

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SALVIA CHRYSOPHYLLA* VE *SALVIA TRICHOCLADA* BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER
METABOLİTLERİN İZOLASYONU, YARI SENTETİK TÜREVLERİNİN ELDESİ,
ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Burcu ÇULHAOĞLU**

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

OCAK 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SALVIA CHRYSOPHYLLA VE SALVIA TRICHOCLADA BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER
METABOLİTLERİN İZOLASYONU, YARI SENTETİK TÜREVLERİNİN ELDESİ,
ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Burcu ÇULHAOĞLU
(509081208)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 20 Aralık 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 27 Ocak 2011

**Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Turan ÖZTÜRK (İTÜ)
Prof. Dr.Dr. Ufuk KOLAK (İÜ)**

OCAK 2011

Eşim Abbas'a,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda destek veren, tez çalışmam sırasında uygun ortam sağlayan ve yönlendiren, tüm zorluklara karşı desteğini benden esirgemeyen,engin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, danışman hocam Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya bana olan güveni ve desteği için teşekkür ederim.

Tezimde çalıştığım *S. chrysophylla* Stapf bitkisinin toplanması ve teşhis edilmesinde, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ'ye ve diğer bir çalışma bitkim olan *Salvia trichoclada* Benthام bitkisinin teşhis ve toplanmasında Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Ali A. DÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Aktivite çalışmalarım da bana yardımcı olan Yüksek Kimyager Seda Damla HATİPOĞLU ve İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Araştırma Görevlilerinden Dr.Mehmet BOĞA'ya teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince İstanbul Teknik Üniversitesi'nde çalışmalarımı sürdürebilmem için anlayış gösteren Kocaeli Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Yüksel GÜNEY ve Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. Cavit UYANIK'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim süresince başta Yüksek Kimyager Fatemeh BAHADORİ olmak üzere İTÜ'de aynı laboratuvarı paylaştığım tüm Doğal Ürünler Laboratuvarı'ndaki sevgili arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm zorluklara rağmen her zaman yanımda olan, anlayış gösteren, akademik çalışmalarımı sürdürmem için beni destekleyen eşim'e sonsuz kez teşekkür ederim. Ve bugünlere gelmemde desteğini esirgemeyen başta babam olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

OCAK 2011

Burcu ÇULHAOĞLU
(Araştırma Görevlisi)

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xi
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xxi
SUMMARY	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Botanik Bilgiler.....	5
2.1.1 Lamiaceae (Labiatae) familyası	5
2.1.2 <i>Salvia</i> cinsi	6
2.1.3 <i>Salvia chrysophylla</i> STAPF	6
2.1.4 <i>Salvia trichoclada</i> BENTHAM.....	7
2.2 <i>Salvia</i> Türlerinin Halk Arasındaki Kullanılışı	8
2.3 <i>Salvia</i> Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Aktivite Çalışmaları	9
2.4 Sekonder Metabolitler	13
2.4.1 Terpenler	14
2.4.1.1. Hemiterpenler (C ₅)	17
2.4.1.2. Monoterpenler (C ₁₀)	17
2.4.1.3. Seskiterpenoitler (C ₁₅).....	18
2.4.1.4. Diterpenoitler (C ₂₀)	18
2.4.1.5. Sesterterpenoidler (C ₂₅).....	21
2.4.1.6. Tetraterpenler C ₄₀	21
2.4.2 Steroitler.....	24
2.4.3 Fenolik bileşikler	25
2.4.3.1. Yapısal tipleri	25
2.4.3.2. Doğal bolluğu	26
2.4.3.3. Fenoller ve fenolik asitler	27
2.4.3.4. Fenilpropanoidler	27
2.4.3.5. Flavonoidler	29
2.4.3.6. Minör flavonoidler, ksantonlar ve stilbenler.....	31
2.5 Antioksidanlar.....	33
2.5.1 Antioksidanların sınıflandırılması	36
2.5.1.1 Birincil antioksidanlar.....	36
2.5.1.2 İkincil antioksidanlar	38
2.6 Antikolinesterazlar	40
2.6.1 Alzheimer hastalığı ve nedenleri.....	40

2.6.2 AChE ve BChE inhibitörleri	41
2.6.3 Kolinesteraz inhibitörlerinin Alzheimer Hastalığındaki Mekanizması	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1 Bitkisel Materyaller	45
3.2 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler.....	45
3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler.....	45
3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması.....	46
3.2.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler	46
3.2.2.2 Toplam flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler	46
3.2.2.3 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler.....	46
3.2.2.4 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler.....	46
3.2.2.5 İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi	47
3.2.2.6 Jones reaktifinin hazırlanması	47
3.3 Cihaz ve Gereçler	48
3.4 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid İçerik Miktar Tayinleri.....	48
3.4.1 Toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesi	48
3.4.2 Toplam flavonoid miktar tayini.....	49
3.5 Antioksidan Tayin Yöntemleri	50
3.5.1 DPPH serbest radikal giderim yöntemi	50
3.5.2 Toplam antioksidan aktivite yöntemi	51
3.6 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemleri	51
3.6.1 Ellman metodu.....	51
3.6.1.1 AChE aktivite testi.....	52
3.6.1.2 BChE Aktivite testi.....	53
3.7 İstatiksel Hesaplamalar	54
3.8 Kromatografik Yöntemler	54
3.8.1 Kolon kromatografisi.....	54
3.8.2 İnce tabaka kromatografisi	54
3.9 Spektroskopik Yöntemler	55
3.9.1 NMR spektroskopisi	55
3.9.2 Kütle spektroskopisi	55
3.9.3 IR spektroskopisi	55
4. DENEYSEL BÖLÜM.....	57
4.1 Ekstrelerin Hazırlanışı	57
4.2 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi.....	60
4.2.1 Toplam fenolik miktar tayini	60
4.2.2 Toplam flavonoid miktar tayini	60
4.3 Antioksidan Aktivite Yöntemleri	60
4.3.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesinin belirlenmesi	60
4.3.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu aktivitesinin belirlenmesi	61
4.4 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi	62
4.4.1 AChE % inhibisyon testi	62
4.4.1 BChE % inhibisyon testi.....	62
4.5 <i>S. chrysophylla</i> ve <i>S. trichoclada</i> Bitkilerinin İzolasyonu ve Saflaştırma Çalışmaları	63
4.5.1 <i>S. chrysophylla</i> bitkisinin toprak üstü kısmının diklorometan ekstresinin (SCD) fraksiyonlandırılması.....	63
4.5.2 <i>S. trichoclada</i> bitkisinin toprak üstü kısmının metanol ekstresinin (STM) fraksiyonlandırılması.....	63
4.6 β -sitosterol'ün Potansiyel Aktif Yarı Sentetik Türevlerinin Sentezi	64

4.6.1 3-asetil- β -sitosterol sentezi.....	64
4.6.2 3-okso-o β -sitosterol sentezi	64
4.6.3 β -sitosterol-3-metil eter sentezi.....	65
5. BULGULAR	67
5.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Miktar Sonuçları.....	68
5.2 Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları-68.....	68
5.2.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları.....	68
5.2.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu (β -karoten renk açılımı) yöntemi sonuçları	69
5.2.3 Antikolinesteraz aktivitesi sonuçları	70
5.3 Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları	71
5.3.1 <i>S. chrysophylla</i> toprak üstü diklorometan (SCD) ekstresi fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarı	71
5.3.2 <i>S. chrysophylla</i> toprak üstü diklorometan (SCD) ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	71
5.3.3 <i>S. chrysophylla</i> toprak üstü diklorometan (SCD) ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon % inhibisyon aktivitesi sonuçları....	72
5.4 <i>S. chrysophylla</i> ve <i>S. S. trichoclada</i> Bitkilerinden İzole Edilen Saf Bileşikler ve Yapı Tayini	72
5.4.1 Saf bileşiklerin yapı tayini	73
5.4.1.1 Sc.45.3.3= Sclareol= 14-Labdene-8,13-diol	73
5.4.1.2 Sc.33-34.1, St.47.2 = β -sitosterol=Stigmast-5-em-3-ol	74
5.4.1.3 Sc 37.11.3.3= Salvigenin= 5-hidroksi-4',6,7-trimetoksiflavon	75
5.4.1.4 St 44.4 =Lupeol= 20(20)-Lupen-3-ol.....	76
5.4.1.6 St 52.2 =Lupenon= 20(29)-Lupen-3-on.....	78
5.4.1.5 St 51.3 =Monogynol A= 20-Hidroksi-Lupen-3-on.....	79
5.4.1.7 St 52.3 =Glochidone= 1,20(29)-Lupadien-3-on	80
5.4.1.9 Sc.39.18.-2, St-42.5.2 =Oleanolik asit	81
5.4.1.10 Sc.39.18.-2, St-40.4.1=Ursolik asit.....	82
5.5 İzole Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları.....	83
5.5.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesinin belirlenmesi	83
5.5.2. Lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi sonuçları.....	84
5.5.2. Antikolinesteraz aktivite sonuçları.....	85
5.6 Yarı Sentetik β -sitosterol Türevlerinin Deneysel Bulguları ve Yapı Tayinleri .	86
5.6.1 3-asetil- β -sitosterol bileşiği.....	86
5.6.2 3-okso-o β -sitosterol bileşiği.....	87
5.6.3 β -sitosterol-3-metil eter bileşiği	88
5.7 Yarı Sentetik β -sitosterol Türevlerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları.....	88
5.7.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesinin sonuçları	88
5.7.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi sonuçları.....	89
5.7.3 Antikolinesteraz aktivite sonuçları.....	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	93
EKLER.....	101
ÖZGEÇMİŞ	135

KISALTMALAR

ACh	: Asetilkolin
AChE	: Asetilkolinesteraz enzimi
AcI	: Asetikolin iyodür
A•	: Antioksidan radikaller
AH	: Birincil antioksidanlar
APT	: Attached proton test
APP	: Amiloid beta prekürsör proteini
BCh	: Butirilkolin
BChE	: Butirilkolinesteraz enzimi
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
CNS	: Central Nervous System
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FCR	: Folin Ciocalteu fenol reaktifi
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
HMQS	: Heteronuclear multiple quantum coherence (HSQC)
IR	: Infrared spektroskopisi
İTK	: İnce tabaka kromatografisi (TLC)
ln	: Doğal logaritma
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
ORAC	: Oksijen radikali absorbans kapasitesi
O₂•	: Süperoksit radikali
OH•	: Hidroksil radikali
PEs	: Pirokatekole eşdeğer
Q	: Kersetin
QEs	: Kersetine eşdeğer
R•	: Alkil radikalleri
RO•	: Alkoksi radikalleri
ROO•	: Peroksit radikalleri
ROOH	: Hidroperoksitler
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RNS	: Reaktif azot türleri
RS•	: Tiyl radikalleri
RSO•	: Sülfenil radikalleri
RSO₂•	: Tiyl peroksit radikalleri
s	: Saat
SCD	: <i>Salvia chrysophylla</i> 'nın diklorometan ekstresi
SCM	: <i>Salvia chrysophylla</i> 'nın metanol ekstresi
STM	: <i>Salvia trichoclada</i> 'nın metanol ekstresi

subsp	: Subspecies
TEAC	: Troloks eşdeğeri antioksidan kapasite yöntemi
TBHQ	: <i>tersiyer</i> -Bütilhidrokinon
TMS	: Tetrametilsilan
α -TOC	: α -Tokoferol
TOSC	: Toplam oksiradikal yöntemi
TRAP	: Toplam radikal yakalama parametresi
Tween-40	: Polioksietilensorbitan monopalmitat
UV	: Ultraviyole

SEMBOLLER

cm	: Santimetre
°C	: Santigrat derece
g	: Gram
L	: Litre
ln	: Doğal logaritma
m	: Metre
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
M	: Molar
Nm	: Nanometre
ppm	: Milyonda bir birim

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Terpenlerin sınıflandırılması	15
Çizelge 2.2 : Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	26
Çizelge 5.1 : Kuru bitki miktarları, ekstre miktarları % verimleri	67
Çizelge 5.2 : Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktarı sonuçları.....	68
Çizelge 5.3 : <i>Salvia chrysophylla</i> ve <i>Salvia trichoclada</i> bitkilerinin diklorometan ve metaol ekstralarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesinin sonuçları.....	68
Çizelge 5.4 : <i>Salvia chrysophylla</i> ve <i>Salvia trichoclada</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının β -karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi (%inhibisyon).....	69
Çizelge 5.5 : Ekstrelerin antikolinesteraz aktivite sonuçları	70
Çizelge 5.6 : SCD ekstresinin fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları	71
Çizelge 5.7 : Saf bileşikler ve miktarları.	73
Çizelge 5.8 : Lupan iskeletine sahip triterpenlerin ^{13}C -NMR verileri.....	77
Çizelge 5.9 : Lupan iskeletine sahip triterpenlerin ^1H -NMR verileri.....	78
Çizelge 5.10 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi sonuçları.....	83
Çizelge 5.11 : İzole saf maddelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon aktiviteleri sonuçları	84
Çizelge 5.12 : İzole saf maddelerin antikolinesteraz % inhibisyon aktivitelerinin sonuçları	85
Çizelge 5.13 : Yarı sentetik saf bileşiklerin DPPH radikal giderim aktivitesi	88
Çizelge 5.14 : Yarı sentetik saf maddelerin β -Karoten-Linoleik Asit Toplam Antioksidan (% İnhibisyon) aktivite sonuçları.....	89
Çizelge 5.15 : Yarı sentetik β -sitosterol türevlerinin antikolinesteraz % inhibisyon aktivite sonuçları	90

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : <i>Salvia chrysophylla</i> STAPF	2
Şekil 1.2 : <i>Salvia trichoclada</i> BENTHAM.....	3
Şekil 2.1 : <i>Salvia chrysophylla</i> STAPF bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölge	7
Şekil 2.2 : <i>Salvia trichoclada</i> BENTHAM bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölge..	8
Şekil 2.3 : Karnosol ve rosmarinik asit bileşikleri.....	10
Şekil 2.4 : Sugiol ve forskalinon bileşikleri	11
Şekil 2.5 : Taksodion bileşiği	11
Şekil 2.6 : 12-demetilmultikaulin, 12-demetilmultiortokinon ve 12-Metil-5-dehidroasetilhorminone bileşikleri	12
Şekil 2.7 : Sıklareol bileşiği.....	13
Şekil 2.8 : Sekonder metabolitlerin oluşumu.....	14
Şekil 2.9 : Terpenlerin oluşumu	16
Şekil 2.10 : Asiklik(geraniol), monosillik(limonen) ve bisiklik fenchone) monoterpenler.....	17
Şekil.2.11 : Asiklik(farnesol), monosiklik(absisik asit) ve bisiklik(caryophyllen) seskiterpenler.....	18
Şekil 2.12 : Giberellik asit bileşiği	19
Şekil 2.13 : Manoiloksit, isopimarik asit, 7-Okso-13- <i>epi</i> -pimaran-8,15-dien-18-oik asit bileşikleri	20
Şekil 2.14 : <i>ent</i> -clerodane bileşiği	20
Şekil 2.15 : Melisodorik asit bileşiği	20
Şekil 2.16 : Barreliol ve 7- <i>epi</i> -salviviridinol bileşikleri	21
Şekil 2.17 : Skalarin bileşiği.....	21
Şekil 2.18 : 6-Dehidroksi-13- <i>epi</i> -yosgadensenol bileşiği.....	22
Şekil 2.19 : Bazı triterpen yapıları.....	22
Şekil 2.20 : <i>Salvia</i> türlerinden elde edilen bazı triterpenler	23
Şekil 2.21 : β -karoten bileşiği.....	23
Şekil 2.22 : α -karoten bileşiği.....	23
Şekil 2.23 : Bir steroidin iskelet yapısı.....	24
Şekil 2.24 : Steroitlerin iskelet yapısı	24
Şekil 2.25 : <i>p</i> -hidroksi fenil asetik asit ve kateşol bileşiği	25
Şekil 2.26 : Orsinol ve şirinjik asit bileşiği	27
Şekil 2.27 : <i>p</i> -Kumarik asit bileşiği	28
Şekil 2.28 : Umbeliferon bileşiği.....	28
Şekil 2.29 : Kumarin ve kromon yapıları	28
Şekil 2.30 : Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası.....	29
Şekil 2.31 : Flavon, flavonol, flavonon, izoflavon,antosiyenin yapıları	30
Şekil 2.32 : Pelargonidin ve siyanidin bileşikleri	30
Şekil 2.33 : Kamferol ve kesretin bileşikleri	31
Şekil 2.34 : Apigenin ve Luteolin bileşiği	31
Şekil 2.35 : Bir flavonon (narinjin) bileşiği.....	32
Şekil 2.36 : İzoflavon (daidzein ve genistein) bileşikleri	32

Şekil 2.37 : Bir ksanton (magniferin) bileşiği.....	32
Şekil 2.38 : Bir hidroksistilben (Lunularik asit) örneği	33
Şekil 2.39 : Antioksidanların Sınıflandırılması	34
Şekil 2.40 : Bütillenmiş hidroksi anisol, bütillenmiş hidroksi toluen, ter-bütıl hidrokinon sentetik antioksidan bileşikleri.....	36
Şekil 2.41 : İkincil antioksidanlar	39
Şekil 3.1 : Pirokatekolün ölçü grafiği	49
Şekil 3.2 : Kersetinin ölçü grafiği.....	50
Şekil 3.3 : Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonu	52
Şekil 4.1 : <i>Salvia chrysophylla</i> bitkisinin diklorometan ve metanol ekstralarının hazırlanması ve fraksiyonlandırılması	58
Şekil 4.2 : <i>Salvia trichoclada</i> bitkisinin metanol ekstresinin hazırlanması ve fraksiyonlandırılması	59
Şekil 4.3 : 3-asetil β -sitosterol sentezi	64
Şekil 4.4 : 3-okso- β -sitosterol sentezi.....	65
Şekil 4.5 : β -sitosterol 3-metil eter sentezi	65
Şekil 5.1 : <i>S. chrysophylla</i> ve <i>S. trichoclada</i> bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstralarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi	69
Şekil 5.2 : <i>Salvia chrysophylla</i> ve <i>Salvia trichoclada</i> bitkilerinin β -karoten- linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi	70
Şekil 5.3 : <i>S. chrysophylla</i> ve <i>S. trichoclada</i> ekstralarının antikolinesteraz aktivitesi	70
Şekil 5.4 : <i>S. chrysophylla</i> diklorometan (SCD) ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbet radikal giderim aktivitesi	71
Şekil 5.5 : SCD ekstresi fraksiyonlarının total antioksidan aktivite lipid peroksidasyon (% İnhibisyon).....	72
Şekil 5.6 : Sclareol bileşiği	73
Şekil 5.7 : β -sitosterol bileşiği	74
Şekil 5.8 : Salvigenin bileşiği	75
Şekil 5.9 : Lupeol bileşiği	76
Şekil 5.10 : Lupenon bileşiği	78
Şekil 5.11 : Monogynol A bileşiği.....	79
Şekil 5.12 : Glochidone bileşiği.....	80
Şekil 5.13 : Oleanolik asit bileşiği.....	81
Şekil 5.14 : Urasolik asit bileşiği.....	82
Şekil 5.15 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi	83
Şekil 5.16 : Saf maddelerin β -karoten renk açılım yöntemi lipid peroksidasyon % inhibisyon aktiviteleri.....	84
Şekil 5.17 : İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu	85
Şekil 5.18 : İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu	86
Şekil 5.19 : 3-asetil- β -sitosterol Bileşiği.....	86
Şekil 5.20 : 3-okso- β -sitosterol bileşiği	87
Şekil 5.21 : β -sitosterol-3-metil eter bileşiği	87
Şekil 5.22 : Yarı sentetik saf bileşiklerin DPPH radikal giderim aktivitesi	88
Şekil 5.23 : Yarı sentetik saf bileşiklerin β -Karoten-Linoleik Asit Toplam Antioksidan (% inhibisyon) aktivitesi sonuçları	89
Şekil 5.24 : Yarı sentetik saf maddelerin AChE % İnhibisyonu	90
Şekil 5.25 : Yarı sentetik saf maddelerin BChE % İnhibisyonu	90
Şekil A.1 : Sclareol bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	103

Şekil A.2 : Sclareol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (olefinik bölge).....	104
Şekil A.3 : Sclareol bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu	105
Şekil B.1 : Salvigenin bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	106
Şekil C.1 : β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	107
Şekil C.2 : β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	108
Şekil C.3 : β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu	109
Şekil D.1 : Lupeol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	110
Şekil D.2 : Lupeol bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu	111
Şekil D.3 : Lupeol bileşiğinin ^1H - ^1H COSY spektrumu.....	112
Şekil E.1 : Lupenon bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	113
Şekil E.2 : Lupenon bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu	114
Şekil E.3 : Lupenon bileşiğinin ^1H - ^1H COSY spektrumu	115
Şekil E.4 : Lupenon bileşiğinin MS spektrumu	116
Şekil F.1 : Monogynol A bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	117
Şekil F.2 : Monogynol A bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (metil bölgesi)	118
Şekil F.3 : Monogynol A bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu	119
Şekil G.1 : Glochidone bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	120
Şekil G.2 : Glochidone bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu.....	121
Şekil H.1 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	122
Şekil H.2 : Oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu.....	123
Şekil I.1 : Ursolik asit bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	124
Şekil I.2 : Ursolik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu	125
Şekil J.1 : 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	126
Şekil J.2 : 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (alifatik bölge)...	127
Şekil J.3 : 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu	128
Şekil K.1 : 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	129
Şekil K.2 : 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	130
Şekil K.3 : 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu	131
Şekil L.1 : β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	132
Şekil L.2 : β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu	133
Şekil L.3 : β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin IR spektrumu.....	134

SALVIA CHRYSOPHYLLA STAPF VE SALVIA TRICHOCLADA BENTHAM BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN İZOLASYONU, YARI SENTETİK TÜREVLERİNİN ELDESİ, ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Salvia türleri ilaç ve gıda endüstrisinde ve parfümeride kullanılan, çoğunlukla güzel kokulu bir ya da çok yıllık bitkileri kapsayan Lamiaceae (Ballıbabagiller) familyasına ait bitkilerdir. Dünyada 900, Türkiye’de ise yarısı endemik olmak üzere 90’ı aşkın *Salvia* türü doğal olarak yetişmektedir. Eski çağlardan beri *Salvia* türleri, halk arasında antiseptik amaçlı, sindirime yardımcı, romatizmal ağrılarda ve sinir sistemi hastalıklarında kullanılmaktadır. *Salvia* türleri taşıdığı sekonder metabolitler olarak terpenoit, steroit, flavonoid ve diğer fenolik bileşiklerce zengindir. *Salvia* türünün en çok yetiştiği yerlerden biri olan Anadolu’da bu bitkiler ‘Adaçayı’ olarak anılmaktadır ve pekçok amaçla kullanılmaktadır. Üzerinde çalışılan *Salvia chrysophylla* Stapf ve *Salvia trichoclada* Benthham bitkileri sırasıyla Burdur ve Bingöl’den toplanmıştır.

Lamiaceae familyası bitkileri ve özellikle *Salvia* türleri taşıdıkları flavonoid ve fenolik bileşikler ve hatta diterpenleri nedeniyle antimikrobiyal, antioksidan ve sitotoksik etkilere sahiptirler. Hatta *Salvia* türlerinin mono-, di- ve triterpenlerinin sedatif, antikolinergik ve/veya nöroprotektif özellikleri ile ilgili araştırmalar son yıllarda giderek artış göstermektedir. Bu nedenle, bu tez çalışmasında, bu iki *Salvia* türünden biyoaktif bileşenlerin izolasyonu ve yapı tayini ve antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla ilk aşamada *Salvia chrysophylla* Stapf ve *Salvia trichoclada* Benthham bitkilerinin diklorometan ve metanol ile ekstraktları hazırlandı. Bu ekstraktların toplam fenolik miktarları pirokatekol ve toplam flavonoid miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildi ve antioksidan aktiviteleri lipid peroksidasyonu inhibisyonu (β -karoten renk açılımı) ve DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi yöntemleriyle, antikolinesteraz aktivitesi ise Ellman yöntemi kullanılarak belirlendi. Çalışılan iki *Salvia* türünden 3 bileşik (β -sitosterol, oleanolik asit ve ursolik asit) her iki türden olmak üzere toplam 9 saf bileşik izole edildi ve bu bileşiklerin yapıları çeşitli spektroskopik (NMR, IR ve kütle spektroskopisi) yöntemlerle belirlendi. Bu bileşikler; bir flavonoid olan salvigenin, bir labdan diterpen olan sklareol, bir steroid olan β -sitosterol ve lupan triterpen yapısındaki lupeol, lupenon, monoginol A, glohidon ve triterpenik asit yapısındaki oleanolik asit ve ursolik asit dir.

Elde edilen saf bileşiklerin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri *in vitro* olarak incelendi. Ayrıca, izole edilen bileşiklerden önemli bir bitki steroidi olan β -sitosterolden hareketle 3-asetil- β -sitosterol, 3-okso- β -sitosterol ve β -sitosterol-3-metil eter olmak üzere üç farklı türevi hazırlanarak antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri incelenmiştir.

Sonuç olarak gerek izole edilen, gerekse türev bileşikler genelde DPPH serbest radikalini yakalamada pek etki göstermezken β -karoten-linoleik asit sisteminde orta

derecede lipid peroksidasyonunu inhibe edici etki göstermişler, AChE ve BChE enzimlerine karşı ise oldukça yüksek aktivite göstermişlerdir.

Bu çalışma, İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 34100.

ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES OF *SALVIA CHRYSOPHYLLA* STAPF AND *SALVIA TRICHOCLADA* BENTHAM PLANTS, PREPARATION OF SEMI-SYNTHETIC DERIVATIVES AND INVESTIGATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES

SUMMARY

Salvia species are used in drug and food industry and perfumery, belonging to Lamiaceae family which contain annual or perennial plants with nice fragrance. Totally 900 *Salvia* species grown wildly all over the world and Turkey has over 90 *Salvia* species being half of them endemic. Since ancient times *Salvia* species have been traditionally used as antiseptic, digestive, in the treatment of rheumatism and neurological diseases. Secondary metabolites of *Salvia* species are rich in terpenoids, steroids, flavonoids and other phenolics. *Salvia* species are widely growing in Anatolia where named ‘Adaçayı’ and used for many purposes. *Salvia chrysophylla* Stapf and *Salvia trichoclada* Benthham are used in this study, and collected from area of Burdur City and Bingöl City, respectively.

Lamiaceae family plants and especially *Salvia* species have antimicrobial, antioxidant and cytotoxic effects which attribute to their secondary metabolites, flavonoids and phenolic compounds including diterpenes. Recently, investigations on sedative, anticholinesterase and/or neuroprotective effects of *Salvia* species are going to be increased. Due to this reason, it is aimed that isolation and structure elucidation of bioactive constituents of the two *Salvia* species, and then investigation of their antioxidant and anti-Alzheimer activity in this study. To achieve the goal, at first step, *Salvia chrysophylla* Stapf and *Salvia trichoclada* Benthham plants extracts are prepared using acetone and methanol. Total phenolic and flavonoid contents of extracts were determined as pyrocatechol and quercetin equivalents, respectively. The antioxidant activity of the extracts was established by using two test systems, β -caroten bleaching for lipid peroxidation inhibition, and DPPH free radical scavenging methods. The extracts were also screened for the anticholinesterase activity by Ellman Method against acetylcholinesterase (AChE) and butrylcholinesterase (BChE) enzymes. Nine pure compounds are isolated from the two *Salvia* species, three of them (β -sitosterol, oleanolic acid and ursolic acid) are common in both, and all structures were identified by spectroscopic (NMR, IR, and mass) methods as a flavonoid salvigenin, a labdane diterpene sclareol, a steroid β -sitosterol, lupane triterpenoids lupeol, lupenone, monogynol A and glochidone, and triterpene acids oleanolic and ursolic acids.

Antioxidant and anticholinesterase activity of the isolated pure compounds were investigated *in vitro*. Three derivatives of an important plant steroid β -sitosterol are synthesized, these are; 3-acetyl- β -sitosterol, 3-oxo- β -sitosterol and β -sitosterol-3-methyl ether. Their antioxidant and anticholinesterase activities were also investigated.

As result, in general, both isolates and the derivatives are not effective in scavenging of DPPH free radical. However, they exhibited moderate lipid peroxidation

inhibitory activity in β -carotene-linoleic acid system, and they have been found highly active against AChE and BChE enzymes.

This work was supported by the Research Found of Istanbul Technical University.
Project No: 34100

1. GİRİŞ

1.1 Tezin Amacı

Dünya'nın çeşitli yerlerinde insanlığın varoluşundan beri bitkiler hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Doğal ürünlerden elde edilen bileşiklerin karmaşık yapılarından dolayı sentezi kimyasal olarak zahmetlidir. Bu da insanları doğal ürün arayışına götürür. Tedavi amaçlı kullanılan bitkiler içinde en yaygın olanlarından biri de *Salvia* türleridir. *Salvia* bitkileri tür farkı gözetmeksizin halk arasında “adaçayı” olarak bilinir. Bitkiler içinde barındırdığı bazı ürünlerden dolayı değişik biyolojik aktivitelere sahiptir. *Salvia*’ lar çeşitli biyolojik aktiviteye sahip yüzlerce bileşik içermektedir. Bundan dolayı *Salvia* türleri eski zamanlardan beri halk arasında, antioksidan, antialzheimer, antimikrobiyal, antienflamatuar, sitotoksik/antitumor özelliklerinden dolayı çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır.

Alzheimer hastalığı, beyindeki öğrenme ve hafıza ile alakalı bölümlerde kolinerjik nöronların kaybıyla bağlantılı olarak nörofibrillerin düğümlenmesi ve amiloidlerin oluşumu olarak tanımlanır. Alzheimer hastalarında asetilkolin düzeyi düşer. Bunu tedavi etmenin yollarından biri asetilkolinin hidrolizinden sorumlu olan enzimin (asetilkolinesteraz) inhibisyonunu sağlamaktır. *Salvia* türlerinde ise asetilkolin inhibitörü sayılabilecek bir çok madde bulunmaktadır.

Oksidasyon ile oluşan serbest radikaller, hücrelere zarar vererek, organizmanın erken yaşlanmasına neden olur. Antioksidanlar oksidasyon sürecini serbet radikallerle reaksiyona girerek engellerler. Yıllardır birçok araştırmacı doğal kaynaklardan en güçlü ve aynı zamanda toksik olmayan antioksidanlar aramaktadır.

Bu çalışmada iki farklı *Salvia* türü çalışılmıştır. Bunlardan biri Balıkesir ili çevresinden toplanan *Salvia chrysophylla* (Şekil 1.1), diğeri ise Bingöl ili çevresinden toplanan *Salvia trichoclada*'dır. Her iki bitkinin de ekstreleri çeşitli yöntemler kullanılarak çıkartılmış bunların antioksidan (DPPH serbest radikal

giderim ve Lipid peroksidasyon inhibisyonu) ve antikolinesteraz (AChE ve BChE inhibisyonu) aktivitelerinin incelenmesi, başlıca sekonder metabolitlerinin (terpenoitler, flavonoidler, ve steroid yapıdaki bileşikler) izole edilmesi ve bunların çeşitli kromatografik yöntemlerle saflaştırılarak yapılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Saf bileşiklerin yapıları spektroskopik yöntemlerle (NMR, kütle, UV) aydınlatılarak, bu bitkilerin gerek ekstreleri, gerekse saf bileşikleri antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri incelenerek ilaç olma potansiyellerinin araştırılması amaçlanmış ve çalışmalar bu yönde gerçekleştirilmiştir. Daha sonrasında bu türlerden elde edilen β -sitosterolün daha aktif olabilecek yarı sentetik türevlerinin hazırlanarak antioksidan ve antikolinesteraz aktivitesi değerlendirilmiştir.



Şekil 1.1: *Salvia chrysophylla* STAPF (Fotoğraf: Dr. Ersin Karabacak)



Şekil 1.2: *Salvia trichoclada* BENTHAM (Fotoğraf: Mehmet Fırat)

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Botanik Bilgiler

2.1.1 Lamiaceae (Labiatae) Familyası

Lamiaceae familyası ilk kez De Jussieu tarafından 1789 yılında Labiatae adıyla isimlendirilmiştir. Daha sonra Lindley tarafından 1836 yılında Lamiaceae olarak isimlendirilmiştir [1-2]. Dünyanın belli başlı büyük ve eski familyalarındandır. Familya ile ilgili fosil kayıtları olmamasına rağmen yine de kökeninin Oligosen'e veya 70-90 milyon yıl öncesine dayandığı söylenebilir [3-4].

Lamiaceae (ballıbabagiller), çoğunlukla güzel kokulu, bir ya da çok yıllık, otsular, nadiren çalılar veya ağaçları kapsayan çiçekli bitkiler familyasıdır. Lamiaceae familyası tıpta ve parfümeride kullanılan birçok uçucu yağı içeren bir familya olarak önem taşımaktadır. Yapraklarında, kokulu yağ salgılayan küçük salgı bezleri bulunur. Dolayısıyla başta nane, kekik, adaçayı ve lavanta çiçeği olmak üzere bu familyaya ait çiçekler bol ıtırılı olur. Baş sekiz hücreli pul şeklindeki salgı tüyleri bu familya için karakteristiktir [5]. Gövdeleri genellikle 4 köşelidir. Yapraklar dekusat dizilişlidir. Çiçekler vertisillastrum durumdadır. Korolla çoğunlukla iki dudaklıdır. Stamenler 4 veya 2 tanedir. Meyva 4 nuksa yarılan bir şizokarptır [6-7].

Familya üyeleri Dünya'nın birkaç bölgesi hariç, Himalaya'lardan Güneybatı Asya'ya, Hawai ve Avustralya'ya, Afrika ve Amerika'ya kadar değişik bölgelerde çok farklı yüksekliklerde ve değişik habitatlarda yetişebilirler. Lamiaceae familyasının yeryüzünde 250 kadar cinsi ve 3200'ü aşkın türü mevcuttur. Yurdumuzda ise 46 cins ve bunlara ait 758 takson ile temsil edilen Lamiaceae familyası Türkiye'nin en zengin üçüncü familyası olup ülkemizdeki endemizm oranı % 45'tir [8]. Lamiaceae familyasının en fazla takson içeren cinslerinin başında *Salvia* (c. 900 tür) gelir ve kozmopolit bir cinstir. Ayrıca *Scutellaria*, *Stachys* ve *Thymus* familyanın diğer kozmopolit cinsleridir. *Rosmarinus*, *Phlomis* ve *Sideritis* türleri karakteristik maki ve garig üyeleridir. Genellikle açık habitatlara uyum

sağlamış türlerdir. Sadece birkaç cins (*Gomphostemma*) tropikal yağmur ormanlarında görülür.

2.1.1 *Salvia* Cinsi

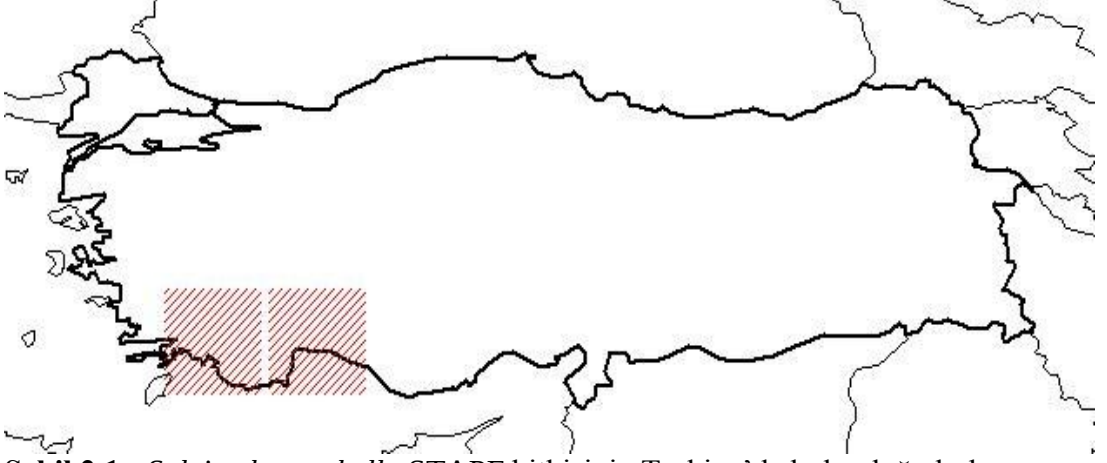
Salvia cinsinin ismi, eski zamanlarda şifalı bitki olarak ünlenen, Latince “salvere”, korumak, isminden türemiştir [9]. Çoğunlukla aromatik, otsu, yarı çalimsı veya çalimsı, çok yıllık, nadiren iki ve tek yıllık bitkilerdir. Gövde dik veya yatık, salgı tüylü veya salgı tüysüz ya da çıplaktır. Yapraklar tam parçalanmamış, çiçek durumu çeşitli dizilişte simoz olup vertisillastrumlar çiçekli, uzak veya birbirine yakın gruplar halindedir [6].

Dünyada bugün salvianın 900 den fazla türü vardır. Ağırlıklı olarak orta Amerika, güney Amerika ve Asya’da bulunmaktadır. Türkiye’de ise 94 taxonu vardır. Bunlardan 45’i Türkiye’ye endemiktir. Bitki kimyası araştırmaları *Salvia* türlerinin flavonoidler [10] ve diğer fenolik bileşiklerin [11] yanı sıra, diterpenler [12-15] ve triterpenlerce de [16,17] zengin olduğunu göstermiştir [18]. *Salvia* türleri eski zamanlardan beri bütün dünyada soğuk algınlığı, bronşit, tüberküloz, menstürel bozukluklar ve sindirim bozukluklarından korunmak için kullanılmaktadır [19]. Ayrıca antioksidan, antibakteriyel, antitümör, cardioaktif ve antidiyabetik özelliklere sahiptir [20].

2.1.3 *Salvia chrysophylla* STAPF

Salvia chrysophylla Türkiye’nin kuzeybatısında 1300-2300 m yükseklikteki çimenlik yerler de ve kireçtaşı yamaçlar da yetişen bir Akdeniz bitkisidir. Türkiye’ye endemiktir. Türkiye’de yetişen diğer *salvia* türlerine pek benzememektedir. Ortalama 10-60 cm boyutunda çok yıllık bir bitkidir. Bitki dik bir gövdeye, salkım çiçekli eksene, yumurta şeklinden mızraksı şekle, çandan huniye yapraklara sahiptir. Ayrıca mor üst dudak ve sarı alt dudağa sahip taç yapraklıdır. *S. chrysophylla* hexacolpate, radyal ve simetrik olan izopolar polen tanelerine sahiptir. Polen taneleri yassı ve küreye benzer şekildedir.

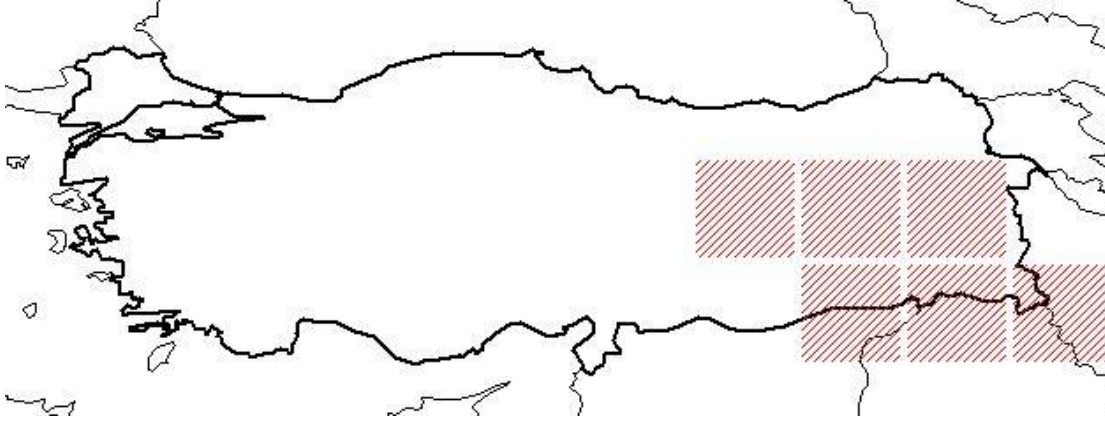
Kök anatomisi açısından bakıldığında, *Salvia chrysophylla* daha önce araştırılan diğer türlerden farklı olarak daha fazla sıralı hücrelerden oluşan damarlara sahiptir [17,18]. *Salvia chrysophylla*’nın gövdesinde, çiçek ekseninde, yaprak bölmelerinde ve çanak yapraklarda kalkanımsı, salgı uçlu ve salgısız olmak üzere, 3 çeşit diken görülmüştür [18].



Şekil 2.1 : *Salvia chrysophylla* STAPF bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölge

2.1.4 *Salvia trichoclada* BENTHAM

Salvia trichoclada, Türkiye’de ağırlıklı olarak Güneydoğu Anadolu bölgesinde, 300-2000m yükseklikteki çimenlik yerler, kireçtaşı yamaçlar ve nadas tarlalarında yetişen çok yıllık otsu bir bitkidir. Mayıs ayı ile çiçeklenmeye başlar, son çiçeklenme ise temmuz ayında gözüktür. *Salvia bracteata*’ ya benzer; salgı bezlerini içeren glandulara ilave, gövdesi eglandular saçaklarla kaplıdır. *Salvia bracteata*’ ya göre çiçeksi yaprakları daha küçük (12-20X6-11mm), meyve çanağı(çanak yaprakları) daha geniş (15-20-25mm), taç yaprakları geniş (20-40 mm) ve sapı daha uzundur (3-6mm). En az 2-8 çiçeklidir. Türkiye’ de Elazığ’da; Maden’den Ergani’ye uzanan 2 km’lik bölgede, Diyarbakır’da; Malabad’ın kuzeyinde, Bitlis’de; Avata ve Garzit arasında, Bingöl’de Yolçatı Köyü’ nden Bingöl’ e 1,5 km’lik yol kenarında, Siirt’in 3 km kuzeyinde Botan Çayı’nda, Mardin’de; Kasrik Geçidinde ve Hakkari’de ise Zob Geçidi civarında görülmektedir. Dünya’da ise genel dağılımı Kuzey Irak, Kuzeybatı ve Batı İran bölgeleridir. *Salvia bracteata* ile integre olan bu problemlili türlerin daha geniş alanlarda gözlemi gerekir. Bu da *Salvia bracteata*’dan daha doğal habitatlarla sınırlıdır.



Şekil 2.2 : *Salvia trichoclada* BENTHAM bitkisinin Türkiye’ de bulunduğu bölge.

2.2 Salvia Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı

1. Küçük dozlarda anti-enflamatuar olarak kullanılır.
2. Yeterli miklarda alındığında aşırı terlemeyi önler [19].
3. Kanamayı durdurucu, antiseptik, spazmolitik ve gaz giderici özelliklerinin yanında ağız iltahaplarını önleme özelliği vardır. Dil, boğaz ve ağız gargalarında kullanılmaktadır [20].
4. Gaz sancılarının önlenmesiyle birlikte hazımsızlığın giderilmesinde kullanılır [21].
5. Mantar önleyici özelliğinden dolayı, banyoda cilt problemlerinin giderilmesinde kullanılır [22].
6. Hamilelik boyunca rahim kaslarının uyarılmasını engellemek için kullanılır [23].
7. Cinsel güçsüzlüğün giderilmesinde kullanılır [24].
8. Romatizma ağrılarında merhem olarak kullanılır [25]. Salviadan yapılan merhemler kas ağrılarının giderilmesinde ve eklem tutulmalarında kullanılır [26].
9. İçerdiği tanenlerden dolayı kanamayı önleyici ve anti-enflamatuar özelliği vardır. Yaralar için losyon veya kompres olarak kullanılır [27]. Bunun

yanında açık yaralar için mükemmel bir losyon ve der döküntüsü tedavisinde kullanılır [25].

10. Varisli damarların iyileştirilmesinde ve bacaklarda bulunan siğillerin giderilmesinde kullanılır [28].
11. Saç derisine uygulandığında saçı koyulaştırıcı olarak kullanılır [25]. Saç dökülmesini engellemek için kullanılır [29]. İyi bir saç toniğidir ve saç derisine uygulandığında saçın parlaklığını artırır. Saçı kuvvetlendirir, her gün uygulandığında doğal koyu bir renk oluşturur [26].
12. Arı sokması ve böcek ısırıklarında kullanılır [26].
13. Bu ve diğer Labiatealerin uçucu yağları böceksavar özellik taşır. Yetiştği alanlarda, bahçe ve sahalarda böcek popülasyonunu azaltmaktadır [30].
14. Sinirsel durumlarda, depresyon, titreme ve kontrol kaybı şartlarında kullanılır [31].
15. Alzheimer hastalığının tedavisinde ve benzer şekilde hafıza kaybı ile seyreden nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılma potansiyeline sahiptir [32].

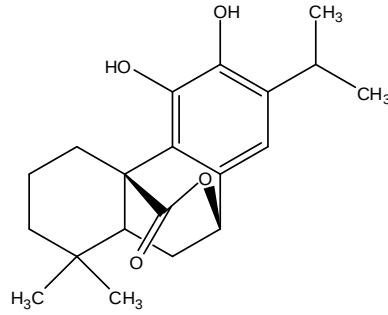
2.3 *Salvia* Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Aktivite Çalışmaları

Salvia'lar üzerine birçok kimyasal araştırma ve aktivite çalışmaları yapılmıştır. Uzakdoğudan Avrupa'ya kadar tüm dünyadaki ülkelerdeki ilaçla ilgili dökümanlarda belirgin bir şekilde görünür ki 1000'e yakın *Salvia* çeşidi, uçucu yağlarının parfümeri alanında kullanılması gibi, birçok alanda kullanılmaktadır [33]. *Salvia* türleri özellikle *S. officinalis* gıda endüstrisinde önemli antioksidan kaynaklardandır ve doğal antioksidanların vücuda alımıyla ilgili geniş uygulamaları vardır [33]. Ayrıca çeşitli biyolojik aktivite gösterirler. Örneğin, antibakteriyel, mikostatik, virütik, astingent ve antihidrotik olarak aktivite gösterirler [34].

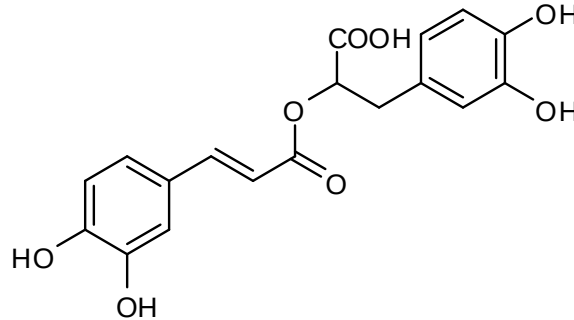
Salvia brachyantha'nın antioksidan enzim savunma sisteminin neden olduğu hücre tahribatına karşı koruma sağladığı görülmüştür. Bundan dolayı bu bitkinin özütü ilaç ve gıda endüstrisi için değerlidir [35].

Salvia türlerinden izole edilen rozmarinik asit doğal fenolik bileşiktir. Orto pozisyonunda hidroksil grubuna sahip iki fenol halkası vardır. İki fenolik halkanın arasında bir karbonil, bir doymamış çifte bağ ve bir karboksilik asiti olmasından dolayı yapı olarak diğer flavonoidlerden farklılık gösterir. Bundan dolayı HIV-1'in inhibisyonu, antitümör, antihepatit, kanın pıhtılaşmasını önleyici, iltihap önleyici ve karaciğer korunması gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip olduğu bulunmuştur [35].

Karnosik asit, karnosol ve rozmarinik asit gibi yüksek antioksidan aktivite gösteren bileşiklere sahip olan *Salvia* türleri ve bileşenleri; reaktif oksijenin etkisiz hale getirilmesi, lipid peroksidasyonunun inhibe edilmesi ve antioksidan özelliklerinin yanı sıra genelde kuvvetli antimikrobial aktiviteye de sahiptir[36].



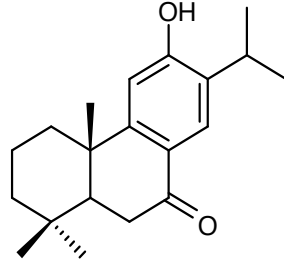
Karnosol



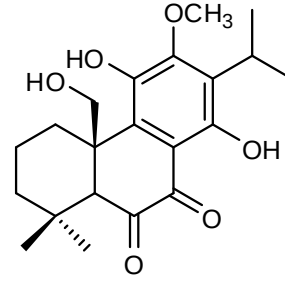
Rozmarinik asit

Şekil 2.3: Karnosol ve rozmarinik asit bileşikleri

Salvia albocaerulnea Lidl.'den izole edilen sugiol bileşiği (Şekil 2.3) gram-pozitif bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir. *Salvia forskahlei* bitkisinden izole edilen abietan diterpen forskalinon antibakteriyel aktivite göstermiştir [37].



