



***Asphodelus aestivus* Brot. (ÇİRİŞ) BİTKİSİNİN
FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Zeki ADIGÜZEL
Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı
Dr. Öğr. Üyesi Tuba AYDIN
AĞRI-2019
(Her hakkı saklıdır)

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Mehmet Zeki ADIGÜZEL

***Asphodelus aestivus* Brot. (ÇİRİŞ) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL**
ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Dr. Öğr. Üyesi Tuba AYDIN

AĞRI-2019



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ BEYAN FORMU

04/09/2019

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "*Asphodelus aestivus* Brot. (ÇİRİŞ) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI" adlı yüksek lisans tezinin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu ve bu tezi Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik gaye ve ünvan almak amacıyla vermediğimi beyan ederim. Lisansüstü Eğitim-Öğretim yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

Mehmet Zeki ADIGÜZEL

2019/09/04



T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



TEZ ONAY FORMU

***Asphodelus aestivus* Brot. (ÇİRİŞ) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE
BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Öğr. Üyesi Tuba AYDIN danışmanlığında, Mehmet Zeki ADIGÜZEL tarafından hazırlanan bu çalışma, 05/08/2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Organik Kimya Anabilim Dalı Kimya Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak oybirliği ~~veya çoğunluğu~~ (.../...) ile kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet Serdar GÜLTEKİN

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Gökhan AĞGÜL

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Tuba AYDIN

İmza : 
İmza : 
İmza : 

Yukarıdaki sonuç;

Enstitü Yönetim Kurulu .../.../201.. tarih ve / nolu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim HAN
Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaklardan yapılan bildiriş, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak olarak kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***Asphodelus aestivus* Brot. (ÇİRİŞ) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZİ VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Mehmet Zeki ADIGÜZEL

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Tuba AYDIN

2019, 42 sayfa

Bu tezde, *Asphodelus aestivus* Brot. (Çiriş) bitkisinin metanol ekstresinin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi araştırıldı. Ekstreden kromatografik yöntemlerle bir trigliserit, bir uzun zincirli doymamış yağ asidi ve iki bitki sterolü saflaştırıldı. Saflaştırılan sterollerin kimyasal yapıları 1D ve 2D ^1H -NMR ve ^{13}C -NMR spektroskopik yöntemleriyle β -sitosterol ve β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit olarak karakterize edildi. Metanol ekstresinin IC_{50} değerleri hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için sırasıyla 15,54 mg/mL ($R^2=0,9654$) ve 13,33 mg/mL ($R^2=0,9569$) olarak hesaplandı. Bu sonuçlara göre *A. aestivus* Brot.'un metanol ekstresi orta derecede hCA-I ve hCA-II inhibitörü olarak değerlendirildi.

Bu tez çalışmasında *Asphodelus aestivus* Brot. (Çiriş) bitkisinin ilk defa hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi incelendi. Bitkinin halk arasında özellikle hemoroide karşı kullanılması göz önüne alındığında, içeriğindeki yağ asitleri ve fitosterollerden dolayı antihemoroidal aktiviteye sahip olabilme potansiyeli düşünülmektedir.

2019, 42 sayfa

Anahtar sözcükler: *Asphodelus aestivus* Brot., fitosterol, hCA-I, hCA-II, hemoroit

ABSTRACT
MASTER DISSERTATION
PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND INVESTIGATION OF BIOLOGICAL
ACTIVITIES OF *Asphodelus aestivus* Brot. (ÇİRİŞ)

Mehmet Zeki ADIGÜZEL

Advisor: Assistant Professor Dr. Tuba AYDIN

2019, Page: 42

In this thesis, the inhibitory effect of methanol extract of *Asphodelus aestivus* Brot. (Çiriş) was investigated on hCA-I and hCA-II isoenzymes. One triglyceride, one long chain unsaturated fatty acid and two phytosterol were purified from extract by chromatographic methods. The chemical structures of the purified sterols were characterized as β -sitosterol and β -sitosterol-3-*O*- β -D-glycopyranoside by 1D and 2D ^1H -NMR and ^{13}C -NMR spectroscopic methods. IC_{50} values of methanol extract were calculated as 15.54 mg/mL ($R^2 = 0.9654$) and 13.33 mg/mL ($R^2 = 0.9569$) for hCA-I and hCA-II isoenzymes, respectively. According to these results, methanol extract of *A. aestivus* Brot. was evaluated as medium hCA-I and hCA-II inhibitor.

In this study, the inhibitory effect of *A. aestivus* Brot. was examined on hCA-I and hCA-II isoenzymes for the first time. Among the people of the plant is used especially against hemorrhoids. Therefore, it is thought that the plant may have antihemoroidal activity due to the fatty acids and phytosterols contained in the *A. aestivus* Brot.

2019, 42 pages

Keywords: *Asphodelus aestivus* Brot., phytosterol, hCA-I, hCA-II, hemorrhoid

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim boyunca, benden bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen, çalışmalarımın tamamlanabilmesi için her türlü şartı sağlayan ve bana her zaman her türlü desteği sunan çok değerli danışman hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuba AYDIN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez jürimde bulunarak beni onurlandıran Sayın Prof. Dr. Mehmet Serdar GÜLTEKİN ve Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Gökhan AĞGÜL'e teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmalarım boyunca NMR spektrumlarının alınmasında yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Cavit KAZAZ'a ve biyolojik aktivite çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU'na ve Sayın Öğr. Gör. Rüya KAYA'ya teşekkür ederim.

19.07.2019

Mehmet Zeki ADIGÜZEL

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

^{13}C -NMR	Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans
^1H -NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
1-D	1 boyutlu
2-D	2 boyutlu
COSY	Two Dimensional ^1H -Correlation Spectroscopy
<i>d</i>	Dublet
<i>dd</i>	Dubletin dubleti
<i>t</i>	Triplet
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMSO- d_6	Dötero dimetilsülfoksit
g	Gram
H	Hidrojen
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multi Bond Coherence
Hz	Hertz
IR	Infrared
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	Jiromanyetik sabiti
KK	Kolon Kromatografisi
<i>m</i>	Multiplet
m/z	Kütle/İyon
MA	Molekül Kütlesi
mg	Miligram
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitre
MS	Kütle Spektrometresi
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
SKK	Silika jel Kolon Kromatografisi
Q-TOF LC/MS	Mass Quadrupole Time-Of-Flight

ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil 2.1. <i>Asphodellus aestivus</i> Brot. (Çiriş) bitkisinin fotoğrafları	3
Şekil 4.1. AA-1 maddesine ait Q-TOF LC/MS spektrumu	13
Şekil 4.2. AA-1 maddesine ait ^1H -NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spektrumu	14
Şekil 4.3. AA-1 maddesine ait ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spektrumu	15
Şekil 4.4. AA-2 maddesine ait Q-TOF LC/MS spektrumu	16
Şekil 4.5. AA-2 maddesine ait ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) spektrumu	17
Şekil 4.6. AA-2 maddesine ait ^{13}C -NMR (100 MHz, CHCl_3) spektrumu	18
Şekil 4.7. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu	20
Şekil 4.8. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu	21
Şekil 4.9. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) DEPT-135 (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu	22
Şekil 4.10. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) DEPT-90 (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu	23
Şekil 4.11. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu	24
Şekil 4.12. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3) spektrumu	25
Şekil 4.13. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) HMBC (CDCl_3) spektrumu	26
Şekil 4.14. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3- <i>O</i> - β -D-glikopiranozit) ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu	28

Şekil 4.15. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) ^{13}C -NMR (CDCl ₃ , 100 MHz) spektrumu	29
Şekil 4.16. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) DEPT-90 (CDCl ₃ , 100 MHz) spektrumu	30
Şekil 4.17. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) DEPT-135 (CDCl ₃ , 100 MHz) spektrumu	31
Şekil 4.18. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) ^1H - ^1H COSY (CDCl ₃ , 400 MHz) spektrumu	32
Şekil 4.19. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) ^1H - ^{13}C HMQC (CDCl ₃) spektrumu	33
Şekil 4.20. Metanol ekstresinin hCA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği	34
Şekil 4.21. Metanol ekstresinin hCA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği.....	34
Çizelge 4.1. Saflaştırılan sekonder metabolitlerin R _f değerleri	11
Çizelge 4.2. Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC ₅₀ değerleri	35

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİL VE ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1. <i>Asphodellus aestivus</i> Brot.	2
2.2. <i>Asphodellus aestivus</i> Brot. Üzerine Yapılan İzolasyon ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	3
2.3. Karbonik Anhidraz	5
3. MATERYAL ve YÖNTEM	7
3.1. Materyal	7
3.1.1. Bitki materyali.....	7
3.1.2. Kimyasal maddeler.....	7
3.1.3. Enzim materyali	7
3.1.4. Kullanılan alet ve cihazlar	7
3.1.5. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar	8
3.1.6. Kullanılan revelatörler.....	8
3.2. Yöntem	8
3.2.1. İzolasyon için ekstrenin hazırlanması	8
3.2.2. Kromatografik çalışmalar.....	8
3.2.3. MeOH ekstresi ve saflaştırılan bileşikler üzerinde insan karbonik anhidraz I ve II aktivite çalışmaları	10

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	11
4.1. Saflaştırılan Sekonder Metabolitlere Ait Deneysel Bulgular	11
4.1.1 İnce tabaka kromatografisi sonuçları	11
4.2. Saflaştırılan Sekonder Metabolitlere Ait Spektral Bulgular.....	11
4.3. Metanol Ekstresinin hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine İnhibisyonunu Gösteren Bulgular	34
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	36
KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	42

1. GİRİŞ

Terapötik aktiviteleri göz önüne alındığında, doğal ürünler yüzyıllar boyunca geleneksel ilaç olarak kullanılmıştır. Bitkiler ve bitkisel ürünler zengin fitokimyasal kaynaklar olup, birçok önemli biyolojik aktiviteye sahiptir. Günümüzde de hastalıkların tedavisinde ve hastalıklardan korunma amaçlı olarak bitkisel droglar kullanılmaktadır. İlaçların yan etkilerinin olması, insanları daha az yan etkiye sahip olduğunu düşündükleri bitkilerle tedaviye sevk etmiştir. Bundan dolayı bitkilerin bileşiminde bulunan fitokimyasalların bilinmesi ve hangi hastalıkların tedavisinde kullanılabileceğinin tespit edilmesi büyük önem taşımaktadır.

Türkiye zengin bir bitki örtüsüne sahiptir. Dünyadaki yaklaşık 800.000 bitki türünün 10.000'i Türkiye'de yetişmektedir (Unal and Ince 2017). Ülkemizde yetişen bitki türleri üzerine yapılan bilimsel araştırmalar özellikle bitki ekstre ve sekonder metabolitlerinin biyoaktivitesi hakkında her geçen gün yeni bilgiler sağlamaktadır. Bu tez çalışmasında kullanılan bitki materyali, halk arasında çiriş otu olarak bilinen *Asphodelus aestivus* Brot. bitkisidir. Akdeniz havzasında meralarda tarımsal arazilerde, yollarda ve kireçli topraklarda bol miktarda bulunan çiriş otu Ağrı yöresinde de halk arasında yemek olarak oldukça fazla tüketilen bir bitkidir (Samocha *et al.* 2009; Sakar *et al.* 2010; Kirmizi *et al.* 2014). Literatürde çiriş otu hakkında ekzema, mide hastalıkları ve hemoroitler için halk ilacı olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Unal and Ince 2017).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. *Asphodelus aestivus* Brot.

Asphodelus cinsi *Asphodelaceae* (Xanthorrhoeaceae) familyasının *Asphodeloideae* alt familyasına dahildir. Bu familyaya ait bitkiler başlıca ılıman bölgelerde ve Afrika iklim kuşağında olmak üzere 40 cins ve 900 türden oluşmaktadır (El Shabrawy *et al.* 2018).

Asphodelus aestivus Brot. Türkiye’de geleneksel olarak “çiriş otu, yalancı çiriş, çirişlik, deve soğanı” gibi isimlerle tanınır ve halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılır (Matthews 1984; Baytop 1999; Polat and Satıl 2012; Fafal *et al.* 2016). *A. aestivus* Brot. Arap ülkeleri, Afrika, Mısır, Türkiye ve Avrupa’nın bazı kesimlerinde yayılış gösteren, çok yıllık bir bitkidir. Boyları 50 ile 150 cm arasında değişir, yaprakları kılıç şeklinde olup, nisan ve mayıs aylarında beyaz pembemsi çiçekler açar. Bitkinin meyveleri 7 mm büyüklüğünde, bezelye şekilli ve yeşil renklidir. Çiriş otunun yetiştiği topraklar kuru, besince fakir ve kumludur. Ayrıca bitkinin kültürü yapılmaz (Davis 1965).

Çiriş otu halk arasında yemek ve konserve yapımında, otlu peynir yapımında, maya üretiminde, cilt kaplamada yapıştırıcı olarak ve ayakkabı sanayisinde kullanılmıştır. Erzurum ve çevre illerinde üretilen ehram kumaşına sertlik ve parlaklık kazandırmak amacıyla çiriş otunun kullanıldığı, ayrıca İtalyan Rignano Garganico peynirinin üretiminde de bitkinin yapraklarının kullanıldığı rapor edilmiştir (Baydar 2006; İmamoğlu 2010).

Çiriş otu gıda olarak tüketilmesinin yanında geleneksel tıpta da birçok tedavide kullanılmıştır. Diüretik ve yara iyileştirici olarak, hemoroit tedavisinde, menstrual kolaylaştırıcı, saçkıran, ekzema ve abse tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (Baytop 1999; Fafal *et al.* 2016). Bitkinin Gönen yöresinde hıdırellez kamçısı olarak tanındığı ve hemoroid tedavisinde kullanıldığı tespit edilmiştir (Gürhan ve Ezer 2004).



Şekil 2.1. *Asphodellus aestivus* Brot. (Çiriş) bitkisinin fotoğrafları

A. aestivus Brot.'un İran kültüründe de sıkça yer aldığı diş ağrısı, öksürük, mide ve koleretik ağrılarda, idrar söktürücü ve müshil olarak kullanıldığı, küçük parçalara bölünen kurutulmuş kök yumrularının su ve alkolle karıştırılarak güçlü bir yapıştırıcı elde edildiği bilinmektedir. Çiriş otunun kök kısımlarının İsrail'de ekzema, sedef ve mantarda, çatlamış derinin tedavisinde tonik olarak kullanıldığı rapor edilmiştir (Handa *et al.* 2006; İmamoğlu 2010). Yine bazı ülkelerde, bitkinin kurutulmuş köklerinden müsilağ elde edildiği, tahıllar ve patatesle karıştırılarak aspodel ekmeği üretildiği tespit edilmiştir (Sawidis *et al.* 2005; İmamoğlu 2010).

2.2. *Asphodellus aestivus* Brot. Üzerine Yapılan İzolasyon ve Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Literatürde *Asphodelus* türlerinin kimyasal bileşiminde antranoit, flavanoit, steroid, triterpen, arilkumarin, antrakınon ve glikozitleri türevi bileşiklerin bulunduğu rapor edilmiştir (Rizk *et al.* 1972; Adinolfi *et al.* 1984; Adinolfi *et al.* 1991; Van Wyk *et al.* 1995; Calis *et al.* 2006; El-Seedi 2007; Fafal *et al.* 2016).

Son yıllarda yapılan bilimsel çalışmalarda *A. aestivus* Brot.'un çeşitli ekstrelerinin mide koruyucu, antifungal, antioksidan, sitotoksik ve apoptotik etkilere sahip olduğu tespit edilmiştir (Fafal *et al.* 2016). Peksel (2013) ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *A. aestivus* Brot.'un serbest radikal giderme aktivitesi, indirgeme kuvveti, metal şelatlama aktivitesi ve fenolik madde içeriği açısından oldukça iyi bir kaynak olduğu tespit edilmiştir.

