

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MUĞLA İLİ ÇEVRESİNDE YETİŞEN *NARCISSUS TAZETTA* L. SUBSP.
TAZETTA L. BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR

Farmakognozi Programı

Doktora Tezi

Eczacı Çiğdem KARAKOYUN

Danışman: Prof. Dr. Nehir SOMER

İZMİR

2018

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MUĞLA İLİ ÇEVRESİNDE YETİŞEN *NARCISSUS TAZETTA* L. SUBSP.
TAZETTA L. BİTKİSİ ÜZERİNDE FARMAKOGNOZİK ÇALIŞMALAR

Farmakognozi Programı

Doktora Tezi

Eczacı Çiğdem KARAKOYUN

Danışman: Prof. Dr. Nehir SOMER

İZMİR

2018

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Nehir SOMER

Üye : Prof. Dr. Fatih KALYONCU

Üye : Doç. Dr. Zeynep SOYER

Üye : Doç. Dr. Zeki HAZNEDAROĞLU

Üye : Doç. Dr. Buket BOZKURT



Doktora Tezinin Kabul Edildiği Tarih: 06.09.2018

ÖNSÖZ

Tez çalışmamı planlayan, başlatan ve emekli oluncaya kadar danışmanlığımı yapan Prof. Dr. Mustafa Ali ÖNÜR'e,

Tez danışmanlığımı üstlenen ve hiçbir konuda desteğini esirgememiş olan Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Nehir SOMER'e,

Araştırmalarımın Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi kısmında deneyimlerini paylaşan ve değerlendirmelerime yardımcı olan Doç. Dr. Buket BOZKURT'a,

Moleküler Doking Çalışmalarını yürüten ve yazım aşamasında değerli katkılarda bulunan Dr. Güneş Çoban'a,

İzolasyon çalışmalarım için laboratuvarını kullanımına sunan Napoli Federico II Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Antonio EVIDENTE'ye,

Çalışmalarımda yardımlarını gördüğüm, her türlü bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan Dr. Marco MASI'ye ve Alessio Cimmino'ya,

GC-MS ve LC-MS/MS analizleri için cihazların kullanımını sağlayan Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarı (FABAL)'na ve cihaz kullanım ve izlem sorumlusu Uzm. Çiğdem YENGİN ile Kimy. Nihan ATABAY'a,

Bitkinin toplanması sırasındaki misafirperverlikleri ve yardımları için Muğla, Akçapınar beldesi sakinlerine,

Hayatımın her aşamasında yanımda olan canım aileme ve süreç boyunca yanımda olan tüm arkadaşlarıma,

Teşekkür ederim.

İzmir, 2018

Çiğdem KARAKOYUN

ÖZET

Amaryllidaceae alkaloidleri biyoaktivitesi yönünden kapsamlı olarak araştırılan ve çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanım potansiyeli olan sekonder metabolit grubudur. Amaryllidaceae familyasına ait olan *Narcissus* cinsi, doğal ilaç kaynağı olarak değerlendirilip, pek çok tür ve alt türü alkaloid profili açısından araştırılmaktadır. Bu tez çalışmasında ülkemizde Muğla ve çevresinde doğal olarak yetişen *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. alt türü üzerinde herhangi bir çalışma yapılmamış olması nedeniyle çiçekli dönemde toplanmış toprak üstü kısımları ve soğanları üzerinde fitokimyasal çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Drog örnekleri üzerinde, Avrupa Farmakopesi'ne göre kurutmada kayıp, bütün kül, sülfat külü, hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı deneylerini içeren kalite kontrol çalışmaları yapılmıştır. Bu deneylerin sonuçları % değerler olarak verilmiştir. Ayrıca drog örnekleri üzerinde, total alkaloid miktar tayini titrimetrik bir yöntemle gerçekleştirilmiştir.

Amaryllidaceae familyasının biyolojik aktivite açısından önemli olan alkaloidleri galantamin ve likorin, *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinden hazırlanan toprak üstü ve soğan örneklerinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak kalitatif ve kantitatif olarak araştırılmıştır. Ek olarak, yine bu iki farklı drog örneğinin alkaloid profilini belirlemek amacıyla kapiler gaz kromatografisi-kütle spektroskopisi (GC-MS) yöntemi kullanılmıştır. Bunun sonucunda, *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinin 23 adet alkaloid içerdiği saptanmıştır.

İzolasyon ve yapı aydınlatma çalışmalarında, oda sıcaklığında kurutulmuş ve toz edilmiş total bitki materyalinden hazırlanan total alkaloid ekstresinin kolon kromatografisiyle fraksiyonlandırılması sonucu elde edilen fraksiyonlar, preparatif sütun kromatografisi, preparatif ince tabaka kromatografisi ve kristallendirme gibi farklı yöntemler kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen bileşiklerin yapıları modern spektroskopik yöntemlerle (1D, 2D NMR, MS) aydınlatılmıştır.

Bu çalışmaların sonucunda, *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinden, Amaryllidaceae alkaloidlerinin likorin alt grubundan (-)-likorin, (-)-psödolikorin, (-)-9-O-metilpsödolikorin, (+)-11-hidroksigalantin, (-)-narsissidin; homolikorin alt grubundan (+)-9-O-demetil-2- α -hidroksihomolikorin; montanin alt grubundan (-)-pankratinin-C ve galantamin alt grubundan (-)-galantamin adlı bileşikler izole edilmiştir.

İzole edilen bileşiklerden daha önce *in vitro* Ellman metodu ile biyoaktivite çalışması yapılmamış olanlarda bu yöntemle mikropilaka deneyi uygulanarak asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz inhibitör aktiviteleri araştırılmıştır. Aktif olan tüm bileşiklerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır.

Ayrıca izole edilen bileşikler için moleküler doking çalışması yapılarak kolinesteraz enzimlerinin aktif bölgeleri içerisindeki bağlanma yönelimleri incelenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta*; antikolinesteraz aktivite; izolasyon ve yapı aydınlatma çalışmaları, kalite kontrol çalışmaları

ABSTRACT

Amaryllidaceae alkaloids are a group of secondary metabolites which have therapeutic potential for the treatment of various diseases and have been deeply searched in terms of bioactivity. The genus *Narcissus*, belonging to the Amaryllidaceae family, evaluated as a valuable source of natural products, has been investigated for its alkaloidal profile in terms of its species and subspecies. This thesis consists of phytochemical studies on bulbs and aerial parts of *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. collected from its natural habitat in Mugla/Turkey as there have been no study carried out on this subspecies.

Quality-control studies including, loss on drying, total ash, sulphated ash and hydrochloric acid-insoluble ash have been performed according to European Pharmacopoeia on drug specimens. The results were given as percentage values. Additionally, total alkaloidal contents of the drug specimens were determined by a titrimetric method.

Galanthamine and lycorine, biologically important alkaloids of Amaryllidaceae family, in two different drug specimens prepared from *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L, were qualitatively and quantitatively investigated using high pressure liquid chromatography (HPLC). Furthermore, capillary gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to determine the alkaloidal profile of two different drug specimens. As a result, 23 alkaloids were detected in *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta*.

In the studies, where isolation and structure elucidation investigations were carried out, total alkaloidal extract, prepared from powdered whole plant material dried at room temperature, was fractionated by column chromatography. The obtained fractions have been purified by different methods such as preparative column chromatography, preparative thin layer chromatography and crystallization. The structures of the obtained compounds were elucidated by modern spectroscopic methods (1D, 2D NMR, MS).

As a result of these studies, the Amaryllidaceae alkaloids, (-)-lycorine, (-)-pseudolycorine, (-)-9-*O*-methylpseudolycorine, (+)-11-hydroxygalanthine, (-)-narcissidine from the lycorine subgroup; (+)-9-*O*-demethyl-2- α -hydroxyhomolycorine from the homolycorine subgroup; (-)-pancratinine-C from the montanine subgroup and (-)-galanthamine from the galanthamine subgroup were isolated from *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta*. All compounds are reported for the first time in the title subspecies collected from Turkey.

Acetylcholinesterase ve butyrylcholinesterase inhibitory activities of isolated compounds which are not studied before, were determined by using a microplate assay based on *in vitro* Ellman's method. The IC₅₀ values of all active compounds were calculated.

Also, molecular docking studies were performed to evaluate the binding orientations of the isolated compounds inside the active sites of cholinesterase enzymes.

Keywords: *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta*, anticholinesterase activity; isolation; quality control experiments; structure elucidation studies

İçindekiler

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TABLO DİZİNİ.....	IX
ŞEKİL DİZİNİ.....	XI
SPEKTRUM DİZİNİ.....	XI
GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
I. BÖLÜM	6
GENEL BİLGİLER	6
1. Bitki Hakkında Botanik Bilgiler.....	6
1.1. <i>Narcissus</i> L. Cinsi.....	6
1.1.1. <i>Narcissus</i> L. Cinsinin Sınıflandırılması	6
1.1.2. Türkiye'nin <i>Narcissus</i> L. Florası	10
1.1.3. <i>Narcissus</i> L. Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar	11
1.2. <i>N. tazetta</i> L.....	13
1.3. <i>N. tazetta</i> subsp. <i>tazetta</i> L.	14
2. Kalite Kontrol ve Miktar Tayini Çalışmaları	17
2.1. Uçucu Yağ İçeriği ile ilgili Çalışmalar	17
2.2. Alkaloid Miktar Tayini Çalışmaları	19
2.3. Bitkide Alkaloid Üretimini Arttırmaya Yönelik Araştırmalar	26
2.4. GC-MS Yöntemi ile tespit edilmiş alkaloidler	27
3. İzolasyon, Yapı Aydınlatma ve Biyoaktivite Çalışmaları.....	28
3.1. Alzheimer Hastalığı.....	28
3.2. Amaryllidaceae Alkaloidleri	29
3.3. Bitkiden Elde Edilen Ekstreler Üzerinde Aktivite Araştırmaları.....	34
4. Moleküler Doküman Çalışmaları.....	91
II. BÖLÜM	92
GEREÇ VE YÖNTEMLER	92
1. Bitkisel Materyal.....	92
2. Kalite Kontrol ve Miktar Tayini Araştırmaları.....	94
2.1. Gereç	94
2.2. Yöntem	94
2.2.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini	94

2.2.2. Bütün Kül Miktar Tayini.....	94
2.2.3. Sülfat Külü Miktar Tayini	95
2.2.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini.....	95
2.2.5 Total Alkaloit Miktar Tayini	96
2.2.5.1. Total Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı.....	96
2.2.5.2. Total Alkaloit Miktar Tayini Uygulaması	96
2.2.5.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Uygulanması.....	96
2.2.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Likorin ve Galantamin Alkaloitlerinin Teşhis ve Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu	98
2.2.6.1. Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı	98
2.2.6.2. Standart Alkaloide Ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması.....	98
2.2.6.3. Alkaloit Miktarının Tayin Edilmesi	98
2.3. Deneyler	98
2.3.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini	98
2.3.2. Bütün Kül Miktar Tayini.....	99
2.3.3. Sülfat Külü Miktar Tayini	99
2.3.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini.....	99
2.3.5. Total Alkaloit Miktar Tayini	100
2.3.5.1. Total Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı.....	100
2.3.5.2. Total Alkaloit Miktar Tayini Uygulaması	100
2.3.5.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Ayarlanması	101
2.3.5.3.1 0.1 N Sülfürik Asit Çözeltilisinin Hazırlanması.....	101
2.3.5.3.2. 0.02 N Sülfürik Asit Çözeltilisinin Hazırlanması	101
2.3.5.3.3. 0.02 N Sülfürik Asit Çözeltilisinin Ayarlanması.....	101
2.3.5.3.4. 0.1 N Sodyum Hidroksit Çözeltilisinin Hazırlanması	101
2.3.5.3.5 0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltilisinin Hazırlanması	101
2.3.5.3.6. 0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltilisinin Ayarlanması	102
2.3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Likorin ve Galantamin Alkaloitlerinin Teşhis ve Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu	102
2.3.6.1. Alkaloit Ekstrelerinin Hazırlanışı	102
2.3.6.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analiz Koşulları	103
2.3.6.3. Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı	103
2.3.6.4. Standart Likorin Çözeltilisinin Hazırlanışı	103
2.3.6.5. Standart Likorine Ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	104
2.3.6.6. Likorinin HPLC ile Teşhis ve Miktar Tayini	104

2.3.6.7. Standart Galantamin Çözeltilisinin Hazırlanışı.....	104
2.3.6.8. Standart Galantamine Ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması	104
2.3.6.9. Galantaminin HPLC ile Teşhis ve Miktar Tayini.....	104
2.3.6.10. Yöntem Validasyonu	105
3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) Yöntemiyle Drog İçeriğindeki Alkaloidlerin Saptanması	107
3.1. Gereç	107
3.2. Yöntem	107
3.2.1. GC Ölçümü İçin Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı	107
3.2.2. GC-MS Cihazına Uygulamanın Yapılışı	107
3.3 Deney	108
3.3.1. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) Yöntemiyle Drog İçeriğindeki Alkaloidlerin Saptanması	108
3.3.1.1. Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı	108
3.3.1.2. Deneyin Yapılışı	108
4. İzolasyon, Yapı Aydınlatma ve Antikolinesteraz Aktivite Çalışmaları	109
4.1. Gereç	109
4.2. Yöntem	110
4.2.1. Alkaloid Ekstraksiyonu	110
4.2.2. Alkaloidlerin Saflaştırılmaları	111
4.2.3. Total Alkaloid Ekstresinin Sütun Kromatografisi ile Fraksiyonlandırılması	111
4.2.4. Alkaloidlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile (İ.T.K.) İncelenmesi	111
4.2.5. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	112
4.2.6. Kristalizasyon.....	112
4.2.7. Saf Halde Elde Edilen Bileşiklerin Tanımlanması	113
4.2.8. Antikolinesteraz Aktivite Tayini	113
4.3. Deney.....	113
4.3.1. Alkaloid Ekstraksiyonu	113
4.3.2. Total Alkaloid Ekstresinin Sütun Kromatografisi ile Fraksiyonlandırılması	114
4.3.3. Ana Fraksiyonlar Üzerinde Çalışmalar	116
4.3.3.1. D Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar	116
4.3.3.2. F Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar	117
4.3.3.3. H Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar	118

4.3.3.4. I Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar	119
4.3.3.5. J Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar	119
4.3.4. Mikroplaka Deneyi ile Ekstre ve Saf Maddelerin Antikolinesteraz Aktivitelerinin Tayini	120
5. İzole Edilen Alkaloidler Üzerinde Moleküler Doking Çalışmaları	120
5.1. Gereç	120
5.2. Yöntem ve Deney	121
5.2.1. Homoloji Modelleme	122
5.2.2. Doking Protokolü	122
5.2.3. SlogP Değerlerinin Belirlenmesi	123
III. BÖLÜM	124
BULGULAR	124
1. Kalite Kontrol ve Miktar Tayini Araştırmalarına Ait Bulgular	124
1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları	124
1.2. Bütün Kül Miktar Tayini Sonuçları	124
1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları	125
1.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini Sonuçları	125
1.5. Total Alkaloid Miktar Tayini Sonuçları	126
1.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Likörin ve Galantamin Alkaloidlerinin Teşhis ve Miktar Tayini Sonuçları ve Yöntemin Validasyonu	127
1.6.1. Likörinin HPLC ile Miktar Tayini Prosedür Verileri	128
1.6.2. Ekstrelelere Ait Likörin Miktar Tayini Bulguları	129
1.6.3. Likörin Miktar Tayininin Validasyonu	132
1.6.3.1. Özgüllük (Seçicilik)	132
1.6.3.2. Doğrusallık ve Tayin Aralığı	133
1.6.3.3. Doğruluk (Gerçeklik)	133
1.6.3.4. Kesinlik	135
1.6.3.5. Tayin Sınırı (LOD)	137
1.6.3.7. Niceleme Sınırı (LOQ)	139
1.6.3.8. Sağlamlık	140
1.6.4. Galantaminin HPLC ile Miktar Tayini Prosedür Verileri	141
1.6.5. Ekstrelelere Ait Galantamin Miktar Tayini Bulguları	142
1.6.6. Galantamin Miktar Tayininin Validasyonu	145
1.6.6.1. Özgüllük (Seçicilik)	145
1.6.6.2. Doğrusallık ve Tayin Aralığı	145

1.6.6.3. Doğruluk (Gerçeklik)	145
1.6.6.4. Kesinlik	146
1.6.6.5. Tayin Sınırı (LOD)	148
1.6.6.6. Nicleme Sınırı (LOQ)	149
1.6.6.7. Sağlamlık	150
2 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloit Tespiti Çalışmalarına Ait Bulgular.....	151
3. İzolasyon ve Biyoaktivite Çalışmalarına Ait Bulgular	155
3.1. İzolasyonla Elde Edilen Bileşiklere Ait Bulgular	155
3.1.1 NT1 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular	155
3.1.2. NT2 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular	159
3.1.3. NT3 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular	165
3.1.4. NT4 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular	171
3.1.5. NT5 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular	182
3.1.6. NT6 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular	193
3.1.7. NT7 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular	197
3.1.8. NT8 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular	202
3.2. Antikolinesteraz Aktivite Tayinine Ait Bulgular	212
4. İzole Edilen Alkaloitler Üzerinde Moleküler Doking Çalışmaları	213
IV. BÖLÜM	230
TARTIŞMA	230
1. Kalite Kontrol ve Miktar Tayini Araştırmaları.....	230
1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini ve Kül Miktar Tayini Yöntemleri	230
1.2. Total Alkaloit Miktar Tayini	230
1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Likorin ve Galantamin Alkaloitlerinin Teşhis ve Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu	231
2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloit Tespiti Çalışmaları	233
3. İzolasyon, Yapı Aydınlatma ve Antikolinesteraz Aktivite Çalışmaları	235
3.1. NT1: (-)-Likorin	235
3.2. NT2: (-)-Psödolikorin.....	238
3.3. NT3: (-)-9-O-Metilpsödolikorin	241
3.4 NT4: (-)-Narsissidin	243
3.5. NT5: (+)-11-Hidroksigalantin	246
3.6. NT6: (-)-Galantamin	249

3.7. NT7: (+)-9- <i>O</i> -Demetil-2- α -hidroksihomolikorin	252
3.8. NT8: (-)-Pankratinin- C	255
4. İzole Edilen Alkalolitler Üzerinde Moleküler Doking Çalışmaları	259
V. BÖLÜM	267
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	267
VI. BÖLÜM	271
KAYNAKLAR.....	271
ÖZGEÇMİŞ.....	290



TABLO DiZiNi

Tablo 1. <i>Narcissus</i> Türleri Üzerinde Yapılmış Alkaloit Miktar Tayini Çalışmaları.....	22
Tablo 2. İskelet yapılarına göre Amaryllidaceae alkaloitleri	30
Tablo 3. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin <i>Narcissus</i> Türlerinde Bulunuşları.....	35
Tablo 4. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri.....	74
Tablo 5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analiz Koşulları.....	103
Tablo 6. GC-MS Yöntemiyle Alkaloit İçeriğinin Saptanmasında Kullanılan Cihazın Deney Şartları.....	109
Tablo 7. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözücü ve Çözücü sistemleri.....	115
Tablo 8. Ana Fraksiyon Kodları ve Kullanılan Çözücü Sistemleri.....	116
Tablo 9. <i>Narcissus tazetta</i> L. subsp. <i>tazetta</i> L. Bitkisinden Hazırlanan Örnekler Üzerinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları.....	124
Tablo 10. <i>Narcissus tazetta</i> L. subsp. <i>tazetta</i> L. Bitkisinden Hazırlanan Örnekler Üzerinde Yapılan Bütün Kül Miktar Tayini Sonuçları.....	125
Tablo 11. <i>Narcissus tazetta</i> L. subsp. <i>tazetta</i> L. Bitkisinden Hazırlanan Örnekler Üzerinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları.....	125
Tablo 12. <i>Narcissus tazetta</i> L. subsp. <i>tazetta</i> L. Bitkisinden Hazırlanan Örnekler Üzerinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini Sonuçları	126
Tablo 13. NTÜ Kodlu Örneğe Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları.....	126
Tablo 14. NTA Kodlu Örneğe Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları.....	126
Tablo 15. Likorinin HPLC ile Miktar Tayini Verileri.....	128
Tablo 16. NTA kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile likorin miktar tayini verileri.....	130
Tablo 17. NTA Kodlu Örnek Üzerinde HPLC Yöntemi ile Likorin Miktar Tayini Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi	131
Tablo 18. NTÜ kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile likorin miktar tayini verileri.....	131
Tablo 19. NTÜ Kodlu Örnek Üzerinde HPLC Yöntemi ile Likorin Miktar Tayini Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi	132
Tablo 20. <i>Narcissus tazetta</i> L. subsp. <i>tazetta</i> L. Örneği Üzerinde Yapılmış Geri Kazanım Çalışması Sonuçları	134
Tablo 21. Likorin ile Yapılmış Günlerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları	136
Tablo 22. Likorin için Tayin Sınırı Belirleme Verileri	137
Tablo 23. Likorin için Niceleme Sınırı Belirleme Verileri	139
Tablo 24. Likorin Miktar Tayini İçin Kullanılan Yöntemin Sağlamlık Verileri.....	140
Tablo 25. Galantaminin HPLC ile Miktar Tayini Verileri.....	141
Tablo 26. NTS kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile galantamin miktar tayini verileri	143
Tablo 27. NTA Kodlu Örnek Üzerinde HPLC Yöntemi ile Galantamin Miktar Tayini Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	144
Tablo 28. NTÜ kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile galantamin miktar tayini verileri	144
Tablo 29. NTÜ Kodlu Örnek Üzerinde HPLC Yöntemi ile Galantamin Miktar Tayini Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi.....	144
Tablo 30. Galantamin ile Yapılmış Geri Kazanım Çalışması Sonuçları.....	146
Tablo 31. Galantamin ile Yapılmış Günlerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları....	147

Tablo 32. Galantamin için Tayin Sınırı Belirleme Verileri.....	149
Tablo 33. Galantamin için Niceleme Sınırı Belirleme Verileri.....	150
Tablo 34. Galantamin Miktar Tayini İçin Kullanılan Yöntemin Sağlamlık Verileri	151
Tablo 35. NTÜ Kodlu Örneğin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloid Tespiti Analizine Ait Bulgular	151
Tablo 36. NTA Kodlu Örneğin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloid Tespiti Analizine Ait Bulgular	153
Tablo 37. NT2 Bileşiğine Ait NOESY Bulguları.....	164
Tablo 38. NT3 Bileşiğine Ait ¹ H NMR ve ¹ H, ¹ H COSY Spektral Bulguları.....	170
Tablo 39. NT4 Kodlu Bileşiğin 1D ve 2D NMR Spektral Bulguları	181
Tablo 40. NT5 Kodlu Bileşiğin 1D ve 2D NMR Spektral Bulguları	192
Tablo 41. NT7 Bileşiğine Ait NOESY Bulguları.....	201
Tablo 42. NT8 Kodlu Bileşiğin 1D ve 2D NMR Spektral Bulguları	211
Tablo 43. Saf Bileşiklere Ait Antikolinesteraz Aktivite Bulguları	212
Tablo 44. Ekstrelelere Ait Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları.....	212
Tablo 45. Bileşiklerin GoldScore uyumluluk fonksiyonu kullanılarak <i>ee</i> AChE ve homoloji model <i>eq</i> BuChE enzimleri içerisindeki hesaplanmış doking skorları ve hesaplanmış SLogP değerleri	213

RESİM DİZİNİ

Resim 1(a). <i>Narcissus tazetta</i> L. subsp. <i>tazetta</i> L. Bitkisinin Doğadaki Görünüşü 1(b). <i>Narcissus tazetta</i> L. subsp. <i>tazetta</i> L. Bitkisinin Yakından Görünüşü.....	92
Resim 2. <i>Narcissus tazetta</i> L. subsp. <i>tazetta</i> L. Bitkisine Ait Herbaryum Örneği	93

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Standart Maddeler ve Örnekler ait Kromatogram	127
Şekil 2 Likorin Standart Ölçü Eğrisi ve Regresyon Denklemi.....	128
Şekil 3. Galantamin Standart Ölçü Eğrisi ve Regresyon Denklemi	141
Şekil 4 A-B. (-)-Likorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Likorin pembe çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-Likorin bileşiğinin <i>eeAChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eeAChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	214
Şekil 5 A-B. (-)-Likorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Likorin pembe çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-Likorin bileşiğinin <i>eqBuChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eqBuChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	215
Şekil 6 A-B. (-)-Psödolikorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Psödolikorin açık yeşil çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-Psödolikorin bileşiğinin <i>eeAChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eeAChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	216
Şekil 7 A-B. (-)-Psödolikorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Psödolikorin açık yeşil çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-Psödolikorin bileşiğinin <i>eqBuChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eqBuChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	217
Şekil 8 A-B. (-)-9-O-metilpsödolikorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-9-O-metilpsödolikorin mor çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-9-O-metilpsödolikorin bileşiğinin <i>eeAChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eeAChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.	218
Şekil 9 A-B. (-)-9-O-metilpsödolikorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-9-O-metilpsödolikorin mor çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-9-O-metilpsödolikorin bileşiğinin <i>eqBuChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eqBuChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.	219
Şekil 10 A-B. (-)-Narsissidin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Narsissidin mavi çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-Narsissidin bileşiğinin <i>eeAChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eeAChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	220
Şekil 11 A-B. (-)-Narsissidin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Narsissidin mavi çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-Narsissidin bileşiğinin <i>eqBuChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eqBuChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	221
Şekil 12 A-B. (+)-11-Hidroksigalantin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(+)-11-Hidroksigalantin grimsi mavi çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (+)-11-Hidroksigalantin bileşiğinin <i>eeAChE</i> içerisindeki ilk sıradaki doking poz. B. <i>eeAChE</i> 'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	222

Şekil 13 A-B. (+)-11-Hidroksigalantin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(+)-11-Hidroksigalantin grimsi mavi çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (+)-11-Hidroksigalantin bileşiğinin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. B. eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	223
Şekil 14 A-B. (-)-Galantamin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Galantamin altın sarısı çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-Galantamin bileşiğinin eeAChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. B. eeAChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	224
Şekil 15 A-B. (-)-Galantamin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Galantamin altın sarısı çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. (-)-Galantamin bileşiğinin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. B. eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	225
Şekil 16 A-B. 9-O-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin ve Aktif yöre artıkları [9-O-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin magenta çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. 9-O-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin bileşiğinin eeAChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. B. eeAChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.	226
Şekil 17 A-B. 9-O-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin ve Aktif yöre artıkları [9-O-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin magenta çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. 9-O-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin bileşiğinin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. B. eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.	227
Şekil 18 A-B. Pankratinin-C ve Aktif yöre artıkları [Pankratinin-C turuncu çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. Pankratinin-C bileşiğinin eeAChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. B. eeAChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	228
Şekil 19 A-B. Pankratinin-C ve Aktif yöre artıkları [Pankratinin-C turuncu çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] A. Pankratinin-C bileşiğinin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. B. eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.....	229
Şekil 20 Donepezil-AChE kompleksinin (1EVE.pdb) kristal yapısı ile donepezil bileşiğinin hazırlanan model içerisindeki ilk sıra doking pozunun superimpozisyonu.	259
Şekil 21 3F9-BuChE kompleksinin (4TPK.pdb) kristal yapısı ile 3F9 bileşiğinin BuChE'nin homoloji modeli içerisindeki ilk sıra doking pozunun superimpozisyonu.	260
Şekil 22 Galantamin, 11-hidroksigalantin, narsissidin ve 9-O-metilpsödolikorin bileşiklerinin eeAChE içerisindeki ilk sıra doking pozlarının superimpozisyonu.	261
Şekil 23 Galantamin-AChE kompleksinin (1DX6.pdb) kristal yapısı ile galantamin bileşiğinin hazırlanan model içerisindeki ilk sıra doking pozunun superimpozisyonu.	262

SPEKTRUM DiZiNi

Spektrum 1. Standart Likorine Ait UV Spektrumu	129
Spektrum 2. NTA Kodlu Örnekteki Likorine Ait UV Spektrumu	129
Spektrum 3. NTÜ Kodlu Örnekteki Likorine Ait UV Spektrumu	130
Spektrum 4. Standart Galantamine Ait UV Spektrumu	142
Spektrum 5. NTA Kodlu Örnekteki Galantamine Ait UV Spektrumu.....	142
Spektrum 6. NTÜ Kodlu Örnekteki Galantamine Ait UV Spektrumu.....	143

Spektrum 7. NT1 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu.....	156
Spektrum 8. NT1 Bileşğine Ait ^1H NMR spektrumu.....	157
Spektrum 9. NT1 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu.....	158
Spektrum 10. NT2 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu.....	160
Spektrum 11. NT2 Bileşğine Ait ^1H NMR spektrumu.....	161
Spektrum 12. NT2 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu.....	162
Spektrum 13. NT2 Bileşğine Ait NOESY Spektrumu	163
Spektrum 14. NT2 Bileşğine Ait Genişletilmiş NOESY spektrumu.....	164
Spektrum 15. NT3 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu.....	166
Spektrum 16. NT3 Bileşğine Ait ^1H NMR spektrumu.....	167
Spektrum 17. NT3 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu.....	168
Spektrum 18. NT3 Bileşğine Ait ^1H , ^1H -COSY Spektrumu	169
Spektrum 19. NT4 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu.....	172
Spektrum 20. NT4 Bileşğine Ait ^1H NMR Spektrumu	173
Spektrum 21. NT4 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu	174
Spektrum 22. NT4 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu	175
Spektrum 23. NT4 Bileşğine Ait ^{13}C NMR Spektrumu	176
Spektrum 24. NT4 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^{13}C NMR Spektrumu	177
Spektrum 25. NT4 Bileşğine Ait HSQC Spektrumu.....	178
Spektrum 26. NT4 Bileşğine Ait Genişletilmiş HSQC Spektrumu.....	179
Spektrum 27. NT4 Bileşğine Ait ^1H , ^1H -COSY Spektrumu	180
Spektrum 28. NT5 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu.....	183
Spektrum 29. NT5 Bileşğine Ait ^1H NMR Spektrumu	184
Spektrum 30. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu	185
Spektrum 31. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu	186
Spektrum 32. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu	187
Spektrum 33. NT5 Bileşğine Ait ^{13}C NMR Spektrumu	188
Spektrum 34. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^{13}C NMR Spektrumu	189
Spektrum 35. NT5 Bileşğine Ait HSQC Spektrumu.....	190
Spektrum 36. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş HSQC Spektrumu.....	191
Spektrum 37. NT6 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu.....	194
Spektrum 38. NT6 Bileşğine Ait ^1H NMR Spektrumu	195
Spektrum 39. NT6 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu	196
Spektrum 40. NT7 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu.....	198
Spektrum 41. NT7 Bileşğine Ait ^1H NMR Spektrumu	199
Spektrum 42. NT7 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu.....	200
Spektrum 43. NT7 Bileşğine Ait NOESY Spektrumu	201
Spektrum 44. NT8 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu.....	203
Spektrum 45. NT8 Bileşğine Ait ^1H NMR Spektrumu	204
Spektrum 46. NT8 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu	205
Spektrum 47. NT8 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu	206
Spektrum 48. NT8 Bileşğine Ait ^1H , ^1H -COSY Spektrumu	207
Spektrum 49. NT8 Bileşğine Ait ^{13}C NMR Spektrumu	208
Spektrum 50. NT8 Bileşğine Ait HMBC Spektrumu.....	209
Spektrum 51. NT8 Bileşğine Ait NOESY Spektrumu	210

KISALTMALAR

AChE: Asetilkolinesteraz

BuChE: Bütirikolinesteraz

CDCl₃: Dötoro Kloroform

CD₃OD: Dötoro Metanol

NTA: Narcissus Toprak Altı

NTÜ: Narcissus Toprak üstü

DMSO-d₆: Dötoro Dimetilsülfoksit

FDA: Food and Drug Administration

GC-MS: Gas Chromatography–Mass Spectrometry

¹H ¹H COSY: Correlation Spectroscopy

HMBC: Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy

HSQC: Heteronuclear Single-Quantum Correlation Spectroscopy

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

Hz: Hertz

IC₅₀: Half Maximal Inhibitory Concentration

NOESY: Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy

!: Görüldü

GİRİŞ ve AMAÇ

Amaryllidaceae, dünyada yaklaşık 85 cins ve 1100 türle temsil edilen, süs bitkisi olarak büyük bir ekonomik değere sahip olmasının yanı sıra tedavide de kullanımı geniş yer tutan bitkileri bünyesinde barındıran bir monokotil bitki familyasıdır (1, 2). Söz konusu familya üyeleri, Akdeniz, Güney Amerika ve Güney Afrika'yı kapsayan tropikal, subtropikal ve ılıman bölgelerde yayılış göstermektedir (2). Amaryllidaceae familyası üyesi olan *Narcissus* L. türleri çok yıllık, soğanlı, otsu bitkilerdir. Ülkemizde halk arasında genel olarak "nergis" adıyla bilinen bu cins için "nargoz", "nargöz" gibi isimler kullanılmaktadır. Buna ilaveten *Narcissus jonquilla* L. türü "fulya", *N. poeticus* L. "zerrinkadeh", *N. pseudonarcissus* L. "boru çiçeği", *N. serotinus* L. "güz nergisi", *N. tazetta* L. "nergis" ve *N. tazetta* L.'nin Antakya civarında yetişen katmerli formu da "katkatlı nergis" olarak bilinmektedir (3). Bir başka kaynakta *N. assoanus* Dufour ex Schult. & Schult. f. "kel nergis", *N. ×laetus* Salisb. "melez nergis", *N. papyraceus* Ker Gawl. "mısırgülü", *N. pseudonarcissus* L. "zeren", *N. serotinus* L. "deli nergis" olarak verilmiştir (4). Bazı kayıtlarda, çiçekleri "fatma çiçeği" ismiyle yer alan (5) *Narcissus* cinsi, güzel ve renkli çiçeklerinden dolayı süs bitkisi olarak yaygın şekilde kullanılmakta ve soğanları ülkemizden ihraç edilmektedir (6).

Amaryllidaceae familyasına ait bitkilerin kullanılışı M.Ö. 4. yüzyılda Hipokrat'ın (M.Ö. 460-370), *Narcissus poeticus* L. türünü kullanarak elde ettiği nergis uçucu yağını uterus tümörlerinde kullandığı zamanlara dayanmaktadır. Kendisini takip eden Yunan asıllı doktor Dioscorides (M.S. 40-90) ve Efes'te doğmuş tıp doktoru Soranus (M.S. 98-138) da 1. ve 2. yüzyılda Hipokrat'ın bu tedavisini devam ettirmiştir. Ayrıca *N. pseudonarcissus* L. ekstrelerinin de topikal olarak antikanser kullanılışı eski Romalı doğa bilgini Büyük Plinius tarafından kaydedilmiştir. Akdeniz ülkelerinde doğal olarak yetişen *Narcissus tazetta* L. bitkisinin çeşitli kullanımlarına yönelik kanıtlar da bulunmaktadır (7).

17. yüzyılda bitkisel tedavi konusunda önemli bir kaynak olarak kabul edilen "Culpeper's Herbal", nergis soğanlarından elde edilen homeopatik bir remedinin boğmaca tip öksürük ve bronşit başta olmak üzere solunum sistemi hastalıklarında kullanımını tavsiye etmiştir (8). Bu kaynağa göre kavrulmuş arpa yemeği ve *Narcissus* köklerinden hazırlanan bitkisel içerikli harç büyük çıbanlarda ve sert şişlikleri iyileştirmede; balla tatlandırılmış içeceğe veya akgünlük şarabına

konduğunda kulağa damlatılarak kulak rahatsızlıklarında, yağ içinde kaynatıldığında topukta oluşmuş açık yaralarda, köklerinden hazırlanmış içeceği halinde ise ciltteki renk kayıplarında kullanıldığı belirtilmiştir.

Geçmişten günümüze *Narcissus* soğan ve çiçeklerinin sinir sistemi üzerinde de olumlu etkileri olmuştur. Kitaplara yılançık ve felç için tedavi edici özelliğine ek olarak kusturucu ve barsak boşaltıcı etkileriyle konu olmuştur (9).

Narcissus, “*Narcissimum*” adıyla bilinen tarihi bir merhemin temel maddesi olmuştur. Toz haline getirilmiş çiçeklerinden hazırlanan şurup ve infüzyonları akciğer iltihabında kullanılmış, kusturucu etkisinden faydalanılmıştır. Ayrıca kurutulmuş çiçeklerden hazırlanan dekoksiyonun da kusturucu etkisi görülmüş, çocuklardaki konjestif bronşiyal iltihaplanmada ve epidemik dizanteride tedavi edici olmuştur (7).

Fransa’da *Narcissus* çiçekleri antispazmodik olarak kullanılmıştır. Soğanlardan hazırlanan ekstre, karakteristik kokulu sarı renkli bir uçucu yağ ve kahverengi öz içerir. İçeriğinde kersetin adlı flavonoidi de yoğun olarak bulundurur ve tedavide haricen masaj şeklinde uygulanır. Araplar bu yağı kellik için ve afrodisyak etkisi için kullanmışlardır (10). Kontraseptif olarak *Narcissus tazetta* soğanlarının kullanıldığı da belirtilmiştir (11). Nergis yağının antikanser amaçlı kullanılışı orta çağlarda Çin, Kuzey Afrika, Amerika ve Arap tıbbında devam etmiştir (7).

Narcissus tazetta bitkisinin Yunan kaynaklarında çeşitli cilt hastalıklarının tedavisinde kullanıldığı kayıtlıdır. Ayrıca Ziya Al-Din Abdullah Ibn Al-Baitar tarafından yazılmış “*Al-Jaame’-li-Mufradaat-al-Adviawal- Aghzia*” adlı eserde *Narcissus tazetta* bitkisinin alopesi tedavisinde kullanımından bahsedilmiştir (12).

İbn’i Sina (M.S 981-1037)’nın *Al-Qaanoon-fil-Tibb* adlı eserinde ise *Narcissus tazetta* köklerinin cilt lekeleri ve çillerin tedavisinde etkili olduğu kayıtlıdır. Ayrıca çiban ve kistik sivilceler için ve deriden diken çıkarmak için yapılacak müdahalelerde bitkinin köklerinin haricen kullanılabileceği belirtilmiştir. Eklem ağrıları, burkulmalar, ateş yanıkları, ciltteki kesikler yine bu bitkinin kökleri ile tedavi edilmektedir. Aynı kaynaktan haricen saçkıran tedavisinde kullanılan köklerin dahilen alındığında bulantı ve kusmayı arttırdığı ve hamilelerde düşüklere sebep olduğu bildirilmiştir (13).

Narcissus türleri, sitotoksik, antiviral, antifungal, antiinflamatuvar ve antikolinesteraz aktivite gibi farklı özelliklere sahip Amaryllidaceae alkaloidlerinin

yanısıra, antiviral, insektisit ve eritrosit aglütinasyonunu indükleyici etkileri kanıtlanmış bir grup olan lektin içermeleri sebebiyle araştırmacıların ilgisini çekmektedir (14, 15).

Narcissus türleri üzerinde yoğun bir şekilde yürütülen fitokimyasal araştırmaların temelini ise izole edilen ilk Amaryllidaceae alkaloidi olan ve *N. pseudonarcissus*'tan elde edilen "likorin" adlı alkaloidin keşfi oluşturmuştur. Likorin, *Narcissus* türlerinde yaygın olarak bulunan bir Amaryllidaceae alkaloidi olup, antitümör (16-18), antiproliferatif (19-21), antiviral (22), antimikrobiyal (23), antiplatelet (24), antimalarial-antiparazitik (25), antiinflamatuvar (26), analjezik ve hepatoprotektif etkileri saptanmıştır (27).

Amaryllidaceae alkaloidleri arasında günümüzde Alzheimer hastalığı tedavisinde mental performansı arttırmak için kullanılan bir bileşik olan "galantamin" en çok bilinenidir. Galantamin, hidrobromür tuzu halinde önce "Nivalin®" adı altında Bulgaristan'da üretilmiş, daha sonra "Reminyl®" ve "Razadyne®" olarak FDA tarafından onaylanmıştır (28). Türkiye'de ise "Beklamen®" ve "Reminyl®" isimli müstahzarları bulunmaktadır (29). Galantamin, Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde, yüksek dozda güvenli olarak kullanılabilen uzun etkili, seçici, geri dönüşümlü ve kompetitif asetilkolinesteraz inhibitörü bir ilaç olmakla beraber düşük dozda nöronal nikotinik asetilkolin reseptörlerine allosterik olarak bağlanabilme özelliğine sahip bir alkaloiddir. Söz konusu alkaloidin, esas olarak Alzheimer hastalığının gelişmesinde yer alan nörotoksik karakterdeki β -amiloid plakların birikmesini inhibe ettiği, β -amiloid kaynaklı oksidatif stres ve apoptozisi önleyerek nöroprotektif etki gösterdiği belirtilmiştir (30). Galantaminin bu etki mekanizması üzerinden hem sinaptik transmisyonu kolaylaştırdığı, hem de serebral iskemiye etkilediği görülmüştür (31-33).

1960'lara kadar galantamin üretimi büyük ölçüde *Galanthus nivalis* L. türünden karşılanmıştır. Bu dönemde *Ungernia* Bge. türlerinden ticari galantamin kaynağı olarak faydalandığı da rapor edilmiştir (34). Galantamin kaynağı olarak kullanılan *Galanthus* L. ve *Leucojum* L. cinslerine ilaveten *Narcissus* kültürleri de önemli galantamin kaynakları arasında yer almıştır (35). Bitki fizyolojisine dair araştırmalar ve kültür çalışmaları *Narcissus* türlerini galantamin üretimi açısından en popülar türler galantamin kaynağı olan *Leucojum aestivum* L.'a göre daha avantajlı hale getirmiştir (35, 36). *Narcissus* "Carlton", "Gigantic Star", "Ice Follies" ve

“Fortune” gibi galantamin bakımından zengin *Narcissus* kùltivarları arasından *Narcissus* “Carlton” galantamin üretimine kaynak bitki olarak ABD, Hollanda gibi ùlkelerde kùltür bitkisi olarak yetiştirilmektedir (34, 37).

Anti-asetilkolinesteraz aktivitesi dışında, galantaminin analjezik (38), sitotoksik (39), antiviral, antimikrobiyal ve antioksidan (40) gibi çeşitli aktiviteleri bulunmakla birlikte son yıllarda metabolik sendromu bulunan hastalarda, adipoz dokudan salınan bir nöromediyatör olan adipokin ile yine bu dokudan salınan bir protein olan leptin düzeylerini düzenlediğı ve insülin direncini düşürdüğü (41), anti-insülin antikorlarını inhibe ederek Tip-1 diyabette etkili olduğı *in vivo* olarak gösterilmiştir (42).

Galantamin ve likorin dışında da Amaryllidaceae familyasına ait pek çok bitki türünden değışik aktivitelere sahip alkaloitler elde edilmiştir. Bunlara örnek olarak antitümoral (43) ve antimalaryal (44) aktivite gösteren hemantamin, antiviral etkilere sahip pretazettin, tazettin, hipeastrin (45) ve yüksek seçiciliğı sahip antikanser bileşik olan narsiklasin (46) verilebilir. Yine pretazettin, pankratistatin, krinamin, trisferidin, klivimin, hipeastrin, bufenamin, narsiprimin, arolikorisidin, bulbispermin ve likorenan-7-on gibi alkaloitlerin de çeşitli tümör hücre hatları üzerinde sitotoksik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (43, 47-52).

Amaryllidaceae familyası alkaloitler dışında lektin içerikleri nedeniyle de araştırmaya değıer bitkileri kapsayan bir familyadır (53). Lektinler mono veya oligosakkaritlere spesifik olarak bağlanma yeteneğı olan proteinlerdir. Aglutinin veya hemaglutininler olarak da bilinirler. *Galanthus* L., *Hippeastrum* Herbert, *Leucojum* L., *Narcissus* L. türlerinde lektin izolasyon çalışmaları yapılmış ve biyoaktiviteleri incelenmiştir (53, 54). *Narcissus* cinsinden lektin izolasyonu ve yapı tayini ilk olarak 1988 yılında olmuş, sonrasında otuz *Narcissus* tür ve varyetesinin farklı tiplerde lektin polipeptitleri içerdiği gösterilmiştir (53, 55). Yine *Narcissus* cinsinden izole edilmiş bir mannoz bağlayıcı lektin (*Narcissus tazetta* lektin-NTL), respiratuvar sinsityal virüs (RSV), influenza A (H1N1, H3N2, H5N1) ve influenza B virüslerine karşı güçlü antiviral etki göstermiştir (56). HIV-1 virüsüne karşı en etkin olanı ise *Narcissus torifolius* Fdez. Casas’tan ve *Narissus pseudonarcissus* L.’den elde edilen mannoz bağlayıcı lektin olmuştur (57, 58). *Narcissus pseudonarcissus* L. lektinleri tavşan kanındaki eritrositleri aglütine ederken insan kan hücrelerinde etkisiz bulunmuş ancak (53, 59); bazı böcek türlerine karşı güçlü toksisite gösterdiği deneysel olarak ortaya konmuştur (60, 61).

Narcissus tazetta L. başta olmak üzere (62) çeşitli *Narcissus* türleri üzerinde alkaloid izolasyonu çalışmaları yapılmıştır (63). Türkiye’de yetişen *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. alt türünün fitokimyasal içeriği incelenmiş olmakla beraber (64), söz konusu tür üzerinde kapsamlı bir fitokimyasal çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle tezimizde farklı bir bölgeden toplanan bitki örneği üzerinde potansiyel biyoaktif alkaloidlerin elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda elde edilecek alkaloidlerin anti-kolinesteraz aktivitelerinin *in vitro* olarak tayin edilmesi yanında, moleküler doking tekniği kullanılarak asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri ile oluşturulan tahmini ligand-reseptör kompleksleri yardımıyla alkaloidlerin, enzimlerin aktif bölgeleri içerisindeki bağlanma yönelimlerinin değerlendirilmesi de hedeflenmiştir.

İlaveten, farmakognozik çalışmalar kapsamında bitki örneğinin kalite kontrol özelliklerinin saptanması da amaç olarak belirlenmiştir.

Sonuç olarak bu çalışma ile Muğla bölgesinden toplanmış ve daha önce alkaloid izolasyonu gerçekleştirilmemiş olan *N. tazetta* subsp. *tazetta* bitki örneğinin, daha önce çalışılmış olan diğer *Narcissus* türleri ile karşılaştırılarak fitokimyasal farklılıkları ortaya konabilecektir.

I. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER

1. Bitki Hakkında Botanik Bilgiler

Narcissus cinsine ait bitkiler “Flora of Turkey and the East Aegean Islands” adlı eserin 8., 10. ve 11. ciltlerinde yer almaktadır. *Narcissus* türleri, çok yıllık soğanlı bitkiler olup, Amaryllidaceae familyası üyeleri arasında bulunmaktadır (65).

1.1. *Narcissus* L. Cinsi

Narcissus L., Amaryllidaceae familyasının diğer cinslerinden, çiçek örtüsündeki tüp veya yüzük şeklini almış perigonal korona yapısı ile ayrılmaktadır (66). Ovalardan dağlık alanlara, daha çok çayır, makilik arazi, orman, akarsu kenarları ve kaya çatlaklarını da kapsayan belli alanlarda yayılış göstermektedir (67). *Narcissus* L., farklı yazarlara göre pek çok türler arası hibrit ve poliploit formlarıyla da birlikte yaklaşık 50-180 farklı türü bünyesinde bulundurur. Çeşitli mikrohabitatlardaki oldukça geniş yayılımı, türler arası büyük morfolojik farklılıklar göstermesinin sebebini açıklar niteliktedir (68).

“Flora of Turkey and the East Aegean Islands” isimli kaynak *Narcissus* L. cinsini, çok yıllık, soğanlı; yaprakları bazal, enine kesitte düz ila silindirik; çiçekleri tek veya 2-15’li şemsiye şeklinde beyaz, sarı veya çift renkli, kokulu veya kokusuz bitkiler şeklinde ifade etmektedir. Spata genellikle zarımsıdır. Çukurlaşmış reseptakulum tübü bulunmaktadır. Korona belirgin, bazen diske veya 6 küçük loba indirgenmiş ve stamenlerden bağımsız şekildedir. Meyve elipsoid veya küremsi kapsüldür (65).

1.1.1. *Narcissus* L. Cinsinin Sınıflandırılması

Narcissus L.; taksonomisi oldukça zor olan bir cinstir. Taksonomi; *N. pseudonarcissus* ve *N. tazetta* L. gibi bazı türlerin doğada yüksek polimorfizm göstermesinin yanı sıra; köklü kültür, hibritleme ve doğal/yapay seçilimin etkilerinden dolayı karışmış haldedir. Batı Avrupa’da yetişen pek çok türün Franks tarafından Türkiye’ye tanıtılarak kültürü suretiyle yetiştirildiği; bazılarının ise doğal olarak yetiştiği (*N. assoanus*) bildirilmiştir (65).

Bazı araştırmacıların DNA dizilim verileri ile yaptıkları analizler ve genom alışmaları, *Narcissus* cinsinin alt cinslerini Subgenus *Hermione* (Haw.) Spach. ve Subgenus *Narcissus* olarak gösterse de, *Narcissus* için evrimsel soy ilişkisi, halen tam olarak saptanamamıştır (69, 70). 2008 yılında Zonneveld'in tüm *Narcissus* türleri üzerinde yaptığı genetik temelli bir araştırmada *Narcissus tazetta* L. türünün ve dolayısıyla tezimize konu olan *N. tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinin *Hermione* alt cinsinde *Tazettae* DC. seksiyonuna karşılık geldiği görülürken (71), bir başka kaynak bu bitkinin aynı alt cinste *Hermione* seksiyonunda olduğunu belirtmektedir (72).

Narcissus cinsine ait sınıflandırma bu kaynakta ana hatlarıyla şu şekilde verilmektedir (72):

1.Subgenus *Narcissus* [Subgenus *Eu-narcissus* Pax]

1.a. Section *Narcissus* [Section *Helena* (Haworth) Ascherson and Graebner]

N. poeticus L.

N. radiiflorus Salisbury

1.b. Section *Pseudonarcissus* DC. [subgenus *Ajax* Spach]

N. asturiensis (Jordan) Pugsley

N. cyclamineus DC.

N. jacetanus Casas.

N. lagoi Merino.

N. minor L.

N. nanus Spach.

N. provincialis Pugsley

N. parviflorus Jordan

N. pumilus Salisbury

N. portensis Pugsley

N. abscissus (Haworth) Schultes and Schultes fil.

N. albescens Pugsley

N. alpestris Pugsley

N. bicolor L.

N. bujei (Casas) Casas.

N. calcicarpetus Casas.

N. confusus Pugsley

N. fontqueri Casas and Rivas Ponce.
N. gayi (Hénon) Pugsley.
N. genesii-lopezii Casas
N. hispanicus Gouan
N. longispathus Pugsley
N. macrolubus (Jordan) Pugsley.
N. moleroi Casas.
N. moschatus L.
N. nevadensis Pugsley.
N. nobilis (Haworth) Schultes fil.
N. obvallaris Salisbury.
N. pallidiflorus Pugsley.
N. perez-chiscanoi Casas.
N. primigenius (Suarez ex Lainz) Casas and Lainz.
N. pseudonarcissus L.
N. pseudonarcissus L. ssp. *pugsleyanus* Barra and Lopez.
N. radinganorum Casas
N. tortuosus Haworth

1.c. Section Ganymedes Salisbury ex Schultes and Schultes fil.

N. triandrus L.

1.d. Section Jonquillae De Candolle

i) Subsection Jonquillae

N. jonquilla L.
N. assoanus Dufour [syn. *N. juncifolius* auct. plur., *N. requienii* Roemer]
N. baeticus Casas
N. cerrolazae Ureña.
N. cordubensis Casas
N. fernandesii G. Pedro.
N. gaditanus Boiss. and Reuter.
N. jonquilla var. *henriquesii* Sampaio
N. marianicus Casas
N. minutiflorus Willkomm
N. palearensis Romo

N. pallens Freyn and Willk.

N. wilkommii (Sampaio) Fernandes.

ii) Subsection Apodanthi (A. Fernandes) D.A. Webb

N. albamarginatus Muller-Doblies.

N. atlanticus F.C. Stern.

N. calcicola Mendonça.

N. cuatrecasasii Casas, Laínz and Ruiz Rejón.

N. rupicola Dufour.

N. scaperulus Henriques.

iii) Subsection Chloranthi D.A. Webb [Sect. Chloraster (Haworth)

E. Dorda and F.J. Fernández Casas]

N. viridiflorus Schousboe.

1.e. Section Tapeinanthus (Herbert) Traub [Sect. Braxireon (Rafinesque) B. Valdes]

N. cavanillesii A. Barra and G. López [syn. *Tapeinanthus humilis* (Cavanilles) Herbert].

2.Subgenus Hermione (Salisbury) Spach [syn. Sect. Tazettae De Candolle]

2.a.Section Hermione

i) Subsection Hermione

Series A. Hermione

N. tazetta L.

N. aureus Loiseleur.

N. bertolonii Parlato.

N. canaliculatus hort. (*N. tazetta* ssp. *lacticolor*).

N. corcyrensis (Herbert) Nyman

N. cupularis (Salisbury) Schultes.

N. cypri Sweet.

N. italicus Ker-Gawler.

N. ochroleucus Loiseleur.

N. patulus Loiseleur.

Series B. Albiflorae Rouy.

N. papyraceus Ker-Gawler.

N. barlae Parlato.

N. canariensis Burbidge.

N. pachybolbos Durieu.

N. panizzianus Parlato.

N. polyanthus Loiseleur.

N. dubius Gouan.

N. tortifolius Casas.

ii) Subsection Angustifolii (A. Fernandes) F.J. Fernández Casas

N. elegans (Haw.) Spach.

iii) Subsection Serotini Parlato

N. serotinus L.

2.b. Section Aurelia (J. Gay) Baker

N. broussonetii Lagasca.

3. Subgenus Corbularia (Salisb.) Pax [Section Bulbocodium De Candolle]

N. blancoi Barra and Lopez.

N. bulbocodium L.

N. cantabricus DC.

N. hedraeanthus (Webb and Heldr.) Colmeiro

N. jacquemoudii Casas

N. obesus Salisbury.

N. romieuxii Braun Blanquet and Maire.

N. tingitanus Fern.Casas

1.1.2. Türkiye'nin Narcissus L. Florası

Davis "Flora of Turkey and the East Aegean Islands" adlı eserinin 8. cildinde *Narcissus* cinsi için 7 tür ve 2 hibritten bahsetmiştir (65). Bunlar;

Narcissus serotinus L.,

N. tazetta L.,

N. jonquilla L.,

N. assoanus Dufour,

N. poeticus L.,

N. pseudonarcissus L.,

N. papyraceus Ker-Gawier, (isimlendirmede ikilemde kaldığı bildirilmiş; *N. tazetta* veya *N. papyraceus*)

N. assoanus Dufour $\times$ *N. tazetta* L.,

N. \times N. laetus Salisb (*N. jonquilla* L. $\times$ *N. minor* L.) adlarıyla verilmiştir.

Narcissus tazetta L. ve *N. serotinus* L. türleri ülkemizde doğal yayılış gösteren *Narcissus* türleridir. Bunlardan *N. tazetta* L., Türkiye’de *N. tazetta* L. subsp. *tazetta* L.ve *N. tazetta* L. subsp. *aureus* Loisel. alt türleri ile temsil edilmektedir.

Narcissus poeticus L., *N. jonquilla* L., *N. assoanus* Dufour ex Schult. & Schult.f. ve *N. pseudonarcissus* L. türleri ise ülkemizde sonradan doğallaşmış *Narcissus* türleri olarak bilinmektedir. Anadolu’da bu cinse ait rastlanan diğer türler ise kültür formlarıdır (65).

1.1.3. *Narcissus* L. Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Çalışmalar

Taramalı elektron mikroskobu kullanılarak, çeşitli bitkisel kaynaklardan elde edilmiş 54 farklı nişasta granülünün incelendiği bir çalışmada “Paper White *Narcissus*” olarak bilinen *Narcissus papyraceus* Ker Gawl. nişastalarının 5-40 µm boyutunda eksenlere sahip, orta büyüklükte, pürüzsüz bir yüzeye sahip, düzensiz şekilli granüller olduğu bildirilmiştir (73).

En iyi hazırlama yöntemini tespit etmek için *Narcissus* Golden Harvest kültivarı üzerinde yapılan örnek bir çalışmada iki farklı dehidrasyon tekniği denenmiştir. Sıvı azotla dondurarak kurutma ve etil alkol ile dehidrasyon yöntemlerinin ikisi de mumsu tabakayı uzaklaştırarak berrak görüntü elde edilmesi açısından uygun bulunmuştur (74).

Narcissus tazetta L. soğanından alınan örnekte mikroskop yardımıyla epidermis incelenmiştir. Bu çalışmada ince bir kutikulaya sahip üst epidermis hücrelerinin, altında uzanan hücrelere sıkıca tutunmuş şekilde olduğu ve daha altta bulunan mezofil hücrelerinin iri nişasta taneleriyle dolu olduğu görülmüştür. Ayrıca en kompleks taneciklerin epidermiste olduğu bildirilmiştir. Nişasta incelemesi sonucu mezofildeki hücrelere olan karbonhidrat iletim ve desteğinin epidermistekilere oranla daha fazla olduğu görülmüştür (75).

Bunlara ilaveten farklı saklama koşullarının nişasta metabolizması üzerindeki etkileri de *Narcissus tazetta* kültür örneğinde araştırılmıştır (76).

Yine *Narcissus* cinsi üzerinde yapılmış bir çiçek morfolojisi çalışmasında over, hem vasküler anatomi hem de ontogenez yönünden incelenmiştir. Koronanın diğer tüm çiçek yapılarının tamamlanmasından sonra oluştuğu görülmüştür. *Narcissus*

tazetta ve *N. pseudonarcissus*'un her ikisinde de stilusun iinin boş olduğu ve stilusta doku iletiminin bir katman; stigmada ise 2-6 katman üzerinden gerçekleştirildiği bildirilmiştir (77).

Narcissus periant segmentlerindeki epidermis hücrelerinin, taze doku örnekleri kullanılarak tarayıcı elektron mikroskobunda incelendiği çalışmaya göre, selülozik çepere sahip hücrelerin aralarının boşluklu olduğu, dolayısıyla çeperde meydana gelen bir hasarın büyük hacimsel değişikliklere sebep olduğu bildirilmiştir. Epidermis hücrelerinin dışa doğru gittikçe kubbemsi şekil aldığı ve hekzagonal düzende bulunduğu bildirilmiştir (78).

Narcissus tazetta L. var. *chinensis*'e ait çiçeklerin makroskobik ve mikroskobik incelemesi sonucunda çiçeklerin fitokimyasının ve morfolojisinin tozlaşmaya olan etkisi ortaya konmuştur. Araştırmada, *Narcissus* ieklerine sarı ve beyaz rengini veren kimyasal grubun antoksanlinler olduğu vurgulanmıştır. Antoksanlinler insan gözünün ultraviyole (UV) ışığı tamamen absorbe etmesi nedeniyle insanlar tarafından beyaz renkte algılansa da UV ışığına hassas böcekler tarafından mavi-yeşil olarak algılanmaktadır. Petallerde bu metabolitlerin yerleşimi de detaylı gösterilmiş olup, görevinin UV ışığına hassas böceklerin çiçekteki nektarı bulmasına kılavuzluk etmek olduğu belirtilmiştir. *Narcissus tazetta* ieklerinin beyaz renkli periant segmentlerinin ucunda UV floresan zonları bulunmuştur. Her periant segmentinin apikal bölgesinde lokalize olmuş tüy demeti grlmştir. *N. incomparabilis*, ve *N. pseudonarcissus* ieklerinin tepallerinde de aynı tip tüy bulunmakla beraber; *Narcissus tazetta* tepallerindeki bu tüylerde floresan özelliği flavonoitler değil, fenilpropanoit yapılarının sağladığı tespit edilmiştir (79).

Narcissus pseudonarcissus örneğinde taramalı elektron mikroskobu kullanılarak yüzey topografisi ve kütikula tabakalarının incelendiği bir çalışma mevcuttur (80).

Literatürde, kültür bitkisi yetiştirmede verimi arttırmak amacıyla yapılmış bazı morfolojik çalışmalar da yer almaktadır. Çiçeklenme döneminde genetik ve çevresel faktörlerin florojeneze etkisini incelemek için *Narcissus tazetta* bitkisinin soğanlarının farklı sıcaklık koşulları altında tutulması sonucu taramalı elektron mikroskobu ile inceleme yapılmıştır. Pekçok bitkinin çiçeklenme başlangıcı ve gelişimi için soğanları düşük sıcaklıklara ihtiyaç duyarken *Narcissus tazetta* bitkisinin bir kltivarı olan *Narcissus tazetta* cv. Ziva'nın düşük sıcaklıklara ihtiyaç

duymadığı, 20-30 °C aralığının çiçek gelişimi için optimal sıcaklık olduğu belirlenmiştir (81).

Narcissus için çeşitliliğin merkezi olarak bilinen İber yarımadası bölgesinin (82) güneybatısında yetişen *Narcissus serotinus* L.'a ait 40 populasyon üzerinde yapılmış bir morfoloji çalışmasında, 42 vejetatif karakter ve çiçek özelliğine göre, bitki taksonomisine katkı sağlayacak değerlendirmelerde bulunulmuştur. Çiçeklenme döneminde toplanmış bu örneklerle ait soğan boyutları toplama alanında preslenmeden önce ölçülmüş, çiçeğe ait ölçümler, korunmuş örnekler üzerinden alınmış ve kalan vejetatif kısım ölçümleri preslenmiş materyalde yapılmıştır. Soğan ve tüp genişlikleri, iç tepal ve alt stamen filamentlerinin uzunluklarına göre sınıflandırma yapılmıştır. Coğrafik etkenlerin bitki çeşitliliğindeki etkisi de bu çalışma ile doğrulanmıştır. Aynı bölgede yetişen bazı bitkiler korona renk geçişleri gibi kalitatif ve soğan genişliği, filament uzunluğu gibi kantitatif özelliklerindeki farklar sebebiyle Cluster analizi uygulanarak birbirinden ayrılmıştır (83).

Başka bir mikroskop çalışmasında, *Narcissus* L. cv “Garden Giant” bitkisinin çeşitli organlarında rafit kristalleri halinde veya çeşitli uzunluklardaki iğne kristalleri halinde kalsiyum okalat birikimi görülmüştür. Kökte bulunan kristaller, özel hücrelerin vakuolünde bulunmaktadır (84).

Narcissus yapraklarının sağlıklı bitkide pürüzsüz yüzeye sahip olup hava alışverişini sağlayan stomalar içerdiği; egzoz dumanından kaynaklanan kirliliğe maruz kalmış örneklerde ise kükürt, alüminyum ve silisyum gibi elementlerin bu stomalara dolmuş olduğu tespit edilmiştir (85).

1.2. N. tazetta L.

Soğan, 20-60 x (20-)25-50 mm. Yapraklar (14-)20-75 cm x (3-)5-14 mm, yeşil mavi-yeşil, genellikle mat yeşil, yassı veya kanalsı, enine kesitte nadiren V-şeklindedir. Sap 15-65 cm. Çiçekler çiçek sapı üzerindedir ve kokuludur. Her bir çiçek sapı üzerinde 2-10(-15) çiçek bulunur. Bu çiçeklerin dizilişi şemsiye şeklindedir. Spata 20-65 mm ve incedir. Çiçek sapları eşit değildir ve en uzun (20-)30-75(-100) mm'dir. Çukurlaşmış reseptakulum tübü (15-) 18-30 mm, silindirik, üste doğru huni şeklindedir. Periant segmentleri beyaz (kuruyken genelde kırışık ya da parşömen renginde görünür.) ya da sarı, 8-17 x 4-11(-14) mm, ovattan obovata

bazen mukronat veya apikulattır. Korona sarıdan turuncuya, 2.5-6(-7) x 4.5-12(-19) mm. Stamenler eşit değil, üst dairesel kıvrım, hipantiyal tüpten çıkmış fakat koronaya dahil olmuş durumdadır. Periant segmentleri tazeyken beyaz olanlar tazetta koyu sarı olanlar aureus alttürüne karşılık gelmektedir. Çam ve meşe ormanlarında, sahil ve göl kıyılarında 850 m rakıma kadar yayılış gösterir (65).

N. tazetta L.; ülkemizdeki en yaygın nergis türüdür. Yeryüzünde, altı alt türü bulunduğu kabul edilir. Anadolu'da, iki alt türü (*Narcissus tazetta* L. subsp. *tazetta* ve *Narcissus tazetta* L. subsp. *aureus*) ve katmerli formları bulunmaktadır (86). *Narcissus tazetta* L. bitkisinin taze halde periant segmentleri beyaz olanlar *N. tazetta* subsp. *tazetta*; koyu sarı olanlar *N. tazetta* subsp. *aureus* olarak adlandırılır (65).

N. tazetta L türünün çiçekleri, iki renklidir; tepaller beyaz, korona sarı renklidir. Cazip renklerinin yanı sıra, keskin ve güzel kokusundan dolayı, ilk kültüre alınan soğanlı bitkidir. Türe ait farklı çeşitler, Asya'nın batısı ve orta bölgeleri ile Çin'e, Japonya'ya kadar yayılır. Bu geniş yayılmada, tarihte doğu-batı arasındaki önemli ticaret yolu olan İpek Yolu'nun etkisi olduğu düşünülmektedir (86).

Narcissus tazetta L. için çiçeklenme zamanı:

Sonbahar (Eylül- Ekim)

Bu dönemde çiçeklenen *Narcissus tazetta*, aynı dönemde çiçeklenen diğer tür olan *Narcissus serotinus*'tan çiçeklerini 2-15'li şemsiyeler şeklinde bulundurması ile ayrılır. *N. serotinus*'ta çiçekler tek başına nadiren ikili haldedir. Ayrıca *N. serotinus*'ta yapraklar silindirik iken, *N. tazetta*'da düz veya hafif kanalsı şekilde ve 1-1.5 mm'den daha geniştir.

Kış, bahar, yazın ilk zamanları (Aralık-Mayıs)

Bu çiçeklenme zamanında çiçeklenen *N. tazetta* ise diğer *Narcissus* türlerinden şu karakteristik morfolojik özelliklerle ayrılmaktadır. Yapraklar düz ve/veya hafif kanalikulat şeklindedir (veya nadiren V şeklinde olabilir). Çiçekleri 2-10'lu şemsiye şeklinde birleşmiştir. Hipantiyal tüp ince ve silindiriktir. Korona ise sarı veya turuncu renktedir (65).

1.3. *N. tazetta* subsp. *tazetta* L.

Soğanları, 10 g ile 96 g arasında değişmektedir. Soğan boyu 6.2 ile 4.1 mm, eni 6.1-3.4 boyutundadır. Yapraklarının boyutu, 15-80 cm x 2.8-4 mm olup yeşil veya mavimsi yeşil renklidir. Çiçekleri, çiçek sapı üzerinde şemsiye şeklindedir. Bir

sap üzerinde, genelde 2-7 adet bazı tiplerde 21 adet kadar çiçek tespit edilmiştir. Korona, sarı renk ile turuncu renk arasında değişir. Polimorfik tür olduğundan, tür içinde; çiçek sayısı, çiçek büyüklüğü, çiçek sapı uzunluğu, soğan büyüklüğü gibi özelliklerle farklılaşan formlar tespit edilmiştir (86).

Sinonim:

N. syriacus Boiss. & Gaill, *N. tazetta* L.var. *syriacus* (Boiss.&Gaill.), *N. caucasicus* (Fomin)

Dünyada yayılışı:

Fransa, Portekiz, İspanya ve Türkiye'dir.

Türkiye'de yayılışı:

Ülkemizde İzmir, Muğla, Antalya, Mersin, Adana, Hatay ve Diyarbakır'da tespit edilmiştir.

İncelenen Örnekler:

A6 Samsun: Engiz, Balık G., 0.5 m.Tobey & Kurt 1575!

B1 İzmir: Güzelbahçe İzmir, Leblebici (ISTE 12286)!

B8, Diyarbakır: Diyarbakır'dan Lice'ye, Küçük Köyü, T.Baytop(ISTE 34444)!

B9 Siirt/Van: Van 910 m, iv 1899-1900, Maunsell!

C2 Muğla: Peraea Kıyısının küçük adası, xi 1841, Forbes!

C3 Antalya: Manavgat'tan Akseki'ye, Fersune, 850m, T.Baytop (ISTE31387)!

C4 İçel: d. Mersin,limandan Taşucu'na, 35 m, Watson et al. 3909!

C5 Adana: d. Ceyhan, Mercimek, T.Baytop (ISTE 16484)! C6 Hatay: Bailan(Belen), Kirk Khan, Sint. 1888:130!

Is: Lesvos, Cand.; Khios, Neachorio, Platt 395! Ikaria,W. Petrapouli'nin 1-1,5 km'si, 250 m, Runem. & Snog. 7066! Lipsoi, Desio obs.; Arkoi, Desio; Rodhos, Senni.

Akdeniz, Transkafkasya; İran, Kaşmir, Çin, Japonya'da ve muhtemel başka yerlerde tanıtılmıştır; ayrıca çok geniş kapsamda kültürü yapılmaktadır. Türkiye'de yukarıda belirtilen bölgelerde doğal olarak yetiştiği görülmekle beraber özellikle İstanbul civarında kültürü yapılmaktadır. Kültür formu sıkça daha geniş periant

segmentlerine ve daha büyük çiçeklere sahiptir. Örneğin A2(E) İstanbul:'İstanbul Nergisi', kült., 9 iv 1892, Azn.!

N. orientalis L., Mant. 62 (1767) ve N.'Grand Primo'olarak adlandırılmıştır. Meikle (Kew Bull. 1954:177, 1954), Sakız Adası'nda çift-çiçekli kültürünün yetiştiğini kaydetmiştir (65).

Türkiye'de yetişen *Narcissus* türleri üzerinde yapılmış çalışmaların genellikle zirai araştırmalar olduğu görülmektedir. Samsun'da kesme nergis çiçeği yetiştiriciliği (87) ve Ünye'de doğal yayılış gösteren *Narcissus tazetta* L. çiçeğinin kültüre alınması üzerine yapılmış çalışmalar mevcuttur (88). Güney Doğu Anadolu Bölgesi'nde yetişen *Naracissus tazetta* L. bitkisinin varyasyonları botanik açıdan incelenmiştir (89).

Doğal ve kültür olarak yetiştirilen *Narcissus* sp. için çeşitli kimyasalların büyüme ve gelişmeye etkisi de ziraat mühendisi alanında araştırmalara konu olmuştur (90, 91). Ayrıca Türkiye'de kültürü yapılan ve doğal yayılış gösteren bazı *Narcissus* türlerinin biyolojik ve morfolojik özellikleri yine bir doktora tezi kapsamında araştırılmıştır (92).

Tezimize konu olan *N. tazetta* subsp. *tazetta* alt türünün soğanları üzerinde biyoreaktörler kullanılarak *in vitro* soğan üretimi araştırmaları gerçekleştirilmiştir (93).

2. Kalite Kontrol ve Miktar Tayini Çalışmaları

2.1. Uçucu Yağ İçeriği ile ilgili Çalışmalar

Bitkilerin uçucu yağlarından parfümeride koku verici olarak, gıda sanayiinde aroma ve lezzet verici olarak kullanıldığı bildirilmiştir. Böcekleri çekerek tozlaşmaya yardımcı olan uçucu bileşikler insanlar üzerinde de olumlu olfaktif etkiler yaratmaktadır (94).

Narcissus tazetta L., çiçeklerinin güzel ve keskin kokulu olması sebebiyle ilgi çeken bir tür olmuştur. Ülkemizde en yaygın görülen nergis türüdür ve kültüre alınan ilk soğanlı bitkidir (86).

Narcissus çiçekleri narin yapılı çiçeklerdir ve kokusundan faydalanmak amacıyla kullanılacaksa toplandıktan sonraki en kısa zamanda işlenmesi önerilmektedir (95).

Portakal çiçeği, gül ve yasemin gibi çiçeklerde olduğu gibi *Narcissus* çiçeklerinde de çözücülerle ekstraksiyon sonucu (genelde hekzan kullanılır) konkret adı verilen viskoz yapıda ürünler elde edilmektedir. Konkret, içerisinde bulunan bitkisel mumsu yapılarından uzaklaştırılmak üzere alkolle muamele edilir. Bu şekilde elde edilen absolü parfümeride konkrete göre daha kullanışlı bir üründür. *Narcissus* türünden elde edilen absolünün veriminin düşük olması da parfümeride hem ağaçsı hem de keskin çiçeksi kokusu ile önemli bir yeri olan bu ürünün pahalı olmasına sebep olmaktadır (95).

Fransa'dan toplanmış *Narcissus poeticus* L. bitkisinden elde edilen absolü üzerinde GC-MS ile içerik taraması yapılmış; sonucunda % 35 alkol, % 21 fenol ve % 30 ester grubu içerdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada minör maddeleri tespit etmek de amaçlanmış ve 280 civarında bileşik rapor edilmiştir (96).

İtalya'dan toplanmış *Narcissus tazetta* L. türü ve *Narcissus tazetta* L. subsp. *tazetta* L. alt türünün çiçeklerinden elde edilen absolü üzerinde GC çalışması ile uçucu bileşenlerin varlığı tespit edilmiştir. Bu çalışmaya göre, *Narcissus tazetta* L.'nin nonterpenoid bileşikler yönünden zengin olduğu, tezimize konu olan alt tür *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L.'nin ise yüksek oranda terpenik bileşik taşıdığı tespit edilmiştir (97). *Narcissus tazetta* L. uçucu yağında linalol ve benzoik asit bileşiklerine rastlandığı başka kaynaklarda da karşımıza çıkmaktadır(98).

İspanya’da farklı bölgelerden toplanmış 9 farklı *Narcissus* türüne çiçek kokusunu veren bileşiklerin GC-MS yöntemi ile tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmaya *N. assoanus*, *N. bujei*, *N. bulbocodium*, *N. cuatrecasasii* Fernandez-Casas, Lainz & Ruiz Rejon, *N.gaditanus* Boiss. & Reuter, *N. jonquilla*, *N. papyraceus*, *N. serotinus*, *N. triandrus* bitkileri konu olmuştur. Koku veren bileşenleri kimyasal olarak monoterpenik izoprenoidler ve benzenoidler olarak ana hatlarıyla iki gruba ayırmanın mümkün olduğu vurgulanmıştır. Test edilen örneklerden çıkarılan genel sonuca göre uçucu bileşiklerin %99’luk bir kısmını monoterpenik yapılar oluşturmaktadır. En sık görülen monoterpenler ise limonen, mirsen ve *trans-β*-osimen olmuştur. Yağ asidi türevlerine sadece birkaç türde rastlanmıştır. Bunlardan en önemlisi *N. cuatrecasasii* türüdür. Bu örnekte, baskın olan madde grubu yağ asidi türevleri olduğu için diğer *Narcissus* türlerine göre *N. cuatrecasasii* türünün kokusunun bileşenlerinin karakteristik bir farklılığı olduğunu söylemek mümkündür (99).

Bir başka çalışmada Çin’den toplanmış *N. tazetta* var. *chinensis* Roem tek çiçekli ve çift çiçekli örnekleri üzerinde aynı şekilde uçucu bileşenlerin analizi GC-MS yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Tek çiçekli örnekte 35; çift çiçekli örnekte 26 bileşik varlığı tespit edilmiş olup; genel içeriklerin *trans-β*-osimen ve benzil asetat olduğu bildirilmiştir. Ayrıca çift çiçekli örnekte 1,8-sineol yapısı yüzde olarak daha yüksek bulunurken tek çiçekli örnekte benzil asetatın daha fazla olduğu tespit edilmiştir (100).

Yunanistan’da yetişen *Narcissus tazetta* L. subsp. *tazetta* L. ve *Narcissus serotinus* L. bitkilerinin taze çiçek örneklerinden su distilasyonu ile elde edilen uçucu yağların GC-FID çalışması sonucunda içerik yönünden birbirinden önemli farklarla ayrıldığı görülmektedir. Bu çalışmaya göre *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. uçucu yağındaki major bileşen (% 61.1) *trans*-osimen iken, *Narcissus serotinus* L. için bu bileşen benzil astetat (% 19.4) olmuştur (101).

Bir *N. tazetta* hibriti olan *N. geranium*’a ait çiçeklerin eski literatürlerdeki başka nergislerle kıyaslamalı olarak GC-MS tekniğiyle terpenik madde profili görüntülenmiştir (102).

Aldehit, alkol, terpen ve minor maddeleriyle Adana'dan toplanmış *N. pseudonarcissus* bitkisinin petal yaprakları üzerinde farklı NaCl konsantrasyonları ile çalışılarak gaz kromatografisi yöntemi ile içerikleri tespit edilmiştir (103).

Narcissus poeticus ve *Narcissus pseudonarcissus* uçucu yağları uterus tümörlerinin tedavisinde kullanım bulmuş yağlar olduğu için GC tekniği ile içerik açısından incelenmelerine önem verilmiştir. *Narcissus tazetta* çiçeklerindeki terpenik bileşenler de GC-MS yöntemi ile izlenmiştir (99).

Çin nergisi (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) Çin'de kültürü yaygın olan bir bitkidir. Nergisin sinir sistemi üzerinde etkisi olduğu ve epilepsi tedavisine olanak verdiği bilinmektedir. Kurutulmuş çiçeklerinin dekoksasyonunun emetik etkisi vardır. Bu türden elde edilen uçucu yağdaki bileşenler yine GC-MS ile araştırılmıştır (104).

2.2. Alkaloid Miktar Tayini Çalışmaları

Galantamin gibi Amaryllidaceae alkaloidleri üzerinden yapılan miktar tayinlerinin bu familyaya ait bitkilerden elde edilen drogların kalite kontrolü için önemli bir parametre olduğu yaygın olarak bilinmektedir (105).

Narcissus cinsine ait yüzden fazla bitki örneği galantamin içeriği bakımından taranmış ve otuz üç tanesinin % 0.1'den fazla galantamin içerdiği anlaşılmıştır (106). Bu sonuçlar *Narcissus* türlerinin galantamin üretimi için kültürünün yapılmasının anlamlı olduğunu doğrulamaktadır. *Narcissus* türü üzerindeki miktar tayini çalışmalarından ilki çiçekli kısımlarda karotenoid miktarının tespit edilmesi şeklinde olmuştur (107). Alkaloid miktar tayini açısından ilk araştırma ise 1997 yılında rapor edilmiştir. Bu çalışmada *N. confusus* soğan, yaprak, kök, çiçek ve bitki sapından elde edilen ekstraktlerdeki galantamin miktarı tayin edilmiştir (108). Sonrasında yine *N. confusus* soğanlarındaki galantamin, *N*-formilnorgalantamin, hemantamin, homolikorin ve tazettin/pretazettin alkaloidleri için HPLC ile miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir (109).

Narcissus türleri ile ilgili yapılmış miktar tayini (total alkaloid, galantamin ve likorin miktar tayini) çalışmaları kapsamında, galantamin ve likorinin miktarlarının kantitatif olarak tespit edildiği spektrofotometrik, spektroskopik, kromatokolorimetrik, yüksek performanslı sıvı kromatografisi gibi yöntemlerin kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır (34, 105, 110-113). Yine *Narcissus* türlerinde

miktar tayini için uygulamak üzere geliştirilmiş HPTLC ve kapiler kolon gaz kromatografisi yöntemleri de vardır (114, 115).

Bu yöntemlere örnek olarak; yirmi farklı *Narcissus* türünden alınmış soğan örneklerinin HPLC ile galantamin içeriklerinin tespit edildiği bir çalışma (34), FID ve NPD dedektörlerinin kullanıldığı GC-MS yöntemi ile dört *Narcissus* türü için galantamin miktarının tespit edildiği bir çalışma (116) verilebilir. Son zamanlarda farklı bölgelerden toplanmış örneklerin galantamin miktarındaki farklılıklar ^1H NMR tekniği ile de tespit edilmeye başlanmıştır (110).

HPLC ve ^1H NMR yöntemlerinin karşılaştırmalı olarak kullanıldığı bir çalışmada farklı bölgelerden toplanmış üç *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton bitkisinin liyofilize edilmiş örneğinin içerdiği galantamin miktarları saptanmıştır. HPLC yöntemine göre, 2.23-3.13 mg/g konsantrasyon aralığında galantamin tespit edilirken, ^1H NMR yönteminde galantamin oranı 2.36-3.32 mg/g şeklinde verilmiştir (112).

Narcissus angustifolius Curtis ex Haw., *N. bujei* Fdez. Casas, *N. bulbocodium* L., *N. confusus* Pugsley, *N. eugeniae* Fdez. Casas, *N. jonquilla* L., *N. lobularis* Hort., *N. nivalis* Graells, *N. obesus* Salisbury, *N. perez-chiscanoi* Fdez. Casas, *N. poeticus* L., *N. tazetta* L. ve *N. tortifolius* Fdez. Casas; *Narcissus* genusundaki galantamin taşıdığı bilinen bazı türlerdir (117).

Narcissus cinsi süs bitkisi olarak yaygın bir kullanılışa sahip olduğundan dolayı, hibritleme için uygun türleri içeren bir genus olmasının da avantajı ile oldukça fazla melezlenmiştir. Bu hibrit bitkilerin bazılarının galantamin kaynağı olarak kullanılabilecek düzeyde galantamin içermesi sebebiyle, galantamin içerdiği bilinen türlerden yola çıkarak elde edilen kültürlerdeki galantamin miktarı detaylı şekilde araştırılmaya başlanmıştır (117). Bu bağlamda *Narcissus* “Pipit” (*Jonquilla*) örneğinin HPLC ile içerdiği galantamin miktarı incelenmiş ve galantamin kaynağı olarak kullanılabileceği önerilmiştir (113).

Amaryllidaceae bitkileri için ağırlık ve hacim olarak fazla yer tutan ve alkaloid yönünden ticari değer taşıyan kısmın bitkinin soğanı olmasına rağmen (34), özellikle çiçeklenme dönemindeki *Narcissus* türlerinde alkaloidlerin genelde yaprakta daha yüksek oranda bulunduğu görülmektedir (118).

Narcissus için yetiştiği yerdeki toprağın kimyasal bileşimi ve çevresel faktörlerin alkaloit çeşitliliğini etkilediği gösterilmiş olduğu için içerik bakımından avantajlı bir cinstir (119). Bitkinin toprağın ne kadar derininde yetiştiği veya soğanların büyüklüğü alkaloit içeriğini etkilememesine rağmen, bitkinin bulunduğu ortamdaki azot ve potasyum miktarının alkaloit verimini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (120).

Genus içindeki türlerin çoğu, fertilizasyonun ebeveynsel yakınlığına bağlı olmasına rağmen hibritleşmeye müsaittir. Uluslararası Nergis Kayıtları'na bakıldığında da (The International Daffodil Register and Classified List 2008) 27 bin den fazla Nergis eşidi sağlandığı görülmektedir. İlginç şekilde, seksiyonları arası yapılan hibritlemeyle elde edilen çeşitlerden bazıları önemli galantamin kaynağı olarak kayıtlarda yerini almıştır (121).

Doku kültürü çalışmaları ile farklı gıdalar ve kültür yöntemleri sonucu *Narcissus confusus*'taki total alkaloit miktarı ve galantamin, hemantamin, tazettin gibi alkaloit miktarlarının değişkenliği incelenmiş (122-125), çeşitli modifikasyonlar sonucu galantamin miktarı % 5'e çıkarılmıştır (126).

Tablo 1. *Narcissus* Türleri Üzerinde Yapılmış Alkaloit Miktar Tayini Çalışmaları

Bitki Adı	(Belirtilmiş ise toplama yılı, yeri)	Bitkinin Çalışılan Kısmı	(Lit)	Galantamin Miktarı	Diğer
<i>Narcissus bujei</i> #	1999, Mart-Haziran İspanya	soğan	(111)	% 0.02 kuru ağırlığa göre	Sanguinin (nd) 11-hidroksigalantamin ***
<i>Narcissus confusus</i> #	1999, Mart-Haziran İspanya	soğan	(111)	% 0.54kuru ağırlığa göre	Epinorgalantamin % 0.03 kuru ağırlığa göre Sanguinin *** 11-hidroksigalantamin ***
<i>Narcissus confusus</i> #	1998, Mart İspanya	soğan kök toprak üstü kısmı	(118)	% 0.23-2.54 Kuru ağırlığa göre	-
<i>Narcissus confusus</i> ♂	1985 mart Salamanka	Metanol (soğan)	(127)	% 0.1117 Taze ağırlığa göre	-
<i>Narcissus eugeniae</i> #	1999, Mart-Haziran İspanya	soğan	(111)	% 0.02 kuru ağırlığa göre	Sanguinin *** 11-hidroksigalantamin ***
<i>Narcissus tazetta</i> L. #	2014, Mart- Nisan,meyveli dönem Ghaemshahr, İran	soğan	(128)	% 0.003-0.033 Kuru ağırlığa göre	-
<i>Narcissus tazetta</i> subsp. <i>tazetta</i> #	Ticari alım-Türkiye	soğan	(24)	-	% 0.089 likorin
<i>Narcissus jonquilla</i> (Quail)*	Ticari alım	soğan	(129)	% 0.217 kuru ağırlığa göre	Hemantamin (GC koşullarında bozunma)
<i>Narcissus jonquilla</i> (Quail)**	Ticari alım	soğan	(129)	% 0.22 kuru ağırlığa göre	Hemantamin % 0.03 kuru ağırlığa göre

Tablo 1'in Devamı. *Narcissus* Türleri Üzerinde Yapılmış Alkaloid Miktar Tayini Çalışmaları

Bitki Adı	(Belirtilmiş ise toplama yılı, yeri)	Bitkinin Çalışılan Kısmı	(Lit)	Galantamin Miktarı	Diğer
<i>N. jonquilla</i> “Pipit”#	Ticari alım	soğan	(130)	% 0.02- 0.10	Likorin % 0.02-0.32
<i>N. jonquilla</i> “Pipit”###	Ticari alım	soğan	(130)	% 0.02-0.09	Likorin % 0.01-0.29
<i>Narcissus legionensis</i> #	1999, Mart-Haziran İspanya	soğan	(111)	***	Epinorgalantamin % 0.02 kuru ağırlığa göre Sanguinin *** 11-hidroksigalantamin ***
<i>N. leonensis</i> #	1999, Mart-Haziran İspanya	soğan	(111)	***	Epinorgalantamin % 0.12 kuru ağırlığa göre Sanguinin *** 11-hidroksigalantamin ***
<i>Narcissus nivalis</i> Graells ç	Nisan-1985 İspanya	soğan ve toprak üstü birlikte	(131)	% 0.0095 Taze ağırlığa göre	-
<i>Narcissus obesus</i> ç	1990 mart Portekiz	tamamı	(132)	% 0.001 Taze ağırlığa göre	-
<i>Narcissus perez-chiscanoi</i> Fern. Casas #	1999, Mart-Haziran İspanya	soğan	(111)	% 0.2 kuru ağırlığa göre	Epinorgalantamin % 0.04 kuru ağırlığa göre Sanguinin *** 11-hidroksigalantamin ***

Tablo 1'in Devamı. *Narcissus* Türleri Üzerinde Yapılmış Alkaloid Miktar Tayini Çalışmaları

Bitki Adı	(Belirtilmiş ise toplama yılı, yeri)	Bitkinin Çalışılan Kısmı	(Lit)	Galantamin Miktarı	Diğer
<i>Narcissus poeticus</i> #	1999, Mart-Haziran İspanya	soğan	(111)	***	Epinorgalantamin % 0.15 kuru ağırlığa göre Sanguinin *** 11-hidroksigalantamin ***
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> Cultivar “Carlton” ##/#	Noordwijk/Hollanda	soğan	(112)	% 0.24/0.22 liyofilize	-
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> Cultivar “Carlton” ##/#	Lisse/Hollanda	soğan	(112)	% 0.33/ 0.31 Liyofilize	-
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> Cultivar “Carlton” ##/#	Lincolnshire/UK	soğan	(112)	% 0.33/ 0.3 Liyofilize	-
<i>Narcissus tazetta</i> L. ♂	1989-temmuz Asyut/Mısır	Soğan	(133)	% 0.005 Taze ağırlığa göre	-
<i>Narcissus tazetta</i> L. #	Leiden/ Hollanda	soğan	(113)	***	-

Tablo 1'in Devamı. *Narcissus* Türleri Üzerinde Yapılmış Alkaloid Miktar Tayini Çalışmaları

Bitki Adı	(Belirtilmiş ise toplama yılı, yeri)	Bitkinin Çalışılan Kısmı	(Lit)	Galantamin Miktarı	Diğer
<i>Narcissus</i> “Empress of Ireland” (Trumpet) #	Leiden/Hollanda	soğan	(113)	***	-
<i>Narcissus</i> cv. Ice Follies ♂ ♂	Ticari alım	soğan	(134)	% 0.06-0.17 kuru ağırlığa göre	Total Alkaloid: % 0.15-0.46 Likoramin: % 0.003-0.04 N-demetil likoramin: % 0.04 Karanin: % 0.002-0.03 Likorin: % 0.02-0.08 Hemantamin: % 0.02-0.23 Hipeastrin: % 0.01
<i>Narcissus</i> “Pipit” (Jonquilla) #	Leiden/Hollanda	Soğan	(113)	% 0.025-0.026 Taze ağırlığa göre	-
<i>Narcissus</i> “Sir Winston Churchill” #	Leiden/Hollanda	soğan	(113)	***	-

HPLC yöntemi kullanılmıştır. ## ¹H NMR yöntemi kullanılmıştır. ### HPTLC yöntemi kullanılmıştır.