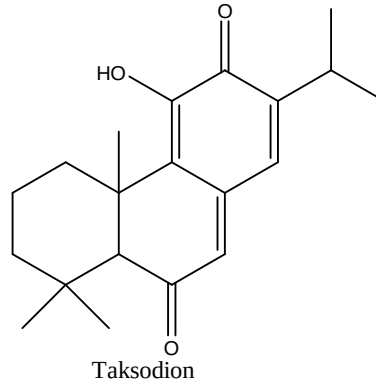
Sugiol



Forskalinon

Şekil 2.4 : Sugiol ve forskalinon bileşikleri

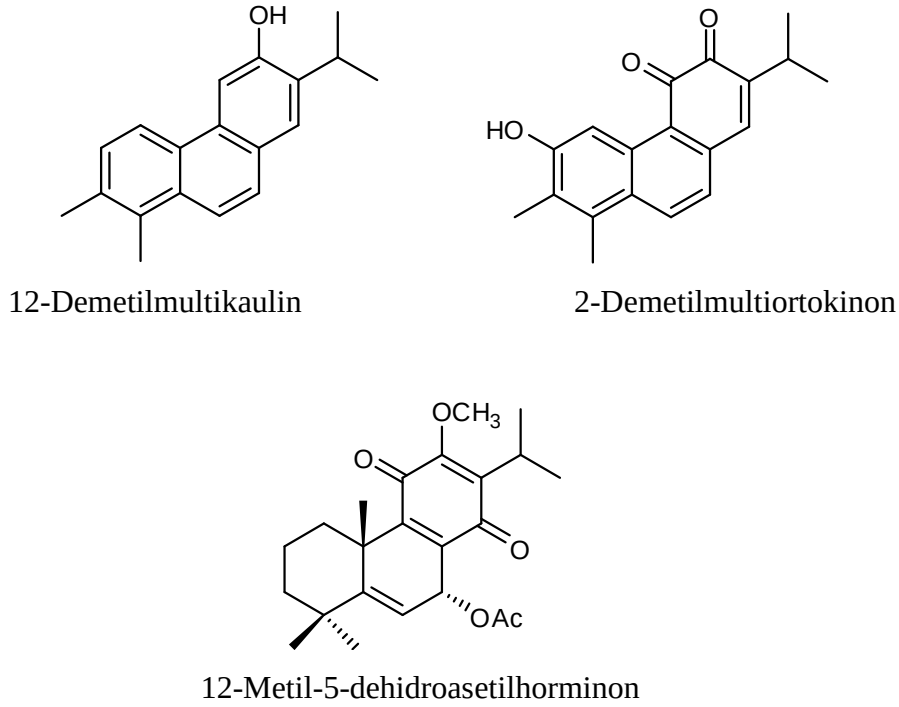
Salvia barrelieri' den izole edilen taksodion, ferruginol, iguestol ve demetilinorroyleanon bileşiklerinin çeşitli yöntemleriyle antioksidan aktivitelerine bakılmıştır. En yüksek antioksidan aktivite gösteren bileşiğin taksodion olduğu bulunmuştur. Bu bileşiklerden yine yüksek antioksidan aktivite gösteren iguestol' ün bir standart olan BHT ve alfa-TOC'dan daha yüksek süperoksit anyon radikal giderim aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir [38].



Taksodion

Şekil 2.5: Taksodion bileşiği

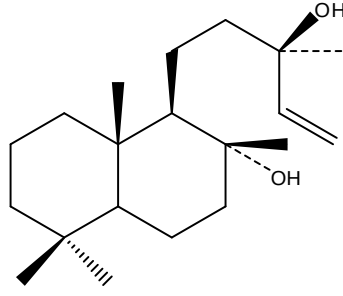
Salvia multicaulis bitkisinden izole edilen; multicaulin, 12-demetilmultikaulin multiortokinon, 12-Demetilmultiortokinon, 12-Metil-5-dehidrohorminon, 12-Metil-5-Dehidroasetilhorminon, salvipimaron bileşiklerinin anti-tüberküloz aktivitelerine bakılmıştır. *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv'e karşı yapılan anti-tüberküloz testinde yukarıdaki bileşiklerin oldukça aktif olduğu ve en aktiflerinin ise 12-demetilmultikaulin, 12 demetilmultiortokinon, dehidroasetilhorminon olduğu tespit edilmiştir [39].



Şekil 2.6: 12-Demetilmultikaulin, 2-Demetilmultiortokinon ve 12-Metil-5-Dehidroasetilhorminon bileşikleri

Salvia miltiorrhiza’nın karaciğer hücresinde anti-tümör etki gösterdiği saptanmıştır. Bunun için *S. miltiorrhiza*’nın insan karaciğeri hücresindeki moleküler mekanizması incelenmiş, bitki’nin yüksek sitotoksik aktivite gösterdiği ve HepG2 hücrelerinin kuvvetli derecede çoğalmasını inhibe ettiği ortaya konulmuştur[40].

Yine *Salvia miltiorrhiza*’dan izole edilen Salvianik asit A’nın MPP⁺ üzerinde koruyucu etkiye sahip olduğu, yani insan nöroblastom SH-SY5Y hücrelerinde sitotoksositeye neden olduğu tespit edilmiştir. Salvianik asit A’nın bu koruyucu özelliğinin Bcl2 ve Bax’ın ayarlanması yolu ile onun antioksidan özelliklerine ve antiapoptotik aktivitesine aktarılabilirliği önerilir. Bu veriler Salvianik asit A’nın nörodejeneratif bir bozukluk olan parkinson hastalığının tedavisine iyileştirici bir yöntem sunabilir[41]. Sıklareol insandaki çeşitli kanser hücrelerine karşı sitotoksik aktivite ve inhibisyon artışı gösterir. *Salvia sclarea* bitkisinden izole edilen sclareol tümöre direk enjeksiyonunda bağışıklık sistemini koruyucu etki göstermiştir. Bunun yanında spleosit çoğalma, tümörlü CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg hücreleri, IFN-gamma, IL-4 salgısı ve tümör büyüklüğü gibi parametreler anti-tümör bağışıklık sistemi ölçülerek belirlenmiştir. Bütün bunların sonucunda, veriler sklareolün canlı vücudunda göğüs kanserine karşı tümör büyümesini azalttığını göstermiştir [42].

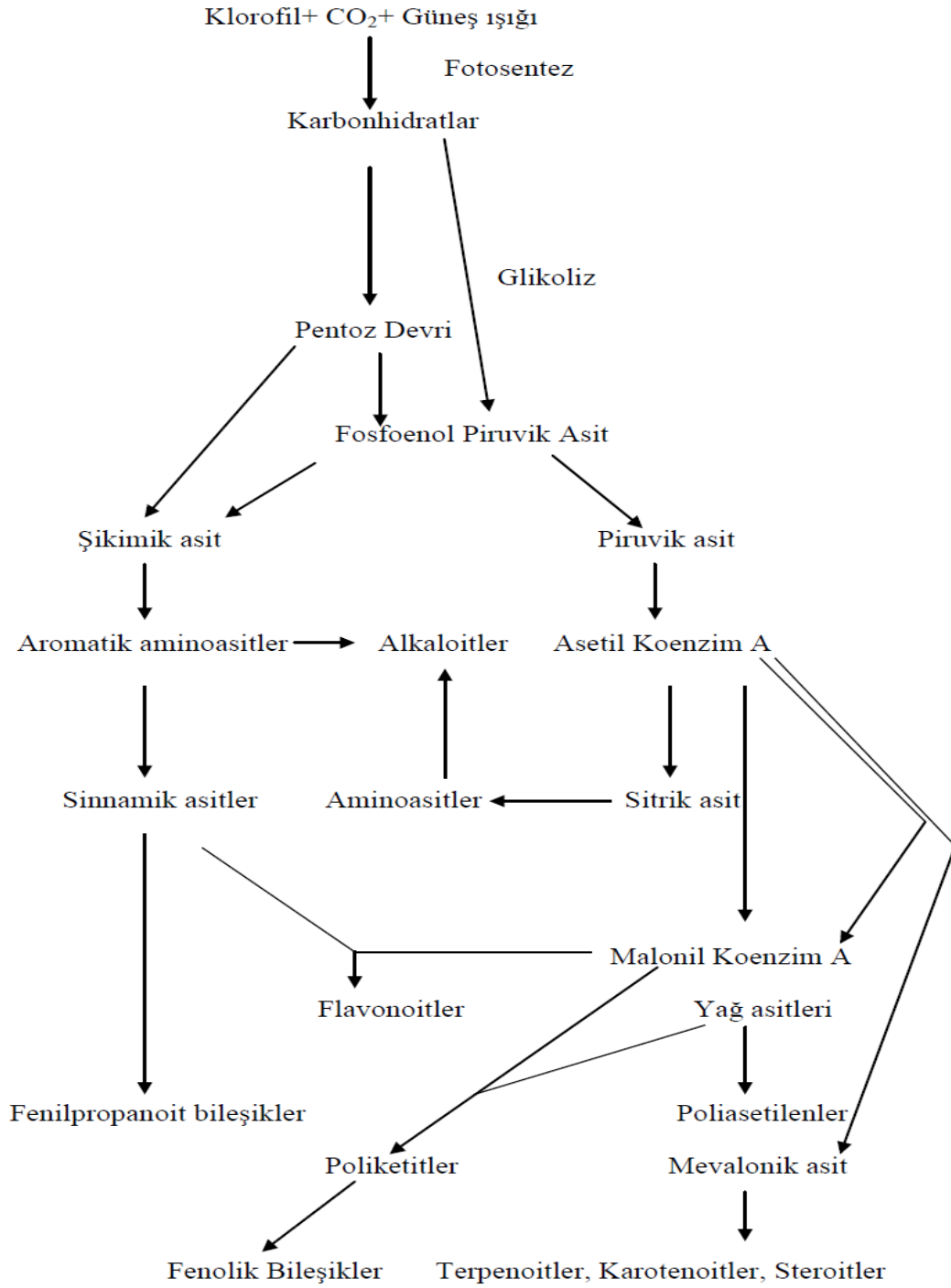


Şekil 2.7 : Sıklareol bileşiği

2.4 Sekonder Metabolitler

Sekonder metabolitler; aminoasitler, basit şekerler, basit karakterli lipidler ve yağlar gibi yaşamsal faaliyetler için gerekli olan primer metabolitlerden oluşur [7]. Sekonder metabolitler bitkinin büyüme ve gelişmesinde, savunma mekanizmasında, dış etkilere korunmasında ve bitkiler arası etkileşimin sağlanmasında önemli rol oynamaktadır. Bitkilerdeki bu organik bileşikler özellikle ilaç yapımında önemli bir yere sahiptir [43].

Biyosentetik oluşumları temel alındığında doğal ürünler üç ana gruba ayrılırlar: Terpenik bileşikler, alkaloidler ve fenolik bileşikler. 25000'den fazla sekonder metabolit ve birincil metabolitlerin tümünü içeren terpenoidler; beş karbonlu başlatıcı olan izopentenil pirofosfat (IPP) birimlerinden oluşur.



Şekil 2.8: Sekonder metabolitlerin oluşumu

2.4.1 Terpenler

Terpenler doğal ürünlerin en büyük sınıfını teşkil eder [44]. Bu bileşikler genellikle uzun bitkilerin her bölgesinde (çiçek, tohum, yaprak, kök, gövde gibi), yosunlarda, yabani otlarda, alglerde ve likenlerde, hatta mikrobiyal orjinli bazı böceklerde bile bulunur. Sınıfın uçucu yağ veya ekstre gibi bileşikleri, ilk çağlardan beri, aroma

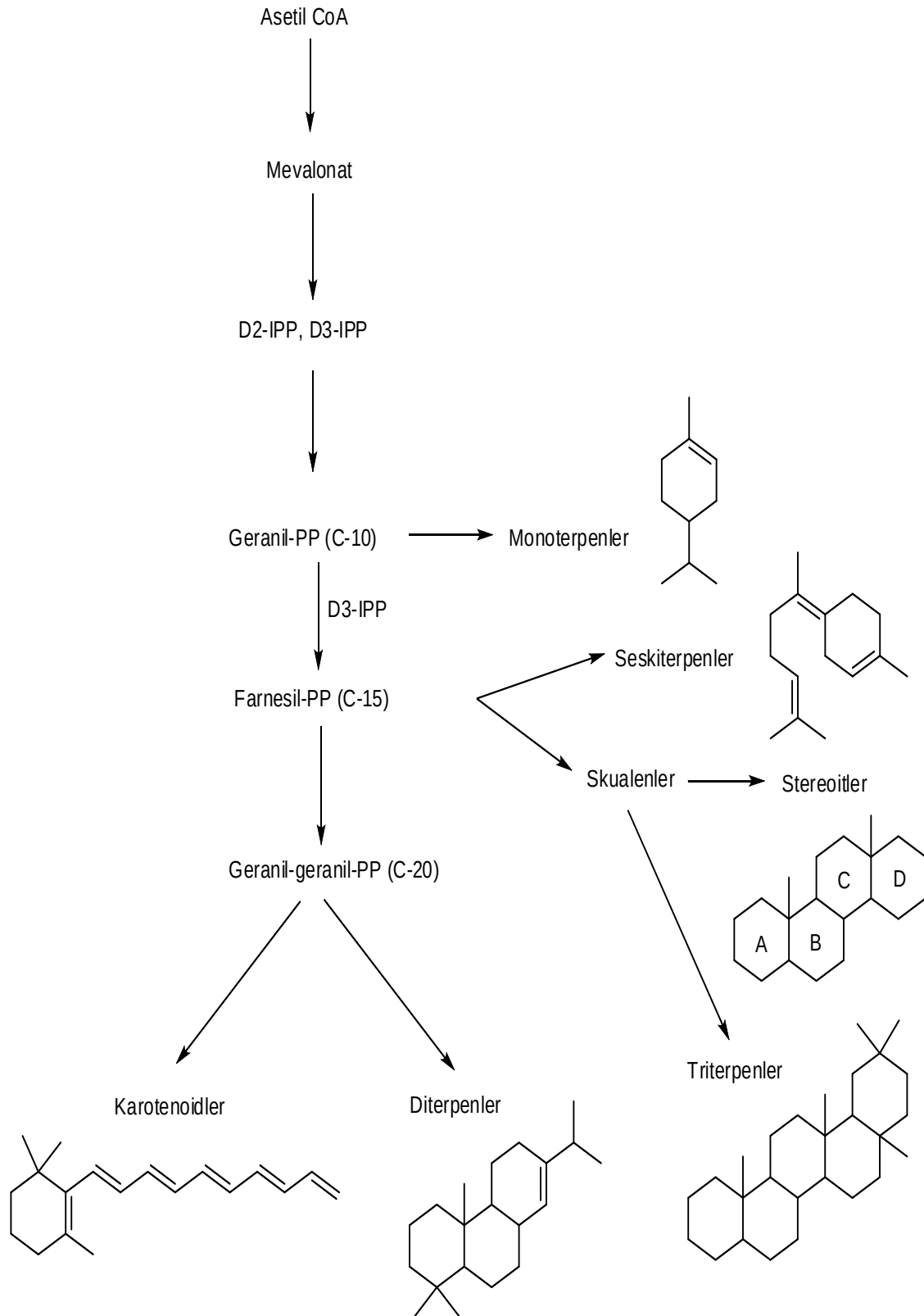
içeriği, koruyucu, parfüm, ilaç, sabun ve uyuşturucu ilaç olarak kullanılmaktadır[45].

Sadece hidrokarbon içeren terpenler olabileceği gibi, oksijen içeren yani alkol, keton, aldehit ve asit grubu taşıyan terpenler de çok yaygındır. Oksijen ihtiva eden terpenler terpenoitler olarak da adlandırılırlar. Bugün gerek açık zincirli gerekse halkalı yapıda olan çeşitli fonksiyonel gruplara sahip 20.000 den fazla terpen yapısı bilinmektedir. Terpenler bitki dokularında genellikle serbest olarak, bazıları glikozitleri ya da organik asit esterleri halinde, bazen de proteinlerle birleşmiş olarak bulunurlar [46].

Salvia türlerinin ana bileşenleri flavonoit ve terpenoitlerdir. Bu bitkilerin toprak üstü kısımları çoğunlukla flavanoit, terpenoit ve monoterpenler gibi uçucu bileşenleri ihtiva ederken, kök kısımları ise esas olarak diterpenoitleri içerir. Hem sesquiterpenoit hem de sesterterpenlere *Salvia* türlerinde nadir olarak rastlanmaktadır. Terpenoitler izopren birimlerinin sayısına göre sınıflandırılırlar. Ruzicka tarafından ortaya atılmış olan ‘İzopren Kuralına’ göre bütün terpenik bileşiklerin karbon iskeletleri izopren birimlerinin iki ya da daha fazlasının birleşmesiyle oluşmuştur [47].

Çizelge 2.1 : Terpenlerin Sınıflandırılması

Karbon sayısı	İzopren sayısı	İsim	Bitkilerde bulunduğu yer
5	1	Hemiterpenler	Dış kısım; uçucu yağ
10	2	Monoterpenler	Taç yaprak; uçucu yağ
15	3	Seskiterpenler	Taç yaprak; reçine, uçucu yağ
20	4	Diterpenler	Gövde; reçine, uçucu yağ
25	5	Sesterterpenler	Gövde; reçine, uçucu yağ
30	6	Triterpenler	Gövde, yaprak üstü; reçine
40	7	Tetraterpenler (Karotenler)	Bütün yeşil bölümler, kök, yaprak
45-...	Poli	Poliizopren	Lateks, yaprak üstü



Şekil 2.9: Terpenlerin oluşumu

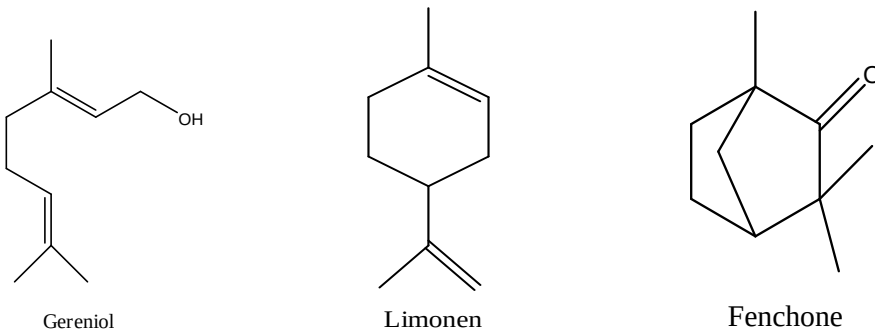
2.4.1.1 Hemiterpenler (C₅)

Ana iskeleti 5 karbondan oluşan en küçük terpen birimidir. İzoterpenler kendi başlarına monoterpenlerin pirolizinden oluştuğu bilinsede, istenilen şekilde bu bileşiklerin biyokimyasal olarak elde edilmesi mümkün değildir [48].

2.4.1.2 Monoterpenler (C₁₀)

İki izopren ünitesinin bağlanmasından oluşan on karbonlu bileşiklerdir. Ekonomik öneminden dolayı son yüzyılda monoterpenlere olan ilgi artmıştır. Uçucu monoterpenler yiyeceklerde aroma ve tat olarak kullanılır ve parfümeri alanında büyük öneme sahiptirler. Gaz kromatografisi ve GC-MS teknikleri bu bileşiklerin analizinde kullanılır [49].

Monoterpenler iki izopren molekülünün ‘baş-kuyruk’ bağı ile bağlanması ile oluşur. Birçok monoterpenin doğada tek bir izomeri bulunur. Fakat aynı bitkide iki izomerin bulunması haline sıkça rastlanır. Monoterpenlerin en yaygın kullanılanları α -pinen ve β -pinen’dir. Çam ağaçlarında bulunurlar ve plastik sanayinin hammaddesi, parfümeri sanayinin ise başlangıç maddesi olarak kullanılırlar. Bunun yanı sıra monoterpenler antispazmotik, antibakteriyel, antifungal, antikanser ve hatta anti-Alzheimer özellikleri nedeni ile halk ilaçlarında kullanılırlar. Monoterpenler yapılarına göre asiklik, monosiklik ve bisiklik monoterpenler olmak üzere üç grupta incelenirler [50].

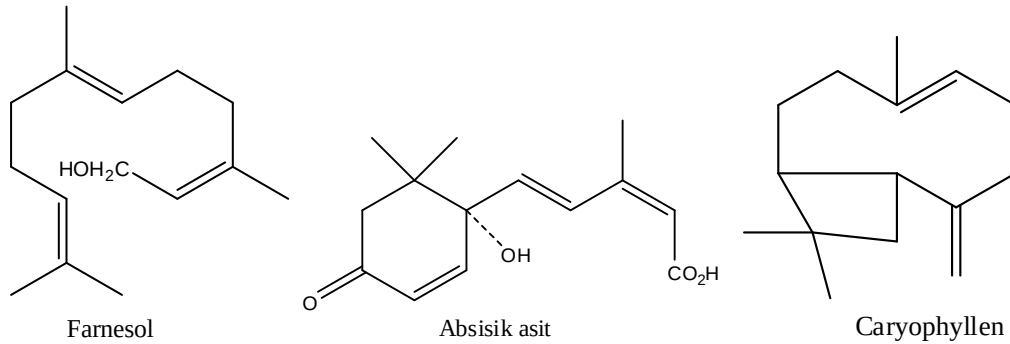


Şekil 2.10 : Asiklik (geraniol), monosiklik (limonen) ve bisiklik (fenchone) monoterpenler

2.4.1.3 Seskiterpenoitler (C₁₅)

Geçen yüzyılda yeni karbon iskeletine sahip birçok seskiterpen izole edildi. Bunlardan bazıları doğal kaynaklardan elde edilirken bazıları ise sentezlendi. Seskiterpenler yaygın olmalarına karşılık küçük bir kısmı bitkilerin yağından elde edilir. Büyük bir kısmı tatlandırıcı amacıyla kullanılır (zencefil ve karanfil yağı gibi).

Seskiterpenler de temen karbon iskeleti şekline göre asiklik (farnesol), monosiklik (absisik asit) ve bisiklik (β -selinen) olmak üzere üç gruba ayrılırlar.



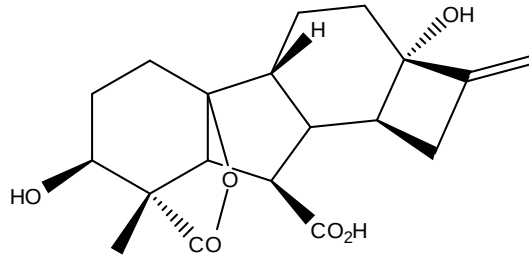
Şekil 2.11: Asiklik (farnesol), monosiklik (absisik asit) ve bisiklik (caryophyllen) seskiterpenler

Bitki örneklerinden izolasyon yapılırken, mono ve seskiterpenler petrol eteri veya asetona ekstraksiyon yapılarak ayrılır. Taze bitki örenğinden uçucu yağların izolasyonunda kullanılan klasik yöntem buhar destilasyonudur. Artan sıcaklıklarda hata oluşumu gözelenebileceğinden dolayı bu yöntemin kısıtlılığı vardır. Terpenler tekrar düzenlenmeye (tersiyer alkollerin dehidrasyona uğradığı gibi) veya polimerizasyona uğrayabilir. Basit terpenlerin uçuculuğu onların GLC yöntemiyle ayrılmasına uygunluk sağlar. Bunların çoğu güzel kokulara sahiptir ve bitkinin direk olarak destilasyonundan elde edilir [51].

2.4.1.4 Diterpenoitler (C₂₀)

Diterpenler 4 izopren birimine sahip 20 C'lu, kimyasal olarak heterojen bileşikleridir. Diterpenoitleri 3 grup halinde inceleyebiliriz: Reçine diterpenler, toksik diterpenler, ve giberellinler.

Abiyetik asit ve agatik asit içeren reçine diterpenleri hem fosil hem de taze bitki reçinelerinde bulunur [52]. Bu ağaçların gövdesinden veya otsul bitkilerin lateksinden sızan reçineli bileşiklerin doğada koruyucu özellikleri vardır. Toksik diterpenler bitkilerin yapraklarındaki diterpenler bitkilerin yapraklarındaki zehirli bileşiklerdir. Üçüncü tip diterpenler olan giberellins ise bitkilerde yaygın olan bulunur, bitkinin büyümesini düzenleyen hormonlardır . Giberellik asit giberellinlere verilebilecek örneklerdendir ve hale günümüzde yüzlerce giberellin yapısı aydınlatılmaktadır. Kimyasal olarak birbirine çok yakın yapıya sahip olduklarından izole edilmesi ve ayrımının yapılması oldukça zordur. En kullanışlı ayırım metodu GLC-MS'dir [53].



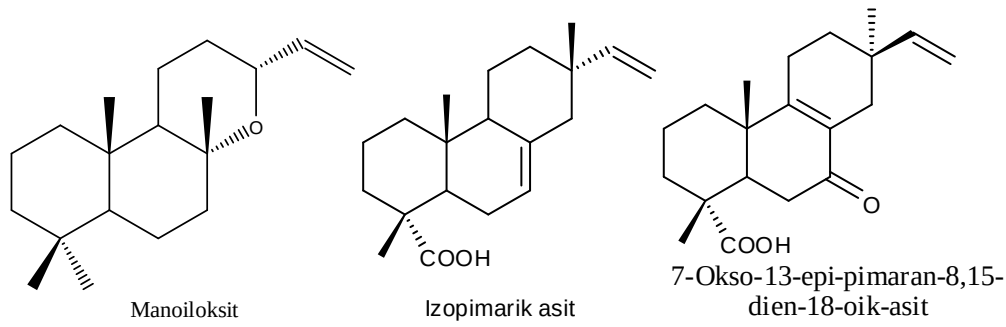
Giberellik asit

Şekil 2.12 : Giberellik asit bileşiği

Salvia türleri abietan, klerodan, pimarane ve labdan tipli diterpenoitler içerirler.

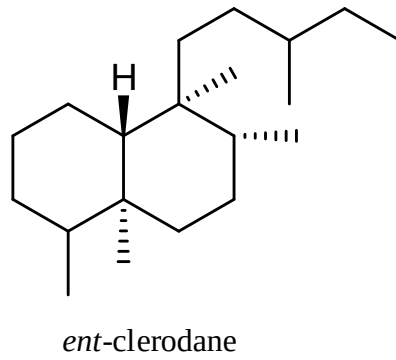
Labdan ve pimarane diterpenoitler, diterpenoitlerin en yaygın sınıflarından biridir ve daha çok sentetik amaçlıdır. Bunun yanında forskolin gibi kan basıncını düşürme etkisine sahip labdan türevleri de mevcuttur [54].

Labdan diterpenoitler Lamiaceae familyası bitkilerinde bulunmasına rağmen *Salvia* türlerinde nadir olarak bulunurlar. Bir labdan diterpen olan manoiloksit (manoyloxide) (Şekil 2.13) *S.candidissima* susp. *occidentalis*'in ürünüdür. Doğu Akdeniz bölgesine endemik olan *S.heldrichiana* Boiss. bitkisinden üç pimarane diterpen; isopimarik asit, 7β-hidroksisandrakopimarik asit ve 7-okso-13-*epi*-pimarane-8,15-dien-18-oik-asit (Şekil 2.13) izole edilmiştir [55].



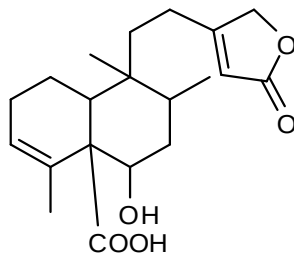
Şekil 2.13 : Manoiloksit, isopimarik asit, 7-Okso-13-*epi*-pimaran-8,15-dien-18-oik asit bileşikleri

Clerodan diterpenoidler ise, 1991'e kadar 650'den fazla izole edilen ent-clerodan tipi diterpenlerdir (Şekil 2.14). Clerodan diterpenler genellikle çift çenekli bitkilerden izole edilirken bakteri, mantar, koyunotu gibi tek çenekli bitkilerden de izole edilir [56].



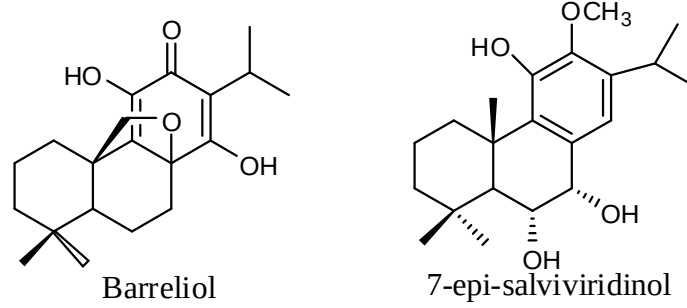
Şekil 2.14 : *ent*-clerodane bileşiği

Amerikan *Salvia* türleri çoğunlukla klerodan tipli diterpenoitler içerirken nadir olarak da abietan diterpenoit içerirler. Bir Meksika bitkisi olan *S. melissodira* Lag. ve *S. languiduline*'den bir klerodan diterpenoit olan melisodorik asit (Şekil 2.15) izole edilmiştir [57].



Şekil 2.15 : Melisodorik asit bileşiği

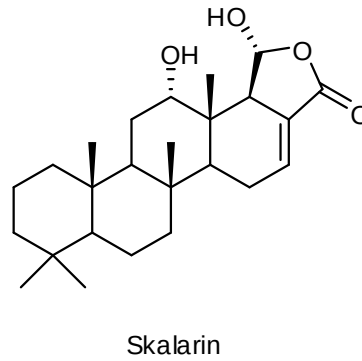
Bitki kimyası çalışmaları diterpenlerin, özellikle de *Salvia* türlerinden elde edilen abietane tipi diterpenlerin çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Yapılan bu çalışmada üç tane yeni abietane tipi diterpen elde edilmiştir. Bunlar; barreliol, Royleanone 12-methyl ether ve 7-*epi*-salviviridinol (3)' dur [38].



Şekil 2.16 : Barreliol ve 7-*epi*-salviviridinol bileşikleri

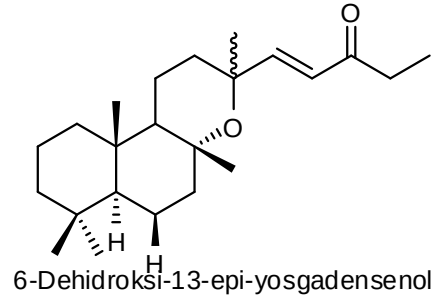
2.4.1.5 Sesterterpenoidler (C₂₅)

Sesterterpenoidler karasal bitkilerde az bulunan, çoğu deniz organizmalarında yer alan doğal ürünlerin küçük bir grubudur. Yapısı aydınlatılan sadece 200 tane doğal sesterterpenoid vardır fakat çoğu 30'lu karbon çatısında farklı diziliştedir. Genellikle süngerlerde bulunan skalarinler sesterterpenoidlerin en yaygın olanlarıdır. Diyet besini olarak kullanılırlar. Skalarinlerin yapısına örnek olarak basit bir yapıya sahip olan skalarin (Şekil 2.17) verilebilir [58].



Şekil 2.17 : Skalarin Bileşiği

Salvia türlerinden de çeşitli sesterterpenoidler izole edilmiştir. Örneğin; *Salvia limbata* C.A. bitkisinden ise iki yeni dinorsesterterpen 6-Dehidroksiyosgadensenol ve 6-dehidroksi-13-*epi*-yosgadensenol elde edilmiştir [37].

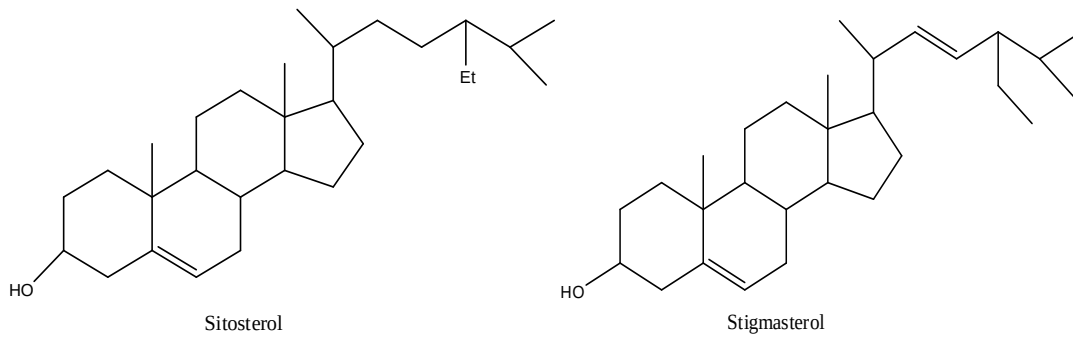


Şekil 2.18 : 6-Dehidroksi-13-epi-yosgadensenol bileşiği

2.4.1.6 Triterpenoitler (C₃₀)

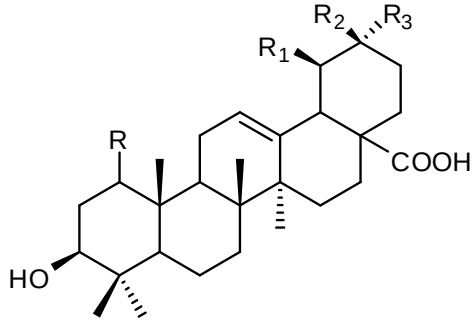
Triterpenler altı izopren biriminden oluşan karbon iskeletine sahip, biyosentetik olarak 30C’lu asiklik hidrokarbon squalenden elde edilen bileşiklerdir. Çoğu alkol , aldehit veya karboksilik asitten oluşan karmaşık siklik yapılardır. Renksiz, yüksek erime noktasına sahip, optikçe aktif ve kimyasal reaktivliğinin kısıtlılığınan karakterizasyonu zor olan bileşiklerdir [59].

Triterpenler en az dört gruba ayrılır: gerçek triterpenler, steroidler, saponinler ve kardiyak glikozitler. Saponinler ve kardiyak glikozitler glikozit sınıfına giren steroid ve triterpenlerdir. Bütün triterpenlerin izolasyonu temel ayırma tekniklerine dayanan TLC ve GLC teknikleridir. Yapıları ise erime noktası, rotasyon ve GLC-MS, IR, NMR spektroskopik teknikleri ile aydınlatılır [59].

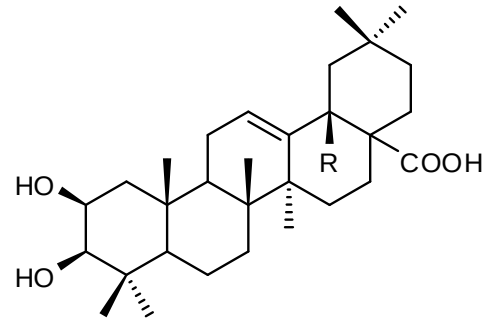


Şekil 2.19 : Bazı triterpen yapıları

Hemen hemen tüm *Salvia* türlerinde yaygın olarak bulunan triterpenoidler; ursolik asit ve oleanolik asit (Şekil 2.24) *S.officinalis* L. den izole edilmiştir [60]. Sonraki yıllarda çalışma grubumuz *S. virgata* Jacq bitkisinden yeni bir triterpenoit olan vergatik asit (virgatik asit) ve *S. pinnata* L.’den 2β,3β,11α-trihydroxy olean-13(18)-en izole etmişlerdir (Şekil 2.20) [61, 62].



Ursolik asit; R=H, R₁=R₂=Me, R₃=H
 Oleanolik asit; R=R₁=H, R₂=R₃=Me
 Virgatik asit; R=O, R₁=H, R₂=R₃=Me

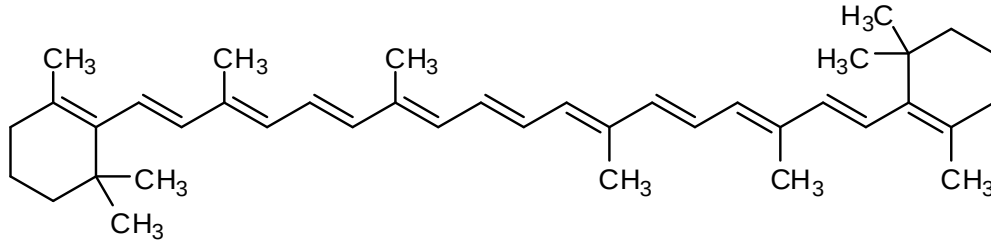


2β,3β,11α-trihydroxy olean-13(18)-en

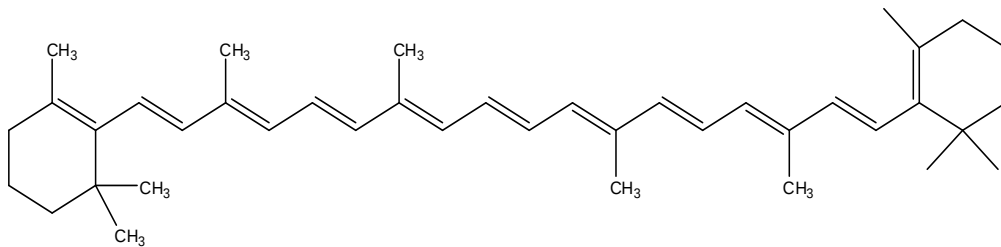
Şekil 2.20 : *Salvia* türlerinden elde edilen bazı triterpenler

2.4.1.6 Tetraterpenler (Karotenler=C₄₀)

Tetraterpenler olarak da adlandırılan karotenoidler, yağlarda çözünen maddeler olarak bilinirler ve basit bakteriden sarı çiçekli bileşenlere kadar bütün bitki çeşitlerinde bulunurlar. Bitkilerde iki fonksiyonu yerine getirir; fotosentezin gerçekleşmesine yardımcı olmak ve çiçek ve meyvelere renklenmesini sağlamak. Sebze ve meyvelere kırmızı ve turuncu renkleri verirken(kuşburnu, domates), meyvelere sarı tonlarında (nergis, menekşe, kadife çiçeği) renk verir [63].



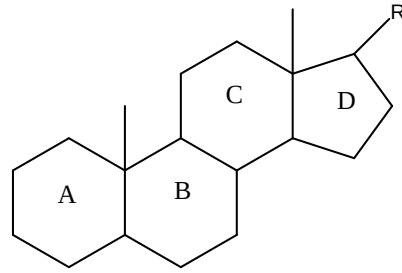
Şekil 2.21 : β-karoten bileşiği



Şekil 2.22 : α -karoten bileşiği

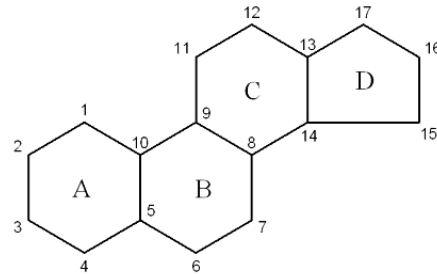
2.4.2 Steroitler

Triterpenlerin alt sınıfı olan steroitlerin aşağıda verilen şekil temel çatısını oluşturur ($R = C_0-C_{10}$). Çok azı homojen olup çoğu bazı yapıların indirgenmiş bileşenleridir. Steroitler biyolojik, kimyasal ve medikal önem olarak doğal ürünlerden ayrılırken, biyojenetik yol olarak benzerlik gösterirler [64].



Şekil 2.23 : Bir steroidin iskelet yapısı

Bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları steroid sınıfı bileşiklerdir. Steroitlerin karakteristik halka yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir (Şekil 2.24).



Şekil 2.24 : Steroitlerin iskelet yapısı

Bitkisel steroidler genellikle, C-3'te OH, C-5'te çift bağ, C-17'de yan zincir taşırlar. C-3'teki OH grubu, halkadaki metil gruplarıyla dik açı yaparsa A ve B halkaları *cis* şeklinde birleşmişlerdir. Bu konumdaki OH grubu düzlemin üstündedir yani β şeklindedir. OH grubu metil gruplarına paralel ise A ve B halkaları *trans* yapıda olup OH grubu α şeklindedir. Yan zincirin konfigürasyonu ise steroidlerde genellikle β şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle *trans* birleşirler [65].

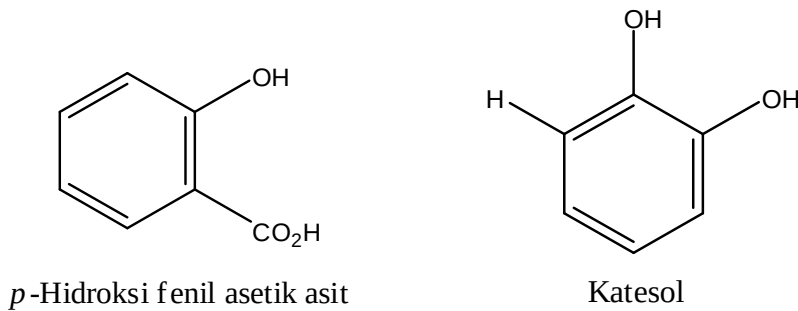
2.4.3 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bir aromatik halkaya tutunmuş bir yada daha fazla hidroksili olan, bitkilerden elde edilen sayıları çok fazla olan bileşiklerdir. Flavonoidler, tanınan binlerce çeşit doğal fenolik bileşik çeşitlerinin içerisinde , monosiklik fenoller, fenilpropanoidler ve fenolik kinonların da hatırı sayılır miktarda çeşitleri olmasına rağmen, en geniş sınıftır. Bitkilerde bulunan ligninler, melaninler ve tanenler gibi polimerik bileşenlerde polifenolik bileşikler içerisine girer. Zaman zaman fenolik türlerde proteinler, alkaloidler ve terpenoidlere de rastlanmaktadır. Fenolik bileşiklerin bazı sınıflarının işlevi açığa çıkarılmış olmakla birlikte bir kısım fenolik bileşiğin işlevi hala araştırılmaktadır [66].

Fenolikler en aktif doğal antioksidanlar olup, antioksidan etkileri serbest radikalleri bağlamaları, metallerle kelat oluşturmaları ve lipoksijenaz enzimini inaktive etmeleri ile gerçekleşmektedir. Bir polifenolün antioksidan olarak tanımlanabilmesi için iki özelliğe sahip olması gerekmektedir. Birincisi, düşük konsantrasyonlarda bile oksidasyonu geciktirebilme, yavaşlatma veya önleme yeteneğine sahip olması, ikincisi de kendisi serbest radikale dönüştüğünde kararlı bir formda kalabilmesidir [67]. Bitkisel gıdalarda bulunan fenolik maddeler; fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar ve stilbenler gibi alt gruplara ayrılmaktadır.

2.4.3.1 Yapısal tipleri

Fenoller, temel iskeletindeki karbon atomu sayısına göre sınıflandırılırlar. Fenol, catechol (kateşol) ve florogulisinol basit fenollere örnektir. Bir, iki veya üç karbon zincir reaksiyonlarından salisilik asit varlığında, büyük bitkilerin hücrelerinden elde edilen p-hidroksifenilasetik asit, hidrosinamik asit, kafeik asit gibi çeşitleri vardır [68].



Şekil 2.25 : p-hidroksi fenil asetik asit ve kateşol bileşiği

Çizelge 2.2 : Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

C atomu	İskelet	Sınıf	Örnek
6	C ₆	Basit fenoller Benzokinonlar	Hidrokinon 2,6-Dimetoksibenzokinon
7	C ₆ -C ₁	Fenolik asitler	Salisilik asit
8	C ₆ -C ₂	Asetofenonlar Fenilasetik asitler	3-Asetil-6-OMe-benzaldehit <i>p</i> -Hidroksifenilasetik asit
9	C ₆ -C ₃	Hidrosisinamik asitler Fenilpropenler Kumarinler İzokumarinler Kromonlar	Kafeik Asit Eugenol Umbelliferon Bergenin Eugenin
12	C ₆ -C ₄	Naftakinonlar	Juglon
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Ksantonlar	Mangiferin
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Stilbenler Antrokinonlar	Lunularik asit Emodin
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoitler	Kersetin
		İzoflavonoitler	Genistein
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanlar	Pinoresinol
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoitler	Amentoflavon
n	(C ₆ -C ₃) _n	Ligninler	
	(C ₆) _n	Kateşol melaninleri	
	(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Tanenlerle kondense flavonlar	

2.4.3.2 Doğal bolluğu

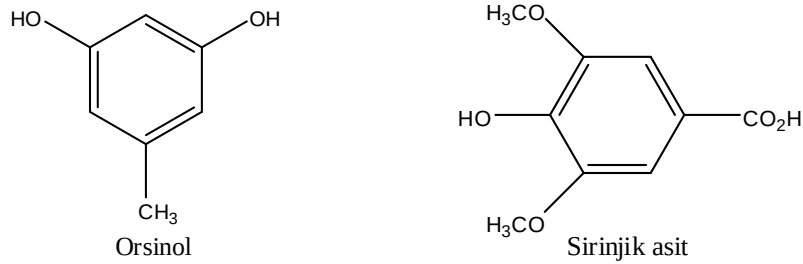
Fenolik bileşikler bütün bitkiler aleminde yer alır ancak hangi bitkiden elde edildiğine göre bileşiğin tipi değişiklik gösterir. Fenolikler bakteri, alg ve mantarlarda seyrek olarak bulunurlar bulunanlarda antibiyotik özellikle taşırlar.

Doğal fenollerin kimyası, bitkilerde özellikle şeker kalıntılarının bir yada daha fazla fenolik grupla bağlanması gibi konjuge şekilde bulunmasından dolayı karmaşıktır. Bu konjuge formların fazla olmasından dolayı kimyasal karakterizasyon da zorlaşmaktadır [69].

2.4.3.3 Fenoller ve fenolik asitler

Serbest fenoller ve fenolik asitler birlikte çok iyi izole edildiklerinden bitki analiz edilirken genellikle birlikte analiz edilirler. Bitkilerin asit hidrolizi çok geniş yayılışa sahip olan ve eterde çözünen fenolik asitleri açığa çıkartır. Bu asitler lignine bağlı estergrupları gibi, alkolde çözünen kısımlara bağlı basit glikozitler gibi veya yaprağın alkolde çözünmeyen kısımlarında bulunur. p-hidroksibenzoik asit, proto-kateşuik asit, vabilik asit ve şirinjik asit en yaygın olarak kullanılan fenolik asitlerdir [66].

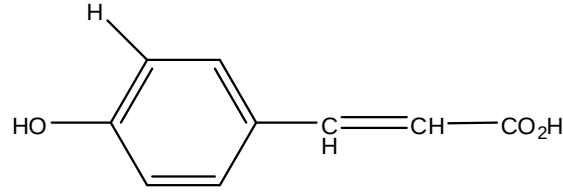
Yukarıda verdiğimiz asit örneklerine zıt olarak serbest fenoller genellikle bitkilerde nadir olarak bulunur. Kateşol, orsinol, floroglisinol, ve pirogallol gibi bileşikler sadece birkaç kaynaktan bulunmasına karşılık, hidrokinon en yaygın olanlarıdır. Basit fenollerin tanımlanması flavonoid yapılarının da aydınlatılmasına yardımcı olur. Basit fenollere orsinol ve fenolik asitlere syringic acid (şirinjik asit) örnek Şekil 2.26'da verilmiştir [66].



Şekil 2.26 : Orsinol ve şirinjik asit

2.4.3.4 Fenilpropanoidler

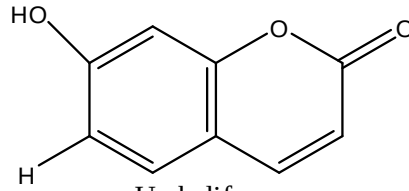
Fenilpropanoidler aromatik halkaya üç karbonlu yan zincir bağlanmasıyla doğal olarak oluşan bileşiklerdir. Bunlar biyosentetik olarak fenilalanin aminoasitinden oluşan aromatik proteinden elde edilebilir ve bir veya daha fazla C₆-C₃ kalıntısı içerebilir. En bilinenlerinden hidroksisinamik asitler sadece ligninlerin yapıtaşlarını oluşturmakla kalmaz aynı zamanda hastalıklara karşı koruyucu görev taşımaktadır [70].



p-Kumarik asit

Şekil 2.27: p-Kumarik asit bileşiği

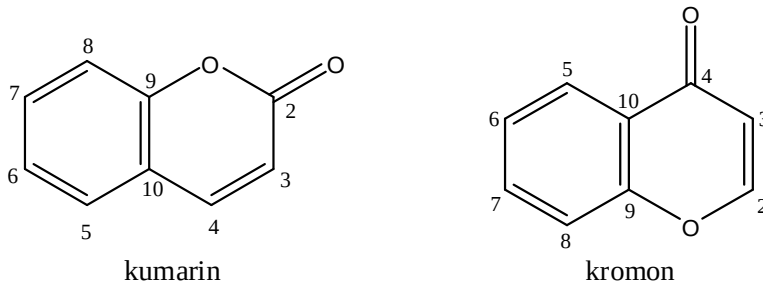
Kumarinler, fenilpropanoidlerin en yaygın bileşenlerindendirler ve kendi başına neredeyse 27 bitki ailesinde bulunur. Bunlar genellikle otlarda, tatlımsı kokulu maddeler bırakan ekin ürünlerinde bulunmaktadır. Hidroksikumarinler de birbirinden değişik bitki ailelerinde bulunmaktadır: en yaygınları Şekil 2.28 umbeliferon(7-hidroksi), askuletin(6,7-hidroksi) ve skopoletin (6-metoksi-7-hidroksikumarin)'dir [71].



Umbeliferon

Şekil 2.28 : Umbeliferon bileşiği

Benzopiranlar olarak bilinen heterosiklik bileşik sınıfı piron halkasının benzen halkası ile kondenzasyonu sonucu oluşurlar. Heterosiklik halkadaki karbonil grubunun pozisyonuna göre iki tür benzopiran bileşiği tanımlanır. Bir α-piron halkasının benzen halkasına kondanse olmasıyla oluşan bileşikler “kumarin”, bir γ-piron halkasının benzen halkasına kondanse olmasıyla oluşan bileşikler ise “kromon” olarak adlandırılırlar [72].



