

**T.C.**  
**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***XANTHIUM STRUMARIUM* L. BİTKİSİNDEN BİYOLOJİK  
AKTİF BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU, YAPILARININ  
AYDINLATILMASI VE  
ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ  
İNHİBİSYON AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**PINAR ALPASLAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**YRD. DOÇ. DR. ÖZLEM DEMİRKİRAN**

**EDİRNE 2013**

***XANTHIUM STRUMARIUM* L. BİTKİSİNDEN BİYOLOJİK AKTİF  
BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU, YAPILARININ  
AYDINLATILMASI VE  
ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ  
İNİBİSYON AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**PINAR ALPASLAN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**2013**


**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN


Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

  
Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

  
Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

Tez Danışmanı

Bu tez, tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından Kimya Anabilim Dalında bir Yüksek lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.


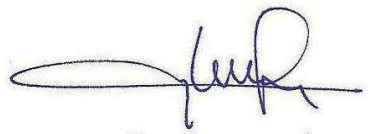

Jüri Üyeleri:

Yrd. Doç. Dr. Hakan KOLANCILAR

Yrd. Doç. Dr. Mehmet AYBEKE

Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN

İmza

Tarih: .02./05/2013

**T.Ü.FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**DOĞRULUK BEYANI**

İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin kaynak gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

02/05/2013

Pınar ALPASLAN



Yüksek Lisans Tezi  
*Xanthium strumarium* L. Bitkisinden Biyolojik Aktif Bileşiklerin  
İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve  
Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz İnhibisyon Aktivitelerinin İncelenmesi  
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

## ÖZET

Bu tez çalışmasında *Xanthium strumarium* L. bitkisinin kimyasal bakımdan incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bitki metanol içinde 2 hafta bekletilmiştir. Daha sonra bitki ekstresi su ile seyreltilerek sırası ile hekzan, diklorometan ve etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen bu fraksiyonların ince tabaka kromatografileri yapılmış ve diklorometan ve hekzan fraksiyonlarının benzer bileşenler içermesinden dolayı diklorometan ve hekzan fraksiyonları birleştirilmiştir. Maddelerin bu fraksiyonlardan eldesinde çeşitli kromatografik yöntemlerden yararlanılmıştır.

*Xanthium strumarium* L bitkisinin diklorometan ekstresinden dördü seskiterpen lakton, biri flavonoid, biri steroid, biri fenolik bileşik, biri de fenil propanoid olmak üzere toplam sekiz bileşik izole edilmiştir. Bileşiklerin yapı tayininde IR, UV, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, COSY, ESI-MS gibi spektroskopik tekniklerden yararlanılmıştır. Bileşikler literatür ile kıyaslanarak kesin sonuca varılmıştır. Bulgular ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

İzole edilen bileşikler (1-8) AChE ve BChE inhibisyon aktivitelerini tespit etmek üzere taranmıştır. AChE için test edildiğinde, xanthatin (1), tomentosin (2), 4-okso-bedfordia acid (3), isoxanthanol (4) ve stigmasterol (5) sırası ile 0.64, 0.90, 0.69, 0.50, and 0.42 mM'lık IC<sub>50</sub> değerleri göstermiştir. BChE inhibisyonu IC<sub>50</sub> değerleri (1-5) nolu bileşikler için 2.17, 8.64, 4.16, 2.20, 5.88 mM olarak tespit edilmiştir. Ancak, fenolik bileşikler (6-8) her iki enzime karşı inhibisyon aktivitesi göstermemiştir. Standart inhibitörün (galantamin) AChE ve BChE enzimlerine karşı IC<sub>50</sub> değerleri sırası ile 0.12 mM and 0.33 mM bulunmuştur.

Yıl : 2013  
Sayfa Sayısı : 129  
Anahtar Kelimeler : *Xanthium strumarium*, Compositae, xantholidler, Alzheimer, Asetilkolinesteraz, Bütirilkolin esteraz

Master Thesis  
The Isolation and Structure Elucidation of  
Bioactive Compounds from *Xanthium strumarium* L.  
Trakya University Institute of Natural Sciences  
Department of Chemistry

## ABSTRACT

In this study, the chemically investigation of *Xanthium Strumarium* L. was aimed. For this purpose, the plant material was soaked in MeOH for two weeks. Then MeOH extract was diluted with water and fractionated with hexane, dichloromethane, and ethyl acetate, respectively. Based on the results of TLC chromatography, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and hexane extracts were found very similar. Therefore, these two extracts were combined. Several chromatographic techniques have been used for the isolation of the compounds from the extracts of hexane-dichloromethane, and ethyl acetate.

Purification of dichloromethane extract of *Xanthium strumarium* L. resulted with the isolation of eight compounds including four sesquiterpene lactones, a sterol, and three phenolic compounds. The structure determination of the compounds achieved by spectral methods such as IR, UV, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, DEPT, HMBC, COSY, ESI-MS and also by comparing their spectral data to those of literature values. The results were discussed.

The isolated compounds (**1-8**), were screened against AChE and BChE inhibitory activity. When tested against the AChE, xanthatin (**1**), tomentosin (**2**), 4-oxo-bedfordia acid (**3**), isoxanthanol (**4**) and stigmasterol (**5**) displayed IC<sub>50</sub> values of 0.64, 0.90, 0.69, 0.50, and 0.42 mM, respectively. The IC<sub>50</sub> values for BChE inhibition by compounds (**1-5**) were 2.17, 8.64, 4.16, 2.20, 5.88 mM, respectively. However, phenolic compounds **6-8** were not active against both enzyme. Standard inhibitor (galanthamine) exhibited AChE and BChE inhibition with IC<sub>50</sub> value of 0.12 mM and 0.33 mM, respectively.

Year : 2013  
Number of Pages : 129  
Keywords : *Xanthium strumarium*, Compositae, xantholides, Alzheimer, Acetylcholine esterase, Butyrylcholin esterase

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı, Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu bu çalışmada *Xanthium strumarium* L. bitkisindeki biyoaktif bileşikler izole edilerek yapıları aydınlatılmış ve bunların asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir.

Tez çalışmam süresince çalışmalarımı titizlikle yönlendiren, her adımında yanımda olan ve değerli bilgilerini benimle paylaşan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Aldığım yüksek lisans derslerinde emeği geçen ve organik kimyaya bakış açımı genişleten değerli hocalarım Prof.Dr. Ömer ZAIM, Doç.Dr. Mesut KAÇAN Yrd. Doç. Dr. Hakan KOLANCILAR ve Yrd. Doç. Dr. Hayrettin BEYNEK'e ve çalışmalarımız sırasında yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. H. R. Ferhat KARABULUT, Doç. Dr. Hülya YAĞAR ve Araş. Gör. Dr. Hafize ÇALIŞKAN'a çok teşekkür ederim.

Bileşiklerin NMR spektrumlarının alınmasında emeği geçen uzman Tahir BAKKAL'a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında her türlü destek ve yardımları için başta Nilay TEKER olmak üzere Nur SEYHAN, Sedat Semih BAŞTÜRK, Araş. Gör. Ali Osman KARATAVUK, Betül ERKUŞ, Yusuf KARAÇAM ve diğer tüm laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bitkinin tanımlanmasında emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Mehmet AYBEKE'ye teşekkür ederim.

TÜBAP-318-2012 numaralı proje çalışmamızı destekleyen Trakya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna teşekkür ederim.

Maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, hep yanımda olan canım aileme sonsuz teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

## SayfaNo

Özet	I
Abstract	II
Önsöz	III
Simgeler	VIII
Kısaltmalar	VIII
Şekiller Dizini	X
Tablolar Dizini	XIII
BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
BÖLÜM 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2. 1. Bitkinin Tanımı ve Yayılışı	3
2. 1. 1. <i>Asteraceae</i> ( <i>Compositae</i> ) Familyasının Özellikleri	3
2. 1. 2. <i>Xanthium</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	4
2. 1. 3. <i>Xanthium strumarium</i> L. Türünün Özellikleri	4
2. 1. 4. <i>Xanthium strumarium</i> L. Türünün Biyolojik Aktivitesi	6
2. 1. 5. <i>Xanthium</i> L. Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	9
2. 2. Alzheimer Hastalığı Nedir?	11
2. 2. 1. Asetilkolin Metabolizması ve Kolinesterazlar	13
2. 2. 2. Alzheimer Hastalığının Tedavisi ve Kolinesteraz İnhibitörleri	15
2. 3. Terpenoid Bileşikleri	17
2. 3. 1. Terpenoid Bileşiklerinin Biyosentezi	18
2. 3. 2. Seskiterpenler	24
2. 3. 2. 1. Seskiterpenlerin Biyosentezi	26
2. 3. 2. 2. Seskiterpen Laktonlar	28
2. 3. 2. 3. Seskiterpen Laktonların Biyolojik Aktiviteleri	29
2. 3. 2. 4. Seskiterpenlerin Tanınmaları	30
2. 3. 3. Steroidler	31
2. 3. 3. 1. Steroidlerin Tanınmaları	32
2. 4. Fenil Propanoidler	33
2.4.1. Hidroksisinnamik Asit Türevleri	33

2. 4. 2. Fenil Propanoidlerin Biyosentezi	33
2. 5. Flavonoid Bileşikleri	35
2. 5. 1. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşu ve Kullanımları	35
2. 5. 2. Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri	36
2.5.3. Flavonoidlerin Yapı Özellikleri ve Sınıflandırılması	37
2. 5. 4. Flavonoidlerin Biyosentezi	38
2. 5. 5. Flavonoidlerin Tanınmaları	40
2. 6. Ayırma ve Saflaştırma Metodları	42
2. 6. 1. Ekstraksiyon Teknikleri	43
2. 6. 2. Kromatografik Analiz Yöntemleri	44
2. 6. 2. 1. Kağıt Kromatografisi	44
2. 6. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi	44
2. 6. 2. 3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	45
2. 6. 2. 4. Kolon Kromatografisi	45
2. 6. 2. 5. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)	47
2. 7. Yapı Açıklama Metodları	47
2. 7. 1. Ultraviyole Spektroskopisi	47
2. 7. 2. İnfrared Spektroskopisi	48
2. 7. 3. <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopisi	49
2. 7. 4. <sup>13</sup> C-NMR Spektroskopisi	49
2. 7. 5. Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi (LC-MS)	50
BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD	51
3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	51
3. 2. Kullanılan Yöntemler	52
3. 2. 1. Kolon Kromatografisi	52
3. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi	52
3. 2. 3. Enzim İnhibisyon Aktivitesi Çalışmaları	52
3. 2. 3. 1. Ellman Metodu	52
3. 2. 3. 2. Enzim İnhibisyon Deneyi Reaktifleri	53
3. 3. Belirteçler	54
3. 3. 1. Kromatografi İşlemlerinde Kullanılan Belirteçler	54
3. 3. 2. UV Spektrumu Kayma Belirteçleri	54

3. 4. Kullanılan Cihazlar	54
3. 5. Çözücüler	54
BÖLÜM 4. DENEYSEL KISIM	55
4. 1. Bitkinin Ekstre Edilmesi	55
4. 2. Kromatografik Yöntemlerle Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri	58
4. 2. 1. Dikloro metan ve Hegzan Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması	58
4. 2. 1. 1. Diklorometan ve Hegzan Ekstresinden Elde Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri	59
1 Numaralı Bileşik: 4-okso-1(5),2,11(13)-Xanthatrien-12,8-olid; Xanthatin	59
2 Numaralı Bileşik: 4-okso-1(5), 11(13) xanthatrien-12,8 olid; Tomentosin	61
3 Numaralı Bileşik: 4-okso-bedfordia Asit;	63
4 Numaralı Bileşik: 2-asetoksi,4-hidroksi 1(5), 11(13)-xanthadien-12,8-olid; Isoxanthanol	65
5 Numaralı Bileşik: Stigmasterol	67
4. 2. 2. Etilasetat Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması	68
4. 2. 2. 1. Etilasetat Ekstresinden Elde Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri	69
6 Numaralı Bileşik: Axillarin; 3,6-dimetoksi-5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon	69
7 Numaralı Bileşik: 4-hidroksi benzoik asit; <i>p</i> -hidroksi benzoik asit	71
8 Numaralı Bileşik: Sinarin; 1,5-di- <i>O</i> -kaffeoilkuinik asit	72
BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	74
5. 1. Kimyasal Bulgular	74
5. 1. 1. 1 numaralı Bileşik: 4-okso-1(5),2,11(13)-Xanthatrien-12,8-olid; Xanthatin	74
5. 1. 2. 2 Numaralı Bileşik: 4-okso-1(5), 11(13) xanthatrien-12,olid; Tomentosin	83

5. 1. 3. 3 Numaralı Bileşik: 4-okso-bedfordia Asit	89
5. 1. 4. 4 Numaralı Bileşik: 2-asetoksi,4-hidroksi 1(5), 11(13)- xanthadien-12,8 olid; Isoxanthanol	95
5.1.5. 5 Numaralı Bileşik: Stigmasterol	101
5.1.6. 6 Numaralı Bileşik: Axillarin; 3,6-dimetoksi-5,7,3',4'- tetrahidroksiflavon	104
5.1.7. 7 Numaralı Bileşik: 4-hidroksi benzoik asit; <i>p</i> -hidroksi benzoik asit	110
5.1.8. 8 Numaralı Bileşik: Sinarin; 1, 5-di- <i>O</i> -kaffeoilkuinik asit	115
5.2. Elde Edilen Bileşiklerin Asetilkolinesteraz ve Bütirikolinesteraz İnhibisyon Aktivitesi	120
6. KAYNAKLAR	121
ÖZGEÇMİŞ	129

## **SİMGELER DİZİNİ**

$[\alpha]_D$	: optik çevirme açısı
$\delta$	: kimyasal kayma
IC <sub>50</sub>	: % 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
J	: yarımlama sabiti
$\lambda$	: dalga boyu
m/z	: kütle/yük
$\nu$	: frekans
w/w	: ağırlıkça oran
v/v	: hacimce oran

## **Kısaltmalar**

ACE	: Anjiotensin dönüştürücü enzim
ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AH	: Alzheimer hastalığı
BChE	: Butirilkolinesteraz
br	: broad
ChAT	: Kolin asetiltransferaz
CoA	: Asetilkoenzim A
d	: dublet
dd	: dubletin dubleti
ddd	: dubletin dubletinin dubleti
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ELISA	: Enzym Linked Immunosorbent Assay
ESI	: Elektrosprey İyonlaştırma
e. n.	: erime noktası
FAB	: Fast Atomic Bombardment
GC	: Gaz kromatografisi
HMBC	: Heteronuclear Multi Bond Coherence
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi

Hz	: Hertz
IC <sub>50</sub>	: İnhibitör konsantrasyonu
IR	: İnfrared (Kızıl ötesi)
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometresi
M	: multiplet
MHz	: megahertz
MS	: kütle spektroskopisi
nm	: nanometre
NMDA	: N-metil-D-aspartik asit
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
ppm	: per part million
Rt	: Retensiyon zamanı
t	: triplet
TLC	: ince tabaka kromatografisi
UV	: Ultraviyole (Mor ötesi)

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2. 1. <i>Xanthium strumarium</i> L. bitkisi	5
Şekil 2. 2. <i>Xanthium strumarium</i> L. bitkisi	6
Şekil 2. 3. Xanthinin bileşiği	7
Şekil 2. 4. Kaffeoilkuinik asit türevleri	8
Şekil 2. 5. Xanthatin, Xanthinosin ve 4-okso-bedfordia asit bileşikleri	8
Şekil 2. 6. 2- Okso-4-O-asetil-diasetil xantanol bileşiği	10
Şekil 2. 7. Xanthiazinone bileşiği	10
Şekil 2. 8. 4, 5-epoksit-10H-xanthan-1 (2), 11 (13)-dien-7, 8-olid bileşiği	11
Şekil 2. 9. 4,5-dihidrovomifoliol bileşiği	11
Şekil 2. 10. Sağlıklı bireyde ve Alzheimer hastasında beyin yapısı	12
Şekil 2. 11. Asetilkolin metabolizması	14
Şekil 2. 12. Kolinesteraz inhibitörü olarak kullanılan moleküller	17
Şekil 2. 13. İzopren birimlerinin baş-kuyruk şeklinde kondenzasyonu	18
Şekil 2. 14. Mevalonik asit-5-pirofosfat oluşumu	19
Şekil 2. 15. İzopentil pirofosfat oluşumu	19
Şekil 2. 16. İzopentil pirofosfatın izomerizasyonu	19
Şekil 2. 17. Geranil pirofosfat ve geraniol oluşumu	20
Şekil 2. 18. Farnesil pirofosfat oluşumu	20
Şekil 2. 19. Geranil-geranil pirofosfat oluşumu	21
Şekil 2. 20. Terpenlerin oluşumu	23
Şekil 2. 21. Seskiterpenlerin sınıflandırılması	25
Şekil 2. 22. Seskiterpenlerin oluşumu	27
Şekil 2. 23. Seskiterpen laktonların sınıflandırılması	28
Şekil 2. 24. Agrofilin B ve 4,5-Dihidronivösün A bileşikleri	29
Şekil 2. 25. Desasetilöpaserin ve Desasetoksiöpaserin bileşikleri	29
Şekil 2. 26. Siklopentanoperhidrofenantren	31
Şekil 2. 27. Kolesterolün yapısı	32
Şekil 2. 28. Sinamik asit türevleri	33
Şekil 2. 29. Fenil propanoidlerin sentezi	34
Şekil 2. 30. Genel flavonoid iskeleti	37

Şekil 2. 31. 2-fenilbenzopiran yapısı	38
Şekil 2. 32. Flavonoidlerin oluşumu	39
Şekil 2. 33. Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası	40
Şekil 3. 1. Elmann metodu	53
Şekil 4. 1. Ana ekstrenin eldesi	56
Şekil 4. 2. Hegzan, diklorometan, etil asetat ve su fazlarının eldesi	57
Şekil 4. 3. Xanthatin	59
Şekil 4. 4. Tomentosin	61
Şekil 4. 5. 4-okso-bedfordia asit	63
Şekil 4. 6. Isoxanthanol	65
Şekil 4. 7. Stigmasterol	67
Şekil 4. 8. Axillarin	69
Şekil 4. 9. 4-hidroksibenzoik asit	71
Şekil 4. 10. Sinarin	72
Şekil 5. 1. Xanthatin bileşiğine ait HMBC korelasyonları	76
Şekil 5. 2. Xanthatin bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	77
Şekil 5. 3. Xanthatin bileşiğine ait <sup>13</sup> C-NMR (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	78
Şekil 5. 4. Xanthatin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	79
Şekil 5. 5. Xanthatin bileşiğine ait HMBC spektrumu	80
Şekil 5. 6. Xanthatin bileşiğine ait COSY spektrumu	81
Şekil 5. 7. Xanthatin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu	82
Şekil 5. 8. Tomentosin bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	85
Şekil 5. 9. Tomentosin bileşiğine ait <sup>13</sup> C-NMR (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	86
Şekil 5. 10. Tomentosin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	87
Şekil 5. 11. Tomentosin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu	88
Şekil 5. 12. 4-okso-bedfordia asit bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	91
Şekil 5. 13. 4-okso-bedfordia asit bileşiğine ait <sup>13</sup> C-NMR (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	92
Şekil 5. 14. 4-okso-bedfordia asit bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	93
Şekil 5. 15. 4-okso-bedfordia asit bileşiğine ait ESI-MS spektrumu	94

<b>Şekil 5. 16.</b> Isoxanthanol bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	97
<b>Şekil 5. 17.</b> Isoxanthanol bileşiğine ait <sup>13</sup> C-NMR (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	98
<b>Şekil 5. 18.</b> Isoxanthanol bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	99
<b>Şekil 5. 19.</b> Isoxanthanol bileşiğine ait ESI-MS spektrumu	100
<b>Şekil 5. 20.</b> Stigmasterol bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) spektrumu	102
<b>Şekil 5. 21.</b> Stigmasterol bileşiğine ait ESI-MS spektrumu	103
<b>Şekil 5. 22.</b> Axillarin bileşiğine ait HMBC korelasyonları	105
<b>Şekil 5. 23.</b> Axillarin bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) spektrumu	106
<b>Şekil 5. 24.</b> Axillarin bileşiğine ait HMQC spektrumu	107
<b>Şekil 5. 25.</b> Axillarin bileşiğine ait HMBC spektrumu	108
<b>Şekil 5. 26.</b> Axillarin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu	109
<b>Şekil 5. 27.</b> 4-hidroksi benzoik asit bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) spektrumu	111
<b>Şekil 5. 28.</b> 4-hidroksibenzoik asit bileşiğine ait <sup>13</sup> C-NMR (75 MHz, CD <sub>3</sub> OD) spektrumu	112
<b>Şekil 5. 29.</b> 4-hidroksibenzoik asit bileşiğine ait HMBC spektrumu	113
<b>Şekil 5. 30.</b> 4-hidroksibenzoik asit bileşiğine ait ESI-MS spektrumu	114
<b>Şekil 5. 31.</b> Sinarin bileşiğine ait <sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, CD <sub>3</sub> OD) spektrumu	117
<b>Şekil 5. 32.</b> Sinarin bileşiğine ait HMBC spektrumu	118
<b>Şekil 5. 33.</b> Sinarin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu	119

## TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
<b>Tablo 2. 1.</b> Alzheimer hastalığı ile normalde görülebilecek bellek bozuklukları arasındaki farklar.	13
<b>Tablo 2. 2.</b> Terpenoidlerin Sınıflandırılması	22
<b>Tablo 2. 3.</b> Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bandları	41
<b>Tablo 4. 1.</b> Xanthatin bileşiği için $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), DEPT ve $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) değerleri	60
<b>Tablo 4. 2.</b> Tomentosin bileşiği için $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), DEPT ve $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) değerleri	62
<b>Tablo 4. 3.</b> 4-okso-bedfordia asit bileşiği için $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), DEPT ve $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) değerleri	64
<b>Tablo 4. 4.</b> Isoxanthanol bileşiği için $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ), DEPT ve $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) değerleri	66
<b>Tablo 4. 5.</b> Axillarin bileşiği için $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ve $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) değerleri	70
<b>Tablo 4. 6.</b> 4-hidroksibenzoik asit bileşiği için $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ve $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	71
<b>Tablo 4. 7.</b> Sinarin bileşiği için $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ve $^{13}\text{C-NMR}$ (75 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	73
<b>Tablo 5. 1.</b> İzole edilen bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri	120

# BÖLÜM 1

## 1. GİRİŞ

Doğal bileşikler, canlı organizmalardan çeşitli fiziksel, biyolojik ve kimyasal yöntemler kullanılarak elde edilen organik maddelerdir. Temel kaynakları arasında bitkiler, deniz canlıları, mikroorganizmalar ve diğer bazı hayvansal organizmalar en önemli yeri almaktadır. Çeşitli tekniklerle bu canlıların ürettiği organik maddeler izole edilmekte, yapıları aydınlatılmakta ve farklı amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır.

Doğal bileşiklerle ilgili yapılan çalışmaların tarihçesi aslında çok eski dönemlere dayanmaktadır. Özellikle hastalıkların tedavisinde bitkilerden faydalanma 5000 yıllık bir geçmişe sahiptir. İnsanoğlu önce yakın çevresindeki yabani bitkileri tanımış, deneme yanılma yöntemi ile yiyebileceklerini ve yememesi gerekenleri, zehirli olanları belirlemiş daha sonra hastalıkları iyileştirmede yakın çevresindeki bitkilerden yararlanmaya başlamıştır.

Bilimin ilerlemesi ve eczacılık tekniklerine bağlı olarak 19. ve 20. yüzyıllarda bitkilerin tedavi edici etken maddelerinin saflaştırılması sağlanmış ve bunların çoğu sentetik yollarla elde edilmiştir. Son zamanlarda sentetik ilaçlarda meydana gelebilen ciddi yan etkilerin yol açtığı tıbbi ve ekonomik sorunlar ve sanayileşmiş ülkelerdeki çevre kirliliğinin arttırdığı ekolojik kirlilikler, tedavileri henüz mümkün olmayan pek çok hastalığın oluşturduğu tehdit, doğal olması ve yan etkilere yol açmadığı düşüncesi gibi pek çok faktöre bağlı olarak bitkilerle tedavi tekrar popüler hale gelmeye başlamıştır.

Tez çalışma konumuz olan *Xanthium* türleri kurt düşürücü, romatizmal ağrılar, sinüzit, uzun süren sıtmalar ve yüksek ateşli hastalıklar, sinir sistemini yatıştırıcı ve ağrı kesici özelliklerinden dolayı yüzyıllardır halk arasında kullanılmakta olan bir bitkidir. *Xanthium* türlerinin farklı biyolojik etkilerinden dolayı bu tür üzerinde yapılan kimyasal çalışmalar oldukça fazladır. Yapılan çalışmalarda birçok biyoaktif özellik gösteren bileşikler bulunmuş ve bu bileşiklerin antitümör, antibakteriyal, antifungal (mantar önleyici), antitussif (öksürük giderici), antiinflamatuvar (iltihap azaltıcı), antinosiseptif (ağrı kesici), hipoglisemik (kan şekeri düşürücü), antimitotik (hücre çoğalmasını durdurucu), antioksidant ve insektisit (böcek öldürücü) etkilerinin olduğu belirlenmiştir [1].

*Xanthium* bitkisi geleneksel Hint tıbbında (Ayurveda) hafıza güçlendirici olarak kullanılmaktadır. Bu nedenle bitkinin bu özelliği göz önüne alınarak *Xanthium* türlerinden biri olan *Xanthium strumarium* L. bitkisinin içerdiği bileşiklerin izole edilmeleri, yapılarının aydınlatılması, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz inhibisyon aktivitelerinin değerlendirilmesi ile Alzheimer hastalığındaki mümkün tedavi edici etkinliğinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

Yirminci yüzyılda, bilim ve teknoloji alanındaki gelişmelere paralel olarak dünya nüfusundaki artış hızlanmış, 1900 yılında 1,6 milyar olan dünya nüfusu 1950’de 2,5 milyara ulaşmıştır. Yaşam süresinin uzaması daha çok sayıda bireyin nörodejeneratif hastalıklar yönünden araştırılmasına yol açmıştır. Alzheimer hastalığı (AH) bütün demans vakalarının yarısından fazlasından sorumlu olan en yaygın nörodejeneratif hastalıktır. Ayrıca, dünya nüfusunun yaşlanmasıyla hastalığın prevalansının (yaygınlığının) daha da artacağı beklenmektedir. Bu yüzden hastalığın tedavisinde daha etkin ve de daha az yan etkiye sahip yeni ilaçların keşfedilmesi her geçen gün önem kazanmaya devam etmektedir.

## BÖLÜM 2

### 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

#### 2. 1. Bitkinin Tanımı ve Yayılışı

##### 2. 1. 1. *Asteraceae* (*Compositae*) Familyasının Özellikleri

Papatyagiller olarakta bilinen *Asteraceae* familyası ismini yıldız şeklinde çiçekleri bulunan bir cins olan *Aster* türünden alır. Bu bitkilerin çiçek durumunun kompozit yapısı, taksonomistlerin bu familyayı *Compositae* olarak da anmasına yol açmıştır. Yapraklar basit veya bileşik, stipulsuz, alternat, rozet şeklindedir. Çiçekler baş veya kapitulum durumlarındadır. Bunlarda baş birçok küçük veya florat olarak adlandırılan çiçekler; konik, küresel ya da düzleşmiş bir reseptakulum veya diskten çıkarlar. Bütün kapitulum fillari olarak adlandırılan involukral brakteler tarafından sarılmıştır. Bunlar bir veya birkaç seri halinde olabilirler veya imbrikat dizilmiş olabilirler. Braktenin ikinci bir tipi de (chaffy) bulunabilir. Bu yapı genel resaptakulum üzerinde bireysel çiçeklerin tabanında bulunur. Brakteler mevcutsa, resaptakulum chaffy'dir; mevcut değilse çıplaktır. Reseptakulum (çiçek tablası) tüyler, dikenler ve oyuklar taşıyabilir. Kapitulumda bulunan çiçekler hermafrodit veya tek eşeyli, (bitkiler monoik veya dioik), aktinomorf veya zigomorf yalnız bir periyant serisi iyi gelişmiştir. Kaliks pappus olarak adlandırılan tüysü şekilde ya da tamamen eksiktir. Korolla 5'li ve simpetaldır. Korolla tubular çiçeklerde aktinomorf, ligulat olanlarda zigomorfdur. Androkeum 5 stamenlidir, (erkekorgan) onların anterleri (başçık) birleşik, filamentleri

serbesttir (singenezik). Ginekeum 2 birleşik karpelli, tek odalı, ovaryum alt durumludur. Meyve akendir [2].

*Asteraceae* familyası bitkilerinin birçoğu bahçelerde yetiştirilen veya çiçekçilikte değerli olan süs bitkileridir. Yeryüzünde 1000'e yakın cins ve 20 000 kadar türü bulunan çiçekli bitkilerin en zengin familyalarından biridir. Yurdumuzda familyanın 133 kadar cinsi ve 1156'dan fazla türü yetişmektedir [3]. Familya üyeleri Antartika bölgesi dışında, dünyada geniş yayılış gösterir. Özellikle Akdeniz Bölgesi, Meksika ve Güney Afrika gibi tropik ve subtropik yan kurak bölgelerde, Afrika, Güney Amerika ve Avustralya'nın ormanlık bölgelerinde, kırlarda ve çalı formasyonlarında temsil edilmektedir [4].

### **2. 1. 2. *Xanthium* L. Cinsinin Genel Özellikleri**

*Xanthium* L. papatyagiller (*Asteraceae*) familyasından, Amerika ve Asya'ya özgü dikenli tohumlara sahip, halk arasında "Pıtrak dikenli" olarak bilinen otsu bitki türlerinin ortak adıdır.

Kaba, otsu, 50-120 cm kadar büyüeyebilen bir yıllık bitkilerdir. Bazı türleri dikenlidir ve yaprakları uzun, zayıf dikenlere sahiptir. Çiçekleri iki tiptedir. Biri kısa saplıdır ve yalnızca polen üretirler. Diğerleri ise, yaprakların dal ile birleştikleri yerlerde oluşur ve yalnızca tohum üretir. İpeksi tüylü tohumları havada uçuşan papatyagiller familyasının diğer üyelerinden farklı olarak pıtrak tohumları sert, dikenli, küre ya da oval şekilde, 8-20 mm uzunluğunda tek tohumludurlar. Tohumlar katı, çengelimsi dikenlerle kaplıdır [5].

*Xanthium* L. cinsinin 25 türü Amerika kökenlidir. *Xanthium spinosum* L. ve *Xanthium strumarium* L. Avrupa, Kuzey Amerika ve Brezilya, Çin, Hindistan ve Malezya'da, *Xanthium canadens* M. Kuzey Amerika ve Brezilya'da geniş bir ölçüde dağılım gösterir [6].

### **2. 1. 3. *Xanthium strumarium* L. Türünün Özellikleri**

Bitkinin ismi olgunlaşırken yeşilden sarı renge dönen, oval şekildedeki tohum keselerine bakılarak türetilmiştir. "Xanthium" sözcüğü, Antik Yunan'da sarı anlamına gelen "Xantos" sözcüğünden gelir. Strumarium sözcüğü ise "yastık benzeri şişlik" anlamındadır [7].

Bitki oldukça odunsu, dallanmış ve kuvvetli bir kazık köke sahiptir. Yapraklar, geniş alternate (almaşlı) dizilimli, açık ya da koyu yeşil renkli, 3 yada 5 loblu, çıkıntılı damarlı, uzun saplı genellikle 5-15 cm uzunluğunda ve her iki yüzeyi de pürüzlü, üçgenimsi-yumurta ya da suborbiküler şekilde ve zayıf dikenlere sahiptir. Gövde halkalı ya da çok küçük damarlı, çoğunlukla rengi alacalı mor ve yüzeyinde küçük beyaz tüyler bulunur. Çiçek başları terminal durumlu, aksiler salkımlı, beyaz ya da yeşil renklidir [8]. Çiçekler bir evciklidir ve dişi çiçekler bitkinin ana ve yan dalları üzerinde erkek çiçeğin altında bulunurlar. Bitki üzerindeki erkek ve dişi çiçeklerin yerleşimi bitkinin kendi kendine tozlaşmasını ve melezleşmesini kolaylaştırır [9]. Erkek kapıtulum, 1-serili fillarili, çiçek tablası palealı, çok çiçekli, korolla yeşilimsi, tubular, 5-dişli, filamentler monodelf ve serbest anterlidir. Dişi kapıtulum, oval ve 2-hücreli (her boşluk bir çiçek içerir) , fillariler bitişik, sertleşmiş ve içeride düz ya da çengelli diken olarak değişmiş ve korolla bulundurmaz. Meyveler oldukça büyük (yaklaşık 1-3.5 cm uzunluğunda) , obovoid şeklinde, çengeller veya iğnemi çıkıntılar içerir ve hayvanların üzerine yapışarak uzak mesafelere taşınır [10].



**Şekil 2. 1.** *Xanthium strumarium* L. bitkisi

Bitki tek yıllık olup, meyvesini sezon sonunda döker [9, 11]. Bitki çimlenip, gelişip reproduktif döneme geçtikten sonra meyveleri oluşturur. Meyveler yumurta şekilli, aken tipde ve iki odacıklı olup, iki tohum taşır [12]. Bitki, Haziran-Temmuz ayları arasında çiçeklenir ve Ağustos-Eylül aylarında da olgunlaşarak meyve verir.

Genellikle nemli ve sıcak bölgelerde, çorak arazilerde, yol kenarlarında, pirinç ve mısır tarlalarında ve nehirlerin kıyısı boyunca yabani bir ot olarak kendiliğinden çıkar [8].



Şekil 2. 2. *Xanthium strumarium* L. bitkisi

Halk arasında *Xanthium strumarium* L.'nin tıbbi bitki olarak kullanımı oldukça yaygındır. Bitkinin ekstraktı, özellikle de yaprak, kök ve meyve kısımları; lökoderma, böcek sokma ve zehirlenmeleri, epilepsi, migren, salivasyon, uzun süren sıtmalar, tüberküloz, alerjik rinit, sinüzit, kurdeşen, romatizma, romatizmal eklem ağrıları, peklilik, diyare, suçiçeği, cüzam, deride kaşıntı, bel ağrısı, bakteri ve çeşitli mantar enfeksiyonları gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmıştır [1].

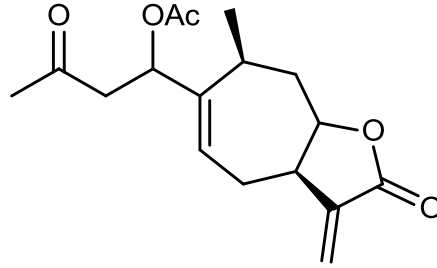
Bitki tedavi edici özelliğinin yanı sıra toksik bileşikler içerir. Fazla miktarda tüketen hayvanlarda zehirlenme ve ölümlere yol açtığı bilinmektedir. Bu yüzden otlarla beslenen hayvanlar için (sığır, domuz, at, kümes hayvanları vb.) toksik bir bitkidir [13, 14, 15].

#### 2. 1. 4. *Xanthium Strumarium* L. Türünün Biyolojik Aktivitesi

*Xanthium strumarium* L. bitkisi yapısında xanthatin, deasetil xanthumin, xanthanol, karboksi atraktilozid, kafeik asit ve türevleri, kuinik asit ve türevleri, yağ asitleri, flavonoid, C vitamini ve terpenler vb. birçok bileşik bulunur [16, 17, 18, 19].

Yapılan araştırmalar sonucunda bitkinin antibakteriyel, antitümör, antikanser, antifungal, antienflamatuvar (iltihap azaltıcı), antinosiseptif (ağrı kesici), antitussif (öksürük giderici), hipoglisemik (kan şekeri düşürücü), antimitotik( hücre çoğalmasını durdurucu), antitripanozomal (triplanozomları öldürücü), antimalaryal (sıtma ilacı), diüretik (idrar söktürücü), antioksidant, analjezik (ağrı kesici) ve insektisit (böcek öldürücü) gibi çeşitli biyolojik aktivitelerinin olduğu tespit edilmiştir [1].

Bitkide bulunan Xanthinin bileşiği antibakteriyel aktivitede rol oynar (şekil 2. 3). Alkoldeki Xanthinin çözeltisi gram-negatif bakterileri ve mantarlara karşı güçlü antibakteriyel etki gösterir. Gautam ve ekibi bitki ekstraktlarını *in vitro* antimycobacterium aktivitesi için test etmiş ve metanol-petrol eteri ekstraktının *Mycobacterium tuberculosis* ve *Mycobacterium smegmatis* bakterilerine karşı önemli ölçüde aktivite gösterdiğinin belirlemiştir [20].



**şekil 2. 3.** Xanthinin bileşiği

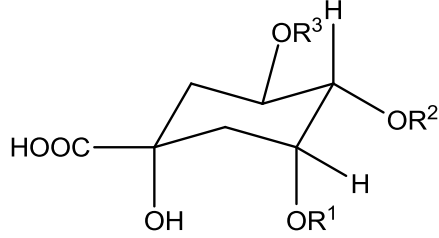
Yapraklardan izole edilmiş iki seskiterpen lakton xantholid 8-epi-xanthatin ve 8-epi-xanthatin-5 $\beta$ -epoksit'in insanlarda oluşan tümör hücrelerinin büyümesini önemli ölçüde inhibe ettiği belirlenmiştir [21, 22].

Fouche ve ekibi bitki ekstresinde *in vitro* antikanser aktivitesini inceleyerek, antikanser aktiviteye sahip olduğunu belirlemiştir [23].

Mendal ve ekibi, farelerle doza bağlı olarak yapılan çalışmada, bitkinin önemli ölçüde antitussif aktiviteye sahip olduğunu göstermiştir [24, 25].

Bitki tohumunun metanol ekstresindeki kaffeoilkuinik asit gibi fenolik bileşiklerin varlığı antinosiseptif etkiye sebep olur (şekil 2. 4.) Bir diğer çalışmada, etanol ekstraktı polaritelerine göre çözücü ile fraksiyonlarına ayrılmıştır. Farklı fraksiyonlar arasında, *n*-bütanol fraksiyonu kroton-yağı-uyarılmış kulak ödem testinde

yüksek antiinflamatuvar aktivite göstermiştir. Bitki ayrıca vazorelaksasyon (damar basıncı düşürücü) aktivitesine de sahiptir ve endotelyuma bağımlı nitrik oksit vasıtasıyla damar düz kaslarını gevşetir [26, 27, 28].



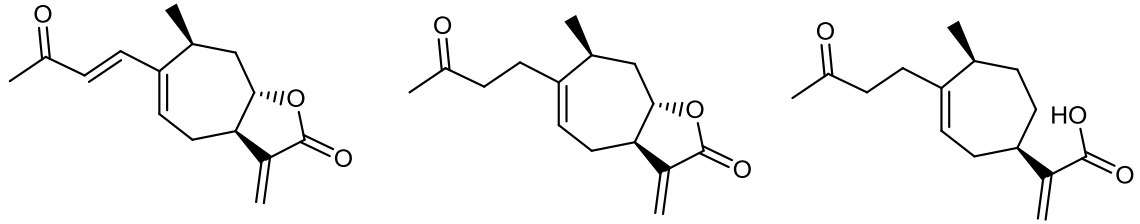
a.  $R^1, R^2, R^3$ : kaffeoil

b.  $R^1$ : H,  $R^2, R^3$ : kaffeoil

c.  $R^1, R^3$ : H,  $R^2$ : kaffeoil

**Şekil 2. 4.** Kaffeoilkuinik asit türevleri

Yoon ve ekibi bitkiden, xanthatin, xanthinosin ve 4-okso-bedfordia asit bileşiklerini izole etmişler ve bu bileşiklerin aktive edilmiş mikrogial BV-2 hücrelerindeki nitrik oksit üretiminin inhibitörü olduğunu ortaya çıkarmışlardır (Şekil 2. 5) [29, 30].



**Şekil 2. 5.** Xanthatin, Xanthinosin ve 4-okso-bedfordia asit bileşikleri

Bitkinin meyvelerinde bulunan fenolik bileşikler ve kafeik asitin antihipoglisemik etkisi araştırılmıştır. Buna göre; streptozotosin ile oluşturulmuş diyabet ve insülin direnci modellerindeki diyabetik sıçanlara kafeik asitin damardan enjeksiyonundan sonra doza bağımlı olarak plazma glikozunun azaldığı gözlemlenmiştir. Ayrıca bitkideki karboksi atraktilozid bileşiği de hipoglisemik aktiviteye sahiptir [31].

Bitkinin antimitotik etkisi memeli dokusundan izole edilen mikrotübüller kullanılarak gözlemlenmiştir. Elde edilen fraksiyonlar ayrılarak *in vitro* polimerizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Ayrılan kimyasal bileşenlerin hemen hemen hepsi tübülün polimerizasyonunda inhibisyon etkisi göstermiştir [32].

Quan ve ekibi bitkinin su ve metanol-su ekstraktının, klorokine dirençli *Plasmodium falciparum*'un çoğalmasını önleyerek antiplazmoidal aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bitkinin bu etkisinin Xanthinin bileşiğinden kaynaklandığını açıkladılar [33].

Anjiotensin dönüştürücü enzimi (ACE) için yapılan inhibitör aktivitesi çalışmalarında bitki tohumunun n-bütanolde çözünmüş ekstraktının ACE enzimine karşı inhibitör etkisi gösterdiği belirlenmiştir [1].

Bir diğer çalışma bitkinin antioksidant aktivitesinin belirlenebilmesi için bitkinin çeşitli ekstreleri (hekzan, etil asetat, n-bütanol ve su) kullanılarak yapılmıştır. Ekstrelerin lipid peroksidasyon sistemindeki antioksidant aktivitesini belirlemek için fare beyin homojenatı ve kırmızı kan hücrelerinde antihemoliz analizi kullanılmıştır. Ayrıca ekstrelerin süperoksit ve hidroksil radikallerini tutma kabiliyetini belirleyebilmek için *in vitro* çalışmalar yapılmıştır. Bütanol ekstresinde oldukça yüksek antioksidant aktivite belirlenmiş ve bu aktivitenin ekstrede bulunan tannin ve flavonoid gibi fenolik bileşiklerden ve ayrıca polifenollerden olabileceği düşünülmüştür. Çünkü bu bileşiklerin yapısındaki reaktif oksijen atomlarından dolayı antioksidant tutma kabiliyeti ve hidroksil gruplarından dolayı çift değerlikli katyonlar ile şelat yapabilme kabiliyeti vardır [34].

1980 yılında Cole ve ekibi Güney Gürcistan'daki domuz zehirlenmelerinin *Xanthium strumarium* L.' un dikenlerinin içindeki tohumlarda bulunan ve toksik bir madde olan karboksi atraktilozidden kaynaklandığını ispatladılar. Ayrıca, karboksi atraktilozid bitkide mitokondriyal ADP/ATP eşleşmesini inhibe ederek "bitki büyüme inhibitörü" özelliği gösterir.

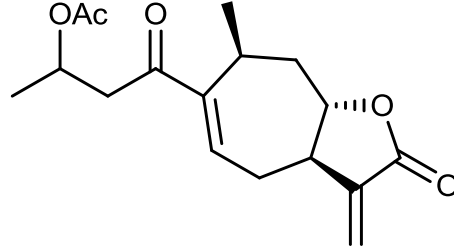
Bitkinin yaprak ve meyvelerindeki, xanthatin ve hidroquinon bileşikleri de kısmen toksik etkiye sahiptir ve böcek öldürücü olarak bilinirler [35, 36].

### **2. 1. 5. *Xanthium* L. Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar**

*Xanthium* L. türleri üzerine, özellikle *Xanthium strumarium* L. ile yapılan çeşitli biyolojik aktivite çalışmalarının dışında ayrıca farklı *Xanthium* türleri ile gerçekleştirilmiş birçok fitokimyasal çalışmalar da mevcuttur.

Genel olarak *Xanthium* türlerinde en çok bulunan bileşikler, bitkinin ikincil metabolitleri olan seskiterpen laktonlardır.

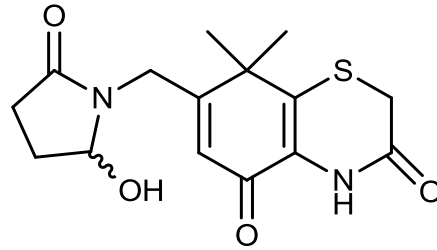
*Xanthium spinosum* L. türünün petrol eteri–metanol ekstraktının kolon kromatografisiyle fraksiyonlandırılıp, daha sonra fraksiyonların HPLC ile ayrılmasıyla yeni bir seskiterpen lakton olan 2-okso-4-*O*-asetil-diasetil xantanol (Şekil 2. 6) bileşiği elde edilmiştir [37].



**Şekil 2. 6.** 2-okso-4-*O*-asetil-diasetil xantanol bileşiği

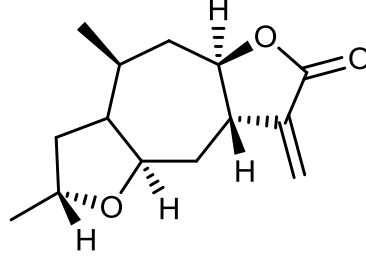
*Xanthium catharticum* türüyle yapılan bir çalışmada bitkinin toprak üstü kısmının dikloro metan ekstresi ve köklerinin metanol ekstresinin *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı zayıf antibakteriyal aktivite ve *Candida albicans*'a karşı antifungal aktivite gösterdiği belirlenmiştir [38].

