

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***LEUCOJUM AESTIVUM* L. BİTKİSİNDEN ALKALOİDLERİN
İZOLASYONU, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE
ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİSYON
AKTİVİTELERİNİN (ANTI-ALZHEIMER) İNCELENMESİ**

CANAN KARUNCULA
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
YRD. DOÇ. DR. ÖZLEM DEMİRKIRAN

EDİRNE 2013

***LEUCOJUM AESTIVUM* L. BİTKİSİNDEN ALKALOİDLERİN
İZOLASYONU, YAPILARININ AYDINLATILMASI VE
ASETİLKOLİNESTERAZ VE BUTİRİLKOLİNESTERAZ İNHİBİSYON
AKTİVİTELERİNİN (ANTI-ALZHEIMER) İNCELENMESİ**

CANAN KARUNCULA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

2013

**TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü onayı

Prof. Dr. Mustafa ÖZCAN
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.

Prof. Dr. Ayten SAĞIROĞLU
Anabilim Dalı Başkanı

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

Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKİRAN
Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri:

İmza

Yrd. Doç. Dr. Mehmet AYBEKE

Yrd. Doç. Dr. H. R. Ferhat KARABULUT

Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKİRAN

Tarih:

T.Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ORGANİK KİMYA YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
DOĞRULUK BEYANI

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

.... / / 2013

Canan KARUNCULA

Yüksek Lisans Tezi
Leucojum aestivum L. Bitkisinden Alkaloidlerin İzolasyonu,
Yapılarının Aydınlatılması ve Asetilkolinesteraz ve Butirilkolinesteraz
İnhibisyon Aktivitelerinin (Anti-Alzheimer) İncelenmesi
T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

ÖZET

Bu tez çalışmasında *Leucojum aestivum* L. bitkisinin kimyasal bakımdan incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bitki etanol içinde 3 hafta bekletilmiştir. Daha sonra bitki ekstresi asitlendirilip, hekzan ile ekstrakte edilmiş ve bazık hale getirildikten sonra sırası ile diklorometan ve etil asetat ile ekstrakte edilmiştir. Elde edilen bu fraksiyonların ince tabaka kromatografileri yapılmış ve diklorometan ekstresinin içerdiği alkaloid miktarı ve çeşitliliğinin fazla olduğu gözlenmiştir. Maddelerin bu fraksiyondan eldesinde çeşitli kromatografik yöntemlerden yararlanılmıştır.

Leucojum aestivum L. bitkisinin diklorometan ekstresinden üçü galantamin biri likorenin türevi olmak üzere toplam dört bileşik izole edilmiştir. Bileşiklerin yapı tayininde IR, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMBC, HSQC, COSY, ESI-MS gibi spektroskopik tekniklerden yararlanılmıştır. Bileşikler literatür ile kıyaslanarak kesin sonuca varılmıştır. Bulgular ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

İzole edilen bileşikler (1-4) AChE ve BChE inhibisyon aktivitelerini tespit etmek üzere taranmıştır. AChE için test edildiğinde, galantamin (1) epinorgalantamin (2), dihidroksihabrantin (3), 2-O-asetildemetillikorenin (4) sırası ile 3.5 µM, 7.5 µM, 12.5 µM, 730.0 µM'lık IC₅₀ değerleri göstermiştir. BChE inhibisyonu IC₅₀ değerleri galantamin (1) için 36.0 µM bulunurken (2-4) nolu bileşikler için 840.0, 19.3, 197.0 µM olarak tespit edilmiştir. Standart inhibitörün (galantamin) AChE ve BChE enzimlerine karşı IC₅₀ değerleri sırası ile 3.5 µM and 36.0 µM bulunmuştur.

Yıl : 2013
Sayfa Sayısı : 107
Anahtar Kelimeler : *Leucojum aestivum*, Amaryllidaceae, alkaloidler, Alzheimer, Asetilkolinesteraz, Butirilkolinesteraz

Master Thesis

The Isolation and Structure Elucidation of Alkaloids from *Leucojum aestivum* L.
and Investigation of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase

Inhibition (Anti-Alzheimer) Activities

Trakya University Institute of Natural Sciences

Department of Chemistry

ABSTRACT

In this study, the chemically investigation of *Leucojum aestivum* L. was aimed. For this purpose, the plant material was soaked in EtOH for three weeks. Then EtOH extract acidificated and extracted with hexane after plant make basic and fractionated with dichloromethane, and ethyl acetate, respectively. Based on the results of TLC chromatography, it was observed that CH₂Cl₂ extract contain good amount of alkaloids in rich diversity. Several chromatographic methods have been used to isolate the alkaloids from this fraction.

Purification of dichloromethane extract of *Leucojum aestivum* L. resulted in the isolation of four compounds including three galanthamine and one lycorenine derivative compounds. The structure determination of the compounds achieved by spectral methods such as IR, UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, HMBC, HSQC, COSY, ESI-MS and also by comparing their spectral data to those of literature values. The results were discussed.

The isolated compounds (**1-4**), were screened against AChE and BChE inhibitory activity. When tested against the AChE, galantamin (**1**), epinorgalanthamine (**2**), Dihydroxyhabranthine (**3**), 2-*O*-acetyldemethyllycorenine (**4**) displayed IC₅₀ values of 3.5 μM, 7.5 μM, 12.5 μM, 730.0 μM, respectively. The IC₅₀ values for BChE inhibition by compounds (**2-4**) were 840.0, 19.3, 197.0 μM, respectively. Standard inhibitor (galanthamine) exhibited AChE and BChE inhibition with IC₅₀ value of 3.5 μM and 36.0 μM, respectively.

Year : 2013

Number of Pages : 107

Keywords : *Leucojum aestivum*, Amaryllidaceae, alkaloides, Alzheimer, Acetylcholinesterase, Butyrylcholinesterase

ÖNSÖZ

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

Bu bu çalışmada *Leucojum aestivum* L. bitkisindeki alkaloidler izole edilerek yapıları aydınlatılmış ve bunların asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz enzim inhibisyon aktiviteleri incelenmiştir.

Tez çalışmamın başta deneysel olmak üzere tüm aşamalarında her zaman yanımda olan, kimya alanında ve hayatta edindiği tecrübe ve bilgi birikimini benimle paylaşan değerli danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKİRAN'a teşekkürü bir borç bilirim.

Aldığım yüksek lisans derslerinde emeği geçen ve organik kimya alanında donanımlı olmamı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Ömer ZAİM, Doç. Dr. Mesut KAÇAN, Yrd. Doç. Dr. Hakan KOLANCILAR ve Yrd. Doç. Dr. Hayrettin BEYNEK'e teşekkür ederim.

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

Laboratuar çalışmalarım sırasında her türlü destek ve yardımları için başta Özlem GENÇAY olmak üzere Pınar ALPASLAN, Merve ÇAMURCU, Abdullah ÇELİK, Araş. Gör. Ali Osman KARATAVUK, Betül ERKUŞ, Halide Özlem KARAAĞAÇ, Nur SEYHAN ve diğer tüm laboratuar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bitkinin tanımlanmasında emeği geçen Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER'e ve *Leucojum aestivum* L. bitkisi ile ilgili botanik bilgilerine ulaşmamda yardımcı olan Yrd. Doç. Dr. Mehmet AYBEKE'ye teşekkür ederim.

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

İÇİNDEKİLER

SayfaNo

Özet	I
Abstract	II
Önsöz	III
Simgeler	VIII
Kısaltmalar	VIII
Şekiller Dizini	X
Tablolar Dizini	XIII

BÖLÜM 1. GİRİŞ	1
----------------	---

BÖLÜM 2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
--	---

2. 1. Bitkinin Tanımı ve Yayılışı	3
2. 1. 1. Amaryllidaceae Familyasının Özellikleri	3
2. 1. 2. <i>Leucojum</i> L. Cinsinin Genel Özellikleri	4
2. 1. 3. <i>Leucojum aestivum</i> L. Türünün Özellikleri	4
2. 1. 4. <i>Leucojum aestivum</i> L. Türünün AChE İnhibisyon Aktivitesi	6
2. 1. 5. <i>Leucojum</i> L. Türleri Üzerine Yapılan Diğer Aktivite Çalışmaları	8
2. 2. Alzheimer Hastalığı Nedir?	9
2. 2. 1. Asetilkolin Metabolizması ve Kolinesterazlar	10
2. 2. 2. Alzheimer Hastalığının Tedavisi ve Kolinesteraz İnhibitörleri	12
2. 3. Alkaloid Bileşikleri	15
2. 3. 1. Genel özellikler	15
2. 3. 2. Alkaloid Bileşiklerinin Bitkiler Aleminde Bulunuşu	15
2. 3. 3. Alkaloidlerin Bitkide Bulunduğu Yerler	16
2. 3. 4. Alkaloidlerin Bitkideki Rolü	17
2. 3. 5. Alkaloidlerin İlaç olarak Keşfedilmesi ve Tıpta kullanımı	17
2. 3. 6. Alkaloid Sınıfları	18
2. 3. 6. 1. Amino Alkaloidler	19
2. 3. 6. 2. Piridin ve Piperidin Alkaloidleri	21

2. 3. 6. 3. Tropan Alkaloidleri	24
2. 3. 6. 4. Pirolizidin Alkaloidleri	25
2. 3. 6. 5. Kinolizidin Alkaloidleri	26
2. 3. 6. 6. İzokinolin Alkaloidleri	27
2. 3. 6. 6. 1. Protoberberin Alkaloidleri	27
2. 3. 6. 6. 2. Benzilizokinolin Alkaloidleri	28
2. 3. 6. 6. 3. Bisbenzilizokinolin Alkaloidleri	31
2. 3. 6. 7. Amaryllidaceae Alkaloidleri	32
2. 3. 6. 7. 1. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin Biyosentezi	32
2. 3. 6. 8. Benzofenantridin Alkaloidleri	35
2. 3. 6. 9. Terpenoid Tetrahidroizokinolin Alkaloidleri	35
2. 3. 6. 10. İndol Alkaloidler	36
2. 3. 6. 10. 1. Basit İndol Alkaloidler	36
2. 3. 6. 10. 2. Terpenoid İndol Alkaloidler	37
2. 3. 6. 11. Kinolin Alkaloidleri	38
2. 3. 6. 12. İmidazol Alkaloidler	38
2. 3. 6. 13. Steroidal Alkaloidler	39
2. 3. 6. 14. Akonitum Alkalodleri	40
2. 3. 6. 15. Guanidinyum Alkaloidleri	41
2. 4. Ayırma ve Saflaştırma Metodları	42
2. 4. 1. Ekstraksiyon Teknikleri	42
2. 4. 2. Alkaloidlerin Belirlenmesi ve İzolasyonu	43
2. 4. 3. Kromatografik Analiz Yöntemleri	44
2. 4. 2. 1. Kağıt Kromatografisi	44
2. 4. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi	45
2. 4. 2. 3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	45
2. 4. 2. 4. Kolon Kromatografisi	46
2. 4. 2. 5. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)	47
2. 5. Yapı Açıklama Metodları	48
2. 5. 1. Ultraviyole Spektroskopisi	48
2. 5. 2. İnfrared Spektroskopisi	48

2. 5. 3. ¹ H-NMR Spektroskopisi	48
2. 5. 4. ¹³ C-NMR Spektroskopisi	49
2. 5. 5. Sıvı Kromatografisi - Kütle Spektroskopisi (LC-MS)	49
BÖLÜM 3. MATERYAL VE METOD	50
3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	50
3. 2. Kullanılan Yöntemler	51
3. 2. 1. Kolon Kromatografisi	51
3. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi	51
3. 2. 3. Enzim İnhibisyon Aktivitesi Çalışmaları	51
3. 2. 3. 1. Ellman Metodu	51
3. 2. 3. 2. Enzim İnhibisyon Deneyi Reaktifleri	52
3. 3. Kromatografi İşlemlerinde Kullanılan Belirteçler	53
3. 4. Kullanılan Cihazlar	53
3. 5. Çözücüler	53
BÖLÜM 4. DENEYSEL KISIM	54
4. 1. Bitkinin Ekstre Edilmesi	54
4. 2. Kromatografik Yöntemlerle Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri	57
4. 2. 1. Diklorometan Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması	57
4. 2. 2. Diklorometan Ekstresinden Elde Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri	58
4. 2. 2. 1 Numaralı Bileşik: Galantamin	58
4. 2. 2. 2 Numaralı Bileşik: Epinorgalantamin	60
4. 2. 2. 3 Numaralı Bileşik: Dihidroksihabrantin	62
4. 2. 2. 4 Numaralı Bileşik: 2-O-asetildemetillikorenin	64
BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	66
5. 1. Kimyasal Bulgular	66
5. 1. 1. 1 numaralı Bileşik: Galantamin	66

5. 1. 2. 2 Numaralı Bileşik: Epinorgalantamin	75
5. 1. 3. 3 Numaralı Bileşik: Dihidroksihabrantin	84
5. 1. 4. 4 Numaralı Bileşik: 2-O-asetildemetillikorenin	93
5.2. İzole Edilen Bileşiklerin Asetilkolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz İnhibisyon Aktiviteleri	101
6. KAYNAKLAR	102
ÖZGEÇMİŞ	107

SİMGELER DİZİNİ

δ	: kimyasal kayma
IC ₅₀	: % 50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonu
J	: yarımlama sabiti
λ	: dalga boyu
m/z	: kütle/yük
ν	: frekans
w/w	: ağırlıkça oran
v/v	: hacimce oran

Kısaltmalar

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AH	: Alzheimer hastalığı
BChE	: Butirilkolinesteraz
brs	: broad singlet
ChAT	: Kolin asetiltransferaz
CoA	: Asetilkoenzim A
d	: dublet
dd	: dubletin dubleti
ddd	: dubletin dubletinin dubleti
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
ELISA	: Enzym Linked Immunosorbent Assay
ESI	: Elektrosprey İyonlaştırma
E. N.	: Erime noktası
GC	: Gaz kromatografisi
HMBC	: Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	: Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi

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

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa
Şekil 2. 1. <i>Leucojum aestivum</i> L. bitkisi	5
Şekil 2. 2. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi incelenen Amaryllidaceae alkaloidleri	7
Şekil 2. 3. Sağlıklı bireyde ve Alzheimer hastasında beyin yapısı	10
Şekil 2. 4. Asetilkolin metabolizması	11
Şekil 2. 5. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçlar	14
Şekil 2. 6. (1R,2S)-(-)-Efedrin	20
Şekil 2. 7. Amino alkaloid örnekleri	21
Şekil 2. 8. Pridin ve Piperidin alkaloid örnekleri	22
Şekil 2. 9. Nikotin	22
Şekil 2. 10. Norkotin ve anabazin alkaloid örnekleri	23
Şekil 2. 11. Tropan	24
Şekil 2. 12. Kokain	24
Şekil 2. 13. Tropan alkaloid örnekleri	25
Şekil 2. 14. Prolizidin alkaloidleri	25
Şekil 2. 15. Senesionin	26
Şekil 2. 16. Kinolizidin alkaloidlerine örnekler	26
Şekil 2. 17. Sitisin	27
Şekil 2. 18. İzokinolin	27
Şekil 2. 19. Berberin	28
Şekil 2. 20. Papaverin	29
Şekil 2. 21. Morfin	29
Şekil 2. 22. Kodein	30
Şekil 2. 23. Noskapin	30
Şekil 2. 24. Tubokürarin	31
Şekil 2. 25. Galantamin sentezi	34
Şekil 2. 26. Sanguinarin	35
Şekil 2. 27. Fizostigmin	37

Şekil 2. 28. Liserjik asit dietilamid (LSD)	37
Şekil 2. 29. Kinolin alkaloidleri	38
Şekil 2. 30. Pilocarpin	39
Şekil 2. 31. Steroidal alkaloidler	40
Şekil 2. 32. Akonitin	41
Şekil 2. 33. Tetrodoksine	41
Şekil 3. 1. Elmann metodu	52
Şekil 4. 1. <i>L. aestivum</i> bitkisinden ham ekstrenin eldesi	55
Şekil 4. 2. <i>L. aestivum</i> bitkisinin ham ekstresinden hekzan, dikolorometan ve Etil asetat fazlarının eldesi	56
Şekil 5. 1 Galantamin bileşimine ait HMBC korelasyonları	68
Şekil 5. 2. Galantamin bileşimine ait ¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD)spektrumu	69
Şekil 5. 3. Galantamin bileşimine ait DEPT (75 MHz, CD ₃ OD) spektrumu	70
Şekil 5. 4. Galantamin bileşimine ait HMQC spektrumu	71
Şekil 5. 5. Galantamin bileşimine ait HMBC spektrumu	72
Şekil 5. 6. Galantamin bileşimine ait COSY spektrumu	73
Şekil 5. 7. Galantamin bileşimine ait ESI MS spektrumu	74
Şekil 5. 8. Epinorgalantamin bileşimine ait HMBC korelasyonları	77
Şekil 5. 9. Epinorgalantamin bileşimine ait ¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD) Spektrumu	78
Şekil 5. 10. Epinorgalantamin bileşimine ait DEPT (75 MHz, CD ₃ OD) Spektrumu	79
Şekil 5. 11. Epinorgalantamin bileşimine ait HMQC spektrumu	80
Şekil 5. 12. Epinorgalantamin bileşimine ait HMBC spektrumu	81
Şekil 5. 13. Epinorgalantamin bileşimine ait COSY spektrumu	82
Şekil 5. 14. Epinorgalantamin bileşimine ait ESI MS spektrumu	83
Şekil 5. 15. Dihidroksihabrantin bileşimine ait HMBC korelasyonları	86
Şekil 5. 16. Dihidroksihabrantin bileşimine ait ¹ H-NMR (300 MHz, CD ₃ OD) spektrumu	87
Şekil 5. 17. Dihidroksihabrantin bileşimine ait DEPT (75 MHz, CD ₃ OD) Spektrumu	88
Şekil 5. 18. Dihidroksihabrantin bileşimine ait HMQC spektrumu	89
Şekil 5. 19. Dihidroksihabrantin bileşimine ait HMBC spektrumu	90
Şekil 5. 20. Dihidroksihabrantin bileşimine ait COSY spektrumu	91

Şekil 5. 21. Dihidroksihabrantin bileşiğine ait ESI MS spektrumu	92
Şekil 5. 22. 2- O-asetildemetillikorenin bileşiğine ait HMBC korelasyonları	95
Şekil 5. 23. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiği için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) Spektrumu	96
Şekil 5. 24. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiği için ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) Spektrumu	97
Şekil 5. 25. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiği için HMQC spektrumu	98
Şekil 5. 26. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiği için HMBC spektrumu	99
Şekil 5. 27. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiğine ait ESI MS spektrumu	100

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 4. 1. Galantamin bileşiği için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD), DEPT ve ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri	59
Tablo 4. 2. Epinorgalantamin bileşiği için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD), DEPT ve ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri	61
Tablo 4. 3. Dihidroksihabrantin bileşiği için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD), DEPT ve ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri	63
Tablo 4. 4. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiği için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) ve ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri	65
Tablo 5. 1. İzole edilen bileşiklerin asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri	101

BÖLÜM 1

1. GİRİŞ

Doğal bileşikler, canlı organizmalardan çeşitli fiziksel, biyolojik ve kimyasal yöntemler kullanılarak elde edilen organik maddelerdir. Temel kaynakları arasında bitkiler, deniz canlıları, mikroorganizmalar ve diğer bazı hayvansal organizmalar en önemli yeri almaktadır. Çeşitli tekniklerle bu canlıların üretmiş oldukları organik maddeler izole edilmekte, yapıları aydınlatılmakta ve farklı amaçlara yönelik olarak kullanılmaktadır. İnsanoğlu yeryüzünde ilk insandan beri beslenmesini sağlamak amacı ile mevcut besin maddelerinden faydalanma, daha sonra planlı bir şekilde üretme yolu seçerken, hastalık etmenlerine karşı da kendini koruma yöntemleri aramıştır. İnsanoğlu önce yakın çevresindeki yabani bitkileri tanımış, deneme yanılma yöntemi ile yiyebileceklerini ve yememesi gerekenleri, zehirli olanları belirlemiş daha sonra hastalıkları iyileştirmede yakın çevresindeki bitkilerden yararlanmaya başlamıştır. Tıbbi bitkilerin tarihçesi insanlık tarihi kadar eskidir. Sümerler ve Asurlular tarafından M.Ö. 5000-3000 tarihlerinde bu bitkileri kullanılmaya başlanmış ve tarihin ileriki dönemlerinde Yunanlılar, Mısırlılar, Hititler bu bitkileri kullanmışlardır. Bilindiği gibi bugün dünya üzerinde 1.000.000 kadar bitki türü vardır. Ancak tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin sayısı antik çağlardan beri devamlı bir artış göstermiştir. Orta çağlarda 4000'e kadar çıkan bu sayı, 19. yüzyıl başlarında 13.000'e ulaştı. 1979 yılında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından yapılan bir araştırmanın sonuçlarına göre, 5'den fazla kayıtlı olan ve ticareti yapılan 1900 farklı bitkisel ilaç saptanmıştır [1].

Kimyadaki gelişmeler bitkilerdeki aktif maddelerin saflaştırılmasına hız kazandırmıştır. 1805'de Alman eczacı Friederich Wilhelm Sertürner haşhaştan morfini izole etmiş ve bunu diğerleri izlemiştir [2].

Bilimin ilerlemesi kimya ve eczacılık tekniklerine bağlı olarak 19. ve 20. yüzyıllarda bitkilerin tedavi edici etken maddelerinin saflaştırılması sağlanmış ve bunların çoğu sentetik yollarla elde edilmiştir. Son zamanlarda sentetik ilaçlarda meydana gelebilen ciddi yan etkilerin yol açtığı tıbbi ve ekonomik sorunlar ve sanayileşmiş ülkelerdeki çevre kirliliğinin arttırdığı ekolojik kirlilikler, tedavileri henüz mümkün olmayan pek çok hastalığın

oluşturduğu tehdit, doğal olması ve yan etkilere yol açmadığı düşüncesi gibi pek çok faktöre bağlı olarak bitkilerle tedavi tekrar popüler hale gelmeye başlamıştır.

Alkaloidler Alzheimer, MS, myastenia gravis, miyopi, glokom hastalığının tedavisinde kullanılmaktadır [3]. Amaryllidaceae alkaloidleri en çok *Galanthus*, *Leucojum* ve *Narcissus* türlerinden izole edilmektedirler. Tez çalışma konumuz olan *Leucojum* türlerinden izole edilen galantamin çocuk felci ve Alzheimer tedavisinde, likorin domateste oluşan mantara karşı tarım ilacı olarak kullanılmaktadır [4, 5].

Leucojum türlerinin izolasyonu sonucu birçok biyoaktif özellik gösteren bileşikler bulunmuş ve bu bileşiklerin antikolinesteraz, antibakteriyel, antifungal (mantara karşı), antiplatelet, antimalarial, insektisit (böcek öldürücü), sitotoksik etkilerinin olduğu belirlenmiştir. *Leucojum aestivum* L. türü her ne kadar başka hastalıkların tedavisinde kullanılsa da öncelikli olarak Alzheimer hastalığının tedavisinde büyük önem taşır.

Alzheimer hastalığı, halen nöropatolojisi ve etiyolojisi net olarak ortaya konamamış ve ilaçla kökten tedavisi mümkün olmayan hastalıklar arasında yer almaktadır. Bu noktada hastalığın özellikle kökten farmakolojik tedavisi önem kazanmaktadır. 19. yüzyılda insanların ortalama yaşam süresi 50 yıl civarındaydı. 20. yüzyılda tıptaki gelişmelere paralel olarak mortalite hızının azalması ile ortalama yaşam süresi 80'e yaklaştı. Bir zamanlar bu hastalık çok nadir görülürken bugün dünyada 20-25 milyon civarında Alzheimer hastası olduğu düşünülmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 65 yaşın üstü 8 kişiden, 80 yaş üzeri her 2 kişiden biri Alzheimer (AH) hastasıdır. Her 71 saniyede bir kişi ABD'de Alzheimer tanısı almaktadır. 2050'de ABD'de hasta sayısının 13,5 milyonu bulacağı tahmin edilmektedir. Türkiye'de yaklaşık 400 bin civarı Alzheimer hastası olduğu belirlenmiştir [6].

Leucojum aestivum L. bitkisinin içerdiği bileşiklerin izole edilmeleri, yapılarının aydınlatılması, asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerinin değerlendirilmesi ile Alzheimer hastalığındaki mümkün tedavi edici etkinliğinin belirlenmesi amacıyla bu çalışma planlanmıştır.

BÖLÜM 2

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ARAŞTIRMASI

2. 1. Bitkinin Tanımı ve Yayılışı

2. 1. 1. Amaryllidaceae Familyasının Özellikleri

Amaryllidaceae familyası otsu çok yıllık bitkilerden oluşan bir familyadır. Soğanlı çiçekli bitkilerdir ve asparagus takımı ve amaryllis cinsine ait tek çenekli bitkilerdir. Bu nedenle Amaryllis familyası bu familyanın ortak adıdır. Bu nedenle familyanın sınırlarının belirlenmesinde farklı görüşler vardır. Sonra APG III sistemi yani bitkilerde Evrimsel Kapalı Tohumlu Gelişimi Topluluğu III sistemi ile Amaryllidaceae familyası daha geniş bir alan kapsamaktadır. Bu sistem ile Agapanthoideae, Allioideae Amaryllidoideae olmak üzere aile üç alt familyaya ayrılmıştır. Agapanthoideae alt familyasının tohumları ile daha çok benzerlik gösterir. Alloideae alt familyasına ait bitkiler karakteristik bir koku veren allil sülfür bileşikler üretilir [7].

Amaryllidaceae familyası, Tropikal bölgelerde özellikle Güney Amerika ve Afrika ile Akdeniz kıyılarında yayılış göstermektedir [8].

Ilımlı ve subtropik bölgelerde yayılmış rizomlu, yumrulu veya soğanlı çok yıllık otsu bitkiler, ender olarak da çalı ve ağaçlardır. 175 cinse dahil 2000'den fazla türü bulunan çok geniş bir familyadır. Birçok taksonu süs bitkisi olarak bahçelerde ve saksılarda yetiştirilmektedir. Yaprakları tabandan çıkan yassı ve lineer bazen yürek şeklinde bazen de küçük zarımsı pul şeklinde veya etlidir. Yaprakları genellikle kış mevsiminde dökülür. Bazı taksonlarında filloklatlara ve sülüklere rastlanır. Çiçekler erdişi, aktinomorftur. Çiçek yatağı taç şekilli, sona kadar 6 parçaya bölünmüş veya bitişik, stamenler 6, ovaryum alt durumlu, 3 lopludur. Dış iki halka renkli bir perigon şeklinde tepaller serbest veya birleşiktir. Periant bazen koronali çiçek partileri üçlü, ovaryum alt durumludur. Olgun meyva; açılan kapsül veya

üzümsü tiptedir. Etamin çoğunlukla altı adet fakat üçte olabilmektedir. Alt yapraklar klodatlara indirgenemez [9].

Amaryllidaceae familyasının Türkiye’de 8 cinsi bulunmaktadır. Bunların en önemlileri *Galanthus*, *Agave*, *Sternbergia*, *Narcissus* ve *Pancraticum* cinsleridir [10].

2. 1. 2. *Leucojum* L. Cinsinin Genel Özellikleri

Soğanlı, yapraksız gövdeli, çok yıllık bitkilerdir. Bütün yapraklar bazal ve lineardır. Çiçek durumu umbellat tiptir. Çiçekleri beyaz renkli, kampanulat tipte ve nodludur. Hipantial tüp ve korona bulunmaz. Periant segmentleri serbesttir, hepsi birbirine benzer ya da benzemeyebilir. Filamentler anterlerden daha kısadır. Anterler apikulat değildir. Kapsül subglobozdur. Tohumlar çok sayıdadır, strofiol bazen bulunur. Amaryllidaceae familyasına ait *Leucojum* cinsinin türlerinin taksonomisi üzerinde uzun yıllar çalışılmıştır. Darlington ve Amal’ın kromozom atlasında *Leucojum* cinsinin 7 türü kayıtlıdır [11]. Bunlar, *Leucojum autumnale*, *L. trichophyllum*, *L. roseum*, *L. hymale*, *L. aestivum*, *L. pulchellum*, *L. vernum*’dur. Balkan Yarımadasında *L. aestivum* ve *L. vernum* olmak üzere iki tür kayıtlıdır. Türkiye florasında ise bu cins *L. aestivum* ile temsil edilmektedir [9].

2. 1. 3. *Leucojum aestivum* L. Türünün Genel Özellikleri

Leucojum aestivum ilk kez 1629 yılında İngiliz botanikçi John Parkinson’un Garden Pleasant Flowers adlı kitabında büyük soğanlı menekşe ismiyle yer almıştır (Şekil 2. 1.). Soğanlı, yapraksız gövdeli, çok yıllık bitkilerdir. Bütün yapraklar bazal ve lineardır. Çiçek durumu umbellat tiptir. Çiçekleri beyaz renkli, kampanulat tipte ve nodludur. Bulb (soğan) 25-45 mm çapında, yapraklar genişçe linera, 22-62 cm x 7-14 mm ebatlarında, skapus, 8-90 cm uzunluğunda, yapraklara yakın veya onları geçen uzunlukta, kalın, oluklu ve bazen de basık olup yanlarında 2 kanat yapısı taşır. Kanatlar dar zarımsı dentikulkat kenarlıdır. Umbella 2-5 çiçeklidir. Spata 20-40 x 3,5-8 mm ebadlarında, 1 kapaklıdır. Pedisel 8-10 en fazla 65 mm uzunluğunda olup spataya eşit veya onda daha uzundur. Periant segmentleri beyaz olup, uçlarının kalınlaşmış alt kısımlarında yeşil benekler taşır. Apeks 12-20 mm’dir. Anter yaklaşık 4 mm uzunluğundadır. Stilus hafifçe klavat olup, stamenlerden az çok uzundur. Tohumlar siyah, 5-7 mm uzunluğundadır. Çiçeklenme; 3-6. aylar arasındadır. Nemli

çayırlarda deniz seviyesinden 1100 metre yüksekliğe kadar yayılış gösterir. -5° C'ye kadar dayanabilmektedirler. *Leucojum aestivum*'un en önemli avantajı nem seven bir bitki olmasına rağmen; çeşitli topraklarda yetişebilmektedir [12, 13].

L. aestivum için İngiltere'de kullanılan diğer yaygın isimler; Loddon zambağı, Devon kardeleni, St. Agnew çiçeği ve St. George menekşesidir [14].

Lecojum aestivum dünyada doğal olarak Kuzey Afrika, Avrupa ve Güneybatı Asya ile Akdeniz kıyılarında yayılış gösterir. Avrupa'da İrlanda, İngiltere, Hollanda, Belçika, Almanya, Fransa, İspanya, İsviçre, İtalya, Avusturya, Kosova, Arnavutluk, Macaristan, Romanya, Bulgaristan, Ukrayna, Türkiye, Asya, İran, Rusya ve Ermenistan'da yetiştirilir [11].

Leucojum aestivum Türkiye'de halk arasında akçabardak, göl soğanı, çan çiçeği, sümbül, kabalak, sarıklı kökü gibi isimlerle adlandırılır. Birçok ülkede yaz kardeleni olarak isimlendirilir [15].



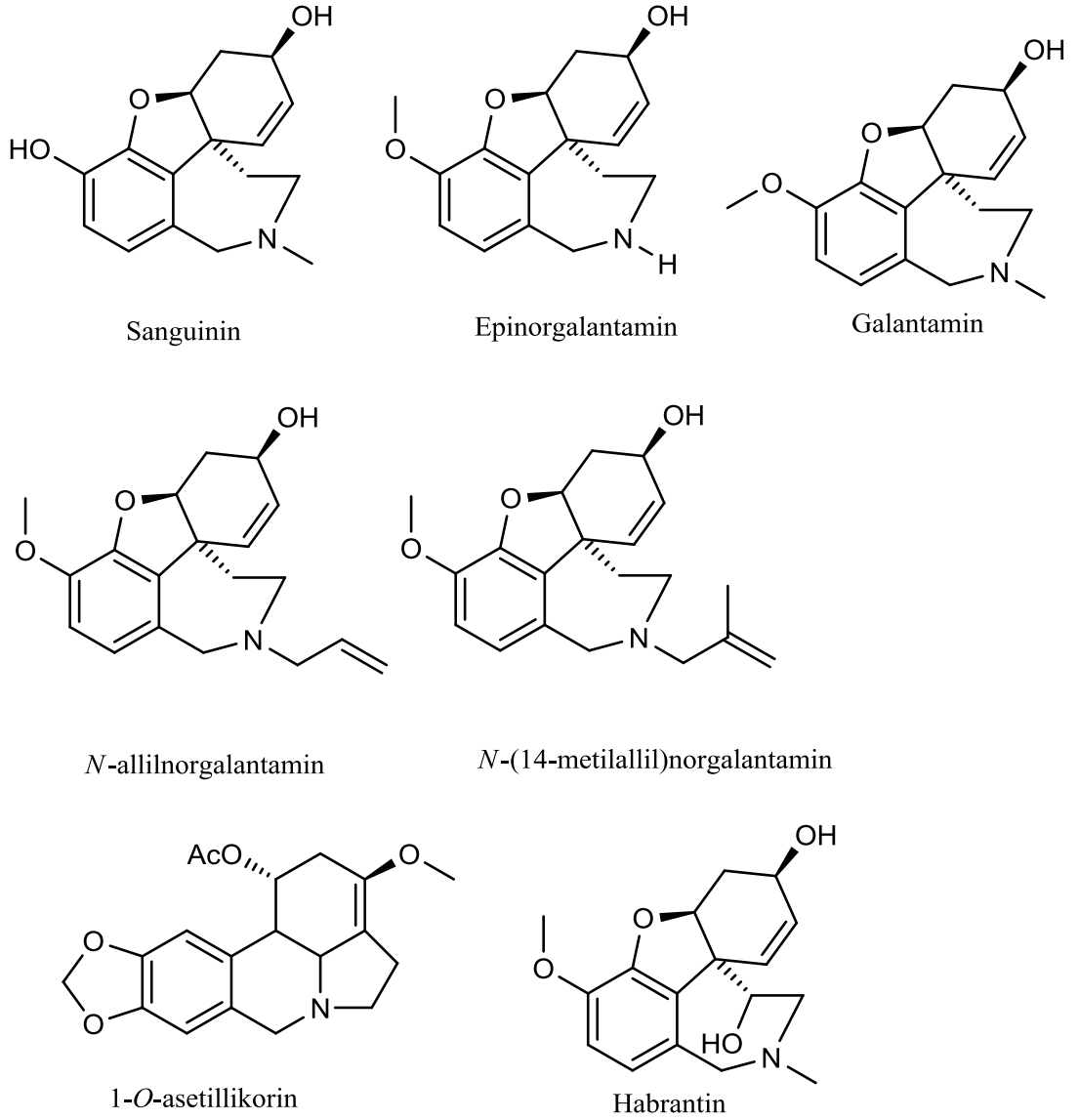
Şekil 2. 1. *Leucojum aestivum* L. Bitkisi

2. 1. 4. *Leucojum aestivum* L. Türünün AChE İnhibisyon Aktivitesi

Son yıllarda yapılan çalışmalar bu bitkinin farmakolojik ve biyokimyasal özellikleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Amaryllidaceae familyasının bazı türlerinden elde edilen bir çeşit alkaloid olan galanthaminin *L. aestivum*'da varlığı araştırılmış ve bu maddenin ara metabolitlerinin özellikle ovaryum duvarı, çiçek sapı ve tepalde yoğun olarak bulunduğu saptanmıştır. Birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaç hammaddelerinden biri olan galanthamin özellikle Alzheimer hastalığının tedavisinde pozitif etki göstermektedir. Galanthamin sentezlenmesi zor ve ekonomik olmadığı için yapılan çalışmalar bu maddenin biyosentez yollarının araştırılması yönünde olmuştur [16].