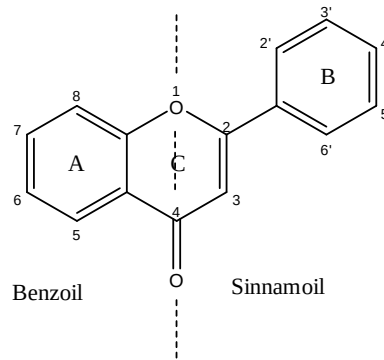
Şekil 2.29 : Kumarin ve kromon yapıları

Kumarin ve türevleri antibiyotik, antikoagulan, antikanser, antienflamatuar ve bakteriostatik etkilere sahip olmaları nedeniyle özellikle biyoloji ve tıp alanında araştırmalara konu olmaktadır. İn vivo olarak birçok tümör türüne karşı etki gösterdiği, bazılarının anti-Hıv aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir [73].

2.4.3.5 Flavonoidler

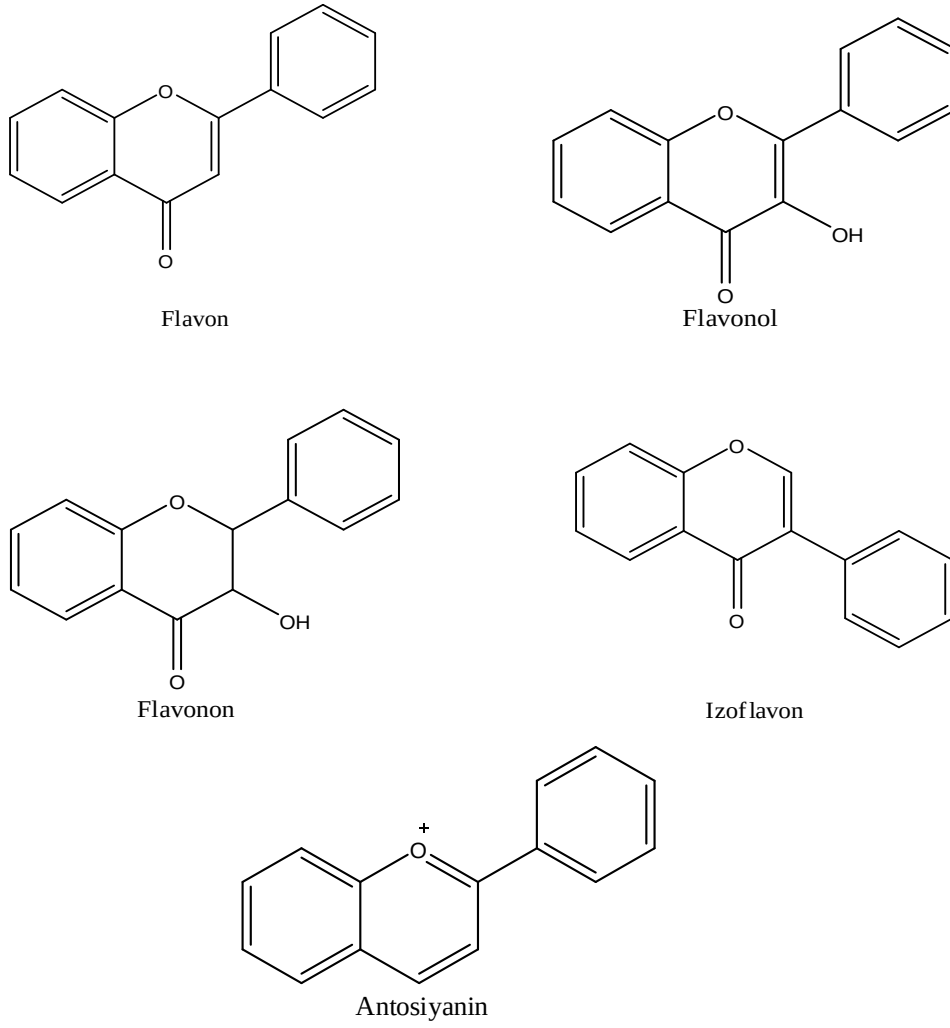
Flavonoidler fenolik bileşiklerin en geniş ve en önemli grubudur[74]. Flavonoidler bitki dokularında genellikle karışım halinde bulunurlar. Günümüzde bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır [75]. Flavonoidler suda çözünür bileşiklerdir. Fenolik olduklarından dolayı baz veya amonyakla muamele edildiklerinde renklenirler, kromatogramlarda veya çözeltilerde kolayca ayrımları yapılabilir. Flavonoidler bitkilerde genellikle şekerlere bağlı glikozitler halinde bulunur ve bir flavonoid aglikon tek bir bitkide değişik glikozidik kombinasyonlarında bulunabilir. Bundan dolayı flavonoidler analiz edilirken ana ekstraktaki glikozidlerin karışık halde bulunmasından dolayı hidroliz edilen bitki ekstraktındaki aglikonlarada bakılır [76].

Karbon iskeleti $C_6-C_3-C_6$ şeklinde olan flavonoidlerin ana iskeletinde 15 karbon bulunur. 2-fenil benzopiran yapısındadırlar. Flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, heterohalka ise C ile gösterilmektedir. A ve C halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılırken, B halkasındaki atomlar ise (') rakamlarla numaralandırılmaktadır [7].



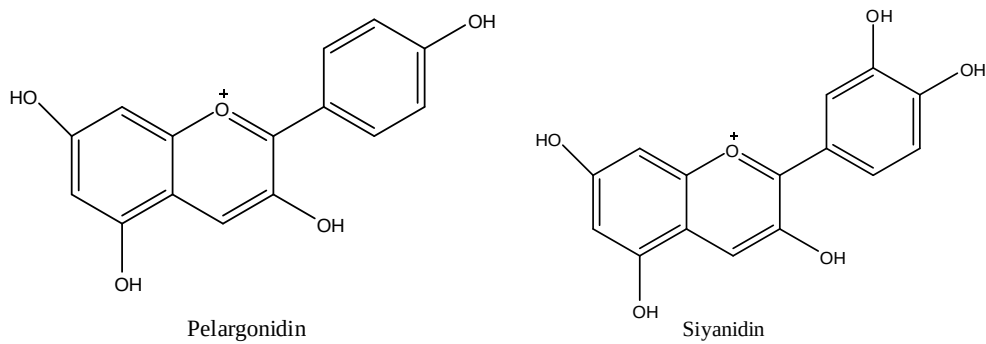
Şekil 2.30 : Flavonoidlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası

Flavonoidler çok geniş bir grup olup çok sayıda sınıfa ayrılmaktadır. Antosiyaninler, proantosiyanidinler, flavonoller, flavonlar, biflavoniller, flavononlar, izoflavonlar, kalkon ve auronlar flavonoid sınıfında yer alan bileşiklerdir.



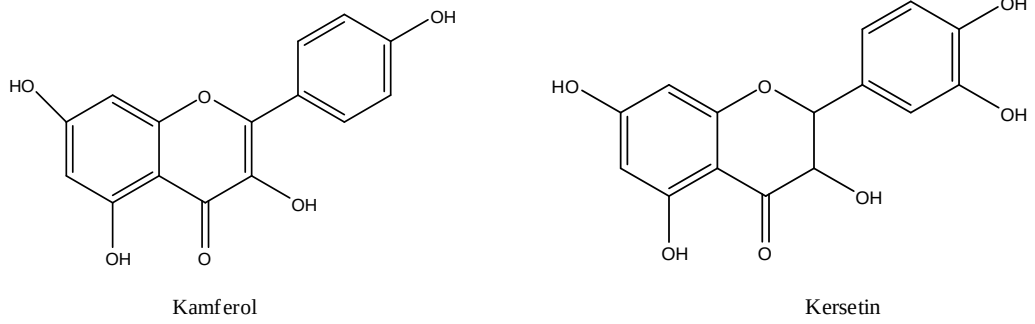
Şekil 2.31: Flavon, flavonol, flavonon, izoflavon, antosiyanin yapıları

Antosiyaninler, bitkilere renk verici en yaygın gruplar olup, önemli bir sınıftır. Meyvelerde, taç yapraklarda ve yapraklardaki mavi, pembe, kırmızı, mor renklerinin hepsinden sorumlu olup suda çözünen renk pigmentleridirler. Kimyasal olarak tek aromatik yapı üzerine temellenir, siyanidine hidroksil gruplarının, eklenip çıkarılması, metillenmesi veya glikozillenmesi şeklinde oluşur [77].



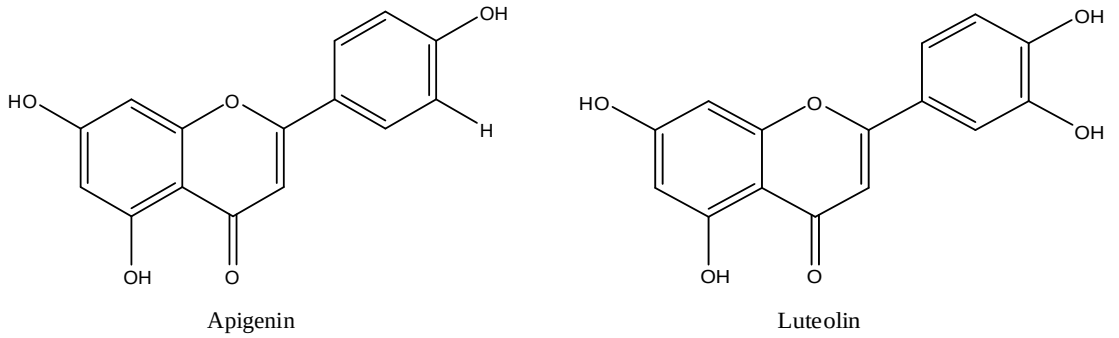
Şekil 2.32 : Pelargonidin ve siyanidin bileşikleri

Flavonol, bitkilerde fazlaca bulunan, ta yapraklarda, yapraklarda ve yüksek bitkilerde bulunan antosiyaninlere yardımcı renk pigmentleridir. Antosiyaninler gibi glikozidik kombinasyonla oluşurlar. 300'e yakın flavonol aglikonu bulunmasına karşılık, en yaygın olanları bu üç tanesidir. Kamferol, kesretin, mirisetin[78].



şekil 2.33 : Kamferol ve kesretin bileşikleri

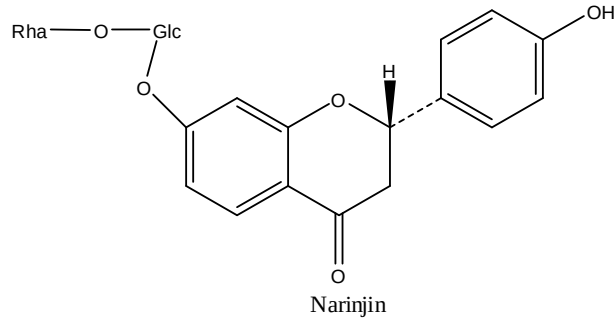
Flavonlar bitkilerde hem serbest hem de glikozitleri halinde bulunurlar. Kamferol ve kesretine göre hidroksilasyonda görevli, sadece iki bilinen flavon vardır: Apigenin ve luteolin. Flavonlar, flavonollerin tersine bir C-C bağıyla şekerde bağlıdır [78].



şekil 2.34 : Apigenin ve Luteolin bileşiği

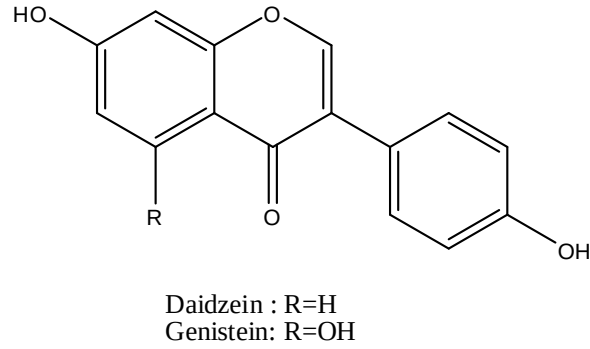
2.4.3.6 Minör flavonoidler, ksantonlar ve stilbenler

Kalkonlar, auronlar, flavononlar, dihidrokalkonlar ve isoflavonlar doğal dağılımlarının kısıtlı olmasından dolayı minör flavonoidler olarak anılırlar. Butein en yaygın olan kalkonlardandır. Flavononlar kalkonlarla izomerdir. Kalkonlara doğada sık sık flavonon analoglarıyla rastlanırken, tam tersi için bu geçerli değildir. Portakaldaki narinjin gibi bazı flavononlar tatlandırıcı özelliğe sahiptirler [79].



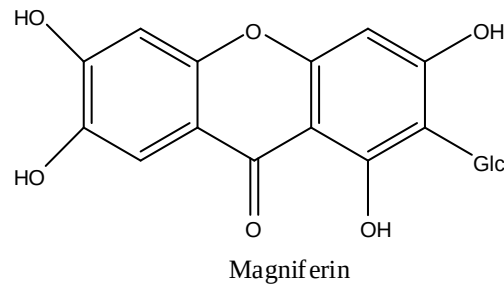
Şekil 2.35 : Bir flavonon (narinjin) bileşiği

Yaklaşık olarak 500 tanesi bilinen fakat nadir rastlanan isoflavonlar flavonlarla izomerdir. Fizyolojik özelliklerine göre isoflavonoidler 3 sınıfa ayrılırlar. Karanfilde bulunan ve zayıf östrojen olan genisteinler, daidzeinler ve rotenon gibi karmaşık isoflavonlar olan doğal böcek öldürücüler [80].



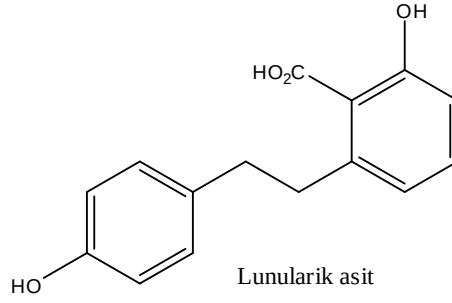
Şekil 2.36 : İzoflavon (daidzein ve genistein) bileşikleri

Ksantonlar renk reaksiyonları ve kromatografik hızı flavonoidlerle aynı olan sarı fenolik maddelerdir. Fakat spektroskopik özellikleri flavonoidlere göre farklılık gösterir. En çok bilinen ksanton olan magniferin (Şekil 2.37) C bağıyla glikozlanmıştır ve yüksek bitkilerde bulunduğu kadar eğrelti otlarında da bulunmaktadır [81].



Şekil 2.37 : Bir ksanton (magniferin) bileşiği

Hidroksistilbenler biyogenetik olarak kalkonlarla aynı olmasına rağmen temel iskeletinde $C_6-C_2-C_6$ yapısı kadar daha az karbon içerir. Odunsu bileşikler olduklarından dolayı bunlara daha özen gösterilmelidir. Gerek serbest gerekse bazı bileşiklerle kombine olmuş antioksidanlar içerirler, antioksidan özelliklerinden dolayı da ilaç dünyasında çok kullanılan bileşenlerdir [82]. Biyolojik olarak aktif bir stilben olan lunularikasit bazı koyunotlarında bulunur ve inhibisyonu artırıcı özelliktedir [83].



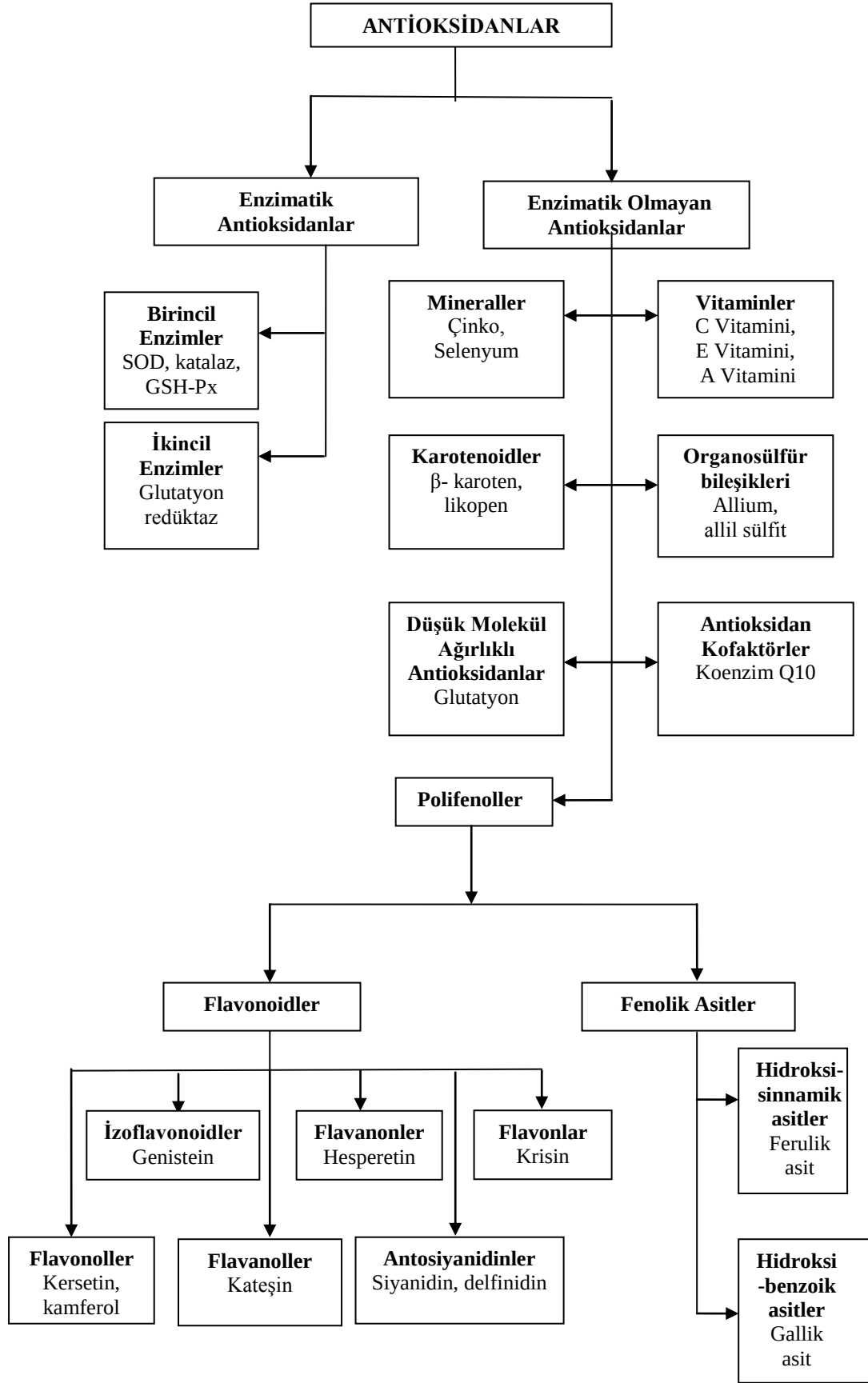
Şekil 2.38 : Bir hidroksistilben (Lunularik asit) örneği

2.5 Antioksidanlar

Serbest radikal bir yada birden çok ortaklanmamış elektron bulunduran bir maddedir ve bu elektron atomik yada moleküler orbitalde tek başına bulunur. Bir yada birden çok çiftleşmemiş elektronun bulunması o maddenin magnetik bir alana çekilmesine yol açar ve bazende o maddenin son derece aktif olmasına neden olur. Bugün kimya ve biyolojide pek çok serbest radikal mevcuttur [84].

Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürebilmeleri için çok büyük öneme sahip bir elementtir. Canlılarda solunum ile alınan oksijen mitokondrilerdeki elektron taşıma sisteminde aşamalı bir indirgenme işlemine girer ve suya metabolize olur [85]. Ancak bazı durumlarda oksijenin reaksiyonunu tamamlamadan vücuttan ayrıldığı ve geride reaktif ara ürünler bıraktığı gözlemlenmektedir. Bu reaktif ara ürünler genel olarak Reaktif Oksijen Türleri (ROS) olarak isimlendirilir [86]. Oksidasyon, radikalik zincir reaksiyonları üzerinden yürür. Radikaller eşleşmemiş elektronlarını eşleştirme eğiliminde oldukları için özellikle gevşek bağlı elektronları koparırlar. [87].

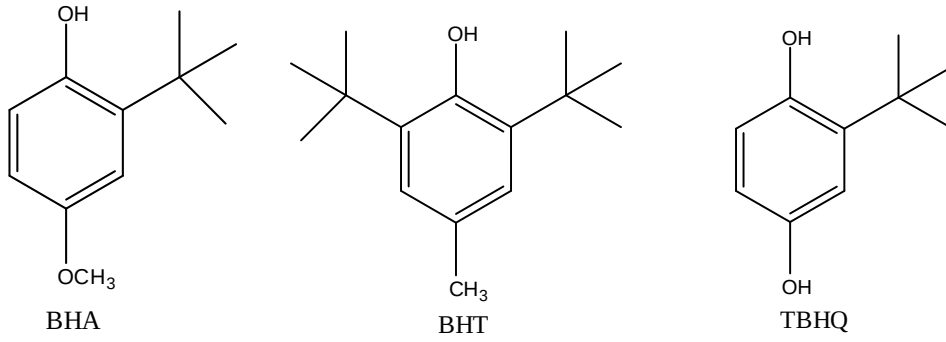
Reaktif oksijen türleri havayla solunum yapan bütün organizmalarda bulunur ve bunlar süperoksit anyon radikali, hidroksil radikali ve hidrojen peroksit radikali içerirler [88].



Şekil 2.39: Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidan savunma sistemleri oksidan giderme ve hücre zararını engelleme işine yarayan enzim (süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz) ve enzim olmayan (glutatyon, C ve E vitamini) maddeler içerirler [89]. İnsanlarda ve diğer organizmalarda antioksidan savunma sistemleri (enzimler gibi) ve oksidatif tahribatı onarıcı sistemler olmasına rağmen tüm zararı önlemeye yetmemektedir [90]. Antioksidanlar oksidasyon sürecini serbest radikallerle reaksiyona girerek, katalitik metallerle kompleks oluşturarak ve oksidan giderici gibi davranarak engellerler. Yıllardır birçok araştırmacı özellikle bitkisel olmak üzere doğal kaynaklardan en güçlü ve aynı zamanda toksik olmayan antioksidanlar aramaktadır [91].

Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında doğal bir şekilde meydana gelmektedir. Bunlar karotenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, glutatyon ve endojen metabolitleri içerir. Laboratuvar ortamında yapılan çalışmalar belirgin bir şekilde fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitesinin yüksek olduğunu göstermiştir. Fenolik antioksidanlar, hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu arttırarak onun reaktifliğini azaltır. Hidroksil grubuna göre para konumunda etil veya bütıl grupların süstitüsüyonu, antioksidan aktiviteyi arttırır. Bununla beraber sterik engelleme nedeniyle para pozisyonlardaki uzun zincir veya dallanmış alkil gruplarının varlığı antioksidan etkiyi azaltabilir. Orto pozisyonlardaki dallanmış alkil gruplarının süstitüsüyonları kararlı rezonans yapılar oluşturarak fenolik antioksidanın etkisini arttırırlar ve antioksidan radikalının reaksiyonlara katılma yeteneğini azaltırlar [92]. Bitki kimyası analizleri *Salvia* türlerinde fenolik asitle, fenolik glikozitler ve flavonoidler gibi antioksidan özellik gösteren bileşiklerin oldukça çok olduğunu göstermiştir. Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT), bütillenmiş hidroksi anisol (BHA), ve ter-Bütıl hirokinon (TBHQ), gibi antioksidanlar sentetik antioksidanlara örnektir. Sentetik antioksidanların yan etkileri olduğundan son yıllarda doğal antioksidanların üzerine yoğunlaşmıştır. Örneğin BHT non-toksik olmakla beraber, karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiğine dair bazı çalışmalar mevcuttur. Farelere yüksek dozlarda verildiğinde ise karaciğerde hasara sebep olduğu görülmüştür. Ayrıca yapılan bazı araştırmalar, BHT gibi bazı sentetik antioksidanların fazla alınması durumunda vücuttan atılamadığı adipoz dokuda depolandığını göstermiştir [93]. Binlerce sayıda bitkinin antioksidan aktivitesi test edilmiştir ve bunlardan gelen ana ekstraktlar ve bazı izole edilen saf maddeler sentetik antioksidanlardan (BHT ve vitamini) bile daha aktif çıkmıştır [94].



Şekil 2.40 : Bütillenmiş hidroksi anisol, bütillenmiş hidroksi toluen, ter-bütıl hidrokinon sentetik antioksidan bileşikleri

Antioksidanlar dört ayrı şekilde etki gösterirler;

-Temizleyici (Scavenging effect): Serbest radikalleri etkileyerek onları tutma veya daha zayıf bir moleküle çevirme.

- Bastırıcı etki (Quencher effect) : Serbest radikallerle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini artırma.

-Onarıcı etki (Repair effect): Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın onarılması.

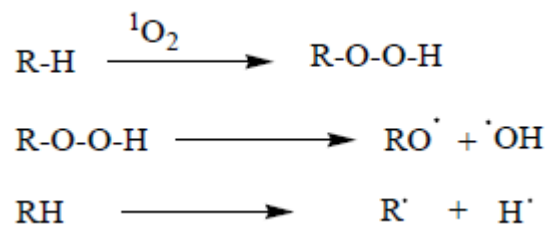
- Zincir kırıcı etki (Chain breaking effect) : Serbest radikalleri kendilerine bağlayarak zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleme.

2.5.1. Antioksidanların sınıflandırılması

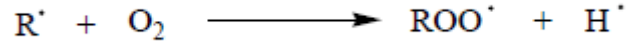
Antioksidanlar, reaksiyon mekanizmalarına göre birincil ve ikincil antioksidanlar olarak ikiye ayrılmaktadır. Bazı antioksidanlar birden fazla aktivite mekanizması gösterirler ve bunlar çok fonksiyonlu antioksidanlar olarak adlandırılmaktadır [14].

2.5.1.1. Birincil antioksidanlar

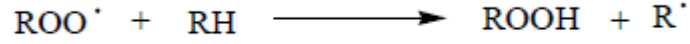
Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Bir lipit (alkil) radikali (R.) oluşturmak için, doymamış yağdan α -metilenik hidrojen ayrıldığında otooksidasyon başlar [95].



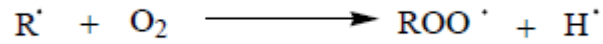
Oluşan lipid radikali çok reaktiftir, ilerleyen aşamalarda peroksi radikali (ROO.) oluşturmak için oksijenle reaksiyona girer [95].



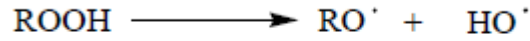
Reaksiyonun ilerleyen aşamalarında peroksi radikalleri lipitle reaksiyona girerek hidroperoksit ve yeni bir kararsız lipid radikali oluştururlar [95].



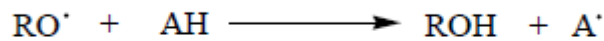
Daha sonra bu lipid radikali başka peroksi radikali oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girecektir. Bu oksidatif mekanizma kendiliğinden katalizlenir ve böylece otooksidasyon devam eder [95].

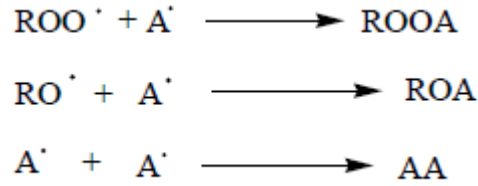


Hidroperoksitler (ROOH) kararsızdırlar ve bozunarak radikaller oluştururlar. Bu da reaksiyonun hızlanmasına neden olur [95].



Birincil antioksidanlar (AH) lipid radikali (R.) ve peroksi radikallerle (ROO.) reaksiyona girerler ve onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Birincil antioksidanlar lipid radikallerine hidrojen atomları verirler ve lipid türevleri ile antioksidan radikaller meydana getirirler (A.). Hidrojen verici olarak birincil antioksidanlar peroksi radikallerine lipidlerden daha çok ilgi gösterirler. Bu yüzden otooksidasyon reaksiyonunda oluşan peroksi (ROO.) ve oksil (RO.) serbest radikalleri birincil antioksidanlar tarafından giderilirler. Antioksidanlar lipid radikalleriyle doğrudan da etkileşebilirler [95].





Hidrojenin verilmesiyle oluşan antioksidan radikali lipitlerle çok az reaksiyona girer. Oksijen veya lipitlerle antioksidan radikalının reaksiyonu çok yavaş olduğundan reaksiyon hızı azalır. Kararlı rezonans hibritler oluşturmak için fenol halkasının çevresindeki ortaklanmamış elektronun delokalizasyonu ile antioksidan radikali kararlı hale getirilir. Antioksidan radikaller peroksi, oksi ve diğer antioksidan radikaller ile sonlandırma reaksiyonlarına katılabilme yeteneğine sahiptirler [95].

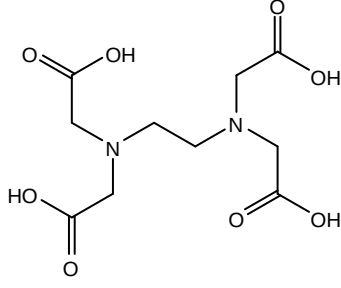
Katı ve sıvı yağlarda antioksidan dimerlerin oluşumu göze çarpar ve bu oluşum fenolik antioksidan radikallerin kolayca sonlandırma reaksiyonlarına uğradığını gösterir. Antioksidan, radikal olmayan şeklinde ne kadar uzun süre kalırsa antioksidan dimerler otokatalitik serbest radikal zincir mekanizmasını o kadar etkili şekilde durdururlar [95].

2.5.1.2 İkincil antioksidanlar

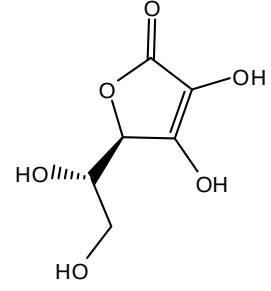
İkincil (tip-2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar çok çeşitli reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. İkincil antioksidanlar prooksidan metallerle kelat yapabilirler ve onları deaktive edebilirler, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan türlere parçalanmasını sağlayabilirler, singlet oksijeni deaktive edebilirler, ultraviyole radyasyonu absorbe edebilirler veya oksijen giderici olarak davranabilirler. Bu antioksidanlar sıklıkla birincil antioksidanların antioksidan aktivitesini arttırırlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil palmitat, lesitin, tartarik asit, EDTA ve β -karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilirler [95].

İkincil antioksidanlar en önemli etki mekanizmalarına göre 3 gruba ayrılabilir [95]:

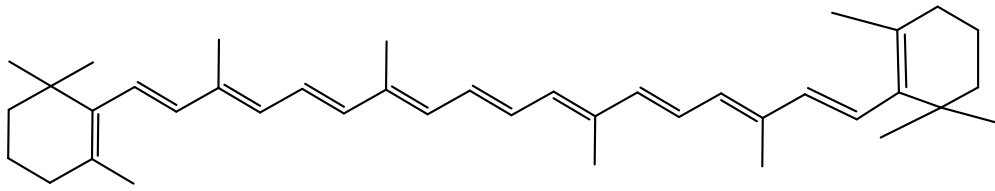
- a) Kelat Yapıcılar: Sitrik asit, fosforik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), tartarik asit
- b) Oksijen Gidericiler ve İndirgeme Ajanları: Askorbik asit, askorbil palmitat, eritorbik asit, sodyum eritorbat, sülfidler.
- c) Singlet Oksijen Gidericiler: Karotenoitler (β -Karoten, likopen ve lutein)



Etilendiamintetraasetikası (EDTA)



Askorbik asit (C Vitamini)



β -Karoten (A Vitamini)

Şekil 2.41: İkincil antioksidanlar

Antioksidan aktivite tayin yöntemleri elektron ve hidrojen transferine göre dayalı olmak üzere ikiye ayrılır:

Elektron transfer metodunda antioksidan maddenin ölçümü oksidan maddenin indirgenmesi sonucu oluşan rengin değişiminin ölçülmesi ile yapılır. Renk değişiminin derecesi örnekteki antioksidan madde konsantrasyonuna bağlıdır. Bunlar;

- ABTS/TEAC (antioksidan kapasite ölçme metodu)
- DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) Serbest Radikal Giderim Yöntemi
- Folin- Ciocalteu (total fenolik madde miktarı ölçme metodu)
- FRAP-ferric reducing antioxidant power- (Demir iyonu indirgeme gücü metodu)
- CUPRAC-cupric reducing antioxidant capacity- metodu

H atomu transferine dayalı tekniklerin çoğunda antioksidan ve substrat arasında rekabete dayalı reaksiyonlar gözlenir ve bu metoda dayalı ölçümler genelde azotlu grup taşıyan maddelerin bozulup peroksil radikalleri oluşumuna dayanır. Bunlar;

- Düşük dansiteli lipoprotein otooksidasyonunun neden olduğu inhibisyon
- Oksijen radikali absorban kapasitesi (ORAC)

- Toplam radikal yakalama parametresi (TRAP)
- Luminol yöntemi
- Fikoeritrin esaslı yöntemler
- Krosin yöntemi
- DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi
- TOSC (Toplam oksiradikal) yöntemi

2.6. Antikolinesterazlar

2.6.1 Alzheimer hastalığı ve nedenleri

Alman psikiyatrist Aloist Alzheimer tarafından 1906 yılında tanımlanmış olan Alzheimer hastalığı (AH), yaşlılardaki primer dejeneratif demansın en sık görülen formudur. Demans bilinci açık bir insanın günlük yaşamını etkileyecek derecede zihinsel ve sosyal uyum yeteneğinin azalması durumudur [96]. Alzheimer hastalığında en erken semptom, genellikle ani başlangıç ve hafıza kaybının progresyonudur. Başlangıçta bu hafıza kaybını yaşlılığa bağlı unutkanlıktan ayırmak güç olabilir. Ancak unutkanlığı olanlar bu durumun farkındadır ve günlük yaşam aktiviteleri minimal düzeyde etkilenir [97]. Yeni bilgilerin hemen unutulması, yakın geçmişi hatırlayamamak, buna karşılık uzak geçmişi çok iyi hatırlamak önemli bir özelliktir. Alzheimer hastalarında konuşma bozukluğu sıktır, cümle kurmakta zorlanırlar. Hastalık ilerledikçe bellek problemleri artar. Zamanla özel bakım işleri bozulur, psikiyatrik semptomla başlar ve hasta yatağa bağımlı kalır [97-99]. Alzheimer hastalığı; beyindeki öğrenme ve hafıza ile alakalı bölümlerde kolinerjik nöronların kaybıyla bağlantılı olarak nörofibrillerin düğümlenmesi ve amiloidlerin oluşumu olarak tanımlanır. Kolinerjik çekirdek doku bozulması, kolinerjik sinir iletimini azaltmaktadır. Ard arda gelen doku bozulmaları artan toksisiteye bağlı birlikte hafıza kaybıyla sonuçlanan geri dönüşümsüz fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Semptomlar ayrıca beynin diğer bölgeleri ve serebral kortekste kolinerjik transmisyonun kaybı ile de alakalıdır [102]. olarak sinirlerin ölümünü hızlandırır [100,101]. Alzheimerlı hastalarda beynin neokorteks ve hipokampus gibi yüksek mental fonksiyonlarından sorumlu bölgelerinde beyin hücreleri üzerinde patolojik bir protein birikimi görülür. Bu protein birikimi β -amiloid plaklardır.

Ayrıca neokorteks ve hipokampusun kolinerjik inervasyonunun kaynağı olan bazal ön beyinde ilerleyen bir nöron kaybı da gözlenmektedir.

2.6.2 AChE ve BChE inhibitörleri

Kolinesteraz inhibitörleri Alzheimer hastalığının ilk ilaç tedavisi olarak US Food and Drug Administration (FDA) tarafından kanıtlanmıştır. Alzheimer hastalarındaki tedavi edici etkileri 6 ile 36 hafta arasındaki tedavi süresine incelenmiş ve bilişsel fonksiyonlarındaki artış gözlenmiştir [103,104]. Bunun kanıtı olarak alzheimer hastalığının nörotoksitesinin kolinesteraz inhibitörlerinin tedavi edici etkisiyle karşılaşması ve sonunda sadece sinir hücrelerindeki asetilkolin açığa çıkmasının engellenmesi değil hastalığın oluşumunda da gecikme gözlenmesidir [105,106]. Kolinesterazların hastalığı engelleyici ve nörolojik olarak koruyucu etkisinden dolayı, hastalığın ilk safhalarında da nörotoksiteyi ve fonksiyonel komplikasyonları engellemesi Alzheimer hastalığının tedavisinde umut olmuştur.

Normal erişkin beyinde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır [107]. Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, butirikolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferik sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır [108].

2.6. 3 Kolinesteraz inhibitörlerinin alzheimer hastalığındaki mekanizması

Kolinesteraz inhibitörleri, asetilkolinesteraz enziminin neden olduğu asetilkolin sinir taşıyıcılarının yıkımını engeller. Alzheimerlı hastaların kolinerjik sinirlerinde asetilkolin miktarı azalır. Kolinerjik sinir hücrelerinin kaybı bilişsel olarak tehlike yaratmaktadır. Asetilkolin enzimi amiloid beta (A-beta) denilen plakaların oluşumunu destekler, bu plakalar ise asetilkolinesteraz enziminin bozunumunu azaltır [109,110]. Amiloid çeşitli klinik bozukluklarda vücudun birçok doku ve organlarında hücreler arasında depolanan anormal bir proteindir.

Bu protein dallanmayan fibrillerden yapılmıştır ve beta kıvrımlı tabaka yapısı gösterir. β -amiloid 21. Kromozomda kodlanan transmembran protein olan APP (Amiloid Prekürsör Protein) 'nin sekretaz enzimiyle kesilmesi, sonucu oluşur. APP amiloid diziliminde velin yerine izolösin, glisin yerine fenilalanin değişiminden dolayı mutasyona sebep olmakta buda β -amiloid depolanmasında etkili olmaktadır.

Bu enzimler α sekretaz, β sekretaz, γ sekretaz enzimleridir. Hastakıltı α ve β sekretaz enzim aktiviteleeri arasındaki dengenin β sekretaz enzim lehine gelişmesi nöronal dejenerasyona sebep olmaktadır [111]. Rees ve Birmijoin asetilkolinestetrazın A-beta ile direk olarak etkileşebildiğinden dolayı bu peptid çözünen plakalar içinde kümelenme imkânı bulup, buna uygun şekilde düzenlenen kolinestreaz inhibitörleeri hastalığın ilerlemesini inhibe ederek bulgusal yararlar sağladığını idda etmektedir. Birçok veriye dayanarak, bu araştırmacıların hipotezi; asetilkolinesteraz inhibisyonunun amiloid başlatıcı proteini (APP) üreterek, sinir hücreleerini koruyan bir sürecin başalamasını sağlamaktır [100]. Kısacası amiloidleer (Amyloidleer) beyin hücreleeri arasındaki haberleşmeyi önler ve beyin hücreleerinin yavaş yavaş ölmesine neden olurlar [112].

Alzheimer hastalarında beta amiloid (A-beta) üretimi sağlıklı bir birey ile aynı olmakla birlikte, beta amiloidleerin dışarı atılmasında sorun yaşanmaktadır. Normal olarak beta amiloidleer hücrenin dışına çıktığı zaman erir, ancak bazen erimesi mümkün olmayan ve adına “fibril” denilen birikintileer oluştururlar. Bu fibrilleer birbirine yapışarak plakalar haline gelir. Her insan yaşlandıkça plaka üretir. Gerçek sorun, bu plakaların iltihaplanma ile sonuçlanan reaksiyonları tetiklemesidir. Beyin, genel olarak, enfeksiyonlarla mücadele ederken serbest radikal denilen toksik ajanlar üretir. İşte bu fibrilleer de benzer reaksiyonlara zemin hazırlar. Nöronun küresel gövdesi, akson denilen ince uzantılarla kaplıdır. Bunlar diğer hücreleerle bağlantı kurmaya yarar. Adına mikrotüp denilen içyapıların çevresinde oluşan uzantılar, dolaşım sistemi olarak görev yapar; besinleeri taşır ve kimyasal mesajları iletir. Bu sistemi, adına tau denilen bir çeşit yapışkanlı protein bir arada tutar. Tau molekülleeri, mikrotüpleerin kenarlarına sıkıca yapışır. Alzheimer söz konusu olduğunda, tau molekülleeri ayrılır ve kendiliğinden düğümler oluşturur. Bu durumda mikrotüpleer parçalara ayrılır ve nöronlar ölür [113].

Reaktif oksijen türleerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stresin hücre tahribatıyla sonuçlanan biyomolekülleerin oksitlenmesine neden olduğu bilinmektedir [114]. Toksik beta amiloidleerin yavaş yavaş birikimi, sürekli oksidatif stres ve benzeri olaylarla birleştiğinde nöronlarda yapısal bozukluğa neden olmaktadır. Bu süreç; fonksiyonel aksaklıklara, kavramsal ve davranışsal bozukluklara ve hatta ölüme neden olabilmektedir. Beyindeki beta amiloid birikimini hızlandıran patofizyolojik durumlar Alzheimer riskini arttırmaktadır [108].

Sonuç olarak; oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk adımlarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynama durumuna sahiptir [114].

Beyinde nöronlar arasında veya bir nöron ile başka bir (tür) hücre arasında iletişimi sağlayan kimyasallara “nörotransmitter” denir. Sinir sistemi boyunca sinirsel sinyaller bu kimyasal taşıyıcılar yardımıyla iletilir. Temel olarak iki nörotransmitter madde bulunur:

1.Asetilkolin nörotransmitter: Dokulardaki bilgiyi ve ya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolin esterase isimli enzim tarafından parçalanır. Bir sonraki bilgi aktarımı için yeniden asetilkolin üretmek gerekir. Asetilkolin, Alzheimer hastalarında yeterince üretilmemektedir. Asetilkolini parçalayan asetilkolinesteraz enziminin frenlenmesi ile Alzheimer hastalığının ilerlemeyeceği düşünülmektedir [115].

2.Glutamat: Sinir hücrelerinde % 70 oranında bulunur. Görevi; öğrenme ve hafızadır. Alzheimer hastalarında glutamat çok aşırı şekilde salgılanır ve bu durum sinir hücrelerinin tahrip olmasına sebep olur. Glutamat salgılanması frenlenirse sinir hücrelerinin ölümünün yavaşlayacağı ve Alzheimer hastasının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği düşünülmektedir [115].

Alzheimer hastalığında kullanılan iki önemli tedavi seçeneği “kolinesteraz inhibitörler” ve “N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleridir”:

Kolinesteraz inhibitörleri bellek ve düşünce ile ilgili bir nörotransmitter olan asetilkolinin parçalanmasını önlemeye yardımcı olurlar [108].

N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri ise öğrenme ve bellek fonksiyonları açısından önem taşıyan bir transmitter olan glutamat’ı düzenleyici etkiye sahiptir [108].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bitkisel Materyaller

Salvia chrysophylla bitkisi 08.06.2008 tarihinde Burdur; Altınyayla-Ballık köyü civarından toplanmıştır. Bitki örneği Balıkesir Üniversitesi Herbaryum’unda Dirmenci 3467 kodu ile saklanmaktadır.

Salvia trichoclada 27.05.2002 tarihinde Bingöl’e 1,2 km kala yol kenarı, Yolçatı köyün’den (1550km) Ali Aslan Dönmez tarafından toplandı. Bitki örneği Hacettepe Üniversitesi Herbaryum’unda AAD 10716 kodu ile saklanmaktadır.

3.2 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler

- Merck; 1.07734.1000 Silica gel 60 (0.063-0.200 mm), BHT, BHA, sodyumbikarbonat, potasyum asetat(susuz), asetik anhidrit, petrol eteri, sülfirik asit (%98), Hidroksil amin hidroklorür, metil iyodür, tetrahidrofuran, sodyum hidrür.
- Sigma-Aldrich; Chemistry Serium (IV) sülfat, DTNB(5,5’-Dithiobis (2-Nitrobenzoik asit)), Folin Ciocalteu reaktifi, α -Tokoferol, β - karoten, Tween-40, Linoleik asit, pirokatekol, kersetin, DPPH (2,2-Difenil-1-pikrilhidrazil), Sigma-Aldrich asetiltiyokolin iyodür, butiriltiyokolin iyodür, sodyumbifosfatdihidrat, sodyumdihidrojenfosfatdihidrat, asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz, metanol, aseton, etanol, etil asetat
- Riedel-de Haen; diklorometan, kloroform, sodyum karbonat, pridin, sodyum sülfat.
- Carlo Erba; alüminyumnitratnonahidrat
- Fluka; krom (VI) oksit

3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması

3.2.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 1 g Na_2CO_3 50 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile hacmine tamamlandı.

Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + CuSO_4): Satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.2.2.2 Toplam flavonoid miktar tayininde kullanılan çözeltiler

% 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması: 1,76 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

1 M Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması: 0,98150 g CH_3COOK 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

3.2.2.3 Antioksidan aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

0,1 mM DPPH çözeltisinin hazırlanması: 4 mg DPPH tartılarak 100 mL etil alkolde çözüldü.

0,1 mM β -Karoten çözeltisinin hazırlanması: 0,2 mg β -karoten 1 mL kloroformda çözüldü. 20 μg linoleik asit ve 200 mg Tween 40 ilave edildi. Kloroform rotaevaporatörde uçurulduktan sonra 50 mL oksijen gazı ile doyurulmuş destile su ilave edilerek kuvvetlice karıştırıldı.

3.2.2.4 Antikolinesteraz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler

0,1 M H_2PO_4^- Çözeltisinin Hazırlanması: 1,56 g H_2PO_4^- tartılıp, 100 mL distile suda çözülür.

0,1 M HPO_4^{2-} Çözeltisinin Hazırlanması: 3,556 g $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ tartılıp, 200 mL distile suda çözülür.

0,1 M pH=8 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 94,7 mL HPO_4^- ve 5,3 mL $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ çözeltilerinden alındıktan sonra 100 mL distile su eklenerek hazırlanır.

0,1 M pH=7 Tampon Çözeltisinin Hazırlanması: 3,9 mL H_2PO_4^- ve 6,1 mL HPO_4^{2-} çözeltilerinden alındıktan sonra 10 mL distile su eklenerek hazırlanır.

DTNB Çözeltisinin Hazırlanması: 16 mg DTNB 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde ve 7,5 mg NaHCO_3 1 mL pH=7 tampon çözeltisinde çözüldükten sonra iki çözelti karıştırılır. Hazırlanan bu çözelti karışımı, 2 mL pH=7 tampon çözeltisi ile 4 mL'ye tamamlanır. Kullanma aşamasında 4 mL pH=8 tampon çözeltisi ilave edilir.

AcI: 32,8 mg AcI alınarak, 8 mL deiyonize su eklenir. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlanır.

BuI: 4 mg BuI alınarak, 8 mL deiyonize su eklenir. Kullanma aşamasında 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlanır.

AChE Enzimleri: 1,17 mg AChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözülür ve 1'er mL'lik beş bölüme ayrılır. Her biri için 0,235 mg/mL'lik konsantrasyon sağlanmış olur. 8 mL distile su eklenmesi sonucu 125 μL 'lik enzim çözeltileri elde edilir. Her bir 125 μL 'lik örnekte 0,02925 mg enzim bulunur. 125 μL 'lik enzim çözeltisine 460 μL pH=8 tampon çözeltisi eklenir. 585 μL çözelti 25 μL 'lik 23 küçük şişelere doldurulur ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletilir. Stok çözeltiler kullanılmadan önce pH=8 tampon çözeltisiyle 3000 μL 'ye tamamlanır.

BChE Enzimleri: 1 mg BChE enzimi alınarak 5 mL pH=8 tampon çözeltisinde çözülür. Bu çözeltiden 300 μL 'lik stoklar oluşturularak küçük şişelere doldurulur ve daha sonra kullanılmak üzere derin dondurucuda bekletilir. Stok çözeltiler kullanılmadan önce 1800 μL pH=8 tampon çözeltisinden eklenerek kullanıma hazır hale getirilir.

3.2.2.5 İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi

Serik sülfat belirtecinin hazırlanması: 2,0 g seryum (IV) sülfat tetrahidrat 100 mL % 10'luk H_2SO_4 'de çözülerek hazırlandı. Belirteç, uygun çözücü sisteminde yürütülen ince tabaka plaklarına pulvarizatör kullanılarak püskürtüldü.

3.2.2.6 Jones reaktifinin hazırlanışı

2,67 g CrO_3 + 2,3 mL H_2SO_4 karışımını 10 mL'ye distile su ile tamamlandı.