*Xanthium sibiricum* türünün meyvelerinin n-bütanol ekstresinin kolon kromatografisiyle fraksiyonlandırılıp, ayrılan fraksiyonlara tekrar kolon kromatografisi uygulanmasıyla yeni bir tiazidon olan ve “Xanthiazinone” olarak adlandırılan 7-(5-hydroxy-2-pirolidinon-1-il-metil)-8,8-dimetil-4,8-dihidrobenzo [1,4] tiazin-3,5-dion bileşiği (Şekil 2. 7) elde edilmiştir [39].



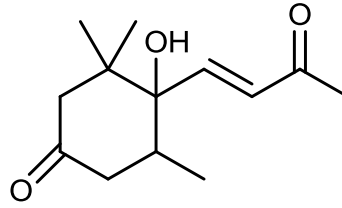
**Şekil 2. 7.** Xanthiazinone bileşiği

*Xanthium cavanillesii* türünün yapraklarının kloroform ekstraktının kolon kromatografisiyle fraksiyonlandırılıp, fraksiyonlara preparatif-TLC uygulanmasıyla yeni bir xanthanolid olan 4,5-epoksit-10H-xanthan-1(2),11(13)-dien-7,8-olid bileşiği (Şekil 2. 8) elde edilmiştir [40].



**Şekil 2. 8.** 4,5-epoksit-10H-xanthan-1(2),11(13)-dien-7,8-olid bileşiği

A. A. Ahmed *Xanthium* türleri ile yaptığı çalışmada yeni bir vomifoliol türeviden olan 4,5-dihidrovomifoliol bileşiğini (Şekil 2. 9.) izole etmiştir [41].



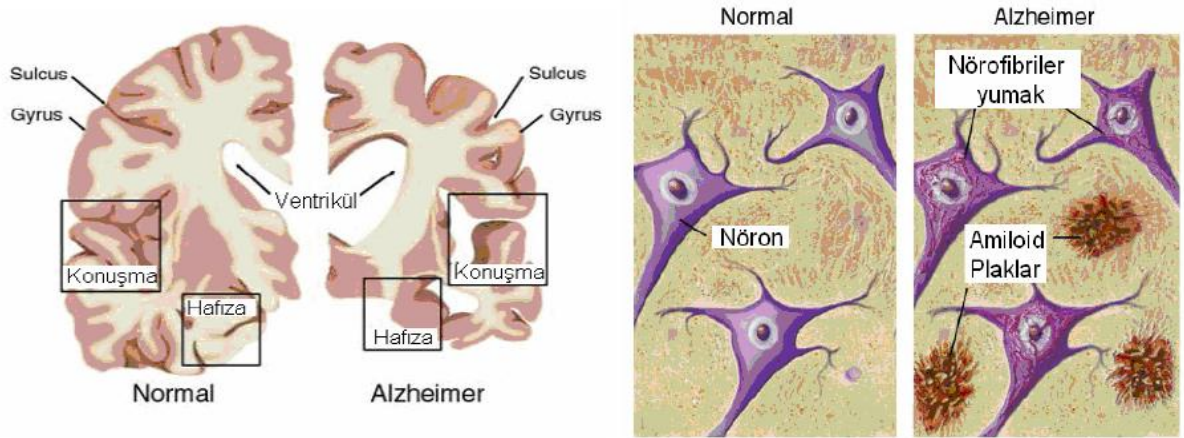
**Şekil 2. 9.** 4,5-dihidrovomifoliol bileşiği

## 2. 2. Alzheimer Hastalığı Nedir?

Alzheimer hastalığı, bellekte ve öğrenme, konuşma, akıl yürütme, yargılama, iletişim ve günlük yaşam etkinliklerini sürdürme yetilerinde kademeli olarak yıkıma ve davranışlarda değişikliklere yol açan ilerleyici bir beyin hastalığıdır. Alzheimer hastalığı, halk arasında "bunama" diye adlandırılan demansın en sık nedenidir.

Alzheimer hastalığı adını, Alman doktor Alois Alzheimer'den almıştır. Dr. Alzheimer 1906 yılında Tübingen'de düzenlenen Güneybatı Alman Psikiyatristler Konferansında ilk kez bir demans vakasının sunulduğu çok çarpıcı bir ders vermiştir. Dr. Alzheimer bu konferansta Auguste D adlı 51 yaşındaki kadın hastasını sunmuştur.

Dr. Alzheimer ilk muayene sırasında bu hastada, ilerleyici zihinsel bozukluklar (hafıza, kavrama, konuşma ve yön bulma bozukluğu), işitsel halüsinasyonlar, hezeyanlar ve belirgin davranış bozuklukları saptamıştır. Daha sonra bu hastayı 1906 yılında ölene kadar yaklaşık 5 yıl boyunca izlemiştir. Hastanın ölümünden sonra yapılan otopside beyinde anormal kümeleşmeler (günümüzde amiloid plaklar olarak adlandırılmaktadır) ve lif yumakları (nörofibriler yumaklar) saptamıştır. Bugün beyindeki bu yumaklar ve plaklar Alzheimer hastalığının beyinde oluşturduğu ana değişiklikler olarak kabul edilmektedir. Bilim insanları daha sonraları Alzheimer hastalarının beyinlerinde başka değişiklikler de saptamıştır. Beynin, bellek ve diğer zihinsel yetiler açısından büyük önem taşıyan bölgelerindeki sinir hücreleri ölmekte ve sinir hücreleri arasındaki bağlantılar bozulmaktadır. Ayrıca sinir hücreleri arasında mesajları taşıyan bazı kimyasal maddelerin düzeyleri de azalmaktadır [42].



**Şekil 2. 10.** Sağlıklı bireyde ve Alzheimer hastasında beyin yapısı

Alzheimer hastalığı günümüzde milyonlarca kişiyi etkilemektedir. Alzheimer hastalığının yaşlanmanın normal bir sonucu olmadığı bilinmesi çok önemlidir. Çünkü, hastalığı ortadan kaldıran bir tedavi olmamakla birlikte, hastalığın belirtilerini azaltabilen ve hastanın yaşam kalitesini iyileştirebilen tedaviler bulunmaktadır.

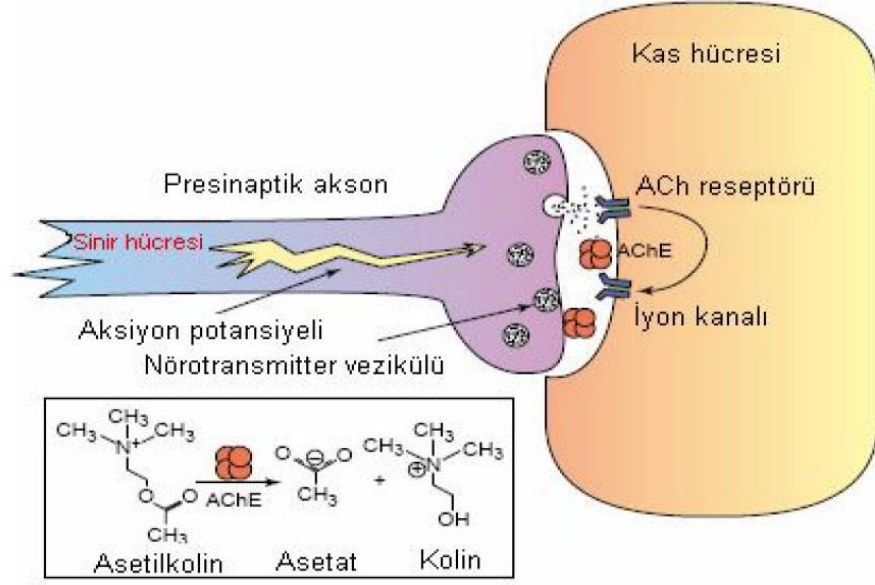
**Tablo 2. 1.** Alzheimer hastalığı ile normalde görülebilecek bellek bozuklukları arasındaki farklar.

<b>Alzheimer hastalığı</b>	<b>Normal olabilecek bellek bozuklukları</b>
Yaşanan bir olayın tümü unutulur.	Yaşanan bir olayın bir parçası unutulur.
Nadir olarak daha sonra hatırlanır	Çoğunlukla daha sonra hatırlanır.
Giderek yazılı/sözlü talimatlar izlenemez hale gelir.	Yazılı/sözlü talimatlar izlenebilir.
Giderek özbakım bozulur.	Özbakım sürdürülür.

### **2. 2. 1. Asetilkolin Metabolizması ve Kolinesterazlar**

Alzheimer hastalığı beyindeki nörotransmitterlerin azalması ile karakterizedir. Hastalık temel olarak asetilkolin azalması, kolinesteraz metabolizmasındaki değişim ve dejenerasyon ile ilişkilidir.

Asetilkolin beyin bellek ile ilgili bölgelerinde önemli bir nörotransmitterdir. ACh (asetilkolin) kolinerjik nöronların gövdesinde asetilkoenzim A (CoA)' dan gelen asetil ve kolinin kolin asetiltransferaz (ChAT) tarafından birleştirilmesi ile oluşur. Asetil koenzim A glikoliz ürünüdür. Kolinin ise besinler ve hücre membranındaki fosfolipidler dışındaki en önemli kaynağı ACh hidrolizi sonucu açığa çıkan ve yeniden asetilkolin sentezinde kullanılan kolindir. Üretilen ACh presinaptik nöronlardaki veziküllerde depolanır ve bu veziküller nörona sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaptik boşluğa döker. Sinaptik boşluğa dökülen ACh moleküllerinin çoğu postsinaptik reseptörlere bağlanır. Reseptörlere bağlanmayan ACh molekülleri AChE tarafından yıkılır. Postsinaptik nörona bağlanan ACh molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, AChE tarafından yıkılır ve açığa çıkan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona gönderilir.



**Şekil 2. 11.** Asetilkolin metabolizması

Kolinesterazlar, plazma ve diğer vücut sıvılarında da bulunmak üzere kolinerjik ve kolinerjik olmayan dokularda geniş bir dağılıma sahip enzimlerdir. Substrat özgüllüğüne, aşırı substrat varlığındaki davranışlarına ve inhibitörlere karşı duyarlılıklarına göre iki sınıfa ayrılmışlardır. AChE veya gerçek kolinesteraz (AChE: E.C.3.1.1.7, asetilkolin asetilhidrolaz) ve bütirikolinesteraz (BChE: E.C.3.1.1.8 açilkolin açilhidrolaz) spesifik olmayan kolinesteraz veya psödokolinesteraz olarak bilinir. AChE beyin ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunurken, BChE ise serum, pankreas, karaciğer ve santral sinir sisteminde bulunur.

AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim güçlü bir nükleofil rolü oynar. İkinci basamakta ise enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığıyla mükemmel bir parçalayıcı grup işlevi görür. AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır fakat asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir.

Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden olur. Daha düşük

konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak ve sonuç olarak bilgilerin aktarımı daha güç bir hal alır. Bu durumu düzeltmek için uygulanacak yöntemlerden biri sinir hücrelerine asetilkolin benzeri maddelerin verilmesidir. Asetilkolin düzeyini arttırmak için uygulanacak diğer bir yöntem ise asetilkolini yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyi artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif defisiti iyileştirebileceğini göstermiştir. Asetilkolinin sinaptik boşlukta daha uzun kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın tedavisinde en sık uygulanan stratejidir. Bu amaca yönelik olarak çoğunlukla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır [43].

### **2. 2. 2. Alzheimer Hastalığının Tedavisi ve Kolinesteraz İnhibitörleri**

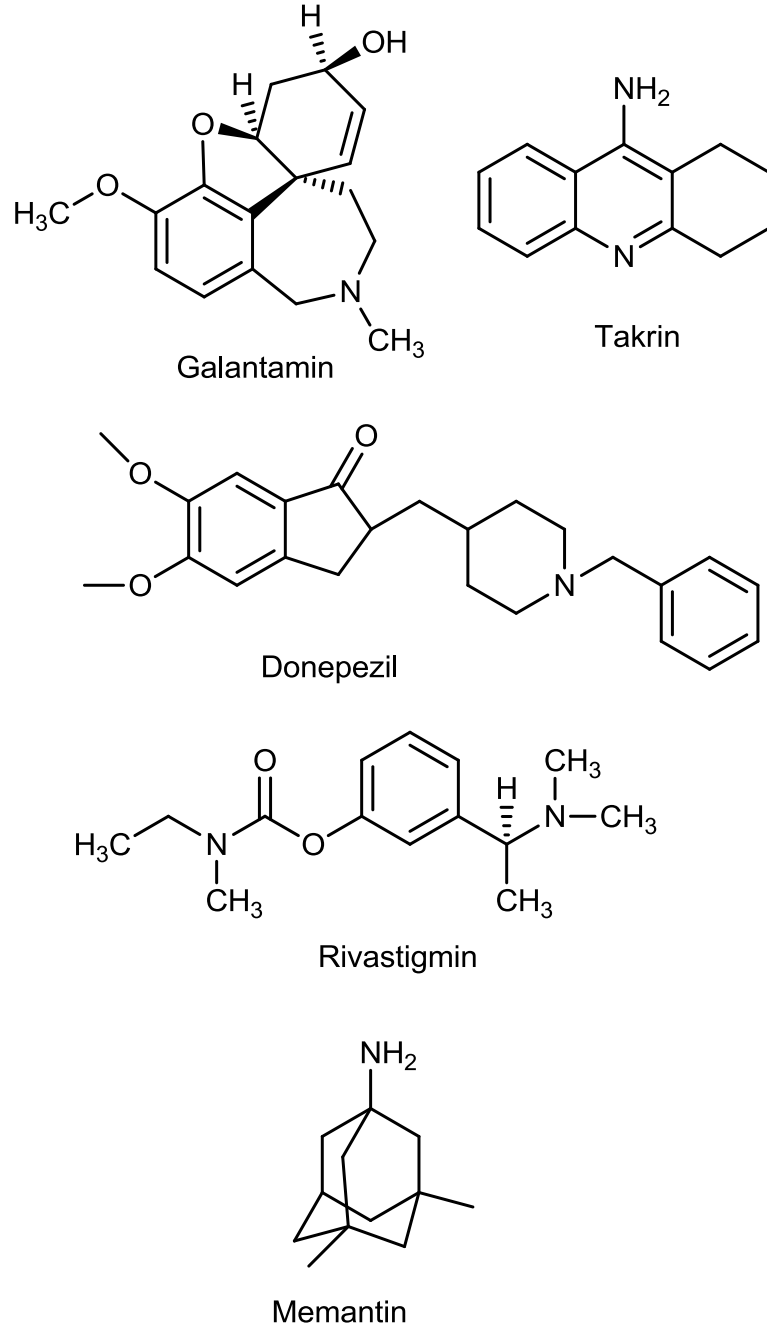
Alzheimer hastalığında kolinerjik kayıp olduğu bilgisi 1970'lerden itibaren tedavi için bir umut ışığı haline gelmiştir. Parkinson hastalığında dopamin eksikliğinin giderilmesi ile hastalığın belirtilerinin tedavi edilir hale gelmesi ile paralellik kurulmuş ve Alzheimer hastalarında da kolinerjik sistemin güçlendirilmesinin hastalığı tedavi edebileceğinden yola çıkılmıştır. Ancak zamanla araştırmalar göstermiştir ki Alzheimer hastalığının karmaşık yapısı sadece kolinerjik eksikliği değil, hem belirgin hücre kaybını, hem de diğer beyin kimyasallarının dengesinde kayda değer bir bozulmayı içermektedir.

Kolinesteraz inhibitörleri 1990'larda Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanıma sunulmuştur. Etki mekanizmaları Asetilkolin adı verilen kimyasal habercinin yıkımını azaltarak kolinerjik etkinliği arttırabilmelerine dayalıdır. Ülkemizde bu ilaçlardan üç tanesi bulunmaktadır: Donepezil ve Rivastigmine 1998'den beri, Galantamine ise 2003'den beri reçete edilebilmektedir. Dünyada ilk çıkan antikolinesteraz olan Tacrine kullanım güçlüğü ve yan etkileri nedeniyle ülkemizde kullanıma hiç sunulmamıştır ve diğer ülkelerde de artık pek kullanılmamaktadır. Bu ilaçların hepsi asetilkolinin yıkımını engellerler. Asetilkolin dikkat ve bellek süreçlerinde özellikle önemli rol oynayan bir kimyasal habercidir. Yıkımının azalmasının, beyinde kullanılabilirliği artırması ve yukarıda sözedilen zihinsel süreçleri iyileştirmesi beklenir. Yapılan klinik çalışmalarda erken ve orta evre Alzheimer

hastalarında bu ilaçların zihinsel işlevlerde kısmen iyileştirici ya da zihinsel yıkımı yavaşlatıcı etkisinin görüldüğü bildirilmiştir [44] .

Diğer bir ilaç yaklaşımı Alzheimer hastalarının beyinlerinde artmış bir madde olan glutamati azaltmaya yönelik olarak kullanılan Memantin'dir. Bu ilaç kolinesteraz inhibitörü olmayan ve Alzheimer hastalığı tedavisi için dünyada onaylanan ilk farklı mekanizmalı ilaçtır. Ülkemizde 2003 sonu piyasaya verilmiştir. Bu ilaç 1982'den beri Almanya'da farklı nörolojik hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Memantin, glutamat adı verilen kimyasal habercinin aktivitesini düzenler. Glutamat, NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri denilen hücre algılayıcılarını uyararak bilgi işleyişinde ve bellek işlevlerinde önemli rol oynadığı düşünülen, uyarıcı etkili bir maddedir. Aşırı glutamat NMDA reseptörlerini aşırı uyaracak ve bu yüklenmenin sonucunda hücreler yıkıma uğrayabilecektir (glutamat toksisitesi). Nörodejeneratif hastalıkların (sinir hücrelerinin yıkımı ile seyreden) birçoğunda glutamatın bu olası zararlı etkisi bir faktör olarak düşünülmektedir. Memantin NMDA reseptörlerini kısmen bloke ederek glutamatın aşırı uyarıcı etkisini ve bundan kaynaklanan hücre hasarını önleyebilir. Memantin'in etkisi hücre hasarını önlemeye yönelik olduğu için daha çok orta ve ileri evre Alzheimer hastalığında kullanımı önerilmektedir [44].

Klinik çalışmalar Memantin'in zihinsel işlevleri iyileştirmekten çok hastanın bakıma bağımlılık derecesini azalttığını ya da ilerleyişi yavaşlatabildiğini düşündürmektedir. Bazı klinisyenler Memantin ve kolinesteraz inhibitörlerini birlikte kullanmaktadırlar. Ancak henüz birlikte kullanımın klinik üstünlüğü kanıtlanmamıştır.



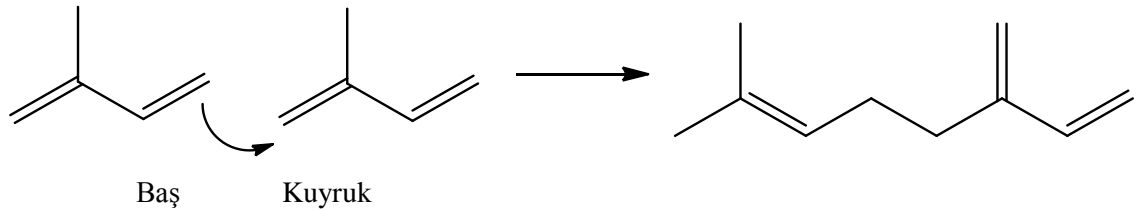
Şekil 2. 12. Kolinesteraz inhibitörü olarak kullanılan moleküller

### 2. 3. Terpenoid Bileşikleri

Bitkilerde yaygın olarak bulunan terpenoid bileşikler değişik yapısal özellikler gösteren ve biyolojik önemi olan bileşik sınıflarından birisidir. Tüm canlı organizmalarda bulduklarından dolayı, çok fazla araştırılmaktadırlar.

Terpenler bitki dokularında çoğunlukla serbest olarak, bazıları glikozitleri ya da organik asit esterleri halinde, bazen de proteinlerle birleşmiş olarak bulunmaktadır. 10 ya da 15 karbonlu olan uçucu terpenler bitkilerden su buharı destilasyonu ile, daha fazla karbonlu uçucu olmayan terpenler ise ekstraksiyon yöntemiyle izole edilmektedirler.

Terpenoid bileşiklerin ana iskeleti, beş karbonlu izopren (2-metil-1,3-butadien) birimlerinin baş-kuyruk şeklinde birleşmesiyle oluşmuştur (Şekil 2. 13). Yapısında izopren birimi bulunan bileşiklere izoprene benzeyen anlamına gelen izoprenoid veya terpenoid adı verilmektedir.



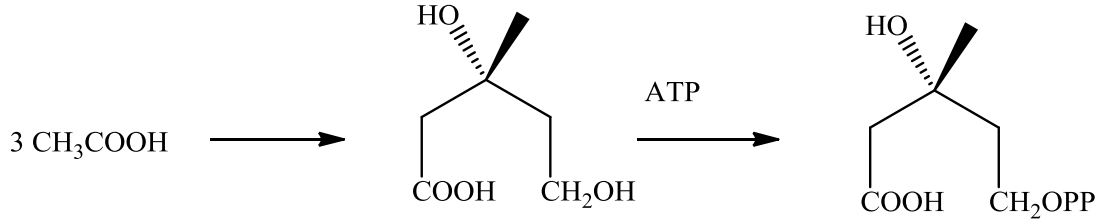
**Şekil 2. 13.** İzopren birimlerinin baş-kuyruk şeklinde kondenzasyonu

### 2. 3. 1. Terpenoid Bileşiklerinin Biyosentezi

Mevalonik asit terpenlerin biyosentezinde önemli rol oynamaktadır. 3 mol asetik asid'in kondenzasyonu ile oluşan mevalonik asit  $H_2O$  ve  $CO_2$  kaybı ile izopren birimlerini oluşturmaktadır.

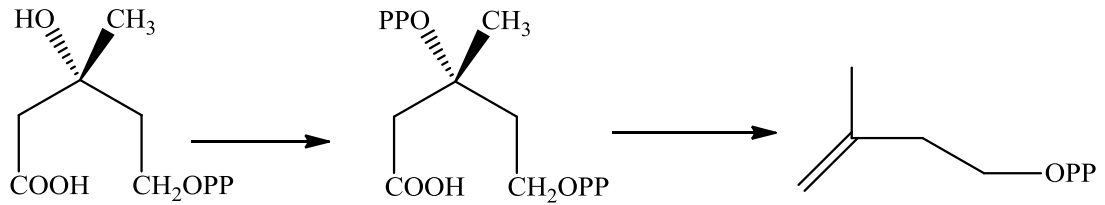
Mevalonik asit eldesinde başlangıç maddesi olan asetil koenzimA ( $CH_3COSCoA$ ) pek çok doğal bileşiğin biyosentezinde rastlanan bir madde olup şekerlerin oksidatif degradasyonundan oluşur ve sonunda  $CO_2$ 'e okside olur [45]. Asetil koenzim A'nın doğal bileşiklerin oluşumunda önemli rolü vardır. Asetil koenzim A birçok doğal bileşiğin yapı taşıdır. Mevalonik asit ise yalnız terpenlerin oluşumunda rol oynar. Mevalonik asit terpen biyosentezini diğer metabolik yollardan ayıran bir bileşiktir [46, 47]

Mevalonik asitin ATP (adenosintrifosfat) ile reaksiyonundan mevalonik asit-5-pirofosfat oluşur (Şekil 2. 14).



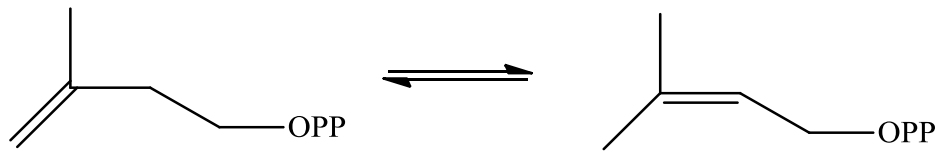
**Şekil 2. 14.** Mevalonik asit-5-pirofosfat oluşumu

Tersiyer OH grubunun fosforlanması bunu takiben dekarboksilasyonu ve dehidrasyonu ile izopentil pirofosfat oluşmaktadır (Şekil 2. 15).



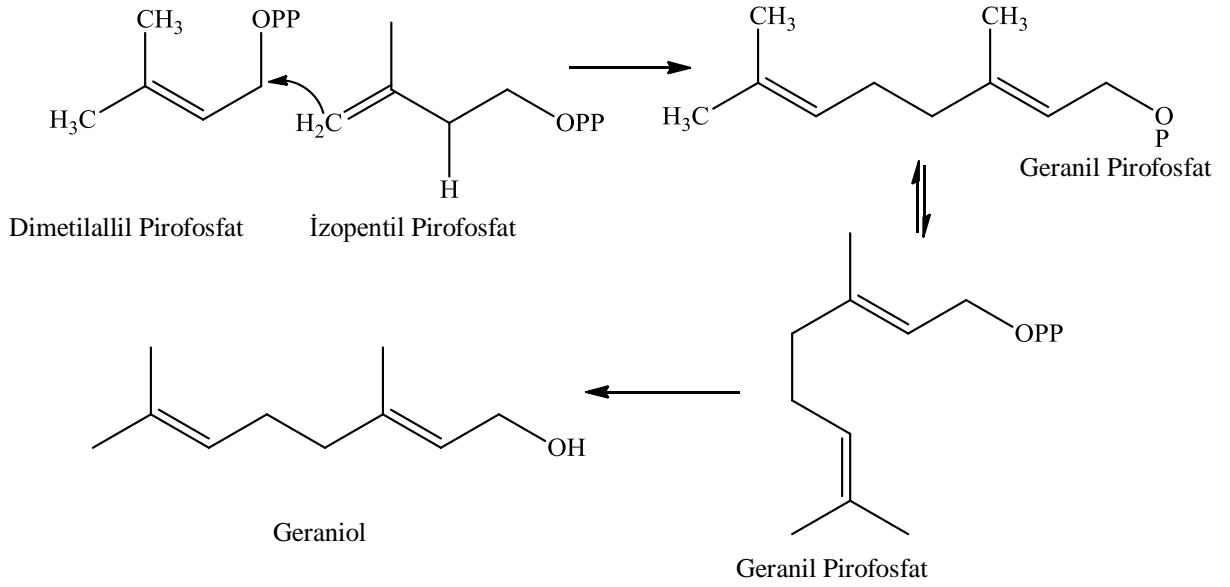
**Şekil 2. 15.** İzopentil pirofosfat oluşumu

İzopentil pirofosfat, bir enzim yardımıyla izoprenoid biyosentezini gerçekleştirmektedir. İzopentil pirofosfatın enzim ile izomerizasyonu sonucu dimetilallil esteri oluşmaktadır ( Şekil 2. 16) [47, 48].



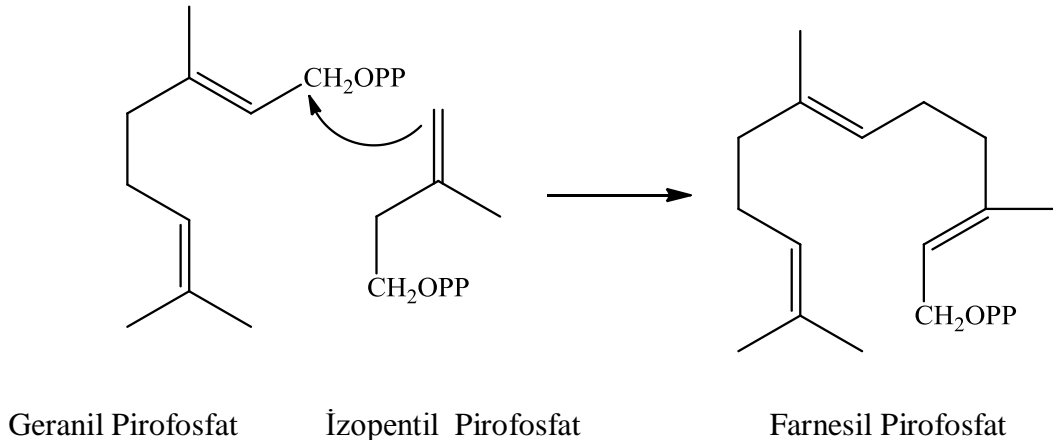
**Şekil 2. 16.** İzopentil pirofosfatın izomerizasyonu

Bu iki izomerin kondenzasyonu sonucu geranil pirofosfat, geranil pirofosfat'ın dehidrasyonu sonucuda geraniol meydana gelmektedir. Bu madde monoterpenlerin biyosentezinde rol oynamaktadır (Şekil 2. 17).



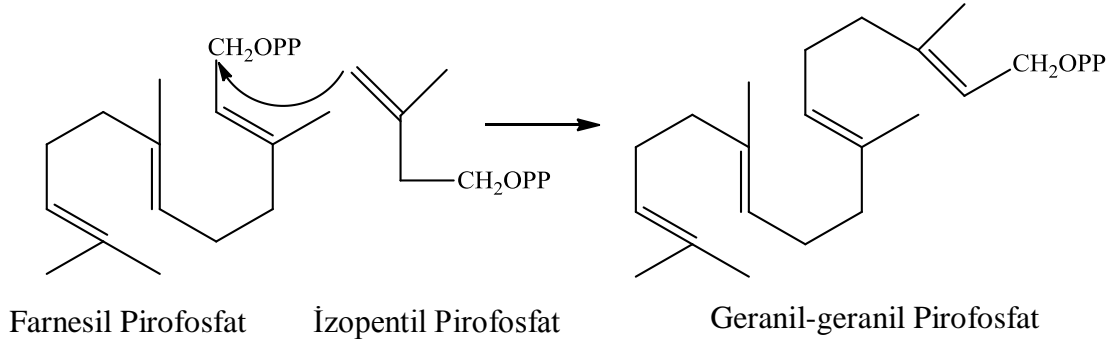
**Şekil 2. 17.** Geranil pirofosfat ve geraniol oluşumu

Geranil pirofosfat ile izopentenil pirofosfatın kondenzasyonu farnesil pirofosfatı vermektedir. Bu ürün seskiterpenlerin biyosentezinde rol oynamaktadır (Şekil 2. 18).



**Şekil 2. 18.** Farnesil pirofosfat oluşumu

Farnesil pirofosfatın tekrar izopentenil pirofosfat ile kondenzasyonu geranil-geranil pirofosfatı vermekte ve bu ürün diterpenleri oluşturmaktadır (Şekil 2. 19).



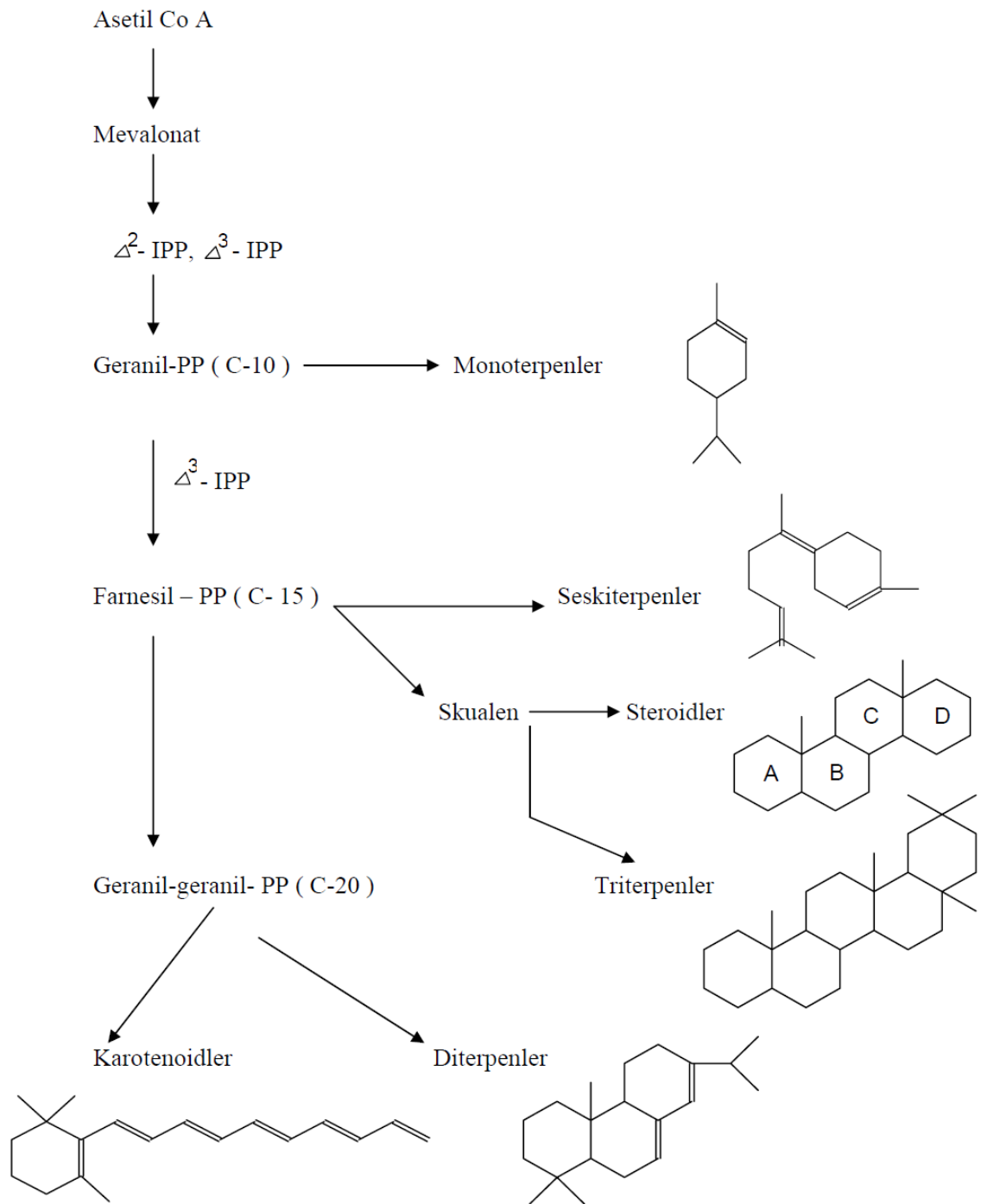
**Şekil 2. 19.** Geranyl-geranyl pirofosfat oluşumu

İzopentenil, geranyl ve farnesil pirofosfat moleküllerinin birbirleriyle değişik kondenzasyonları sonucu daha yüksek yapılı terpenoidler oluşmaktadır. Asetil koenzim A'dan başlayarak biyosentez yoluyla oluşan maddeler Şekil 2. 20'de gösterilmektedir.

İzopentenil pirofosfat moleküllerinden iki, üç, dört, beş, altı ve sekiz izopentil pirofosfat molekülünün birleşmesi sonucunda, açık zincirli ya da halkalı terpenoid bileşikler meydana gelmektedir. Terpenoidlerin ana iskeletleri 5 karbonlu izopren birimlerinden olduğundan sınıflandırılmaları izopren birimlerinin sayısına göre yapılmaktadır. "İzopren Kuralına" göre bütün terpenik bileşiklerin karbon iskeletleri izopren birimlerinin iki ya da daha fazlasının birleşmesi ile oluşmaktadır [49].

**Tablo 2. 2.** Terpenoidlerin Sınıflandırılması

<b>İzopren Sayısı</b>	<b>SINIFI</b>	<b>C SAYISI</b>
1	Hemiterpenler	5
2	Monoterpenler	10
3	Seskiterpenler	15
4	Diterpenler	20
5	Sesterterpenler	25
6	Triterpenler	30
8	Tetraterpenler (Karotenoidler)	40
n	Politerpenler	(5) n



Şekil 2. 20. Terpenlerin oluşumu

### 2. 3. 2. Seskiterpenler

Seskiterpenler 15 karbon atomu içeren terpenlerdir. Üç izopren biriminin birleşmesiyle oluşurlar ve  $C_{15}H_{24}$  moleküler formülüne sahiptirler. Terpenlerin en geniş sınıfını oluştururlar. Günümüzde 1000'den fazla seskiterpen bilinmekte ve bunlar 100 farklı karbon iskeleti taşımaktadır [50]. Monoterpenlerden daha büyük molekül ağırlığına sahiptirler ve bu yüzden yüksek kaynama noktasına sahip olup daha az uçucu özellik gösterirler. Oksidasyona eğilimleri mevcuttur fakat atmosferik oksijenle daha yavaş okside olurlar. Ayrıca kuvvetli ve belirgin kokulara sahiptirler [51].

Bu bileşikler doymamışlık içerirler ve asiklik, monosiklik, bisiklik ve trisiklik olarak 4 gruba ayrılabilirler (Şekil 2. 21) [52].

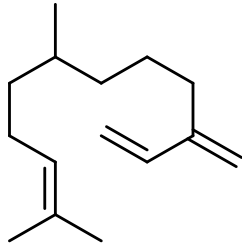
Seskiterpenler biyogenezlerine göre tekrar sınıflandırılmışlardır:

1. Bisabolan sınıfı
2. Humulan sınıfı
3. Germakran sınıfı
4. İresan sınıfı
5. Farnesen sınıfı olmayan ( orijini bilinmeyen)

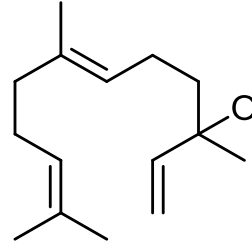
Seskiterpen yapısında siklik hidrokarbonlar, alkoller, ketonlar ya da laktonlar gibi fonksiyonel gruplar da bulunabilir.

Bitkilerden elde edilen uçucu yağlar içinde seskiterpenlere de rastlanmaktadır ve uçucu fraksiyonların farmakolojik özellikleri çoğunlukla bu bileşiklerden ileri gelmektedir [53]. Bu bileşikler aromatik bitkilerin ve gıdaların aroma, koku ve tatlarından sorumlu olan maddelerdir. Bu yüzden gıda, parfümeri ve ilaç sanayinde seskiterpenlerin yeni türevleri, geniş kullanım alanları bulabilme potansiyeline sahiptir.

### Asiklik

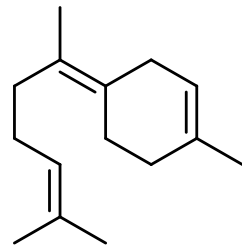


Beta-farnesen

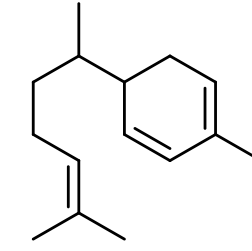


Nerolidol

### Monosiklik

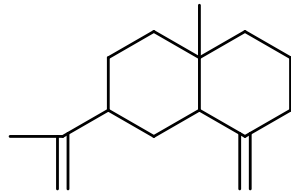


Bisabolen

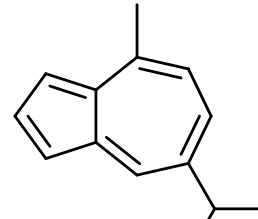


Zingiberen

### Bisiklik

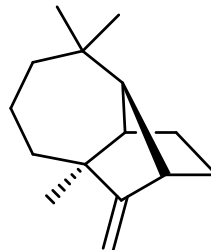


Selinen



Guaiazulen

### Trisiklik

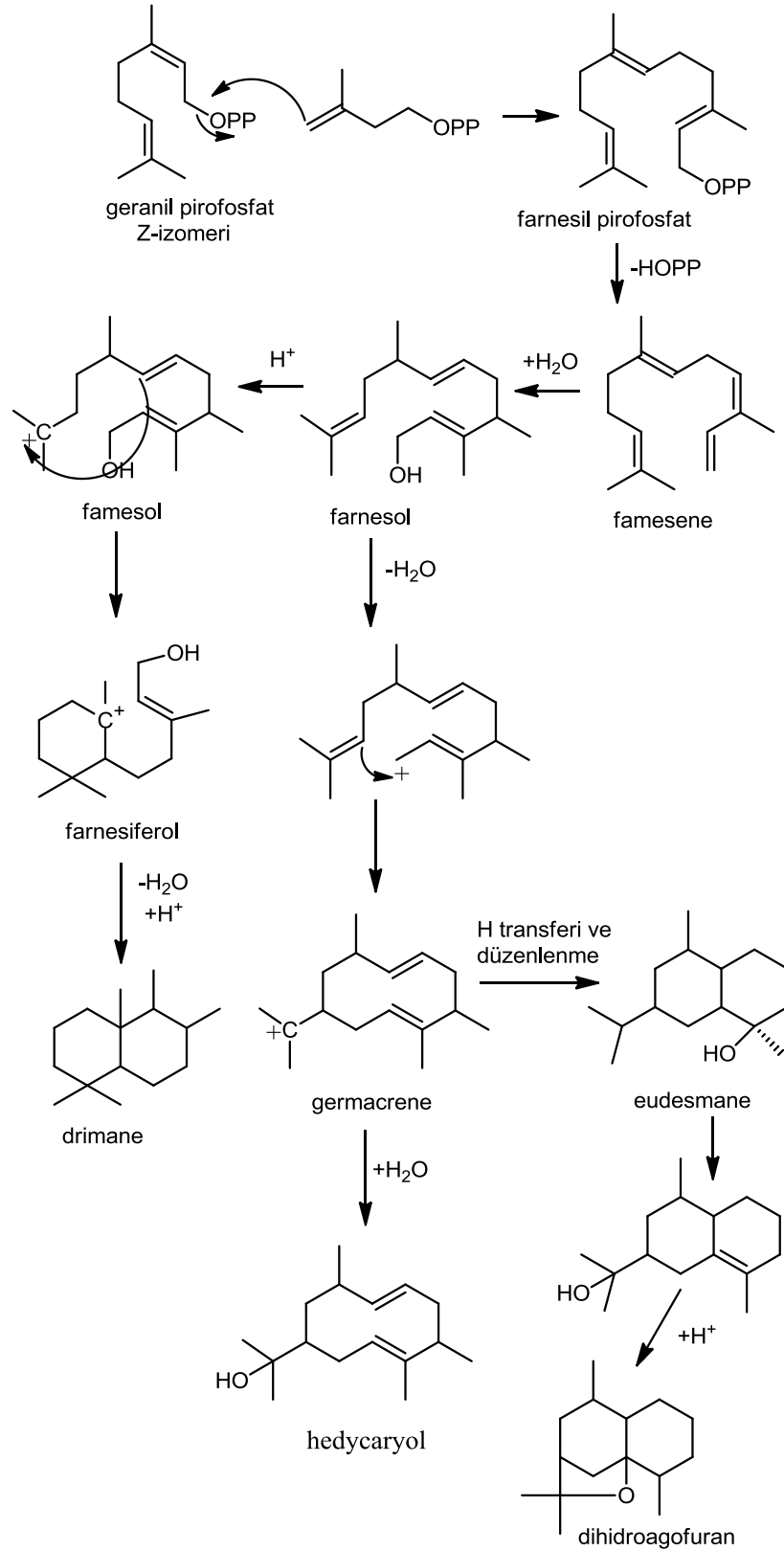


Longifolen

Şekil 2. 21. Seskiterpenlerin sınıflandırılması

### **2. 3. 2. 1. Seskiterpenlerin Biyosentezi**

Monoterpenlerin yapıtaşı olan geranil pirofosfat molekülü, izopentenil pirofosfat ile kondenzasyona uğrayarak seskiterpenleri oluşturur (Şekil 2. 22). İskelet yapılarının oluşumu sırasında farnesil pirofosfatın trans-trans ve cis-farnesil katyonlarına dönüştüğü ve farnesil difosfatın siklizasyonu ile germakradien iskeleti oluşturduğu tespit edilmiştir.

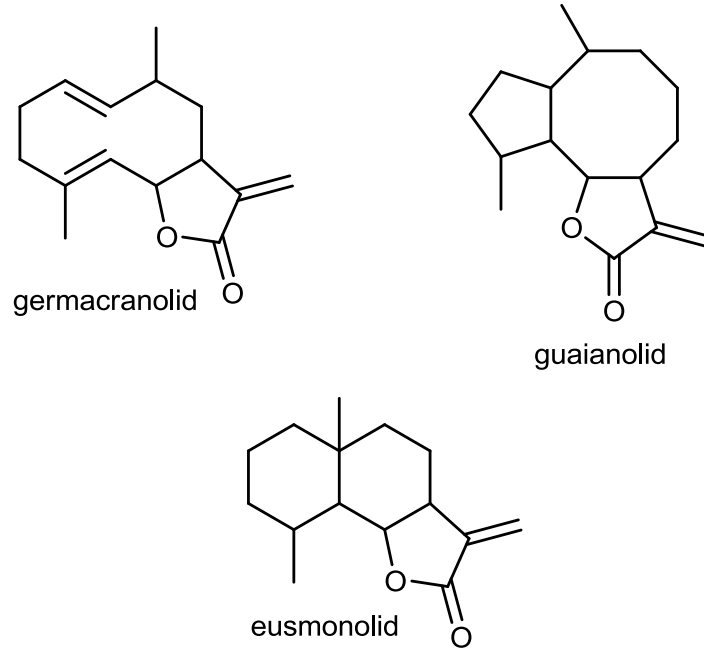


Şekil 2. 22. Seskiterpenlerin oluşumu

### 2. 3. 2. 2. Seskiterpen Laktonlar

Seskiterpen laktonlar önemli biyolojik aktiviteleri olan fakat doğada sınırlı sayıda bulunan bileşik gruplarıdır. Uçucu özellik göstermezler.  $\alpha$ -metilen  $\gamma$ -lakton yapısı içerirler. Pek çoğu ayrıca,  $\alpha,\beta$  doymamış karbonil ve epoksit grubu içermektedir. Bu fonksiyonel gruplar biyolojik nükleofiller için reaktif reseptör bölümleri olduğu için bu bileşikler için, antimikrobiyal, antitümoral aktivite gibi, çok farklı biyolojik aktiviteler rapor edilmiştir. Bu gruptan bazı bileşikler ise memeliler için oldukça toksiktir [54].