Bazı veterinerlerin yaptığı çalışmalar neticesinde Türkiye’de *A. aestivus*’un bulunduğu alanlarda otlayan koyunlarda ürperme, kısmi felç, kas koordinasyon bozukluğu, ağız ve burun akıntısı, solunum yetmezliği, sinirsel lipofuskinozise gibi bazı nörolojik semptomların olduğu rapor edilmiştir (Birincioglu *et al.* 2005, 2011). *A. aestivus* Brot. bitkisinin yumrularının bioetanol üretimi için kullanılabilecek bir kaynak olduğu belirlenmiştir (Polycarpou 2009).

A. aestivus Brot. yumrularının dietil eter, petrol eteri, etil asetat ve su ekstraktları hazırlanarak yapılan bir çalışmada bitkinin antioksidan, sitotoksik ve apoptotik özellikleri araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre bitkinin tüm ekstraktlarının önemli sitotoksik ve apoptotik aktiviteye sahip olduğu bunun yanında dietil eter ve petrol eteri ekstraktlarının ise antioksidan aktivite gösterdiği saptanmıştır (Aslanturk and Celik, 2013). *A. aestivus* Brot. köklerinin dekoksilyon yöntemiyle ekstrakte edildiği bir çalışmada bitki ekstresinin ratlarda antiülser aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Gurbuz *et al.* 2002).

Fafal (2016) ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *A. aestivus* tohumlarının gram (+) ve gram (-) bakterilerine karşı orta derecede antimikrobiyal aktivite gösterdiği, klinik uygulamalar için güçlü antibakteriyel ve antifungal özelliğe sahip olduğu rapor edilmiştir. Aynı çalışmada bitkinin yağ asidi bileşimi GC ile araştırılmış ve yüksek yağ asidi içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre *A. aestivus*’un önemli miktarda doymuş yağ asidi içerdiği tespit edilmiştir (%76,26).

A. aestivus yapraklarının metanol ve aseton ekstraktlarının antioksidan aktivitelerinin araştırıldığı bir çalışmada bitkinin her iki ekstresinin de radikal süpürücü aktivitelerinin olduğu, lipid peroksidasyonunu inhibe ettiği ve iyi bir flavonoid içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir (Peksel *et al.* 2013).

A. aestivus bitkisinin sekonder metabolitlerinin araştırıldığı bir çalışmada bitkinin yapraklarının metanol ekstresinin suda çözünen kısmından klorjenik asit, adenosin, triptofan, fenilalanin, aloë-emodin, aloë-emodin asetat, chrysophanol 1-O-gentiobioside, isovitexin, isoorientin, isoorientin 4’-O- β -glucopyranoside, 6’’-O- (malonyl)-isoorientin, 6’’-O-[(S)-3-hydroxy-3-methylglutaryl]-isoorientin bileşiklerinin izole edildiği rapor edilmiştir (Calis *et al.* 2006).

Kıbrıs'tan toplanan *A. aestivus* Brot.'un çiçeklerinden elde edilen uçucu yağın GC/MS ile bileşenlerinin araştırıldığı bir çalışmada, uçucu yağın ana bileşenlerinin %35,6 hekzadekanoik asit, %17,4 pentakoz, %13,4 trikoz ve %8,4 heptakoz olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada uçucu yağın yüksek miktarda düz zincirli alkanlar, doymuş yağ asidi ve az miktarda asiklik diterpenler içerdiği belirlenmiştir (Polatoglu *et al.* 2016).

2.3. Karbonik Anhidraz

Karbonik anhidrazlar (CA) enzimleri bakterilerde, alglerde, yeşil bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan çinko enzimlerdir. Bu enzimler karbondioksitin bikarbonata geri dönüşümünü sağlayan katalizörlerdir. CA'lar ökaryotik ve prokaryotik hücrelerde bulunur ve bunlar yedi ayrı gen ailesi (α , β , γ , δ , ζ , η ve θ) tarafından kodlanır. Memelilerde sadece α -CA'lar bulunur. Memelilerde karbondioksit kan plazmasında difüzyonla kırmızı kan hücrelerine geçtiğinde, CA enzimi ile hızla karbonik aside dönüşür. Karbonik asit proton ve bikarbonat iyonlarına ayrılır ve tekrar kana geçer ve kanın pH'sını 7.4'e dengeleyerek doğal bir tampon ortamı sağlar. Böylece CA enzimi, vücut fonksiyonlarının zarar görmesini önlemek için kimyasal ortamın asitliğini düzenler (Koksal *et al.* 2019).

Şimdiye kadar memelilerde amino asit dizilimleri, katalitik aktiviteleri, biyokimyasal özellikleri, hücre altı lokalizasyonları ve inhibitörlere/aktivatörlere duyarlılıkları ile 16 farklı α -CA izoenzimi karakterize edilmiştir. Bu izoenzimler, sitoplazmik (CA-I, CA-II, CA-III, CA-VII ve CA-XIII), membran bağlı (CA-IV, CA-IX, CA-XII, CA-XIV, CA-XV), mitokondrial (CA-V), salgı (CA-VI) ve protein (CA-VIII, CA-X ve CA-XI) olarak gruplandırılır (Koksal *et al.* 2019).

Önemli fizyolojik fonksiyonları nedeniyle CA izoenzimleri üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. En çok çalışılan CA izoenzimleri CA-I ve CA-II'dir. CA-I eritrositler ve gastrointestinal sistemde eksprese edilirken, CA-II hemen hemen tüm formlarda ifade edilir. CA-I ve CA-II gaz değişimi ve iyon aktarımı gibi önemli metabolik fonksiyonlara katılırlar (Koksal *et al.* 2019).

CA'lar başlıca iki ana bileşik grubu tarafından inhibe edilir. Bunlar metal kompleks yapıcı inorganik anyonlar ve sülfonamidlerdir. Sülfonamid karbonik

anhidraz inhibitörleri, diüretik olarak veya glokom, epilepsi, konjestif kalp yetmezliği, dağ hastalığı, mide ve duodenal ülser, nörolojik bozukluklar ve osteoporoz gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan ajanlardır (Supuran and Scozzafava 2005). Sülfonamit grubu, çinko bağlama fonksiyonuna bağlı olarak CA inhibisyonu için kullanılan en önemli ve en geniş bileşik grubudur. Günümüzde klinik olarak glokom, epilepsi, kanser, obezite ve zedelenme tedavisinde kullanılan çok sayıda sülfonamideritler geliştirilmiştir (Koksal *et al.* 2019).

Çalışmanın Amacı

Ülkemizde çiriş otu olarak bilinen *A. aestivus* Brot. halk arasında yemek olarak tüketilmesinin yanında çeşitli hastalıkların tedavisinde de kullanılmaktadır. Yapılan literatür taramasında *A. aestivus* Brot.'un insan CA-I ve CA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisini belirleyen herhangi bir bilimsel araştırma yapılmadığı saptanmıştır. Bu çalışmada *A. aestivus* Brot. bitkisinin metanol ekstresinin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerindeki inhibisyon etkisi araştırıldı. Bitkinin metanol ekstresi kromatografik yöntemlerle saflaştırıldı.

3. MATERİYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Bitki materyali

A. aestivus Brot. bitkisinin toprak üstü kısımları 2015 yılı Nisan ayında Ağrı İli Tutak İlçesi Ceylanlı köyünden toplandı. Bitkinin tür teşhisi Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nden Dr. Öğr. Üyesi Yalçın KARAGÖZ tarafından yapıldı. Bitki temin edildikten sonra gölgede kurutulup, Ağrı İbrahim Çeçen Üniversitesi Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarında muhafaza edildi.

3.1.2. Kimyasal maddeler

Çalışmada kimyasal madde olarak vanilin, sülfürik asit (%98), metanol, kloroform, diklormetan, etilasetat, aseton, dietil eter, *n*-hekzan, dötere kloroform ve dötere piridin kullanılmıştır. Tüm kimyasallar Tekkim ve Sigma-Aldrich firmalarından satın alınmıştır.

3.1.3. Enzim materyali

Biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılan insan karbonik anhidraz enzimleri (hCA-I ve hCA-II) literatüre göre insan kanından saflaştırılmıştır (Göçer 2014).

3.1.4. Kullanılan alet ve cihazlar

NMR Spektrometre (Bruker 400 MHz), Spektrofotometre (Perkin-Elmer), Rotary Evaporatör (Heidolph), UV Lambası (Camag UV Bethrachter), UV-VIS Spektrofotometre (Shimadzu, UV-1208), Derin dondurucular (-30 ve -86°C, Sanyo, Japan), pH metre (Hanna Instrument), Hassas terazi (Scaltec SBA 41), İnkübatör (Elektro-Mag, 0-300°C), Otomatik pipetler (Biohit, Socorex ve Oxford Pipettors), Çalkalayıcı (Nüve SL 350), Vorteks (Fisons, Whirlimixer), Saf su cihazı (Firstreem Calypso MK 1 Glass Still), Magnetik karıştırıcı (Stuart Scientific), UV-Spektrofotometre küveti (1 cm³'lük Kuartz Küvet).

3.1.5. Kromatografik çalışmalarda kullanılan adsorbanlar

İnce Tabaka Kromatografisi (İTK); Silika jel (Hazır plak, Kiesel gel 60 F254, 0,2 mm, Merck, 5554), Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi (PİTK): Silika jel (Hazır plak, Kiesel gel 60 F254, 0,5 mm, Merck 5557), Kolon Kromatografisi (KK); Silika jel (Kiesel gel 60, 70-230 mesh, Merck; Kiesel gel 60, 230-400 mesh, Merck).

3.1.6. Kullanılan revelatörler

UV Lambası (UV₂₅₄ ve UV₃₆₆ nm)

Vanilin/Sülfürik asit: Vanilinin derişik H₂SO₄ içerisindeki çözeltisi (%1'lik, püskürtmeden sonra kromatogram 105°C'de birkaç dakika ısıtılır).

3.2. Yöntem

3.2.1. İzolasyon için ekstrenin hazırlanması

1850 g *Asphodelus aestivus* Brot. bitkisinin toprak üstü kısımları güneş görmeden gölgede kurutulduktan sonra sıvı azot ile öğütüldü. Öğütülmüş bitki 3L MeOH ile 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek tüketildi ve bu işlem 6 defa tekrarlandı. Elde edilen metanollü ekstratlar adi süzgeç kağıdı ile süzüldü ve süzüntüler birleştirildi. Süzüntüler 50°C sıcaklık ve düşük basınçta döner buharlaştırıcı yardımıyla konsantre hale getirildi ve ekstraksiyon sonucunda toplam 95 g ham ekstre elde edildi. Ekstraksiyon verimi %5,14 olarak belirlendi. 8 g ekstrenin biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmak üzere ayrıldı.

3.2.2. Kromatografik çalışmalar

Ham ekstre (87 g) önce az miktarda su ve MeOH karışında çözöldü ve farklı çözücü sistemlerinde İTK yapılarak kontrol edildi. İTK ile yapılan kontrollerde meydana gelen renkler yardımıyla SKK için uygun hareketli faz sistemleri belirlendi. Bu amaçla 87 g ham ekstre kuru tatbik yapılmak üzere 120 g silika jele iyice emdirildi. Ekstreği fraksiyonlara ayırmak için 2 ayrı SKK yapıldı. İlk fraksiyonlama için 350 g silika jel 60 (70-230 mesh) CHCl₃:MeOH (90:10) çözücü sisteminde süspanse edildikten sonra 4x72 cm ebatlarındaki kolona tatbik edildi. Silika jele emdirilmiş haldeki ham ekstrenin 100 gramı kuru tatbikle kolona

yüklendi. Fraksiyonlama işlemine 1000 mL saf $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (90:10) hareketli faz sistemi ile başlandı ve metanolün artan polaritesi ile $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (1000 mL; 80:20; 70:30; 60:40) devam edildi. Fraksiyonlar 50 mL hacimler halinde toplandı ve yoğunlaştırıldıktan sonra İTK ile farklı çözücü sistemlerinde kontrol edildi. Aynı R_f değerlerini taşıyan ve aynı lekeleri veren fraksiyonlar birleştirildi. Aynı işlemler ham ekstrenin silika jele emdirilmiş olan kalan kısmı (107 g) için tekrarlandı. Bu amaçla 350 g silika jel 60 (70-230 mesh) $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$ (90:10) ile süspansiyon haline getirildi ve 4x70 cm ebatlarındaki kolona tatbik edildi. Silika jele emdirilmiş ham ekstre (107 g) kuru tatbikle kolona yüklendikten sonra elüsyona ilk kolondaki gibi devam edildi. Farklı kolonlarda elüe edilen ham ekstrenin fraksiyonları İTK ile kontrol edildikten sonra ilk kolonda elde edilen fraksiyonlar ile benzer lekeleri içerenler birleştirildi. Ham ekstrenin fraksiyonlama işlemlerinin sonucunda toplam 8 alt fraksiyon elde edildi ve bu fraksiyonlar **AAA** (1,92 g), **AAB** (6,00 g), **AAC** (2,90 g), **AAD** (2,37 g), **AAE** (2,71 g), **AAF** (0,80 g), **AAG** (6,46 g), **AAH** (6,51 g) olarak kodlandı.

AAA Fraksiyonu Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar:

AAA fraksiyonundan madde saflaştırmak için 100 g silika jel (230-400 mesh) $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:EtOAc}$ (90:10) sisteminde süspansiyon haline getirildikten sonra 4x50 cm ebatlarındaki kolona tatbik edildi. AAA (1,92 g) fraksiyonu aynı çözücü sisteminde çözüldükten sonra kolona yüklendi. Fraksiyonlamaya $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:EtOAc}$ (90:10) sistemiyle devam edildi ve fraksiyonlar 25 mL hacimler halinde toplandı. İTK ile yapılan kontrollerde 1-2. fraksiyonlarda major bir leke gözlemlendi ve bu lekeyi saf olarak ayırmak için 1-2. fraksiyonlar (435 mg) tekrar SKK ile elüe edildi. Bu amaçla 30 g silika jel (230-400 mesh) *n*-hekzan: Et_2O (80:20) çözücü karışımıyla süspanse edildikten sonra 2x22 cm ebatlarındaki kolona yüklendi. 435 mg karışım kolona tatbik edildikten sonra *n*-hekzan: Et_2O (80:20) sistemiyle kolon 10 mL hacimlerle fraksiyonlara ayrıldı. Fraksiyonlama işlemlerinin sonucunda 5. fraksiyonda major bir leke temiz olarak elde edildi ve **AA-1** (20 mg) olarak kodlandı.

AAB Fraksiyonu Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar:

AAB fraksiyonunu SKK ile saflaştırılmak üzere 90 g silika jel (230:400 mesh) $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{:EtOAc}$ (70:30) çözücü sisteminde süspansiyon haline getirildikten

sonra kolona yüklendi. AAB (6,00 g) fraksiyonu aynı çözücü sisteminde 50°C sıcaklıkta ısıtılarak çözülüp kolona tatbik edildi. Elüsyon CH₂Cl₂:EtOAc (70:30) çözücü sistemiyle devam ettirildi. Fraksiyonlar 10 mL hacimlerle toplandı ve 6-10 (1,95 g) ile 11-14. (847 mg) fraksiyonlar tekrar SKK ile elüe edildi. 6-10. fraksiyonları elüe etmek için 60 g silika jel (230:400 mesh) CHCl₃:Aseton (95:5) çözücü sistemi ve 2x26 cm ebatlarındaki kolon kullanıldı. Fraksiyonlar 10 mL hacimlerle toplandı ve İTK’da yapılan incelemeler sonucunda 6-7. fraksiyonlarda bekletilme esnasında kendiliğinden çökme meydana geldi. Çöken madde metanol ile iyice temizlendikten sonra İTK ile kontrol edildiğinde temiz olduğu görülen bu madde AA-2 (572 mg) olarak kodlandı. Aynı kolonun 22-25. fraksiyonlarda yine temiz bir maddenin olduğu gözlemlendi ve bu madde AA-3 (130 mg) olarak kodlandı.