3.3 Cihazlar ve Gereçler

- Eliza Reader Molecular Devices Spectro Max340 PC
- Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı (NMR): Bruker AC (^1H : 250 MHz; ^{13}C : 60 MHz), Varian Mercury (^1H : 400 MHz, ^{13}C : 100 MHz), Varian Inova (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 100 MHz)
- FT-IR (Thermo, Nicolet 6700)
- Ultraviyole Spektrofometresi (UV-Vis) (Shimadzu UV-1601)
- Erime derecesi cihazı (Reichert firmasının Kofler model cihazı)
- Döner Buharlaştırıcı (Rota Evaporatör, Büchi ve Heidolph)
- Hassas terazi (Ohaus Adventurer-Pro)
- Manyetik Karıştırıcı ve Isıtıcı (IKA RCT basic hot plate)
- Vortex IKA MS3 basic
- Ultrasonik Banyo (Fisher Scientific FB 15051)
- pH-metre (WTW Inolab pH 720)
- Etüv (Ecocell)
- UV kabin ve lamba (Camag)
- Otomatik tekli ve çoklu pipetler (0,5-10 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 1000-5000 μL) (Eppendorf)
- Azot Tüpü

3.4 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Flavonoid İçeriklerinin Belirlenmesi

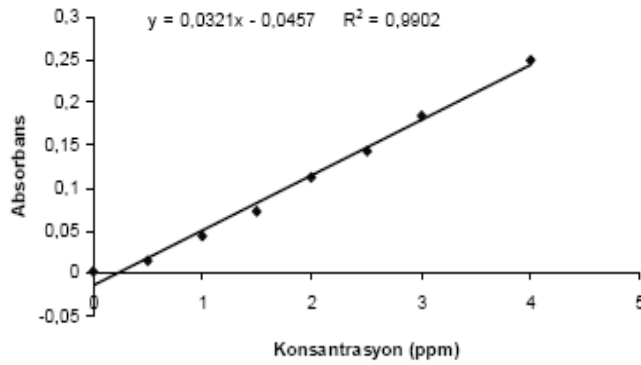
3.4.1 Toplam fenolik içeriklerinin belirlenmesi

Folin Ciocalteu Yöntemi olarak adlandırılan bu yöntem; Singleton ve arkadaşları tarafından toplam fenolik içeriği ölçmek için geliştirilmiştir. Toplam fenolik ayırıcı olarak bilinen Folin-Ciocalteu ayırıcı (FCR) bazlı yöntem, örneğin indirgeme kapasitesini tayin etmektedir. FC reaktifi sadece fenolik bileşenlere özgü değil, birçok fenolik yapıda olmayan bileşenleri de indirgeme yeteneğine sahiptir. Bu yöntemde kullanılan CuSO_4 (bakır(II) sülfat) alkali ortamda protein veya antioksidanla kompleks yapar. Folin fenol reaktifi (fosfo molibdik fosfotungstik asit) eklendiğinde, folin reaktifi proteine bağlanır. Protein veya antioksidanla Cu(II) 'nin reaksiyonundan açığa çıkan Cu(I) olasılıkla molibdatotungstat ayırıcını heteropoli

mavisine indirger ve rengi sarıdan maviye dönüşür. Reaksiyon tamamlandınc 750 nm’de örnek absorbansları ölçülür.

Fenolik bileşikler FCR ile sadece bazik ortamlarda reaksiyon verirler. Fenolik protonun dissosiasyonu, ayırıcı indirgeme yeteneği bu nedenle artan fenolat anyonunun oluşumunu sağlar [116,117].

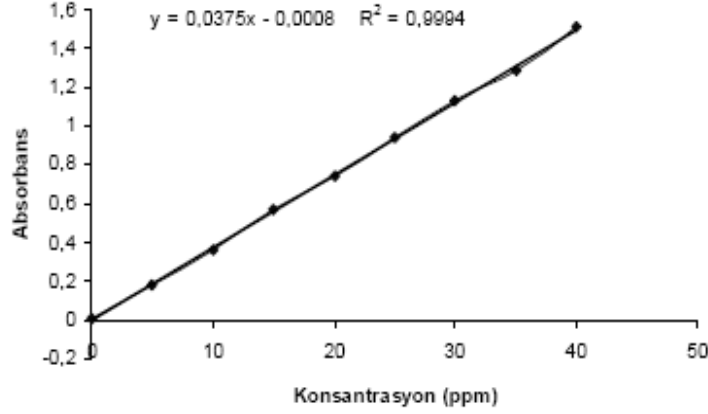
Numunelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi [64]. 1 mg numune içeren örnek çözeltileri distile su ile 46 mL’ye tamamlandı. Bu karışıma 1 mL Folin-Ciocalteu Reaktifi (FCR) ve 3 dakika sonra %2’lik Na₂CO₃ çözeltisinden 3 mL ilave edildi. Karışım 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı. Numunelerin absorbansları 760 nm’de okunarak toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlendi [118].



Şekil 3.1: Pirokatekolün ölçü grafiği

3.4.2 Toplam flavonoid içeriklerinin belirlenmesi

Hazırlanan numunelerin toplam flavonoid içerikleri kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat metodu ile belirlendi. 1000 ppm’lik kersetin çözeltisi hazırlandı ve bu çözeltiden 0, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 ve 200 µL alınarak hacimleri %80’lik etanol ile 4,8 mL’ye tamamlandı. 0,1 mL 1 M potasyum asetat eklendi ve bir dakika sonra 0,1 mL %10’luk alüminyum nitrat ilave edildi. 40 dakika inkübasyon süresinden sonra 415 nm’de kontrole karşı UV spektrofotometresinde absorbansları okundu [119].



Şekil 3.2: Kersetinin ölçü grafiği

3.5 Antioksidan Tayin Yöntemleri

3.5.1 DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikal giderim yöntemi

Sanchez ve arkadaşları tarafından geliştirilen bu yöntem; antioksidanların kararlı bir organik azot radikali olan DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalinin süpürücü etkilerini ölçmeye dayanan bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Mor renkli DPPH radikali 517 nm’de maksimum absorpsiyon verir. DPPH çözeltisine antioksidanın ilave edilmesiyle absorbansta düşüş meydana gelir ve antioksidanların varlığıyla rengi mordan sarıya döner. Bu yöntem antioksidanların süpürme kabiliyetlerini değerlendiren kolay ve geçerli yöntemdir. Yöntem hızlı ve basittir. Ancak bazı bileşenlerin (özellikle karotenoidler) 517 nm’de DPPH ile çakışık spektrum vermesi analizin yorumunu güçleştirir. Ayrıca çoğu sterik engellemeden dolayı DPPH ile yavaş tepkimeye girer. Bundan dolayı yöntem; DPPH ile tepkimeye giren antioksidanların antioksidan kapasitesi hakkında doğru bir değerlendirme vermez. Bunlara ek olarak DPPH’nın rengi; ışık, hava oksijeni, nem ve pH’a fazla duyarlı olduğundan tekrarlanabilir sonuçların eldesi güçtür [120].

Bitki ekstraktlarının ve saf maddelerin serbest radikal giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. 50 µg ile 500 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1’er mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL metanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyondan sonra 517 nm’de absorbanları ölçüldü. Örneklerin absorban

değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% İnhibisyon)} = (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.5.2 β -Karoten-linoleik asit yöntemi (toplam antioksidan aktivite tayini)

β -Karoten-linoleik asit yöntemi, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerin inhibisyonunun ölçülmesine dayanmaktadır. Bu yöntem, β -karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. α -Toc, BHT, kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 20, 40, 80 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde, 4 mL β -karoten çözeltisi ilave edildi. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez UV-spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm’de ölçüldü. Kontrol

olarak etanol kullanıldı. Tüpler 50°C’de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki β -karotenin rengi kayboluncaya kadar (yaklaşık 120 dakika) inkübasyona devam edildi. Bu süre sonunda absorbans tekrar 490 nm’de ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi [121]. β -Karotenin renk açılım oranı aşağıdaki formül ile hesaplandı [122].

$$R = \ln (a/b)/t \quad (3.2)$$

$\ln$ =doğal logaritma

a =başlangıç absorbansı

b = t zaman (dakika) inkübasyonundan sonraki absorbans.

Toplam antioksidan aktivite, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Toplam Antioksidan Aktivite (\% İnhibisyon)} = [(R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}}] \times 100 \quad (3.3)$$

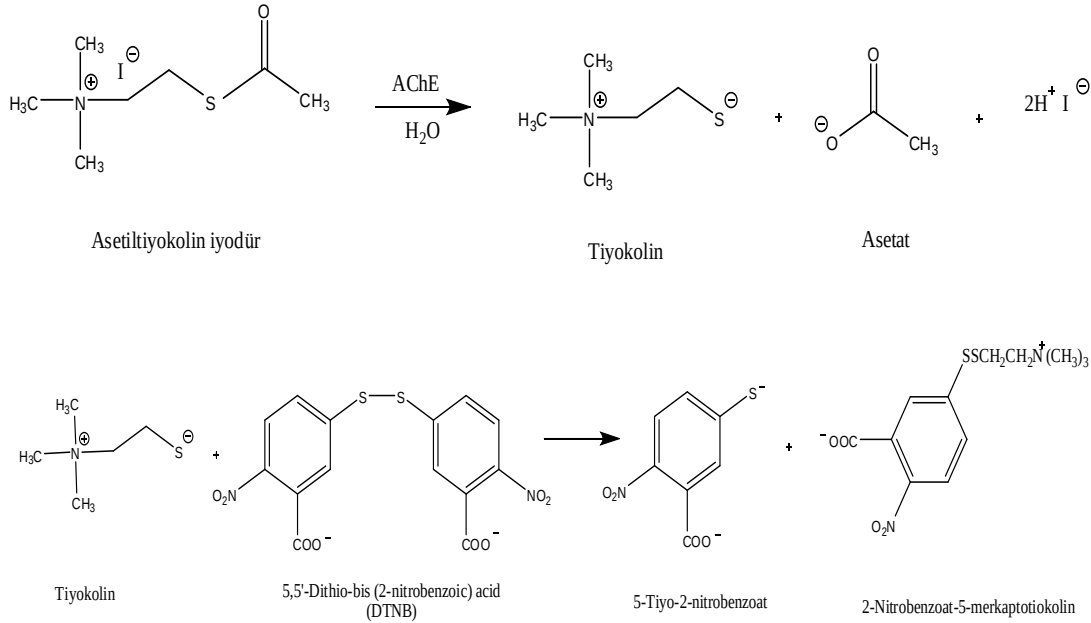
3.6 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemleri

3.6.1 Ellman metodu

Asetilkolinin AChE tarafından tiyokoline parçalandıktan sonra, tiyokolinin sarı renkli 5- tiyo-2-nitrobenzoat anyonunu vermek üzere 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ile reaksiyon verdiği kolorimetrik bir yöntem olan Ellman metodu, 96 kuyucuklu mikrotiplalarda gerçekleştirilmektedir.

3.6.1.1 AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Reaksiyon şematik olarak şekil 3.5'te gösterilmektedir:



Şekil 3.3: Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonu

Sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonunun konsantrasyonu 412 nm'de spektrofotometrede ölçülmektedir [123].

Reaktiflerin Hazırlanışı:

- DTNB: 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7.5 mg NaHCO₃ 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 ml pH=7 tamponu ile hacmi 4 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 ml pH=8 tamponu eklendi.
- Substrat: 32,8 mg asetilkolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.
- Enzim Çözeltisi: 0,2 mg asetilkolinesteraz enzimi 3 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözülerek hazırlandı.

3.6.1.2 BChE aktivite testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanılmaktadır.

Reaktiflerin Hazırlanışı

- DTNB: 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7.5 mg NaHCO₃ 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 mL pH=7 tamponu ile hacmi 4 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 mL pH=8 tamponu eklendi.
- Substrat: 4 mg butirilkolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 ml'ye tamamlandı.
- Enzim Çözeltisi: 0,2 mg butirilkolinesteraz enzimi 1,8 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözülerek hazırlandı.

Deneyin Yapılışı

- Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu.
- Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi.
- 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (20 µL) herbir kuyucuğa ilave edildi.
- Standart olarak (antikolinesteraz) Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galanthamin kullanıldı.
- Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.
- Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

3.7 İstatistiksel Hesaplamalar

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

3.8 Kromatografik Yöntemler

3.8.1 Kolon kromatografisi

Ekstreleri fraksiyonlandırmak ve bu fraksiyonlardan saf madde elde etmek amacıyla kolon kromatografisi yöntemi kullanıldı. Sütun dolgu maddesi olarak silikajel (Merck 1.07734) ve Sephadex LH-20 kullanıldı. Ekstreler az miktarda uygun çözücüde çözülerek adsorban ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş, ekstre miktarına uygun olarak seçilmiş ve boyunun 2/3 oranında silikajel ile doldurulmuş kolonun üst kısmına yerleştirildi. Elüsyona apolar bir çözücü olan % 100 petrol eteri ile başlandı ve sırasıyla diklorometan, aseton ve metanol ile polarite arttırılarak elüsyona devam edildi, sonunda % 100 metanol ile elüsyon tamamlandı. Benzer fraksiyonlar birleştirildi ve saflaştırma için daha küçük boyuttaki kolonlarda adsorban olarak silikajel kullanıldı.

3.8.2 İnce tabaka kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde, alüminyum üzerine silikajel kaplı hazır plaklardan (20 x 20 cm) (Merck 1.05554) ve cam plaklardan (20 x 20 ; 20 x 10) yararlanıldı. Tatbik edilen maddelerin uygun çözücü sistemleriyle ilerlemesi sağlandı. Çözücü ile yürütme işleminin ardından ortaya çıkan lekeler UV ışık altında işaretlendikten sonra özel bir belirteç olan serik sülfat belirteci ile etüvde 105 °C'de 5 dakika bekletilerek belirgin lekeler gözlenmesi sağlandı. İnce tabaka kromatografisinde maddelere özgü R_f değerleri sayesinde farklı maddeler ayırt edilebildi.

Ayrıca preparatif ince tabaka kromatografisi; az miktardaki karışımlardan istenilen maddeyi ayırt etmek için uygulandı. Önce analitik çalışılıp uygun koşullar belirlendi. Bu yöntemde içindeki bileşikleri ayrı ayrı izole etmek istediğimiz madde; plaklara başlangıç çizgisi boyunca düzgün bir şekilde tatbik edildikten sonra maddelerin

ayrılmasına olanak verecek uygun polariteye sahip çözücü sistemi belirlenerek yürütüldü. UV ışık altında birbirinden ayrılmış çizgiler halinde maddeler tespit edilerek, ayrı ayrı erlenlere alındıktan sonra uygun çözücülerle maddeler saf halde geri kazanıldı.

3.9 Spektroskopik Yöntemler

3.9.1 NMR (Nükleer Magnetik Rezonans) spektroskopisi

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin ^1H NMR, ^{13}C NMR, APT, ^1H - ^1H COSY (proton-proton etkileşimi için). Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform (CDCl_3), döterometanol (CD_3OD) ve döterodimetilsülfoksit (CD_3SOCD_3) kullanıldı. Saf bileşiklerin ^1H NMR analizleri 600 MHz, ^{13}C NMR analizleri 150 MHz Varian ID-6508 indirect problu cihazlarda UME-TÜBİTAK'ta yapılmıştır.

3.9.2 Kütle spektroskopisi

Bu çalışmada; kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin NMR sonuçları değerlendirildikten sonra kütle spektroskopisi yardımıyla kesin sonuçlar elde edildi. Kütle spektrumları (+) APCI (Positive Atmospheric Pressure Chemical Ionization) metoduyla LCQ-Deca Ion Trap cihazıyla alınmıştır.

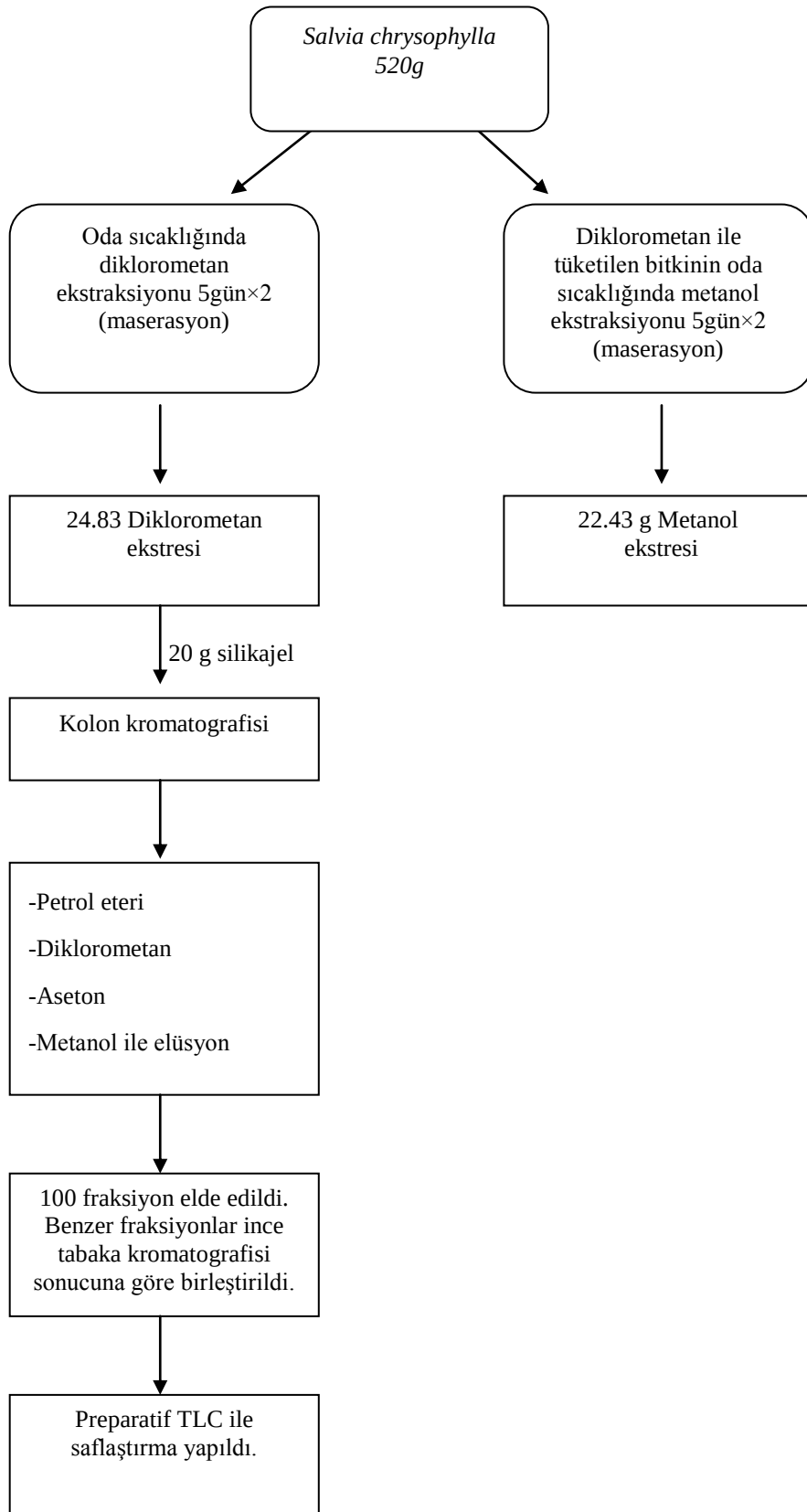
3.9.3 IR spektroskopisi

Perkin Elmer Spectrum One FT-IR Spectrometer cihazında çalışılmıştır.

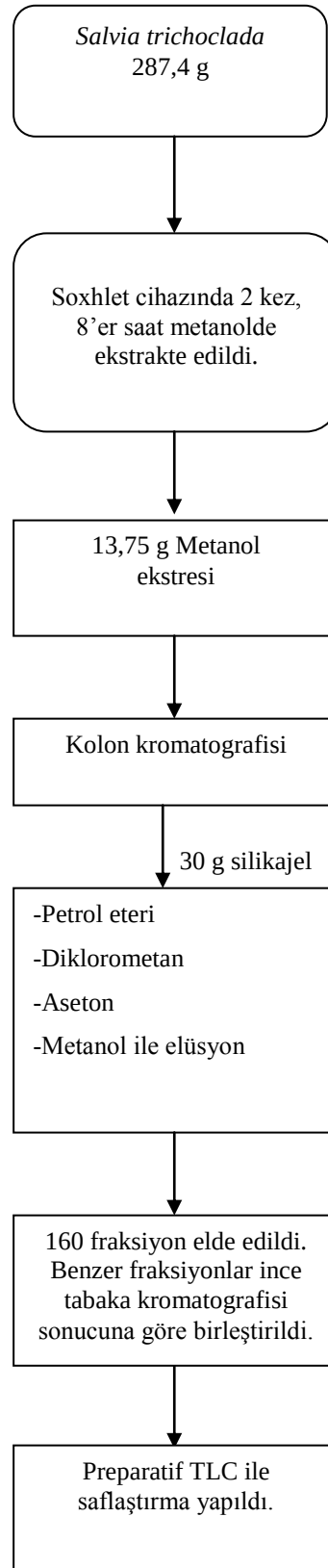
4. DENEYSEL BÖLÜM

4.1 Ekstrelerin Hazırlanışı

Bitkiler gölgede kurutulduktan sonra biyotomatik kesici yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Küçük parçalara ayrılan *Salvia chrysophylla* (520 g) öncelikle oda sıcaklığında diklorometan ile 5günx2 kez masere edildi. Daha sonra diklorometan ile tüketilen bitkilerin oda sıcaklığında metanol ile 3günx2 kez masere edildi. Rotaevaporatörde çözücüleri uçurulduktan sonra ekstreler elde edildi. 24.83 g diklorometan ekstresi, 22.43g metanol ekstresi elde edildi. Aynı şekilde küçük parçalara ayrılan *Salvia trichoclada* bitkisi Soxhlet cihazında 2 kez 8'er saat metanol'de ekstrakte edildi. Evaporatörde çözücünün uçurulması sonucu 13.75g ekstre elde edildi.



Şekil 4.1: *Salvia chrysophylla* bitkisinin diklorometan ve metanol ekstrelerinin hazırlanması ve fraksiyonlandırılması



Şekil 4.2: *Salvia trichoclada* bitkisinin metanol ekstresinin hazırlanması ve fraksiyonlandırılması

4.2 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçeriklerinin Belirlenmesi

4.2.1 Toplam fenolik miktar tayini

Ekstre ve fraksiyonların toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi. Üç miligram olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlandı. 1000 ppm olarak hazırlanan pirokatekol çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri etanolle 200 µL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu karışımlara su, FCR reaktifi ve 3 dk sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı ve örneklerin absorbansları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

$$Absorbans = 0,0148 \text{ pirokatekol } (\mu\text{g}) + 0,0225 \quad (R^2 = 0,9953) \quad (4.1)$$

4.2.2 Toplam flavonoid miktar tayini

Ekstre ve fraksiyonların toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi (Moreno ve diğ., 2000). Her bir örnekten 100 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Kersetinin 1000 ppm'lik çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Bu karışımlara 100 µL 1M potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µL %10'luk alüminyum nitrat çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de absorbansları okundu. Ekstrelerin toplam flavonoid miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

$$Absorbans = 0,1574 \text{ kersetin } (\mu\text{g}) - 0,1239 \quad (R^2 = 0,9968) \quad (4.2)$$

4.3 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

4.3.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesinin belirlenmesi

Ekstreler, fraksiyonlar ve saf maddelerin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 517 nm'de karakteristik absorpsiyonu olan kararlı serbest bir radikaldır. DPPH'nın 517

nm'deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlendi (Gülçin ve diğ., 2004). Örneklerin 50 µg ile 500 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL metanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$DPPH \text{ Giderim Aktivitesi (\% inhibisyon)} = \left(\frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

$A_{kontrol}$ kontrolün absorbansı, $A_{örnek}$ örneğin absorbansıdır

4.3.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu aktivitesinin (β -karoten-linoleik asit yöntemi) belirlenmesi

Örneklerin toplam antioksidan aktivite olarak da isimlendirilen lipid peroksidasyon inhibisyonu, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β -karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem, β -karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. α -Toc, BHT, kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 10, 25, 50, 100 µg/mL olacak şekilde, 4 mL β -karoten çözeltisi ilave edildi. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Kontrol olarak etanol kullanıldı. Tüpler 50°C'de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki β -karotenin rengi kayboluncaya kadar (yaklaşık 120 dk) inkübasyona devam edildi. Absorbans yine 490 nm'de ölçüldü. β -karoten renk açılım oranı (R), aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t} \quad (3.2)$$

ln: doğal logaritma, a : başlangıç absorbansı, b : inkübasyondan sonraki absorbans, t : inkübasyon süresi (dk).

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA (\% inhibisyon) = (R_{kontrol} - R_{örnek}) / R_{kontrol} \times 100 \quad (3.3)$$

$R_{kontrol}$ kontrolün renginin açılma hızı ve $R_{örnek}$ örneğin renginin açılma hızıdır.

4.4Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi

4.4.1 AChE % inhibisyon testi

- Mikroplakadaki kuyucuklara 130 μ L fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 μ L ve enzim çözeltisinden 20 μ L konuldu.
- Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi.
- 10 dakika sonra 20 μ L DTNB reaktifi ve substrat (20 μ L) herbir kuyucuğa ilave edildi.
- Standart olarak (antikolinesteraz) Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanıldı.
- Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanlardan V_{max} değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.
- Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM dan 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak IC_{50} değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

4.4.2 BChE % inhibisyon testi

- Mikroplakadaki kuyucuklara 130 μ L fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 μ L ve enzim çözeltisinden 20 μ L konuldu.
- Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi.
- 10 dakika sonra 20 μ L DTNB reaktifi ve substrat (20 μ L) herbir kuyucuğa ilave edildi.
- Standart olarak (antikolinesteraz) Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galanthamin kullanıldı.

- Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorban okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanlardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.
- Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

4.5 *S.chrysophylla* ve *S. trichoclada* Bitkilerinin İzolasyon ve Saflaştırma Çalışmaları

4.5.1 *S. chrysophylla* bitkisinin toprak üstü kısmının diklorometan ekstresinin (SCD) fraksiyonlandırılması

S. chrysophylla bitkisinin toprak üstü kısımları (560g) gölgede kurutulduktan sonra oda sıcaklığında iki kez aseton ile masere edilerek 24.83 g ekstre elde edildi. Diklorometan ekstresi kurutulduktan sonra silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlayarak ve polariteyi belli oranda arttırarak %100 diklorometana; diklorometandan yine polarite arttırılarak %100 asetona ve ardından %100 metanole kadar devam edilmiştir. İTK yapılarak benzer fraksiyonların birleştirilmesi ile toplam olarak 10 adet fraksiyon (herbiri için ortalama 750 mL çözücü kullanarak) elde edilmiştir. Bu fraksiyonlara kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak toplam 5 saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

4.5.2 *Salvia trichoclada* bitkisinin toprak üstü kısmının metanol ekstresinin (STM) fraksiyonlandırılması

Salvia trichoclada BENTHAM bitkisinin toprak üstünden elde edilen diklorometan ekstresi (18.75g) kurutulduktan sonra silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyon sistemine nonpolar bir çözücü olan %100 petrol eteri ile başlanmış ve polarite belli oranda arttırılarak sırasıyla diklorometan, aseton ve %100 metanole kadar devam edilmiştir. İTK sonuçlarına göre benzer fraksiyonların birleştirilmesi sonucu 20 fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlara kolon ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak

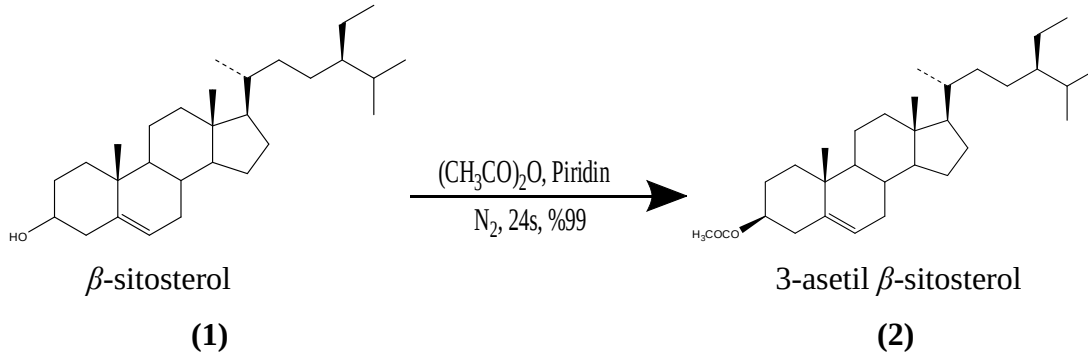
toplam 5 saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

4.6 β -sitosterol 'ün Potansiyel Aktif Yarı Sentetik Türevlerinin Sentezi

S. chrysophylla ve *S. trichoclada* bitkisinden elde edilen β -sitosterol kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve 3 farklı türevi sentezlendi.

4.6.1 3-asetil β -sitosterol sentezi

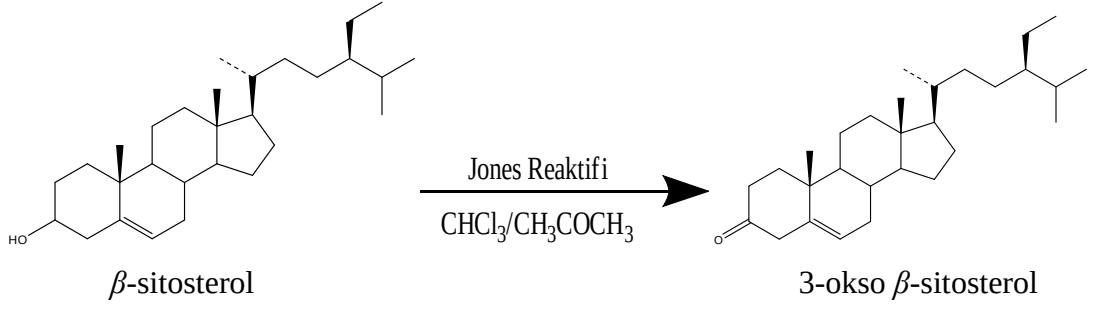
166 mg (0,4 mmol) β -sitosterol 5 mL piridin içerisinde çözüldü. İçerisine 5 mL asetik anhidrit ilave edilerek bu karışım N_2 atmosferine alınıp oda sıcaklığında 24 saat karışmaya bırakıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve karışım 250 mL'lik ayırma hunisine alınarak su ve DCM (15mL*2) ile ekstraksiyon yapıldı. Organik fazı topladıktan sonra asitliğinin giderilmesi için su ile birkaç kez (20mL*6) yıkandı, sulu fazın pH'ı kontrol edildikten sonra organik faz Na_2SO_4 ile kurutuldu çözücü rotavaporda uçuruldu, son olarak da ürün 5 defa toluen ile muamele edilerek çözücüsü rotavaporda uçuruldu ve (Şekil 4.1) ürün elde edildi [7].



Şekil 4.3 : 3-asetil β -sitosterol sentezi

4.6.2 3-okso- β -sitosterol sentezi

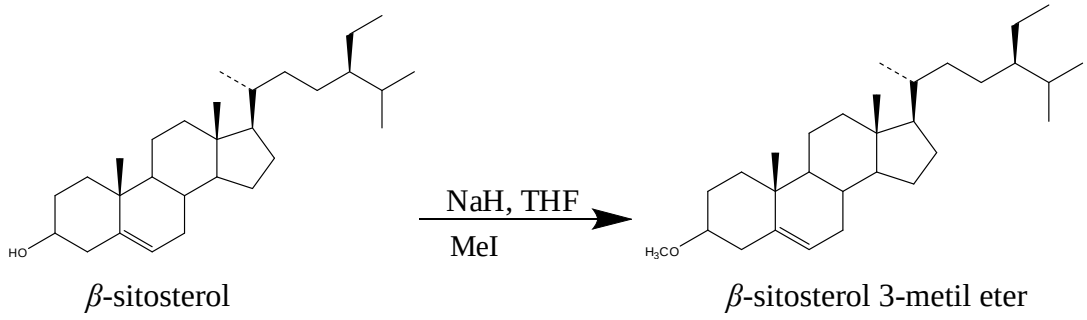
166 mg (0,4 mmol) β -sitosterol (1) 10 mL aseton içerisinde çözüldü. Karışım buz banyosuna alınıp Jones reaktifinden renk berrak turuncu olana kadar damla damla ilave edidi. 2 saat soğukta bekletildikten sonra renk donuk yeşile döndü. Karışım buz banyosundan çıkarılıp oda sıcaklığında 24 saat karışmaya bırakıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı. Su ve diklorometan ile muamele edilerek organik faz Na_2SO_4 ile kurutulur ve çözücüsü rotavaporda uçurularak ürün (Şekil 4.2) elde edildi [7].



Şekil 4.4 : 3-okso- β -sitosterol sentezi

4.4.3 β -sitosterol 3-metil eter sentezi

NaH (63.5mg) 8 mL THF içerisinde çözüldü. Bu karışım buz banyosuna alınarak balonun içerisine 8 mL THF’de çözülen β -sitosterol (63.5mg) eklendi. Bu karışım aynı sıcaklıkta 1 saat karıştırıldı ve daha sonra balona MeI (300 μ L, 4,82 mmol) damla damla ilave edilerek reaksiyon 18 saat karışmaya bırakıldı. Reaksiyonun devam edip etmediği TLC ile gözlemlendi. Reaksiyon sonlandıktan sonra karışımı 250 mL lik ayırma hunisine alıp NH₄Cl ile doyurulmuş su ve EtOAc ile ekstrakte edildi, organik faz ayrıldıktan sonra Na₂SO₄ ile kurutuldu ve çözücüsü uçurulurak ürün elde edildi [124].



Şekil 4.5 : β -sitosterol 3-metil eter sentezi

5. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *Salvia chrysophylla* STAPF toprak üstü kısımlarından ayrı ayrı hazırlanan diklorometan ve metanol ekstrelerinin ve *Salvia trichoclada* BENTHAM bitkisinin toprak üstü kısımlarının metanol ekstrelerinin antioksidan aktivite tayinleri; başlıca iki yöntem DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ve β -karoten renk açılım yöntemleriyle yapıldı. Antikolinesteraz aktivite tayinleri ise asetilkolinesteraz (AChE) ve (BChE) enzimlerine karşı Ellman metodu ile yapıldı. Ayrıca tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları da sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. *Salvia chrysophylla* STAPF'dan elde edilen toprak üstü (diklorometan + metanol) ekstrelerinin ve *Salvia trichoclada* BENTHAM'dan elde edilen aseton ve metanol ekstrelerinin taşıdığı sekonder metabolitler izole edilerek saflaştırılan bileşiklerin yapıları IR, 1D- ve 2D-NMR ve kütle spektroskopik yöntemleriyle belirlendi. Ekstrelerden yüksek verimde elde edilen β -sitosterol'ün 3 yarı sentetik türevi hazırlanarak aktiviteleri araştırıldı ve sonuçlar verildi. Çizelge 5.1'de kuru toz halindeki bitki örneklerinin ve bunlardan hazırlanan ekstrelerin miktarları ve % verimleri verilmiştir:

Çizelge 5.1: Kuru bitki miktarları, ekstre miktarları ve % verimleri

<i>Salvia</i> Türleri	Kuru Toz Bitki	Ekstreler	Ekstre Miktarları	% Verim
<i>Salvia chrysophylla</i>	520 g	<i>S. chrysophylla</i> DCM	24,83 g	% 4,78
		<i>S. chrysophylla</i> MeOH	22,43 g	% 4,31
<i>Salvia trichoclada</i>	287,4g	<i>S. trichoclada</i> MeOH	13,75 g	% 4,78

5.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoid Miktar Sonuçları

Tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi.

Çizelge 5.2 : Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoid miktar sonuçları

Fraksiyonlar	Toplam Fenolik Miktarı (μg pirokatekol eşdeğer) /mg Ekstre	Toplam Flavonoid Miktarı (μg quercetin eşdeğer) /mg Ekstre
STM	12,03 $\pm$ 1,26	23,52 $\pm$ 1,86
SCD	10,76 $\pm$ 2,33	21,88 $\pm$ 0,37
SCM	43,88 $\pm$ 1,44	37,93 $\pm$ 0,98

5.2 Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

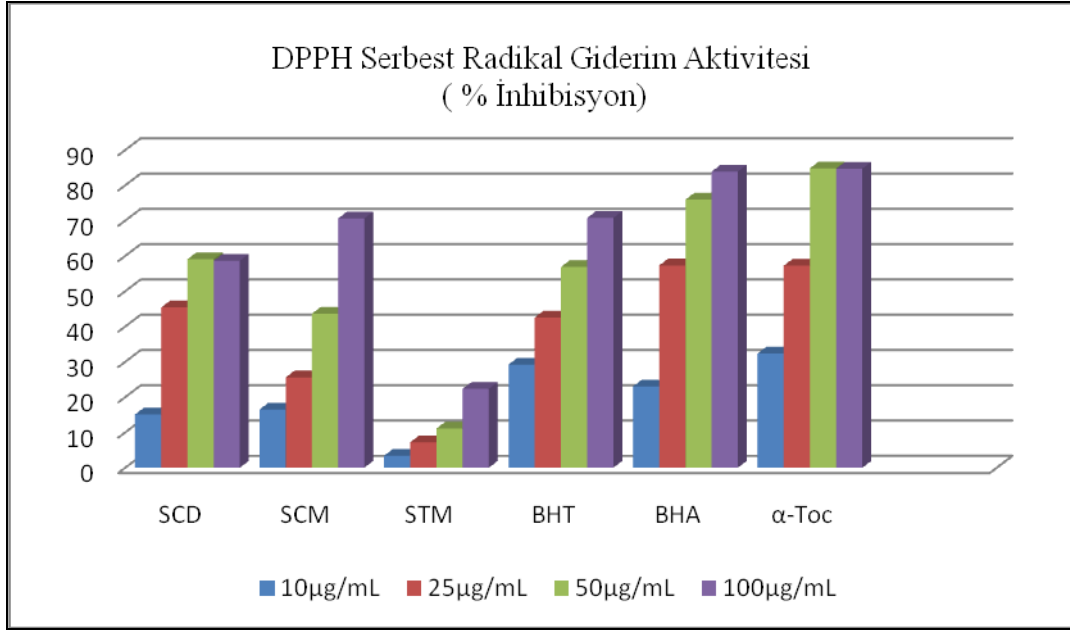
5.2.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları

Salvia chrysophylla (SCD, SCM) diklorometan ve metanol ekstreleri ile *S. trichoclada* toprak üstü metanol ekstresi DPPH serbest radikali giderim aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHT, BHA ve α -tokoferole göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı. ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyon olarak Çizelge 4.2 de verilmiştir.

Çizelge 5.3 : *Salvia chrysophylla* ve *Salvia trichoclada* bitkilerinin diklorometan ve metanol Ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

DPPH Serbest radikal Giderimi Aktivitesi (%İnhibisyon)				
Ekstreler	10 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
SCD	15,1	45,43	59,08	58,63
SCM	16,49	25,6	43,64	70,63
STM	3,38	7,22	11,12	22,35
BHT*	29,22	42,57	56,87	70,77
BHA*	23,03	57,31	75,95	83,9
α -Toc*	32,36	57,24	84,83	84,71

*standart



Şekil 5.1 : *S. chrysophylla* ve *S. trichoclada* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrlerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi

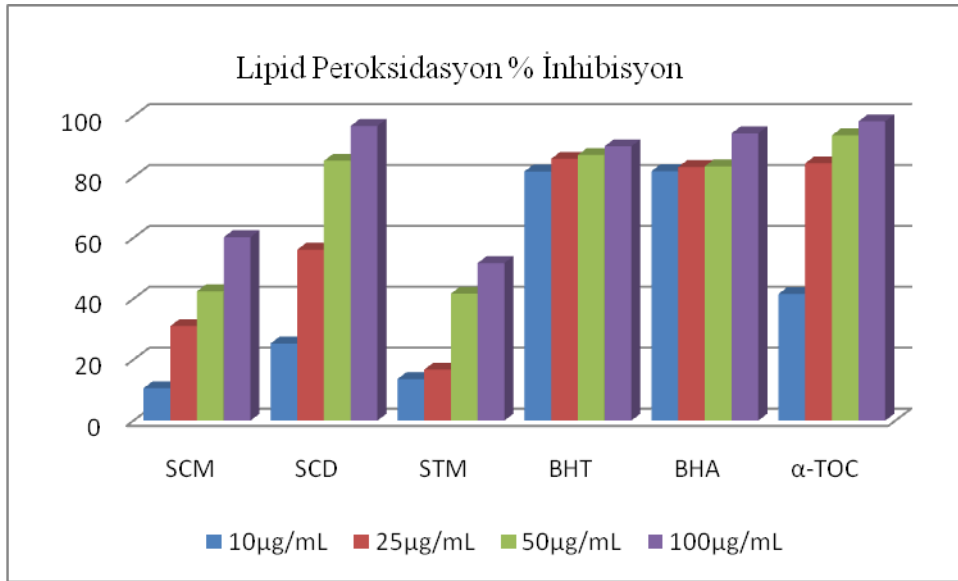
5.2.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu (β -karoten renk açılım) yöntemi sonuçları

S. chrysophylla ve *S. trichoclada* bitkilerinden hazırlanan aseton ve metanol ekstrleri toplam antioksidan aktiviteleri β -karoten renk açılım yöntemine göre dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) yapıldı. Antioksidan aktivite karşılaştırmalarında standart olarak BHT, BHA, kullanıldı.

Çizelge 5.4 : *Salvia chrysophylla* ve *Salvia trichoclada* bitkilerinin diklorometan ve metanol ekstrlerinin β -karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi (%inhibisyon)

Lipid Peroksidasyon % İnhibisyonu				
Ekstreler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
SCM	10,62	31,03	42,45	60,23
SCD	25,31	56,14	85,33	96,78
STM	13,65	16,75	41,7	51,74
BHT	81,83	85,97	87,25	90,07
BHA	81,91	83,29	83,51	94,35
α-TOC	41,58	84,48	93,69	98,29

*standart



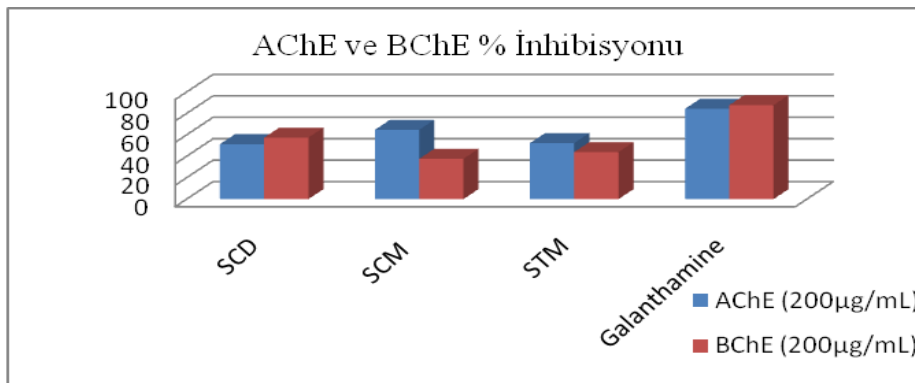
Şekil 5.2: *Salvia chrysophylla* ve *Salvia trichoclada* bitkilerinin β-karoten-linoleik asit toplam antioksidan aktivitesi

5.2.3 Antikolinesteraz aktivitesi sonuçları

S.chrysophylla ve *S. trichoclada* toprak üstü ekstrelerinin AChE ve BChE % inhibisyon değerleri Çizelge 5.5’ de verilmiştir.

Çizelge 5.5 : Ekstrelerin antikolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)

Fraksiyonlar	AChE (200µg/mL)	±SD	BChE (200µg/mL)	±SD
<i>S. chrysophylla</i> STAPF Diklorometan Ekstresi	51,26	2,15	57,40	2,42
<i>S. chrysophylla</i> STAPF MeOH Ekstresi	64,65	2,62	37,59	2,22
<i>S.trichoclada</i> BENTHAM MeOH Ekstresi	52,23	2,13	43,89	2,05
Galanthamine	84,24	0,73	87,72	0,80



Şekil 5.3 : *S. chrysophylla* ve *S. trichoclada* ekstrelerinin antikolinesteraz aktiviteleri

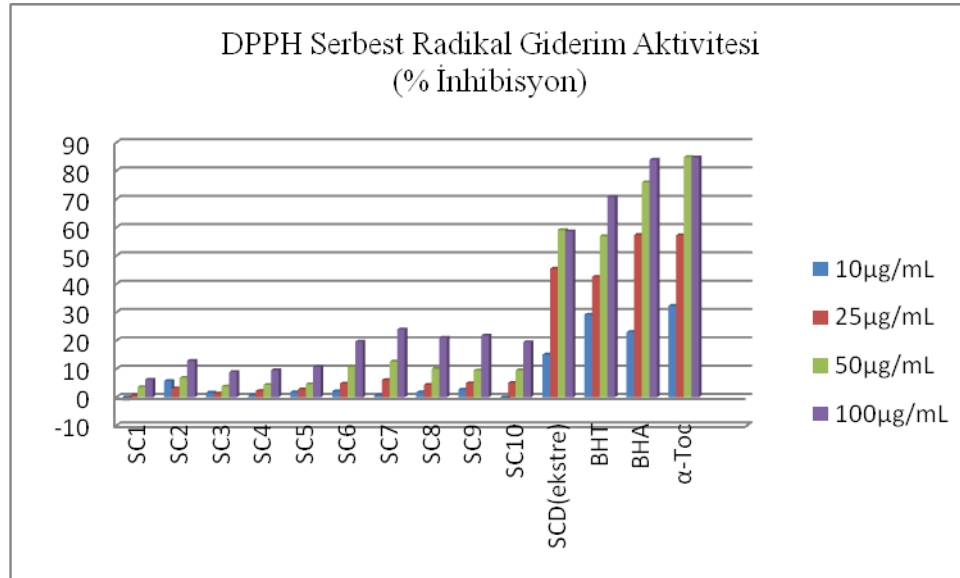
5.3 Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

5.3.1 *S. chrysophylla* toprak üstü diklorometan (SCD) ekstresi fraksiyonlarının toplam fenolik miktarı ve toplam flavonoit miktarı

Çizelge 5.6 : SCD ekstresinin fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları

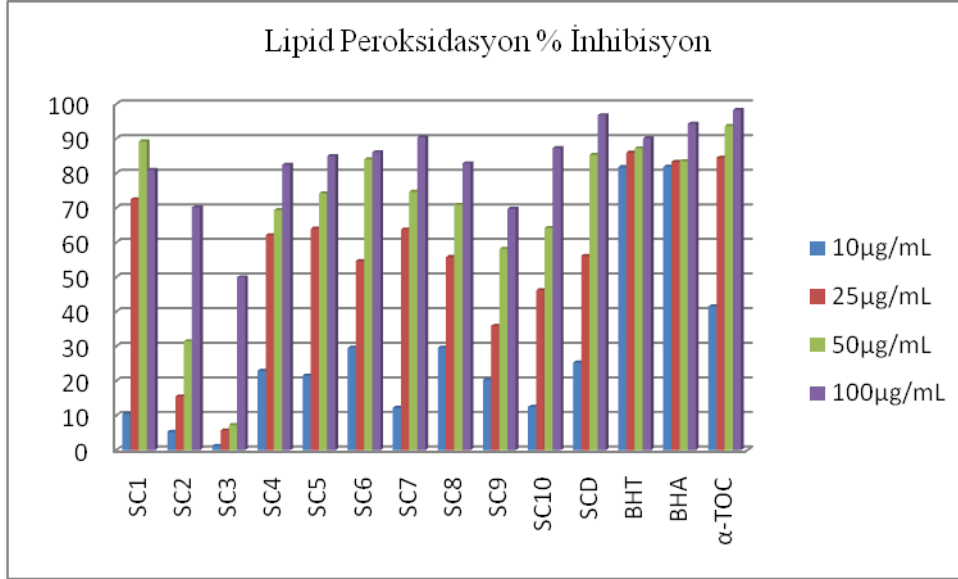
Fraksiyonlar	Toplam Fenolik Miktarı (μg pirokatekol eşdeğer) /mg Ekstre	Toplam Flavonoid Miktarı (μg quercetin eşdeğer) /mg Ekstre
SC1	17,17 $\pm$ 3,24	27,85 $\pm$ 1,55
SC2	20,41 $\pm$ 0,16	67,19 $\pm$ 1,84
SC3	12,55 $\pm$ 3,32	8,92 $\pm$ 0,56
SC4	8,54 $\pm$ 2,02	9,75 $\pm$ 0,52
SC5	13,05 $\pm$ 3,92	10,57 $\pm$ 1,51
SC6	7,28 $\pm$ 1,65	24,39 $\pm$ 1,37
SC7	10,86 $\pm$ 0,87	31,04 $\pm$ 1,01
SC8	11,87 $\pm$ 0,99	29,15 $\pm$,11
SC9	10,02 $\pm$ 1,74	22,15 $\pm$ 1,04
SC10	12,03 $\pm$ 1,26	23,52 $\pm$ 1,86

5.3.2 *S.chrysophylla* toprak üstü diklorometan (SCD) ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları



Şekil 5.4 : *S. chrysophylla* diklorometan (SCD) ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbet radikal giderim aktivitesi

5.3.3 *S.chrysophylla* Toprak Üstü Diklorometan (SCD) Ekstresi Fraksiyonlarının Lipid Peroksidasyon % İnhibisyon Aktivitesi Sonuçları



Şekil 5.5 : SCD ekstresi fraksiyonlarının Total Antioksidan Aktivite Lipid Peroksidasyon (% İnhibisyon)

5.4 *S. chrysophylla* ve *S. trichoclada* Bitkilerinden İzole Elde Edilen Saf Bileşikler ve Yapı Tayini

Salvia chrysophylla 'dan elde edilen saf bileşikler

- Sclareol
- β -sitosterol
- Salvigenin
- Oleanolik Asit
- Ursolik asit

Salvia trichoclada 'dan elde edilen saf bileşikler

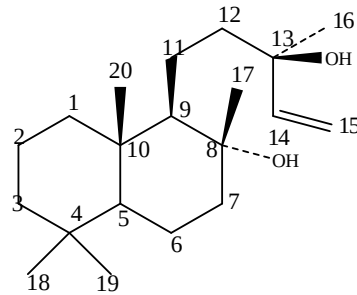
- Lup(20)29-en-3-ol (Lupeol)
- 20(29)-Lup-20(29)-en-3-on (Lupenone)
- Lup-20-hidroksi-3-on (Monogynol A)
- Lup-1, 20(29)-dien-3-on (Glochidone)
- Oleanolik Asit ve Ursolik Asit

Çizelge 5.7: Saf bileşikler ve miktarları

Saf Bileşikler	Elde Edildiği Bitki	İzole Edilen Saf Bileşik Miktarı	Ekstre	İzole edildiği fraksiyonun çözücü sistemi
Sclareol	<i>S. chrysophylla</i>	5 mg	Diklorometan	DM:AC [1:1]
Salvigenin	<i>S. chrysophylla</i>	35mg	Diklorometan	DM:AC [8:2]
β -sitosterol	<i>S. chrysophylla</i> <i>S. trichoclada</i>	250mg	Diklorometan Metanol	DM:AC [9:1] DM:AC [95:5]
Lupeol	<i>S. trichoclada</i>	5mg	Metanol	DM:AC [98:2]
Lupenon	<i>S. trichoclada</i>	7mg	Metanol	DM:AC [9:1]
Glochidone	<i>S. trichoclada</i>	7,1 mg	Metanol	DM:AC [9:1]
Monogynol A	<i>S. trichoclada</i>	8mg	Metanol	DM:AC [9:1]
Oleanolik Asit	<i>S. chrysophylla</i> <i>S. trichoclada</i>	230mg	Diklorometan Metanol	DM:AC [7:3] %100 DM
Ursolik asit	<i>S. chrysophylla</i> <i>S. trichoclada</i>	120mg	Diklorometan Metanol	DM:AC [7:3] %100 DM

5.4.1 Saf bileşiklerin yapı tayinleri

5.4.1.1 Sc.45.3.3= Sclareol= 14-Labdene-8,13-diol

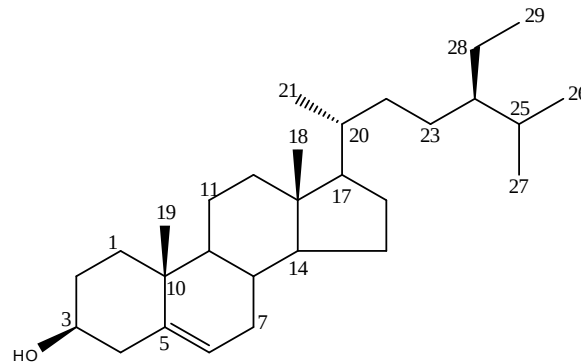


Şekil 5.6: Sclareol bileşiği

Beyaz renkli olan bu bileşik katı halde elde edilmiştir ve erime noktası 106°C olarak bulunmuştur. Silika jel kaplı plakta UV lamba altında 254 nm’de koyu renkte görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105 °C’de yakıldığında kahverengi leke olarak gözlemlenmiştir.