Leucojum aestivum bitkisi galantaminin yanısıra likorin, tazettin ve bunların türevleri olan birçok alkaloid içermektedir. Yapılan çalışmalarda bitkinin AChE inhibisyon aktivitesi, antimalarial, antifungal, antibakteriyal, antiplatelet aktiviteleri, insektisit ve sitotoksik özellikleri incelenmiştir. Bitkide bulunan galantamin ve onun türevi olan birçok bileşik asetilkolinesteraz inhibisyonunda rol oynar. *L. aestivum*'un alkaloidleri arasında, AChE inhibisyon aktivitesi özellikle galantamin ve türevleri ile ilişkilidir. Galantamin türevi sanguinin (9-*O*-dimetilgalantaminin) galantamine göre daha aktif bir asetilkolinesteraz inhibitörü olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada izole edilen habrantin, sanguinin ve 1-*O*-asetillikorinin aktivitesi incelenmiş galantaminden daha fazla aktiviteye sahip oldukları gözlenmiştir (Şekil 2. 2.) [17].

Diğer bir aktivite çalışmasında sırasıyla *N*-allilnorgalantaminin $IC_{50} = 0.18 \mu M$, *N*-(14-metilallil)norgalantaminin ise $0.16 \mu M$ değerinde aktivite gösterdiği ve galantamin ($IC_{50} = 1.82 \mu M$) ile kıyaslandığında yaklaşık 10 kat daha aktif oldukları belirlenmiştir [18]. Bu uygulamadan sonra sentetik çalışmaları sanguinin bileşiğini elde etmek üzerine olmuştur. Sanguininin içerdiği fenolik grup nedeniyle hidrofilikliği artırır ve kan beyin bariyerini geçme yeteneğini azaltır. Bu yüzden beyindeki biyoyararlanırlığı düşük seviyededir. *N*-allilnorgalantamin ve *N*-(14-metilallil)norgalantamin ise sanguinin ve galantamin ile karşılaştırıldığında yüksek lipofilisite (maddenin yağda çözünürlüğü) göstermektedir. Bu durum TLC plakları üzerinde *N*-allilnorgalantamin ve *N*-(14-metilallil)norgalantamin bileşiklerinin yüksek R_f değerine sahip olmasıyla doğrulanmıştır.



Şekil 2. 2. Asetilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri incelenen Amaryllidaceae alkaloidleri

Galantaminin kristal yapısının enzimin aktif kısmıyla gösterdiği nispeten kuvvetli bir bağlanmanın oluşması bazı klasik ve klasik olmayan hidrojen bağlarını da içeren, protein ile çok sayıdaki orta ve zayıf etkileşimlerden kaynaklanmaktadır [19]. Tahchy ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *Narcissus pseudonarcissus*, *Galanthus elwesii*, *Leucojum. aestivum*'a ait bitki ekstraktlarının AChE inhibisyon aktivitesi Ellman Fotometrik yöntemi ile ölçülmüştür. Galantaminin ve takrin standart olarak kullanılmışlar ve inhibisyon değerleri sırasıyla % 2.1 ve % 0.3 olarak ölçülmüştür. Bu bitkiler ayrıca GC-MS analizine tabi tutulmuş *N. pseudonarcissus*' un galantamin değeri % 0.1, *L. aestivum*' un % 0.07, *G. elwesii*' nin % 0.02

olarak bulunmuş, en yüksek galantamin içeriğine sahip olan *Narcissus. pseudonarcissus*'un inhibisyon değeri % 80 olarak gözlenmiştir [20].

2. 1. 5. *Leucojum* L. Türleri Üzerine Yapılan Diğer Aktivite Çalışmaları

AChE inhibisyon aktiviteleri dışında *Leucojum aestivum* ve bunun yanında farklı bitki ekstraktlarının antimalarial aktiviteleri incelenmiştir. Amaryllidaceae familyasına ait bitkilerin iyi antimalarial aktivite gösterdiği bilinmesine karşın *Leucojum aestivum* ve *Narcissus tazetta* bitkilerinin *P. falciparum* mikrobuna karşı hiç aktivite göstermediği görülmüştür. Aynı çalışmada bazı alkaloidlerin doza bağlı olarak antimalarial aktivitesi test edilmiş, bu alkaloidler arasında en aktif olanlar; Hemantamin, 6-hidroksihemantamin ve Likorinin *P. falciparum*'a karşı en yüksek aktiviteyi gösterirken, galantamin ve tazettin ise en düşük aktiviteyi göstermektedir [21].

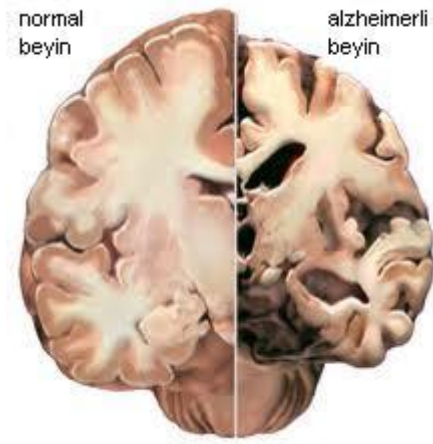
Diğer bir çalışmada *Leucojum* ve *Galanthus* cinslerinin kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivitesi incelenmiştir. *L. aestivum*'un da içerisinde bulunduğu bitki ekstraktlarının sitotoksik aktivitesi araştırılmıştır. Bu ekstraktların arasından *Galanthus* ve *Leucojum* ekstraktlarının önemli sitotoksik aktivite gösterdikleri tespit edilmiştir. Diğer ekstraktlar aktivite göstermemiştir. *Galanthus platyphyllus*ün metanol ekstresi kanser hücrelerine karşı daha fazla sitotoksik aktivite göstermektedir. Tazettin ve Galantamin ise orta derece bir sitotoksik aktivite göstermektedir [22]. Yapılan bir çalışmada bazı bitki ekstraktlarının insektisit özelliği incelenmiştir. *Artemia* böceğine karşı yapılan testlerde *Leucojum aestivum* ve 16 bitki ekstresinin 24 saat içinde zararlı organizmaların (*Artemia*) % 30'unda etkili oldukları belirlenmiştir. 17 ekstrenin tamamı ipekböceğine karşı aktivite gösterirken, 9'u sivrisineklere karşı aktivite göstermiştir. *Sinapis arvensis*, *Veratrum album*, *Biphora radians* ve *Ferula rigidula* ekstraktları böceklere karşı aktivite gösterirken aynı zamanda toksik özellik göstermektedir. Bazı ekstraktlar sadece ipek böceğine karşı ya da sadece sivrisineklere karşı aktivite göstermektedir. Zararlı böcekleri yok ederken yararlıların yok olmaması için ikisinin de aynı ortamda bulundurularak aktivite testlerinin yapılması gerekmektedir. *Galanthus elwesii* L., *Leucojum aestivum* L. ve 16 bitki ekstresinin ipek böceğine karşı 6 gün içinde % 90 aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *Echium italicum* L., *Convolvulus arvensis* L., *Sinapis arvensis* L., *Onobrychis armena* Boiss. & Huet. , *Maclurapomifera* L. , *Veratrum album* L.,

Reseda lutea L., *Biphora radians* Bieb. ve *Ferulu rigidula* DC. bitki ekstraları sarı humma sivrisineğine karşı 6 gün içinde % 100 aktivite göstermiştir [23].

Amaryllidaceae familyasına ait bazı türlerin alkaloid içerikleri ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesine dayanan bir derleme çalışmasında, *Narcissus tazetta* subsp. *tazetta* ve *Leucojum aestivum* bitkilerine ait etanol ekstraları *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas pseudomolli*, *Vibrio cholerae*, *Enterobacter cloacea*, *Corynebacterium hoffmanni*, *Corynebacterium diptheriae* ve *Salmonella typhi*'ye karşı antibakteriyel etki göstermiştir. Bunun yanında, her iki bitkinin de etanol ekstraları antifungal, antimalariyal, antiplatelet ve insektisidal aktiviteleri açısından aktif bulunmuştur [24].

2. 2. Alzheimer Hastalığı Nedir?

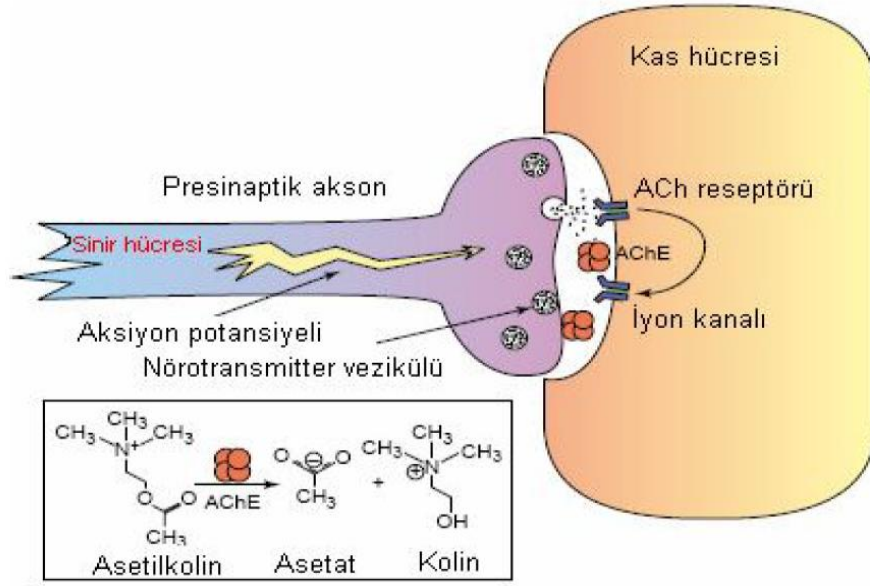
Alzheimer hastalığı, bellekte ve öğrenme, konuşma, akıl yürütme, yargılama, iletişim ve günlük yaşam etkinliklerini sürdürme yetilerinde kademeli olarak yıkıma ve davranışlarda değişikliklere yol açan ilerleyici bir beyin hastalığıdır. Alzheimer hastalığı, halk arasında "bunama" diye adlandırılan demansın en sık nedenidir. Hastalık adını, Alman doktor Alois Alzheimer'den almıştır. Dr. Alzheimer 1906 yılında Tübingen'de düzenlenen Güneybatı Alman Psikiyatristler konferansında Auguste adlı 51 yaşındaki kadın hastasını sunmuştur. Dr. Alzheimer ilk muayene sırasında bu hastada, ilerleyici hafıza, kavrama, konuşma ve yön bulma bozukluğu, işitsel halüsinasyonlar ve belirgin davranış bozuklukları olduğunu belirlemiştir. Hastayı ölene kadar izlemiş, hastanın ölümünden sonra yapılan otopside beyinde anormal kümeleşmeler ve lif yumakları saptamıştır. Alzheimer beyin temel hücresi olan nöronları harab eder. Alzheimer'lı bir beyin ile normal bir beyni karşılaştırıldığında (Şekil 2. 3.) değişim önce beyin hafıza merkezi olan Hippokampus'da başlar sonra duygu ve düşüncede etkili bölümler ve korteks (beyin zarı) etkilenir, beyin kütlesi küçülür lisan becerisi ve muhakeme yeteneği azalır [25].



Şekil 2. 3. Sağlıklı bireyde ve Alzheimer hastasında beyin yapısı

2. 2. 1. Asetilkolin Metabolizması ve Kolinesterazlar

Alzheimer hastalığı semptomlarının oluşmasındaki ana mekanizma nörotransmitter değişimleridir. Asetilkolin miktarının azalması Alzheimer hastalığı ile paraleldir. Alzheimer hastalarında başta kolinerjik sistem olmak üzere kimi nörotransmitter sistemleri seçici olarak etkilenmektedir. Asetilkolinin sinaptaki varlığı, kolinasetiltransferaz ve asetilkolinesteraz enzimlerinin etkinliğine bağlıdır. Asetilkolinin öğrenme ve hafıza ile de derin bir ilişkisi bulunur ve bu yüzden beyinde asetilkolin içeren nöronlar mevcuttur. Asetilkolin belli nöronlarda kolin asetiltransferaz enzimi tarafından, kolin ve asetil-CoA'dan sentezlenir (Şekil 2. 4.). Sinaptik boşluğa salınarak görevini tamamladıktan sonra asetilkolin, asetilkolinesteraz enzimi yardımıyla kolin ve asetat'a (asetik asit tuzu) çevrilerek yıkılır. Presinaptik nöronda üretilen asetilkolin molekülleri presinaptik terminallerdeki özelleşmiş kofullarda depolanır ve bu kofullar, nörona bir sinir uyarısı geldiğinde içeriğini sinaps aralığına döker. Sinaps aralığına bırakılan asetilkolin moleküllerinin çoğu hemen postsinaptik reseptörlere bağlanır ve uyarıyı iletirken reseptörlere bağlanamayan moleküller asetilkolinesteraz tarafından etkisiz hale getirilirler. Postsinaptik reseptörlere bağlanan asetilkolin molekülleri, sinir uyarısının diğer nörona iletilmesinin ardından reseptörden ayrılır, asetilkolinesteraz tarafından yıkılır ve molekülden arta kalan kolin yeniden kullanılmak üzere presinaptik nörona döndürülür [26, 27].



Şekil 2. 4. Asetilkolin metabolizması

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

AChE tarafından katalizlenen tepkime enzimatik olarak iki basamakta gerçekleşir. İlk basamakta enzim güçlü bir nükleofil rolü oynar. İkinci basamakta ise enzim özgül bir serin kalıntısının nükleofilik hidroksil grubu aracılığıyla mükemmel bir parçalayıcı grup işlevi görür. AChE'nin temel fonksiyonu kolinerjik nörotransmisyonun sonlandırılmasıdır fakat asetilkolin ve diğer kolin esterlerini hidroliz eden BChE'nin gerçek fizyolojik işlevi bilinmemektedir. Alzheimer hastalığının başlaması ile birlikte gerçekleşen nöron ve akson kaybı daha düşük düzeylerde asetilkolin salınımına neden olur. Daha düşük konsantrasyondaki nörotransmitter düzeylerinde sinir iletilerinin devamlılığını sağlamak ve

sonuç olarak bilgilerin aktarımı daha güç bir hal alır. Bu durumu düzeltmek için uygulanacak yöntemlerden biri sinir hücrelerine asetilkolin benzeri maddelerin verilmesidir. Asetilkolin düzeyini arttırmak için uygulanacak diğer bir yöntem ise asetilkolini yıkan AChE enziminin baskılanmasıdır. Çalışmalar AChE inhibisyonuna bağlı asetilkolin düzeyi artışlarının, Alzheimer hastalığının erken evrelerindeki kognitif defisiti iyileştirebileceğini göstermiştir. Asetilkolinin sinaptik boşlukta daha uzun kalmasını sağlama amacı, günümüzde hastalığın tedavisinde en sık uygulanan stratejidir. Bu amaca yönelik olarak çoğunlukla kolinesteraz enzim inhibitörleri kullanılmaktadır [28].

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

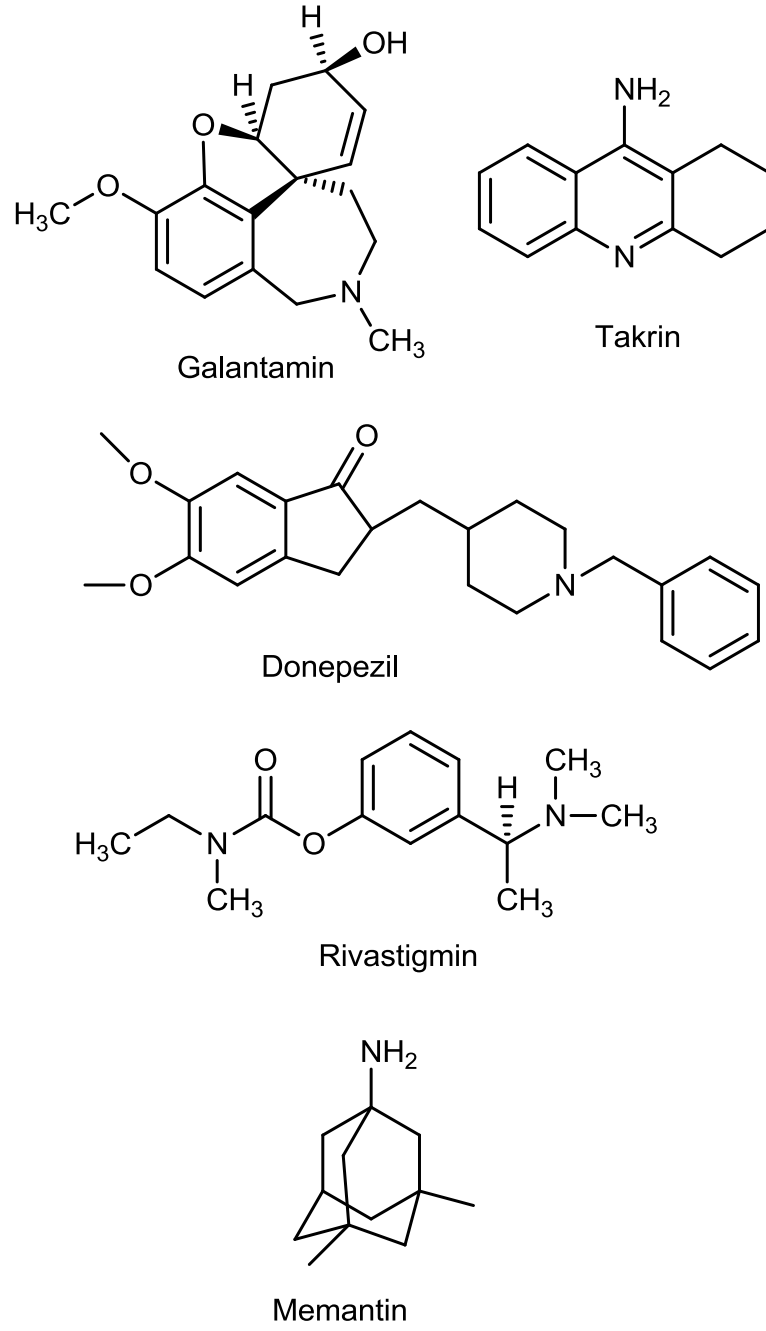
Alzheimer hastalığında kolinerjik kayıp olduğu bilgisi 1970'lerden itibaren tedavi için bir umut ışığı haline gelmiştir. Parkinson hastalığında dopamin eksikliğinin giderilmesi ile hastalığın belirtilerinin tedavi edilir hale gelmesi ile paralellik kurulmuş ve Alzheimer hastalarında da kolinerjik sistemin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

Kolinesteraz inhibitörleri 1990'larda Alzheimer hastalığının tedavisi için kullanıma sunulmuştur (Şekil 2. 5.). Etki mekanizmaları Asetilkolin adı verilen kimyasal habercinin yıkımını azaltarak kolinerjik etkinliği arttırabilmelerine dayalıdır. Ülkemizde bu ilaçlardan üç tanesi bulunmaktadır: Donepezil ve Rivastigmin 1998'den beri, Galantamin ise 2003'den beri reçete edilebilmektedir. Huperzin A Çin'de kullanılan bir asetilkolinesteraz inhibitörüdür ve oldukça etkilidir. Dünyada ilk çıkan antikolinesteraz olan Takrin'in tarihi eskiye dayanmaktadır. Adrian Albert tarafından ikinci dünya savaşında antiseptik ilaç yapmak amacıyla monoakridin türevleri sentezlenmiş daha sonra 1986 yılında Sydney Üniversitesi tarafından takrin bileşiği sentezlenmiştir. Takrin'in kullanım gücü ve yan etkileri nedeniyle ülkemizde kullanıma hiç sunulmamıştır ve diğer ülkelerde de artık pek kullanılmamaktadır. Bu ilaçların hepsi asetilkolinin yıkımını engellerler. Asetilkolin dikkat ve bellek süreçlerinde özellikle önemli rol oynayan bir kimyasal habercidir. Yıkımının azalmasının, beyinde kullanılabilirliği artırması ve yukarda sözedilen zihinsel süreçleri iyileştirmesi beklenir. Yapılan klinik çalışmalarda erken ve orta evre Alzheimer hastalarında bu ilaçların zihinsel

işlevlerde kısmen iyileştirici ya da zihinsel yıkımı yavaşlatıcı etkisinin görüldüğü bildirilmiştir.

Diğer bir ilaç yaklaşımı Alzheimer hastalarının beyinlerinde artmış bir madde olan glutamati azaltmaya yönelik olarak kullanılan Memantin'dir (Şekil 2. 5.). Bu ilaç kolinesteraz inhibitörü olmayan ve Alzheimer hastalığı tedavisi için dünyada onaylanan ilk farklı mekanizmalı ilaçtır. Ülkemizde 2003 sonu piyasaya verilmiştir. Bu ilaç 1982'den beri Almanya'da farklı nörolojik hastalıkların tedavisi için kullanılmaktadır. Memantin, glutamat adı verilen kimyasal habercinin aktivitesini düzenler. Glutamat, NMDA (N-metil-D-aspartik asit) reseptörleri denilen hücre algılayıcılarını uyarak bilgi işleyişinde ve bellek işlevlerinde önemli rol oynadığı düşünülen, uyarıcı etkili bir maddedir. Aşırı glutamat NMDA reseptörlerini aşırı uyaracak ve bu yüklenmenin sonucunda hücreler yıkıma uğrayabilecektir (glutamat toksisitesi). Sinir hücrelerinin yıkımı ile seyreden nörodejeneratif hastalıkların birçoğunda glutamatın bu olası zararlı etkisi bir faktör olarak düşünülmektedir. Memantin NMDA reseptörlerini kısmen bloke ederek glutamatın aşırı uyarıcı etkisini ve bundan kaynaklanan hücre hasarını önleyebilir. Memantin'in etkisi hücre hasarını önlemeye yönelik olduğu için daha çok orta ve ileri evre Alzheimer hastalığında kullanımı önerilmektedir [29, 30].

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



Şekil 2. 5. Alzheimer hastalığı tedavisinde kullanılan ilaçlar

2. 3. Alkaloid Bileşikleri

2. 3. 1. Genel özellikler

Alkaloidler aminoasitlerden oluşur, ancak terpenler ve steroidler de çoğu zaman alkaloid iskeletini oluşturan diğer öncü bileşiklerdendir. Bu nedenle, alkaloidlerin biyosentezi daha önce tanımlanan ana biyosentez yollarının herhangi birine dahil edilemez. Ancak çoğunlukla iki biyosentetik yolun kombinasyonu ile oluşurlar. Bu yüzden alkaloidler kendi yapılarının temel kısmını oluşturan halka sistemleri göz önüne alınarak sınıflandırılırlar. “Alkaloid” terimi genellikle “canlılarda fizyolojik etkileri olan azotlu ve bazik bitki bileşenleri için kullanılır. Ancak birçok farklı durumlar söz konusudur. Örneğin kolşisin, bazik karakterde olmamasına rağmen bir alkaloid olarak kabul edilir ve çok sayıda hayvansal kökenli ve fizyolojik olarak aktif azot içeren bileşikler de alkaloid olarak adlandırılır. Bu sorunları önlemek için şu tanım önerilmiştir: “Bir alkaloid canlılar organizmalarda sınırlı bir dağılım gösteren, azot içeren halkalı bir bileşiktir.” Bu tanım aminler, aminoasitler, peptidler, proteinler, nükleik asitler, nükleotidler, porfinler, vitaminler, nitro ve nitroz bileşikler gibi azotlu bileşikler hariç bugüne kadar alkaloidler olarak kabul edilen tüm bileşikler kapsamaktadır [31, 32].

2. 3. 2. Alkaloidlerin Bitkiler Âleminde Bulunuşu

Alkaloidler tüm bitki familyalarında bulunmazlar. Bakteri, yosun, mantar ve likenlerde çok nadirdir ve genellikle eğrelti otları ve kozaklarda da bulunmazlar. Cordell ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmanın sonuçlarına göre tek çeneklilerde, çift çeneklilerde ve açık tohumlularda bulunan alkaloidlerin toplam sayısı 21.120’dir. Alkaloidler 186 bitki familyası içinde 1730 cinsi kapsayan yaklaşık 7231 türde dağılım göstermektedirler. 35 familya içinde alkaloidlerin bulunduğu tespit edilmiştir ama henüz izole edilmemişlerdir. 20 bitki familyasında ise henüz hiç alkaloid tespit edilmemiştir. Tek çenekliler arasında, Amaryllidaceae, Liliaceae ve Poaceae (buğdaygil) familyaları alkaloid açısından zengindir ve birçok orkide türünde daha önce bu tip bileşiklerin olmadığı kabul edilmesine rağmen şimdi alkaloid içerdiği bulunmuştur. Alkaloidlerin çoğu dikotiledon olarak adlandırılan embriyosunda iki çenek yaprağı bulunan bitkilerde oluşur, özellikle bu familyalar

Annonaceae, Apocynaceae, Asteraceae, Beberidaceae, Boraginaceae, Buxaceae, Celastraceae, Fabaceae, Luaraceae, Loganiaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Solanaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Piperaceae ve Ranunculaceae'dir. En çok sayıda alkaloid başlıca 5 farklı familyadaki bitkilerden izole edilmiş ve karakterize edilmişlerdir. Bu familyalar: Apocynaceae, Rutaceae, Ranunculaceae, Fabaceae ve Papaveraceae'dir [33].

2. 3. 3. Alkaloidlerin Bitkide Bulunduğu Yerler

Alkaloidler bir bitkinin her bölümünde oluşabilir ama genellikle bir ya da daha fazla organı diğerlerinden daha fazla içeriğe sahiptir. Genellikle kabukları, yaprakları ve meyveleri alkaloid açısından zengindir ki, bunların da belirli bir doku ya da hücrelerinde oluşabilir. *Opium* (Afyon) alkaloidlerine haşhaş bitkisinin özellikle lateks damarlarında rastlanmaktadır. *Datura* türlerinin tropan alkaloidlerine yaprağın orta damarına bitişik dokudaki yaprak sapında rastlanılmıştır. Hücrede, alkaloidler genellikle vakuollerde meydana gelirler, protoplazma ve hücre duvarında oluşmazlar.

Fazla alkaloid içeren organın, alkaloidlerin oluştuğu yer olması gerekmez. Birçok bitkide bir organdan diğer organa aktif taşıma gözlenmiştir. Bu süreçler aşılama deneyleri ile incelenmiştir. Özellikle Solanaceae familyasına ait bitkiler dikkate alınmıştır: Bir domates bitkisinin toprak üstü kısımlarından tropan alkaloidleri üreten bir bitki olan öldürücü köpek üzümünün (*Atropa belladonna*) köküne aşılama yapılmıştır. Bir süre sonra aşı domatesinden tropan alkaloidleri izole edilmiştir. Tersine, domates bitkisinin köküne, *Atropa*'nın toprak üstü kısımlarından aşılama yapıldığı zaman ise tropan alkaloidleri *Atropa*'da yavaş yavaş kaybolmuştur. Bu deneyler gösteriyor ki *Atropa belladonna*'daki tropan alkaloidleri kökte oluşur ve depolamak için yapraklara taşınır. Benzer deneyler göstermiştir ki *Lupin* (acıbakla) alkaloidler için de tersi geçerlidir. *Lupin* alkaloidleri gövdede sentezlenir ve daha sonra köklere taşınır. Radyoaktif olarak etiketlenmiş alkaloidlerin öncülleri kullanılarak da nikotin alkaloidin çoğunun tütün bitkisinin kökünde oluştuğu ve yapraklara taşındığı gözlenmiştir. Ancak çok az bir miktarda alkaloid gövdede sentezlenmiştir.

Köklerde sentezlenen alkaloidlerin taşınması çoğunlukla damarlar yoluyla gerçekleştiriliyor gibi çünkü bitki içindeki su taşınması çok aktif olduğu zaman yaprak uçlarından damlayan sıvıda ve damarlarda da alkaloidler tespit edilmiştir. Yine de bu

alkaloidlerin taşınması, yapraklarda ve gövdede oluşması ile ilgili bilinenler oldukça azdır [33].

2. 3. 4. Alkaloidlerin Bitkideki Rolü

Alkaloidin bitkide bulunmasının bitkiye nasıl bir avantaj sağladığı konusunda pek çok tahmin olmasına rağmen bu konu hakkında bilinen çok az şey vardır. Üstelik aynı durum bitkilerdeki sekonder metabolitler için de geçerlidir. Sekonder metabolitler terimi bitkide oluşan bileşikler ifade etmek için kullanılır fakat bunlar bitkinin ömrü ve gelişimi için gerekli olan metabolik yöntemlerde görev almamaktadırlar. İlaç üretiminde en çok kullanılan bitki bileşenleri sekonder metabolitlerdir.

Alkaloidler bitkideki varlığı onları otlayan sığır hayvanlarından koruyabilir. Çünkü bazı alkaloidlerin acı bir tadı vardır ve hayvanlar bu alkaloidleri içeren bitkileri tecrübe ettikleri için onlardan uzak durmaktadır. Hemen hemen her şey çevremizde tükenmek üzere iken hala yeşilliğin bol olduğu otlak alanlarda el değmemiş keşfedilmemiş alkaloid içeren bitkilerin olduğu tespit edilmektedir. Sonuç olarak bitki çeşitliliği azalmış olsa da bu durumun etkisinin alkaloidlerin tükenmesine neden olacağını söylemek mümkün değildir. Alkaloid içeren bitkiler otlak alanlarda hayatta kalabilirler bunun nedeni içerdiği alkaloidlerdir. Bitkinin alkaloid sentezi için kaynaklarını geliştirmesi bunun sebebi değildir çünkü bu kaynakların gelişimi sığır hayvanlarının var olmadan milyonlarca yıl öncesine dayanır.

Alkaloidlerle ilgili diğer hipotez önerileri ise alkaloidlerin normal bir metabolizmada zehir üreten organizmaların ürettikleri zehrin arındırılması için oluşan maddeler olduğu ya da alkaloidlerin bitkilerin azot depolamasını sağlayan maddeler olduğu ve besin rezervini oluşturduğu hipotezidir. [34].

2. 3. 5. Alkaloidlerin İlaç Olarak Keşfedilmesi ve Tıpta Kullanımı

Alkaloidler farmolojik etkilere sahiptir, geniş kapsamlı biyolojik etki ve potansiyel göstermektedirler. Bugün alkaloidlerin çoğu hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanılmaktadır. Örneğin; vincristin ve vinblastin kanser tedavisinde, morfin ise ağrı kesici olarak kullanılır. Eroin, kokain gibi alkaloidler yasal olmayan yollar ile kullanılmaktadır. Aconitin ve prolizidin alkaloidleri ise kuvvetli toksin özelliği göstermektedir. Alkaloid içeren bitkiler bilinen doğal ürünlerin % 15.6'sını oluşturmaktadır. Fakat farmasötik ve biyolojik

öneme sahip alkaloidler bitki kaynaklı doğal ürünlerin % 50'sini oluşturmaktadır. Alkaloidler yeni ilaçlar üzerindeki gelişmelerde çok büyük bir payı temsil etmektedir. Ancak; kimyagerler ve farmakologlar arasında alkaloidlerin izolasyonu ve yapısının belirlenmesi konusunda çok az ilgilenen vardır ve bu konuda çok az işbirliği yapılmaktadır. Bu yüzden birçok alkaloidin izolasyonu yapılarak yapısı belirlenmiş ancak biyolojik ve farmakolojik özellikleri incelenmemiştir. Cordell ve arkadaşlarının yaptığı bir derlemeye göre şu ana kadar elde edilen alkaloidlerin % 75'i in vitro ve in vivo biyolojik aktivite analizlerine tabi tutulmamış ve farmakolojik etkileri test edilmemiştir. 2291 numune sadece bir teste, 1995'i 2-5 arası teste, sadece 167'si 20 den fazla teste tabi tutulmuştur. En çok sayıda test edilen bu 167 alkaloidin % 35'i farmasötik açıdan önemli bulunmuştur. Asetat yolu ile türeyen terpenoidler ve fenilpropanoidler ile karşılaştırıldığında alkaloidler zengin bir iskelet yapısına sahiptir ve fonksiyonel grup çeşitliliği gösterir. Bilinen 21.120 alkaloid içinde alkaloidlere ait 1872 farklı iskelet yapısı vardır. Bitkisel kaynaklı doğal ürünlerin sayısı 135.500 dür, bunlar arasında 5750 tane farklı iskelet yapısı vardır. Yani alkaloidler bitkilerden elde edilen bileşiklerin %15.6'sını temsil ederken, toplam iskelet sayısının % 32.5'lik bir kısmını oluştururlar. Düz zincirli, halkalı ya da küresel yapıdaki çeşitli alkaloidler hareketli ya da sabit konformasyonel yapıların büyük bir kısmını kapsamaktadır. Alkaloidler tek veya birden fazla kiral merkez bulundururlar ve nadiren rasemik karışım halindedirler. Ama genellikle bir enantiyomerik formu yüksek derecede optikçe saf olarak elde edilmektedir. Bu yüzden alkaloidlerin ve enzimlerin etkileşebilmesi için pek çok olasılık vardır ve alkaloid içeren bitkilere ilaç keşif sürecinde önemli bir bütçe ayrılmaktadır [35].

2. 3. 6. Alkaloid Sınıfları

Alkaloidler 15 grupta sınıflandırılabilirler.

1. Amino alkaloidler
2. Piridin ve piperidin alkaloidleri
3. Tropan alkaloidleri
4. Pirolizidin alkaloidleri

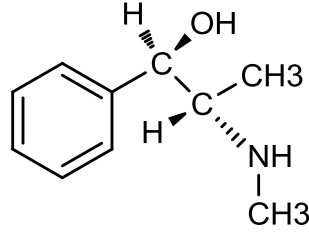
5. Kinolizidin alkaloidleri
6. İzokinolin alkaloidleri
7. Amaryllidaceae alkaloidleri
8. Benzofenantridin alkaloidleri
9. Terpenoid tetrahidroizokinolin alkaloidleri
10. İndol alkaloidler
11. Kinolin alkaloidleri
12. İmidazol alkaloidler
13. Steroidal alkaloidler
14. Aconitum alkaloidleri
15. Guanidinyum alkaloidleri

2. 3. 6. 1. Amino alkaloidler

Amino alkaloidlerin azot atomu amino grubunda bulunur ve diğer alkaloidlerin ortak özelliği olan bir heterosiklik halka üyesi değildir. Alifatik seride çok az alkaloid vardır ve bunlar genellikle aminlerden sayılır. Hordenin, meskalin, efedrin, galegin bunlara örnek olarak verilebilir.

