CDCL3



AVANCE AV-III HD
400 MHz
LAB #109A

Current Data Parameters
NAME mar02-16
EXPNO 6
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20160303
Time_ 13.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm SEI 1H/D-
PULPROG zgpg
TD 32768
SOLVENT CDCL3
NS 18432
DS 4
SWH 24038.461 Hz
FIDRES 0.733596 Hz
AQ 0.6815744 sec
RG 327.5
DE 20.800 usec
TE 298.0 K
D1 1.50000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 18

CHANNEL f1
SFO1 100.6746353 MHz
NUC1 13C
P1 11.00 usec
PLW1 150.00000000 W

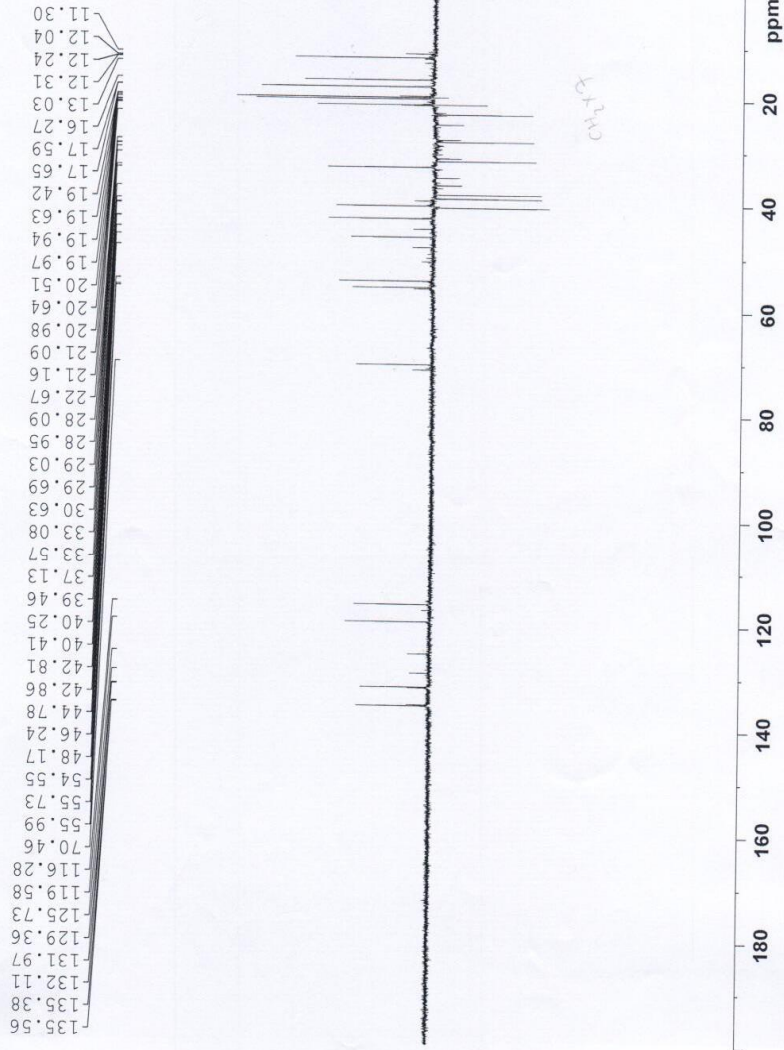
CHANNEL f2
SFO2 400.3316013 MHz
NUC2 1H
PCPD2 waltz16
PLW2 20.00000000 W
PLW12 0.08984600 W
PLW13 0.07277500 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 100.6630606 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
FC 1.40

Şekil 3.102. RHJ-1 (6)'nın ¹³C-NMR Spektrumu (CDCl₃, 75 MHz)

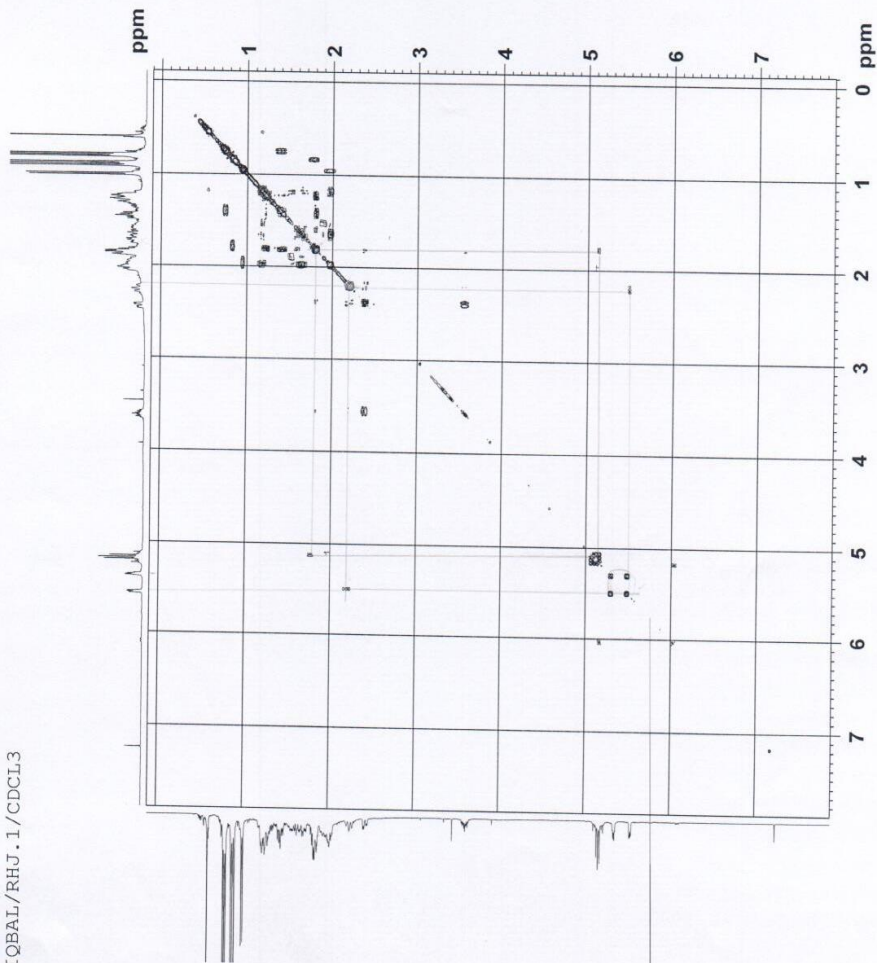
ER#AN/DR.IQBAL/RHJ.1/CDCL3
Dept135

AVANCE AV-III HD
400 MHz
LAB #109A



Current Data Parameters
NAME C
EXPNO 7
PROCNO 1
Date_ Time 20160304 0.35
F2 - Acquisition Parameters
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm SEI IH/D-
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT CDCL3
NS 9216
DS 4
SWH 20161.299 Hz
FIDRES 0.615274 Hz
AQ 0.812646 sec
RG 202.75
DW 24.800 usec
DE 6.500 usec
TE 298.0 K
CNST2 145.0000000
D1 1.50000000 sec
D2 0.00344828 sec
D3 0.0002009 sec
TDO 0
===== CHANNEL f1 =====
SFO1 100.6731253 MHz
NUC1 13C
P1 11.00 usec
PL1 2000.00 usec
PLW0 0 W
PLW1 150.00000000 W
PLW2 150.00000000 W
SFO2 400.3316013 MHz
NUC2 1H
P2 6.80 usec
PL2 11.00 usec
PLW3 0 W
PLW4 20.00000000 W
PLW5 0.11417000 W
SFO3 100.6263605 MHz
NUC3 13C
P3 6.80 usec
PL3 11.00 usec
PLW6 0 W
PLW7 20.00000000 W
PLW8 0.11417000 W
===== CHANNEL f2 =====
SFO4 100.6263605 MHz
NUC4 13C
P4 6.80 usec
PL4 11.00 usec
PLW9 0 W
PLW10 20.00000000 W
PLW11 0.11417000 W
===== CHANNEL f3 =====
SFO5 100.6263605 MHz
NUC5 13C
P5 6.80 usec
PL5 11.00 usec
PLW12 0 W
PLW13 20.00000000 W
PLW14 0.11417000 W
===== CHANNEL f4 =====
SFO6 100.6263605 MHz
NUC6 13C
P6 6.80 usec
PL6 11.00 usec
PLW15 0 W
PLW16 20.00000000 W
PLW17 0.11417000 W
===== CHANNEL f5 =====
SFO7 100.6263605 MHz
NUC7 13C
P7 6.80 usec
PL7 11.00 usec
PLW18 0 W
PLW19 20.00000000 W
PLW20 0.11417000 W
===== CHANNEL f6 =====
SFO8 100.6263605 MHz
NUC8 13C
P8 6.80 usec
PL8 11.00 usec
PLW21 0 W
PLW22 20.00000000 W
PLW23 0.11417000 W
===== CHANNEL f7 =====
SFO9 100.6263605 MHz
NUC9 13C
P9 6.80 usec
PL9 11.00 usec
PLW24 0 W
PLW25 20.00000000 W
PLW26 0.11417000 W
===== CHANNEL f8 =====
SFO10 100.6263605 MHz
NUC10 13C
P10 6.80 usec
PL10 11.00 usec
PLW27 0 W
PLW28 20.00000000 W
PLW29 0.11417000 W
===== CHANNEL f9 =====
SFO11 100.6263605 MHz
NUC11 13C
P11 6.80 usec
PL11 11.00 usec
PLW30 0 W
PLW31 20.00000000 W
PLW32 0.11417000 W
===== CHANNEL f10 =====
SFO12 100.6263605 MHz
NUC12 13C
P12 6.80 usec
PL12 11.00 usec
PLW33 0 W
PLW34 20.00000000 W
PLW35 0.11417000 W
===== CHANNEL f11 =====
SFO13 100.6263605 MHz
NUC13 13C
P13 6.80 usec
PL13 11.00 usec
PLW36 0 W
PLW37 20.00000000 W
PLW38 0.11417000 W
===== CHANNEL f12 =====
SFO14 100.6263605 MHz
NUC14 13C
P14 6.80 usec
PL14 11.00 usec
PLW39 0 W
PLW40 20.00000000 W
PLW41 0.11417000 W
===== CHANNEL f13 =====
SFO15 100.6263605 MHz
NUC15 13C
P15 6.80 usec
PL15 11.00 usec
PLW42 0 W
PLW43 20.00000000 W
PLW44 0.11417000 W
===== CHANNEL f14 =====
SFO16 100.6263605 MHz
NUC16 13C
P16 6.80 usec
PL16 11.00 usec
PLW45 0 W
PLW46 20.00000000 W
PLW47 0.11417000 W
===== CHANNEL f15 =====
SFO17 100.6263605 MHz
NUC17 13C
P17 6.80 usec
PL17 11.00 usec
PLW48 0 W
PLW49 20.00000000 W
PLW50 0.11417000 W
===== CHANNEL f16 =====
SFO18 100.6263605 MHz
NUC18 13C
P18 6.80 usec
PL18 11.00 usec
PLW51 0 W
PLW52 20.00000000 W
PLW53 0.11417000 W
===== CHANNEL f17 =====
SFO19 100.6263605 MHz
NUC19 13C
P19 6.80 usec
PL19 11.00 usec
PLW54 0 W
PLW55 20.00000000 W
PLW56 0.11417000 W
===== CHANNEL f18 =====
SFO20 100.6263605 MHz
NUC20 13C
P20 6.80 usec
PL20 11.00 usec
PLW57 0 W
PLW58 20.00000000 W
PLW59 0.11417000 W
===== CHANNEL f19 =====
SFO21 100.6263605 MHz
NUC21 13C
P21 6.80 usec
PL21 11.00 usec
PLW60 0 W
PLW61 20.00000000 W
PLW62 0.11417000 W
===== CHANNEL f20 =====
SFO22 100.6263605 MHz
NUC22 13C
P22 6.80 usec
PL22 11.00 usec
PLW63 0 W
PLW64 20.00000000 W
PLW65 0.11417000 W
===== CHANNEL f21 =====
SFO23 100.6263605 MHz
NUC23 13C
P23 6.80 usec
PL23 11.00 usec
PLW66 0 W
PLW67 20.00000000 W
PLW68 0.11417000 W
===== CHANNEL f22 =====
SFO24 100.6263605 MHz
NUC24 13C
P24 6.80 usec
PL24 11.00 usec
PLW69 0 W
PLW70 20.00000000 W
PLW71 0.11417000 W
===== CHANNEL f23 =====
SFO25 100.6263605 MHz
NUC25 13C
P25 6.80 usec
PL25 11.00 usec
PLW72 0 W
PLW73 20.00000000 W
PLW74 0.11417000 W
===== CHANNEL f24 =====
SFO26 100.6263605 MHz
NUC26 13C
P26 6.80 usec
PL26 11.00 usec
PLW75 0 W
PLW76 20.00000000 W
PLW77 0.11417000 W
===== CHANNEL f25 =====
SFO27 100.6263605 MHz
NUC27 13C
P27 6.80 usec
PL27 11.00 usec
PLW78 0 W
PLW79 20.00000000 W
PLW80 0.11417000 W
===== CHANNEL f26 =====
SFO28 100.6263605 MHz
NUC28 13C
P28 6.80 usec
PL28 11.00 usec
PLW81 0 W
PLW82 20.00000000 W
PLW83 0.11417000 W
===== CHANNEL f27 =====
SFO29 100.6263605 MHz
NUC29 13C
P29 6.80 usec
PL29 11.00 usec
PLW84 0 W
PLW85 20.00000000 W
PLW86 0.11417000 W
===== CHANNEL f28 =====
SFO30 100.6263605 MHz
NUC30 13C
P30 6.80 usec
PL30 11.00 usec
PLW87 0 W
PLW88 20.00000000 W
PLW89 0.11417000 W
===== CHANNEL f29 =====
SFO31 100.6263605 MHz
NUC31 13C
P31 6.80 usec
PL31 11.00 usec
PLW90 0 W
PLW91 20.00000000 W
PLW92 0.11417000 W
===== CHANNEL f30 =====
SFO32 100.6263605 MHz
NUC32 13C
P32 6.80 usec
PL32 11.00 usec
PLW93 0 W
PLW94 20.00000000 W
PLW95 0.11417000 W
===== CHANNEL f31 =====
SFO33 100.6263605 MHz
NUC33 13C
P33 6.80 usec
PL33 11.00 usec
PLW96 0 W
PLW97 20.00000000 W
PLW98 0.11417000 W
===== CHANNEL f32 =====
SFO34 100.6263605 MHz
NUC34 13C
P34 6.80 usec
PL34 11.00 usec
PLW99 0 W
PLW100 20.00000000 W
PLW101 0.11417000 W
===== CHANNEL f33 =====
SFO35 100.6263605 MHz
NUC35 13C
P35 6.80 usec
PL35 11.00 usec
PLW102 0 W
PLW103 20.00000000 W
PLW104 0.11417000 W
===== CHANNEL f34 =====
SFO36 100.6263605 MHz
NUC36 13C
P36 6.80 usec
PL36 11.00 usec
PLW105 0 W
PLW106 20.00000000 W
PLW107 0.11417000 W
===== CHANNEL f35 =====
SFO37 100.6263605 MHz
NUC37 13C
P37 6.80 usec
PL37 11.00 usec
PLW108 0 W
PLW109 20.00000000 W
PLW110 0.11417000 W
===== CHANNEL f36 =====
SFO38 100.6263605 MHz
NUC38 13C
P38 6.80 usec
PL38 11.00 usec
PLW111 0 W
PLW112 20.00000000 W
PLW113 0.11417000 W
===== CHANNEL f37 =====
SFO39 100.6263605 MHz
NUC39 13C
P39 6.80 usec
PL39 11.00 usec
PLW114 0 W
PLW115 20.00000000 W
PLW116 0.11417000 W
===== CHANNEL f38 =====
SFO40 100.6263605 MHz
NUC40 13C
P40 6.80 usec
PL40 11.00 usec
PLW117 0 W
PLW118 20.00000000 W
PLW119 0.11417000 W
===== CHANNEL f39 =====
SFO41 100.6263605 MHz
NUC41 13C
P41 6.80 usec
PL41 11.00 usec
PLW120 0 W
PLW121 20.00000000 W
PLW122 0.11417000 W
===== CHANNEL f40 =====
SFO42 100.6263605 MHz
NUC42 13C
P42 6.80 usec
PL42 11.00 usec
PLW123 0 W
PLW124 20.00000000 W
PLW125 0.11417000 W
===== CHANNEL f41 =====
SFO43 100.6263605 MHz
NUC43 13C
P43 6.80 usec
PL43 11.00 usec
PLW126 0 W
PLW127 20.00000000 W
PLW128 0.11417000 W
===== CHANNEL f42 =====
SFO44 100.6263605 MHz
NUC44 13C
P44 6.80 usec
PL44 11.00 usec
PLW129 0 W
PLW130 20.00000000 W
PLW131 0.11417000 W
===== CHANNEL f43 =====
SFO45 100.6263605 MHz
NUC45 13C
P45 6.80 usec
PL45 11.00 usec
PLW132 0 W
PLW133 20.00000000 W
PLW134 0.11417000 W
===== CHANNEL f44 =====
SFO46 100.6263605 MHz
NUC46 13C
P46 6.80 usec
PL46 11.00 usec
PLW135 0 W
PLW136 20.00000000 W
PLW137 0.11417000 W
===== CHANNEL f45 =====
SFO47 100.6263605 MHz
NUC47 13C
P47 6.80 usec
PL47 11.00 usec
PLW138 0 W
PLW139 20.00000000 W
PLW140 0.11417000 W
===== CHANNEL f46 =====
SFO48 100.6263605 MHz
NUC48 13C
P48 6.80 usec
PL48 11.00 usec
PLW141 0 W
PLW142 20.00000000 W
PLW143 0.11417000 W
===== CHANNEL f47 =====
SFO49 100.6263605 MHz
NUC49 13C
P49 6.80 usec
PL49 11.00 usec
PLW144 0 W
PLW145 20.00000000 W
PLW146 0.11417000 W
===== CHANNEL f48 =====
SFO50 100.6263605 MHz
NUC50 13C
P50 6.80 usec
PL50 11.00 usec
PLW147 0 W
PLW148 20.00000000 W
PLW149 0.11417000 W
===== CHANNEL f49 =====
SFO51 100.6263605 MHz
NUC51 13C
P51 6.80 usec
PL51 11.00 usec
PLW150 0 W
PLW151 20.00000000 W
PLW152 0.11417000 W
===== CHANNEL f50 =====
SFO52 100.6263605 MHz
NUC52 13C
P52 6.80 usec
PL52 11.00 usec
PLW153 0 W
PLW154 20.00000000 W
PLW155 0.11417000 W
===== CHANNEL f51 =====
SFO53 100.6263605 MHz
NUC53 13C
P53 6.80 usec
PL53 11.00 usec
PLW156 0 W
PLW157 20.00000000 W
PLW158 0.11417000 W
===== CHANNEL f52 =====
SFO54 100.6263605 MHz
NUC54 13C
P54 6.80 usec
PL54 11.00 usec
PLW159 0 W
PLW160 20.00000000 W
PLW161 0.11417000 W
===== CHANNEL f53 =====
SFO55 100.6263605 MHz
NUC55 13C
P55 6.80 usec
PL55 11.00 usec
PLW162 0 W
PLW163 20.00000000 W
PLW164 0.11417000 W
===== CHANNEL f54 =====
SFO56 100.6263605 MHz
NUC56 13C
P56 6.80 usec
PL56 11.00 usec
PLW165 0 W
PLW166 20.00000000 W
PLW167 0.11417000 W
===== CHANNEL f55 =====
SFO57 100.6263605 MHz
NUC57 13C
P57 6.80 usec
PL57 11.00 usec
PLW168 0 W
PLW169 20.00000000 W
PLW170 0.11417000 W
===== CHANNEL f56 =====
SFO58 100.6263605 MHz
NUC58 13C
P58 6.80 usec
PL58 11.00 usec
PLW171 0 W
PLW172 20.00000000 W
PLW173 0.11417000 W
===== CHANNEL f57 =====
SFO59 100.6263605 MHz
NUC59 13C
P59 6.80 usec
PL59 11.00 usec
PLW174 0 W
PLW175 20.00000000 W
PLW176 0.11417000 W
===== CHANNEL f58 =====
SFO60 100.6263605 MHz
NUC60 13C
P60 6.80 usec
PL60 11.00 usec
PLW177 0 W
PLW178 20.00000000 W
PLW179 0.11417000 W
===== CHANNEL f59 =====
SFO61 100.6263605 MHz
NUC61 13C
P61 6.80 usec
PL61 11.00 usec
PLW180 0 W
PLW181 20.00000000 W
PLW182 0.11417000 W
===== CHANNEL f60 =====
SFO62 100.6263605 MHz
NUC62 13C
P62 6.80 usec
PL62 11.00 usec
PLW183 0 W
PLW184 20.00000000 W
PLW185 0.11417000 W
===== CHANNEL f61 =====
SFO63 100.6263605 MHz
NUC63 13C
P63 6.80 usec
PL63 11.00 usec
PLW186 0 W
PLW187 20.00000000 W
PLW188 0.11417000 W
===== CHANNEL f62 =====
SFO64 100.6263605 MHz
NUC64 13C
P64 6.80 usec
PL64 11.00 usec
PLW189 0 W
PLW190 20.00000000 W
PLW191 0.11417000 W
===== CHANNEL f63 =====
SFO65 100.6263605 MHz
NUC65 13C
P65 6.80 usec
PL65 11.00 usec
PLW192 0 W
PLW193 20.00000000 W
PLW194 0.11417000 W
===== CHANNEL f64 =====
SFO66 100.6263605 MHz
NUC66 13C
P66 6.80 usec
PL66 11.00 usec
PLW195 0 W
PLW196 20.00000000 W
PLW197 0.11417000 W
===== CHANNEL f65 =====
SFO67 100.6263605 MHz
NUC67 13C
P67 6.80 usec
PL67 11.00 usec
PLW198 0 W
PLW199 20.00000000 W
PLW200 0.11417000 W
===== CHANNEL f66 =====
SFO68 100.6263605 MHz
NUC68 13C
P68 6.80 usec
PL68 11.00 usec
PLW201 0 W
PLW202 20.00000000 W
PLW203 0.11417000 W
===== CHANNEL f67 =====
SFO69 100.6263605 MHz
NUC69 13C
P69 6.80 usec
PL69 11.00 usec
PLW204 0 W
PLW205 20.00000000 W
PLW206 0.11417000 W
===== CHANNEL f68 =====
SFO70 100.6263605 MHz
NUC70 13C
P70 6.80 usec
PL70 11.00 usec
PLW207 0 W
PLW208 20.00000000 W
PLW209 0.11417000 W
===== CHANNEL f69 =====
SFO71 100.6263605 MHz
NUC71 13C
P71 6.80 usec
PL71 11.00 usec
PLW210 0 W
PLW211 20.00000000 W
PLW212 0.11417000 W
===== CHANNEL f70 =====
SFO72 100.6263605 MHz
NUC72 13C
P72 6.80 usec
PL72 11.00 usec
PLW213 0 W
PLW214 20.00000000 W
PLW215 0.11417000 W
===== CHANNEL f71 =====
SFO73 100.6263605 MHz
NUC73 13C
P73 6.80 usec
PL73 11.00 usec
PLW216 0 W
PLW217 20.00000000 W
PLW218 0.11417000 W
===== CHANNEL f72 =====
SFO74 100.6263605 MHz
NUC74 13C
P74 6.80 usec
PL74 11.00 usec
PLW219 0 W
PLW220 20.00000000 W
PLW221 0.11417000 W
===== CHANNEL f73 =====
SFO75 100.6263605 MHz
NUC75 13C
P75 6.80 usec
PL75 11.00 usec
PLW222 0 W
PLW223 20.00000000 W
PLW224 0.11417000 W
===== CHANNEL f74 =====
SFO76 100.6263605 MHz
NUC76 13C
P76 6.80 usec
PL76 11.00 usec
PLW225 0 W
PLW226 20.00000000 W
PLW227 0.11417000 W
===== CHANNEL f75 =====
SFO77 100.6263605 MHz
NUC77 13C
P77 6.80 usec
PL77 11.00 usec
PLW228 0 W
PLW229 20.00000000 W
PLW230 0.11417000 W
===== CHANNEL f76 =====
SFO78 100.6263605 MHz
NUC78 13C
P78 6.80 usec
PL78 11.00 usec
PLW231 0 W
PLW232 20.00000000 W
PLW233 0.11417000 W
===== CHANNEL f77 =====
SFO79 100.6263605 MHz
NUC79 13C
P79 6.80 usec
PL79 11.00 usec
PLW234 0 W
PLW235 20.00000000 W
PLW236 0.11417000 W
===== CHANNEL f78 =====
SFO80 100.6263605 MHz
NUC80 13C
P80 6.80 usec
PL80 11.00 usec
PLW237 0 W
PLW238 20.00000000 W
PLW239 0.11417000 W
===== CHANNEL f79 =====
SFO81 100.6263605 MHz
NUC81 13C
P81 6.80 usec
PL81 11.00 usec
PLW240 0 W
PLW241 20.00000000 W
PLW242 0.11417000 W
===== CHANNEL f80 =====
SFO82 100.6263605 MHz
NUC82 13C
P82 6.80 usec
PL82 11.00 usec
PLW243 0 W
PLW244 20.00000000 W
PLW245 0.11417000 W
===== CHANNEL f81 =====
SFO83 100.6263605 MHz
NUC83 13C
P83 6.80 usec
PL83 11.00 usec
PLW246 0 W
PLW247 20.00000000 W
PLW248 0.11417000 W
===== CHANNEL f82 =====
SFO84 100.6263605 MHz
NUC84 13C
P84 6.80 usec
PL84 11.00 usec
PLW249 0 W
PLW250 20.00000000 W
PLW251 0.11417000 W
===== CHANNEL f83 =====
SFO85 100.6263605 MHz
NUC85 13C
P85 6.80 usec
PL85 11.00 usec
PLW252 0 W
PLW253 20.00000000 W
PLW254 0.11417000 W
===== CHANNEL f84 =====
SFO86 100.6263605 MHz
NUC86 13C
P86 6.80 usec
PL86 11.00 usec
PLW255 0 W
PLW256 20.00000000 W
PLW257 0.11417000 W
===== CHANNEL f85 =====
SFO87 100.6263605 MHz
NUC87 13C
P87 6.80 usec
PL87 11.00 usec
PLW258 0 W
PLW259 20.00000000 W
PLW260 0.11417000 W
===== CHANNEL f86 =====
SFO88 100.6263605 MHz
NUC88 13C
P88 6.80 usec
PL88 11.00 usec
PLW261 0 W
PLW262 20.00000000 W
PLW263 0.11417000 W
===== CHANNEL f87 =====
SFO89 100.6263605 MHz
NUC89 13C
P89 6.80 usec
PL89 11.00 usec
PLW264 0 W
PLW265 20.00000000 W
PLW266 0.11417000 W
===== CHANNEL f88 =====
SFO90 100.6263605 MHz
NUC90 13C
P90 6.80 usec
PL90 11.00 usec
PLW267 0 W
PLW268 20.00000000 W
PLW269 0.11417000 W
===== CHANNEL f89 =====
SFO91 100.6263605 MHz
NUC91 13C
P91 6.80 usec
PL91 11.00 usec
PLW270 0 W
PLW271 20.00000000 W
PLW272 0.11417000 W
===== CHANNEL f90 =====
SFO92 100.6263605 MHz
NUC92 13C
P92 6.80 usec
PL92 11.00 usec
PLW273 0 W
PLW274 20.00000000 W
PLW275 0.11417000 W
===== CHANNEL f91 =====
SFO93 100.6263605 MHz
NUC93 13C
P93 6.80 usec
PL93 11.00 usec
PLW276 0 W
PLW277 20.00000000 W
PLW278 0.11417000 W
===== CHANNEL f92 =====
SFO94 100.6263605 MHz
NUC94 13C
P94 6.80 usec
PL94 11.00 usec
PLW279 0 W
PLW280 20.00000000 W
PLW281 0.11417000 W
===== CHANNEL f93 =====
SFO95 100.6263605 MHz
NUC95 13C
P95 6.80 usec
PL95 11.00 usec
PLW282 0 W
PLW283 20.00000000 W
PLW284 0.11417000 W
===== CHANNEL f94 =====
SFO96 100.6263605 MHz
NUC96 13C
P96 6.80 usec
PL96 11.00 usec
PLW285 0 W
PLW286 20.00000000 W
PLW287 0.11417000 W
===== CHANNEL f95 =====
SFO97 100.6263605 MHz
NUC97 13C
P97 6.80 usec
PL97 11.00 usec
PLW288 0 W
PLW289 20.00000000 W
PLW290 0.11417000 W
===== CHANNEL f96 =====
SFO98 100.6263605 MHz
NUC98 13C
P98 6.80 usec
PL98 11.00 usec
PLW291 0 W
PLW292 20.00000000 W
PLW293 0.11417000 W
===== CHANNEL f97 =====
SFO99 100.6263605 MHz
NUC99 13C
P99 6.80 usec
PL99 11.00 usec
PLW294 0 W
PLW295 20.00000000 W
PLW296 0.11417000 W
===== CHANNEL f98 =====
SFO100 100.6263605 MHz
NUC100 13C
P100 6.80 usec
PL100 11.00 usec
PLW297 0 W
PLW298 20.00000000 W
PLW299 0.11417000 W
===== CHANNEL f99 =====
SFO101 100.6263605 MHz
NUC101 13C
P101 6.80 usec
PL101 11.00 usec
PLW300 0 W
PLW301 20.00000000 W
PLW302 0.11417000 W
===== CHANNEL f100 =====
SFO102 100.6263605 MHz
NUC102 13C
P102 6.80 usec
PL102 11.00 usec
PLW303 0 W
PLW304 20.00000000 W
PLW305 0.11417000 W
===== CHANNEL f101 =====
SFO103 100.6263605 MHz
NUC103 13C
P103 6.80 usec
PL103 11.00 usec
PLW306 0 W
PLW307 20.00000000 W
PLW308 0.11417000 W
===== CHANNEL f102 =====
SFO104 100.6263605 MHz
NUC104 13C
P104 6.80 usec
PL104 11.00 usec
PLW309 0 W
PLW310 20.00000000 W
PLW311 0.11417000 W
===== CHANNEL f103 =====
SFO105 100.6263605

ERHAN/DR. IOBAL/RHJ.1/CDCL3
COSY



AVANCE AV-III HD
400 MHz
LAB #109A

Current Data Parameters
Date mar02-16
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20060202
Time_ 15.04
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm SR 1H/1D-
PULPROG cosyzgpg
TD 32768
SOLVENT CDCL3
DS 16
SWH 3605.769 Hz
FIDRES 1.760630 Hz
AQ 0.253953 sec
RG 327.68
DE 138.667 usec
TE 300.2 K
D0 0.00020000 sec
D1 1.50000000 sec
D13 0.00000400 sec
D16 0.00020000 sec
D20 0.00020000 sec
INA 0.00027740 sec

Channel f1
NUC1 1H
P1 400.3318015 MHz
PC 6.70 usec
PO 6.70 usec
PR 6.70 usec
PL1 20.00000000 W
PL2 20.00000000 W