Bileşiğin ¹H-NMR spektrumunda metil bölgesinde dört tane singlet sinyali izlenmiş, bunlardan 0.81 ppm’deki singlet sinyalinin 6 protona karşılık gelmesinden dolayı iki metil grubuna ait olduğu anlaşılmıştır. Bu pik 18 ve 19 nolu karbon metil protonlarının pikidir, 0.89 ppm de çıkan metil pikinin ise C-20 ye ait olduğu belirlenmiştir. Diğer iki metil sinyalinin ise 1.20 ve 1.30 ppm’de izlenmesi bu metillerin oksijen taşıyan C’lara bağlı olabileceğine işaret etmiştir. Nitekim ¹³C-NMR (APT) spektrumunda kısa boylu 75.12 ve 73.24 ppm’de iki pikin izlenmesi yapıda iki oksijenli karbonun varlığına işaret etmiştir. Bileşikte bir terminal (uç) etilen grubunun varlığı ise gerek proton NMR’ındaki metin protonu (5.96 ppm’de izlenen dd, J=17Hz, J=10Hz) ve bu protonla etkileşen 17 ve 10 Hz’lik iki genişlemiş dubletler şeklindeki geminal metilen protonları [5.24 brd (J=17 Hz) H-15a ve 5.06 brd (J=10 Hz), H-15b] ve gerekse bunlara karşılık gelen ¹³C-NMR sinyalleri [δ 147.73 (C-14) ve 110.26 (C-15)] ile açıkça izlenmiştir. APT tekniğiyle alınan ¹³C-NMR spektrumunda biri etilenik çifte bağa ait 3 metin, yine biri aynı çifte bağa ait olmak üzere 8 metilen, 5 metil ve ikisi katerner hidroksilleri taşıyan 4 katerner karbondan ibaret 20 karbon sinyalinin izlenmesi yapının diterpen iskeletini doğrulamış, iki katerner OH grubunun ve bir etilenik yan zincirin yerleri tüm spektral veriler ve literatür bulguları incelenerek saptandığında bileşiğin bazı *Salvia* türlerinden daha önce de elde ettiğimiz ve özellikle *S. sclarea* türünden elde edilen önemli bir labdan diterpen olan sclareol olduğunu göstermiştir [125].

5.4.1.2 Sc.33-34.1, St.47.2 = β -sitosterol= Stigmast-5-en-3-ol

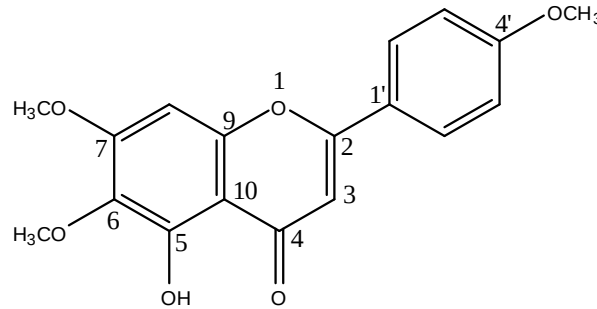


Şekil 5.7 : β -sitosterol bileşiği

Beyaz renkli katı madde olarak elde edilen bileşiğin (250 mg) erime noktası 137-138°C olarak belirlendi. Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında önce mavi sonra kahverengi bir renk aldı.

Bileşiğin ^1H NMR spektrumunda 3.52 ppm’de izlenen multiplet sinyali bize yapıda oksijen taşıyan bir sübstitüente komşu protona ait olabileceğini gösterdi. 5.35 ppm’de gözlenen multipletimsi dublet sinyali ise olefinik bir proton olarak yorumlandı. 1-2 ppm arasındaki metilen zarfının yanısıra metil piklerinin multiplisiteleri yapının bir steroid olabileceğini düşündürmüştür. Alınan ^1H -NMR spektrumunda 6 metil sinyalinin çıkış şekli (2 singlet, 3 dublet ve 1 tripletten ibaret) bileşiğin 29 C’lu stigmasten yapısına sahip olduğunu ispatlamıştır. IR spektrumunda 3426, 3302, 2956, 2863, 1643, 1375 ve 956 cm^{-1} , de izlenen sinyaller de yapıda hidroksil ve doymamışlık olduğunu göstermiştir. Biyojenetik olarak ve karakteristik bölünme şekli dikkate alındığında OH grubunun C-3’e yerleşmesi ve literatür verilerinin de bunu doğrulaması ve de tüm spektral veriler ve fiziksel özelliklerine dayanarak bu bileşiğin yapısının *Salvia* türlerinden daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan β -sitosterol olduğunu kanıtlamıştır.

5.4.1.3 Sc.37.11.3.3= Salvigenin= 5-hidroksi-4’,6,7-trimetoksiflavon

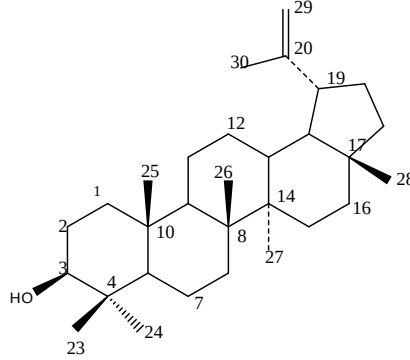


Şekil 5.8 : Salvigenin bileşiği

^1H -NMR’ında gözlenen 12.8 ppm deki singlet piki yapıda bir hidrojen bağının olabileceği fikrini verdi. 6.5 ve 6.6 ppm’de görünen singlet protonları ise iki aromatik protonun varlığını gösterdi. 7.0 ve 7.8 ppm de gözlenen ikişer protonluk karakteristik dubletler *p*-süstitüe bir aromatik halkanın varlığına işaret etmiştir. Bu proton çiftlerinin multiplisiteleri ve kimyasal kaymaları, flavon iskeletine sahip bir yapıdaki diğer aromatik sinyallerle birlikte değerlendirildiğinde *p*-süstitüe B halkasının varlığına işaret etmiştir. ^1H NMR spektrumumuzda δ 3.8, 3.9 ve 4.0 ppm de

gözlenen üçer protonluk singletler bileşikte 3 OCH₃ sübstitüentinin bulunduğunu göstermiştir. Literatür taraması yaptığımızda bu bileşiğin ¹H-NMR spektrumunun, bir flavon olan salvigeninin ¹H-NMR verileriyle birebir örtüştüğünü gördük [125]. Alınan spektrumlara ve fiziksel özelliklerine dayanarak bu bileşiğin yapısının *Salvia* türlerinden daha önce de izole edilen salvigenin olduğuna karar verildi.

5.4.2.4 St 44.4 =Lupeol = Lup(20)29-en-3-ol



Şekil 5.9 : Lupeol bileşiği

Beyaz renkli katı toz halinde elde edilmiştir. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) kahverengi tonlarında görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında koyu eflatun-mor rengini aldı.

Lupeolün ¹H NMR spektrumu incelendiğinde 1.61 ve 0.69 ppm arasındaki bölgede 7 tane singletin varlığı bize bu bileşiğin triterpen iskeletine sahip olduğu konusunda ipucu vermiştir. 4.50 ve 4.62 ppm’lerde 1-2 Hz’lik dubletler olarak gözlenen sinyaller yapıda terminal bir çifte bağın olduğunu ve birbirleriyle dublet verdiğini düşündürmüştür. 1.61 ppm’de çıkan 3 protonluk singlet piki ise bu sinyalin vinilik bir metile ait olabileceğini, yani 4.62 ve 4.50 ppm’deki piklerle birlikte değerlendirildiğinde bir isopren grubunun varlığını göstermiştir. ¹H-NMR spektrumunda 3.12 ppm’deki sinyal ise bir hidroksil grubuna komşu bir protonun varlığını ve bu protonun komşu C atomundaki iki protonla etkileşimi sonucu dubletin dubleti şeklinde izlendiğini ifade etmektedir. Lupan triterpenler, hatta pek çok tip triterpen yapısında bulunan ilk OH grubu biyojenetik olarak C-3’de izlendiğinden ve gerek bölünme şekli gerekse kimyasal kayması literatür verileriyle karşılaştırıldığında bu bileşiğin 3.12 ppm’deki sekonder OH grubunun C-3’de olduğu kesinlik kazanmıştır. Bileşiğin ¹³C-NMR (APT) spektrumunu incelediğimizde 150.95 ve 109.32 ppm’deki sinyaller de yine isopropenil grubundaki karbonların

varlığını doğrulamıştır. Spektrumun 38-55 ppm arası incelendiğinde 5 tane CH karbonunun varlığı ve C-3 de hidroksil taşıyan karbonun ise 72.58 ppm’de rezonansa geldiği izlenmiştir.

Bileşiğin COSY spektrumuna bakıldığında 4.50 ve 4.62 ppm’deki H-29 protonlarının kendi aralarında küçük J değerli geminal etkileşimleri ve yine 1.60 ppm deki vinilik metil grubu ile uzak etkileşimleri açıkça izlenmiştir. Ayrıca 3.12 ppm’de izlenen protonun 1.59 ppm deki H-2 protonu ile etkileşimi görülmektedir. Tüm 1D- and 2D-NMR (^1H , ^{13}C , COSY) spektrumları sonuçları değerlendirildiğinde bu bileşiğin yapısının *Salvia* türlerinden daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde yaygın olarak bulunan lupeol olduğuna karar verilmiştir.

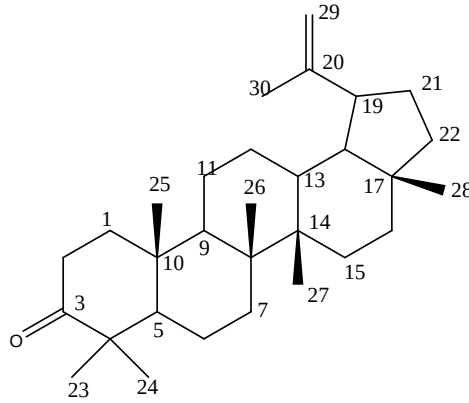
Çizelge 5.8: Lupan iskeletine sahip triterpenlerin ^{13}C -NMR verileri

C	Lupeol	Lupenon	Monogynol A
1	38.93	39.62	39.63
2	29.70	27.43	28.72
3	79.2	218	218
4	39.28	47.35	47.31
5	55.51	54.82	54.82
6	18.33	19.69	19.71
7	34.30	35.53	35.53
8	42.85	40.79	41.30
9	50.32	49.80	49.95
10	40.85	36.89	36.90
11	20.85	21.48	21.95
12	27.42	25.16	27.56
13	37.38	38.17	37.61
14	40.01	42.90	43.60
15	27.46	28.83	29.02
16	36.15	34.18	34.15
17	43.01	43.0	44.63
18	48.2	48.25	48.28
19	48	47.97	49.64
20	150.98	150.91	73.49
21	29.87	33.57	33.86
22	40.01	39.62	40.18
23	27.85	26.66	26.70
24	16.82	21.05	21.05
25	16.70	15.98	15.98
26	16.57	15.98	16.01
27	15.06	14.49	14.79
28	17.92	18.02	19.23
29	109.32	109.40	24.75
30	19.40	38.17	31.64

Çizelge 5.9: Lupan iskeletine sahip triterpenlerin ¹H-NMR verileri

H	Lupeol (ppm)	Monogynol A (ppm)	Lupenon (ppm)	Glochidone (ppm)
1				7.05, <i>d</i> ,(10Hz)
2		1.67, <i>dddd</i>		5.72, <i>d</i> ,(10.1 Hz)
3	3.12(<i>dd</i>)	-	-	-
19	2.31(<i>m</i>)	2.38(<i>m</i>)	2.31(<i>m</i>)	2.34(<i>m</i>)
23	0.90	0.90	0.90	0.90
24	0.69	0.86	0.72	1.05
25	0.76	0.96	0.76	1.01
26	0.96	1.06	0.96	1.06
27	0.87	1.01	0.87	1.06
28	0.72	0.75	0.69	0.74
29	4.5 <i>d</i> 4.62 <i>d</i>	1.02	4.5 <i>d</i> 4.63 <i>d</i>	4.52 <i>d</i> 4.64 <i>d</i>

5.4.2.6 St-52.2 =Lupenon= Lup-20(29)-en-3-on



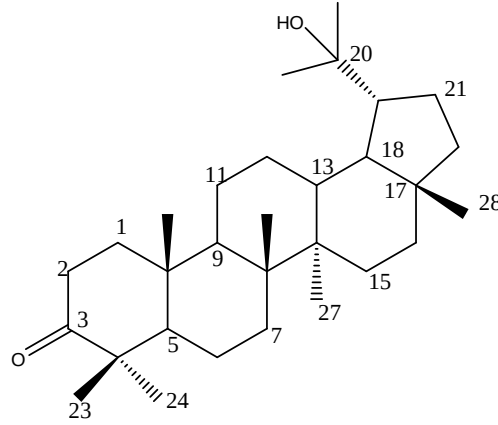
Şekil 5.10 : Lupenon bileşiği

Beyaz renkli katı toz halinde elde edilmiştir. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) kahverengi tonlarında görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında koyu eflatun rengini aldı ve kısa bir süre içinde rengi soldu.

¹H NMR spektrumu incelendiğinde 4.50 ve 4.63 ppm’de etkileşim sabiti 1.2 Hz olan sinyaller lupeolde olduğu gibi yine yapıda bulunan bir uç metilen grubunun varlığına işaret etmiştir. Nitekim 1.62 ppm’de izlenen genişlemiş singlet sinyali ile yapıda bir isopropilen grubu olduğu anlaşılmaktadır. δ 0.5 - 1.60 Arasındaki toplam 7 metil sinyali yapının bir triterpen olduğunu ve isopropilen grubu nedeniyle bu triterpenin lupen iskeletine sahip olduğunu göstermiştir, bir triterpen iskeletinin varlığı bileşiğin ¹³C-NMR (APT) spektrumunda 30 karbon sinyali vermesi doğrulamıştır. Bileşikte

bir keto grubunun varlığı ise 218.5 ppm'deki katerner C sinyali ile izlenmiş ve bu keto grubunun da biyojenetik olarak büyük olasılıkla C-3 de yer aldığı düşünülmüştür. Nitekim Me-24 protonlarının lupeol'e göre hem proton hem de karbon NMR spektrumlarında daha alt alana kayması bunu desteklemektedir. Ayrıca 150.91 ve 109.40 ppm'deki çifte bağa ait C sinyalleri ve 18.02-38.17 ppm arasında ise 7 metil sinyali APT spektrumunda açıkça izlenmiştir. Kütle spektrumunda moleküler piki $[M+1]^+$ olarak 425'de izlenmiştir EK E.4. Alınan spektrumlar ve literatür verileriyle olan uygunluğu da göz önüne alınarak bu bileşiğin daha önce de *Salvia* 'lar ve bazı bitkilerden izole edilen lupenon (lupen-3-one) olduğuna karar verilmiştir [127].

5.4.2.5 St-51.3 = Monogynol A = Lup-20-hidroksi-3-on



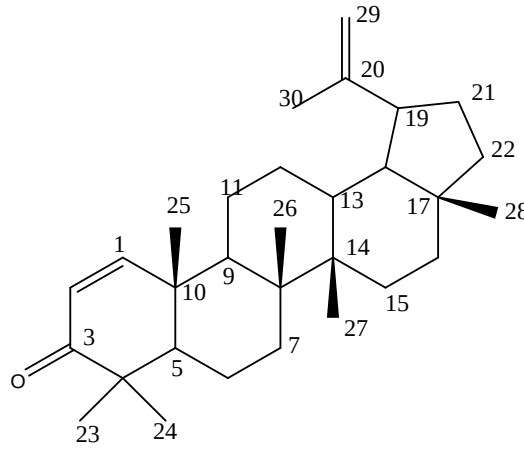
Şekil 5.11 : Monogynol A bileşiği

Bileşik renksiz katı toz görünümünde elde edilmiştir. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) koyu kahve-mor renklerde görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında mor rengini alıp kısa bir süre sonra solmuştur.

^1H NMR spektrumu incelendiğinde 0.75 ve 1.06 ppm arasında gözlenen 8 metil sinyali yapının bir triterpen iskeletine sahip olduğunu düşündürdü. ^1H -NMR spektrumunda tüm metillerin singlet olarak izlenmesine rağmen iki metil sinyalinin lupeol'e nazaran daha alt alanda rezonans olması (1.06 ve 1.01) ve isopropilen grubuna ait sinyallerin izlenmemesi iskeletin bir lupan, fakat lupen olmadığına işaret etmiştir. Bileşiğin ^{13}C -NMR (APT) spektrumunu incelediğimizde 218 ppm'de çıkan kısa boylu pikin yapıdaki keto grubuna ait olduğu anlaşıldı. 73.49'da çıkan kısa boylu katerner C piki ise yapıda bir OH grubunun varlığını ispatladı. Nitekim ^1H

NMR spektrumunda göreceli olarak alt alana kayan iki singlet metil grubunun varlığı, üstelik lupeoldeki gibi 7 değil de 8 metil sinyalinin izlenmesi, yani uç metilen grubunun izlenmemesi hidroksil grubunun C-20'ye yerleştiğine işaret etmiştir. Literatür taraması sonucu bu bileşiğin, alınan spektrumlara ve fiziksel özelliklerine dayanarak verilerinin daha önce grubumuz tarafından da diğer bileşikler gibi *Salvia* türlerinden elde edilmiş olan Monogynol A bileşiğinin verileri ile uyduğu, yani açık yapısıyla bileşiğin lup-20-hidroksi-3-on olduğu anlaşılmıştır [126].

5.4.2.7 St-52.3 = Glochidone = Lup-1, 20(29)-dien-3-on

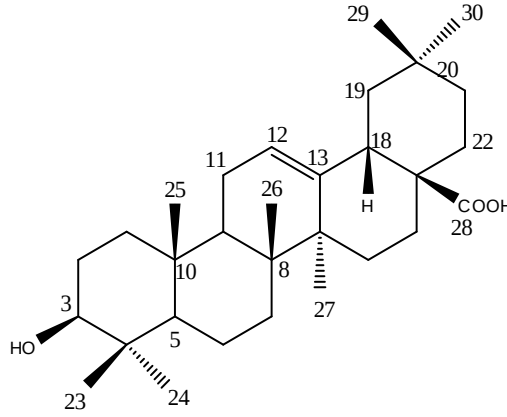


Şekil 5.12 : Glochidon bileşiği

Bileşik beyaz katı toz görünümünde elde edildi. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) kahverengi tonlarında görünen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında koyu eflatun rengini aldı ve kısa bir süre içinde rengi soldu.

¹H-NMR spektrumu lupenon spektrumu (Çizelge 5.9) ile iki sinyal hariç hemen hemen aynıdır. Spektrumu incelediğimizde etkileşim sabiti 10Hz olan 7.05 ve 5.72'de iki dublet sinyali görülmektedir. Bir çifte bağa ait olan sinyaller arasındaki kimyasal kayma farkı bir enon grubuna ait protonların varlığına işaret etmektedir. Böyle bir grubun lup-20(29)-en iskeletine ait bir triterpende yerleşebileceği yegane yer A halkasıdır ve sadece iki ihtimal vardır. Bu da; 1-okso-2-en veya 3-okso-1-en'dir. Fakat yapılan literatür taraması sonunda keto grubunun lupenonda olduğu gibi A halkasında C-3'de yer aldığı belirlenmiştir. ¹H-NMR spektrumu ve birebir örtüşen literatür verileriyle olan uygunluğu göz önüne alınarak bu bileşiğin daha önce de izole edilen 1,20(29)-lupadien-3-on olduğuna karar verilmiştir [128].

5.4.2.8 Sc.39.18.-2, St-42.5.2 =Oleanolik asit=3 β -hidroksi-olean-12-en-28-oik asit



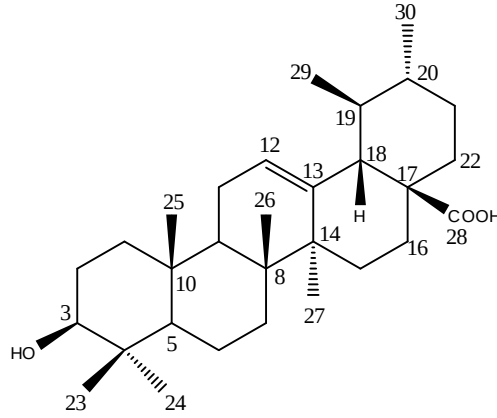
Şekil 5.13 : Oleanolik asit bileşiği

Beyaz renkli olan bu bileşik katı toz halde elde edildi ve erime derecesi 304-306°C olarak belirlendi. Silika jel kaplı plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında eflatun-mor renk aldı.

¹H NMR spektrumunda (EK H.1) 0.68-1.30 ppm arasında çıkan 7 metil sinyali yapının bir triterpen olduğu konusunda fikir vermiştir. Bileşiğin ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde 180.02 pmm de çıkan pik karboksilik asit, 144 ve 123 ppm deki sinyaller ise yapıda bir çifte bağın olduğunu düşündürür. 3.18’ppmdeki dubletin dubleti şeklinde izlenen pik 4,5 ve 9,5 Hz lik etkileşim değerlerine sahip olup 3 numaralı C’da yine sekonder bir hidroksil grubunun varlığını göstermiştir. Piklerden yola çıkarak yapıda bulunduğunu kabul ettiğimiz OH, karboksilik asit ve çifte bağ, bu triterpenin oleanolik asit veya ursolik asit olduğunu düşündürdü. Birbirinin izomeri olan oleanolik asit ile ursolik asiti ¹H NMR da ayıran en karakteristik pikler ursolik asit de iki dublet ve 5 singlet metiline karşın oleanolik asit de tüm metil sinyallerinin singlet olarak izlenmesidir. Dolayısıyla ¹³C NMR spektrumunda da ursolik asit de toplam da 7 ve (40-60) ppm arasında 5 CH izlenirken oleanolik asit de toplam da 5CH ve aynı ppmler de 3CH grubu izlenecektir. Ursolik asit de fazladan izlenen iki CH grubu (C-19 ve C-20) çok karakteristik olarak 39-40 ppm civarında izlenirken bu CH lar elde edilen bu triterpende izlenmedi. H-19 protonu ile etkileşen H-18 sinyalinin verdiği bölünme ve kayma değeri de yine oleanolik asit için oldukça karakteristiktir. Nitekim bileşiğin β konumundaki H-18 sinyali C-19 protonlarıyla

2,5 ve 12 Hz lik etkileşim değeri vererek karakteristik bir dublet dublet şeklinde 2.8 ppm civarında izlenmiştir. Tüm spektral veriler ve literatür verilerine dayanarak yapının yine *Salvia* türlerinde çok rastlanan 3 β -hidroksiolean-12-en-28-oik asit (oleanolik asit) olduğu belirlenmiştir. Ayrıca standart örnekle de ince tabaka kromatografisinde farklı çözücü sistemlerinde kıyaslanarak yapının kesin olarak oleanolik asit olduğu ispatlanmıştır.

5.4.2.8 Sc.39.18.-2, St-40.4.1=Ursolik asit=3 β -hidroksi-12-ursen-28-oik asit



Şekil 5. 14 : Ursolik asit bileşiği

Beyaz renkli olan bu bileşik katı toz halde elde edildi ve erime noktası 290 °C olarak bulundu. Silikajel plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında eflatun-mor renk aldı.

¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 600 MHz) (EK I.1) yine üst alanda çıkan metil singletleri yapının triterpen iskeletine sahip olduğunu düşündürdü. Fakat bu kez 0.75-1.05 ppm ler arasında beş metil singleti ve 0.86 ppm ile 0.78 ppm de çıkan 6,5 Hz lik iki metil dupleti (sırasıyla Me-29 ve Me-30) bileşiğin ursan yapısında bir triterpen olduğunu düşündürdü. 5.23 Ppm’de çıkan J= 2.5 Hz lik dar triplet piki ve ¹³C-NMR’ında 125.89 ppm’de buna karşılık gelen CH karbonunun varlığı bize yapıda bir çifte bağın olduğunu düşündürdü. Yine ¹H-NMR spektrumunda 3.23 ppm’de izlenen dd (J=4,5 ve 9,5 Hz) sinyali C-3 deki hidroksile komşu proton (H-3 α) varlığına işaret etti. ¹³C NMR (APT) spektrumunda izlenen 7 CH, 9 CH₂, 7 CH₃ ve biri asit karboniline ait toplam 7 katerner C sinyalinin izlenmesi bileşiğin olean yapısından farklı olarak ursan iskeletine sahip olduğunu kesinleştirmiştir. Tüm ¹H-ve ¹³C-NMR bulguları incelenip literatür verileri ile karşılaştırıldığında nerdeyse birebir

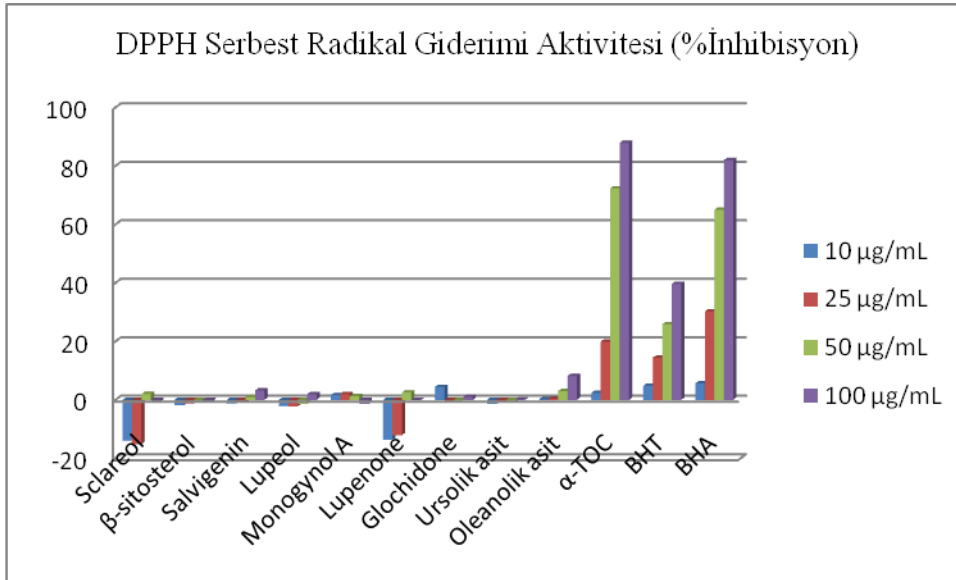
uygunluk gösteren veriler, bize bu yapının *Salvia* türlerinden grubumuz ve diğer gruplar tarafından daha önce de izole edilen ve bitkiler aleminde oldukça yaygın olarak bulunan ursolik asit olduğunu göstermiştir.

5.5 İzole Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

5.5.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 5.10 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi sonuçları

DPPH Serbest Radikal Giderimi % İnhibisyon Aktivitesi				
Saf Bileşikler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
Sclareol	-13,98	-15,11	2,02	-0,51
β -sitosterol	-1,78	-1,29	-0,63	-0,49
Salvigenin	-1,29	-0,90	0,95	3,26
Lupeol	-2,14	-2,21	-1,34	1,97
Monogynol A	1,65	2,01	1,28	-1,40
Lupenone	-13,64	-12,11	2,54	-0,08
Glochidone	4,42	-0,94	-0,13	1,06
Ursolik asit	-1,38	-0,22	-0,71	0,13
Oleanolik asit	0,19	0,41	3,02	8,19
α -TOC	2,35	19,90	72,29	87,93
BHT	4,84	14,42	25,89	39,68
BHA	5,69	30,25	65,00	82,02

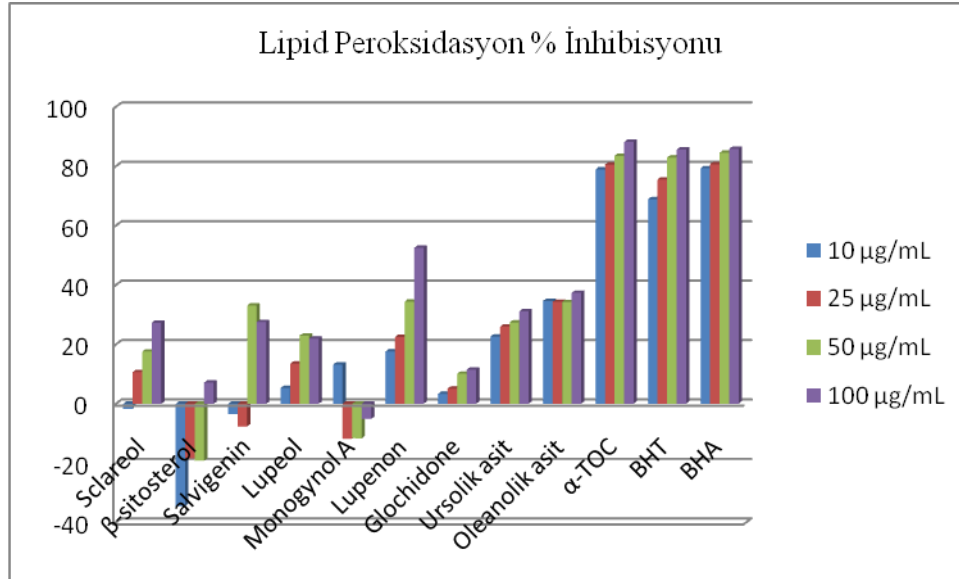


Şekil 5.15 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi

5.5.2 β -Karoten-Linoleik Asit (Lipid Peroksidasyon % İnhibisyon) Toplam Antioksidan Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 5.11 : İzole saf maddelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon aktiviteleri sonuçları

Lipid Peroksidasyon% İnhibisyonu				
Saf Maddeler	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL
Sclareol	-1,70	10,67	17,57	27,25
β -sitosterol	-34,54	-18,43	-19,19	7,15
Salvigenin	-3,48	-7,66	33,10	27,52
Lupeol	5,31	13,49	22,95	21,95
Monogynol A	13,16	-11,74	-11,63	-5,13
Lupenon	17,62	22,50	34,38	52,51
Glochidone	3,38	5,09	10,11	11,48
Ursolik asit	22,60	26,01	27,36	31,14
Oleanolik asit	34,61	34,31	34,23	37,35
α -TOC	78,88	80,55	83,47	88,18
BHT	68,83	75,50	82,94	85,61
BHA	79,30	80,64	84,54	85,79



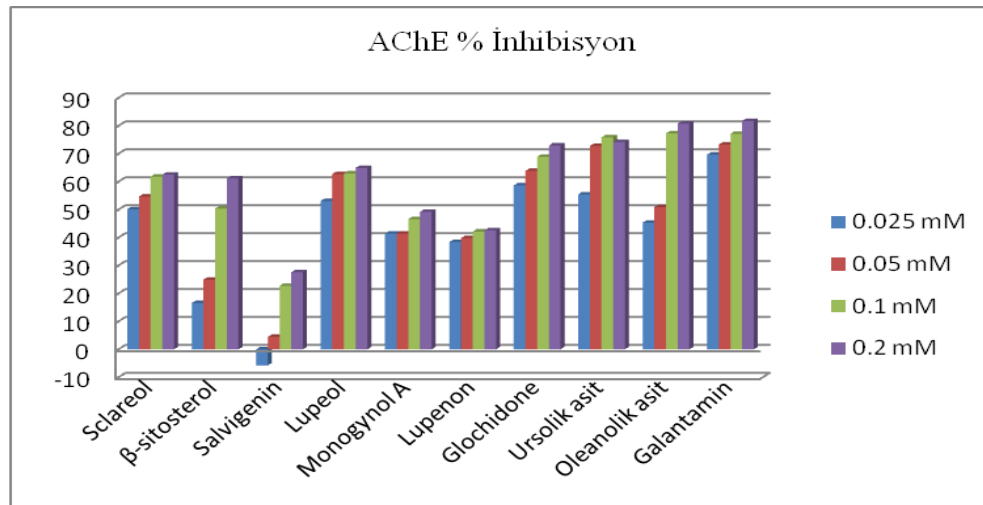
Şekil 5.16 : Saf maddelerin β -karoten renk açılım yöntemi ile lipid Peroksidasyon % inhibisyon aktiviteleri

Bu yöntemlerde 10, 25, 50, 100 μ g/mL konsantrasyonlarda 3 paralel çalışılma yapıldı. α -TOC, BHA ve BHT standart olarak kullanıldı. Bileşikler genelde yüksek konsantrasyonlarda daha iyi aktivite göstermiş, özellikle triterpen bileşikler oleanolik asit, ursolik asit, lupenon aktif bulunmuşlardır.

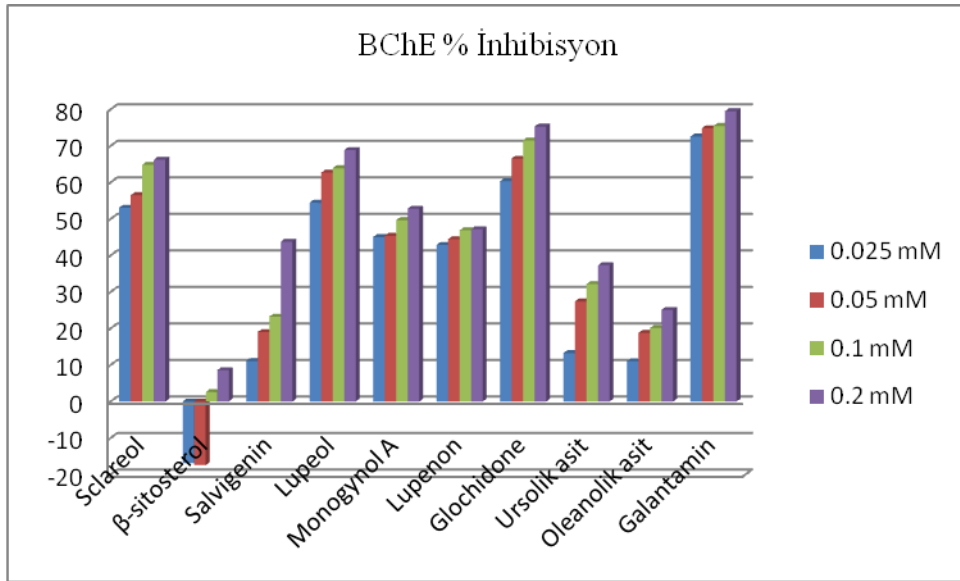
5.5.3 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Çizelge 5.12 : İzole saf maddelerin antikolinesteraz % inhibisyon aktivitelerinin sonuçları

	AChE				BChE			
	Konsantrasyon (μM)							
Saf Maddeler	25	50	100	200	25	50	100	200
Sclareol	50,13	54,72	61,81	62,49	53,1	56,54	64,85	66,23
β-sitosterol	16,55	24,92	50,39	61,16	-16,88	-17,41	2,59	8,61
Salvigenin	-5,77	4,47	22,72	27,61	11,09	19,04	23,25	43,79
Lupeol	53,07	62,69	62,94	64,93	54,45	62,7	63,91	68,89
Monogynol A	41,4	41,43	46,62	49,22	45,05	45,4	49,7	52,81
Lupenon	38,37	39,81	42,14	42,61	42,88	44,49	46,91	47,18
Glochidone	58,7	63,89	68,92	72,94	60,35	66,53	71,53	75,32
Ursolik asit	55,43	72,8	75,87	74,22	13,29	27,42	32,21	37,35
Oleanolik asit	45,32	50,86	77,26	80,81	11,02	18,8	20,16	25,11
Galantamin	69,69	73,29	77,13	81,72	72,59	74,86	75,49	79,54



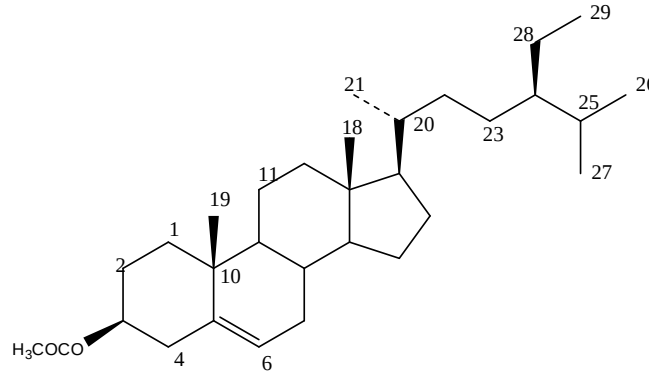
Şekil 5.17: İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu



Şekil 5.18: İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu

5.6 Yarı Sentetik β -sitosterol Türevlerinin Deneysel Bulguları ve Yapı Tayinleri

5.6.1 3-asetil- β -sitosterol Bileşiği



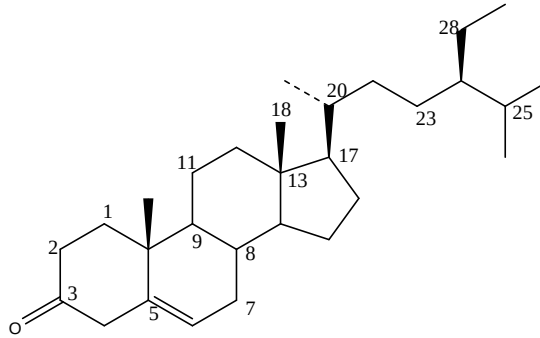
Şekil 5.19 : 3-asetil- β -sitosterol Bileşiği

Reaksiyon %97 verimle gerçekleşerek beyaz katı toz halinde ürün elde edildi. ^1H -NMR spektrumunda (CDCl_3 , 400 MHz) (EK C.1, Şekil C.1) pikler; δ ; 5.3 (1H, *d*, H-6), 4.54 (1H, *m*, H-3), 1.96 (1H, *s*, OCH_3 -metili), 0.95 (3H, *s*, H-19), 0.85 (3H, *t*, H-9), 0.85 (3H, *d*, $J=7.5$ Hz, H-21), 0.78 (3H, *d*, $J=6.91$ Hz, H-26), 0.74 (3H, *d*, $J=6.8$ Hz, H-27), 0.62 (3H, *s*, H-18).

β -sitosterol bileşiğini asetilleyerek elde ettiğimiz ürünün IR spektrumunda da 1729.70 cm^{-1} de izlenen bant asetil ürününün karboksil grubunun gerilim bandına, 1256 cm^{-1} deki ise yine asetil grubundaki C-O bandına ait olup asetil oluşumuna

işaret etmişlerdir. Ürünün ^1H - NMR spektrumu incelendiğinde β -sitosterol ile çok büyük benzerlik gösterdiği, fakat sitosteroldeki 3.5 ppm de izlenen OH'a komşu proton sinyalinin kaybolarak 4.54 ppm' e kayması ve asetile ait metil sinyalinin 1.96 ppm'de 3H lık singlet piki olarak izlenmesi asetilleme ürününün oluştuğunun ispatıdır.

5.6.2 3-okso- β -sitosterol Bileşiği

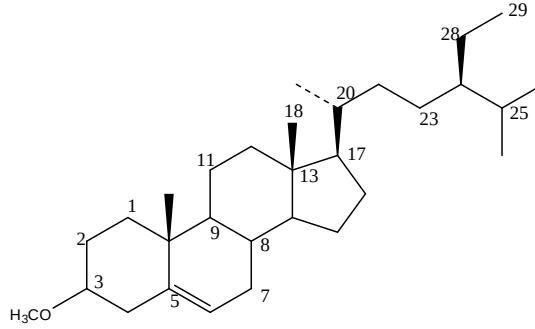


Şekil 5.20 : 3-okso- β -sitosterol bileşiği

Reaksiyon %75 verimle gerçekleşerek sarımtırak beyaz renkte katı ürün oluştu. ^1H - NMR spektrumunda (CDCl_3 , 400 MHz) (EK C.1, Şekil C.1) pikler; δ ; 5.3 (1H,d, H-6), 1.18 (1H,s, H-4), 0.94 (3H, s, H-19), 0.77 (3H, s, J=7Hz, H-29), 0.76 (3H, d, J=6.8 Hz, H-26), 0.74 (3H, d, J=6.8Hz, H-27), 0.68 (3H, s, H-18) şeklindedir.

β -sitosterol bileşiğini yükseltgeyerek elde ettiğimiz ürünün proton NMR'ı incelendiğinde NMR sinyallerinin çoğunun başlangıç maddesi olan β -sitosterol ile benzerlik gösterdiği, fakat 3.5 civarında izlenen pikin, OH'ın yükseltgenip karboksile dönüşmesinden dolayı yok olduğu gözlenmiştir. Ayrıca IR spektrumunda 3400'lerdeki OH pikinin yok olup, 1739'daki keto grubundan meydana gelen da karbonil sinyalinin izlenmesi bileşiğin C-3'den keto dönüştüğünün ispatıdır.

5.6.3 β -sitosterol 3-metil eter Bileşiğı



Şekil 5.21 : β -sitosterol-3-metil eter bileşiğı

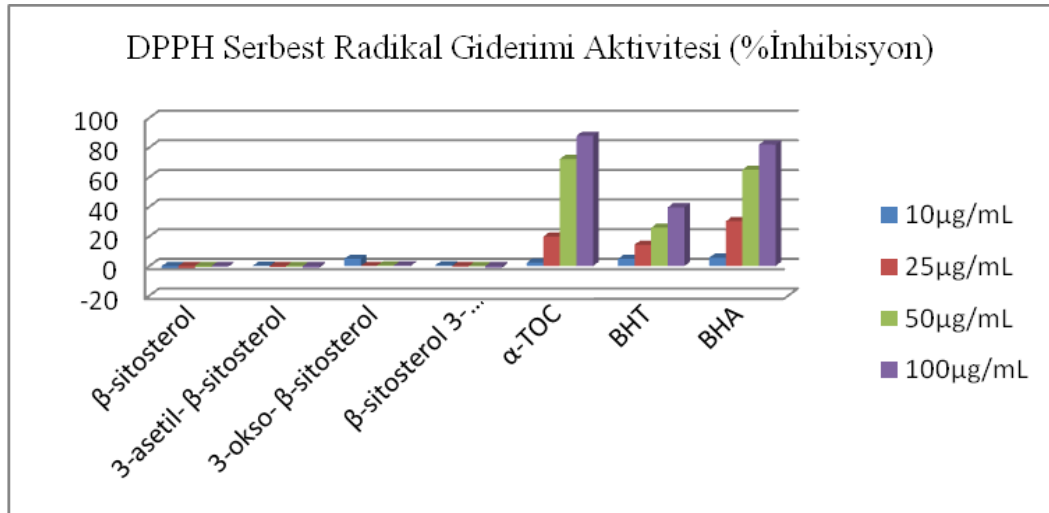
Reaksiyon %75 verimle gerçekleşerek sarı renkte katı kristaller oluştu. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (CDCl_3 , 600 MHz) (EK L.1, Şekil L.1) pikler; δ ; 5.36 (1H, *d*, *J*= 5.56, H-6), 3.36 (3H, *s*, CH_3O), 3.03 (1H, pentet, H-3), şeklindedir. 3.36 Ppm'deki sinyal, oluşan metoksi grubuna aittir ve 3.03 ppm'deki pentet sinyali ise komşusunda 4 proton bulunan H-3 protonuna aittir. Alınan IR spektrumunda OH grubunun metoksiye dönüşmesinden dolayı 3400 cm^{-1} deki bant yok olup, 1193 cm^{-1} de ise metoksi bandının izlenmesi 3-keto sitosterol bileşiğinin sentezlendiğini doğrulamıştır.