Efedrin *Ephedra sinicia* ve benzer türlerinden elde edilir. L-efedrin doğal bir üründür ama metilamin ve 1-hidroksi-1-fenilasetondan da sentezlenebilir. 1-hidroksi-1-fenilaseton bira mayası ile benzaldehitin fermantasyonu ile hazırlanır. Efedrin, bir benzen halkasına bağlı 3 karbonlu yan zincirde bir hidroksil ve bir de süstitüe amin grubu içermektedir.

Efedrin, astım hastalığında kullanılan bir alkaloidtir (Şekil 2. 6.). Tansiyon yükseltici bir etkisi olduğundan hipotansiyonda da tavsiye edilir [2, 36].

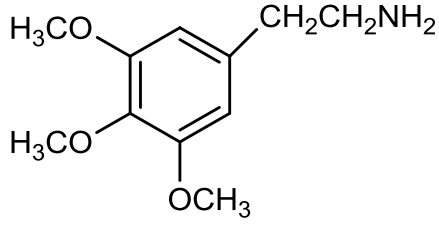


Şekil 2. 6. (1R,2S)-(-)-Efedrin

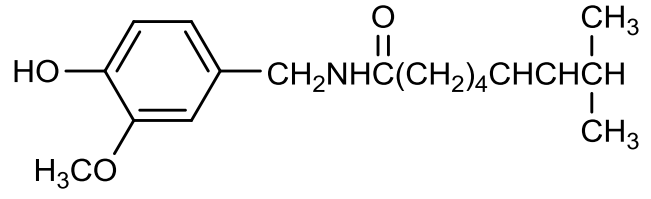
Ham droglar

Ephedra, *Ephedrae sinicia* Stapf. (Gnetaceae)'nin toprak üstü kısımlarında bulunur. Bitki 60-90 cm yüksekliğindeki bir çalıdır. *E. sinicia* Çin'den gelir ve orada binlerce yıldır “ma huang” adı altında, soğuk algınlığı semptomlarının tedavisinde kullanılmıştır. Günümüzde bitkinin ana kaynakları Hindistan ve Pakistan'dır. Alkaloid miktarı sonbaharda en yüksek olduğundan, dallar bu mevsimde toplanır ve havada kurutularak drog elde edilir. Ephedra türleri en fazla % 0.5–2 kadar alkaloid içerirler. Alkaloid karışımının %30–90'ını efedrin oluşturmaktadır [37].

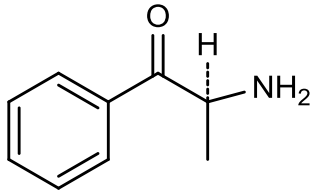
Meskalin, kapsaisin, katinon, kolşisin amino alkaloidlere verilebilecek diğer örneklerdir (Şekil 2. 7.).



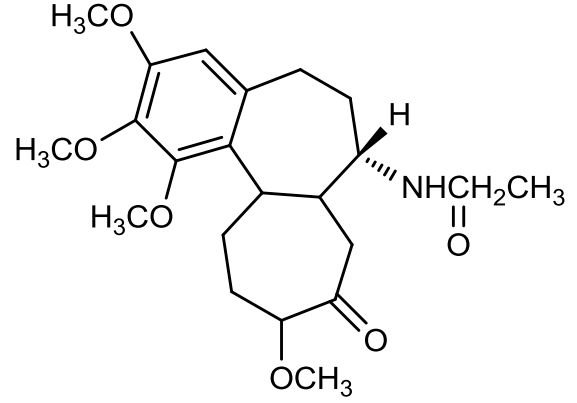
Meskalin



Kapsaisin



Katinon

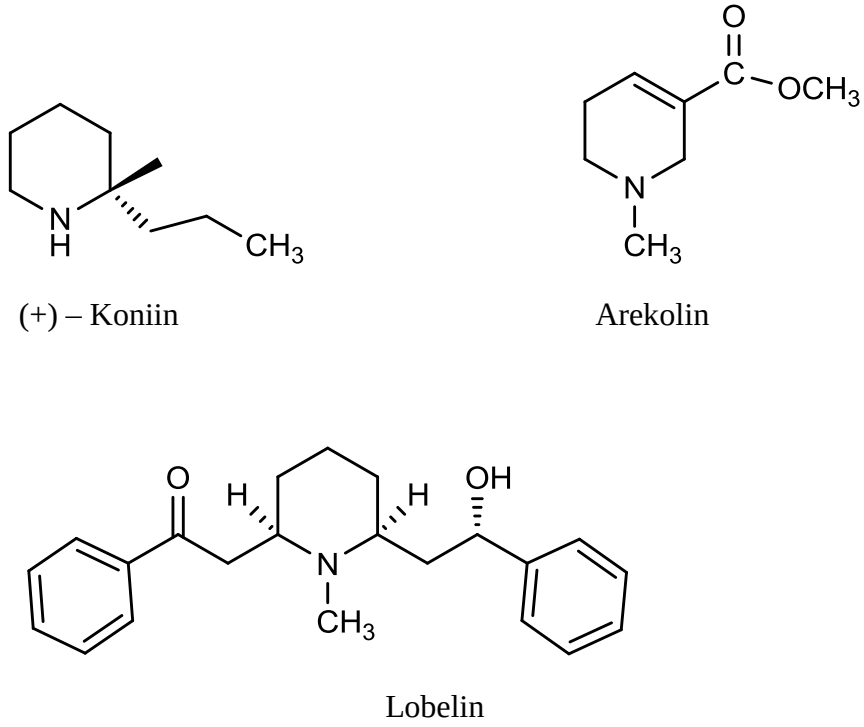


Kolşisin

Şekil 2. 7. Amino alkaloid örnekleri

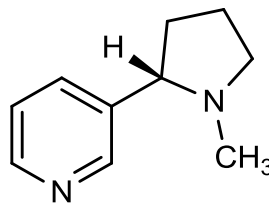
2. 3. 6. 2. Piridin ve Piperidin alkaloidleri

Piridin ya da piperidin halkası içeren alkaloidlerdir. Koniin, arekolin, lobelin, nikotin bu gruba verilebilecek örneklerdir (Şekil 2. 8.).



Şekil 2. 8. Piridin ve piperidin alkaloid örnekleri

Nikotin *Nicotiana tabacum* tütün bitkisinin ana alkaloididir ve tütün kullanma alışkanlığına neden olan bileşiktir (Şekil 2. 9.). Bir yağ olan nikotin, birçok farmakolojik etkilere sahiptir. Düşük dozlarda, örneğin sigara içilirken alınan miktarlarda nikotin çeşitli bezlerden salgı uyarısı ve solunum uyarısı ile hipertansiyona neden olur. Ayrıca merkezi sinir sistemini uyarıcı etkisi vardır. Nikotin nikotinik asetilkolin reseptörleri ile etkileşen güçlü bir zehirdir. Sigarada nikotin çoğu ısı ile yok olur ve havaya dağılır. Düşük dozdaki etkisinin aksine, toksik dozlar hipotansiyona ve solunumun durması sonucu ölüme neden olur.

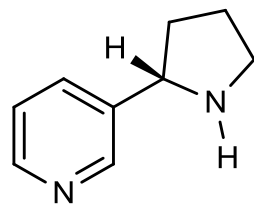


Şekil 2. 9. Nikotin

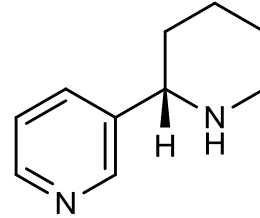
Nikotin tütün atıklarından izole edilerek bahçelerde böcek ilacı olarak kullanılır. Tıbbi amaçlar için ise nikotin sakız içinde, burun spreyinde ve sigara içme alışkanlığı olan insanların bu alışkanlığını bırakabilmesi için nikotin emdirilmiş bantlarda mevcuttur.

Ham droglar

Tütün kurutulmuş ve fermente edilmiş *Nicotiana tabacum L.*'in yapraklarından oluşur. *Nicotiana rustica L.* benzer türlerdendir. *Nicotiana* türleri Kuzey Amerika'da tütün yapımında kullanılmıştır ve oradaki yerliler (kızılderililer) yaprakların uyarıcı olarak nasıl kullanılacağını bilmekteydiler. Yenidünyanın keşfinden sonra tütün kullanımı dünyanın geri kalanına yayılmıştır ve bitki şimdi hem tropikal hem de subtropikalde aynı zamanda ılıman bölgelerde yaygın olarak yetiştirilmektedir. Tütün 'curing' tekniği olarak adlandırılan yavaş kurutma ve fermentasyon ile gerçekleşen bir teknik ile hazırlanır. Bunun sonucunda kahve renkli ve kokulu drog oluşur. Ürünün kalitesi kısmen kökene (tür, cins, melez) ve kısmen de hangi yolla kurutulduğuna ve fermentasyonun nasıl gerçekleştiğine bağlıdır. Tütündeki nikotin içeriği oldukça geniş bir aralıkta değişiklik gösterir (% 0.05–9). Narkotin ve Anabazin alkaloidleri bu sınıfa verilebilecek başka örneklerdir (Şekil 2. 10.).



Nornikotin



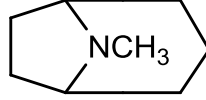
Anabazin

Şekil 2. 10. Nornikotin ve Anabazin alkaloidleri

Tütün sağlık için önemli bir risk içerir. Nikotin damar sertliğine ve kalp hastalıklarına neden olur. Sigara dumanı 3000'den fazla bileşik içerir. Bunların bazıları güçlü kanserojen maddelerdir. Sigara içenlerde özellikle akciğer kanseri belirgin bir risk teşkil etmektedir [33].

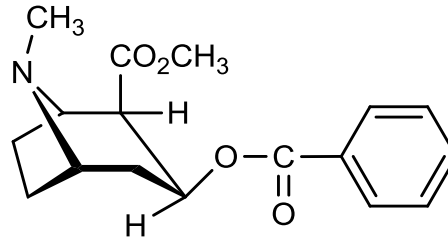
2. 3. 6. 3. Tropan alkaloidleri

Bu alkaloid gruplarının en önemli temsilcileri hiyosiyamin, skopolamin ve kokaindir. Tropan iskeleti iki karbon ve bir azot atomunun ortak kullanıldığı bir piperidin ve bir pirolidin halkasından oluşur (Şekil 2. 11.).



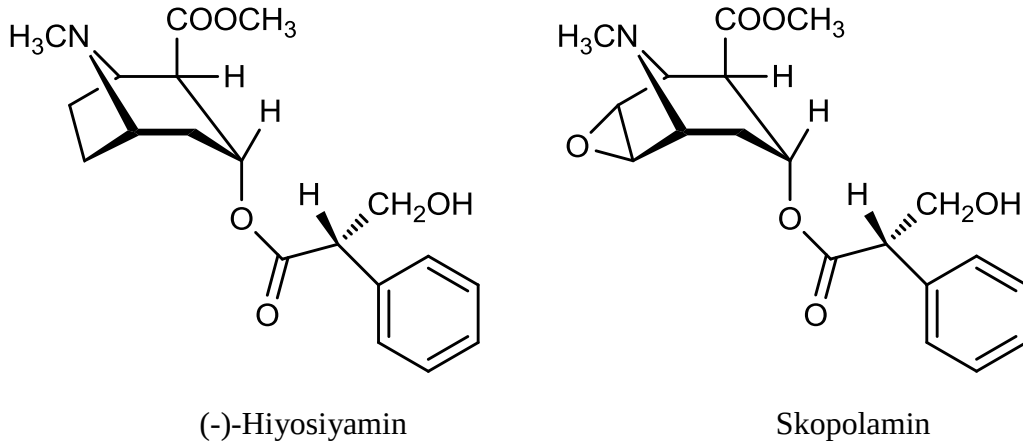
Şekil 2. 11. Tropan

Kokain *Erythroxylum coca*'da oluşmaktadır. Kokain alkaloidi bir ecgonin esteridir (Şekil 2. 12.). Kokain, C-2'deki karboksil grubunun metanol ile esterleşmesi ve hidroksil grubunun ise benzoik asit ile esterleşmesi sonucu oluşmuştur. Kokain özellikle oftalmik (göz) uygulamada lokal anestezik olarak kullanılır ancak bileşik aynı zamanda merkezi bir uyarıcı olduğundan narkotik olarak yanlış kullanımından dolayı uygulamada sınırlıdır. Ancak kokain bileşiği prokain bileşiğinin sentezlenmesinde bir model olarak kullanılmıştır ve aynı şekilde diğer lokal anesteziklerin gelişiminde önemli bir rol oynamıştır [38, 39].



Şekil 2. 12. Kokain

Hiyosiyamin, skopolamin tropan alkaloidlere örnek verilebilir (Şekil 2. 13.).



Şekil 2. 13. Tropan alkaloid örnekleri

2. 3. 6. 4. Pirolizidin alkaloidleri

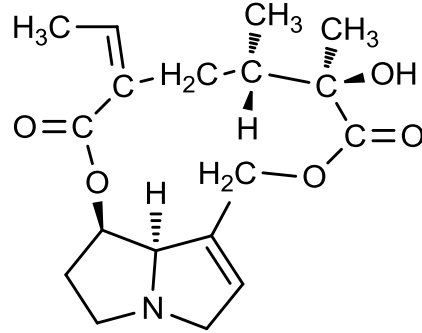
Pirolizidin alkaloidleri ornitin aminoasitinden biyosentetik yolla türeyen alkaloid gruplarından biridir [33]. Pirolizin iki pirol halkasının azotlarının ortak olarak kondensasyonundan oluşur. Bunun hidrojenlenmiş türevine de pirolizidin denir (Şekil 2. 14). Bazı pirolizidin alkaloidlere örnek olarak senesionin (Şekil 2. 15), monosirotalin ve lasiosarpin verilebilir.



Şekil 2. 14. Prolizidin alkaloidleri

Senesionin pirolizidin sınıfının bir üyesidir ve hepatotoksik özelliği sayesinde tanınmıştır. Bu bileşikler reaktif bir karbona sahiptirler. Reaktif karbon karaciğerde bulunan birçok enzimdeki reaktif tiol grupları tarafından kolayca alkillenir ve toksik bir madde oluşur. Bu durum uzun zamandır tıbbi bir bitki olarak kullanılan *Symphytum officinale* bitkisinin piyasadan çekilmesine neden olmuştur. Senesionin kanarya otunda (*Senecio vulgaris*,

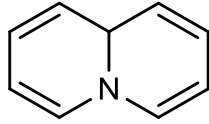
Asteraceae) meydana gelmektedir. Bu bileşik çiftliklerde ve küçük otlak alanlarda problem yaratabilir çünkü çiftlik hayvanları ve atların zehirlenmelerine neden olabilir [40].



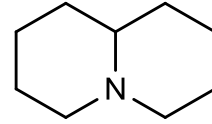
Şekil 2. 15. Senesionin

2. 3. 6. 5. Kinolizidin alkaloidleri

Kinolizin iki piridin halkasının azotlarının ortak olarak kondansasyonundan oluşur. Bunun hidrojenlenmiş türevine de kinolizidin denir (Şekil 2. 16).



Kinolizin



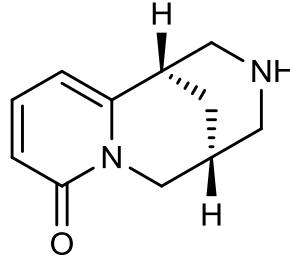
Kinolizidin

Şekil 2. 16. Kinolizidin alkaloidleri

Kinolizin alkaloidlerine pek çok familyada rastlanmaktadır. Bunların birçoğunda kinolizin veya daha çok kinolizidin iskeleti, diğer azotlu halka sistemiyle bir arada bulunur. Sitisin bu alkaloid gruplarına verilebilecek bir örnektir [41].

Sitisin *Laburnum anagyroides* Medic. ve *L. alpinum* J. Presl. (Fabaceae) süs ağaçlarında oluşur (Şekil 2. 17.). İlkbaharda sarı çiçekler verir ve büyük çiçek salkımı şeklinde bir bitkidir. Meyvesi bezelyeye benzer bir baklagildir. Bitkinin tüm bölümleri sitisin içerir. Özellikle tohumunda % 3 kadar sitisin içermektedir. Sitisinin farmakolojik etkileri

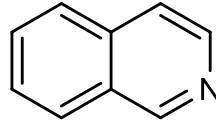
nikotine benzemektedir. Bu bileşik ilaç olarak kullanılmaz çünkü sarısalkım (*Laburnum*) meyvesi yiyen çocuklarda bazen zehirlenmelere neden olmuştur. Bu alkaloid zehirli bir alkaloiddir [33].



Şekil 2. 17. Sitsin

2. 3. 6. 6. İzokinolin alkaloidleri

İzokinolin, azotu β konumunda olan bir benzopiridindir. İzokinolin iskeleti çok sayıda alkaloidte mevcuttur (Şekil 2. 18.).



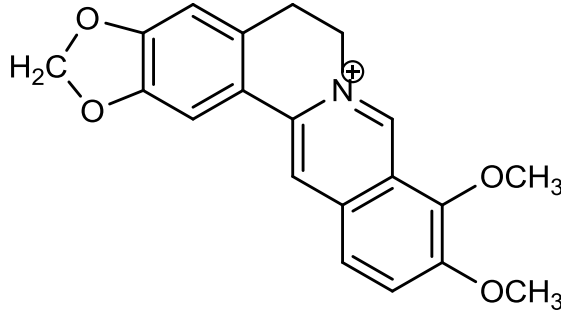
Şekil 2. 18. İzokinolin

Tirozin aminoasiti izokinolin alkaloidlerinin biyosentetik öncüsüdür. Tetrahidroizokinolin alkaloidlerinin biyosentezi de tirozinden başlar ve bu alkaloidler indirgenmiş izokinolin iskeleti içerirler oysa bu gruptaki alkaloidler daha karmaşık yapılara sahiptirler ve daha fazla halka içermektedirler [42].

2. 3. 6. 6. 1. Protoberberin alkaloidler

Berberin sarı bir alkaloidtir (Şekil 2. 19). Berberidaceae (Berberis, Hydrastis) ve Ranunculaceae (*Loptis*, *Thalictrum* ve diğer cinsler) gibi birkaç familyada bulunmaktadır.

Berberin antiamebik (*Entamoeba histolytica*'nın neden olduğu bir bağırsak enfeksiyonu hastalığı), antibakteriyel ve antienflamatuar (iltihap sökücü) özelliklere sahiptir. Bu alkaloid ilaç olarak Asya'da yaygın kullanılmaktadır. Orada insanlar bunu genellikle ham bitki özü şeklinde kullanırlar. Japonya'da ise alkaloid *Coptis orientalis*'in hücre kültürlerinde üretilmektedir [43].



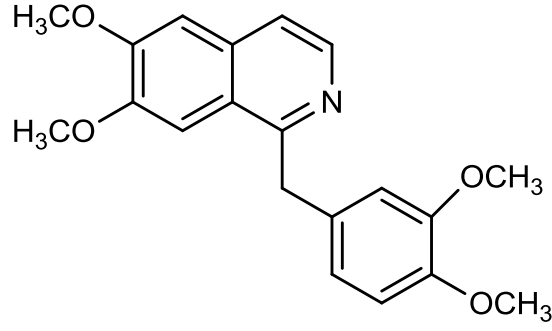
Şekil 2. 19. Berberin

2. 3. 6. 6. 1. Benzilizokinolin alkaloidler

İzokinolinde 1. karbona benzil grubunun bağlanmasıyla benzilizokinolin oluşur.

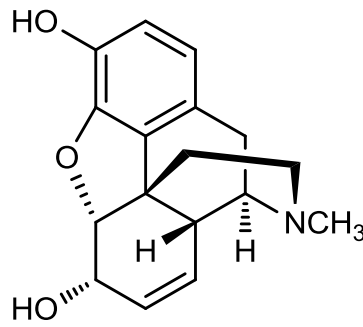
Opium alkaloidleri afyonun ham madde kaynağı olan haşhaştan (*Papaver somniferum*) elde edilir. Haşhaş çok sayıda alkaloid içermektedir. Bilinen opium alkaloidlerinden 4'ü tıbbi alanda kullanılmaktadır. Bunlar; benzilizokinolinden türeyen papaverin, fenantrenden türeyen morfin ve kodein ve de ftalidizokinolinden türeyen noskapin (narkotin)'dir.

Papaverin yapısal olarak basit afyon alkaloidlerinden biridir ve benzilizokinolin alkaloid grubuna girmektedir (Şekil 2. 20.). Bu alkaloid haşhaştan elde edilmektedir Haşhaştta bu alkaloid % 1 oranında bulunmaktadır. Papaverin antispazmodik (spazm giderici) olarak tıpta kullanılmaktadır [33, 42].



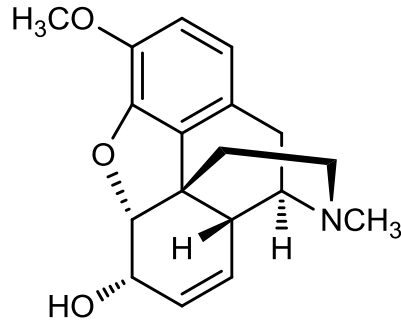
Şekil 2. 20. Papaverin

Morfin yapısal açıdan bakıldığında, bir fenantren türevidir olarak kabul edilebilir (Şekil 2. 21.) ancak biyosentez çalışmaları göstermiştir ki bu alkaloid tirozinden benzilizokinolin alkaloid olan retikulin yoluyla oluşmuştur. Morfin afyonun ana alkaloididir ve % 10-20 arasında miktar olarak bitkide bulunmaktadır. Fenolik karakteri sayesinde diğer alkaloidlerden nispeten daha kolay ayrılabilir. Morfin çok etkili bir analjezik (ağrı kesici) olarak kullanılan ve bağımlılık yapma riski olduğu için büyük bir dikkatle alınması gereken bir alkaloiddir. Morfin bir narkotik olarak sınıflandırılabilir. Morfin, analjezik etkisine ek olarak aşırı mutluluğa neden olur ve bağımlılık yapar. Tekrar kullanımda aynı etkiyi meydana getirmek için alım dozunun artırılması gerekir ve hasta ilaç olmadan yapamaz hale gelir. İlaç alınmazsa vücut yoğun tepki verir. Kişi yaşamak için ne pahasına olursa olsun ilacı almak ister [44, 45].



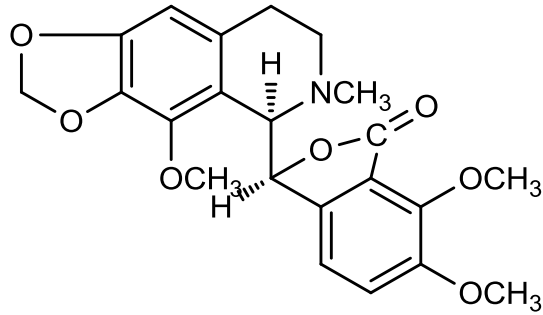
Şekil 2. 21. Morfin

Kodein afyonun başka bir bileşenidir ve % 0.8–2.5 oranında miktar olarak bulunmaktadır fakat kodein morfinin metilasyonu ile hazırlanmaktadır (Şekil 2. 22.). Kodein aynı zamanda bir anajeziktir ama morfinden çok daha zayıf etkisi vardır. Kodeinin analjezik etkisini arttırmak için asetil salisilik asit gibi diğer analjezik bileşikler kullanılır ve kodeinin büyük çoğunluğu bu amaç için kullanılır. Kodein aynı zamanda bir anti-tussif (öksürük ilacı)'dir. Bağımlılık riski morfinden çok daha azdır [33].



Şekil 2. 22. Kodein

Noskapin % 4–8 oranında afyon bitkisinde bulunmaktadır (Şekil 2. 23.). Bu alkaloid öksürük refleksini durdurup, öksürüğü azaltmak için kullanılır. Noskapinin eforik (mutluluk verici) etkisi yoktur [33].

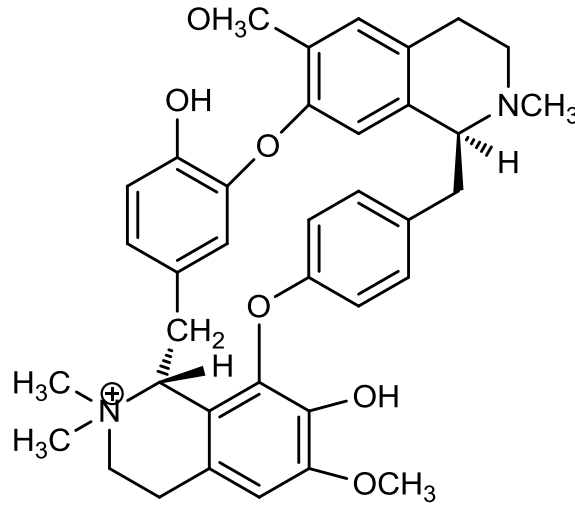


Şekil 2. 23. Noskapin

2. 3. 6. 6. 3. Bisbenzilizokinolin alkaloidler

Bu grup alkaloidlere çoğunlukla Menispermaceae familyasındaki bitkilerde rastlanmıştır. Benzilizokinolin oksidatif dimerizasyon ile oluşan bu grup alkaloidlerde bazen 1, bazen 2 ve bazen de 3 eter bağı bulunmaktadır. Alkaloidlerin bu sınıfının 270'den fazla üyesi bilinmektedir. Birçoğu kas gevşetici, antihipertansif ilaçlar, antimalaryaller (sıtma ilaçları), sitotoksin (hücre zehirleyici) gibi farmakolojik açıdan aktif maddelerdir. Yapısal değişimler fenil halkası üzerindeki substitüent değişimleri ile olur [33, 46].

Tubokürarin bu alkaloid sınıfına girmektedir ve ilaç olarak kullanılan bir alkaloiddir (Şekil 2. 24.). Bu alkaloid Güney Amerika'da yerliler tarafından ok zehiri olarak kullanılan kürardan izole edilebilir. Tubokürarindeki isokinolin halka sistemindeki iki azot atomundan biri kuarternerdir. Bu alkaloid motor sinir hücresi uçlarındaki asetilkolin reseptörlerinin bloke edilmesi ile (anestetik madde ile sinirsel iletimin kesilmesi) kasların gevşemesine neden olur. Etkisi sınırlı bir süre içindir ve bu bileşik cerrahi operasyon sırasında kasların gevşemesi için kullanılmaktadır [33].



Şekil 2. 24. Tubokürarin

Kürar Güney Amerika'da yerlilerin kullandığı çoğu bitkisel ve bazen de hayvansal zehirleri içeren bir ekstredir. Yerliler tarafından ok zehiri olarak kullanılmaktadır. Bu drogun hazırlanmasında başlıca kullanılan bitki familyaları Loganiaceae ve Menispermaceae'dir.

Kürar ekstresi yukarı Amazon (Brezilya ve Peru) bölgesinde yetişen Menispermaceae familyasına ait bitkilerden elde edilir. Bu bitkilerden elde edilen başlıca alkaloid ise tübokürarin dir. Drogun elde edilmesi için bitkiler taze halde iken toplanır ve gövde kabukları, bazen de kök kabuğu soyulur, yılan, karınca gibi o bölgede yetişen zehirli bazı hayvanların zehirleri de buna ilave edilir ve soğuk su ile maserasyon (ıslatarak yumuşatma) yapılır. Bu maserat hafif ateşte yoğunlaştırılır ve böylece yumuşak ekstre hazırlanmış olur [47].

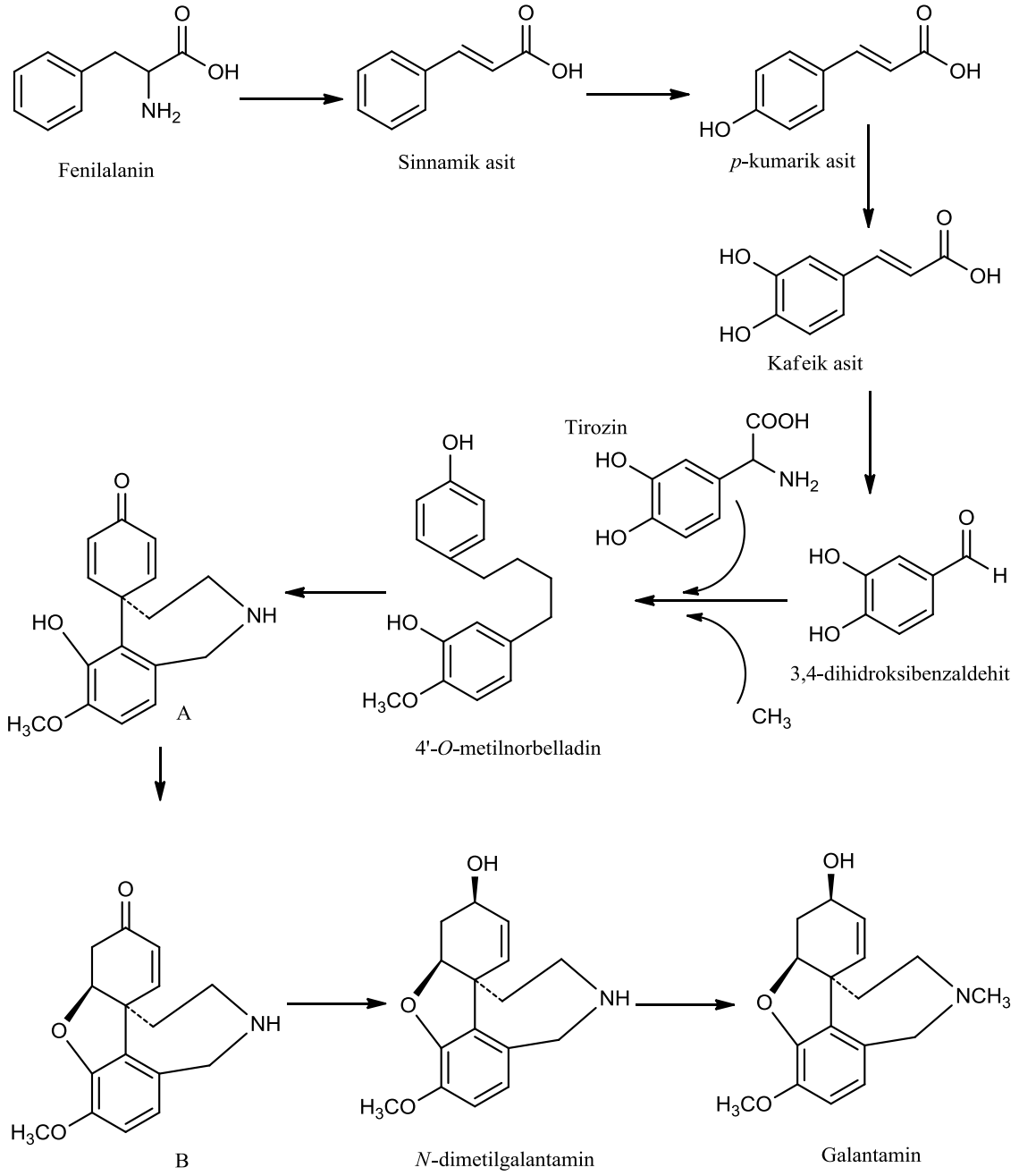
2. 3. 6. 7. Amaryllidaceae alkaloidleri

Amaryllidaceae (Nergisgiller) familyasına ait bitkilerde bulunan alkaloidler bu sınıfa girer. Birçoğu nergis ve kardelen türevi süs bitkileridir. Yüzden fazla alkaloid bu familyadan izole edilmiştir. Bu alkaloidler toksik özellik gösterirler. Yalnızca galantaminin ilaç özelliği keşfedilmiştir. Galantamin ilk olarak kardelen çiçeğinin (*Galanthus*) soğanından izole edilmiş ve Amaryllidaceae familyasının cinsine ait bir alkaloidtir. Galantamin *Leucojum astevium* bitkisinin çiçek ekstresinde % 2 oranında bulunur. *Narcissus pseudonarcissus* bitkisi galantaminin ticari kaynağıdır. 1997 yılında % 18 verimle sentezlenerek patenti alınmıştır fakat sentetik olarak üretimi henüz gerçekleşmemiştir.

2. 3. 6. 7. 1. Amaryllidaceae Alkaloidlerinin Biyosentezi

Galantaminin yapısı incelendiğinde C₆C₂-N-C₁C₆ türünde bir öncü bileşiğin oksidatif intramoleküler kenetlenme ürünü olan A molekülünü oluşturması ile başladığı görülmektedir. (Şekil 2. 25)'de galantaminin biyosentezi gösterilmiştir. Tirozin molekülü C₆C₂ ünitesini taşıırken, N-C₁C₆ fenilalanininden gelmektedir. Fenilalanin sinamik asit ve kumarik asit yoluyla kafeik aside dönüşür. Bu molekülden iki karbon atomu eksilerek 3,4-dihidroksibenzaldehit oluşmaktadır. Sonra 3,4-dihidroksibenzaldehite metilasyon basamağı da içeren tirozin katılması sonucu 4-O-metilnorbelladin ürünü oluşmaktadır. Bu C₆C₂-N-C₁C₆ ürünü *orto* ve *para* kısımlardan gerçekleşen kenetlenme reaksiyonu ile dienon (A) ve eşzamanlı gerçekleşen bir halkalaşma reaksiyonu ile B bileşiği oluşmaktadır. Son olarak B bileşiği indirgenerek N-dimetilgalantamin ve ardından N-metillenmiş bir ürün olan galantamine indirgenmektedir [48].

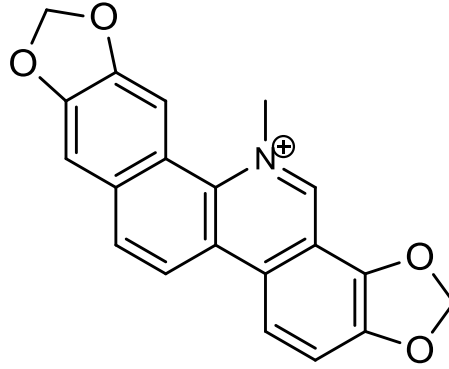
Galantamin Alzheimer hastalığında kullanılan asetilkolinesteraz inhibitörüdür. Alzheimer hastalığında hafıza kaybının nedeninin beynin korteks ve hippocampus bölgesinde yer alan kolinerjik nöronlarla alakalı olduğu bilinmektedir. Kolinerjik transferin bozulması asetilkolin miktarının ve dolayısıyla nörotransmitterlerin eksikliği ile sonuçlanmaktadır. Alzheimer hastaları üzerine yapılan mevcut çalışmalarda sadece AChE inhibitörleri gelişme göstermiştir. Galantamin tersinir yarışlı asetilkolinesteraz inhibitörüdür ve potansiyel olarak iki hareket mekanizması vasıtası ile beyinde kolinerjik fonksiyonu geliştirir. İlki enzimi inhibe ederek olur, ikincisi ise asetilkolin reseptörlerini etkileyerek gerçekleşir. Doğu Avrupa'da galantamin anesteziik uygulamalarda hastayı ayıltmak için kullanılır çünkü tubokarinin anesteziik etkisini nötralize etmektedir. Ayrıca galantaminin hafif derecede güçlendirici ve morfin gibi analjezik etkisi olduğu görülmüştür. Göz ameliyatlarında göz içindeki basıncı düşürdüğü bilinmektedir [49].