GRAB(1) SMSQ10.100
SFO 400.3318015 MHz
PFG 1000.00 usec

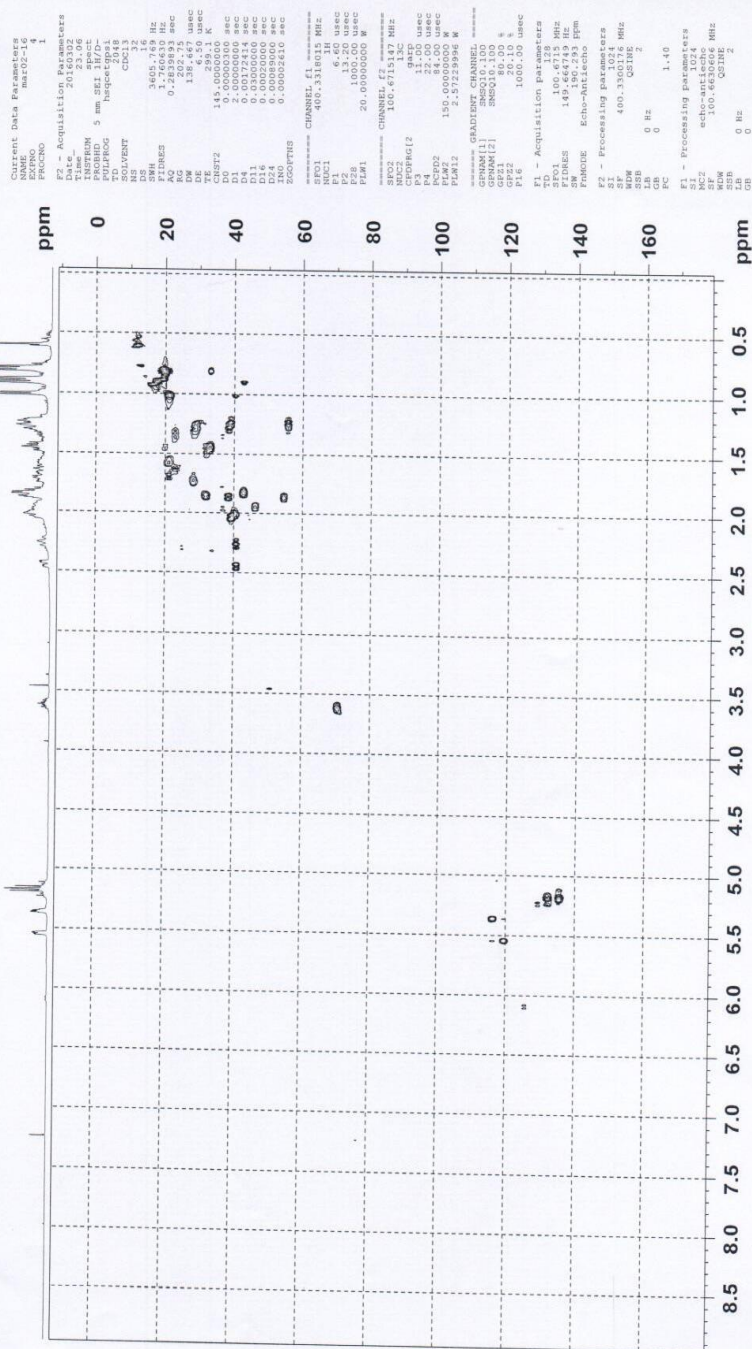
F1 - Acquisition parameters
SFO1 400.3318 MHz
FIDRES 14.081651 Hz
SW 9.005 ppm
FMODE QF

F2 - Processing parameters
SI 2048
SF 400.3318015 MHz
WDW 0 Hz
SSB 0 Hz
LB 0 Hz
GB 0 Hz
PC 1.40

F1 - Processing parameters
SI 32768
SF 400.3318015 MHz
WDW 0 Hz
SSB 0 Hz
LB 0 Hz
GB 0 Hz

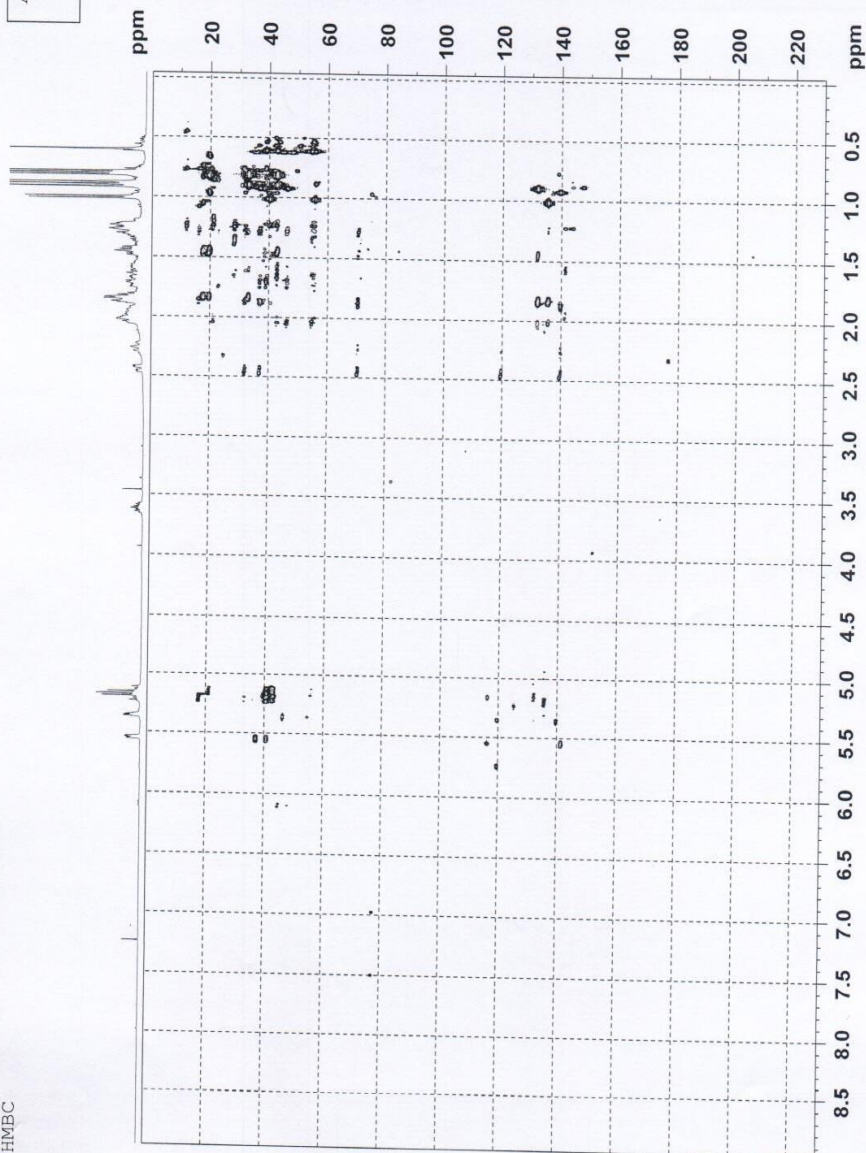
Şekil 3.104. RHJ-1 (6)'nm COSY Spektrumu

AVANCE AV-III HD
400 MHz
LAB #109A

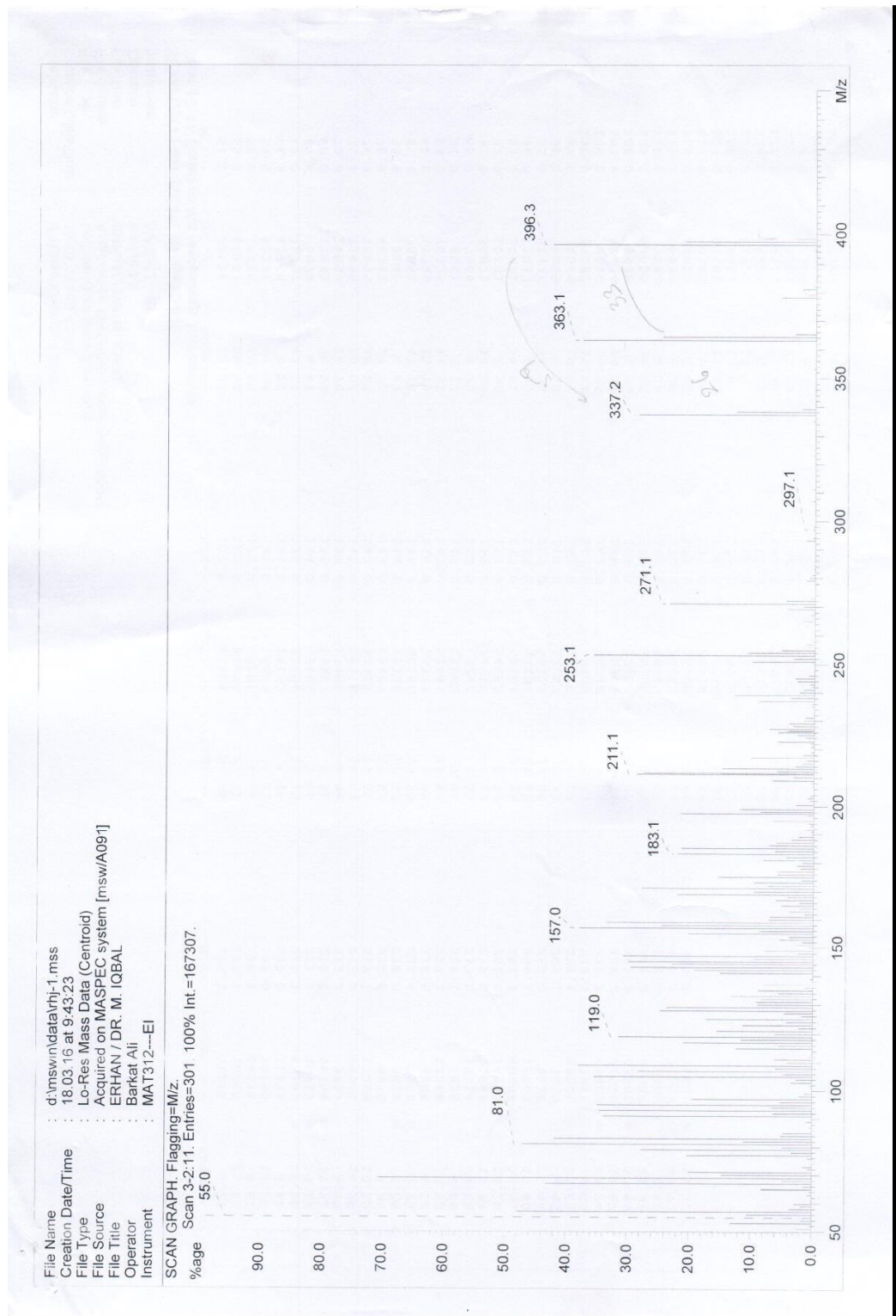


Şekil 3.105. RHJ-1 (6)'nın HSQC Spektrumu

AVANCE AV-III HD
400 MHz
LAB #109A



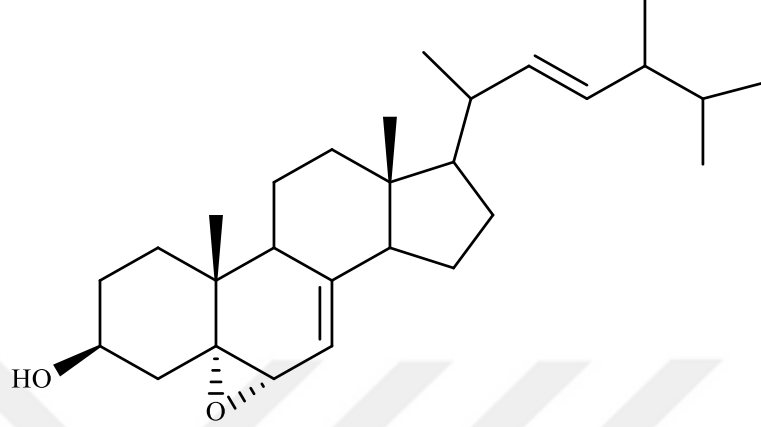
140



Şekil 3.107. RHJ-1 (6)'nm EI-MS Spektrumu

3.7.3.2. TA3-11 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ RHJ-5 (7) =5 α -6 α epoksi ergosta-7,22-dien- 3 β -ol



Şekil 3.108. RHJ-5 (7) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan RHJ-5 (7) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahve renk aldı (Şekil 3.108).

¹H- ve ¹³C-NMR (Şekil 3.109 ve Şekil 3.110), DEPT 135 (Şekil 3.111), COSY (Şekil 3.112), HSQC (Şekil 3.113), HMBC (Şekil 3.114), spektrumları değerlendirildiğinde RHJ-5 (7) maddesinin lanostan steroid oksit olduğu tespit edildi. Çifte bağın yeri HMBC spektrumu ile belirlendi. ¹³C-NMR, DEPT135, HMBC, COSY spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı.

¹H-NMR spektrumunda (CDCl₃+ CD₃OD, 600 MHz) δ 0.53 (3H, s, H-18), δ 0.77 (3H, d, J = 7.0 Hz, H-27), δ 0.76 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-26), δ 0.85 (3H, d, J = 6.8 Hz, H-28), δ 0.96 (3H, d, J = 6.5 Hz, H-21) ve δ 1.00 (3H, s, H-19) ppm’de 6 tane metil piki görüldü. δ 3.95 (1H, m, H-3) ppm’de hidroksil grubuna geminal protonun multipler yarılması 3-OH ın β pozisyonunda olduğunu gösterdi. δ 5.10 (1H, dd, J = 15.3; 8.2, Hz, H-22) ve δ 5.16 (1H, dd, J = 15.3; 7.6, Hz, H-23) ppm’de yan zincir vinilik hidrojen pikleri izlendi. δ 5.26 (1H, br.d, J =5,0 Hz, H-7) olefinik hidrojen piki görüldü. ¹³C-NMR’ı ve HMBC spektrumlarından C-6 ve C-5 arasında bir oksijen köprüsü bulunduğu anlaşıldı. δ 3.52 (1H, br.d, J =5.0 Hz, H-6) ppm de izlenen pik oksijen köprüsünün bir ayağına komşu hidrojenidir.

^{13}C -NMR ve DEPT135 spektrumları beraber değerlendirildiğinde yapıda 6 metil, 7 metilen, 11 metin ve 4 katerner karbon olduğu tespit edildi.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.115), m/z 412,3 $[\text{M}]^+$ piki $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_2$ yapısını doğruladı. Ayrıca su molekülünün ayrılmasıyla m/z 394 $[412-\text{H}_2\text{O}]^+$ pikini verdiği izlendi.

Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.14’de verilen RHJ-5 (7) maddesinin daha önceden izole edilen $5\alpha,6\alpha$ -epoksi ergosta-7,22-dien 3β -ol (Şekil 3.108) (35.0 mg) olduğu belirlendi (Liv d., 2015).



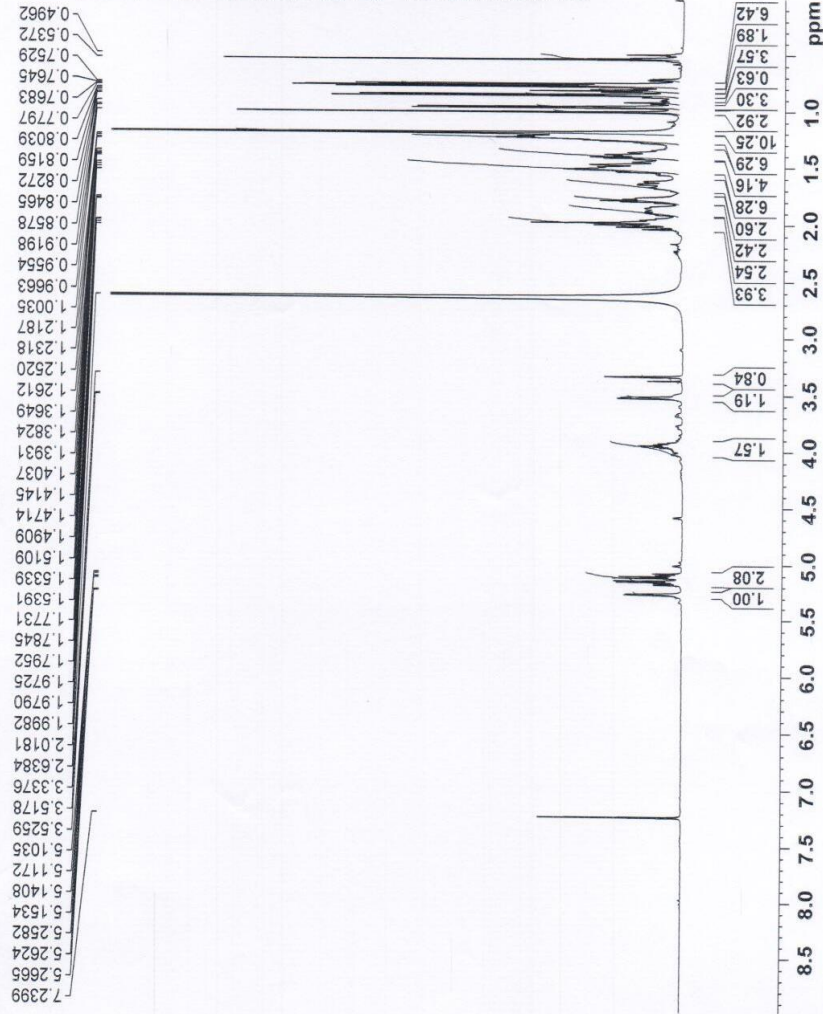
Çizelge 3.14. RHJ-5 (7) saf maddesinin ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC ve COSY değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	HMBC	COSY
1	32.7	1.47; 1.41 (2H, <i>m</i>)		H-2
2	30.4	1.76 (2H, <i>m</i>)		
3	67.3	3.95 (1H, <i>m</i>)		H-4
4	38.9	2.01; 1.64 (2H, <i>m</i>)	C-5, C3, C-2	
5	75.8	-		
6	73.2	3.52 (1H, <i>br.d</i> , <i>J</i> =5.0 Hz)	C-7, C-8, C-5, C-4	H-6
7	117.4	5.26 (1H, <i>br.d</i> , <i>J</i> =5.0 Hz)	C-10, C-14, C-5	
8	143.5	-		
9	43.6	1.88 (1H, <i>m</i>)	C-8, C-11	
10	39.2	-		
11	21.9	1.50 (2H, <i>m</i>)	C-9, C-8	H-12
12	39.2	2.01; 1.64 (2H, <i>m</i>)		
13	43.7	-		
14	54.6	1.86 (1H, <i>m</i>)	C-8	H-15
15	22.8	1.51 (2H, <i>m</i>)		H-16
16	27.9	1.68 (2H, <i>m</i>)		H-17
17	55.9	1.23 (1H, <i>m</i>)		
18	12.2	0.53 (3H, <i>s</i>)	C-12, C-13, C-14, C-17	
19	18.4	1.00 (3H, <i>s</i>)	C-1, C-5, C-9, C-10	
20	40.3	1.97 (1H, <i>m</i>)	C-17, C-22, C23, C-13	H-17
21	21.0	0.96 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.5 Hz)	C-17, C-20, C-22	
22	135.4	5.10 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15.3; 8.2, Hz)	C-21, C-23, C-24	
23	132.0	5.16 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> =15.3; 7.6, Hz)	C-22, C-24, C-28	
24	42.7	1.80 (1H, <i>m</i>)	C-22, C-23, C-26, C-25, C-27, C-28	
25	33.0	1.47 (1H, <i>m</i>)	C-27, C-28, C-26, C-24	
26	19.5	0.76 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.8 Hz)	C-24, C-25, C-26	H-27
27	19.8	0.77 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =7.0 Hz)	C-24, C-25, C-27	
28	17.5	0.85 (3H, <i>d</i> , <i>J</i> =6.8 Hz)	C-23, C-24, C-25	

ERHAN / Dr. IQBAL / RHJ-5 / CDCl₃+CD₃OD
¹H

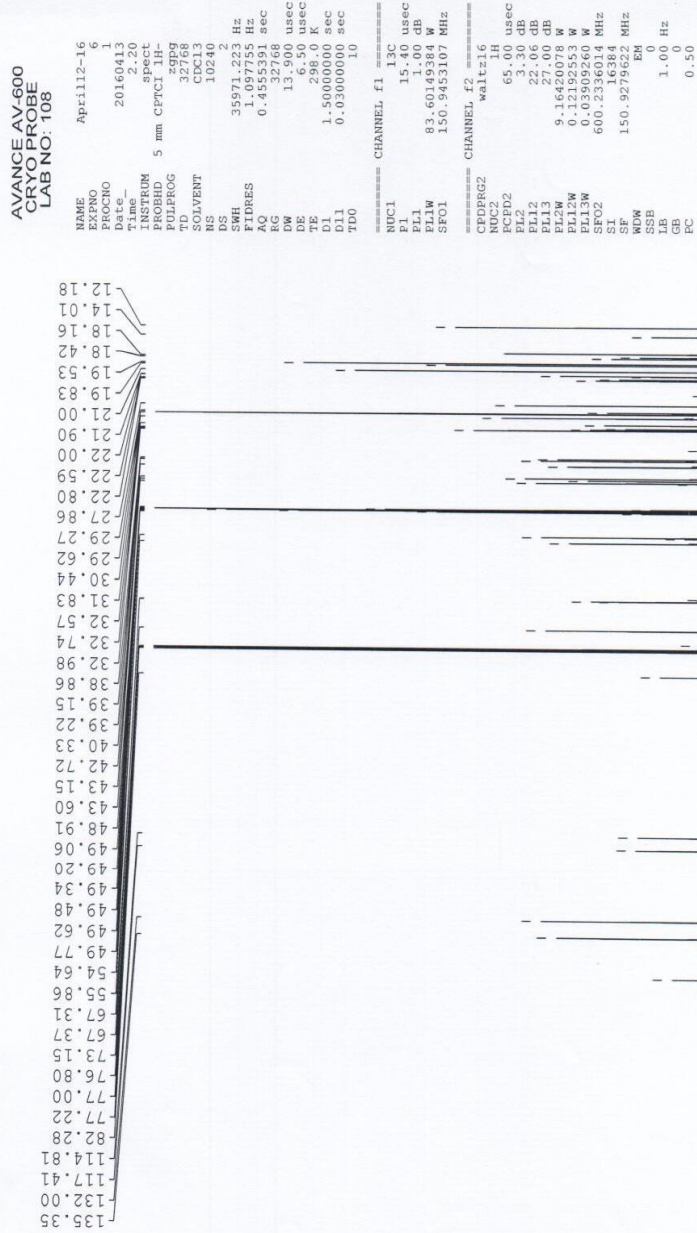
AVANCE AV-600
 CRYO PROBE
 LAB NO: 108

NAME EXPNO 1
 PROCNO 1
 Date_ 20160412
 Time_ 12.25
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm CPTCI 1H-
 PULPROG zg30
 TD 32768
 SOLVENT CDCl₃
 NS 8
 DS 8
 SWH 12019.230 Hz
 FIDRES 0.366798 Hz
 AQ 1.3632404 sec
 RG 9
 DW 41.600 usec
 DE 6.50 usec
 TE 298.0 K
 D1 1.50000000 sec
 TDO 1
 CHANNEL f1
 NUC1 1H
 P1 7.20 usec
 PL1 0.00 dB
 PL12 0.00 dB
 SFO1 9.16420078 MHz
 SI 16384
 SF 600.2340018 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00



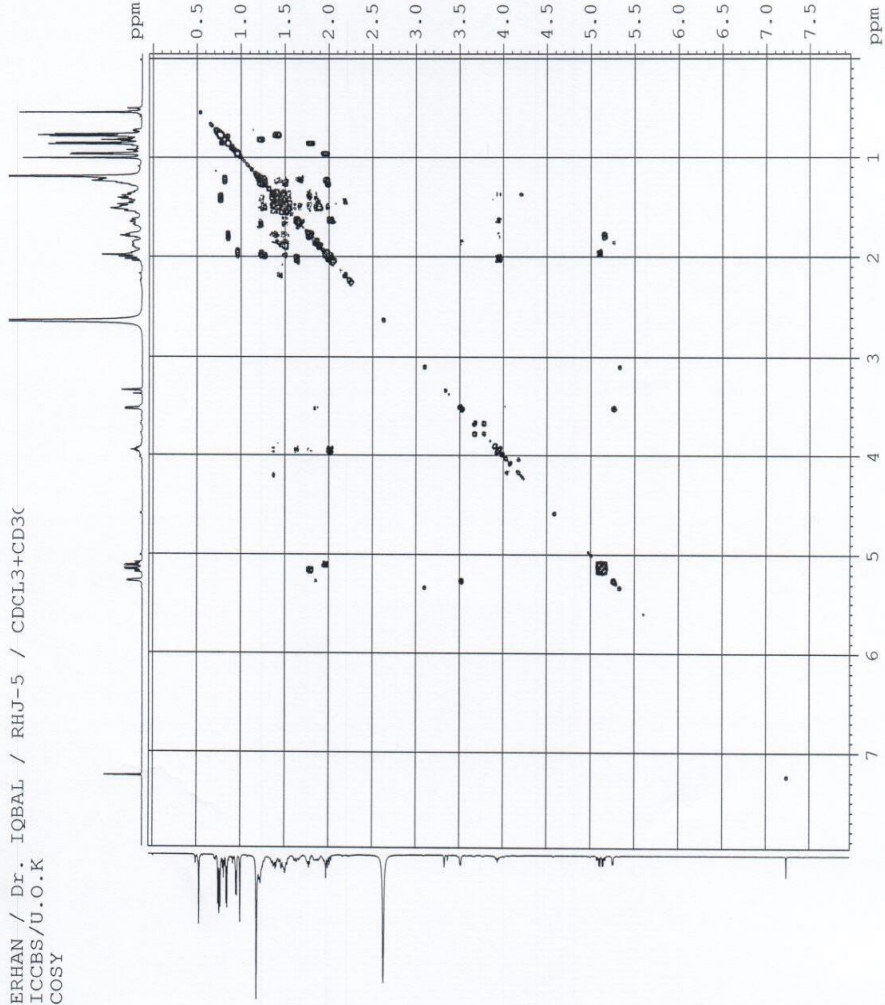
Şekil 3.109. RHJ-5 (7) 'mm ¹H-NMR Spektrumu (CDCl₃ + CD₃OD, 600 MHz)

ERHAN / Dr. IQBAL / RHJ-5 / CDCL3+CD3OD
BB



Şekil 3.110. RHJ-5 (7)'nn ^{13}C -NMR Spektrumu ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$, 150 MHz)

ERHAN / Dr. IQBAL / RHJ-5 / CDCL3+CD3C
 ICCBS/U.O.K
 COSY



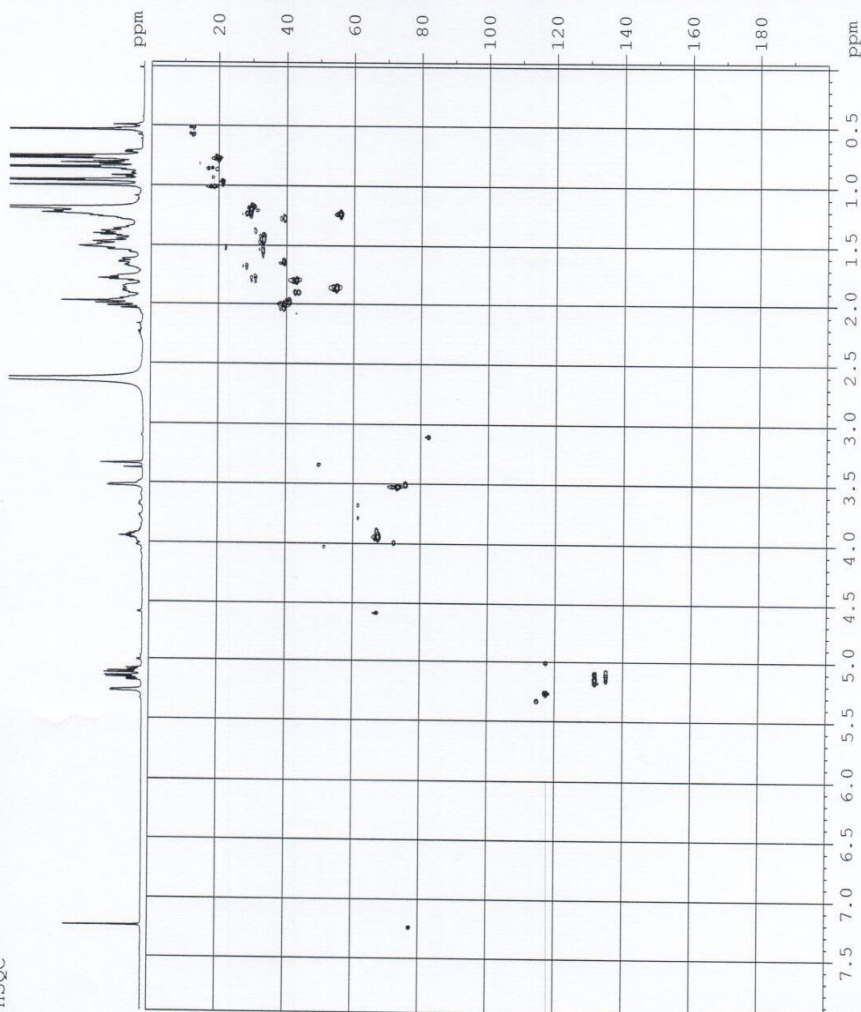
AVANCE AV-600
 CRYO PROBE
 LAB NO: 108

NAME	April12-16	2
EXPNO	1	
PROCNO	1	
Date_	20160412	
Time	12.32	
INSTRUM	5 mm CPTC	
PROBHD	5 mm CPTC	
PULPROG	zgpg30	
TD	65536	
DELTA	2048	
SOLVENT	CDCL3	
NS	8	
DS	4	
SWH	4807.692 Hz	
FIDRES	2.347506 Hz	
AQ	0.2131460 sec	
RG	40.3	
DW	104.000 usec	
DE	6.50 usec	
TE	298.0 K	
D0	0.0000000 sec	
D1	1.5000000 sec	
D13	0.0000400 sec	
D20	0.0000200 sec	
IN0	0.00020800 sec	

===== CHANNEL f1 =====	
NUC1	1H
P1	7.20 usec
PL1	3.30 dB
PL1W	9.16420078 W
SFO1	600.2324009 MHz
NUC2	13C
P2	255
SFO2	600.2324 MHz
FIDRES	18.780046 Hz
SW	8.010 ppm
FOF	OF
SI	1024
SF	600.2300244 MHz
WDW	SSINE
SSB	0
LB	0.00 Hz
GB	0
PC	1.40
SI	1024
SF2	600.2300244 MHz
WDW	SSINE
SSB	0
LB	0.00 Hz
GB	0

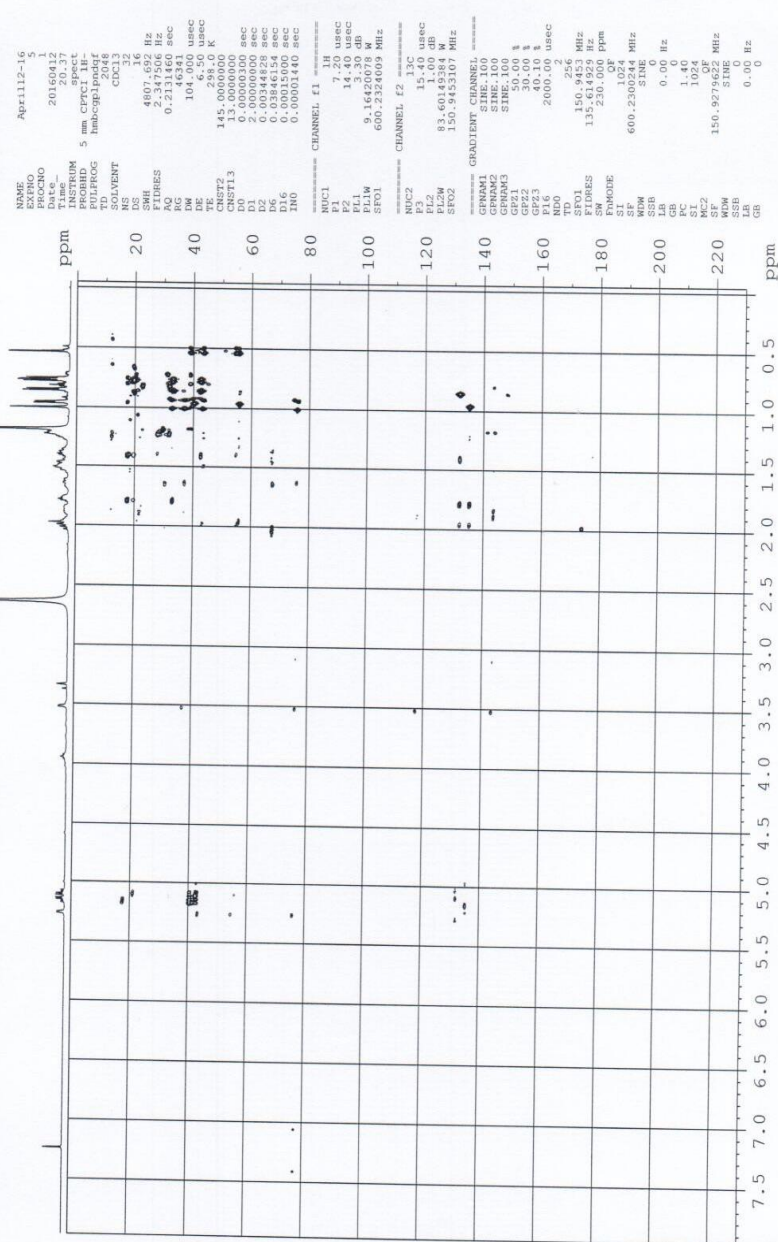
Şekil 3.112. RHJ-5 (7)'nm COSY Spektrumu