* GC-MS yöntemi kullanılmıştır. ** NACE yöntemi kullanılmıştır. *** Tespit edilmemiştir.

♂ İzolasyon yöntemi kullanılmıştır. ♂ ♂ Kapiler GC yöntemi kullanılmıştır.

2.3. Bitkide Alkaloit Üretimini Arttırmaya Yönelik Araştırmalar

Galantamin Alzheimer hastalığında ilaç olarak kullanım bulmuş morfin benzeri bir alkaloittir. Terapötik kullanımı doğrultusunda üretimini arttırmak için araştırmalar yapılmıştır (116, 134, 135).

Total sentezi başarılmış olan (136) bu alkaloidin üretimi için sentez sonucu oluşan ürünün stereoselektivite problemleri ve verim düşüklüğü sebebiyle araştırmacılar biyoteknolojik üretime yönelmiştir (122).

Narcissus tazetta subsp. *italicus* bitkisinde alkaloit üretimini arttırmak amacıyla doku kültürü çalışmaları yapılmıştır. Ortamda büyüme hormonlarının etkisi ve bitkinin kendisinden izole edilmiş fungus suşları belli miktarlarda eklenerek alkaloit üretimine katkıları incelenmiştir (137).

Narcissus tazetta var. *chinensis* Roem bitkisinin alkaloit üretiminde kaynak olma potansiyelinden yola çıkılarak bu bitkiden alkaloit ekstraksiyonunu maksimum verimle gerçekleştirebilmek için farklı yöntemler araştırılmıştır (138).

Yine benzer çalışmada metil jasmonat, salisilik asit, araşidonik asit gibi indükleyicilerin alkaloit üretimine etkileri *N. confusus* bitki doku kültürleri üzerinde araştırılmış, metil jasmonat'ın olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür (125). Ayrıca bu kültür ortamlarına geniş spektrumlu bakteriyosit ve fungusit karışımının belli dozda ilavesinin alkaloit üretimini arttırdığı rapor edilmiştir (139).

Meristematik kalluslar ile embriyojenik kalluslar arasında alkaloit üretimi farkları incelenmiş ve doku kültüründe alkaloit üretimini arttırmak için optimum koşullar araştırılmıştır (124). Ortama prekürsor eklemenin alkaloit üretimini arttırabileceği düşünülerek kalluslarla yapılmış bir araştırmada, bu durumun üretimi negatif yönde etkilediği görülmüştür (124).

2.4. GC-MS Yöntemi ile tespit edilmiş alkaloidler

Bahçecilikte süs bitkisi olarak kullanılan, toplamda 106 farklı *Narcissus* varyetesinde alkaloid tespiti yapılmış ve 62 farklı alkaloid bulunmuştur. Hollanda'dan toplanarak çalışılmış bu varyeteler arasında galantamin miktarı en yüksek bulunanlar *Narcissus confusus* ve “Bella Estrella” kùltürü olmuştur (140).

Bir başka çalışmada 3-O-metil-9-O-demetilmaritidin Amaryllidaceae familyası için varlığı ilk kez GC-MS ile gösterilmiş; tazettamit, sternbergin, 1-O-asetillikörin, 2,11-didehidro-2-dehidroksilikörin alkaloidlerinin ise *Narcissus* cinsinde varlığı ilk kez gösterilmiştir. Trisferidin, 5,6-dihidrobikörin, galantindol, anhidrolikörin, deoksitazettin, 6-O-metilpretazettin, 11,12-dehidroanhidrolikörin, 3-epimakronin alkaloidlerinin *Narcissus tazetta* L. için varlığı ilk kez gösterilmiş, anhidrolikörin ve 11,12-dehidroanhidrolikörin alkaloidlerinin *Narcissus papyraceus* için varlığı ilk kez gösterilmiştir (141).

Bir çalışmada yine *N. tazetta*'nın da dahil olduğu 45 farklı bölgeden toplanmış 22 tür ve 3 hibritin alkaloid profili çıkarılmış ve gruplara göre sınıflandırılmıştır (68). Yapmış olduğumuz taksonomik sınıflandırmada adı geçen türlerin tespit edilmiş alkaloid profili tabloda verilmiştir. Bunun dışında, *N. viridiflorus* Schousboe, *N. segurensis* Ríos, Rivera, Alcaraz & Obón, *N. alcaracensis* Ríos, Rivera, Alcaraz & Obón, *N. salmanticensis* Fdez. Casas ve *N. subnivalis* Fdez. Casas bitkilerinin de alkaloid profilleri bu çalışmada tespit edilmiştir (68).

Narcissus pseudonarcissus bitkisi üzerinde GC-MS ile ilk kez Amaryllidaceae alkaloid profili incelenmiştir (142).

Narcissus confusus; ve *N. pseudonarcissus* cv. Carlton alkaloid profili de GC-MS ile belirlenmiştir (143). *Narcissus pseudonarcissus* cv. Carlton ve *Narcissus jonquilla* Quail üzerinde GC-MS yöntemi ile tespit edilen belli başlı alkaloidler verilmiştir (129).

Fas'tan toplanmış *Narcissus broussonetii* bitkisinin alkaloid profili yine GC-MS yöntemi ile tespit edilmiş olup, obliquin, plikamin ve sekoplükamin gibi nadir alkaloidleri de içeren 23 farklı alkaloid rapor edilmiştir (144).

3. İzolasyon, Yapı Aydınlatma ve Biyoaktivite Çalışmaları

3.1. Alzheimer Hastalığı

Bir insanın günlük yaşamını etkileyecek derecede zihinsel yeteneğinin azalmasına demans adı verilir. Alzheimer hastalığı, en sık görülen demans nedeni olup, ilerleyici bir hastalıktır (145).

Alzheimer hastalığı ilk olarak Alman doktor Alois Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmıştır (146). Hastaların yaklaşık % 5'inde kalıtsal tipi; kalan %95'inde ise sporadik tipi görülmektedir. Sporadik şeklinde en önemli risk faktörü yaşıdır. Diğer risk faktörleri ise; ailede Alzheimer hastalığı öyküsünün bulunması, düşük eğitim düzeyi, bilinç kaybına neden olmuş kafa travması ve apolipoprotein-E'nin $\epsilon 4$ alelinin ve β -amiloidin ($A\beta$) yıkımında görev yaptığı düşünülen $\alpha 2$ -makroglobulinin gen silinmeleridir (145).

Hastalığın karakteristik patolojik bulguları beyinde ekstraselüler senil plaklar, nöronların içinde nörofibriler yumaklar, sinaps ve nöron kaybıdır(145). Nörofibriler yumakların ana bileşeni, hiperfosforile durumdaki "Tau" proteinidir. Tau, aksonal iletimden sorumlu bir moleküldür ve mikrotübüllere bağlanarak stabilizasyonu artırır. Fosforillenme sonucu "tau" proteininin mikrotübüllere bağlanması engellenir. Ortamda giderek artan fosforile tau, önce çözilemeyen çift sarmallı iplikçiklere dönüşür. Bu çift sarmallı iplikçikler birikerek hücre içinde nörofibriler yumaklara dönüşür ve hücreyi ölüme götürür (147). Ayrıca biyokimyasal çalışmalar Alzheimer hastalarında kortekste bazı nöromediyatörlerin ve özellikle asetilkolinin azaldığını göstermiştir (145).

Kolinerjik nöronların dejenerasyonunun amnezi ve bilişsel fonksiyon bozukluğuna yol açtığı bilinmektedir. Korteksteki seratonerjik ve noradrenerjik yetmezliğin de hastalığın depresyon gibi davranışsal semptomları ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Hafif ve orta şiddetli Alzheimer hastalığında geri-dönüslü (reversibl) antikolinesteraz ilaçların etkinliği kanıtlanmıştır. Donepezil, rivastigmin ve galantamin antikolinesteraz ilaç olarak halen Türkiye'de pazarlanmaktadır ve Alzheimer'da endikedir. Bu ilaçlar tersiyer amin yapısında olduklarından dolayı kan-beyin bariyerini geçerler ve beyindeki kolinerjik sinapslarda, bu arada bilişsel fonksiyonlarla ilgili olan bölgelerdeki sinapslarda asetilkolini yıkan asetilkolinesteraz enzimlerini de inhibe ederek, hastalık nedeniyle zayıflamış olan kolinerjik uyarı aşırımını güçlendirirler. Bu ilaçların, aynı zamanda

toksik amiloid- β oluşumunu azalttığı, bu nedenle hastalığın ilerlemesini de önlediği öne sürülmektedir (145).

Bir Amaryllidaceae alkaloidi olan galantaminin Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanım bulmuş olması, bu familyaya ait bitkilerin alkaloit profillerinin daha detaylı incelenmesi ve dolayısıyla pek çok alkaloit yapısının aydınlatılmasına olanak sağlamıştır. *Narcissus* cinsinin ve diğer antikolinesteraz aktiviteye sahip Amaryllidaceae türlerinin alkaloit içeriği çalışmamızda tablolar halinde (Tablo 4) sunulmuştur.

3.2. Amaryllidaceae Alkaloitleri

Günümüze kadar, 500'den fazla Amaryllidaceae alkaloidi, familyanın farklı bitkilerinden izole edilmiş olup, bu alkaloitlerin pek çok farmakolojik aktiviteden sorumlu oldukları modern fitokimyasal çalışmalarla gösterilmiştir (63, 148-150). *Narcissus* cinsinde bulunan alkaloitler iskelet tiplerine göre sekiz gruba ayrılmaktadır. Bu gruplar, temsil eden alkaloidin adına göre; norbelladin, likorin, homolikorin, hemantamin, narsiklasin, tazettin, pankrasin ve galantamin olarak ifade edilmektedir (63).

Amaryllidaceae alkaloitleri, biyojenezleri, farmakolojik ve fizyolojik aktiviteleri dolayısıyla üzerlerinde çok sayıda çalışma yapılmış bir sekonder metabolit grubudur. Bu alkaloitlerle ilgili ikincil kaynak niteliğinde yayınlar bulunmaktadır. "The Alkaloids, Chemistry and Biology" adıyla yayınlanan derlemeler literatürde yer almaktadır (151-154). Ayrıca, on üç cilt halinde yayınlanan "The Alkaloids Specialist Periodical Reports" ile başlayıp 1984 yılından itibaren "Natural Product Reports" ismiyle yayınlanan derleme serisi de bulunmaktadır (150, 155-174). Bunların dışında, Amaryllidaceae alkaloitlerinin biyojenezleri ve farmakolojik aktiviteleri ile ilgili derlemeler de mevcuttur (175-178). Biyojenetik olarak fenil alanin ve tirozinin norbelladini oluşturup, norbelladinden de fenolik bağların çeşitli şekillerde bağlanarak kapanması sonucu oluşurlar (175). Morfin ve kodein iskeletlerine benzerliklerinden dolayı analjezik etkileri yüksektir. Antifungal, antienflamatuvar, sitotoksik, antikanser, antiplatelet, antifeedant aktivitelerle öne çıkmış alkaloitler mevcuttur (63, 179).

Amaryllidaceae alkaloitleri iskelet yapılarına göre temelde 10 grupta incelenmektedir:

Tablo 2. İskelet yapılarına göre Amaryllidaceae alkaloitleri

İskelet Tipi	Molekül Formülü
Norbelladin Tip (63) (4-[[[2-(4-hidroksifenil)etil]amino]metil]-1,2-Benzendiol) Örnek: Norbelladin R= H	
Likorin Tip (63) (4,5-Etanofenantridin) Örnek: Likorin R₁=R₂=OCH₂O R₃=R₄=OH R₅=R₆=Çifte bağ	
Homolikorin Tip (63) (2-Benzopirano[3,4]indol) Örnek: Hippeastrin R₁=R₂=H R₃+R₄=O R₅= OH	

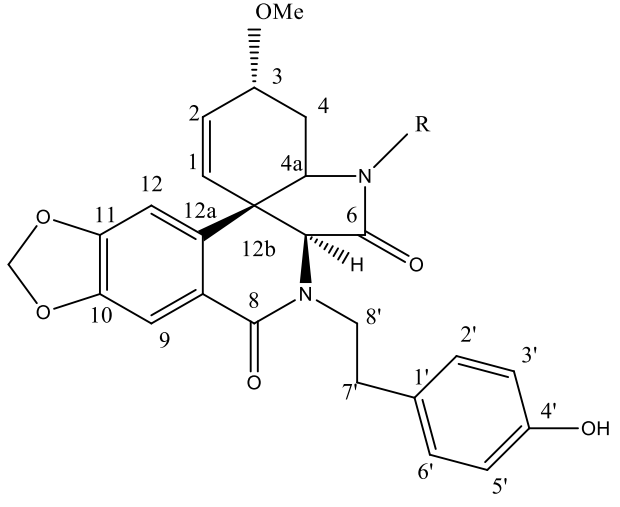
Tablo 2'nin Devamı. İskelet yapılarına göre Amaryllidaceae alkaloidleri

İskelet Tipi	Molekül Formülü
Krinin Tip (63) (β-5,10b-Etanofenantridin) Örnek: Krinin R=OH	
Hemantamin Tip (63) (α-5,10b-Etanofenantridin) Örnek: Hemantamin R1=OCH3 R2=R5=R6=H R3+R4=CH2 R7=OH	
Narsiklasin Tip (63) (Fenantridon) Örnek: Narsiklasin R= OH	

Tablo 2'nin Devamı. İskelet yapılarına göre Amaryllidaceae alkaloidleri

İskelet Tipi	Molekül Formülü
Montanin Tip (63) (Metanomorfantridin) Örnek: Montanin R= OCH₃	
Galantamin Tip (63) (Dibenzofuran) Örnek: Galantamin R₁= OMe R₂= H R₃= OH	
Grasilin Tip (180) (10b,4a-etanoiminodibenzo [3,4d]piran) (2benzopirano[3,4d] indol) Örnek : Grasilin R=H	

Tablo 2'nin Devamı. İskelet yapılarına göre Amaryllidaceae alkaloidleri

Plikamin Tip (180) (5-(4-hidroksifenetil-[1,3-dioksolo [4,5-g]indolo[3,3a-c]izokinolin- 6,12-dion) Örnek: Plikamin R= CH₃	
---	--

3.3. Bitkiden Elde Edilen Ekstreler Üzerinde Aktivite Araştırmaları

Narcissus ekstreleri, kozmetik ürünlerin bileşiminde yer almaktadır. Bu alanda son yıllarda yapılan çalışmalardan birinde hekzan ekstresinin cilt beyazlatıcı ürün bileşimine konması üzerine çok iyi sonuçlar alınmış ve ürünün patenti alınmıştır (181). Aynı amaçla geliştirilmiş bir başka ürün için *Narcissus tazetta* çiçek kısmından hazırlanan ekstrede melanin üretimini baskılayıcı etkili maddelerin varlığı gösterilmiştir (182).

Bir başka kozmetik ürün ise yaşlanma karşıtı olarak geliştirilmiş ve ürüne *Narcissus* türlerine ait soğan ekstresi eklenmiştir (183). Ayrıca farklı bitkilere ait ekstrelerle birlikte bulunduğu bir formülasyonun içme sularında yosun oluşumunu kimyasal madde kullanmaya gerek kalmaksızın engellediği ve sağlığa zarar vermediği gösterilmiştir(184). *N. tazetta* bitkisinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan butanol ekstresinin metisiline rezistan *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans*'a karşı antimikrobiyal etkisi kanıtlanmıştır (185).

Türkiye'den toplanmış *N. tazetta* L. bitkisinin ekstresinin insektisit, antinematodal ve antimikrobiyal aktiviteleri gösterilmiş, Alanya bölgesinden toplanmış *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* etanolik ekstresinin fareler üzerinde antinosiseptif aktivite gösterdiği rapor edilmiştir (186, 187). Antalya/Kumluca bölgesinden toplanmış *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinin 1:1 kloroform:metanol ekstresi Ellman yöntemi ile antikolinesteraz aktivite yönünden değerlendirilmiş ve etkisi içeriğindeki alkaloitlere bağlanmıştır (188). Ürdün'den toplanmış *N. tazetta* L. için, geleneksel olarak çiçekleri ve toprak üstü kısmının infüzyonunun antikanser antienflamatuvar ve sedatif amaçlarla kullanıldığı bildirilmiş ve etanol ekstresinin kanser hücreleri üzerindeki etkisi *in vitro* araştırılmıştır (189).

Bir başka çalışma *Narcissus* “Sir Winston Churchill” bitkisinin ekstresinin antikolinesteraz aktivite taşıdığını ortaya koymuş, biyoaktivitenin ise ungiminorin adlı bileşikten ileri geldiğini göstermiştir (190). Amaryllidaceae alkaloitlerinin en belirgin biyoaktivitelerinden biri de antikolinesteraz aktivite olduğu için *Narcissus* türlerinden elde edilen ekstreler ve izole edilen alkaloitler üzerinde antikolinesteraz aktivite çalışmaları literatürde yer almaktadır (64, 191).

Tablo 3. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>Narcissus angustifolius</i> Curtis ex Haw.	Galantamin	Galantamin	+	(192)
	Nangustin Pankrasin	Montanin		
	Çerilin	Diğer		
	8- <i>O</i> -demetilhomolikorin	Homolikorin		
	8- <i>O</i> -demetil-8- <i>O</i> -asetil homolikorin			
	Ungeremin Psödolikorin Vaskonin	Likorin		
	<i>N. assoanus</i> Leon-Duf	Assoanin		
Oksoassoanin Psödolikorin 1- <i>O</i> -asetilpsödolikorin			+	
2- <i>O</i> -asetilpsödolikorin			+ /GC-MS	
8- <i>O</i> -metilsternbergin Sternbergin Kirkin			GC-MS	
Galantamin			Galantamin	GC-MS
<i>N. austriensis</i> (Jordan) Pugsley		Hemantamin Hemantidin	Hemantamin	+
	Likorin	Likorin		
	3-epimakronin Tazettin	Tazettin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. austriensis</i> (Jordan) Pugsley (Devamı)	Trisferidin İsmin	Fenantridin	+	(195)
<i>N. bicolor</i> L.	Bikolorin 5,6-dihidrobikolorin İsmin	Fenantridin	+	(196)
	9- <i>O</i> -demetil homolikorin	Homolikorin		
	3-epimakronin Pretazettin	Tazettin		
	Vaskonin	Likorin		
	Oksoassoanın – <i>N</i> -oksi			
	<i>N. aureus</i> Loisel.= <i>N. tazetta</i> L. subsp. <i>aureus</i> (Loisel.) Baker	Likorin		
<i>N. biflorus</i> Curtis	Likorin	Likorin	+	(197)
<i>N. bujei</i> (Fdez. Casas)	Krinamin	Krinin	+	(198)
	Bujein Hemantamin 11- <i>O</i> -asetilhemantamin	Hemantamin		
	Homolikorin 8- <i>O</i> -demetilhomolikorin	Homolikorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. bujei</i> (Fdez. Casas) (Devamı)	Likorenin O-metillikorenin 6-O-metilodulin Masonin	Likorenin	+	(198)
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. bulbocodium</i> L. subsp. <i>bulbocodium</i>	Hordenin Hordenin Türevi	Tiramin(Diğer)	GC-MS	(68)
<i>N. canaliculatus</i> Guss.	Hemantamin	Hemantamin	+	(199, 200)
	Narsiklasin	Narsiklasin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. cantabricus</i> DC.	Kantabrisin Hemantamin Vittatin	Hemantamin	+	(68, 201)
	Krinamin	Krinin	GC-MS	
	6 α -hidroksibufanisin 6 β -hidroksibufanisin		+	
	İsmin Triferidin 5,6 dihidrobikolorin	Fenantridin	GC-MS	
	Galantindol	Galantindol	GC-MS	
	Galantamin Metillökotamin	Galantamin	GC-MS	

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. cantabricus</i> DC. (Devamı)	Tazettinol Epimakronin 3- <i>O</i> -asetilmetilpretazettin 3- <i>O</i> -asetilmetilpretazettin izomeri 6-metoksipretazettin 6-metoksipretazettin izomeri	Tazettin	GC-MS	(68, 201)
	Tazettin		+/- GC-MS	
	Homolikorin	Homolikorin	GC-MS	
<i>N. confusus</i> Pugsley	Galantamin <i>N</i> -formil galantamin Anhidrogalantamin Sanguinin Narvedin Lekotamin Metillekotamin 3- <i>O</i> -(3'-asetoksibutanoil) lekotamin 3- <i>O</i> -(3'-asetoksibutanoil) galantamin 3- <i>O</i> -asetilgalantamin <i>N</i> -demetilnorgalantamin	Galantamin	+/- GC-MS	(68, 127, 179, 202, 203)
			GC-MS	

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. confusus</i> Pugsley (Devamı)	Hemantamin 11-hidroksivittatin	Hemantamin	+ / GC-MS GC-MS	(68, 127, 179, 202, 203)
	Likorin Assoanin 11,12 didehidroanhidrolikorin	Likorin	GC-MS	
	Homolikorin	Homolikorin	+ / GC-MS	
	9- <i>O</i> -demetilhomolikorin		+	
	8- <i>O</i> -demetilhomolikorin		GC-MS	
	6- <i>O</i> -metillikorenin	Likorenin		
	Likosenin B Desmetillikosinin	Galantindol		
	Epimakronin Tazettin 6-metoksipretazettin 6-metoksipretazettin izomeri Pretazettin	Tazettin		
<i>N. conspicuus</i> (Haw.) Sweet	Homolikorin	Homolikorin	GC-MS	(68)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Hordenin	Tiramin (diğer)		
<i>N.cyclamineus</i> DC.	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200, 204)
	Narvedin	Galantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N.cyclamineus</i> DC. cv. Beryl	Galantin	Likorin	+	(179, 205, 206)
	Likorin			
	Narsissidin			
	Penarsin	Diğer		
<i>N.cyclamineus</i> DC. cv. Cairhays	Galantin	Likorin	+	(205)
	Hemantidin 6-epihemantidin	Hemantamin		
	Pluviin	Likorin		
<i>N.cyclamineus</i> DC. cv. February Gold	Homolikorin Likorenin	Homolikorin	+	(205)
	Likoramin	Galantamin		
<i>N.cyclamineus</i> DC. cv. Peeping Tom	Likorenin	Homolikorin	+	(205)
	Pluviin	Likorin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. dubius</i> Gouan	Dubiusin	Homolikorin	+	(179, 207)
	9- O-demetil-2- α -hidroksihomolikorin (5-hidroksi 10-O-demetilhomolikorin)			
	Psödolikorin	Likorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. eugeniae</i> Fdez. Casas	Galantamin	Galantamin	+ / GC-MS	(68, 179, 208)
	Anhidrogalantamin		GC-MS	
	Sanguinin			
	<i>N</i> -metilnorgalantamin			
	<i>N</i> -formilgalantamin			
	Metillekotamin			
	3- <i>O</i> -(3'asetoksibutanoil)lekotamin			
	Epigalantamin			
	Likoraminon			
	Homolikorin	Homolikorin	+ / GC-MS	
	Likorenin			
	Eugenin		+	
	Likosenin B		GC-MS	
	Desmetillikosinin			
	8- <i>O</i> -demetil homolikorin			
	Hordenin türevi	Tiramin		
	Trisferidin	Fenantridin		
	Vittatin	Hemantamin		
	8- <i>O</i> -demetilmaritidin			
	Anhidrolikorin	Likorin		
	1- <i>O</i> -asetilpluviin			
	Karanin			

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. eugeniae</i> Fdez. Casas (Devamı)	Kirkin 11,12 didehidroanhidrolikorin Likorin 9-O-metilpsödolikorin Pluviin Norpluviin	Likorin (Devamı)	GC-MS	(68, 179, 208)
<i>N. fernandesii</i> G.Pedro	Likorenin	Homolikorin	GC-MS	(68)
	Galantamin <i>N</i> -demetilnorgalantamin Epigalantamin Likoramin Narvedin 3-O-asetilgalantamin <i>N</i> -formilnorgalantamin	Galantamin		
	Vittatin 11-hidroksivittatin Hemantamin	Hemantamin		
	Galantindol	İndol		
	Trisferidin 5,6dihidrobikolorin İsmin	Fenantridin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. fernandesii</i> G.Pedro (Devamı)	Likörin Anhidrlükörin 1-O-asetilpluviin Assoanin 11,12-didehidroanhidrolükörin Galantin İnkartin	Likörin	GC-MS	(68)
	Tazettinol 6-metoksipretazettin Tazettin	Tazettin		
<i>N. genesii-lopezii</i> Fern. Casas	Hordenin Hordenin türevi	Tiramin	GC-MS	(73)
	Trisferidin 5,6-dihidrobikolorin	Fenantridin		
	Galantamin N-demetilnorgalantamin Metillökotamin 3-O-(3'asetoksibutanoil)lökotamin	Galantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. genesii-lopezii</i> Fern. Casas (Devamı)	Vittatin Maritidin 8-O-demetil maritidin 11-hidroksivittatin	Hemantamin	GC-MS	(73)
	Kirkin Assoanin	Likorin		
	6-O-metillikorenin Likosenin B Likorenin Homolikorin 8-O-demetil homolikorin	Homolikorin		
<i>N. hedraeanthus</i> (Webb & Heldr.) Colmeiro	İsmin Trisferidin 5,6-dihidrobikolorin	Fenantridin	GC-MS	(68)
	Galantamin Likoraminon Narvedin Habrantin	Galantamin		
	3-O-(3'hidroksibutanoil)vittatin 11-hidroksivittatin Vittatin Papiramin	Hemantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. hedraeanthus</i> (Webb & Heldr.) Colmeiro (Devamı)	Dihidrolikorin Anhidrolikorin 11,12-didehidroanhidrolikorin 1-O-asetil dihidrolikorin 1-O-asetil dihidrolikorin izomeri	Likorin	GC-MS	(68)
	Tazettin 6-metoksipretazettin 6-metoksipretazettin izomeri	Tazettin		
<i>N. incomparabilis</i>	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(179)
<i>N. jacetanus</i> Fdez. Casas	Assoanin Oksoassoanin Likorin Psödolikorin	Likorin	+	(209)
<i>N. jonquilla</i> (Quail)	Galantamin Likoramin Narvedin	Galantamin	GC-MS	(210)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. jonquilla</i> L.	Hemantamin	Hemantamin	GC-MS	(68, 179, 211)
	Golseptin	Likorin	+	
	Narsiklasin	Narsiklasin	+	
	Galantindol	Galantindol	GC-MS	

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür		
<i>N. jonquilla</i> L. (Devamı)	Galantamin	Galantamin	+ / GC-MS	(68, 179, 211)		
	Likoramin		+			
	Metillökotamin Narvedin Anhidrogalantamin Likoramin 3- <i>O</i> -metilgalantamin Likoraminon		GC-MS			
	Trisferidin İsmin 5,6-dihidrobikolorin	Fenantridin	GC-MS			
	<i>N. jonquilla</i> L. cv. Golden Sceptre	Galantin	Likorin		+	(205, 212-215)
		Goleptin Golseptin Jonquilin Likorin				
		Hemantamin				
Galantamin		Galantamin				
Hipeastrin Homolikorin Likorenin Masonin Odulin		Homolikorin				
Tazettin		Tazettin				

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. jonquilla</i> L. cv. Trevithian	Galantamin	Galantamin	+	(200, 205)
	Likorin	Likorin		
	Likorenin	Homolikorin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. leonensis</i> Pugsley	Norgalantamin Epinorgalantamin Epinorlikoramin Norlikoramin	Galantamin	+	(216)
	Likorin	Likorin		
<i>N. lobularis</i> Hort.	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Hemantamin	Hemantamin		
<i>N. munozii-garmendiae</i> Fdez.	Homolikorin Likorenin O-metillikorenin	Homolikorin	+	(68, 218)
	Hordenin	Tiramin		
	5,6-dihidrobikolorin	Fenantridin		
	Galantamin Likoramin Likoraminon Narvedin	Galantamin		
	11-O-asetilhemantamin	Hemantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. munozii-garmendiae</i> Fdez. (Devamı)	Assoanin Kirkin Norpluviin	Likörin	GC-MS	(68, 218)
<i>N. nivalis</i> Graels	Galantamin Norgalantamin	Galantamin	+	(131)
	9-O-metilpsödolikörin	Likörin		
<i>N. obesus</i> Salisb	Bikörin 5-6-dihidrobikörin İsmin	Fenantridin	+	(132)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Galantamin	Galantamin		
	3-epimakronin Obesin Pretazettin	Tazettin		
<i>N. odorus</i> L. var. <i>rugulosus</i>	Rudoline	-	+	(206)
	Penarcine	-		(179)
<i>N. pallidiflorus</i> Pugsley	Hemantamin	Hemantamin	+	(219)
	Homolikörin 8-O-demetilhomolikörin	Homolikörin		
	İsmin 5,6-dihidrobikörin	Fenantridin		
	Pallidiflorin	Diğer		
	Pretazettin	Tazettin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. pallidulus</i> Graels.	Roserin	Likorin	+	(68, 220)
	Mesembrin	Diğer	GC-MS	
	Mesembranol		+/GC-MS	
	Mesembrenon			
<i>N. panizzianus</i> Parl.	Papiramin	Hemantamin	+	(221)
	6-epi papiramin			
	Galantin	Likorin		
	Homolikorin	Homolikorin		
	Pretazettin	Tazettin		
<i>N.papyraceus</i> Ker. Gawl	Galantamin	Galantamin	+	(141, 179, 203, 222-224)
	Likoramin			
	Homolikorin	Homolikorin	+	
	8- <i>O</i> -demetilhomolikorin			
	9- <i>O</i> -demetilhomolikorin			
	8- <i>O</i> -demetilhomolikorin- <i>N</i> -oksit			
	9- <i>O</i> -demetilhomolikorin- α - <i>N</i> -oksit			
	Sternbergin	Likorin	GC-MS	
	1- <i>O</i> -asetillikorin			
	2,11didehidro,2-dehidroksilikorin			
	Likorin		+/ GC-MS	

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N.papyraceus</i> Ker. Gawl (Devamı)	11,12-didehidroanhidrolikorin Anhidrolikorin	Likorin (Devamı)	GC-MS	(141, 179, 203, 222-224)
	Maritidin	Hemantamin	+	
	O-metilmaritidin		+ / GC-MS	
	3-O-metil-9-O-demetilmaritidin		GC-MS	
	Narsimarkin		+	
	Papiramin		+ / GC-MS	
	O-metilpapiramin		GC-MS	
	6-epipapiramin		+	
	O-metil-6-epipapiramin			
	Psödolikorin	Likorin	+	
	Tazettin	Tazettin		
<i>N.perez-chiscanoni</i> Fern. Casas	Çerilin	Diğer	GC-MS	(68)
	8-O-demetilhomolikorin Homolikorin Likosenin B 6-O-metillikorenin	Homolikorin		
	Epimakronin Tazettin	Tazettin		
	11-hidroksivittatin 11-O-asetilhemantamin	Hemantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N.perez-chiscanoni</i> Fern. Casas (Devamı)	Hemantamin	Hemantamin (Devamı)	GC-MS	(68)
	Metillökotamin N-formilnorgalantamin Sanguinin Galantamin	Galantamin		
	5,6-dihidrobikolorin	Fenantridin		
<i>N. poeticus</i> L.	Galantamin	Galantamin	+	(179, 203, 222, 225-232)
	Galantin Likorin Narsissidin Nartazin Narsimarkin	Likorin		
	Likorenin Homolikorin Narsipoetin	Homolikorin		
	Pankrasin	Montanin		
	Poetaminin Poetamin Poetarisin Pluviin 9-O-metilpsödolikorin	Likorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. poeticus</i> L. var. <i>ornatus</i> Hort.	Galantamin	Galantamin	+	(179, 225, 226, 230, 233-235)
	Galantin Likorin Poetaminin Poetamin	Likorin		
	Hemantamin	Hemantamin		
	Homolikorin Likorenin Poetinin Narsipoetin	Homolikorin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. poeticus</i> L. cv. <i>Actea</i>	Galantamin	Galantamin	+	(200, 234)
	Galantin Likorin Narsissidin	Likorin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
	Likorenin	Homolikorin		
<i>N. poeticus</i> L. cv. <i>Daphne</i>	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Homolikorin Likorenin	Homolikorin		
	Likorin	Likorin		
<i>N. poeticus</i> L. cv. <i>Pink Parasol</i>	Narsipavlin Narsikaknin	Galantamin	+	(231)

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. poeticus</i> L. cv. Sarchedon	Galantamin	Galantamin	+	(226)
	Likorenin	Homolikorin		
	Galantin Likorin Narsissidin	Likorin		
<i>N. primigenius</i> (Lainz) Fdez.	Hemantamin 8-O-demetilmaritidin	Hemantamin	+	(236)
	Homolikorin 8-O-demetilhomolikorin	Homolikorin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L.	O-metilnorbelladin	Norbelladin	+	(179, 229, 237-239)
	Hemantamin Narsidin	Hemantamin		
	Masonin Homolikorin	Homolikorin		
	Norpluviin Likorin Assoanin Metilpsödolikorin	Likorin		
	Demetildihidrogalantamin N-demetilgalantamin O-asetilgalantamin	Galantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Carlton	Likoramin Epinorlikoramin Galantamin O-asetilgalantamin Norgalantamin	Galantamin	+/GC-MS	(142, 179, 200, 210, 239, 240)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Likorenin O-metillikorenin Masonin Normasonin Hipeastrin Homolikorin	Homolikorin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
	Narvedin	Galantamin		
	Odulin 6-O-metilodulin	Homolikorin		
	1-O-asetil-9-O-demetilpluviin N-demetilmasonin 9-O-demetilpluviin 1,9-diasetil-9-O-demetilpluviin	Likorin		
	Vittatin	Hemantamin		
	Galantamin Norgalantamin Norlikoramin	Galantamin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Coevnt Garden	Galantamin Norgalantamin Norlikoramin	Galantamin	+	(217, 241)

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Coevnt Garden (Devamı)	Galantin Pluviin Likorin	Likorin	+	(217, 241)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Likorenin	Homolikorin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Early Glory	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Galantin Likorin	Likorin		
	Hemantamin	Hemantamin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Flower Carpet	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200)
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Grant Maitre	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200)
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Grant Maitre	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Galantin Likorin	Likorin		
	Hemantamin	Hemantamin		
	Homolikorin	Homolikorin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Imperator	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Likorenin Homolikorin	Homolikorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Imperator (Devamı)	Galantin Likorin Pluviin	Likorin	+	(217)
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. King Alfred	Hemantamin	Hemantamin	+	(200, 217, 227, 241-245)
	Norlikoramin Galantamin Norgalantamin	Galantamin		
	Hipeastrin Homolikorin 8-O-demetilhomolikorin Likorenin	Homolikorin		
	Narsiklasin	Narsiklasin ve Montanin		
	Assoanin Galantin Likorin Narsissidin 9-O-metil-psödolikorin Pluviin	Likorin		
	Odulin	Homolikorin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Magnet	Hemantamin	Hemantamin	+	(217)
	Galantin Pluviin	Likorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Magnificence	Galantamin Norgalantamin Norlikoramin	Galantamin	+	(217, 241)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Galantin Likorin Pluviin	Likorin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Mount Hood	Hipeastrin Homolikorin	Homolikorin	+	(115, 200, 246, 247)
	Galantamin Likoramin Norlikoramin	Galantamin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Mrs. Ernst. H. Krelage	Galantamin	Galantamin	+	(217, 247)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Galantin Likorin Pluviin	Likorin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv Music Hall	Galantin	Likorin	+	(217)
	Likorin			
	Hemantamin	Hemantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Oliver Cromwell	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Pluviin Galantin	Likorin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. President Lebrun	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200, 247)
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Queen of Bicolors	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Likorin Pluviin	Likorin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Rembrandt	Galantamin Norgalantamin Norlikoramin	Galantamin	+	(200, 217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Likorin	Likorin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Rockery Beauty	Galantin	Likorin	+	(217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
	Norgalantamin Norlikoramin	Galantamin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Romaine	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Pluviin	Likorin		
	Likorenin	Homolikorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Spring Glory	Galantin Likorin Pluviin	Likorin	+	(217)
	Norgalantamin Norlikoramin	Galantamin		
	Hemantamin	Hemantamin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Unsurpassable	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Likorenin	Homolikorin		
	Pluviin	Likorin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Victoria	Hemantamin	Hemantamin	+	(217)
	Galantin Likorin Pluviin	Likorin		
	Norlikoramin Norgalantamin	Galantamin		
<i>N. pseudonarcissus</i> L. cv. Wrestler	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Galantin Pluviin	Likorin		
	Hemantamin	Hemantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür	
<i>N. pseudonarcissus</i> L. subsp. <i>pseudonarcissus</i> cv. Carlton	Odulin Hippeastrin	Homolikorin	+	(142, 240)	
	Masonin		+/GC-MS		
	Homolikorin N-Demetilmasonin O-Metilodulin O-metillikorenin				
	O-metillikorenin izomeri Likorenin				GC-MS
	Galantamin N-demetilgalantamin Likoramin Narvedin		Galantamin		+/GC-MS
	Likoramin izomeri Galantamin izomeri				GC-MS
	Epi-N-demetillikoramin	+			
	Vittatin Hemantamin	Hemantamin	+/GC-MS		
	Hemantamin türevi Hemantamin bozunma ürünü		GC-MS		
	O-Asetilgalantamin	Galantamin	+	(239)	
	1,10-diasetil-10-norpluviin	Likorin	+		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. pseudonarcissus</i> L. subsp. <i>pseudonarcissus</i> cv. Carlton (Devamı)	1- <i>O</i> -asetil-10-norpluviin 10-Norpluviine	Likörin (Devamı)	+ / GC-MS	(239)
<i>N. radinganorum</i> Fdez. Casas	Homolikörin 8- <i>O</i> -demetilhomolikörin 2-Hidroksihomolikörin 6- <i>O</i> -Metil likorenin	Homolikörin	+ / GC-MS	(68, 248)
	Assoanin Kirkin	Likörin	GC-MS	
	8- <i>O</i> -demetilmaritidin 9- <i>O</i> -demetilmaritidin	Hemantamin	GC-MS +	
	3- <i>O</i> -3' (Asetoksibutanoil)galantamin Habrantin Galantamin <i>N</i> -demetil norgalantamin Lökotamin	Galantamin	GC-MS	
<i>N. requienii</i> M. Roem.	2- <i>O</i> -asetilpsödolikörin 1- <i>O</i> -asetilpsödolikörin Psödolikörin	Likörin	+	(193)

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
N. serotinus Löfl. Ex L.	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200)
	Fortusin	Likorin	+	(249)
	1-O-(3´-asetoksibutanoil)likorin		+	(250)
	1-O-(3´-hidroksibutanoil)likorin			
	Likorin			
	Galantin			
	Assoanin			
	Narseronin	Homolikorin		
	Hippeastrin			
	11-hidroksigalantin	Likorin	+	(149)
	1-O-Asetil-3-O-metil-6-oksonarsissidin			
	1-O-Asetil-3-O-metilnarsissidin			
3-O-Metilnarsissidin				
2-Metoksipratosin	Narsiklasin			
4-Metoksi5-metil-1,2,3,5,6,6aR-hekzahidro-[1,3]dioksolo[40,50 : 6,7]-izokromeno[3,4-c]indol-8-on	Tazettin	+	(251)	

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. tazetta</i> L.	Hipeastrin Masonin	Homolikorin	+	(68, 133, 141, 179, 200, 226, 244, 252-261)
	Homolikorin 8-O-demetilhomolikorin		+GC-MS	
	2-hidroksihomolikorin		GC-MS	
	O-metilnorbelladin	Norbelladin	GC-MS	
	Galantindol	Galantindol	GC-MS	
	Narsiklasin	Narsiklasin	+	
	Bikolorin	Fenantridin	+	
	Trisferidin İsmin 5-6 dihidrobikolorin		GC-MS	
	O-demetilmaritidin 6-epihemantidin Hemantidin	Hemantamin	+	
	Vittatin 11-hidroksivittatin Maritidin O-metil Maritidin 8-O-demetilmaritidin		GC-MS	
	Hemantamin Krinamin Fiansin		+	

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. tazetta</i> L. (Devamı)	Narsisin Narvedin	Galantamin	+	(68, 133, 141, 179, 200, 226, 244, 252-261)
	Likoramin Likoraminon		GC-MS	
	Galantamin		+ / GC-MS	
	Krivellin Pretazettin	Tazettin	+	
	Epimakronin 3- Epimakronin 6-metoksipretazettin 6-metoksipretazettin izomeri 11-dezoksitazettin-3-epi-izomeri Tazettamit Deoksitazettin		GC-MS	
	Tazettin		+ / GC-MS	
	Galantin, Narsissidin Nartazin Psödolikorin	Likorin	+	
	Anhidrolikorin 11,12-didehidroanhidrolikorin 8-O-metilsternbergin Assoanin Kirkin		GC-MS	
	Likorin		+ / GC-MS	

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. tazetta</i> L. var <i>chinensis</i> Roem	Galantamin Epigalantamin Likoramin	Galantamin	+	(62, 179, 262, 263)
	Homolikorin Likorenin	Homolikorin		
	Pluviin Psödolikorin Likorin	Likorin		
	Pretazettin Tazettin	Tazettin		
	Hemantidin 6-epihemantidin Maritidin O-metilmaritidin 6- α -hidroksi-3-O-metilepimaritidin 6- β -hidroksi-3-O-metilepimaritidin Papiramin 6-epipapiramin 3-epipapiramin	Hemantamin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. tazetta</i> L. cv. Cragford	Hemantamin	Hemantamin	+	(226)
	Homolikorin	Homolikorin		
	Likorin	Likorin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. tazetta</i> L. cv. Early Perfection	Pluviin	Likorin	+	(226)
	Likorin			
	Hipeastrin Homolikorin	Homolikorin		
	Hemantamin	Hemantamin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. tazetta</i> L. cv. Geranium	Homolikorin	Homolikorin	+	(226, 246, 247, 255)
	Galantamin	Galantamin		
	Likorin Narsissidin	Likorin		
	Hemantamin	Hemantamin		
	Tazettin	Tazettin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
<i>N. tazetta</i> L. cv. La Fiancee	Galantin Likorin	Likorin	+	(226)
	Homolikorin	Homolikorin		
	Hemantamin	Hemantamin		
	Tazettin	Tazettin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. tazetta</i> L. cv. Laurens Koster	Hemantamin	Hemantamin	+	(226)
	Homolikorin	Homolikorin		
	Likorin	Likorin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. tazetta</i> L. cv. L'innocence	Hemantamin	Hemantamin	+	(226)
	Homolikorin	Homolikorin		
	Likorin	Likorin		
	Narsissidin			
<i>N. tazetta</i> L. cv. Scarlet Gem	Tazettin	Tazettin	+	(226)
	Galantin	Likorin		
	Likorin			
	Homolikorin	Homolikorin		
<i>N. tazetta</i> L. cv. St Agnes	Hemantamin	Hemantamin	+	(226)
	Homolikorin	Homolikorin		
	Likorin	Likorin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. tortifolius</i> Fdez. Casas	Dubiusin Homolikorin 8-O-demetilhomolikorin	Homolikorin	+	(179, 264)

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. tortifolius</i> Fdez. Casas (Devamı)	9-O-demetil-2- α -hidroksi homolikorin (5-hidroksi 10-O-demetil homolikorin)	Homolikorin (Devamı)	+	(179, 264)
	Galantamin	Galantamin		
<i>N. tortuosus</i> Haworth	Likorin Tortuosin	Likorin	+	(265)
<i>N. triandrus</i> L. cv. Silver Chimes	Hemantamin	Hemantamin	+	(205)
	Likorin	Likorin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>N. triandrus</i> L. cv. Thalia	Hemantamin	Hemantamin	+	(200, 205, 244)
	Homolikorin Likorenin	Homolikorin		
	Likorin	Likorin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
<i>N. triandrus</i> L. cv. Tresamble	Galantamin	Galantamin	+	(200, 205, 244)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Likorenin	Homolikorin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>N. vasconicus</i> Fdez. Casas	Homolikorin	Homolikorin	+	(179, 266)
	8- <i>O</i> -demetil-8- <i>O</i> -asetil homolikorin (9- <i>O</i> -demetil-9- <i>O</i> -asetil homolikorin)			
	Likorin	Likorin		
	Vaskonin			
<i>Narcissus</i> L. cv. Celebrity	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200)
<i>Narcissus</i> L. cv. Cheerfulness	Galantamin	Galantamin	+	(200, 246)
	Narsiklasin	Narsiklasin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Clamor	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200, 247)
<i>Narcissus</i> L. cv Folly	Likorin	Likorin	+	(253)
	Tazettin	Tazettin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Ice Follies	Norlikoramin Galantamin Likoramin	Galantamin	+	(134, 246)
	Hipeastrin	Homolikorin		
	Hemantamin	Hemantamin		
	Karanin Likorin	Likorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloid	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>Narcissus</i> L. cv. Inglescombe	Galantamin Likoramin Norlikoramin	Galantamin	+	(115, 217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Hipeastrin Homolikorin Likorenin	Homolikorin		
	Likorin Pluviin	Likorin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Insulinde	Galantamin	Galantamin	+	(217)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Likorin Pluviin	Likorin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Irene Copeland	Likorin	Likorin	+	(217)
	Narvedin	Galantamin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Kristalli	Galantamin Narvedin	Galantamin	+	(253)
	Likorin	Likorin		
	Tazettin	Tazettin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Livia	Hemantamin	Hemantamin	+	(217)
	Galantin Karanin Likorin Pluviin	Likorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>Narcissus</i> L. cv. Salome	Krinamin	Hemantamin	+	(267)
	2- α -hidroksi-6-O-metilodulin Norgalantamin, hippeastrin	Homolikorin		
	Vaskonin Tortuosin Psödolikorin	Likorin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Texas	Galantamin Narvedin	Galantamin	+	(200, 217, 247, 268-270)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Narsiklasin	Narsiklasin		
	Likorin Pluviin Norpluviin	Likorin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Totus Albus Prior = <i>N. papyraceus</i> Ker. Gawl.	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200, 247)
<i>Narcissus</i> L. cv. Twink	Galantamin	Galantamin	+	(217, 241)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Galantin Likorin Pluviin	Likorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

Tür	Alkaloit	İskelet Tipi	İzolasyon	Literatür
<i>Narcissus</i> L. cv. Van Sion	Galantamin Norgalantamin Norlikoramin	Galantamin	+	(217, 241)
	Hemantamin	Hemantamin		
	Homolikorin Likorenin	Homolikorin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Van Sion (Devamı)	Likorin Galantin Pluviin	Likorin	+	(217, 241)
	Tazettin	Tazettin		
<i>Narcissus</i> L. cv. Verger	Narsiklasin	Narsiklasin	+	(200, 247)
<i>Narcissus</i> sp.	Galantamin	Galantamin	+	(229, 244, 247, 271)
	Narsiklasin Narsiprimin	Narsiklasin		
	Poetaminin	Likorin		
<i>N. tazetta</i> subsp. <i>tazetta</i>	Likorin Krinin	Likorin	+	(24, 64)
	Galantamin	Galantamin		
	Bufanisin	Likorin		
	2-Demetoksimontanin	Montanin		
	3-Epihidroksibulbispermin Hemantamin	Hemantamin		
	Tazettin	Tazettin		
	9-O-demetilhomolikorin	Homolikorin		

Tablo 3'ün Devamı. Amaryllidaceae Alkaloitlerinin *Narcissus* Türlerinde Bulunuşları

<i>Narcissus</i> “Sir Winston Churchill”	Ungiminorin	Likorin	+	(190)
<i>Narcissus</i> cv. Dutch Mater	6-hidroksigalantindol 6-hidroksigalantindolozit-A 6-hidroksigalantindolozit-B 6-hidroksigalantindolozit-C	Galantindol	+	(148)

Tablo 4. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloidleri

Bitki Adı	Alkaloid Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Ammocharis coranica</i> (Ker-Gawl.)	Likorin	Etanol (Soğan) Butanol (Soğan) Etil asetat (Soğan)	Ellman	(272)
<i>Amaryllis belladonna</i> L.	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Boophane disticha</i> (L.f.)	6-Hidroksikrinamin	-	Ellman	(273)
<i>Chlidanthus fragrans</i> Herbert	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Crinum bulbispermum</i> (Burm.f.)	-	Etil asetat (Soğan)	Ellman	(274)
<i>Crinum bulbispermum</i> (Burm.f.)	-	Alkaloid (Soğan)	Ellman	(275, 276)
<i>Crinum bulbispermum</i> (Burm.f.)	Krinamin 6-Hidroksikrinamin 8- α -Etoksiprekrivellin N-Demetil-8- α - etoksipretazettin N-Demetil-8- β - etoksipretazettin 3-O-asetilhamayin	-	Ellman	(277, 278)
<i>Crinum jagus</i> (Thomps.)	-	Alkaloid (Soğan)	Ellman	(275)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Crinum glaucum</i> A. Chev.	Hamayin Krinamin Likorin	Metanol (Soğan)	Modifiye Ellman	(279)
<i>Crinum jagus</i> (Thomps.)	Hemantamin			
<i>Crinum macowanii</i> Baker	Hamayin Likorin	-	Ellman	(277)
<i>Crinum moorei</i> Hook.	Çerilin Epibufanisin Epivittatin Krinin Krinamidin 1-O-asetillikorin			
<i>Crinum powelli</i> Baker	-	Alkol (Soğan)	Fast Blue testi	(280)
<i>Crinum powelli</i> Baker	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Crinum zeylanicum</i> (L.)	-	Alkaloit (Soğan)	Ellman	(276)
<i>Calostemma purpureum</i> R.Br.	Galantin Likorin	-	Ellman	(281)
<i>Cyrtanthus contractus</i> N.E.Br.	Narsiprimin	-	Ellman	(282)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Cyrtanthus falcatus</i> R. A. Dyer	Tazettin	-	Ellman	(277)
<i>Eucharis amazonica</i> Linden	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Euchoris grandiflora</i> Planch.	Sanguinin	-	Ellman	(111)
<i>Galanthus elwesii</i> Hook.	İnkartin	Alkaloit (Total)	Ellman	(283)
<i>Galanthus elwesii</i> Hook.	-	Alkaloit (Yaprak)	Ellman	(284)
<i>Galanthus elwesii</i> Hook.	-	Kloroform-Metanol (Soğan) Alkaloit (Soğan)	Ellman	(64)
<i>Galanthus gracilis</i> Celak	-	Alkaloit (Toprak üstü, Toprak altı)	Ellman	(285)
<i>Galanthus ikariae</i> L.	-	Kloroform-Metanol (Soğan) Alkaloit (Soğan)	Ellman	(64)
<i>Galanthus ikariae</i> L.	2-Demetoksimontanin 3-Epihidroksibulbispermin Krinin Likorin Tazettin	Alkaloit (Soğan)	Ellman	(64)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Galanthus nivalis</i> L.	-	Alkaloit (Yaprak)	Ellman	(284)
<i>Galanthus nivalis</i> L.	-	Alkol (Soğan)	Fast Blue B Testi	(280)
<i>Galanthus nivalis</i> L.	Galantamin	-	Ellman	(286)
<i>Galanthus reginae-olgae</i> Orph. subsp. <i>vernalis</i> Kamari	-	Metanol, n-Hekzan, Diklorometan, Etil asetat (Toprak üstü, Toprak altı)	Ellman	(287)
<i>Galanthus rizehensis</i> Stern	Likorin <i>N</i> -Oksit İnkartin <i>N</i> -Oksit İnkartin	Alkaloit (Toprak üstü, Toprak altı)	Ellman	(288, 289)
<i>Galanthus xvalentinei</i> nothosubsp. <i>subplicatus</i>	-	Alkaloit (Toprak üstü, Toprak altı)	Ellman	(290)
<i>Galanthus woronowii</i> Losinsk.	Galantin Narvedin <i>O</i> -metillökotamin Sternbergin Sanguinin 1- <i>O</i> -asetil-9- <i>O</i> - metilpsödolikorin 2- <i>O</i> -(3- <i>O</i> - hidroksibutenoil)likorin Likorin Salsolin	-	Ellman	(291)

Tablo4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Galanthus fosteri</i> Baker#	11- <i>O</i> -asetil-9- <i>O</i> -demetilmaritidin 3,11- <i>O</i> -diasetil-9- <i>O</i> - demetilmaritidin İnkartin Galantamin Galantin 9- <i>O</i> -metilpsödolikorin <i>N,O</i> -dimetilnorbelladin Hordenin Vittatin	-	Ellman	(292)
<i>Galanthus cilicicus</i> Baker#	-	Alkaloit (Toprak üstü, Toprak altı)	Ellman	(293)
<i>Habranthus robustus</i> Herb.	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Habranthus jamesonii</i> (Baker)	-	Kloroform (Total)	Ellman	(294)
<i>Hippeastrum</i> sp.	Pretazettin Montanin Hipeastrin	-	Modifiye Ellman	(295)
<i>Hippeastrum barbatum</i> Herb.	-	Alkaloit (Soğan)	Ellman	(275)
<i>Hippeastrum papilio</i> (Ravenna) Van Scheepen	11- β -hidroksigalantamin	-	Ellman	(296, 297)
<i>Hippeastrum puniceum</i> (Lam.)	-	Alkaloit (Soğan)	Ellman	(275, 276)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Hippeastrum reticulatum</i> Herb.#	6- α -hidroksimaritidin 6- β -hidroksimaritidin Retikulinin İzoretikulinin	-	Ellman	(298)
<i>Hymenocallis festalis</i> Worsley	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Hymenocallis</i> “Sulphur Queen	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Hymenocallis caribaea</i> (L.)	-	Alkaloit (Soğan)	Ellman	(276)
<i>Hymenocallis littoralis</i> Salisb.	Likorin 11-hidroksivittatin Hippeastrin	Kloroform (Soğan)	Ellman	(299)
<i>Ismene festalis</i> Worsley	-	Alkol (Soğan)	Fast Blue B Testi	(280)
<i>Leucojum aestivum</i> L.	-	Alkaloit (Yaprak, Soğan)	Ellman	(284)
<i>Leucojum aestivum</i> L.	-	Kloroform-Metanol (Soğan) Alkaloit (Soğan)	Ellman	(64)
<i>Leucojum aestivum</i> L.	Epinorgalantamin	-	Ellman	(111)
<i>Leucojum aestivum</i> L.	Galantamin Dihidroksihabrantin 2-O-asetildemetillikorenin	-	Ellman	(300)
<i>Leucojum aestivum</i> L.	N-allilnorgalantamin N-(14-metilallil)norgalanthamin		Ellman	(301)
<i>Leucojum vernum</i> L.	-	Alkol (Soğan)	Fast Blue B Testi	(302)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Lycoris radiata</i> Delay Paralysis	Hemantidin Memantin 1-O-asetillikorin 1,2-di-O-asetillikorin	-	Biyokimyasal Dedeksiyon	(303)
<i>Lycoris radiatae</i>	Galantamin	-	Ellman	(286)
<i>Narcissus abcissus</i> (Haw.) Schult. & Schult.f.	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus assoanus</i> Dufour ex Schult. & Schult.f.	Assoanin	Metanol (Soğan)	Ellman	(304) (111)
	Oksoassoanin			(111)
	Psödolikorin			
<i>Narcissus asturiensis</i> (Jordan) Pugsley	Hemantamin Hemantidin Tazettin	-	Ellman	(111)
<i>Narcissus baeticus</i> Fern. Casas	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus bujei</i> (Fern.Casas) Fern.Casas	8-O-Demetilhomolikorin O-Metillikorenin Hemantamin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus cantabricus</i>	Krinamin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus confusus</i> Pugsley	Galantamin Hemantamin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111) (304)
<i>Narcissus confusus</i> Pugsley	-	Alkol (Soğan)	Ellman	(304)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloidleri

Bitki Adı	Alkaloid Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Narcissus dubius</i>	Dubiusin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus eugenia</i> Fern. Casas	Likorenin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus fernandesii</i>	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus jacetanus</i>	Psödolikorin Assoanin Oksoassoanin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus legionensis</i>	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus leonensis</i> Pugsley	Epinorgalantamin Epinorlikoramin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus moschatus</i>	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus munozi-garmendiae</i>	O-metillikorenin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus obesus</i>	Galantamin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus pallidiflorus</i>	Hemantamin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus pallidulus</i>	Mesembrenon	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus panizzianus</i>	Pretazettin Papiramin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Narcissus perez-chiscanoi</i>	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus poeticus</i>	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus poeticus</i> L.	11-hidroksigalantamin	-	Ellman	(286)
<i>Narcissus poeticus</i> L. #	-	Absolü(Çiçek)	Ellman	(305)
<i>Narcissus poeticus</i> cv. Pink Parasol#	-	Alkaloit (Soğan)	-	(306)
<i>Narcissus poeticus</i> cv. Pink Parasol#	Narvedin Homolikorin Masonin Likoramin Narsipavlin Galantamin Seko-izopovellamin Oduin Norlikoramin Hemantamin İnkartin Hippeastrin	-	Ellman	(231)
<i>Narcissus primigenius</i> (Fdez. Suarez ex M. LaInz) Fern.Casas & Lainz	Hemantamin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> subsp. <i>pseudonarcissus</i> cv. Carlton	Hippeastrin Likoramin	-	Ellman	(111)
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L. (King Alfred Daffodil)	Hippeastrin	-	Ellman	(111)
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.	Homolikorin 7-O-metillikorenin 9-O-demetil-7-O-metillikorenin Galantamin Hippeastrin Hemantamin Likorin	Kloroform (Soğan)	Ellman	(299)
<i>Narcissus pseudonarcissus</i> L.#	-	Etanol (Soğan)	İTK ve Fast Blue B Testi	(280, 302)
<i>Narcissus radinganorum</i> Fdez. Casas	8-O-demetilhomolikorin	-	Ellman	(111)
<i>Narcissus requienii</i> M. Roem.	2-O-asetilpsödolikorin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus susannae</i> Fern. Casas	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloidleri

Bitki Adı	Alkaloid Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Narcissus tazetta</i> L.	Likörin Psödolikörin Galantamin Hemantamin Tazettin	-	Ellman	(111)
<i>Narcissus</i> “Avalanche” (tazetta)	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman İTK	(191)
<i>Narcissus</i> Grand Soleil d’Or (tazetta)	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman İTK	(191)
<i>Narcissus tazetta</i> subsp. <i>tazetta</i> (L.)	3-Epihidroksibulbispermin Hemantamin N-Norgalantamin Likörin Tazettin	Kloroform-Metanol (1:1) (Soğan) Alkaloid (Soğan)	Ellman	(64)
<i>Narcissus tortifolius</i>	9-O-demetil-2α- Hidroksihomolikörin 8-O-Demetilhomolikörin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus tortuosus</i> Haw.	Likörin	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus triandrus</i>	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus vasconius</i>	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(111)
<i>Narcissus</i> cv. Breath of Spring	Likörin Pretzettin Galantamin Hemantidin	Kloroform (Soğan)	Ellman	(299)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Narcissus</i> “Carlton”	-	Metanol (Soğan)	Ellman, Akış-Biyokimyasal Dedeksiyon, On-line HPLC-UV-Biyokimyasal Dedeksiyon, On-line HPLC-UV-MS-Biyokimyasal Dedeksiyon	(307)
<i>Narcissus jonquilla</i> L. cv. Double Campernelle #	-	Alkaloit ekstresi	-	(308)
<i>N. nanus</i> cv. Elka #	-	Alkaloit ekstresi	-	
<i>Narcissus</i> “Sir Winston Churchill”	Ungiminorin (11cS)-homolikorin	Etanol (Soğan)	Ellman	(190, 306)
<i>Narcissus</i> varyeteleri (çeşitli kültürler)	-	Alkaloit (Yaprak) Alkaloit (Soğan)	Ellman	(117)
<i>Nerine bowdenii</i> W. Wats	-	Alkol (Soğan)	Fast Blue B Testi	(302)
<i>Nerine bowdenii</i> W. Wats	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Nerine bowdenii</i> W. Wats	Ambellin Bufanisin Filifolin 11-O-asetilambellin Undulatin	Toluen (Soğan)	Ellman	(309)
<i>Nerine bowdenii</i> W. Wats	Belladin Asetilkaranin Undulatin Karanin	Alkaloit (soğan)	Ellman	(310)

Tablo4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloidleri

Bitki Adı	Alkaloid Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Nerine bowdenii</i> W. Wats (Devamı)	O-asetilambellin Bufanidrin Bufanisin Ambellin Deasetilbovdesin Sinonim bulbisin Bufanamin Tazettin 2- β - epoksiambellin 6- α -hidroksiundulatin 1-O-asetilbulbisine Hemantamin 1-O-asetillikörin Krinamidin Hamayin Krinin Povellin	Alkaloid (soğan)	Ellman	(310)
<i>Pancratium canariense</i> Ker Gawler	-	Metanol (Soğan, Yaprak, Meyva) Alkaloid (Total)	Ellman	(311)
<i>Pancratium illyricum</i> L.	1- α -hidroksi-O-metillökotamin	Alkaloid (Soğan ve yaprak)	Ellman	(312)
<i>Pancratium maritimum</i> L.	-	Alkaloid (Soğan) Kloroform-Metanol (Soğan) Alkaloid (Soğan)	Ellman	(64, 284)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Phycella herbertiana</i> Lindl.	-	Kloroform (Total)	Ellman	(294)
<i>Rhodophila bifida</i> (Herb.) Traub	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Rhodophiala mendocina</i> (Phil.)	-	Kloroform (Total)	Ellman	(294)
<i>Scadoxus puniceus</i> (L.) Friis & I. Nordal.	-	Etil asetat (Soğan)	Ellman	(274)
<i>Sprekelia formosissima</i> L.	-	Metanol (Soğan)	Ellman	(191)
<i>Sternbergia colchiciflora</i> W. Et K.	-	Alkaloit (Total)	Ellman	(284)
<i>Sternbergia candida</i> Mathew Et T. Baytop	-	Etil asetat (Soğan) Metanol (Soğan) Su (Soğan)	Ellman	(313)
<i>Sternbergia clusiana</i> (Ker Gawl.) Ker Gawl. ex Spreng				
<i>Sternbergia fisheriana</i> (Herbert) Rupr.				

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Sternbergia lutea</i> subsp. <i>lutea</i>	-	Etil asetat (Soğan) Metanol (Soğan) Su (Soğan)	Ellman	(313)
<i>Sternbergia lutea</i> subsp. <i>sicula</i>				
<i>Zephyranthes candida</i> (Lindl.)Herb.	-	Metanol (Soğan) Toluen (Soğan)	Ellman	(191)
	9- <i>O</i> -demetil-11- β -hidroksilikoramin <i>N</i> -Metil-11,12-seko-5,6-dihidroplikan <i>N</i> -izopentil-5,6-dihidroplikan- <i>N</i> -oksit Blikuin- <i>N</i> -oksit <i>N</i> -Metil-11,12-seko-5,6-dihidroplikan Galantamin Sanguinin Likoramin <i>O</i> -demetillikoramin	-	Ellman	(314)
	Zefkandidin A Zefkandidin I Zefkandidin II Zefkandidin III	-	Ellman	(315, 316)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Zephyranthes robusta</i> Baker#	Galantamin 3-Epimakronin Hipeastidin Likoramin Galantin Vittatin Hamayin 8-O-Demetilmaritidin	-	Ellman	(317)
<i>Zephyranthes robusta</i> Baker	8-O-Demetilmaritidin Undulatin	-	Ellman	(318)
<i>Zephyranthes robusta</i>	Galantin 9-O-demetilgalantin	-	(POP)	(319)
<i>Zephyranthes filifolia</i> (Herb.)	-	Kloroform (Total)	Ellman	(304)
<i>Zephyranthes grandiflora</i> Lindl.	-	Alkaloit (Soğan)	Ellman	(320)
<i>Zephyranthes concolor</i> (Lindl.)	Klidantin Galantamin N-Oksit Galvesin	-	Ellman	(321)
<i>Zephyranthes concolor</i> (Lindl.)	-	Alkaloit (Total)	Ellman	(284)
<i>Zephyranthes carinata</i> Herbert	-	Alkaloit (Soğan)	Ellman	(275, 276)

Tablo 4'ün Devamı. Antikolinesteraz Aktiviteye Sahip Amaryllidaceae Türleri ve Alkaloitleri

Bitki Adı	Alkaloit Adı	Ekstre (Çalışılan Kısım)	Yöntem	Literatür
<i>Zephyranthes carinata</i>	Zefikarinatin I Galantin Psödolikorin Galantamin Likoramin 3-epi-likoramin	Etanol (Soğan)	-	(322)

Antiasetilkinesteraz ve antitirilkolinesteraz aktivitenin birlikte araştırıldığı çalışmalar

(Diğerleri aksi belirtilmediği takdirde antiasetilkinesteraz aktivite çalışmasıdır.)

4. Moleküler Doking Çalışmaları

Yeni ilaç etken maddelerinin tasarımı kimyasal bileşiklerin moleküler yapıları ile biyolojik etkileri arasındaki ilişkilerin tanımlanmasına yönelik çalışmaların son dönemde artış gösterdiği görülmektedir(323). Bu kapsamda moleküler modelleme çalışmaları oldukça önemli yer tutmaktadır. Her ne kadar X ışınları difraksiyonu ile kristal yapı tayini ve NMR yöntemleri oldukça hızlı ilerleme kaydetse de; bu tekniklere paralel olarak gelişme gösteren "moleküler modelleme" yöntemi, moleküllerin üç boyutlu yapılarının tespiti ve bağlanma bölgeleri ile etkileşiminde oldukça önemli yer tutmaktadır (324).

Doking tekniği, küçük bir molekül ile bir protein arasındaki etkileşimi atomik seviyede inceleyen bir moleküler modelleme yöntemidir. Hedef proteinlerin bağlanma bölgesinde küçük moleküllerin davranışlarını karakterize etmemizi sağlayan moleküler doking tekniği, 1980'lerin başından beri yaygın olarak kullanılan ilaç keşfi için giderek daha önemli bir araç haline gelmiştir (325).

Galantamin bileşiğinin *Torpedo californica* asetilkolinesterazı içerisindeki X-ray kristal yapısı 1999 yılında çözümlenmiştir (326). Amaryllidaceae alkaloidleri üzerinde yapılan doking çalışmaları son yıllarda artış göstermiştir (276, 327-329). *Eucharis* Planch, *Caliphruria* Herb. *Hippeastrum* Herb, *Hymenocallis* Salisb. *Zephyranthes* Herb. ve *Crinum* L. genuslarından elde edilmiş alkaloidler üzerinde kolinesteraz inhibisyonu etkisi ile ilişkili moleküler doklama çalışmaları mevcuttur (276, 328).

Doking işleminde, etkili olabilecek bileşiğin, reseptördeki ceplere uygunluğunun değerlendirilmesi esastır. Bu yöntem ligandın protein içerisindeki konumu ve yönelimi ile birlikte konformasyonunun tahmini, ve ligandın bağlanma afinitesinin değerlendirilmesini sağlar. Esas amaç, hesaplama yöntemleri kullanılarak, tahmini bir ligand-reseptör kompleks yapısının tasarlanmasıdır (330).

II. BÖLÜM

GEREÇ VE YÖNTEMLER

1. Bitkisel Materyal

Narcissus tazetta subsp. *tazetta* L. bitkisinin çiçekli halinin örnekleri, Akçapınar/Muğla civarından 05.03.2015 tarihinde toplanmıştır. Bitkiye ait örneklerin tayini Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Ali ÖNÜR tarafından yapılmıştır. Bitkinin doğadaki görüntüsü Resim 1(a) ve 1(b)'de yer almaktadır.



Resim 1(a). *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. Bitkisinin Doğadaki Görünüşü **1(b).** *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. Bitkisinin Yakından Görünüşü

Bitkiye ait herbaryum örneği 1596 numara ile Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognozi Anabilim Dalı Herbaryumunda kayıtlı bulunmaktadır. Herbaryum örneğine ait görsel, Resim 2'de verilmiştir.



Resim 2. *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. Bitkisine Ait Herbaryum Örneği

Narcissi Bulbus droğuna ait örnekleri hazırlamak için taze bitkinin toprak üstü kısımlarından ayrılan toprak altı kısımları, gözle görülebilen organik veya inorganik tüm safsızlıklardan ayıklanarak temizlendikten sonra, orta irilikte doğranarak, açık havada, gölgede ve oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Narcissi Herba droğuna ait örnekleri hazırlamak için taze bitkinin toprak altı kısımlarından dikkatle ayrılan toprak üstü kısımları ayıklanarak temizlendikten sonra, Narcissi Bulbus droğuna benzer şekilde kurutulmuştur.

Narcissi Herba droğuna NTÜ; Narcissi Bulbus droğuna NTA kodu verilmiştir.

2. Kalite Kontrol ve Miktar Tayini Araştırmaları

2.1. Gereç

Kalite kontrol ve miktar tayini çalışmalarında kullanılacak bitkisel materyal bir önceki bölümde açıklandığı şekilde hazırlandıktan sonra tüm örnekler elek çapı 1 mm olan Retsch GmbH SK 1 marka elektrikli değirmende ince toz haline getirilmiştir.

Sabit vezne getirmek amacıyla ve kurutmada kayıp miktar tayinlerinde sıcaklığı ayarlanabilen Heraeus marka dijital göstergeli termometreli etüv kullanılmıştır. Kül miktar tayinleri için Heraeus marka yakma fırından yararlanılmıştır.

Kurutmada kayıp ve kül miktar tayinlerinin yanısıra fraksiyon ve saf maddelerin muhafaza edilmesinde de nem çekici madde olarak susuz kalsiyum klorür (CaCl_2) içeren normal tip cam desikatörlerden faydalanılmıştır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile miktar tayini çalışmalarında galantamin ve likorin referans bileşiklerinin sırasıyla hidrobromür ve hidroklorür tuzları (Sigma Aldrich) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan tüm çözücüler analitik saflıktadır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile miktar tayini çalışmasında elde edilen bulgular Thermo-Xcalibur marka yazılım programı kullanılarak değerdendirilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini

Önceden sabit vezne getirilmiş cam tartım kabı içarisine tam tartılmış 1 g civarında drog konur. 100-105°C'lik etüvde 1 saat tutulur. Sonrasında desikatörde belirli bir süre soğuması sağlanan örnek tartılır. Etüvde bekletme soğutma ve tartım işlemlerine son iki tartım arasında 0.5 mg'dan fazla fark olmayana kadar devam edilir, kurutmada kayıp miktarı yüzde olarak hesaplanır (331, 332).

2.2.2. Bütün Kül Miktar Tayini

600 ± 25 °C'lik Heraeus marka yakma fırınında önceden 1 saat yakılıp soğutulularak sabit ağırlığa getirilen porselen kroze içarisine 1 g civarında drog tam

olarak tartılarak konur. Öncelikle 100-105 °C'lik etüvde 1 saat süreyle kurutulur. Daha sonra 600 ± 25 °C'lik yakma fırınında 1 saat yakılır. Desikatörde soğuması için bekletilen örnek tartılır. Bu işlemlere külü içeren krozenin ağırlığında son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar devam edilerek, droğun içerdiği yüzde bütün kül miktarı hesaplanır (331, 332).

2.2.3. Sülfat Külü Miktar Tayini

600 ± 25 °C'lik Heraeus marka yakma fırınında önceden 1 saat yakılıp soğutularak sabit vezne getirilen porselen kroze içine 1 g civarında tam tartılmış drog konur. Üzerine 2 ml % 10'luk sülfürik asit çözeltisi damla damla ilave edilir. Önce su banyosunda kuruluğa kadar bekletildikten sonra ardından tablalı ısıtıcıda duman çıkışı bitene kadar yakılır. Daha sonra 600±25 °C'lik yakma fırınında 1 saat süreyle yakılır. Fırından çıkartılarak desikatörde soğuması için bekletilir. Üzerine % 10'luk sülfürik asit eklenir, benzer şekilde ısıtılıp, yakılır. Soğumasının ardından % 15.8'lik amonyum karbonat çözeltisi ilave edilir ve aynı işlem tekrarlanır. Yakma, soğutma ve tartma işlemlerine sülfat külü içeren kroze sabit vezne gelinceye kadar devam edilir. Droğun yüzde sülfat külü miktarı hesaplanır (331, 332).

2.2.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

600 ± 25 °C'lik Heraeus marka yakma fırınında önceden 1 saat yakılıp soğutularak sabit ağırlığa getirilen porselen kroze içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartılarak konur. Öncelikle 100-105 °C'lik etüvde 1 saat süreyle kurutulur. Daha sonra 600±25°C'lik fırınında 1 saat süreyle yakılır. Fırından çıkartılarak desikatörde bir miktar soğuması için bekletildikten sonra tartılır. Bu işlemlere son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar devam edilir. Daha sonra krozede kalan bakiye üzerine, distile su ve HCl konulur. Krozenin ağzı saat camıyla kapatılır ve tablalı ısıtıcı üzerinde ısıtılıp, kaynaması sağlanır. Soğuduktan sonra kül bırakmayan süzgeç kağıdı (5891 Black ribbon) kullanılarak süzülür. Süzüntü nötr oluncaya kadar sıcak distile suyla süzgeç kağıdı yıkanır. Üzerinde kalan bakiyeyle birlikte süzgeç kağıdı tekrar krozenin içerisine konur ve son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar yakma işlemine devam edilir. Böylece droğun hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı yüzde olarak hesaplanır (331, 332).

2.2.5 Total Alkaloit Miktar Tayini

2.2.5.1. Total Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

100-105 °C'lik etüvde sabit vazne getirilmiş toz drog örnekleri tam olarak tartılır. 24 saat % 96'lık etanolle bir perkolatörde masere edilir. Daha sonra % 96'lık etanolle Mayer ve Dragendorff reaktifleriyle reaksiyon vermeyinceye kadar ekstre edilir. Etanollü ekstre alçak basınç altında kuruluğa kadar distillendikten sonra, % 1'lik sulu HCl içerisinde çözündürülüp, süzülür. Bu işleme asitli süzüntü Mayer ve Dragendorff reaktifleriyle reaksiyon vermeyinceye kadar devam edilir. Birleştirilen asitli çözeltiler küçük porsiyonlar halinde, petrol eteriyle ön ekstraksiyona tabi tutulur. Bu işlemde sonra asitli çözeltiler, derişik amonyum hidroksit çözeltisiyle pH=9-10 olacak şekilde bazikleştirilir ve ardından kloroformla ekstre edilir. Mayer ve Dragendorff reaktifleriyle(331) reaksiyon vermeyinceye kadar ekstraksiyona devam edilir. Kontrol için sonuncu ekstraksiyondan sonra kloroformlu fazdan bir miktar alınıp, susuz sodyum sülfatla suyundan kurtarılır, süzülür. Kloroform distillenip, % 1'lik hidroklorik asit içinde çözündürülen bakiyede, Mayer ve Dragendorff belirteçleriyle alkaloit varlığı kontrol edilir. Alkaloit varsa ekstraksiyon işlemine devam edilir, yoksa ekstraksiyon sonlandırılır. Ekstraksiyon sonucunda kloroformlu kısımlar birleştirilerek susuz sodyum sülfatla suyundan kurtarılır. Alçak basınç altında kuruluğa kadar distillenir. Böylece total alkaloit ekstresi elde edilmiş olur (331, 333).

2.2.5.2. Total Alkaloit Miktar Tayini Uygulaması

Çiçekli dönemde toplanan bitkinin toprak altı ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan total alkaloit ekstreleri üzerine belirli miktarda ayarlı H₂SO₄ çözeltisi ilave edilir. Sıcak su banyosunda ara sıra çalkalanarak çözündürülür. Üzerine birkaç damla metil kırmızısı karışım reaktif çözeltisinden(331) ilave edilir. Asidin fazlası, ayarlı sodyum hidroksit çözeltisiyle titre edilir. Renk kırmızı-menekşe renginden yeşile döndüğü an işleme son verilir. Daha sonra gerekli hesap yapılarak, total alkaloit miktarı tayin edilir (331).

2.2.5.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Uygulanması

0.02 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması ve Ayarlanması

1000 mL balonjojeye kaynatılıp soğutulmuş bir miktar distile su konur. Üzerine büret yardımıyla 2.8 mL % 95-98'lik derişik sülfürik asit ilave edilir, kaynatılıp soğutulmuş distile su ile 1000 mL'e tamamlanır. Böylece 0,1 N sülfürik asit çözeltisi hazırlanır. Hazırlanan 0.1 N sülfürik asit çözeltisinden seyreltme yapılarak 0.02 N sülfürik asit çözeltisi hazırlanır.

Çözeltinin ayarlanması için 100-105 °C'lik etüvde kuruluğa kadar ısıtılıp sabit vezne getirilen susuz sodyum karbonattan (Merck) 30 mg tam tartım alınır ve 30 mL kaynatılmış soğutulmuş distile suda çözülür. Üzerine 0.1 mL metil oranj reaktif çözeltisi (331) ilave edilip 0.02 N sülfürik asitle titre edilir. Ekvivalans noktasına ulaşan çözelti dikkatle ısıtılarak karbondioksit ortamdan uzaklaştırılır. Sonra kırmızı-sarı renk tekrar ortaya çıkana kadar titrasyona devam edilir.

1mL 0.02 N sülfürik asit çözeltisinin 1,0598 mg susuz sodyum karbonata eşdeğer olduğu kabul edilerek faktör hesaplanır (334).

Faktör=Teorik sarfiyat/Pratik sarfiyat

0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması ve Ayarlanması

4.2 g civarında sodyum hidroksit (Riedel-de Haen) tam olarak tartılıp, birkaç mL kaynatılmış soğutulmuş distile su ile 1000 mL'lik balon joje içinde hızlıca yıkanarak karbonatından kurtarıldıktan sonra kaynatılmış soğutulmuş distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır. Böylece 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisi hazırlanmış olur. Hazırlanan 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisinden büret ile ölçülerek 200 mL alınıp, 1000 mL'lik balon jojede kaynatılmış soğutulmuş distile su ile 1000 mL'ye tamamlanır. Bu işlem ile 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisinden seyreltilerek 0.02 N sodyum hidroksit çözeltisi hazırlanır.

0.02 N sodyum hidroksit çözeltisini ayarlamak için, daha önce hazırlanan ayarlı 0.02 N sülfürik asit çözeltisinden büret ile 25 mL ölçülerek bir erlenmayere alınır. Üzerine birkaç damla metil kırmızısı karışım reaktif çözeltisi (331) damlatılınca meydana gelen kırmızı-menekşe renk, yeşile dönüncüye kadar 0.02 N sodyum hidroksit çözeltisi ile titre edilir. Sarfedilen 0.02 N sodyum hidroksit miktarı mL cinsinden aşağıdaki formülde yerine konarak faktör hesaplanır (334).

$$25 \times \text{Faktör} \times \text{sülfirik asit} = \text{Faktör} \times \text{sodyum hidroksit} \times t$$

2.2.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Likorin ve Galantamin Alkaloidlerinin Teşhis ve Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu

2.2.6.1. Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı

Drog örneklerinden 200 mg tartılır. Üzerine 5 ml % 2'lik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek 5 saat süreyle 40 °C'de ultrasonik banyoda ekstre edilir. Bu işlemin ardından 1 mL % 26'luk NH₄OH çözeltisiyle bazikleştirilir ve 4 mL distile su eklenir. 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüj edilir. Üstte kalan sıvı başka bir tübe aktararak distile suyla 10 mL'ye tamamlanır. Bu çözeltiden 3 mL alınarak Extrelut-N (Merck) kolonuna yüklenerek 10 dk bekletilir. Bunu takiben kloroformla elüsyon yapılır. Ele geçen kloroformlu bakiye alçak basınç altında kuruluğa kadar uçurulur. Böylece alkaloid ekstresi elde edilmiş olur.

2.2.6.2. Standart Alkaloid Ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

% 0.1'lik TFA'lı (Trifloroasetik asit) (Merck) su kullanılarak hazırlanan standart alkaloid çözeltisinden seyreltmek suretiyle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözelti HPLC cihazına verilir. Uygulanan miktara karşı okunan alan değerini gösteren bir ölçü eğrisi hazırlanır ve denklem hesaplanır.

2.2.6.3. Alkaloid Miktarının Tayin Edilmesi

Standart alkaloidlere ait ölçü eğrisi hazırlamada kullanılan deney şartlarına göre yapılan uygulamalar sonucunda, okunan alan değerlerine karşılık gelen miktarlar, ölçü eğrisinden faydalanarak hesaplanır. Bu miktar tayini sonuçları, kuru drog üzerinden yüzde miktar olarak hesaplanır (335).

2.3. Deneyler

2.3.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini

Önceden sabit vezne getirilmiş cam tartım kabı içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartıldı. 100-105 °C'lik etüvde 1 saat tutuldu. Etüvden çıkartılarak desikatörde 30 dk soğuması için bekletildikten sonra tartıldı. Bu işlemlere son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar devam edilerek, droğun yüzde nem miktarı hesaplandı.

2.3.2. Bütün Kül Miktar Tayini

600 ± 25 °C'lik Heraeus marka yakma fırınında önceden 1 saat yakılıp, soğutularak sabit ağırlığa getirilen porselen kroze içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartılarak kondu. Önce 100-105 °C'lik etüvde 1 saat kurutuldu. Daha sonra 600±25 °C'lik yakma fırınında 1 saat yakıldı. Desikatörde 30 dk soğuması için bekletildikten sonra tartıldı. Yakma, soğutma ve tartma işlemlerine son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar devam edilerek, droğun yüzde bütün kül miktarı hesaplandı.

2.3.3. Sülfat Külü Miktar Tayini

600 ± 25 °C'lik Heraeus marka yakma fırınında önceden 1 saat yakılıp soğutularak sabit ağırlığa getirilen porselen kroze içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartılarak kondu. Droğun üzerine 2 ml % 10'luk sülfürik asit çözeltisi damla damla ilave edildi. Su banyosu üzerinde kuruluğa kadar bekletildikten sonra tablalı ısıtıcıda duman çıkışı bitene kadar yakıldı. Bir sonraki aşamada 600 ± 25 °C'lik yakma fırınında 1 saat yakılmasının ardından desikatörde 30 dk soğutuldu. Drog içeren krozeye birkaç damla %10'luk H₂SO₄ çözeltisinden tekrar ilave edildi, yukarıda anlatılana benzer şekilde ısıtılıp, yakıldı. Desikatörde 30 dk soğutulmasının ardından, birkaç damla % 15.8'lik amonyum karbonat çözeltisi ilave edildi. Drog içeren kroze sabit vezne gelinceye kadar 1'er saat süreyle yakma fırınında yakıldı ve desikatörde 30 dk soğutulmasını takiben tartıldı. Hesaplamalar sonucunda droğun içerdiği yüzde sülfat külü miktarı bulundu.

2.3.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini

600 ± 25°C'lik Heraeus marka yakma fırınında önceden 1 saat yakılıp soğutularak sabit ağırlığa getirilen porselen kroze içerisine 1 g civarında drog tam olarak tartılarak kondu. 100-105°C'lik etüvde 1 saat süreyle tutuldu. Daha sonra 600±25°C'lik yakma fırınında 1 saat süreyle yakıldı. Desikatörde 30 dk soğuması için bekletildikten sonra tartıldı. Bu işlemlere son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar devam edildi. Daha sonra drog içeren krozenin içine 15 mL distile su ve 10 mL HCl konuldu. Krozenin ağzı saat camıyla kapatıldı ve 10 dk plak ısıtıcı üzerinde ısıtıldı. Soğuduktan sonra kül bırakmayan süzgeç kağıdından (5891 Black ribbon) süzülerek süzüntü nötr oluncaya kadar sıcak distile suyla süzgeç kağıdı yıkandı. Üzerinde kalan bakiyesiyle

birlikte süzgeç kağıdı tekrar krozenin içerisine yerleştirildi. Son iki tartım arasındaki fark 0.5 mg'dan fazla olmayacak şekilde sabit vezne gelinceye kadar yakma işlemine devam edildi. Böylece droğun % olarak hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı hesaplandı.

2.3.5. Total Alkaloit Miktar Tayini

2.3.5.1. Total Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

100-105 °C'lik etüvde sabit vezne getirilmiş toz drog örneğinden 3 g civarında tam tartım alındı. 24 saat % 96'lık 100 mL etanolle bir perkolatörde masere edildi. Daha sonra perkolasyon yöntemiyle % 96'lık etanol kullanılarak tüketme sıvısı Mayer ve Dragendorff reaktifleriyle (331) reaksiyon vermeyinceye kadar toplamda 300 mL alkolle tüketme işlemi gerçekleştirildi. Etanol alçak basınç altında distillendikten sonra bakiye 50 ml'lik porsiyonlar halinde %1'lik hidroklorik asit çözeltisi içerisinde çözündürülüp süzüldü. Çözünmeyen kısımlar %1'lik hidroklorik asit çözeltisinin küçük porsiyonlarıyla yıkandı. Bu işleme asitli süzüntü Mayer ve Dragendorff reaktifleriyle reaksiyon vermeyinceye kadar devam edildi ve toplam 250 mL %1'lik hidroklorik asit çözeltisi kullanıldı. Birleştirilen asitli çözeltiler, 100 mL'lik porsiyonlar halinde üç kez petrol eteriyle, toplamda 300 ml çözücü kullanılarak ekstraksiyona tabi tutuldu. Petrol eterli kısımlar ayrıldı. Bu işlemten sonra asitli çözeltiler birleştirilerek % 26'lık amonyum hidroksit çözeltisiyle pH 9-10 olacak şekilde bazikleştirildi ve ardından kloroformla (6x100 mL) ekstraksiyon yapıldı. Sonuncu ekstraksiyonda kloroformlu kısımdan bir miktar alınıp susuz sodyum sülfatla suyundan kurtarıldı. Süzüldükten sonra kloroform distillenerek uzaklaştırıldı. Bakiye % 1'lik HCl içerisinde çözündürülerek Mayer ve Dragendorff belirteçleriyle alkaloit varlığı kontrol edildi. Ekstraksiyonun bittiğine karar verildikten sonra kloroformlu kısımlar birleştirilerek bir miktar susuz sodyum sülfatla suyundan kurtarılıp, distillendi. Böylece total alkaloit ekstresi elde edilmiş oldu.

2.3.5.2. Total Alkaloit Miktar Tayini Uygulaması

Hazırlanan total alkaloit ekstresi üzerine, 20 mL 0.02 N ayarlı sülfürik asit çözeltisi eklendi. 50-60 °C'lik sıcak su banyosunda ara sıra çalkalayarak ekstrenin tamamen çözünmesi sağlandı. Üzerine metil kırmızısı karışım reaktif çözeltisi(331)

ilave edildi. Asidin fazlası 0.02 N ayarlı sodyum hidroksit çözeltisiyle kırmızı-menekşe renkten yeşil renge dönene kadar titre edildi.

2.3.5.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Ayarlanması

2.3.5.3.1 0.1 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

1000 mL'lik balon jojeye bir miktar kaynatılıp soğutulmuş distile su konulduktan sonra üzerine büret yardımıyla 2.8 mL % 98'lik sülfürik asit (Merck) eklenerek, 1000 mL'ye kaynatılmış soğutulmuş distile suyla tamamlandı.

2.3.5.3.2. 0.02 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Hazırlanması

Hazırlanmış olan 0.1 N sülfürik asit çözeltisinin büretle ölçülerek alınan 200 ml'si 1000 mL'lik bir balon jojeye aktarıldıktan sonra kaynatılmış soğutulmuş distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

2.3.5.3.3. 0.02 N Sülfürik Asit Çözeltisinin Ayarlanması

100-105 °C'lik etüvde kuruluğa kadar ısıtılıp, sabit vazne getirilmiş susuz sodyum karbonattan (Merck) 30 mg civarında tam tartım alındı. 30 mL kaynatılıp soğutulmuş distile su içinde çözündürüldü. Üzerine 0.1 mL metil oranj reaktif çözeltisi (0.1 g metil oranj reaktifi 80 ml distile suda çözündürülür ve etanolle 100 mL'ye tamamlanır) (331) ilave edildi ve hazırlanan 0.02 N sülfürik asit çözeltisiyle titre edildi. Kırmızı-sarı renge dönerek ekivalans noktasına ulaşan çözelti dikkatle ısıtılarak karbondioksidi uzaklaştırıldı. Sonra kırmızı-sarı renk tekrar ortaya çıkana kadar titrasyona devam edildi.