AAC Fraksiyonu Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar:

AAC (2,90 g) fraksiyonunu saflaştırmak için 80 g silika jel (230-400 mesh) CHCl₃:Aseton (90-10) sisteminde süspansiyon haline getirildikten sonra 2x49 cm ebatlarındaki kolona yüklendi. AAC (2,90 g) fraksiyonu aynı çözücü sisteminde çözüldükten sonra kolona tatbik edildi. Elüsyona CHCl₃:Aseton (90-10) çözücü sistemiyle devam edildi. Fraksiyonlar 5 mL hacimler halinde toplandı ve İTK ile farklı çözücü sistemlerinde kontrol edilerek aynı R_f değerlerine sahip olanlar birleştirildi. Birleştirilmeler sonucunda 4-6. fraksiyonların temiz bir madde olduğu anlaşıldı ve bu madde AA-4 (250 mg) kodlandı.

Diğer Fraksiyonlar Üzerinde Yapılan Kromatografik Çalışmalar:

Yapılan kromatografik çalışmalarda diğer fraksiyonlardan saf madde izole edilemedi.

3.2.3. MeOH ekstresi ve saflaştırılan bileşikler üzerinde insan karbonik anhidraz I ve II aktivite çalışmaları

hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine aktivasyon belirleme çalışmaları Doç. Dr. Hülya AKINCIOĞLU’nun bireysel laboratuvarında Öğr. Gör. Rüya KAYA rehberliğinde gerçekleştirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Saflaştırılan Sekonder Metabolitlere Ait Deneysel Bulgular

4.1.1 İnce tabaka kromatografisi sonuçları

A. aestivus Brot. bitkisinin yaprakları kullanılarak elde edilen metanol ekstresinden **AA-1**, **AA-2**, **AA-3** ve **AA-4** kodlu bileşikler izole edildi. İzole edilen bu bileşiklerin İTK ile yürütülmesi neticesinde belirlenen R_f değerleri Çizelge 4.1’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. Saflaştırılan sekonder metabolitlerin R_f değerleri

Madde	Çözücü sistemi	R_f değeri	Adsorban
AA-1	<i>n</i> -hekzan:Et ₂ O (80:20)	0,71	Silika jel
AA-2	CHCl ₃ :Aseton (95:5)	0,53	Silika jel
AA-3	CHCl ₃ :Aseton (90:10)	0,71	Silika jel
AA-4	CHCl ₃ :Metanol (85:15)	0,88	Silika jel

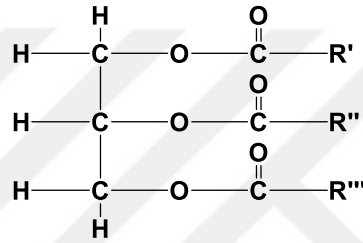
4.2. Saflaştırılan Sekonder Metabolitlere Ait Spektral Bulgular

A. aestivus Brot. bitkisinin yapraklarının metanol ekstresinden izole edilen **AA-1**, **AA-2**, **AA-3** ve **AA-4** maddelerinin molekül yapılarını karakterize etmek üzere 1D ve 2D NMR spektroskopisi ve kütle spektrometresi kullanılmıştır. Elde edilen spektral bulguların analiz edilmesi neticesinde **AA-3** ve **AA-4** kodlu maddelerin kimyasal yapıları sırasıyla **β -sitosterol** ve **β -sitosterol 3-O- β -D-glukopiranozit** olarak karakterize edilmiştir. **AA-1** ve **AA-2** kodlu maddelerin kimyasal yapıları ise tam olarak karakterize edilememiştir.

Saflaştırılan maddelere ait bilgiler aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

AA-1 KODLU MADDE

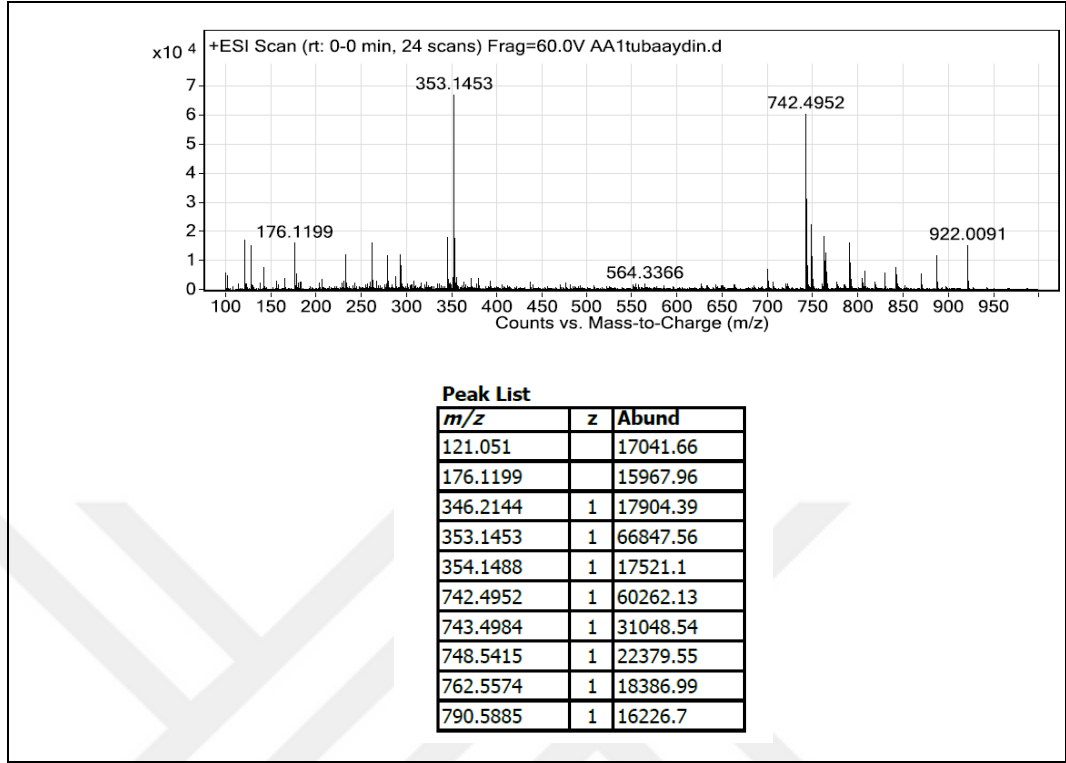
Yapılan analizler neticesinde **AA-1** kodlu maddenin kimyasal yapısının bir tligliserit ait olduğu anlaşıldı. Maddeye ait ^1H ve ^{13}C NMR ile Q-TOF LC/MS kütle spektrumları incelendiğinde maddenin bir trigliserit olabileceği saptandı. Trigliseritlerin kimyasal yapıları, R grupları arasındaki farklılıklar olsa da benzer spektroskopik verilere sahip olabileceği literatürde de bilinmektedir (Simchick *et al.* 2018). **AA-1** kodlu maddeye ait ^1H ve ^{13}C NMR ile Q-TOF LC/MS spektral verileri aşağıdaki gibidir.



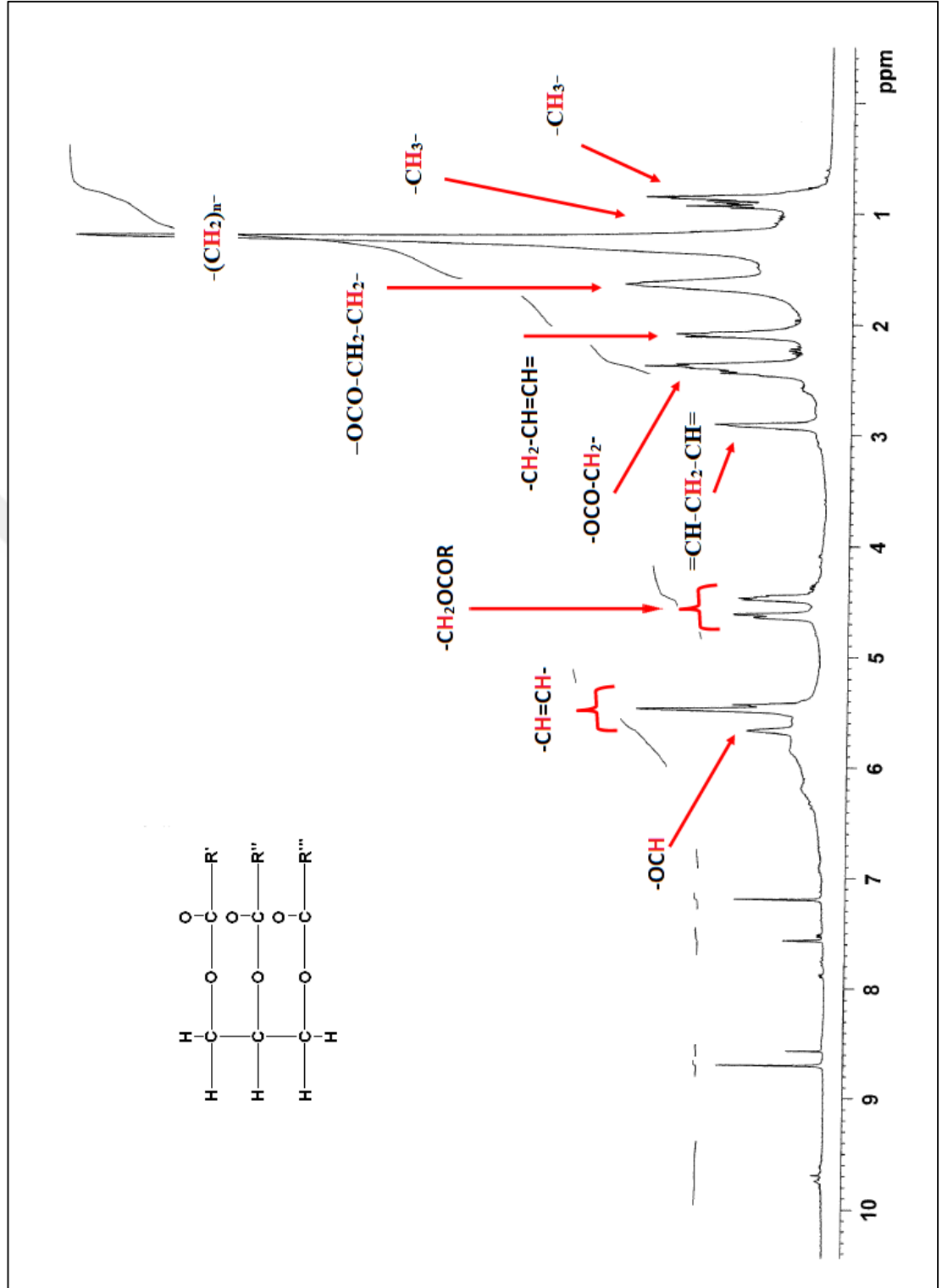
Bir trigliserit genel formülü

Şekil 4.1’de verilen **AA-1** kodlu maddeye ait Q-TOF LC/MS spektrumuna göre birden fazla kütle yarılmaları gözlenmektedir. Maddenin kimyasal yapısı tam olarak bilinmediği için bu yarılmalar bize karışım olma ihtimalini göstermiştir. Tahmin edilen yapı 1D ve 2D NMR spektrumlarına göre uzun zincirli bir trigliserite aittir. Ancak kütle spektrumu ile **AA-1** kodlu maddenin saf olduğu tam olarak saptanamamıştır.

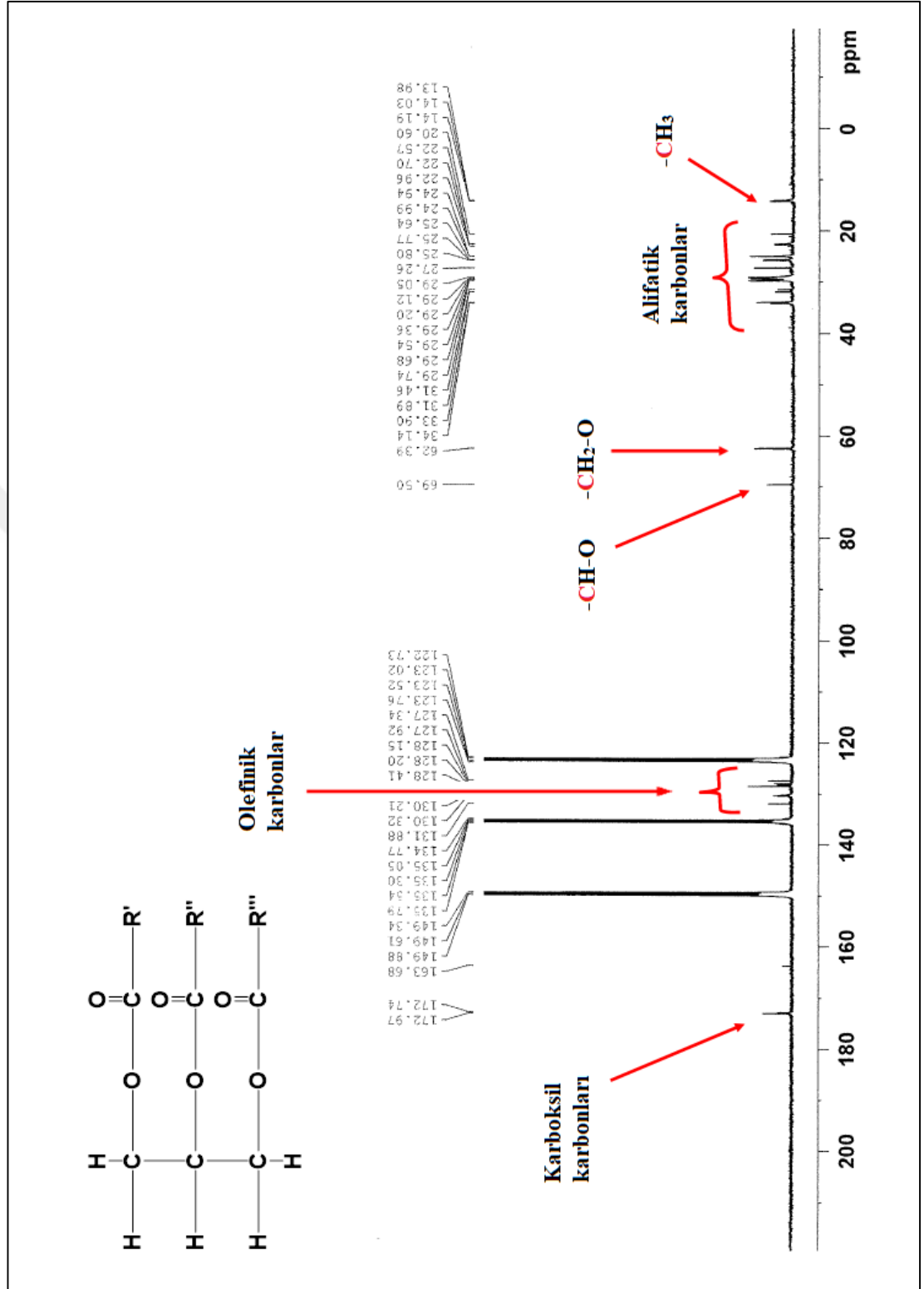
Şekil 4.2’de **AA-1**’e ait ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde bir trigliserite ait karakteristik proton sinyalleri gözlenmektedir. Şekil 4.3’de ^{13}C -NMR spektrumunda $\delta=172,9$ ve $\delta=172,7$ ppm’de görülen sinyaller karboksil sinyallerine, $\delta=122,7$ ile $\delta=131,8$ ppm arasında gelen sinyaller olefinik karbonlara, $\delta=62,3$ ppm ve $\delta=69,5$ ppm’de gelen sinyaller gliserol karbonlarına aittir. $\delta=20,6$ ile $\delta=34,1$ ppm arasındaki sinyaller alifatik karbonlara, $\delta=13,9$ ile $\delta=14,1$ ppm arasındaki sinyaller metil karbonlarına aittir. ^{13}C -NMR spektrumundaki sinyaller ile ^1H -NMR spektrumundaki sinyaller birlikte değerlendirildiğinde **AA-1** kodlu maddenin bir trigliserit olduğunu doğrulamaktadır.