5.7 Yarı Sentetik β -sitosterol Türevlerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları

5.7.1 DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 5.13: Yarı sentetik saf bileşiklerin DPPH radikal giderim aktivitesi

DPPH Serbest Radikal Giderim % İnhibisyonu Aktivitesi				
Yarısentetik Saf Maddeler	10 $\mu\text{g/mL}$	25 $\mu\text{g/mL}$	50 $\mu\text{g/mL}$	100 $\mu\text{g/mL}$
β -sitosterol	-1,78	-1,29	-0,63	-0,49
3-asetil- β -sitosterol	0,33	-0,64	-0,49	-0,98
3-okso- β -sitosterol	4,83	0,06	0,53	0,49
β -sitosterol 3-metil eter	0,57	-0,28	-0,12	-1,02
α -TOC	2,35	19,90	72,29	87,93
BHT	4,84	14,42	25,89	39,68
BHA	5,69	30,25	65,00	82,02

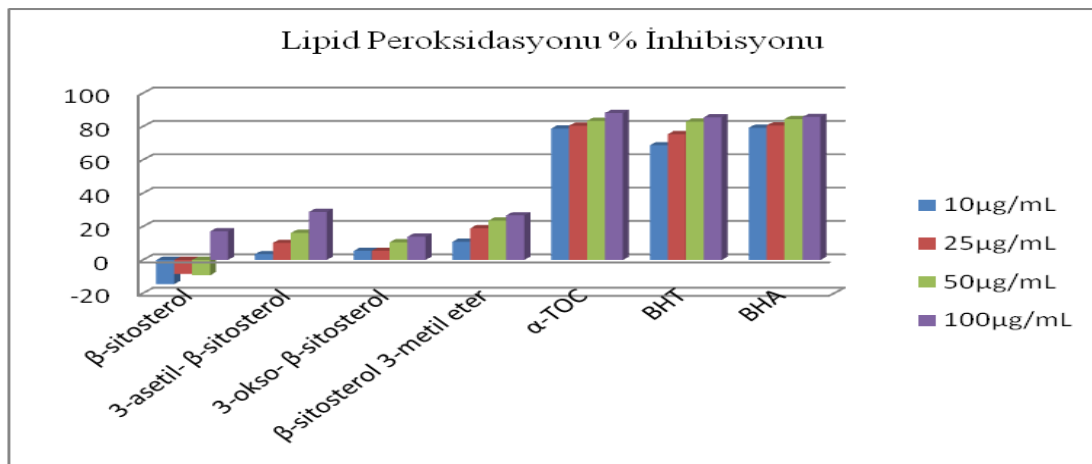


Şekil 5.22 : Yarı sentetik saf bileşiklerin DPPH radikal giderim aktivitesi

5.7.2 β-Karoten-Linoleik Asit Toplam Antioksidan Aktivitesi Sonuçları

Çizelge 5.14 : Yarı sentetik saf maddelerin β-Karoten-Linoleik Asit Toplam Antioksidan (% inhibisyon) aktivitesi sonuçları

Lipid Peroksidasyon% İnhibisyonu				
Yarı Sentetik Saf Maddeler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
β-sitosterol	-14,54	-8,43	-9,19	17,15
3-asetil- β-sitosterol	3,47	10,23	16,21	28,80
3-okso- β-sitosterol	5,46	5,48	10,62	13,92
β-sitosterol 3-metil eter	10,95	19,01	23,59	26,76
α-TOC	78,88	80,55	83,47	88,18
BHT	68,83	75,50	82,94	85,61
BHA	79,30	80,64	84,54	85,79

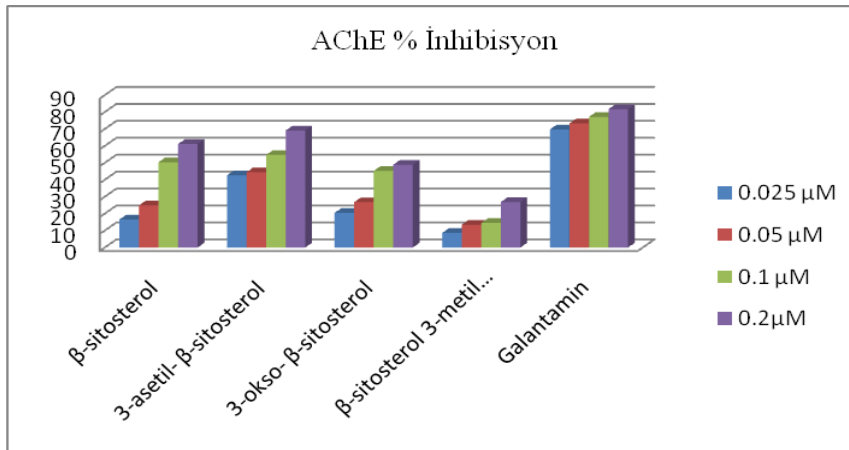


Şekil 5.23 : Yarı sentetik saf bileşiklerin β-Karoten-Linoleik Asit Toplam Antioksidan (% inhibisyon) aktivitesi sonuçları

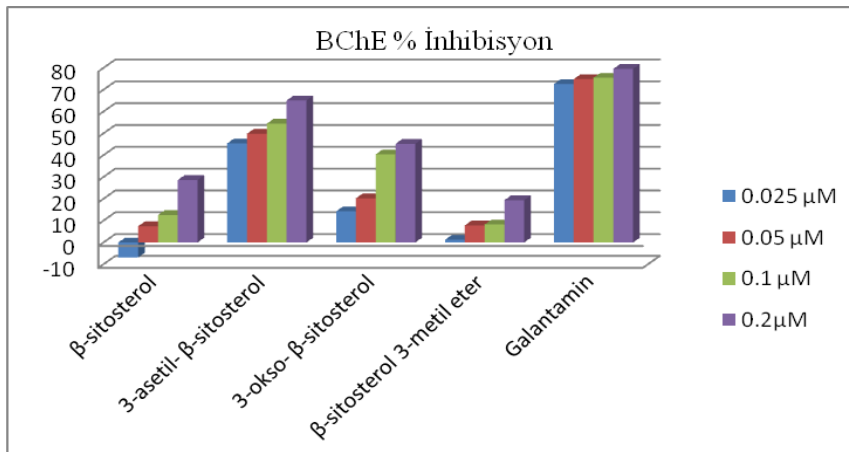
5.7.3 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Çizelge 5.15 : Yarı sentetik β -sitosterol türevlerinin antikolinesteraz % inhibisyon aktivite sonuçları

Yarı sentetik saf bileşikler	AChE				BChE			
	Konsantrasyon (µM)							
	25	50	100	200	25	50	100	200
<i>β</i> -sitosterol	16,55	24,92	50,39	61,16	-6,88	7,41	12,59	28,61
3-asetil- <i>β</i> -sitosterol	42,65	44,5	54,7	69,09	45,4	49,82	54,45	65,06
3-okso- <i>β</i> -sitosterol	20,45	26,79	45,3	48,93	14,25	20,23	40,38	45,21
<i>β</i> -sitosterol 3-metil eter	8,62	13,46	14,58	26,9	1,2	7,8	8,22	19,36
Galantamin	69,69	73,29	77,13	81,72	72,59	74,86	75,49	79,54



Şekil 5.24 : Yarı sentetik saf maddelerin AChE % İnhibisyonu



Şekil 5.25 : Yarı sentetik saf maddelerin BChE % İnhibisyonu

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Türkiye’de yetişen endemik iki *Salvia* türünden (*Salvia chrysophylla* Stapf & *Salvia trichoclada* Benth) hazırlanan ekstrelerin sekonder metabolitlerinin izolasyonu, bazı yarı sentetik türevlerinin sentezi ve bu bileşiklerin antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışılan bitkilerden *Salvia chrysophylla* endemik ve çok dar bir alanda yetişirken, diğer bitki *Salvia trichoclada* geniş bir alanda yetişmektedir.

Bugüne kadar *Salvia* türlerinin sekonder metabolitleri, uçucu yağları ve bazı aktiviteleri üzerine yapılan çalışmalar sonucunda *Salvia* türlerinin sekonder metabolitlerinin başlıca terpenik bileşikler ve bazı flavonoidler ile diğer fenolik bileşikler olduğu anlaşılmıştır. *Salvia* türünün ait olduğu Lamiaceae(Labiatae) familyasına ait sekonder metabolitlerle yapılan aktivite çalışmaları sonucunda bu familyaya ait birçok sekonder metabolitin antioksidan aktivite başta olmak üzere antikolinesteraz ve antimikrobial aktivitelere sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda çalışmalarımız saf bileşiklerin izole edilmesinin ardından antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin tayin edilmesi sürecini takip etmiştir.

İzolasyon işlemine ekstrelerin kolon kromatografisi ile fraksiyonlandırılması ile başladıktan sonra, fraksiyonların küçük kolonlarla ve/veya preparatif ince tabaka kromatografisiyle saflaştırılması ile devam edildi. Elde edilen bileşiklerin saflığı öncelikle ince tabaka kromatografisi ile kontrol edildikten sonra spektral analizleri NMR, MS ve IR spektroskopik teknikler kullanılarak yapıldı. Yapılan çalışmalar sonucunda her iki bitkiden toplam 9 farklı bileşik izole edilmiştir. *Salvia chrysophylla* bitkisinden beş saf bileşik (sclareol, salvigenin, β -sitosterol, oleanolik asit, ursolik asit) izole edilirken, *Salvia trichoclada* bitkisinden ise 3 ü aynı olmak üzere sekiz saf bileşik (lupeol, monogynol A, lupenon, glochidone, β -sitosterol, oleanolik asit, ursolik asit) elde edildi. İzole edilen bileşiklerden hemen hepsi daha önce diğer bazı *Salvia* türlerinden elde edilmiş olmasına rağmen sadece triterpenoit yapısındaki glochidon ilk kez *Salvia* türlerinden izole edilmiştir.

Hazırlanan diklorometan ve metanol ekstralarının ve bu ekstralardan elde edilen saf bileşiklerin antioksidan aktiviteleri DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ve β -karoten-linoleik asit yöntemi metodu ile tayin edilmiştir. İzole edilen bileşikler DPPH yöntemi ile genelde düşük antioksidan aktivite gösterirken, β -karoten-linoleik asit toplam antioksidan metodu ile yapılan ölçümlerde genelde orta dereceli aktivite göstermiştir. İzole edilen saf bileşiklerin antikolinesteraz aktivitesine baktığımızda genelde hepsinin orta/yüksek olduğunu gördük. En düşük AChE ve BChE inhibisyonunu salvigenin bileşiği verirken, en yüksek AChE ve BChE inhibisyonunu 0.2 μ M'da glochidone bileşiği vermiştir ki bu standart madde galantamin ile hemen hemen aynıdır. Hazırlanan β -sitosterol türevlerinin de izole edilen saf bileşikler gibi düşük DPPH aktivite gösterirken antikolinesteraz aktivite sonuçlarının β -sitosterol'den daha iyi olduğu görülmüştür. Hatta asetil türevinin standarda yakın değerlerde aktivite göstermesi potansiyel bir anti-alzheimer ilaç etkin maddesi olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak *Salvia*'lardan elde edilen bileşikler genelde yüksek antioksidan ve antikolinesteraz aktivite göstermesinden dolayı ilaç tasarımına gidilebileceğinden aktif türevlerinin sentezlenmesi önem kazanmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Greuter, W., 1988. *International Code of Botanical Nomenclature*, Koetz Scientific Books, Konigstein, Germany.
- [2] Hedge, I.C., 1992. A global survey of the Lamiaceae, *Advencis in Labiatea Science*, 7-18 .
- [3] Hedge, I.C., 1986. *Lamiaceae of South-West Asia: diversity, distribution and endemism*, **89B.**, 23-25, Proceeding of the Royal society, Edingburgh.
- [4] Chadeaud, M., Emberger, L., 1960. *Traite De Botanique (Systematique)*, Tome II, 832-833.
- [5] Baytop, A., 1996. *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul.
- [6] Davis P., H., 1982. *Flora of Turkey an The East Eagen Islands*, 7, 335-346, Edinburg University Pres, Edinburg.
- [7] Hatipoğlu, S., 2010. *Salvia adenophylla* ve *Salvia verticillata subsp. amasiaca* Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin Aktivite Odaklı İzolasyonu ve Yarı Sentetik Türevlerinin Anrioksidan ve Antikolinesteraz aktivitelerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*. İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- [8] Başer, K., H., C., Kırimer N., 2006. Essential Oils of Lamiaceae Plants of Turkey, *Acta Horticulturae*, **723**, 163-171.
- [9] Grieve, M., 1984. *A Modern Herbal*, Savvas Publishing, Eastern Adelaide, Australia.
- [10] Topcu, G., Tan, N., Ulubelen, A., Sun, D., & Watson, W. H., 1995. Terpenoids and flavonoids from the aerial parts of *Salvia candidissima*, *Phytochemistry*, **40**, 501-504.
- [11] Lu, Y., & Foo, L. Y., 2002. Polyphenolics of *Salvia* – a review. *Phytochemistry*, **59**, 117–140.
- [12] Topcu, G., & Ulubelen, A., 2007. Structure elucidation of organic compounds from natural sources using 1D and 2D NMR techniques, *Journal of Molecular Structure*, 834–836, 57–73.
- [13] Ulubelen, A., & Topcu, G., 1992. Abietane diterpenoids from *Salvia pomifera*, *Phytochemistry*, **31**, 3949–3951.
- [14] Ulubelen, A., Topcu, G., Sönmez, U., Choudhary, M. I., & Atta-ur-Rahman, 1995. Abietane diterpenes from *Salvia napifolia*. *Phytochemistry*, **40**, 861.
- [15] Ulubelen, A., Topcu, G., & Tan, N., 1992. Diterpenoids from *Salvia candidissima*, *Tetrahedron Letters*, **33**, 7241–7244.

- [16] Topcu, G., 2006. Bioactive Triterpenoids from *Salvia* Species, *Journal of Natural Products*, **69**, 482–487.
- [17] Arslan, I., Celik, A., 2008. Chemical composition and antistaphylococcal activity of an endemic *Salvia chrysophylla* Stapf naturally distributed Denizli province (Turkey) and its vicinity, *Pakistan Journal of Botany*, **40**, 1799–1804.
- [18] Kahraman A., Celep F., Dogan M., 2010. Anatomy, trichome morphology and palynology of *Salvia chrysophylla* Stapf (Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, **76**, 187–195.
- [19] Ayensu, Edward S., 1981. *Medicinal Plants of the West Indies*. Algonac, Michigan: Reference Publications Inc.
- [20] British Herbal Pharmacopoeia, 1983. B.H.M.A.: ISBN 0–903032–07–4.
- [21] Evans, W.C., 1989. *Trease and Evans, Pharmacognosy*, 13th edition, Balliere Tindall ISBN 0–7020–1357–9.
- [22] Stuart, M., 1986. *The Encyclopaedia of Herbs and Herbalism*. Orbis ISBN 0–85613–700–6. Talalaj, S. & Czechowicz, A.S.
- [23] Fluck, Hans., 1988. *Medicinal Plants*. W. Foulsham & Co. Ltd. ISBN 0–572–00996–8.
- [24] Phelps Brown, O., 1993. (A reprint of the long-lost classic). *The Complete Herbalist*. Newcastle. Publishing (Van Nuys, California). Originally published 1875. ISBN No. 0–87877–184–0.
- [25] Boyd, Eddie L., et al. 1984. *Home remedies and the black elderly*. Institute of Gerontology and College of Pharmacy, University of Michigan.
- [26] Back, P., 1987. *The Illustrated Herbal*, Hamlyn Publishers, Hong Kong.
- [27] Fluck, Hans., 1988. *Medicinal Plants* W. Foulsham & Co. Ltd. ISBN 0–572–00996–8.
- [28] Trattler, R., 1985. *Better Health through Natural Healing*, Thorsons Publishers. ISBN 0–7225–1382–8.
- [29] Valnet, J., 1986. *The Practice of Aromatherapy*, C.W. Daniel Co. Ltd. ISBN 0–85207–143–4.
- [30] Council of Scientific & Industrial Research, India, 1948–76. *The Wealth of India: Raw Material*, **9**. (Rh-So), New Deli: CSIR.
- [31] Lust, L., 1986. *The Herb Book*, 16th. impression, Bantam Publishing, New York, United States.
- [32] Onlooker., 1995. Sage against age, *The Pharmaceutical Journal*, **255**, 708.
- [33] Tabanca, N., Weerasooriya, A. D., Demirci, B., Baser, H. C., Wedge, D. E., Johnson, N., Khan, I. A., 2008. Biological activities and composition of essential oils from the plants grown in the medicinal plant garden at the national center for natural products research, *Planta Medica*, **74**, 360–360.
- [34] Anonymus, 1994. *Salviae folium* (Salbeiblaetter), Bundesanzeiger Nr. 90/1985, Bundesanzeiger Nr. 50/1990. In *Verffentliche Monographien*.

Bekanntmachung her die Zulassung und Registrierung von Arzneimitteln. Entwurf der Aufbereitungskommission für den humanmedizinischen Bereich, phytotherapeutische Therapie-richtung und Stoffgruppe (Kommission E), Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, 464, Berlin.

- [35] **Esmaili M., A., Sonboli A.**, 2010. Antioxidant, free radical scavenging activities of *Salvia brachyantha* and its protective effect against oxidative cardiac cell injury, *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 846-853.
- [36] **Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samoilik, I., Jovin, E.**, 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L. Lamiaceae) essential oils, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**, pp. 7879-7885.
- [37] **Ulubelen, A., Sönmez, U., Johansson, C.B.**, 1996. An abietane diterpen and two phenolics from *Salvia forskahlei*. *Phytochemistry*, **42(1)**, pp. 145-147.
- [38] **Kolak, U., Kobuche, A., Öztürk, M., Kabouche, Z., Topçu, G., Ulubelen, A.**, 2009. Antioxidant Diterpenoids from the Roots of *Salvia barrelieri*, *Phytochemical Analysis*, **20**, pp. 320-327.
- [39] **Ulubelen A., et al.**, 1997. Norditerpenoids and Diterpenoids from *Salvia multicaulis* with Antituberculous Activity, *Journal of Natural Products*, **60**, pp. 1275-1280.
- [40] **Liu, J., Shen H., M., Ong C., N.**, 2000. *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells, *Cancer Letters*, **153**, pp. 85-93.
- [41] **Xin-Jian W, Jian-Xing X.**, 2005. Salvianic acid A protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced cytotoxicity, *Neurosci Res*, **51**, pp. 129-138.
- [42] **Noori, S., et al.**, 2010. Sclareol modulates the Treg intra-tumoral infiltrated cell and inhibits tumor growth in vivo, *Cellular Immunology*, **263**, pp. 148-153.
- [43] **Hanson, R. J.**, "Tutorial Chemistry Texts, Natural Products: The Secondary Metabolites", *Royal Society of Chemistry*, 1.
- [44] **Thomson, R. H.**, 1993. *The Chemistry of Natural Products*, Second Edition, Chapman & Hall, Suffolk, 106.
- [45] **Mann, J., Davidson R. S., Hobbs J. B., Banthorpe, D. V., Harborne, J. B.**, 1994. *Natural Products*, First Edition, Pearson Education, London, 289.
- [46] **Topçu, G., Bodige, S.G., Gören, A.C., Kılıç, T., Yıldız, Y.K., Watson, W.H., CCDC**, 2001. *Private Communication*, 1078, Cambridge Crystallographic Data Centre.
- [47] **Boiteau, P., Pasich, B., Ratsimamanga, R. Les.**, 1969. Triterpenoides, *Gauthier-Villars*, 3.

- [48] Mann, J., Davidson R. S., Hobbs J. B., Banthorpe, D. V., Harborne, J. B., 1994. *Natural Products*, First Edition, 304, Pearson Education, London.
- [49] Thomson, R. H., 1993. *The Chemistry of Natural Products*, Second Edition, 3, 107, Cahpman& Hall, Suffolk..
- [50] Manitto, P., 1981. *Biosynthesis of natural products*, Ellis harwood Ltd., pp 255-262, Connecticut, United States.
- [51] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, Chapman&Hall, London.
- [52] Thomas, B.R. 1970. *Modern and fossil plant resins in Phytochemical Phylogeny* (ed. J.B. Harborne), pp. 59-80, Acedemic Press, London.
- [53] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, pp. 124-125, Chapman&Hall, London.
- [54] Thomson, R. H., 1993. *The Chemistry of Natural Products*, Second Edition, 124, Cahpman& Hall, Suffolk.
- [55] Ulubelen, A., Topçu, G., Tan, N., 1995. Diterpenods from *Salvia heldrichina*, *Phytochemistry*, **40**, pp. 1473-1475.
- [56] Thomson, R. H., 1993. *The Chemistry of Natural Products*, Second Edition, 125, Cahpman& Hall, Suffolk.
- [57] Rodriguez-Hahn, L., Martinez, G., Romo, J. 1973. Estructura del acido melisodorico, un diterpeno aislado ve *Salvia melissofora* Lag, *Rev. Latinoamer. Quim.*, **4**, pp. 93-100.
- [58] Thomson, R. H., 1993. *The Chemistry of Natural Products*, Second Edition, 129, Cahpman& Hall, Suffolk.
- [59] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 129, Chapman&Hall, London.
- [60] Brieskorn, C. H. and Schlumprecht, I., 1951. Constituents of *Salvia officinalis*, VIII. Isolation of ursolic acid. *Arch, der Pharm.* **284**, pp. 239–242.
- [61] Ulubelen, A. and Ayanoglu, E., 1976. Vergatic acid, a new pentacyclic triterpene from *Salvia virgata* *Phytochemistry*, **15**, pp. 309–311.
- [62] Ulubelen, A. and Topçu, G., 1984. Terpenoids from *Salvia pinnata*. *Phytochemistry*, **23**, pp. 133–134.
- [63] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 139, Chapman&Hall, London.
- [64] Mann, J., Davidson R. S., Hobbs J. B., Banthorpe, D. V., Harborne, J. B., 1994. *Natural Products*, First Edition, 331, Pearson Education, London.
- [65] Cram, D. J. and Hammond, G. S., 1964. *Organic Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, New York.

- [66] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 42, Third Edition, Chapman&Hall, London.
- [67] Oguz, A., 2008. Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri, *Yüksek Lisans Tezi*, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Tokat, Türkiye.
- [69] Mann, J., Davidson R. S., Hobbs J. B., Banthorpe, D. V., Harborne, J. B., 1994. Natural Products, First Edition, pp. 367-369, Pearson Education, London.
- [70] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 43, Chapman&Hall, London.
- [71] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 51, Chapman&Hall, London.
- [72] Boğa, M., 2005. Kumarin Türevi Yeni 14:4 Taç Eter Bileşiklerinin Sentezi ve Yapılarının Aydınlatılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Marmara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye.
- [73] El-Khatib, R. M., Nassr, L. A. E., 2007. Reactivity Trends of The Base Hydrolysis of Coumarin and Thiocoumarin an Binary Aqueous Methanol Mixtures at Different Temperature, *Spectrochimica Acta*, **67**, pp. 643-648.
- [74] Acar, J., 1998. *Fenolik Bileşikler ve Doğal Renk Maddeleri*, Gıda Kimyası, pp. 435-452, Hacettepe Üniversitesi yayınları, Ankara.
- [75] Guliyev, V.B., Harmandar, M., 1999. *Flavonoidler*, Bakanlar Matbaacılık, İstanbul.
- [76] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, Chapman&Hall, London.
- [77] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 67, Chapman&Hall, London.
- [78] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 74, Chapman&Hall, London.
- [79] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 78, Chapman&Hall, London.
- [79] Harborne J. B., 1988. *Phytochemical Methods, A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, Third Edition, 84, Chapman&Hall, London.
- [80] Bailey, J.A., Mansfield, J.W., 1982. *Phytoalexins*, Blackie, Glasgow.
- [81] Hostettmann, K., Wagner, H., 1977. *Phytochemistry*, **16**, 821.
- [82] Watkins, T.R., 1977. *Wine, Nutritional and Therapeutic Benefits*, American Chemical Society, Washington, DC.
- [83] Gorham, J., 1995. *The Biochemistry of the Stilbenoids*, Chapman&Hall, London.
- [84] Brent, J.A., Rumack, H.H., 1991. Role of Free Radicals in Toxic Hepatic Injury I. Free Radical Biochemistry, *Clinical Toxicology*, **31**, pp. 139-171.

- [85] Cadenas, E., and Davies, K. J. A., 2000. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, And Aging, *Free Radical Biology & Medicine*, **29**, pp. 222–230.
- [86] Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö. İ., 2003. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed extracts, *Food Chemistry*, **83**, pp. 371-382.
- [87] Çakar, B., 2010. *Ferulago idaea* ve *Ferulago trojana* Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin İzolasyonu, Antioksidan ve Antikolinestrez Aktivitelerinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [88] Halliwell, B., 1999. Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept. *Nutrition Reviews*, **57**, pp. 104-113.
- [89] Halliwell, B., 1994. Free radicals and Antioxidants: a personal view. *Nutrition reviews*, **57**, pp. 253-265.
- [90] Simic, M.G., 1998. Mechanisims of inhibition of free-radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.* **202**, pp. 377-386.
- [91] Shahidi, K., Wanasundara, P.K.J.P.D., 1992. Phenolic Antioxidants. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, pp. 67-103.
- [92] Krinsky, N. I., 1989. Antioxidant function of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **7**, pp. 617–635.
- [93] Halliwell, B., Gutteridge J.M.C., 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, 543, Clarendon Press, Oxford.
- [94] Cosquni, M., Torsoni, M.A., Stoppa, G.R., Ogo, S.H., 2003. T-BOOH-induced oxidative damage in sickle red blood cells and the role of flavonoids, *Biomed. Pharmacoter*, **57**, pp. 124-129.
- [95] Reische, D. W., Lillard, D. A., Eitenmiller, R. R., Akoh, C. C., Min, D. B., 2002. *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, Marcel Dekker Inc., pp. 489-516, New York.
- [96] Karaman, Y., 2002. Alzheimer Hastalığı ve Diğer Demanslar, pp. 90-210, Kayseri.
- [97] Akalın, H., Ü., 2003. Alzheimer Hastalarının Lenfositlerinde rRNA İfadelenmesinin Araştırılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri.
- [98] Payao, S.L.M., Smith., M.A.C., Kormon-Borlotta, M.,H., Toniolo, J., 1994. Investigation of the Nucleolar Organizer regions in Alzheimer's Disease, *Gerontology*, **40**, pp. 13-17.
- [99] Yamantürk, P., 2000. Alzheimer Hastalığı, Sendrom, **12**, pp. 72-81.
- [100] John, B., Standridge, M.,D., 2004. Pharmacotherapeutic Approches to the Treatment of Alzheimer's Disease, *Clinical Therapeutics*, **26**, 5.
- [101] Zheng, WH, Bastianetto S, Mennicken F, et al., 2002. Amyloid beta peptide induces tau phosphorylation and loss of cholinergic neurons in rat primary septal cultures, *Neuroscience*. **115**, 201–211.

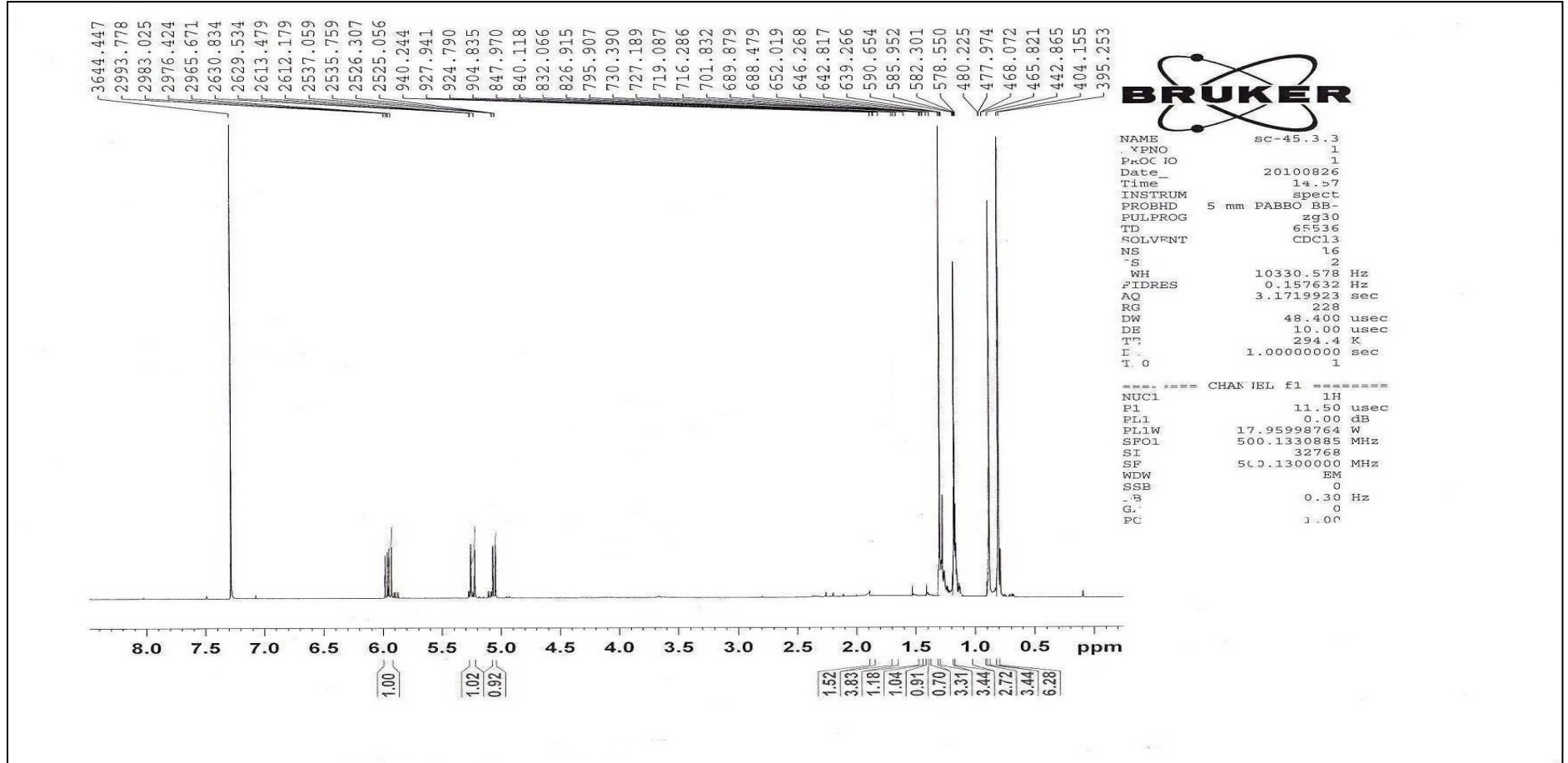
- [102] Mann, D. M., 1989. The pathogenesis and progression of the pathological changes of Alzheimer's disease, *Ann Med*, **21**, 133–136.
- [103] Mohs RC, Doody RS, Morris JC, et al, for the “312” Study Group., 2001. A 1-year, placebo-controlled preservation of function survival study of donepezil in AD patients [published correction appears in *Neurology*, *Neurology*, **57**, 481–488.
- [104] Raskind MA, Peskind ER, Truyen L, et al., 2004. The cognitive benefits of galantamine are sustained for at least 36 months: A long-term extension trial, *Arch Neurol.*, **61**, 252–256.
- [105] Giacobini, E., 2002. Long-term stabilizing effect of cholinesterase inhibitors in the therapy of Alzheimer's disease, *J Neural Transm Suppl.* **62**, pp. 181–187.
- [106] Rees, TM., Brimijoin, S., 2003. The role of acetylcholinesterase in the pathogenesis of Alzheimer's disease, *Drugs Today (Barc).* **39**, 75–83.
- [107] Demans Dergisi 2002: 2: 69-73 Appleyard ME, 1992 Trends Neurosci, **15**: 485-490.
- [108] Hartman, R. E., 2010. Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology. *Taylor & Francis Group, LLC*, chapter 16.
- [109] Rees, T, Hammond, P.I, Soreq, H., et al., 2003. Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex. *Neurobiol Aging.* **24**, pp. 777–787.
- [110] Hu, W., Gray, N.W., Brimijoin, S., 2003. Amyloid-beta increases acetylcholinesterase expression in neuroblastoma cells by reducing enzyme degradation. *J Neuroche.* **86**, pp. 470–478.
- [111] Simon, L., 2001. Alzheimer Hastlığında Erken Tanı ve Tedavi. *Novartis*, İstanbul, pp. 1-74.
- [112] Daniel, S. A. et al. 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategie, *Neurobiology*, **68** , pp. 209–245.
- [113] Lanari, A., et al. 2006. Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, **127**, pp. 158–165.
- [114] Piazzzi, L., Cavalli, A., Colizzi, F., Belluti, F., Bartolini, M., Mancini, F., Recanatini, M., Andrisano, V. and Rampa, A., 2008. Multi-target-directed coumarin derivatives: hAChE and BACE1 inhibitors as potential anti-Alzheimer compounds, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **8**, pp. 423–426.
- [115] Orhan, İ., Kartal, M., Naz, Q., Ejaz, A., Yilmaz, G., Kan, Y., Konuklugil, B., Şener, B., Choudhary, M. I., 2007. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species, *Food Chemistry*, **103**, pp. 1247–1254.

- [116] Singleton, V. L., Rossi, J. A., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolibdic-phosphotungstic Acid Reagents, *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**, pp. 144-158.
- [117] Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R. M., 1999. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent, *Methods in Enzymology*, **299**, pp. 152-178.
- [118] Öztürk, M., Aydoğmuş-Öztürk, F., Duru, M. E., Topçu, G., 2007. Antioxidant Activity of Stem and Root Extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An Edible Medicinal Plant, *Food Chem*, **103**, pp. 623-630.
- [119] Topçu, G., Ay, M., Bilici, A., Sarıkürkcü, C., Öztürk, M., Ulubelen, A., 2007, A New Flavone From Antioxidant Extracts of *Pistacia terebinthus*, *Food Chem*, **103**(3), pp. 816-822.
- [120] Sanchez, M. C., Larrauri, J. A., Saura, C. F. A., 1998. Procedure to Measure The Antiradical Efficiency of Polyphenols, *Journal of The Science of Food and Agriculture*, **76**, pp. 270-276.
- [121] Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Van Beek, T. A., Linssen, P. H., 1998. Antioxidant Activity of Extracts Obtained by Different Isolation Procedures From Some Aromatic Herbs Grown in Lithuania, *J Sci Food Agric*, **77**, pp. 140-146.
- [122] Cheung, L. M., Cheung, P. C. K., Ooi, V. E. C., 2003. Antioxidant Activity and Total Phenolics of Edible Mushroom Extracts, *Food Chem*, **81**, pp. 249-255.
- [123] Ellman et al, *Biochemistry and Pharmacology*, **7**, pp. 88-95.
- [124] Kwon, T. H., Lee, B., Chung, H. S., Kim, D. H. and Lee, S. Y., 2009. Synthesis and NO Production Inhibitory Activities of Ursolic acid and Oleanolic acid Derivatives, *Bull Korean Chem Soc*, **30**(1), pp. 119-123
- [125] Ulubelen, A., Topçu, G., Eriş, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S., Bozok-Johansson, C., 1994. Terpenoids from *Salvia sclarea*, *Phytochemistry*, **36**, pp. 971- 974.
- [126] Topçu, G., Ertas, A., Kolak, U., Öztürk, M., Ulubelen, A., 2007. Antioxidant activity tests on novel triterpenoids from *Salvia macrochlamys*, *Arkivoc*, **7**, pp. 195-208.
- [127] Hisham, A., Kumar, J.G., Fujimoto, Y., Hara, N., 1995. Salacianone and Salacianol, Two Triterpenes from *Salacia Beddomei*, *Phytochemistry*, **40**, pp. 1227-1231.
- [128] Tanaka, R., Matsunaga S., 1988. Triterpene Dienols and Other Constituents from the Bark of *Phyllanthus Flexuosus*, *Phytochemistry*, **27**, 2273.

EKLER

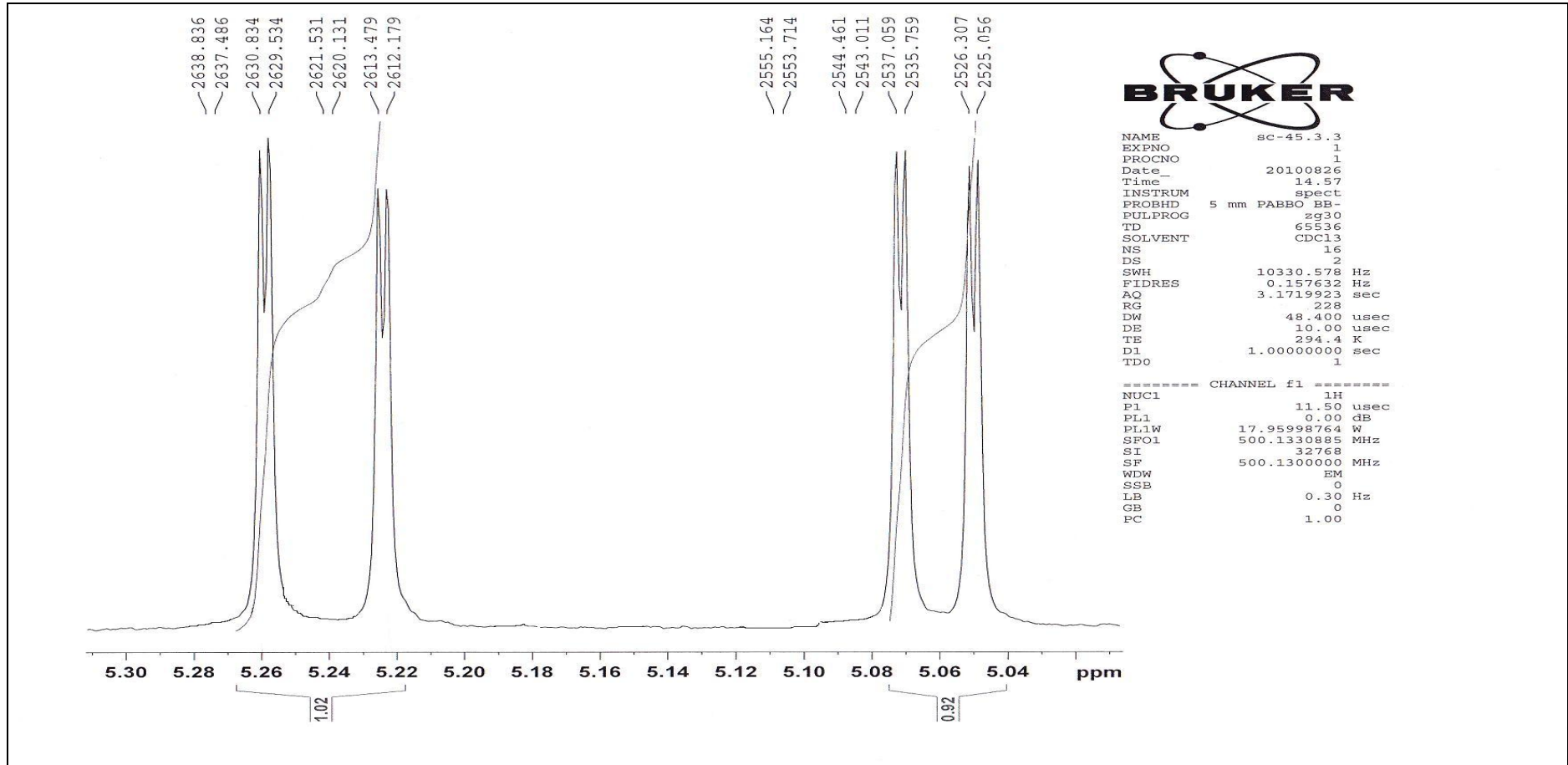
- EK A.1 :** Sclareol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK A.2 : Sclareol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (olefinik bölge)
EK A.3 : Sclareol bileşiğinin ^{13}C -NMR(APT) spektrumu
EK B.1 : Salvigenin bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK C.1 : β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK C.2 : β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK C.3 : β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu
EK D.1 : Lupeol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK D.2 : Lupeol bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu
EK D.3 : Lupeol bileşiğinin ^1H - ^1H COSY spektrumu
EK E.1 : Lupenon bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK E.2 : Lupenon bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu
EK E.3 : Lupenon bileşiğinin ^1H - ^1H COSY spektrumu
EK E.4 : Lupenon bileşiğinin MS spektrumu
EK F.1 : Monogynol A bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK F.2 : Monogynol A bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (metil bölgesi)
EK F.3 : Monogynol A bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu
EK G.1 : Glochidone bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK G.2 : Glochidone bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK H.1 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK H.2 : Oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu
EK I.1 : Ursolik asit bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK I.2 : Ursolik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu
EK J.1 : 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK J.2 : 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (alifatik bölge)
EK J.3 : 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu
EK K.1 : 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK K.2 : 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK K.3 : 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu
EK L.1 : β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK L.2 : β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu
EK L.3 : β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin IR spektrumu

EK A.1



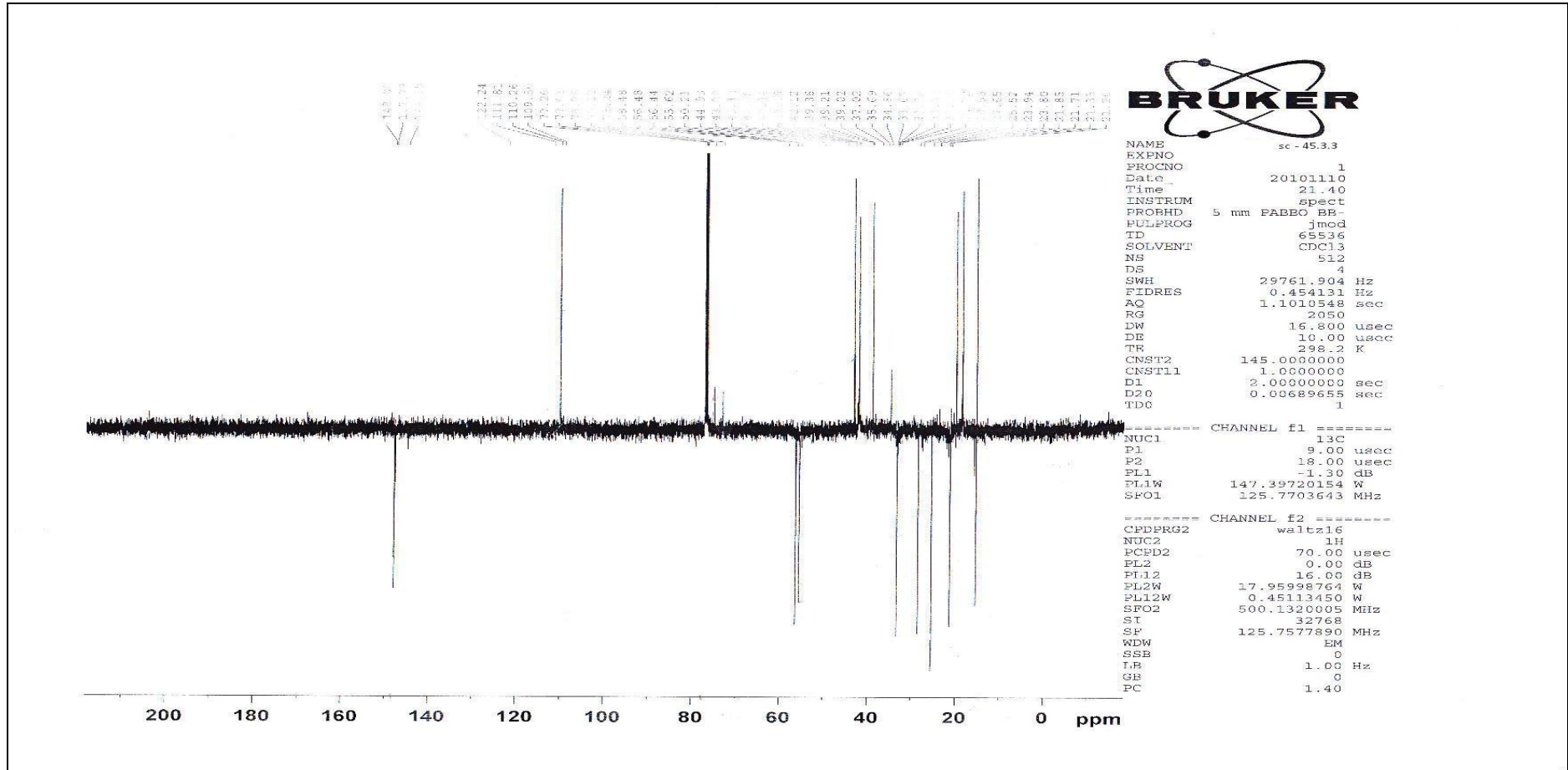
Şekil A.1 : Sclareol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK A.2



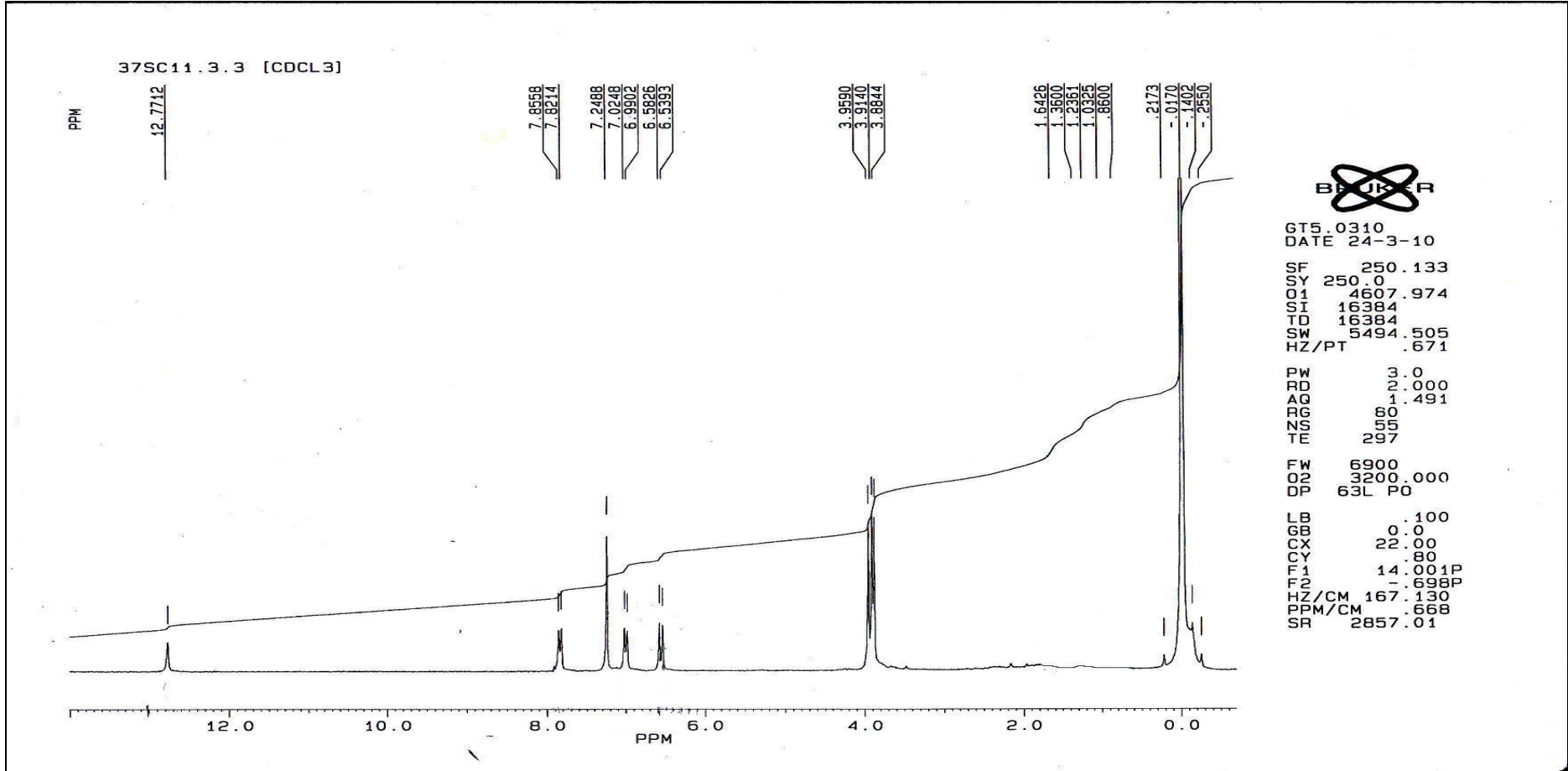
Şekil A.2 : Sclareol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (olefinik bölge)

EK A.3



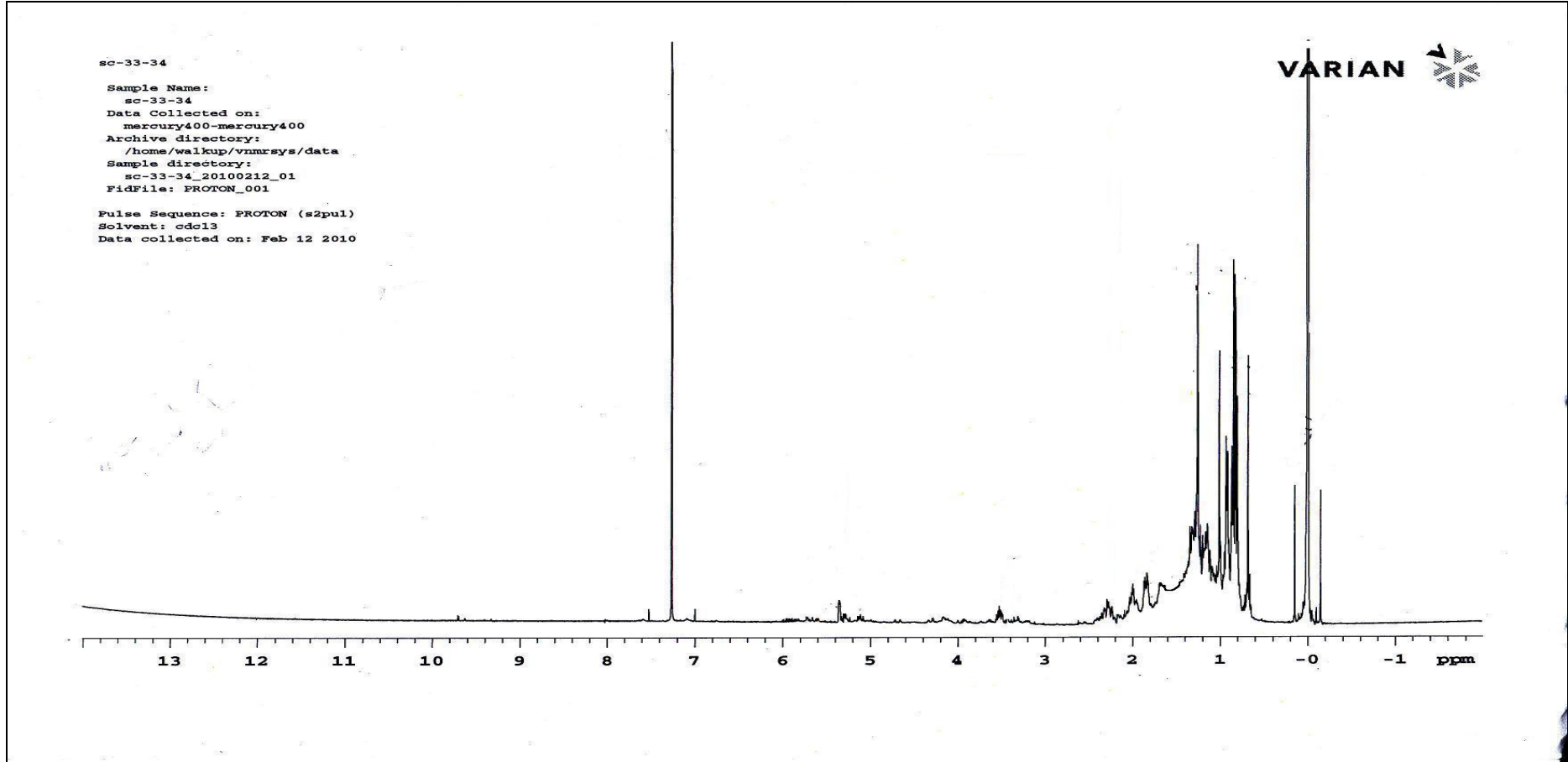
Şekil A.3 : Sclareol bileşiğinin ¹³C-NMR(APT) spektrumu