2.3.5.3.4. 0.1 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması

4.2 g sodyum hidroksit (Merck) tartıldı. 1000 mL'lik bir balon jodede, süratle birkaç ml kaynatılıp soğutulmuş distile suyla yıkanarak karbonatından kurtarıldıktan sonra, 1000 mL'ye kaynatılıp soğutulmuş distile suyla tamamlandı.

2.2.3.5.3.5 0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Hazırlanması

Yukarıda hazırlanışı anlatılan 0.1 N sodyum hidroksit çözeltisinden büretle 200 mL ölçülerek alındı ve 1000 mL'lik bir balon jodede kaynatılıp soğutulmuş distile suyla 1000 mL'ye tamamlandı.

2.3.5.3.6. 0.02 N Sodyum Hidroksit Çözeltisinin Ayarlanması

Ayarlı 0.02 N sülfürik asit çözeltisinin 25 mL'si, büretten ölçülerek bir erlenmayere alındı. Üzerine 3 damla metil kırmızısı reaktif çözeltisi (0.1 g metil kırmızısı ve 50 mg metilen mavisi etanolde çözündürülüp, yine etanolle 100 mL'ye tamamlanır (331)) eklendi. Oluşan kırmızı-menekşe renk, yeşile dönene kadar 0.02 N sodyum hidroksit çözeltisiyle titrasyon yapıldı.

2.3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Likorin ve Galantamin Alkaloidlerinin Teşhis ve Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu

Narcissus tazetta subsp. *tazetta* L. bitkisinden hazırlanmış NTS ve NTY kodlu örneklerdeki galantamin ve likorin miktarlarının belirlenmesi amacıyla, her iki standart için de ayrı ayrı alıkonma zamanları tespit edilmiş, farklı konsantrasyonlarda standart çözeltileri hazırlanıp cihaza verilerek ölçü eğrisi çizilmiş, ve UV spektrumları kaydedilmiştir. Buradaki kantitatif yöntem, beklenen alıkonma zamanında örneğimizde görülen pik alanının standart ile kıyaslanmasına dayanmaktadır.

Çalışılan örneklerde galantamin ve likorin varlığı doğrulanmış ve miktarları tespit edilmiştir. Miktar tayini çalışmalarında PDA (Fotodiyot dizi) dedektör kullanılmıştır. Kullanılan bu miktar tayini yöntemi likorin ve galantamin alkaloidlerinin aynı anda teşhisine ve miktar tayinlerine imkan sağlamaktadır.

2.3.6.1. Alkaloid Ekstrelerinin Hazırlanışı

NTS ve NTY kodlu örneklerden elde edilmiş toz droglardan ayrı ayrı 200'er mg tartıldı. Drog üzerine 5 mL % 2'lik hidroklorik asit çözeltisi eklenerek 5 saat süreyle 40 °C'lik ultrasonik banyoda ekstre edildi. Bu işlemin ardından 1 mL derişik amonyum hidroksit ve 4 mL distile su eklendi. 5000 rpm'de 10 dk boyunca santrifüje tabi tutuldu. Toz droğa ait partiküller çöktükten sonra üstte toplanan sıvı kısım başka bir tübe aktarılarak distile suyla 10 mL'ye tamamlandı. Bu çözeltiden 3 mL alınarak Extrelut-N (Merck) kolonuna yüklendi. 10 dk bekletildikten sonra kloroformla 3x5 mL olacak şekilde elüsyon yapıldı. Ele geçen kloroformlu bakiye alçak basınç altında distillendi. Böylece alkaloid ekstresi elde edildi.

2.3.6.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analiz Koşulları

Tablo 5. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analiz Koşulları

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Analiz Koşulları	
Cihaz	Thermo Scientific Accela HPLC Systems
Kolon	Hichrom 5 C18 (250mm × 4.6mm)
Kolon Partikül Boyutu	5 µm
Mobil Faz	TFA-Su-Asetonitril (0.01 : 90 : 10)
Akış Hızı	1000 µL/dk
Dedektör	Thermo Scientific Accela PDA Dedektör
Dalga Boyu	290 nm
Kolon Sıcaklığı	25 °C
Elde Edilen Verilerin Analizi	Thermo Xcalibur Roadmap

2.3.6.3. Örnek Çözeltilerinin Hazırlanışı

200 mg drogdan hareketle ekstraksiyonu yapılan NTS ve NTY kodlu örneklere ait alkaloit ekstraktları, 1 mL % 0.1'lik TFA (Trifloroasetik asit)'li suda çözüldü, (Sem Concept Syringe 100x13 mm, 0.45 µm) filtreden süzüldü ve cihaza verildi.

2.3.6.4. Standart Likorin Çözeltisinin Hazırlanışı

1 mg likorin hidroklorür (Sigma) bir balon jojede, 1 mL % 0.1'lik TFA'lı su ile çözüldü.

2.3.6.5. Standart Likorine Ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Standart çözeltiden 2.5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler hazırlandı. Her birinden üçer kez 25'er µL uygulama yapılarak alan değerleri ölçüldü. Uygulanan miktara karşı okunan alan değerleriyle likorine ait bir ölçü eğrisi ve regresyon analizi hazırlandı (Şekil 1). Standart likorine ait kromatogram ve UV spektrumu ise sırasıyla Şekil 3 ve Spektrum 1'de verilmiştir.

2.3.6.6. Likorinin HPLC ile Teşhis ve Miktar Tayini

Hazırlanan örnek çözeltilerinden üç paralel uygulama olacak şekilde her birinden üçer kez 25'er µL uygulama yapıldı. Okunan alan değerlerine karşılık gelen miktarlar standart likorine ait ölçü eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. Likorin miktar tayini sonuçları kuru drog üzerinden % miktar olarak tespit edildi .

2.3.6.7. Standart Galantamin Çözeltisinin Hazırlanışı

1 mg galantamin hidrobromür (Sigma) bir balon jofede 1 mL % 0.1'lik TFA'lı suda çözüldü.

2.3.6.8. Standart Galantamine Ait Ölçü Eğrisinin Hazırlanması

Standart çözeltiden hareketle 0.5 µg/mL, 1 µg/mL, 2.5 µg/mL, 5 µg/mL ve 10 µg/mL konsantrasyonda çözeltiler hazırlandı. Her birinden üçer kez 25'er µL uygulanarak alan değerleri ölçüldü. Uygulanan miktara karşı okunan alan değerleriyle galantamine ait bir ölçü eğrisi ve regresyon analizi hazırlandı (Şekil 2).

Standart galantamine ait kromatogram ve UV spektrumu ise sırasıyla Şekil 3 ve Spektrum 2'de verilmiştir.

2.3.6.9. Galantaminin HPLC ile Teşhis ve Miktar Tayini

Hazırlanan örnek çözeltilerinden üç paralel uygulama olacak şekilde her birinden üçer kez 25'er µL uygulama yapıldı. Okunan alan değerlerine karşılık gelen miktarlar standart galantamine ait ölçü eğrisinden yararlanılarak hesaplandı. Galantamin miktar tayini sonuçları kuru drog üzerinden % miktar olarak tespit edildi.

2.3.6.10. Yöntem Validasyonu

Validasyon kelimesi İngilizce bir kelime olan “*valid*=geçerli” kelimesinden türemiştir. Türkçe bilimsel kaynaklarda kullanılmaya başlanana karşılığı “geçerlilik” olmuşsa da orijinal şekli olan “validasyon” ifadesi de sıklıkla karşımıza çıkmaktadır.

Analitik yöntem geçerliliği konusunda ilk yaklaşımlar Brüksel’de 1990 yılında toplanan ve ev sahipliğini Avrupa ilaç endüstrileri ve birlikleri Federasyonu’nun (European Federation of Pharmaceutical Industries and Associations (EFPIA)) yaptığı “İnsanlarda Kullanılan İlaçların Ruhsatlandırılması için Teknik Gerekliliklerin Belirlenmesi Konferansı” (International conference of Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH)) isimli uluslararası kongrede başlamıştır. İçlerinde FDA(Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi, EMEA(Avrupa İlaç Ajansı) ve Japonya İlaç Üreticileri Birliği)’nin de bulunduğu altı tüzel kişilikten oluşan kurul, dünya üzerinde karşılaşılan farklılıkları en aza indirmek amacıyla ICH kılavuzunu oluşturmuştur.

Bir çalışmanın veya yöntemin geçerli kılınmasındaki hedef ve standartlar bu kılavuzda belirlenmiştir. 1994 yılında CDER (Center for Drug Evaluation and Research) İlaç Araştırma ve Değerlendirme Merkezi; 1997 yılında ise USP 30. Cildinde geçerlilik parametrelerini yayınlamıştır. Tez çalışmamızda yöntem geçerliliği ICH kılavuzu esas alınarak araştırılmıştır.

ICH kılavuzundan geçen geçerlilik tanımları şu başlıklar altında incelenmektedir:

- Özgüllük
- Doğrusallık
- Tayin Aralığı
- Doğruluk
- Kesinlik
- Tayin Sınırı
- Niceleme Sınırı

-Sağlamlık

-Sistem Uygunluk Testi

Narcissus tazetta subsp. *tazetta* L. üzerinde yapmış olduğumuz HPLC yöntemi ile galantamin ve likorin alkaloidlerinin miktar tayini çalışmasında kullandığımız yöntemin geçerliliği yukarıdaki başlıklar kapsamında incelenmiş, ICH kılavuzuna göre yöntem uygunluğu doğrulanmıştır.



3. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) Yöntemiyle Drog İçeriğindeki Alkaloidlerin Saptanması

3.1. Gereç

Çiçekli dönemde toplanmış olan bitkinin soğanlarından hazırlanan örneklerle NTA; toprak üstü kısımlarından hazırlananlara ise NTÜ kodu verilmiştir.

GC-MS yönteminde Thermo GC-TraceUltra Ver: 2.0., Thermo MS DSQ II (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) marka cihazdan elektron iyonlaştırma modunda faydalanılmıştır. Sabit faz olarak 30m x 0.25mm x 0.25 µm ebatlarında TR-5 MS kolonu ve taşıyıcı gaz olarak helyum kullanılmıştır.

Kütle spektrumu alınması sonucu piklerin değerlendirilmesi ve pik altında kalan alanların hesaplanması Xcalibur yazılım programı ile gerçekleştirilmiştir. Standart olarak daha önceki çalışmalarda elde edilmiş ve yapıları spektral yöntemlerle aydınlatılmış olan bileşikler veya NIST MS Search 2.0 (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) kütüphanesinden ulaşılan bilgilerden ve literatürden faydalanılmıştır.

3.2. Yöntem

Total alkaloid ekstresinin hazırlanması ve kullanılan yöntem için literatürden yararlanılmıştır (284). Ancak en uygun sonucu elde etmek amacıyla bazı modifikasyonların yapılmasına gerek görülmüştür.

3.2.1. GC Ölçümü İçin Alkaloid Ekstresinin Hazırlanışı

Toz edilmiş bitkisel materyal üzerine metanol eklenerek ekstraksiyon gerçekleştirilir. Filtre kağıdından süzildükten sonra çözücü uzaklaştırılır. Bakiye dilüe asit kullanılarak asitlendirilir. Asitli çözelti dietil eter yardımıyla sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulur. Nötral bileşiklerinden uzaklaştırılan asitli çözelti bazikleştirilerek pH 9-10 arasına getirilir. Kloroform ile ekstraksiyon sonucu alkaloid ekstresi elde edilmiş olur.

3.2.2. GC-MS Cihazına Uygulamanın Yapılışı

Hazırlanan alkaloid ekstresi metanol içinde, uygun olduğu belirlenen konsantrasyonda gaz kromatografisi-kütle spektrometre cihazına verilir.

3.3 Deney

3.3.1. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC-MS) Yöntemiyle Drog İçeriğindeki Alkaloitlerin Saptanması

3.3.1.1. Alkaloit Ekstresinin Hazırlanışı

NTA ve NTÜ kodlu örneklerin her birinden 500 mg tartıldı. Drog üzerine 5 mL metanol eklenerek 30 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletildi. Bu işlemin ardından metanollü çözelti süzülerek alındı. Bakiye üzerine tekrar 5 mL metanol eklemek suretiyle bu işlemler toplam 3 kez yapıldı. Birleştirilen metanollü çözeltiler alçak basınç altında kuruluğa kadar distillenip, kalan bakiye 10 mL % 2'lik sülfürik asit çözeltisi ile çözülüp, süzüldü. Aynı işlem 2 kez daha tekrarlanıp, asitli kısımlar birleştirildi. Birleştirilen asitli çözelti (3x10 mL) dietil eterle sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu. Eterli kısımlar toplanarak uzaklaştırıldı. Daha sonra asitli çözeltiyi kalemileştirmek için (pH 9-10) üzerine derişik amonyak çözeltisi ilave edildi. Kalevi çözelti (3x10 mL) kloroformla ekstre edilerek, kloroformlu kısımlar birleştirilip, suyundan kurtarmak amacıyla bir miktar susuz sodyum sülfat ilave edilip, alçak basınç altında kuruluğa kadar distillendi. Böylece alkaloit ekstresi elde edilmiş oldu.

3.3.1.2. Deneyin Yapılışı

NTA ve NTÜ kodlu örneklerden hareketle hazırlanan alkaloit ekstreleri, konsantrasyonları 5 mg/250 µL olacak şekilde metanolde çözülerek gaz kromatografisi-kütle spektrometresine uygulandı.

Tablo 6. GC-MS Yöntemiyle Alkaloid İçeriğinin Saptanmasında Kullanılan Cihazın Deney Şartları

GC-MS Yöntemiyle Alkaloid İçeriğinin Saptanmasında Kullanılan Cihazın Deney Şartları	
Cihaz	Thermo GC-TraceUltra Ver: 2.0., Thermo MS DSQ II (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)
Mod	EI (70 eV)
Kolon	A TR-5 MS Column (30m x 0.25mm x 0.25 µm)
Kolon Sıcaklık Programı	80°C 1 dk, 80-250°C arası 100 °C/dk artış
	250°C 2 dk sabit, 250°C-300°C arası 10°C/dk artış
	300°C 10 dk sabit
Enjektör Sıcaklığı	250 °C
Taşıyıcı Gaz	Helyum
Akış Hızı	0.8 mL /dk

Alkaloidlerin teşhisi için NIST MS Search 2.0 veritabanından (National Institute of Standardization and Technology, Gaithersburg, MD, USA), literatür bilgilerinden ve daha önce saf olarak elde edilip yapısı aydınlatılan maddelere ait kütle spektrumlarında yer alan karakteristik parçalanmalardan yararlanıldı.

4. İzolasyon, Yapı Aydınlatma ve Antikolinesteraz Aktivite Çalışmaları

4.1. Gereç

Bitkinin soğan ve toprak üstü kısımlarının antikolinesteraz aktiviteleri NTA ve NTÜ kodları verilerek ayrı ayrı tespit edilmiştir. İzolasyon çalışmalarında ise soğan ve toprak üstü kısımları ayrılmamış; bitkinin tamamı kullanılmıştır.

İzolasyon çalışmalarında sütun kromatografisi adsorban olarak, silika jel 60 (70-230 Mesh) (Merck 7734) ve bu fraksiyonların daha ileri saflaştırılmaları için

uygulanan preparatif sütun kromatografisi çalışmalarında silika jel H (Type 60) (5-40 µm) (Merck 7736) kullanılmıştır.

İzolasyon çalışmalarında yapılan İTK deneylerinde ve biyoaktivite çalışmalarında galantamin ve likorin standart bileşikleri, sırasıyla hidrobromür ve hidroklorür tuzu şeklinde (Sigma-Aldrich) kullanılmıştır.

Yapı aydınlatma çalışmalarında 1D NMR (^1H ve ^{13}C NMR) ile 2D NMR spektrumları (^1H , ^1H -COSY, NOESY, HSQC, HMBC) MERCURYplus-AS 400, Bruker 400 MHz veya Varian 500 MHz NMR spektrometrelerinde; CDCl_3 , CD_3OD ve DMSO-d_6 çözücülerinde alınmıştır.

Optik Çevirme: Optik çevirme ölçümlerinde Jasco P-1010 (Jasco, 83 Tokyo, Japan) dijital polarimetresinden yararlanılmıştır.

Kütle spektrumları: ESI kütle spektrumları LC-MS/MS Thermo Scientific TSQ Quantum Access max spektrometresinde alınmıştır.

Antikolinesteraz aktivite çalışmalarında fosfat tamponu hazırlığında Tween 20 (Sigma), Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4) (Sigma), sodyum klorür (NaCl) (Riedel de Haen) ve Dipotasyum Hidrojen Fosfat (K_2HPO_4) (Merck) kullanılmıştır. Asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri yılan balığından elde edilmiş ve liyofilize edilmiş enzimlerdir. Asetilkolin iyodür (ATCI) (Sigma), butirilkolin iyodür (BTCl) (Sigma) ve Ellman's reaktifi (5,5 -ditiyobis- (2-nitrobenzoik asit) (DTNB)) (Sigma) kullanılmıştır.

Mikroplaka üzerinden spektroskopik olarak yapılan ölçüm işleminde, Versamax marka mikroplaka okuyucu kullanılmıştır. Kullanılan tüm çözücüler analitik saflıktadır. IC_{50} değerleri GraphPad Prism V3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) programı kullanılarak hesaplanmıştır.

4.2. Yöntem

4.2.1. Alkaloit Ekstraksiyonu

Orta incelikte toz haline getirilmiş olan materyal, oda sıcaklığında % 96'lık etanolle Mayer ve Dragendorff (331)alkaloit belirteçlerine pozitif reaksiyon vermeyinceye kadar perkolasyon yöntemiyle tüketilir. Etanollü çözeltilerin birleştirilip, alçak basınç altında kuruluğa kadar distillenmesiyle etanol ekstresi elde edilir. Daha sonra etanol ekstresi, % 2'lik hidroklorik asit çözeltisinde çözülür,

çözünmeyen kısımlar süzgeç kağıdından süzülerek ayrılır. Bu işleme, süzüntü Mayer ve Dragendorff alkaloit belirteçlerine olumlu sonuç vermeyinceye kadar devam edilir. Asitli kısımlar birleştirilerek derişik amonyum hidroksit çözeltisiyle pH 9-10 olacak şekilde kalevilendirilir. Elde edilen alkali çözelti, kloroformla Mayer ve Dragendorff alkaloit belirteçlerine karşı olumlu reaksiyon vermeyinceye kadar tüketilir. Kloroformlu kısımlar alınıp, birleştirilir. Susuz sodyum sülfatla suyundan kurtarılarak, süzülür. Kloroformun alçak basınç altında distillenmesiyle total alkaloit ekstresi elde edilir.

4.2.2. Alkaloitlerin Saflaştırılmaları

Sütun kromatografisi, vakum uygulamalı preparatif sütun kromatografisi ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemlerinden ve gerektiğinde kristallendirme yöntemlerinden faydalanılmaktadır.

4.2.3. Total Alkaloit Ekstresinin Sütun Kromatografisi ile Fraksiyonlandırılması

Total alkaloit ekstresinin fraksiyonlandırılmasında ve elde edilen ana fraksiyonların daha ileri fraksiyonlandırma çalışmalarında, sütun kromatografisinden faydalanılmaktadır. Total alkaloit ekstresinden ana fraksiyonların elde edilmesinde adsorban olarak, silika jel 60 (70-230 Mesh) (Merck 7734) ve bu fraksiyonların daha ileri saflaştırılmaları için uygulanan preparatif sütun kromatografisi çalışmalarında silika jel H (Type 60) (5-40 µm) (Merck 7736) kullanılmaktadır. Fraksiyonlandırma işlemi için uygulanacak olan ekstrelerin 1 g'ı için yaklaşık 35-40 g adsorban ve bu miktarlara uygun boyutlara sahip silindirik cam sütunlar kullanılmaktadır. Gerektiğinde vakum uygulanabilecek şekilde imal edilmiş cam sütunlardan da faydalanılmaktadır. Sütun kromatografisine ekstre kuru veya yaş tatbik yöntemiyle uygulanabilmekte olup tez çalışmasında kuru tatbik yöntemiyle uygulama yapılmıştır.

4.2.4. Alkaloitlerin İnce Tabaka Kromatografisi ile (İ.T.K.) İncelenmesi

İ.T.K. yönteminden, sütun kromatografisi çalışmaları sırasında elde edilen fraksiyonların benzerlerinin birleştirilmesi, preparatif ince tabaka ve vakum uygulamalı preparatif sütun kromatografileri için uygun çözücü sistemlerinin

saptanması, bunların yanında izole edilen bileşiklerin saflıklarının kontrolü için faydalanılmaktadır.

Oda sıcaklığında gerçekleştirilen İ.T.K. çalışmalarında 20x20 cm boyutlarında, 0.25 mm kalınlığında silikajel 60F₂₅₄ (Merck 5715) ile kaplanmış hazır cam kromatografi plakları kullanılmaktadır. Örnekler, kromatografi plaklarına deneysel olarak belirlenmiş uygun konsantrasyonlardaki çözeltileri halinde tatbik edilip plaklar deneysel olarak tespit edilmiş uygun çözücü sistemlerinde yükseltilmektedir.

4.2.5. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Preparatif ince tabaka kromatografisinde, 0.50 mm adsorban tabakası kalınlığında, 20x20 cm boyutlarındaki silika jel 60 F₂₅₄ (Merck 5744) ile kaplanmış cam plaklar kullanılmaktadır. En uygun çözücü sistemlerinin saptanması için çok sayıda İ.T.K. denemesi yapılmaktadır. Çözücü sistemleri plaklarda tek developman yapıldığında 17 cm, ardışık iki developman yapıldığında ise önce 15 cm ve daha sonra 18 cm olacak şekilde yükseltilmektedir. Bantların belirlenmesi, 254 nm ve 366 nm dalga boylarındaki UV ışık altında incelenerek ve Dragendorff alkaloit belirtecini plağın çok ince bir kısmına püskürtülerek yapılmaktadır. Plaktan kazıyarak alınan bantlar kloroform-metanol (8:2) çözücü sistemiyle elüe edilmektedir. Alçak basınç altında distile edilerek çözücü uzaklaştırılıp, bileşikler amorf halde elde edilmektedir. Bunun ardından gerektiğinde kristalizasyon işlemi de uygulanmaktadır.

4.2.6. Kristalizasyon

Fraksiyonların saflaştırılmaları sırasında ve bileşiklerin saf olarak elde edilebilmeleri için kristalizasyondan da faydalanılmaktadır. Alkaloitlerin kristal halde iken daha stabil olması nedeniyle; elde edilen amorf bileşiğin, uygun polaritede seçilen az miktarda çözücünde, yüksek sıcaklıkta çözünmesi sağlanarak, hava ve ışıkla teması en az olacak şekilde oda sıcaklığında veya buzdolabında kristallerin oluşması için bir süre bekletilmektedir. Kristaller hızlı bir şekilde önce kendi çözücüsünde, daha sonra ise kristalleri zor çözen veya hiç çözmeyen bir çözücü ile yıkanarak temizlenmektedir. Elde edilen kristallerin saflıkları kromatografik olarak kontrol edilmekte ve safsızlıkları uzaklaştırmak için kristalizasyon işlemi tekrarlanmaktadır.

4.2.7. Saf Halde Elde Edilen Bileşiklerin Tanımlanması

Kromatografik olarak saf halde elde edilen bileşiklerin yapılarının aydınlatılması için çeşitli spektroskopik yöntemlerden [1D NMR (^1H , ^{13}C), 2D NMR (COSY, NOESY, HSQC, HMBC), LC-ESI/MS] yararlanılmaktadır. Bunlara ek olarak optikçe aktif olan bileşiklerin spesifik optik çevirmeleri de ($[\alpha]_D$) ölçülmektedir. Bulguların değerlendirilmesinde literatür bilgilerinden yararlanılmaktadır.

4.2.8. Antikolinesteraz Aktivite Tayini

Mikroplaka deneyinde enzimlerin (asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz), substratları (asetiltiyokolin ve bütiriltiyokolin) kataliz etmesi sonucunda oluşan tiyokolin, Ellman reaktifi olarak bilinen 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile tepkimeye girmekte ve 2-nitrobenzoat-5-merkaptotiyokolin ve sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat oluşturmaktadır. Antikolinesteraz aktivite tayini, tez çalışmamız kapsamında *in vitro* Ellman yöntemi esasına dayalı mikroplaka deneyi (336) esas alınarak yapılmaktadır.

Antikolinesteraz aktivite deneyinde, izole edilen saf maddelerin ve ekstrelerin metanoldeki çözeltileri uygun ve farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış ve reaksiyon sonucunda oluşan 5-tiyo-2-nitrobenzoat bileşiğine ait absorpsiyon, 405 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu cihazı kullanılarak ölçülmektedir. Çözeltilerin renklenme (sarı renk) şiddeti ne kadar düşüğe inhibisyonun derecesi o kadar fazla olmaktadır. Saf bileşiklerin IC_{50} değeri hesaplanmaktadır.

4.3. Deney

4.3.1. Alkaloit Ekstraksiyonu

Bitkinin soğan ve toprak üstü kısımları karıştırılarak elde edilen uygun incelikte toz haline getirilmiş 10,5 kg materyal, oda sıcaklığında çözücüsü % 96'lık etanol olan perkolasyon yöntemi ile (ort. 20mL/dak akış hızı ile) tüketme sıvısı Dragendorff ve Mayer alkaloit belirteçleriyle reaksiyon vermeyinceye kadar ekstre edildi. Bu esnada toplam 120 litre etanol kullanıldı. Elde edilen etanollü kısımlar alçak basınç altında kuruluğa kadar distillenerek total alkol ekstresi hazırlandı. Total alkol ekstresi önce % 2'lik hidroklorik asit çözeltisiyle sıcak su banyosunda (40-50 °C) çözündürüldü. Daha sonra soğutulurken, çözelti içerisindeki reçine ve buna

benzeyen, asitte çözünmeyen kısımlar katılaştırılıp, süzgeç kağıdından süzülerek uzaklaştırıldı. 350 mL asitli su kullanımından sonra asitlendirme işlemine porsiyonlar halinde % 1'lik hidroklorik asit çözeltisi eklemek suretiyle, asitli sulu çözelti Dragendorff ve Mayer alkaloit belirteçleriyle reaksiyon vermeyinceye kadar devam edildi. Toplamda 8 litre asitli su elde edildi. Bu şekilde elde edilen asitli sulu kısım, % 26'luk amonyum hidroksit çözeltisiyle pH 9-10 olacak şekilde bazik hale getirildi. Alkalileştirme için 250 ml derişik amonyak çözeltisi kullanıldı. Bazik çözeltinin her 1 litresi için 500 mL kloroform kullanılarak yine Dragendorff ve Mayer alkaloit belirteçleriyle reaksiyon vermeyinceye kadar sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutuldu. Kloroformlu kısımlar birleştirilip, susuz sodyum sülfatla suyundan kurtarılıp, süzüldü. Kloroform alçak basınç altında kuruluğa kadar distillendi. Bakiye desikatörde sabit vezne gelinceye kadar bekletilip, tartıldı. Sonuç olarak, 26.45 g ağırlığında % 0.248 verim ile total alkaloit ekstresi elde edilmiş oldu.

4.3.2. Total Alkaloit Ekstresinin Sütun Kromatografisi ile Fraksiyonlandırılması

Silika jel 60 (70-230 Mesh) (Merck)'den 600 g tartıldı ve 1200 mL I no'lu çözücü sistemiyle süspansiyon haline getirildikten sonra 7 cm çapında ve 110 cm yüksekliğindeki cam sütuna dolduruldu. 26 g total alkaloit ekstresi kloroform-metanol (8:2) çözeltisinde çözülüp, 30 g silika jel 60 (70-230 Mesh) (Merck) adsorbanına emdirildi. Karışımın oda sıcaklığında, ara ara karıştırılmak suretiyle çözücüsü uzaklaştırıldı. Bakiye desikatörde kurutuldu. Bu şekilde hazırlanan akıcı toz haline gelmiş ekstre-adsorban karışımı daha önceden silika jel yüklenmiş sütuna katı halde tatbik edildi. Elüsyon, I no'lu çözücü sistemiyle oda sıcaklığında, gündüz dakikada ortalama 80 damla (maksimum 100 damla), gece ise 15-20 damla akış hızında her fraksiyon 500 ml olacak şekilde gerçekleştirildi. İ.T.K.'da görülen alkaloit lekelerinin nitelik ve miktarlarına göre elüsyon çözeltisinin polaritesi metanol eklenerek (%1, % 2, % 5, % 7.5, %10, % 15, % 20) dereceli olarak artırıldı. Son olarak da IX nolu çözücü sistemi geçirilerek ayırım tamamlandı. Elde edilen fraksiyonlar alçak basınç altında distillendikten sonra kalan bakiyeler kloroform-metanol (8:2) karışımının deneysel olarak saptanmış en uygun ve en az miktarında çözüldü. İ.T.K. uygulanması sonucunda elde edilen kromatogramlar, 254 ve 366 nm dalga boyundaki UV ışık altında karşılaştırmalı olarak incelendi. Daha sonra

Dragendorff belirteci püskürtülerek alkaloit lekeleri görünür hale getirildi. Yakın R_f değerine sahip olan ve alkaloit içerikleri bakımından benzer özellik gösteren fraksiyonlar birleştirildi. Alçak basınç altında distillendi, sabit ağırlığa gelinceye kadar desikatörde bekletildi ve tartıldı. Böylece toplamda 185 fraksiyon elde edildi. Sonraki aşamada, benzer olduğu kromatografik çalışmalarla tespit edilen bazı fraksiyonlar çalışma kolaylığı açısından tekrar birleştirilerek; ana fraksiyonlar elde edildi. Bu şekilde elde edilen ana fraksiyonlara ait kodlar, elüsyon için kullanılan çözücü sistemleri ve ana fraksiyonların ağırlıkları Tablo 7 ve Tablo 8’de yer almaktadır.

Tablo 7. Tez Çalışmasında Kullanılan Çözücü ve Çözücü sistemleri

No	Çözücü sistemi
I	Kloroform
II	Kloroform: Metanol (99:1)
III	Kloroform: Metanol (98:2)
IV	Kloroform: Metanol (95:5)
V	Kloroform: Metanol (92.5:7.5)
VI	Kloroform: Metanol (90:10)
VII	Kloroform: Metanol (85:15)
VIII	Kloroform: Metanol (80:20)
IX	Etilasetat:Kloroform:Metanol:Amonyak(5:2:3:2)
X	Benzen: Kloroform:Metanol:Amonyak (7:2:1:1damla)
XI	Benzen: Kloroform:Metanol:Amonyak (6.25:3:0.75:2damla)
XII	Etilasetat:Kloroform:Metanol (6:2:2)
XIII	Etilasetat:Kloroform:Metanol:Asetonitril (5:2.5:2:0.5)
XIV	Etilasetat:Kloroform:Metanol:Amonyak (6:2:2:2)
XV	Etilasetat:Kloroform:Aseton: Metanol:Amonyak (6:2:1.5:0.5:2damla)
XVI	Etilasetat:Kloroform:Metanol:Asetonitril (5:2.5:2:0.5) (Havasına amonyak)

Tablo 8. Ana Fraksiyon Kodları ve Kullanılan Çözücü Sistemleri

Fr. No	Ana Fr. Kodu	Çözücü Sistemi	Miktar (g)
1-10	A	I	1.647
10-31	B	I	3.267
32-50	C	II	1.862
51-53	D	II	0.275
54-57	E	II	0.316
58-61	F	II	0.607
62-80	G	III	1.456
81-83	H	IV	0.780
84-99	I	IV	1.998
100-117	J	V	1.633
117-120	K	V	0.273
121-138	L	VI	0.117
139-157	M	VII	2.489
158-176	N	VIII	0.738
177-184	O	IX	7.526g

TOTAL: 24.984 g total alkaloid ekstresi

4.3.3. Ana Fraksiyonlar Üzerinde Çalışmalar

4.3.3.1. D Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar

Ana kolondan alınan 51-53. fraksiyonlar İTK profillerinin benzer olduğu görüldüğünden dolayı birleştirildi (275.1 mg). Sözü geçen fraksiyon üzerinde preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirildi.

Sabit fazı hazırlamak için 3.5 cm çapında vakum uygulanabilen cam kolon içerisine yaklaşık 8 cm yüksekliğe karşılık gelecek şekilde 30 g silikajel H (Type 60) (5-40 µm) (Merck) dolduruldu. Kromatografide kuru tatbik uygulanmış olup, bunun için çalışılan fraksiyonun tamamı bir miktar kloroform: metanol (8:2) içinde çözündürülüp, 1.2 g silikajel 60 (70-230 Mesh) adsorbanına emdirildi. Adsorban üzerine emdirilen fraksiyon çeker ocak altında ve ışık almayan ortamda ara ara

karıştırılarak tamamen kuru ve akıcı toz haline getirildi. Ardından desikatörde bir süre bekletilerek sabit ağırlığa gelmesi sağlanıp, sonrasında sütuna tatbik edildi. Hareketli faz olarak XV nolu çözücü sistemi kullanıldı.

800-900 mbar ters basınçla dakikada 40-50 damla akış hızı sağlanarak fraksiyonlandırma yapıldı. İTK ile izlenip, benzerliklerine göre gerekli tekrar birleştirmeler yapıldı ve sekiz adet alt fraksiyon elde edildi.

Sütun kromatografisi ile elde edilen alt fraksiyonlara D-1 ve D-8 arasında kodlar verildi. D-6 kodlu alt fraksiyon (75mg), hareketli faz olarak XVI nolu çözücü sisteminin kullanıldığı preparatif İTK ile saflaştırıldı. Bu amaçla 20×20 cm boyutlarında 0.5 mm kalınlığında 3 adet silikajel 60 F₂₅₄ (Merck 5744) kaplı hazır cam plak kullanıldı. Çözücü plağın üzerinde 17 cm yükseldiğinde yürütme işlemine son verildi ve plak çeker ocak altında çözücünün uzaklaşması için bekletildi. UV lamba yardımı ile plak incelenip, bileşiklere ait lekeler kurşun kalemle işaretlendi. Plağın yan kısmından bir parça kesilerek Dragendorff belirteci püskürtüldü. R_f = 0.42 değerine sahip lekenin plaktan kazınarak kloroform: metanol (8:2) çözücü sistemi ile elüe edilmesi sonucunda 7 mg ağırlığında elde edilen bileşiğe NT6 kodu verildi.

4.3.3.2. F Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar

Ana kolondan alınan fraksiyonlar İTK yardımıyla incelendi ve kromatografik olarak benzer olanlardan 58 ve 61 arası fraksiyonların birleştirilmesine karar verildi(607mg). Birleştirilen bu fraksiyonlar üzerinde preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirildi.

Preparatif sütun kromatografisinde sabit faz olarak 3.5 cm çaplı vakum uygulanabilen özellikteki cam kolona yaklaşık 10-12 cm yüksekliğe karşılık gelecek şekilde 40 gram silikajel H (Type 60) (5-40µm) (Merck) dolduruldu. Fraksiyonun tamamı kloroform: metanol (8:2) çözücü sistemi ile çözündürülerek 1, 50 g silikajel 60 (70-230 mesh) üzerine damla damla ilave edilip eş zamanlı karıştırılarak emdirildi. Fraksiyon-adsorban karışımı serin, kuru ve karanlık ortamda ara sıra karıştırılarak çözücünün tamamen uzaklaşması ve kuru akıcı homojen toz haline gelmesi sağlandıktan sonra bir süre desikatörde bekletildi ve ardından kolona tatbik edildi.

Hareketli faz olarak X nolu çözücü sistemi kullanıldı. 800-900 mbar basınç altında dakikada 40-50 damla akış hızı sağlanacak şekilde ayarlanan sistemden 30'ar

mL hacimlerde toplamda 28 adet fraksiyon alındı. İTK ile inceleme sonucu benzer olduğu tespit edilen alt fraksiyonlar kendi arasında geri birleştirildi. Bunun sonucunda F-1;F-8 arasında kodlar verdiğimiz 8 adet fraksiyon elde edildi.

F-8 kodlu fraksiyondan (165.6mg) metanolden kristallendirme sonucu 38 mg ağırlığında elde edilen bileşiğe NT1 kodu verildi.

Buna ilaveten, F-8 kodlu fraksiyonda (165.6mg) fraksiyonun 30 mg'lık kısmı alındıktan sonra preparatif İTK yöntemiyle ileri saflaştırmaya gidildi. Sabit faz olarak bir adet 20×20 cm silikajel 60 F₂₅₄ kaplı 0.5 mm kalınlığında hazır cam plak kullanıldı. XIV nolu çözücü sisteminin alt fazının hareketli faz olarak uygulandığı ince tabaka kromatografisi işleminde bantların kesin olarak ayrılmasını sağlamak için iki developman yapıldı. UV ışık altında incelenip, plaktaki lekelerin kurşun kalemle işaretlenmesinden sonra plağın bir bölümü kesilerek iyot buharıyla doymuş tankta bekletildi ve renklenmeler görüldü. Referans olarak tatbik ettiğimiz NT1 bileşiğine çok yakın bir R_f değerine sahip olan (R_f = 0.344) 2 mg ağırlığındaki bileşiğe NT3 kodu verildi.

4.3.3.3. H Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar

Ana kolondan alınan fraksiyonlardan İTK ile inceleme sonucu benzer olduğu belirlenen 81-83. fraksiyonlar birleştirildi (618mg) ve preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirildi.

Sabit faz olarak 30 cm yüksekliğe kadar silikajel H (Type 60) (5-40µm) (Merck) ile doldurulmuş 3.5 cm çaplı normal cam kolon kullanıldı. Hareketli faz olarak XI nolu çözücü sistemi kullanıldı. Dakikada 70 damla akış hızı ile tüplerde 30'ar mL alınan fraksiyonlar eş zamanlı olarak İTK'da, aynı çözücü sistemi ile izlendi. Kromatografik benzerliklerine göre birleştirme sonucunda toplamda 28 alt fraksiyon elde edildi. Bu alt fraksiyonlara H-1-H-28 arasında kodlar verildi.

H-18 kodlu alt fraksiyona (32 mg) preparatif İTK uygulandı. 0.25 mm kalınlığında 20×20 cm boyutlarında silikajel 60 F₂₅₄ kaplı standart İTK plaklarından (Merck 5715) iki adedinin kullanıldığı kromatografi işleminde hareketli faz olarak XIV nolu çözücü sisteminin alt fazından yararlanıldı. Plağın en üst noktasına yaklaşık 3 cm kala yürütme işlemine son verilmiş; tanktan çıkarılan plak çeker ocak altında çözücü buharının uçması için beklemeye bırakıldı. Ardından UV lamba

altında incelenen lekeler kurşun kalemle işaretlendi ve plağın bir kısmı iyot buharı ile doymuş tank içerisine bırakılarak alkaloit lekelerinin belirmesi sağlandı. Hedeflenen lekeye karşılık gelen R_f değeri bu çözücü sistemi için 0.383 bulunmuş olup plaktan kazındı.

Kloroform: metanol (8:2) karışımı ile elüe edilip, çözücü rotavaporda alçak basınç altında uzaklaştırıldı. Desikatörde bekletildikten sonra tartılan 10 mg ağırlığında olduğu tespit edilen bu bileşiğe NT5 kodu verildi.

4.3.3.4. I Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar

Ana kolondan alınan fraksiyonlarda İTK ile inceleme sonucu benzer olduğu belirlenen 84-99. fraksiyonlar birleştirildi (5.36 g). Bu işlem sırasında çökelti oluşturan maddenin saflığı kromatografik olarak incelendi. Kloroform yardımıyla temizleme işlemi sonucunda elde edilen 12.5 mg ağırlığında optikçe aktif bu bileşiğe NT2 kodu verildi.

4.3.3.5. J Kodlu Ana Fraksiyon Üzerinde Çalışmalar

Ana kolondan alınan fraksiyonlarda İTK ile inceleme sonucu benzer olduğu belirlenen 100-117. fraksiyonlar birleştirildi (1.633 g), preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirildi. Püskürtülen Dragendorff belirteci ile renklenen alkaloitlerin izole edilmesi amacıyla kurulan kromatografi düzeneğinde sabit faz olarak 3.5 cm çaplı vakum uygulanabilen özellikteki cam kolona yaklaşık 10-12 cm yüksekliğe karşılık gelecek şekilde 40 gram silikajel H (Type 60) (5-40 μ m) (Merck) dolduruldu. Fraksiyonun tamamı kloroform: metanol (8:2) çözücü sistemi ile çözündürülerek 1.60 g silikajel 60 (70-230 mesh) üzerine damla damla ilave edilip eş zamanlı karıştırılarak emdirildi. Serin, kuru ve karanlık ortamda ara ara karıştırılarak çözücünün tamamen uzaklaşması ve karışımın kuru, akıcı, homojen toz haline gelmesi sağlandıktan sonra fraksiyon-adsorban karışımı bir süre desikatörde bekletildi ve ardından kolona tatbik edildi.

Hareketli faz olarak XV nolu çözücü sistemi kullanıldı. 800-900 mbar ters basınçla dakikada 40-50 damla akış hızı sağlanarak 30'ar mL hacimli fraksiyonlar alındı. İTK ile izlenip, benzerliklerine göre fraksiyonlar gerekli birleştirmeler yapıldıktan sonra elde edilen alt fraksiyonlara J-1-J-10 arasında kodlar verildi.

J-3 kodlu fraksiyonda (121.1mg) asetondan kristallendirme ile 20 mg elde edilen bu bileşiğe NT4 kodu verildi.

J-10 kodlu fraksiyondan (500mg) VIII nolu çözücü sistemi ile aktarma sırasında doğrudan balon dibinde çökelti oluşturan 5 mg ağırlığındaki bileşiğe NT7 kodu verildi.

J-5 kodlu fraksiyonda (197.9mg) ileri saflaştırmaya gidildi; silikajel H (Type 60) (5-40 μ m) (Merck) sabit faz ve XII nolu çözücü sistemi hareketli faz olarak kullanılarak preparatif sütun kromatografisi uygulandı. Eş zamanlı olarak İTK ile izlenip, benzerliklerine göre fraksiyonlarda gerekli birleştirmeler yapıldığında 15 alt fraksiyon elde edildi. 12 nolu alt fraksiyondan aseton ile kristallendirme sonucu 5 mg ağırlığında elde edilen bileşiğe NT8 kodu verildi.

4.3.4. Mikroplaka Deneyi ile Ekstre ve Saf Maddelerin Antikolinesteraz Aktivitelerinin Tayini

Saf halde elde edilen bileşiklerin metanol içerisinde ve konsantrasyonları 1000, 100, 10, 1, 0.1 ve 0.01 μ g/mL olacak şekilde çözeltileri hazırlandı. Bileşiklerin çözeltileri 96 kuyucuklu mikroplakaya uygulanıp, absorbansları 405 nm dalga boyunda mikroplaka okuyucu kullanarak ölçüldü. Buna göre, toprak üstü ve soğan kısımlarından elde edilen ekstrelerin yüzde inhibisyon değerleri ve saf bileşiklere ait IC₅₀ değerleri GraphPad Prism V3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) programı kullanılarak hesaplandı.

5. İzole Edilen Alkaloidler Üzerinde Moleküler Doking Çalışmaları

5.1. Gereç

Homoloji modeli oluşturmak için, *Equus caballus* (at) butirilkolinesteraz (eqBuChE) enzimine ait Q9N1N9 kodlu aminoasit dizisi UniProt Knowledgebase (<http://www.uniprot.org/uniprot>) adresinden temin edilmiştir. Homoloji model için kalıp yapı olan insan butirilkolinesteraz (huBuChE) enzimi (PDB id: 4TPK; 2.7 Å'da çözümlenmiştir) ile *Torpedo californica* asetilkolinesteraz (eeAChE) enziminin kristal yapılarının (PDB id: 1EVE; 2.5 Å'da çözümlenmiştir) üç boyutlu haritaları

“RCSB Protein Veri Bankasından” temin edilmiştir. Homoloji model SWISS-MODEL web sunucusu ile oluşturulmuş ve doking çalışması için Amber 12 programı kullanılarak hazırlanmıştır. İzole edilen alkalolitler ve *ee*AChE doking çalışması için MOE2016.08 programı ile hazırlanmıştır. Doking çalışmaları GOLD 5.6.2 programı kullanılarak yapılmıştır. Doking sonuçlarının analizi ve doking pozlarının oluşturulması MOE2016.08 programı ile gerçekleştirilmiştir.

5.2. Yöntem ve Deney

Homoloji modelleme yöntemi, bilinen yapısı (şablonu) olan benzer bir proteinle bir hizalama temelinde aminoasit dizisinden bir proteinin (hedef) üç boyutlu modellerini oluşturma esasına dayanmaktadır. Uygun şablon yapısının belirlenemediği durumlarda, homolog bir şablon yapısına dayanmadan üç boyutlu protein modelleri üretmek için de novo yapı tahmin yöntemleri kullanılabilir. Bununla birlikte, alandaki son gelişmelere rağmen, de novo tahminleri nispeten küçük proteinlerle sınırlıdır ve karşılaştırmalı modellere kıyasla doğruluk açısından yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, homoloji modelleme, şablon yapılarının tanımlanabileceği tüm durumlarda güvenilir üç boyutlu bir proteinin siliko modelini oluşturmak için bir tercih edilen bir yöntemdir. Homoloji modelleme genel olarak dört ana basamaktan oluşur. Bunlar sırasıyla; ilgili hedef proteinin modellenmesi için şablon olarak kullanılabilecek deneysel olarak çözülmüş yapılar ile evrimsel olarak ilişkili proteinlerin tanımlanması; sekans hizalama yöntemleri ve manuel ayarlama aracılığıyla hedef sekansın ve şablon yapısının/yapılarının karşılık gelen kalıntılarının haritalanması; üç boyutlu modeli hizalama temelinde inşa edilmesi; ve ortaya çıkan modelin kalitesini değerlendirmesi şeklindedir(337).

Doking yöntemi, ligandın protein içerisindeki konumu ve yönelimi ile birlikte konformasyonunun tahmini, ve ligandın bağlanma afinitesinin değerlendirilmesini sağlar. Esas olarak, moleküler doking tekniğinin amacı hesaplama yöntemleri kullanılarak tahminini bir ligand-reseptör kompleks yapısının oluşturulmasıdır. Doking, birbiriyle ilişkili iki adımda gerçekleştirilir. Bu adımlar sırasıyla, proteinin aktif bölgesinde ligandın konformasyonlarının örneklenmesi ve devamında bu konformasyonların bir skarlama fonksiyonu ile sıralaması şeklindedir. İdeal bir çalışmada, örnekleme algoritmaları deneysel bağlama modunu yeniden üretebilmeli ve skarlama fonksiyonu da yaratılan tüm konformasyonlar arasında en üst sırada yer almalıdır(325).

SLogP, örtülü hidrojenlerin dahil olduğu oktanol/su partiyon katsayısının logaritma değerini ifade eder. Bu yöntem doğru protonasyon bölgesi bulunan yapıların logP değerlerinin hesaplayan atomik katkı modeline dayanmaktadır. Atomik katkı modelinde moleküldeki her bir atomun katkılarının toplamı ile moleküllerin logP değeri hesaplanabilir. Bu yöntemde 68 adet atom tipi katkısı logP hesaplanmasına yardımcı olur(338).

5.2.1. Homoloji Modelleme

Taslak model olarak “RCSB Protein Veri Bankasından” *eqBuChE* ile primer sekans benzerliği % 90.80 olan insan butirilkolinesteraz (*huBuChE*) enzimine (PDB id: 4TPK; 2.7 Å’da çözümlenmiştir) ait pdb dosyası seçilmiş ve SWISS-MODEL web sunucusu kullanılarak homoloji model oluşturulmuştur (339).

Oluşturulan homoloji modelin bağlanma bölgesi ham model ile *huBuChE* kristal yapısının (PDB id: 4TPK) hizalanmasıyla belirlenmiştir. Ham model Amber Tools 16’nın xleap modülü ile AMBER99SB güç alanı şartları altında protein yüzeyi ve kutu sınırı arasındaki mesafenin 10 Å olduğu bir oktahedral kutu içerisinde TIP3P su molekülleri ile çözündürülerek hazırlanmış ve Amber 12 programının “Sander.MPI” modülü ile enerji minimizasyonuna tabi tutulmuştur (340, 341).

5.2.2. Doking Protokolü

Bileşiklerin kimyasal yapıları MOE2016.08 programının bileşik oluşturma paneli kullanılarak oluşturulmuş, üç boyutlu protonlandırma protokolü kullanılarak bileşiklerin hidrojenleri eklenmiş ve oluşturulan yapılar MMFF94x güç alanı kullanılarak MOE2016.08 programı ile enerji minimizasyonuna tabi tutulmuştur (342, 343). *Torpedo californica* asetilkolinesteraz (*eeAChE*) enziminin kristal yapısı (PDB id: 1EVE; 2.5 Å’da çözümlenmiştir) RCSB Protein Veri Bankasından elde edilmiştir (344). Kristal yapının A zinciri doking çalışması için korunmuştur. B zinciri, heteroatomlar ve su molekülleri (bağlanma bölgesindeki su molekülleri hariç) pdb dosyasından silinmiştir. A zinciri AMBER12SB güç alanı şartları altında MOE.2016.08 programında enerji minimizasyonuna tabi tutulmuştur (345).

Çalışmada izole etmiş olduğumuz alkoloitlerin, galantamin dışında, asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimleri içerisindeki çözümlenmiş X-ray kristal yapısı mevcut değildir. Bileşiklerin doking çalışmaları varsayılan jenerik

algoritma parametreleri kullanılarak GOLD 5.6.2 programı ile gerçekleştirilmiştir (346, 347). Bileşikler, sırasıyla *eeAChE* aktif yöresinde bulunan Glu199 aminoasit artığının oksijen atomunu (OE1) ve *eqBuChE* aktif yöresinde bulunan His438 aminoasit artığının nitrojen atomunu (NE2) merkez alan 22 Å yarıçapına sahip alan içerisindeki aminoasit artıkları ile etkileşimlerini belirlemek amacıyla doking işlemine tabi tutulmuştur. Her bir yapı için MOE2016.08 programı ile elli adet konformasyon oluşturulmuş olup, skarlama fonksiyonu olarak GoldScore uygunluk fonksiyonu kullanılmıştır (347).

5.2.3. SlogP Değerlerinin Belirlenmesi

Bileşiklerin SLogP değerleri MOE2016.08 programı kullanılarak hesaplanmıştır (338).

III. BÖLÜM

BULGULAR

1. Kalite Kontrol ve Miktar Tayini Araştırmalarına Ait Bulgular

1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları

NTA VE NTÜ kodlu örnekler üzerinde, Avrupa Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde bulunan yöntem kullanılarak üç paralel deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, Tablo 9'da yer almaktadır.

Tablo 9. *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. Bitkisinden Hazırlanan Örnekler Üzerinde Yapılan Kurutmada Kayıp Miktar Tayini Sonuçları

NTÜ Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar		NTA Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar	
Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı	Drog Miktarı (g)	% Kurutmada Kayıp Miktarı
1.002	7.9546	1.003	8.2301
1.012	8.1223	1.005	7.5674
1.007	7.1207	1.008	7.9756
Ortalama:	7.7325	Ortalama:	7.9243

1.2. Bütün Kül Miktar Tayini Sonuçları

NTA ve NTÜ kodlu örnekler üzerinde, Avrupa Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde bulunan yöntem kullanılarak üç paralel deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, aşağıda Tablo 10'da yer almaktadır.

Tablo 10. *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. Bitkisinden Hazırlanan Örnekler Üzerinde Yapılan Bütün Kül Miktar Tayini Sonuçları

NTÜ Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar		NTA Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar	
Drog Miktarı (g)	% Bütün Kül Miktarı	Drog Miktarı (g)	% Bütün Kül Miktarı
1.0065	8.4943	1.0074	8.7354
1.0035	7.9521	1.0022	9.0875
1.0037	8.2396	1.0026	9.1964
Ortalama±Std sapma	8.2286±2.7123	Ortalama±Std sapma	9.0064±2.4095

1.3. Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları

NTA ve NTÜ kodlu örnekler üzerinde, Avrupa Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde bulunan yöntem kullanılarak üç paralel deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 11'de yer almaktadır.

Tablo 11. *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. Bitkisinden Hazırlanan Örnekler Üzerinde Yapılan Sülfat Külü Miktar Tayini Sonuçları

NTA Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar		NTÜ Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar	
Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı	Drog Miktarı (g)	% Sülfat Külü Miktarı
1.021	18.8621	1.008	18.9506
1.025	18.5594	1.013	20.0398
1.003	20.7513	1.002	17.9214
Ortalama±Std sapma	19.3909±11.8779	Ortalama±Std sapma	18.9706±0.0055

1.4. Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini Sonuçları

NTA ve NTÜ kodlu örnekler üzerinde, Avrupa Farmakopesi ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde bulunan yöntem kullanılarak üç paralel deneme yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, aşağıda Tablo12'de yer almaktadır.

Tablo 12. *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. Bitkisinden Hazırlanan Örnekler Üzerinde Yapılan Hidroklorik Asitte Çözünmeyen Kül Miktar Tayini Sonuçları

NTÜ Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar		NTA Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar	
Drog Miktarı (g)	% HCl'de Çözünmeyen Kül Miktarı	Drog Miktarı (g)	% HCl'de Çözünmeyen Kül Miktarı
1.0065	1.5025	1.0074	1.5112
1.0035	1.4872	1.0022	1.1049
1.0037	1.4934	1.0026	1.4986
Ortalama±Std sapma	1.4943±0.0769	Ortalama±Std sapma	1.3715±2.3102

1.5. Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları

Anabilim Dalımızda daha önce DAB ve Avrupa Farmakopesi'nde yer alan drog monograflarından yararlanarak geliştirilmiş olan yöntem kullanılmıştır (348). NTA ve NTÜ kodları verilen örneklerin her birinden ayrı ayrı beş paralel deneme olacak şekilde miktar tayini çalışması yapılmıştır. Sonuçlar, kuru drogda likorin üzerinden yüzde olarak hesaplanmıştır.

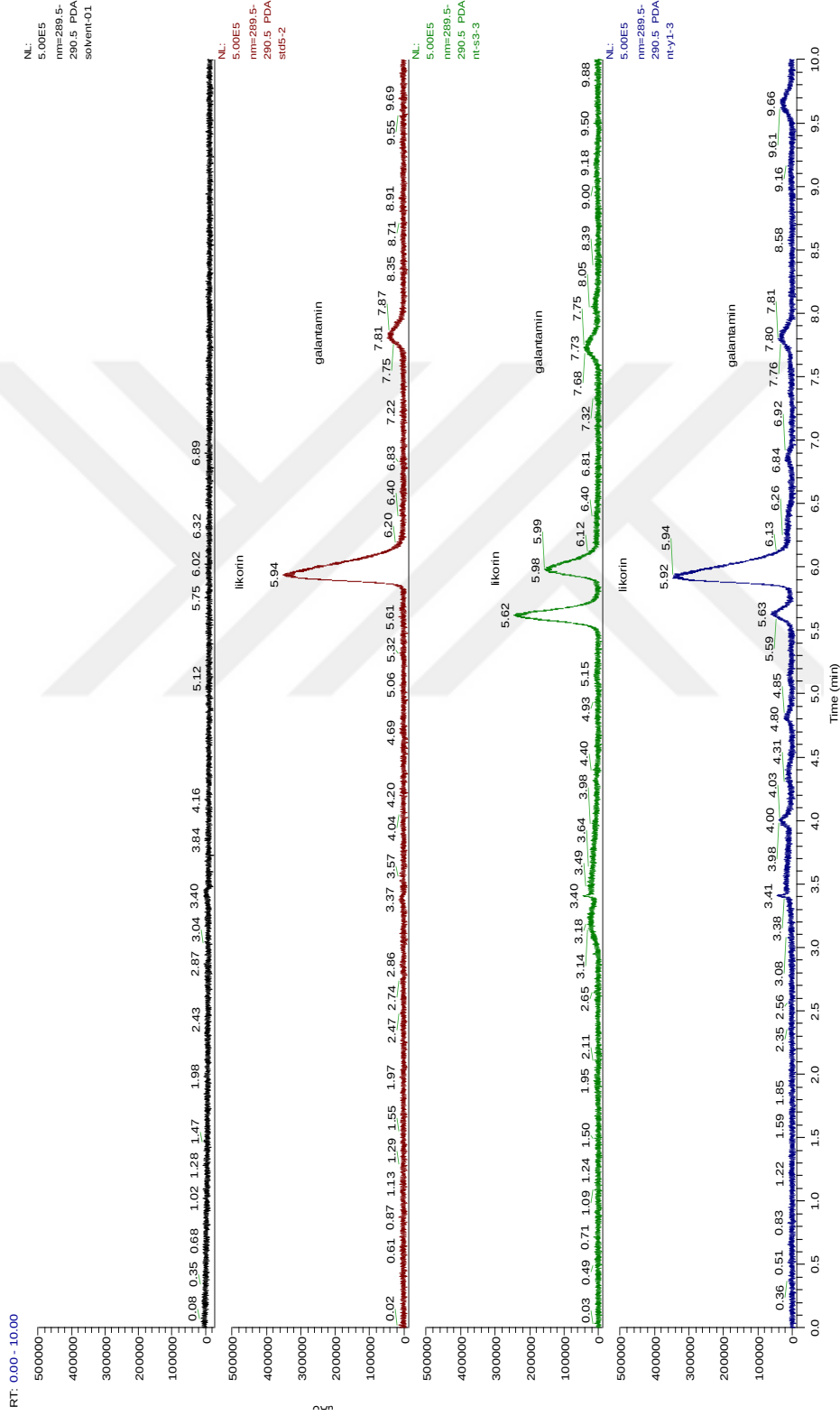
Tablo 13. NTÜ Kodlu Örneğe Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları

NTÜ Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar				
Drog Miktarı (g)		% Total Alkaloit Miktarı		
3.009		0.1184		
3.002		0.1196		
3.003		0.1179		
N	Ortalama	Standart Sapma	Min. Değer	Max. Değer
3	0.1186	0.0004	0.1179	0.1196

Tablo 14. NTA Kodlu Örneğe Ait Total Alkaloit Miktar Tayini Sonuçları

NTA Kodlu Örneğe Ait Sonuçlar				
Drog Miktarı (g)		% Total Alkaloit Miktarı		
3.001		0.0667		
3.003		0.0667		
3.004		0.0666		
N	Ortalama	Standart Sapma	Min. Değer	Max. Değer
3	0.0667	<0.0001	0.0666	0.0667

1.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Likorin ve Galantamin Alkaloitlerinin Teşhis ve Miktar Tayini Sonuçları ve Yöntemin Validasyonu



Şekil 1. Standart Maddeler ve Örneklere ait Kromatogram

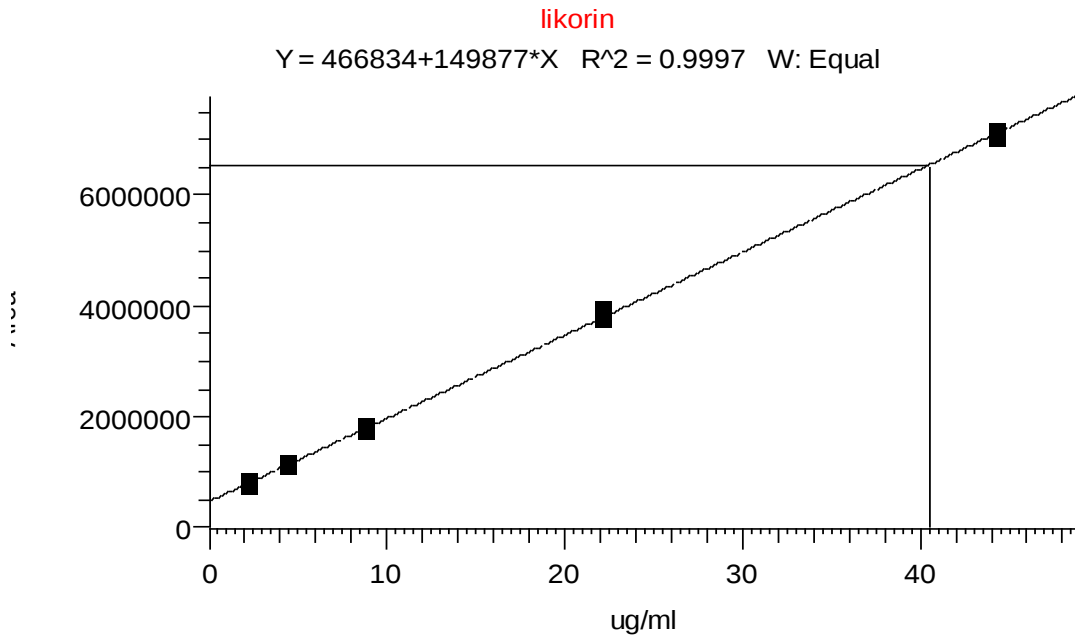
R_t Likorin = 5.98; R_t Galantamin = 7.78 (dakika)

1.6.1. Likorinin HPLC ile Miktar Tayini Prosedür Verileri

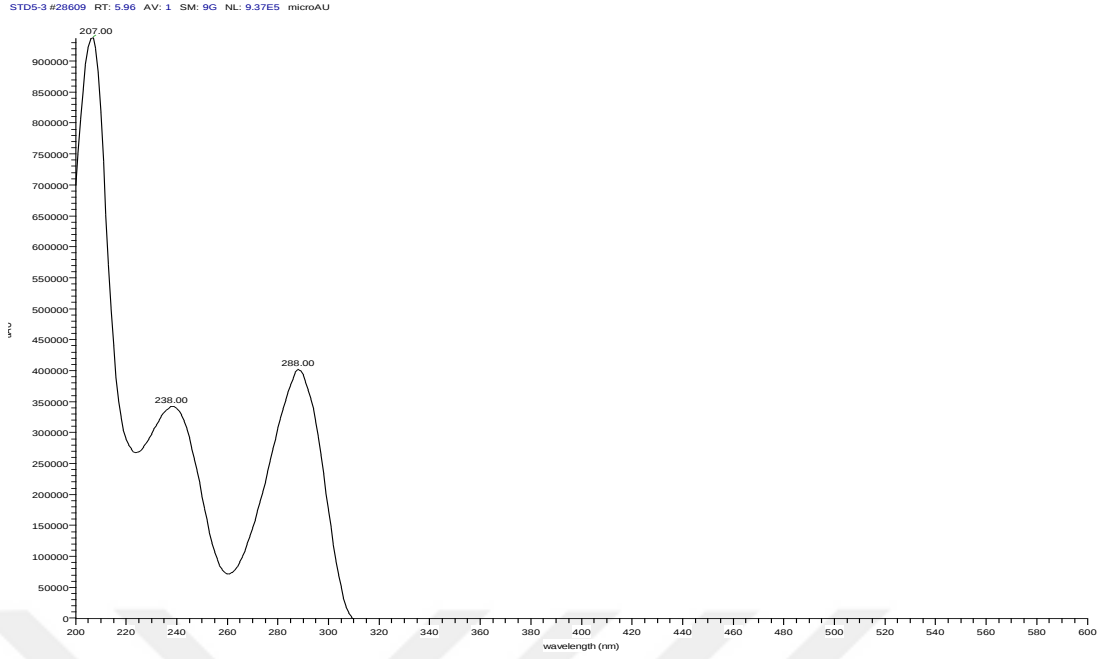
HPLC yöntemini kullanarak drogdaki likorin miktarını belirlemek için kullandığımız standart çözelti konsantrasyonları ve karşılık gelen alan değerleri tablo 15'te verilmiştir. Bu değerler üzerinden kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve regresyon analizi yapılmıştır.

Tablo 15. Likorinin HPLC ile Miktar Tayini Verileri

Konsantrasyon (µg/mL) (Likorin Hidroklorür)	Konsantrasyon (µg/mL) (Tuz tartımına karşılık gelen baz haldeki Likorin)	Alan Değerleri (cm ²)
2.5	2.219	787023
5	4.437	1128039
10	8.874	1789855
25	22.185	3833280
50	44.370	7098570



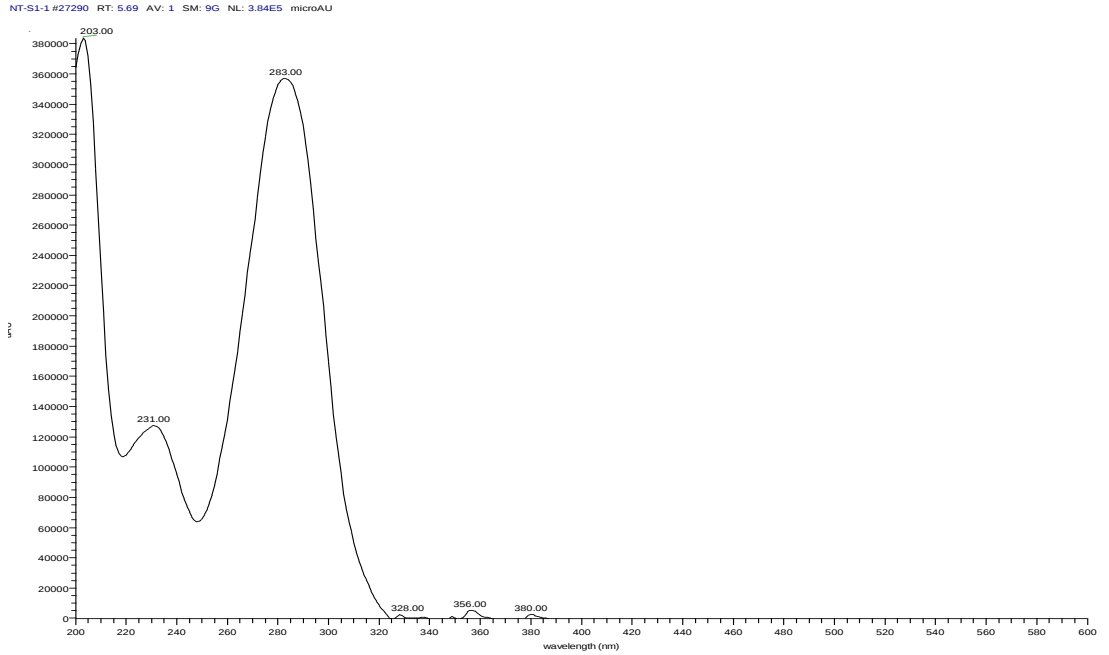
Şekil 2 Likorin Standart Ölçü Eğrisi ve Regresyon Denklemi



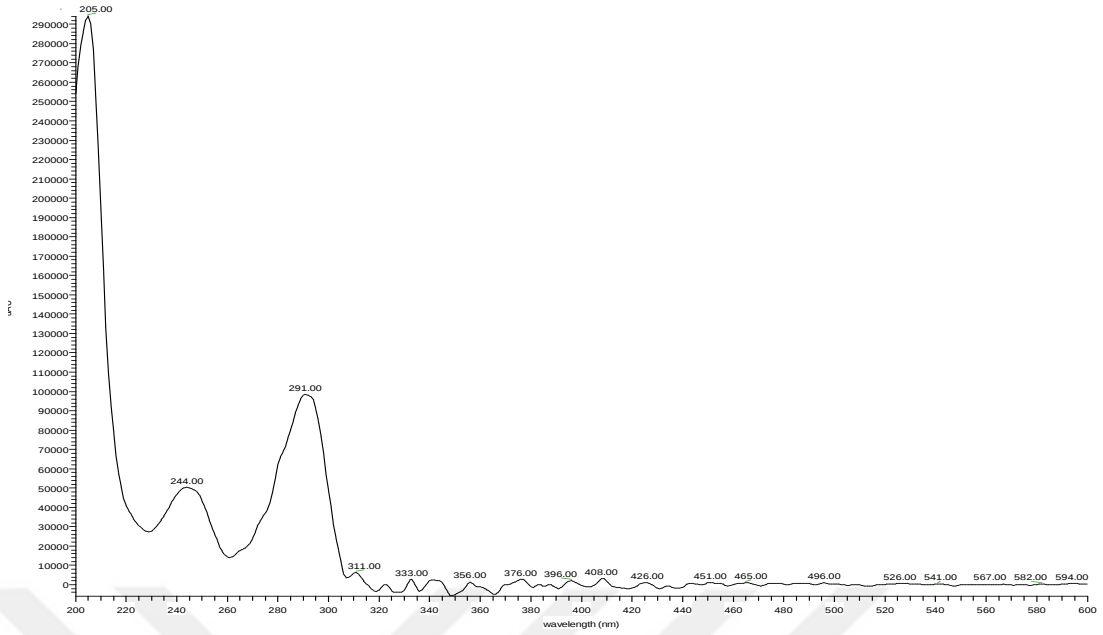
Spektrum 1. Standart Likorine Ait UV Spektrumu

1.6.2. Ekstrelelere Ait Likorin Miktar Tayini Bulguları

Ekstrelerde bulunan likorine ait UV spektrumları Spektrum 2. ve Spektrum 3'te yer almaktadır.



Spektrum 2. NTA Kodlu Örnekteki Likorine Ait UV Spektrumu



Spektrum 3. NTÜ Kodlu Örnekteki Likorine Ait UV Spektrumu

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenen % likorin miktarları Tablo 16 ve Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 16. NTA kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile likorin miktar tayini verileri

Drog	Drog Miktarı (mg)	Okunan Alan Değerleri	Hesaplanan Miktar (mcg)	% Likorin Miktarı
NTA ₁	200	2711728	14.978	0.02496
		2703888	14.926	0.02493
		2701034	14.907	0.02489
NTA ₂	200	2708022	14.953	0.02497
		2721365	15.043	0.02513
		2711759	14.978	0.02501

Tablo 16'nın Devamı. NTA kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile likorin miktar tayini verileri

Drog	Drog Miktarı (mg)	Okunan Alan Değerleri	Hesaplanan Miktar (mcg)	% Likorin Miktarı
NTA ₃	200	2712502	14.983	0.02502
		2714784	14.999	0.02504
		2699473	14.896	0.02487

Tablo 17. NTA Kodlu Örnek Üzerinde HPLC Yöntemi ile Likorin Miktar Tayini Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Ort.	St. Sapma ($\times 10^{-5}$)	Min.	Max.
9	0.02498	8.0467	0.02487	0.02513

Tablo 18. NTÜ kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile likorin miktar tayini verileri

Drog	Drog Miktarı (mg)	Okunan Alan Değerleri	Hesaplanan Miktar (mcg)	% Likorin Miktarı
NTÜ ₁	200	6472658	40.072	0.06692
		6500850	40.260	0.06723
		6470336	40.056	0.06689

Tablo 18'in Devamı. NTÜ kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile likorin miktar tayini verileri

Drog	Drog Miktarı (mg)	Okunan Alan Değerleri	Hesaplanan Miktar (mcg)	% Likorin Miktarı
NTÜ ₂	200	6544480	40.551	0.06772
		6534591	40.485	0.06761
		6532041	40.468	0.06758
NTÜ ₃	200	6479231	40.115	0.06699
		6477854	40.106	0.06698
		6489565	40.184	0.06711

Tablo 19. NTÜ Kodlu Örnek Üzerinde HPLC Yöntemi ile Likorin Miktar Tayini Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Ort.	St. Sapma ($\times 10^{-5}$)	Min.	Max.
9	0.06723	32.7	0.06689	0.06772

1.6.3. Likorin Miktar Tayininin Validasyonu

ICH'ye göre (349) yöntem geçerlilik parametrelerini içeren yöntem validasyon çalışmasına ait sonuçlar aşağıda verilmektedir.

1.6.3.1. Özgüllük (Seçicilik)

Olması beklenen diğer bileşenlerin varlığında analitin tam olarak değerlendirilebilmesi bu parametrenin temelini oluşturmaktadır. Bu parametrede analite yapıcı yakın olan başka moleküllerin varlığında da yöntemin ayrımı net olarak yapabilmesi esastır (349). Likorin standartlarına ve örneğe ait kromatogramda

da görüldüğü üzere, kolondan likorinin alıkonma zamanında likorin dışında başka bir molekül gelmemektedir. Likorin piki herhangi bir pikle girişim yapmamaktadır. Alıkonma zamanı ($R_t=5.91-6.05$) aralığında likorin pikinin tamamını net şekilde kromatogramda izleyebilmemiz yöntemin likorine özgüllüğünü göstermektedir.

1.6.3.2. Doğrusallık ve Tayin Aralığı

ICH kılavuzunda doğrusallığın kontrolü için en az beş konsantrasyon gerekli olduğundan (349) standart likorin çözeltileri beş ayrı konsantrasyonda hazırlanmış ve her bir konsantrasyon üzerinde HPLC cihazı ile üçer kez ölçüm yapılmıştır. Likorin konsantrasyonuna karşılık pik alanını veren kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır.

Tayin aralığı, örnek içindeki analitin, tanımlanan doğruluk ve kesinlik parametrelerinde tayin edilebilen üst ve alt derişimleri arasındaki aralıktır. Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük derişimden, doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime kadar olan derişim aralığını kapsar (349). Çalıştığımız konsantrasyonlar doğrusallık açısından kabul edilebilir olduğundan, maliyeti de düşünülerek, tüm tayin aralığını belirlemeye gidilmemiştir.

1.6.3.3. Doğruluk (Gerçeklik)

Kesinlik, doğrusallık ve özgüllük parametrelerinin sağlandığı koşullarda doğruluk parametresi de sağlanmış kabul edilmektedir. Kullanmış olduğumuz yöntem likorin için kesinlik, doğrusallık ve özgüllük parametrelerini sağlamaktadır. Buna ek olarak geri kazanım çalışması yapılmış ve sonuçları bağıl hatalarıyla birlikte Tablo 20’de verilmiştir. Sonuçlar, ilave edilen ve ölçülen likorin miktarları ile karşılaştırmalı olarak verilmiş, ölçülen değerlerin, doğru olduğu kabul edilen değerlere yakınlığı değerlendirilmiştir.

Tablo 20. *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. Örneği Üzerinde Yapılmış Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

Örnekteki likorin miktarı (µg/mL)	Örneğe eklenen likorin miktarı (µg/mL)	Örnekten geri alınan miktar (µg/mL)	Geri Kazanım (%)±STD	RSD (%)
15	7.5	22.272	99.64±0.28	1.2
		22.635		
		22.596		
		22.474		
		22.037		
		22.026		
		22.237		
		22.792		
		22.696		
15	15	29.721	98.97±0,29	0.98
		29.735		
		29.823		
		29.784		
		29.978		
		29.901		
		29.183		
		29.871		
		29.213		
15	30	44.347	98.37±0,16	0.37
		44.413		
		-		
		44.063		
		44.302		
		44,473		
		44.199		
		44.338		
		44.013		

1.6.3.4. Kesinlik

Kesinlik; gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik olmak üzere üç seviyede ifade edilebilen bir parametredir. ICH kılavuzunda en az 9 ölçüm üzerinden verilmesi gerektiği bildirilmiştir(en az 3 farklı konsantrasyon üzerinde 3 tekrar ölçümü şeklinde) (349). Bu çalışmada günler arası tekrarlanabilirliğin ifade edilmesi için beş farklı konsantrasyonda hazırlanmış likorin çözeltisi üzerinde 3'er kez ölçüm yapılmıştır. Birbirini takip eden iki gün aynı laboratuvar koşulları ve aynı cihaz ile ölçüm tekrarlanarak verileri kaydedilmiş ve her iki gün elde edilen veriler için ayrı ayrı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Veriler arasındaki ortalama, standart sapma (SD) ve % bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 21. Likorin ile Yapılmış Günlerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

1.Gün				2.Gün			
	Konsantrasyon (µg/ml) Likorin (Baz)	Ortalama ±Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)		Konsantrasyon (µg/ml) Likorin (Baz)	Ortalama ±Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)
1	2.122	2.136±0.0515	2.4	1	2.221	2.238±0.0200	0.9
	2.093				2.261		
	2.193				2.232		
2	4.384	4.411±0.0247	0.6	2	4.383	4.378±0.0541	1.2
	4.418				4.322		
	4.432				4.430		
3	8.728	8.827±0.1078	1.2	3	8.717	8.72±0.0641	0.7
	8.942				8.658		
	8.812				8.786		
4	22.301	22.461±0.4695	2.1	4	22.344	22.5±0.2094	0.9
	22.990				22.738		
	22.093				22.418		
5	44.330	44.248±0.3205	0.7	5	44.849	44.248±0.5720	1.3
	44.519				43.710		
	43.894				44.186		

1.6.3.5. Tayin Sınırı (LOD)

Örnek içindeki analitin nicel olarak tam bir değer ifade etmesine gerek olmaksızın tayin edilebilen en düşük miktarına tayin sınırı denmektedir. Tayin sınırının belirlenmesi için enstrümental olan veya olmayan pek çok uygulama vardır. Bu uygulamalardan kabul edilebilir olanlarından biri; sinyal/gürültü (S/G) baz alınarak yapılan hesaplamadır. Bu yaklaşım sadece taban çizgisinde gürültü var olan analitik yöntemler için uygulanabilmektedir (349). Tayin sınırı (LOD) hesaplanırken, likörün için ölçüm yaptığımız en düşük konsantrasyon olan 2.5 µg/mL tuz (2.219 µg/mL baz) derişim üzerinden 10 kez ölçüm yapılmış ve S/G oranları kaydedilmiştir (Tablo 22). Tüm S/G oranlarının ortalaması alınarak, 2.5 µg/mL tuz (2.219 µg/mL baz) konsantrasyonuna karşılık gelen S/G oranı bulunmuştur. Tayin sınırı için tipik S/G oranı 3:1'dir (349). Basit oran orantı hesabı ile S/G oranının 3 olduğu konsantrasyonun teorik olarak bulunması sağlanmıştır.

Tablo 22. Likörün için Tayin Sınırı Belirleme Verileri

Paralel No	Sinyal/Gürültü
1	20.54
2	14.79
3	17.41
4	14.21
5	14.23
6	16.22
7	12.44
8	17.59
9	8.12
10	17.47
Ortalama±STD	15.302±3.4162

$$\text{LOD}_{\text{Likorin}} = 0.4901$$



1.6.3.7. Niceleme Sınırı (LOQ)

Niceleme sınırı bir örneğin içindeki analitin, uygun doğruluk ve kesinlik ile kantitatif olarak tayin edilebileceği en düşük miktardır. Niceleme sınırının belirlenmesi için enstrümental olan veya olmayan pek çok uygulama vardır. Bu uygulamalardan kabul edilebilir olanlarından biri; sinyal/gürültü baz alınarak yapılan hesaplama dır. Bu yaklaşım sadece taban çizgisinde gürültü var olan analitik yöntemler için uygulanabilmektedir(349). Niceleme sınırı (LOQ) hesaplanırken, likorin için ölçüm yaptığımız en düşük konsantrasyon olan 2.5 µg/mL derişimden (2.219 µg/mL baz) 10 kez ölçüm yapılmış ve S/G oranları kaydedilmiştir (Tablo 23). Tüm S/G oranlarının ortalaması alınarak, 2.5 µg/mL konsantrasyona (2.219 µg/mL baz) karşılık gelen S/G oranı bulunmuştur. Niceleme sınırındaki tipik S/G oranı 10:1'dir (349). Basit oran orantı hesabı ile S/G oranının 10 olduğu konsantrasyonun teorik olarak bulunması sağlanmıştır.

Tablo 23. Likorin için Niceleme Sınırı Belirleme Verileri

Paralel No	Sinyal/Gürültü
1	20.54
2	14.79
3	17.41
4	14.21
5	14.23
6	16.22
7	12.44
8	17.59
9	8.12
10	17.47
Ortalama±STD	15.302±3.4162

$$LOQ_{\text{Likorin}}=1.6337$$

1.6.3.8. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, metotta küçük fakat planlanmış değişmelere gidildiğinde, yöntemin değişmeden kalma kapasitesidir ve güvenilirliğin bir göstergesidir (349). Yöntemde geçerli ölçüm sıcaklığı 25 °C iken planlı şekilde 20 °C ve 30 °C'e ayarlanmıştır. Derişimi bilinen beş farklı örneğin ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldığında yöntemin likorin miktar tayini açısından sağlamlığı doğrulanmıştır.

Tablo 24. Likorin Miktar Tayini İçin Kullanılan Yöntemin Sağlamlık Verileri

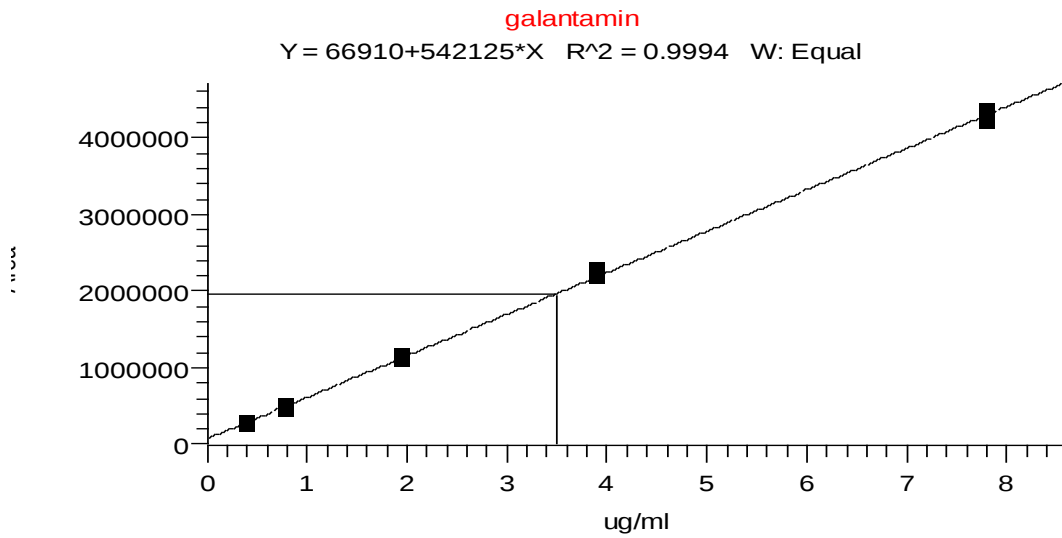
Örnek	Konsantrasyon (µg/mL) 20 °C	Konsantrasyon (µg/mL) 25 °C	Konsantrasyon (µg/mL) 30 °C	Konsantrasyon (µg/mL) Ortalama±STD
1	25.083	25.503	25.003	25.1963±0.2686
2	31.415	31.379	31.017	31.2703±0.2201
3	43.024	44.237	41.167	42.8093±1.5462
4	22.428	22.465	22.542	22.4783±0.0581
5	44.010	44.030	44.017	44.0190±0.0101

1.6.4 Galantaminin HPLC ile Miktar Tayini Prosedür Verileri

HPLC yöntemini kullanarak drogdaki galantamin miktarını belirlemek için kullandığımız standart çözelti konsantrasyonları ve karşılık gelen alan değerleri Tablo 25’te verilmiştir. Bu değerler üzerinden kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve regresyon analizi yapılmıştır.

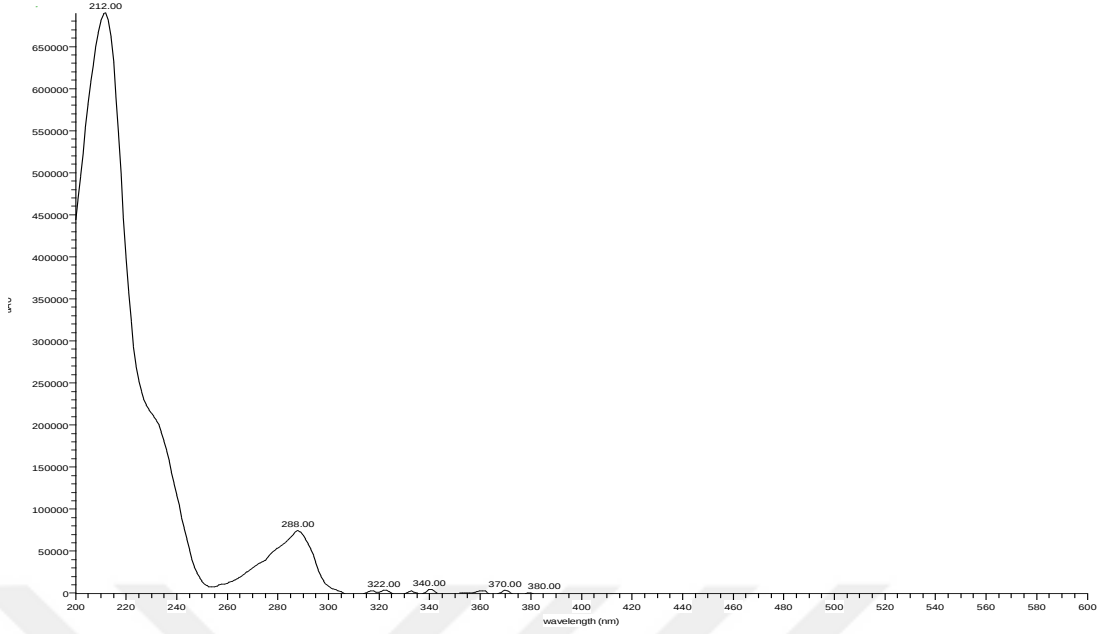
Tablo 25. Galantaminin HPLC ile Miktar Tayini Verileri

Konsantrasyon (µg/mL) (Galantamin Hidrobromür)	Konsantrasyon (µg/mL) (Tuz tartımına karşılık gelen baz haldeki Galantamin)	Alan Değerleri (cm ²)
0.5	0.390	275440
1	0.780	490500
2.5	1.951	1130097
5	3.902	2222804
10	7.803	4275293



Şekil 3. Galantamin Standart Ölçü Eğrisi ve Regresyon Denklemi

STD5-3 #37825 RT: 7.88 AV: 1 SM: 9G NL: 6.89E5 microAU

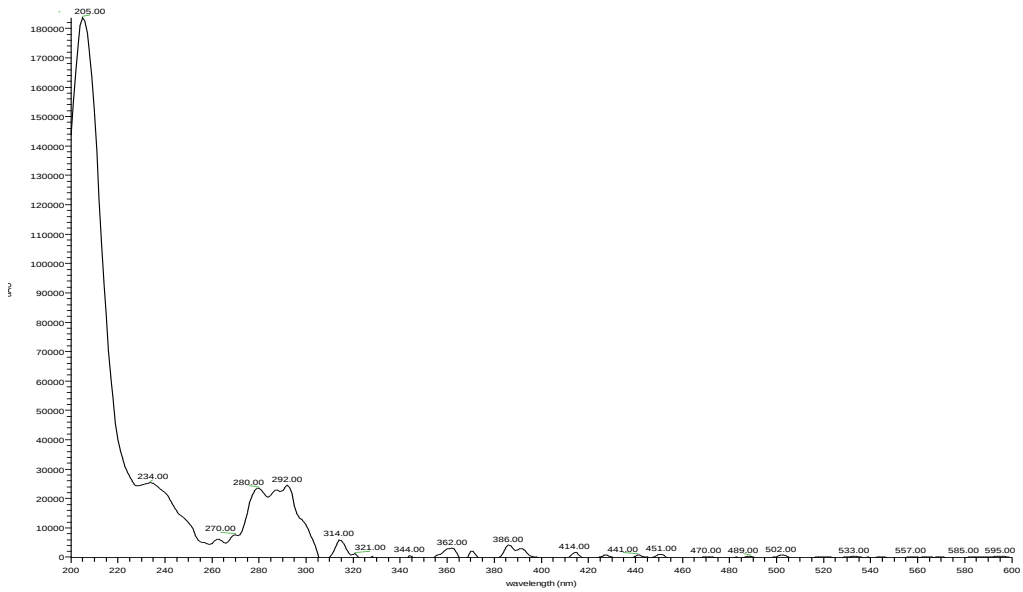


Spektrum 4. Standart Galantamine Ait UV Spektrumu

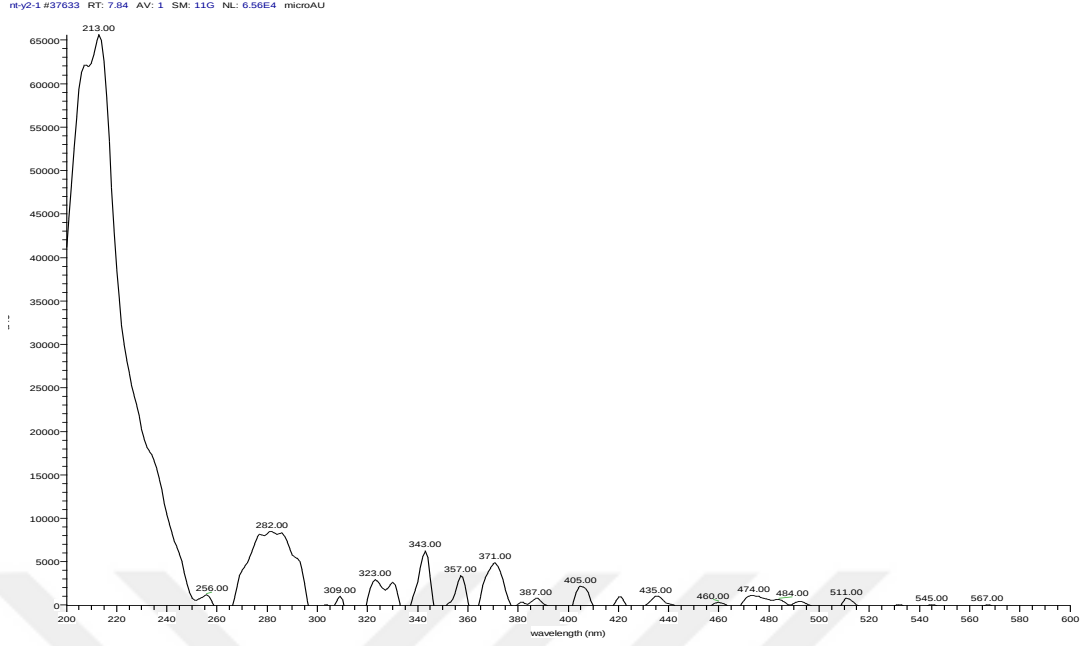
1.6.5. Ekstrelelere Ait Galantamin Miktar Tayini Bulguları

Ekstrelerde bulunan galantamine ait UV spektrumları Spektrum 4. ve Spektrum 5'te yer almaktadır.