Şekil 2. 25. Galantaminin biyosentezi

2. 3. 6. 8. Benzofenantridin alkaloidleri

Sanguinarin antibakterial özellikte bir alkaloidtir (Şekil 2. 26.). Diş macununda ve diğer oral hijyen ürünlerinde plak oluşumunu önlemek için kullanılmaktadır. Sanguinarin haşhaş, gelincik, Kaliforniya haşhaşından elde edilmektedir [33].



Şekil 2. 26. Sanguinarin

2. 3. 6. 9. Terpenoid tetrahidroizokinolin alkaloidleri

Bu alkaloidler Rubiaceae (kökboyası) familyasının *Cephaelis* cinsi bitkisinde rastlanan alkaloidlerdir. Terpenoid kısmı iki tetrahidroizokinolin halkasını birleştiren kısımdır. Emetin, sefalin *Cephaelis ipecacuanha* ve *Cephaelis acuminata* bitkilerinden elde edilmektedir. Emetin amiplerin neden olduğu dizanterinin tedavisinde kullanılmaktadır. Bu hastalığın nedeni tropikal bölgede yaşayan *Entamoeba histolytica* isimli tek hücrelidir. Emetin ciddi yan etkilerinden dolayı günümüzde az kullanılmaktadır. Emetin ve sefalin kusturucu ilaçlardır. *C. ipecacuanha* bitkisi Brezilya'nın Mato Grosso eyaletinde yetişir. Kökleri yağmurlu günler hariç tüm yıl boyunca toplanır. Ancak en iyi ilaç bitkinin 3-4 yaşındaki halinden elde edilmektedir. *Cephaelis ipecacuanha*'nın Hindistan'daki çeşidi *Rio ipecacuanha* adını alır, Kuzey Kolombiya, Nikaragu ve Panama'da yetişeni *Cartagena ipecacuanha* adını almaktadır. *Rio ipecacuanha* % 2 oranında alkaloid içerir ve Emetinin, Sefaline oranı 2:1 dir. *Cartagena ipecacuanha* % 2-2,5 oranında alkaloid içerir ve Emetinin Sefaline oranı 1:2 dir. *Cephaelis ipecacuanha* ise emetinin ekstraksiyonu için kullanılır [33].

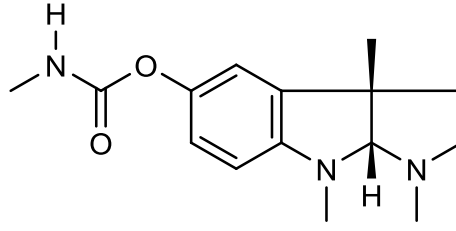
2. 3. 6. 10. İndol alkaloidler

İndol iskeleti taşıyan alkaloidler bu sınıfa girerler. Triptofan türevi bileşiklerdir, triptofan dışında kalan 5 karbonlu ya da 9 karbonlu kısımların biyosentezi ise mevalonik asit aracılığı ile olmaktadır [50].

2. 3. 6. 10. 1. Basit indol alkaloidler

Psilobisin ve psilosin alkaloidleri bunlara örnektir ve *Psilocybe* türü halusinojen mantardan izole edilmişleridir. Orta Amerika'da yaşayan yerliler çok eskiden beri dini inançlarını kültür ve geleneklerini sürdürmüşlerdir. Yerliler mantarı dinsel törenlerde Tanrılar ile iletişim kurmak amacıyla ayrıca çeşitli hastalıkların tedavisinde ve alkol zehirlenmelerinde kullanılmaktadırlar. 3000 yıllık geçmişi olan Guatemala'daki halusinojenik mantarın dinsel törenlerde büyük rolü olduğu kesinleşmiştir. Bu mantara taş mantar denir ve zehirli, şapkalı mantarlardır. Üzerlerinde oyulmuş tanrı ya da iblise benzer figürler yer almaktadır. Meksika'nın güneyindeki bazı eldeğmemiş bölgelerde halen yerlilerin büyü ayinlerinde *Psilocybe* mantarı kullanılmaktadır. Psilosibin ve psilosinin farmakolojik etkilerinin benzer olduğu ancak kimyasal olarak psilobisinin daha kararlı olduğu görülmüştür. Bu alkaloidler ilaç olarak kullanılmamaktadır. Ancak LSD'de (Liserjik asit dietilamid) olduğu gibi psilosibin psikiyatride terapötik olarak test edilmiş ve bazı model ruh hastalıklarında araştırma amaçlı incelenmiştir.

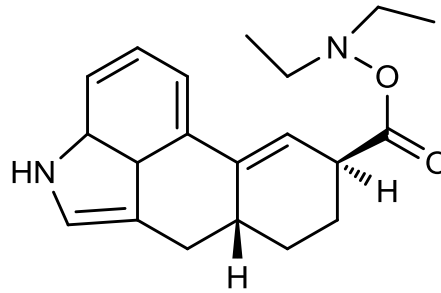
Fizostigmin bu sınıfa diğer bir örnektir (Şekil 2. 27). Kalaba fasulyesi denilen *Physostigma venenosum*'dan elde edilir, kararsızdır, ışıksız ve hava geçirmeyen ortamda saklanmalıdır. Tersinir AChE inhibitörüdür, glukom hastalığında ortaya çıkan ağzı kuruluğunu giderici olarak pilokarpin adı altında kullanılmaktadır. Hiyosiyamin, atropin ve skopolamin gibi antikolinergik zehirlere karşı panzehir olarak kullanılır. Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılır ancak başarı sınırlıdır [33].



Şekil 2. 27. Fizostigmin

2. 3. 6. 10. 2. Terpenoid indol alkaloidleri

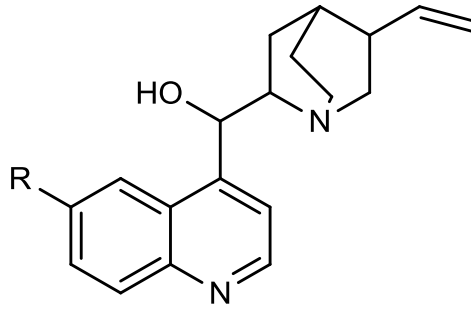
Ergot alkaloidleri bu sınıfa örnek verilebilir. Ergot alkaloidleri *Claviceps purpurea* (çavdarmahmuzu) adındaki mantardan izole edilen indol türevi D-liserjik asitin amidleri olan alkaloidlerdir. Bu asit kolayca D-isoliserjik aside dönüşür bu yüzden mantar D-liserjik asit ve D-isoliserjik asitten türeyen iki grup alkaloid içerir. Liserjik asit alkaloidleri *Clavisepts* cinsi mantardan ve *Araliaceae* familyasının üyelerinden örneğin; çan çiçeği denen *Ipomoea violacea*'dan ve yılbaşı sarmaşığı olarak bilinen *Rivea corymbosa*'dan izole edilir. Bu tür bitkilerin tohumları liserjik asit amid (ergine) içerdiklerinden LSD (Şekil 2. 28.) gibi uyuşturucu olarak kötüye kullanılmaktadır ancak LSD ye göre etkisi azdır. Ergotamin, ergokristin, α ve β -ergokriptin ve ergokornin alkaloidleri amino asit içeren halkalı tripeptitlerdir [51].



Şekil 2. 28. Liserjik asit dietilamit (LSD)

2. 3. 6. 11. Kinolin alkaloidleri

Kınakına ağacından elde edilen alkaloidlerdir. Kinidin ve kinin alkaloidleri merkezde kinolin halkası bulundurmaktadır (Şekil 2. 29.). Monoterpenoid iskeleti ve triptofan aminoasitinden üretilen alkaloidlerdir. Aşk ağacı denen corynanthenin benzeri alkaloidleri içerirler. Kınakına ağacının kabukları yaklaşık 25 alkaloid içerir. Bunlar kinin ve kinidinin stereoizomerleridir. Diğer iki stereoizomer sinkonin ve sinkonidindir. Yapısına bakıldığında merkezde kinolin vardır, kinin ve kinidinden farklı olarak 6. karbondan bir metoksi grubu eksiktir. Kinin ve kinidin ile sinkonin ve sinkonidinin farkı ise OH grubunun stereoizomerik olarak farklılık göstermesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2. 29.). Kinin sıtma tedavisinde kullanılır, kinidin de sıtmaya karşı aktiftir ancak daha çok kalpteki ritim bozukluğunda tedavi amaçlı kullanılır [33].



R: OCH₃ kinin ve kinidin

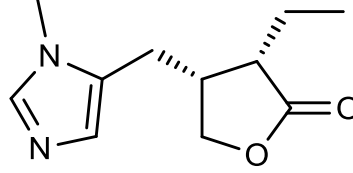
R: H sinokinin ve sinokinidin

Şekil 2. 29. Kinolin alkaloidleri

2. 3. 6. 12. İmidazol alkaloidler

Pilokarpin *Pilocarpus* türünün yapraklarında bulunmaktadır (Şekil 2. 30). Kolinergik bir madde olup hidroklorür ya da nitrat halinde glokom hastalığı tedavisinde göz damlası olarak kullanılmaktadır. Pilokarpinin biyosentezi bilinmemektedir ancak imidazol kısmının histidin aminoasidinden elde edilmiş olma olasılığı vardır. Jaborandi *Pilocarpus* türlerinin genel adıdır. Bu bitkinin ağaçları Orta ve Güney Amerika'da ve Batı Hindistan'da doğal olarak yetişmektedir. Pilokarpinin elde edildiği en önemli tür olan *P. microphyllus*

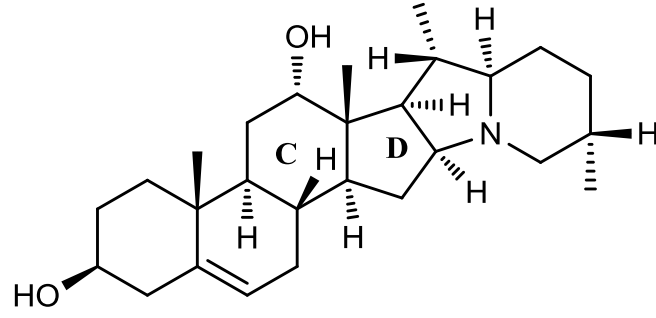
Brezilya’da yetişmektedir ve “Maranham jaborandi” adı altında ilaç olarak satılmaktadır. İlaç % 0.7- 0.8 oranında pilokarpin içerir, pilokarpin kaynağı olarak kullanılır. Jaborandinin diğer çeşitleri daha büyük yapraklıdır ve piyasada mevcuttur. Fakat diğer ilaca göre daha az miktara, % 0.5-0.7 oranında alkaloid içerir [33].



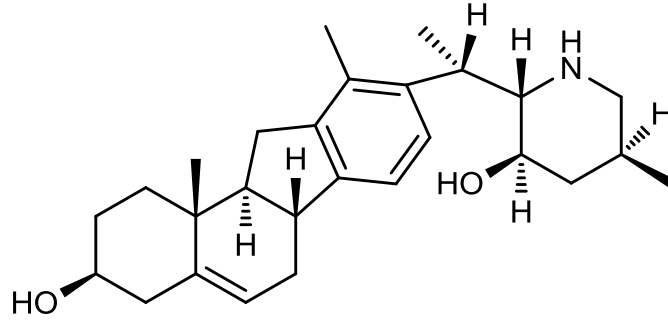
Şekil 2. 30. Pilokarpin

2. 3. 6. 13. Steroidal alkaloidler

Veratrum album ve *Veratrum viride* bitkilerinden elde edilen alkaloidlerdir. Bazılarında normal steroid iskeleti vardır bazıları da modifiye olmuş C ya da D halkası ile farklı bir steroid iskeletine sahiptirler. Rubiverjin normal steroid iskeletine sahip alkaloidlerden biridir. Veratramin ise steroid iskeleti değişime uğramış alkaloidlere örnek verilebilir (Şekil 2. 31.).



Rubijervin



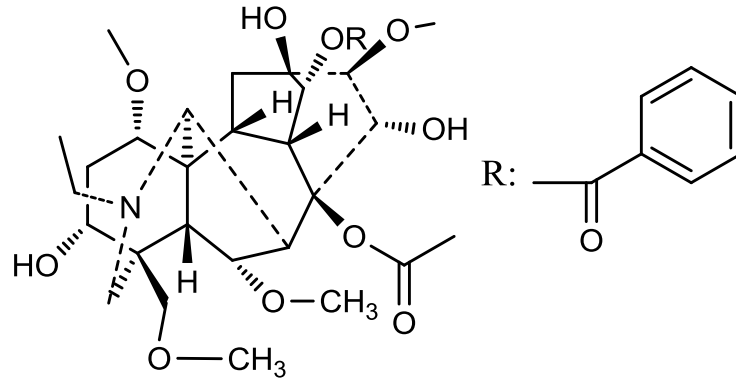
Veratramin

Şekil 2. 31. Steroidal alkaloidler

2. 3. 6. 14. Akonitum alkaloidleri

Aconitum alkaloidleri *Aconitum*, *Delphinium*, *Garrya* ve *Inula* türlerinde bulunan diterpen yapısındaki alkaloidlerdir.

Akonitin bu alkaloid sınıfına ait alkaloidler arasında tıbbi açıdan ilginç olan tek alkaloidtir (Şekil 2. 32.). Akonitin alkamin aconine bileşiğinin asetik ve benzoik asit ile esterleştiği bir ester alkaloididir ve oldukça toksik özelliktedir. Bir insan için ölümcül dozu 3-6 mg'dır. Etkisi merkezi ve çevresel sinir sisteminedir. Önce uyarıcı etkisi vardır sonra felç eder. Bu etkisi yüzünden bitkinin kökleri, yüzde anlık, bıçak saplanır gibi veya ağrılara neden olan trigeminal nevralji hastalığının tedvisinde harici ağrı kesici merhem olarak kullanılmaktadır.



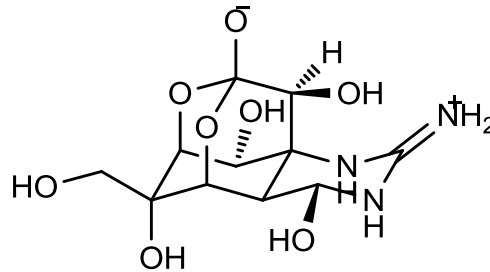
Şekil 2. 32. Aconitin

Aconite kökü: Türkçesi bıldırcın otu köküdür. 0.5-2 metre boyundadır. Avrupa’da dağlık bölgelerde yetişir. Bahçede süs bitkisi olarak kullanılır. % 0.5-1.5 oranında alkaloid içerir [32].

2. 3. 6. 15. Guanidinyum alkaloidleri

Bu alkaloidler yapılarında protone olmuş bir guanidin kısmı bulundurulur.

Tetradotoksin bu alkaloidlere örnektir (Şekil 2. 33.). İlk kez Japon kirpi balığı *Takifugu*’dan izole edilmiştir. Hayvanın karaciğerinde, yumurtalık veya testisinde oluşur. Bu organlar balık tüketilmeden önce dikkatlice çıkarılmalıdır. Ancak bu balık türünün tüketimi ciddi bir tehlike oluşturur, zehirlenmeyle birlikte çoğunlukla ölümlere yol açmaktadır. Tetradotoksinin aynı zamanda yengeç, amfibi, salamander, kurbağa gibi diğer birçok deniz canlısında da bulunur. Tetradotoksinin biyosentezi bilinmemektedir ancak arginin aminoasidinin öncü molekül olduğu ve isopentil difosfat yolu ile oluştuğu tahmin edilmektedir [33].



Şekil 2. 33. Tetradotoksin

2. 4. Ayırma ve Saflaştırma Metodları

Bu aşamada üzerinde işlem yapılacak olan moleküllerin diğer moleküllerden ayrılıp saf bir şekilde elde edilmesine yönelik bir seri işlem uygulanır. Bu ayırma işlemleri, molekül gruplarının genellikle çözünürlüklerine, yoğunluğuna, elektriksel yük gibi fiziksel karakteristiklerine veya diğer moleküller ile etkileşimlerine göre birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan yöntemleri kapsar.

Bitki kimyası çalışmalarında izlenen yöntem aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Bitkilerin çiçeklenme döneminde toplanarak, teşhisi.
- Bitkilerin gölgede kurutulması ve toz haline getirilmesi.
- Bitkilerin uygun çözücülerle ekstraksiyonu.
- Hazırlanan ekstrelerden çeşitli kromatografik (kolon, ince tabaka ve preparatif ince tabaka) yöntemlerle organik bileşiklerin izolasyonu.
- Elde edilen maddelerin çeşitli spektroskopik yöntemlerle (IR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, MS) yapılarının tayini.
- Bitki ekstraktlarının ya da ekstraktlardan elde edilen saf maddelerin aktivite (antibakteriyel, antiviral, antimalarial, antikolinesteraz, antifungal, sitotoksik, anti tümör v.b.) tayini.

2. 4. 1. Ekstraksiyon Teknikleri

Bitki örneklerinden bileşiklerin izole edilmesi genellikle seçici ekstraksiyon yöntemiyle yapılır. Bu yöntemle bileşikler, bitki örneğinden farklı çözücülerle, polaritenin artış sırası ile ardarda ekstraksiyon yapılarak izole edilirler. Böyle bir ekstraksiyon yapılırken, bitki örneğini lipofil karakterli bileşiklerden (klorofil, karotenoidler, steroller, yağlar, vakslar vb.) arıtmak için önce petrol eteri veya hekzan gibi apolar çözücüler ile işlem yapılması gerekir. Daha sonra bitki kalıntısı artan polaritede çözücülerle; diklorometan, etil asetat, etanol veya metanol ve bunların farklı konsantrasyonlarla sulu çözeltileri ile konsantrasyon artırılarak ekstrakte edilir.

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

2. 4. 2. Alkaloidlerin Belirlenmesi ve İzolasyonu

Çoğu alkaloid bitkilerde tuz formunda bulunurlar. Su ya da sulu etanol içerisinde nispeten çözünse de kloroform, toluen, eter gibi organik çözücüler içerisinde çözünmezler. Ancak baz formunda çözünürlüğü tam tersidir. Alkaloid bazları suda çözünmez, etanolde kısmen çözünürler, organik çözücülerde ise kolaylıkla çözünürler. Çözünürlükteki bu fark bitkilerde alkaloidlerin tespiti ve izolasyonu için kullanılmaktadır. Bitkide alkaloid varlığını belirlemek için yapılan testte bitkinin su ya da etanol ekstresine amonyak veya NaOH gibi bir baz ilave ederek kloroform gibi su ile karışmayan bir çözücü ile ekstrakte edilmektedir. Evaporatör yardımıyla çözücü uzaklaştırıldıktan sonra kalan tortu seyreltik asit ile çözülerek birkaç damla Mayer's reaktifi (potasyum civa iyodür) ilave edilir bu işlem sonunda çökelme gözlenmesi alkaloidlerin varlığını gösterir. Organik ekstreden TLC üzerine bir noktaya ekilerek uygun çözücü karışımı ile yürütülür ve Dragendroff's reaktifi ile boyanarak kurutulur. Alkaloidler TLC tabakası üzerinde turuncu spotlar olarak gözlenmektedir. Kafein gibi pürin bazlarında alkaloid çökeltme reaktifleri tarafından çökelme olmaz. Bu tür alkaloidler mureksid testi ile tespit edilir. Az miktarda potasyum klorat ve bir damla hidroklorik asit ilave edilerek baz ile karıştırılır oluşan karışımın çözücüsü kuruyana dek evaporatörde uçurulur. Oluşan tortu amonyak buharına maruz bırakılır ve mor bir renk verir.

Yapısında kuarterner azot bulunduran alkaloidler genellikle bazik pH değerine sahip sulu çözeltiden bile organik bir çözücü ile ekstrakte edilemez. Bu gibi alkaloidler yukarıdaki yönteme göre tespit edilemezler ancak doğrudan sulu ya da etanolik ekstre Mayers' reaktifi ya da amonyum reinecke tuzu ile çöker. Ancak ekstrakt aynı zamanda çökelti verecek bir protein içeriyorsa yanlış sonuçlar elde edilebileceği dikkate alınmalıdır. Proteinleri ortadan kaldırmak için önceden denaturasyon sıcaklığını test etmek gerekir. Kolin içeren pek çok bitki ekstresi de bu reaktifler ile çökebilmektedir.

Alkaloidler bitkiden izole edilen doğal ürünlerdir ve diğer gruplara göre elde edilmesi nispeten daha kolay olduğu için üzerinde daha fazla çalışılmaktadır. Alkaloidlerin izolasyonu içeriğinin saptanması için yukarıda tarif edildiği gibi aynı prensibe göre gerçekleşir: Toz haline getirilmiş bitki materyali su ile nemlendirilir ve kalsiyum hidroksit ile karıştırılır ve alkaloid tuzları oluşur sonra tuzlar serbest bazlara dönüştürülür. Alkaloidler organik çözücü ile karışımdan ekstrakte edildikten sonra, elde edilen saf haldeki ekstre seyreltik asit ile asitlendirilerek alkaloidler tuzları haline getirilir. Bir sonraki aşamada aynı işlem

tekrarlanarak sulu faza daha fazla alkaloid geçmesi sağlanır ve tekrar organik çözücü ile ekstraksiyon yapılır. Evoparatör yardımı ile çözücü uçurulur. Bu metodta alkaloidlerin serbest bazlara dönüştürülmesi için amonyak ya da sodyum karbonat kullanılır. Kullanılacak organik çözücünün seçimini etkileyen çeşitli faktörler vardır. Alkaloidler için en iyi çözücüler; kloroform, eter, etilasetat, benzen, toluen, petrol eteridir. Kloroform çoğu alkaloid bileşiği için mükemmel bir çözücüdür fakat istenmeyen maddeleri çözer ve diğer çözücülere göre daha pahalıdır. Bu yüzden ekstraksiyon işlemi sırasında çok az tercih edilir. Sonraki aşamada alkaloid tuzları baz ile sulu faza geçerler ayrıca bu aşamada alkaloidlerin büyük bir kısmı ve alkaloid benzer maddeler sulu faza geçer. Bu metod ile alkaloidlerin büyük bir kısmı az miktarda çözücü kullanılarak elde edilmiş olur. Bir sonraki basamakta alkaloid ekstresi bileşenlerine ayrılır. Bu işlem oldukça zordur çünkü karışım oldukça kompleks bir yapıdadır. Endüstriyel ölçekli çalışıldığında alkaloidlerin bazları ya da tuzları ham ekstreden fraksiyonlar halinde izole edilebilmektedir. Bu sırada kromatografik ayırma metodlarına başvurmak gerekir. Kuartern azot içeren alkaloidlerin dışında fenolik, N-oksit alkaloidler bu yöntem ile izole edilemezler. Fenolik alkaloidler yüksek pH değerine sahiptir ve fenolatlara dönüştürülürler. Organik çözücü ile ekstrakte edilemezler. Güçlü bazların ilavesi ile tuzları elde edilir. Fenolatların yapılarının bozulmaması için ekstraksiyondan önce pH değerinin azaltılması gerekir. N-oksit alkaloidler benzerlerine göre daha polardır, organik çözücü ile ekstraksiyonu oldukça zordur. Etil asetat ya da kloroformla ekstrakte edilirler fakat dietileter gibi daha az polar çözücü ile edilemezler [52].

2. 4. 3. Kromatografik Analiz Yöntemleri

2. 4. 3. 1. Kağıt Kromatografisi

Kromatografik incelemelerde kullanılan kağıt türünün özelliği oldukça önemlidir. Bu nedenle kağıt kromatografisi tekniğinde saf olmasından dolayı selüloz filtre kağıdı kullanılır.

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

Kağıt kromatografisi ile bir karışımın bileşenlerine ayrılmasına etki eden faktörlerden

birisi de kullanılan çözücü sisteminin özellikleridir.

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

Kromatograma UV ışığında bakılması lekelerin yerlerinin belirlenmesini sağlar. Alkaloidler genellikle UV ışığında 254 nm’de görülür ve mor renklidir.

2. 4. 3. 2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinin yapılış tekniği kağıt kromatografisine benzer. Bu kromatografi türünde sabit faz olarak silika jel (SiO_2), alüminyumoksit (Al_2O_3), toz selüloz gibi maddeler kullanılır. Burada etkin mekanizma adsorbsiyondur. TLC de özel olarak hazırlanmış cam, alüminyum veya plastik levhalar kullanılır. Bu levhaların üzeri silika jel, alümina gibi bir adsorbanla kaplanır. Bu plakalar hazır olarak satılabildiği gibi laboratuarda da hazırlanabilir. Cam levhaların boyutları 5x20 cm ile 20x20 cm arasında değişir. Adsorblayıcı tabakanın kalınlığı yapılacak analizin cinsine göre değişir, bu kalınlık 0.25-2 mm arasındadır. Plakalar kullanılmadan önce 120 °C’deki etüvde 2 saat kurutulularak aktifleştirilir ve hemen kullanılır.

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

2. 4. 3. 3. Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Silika jel kaplı alüminyum plaklar miktarı az olan fraksiyonları ayırmak için kullanılır. Karışım halde bulunan fraksiyonlar miktarlarına göre (1 plağa ortalama 15-20 mg) plaklara tatbik edilirler ve uygun çözücü sistemleri ile bileşenlerine ayrılırlar. Her fraksiyon için farklı çözücü sisteminde denemeler yapılarak fraksiyondaki maddelerin en iyi ayrıldığı sistem

bulunur. UV (254 nm) ışık altında maddelere ait bantlar işaretlenir ve tabaka üzerinden kazınarak erlenlere aktarılır. Uygun çözücü ile erlende 15–30 dakika bekletilen maddeler süzülerek alınır ve çözücülerini uçurularak saflaştırılırlar.

2. 4. 3. 4. Kolon Kromatografisi

Bitkilerden elde edilen ekstraktlardan istenmeyen maddelerin uzaklaştırılması, bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bileşiklerin mg miktarlarda saf olarak elde edilmesi için kolon kromatografisi yöntemi kullanılır. Kolon kromatografisinde, selüloz, iyon değiştirici reçineler, silika jel, poliamid ve sefadeks gibi adsorbanlar kullanılır. Kolon kromatografisinde kullanılan bazı adsorbanların özellikleri aşağıda verilmiştir.

Silika jel: Silika jel kolonlar çoğu alkaloid bileşiğini ayırmak için uygundur. Silika jel kolon dışında alümina kolon da kullanılabilir. Alkaloidler diklorometan ve etanol gibi organik çözücülerde çözünürler fakat suda çözünmezler. En yaygın olarak kullanılan silika jel adsorban Kieselgel 60, 70-230 mesh (Merck) tir [53].

Selüloz: Selüloz kolonda solvent kullanımına bağlı olarak adsorbsiyon ve partiyon kromatografisi uygulanabilir. Selüloz kolonun sınırlı ayırma kapasitesini arttırmak için silika jel-selüloz (1:1; w/w) karışımı kullanılabilir [54]. Selüloz kolondan elüsyon kağıt kromatografisinde uygulanan çözelti sistemleri ile yürütülebilir ya da farklı oranlarda metanol ve su içeren çözücü sistemleri kullanılır. Selüloz adsorbanların en yaygın olanları mikrokristal selüloz (Merck, Macheray ve Nagel) ve Whatman CF-11 dir.

Poliamid: Poliamid kolonlar fenolik bileşiklerin diğer bitki metabolitlerinden ayrılmasında kullanılan diğer bir seçenektir, alkaloidlerin ayrılmasında tercih edilmez. Polikaprolaktam, polihekzametilen diamidoadipinat, polivinilpirolidon gibi poliamid reçineler kullanılır. Poliamid adsorbanların diğer adsorbanlar karşısındaki bazı üstünlükleri yüksek adsorban yeteneği ve elüsyonda basit çözücü sistemlerinin kullanılmasıdır. Genellikle ilk sırada su, sonra su-alkol karışımları ve sonunda saf alkoller kullanılır. Bu kolonların tek dezavantajı kolon kullanımdan önce yıkanmaz ise çözünebilir poliamid fraksiyona bulaşabilir. Poliamid kolonlar kullanımdan sonra da yıkanarak tekrar kullanılması sağlanabilir [55].

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

Sefadeks jel: Genellikle sefadeks LH-20 kullanılır fakat LH-60 ve G-25 sefadekslerin kullanımı da yaygındır. Kolon kromatografisi, TLC veya kağıt kromatografisi yoluyla izole edilen maddeler genellikle adsorbandan kaynaklanan kirlilikleri de taşırlar. Fakat sefadeks LH-20 kolonlar elüsyon sırasında kirlilik taşımazlar bu yüzden son saflastırma işlemleri için uygundurlar [56]. Alkaloidler sefadeks kolonda ayırabilmek için n-butanol-asetikasit-su-metanol çözücü sistemi kullanılabilir. n-butanol-asetikasit-su-metanol (10:10:90:15) oranından artan oranda metanole gidilir [57].

2. 4. 3. 5. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)

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

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

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

2. 5. Yapı Açıklama Metodları

2. 5. 1. Ultraviyole Spektroskopisi

Görünür bölge ve mor ötesi (UV-VIS) spektroskopisi moleküllerdeki elektronik geçişlerin verdiği spektrumları konu alır ve ikisi birden elektronik spektroskopi olarak adlandırılır. Elektronik spektrum 100-700 nm aralığını kapsar; 100-200 nm aralığı vakum UV, 200-400 nm aralığı UV (veya yakın UV) ve 400-700 nm aralığı görünür bölgedir. Bir bileşik görünür bölgede absorpsiyon yaparsa renklidir ve absorbladığı rengin tamamlayıcı renginde görünür. Ultraviyole spektroskopisi genellikle fenolik yapıların belirlenmesi ve yapı özellikleri hakkında önemli bilgiler verir. Alkaloidlerin UV özellikleri flavonoid benzeri yapılar kadar ayırt edici değildir. Galantamin türevleri UV bölgede 284 ile 290 nm aralığında absorpsiyon gösterirler [58, 59].

2. 5. 2. İnfrared Spektroskopisi

Infrared spektroskopisi, görünür ve mikrodalga bölgeleri arasındaki infrared bölgede, elektromanyetik dalganın moleküller ya da kimyasal gruplar tarafından soğurulmasını inceler. Bu yöntemle, bir organik bileşiğin yapısının buna bağlı olarak, kimyasal özelliklerinin aydınlatılması, yapı tayini, bağ titreşimleri ve ayrıca hidrojen bağlarının bulunması, bağ uzunlukları ve bağ açılarının bulunması mümkündür. İnfrared spektroskopisi tekniği, belirli dalga boylarında örnek hücrelerine giren ve çıkan ışınların şiddetlerinin karşılaştırılması ve dalga boylarına göre grafiğe geçirilmesi prensibine dayanır. İnfrared ışık soğurulması durumunda bir molekülün titreşim ve dönme enerji düzeylerinde değişiklikler meydana gelir [60].

2. 5. 3. ¹H-NMR Spektroskopisi

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

CDCl₃ düşük polariteli bileşikler için ideal çözücüdür. Genellikle C₅D₅N, DMSO-d₆, CD₃OD, D₂O, aseton gibi çözücüler alkaloid bileşiklerini çözmek için daha uygundur.

^1H -NMR spektrumu alkaloidlerin aromatik halka protonlarını ve sübstituentlerin durumunu gösterir. Aromatik halka protonları 5.00- 8.00 ppm arasında gözlenmektedir. Aromatik halkadaki orto etkileşimlerde $J=8-9$ Hz, meta etkileşimlerde $J=2-3$ Hz'dir. Metoksi grupları 3.8-3.9 ppm civarında singlet olarak görülür. Azota bağlı metil grubunun proton sinyali ise 2-3 ppm arasında singlet olarak görülmektedir.

2. 5. 4. ^{13}C -NMR Spektroskopisi

250 ppm'lik geniş bir alanda karbon sinyalleri gözlenir. Spektrumda; sp^3 karbonları ortalarında 76.8-67.1 ppm arasında, oksijene bağlı olmayan sp^2 karbonları ve aromatik halkaya bağlı karbonlar daha aşağıda bir alanda gözlenmektedir. Oksijene komşu sp^3 karbonları ise 101.5-100.7 ppm arasında çıkarlar. Azota bağlı olan metil karbonunun sinyali ise 40-45 ppm aralığında gözlenir.

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

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

İyonlaştırma kaynağı olarak kullanılan yöntemlerden biri, elektrosprey iyonlaştırmadır (ESI). ESI, atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşir. Numune çözeltisi, paslanmaz çelikten iğne şeklinde bir kapiler ile dakikada birkaç mikrolitre hız sağlanarak pompalanır. İğneye, etrafındaki silindirik elektroda göre birkaç kilovolt potansiyel uygulanır. Oluşan çok küçük ve elektrik yüklü damlacıklar, daha sonra bir çözücü giderme kapilerinden geçer. Burada çözücü buharlaşır ve elektrik yükleri analit moleküllerine tutunur. Çözücü buharlaşıp damlacıklar küçülürken yük yoğunluğu artar ve iyonlar, gaz fazına desorbe olur [61].

BÖLÜM 3

3. MATERYAL VE METOD

3. 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Hekzan (Teknik)

Aseton (Teknik)

Metanol (Teknik)

Metilenklorür (Teknik)

Etil asetat (Teknik)

Dragendroff's belirteci

Su (Grade)

Alumina (Merck Type 60)

Silika jel (Kiesel G, E. Merck Type 60)

$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

BChE

AChE

Asetiltiyokolin iyodür

Bütiriltiyokolin klorür

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

Sodyum fosfat tamponu (pH:8)

Galantamin

3. 2. Kullanılan Yöntemler

3. 2. 1. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi gerek ekstrelerin fraksiyonlandırılarak ayrılması gerekse saflaştırılması aşamasında kullanıldı. Adsorban olarak Merck Alumina, Merck silika jel (70-230 mesh), dolgu maddeleri kullanıldı. Silika jel adsorban diklorometan ile şişirildikten sonra cam kolona yerleştirildi. Aynı yöntem kullanılarak Alumina adsorban diklorometan ile şişirildikten sonra cam kolona yerleştirildi.

Ekstreler, miktarına uygun adsorbanla karıştırıldı ve çözücüsü tamamen uçurulduktan sonra kolonun üst kısmına yerleştirildi.