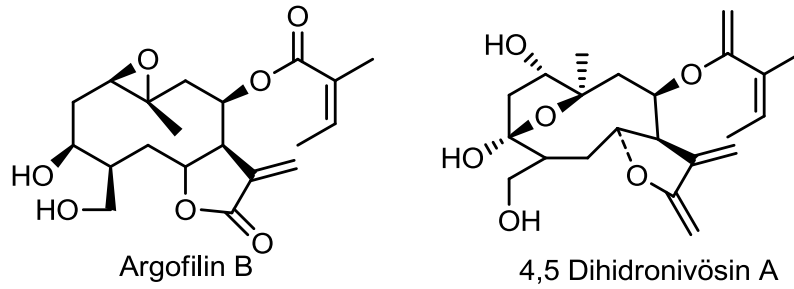
Seskiterpen laktonları içerdikleri karbosiklik iskelet yapısına göre üç grupta incelenir. On üyeli halka germacranolidler, birbirine bağlanmış iki altılı halka eusmonolidler ve yedi üyeli halkaya bağlanmış bir beşli halkadan oluşan guaianolidlerdir (Şekil 2. 23) [55].



Şekil 2. 23. Seskiterpen laktonların sınıflandırılması

### 2. 3. 2. 3. Seskiterpen Laktonların Biyolojik Aktiviteleri

Seskiterpen laktonların böceklerin bitkiyi yemesini engelleyen etkileri kanıtlanmıştır. Bunlar, bitkinin tadını ve kokusunu bozarak etki etmektedir. *H. annuus* L.'un çiçeklerinin etil asetat ekstresinden böceklerin bitkiyi yemesini engelleyici etkide, seskiterpen lakton yapısında bileşikler bulunmuştur. Bunlardan bazıları; 4,5-dihidronivösin A, argofilin B gibi bileşikler olduğu tespit edilmiştir (Şekil 2. 24) [56].

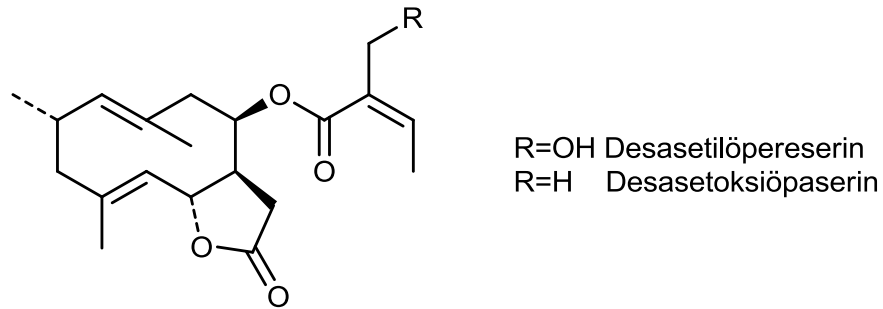


Şekil 2. 24. Agrofilin B ve 4,5-Dihidronivösin A bileşikleri

Böceklerle karşı, seskiterpen laktonlar üzerindeki toksikolojik çalışmalar, haşarelerin kontrolünde bir araç olarak gücünün araştırılmasında yoğunlaşmıştır [56].

Son zamanlarda, bu şekilde etkili 1,10-epoksi içeren argofilin tipi germakranolit seskiterpen lakton yapısında 2 bileşik de bulunmuştur. Bitkilerdeki kınkanatlı böceklerle karşı nörotoksik etki eder, yumurtaları ortadan kaldırır [56].

*Helianthus* türlerinde genellikle sitotoksik etkili seskiterpen laktonlar, özellikle furanoheliangolitler ile antilösemik etkili germakranolitler (desasetilöpereserin ve desasetoksiöpereserin gibi) izole edilmiştir (Şekil 2. 25) [57].



Şekil 2. 25. Desasetilöpereserin ve Desasetoksiöpereserin bileşikleri

Bazı bitkilerde bulunan seskiterpen laktonlar alerjik kaynaklı dermatitten sorumludur. Bu bileşiklerin proteinlerle birleserek oluşturdıkları alerjen, lenfositlerin hassasiyetine neden olur. Bu tepkimeye ise  $\alpha$ -metilen  $\gamma$ -lakton yapısı sebep olur.

Şu anda seskiterpenoid laktonların gerçek bir terapötik kullanılışları yoktur. Buna karşın birkaç drog halk tıbbında ve fitoterapide kullanılmaktadır. Birçok lakton özellikle gram(+) bakterilere karşı antibakteriyel ajandır. Mesela andız otu laktonu tonik ve haricen ise yara ve ülser tedavisinde kullanılmıştır. Bunların dışında antiparazit, antihelmintik, sitotoksik etkili bileşikler de vardır. Fakat toksisitelerinden dolayı klinik denemelere alınmamışlardır.

#### **2. 3. 2. 4. Seskiterpenlerin Tanınmaları**

Seskiterpenler kolon kromatografisi, ince tabaka kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi gibi kromatografik yöntemlerle ayrılarak elde edilirler. Seskiterpenler genellikle kristal yapıdadırlar.

Seskiterpenlerin tanınmasında spektroskopik yöntemlerden yararlanılır.

Seskiterpenlerin iskeletleri uygun kromofor bölge bulundurmaz ve hiçbir karakteristik UV absorpsiyonu içermez. Eğer seskiterpen molekülünde bir konjuge çift bağ yada yan zincirde aromatik ester bulunursa, UV absorpsiyonu gösterebilir. UV'de izole çifte bağ halka içinde ise 220 nm civarında, halka dışında ise 205-210 nm civarında bir maksimum verir. Konjugasyona bağlı olarak bu bant uzun dalga boyuna kayabilir.

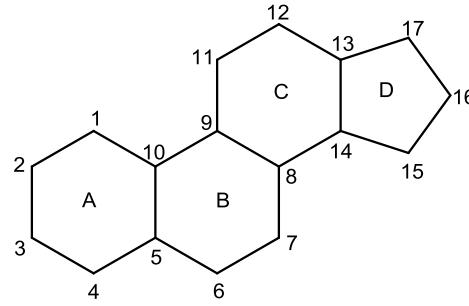
IR'de -OH grupları  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$ 'de, -C=O grubu  $1710\text{ cm}^{-1}$  dolayında çıkarlar.

$^1\text{H-NMR}$  spetrumunda 0.00-2.00 ppm arasında metil pikleri; moleküler çevresine bağlı olarak 1.5-4.00 ppm arasında metilen pikleri; 4.50-6.50 ppm arasında doymamışlık pikleri görülmektedir.

Benzer şekilde tüm kimyasal kayma sinyalleri her karbon atomunun kimyasal çevresinden ayırt edilebilir. Spektrum  $^{13}\text{C-NMR}$ 'dan dolayı 0 ila 140 arasında geniş bir biçimle gösterilir [58].

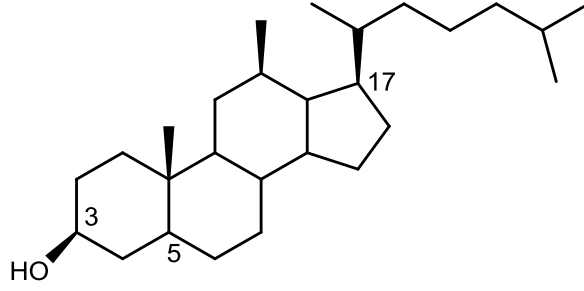
### 2. 3. 3. Steroidler

Bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Steroid grubunun içinde, steroller, vitamin D, mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları, kansinojik hidrokarbonlar, bazı saponinler yer almaktadır. Steroidlerin temel yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir ve genelde 29 karbon atomu ya da 27 karbon atomundan oluşur (Şekil 2. 26). Bu halka, dört halkanın birleşmesi ile oluşmuştur. Halka sistemi A halkasından başlayarak numara ve harflerle işaretlenir. Substitüentler genellikle C-3, C-7, C-12'de bulunur.



Şekil 2. 26. Siklopentanoperhidrofenantren

Bitkisel steroidler genellikle C-3'de hidroksil, C-5'de çift bağ ve C-17'de yan zincir taşırlar. Bu bileşiklerde halka üyesi atomlar iki paralel düzlem içerisinde bulunurlar ve bunlara bağlı gruplar arasında da, aynen sikloheksan türevlerinde olduğu gibi, *cis* ve *trans* durumlar meydana çıkmaktadır. Bu durumun belirlenmesi, C-10'daki CH<sub>3</sub> grubu ile C-3'deki hidroksil grubuna bakılarak yapılır. C-3'teki hidroksil grubu, C-10'daki metil grubu ile dik açı yaparsa *cis* yapı mevcuttur ve bu konuma  $\beta$  şekli denir. Eğer C-10'daki metil ve C-3'teki hidroksil grubu paralel olursa *trans* yapı ya da  $\alpha$  şekli söz konusudur. Yan zincirin konfigürasyonu steroidlerde genellikle  $\beta$  şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle *trans* bağlanmıştır [59]. Çok iyi bilinen bir steroid olan kolesterolün formülü aşağıda verilmektedir (Şekil 2. 27).



Şekil 2. 27. Kolesterolün yapısı

### 2. 3. 3. 1. Steroidlerin Tanınmaları

Steroidler, bitkiden değişik polaritede çözücülerle ekstrakte edilirler. Genellikle polar olmayan çözücüler kullanılır. Ancak steroid molekülünün hidroksil ve karboksil gibi gruplar içermesi veya steroid molekülüne glikozit bağlı olması durumunda alkol, etilasetat gibi daha polar çözücüler kullanılır.

Steroidlerin yapıları spektroskopik ve kimyasal yöntemlerle tayin edilmektedir. UV spektroskopisi steroidler için fazla bilgi vermez. Steroidlerin çifte bağları genel olarak izole durumdadır ve 200-210 nm de kuvvetli bir uç absorpsiyon gösterirler [60].

IR spektroskopisi, steroidlerdeki süstitüentlerin açıklanmasında önemli rol oynar, hidroksil grupları 3000-3500  $\text{cm}^{-1}$  de, alifatik C-H bağları 2850-2900  $\text{cm}^{-1}$ 'de görülürler.

$^1\text{H}$  NMR spektrumunda, metil pikleri 0.00-1.5 ppm arasında, metilen bantları 1.0-2.5 ppm arasında çıkar. Steroidlerde metilen pikleri çok karmaşık ve yaygındırlar. Bu nedenle metilen bantları yerine metilen zarfı denilmektedir. Hidroksile komşu hidrojenler 3.5-4.5 ppm'de ve doymamışlık bantları 5-6 ppm'de görülürler.

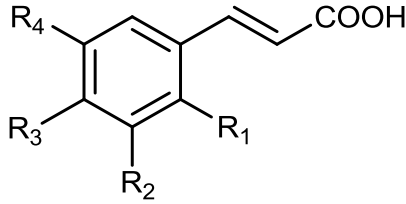
Kütle spektrumunda en önemli bantlar,  $\text{M}^+$ ,  $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ , hidroksil grubu varsa  $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}]^+$  parçalanma ürünleridir. Diğer parçalanma ürünleri ise,  $[\text{M}-\text{D halkası}+\text{yan zincir}]$ ,  $[\text{M}-\text{D halkası}+\text{H}]^+$ ,  $[\text{M}-\text{D halkası}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$  bantlarıdır [61].

## 2. 4. Fenil Propanoidler

Fenil propanoidler fenolik bir çekirdeğe bağlı üç karbonlu bir yan zincir içerirler. En sık rastlanan türleri hidroksisinnamik asit türevleri, kumarinler ve kromonlardır.

### 2.4.1. Hidroksisinnamik Asit Türevleri

En yaygın dört hidroksisinnamik asit Şekil 2. 28'de gösterilmiştir. Bunlar *p*-kumaroik (b) kafeik (c), ferulik (d) ve sinapik (f) asitlerdir. Diğer daha az bulunan hidroksisinnamik asitler, (*Z*) izomerinin siklizasyonu ile kumarin veren *o*-kumarik (a) ve metilotik ve floretik asitlerdir. Metilotik ve floretik asitler, sırası ile *o*-kumarik ve *p*-kumarik asidin,  $\alpha$ ,  $\beta$ -dihidro türevleridir. En az bulunan da ferulik asittir (e). [62]



**a**, R<sub>1</sub>= OH, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>= H

**b**, R<sub>3</sub>= OH, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>= H

**c**, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>= OH, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>=H

**d**, R<sub>2</sub>=OMe, R<sub>3</sub>=OH, R<sub>1</sub>, R<sub>4</sub>=H

**e**, R<sub>2</sub>=OMe, R<sub>1</sub>=OH, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>=H

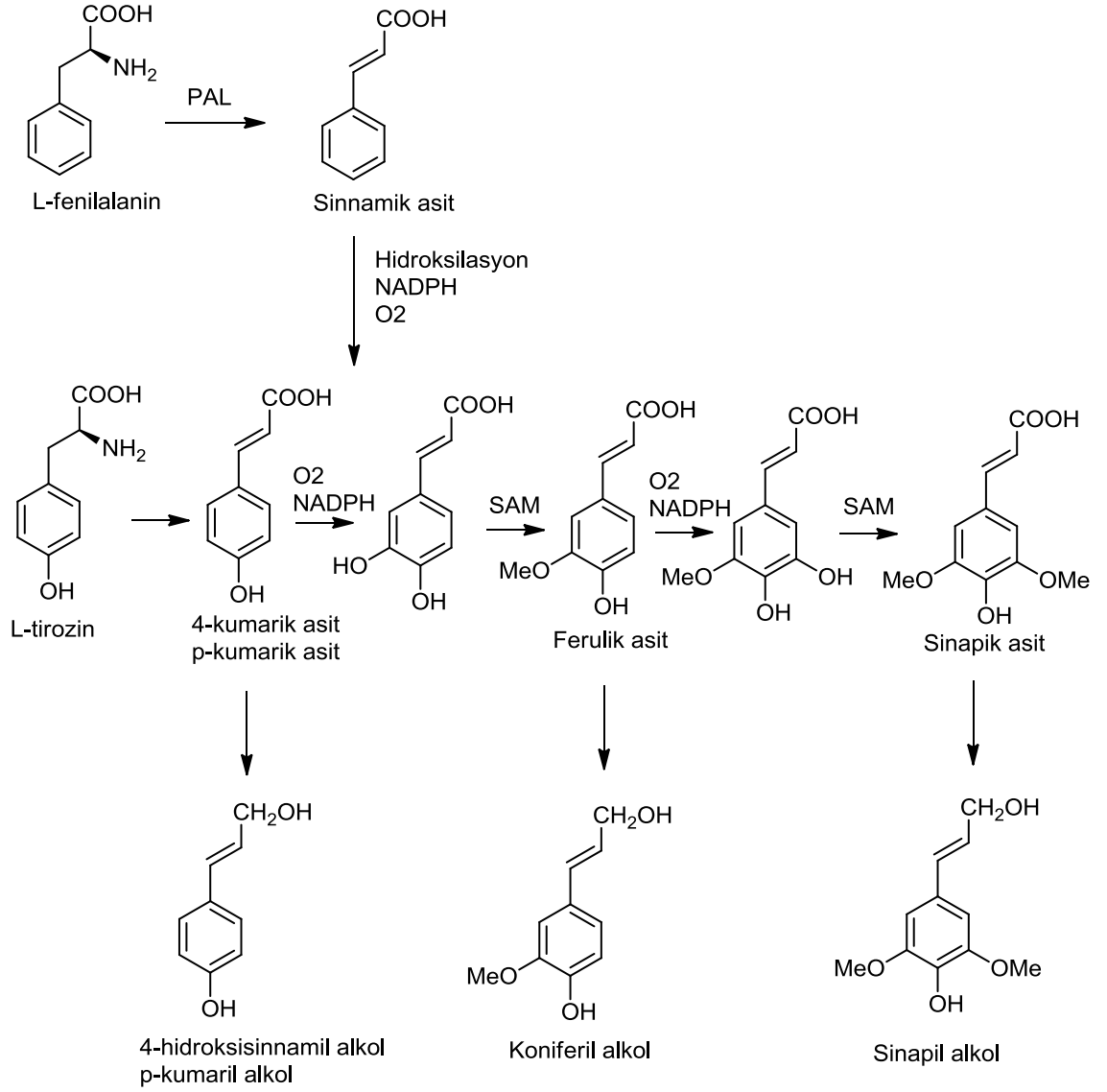
**f**, R<sub>3</sub>= OH, R<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>= OMe, R<sub>1</sub>=H

Şekil 2. 28. Sınnamik asit türevleri

### 2. 4. 2. Fenil Propanoidlerin Biyosentezi

L-fenil alanin ve L-tirozin pek çok doğal üründe olduğu gibi sınnamik asit türevlerinin de yapı taşlarıdır. Biyosentezde ilk basamak (*E*)-sınnamik asidi vermek üzere yan zincirden amonyak grubunun elimine olmasıdır. Fenilalanin amonyağın ayrılması ile sınnamik asidi verirken, tirozin 4-kumarik asiti (*p*-kumarik asit) verir. Hemen hemen tüm bitkilerde fenil alanini deamine edecek fenilalanin amonyak liyaz (PAL) enzimi mevcuttur. Oysa tirozin için aynı dönüşüm tirozin amonyak liyaz enziminin sınırlı olması ve deaminasyonu gerçekleştirememesinden ötürü pek mümkün değildir. Bu yüzden 4-kumarik asit sınnamik asidin doğrudan hidroksilasyonu ile

oluşur. Diğer sinnamik asitler, ardı ardına devam eden hidroksilasyon ve metilasyon reaksiyonları sonucu oluşur. (Şekil 2. 29) [63].



**Şekil 2. 29.** Fenil propanoidlerin sentezi

## 2. 5. Flavonoid Bileşikleri

### 2. 5. 1. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşu ve Kullanımları

Flavonoidler en yüksek yapılı bitkilerden basit yapılı mantarlara kadar hemen her bitki türünde yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Bakteri ve yosunların büyük bir kısmında bulunmazlar. Böylece flavonoidler doğal olarak bulunan fenollerin en büyük gruplarından birini oluştururlar. Ayrıca sahip oldukları biyolojik etkinliklerinden dolayı flavonoidler bitkilerin sekonder metabolitleri arasında en önemli bileşik sınıflarından birisini oluştururlar.

Flavonoidler doğada bir milyar yıldan beri bulunmaktadırlar [64]. Bu uzun zaman sürecinde bu bileşiklerin gelişen organizmalarla karşılıklı etkileşimde buldukları düşünülmektedir.

Limon kabuğundan 1936 yılında elde edilen flavon bileşiklerinin, P-vitamini adı altında, kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması, flavonoidlere verilen önemi arttırmıştır. Bu nedenle flavonoidlere karşı ilgi 1940'lardan itibaren artmaya başlamıştır [65]. 1970'li yıllarda flavonoidlerle yapılan çalışmaların boyutu daha da genişlemiş ve bu araştırmaların sonucu olarak bugün bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.

Bitkilerde rastlanan bu bileşikler, önceleri çiçeklerin sarı, kırmızı, turuncu, lacivert ve benzeri renklerinden sorumlu olan pigmentler olarak biliniyorlardı. Flavonoidlere genellikle bitkilerin çiçek, yaprak, gövde, kök, kabuk, dal, meyve gibi tüm organlarında rastlanmaktadır.

Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışından koruma gibi bazı önemli özelliklere sahiptirler [66, 67]. Bunlardan başka flavonoidler, bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki ederler. Ayrıca solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunma fonksiyonlarına sahiptirler [68]. Son araştırmalar flavonoidlerin bitkilerde azotun tutulmasını düzenleyen bakteriyel genlerin aktifleştirilmesinde yer aldıklarını da göstermiştir. Bu ise, flavonoidlerle genler arasında belirgin bir ilişki olduğunu düşündürmektedir [69, 70].

Son yıllarda flavonoidlerin endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılması amacıyla yürütülen araştırmaların sayısı artmaktadır. Bu bileşiklerin antioksidant özellikleri,

çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri, metaller ile tepkimede bulunma ve tabaklama maddelerinin (tanenlerin) bileşenine katılmalarından dolayı, besin, tekstil, deri, metalürji, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanılma olasılıkları artmaktadır. Bazı flavonoidler UV ışıklardan koruma özelliklerine sahip olmaları nedeni ile kozmetik ürünlerde, özellikle kremlerde önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Metal iyonları ile reaksiyon verme kapasitesine sahip olduklarından analitik amaçla uranyum, zirkonyum, titan ve diğer metallerin tayininde kullanılabilirler.

Flavonoidlerin askorbik asitle birlikte et ve et ürünlerinin proteolizini hızlandırdığı açıklanmıştır. Bu nedenle flavonoidlerin et ve konserve endüstrisinde de kullanımı söz konusudur [71].

Günümüzde bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid özellikli bileşik bilinmekte ve flavonoid içeriği bakımından henüz incelenmemiş on binlerce bitki türü bulunmaktadır.

### **2. 5. 2. Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri**

Flavonoidlerin ilk olarak belirlenen biyolojik özelliği kılcal damar duvarlarına olumlu etkileridir [65]. Bu bileşiklerin kılcal damar sistemine olumlu etkisi, genellikle kan sızdırmanın önlenmesinde, kırılabilirlik ve geçirgenliğin ortadan kalkmasında kendini göstermiştir [72]. Flavonoidlerden flavon ve flavonoller, flavanonlar [73], katekinler [74] ve lökoantosiyanidinlerin [75] kılcal damarların tedavisinde etkili oldukları tespit edilmiştir. Borkowski flavonoidlerin kan damarlarına olumlu etkisinin, spazmolitik özelliklerinden ileri geldiğini göstermiştir [76].

Flavonoidlerin kanın bileşenleri üzerine etkisi de açıklanmıştır. Örneğin, *Hedusarum* L. türünün toplam flavonoidlerinin eritropezi (eritrosit oluşumu) teşvik ettiği ve kanda lökositlerin (akyuvarlar) miktarını artırdığı açıklanmıştır [77]. 3-metilflavonoidlerin kanın formülü elementlerine (bu elementler kan hücrelerinin agregasyon ve sedimentasyonunu önlerler) etki gösterdikleri de belirtilmiştir [78]. Flavonoidler kan damarlarına etkileri ile birlikte, zayıf kardiyotonik (kalp kuvvetlendirici) maddeler olarak da bilinirler. Bunlar kalp ritimlerinin kısılmasını sınırlama ve amplitüdünü artırma özelliği gösterirler. Başka bir araştırma sonucuna göre kersetin, rutin ve bazı flavonoller zayıf (hipodinamik) kalbi kuvvetlendirme, nabızı

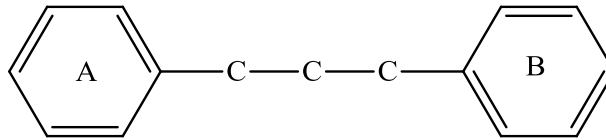
normalleştirme özelliğine sahiptirler [72]. Bazı flavonoidlerin zayıf hipotansif etki gösterdikleri de açıklanmıştır.

Flavonoidlerin en önemli özelliklerinden biri de, karaciğer fonksiyonuna olumlu etkileridir [79]. Flavonoidlerin safra salgılamasını hızlandırdıkları, karaciğerin barbiturat ve arsenik [80] gibi bileşiklere karşı detoksikasyonuna etki ettikleri açıklanmıştır. Flavonoidlerin detoksikasyon etkisinin nedenlerinden birinin, idrar sökücü özellikleri olduğu gösterilmiştir [76]. Bazı flavonoidler bağırsakların çalışmasını olumlu bir şekilde etkileyerek, hazım sürecine olumlu etki gösterirler.

Flavonoidlerin pratik kullanım amacı ile incelenmeleri 1970'li yıllarda daha da hızlanmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu flavonoidlerin çok yönlü biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidant özelliğe [81, 82], antimikrobiyal [83], antiülserojenik, antiviral, hepatoprotektif, hipolidemik [84, 85, 86] ve iltihaba karşı etkiye [87] sahip oldukları açıklanmıştır.

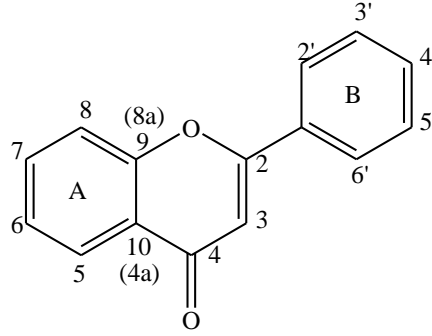
### 2. 5. 3. Flavonoidlerin Yapı Özellikleri ve Sınıflandırılması

Flavonoidlerin karbon iskeleti iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşur ve 15 karbon atomu içerir. Bu 15 karbon atomu C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> konfigürasyonunda düzenlenmiştir. (Şekil 2. 30). Üç karbonlu propan zincirinin üçüncü bir halka oluşturması, farklı şekiller alması veya fenil gruplarının farklı pozisyonlarda bağlanması sonucu flavonoidlerin farklı sınıfları oluşur.



Şekil 2. 30. Genel flavonoid iskeleti

Flavonoidler kimyasal bakımdan 2-fenilbenzopiran yapısı gösterirler [88]. (Şekil 2. 31).



Şekil 2. 31. 2-fenilbenzopiran yapısı

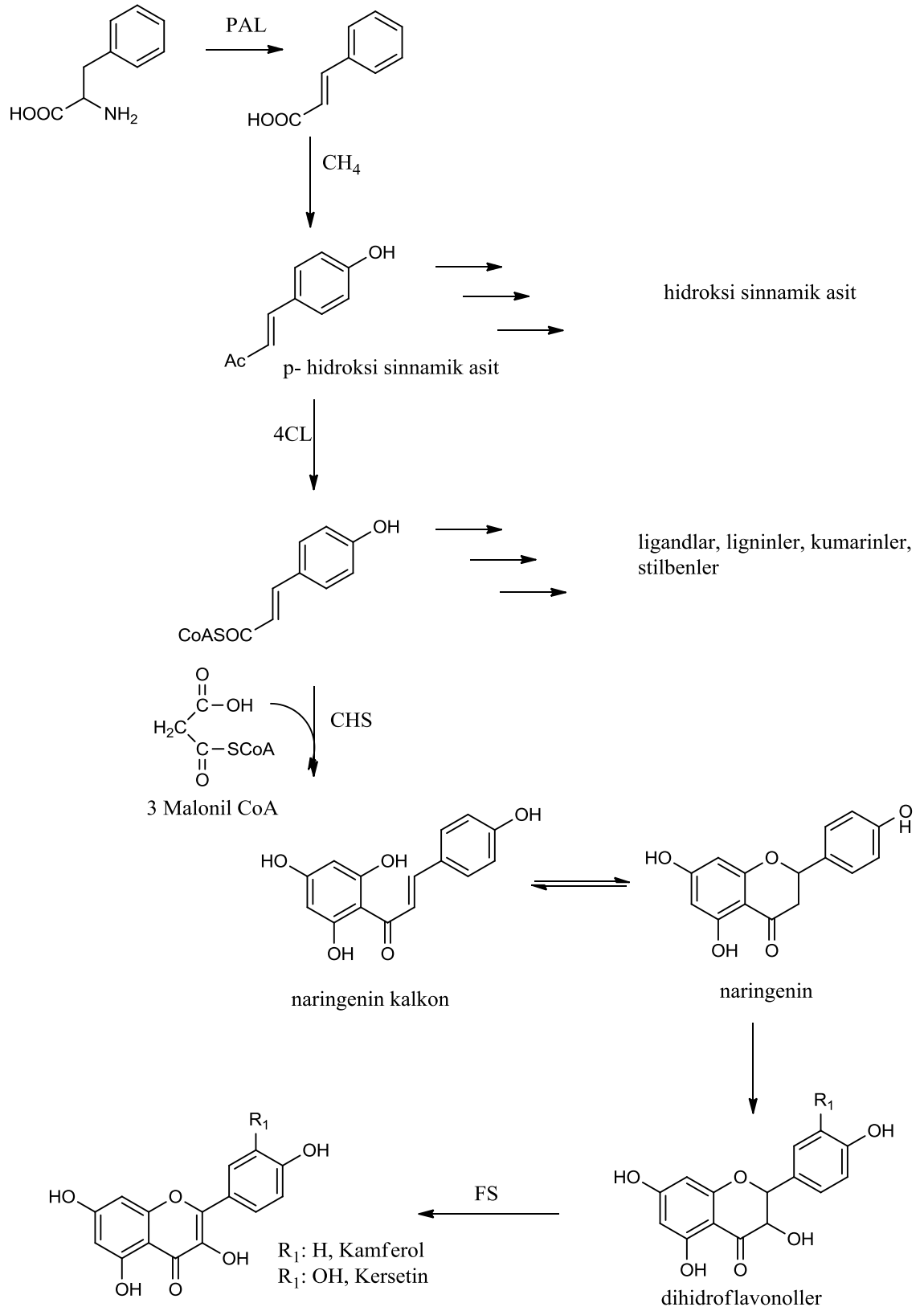
Flavon yapılarındaki aromatik halkalar **A** ve **B**, heterohalka ise **C** ile gösterilir. **A** ve **C** halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. **B** halkasındaki atomlar ise (') rakamlarla numaralandırılır. Bazı yazarlar flavonoid yapısındaki C-9 ve C-10 atomlarını C-8a ve C-4a olarak da göstermektedirler.

#### 2. 5. 4. Flavonoidlerin Biyosentezi

Flavonoidler bitkilerin sekonder metabolitlerindendirler. Bitkilerin fotosentez yoluyla oluşturdukları ve hayati ihtiyaçlarını karşıladıkları karbonhidrat, aminoasitler gibi primer metabolitlerden türerler (Şekil 2. 32) [89].

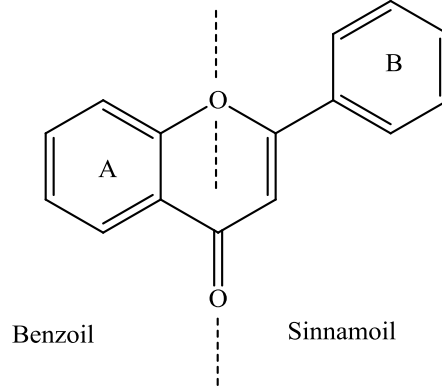
Bitkiler tarafından fotosentez yoluyla oluşturulan bütün karbonların yaklaşık olarak % 2'sinin flavonoidlere veya ilgili diğer bileşiklere dönüştürüldüğü tahmin edilmektedir.

Biyosentez araştırmalarında elde edilen verilere göre flavonoidler, fenilalanin gibi aminoasitlerin enzimatik deaminasyonundan oluşan sennamik asit türevlerinin, asetil CoA molekülleri ile kondenzasyonundan ya da malonil CoA kondenzasyonundan oluşurlar [63, 66].



Şekil 2. 32. Flavonoidlerin oluşumu

Malonil koenzim A'dan gelen kısım benzoil (A) halkasını, sinamik asitinden gelen kısım ise sinnaoil (B) halkasını meydana getirmektedir (Şekil 2.33) [90].



**Şekil 2. 33.** Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnaoil (B) halkası

Biyosentez esnasında kalkon/flavon izomerizasyonu, oksidasyon, çevrilme, alkilasyon ve glikozillenme gibi birçok ara reaksiyonlar da yer alır. Vitamin aktivitesine sahip flavon türleri genellikle biyoflavonoidler diye isimlendirilirler. Tıbbi literatürde ve klinik terminolojide vitamin P deyimini flavonoidlere göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır [71].

### 2. 5. 5. Flavonoidlerin Tanınmaları

Flavonoidler UV ışıkta floresans göstermektedirler. Ayrıca fenolik yapıları nedeniyle de  $\text{NH}_3$  ile renk değiştirirler. Bu özelliklerinden dolayı, ince tabaka ve kağıt kromatografisinde UV ışık (254 ve 366) ile incelenmektedirler. Hidroksil gruplarının bağlı oldukları yerlere göre UV ışıkta,  $\text{NH}_3$  buharında ve NA belirteciyle verdikleri renkler değişmektedir.

UV spektroskopisi, flavonoid bileşiklerin yapısı hakkında önemli bilgiler veren bir yöntemdir. Bileşiğin metanoldeki çözeltisine ayrı ayrı NaOMe, susuz  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{AlCl}_3/\text{HCl}$ , susuz NaOAc ve NaOAc/ $\text{H}_3\text{BO}_3$  in metanoldeki çözeltilerinden az miktarda ilave edilerek alınan spektrumlarda gözlenen kaymalar, piklerin şiddeti ve şekilleri arasındaki farklar flavonoid bileşiğinin ana iskeleti ve moleküldeki hidroksil gruplarının yerleri hakkında fikir vermektedir [88].

UV spektrumunda flavonoid bileşikleri biri uzun diğeri kısa dalga boyunda olmak üzere iki absorpsiyon bantı vermektedir. Uzun dalga boyunda olan, flavonoidin B halkasının (Sinnamoil) absorpsiyonu ile ilgilidir ve Bant I adını almaktadır. Kısa dalga boyunda olan ise A halkasının (Benzoil grubu) absorpsiyonu ile ilişkilidir ve Bant II adını almaktadır (Tablo 2. 3) [88].

**Tablo 2. 3.** Flavonoidlerin UV spektroskopisindeki absorpsiyon bandları

	Bant I (nm)	Bant II (nm)
Flavon	304-350	250-270
Flavonol	352-385	250-270
Flavonon	310-330	275-290
Kalkon	360-390	240-260
Auron	390-430	240-260
Antosiyanidin	475-560	275-280
İzoflavon	300-340	245-270

B halkasında oksijen fonksiyonunun artması Bant I'in, A halkasında 6 ve 8 konumunda oksijen fonksiyonunun bulunması Bant II'nin uzun dalga boyuna kaymasına sebep olmaktadır. Her iki halkada da hidroksil grubunun bulunmaması, bantların şiddetinin zayıf olmasına neden olmaktadır. İzoflavonlarda Bant II, 245-270 nm ve Bant I, 300-340 nm de omuz şeklinde izlenirken, C-6, C-7 dioksijene izoflavonlar oldukça şiddetli Bant II absorpsiyonu gösterirler.

NaOMe kuvvetli baz olduğundan, flavon çekirdeğindeki tüm OH gruplarını iyonlaştırmaktadır. Özellikle 4'-OH taşıyan flavonoidler Bant I'de 45-60 nm lik batokromik kayma verdikleri için bant şiddeti artmaktadır. 7-OH flavon ve flavonollerde 305-345 nm arasında düşük şiddette bir bant gözlenmekte olup, bu Bant III olarak tanımlanmaktadır.

$AlCl_3$ , A halkasındaki C-3 ve C-5 konumunda serbest hidroksil grupları ve B halkasındaki *orto*-dihidroksi grupları ile ayrı ayrı kelat oluşturmaktadır.

B halkasındaki *orto*-dihidroksi grupları ile oluşan kelat, seyreltik HCl ilavesiyle bozunur. Ayrıca AlCl<sub>3</sub>/HCl spektrumunda Bant I'de oluşan batokromik kayma, metanol ile alınan spektrumdaki Bant I'e göre 35-50 nm uzun dalga boyuna kayarsa 5-OH, 6-H gruplarının; 25-30 nm uzun dalga boyuna kayarsa 5-OH, 6-OH gruplarının; 16-22 nm kayarsa 5-OH, 6-OMe gruplarının varlığını göstermektedir.

NaOAc, NaOMe'ten daha zayıf bir baz olduğundan, asit karakterdeki fenolik hidroksilleri iyonize etmektedir. C-7 de serbest OH grubu varsa, Bant II'de 5-20 nm uzun dalga boyuna kayma yapmaktadır. Eğer C-6 veya C-8 de oksijen fonksiyonu varsa flavonlarda 4-8 nm'lik bir kayma gözlenmekte ya da hiç gözlenmemektedir [85]. Flavonoid yapısında 4'-OH, 7-OR grubunun bulunması durumunda Bant I, NaOMe Bant I' i ile aynı dalga boyunda çıkmaktadır.

Flavon ve flavonollerde B halkasında *orto*-dihidroksi grupları varsa bunlar borikasit ile kelat oluşturmaktadırlar. Bu durumda Bant I, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> ile 12-30 nm uzun dalga boyuna kaymaktadır. 3'-4' serbest hidroksil grubu yoksa spektrum MeOH spektrumu ile aynı çıkmaktadır [88].

Flavonoidlerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu aromatik halka protonlarını ve süstitüentlerin durumunu göstermektedir. Flavonoidlerde, aromatik halka protonları 5.00-8.00 ppm arasında izlenirken, metoksi grupları 3.8-3.9 ppm civarında singlet olarak görülmektedir. Eğer bir şeker grubu bağlı ise monoglikozitlerde şeker protonları 3.0-4.0 ppm arasında gözlenmekte, şekerin anomerik protonu H-1' daha aşağı alanda 4.8-6.0 ppm de dublet olarak görülmektedir.

Kütle spektrumu, flavonoid aglikon ve glikozitlerin yapıları hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Flavonoid aglikonların çoğu şiddetli moleküler iyon piki [M]<sup>+</sup> vermektedirler. Moleküler iyon pikine ek olarak, flavon aglikonları [M-H]<sup>+</sup> ve [M-CO]<sup>+</sup> piklerini de göstermektedirler. Metoksi flavon olması halinde ise [M-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ve [M-CO-CH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> pikleri gözlenmektedir [66].

## 2. 6. Ayırma ve Saflaştırma Metodları

Üzerinde çalışılacak molekül grubunu diğer moleküllerden ayırıp saf şekilde elde etmeye yönelik bir seri işlem uygulanır. Bu işlemler, karışımdaki molekül gruplarının genellikle çözünme özelliklerine, yoğunluk, elektriksel yük gibi fiziksel

karakteristiklerine veya diğer moleküllere ilgisine göre birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan yöntemleri kapsar.

Bitki kimyası çalışmalarında izlenen yöntem aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Bitkilerin çiçeklenme döneminde toplanması ve teşhisi.
- Bitkilerin gölgede kurutulması ve toz edilmesi.
- Bitkilerin uygun çözücülerle ekstraksiyonu.
- Hazırlanan ekstrelerden çeşitli kromatografik (kolon, ince tabaka ve preparatif ince tabaka) yöntemlerle kimyasal organik maddelerin izolasyonu.
- Elde edilen maddelerin çeşitli spektroskopik yöntemlerle (IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, MS) yapılarının tayini.
- Gerek bitki ekstralarının gerekse ekstralardan elde edilen saf maddelerin aktivite (antibakteriyel, antiviral, antifungal, sitotoksik, anti tümör v.b.) tayini.

## **2. 6. 1. Ekstraksiyon Teknikleri**

Bitki örneklerinden bileşiklerin izolasyonu çoğunlukla seçici ekstraksiyon yöntemiyle yapılır. Bu yöntemle fenolik bileşikler, bitki örneğinden farklı çözücülerle, polaritenin artış sırası ile ardarda ekstraksiyon yapılarak izole edilirler. Böyle bir ekstraksiyon yapılırken, bitki örneğini lipofil karakterli bileşiklerden (klorofil, karotenoidler, steroller, yağlar, vakslar vb.) arıtmak için önce petrol eteri veya hekzanla işlem yapılması gerekir. Daha sonra bitki kalıntısı artan polaritede çözücülerle; dietil eter, etil asetat, etanol veya metanol ve bunların farklı konsantrasyonlarla sulu çözeltileri ile ardarda ekstre edilir.

Başka bir yöntem ise şöyle açıklanabilir: Bitki örneği önce apolar çözücü ile muamele edilerek lipofil bileşiklerden arındırılır. Sonra ise, düşük molekül ağırlıklı alkolle (metanol veya etanol) veya bunların sulu çözeltileriyle birkaç kez ekstre edilir [71].

Elde edilen ekstraların ön saflaştırılması, bileşiklerin birbirinden ayrılması ve bileşiklerin belli miktarda saf halde elde edilmesi için, preparatif kağıt, ince tabaka, kolon kromatografisi ve HPLC kullanılır.

## 2. 6. 2. Kromatografik Analiz Yöntemleri

### 2. 6. 2. 1. Kağıt Kromatografisi

Kromatografik incelemelerde kullanılan kağıt türünün özelliğinin büyük önemi vardır. Bu nedenle kağıt kromatografisi tekniğinde özel saflığa sahip, selüloz filtre kağıdı kullanılır.

Yüksek kaliteli kromatografik kağıt türlerinden biri Whatman No:4'dür. Bu kağıt türü saflığına ve ayırma yeteneğine göre Whatman No:1'e yakındır. Ancak Whatman No:1'e göre yoğunluğu fazladır ve bu nedenle yüzeyine daha fazla miktar karışım uygulanabilir. Aynı zamanda bu kağıt türünde ayrılma diğer türlere göre daha çabuk ve etkili olur.

Kağıt kromatografisi ile analizlenen karışımın bileşenlerine ayrılmasına etki eden faktörlerden birisi de çözücü sisteminin özellikleridir.

Renkli bileşikler kağıt kromatografisi ile karışımdan ayrıldıktan sonra, kromatogramda belirgin lekeler halinde görünürler. Renksiz bileşiklerin çoğu kromatogramda floresans yapar veya floresansı bastırırlar. Bileşenler bahsedilen yöntemlerle teşhis edilemezse, bu bileşiklerle renkli kompleks oluşturan reaktifler kağıda püskürtülür veya kağıt reaktif çözeltilisine daldırılır. Kromatogram kurutulurken lekeler açığa çıkartılır.

Kromatograma önce UV ışında ve sonra NH<sub>3</sub> buharları ile muamele edildikten sonra tekrar UV ışığında bakılması lekelerin yerlerinin belirlenmesini sağlar. Flavonoidlerin çoğunluğu UV ışığın etkisinde floresans yapar veya floresansı absorblarlar. UV ışığında flavon ve flavonol glizkozitlerin lekeleri mor renkte görünür, kromatogram NH<sub>3</sub> buharlarına tutulduktan sonra sarı veya sarımsı yeşil renge dönüşürler.

### 2. 6. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi, yapılış tekniğine göre kağıt kromatografisine benzer. Bu kromatografi türünde sabit faz olarak silikajel (SiO<sub>2</sub>), alüminyumoksit (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), toz selüloz gibi maddeler kullanılır. Burada etkin mekanizma adsorbsiyondur. TLC de özel olarak hazırlanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Bu levhaların üzeri silikajel, alümina gibi bir adsorbanla kaplanır. Bu plakalar hazır olarak satılabildiği gibi

laboratuarda da hazırlanabilir. Cam levhaların boyutları 5x20 cm ile 20x20 cm arasında değişir. Adsorblayıcı tabakanın kalınlığı yapılacak analizin cinsine göre değişir, bu kalınlık 0.25-2 mm arasındadır. Plakalar kullanılmadan önce 120 °C'deki etüvde 2 saat kurutularak aktive edilir ve hemen kullanılır.

Örneklerin plakalara uygulanması ve geliştirme kağıt kromatografisinde olduğu gibidir. İnce tabaka kromatografisinde geliştirme aşağıdan yukarıya doğru yapılır. Plakanın tanka yerleştirilmesinden önce tank atmosferinin çözücü buharıyla doymuş olmasına dikkat edilir. Ayrılan maddelerin lekelerinin belirlenmesi ve kullanılan reaktifler kağıt kromatografisinde olduğu gibidir.

### **2. 6. 2. 3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi**

Silikajel kaplı alüminyum plaklar miktarı az olan fraksiyonları ayırmak için kullanılır. Karışım halde bulunan fraksiyonlar miktarlarına göre (1 plağa ortalama 15-20 mg) plaklara tatbik edilirler ve uygun çözücü sistemleri ile bileşenlerine ayrılırlar. Her farklı fraksiyon için gerektiğinde farklı denemeler yapılarak her birinin en iyi ayrıldığı sistem bulunur. UV (254 nm) ışık altında maddelere ait bantlar işaretlenir ve kazınarak erlenelere aktarılır. Uygun çözücü ile erlende 15-30 dakika bekletilen maddeler süzülerek alınır ve çözücüleri uçurularak saflaştırılırlar.

### **2. 6. 2. 4. Kolon Kromatografisi**

Bitkilerden elde edilen ekstraktların ön saflaştırılması, bileşenlerin birbirinden ayrılması ve aynı zamanda bileşiklerin mg miktarlarda saf halde elde edilmesi için kolon kromatografisi kullanılır. Kolon kromatografisinde, selüloz, iyon değiştirici reçineler, silikajel, poliamid ve sefadeks gibi adsorbanlar kullanılır. Kolon kromatografisinde kullanılan bazı adsorbanların özellikleri aşağıda verilmiştir.