AVANCE AV-600
CRYO PROBE
LAB NO: 108



Şekil 3.113. RHJ-5 (7)'nin HSQC Spektrumu

AVANCE AV-600
CRYO PROBE
LAB NO: 108



Şekil 3.114. RHJ-5 (7)'nin HMBC Spektrumu

HEJ-CCBS
4/13/2016 10:42:23 AM

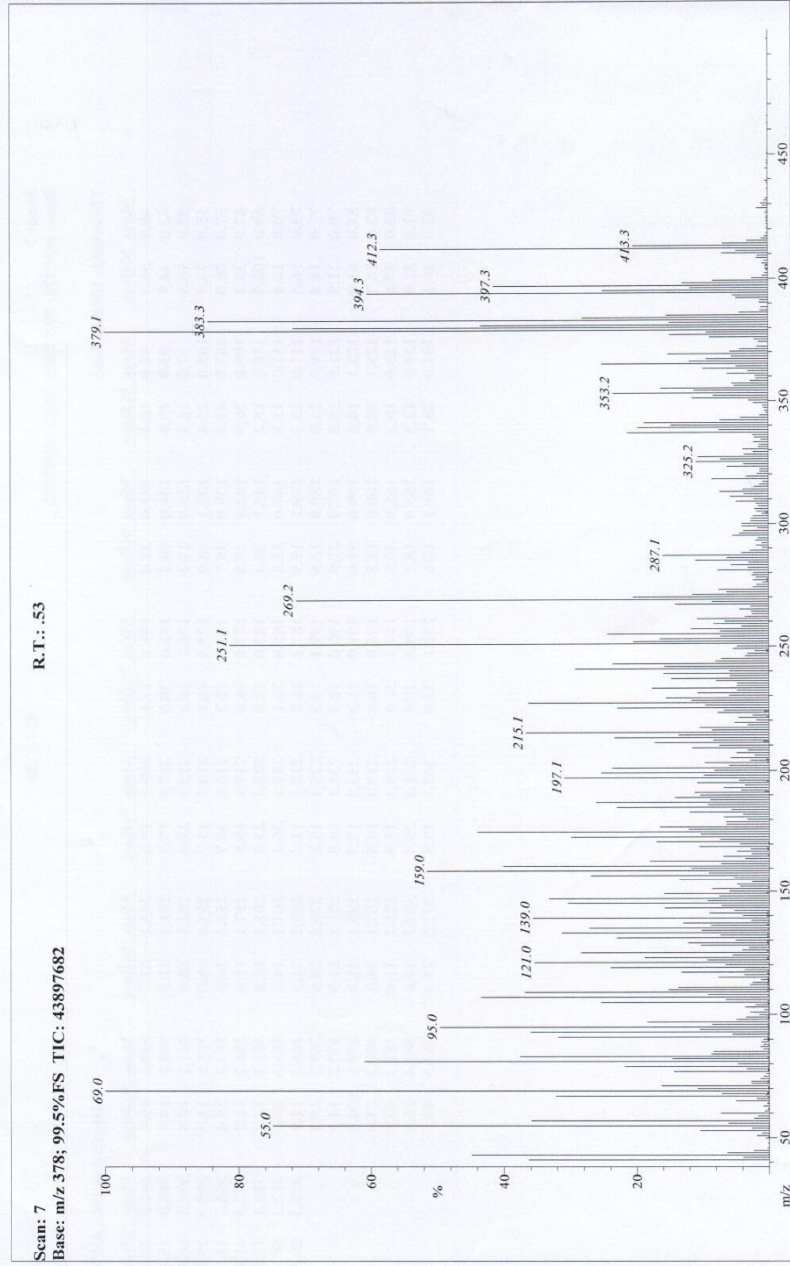
Date Run: 04-13-2016 (Time Run: 10:26:19)

File: RHJ-5
Sample: ERHAN / DR. M.IQBAL
Instrument: JEOL MS 600H-I

Ionization mode: EI+

R.T.: .53

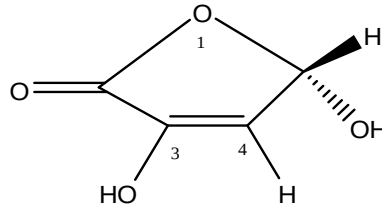
Scan: 7
Base: m/z 378; 99.5%FS TIC: 43897682



Şekil 3.115. RHJ-5 (7)'nın EI-MS Kütle Spektrumu

3.7.3.3. TA3-7-8 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ TA3-7F3WS (8) = 3,5-dihidroksi, (5β-H) 2-furanone



Şekil 3.116. TA3-7F3WS (8) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan TA3-7F3WS (8) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) siyah renk aldı (Şekil 3.116).

¹H- ve ¹³C-NMR (Şekil 3.117 ve Şekil 3.118), DEPT 135 (Şekil 3.119), COSY (Şekil 3.120), HSQC (Şekil 3.121), HMBC (Şekil 3.122), spektrumları değerlendirildiğinde TA3-7F3WS (8) maddesinin furanon yapısında olduğu tespit edildi. Çifte bağın yeri HMBC spektrumu ile belirlendi. ¹³C-NMR, DEPT135, HMBC, COSY spektrumları beraber incelendiğinde yapının tamamı doğrulandı.

Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizege 3.15’de verilen TA3-7F3WS maddesinin daha önceden izole edilen 3,5-dihidroksi, (5β-H) 2-furanone (Şekil 3.121) (2.0 mg) olduğu belirlendi (Dixit vd.,2011).

¹H-NMR spektrumunda (D₂O, 500 MHz) δ 5.69 (1H, d= 8.0 Hz, H-5) ve δ 7.41 (1H, d= 8.0 Hz, H-4) ppm’de iki adet metin sinyali görüldü. Bu iki metin sinyali birbirleri ile COSY spektrumunda da etkileşmektedirler. δ 170.1 (C-2) ppm’de rezonans olan pik lakton karboniline ve δ 155.7 (C-3) ppm’de rezonans olan pik ise hidroksile bağlı vinil karbobuna aittir ve her ikisinde HMBC spektrumunda H-4 ile etkileşmektedirler. δ 103.7 ppm’de rezonans olan pik iki oksijen arasında kalmış C-5 karbonuna ait olup HMBC spektrumunda H-2 ve H-4 ile etkileşmektedir.

¹³C-NMR ve DEPT135 spektrumları birlikte değerlendirildiğinde 2 adet metin ve 2 adet katerner karbon izlendi.

Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.123), m/z 116,0 [M]⁺ piki C₄H₄O₄ yapısını ve 3 doymamışlık derecesini belirtti. Su molekülünün ayrılmasıyla m/z 98 [116-H₂O]⁺ pikini vermektedir.

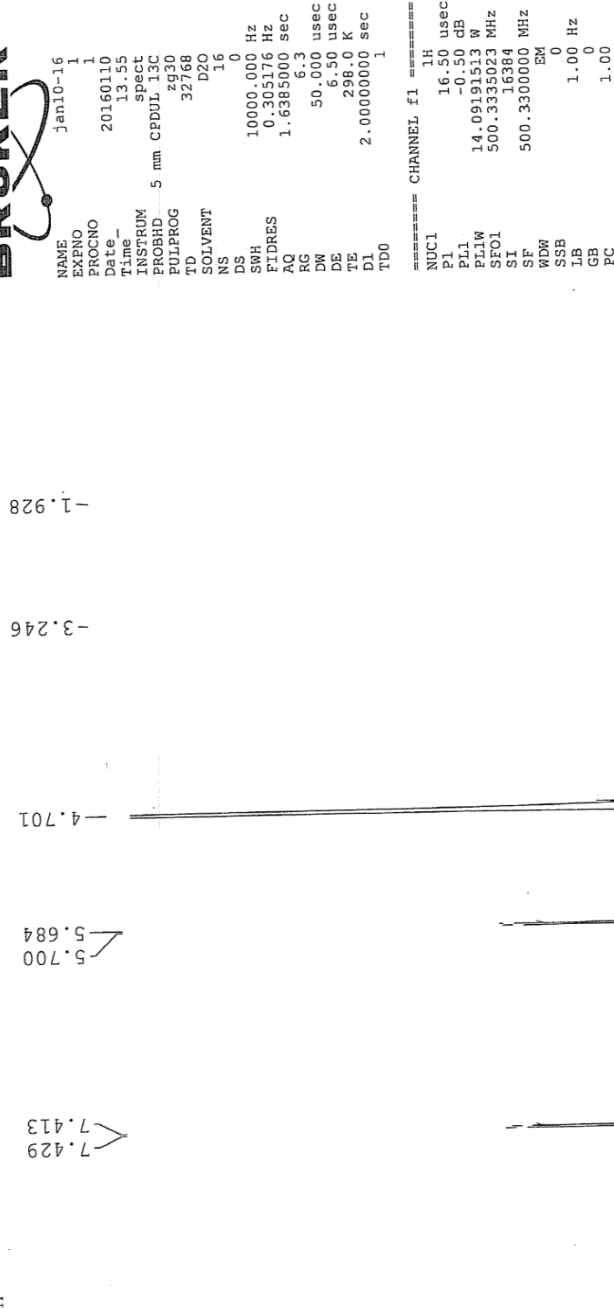
Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında NMR değerleri Çizelge 3.15’de verilen TA3-7F3WS (**8**) maddesinin daha önceden izole edilen 3,5-dihidroksi, (5 β -H) 2-furanone (Şekil 3.116) (2.0 mg) olduğu belirlendi (Dixit vd.,2011).

Çizelge 3.15. TA3-7F3WS (8**) saf maddesinin ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, HMBC ve COSY değerleri**

Pozisyon	^{13}C -NMR	^1H -NMR	HMBC	COSY
2	170,1	-		
3	155,7	-		
4	146,1	7.41 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz)	C-5, C-3, C-2	H-5
5	103,7	5.69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> =8.0 Hz)	C-4, C-2	H-4

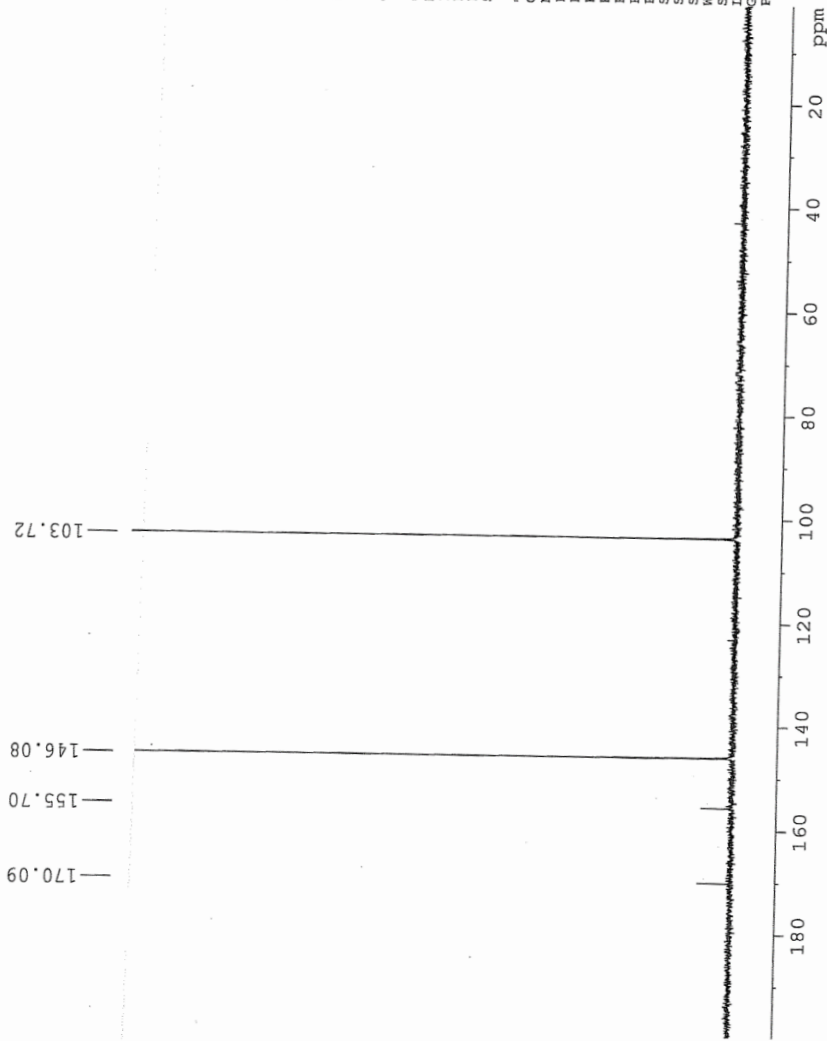


Dr. Mehmet / TA3-7F3WS / D2O
1H



Şekil 3.117. TA3-7F3WS (8)'in ¹H-NMR Spektrumu (D₂O, 500 MHz)

Dr. Mehmet / TA3-7F3WS / D2O
BB



NAME jani10-16
EXPNO 5
PROCNO 1
F2 - 20160111
F3 - 2.28
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CPDUL 13C
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 12288
DS 2
SWH 30303.031 Hz
FIDRES 0.924775 Hz
AQ 0.5407385 sec
RG 32768
IN 16.500 usec
DE 6.50 usec
TE 298.0 K
D1 1.5000000 sec
D11 0.0300000 sec
TD0 12

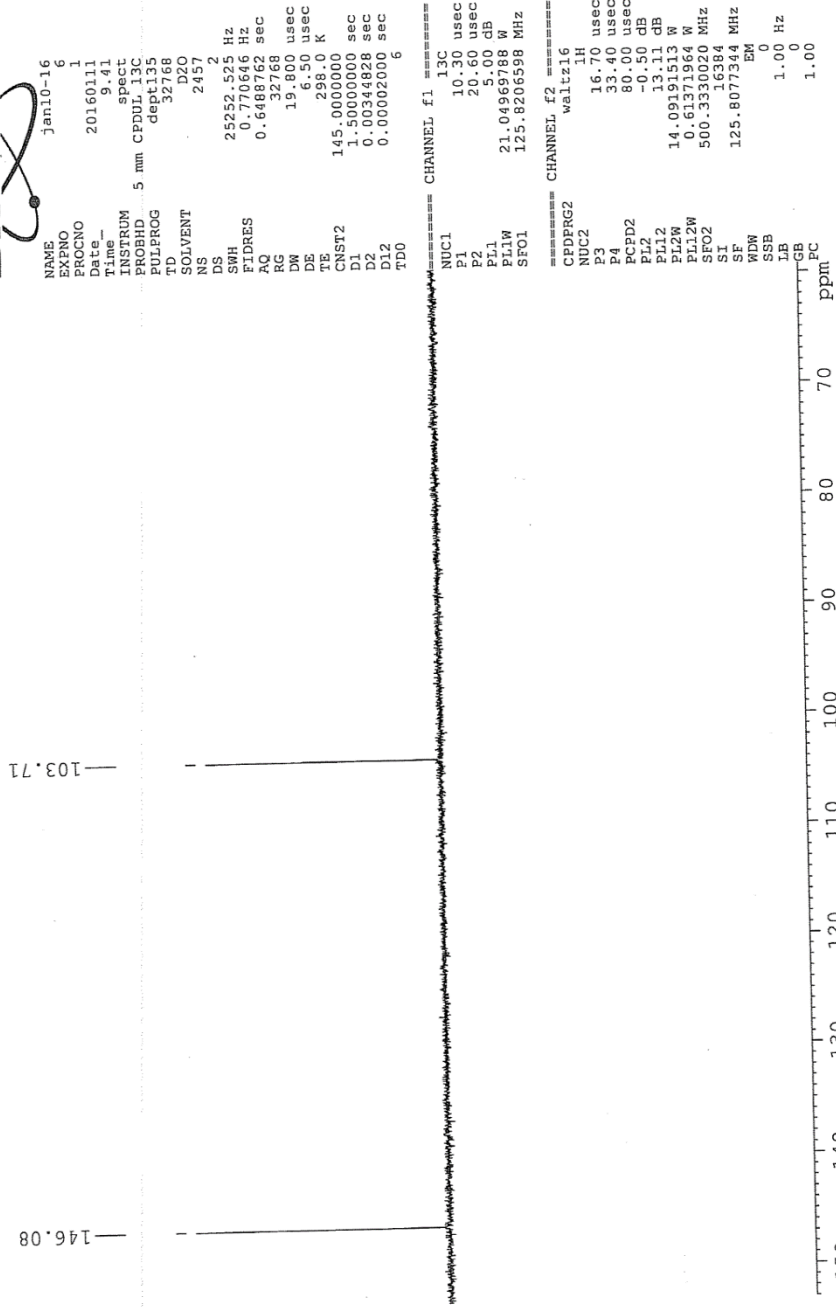
CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 10.30 usec
PL1 5.00 dB
PL1W 21.04969788 W
SFO1 125.8226727 MHz

CHANNEL f2
waitz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -0.50 dB
PL12 13.11 dB
PL13 24.00 dB
14.09191513 W
PL12W 0.61371964 W
PL13W 0.05000000 W
SFO2 500.3335023 MHz
SI 16384
SF 125.8077344 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.50 Hz
GB 0
PC 1.00

Şekil 3.118. TA3-7F3WS (8)'min ¹³C-NMR Spektrumu (D₂O, 125 MHz)



Dr. Mehmet / TA3-7F3WS / D2O
DEPT135



NAME jani10-16
EXPNO 6
PROCNO 1
Date_ 20160111
Time 9.41
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CPDUP-13C
PULPROG dept135
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 2457
DS 2
SWH 25252.525 Hz
FIDRES 0.770646 Hz
AQ 0.6488762 sec
RG 32768
DM 19.800 usec
DE 6.50 usec
TE 298.0 K
CNST2 145.0000000
D1 1.50000000 sec
D2 0.00344828 sec
D12 0.00002000 sec
TD0 6

CHANNEL f1
NUC1 13C
P1 10.30 usec
F2 20.60 usec
PL1 0.00 dB
PL1W 21.0496788 W
SFO1 125.8206598 MHz

CHANNEL f2
waltz16
CPDPRG2
NUC2 1H
P3 16.70 usec
F3 33.40 usec
PCPD2 80.00 usec
PL2 -0.50 dB
PL2 13.11 dB
PL2W 14.09191513 W
PL2W 0.61371964 W
SFO2 500.3330020 MHz
SI 16384
SF 125.8077344 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.00

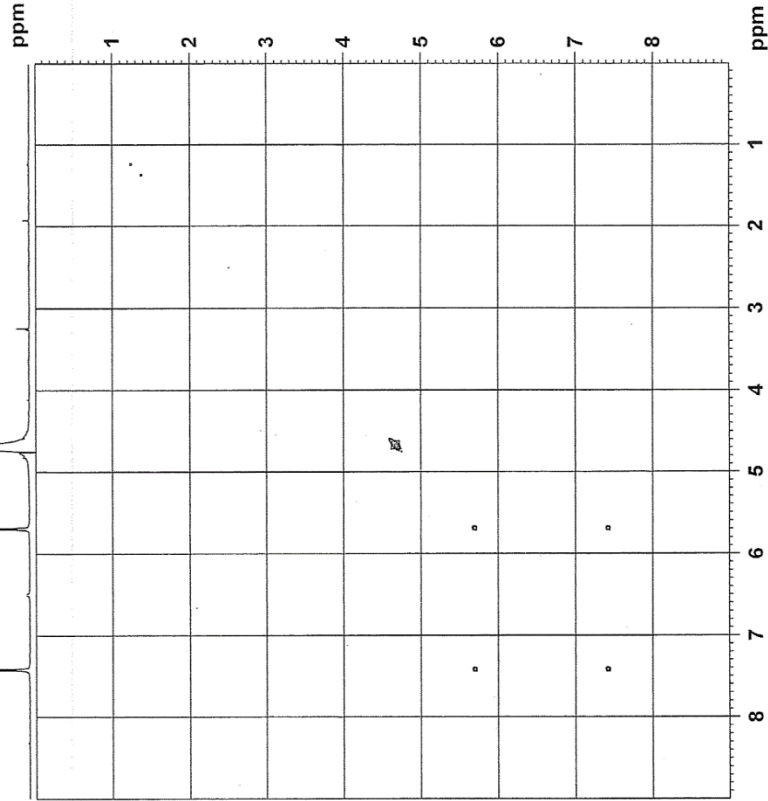
Şekil 3.119. TA3-7F3WS (8)'nin DEPT 135 Spektrumu

Dr. Mehmet / TA3-7F3WS / D2O
COSY



NAME jan10-16
EXPNO 2
PROCNO 1
Date_ 20160110
Time_ 13:59
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CPDUL 13C
PULPROG cosydfqf
TD 2048
SOLVENT D2O
NS 8
DS 2
SWH 4496.403 Hz
FIDRES 2.1195509 Hz
AQ 0.2278988 sec
RG 114
DW 111.200 usec
DE 6.500 usec
TE 298.0 K
D0 0.00000300 sec
D1 2.00000000 sec
D13 0.00000400 sec
D20 0.00000400 sec
IN0 0.0002240 sec

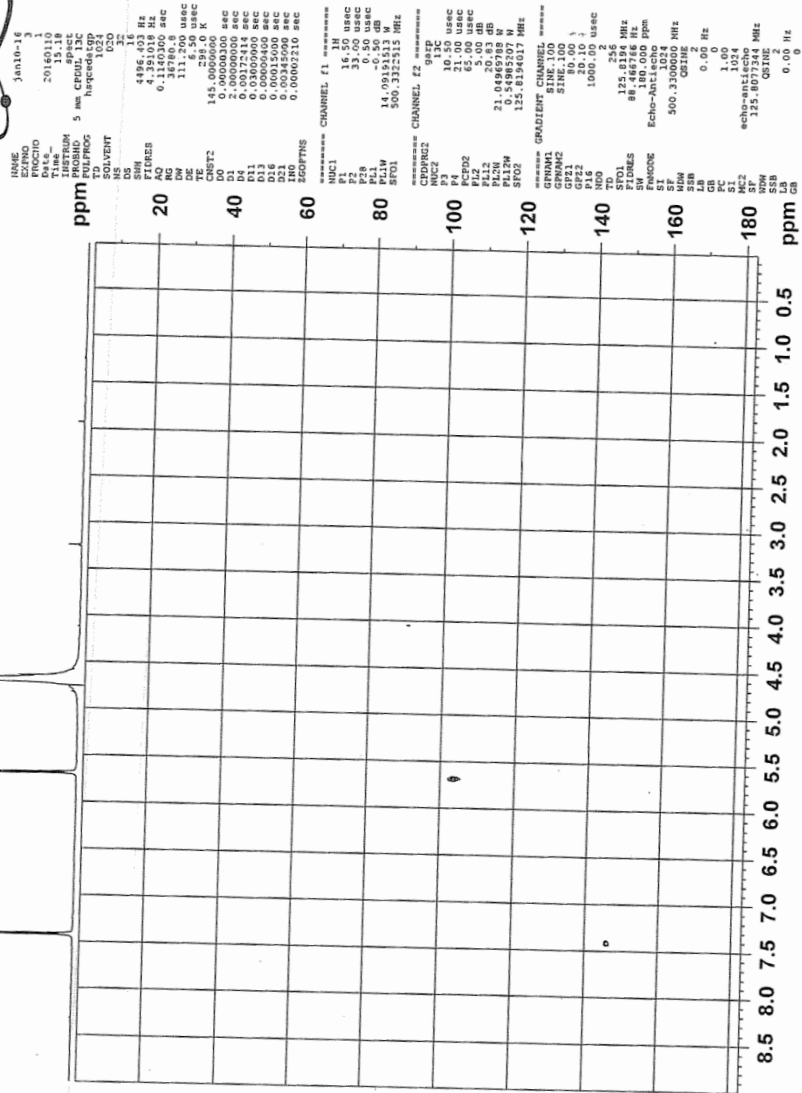
===== CHANNEL f1 =====
NUC1 1H
P1 16.50 usec
PL1 -0.50 dB
PL1W 14.09191513 W
SFO1 500.3322515 MHz
ND0 1
TD 256
SFO1 500.3323 MHz
FIDRES 17.564074 Hz
SW 8.987 ppm
FQMODE OF
SI 2048
SFO1 500.3300000 MHz
WDW QSI
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0
PC 4.00
SI 2048
MC2 OF
SF 500.3300000 MHz
WDW QSI
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0



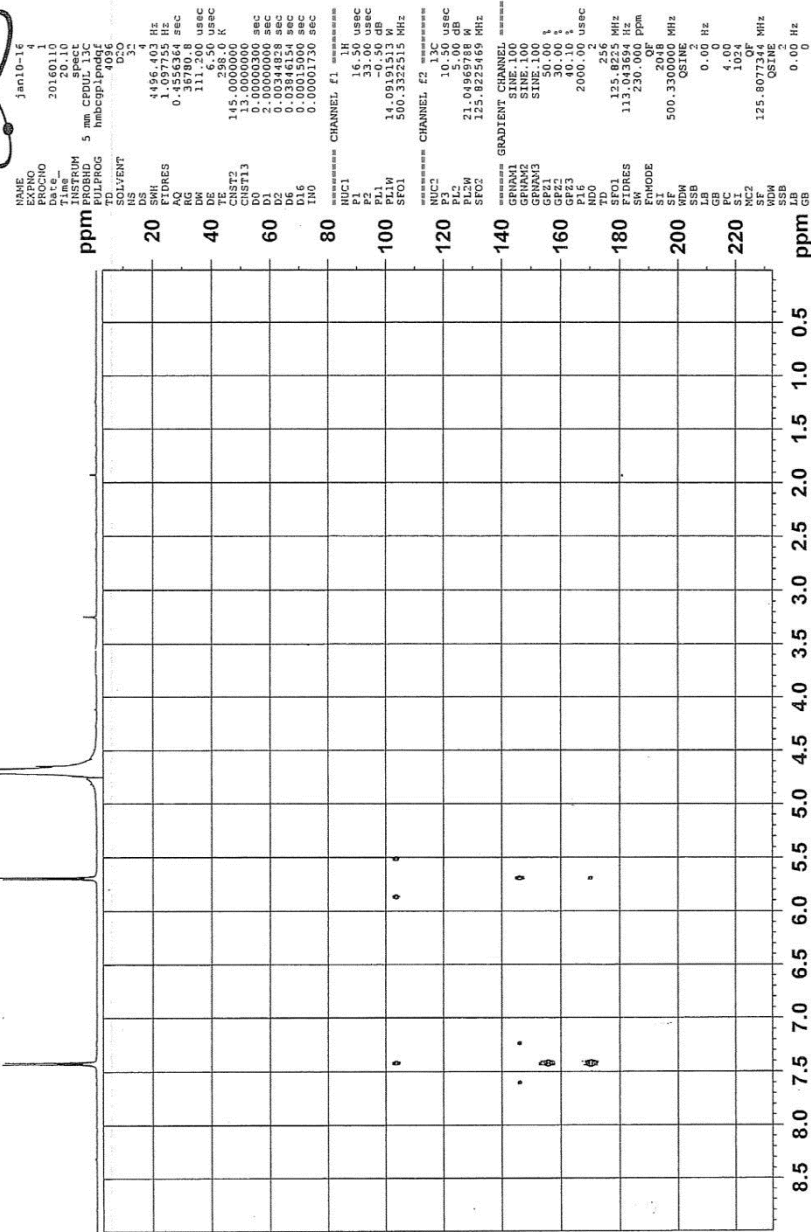
Şekil 3.120. TA3-7F3WS (8)'nin COSY Spektrumu



BRUKER



Şekil 3.121. TA3-7F3WS (8)'nin HSQC Spektrumu



Şekil 3.122. TA3-7F3WS (8)'nin HMBC Spektrumu

HEJ MASS SECTION
1/1/2016 10:10:26 AM

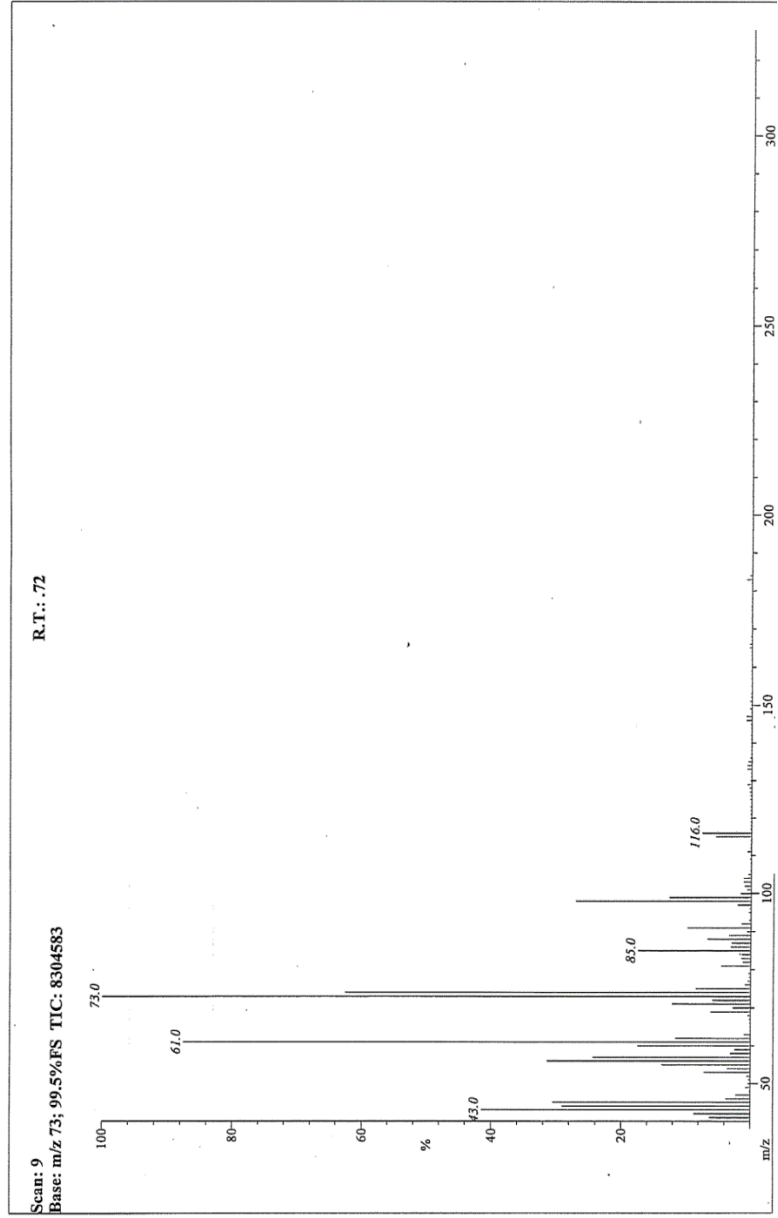
Date Run: 01-01-2016 (Time Run: 10:04:43)

Ionization mode: EI+

File: TA3-7F3WS
Sample: DR. MEHMET / DR. M. IQBAL
Instrument: JEOL MS 600H-1

R.T.: 72

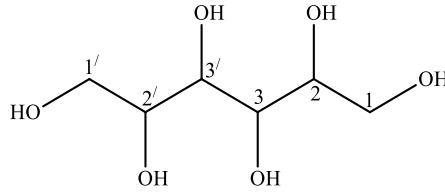
Scan: 9
Base: m/z 73; 99.5%FS TIC: 8304583



Şekil 3.123. TA3-7F3WS (8)'nin EI-MS Kütle Spektrogramı

3.7.3.4. TA3-12 fraksiyonundan elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ TA3-12F2 (9) = Mannitol



Şekil 3.124. TA3-12F2 (9) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan TA3-12F2 (9) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) siyahımsı yeşil renk aldı (Şekil 3.124).