Şekil 4.1. AA-1 maddesine ait Q-TOF LC/MS spektrumu



Şekil 4.2. AA-1 maddesine ait ^1H -NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spektrumu

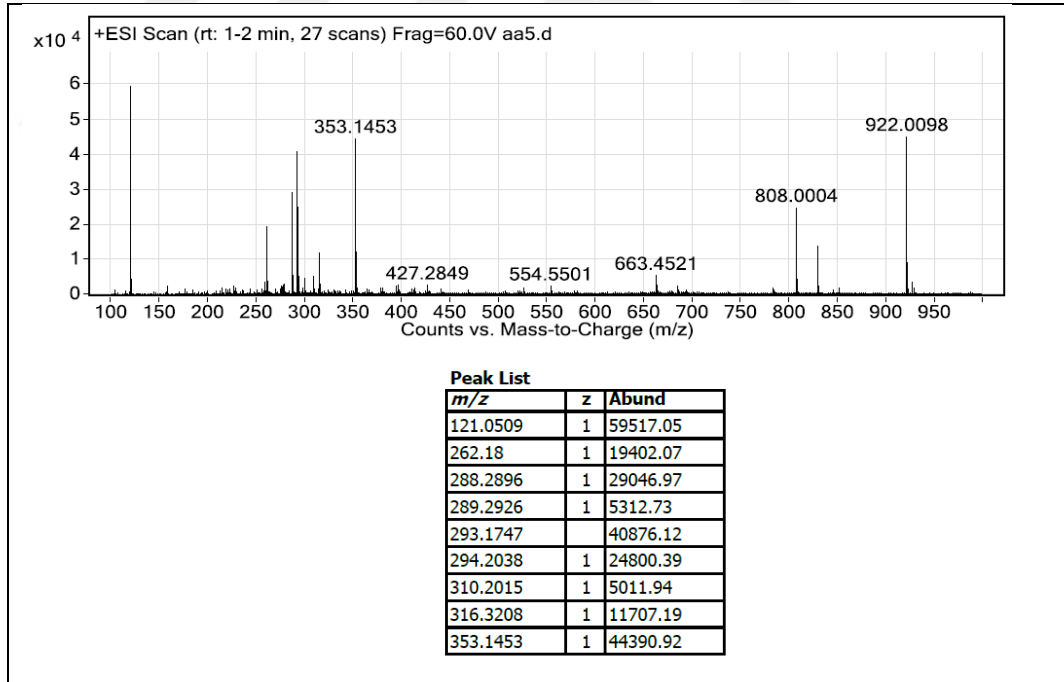


Şekil 4.3. AA-1 maddesine ait ^{13}C -NMR (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spektrumu

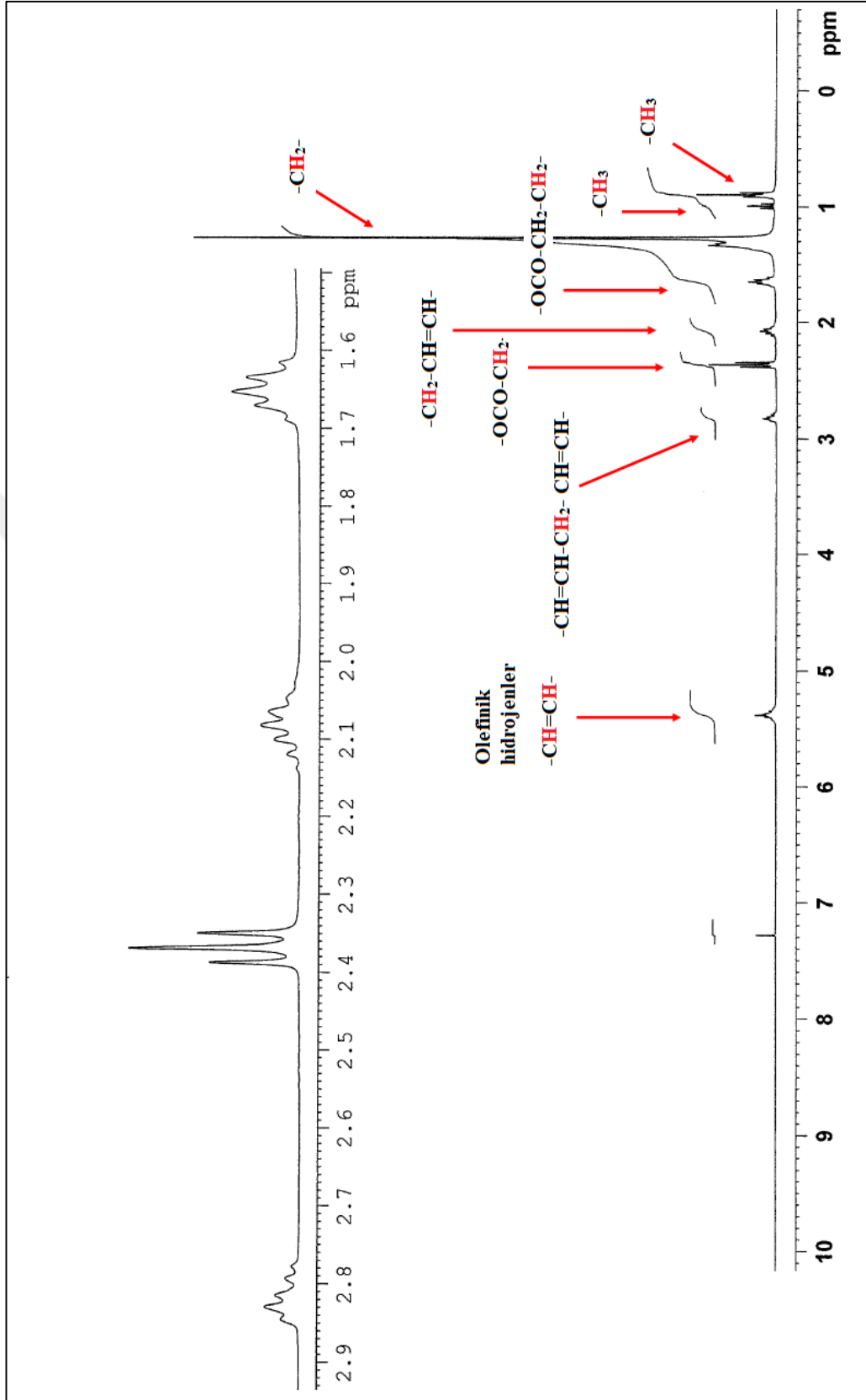
AA-2 KODLU MADDE

AA-2 kodlu maddenin ^1H ve ^{13}C NMR ile Q-TOF LC/MS kütle spektrumları incelendiğinde uzun zincirli doymamış yağ asidi yapısına sahip olduğu saptandı. Şekil 4.4’de verilen Q-TOF LC/MS kütle spektrumuna göre AA-2 kodlu maddenin saf olup olmadığı tam olarak saptanamamıştır.

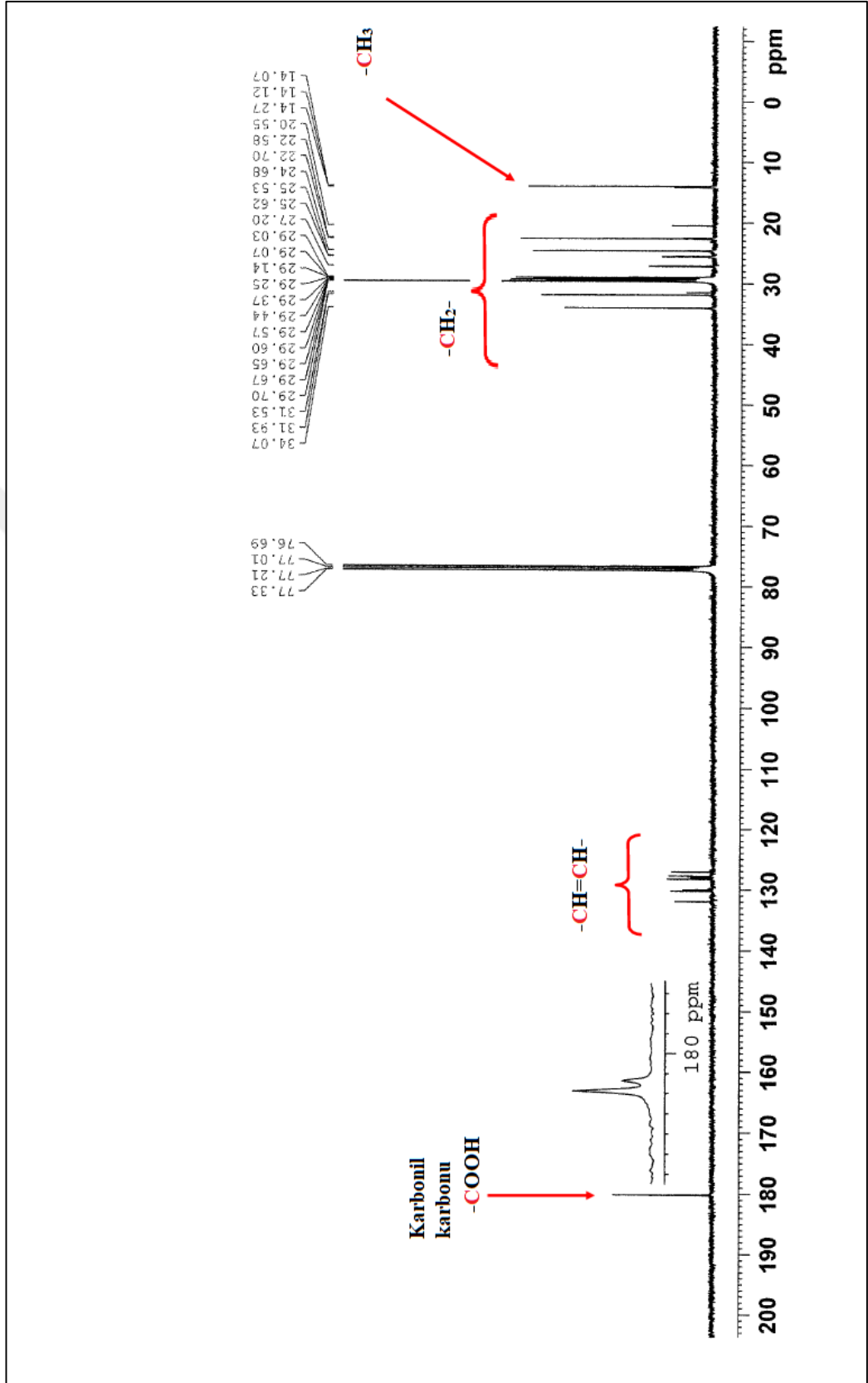
Şekil 4.5’de verilen ^1H -NMR spektrumunda uzun zincirli yağ asitlerine ait karakteristik pikler gösterilmiştir. Şekil 4.6’da ^{13}C -NMR spektrumunda görüldüğü gibi $\delta=180,1$ ve $\delta=180,1$ ppm’de karboksil karbonuna ait sinyallerdir. $\delta=127,1$ ile $\delta=131,9$ ppm arasındaki sinyaller bir yağ asidinin uzun zincirindeki çift bağ taşıyan karbonlara aittir. $\delta=20,5$ ppm ile $\delta=34,0$ ppm arasındaki sinyaller alifatik karbon sinyalleri ve $\delta=14,0$ ile $\delta=14,2$ ppm arasındaki sinyaller metil gruplarına aittir. Karboksil grubu ve metil grubuna ait sinyallerin birden fazla olması bize AA-2 kodlu maddenin saf olmayacağı ihtimalini göstermiştir. AA-2 kodlu maddeye ait spektral veriler aşağıdaki gibidir.



Şekil 4.4. AA-2 maddesine ait Q-TOF LC/MS spektrumu

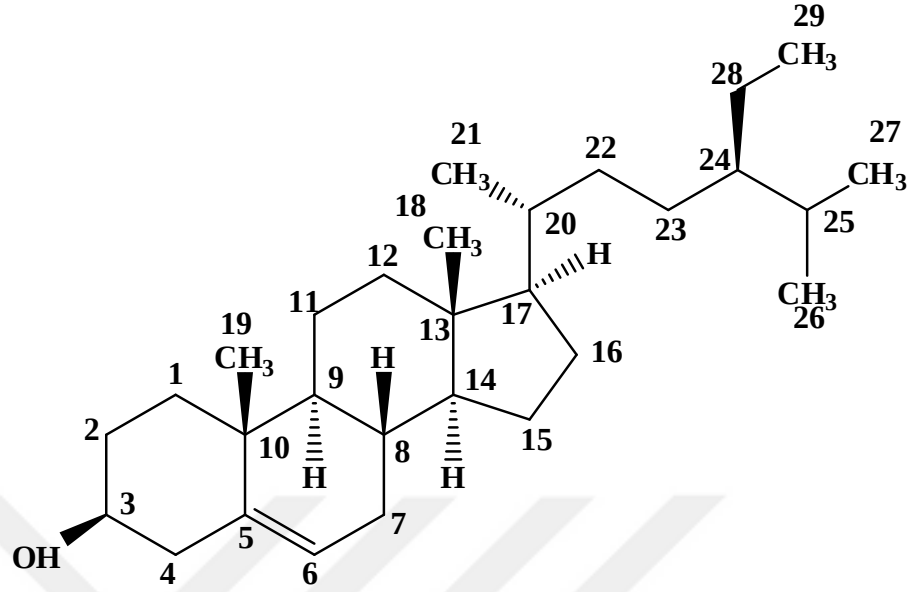


Şekil 4.5. AA-2 maddesine ait ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) spektrumu