**Silikajel:** Silikajel kolonlar düşük polariteli aglikon flavonoidleri, az sayıda hidroksil grubu taşıyan fenolik bileşikleri ayırmak için daha uygundur. Kolonu konsantre HCl ile yıkamak silikajelin yapısında bulunan eser miktardaki Fe iyonlarını uzaklaştırır. Aksi takdirde bu iyonlar hidroksillenmiş aglikon flavonoidlerin kolona tutunmasına neden olur. Düşük polariteye sahip çözücülerin kullanılması tavsiye edilir. **Benzen:** kloroform (1:1) oranından CHCl<sub>3</sub>'a ve artan oranda EtOAc'a gidilir. En yaygın olarak kullanılan silikajel adsorban Kieselgel 60, 70-230 mesh (Merck) tir [91].

**Selüloz:** Selüloz kolonlar özellikle flavanoidler olmak üzere tüm fenolik birleşik sınıflarını ve bunların glikozidlerini ayırmak için yararlı bir adsorbandır. Solvent kullanımına bağlı olarak adsorbsiyon ve partiyon kromatografisi uygulanabilir. Selüloz kolonun sınırlı ayırma kapasitesini arttırmak için silika jel-selüloz (1:1;w/w) karışımı kullanılabilir [92]. Selüloz kolondan elüsyon kağıt kromatografisinde uygulanan çözelti sistemleri ile yürütülebilir. Ya da farklı oranlarda metanol ve su içeren çözücü sistemleri kullanılır. Selüloz adsorbanların en yaygın olanları mikrokristal selüloz (Merck, Macheray ve Nagel) ve Whatman CF-11 dir.

**Poliamid:** Poliamid kolonlar da fenolik bileşiklerin diğer bitki metabolitlerinden ayrılmasında kullanılan diğer bir seçenektir. Polikaprolaktam, polihekzametilen diamidoadipinat, polivinilpirolidon gibi poliamid reçineler kullanılır. Poliamid adsorbanların diğer adsorbanlar karşısındaki bazı üstünlükleri yüksek adsorban yeteneği ve elüsyonda basit çözücü sistemlerinin kullanılmasıdır. Genellikle ilk sırada su, sonra su-alkol karışımları ve sonunda saf alkoller kullanılır. Bu kolonların tek dezavantajı kolon kullanımdan önce yıkanmaz ise çözünabilir poliamid fraksiyona bulaşabilir. Poliamid kolonlar kullanımdan sonra da yıkanarak tekrar kullanılması sağlanabilir [93].

Flavonoidlerin poliamid adsorbanlardan elüsyonu için su, etil veya metil alkol, aseton, formamid veya dimetil formamid gibi polar çözücüler kullanılır. İzoflavon, flavon, flavonol glikozidler poliamid kolondan etanol veya metanolün artan orandaki çözeltileri ile elüe olurlar. Metoksi aglikonlar kloroform-etilasetat (3:1) , kloroform-metanol-n-bütanol-aseton (20:10:5:1), kloroform-metanol (3:1) çözücü sistemleri yardımıyla elüsyon edilebilirler [94].

Poliamid kolonlar ikinci aşama saflaştırmada da kullanılabilirler gibi ilk basamakta fraksiyonlandırma amacı ile de kullanılabilir [95].

Poliamid adsorbanların kullanışlı ticari türleri şunlardır: Polyclar AT, Polupenco 66D ve Poliamid (Woelm).

**Sefadeks jel:** Genellikle sefadeks LH-20 kullanılır fakat LH-60 ve G-25 sefadekslerin kullanımı da yaygındır. Kolon kromatografisi, TLC veya kağıt kromatografisi yoluyla izole edilen maddeler genellikle adsorbandan kaynaklanan kirlilikleri de taşırlar. Fakat sefadeks LH-20 kolonlar elüsyon sırasında kirlilik tasımazlar bu yüzden son saflaştırma işlemleri için uygundur [96]. Elüsyon genellikle

metanol ile gerçekleştirilir. Fakat etanol-su veya metanol-su çözücü sistemleri de flavonol glikozidleri izole etmek için kullanılır [97].

Sefadeks LH-20 sadece organik çözücülerle de çalışma imkanı verdiği için suda çözünmeyen maddelerin ayrılması için uygundur. LH harfleri bu jelin hem lipofil hem de hidrofil çözeltilerde sismesini gösteren bir simgedir.

## **2. 6. 2. 5. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)**

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulaması gerekir. Bu yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, element türlendirilmesinde en yaygın biçimde uygulanan kromatografi türüdür.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir. Bilhassa diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur.

HPLC'nin sıvı kromatografisinin diğer türlerden üstünlükleri şunlardır. HPLC kolonu rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir. Böylece kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, eski yöntemlerle elde edilenlerden çok daha çeşitlidir. Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir. Nicel analiz amaçları için de kullanılabilir. Analiz süresi çok daha kısadır.

## **2. 7. Yapı Açıklama Metodları**

### **2. 7. 1. Ultraviyole Spektroskopisi**

Ultraviyole spektroskopisi fenolik yapıların belirlenmesi ve yapı özellikleri hakkında önemli bilgiler verir. Tüm fenolik bileşikler UV bölgede 230-290 nm'de bir veya daha fazla karakteristik absorpsiyon gösterirler. Bir baz etkisi ile iyonlaşmaya bağlı olarak absorbansta 15-50 nm'lik geniş bir batokromik kayma gösterirler. Bu tür

ölçümler, ilk taramalar sırasında bilinmeyen bitki içeriğinin fenolik doğasının belirlenmesinde önemlidirler.

Basit fenoller ve fenolik asitler 230-290 nm arasında bir veya iki güçlü band gösterirler. Hidroksi sinnamik asitler 310-332 nm'de keskin bir absorpsiyon piki verirler. Fakat flavonoidler hem 255-285 nm aralığında hem de 310-390 aralığında olmak üzere iki band verirler. 6 ve 8-hidroksiflavonoller, kalkon ve auronlar 380-430 nm aralığında görünür bölgeye doğru kayan adsorpsiyon bandı verirler. Antosiyaninler 500 nm üzerinde bir band ile karakterize olurlar. Kinon pigmentleri de diğer fenolik bileşiklerden ultraviyole bölgedeki karmaşık spektral bandları ve uzun dalga boyunda zayıf absorpsiyon pikleri ile ayrılırlar.

Flavonoid yapılarında bulunan hidroksil gruplarının pozisyonunu belirlemek için molekülün kromofor sistemine değişik reaktiflerin etkisinden geniş bir şekilde yararlanılır. Bu amaçla NaOMe, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl gibi iyonlaştırıcı ve kompleks oluşturucu reaktifler kullanılır [93].

## 2. 7. 2. İnfrared Spektroskopisi

Infrared spektroskopisi, görünür ve mikrodalga bölgeleri arasındaki infrared bölgede, elektromanyetik dalganın moleküller ya da kimyasal gruplar tarafından soğurulmasını inceler. Bu yöntemle, bir organik bileşiğin yapısının buna bağlı olarak, kimyasal özelliklerinin aydınlatılması, yapı tayini, bağ titreşimleri ve ayrıca hidrojen bağlarının bulunması, bağ uzunlukları ve bağ açılarının bulunması mümkündür. İnfrared spektroskopisi tekniği, belirli dalga boylarında örnek hücre sine giren ve çıkan ışınların şiddetlerinin karşılaştırılması ve dalga boylarına göre grafiğe geçirilmesi prensibine dayanır. İnfrared ışık soğurulması durumunda bir molekülün titreşim ve dönme enerji düzeylerinde değişiklikler meydana gelir.

Non-polar fenolik bileşikler infrared spektral ölçümleri için genellikle kloroformda çözülürler. Pek çok diğer fenolik bileşiğin KBr ile karıştırılarak diskleri hazırlanır ve ölçüm yapılır. Aslında IR spektroskopisi fenolik bileşiklerin karakterizasyonunda yaygın bir şekilde kullanılmaz. Ancak karbonil grubu taşıyan fenolik bileşikler için faydalıdır. Çünkü karbonil absorpsiyon bandının durumundan serbest bir hidroksil grubuna bağlı olup olmadığı anlaşılır [98].

### 2. 7. 3. <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopisi

<sup>1</sup>H-NMR spektroskopisi için 5-10 mg örnek gereklidir. Çözücünün seçimi bileşiğin polaritesine bağlı olmalıdır.

CDCl<sub>3</sub> düşük polariteli bileşikler için ideal çözücüdür. Genellikle C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, DMSO-d<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub>OD, D<sub>2</sub>O gibi çözücüler polar fenolik bileşikler için daha uygundur.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumu fenolik bileşiklerin aromatik halka protonlarını ve süstitüentlerin durumunu gösterir. Aromatik halka protonları 5.00- 8.00 ppm arasında gözlenirler. Orto etkileşimlerde  $J=8-9$  Hz, meta etkileşimlerde  $J=2-3$  Hz'dir. Metoksi grupları 3.8-3.9 ppm civarında singlet olarak görülür.

### 2. 7. 4. <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopisi

<sup>13</sup>C-NMR spektroskopisi, özellikle glikozidlerde, şekerlerin sırası ve bağlanma noktaları ya da glikozil grubundaki açıl gruplarının cinsi ve yerlerini incelemede yararlıdır. 250 ppm'lik geniş bir alanda karbon sinyalleri gözlenir. Genellikle diğer veriler yeterli bilgi vermediğinde kullanılır.

Spektrumda; sp<sup>3</sup> karbonları ortalarında 76.8-67.1 ppm arasında, oksijene bağlı olmayan sp<sup>2</sup> karbonları daha aşağıda bir alanda çıkarlar. Oksijene komşu sp<sup>3</sup> karbonları ise 101.5-100.7 ppm arasında çıkarlar.

Fenolik bileşiklerin çoğunluğu aromatik halkalarında OH, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>, izoprenil ve şeker fonksiyonları içerir. Fenolik bileşiklerin çekirdeğine bu tür farklı süstitüentlerin bağlanması yeni karbon rezonanslarının ortaya çıkmasına neden olur. Sonuçta süstitüentin sayısına bağlı olarak aromatik kuarterner karbon sinyallerinin sayısında artma olur. O-glukozillenme bağlandığı karbon sinyalinin 2 ppm civarında yukarı, orto ve özellikle para pozisyonlarında bulunan karbon sinyallerinin ise aşağı alana 1-4 ppm kaymasına neden olur. C-glikozillenme ise aglikona bağlandığı karbon atomu sinyalinin 10 ppm aşağı alana kaymasına neden olduğu halde diğer atomların sinyallerini etkilemez.

### **2. 7. 5. Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi (LC-MS)**

Kütle spektroskopisi, uçucu olmayan bileşenler içeren numunelerin analizi için sıvı kromatografisi ile birleştirilmiştir. GC'den farklı olarak burada hareketli faz sıvıdır ve bu sıvı faz analit moleküllerini içinde buldukları çözelti fazından, belli uzunluk ve çaptaki kolon yardımı ile ayırır.

İyonlaştırma kaynağı olarak kullanılan yöntemlerden biri, elektrosprey iyonlaştırmadır (ESI). ESI, atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşir. Numune çözeltisi, paslanmaz çelikten iğne şeklinde bir kapiler ile dakikada birkaç mikrolitre hız sağlanarak pompalanır. İğneye, etrafındaki silindirik elektroda göre birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük ve elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir çözücü giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır ve elektrik yükleri analit moleküllerine tutunur. Çözücü buharlaşıp damlacıklar küçülürken yük yoğunluğu artar ve iyonlar, gaz fazına desorbe olur [99].

## BÖLÜM 3

### 3. MATERYAL VE METOD

#### 3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hekzan (Teknik)

Aseton (Teknik)

Metanol (Teknik)

Metilenklorür (Teknik)

Etilasetat (Teknik)

Su (Grade)

Sefadeks LH-20

Silikajel (Kiesel G, E. Merck Type 60)

Poliamid (Fluka)

$Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$

BChE

AChE

Asetiltiyokolin iyodür

Bütiriltiyokolin klorür

DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit)

Sodyum fosfat tamponu (pH:8)

Galantamin

### **3. 2. Kullanılan Yöntemler**

#### **3. 2. 1. Kolon Kromatografisi**

Kolon kromatografisi gerek ekstrelerin fraksiyonlandırılarak ayrılması gerekse saflaştırılması aşamasında kullanıldı. Adsorban olarak Merck silika jel (70-230 mesh), Sefadeks LH-20 (Merck), poliamid (Fluka) dolgu maddeleri kullanıldı. Silika jel adsorban hekzan ile şişirildikten sonra dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş cam kolona yerleştirildi. Poliamid adsorban ise kolona kuru olarak tatbik edildi.

Ekstreler, miktarına uygun adsorbanla karıştırıldı ve çözücüsü tamamen uçurulduktan sonra kolonun üst kısmına yerleştirildi. Sefadeks LH-20 dolgu maddesi ise su içinde bekletilerek kolona konuldu ve ekstreler ise sıvı olarak tatbik edildi.

#### **3. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi**

Kolon kromatografisinden elde edilen fraksiyonlar miktarlarına göre silikajel kaplı hazır alüminyum plakalara (DC-Alufolien Kieselgel 60 F254 Merck) tatbik edilerek uygun çözücü sistemlerinde yürütüldü. Kolonda saflaştırılan maddelerin kontrolü ve preparatif-TLC yöntemi ile kolondan alınan fraksiyonların ayrılıp saflaştırılmasında kullanıldı.

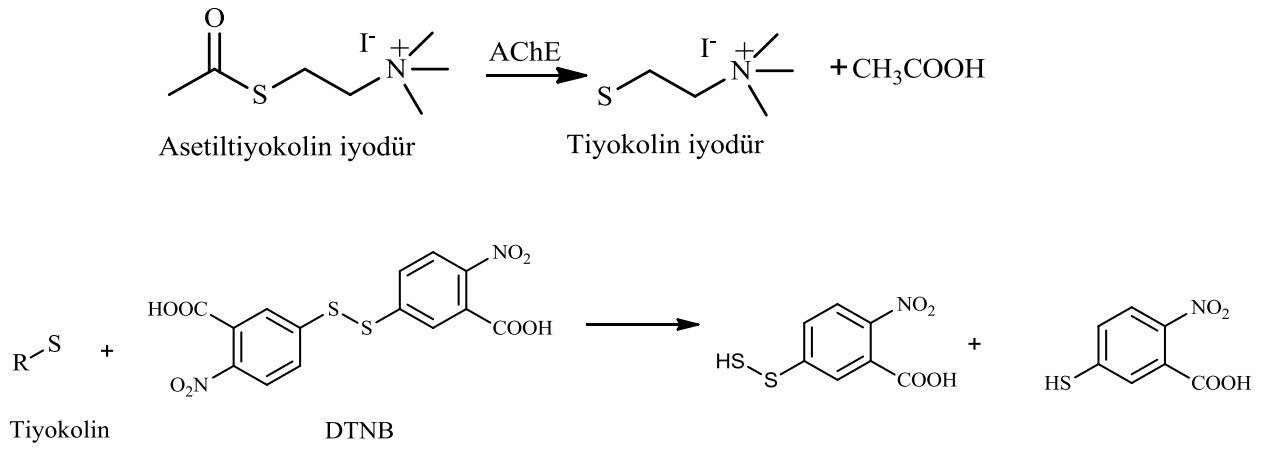
#### **3. 2. 3. Enzim İnhibisyon Aktivitesi Çalışmaları**

##### **3. 2. 3. 1. Ellman Metodu**

Asetil ve bütirilkolinesteraz inhibitör aktiviteleri Ellman tarafından geliştirilmiş olan spektrofotometrik metodun uygulanmasıyla ölçülmüştür [100]. Elektrik balığından elde edilen AChE ve at serumundan elde edilen BChE enzim kaynağı olarak, asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin klorür ise reaksiyonun substratları olarak kullanılmıştır. DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit) kolinesteraz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılmıştır. Kontrol ve test bileşiklerini çözmek amacı ile etanol çözücü olarak kullanılmıştır. 150 µL 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH:8) farklı konsantrasyonlarda 10 µL etanolde çözülmüş örnek çözeltisi ve 20 µL AChE ( $5.32 \times 10^{-3}$  U) veya BChE ( $6,85 \times 10^{-3}$  U) çözeltileri karıştırılmış ve 25 °C de 15 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 µL asetiltiyokolin iyodür (0.7 mM) veya bütiriltiyokolin klorür (0.2 mM) eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Bu substratların hidrolizi ile oluşan tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonu sonucu sarı renkli 5-tiyo -2-nitrobenzoat anyonunun

oluşumu 412 nm dalga boyunda absorbansın ölçülmesi ile spektrofotometrik olarak gözlenmiştir (Şekil 3. 1).

96 kuyucuklu mikropılaka okuyucuda (Thermo Scientific Multiskan Go) spektrofotometrik ölçümler gerçekleştirilmiştir. AChE ve BChE inhibisyon yüzdeleri  $(E-S)/E \times 100$  formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Bu formülde E: test bileşiği olmaksızın enzimin aktivitesi ve S: test bileşiği ile enzimin aktivitesini ifade etmektedir. Denepler üç kez tekrarlanmış olup galantamin referans bileşiği olarak kullanılmıştır.



Şekil 3. 1. Ellman metodu

### 3. 2. 3. 2. Enzim İnhibisyon Deneyi Reaktifleri

**Fosfat Tamponu (pH:8):** 8.75 g sodyum fosfat dihidrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O) 950 mL destile suda çözüldü. 1N NaOH çözeltilisiyle pH 8'e ayarlandı ve hacmi destile suyla 1 L ye tamamlandı.

**5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltilisi:** 16 g DTNB ve 7.5 g NaHCO<sub>3</sub>'ün 4 mL fosfat tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

**Substrat (Asetiltiyokolin iyodür ve Bütiriltiyokolin klorür):** 16 mg asetiltiyokolin iyodür veya bütiriltiyokolin klorürün 4 mL destile suda çözülmesiyle hazırlandı.

**Enzim (Asetilkolin esteraz ve Bütirilkolin esteraz):** 0.2 mg enzimin 4 mL fosfat tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

### 3. 3. Belirteçler

#### 3. 3. 1. Kromatografi İşlemlerinde Kullanılan Belirteçler

**Serik Sülfat Belirteci:** 2 g  $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$  100ml %10'luk  $H_2SO_4$  içinde çözülmesi ile hazırlandı. Belirteç püskürtüldükten sonra kromatografi plağı  $100^\circ C$ 'de 5-10 dakika lekeler oluşuncaya kadar bekletildi.

#### 3. 3. 2. UV Spektrumu Kayma Belirteçleri

**Sodyum metoksit (NaOMe) Belirteci:** 2.5 g temizlenmiş metalik sodyum küçük parçacıklar halinde 100 ml saf metanole dikkatlice ilave edilerek hazırlandı.

**Alüminyum Klorür ( $AlCl_3$ ) Belirteci:** 5 g susuz alüminyum (III) klorür 100 ml saf metanolde çözülerek hazırlandı.

**Hidroklorik Asit (HCl) Çözeltisi:** 50 ml saf derişik HCl'in 100 ml destile su ile karıştırılmasıyla hazırlandı.

**Sodyum Asetat (NaOAc) Belirteci:** Toz halinde susuz saf sodyum asetat kullanıldı.

**Borik Asit ( $H_3BO_3$ ) :** Toz halinde susuz saf borik asit kullanıldı.

### 3. 4. Kullanılan Cihazlar

**NMR Spektrometresi:**  $^1H$  NMR ve  $^{13}C$ -NMR spektrumları Varian Oxford 300 MHz cihazında alınmıştır. Çözücü olarak  $CDCl_3$  ve  $CD_3OD$  kullanılmıştır.

**Kütle Spektroskopisi:** Kütle spektrometresi ölçümlerinde Zivak Technologies, Tandem Gold LC-MS kullanılmıştır.

**HPLC:** Shimadzu Prominence LC-8A preparatif geri-döngülü HPLC (C-18 kolon) kullanılmıştır.

**Infrared Spektrofotometresi:** Mattson 1000 FTIR Spektrometresi ve Shimadzu IR 470 Infrared Spektrometresi kullanılmıştır.

**Ultraviyole Spektrofotometresi:** Spektrumlar Shimadzu UV-160A cihazında alındı.

### 3. 5. Çözücüler

Ekstraksiyon işlemlerinde, kolon kromatografisinde ve ön ayırma işlemlerinde teknik çözücüler tekrar destile edildikten sonra kullanılmış, madde saflaştırılmasında Merck çözücüler, spektral analizler için spektroskopik çözücüler kullanılmıştır.

## BÖLÜM 4

### 4. DENEYSEL KISIM

#### 4. 1. Bitkinin Ekstre Edilmesi

*Xanthium strumarium* L. (Asteraceae) bitkisi 26 Eylül 2011'de Trakya Üniversitesi Balkan Yerleşkesi'nden (A1/E, Edirne, Merkez) Pınar Alpaslan ve Yrd. Doç. Dr. Özlem Demirkıran tarafından toplandı. Bitkinin tanımlanması Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Ana Bilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Mehmet AYBEKE tarafından yapıldı (EDTU Herbaryumu, No: 894). Bitki gölgede kurutulup, toprak üstü ve kök kısımları ayrılarak toprak üstü kısmı çalışılmak üzere ufak parçalar halinde kesildi.

2.5 kg kuru bitki oda şartlarında, büyük cam kavanozlarda haftada bir süzülme koşuluyla üç hafta maserasyon yöntemi ile ekstrakte edildi. Çözücü rotaevaporatörde buharlaştırıldıktan sonra elde edilen 325 g ham ekstre su ile seyreltilip sırası ile hegzan, diklorometan ve etil asetat ile ekstraksiyonları gerçekleştirildi.

Bu fazlar rotaevaporatörde yoğunlaştırılarak hegzan, diklorometan, etil asetat ve su fazına ait ekstratlar elde edildi. Biyolojik aktivite için her fazdan numune alındı. Elde edilen ekstratların miktarları aşağıdaki gibidir:

Hegzan fazı: 97.21 g

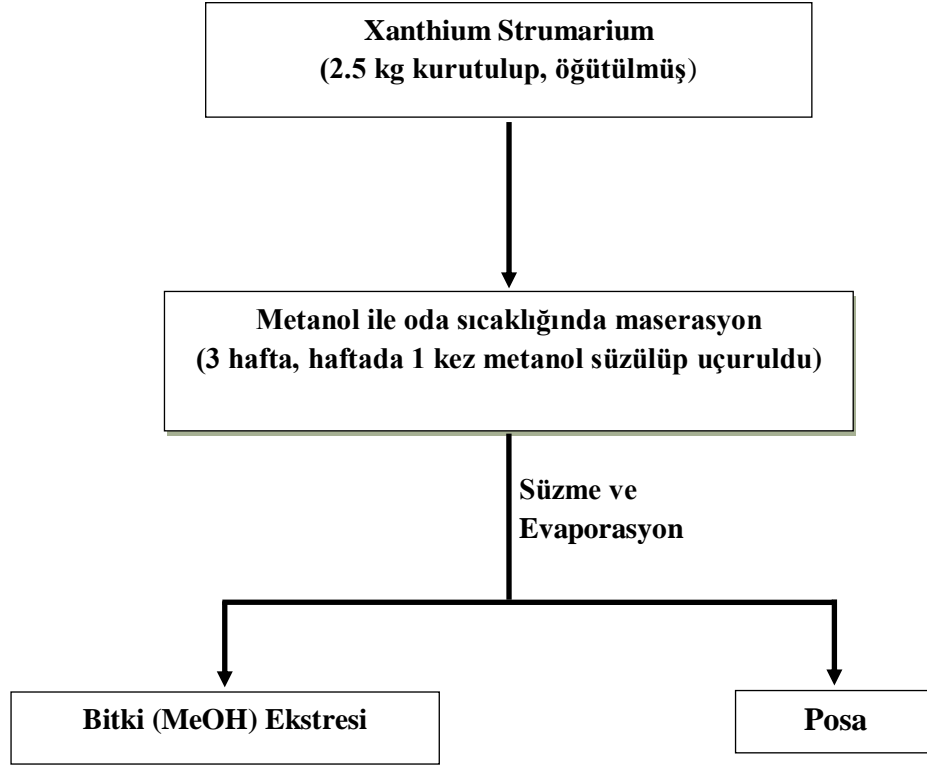
Diklorometan fazı: 10 g

Etil asetat fazı: 2.5 g

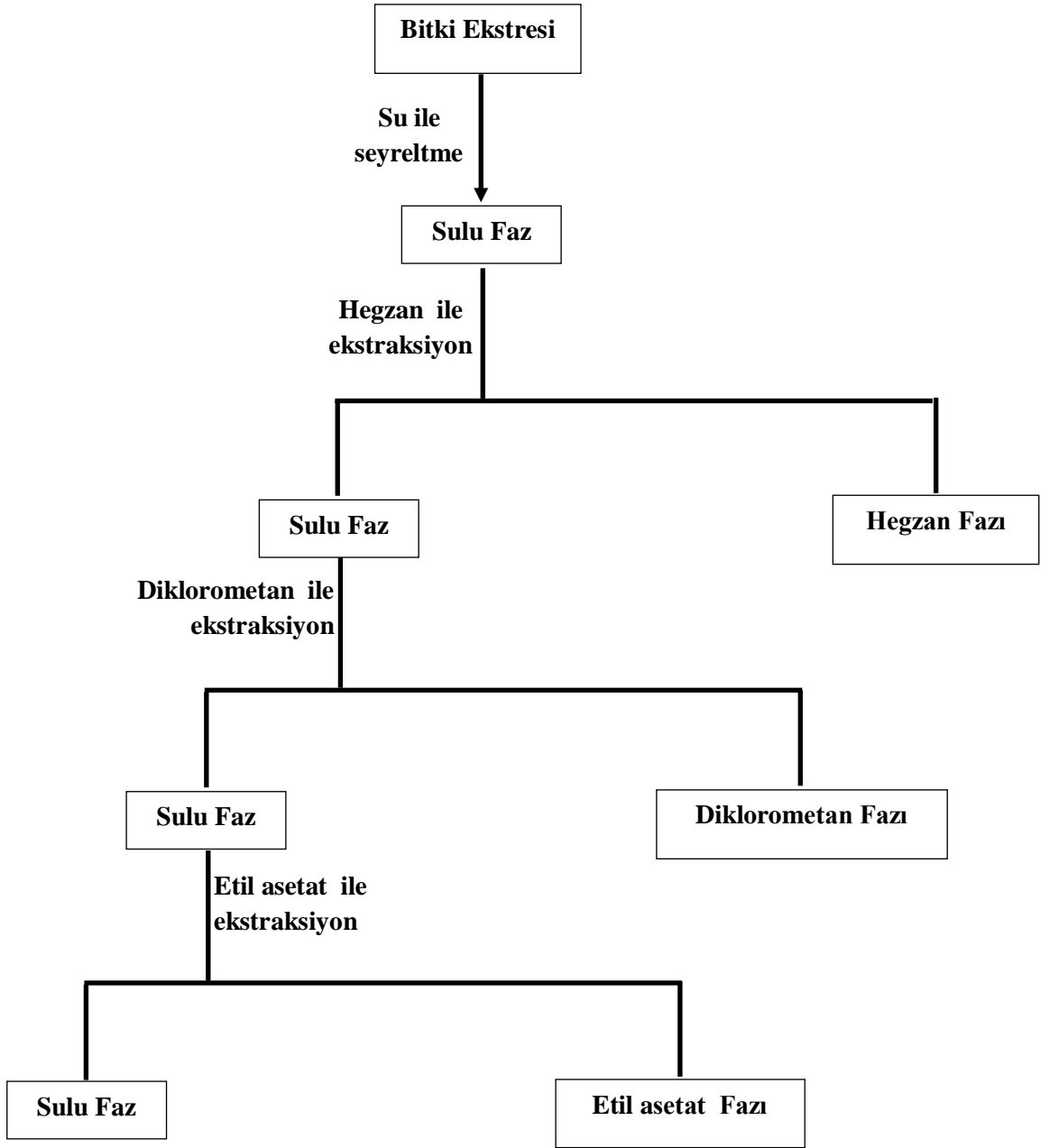
Su fazı: 215.42 g

Daha sonra her bir ekstreye ince tabaka kromatografisi uygulandı. Yapılan TLC gözlemlerine dayanarak hegzan ve diklorometan ekstratlarındaki lekeler birbirine benzediği için bu ekstratların birleştirilerek çalışılmasına karar verildi. Etil asetat ekstratında, UV ışık altında mor, serik sülfat belirteci ile yakıldığında sarı renk veren bileşenlerin flavonoidler olabileceği sonucuna varıldı. Su fazında gözlenen kahve-siyah

lekeler genellikle herhangi bir biyolojik aktivite göstermeyen şekerli bileşikler olabileceğinden dolayı su fazının çalışılması planlanmadı.



Şekil 4. 1. Ana ekstrenin eldesi



Şekil 4. 2. Hegzan, diklorometan, etil asetat ve su fazlarının eldesi

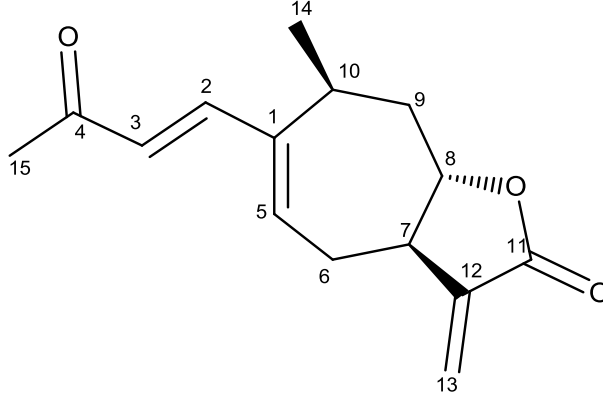
## 4. 2. Kromatografik Yöntemlerle Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri

### 4. 2. 1. Dikloro metan ve Hegzan Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Hegzan ve diklorometan fraksiyonları birleştirilerek silika jel kolon kromatografisi uygulandı. Hegzan ve artan oranda diklorometan ilavesi ve daha sonra metanol ilavesi ile kolon fraksiyonlandırılarak 415 tüpe toplandı. Her bir tüpün içeriğine TLC uygulandı ve birbiririne benzeyen kısımlar birleştirilerek ondokuz alt fraksiyon elde edildi. **7.** fraksiyondaki tüplerde iğnemsiz kristaller oluştuğu gözlemlendi ve kristallerin bir kısmı hegzan-diklorometan karışımı ile yıkanarak, bir kısmı da 1:2 diklorometan:hekzan karışımından yeniden kristallendirme işlemiyle ayrılarak **1** numaralı Xanthatin bileşiği elde edildi. **19** alt fraksiyona TLC uygulandıktan sonra **XS-6, XS-8, XS-10, XS-13, XS-14, XS-15 ve XS-16** fraksiyonlarına tekrar kolon kromatografisi uygulanmasına karar verildi. **XS-8** fraksiyonu silikajel kolona tatbik edilerek hegzan ve artan oranda etil asetat çözücü sistemi ile elue edildi. Kolonun incelenen TLC'sine göre fraksiyonlar birleştirilip ondört alt fraksiyona toplandı. Toplanan fraksiyonlara preparatif TLC uygulanarak ikinci fraksiyondan **3** numaralı bileşik 4-okso-bedfordia asit ve 11. fraksiyondan **4** numaralı isoxanthanol bileşiği elde edildi. **XS-6** fraksiyonunda silikajel kolona tabi tutuldu. Kolondan elde edilen 12. tüpte bir müddet sonra bir bileşiğin kristallendiği gözlemlendi. UV aktif olmayan kristallere yapılan spektral analizler sonucunda bileşiğin yapısı **5** numaralı stigmasterol olarak belirlendi. **XS-13, XS-14 ve XS-15** fraksiyonları da silikajel kolona yüklenerek hegzan ve artan oranda etil asetat ve daha sonra etil asetat ve artan oranda metanol karışımı ile fraksiyonlandırıldılar. Fraksiyonların TLC'leri incelenerek preparatif TLC ve bazı fraksiyonlara HPLC uygulandı. Birbirine çok yakın maddelerin ayrılamadığı ya da ayrılan maddelerin miktarının çok az olmasından dolayı spektral olarak bir bulguya rastlanamadı. **XS-16** fraksiyonu da silikajel kolonda elue edildi. Fraksiyonların TLC ile incelenmesiyle 12. tüpteki maddenin saf olduğu düşünülerek başta NMR olmak üzere spektroskopik incelemeleri yapıldı ve 12. tüpteki maddenin **2** numaralı tomentosin bileşiğine ait olduğu tespit edildi.

#### 4. 2. 1. 1. Dikloro metan ve Hegzan Ekstresinden Elde Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

##### 1 Numaralı Bileşik: 4-okso-1(5),2,11(13)-Xanthatrien-12,8-olid; Xanthatin



Şekil 4. 3. Xanthatin

Xanthatin birleştirilmiş hegzan ve dikloro metan ekstraktının silikajel kolona tatbik edilip hegzan-diklorometan çözücü sistemi ile elüe edilmesi sonucunda renksiz iğnemsî kristaller halinde elde edildi (100 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra turuncu renk verdi.

E.N. :76 °C

UV  $\lambda_{\max}$  (nm) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: 294

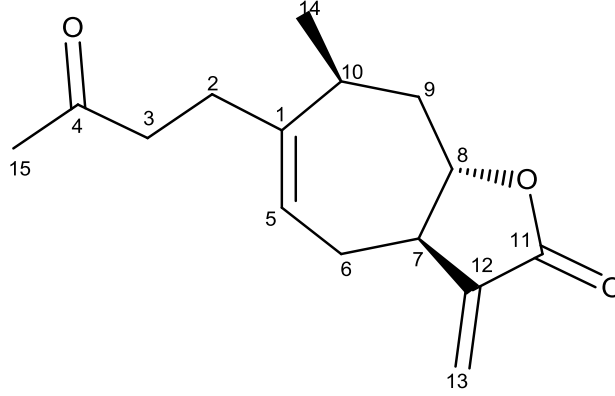
IR  $\nu_{\max}$  (KBr) cm<sup>-1</sup>: 1765, 1650, 1605, 1362, 1288, 1200, 1183, 995, 965

ESI-MS  $m/z$ : 269.1 [M+Na]<sup>+</sup>

**Tablo 4. 1.** Xanthatin bileşiği için  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), DEPT ve  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) değerleri

C No	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	DEPT
1	—	144.9	—
2	7.08, d ( $J=15.6$ Hz)	148.8	—CH
3	6.21, d ( $J=15.6$ Hz)	124.8	—CH
4	—	198.9	—
5	6.30, dd ( $J=9.0$ ve $2.7$ Hz)	138.5	—CH
6 $\alpha$	2.82, ddd ( $J=11.7$ , $9.0$ ve $2.7$ Hz)	27.3	—CH <sub>2</sub>
6 $\beta$	2.22-2.30, m	27.3	—CH <sub>2</sub>
7	2.52-2.61, m	47.6	—CH
8	4.31, ddd ( $J=12.3$ , $9.9$ ve $2.7$ Hz)	81.7	—CH
9 $\alpha$	1.86, ddd ( $J=16.0$ , $12.6$ ve $3.9$ Hz)	36.7	—CH <sub>2</sub>
9 $\beta$	2.37-2.42, m	36.7	—CH <sub>2</sub>
10	2.33-2.36, m	29.2	—CH
11	—	170.0	—
12	—	139.3	—
13	6.21, d ( $J=3.0$ Hz) 5.51, d ( $J=3.0$ Hz)	119.3	—CH <sub>2</sub>
14	1.16, d ( $J=7.2$ Hz)	19.0	—CH <sub>3</sub>
15	2.31, s	28.1	—CH <sub>3</sub>

**2 Numaralı Bileşik: 4-okso-1(5), 11(13) xanthatrien-12,8 olid;Tomentosin**



**Şekil 4. 4.** Tomentosin

Tomentosin **XS-16** fraksiyonunun silikajel kolonda hegzan ve artan oranda etil asetat çözücü sistemi ile yıkanması sonucunda renksiz yağmsı şekilde edildi (50 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra kahverengi renk verdi.

UV  $\lambda_{\max}$  (nm)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 245.5

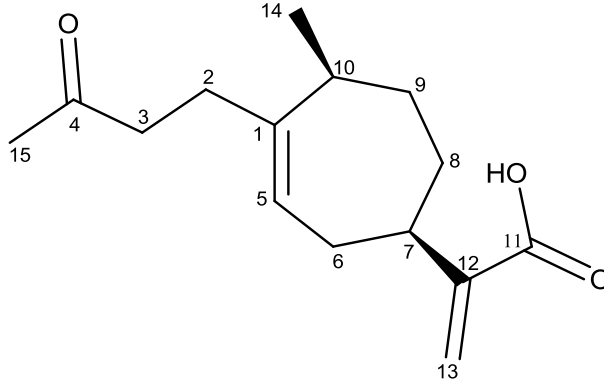
IR  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 1775, 1710, 1590, 1210, 1083, 950

ESI-MS  $m/z$ : 271.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**Tablo 4. 2.** Tomentosin bileşiği için  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), DEPT ve  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) değerleri

C No	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	DEPT
1	—	139.9	—
2	2.44-2.55, m	34.6	— $\text{CH}_2$
3	2.44-2.55, m	42.9	— $\text{CH}_2$
4	—	208.4	—
5	5.53, dd ( $J=8.4$ ve $1.5$ Hz)	118.8	—CH
6 $\alpha$	2.20-2.34, m	26.1	— $\text{CH}_2$
6 $\beta$	2.02, m	26.1	— $\text{CH}_2$
7	2.44-2.55, m	48.4	—CH
8	4.22, ddd ( $J=12.0$ , $7.2$ ve $4.8$ Hz)	82.3	—CH
9 $\alpha$	1.7, ddd ( $J=12.0$ ve $4.2$ Hz)	37.2	— $\text{CH}_2$
9 $\beta$	2.20-2.34, m	37.2	— $\text{CH}_2$
10	2.20-2.34, m	34.2	—CH
11	—	170.4	—
12	—	146.5	—
13	6.15, d, ( $J=3.3$ Hz) 5.44, d, ( $J=3.3$ Hz)	121.8	— $\text{CH}_2$
14	1.13, d ( $7.5$ Hz)	18.7	— $\text{CH}_3$
15	2.16, s	30.2	— $\text{CH}_3$

### 3 Numaralı Bileşik: 4-okso-bedfordia asit



Şekil 4. 5. 4-okso-bedfordia asit

4-okso-bedfordia asit **XS-8** fraksiyonununun silikajel kolonda hegzan ve artan oranda etil asetat çözücü sistemi ile fraksiyonlandırılıp, 2. fraksiyona preparatif TLC uygulanması sonucunda renksiz yağimsı şekilde edildi (20 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra sarımsı kahverengi renk verdi.

UV  $\lambda_{\max}$  (nm)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 291.5

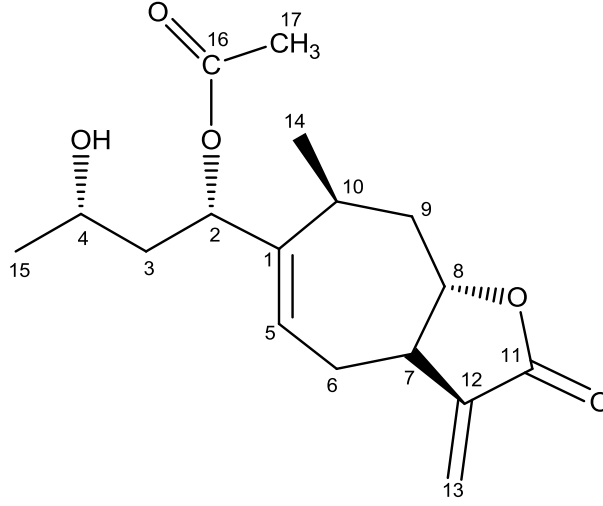
IR  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 3500, 1712, 1630, 1307, 1200, 1030, 975

ESI-MS  $m/z$ : 273.1  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**Tablo 4. 3.** 4-okso-bedfordia asit bileşigi için  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), DEPT ve  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) değerleri

C No	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	DEPT
1	—	147.4	—
2	2.18-2.23, m	33.6	— $\text{CH}_2$
3	2.52-2.56, m	42.9	— $\text{CH}_2$
4	—	209.3	—
5	5.43, dd, ( $J=6.3$ ve $1.2$ Hz)	124.7	—CH
6	1.64- 1.7, m	32.8	— $\text{CH}_2$
7	2.48, m	39.6	—CH
8	1.77-1.82, m	31.7	— $\text{CH}_2$
9	2.18-2.23, m	34.0	— $\text{CH}_2$
10	2.28-2.33, m	37.3	—CH
11	—	172.6	—
12	—	146.6	—
13	6.13, d, ( $J=1.2$ Hz) 5.60, d, ( $J=1.2$ Hz)	122.8	— $\text{CH}_2$
14	1.12, d ( $J=7.5$ Hz)	16.9	— $\text{CH}_3$
15	2.10, s	30.2	— $\text{CH}_3$

**4 Numaralı Bileşik: 2-asetoksi,4-hidroksi 1(5), 11(13)-xanthadien-12,8 olid; Isoxanthanol**



**Şekil 4. 6.** Isoxanthanol

İsoxanthanol **XS-8** fraksiyonunun silikajel kolonda hegzan ve artan oranda etil asetat çözücü sistemi ile fraksiyonlandırılıp, 11. fraksiyona preparatif TLC uygulanması sonucunda renksiz yağimsı şekilde edildi (20 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra kahverengi renk verdi.

UV  $\lambda_{\max}$  (nm)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 248

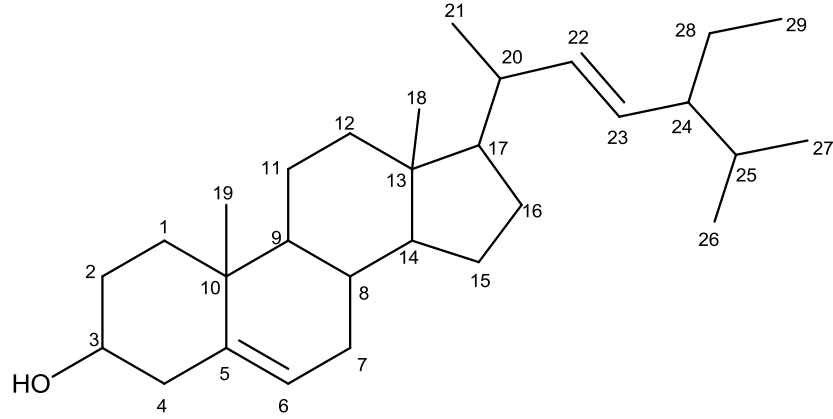
IR  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 3400, 1772, 1740, 1610, 1345, 1210, 1110, 980

ESI-MS  $m/z$ : 331.2  $[\text{M}+\text{Na}]^+$

**Tablo 4. 4.** Isoxanthanol bileşiği için  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), DEPT ve  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) değerleri

C No	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$	DEPT
1	—	146.2	—
2	5.39, dd, ( $J=10.5$ ve $3.3$ Hz)	78.0	—CH
3	1.57, m	43.6	—CH <sub>2</sub>
4	3.71, m	64.0	—CH
5	5.93, dd, ( $J=9.6$ ve $5.7$ Hz)	126.1	—CH
6 $\alpha$	2.45-2.54, m	25.4	—CH <sub>2</sub>
6 $\beta$	2.16, m	25.4	—CH <sub>2</sub>
7	2.45-2.54, m	48.2	—CH
8	4.29, ddd ( $J=10.2$ , $9.3$ ve $2.5$ Hz)	82.3	—CH
9 $\alpha$	1.69-1.88, m	37.0	—CH <sub>2</sub>
9 $\beta$	2.32, m	37.0	—CH <sub>2</sub>
10	2.8, m	30.1	—CH
11	—	171.5	—
12	—	139.4	—
13	6.17, d, ( $J=3.3$ Hz) 5.46, d, ( $J=3.3$ Hz)	118.9	—CH <sub>2</sub>
14	1.15, d (7.2 Hz)	19.5	—CH <sub>3</sub>
15	1.22, s	23.5	—CH <sub>3</sub>
16	—	171.5	—
17	2.10, s	21.4	—CH <sub>3</sub>

**5 Numaralı Bileşik : (E)-17-(5-Etil-6-metilhept-3-en-2-il)-10,13-dimetil 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradekahidro-1H-siklopenta [ $\alpha$ ] fenantren-3-ol; Stigmasterol**



**Şekil 4. 7.** Stigmasterol

Stigmasterol **XS-6** fraksiyonunun silikajel kolonda hegzan ve artan oranda etilasetat çözücü sistemi ile yıkanması sonucunda renksiz katı halde elde edildi (120 mg). UV ışık altında (254 ve 366 nm) absorbanısı gözlenemedi. Serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra bordo-kırmızı renk verdi. E.N.: 169-170 °C

UV  $\lambda_{\max}$  (nm)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : 260

IR  $\nu_{\max}$  ( $\text{CHCl}_3$ )  $\text{cm}^{-1}$ : 3434, 2924, 1639, 1457, 1375, 1179

ESI-MS:  $m/z$  413.4  $[\text{M}+\text{H}]^+$

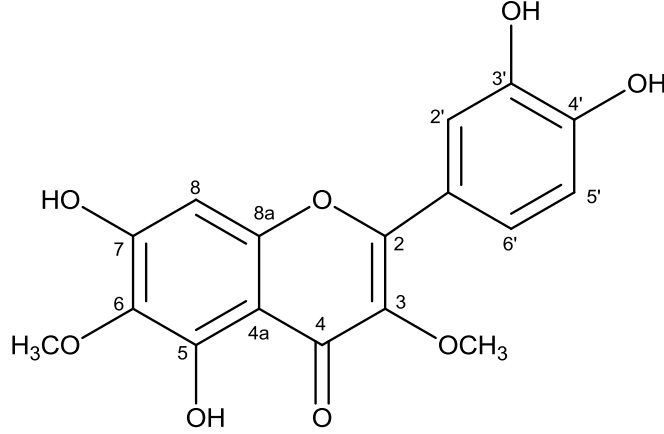
$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$ , 300 MHz, ppm) : 5.36 (1H, br. s, H-6), 5.15 (1H, m, H-22), 5.03 (1H, m, H-23)ppm de, 3.53 ppm de (1H, m, H-3), 1.0 (3H, s, Me-19), 0.92 (3H, d,  $J = 5.7$  Hz, Me-27), 0.82 (3H, t,  $J = 6.3$  Hz, Me-29), 0.69 (3H, d,  $J = 5.7$  Hz, Me-26), 1.05-2.20 (36H, m, metilen protonları).