NT-S1-1 #37825 RT: 7.88 AV: 1 SM: 9G NL: 1.84E5 microAU



Spektrum 5. NTA Kodlu Örnekteki Galantamine Ait UV Spektrumu



Spektrum 6. NTÜ Kodlu Örnekteki Galantamine Ait UV Spektrumu

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile belirlenen galantamin miktarları Tablo 26’da verilmiştir.

Tablo 26. NTS kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile galantamin miktar tayini verileri

Drog	Drog Miktarı (mg)	Okunan Alan Değerleri	Hesaplanan Miktar (mcg)	% Galantamin Miktarı
NTA ₁	200	1699974	3.012	0.00503
		1693926	3.001	0.00501
		1698833	3.010	0.00503
NTA ₂	200	1715338	3.041	0.00508
		1714436	3.039	0.00507
		1738872	3.084	0.00515
NTA ₃	200	1792179	3.182	0.00531
		1791151	3.181	0.00531
		1777930	3.156	0.00527

Tablo 27. NTA Kodlu Örnek Üzerinde HPLC Yöntemi ile Galantamin Miktar Tayini Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Ort.	St. Sapma ($\times 10^{-5}$)	Min.	Max.
9	0.00514	12.5	0.00501	0.00531

Tablo 28. NTÜ kodlu örnek üzerinde HPLC yöntemi ile galantamin miktar tayini verileri

Drog	Drog Miktarı (mg)	Okunan Alan Değerleri	Hesaplanan Miktar (mcg)	% Galantamin Miktarı
NTÜ ₁	200	2012902	3.590	0.00599
		1968255	3.507	0.00586
		1748671	3.102	0.00518
NTÜ ₂	200	1962144	3.496	0.00584
		1926112	3.429	0.00573
		1891756	3.366	0.00562
NTÜ ₃	200	1697272	3.007	0.00502
		1697747	3.008	0.00502
		1716528	3.043	0.00508

Tablo 29. NTÜ Kodlu Örnek Üzerinde HPLC Yöntemi ile Galantamin Miktar Tayini Verilerinin İstatiksel Olarak Değerlendirilmesi

N	Ort.	St. Sapma ($\times 10^{-5}$)	Min.	Max.
9	0.00548	40	0.00502	0.00854

1.6.6. Galantamin Miktar Tayininin Validasyonu

ICH'ye göre (349) yöntem geçerlilik parametrelerini içeren yöntem validasyon çalışmasına ait sonuçlar aşağıda verilmektedir.

1.6.6.1. Özgüllük (Seçicilik)

Galantamin standartlarına ve örneğe ait kromatogramda da görüldüğü üzere, kolondan likorinin alıkonma zamanında galantamin dışında başka bir molekül gelmemektedir. Galantamin piki herhangi bir pikle girişim yapmamaktadır. Alıkonma zamanı ($R_t = 7.76-7.81$) aralığında galantamin pikinin tamamını net şekilde kromatogramda izleyebilmemiz yöntemin galantamine özgüllüğünü göstermektedir.

1.6.6.2. Doğrusallık ve Tayin Aralığı

ICH kılavuzunda doğrusallığın kontrolü için en az beş konsantrasyon gerekli olduğundan(349) standart galantamin çözeltileri beş ayrı konsantrasyonda hazırlanmış ve her bir konsantrasyon üzerinde HPLC cihazı ile üçer kez ölçüm yapılmıştır. galantamin konsantrasyonuna karşılık pik alanını veren kalibrasyon eğrisi çizilmiş ve regresyon denklemi hesaplanmıştır.

Tayin aralığı, örnek içindeki analitin, tanımlanan doğruluk ve kesinlik parametrelerinde tayin edilebilen üst ve alt derişimleri arasındaki aralıktır. Kalibrasyon eğrisinde tayin edilebilen en düşük derişimden, doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime kadar olan derişim aralığını kapsar (349). Çalıştığımız konsantrasyonlar doğrusallık açısından kabul edilebilir olduğundan, maliyeti de düşünülerek, tüm tayin aralığını belirlemeye gidilmemiştir.

1.6.6.3. Doğruluk (Gerçeklik)

Kesinlik, doğrusallık ve özgüllük parametrelerinin sağlandığı koşullarda doğruluk parametresi de sağlanmış kabul edilmektedir (349). Kullanmış olduğumuz yöntem galantamin için kesinlik, doğrusallık ve özgüllük parametrelerini sağlamaktadır. Buna ek olarak geri kazanım çalışması yapılmış ve sonuçları bağlı hatalarıyla birlikte Tablo 30'da verilmiştir. Sonuçlar ilave edilen ve ölçülen galantamin miktarları ile karşılaştırmalı olarak verilmiş, ölçülen değerlerin, doğru olduğu kabul edilen değerlere yakınlığı değerlendirilmiştir.

Tablo 30. Galantamin ile Yapılmış Geri Kazanım Çalışması Sonuçları

Örnekteki galantamin miktarı (µg/mL)	Örneğe eklenen galantamin miktarı (µg/mL)	Örnekten geri alınan miktar (µg/mL)	Geri Kazanım (%)±STD	RSD (%)
3	1.5	4.497	97.69	1.19
		4.354		
		4.381		
		4.424		
		4.435		
		4.419		
		4.376		
		4.333		
		4.347		
3	3	6.013	99.33	0.98
		5.949		
		5.990		
		6.021		
		5.948		
		5.966		
		5.974		
		5.994		
		5.824		
3	6	8.826	98.78	1.37
		8.908		
		-		
		8.990		
		8.936		
		8.853		
		8.615		
		8.971		
		8.914		

1.6.6.4. Kesinlik

Kesinlik; gün içi tekrarlanabilirlik, günler arası tekrarlanabilirlik ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik olmak üzere üç seviyede ifade edilebilen bir parametredir. ICH kılavuzunda en az 9 ölçüm üzerinden verilmesi gerektiği bildirilmiştir (en az 3 farklı konsantrasyon üzerinde 3 tekrar ölçümü şeklinde). Bu çalışmada günler arası tekrarlanabilirliğin ifade edilmesi için beş farklı

konsantrasyonda hazırlanmış galantamin çözeltisi üzerinde 3'er kez ölçüm yapılmıştır. Birbirini takip eden iki gün aynı laboratuvar koşulları ve aynı cihaz ile ölçüm tekrarlanarak verileri kaydedilmiş ve her iki gün elde edilen veriler için ayrı ayrı kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Veriler arasındaki ortalama, standart sapma (SD) ve % bağıl standart sapma (RSD) değerleri hesaplanmıştır.

Tablo 31. Galantamin ile Yapılmış Günlerarası Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

1.Gün				2.Gün			
	Konsantras yon (µg/ml) Galantamin (Baz)	Ortalama ±Standart Sapma	Bağl Standar t Sapma (%)		Konsantras yon (µg/ml) Galantami n (Baz)	Ortalama ±Standart Sapma	Bağl Standar t Sapma (%)
1	0.377	0.385±0.0084	2.2	1	0.394	0.394±0.0007	0.2
	0.393						
	0.384						
2	0.764	0.781±0.0168	2.1	2	0.773	0.782±0.0081	1
	0.797						
	0.783						

Tablo31'in Devamı. Galantamin ile Yapılmış Günlük Tekrarlanabilirlik Çalışması Sonuçları

1.Gün				2.Gün			
	Konsantrasyon (µg/ml) Galantamin (Baz)	Ortalama ±Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)		Konsantrasyon (µg/ml) Galantamin (Baz)	Ortalama ±Standart Sapma	Bağıl Standart Sapma (%)
3	1.955	1.961±0.0331	1.7	3	1.926	1.968±0.0470	2.4
	1.997				1.957		
	1.932				2.019		
4	4.061	3.977±0.0743	1.9	4	3.878	3.909±0.0570	1.5
	3.920				3.874		
	3.949				3.975		
5	7.668	7.763±0.1122	1.4	5	7.893	7.795±0.0870	1.1
	7.887				7.765		
	7.733				7.727		

1.6.6.5. Tayin Sınırı (LOD)

Örnek içindeki analitin nicel olarak tam bir değer ifade etmesine gerek olmaksızın tayin edilebilen en düşük miktarına tayin sınırı denmektedir. Tayin sınırının belirlenmesi için enstrümental olan veya olmayan pek çok uygulama vardır. Bu uygulamalardan kabul edilebilir olanlarından biri; sinyal/gürültü baz alınarak yapılan hesaplamadır. Bu yaklaşım sadece taban çizgisinde gürültü var olan analitik yöntemler için uygulanabilmektedir (349). Tayin sınırı (LOD) hesaplanırken, galantamin için ölçüm yaptığımız en düşük konsantrasyon olan 0.5 µg/mL tuz derişimden (0.390 µg/mL baz) 10 kez ölçüm yapılmış ve S/G oranları kaydedilmiştir. Tüm S/G oranlarının ortalaması alınarak, 0.5 µg/mL konsantrasyona (0.390 µg/mL baz) karşılık gelen S/G oranı bulunmuştur. Basit oran orantı hesabı ile S/G oranının 3 olduğu konsantrasyonun teorik olarak bulunması sağlanmıştır.

Tablo 32. Galantamin için Tayin Sınırı Belirleme Verileri

Paralel No	Sinyal/Gürültü
1	3.87
2	4.02
3	4.38
4	3.67
5	4.71
6	2.29
7	4.38
8	4.39
9	2.82
10	4.5
Ortalama±STD:	3.903±0.7848

$$LOD_{gal}=0.3843$$

1.6.6.6. Niceleme Sınırı (LOQ)

Niceleme sınırı bir örneğin içindeki analitin, uygun doğruluk ve kesinlik ile kantitatif olarak tayin edilebileceği en düşük miktardır. Niceleme sınırının belirlenmesi için enstrümental olan veya olmayan pek çok uygulama vardır. Bu uygulamalardan kabul edilebilir olanlarından biri; sinyal/gürültü baz alınarak yapılan hesaplamadır. Bu yaklaşım sadece taban çizgisinde gürültü var olan analitik yöntemler için uygulanabilmektedir(349). Niceleme sınırı (LOQ) hesaplanırken, galantamin için ölçüm yaptığımız en düşük konsantrasyon olan 0.5 µg/mL derişimden (0.390 µg/mL baz) 10 kez ölçüm yapılmış ve S/G oranları

kaydedilmiştir. Tüm S/G oranlarının ortalaması alınarak, 0.5 µg/mL konsantrasyona (0.390 µg/mL baz) karşılık gelen S/G oranı bulunmuştur. Niceleme sınırındaki tipik S/G oranı 10:1'dir. Basit oran orantı hesabı ile S/G oranının 10 olduğu konsantrasyonun teorik olarak bulunması sağlanmıştır.

Tablo 33. Galantamin için Niceleme Sınırı Belirleme Verileri

Paralel No	Sinyal/Gürültü
1	3.87
2	4.02
3	4.38
4	3.67
5	4.71
6	2.29
7	4.38
8	4.39
9	2.82
10	4.5
Ortalama±STD:	3.903±0.7848

$$LOQ_{gal}=1.281$$

1.6.6.7. Sağlamlık

Bir analitik yöntemin sağlamlığı, metotta küçük fakat planlanmış değişmelere gidildiğinde, yöntemin değişmeden kalma kapasitesidir ve güvenilirliğin bir göstergesidir. Yöntemdeki geçerli ölçüm sıcaklığı 25 °C iken planlı şekilde 20 °C ve 30 °C'e ayarlanmış ve derişimi bilinen beş farklı örneğin ölçümleri yapılmıştır.

Sonuçlar birbiriyle karşılaştırıldığında yöntemin galantamin miktar tayini açısından sağlamlığı doğrulanmıştır.

Tablo 34. Galantamin Miktar Tayini İçin Kullanılan Yöntemin Sağlamlık Verileri

Örnek	Konsantrasyon (µg/mL) 20 °C	Konsantrasyon (µg/mL) 25 °C	Konsantrasyon (µg/mL) 30 °C	Konsantrasyon (µg/mL) Ortalama±STD
1	4.900	4.994	4.960	4.951±0.0479
2	5.051	4.968	5.011	5.010±0.0413
3	10.430	10.987	10.221	10.546±0.3960
4	3.975	3.984	3.855	3.938±0.0720
5	7.490	7.590	7.379	7.487±0.1058

2 Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloit Tespiti Çalışmalarına Ait Bulgular

GC-MS yöntemi kullanılarak NTA ve NTÜ kodlu örneklerde tespit edilen alkaloitler Tablo 35 ve 36’da yer almaktadır.

Tablo 35. NTÜ Kodlu Örneğin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloit Tespiti Analizine Ait Bulgular

Alkaloit	R.T. (dk)	[M ⁺] (%)	Karakteristik İyonlar m/z (%)	Yüzde Miktar	Literatür
Galantamin	19.69	287(78)	286(100), 244(32), 230(17), 216(35), 174(34), 128(14), 115(23)	7.88	(327)
Sanguinin	19.93	273(100)	272(89), 256(22), 230(35), 160(70)	0.93	(327)
Narvedin	20.59	285(79)	284(100), 242(26), 216(25), 199(37), 174(37)	0.74	(327)
Anhidrolikorin	20.89	251(40)	250(100), 192(18), 191(23)	3.34	(327)

Tablo 35'in Devamı. NTÜ Kodlu Örneğin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloit Tespiti Analizine Ait Bulgular

Alkaloit	R.T. (dk)	[M ⁺] (%)	Karakteristik İyonlar m/z (%)	Yüzde Miktar	Literatür
MW 275*	21.22	275(100)	274(28), 247(20), 246(34), 228(32), 204(78), 203(82),	3.80	-
MW 317*	22.52	317(100)	259(15), 258(81), 229(42), 203(35), 202(33)	4.17	-
MW 265*	22.67	265(76)	264(100), 250(13), 248(22), 220(20), 207(51)	1.30	-
MW 389*	22.97	389(34)	388(34), 358(39), 266(23), 242(15), 241(39), 228(100),207(29)	5.94	-
Likörin	23.34	287(18)	268(16), 250(13), 227(65), 226(100), 211(6), 147(17)	31.54	(327)
MW 315*	23.62	315(21)	297(6), 284(7), 24(36), 241(92), 240(100), 228(7)	4.73	-
Psödolikörin	24.00	289(21)	288 (13), 270(14), 230(14), 229(67), 228(100)	0.83	(193)
1-O-Asetil-3-O-metilnarsissidin	24.08	389(-)	357(52), 326(99), 298(27), 284(51), 266(100), 258(87), 228(99)	18.37	(149)
11-hidroksigalantin	24.65	333(11)	332(13), 314(14), 284(19), 266(14), 259(100), 258(99), 240(24), 162(18), 141(22)	1.48	(149)
Narsissidin	24.76	333(9)	332(21), 315(55), 242(23), 284(100), 258(44), 230(62), 228(53)	4.92	(350)
MW 295*	24.97	295(88)	294(100), 278(10), 251(5), 207(11), 148(15)	9.36	-
MW 295 izomeri*	26.46	295(26)	294(38), 281(33), 253(16), 207(100), 191(23)	0.65	-

* Elimizdeki veriler molekül yapısını aydınlatmak için yeterli olmadığından molekül ağırlıkları ile adlandırılmıştır.

Tablo 36. NTA Kodlu Örneğin Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloid Tespiti Analizine Ait Bulgular

Alkaloid	R.T. (dk)	[M ⁺] (%)	Karakteristik İyonlar m/z (%)	Yüzde Miktar	Literatür
Galantamin	19.69	287(79)	286(100), 244(31), 230(16), 216(37), 174(45), 128(20), 115(32)	4.14	(327)
Narvedin	20.59	285(86)	284(100), 242(28), 216(24), 199(38), 174(52)	0.35	(327)
Demetilmaritidin	20.88	273(100)	230(28), 201(85), 189(80), 174(21)	1.20	(327)
O-Metilnorbelladin	21.33	273(-)	180(25), 137(100), 122(5), 107(5), 77(6)	0.46	(351)
Pankratinin-C	21.69	287(45)	203 (49), 188 (77), 176 (100), 161 (36), 148 (75)	0.01	(352)
MW 317*	22.51	317(95)	258(80), 228(74), 207(100), 203(41), 191(42), 187(48)	0.55	-
MW 265*	22.67	265(72)	264(100), 248(23), 220(21), 207(18), 191(32), 178(36)	2.46	-
Galantin	22.90	317(12)	316(12), 298(7), 284(9), 268(12), 266(10), 244(14), 243(84), 242(100)	2.30	(327)
MW 389*	22.97	389(57)	358(81), 264(42), 241(69), 228(100), 129(44)	13.23	-
Likorin	23.34	287(15)	268(14), 250(13), 227(64), 226(100), 211(5), 147(19)	16.37	(327)
9-O-Metilpsödolikorin	23.64	303(17)	284(14), 243(61), 242(100)	14.67	(353)
11-hidroksigalantin	24.68	333(11)	332 (13), 314 (13), 284 (19), 266 (15), 259 (91), 258 (100), 240 (25), 162 (18), 141 (25)	1.55	(149)
9-O-demetil-2α-hidroksihomolikorin	24.81	317(-)	126(9),125(100),124(10), 96(41)	İz miktarda	(264)
Narsissidin	24.83	333(6)	332(15), 315(45), 242(27), 284(100), 258(39), 230(56), 228(57)	26.34	(350)
MW 295*	24.98	295(87)	294(100), 278(10), 207(12), 194(11), 147(18)	6.40	-
MW 281*	25.20	281(80)	280(100), 264(16), 236(22), 219(7), 194(20)	7.58	-
MW 295 izomeri*	26.48	295(75)	294(100), 281(23), 278(14), 250(14), 207(65), 191(17)	2.15	-

* Elimizdeki veriler molekül yapısını aydınlatmak için yeterli olmadığından molekül ağırlıkları ile adlandırılmıştır.



3. İzolasyon ve Biyoaktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

3.1. İzolasyonla Elde Edilen Bileşiklere Ait Bulgular

3.1.1 NT1 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular

$[\alpha]_D^{25}$: -65.3 (MeOH; c 0.14)

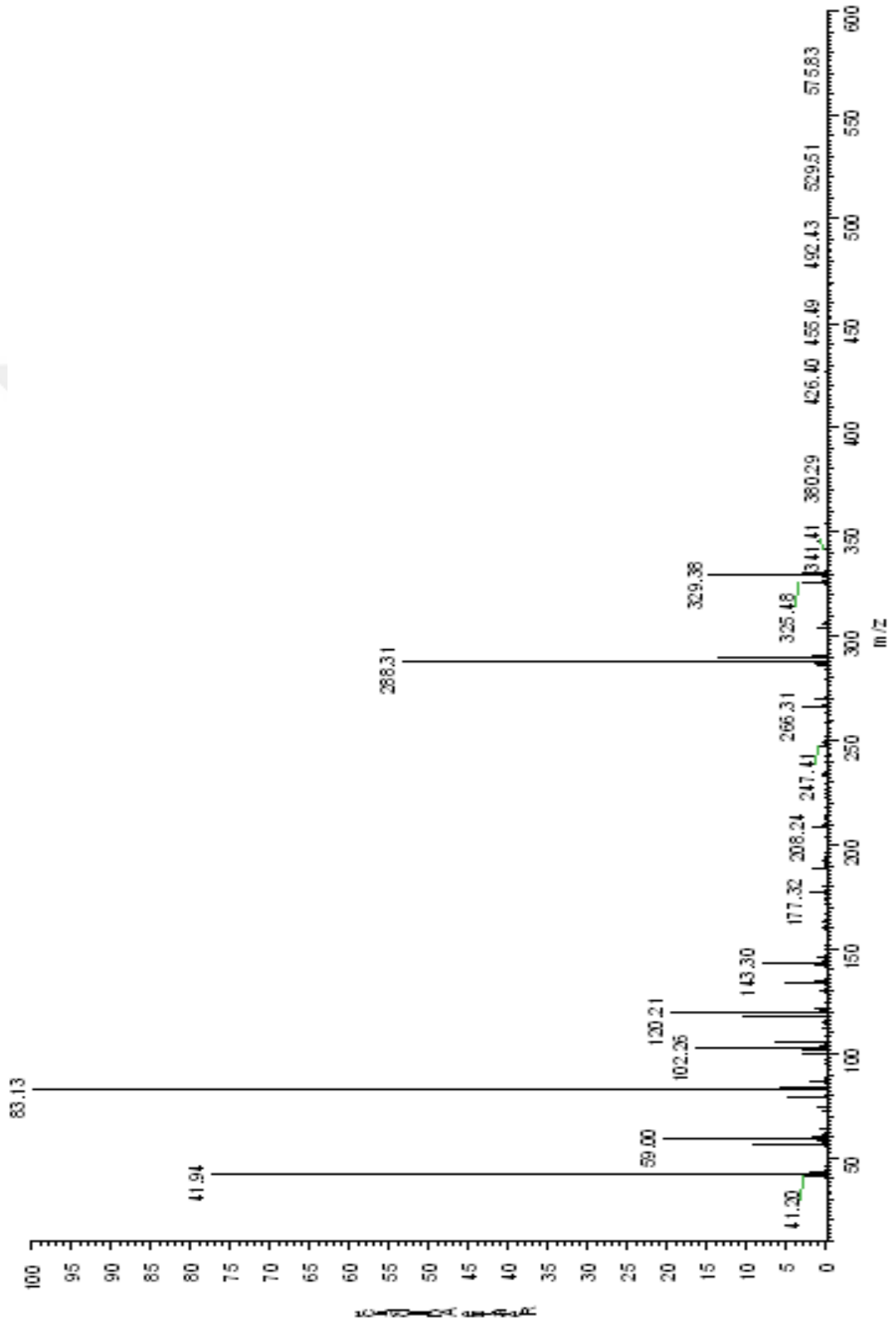
ESI Kütle (Spektrum 7)

m/z: 288.31 $[M+H]^+$

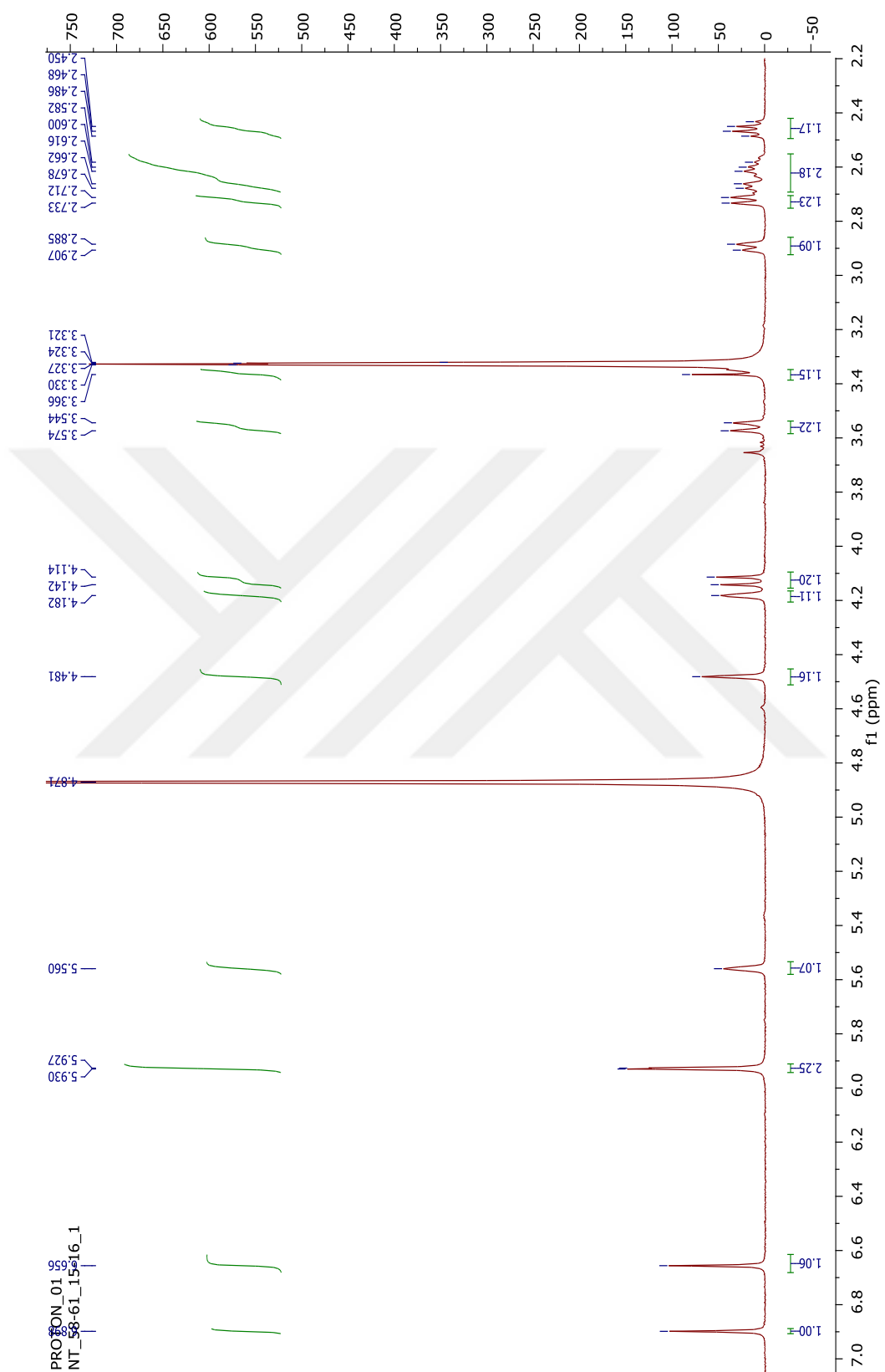
1H NMR (Spektrum 8)

(500 MHz, CD_3OD): δ 6.89 (1H, s, H-10), 6.66 (1H, s, H-7), 5.929 (2H, d, $J=1.5$ Hz, OCH_2O), 5.56 (1H, *brs*, H-3), 4.48 (1H, *brs*, H-1), 4.18 (1H, m, H-2 α), 4.13 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-6 β), 3.56 (1H, d, $j=15$ H-6 α), 3.37 (1H, m, CD_3OD -su piki ile çakışık, H-12 β), 2.9 (1H, d, $J=10$ Hz, H-4a), 2.72 (1H, d, $j=10$, H-10b), 2.70-2.65 (1H, m, H-11 α), 2.64-2.56 (1H, m, H-11 β), 2.46 (1H, q, $J=9$ Hz, H-12 α) ppm.

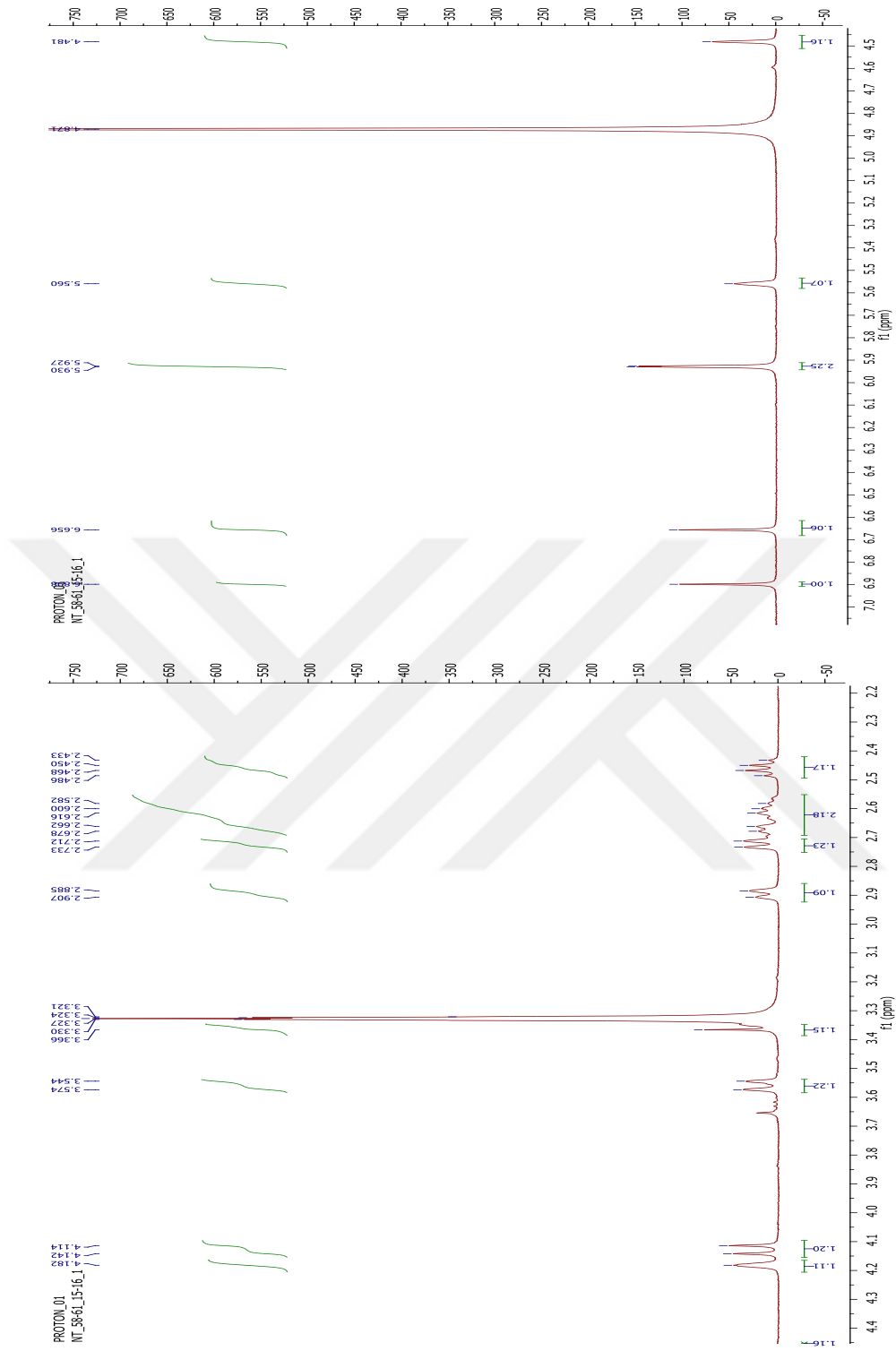
Genişletilmiş 1H NMR (Spektrum 9)



Spektrum 7. NT1 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu



Spektrum 8. NT1 Bileşigine Ait ^1H NMR spektrumu



Spektrum 9. NT 1 Bileşğine Ait Genişletilmiş ¹H NMR spektrumu

3.1.2. NT2 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular

$[\alpha]_D^{25}$: -36.2 (MeOH; c 1.5)

ESI Kütle (Spektrum10)

m/z: 290.36 $[M+H]^+$

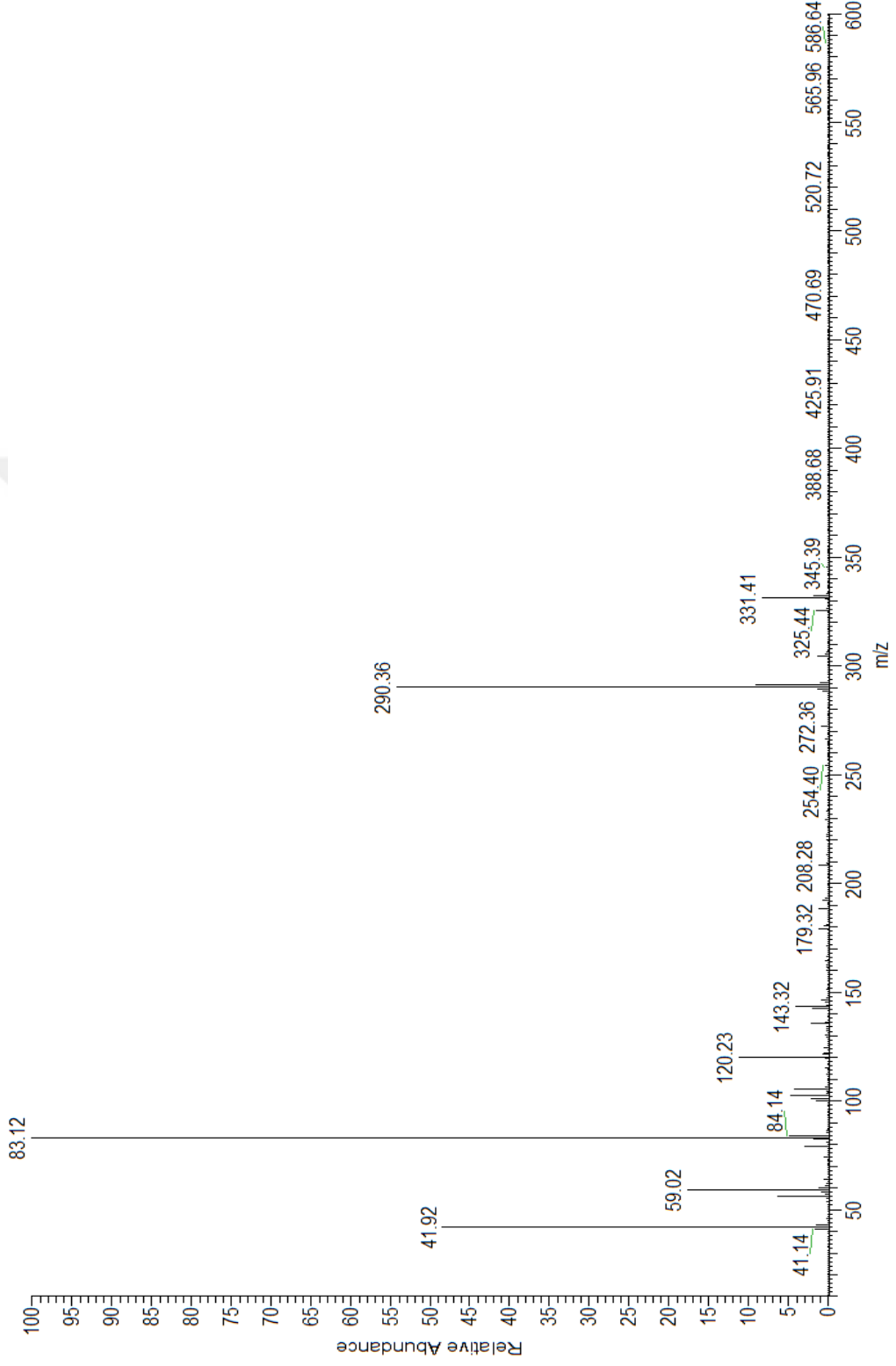
1H NMR (Spektrum 11)

(500 MHz, CD_3OD): δ 6.87 (1H, s, H-10), 6.73 (1H, s, H-7), 5.55 (1H, *brs*, H-3), 4.48 (1H, s, H-1), 4.18 (1H, m, H-2 α), 4.16 (1H, d, J = 15.0 Hz, H-6 β), 3.84 (3H, s, O-Me), 3.56 (1H, d, J =15 Hz, H-6 α), 3.37 (1H, m, CD_3OD -su piki ile çakışık, H-12 β), 2.88 (1H, d, J =10, H-4a), 2.72 (1H, d, J =10, H-10b), 2.67 (1H, m, H-11 α), 2.61 (1H, m, H-11 β), 2.44 (1H, q, J =10, H-12 α) ppm.

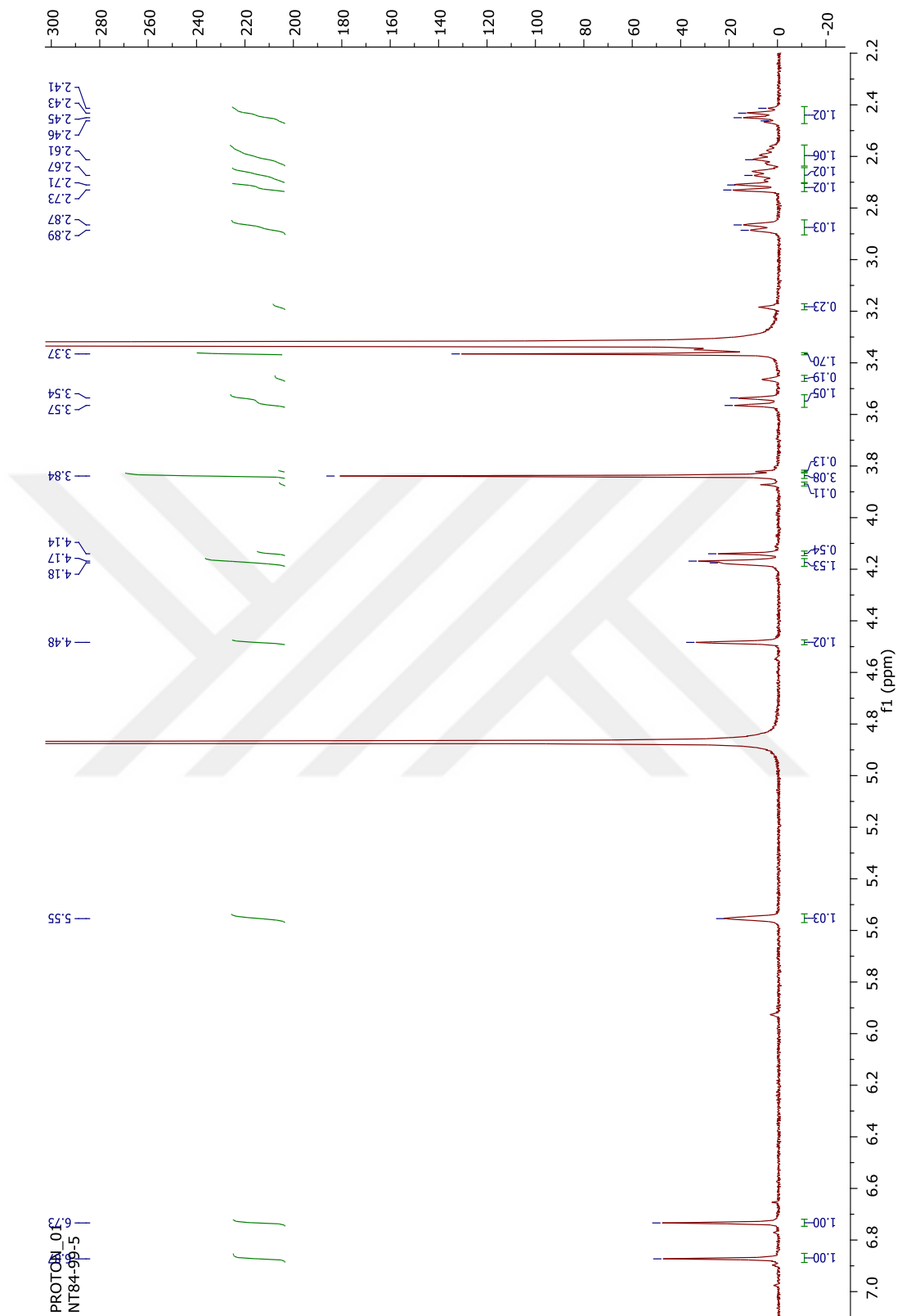
Genişletilmiş 1H NMR (Spektrum 12)

NOESY (Spektrum 13)

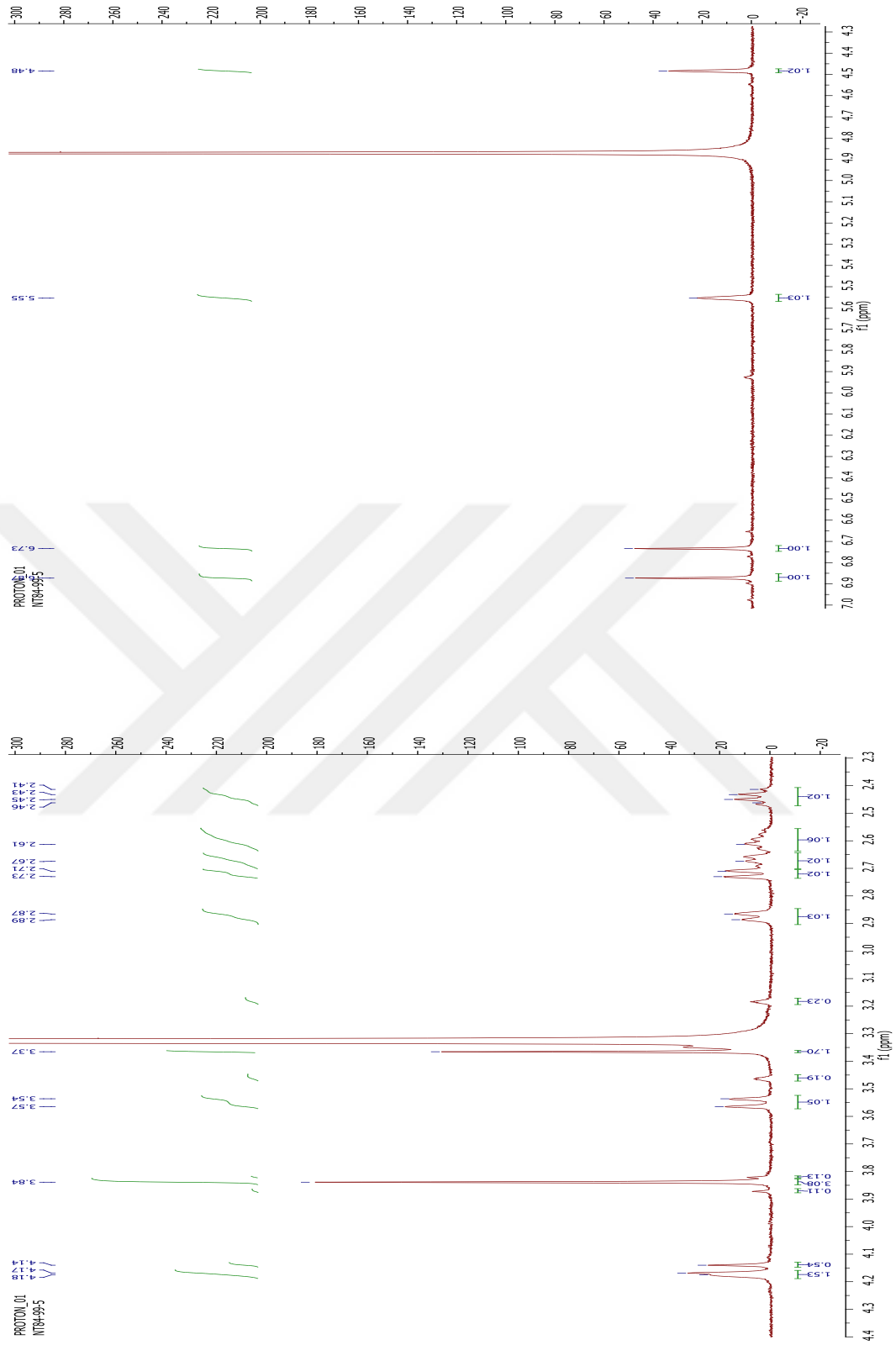
Genişletilmiş NOESY (Spektrum 14)



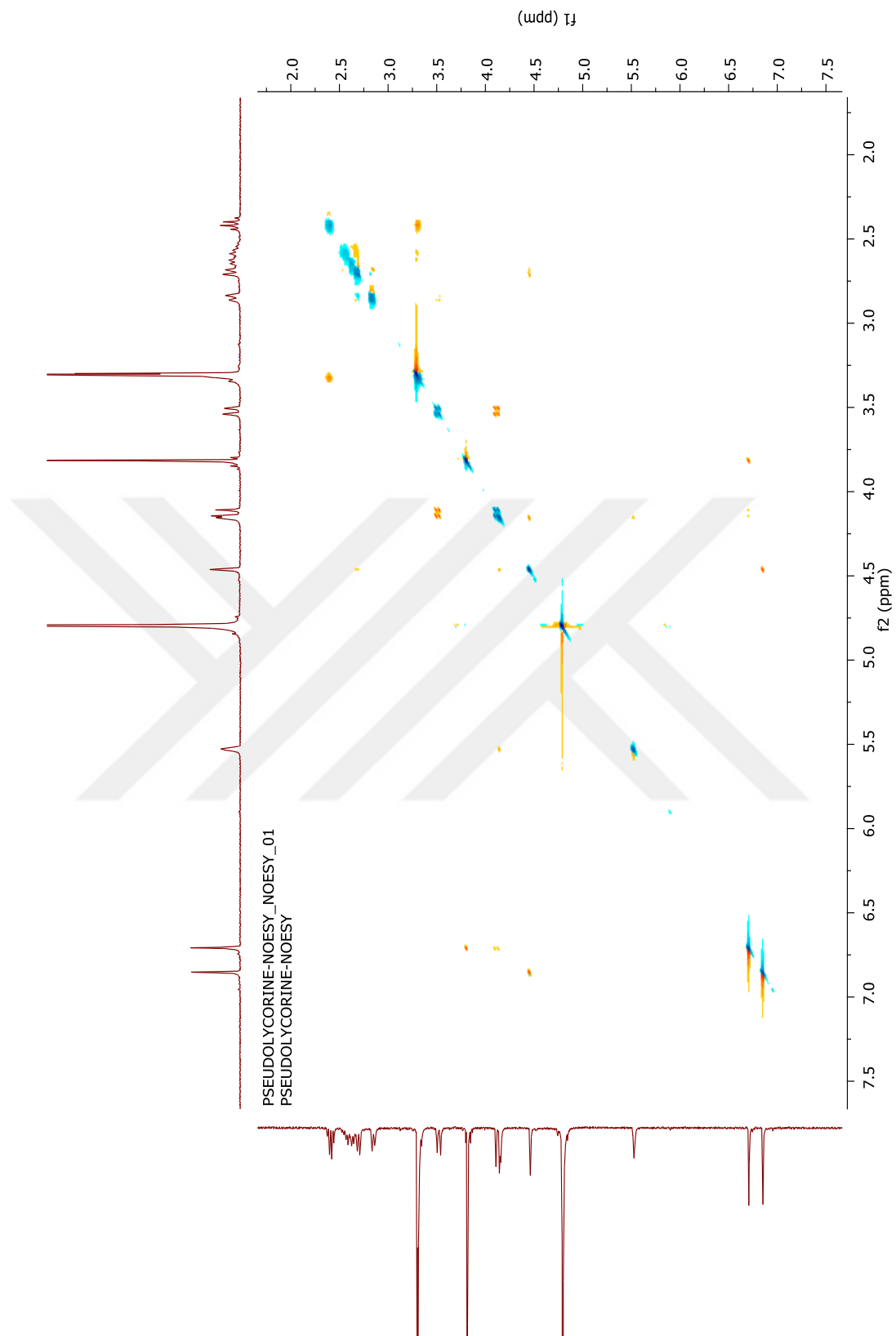
Spektrum 10. NT2 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu



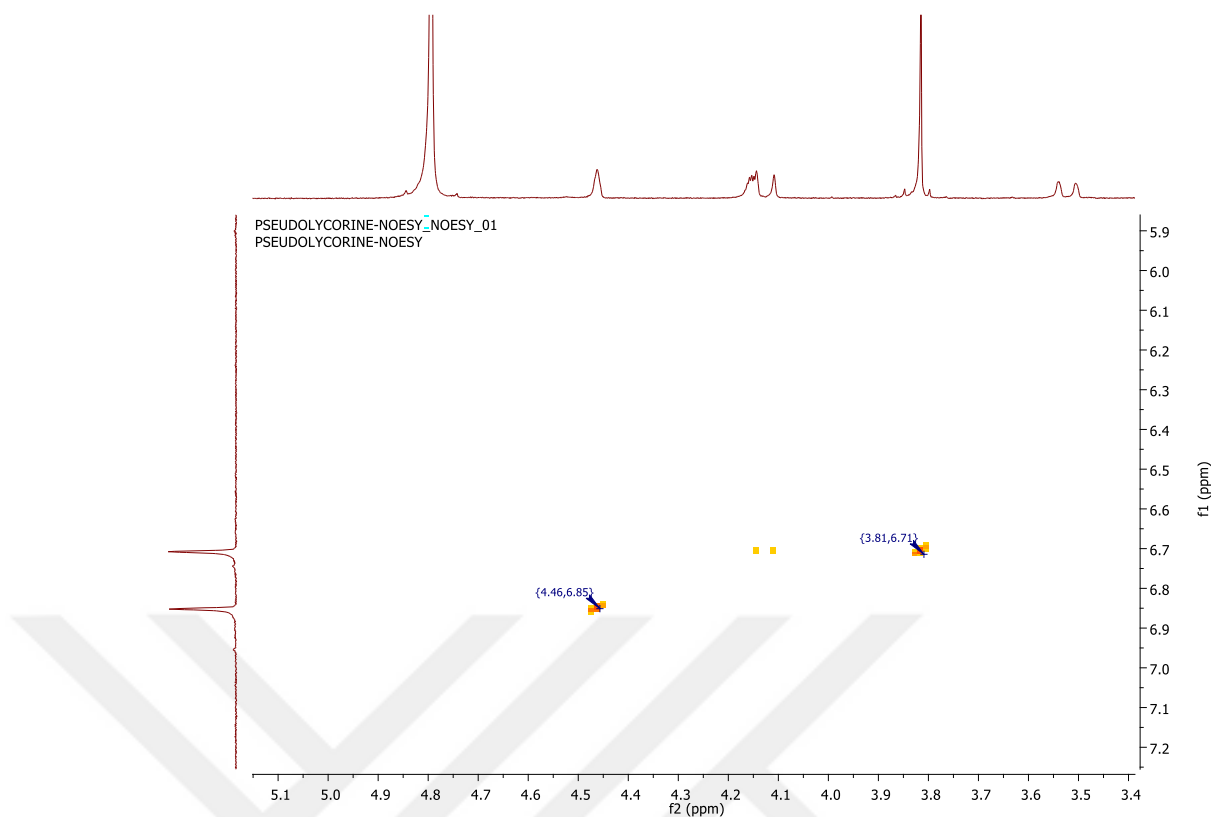
Spektrum 11. NT2 Bileşigine Ait ^1H NMR spektrumu



Spektrum 12. NT2 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu



Spektrum 13. NT2 Bileşigine Ait NOESY Spektrumu



Spektrum 14. NT2 Bileşiğine Ait Genişletilmiş NOESY spektrumu

Tablo 37. NT2 Bileşiğine Ait NOESY Bulguları

H	^1H (δ)	NOESY
1	4.48	H-10, H-10b
2	4.18	H-3, H-11 α , H-4a
3	5.55	H-2
4a	2.88	H-2
6 α	3.56	H-6 β
6 β	4.16	H-6 α
7	6.73	O-Me
10	6.87	H-1
10b	2.72	H-1
11 α	2.67	H-2, H-12 α
11 β	2.61	H-12 β
12 α	2.44	H-11 α
12 β	3.37	H-11 β
O-Me	3.84	H ₇

3.1.3. NT3 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular

$[\alpha]_D^{25}$: -25 (0.4; EtOH)

ESI Kütlet (Spektrum 15)

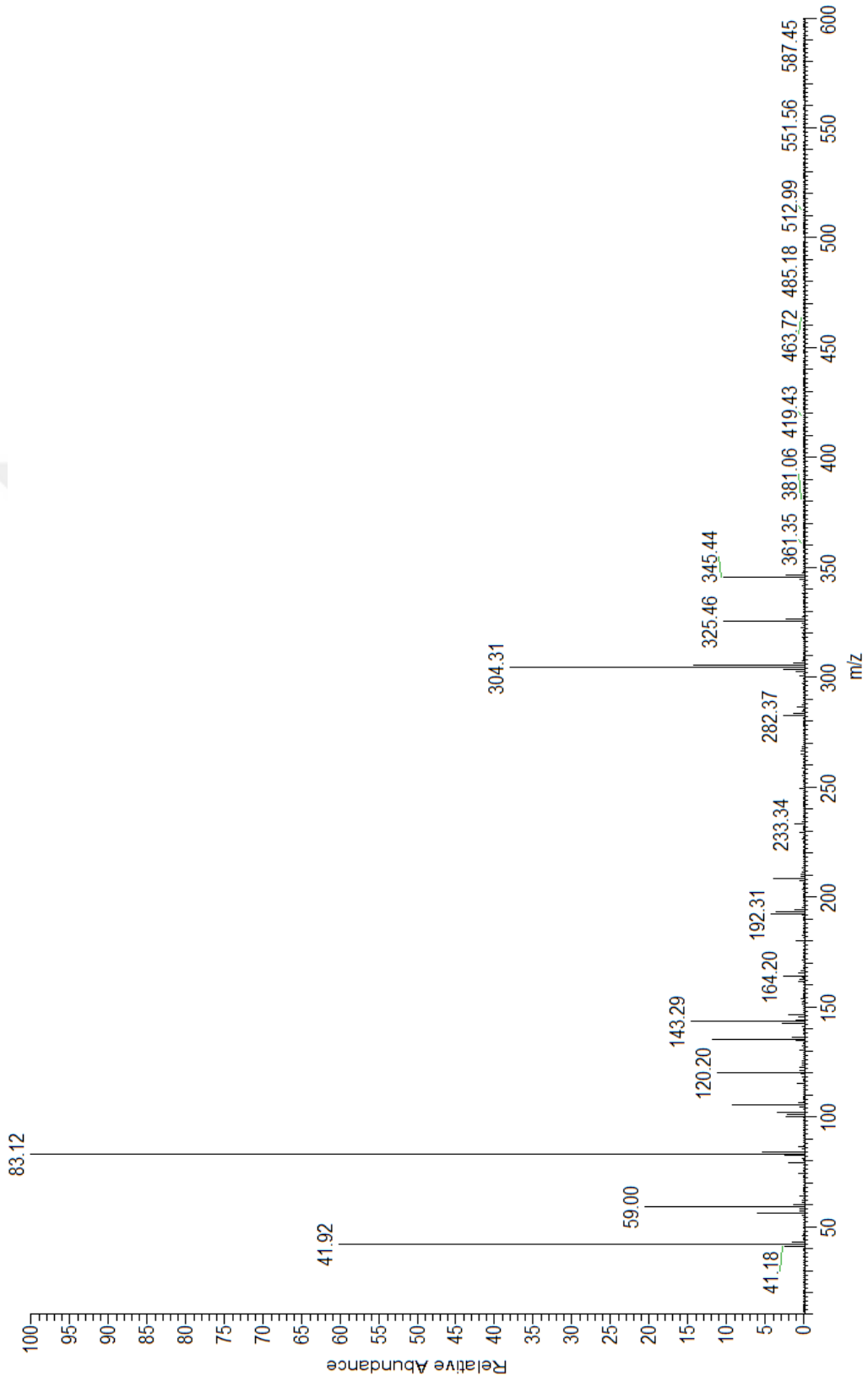
m/z: 304.31 $[M+H^+]$

1H NMR (Spektrum 16)

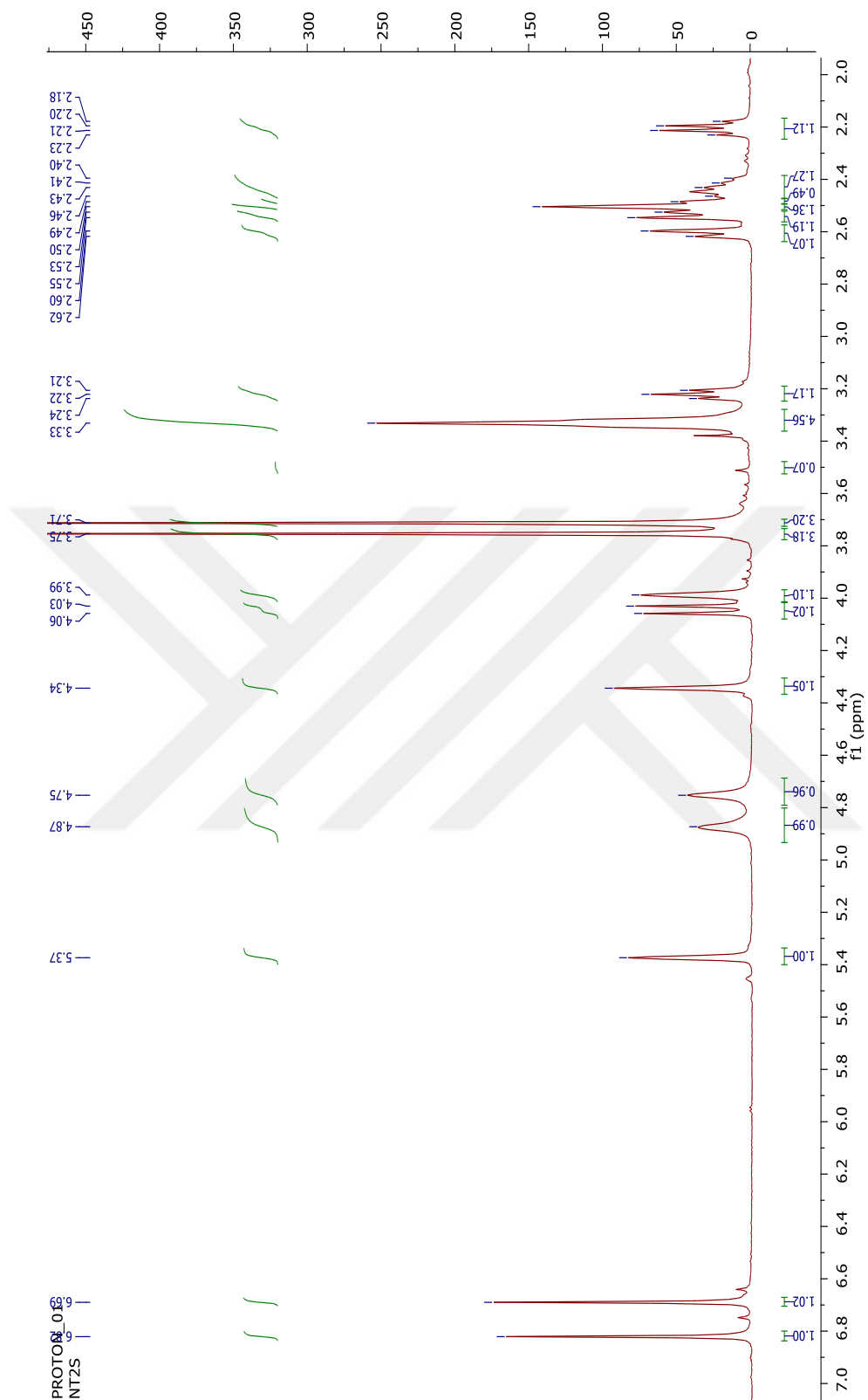
(500 MHz, CD_3OD): δ 6.82 (1H, s, H-10), 6.69 (1H, s, H-7), 5.37 (1H, s, H-3), 4.34 (1H, s, H-1), 4.05 (1H, d, $J=15.0$ Hz, H-6 β), 3.99 (1H, *brs*, H-2 α), 3.75 (3H, s, *O*-Me), 3.71 (3H, s, *O*-Me), 3.33 (1H, m, CD_3OD -su piki ile χ akışık, H-6 β), 3.23 (1H, t, $J=5$, H-12 β), 2.61 (1H, d, $J=10$, H-4a), 2.54 (1H, d, H-10b), 2.50 (1H, m, H-11 β), 2.45 (1H, m, H-11 α), 2.21 (1H, q, H-12 α) ppm.

Genişletilmiş 1H NMR (Spektrum 17)

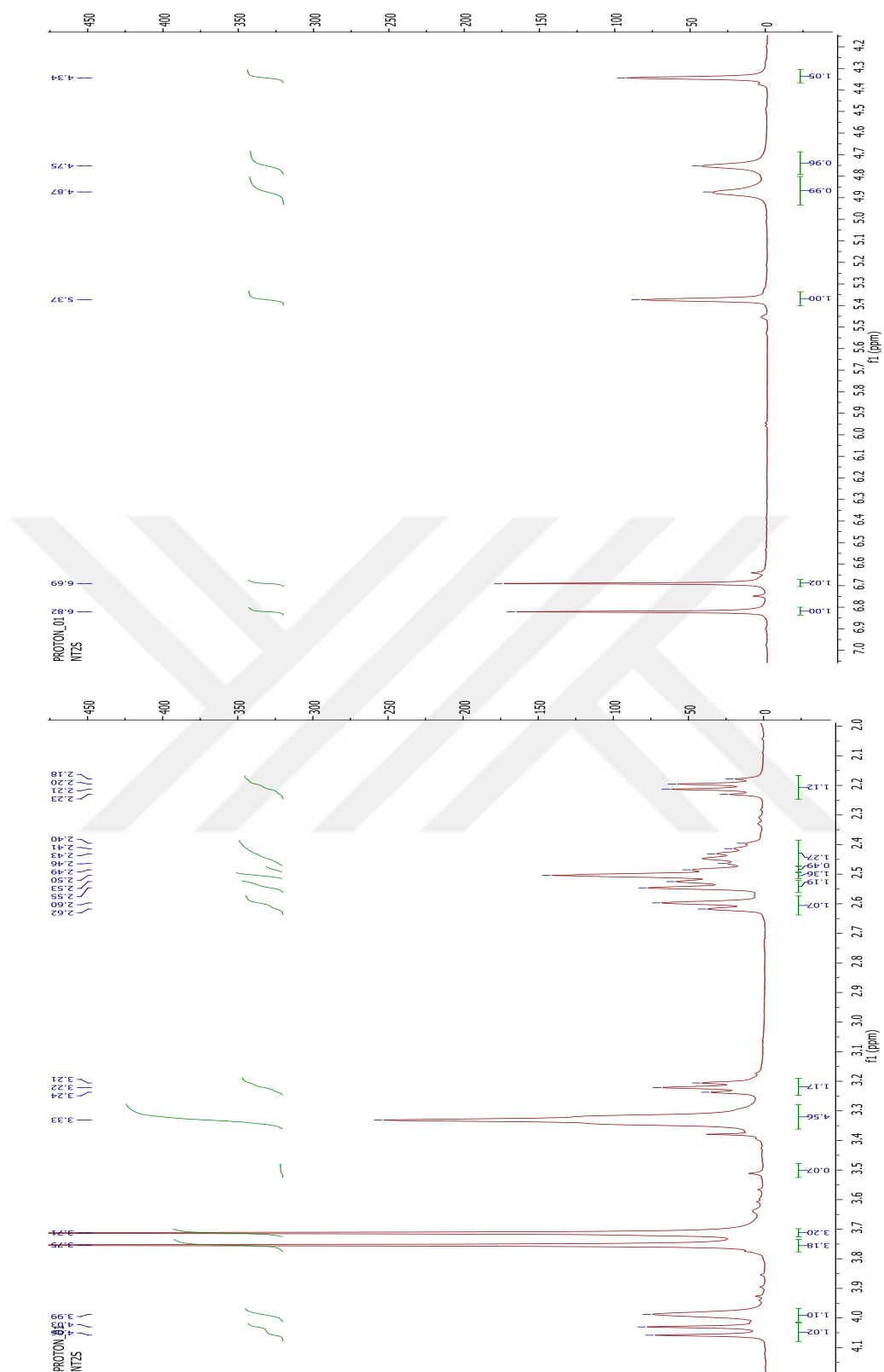
1H , 1H -COSY (Spektrum 18)



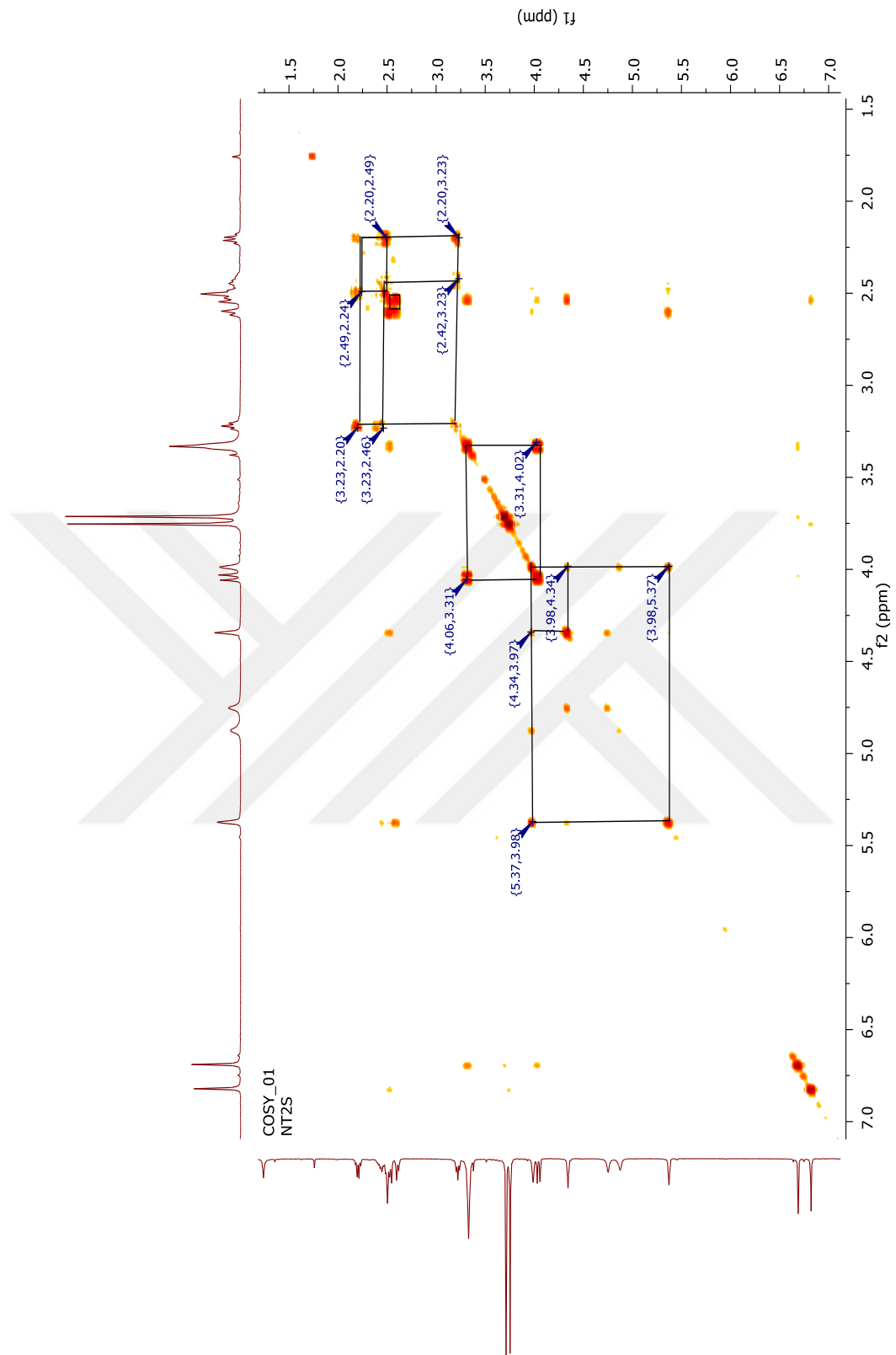
Spektrum 15. NT3 Bileşiğine Ait Kütle Spektrumu



Spektrum 16. NT3 Bileşigine Ait ^1H NMR spektrumu



Spektrum 17. NT3 Bileşiğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu



Spektrum 18. NT3 Bileşğine Ait ^1H , ^1H -COSY Spektrumu

Tablo 38. NT3 Bileşiğine Ait ^1H NMR ve $^1\text{H}, ^1\text{H}$ COSY Spektral Bulguları

H	$^1\text{H}(\delta)$	$^1\text{H}, ^1\text{H}$ -COSY
1	4.34	H-1, H-2 α
2 α	3.99	H-2 α , H-3
3	5.37	H-3, H-2 α
4a	2.61	-
6 α	3.33	H-6 α , H-6 β
6 β	4.05	H-6 β , H-6 α
7	6.69	-
10	6.82	-
10b	2.54	-
11 α	2.45	H-11 α , H-12 β , H-12 α
11 β	2.50	H-11 β , H-12 β , H-12 α
12 α	2.21	H-12 α , H-11 α
12 β	3.23	H-12 β , H-11 α , H-11 β
O-CH ₃	3.75	-
O-CH ₃	3.71	-

3.1.4. NT4 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular

$$[\alpha]_D^{25} = -43.1 (0.56, \text{CHCl}_3)$$

ESI Kütlet (Spektrum 19)

$$m/z = 334.41 \text{ [M+H]}^+$$

^1H NMR (Spektrum 20)

(500 MHz, CD_3OD): δ 7.02 (1H, s, H-10), 6.89 (1H, s, H-7), 5.76 (1H, d, $J=2.5$ Hz, H-11 α), 4.76 (1H, *brs*, H-3 β), 4.63 (1H, d, $J=1.5$ Hz, H-1 β), 4.09 (1H, d, $J=16$ Hz, H-6 β), 4.02 (1H, m, H-12 α), 3.98 (1H, m, H-4a), 3.88, (3H, s, *O*-Me), 3.84, (3H, s, *O*-Me), 3.73 (1H, t, $J=4$; $J=3.5$ Hz, H-2 α), 3.65 (1H, d, $J=16$ Hz, H-6 α), 3.60 (1H, m, H-12 β), 3.48 (3H, s, *O*-Me), 2.85 (1H, dd, $J=14$ $J=1.5$ Hz H-10b) ppm.

Genişletilmiş ^1H NMR (Spektrum 21, 22)

^{13}C NMR (Spektrum 23)

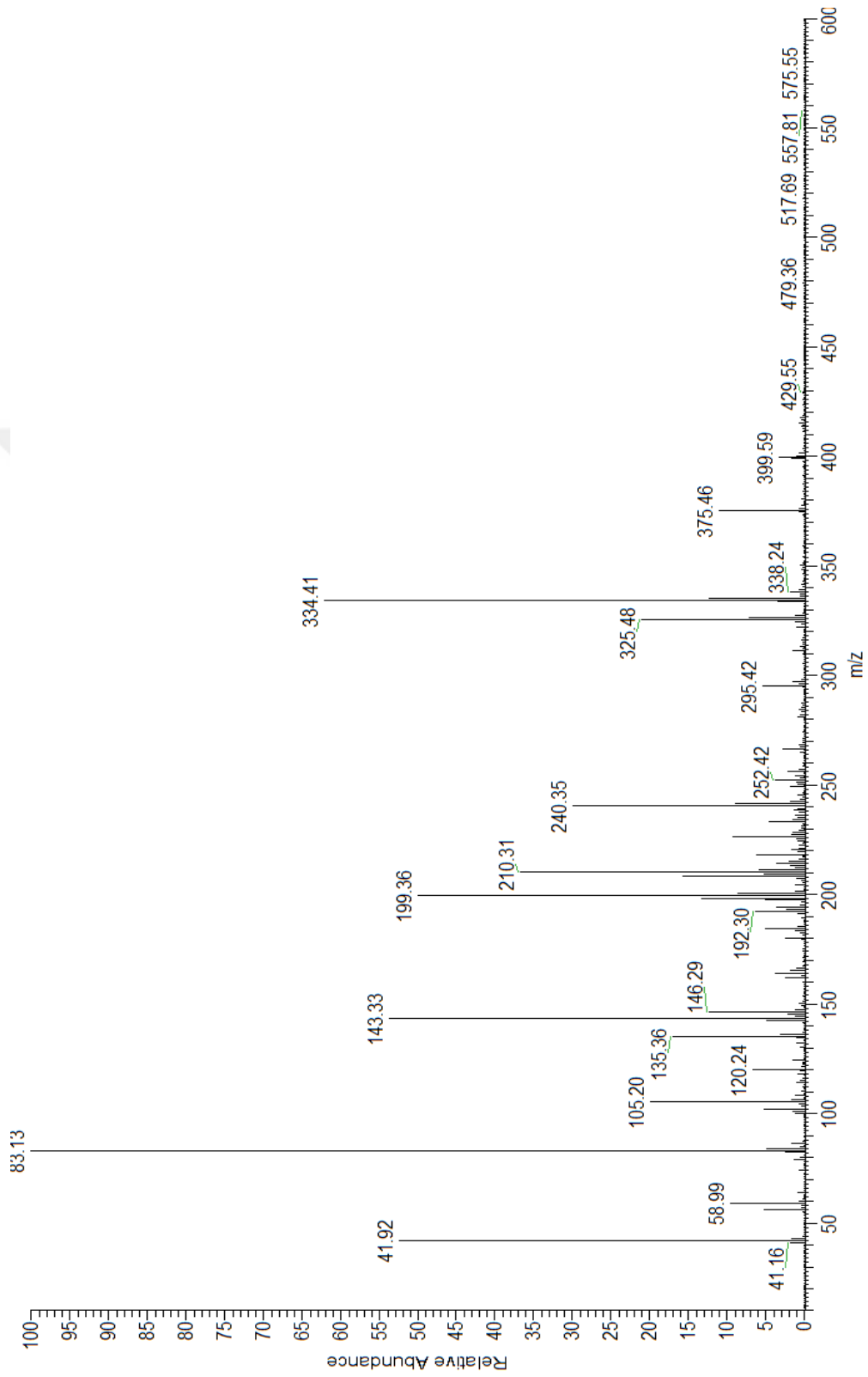
(500 MHz, CD_3OD): δ 121.5 (C-11), 111.1 (C-7), 108.4 (C-10), 81.4 (C-2), 67.8 (C-3), 67.7 (C-1), 62.5 (C-4a), 61.6 (C-12), 56.9 (2-*O*-CH₃), 55.32 – 55.31 (8-9-*O*-CH₃), 54.2 (C-6), 40.7 (C-10b) ppm.

Genişletilmiş ^{13}C NMR (Spektrum 24)

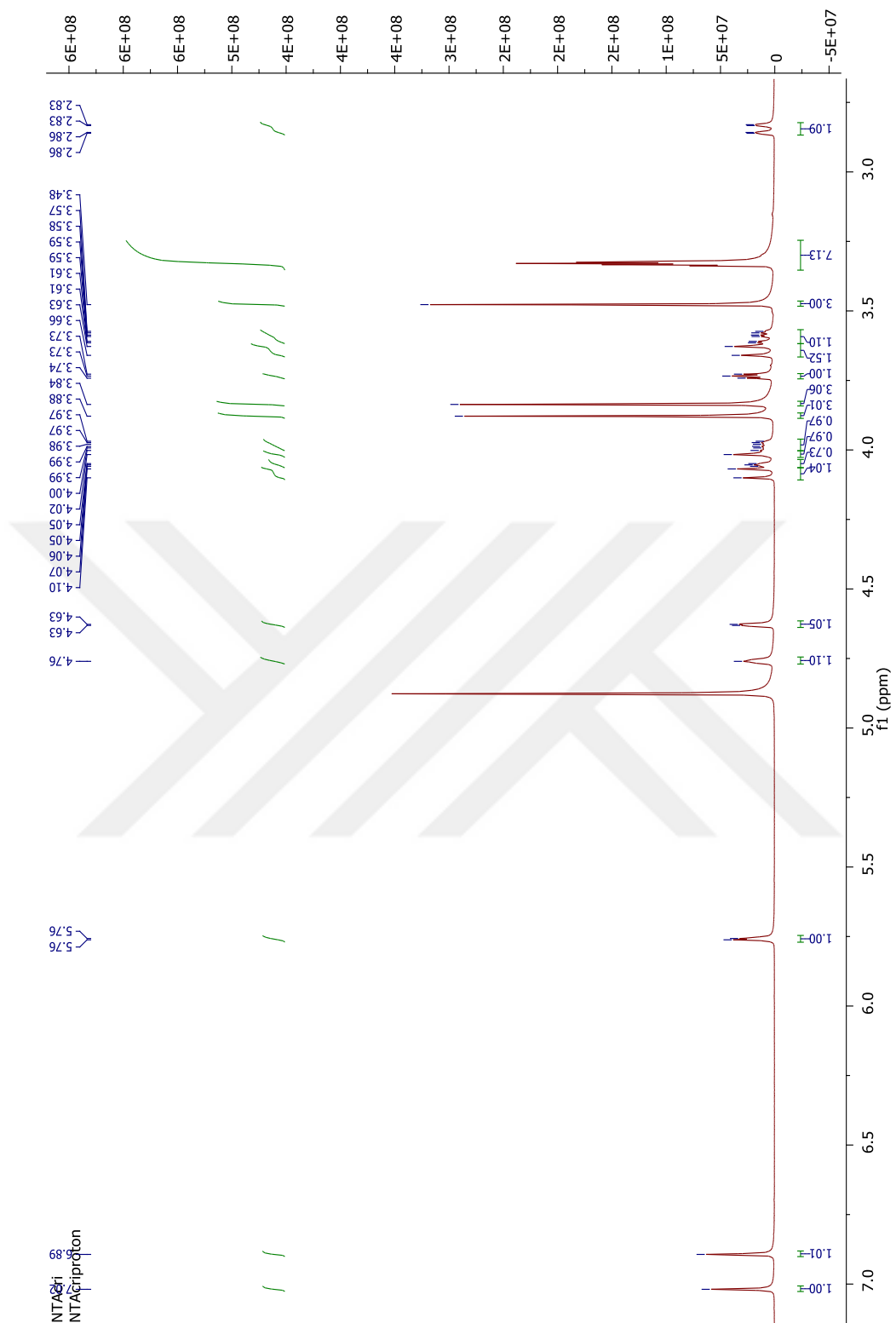
HSQC (Spektrum 25)

Genişletilmiş HSQC (Spektrum 26)

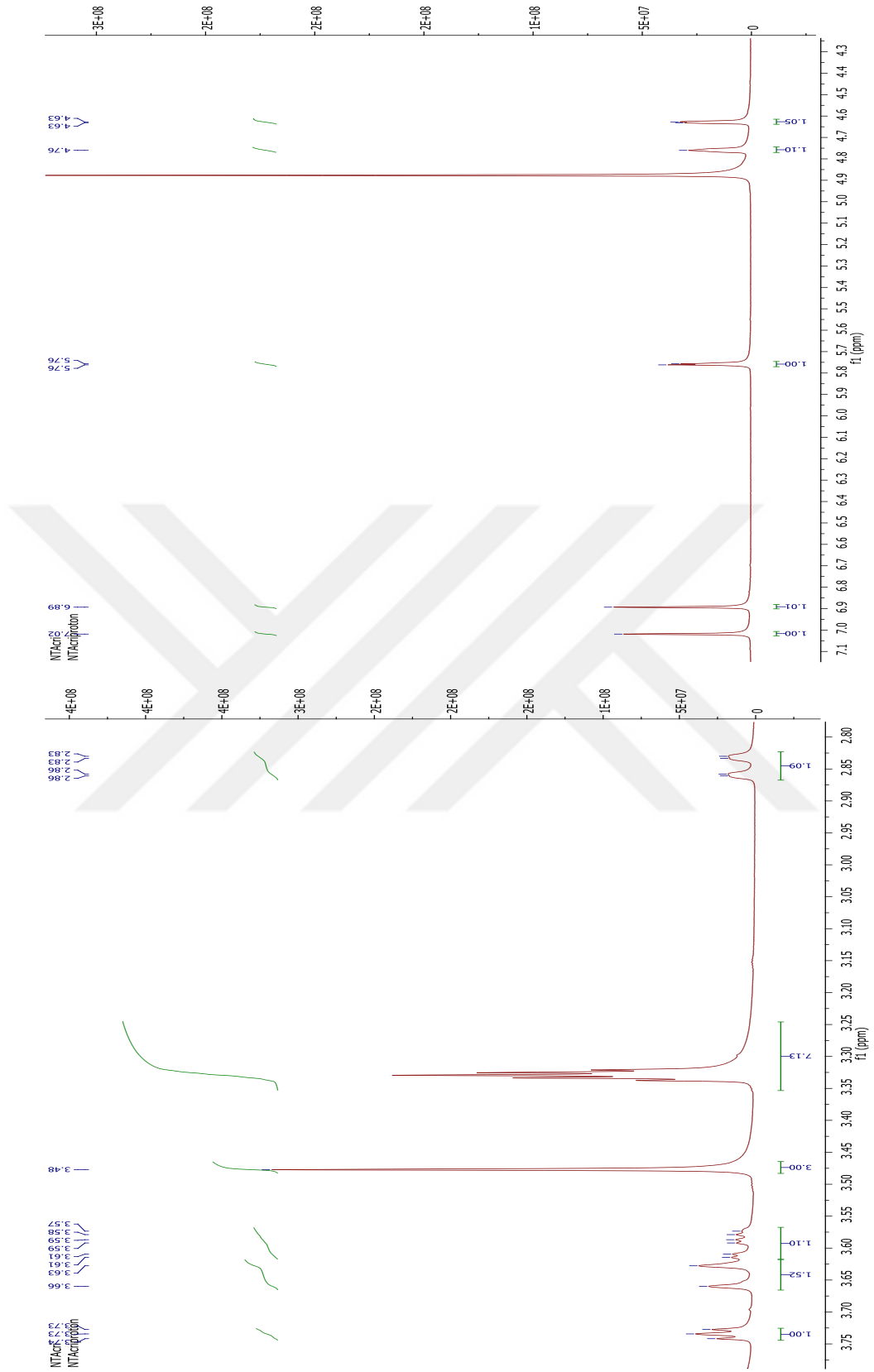
^1H , ^1H -COSY (Spektrum 27)



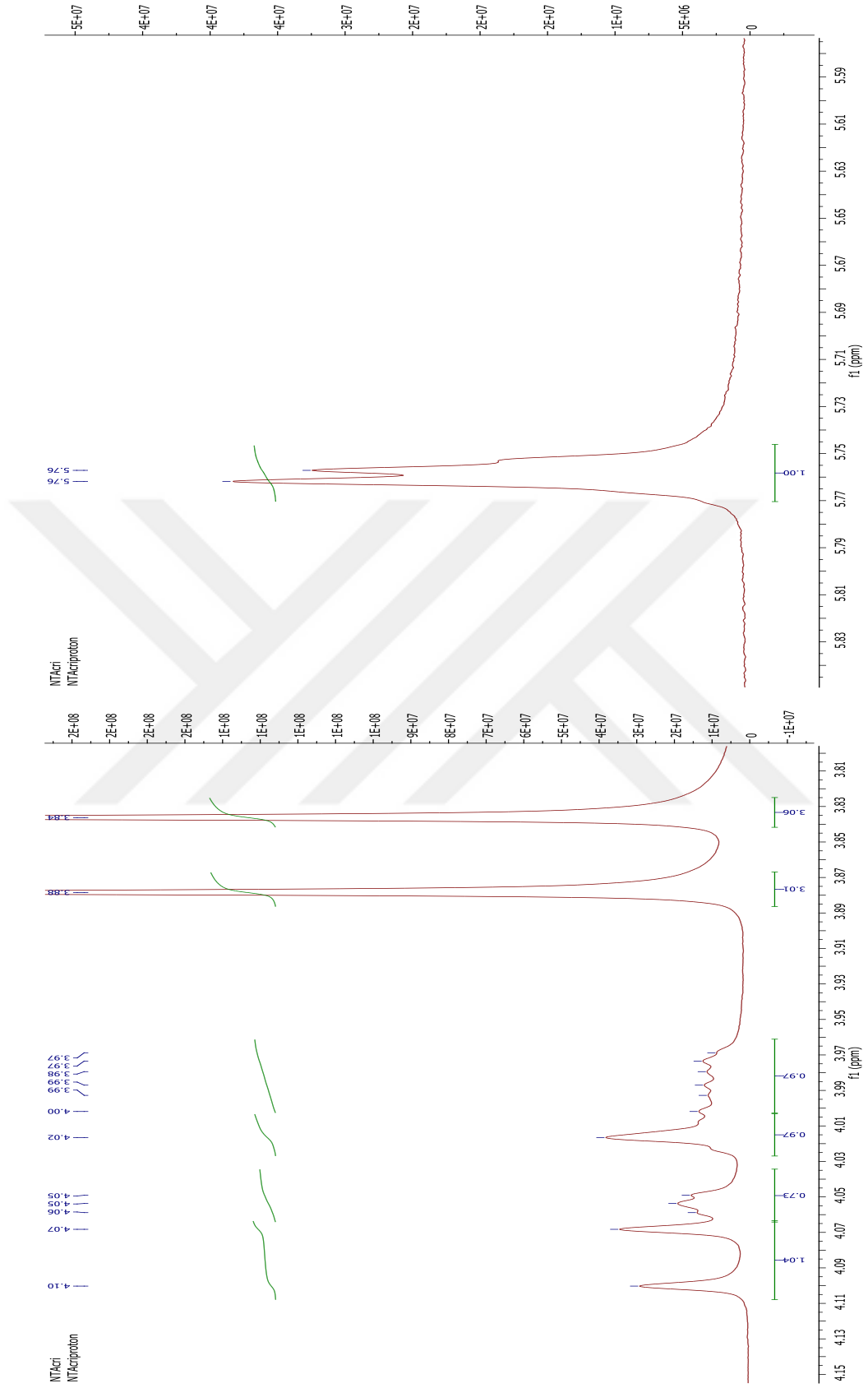
Spektrum 19. NT4 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu



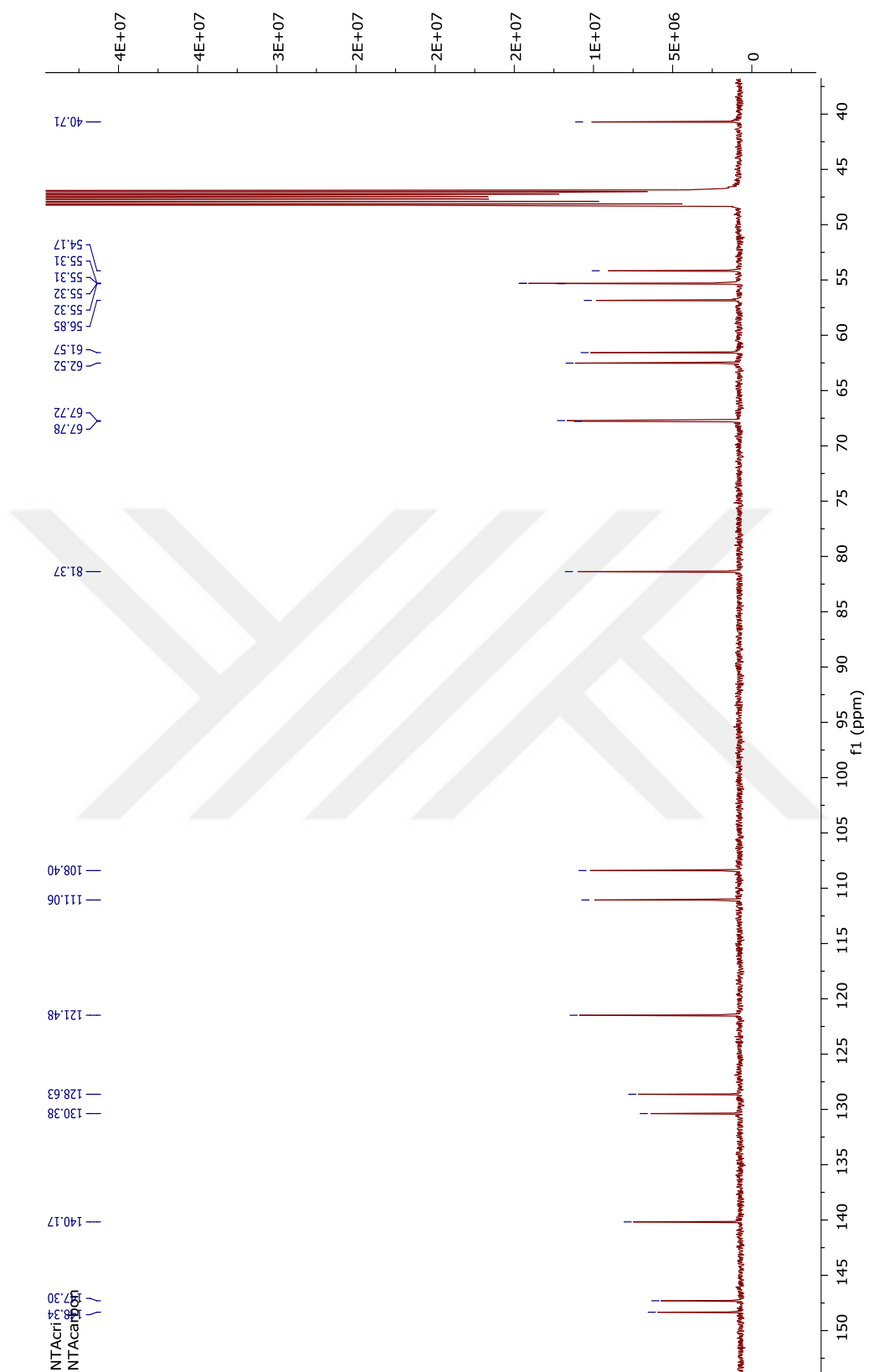
Spektrum 20. NT4 Bileşimine Ait ^1H NMR Spektrumu