Şekil 4.6. AA-2 maddesine ait ^{13}C -NMR (100 MHz, CHCl_3) spektrumu

AA-3 KODLU BİLEŞİK



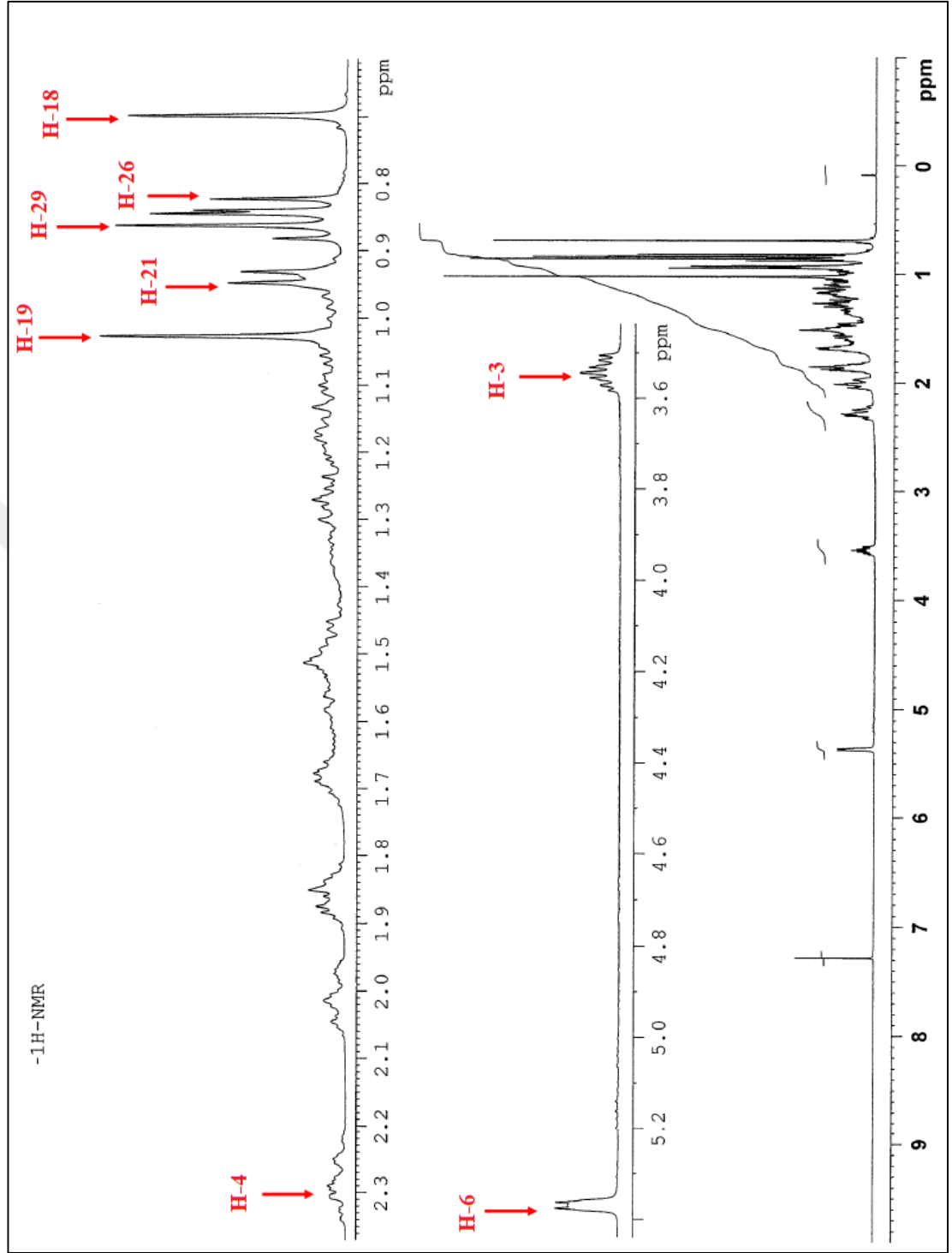
β -Sitosterol

C₂₉H₅₀O

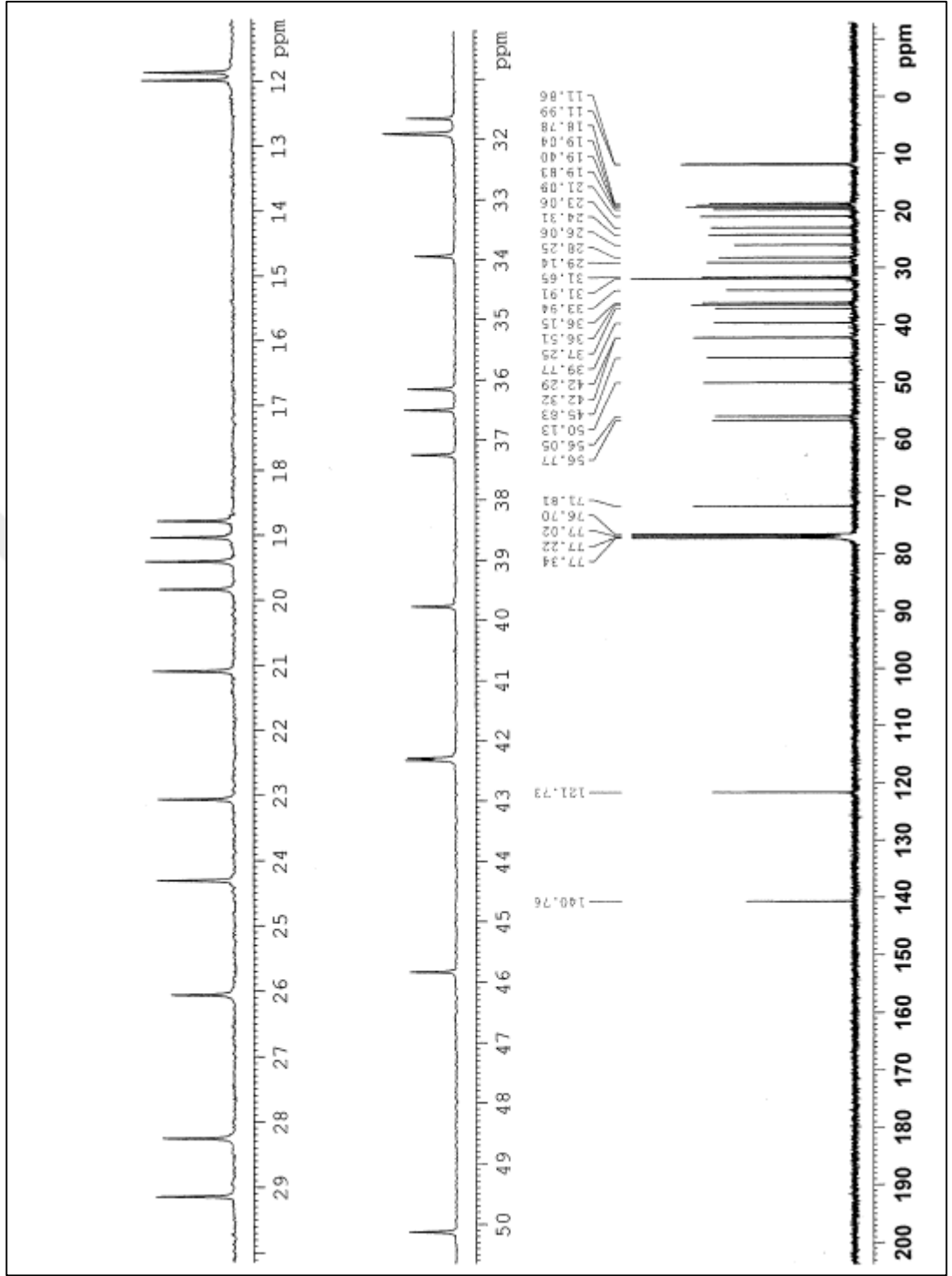
MA: 414 g/mol

Beyaz kristalimsi bir yapıda saflaştırılan AA-3 bileşiğine ait spektrumlar incelendiğinde maddenin yapısının bir bitki sterolü olan **β -Sitosterol**'e ait olduğu anlaşıldı. ¹³C-NMR spektrumunda toplam 29 karbon sinyali görülmektedir. Bileşiğe ait DEPT spektrumunda 9 adet CH, 11 adet CH₂ ve 6 adet CH₃ sinyali mevcuttur. Bileşiğin ¹H-¹H COSY, ¹³C-¹H HMQC ve HMBC sinyalleri de incelendiğinde kimyasal yapısının **β -Sitosterol** olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca literatür verileri ile de AA-3 kodlu bileşiğin kimyasal yapısının **β -Sitosterol** olduğu desteklenmiştir (Aydın *et al.* 2014). Bileşiğe ait ¹³C-NMR sinyalleri aşağıda verilmiştir.

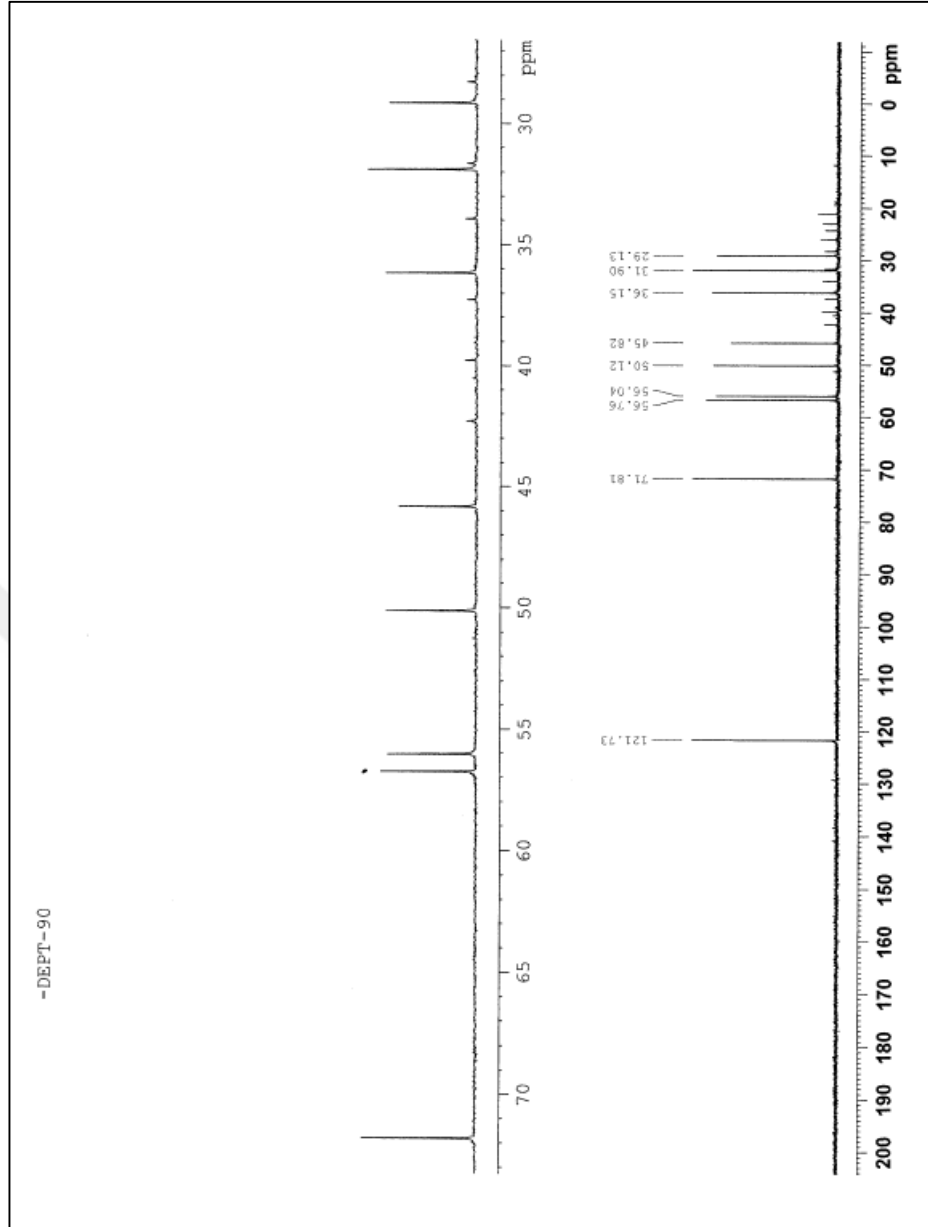
β -Sitosterol: ¹³C-NMR (CDCl₃): 140.7 C(5); 121.7 C(6); 71.8 C(3); 56.7 C(14); 56.0 C(17); 50.1 C(9); 45.8 C(24); 42.3 C(4); 42.2 C(13); 39.7 C(12); 37.2 C(1); 36.5 C(10); 36.1 C(20); 33.9 C(22); 31.9 C(7); 31.9 C(8); 31.6 C(2); 29.1 C(25); 28.2 C(16); 26.0 C(23); 24.3 C(15); 23.0 C(28); 21.0 C(11); 19.8 C(26); 19.4 C(19); 19.0 C(27); 18.7 C(21); 11.9 C(29); 11.8 C(18).



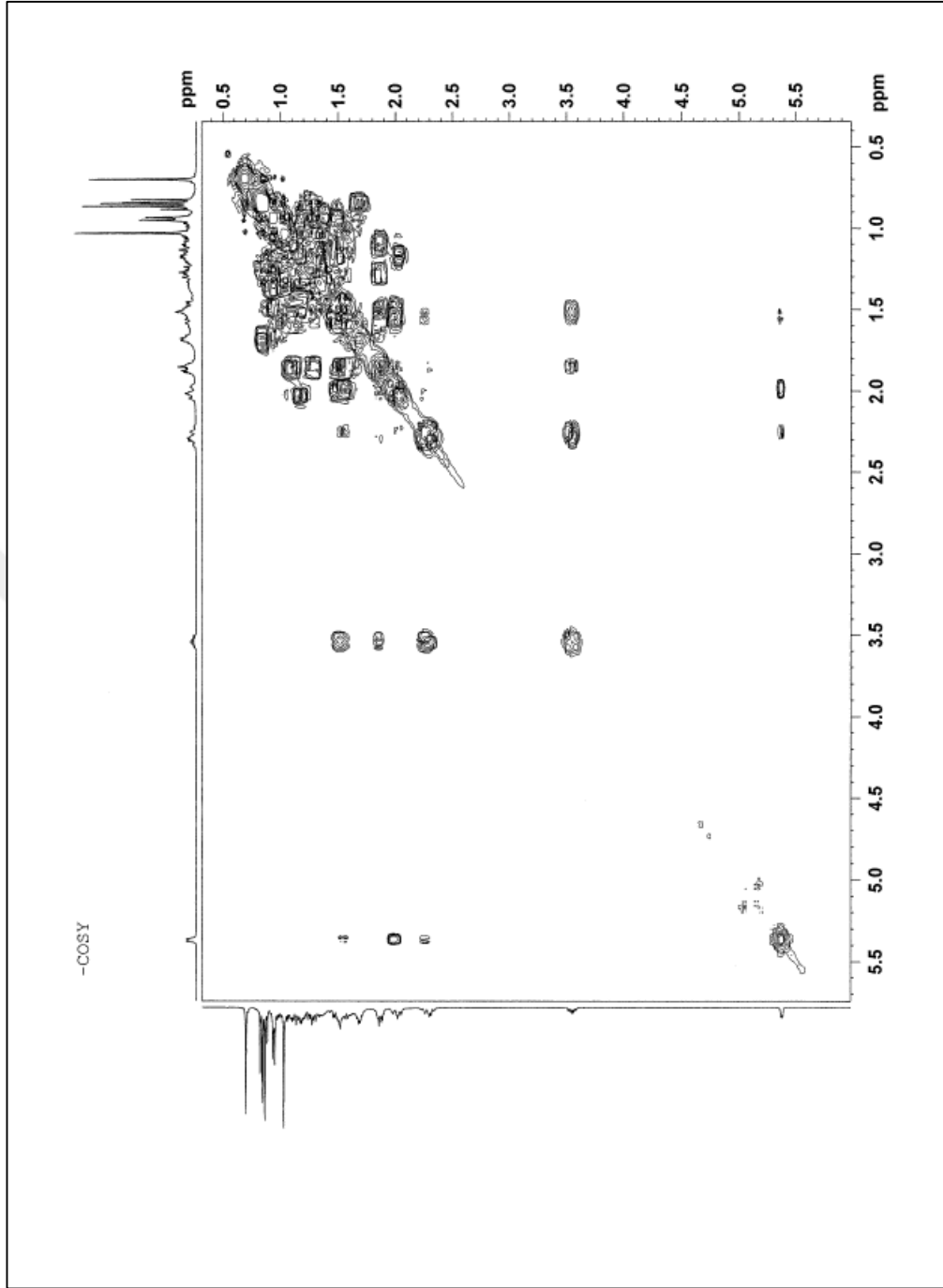
Şekil 4.7. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) ^1H -NMR (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu



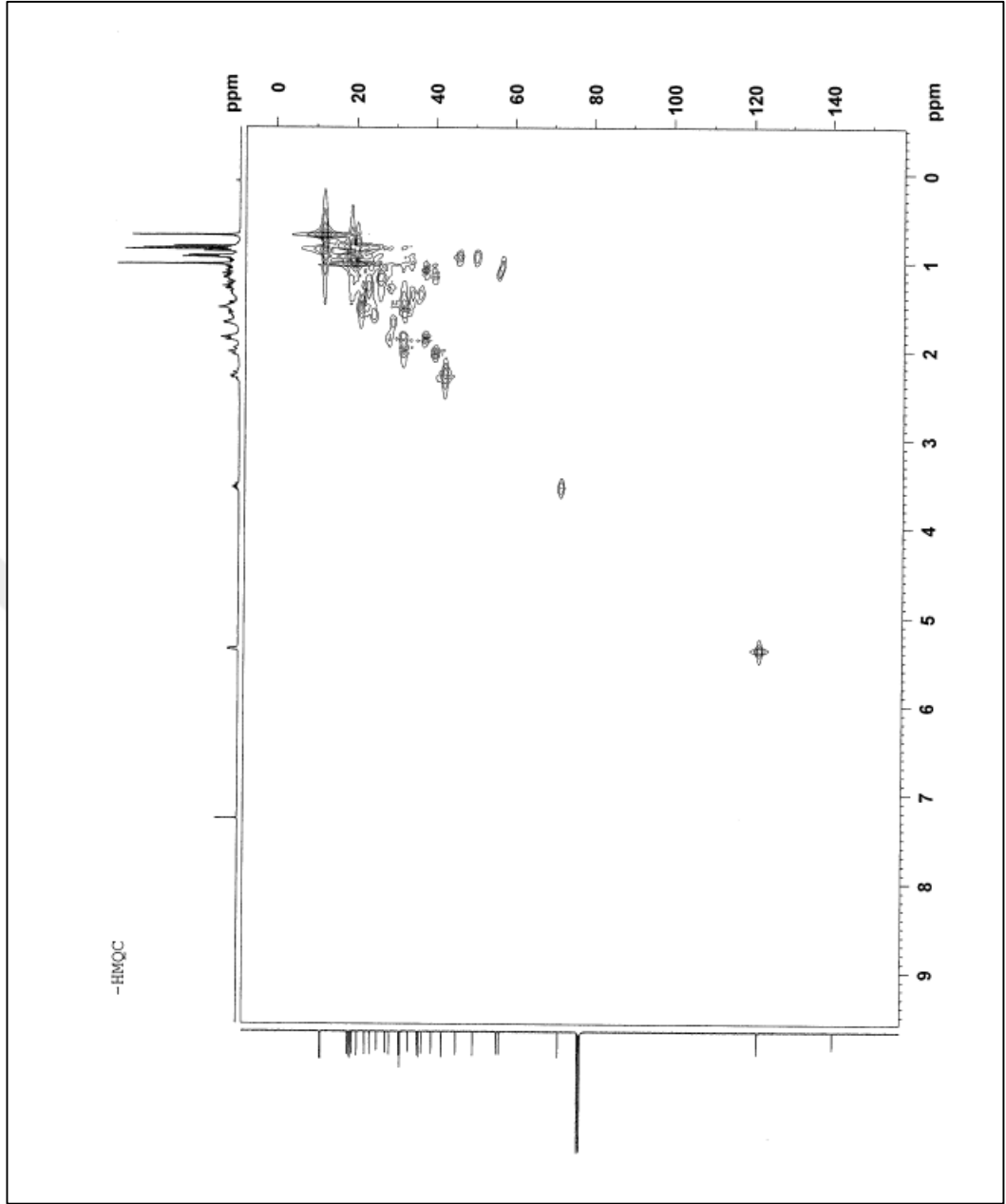
Şekil 4.8. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu



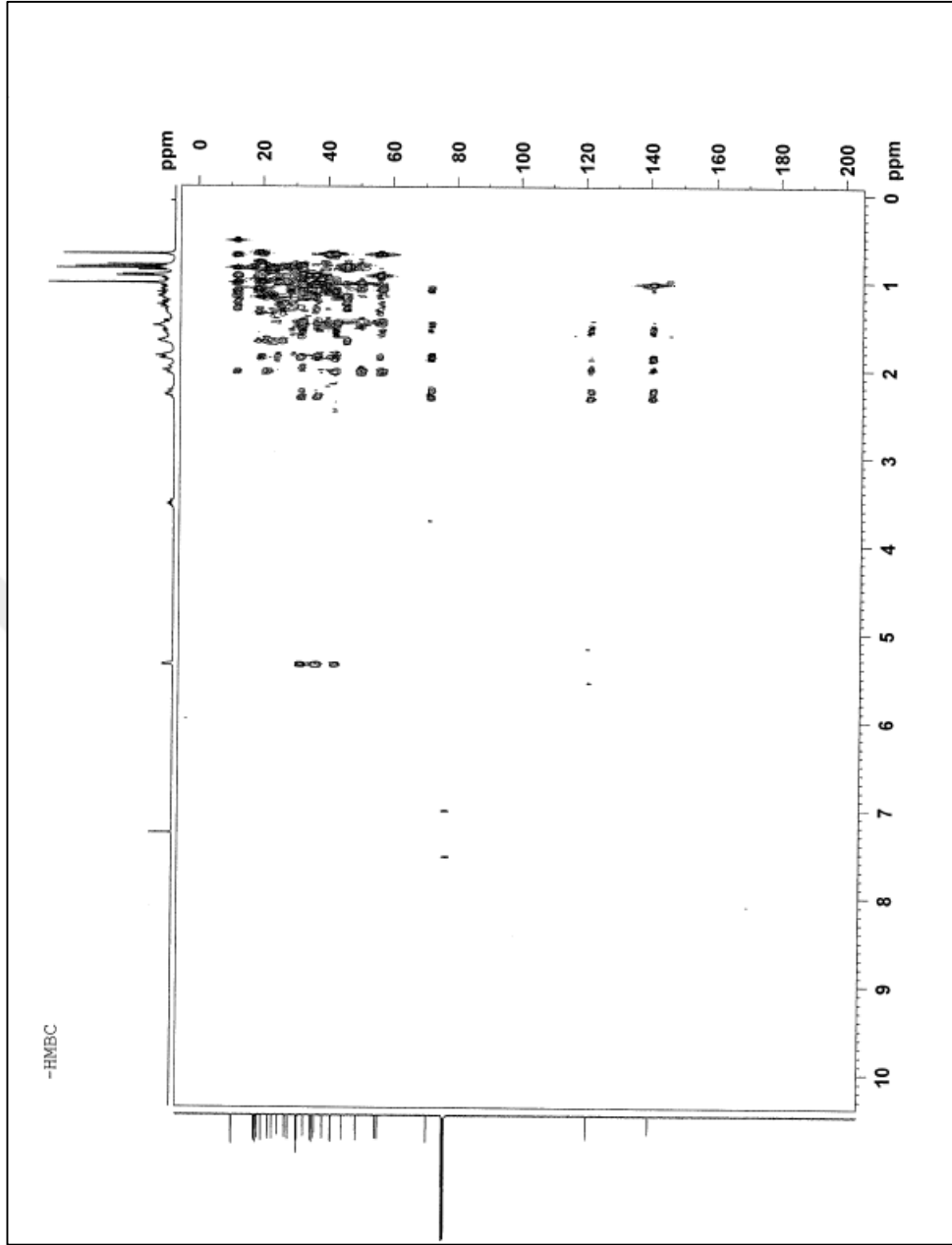
Şekil 4.10. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) DEPT-90 (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu



Şekil 4.11. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu

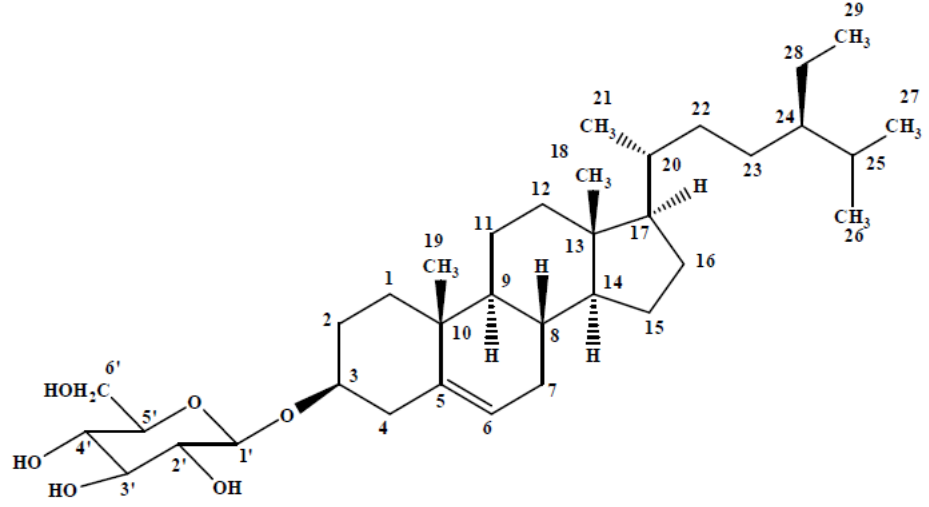


Şekil 4.12. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) ^{13}C - ^1H HMQC (CDCl_3) spektrumu



Şekil 4.13. AA-3 bileşiğinin (β -sitosterol) HMBC (CDCl_3) spektrumu

AA-4 KODLU BİLEŞİK



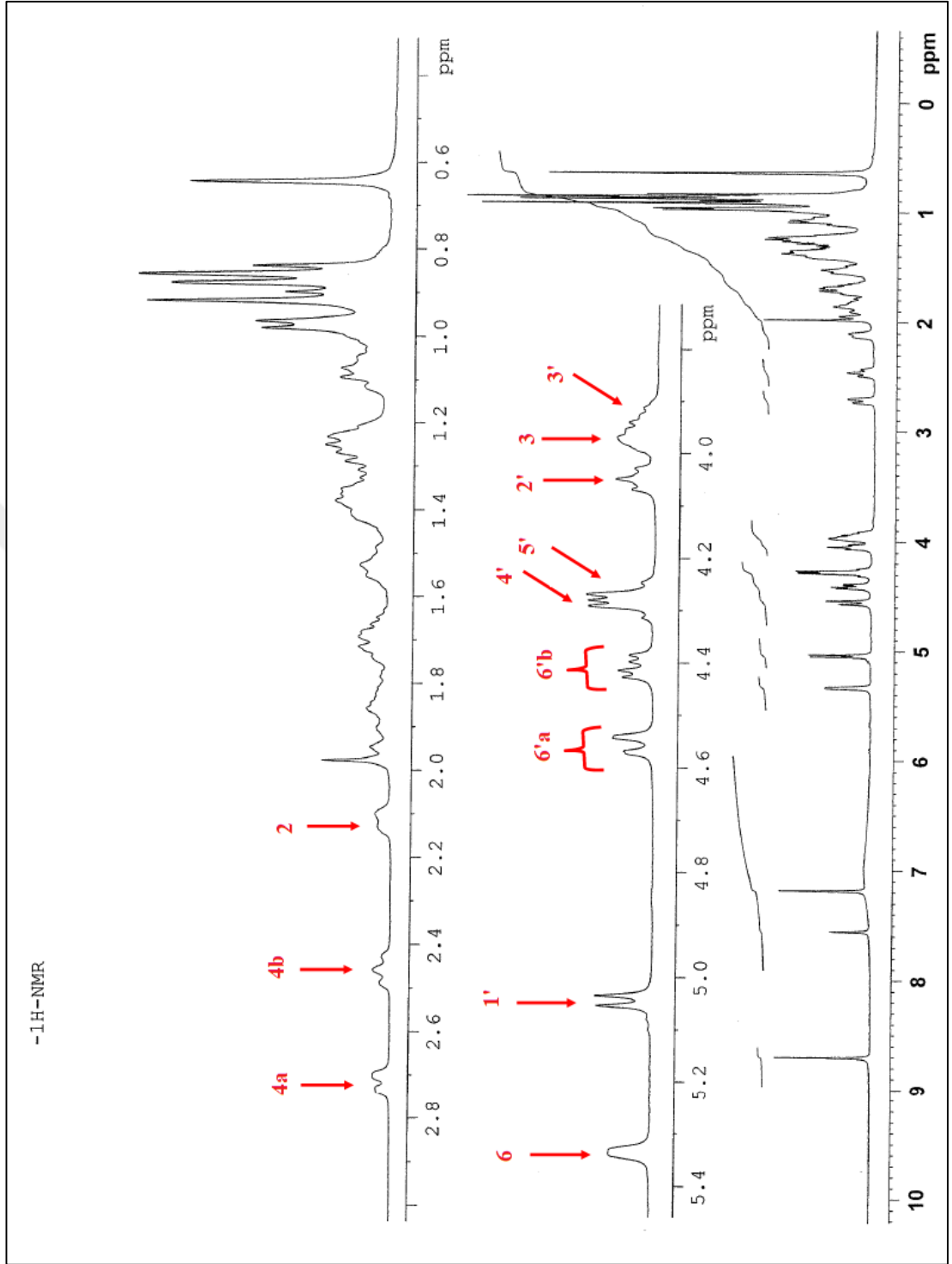
β -sitosterol 3-O- β -D-glukopiranozit

$C_{35}H_{60}O_6$

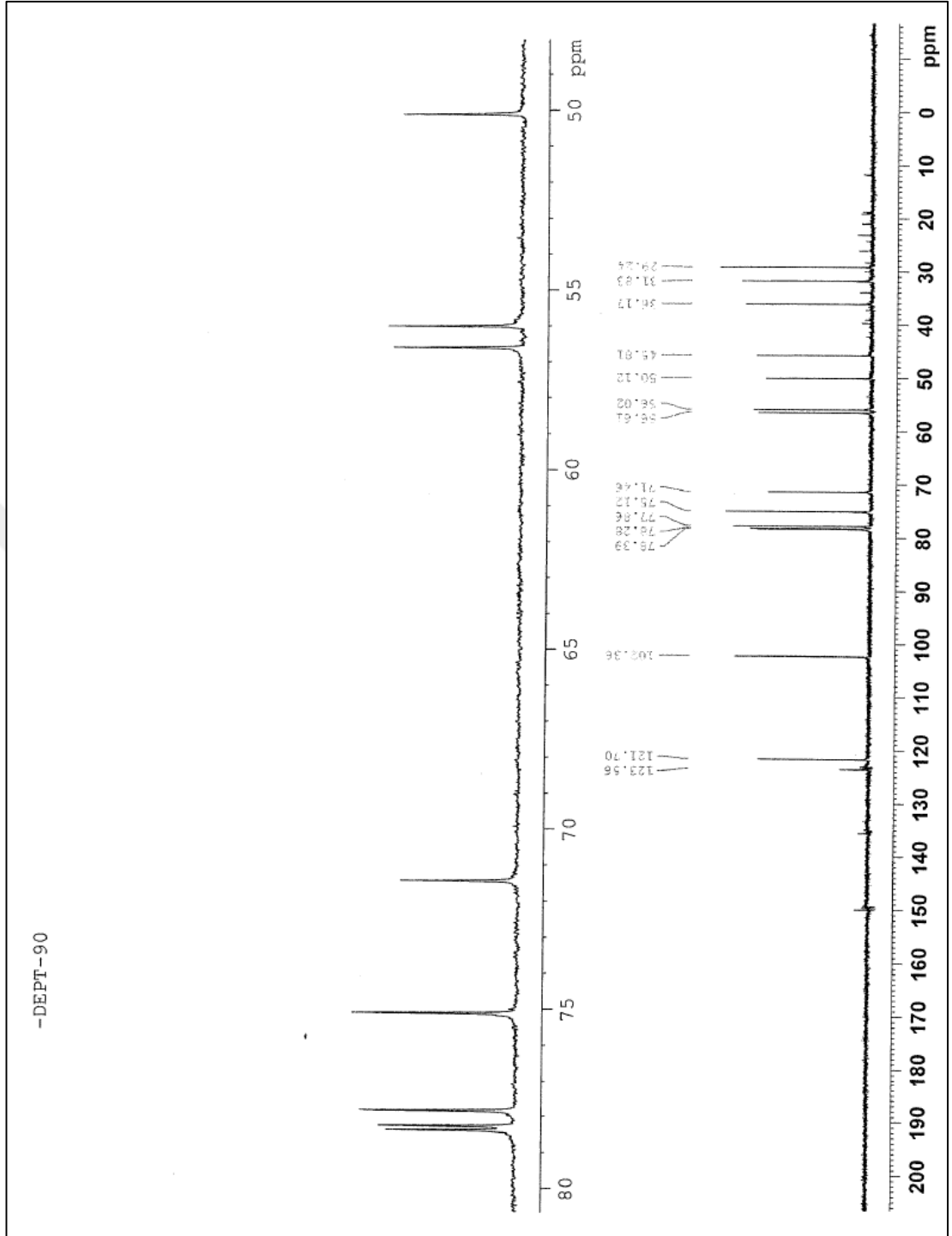
MA: 576 g/mol

Beyaz kristaller halinde saflaştırılan AA-4 bileşiğinin kimyasal yapısı β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit olarak karakterize edilmiştir. β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit bir bitki sterolu olan β -sitosterol'ün glikozitidir. Bileşiğin 1H -NMR (C_5D_5N , 400 MHz) spektrumunda yapıda bulunan glukoz biriminin anomerik protonuna (H-1') ait karakteristik pik $\delta=5,04$ ppm'de dublet ($J=7,68$ ppm) sinyal görülmektedir. Yine yapıdaki glikoza ait diastropik protonlar H-6'a ve H-6'b sırasıyla $\delta=4,55$ ppm'de dd (H-6'a, $J_1=11,74$ Hz, $J_2=2,08$ Hz ve 2,28 Hz) ve $\delta=4,40$ ppm'de dd (H-6'b, $J_1=11,74$ Hz, $J_2=5,20$ Hz ve 5,16 Hz) olarak sinyal vermiştir. Aglikonda bulunan olefinik H ise (H-6) $\delta=5,35$ ppm'de dublet ($J=5,13$ Hz) sinyal vermiştir. Literatürde de aynı bileşiğe ait spektrumlar bulunmaktadır (Aydin *et al.* 2014).