¹H- NMR (Şekil 3.125) TA3-12F2 maddesinin anomerik protonu olmayan lineer bir şeker olduğunu önerdi. δ 3.74 (dd, $J = 9.1, 2.5$ Hz,) ve δ 3.54 (dd, $J = 11.8, 6.2$ Hz) ppm'de rezonans olan pikler H-1, 1' gösterdi 3.66 (dt, $J = 6.0, 2.5$ Hz), 3.69 (d, $J = 6.0$ Hz,) ppm'de rezonans olan pikler sırasıyla H-2, 2' ve H-3, 3' ü gösterdi.

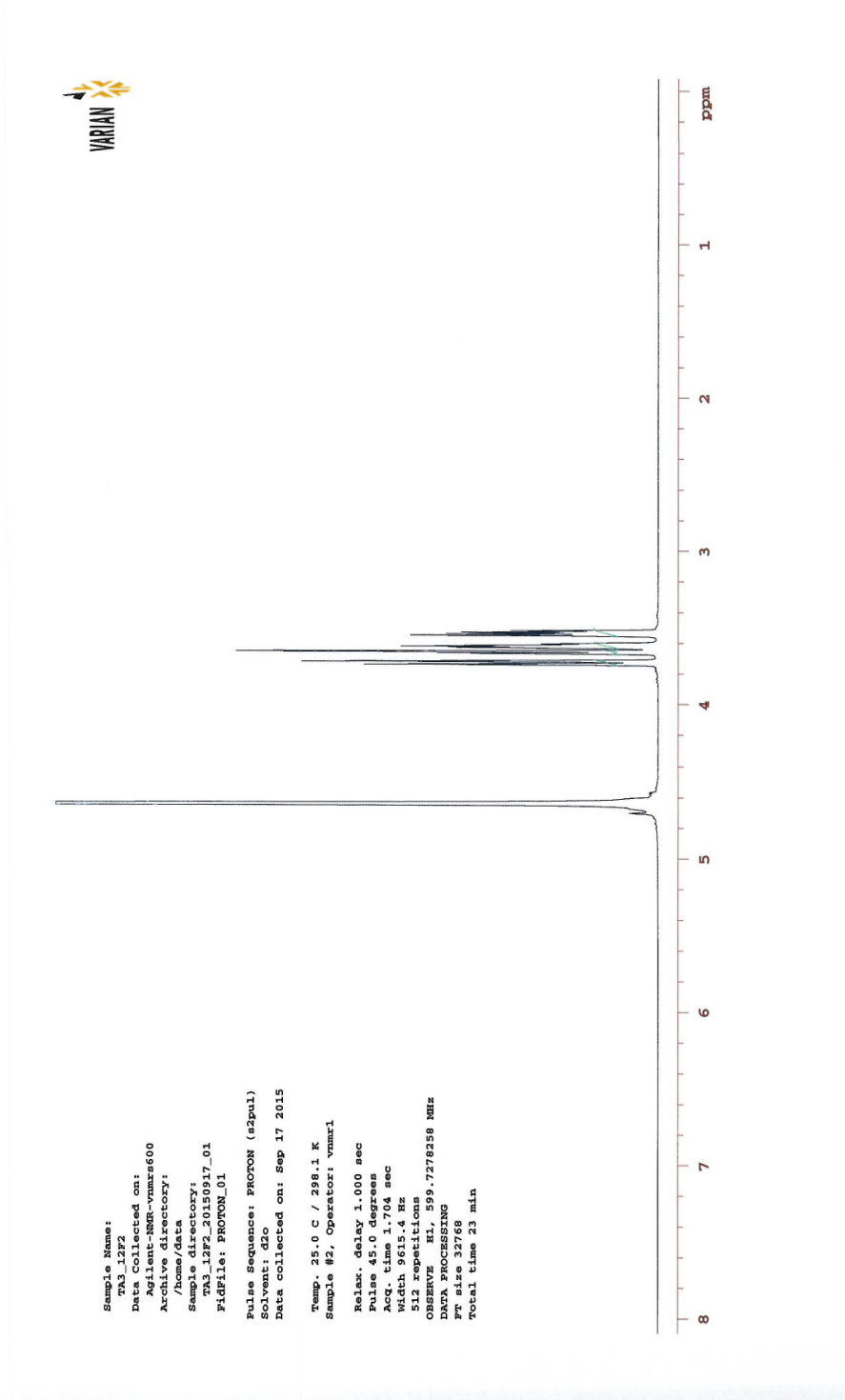
¹³C-NMR ve HSQC (Şekil 3.126 ve Şekil 3.127) spektrumları birlikte değerlendirildiğinde 2 adet metin ve 1 adet metilen karbonu izlendi. HMBC spektrumu (Şekil 3.128) ve ESI-MS (Şekil 3.129) kütle spektrumu ile birlikte değerlendiriliğinde aslında yapının simetrik olduğu ve 6 C den oluştuğu anlaşıldı.

¹³C-NMR'ında δ 63.1, 70.8 ve 69.2 ppm'de rezonans olan pikler sırası ile C-1, C-1', C-2, C-2' ve C-3, C-3' karbonlarına aittir.

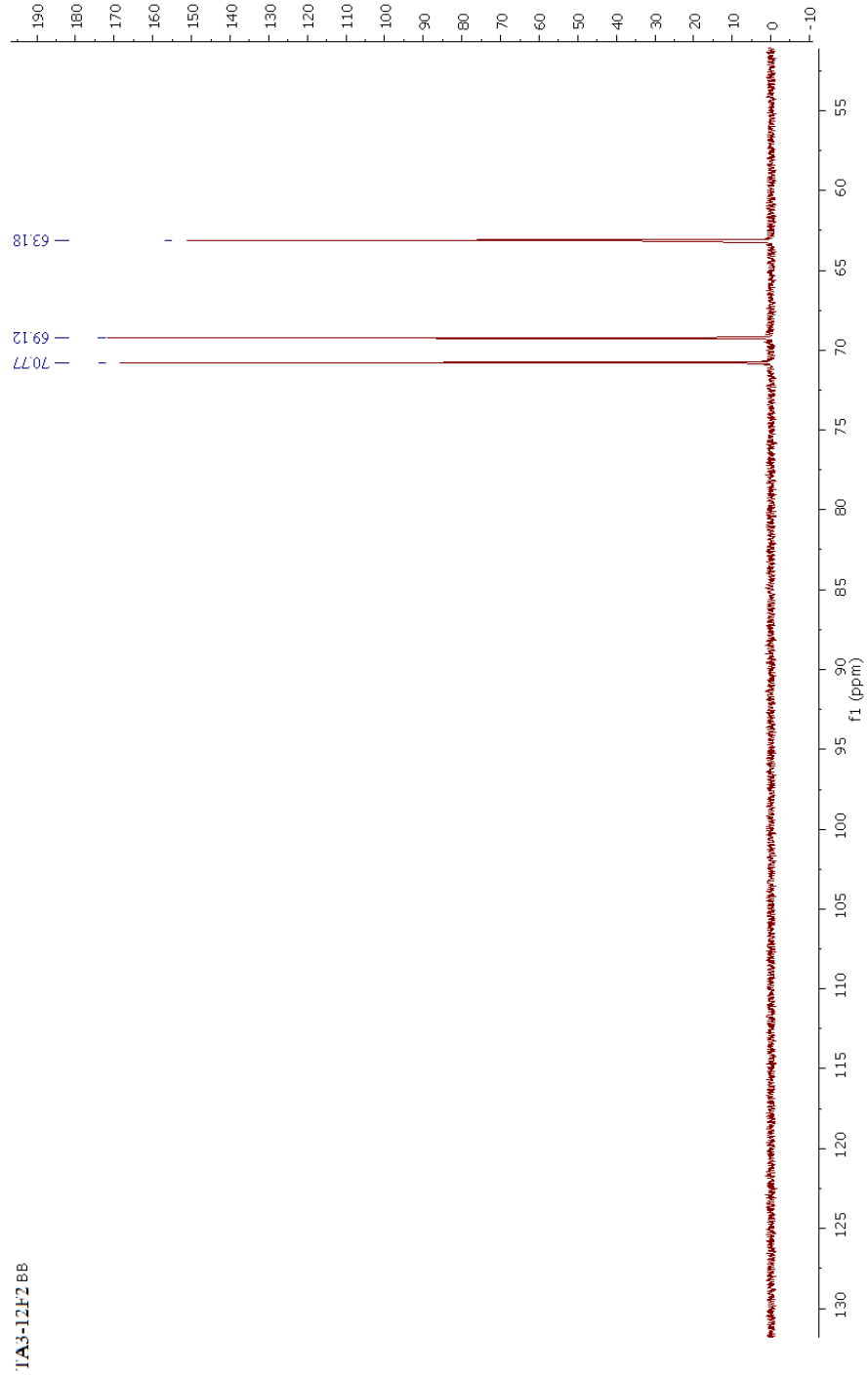
Kütle spektrumunda (ESI-MS) (Şekil 3.129), m/z 205,0 $[M+Na]^+$ piki C₆H₁₄O₆ yapısını belirtti. Bölüm 2.7'de verilen GC-MS şartlarında standartlar ile karşılaştırıldı. Şekil 3.130'da verilen GC-MS kromatogramları ve Şekil 3.131'de verilen MS spektrumunun Wiley 2008 kütüphanesi ile karşılaştırılması ve Çizelge 3.16 da NMR değerleri verilen maddenin yapının Mannitol (Şekil 3.124) (12 mg) olduğu doğrulandı (Duquesnoy vd., 2008).

Çizelge 3.16. TA3-12F2 (9) saf maddesinin ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, HMBC değerleri

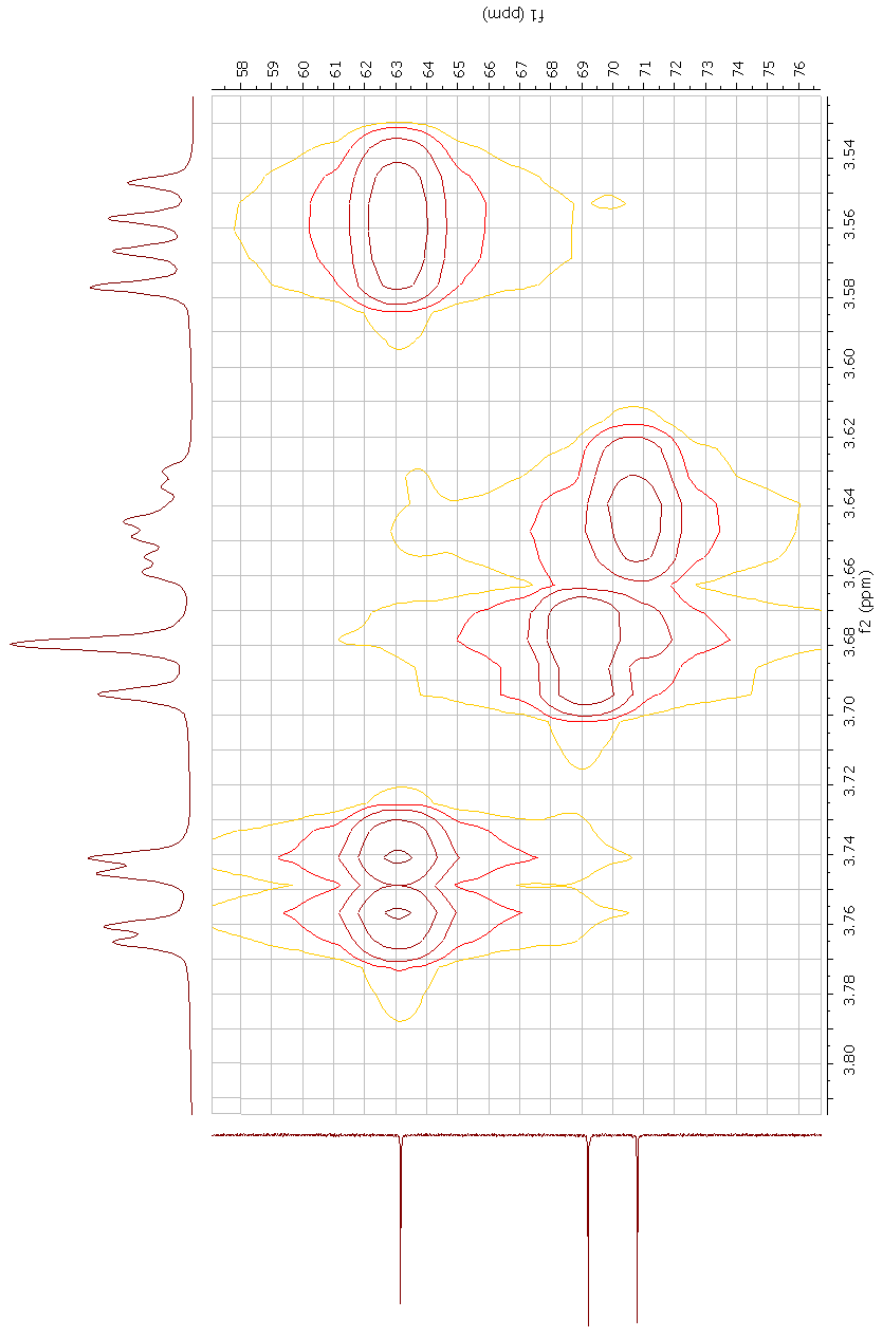
Pozisyon	^{13}C -NMR(δ)	^1H -NMR (δ)	HMBC
1-1'	63.1	3.74 (1H, <i>dd</i> , $J = 9.1, 2.5$ Hz), 3.54 (1H, <i>dd</i> , $J = 11.8, 6.2$ Hz)	C-3-3', C-2-2'
2-2'	70.8	3.66 (1H, <i>dt</i> , $J = 6.0, 2.5$ Hz)	C-3-3', C-1'
3-3'	69.2	3.69 (1H, <i>d</i> , $J = 6.0$ Hz)	C-2-2', C-3-3'



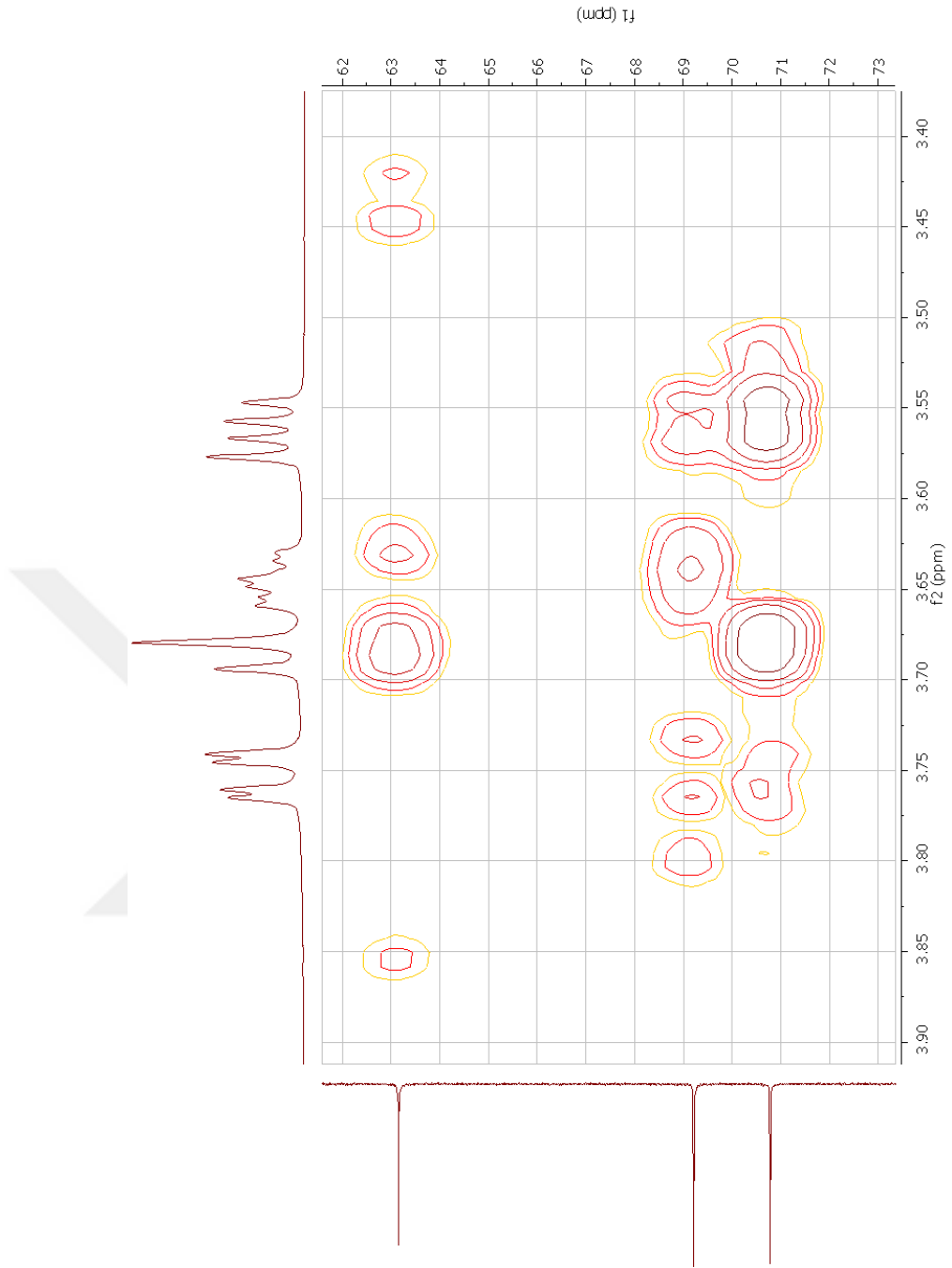
Şekil 3.125. TA3-12F2 (9)'nin ^1H -NMR Spektrumu (D_2O , 600 MHz)



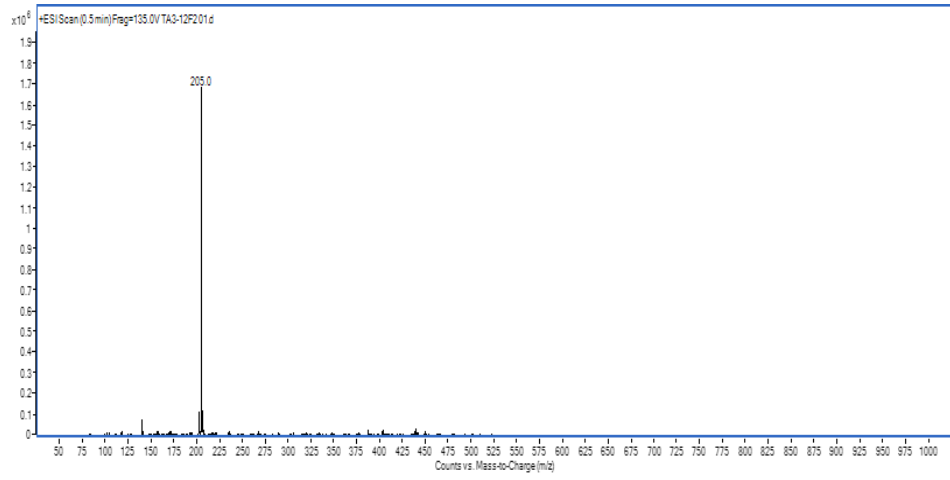
Şekil 3.126. TA3-12F2 (9)'nin ^{13}C -NMR Spektrumu (D_2O , 150MHz)



Şekil 3.127. TA3-12F2 (9)'nin HSQC spektrumu



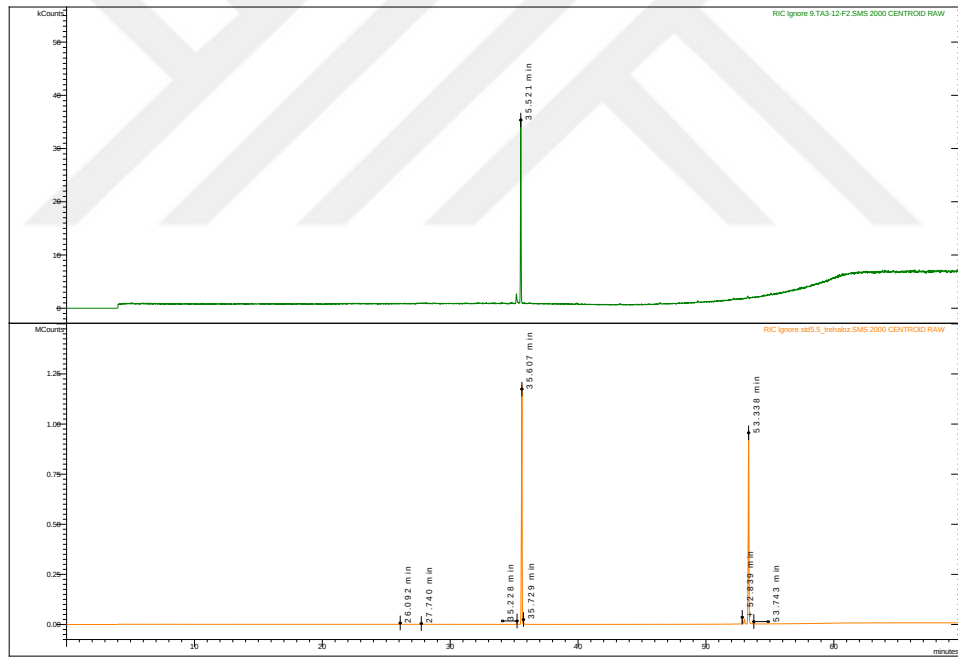
Şekil 3.128. TA3-12F2 (9)'nin HMBC spektrumu



Şekil 3.129. TA3-12F2 (9)'nin ESI-MS Spektrumu

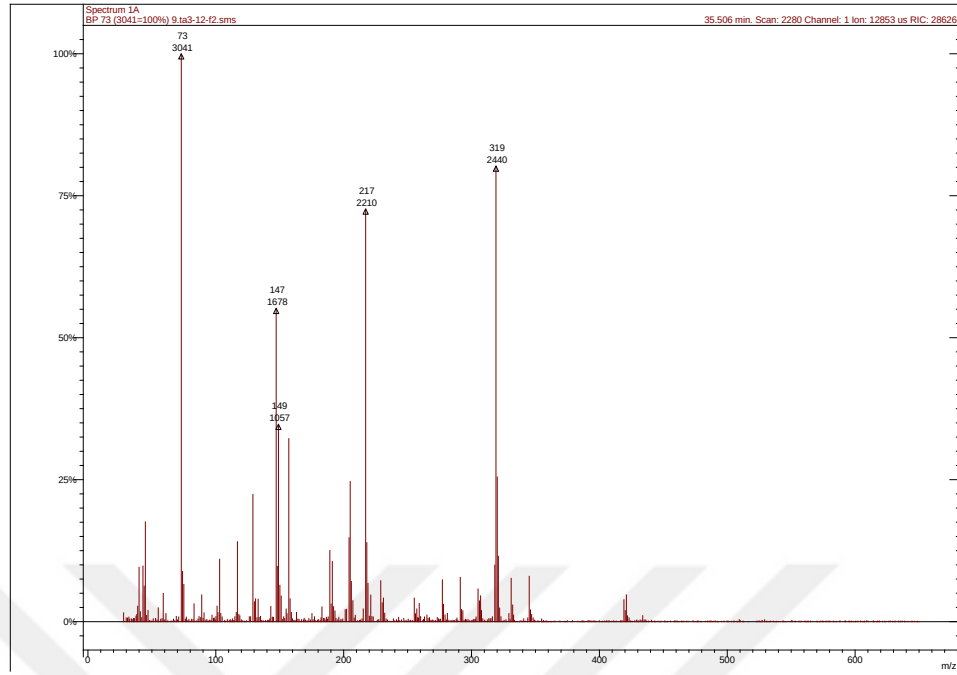
Chromatogram Plots

Plot 1: ...23032016isugar-ric-ta14042016@ta3-12-f2.sms RIC Ignore
Plot 2: ... & mhlseker std 23032016std5_5_trehaloz.sms RIC Ignore



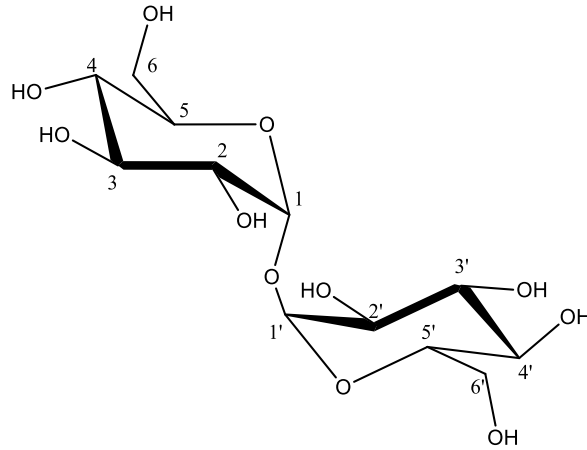
Şekil 3.130. TA3-12F2 (9)'nin ve standart mannitol'ün GC-MS Kromatogramları

Spectrum Plot - 6.6.2016 18:20



Şekil 3.131. Silillenmiş TA3-12F2 (9)'nin GC-MS Spetrumu

❖ **TA3-12F3C1 (10) = α -D-Glucopyranoside, α -D-glucopyranosyl**



Şekil 3.132. TA3-12F3C1 (10) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan TA3-12F3C1 (10) maddesi kristal halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) siyahımsı yeşil renk aldı (Şekil 3.132).

^1H - NMR (Şekil 3.133) TA3-12F3C1 (10) maddesinin anomerik protonu olan piranoz halkasında bir disakkarit olduğunu önerdi. ^{13}C -NMR (Şekil 3.134), DEPT 135 (Şekil 3.135), COSY (Şekil 3.136), HSQC (Şekil 3.137), HMBC (Şekil 3.138), spektrumları değerlendirildiğinde TA3-12F3C1 (10) maddesinin yapının tamamı doğrulandı.

ESI-MS kütle spektrumunda (Şekil 3.141) m/z 365,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ piki $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ yapısını belirtti. ^1H -NMR spektrumu (D_2O , 600 MHz) ve HMBC spektrumuna göre δ 5,08 (1H, d , $J=1.8$ Hz) ppm'de rezonans olan pik anaomerik proton ve δ 95.9 (C-1') ppm'de rezonans olan karbon ve δ 74.8 (C-5) ppm'de rezonans olan karbon ile ekkileşmektedir (Şekil 3.139). Buda her iki şeker monomerinin 1 pozisyonundan bağlı olduğunu göstermektedir. Çizelge 3.17'de verilen NMR değerleri incelendiğinde ve X-ray'i (Şekil 3.140) göz önüne alındığında kristalin 1-1 pozisyonundan bağlanan disakkarit α -D-Glucopyranoside, α -D-glucopyranosyl (Şekil 3.132) (123.0 mg) olduğu belirlendi.

Çizelge 3.17. TA3-12F3C1 (10) saf maddesinin ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, HMBC ve COSY değerleri

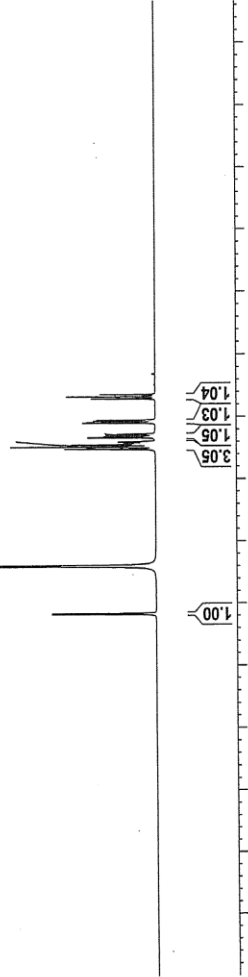
Pozisyon	^{13}C -NMR	^1H -NMR
1	95.9	5.08, (1H, <i>d</i> , $J=1.8$ Hz)
2	73.7	3,54 (1H, <i>dd</i> , $J=10,2$; 4,0 Hz)
3	72.3	3,33 (1H, <i>t</i> , $J=9,6$ Hz)
4	75.2	3.75 (1H, <i>m</i>)
5	74.8	3.70 (1H, <i>dt</i> , $J=1,8$; 5,4; 5,4 Hz)
6	63.2	3,65 (2H, <i>dd</i> , $J= 5,4$; 5,4 Hz)

DR.MEHMET / TAE-12F3C1 / D2O
1H

Avance AV-600 MHz
CRYOBROBE (LC)
Lab No: 108

5.089
5.083
4.699
3.763
3.759
3.742
3.740
3.726
3.720
3.717
3.712
3.709
3.704
3.700
3.666
3.657
3.646
3.637
3.550
3.544
3.534
3.527
3.354
3.338
3.323

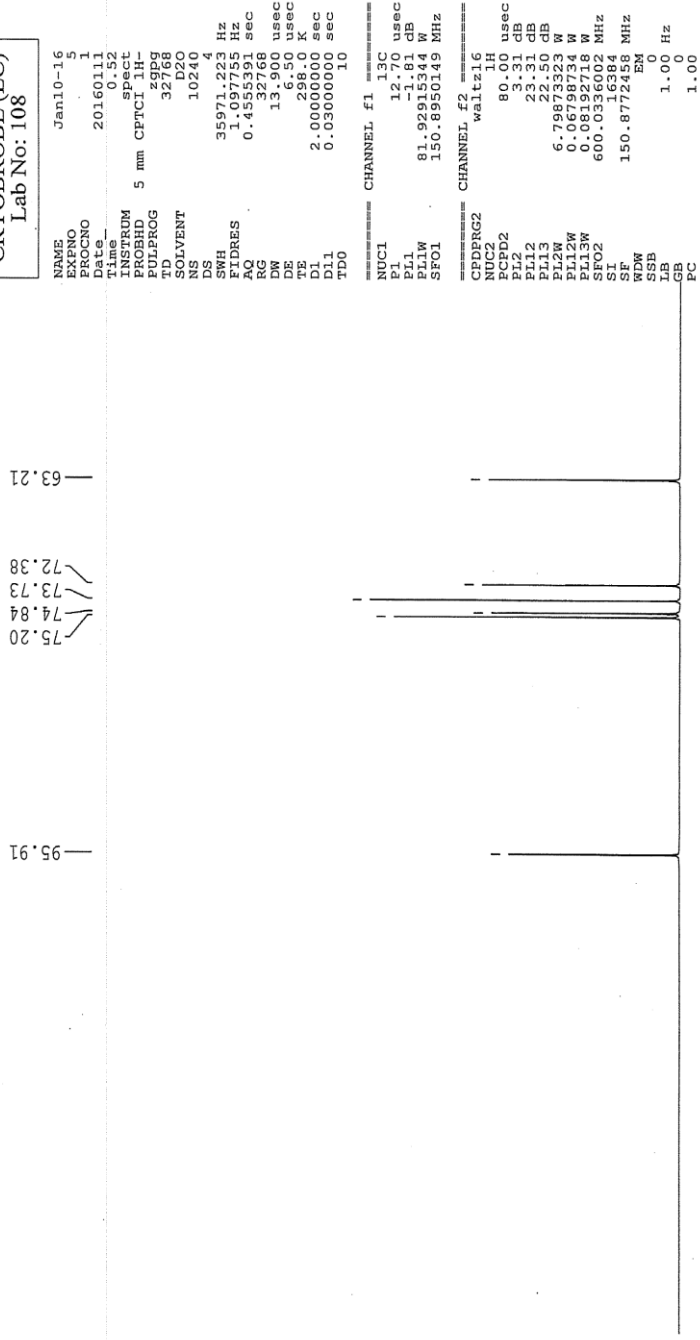
NAME Jan10-16
EXPNO 1
PROCNO 1
Date_ 20160110
Time_ 13.46
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CPTC-1H
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 8
DS 0
SWH 12019.230 Hz
FIDRES 0.336798 Hz
AQ 1.3632404 sec
RG 10.1
DW 41.600 usec
DE 6.50 usec
TE 298.0 K
D1 2.00000000 sec
TD0 1
CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 8.90 usec
PL1 0.00 dB
PL12 3.00 dB
PL1W 6.79873323 W
SFO1 600.0348002 MHz
SI 32768
SF 600.0300000 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.50 Hz
GB 0
PC 1.40



Şekil 3.133. TAE-12F3C1 (10)'nin ¹H-NMR Spektrumu (D₂O, 500 MHz)