#### 4. 2. 2. Etilasetat Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Etilasetat fraksiyonu poliamid kolona yüklenerek artan oranda metanol ilavesi ile diklorometan-metanol çözücü sistemi ve daha sonra %50 su-metanol, %100 su çözücü sistemi ile yıkandı. Yapılan fraksiyonlandırma işleminden **80** alt fraksiyon elde edildi. Fraksiyonların TLC'leri incelenerek saf olabilecekler belirlendi. **38** numaralı fraksiyonun metanol ile yıkanması sonucunda sarı toz formunda **6** numaralı axillarin bileşiği elde edildi. **42** numaralı fraksiyonda gözlenen sarı-turuncu renkli kristallerin spektral değerleri incelenerek **7** numaralı *p*-hidroksi benzoik asit olduğu tespit edilmiştir. TLC'de **69-72** numara aralığındaki fraksiyonlar temiz ve tek leke olduğundan spektral olarak incelenmesi yapılmış ve **8** numaralı 1,5-di-*O*-kaffeoil kuinik asit bileşiği olduğu belirlenmiştir.

#### 4. 2. 2. 1. Etilasetat Ekstresinden Elde Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

##### 6 Numaralı Bileşik: Axillarin; 3,6-dimetoksi-5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon



Şekil 4. 8. Axillarin

Axillarin bileşiği **etil asetat** ekstraktının poliamid kolona tatbik edilip diklorometan ve artan oranda metanol ilavesi ile elüe edilmesi sonucu sarı renkli toz halinde elde edildi (110 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik serif sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra sarı renk verdi.

UV  $\lambda_{\max}$  (nm) MeOH: 224.5, 260.5, 373.5

NaOMe: 411.0

AlCl<sub>3</sub>: 211.0, 267.0, 387.5

AlCl<sub>3</sub>+HCl: 212.0, 361.0, 362.2

NaOAc: 206.5, 272.5, 403.5

NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>: 212.5, 264.0, 380.0

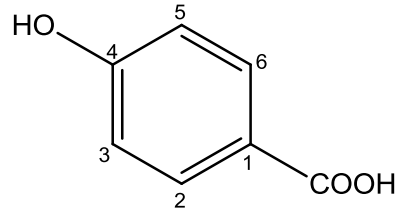
IR  $\nu_{\max}$  (nujol) cm<sup>-1</sup>: 3400, 1660, 1615, 1545, 1394, 1332, 1156, 1090, 959, 758

ESI-MS m/z : 341.2 [M+Na]<sup>+</sup>

**Tablo 4. 5.** Axillarin bileşigi için  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ve  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) değerleri

<b>C No</b>	<b><math>^1\text{H-NMR}</math></b>	<b><math>^{13}\text{C-NMR}</math></b>
<b>2</b>	—	156.9
<b>3</b>	—	138.0
<b>4</b>	—	179.7
<b>5</b>	—	167.1
<b>6</b>	—	132.0
<b>7</b>	—	158.0
<b>8</b>	6.49, s	93.7
<b>8a</b>	—	152.5
<b>4a</b>	—	106.9
<b>1'</b>	—	121.1
<b>2'</b>	7.61, d ( $J=2.1$ Hz)	115.2
<b>3'</b>	—	146.3
<b>4'</b>	—	148.5
<b>5'</b>	6.89, d ( $J=8.4$ Hz)	115.0
<b>6'</b>	7.52, dd ( $J=8.4$ ve $2.1$ Hz)	121.5
<b>3-OMe</b>	3.77, s	59.3
<b>6-OMe</b>	3.87, s	59.7

## 7 Numaralı Bileşik: 4-hidroksibenzoik asit; *p*-hidroksibenzoik asit



Şekil 4. 9. 4-hidroksibenzoik asit

4-hidroksibenzoik asit bileşiği **etil asetat** ekstraktının poliamid kolona tatbik edilip diklorometan ve artan oranda metanol ilavesi ile elüe edilmesi sonucu elde edildi (40 mg). Serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra kahverengi renk verdi.

UV  $\lambda_{\max}$  (nm) MeOH: 342, 253.5, 205.5, 253.5, 205.5

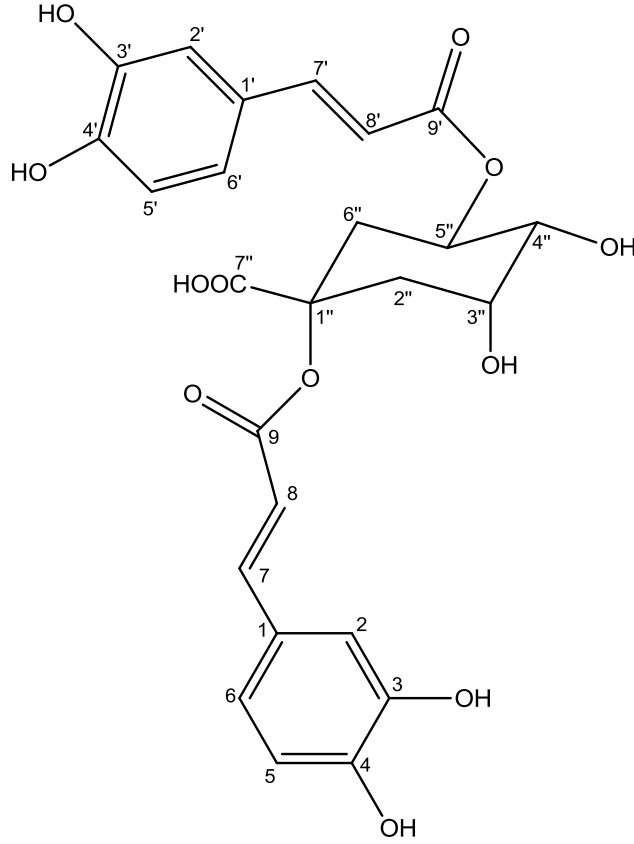
IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3405, 2854, 1660, 1635, 1445, 1293, 1085, 930.

ESI-MS  $m/z$ : 161.0  $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$

**Tablo 4. 6.** 4-hidroksibenzoik asit bileşiği için  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ve  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) değerleri

C No	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1	—	121.1
2	7.87, d, ( $J=9.0$ Hz)	131.8
3	6.81, d, ( $J=9.0$ Hz)	115.0
4	—	162.0
5	6.81, d, ( $J=9.0$ Hz)	115.0
6	7.87, d, ( $J=9.0$ Hz)	131.8
—COOH	—	169.0

**8 Numaralı Bileşik: Sinarin; 1,5-Di-O-kaffeoilkuinik asit**



**Şekil 4. 10.** Sinarin

Sinarin bileşiği **etil asetat** ekstraktının poliamid kolona tatbik edilip diklorometan ve artan oranda metanol ilavesi ile elüe edilmesi sonucu elde edildi (80 mg). Serik sülfat belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra gri-kahve renk verdi.

UV  $\lambda_{\max}$  (nm) MeOH: 210.0, 261.0, 310.0, 376.0

IR  $\nu_{\max}$  (KBr)  $\text{cm}^{-1}$ : 3424, 1674, 1635, 1510, 1435, 1278, 1176, 1081, 1033, 978

ESI-MS  $m/z$ : 539.1  $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$

**Tablo 4. 7.** Sinarin bileşigi için  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) ve  $^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) değerleri

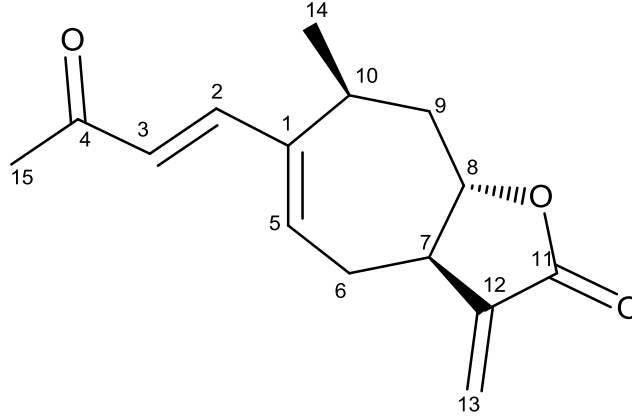
C No	$^1\text{H-NMR}$	$^{13}\text{C-NMR}$
1,1'	—	126.6
2,2'	7.05, d, ( $J=1.2$ Hz)	115.3
3,3'	—	146.1
4,4'	—	148.4
5,5'	6.77, d ( $J=7.8$ Hz)	113.9
6,6'	6.95, dd ( $J=7.8$ ve 1.2 Hz)	121.9
7,7'	7.57, d ( $J=15.6$ Hz)	145.6
8	6.26, d ( $J=15.6$ Hz)	115.3
8'	6.30, d ( $J=15.6$ Hz)	115.3
9	—	166.9
9'	—	167.6
1''	—	86.3
2''	2.10, m	30.2
3''	4.28, br dd, ( $J=3.0$ Hz)	68.5
4''	3.77, dd, ( $J=8.1$ ve 3.0 Hz)	71.3
5''	5.39, td ( $J=8.1$ ve 3.4 Hz)	70.3
6''	2.51, m	35.8
7''	—	174.0

## BÖLÜM 5

### 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

#### 5. 1. Kimyasal Bulgular

##### 5. 1. 1 numaralı bileşik: 4-okso-1(5), 2, 11(13)- xanthatrien-12, 8-olide; Xanthatin



Xanthatin

Xanthatin bileşiği daha önce çeşitli *Xanthium* türlerinden izole edilmiştir. Böcek savar özelliğinin yanı sıra antibakteriyal, antifungal etkileri vardır [1].

IR spektrumunda  $1765\text{ cm}^{-1}$  de lakton grubuna ait karboksil bandı,  $1680\text{ cm}^{-1}$  de karboksil bandı ve  $1605\text{--}965\text{ cm}^{-1}$  de doymamışlık bantları gözlenmiştir.

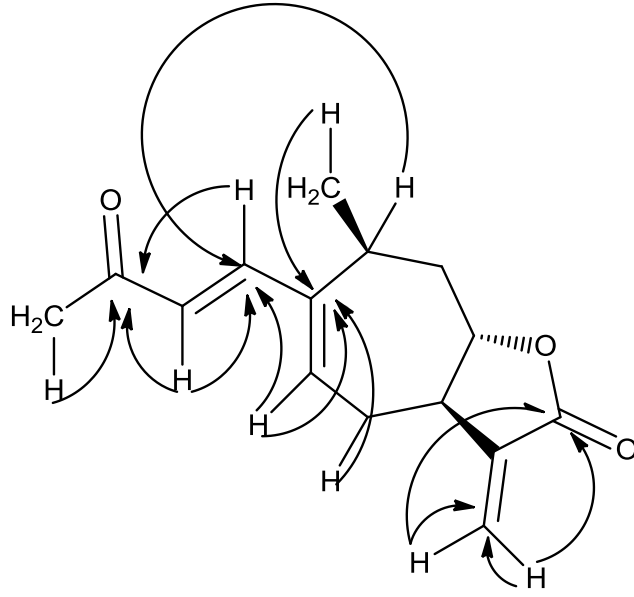
Bileşiğin DCM ile alınan UV spektrumunda maksimum absorpsiyon bandı  $294\text{ nm}$ 'de gözlemlenmiştir.

Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_3$  kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini  $m/z\ 269.1\ [\text{M}+\text{Na}^+]^+$  olarak vermiştir.

Bileşğin  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda yedili halkadaki vinilik proton (H-5) 6.30 ppm'de (dd,  $J=9.0$  ve  $2.7$  Hz, 1H), alifatik protonlardan oksimetin protonu (H-8) 4.31 (ddd,  $J=12.3$ ,  $9.9$  ve  $2.7$  Hz, 1H), H-6 $\alpha$  2.82 ppm (ddd,  $J=11.7$ ,  $9.0$  ve  $2.7$  Hz, 1H), H-6 $\beta$  2.22-2.30 ppm (m, 1H), H-7 2.52-2.61 ppm (m, 1H), H-9 $\alpha$  1.86 ppm (ddd,  $J=16.0$ ,  $12.6$  ve  $3.9$  Hz, 1H), H-9 $\beta$  2.37-2.42 (m, 1H), H-10 2.33-2.36 ppm (m, 1H) ve halkaya bağlı metil grubu protonları (H-14) 1.16 ppm'de (d,  $J=7.2$  Hz, 3H) gözlenmiştir. Karbonile  $\alpha$ ,  $\beta$ -doymamış konumda olan olefinik protonlardan  $\beta$  konumda olan hidrojen (H-2) karbonilin rezonansla elektron çekmesinden dolayı aşağı alanda 7.08 ppm'de dublet sinyal verirken  $\alpha$  konumda olan hidrojen (H-3) 6.21 ppm'de dublet sinyal vermiştir ve 15.6 Hz'lik yarımlama sabiti bunların trans konumda olduğunu kanıtlar şekildedir. Karbonil grubuna bağlı metil protonları (H-15) 2.31 ppm'de (s, 3H) sinyal vermiştir. Lakton halkasına bağlı vinilik metilen protonlarının (H-13) 6.21 ve 5.51 ppm'de 3.0 Hz'lik geminal yarımlama değeriyle dublet sinyal verdiği gözlemlendi.

Bileşğin DEPT spektrumunu alınmış ve 6 metin karbonu, 3 metilen karbonu, 2 tane metil karbonu piki çıkmıştır.  $^{13}\text{C-NMR}$  spektrumunda  $\alpha,\beta$ -doymamış karbonil grubu 198.9 ppm'de gözlenirken lakton kısmının karbonili 170.0 ppm'de pik vermiştir. Lakton halkasına bağlı vinilik grup karbonları 139.3 (C-12) ve 119.3 (C-13) ppm'de gözlemlenmişlerdir. Karbonil grubuna  $\alpha,\beta$  konumda bulunan trans olefinik karbonlardan C-3 ( $\alpha$ ) 124.8 ppm'de sinyal verirken C-2 ( $\beta$ ) 148.8 ppm'de ve karbonil grubunun diğer tarafından bağlı olan metil karbonu 28.1 (C-15) ppm'de sinyal vermiştir. Yedili halkadaki olefinik karbonlar 144.9 (C-1) ve 138.5 (C-5) ppm'de, lakton halkasının oksijenine bağlı metin karbonu 81.7 (C-8) ppm'de ve halkaya bağlı diğer karbonlar ise 47.6 (C-7), 36.7 (C-9), 29.2 (C-10), 27.3 (C-6) ve 19.0 (C-14) ppm'de gözlemlenmişlerdir.

HMBC spektrumunda önemli eşleşmeler H-15 ( $\text{CH}_3$ ), H-2 ve H-3 protonları ile C-4 karbonili arasında gözlemlendi. Ayrıca H-5, H-10 ve H-3 protonları C-2 karbonu ile, H-14, H-10, H-5 ve H-6 protonları C-1 karbonu ile eşleşme göstermiştir. Lakton halkasının karbonil grubu ile H-13 vinilik protonları arasında da eşleşme gözlenmiştir.

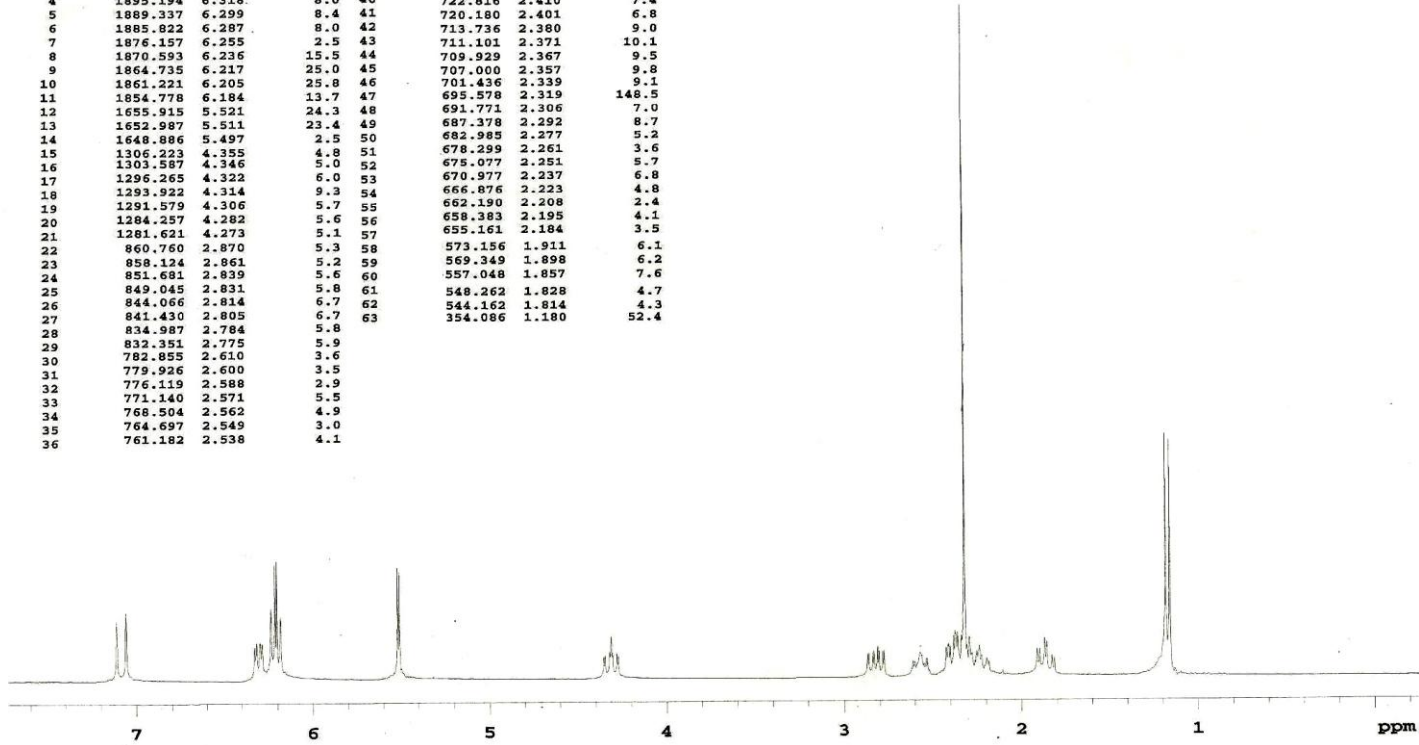


**Şekil 5. 1.** Xanthatin bileşiğine ait HMBC korelasyonları

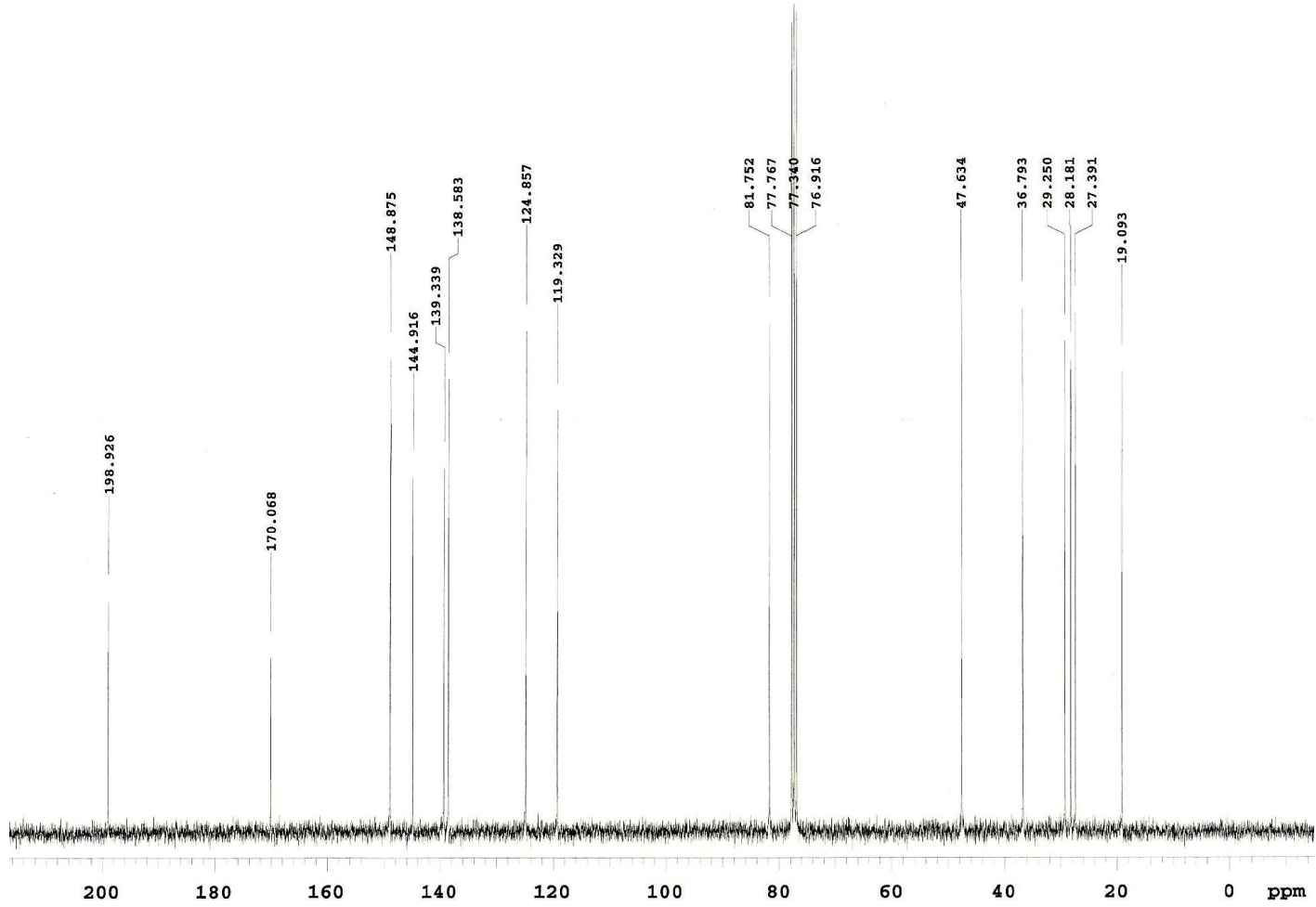
COSY spektrumunda trans olefinik protonlar arasında, H-6 protonları ile H-5 protonu arasında, H-9 protonları ile H-8 protonu arasında, H-7 ve H-8 protonları arasında, H-14 ile H-10 protonları arasında eşleşmeler görülmüştür.

Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğin Xanthatin olduğu doğrulanmıştır [29].

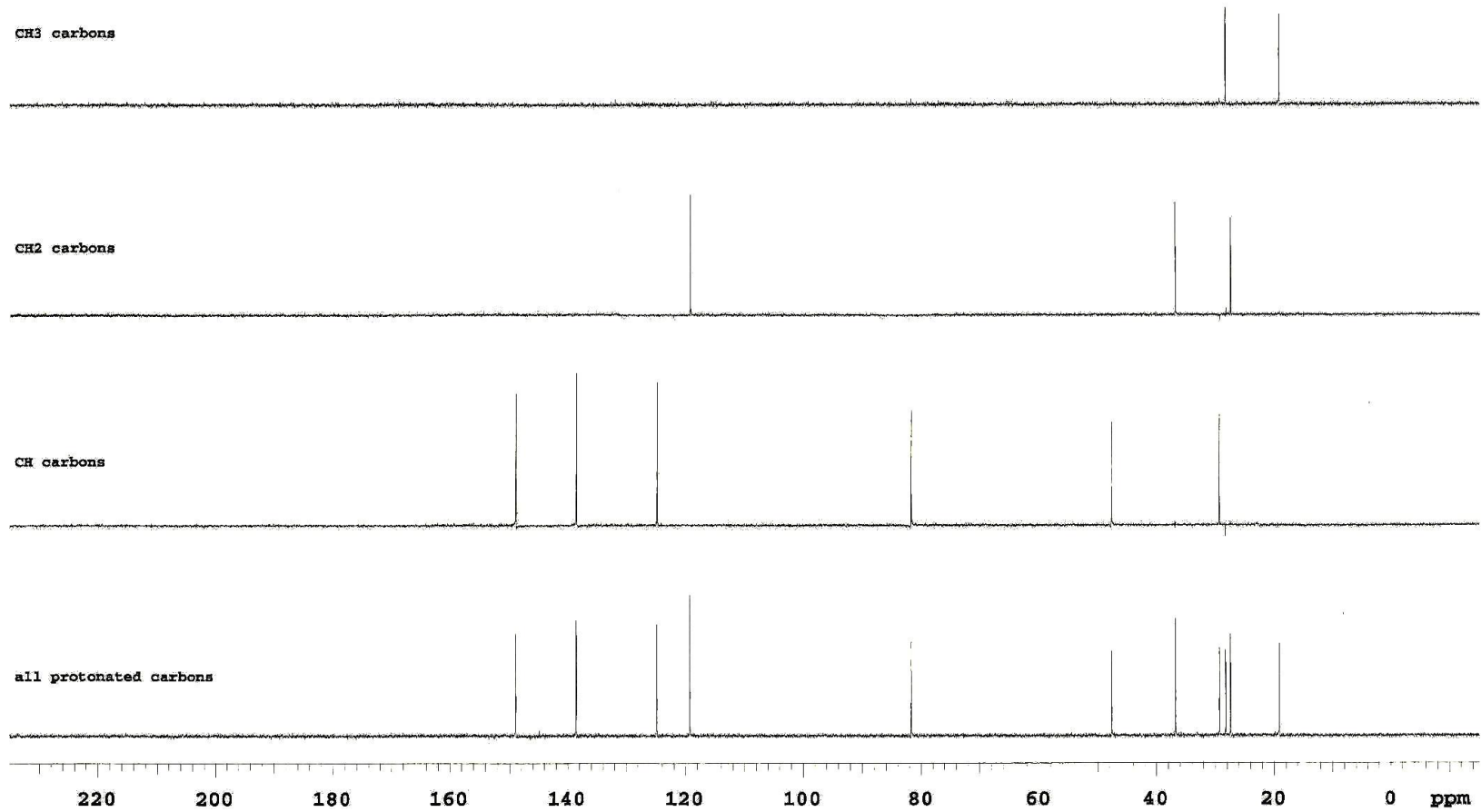
INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT	INDEX	FREQUENCY	PPM	HEIGHT
1	2133.887	7.114	13.0	37	758.546	2.529	4.2
2	2117.779	7.061	14.7	38	726.916	2.423	6.4
3	1898.416	6.329	7.3	39	723.987	2.414	7.0
4	1895.194	6.318	8.0	40	722.816	2.410	7.4
5	1889.337	6.299	8.4	41	720.180	2.401	6.8
6	1885.822	6.287	8.0	42	713.736	2.380	9.0
7	1876.157	6.255	2.5	43	711.101	2.371	10.1
8	1870.593	6.236	15.5	44	709.929	2.367	9.5
9	1864.735	6.217	25.0	45	707.000	2.357	9.8
10	1861.221	6.205	25.8	46	701.436	2.339	9.1
11	1854.778	6.184	13.7	47	695.578	2.319	148.5
12	1655.915	5.521	24.3	48	691.771	2.306	7.0
13	1652.987	5.511	23.4	49	687.378	2.292	8.7
14	1648.886	5.497	2.5	50	682.985	2.277	5.2
15	1306.223	4.355	4.8	51	678.299	2.261	3.6
16	1303.587	4.346	5.0	52	675.077	2.251	5.7
17	1296.265	4.322	6.0	53	670.977	2.237	6.8
18	1293.922	4.314	9.3	54	666.876	2.223	4.8
19	1291.579	4.306	5.7	55	662.190	2.208	2.4
20	1284.257	4.282	5.6	56	658.383	2.195	4.1
21	1281.621	4.273	5.1	57	655.161	2.184	3.5
22	860.760	2.870	5.3	58	573.156	1.911	6.1
23	858.124	2.861	5.2	59	569.349	1.898	6.2
24	851.681	2.839	5.6	60	557.048	1.857	7.6
25	849.045	2.831	5.8	61	548.262	1.828	4.7
26	844.066	2.814	6.7	62	544.162	1.814	4.3
27	841.430	2.805	6.7	63	354.086	1.180	52.4
28	834.987	2.784	5.8				
29	832.351	2.775	5.9				
30	782.855	2.610	3.6				
31	779.926	2.600	3.5				
32	776.119	2.588	2.9				
33	771.140	2.571	5.5				
34	765.504	2.562	4.9				
35	764.697	2.549	3.0				
36	761.182	2.538	4.1				



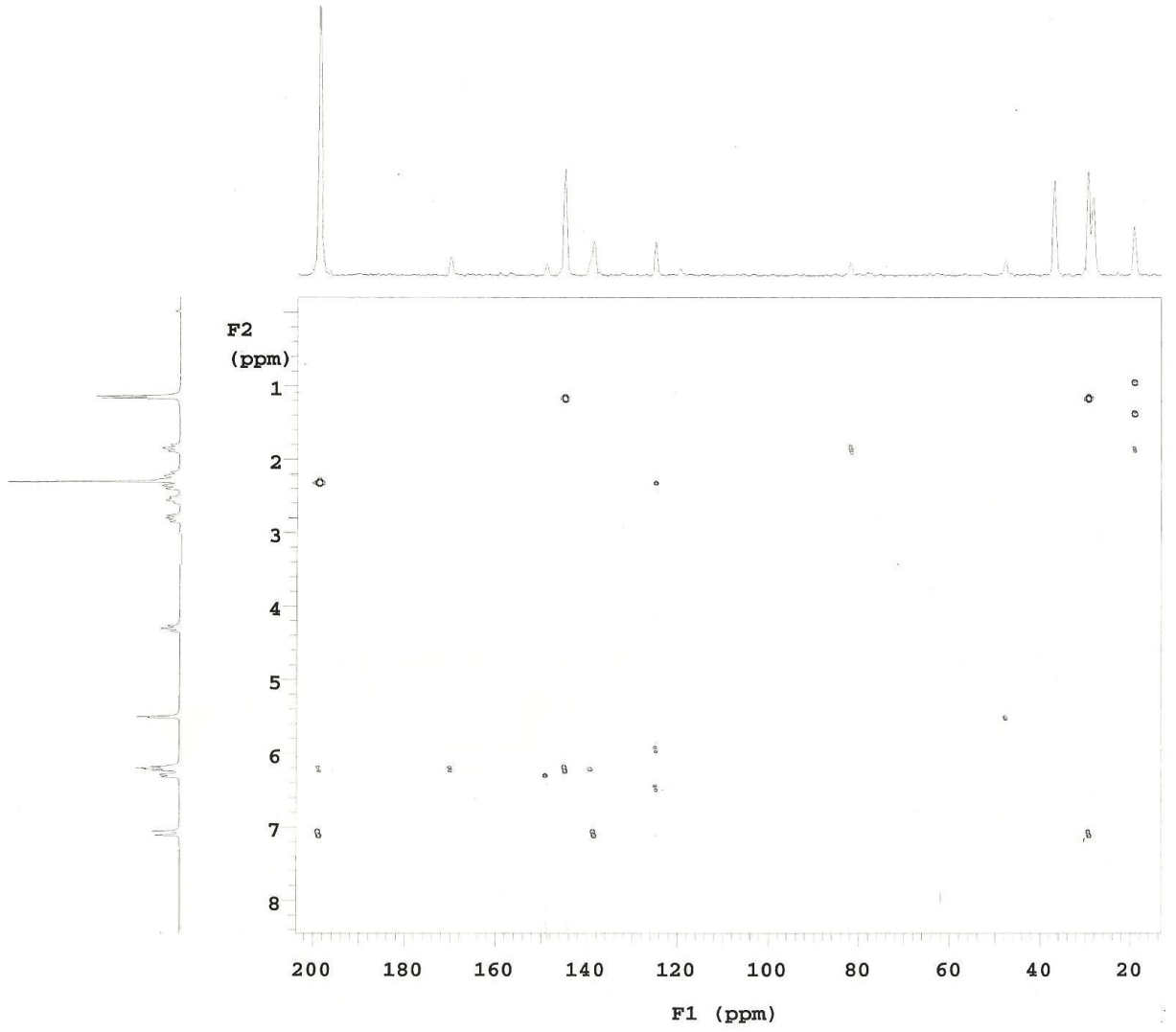
Şekil 5. 2. Xanthin bileşiğine ait  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu



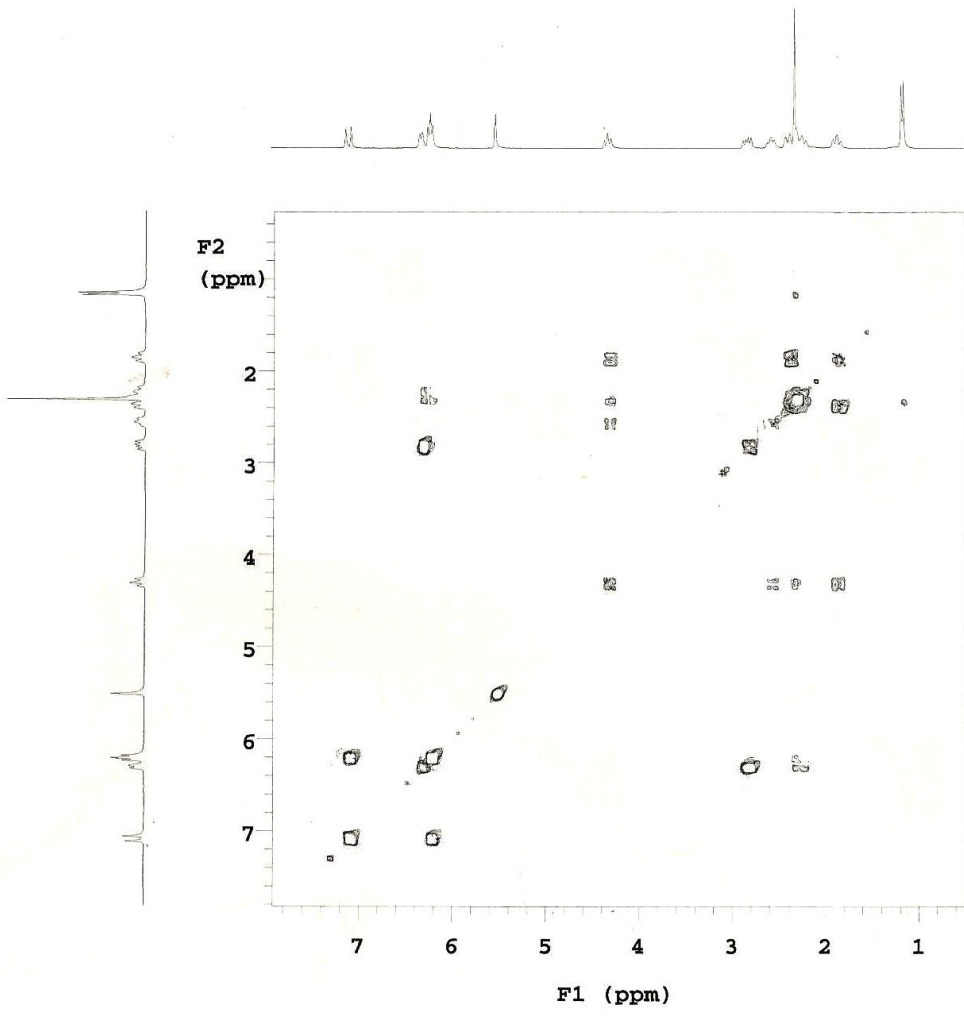
Şekil 5. 3. Xanthin bileşiğine ait  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu



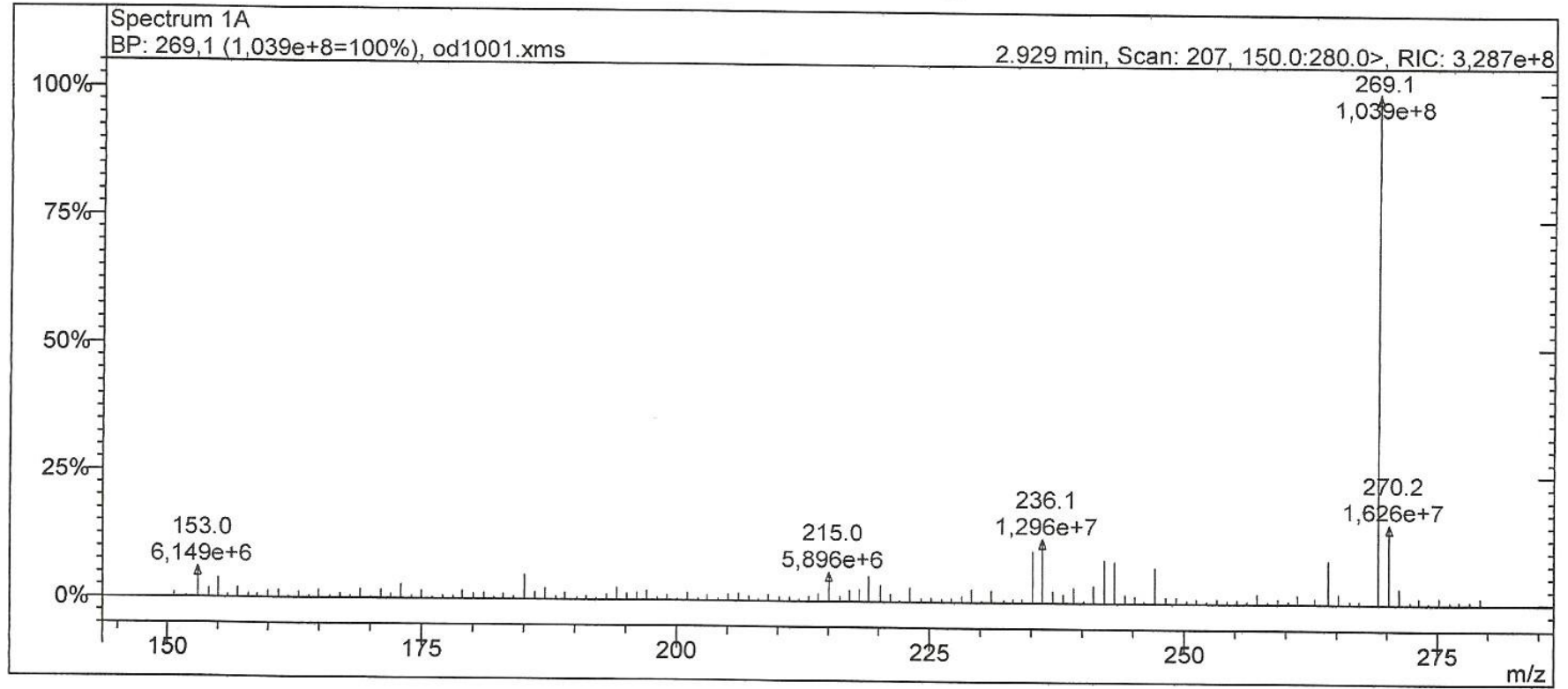
Şekil 5. 4. Xanthatin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spektrumu



Şekil 5. 5. Xanthatin bileşiğine ait HMBC spektrumu

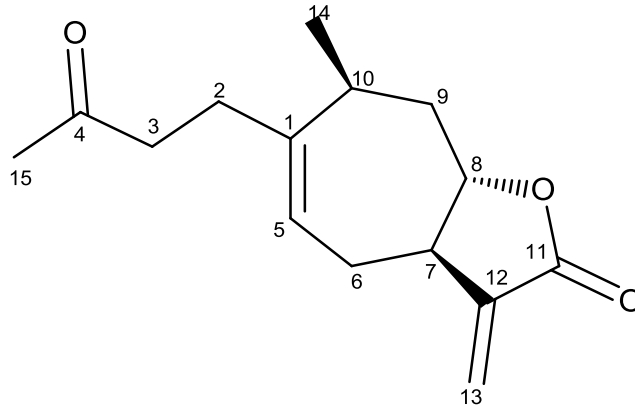


Şekil 5. 6. Xanthatin bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 5. 7. Xanthatin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

### 5. 1. 2. 2 Numaralı Bileşik 4-okso-1(5), 11(13) xanthatrien-12,8 olid; Tomentosin



Tomentosin

Bileşğin DCM ile alınan UV spektrumunda maksimum absorpsiyon bandı 245.5 nm’ de gözlemlenmiştir.

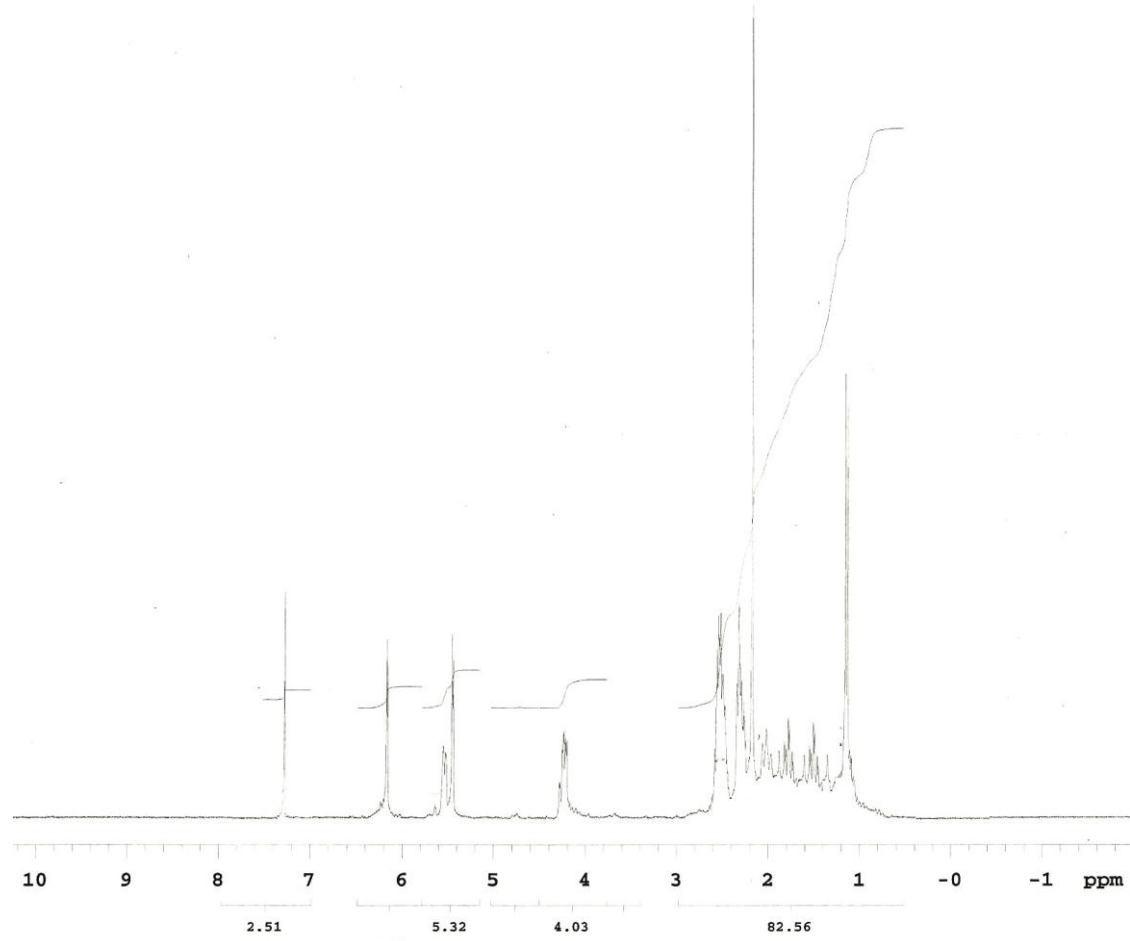
IR spektrumunda  $1775\text{cm}^{-1}$  de lakton grubuna ait karboksil bandı,  $1710\text{cm}^{-1}$  de karboksil bandı gözlenmiştir.

Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$  kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini  $m/z$  271.1  $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$  olarak vermiştir.