3. 2. 2. İnce Tabaka Kromatografisi

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

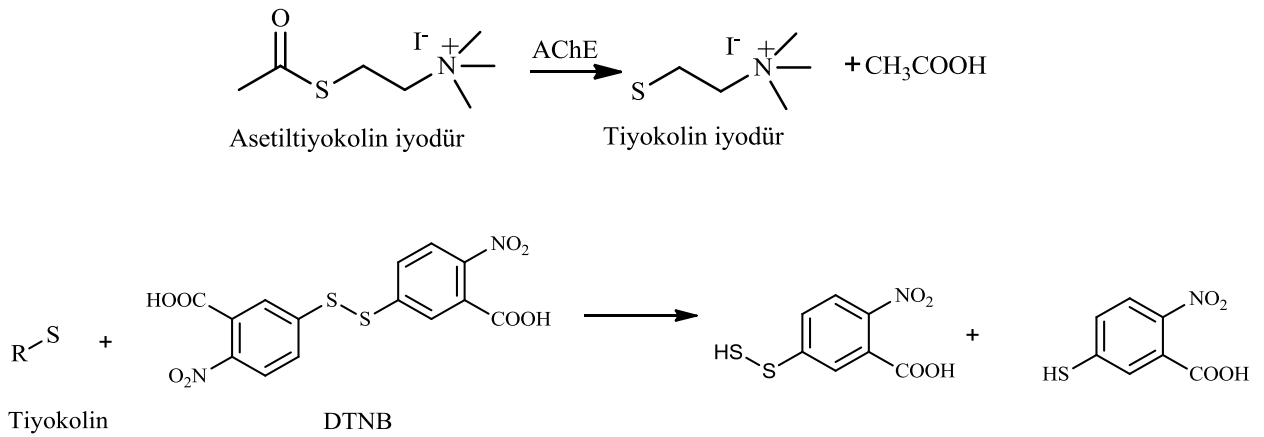
3. 2. 3. Enzim İnhibisyon Aktivitesi Çalışmaları

3. 2. 3. 1. Ellman Metodu

Asetil ve bütirilkolinesteraz inhibitör aktiviteleri Ellman tarafından geliştirilmiş olan spektrofotometrik metodun uygulanmasıyla ölçülmüştür [62]. Elektrik balığından elde edilen AChE ve at serumundan elde edilen BChE enzim kaynağı olarak, asetiltiyokolin iyodür ve bütiriltiyokolin klorür ise reaksiyonun substratları olarak kullanılmıştır. DTNB (5,5'-ditiyo-bis(2-nitrobenzoik) asit) kolinesteraz aktivitesinin ölçülmesi için kullanılmıştır. Kontrol ve test bileşiklerini çözmek amacı ile etanol çözücü olarak kullanılmıştır. 150 µL 100 mM sodyum fosfat tamponu (pH:8) farklı konsantrasyonlarda 10 µL etanolde çözünmüş örnek çözeltisi ve 20 µL AChE (5.32×10^{-3} U) veya BChE (6.85×10^{-3} U) çözeltileri karıştırılmış ve 25 °C de 15 dakika inkübe edilmiştir. Reaksiyon 10 µL asetiltiyokolin iyodür (0.7 mM) veya bütiriltiyokolin klorür (0.2 mM) eklenmesiyle reaksiyon başlatılmıştır. Bu substratların

hidrolizi ile oluşan tiyokolin ve DTNB'nin reaksiyonu sonucu sarı renkli 5-tiyo -2-nitrobenzoat anyonunun oluşumu 412 nm dalga boyunda absorbansın ölçülmesi ile spektrofotometrik olarak gözlenmiştir (Şekil 3. 1).

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



Şekil 3. 1. Elmann metodu

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

Fosfat Tamponu (pH 8): İki çözelti hazırlandı.

A Çözeltisi: 8.75 g sodyum fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 500 mL destile suda çözüldü.

B Çözeltisi: 13.6 g di-potasyum hidrojen fosfat ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 250 mL destile suda çözüldü. Bu iki çözelti karıştırıldı ve pH 8'e ayarlandı.

5,5'-ditiyobis 2-nitrobenzoik asit (DTNB) çözeltisi: 16 mg DTNB ve 7.5 mg NaHCO_3 'ün 4 mL fosfat tamponunda çözülmesiyle hazırlandı.

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

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

3. 3. Kromatografi İşlemlerinde Kullanılan Belirteçler

Serik Sülfat Belirteci: 2 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100ml %10'luk H_2SO_4 içinde çözülmesi ile hazırlandı. Belirteç püskürtüldükten sonra kromatografi plağı 100°C 'de 5-10 dakika lekeler oluşuncaya kadar bekletildi.

Dragendorff's Belirteci: İki çözelti hazırlandı.

A Çözeltisi: 0.17 g Bizmut nitrat 2 mL asetik asitte çözünür ve daha sonra 8 mL su ile karıştırılır.

B Çözeltisi: 4 g Potasyum iyodür 10 mL asetik asitte çözünür ve daha sonra 20 mL su ile karıştırılır.

Hazırlanan bu iki karışım daha sonra birleştirilir ve üzerine su ilavesi ile 100 mL ye tamamlanır.

3. 4. Kullanılan Cihazlar

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

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

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

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

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

3. 5. Çözücüler

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

BÖLÜM 4

4. DENEYSEL KISIM

4. 1. Bitkinin Ekstre Edilmesi

Leucojum aestivum L. bitkisi Haziran ayında Edirne-Sarayiçi mevkii Tavuk Ormanı'ndan Canan KARUNCULA, Özlem GENÇAY, Pınar ALPASLAN ve Yrd. Doç. Dr. Özlem DEMİRKIRAN tarafından toplandı. Bitkinin tanımlanması Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Necmettin GÜLER tarafından yapıldı. Bitki gölgede kurutulup, yaprak ve çiçek kısımları ayrılarak yaprak kısmı çalışılmak üzere ufak parçalar halinde kesildi.

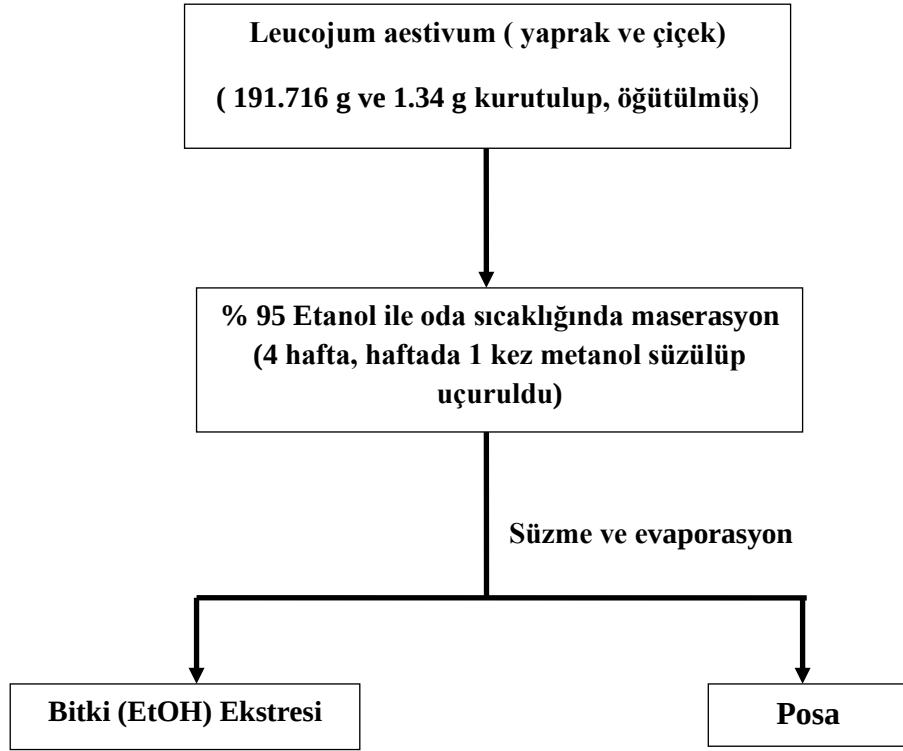
Bitkinin 191.71 g yaprak ve 1.34 g çiçek kısmı, oda şartlarında büyük cam kavanozlarda haftada bir süzölmek koşuluyla dört hafta maserasyon yöntemi ile ekstrakte edildi (Şekil 4. 1.). Çözücü rotaevaporatörde buharlaştırıldıktan sonra elde edilen ham ekstre % 10'luk HCl ile asitlendirildi. Sonra hekzan ile ekstrakte edilerek alkaloid dışında kalan yağlar, vakslar vb. maddelerin uzaklaştırılması gerçekleştirildi. Kalan ekstre pH 11 olana kadar % 25'lik NH₃ ile bazikleştirilerek ekstre içerisinde bulunan alkaloidlerin serbest hale gelmesi sağlandı ve elde edilen sulu faz sırasıyla diklorometan ve etilasetat ile ekstrakte edildi (Şekil 4. 2.) [63].

Yaprak ve çiçekten elde edilen ekstrelerin miktarları aşağıdaki gibidir:

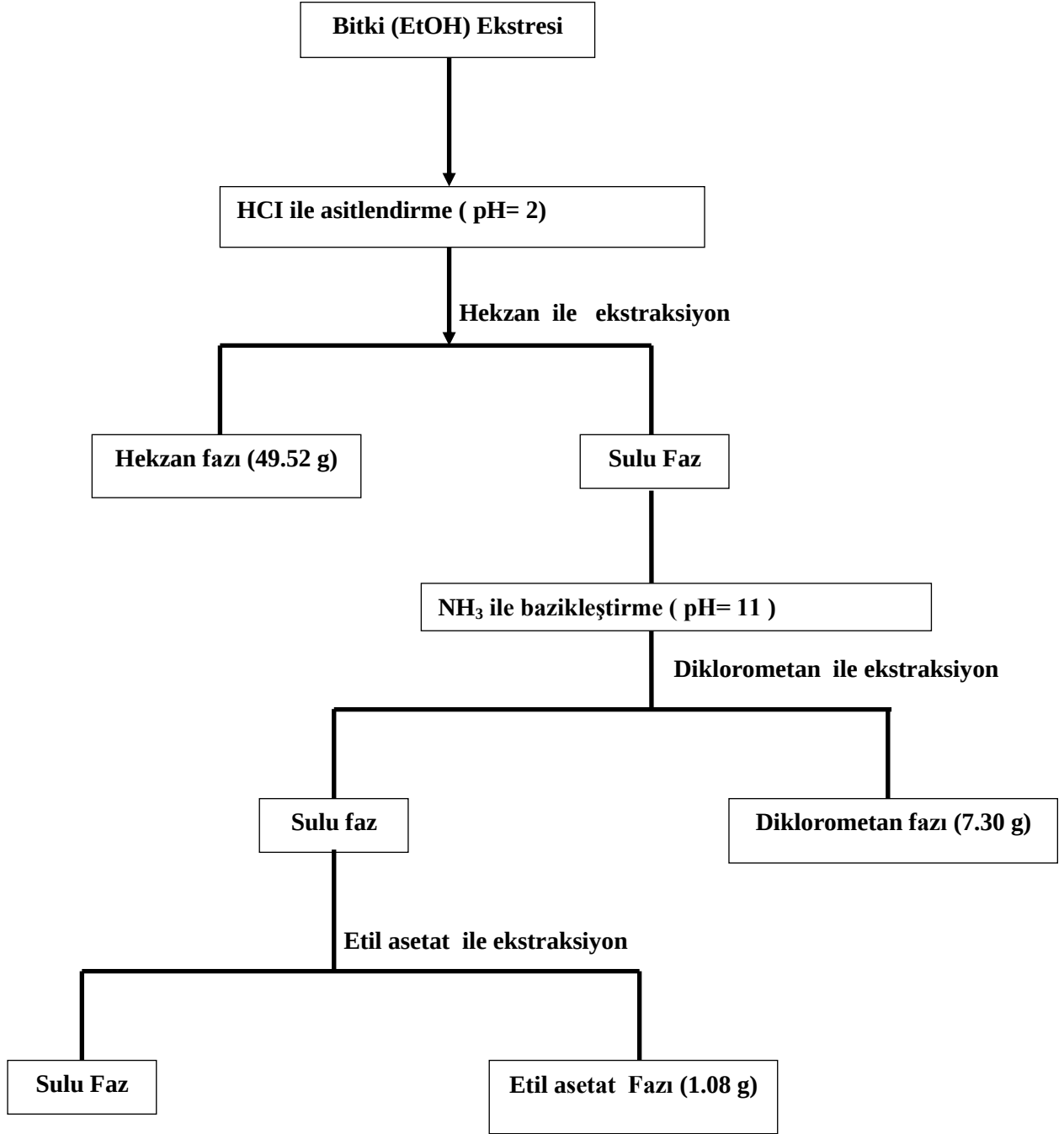
Yaprak ekstresi:	Çiçek ekstresi:
Hekzan fazı: 49.52 g	Hekzan fazı: 1.78 g
Diklorometan fazı: 7.30 g	Diklorometan fazı: 1.34 g
Etil asetat fazı: 1.08 g	Etil asetat fazı: 0.69 g

Daha sonra her bir ham ekstreye ince tabaka kromatografisi uygulandı. Yapılan TLC gözlemlerine dayanarak yaprak kısmının diklorometan ekstresinde UV ışık altında mor, Dragendroff's belirteci ile yakıldığında turuncu renk veren bileşenlerin alkaloidler olabileceği sonucuna varıldı. Yaprak kısmının diklorometan ekstresinde daha fazla sayıda turuncu

lekelerin gözlenmesi bu ekstreden elde edilecek olan alkaloid miktarının daha fazla olacağı düşüncesini doğrulduğundan bu ekstrenin çalışılması planlandı.



Şekil 4. 1. *L. aestivum* bitkisinden ham ekstrenin eldesi



Şekil 4. 2. *L. aestivum* bitkisinin ham ekstresinden hekzan, diklorometan ve etil asetat fazlarının eldesi

4. 2. Kromatografik Yöntemlerle Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri

4. 2. 1. Diklorometan Ekstresindeki Bileşiklerin İzolasyonu ve Saflaştırılması

Diklorometan ekstresi silika jel kolon kromatografisine uygulandı. Diklorometan ile başlanarak daha sonra artan metanol ilavesi ile kolondan % 100 MeOH olana dek elde edilen fraksiyonlar 273 tüpte toplandı. Her bir tüpün içeriğine TLC uygulandı.

59. ile 76. tüp arasında sarı renkli çubuk şeklinde kristaller oluştuğu gözlemlendi ve bu kristaller aseton ile yıkanarak **1** numaralı **Galantamin** bileşiği elde edildi.

85. ve 86. tüpte açık sarı renkli iğne şeklinde kristallerin oluştuğu gözlemlendi ve kristallerin aseton ile yıkanması sonucu **2** numaralı **Epinorgalantamin** bileşiği elde edildi.

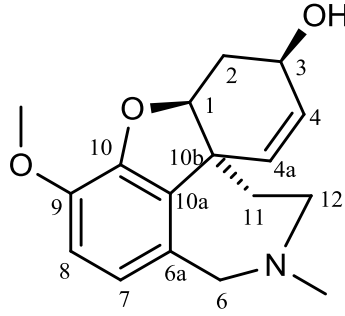
128. ve 133. tüpler arasında sarı renkli katı bir madde oluştuğu gözlemlendi. Çözücü karışımları ile yıkanarak safsızlıklardan arındırıldı. **3** numaralı **Dihidroksihabrantin** bileşiği elde edildi.

45 ile 58. tüp arasındaki fraksiyonlar yapılan TLC sonuçlarının değerlendirilmesi sonucu benzer içeriğe sahip olmalarından dolayı birleştirildi ve bu alt fraksiyon silika jel kolon kromatografisine tatbik edildi. Hekzan ile başlanarak artan etil asetat ilavesi ile % 100 etil asetat ve daha sonra artan metanol ilavesi %100 metanol olana kadar kolonda polarite artırıldı ve kolondan elde edilen maddeler 100 tüpte toplandı. Her bir tüpün içeriğine TLC uygulandı. 58-100. tüp aralığı benzer içeriğe sahip olmalarından dolayı birleştirilerek tekrar silika jel kolon kromatografisine uygulandı. Elde edilen fraksiyonlar 145 tüpte toplandı ve TLC ile tüplerin içeriği incelendi. 101-110. tüp aralığında sarı renkli katı maddenin oluştuğu gözlemlendi ve **4** numaralı **2-O-asetildemetillikorenin** olduğu spektroskopik teknikler yardımı ile belirlendi.

Diklorometan ekstresinin silika jel kolonundan elde edilen 87-102. tüp aralığı birleştirilerek oluşan fraksiyona alümina kolon kromatografisi uygulandı. Bu kolondan elde edilen 103-113. tüp aralığı, 242-246. tüp aralığı birleştirilerek elde edilen fraksiyonlara ayrı ayrı silika jel kolon kromatografisi uygulandı. Elde edilen bileşiklerin miktarlarının çok az olmasından dolayı NMR spektroskopisi ile yapılarının aydınlatılması mümkün olmadı.

4. 2. 2. Diklorometan Ekstresinden Elde Edilen Bileşiklerin Fiziksel ve Spektral Özellikleri

4. 2. 2. 1 Numaralı Bileşik: Galantamin



Galantamin diklorometan ekstraktının silika jel kolona tatbik edilip diklorometan-metanol çözücü sistemi (% 6 MeOH-DCM) ile elüe edilmesi sonucunda sarı renkli çubuk kristaller halinde elde edildi (147.4 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik Dragendroff's belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra turuncu renk verdi.

E.N: 126.5 °C

UV λ_{max} (nm) MeOH: : 291.0, 238.0

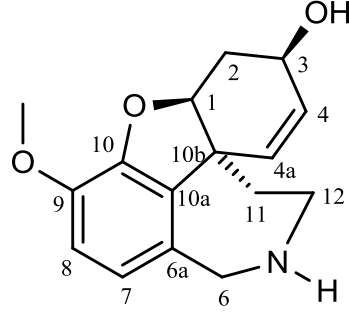
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3410, 3355, 1645, 1605, 1590, 1502, 1275, 1035, 923.

ESI MS m/z : 288.2 $[\text{M}+1]^+$

Tablo 4. 1. Galantamin bileşiği için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD), ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri

C No	^1H -NMR	^{13}C -NMR	DEPT
1	4.65, brs	87.2	-CH
2α	2.47, ddd ($J=13.5, 6.0, 3.0$ Hz)	30.2	-CH ₂
2β	2.20, ddd ($J=13.5, 5.4, 3.3$ Hz)	30.2	-CH ₂
3	4.20, brs	60.8	-CH
4	6.03, dd ($J=10.2, 4.8$ Hz)	129.5	-CH
4α	6.17, d ($J=9.9$ Hz)	126.2	-CH
6α	4.78, d ($J=14.4$ Hz)	55.5	-CH ₂
6β	4.33, d ($J=14.4$ Hz)	55.5	-CH ₂
6α	-	118.0	-
7	6.84, d ($J=8.7$ Hz)	123.8	-CH
8	6.85, d ($J=8.7$ Hz)	112.6	-CH
9	-	146.0	-
10	-	147.0	-
10α	-	133.0	-
10β	-	47.0	-
11α	2.32, ddd ($J=11.4, 6.9, 3.6$ Hz)	29.5	-CH ₂
11β	2.05, dd ($J=15.6, 2.7$ Hz)	29.5	-CH ₂
12α	3.63, ddd ($J=11.2, 9.1, 4.5$ Hz)	63.1	-CH ₂
12β	3.53, dt ($J=11.1, 4.5$ Hz)	63.1	-CH ₂
OMe	3.82, s	55.5	-CH ₃
N-Me	2.97, s	42.0	-CH ₃

4. 2. 2. 2 Numaralı Bileşik: Epinorgalantamin



Epinorgalantamin diklorometan ekstraktının silika jel kolona tatbik edilip diklorometan-metanol çözücü sistemi (% 6-MeOH-DCM) ile elüe edilmesi sonucunda Açık sarı iğne kristaller halinde elde edildi (140.8 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik Dragendroff's belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra turuncu renk verdi.

E.N: 150°C

UV λ_{max} (nm) MeOH: 289.5, 212.0

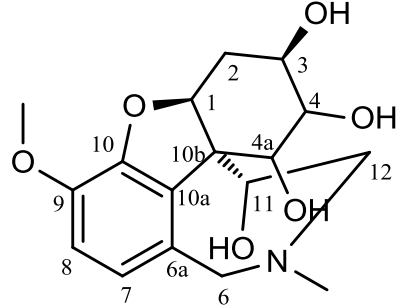
IR ν_{max} (KBr) cm^{-1} : 3500-3200, 1620, 1510, 1440, 1275, 1040.

ESI MS m/z : 274 $[\text{M}+1]^+$

Tablo 4. 2. Epinorgalantamin bileşigi için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD), ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri

C No	^1H -NMR	^{13}C -NMR	DEPT
1	4.62, brs	88.0	-CH
2α	2.54, ddd ($J=12.9, 3.0, 1.5$ Hz)	31.0	-CH ₂
2β	2.49, ddd ($J=12.9, 3.0, 1.5$ Hz)	31.0	-CH ₂
3	4.21, brs	60.5	-CH
4	6.01, dd ($J=10.2, 4.8$ Hz)	129.9	-CH
4a	6.15, d ($J=10.2$ Hz)	126.0	-CH
6α	4.53, d ($J=15.3$ Hz)	51.0	-CH ₂
6β	4.33, d ($J=15.3$ Hz)	51.0	-CH ₂
6a	-	116.0	-
7	6.83, d ($J=8.1$ Hz)	122.5	-CH
8	6.86, d ($J=8.1$ Hz)	112.5	-CH
9	-	146.0	-
10	-	147.0	-
10a	-	133.0	-
10b	-	48.0	-
11α	2.18, dd($J=16.5, 5.1, 3.0$ Hz)	36.0	-CH ₂
11β	2.09, dd ($J=15.0, 3.0$ Hz)	36.0	-CH ₂
12α	3.64, d ($J=3.0$ Hz)	46.0	-CH ₂
12β	3.62, d ($J=3.0$ Hz)	46.0	-CH ₂
OMe	3.83, s	56.0	-CH ₃

4. 2. 2. 3 Numaralı Bileşik: Dihidroksihabrantin



Dihidroksihabrantin diklorometan ekstraktının silika jel kolona tatbik edilip diklorometan-metanol çözücü sistemi (%8 MeOH-DCM) ile elüe edilmesi sonucunda sarı renkli katı halinde elde edildi (83.5 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik Dragendroff's belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra turuncu renk verdi.

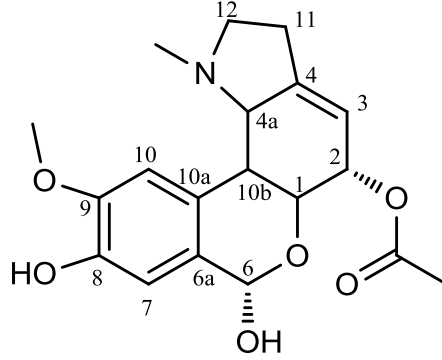
UV λ_{max} (nm) MeOH: 292.5, 214.5

ESI MS m/z : 336.0 [M-OH]⁺

Tablo 4. 3. Dihidroksihabrantin bileşigi için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD), ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri

C No	^1H-NMR	^{13}C-NMR	DEPT
1	4.74, brs	87.5	-CH
2α	2.46, d ($J=15.0$ Hz)	31.0	-CH ₂
2β	2.15, d ($J=15.0$ Hz)	31.0	-CH ₂
3	4.20, brs	60.7	-CH
4	3.81, brs	70.0	-CH
4a	3.77, brs	68.3	-CH
6α	3.70, d ($J=10.5$ Hz)	65.0	-CH ₂
6β	3.50, d ($J=10.5$ Hz)	65.0	-CH ₂
6a	-	116.0	-
7	6.90, s	124.7	-CH
8	6.90, s	112.6	-CH
9	-	147.0	-
10	-	148.0	-
10a	-	133.0	-
10b	-	47.0	-
11	3.77, brs	71.0	-CH
12α	4.05, d ($J=3.3$ Hz)	63.0	-CH ₂
12β	3.67, d ($J=3.3$ Hz)	63.0	-CH ₂
OMe	3.83, s	55.5	-CH ₃
NMe	3.0, s	42.0	-CH ₃

4. 2. 2. 4. Numaralı Bileşik: 2-*O*-asetildemetillikorenin



2-*O*-asetildemetillikorenin diklorometan ekstraktının silika jel kolona tatbik edilip diklorometan-metanol çözücü sistemi (% 30 MeOH-EtOAc) ile elüe edilmesi sonucunda sarı renkli katı madde elde edildi (25.8 mg). UV ışık altında mor renkli gözlenen bileşik Dragendroff's belirteci püskürtülüp yakıldıktan sonra turuncu renk verdi.

UV λ_{max} (nm) MeOH: 453.5, 281.0, 228.0, 209.5

ESI MS m/z : 302.1 [M-*O*-asetil]⁺

Tablo 4. 4. 2-O-asetildemetillikorenin bileşigi için ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD), ^{13}C -NMR (75 MHz, CD_3OD) değerleri

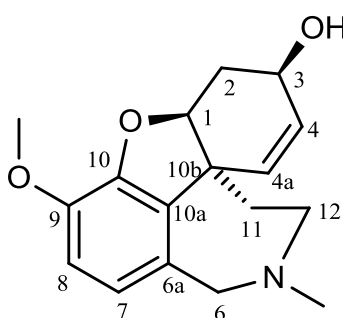
C No	^1H-NMR	^{13}C-NMR
1	4.27, brs	66.2
2	4.90, d ($J=3.6$ Hz)	67.0
3	5.65, brs	119.2
4	-	135.2
4a	2.83, d ($J=9.3$ Hz)	68.9
6	5.45, s	98.4
6a	-	126.4
7	6.75, s	114.6
8	-	146.0
9	-	147.8
10	7.01, s	111.8
10a	-	127.2
10b	2.75, dd ($J=10.2, 1.8$ Hz)	40.5
11	2.64, m	26.7
12	3.30, m	55.0
OMe	3.87, s	55.3
NMe	2.45, s	41.6
C=O	-	174.8
COMe	1.92, s	22.5

BÖLÜM 5

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

5. 1. Kimyasal Bulgular

5. 1. 1. 1 numaralı bileşik: Galantamin



Bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda 6.85 (H-8) ve 6.84 (H-7) ppm'de çıkan dubletlerin $J=8.7$ Hz'lik yarıllma değeri vermeleri *orto* konumda bulunan iki aromatik halka protonunu işaret etmektedir. 6.17 (H-4a) (d, $J=9.9$ Hz) ve 6.03 (H-4) ppm'de (dd, $J=10.2, 4.8$ Hz) ise olefinik protonlar gözlenmiştir. Ayrıca 3.82 ppm'de metoksi grubu singlet olarak gözlenmiştir. 4.65 (H-1) ve 4.20 (H-3) ppm'deki brs olarak gözlenen oksi protonların karbonları HMQC spektrumunda 87.2 (C-1) ve 60.8 (C-3) ppm'de belirlenmiştir. 2.97 ppm'de brs olarak gözlenen sinyal azot atomuna bağlı olan metil protonlarına aittir ve karbonu 42.0 ppm'de tespit edilmiştir. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunun yukarı alanında 2.05 ppm (dd, $J= 15.6, 2.7$ Hz, H-11 α) ve 2.32 ppm'deki (ddd, $J=11.4, 6.9, 3.6$ Hz, H-11 β) protonların 29.5 ppm'de gözlenen (C-11) karbona bağlı olduğu belirlenmiştir. 2.05 (H-11 β) ppm'deki protonun ddd şeklinde yarıllması beklenirken, ancak komşu karbonda bulunan 3.63 ppm (ddd $J=11.2, 9.1, 4.5$ Hz, H12 α) ve 3.53 ppm (dt $J=11.1, 4.5$ Hz, H-12 β) değerindeki protonların sadece birinden yarıllabildiği görülmüştür. Bunun sebebi bu visinal protonlardan biri ile arasındaki dihedral açının 90° olması olabilir. 2.47 ppm (ddd $J=13.5, 6.0, 3.0$ Hz, H-2 α) ve 2.20 ppm'deki (ddd, $J=13.5, 5.4, 3.3$ Hz, H-2 β) protonların 30.2 (C-2) ppm'deki karbona ait

oldukları yine HMQC spektrumunda gözlenmiş ve bu spektrumunun ayrıntılı incelenmesi sonucunda 112.6 (C-8), 123.8 (C-7), 126.2 (C-4a) ve 129.5 (C-4) ppm'deki karbonlara sırasıyla 6.85 (H-8), 6.84 (H-7), 6.17 (H-4a), 6.03 (H-4) ppm'deki protonlara bağlı olduğu belirlenmiştir.

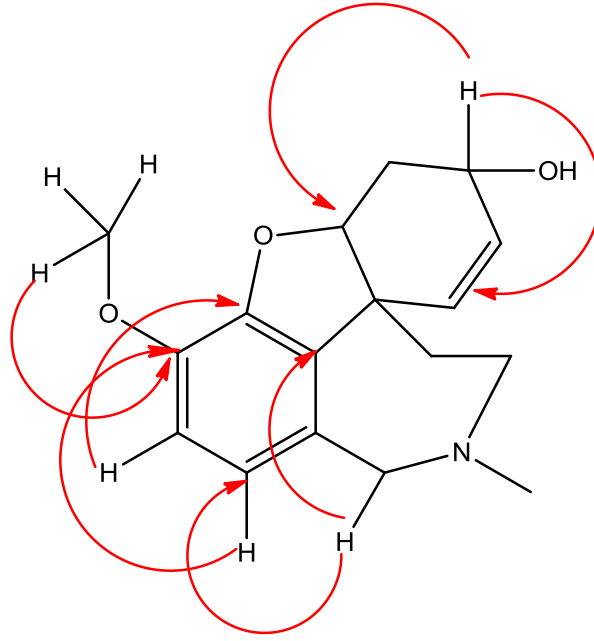
Bileşiğin DEPT spektrumu alınmış 6 tane metin karbonu, 4 metilen karbonu ve 2 metil piki gözlenmiştir. Metilen karbonlarının yeri ^{13}C -NMR spektrumunda 63.1 (C-12), 55.5 (C-6), 30.2 (C-2), 29.5 (C-11) olarak belirlenmiştir. Metil karbonları ise 55.5 (-OCH₃) ve 42.0 (N-CH₃) ppm'de gözlenirken aromatik halkaya ait metin karbonları 123.8 (C-7) ve 112.6 (C-8) ppm'de, olefinik metin karbonları ise 129.5 (C-4) ve 126.2 (C-4a) ppm'de, oksimetinler de 87.2 (C-1) ve 60.8 (C-3) ppm'de gözlenmiştir.

HMBC korelasyonları incelendiğinde 3.83 ppm karakteristik piki gözlen metoksi protonları 146.0 (C-9) ppm'deki karbon ile korelasyon göstermektedir. Bu sayede metoksi grubunun bileşikteki konumu belirlenmektedir. 4.20 ppm (brs) değerindeki H-3 protonu 129.5 (C-4) ve 87.5 (C-1) ppm'deki karbonlar ile korelasyon göstermiştir. 6.85 (H-8) ve 6.84 (H-7) ppm'deki protonların sırası ile 147.0 (C-10) ve 146.0 (C-9) ppm ile korelasyon göstermesi bu protonların metoksi grubuna olan yakınlığını ispatlamakta ve konumlarını doğrulamaktadır. δ_{H} 4.79 (H-6 α) ve 4.33 (H-6 β) ppm'deki protonların sırası ile 123.8 ppm (C-7) ve 133.0 ppm (C-10a)'deki karbonlar ile korelasyon göstermiştir. bu protonların azot atomuna komşu H-6 protonları olduğunu doğrulamaktadır. Diğer önemli bir korelasyon 4.20 ppm'de gözlenen H-3 protonu ile 87.2 (C-1) ve 126.2 (C-4a) ppm'deki karbonlarla gözlenmiştir.

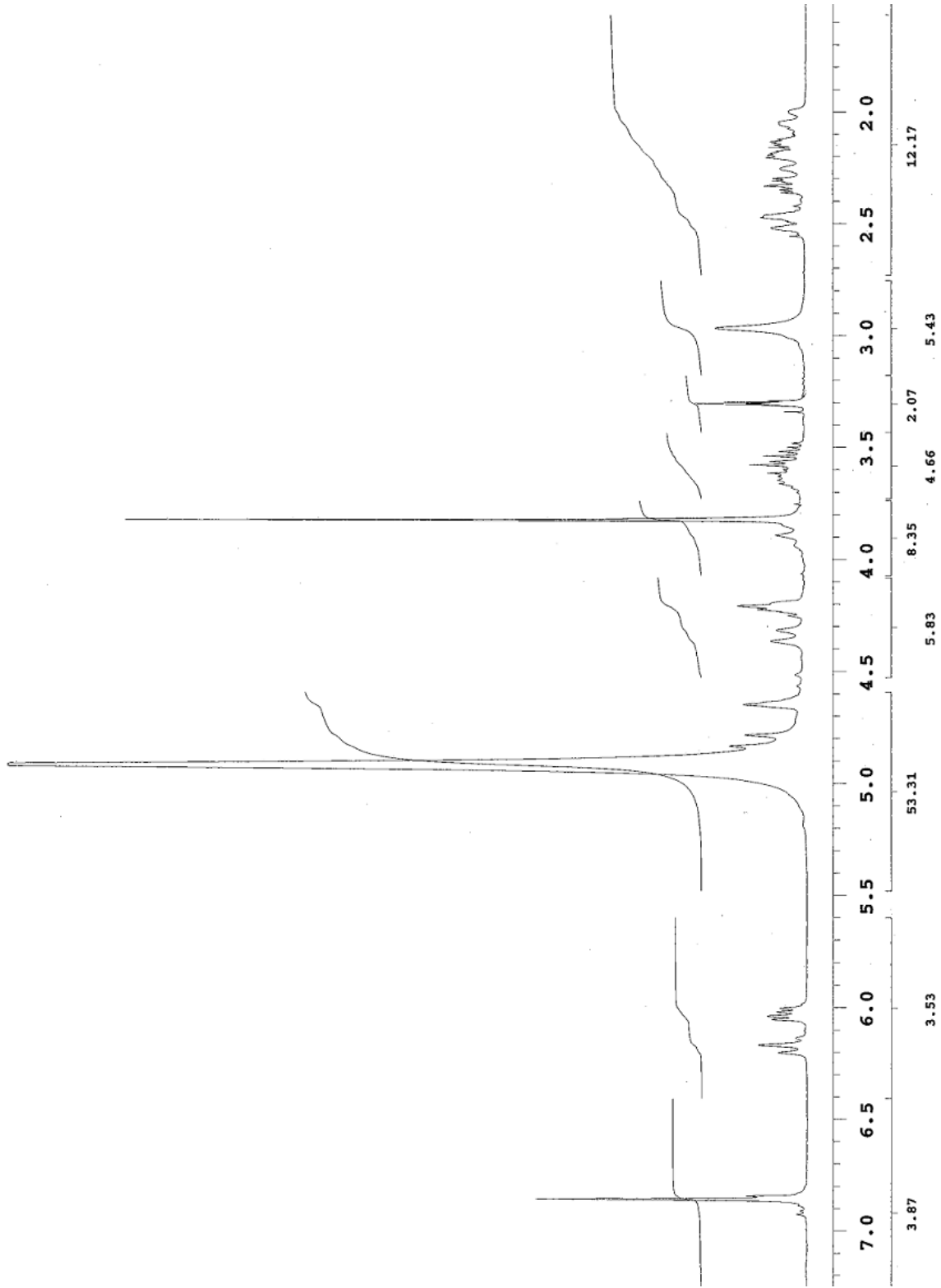
Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde C₁₇H₂₁NO₃ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini m/z 288.2 [M+1]⁺ olarak vermiştir.