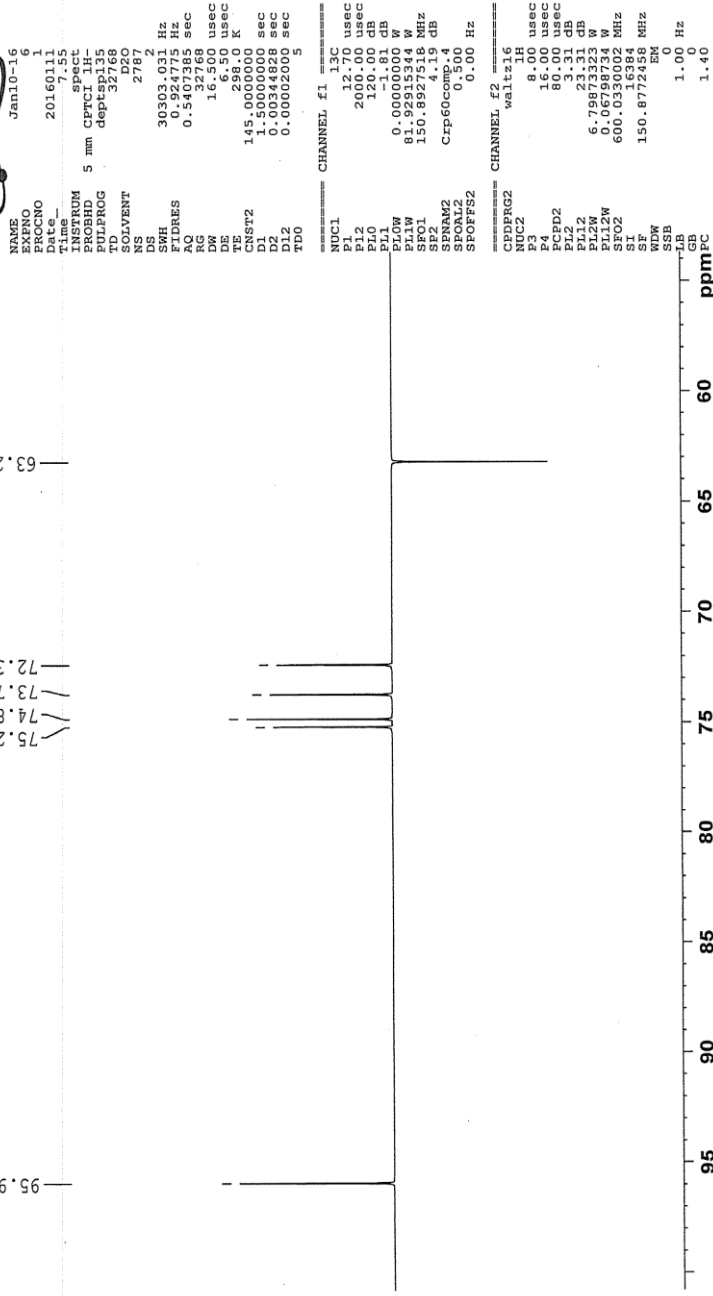
DR. MEHMET / TAE-12F3C1 / D2O
BB

Avance AV-600 MHz
CRYOBROBE (LC)
Lab No: 108



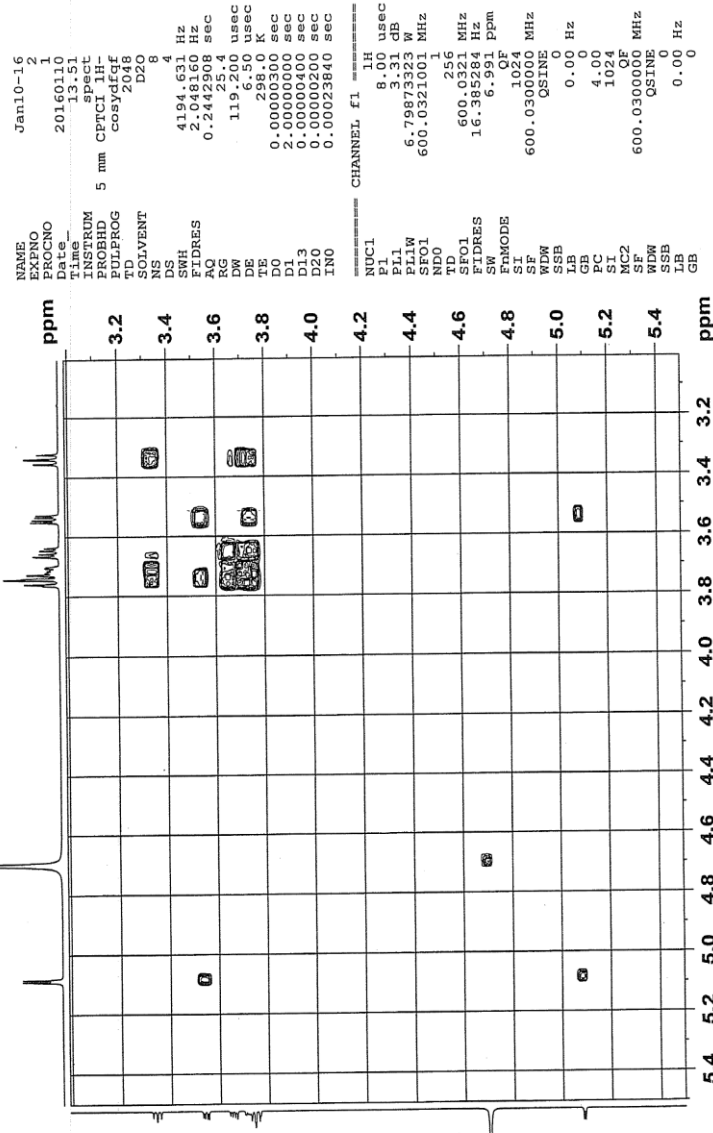
Şekil 3.134. TAE-12F3C1 (10)'nin ¹³C-NMR Spektrumu (D₂O, 125 MHz)

DR. MEHMET / TAE-12F3C1 / D2O
dept135



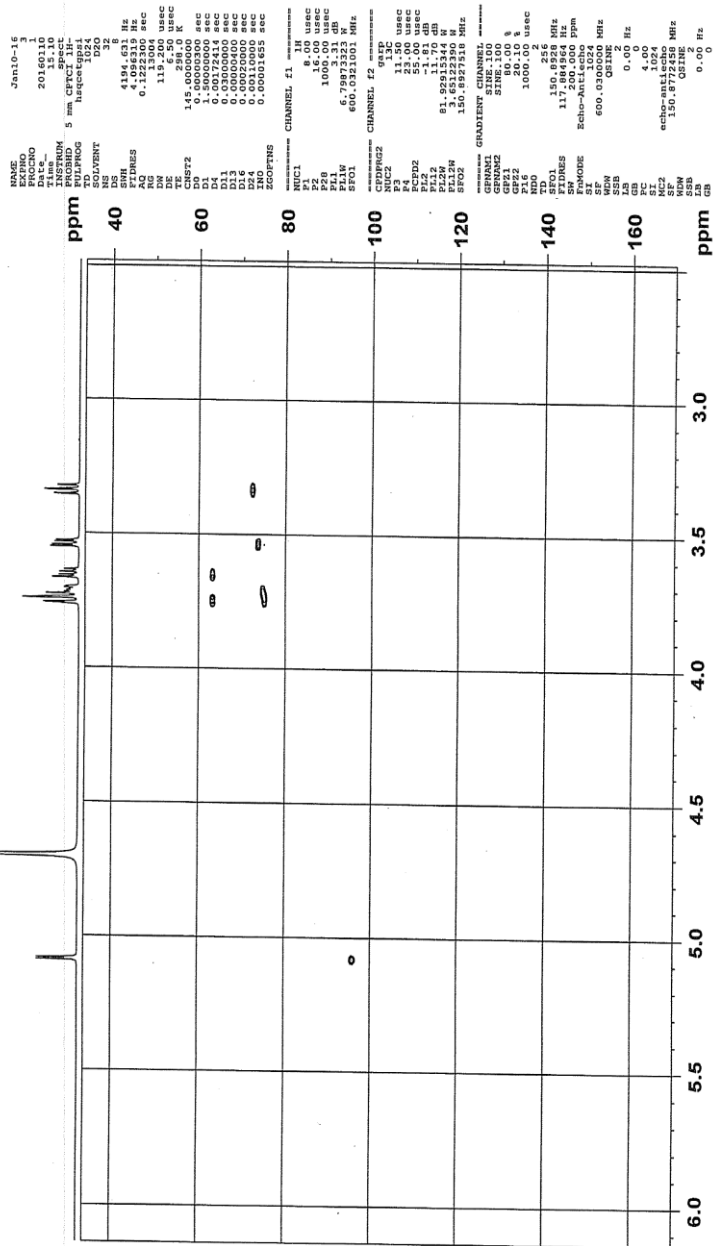
DR. MEHMET / TAE-12F3C1 / D2O
cosy

Avance AV-600 MHz
CRYOBROBE (LC)
Lab No: 108

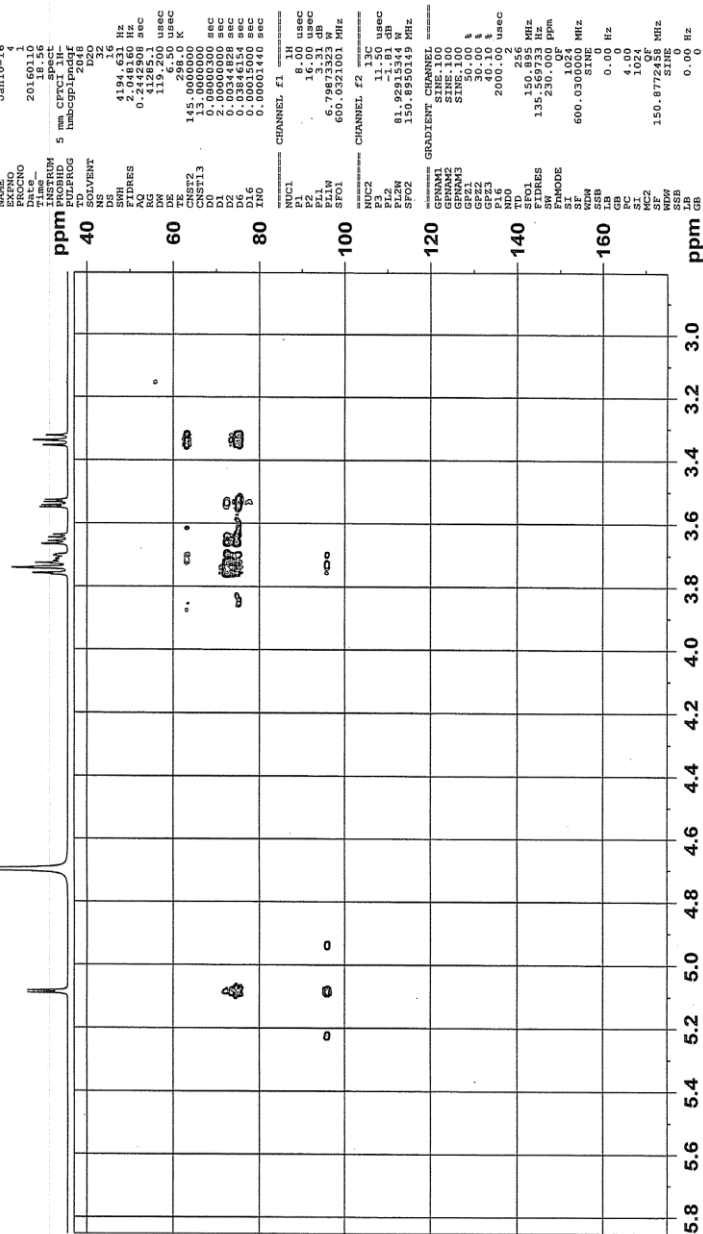


Şekil 3.136. TA3-12F3C1 (10)'nin COSY Spektrumu

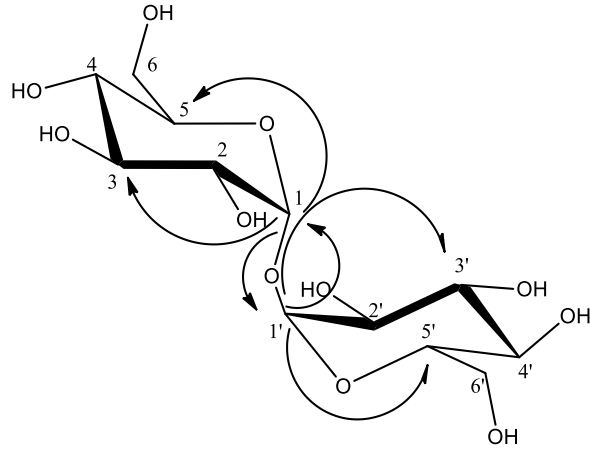
Avance AV-600 MHz
CRYOBROBE (LC)
Lab No: 108



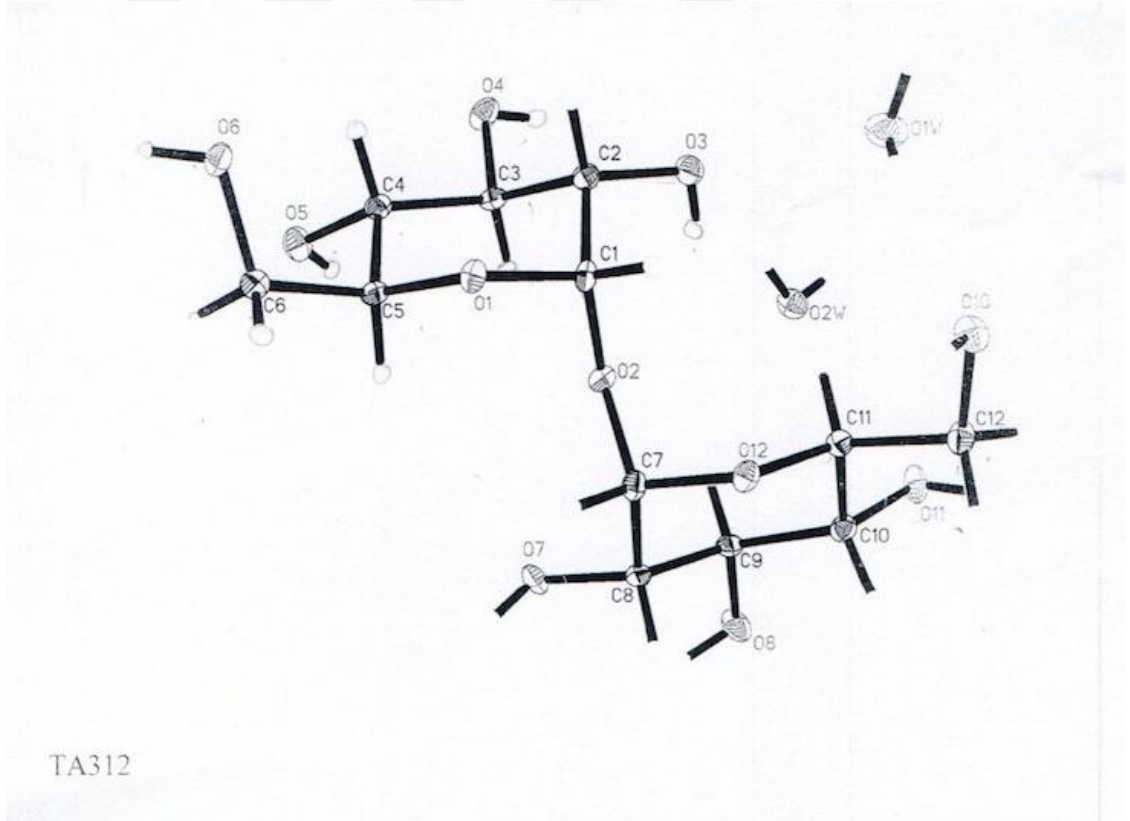
Şekil 3.137. TA3-12F3C1 (10)'nin HSQC Spektrumu



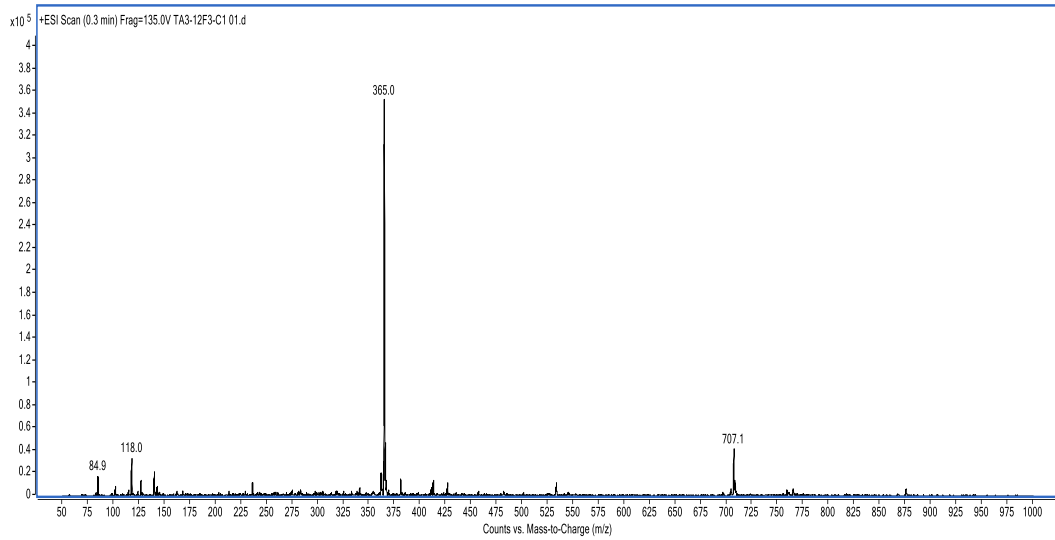
Şekil 3.138. TA3-12F3C1 (10)'nin HMBC Spektrumu



Şekil 3.139. TA3-12F3C1 (10)'nin önemli HMBC korelasyonları



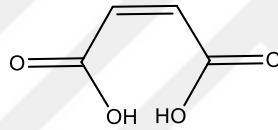
Şekil 3.140. TA3-12F3C1 (10)'nin X- Ray'i



Şekil 3.141. TA3-12F3C1 (10)'nin ESI-MS spektrumu



TA3-12F3C1C1 (11) = *Maleik asit*



Şekil 3.142. TA3-12F3C1 (11) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan TA3-12F3C1 (11) maddesi amorf halde elde edildi. (Şekil 3.142).

^1H -NMR (500 MHz, D_2O) spektrumunda (Şekil 3.143) δ 6,49 ppm'de rezonans olan singlet protonunu izlendi. Moleküldeki tek protonun olefinik proton olduğu düşünüldü.

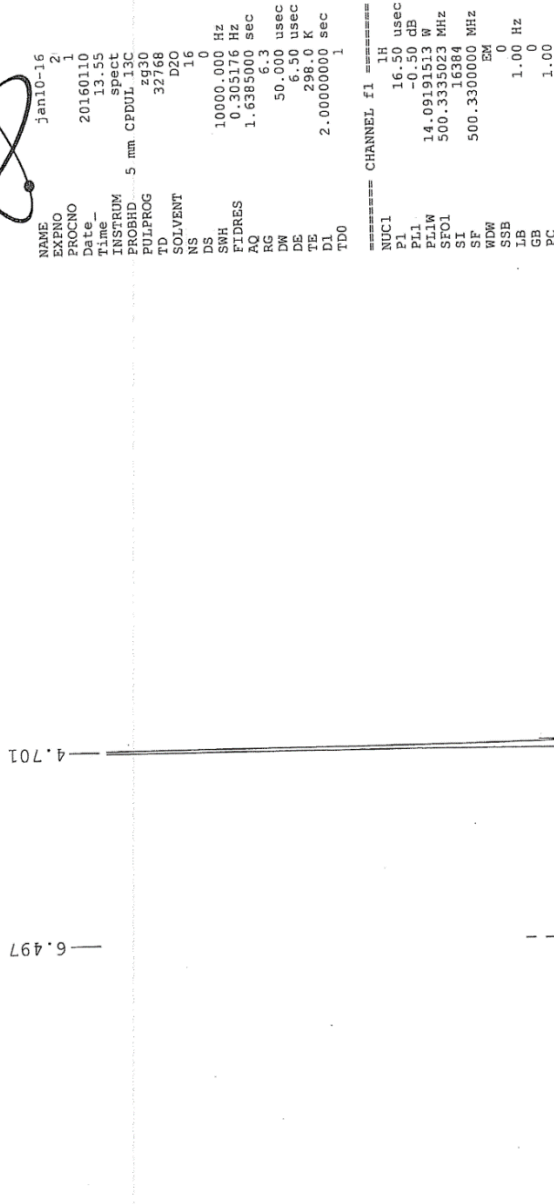
^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) (Şekil 3.144) incelendiğinde δ 137,7 ve δ 175,8 ppm'de rezonans olan sırasıyla 1 metin ve 1 katerner karbon görüldü. ESI-MS kütle spektrumunda (Şekil 3.146) m/z 139,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ piki $\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_4$ yapısını belirtti. HMBC spektrumu (Şekil 3.145) ve ESI-MS kütle spektrumu birlikte incelendiğinde Çizelge 3.18'de NMR değerleri verilen maddenin simetrik olabileceği düşünüldü. Literatür araştırması sonucu TA3-12F3C1 (11) (Şekil 3.142) organik asitlerden biri olan maleik asit olduğu belirlendi.

Çizelge 3.18. TA3-12F3C1C1 (11) saf maddesinin ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HMBC değerleri

Pozisyon	¹³ C-NMR	¹ H-NMR	HMBC
1,1'	175.8	-	C-2
2,2'	137.7	6.49 s	C-1



Dr. Mehmet / TA3-12F/ D2O
1H



Şekil 3.143. TA3-12F1C1 (11)'nin ¹H-NMR Spektrumu (D₂O, 500 MHz)



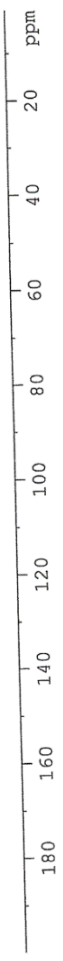
Dr. Mehmet / TA3-12F/ D2O
BB

175.80
137.68

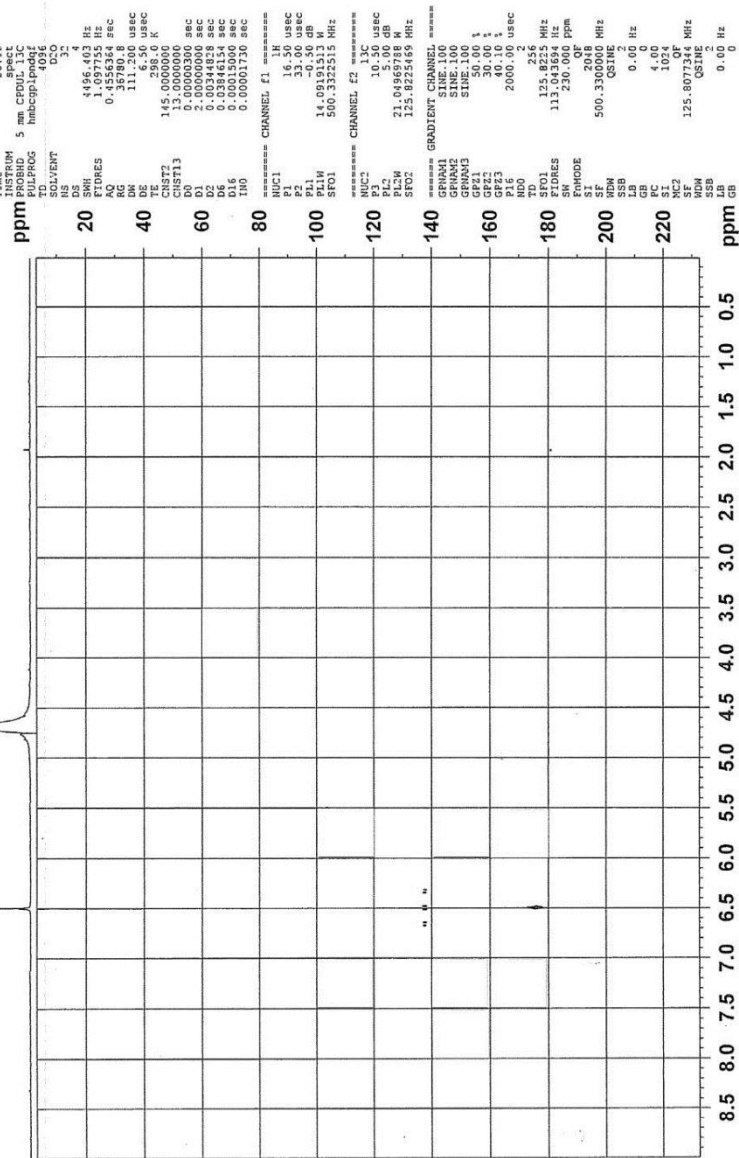
NAME jan10-16
EXPNO 5
PROCNO 1
Date_ 20160111
Time_ 2.28
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm CPDUL 13C
PULPROG zgpg30
TD 32768
SOLVENT D2O
NS 12288
DS 2
SWH 30303.031 Hz
FIDRES 0.324775 Hz
AQ 0.5401385 sec
RG 32768
NG 16.500 usec
DM 6.50 usec
DE 298.0 K
TE 1.50000000 sec
D1 0.03000000 sec
D11 12
TD0 12

===== CHANNEL f1 =====
NUC1 13C
P1 10.30 usec
PL1 0.00 dB
PL12 21.0496780 dB
SFO1 125.8226727 MHz

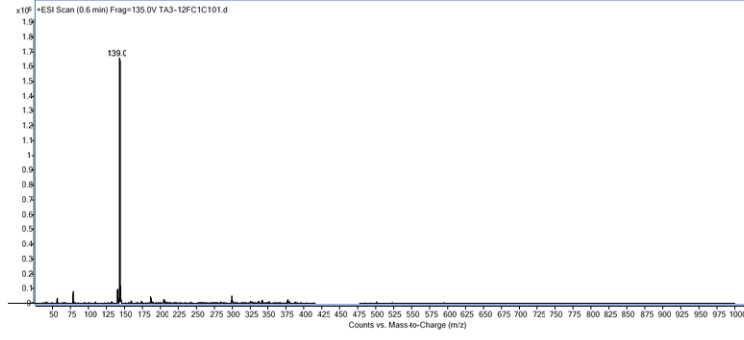
===== CHANNEL f2 =====
CPDPRG2 waltz16
NUC2 1H
PCPD2 80.00 usec
PL2 -0.50 dB
PL12 13.11 dB
PL13 24.00 dB
PL12W 14.09191513 W
PL12W 0.61371964 W
PL13W 0.05000000 W
SFO2 500.3335023 MHz
SI 16384
SF 125.8077344 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.50 Hz
GB 0
PC 1.00



Şekil 3.144. TA3-12F1C1 (11)'nin ¹³C-NMR Spektrumu (D₂O, 125 MHz)



Şekil 3.145. TA3-12F1C1 (11)'nin HMBC Spektrumu

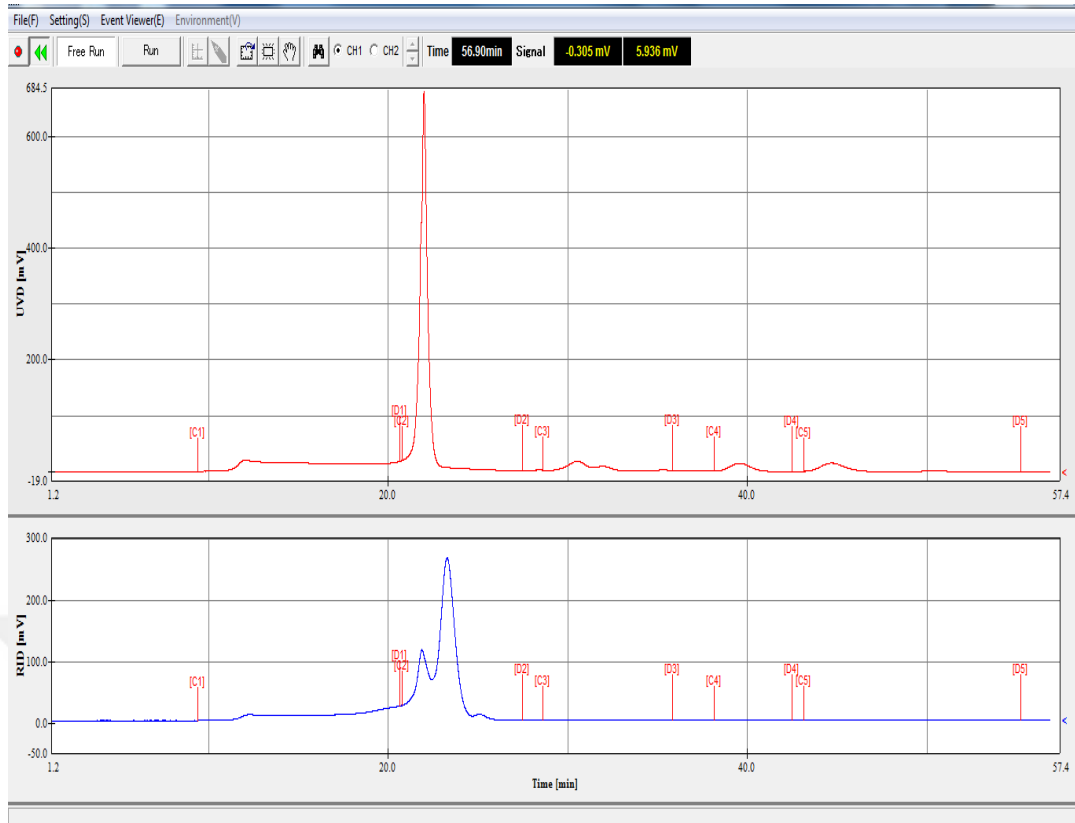


Şekil 3.146. TA3-12F1C1 (11) 'in ESI-MS spektrumu

3.8. *Tricholoma anatolicum*'un HWES Ekstresinden Madde İzolasyonu çalışmaları

3.8.1. *T. anatolicum*'un HWES ekstresinin fraksiyonlandırılması

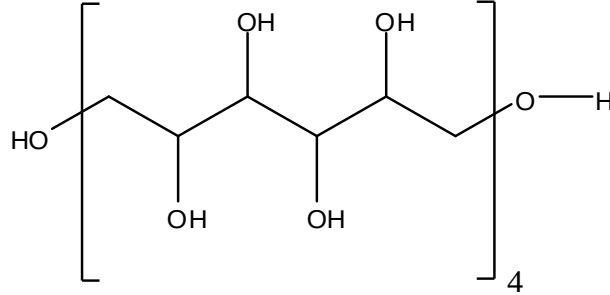
Antikanser aktivite testlerinde yüksek aktivite gösteren HWES ekstresi oldukça polar yapıda olduğundan izolasyon çalışmaları JAI-NEXT marka UV ve RI dedektörlü preparative Recycle-HPLC cihazında GS-320 jel kolonunda (*Kolon 2*) yapıldı. Ekste analize başlanmadan önce C18 SPE kartuşundan metanol ve sonrasında su geçirilerek 2 parçaya ayrıldı. İzolasyona başlamadan önce profillemeye çalışmaları yapıldı ve en uygun ayrılmanın olduğu sistem %90 su ve %10 metanol (*Çözücü sistemi 2*) olarak tespit edildi. Elde edilen kromatogramdaki rezolüsyona göre uygun fraksiyonlandırmalar yapıldı. Fraksiyonlar tekrar enjekte edilip temizlemeler yapılarak saf maddelere ulaşıldı. Maddenin saflığını anlamak için kromatogramda maddeler görüldüğü anda recyle işlemi başlanarak en az 4 recyle işlemi gerçekleştirildi. Akış hızı: 5 ml/dk olarak ayarlandı. Bu çalışmalar ile TA6 ekstresinden 3 adet TA6_F2_C4 (**12**), TA6_SPM_e_C2 (**13**) ve TA6SPW_C3 (**14**) maddeleri saflaştırıldı.