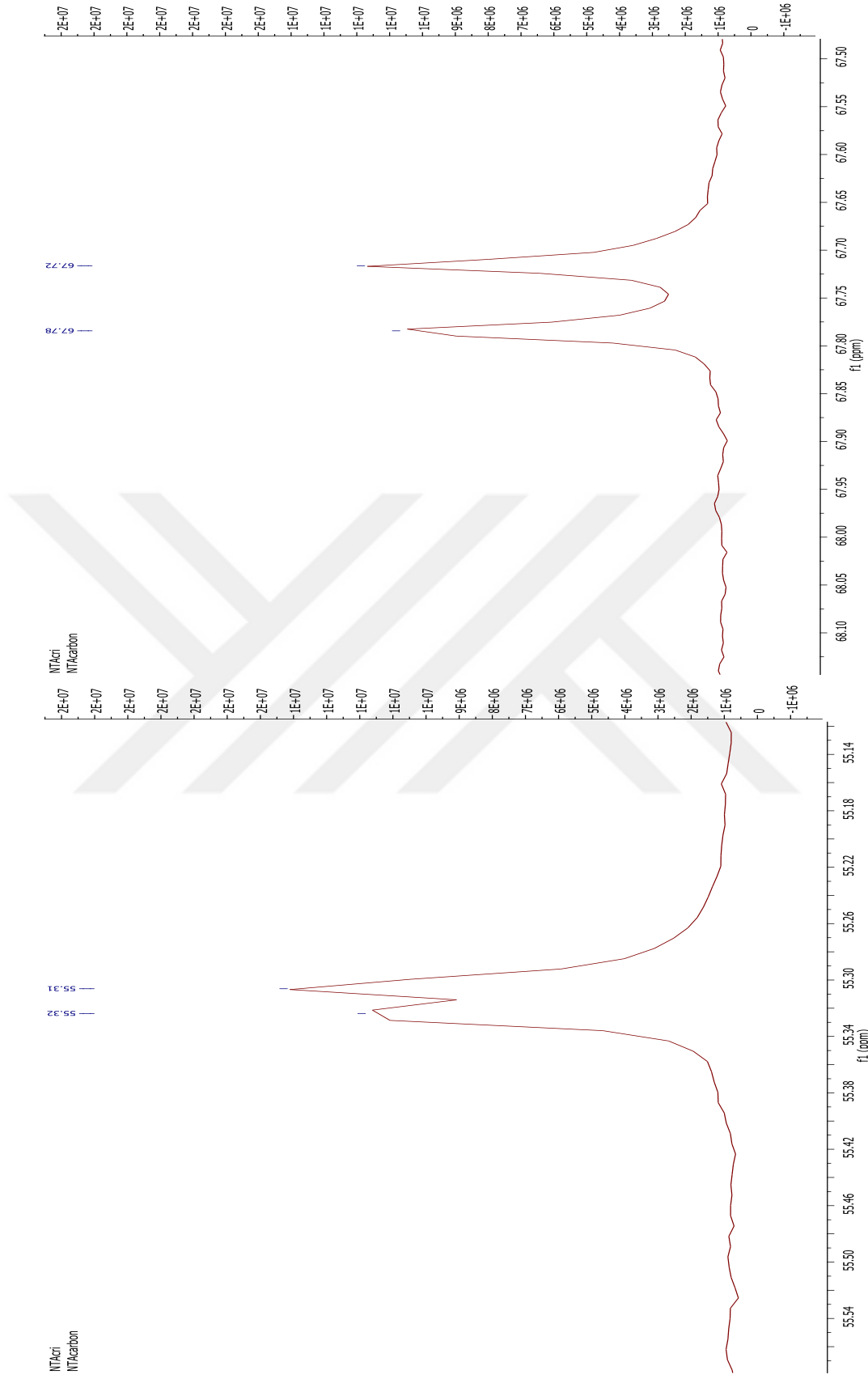
Spektrum 21. NT4 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu



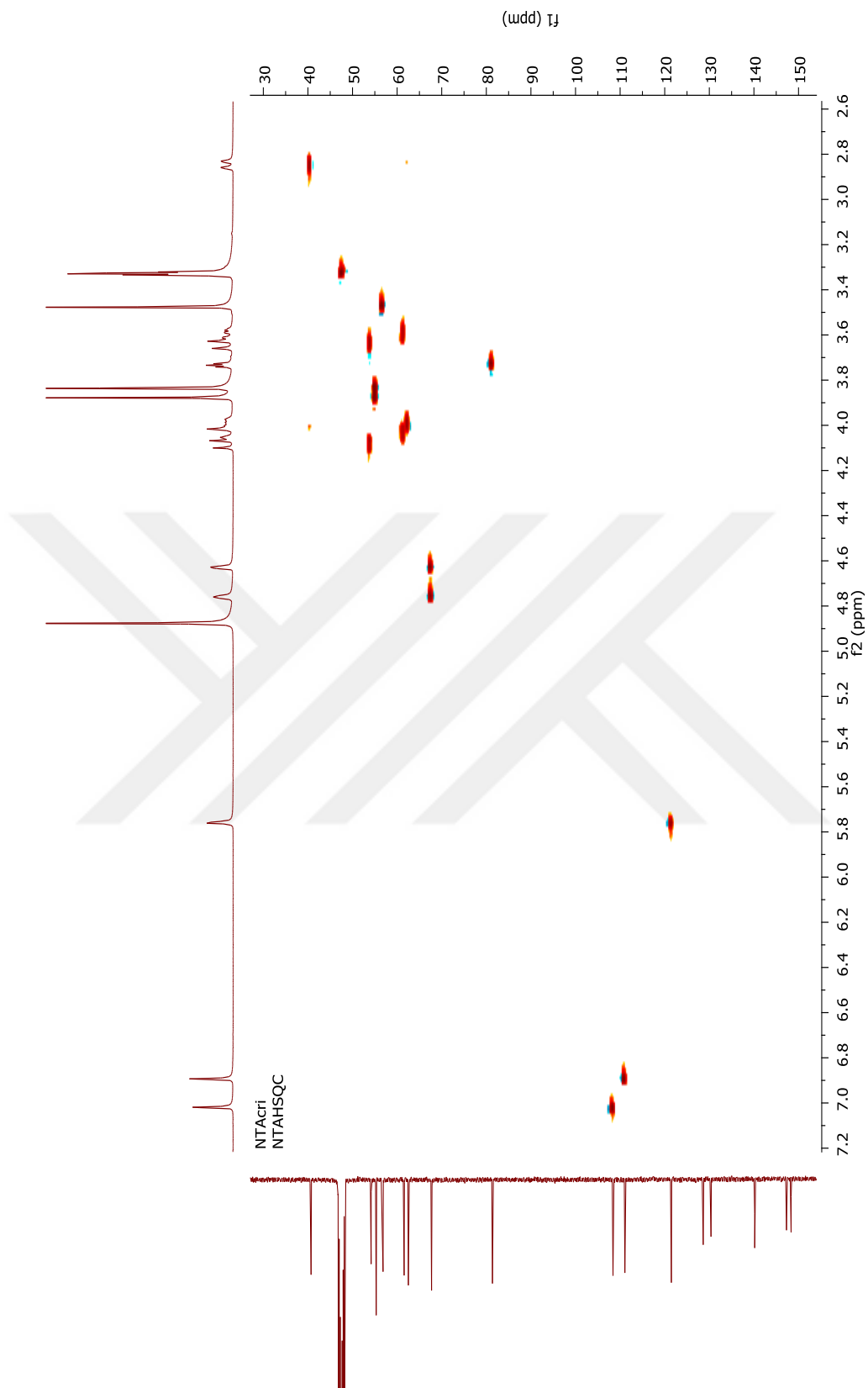
Spektrum 22. NT4 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu



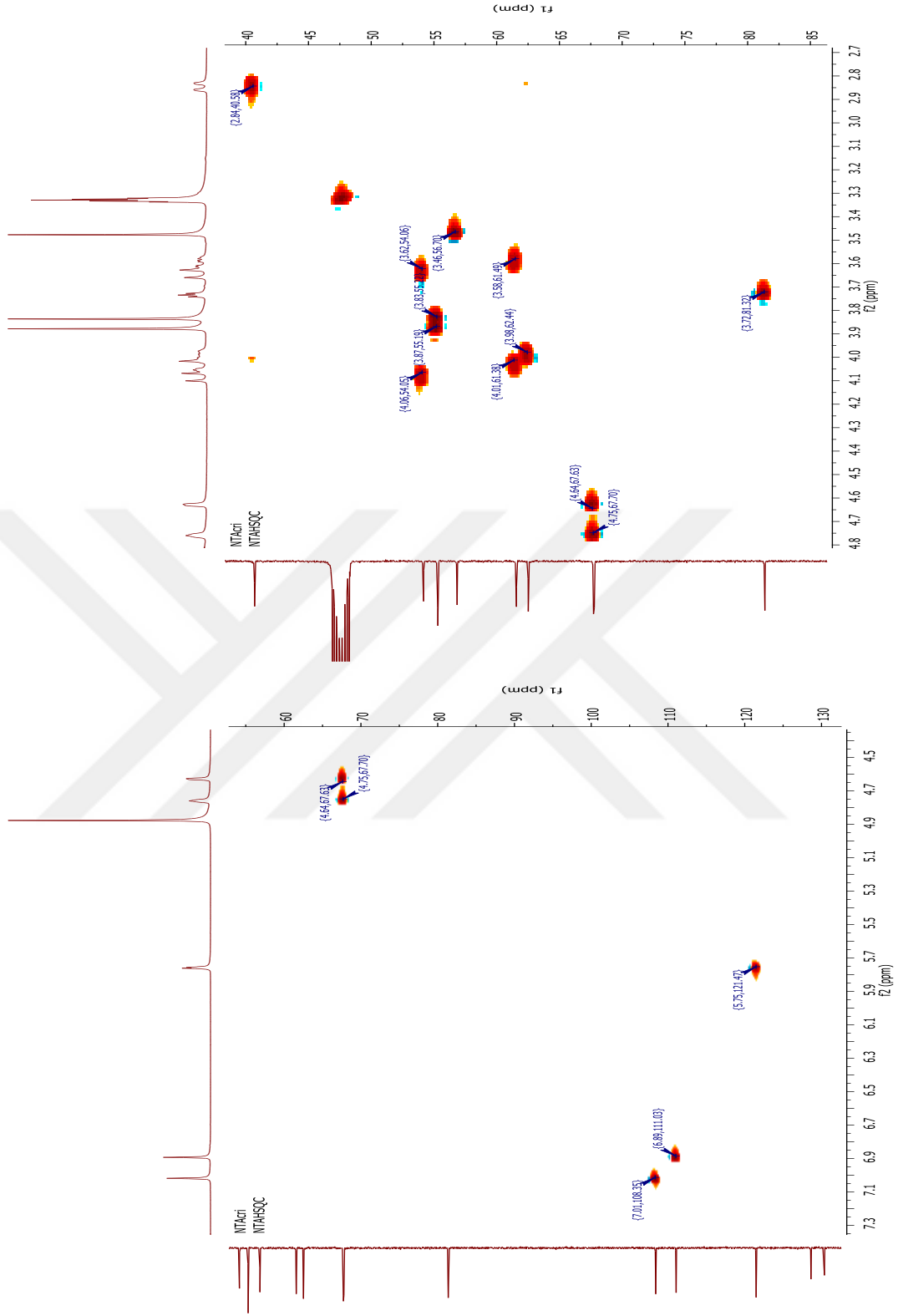
Spektrum 23. NT4 Bileşigine Ait ^{13}C NMR Spektrumu



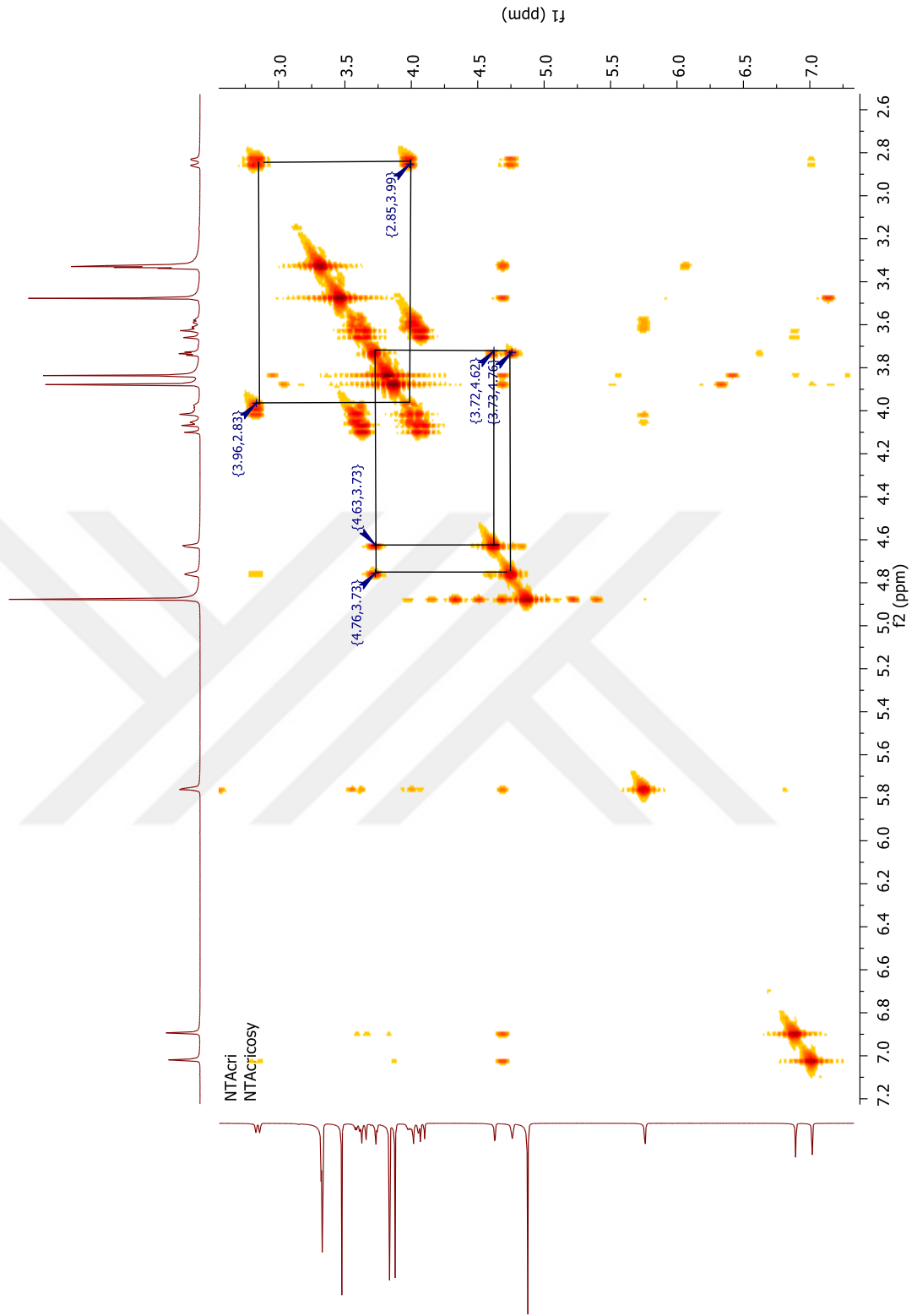
Spektrum 24. NT4 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^{13}C NMR Spektrumu



Spektrum 25. NT4 Bileşiğine Ait HSQC Spektrumu



Spektrum 26. NT4 Bileşğine Ait Genişletilmiş HSQC Spektrumu



Spektrum 27. NT4 Bileşigine Ait ^1H , ^1H -COSY Spektrumu

Tablo 39. NT4 Kodlu Bileşiğin 1D ve 2D NMR Spektral Bulguları

H	¹ H(δ)	¹³ C (δ)/HSQC	¹ H, ¹ H-COSY
1β	4.63	67.7	H-1β, H-3β
2α	3.73	81.4	H-2α, H-3β
3β	4.76	67.8	H-3β, H-1β, H-2α
4a	3.98	62.5	H-4a- H-10b
6α	3.65	54.2	H-6α, H-6β
6β	4.09		H-6β, H-6α
7	6.89	111.1	-
10	7.02	108.4	-
10b	2.85	40.7	H-10b, H-4a
11α	5.76	121.5	H-11α, H-12α,, H-12β
12α	4.02	61.6	H-12α, H-11α
12β	3.60		H-12β, H-11α
O-CH ₃	3.88	56.9	-
O-CH ₃	3.84	55.32	-
O-CH ₃	3.48	55.31	-

3.1.5. NT5 Bileşğine Ait Spektral Bulgular

$[\alpha]_D^{25} = +78$ (0.06, CHCl₃)

ESI Kütle (Spektrum28)

$m/z = 334.43$ [M+H]⁺

¹H NMR (Spektrum 29)

(500 MHz, CD₃OD): δ 6.99 (1H, s, H-10), 6.77 (1H, s, H-7), 5.91 (1H, *brs*, H-3), 4.77 (1H, td, $J=8.5$; $J=2.5$ Hz H-11), 4.68 (1H, s, H-1), 4.09 (1H, d, $J=17.5$ Hz, H-6 β), 3.88 (3H, s, O-Me), 3.83(1H, m, H-2), 3.82 (3H, s, O-Me), 3.63-3.58, (2H, m, H-12 β ve H-6 α), 3.56 (3H, s, O-Me), 3.144(1H, d-d, $J=14$ $J=2$ Hz, H4a), 2.58 (1H,d, $J=13$ Hz, H-10b), 2.36 (1H, q, H-12 α) ppm.

Genişletilmiş ¹H NMR (Spektrum 30, 31, 32)

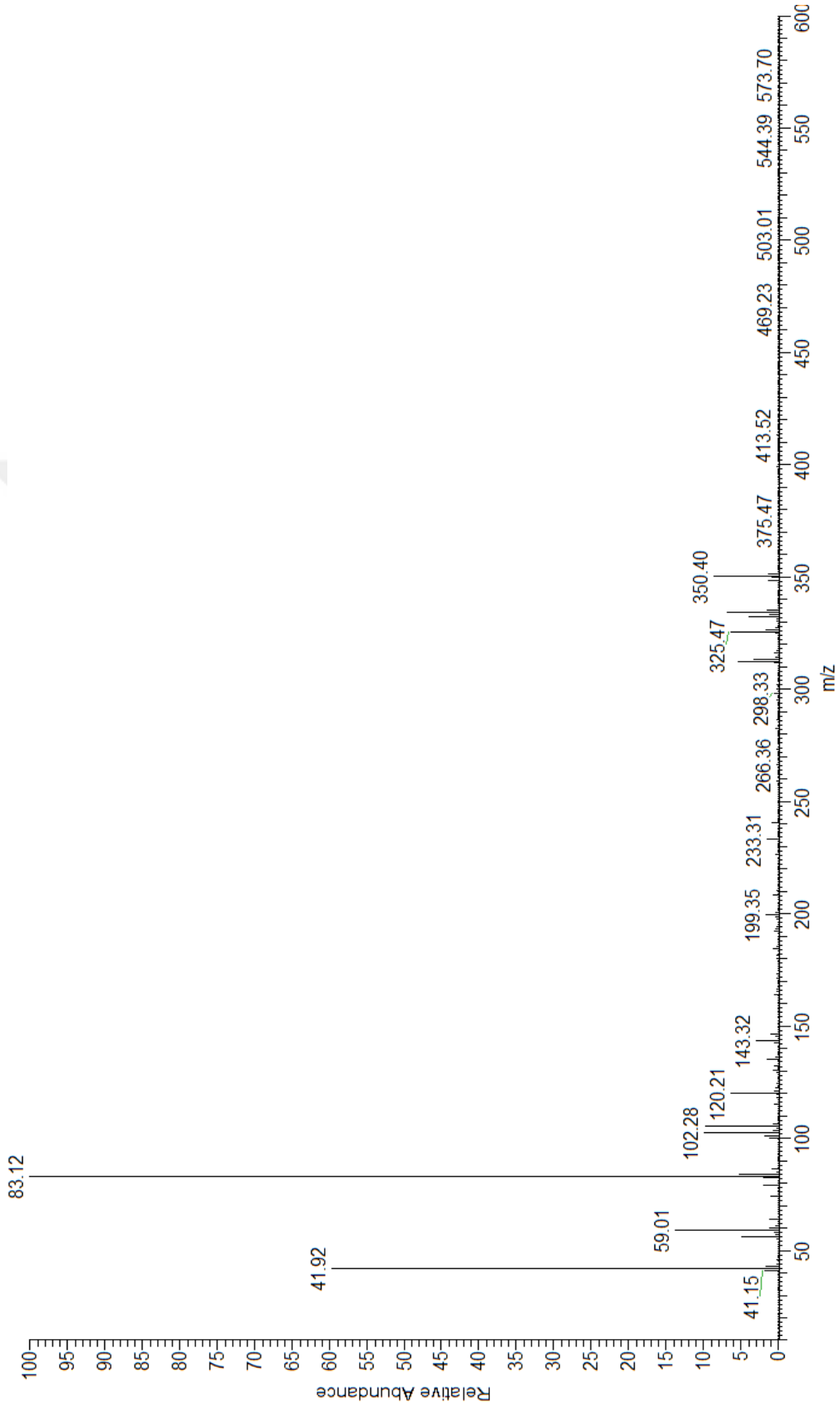
¹³C NMR (Spektrum 33)

(500 MHz, CD₃OD): δ 149.4 (C-9), 149.2 (C-8), 146.7 (C-4), 129.5 (C-6a), 128.5 (C-10a), 120.7 (C-3), 112.2 (C-7), 110.0 (C-10), 82.8 (C-2), 71.6 (C-11), 68.4 (C-1), 63.4 (C-12), 61.4 (C-4a), 58.2 (2-O-CH₃), 57.0 (C-6), 56.7 (9-O-CH₃), 56.6 (8-O-CH₃), 42.13 (C-10b) ppm.

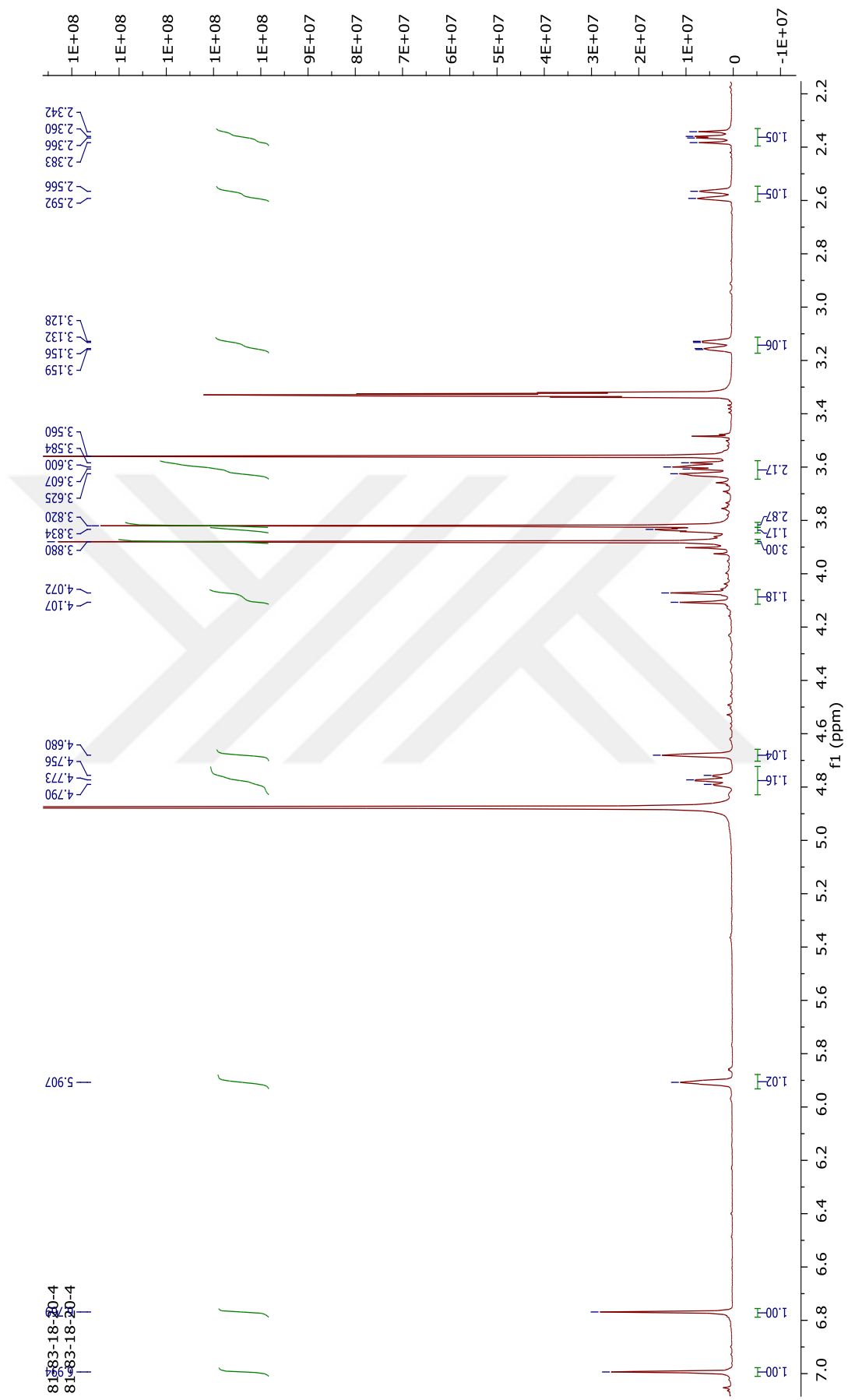
Genişletilmiş ¹³C NMR (Spektrum 34)

HSQC (Spektrum 35)

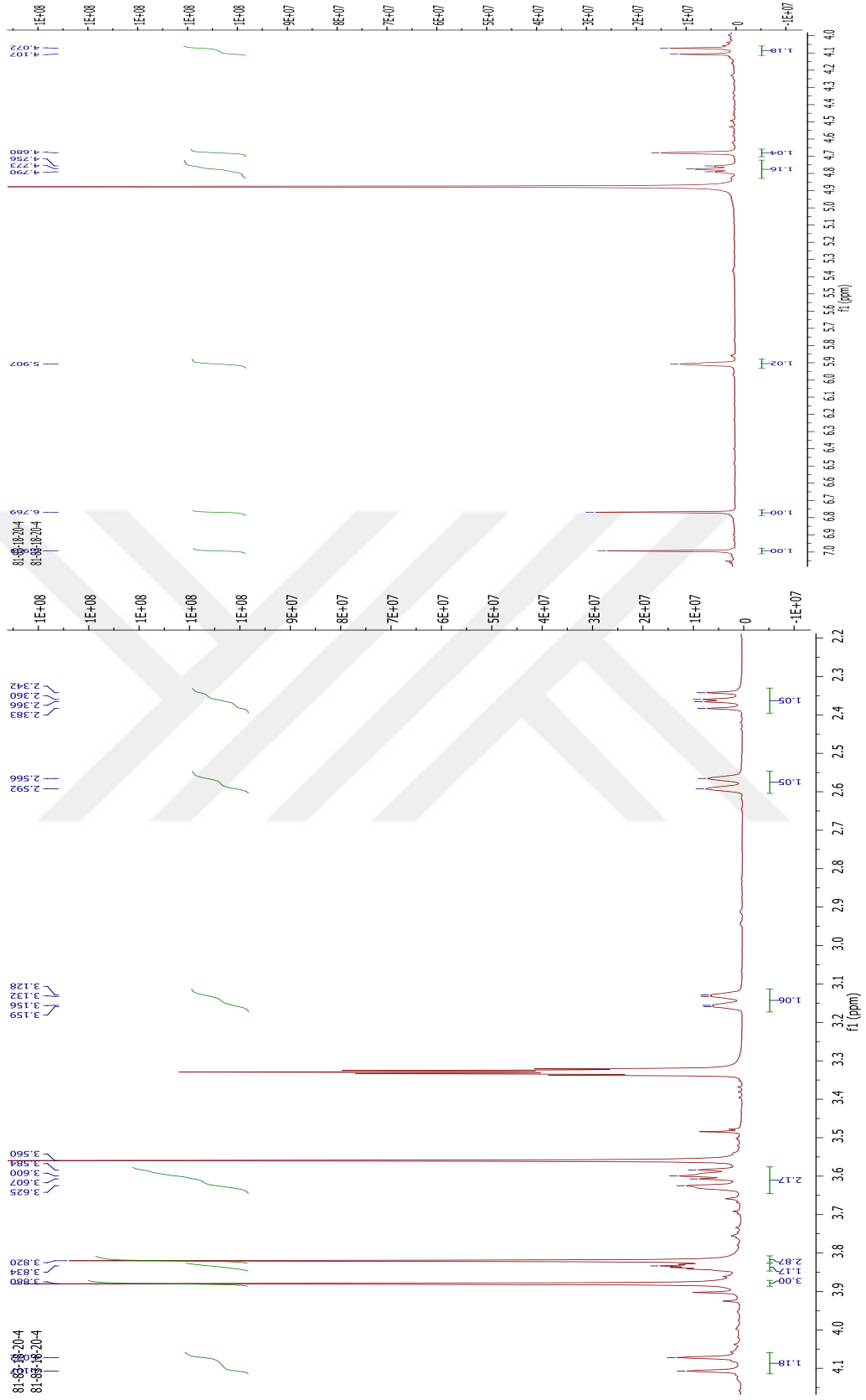
Genişletilmiş HSQC (Spektrum 36)



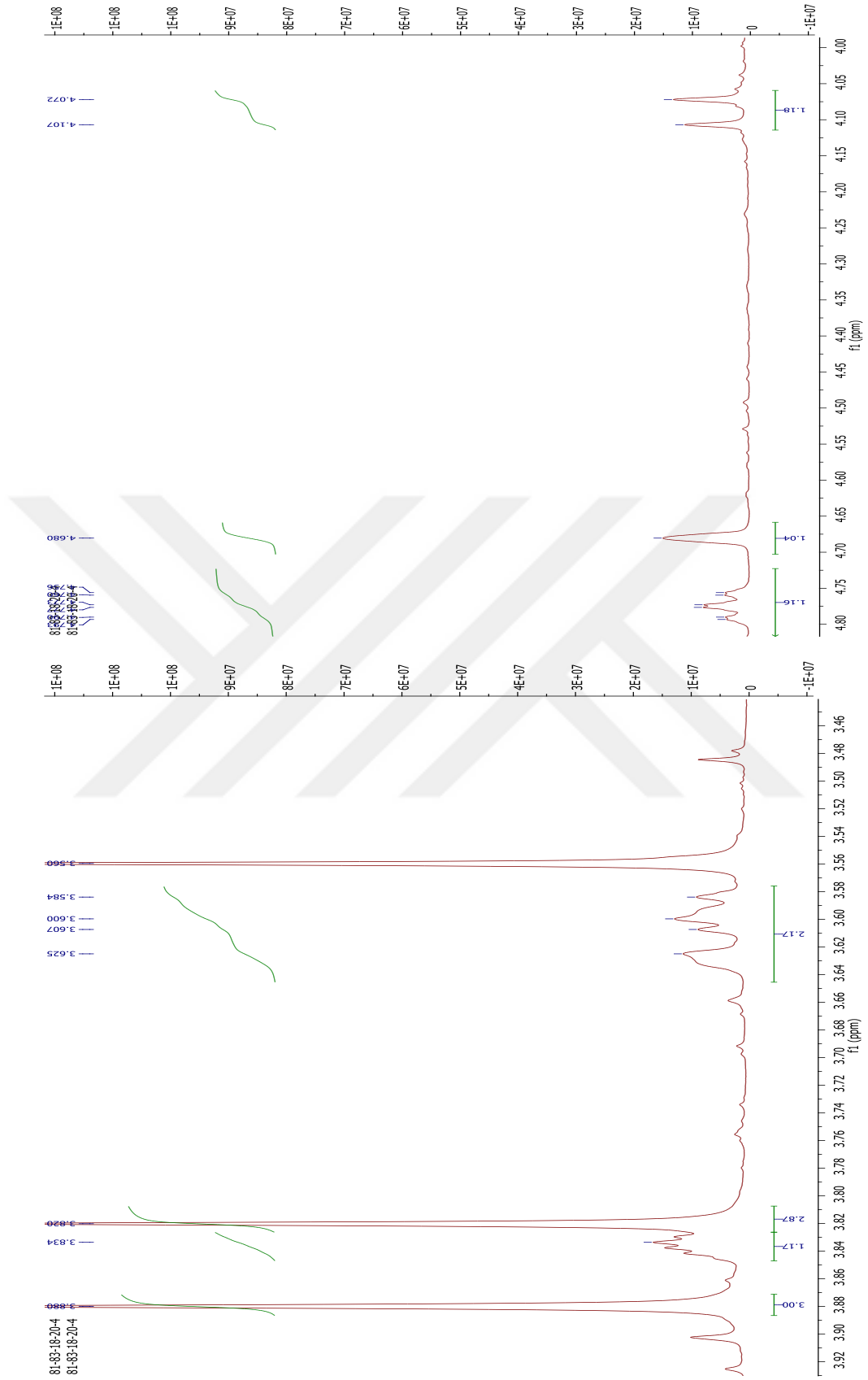
Spektrum 28. NT5 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu



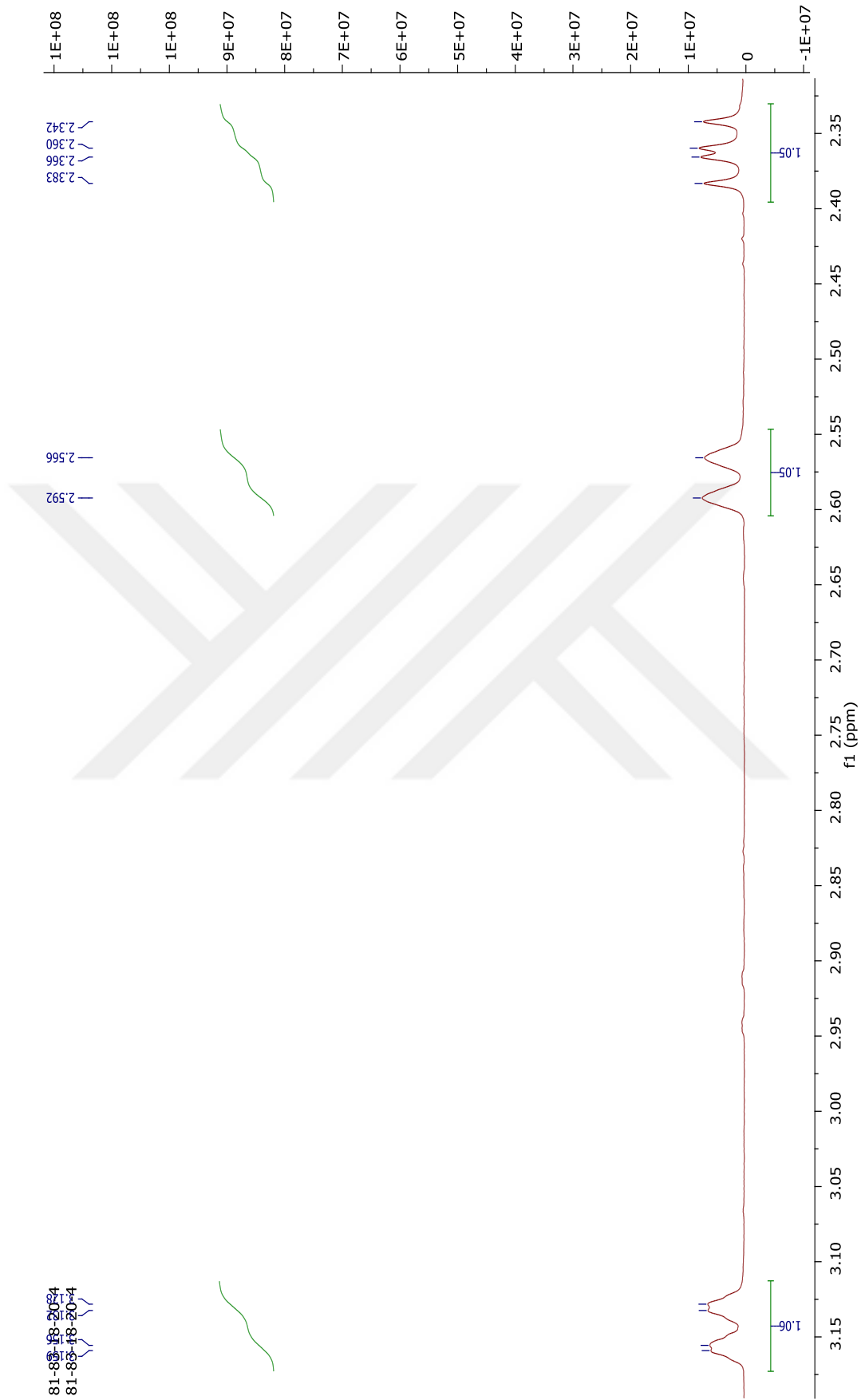
Spektrum 29. NT5 Bileşiğine Ait ¹H NMR Spektrumu



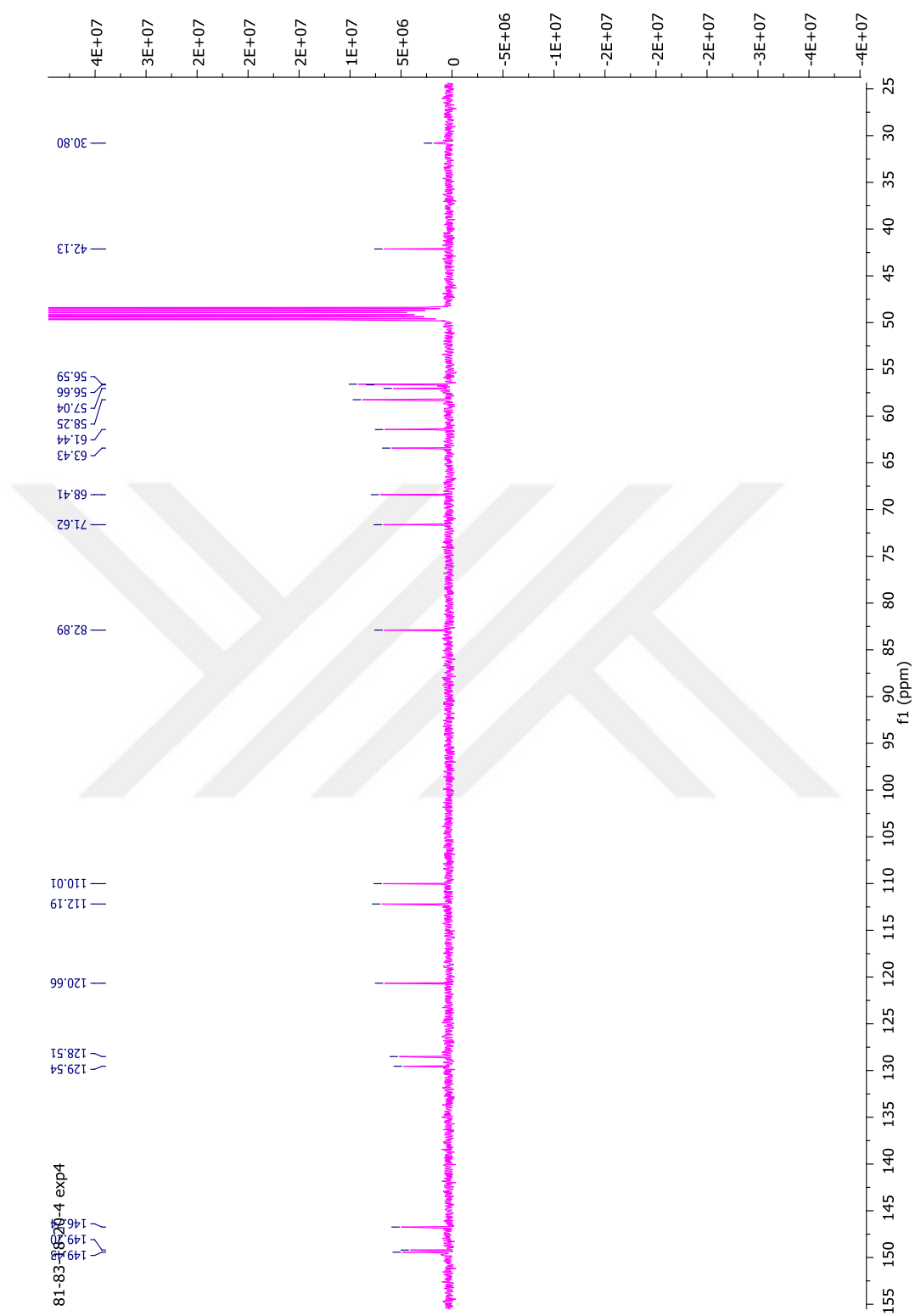
Spektrum 30. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu



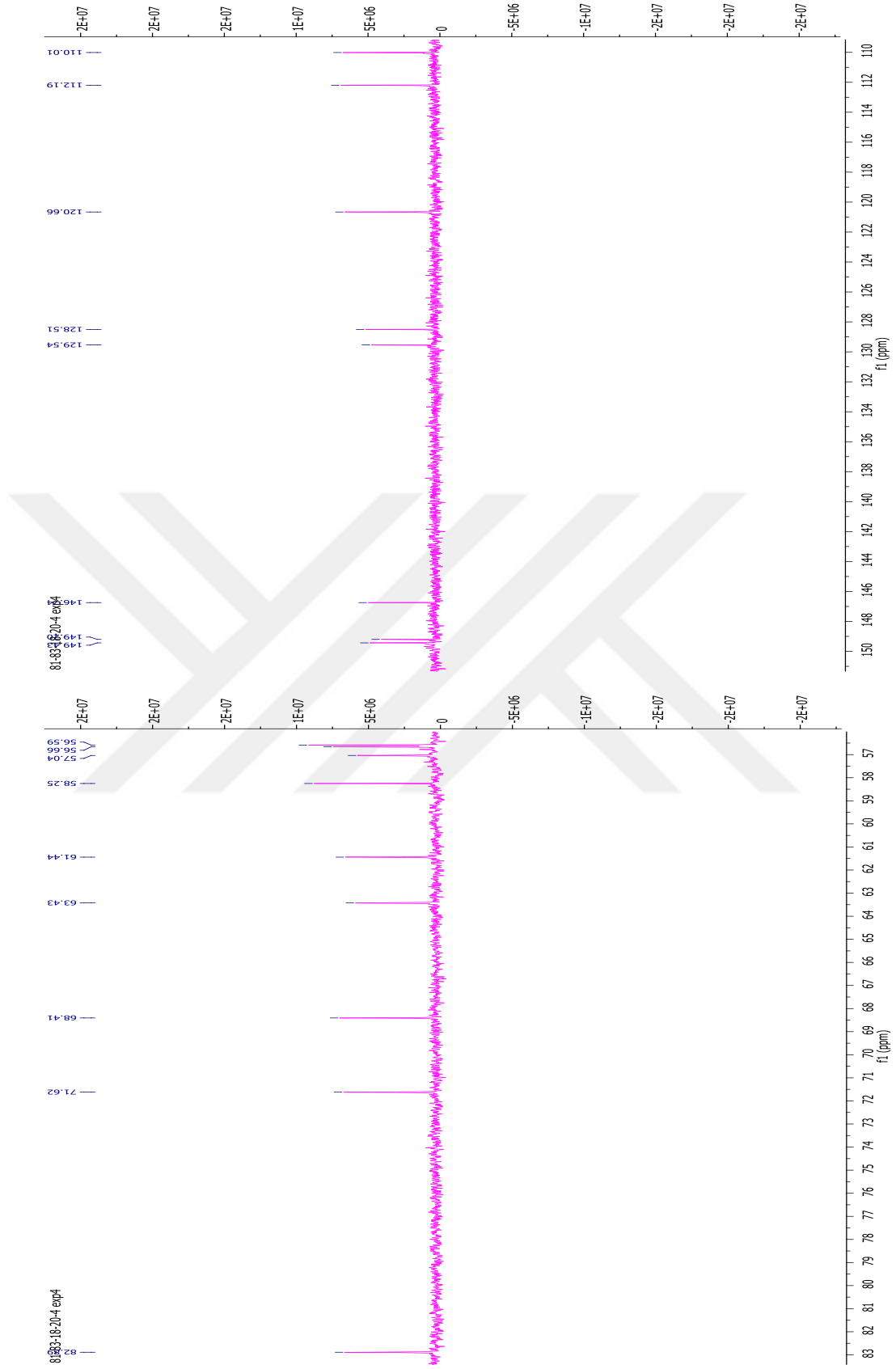
Spektrum 31. NT5 Bilesiğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu



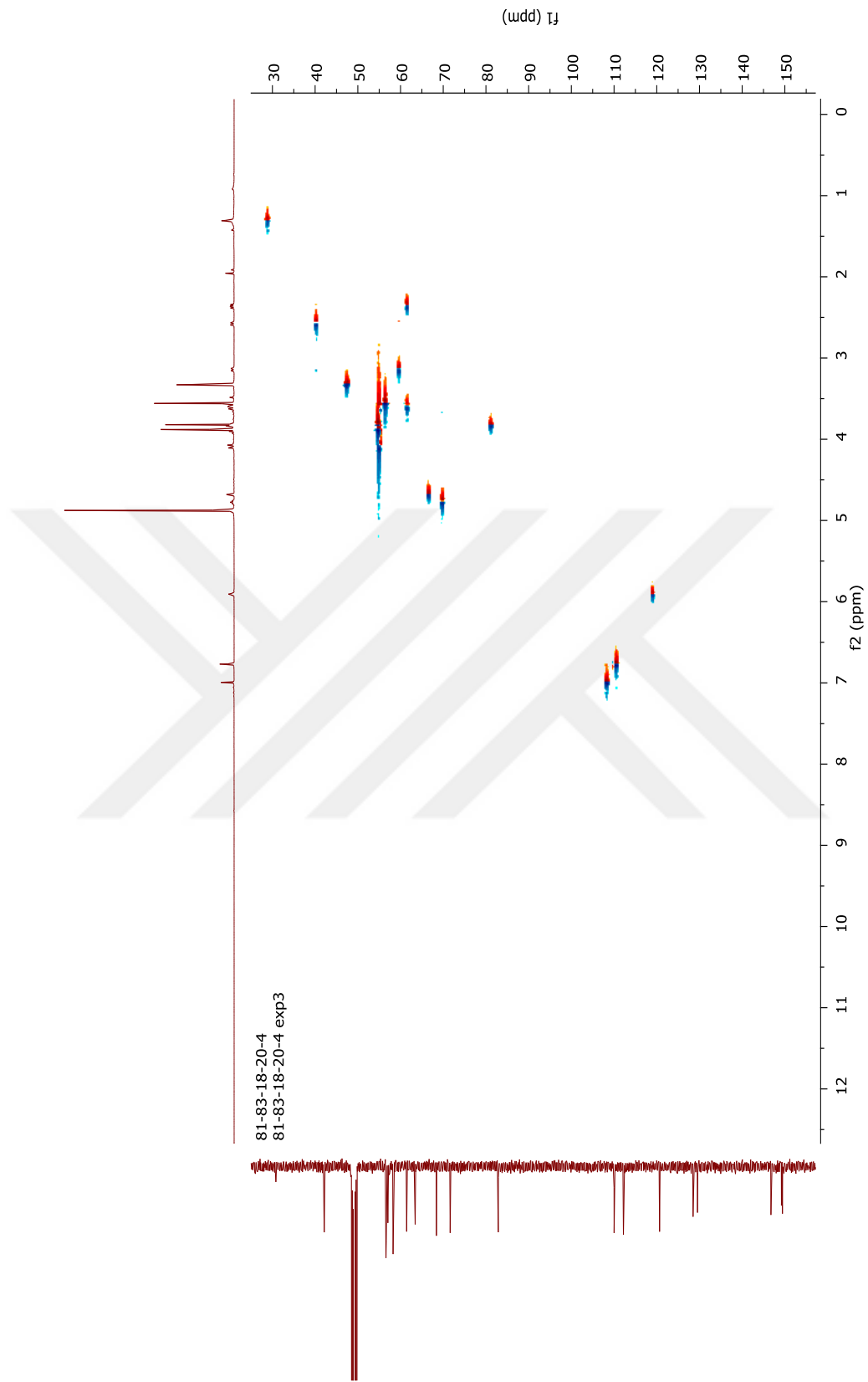
Spektrum 32. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu



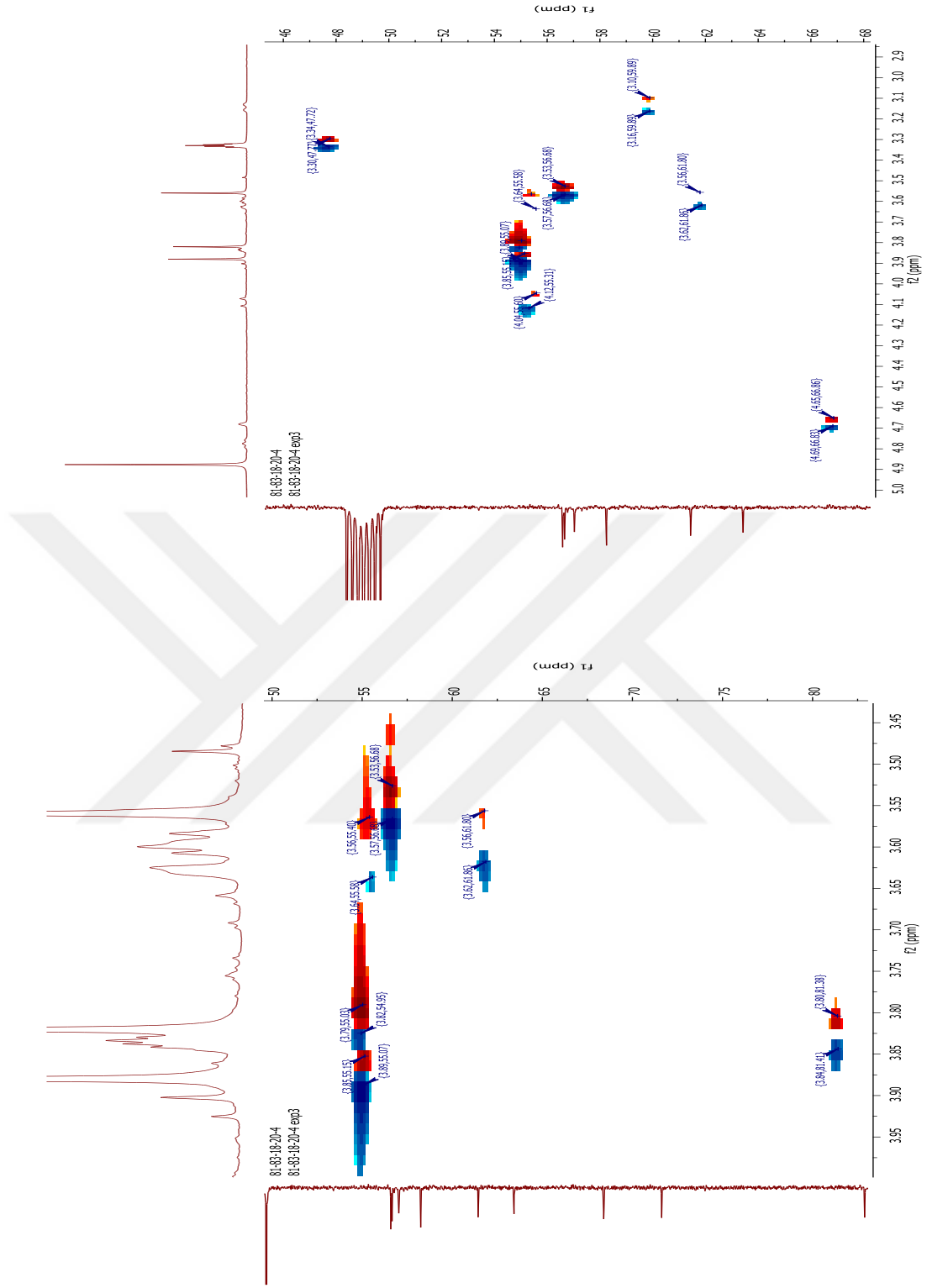
Spektrum 33. NT5 Bileşiğine Ait ^{13}C NMR Spektrumu



Spektrum 34. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^{13}C NMR Spektrumu



Spektrum 35. NT5 Bileşğine Ait HSQC Spektrumu



Spektrum 36. NT5 Bileşğine Ait Genişletilmiş HSQC Spektrumu

Tablo 40. NT5 Kodlu Bileşğin 1D ve 2D NMR Spektral Bulguları

H	¹ H(δ)	¹³ C (δ)/HSQC
1	4.68	68.4
2	3.83	82.8
3	5.91	120.7
4a	3.14	61.4
6 α	3.58-3.62	57.0
6 β	4.09	
7	6.77	112.2
10	6.99	110.0
10b	2.58	42.1
11	4.77	71.6
12 α	2.36	63.4
12 β	3.58-3.62	
O-CH ₃	3.88	56.6
O-CH ₃	3.82	56.7
O-CH ₃	3.56	58.2

3.1.6. NT6 Bileşiğine Ait Spektral Bulgular

$$[\alpha]_D^{25} = -108.5 (0.25; \text{EtOH})$$

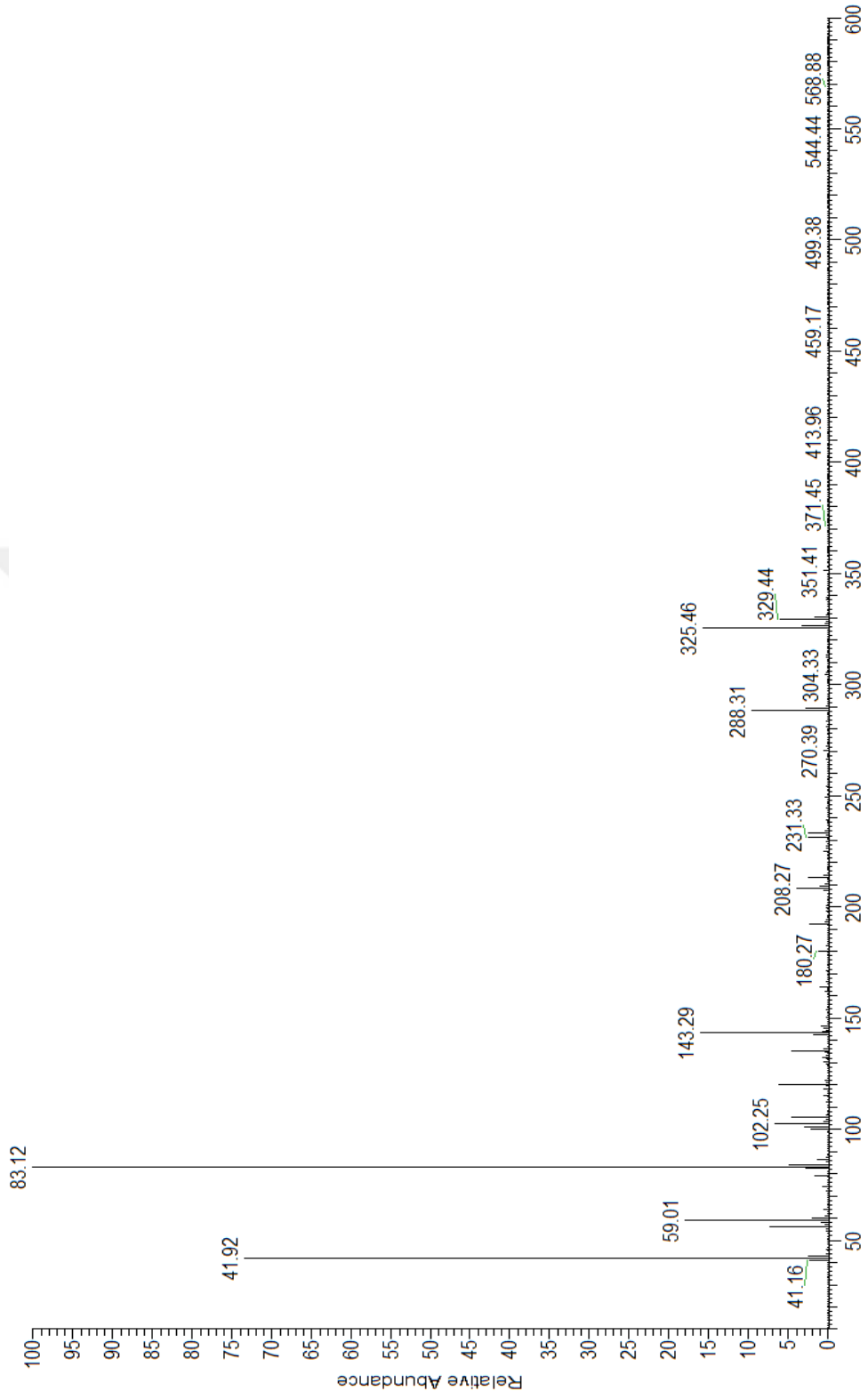
ESI Kütlet (Spektrum 37)

$$m/z = 288.31 \text{ [M+H]}^+$$

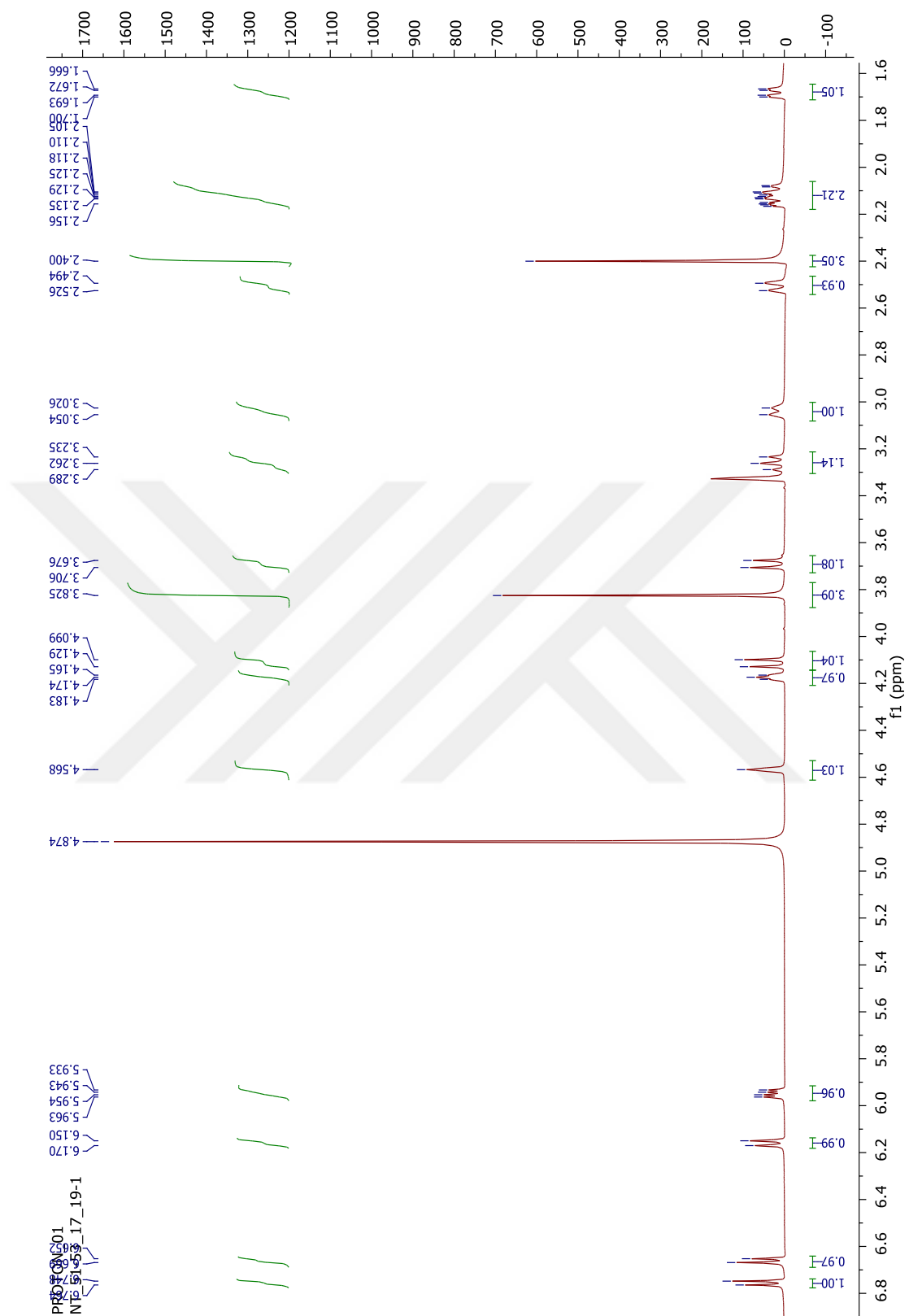
^1H NMR (Spektrum 38)

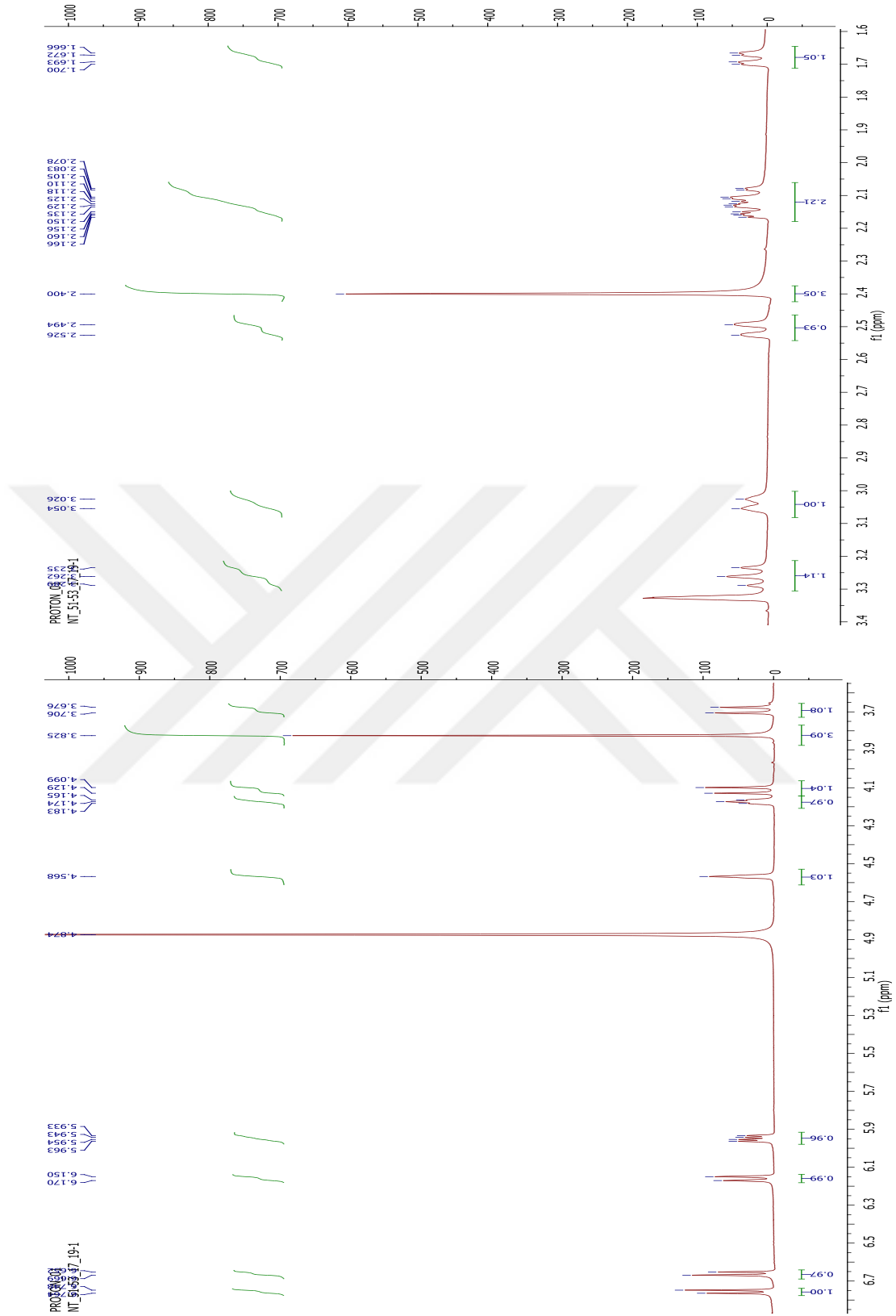
(500 MHz, CD_3OD): δ 6.76 (1H, d, $J=8$ Hz, H-8), δ 6.67 (1H, d, $J=8.5$ Hz, H-7), δ 6.16 (1H, d, $J=10$ Hz, H-4a), δ 5.94 (1H, dd, $J=10.5$; 4.5 Hz, H-4), δ 4.57 (1H, t. benzeri, H-1), δ 4.17 (1H, t, $J=4.5$ Hz, H-3), δ 4.12 (1H, d, $J=15$ Hz, H-6 α), δ 3.83 (3H, s, O-Me), δ 3.70, (1H, d, $J=15$ Hz, H-6 β), δ 3.26, (1H, t, $J=13.5$ Hz, H-12 β), δ 3.04 (1H, dt. benzeri, $J=14$ Hz, H-12 α), δ 2.51 (1H, dd, $J=16$; 1.5 Hz, H-2 β), δ 2.40 (3H, s, N-Me), δ 2.17- 2.08 (2H, m, H-11 α ve H-2 α), δ 1.68 (1H, dd, $J=14$; 3.5 Hz, H-11 β) ppm.

Genişletilmiş ^1H NMR (Spektrum 39)



Spektrum 37. NT6 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu





Spektrum 39. NT6 Bileşiğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu

3.1.7. NT7 Bileşğine Ait Spektral Bulgular

$[\alpha]_D^{25} = +107$ (0.1; EtOH)

ESI Kütle (Spektrum 40)

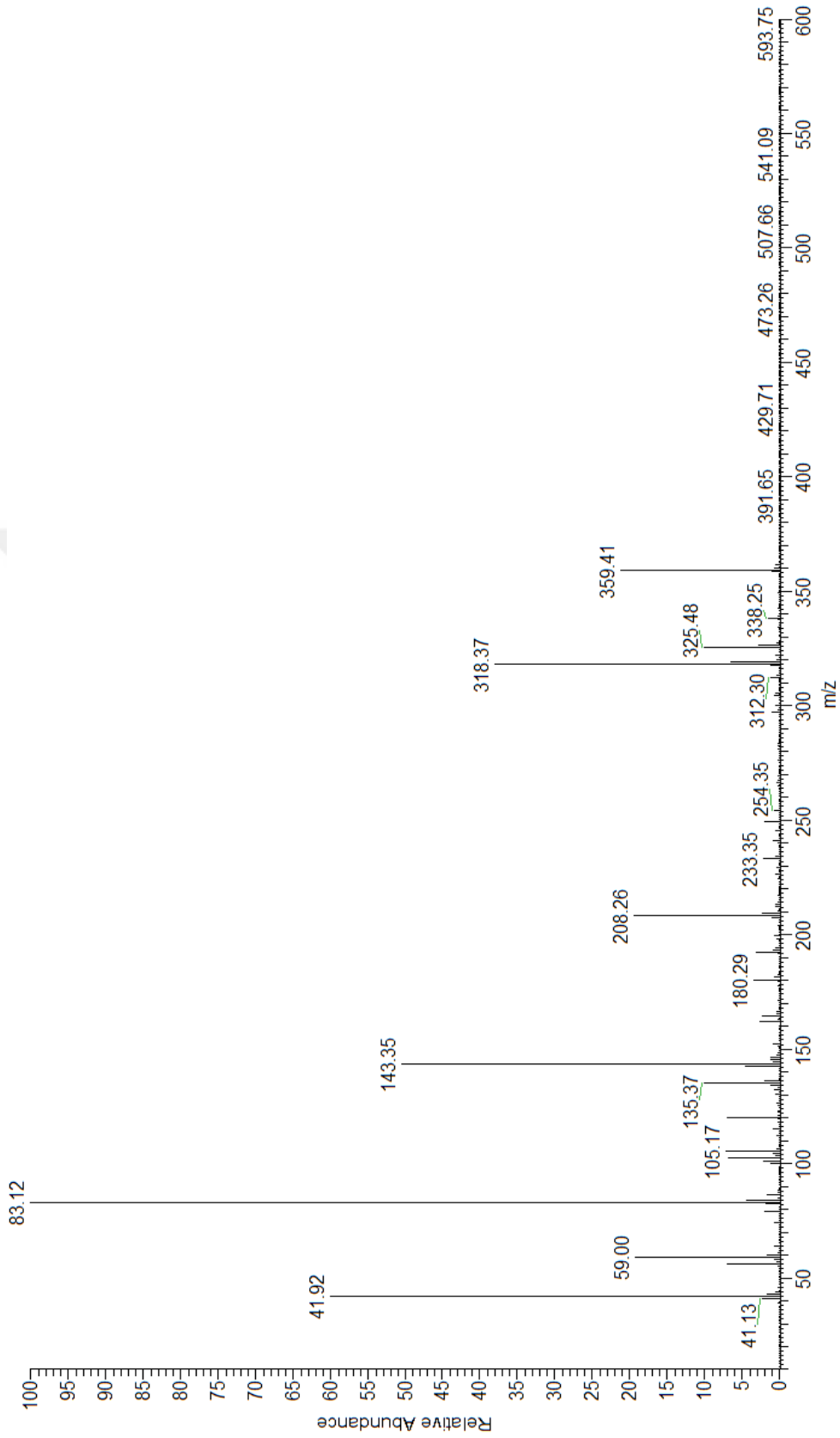
$m/z = 318.13$ $[M+H]^+$

^1H NMR (Spektrum 41)

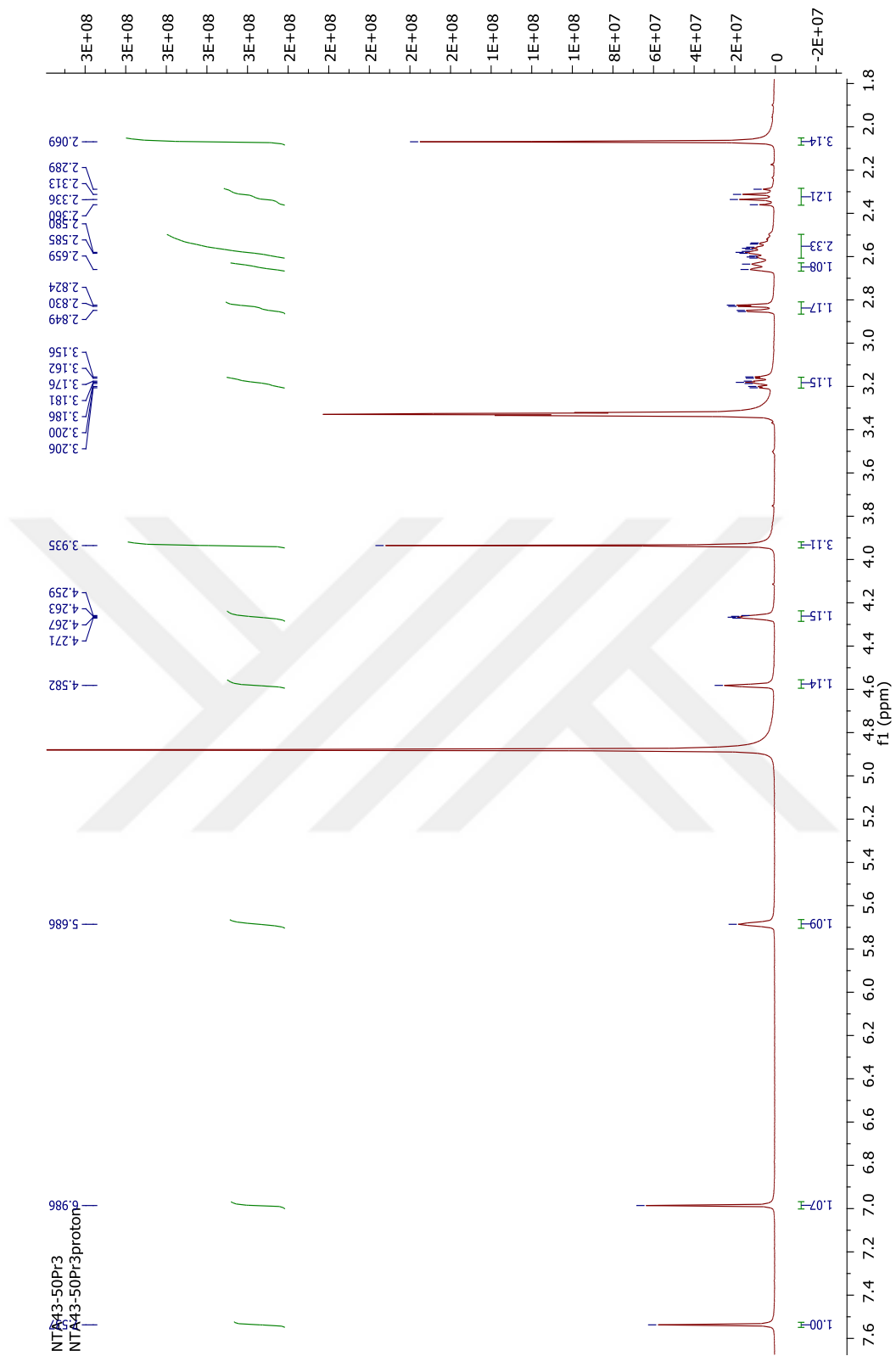
(500 MHz, CD_3OD): δ 7.54 (1H, s, H-7), 6.99 (1H, s, H-10), 5.69 (1H, *brs.*, H-3), 4.58 (1H, *brs.*, H-1), 4.27 (1H, m, H-2), 3.94 (3H, s, O-Me), 3.18 (1H, m, H-12 α), 2.84 (1H, dd, $J=12.5$; 2.5 Hz, H-10b), 2.65 (1H, *brd.*, H-4a), 2.61-2.54 (2H, m, H-11), 2.33 (1H, q, H-12 β), 2.07 (3H, s, N-Me) ppm.

Genişletilmiş ^1H NMR (Spektrum 42)

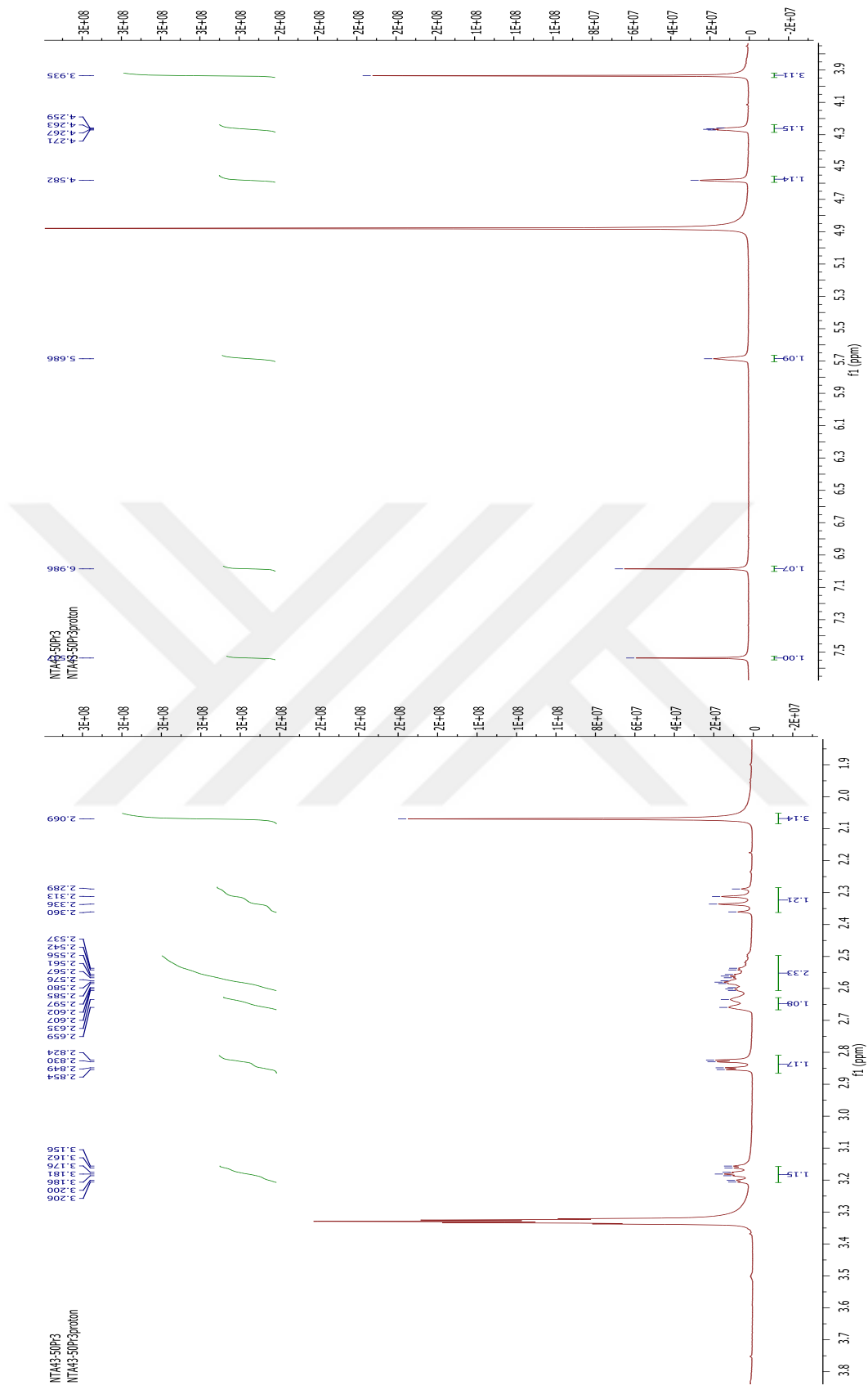
NOESY (Spektrum 43)



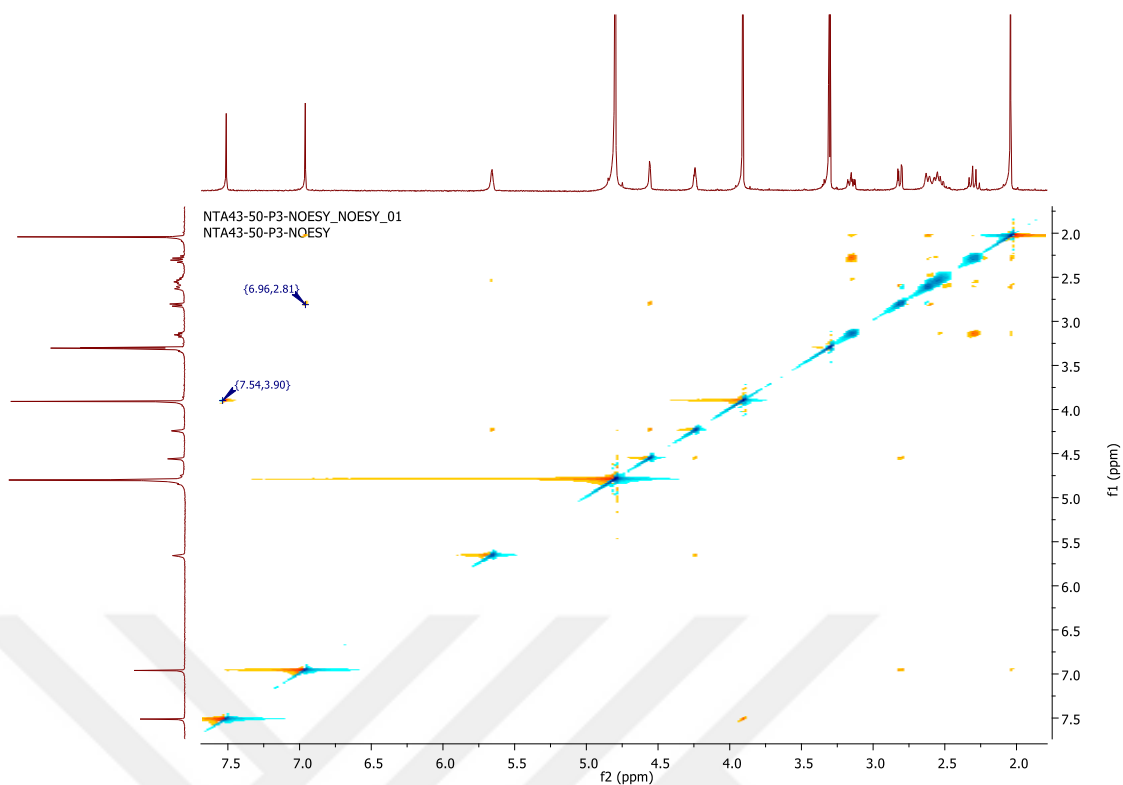
Spektrum 40. NT7 Bileşğine Ait Kütle Spektrumu



Spektrum 41. NT7 Bileşğine Ait ^1H NMR Spektrumu



Spektrum 42. NT7 Bileşiğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu



Spektrum 43. NT7 Bileşiğine Ait NOESY Spektrumu

Tablo 41. NT7 Bileşiğine Ait NOESY Bulguları

H	$^1\text{H}(\delta)$	NOESY
1	4.58	H-10b, H-2
2	4.27	H-1
3	5.69	H-10
4a	2.65	H-10b, <i>N</i> -Me, H-12 β
7	7.54	<i>O</i> -Me
10	6.99	H-10b, <i>N</i> -Me
10baa	2.84	<i>N</i> -Me
11	2.61-2.54	H-12 β , H-12 α
12 α	3.18	H-11
12 β	2.33	<i>N</i> -Me
<i>O</i> -Me	3.94	H-7
<i>N</i> -Me	2.07	H-12 β , H-10b, H-10

3.1.8. NT8 Bileşğine Ait Spektral Bulgular

$$[\alpha]_D^{25} = -15 (0.02; \text{MeOH})$$

ESI Kütlesi (Spektrum 44)

$$m/z = 288.32 \text{ [M+H]}^+$$

^1H NMR (Spektrum 45)

(400 MHz, CD_3OD): δ 6.59 (1H, s, H-10), δ 6.54 (1H, s, H-7), δ 5.99 (1H, dd, $J=10.4$; $J=1.6$ Hz, H-2), δ 5.87 (2H, s, OCH_2O), δ 5.72 (1H, dd, $J=10.4$; $J=1.2$ Hz, H-1), δ 4.28 (1H, m, H-3), δ 4.22 (1H, d, $J=16.8$, H-6 α), δ 3.83 (1H, d, $J=16.8$ Hz, H-6 β), δ 2.97-2.94, (2H, m, H-12 α ve H-4a), δ 2.81, 1H, d, H12 β), δ 2.64 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H-11), δ 2.23 (1H, bd, $J=12.8$, H-4 α), δ 1.57, (1H, ddd, $J=12.8$ $J=10.8$, $J=4.4$ H-4 β) ppm.

Genişletilmiş ^1H NMR (Spektrum 46, 47)

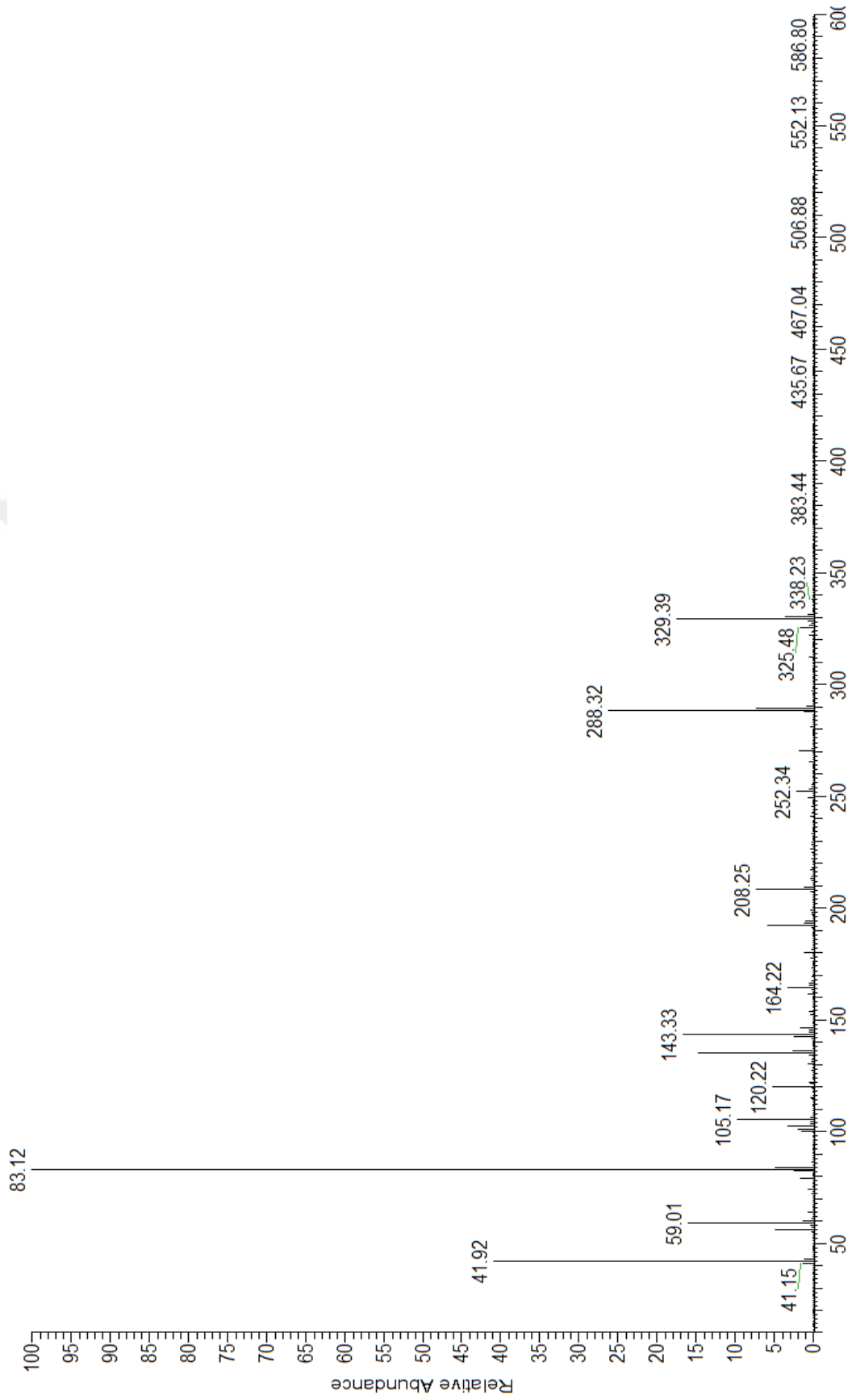
^1H , ^1H -COSY (Spektrum 48)

^{13}C NMR (Spektrum 49)

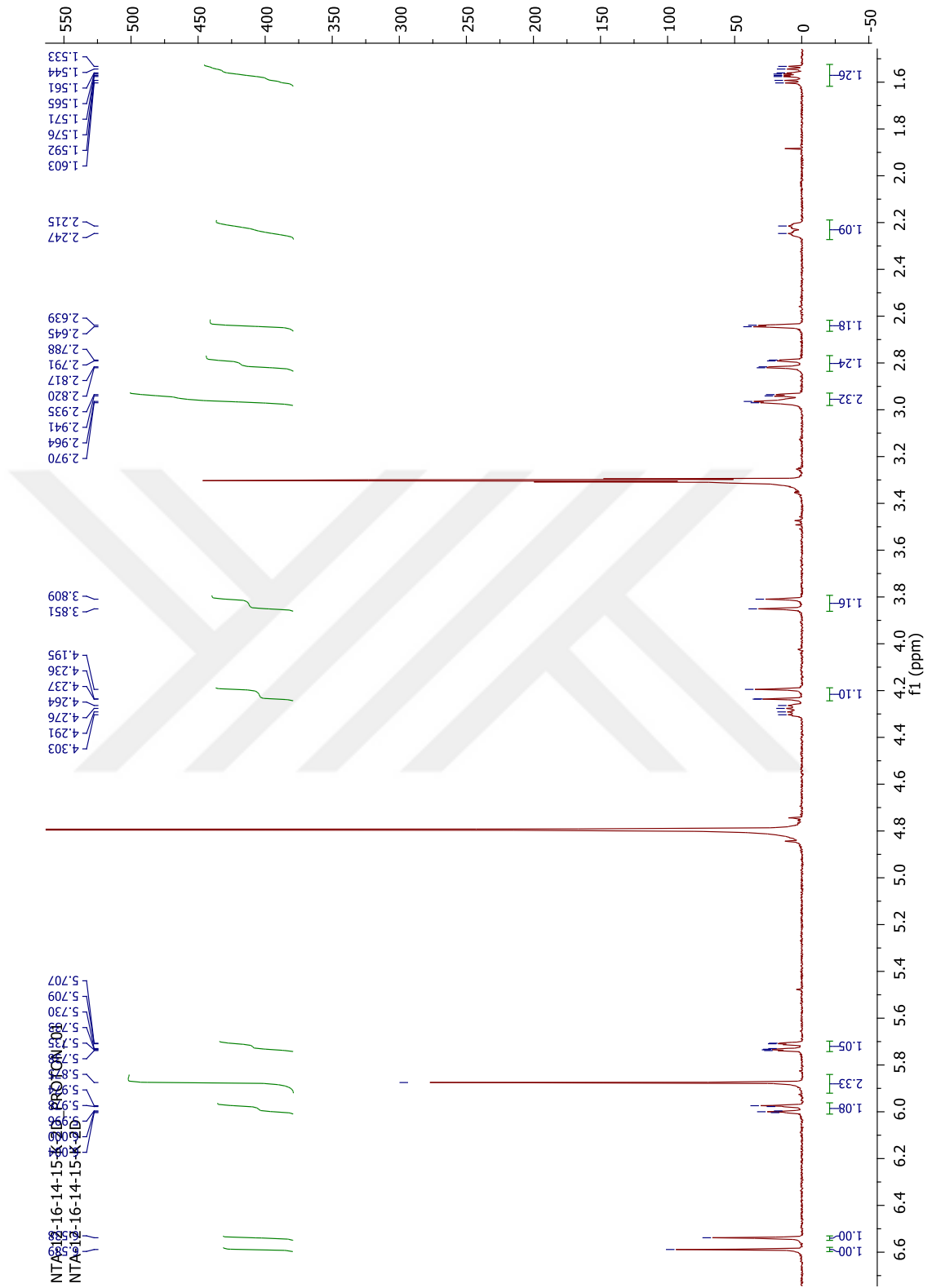
(125MHz, CD_3OD): δ 147.2 (C-9), 145.9 (C-8), 135.2 (C-1), 131.4 (C-2), 130.3 (C-10a), 124.7 (C-6a), 109.7 (C-10), 106.1 (C-7), 100.7 (O-CH₂-O), 81.9 (C-4b), 67.0 (C-4a), 62.6 (C-3), 61.3 (C-6), 54.6 (C-12), 49.3 (C-11), 33.7 (C-4) ppm.