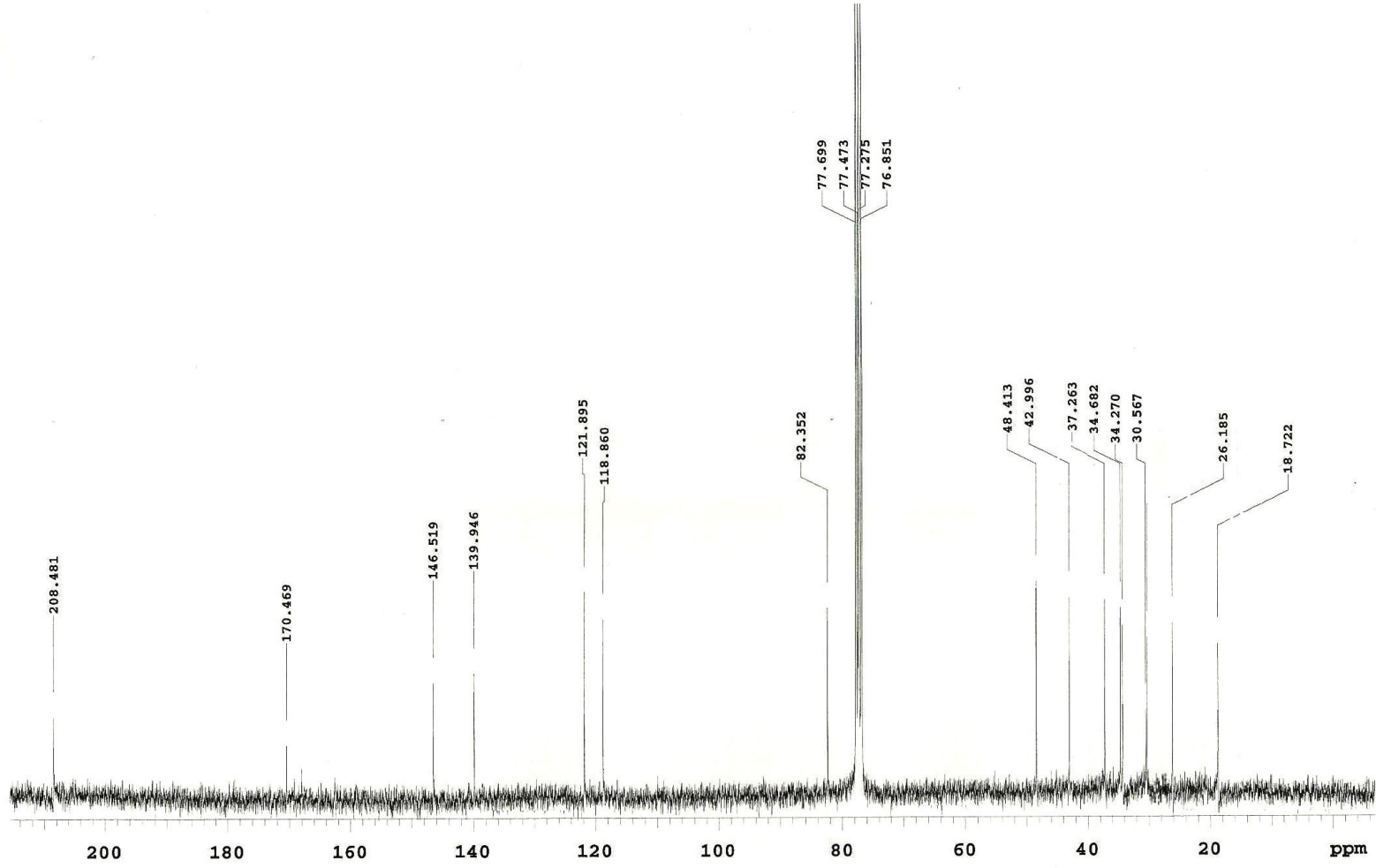
$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda önceki yapıya göre spektrumda iki dublet pikinin eksikliği ve olefinik hidrojen H-5’in 5.53 ppm’de (dd,  $J=8.4$  ve 1.5 Hz, 1H) daha yüksek alanda sinyal vermesi yapıda konjugasyonu sağlayan 2-3 konjuge çift bağın bulunmadığını düşündürmüştür. Ayrıca spekturumda 2.44-2.55 ppm aralığında 4H integrale sahip multipler sinyal gözlenerek H-2 ve H-3 metilen protonlarının varlığına karar verilmiştir. 3H integrale sahip iki metil grubunun protonlarından karbonil grubuna bağlı olan (H-15) 2.16 ppm’de ve yedili halkaya bağlı olan (H-14) 1.13 ppm’de singlet sinyal vermiştir. Yedili halkadaki oksi metin protonu (H-8) 4.22 ppm’de (ddd,  $J=12.0$ , 7.2 ve 4.8 Hz, 1H) ve diğer alifatik protonlar H-6 $\beta$  2.02 ppm (m, 1H), H-7 2.44-2.55 ppm (m, 1H), H-9 $\alpha$  1.7 ppm (ddd,  $J=12.0$  ve 4.2 Hz, 1H) ve H-6 $\alpha$ , H-9 $\beta$  ve H-10 protonları 2.20-2.34 ppm aralığında multipler olarak örtüşmüşlerdir. Lakton halkasına bağlı ekzosiklik çift bağ protonları (H-13) 6.15 (d,  $J=3.3$  Hz, 1H) ve 5.44 ppm (d,  $J=3.3$  Hz, 1H) değerlerinde gözlemlenmiştir.

Bileşğin DEPT spektrumu alınmış, 4 tane metin karbonu, 5 tane metilen karbonu ve 2 tane metil karbonu piki çıkmıştır. <sup>13</sup>C-NMR spektrumunda lakton karbonili 170.4 ppm'de ve keton karbonili 208.4 ppm'de sinyal vermiştir. Karbonile komşu C-2 karbonunun 42.9 ppm, C-3 karbonunun 34.6 ppm'de ve olefinik karbonlardan olan C-5 konjugasyon olmamasından dolayı 118.8 ppm değerinde 1 nolu bileşiğe kıyasla daha yüksek manyetik alanda sinyal vermiştir. Karbonile bağlı metil karbonu (C-15) 30.2 ppm, yedili halkadaki C-1 139.9 ppm, oksimetin protonu (C-8) 82.3 ppm, C-7 48.4 ppm, C-9 37.2 ppm, C-10 34.2 ppm, C-6 26.1 ppm, metil grubu karbonu (C-14) 18.7 ppm'de gözlenmiştir. Lakton halkasına bağlı vinilik karbonlar (C-12) 146.5 ve (C-13) 121.8 ppm'de gözlenmiştir.

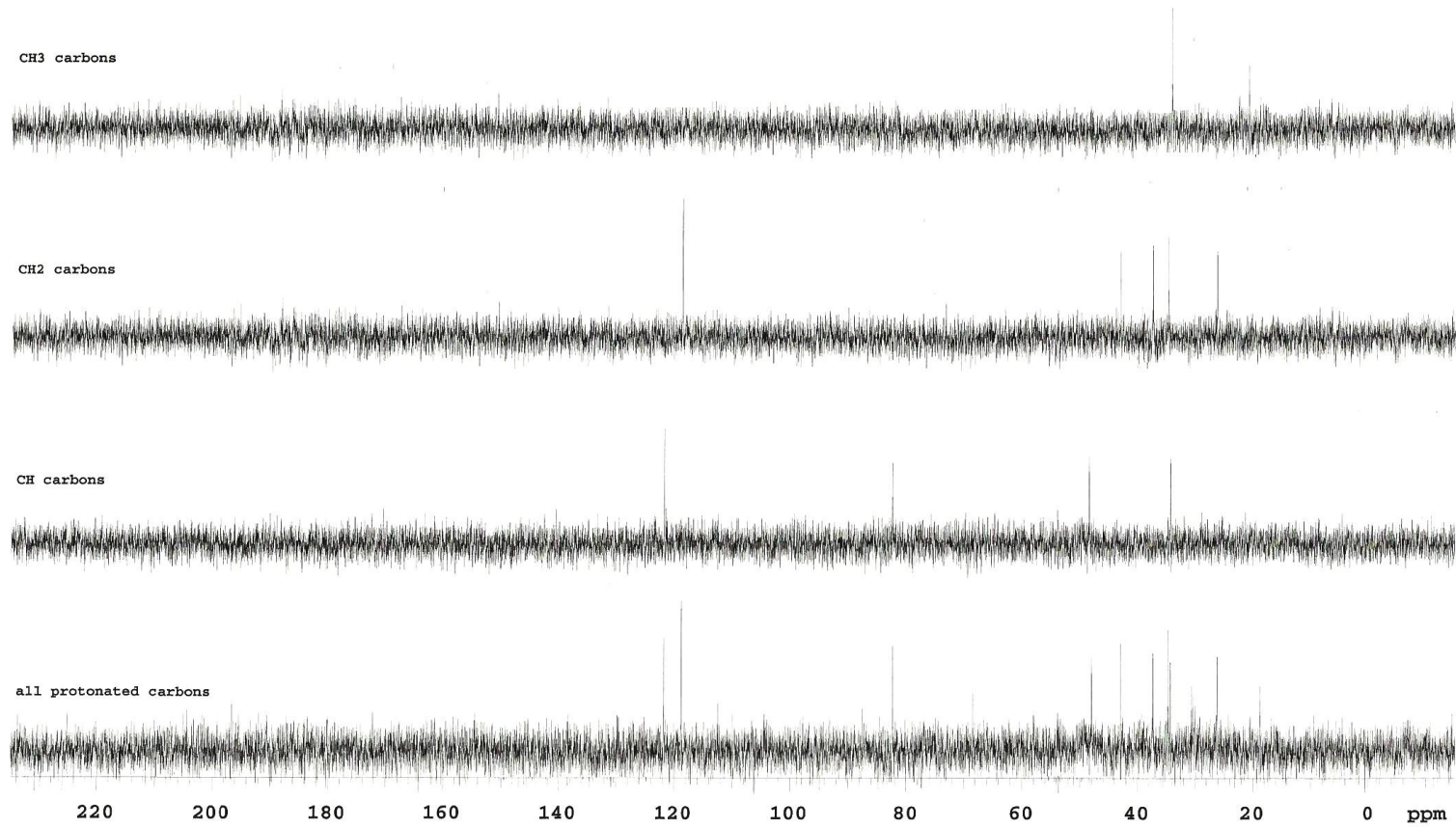
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olması yapının Tomentosin olduğu görüşünü desteklemiştir. [101, 102].



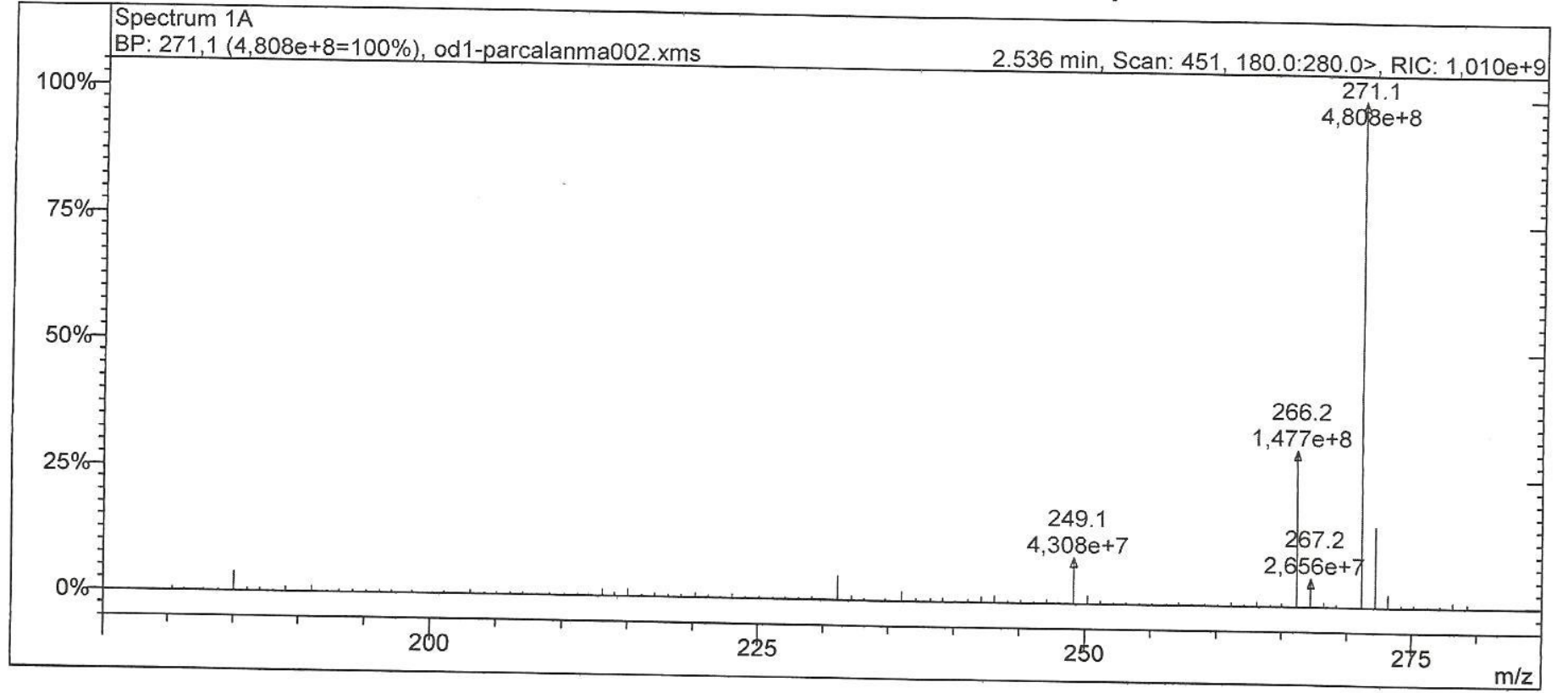
Şekil 5. 8. Tomentosin bileşiğine ait  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu



Şekil 5. 9. Tomentosin bileşiğine ait  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu

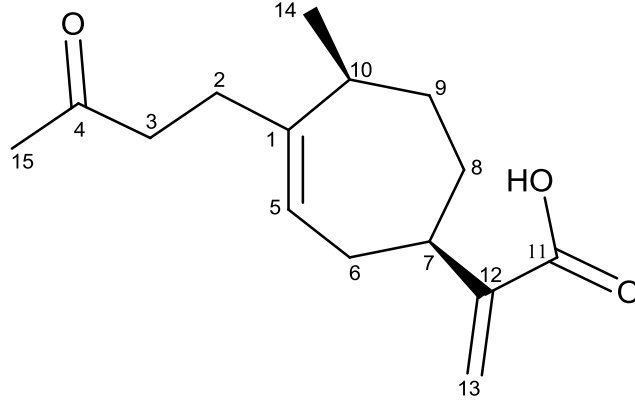


Şekil 5. 10. Tomentosin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spektrumu



Şekil 5. 11. Tomentosin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

### 5. 1. 3. 3 Numaralı Bileşik: 4-okso-bedfordia asit



4-okso-bedfordia asit

Bileşğin DCM ile alınan UV spektrumunda maksimum absorpsiyon bandı 291.5 nm’de gözlemlenmiştir.

IR spektrumunda karboksilli asidin 1715 cm<sup>-1</sup> de karboksil ve 3500 cm<sup>-1</sup> de O-H gerilmeleri, 1710 cm<sup>-1</sup>de karbonil bandı gözlenmiştir.

Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub> kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini m/z 273.1 [M+Na]<sup>+</sup> olarak vermiştir.

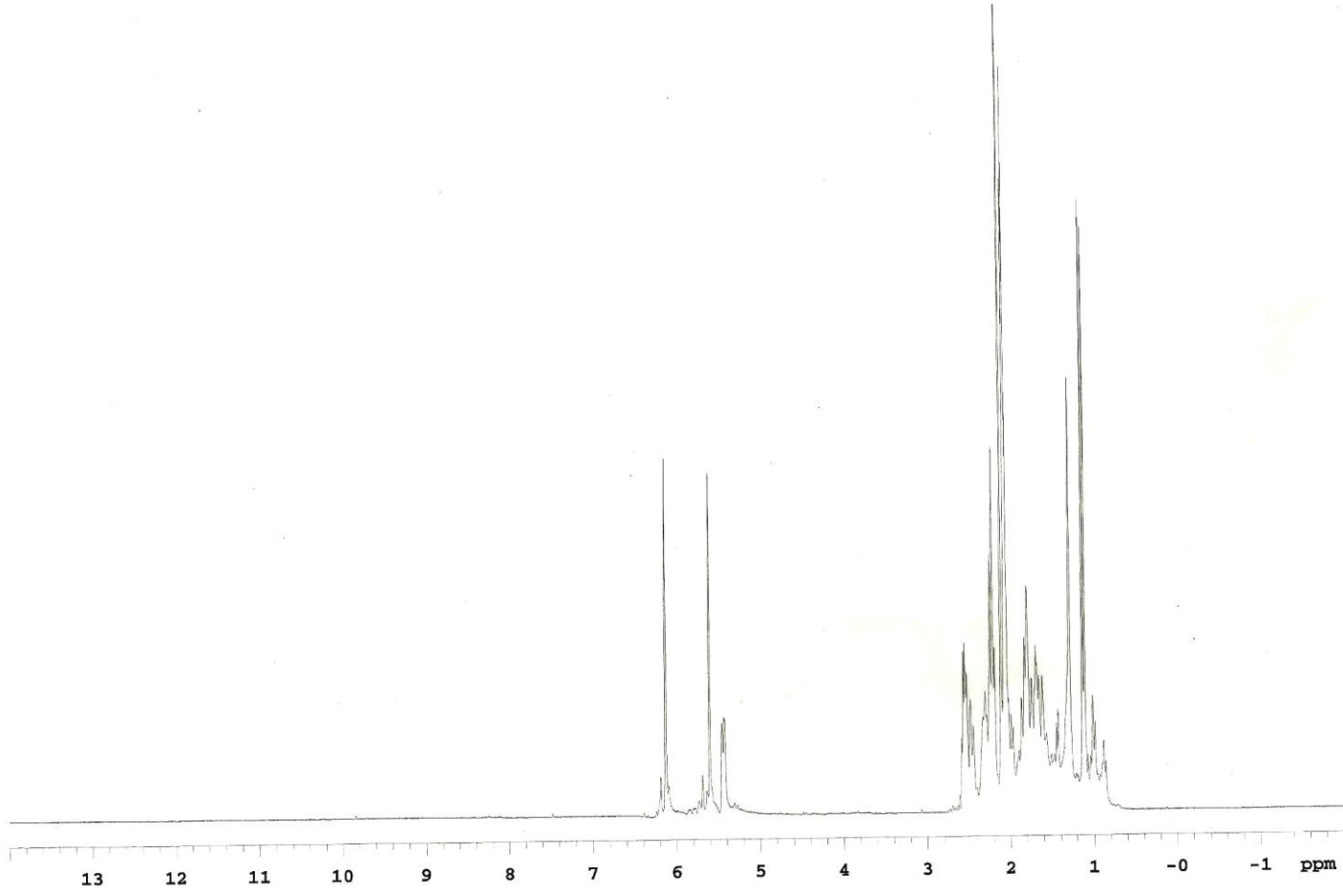
<sup>1</sup>H-NMR spektrumu genel olarak 2 nolu bileşğin spektrumuna benzemektedir. En önemli fark diğer iki xantholid yapılarında karakteristik olarak 4 ppm civarında sinyal veren oksimetin protonu pikinin bu bileşğin spektrumunda gözlenmemesi olmuştur. H-8 protonları 1.77-1.82 ppm civarında (m, 2H) sinyal vermiştir. Karbonil grubuna bağlı metil protonları (H-15) 2.10 ppm’de ve yedili halkaya bağlı metil protonlarının (H-14) 1.12 ppm’de singlet sinyal verdiği gözlenmiştir. Bileşğin asit kısmına komşu vinilik protonlar (H-13) 6.13 ppm (d, *J*=1.2 Hz, 1H) ve 5.60 ppm’de (d, *J*=1.2 Hz, 1H) sinyal vermiştir.

Yedili halkadaki alifatik protonların karbonlarını belirleyebilmek için HMQC spektrumundan faydalanılmıştır. Buna göre 32.8 ppm’deki karbonun (C-6) 1,64-1.7 ppm arasındaki protonları, 39.6 ppm’deki karbonun (C-7) 2.48 ppm’deki protonu, 31.7 ppm’deki (C-8) karbonunun 1.77-1.82 ppm arasındaki protonları, 34.0 ppm’deki

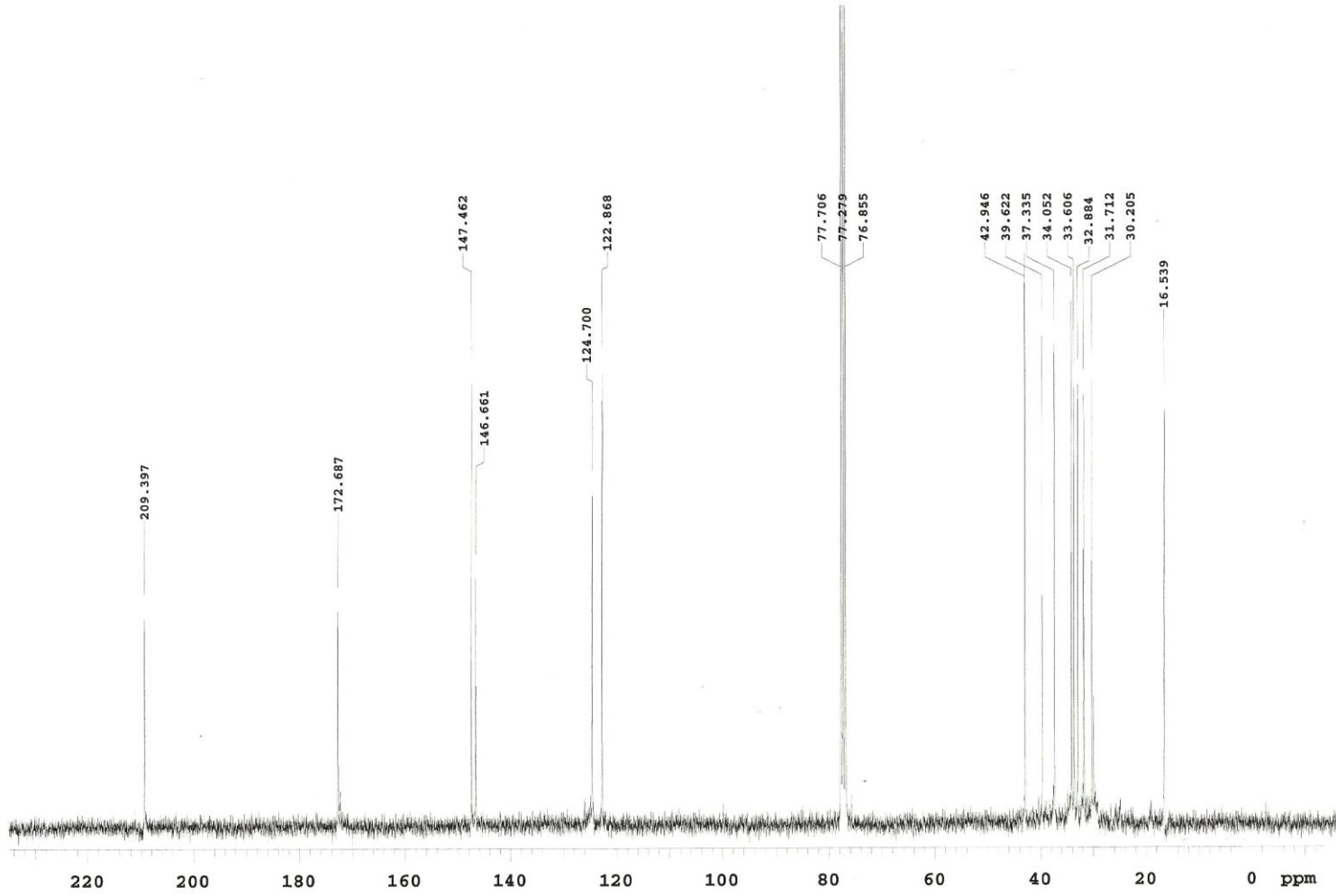
karbonun (C-9) 2.18-2.23 ppm arasındaki protonları ve 37.3 ppm'deki karbonun (C-10) 2.28-2.33 ppm arasındaki protonları taşıdığı belirlenmiştir.

Bileşiğin DEPT spekturumu alınmış, 3 tane metin karbonu, 6 tane metilen karbonu ve 2 tane metil grubu karbonu piki belirlenmiştir. Metin karbonları 124.7 (C-5), 39.6 (C-7) ve 37.3 (C-10) ppm, metilen karbonları 122.8 (C-13), 42.9 (C-3), 39.6 (C-7), 34.0 (C-9), 33.6 (C-2), 31.7 (C-8) ppm, metil karbonlarının ise 30.2 (C-15) ve 16.9 (C-14) ppm değerlerinde sinyal verdiği gözlemlenmiştir. DEPT spektrumuna ek olarak <sup>13</sup>C-NMR spekturumunda 147.4 (C-1) ve 146.6 (C-12) ppm'de kuarterner olefinik karbonlar, 172.6 (C-11) ppm de karboksilli asit karbonu ve 209.3 (C-4) ppm değerinde keton karbonil piki belirlenmiştir.

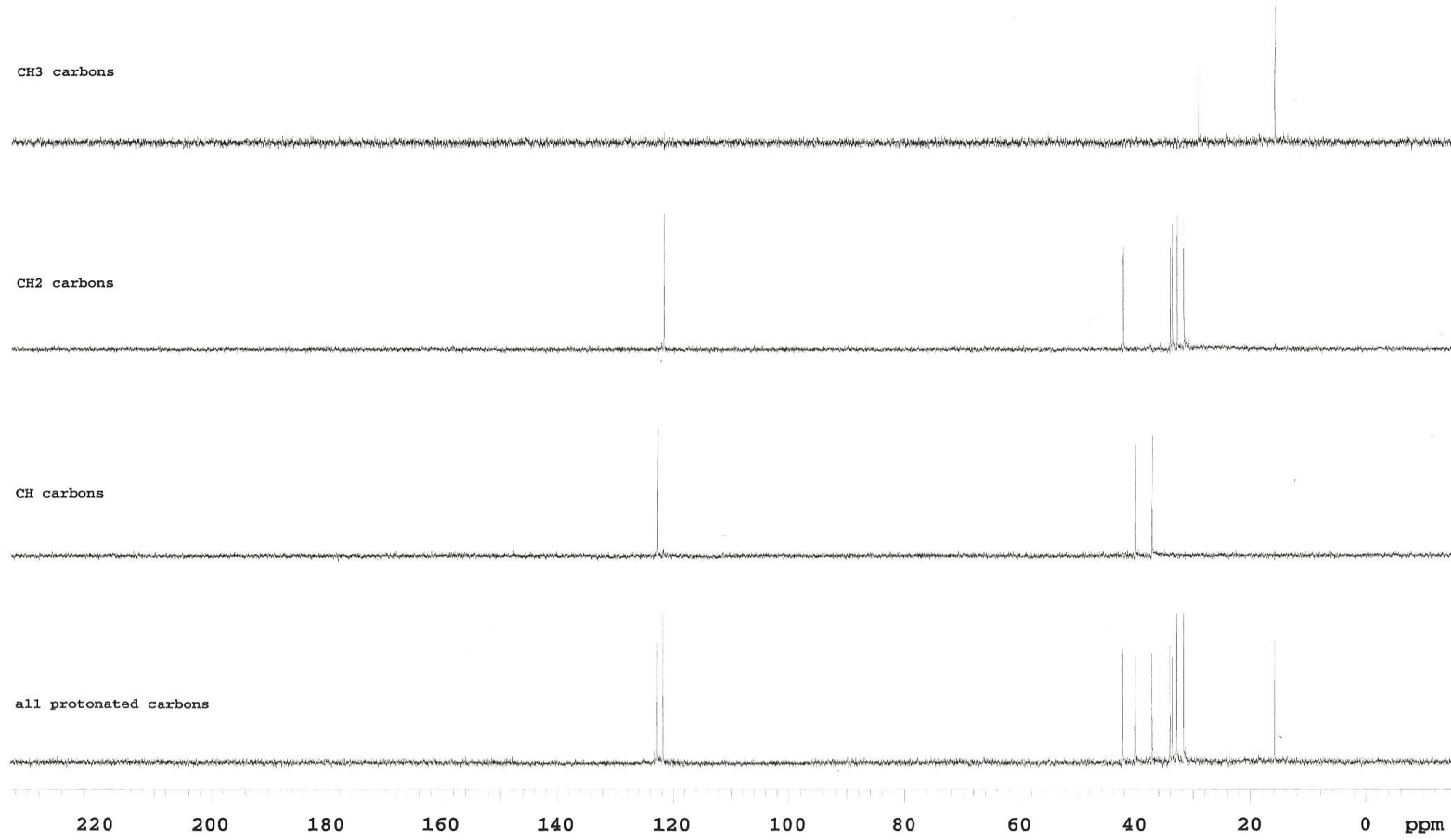
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu görüldüğünden bileşiğin 4-okso-bedfordia asit olduğu görüşüne varılmıştır [101, 103]



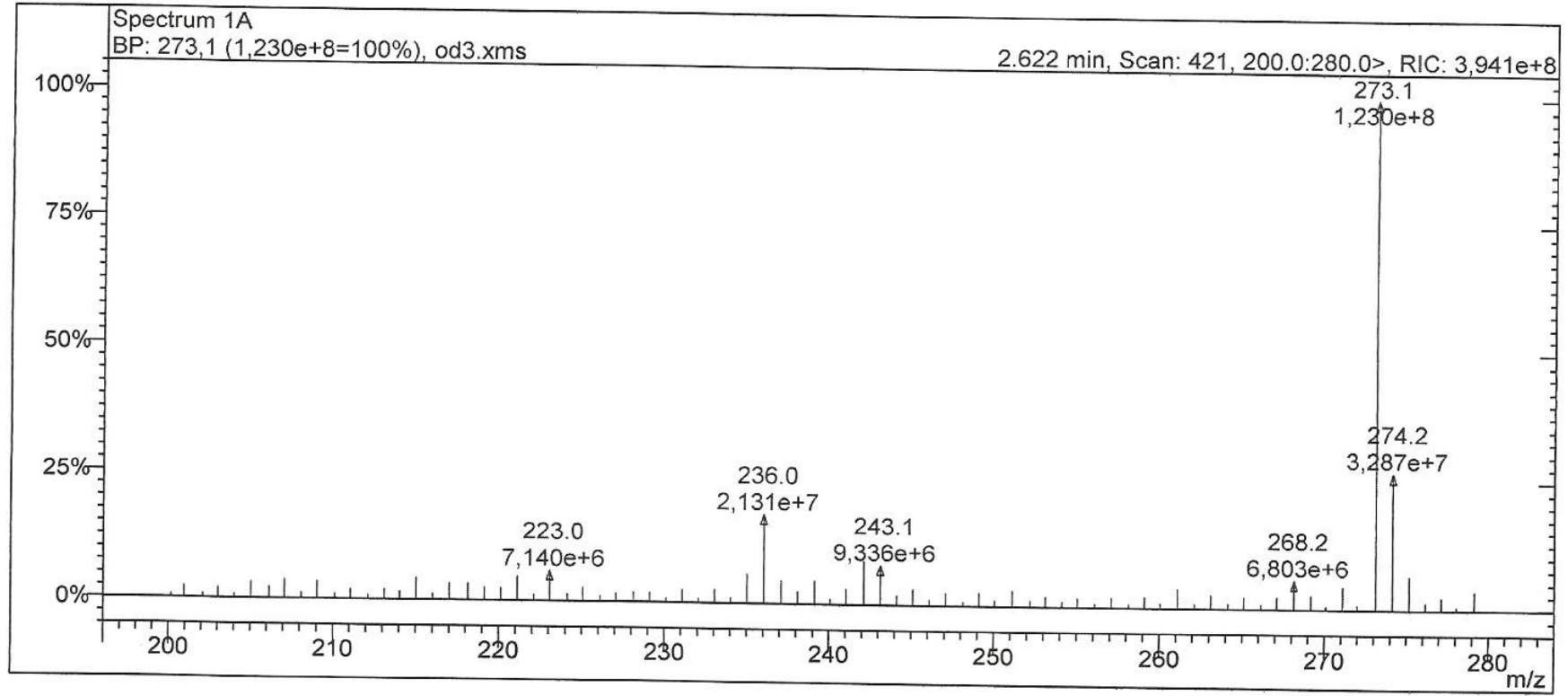
**Şekil 5. 12.** 4-okso-bedfordia asit bileşiğine ait <sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spektrumu



Şekil 5. 13. 4-okso-bedfordia asit bileşiğine ait  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu

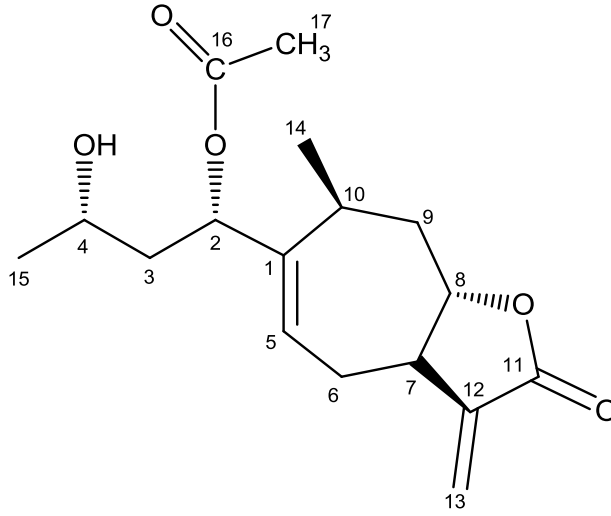


Şekil 5. 14. 4-okso-bedfordia asit bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spektrumu



Şekil 5. 15. 4-okso-bedfordia asit bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

#### 5. 1. 4. 4 Numaralı Bileşik -asetoksi,4-hidroksi 1(5), 11(13)-xanthadien-12,8 olid; Isoxanthanol



Isoxanthanol

Bileşğin DCM ile alınan UV spektrumunda maksimum absorpsiyon bandı 248 nm’ de gözlemlenmiştir.

IR spektrumunda 3400 cm<sup>-1</sup> de O-H gerilmeleri, 1772 cm<sup>-1</sup> de laktona ait karbonil bandı, 1740 cm<sup>-1</sup> de asetil grubu karbonil bandı gözlenmiştir.

Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde C<sub>17</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub> kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini m/z 331.2 [M+Na]<sup>+</sup> olarak vermiştir.

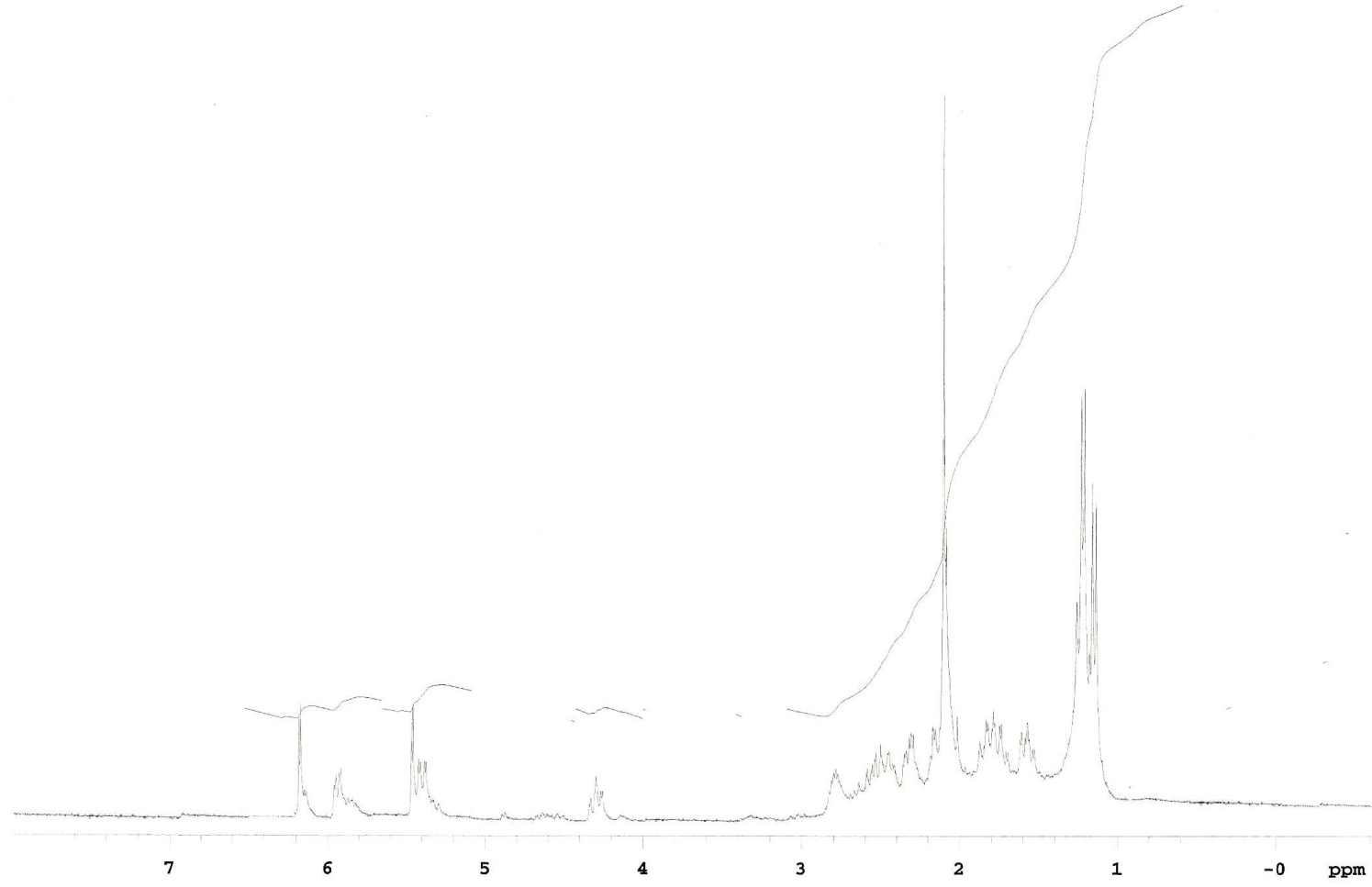
<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda yedili halkadaki olefinik proton (H-5) 5.93 (dd, *J*=9.6 ve 5.7 Hz, 1H) ppm’ de ve lakton halkasına bağlı vinilik protonlar (H-13) 6.17 ve 5.46 ppm de *J*=3.3 Hz’lik geminal yarımla değeriyle dublet sinyaller vermiştir. Karakteristik oksijen protonu (H-8) 4.29 (ddd, *J*=10.2, 9.3 ve 2.5 Hz, 1H), hidroksil grubunu taşıyan karbondaki H-4 protonu 3.71 (1H, m), asetil grubunu taşıyan karbondaki (H-2) protonu ise 5.39 (dd, *J*=10.5 ve 3.3 Hz, 1H) ppm de gözlemlenmiştir. Asetil metili 2.1 (s, 3H) ppm’de, bileşikteki diğer metil grupları (H-15) 1.22 (d, *J*=6.3 Hz, 3H) ve (H-14) 1.15 (d, *J*=7.2 Hz, 3H) ppm de dublet sinyal vermişlerdir. Bileşikteki alifatik protonlar 1.52-2.54 ppm aralığında multipler olarak örtüşmüşlerdir.

Bileşğin DEPT spekturumu alınmış, 6 metin karbonu, 4 metilen karbonu ve 3 metil grubu karbonu piki belirlenmiştir. Metin karbonları 126.1 (C-5), 82.3 (C-8), 78.0 (C-2), 64.0 (C-4), 48.2 (C-7) ve 30.1 (C-10) ppm, metilen karbonları 118.9 (C-13), 43.6

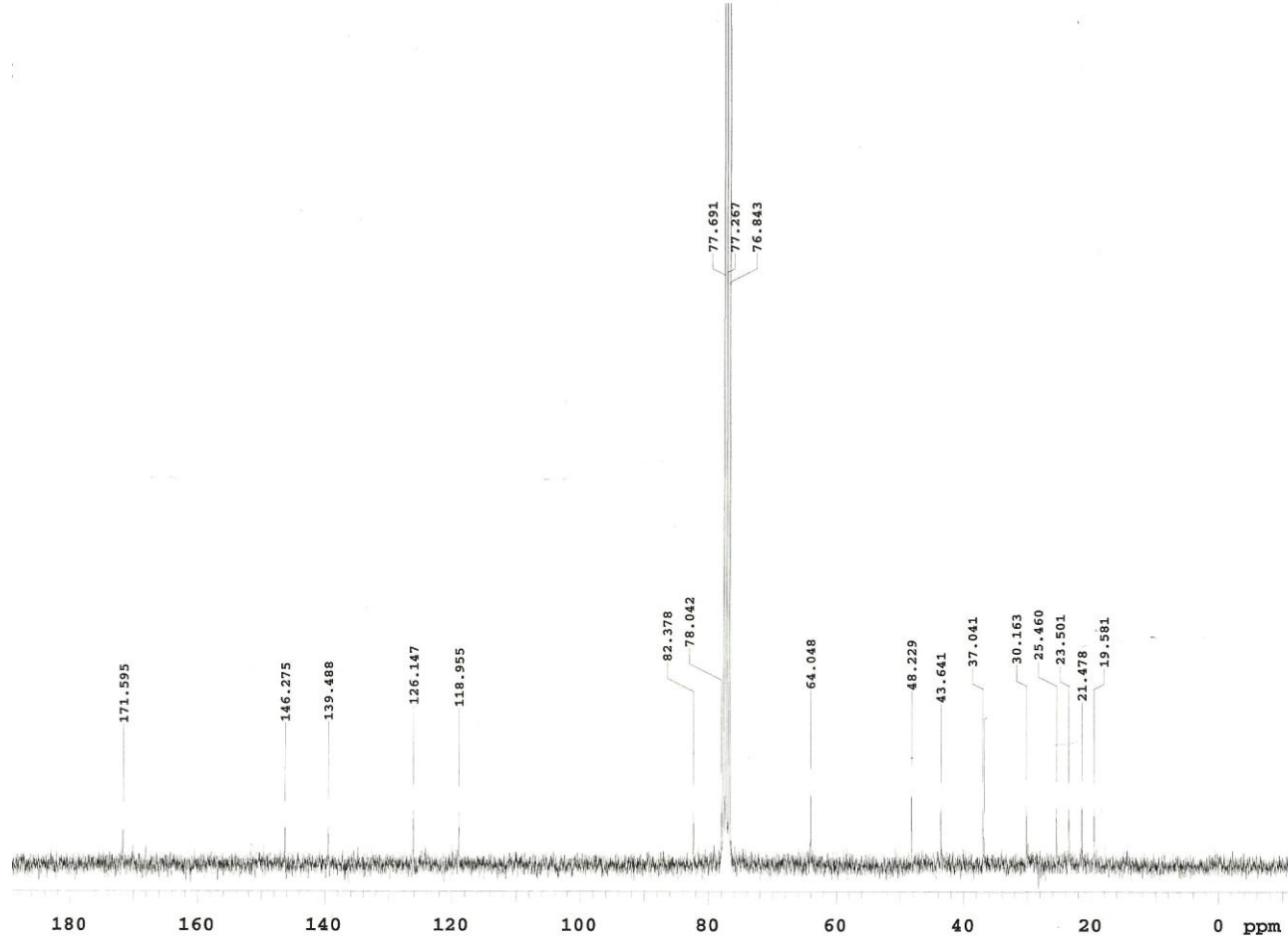
(C-3), , 37.0 (C-9), 25.4 (C-6) ppm, metil karbonları ise 23.5 (C-15), 21.4 (C-17) ve 19.5 (C-14) ppm değerlerinde sinyal vermişlerdir. DEPT spektrumuna ek olarak <sup>13</sup>C-NMR spekturumunda 146.2 (C-1) ve 139.4 (C-12) ppm'de kuarterner olefinik karbonlar ve 171.5 ppm de asetil ve lakton karbonil karbonu pik vermiştir.

HMBC spektrumunda asetil protonları (H-17) ile karbonil karbonu arasında, C-16'daki metil protonlarının ise C-3 ve C-4 karbonları ile önemli eşleşmeler gösterdiği tespit edilmiştir.