COSY spektrumunda δ_{H} 6.03 (H-4) protonu ile 4.20 (H-3) protonları arasında eşleşme gözlenmiş ve komşulukları doğrulanmıştır. δ_{H} 2.47 (H-2 α) ve 2.20 (H-2 β) protonları δ_{H} 4.65 (H-1) ve 4.20 (H-3) protonlarının herikisiyle de komşuluk ilişkisi göstermiştir.

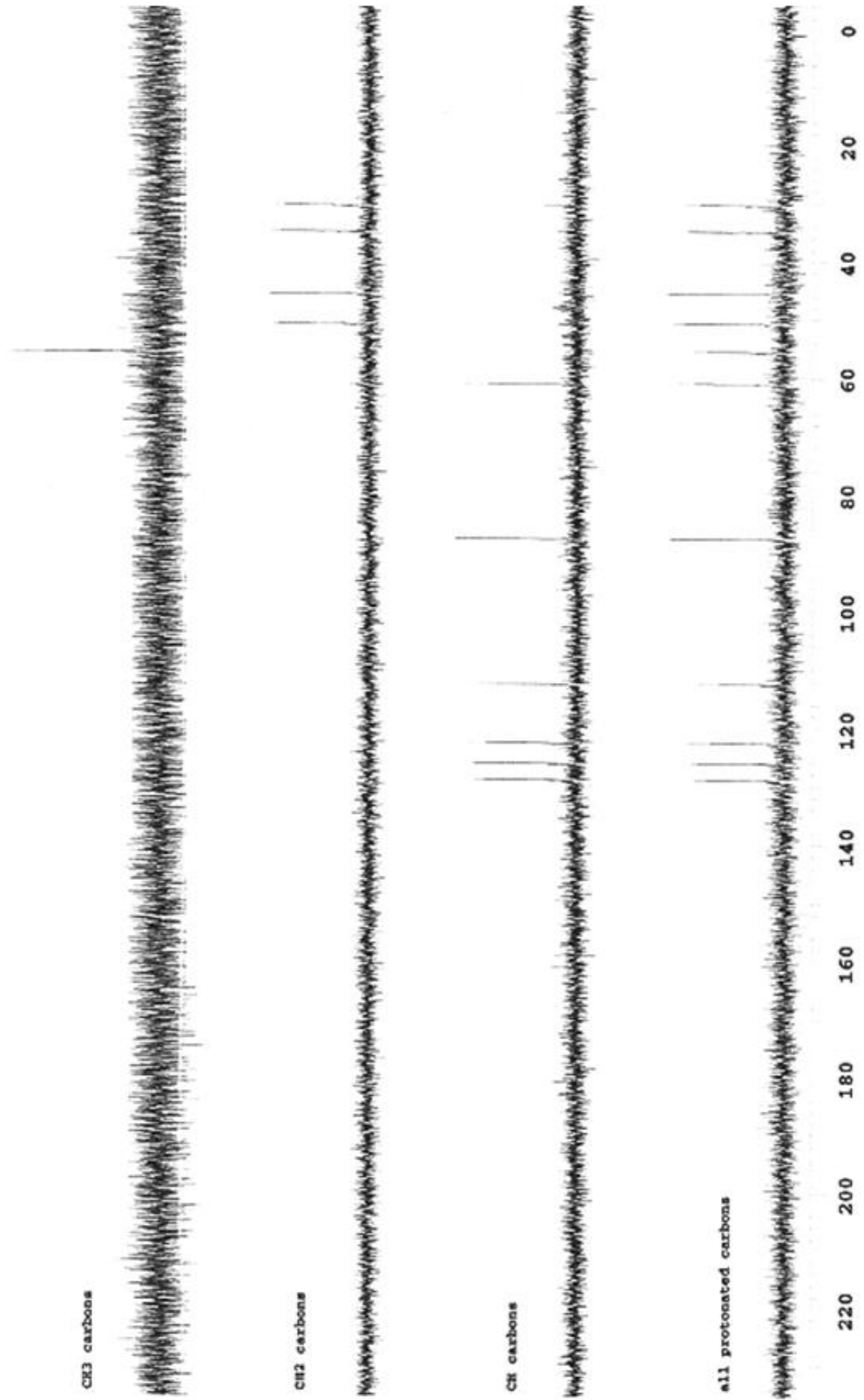
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile birebir özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğin galantamin olduğu doğrulanmıştır [64, 65].



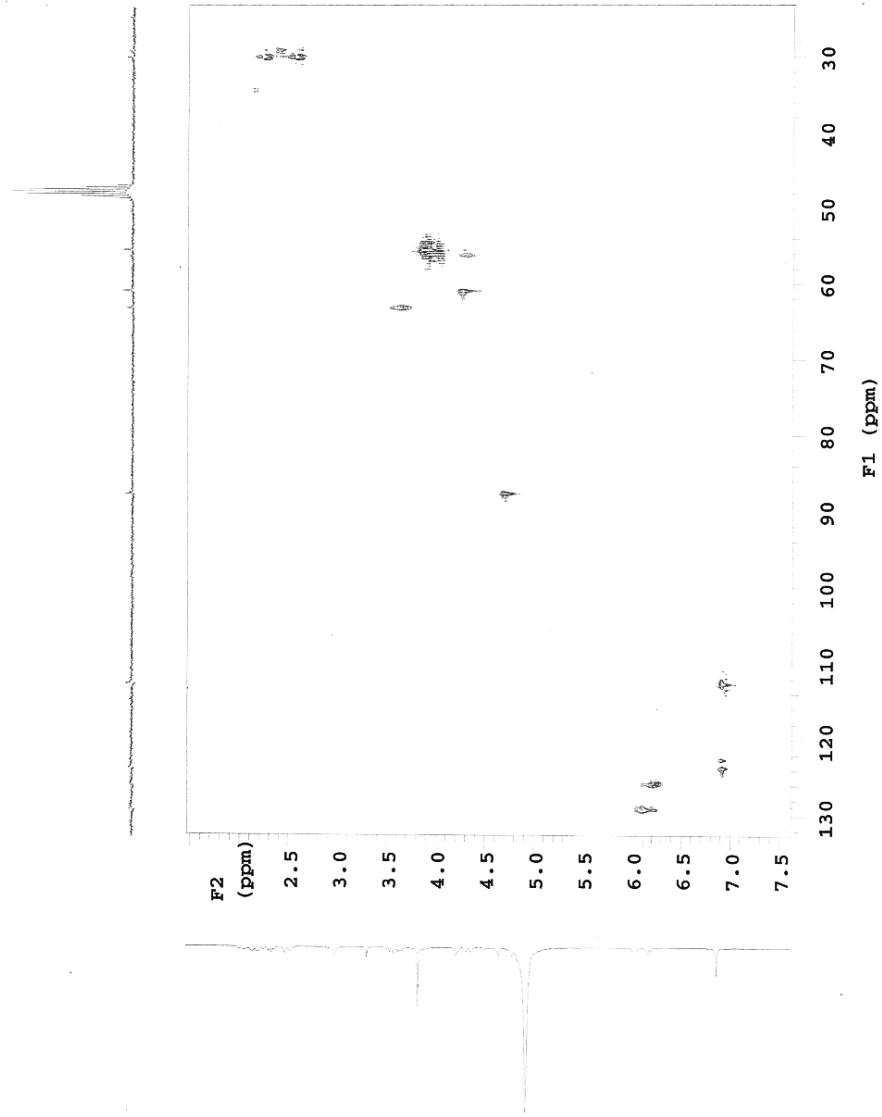
Şekil 5.1. Galantamin bileşiğine ait HMBC korelasyonları



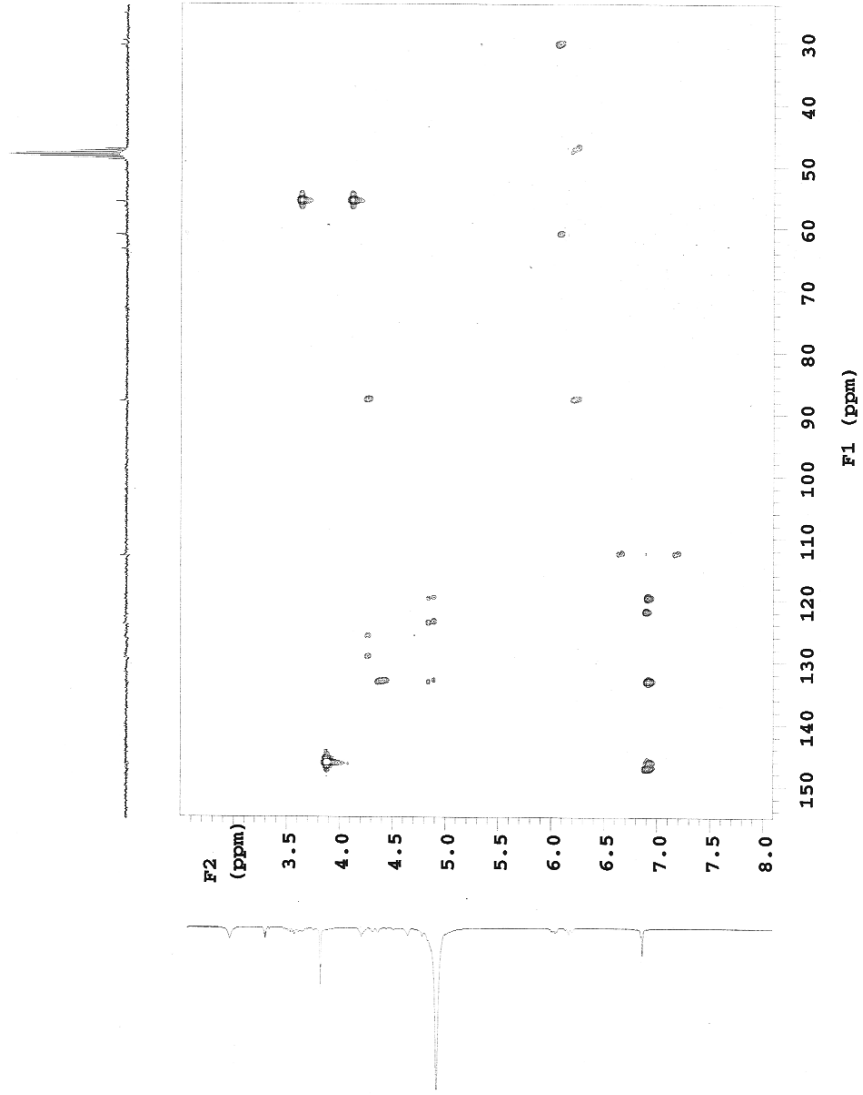
Şekil 5. 2. Galantamin bileşiğine ait ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) spektrumu



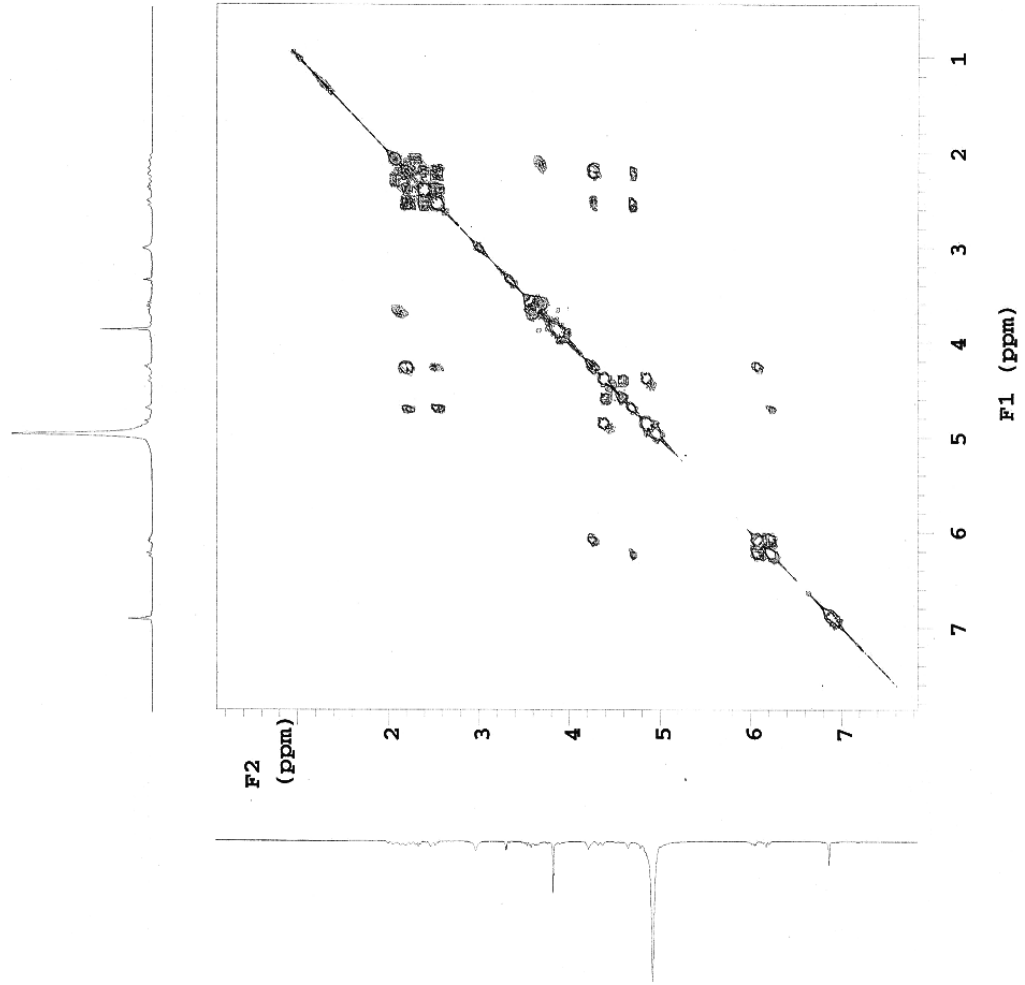
Şekil 5. 3. Galantamin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CD₃OD) spektrumu



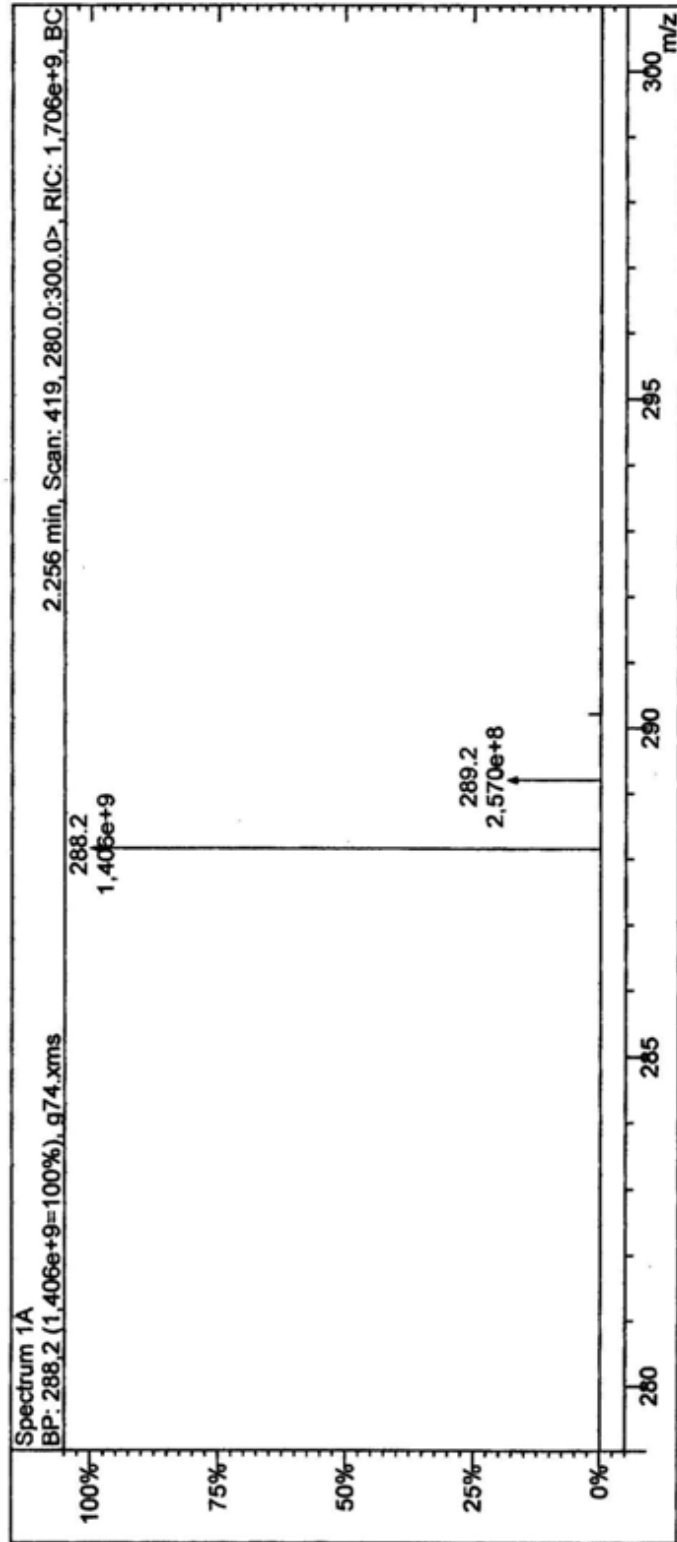
Şekil 5. 4. Galantamin bileşiğine ait HMQC spektrumu



Şekil 5. 5. Galantamin bileşiğine ait HMBC spektrumu

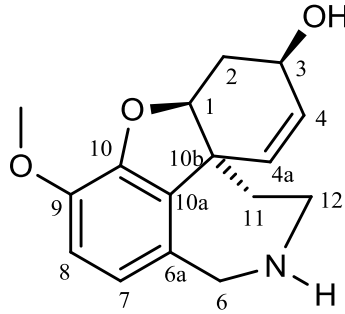


Şekil 5. 6. Galantamin bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 5. 7. Galantamin Bileşiğine ait ESI MS Spektrumu

5. 1. 2. 2 numaralı bileşik: Epinorgalantamin



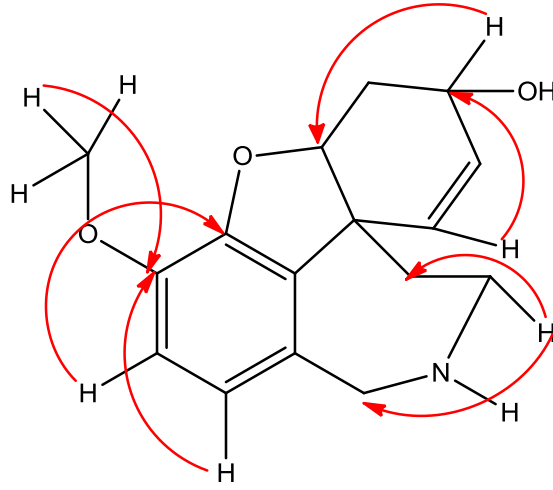
^1H -NMR spektrumunda 6.86 ppm (H-8) ve 6.83 (H-7) ppm'de (d, $J=8.1$ Hz) gözlenen aromatik halka protonları ve 6.15 (H-4a), (d, $J=10.2$ Hz) ve 6.01 (H-4) ppm'de (dd, $J=10.2$, 4.8 Hz) gözlenen olefinik halka protonları ve diğer tüm proton sinyalleri galantamindeki protonlar ile benzerlik göstermiştir. Aradaki en önemli fark 1 nolu bileşikte 2.97 ppm'deki azota bağlı metil grubuna ait singlet proton sinyalinin bu bileşiğin spektrumunda gözlenmemesi olmuştur. Ayrıca azot atomuna komşu olan C-11 ve C-12 karbonlarının ppm değerleri 1 nolu bileşikte sırası ile 29.4 ve 63.1 iken, 2 nolu bileşikte 36.0 ve 46.0 olarak gözlenmiştir. 4.53 ve 4.33 ppm'deki H-6 protonları (d, $J=15.3$ Hz) azota ve aromatik halkaya komşu olduklarından aşağı alanda gözlenmişlerdir ve bu protonların HMBC spektrumunda sırası ile 122.5 (C-7), 133.0 (C-10a) ve 46.0 (C-12) ppm'deki karbonlar ile korelasyonları gözlenmiştir. Benzer şekilde H-12 protonları azota komşu olmalarından dolayı 3.64 ve 3.62 ppm'de gözlenmişlerdir. 2.18 ppm (dd $J=16.5$, 5.1, 3.0 Hz, H-11 α) ve 2.09 ppm'deki (dd, $J=15$, 2.4 Hz, H-11 β) protonların 36.0 (C-11) ppm'deki karbona bağlı olduğu, 2.54 ve 2.49 ppm ($J=12.9$, 3.0, 1.5 Hz, H-2)'deki protonların ise 31.0 (C-2) ppm'deki karbona ait oldukları HMQC spektrumundan belirlenmiştir. Yine aynı spektrumdan 112.5 (C-8), 122.5 (C-7), 126.0 (C-4a) ve 129.9 (C-4) ppm'deki karbonlara sırasıyla 6.86 (H-8), 6.83 (H-7), 6.15 (H-4a), 6.01 (H-4) ppm'deki protonların bağlı olduğu belirlenmiştir. 4.62 (H-1) ve 4.21 (H-3) ppm'deki (brs) protonların ise 88.0 (C-1) ve 60.5 ppm'deki (C-3) karbonlara bağlı olduğu belirlenmiştir.

HMBC spektrumunda 3.83 ppm'deki metoksi grubunun protonu 146.0 (C-9) ppm'deki karbon ile gösterdiği korelasyon ile metoksi grubunun bileşikteki konumu belirlenmektedir. 6.83 (H-7) ppm'deki protonu aynı kuarterner C-9 (δ_C 146.0) karbonu ile korelasyon göstermiştir. 6.86 (H-8) ppm'deki protonunun da yine oksijen bağlı bir kuarterner aromatik

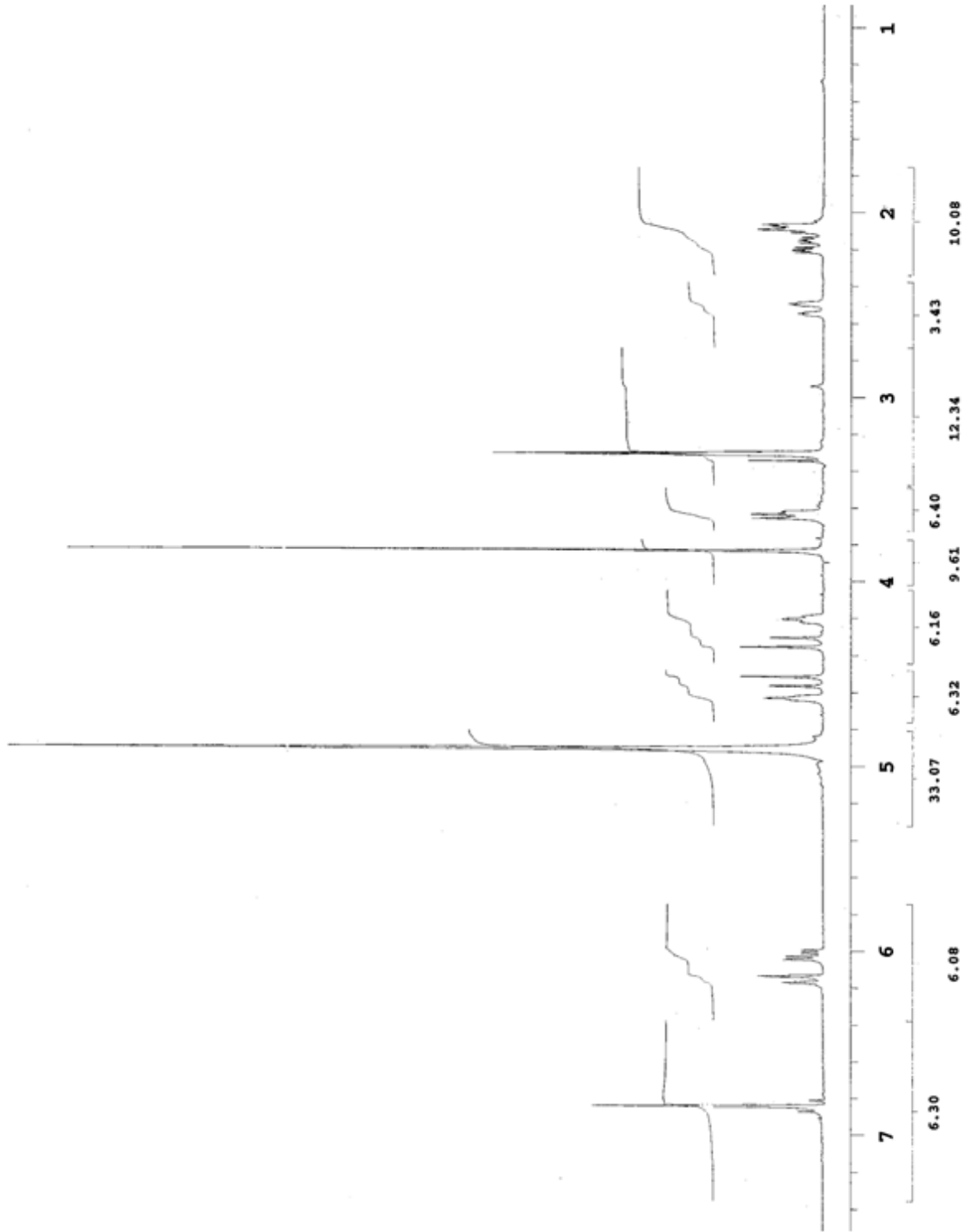
karbon olan C-10 (δ_C 147.0) ile korelasyonu gözlenebilmiştir. DEPT spektrumunda dört CH_2 karbonundan yalnızca biri gözlenmiş, yedi CH, bir CH_3 karbonu olduğu tespit edilmiştir. DEPT spektrumunda gözlenen metilen karbonu C-2 (31.0 ppm)'dir. Metin karbonlarından oksijene komşu olanlar yukarı manyetik alanda 60.5 (C-3) ve 88.0 (C-1) ppm'de gözlenmişlerdir. Aromatik ve olefinik karbonlara ait metin sinyalleri ise 122.5 (C-7), 112.5 (C-8), 129.9 (C-4) ve 126.0 (C-4a) ppm'de belirmişlerdir. Gözlenen tek metil karbonu ise metoksiye aittir ve 56.0 ppm'de gözlenmiştir. Galantamin bileşiğinden (**1**) farklı olarak DEPT spektrumunda N-CH₃'e ait metil karbonu tespit edilmemiştir.

Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde $C_{16}H_{19}NO_3$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini m/z 274 $[M+1]^+$ olarak vermiştir.

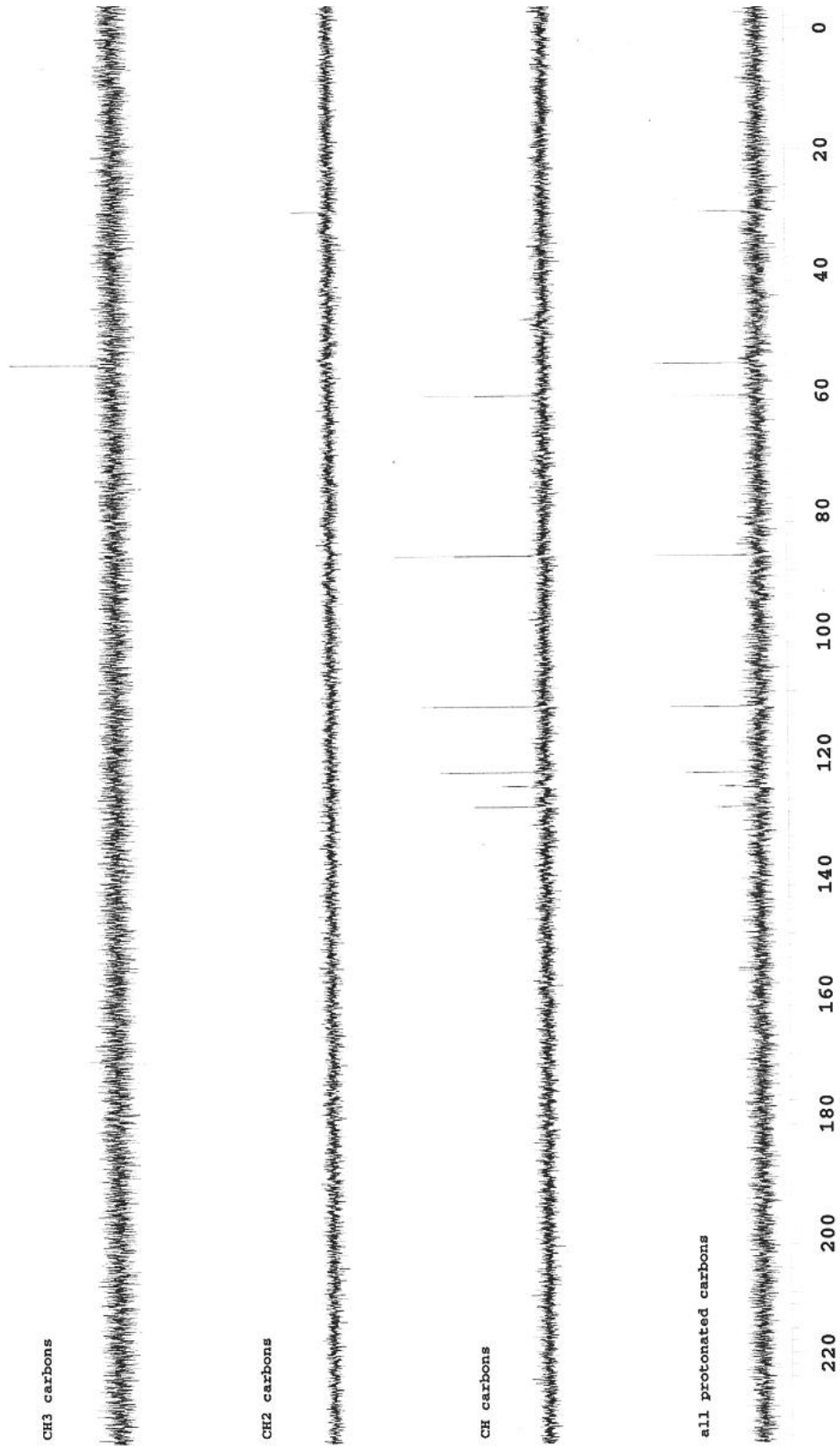
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerlerin literatürde verilen değerler ile birebir özdeş olduğu belirlendiğinden bileşiğin epinorgalantamin olduğu doğrulanmıştır [66].