HMBC (Spektrum 50)

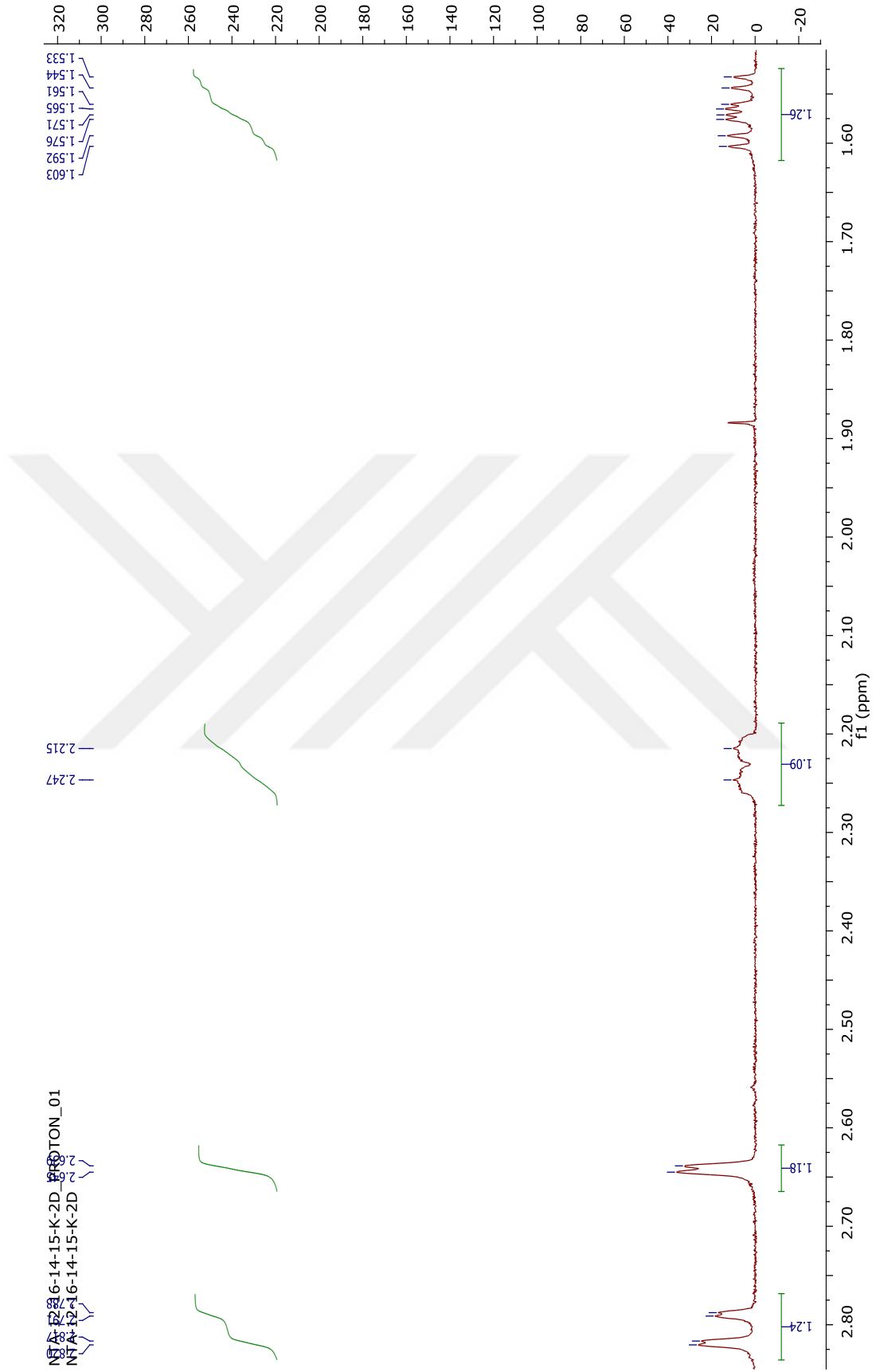
NOESY (Spektrum 51)



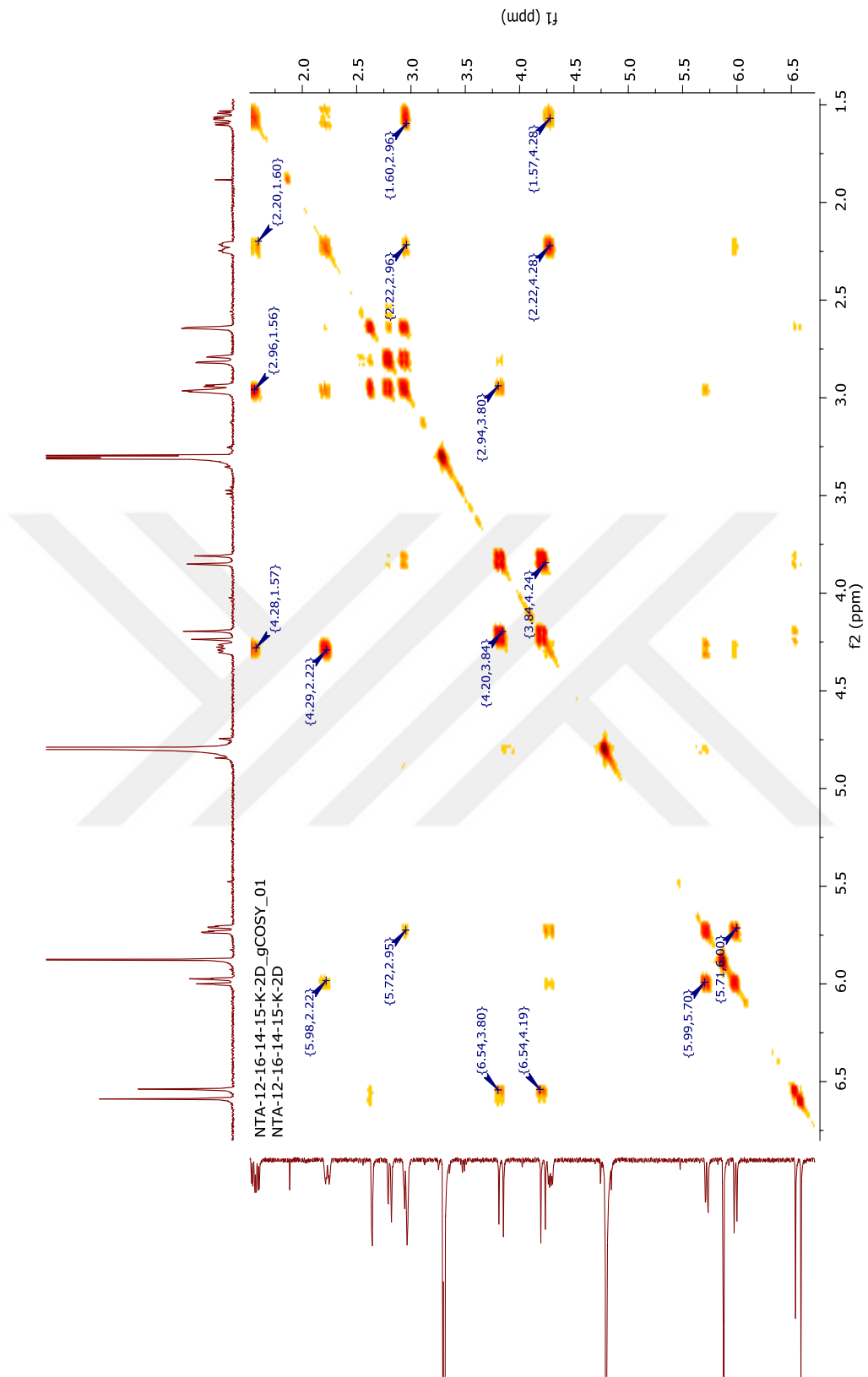
Spektrum 44. NT8 Bileşğine Ait Kütle Spektrogramı



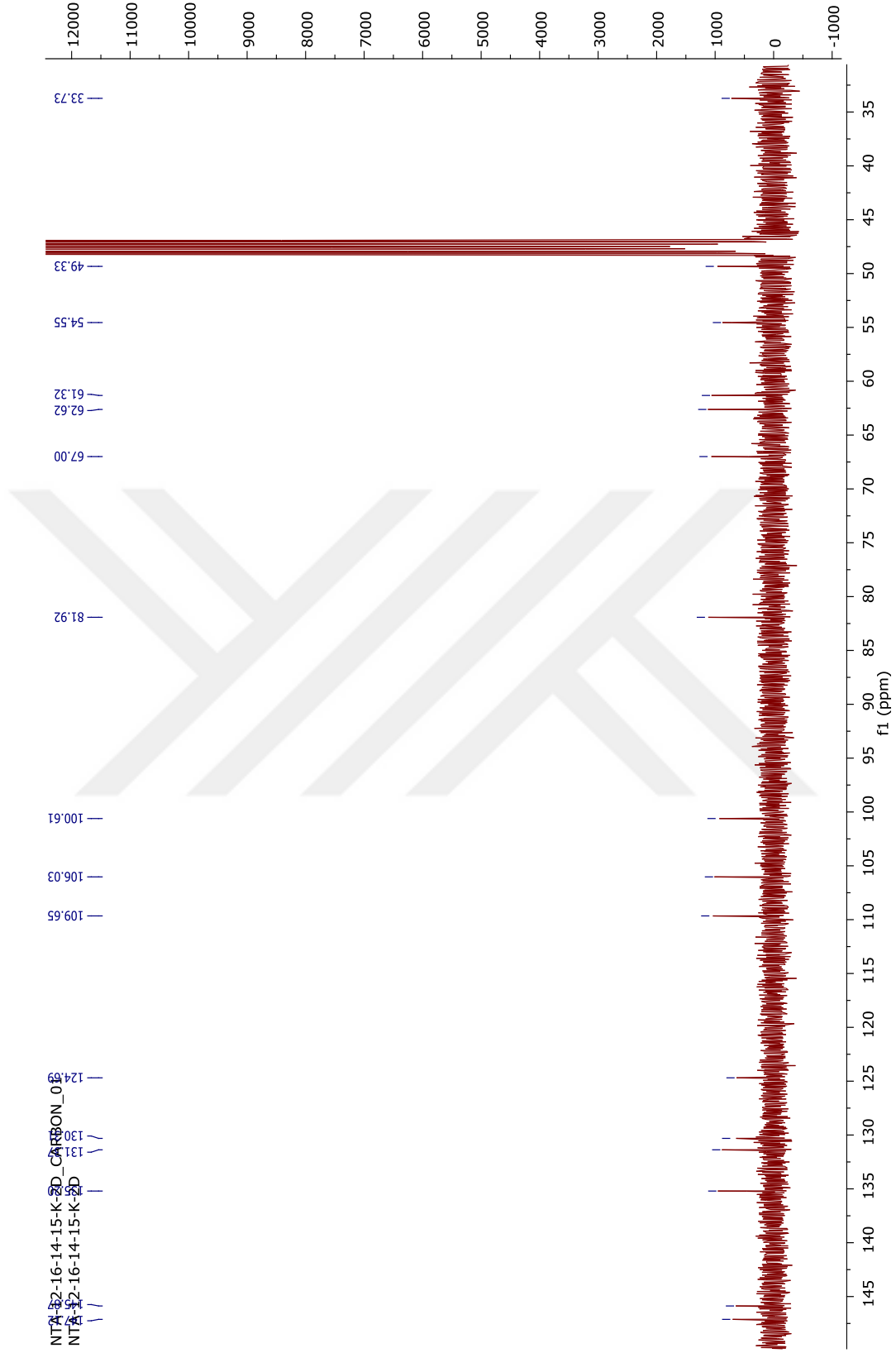
Spektrum 45. NT8 Bileşiğine Ait ¹H NMR Spektrumu



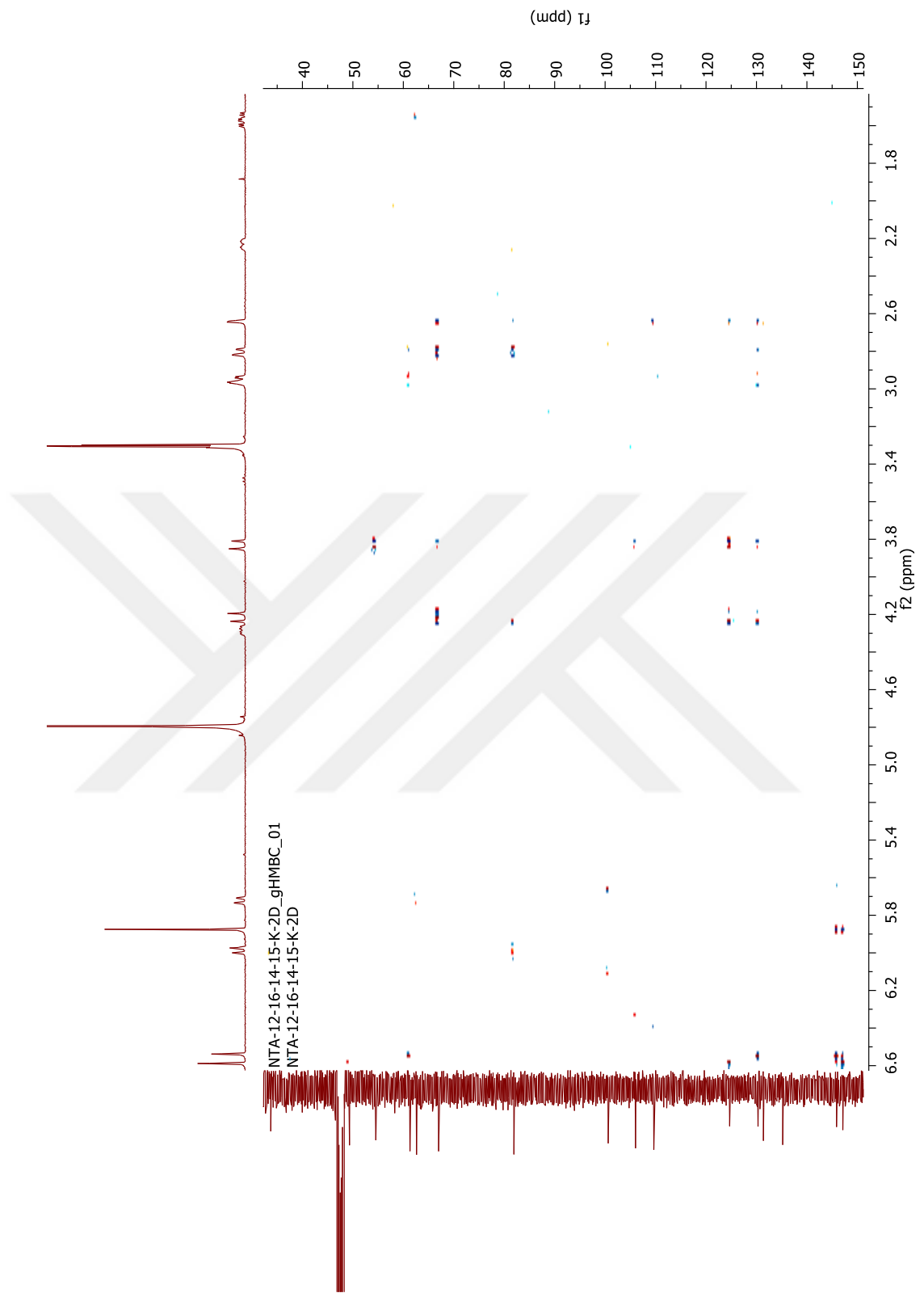
Spektrum 47. NT8 Bileşğine Ait Genişletilmiş ^1H NMR Spektrumu



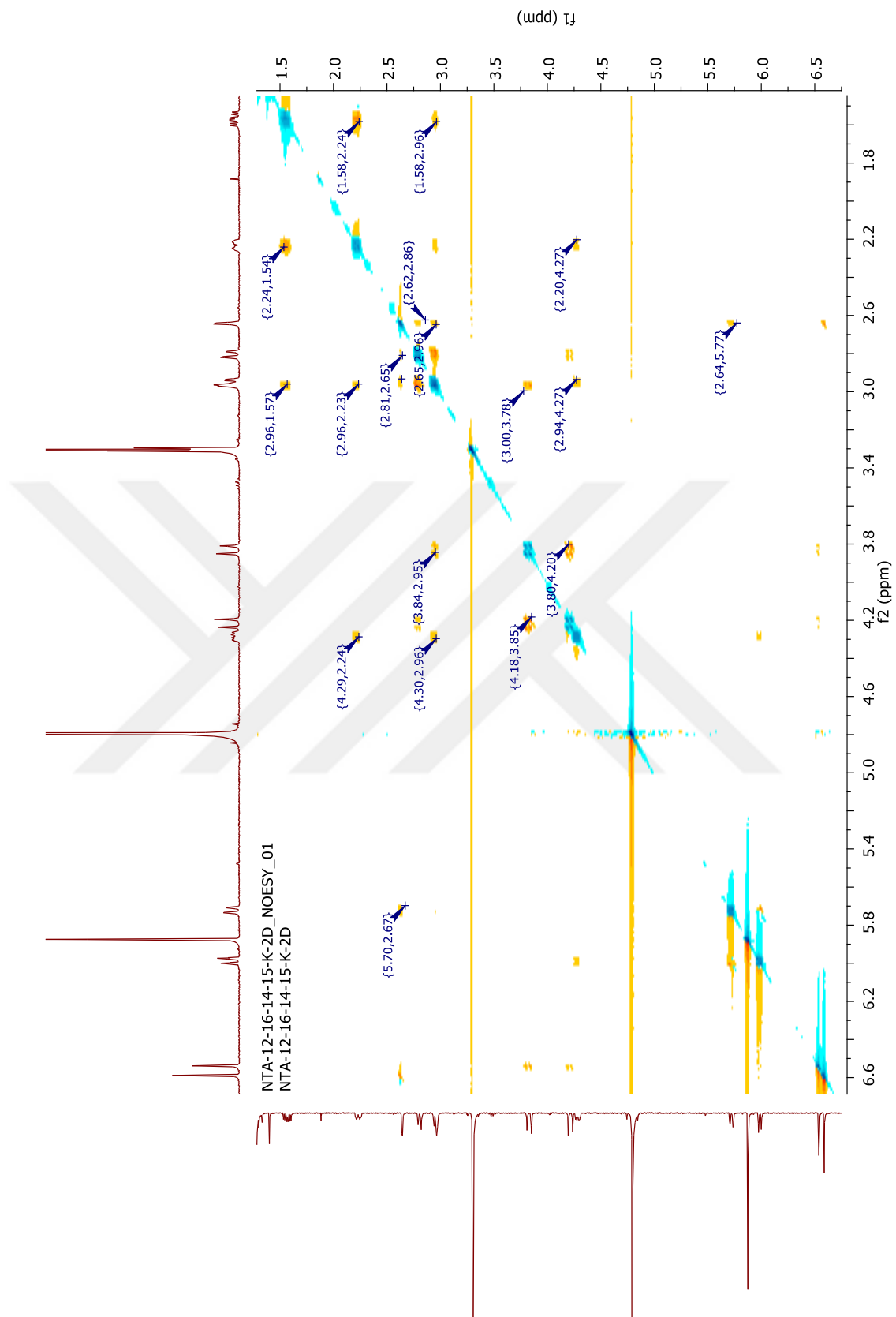
Spektrum 48. NT8 Bileşiğine Ait ^1H , ^1H -COSY Spektrumu



Spektrum 49. NT8 Bileşğine Ait ^{13}C NMR Spektrumu



Spektrum 50. NT8 Bileşiğine Ait HMBC Spektrumu



Spektrum 51. NT8 Bileşiğine Ait NOESY Spektrumu

Tablo 42. NT8 Kodlu Bileşiğin 1D ve 2D NMR Spektral Bulguları

¹ H	H(δ)	¹³ C (δ)/HSQC	¹ H, ¹ H-COSY	HMBC	NOESY
1	5.72	135.2	H-1 H-2	C-3	H-11 H-2
2	5.99	131.4	H-2 H-3	C-4b	H-1 H-3
3	4.28	62.6	H-3 H-4 β H-4 α	-	H-4 α H-12 α x
4a	2.97-2.94	67.0	H-4 α H-4 β H-4 α	C-6	H-6 α H-4 α H-4 β
4 α	2.23	33.7	H-4 H-4a	-	H-4a, H-12 eq H-3
4 β	1.57		H-4 α	C-3	H-4a,
6 α	4.22	61.3	H-6 α H-6 β H-7	C-4a, C-6a C-10a	H-4a, H-12 α x , H-6 β H-7
6 β	3.83			C-4a, C-6a C-10a, C-12	H-7 H-12 α x H-6 α
7	6.54	106.1	H-7 H-6 β H-6 α	C-6, C-10a C-8, C-9	H-6 β H-6 α
10	6.59	109.7	H-10 H-11	C-6a, C-11 C-8, C-9	H-11
11	2.64	49.3	H-11 H-10 H-12 α x H-12 eq	C-10a, C-6a, C-4a C-10	H-10 H-1
12 α	2.97-2.94	54.6	H-12 α x	C-6	H-11, H-6 β
12 eq	2.81		H-11 H-12 eq	C-4a C-4b	H-3 H-11
O-CH ₂ -O	5.87	100.7	-	C-8 C-9	-

3.2. Antikolinesteraz Aktivite Tayinine Ait Bulgular

Saf bileşiklerin antikolinesteraz aktiviteleri, metanol içerisindeki 1000, 100, 10, 1, 0.1 ve 0.01 µg/mL konsantrasyondaki çözeltilerinin 405 nm dalga boyunda verdikleri absorbans üzerinden hesaplanarak Tablo 43'te verilmiştir. Tablo 44'te ise ekstrele ait biyoaktivite sonuçları yer almaktadır.

Tablo 43. Saf Bileşiklere Ait Antikolinesteraz Aktivite Bulguları

Bileşik	AChE İnhibisyonu (IC ₅₀) (µM)	BuChE İnhibisyonu (IC ₅₀) (µM)
11-Hidroksigalantin	0.67	18.17
Pankratinin-C	-	32.04
9-O-Demetil-2-α-hidroksihomolikorin	19.84	-
Narsissidin	1.85	-
Psödolikorin	32.51	21.64

Tablo 44. Ekstrele Ait Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

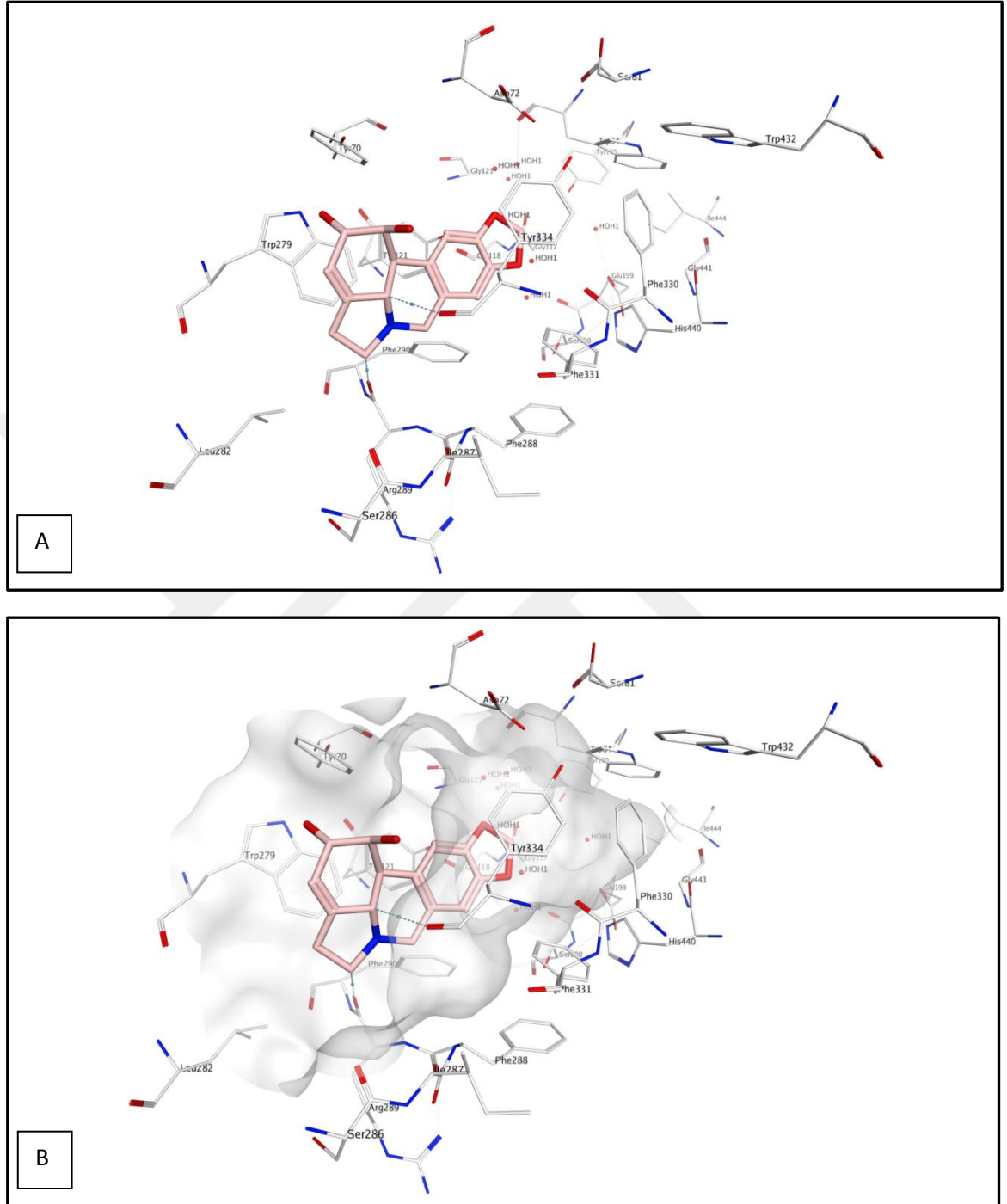
Örnek	Konsantrasyon (µg/mL)	AChE İnhibisyonu (%)	BuChE İnhibisyonu (%)
NTA	1000	100	85.23
	100	87.13	37.96
	10	58.23	23.90
NTÜ	1000	100	92.67
	100	67.47	35.06
	10	30.59	11.02

4. İzole Edilen Alkaloidler Üzerinde Moleküler Doking Çalışmaları

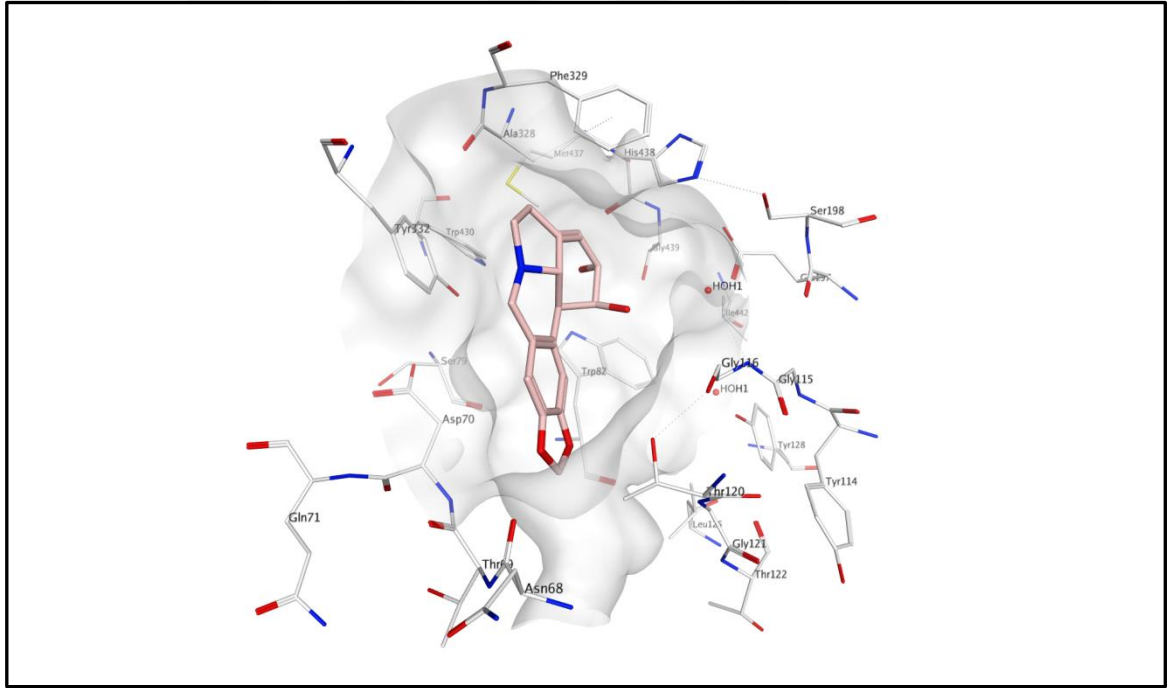
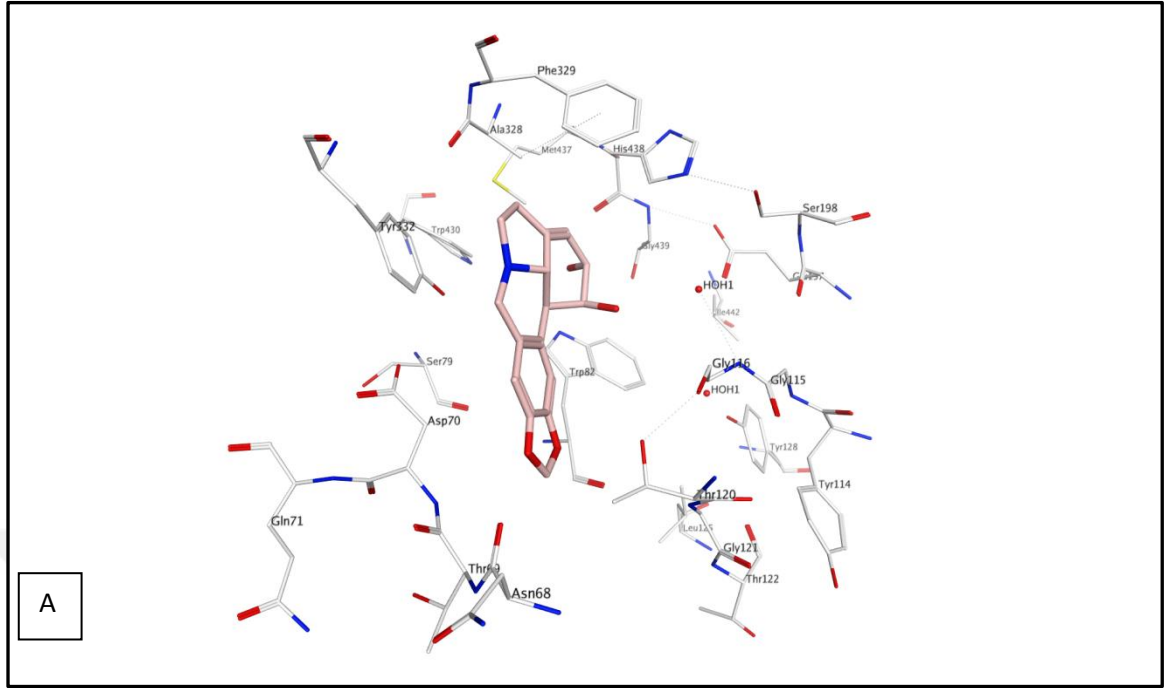
Tablo 45. Bileşiklerin GoldScore uyumluluk fonksiyonu kullanılarak *eeAChE* ve homoloji model *eqBuChE* enzimleri içerisindeki hesaplanmış doking skorları ve hesaplanmış SLogP değerleri

Bileşikler	<i>eeAChE</i> (1EVE)	<i>eqBuChE</i> (Homoloji Model)	SlogP
(-)-Likorin	60.9245 (1)	59.0144 (1)	-0.402
(-)-Psödolikorin	60.3888 (1)	62.7485 (1)	-0.417
(-)-9- <i>O</i> -metilpsödolikorin	61.0290 (1)	60.8442 (1)	-0.114
(-)-Narsissidin	62.0439 (1)	54.5622 (1)	-0.489
(+)-11-Hidroksigalantin	62.7646 (1)	61.1730 (1)	-0.489
(-)-Galantamin	64.6201 (1)	53.8274 (1)	0.699
9- <i>O</i> -Demetil-2- α -hidroksihomolikorin	62.7722 (1)	57.7634 (1)	-0.340
Pankratinin-C	58.7662 (1)	52.8846 (1)	-0.402
Donepezil	82.1646 (1)		3.210
3F9		71.1902 (1)	5.020

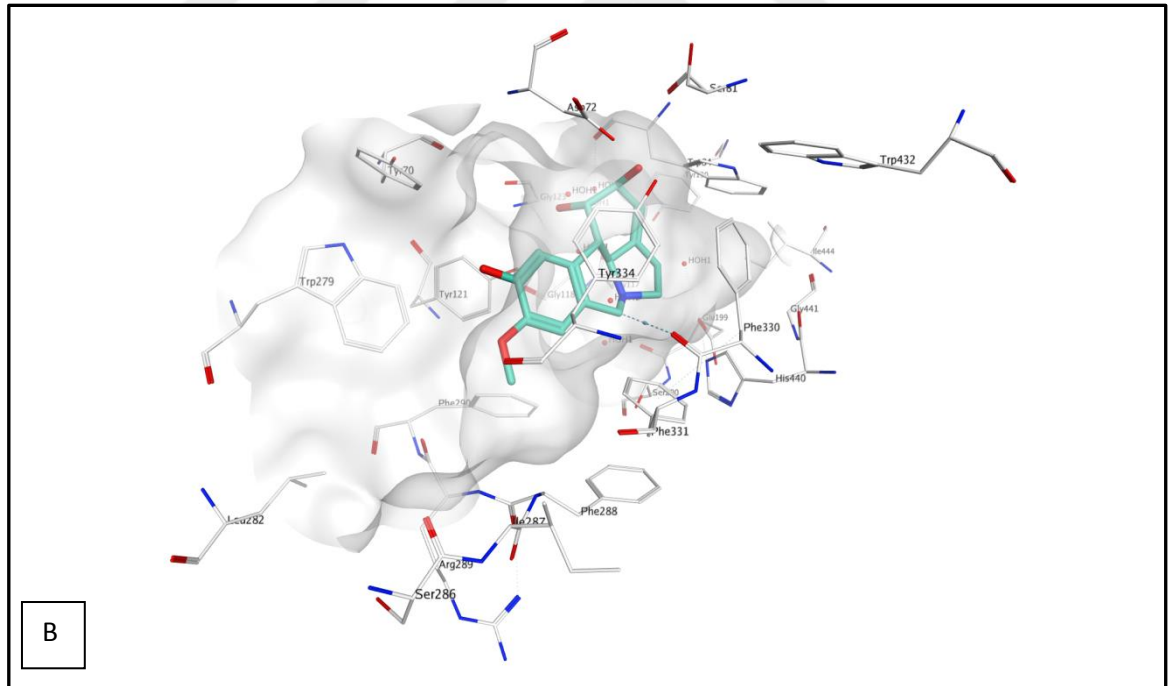
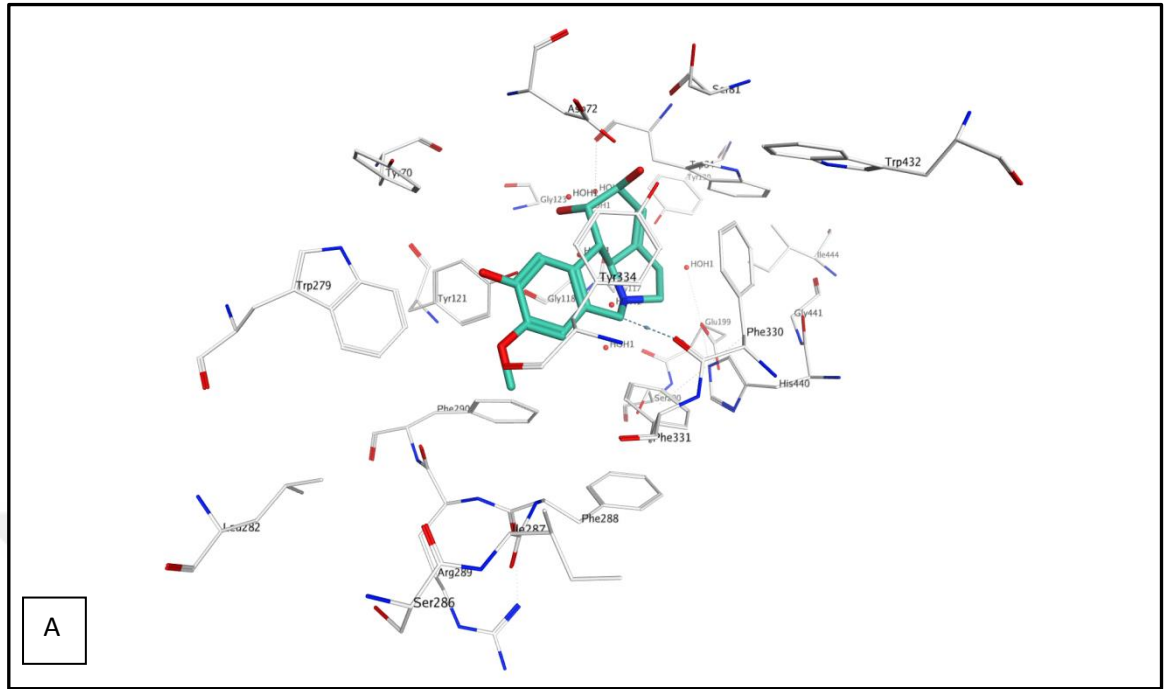
(Parantez içerisinde doking pozlarının sırası verilmiştir)



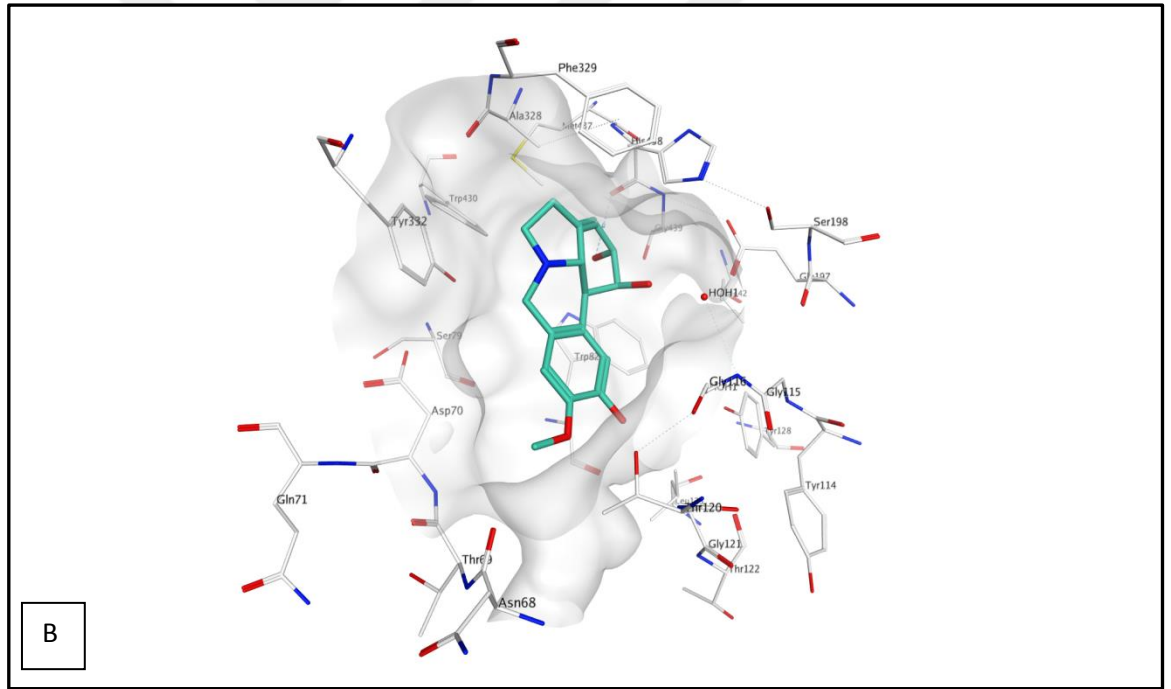
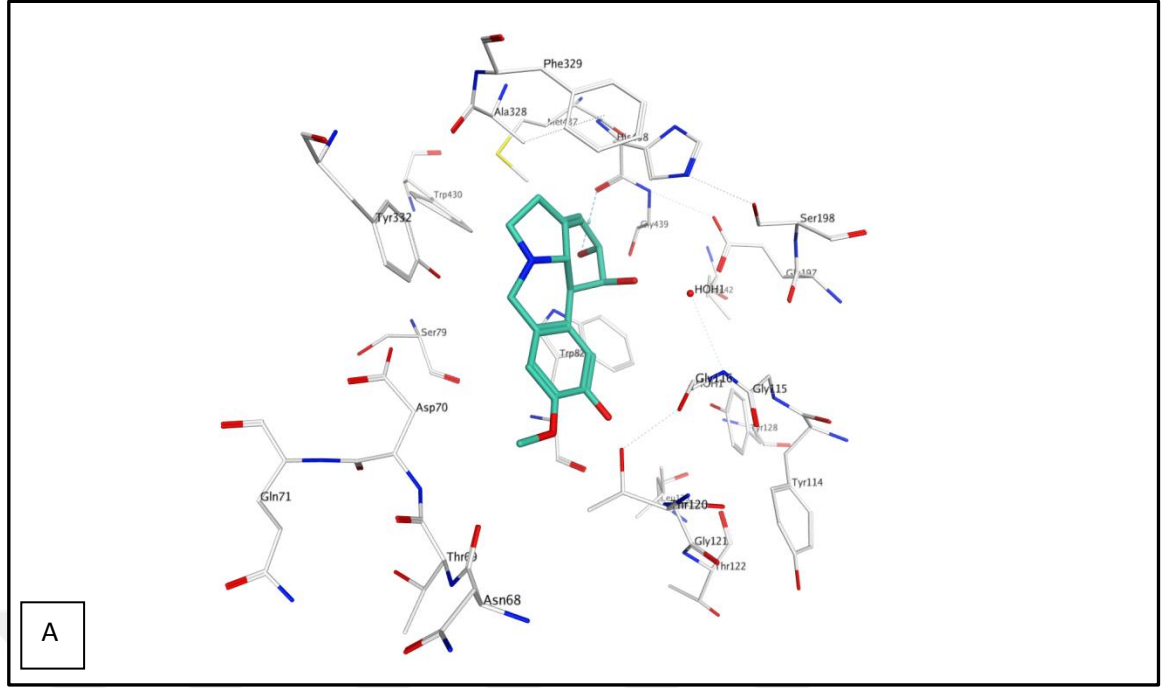
Şekil 4 A-B. (-)-Ligand bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Ligand pembe çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-Ligand bileşiğinin eeAChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozü. **B.** eeAChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



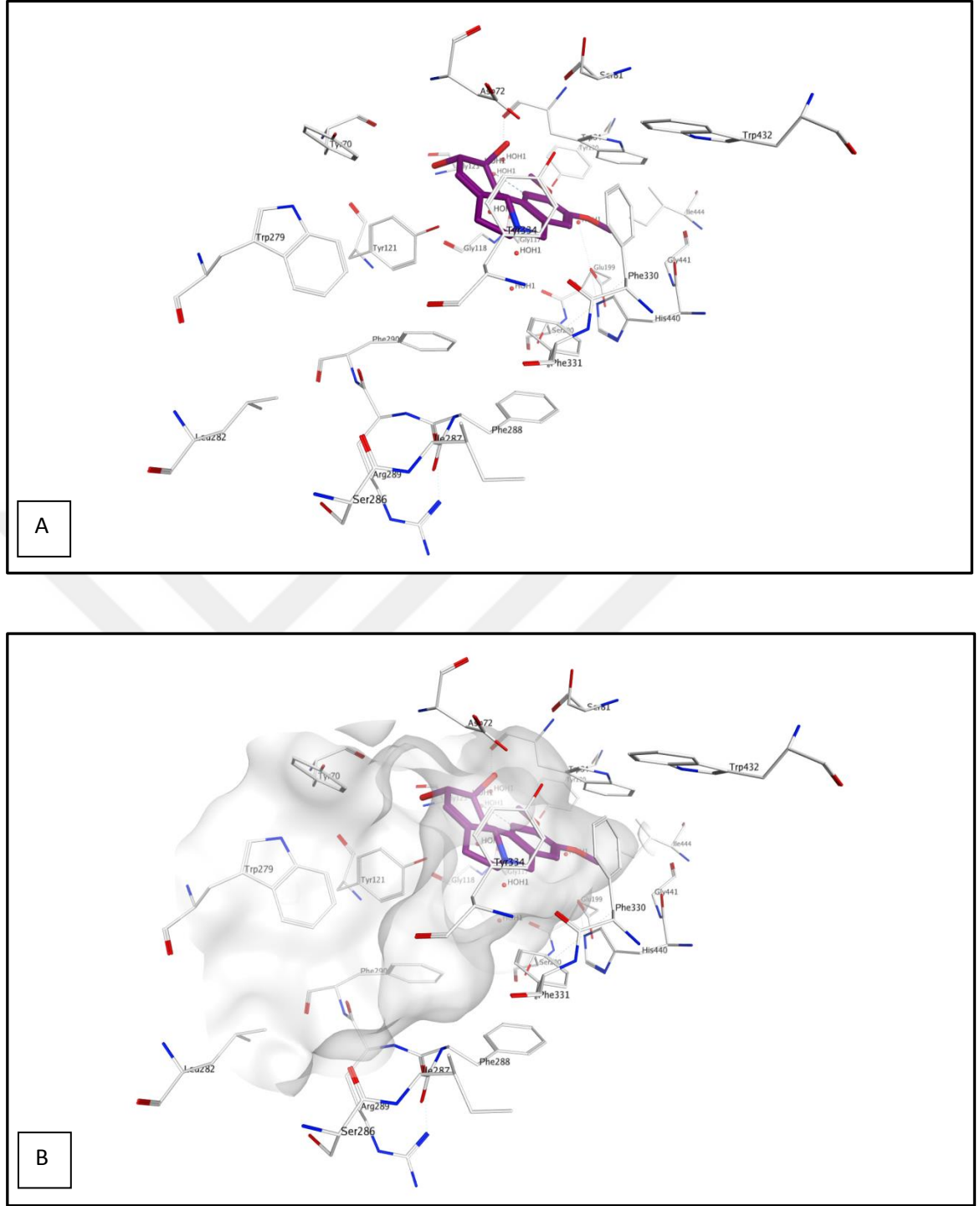
Şekil 5 A-B. (-)-Liquorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Liquorin pembe çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-Liquorin bileşiğinin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir



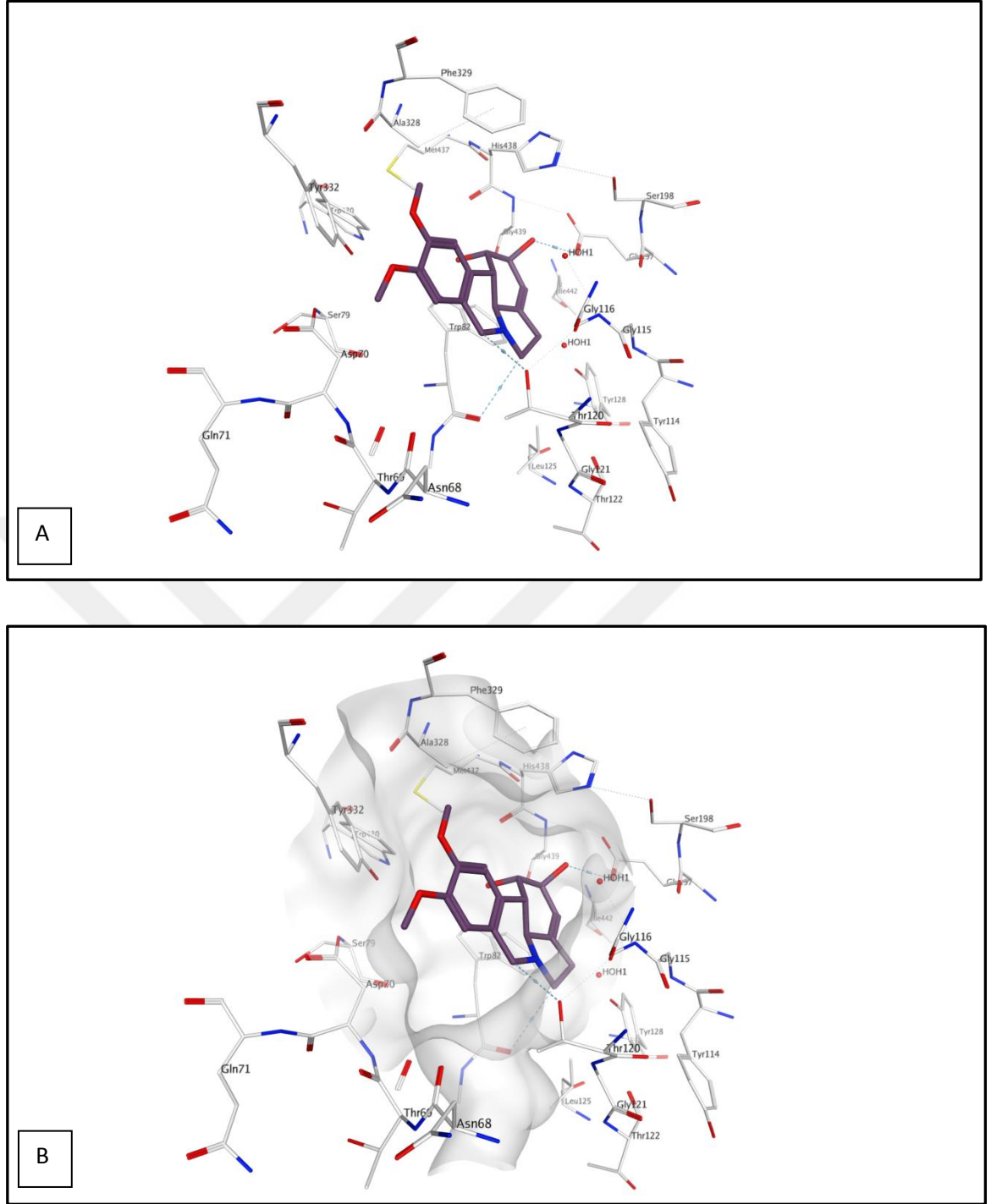
Şekil 6 A-B. (-)-Psödolikorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Psödolikorin açık yeşil çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-Psödolikorin bileşiğinin *eeAChE* içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** *eeAChE*'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



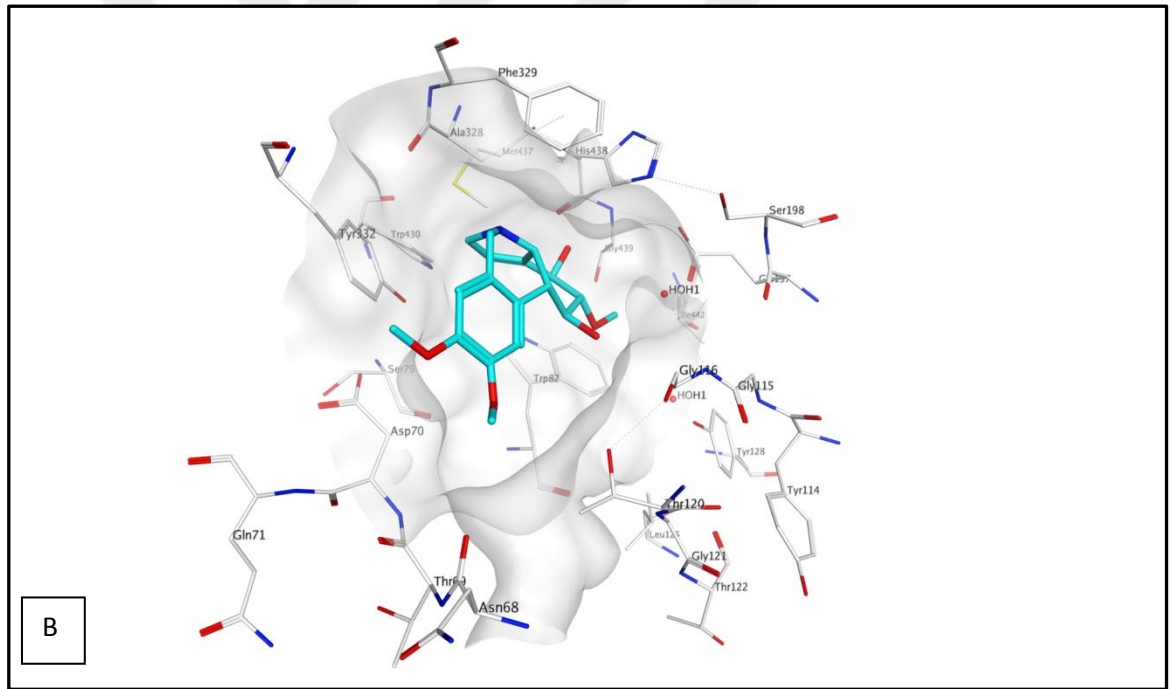
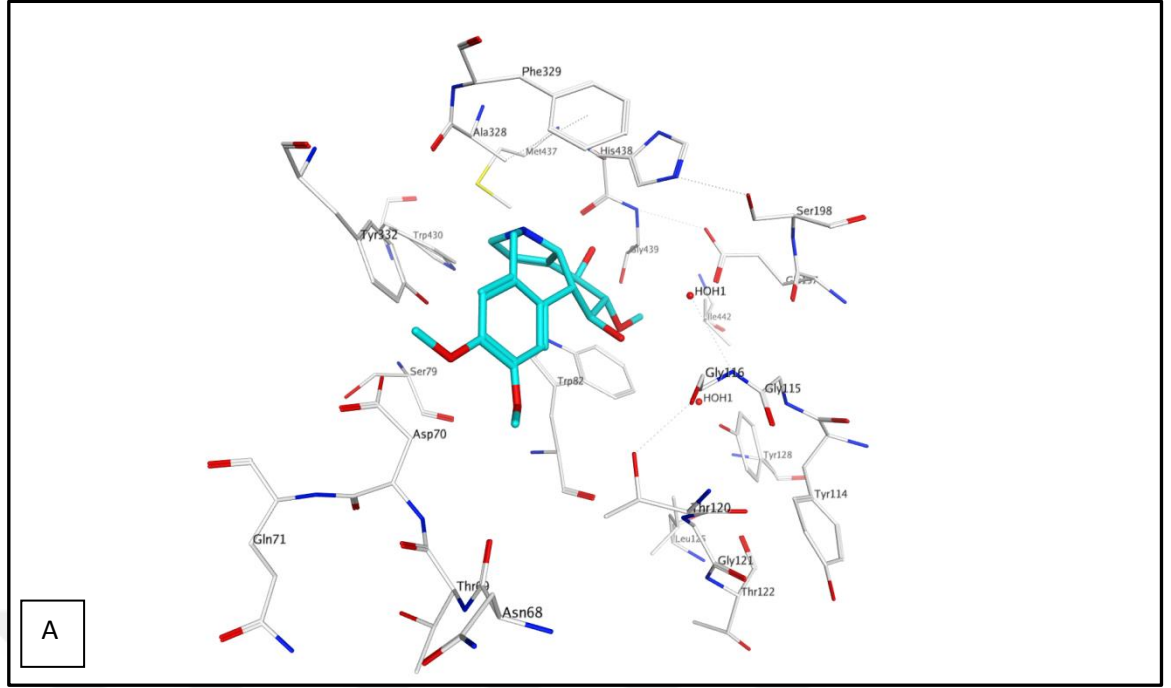
Şekil 7 A-B. (-)-Psödolikorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Psödolikorin açık yeşil çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-Psödolikorin bileşiğinin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozunu. **B.** eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



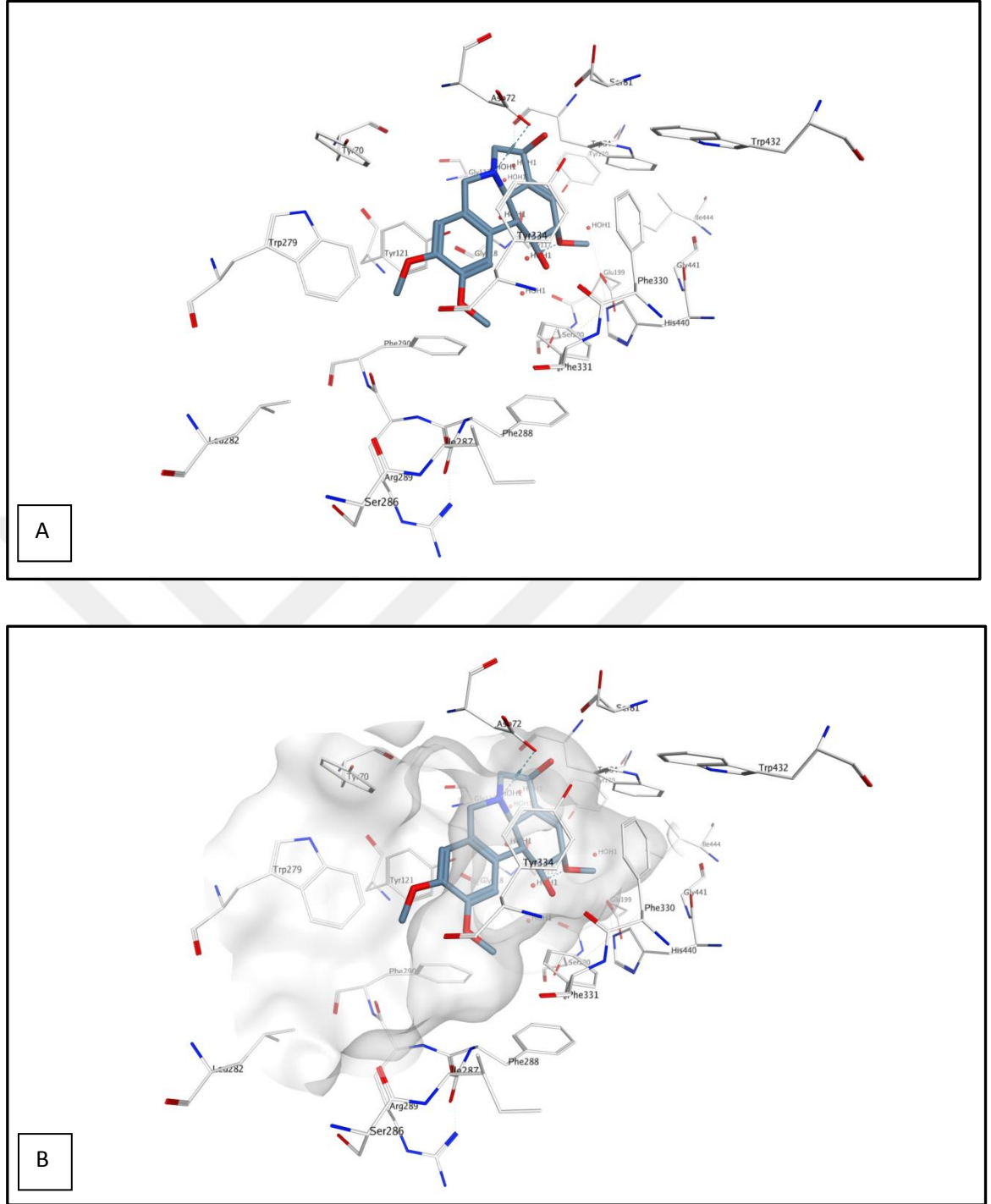
Şekil 8 A-B. (-)-9-*O*-metilpsödolikorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-9-*O*-metilpsödolikorin mor çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-9-*O*-metilpsödolikorin bileşiğinin *eeAChE* içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** *eeAChE*'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



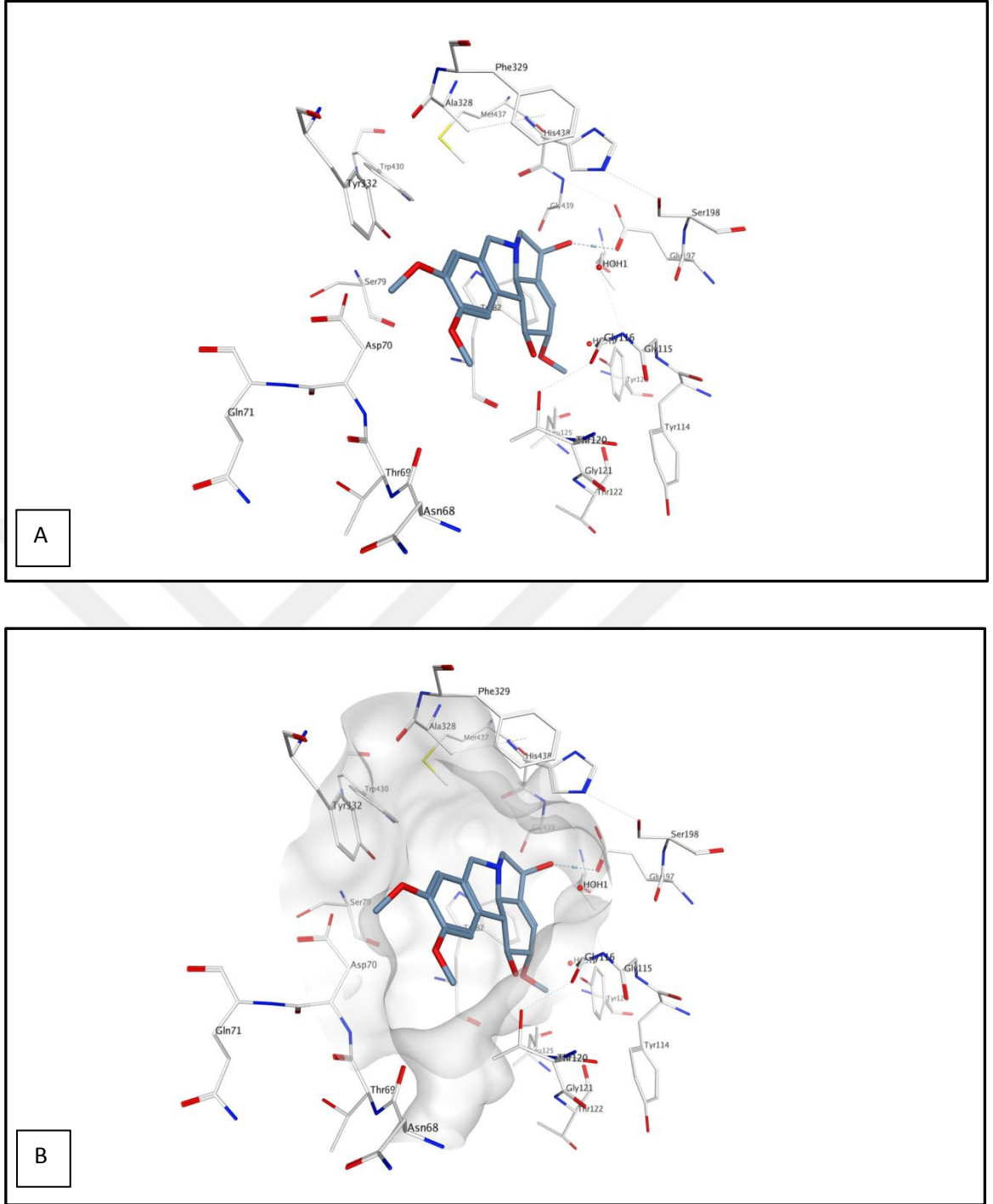
Şekil 9 A-B. (-)-9-O-metilsödolikorin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-9-O-metilsödolikorin mor çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-9-O-metilsödolikorin bileşiğinin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



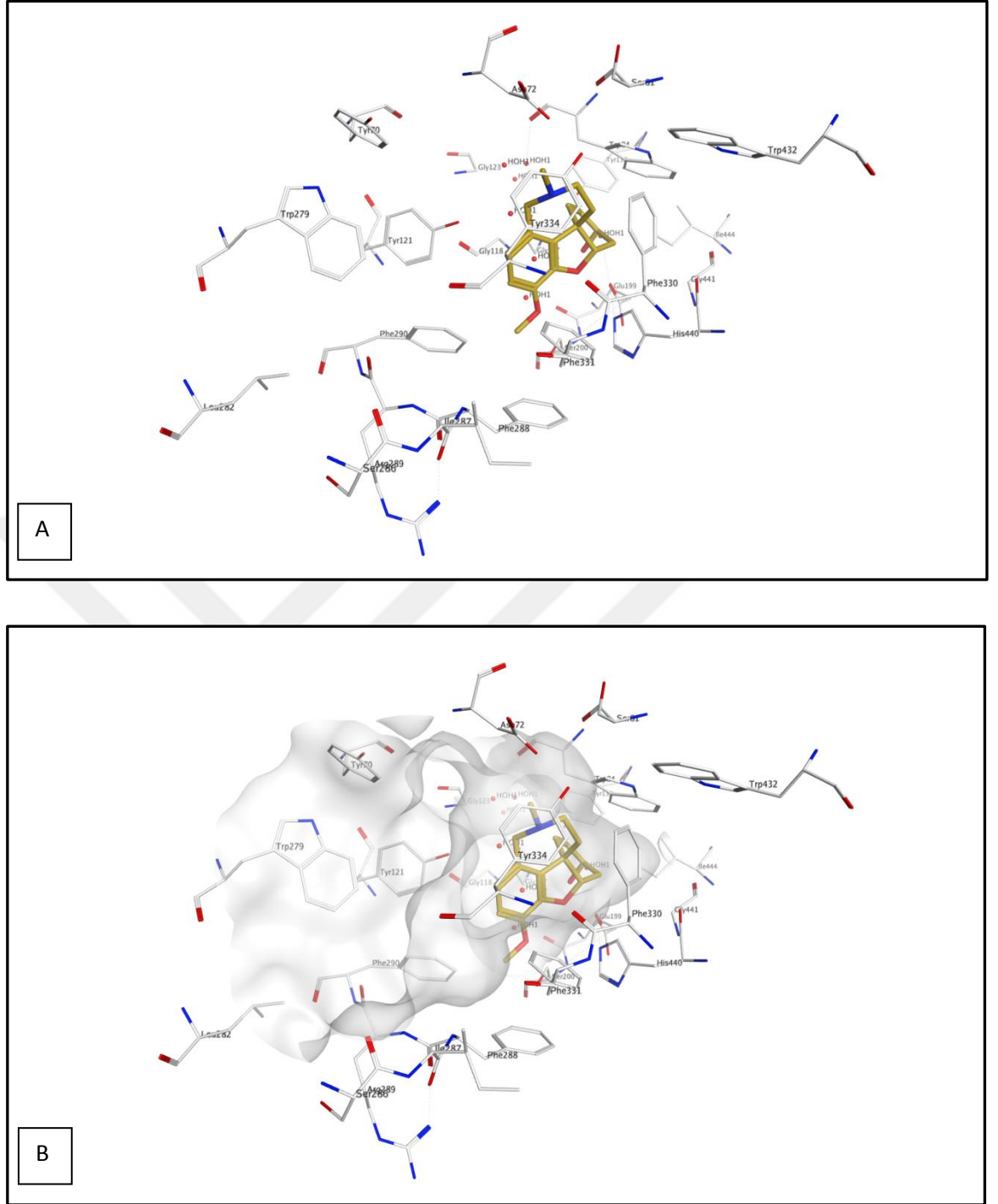
Şekil 11 A-B. (-)-Narsissidin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Narsissidin mavi çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-Narsissidin bileşiğinin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



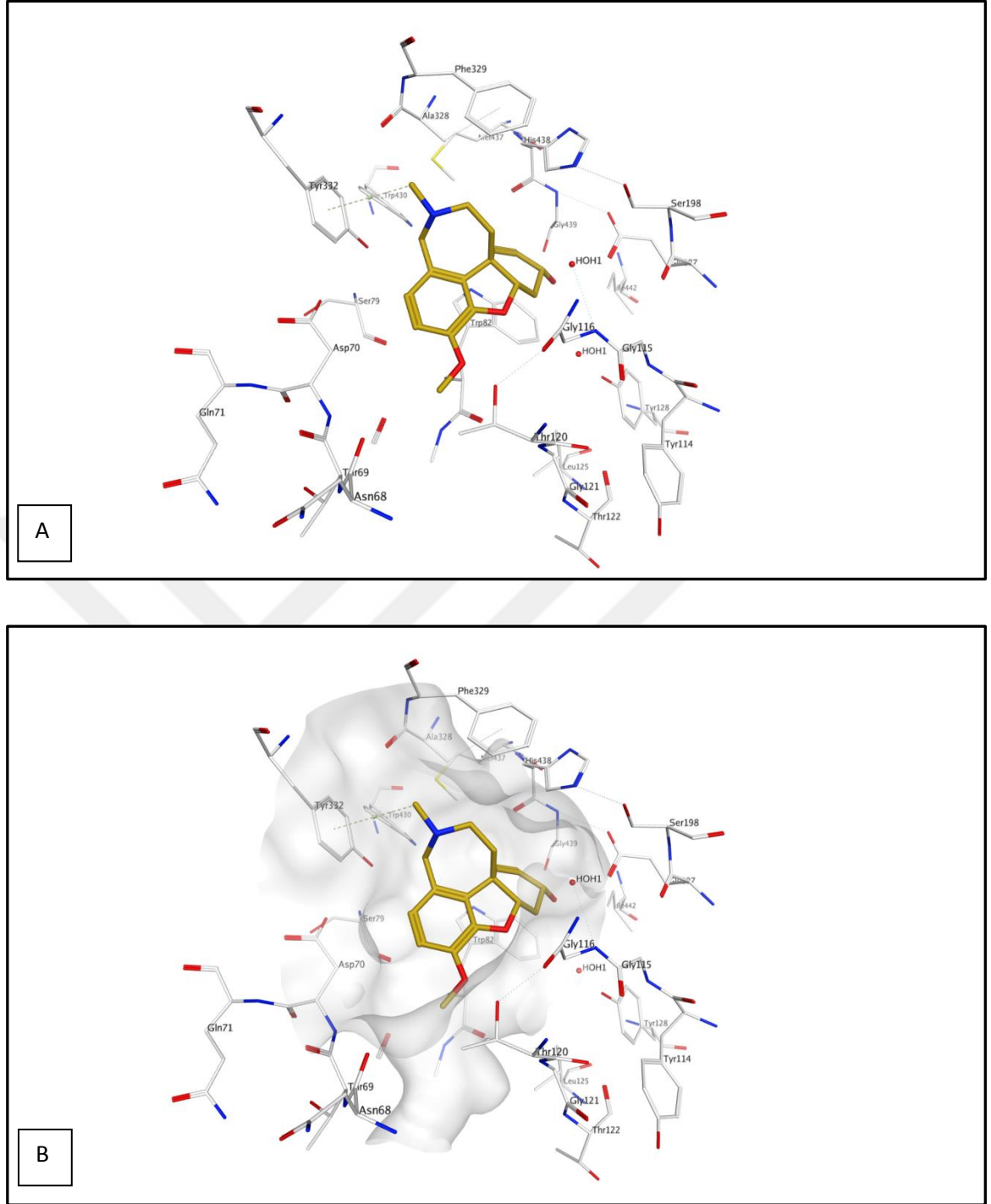
Şekil 12 A-B. (+)-11-Hidroksigalantin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(+)-11-Hidroksigalantin grimsi mavi çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (+)-11-Hidroksigalantin bileşiğinin *eeAChE* içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** *eeAChE*'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



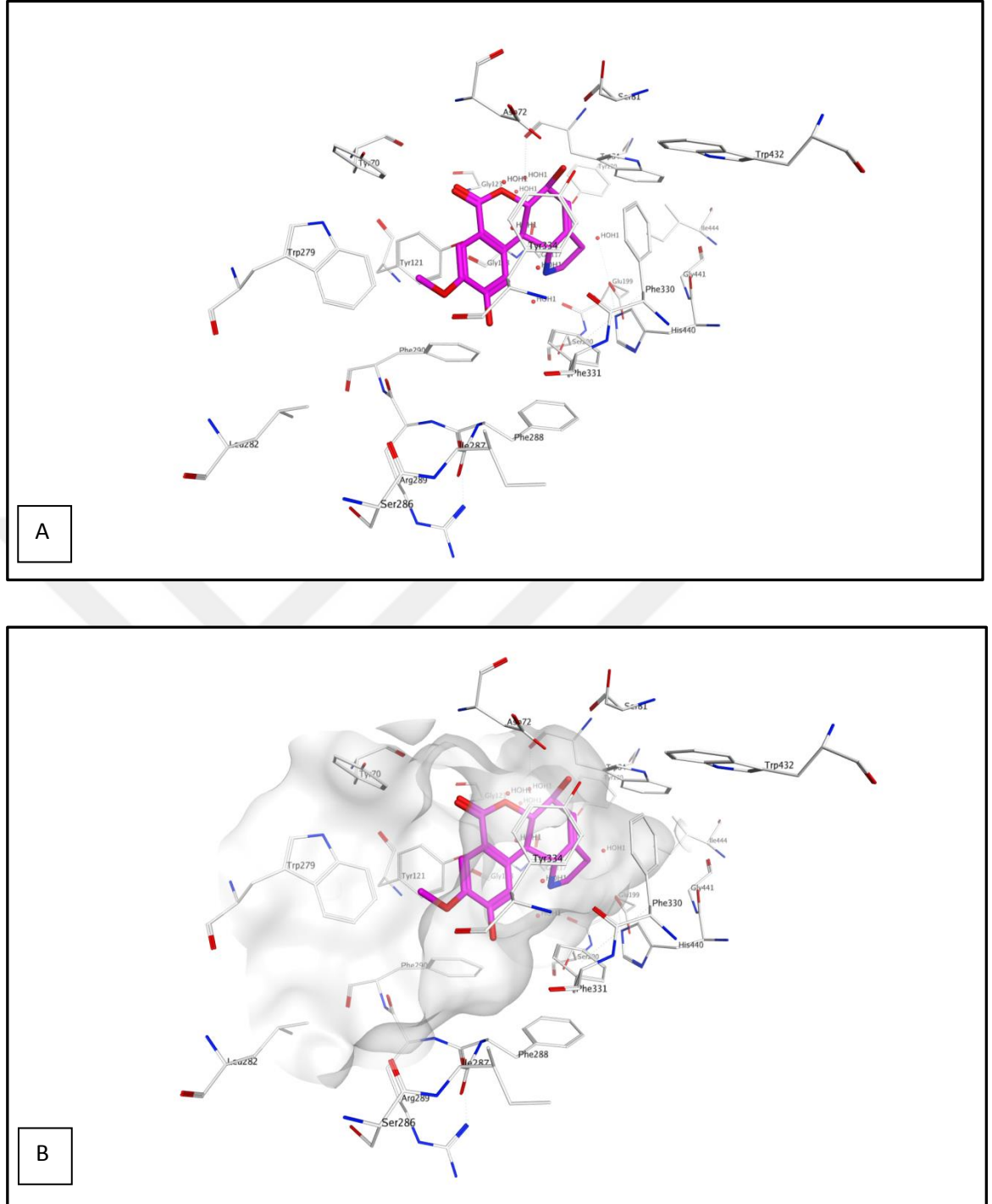
Şekil 13 A-B. (+)-11-Hidroksigalantin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(+)-11-Hidroksigalantin grimsi mavi çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (+)-11-Hidroksigalantin bileşiğinin *eqBuChE* içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** *eqBuChE*'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



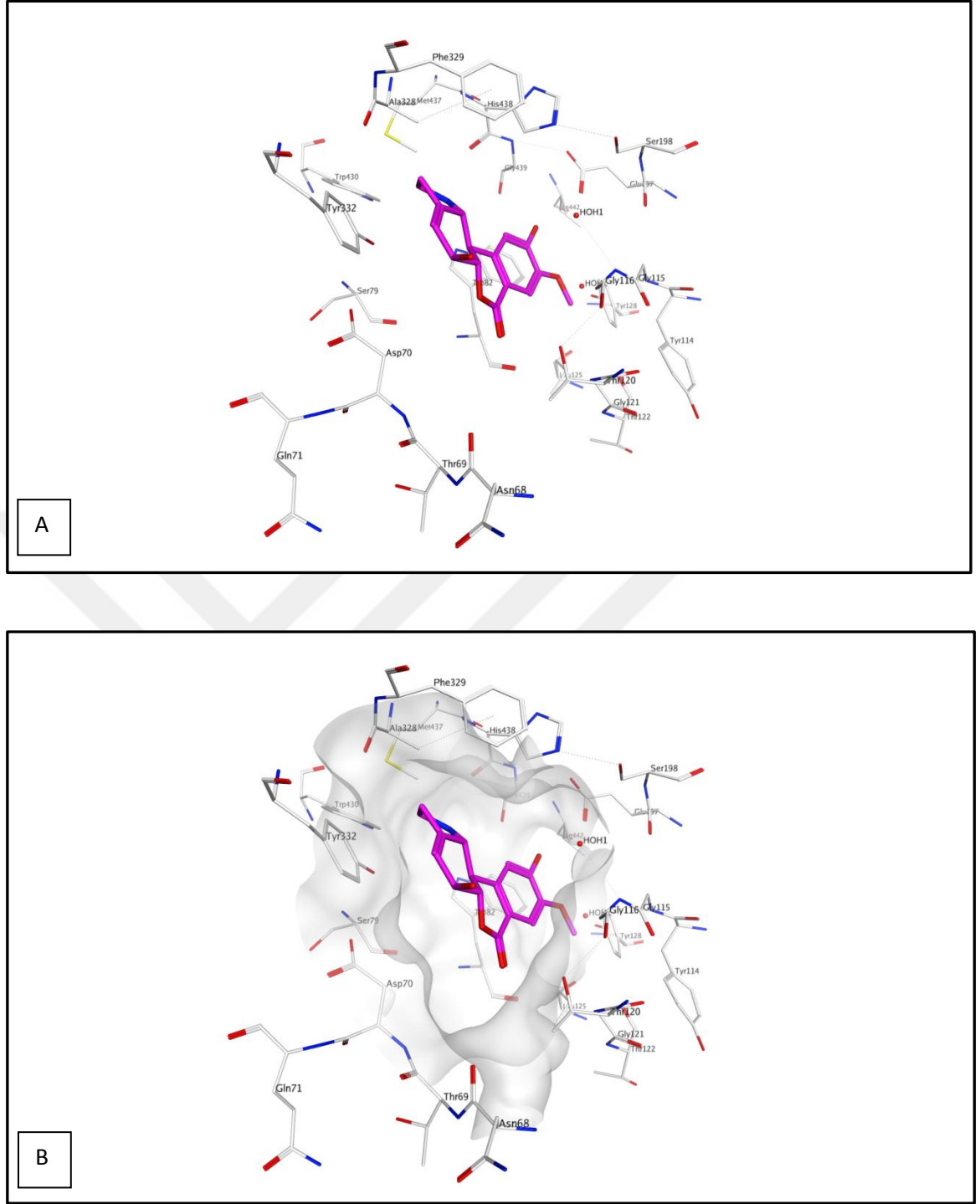
Şekil 14 A-B. (-)-Galantamin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Galantamin altın sarısı çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-Galantamin bileşiğinin *eeAChE* içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** *eeAChE*'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



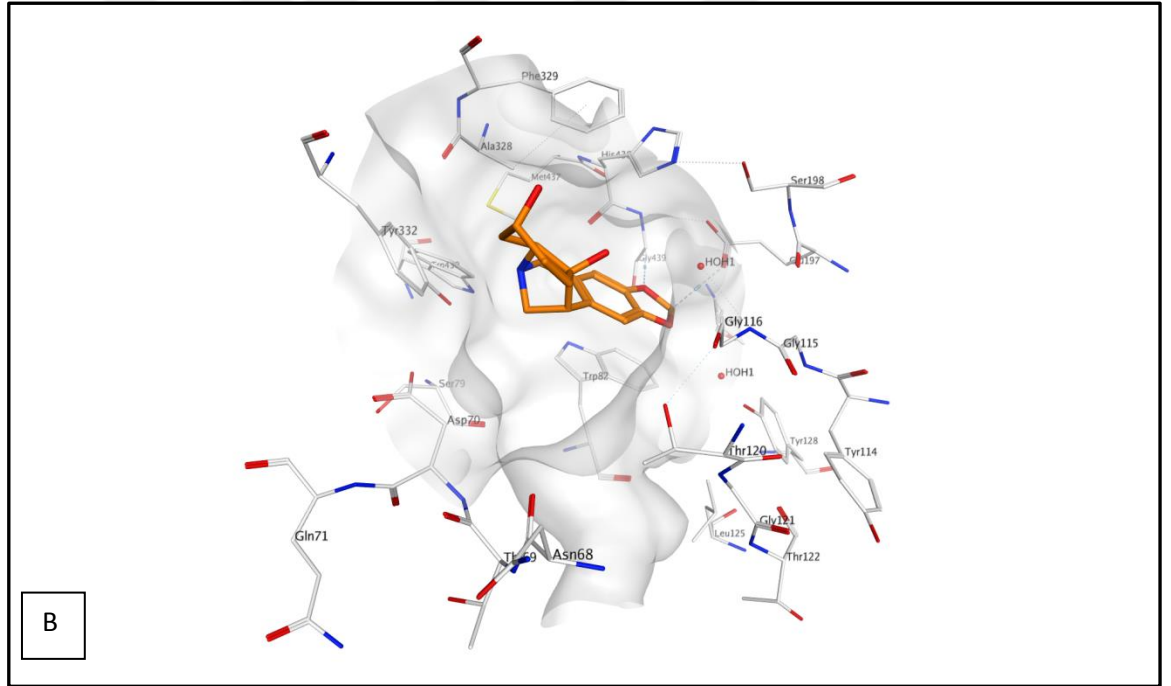
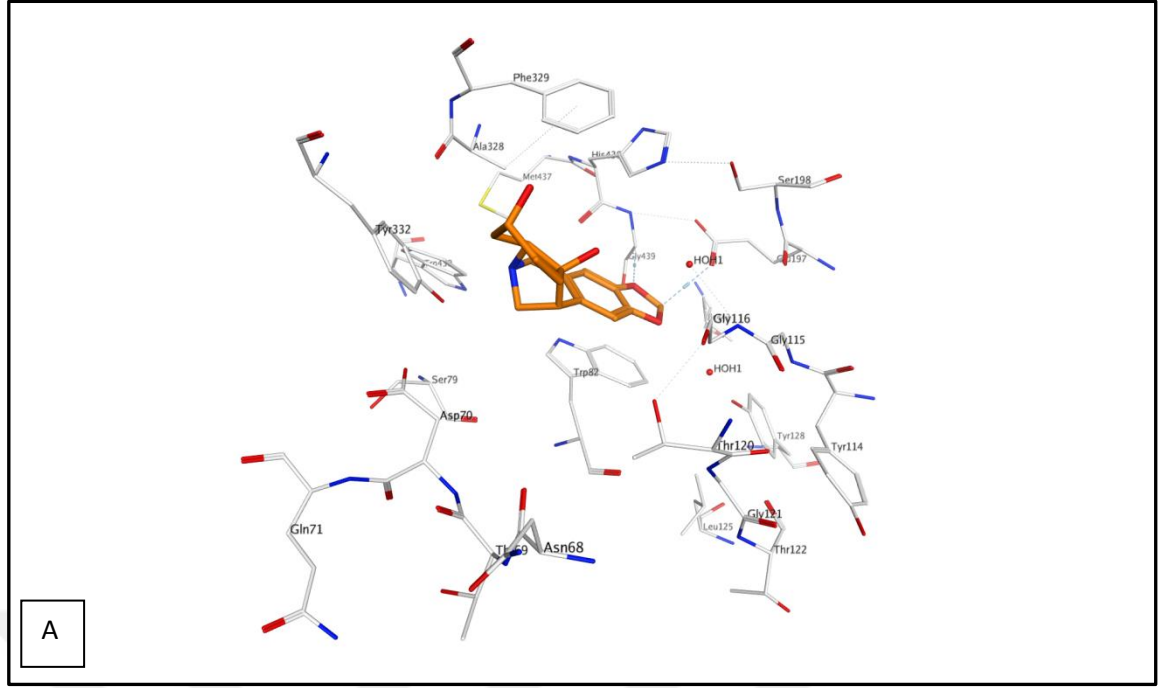
Şekil 15 A-B. (-)-Galantamin bileşiği ve Aktif yöre artıkları [(-)-Galantamin altın sarısı çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** (-)-Galantamin bileşiğinin *eqBuChE* içerisindeki ilk sıradaki doking pozü. **B.** *eqBuChE*'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



Şekil 16 A-B. 9-*O*-Demetil-2- α -hidroksihomolitorin ve Aktif yöre artıkları [9-*O*-Demetil-2- α -hidroksihomolitorin magenta çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** 9-*O*-Demetil-2- α -hidroksihomolitorin bileşiğinin eeAChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** eeAChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



Şekil 17 A-B. 9-*O*-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin ve Aktif yöre artıkları [9-*O*-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin magenta çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** 9-*O*-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin bileşiğinin *eqBuChE* içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** *eqBuChE*'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



Şekil 19 A-B. Pankratinin-C ve Aktif yöre artıkları [Pankratinin-C turuncu çubuklar olarak, aktif yöre beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir.] **A.** Pankratinin-C bileşiminin eqBuChE içerisindeki ilk sıradaki doking pozu. **B.** eqBuChE'nin liganda yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.

IV. BÖLÜM

TARTIŞMA

1. Kalite Kontrol ve Miktar Tayini Araştırmaları

Kalite kontrol çalışmalarında deneyler için Avrupa Farmakopesi (331) ve Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi'nde (354) yer alan temel yöntemlerden yararlanılmıştır. Bu kapsamda gravimetrik esaslı kurutmada kayıp, bütün kül, sülfat külü ve hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı tayin yöntemleri uygulanmıştır. Drog örneklerindeki total alkaloit miktarı, Avrupa Farmakopesi'ndeki farklı drogların monograflarından yararlanılarak geliştirilmiş ve daha önce farklı Amaryllidaceae türlerinde uygulanmış titrimetrik yöntemle saptanmıştır. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemiyle (335) drog örneklerinde, önemli farmakolojik etkileri olan galantamin ve likorin alkaloitlerinin miktarı belirlenmiştir.