Şekil 3.147. *T. anaticum*'un HWES (TA6) ekstresinin profili

3.8.2. *T. anatolicum*'un HWES fraksiyonlarından elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ TA6_F2_C4 (12) = Tetramannitol

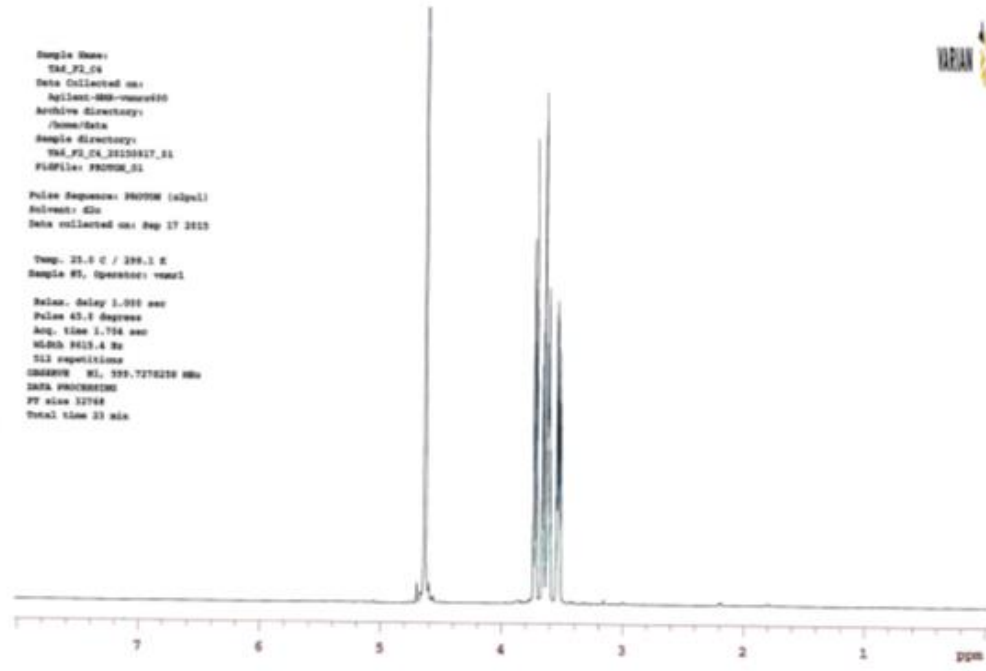


Şekil 3.148. TA6-F2-C4 (12) saf maddesinin yapısı

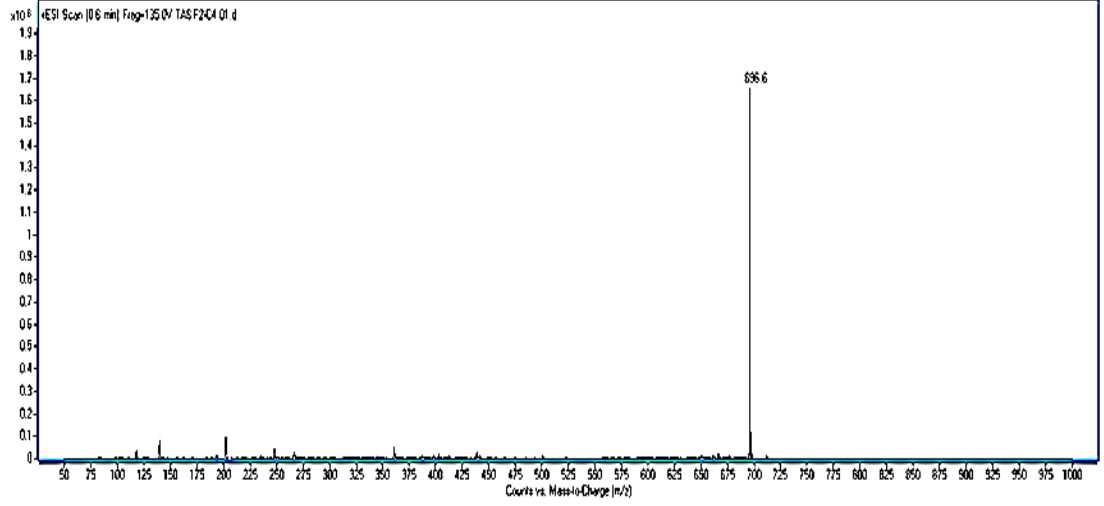
Beyaz renkli olan TA6-F2-C4 (12) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) siyahımsı yeşil renk aldı (Şekil 3.148).

¹H- NMR (Şekil 3.149) spektrumu TA6-F2-C4 (12) maddesinin anmerik protonu olmayan lineer bir şeker olduğunu önerdi. Bölüm 2.8’de verilen şartlarda HPLC de Dekstran standartları varlığında *Kolon 3* ve *Çözücü 5* ile yapılan GPC çalışmalarında Molekül ağırlığının 1000 Da dan düşük olduğu izlendi. Bu durum 5 monemerden daha düşük molekül ağırlığına sahip olduğunu önerdi. ESI-MS spektrumu alınan maddenin molekül ağırlığı 673,7 olduğu izlendi. Kütle spektrumunda (ESI-MS) (Şekil 3.150), m/z 696,6 $[M+Na]^+$ piki $C_{24}H_{50}O_{21}Na$ yapısını belirtti.

Hidroliz edilen TA6-F2-C4 (12) maddesi, Bölüm 2.7 de verilen GC-MS şartlarında standartlar ile karşılaştırıldı. Şekil 3.151’de verilen GC-MS kromatogramları ve Wiley 2008 kütüphanesi ile karşılaştırılması sonucu mannitol monemerine sahip tek bir monomerden oluştuğu görüldü. Bu durumda, yapının 1-6 bağlanmış tetramannitol (Şekil 3.148) (50 mg) olduğu doğrulandı.



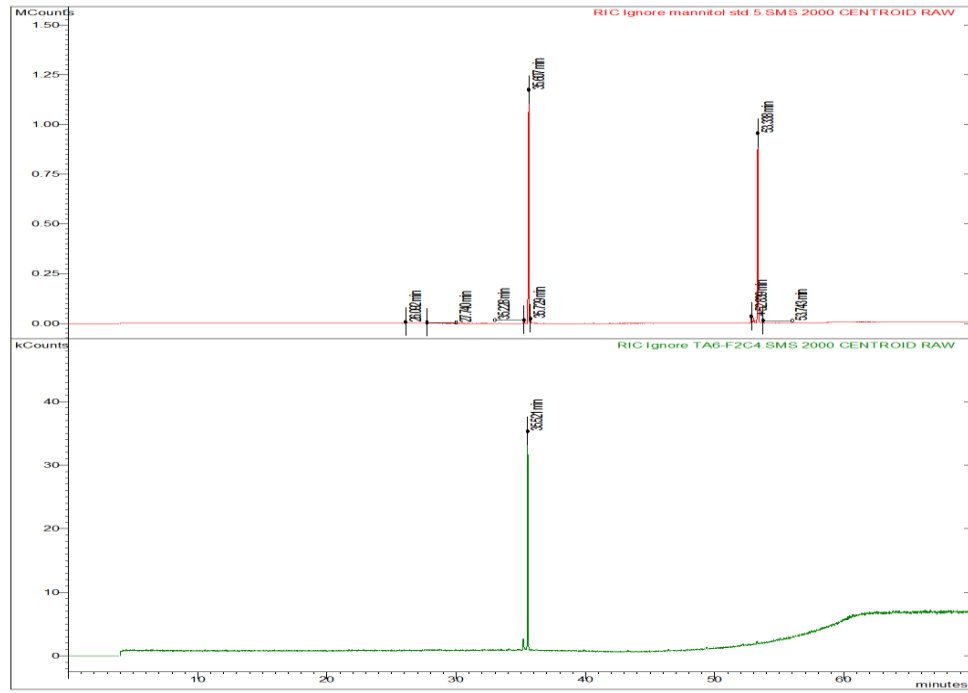
Şekil 3.149. TA6_F2_C4 (12)'ün ^1H NMR spektrumu (600 MHz ; D_2O)



Şekil 3.150. TA6-F2-C4 (12)'ün ESI-MS Spektrumu

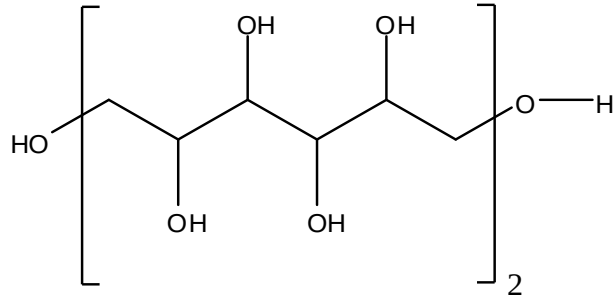
Chromatogram Plots

Plot 1: ...016\113r012 gc calismalari\mannitol std 5.sms RIC Ignore
Plot 2: ... 23032016\113r012 gc calismalari\ta6-f2c4.sms RIC Ignore



Şekil 3.151. TA6-F2-C4 (12)'ün ve standart mannitol'ün GC-MS Kromatogramları

❖ **TA6_SPMe_C2 (13) = Dimannitol**

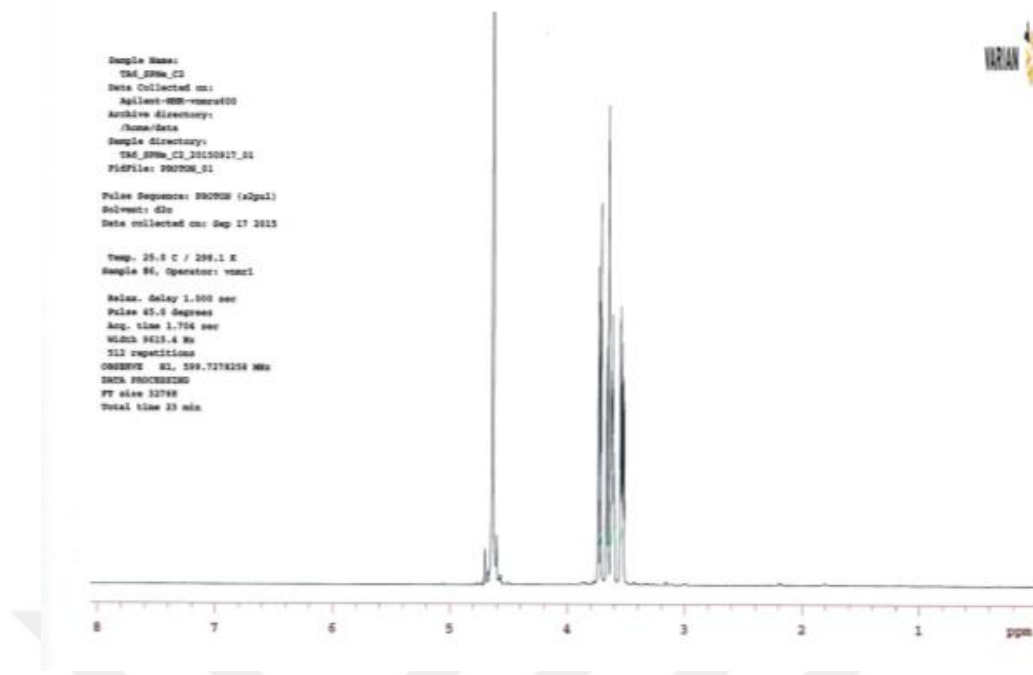


Şekil 3.152. TA6_SPMe_C2 (13) saf maddesinin yapısı

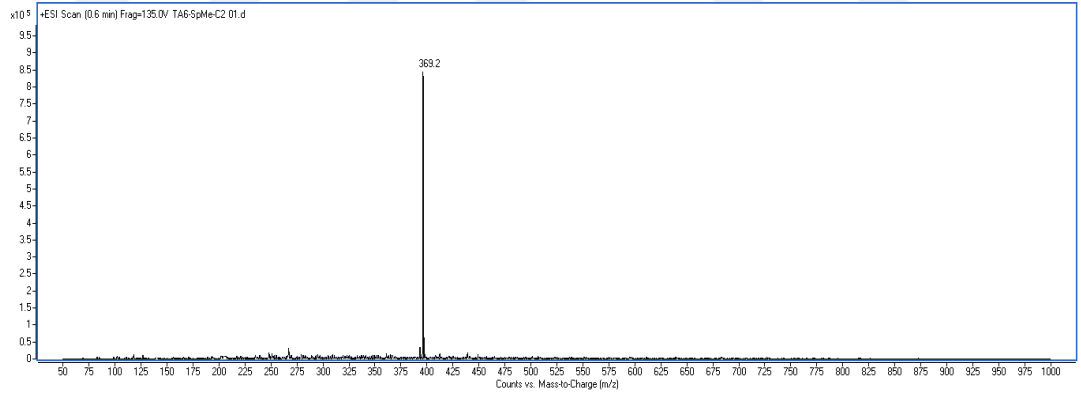
Beyaz renkli olan TA6_SPMe_C2 (13) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) siyahımsı yeşil renk aldı (Şekil 3.152).

^1H - NMR spektrumu (Şekil 3.153) TA6_SPMe_C2 (13) maddesinin anemorik protonu olmayan lineer bir şeker olduğunu önerdi. Bölüm 2.8’de verilen şartlarda HPLC de Dekstran standartları varlığında Kolon 3 ve Çözücü 5 ile yapılan GPC çalışmalarında Molekül ağırlığının 1000 Da’dan düşük olduğu izlendi. Bu durum maddenin 5 monemerden daha düşük molekül ağırlığına sahip olduğunu önerdi. ESI-MS spektrumu alınan maddenin molekül ağırlığı 369,2 olduğu izlendi. Kütle spektrumunda (ESI-MS) (Şekil 3.154), m/z 369,2 $[\text{M}]^+$ piki $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$ yapısını belirtti.

Hidroliz edilen TA6_SPMe_C2 (13) maddesi, Bölüm 2.8’de verilen GC-MS şartlarında standartlar ile karşılaştırıldı. Şekil 3.155’de verilen GC-MS kromatogramlarının standartlar ile karşılaştırılması ile dimannitol (Şekil 3.152) (19 mg) olduğu doğrulandı.



Şekil 3.153. TA6_SPMe_C2 (13)'nin ^1H NMR spektrumu (600 MHz ; D_2O)

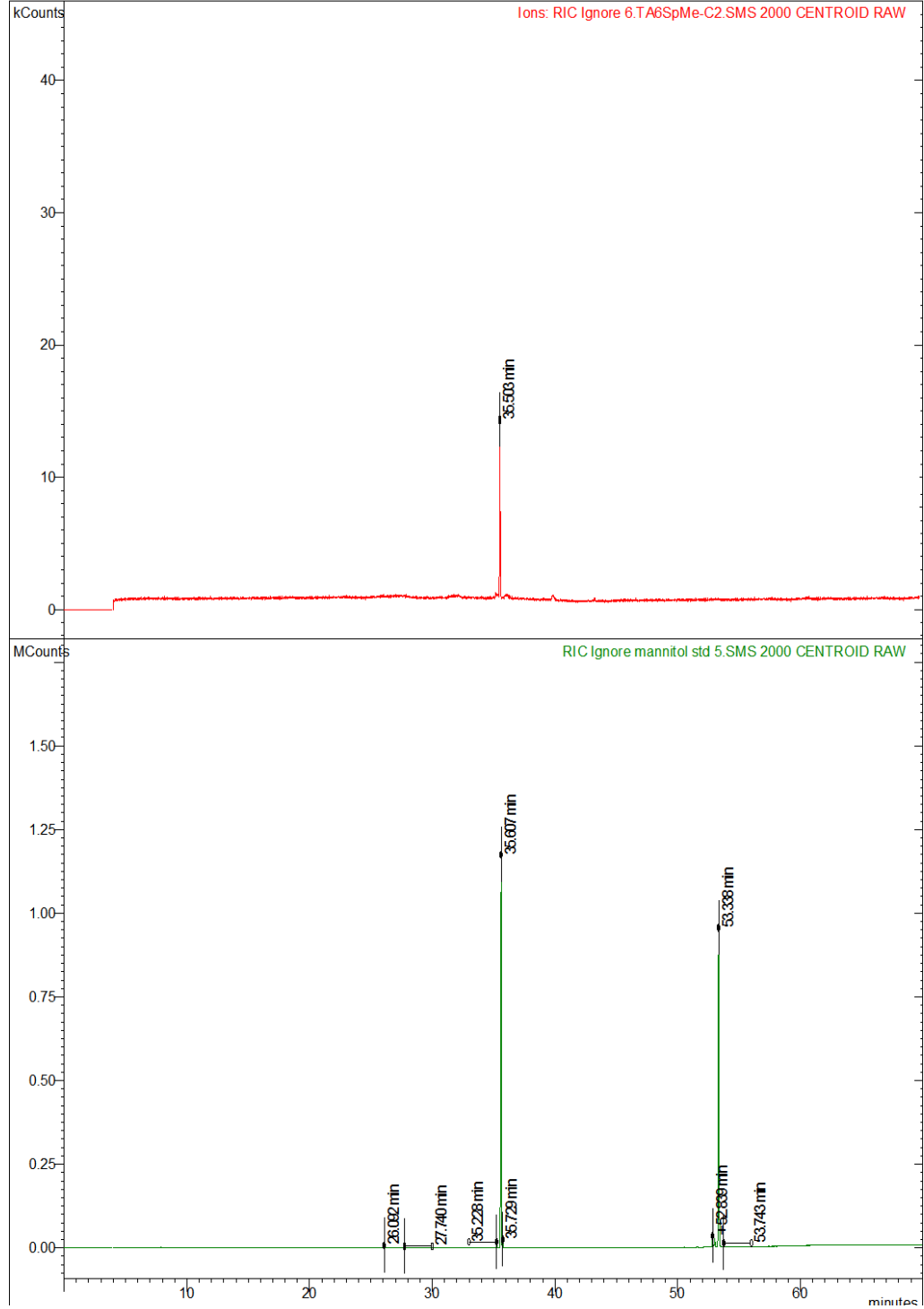


Şekil 3.154. TA6_SPMe_C2 (13)'nin ESI-MS Spektrumu

Chromatogram Plots

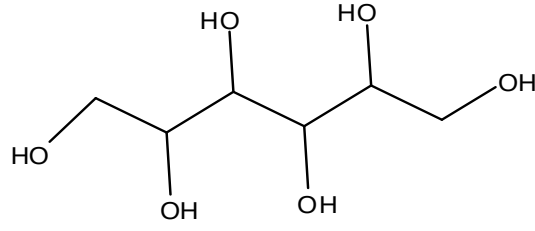
Plot 1: ...32016\113r012 gc calismalari\6.ta6spme-c2.sms Ions: RIC Ignore

Plot 2: ...016\113r012 gc calismalari\mannitol std 5.sms RIC Ignore



Şekil 3.155. TA6_SPMc_C2 (13)'nin ve standart mannitol'ün GC-MS Kromatogramları

❖ TA6SPW_C3 (14) = Mannitol

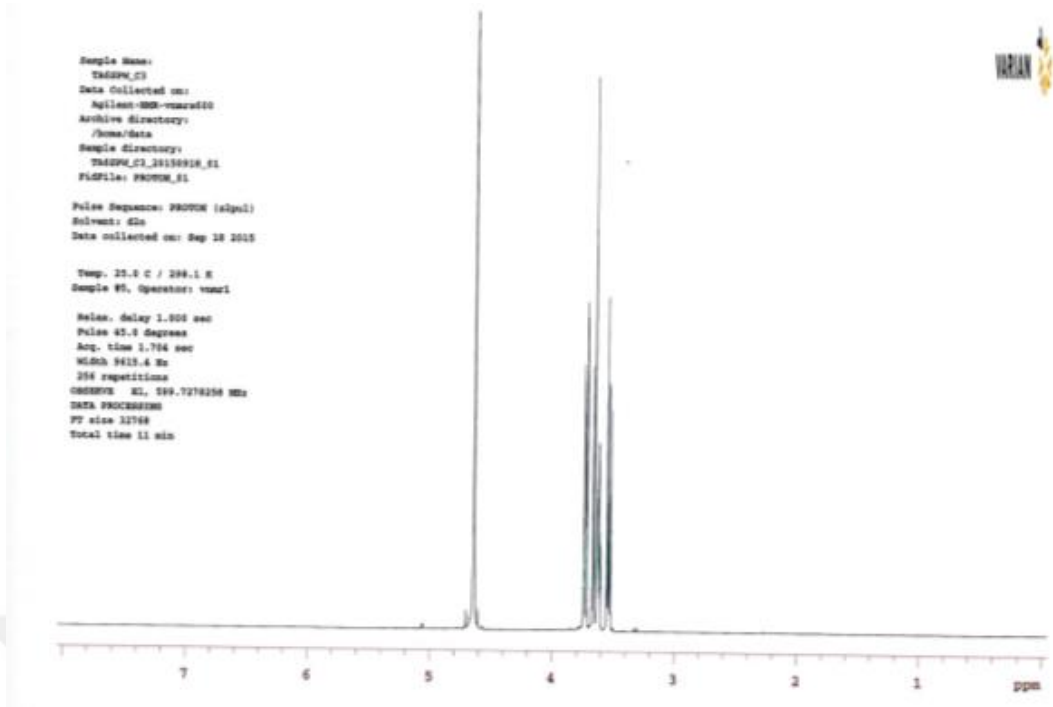


Şekil 3.156. TA6SPW_C3 (14) saf maddesinin yapısı

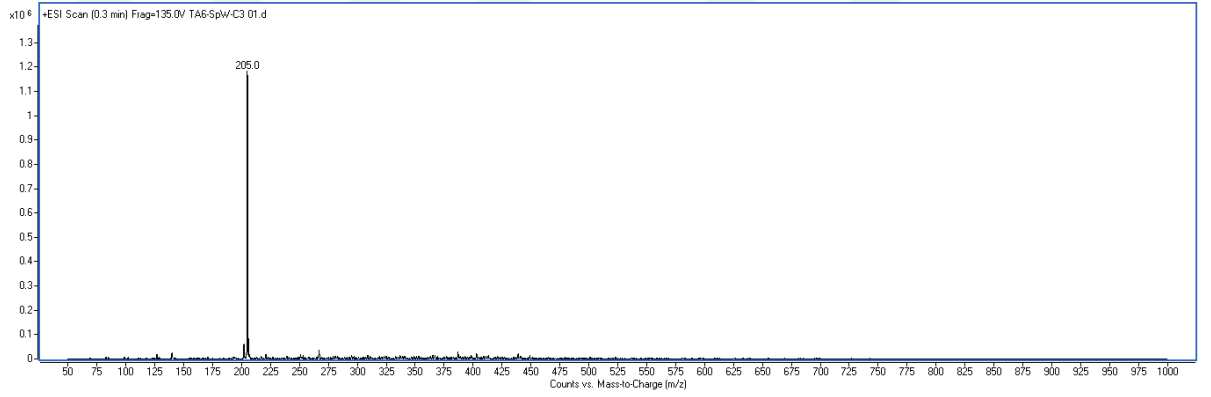
Beyaz renkli olan TA6SPW_C3 (14) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülmeyen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) siyahımsı yeşil renk aldı (Şekil 3.156).

^1H - NMR spektrumu (Şekil 3.157) TA6SPW_C3 (14) maddesinin anemorik protonu olmayan lineer bir şeker olduğunu önerdi. Bölüm 2.8’de verilen şartlarda HPLC de Dekstran standartları varlığında Kolon 3 ve Çözücü 5 ile yapılan GPC çalışmalarında Molekül ağırlığının 1000 Da dan düşük olduğu izlendi. Bu durum 5 monemerden daha düşük molekül ağırlığına sahip olduğunu önerdi. ESI-MS spektrumu alınan maddenin molekül ağırlığı 205,0 olduğu izlendi. Kütle spektrumunda (ESI-MS) (Şekil 3.158), m/z 205,0 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ piki $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_6$ yapısını belirtti.

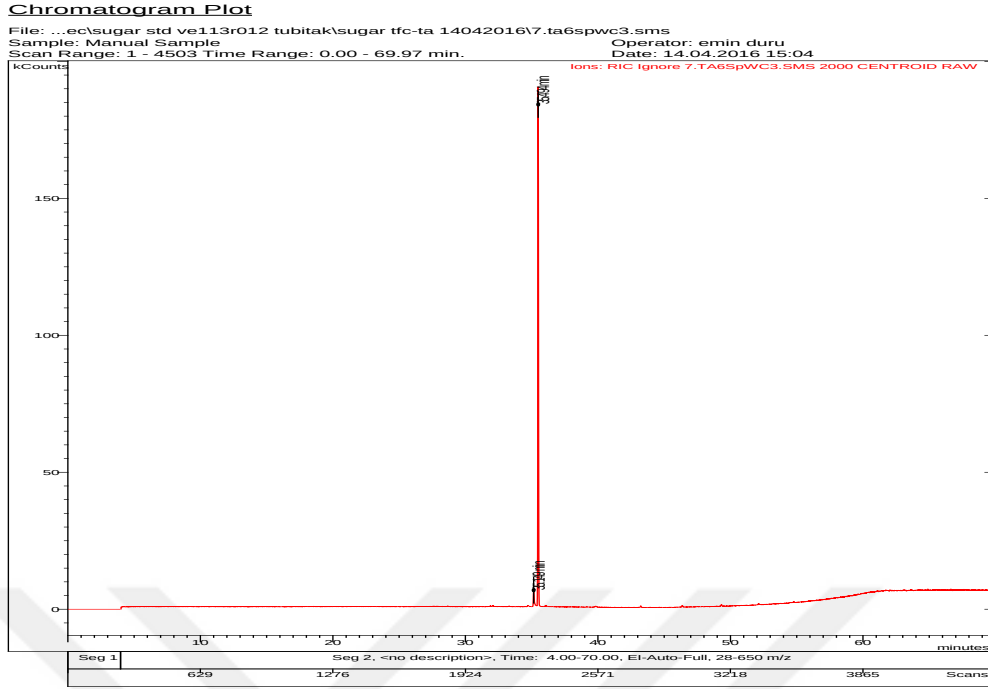
Bölüm 2.7’de verilen GC-MS şartlarında standartlar ile karşılaştırıldı. TA3-12 F2 (9) maddesi ile aynı olduğu belirlendi. Şekil 3.159’de verilen GC-MS kromatogramlarının standartlar ile karşılaştırılması ile mannitol (Şekil 3.156) (26 mg) olduğu doğrulandı.



Şekil 3.157. TA6SPW_C3 (14)'ün ^1H NMR spektrumu (600 MHz ; D_2O)



Şekil 3.158. TA6SPW_C3 (14)'ün ESI-MS Spektrumu



Şekil 3.159. TA6SPW_C3 (14)'ün ve standart mannitol'un GC-MS Kromatogramları

3.9. *Tricholoma imbricatum*'un Aseton ve Metanol Ekstresinden Madde İzolasyonu Çalışmaları

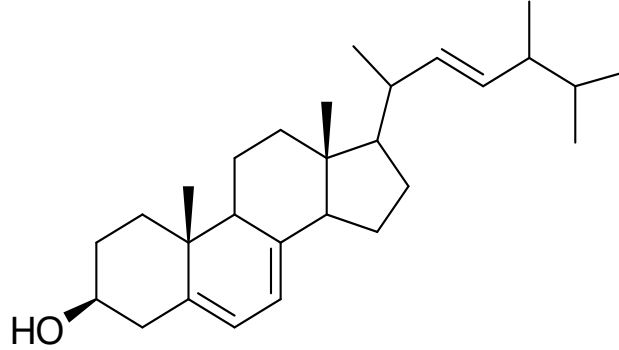
Bu mantardan elde edilen ekstre miktarları az olduğundan aseton ve metanol ekstresi birleştirilerek bir saflaştırma işlemleri yapılmıştır.

3.9.1. *Tricholoma imbricatum*'un birleştirilen ekstresinin fraksiyonlandırılması

Kolon kromatografisinde silika jel kullanıldı. Fraksiyonlar az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Silikajele emdirilmiş fraksiyon miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silika jel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına paketleme yöntemiyle yerleştirildi. 2.4'de anlatıldığı gibi fraksiyonlandırma yapıldı. Elüentler 10 ml hacimlerde viallere toplandı ve ince tabaka kullanarak saf maddeler tespit edildi. Bu ekstrelerden 1 adet RHJ-4 (15) maddesi izole edildi.

3.9.1.1. TİM ekstrelerinden elde edilen saf maddenin yapı tayini

❖ RHJ-4 (15) = ergosta-5,7,22-trien 3 β -ol



Şekil 3.160. RHJ-4 (15) saf maddesinin yapısı

Beyaz renkli olan RHJ-4 (15) maddesi amorf halde elde edildi. Silikajel plakta UV lamba (254 nm) altında da görülen madde serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldığında (105°C) koyu kahve renk aldı (Şekil 3.160)

¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.161) δ 0.61 (3H, s, H-18), δ 0.80 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-26), δ 0.82 (3H, d, J = 6.6 Hz, H-27), δ 0.89 (3H, d, J = 6.0 Hz, H-28), δ 0.92 (3H, s, H-19) ve δ 1.00 (3H, d, J = 6 Hz, H-21)'de 6 tane metil piki görüldü. δ 3.63 (1H, m, H-3) ppm'de görülen multiplet yarıma hidroksil grubunun β olduğunu önerdi. δ 5.17 (1H, dd, J =15.3; 7.5 Hz, H-23) ve δ 5.18 (1H, dd, J =15.3; 6.9 Hz, H-22)'de yan zincirdeki vinilik hidrojen pikleri izlendi. δ 5.55 (1H, d, J =8.5 Hz, H-6) ve δ 5.36 (1H, d, J =8.5 Hz, H-7) olefinik hidrojen pikleri izlendi

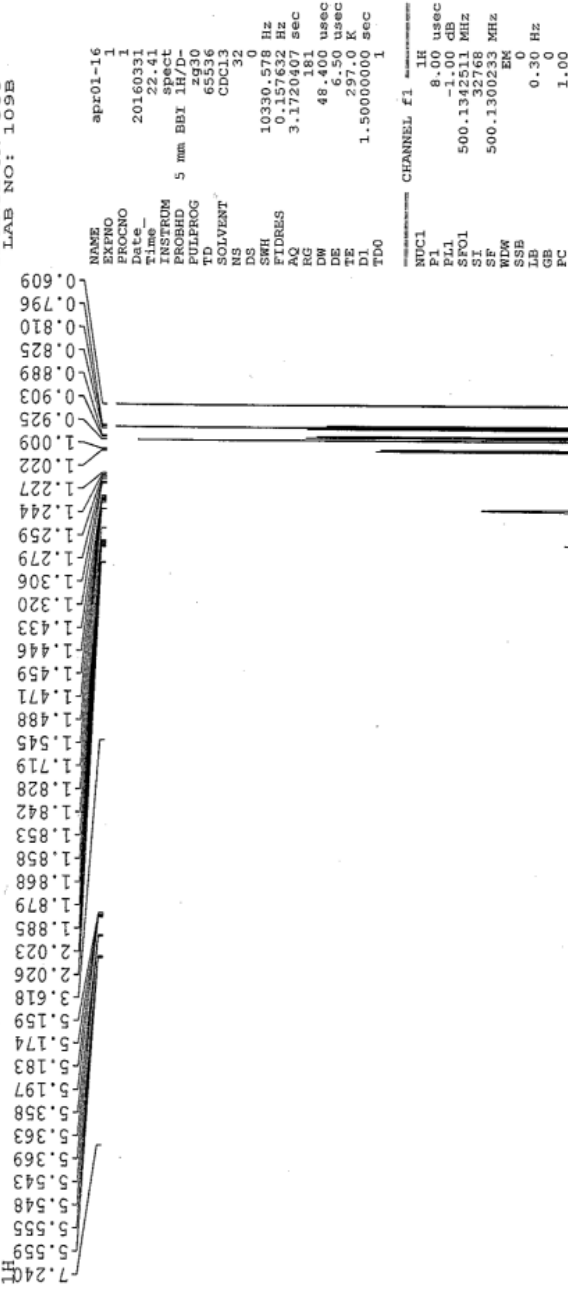
Kütle spektrumunda (EI-MS) (Şekil 3.162), m/z 396.3 $[M]^+$ piki C₂₈H₄₄O yapısını belirtti. Su molekülünün ayrılmasıyla m/z 378 $[396-H_2O]^+$ 'deki piki verdi.

RHJ-4(15) maddesinin kimyasal kaymaları ve kütle spektrumu incelendiğinde *Tricholoma anatolicum* türünden elde edilen RHJ-1(6) kodlu madde ile aynı olduğu görüldüğünden ileri spektroskopik teknikler yapılmadı.