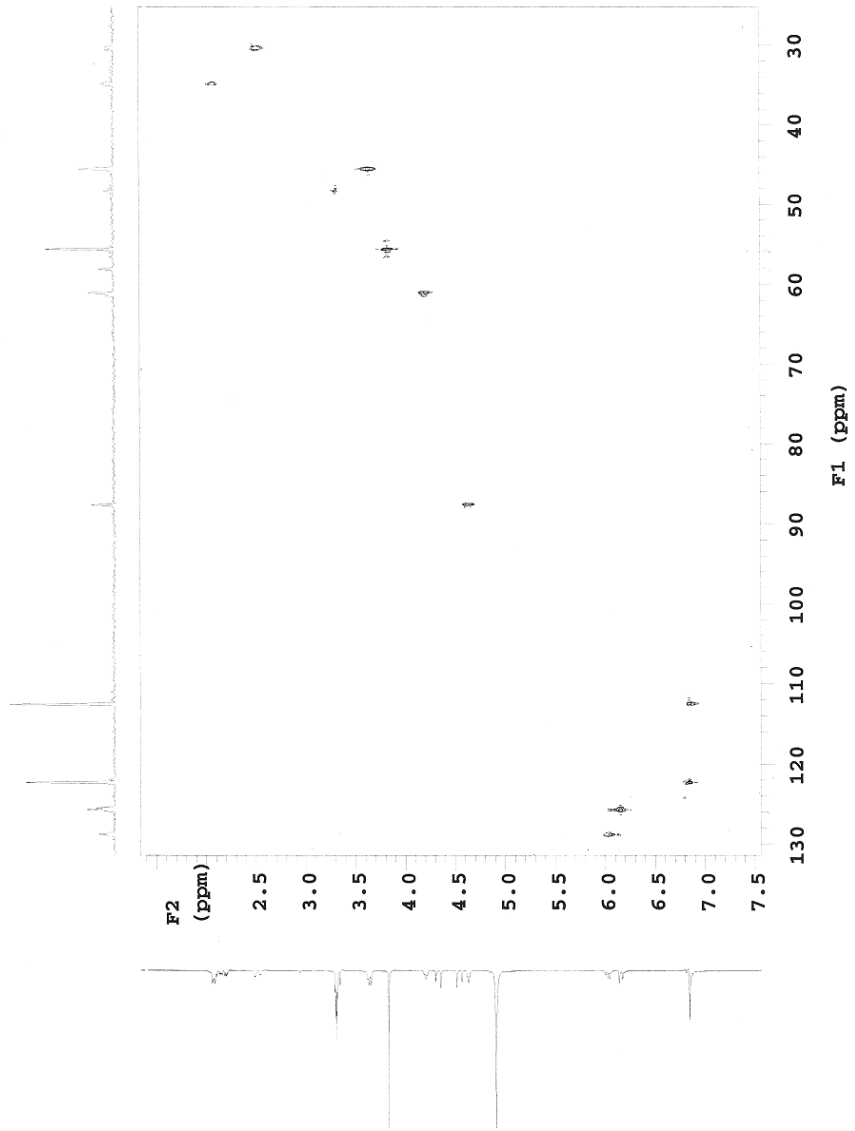
Şekil 5. 8. Epinorgalantamin bileşiğine ait HMBC korelasyonları



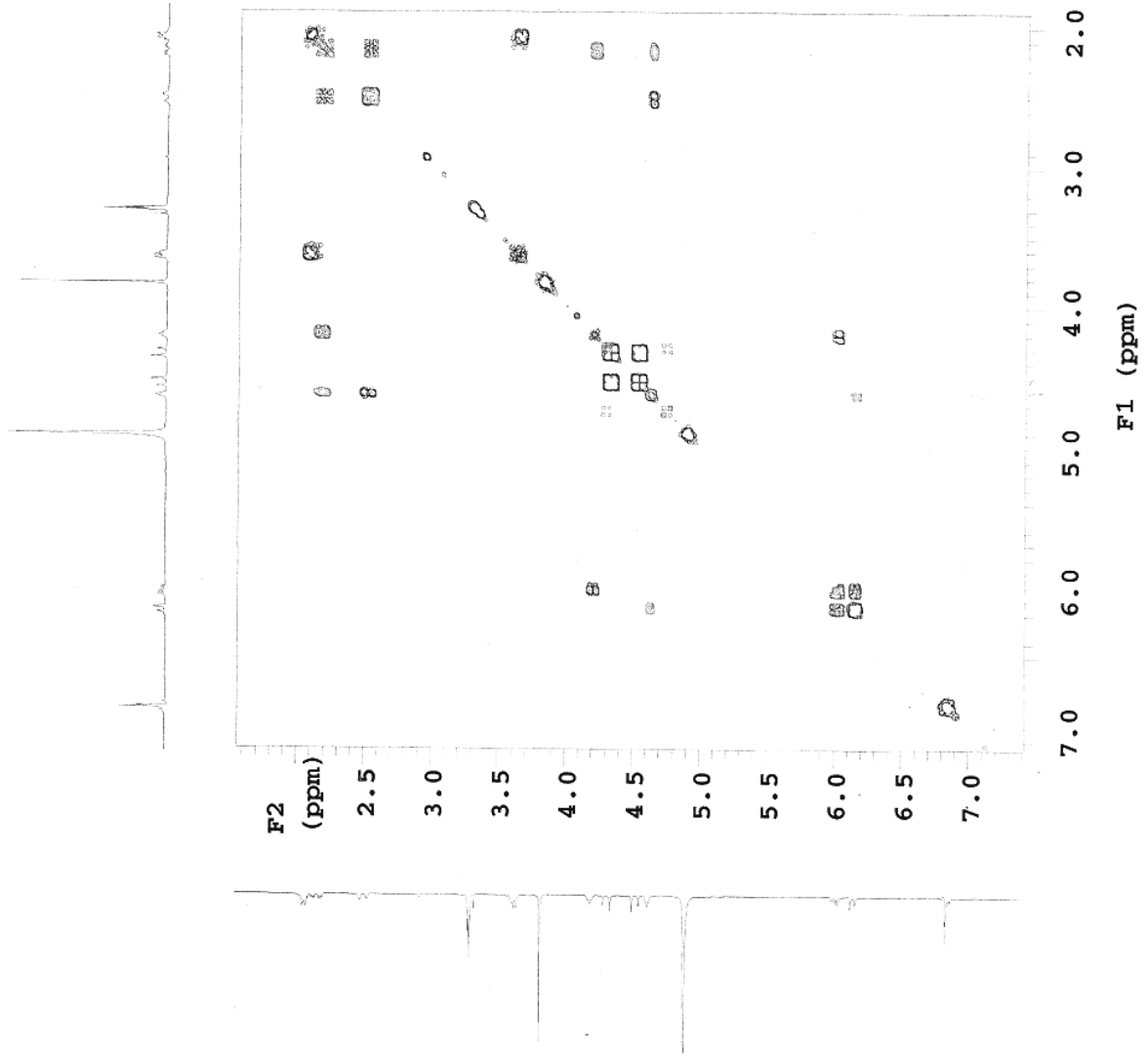
Şekil 5. 9. Epinorgalantamin bileşiğine ait ¹H-NMR (300 MHz, CD₃OD) spektrumu



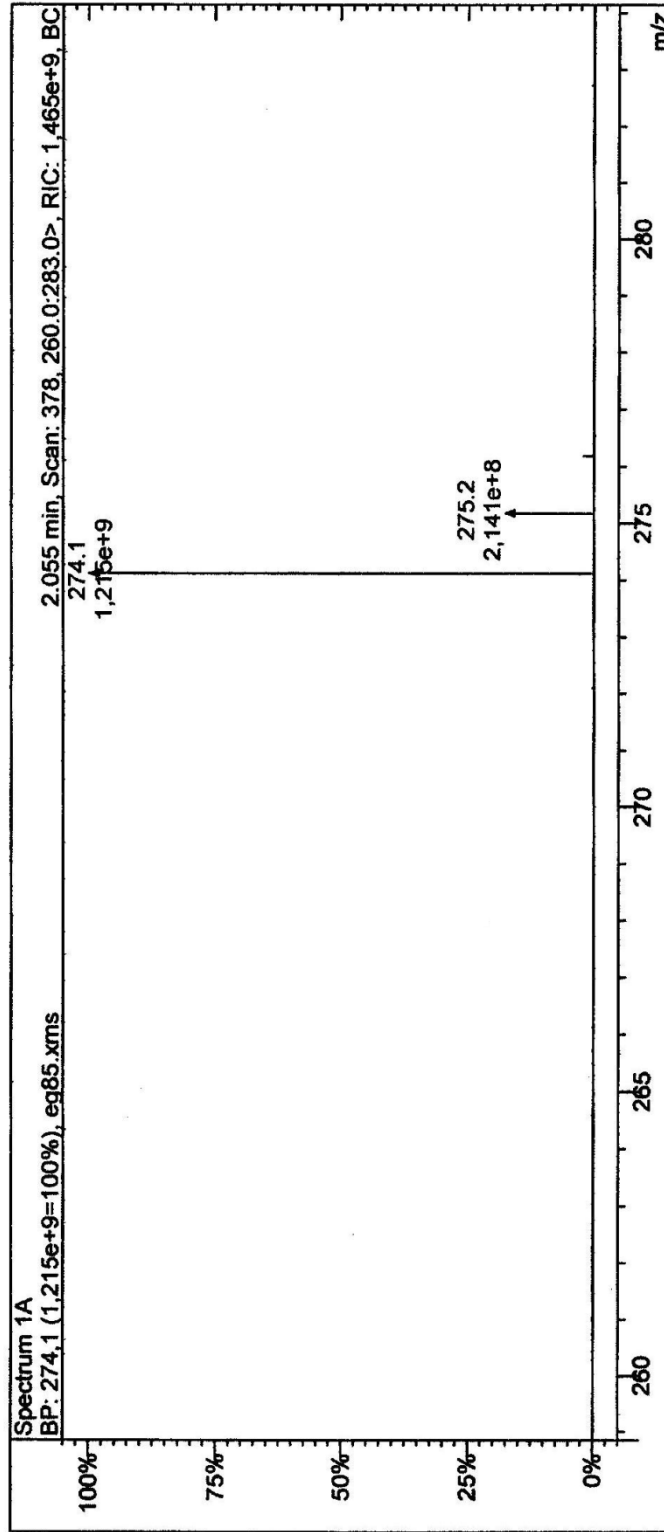
Şekil 5. 10. Epinorgalantamin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CD₃OD) spektrumu



Şekil 5. 11. Epinorgalantamin bileşiğine ait HMQC spektrumu

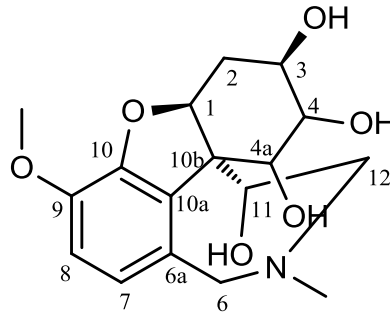


Şekil 5. 13. Epinorgalantamin bileşiğine ait COSY spektrumu



Şekil 5. 14. Epinorgalantamin Bileşiğine ait ESI MS Spektrumu

5. 1. 2. 3 numaralı bileşik: Dihidroksihabrantin



Bu bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda **1** ve **2** nolu bileşikten farklı olarak 6 ppm civarında olefinik protonlara ait olan protonlar gözlenmemiştir. Bunun yerine 3-4 ppm aralığında daha fazla sayıda proton sinyalleri gözlenmiş ve bunların karbonları HSQC’de 60-75 ppm aralığında gözleendiğinden oksi protonlar oldukları düşünülmüştür. 4.20 (H-3), 3.81 (H-4), 3.77 (H-11 ve H-4a) ppm’de gözlenen sinyaller sırası ile 60.7 (C-3), 70.0 (C-4), 71.0 (C-11), 68.3 (C-4a) ppm karbonlarına aittir. 6.90 (H-7 ve H-8) ppm’de singlet olarak gözlenen sinyalin HSQC’de iki karbon göstermesi 124.7 (C-7) ve 112.6 (C-8) ppm’de H-7 ve H-8 protonlarının örtüştüğünü göstermektedir. Aşağı manyetik alana kayan bir diğer oksi proton 4.74 ppm’de (brs) olarak gözlenen H-1 protonudur.

HSQC spektrumundan 3.70 (d, $J=10.5$ Hz, H-6 α) ve 3.50 (d, $J=10.5$ Hz, H-6 β) ppm’de gözlenen protonların 65.0 (C-6), 4.05 (d, $J=3.3$ Hz, H-12 α) ve 3.67 ppm’deki (d, $J=3.3$ Hz, H-12 β) protonların 63.0 (C-12), 2.46 (d, $J=15.0$ Hz, H-2 α) , 2.15 ppm’deki (d, $J=15.0$ Hz, H-2 β) protonların ise 31.0 (C-2) ppm değerindeki CH_2 karbonlarına ait olduğu bulunmuştur. 3.0 ppm’deki pik azota bağlı metilin protonuna aittir ve karbonu 42.0 ppm olarak belirlenmiştir. Metoksi grubuna ait protonun sinyali 3.83 ppm’de gözlenmiş ve karbonu 55.5 ppm’de olarak tespit edilmiştir.

DEPT spektrumunda üç metilen, altı metin, ve iki metil karbonu görülmüştür. CH_2 karbonları 31.0 (C-2), 65.0 (C-6), 63.0 (C-12) ppm’de tespit edilmişlerdir. **1** ve **2** nolu bileşikten farklı olarak bu bileşiğin DEPT spektrumunda CH_2 karbonlarının sayısında bir azalma olduğu görülmüştür. HMBC korelasyonları incelendiğinde 3.0 ppm’deki N- CH_3 ’e ait proton sinyalinin 65.0 (C-6), 63.0 (C-12) ve 71.0 (C-11) karbonları ile korelasyon yaptığı

görülmektedir ki 71.0 (C-11) ppm'deki sinyalin DEPT spektrumunda metin (CH) olarak tespit edilmesi C-11 karbonunun bu bileşikte artık bir metilen karbonu olmadığını ispatlamaktadır. Aşağı manyetik alanda, 71.0 ppm'de çıkması ise C-11 karbonuna hidroksi grubunun bağlanmış olabileceğini düşündürmüştür.

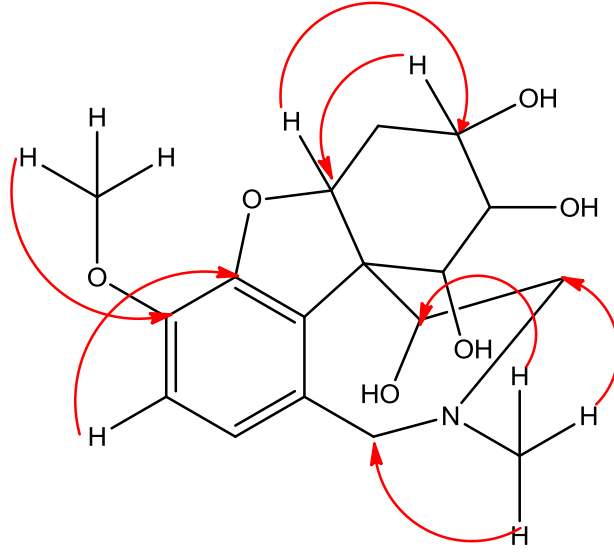
1 ve 2 nolu bileşikten farklı olarak bu bileşikte olefinik protonların sinyallerinin kaybolması ve bu protonlara ait karbonların gerek ^{13}C -NMR gerekse DEPT spektrumunda gözlenmemesi, bunun yerine 60-70 ppm civarında oksimetin (CH) karbon sayısının artması, 1 ve 2 nolu bileşikteki olefinik C-4 (δ_{C} 70.0) ve C-4a (δ_{C} 68.3) karbonlarına hidroksi gruplarının bağlandığını göstermektedir.

HMBC korelasyonları incelendiğinde metoksi grubunun 147.0 ppm'deki (C-9) karbon ile korelasyon göstermesi bu karbona bağlı olduğunun anlaşılmasını sağlamaktadır. 6.90 ppm'de singlet olarak gözlenen H-8 ve H-7 sırasıyla 116.0 (C-6a), 133.0 (C-10a) ppm'deki karbonlar ile korelasyon göstermektedir. δ_{H} 4.20 ppm'deki protonun (H-3), 87.5 (C-1) ppm'deki karbon ile korelasyon göstermesi protonun C-3 karbonuna ait olduğunu doğrulamaktadır. Tam tersi korelasyon 4.74 ppm'deki (H-1) protonu ile C-3 (δ_{C} 60.7) arasında gözlenmiştir. HMBC spektrumunda diğer önemli bir korelasyon 2.46 (d, $J=15.0$ Hz, H-2 α) ve 2.15 (d, $J=15.0$ Hz, H-2 β) ppm'deki H-2 protonları 47.0 ppm'deki kuarterner (C-10b) karbonu arasında gözlenmiştir.

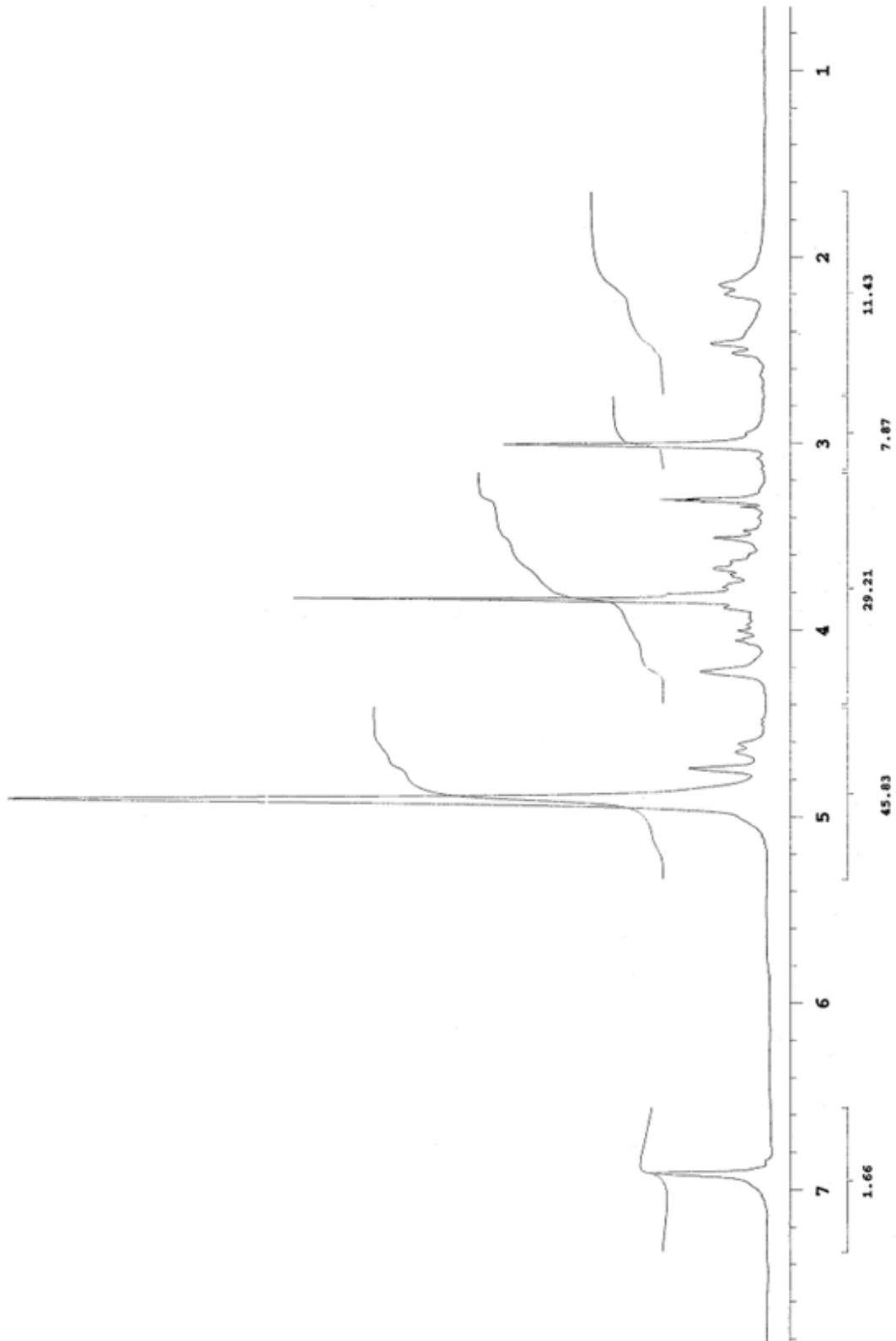
Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_6$ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini m/z 336.0 $[\text{M}-\text{OH}]^+$ olarak vermiştir.

COSY spektrumunda H-2 α ve H-2 β protonları hem H-1 hem de H-3 protonu ile korelasyon göstermiştir.

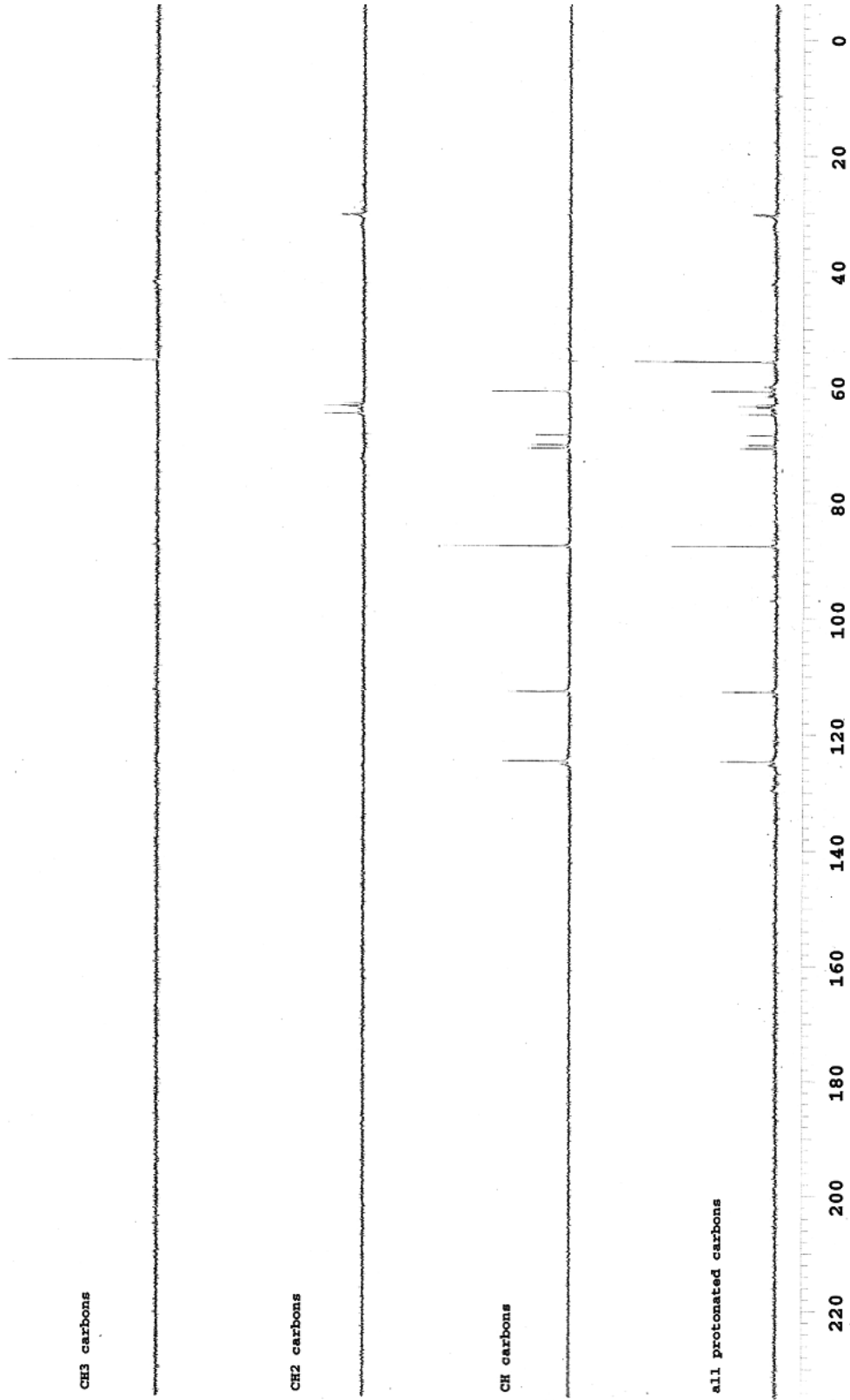
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerler literatürde verilen değerler ile kıyaslandığında habrantin bileşiğine benzer bir yapıda olduğu ancak birebir özdeş olmayıp C-4 ve C-4a karbonlarından dihidroksillendiği sonucuna varılmıştır [63].



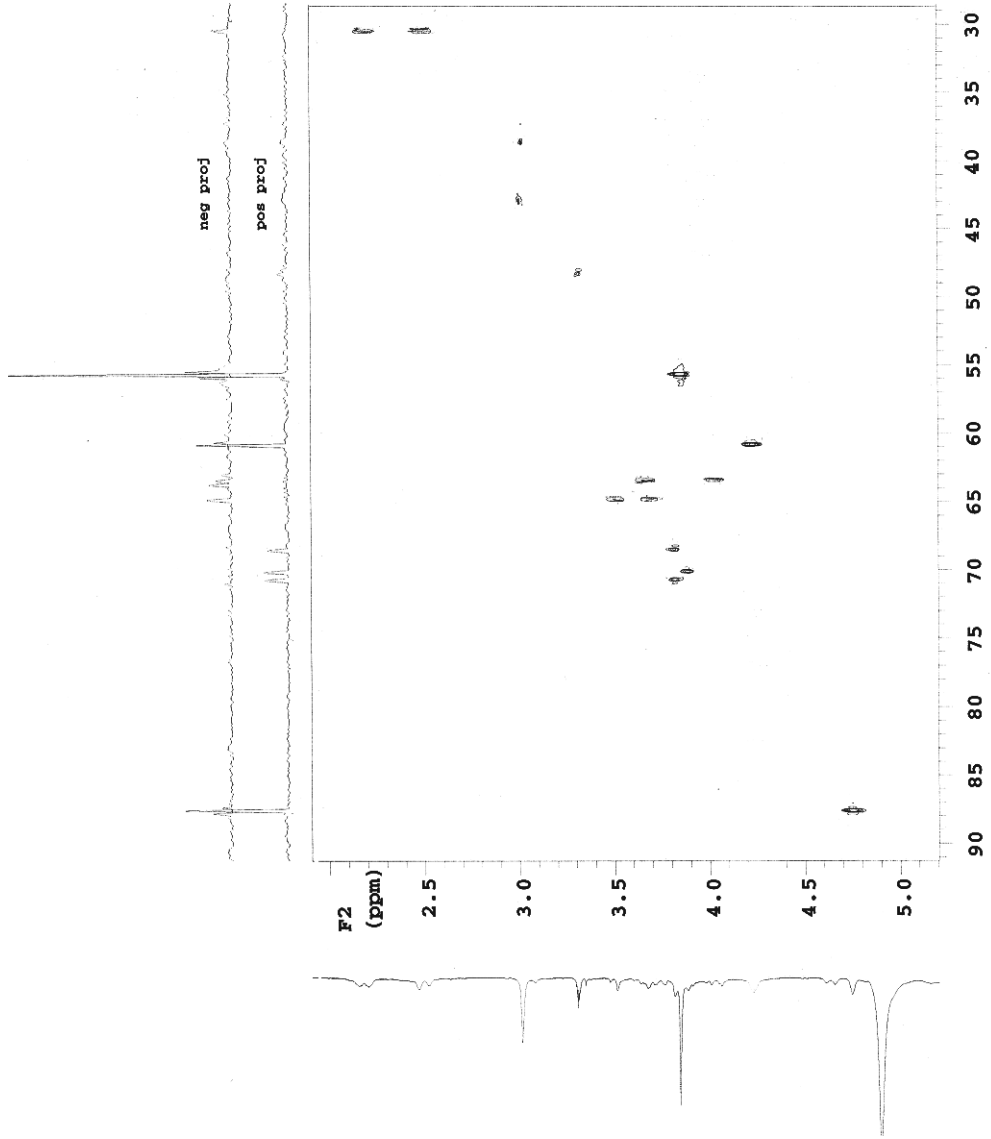
Şekil 5. 15. Dihidroksihabrantin bileşğine ait HMBC korelasyonları



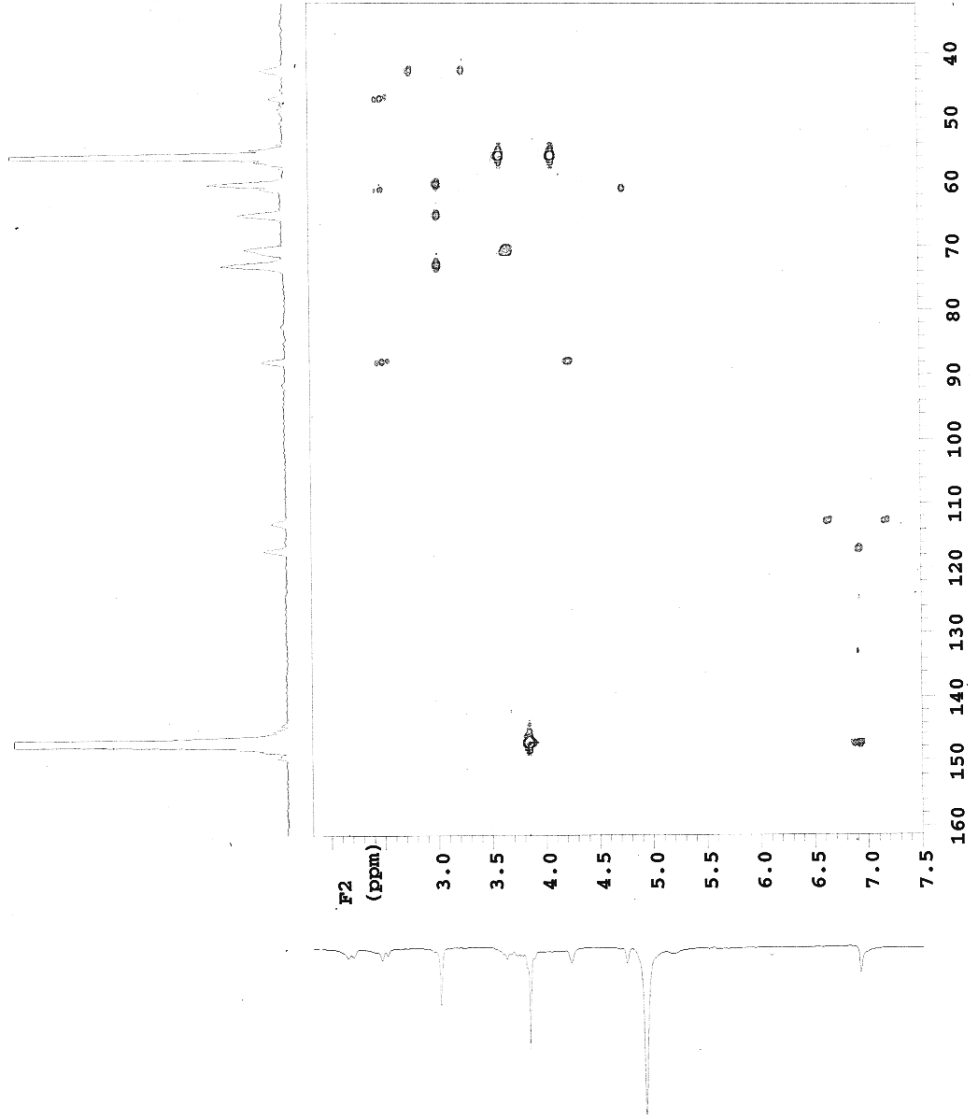
Şekil 5. 16. Dihidroksihabrantin bileşiğine ait ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) spektrumu



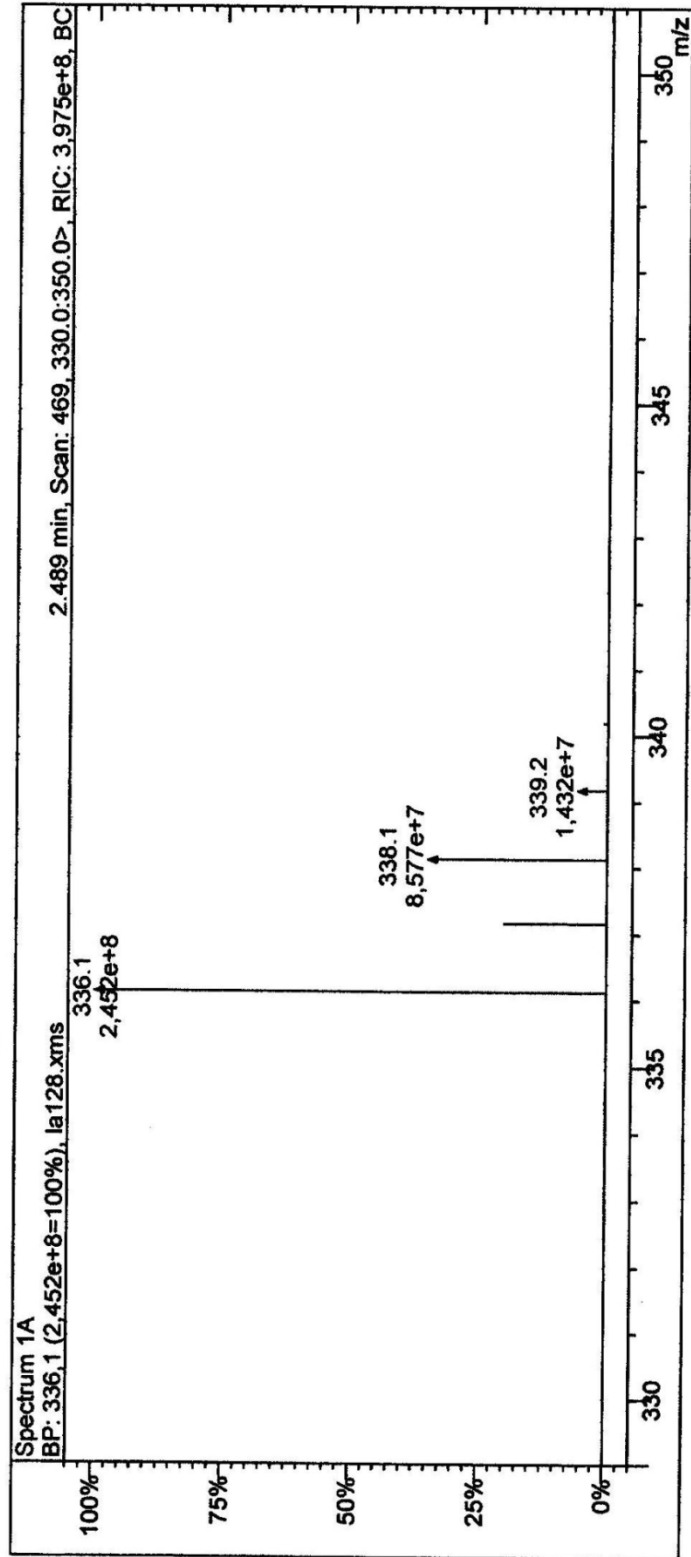
Şekil 5. 17. Dihidroksihabrantin bileşiğine ait DEPT (75 MHz, CD₃OD) spektrumu



Şekil 5. 18. Dihidroksihabrantin bileşiğine ait HSQC spektrumu

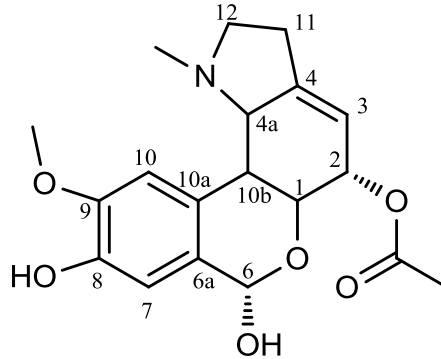


Şekil 5. 19. Dihidroksihabrantin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 5. 21. Dihidroksihibrantin Bileşiğine ait ESI MS Spektrumu

5. 1. 2. 4. Numaralı Bileşik: 2-O-asetildemetillikorenin



Bileşiğin ^1H -NMR spektrumunda 7.01 (H-10) ve 6.75 (H-7) ppm'de gözlenen singlet sinyaller aromatik halka protonlarının birbiri ile *para* konumda olduğunu göstermektedir. Olefinik proton H-3, 5.65 ppm'de brs olarak gözlenmiş, karbonu HMQC'den 119.2 ppm olarak tespit edilmiştir.

Metil grubu 1.92 ppm'deki singlet pik olarak gözlenmiştir ve karbonile komşu olduğu HMBC'de 174.8 ppm ile gösterdiği korelasyon ile anlaşılmaktadır.

Ester oksijenine komşu olan H-2 protonuna ait pik 4.90 ppm'de (d, $J=3.6$ Hz) görülmüş ve HMQC spektrumunda karbonu 67.0 ppm olarak bulunmuştur.

Metoksi grubuna ait sinyal 3.87 ppm (s) olarak gözlenmektedir. Karbonu ise 55.3 ppm'de gözlenmiştir. Azot atomuna bağlı olan metil protonunun sinyali 2.45 ppm'de singlet olarak gözlenmiş ve karbonu 41.6 ppm olarak tespit edilmiştir.

HMQC spektrumundan 3.30 (H-12) ve 2.64 (H-11) ppm'de multipler olarak gözlenen piklerin karbonları sırası ile 55.0 (C-12) ve 26.7 (C-11) ppm olarak belirlenmiştir. 5.65 ppm'de brs olarak gözlenen H-3 protonunun karbonu 119.2 olarak tespit edilmiştir. 4.27 ve 4.90 ppm'de gözlenen H-1 ve H-2 oksiprotonlarının karbonları ise sırasıyla 66.2 (C-1) ve 67.0 (C-2) ppm'de gözlenmiştir. Bir diğer oksiproton H-6 protonuna (δ_{H} 5.45, s) ait karbonun 98.4 ppm'de gözlenmesi bu protonun iki oksijen atomuna komşu olduğunu destekler niteliktedir. İki elektronegatif oksijen atomu arasında olması H-6 protonunun ve karbonunun bu değerde bir sinyal vermesine sebep olmaktadır.

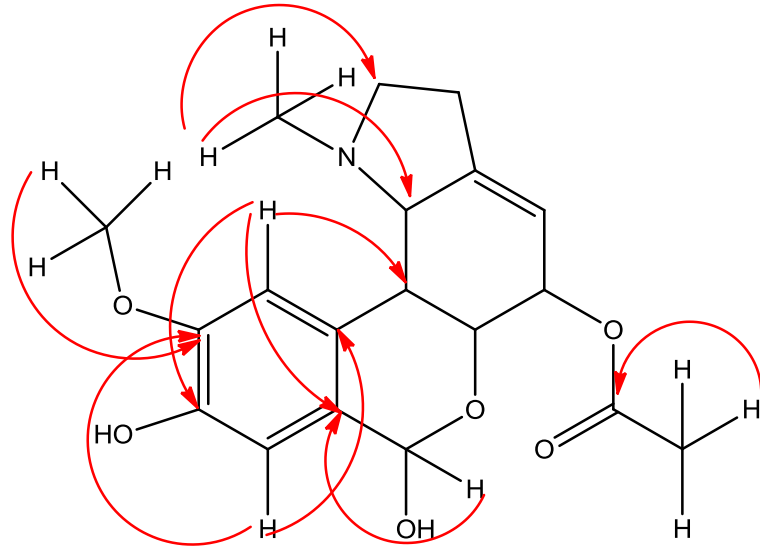
^{13}C -NMR spektrumunda karbonil karbonu aşağı manyetik alanda 174.8 ppm'de, karbonil karbonuna bağlı metilin karbon sinyali ise 22.5 ppm'de gözlenmiştir. Aromatik

halka karbonlarından oksijen taşıyan kuarternar karbonların sinyali 147.8 (C-9), 146.0 (C-8) ppm'de, diğar kuarternar karbonlar 127.2 (C-10a) ve 126.4 (C-6a) ppm'de, *para* konumlu metin karbon sinyalleri ise 114.6 (C-7) ve 111.8 (C-10) ppm'de belirlenmişlerdir.