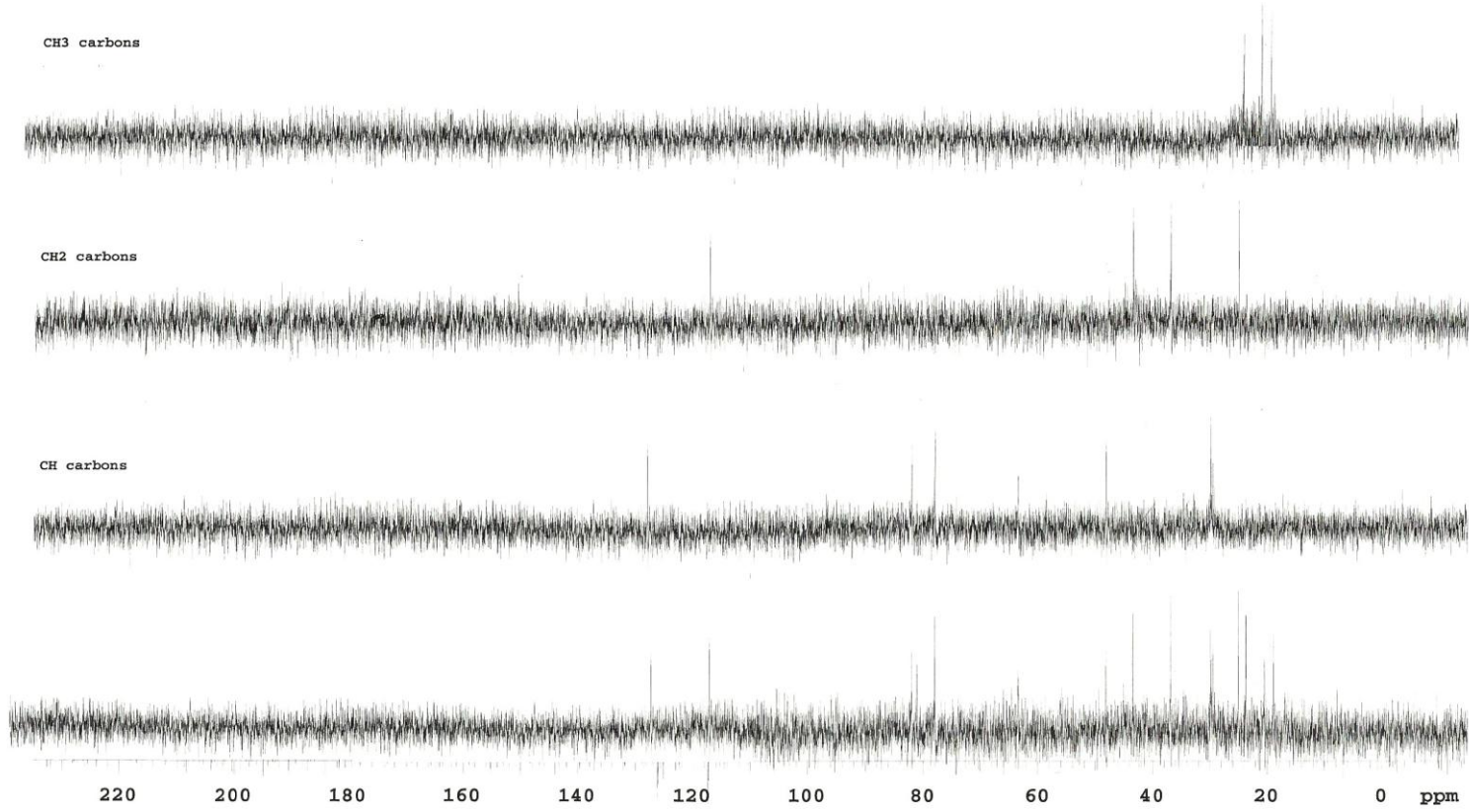
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğin isoxanthanol olduğu doğrulanmıştır [103].



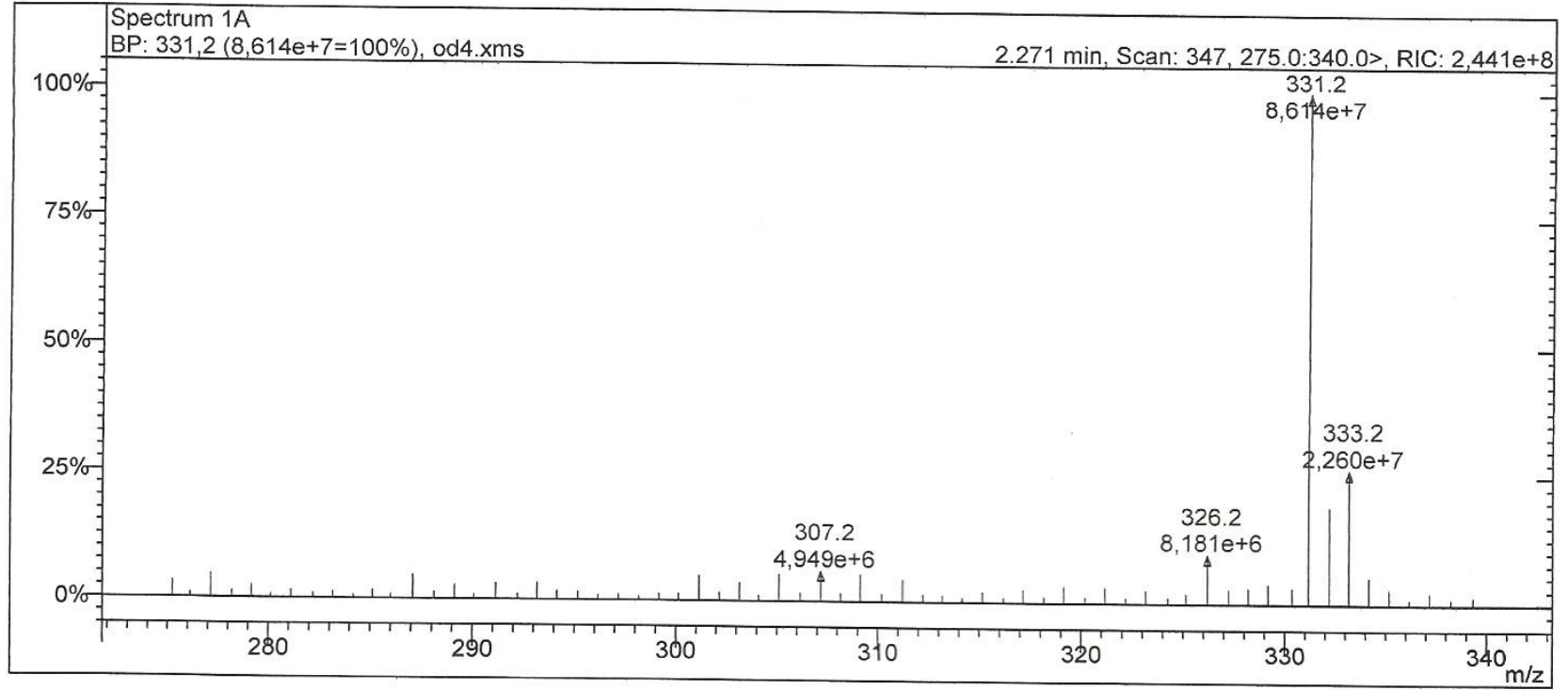
Şekil 5. 16. Isoxanthanol bileşiğine ait  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu



Şekil 5. 17. Isoxanthanol bileşiğine ait  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu

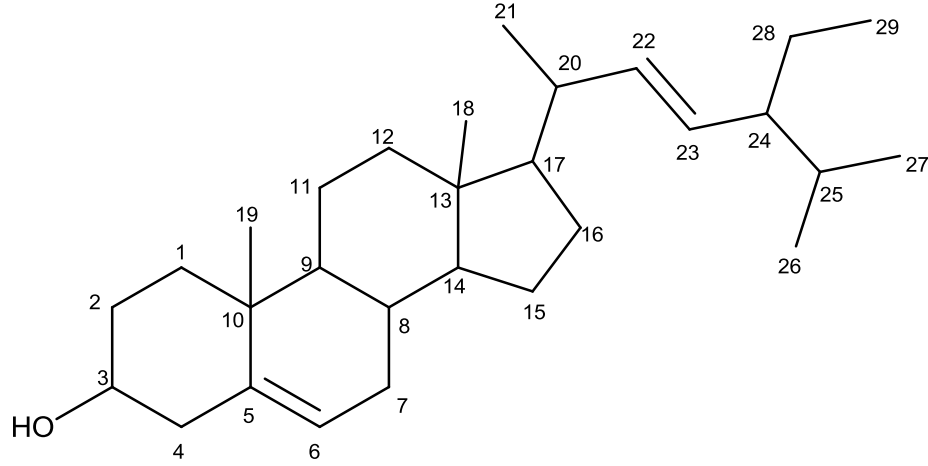


Şekil 5. 18. Isoxanthanol bileşiğine ait DEPT (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu



Şekil 5. 19. Isoxanthanol bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

**5. 1. 5. 5 Numaralı Bileşik (*E*)-17-(5-Etil-6-metilhept-3-en-2-il)-10,13-dimetil 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17-tetradekahidro-1H-siklopenta [ $\alpha$ ] fenantren-3-ol; Stigmasterol**



Stigmasterol

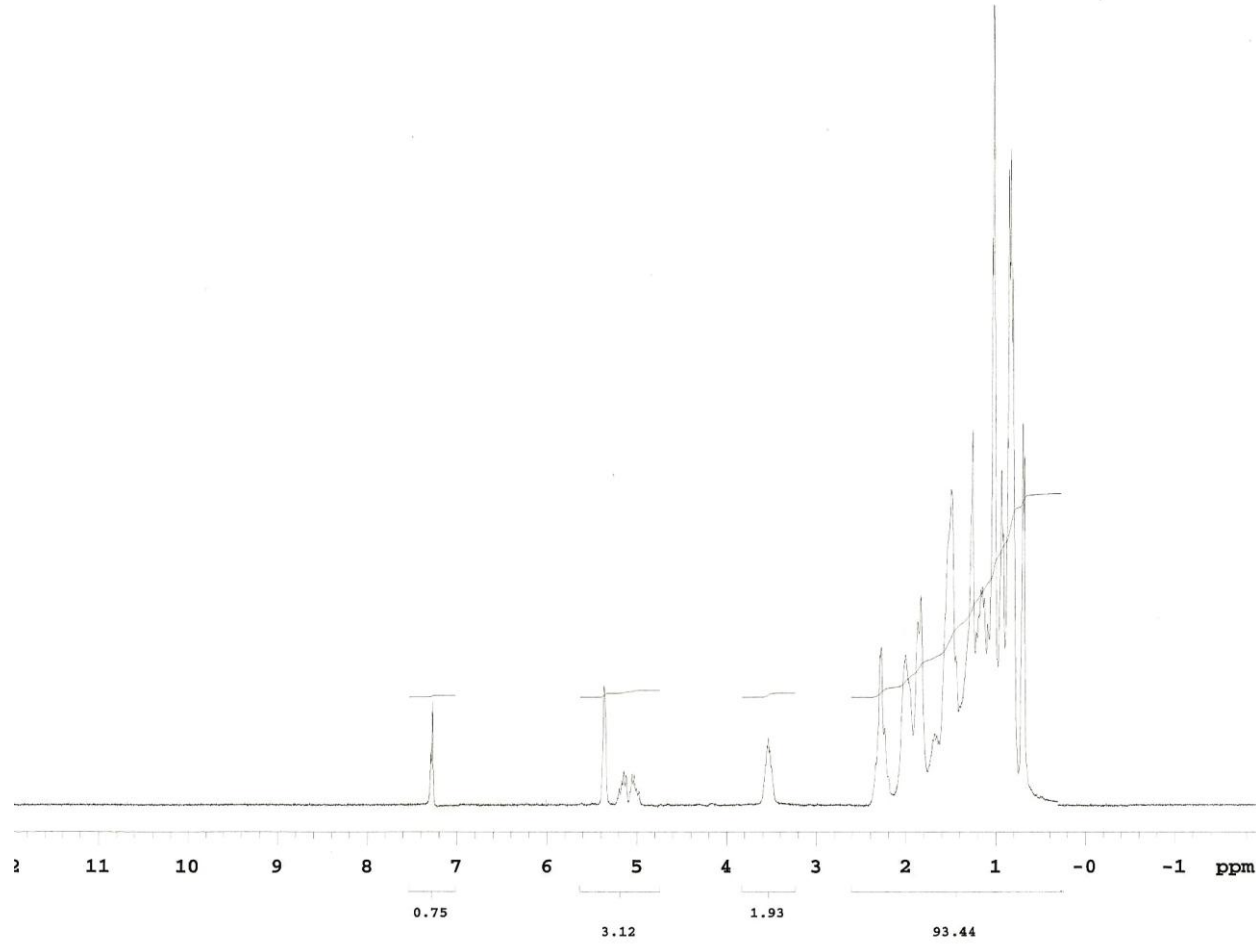
Bileşğin DCM ile alınan UV spektrumunda maksimum absorpsiyon bandı 260 nm' de gözlemlenmiştir.

IR spektrumunda 3434 cm<sup>-1</sup> de hidroksil grubu, 1639 cm<sup>-1</sup> de doymamışlık, 1179 cm<sup>-1</sup> de (C-O) bantları izlenmiştir.

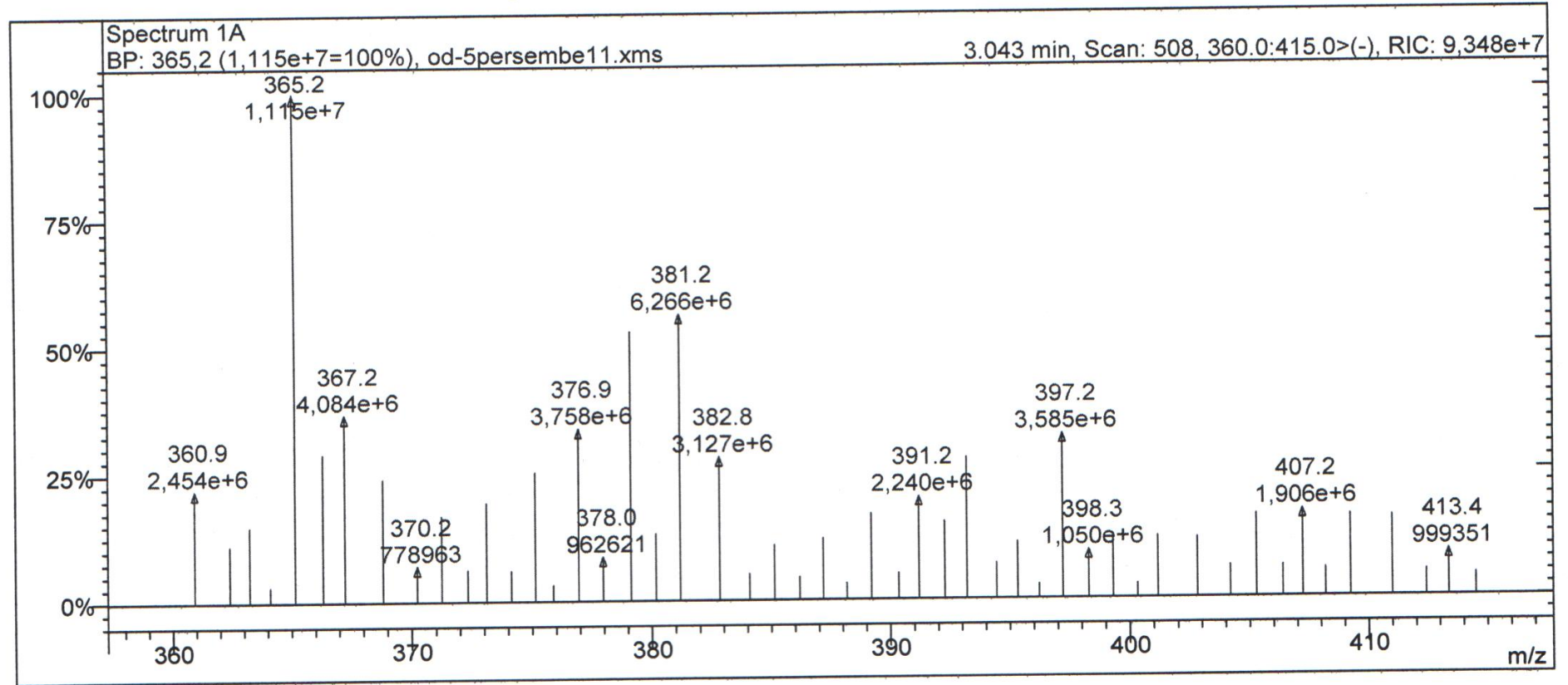
Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde C<sub>28</sub>H<sub>45</sub>O kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini m/z 413.4 [M+H]<sup>+</sup> olarak vermiştir.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda olefinik protonlar 5.36 (br s, H-6, 1H), 5.15 (m, H-22, 1H) ve 5.03 (m, H-23, 1H) ppm'de ve H-3 protonu elektronegatif oksijenden dolayı 3.53 ppm'de (m, 1H) gözlenmiştir. Metil hidrojenleri sırasıyla 1.0 (s, Me-19, 3H), 0.92 (d, *J*=5.7 Hz, Me-27, 3H), 0.82 (t, *J*=6.3 Hz, Me-29, 3H), 0.69 (d, *J*=5.7 Hz, Me-26, 3H) ppm'de ve metilen protonları 1.05-2.20 ppm aralığında (m, 36H) gözlenmiştir.

Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu belirlendiğinden bileşğin stigmasterol olduğu doğrulanmıştır [104].

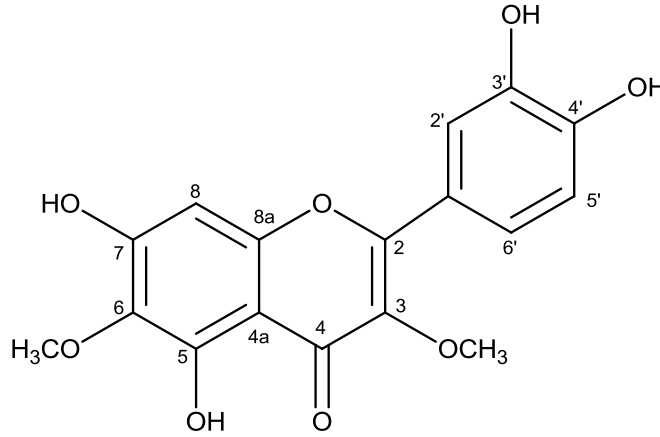


Şekil 5. 20. Stigmasterol bileşiğine ait  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) spektrumu



Şekil 5. 21. Stigmasterol bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

### 5. 1. 6. 6 Numaralı Bileşik Axillarin; 3,6-dimetoksi-5,7,3',4'-tetrahidroksiflavon



Axillarin

Bileşğin IR spektrumu  $3400\text{ cm}^{-1}$ 'de fenolik hidroksil grubunun gerilmeleri,  $1660\text{ cm}^{-1}$ 'de karbonil grubuna ait gerilmeleri gösterdi.

Bileşğin MeOH ile alınan UV spektrumunda band I'in NaOMe ilavesi ile 38 nm batokromik kayma göstermesi  $4'$ -OH olduğunu kanıtlamaktadır. Bileşğin MeOH+AlCl<sub>3</sub> ile alınan spektrumunda band I'in HCl ilavesi ile 387.5 nm den 361.0 nm ye kayması  $3'$  ve  $4'$ -OH olduğunu kanıtlamaktadır. NaOAc+H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> spektrumunda band I'in MeOH spektrumuna göre batokromik kayma göstermesi B halkasındaki *o*-hidroksi sistemin varlığını açıklamaktadır. MeOH spektrumunun NaOAc ilavesi ile band II'deki 12 nm lik kayma serbest 7-OH varlığının göstergesidir.

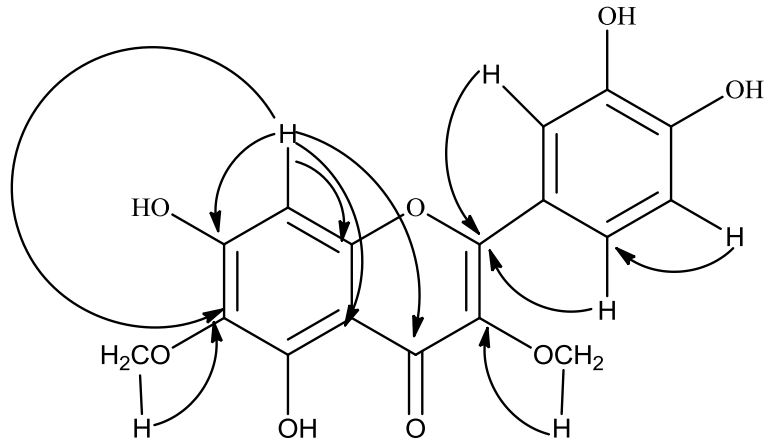
Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>8</sub> kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini  $m/z$  341.2 [M+Na]<sup>+</sup> olarak vermiştir.

Bileşğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda 6-7 ppm aralığında dört proton sinyali gözlenmiştir. B halkasına ait üç proton sinyali 7.61 ppm'de (d,  $J=2.1$  Hz, H-2'), 7.52 ppm'de (dd,  $J=8.4$  ve 2.1 Hz, H-6') ve 6.89 ppm'de (d,  $J=8.4$  Hz, H-5') bir ABX sistemi oluşturmakta idi. A halkasına ait aromatik proton sinyali (H-8') 6.49 ppm'de singlet olarak gözlendi. Ayrıca 3.87 ve 3.77 ppm değerlerinde metoksi grupları singlet olarak gözlenmiştir.

HSQC spektrumunda B halkasında 115.2 (C-2'), 121.5 (C-6') ve 115.0 (C-5') ppm'deki karbonlara sırasıyla 7.61 (H-2'), 7.52 (H-6') ve 6.89 (H-5') ppm'deki

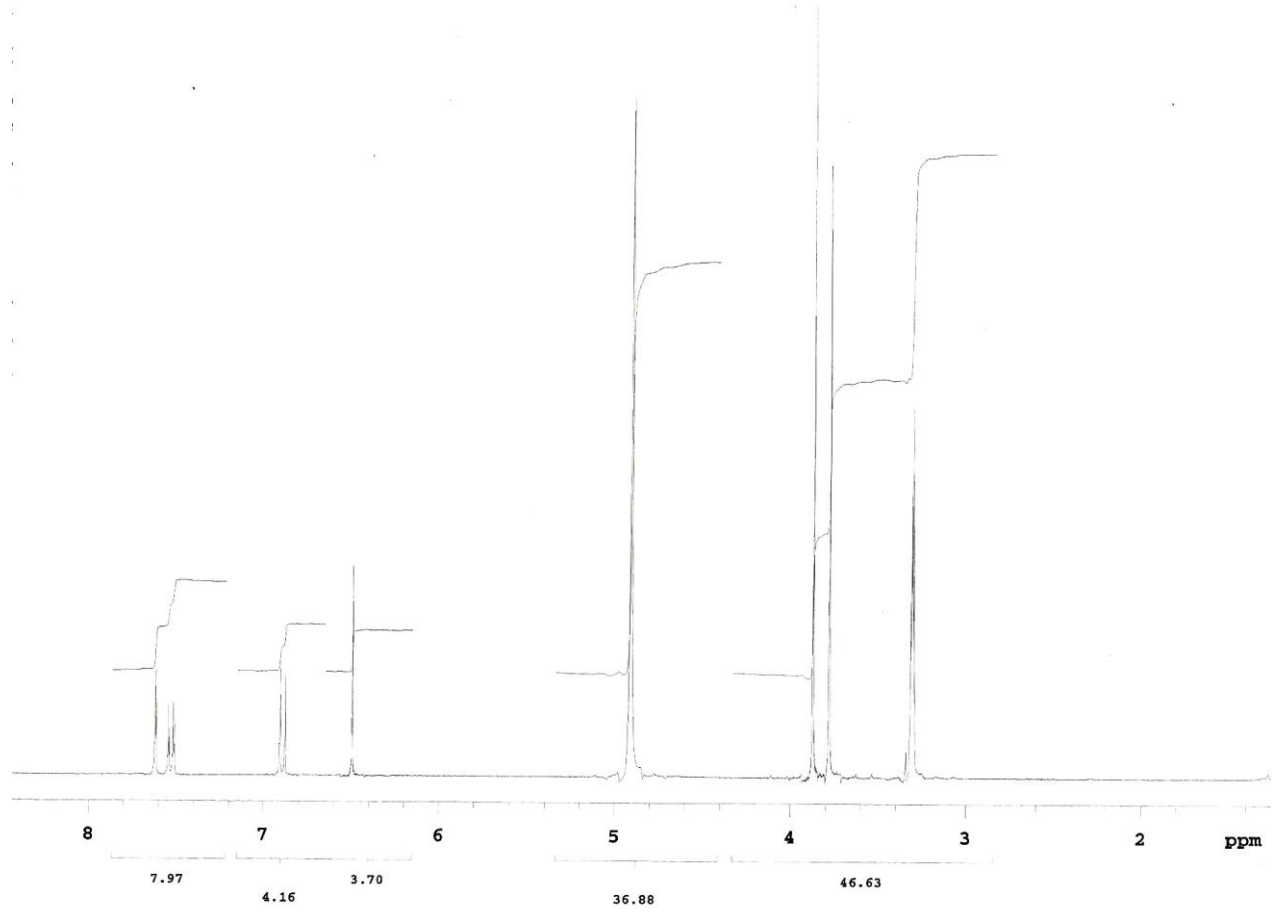
protonların, A halkasındaki 6.49 (H-8) ppm deki protonun ise 93.7 (C-8) ppm deki karbona bağlı olduğu belirlenmiştir. Metoksi gruplarının karbonları 59.7 (C-6-OMe) ve 59.3 (C-3-OMe) ppm de ve bunlara bağlı protonlar sırasıyla 3.87 ve 3.77 ppm de tespit edilmiştir.

HMBC spektrumunda önemli eşleşmeler H-2' ve H-6' daki protonlar ile C-2 karbonu arasında, H-8 protonu ile karbonil karbonu arasında, A halkasına bağlı metoksi grubu protonları ile C-6 arasında ve C halkasına bağlı olan metoksi protonları ile C-3 arasında gözlemlenmiştir.

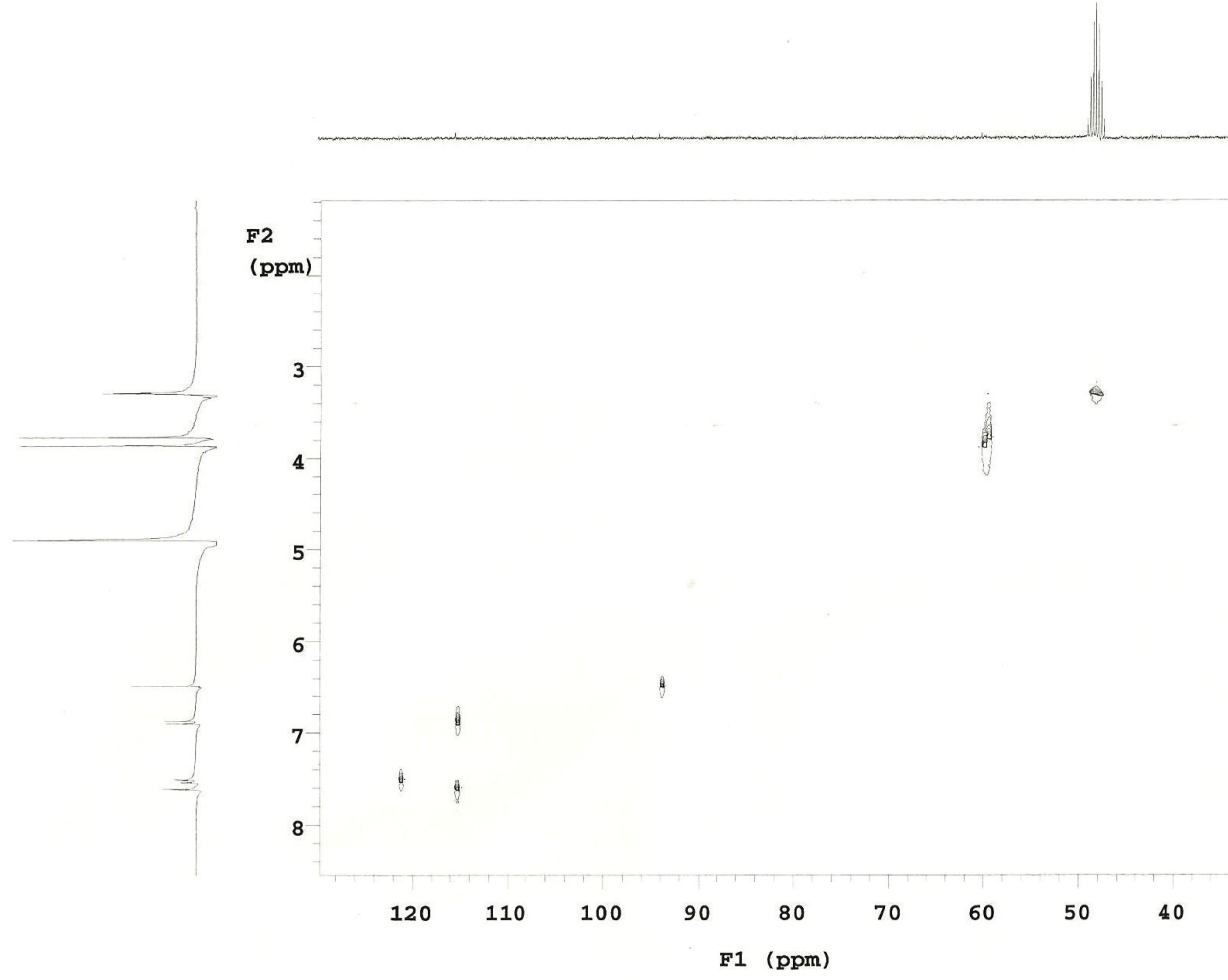


**Şekil 5. 22.** Axillarin bileşiğine ait HMBC korelasyonları

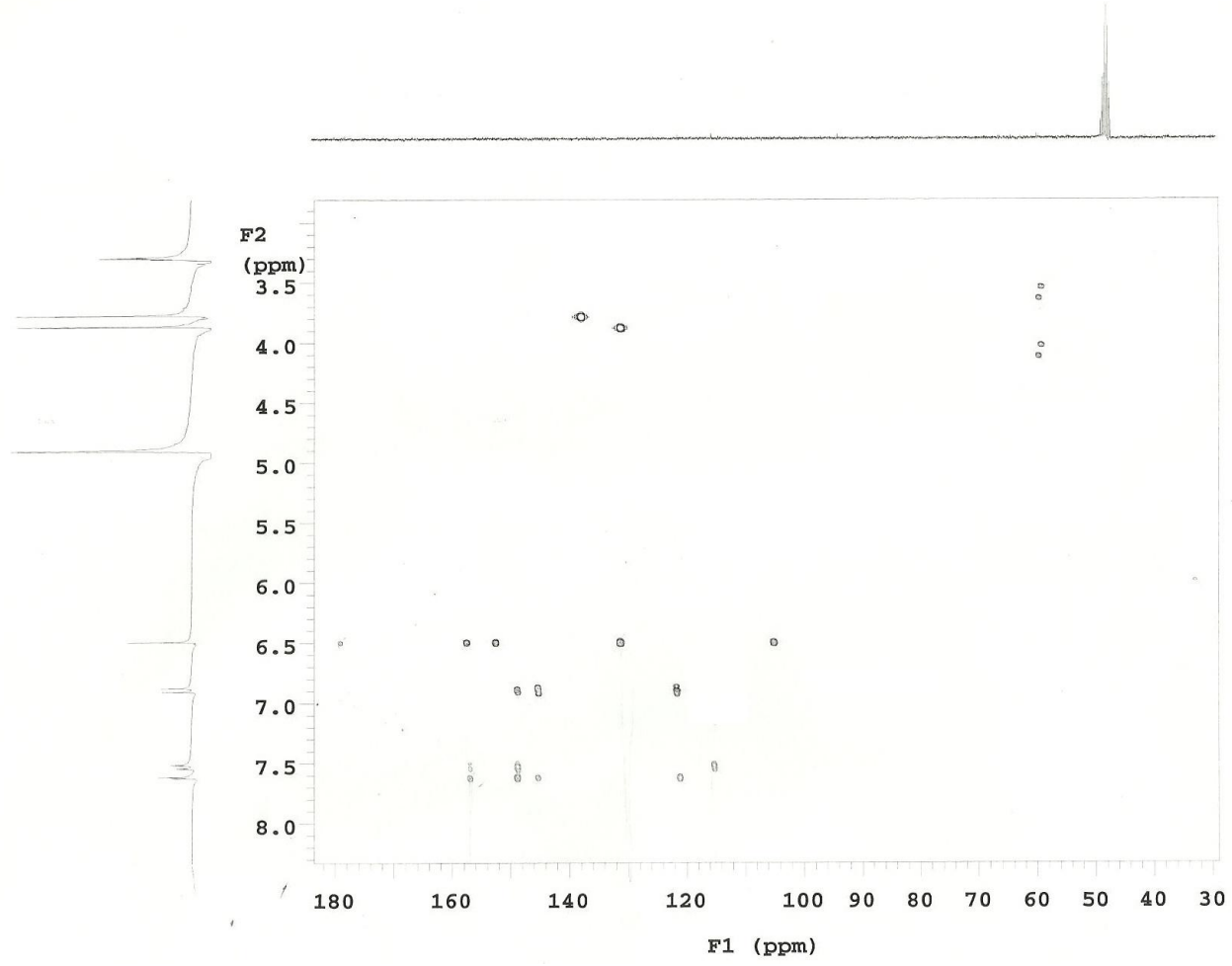
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğin axillarin olduğu doğrulanmıştır [105].



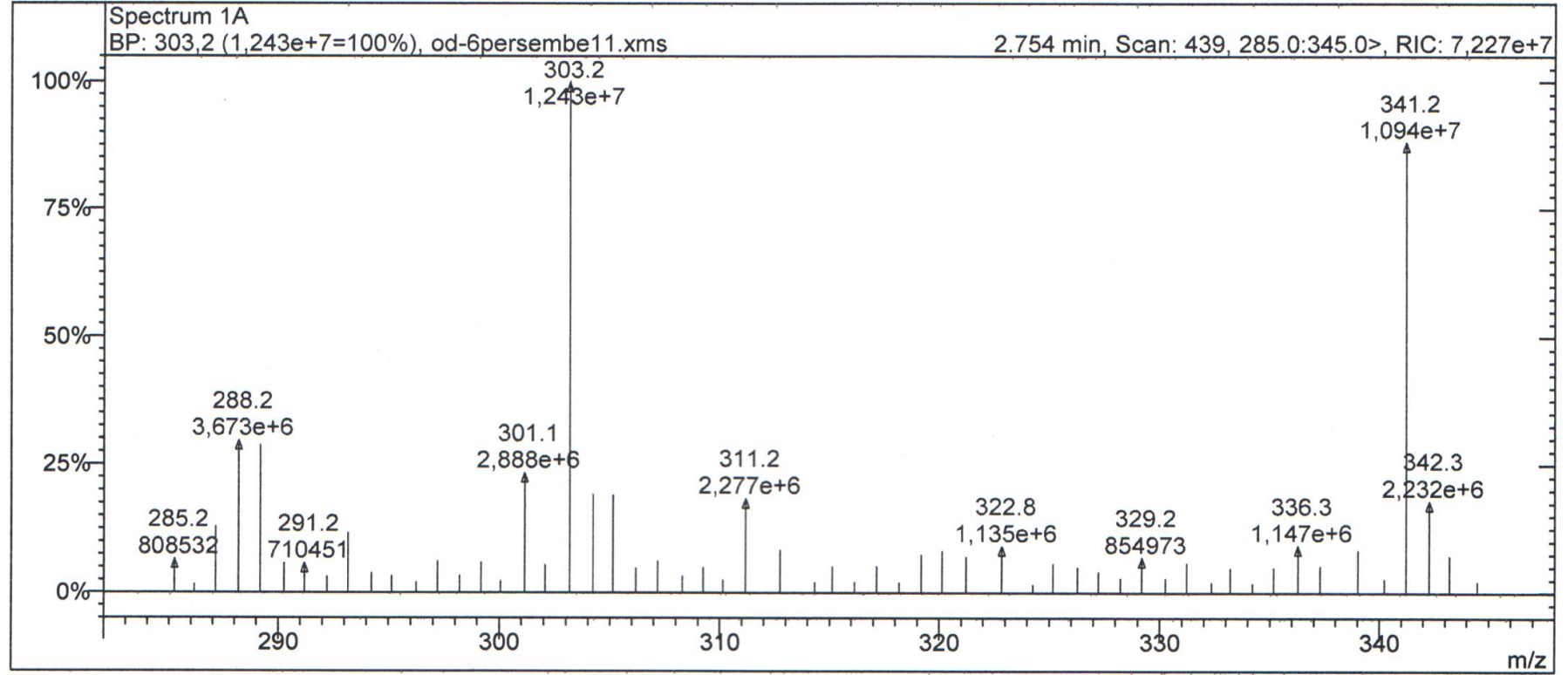
Şekil 5. 23. Axillarin bileşiğine ait  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spektrumu



Şekil 5. 24. Axillarin bileşğine ait HSQC spektrumu

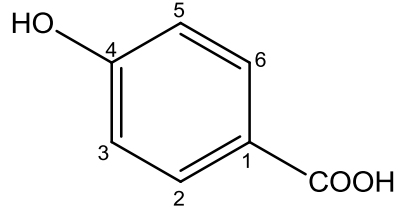


Şekil 5. 25. Axillarin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 5. 26. Axillarin bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

### 5. 1. 7. 7 Numaralı Bileşik: 4-hidroksibenzoik asit; *p*-hidroksibenzoik asit



4-hidroksibenzoik asit

Bileşğin IR spektrumunda  $3405\text{ cm}^{-1}$  de OH gerilmesi,  $2854\text{ cm}^{-1}$  de karboksilli aside ait OH gerilmeleri,  $1660\text{ cm}^{-1}$  de karboksilli asit karboniline ait gerilmeler gözlenmiştir.

MeOH ile alınan UV spektrumunda maksimum absorpsiyon bandı  $342\text{ nm}$ 'de gözlenmiştir.

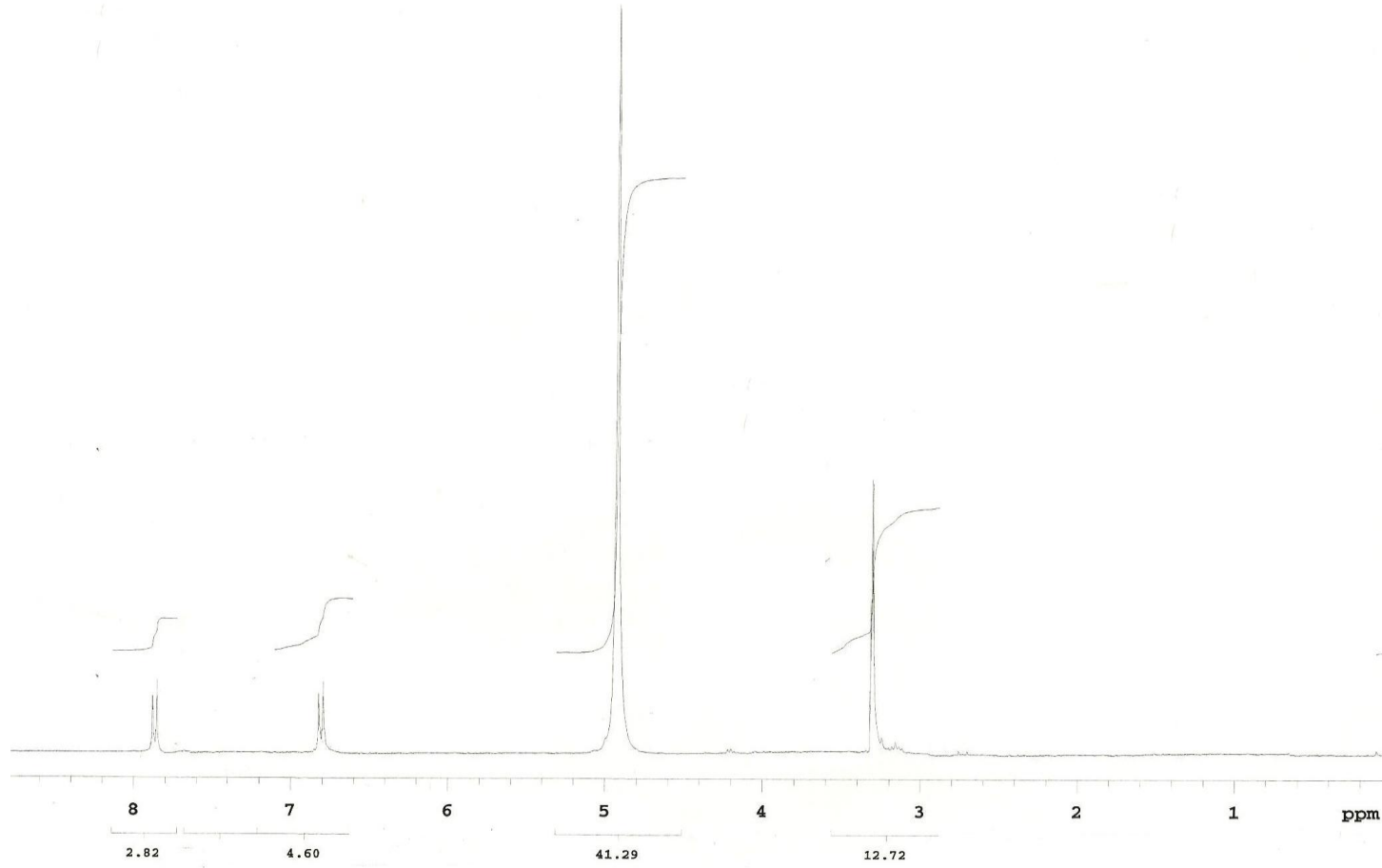
Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde  $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_3$  kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini  $m/z\ 161.0\ [\text{M}+\text{Na}]^+$  olarak vermiştir.

Bileşğin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumunda sadece beş karbon piki gözlenmiştir. Bunlardan karbonile komşu C-1 karbonu  $121.1$ , hidroksil bağlı C-4 karbonu  $162.0$ , karbonil karbonu  $169.0$ , C-2 ve C-6 karbonları  $131.8$  ve C-3 ve C-5 karbonları  $115.0$  ppm'de sinyal vermiştir.

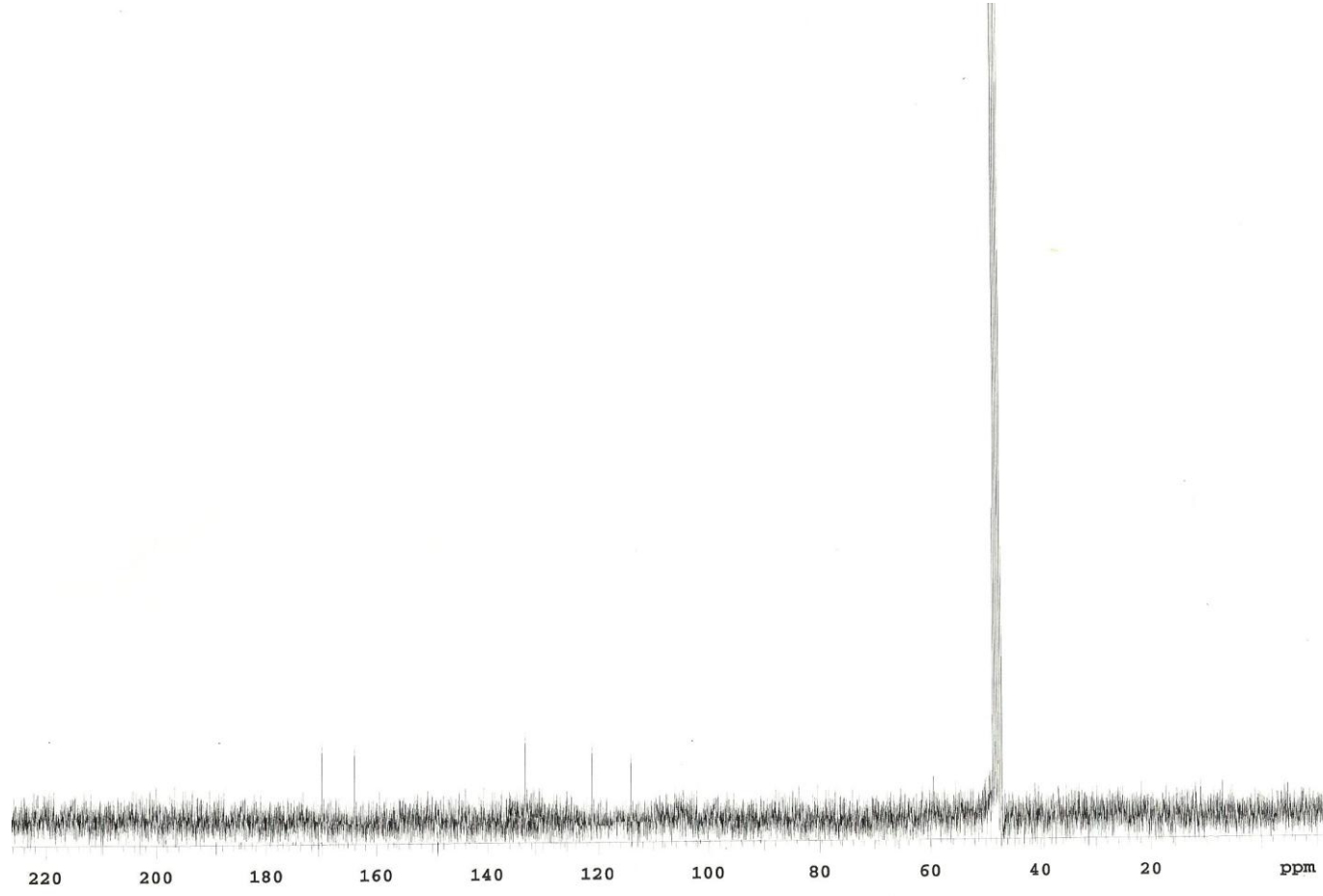
$^1\text{H}$ -NMR spektrumunda ise iki tane  $9.0\text{ Hz}$ 'lik yarımla sabiti ile  $7.87$  ve  $6.81$  ppm'de gözlenen dubletler aromatik hidrojenlerin birbiri ile *orto* pozisyonda olduğunu göstermektedir.