1.1. Kurutmada Kayıp Miktar Tayini ve Kül Miktar Tayini Yöntemleri

Narcissus tazetta subsp. *tazetta* bitkisinin farklı kısımları üzerinde yapılan kurutmada kayıp miktar tayininde NTA kodlu örnekte % 7.9243; NTÜ kodlu örnekte % 7.7325 oranında kurutmada kayıp tespit edilmiştir. Bütün kül miktar tayini deneyinde NTA kodlu örnekte % 9.0064; NTÜ kodlu örnekte % 8.2286 oranında bütün kül miktarı tespit edilmiştir. Sülfat külü miktar tayini deneyinde NTA kodlu örnekte % 19.0939; NTÜ kodlu örnekte % 18.9706 oranında sülfat külü miktarı tespit edilmiştir. Hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktar tayini deneyinde NTA kodlu örnekte % 1.3715; NTÜ kodlu örnekte % 1.4943 oranında hidroklorik asitte çözünmeyen kül miktarı tespit edilmiştir. *Narcissus* türleri üzerinde farmakopede belirtilen bu kalite kontrol çalışmalarına ait bulgulara rastlanmamaktadır.

1.2. Total Alkaloit Miktar Tayini

NTA kodlu örnek için ortalama % 0.0667; NTÜ kodlu örnek için ortalama % 0.1186 oranında total alkaloit miktarı tespit edilmiştir. Toprak üstünde, soğanlara göre daha yüksek miktarda alkaloit bulunmasının, bitkimizin çiçeklenme dönemi sonunda toplanmış olmasına bağlı olabileceği belirtilebilir. *Narcissus confusus* Pugsley türü üzerinde yapılan bir araştırmada bitkinin ontojenik döngüsünde farklı dönemlerde örnekler alınarak alkaloit içeriğine bakıldığında, vejetatif dönemde soğanlarda yüksek miktarda alkaloit mevcutken, çiçekli dönemde alkaloit

yoğunluğunun toprak üstü kısımlarında olduğu görülmektedir (118). Yapraklarda soğandan daha fazla alkaloid bulundurması, *Narcissus assoanus* Dufour ex Schult. & Schult.f. ve yine bir Amaryllidaceae bitkisi olan *Leucojum aestivum* L. üzerinde yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumludur (119, 355)

1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Likorin ve Galantamin Alkaloidlerinin Teşhis ve Miktar Tayini ve Yöntemin Validasyonu

Miktar tayini, kromatogramda görülen piklerin altında kalan alanlar tespit edilerek gerçekleştirilmiştir. Galantamin ve likorinin alıkonma zamanları sırasıyla; 7.82 ± 0.02 ve 5.91 ± 0.048 dakika olarak tespit edilmiştir.

Narcissus genusuna ait pek çok tür, Alzheimer hastalığı için reçete edilen ve Amaryllidaceae alkaloidlerinin en önemlisi olan galantamin miktar tayini açısından araştırılmıştır (108, 110, 128). Bu amaçla HPLC, GC, ^1H NMR gibi yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır (34, 110, 116, 117). Bu yöntemler arasında HPLC, hızlı, hassas ve güvenilir sonuçlar vermesi ile bilinmekte olup, yöntemin galantamin miktar tayini için uygulanabilir olduğu çalışmalarla gösterilmiştir(113).

Özellikle biyolojik açıdan aktif olan likorin ve galantamin alkaloidlerinin varlığının ve miktarlarının saptanması kalite kontrol araştırmaları açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda kullanılan yöntemin validasyonu da yapılarak güvenilirliği saptanmıştır.

Narcissus “Pipit” (Jonquilla) ve *Narcissus pseudonarcissus* cult. “Carlton” gibi *Narcissus* kültürlerinin galantamin için iyi birer kaynak olduğu miktar tayini analizleri ile kanıtlanmıştır (37, 110, 113). Türkiye’de sonradan doğallaşmış olan *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisi, uzman yetiştiriciler tarafından geniş bir alanda üretilen bir bitki olmasına rağmen (6), galantamin miktar tayini hakkındaki çalışmaların yetersiz olduğu görülmektedir.

Dünya genelinde *Narcissus* türleri üzerinde farklı miktar tayini analizleri yapılmış bulunmaktadır. İspanya’da *Narcissus confusus* türünün soğanlarında taze ağırlık üzerinden % 0.1117; *N. nivalis* soğanlarında ise % 0.0095 galantamin tespit edilirken; bu oran Portekiz’den toplanmış *N. obesus* türünde % 0.001 ve Mısır’dan toplanan *N. tazetta* türünde % 0.005 bulunmuştur (113, 133). Daha yakın geçmişte yapılan HPLC çalışmaları; İran’ın farklı bölgelerinden toplanmış *N. tazetta* L.

örneklerinde kuru ağırlık üzerinden % 0.03-0.33 aralığında galantamin bulunduğunu, Hollanda'dan toplanmış örnekte ise galantamin bulunmadığını göstermektedir (113, 128). İklim özellikleri ve toprak bileşimi gibi çevresel faktörlerin bitkilerdeki sekonder metabolit profilini etkilediği göz önünde bulundurulduğunda aynı türün farklı bölgelerden toplanmış örneklerindeki galantamin miktarının bu kadar farklılık göstermesi beklenen bir durumdur (110, 356). Antalya civarından toplanmış *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* örneğinin soğanları üzerinde yapılmış bir izolasyon çalışmasında kuru ağırlık üzerinden % 0.6 galantamin tespit edilmiştir (64). Buna ilaveten, aynı alt türün Yalova'dan ticari olarak alınmış soğan örneğindeki likorin miktarı HPLC yöntemi ile kuru ağırlık üzerinden % 0.089 olarak tespit edilmiştir (357). Muğla'dan toplanmış bulduğumuz bitkinin HPLC analiz sonuçları, örnekte kuru ağırlık üzerinden %0.025-0.067 aralığında likorin; % 0.005 oranında galantamin bulunduğunu göstermiştir.

Daha önce yapılmış çalışmalarda, çiçeklenme döneminde toplanmış *Narcissus* türlerinde soğanlardaki galantamin miktarının toprak üstü kısımlara göre daha yüksek olduğu ortaya konmuştur(34). Bizim çalışmamız sonucunda, toprak üstü kısımdaki alkaloid miktarı soğanlara göre daha yüksek bulunmuştur. Daha önce *Narcissus confusus* bitkisinin farklı dönemlerde toplanmış örnekleri üzerinde galantamin tip alkaloidlerin HPLC ile miktar tayini yapılmış olup; çiçeklenme dönemi sonunda alınan örnekte yapraklardaki alkaloid miktarının soğanlara göre daha fazla olduğu belirlenmiştir(118).

Çalışmamız için önemli bir bulgu, hem toprak üstü hem de soğan örneklerinde tespit edilebilir düzeyde galantamin ve likorin alkaloidlerinin bulunmasıdır.

Galantamin başta olmak üzere alkaloidlerin bulunuşlarının, gübreleme yöntemlerine göre farklılık gösterdiği bilinmektedir (120). Ayrıca miktarlar yalnızca topraktaki bileşim değil, büyüme koşulları da etkili olmaktadır(117). Bitkide alkaloid üretimini artırmak amacıyla bazı *Narcissus* türlerinde farklı kültür yöntemleri (246) ve doku kültürü çalışmaları (122-125) yapılmış ve galantamin için başarıya ulaşılmıştır (126). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda, bitkimizde tespit edilen alkaloid miktarı kısmen daha düşük olsa da, uzman üreticiler tarafından geniş

bir alanda üretilen bu alt türün terapötik alanda da değerlendirilerek ekonomik değerinin artırılması mümkün olabilir.

2. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (GC-MS) Yöntemiyle Alkaloid Tespiti Çalışmaları

Gaz kromatografisi-Kütle Spektrometresi yöntemi bitki içeriğinde bulunan sekonder metabolitlerin tespit edilmesi amacıyla oldukça sık kullanılan bir yöntemdir (358). Güvenilir ve hassas sonuçlar veren bu yöntem Amaryllidaceae familyasına ait çeşitli türlerin alkaloid profilinin belirlenmesi çalışmalarında önemli rol oynamaktadır (129, 359, 360).

İçerdiği Amaryllidaceae alkaloidleri sebebiyle araştırılan *Narcissus* türlerinde metabolit profilinin belirlenmesi üzerine araştırmalar geçmişten günümüze devam etmektedir (115, 129, 142, 144). Muğla çevresinden toplanmış *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. bitkisinin alkaloid içeriği GC-MS yöntemi kullanılarak ilk kez bu çalışmada rapor edilmektedir.

Daha önceden çalışma grubumuz tarafından izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmış saf maddelere ait kütle spektrumlarındaki parçalanmalar, NIST MS Search 2.0 (National Institute of Standardization and Technology, Gaithersburg, MD, USA) veritabanındaki bilgiler ve diğer literatür bilgileri göz önünde bulundurularak bitkisel örneklerle ait GC-MS verileri değerlendirilmiştir. Toprak altı ve toprak üstü kısımların alkaloid içeriği ayrı ayrı tespit edilmiş olup; birbirinden farklı alkaloid profillerine sahip oldukları görülmüştür.

Likörin grubu alkaloidler bakımından zengin olan toprak üstü kısmında bu gruptan; psödolikörin, narsissidin, 1-O-asetil-3-O-metil narsissidin, likörin, 2,11-didehidro-2-dehidroksilikörin ve 11-hidroksigalantin bileşikler saptanmıştır. Bunların dışında, galantamin iskelet tipine sahip; sanguinin, narvedin ve galantamin adlı alkaloidler tespit edilmiştir.

Toprak altı kısmı alkaloid çeşitliliği bakımından toprak üstü kısma üstünlük sağlamıştır. Dört farklı iskelet tipine sahip alkaloidleri içeren soğan örneklerinin taşıdığı, sırasıyla hemantamin, norbelladin ve montanin grubuna ait; O-demetilmaritidin, metilnorbelladin ve Pankratinin-C bileşiklerinin toprak üstü kısımlarda bulunmadığı görülmüştür. Ayrıca likörin tip alkaloidler olan 9-O-metil psödolikörin ve galantin taşınması ile de toprak üstü kısımdan ayrılmaktadır.

Bunlar dışında, molekül ağırlıkları ve moleküler parçalanmaları GC-MS yöntemi ile tespit edilmiş olup, elimizdeki verilerin, yapılarını aydınlatmak için yeterli gelmediği alkaloidler de molekül ağırlıklarını içeren kodlarla Tablo 35 ve Tablo 36’da verilmiştir.

Bitkinin tamamında yaygın olarak görülen ortak alkaloidler likorin, 11-hidroksigalantin, narsissidin, galantamin ve narvedin olmuştur. Likorin familyanın en yaygın alkaloidi olup farklı türlerde varlığı rapor edilmiştir(276). Aynı şekilde narsissidin, narvedin ve galantamin daha önce çeşitli *Narcissus* ekstrelerinde GC-MS yöntemiyle tespit edilmiştir (129, 140). Alkaloidlerin rapor edilen yüzde miktarları, örneklerdeki her bir alkaloid karşılık gelen pik alanının, örnekteki alkaloidlerin piklerinin toplam alanına oranlanmasıyla bağl olarak hesaplanmıştır.

3. İzolasyon, Yapı Aydınlatma ve Antikolinesteraz Aktivite Çalışmaları

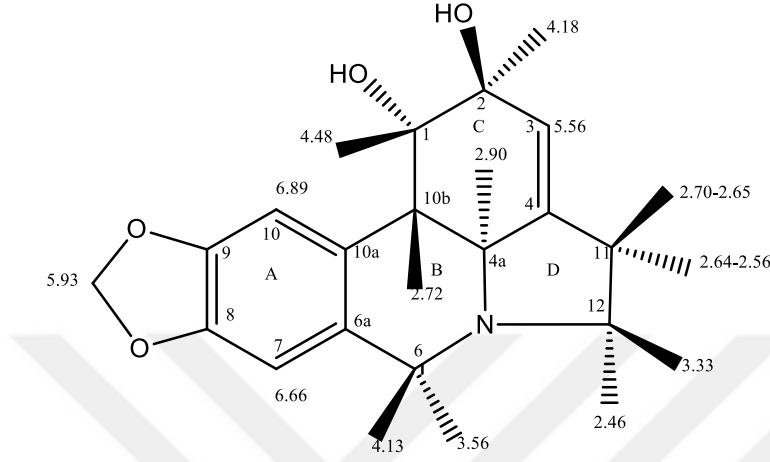
3.1. NT1: (-)-Likorin

Ana kolondan alınan 58. ve 61. fraksiyonlar birleştirilmiş (607 mg), preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak X nolu çözücü sistemi kullanılmıştır. F-1;F-8 arasında kodlar verdiğimiz 8 adet fraksiyon elde edilmiştir. F-8 kodlu fraksiyonda (165.6 mg) metanolden kristallendirme sonucu 38 mg ağırlığında elde edilen optikçe aktif bileşiğe ($[\alpha]_D^{25}$:-65.3°) NT1 kodu verilmiştir.

Bileşiğe ait metanol- d_4 içerisinde 500 MHz NMR spektrometresinde çekilen 1H NMR spektrumunda (Spektrum 8) toplam 14 adet protona ait sinyal izlenmektedir. Molekülde *para* konumda bulunan aromatik protonlar δ 6.89 ve δ 6.66'da iki adet singlet olarak izlenmektedir. δ 5.93'te görülen dublet (J 1.5 Hz) sinyal, metilendioksi grubuna ait protonların varlığını düşündürmektedir. δ 5.56 ppm'de görülen geniş singlet sinyalin, oleofinik özellikte bir protona ait olabileceğini söylemek mümkündür. Alifatik sahada ise aşağı alana kaymış δ 4.48'de geniş singlet ve δ 4.18'de multipler şeklinde izlenen sinyaller, bir heteroatoma komşu iki adet protonun varlığına işaret etmektedir. δ 4.13 ve δ 3.56'da dublet (J 15.0 Hz) olarak izlenen protonların kimyasal kayma değerleri ve etkileşme katsayıları, bir heteroatoma komşu metilen grubuna ait olabileceklerini düşündürmektedir. δ 3.37'de çözücü sinyali altında kalmış olan bir multipler sinyal mevcuttur. δ 2.9'da dublet (J 10 Hz) olarak izlenen sinyal ve δ 2.72 kimyasal kayma değerine sahip yine dublet (J 10 Hz) olarak izlenen sinyal, söz konusu iki protonun birbirlerine göre trans konumda olabileceğini düşündürmektedir. Daha yukarı alanda δ 2.70-2.65 ve δ 2.64-2.56 aralığında iki ayrı multipler sinyal görülmektedir. δ 2.46'da gözlenen sinyaldeki yarılmaların simetrik olması ve etkileşme katsayılarının (J 10 Hz) kendi içinde eşit olması, yarılmaların quartet olduğunu düşündürmüştür.

Molekülün ESI spektrumunda (Spektrum 7) moleküler pik, m/z 288.12 $[M+H]^+$ olarak görülmüştür. 1H NMR verileri ve kütle spektrumu birlikte değerlendirildiğinde bileşiğin Amaryllidaceae ana alkaloid gruplarından likorin alt grubunun prototip alkaloidi olan likorin olduğu saptanmıştır. Kapalı formülü

C₁₆H₁₇NO₄ olan bileşiğin, aşağıda açık kimyasal yapısı literatürle de uyumlu olan proton değerleriyle birlikte verilmiştir (361).



Likorin ilk olarak 1877 yılında Amaryllidaceae familyasına ait *Lycoris* genusundan elde edilmiştir (362). *Crinum defixum* Ker Gawl., *C. laurentii* T.Durand & De Wild., *C. yemense* Dammann, *Galanthus elwesii* Hook.f., *G. woronowii* Losinsk., *Haemanthus katherinae* Baker, *Hippeastrum rutilum* (Ker Gawl.) Herb., *Hymenocallis amancaes* (Ruiz & Pav.) G. Nicholson, *H. calathina* (Herb.) G. Nicholson, *H. rotata* (Ker Gawl.) Herb., *Leucojum aestivum* L., *L. vernum* L., *Lycoris albiflora* Koidz., *L. aurea* (L'Her.) Herb., *L. incarnata* Worsley, *L. radiata* (L'Her.) Herb., *N. lobularis* Schult. & Schult.f., *N. jonquilla* hibritleri, *N. poeticus* L., *N. pseudonarcissus* L., *N. tazetta* L. ve *N. triandrus* L., *Nerine flexuosa* (Jacq.)Herb., *N. undulata* L. (Herb.), *Pancratium Illyricum* L., *Sternbergia fischeriana* (Herb.) Roem., *Ungernia victoris* Vved. ex Artjush., *Vallota purpurea* Herb., *Zephyranthes andersonii* (Herb. ex Lindl.) Benth. & Hook. f. ve *Z. rosea* Lindl. bitkilerinden izolasyonu bildirilmiştir (288, 363). 1982 yılında Afrika ve Volta Nehri civarından toplanmış *Pancratium trianthum* Herb. ve *Hymenocallis littoralis* (Jacq.) Salisb. için likorinin major alkaloid olduğu bildirilmiştir (363). *Narcissus* genusunda *Narcissus tazetta* L. de dahil olmak üzere (199) pek çok türden izole edilmiştir. Tezimize konu olan *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinin farklı

bölgeden toplanmış örneği üzerinde izolasyon çalışması yapılmıştır. Muğla (Ege Bölgesi)'dan toplanan alt tür üzerinde likorin izolasyonu ve yapı aydınlatma çalışması ilk kez tarafımızdan rapor edilmektedir.

Likorinin antiviral aktivitesine ek olarak bitki büyüme inhibitörü özelliği ve yine ökaryotlarda protein inhibisyonu yapma özelliği bulunmaktadır (364). Isıya maruz bırakıldığında stabil, uçucu olmayan, toksik bir alkaloidtir (365).

Ayrıca (-)-likorin respiratuvar stimulan, fagositoz modülatörü, antimalaryal özelliklere sahiptir. Protein sentezini inhibe ederek bitki büyümesini sınırlandırır; klastojenik etki ile antitümör etki gösterir. Antifungal, antiviral etkilerinin yanında zayıf antiprotozoisit etkisi bulunmaktadır (179).

Narcissus requienii M. Roem.'den izole edilmiş likorinin gastrointestinal kanser hücreleri (366) ve tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi de araştırılmıştır (39). Likorin hidroklorür, Rusya'da güçlü bronkolitik olarak tıpta kullanılmaktadır (363). Çalışma grubumuz tarafından anti-asetilkolinesteraz (367) ve anti-butirilkolinesteraz aktivite tayini modifiye Ellman yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiş ve aktif olmadığı belirlenmiştir (288). Antikolinesteraz aktivite deneyleri bu nedenle tekrarlanmamıştır.

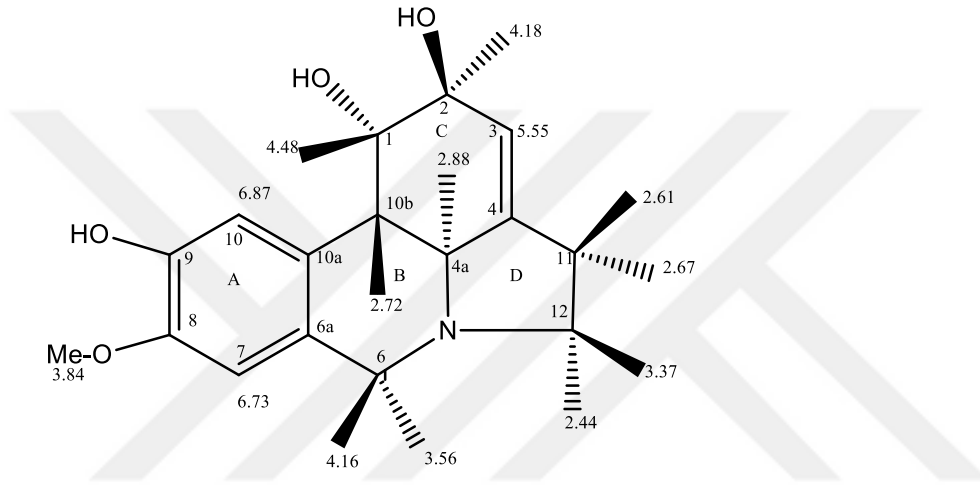
3.2. NT2: (-)-Psödolikorin

Ana kolondan alınan 84. ve 99. fraksiyonlar (5.36 g) birleştirildikten sonra çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Daha sonra kloroform yardımı ile ekstrenin bir başka balona aktarılması sırasında kloroformda çözünmeyerek balon dibinde çökelti oluşturan madde İTK ile üç farklı çözücü sisteminde incelenmiş ve çöken bileşiğin saf olduğu anlaşılmıştır. Bu aşamada 12.5 mg aldığımız optikçe aktif ($[\alpha]_D^{25}$:-36.2°) bu bileşiğe NT2 kodu verilmiştir.

Bileşiğe ait metanol- d_4 içerisinde 500 MHz NMR spektrometresinde çekilen 1H NMR spektrumunda (Spektrum 11) toplam 16 adet protona ait sinyal izlenmektedir. Molekülde *para* konumda bulunan aromatik protonlar δ 6.87 ve δ 6.73'te iki adet singlet olarak karşımıza çıkmaktadır. δ 5.55'de görülen geniş singlet sinyali oleofinik bir proton varlığını düşündürmektedir. Alifatik sahada ise aşağı alana kaymış δ 4.48'deki singlet ve δ 4.18'deki multipler sinyal, oksijen gibi bir heteroatoma komşu proton varlığını düşündürmektedir. δ 4.16 ve δ 3.56'da dublet olarak izlenen protonların kimyasal kayma değerleri ve etkileşme katsayıları (J 15.0 Hz), azot gibi bir heteroatoma komşu metilen grubuna ait olabileceklerine işaret etmektedir. δ 3.84'te 3 hidrojen değerinde izlenen singlet, molekülde *O*-Metil grubunun bulunduğunu göstermektedir. δ 3.37'deki protona ait sinyalin, çözücü sinyali altında kaldığı anlaşılmıştır. δ 2.88 kimyasal kayma değerine sahip dublet olarak izlenen sinyal (J 10 Hz) ve δ 2.72'de dublet olarak görülen sinyal (J 10 Hz), iki proton arasında trans etkileşme olabileceğine işaret etmektedir. Daha yukarı alanda, δ 2.67 ve δ 2.61'de iki ayrı multipler sinyal mevcuttur. δ 2.44'de görülen sinyaldeki yarılmanın simetrik olması ve etkileşme katsayılarının (J 10 Hz) kendi içinde eşit olması, yarılmanın quartet olduğunu düşündürmüştür.

O-Metil grubunun 8.veya 9. konumda olduğunu belirlemek için NOESY deneyinden yararlanılmıştır. Moleküle ait NOESY spektrumu (Spektrum 13 ve Tablo 37) incelendiğinde, δ 4.48 (H-1) görülen protonun, aromatik protonlardan H-10 (δ 6.87) ile etkileştiği anlaşılmıştır. *O*-metil grubu ise H-7 (δ 6.73) ile etkileştiği için *O*-metil grubunun 8. Karbona bağlı olduğu tespit edilmiştir(353).

Molekölün ESI kütle spektrumunda (Spektrum 10) moleküler iyon piki, m/z 290.14 $[M+H]^+$ olarak görölmüştür. 1H NMR verileri ve kütle spektrumu birlikte değeriendirildiğinde bileşiğin Amaryllidaceae ana alkaloid gruplarından likorin tip alkaloid alt grubuna giren psödolikorin olduğu belirlenmiştir. Kapalı formülü $C_{16}H_{19}NO_4$ olan bileşiğin aşağıda açık kimyasal yapısı literatürle de uyumlu olan proton değerileriyle birlikte verilmiştir(368).



Psödolikorin izolasyonu ilk olarak 1932 yılında *Lycoris radiata* (L'Her.) Herb.'dan yapılmış olmasına karşın (369), spektral bulguları ilk olarak *Narcissus requienii* M. Roem. bitkisinden izole edilerek verilmiştir (368). Burdan izole edilen bileşiğin tümör hücrelerine karşı aktivitesi de araştırılmıştır (39). Sonrasında yine *Lycoris*(370), *Hymenocallis*(371), *Narcissus* (194) cinslerinde izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Literatürde, *Narcissus tazetta* L. bitkisinden daha önce izole edilmiş olan bu alkaloid (133), *N. tazetta* subsp. *tazetta* alt türünde ilk kez tarafımızdan rapor edilmektedir.

Psödolikorin bileşiğinin *Plasmodium falciparum*'a karşı da antiplazmoidal aktivitesinin olduğu saptanmıştır (372).

Bileşiğin asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi Ellman yöntemi kullanılarak araştırılmış (111, 367), bu çalışmalardan biri düşük aktivite ($IC_{50}=152.32 \mu M$)

gösterdiğini, diğeri ise aktif olmadığını rapor etmiştir. Butirilkolinesteraz inhibisyonu üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple bileşik üzerinde AChE ve BuChE inhibitör aktivite çalışması *in vitro* Ellman esasına dayalı mikropilaka deneyiyle gerçekleştirilmiştir. IC₅₀ değerleri sırasıyla 32.41 ve 21.64 µM olarak hesaplanmıştır (373). Çalışma sonucunda psödolikorin bileşiğinin antikolinesteraz aktivitesinin düşük olduğu tespit edilmiştir.



3.3. NT3: (-)-9-O-Metilpsödolikorin

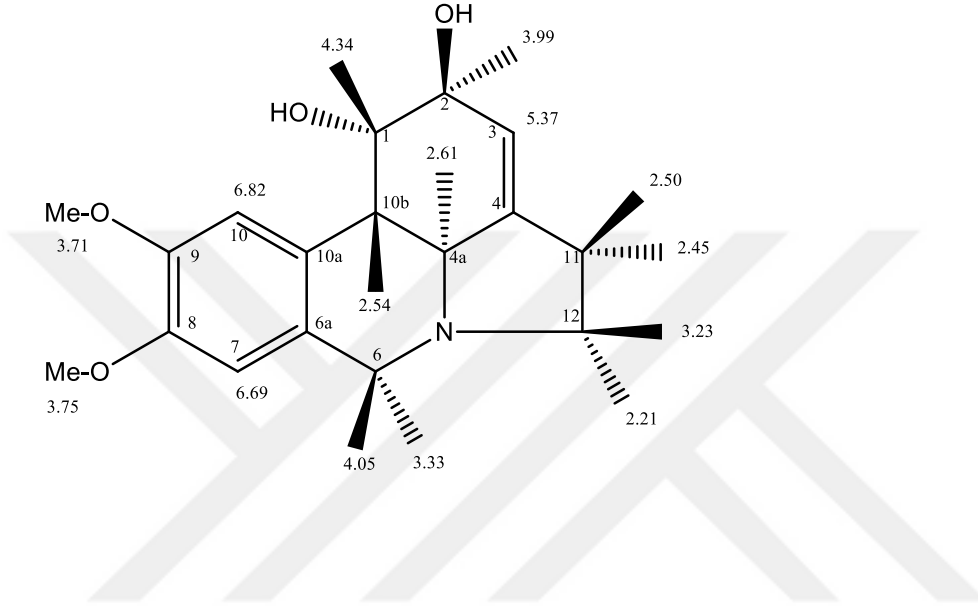
Ana kolondan alınan 58. ve 61. fraksiyonlar birleştirilmiş (607 mg), preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak X nolu çözücü sistemi kullanılmıştır. F-1; F-8 arasında kodlar verdiğimiz 8 adet fraksiyon elde edilmiştir. F-8 kodlu (165.6mg) fraksiyonun 30 mg'lık bir kısmı ileri saflaştırmaya gidilerek, XIV nolu çözücü sisteminin alt fazının hareketli faz olarak uygulandığı preparatif İTK işlemi sonucunda elde edilen 2 mg ağırlığındaki ve optikçe aktif ($[\alpha]_D^{25}$: -25°) olan saf bileşiğe NT3 kodu verilmiştir.

Bileşiğe ait metanol- d_4 içerisinde 500 MHz NMR spektrometresinde çekilen 1H NMR spektrumunda (Spektrum 16) toplam 19 adet protona ait sinyal izlenmektedir. Aromatik sahada δ 6.82 ve δ 6.69'da izlenen sinyaller aromatik halkada ve birbirlerine *para* konumda bulunan iki protonun varlığına işaret etmektedir. δ 5.37'de görülen singlet sinyali oleofinik bir protonun varlığını düşündürmektedir. Alifatik sahada ise aşağı alana kaymış δ 4.34'teki singlet ve δ 3.99'daki geniş singlet şeklinde izlenen sinyaller oksijen gibi bir heteroatoma komşu protonların varlığını düşündürmektedir. δ 4.05'te dublet olarak izlenen sinyalin kimyasal kayma değeri ve etkileşme katsayısı (J 15.0 Hz), bu protonun azot gibi bir heteroatoma komşu olan protonlardan biri olduğunu düşündürmektedir. δ 3.75 ve δ 3.71'de iki adet aromatik metoksil grubuna ait sinyaller mevcuttur. δ 3.33'te azot gibi bir heteroatoma komşu geminal protonlardan bir diğeri, çözücü sinyalinin altında kalmış şekildedir. Buna ilaveten δ 3.23'te triplet (J 7.5 Hz) şeklinde izlenen bir protona ait sinyal mevcuttur. δ 2.61 ve δ 2.54'teki dublet (J 10 Hz) trans visinal protonlara ait olabileceği düşünülmektedir. Bunlara ilaveten, δ 2.50 ve δ 2.45'te iki ayrı protona ait multipler sinyal görülmektedir. δ 2.21'de quartet olarak izlenen bir protona ait sinyal mevcuttur.

1H , 1H -COSY deneyinde (Spektrum 18, Tablo 38) görülen korelasyonlar da moleküldeki protonların birbirleri ile ilişkileri ve dizilişleri hakkında bilgiler sağlamıştır.

Molekülün ESI kütle spektrumunda (Spektrum 15) moleküler iyon piki, m/z 304.31 $[M+H]^+$ olarak görülmüştür. 1H NMR ve 1H , 1H -COSY bulguları ile kütle

spektrumu birlikte değerlendirildiğinde bileşiğin Amaryllidaceae ana alkaloid gruplarından likorin tip alkaloid alt grubuna ait olan 9-O-metilpsödolikorin olduğu belirlenmiştir. Kapalı formülü $C_{16}H_{19}NO_4$ olan bileşiğin aşağıda açık kimyasal yapısı literatürle de uyumlu olan proton değerleriyle birlikte verilmiştir (374).



9-O-metilpsödolikorin ilk olarak 1956 yılında *N. pseudonarcissus* L. bitkisinden izole edilmiştir (374). *Galanthus fosteri* Baker, *Amaryllis* × *parkeri* W. Watson, *Narcissus nivalis* Graells bitkilerinden de izolasyonu daha önce gerçekleşmiştir (131, 292, 375). *N. tazetta* subsp. *tazetta* L. bitkisinden ilk kez tarafımızdan rapor edilmektedir.

Bileşiğin anti-asetilkolinesteraz ($IC_{50}=2.84 \mu M$) ve anti-butirilkolinesteraz ($IC_{50}=1.50 \mu M$) aktivitesi Modifiye Ellman yöntemi ile araştırma grubumuz tarafından daha önceki çalışmalarda tayin edilmiştir (292).

3.4 NT4: (-)-Narsissidin

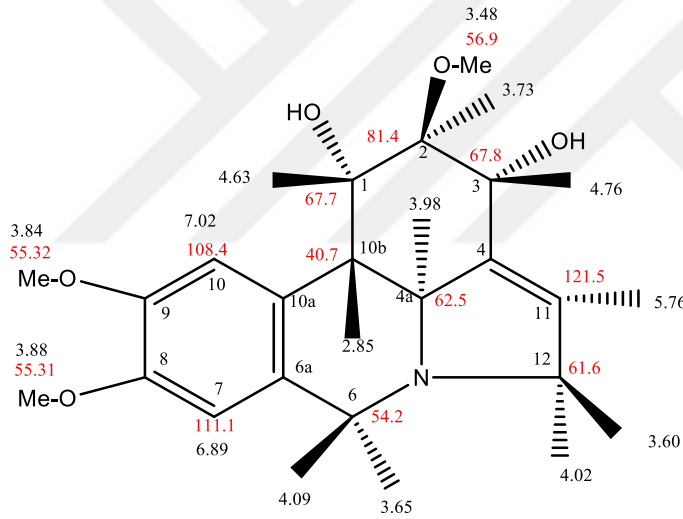
Ana kolon kromatografisi sonucunda elde edilen 100-117. fraksiyonlar birleştirilmiş (1.633 g), preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak XV nolu çözücü sistemi kullanılmıştır. Bu ayırım sonucunda elde edilen fraksiyonlara J-1; J-10 arasında kodlar verilmiştir.

J-3 kodlu fraksiyondan (121.1mg), asetondan basit kristallendirme ile elde edilen 20 mg ağırlığında optikçe aktif ($[\alpha]_D^{25}$: -43.1°) bileşiğe NT4 kodu verilmiştir.

Bileşiğe ait metanol- d_4 içerisinde 500 MHz NMR spektrometresinde çekilen 1H NMR spektrumunda (Spektrum 20) toplam 23 adet protona ait sinyal izlenmektedir. Molekülde *para* konumunda bulunan aromatik protonlar δ 7.02 ve δ 6.89'da iki adet singlet pik olarak izlenmektedir. δ 5.76'da dublet (J 2.5 Hz) şeklinde görülen sinyal oleofinik bir proton varlığını düşündürmektedir. Alifatik sahada ise aşağı alana kaymış δ 4.76'daki geniş singlet olarak izlenen sinyalin ve δ 4.63'teki dublet olarak izlenen sinyalin varlığı, bu protonların oksijen gibi bir heteroatoma komşu olduklarını işaret etmektedir. δ 4.09'da dublet (J 16 Hz) olarak izlenen protonun azot gibi bir heteroatoma komşu olabileceğini söylemek mümkündür. δ 4.02'de görülen multipler sinyal, molekülde yer alan bir heteroatoma komşu karbondaki bulunan hidrojenlerin varlığına işaret etmektedir. δ 3.98'de ise kimyasal kayma değeri nispeten aşağı alanda olan, multipler şeklinde izlenen bir protona ait sinyal bulunmaktadır. δ 3.88 ve δ 3.84'te her biri 3 hidrojen değerindeki iki ayrı singlet şeklinde izlenen sinyal, molekülde iki aromatik O-Metil varlığına işaret etmektedir. δ 3.73'teki triplet olarak görülen sinyal oksijen gibi bir heteroatoma komşu olabileceği için nispeten aşağı alanda görülmektedir. δ 3.65'te yer alan dublet (J 16 Hz) sinyal, azot gibi bir heteroatoma komşu olabilecek bir protonun varlığına işaret etmektedir. Alifatik alanda izlenen diğer protonlara ait sinyaller ise; δ 3.60'da multipler olarak, δ 3.48'de 3 hidrojen değerinde singlet olarak ve δ 2.85'te dublet-dublet olarak izlenen sinyallerdir. δ 3.60'da görülen sinyal HSQC spektrumundan da (Spektrum 25) görüldüğü üzere moleküldeki heteroatoma komşu karbondaki bulunan hidrojenlerden bir diğerine aittir. δ 3.48'deki sinyal alifatik alanda bulunan O-Metil grubuna; son olarak da δ 2.85'teki sinyalin (J 14 ve J 1.5 Hz) trans konumunda bulunan protonlardan birine ait olduğunu söylemek mümkündür. 1H NMR bulguları ve ^{13}C

NMR bulguları (Spektrum 23) değerlendirildiğinde bileşiğin Amaryllidaceae alkaloidlerinden likorin alt grubuna ait narsissidin adlı alkaloid olduğu düşünülmüştür (376).

Molekülün ESI kütle spektrumunda (Spektrum 19) moleküler iyon piki, m/z 334.41 $[M+H]^+$ olarak görülmüştür. 1D NMR, $^1H, ^1H$ -COSY (Spektrum 27) bulgularıyla (Tablo 39) kütle spektrumu birlikte değerlendirildiğinde (350) optikçe aktif olduğu tespit edilen (225) bu bileşiğin likorin alt grubundan narsissidin bileşiği olduğu belirlenmiştir. Kapalı formülü $C_{18}H_{23}NO_5$ olan bileşiğin aşağıda açık kimyasal yapısı literatürle de uyumlu olan proton değerleriyle ve karbon kimyasal kayma değerleriyle birlikte verilmiştir (195).



Narsissidin ilk olarak *Narcissus poeticus* L. bitkisinden izole edilmiş olup(235) sonraki çalışmalar *Narcissus* türlerinde bu bileşiğin varlığını doğrulamıştır. *Leucojum* (377), *Hymenocallis*(378), *Hippeastrum* (379), *Zephyranthes* (380) ve *Cyrtanthus* (376) türlerinden de elde edilmiş olan bu bileşiğin *N. cyclamineus* DC. cv. Beryl, bazı *N. x incomparabilis* hibrit kültürleri, *N. poeticus* L., *N. pseudonarcissus* L. cv. King Alfred ve *N. tazetta* L.'dan izole edildiği bildirilmiştir (381).

Bileşğin bazı tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik aktivitesi MTT deneyi ile araştırılmış ve aktivitesi düşük bulunmuştur (379). Literatürde antikolinesteraz aktivite tayini çalışmasına rastlanmamıştır. Bileşğin antikolinesteraz aktivite tayini *in vitro* Ellman esasına dayalı mikrolaka deneyiyle gerçekleştirilmiş olup, bileşğin anti-asetilkolinesteraz aktivite sonucu $IC_{50}=1.85 \mu M$ bulunurken, anti-butirilkolinesteraz aktivitesi tespit edilmemiştir.

N.tazetta subsp. tazetta L. alt türünden izolasyonu ilk kez tarafımızdan rapor edilmiştir.



3.5. NT5: (+)-11-Hidroksigalantin

Ana kolondan alınan 81. ve 83. fraksiyonlar birleştirilmiş (618mg), preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak XI nolu çözücü sistemi kullanılmıştır. Elde edilen 28 alt fraksiyona H-1; H-28 arasında kodlar verilmiştir.

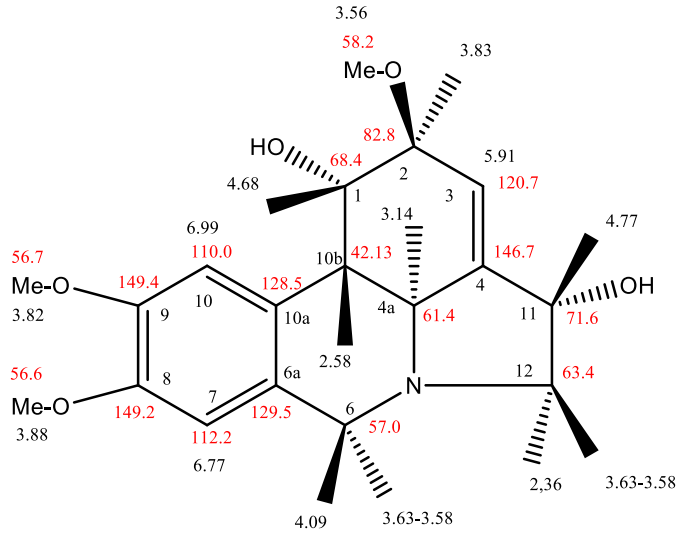
H-18 kodlu alt fraksiyona (32 mg), daha ileri saflaştırma için preparatif İTK uygulanmıştır. Hareketli faz olarak XIV nolu çözücü sisteminin alt fazının kullanıldığı kromatografi işlemi sonucunda elde edilen 10 mg ağırlığında elde edilen optiçe aktif ($[\alpha]_D^{25}:+78^\circ$) bileşiğe NT5 kodu verilmiştir.

Bileşiğin metanol- d_4 içerisinde 500 MHz NMR spektrometresinde çekilen 1H NMR spektrumunda (Spektrum 29) toplam 21 adet protona ait sinyal izlenmektedir. Aromatik alanda δ 6.99 ve δ 6.77'de iki adet singlet şeklinde izlenen sinyalin, aromatik halkada birbirlerine *para* konumunda bulunan iki hidrojene ait olduğu düşünülmüştür. Buna ek olarak δ 5.91'de görülen geniş singlet şeklinde izlenen sinyal, bileşikte oleofinik bir protonun varlığına işaret etmektedir.

Alifatik sahada ise aşağı alana kaymış δ 4.77'de izlenen sinyal, oksijen gibi bir heteroatoma komşu bir protonun varlığını göstermektedir. δ 4.68'de singlet olarak görülen sinyal, oksijene komşu bir başka protonun mevcut olduğunu düşündürmektedir. δ 4.09'da dublet (J 17.5 Hz) olarak izlenen protonun nispeten aşağı alanda görülmesi, azot gibi bir heteroatoma komşu bir proton olabileceğine işaret etmektedir. δ 3.88 ve 3.82'de üçer hidrojen değerinde singlet şeklinde gözlenen iki adet sinyal, iki tane aromatik *O*-Metil grubunun varlığına işaret etmektedir. δ 3.83'deki multiplet sinyal, alifatik kısımda olup heteroatom komşuluğunda bulunan bir hidrojeni işaret etmektedir. δ 3.82'de 3 hidrojen değerindeki singlet sinyal bir diğer aromatik *O*-Metil varlığını göstermektedir. δ 3.63 ve δ 3.58 aralığında bulunan multiplet sinyal toplamda 2 hidrojene karşılık gelmektedir. Bu hidrojenler azot gibi bir heteroatoma komşu olan iki farklı protonun varlığına işaret etmektedir. δ 3.56'da singlet olarak görülen 3 hidrojen değerindeki sinyal alifatik alanda *O*-Metil varlığını düşündürmektedir. Bunlara ilaveten, δ 3.14'te dublet-dublet (J 14; J 1.5 Hz) ve δ 2.58'de dublet (J 13 Hz) şeklinde izlenen sinyaller bulunmaktadır. Son olarak δ

2.36'daki dublet-dublet (J 13; J 8.5 Hz) şeklinde izlenen sinyal, azot gibi bir heteroatoma komşu pozisyonda bulunan bir hidrojenin varlığını düşündürmektedir. ^1H NMR spektrumundan elde edilen bulgular bilinen Amaryllidaceae alkaloidlerinin genel yapıları açısından değerlendirildiğinde, NT5 kodlu bileşiğin likorin alt grubuna ait olabileceğini belirtmek mümkündür (149). Bileşiğe ait ^{13}C NMR spektrumu (Spektrum 33) değerlendirildiğinde on sekiz adet karbona ait sinyal izlenmiştir. HSQC spektrumu (Spektrum 35) incelendiğinde ise bu karbonlardan hangisi üzerinde hangi protonun yer aldığı saptanmıştır.

Molekülün ESI kütle spektrumunda (Spektrum 28) moleküler iyon piki, m/z 334.41 $[\text{M}+\text{H}]^+$ olarak görülmüştür. 1D ve 2D NMR verileri (Tablo 40) ve kütle spektrumu birlikte değerlendirildiğinde bileşiğin Amaryllidaceae ana alkaloid gruplarından likorin tip alkaloid alt grubuna giren 11-hidroksigalantin bileşiği olduğu belirlenmiştir. Kapalı formülü $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ olan bileşiğin aşağıda açık kimyasal yapısı literatürle de uyumlu olan proton ve karbon değerleriyle birlikte verilmiştir (149).



11-hidroksigalantin ilk olarak 2012 yılında *Narcissus serotinus* L. bitkisinden elde edilmiştir (149) ve literatür taramalarımıza göre bugüne kadar herhangi bir

başka bitkiden izolasyonu gerçekleşmemiştir. *N. tazetta subsp. tazetta* L. bitkisinden izolasyonu ilk olarak tarafımızdan rapor edilmektedir.

Bileşiğin antikolinesteraz aktivitesi ve diğer aktiviteleri üzerinde çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple bileşiğin antikolinesteraz aktivite tayini *in vitro* Ellman esasına dayalı mikropilaka deneyiyle yapılmış olup, anti-asetilkolinesteraz ve anti-bütirilkolinesteraz deneylerinde bileşiğe ait IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.67 µM ve 18.17 µM olarak hesaplanmıştır. Bileşiğin her iki deney sonucunda belirgin aktivite görülmüş ve özellikle de anti-asetilkolinesteraz aktivitesinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir.



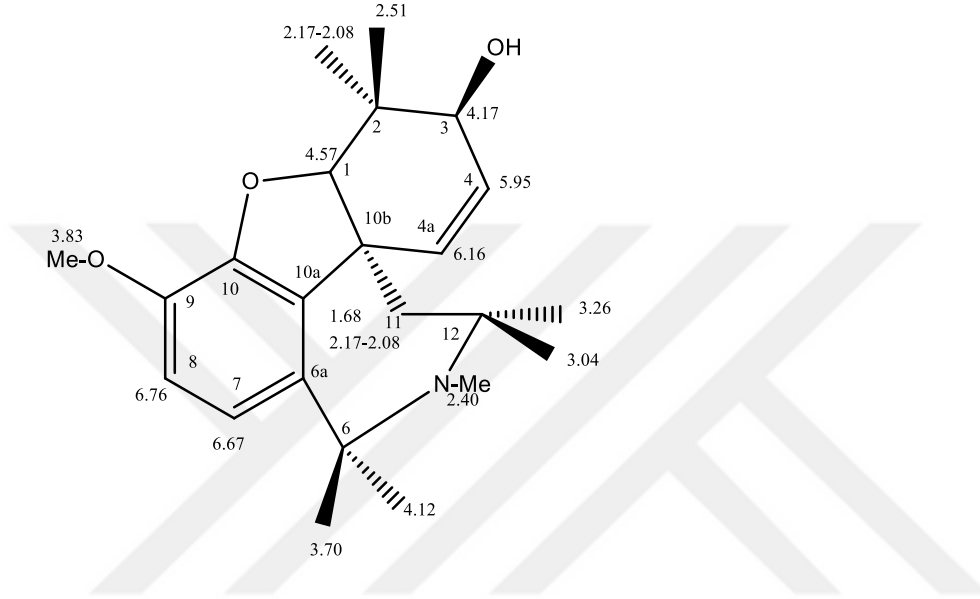
3.6. NT6: (-)-Galantamin

Ana kolondan alınan 51-53. fraksiyonlar birleştirilmiş (275.1 mg), preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak XV nolu çözücü sistemi kullanılmıştır. Sütun kromatografisi ile elde edilen fraksiyonlara D-1; D-8 arasında kodlar verilmiştir. D-6 kodlu alt fraksiyon (75mg), hareketli faz olarak XVI nolu sistemin kullanıldığı preparatif İTK ile saflaştırılmış, sonucunda 7 mg ağırlığında elde edilen optikçe aktif ($[\alpha]_D^{25}$:-108.5°) saf bileşiğe NT6 kodu verilmiştir.

Bileşiğe ait metanol- d_4 içerisinde 500 MHz NMR spektrometresinde çekilen 1H NMR spektrumunda (Spektrum 38) toplam 21 adet protona ait sinyal izlenmektedir. Eşleşme katsayıları dolayısıyla molekülde *orto* konumunda bulunduğu düşünülen aromatik protonlar δ 6.76 ve 6.67'de iki adet dublet sinyal (J 8 Hz) olarak görülmektedir. Yine aşağı alanda δ 6.16'da görülen dublet sinyal (J 10 Hz) ve δ 5.95'de görülen dublet-dublet sinyal (J 10.5; 5 Hz) birbirleriyle bölünen iki adet olefinik protonun varlığını düşündürmektedir. Alifatik sahada δ 4.57'de ise aşağı alana kaymış triplet benzeri sinyal ve δ 4.17'deki triplet (J 4.5 Hz) şeklindeki sinyal, oksijen gibi bir heteroatom komşuluğunda bulunan protonların varlığını göstermektedir. δ 4.12'de (J 15 Hz) ve 3.70'te (J 15 Hz) dublet şeklinde görülen sinyaller, bu protonların azot gibi bir heteroatom komşuluğunda olduğuna ve benzilik metilen grubu hidrojenlerine ait olabileceğine işaret etmektedir. δ 3.83'te 3 hidrojen değerinde singlet izlenmesi, sinyalin aromatik halka üzerindeki bir *O*-metil grubuna ait olabileceğini düşündürmektedir. δ 3.26'daki triplet olarak görülen (J 13.5 Hz) proton ve δ 3.04'te dublet-triplet olarak görülen (J 14 Hz) bir başka proton etkileştikinden, bu protonların azot gibi bir heteroatoma komşu metilen grubuna ait olabileceğini düşündürmüştür. Bunların dışında yukarı alanda δ 2.51'de dublet-dublet yarılmış bir protona ait sinyal, δ 2.17-2.08 arasında iki hidrojen değerindeki multiplet sinyal ve δ 1.68'de görülen dublet-dublet (J 14; 3.5 Hz) yarılmaya sahip sinyal izlenmektedir. δ 2.40'ta izlenen üç proton değerindeki singlet şeklindeki sinyal *N*- metil grubunun varlığına işaret etmektedir.

Molekülün ESI kütle spektrumunda (Spektrum 37) moleküler iyon piki, m/z 288.14 $[M+H]^+$ olarak görülmüştür. 1H NMR verileri ve kütle spektrumu birlikte

değerlendirildiğinde bileşiğin Amaryllidaceae ana alkaloid gruplarından galantamin tip alkaloid alt grubunun prototip bileşiği olan galantamin olduğu belirlenmiştir. Kapalı formülü $C_{17}H_{21}NO_3$ olan bileşiğin aşağıda yer alan açık kimyasal yapısı literatürle de uyumlu olan proton değerleriyle birlikte verilmiştir (63).



Galantamin bileşiği ilk olarak 1952 yılında Proskurnina ve Yakovleva tarafından *Galanthus woronowii* Losinsk.'den izole edilmiştir (382). Sonrasında diğer *Galanthus* türlerinden, *Narcissus* ve *Ungernia* türlerinden izolasyonu yapılmıştır (199, 361, 383). Buna ilaveten bileşiğin *Cyrtanthus*(282), *Zephyranthes*(317), *Sternbergia*, *Leucojum*, *Crinum* ve *Pancratium* genuslarından izolasyonu rapor edilmiştir (384).

N. tazetta L. bitkisinde galantamin eldesi daha önce rapor edilmiş olup (199); *N. tazetta* L. subsp. *tazetta* L. bitkisinin Antalya çevresinden toplanmış örneğinden galantamin izolasyonu gerçekleştirilmiştir(24). Muğla çevresinden toplanmış alt türdeki izolasyonu ilk kez tarafımızdan rapor edilmektedir.

Molekülün gastrointesitnal kanser hücrelerine (366) ve insan tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi de araştırılmıştır (39). Galantaminin

Trichomonas ve *Plasmodium* türleri üzerinde sitotoksik aktivitesine bakılmış, fakat antiprotozoal aktivite tespit edilmemiştir(372). Buna karşılık analjezik (38), antiviral, sitotoksik (39), antimikrobiyal ve antioksidan (385) aktiviteleri bildirilmiş olup, asetilkolinesteraz inhibisyonu etkisi (386) nedeniyle Alzheimer tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir. Ayrıca çalışma grubumuz tarafından yürütülen çalışmalarda daha önce galantaminin anti-asetilkolinesteraz ve anti-butirilkolinesteraz aktiviteleri Ellman yöntemiyle saptanmış ve IC₅₀ değerleri sırasıyla 0.15 µM ve 2.47 µM olarak bulunmuştur (317). Bileşiğin dopaminerjik hücreler üzerindeki nöronal hücre koruma kapasitesi araştırılmıştır (370). Ayrıca galantamin; yakın zamanda Alzheimer hastalığı dışında 'kronik yorgunluk sendromu' adı verilen rahatsızlığın tedavisinde kullanılmak üzere araştırılmıştır. 434 hasta ile yapılan kapsamlı bir randomize kontrollü çalışma sonucu bu hastalığın tedavisinde galantaminin tek başına etkin olmadığı tespit edilmiş (387); fakat kronik yorgunluk sendromunda kolinerjik iletim bozukluğunda rol oynayan stres hormonları olan kortizol ve dehidroepiandrosteron üzerinde düzenleyici etkisinin görülmesinden dolayı tedavide destekleyici olabileceği belirtilmiştir (388).

3.7. NT7: (+)-9-O-Demetil-2- α -hidroksihomolikorin

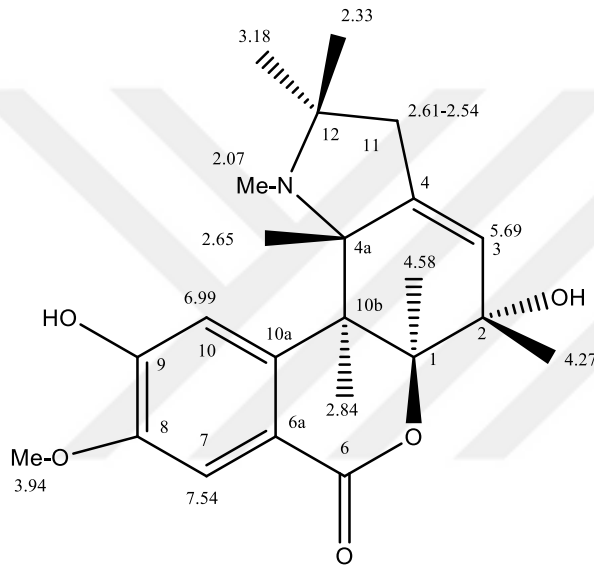
Ana kolondan alınan 100-117. fraksiyonlar birleştirilmiş (1.633 g), preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak XV nolu çözücü sistemi kullanılmıştır. Bu ayırım sonucunda elde edilen fraksiyonlara J-1; J-10 arasında kodlar verilmiştir.

J-10 kodlu fraksiyonda (500mg) VIII nolu çözücü sistemi ile aktarma sırasında çökelti oluşturan 5 mg ağırlığındaki optikçe aktif ($[\alpha]_D^{25}:+107^\circ$) bileşiğe NT7 kodu verilmiştir.

Bileşiğe ait metanol- d_4 içerisinde 500 MHz NMR spektrometresinde çekilen 1H NMR spektrumunda (Spektrum 41) toplam 17 adet protona ait sinyal izlenmektedir. Aromatik sahada iki adet singlet sinyal şeklinde izlenen (δ 7.54 ve δ 6.99) protonların birbirine göre *para* konumunda olduğu belirtilebilir. δ 5.69'da görülen geniş singlet sinyal, oleofinik bir protonun varlığını düşündürmektedir. Alifatik sahada en aşağı alanda izlenen ilk sinyal δ 4.58'de görülen, geniş singlet şeklindedir. δ 4.27'deki multiplet sinyalin ise oksijen gibi bir heteroatoma komşu bir protona ait olduğu düşünülmektedir. δ 3.94'te izlenen singlet sinyal üç hidrojene karşılık gelmektedir ve aromatik halkada metoksi varlığını işaret etmektedir. δ 3.18'de görülen multiplet sinyalin azot gibi bir heteroatoma komşu karbon üzerinde bulunan geminal çiftten birine ait olabileceği belirtilebilir. δ 2.84'te dublet dublet olarak izlenen sinyale (J 12.5; 3 Hz) ve δ 2.65'te görülen ve belirgin dublet olarak izlenen sinyale (J 12 Hz) sahip protonlar trans visinal olarak etkileşmektedir. Ayrıca alifatik alanda δ 2.61- 2.54 arasında iki proton değerinde multiplet sinyal ve δ 2.33'te bir proton değerinde multiplet sinyal izlenmektedir. δ 2.07'de görülen üç hidrojen değerindeki singlet sinyal ise molekülde bir *N*-Metil grubu varlığına işaret etmektedir.

Molekülün ESI kütle spektrumunda (Spektrum 40) moleküler iyon piki, m/z 318.37 $[M+H]^+$ olarak görülmüştür. 1H NMR bulguları ve kütle spektrumu birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin Amaryllidaceae ana alkaloit gruplarından homolikorin tip alkaloit alt grubuna giren *O*-demetil-2- α -hidroksi homolikorin bileşiği olduğu

belirlenmiştir. Demetilasyonun hangi konumdan gerçekleştiğini tespit etmek için NOESY deneyinden (Spektrum 42) faydalanılmıştır. NOESY spektrumunda (Tablo 41) O-Metil grubunun (δ 3.94) δ 6.99'daki aromatik protonla etkileşmesi, bu grubun C-8'den bağlı olduğunu göstermiştir. Kapalı formülü $C_{17}H_{19}NO_5$ olan bileşiğin aşağıda açık kimyasal yapısı literatürle de uyumlu olan proton değerleriyle birlikte verilmiştir(264).



9-O-Demetil-2- α -hidroksihomolikorinin izolasyonu ilk kez Bastida ve arkadaşları tarafından 1988 ve 1990 yıllarında *Narcissus dubius* Gouan (207) ve *N. tortifolius* Fdez. Casas (264) bitkilerinden rapor edilmiştir. *N. tortifolius* bitkisinden elde edilen bileşiğin, tümör hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi de araştırılmıştır (39). Bu alkaloidin tür bazında izolasyonu ilk kez *N. tazetta subsp. tazetta* L. alt türünden, tarafımızdan rapor edilmektedir. *Narcissus* cinsi dışında *Lycoris radiata* (L'Her.) Herb. (370) bitkisinden de izolasyonu yapılmıştır.

Molekölün sitotoksik aktivitesi araştırılmış, Molt 4 lenfositik hücrelerde ve fibroblastik LMTK hücrelerinde sitotoksik aktivitesi tespit edilmiştir (39). Asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi Ellman yöntemi ile araştırılmış ve aktivitenin

bulunmadığı rapor edilmiştir (111). Anti-bütirilkolinesteraz aktivitesi ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Tez kapsamında bileşiğin antikolinesteraz aktivite çalışması *in vitro* Ellman yöntemi esas alınarak yapılmış olup, asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi için IC₅₀ değeri 19.84 µM olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda bileşiğin bütirilkolinesteraz inhibitörü aktivitesi görülmemiştir.



3.8. NT8: (-)-Pankratinin- C

Ana kolondan alınan 100-117. fraksiyonlar birleştirilmiş (1.633 g), preparatif sütun kromatografisi ile ayırım gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak XV nolu çözücü sistemi kullanılmıştır. Bu ayırım sonucunda elde edilen fraksiyonlara J-1; J-10 arasında kodlar verilmiştir.

J-5 kodlu fraksiyon (197.9 mg) ileri saflaştırmaya tabi tutulmuş; XII nolu çözücü sistemi hareketli faz olarak kullanılarak preparatif sütun kromatografisi uygulanmıştır. 15 alt fraksiyon elde ettikten sonra 12. alt fraksiyondan aseton ile kristallendirme sonucu 5 mg ağırlığında elde edilen optikçe aktif ($[\alpha]_D^{25}$:-15°) bileşiğe NT8 kodu verilmiştir.

Bileşiğe ait metanol- d_4 içerisinde 400 MHz NMR spektrometresinde çekilen 1H NMR spektrumunda (Spektrum 44) toplam 15 adet protona ait sinyal izlenmektedir. Aromatik sahada δ 6.61 ve δ 6.57'de iki adet singlet pik olarak izlenen protonlar birbirlerine göre *para* konumda bulunmaktadır. δ 5.99'da dublet-dublet (J 10.4; 1.6 Hz) ve δ 5.72'de dublet-dublet (J 10.4; 1.2 Hz) şeklinde izlenen sinyaller molekülde iki adet olefinik protonun varlığını düşündürmektedir. δ 5.87'de izlenen iki hidrojen değerindeki singlet sinyal, metilendioksi grubunun varlığına işaret etmektedir. Alifatik sahada δ 4.28'de görülen aşağı alana kaymış multipler şeklindeki sinyalin, oksijen gibi bir heteroatoma komşu bir protona ait olduğu belirtilebilir. δ 4.22 ve δ 3.83'te dublet (J 16.8 Hz) şeklinde izlenen sinyallerin, benzilik yapıda geminal çift oluşturan protonlara ait olduğu düşünülmektedir. Bunların dışında, alifatik alanda δ 2.97- 2.94 arasında görülen iki hidrojen değerindeki multipler sinyal mevcuttur. δ 2.81'de dublet şeklinde izlenen (J 7.6 Hz) ve δ 2.64'te dublet şeklinde izlenen sinyal (J 2.4 Hz) dışında; birbiriyle etkileştikleri düşünülen protonlara ait δ 2.23'te ve δ 1.57'de sinyaller mevcuttur.

Bileşiğe ait ^{13}C NMR spektrumu (Spektrum 48) değerlendirildiğinde 16 adet karbona ait sinyal görülmüştür. HSQC deneyinden (Tablo 42) yararlanılarak hidrojen taşıyan ve taşımayan karbonlar birbirinden ayırt edilmiştir. Buna göre ilk incelemelerde metilendioksi grubuna ait protonların δ 100.7'deki karbon üzerinde bulunduğu ve olefinik protonların bağlı oldukları karbonların δ 135.2 ve δ 131.4'te

sinyal verdiği tespit edilmiştir. δ 6.54 (H-7) ve δ 6.59'de (H-10) izlenen protonların üzerlerinde yer aldıkları karbonların sırasıyla δ 106.1 ve δ 109.7'de sinyal verdiği saptanmıştır. ^{13}C NMR spektrumunda bunların dışında 3 adet metilen grubu taşıyan δ 61.3, 54.6 ve 33.7'de izlenen karbonlara ait sinyaller yer almaktadır. Ayrıca multiplet şeklinde bölünen δ 4.28'deki protonun δ 62.6'da rezonans veren karbon üzerinde bulunduğu belirlenmiştir. δ 2.97 -2.94 aralığında multiplet şeklinde izlenen iki protondan birinin δ 66.9'da rezonans veren karbon üzerinde, diğerinin ise δ 54.6'daki karbon üzerinde bulunduğu görülmüştür. Spektrumda bunların dışında aromatik alanda 4 tane (δ 145.9, 147.2, 130.3, 124.7) ve alifatik alanda ise nispeten aşağı alana kaymış bir adet katerner (δ 81.9) karbon yer almaktadır.

Molekülün ESI spektrumunda (Spektrum 43) moleküler pik, m/z 288.29 $[\text{M}+\text{H}]^+$ olarak görülmüştür. Bileşiğin molekül ağırlığı, metilendioksi grubunun bulunması ve olefinik protonların iki adet oluşu, molekülün öncelikle hemantamin grubuna ait olabileceğine işaret etmiştir. Ancak, ^{13}C NMR spektrumunda 11 nolu karbonun δ 49.3'te görülmesi ve HSQC deneyinde δ 2.64'te bir hidrojen değerinde sinyal veren protonun bu karbona bağlı olduğunun belirlenmesi bileşiğinin iskeletinin farklı bir gruba ait olabileceğine işaret etmiştir. H-11'in (δ 2.64) nispeten yukarı alanda yer alması, herhangi bir heteroatoma, α konumda olmadığını doğrular niteliktedir. 1D NMR spektrumlarında *N*-metil grubuna ait sinyalin de bulunmaması nedeniyle azotun da tersiyer olduğu göz önünde bulundurularak bileşiğin montanın alt grubuna ait olabileceği düşünülmüştür.

Bileşiğin yapısının tam olarak aydınlatılabilmesi için $^1J_{\text{CH}}$ korelasyonlarının saptandığı HSQC deneyi dışında diğer 2D NMR tekniklerinden (^1H , ^1H -COSY, HMBC, NOESY) yararlanılmıştır.

HMBC deneyinde (Spektrum 49) δ 6.59 (H-10)'da izlenen proton δ 124.7 (C-6a), δ 49.3 (C-11) ve δ 145.9 (C-8) karbonlarıyla 3 bağ, δ 147.9 (C-9) ile iki bağ aracılığıyla korelasyon göstermektedir. δ 6.54 (H-7)'de izlenen proton ise δ 61.3 (C-6), δ 130.3 (C-10a) ve δ 147.2 (C-9) ile $^3J_{\text{CH}}$, δ 145.9'daki (C-8) karbonla $^2J_{\text{CH}}$ aracılığıyla etkileşmektedir. Metilendioksi grubuna ait protonlar (δ 5.87), δ 145.9 (C-8) ve δ 147.2'de (C-9) rezonans yapan karbonlar ile üç bağ aracılığıyla korelasyon göstermektedir. δ 2.64'te (H-11) izlenen proton $^3J_{\text{CH}}$ aracılığıyla δ 124.7 (C-6a) ve δ 67.0'de (C-4a); $^2J_{\text{CH}}$ aracılığıyla δ 130.3'te (C-10a) rezonans yapan karbonlarla

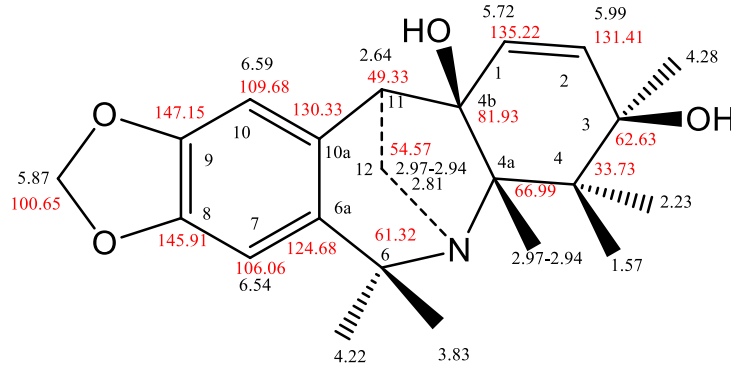
etkileşmektedir. HSQC deneyi ile geminal çift oldukları saptanmış olan ve δ 4.22 ve δ 3.83'te sinyal veren protonlar üç bağ aracılığıyla δ 67.0'de (C-4a) ve δ 130.3'te (C-10a) rezonans veren karbonlarla; iki bağ aracılığıyla δ 124.7'de (C-6a) rezonans veren karbonla korelasyon göstermektedir. İlaveten, H-6 β (δ 3.83), C-12 (δ 54.6) ile üç bağ aracılığıyla etkileşmektedir. δ 2.81'de sinyal veren proton δ 67.0'de (C-4a) ve δ 81.9'da (C-4b) rezonans yapan karbonlarla üç bağ aracılığıyla etkileşmektedir. δ 5.99'da (H-2) görülen olefinik protonun, C-4b (δ 84.9) ile; δ 5.72'de (H-1) görülen protonun ise δ 62.6'da (C-3) rezonans yapan karbonla $^3J_{CH}$ aracılığıyla korelasyonları mevcuttur.

1H , 1H -COSY deneyinde (Spektrum 47) görülen korelasyonlar da halkalardaki protonların dizilişlerini doğrulamaktadır.

Bileşiğin konfigürasyonel niteliklerinin belirlenebilmesi için NOESY deneyinden (Spektrum 50) yararlanılmıştır. NOESY spektrumundan elde edilen bulguların moleküler model üzerinde değerlendirilmesiyle H-10'un (δ 6.59), δ 2.64'te sinyal veren H-11 ile etkileştiği saptanmıştır. H-11 ise bunun dışında H-1 (δ 5.72) ve geminal çift oldukları saptanmış olup δ 2.97-2.94 aralığında ve δ 2.81'de sinyal veren protonlarla korelasyon göstermektedir. Diğer olefinik proton olan H-2 (δ 5.99) H-1 ile kuvvetli şekilde etkileşmektedir. Ayrıca H-4a (δ 2.97-2.94); H-4 α (δ 2.23) ile zayıf, H-4 β (δ 1.57) ile güçlü etkileşim göstermiştir.

Oksijen gibi bir heteroatom komşuluğunda bulunan H-3'ün (δ 4.28), H-2 ile ve H-4 α (δ 2.23) ile etkileştiği görülmüştür. H-3'ün δ 2.81'de (H-12 eq) sinyal veren protonla etkileşmesi kondanse halkaların ve taşıdıkları protonların birbirine göre duruşu hakkında önemli bilgiler vermiştir. Bunlara ek olarak, δ 3.83'te sinyal veren (H-6 α)'nın, H-12 ax (δ 2.97-2.94) ile korelasyonu mevcuttur.

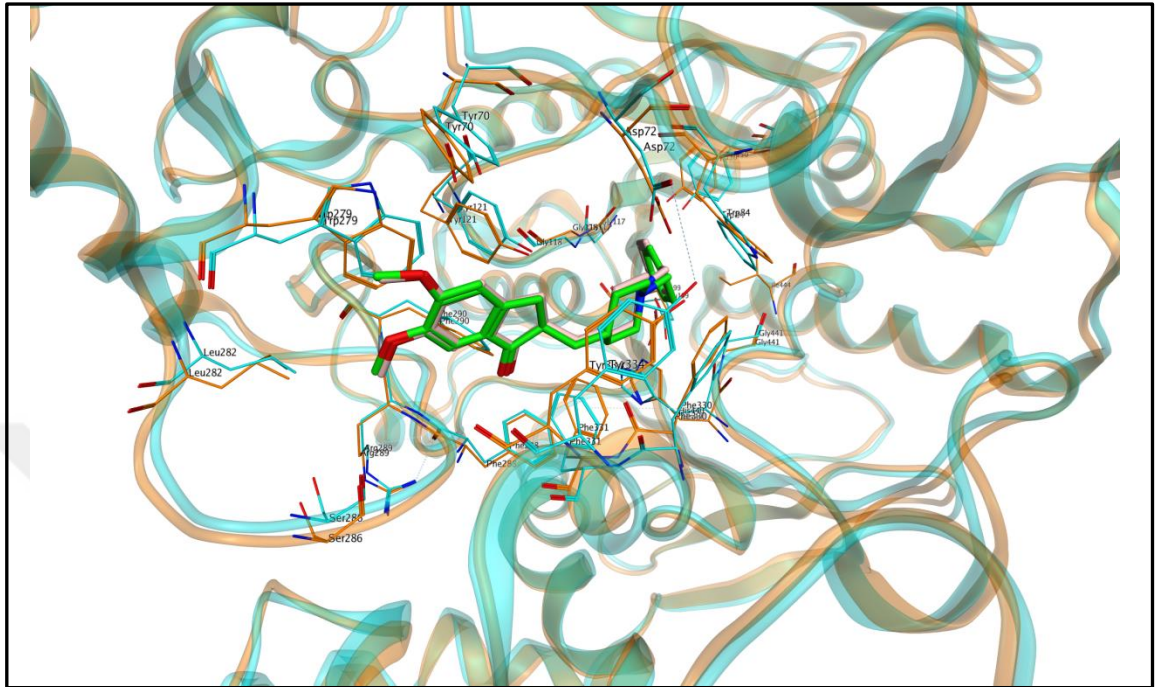
1H NMR verileri, ^{13}C spektrumu ve çeşitli 2D NMR analizleri (Tablo 42) ile kütle spektrumu birlikte değerlendirildiğinde bileşiğin Amaryllidaceae alkaloit gruplarından montanin tip alkaloit alt grubuna giren pankratinin-C bileşiği olduğu belirlenmiştir. Kapalı formülü $C_{16}H_{17}NO_4$ olan bileşiğin aşağıda açık kimyasal yapısı literatürle de uyumlu olan proton ve karbon değerleriyle birlikte verilmiştir (352).



Pankratinin-C ilk olarak 2009 yılında *Panocratium canariense* Ker Gawl. bitkisinden elde edilmiştir(352). *Leucojum aestivum* L. (389) ve *Lycoris radiata* L. (370) türlerinden de izolasyonu yapılmış olan Pankratinin-C, *Narcissus* genusunda ilk kez tarafımızdan rapor edilmektedir.

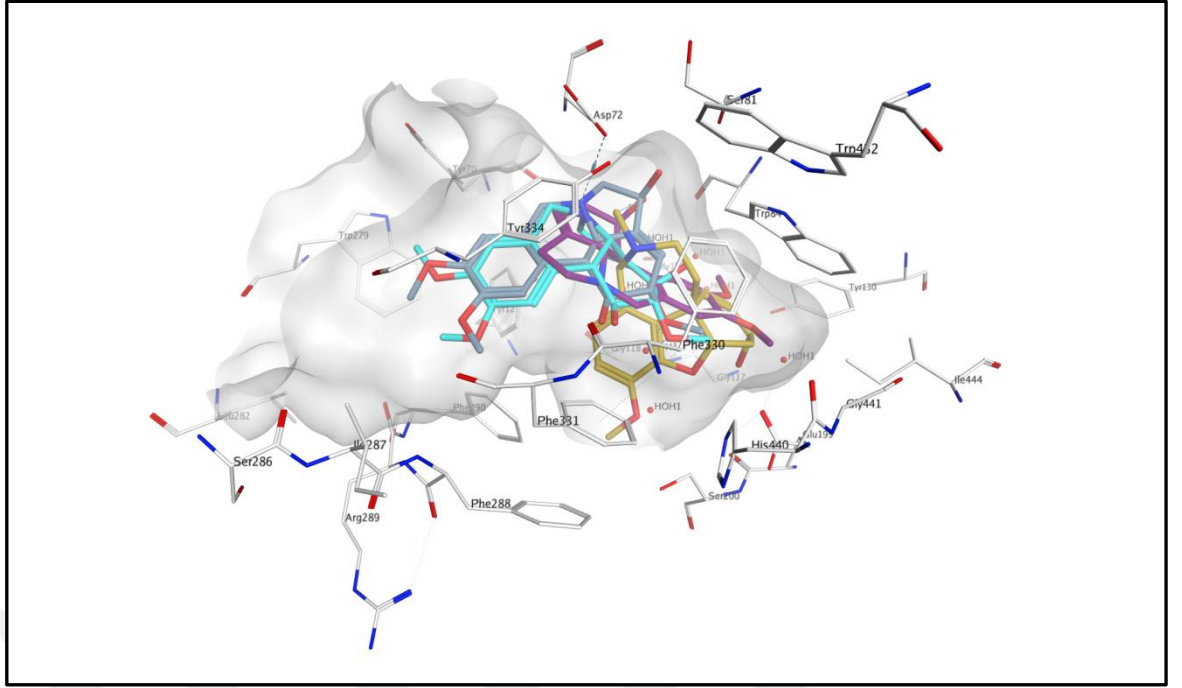
Bileşiğin dopaminerjik hücreler üzerindeki nöronal hücre koruma kapasitesi araştırılmıştır (370). *In vitro* asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz inhibitör aktivite tayini üzerine herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebeple tez kapsamında antikolinesteraz aktivite tayini yürütülmüştür. Ellman yöntemi esas alınarak *in vitro* ortamda gerçekleştirilen deneyde anti-asetilkolinesteraz aktiviteye rastlanmamıştır. Anti-butirilkolinesteraz aktivitesi için IC₅₀ değeri ise 32.04 µM olarak tespit edilmiştir.

4. İzole Edilen Alkalolitler Üzerinde Moleküler Doking Çalışmaları



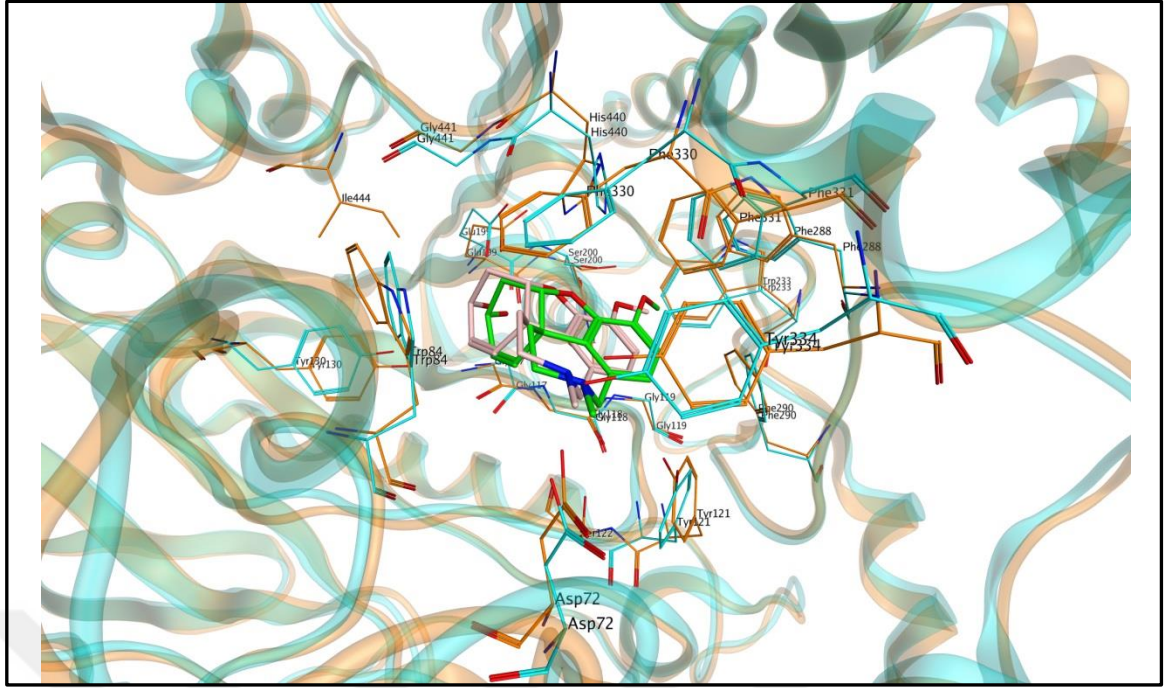
Şekil 20. Donepezil-AChE kompleksinin (1EVE.pdb) kristal yapısı ile donepezil bileşiğinin hazırlanan model içerisindeki ilk sıra doking pozunun superimpozisyonu.

Görselde yeşil çubuklar kristal yapı içerisindeki donepezil bileşimini ve pembe çubuklar hazırlanan model içerisindeki donepezil bileşimini temsil etmektedir. Aktif yöre artıkları üç harfli kodla adlandırılmış ve aktif yöre artıkları kristal yapı için mavi ve hazırlanan model için turuncu olarak gösterilmiştir. Kristal yapı (1EVE.pdb) ve hazırlanan modelin destek yapısı sırasıyla mavi ve turuncu şeritler olarak gösterilmiştir.



Şekil 22. Galantamin, 11-hidroksigalantin, narsissidin ve 9-O-metilpsödolikorin bileşiklerinin eeAChE içerisindeki ilk sıra doking pozlarının superimpozisyonu.

Görselde galantamin altın sarısı, 11-hidroksigalantin bileşiği grimsi mavi, narsissidin mavi ve 9-O-metilpsödolikorin mor çubuklar olarak gösterilmiştir. Aktif yöre artıkları üç harfli kodla adlandırılmış ve aktif yöre artıkları beyaz çubuklar olarak gösterilmiştir. eeAChE'nin ligandlara yakın moleküler yüzeyleri eklenmiştir.



Şekil 23. Galantamin-AChE kompleksinin (1DX6.pdb) kristal yapısı ile galantamin bileşiğinin hazırlanan model içerisindeki ilk sıra doking pozunun superimpozisyonu.

Görselde yeşil çubuklar kristal yapı içerisindeki galantamin bileşiğini ve pembe çubuklar hazırlanan model içerisindeki galantamin bileşiğini temsil etmektedir. Aktif yöre artıkları üç harfli kodla adlandırılmış ve aktif yöre artıkları kristal yapı için mavi ve hazırlanan model için turuncu olarak gösterilmiştir. Kristal yapı (1DX6.pdb) ve hazırlanan modelin destek yapısı sırasıyla mavi ve turuncu şeritler olarak gösterilmiştir.

Moleküler doking küçük molekül ilaç adayları ile bunların hedefledikleri proteinler arasındaki etkileşimleri teorik olarak belirleyen etkili bir yöntemdir. Çalışmamızda bu teknik kullanılarak, izole edilen (-)-likorin, (-)-psödolikorin, (-)-9-*O*-metilpsödolikorin, (-)-narsissidin, (+)-11-hidroksigalantin, (-)-galantamin, 9-*O*-demetil-2- α -hidroksihomolikorin ve pankratinin-C bileşiklerinin *eeAChE* ve *eqBuChE* enzimlerinin aktif yöreleri içerisindeki bağlanma yönelimleri değerlendirilmiştir. Doking çalışmalarına başlamadan önce RCSB'den alınan enzim haritaları materyal ve metot bölümünün homoloji modelleme ve doking çalışmaları alt bölümlerinde belirtilen yöntemlerle doking çalışması için hazırlanmıştır. Bileşiklerin her iki enzim içerisindeki etkileşimleri GOLD 5.6.2 programı ile GoldScore skorumla fonksiyonu kullanılarak ayrı ayrı hesaplanmış ve Tablo 45'te rapor edilmiştir.

Doking metodunu valide etmek için *AChE* inhibitörü donepezil ve *huBuChE*'nin (PDB id: 4TPK) kristal yapısından elde edilen *N*-{[(3*R*)-1-(2,3-dihidro-1*H*-inden-2-il)piperidin-3-il]metil}-*N*-(2-metoksietil)naftalen-2-karboksamit (Ligand id: 3F9) bileşiği sırasıyla *eeAChE* and *eqBuChE*'nin homoloji modeline doklanmıştır. İnhibitörlerin söz konusu proteinler içerisindeki ilk sıra doking pozları ve skorumla değerleri Şekil 20-21 ve Tablo 45'te verilmiştir. Donepezil bileşiğinin ilk sıra doking pozunun *eeAChE*'nin aktif yöresinde kristal yapı ile aynı bağlanma yönelimine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 20). *eqBuChE*'nin homoloji modelinin aktif yöresinde ise 3F9 bileşiğinin ilk sıra doking pozu ve kristal yapının aynı bağlanma yönelimine sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 21).

Çalışmamızda izolasyonu gerçekleştirilmiş olan alkaloidlerin *eeAChE* ve *eqBuChE* enzimleri içerisinde hesaplanan doking skorlarını incelediğimizde her iki enzimden elde edilen doking skorlarının birkaç istisna örnek dışında birbirine çok yakın olduğu gözlemlenmiştir. (Tablo 45). Biyolojik aktivite çalışmasında *eeAChE* enzimine selektif inhibisyon gösteren galantamin, narsissidin ve 9-*O*-demetil-2- α -hidroksihomolikorin bileşiklerinin *eeAChE* içerisindeki doking skorlarının *eqBuChE* içerisinde doking skorlarından belirgin bir şekilde yüksek olduğu hesaplanmıştır. Bununla birlikte *eeAChE* enzimine selektif inhibisyon gösteren 11-hidroksigalantin bileşiğinin *eeAChE* içerisinde hesaplanan doking skorunun *eqBuChE* içerisinde hesaplanan doking skorundan azda olsa yüksek olduğu tespit edilmiştir. Buna benzer

bir durum ise psödolikorin bileşiği için gözlemlenmiştir. *eqBuChE* enzimine daha fazla inhibisyon gösteren psödolikorin bileşiğinin *eqBuChE* içerisinde hesaplanan doking skorunun *eeAChE* içerisinde hesaplanan doking skorundan daha yüksek olduğu belirlenmiştir. *eqBuChE* selektif 9-*O*-metilpsödolikorin ve pankratinin-C bileşiklerinde ise *eqBuChE* içerisinde hesaplanan doking skorunun *eeAChE* içerisinde hesaplanan doking skorundan düşük olduğu tespit edilmiştir.

AChE'nin aktif bölgesi olan katalitik anyonik bölge (CAS); esteratik ve anyonik alt bölge olarak adlandırılan iki alt bölümden oluşmaktadır. Enzimin katalitik aktivitesinden esteratik alt bölge sorumlu iken, anyonik alt bölge kolin bağlama cebi olarak bilinmektedir. Enzimin esteratik aktif bölgesinde bulunan serin ve histidin kalıntıları AChE aktivitesi için çok önemlidir. Anyonik alt bölge, etkileşimi pozitif yüklü katerner bir asetilkolin grubu ile gerçekleştirmektedir. Ayrıca, anyonik alt bölge, AChE'nin inhibitörleri olan bazı katerner amonyum yapısı taşıyan ligandların bağlanma yeridir. AChE'nin bağlanma bölgesinde katalitik merkezinin iki alt kısmının yanı sıra periferik anyonik bölge (PAS) bulunmaktadır. Aktif bölgenin kolin-bağlanma cebinden farklıdır. Bu bölge AChE'nin substrat inhibisyonunda yer alıp, buna rağmen, düşük substrat konsantrasyonlarında, substratın periferik anyonik bölgeye bağlanması katalitik yolakta açılasyon adımını hızlandırabilmektedir (390).

Doking çalışması sonucunda bileşiklerin *eeAChE* içerisindeki elde edilen doking pozları değerlendirildiğinde, *eeAChE* inhibisyonu gerçekleştiren bileşiklerin enzim katalitik anyonik bölgesi içerisine yerleştiği ve/veya yöneldiği görülmüştür (Şekil 22). Bileşikler arasında en iyi inhibitör etkinliğe sahip olduğu belirlenen galantamin bileşiğinin doking pozunun *eeAChE* içerisindeki kristal yapısı ile aynı bağlanma yönelimine sahip olduğu belirlenmiştir (Şekil 23). Galantamin bileşiğinin doking pozu değerlendirildiğine bileşikte bulunan metoksi yapısının enzimin esteratik aktif bölgesinde bulunan Ser200 ve His440 aminoasit artıklarına yöneldiği ve hidroksil grubunun ise Glu199 amino asit artığına yöneldiği belirlenmiştir. Diğer bir inhibitör etkili bileşik olan 9-*O*-metilpsödolikorinin fenil yapısı üzerinde bulunan metoksi gruplarının enzimin katalitik anyonik bölgesinin anyonik alt bölgesi aminoasit artıklarından Trp84 ve Tyr130 arasına yöneldiği tespit edilmiştir. İnhibitör etkili narsissidin ve 11-hidroksigalantin bileşiklerinin Tyr121, Phe290, Phe330 ve Phe331 aminoasit artıklarından oluşan hidrofobik cebe konumlandığı ve enzimin katalitik anyonik bölgesi ile periferik anyonik bölgesi arasında bulunan Asp72

aminoasit artığının karboksilat anyonu ile bileşiklerin pozitif yüklü tersiyer amin gruplarının iyonik etkileşimler gerçekleştirdiği belirlenmiştir. *ee*AChE üzerine daha düşük inhibitör etkinliğe sahip psödolikorin ve 9-*O*-demetil-2- α -hidroksihomolikorin bileşiklerinde Tyr121, Phe290, Phe330 ve Phe331 aminoasit artıklarından oluşan hidrofobik cebe konumlandığı ve bölge aminoasitleri ile hidrofobik etkileşimler gösterdikleri belirlenmiştir. Doking çalışmasında pankratinin-C bileşiğinde psödolikorin ve 9-*O*-demetil-2- α -hidroksihomolikorin bileşikleri gibi Tyr121, Phe290, Phe330 ve Phe331 aminoasit artıklarından oluşan hidrofobik cebe yerleştiği halde biyolojik aktivite çalışmasında bileşiğin *ee*AChE üzerine inhibitör etkinlik göstermediği tespit edilmiştir. Çalışmadaki diğer bileşiklerden farklı olarak likorin bileşiğinin enzimin periferik anyonik bölgesine yerleştiği gözlemlenmiştir. Düşük substrat konsantrasyonunda substratın sadece periferik anyonik bölgeye bağlanmasının ve katalitik yolda açılma adımını hızlandırmasının; likorin için doking çalışmasında enzime bağlanma görülmesine rağmen inhibitör etki gösterememesinin nedeni olabileceği düşünülmektedir.

AChE ile BuChE arasındaki temel farklılık AChE'nin periferik anyonik bölge, enzim çukuru girişi ve açılma bağlanma cebinde bulunan çeşitli aromatik aminoasit artıklarının BuChE ile aynı pozisyonlarda olmamasıdır (341). AChE'nin çeşitli aromatik aminoasit artıklarının BuChE'de küçük ve polar aminoasit artıkları ile değişmesi BuChE'nin daha geniş bir enzim çukuruna sahip olmasına neden olup söz konusu geniş çukurun varlığı substrat seçiciliğini düşürmektedir (341).