EK B.1



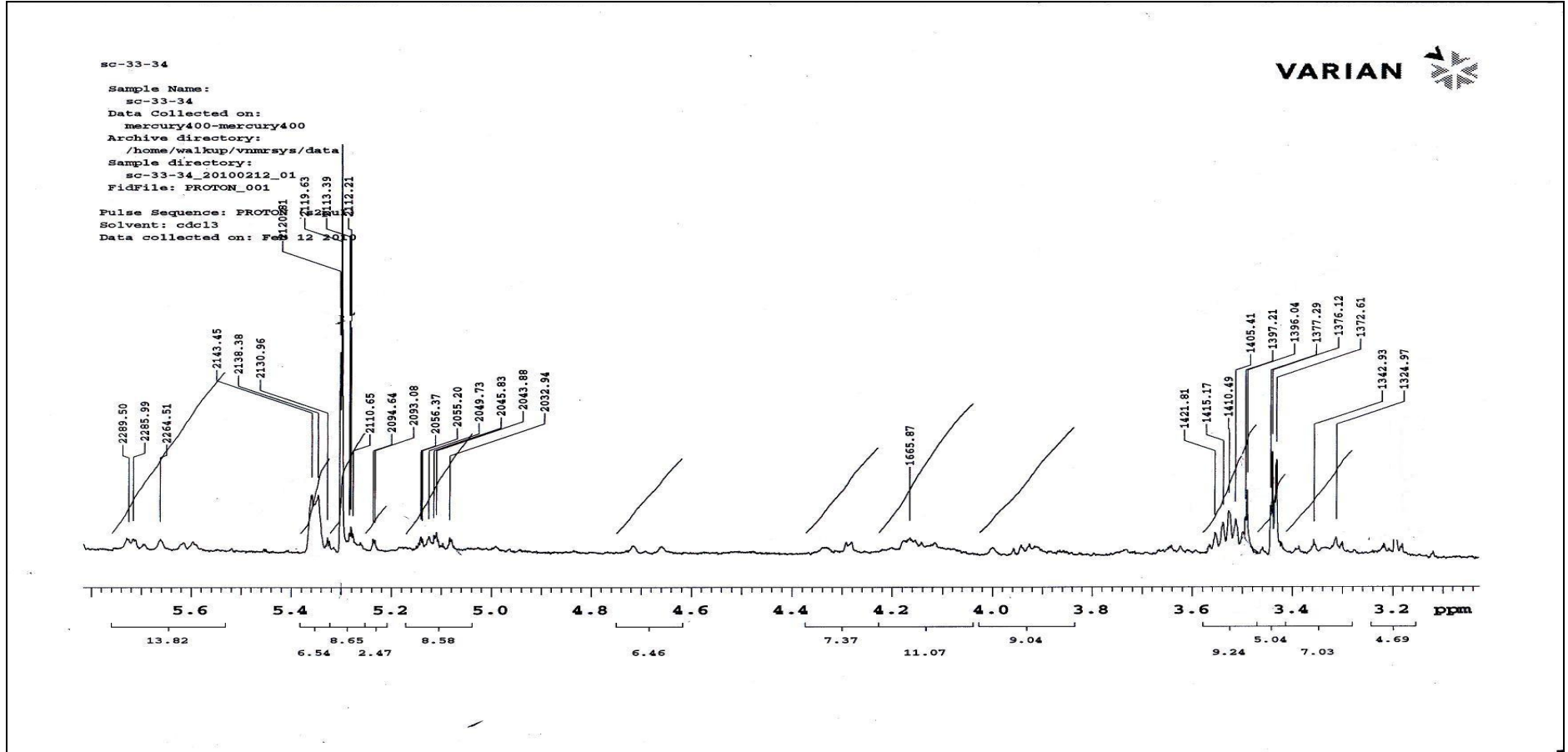
Şekil B.1 : Salvigenin bileşiğinin ¹H -NMR spektrumu

EK C.1



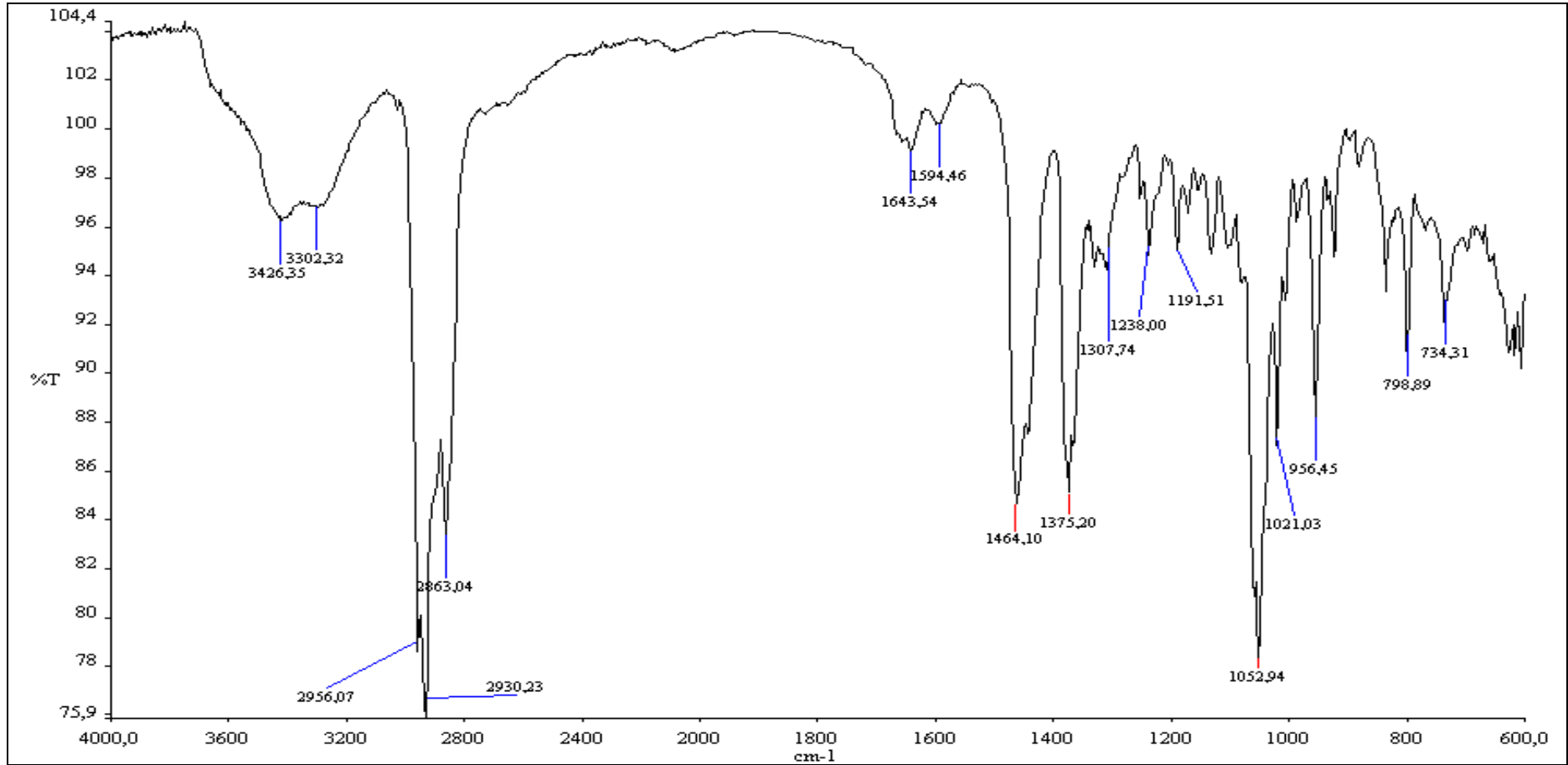
Şekil C.1 : β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK C.2



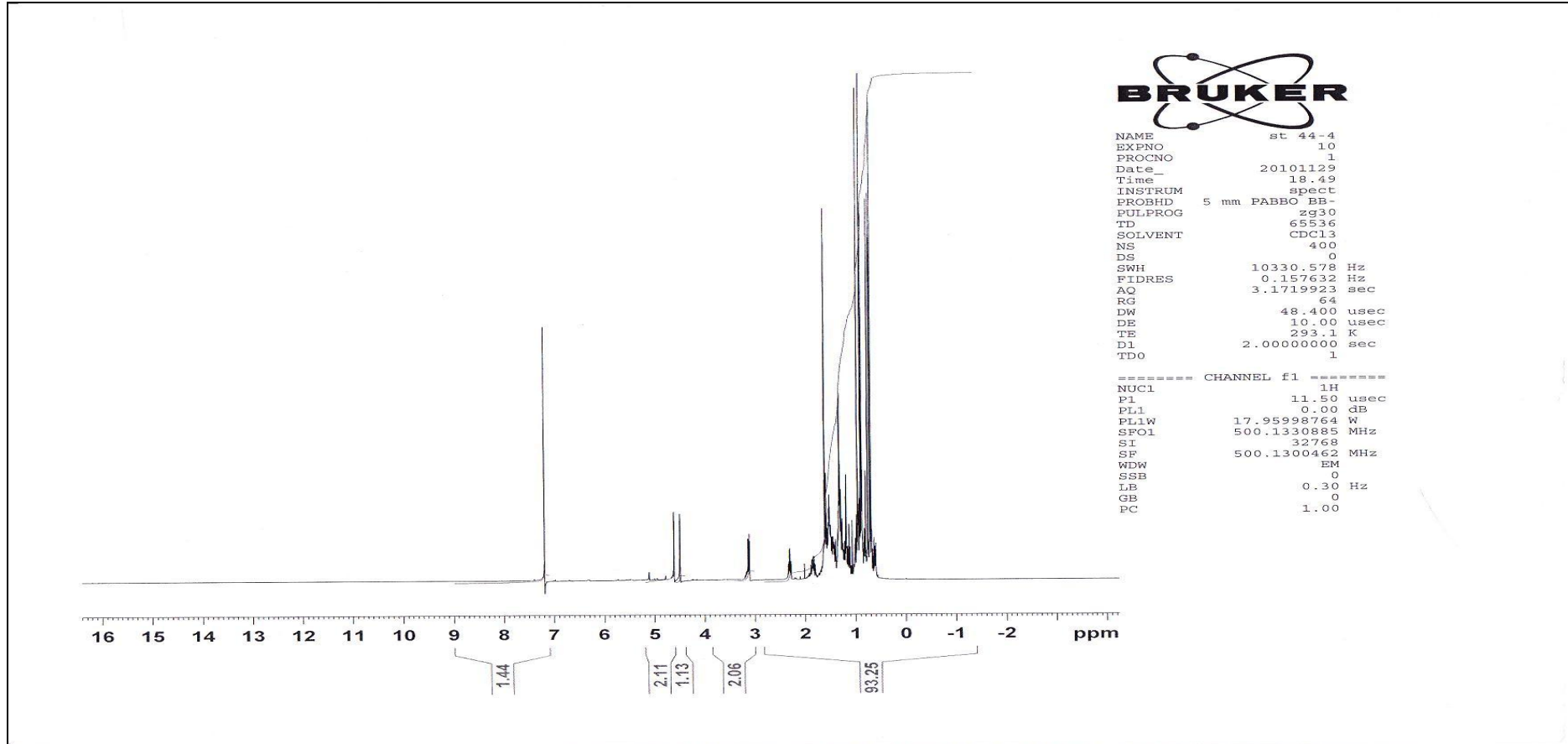
Şekil C.2 : β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK C.3



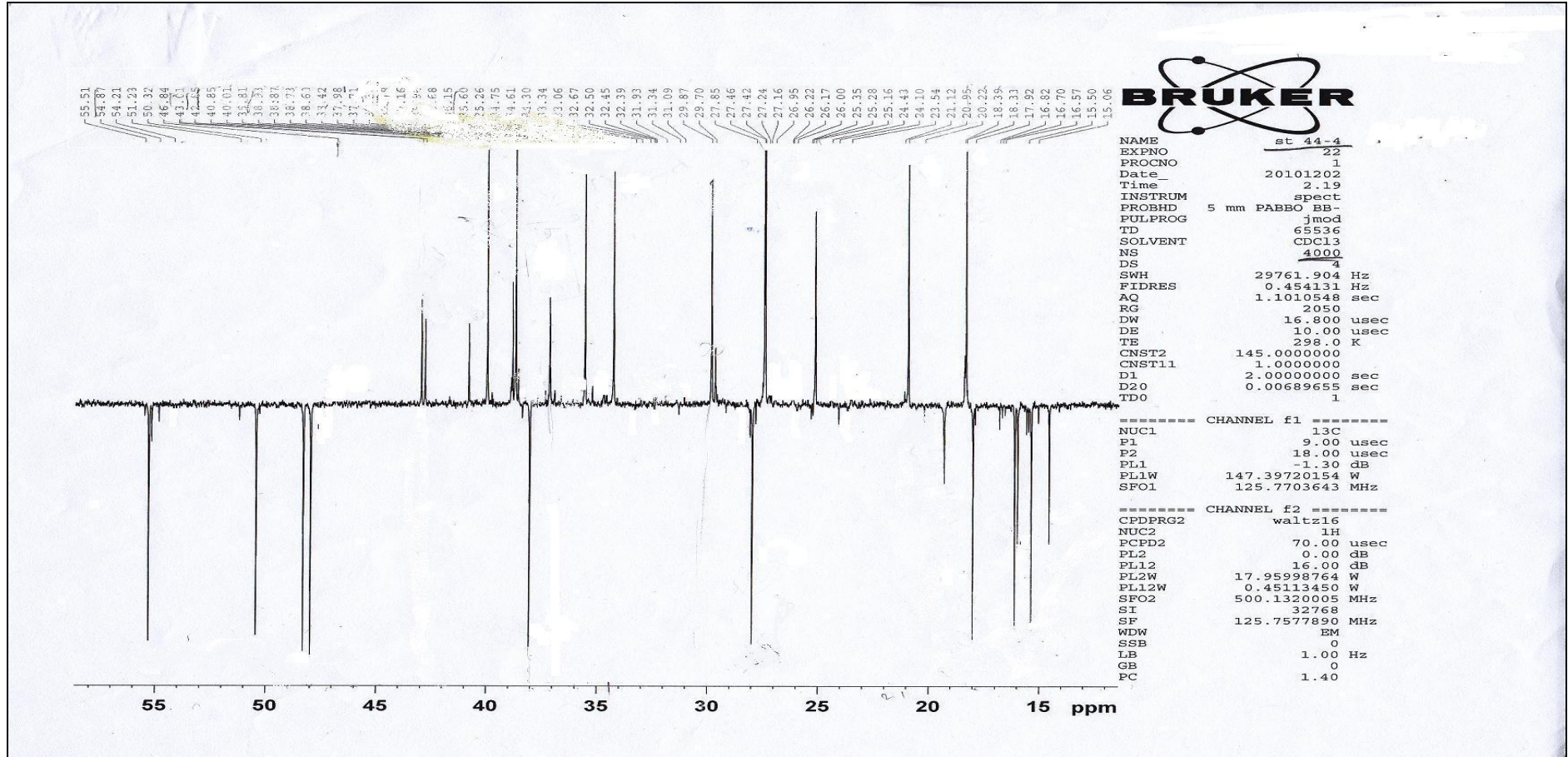
Şekil C.3 : β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu

EK D.1



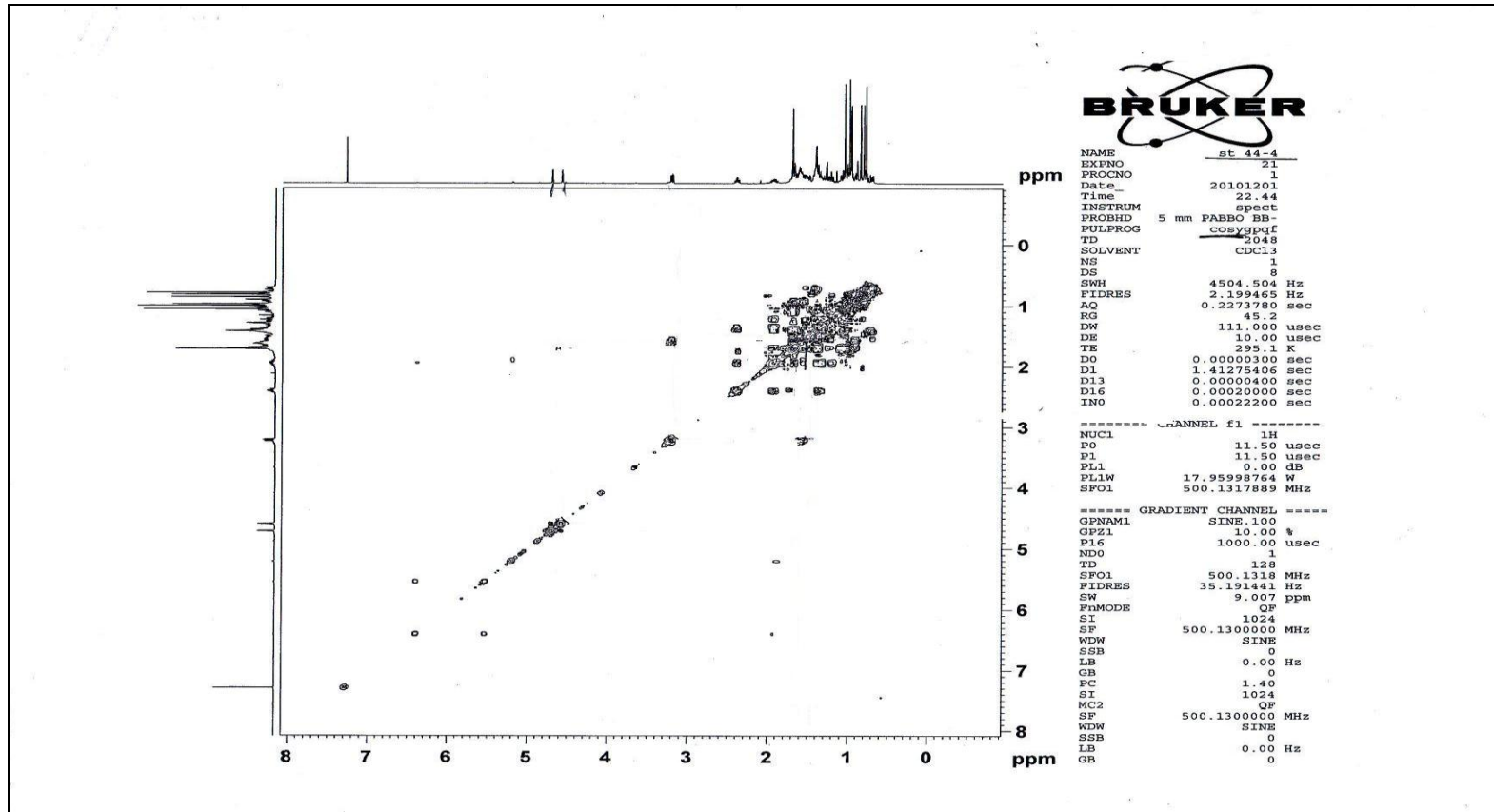
Şekil D.1 : Lupeol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK D.2



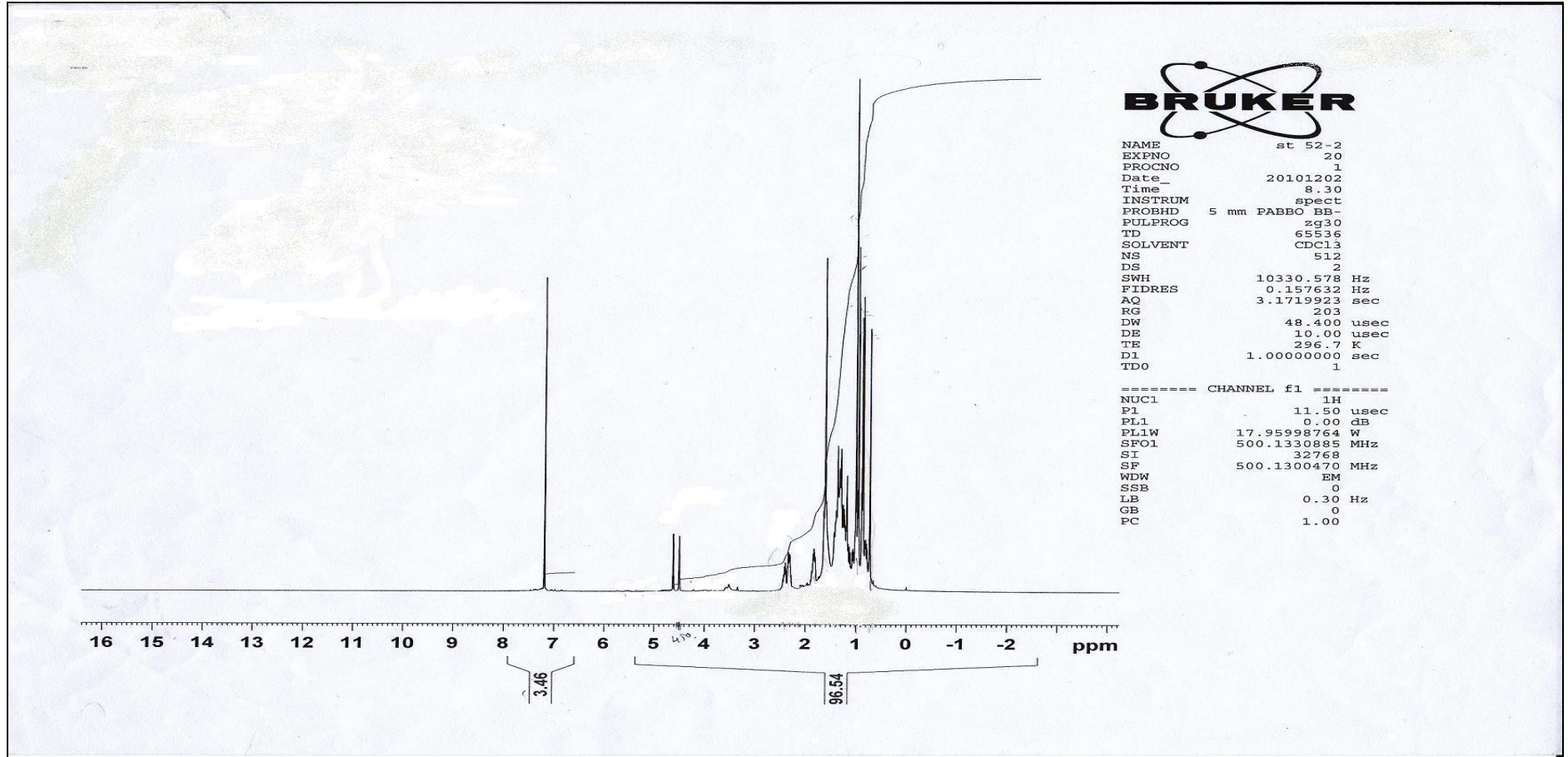
Şekil D.2 : Lupeol bileşiminin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu

EK D.3



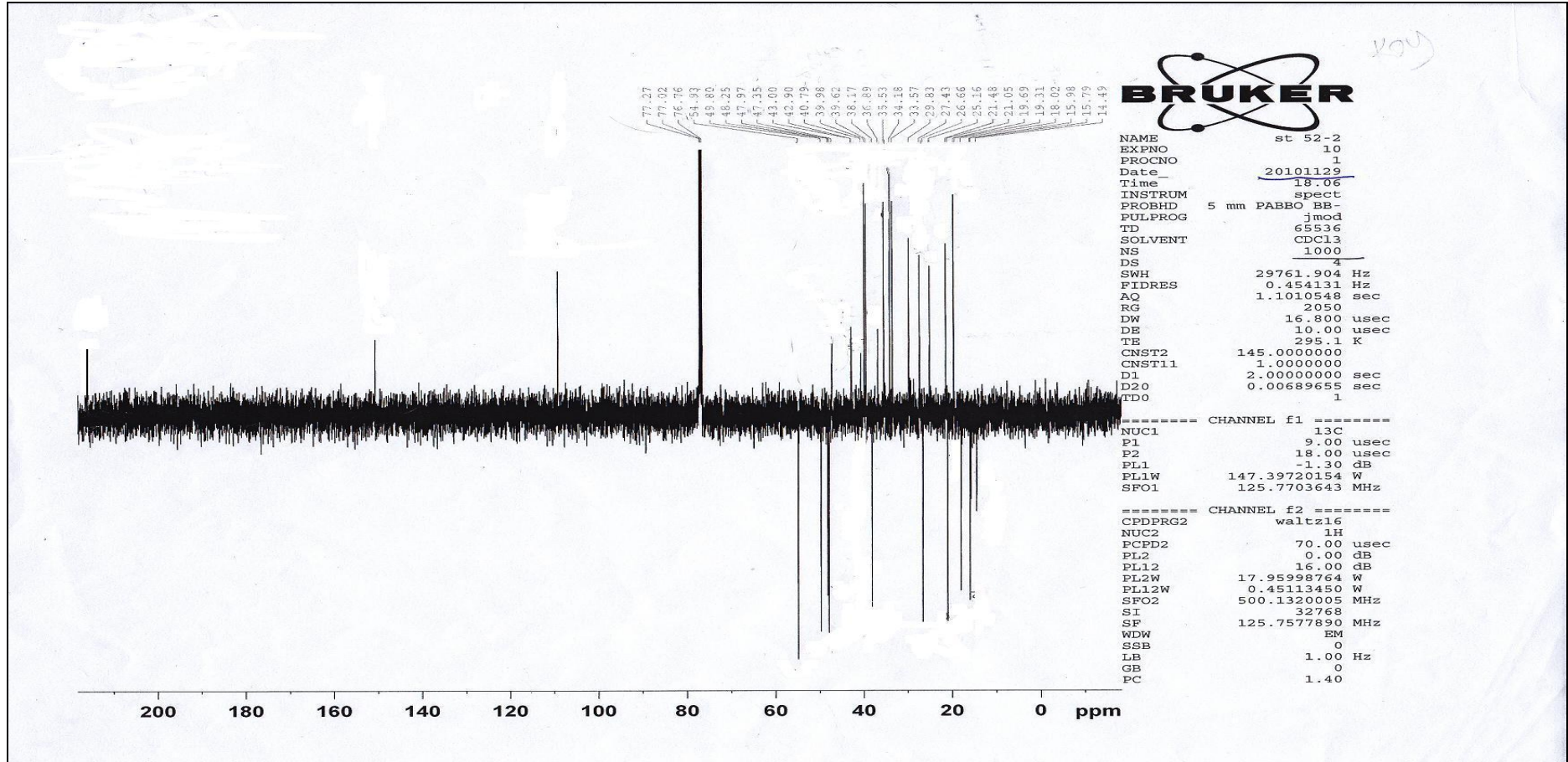
Şekil D.3 : Lupeol bileşiğinin ^1H - ^1H COSY spektrumu

EK E.1



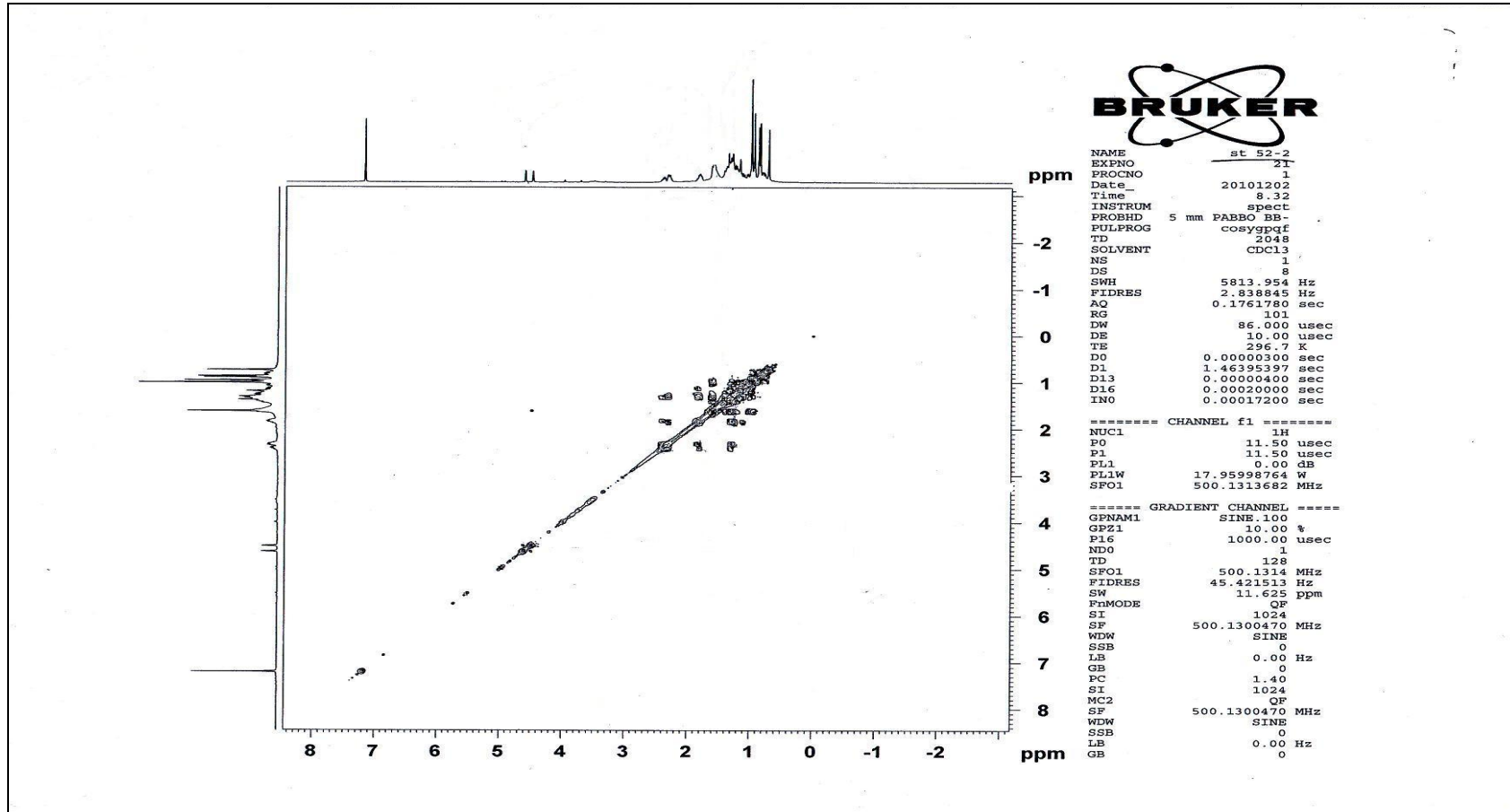
Şekil E.1 : Lupenon bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK E.2



Şekil E.2 : Lupenon bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu

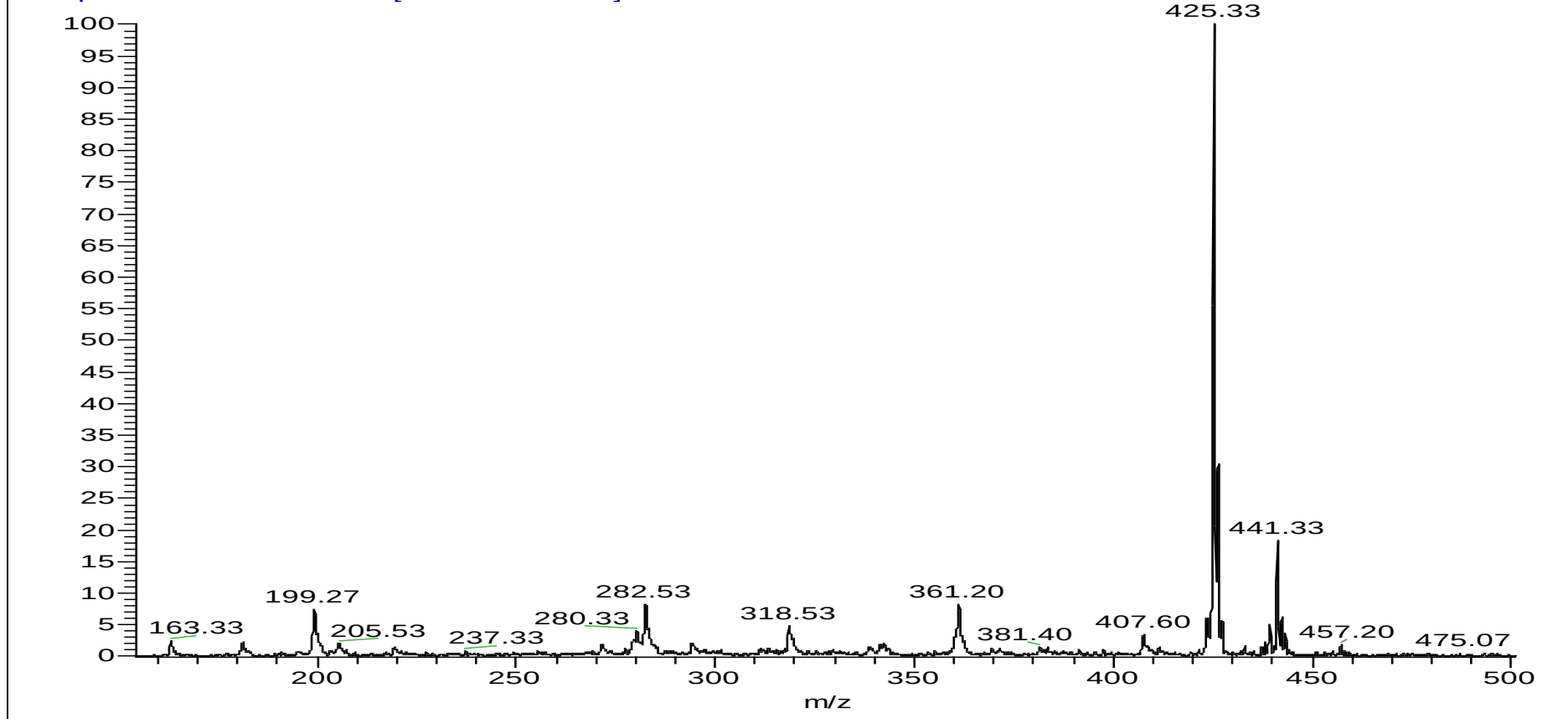
EK E.3



Şekil E.3 : Lupenon bileşiğinin ^1H - ^1H COSY spektrumu

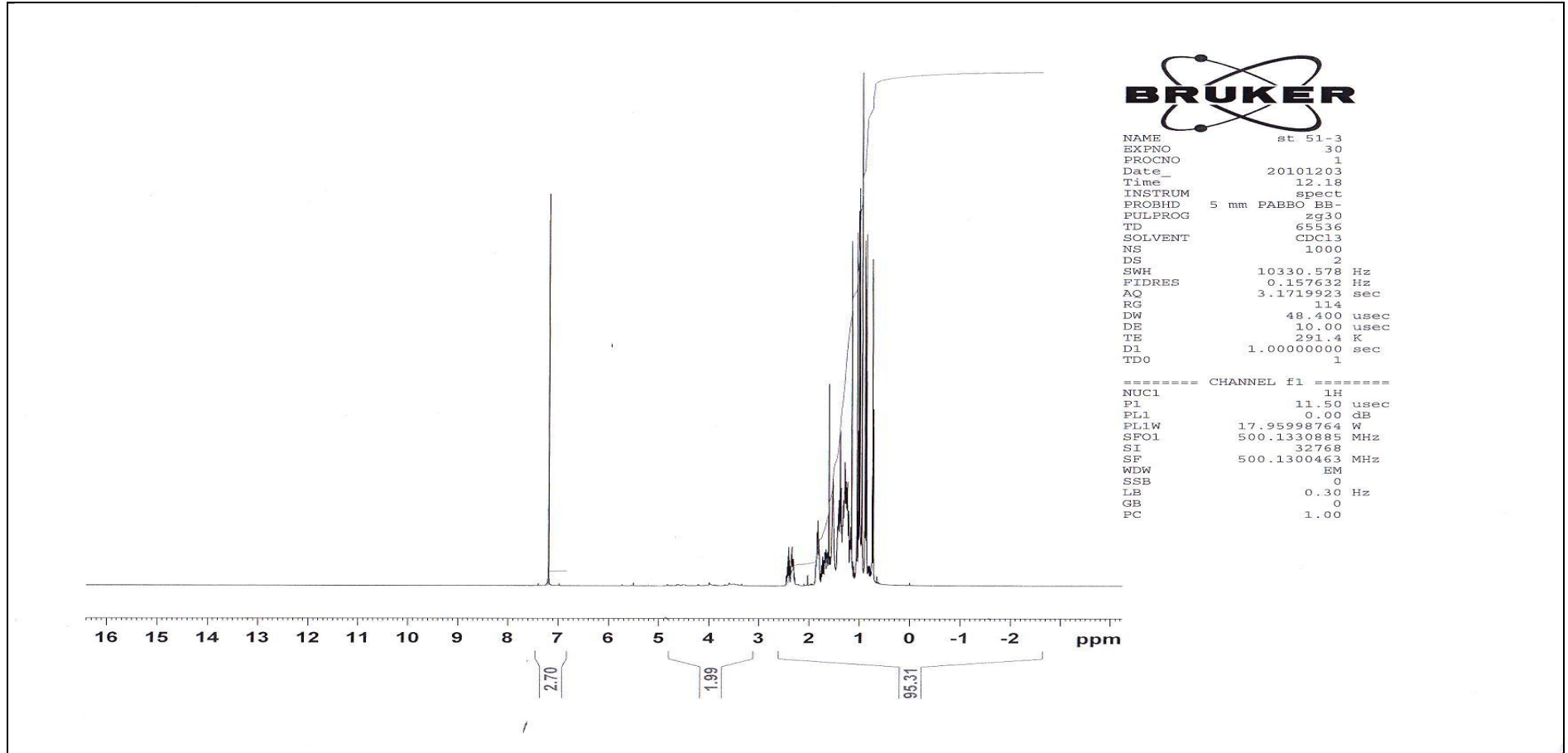
EK E.4

lupenon #13-25 RT: 0.13-0.24 AV: 13 NL: 1.23E7
T: + p APCI corona Full ms [150.00-600.00]



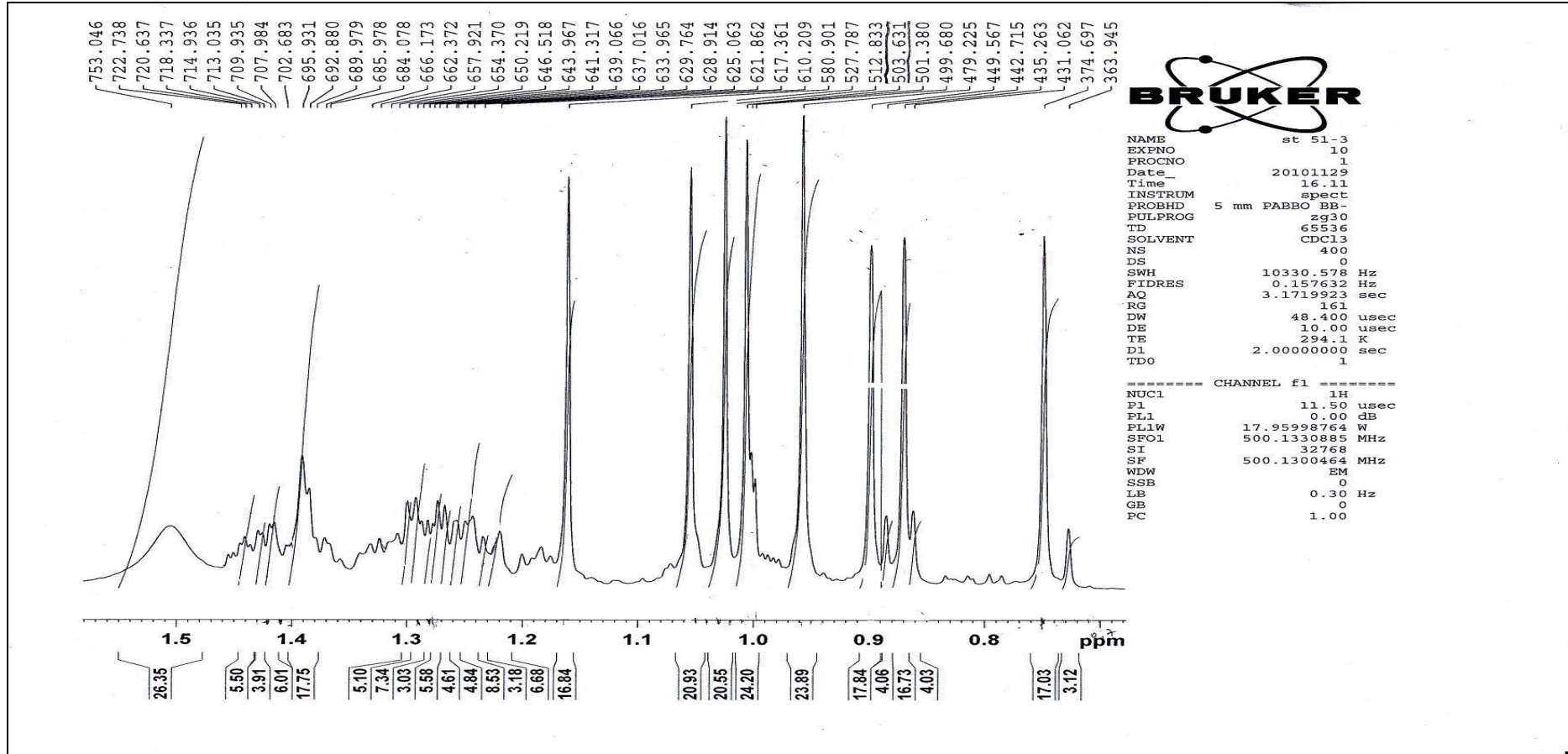
Şekil E.4 : Lupenon bileşiğinin MS spektrumu

EK F.1



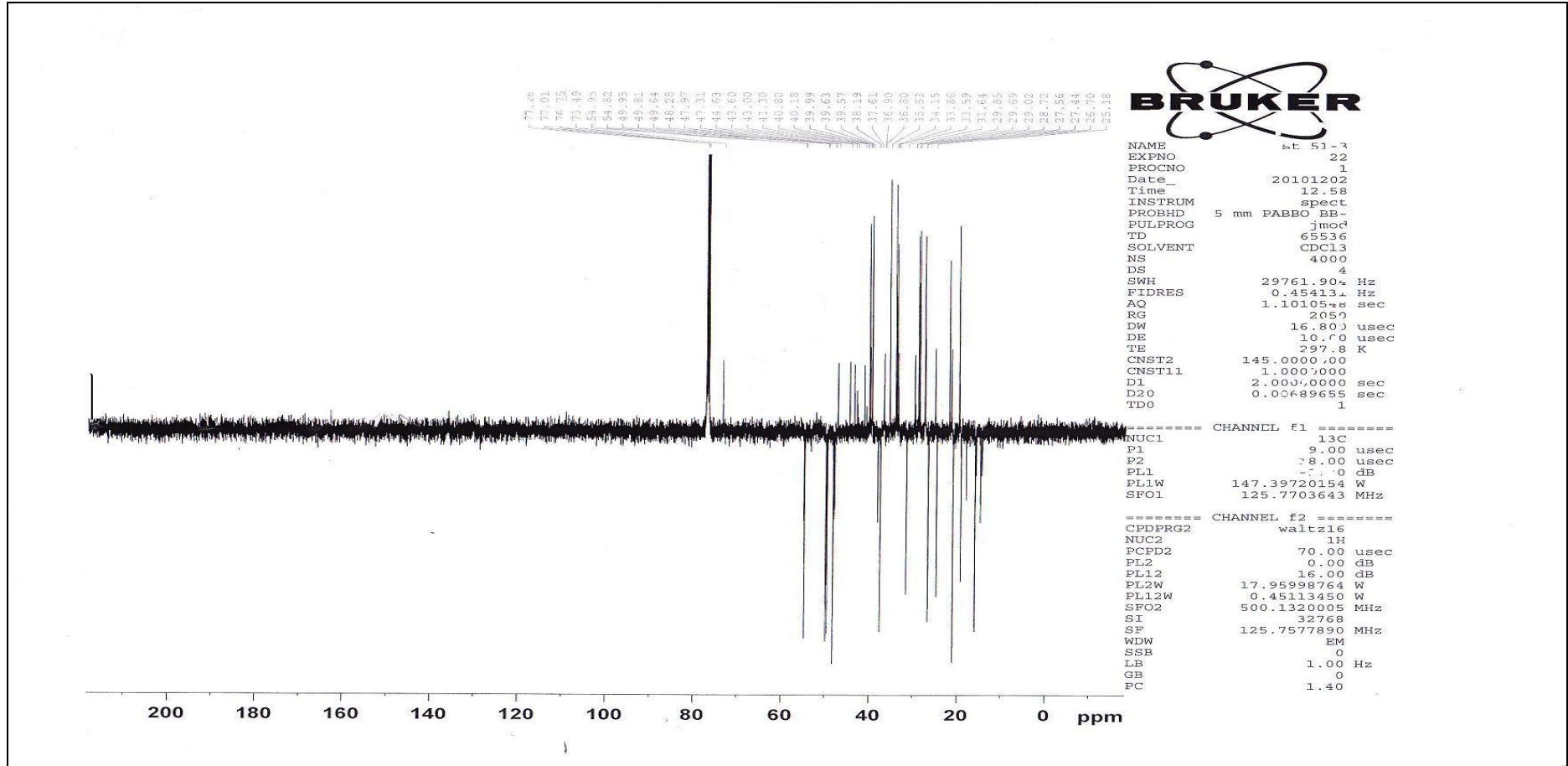
Şekil F.1 : Monogynol A bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK F.2



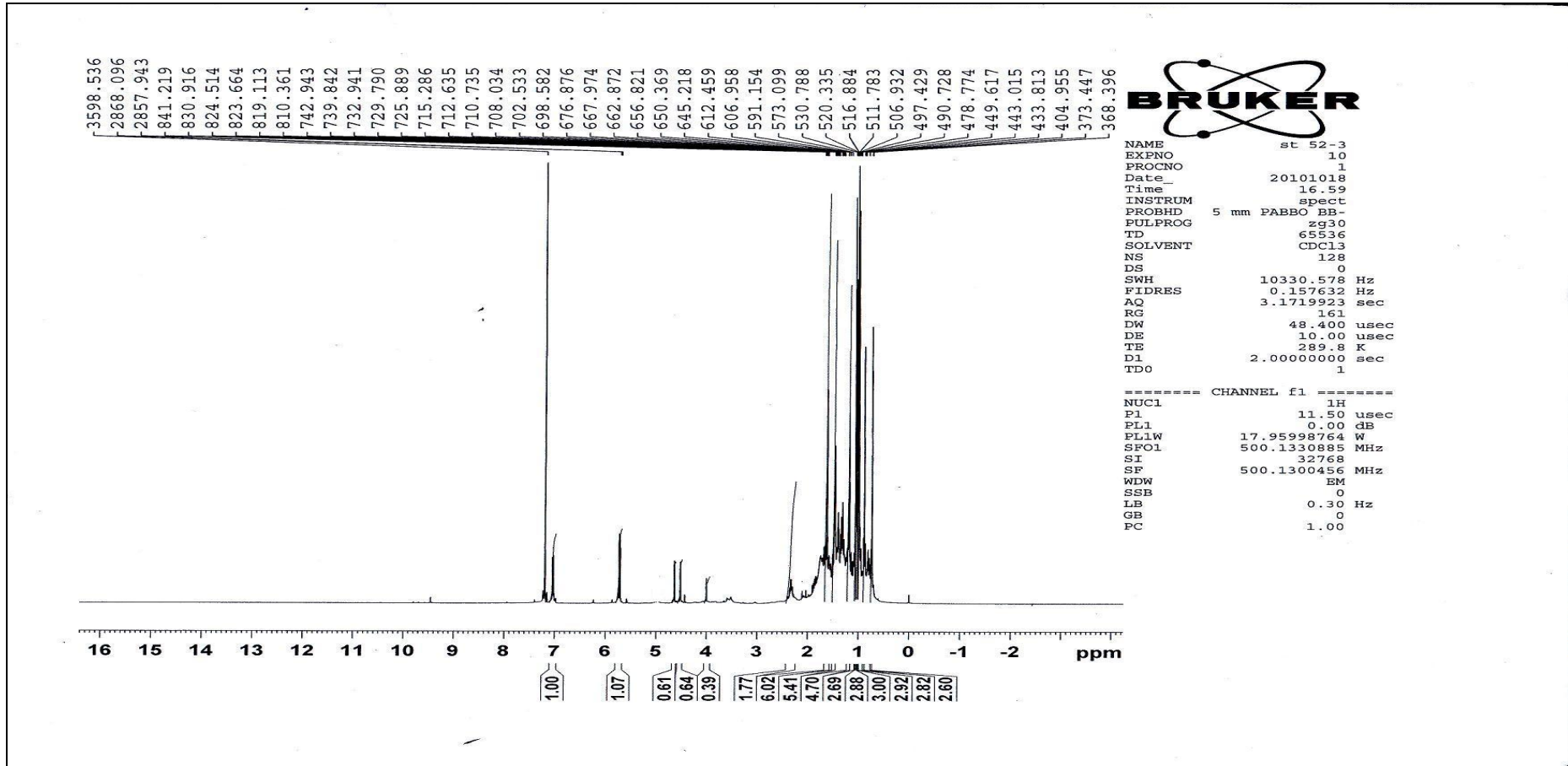
Şekil F.2 : Monogynol A bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (metil bölgesi)