HMBC spektrumunda  $7.87$  (H-2 ve H-6) ve  $6.81$  (H-3 ve H-5) ppm'deki protonlar C-1 ( $121.1$ ) karbonu, karbonil karbonu ( $169.0$ ) ve C-4 ( $162.0$ ) karbonları ile eşleşmeler göstermiştir.

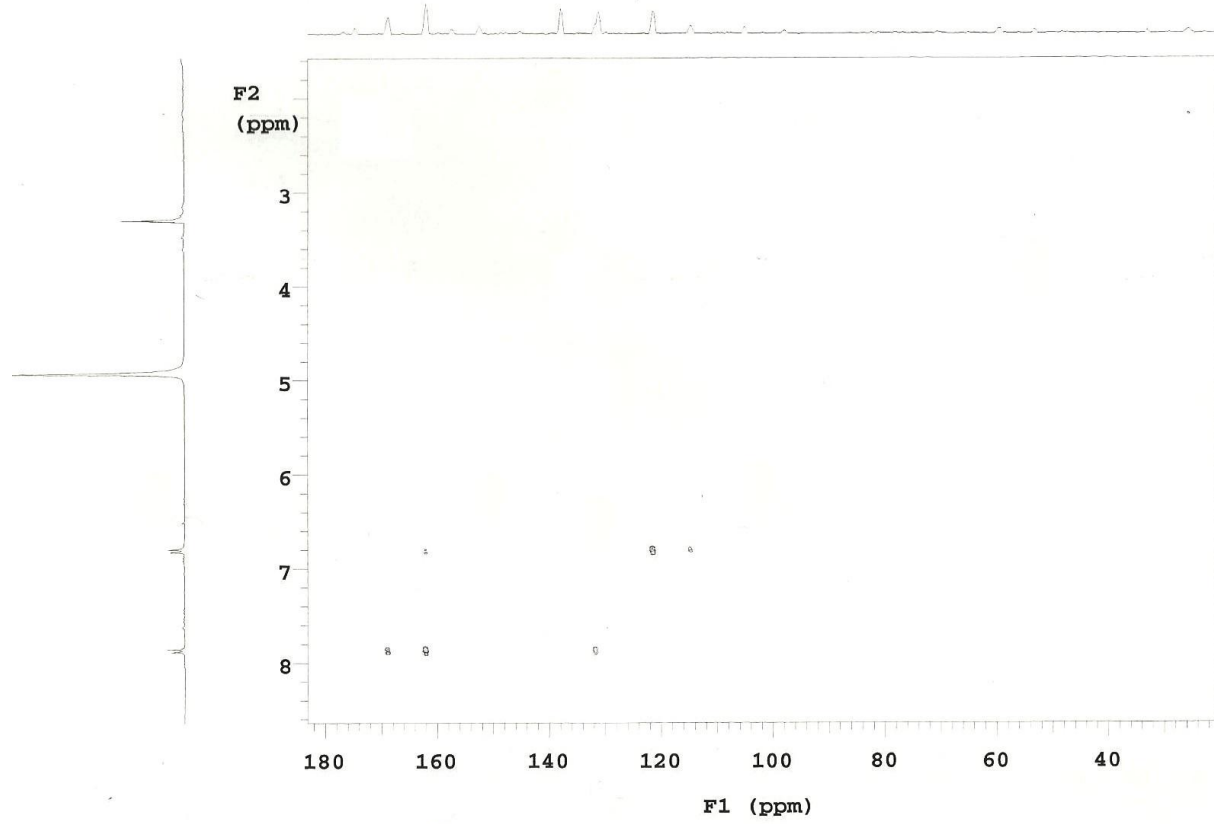
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerden bileşğin 4-hidroksibenzoik asit olduğu görüşüne varılmıştır.



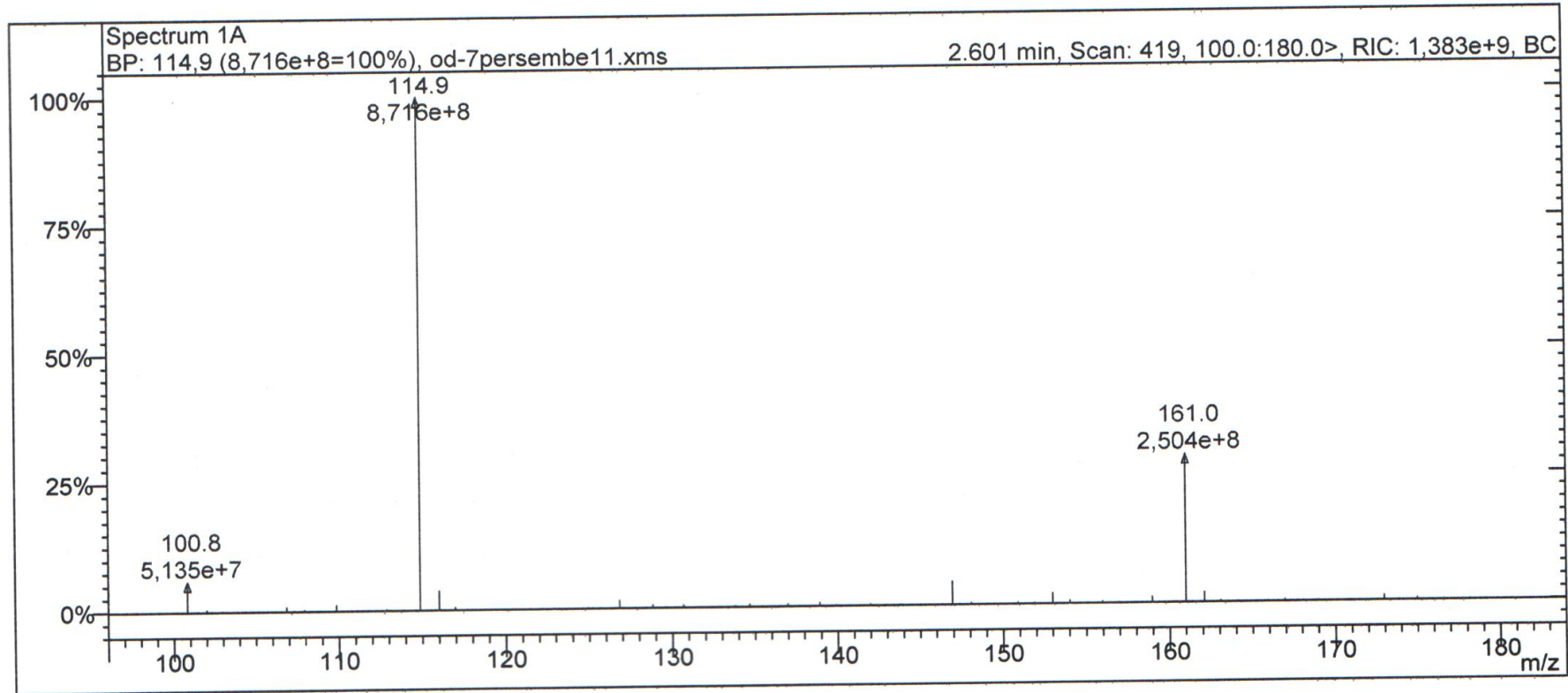
Şekil 5. 27. 4-hidroksibenzoik asit bileşiğine ait  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spektrumu



Şekil 5. 28. 4-hidroksibenzoik asit bileşiğine ait  $^{13}\text{C}$ -NMR (75 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spektrumu

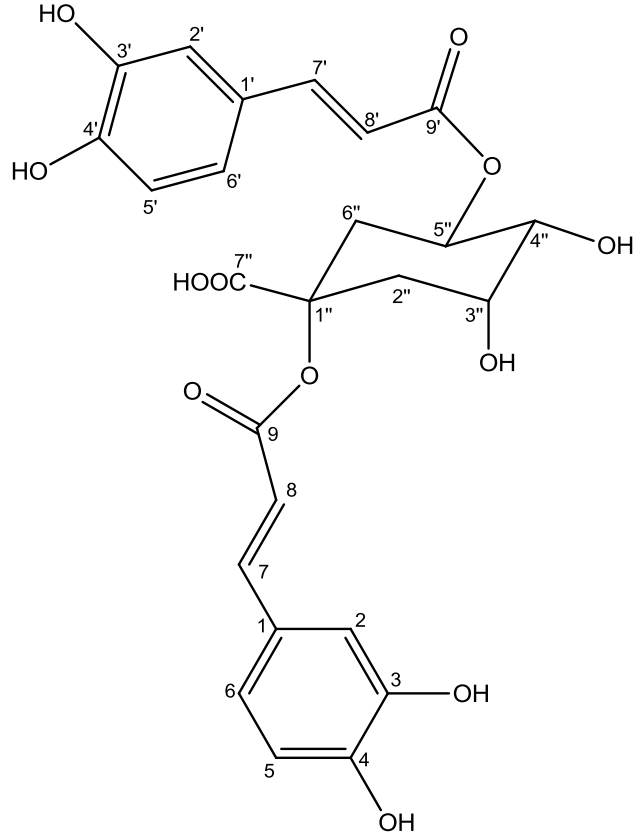


Şekil 5. 29. 4-hidroksibenzoik asit bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 5. 30. 4-hidroksibenzoik asit bileşiğine ait ESI-MS spektrumu

### 5. 1. 8. 8 Numaralı Bileşik Sinarin; 1,5 di-*O*-kaffeoilkuinik asit



Sinarin

Bileşğin IR spektrumunda  $3420\text{ cm}^{-1}$  (OH),  $1685\text{ cm}^{-1}$  (C=O),  $1638\text{ cm}^{-1}$  (C=C) ve  $1510\text{ cm}^{-1}$  aromatik halkaya ait gerilim bandları gözlemlenmiştir.

Bileşğin MeOH ile alınan UV spektrumunda maksimum absorpsiyon bandı  $376\text{ nm}$ 'de gözlenmiştir.

Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$  kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini  $m/z\ 539.1\ [\text{M}+\text{Na}]^+$  olarak vermiştir.

$^1\text{H-NMR}$  spektrumunda  $7.57\ (2\text{H})$ ,  $6.30\ (1\text{H})$  ve  $6.26\ (1\text{H})$  ppm değerlerinde  $15.9\ \text{Hz}$ 'lik dublet sinyallerin gözlenmesi molekülün yapısında iki adet trans  $\alpha,\beta$ -doymamış karbonil fonksiyonelliğini ve  $7.05\ (d)$ ,  $6.95\ (dd)$  ve  $6.77\ (dd)$  ppm'de gözlenen aromatik ABX sistemine ait üç sinyal grubunun her birinin iki hidrojen integraline sahip olması yapıda iki tane kafeik asit grubu bulunduğunu göstermiştir. İki kafeik asit grubunun alfa protonları dışındaki tüm protonlarının örtüştüğü gözlemlendi.

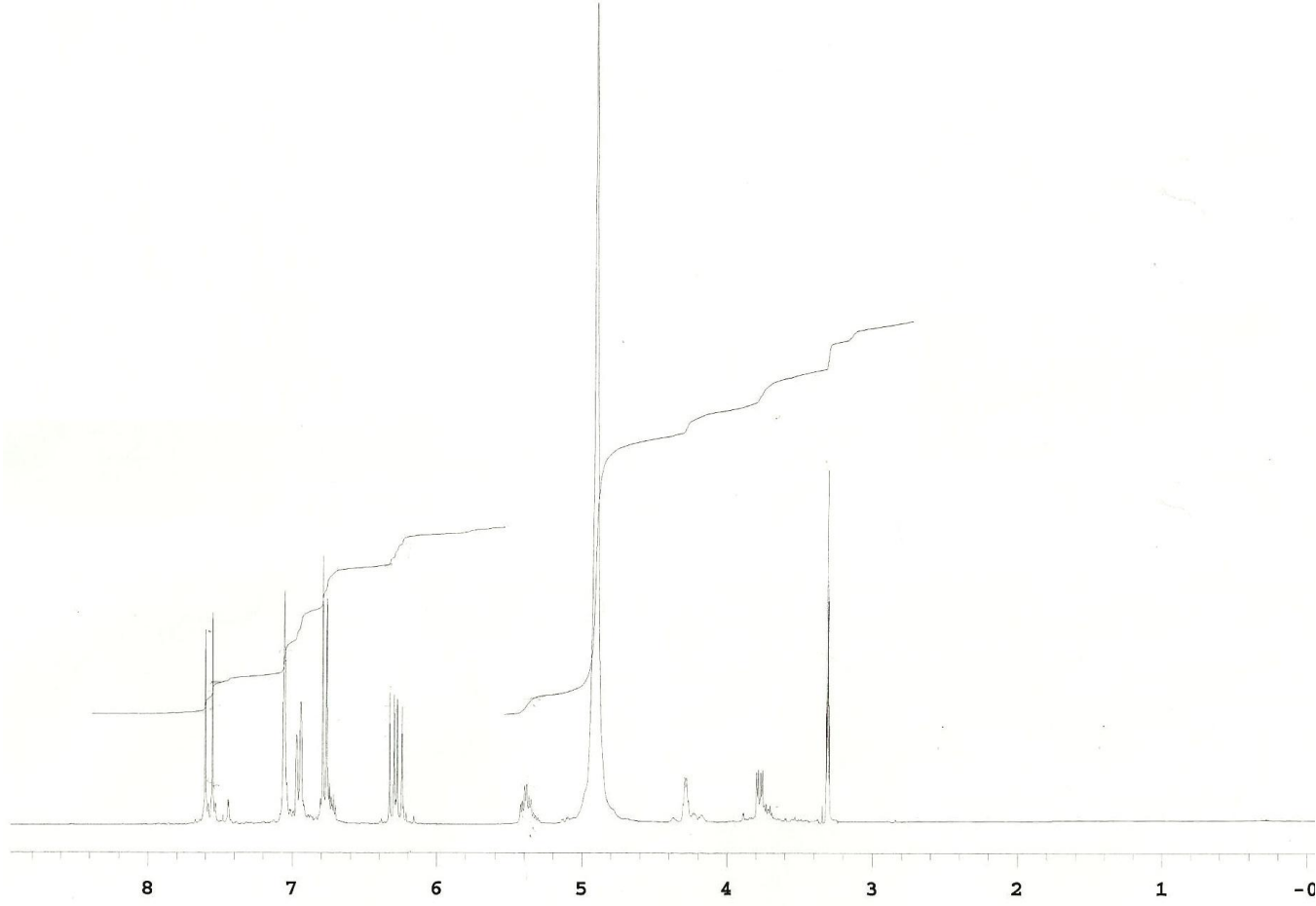
Bileşiğe ait kuinik asit protonlarından CH<sub>2</sub>-6'' 2.51 ppm ve CH<sub>2</sub>-2'' 2.10 ppm'de multiplet, H-5'' protonu 5.39 ppm'de (td, *J*=8.1 ve 3.4 Hz, 1H), H-4'' protonu 3.77 ppm'de (dd, *J*=8.1 ve 3.0 Hz, 1H), H-3'' protonu 4.28 ppm'de (br dd, *J*=3.0, 1H) gözlemlendiler.

<sup>13</sup>C-NMR spektrumunda kuinik asite 1'' konumdan bağı kafeik asidin karbonili 166.9 ppm'de, 5'' konumundan bağı kafeoil karbonili 167.6 ppm'de ve kuinik asit karbonili 174.0 ppm'de pik vermiştir. Aromatik halkaya ait CH karbonları 146.1 (C-3, C-3'), 121.9 (C-6, C-6') ve 115.3 (C-2, C-2') ppm'de trans olefinik CH karbonları ise 145.6 (C-7, C-7') ve 115.3 (C-8, C-8') ppm'de gözlemlenmişlerdir. Kuinik asit karbonları da 86.3 (C-1''), 30.2 (C-2''), 68.5 (C-3''), 71.3 (C-4''), 70.3 (C-5''), 35.8 (C-6'') ppm'de gözlemlenmişlerdir.

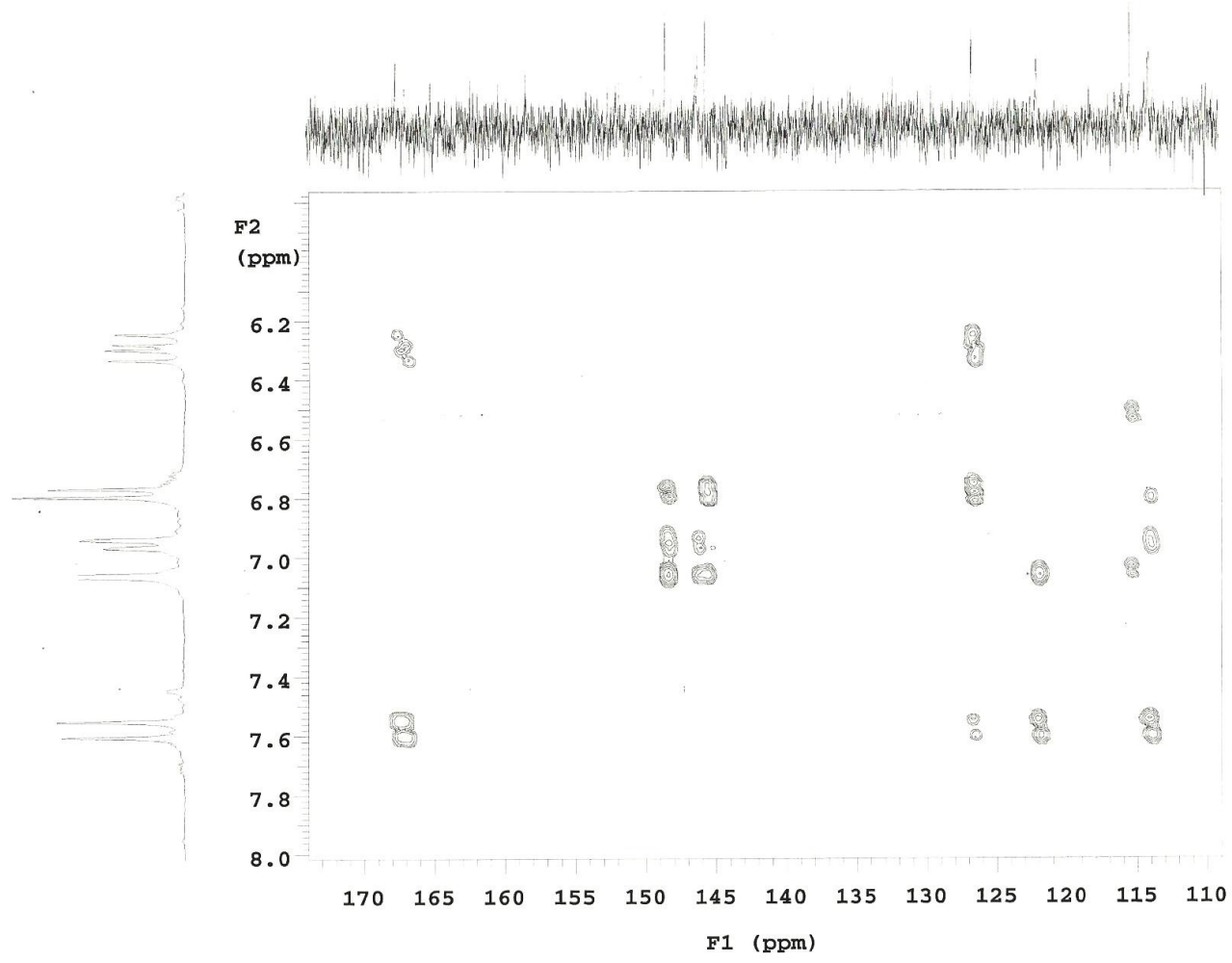
HMBC spektrumunda önemli eşleşmeler H-5'' protonu ile kafeoil karbonili arasında, C-2'' ve C-6'' daki metilen protonları ile kuinik asidin karbonili arasında ve  $\alpha$ ,  $\beta$ -doymamış çift bağı protonları (H-7, H-8) ile C-9, (H-7', H-8') ile C-9' karbonilleri arasında gözlemlenmiştir.

COSY spektrumunda trans olefinik protonlar arasında, H-3'' ve H-2'' protonları arasında, H-3'' ve H-4'' protonları arasında, H-4'' ve H-5'' protonları arasında eşleşmeler görülmüştür.

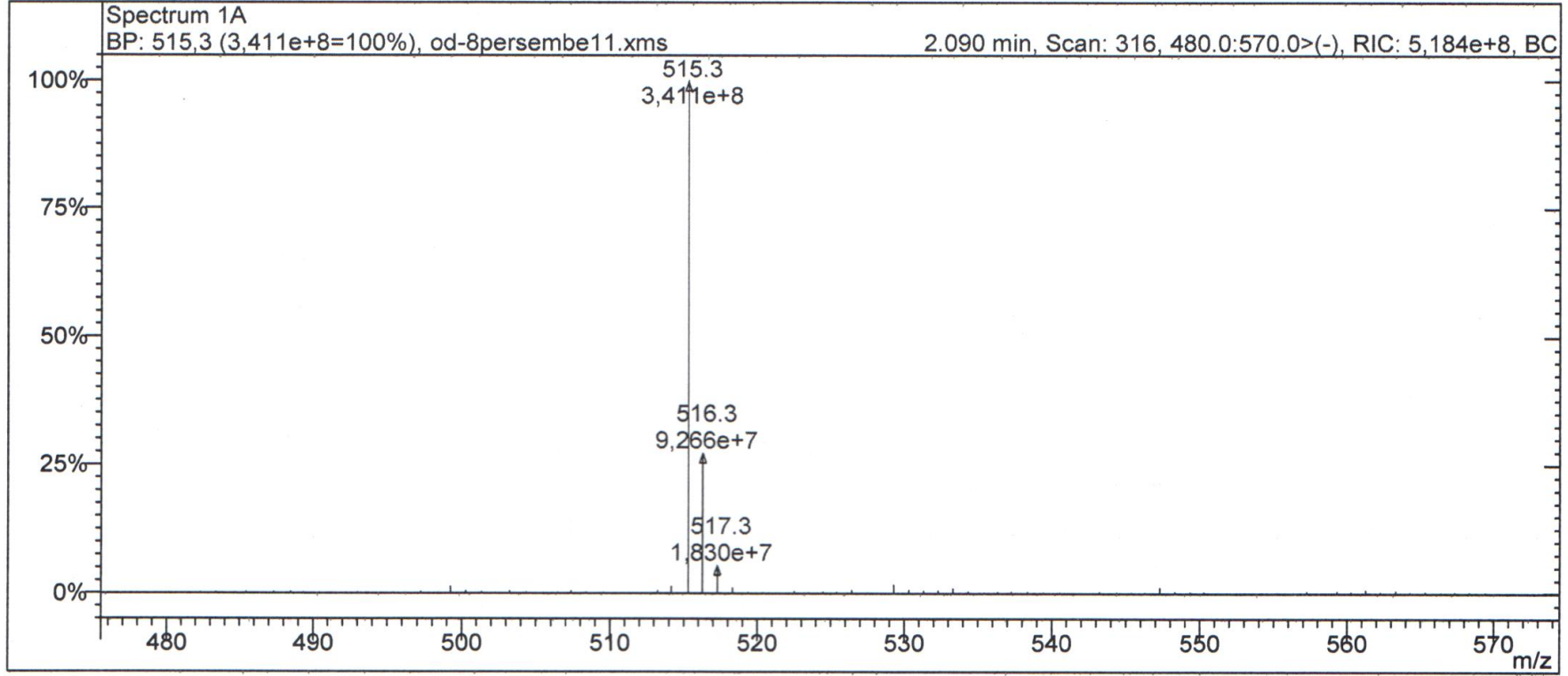
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile özdeş olduğu görüldüğünden bileşiğin sinarin olduğu doğrulanmıştır [106].



Şekil 5. 31. Sinarin bileşiğine ait  $^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) spektrumu



Şekil 5. 32. Sinarin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 5. 33. Sinarin bileşğine ait ESI-MS spektumu

## 5. 2. İzole Edilen Bileşiklerin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibisyon Aktiviteleri

Bileşiklerin AChE ve BChE enzim aktivitelerini belirleyebilmek için Alzheimer ilacı olarak kullanılan Galantamin bileşiği referans madde olarak kullanmıştır.

Yapılan AChE inhibisyon aktivite testleri sonucunda xanthatin (1), 4-okso-bedfordia asit (3) ve isoxanthanol (4) ve stigmaterol (5) bileşiklerinin galantamin ile kıyaslandığında iyi bir aktiviteye sahip olduğu, tomentosin (2) bileşiğinin ise orta derecede inhibisyon aktivitesi gösterdiği belirlenmiştir. Axillarin (6), p-hidroksi benzoik asit (7) ve sinarin (8) bileşiklerinin ise aktivite göstermediği tespit edilmiştir. (Tablo 5.1)

BChE inhibisyon aktivite testleri sonucunda sadece 2 numaralı bileşik olan tomentosinin iyi bir aktiviteye sahip olduğu, xanthatin (1), 4-okso-bedfordia asit (3) ve isoxanthanol (4) ve stigmaterol (5) bileşiklerinin ise orta derecede inhibisyon aktivitesi gösterdiği ve axillarin (6), p-hidroksi benzoik asit (7), sinarin (8) bileşiklerinin ise aktif olmadığı belirlenmiştir (Tablo 5.1).

AChE ve BChE inhibisyon aktiviteleri ile yapılar arasında ilişki kurmak gerekirse seskiterpen lakton bileşiklerinin fenolik bileşiklere kıyasla çok daha güçlü AChE ve BChE inhibitörleri oldukları sonucuna varılmaktadır.

**Tablo 5. 1.** İzole edilen bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri

Örnekler	AChE IC <sub>50</sub> (mM)	BChE IC <sub>50</sub> (mM)
1	0.64	2.17
2	0.90	0.86
3	0.69	4.16
4	0.50	2.20
5	0.42	5.88
6	Aktif değil	Aktif değil
7	Aktif değil	Aktif değil
8	Aktif değil	Aktif değil
Galantamin <sup>a</sup>	0.12	0.33

<sup>a</sup> Standart bileşik

## 6. KAYNAKLAR

- [1] A. Kamboj, A. K. Saluja., *Phytopharmacological review of Xanthium strumarium L. (Cocklebur)*, Int J. Green Pharm, 4, 129-39, 2010.
- [2] M. G. Simpson, *Plant Systematics*, Elsevier Academic Press, California, 2006.
- [3] P. H. Davis, *Flora of Turkey and East Aegan Islands*, 5.Cilt, Edinburgh: University Press, 1997.
- [4] V. H. Heywood, *Flowering Plants of the World*, Oxford University Press, Oxford, UK, 1978.
- [5] <http://www.wikipedia.org/> Pitrak
- [6] J. F. Caius, *Medicinal and poisonous plants of India*, Jodhpur (India), Scientific Publishers; 375-6, 1986.
- [7] S. Dharmananda, *Safety issues affecting Chinese herbs: The case of Xanthium*, **Institute for Tradional Medicine**, European Branch,1, 1-8, 2003.
- [8] S. P. Agharkar, *Medicinal plants of Bombay presidency*, Jodhpur (India), Scientific Publishers, 230, 1991.
- [9] S. E. Weaver ve M. J. Lechowicz, *The biology of Canadian weeds. 56. Xanthium strumarium L .*, Canadian Journal of Plant Science, 63, 211-225, 1983.
- [10] P. H Davis, *Flora of Turkey and East Aegan Islands*. 6.Cilt,1500-1652, Edinburgh: University Press, 1965-1985.
- [11] J. M. Lee, *Common cocklebur Xanthium strumarium*, Iowa State University, The ISU Weed Biology Library, Agronomy 517: Weed Biology and Ecology, 1996.
- [12] J. Ronald, Uchytıl, *Xanthium strumarium*, In: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, Fire Sciences Laboratory, 1992.
- [13] S. Dharmananda, *Safety issues affecting Chinese herbs: The case of Xanthium*. Institute for Tradional Medicine, European Branch, 1, 1-8, 2003.
- [14] T. Martin, E. L. Stair, *Dawson L. Cocklebur poisoning in cattle*, J. A. Vet. Med. Assoc, 189, 562-3, 1986.
- [15] S. Oelkers, F.Oehme, *Cocklebur poisoning in swine (Xanthium)*, Bov Pract, 3, 11-14, 1982.
- [16] M. S. Malik, N. K. Sangwan, K. S. Dhindsa, *Xanthanolides from Xanthium strumarium*, Phytochemistry, 32(1), 206-207, 1992.

- [17] J. A. Marco, J. F. Sanz-Cervera, J. Corral, M. Carda, J. Jakupovic, *Xanthanolides from Xanthium: Absolute configuration of Xanthanol, Isoxanthanol and their C-4 epimers*, *Phytochemistry*, 24(6), 1569-1576, 1993.
- [18] T. E. Winters, T. A. Geissman, D. Safir , *Sesquiterpene lactones of Xanthium species xanthanol and isoxanthanol and correlation of xanthinin with invalibin*, *J. Org Chem*, 34, 153, 1969.
- [19] H. Minato, I. Horibe, *Studies on sesquiterpenoids part XI, structure and stereochemistry of Xanthumin, a stereoisomer of Xanthinin*, *J Chem Soc*; Dec.7009-17, 1965.
- [20] J. D. McChesney, R. P. Adams, *Co-evaluation of plant extracts as petrochemical substitutes and for biologically active compounds*, *Econ Bot*, 39:74-86, 1985.
- [21] HS. Kim, TS. Lee, SW. Yeo, LS. Seong, TS. Yu. , *Isolation and characterization of antitumor agents from Xanthium strumarium*, *L. Korean J Biotechnol Bioeng*, 18, 324-8, 2003.
- [22] S. M. Kupchan, M. A. Eakin, A. Thomas, *Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpenelactones*, *J Med Chem*, 14, 1147-52, 1971.
- [23] G. Fouche, GM. Cragg, P. Pillay, N. Kolesnikova, VJ. Maharaj, J. Senabe, *In vitro anticancer screening of South African plants*, *J Ethnopharmacol*, 119, 455-61, 2008.
- [24] K. K. Dong, K. S. Chang, W. B. Dong, S. K. Yeon, Y. Min-Suk, K. K. He, *Identification and biological characteristics of an antifungal compound extracted from Cocklebur (Xanthium Strumarium) against Phytophthora drechsleri*, *The plant pathology Journal*, 18, 288-92, 2002.
- [25] S. C. Mandal, R. Boominathan, B. P. Devi, S. Panda, *Studies on anti-tussive activity of Xanthium Strumarium L. extract*, *ISHS Acta Horticulturae 678: III WOCMAP congress on Medicinal and Aromatic Plants-4*. Sayı: Targeted Screening of Medicinal and Aromatic Plants, Economics and law, 678, 149-52, 2005.
- [26] C. Jongwon, T. L. Kyung, J. HyunJu, P. HeeJuhn, K. InTae, M. P. Young, *Methanolic extract of Xanthium strumarium L. possesses anti-inflammatory and antinociceptive activities*, *Biol Pharm Bull*, 28, 94-100, 2005.

- [27] T. Han, H. Li, Q. Zhang, P. Hana, H. Zhenga, K. Rahmanc, *Bioactivity guided fractionation for anti inflammatory and analgesic properties and constituents of Xanthium strumarium L.*, Phytomedicine, 10, 1016, 2007.
- [28] M. H. Yin, D. G. Kanga, D. H. Choi, T. O. Kwon, H. S. Lee. , *Screening of vasorelaxant activity of some medicinal plants used in oriental medicines*, J Ethnopharmacol, 99, 113-7, 2005.
- [29] J. H. Yoon, H. T. Lim, H. J. Lee, H. D. Kin, R. Jeon, J. Rya , *Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by xantholides isolated from Xanthium strumarium*, Bioorg Med Chem Lett;18, 2179-82, 2008.
- [30] I. Kim, Y. Park, J. Won, H. Jung, H. Park, J. Choi, *Methanol extract of Xanthium strumarium L. possesses anti-inflammatory and anti-nociceptive activities*, Biol Pharm Bull, 28, 94-100, 2005.
- [31] F. L. Hsu, Y. C. Chen, J. T. Cheng, *Caffeic acid as active principle from the fruit of xanthium strumarium to lower plasma glucose in diabetic rats*, Planta Med; 66, 228-30, 2000.
- [32] G. S. Menon, K. Kuchroo, D. Dasgupta, *Interaction of microtubules with active principles of Xanthium strumarium*, Physiol Chem Phys Med NMR, 33, 153-62, 2001.
- [33] Q. L. Tran, Y. Tezuka, J. Veda, N. T. Nguyen, Y. Maruyama, K. Begum, *Invitro antipalmodial activity of antimalarial medicinal plants used in Vietnamese traditional medicine*, J Ethnopharmacol, 86, 249-52, 2003.
- [34] D. G. Kang, C. K. Yun, H. S. Lee, *Screening and comparision of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea*, J Ethnopharmacol, 87, 231-6, 2003.
- [35] S. Cetinsoy, A. Tamer, M. Aydemir, *Investigations on repellent and insecticidal effects of Xanthium strumarium L. on colorado potato beetle leptinotrasa decemlineata say (Col: Chrysomelidae)*, Traditional J Agric Forestry, 22, 543-52, 1998.
- [36] A. K. Harada, H.Sakata Ina, *Isolation and identification of xanthatin as an antiattaching repellent against Blue mussel*, J Agric Biol Chem, 49, 1887-8, 1985.
- [37] M. Abde1-Mog1b, A. M. Dawıdar, M. A. Metwally, M. Abou-Elzahab, *Xantholides from Xanthium spinosum*, Phytochemistry; 30, 10, 3461-3462, 1991.

- [38] J. Cumanda, G. Marinoni, *New Sesquiterpenes from Xanthium Catharticum*, J. Natural Products; 54, 2, 460-465, 1991.
- [39] Y. H. Dai, Z. Cui, J. L. Li, D. Wang, *A new thiaziedione from the fruits of Xanthium sibiricum*, J. Asian Natural Products Research, 10, 4, 303-305, 2008.
- [40] C. Olivaro, A. Vazquez, *A new bioactive xanthanolide from Xanthium cavanillesii*, Natural Product Research, 23, 4, 388-392, 2009.
- [41] A. A. Ahmed, *A new vomifoliol derivative from Xanthium pungens*, Pharmazie, 45, 9, 1990.
- [42] [http:// www. alzheimernedir.com](http://www.alzheimernedir.com)
- [43] H. E. Temel, Doktora Tezi; *Demanslı Hastalarda Asetilkolinesteraz Aktivitesi ve Oksidatif Stresin Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri İle Değişimi*, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalı, 2008.
- [44] [http:// www. Alzheimer.web.tr](http://www.Alzheimer.web.tr)
- [45] T. J. De Pascual, J. G. Urones, I .S. Marcos, P. Basabe, C. J. Sexmero ve M. R. Fernandez, *Triterpenes from Euphorbia broteri*, Phtochemistry, 26, 1767-1776, 1987.
- [46] J. M. Tedder, A. Nechvatal, A.W. Murroy, Carnduff, *Basic Organik Chemistry*, Wiley, Belfast, 1972.
- [47] T. A. Geisman, D.H.G. Crout, *Organik Chemistry of secondary plant Metabolism*, Cooper and Company, California: 241, 1969.
- [48] F. A. Carey, *Organik Chemistry*, The Mcgraw-Hill Companies: 1070-71, INC (USA), (1996).
- [49] P. Boiteu, B. Pasich, A Ratsimamanga, *Les Triterpenoids*, Gauthier-Villard, Paris, 3, 32, 469, 1964.
- [50] J. D. Connolly, R. A. Hill, *Dictionary of terpenoids*, 690-753, Chapman & Hall, London, 1991.
- [51] A. Clarke, *Essential Chemistry for Safe Aromatherapy*, Elsevier Limited, 41-52, Edinburgh, 2002.
- [52] A. R Pinder, *The Chemistry of The Terpenes*, Chapman & Hall Ltd, 28, London, 1960.
- [53] D. Bruneton, *Sesquiterpenoids. Pharmacognosy, Phytochemistry-Medicinal Plants. 2nd edition*, 479-482, Lavoisier Publishing, Paris, France, 1999.

- [54] J. E. Robbers, Speedie, M. K. Tyler, E. Balado, *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, 81-107, Williams&Wilkins, USA, 1996.
- [55] Y. Akçay, N. Ezer, *4-O-Metilhipoletin-7-Asetilglukopiranozit ve Antienflamatuar Aktivitesi, XI. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı Bildiri Kitabı*, Ankara Üniversitesi, 555, 1997
- [56] J.-C. Chou, C. A. Mullin, *Distribution and Antifeedant Associations of Sesquiterpene Lactones in Cultivated Sunflower (Helianthus annuus L.) on Western Corn Rootworm (Diabrotica virgifera virgifera LeConte)*, J. Chem. Ecol. , 19, 7, 1439-1451, 1993.
- [57] F. Bohlmann, J. Jakupovic, A. Schuster, R. M. Robinson, *Germacranolide, Hydroxyverbanon und Ent-kaur-15(16)-en-17, 19-disaure aus Helianthus occidentalis var. Dowellianus*, Planta Med., 50, 2, 202-203, 1984.
- [58] E. Kılıç, Yüksek Lisans Tezi, *Tanacetum zahlbruckneri (Näb.) Grierson Bitkisi Üzerinde Fitokimyasal Araştırmalar*, Yıldız Teknik Üniversitesi, İstanbul, 2007.
- [59] J. D. Cram, S. G. Hammond, *Organic Chemistry*, Mc.Graw-Hill Book Company, 671, Newyork, 1964.
- [60] A. Ulubelen, S. Öksüz, Z. Samek ve M. Holub, *Sesquiterpenic lactones from smyrnium olusatrum L. roots*, Tetrahedron Letters, 12, 4455-4456, 1971.
- [61] H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D.H Williams, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, 2, 137, Holden-day Inc. , San Francisco, 1964.
- [62] S. El-Basyouni, G. H. N. Towers, *The Phenolic Acids In Wheat: II. Natural Occurrence Of Orthoferulic Acid (2-Hydroxy-3-Methoxycinnamic Acid)*, Can. J. Biochem., 42, 493-497, 1964.
- [63] P. M., Dewick, *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, John Wiley, Chichester, 2001.
- [64] T. Swain, *The Flavonoids*, Chapman and Hall., (Eds.Harborne, J. B., Marby, T. J., Marby, M.), 109, London, 1975.
- [65] S. Ryzsnyak ve Szent-Greorgy, A, *Vitamin Nature of Flavones*, Nature, 138, 27, 1936.
- [66] J. B. Harborne, T. J Marby, H. Marby, *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1975.

- [67] J. B. Harborne ve T. J. Marby, *The Flavonoids: Advances in Research*, Chapman and Hall, London, 1982.
- [68] D. A. Smith, S. W. Banks, *Plant Flavonoids in Biology and Medicine :Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationship*, 113-124, 1986.
- [69] N. K. Peters, J. Forst, W. Long, *A plant flavone, luteolin, induces expression of rhizobium-meliloti nodulation genes*, Science, 233, 978, 1986.
- [70] J. L. Firmin, K. E. Wilson, Rossen, L. Johnston, *Flavonoid activation of nodulation genes in rhizobium reversed by other compounds present in plants*, Nature, 324, 90, 1986.
- [71] M. Harmandar, G. V. Bilaloğlu, *Flavonoidler*, 190, Aktif Yayınevi, Ankara, 1999.
- [72] E. Jeney, J. Uri, *The Flavonoids*, Die Pharmazie, 9, 553. 1954.
- [73] G. Vogel, *Pharmacognosy and Phytochemistry*, 731. (Eds. Wagner, H., Hörhammer, L.), Berlin, 1971.
- [74] M. N. Zaprometov, *Biochimiya Katechinov*, 295, M. Nauka, 1964.
- [75] F. T. Yaeau, *Mejd. konf. Povitamine*, 39, Sofiya, 1962.
- [76] B. Borkowski, H. Krug, , *Biol. Inst. Rosl. Teczn.* , 6,18, 1960.
- [77] A. F. Rus, A. A. Kulikov, *Trudi Alt.*, 23, 32, 1971.
- [78] R. C. Robbins, *J. Clinical. Pharm.*, 13, 401, 1973.
- [79] Y. A. Xadjay, *Farmakol. i toksikol.*, 7, 46, 1972.
- [80] P. M. Davidovich, G. F. Klosterman, *Arch. Dermatol. und Syphilis.* 199, 10, 1954.
- [81] R. A. Larson, *The Antioxidants Of Higher Plants*, Phytochemistry, 27, 969, 1988.
- [82] W. Bors, M. Saran, *Free Radical Res. Commun.*, 2, 131, 1987.
- [83] D. E. Pratt, B. J. F. Hundson, *Food Antioxidants*, 171, Elsevier, London, 1990.
- [84] H. Wagner, *Search for New Plant Constituents with Potential Antiphlogistic and Antiallergic Activity*, Planta Med., 55, 235, 1989.
- [85] H. Wagner, G. Elbi, H. Lotter, N. Guinea, *Pharm. Pharmacol.*, 1, 15, 1991.
- [86] H. Hikino, Y. Kiso, *Econ. And Medicinal Plant Research*, 2, 39, 698, Academic Press, London, 1988.
- [87] M. A. Moroney, M. J. Alcanaz, R. A. Forder, F. Carey, J. R. S. Hoult, *Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an antiinflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids*, J. Pharm. Pharmacol., 40, 787. 1988.

- [88] T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoides*, Springer-Verlag, New York, 1970.
- [89] I. E. Burbulis, M. Iacobucci, B. W. Shirley, *A null mutation in the first enzyme of flavonoid biosynthesis does not affect male fertility in Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 8, 1013-1025. 1996.
- [90] K. R. Markham, B. Ternai, R. Stanley, H. Geiger, T. J. Mabry, *<sup>13</sup>C-NMR studies of flavonoids*, *Tetrahedron*, 34, 1389-1397, 1978.
- [91] K. R. Markham, *Isolation Techniques for Flavonoides*, *The Flavonoids*. Ed. Harborne, J. B. , London, 1975.
- [92] Van de Catelle, De Pooter, H. Van Sumere, *J. Chromatogr.*, 121, 49-63, 1976.
- [93] K. R. Markham, *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London, 1982.
- [94] R. Li, N. Fang, T. J. Mabry, *Flavonoids and a coumarin of Macuna sempervirens*, *Phytochemistry*, 27, 1556-1559, 1988.
- [95] E. Wollenweber, *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*, Plenum Press, New York, 1984.
- [96] M. Cormick, S. Robson, K. Bohm, *Flavonoids from Wyethia glabra*, *Phytochemistry*, 24, 1614-1616, 1985.
- [97] A. Sakushima, S. Nishibe, *Mass-Spectrometry In The Structural Determination Of Flavonol Triglycosides From Vinca-Major*, *Phytochemistry*, 27, 915-919, 1988.
- [98] P. M. Dey, J. B. Harborne, *Methods in Plant Biochemistry*, 1, Academic Press, London, 1989.
- [99] D. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, *Enstrümantal Analiz İlkeleri*, Bilim Yayıncılık, Ankara, 253-258,330,331,332,335,499,500,502,509,512,524-528, 1998.
- [100] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr. ve R. M. Featherstone, *A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity*, *Biochemical Pharmacology*, 7, 88-95, 1961.
- [101] F. Bohlmann, P. K. Mahanta, J. Jakupovic, R. C. Rastogi, A. A. Natu, *New sesquiterpene lactones from Inula species*, *Phytochemistry*, 17, 1165-1172, 1978.
- [102] R. Lanzetta, G. Lama, G. Mauriello, M. Parrilli, R. Racioppi, G. Sodano, *Ichthyotoxic sesquiterpenes and xanthanolides from Dittrichia graveolens*, *Phytochemistry*, 30, 1121-1124, 1991.

- [103] J. A. Marco, J. F. S. Cervera, J. Corral, M. Carda, J. Jakupovic, *Xanthanolides from Xanthium: Absolute configuration of xanthanol, isoxanthanol and their C-4 epimers*, *Phytochemistry*, 34, 1569-1576, 1993.
- [104] M. A. A. Yahyal, W. A. Yaacob and I. Nazlina, *Isolation Of Chemical Constituents From Rhizomes Of Etilingera Sphaerocephala Var. Grandiflora*, *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*, 15, 22-26, 2011.
- [105] M. A. Yahya, A. M. el-Sayed, J. S. Mossa, J. F. Kozlowski, M. D. Antoun, M. Ferin, W. M. Baird, J. M. Cassady, *Potential Cancer Chemopreventive and Cytotoxic Agents from Pulicaria crispa*, 51, 621-624, 1988.
- [106] K. Sprogøe, D. Stærk, A. K. Jäger, A. Adsersen, S. H. Hansen, M. Witt, A. K. R. Landbo, A. S. Meyer, J. W. Jaroszewski, *Targeted Natural Product Isolation Guided by HPLC–SPE–NMR: Constituents of Hubertia Species*, *J. Nat. Prod.*, 70, 1472-1477, 2007.

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında İstanbul'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İstanbul'da tamamladıktan sonra 2006 yılında Trakya Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimime başladım. Kimya bölümünden 2010 yılında mezun oldum ve aynı yıl Organik kimya anabilim dalında yüksek lisans eğitimime başladım.