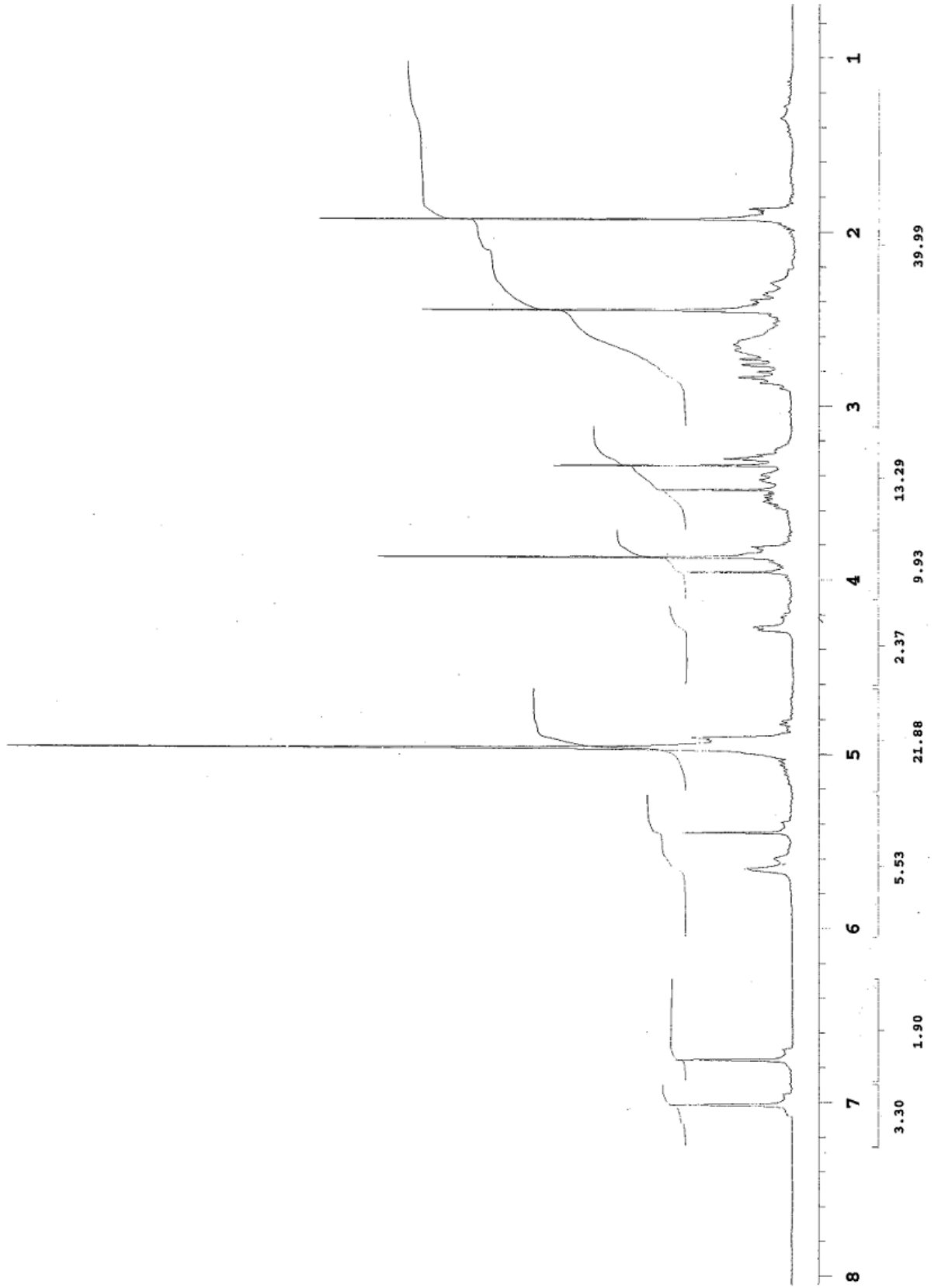
HMBC korelasyonları incelendiğinde 7.01 (H-10) ve 6.75 (H-7) ppm'deki aromatik halkanın pikleri sırası ile 146.0 (C-8) ve 147.8 (C-9) ppm'deki karbonlar ile korelasyon göstermiştir. Ayrıca 7.0 (H-10) ppm'deki pikin 126.4 (C-6a) ile 6.75 (H-7) ppm'deki pikin ise 127.2 ppm (C-10a) ile korelasyon göstermesi singlet hidrojenlerin aromatik halkada *para* konumda olduğunu doğrulamaktadır. Aynı spektrumda azot atomuna bağlı metilin 2.45 ppm'deki (s) protonu 55.0 ppm (C-12) ve 68.9 ppm'deki (C-4a) karbonları ile korelasyon göstermektedir. HMBC spektrumunda diğar önemli eşleşmeler H-10 (δ_H 7.01, s) protonu ile C-10b (δ_C 40.5) karbonu, H-6 (δ_H 5.45, s) ile C-1 (δ_C 66.2) arasında, metoksi protonu (OCH₃) ile C-9 (δ_C 147.8) karbonu arasında gözlenmiştir.

Bileşik ESI-MS kütle spektroskopisinde C₁₉H₂₃NO₆ kapalı formülüne karşılık gelen moleküler iyon pikini m/z 302.1 [M-O-asetil]⁺ olarak vermiştir.

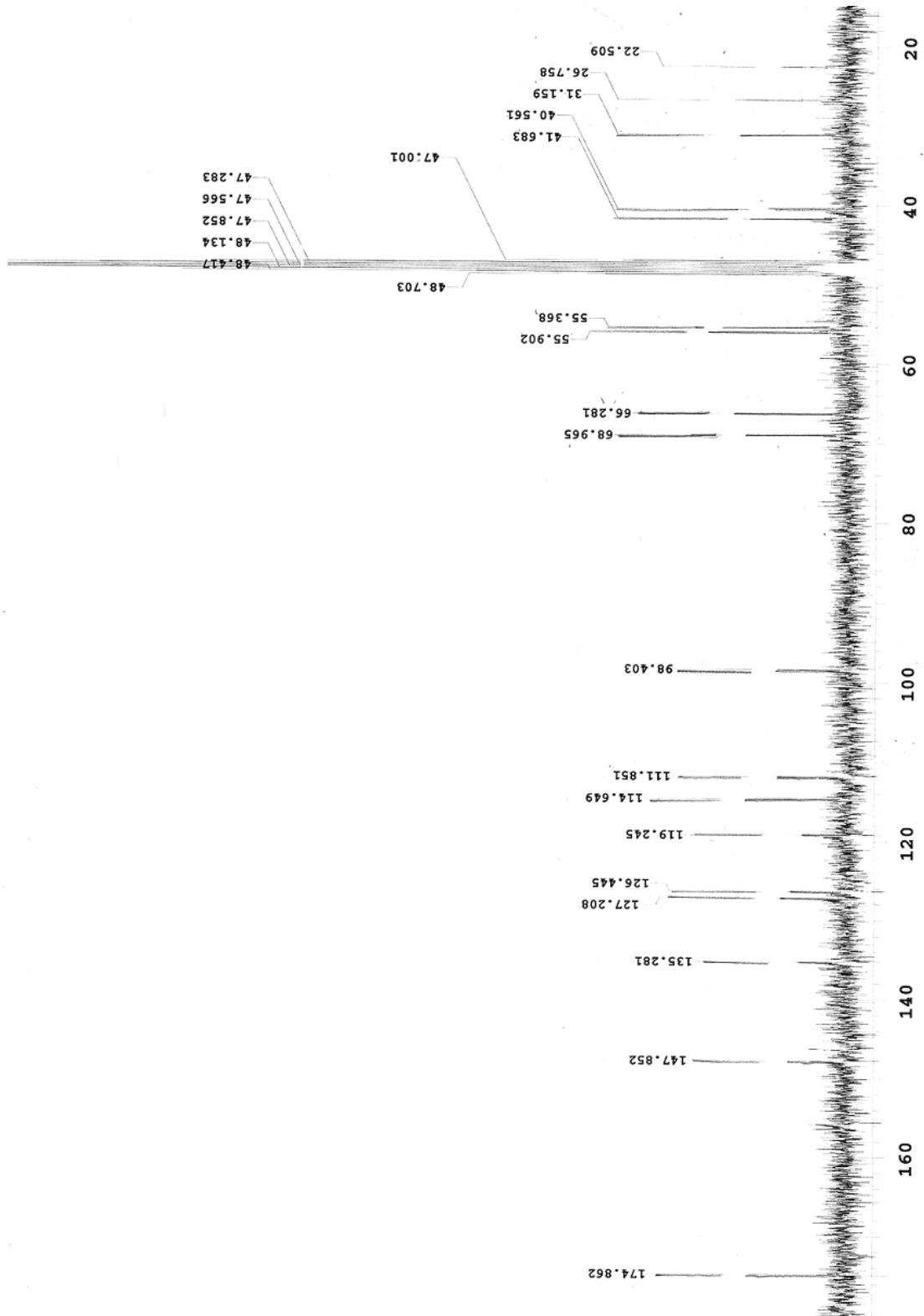
Bileşiğe ait spektral ve fiziksel değerler literatürde verilen değerler ile kıyaslandığında 2-O-asetildemetillikorenin bileşiğine benzer bir yapıda olduğu ancak birebir özdeş olmayıp asetilin C-2 karbonundan eter bağı ile bağlandığı sonucuna varılmıştır [67, 68].



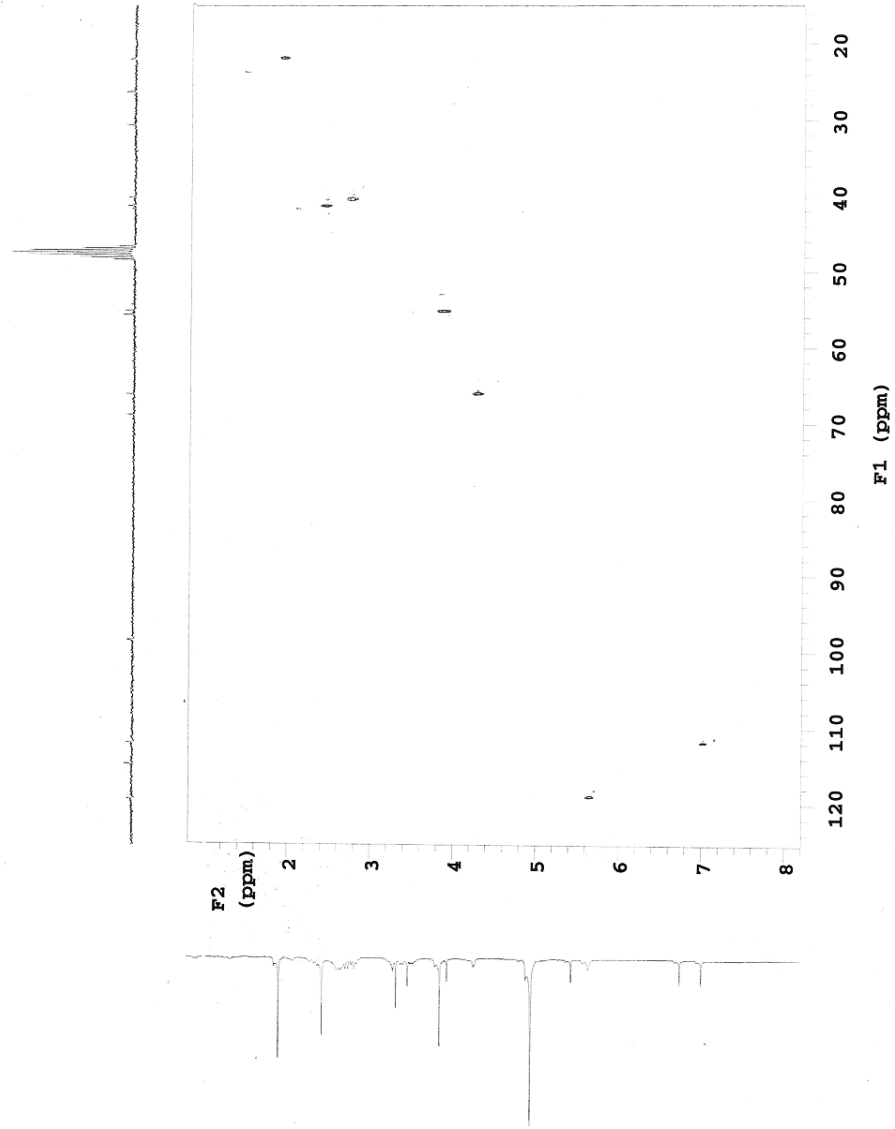
Şekil 5. 22. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiğine ait HMBC korelasyonları



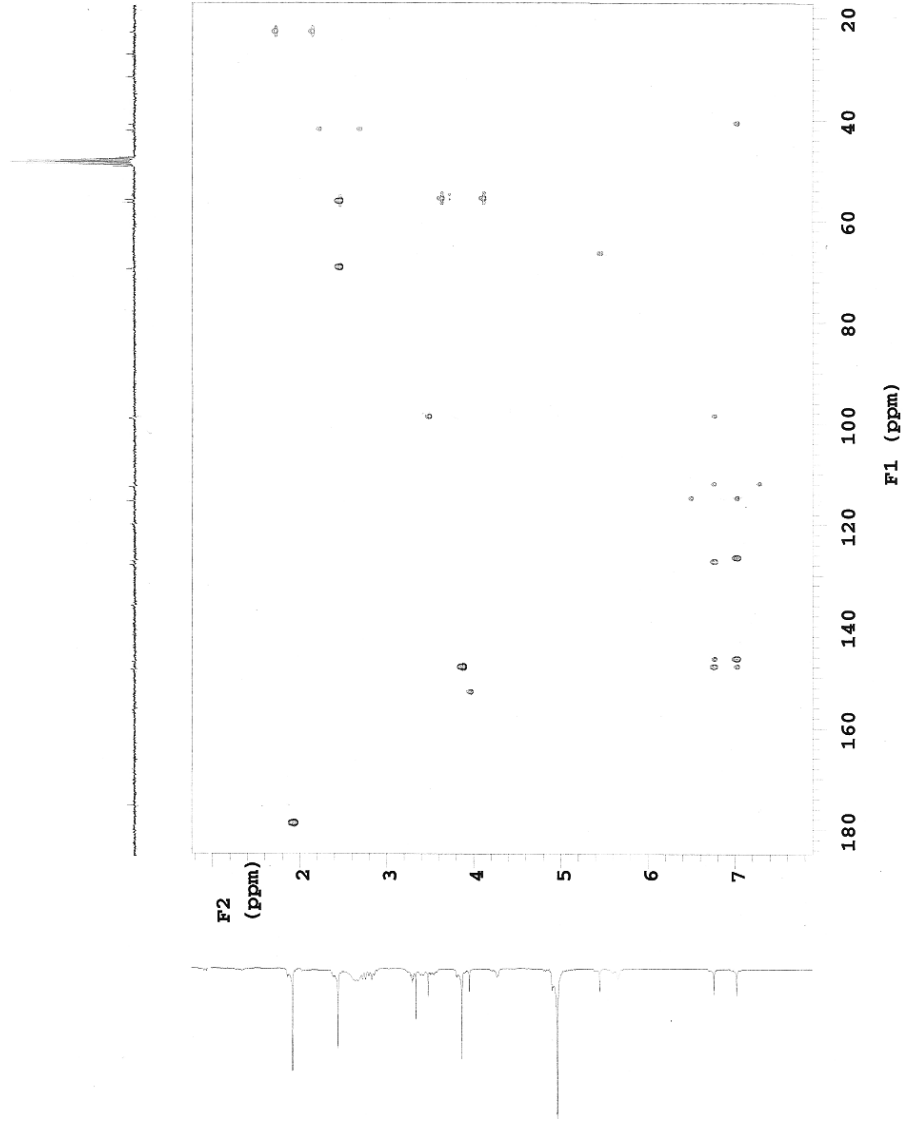
Şekil 5. 23. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiğine ait ^1H -NMR (300 MHz, CD_3OD) spektrumu



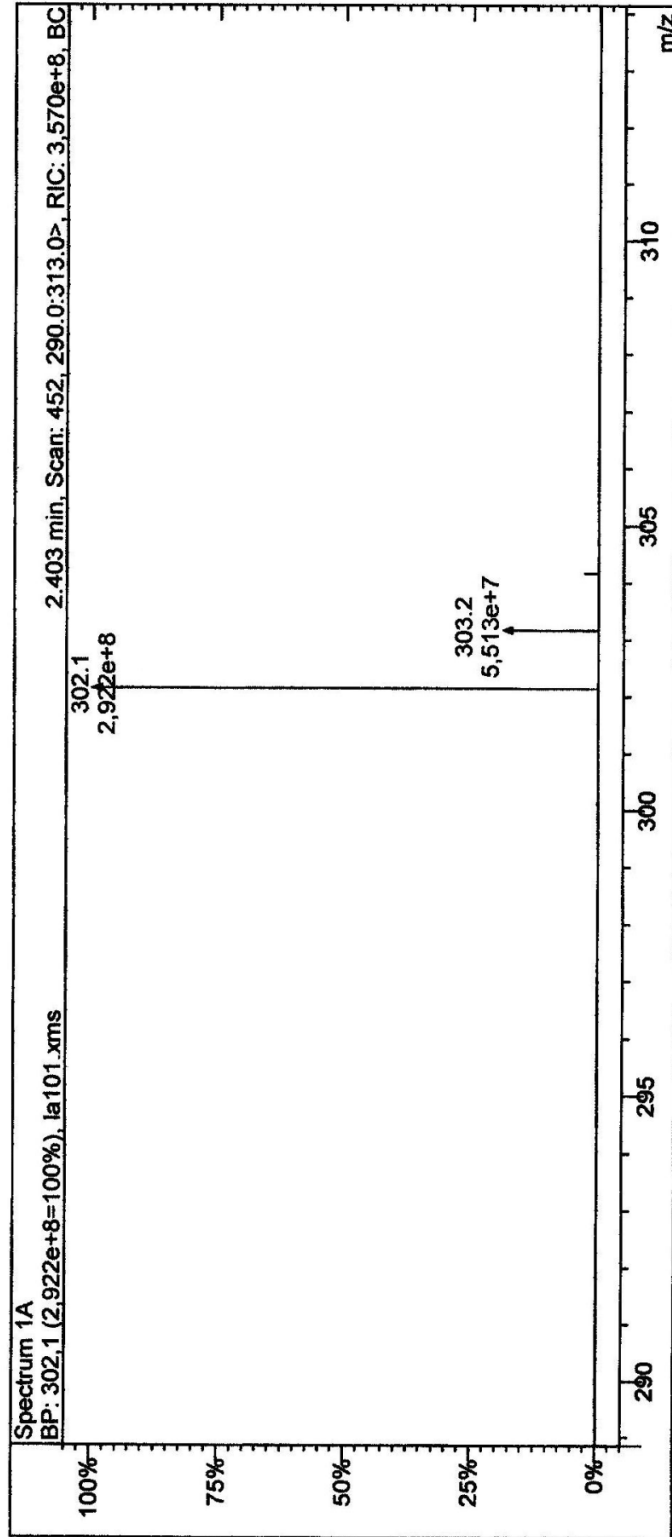
Şekil 5. 24. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 5. 25. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiğine ait HMQC spektrumu



Şekil 5. 26. 2-O-asetildemetillikorenin bileşiğine ait HMBC spektrumu



Şekil 5. 27. 2-O-asetildemetillikorenin bileşğine ait ESI MS Spektrumu

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

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

Yapılan AChE inhibisyon aktivite testleri sonucunda epinorgalantamin (2), Dihidroksihabrantin (3) ve 2-O-asetildemetillikorenin (4) bileşiklerinin standart bileşik olarak kullanılan galantamin (1) ile aktiviteleri kıyaslanmıştır. İzole edilen bileşikler (1-4) AChE ve BChE inhibisyon aktivitelerini tespit etmek üzere taranmıştır. AChE için test edildiğinde, galantamin (1) epinorgalantamin (2), dihidroksihabrantin (3), 2-O-asetildemetillikorenin (4) sırası ile 3.5 μM , 7.5 μM , 12.5 μM , 730.0 μM 'lık IC_{50} değerleri göstermiştir. BChE inhibisyonu IC_{50} değerleri galantamin (1) için 36.0 μM bulunurken (2-4) nolu bileşikler için 840.0, 19.3, 197.0 μM olarak tespit edilmiştir. Standart inhibitörün (galantamin) AChE ve BChE enzimlerine karşı IC_{50} değerleri sırası ile 3.5 μM and 36.0 μM bulunmuştur.

AChE aktiviteleri incelendiğinde 2 nolu bileşiğin hemen hemen galantamine yakın bir aktivite gösterdiği belirlenmiştir. 3 nolu bileşik galantaminden dört kat daha az aktivite göstermesine rağmen oldukça iyi bir aktivite gösterdiği söylenebilir. 4 nolu bileşik ise ortalama bir aktivite göstermiştir. Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitelerine bakıldığında 3 nolu bileşiğin 19.3 μM IC_{50} değeri ile galantaminden daha aktif bileşik olduğu görülmektedir. 2 ve 4 nolu bileşikler ise çok yüksek bir aktivite sergileyememişlerdir. Bu sonuçlara göre yapı ve aktivite arasında ilişki kurmak gerekirse, galantamin ve türevlerinin likorenin türevine göre her iki enzimi de inhibe etmek açısından daha aktif bileşikler olduğu sonucuna varılabilir.

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

Örnekler	AChE IC_{50} (μM)	BChE IC_{50} (μM)
2	7.5	840.0
3	12.5	19.3
4	730.0	197.0
Galantamin ^a	3.5	36.0

^a Standart bileşik

6. KAYNAKLAR

- [1] A. Ceylan, ***Tıbbi Bitkiler I.*** (E.Ü. Ziraat Fakültesi Yayınları, (312), Bornova, İzmir, 1995).
- [2] M. Tanker, N. Tanker, ***Farmakognozi.*** (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2003).
- [3] I. E. Orhan, G. Orhan, E. Gurkas, ***An Overview on Natural Cholinesterase Inhibitors - A Multi-Targeted Drug Class - and Their Mass Production.*** Mini. Rev. Med. Chem. , 10, 836-842, (2011).
- [4] B. Şener, I. Orhan, ***Discovery of drug candidates from some Turkish plants and conservation of biodiversity.*** Pure Appl. Chem. ,77, 1, 53–64, (2005).
- [5] U. Zeybek, ***Über die Alkaloide Verschiedenen Galanthus-Arten. Dissertation.*** Inst. Fur Pharmakognosie Der Univ. Wien. 1983).
- [6] W. Craig, C.W. Lindsley, ***Alzheimer's Disease: Development of Disease-Modifying Treatments Is the Challenge for Our Generation.*** Chem. Neurosci. , 3, 804–805, (2012).
- [7] The angiosperm phylogeny group, ***An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III.*** Bot. J. Linn. Soc. , 161, 2, 105–121, (2009).
- [8] A.W. Meerow, M. F. Fay, C. L. Guy, Q. Li, F. Q. Zaman, M. W.Chase, ***Systematics of Amaryllidaceae based on cladistic analysis of plastid rbcL and trnL-F sequence data.*** Am. J. Bot. , 86, 9, 1325–1345, (1999).
- [9] P.H. Davis, ***Flora of Turkey and the East Aegean Islands.*** (Edinburgh Üniv. Press. ,1984).
- [10] H. Işık, ***Liliaceae ve Amaryllidaceae Familyasından Olan Bazı Geofit Bitki Türleri Üzerinde Fitokimyasal Çalışmalar.*** (T.C. Muğla Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim dalı Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2006).
- [11] C. D. Darlington, E. K. J. Amal, ***Chromosome Atlas of Cultivated Plants.*** 305-307, (1945).
- [12] P. H. Davis, B. R Mill, ***Leucojum L, Amaryllidaceae.*** 8, 364, (Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Univ. Press, Edinburgh. 1984).
- [13] <http://web.ogm.gov.tr>.
- [14] http://www.plantlife.org.uk/wild_plants/county_flowers/

- [15] H. G. Kutbay, M. Kılınç, ***Leucojum aestivum L. (Amaryllidaceae) üzerinde otoekolojik bir çalışma.*** Doğa-Tr. J. of Botany. , 17, 1-4, (1993).
- [16] J. Eichhorn, T. Takada, Y. Kita, M. H. Zenk, ***Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine.*** Phytochemistry. , 49, 1037-1047, (1998).
- [17] S. Lopez, J. Batista, F. Viladomat, C. Codina, ***Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts.*** Life sci. , 71, 2521, (2002).
- [18] G. Bores, F. Hüniger, W. Petko, A. Mutlib, F. Camacho, D. Ruch, D. Selk, V. Wolf, R. Kosley, D. Davis, H. Vargas, ***Pharmalogical evulation of novel Alzheimer's disease therapeutics: Acethylcholine esterase inhibitors related to galanthamine.*** J. FEBS. Lett. , 463, 321-326. , (1999).
- [19] S. Berkov, C. Codina, F. Viladomat, J. Bastida, ***N-Alkylated galanthamine derivatives: Potent acetylcholinesterase inhibitors from Leucojum aestivum.*** Bioorg. Med. Chem. Lett. 18, 2263-6, 2008.
- [20] A. E. Tahchy, S. Bordage, A. Ptak, F. Dupire, E. Barre, C. Guillou, M. Henry, Y. C. D. L. Mattar, ***Effects of sucrose and plant growth regulators on acetylcholinesterase inhibitory activity of alkaloids accumulated in shoot cultures of Amaryllidaceae.*** Plant. Cell. Tiss. Organ. Cult. , 106, 381–390, (2011).
- [21] B. Tener, I. Orhan, J. Satayavivad, ***Antimalarial Activity Screening of Some Alkaloids and the Plant Extracts from Amaryllidaceae.*** Phytother. Res. , 17, 1220–1223, (2003).
- [22] M. Jokhadze, L. Eristavi¹, J. Kutchukhidze, A. Chariot, L. Angenot, M. Tits, O. Jansen, M. Frédérich, ***In Vitro Cytotoxicity of some Medicinal Plants from Georgian Amaryllidaceae.*** Phytother. Res. , 21, 622–624, (2007).
- [23] B. Sener, F. Bingo, I. Erdogan, W. S. Bowers, P. H. Evans, ***Biological activities of some Turkish medicinal Plants.*** Pure. Appl. Chem. , 70, 403-406, (1998).
- [24] B. Şener, , M. Koyuncu, F. Bingöl, F. Muhtar, ***Production of Bioactive Alkaloids from Turkish Geophytes.*** Pure. Appl. Chem. , 70 (11), 1-6, (1999).
- [25] Y. H. Suh, F. Checler, ***Amiloid precursor protein, presenilins, and α -synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease.*** Pharmacol. Rev. , 54: 469-525, (2002).
- [26] C. M. Brenner, C. W. Stevens, ***Pharmacology.*** (Philadelphia, 2006).
- [27] M. Kent, ***Advanced Biology.*** (Oxford University Press. 2000).

- [28] H. E. Temel, ***Demanslı Hastalarda Asetilkolinesteraz Aktivitesi ve Oksidatif Stresin Asetilkolinesteraz Enzim İnhibitörleri İle Değişimi.*** (Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim dalı, 2008).
- [29] [http: // www. Alzheimer.web.tr](http://www.Alzheimer.web.tr)
- [30] N. Qizilbash, A. Whitehead, J. Higgins, ***Cholinesterase inhibition for Alzheimer disease: a meta-analysis of the tacrine trials.*** J. Am. Med. Assoc. , 280, 1777–82, (1998).
- [31] T. Hashimoto, Y. Yamada, ***Alkaloid Biogenesis: Molecular Aspects.*** Annu. Rev. Plant. Biol. , 45: 257-285, (1994).
- [32] S. W. Pelletier, ***The Nature and Definition of an Alkaloid.*** 1 – 31, (Alkaloids Chemical and Biological Perspectives. New York, 1983).
- [33] G. Samuelsson, ***Drugs of Natural Origins.*** Chapter 10, (2004).
- [34] R. B. Herbert, ***The biosynthesis of plant alkaloids and nitrogenous microbial metabolites.*** Nat. Prod. Rep. , 18, 50 – 65, 2001, 14, 359 – 372, 1997, 13, 45-58, 1996, 12, 445-464, (1995).
- [35] G. A. Cordell, M. L. Quinn-Beattie, N. R. Fransworth, ***The potential of alkaloids in drug discovery.*** Phytother. Res. , 15, 183-205, (2001).
- [36] G. Sorensen, I. D. Spenser, ***The biosynthesis of ephedrine.*** Can. J. Chem. , 67, 998-1009, (1989).
- [37] G. Sorensen, I. D. Spenser, ***Biosynthetic route to the Ephedra alkaloids.*** J. Am. Chem. Soc. , 116, 6195-6200, (1994).
- [38] A. Humphrey, D. O'Hagan, ***Tropane alkaloid biosynthesis. A century old problem unresolved.*** J. Nat. Prod. , 18, 494-502, (2001).
- [39] M. N. Huang, T. W. Abraham, S. H. Kim, E. Leete, ***1-Methylpyrrolidine-2-acetic acid is not a precursor of tropane alkaloids.*** Phytochemistry, 41, 767-773, (1996).
- [40] M. Heinrich, A. D. Kinghorn, J. D. Phillipson, D. Maizels, ***Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy.*** (Chapter 6, 2004).
- [41] M. Tanker, N. Tanker, ***Farmakognozi.*** 77, (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2003).
- [42] M. Rueffer, M. H. Zenk, ***Distant precursors of benzyloquinoline alkaloids and their enzymatic formation.*** Z. Naturforsch. , 42c, 319-332, (1987).

- [43] N. Okada, A. Shinmyo, H. Okad, Y. Yamada, **Purification and characterization of (S) – tetrahydroberberine oxidase from cultered Coptis japonica cells.** Phytochemistry, 27(4), 979 -982, (1988).
- [44] B. H. Novak, **Morphine synthesis and biosynthesis-an update.** Curr. Org. Chem. 4, 343-362, (2000).
- [45] S. Hosztafi, Z. Fürst, **Endogenous morphine.** Pharmacol. Res. , 32(1), 15-20, (1995).
- [46] M. Tanker, N. Tanker, **Farmakognozi.** 93, (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2003).
- [47] M. Tanker, N. Tanker, **Farmakognozi.** 118, (Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, 2003).
- [48] J. Eichhorn, T. Takada, Y. Kita, M. H. Zenk, **Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloid galanthamine.** Phytochemistry, 49, 1037-1047, (1998).
- [49] L. J. Scott, K. L. Goa, **A review of its use in Alzheimer's disease.** Drugs, 60 (5), 1095-1122, (2000).
- [50] J. P. Kutney, **Biosynthesis and synthesis of indole and bisindole alkaloids in plant cell cultures: a personal overview.** Nat. Prod. Rep. , 7, 85-103, (1990).
- [51] H. von Döhren, U. Keller, J. Vater, R. Zocher, **Multifunctional peptide synthetases.** Chem. Rev. , 97, 2675-2705, (1997).
- [52] G. A. Cordell, M. L. Quinn-Beattie, N. R. Fransworth, **The potential of alkaloids in drug discovery.** Phytother. Res. , 15, 183-205, (2001).
- [53] V. Alagarsamy, **Alkaloids.** (Pharmaceutical chemistry of natural products, Chapter 5, 2012).
- [54] V. D. Catella, D. Pooter, H. Van Sumere, **J. Chromatogr.** 121, 49-63, (1976).
- [55] K. R. Markham, **Techniques of Flavonoid Identification.** (Academic Press, London, 1982).
- [56] M. Cornick, S. Robson, K. Bohm, **Flavonoids from Wyethia glabra.** Phytochemistry, 24, 1614-1616, 1985.
- [57] N. Asano, A. Kato, K. Oseki, H. Kizu, K. Matsui, **Calystegins of Physalis alkekengi var. francheti (Solanaceae) Structure determination and their glycosidase inhibitory activities.** Eur. J. Biochem. 229, 369-376 (1995).
- [58] biyokure.org/uv-gorunur-bolge-spektroskopisi/5276

- [59] H. N. Patel, V. A. Patel, J. V. Patel, B. D. Jayant, N. P. Chhaganbhai, **UV-spectrophotometric method development and validation for estimation of Galantamine Hydrobromide in tablet dosage form.** J. Chem. Pharm. Res. , 2(2), 44-49, (2010).
- [60] P. M. Dey, J. B. Harborne, **Methods in Plant Biochemistry.** 1, (Academic Press, London, 1989).
- [61] D. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, **Enstrümantal Analiz İlkeleri.** 253-258,330,331,332,335,499,500,502,509,512,524-528 (Bilim Yayıncılık, Ankara, 1998).
- [62] G. L. Ellman, K. D. Courtney, V. Andres, Jr. , R. M. Featherstone, **A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity.** Biochem. Pharmacol. , 7, 88-95, (1961).
- [63] J. P. Andrade, S. Berkov, F. Viladomat, C. Codina, J. S. Zuanazzi, J. Bastida, **Alkaloids from Hippeastrum papilio.** Molecules, 16, 7097-7204, 2011.
- [64] A. Lavata, A. Linden, M. Hesse, M. A. Onur, T. Gözler, B. Kivcak, **Alkaloids of Galanthus elwesii.** Vol. 39, 1229-1240 (12), Phytochemistry, (1995).
- [65] W. C. Shieh, J. A. Carlson, **Asymmetric Transformation of Either Enantiomer of Narwedine via Total Spontaneous Resolution Process, a Concise Solution to the Synthesis of (-)-Galanthamine.** J. Org. Chem. , 59 (18), 5463–5465, (1994).
- [66] J. Bastida, F. Viladomat, J. M. Llabrés, S. Quiroga, C. Codina, M. Rubiralta, **Narcissus nivalis: A New Source of Galanthamine.** Planta medica. , 56, (1988).
- [67] M. Kreh, R. Matusch, **O-Methylodune And N-Demethylmasonine, Alkaloids From Narcissus Pseudonarcissus.** Phytochemistry, 38, 1533-1535, (1994).
- [68] G. R. Almanza, J. M. Frenandez, **Alkaloids from Narcissus Cv. Salome.** Phytochemistry, 43, 6, 1375-1378, (1996).

ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Edirne’de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Edirne’de tamamladıktan sonra 2006 yılında Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde lisans öğrenimime başladım. Kimya bölümünden 2011 yılında mezun oldum ve aynı yıl Organik Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimime başladım.