Enzim inhibisyon çalışmalarında 9-*O*-metilpsödolikorin bileşiği çalışılan bileşikler arasında *eq*BuChE inhibisyonu üzerine en etkili bileşik olarak belirlenmiştir. 9-*O*-metilpsödolikorin'in en yüksek doking skoruna sahip konformasyonu incelediğinde bileşiğin katalitik anyonik bölgesi içerisine yöneldiği görülmüştür. Özellikle hidroksil gruplarını taşıyan heksahidroindol yapısının Trp82, Gly115, Gly116, Thr120, Tyr128, Glu197, Ser198 ve His438 aminoasit artıklarının oluşturduğu esteratik ve anyonik alt bölge ile açılma bağlanma bölgesi arasına yerleştiği belirlenmiştir. Molekülün 2 konumundan süstitüe hidroksil grubunun Glu197'nin karboksilik asit oksijen atomları ile hidrojen bağı yaptığı tespit edilmiştir. Diğer inhibitör etkili bileşikler olan galantamin, 11-hidroksigalantin, psödolikorin ve pankratinin-C bileşiklerinin 9-*O*-metilpsödolikorin gibi katalitik anyonik bölgesi içerisine yöneldiği başta Glu197 ve His438 ile hidrojen bağı yaptıkları ve diğer aminoasit artıkları ile hidrofobik etkileşimler gösterdikleri belirlenmiştir. BuChE'ye

karşı inhibitör etki göstermeyen likorin hariç diğer bileşiklerin de aktif bileşiklerle aynı şekilde bağlanma bölgesine yerleştiği fakat hidrojen bağları gerçekleştiremediği görülmüştür. Likorin molekülünün ise Ala328, Phe329 ve Tyr332'den oluşan hidrofobik cebe oturduğu tespit edilmiştir.



V. BÖLÜM

SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasından elde edilen bulgular ileride Türkiye’den toplanmış *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. bitkisinin monografinin hazırlanması durumunda yararlı olabilecek kalite kontrol çalışmalarına ait verileri kapsamaktadır.

Soğan ve toprak üstü kısımları üzerinde yapılan miktar tayini çalışmaları, bitki örneğinin likorin ve galantamin miktarları açısından değerlendirilmesine olanak sağlamıştır.

Amaryllidaceae familyası bitkilerinde iz miktarlardan kuru ağırlık üzerinden hesaplanmak şartıyla % 0.5'lere varan galantamin bulunmaktadır (363).

Yüksek miktarda galantamin taşıdığı bilindiği için ticari olarak da kullanılan bitkilerden ilk göze çarpanları kuru ağırlığa göre % 0.3 galantamin taşıyan *Leucojum aestivum* L., *Galanthus woronowi* (%0.9) ve *Ungernia victoris* (%0.6) bitkileridir. *Narcissus* türlerinden birkaçı da yine galantamince zengin bitkiler arasında değerlendirilmektedir (363).

Narcissus genusunda HPLC ile alkaloid miktar tayini yapılmış türler arasında kuru soğan örneklerinde *N. confusus* 5.38, *N. perez-chiscanoi* ise 1.93 (mg/g) oranında galantamin taşımaktadır(111).

Ayrıca galantamin kaynağı olarak kullanılan ve bu amaçla kültürü yapılan *Narcissus pseudonarcissus* cult. Carlton bitkisinin farklı bölgelerden toplanmış örneklerinin kuru soğanlarında 2.23-3.32 arasındaki oranlarda (mg/g) galantamin varlığı saptanmıştır. Aynı örneklerdeki miktarlar ¹H NMR yöntemi ile incelendiğinde bu oran 2.36-3.32 (mg/g) arasında bulunmuştur (110).

Narcissus tazetta L. bitkisi üzerinde farklı yöntemler kullanılarak galantamin miktarları araştırılmıştır. İran’da farklı lokalitelerden toplanmış soğan örneklerinde HPLC ile yapılmış çalışmada % 0.03-0.33 arasında galantamin bulunduğu rapor edilmiştir (128, 133). Hollanda’dan toplanmış soğan örneğinde HPLC ile yapılmış tayinde galantamin bulunmadığı görülmüştür(113). *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* L. örneği üzerinde galantamin miktar tayinine rastlanmamıştır. Yaptığımız HPLC çalışmasında ise bitkide galantamin miktarı soğanda % 0.0051 toprak üstü kısımda % 0.0055 bulunmuştur. Bundan dolayı bitkinin galantamin kaynağı olarak kullanılamayacağı belirtilebilir.

Narcissus tazetta subsp. *tazetta* bitkisinin Antalya/Türkiye’den toplanmış örneğinde daha önce likorin miktar tayini HPLC ile yapılmıştır (24). Bu çalışmada soğan örneklerinde % 0.089 oranında likorin bulunduğu tespit edilmiştir. Tez çalışmamızda Muğla/Türkiye’de yetişen bitki örneğinde yaptığımız çalışmada soğanlarda % 0.025 ve toprak üstü kısımda % 0.067 oranında likorine rastlanmıştır. Tez çalışmamızda HPLC yöntemi kullanılarak yapılan miktar tayini sonuçları değerlendirildiğinde bitkinin toprak üstü örneklerinde, soğan örneklerine göre daha yüksek oranda alkaloid bulunduğunu göstermektedir. Bu sonuç, galantamine zengin bir tür olan *Narcissus confusus* üzerinde yapılmış, bitkinin büyüme döngüsü ile organlardaki galantamin miktarının ilişkilendirildiği çalışmada, çiçeklenmenin ardından başlayan dönemde galantamin içeriğinin yapraklarda soğanlardan daha yüksek bulunması sonucu ile uyum göstermektedir (118).

Narcissus kùltivarları ile çiçeklenme döneminde yapılmış bir başka çalışmada yaprak ve soğanların kuru ağırlığa göre sırası ile % 0.02-0.1 ve % 0.05-0.1 oranında galantamin içerdikleri saptanmıştır. Beş farklı sera kùltivarındaki alkaloid içeriği ise yine kuru ağırlığa göre % 0.1–0.2 ve % 0.05–0.2 olarak belirlenmiştir. Bu sebeple çiçek hasatından sonra bu sera bitkilerinin yapraklarının galantamin üretimi için kullanılabileceği önerilmiştir (363). Çalışmamızda kullandığımız bitki örneği de toplama zamanı olarak bu dönemlere karşılık geldiğinden toprak üstü kısımların galantamin veriminin soğanla karşılaştırıldığında önemli düzeylere ulaşmış olmasını destekleyici niteliktedir.

Narcissus cinsine ait bitkilerin çiçeklerinden elde edilen uçucu yağ ile soğan ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan ekstratlar üzerinde GC-MS çalışmaları mevcuttur (100, 140). *Narcissus* cinsi üzerinde yapılmış GC-MS çalışmaları sayesinde familya ve cins için yeni olan alkaloidlerin tespiti mümkün olmakta, izolasyon çalışmalarında hedefe daha kolay ulaşmayı sağlamaktadır(141). Türkiye’de yetişen *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* bitkisinin toprak üstü kısımları ve soğanları üzerinde, GC-MS yöntemi kullanılarak alkaloid içeriklerinin tayini ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Bitkideki galantamin miktarı bitki örneğinin bir galantamin kaynağı olarak kullanılması için yeterliliğini tam olarak sağlamasa da GC-MS bulguları ve izolasyonla elde edilen maddeler açısından değerlendirildiğinde, ülkemizde yetişen bu alt türün Amaryllidaceae alkaloid iskelet tipleri bakımından çeşitliliğe sahip olduğunu açıkça ortaya koymaktadır. Tez çalışmaları kapsamında

yapılan GC-MS çalışması sonucunda bitkide 5 farklı iskelet tipinde, 23 adet alkaloid olduğu saptanmıştır.

İzolasyon ve yapı aydınlatma çalışmaları sonucunda 4 farklı iskelet tipine ait toplamda 8 Amaryllidaceae alkaloidi Muğla/Türkiye’de yetişen *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* örneğinden rapor edilmiştir.

Bu alkaloidlerden yalnız likorin ve galantamin daha önce Türkiye kaynaklı *Narcissus tazetta* bitkisinden izole edilmiştir (24, 64). Bir çalışmada Antalya ve çevresinden toplanmış örnek çalışılmış ve sonuçta likorin dışında tazettin, N-norgalantamin, hemantamin ve 3-epihidroksibulbispermin izole edilmiştir(64). Diğer bir çalışmada ise Yalova’da ticari olarak temin edilmiş soğanlardan galantamine ek olarak bufanisin, 9-O-demetilhomolikorin, 3-epihidroksibulbispermin, hemantamin ve tazettin izole edilmiştir (24).

Tez çalışmamız sonucunda izole ettiğimiz alkaloidlerden Pankratinin-C, *Narcissus* cinsinden; 9-O-metilpsödolikorin, narsissidin, 11-hidroksigalantin, 9-O-demetil-2- α -hidroksihomolikorin *Narcissus tazetta* türünden ilk kez bu çalışma ile rapor edilmiştir. Psödolikorin ise *N.tazetta* subsp. *tazetta* alt türünden ilk kez bu çalışmada izole edilmiştir.

İzolasyon ve yapı aydınlatma sonucunda elde edilen saf bileşiklerin *in vitro* Ellman yöntemine dayalı mikrolaka deneyiyle asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz enzimlerini inhibe edici etkileri, standart olarak galantamin kullanılarak saptanmış ve aktif bulunan bileşiklerin IC₅₀ değerleri hesaplanmıştır. Bu kapsamda 11-hidroksigalantin, narsissidin, 9-O-demetil-2- α -hidroksihomolikorin ve psödolikorin anti-asetilkolinesterazaktivite gösterirken, montanin alt grubundan olan pankratinin-C’nin aktif olmadığı görülmüştür. 9-O-demetil-2- α -hidroksihomolikorin ve narsissidin alkaloidlerinin anti-butirilkolinesteraz aktivitesi saptanmamış, ancak 11-hidroksigalantin, pankratinin-C ve psödolikorinin BuChE inhibisyonu yaptığı belirlenmiştir. (-)-Likorin, (+)-galantamin ve 9-O-metilpsödolikorin bileşiklerinin anti-asetilkolinesteraz ve anti-butirilkolinesteraz aktiviteleri daha önce çalışma grubumuz tarafından araştırılmış olduğu için bu çalışmada tekrarlanmamıştır (289, 292). Ayrıca bu çalışmada moleküler doking teknik kullanılarak izole edilen alkaloidlerin *Torpedo californica* asetilkolinesterazı (*eeAChE*) ve *Equus caballus* butirilkolinesterazı (*eqBuChE*) ile oluşturulan tahmini ligand-reseptör kompleksleri

yardımla alkoloitlerin enzimlerin aktif yöreleri içerisindeki bağlanma yönelimleri değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak bitkilerin yetiştiği toprak yapısı, iklim koşulları, her türlü çevresel faktör ve genetik çeşitliliğe bağlı olarak içeriğinin değişmesine dayanarak, Türkiye’de yetişen Amaryllidaceae bitkilerinin alkaloit içeriklerinin daha detaylı araştırılmasının gerektiği söylenebilir. İlavenen, teze konu olan bitkinin farklı lokalitelerden toplanacak olan örneklerinin fitokimyasal içeriklerinin araştırılması ile ilginç kimyasal yapıya sahip biyoaktif moleküllerin elde edilmesi mümkün olabilir.



VI. BÖLÜM

KAYNAKLAR

1. Willis J. Amaryllidaceae. In: Shaw A, editor. A dictionary of the flowering plants&ferns. 8th ed. Cambridge Cambridge University Press; 1988. p. 49-50.
2. Nair JJ, Bastida J, Codina C, Viladomat F, van Stadene J. Alkaloids of the South African Amaryllidaceae: a Review. Nat Prod Commun. 2013;8(9):1335-1350.
3. Turhan B. Türkçe Bitki Adları Sözlüğü. 4. ed. Çankaya Ankara: Ertem Basım Yayın Dağıtım; 2015.
4. Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Güner A, Aslan S, Ekim T, Vural M, MT B, editors. İstanbul, Turkey 2012.
5. Bahar G, Sukran K. The edible and miscellaneous useful plants in Marmaris (Southwest Turkey). J Fac Pharm Istanbul. 2014;44(1):69-78.
6. Uzmaz A, Durmaz S, Orumlu AE. A Study On The Problems Of Narcissus Farming In Mordogan. Ege Üniv Ziraat Fak Derg. 2001;38(1):39-46.
7. Dweck AC. The folklore of Narcissus. In: Hanks GR, editor. Narcissus and Daffodil - The genus Narcissus. New York: Taylor & Francis Ltd; 2002. p. 19-29.
8. Culpeper's Colour Herbal. Potterton D, editor. London: W. Foulsham; 1983.
9. Grigson G. The Englishman's Flora. Oxford: Helicon Publishing Ltd; 1996.
10. Grieve M. A Modern Herbal – The Medicinal, Culinary, Cosmetic and Economic Properties, Cultivation and Folklore of Herbs, Grasses, Fungi, Shrubs and Trees with all their Modern Scientific Uses. London: Tiger Books International; 1998.
11. Matsui AS, Rogers J, Woo YK, Cutting WC. Effects of some natural products on fertility in mice. Med Pharmacol Exp. 1967; 16:414.
12. Akram U, Azhar M, Akthar J, Kumar P, Fazıl M, Ahmed S. Narcissus tazetta – a case study of biopiracy Curr Sci. 2012;103(9):978-979.
13. Sina İ-i. El-Kanun Fi't-Tıbb. Ankara: Atatürk Kültür Merkezi Yayınları; 2015.
14. Van Damme EJM, Willy JP. Narcissus Lectins. In: Hanks GR, editor. Narcissus and Daffodil- The genus Narcissus. New York: Taylor & Francis Ltd; 2002. p. 380-390.
15. David B. Compounds from the genus *Narcissus* : pharmacology, pharmacokinetics and toxicology. Narcissus and Daffodil- The genus Narcissus. New York: Taylor&Francis Ltd.; 2002. p. 333-354.
16. Nair JJ, Bastida J, Viladomat F, van Staden J. Cytotoxic Agents of the Crinane Series of Amaryllidaceae Alkaloids. Nat Prod Commun. 2012;7(12):1677-1688.
17. Liu RF, Cao ZF, Tu J, Pan YY, Shang BX, Zhang GC et. al. Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell-dominant vasculogenic mimicry. Pigm Cell Melanoma R. 2012;25(5):630-638.
18. Liu J, Li Y, Tang LJ, Zhang GP, Hu WX. Treatment of lycorine on SCID mice model with human APL cells. Biomed Pharmacother. 2007;61(4):229-234.
19. Hohmann J, Forgo P, Molnar J, Wolfard K, Molnar A, Thalhammer T et. al. Antiproliferative Amaryllidaceae alkaloids isolated from the bulbs of *Sprekelia formosissima* and *Hymenocallis x festalis*. Planta Med. 2002;68(5):454-457.
20. Roy M, Liang L, Xiao XJ, Peng YL, Luo YH, Zhou WH et. al. Lycorine Downregulates HMGB1 to Inhibit Autophagy and Enhances Bortezomib Activity in Multiple Myeloma. Blood. 2016;128(22).
21. Luo YH, Roy M, Xiao XJ, Sun SM, Liang L, Chen HY et. al. Lycorine induces programmed necrosis in the multiple myeloma cell line ARH-77. Tumor Biol. 2015;36(4):2937-2945.

22. Li SY, Chen C, Zhang HQ, Guo HY, Wang H, Wang L et. al. Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antivir Res.* 2005;67(1):18-23.
23. Evidente A, Andolfi A, Abou-Donia AH, Touema SM, Hammoda HM, Shawky E et. al. (-)-Amarbellisine, a lycorine-type alkaloid from *Amaryllis belladonna* L. growing in Egypt. *Phytochemistry.* 2004;65(14):2113-2118.
24. Sener B, Koyuncu M, Bingöl F, Muhtar F, editors. *Production of Bioactive Alkaloids from Turkish Geophytes. International Conference on Biodiversity and Bioresources: Conservation and Utilization; 1997; Phuket, Thailand.*
25. Sener B, Orhan I, Satayavivad J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytother Res.* 2003;17(10):1220-1223.
26. Yui S, Mikami M, Mimaki Y, Sashida Y, Yamazaki M. Inhibition effect of Amaryllidaceae alkaloids, lycorine and lycoricidinol on macrophage TNF-alpha production. *Yakugaku Zasshi.* 2001;121(2):167-171.
27. Citoglu GS, Acikara OB, Yilmaz BS, Ozbek H. Evaluation of analgesic, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of lycorine from *Sternbergia fisheriana* (Herbert) Rupr. *Fitoterapia.* 2012;83(1):81-87.
28. Heinrich M, Teoh HL. Galanthamine from snowdrop - the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J Ethnopharmacol.* 2004;92(2-3):147-162.
29. Ustunes L. Rx MediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı. In: L U, editor. Bornova İzmir: Gemaş Müh.; 2017.
30. Melo JB, Sousa C, Garcao P, Oliveira CR, Agostinho P. Galantamine protects against oxidative stress induced by amyloid-beta peptide in cortical neurons. *Eur J Neurosci.* 2009;29(3):455-464.
31. Schilstrom B, Ivanov VB, Wiker C, Svensson TH. Galantamine enhances dopaminergic neurotransmission in vivo via allosteric potentiation of nicotinic acetylcholine receptors. *Neuropsychopharmacol.* 2007;32(1):43-53.
32. Lorrio S, Negredo P, Roda JM, Garcia AG, Lopez MG. Effects of memantine and galantamine given separately or in association, on memory and hippocampal neuronal loss after transient global cerebral ischemia in gerbils. *Brain Res.* 2009;1254:128-137.
33. Lorrio S, Sobrado M, Arias E, Roda JM, Garcia AG, Lopez MG. Galantamine postischemia provides neuroprotection and memory recovery against transient global cerebral ischemia in gerbils. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007;322(2):591-599.
34. Kreh M. Studies on galanthamine extraction from *Narcissus* and other Amaryllidaceae. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil -The genus Narcissus.* nEW yORK: Taylor & Francis Ltd; 2002. p. 256-272.
35. Moraes RM. Galanthamine production from *Narcissus*: agronomic and related considerations. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil - The genus Narcissus.* New York: Taylor & Francis Ltd; 2002. p. 273-285.
36. Rees A. Bulb, corm and tuber production. In: Rees A, editor. *Ornamental Bulbs, Corms and Tubers.* Wallingford: C.A.B. International; 1992. p. 112-138.
37. Hanks GR. Commercial production of *Narcissus* bulbs. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil- The genus Naricssus.* New York: Taylor & Francis Ltd; 2002.
38. Harvey AL. The Pharmacology of Galanthamine and Its Analogs. *Pharmacol Therapeut.* 1995;68(1):113-128.
39. Weniger B, Italiano L, Beck JP, Bastida J, Bergonon S, Codina C et. al. Cytotoxic Activity of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Med.* 1995;61(1):77-79.
40. Rao VK, Rao AJ, Reddy SS, Raju CN, Rao PV, Ghosh SK. Synthesis, spectral characterization and biological evaluation of phosphorylated derivatives of galanthamine. *Eur J Med Chem.* 2010;45(1):203-209.

41. Sangaleti CT, Costa FO, Moraes TL, Irigoyen MC, Bortolotto LAT, Lopes HF et. al. Improvement of the Adipokines Profile and Insulin Resistance in Metabolic Syndrome Patients Induced by Galantamine Activation of Cholinergic Pathway. *Faseb J.* 2016;30.
42. Hanes WM, Olofsson PS, Kwan K, Hudson LK, Chavan SS, Pavlov VA et. al. Galantamine Attenuates Type 1 Diabetes and Inhibits Anti-Insulin Antibodies in Nonobese Diabetic Mice. *Mol Med.* 2015;21:702-708.
43. McNulty J, Nair JJ, Codina C, Bastida J, Pandey S, Gerasimoff J et. al. Selective apoptosis-inducing activity of crinum-type Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry.* 2007;68(7):1068-1074.
44. Kaya GI, Sarikaya B, Onur MA, Somer NU, Viladomat F, Codina C et. al. Antiprotozoal alkaloids from *Galanthus trojanus*. *Phytochem Lett.* 2011;4(3):301-305.
45. Ghosal S, Lochan R, Ashutosh, Kumar Y, Srivastava RS. Chemical-Constituents of Amaryllidaceae .13. Alkaloids of *Haemanthus-Kalbreyeri*. *Phytochemistry.* 1985;24(8):1825-1828.
46. Dumont P, Ingrassia L, Rouzeau S, Ribaucour F, Thomas S, Roland I et. al. The amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia.* 2007;9(9):766-776.
47. Evidente A, Kireev AS, Jenkins AR, Romero AE, Steelant WFA, Van Slambrouck S et. al. Biological Evaluation of Structurally Diverse Amaryllidaceae Alkaloids and their Synthetic Derivatives: Discovery of Novel Leads for Anticancer Drug Design. *Planta Med.* 2009;75(5):501-507.
48. Sarikaya BB, Zencir S, Somer NU, Kaya GI, Onur MA, Bastida J et. al. The Effects of Arolycoridine and Narciprimine on Tumor Cell Killing and Topoisomerase Activity. *Rec Nat Prod.* 2012;6(4):381-385.
49. Nair JJ, Rarova L, Strnad M, Bastida J, van Staden J. Apoptosis-inducing effects of distichamine and narciprimine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22(19):6195-6199.
50. Luchetti G, Johnston R, Mathieu V, Lefranc F, Hayden K, Andolfi A et. al. Bulbispermine: A Crinine-Type Amaryllidaceae Alkaloid Exhibiting Cytostatic Activity toward Apoptosis-Resistant Glioma Cells. *Chemmedchem.* 2012;7(5):815-822.
51. Havelek R, Seifrtova M, Kralovec K, Bruckova L, Cahlikova L, Dalecka M et. al. The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine.* 2014;21(4):479-490.
52. Kornienko A, Evidente A. Chemistry, biology, and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chem Rev.* 2008;108(6):1982-2014.
53. Van Damme EJM, Allen AK, Peumans WJ. Related Mannose-Specific Lectins from Different Species of the Family Amaryllidaceae. *Physiol Plantarum.* 1988;73(1):52-57.
54. Balzarini J, Hatse S, Vermeire K, Princen K, Aquaro S, Perno CF et. al. Mannose-specific plant lectins from the Amaryllidaceae family qualify as efficient microbicides for prevention of human immunodeficiency virus infection. *Antimicrob Agents Ch.* 2004;48(10):3858-3870.
55. Van Damme EJM, Peumans WJ. Isolectins in *Narcissus* - Complexity, Interspecies and Intraspecies Differences and Developmental Control. *Physiol Plantarum.* 1990;79(1):1-6.
56. Ooi LS, Ho WS, Ngai KL, Tian L, Chan PK, Sun SS et. al. *Narcissus tazetta* lectin shows strong inhibitory effects against respiratory syncytial virus, influenza A (H1N1, H3N2, H5N1) and B viruses. *J Biosciences.* 2010;35(1):95-103.
57. Lopez S, Armand-Ugon M, Bastida J, Viladomat F, Este JA, Stewart D et. al. Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) activity of lectins from *Narcissus* species. *Planta Med.* 2003;69(2):109-112.

58. Akkouch O, Ng TB, Singh SS, Yin C, Dan X, Chan YS et. al. Lectins with Anti-HIV Activity: A Review. *Molecules*. 2015;20(1):648-668.
59. Van Damme EJM, Goldstein IJ, Peumans WJ. A Comparative-Study of Mannose-Binding Lectins from the Amaryllidaceae and Alliaceae. *Phytochemistry*. 1991;30(2):509-514.
60. Powell KS, Gatehouse AMR, Hilder VA, Van Damme EJM, Peumans WJ, Boonjawat J et. al. Different Antimetabolic Effects of Related Lectins Towards Nymphal Stages of *Nilaparvata-Lugens*. *Entomol Exp Appl*. 1995;75(1):61-65.
61. Sauvion N, Rahbe Y, Peumans WJ, VanDamme EJM, Gatehouse JA, Gatehouse AMR. Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the peach-potato aphid *Myzus persicae*. *Entomol Exp Appl*. 1996;79(3):285-293.
62. Ma GE, Li HY, Lu CE, Yang XM, Hong SH. Studies on the Alkaloids of Amaryllidaceae .9. 6-Alpha-6-Beta-Hydroxy-3-O-Methylepipimaritidine, 2 New Alkaloids from *Narcissus-Tazetta* L Var *Chinensis* Roem. *Heterocycles*. 1986;24(8):2089-2092.
63. Bastida J, Lavilla R, Viladomat F. Chemical and Biological Aspects of *Narcissus* Alkaloids. *Alkaloids: Chemistry and Biology*, Vol 63. 2006;63:87-179.
64. Orhan I, Sener B. Bioactivity-directed fractionation of alkaloids from some amaryllidaceae plants and their anticholinesterase activity. *Chem Nat Compd*+. 2003;39(4):383-386.
65. Davis PH. *Flora of Turkey and The East Aegean Islands*. In: H DP, editor. 8. Edinburgh: Edinburgh University Press; 1984. p. 358-377.
66. Mathew B. The Families of the Monocotyledons - Structure, Evolution and Taxonomy - Dahlgren,Rmt, Clifford,Ht, Yeo,Pf. *Nature*. 1985;317(6033):122-122.
67. Casas J, Ramírez JE, Ríos S, Juan J, Martínez-Francés V, Laguna E et. al. Endemic species of *Narcissus* in Central Spain: Biodiversity and conservation under grazing pressure by wild and domestic herbivorous. In: Porqueddu C, Ríos S, editors. *The contributions of grasslands to the conservation of Mediterranean biodiversity. Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens*. 92: Zaragoza : CIHEAM / CIBIO / FAO / SEEP; 2010. p. 79-83.
68. Berkov S, Martinez-Frances V, Bastida J, Codina C, Rios S. Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*. 2014;99:95-106.
69. Graham SW, Barrett SCH. Phylogenetic reconstruction of the evolution of stylar polymorphisms in *Narcissus* (Amaryllidaceae). *Am J Bot*. 2004;91(7):1007-1021.
70. Ronsted N, Savolainen V, Molgaard P, Jager AK. Phylogenetic selection of *Narcissus* species for drug discovery. *Biochem Syst Ecol*. 2008;36(5-6):417-422.
71. Zonneveld BJM. The systematic value of nuclear DNA content for all species of *Narcissus* L. (Amaryllidaceae). *Plant Syst Evol*. 2008;275(1-2):109-132.
72. Mathew B. Classification of the genus *Narcissus*. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil-The genus Narcissus*. New York: Taylor & Francis Ltd.; 2002. p. 31-34.
73. Jane JL, Kasemsuwan T, Leas S, Zobel H, Robyt JF. Anthology of Starch Granule Morphology by Scanning Electron-Microscopy. *Starch-Starke*. 1994;46(4):121-129.
74. Jones D. Surface Morphology Of *Narcissus* Flowering Stems As Revealed By Scanning Electron Microscopy *Micron*. 1978;9:95-97.
75. Badenhuizen NP. Growth And Corrosion Of The Starch Grain In Connection With Our Present Knowledge Of The Microscopical And Chemical Organization *Protoplasma*. 1939;33:440-468.
76. Chen JX, Ziv M. The effects of storage condition on starch metabolism and regeneration potentials of twin-scales and inflorescence stem explants of *Narcissus tazetta*. *In Vitro Cell Dev-Pl*. 2005;41(6):816-821.
77. Chen S. Developmental Morphology of the Flower in *Narcissus*. *Ann Bot-London*. 1971;35(4):881-890.

78. Shah JS, Beckett A. A Preliminary Evaluation Of Moist Environment Ambient Temperature Scanning Electron Microscopy Micron. 1979;10:13-23.
79. Lam TH, Ho YB, Chen S. Observations on Ultraviolet-Fluorescent Trichomes on the Tepals of Narcissus Flowers. Plant Sci Lett. 1980;18(2):115-120.
80. Baker EA, Parsons E. Scanning electron microscopy of plant cuticles Journal of Microscopy. 1971;94:39-49.
81. Noy-Porat T, Flaishman MA, Eshel A, Sandler-Ziv D, Kamenetsky R. Florogenesis of the Mediterranean geophyte *Narcissus tazetta* and temperature requirements for flower initiation and differentiation. Sci Hortic-Amsterdam. 2009;120(1):138-142.
82. Hanks GR. The biology of Narcissus. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil- The Genus Narcissus*. London: Taylor & Francis; 2002. p. 1-17.
83. Lifante ZD, Camacho CA. Morphological variation of *Narcissus serotinus* L. s.l. (Amaryllidaceae) in the Iberian Peninsula. Bot J Linn Soc. 2007;154(2):237-257.
84. Ruamrungsri S, Ruamrungsri S, Sato T, Ohyama T, Ikarashi T. Identification of long needle crystals and distribution of oxalate salts in *Narcissus* cv. 'Garden Giant'. Soil Sci Plant Nutr. 1997;43(4):891-900.
85. Tazaki K, Zhou G, Makaino K. Effect on narcissus plant by exhaust emissions derived from diesel engine. Earth Science (Chikyu Kagaku). 1996;50(2):100-110.
86. Alp Ş, Zeybekoğlu E, Salman A, Özzambak ME. Natural and Naturalized *Narcissus* Taxa in Anatolia and its Faced Problems. Selçuk Tar Bil Der. 2015;3(2):304-308.
87. Kebeli F. A study on bulb propagation and production of cut *Narcissus* flowers in Samsun: Ondokuz Mayıs University; 2012.
88. Sari O. A study on growing techniques of the native *Narcissus* (*Narcissus tazetta* L.) flowers in Unye province: Ondokuz Mayıs University; 2013.
89. Kilincer M. A research on determining variations of the species *Narcissus tazetta* L. cultivated in Southeastern Anatolia region: Yuzuncuyil University; 2015.
90. Demir S. Plant height control by chemical methods in native and hybrid narcissus flowers grown in pots: Ondokuz Mayıs University; 2014.
91. Bademkiran F. The effects of dosages of vermicompost and vermisoil on plant growth and nutrient content of narcissi (*Narcissus* sp.) in ecological conditions of siirt: Siirt University; 2018.
92. Zeybeoglu E. Research on wild and culture narcissi (*Narcissus*) of Turkey, their cultivation and investigation on their biological and morphological properties: Ege University; 2010.
93. Yilan C. In vitro bulb production using RITA bioreactors in daffodil (*Narcissus tazetta* subsp. *tazetta*) plants: Ege University; 2017.
94. Isman MB. Plant essential oils as green pesticides for pest and disease management. Acs Sym Ser. 2004;887:41-51.
95. Remy C. *Narcissus* in Perfumery. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil- The genus Narcissus*. London: Taylor & Francis 2002. p. 392-398.
96. Ehret C, Maupetit, P., Petrzilka M. New Organoleptically Important Constituents of *Narcissus Absolute* (*Narcissus poeticus* L.) Journal Of Essential Oil Research 1992;4:41-47.
97. Bruno S, De Laurentis N, Amico A, Stefanizzi L. Chemical Investigation and Cytologic Localization of Essential Oils in the Flowers of *Narcissus tazetta* Int J Pharmacog. 1994;32(4):357-361.
98. Kar A. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Daryaganj, New Delhi: New Age International Ltd.; 2007.
99. Dobson HEM, Arroyo J, Bergstrom G, Groth I. Interspecific variation in floral fragrances within the genus *Narcissus* (Amaryllidaceae). Biochem Syst Ecol. 1997;25(8):685-706.

100. Chen HC, Chi HS, Lin LY. Headspace Solid-Phase Microextraction Analysis of Volatile Components in *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem. *Molecules*. 2013;18(11):13723-13734.
101. Melliou E, Kalpoutzakis E, Tsitsa E, Magiatis P. Composition of the essential oils of *Narcissus tazetta* and *Narcissus serotinus* from Greece. *J Essent Oil Bear Pl*. 2007;10(2):101-103.
102. Vandort HM, Jagers PP, Terheide R, Vanderweerd AJA. *Narcissus-Trevithian* and *Narcissus Geranium* - Analysis and Synthesis of Compounds. *J Agr Food Chem*. 1993;41(11):2063-2075.
103. Koksai N, Kafkas E, Sadighazadi S, Kulahlioglu I. Floral Fragrances of Daffodil under Salinity Stress. *Rom Biotech Lett*. 2015;20(4):10600-10610.
104. Song G, Xiao J, Deng C, Zhang X, Hu Y. Use of solid-phase microextraction as a sampling technique for the characterization of volatile compounds emitted from Chinese daffodil flowers. *J Anal Chem+*. 2007;62(7):674-679.
105. Ganzera M. Quality control of herbal medicines by capillary electrophoresis: Potential, requirements and applications. *Electrophoresis*. 2008;29(17):3489-3503.
106. Codina C. Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles:. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil, The genus Narcissus*. New York Taylor & Francis Ltd; 2002. p. 215-241.
107. Valadon G, Mummery RS. Carotenoids in Floral Parts of a *Narcissus*, a Daffodil and a Tulip. *Biochem J*. 1967;106:479.
108. Selles M, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Quantitative evaluation of galanthamine and related alkaloids in wild plants and tissue cultures of *Narcissus confusus* by high performance liquid chromatography. *Analisis*. 1997;25(5):156-158.
109. Lopez S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of the five major alkaloids in *Narcissus confusus*. *Phytochem Analysis*. 2002;13(6):311-315.
110. Lubbe A, Pomahacova B, Choi YH, Verpoorte R. Analysis of Metabolic Variation and Galanthamine Content in *Narcissus* Bulbs by H-1 NMR. *Phytochem Analysis*. 2010;21(1):66-72.
111. Lopez S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sci*. 2002;71(21):2521-2529.
112. Andrea L, Barbora P, Hae CY, Robert V. Analysis of metabolic variation and galanthamine content in *Narcissus* bulbs by 1H NMR. *Phytochem Anal*. 2010;21:66-72.
113. Mustafa NR, Rhee IK, Verpoorte R. Rapid method for determination of galanthamine in Amaryllidaceae plants using HPLC. *J Liq Chromatogr R T*. 2003;26(19):3217-3233.
114. Abou-Donia AH, Toaima SM, Hammada HM, Shawky E. New rapid validated HPTLC method for the determination of lycorine in amaryllidaceae plants extracts. *Chromatographia*. 2007;65(7-8):497-500.
115. Bastos JK, Xu L, Nanayakkara NPD, Burandt CL, MoraesCerdeira RM, McChesney JD. A rapid quantitative method for the analysis of galanthamine and other amaryllidaceae alkaloids by capillary column gas chromatography. *J Nat Prod*. 1996;59(6):638-640.
116. MoraesCerdeira RM, Burandt CL, Bastos JK, Nanayakkara NPD, Mikell J, Thurn J et. al. Evaluation of four *Narcissus* cultivars as potential sources for galanthamine production. *Planta Med*. 1997;63(5):472-474.
117. Laura T-C, Strahil B, Carles C, Francesc V, Jaume B. Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Ind Crop Prod*. 2013;43:237-244.
118. Lopez S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Galanthamine pattern in *Narcissus confusus* plants. *Planta Med*. 2003;69(12):1166-1168.

119. Gorinova NI, Atanassov AI, Stojanov DV, Tencheva J. Influence of Chemical-Composition of Soils on the Galanthamine Content in *Leucojum-Aestivum*. *J Plant Nutr.* 1993;16(9):1631-1636.
120. Lubbe A, Choi YH, Vreeburg P, Verpoorte R. Effect of Fertilizers on Galanthamine and Metabolite Profiles in *Narcissus* Bulbs by H-1 NMR. *J Agr Food Chem.* 2011;59(7):3155-3161.
121. Torras-Claveria L, Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. Daffodils as potential crops of galanthamine. Assessment of more than 100 ornamental varieties for their alkaloid content and acetylcholinesterase inhibitory activity. *Ind Crop Prod.* 2013;43:237-244.
122. Bergonon S, Codina C, Bastida J, Viladomat F, Mele E. Galanthamine production in "shoot-clump" cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell Tiss Org.* 1996;45(3):191-199.
123. Selles M, Bergonon S, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Effect of sucrose on growth and galanthamine production in shoot-clump cultures of *Narcissus confusus* in liquid-shake medium. *Plant Cell Tiss Org.* 1997;49(2):129-136.
124. Selles M, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Callus induction, somatic embryogenesis and organogenesis in *Narcissus confusus*: correlation between the state of differentiation and the content of galanthamine and related alkaloids. *Plant Cell Rep.* 1999;18(7-8):646-651.
125. Colque R, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Improved production of galanthamine and related alkaloids by methyl jasmonate in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Planta Med.* 2004;70(12):1180-1188.
126. Carles C. Production of galanthamine by *Narcissus* tissues in vitro. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil-The genus Narcissus*. New York: Taylor & Francis Inc; 2002. p. 215-241.
127. Bastida J, Viladomat F, Llabres JM, Codina C, Feliz M, Rubiralta M. *Narcissus* Alkaloids .4. Alkaloids from *Narcissus-Confusus*. *Phytochemistry.* 1987;26(5):1519-1524.
128. Khonakdari MR, Mirjalili MH, Gholipour A, Rezadoost H, Farimani MM. Quantification of galantamine in *Narcissus tazetta* and *Galanthus nivalis* (Amaryllidaceae) populations growing wild in Iran. *Plant Genet Resour-C.* 2018;16(2):188-192.
129. Gotti R, Fiori J, Bartolini M, Cavrini V. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC-MS and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2006;42(1):17-24.
130. Mroczek T, Mazurek J. Pressurized liquid extraction and anticholinesterase activity-based thin-layer chromatography with bioautography of Amaryllidaceae alkaloids. *Anal Chim Acta.* 2009;633(2):188-196.
131. Bastida J, Viladomat F, Llabres JM, Quiroga S, Codina C, Rubiralta M. *Narcissus*-Alkaloids *Narcissus-Nivalis* - a New Source of Galanthamine. *Planta Med.* 1990;56(1):123-124.
132. Viladomat F, Bastida J, Codina C, Rubiralta M, Quirion JC. *Narcissus* Alkaloids .17. Obesine, a Novel Alkaloid from *Narcissus-Obesus*. *J Nat Prod.* 1992;55(6):804-806.
133. Abdallah OM. Narcisine, an Alkaloid from *Narcissus-Tazetta*. *Phytochemistry.* 1993;34(5):1447-1448.
134. MoraesCerdeira RM, Bastos JK, Burandt CL, Nanayakkara NPD, Mikell J, McChesney JD. Alkaloid content of different bulb parts of *Narcissus* cv Ice Follies. *Planta Med.* 1997;63(1):92-93.
135. Perissutti E, Fiorino F, Severino B, Frecentese F, Massarelli P, Nencini C et. al. Synthesis of 6 beta-D-glucosyl and 6-nitroxy (-)-galanthamine derivatives as acetylcholinesterase inhibitors. *Pharmazie.* 2007;62(6):403-405.
136. Czollner L, Frantsits W, Kuenburg B, Hedenig U, Frohlich J, Jordis U. New kilogram-synthesis of the anti-Alzheimer drug (-)-galanthamine. *Tetrahedron Lett.* 1998;39(15):2087-2088.

137. Amira M. Abu Taleb, Eman R. Hamed, Shimaa A. Zaki, Adel B. Salama, Ahmed Abdel-Fattah, Tarek Y. S. Kapiel. Enhancement of alkaloids production in tissue culture of *Narcissus tazetta* var. *italicus* L: Effect of growth regulators and fungal elicitors. *Journal of Agricultural Technology*. 2014;10(6):1413-1429.
138. Wei N, Dong-Ming P. Study on the Extraction Method of Alkaloids from *Narcissus tazetta* var. *chinensis* Roem. *Anhui Nongye Kexue*. 2012;40(19):10018-10019.
139. Colque R, Viladomat F, Bastida J, Codina C. Effect of PPM on alkaloid production in *Narcissus confusus* shoot-clumps. *Acta Hort.* 2001(560):267-270.
140. Torras-Claveria L, Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. Metabolomic analysis of bioactive Amaryllidaceae alkaloids of ornamental varieties of *Narcissus* by GC-MS combined with k-means cluster analysis. *Ind Crop Prod*. 2014;56:211-222.
141. Shawky E, Abou-Donia AH, Darwish FA, Toaima SM, Takla SS, Pigni NB et. al. HPTLC and GC/MS Study of Amaryllidaceae Alkaloids of Two *Narcissus* Species. *Chem Biodivers*. 2015;12(8):1184-1199.
142. Kreh M, Matusch R, Witte L. Capillary Gas-Chromatography Mass-Spectrometry of Amaryllidaceae Alkaloids. *Phytochemistry*. 1995;38(3):773-776.
143. Berkov S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Development and validation of a GC-MS method for rapid determination of galanthamine in *Leucojum aestivum* and *Narcissus* ssp.: A metabolomic approach. *Talanta*. 2011;83(5):1455-1465.
144. de Andrade JP, Pigni NB, Torras-Claveria L, Berkov S, Codina C, Viladomat F et. al. Bioactive alkaloid extracts from *Narcissus broussonetii*: Mass spectral studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012;70:13-25.
145. Oğuz K, Turgay D. Parkinson Hastalığının Ve Diğer Hareket Bozuklukları ile Alzheimer Hastalığının Tedavisinde Kullanılan İlaçlar. In: Kayaalp O, editor. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji*. 11. Sıhhiye/Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd.; 2005. p. 902-917.
146. Janssen B, Schafer B. Galantamine. *Chemtexts*. 2017;3(2).
147. Grober E, Dickson D, Sliwinski MJ, Buschke H, Katz M, Crystal H et. al. Memory and mental status correlates of modified Braak staging. *Neurobiol Aging*. 1999;20(6):573-579.
148. Rezanka T, Rezanka P, Sigler K. Glycosides of benzodioxole-indole alkaloids from *Narcissus* having axial chirality. *Phytochemistry*. 2010;71(2-3):301-306.
149. Pigni NB, Rios-Ruiz S, Martinez-Frances V, Nair JJ, Viladomat F, Codina C et. al. Alkaloids from *Narcissus serotinus*. *J Nat Prod*. 2012;75(9):1643-1647.
150. Jin Z. Amaryllidaceae and Scelletium alkaloids. *Nat Prod Rep*. 2013;30(6):849-868.
151. Cook J, Loudon J. Alkaloids of the Amaryllidaceae. The alkaloids chemistry and pharmacology. New York: Academic Press Inc.; 1952.
152. Wildman W. The Amaryllidaceae Alkaloids. In: Manske R, Holmes H, editors. The alkaloids chemistry and pharmacology. New York: Academic Press Inc.; 1968. p. 307-405.
153. Fuganti C. The Amaryllidaceae alkaloids. In: Manske R, Holmes H, editors. The Alkaloids Chemistry and Pharmacology. New York: Academic Press Inc.; 1975. p. 83-164.
154. Martin S. The Amaryllidaceae alkaloids. In: Brossi A, editor. The alkaloids chemistry and pharmacology. New York: Academic Press Inc.; 1987. p. 251-376.
155. Grundon MF. Amaryllidaceae Alkaloids. *Nat Prod Rep*. 1984;1(3):247-250.
156. Grundon MF. Amaryllidaceae Alkaloids. *Nat Prod Rep*. 1989;6(1):79-84.
157. Grundon MF. Amaryllidaceae Alkaloids. *Nat Prod Rep*. 1987;4(2):89-94.
158. Grundon MF. Amaryllidaceae Alkaloids. *Nat Prod Rep*. 1985;2(3):249-251.
159. Lewis JR. Amaryllidaceae and Scelletium Alkaloids. *Nat Prod Rep*. 1992;9(2):183-191.
160. Lewis JR. Amaryllidaceae and Scelletium Alkaloids. *Nat Prod Rep*. 1993;10(3):291-299.
161. Lewis JR. Amaryllidaceae and Scelletium Alkaloids. *Nat Prod Rep*. 1994;11(3):329-332.

162. Lewis JR. Amaryllidaceae and Sceletium Alkaloids. *Nat Prod Rep.* 1995;12(3):339-345.
163. Lewis JR. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 1996;13(2):171-176.
164. Lewis JR. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 1998;15(1):107-110.
165. Lewis JR. Miscellaneous alkaloids: Amaryllidaceae, Sceletium, muscarine, imidazole, oxazole, peptide and other miscellaneous alkaloids. *Nat Prod Rep.* 1999;16(3):389-416.
166. Lewis JR. Amaryllidaceae, Sceletium, imidazole, oxazole, thiazole, peptide and miscellaneous alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2001;18(1):95-128.
167. Jin Z, Li ZG, Huang RQ. Muscarine, imidazole, oxazole, thiazole, Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2002;19(4):454-476.
168. Lewis JR. Amaryllidaceae, Sceletium, imidazole, oxazole, thiazole, peptide and miscellaneous alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2002;19(2):223-258.
169. Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2003;20(6):606-614.
170. Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2005;22(1):111-126.
171. Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2007;24(4):886-905.
172. Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2009;26(3):363-381.
173. Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2011;28(6):1126-1142.
174. Jin Z. Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Nat Prod Rep.* 2016;33(11):1318-1343.
175. Brossi A. Introduction to Alkaloids, a Biogenetic Approach - Cordell, Gac. *J Am Chem Soc.* 1983;105(15):5178-5178.
176. Ghosal S, Saini KS, Razdan S. Chemical-Constituents of the Amaryllidaceae .14. Crinum-Alkaloids - Their Chemistry and Biology. *Phytochemistry.* 1985;24(10):2141-2156.
177. Polt R. Amaryllidaceae alkaloids with antitumor activity. *Org Synth.* 1996;3:109–148.
178. Osorio O, Robledo S, Bastida J. Alkaloids with antiprotozoal activity. In: Cordell G, editor. *The Alkaloids.* Amsterdam: Elsevier; 2008. p. 113.
179. Buckingham J, Baggaley KH, Roberts, A. D., Szabo LF. *Dictionary of alkaloids.* USA: CRC Press Taylor & Francis Group; 2010.
180. Unver N. New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochem Rev.* 2007;6(1):125-135.
181. Zheng J, Wang C, Zhang C, inventorsContaining natural plant extract for whitening skin care product [Machine Translation]2018 2.nd Feb. 2018.
182. Muraoka O, Morikawa T, Ninomiya K, inventorsMelanin production inhibitor obtained from flower part of *Narcissus tazetta*2016 Aug 8, 2016.
183. Liu R, Wan J, inventorsSkin care product based on telomerase for delaying skin aging symptoms2016 Dec 7, 2016.
184. Gao Y, Xu H, inventorsPreparation method of safe biological algaecide2017 Mar 29, 2017.
185. Talib WH, Mahasneh AM. Antimicrobial, Cytotoxicity and Phytochemical Screening of Jordanian Plants Used in Traditional Medicine. *Molecules.* 2010;15(3):1811-1824.
186. Sener B, Bingol F, Erdogan I, Bowers WS, Evans PH. Biological activities of some Turkish medicinal plants. *Pure Appl Chem.* 1998;70(2):403-406.
187. Cakici I, Ulug HY, Inci S, Tunctan B, Abacioglu N, Kanzik I et. al. Antinociceptive effect of some amaryllidaceae plants in mice. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49(8):828-830.
188. Orhan I, Sener B. Sustainable use of various amaryllidaceae plants against Alzheimer's disease. *WOCMAP III: Targeted Screening of MAPs, Economics and Law.* 2005(678):59-64.
189. Talib WH, Mahasneh AM. Antiproliferative Activity of Plant Extracts Used Against Cancer in Traditional Medicine. *Sci Pharm* 2010;78:33-45.

190. Ingkaninan K, Hazekamp A, de Best CM, Irth H, Tjaden UR, van der Heijden R et. al. The application of HPLC with on-line coupled UV/MS-biochemical detection for isolation of an acetylcholinesterase inhibitor from *Narcissus* 'Sir Winston Churchill'. *J Nat Prod.* 2000;63(6):803-806.
191. Rhee IK, van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *J Chromatogr A.* 2001;915(1-2):217-223.
192. Cherkasov OA, Tokhtabaeva GM, Margvelashvili NN, Maisuradze NI, Tolkachev ON. The contents of galanthamine in some cultivars of *Narcissus hybridus* Hort. *Rastitel'nye Resursy.* 1988;24:414-420.
193. Llabres JMV, Francesc; Bastida, Jaume; Codina, Carles; Serrano, Manuel; Rubiralta, Mario; Feliz, Miguel. Two alkaloids from *Narcissus requienii*. *Phytochem Lett.* 1986;25(6):1453-1459.
194. Llabres JM, Viladomat F, Bastida J, Codina C, Rubiralta M. *Narcissus* Alkaloids .2. Phenanthridine Alkaloids from *Narcissus-Assoanus*. *Phytochemistry.* 1986;25(11):2637-2638.
195. Viladomat F, Selles M, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Narcissus asturiensis*. *Planta Med.* 1997;63(6):583-583.
196. Viladomat F, Bastida J, Tribo G, Codina C, Rubiralta M. *Narcissus* Alkaloids .10. Alkaloids from *Narcissus-Bicolor*. *Phytochemistry.* 1990;29(4):1307-1310.
197. Hung SH, Chen, Z.X. and Li, C.F. Studies On The Alkaloids Of Amaryllidaceae- II .A New Method For The Isolation Of Pseudolycorine And Search Of Plants Rich In Lycorine. Yao Hsueh Hsueh Pao,. 1962;9:719-724.
198. Labrana J, Choy G, Solans X, Font-Bardia M, de la Fuente G, Viladomat F et. al. Alkaloids from *Narcissus bujei* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry.* 1999;50(1):183-188.
199. Döpke HGBW. Alkaloide von *Narcissus tazetta* und *N. poeticus* (XIII. Mitteil.: Über Amaryllidaceen-Alkaloide). *European Journal of Inorganic Chemistry.* 1956;89(10):2462-2465.
200. Piozzi F, Marino, M.L., Fuganti, C. and Di Martino, A. Occurrence of non-basic metabolites in Amaryllidaceae. *Phytochemistry.* 1969;8:1745-1748.
201. Bastida J, Contreras JL, Codina C, Wright CW, Phillipson JD. Alkaloids from *Narcissus-Cantabricus*. *Phytochemistry.* 1995;40(5):1549-1551.
202. Bastida J, Llabres JM, Viladomat F, Codina C, Rubiralta M, Feliz M. *Narcissus* Alkaloids .3. 9-O-Demethylhomolycorine from *Narcissus-Confusus*. *J Nat Prod.* 1987;50(2):199-202.
203. Kolle F, Gloppe KE. Alkaloids of *Narcissus poeticus* L. *Pharmazeutische Zentralhalle fuer Deutschland.* 1934;75:237-239.
204. Bazhenova EDA, Kh. U.; Zakirov, U. B. Interaction of the alkaloid narwedine with caffeine, Corazol, arecoline, and nicotine. *Farmakol Alkaloidov Serdech.* 1971:100-103.
205. Boit HG, Stender, W. and Beitner, A. Die alkaloide einiger gartensorten von *Narcissus jonquilla*, *N. triandrus* und *N. cyclamineus* (XVII. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte.* 1957;90:725-728.
206. Boit HGD, W.; Stender, W. New amaryllidaceae alkaloids. *Naturwissenschaften.* 1958;45:262-263.
207. Bastida J, Llabres JM, Viladomat F, Codina C, Rubiralta M, Feliz M. *Narcissus* Alkaloids .7. Dubiusine from *Narcissus-Dubius*. *Phytochemistry.* 1988;27(11):3657-3660.
208. Codina CV, Francesc; Bastida, Jaume; Rubiralta, Mario; Quirion, Jean Charles. 2D NMR studies of lycorenine as a model for the structural assignment of lycorenine-type alkaloids. *Natural Product Letters.* 1992;1(2):85-92.
209. Bastida J, Viladomat F, Llabres JM, Codina C, Rubiralta M. *Narcissus* Alkaloids .6. Alkaloids from *Narcissus-Jacatanus*. *Planta Med.* 1988(4):362-362.

210. R G, J F, M B, V C. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Narcissus* by GC–MS and capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2006;42:17-24.
211. Vigneau C, Tsao, J., Ducluzeau, R. and Galzot, J. Deux cas cliniques d'intoxication par la jonquille. *Journal de Toxicologie Médicale*. 1984; 4:21–26.
212. Döpke W. Alkaloide aus Amaryllidaceen. *Naturwissenschaften*. 1963;50:645.
213. Döpke W. Über den zusammenhang von aminosäure- und alkaloidgehalt bei der *Narcissus jonquilla* hybride Golden Sceptre. *Planta Med*. 1963;11:154–158.
214. Döpke W. Alkaloide aus Amaryllidaceen. Über die konstitution des goleptins und golceptins. *Archiv der Pharmazie*. 1964;297:39-45.
215. Döpke W, Dalmer, H. Alkaloide aus Amaryllidaceen. *Naturwissenschaften*. 1965;52:60-61.
216. Bastida J, Viladomat F, Bergonon S, Fernandez JM, Codina C, Rubiralta M et. al. Alkaloids from *Narcissus-Leonensis*. *Phytochemistry*. 1993;34(6):1656-1658.
217. Boit HG, Döpke, W., Beitner, A. Alkaloide aus trompeten-narcissen, schalennarcissen und gefüllten narcissen. *Chemische Berichte*,. 1957;90:2197–2202.
218. Codina CB, Jaume; Viladomat, Francesc; Marcos Fernandez, Juan; Bergonon, Salvador; Rubiralta, Mario; Quirion, Jean Charles. Alkaloids from *Narcissus munozi-garmendiae*. *Phytochem Lett*. 1993;32(5):1354-1356.
219. Codina C, Viladomat F, Bastida J, Rubiralta M, Quirion JC. *Narcissus* Alkaloids .12. A Heterodimer Alkaloid from *Narcissus-Pallidiflorus*. *Phytochemistry*. 1990;29(8):2685-2687.
220. Bastida J, Viladomat F, Llabres JM, Ramirez G, Codina C, Rubiralta M. *Narcissus* Alkaloids .8. Mesembrenone - an Unexpected Alkaloid from *Narcissus-Pallidulus*. *J Nat Prod*. 1989;52(3):478-480.
221. C. C, F. V, J. B, J.-C. Q. Alkaloids from *Narcissus panizzianus*. *PLANTA MED*. 1990;56(6):515-516.
222. Döpke W, Sewerin, E. Zur struktur des narcimarkins. *Zeitschrift für Chemie*. 1981;21:71.
223. Hung SH, Ma GE, Sung GQ. Studies on the Alkaloids of Amaryllidaceae .5. The Alkaloids of *Narcissus Papyraceus* Ker-Gawl and the Structure of a New Alkaloid, Papyramine. *Acta Chim Sinica*. 1981;39(6):529-539.
224. Suau R, Rico R, Garcia AI, Gomez AI. New Amaryllidaceae Alkaloids from *Narcissus-Papyraceus* Ker-Gawler. *Heterocycles*. 1990;31(3):517-522.
225. Boit HG, Stender, W. Über die alkaloide von *Narcissus poeticus* (I. über Amaryllidaceen- Alkaloide). *Chemische Berichte*,. 1954;87:624-627.
226. Boit HG, Döpke, W. Alkaloide von *Narcissus tazetta* und *N. poeticus* (XIII. über Amaryllidaceen-Alkaloide). . *Chemische Berichte*,. 1956;89:2462-2465.
227. Harken RD, Christensen, C.P., Wildman, W.C. Interconversions in the pluviine-lycorenine series. *J Org Chem*. 1976;41:2450–2454.
228. Wildman WC, Brown, C.L. Mass spectra of 5,11b-methanomorphanthridine alkaloids. The structure of pancracine. *J Am Chem Soc*. 1968; 90:6439–6446.
229. Willaman JJ, Li, H.L. Alkaloid-bearing plants and their contained alkaloids. *Lloydia*. 1970;33S:1957-1968.
230. Doepke W. New alkaloids from Amaryllidaceae. *Naturwissenschaften*. 1963;50:354.
231. Safratova M, Hostalkova A, Hulcova D, Breiterova K, Hrabcova V, Machado M et. al. Alkaloids from *Narcissus poeticus* cv. Pink Parasol of various structural types and their biological activity. *Arch Pharm Res*. 2018;41(2):208-218.
232. Doepke W. Secondary alkaloids from Amaryllidaceae. *Naturwissenschaften*. 1963;50(18):595.

233. Döpke W, Nguyen, T.D. Poetinatin, ein neues alkaloid aus Amaryllidaceen. Zeitschrift für Chemie. 1974;14:57-58.
234. Boit HG. Über die alkaloid von *Leucojum vernum* und von *Narcissus poeticus* var. *ornatus* (II. über Amaryllidaceen-Alkaloide). Chemische Berichte,. 1954;87:681-683.
235. Boit HG, Stender W. Alkaloids of the Amaryllidaceae. II. Alkaloids of *Leucojum vernum* and *Narcissus poeticus* var. *ornatus*. Chemische Berichte,. 1954;87:681-683.
236. Bastida J, Bergonon S, Viladomat F, Codina C. Alkaloids from *Narcissus-Primigenius*. *Planta Med.* 1994;60(1):95-96.
237. Cook JW, Loudon, J.D., McCloskey, P. Dehydration of lycorine. *Journal of the Chemical Society*,. 1954:4176-4181.
238. Gude M, Hausen BM, Heitsch H, König WA. An Investigation of the Irritant and Allergenic Properties of Daffodils (*Narcissus-Pseudonarcissus* L, Amaryllidaceae) - a Review of Daffodil Dermatitis. *Contact Dermatitis*. 1988;19(1):1-10.
239. Kreh M, Matusch R, Witte L. Acetylated Alkaloids from *Narcissus-Pseudonarcissus*. *Phytochemistry*. 1995;40(4):1303-1306.
240. Kreh M, Matusch R. O-Methyloduline and N-Demethylmasonine, Alkaloids from *Narcissus-Pseudonarcissus*. *Phytochemistry*. 1995;38(6):1533-1535.
241. Boit HG, Ehmke, H. Die alkaloid einiger gartensorten von *Narcissus pseudonarcissus* und *N. incomparabilis* (X. über Amaryllidaceen-Alkaloide). 1956;89:163-167.
242. Fales HM, Giuffrida D, Wildman WC. Alkaloids of the Amaryllidaceae. VIII. The Structures of Narcissamine, Pseudolycorine and Methylpseudolycorine1. *J Am Chem Soc.* 1956;78(16):4145-4150.
243. Tojo E. (+)-Narcidine, a New Alkaloid from *Narcissus-Pseudonarcissus*. *J Nat Prod.* 1991;54(5):1387-1388.
244. Piozzi F, Fuganti, C., Mondelli, R., Ceriotti, G. Narciclasine and narciprimine. *Tetrahedron*. 1968;24:1119-1131.
245. Fuganti C, Ghiringhelli, D. and Grasselli, P. Further information on the origin of the aromatic, C6-C1 unit of the amaryllidaceae alkaloids. *Tetrahedron Lett.* 1974:2261-2264.
246. Moraes-Cerdeira RM, Burandt, C.L., Bastos, J.K., Nanayakkara, N.P.D., Mikell, J., Thurn, J. and McChesney, J.D. Evaluation of four *Narcissus* cultivars as potential sources for galanthamine production. *Planta Med.* 1997;63:472-474.
247. Ceriotti G. Narciclasine: An antimitotic substance from *Narcissus* bulbs. *Nature*. 1967;213:595-596.
248. Bastida J, Llabres JM, Viladomat F, Codina C, Rubiralta M, Feliz M. 9-O-Demethylmaritidine - a New Alkaloid from *Narcissus-Radinganorum*. *Planta Med.* 1988(6):524-526.
249. Tokhtabaeva GM, Sheichenko VI, Yartseva IV, Tolkachev ON. Structure of New Alkaloid from *Narcissus-Fortune*. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*. 1987(6):872-875.
250. Pigni NB, Berkov S, Elamrani A, Benaissa M, Viladomat F, Codina C et. al. Two New Alkaloids from *Narcissus serotinus* L. *Molecules*. 2010;15(10):7083-7089.
251. Vronteli A, Kefalas P, Kokkalou E. A new alkaloid from *Narcissus serotinus* L. *Pharmazie*. 2005;60(7):559-560.
252. Bi YR, Yung KH, Wong YS. Physiological effects of narciclasine from the mucilage of *Narcissus tazetta* L. bulbs. *Plant Sci.* 1998;135(1):103-108.
253. Abduazimov KA, Yunusov, S.Y. Ungernia trisphaera, *Narcissus tazetta*, N. Kristalli and N. folli alkaloids. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*. 1967;3:64-65.
254. Abou-Donia AA, Darwish, F.A. and Ghazy, N.M. Alkaloids of *Narcissus tazetta* L. grown in Egypt. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1989;3:122-123.
255. Evidente A. Narciclasine: 1H- and 13C-NMR data and a new improved method of preparation. *Planta Med.* 1991;57:293-295.

256. Evidente A, Lanzetta R, Aboudonia AH, Amer ME, Kassem FF, Harraz FM. 9-O-Demethylhomolycorine from Egyptian *Narcissus tazetta*. *Archiv Der Pharmazie*. 1994;327(9):595-596.
257. Furusawa E, Furusawa S, Tani S, Irie H, Kitamura K, Wildman W.C. Isolation of pretazettine from *Narcissus tazetta*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1976;24:336-338.
258. Späth E, Kahovec L. Über das tazettin. *Chemische Berichte*. 1934;67:1501-1506.
259. Späth E, Kondo H, Kuffner F. Über die identität des tazettins (aus *Narcissus tazetta* L.) mit der Base VIII aus *Lycoris radiata* Herb. *Chemische Berichte*. 1936;69:1086-1087.
260. Tani S, Kobayashi N, Fujiwara H, Shingu T, Kato A. Isolation of O-methylmaritidine from bulbs of *Narcissus tazetta* L. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1981;29:3381-3384.
261. Youssef DT, Khalifa AA. Cytotoxic quaternary alkaloids from the flowers of *Narcissus tazetta*. *Pharmazie*. 2001;56(10):818-822.
262. Hung SH, Ma G.E., Chu M. Alkaloids of Amaryllidaceae. VII. Suisenine. Yao Hsueh Hsueh Pao. 1966;13:499-502.
263. Laing M, Clark R.C. The crystal and molecular structure of the O,O'-dipara-bromobenzoate of brunsvigine, an Amaryllidaceae alkaloid from *Brunsvigia cooperii*. *Tetrahedron Lett*. 1974:583-584.
264. Bastida J, Codina C, Viladomat F, Rubiralta M, Quirion JC, Husson HP. *Narcissus* Alkaloids .11. 9-O-Demethyl-2-Alpha-Hydroxyhomolycorine, an Alkaloid from *Narcissus-Tortifolius*. *Phytochemistry*. 1990;29(8):2683-2684.
265. Bastida J, Fernandez JM, Viladomat F, Codina C, Delafuente G. *Narcissus* Alkaloids .21. Alkaloids from *Narcissus-Tortuosus*. *Phytochemistry*. 1995;38(2):549-551.
266. Bastida J, Codina C, Viladomat F, Rubiralta M, Quirion J.C., Weniger B. *Narcissus* alkaloids, XIV. (+)-8-O-acetylhomolycorine and vasconine, two novel alkaloids from *Narcissus vasconicus*. *J Nat Prod*. 1992;55:122-125.
267. Almanza GR, Fernández J.M., Wakori E.W.T., Viladomat F, Codina C, Bastida J. Alkaloids from *Narcissus* cv. Salome. *Phytochemistry*. 1996;43:1375-1378.
268. Barton DHR, Kirby G.W. Phenol oxidation and biosynthesis. Part V. The synthesis of galanthamine. *Journal of the Chemical Society*. 1962:806-817.
269. Kirby GW, Michael J. Stereoselective β -labeling of aromatic amino-acids with deuterium and tritium. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions I*. 1973:115-120.
270. Kirby GW, Tiwari H.P. Phenol oxidation and biosynthesis. Part IX. The biosynthesis of norpluviine and galanthine. *Journal of the Chemical Society (C)*. 1966:676-682.
271. Cherkasov OA, Maisuradze N.I., Glyzina G.S., Gayevskii A.V. *Narcissus* as a source of raw materials for producing galanthamine. *Khimiko Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1989;23:621-623.
272. Elisha IL, Elgorashi EE, Hussein AA, Duncan G, Eloff JN. Acetylcholinesterase inhibitory effects of the bulb of *Ammocharis coranica* (Amaryllidaceae) and its active constituent lycorine. *S Afr J Bot*. 2013;85:44-47.
273. Adewusi EA, Fouche G, Steenkamp V. Cytotoxicity and acetylcholinesterase inhibitory activity of an isolated crinine alkaloid from *Boophane disticha* (Amaryllidaceae). *J Ethnopharmacol*. 2012;143(2):572-578.
274. Adewusi EA, Steenkamp V. In vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from southern Africa. *Asian Pac J Trop Med*. 2011;4(10):829-835.
275. Cortes N, Posada-Duque RA, Alvarez R, Alzate F, Berkov S, Cardona-Gomez GP et. al. Neuroprotective activity and acetylcholinesterase inhibition of five Amaryllidaceae species: A comparative study. *Life Sci*. 2015;122:42-50.

276. Cortes N, Alvarez R, Osorio EH, Alzate F, Berkov S, Osorio E. Alkaloid metabolite profiles by GC/MS and acetylcholinesterase inhibitory activities with binding-mode predictions of five Amaryllidaceae plants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2015;102:222-228.
277. Elgorashi EE, Malan SF, Stafford GI, van Staden J. Quantitative structure-activity relationship studies on acetylcholinesterase enzyme inhibitory effects of Amaryllidaceae alkaloids. *S Afr J Bot*. 2006;72(2):224-231.
278. Elgorashi EE, Stafford GI, Staden Jv. Acetylcholinesterase Enzyme Inhibitory Effects of Amaryllidaceae Alkaloids. *Planta Med*. 2004;70(3):260-262.
279. Houghton PJ, Agbedahunsi JM, Adegbulugbe A. Choline esterase inhibitory properties of alkaloids from two Nigerian *Crinum* species. *Phytochemistry*. 2004;65(21):2893-2896.
280. A. Marston, Kissling J, Hostettmann K. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. *Phytochem Anal*. 2002;13:51-54.
281. Jensen BS, Christensen SB, Jager AK, Ronsted N. Amaryllidaceae alkaloids from the Australasian tribe Calostemmataceae with acetylcholinesterase inhibitory activity. *Biochem Syst Ecol*. 2011;39(2):153-155.
282. Nair JJ, Aremu AO, van Staden J. Isolation of narciprimine from *Cyrtanthus contractus* (Amaryllidaceae) and evaluation of its acetylcholinesterase inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*. 2011;137(3):1102-1106.
283. Berkov S, Reyes-Chilpa R, Codina C, Viladomat F, Bastida J. Revised NMR data for incartine: an alkaloid from *Galanthus elwesii*. *Molecules*. 2007;12(7):1430-1435.
284. Berkov S, Bastida J, Nikolova M, Viladomat F, Codina C. Rapid TLC/GC-MS identification of acetylcholinesterase inhibitors in alkaloid extracts. *Phytochem Analysis*. 2008;19(5):411-419.
285. Bozkurt-Sarikaya B, Kaya GI, Onur MA, Bastida J, Berkov S, Unver-Somer N. GC/MS Analysis of Amaryllidaceae Alkaloids in *Galanthus gracilis*. *Chem Nat Compd+*. 2014;50(3):573-575.
286. Wszelaki N. Plants As A Source Of Acetylcholinesterase And Butyrylcholinesterase Inhibitors. *Borgis - Postępy Fitoterapii*. 2009;1:24-38.
287. Conforti F, Loizzo MR, Marrelli M, Menichini F, Statti GA, Uzunov D et. al. Quantitative determination of Amaryllidaceae alkaloids from *Galanthus reginae-olgae* subsp *vernalis* and in vitro activities relevant for neurodegenerative diseases. *Pharm Biol*. 2010;48(1):2-9.
288. Sarikaya BB, Kaya GI, Onur MA, Viladomat F, Codina C, Bastida J et. al. Alkaloids from *Galanthus rizehensis*. *Phytochem Lett*. 2012;5(2):367-370.
289. Sarikaya BB, Somer NU, Kaya GI, Onur MA, Bastida J, Berkov S. GC-MS Investigation and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of *Galanthus rizehensis*. *Z Naturforsch C*. 2013;68(3-4):118-124.
290. Sarikaya BB, Berkov S, Bastida J, Kaya GI, Onur MA, Somer NU. GC-MS Investigation of Amaryllidaceae Alkaloids in *Galanthus xvalentinei* nothosubsp *subplicatus*. *Nat Prod Commun*. 2013;8(3):327-328.
291. Sarikaya BB, Kaya GI, Onur MA, Bastida J, Somer NU. Phytochemical investigation of *Galanthus woronowii*. *Biochem Syst Ecol*. 2013;51:276-279.
292. Emir A, Emir C, Bozkurt B, Onur MA, Bastida J, Somer NU. Alkaloids from *Galanthus fosteri*. *Phytochem Lett*. 2016;17:167-172.
293. Kaya GI, Uzun K, Bozkurt B, Onur MA, Somer NU, Glatzel DK et. al. Chemical characterization and biological activity of an endemic Amaryllidaceae species: *Galanthus cilicicus*. *S Afr J Bot*. 2017;108:256-260.

294. Ortiz JE, Berkov S, Pigni NB, Theoduloz C, Roitman G, Tapia A et. al. Wild Argentinian Amaryllidaceae, a New Renewable Source of the Acetylcholinesterase Inhibitor Galanthamine and Other Alkaloids. *Molecules*. 2012;17(11):13473-13482.
295. Pagliosa LB, Monteiro SC, Silva KB, de Andrade JP, Dutilh J, Bastida J et. al. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on in vitro acetylcholinesterase activity. *Phytomedicine*. 2010;17(8-9):698-701.
296. de Andrade JP, Berkov S, Viladomat F, Codina C, Zuanazzi JAS, Bastida J. Alkaloids from *Hippeastrum papilio*. *Molecules*. 2011;16(8):7097-7104.
297. Guo Y, de Andrade JP, Pigni NB, Torras-Claveria L, Tallini LR, Borges WD et. al. New Alkaloids from *Hippeastrum papilio* (Ravenna) Van Scheepen. *Helv Chim Acta*. 2016;99(2):143-147.
298. Tallini LR, Osorio EH, dos Santos VD, Borges WD, Kaiser M, Viladomat F et. al. *Hippeastrum reticulatum* (Amaryllidaceae): Alkaloid Profiling, Biological Activities and Molecular Docking. *Molecules*. 2017;22(12).
299. Hammada HM, ABOU-DONIA AH, TOAIMA SM, Shawky E. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae plant extracts and their alkaloidal isolates. *Alexandria Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011;25(1):26-28.
300. C. K. Leucojum aestivum L. Bitkisinden Alkaloidlerin İzolasyonu, Yapılarının Aydınlatılması ve Asetilkolinesteraz ve Bütilkolinesteraz İnhibisyon Aktivitelerinin (Anti-Alzheimer) İncelenmesi [Yüksek lisans tezi]. Edirne: Fen Bilimleri Enstitüsü; Trakya Üniversitesi;; 2013.
301. Berkov S, Codina C, Viladomat F, Bastida J. N-alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from *Leucojum aestivum*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(7):2263-2266.
302. Marston A, Kissling J, Hostettmann K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem Analysis*. 2002;13(1):51-54.
303. Xin LJ, Yamujala R, Wang YH, Wang H, Wu WH, Lawton MA et. al. Acetylcholinesterase-Inhibiting Alkaloids from *Lycoris radiata* Delay Paralysis of Amyloid Beta-Expressing Transgenic *C. elegans* CL4176. *Plos One*. 2013;8(5).
304. Wszelaki N. Plants as a source of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. *Postępy Fitoterapii*. 2009;1:24-38.
305. Okello EJ, Dimaki C, Howes MJR, Houghton PJ, EK P. In vitro inhibition of human acetyl- and butyryl-cholinesterase by *Narcissus poeticus* L. (Amaryllidaceae) flower absolute. *International Journal of Essential Oil Therapeutics*. 2008;2(3):105-110.
306. Cahlikova L, Locarek M, Benesova N, Kucera R, Chlebek J, Novak Z et. al. Isolation and Cholinesterase Inhibitory Activity of *Narcissus* Extracts and Amaryllidaceae Alkaloid. *Nat Prod Commun*. 2013;8(6):781-785.
307. Ingkaninan K, de Best CM, van der Heijden R, Hofte AJP, Karabatak B, Irth H et. al. High-performance liquid chromatography with on-line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. *J Chromatogr A*. 2000;872(1-2):61-73.
308. Havlasova J, Safratova M, Siatka T, Stepankova S, Novak Z, Locarek M et. al. Chemical Composition of Bioactive Alkaloid Extracts from Some *Narcissus* Species and Varieties and their Biological Activity. *Nat Prod Commun*. 2014;9(8):1151-1155.
309. van Rijn RM, Rhee IK, Verpoorte R. Isolation of acetylcholinesterase inhibitory alkaloids from *Nerine bowdenii*. *Nat Prod Res*. 2010;24(3):222-225.
310. Vaneckova N, Host'alkova A, Safratova M, Kunes J, Hulcova D, Hrabanova M et. al. Isolation of Amaryllidaceae alkaloids from *Nerine bowdenii* W. Watson and their biological activities. *Rsc Adv*. 2016;6(83):80114-80120.

311. Torras-Claveria L, Berkov S, Jauregui O, Caujape J, Viladomat F, Codina C et. al. Metabolic Profiling of Bioactive *Pancreaticum canariense* Extracts by GC-MS. *Phytochem Analysis*. 2010;21(1):80-88.
312. Iannello C, Pigni NB, Antognoni F, Poli F, Maxia A, de Andrade JP et. al. A potent acetylcholinesterase inhibitor from *Pancreaticum illyricum* L. *Fitoterapia*. 2014;92:163-167.
313. Orhan IE, Yilmaz BS, Altun ML, Saltan G, Sener B. Anti-Acetylcholinesterase and Antioxidant Appraisal of the Bulb Extracts of Five *Sternbergia* Species. *Rec Nat Prod*. 2011;5(3):193-201.
314. Zhan GQ, Zhou JF, Liu R, Liu TT, Guo GL, Wang JP et. al. Galanthamine, Plicamine, and Secoplicamine Alkaloids from *Zephyranthes candida* and Their Anti-acetylcholinesterase and Anti-inflammatory Activities. *J Nat Prod*. 2016;79(4):760-766.
315. Zhan GQ, Liu JJ, Zhou JF, Sun B, Aisa HA, Yao GM. Amaryllidaceae alkaloids with new framework types from *Zephyranthes candida* as potent acetylcholinesterase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2017;127:771-780.
316. Zhan GQ, Qu XL, Liu JJ, Tong QY, Zhou JF, Sun B et. al. Zephycandidine A, the First Naturally Occurring Imidazo[1,2-f] phenanthridine Alkaloid from *Zephyranthes candida*, Exhibits Significant Anti-tumor and Anti-acetylcholinesterase Activities. *Sci Rep-Uk*. 2016;6.
317. Kulhankova A, Cahlikova L, Novak Z, Macakova K, Kunes J, Opletal L. Alkaloids from *Zephyranthes robusta* Baker and Their Acetylcholinesterase- and Butyrylcholinesterase-Inhibitory Activity. *Chem Biodivers*. 2013;10(6):1120-1127.
318. Cahlikova L, Perez DI, Stepankova S, Chlebek J, Safratova M, Host'alkova A et. al. In Vitro Inhibitory Effects of 8-O-Demethylmaritidine and Undulatine on Acetylcholinesterase and Their Predicted Penetration across the Blood-Brain Barrier. *J Nat Prod*. 2015;78(6):1189-1192.
319. Safratova M, Novak Z, Kulhankova A, Kunes J, Hrabanova M, Jun D et. al. Revised NMR Data for 9-O-Demethylgalanthine: an Alkaloid from *Zephyranthes robusta* (Amaryllidaceae) and its Biological Activity. *Nat Prod Commun*. 2014;9(6):787-788.
320. Cahlikova L, Valterova I, Macakova K, Opletal L. Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Zephyranthes grandiflora* by GC/MS and their cholinesterase activity. *Rev Bras Farmacogn*. 2011;21(4):575-580.
321. Reyes-Chilpa R, Berkov S, Hernandez-Ortega S, Jankowski CK, Arseneau S, Clotet-Codina I et. al. Acetylcholinesterase-inhibiting Alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*. 2011;16(11):9520-9533.
322. Zhan GQ, Zhou JF, Liu JJ, Huang JF, Zhang HQ, Liu R et. al. Acetylcholinesterase Inhibitory Alkaloids from the Whole Plants of *Zephyranthes carinata*. *J Nat Prod*. 2017;80(9):2462-2471.
323. Ooms F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. *Curr Med Chem*. 2000;7(2):141-158.
324. Vriend G. What If - a Molecular Modeling and Drug Design Program. *J Mol Graphics*. 1990;8(1):52-&.
325. Meng XY, Zhang HX, Mezei M, Cui M. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Curr Comput-Aid Drug*. 2011;7(2):146-157.
326. Greenblatt HM, Kryger G, Lewis T, Silman I, Sussman JL. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 angstrom resolution. *Febs Lett*. 1999;463(3):321-326.
327. Bozkurt B, Coban G, Kaya GI, Onur MA, Unver-Somer N. Alkaloid profiling, anticholinesterase activity and molecular modeling study of *Galanthus elwesii*. *S Afr J Bot*. 2017;113:119-127.
328. Castillo-Ordóñez WO, Tamarozzi ER, da Silva GM, Aristizabal-Pachon AF, Sakamoto-Hojo ET, Takahashi CS et. al. Exploration of the Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Alkaloids from Amaryllidaceae Family by Molecular Docking In Silico. *Neurochem Res*. 2017;42(10):2826-2830.

329. Dasari R, Banuls LMY, Masi M, Pelly SC, Mathieu V, Green IR et. al. C1, C2-ether derivatives of the Amaryllidaceae alkaloid lycorine: Retention of activity of highly lipophilic analogues against cancer cells. *Bioorg Med Chem Lett.* 2014;24(3):923-927.
330. Kontoyianni M, Sokol GS, McClellan LM. Evaluation of library ranking efficacy in virtual screening. *J Comput Chem.* 2005;26(1):11-22.
331. European Pharmacopoeia. 9th ed 2016.
332. Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi: Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu; 2016.
333. Kaya GI, Cicek PD, Emir A, Bozkurt-Sarikaya B, Onur MA, Unver-Somer N. Quantitative Determination of Galanthamine and Lycorine in *Galanthus elwesii* by HPLC-DAD *Turk J Pharm Sci.* 2014;11(1):107-112.
334. Ergenç N GA, Ateş Ö. İlaçların Tanınması ve Kantitatif Tayini. 4.Baskı ed. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları; 1989.
335. Emir A, Onur MA. Simultaneous Quantification of Galanthamine and Lycorine in *Galanthus fosteri* by HPLC-DAD. *Marmara Pharm J.* 2016;20(3):320-324.
336. Orhan I, Aslan S, Kartal M, Sener B, Baser KHC. Inhibitory effect of Turkish *Rosmarinus officinalis* L. on acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase enzymes. *Food Chem.* 2008;108(2):663-668.
337. Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J, Schwede T. Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat Protoc.* 2009;4(1):1-13.
338. Wildman SA, Crippen GM. Prediction of physicochemical parameters by atomic contributions. *J Chem Inf Comp Sci.* 1999;39(5):868-873.
339. Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* 2006;22(2):195-201.
340. Case DA, Darden TA, Cheatham TE, Simmerling CL, Wang J, Duke RE et. al. Amber12. San Francisco: University of California; 2012.
341. Jorgensen WL, Chandrasekhar J, Madura JD, Impey RW, Klein ML. Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *J Chem Phys.* 1983;79(2):926-935.
342. Halgren TA. Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *J Comput Chem.* 1996;17(5-6):490-519.
343. Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018.
344. RCSB Protein Data Bank Web Site U. S.: Research Collaboratory for Structural Bioinformatics; 2003. Available from: <http://www.rcsb.org/pdb>.
345. Zgarbova M, Otyepka M, Sponer J, Mladek A, Banas P, Cheatham TE et. al. Refinement of the Cornell et al. Nucleic Acids Force Field Based on Reference Quantum Chemical Calculations of Glycosidic Torsion Profiles. *J Chem Theory Comput.* 2011;7(9):2886-2902.
346. Jones G, Willett P, Glen RC. Molecular Recognition of Receptor-Sites Using a Genetic Algorithm with a Description of Desolvation. *J Mol Biol.* 1995;245(1):43-53.
347. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.* 1997;267(3):727-748.
348. I. DG. *Galanthus elwesii* Hook. Üzerinde Kalite Kontrol Çalışmaları [Yüksek Lisans Tezi]. İzmir: Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Ege Üniversitesi; 1997.
349. ICH. 60 FR 11260 - International Conference on Harmonisation; Guideline on Validation of Analytical Procedures: Definitions and Terminology; Availability US: Office of the Federal Register, National Archives and Records Administration; 1995. Available from: <https://www.gpo.gov/fdsys/granule/FR-1995-03-01/95-4956>.
350. Kinstle TH, Wildman WC, Brown CL. Mass spectra of amaryllidaceae alkaloids. The structure of narcissidine. *Tetrahedron Lett.* 1966;7(39):4659-4666.

351. Emir C. Pharmacognostical Studies on *Galanthus alpinus* sosn. var. *alpinus*. İzmir: Ege University; 2018.
352. Cedron JC, Oberti JC, Estevez-Braun A, Ravelo AG, Del Arco-Aguilar M, Lopez M. *Pancratium canariense* as an Important Source of Amaryllidaceae Alkaloids. *J Nat Prod*. 2009;72(1):112-116.
353. Evidente A, Iasiello I, Randazzo G. Isolation of Sternbergine, a New Alkaloid from Bulbs of *Sternbergia-Lutea*. *J Nat Prod*. 1984;47(6):1003-1008.
354. Avrupa Farmakopesi Adaptasyonu Türk Farmakopesi.: Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu; 2016.
355. Viladomat F, Llabres JM, Bastida J, Cusido RM, Codina C. Ontogenic Variations in the Alkaloids of *Narcissus-Assoanus*. *Physiol Plantarum*. 1986;68(4):657-661.
356. Ramakrishna A, A. RG. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signal Behav*. 2011;6(11):1720-1731.
357. B. S, M. K, F. B, F. M. Production and bioactive alkaloids from Turkish geophytes. *Pure Appl Chem* 1998;70:2131.
358. Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L, Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants (vol 1, pg 387, 2006). *Nat Protoc*. 2015;10(9):1457-1457.
359. Berkov S, Bastida J, Sidjimova B, Viladomat F, Codina C. Phytochemical differentiation of *Galanthus nivalis* and *Galanthus elwesii* (Amaryllidaceae): A case, study. *Biochem Syst Ecol*. 2008;36(8):638-645.
360. Berkov S, Pavlov A, Ilieva M, Burrus M, Popov S, Stanilova M. CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their in vitro cultures. *Phytochem Analysis*. 2005;16(2):98-103.
361. Latvala A, Onur MA, Gozler T, Linden A, Kivcak B, Hesse M. Alkaloids of *Galanthus-Elwesii*. *Phytochemistry*. 1995;39(5):1229-1240.
362. He MM, Qu CR, Gao OD, Hu XM, Hong XC. Biological and pharmacological activities of amaryllidaceae alkaloids. *Rsc Adv*. 2015;5(21):16562-16574.
363. Cherkasov OA, Tolkachev ON. *Narcissus and other Amaryllidaceae as sources of galanthamine. Narcissus and Daffodil- The Genus Narcissus*. 29 West 35th Street, New York, NY 10001: Taylor & Francis Inc; 2002. p. 242-255.
364. Ieven M, Van den Berghe DA, Vlietinck AJ. Plant antiviral agents IV. Influences of lycorine on growth pattern of three animal viruses. *Planta Med*. 1983;49:109-114.
365. Julian CG, Bowers PW. Harmful effects due to *Narcissus* and its constituents. *Narcissus and Daffodil- The Genus Narcissus*. 11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE: Taylor & Francis; 2002. p. 399-407.
366. Doskocil I, Hostalkova A, Safratova M, Benesova N, Havlik J, Havelek R et. al. Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochem Lett*. 2015;13:394-398.
367. McNulty J, Nair JJ, Little JRL, Brennan JD, Bastida J. Structure-activity studies on acetylcholinesterase inhibition in the lycorine series of Amaryllidaceae alkaloids. *Bioorg Med Chem Lett*. 2010;20(17):5290-5294.
368. Llabres JM, Viladomat F, Bastida J, Codina C, Serrano M, Rubiralta M et. al. 2 Alkaloids from *Narcissus-Requienii*. *Phytochemistry*. 1986;25(6):1453-1459.
369. Uyeo S, Yanaihara N. Phenolic alkaloids occurring in *Lycoris radiata*. *Journal of the Chemical Society (C)*,. 1959:172-177.
370. Li X, Yu HY, Wang ZY, Pi HF, Zhang P, Ruan HL. Neuroprotective compounds from the bulbs of *Lycoris radiata*. *Fitoterapia*. 2013;88:82-90.
371. Seaforth CEW, G. S.; Tinto, W. F. Alkaloids from *Hymenocallis tubiflora*. *Fitoterapia*. 1998;99(1):79.

372. Osorio EJ, Berkov S, Brun R, Codina C, Viladomat F, Cabezas F et. al. In vitro antiprotozoal activity of alkaloids from *Phaedranassa dubia* (Amaryllidaceae). *Phytochem Lett.* 2010;3(3):161-163.
373. Savelev SU, Okello EJ, Perry EK. Butyryl- and acetyl-cholinesterase inhibitory activities in essential oils of *Salvia* species and their constituents. *Phytother Res.* 2004;18(4):315-324.
374. Fales HM, Giuffrida LD, Wildman WC. Alkaloids of the Amaryllidaceae. VIII. The Structures of Narcissamine, Pseudolycorine and Methylpseudolycorine¹. *J Am Chem Soc.* 1956;78(16):4145-4150.
375. Boit HG, Dopke W. Alkaloids from *Amaryllis parkeri*. *Chemische Berichte.* 1959;92:2578-2582.
376. Brine ND, Campbell WE, Bastida J, Herrera MR, Viladomat F, Codina C et. al. A dinitrogenous alkaloid from *Cyrtanthus obliquus*. *Phytochemistry.* 2002;61(4):443-447.
377. Kihara M, Ozaki T, Kobayashi S, Shingu T. Alkaloidal Constituents of *Leucojum-Autumnale* L (Amaryllidaceae). *Chem Pharm Bull.* 1995;43(2):318-320.
378. Boit HG, Dopke W. Alkaloids from *Hymenocallis harrisiana* and two *hymenocallis* hybrids. *Naturwissenschaften.* 1960;47:323.
379. Carvalho KR, Silva AB, Torres MCM, Pinto FCL, Guimaraes LA, Rocha DD et. al. Cytotoxic Alkaloids from *Hippeastrum solandriiflorum* Lindl. *J Brazil Chem Soc.* 2015;26(10):1976-1980.
380. Herrera MR, Machocho AK, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Med.* 2001;67(2):191-193.
381. Bastida J, Viladomat F. Alkaloids of *Narcissus*. In: Hanks GR, editor. *Narcissus and Daffodil-The genus Narcissus*. 11 New Fetter Lane, London EC4P 4EE: Taylor & Francis 2002. p. 172-183.
382. Proskurnina NF, Yakovleva AP. The alkaloids of *Galanthus woronowi*. II. Isolation of a new alkaloid. *Zhurnal Obshchei Khimii.* 1952;22:1941-1944.
383. Cherkasov OA, Poshkurlat AP, Stikhin VA. Galanthamine content of *Ungernia* [plants]. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal.* 1984;18(3):327-329.
384. Kintsurashvili L, Vachnadze V. Plants of the amaryllidaceae family grown and introduced in georgia: A source of galanthamine. *Pharm Chem J* 2007;41(9):38-40.
385. Triana-Vidal LE, Carvajal-Varona SM. Protective Effect of Galantamine Against Oxidative Damage Using Human Lymphocytes: A Novel In Vitro Model. *Arch Med Res.* 2013;44(2):85-92.
386. Feldman HH, Pirttila T, Dartigues JF, Everitt B, Van Baelen B, Brashear HR et. al. Analyses of mortality risk in patients with dementia treated with galantamine. *Acta Neurol Scand.* 2009;119(1):22-31.
387. Blacker CVR, Greenwood DT, Wesnes KA, Wilson R, Woodward C, Howe I et. al. Effect of galantamine hydrobromide in chronic fatigue syndrome - A randomized controlled trial. *Jama-J Am Med Assoc.* 2004;292(10):1195-1204.
388. Turan T, Izgi HB, Ozsoy S, Tanriverdi F, Basturk M, Asdemir A et. al. The Effects of Galantamine Hydrobromide Treatment on Dehydroepiandrosterone Sulfate and Cortisol Levels in Patients with Chronic Fatigue Syndrome. *Psychiat Invest.* 2009;6(3):204-210.
389. Ivanov I, Georgiev V, Berkov S, Pavlov A. Alkaloid patterns in *Leucojum aestivum* shoot culture cultivated at temporary immersion conditions. *J Plant Physiol.* 2012;169(2):206-211.
390. Lazarevic-Pasti T, Leskovac A, Momic T, Petrovic S, Vasic V. Modulators of Acetylcholinesterase Activity: From Alzheimer's Disease to Anti-Cancer Drugs. *Curr Med Chem.* 2017;24(30):3283-3309.

ÖZGEÇMİŞ

2006-2011 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde lisans eğitimi almıştır. 2012 yılından bu yana Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Anabilim Dalı'nda doktora programına kayıtlıdır.

Çiğdem KARAKOYUN

E-posta: cigdem.karakoyun@ege.edu.tr

Tel:05416275854