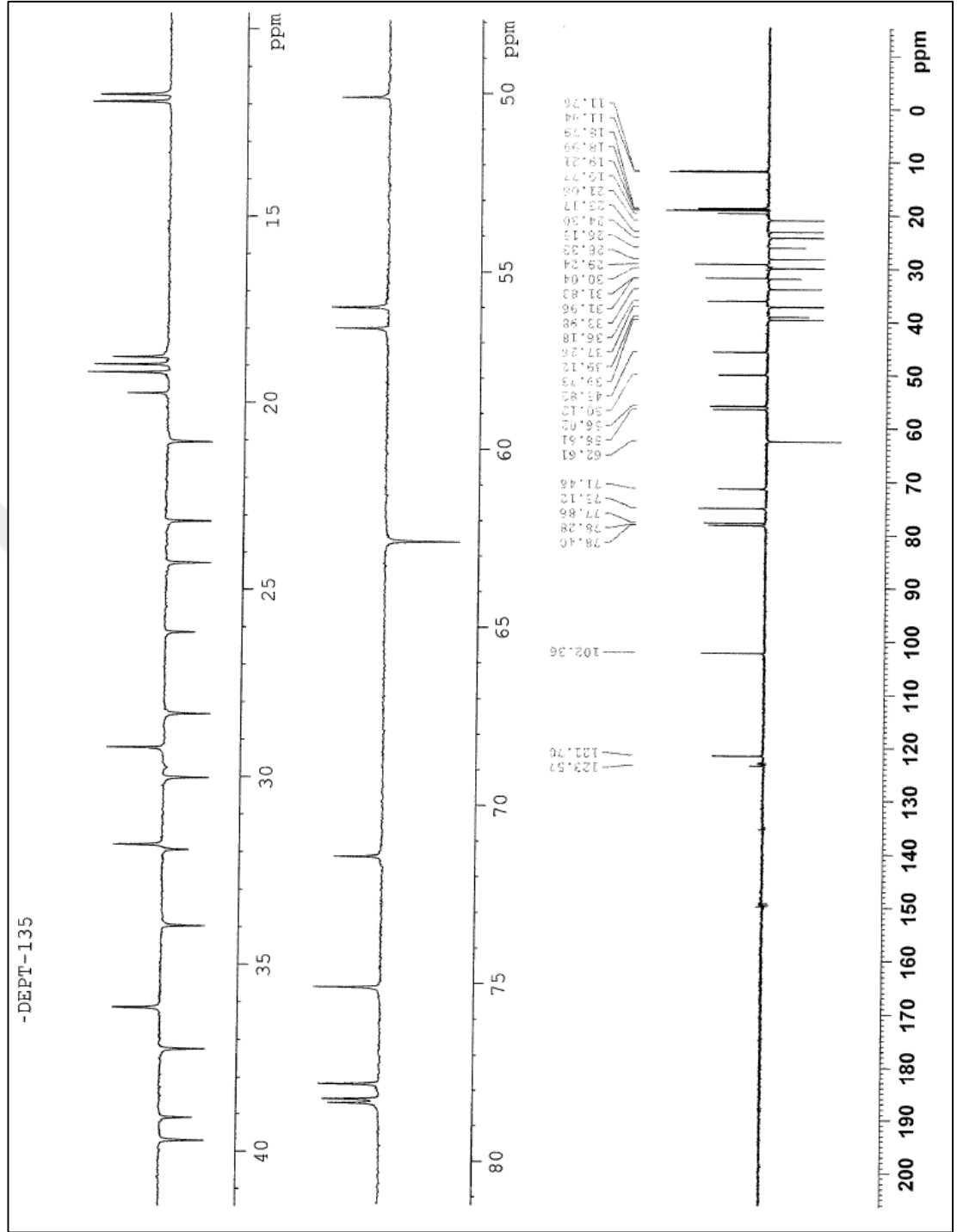
β -sitosterol-3-O- β -D-glukopiranozit: ^{13}C -NMR (C_5D_5N , 400 MHz): 140.7 C(5); 121.7 C(6); 102.4 C(1'); 78.4 C(5'); 78.3 C(3'); 77.9 C(3); 75.1 C(2'); 71.5 C(4'); 62.6 C(6'); 56.6 C(14); 56.0 C(17); 50.1 C(9); 45.8 C(24); 42.3 C(13); 39.7 C(12); 39.1 C(4); 37.3 C(1); 36.7 C(10); 36.2 C(20); 34.0 C(22); 32.0 C(7); 31.9 C(8); 30.0 C(2); 29.3 C(25); 28.3 C(16); 26.2 C(23); 24.3 C(15); 23.2 C(28); 21.1 C(11); 19.8 C(27); 19.2 C(26); 19.0 C(19); 18.8 C(21); 12.0 C(29); 11.9 C(18).



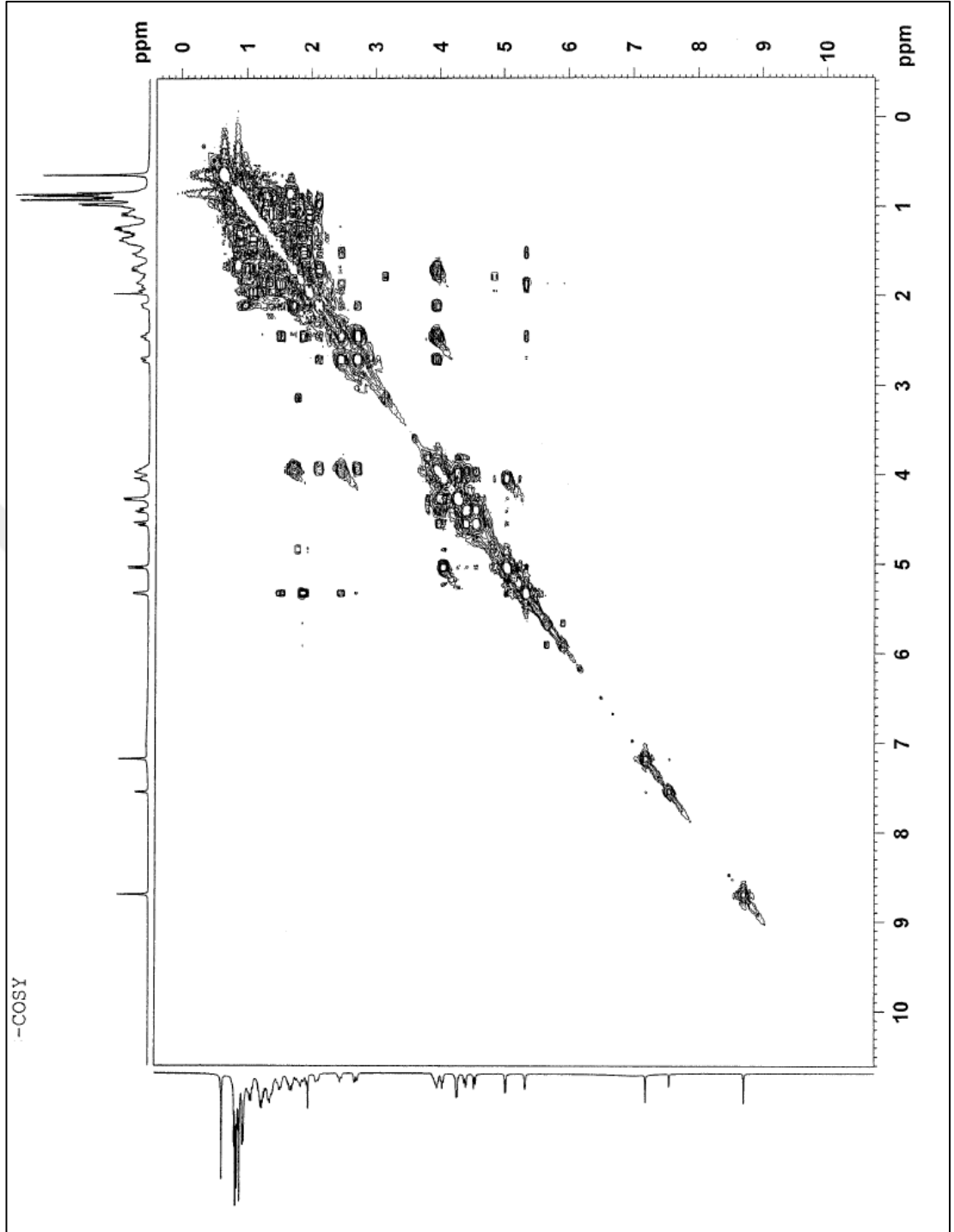
Şekil 4.14. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) ¹H-NMR (CDCl₃, 400 MHz) spektrumu



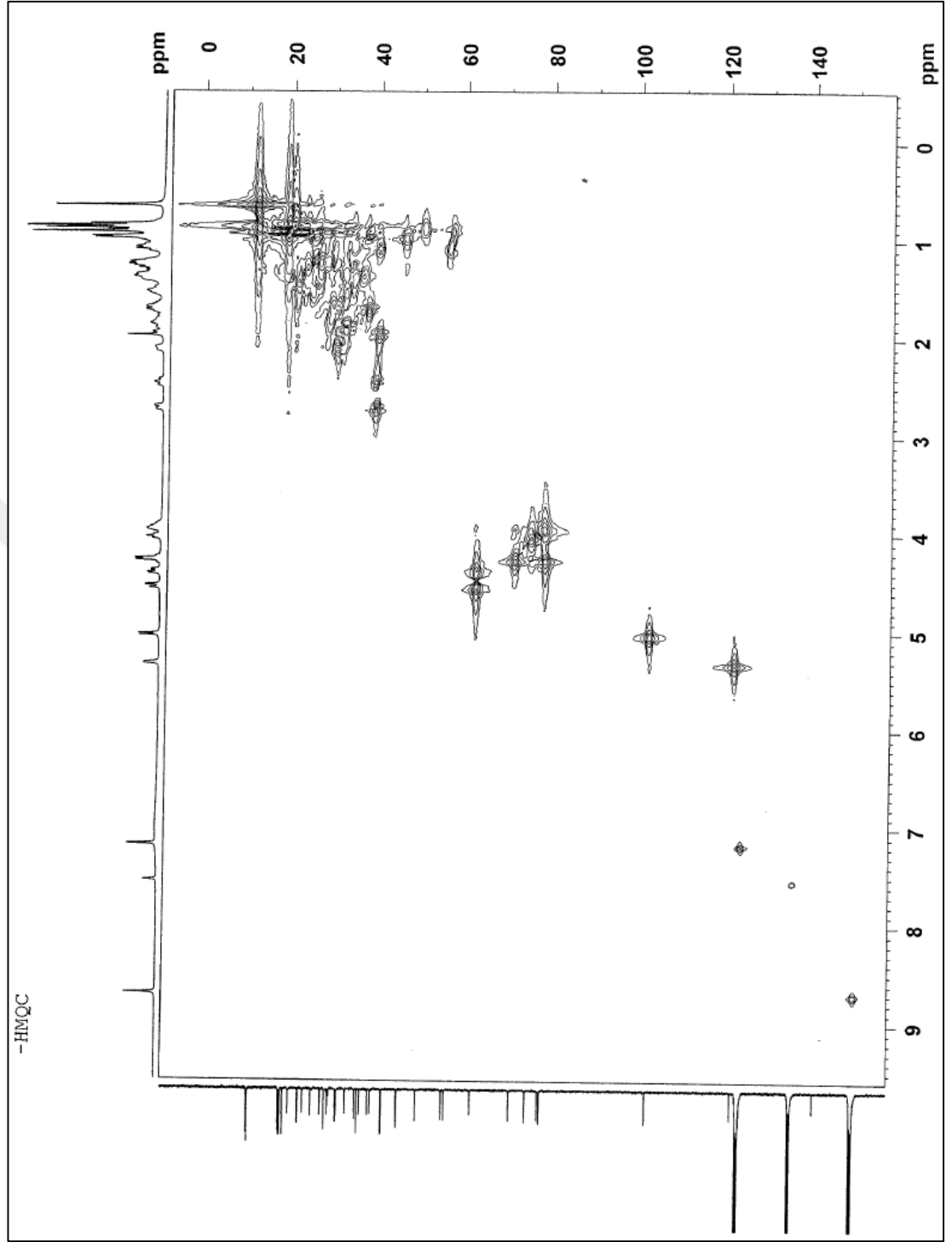
Şekil 4.16. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) DEPT-90 (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu



Şekil 4.17. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) DEPT-135 (CDCl_3 , 100 MHz) spektrumu



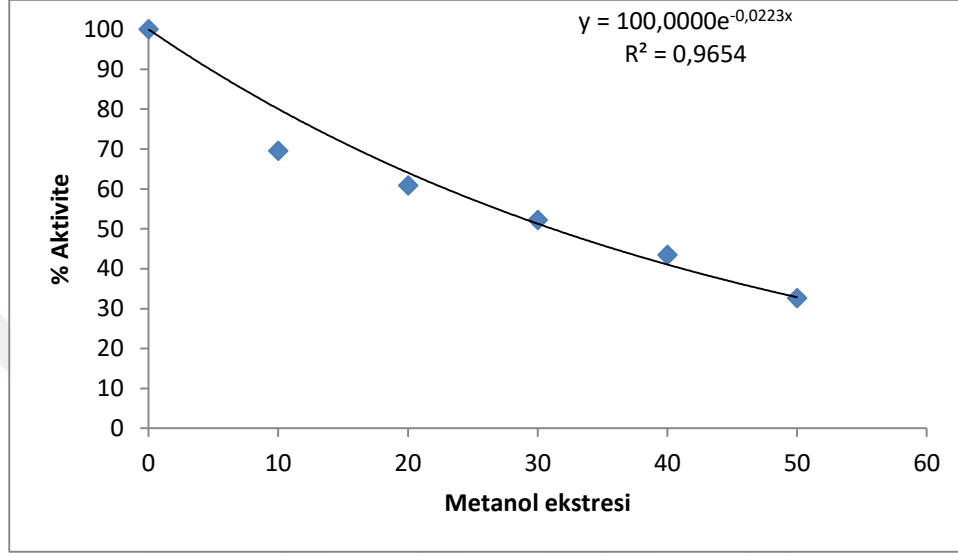
Şekil 4.18. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) ^1H - ^1H COSY (CDCl_3 , 400 MHz) spektrumu



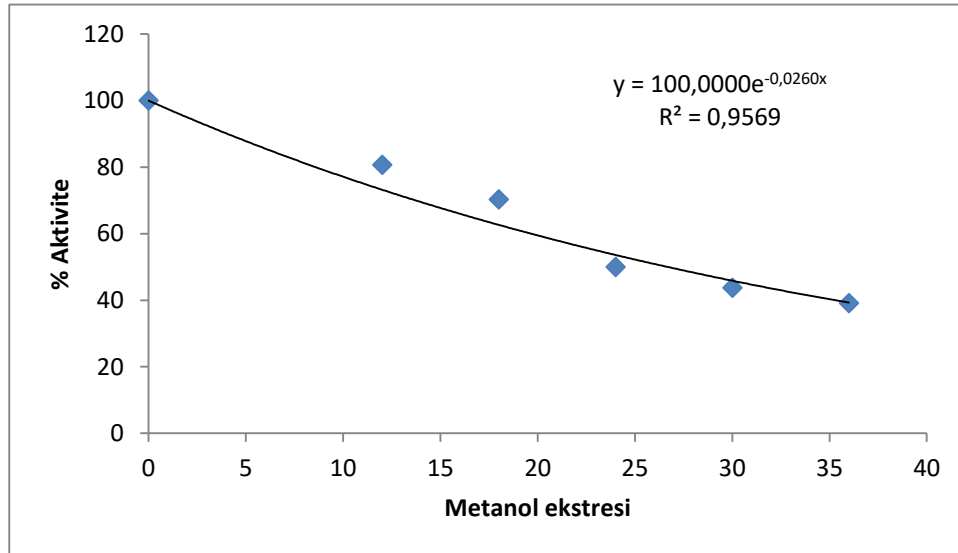
Şekil 4.19. AA-4 bileşiğinin (β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit) ^1H - ^{13}C HMQC (CDCl_3) spektrumu

4.3. Metanol Ekstresinin hCA-I ve hCA-II İzoenzimleri Üzerine İnhibisyonunu Gösteren Bulgular

Bu bölümde *A. aestivus* Brot. bitkisinin metanol ekstresinin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisini gösteren grafik ve çizelgeler verilmiştir.