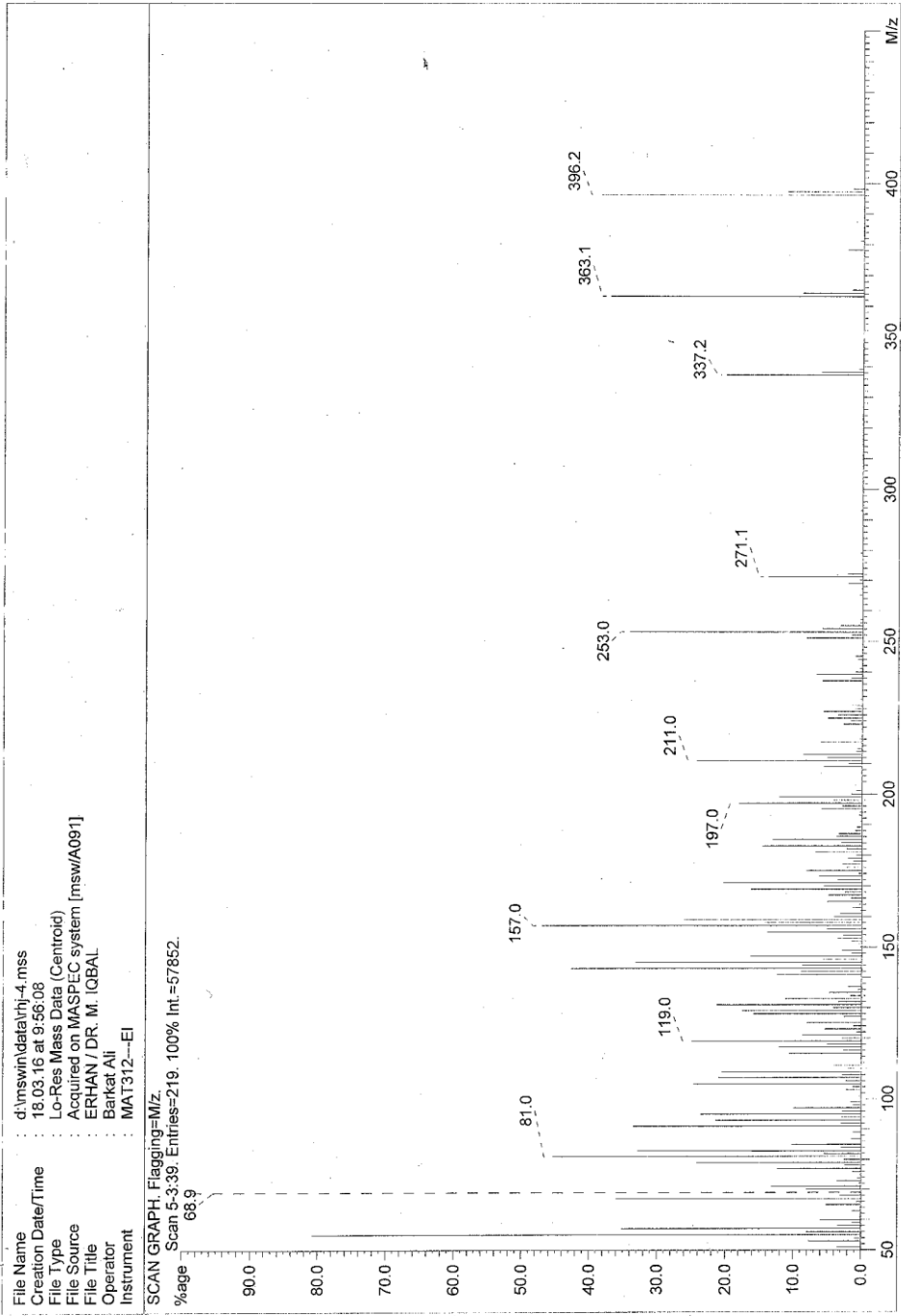
Literatürde verilen spektral değerler ile ve RHJ-1(6)'nın spektral değerleri karşılaştırıldığında RHJ-4 (15) maddesinin daha önceden izole edilen ergosta-5,7,22-trien 3 β -ol (Şekil 3.160) (120.0 mg) olduğu belirlendi (Seo vd., 2009).

AVANCE AV-500
LAB NO: 109B

ERHAN/DR. IOBAL/RHJ-4/CDCl₃



Şekil 3.161. RHJ-4 (15)'ün ¹H NMR spektrumu (500 MHz ; CDCl₃)



Şekil 3.162. RHJ-4 (15)'ün EI-MS Kütle Spektrumu

4. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tricholoma türleri Matsutake mantarının ailesinden gelmektedir. Bu nedenle *Tricholoma* türlerinin potansiyel tıbbi özellikleri olabilmektedir. Bilindiği üzere *Tricholoma matsutake* dünyada hem gıda hem de tıbbi olarak kullanılmaktadır. Tıbbi olarak özellikle kanser hastalıklarının tedavisinde ve bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde tercih edilen türlerdendir. *Tricholoma anatolicum* türü *Tricholoma matsutake*'ye en çok benzeyen türdür ve Japon'ların kutsal mantarı olarak bilinir. Bu nedelerle, tez çalışmasına bölgemizde doğal olarak yetişen ve ticari potansiyele sahip *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini ve *Tricholoma imbricatum* (Fr.) P.Kumm türleri üzerinde madde izolasyonu, yapı aydınlatması ve aktivite çalışmaları ilk defa bu tez çalışmasında belirlendi. Özellikle birbirleriyle ilişkili oldukları için antioksidan ve sitotoksik aktivite çalışmaları üzerinde duruldu. Bu nedenle, maddeler antioksidan aktivite kontrollü olarak DPPH ve ABTS yöntemleri kullanılarak, izole edildiler.

Gıda olarakda tümü tüketildiğinden mantarın ekstrelerinin antioksidan ve sitotoksik aktiviteleri ile apoptoz ve nekroz indeksleri de belirlendi. Ekstrelerin antioksidan aktivitesi spektroskopik olarak β -karoten renk açılım, DPPH serbest radikali giderimi, ABTS katyon radikali giderimi, CUPRAC ve metal bağlama yöntemleri gibi *in vitro* metotlar kullanılarak belirlendi. Sitotoksik aktivite *in vitro* hücre kültürü ortamında fibroblast (L929), akciğer kanser hücresi (H1299) ve meme kanser hücresi (MCF-7) hatlarına karşı belirlendi. Ayrıca hücre hatlarının hücre proliferasyonları gerçek zamanlı olarak belirlenerek sitotoksik aktiviteler desteklendi. Apoptatik ve nektotik indeks Kaspaz-3 immunositokimyasal yöntemler ile yapıldı. Antioksidan ve sitotoksik aktivite göstren ekstreler slika jel adsorban üzerinden fraksiyonlandırıldılar. Elde edilen fraksiyonların antioksidan aktiviteleri DPPH ve ABTS yöntemleri ile incelendi. İnhibisyonu en yüksek olan fraksiyonlardan kromatografik yöntemler kullanılarak 15 madde (1-15) saflaştırıldı ve yapıları spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı.

Tez çalışmasında 2 mantar türünden 2 tanesi yeni madde olmak üzere 15 madde izole edildi ve yapıları tayin edildi. Ayrıca, bu maddelerin sitotoksik aktiviteleri ve miktarları elverdiği durumlarda antioksidan aktiviteleri yapıldı.

Çizelge 4.1’de iki mantar türünden izole edilen maddelerin kodları yapıları ile antioksidan ve sitotoksik aktivite testleri sonuçları verilmektedir. Bu sonuçlara göre *Tricholoma anatolicum* türünün meme ve akciğer kanserine karşı koruma etkisi yada tedavi edici özelliği olabileceği potansiyeli bulunmaktadır. İzole edilen ve yapıları aydınlatılan maddelerin sitotoksik aktiviteleri her ne kadar ekstreler kadar yüksek aktivite göstermiyorlarsada özellikle steroidlerin IC₅₀ değerleri 100 µg/mL değerinin altındadır ve bu değer kıymetlidir. Steroidlerin orta seviyede lipid peroksidasyonu inhibisyon aktivitesi de gösterdikleri düşünülürse antioksidan aktivite ile sitotoksik aktivite arasında daha önceki çalışmalarda kurulan korelasyonu bizim çalışmamızda desteklemektedir. Ancak elde edilen maddelerin daha fazla miktarda elde edilip *in vivo* koşullarda çalışılması gerekmektedir. Bu şekilde yapılacak çalışmalar, yeni antikanser ilaçlarının ortaya çıkmasında katkı sağlayacaktır.

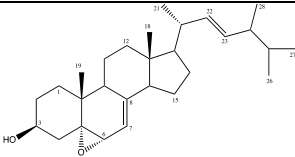
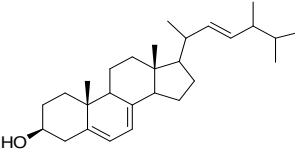
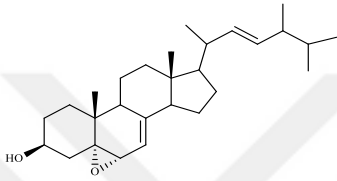
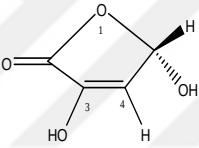
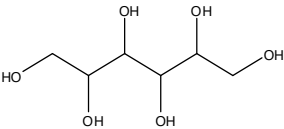
Bu tez çalışmasından elde edilen 5 α ,9 α -epoksiergosta-7,22-dien 3 β ,6 α -diol (2), 5 α ,9 α -epoksiergosta-7,22-dien 3 β ,6 β –diol (3), lanostan tipi steroidler ilk defa bu çalışma ile elde edildiler. Bu yapıların (2 ve 3) streokimyasında farklılıklar bulunmaktadır. Bu yeni maddeler organik kimya alanında literatürlere de katkı sağlamaktadır. Bunlara ilaveten ergosterol peroksit (1), 5 α ,6 α -epoksi ergosta-7,22-dien, 3 β -ol (4), 5 α ,6 α -epoksiergosta-7,22-dien, 3 β -ol (5), ergosta-5,7,22-trien, 3 β -ol (6), 5 α ,6 α -epoksiergosta-7,22-dien, 3 β -ol (7), 3,5-dihidroksi, (5 β -H) 2-furanone (8), mannitol (9), α -D-Glucopyranoside, α -D-glucopyranosyl (10), maleik asit (11), tetramannitol (12), dimannitol (13), mannitol (14) ve ergosta-5,7,22-trien, 3 β -ol (15) diğer yapısı aydınlatılan maddelerdir.

Özellikle, *Tricholoma anatolicum* mantar türünün, yetiştiği ortamların kısıtlılığı nedeniyle, yeni üretim alanlarının araştırılması ve bu mantar türünün kültürünün yapılması önerilmektedir. Böyle büyük çaplı bir üretim ülkemiz sağlık ve ekonomisine katkı sağlayacaktır.

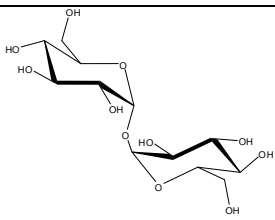
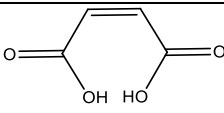
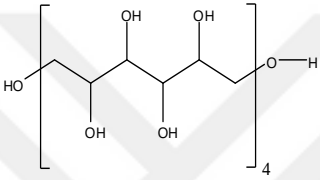
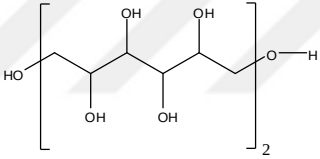
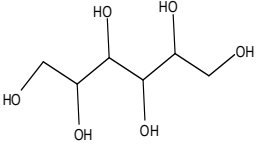
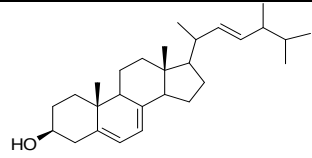
Çizelge 4.1. Tez çalışmasında izole edilen ve yapıları aydınlatılan maddelerin (1-15) antioksidan ve sitotoksik aktivitelerinin sonuçları

NO	İzole edilen maddeler	Yeni mi?	Antioksidan Aktivite		Sitotoksik Aktivite		
			β -karoten- linoleik asit	ABTS	L929	H1299	MCF-7
			IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M	IC ₅₀ μ M
1	TA2-5PA (1) = Ergosterol peroksit	-	>200	>200	85	48	45
2	TA2-8(4)B (2) = 5α,9α-epoksiergosta-7,22-dien 3β,6α-diol	Yeni	145	>200	93	44	40
3	TA2-7C4-PB (3) = 5α,9α-epoksi ergosta-7,22-dien 3β,6β-diol	Yeni	168	>200	78	45	40
4	TA2-7C5-C2 (4) = 5α,6α-epoksi ergosta-7,22-dien, 3β-ol	-	175	>200	85	40	38

Çizelge 4.1. (Devam)

5		-	176	>200	90	41	35
TA2-7C5 (5) = 5 α ,6 α -epoksiergosta-7,22-dien, 3 β -ol							
6		-	190	>200	65	49	48
RHJ-1 (6) = Ergosta-5,7,22-trien, 3 β -ol							
7		-	178	>200	91	41	35
RHJ-5 (7) = 5 α ,6 α -epoksiergosta-7,22-dien, 3 β -ol							
8		-	>200	>200	>200	>200	>200
TA3-7F3WS (8) = 3,5-dihidroksi, (5 β -H) 2-furanone							
9		-	>200	>200	>200	>200	>200
TA3-12F2 (9) = mannitol							

Çizelge 4.1. (Devam)

10		-	>200	>200	>200	>200	>200
TA3-12F3C1 (10) = α -D-Glucopyranoside, α -D-glucopyranosyl							
11		120	>200	>200	>200	>200	>200
TA3-12F3C1C1 (11) = Maleik asit							
12		-	>200	>200	>200	>200	>200
TA6-F2-C4 (12) = tetra-mannitol							
13		-	>200	>200	>200	>200	>200
TA6_SPMe_C2 (13)= dimannitol							
14		-	>200	>200	>200	>200	>200
TA6SPW_C3 (14) = Mannitol							
15		-	190	>200	65	49	48
RHJ-4 (15) = Ergosta-5,7,22-trien, 3 β -ol							

KAYNAKLAR

- Angg rd, E. (1994) Nitric oxide: Mediator, murderer and medicine, *Lancet*; 343: 1199–1206.
- Apak, R., G  l , K.,  zy rek, M. ve Karademir, S. E. (2004) Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, Using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method, *J Agric Food Chem*, 52: 7970–7981.
- Aruoma, O. I. ve Cuppett, S. L. (1997) *Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept*, Champaign, Illinois, AOCS Press; pp: 241.
- Babior, B. M. ve Woodman, R. C. (1990) Chronic granulomatous disease, *Sem Hematol* 27: 247–259.
- Barros, L., Duenas, M., Ferreira, I.C.F.R, Baptista, P. ve Santos-Buelga, C. (2009) Phenolic acids determination by HPLC-DAD-ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species, *Food and Chem Toxicol*, 47(6): 1076-1079.
- Barros, L., Venturini, B.A., Baptista, P., Estevinho, L.M. ve Ferreira, I.C.F.R. (2008) Chemical Composition and Biological Properties of Portuguese Wild Mushrooms: A Comprehensive Study, *J Agric Food Chem*, 56(10): 3856-3862.
- Bell, J.M., Erfle, J.D., Spencer, J.F.T. ve Reusser, F. (1958) *Tricholoma nudum* as a source of amino acids, vitamins, and unidentified factors, *Can. J. Anim. Sci*, 38: 122-128.
- Benevelli, F., Carugo, O., Invernizzi, A. G. ve Vidari, G. (1995) The structures of trichaurantianolides B, C and D, novel diterpenes from *Tricholoma aurantium*, *Tetrahedron Lett*, 36(17): 3035–3038. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)00420-H](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)00420-H)
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, 181: 1199–1200.
- Bobek, P., Ginter, E., Jurcovicova, M. ve Kunia, K. (1991). Cholesterol-lowering effect of the mushroom *Pleurotus ostreatus* in hereditary hypercholesterolemic rats. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 35: 191–195.
- Breene WM. (1990) Nutritional and medicinal value of specialty mushrooms. *J Food Prot*, 53(10):883–894.

- Buchanan, B.B., Schurmann, P., Decottignies, P.T. ve Lozano, R.M. (1994) Perspectives in biochemistry and biophysics: thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine, *Arch Biochem Biophys*, 314: 257–260.
- Çağlarirmak, N., Ünal, K. ve Ötleş, S. (2002) Nutritive value of edible wild mushrooms grown in Black Sea region of Turkey, *Micol. App. Int*, 14:1–5.
- Chatterjee S., Saha G.K. ve Acharya K. (2011) Antioxidant activities of extracts obtained by different fractionation from *Tricholoma giganteum* basidiocarps, *Pharmacologyonline*, 3: 88-97.
- Chen, C.Y. (2010) Steroids from the Whole Plants of *Leucaena Leucocephala*, *Am J Analyt Chem*, 01(01): 31–33.
- Chen, Y., Wang, C., Wang, R., Hu, M., Duan, P. ve Zhai T. (2012) Method for preparation of natural antioxidant *Tricholoma giganteum* polysaccharide, Faming Zhuanli Shenqing. Patent no: CN 102603908 A 20120725.
- Chiang, H.C. ve Chu, S.C. (1991) Studies on the Constituents of *Ganoderma Lucidum*, *J Chinese Chem Soc*, 38: 71–76.
- Chihara, G., Hamuro, J., Maeda, Y.Y., Arai, Y. ve Fukuoka, F. (1970) Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom), *Cancer Res*, 30: 2776–2781.
- Cho, I. H. Kim, S. Y. Choi, H. K. Kim, Y. S. 2006b. “Characterization of aroma-active compounds in raw and cooked pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.)”, *J. Agr. Food Chem*, 54: 6332–6335.
- Cho, I.H., Choi, H.K. ve Kim, Y.S. (2006a) Difference in the volatile composition of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) according to their grades, *J. Agr. Food Chem*, 54: 4820–4825.
- Cho, I.H., Lee, S.M., Kim, S.Y., Choi, H.K., Kim, K.O. ve Kim, Y.S. (2007) Differentiation of aroma characteristics of pine-mushrooms (*Tricholoma matsutake* Sing.) of different grades using gas chromatography-olfactometry and sensory analyses, *Journal of Agricultural and Food Chem*, 55: 2323-2328.
- Cho, I.H., Namgung, H.J., Choi, H.K. ve Kim, Y.S. (2008) Volatiles and key odorants in the pileus and stipe of pine-mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.), *Food Chem*, 106: 71-76.
- Choi, H.S. (2012) Method for extracting active ingredients from natural materials using honey as solvent, Korean Taeho Kongbo. Patent no: KR 2012060313 A 20120612.

- Crisan, E.V. ve Sands, A. (1978) *Nutritional value*, In S. T. Chang, & W. A. Hayes (Eds.), *The biology and cultivation of edible fungi* (pp. 727–793). New York: Academic Press.
- Danishefsky, S.J. Chou, T.C., Lei, X., Yun, H., Ng, F., Hartung, J. ve Sames, D. (2010) Compounds, compositions and methods for reducing toxicity and treating or preventing diseases, PCT Int. Appl. Patent no: WO 2010025272 A1 20100304.
- De Bernardi, M., Garlaschelli, L., Gattl, G., Vidari, G. ve Vita-Finzi, P. (1988) Fungal metabolites xxii, *Tetrahedron*, 44: 235-240.
- De Bernardi, M., Garlaschelli, L., Toma, L., Vidari, G. ve Vita-Finzi, P. (1991) Fungal metabolites XXVI: The structure of saponaceolides B, C and D, new C-30 terpenoids from *Tricholoma saponaceum*, *Tetrahedron*, 47: 7109-7116.
- De Pinho, P.G., Ribeiro, B., Gonçalves, R.F., Baptista, P., Valentão, P., Seabra, R.M. ve Andrade, P.B. (2008) Correlation between the pattern volatiles and the overall aroma of wild edible mushrooms, *J. Agr. Food Chem*, 56(5):1704–1712. <https://doi.org/10.1021/jf073181y>
- Decker, E.A. ve Welch, B. (1990) Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food, *J. Agr. Food Chem*, 38: 674–677.
- Díez, V. ve Alvarez, A. (2001) Compositional and nutritional studies on two wild edible mushrooms from northwest Spain, *Food Chem*, 75(4):417–422. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00229-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00229-1)
- Ding, X., Tang, J., Cao, M., Guo, C., Zhang, X., Zhong, J. ve Zhao, J. (2010) Structure elucidation and antioxidant activity of a novel polysaccharide isolated from *Tricholoma matsutake*, *Int J of Biol Macromol*, 47(2): 271–275. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.04.010>
- Dixit, P., Khan, M.P. ve Swarnkar, G. (2011) Osteogenic constituents from *Pterospermum acerifolium* Willd. flowers, *Bioorganic Med Chem Lett*, 21: 4617–4621.
- Doğan, H.H. ve Akata, I. (2011) Ecological features of *Tricholoma anatolicum* in Turkey, *Afr. J. Biotechnol*, 10(59): 12626-12668.
- Doğan, H.H., Sanda, M.A. ve Akata, I. (2012) Mn, Fe, K, Na, and P contents in some *Tricholoma* (Fr.) staude (*Tricholomataceae*) taxa from central Anatolia, Turkey, *Fresen Environ Bull*, 21(11b): 3389-3393.
- DuBois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. ve Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances, *Anal Chem*, 28(3): 350–356.

- Duquesnoy, E., Castola, V. ve Casanova, J. (2008) Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using ^{13}C NMR spectroscopy, *Carbohydr Res*, 343(5): 893–902. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2008.01.001>
- Elkady, A.I., Hussein, R.A.E.H. ve Abu-Zinadah, O.A. (2014) Effects of crude extracts from medicinal herbs *Rhazya stricta* and *Zingiber officinale* on growth and proliferation of human brain cancer cell line in vitro, *Biomed Res Int*, 2014: 1-16. <https://doi.org/10.1155/2014/260210>
- Enman, J., Rova, U. ve Berglund, K.A. (2007) Quantification of the bioactive compound eritadenine in selected strains of shiitake mushroom (*Lentinus edodes*), *J. Agr. Food Chem*, 55(4):1177–1180. <https://doi.org/10.1021/jf062559>
- Ersel, F.Y. ve Cavas, L. (2008) Enzyme-based scavengers and lipid peroxidation in some wild edible Agaricales s.l. mushrooms from Mugla (Turkey), *Int J Med Mushrooms*, 10: 269-277.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Baos, M. ve Barros, L. (2007) Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity, *Food Chem*, 100: 1511-1516.
- Floyd, R.A. West, M.S., Eneff, K.L., Hogsett, W.E. ve Tingey, D.T. (1988) Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA, *Arch Biochem Biophys*, 262: 266–272.
- Fons, F., Rapior, S. ve Fruchier, A. (2006) Volatile composition of *Clitocybe amoenolens*, *Tricholoma caligatum* and *Hebeloma radicosum*, *Cryptogamie Mycol*, 27(1): 45-55.
- Fridovich, I. (1986) Superoxide Dimutases, *Meth. Enzymol*, 58: 61–97.
- Fujii, T., Ishida, N., Maeda, H., Mizutani, I. ve Suzuki, F. (1979), KS-2-A.US Patent 4163780.
- Gao, Y., Zhou, S.H., Chen, G., Dai, X. ve Ye, J. (2003) A phase I/II study of a *Ganoderma lucidum* (Curt.: Fr.) P. Karst. extract (ganopoly) in patients with advanced cancer, *Int J Med Mushroom*, 4: 207–214.
- Garcha, H.S., Khanna, P.K. ve Soni, G.L. (1993) Nutritional importance o mushrooms” Mushroom biology and mushroom products, *Proceeding of the first international conference The Chinese University of Hong Kong*. (pp. 227–236).
- Garlaschelli, L., Magistrali, E., Vidari, G. ve Zuffardi, O. (1995) *Tricholomenyns A* and B, novel antimitotic acetylenic cyclohexenone derivatives from the fruiting

- bodies of *Tricholoma acerbum*, *Tetrahedron Lett*, 36(31): 5633–5636. [https://doi.org/10.1016/0040-4039\(95\)01033](https://doi.org/10.1016/0040-4039(95)01033)
- Garlaschellil, L., Pang, Z., Sterne, O., Vida, G., Organica, C., Pavia, U. ve Taramelli, V. (1994) New Indole Derivatives from the Fruit Bodies of *Tricholoma sciodes* and *T. virgatum*. *Tetrahedron*, 50(11): 3571–3574. [https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)87033-2](https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)87033-2)
- Gezer, K., Duru, M.E. Kivrak, I., Türkoğlu, A., Mercan, N., Türkoğlu, H. ve Gülcan, S. (2006) Free-radical scavenging capacity and antimicrobial activity of wild edible mushroom from Turkey, *Afr. J. Biotechnol*, 5: 1924–1928.
- Gutiérrez, A., Prieto, A. ve Martínez, A.T. (1996) Structural characterization of extracellular polysaccharides produced by fungi from the genus *Pleurotus*, *Carbohydr Res*, 281: 143–154.
- Guyton, K.Z. ve Kensler T.W. (1993) Oxidative mechanism in carcinogenesis, *Br Med Bull*, 49: 523–544.
- Halliwell, B. (1994) Free Radicals and Antioxidants: A Personal View, *Nutr Rev*, 52: 253–265.
- Hatipoğlu, A.A. (2007) Kanser erken tanı ve tarama problemleri, Tuncer A.M. *Türkiye’de Kanser Kontrolü*.(1. Baskı). Ankara: Onur Matbaacılık, 381-388.
- Hazar, A. (2006) *Akciğer kanserli hastalarda malondialdehit (MDA) ve total antioksidan kapasite (TAOK) düzeyi ölçümü ile oksidan-antioksidan dengenin araştırılması*, Uzmanlık tezi, T.C. Sağlık Bakanlığı Süreyyapaşa Göğüs Ve Kalp-Damar Hastalıkları Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, 74.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A. ve Ferreira, I.C.F.R. (2009a) Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity, *Food Chem*, 119(4): 1443-1450.
- Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A. ve Ferreira, I.C.F.R. (2009b) Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography, *Microchem J*, 93: 195-199.
- Hernández, D., Sánchez, J.E. ve Yamasaki, K. ..(2003) A simple procedure for preparing substrate for *P. ostreatus* cultivation, *Bioresour Technol*, 90: 145–150.
- Huang, Q.L., Jin, Y., Zhang, L.N., Cheung, C.K. ve Kennedy, J.F. (2007) Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia produced in fermenter, *Carbohydr Polym*, 70: 324–333.
- Hudson, B.J.F. (1990) *Food Antioxidants*, Elsevier Applied Science, London and New York, pp. 1-316.

- Ikekawa, T., Ikeda, Y., Yoshioka, Y., Nakanishi, K., Yokoyama, E. ve Yamazaki, E. (1982) Antitumor polysaccharides of *Flammulina velutipes* 2. The structure of EA-3 and further purification of EA-5, *J Pharmacobio-Dyn*, 5: 576–81.
- Intini, M., Dogan, H.H. ve Riva A. (2003) *Tricholoma anatolicum* spec. nov.: a new member of the matsutake group, *Micol. Vegetazione Mediterr*, 18: 135-142.
- Ito, T. ve Harada, E. (2010) Anti-inflammatory compositions containing hot water extracts of edible mushrooms or ergothioneine and their manufacture, Jpn. Kokai Tokkyo Koho. Patent no: JP 2010189284 A 20100902.
- Jang, M.S., Kang, Y. ve Jang, T.H. (2008) Cosmetic composition containing natural complex extracts with excellent antioxidation, whitening and anti-inflammatory effects, Korean Kongkae Taeho Kongbo. Patent no: KR 2008104672 A 20081203.
- Jayakumar, T., Ramesh, E. ve Geraldine, P. (2006) Antioxidant activity of the oyster mushroom, *P. ostreatus*, on CCl₄-induced liver injury in rats, *Food Chem Toxicol*, 44:1989–1996.
- Jayakumar, T., Thomas, P.A. ve Geraldine, P. (2007) Protective effect of an extract of the oyster mushroom, *P. ostreatus*, on antioxidants of major organs of aged rats, *Exp Gerontol*, 42: 183–191.
- Jemal, A., Tiwari, R.C., Murray, T., Ghafoor, A., Samuels, A., Ward, E., Feuer, E.J. ve Thun, M. (2004) Cancer statistics,. *CA Cancer J Clin*, 54(1):8-29.
- Jiang, Y., Wong, J.H., Fu, M., Ng, T.B., Liu, Z.K., Wang, C.R., Li, N., Qiao, W.T., Wen, T.Y. ve Liu, F. (2011) Isolation of adenosine, iso-sinensetin and dimethylguanosine with antioxidant and HIV-1 protease inhibiting activities from fruiting bodies of *Cordyceps militaris*, *Phytomedicine*, 18(2-3): 189-193.
- Kalmış, E., Nuri, A., Hasan, Y. ve Fatih, K. (2008) Feasibility of using olive mill effluent (OME) as a wetting agent during the cultivation of oyster mushroom, *P. ostreatus*, on wheat straw, *Bioresour Technol*, 99: 164–169.
- Kalmis, E., Yildiz, H. ve Ergonul, B. (2011) Chemical composition and nutritional value of a wild edible ectomycorrhizalmushroom, *Tricholoma anatolicum*, *Turkish J. Biol*, 35(5): 627-633.
- Kang, C.K., Cho, S.A., Kim, J.H., Chang, H.K., Park, N.H. ve Cho, J.C. (2011) Anti-inflammatory and antioxidant cosmetic composition containing green tea polysaccharide and *Tricholoma matsutake* extract, U.S. Pat. Appl. Publ. Patent no: US20110097356 A1 20110428.
- Kang, H.Y., Heo, N.E., Yoon, S. J., Baek, H., Jung, H. J., Jeon, H.Y. ve Kim, J.H. (2012) Antiaging cosmetic composition containing mushroom extracts. Korean Taeho Kongbo. Patent no: KR 2012032690 A 20120406.

- Kasal, A. (2010) *Structure and Nomenclature of Steroids*, Steroid Analysis Editors: Makin, Hugh L. J., Gower, D.B. <http://www.springer.com/gp/book/9781402097744>
- Kawagishi, H., Tonomura, Y., Yoshida, H., Sakai, S. ve Inoue, S. (2004) Orirubenones A, B and C, novel hyaluronan-degradation inhibitors from the mushroom *Tricholoma orirubens*, *Tetrahedron*, 60:7049-7052.
- Kaya, A., Genccelep, H., Uzun, Y. ve Demirel, K. (2011) Analysis of trace metal levels in wild mushrooms, *Asian J Chem*, 23(3): 1099-1103.
- Kim, G.H., Kim, H.J., Lee, G.N. ve Kim, S.H. (2010) Method for manufacturing low-molecular-weight fucoidan from brown algae, Korean Kongkae Taeho Kongbo. Patent no: KR 2010001375 A 20100106.
- Kobayashi, S. (1998) Production of *Tricholoma matsutake* food capable of withstanding long term storage, Jpn. Kokai Tokkyo Koho. Patent no: JP 10004913 A 19980113.
- Kwon, G.Y., Yoon, D.Y., Lee, S.J. ve Jung, U.J. (2010) Mushroom culture, its producing method, and functional food containing the mushroom culture, Korea. Patent no: KR 965722 B1 20100624.
- Kwon, S.G. ve Jung, B.H. (2012) Production of eco-friendly functional honey by administering functional material extract to honeybee, and produced eco-friendly functional honey, Korean Kongkae Taeho Kongbo, Patent no: KR 2012028488 a 20120323.
- Larson, R.A. (1988) The antioxidants of higher plants, *Phytochemistry*, 27: 969–978.
- Li, W., Zhou, W. ve Cha, J.Y. (2015) Sterols from *Herichium erinaceum* and their inhibition of TNF- α and NO production in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells, *Phytochemistry*, 115: 231–8.
- Lim H.W., Yoon J.H., Kim Y.S., Lee M.W., Park S.Y. ve Choi H.K. (2007) Free radical-scavenging and inhibition of nitric oxide production by four grades of pine mushroom (*Tricholoma matsutake* Sing.), *Food Chem*, 103(4): 1337-1342.
- Maga, J.A. (1981) Mushroom flavor, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29: 1–4.
- Mattila, P., Salo-Väänänen, P., Könkö, K., Aro, H.ve Jalava, T. (2002) Basic composition and amino acid contents of mushrooms cultivated in Finland, *J Agric Food Chem*, 50: 6419–6422.
- Mau J.L., Lin H.C. ve Song S.F. (2002) Antioxidant properties of several specialty mushrooms, *Food Res Int*, 35(6): 519-526.