EK F.3



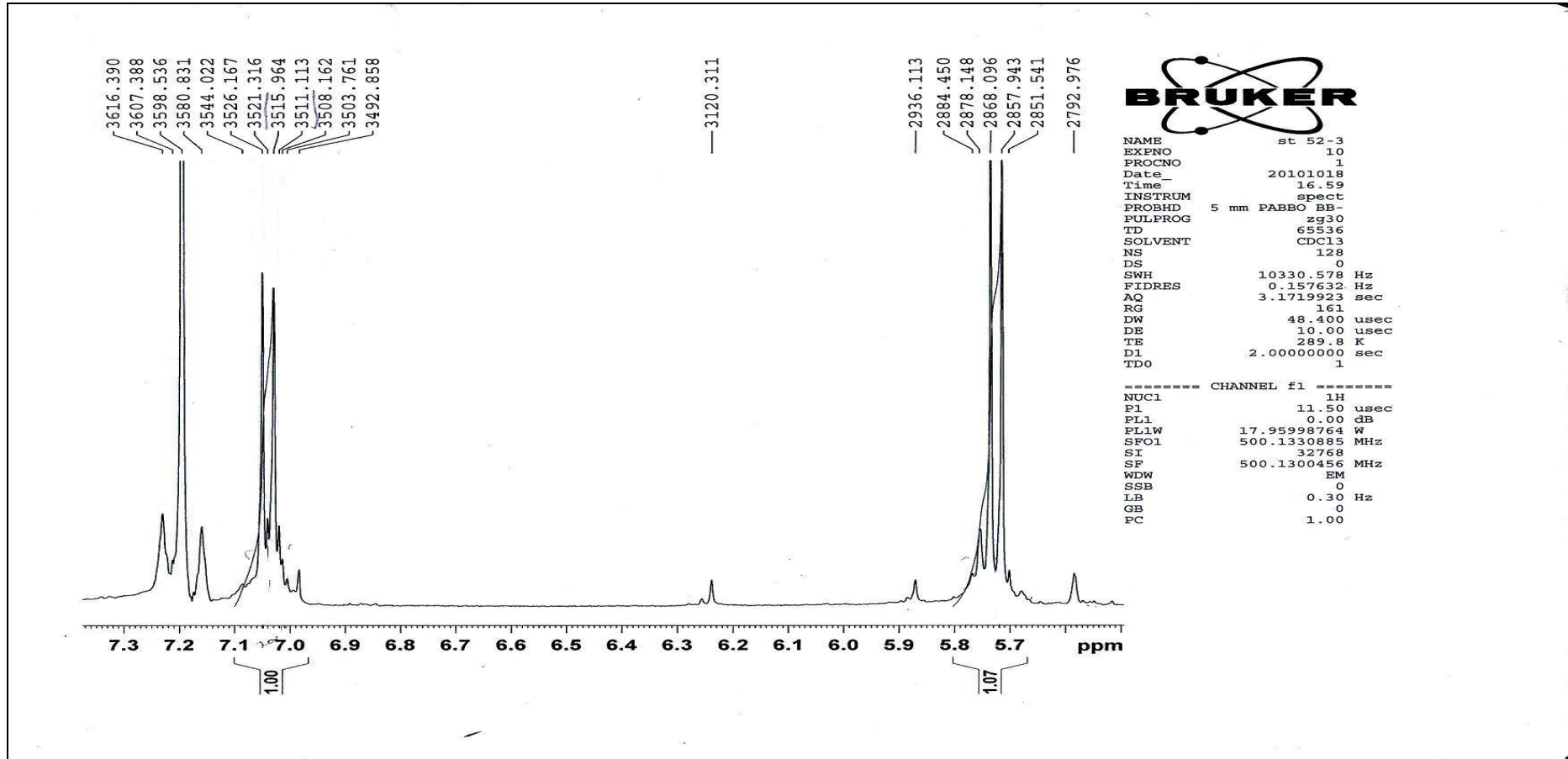
Şekil F.3 : Monogynol A bileşiğinin ¹³C-NMR (APT) spektrumu

EK G.1



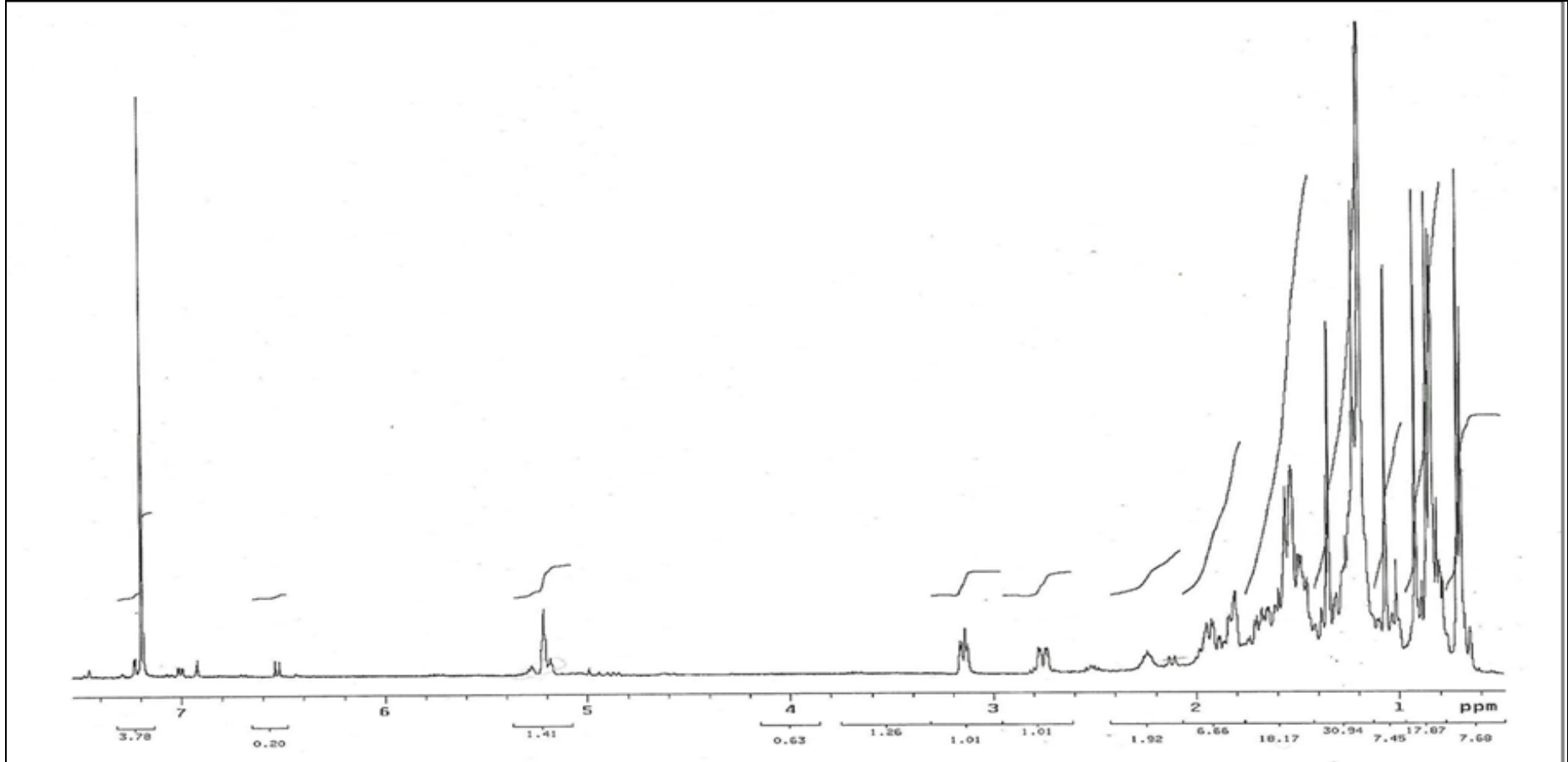
Şekil G.1 : Glochidone bileşiğinin ¹H -NMR spektrumu

EK G.2



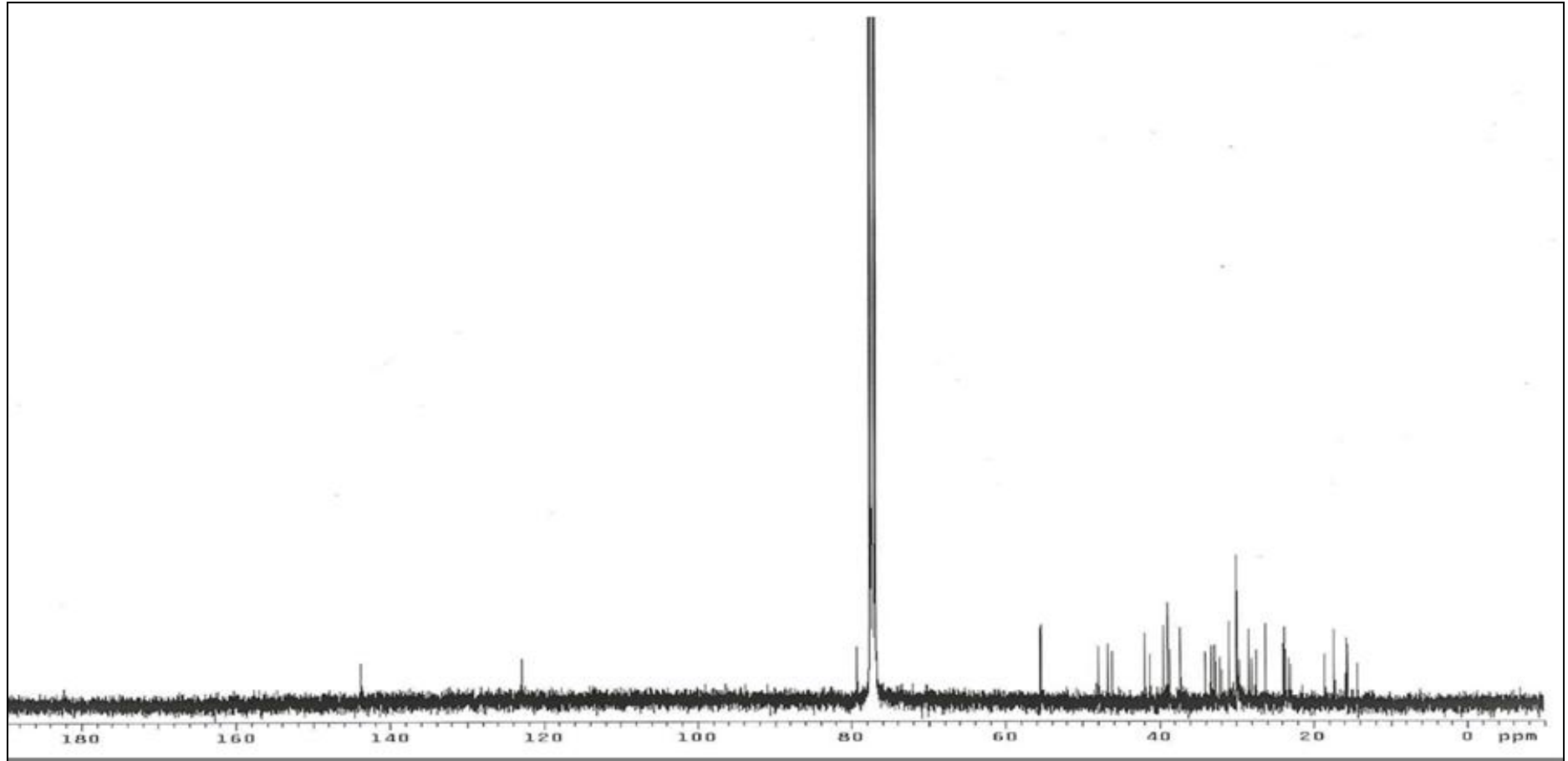
Şekil G.2 : Glochidone bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK H.1



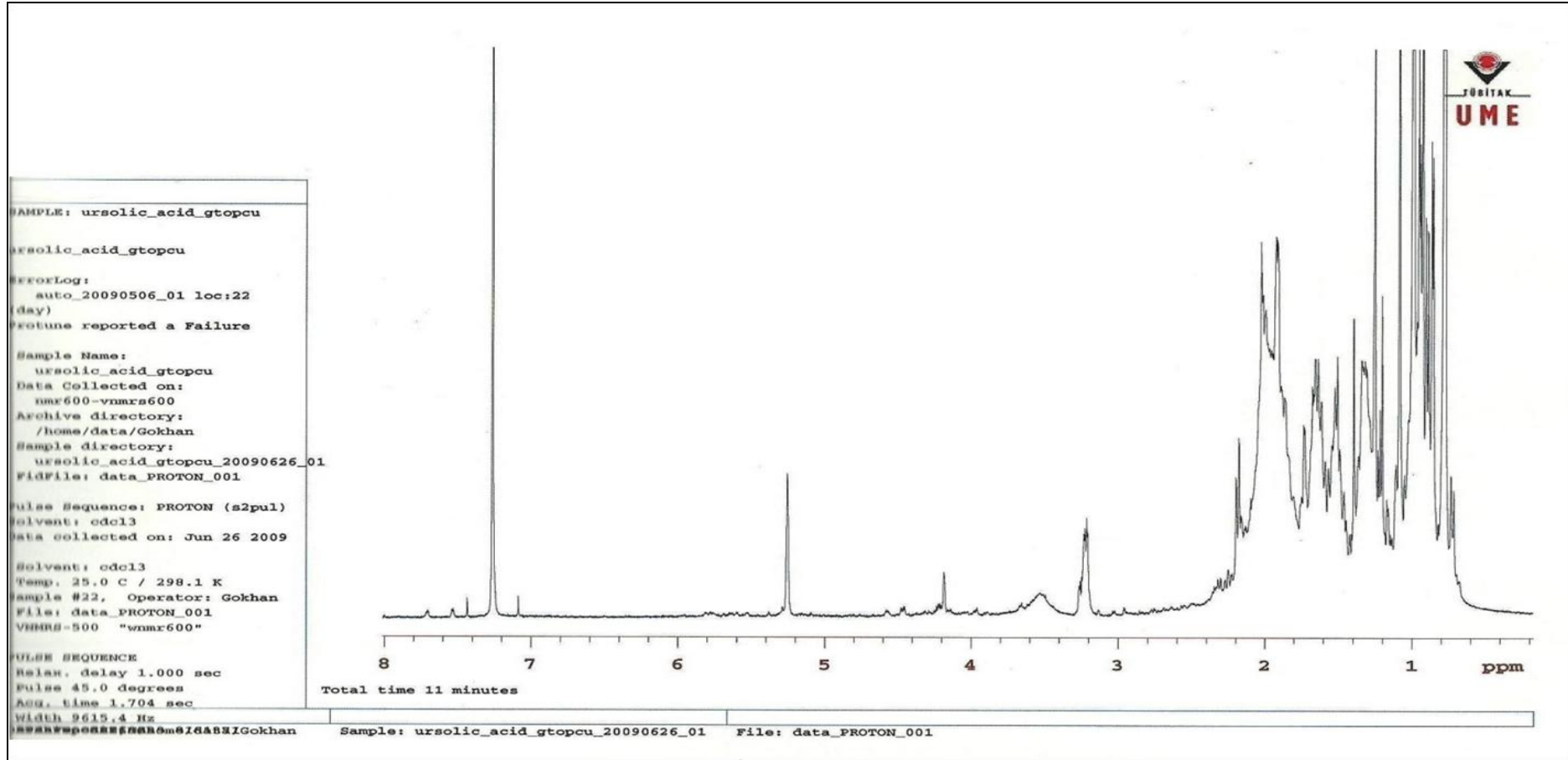
Şekil H.1 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK H.2

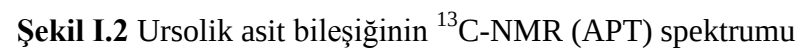


Şekil H.2 Oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C -NMR (APT) spektrumu

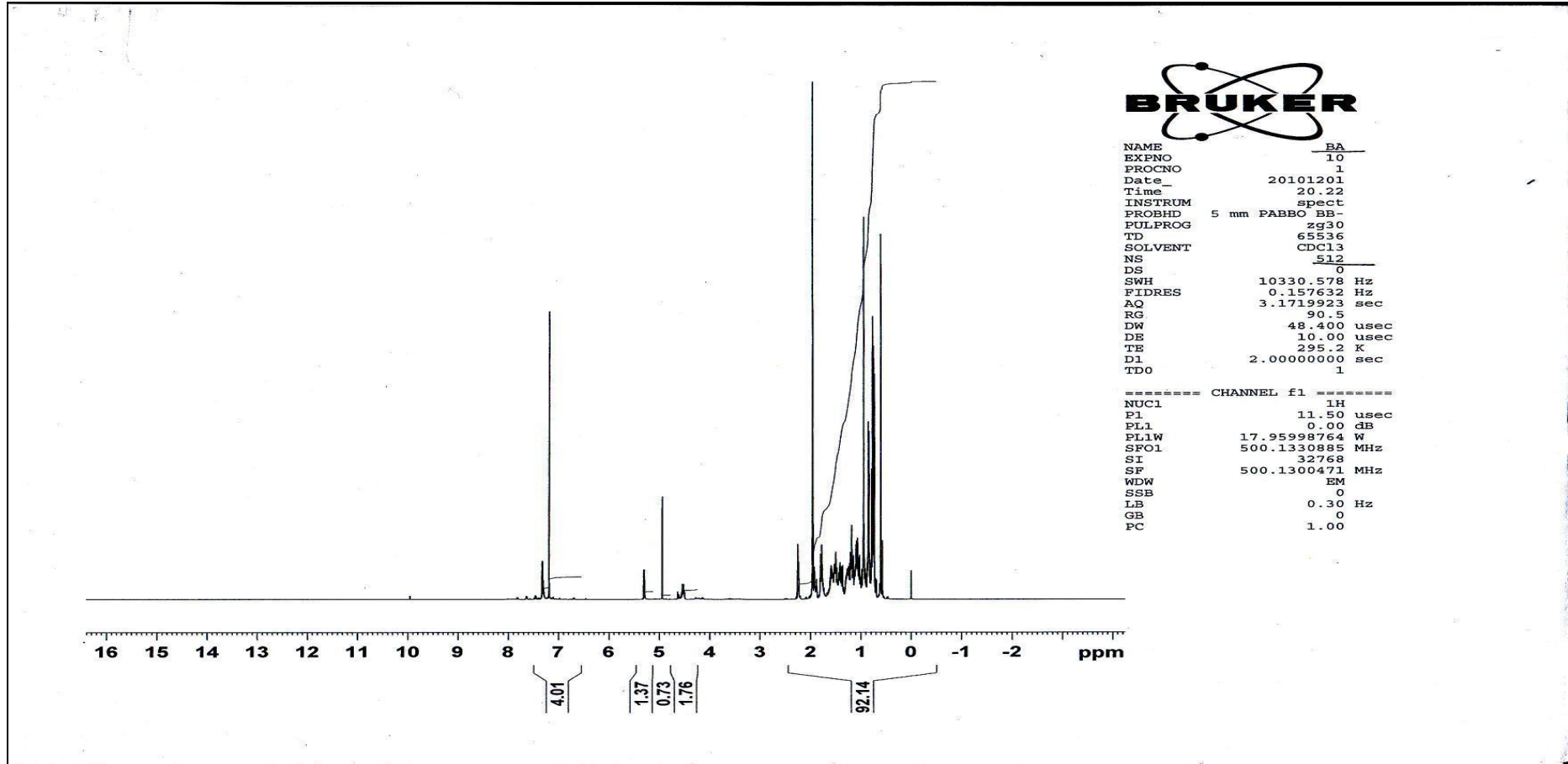
EK I.1



Şekil I.1 : Ursolik asit bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

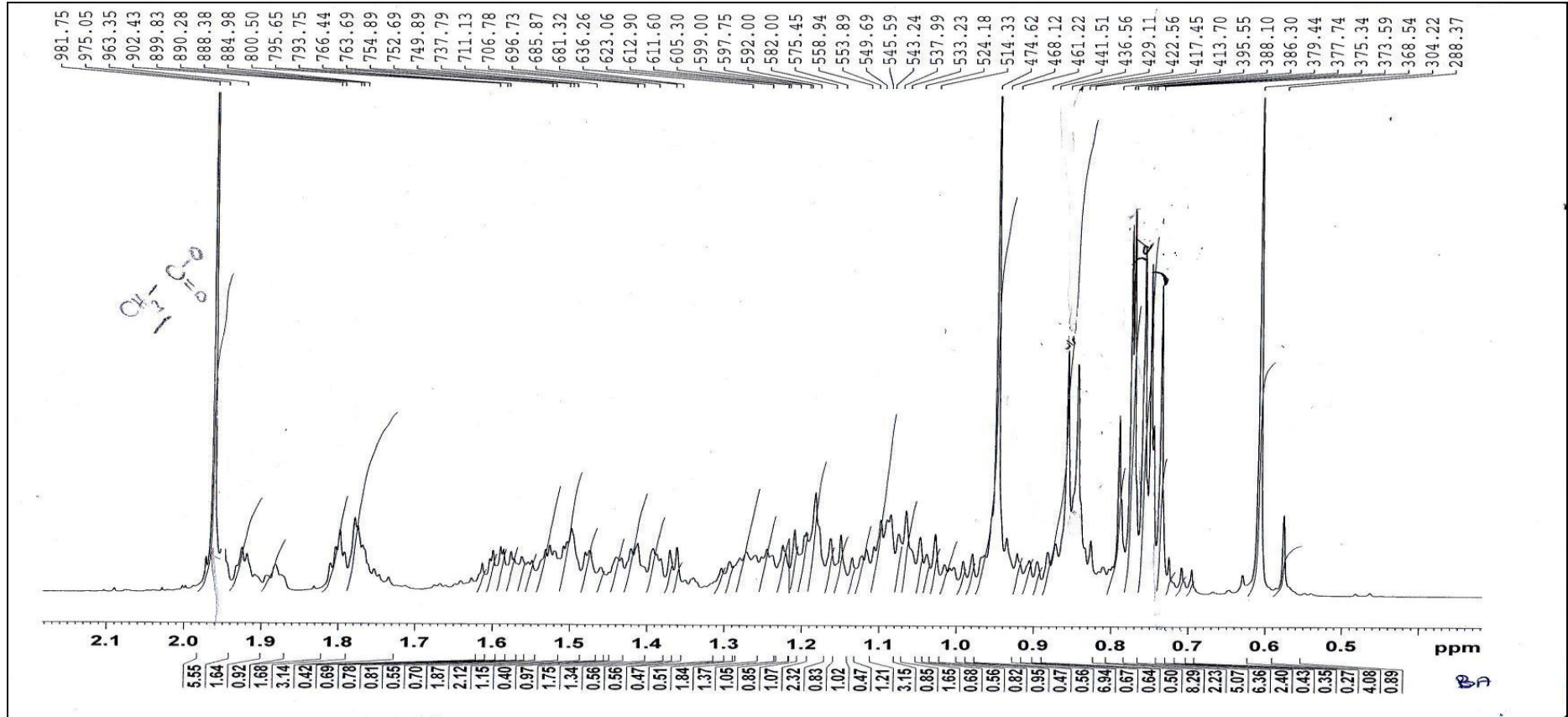


EK J.1



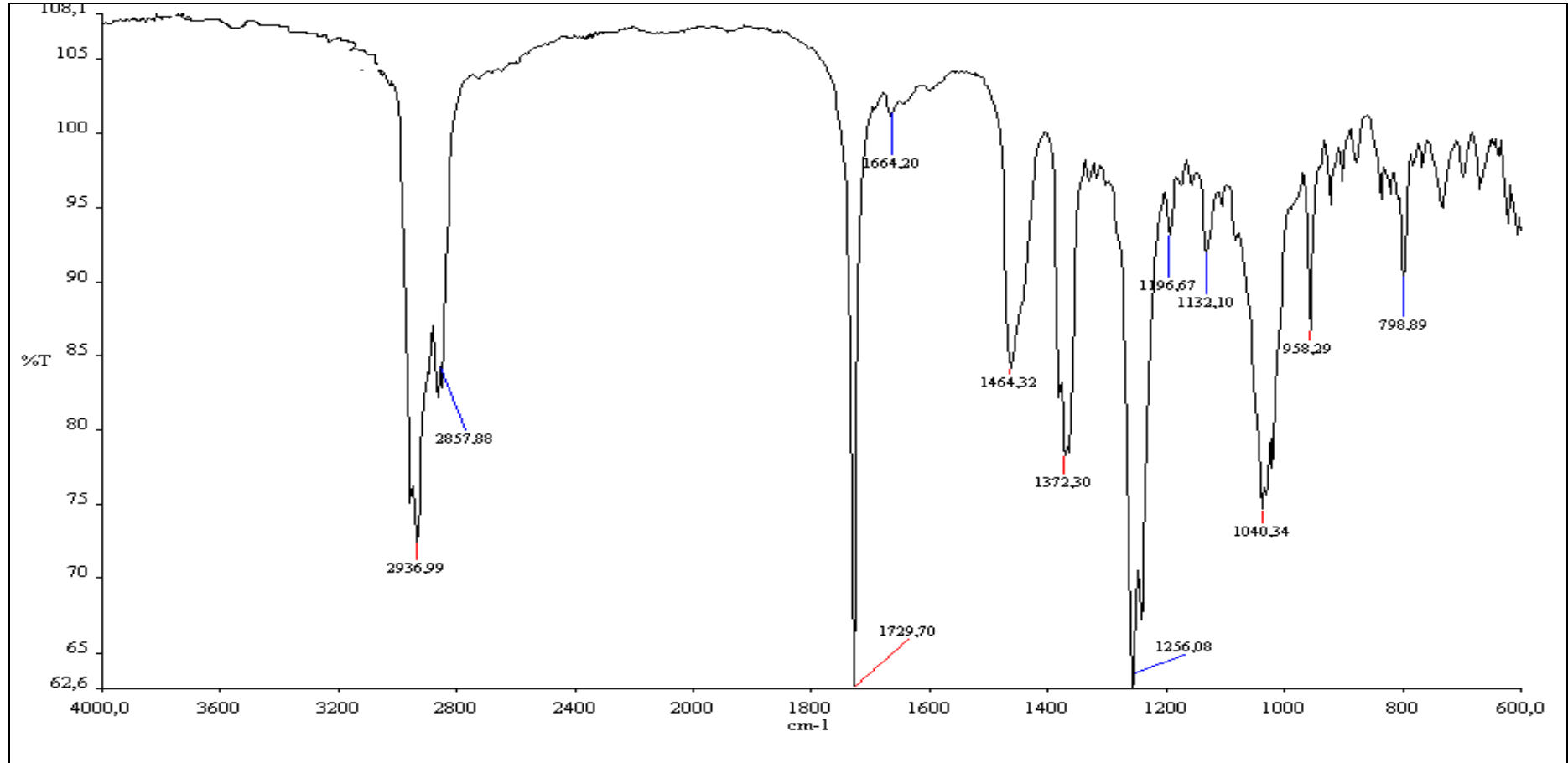
Şekil J.1 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK J.2



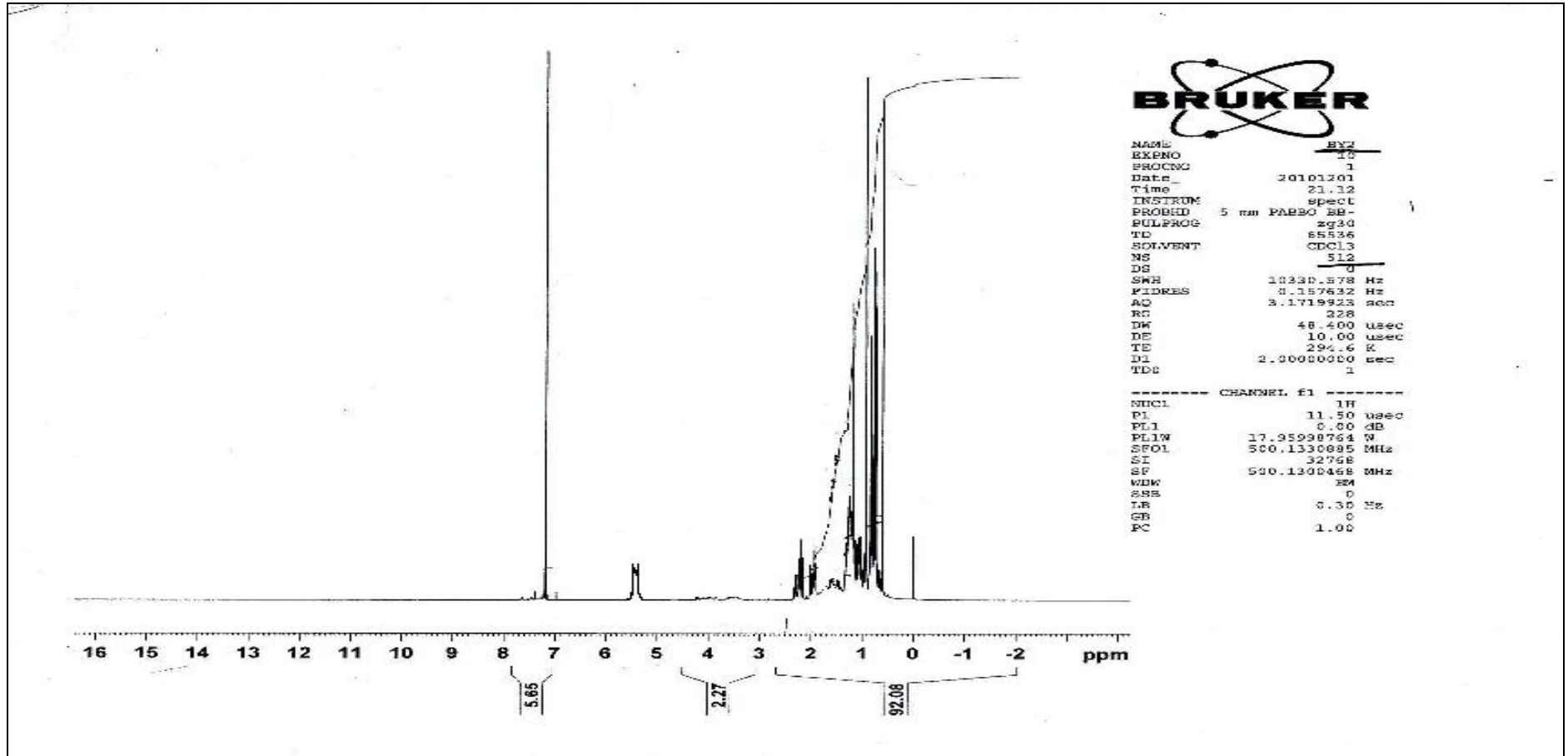
Şekil J.2 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (alifatik bölge)

EK J.3



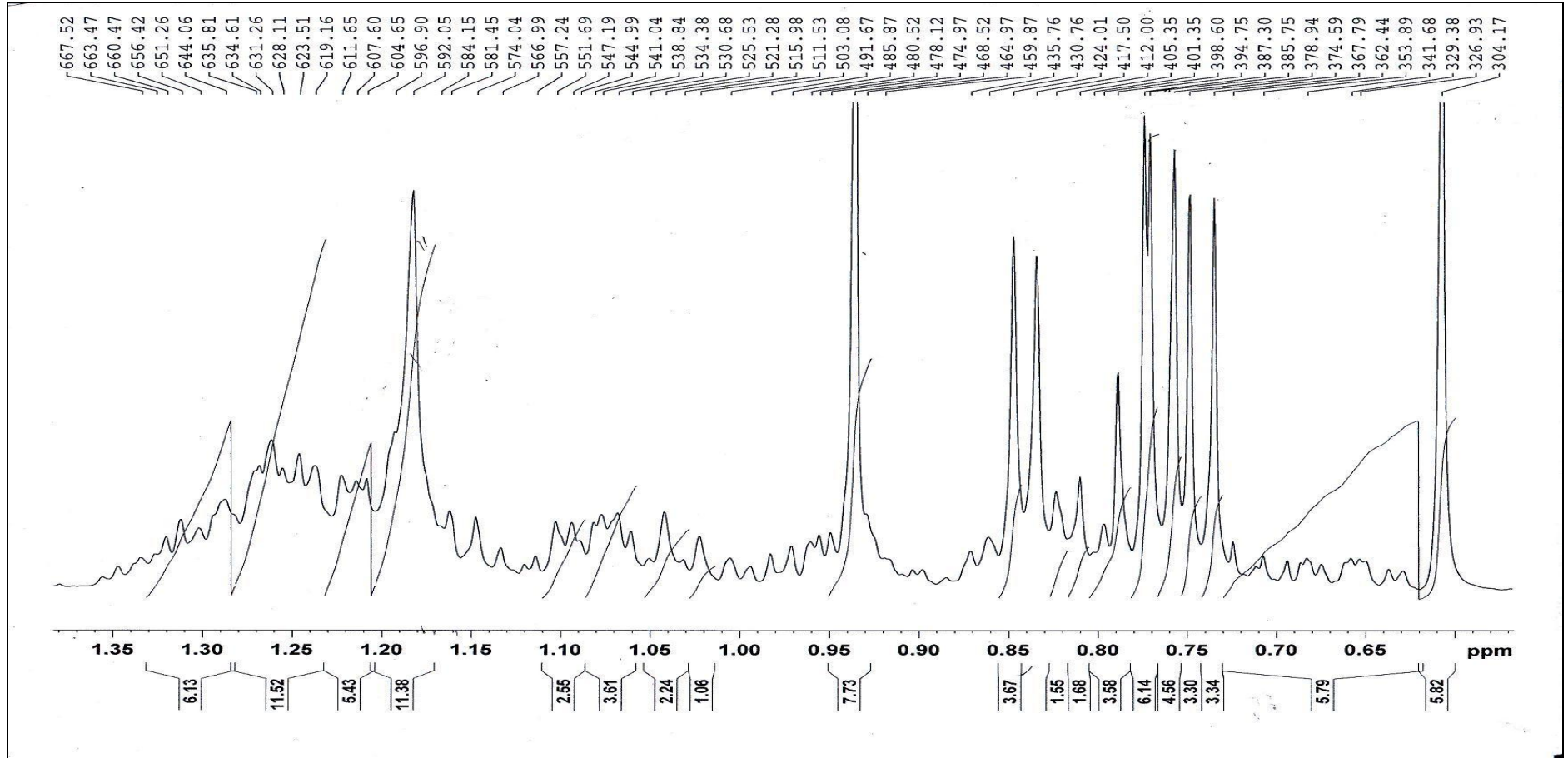
Şekil J.3 3-asetil- β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu

EK K.1



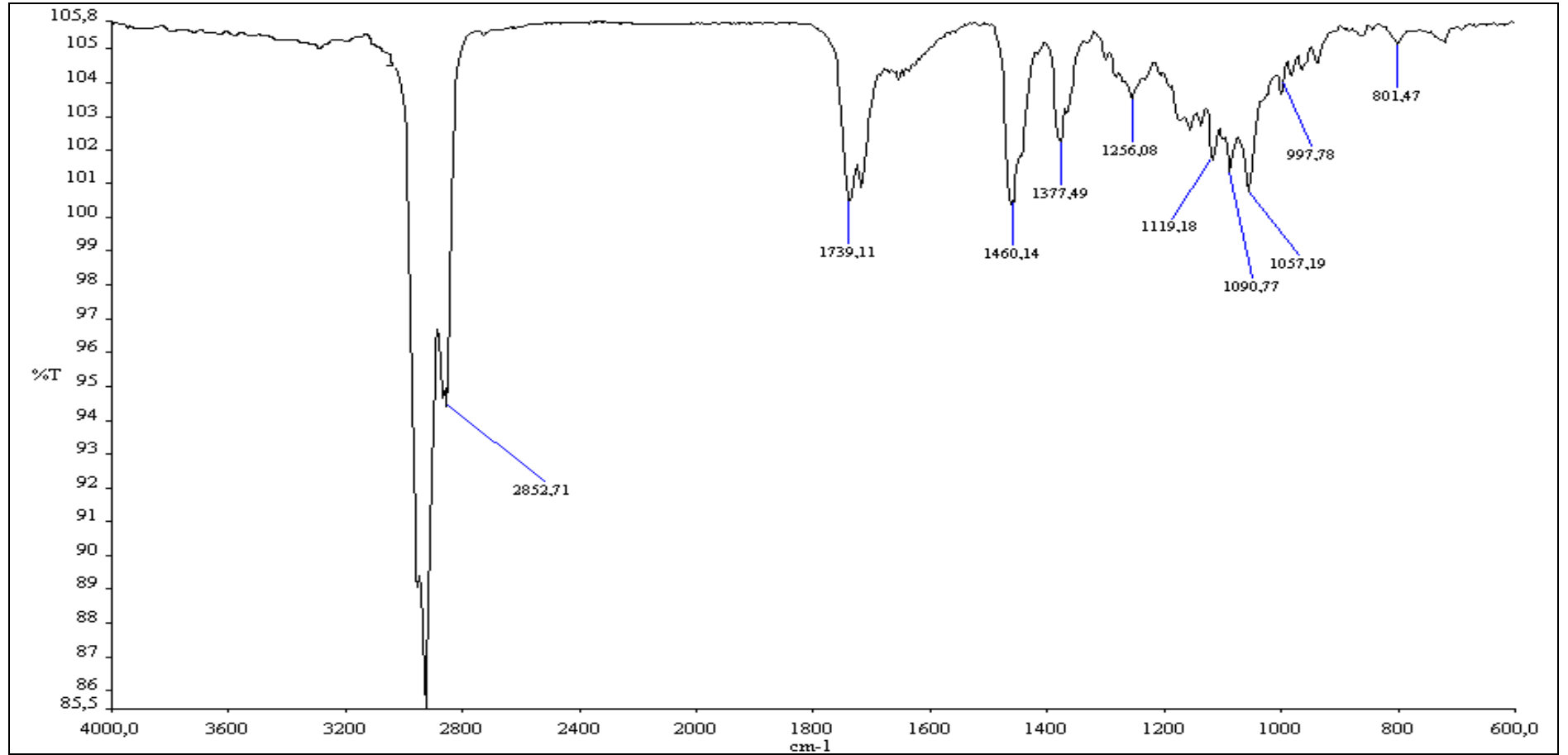
Şekil K.1 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK K.2



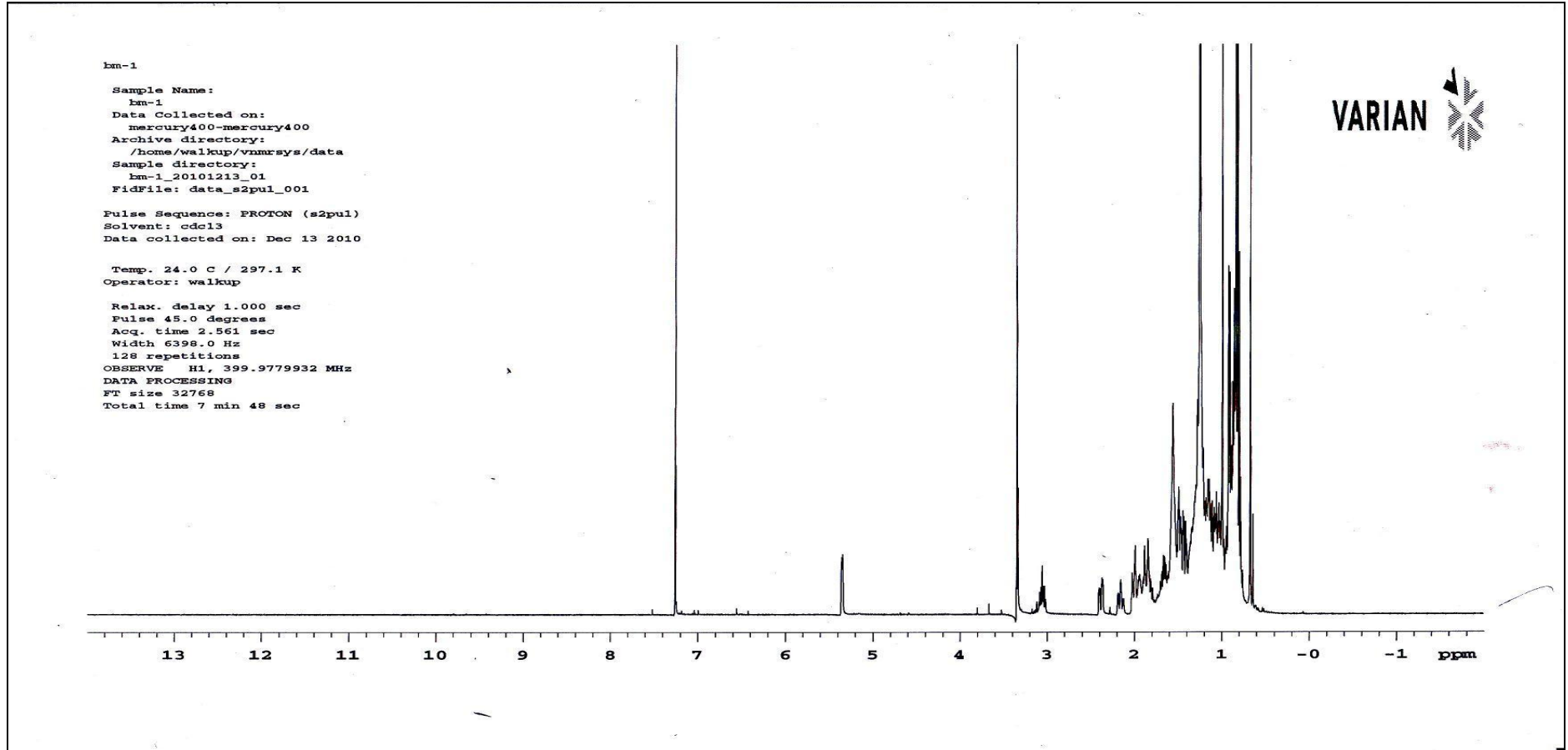
Şekil K.2 : 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK K.3



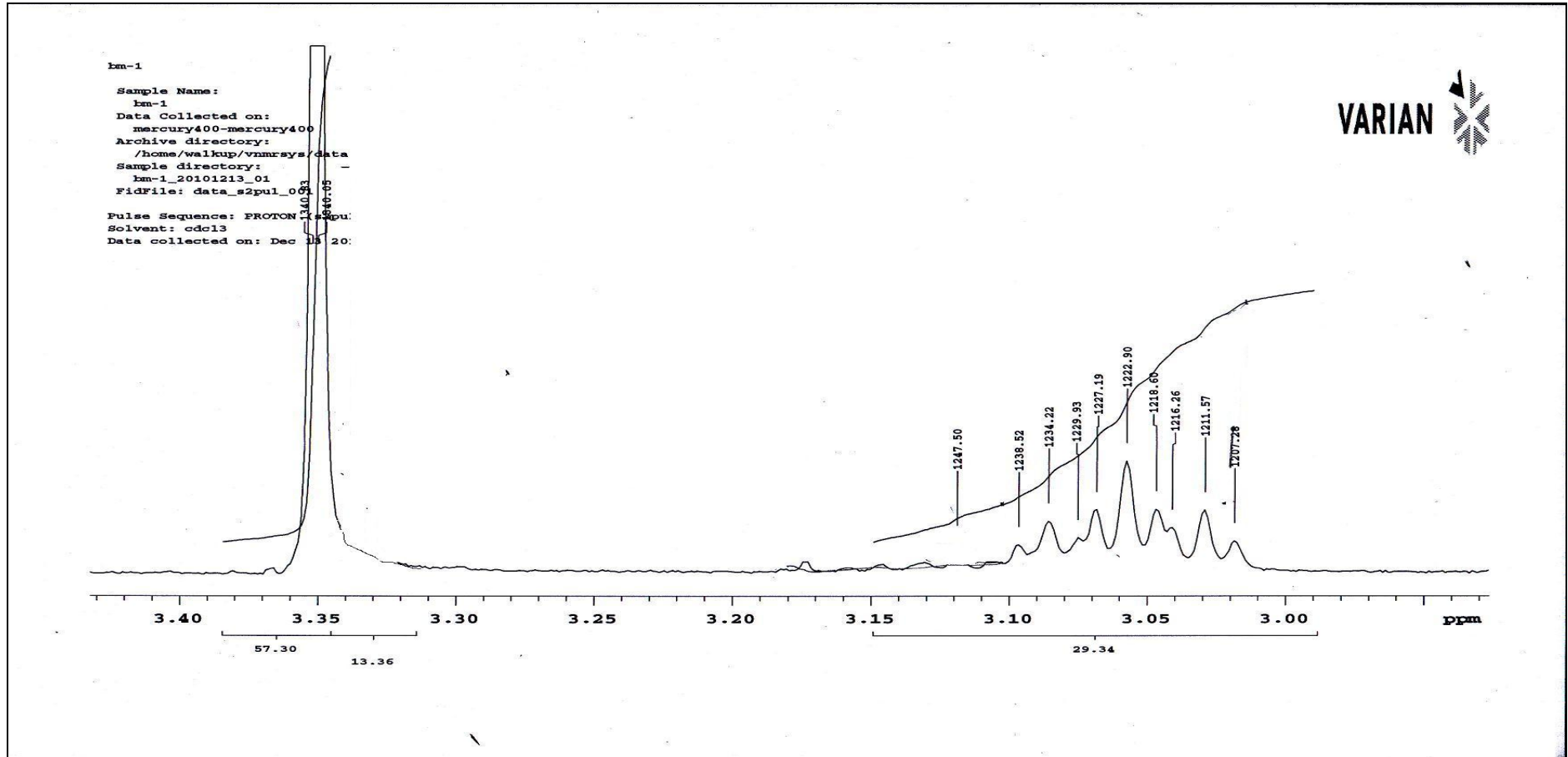
Şekil K.3 : 3-okso- β -sitosterol bileşiğinin IR spektrumu

EK L.1



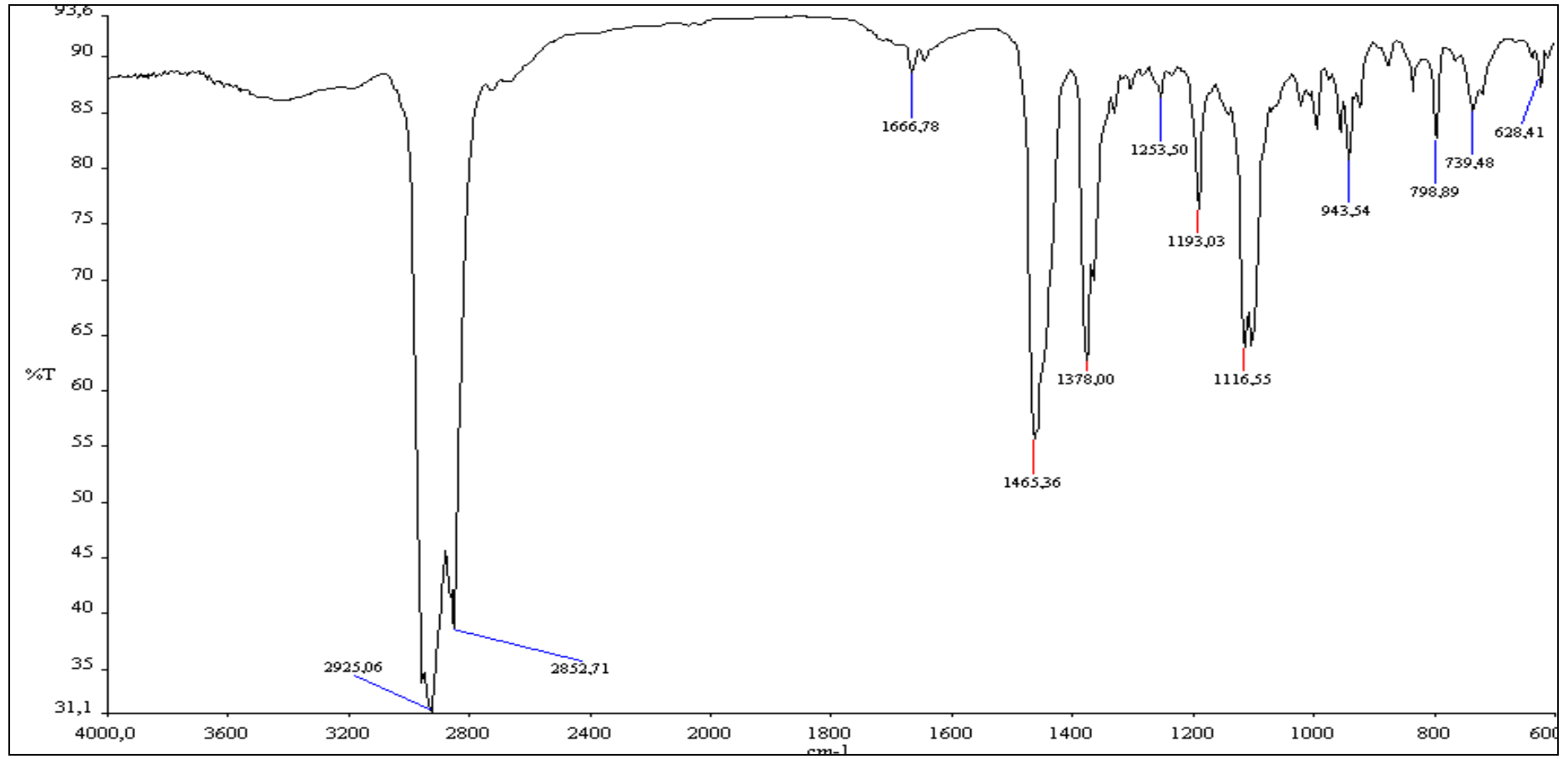
Şekil L.1 β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK L.2



Şekil L.2 β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu

EK L.3



Şekil L.3 β -sitosterol-metil-eter bileşiğinin IR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Burcu Çulhaoğlu

Doğum Yeri ve Tarihi: Erzincan 1985

Lisans Üniversitesi: Marmara Üniversitesi