Şekil 4.20. Metanol ekstresinin hCA-I enzimi için % aktivite-[I] grafiği



Şekil 4.21. Metanol ekstresinin hCA-II enzimi için % aktivite-[I] grafiği

Çizelge 4.2. Aktivite-[I] grafiklerinden elde edilen IC₅₀ değerleri

İnhibitör	hCA-I için IC₅₀ (mg/mL)	R²	hCA-II için IC₅₀ (mg/mL)	R²
Metanol Ekstresi	15,54	0,9654	13,33	0,9569

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

A. aestivus Brot., halk arasında çiriş otu olarak bilinen ve özellikle gıda malzemesi olarak yemeklerde kullanılan bir bitki türüdür. Geleneksel tıpta diüretik, yara iyileştirici ve menstrual kolaylaştırıcı olarak, hemoroit ve abse tedavisinde, saçkıran ve ekzemada kullanılmıştır. Bu çalışmada bitkinin metanol ekstresinin fitokimyasal bir araştırması ve hCA-I ve hCA-II izoenzimleri üzerine inhibisyon etkisi araştırılmıştır.

A. aestivus Brot.'un metanol ekstresinin hCA-I ve hCA-II izoenzimleri için enzim-aktivite grafiklerinden elde edilen sonuçlara göre IC₅₀ değerleri sırasıyla 15,54 mg/mL ($R^2=0,9654$) ve 13,33 mg/mL ($R^2=0,9569$)'dir. Bu sonuçlara göre *A. aestivus* Brot.'un metanol ekstresi orta derecede hCA-I ve hCA-II inhibitörü olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada yapılan fitokimyasal araştırmalarda *A. aestivus* Brot.'un metanol ekstresinden bir trigliserit, bir uzun zincirli doymuş yağ asidi ve iki bitki sterolü olmak üzere dört madde izole edilmiştir. İzole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları 1D ve 2D ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. Yapılan analizlerde bitki sterollerinin kimyasal yapıları ***β*-sitosterol** ve ***β*-sitosterol-3-O-*β*-D-glikopiranozit** olarak aydınlatılmıştır.

Fitosteroller, kolesterolün de yapısında bulunan, bitkiler tarafından doğal olarak sentezlenen steroidal yapıdaki bileşiklerdir. Günümüze kadar iki yüzden fazla sterol yapıdaki bileşik farklı bitkilerden izole edilmiştir. Fitosterollerin başlıca kolesterol düşürücü özelliğe sahip gıda takviyeleri olarak kullanıldığı bilinmektedir (Patel *et al.* 2017). Çalışmamızda *A. aestivus* Brot.'dan izole edilen *β*-sitosterol, steroidal yapıya sahip doğal fitosterollerden biridir. Tanımlanan çok sayıda fitosterol arasından *β*-sitosterol en bol bulunan bitki sterolüdür (Fernandez and Vega-Lopez 2005). Literatürde *β*-sitosterolün bağırsakta emilim için kolesterol ile rekabet ederek kolesterol seviyesini düşürdüğü ve bundan dolayı kardiyovasküler koruma için değerli bir molekül olduğu rapor edilmiştir. *β*-sitosterol ayrıca tümör büyümesini inhibe etme ve immün yanıtı modüle etme aktivitelerine sahip antioksidan bir moleküldür. Gelecekte *β*-sitosterolün prostat kanserini ve meme kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisi için potansiyel bir kemo önleyici ajan olabileceği öngörülmektedir (Patel *et al.* 2017).

Çalışmada *A. aestivus* Brot.'dan izole edilen diğer fitosterol β -sitosterol'un glikoziti olan β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozittir. Bu bileşik de β -sitosterol gibi bitkilerde doğal olarak sentezlenen önemli bir glukosteroldür. Meyve ve sebzelerde bulunan β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit temel bir mikro besin maddesi gibi davrandığı için bu bileşiğin günlük diyetle alımı tavsiye edilmektedir. Ayrıca bileşiğin hayati bir hücre bileşeni olduğu bildirilmiştir (Subramaniam *et al.* 2014). β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit, yaşlı yetişkinlerin bağışıklık fonksiyonlarını arttırmak için bir besin takviyesi olarak β -sitosterol ile birlikte kullanılır. Piyasada ticari olarak satılan Moducare®, Harzol® ve Sitosterin® hayati bir bileşen olarak β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozit içeren gıda takviyeleridir (Subramaniam *et al.* 2014). Diğer fitosterollerle birlikte β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozitin diyetle alınması, kanser ve prostat anormallikleri ile mücadelede bağışıklık sistemini iyileştirdiği açıkça kanıtlanmıştır. Ayrıca β -sitosterol-3-O- β -D-glikopiranozitin antimikrobiyal, antilösemik, antispazmotik, antitümör ve hipoglisemik olduğu, bazı ticari antibiyotiklerle birleştirildiğinde insan patojenleriyle sinerjistik olarak mücadele ettiği kanıtlanmıştır (Subramaniam *et al.* 2014).

Çalışmada *A. aestivus* Brot.'un metanol ekstresinden izole edilen ancak kimyasal yapısı tam olarak aydınlatılmayan trigliserit **AA-1** ve uzun zincirli doymuş yağ asidi **AA-2**'ye ait NMR spektrumları, bu maddelerin karışım olabileceği şeklinde değerlendirilmiştir. Bununla birlikte izole edilen maddeler arasında **AA-2** kodlu uzun zincirli yağ asidinin miktarının (572 mg) fazla olması, bitkinin yağ asitlerince zengin olduğunu göstermektedir.

Bu tez çalışmasında halk arasında yemek olarak tüketilen *A. aestivus* Brot.'un fitosterol ve yağ asitlerince zengin olduğu ortaya çıkarılmıştır. Bitkinin halk arasında özellikle hemoroide karşı kullanılması göz önüne alındığında, içeriğindeki yağ asitleri ve fitosterollerden dolayı antihemoroidal aktiviteye sahip olabileceği düşünülmektedir. *A. aestivus* Brot. doğada kendiliğinden yetişmektedir ve kültürü yapılmamaktadır. Bu bakımdan değerlendirildiğinde ülkemizde elde edilmesi kolay ve biyoaktif fitokimyasallara sahip olduğu için gıda takviye ürünlerinde kullanılabilmesi yönünde ileri araştırmalar yapılması gerektiği öngörülmektedir. Bununla birlikte fitosterol kaynağı olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adinolfi, A., Adinolfi, M. and Hopkinson, D.A. 1984. Immunological and biochemical characterization of the human alcohol dehydrogenase chi-ADH isozyme. *Annals of Human Genetics*, 48, 1-10.
- Adinolfi, M., Lanzetta, R., Marciano, CE., Parrilli, M. and Giulio, A. 1991. A new class of anthraquinone-anthrone-C-glycosides from *Asphodelus ramosus* tubers. *Tetrahedron*, 47, 4435-4440.
- Aslanturk, Ö.S. and Celik, T.A. 2013. Investigation of antioxidant, cytotoxic and apoptotic activities of the extracts from tubers of *Asphodelus aestivus* Brot *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 7(11), 610-621.
- Aydin, T., Cakir, A., Kazaz, C., Bayrak, N., Bayir, Y. and Taskesenligil, Y. 2014. Insecticidal Metabolites from the Rhizomes of *Veratrum album* against Adults of Colorado Potato Beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. *Chemistry & Biodiversity*, 11, 1192-1204.
- Baydar, S. N. 2006. Şifalı bitkiler Ansiklopedisi. Palme Yayıncılık, Ankara.
- Baytop, T. 1999. Treatment with Plants in Turkey. Nobel Tip Kitapevleri, 277, Istanbul.
- Birincioglu, SS., Calıs, I., Avcı, H. and Erdag, B. 2005. Pathological and phytochemical investigation of neuronal lipofuscinosis caused by *Asphodelus aestivus* in sheep. *Turk J Vet Anim Sci*, 29, 1351-1356.
- Birincioglu S.S., Schmanl, W. and Avcı, H. 2011. Neuronal and extraneuronal lipofuscinosis in Merino sheep grazing *Asphodelus aestivus* seeds in western Turkey, *Tübitak, Vet. Anim. Sci.* 36(5), 476-482.
- Calıs, I., Birincioglu, S.S., Kırmızıbekmez, H. and Pfeiffer, B. 2006. Heilmann J. Secondary metabolites from *Asphodelus aestivus*. *Z Naturforsch*, 61, 1304-1310.

- Davis, P. 1965. Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Edinburgh University Press. 2, 451–474.
- El-Seedi, H. 2007. Antimicrobial arylcoumarins from *Asphodelus microcarpus*. Journal of Natural Products, 70, 118-120.
- El Shabrawy, M.O.A., Marzouk, M.M., Kawashty, S.S., Hosni, H.A., El Garf, I.A. and Saleh, N.A.M. 2018. A chemosystematic study of *Asphodelus aestivus* Brot. (Asphodelaceae) in Egypt. Egyptian Pharmaceutical Journal, 17, 150-54.
- Fafal, T., Yılmaz, F.F., Birincioglu, S.S., Hoşgör-Limoncu, M., and Kivçal, B. 2016. Fatty acid composition and antimicrobial activity of *Asphodelus aestivus* seeds. Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society, 8 (2), 103-107.
- Fernandez, M.L. and Vega-Lopez, S. 2005. Efficacy and Safety of Sitosterol in the Management of Blood Cholesterol Levels. Cardiovascular Drug Reviews. 23(1), 57-70.
- Göçer, H. 2014. Sinefrin ve fenilefrin: Antioksidan kapasitelerinin belirlenmesi ve insan karbonik anhidraz izoenzimleri (hCA I ve hCA II) ile asetilkolin esteraz enzimi üzerine etkilerinin araştırılması. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Erzurum.
- Gurbuz, I., Ustun, O., Yesilada, E., Sezik, E. and Akyurek, N., 2002. Evaluation of the antiulcerogenic activity profile of a flavonol diglucoside from *Equisetum palustre* L. Journal of Ethnopharmacology, 83, 241-244.
- Gürhan, G. and Ezer, N. 2004. Halk arasında hemoroit tedavisinde kullanılan bitkiler-I. Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi. 24(1), 37-55.
- Handa, S., Rakesh, D. and Vasisht, K. 2006. Compendium of medicinal and aromatic plants Asia. medicinal and aromatic plants, 303, İtalya.

- İmamoğlu, S. 2010. *Asphodelus Aestivus* Brot. (Çiriş Otu) Bitkisinin Çeşitli ekstraktlarının *In vitro* Antioksidan Aktivitelerinin Araştırılması. (Y. Lisans Tezi), Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- Kirmizi, S., Gülerüz, G. And Arslan, H. 2014. Protein Mobilisation and Proteolytic Activities in Root Tubers of *Asphodelus aestivus*. Turk. J. Bot, 38, 302–308.
- Koksal, Z., Alim, Z., Bayrak, S., Gulcin, I. and Ozdemir, H. 2019. Investigation of the effects of some sulfonamides on acetylcholinesterase and carbonic anhydrase enzymes. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 1-8.
- Matthews, V. A. 1984. *Asphodellus* L. In: Davis, P.H., Ed. Flora o f Turkey and the East Aegean Islands, Edinburgh University Press, Edinburgh, 85-86.
- Patel, K., Kumar, V., Verma, A., Rahman, M. and Patel D.K. 2017. β -sitosterol: Bioactive Compounds in Foods, their Role in Health Promotion and Disease Prevention “A Concise Report of its Phytopharmaceutical Importance”. Current Traditional Medicine, 3(3), 168-177.
- Peksel, A., Arisan, I. and Yanardag, R. 2013. Radical Scavenging And Anti-Acetylcholinesterase Activities of Aqueous Extract of Wild Pistachio (*Pistacia Atlantica* Desf.) Leaves. Food Science And Biotechnology, 22(2), 515-522.
- Polat, R. and Satıl, F., 2012. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Edremit Gulf. Journal of Ethnopharmacology, (139), 626–64.
- Polatoglu, K., Demirci, B., Baser, K.H.C., 2016. High Amounts of n-Alkanes in the Composition of *Asphodelus aestivus* Brot. Flower Essential Oil from Cyprus. Journal of Oleo Science, 65(10), 867-870.
- Polycarpou, P. 2009. Bioethanol production from *Asphodelus aestivus*. Renewable Energy, 34(12), 2525-2527.

- Rizk, A., Hammouda, F. and Abdel-Gawad, M. 1972. Anthraquinones of *Asphodelus microcarpus*. *Phytochemistry*, 11, 2122-2155.
- Sakar, F. S., Arslan, H., Kırmızı, S. Guleryuz, G. 2010. Nitrate Reductase Activity (NRA) in *Asphodelus aestivus* Brot. (Liliaceae): Distribution Among Organs, Seasonal Variation and Differences Among Populations. *Flora*, 205, 527–531.
- Samocha, Y., Shklar, G., Korol, L., Sternberg, M. 2009. From Mesic to Arid Environments: Morphological and Genetic Divergence in *Asphodelus aestivus* Brot. Populations. *Israel Journal of Plant Science*, 57, 91–102.
- Sawidis, T., Kalyva, S. and Delivopoulos, S. 2005. The root-tuber anatomy of *Asphodelus aestivus*. *School of Biology, Elsevier- Flora*, 200, 332-338.
- Simchick, G., Yin, A., Yin, H. and Zhao, Q. 2018. Fat spectral modeling on triglyceride composition quantification using chemical shift encoded magnetic resonance imaging. *Magnetic Resonance Imaging*, 52, 84-93.
- Subramaniam, S., Palanisamy, A. and Sivasubramanian, A. 2014. An unique solvent assisted ‘green’ hydrotropic precipitation and response surface optimization for isolation of the dietary micronutrient β -sitosterol D-glucopyranoside from *Desmostachya bipinnata*. *RSC Advances*, 5, 7479-7484.
- Supuran, C.T. and Scozzafava, A. 2005. Carbonic anhydrase inhibitors and their therapeutic potential. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 10-5, 575-600.
- Unal, I. and Ince, O.K., 2017. Characterization of antioxidant activity, vitamins, and elemental composition of ciris (*Asphodelus aestivus* L.) from Tunceli, Turkey. *Instrumentation Science and Technology*, 45(5), 469–478.
- Van Wyk, B., and Yenesew, A. 1995. Dagne E. Chemotaxonomic significance of anthraquinones in the roots of Asphodeloideae. *Biochem Syst Ecol*, 23, 277-281.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Mehmet Zeki ADIGÜZEL
Doğum Yeri ve Tarihi	Diyadin, 1972
Eğitim Durumu	
Lisans Öğrenimi	Atatürk Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 1996
Yüksek Lisans Öğrenimi	-
Bildiği Yabancı Diller	-
Bilimsel Faaliyetler	-
İş Deneyimi	
Stajlar	-
Projeler	-
Çalıştığı Kurumlar	Milli Eğitim Bakanlığı Final Özel Eğitim Kurumları
İletişim	
E-posta Adresi	zeki_adiguzel@icloud.com
Mezuniyet Tarihi	
2019	