- Mau, J.L., Chang, C.N., Huang, S.J. ve Chen, C.C. (2004) Antioxidant properties of methanolic extracts from *Grifola frondosa*, *Morchella esculanta* and *Termitomyces albuminosus* mycelia, *Food Chem*, 87: 111–118.
- Mau, J.L., Lin, H.C. ve Chen C.C. (2002) Antioxidant properties of several medicinal mushrooms, *J Agric Food Chem*, 50: 6072–6077.
- Mercan, N., Duru, M.E., Türkoğlu, A., Gezer, K., Kıvrak, İ. ve Türkoğlu, H. (2006) Antioxidant And Antimicrobial Properties Of Ethanolic Extract From *Lepista nuda* (Bull.) Cooke, *Annals of Microbiology*, 56: 339-344.
- Miller, H.M. (1971) A simplified method for the evaluation of antioxidants, *J Am Oil Chem Soc*, 48: 91.
- Mizuno T. (1999) The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan [Review], *Int J Med Mushroom*, 1: 9–30.
- Moncada, S., Palmer, R., Higgs, E., (1991) Nitric Oxide Physiology, Pathophysiology and Pharmacology, *Pharmacol Rev*, 43: 109–142.
- Moradali, M.F., Mostafavi, H., Ghods, S. ve Hedjaroude, G.A. (2007) Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi), *Int Immunopharmacol*, 7: 701–724.
- Murcia, M.A., Martinez-Tome, M., Jimenez, A.M., Vera, A.M., Honrubia, M. ve Parras, P. (2002) Antioxidant activity of edible fungi (truffles and mushrooms): losses during industrial processing, *J. Food Prot*, 10: 1614–1622.
- Nimura, H., Mitsumori, N. ve Takahashi, N. (2006) S-1 combined with lentinan in patients with unresectable or recurrent gastric cancer, *Gan To Kagaku Ryoho*, 33(1):106-109.
- Noh, H.J., Yang, H.H., Kim, G.S., Lee, S.E., Lee, D.Y., Choi, J.H. ve Kim, K.H. (2015) Chemical constituents of *Hericium erinaceum* associated with the inhibitory activity against cellular senescence in human umbilical vascular endothelial cells, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 30(6): 934–940. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.995181>
- Ohnuma, N., Amemiya, K., Kakuda, R., Yaoita, Y., Machida, K. ve Kikuchi, M. (2006) Sterol Constituents from Two Edible Mushrooms, *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake*, *Chem Pharm Bull*, 48: 749-751.
- Ooi V.E.C. (2001) Pharmacological studies on certain mushrooms from China, *Int J Med Mushrooms*, 3(4): 341-354.
- Osawa, T., Ito, T., Yamamoto, H. ve Harada, E. (2008) Manufacture of ergothioneine from mushroom . Jpn. Kokai Tokkyo Koho ,Patent no: JP 2009161498

- Öztürk M. *Micromeria cilicica* ve *M. juliana* türlerinde antioksidan bileşiklerin hplc ile analizi ve yapılarının aydınlatılması. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul-2008.
- Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M.E. ve Topçu, G. (2007) Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant, *Food Chem*, 103: 623-630.
- Öztürk, M., Duru, M. E., Kivrak, S., Mercan-Doğan, N., Türkoglu, A. ve Özler, M.A. (2011) In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents: a comparative study on the three most edible mushrooms, *Food and Chem Toxicol*, 49(6): 1353–60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.03.019>
- Papas, A. M. (1996) Determinants of antioxidant status in humans, *Lipids*, 31(1): 77–82.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. ve Rice-Evans, C. (1989) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, *Free Radical Bio Med*, 26: 1231–1237.
- Regina, M.M.G., Elisabeth, W., Jamile, R.R., Jorge, L.N. ve Sandra, A.F. (2008) Alternative medium for production of *P. ostreatus* biomass and potential antitumor polysaccharides, *Bioresour Technol*, 99: 76–82.
- Reis, F.S., Heleno, S.A., Barros, L., Sousa, M.J., Martins, A., Santos-Buelga, C. ve Ferreira, I.C.F.R. (2011) Toward the antioxidant and chemical characterization of mycorrhizal mushrooms from Northeast Portugal, *J Food Sci*, 76(6): C824-C830.
- Ribeiro, B., Rangel, J., Valentao, P., Baptista, P., Seabra, R.M. ve Andrade, P.B. (2006) Contents of Carboxylic Acids and Two Phenolics and Antioxidant Activity of Dried Portuguese Wild Edible Mushrooms, *J Agric Food Chem*, 54(22): 8530-8537.
- Rout, S. ve Banerjee, R. (2007) Free radical scavenging, antiglycation and tyrosinase inhibition properties of a polysaccharide fraction isolated from the rind from *Punica granatum*, *Bioresour Technol*, 98: 3159–3163.
- Sakai, S., Tomomura, Y., Yoshida, H., Inoue, S. ve Kawagishi, H. (2005) Orirubenones D to G, novel phenones from the *Tricholoma orirubens* mushroom. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(8):1630–2. <https://doi.org/10.1271/bbb.69.1630>
- Seo, H. W., Hung, T. M., Na, M., Jung, H. J., Kim, J. C., Choi, J. S. ve Min, B.S. (2009) Steroids and triterpenes from the fruit bodies of *Ganoderma lucidum* and their anti-complement activity, *Arch Pharm Res*, 32(11): 1573–1579. <https://doi.org/10.1007/s12272-009-2109-x>
- Sesli, E. (2007) Trace metal contents of higher fungi from Zigana Highland in Turkey, *Asian J Chem*, 19(1): 636-340.

- Sesli, E. ve Tuzen, M. (2006) Micro- and macroelement contents of edible wild growing mushrooms in Artvin province of Turkey, *Asian J Chem*, 18(2):1423-1429.
- Solak, M.H. Işıloğlu, M. Kalmış, E. ve Allı, H. (2007) Macrofungi of Turkey, Checklist Vol. I” Bornova, İzmir: Genç Üniversiteler Ofset. p: 254.
- Spratt, J.S., Donegan, W.L. ve Sigdestad, C.P. (1995) *Epidemiology and etiology*. In Donegan WL ,Spratt JS,eds. Cancer of the breast, Philadelphia: WB Saunders 116-141.
- Takeuchi, T., Nakajima, M. ve Morimoto, K. (1994) Establishment of a human system that generates O₂• and induces 8-hydroxydeoxyguanosine, typical of oxidative DNA damage, by a tumor promoter, *Cancer Res*, 54: 5837–5840.
- Talou, T., Breheret, H.B.S. ve Gaset, A. (2000) Identification of the major key flavor compounds in odorous wild mushrooms, *Frontiers of Flavour Sciences*, Proceedings of the Weurman Flavour Research Symposium, 9th ,Freising, Germany, 46-50.
- Taylor, M.J. ve Richardson, T. (1980) Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by haemoglobin, *J Food Sci*, 30: 1223–1227.
- Tel, G., Apaydın, M., Duru, M.E. ve Öztürk, M. (2012) Antioxidant and Cholinesterase Inhibition Activities of Three Tricholoma Species with Total Phenolic and Flavonoid Contents: The Edible Mushrooms from Anatolia, *Food Anal Methods*, 5(3): 495–504. <https://doi.org/10.1007/s12161-011-9275-4>
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H.A. ve Aydin, E. (2007) Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of The Methanolic Extracts of Salvia verticillata (L.) subsp. verticillata and S. verticillata (L.) subsp. amasiaca (Freyn & Bornm.) Bornm, *Food Chem*, 100: 985–989.
- Tong, H., Liu, X., Tian, D. ve Sun, X. (2013) Purification, chemical characterization and radical scavenging activities of alkali-extracted polysaccharide fractions isolated from the fruit bodies of Tricholoma matsutake, *World J Microbiol Biotechnol*, 29(5): 775–780. <https://doi.org/10.1007/s11274-012-1232-x>
- Tong, H., Xia, N., Feng, K., Sun, G., Gao, X., Sun, L., Jiang, R., Tian, D. ve Sun, X. (2009) Structural characterization and in vitro antitumor activity of a novel polysaccharide isolated from the fruiting bodies of Pleurotus ostreatus, *Bioresour Technol*, 100: 1682–1686.
- Tsukamoto, S., Macabalang, A. D., Nakatani, K., Obara, Y., Nakahata, N. ve Ohta, T. (2003) Tricholomalides A-C, New Neurotrophic Diterpenes from the Mushroom Tricholoma sp. *J Nat Prod*, 66(12): 1578–1581. <https://doi.org/10.1021/np030140x>

- Türkoğlu, A., Duru, M.E., Mercan, N., Kıvrak, İ. ve Gezer, K. (2007) Antioxidant and antimicrobial activity of *Laetiporus sulphureus* (Bull.: Fr.) Murr”, *Food Chem*, 101: 267–273.
- Türkoğlu, A., Kıvrak, I., Mercan, N., Duru, M.E., Gezer, K. ve Türkoğlu, H., (2006) Antioxidant and antimicrobial activities of *Morchella conica* Pers., *Afr J Biotechnol*, 5: 1146–1150.
- Ünal, K., Ötleş, S.ve Çağlarirmak, N. (1996) Chemical composition and nutritive value of (*A. bisporus*) and wild mushroom product grown in Turkey, *Acta Aliment*, 25: 257–266.
- Vaz, J.A., Barros, L., Martins, A., Morais, J.S., Vasconcelos, M.H. ve Ferreira, I.C.F.R. (2010) Phenolic profile of seventeen Portuguese wild mushrooms, *Food Sci Technol*, 44(1): 343-346.
- Von-Sonntag, C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*, London, Taylor & Francis, pp:15-49.
- Wang, H., Lui, G., Zhou, B. ve Hu, X. (2012b) Monosaccharide compositional analysis of purified polysaccharide from *Tricholoma matsutake* by capillary gas chromatography, *J Med Plant Res*, 6(10): 1935-1940.
- Wang, H.X. Gao, J.Q. ve Ng, T.B. (2000) A new lectin with highly potent antihepatoma and antisarcoma activities from the oyster mushroom *P. ostreatus*, *Biochem Biophys Res Commun*, 275: 810–816.
- Wasser, S.P., Weis, A.L. ve Nevo, E. (1997) Medicinal Mushrooms: *Ganoderma lucidum* (Curtis: Fr.) P. Karst. Reishi Mushroom, Haifa, Israel: Pedelfus Publishing House.
- World Health Organization (WHO) (2004) *The World Health Report*.
- World Health Organization (WHO) (2008) *Cancer*. Temmuz.
- Xiao, S.Y., Guo, S.X., Yu, N.J. ve Xie, F. (2001) Secondary metabolites of *Gliocladium* sp., a growth accelerating fungus for *Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 26: 324–326.
- Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O. ve Inoue, T. (2007) Antioxidant Activity of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum*) Fruit, *Food Chem*, 100: 171–177.
- Yaoita, Y., Amemiya, K. ve Ohnuma, H. (1998) Studies on the constituents of mushrooms. Part III. Sterol Constituents from Five Edible Mushrooms, *Chem Pharm Bull*, 46: 944–950.
- Yermilov, V., Rubio, J. ve Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination, *FEBS Lett*, 376: 207–210.

- Yoshikawa, K., Kuroboshi, M., Ahagon, S. ve Arihara, S. (2004). Three novel crustulinol esters, saponaceols A-C, from *Tricholoma saponaceum*, *Chem Pharm Bull*, 52(7): 886–8. <https://doi.org/10.1248/cpb.52.886>
- Yoshikawa, K., Kuroboshi, M., Arihara, S., Miura, N., Tujimura, N. ve Sakamoto, K. (2002) New triterpenoids from *Tricholoma saponaceum*, *Chem. Pharm. Bull*, 50: 1603.
- You, L., Gao, Q., Feng, M., Yang, B., Ren, J., Gu, L. ve Zhao, M. (2013) Structural characterisation of polysaccharides from *Tricholoma matsutake* and their antioxidant and antitumour activities, *Food Chem*, 138(4): 2242–2249. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.140>
- Zaidman, B.-Z., Yassin, M., Mahajna, J. ve Wasser, S.P. (2005) Medicinal mushroom modulators of molecular targets as cancer therapeutics, *Appl Microbiol Biotechnol*, 67(4): 453–68. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1787-z>
- Zhang, A.-L., Li, Y.-L., Ma, Y.-T., Gao, J.-M. ve Jia, A.-Q. (2009) Phenolic meroterpenoids and steroids from the basidiomycete *Tricholoma imbricatum*, *Biochem Syst Ecol*, 37(6): 756–758. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2009.10.002>
- Zhang, M., Cui, S.W., Chueng, P.C. ve Wang, K.Q. (2007) Antitumor polysaccharides from mushrooms: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity, *Trends Food Sci Technol*, 18: 4–19.
- Zhang, R.H., Li, X.J. ve Fadel, J.G. (2002) Oyster mushroom cultivation with rice and wheat straw, *Bioresour Technol*, 82: 277–284.
- Zhuang, C., Mizuno, T., Ito, H., Shimura, K. ve Sumiya, T. (1994) Chemical modification and antitumor activity of polysaccharides from the mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 41: 733–40.

EKLER

Ek A. Tez çalışması materyallerinin toplanmasında kullanılan izin belgesi



T.C.
ORMAN GENEL MÜDÜRLÜĞÜ
Odun Dışı Ürün ve Hizmetler Dairesi Başkanlığı



Sayı : 78751944-305.03.01/454645

11.03.2014

Konu : Materyal Toplanması Talebi

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
(Fen Fakültesi Dekanlığı)

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı öğretim görevlisi Doç.Dr.Mehmet ÖZTÜRK'ün "*Tricholoma arvernense* Bon ve *Tricholoma anatolicum* H.H.dOĞAN & Intini Türlerinin Antioksidan Aktivite Gösteren Bileşiklerin HPLC ile İzolasyonu ve Yapılarının Aydınlatılması"başlıklı proje kapsamında, araştırma materyali olarak Başvuru Formunda belirtilen mantar türlerinin temin edilmesi gerektiği belirtilerek söz konusu araştırma materyallerinin temini için gerekli iznin verilmesi Daire Başkanlığımızdan talep edilmiştir.

İlgili Orman Bölge Müdürlüğü ve Orman İşletme Müdürlüklerinin bilgisi ve denetimi kaydı ile beyan edilen türlerle ilgili bilimsel maksatlı çalışma yapılması amacıyla araştırma materyali toplanmasında herhangi bir sakınca bulunmadığının belirtildiği Başvuru Formu imzalanarak yazımız ekinde gönderilmektedir..

Gereğini arz ederim.

İsa SERTKAYA
Genel Müdür a.
Daire Başkanı V.

Ek :
Başvuru Formu (1 Takım)

ASLI GİBİDİR
Özgür BALCI
Bitkisel Ürünler
Şube Müdürü

Bu evrakın 5070 Sayılı Kanun
gereğince E-İmza ile imzalandığı tasdik
olunur. 11.03.2014

A. BALTA
V.E.K.I.

Veri Hazırlama Kontrol İşletmeni
Ş.Md.

: A.BALTA
: Ö.BALCI

Not: 5070 sayılı elektronik imza kanunu gereği bu belge elektronik imza ile imzalanmıştır.



TOBB - Dumlupınar Bulvarı No:252 (Eskişehir Yolu 9.Km) 06530 /ANKARA
ÇANKAYA/ANKARA
Telefon No: Belge Geçer No:
e-posta: internet adresi:

Ayrıntılı bilgi için:
A.BALTA
Veri Hazırlama Kontrol
İşletmeni

Ek B.Turnitin Raporu



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Erhan Kaplaner
Ödev başlığı: Doktora Tezleri
Gönderi Başlığı: Tricholoma imbricatum (Fr.) P. Kum...
Dosya adı: ERhan_tez_doktora.docx
Dosya boyutu: 25.44M
Sayfa sayısı: 246
Kelime sayısı: 29,998
Karakter sayısı: 221,586
Gönderim Tarihi: 27-Eyl-2017 12:48AM (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 852979220

E.KAPLANER
KİMYA ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ
MUĞLA 2017

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tricholoma imbricatum (Fr.) P. Kumm. ve *Tricholoma
anatolicum* H.H. Duhan & İstifini TÜRLERİNİN
ANTİOKSİDAN VE SİTOTOXİK AKTİVİTE
GÖSTEREN BİLEŞİKLERİNİN HPLC İLE
İZOLASYONU VE YAPILARININ AYDINLATILMASI

DOKTORA TEZİ

ERHAN KAPLANER

AĞUSTOS 2017
MUĞLA

Copyright 2017 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

11/8/2017

E.KAPLANER

KİMYA ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

MUĞLA 2017

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI

Tricholoma imbricatum (Fr.) P. Kumm. ve *Tricholoma
anatolicum* H.H. Doğan & Intini TÜRLERİNİN
ANTIÖKSİDAN VE SİTOTOKSİK AKTİVİTE
GÖSTEREN BİLEŞİKLERİNİN HPLC İLE
İZOLASYONU VE YAPILARININ AYDINLATILMASI

DOKTORA TEZİ

ERHAN KAPLANER

AĞUSTOS 2017
MUĞLA

Handwritten signature

Ek B. (devam)

Tricholoma imbricatum (Fr.) P. Kumm. ve Tricholoma
anatolicum H.H. Doğan & İntini TÜRLEİNİN ANTİOKSİDAN VE
SİTOTOKSİK AKTİVİTE GÖSTEREN BİLEŞİKLERİNİN HPLC
İLE İZOLASYONU VE YAPILARININ AYDINLATILMA

ORJİNALLİK RAPORU

% 5	% 5	% 3	%
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	polen.itu.edu.tr İnternet Kaynağı	% 2
2	shodhganga.inflibnet.ac.in İnternet Kaynağı	% 1
3	田中 奈津美. "抗腫瘍性化合物(-)-FR182877の不 斉全合成", [出版者不明], 2012. Yayın	% 1
4	repositorium.sdum.uminho.pt İnternet Kaynağı	% 1
5	www.pdrhizmetleri.com İnternet Kaynağı	% 1
6	www.yuvamsohbet.com İnternet Kaynağı	% 1

U. g. two

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad :Erhan KAPLANER
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi: 05/01/1986
Medeni Hali :Evli
Telefon : +90 555 552 55 47
E-posta : kaplaner.erhan@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Aldığı Kurum/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Lise	Teğmen Ali Rıza Akıncı Lisesi	2004
Lisans	Muğla Ünivesitesi	2008
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2011

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon/görev
2010-2017	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	Arş. Görevlisi

Yabancı Dil(ler)

Dil (İngilizce, vs)	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma			X
Konuşma			X
Anlama			X
Okuma			X

Bilimsel Faaliyetler

Yüksek Lisans Tez Başlığı (özeti ekte) ve Tez Danışman(lar)ı :

“CVOCs un katalitik oksidasyon yöntemiyle giderimi için uygun bimetallik nanosol PILCs kataliz sistemlerinin geliştirilmesi” Danışman: Prof Dr. Nurgün BEŞÜN

Doktora Tezi/S.Yeterlik Çalışması/Tıpta Uzmanlık Tezi Başlığı (özeti ekte) ve Danışman(lar)ı :

“*Tricholoma imbricatum* (Fr.) P.Kumm. ve *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini Türlerinin Antioksidan ve Sitotoksik Aktivite Gösteren Bileşiklerinin HPLC ile İzolasyonu ve Yapılarının Aydınlatılması” Danışman: Doç.Dr. Mehmet ÖZTÜRK

Görevler:

Unvan	Görev Yeri	Yıl
Arş. Gör.	Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi	2010- 2017

Projelerde Yaptığı Görevler:

TUBİTAK 1001 113R012 Ticari Potansiyeli Olan *Tricholoma* Türlerinde Antikanser ve Antioksidan Bileşiklerinin Araştırılması: Aktivitelerden Sorumlu Bileşikler ile Polisakkaritlerinin İzolasyonları ve Yapılarının Spektroskopik Yöntemlerle Aydınlatılması **(2013-2016) : Bursiyer**

MSKÜ BAP 14/04 *Tricholoma arvernense* Bon ve *Tricholoma anatolicum* H.H. Doğan & Intini Türlerinin Antioksidan Aktivite Gösteren Bileşiklerinin HPLC ile İzolasyonu ve Yapılarının Aydınlatılması **(2013-2016): Araştırmacı**

MSKÜ BAP 15/213 *Tricholoma* türlerinden izole edilen bileşiklerin antiinflammatuar aktivitelerinin belirlenmesi**(2015-2016): Araştırmacı**

Yabancı Dil Bilgisi: İleri düzeyde ingilizce

ÜDS 2009 Sonbahar: **91.25**

YÖKDİL 2017 Mart:**91.25**

Diğer Sınav Bilgileri

ALES: (son 2 yıla ait güncel sınav notu bulunmamaktadır)

ESERLER

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

A1. Amira Labeled, Maria Ferhat, Ilhem Labeled-Zouad, **Erhan KAPLANER**, Sakina Zerizer, Laurence Voutquenne-Nazabadioko, Abdulmagid Alabdul Magid, Zahia Semra, Ahmed Kabouche, Zahia Kabouche and Mehmet Öztürk “Compounds from the pods of Astragalus armatus with antioxidant, anticholinesterase, antibacterial and phagocytic activities” Pharmaceutical Biology, 2016 <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2016.1200632>

A2. Canan ÖNTAŞ, Esin BABA, **Erhan KAPLANER**, Selçuk KÜÇÜKAYDIN, Mehmet ÖZTÜRK, Menekşe Didem ERCAN “Antibacterial Activity of Citrus limon Peel Essential Oil and Argania spinosa Oil Against Fish Pathogenic Bacteria” Kafkas Univ Vet Fak Derg 22 (5): 741-749, 2016 DOI: 10.9775/kvfd.2016.15311

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında (proceedings) basılan bildiriler :

B1. Nurgün BESÜN, Ilyas DEVECI, **Erhan KAPLANER** “Catalytic Deep Oxidation of Trichloroethylene over Acid Activated PILCs Catalyst” 8thEuropean Congress of Chemical Engineering, ICC Berlin, Germany, Eylül 25 - 29, 2011,

B2. Nurgün BESÜN, Ilyas DEVECI, **Erhan KAPLANER** “High Catalytic Activity of Delaminated Zr-PILC with Varying Pillar density” 8thEuropean Congress of Chemical Engineering, ICC Berlin, Germany, Eylül 25 - 29, 2011

B3. Selçuk KÜÇÜKAYDIN^a, Mehmet Emin DURU^a, **Erhan KAPLANER**^a Gülsen TEL^a, Meltem TAŞ^a, Gülay ŞAVKINCI^a, The Chemical Composition of Essential Oil

and Anticholinesterase Inhibition Activity of Various Extracts of *Thymus cilicicus* Boiss. & Bal., tarihleri arasında Sarajevo/BOSNA ‘da gerçekleştirilecek olan 1. Uluslararası Kimya Bilimleri ve Teknolojileri üzerine Türk Dünya Konferansı’nda (1st International Turkic World Conference on Chemical Sciences and Technologies) 27 October – 1 November 2015

B4. Özge Tokul-Ölmez¹, İsmail Yener², Abdulsalam Ertaş³, Mehmet Fırat⁴, **Erhan Kaplaner**¹, Mehmet Öztürk¹, Hamdi Temel⁵ “Trace Element Analysis in Some *Euphorbia* Species by ICP-MS and Chemometric Approach” 3rd International Conference on New Trends in Chemometrics and Applications, 23-28 May 2016

B5. Fatiha Grina, Zain Ullah, **Erhan Kaplaner**, Kübra Elik, Abderrahman Moujahid, Abdel Khalid Essamadi and Mehmet Öztürk “Screening of Antioxidant Activity of Selected Seaweeds Collected from Morocco” 23-27 May, Antalya, 2016

B6. Fatiha Grina, **Erhan Kaplaner**, Mehmet Hüseyin Singeç, Zain Ullah, Boubker Nasser, Abdel Khalid Essamadi and Mehmet Öztürk “Tyrosinase, acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activity of *Bifurcariabifurcate*, *cystoseiracompressa* and *cystoseirstricta* collected from Morocco” 23-27 May, Antalya, 2016

B7. **Erhan Kaplaner** ^a, Mehmet Hüseyin Singeç ^a, Hüseyin Çelikkan ^b, Mehmet Öztürk ^a, Mehmet Emin Duru “Cytotoxic Activity of *Tricholoma anatolicum* Against MCF-7 and H1299 Cell Lines” 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 9th International Conference on Biodiversity” (ISCNP-29 & ICOB-9) 24-27 September 2016

B8. Erhan Kaplaner a , Mehmet H. Singeç a , Mehmet Öztürk a,* , Atia-tul Wahab b , M. Iqbal Choudhary b,c ,”Stereochemistry of C-6 Position of Two New Sterols from *Tricholoma anatolicum* “29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 9th International Conference on Biodiversity” (ISCNP-29 & ICOB-9) 24-27 September 2016

B9. Mehmet Hüseyin Singeç a , **Erhan Kaplaner** a , Akhtar Muhammad a , Mehmet Öztürk a,* ,M. Iqbal Choudhary b,c ,” Nitrogenized Natural Compounds from *Tricholoma focale* “29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 9th International Conference on Biodiversity” (ISCNP-29 & ICOB-9) 24-27 September 2016

B10. Akhtar Muhammad^a, Kübra Elik^a Mehmet Hüseyin Singeç^a, **Erhan Kaplaner**, Riadh Ben Mansour^b, Mehmet Öztürk^a “Secondary Metabolites of *Rhizopogon roseolus* with Cytotoxic Activity” 29th International Symposium on the Chemistry of Natural Products and the 9th International Conference on Biodiversity” (ISCNP-29 & ICOB-9) 24-27 September 2016

B11. Ebubekir İzol A , Abdulsalam Ertas A , Mehmet Boğa B , **Erhan Kaplaner** C , Serkan Yiğitkan A , Kerem Şentürk D , Murat Bingül E , Hüseyin Alkan F , Mehmet Öztürk C,* ”The Total Phenolic-Flavonoid Content, Cytotoxic, Antioxidant and Anticholinesterase Activities of Ethanol Extract of *Allium scabriscapum* 10th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD2016) International Conference, 29 Sep - 2 Oct 2016

B12. Erhan Kaplaner A , Mehmet H. Singeç A , Mehmet Öztürk A,* , Atia-tul Wahab B , M. Iqbal Choudhary B,C , “NMR Studies on the Secondary Metabolites of *Tricholoma anatolicum* “ 10th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD2016) International Conference, 29 Sep - 2 Oct 2016

B13. Erhan Kaplaner^A, Mehmet Hüseyin Singeç^A, Mehmet Öztürk^A, Investigation of Cell proliferation, Apoptotic and Necrotic Effects of *Tricholoma anatolicum* against MCF-7 and H1299 Cell Lines , 14th eurasia conference on chemical sciences, 15 - 18 December,Karachi,.

B14. Mehmet Hüseyin Singeç^a, **Erhan Kaplaner^a**, Akhtar Muhammad^a, Pinar Terzioğlu^b, Mehmet Öztürk^{a,b,*}, Muhammad Iqbal Choudhary^{c,d}, Anti-inflammatory Activity of Steroids of *Tricholoma focale* and *T. Anatolicum*, 14th eurasia conference on chemical sciences, 15 - 18 December,Karachi,.

B15.Kübra Elik, Mehmet Öztürk, **Erhan Kaplaner**, Zain Ullah, Yusuf Sıcak, Mehmet Emin Duru, Abdulsalam Ertaş, Riadh Ben Monsour, Mehmet Hüseyin Singeç, Comparison Of Antioxidant Activity Of Baked And Raw Materials Of Gyromitra Esculenta, 1st International Congress on Medical and Aromatic Plants, TABKON 2017,10-12 May, Konya.

B16.Hüseyin Türkoğlu, Bihter Şahin, Özge Tokul Ölmez, **Erhan Kaplaner**, Mehmet Öztürk, Mehmet Emin Duru , Evaluation Of The Fatty Acid Compositions Of 14 Pistacia Vera Fruits With Chemometric Approach, 1st International Congress on Medical and Aromatic Plants, TABKON 2017,10-12 May, Konya.

B17. Erhan Kaplaner, Mehmet Hüseyin Singeç, Mehmet Öztürk, Antioxidant Activity Of Polysaccharide Extracts Of *Tricholoma Anatolicum*, 1st International Congress on Medical and Aromatic Plants, TABKON 2017,10-12 May, Konya.

B18. Mehmet Hüseyin Singeç, **Erhan Kaplaner**, Mehmet Öztürk, Isolation Biological Compounds From *Tricholoma Focale*, 1st International Congress on Medical and Aromatic Plants, TABKON 2017,10-12 May, Konya.

B19. Mehmet Öztürk, **Erhan Kaplaner**, Mehmet Hüseyin Singeç, Adem Turan², A Rapid Method For The Determination Of Curcumin In Food Samples, 1st International Congress on Medical and Aromatic Plants, TABKON 2017,10-12 May, Konya

C. Yazılan ulusal/uluslararası kitaplar veya kitaplardaki bölümler :

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler :

D1. Deniz Altuntaş, Hakan Allı, **Erhan Kaplaner**, Mehmet Öztürk “Bazı Lactarius Türlerinin Yağ Asidi Bileşenlerinin ve Makrobesinsel Özelliklerinin Belirlenmesi” Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 4(3): 216-220, 2016

D2. **Erhan KAPLANER**, Mehmet Hüseyin SİNGEÇ, Mehmet ÖZTÜRK, “Fatty Acid Composition and Antioxidant Activity of *Tricholoma Imbricatum* And *T. Focale*, Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology, <https://doi.org/10.24925/turjaf.v5i9.1080-1085.1291> (2017).

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

E1. Nurgün BEŞÜN, İlyas DEVECİ, Hanife ERDEN ,Lütfi ERDEN, **Erhan KAPLANER**” Synthesis of Bimetalic Nanosol PILCs for Abatement of Chlorinated Volatile Organic Emissions And Catalytic Test” Third National Catalysis Conference(NCC-3), 28 April -1 May 2010, Zonguldak

E2. Ebru Erol, **Erhan KAPLANER**, Mehmet Öztürk, Mehmet Emin Duru “*Tricholoma anatolicum* ve *T.caligatum* Türlerinin Antioksidan Aktivitesi” Ulusal Mikoloji Günleri 1-4 Eylül 2014, Erzurum Teknik Üniversitesi,

E3. Gülsen Tel, Hamide Çavdar, Ebru Erol, **Erhan Kaplaner**, Mehmet Öztürk, Mehmet Emin Duru “Bazı *Tricholoma* Türlerinin Yağ Asidi Bileşenleri” Ulusal Mikoloji Günleri 1-4 Eylül 2014, Erzurum Teknik Üniversitesi,

E4. Erhan KAPLANER, Ebru EROL, Mehmet ÖZTÜRK, Gülsen TEL ÇAYAN, Mehmet Emin DURU “*Tricholoma imbricatum* Polisakkarit Ekstrelerinin Antioksidan Aktivitesi” 27. Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale

E5. Mehmet Hüseyin SİNGEÇ , **Erhan KAPLANER**, Ebru EROL, Mehmet ÖZTÜRK, Aziz TÜRKÖĞLU “*Tricholoma focale* Mantarının Antioksidan Aktivitesi” , 27. Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale

E6. Ebru Erol, **Erhan KAPLANER**, Mehmet Öztürk, Mehmet Emin Duru “*Tricholoma fracticum* (Britzelm.) Kreisel Makromantarının Antioksidan ve Sitotoksik Aktivitesi” , 27. Ulusal Kimya Kongresi, 23-28 Ağustos 2015, Çanakkale

Yurtdışı Deneyimleri

Araştırma

1. ICCBS, Research, ICCBS;HEJ, Araştırma, 15.12.2016 -15.03.2017 (Uluslararası)

Çalışma

1. ICCBS;HEJ, Research, ICCBS;HEJ, Çalışma, 31.01.2016 -23.04.2016 (Uluslararası)