

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SALVIA ADENOPHYLLA* VE *SALVIA VERTICILLATA* SUBSP. *AMASIACA*
BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN AKTİVİTE ODAKLI
İZOLASYONU VE YARI SENTETİK TÜREVLERİNİN ANTİOKSİDAN
VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Seda Damla HATİPOĞLU**

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

HAZİRAN 2010

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***SALVIA ADENOPHYLLA* VE *SALVIA VERTICILLATA* SUBSP. *AMASIACA*
BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN AKTİVİTE ODAKLI
İZOLASYONU VE YARI SENTETİK TÜREVLERİNİN ANTİOKSİDAN
VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Seda Damla HATİPOĞLU
(509071213)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 Mayıs 2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 09 Haziran 2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Turan ÖZTÜRK (İTÜ)
Prof. Dr. Keriman GÜNAYDIN (İÜ)

HAZİRAN 2010

Bugünün yaşanmasında çok büyük emekleri olan Canım Aileme,

ÖNSÖZ

Bu çalışmada *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.- Mor ve *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* (adaçayı) bitkilerinin biyoaktivite odaklı izolasyonu çalışılmış, yüksek verimle elde edilen oleanolik asitin yarı sentetik türevleri sentezlenmiş, izole saf bileşiklerinin ve yarı sentetik oleanolik asit türevlerinin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri incelenmiştir.

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında;

Doğal ürünler kimyası alanını bana sevdiren, bilgisinden ve tecrübesinden daima yararlandığım, sabrına, disiplinine ve anlayışına her zaman hayran olduğum, her konuda ilgisini benden esirgemeyen ve bana güveni olan ve tüm zorluklara karşı beni cesaretlendiren, kendisini akademik hayatım boyunca örnek olarak alacağım, tezimle ilgili çalışmalarda projesiyle bana maddi destek sağlayan çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Gülaçtı TOPÇU'ya teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her konuda destek veren ve bir süre laboratuvarını benimle paylaşma özverisini gösteren öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Gönül YAPAR'a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince öğretici ve yardımcı fikirleri ile bana her konuda yol gösteren İstanbul Üniversite'sinden başta Araş. Gör. Hocam Mehmet BOĞA'ya ve Araş. Gör. Dr. Mehmet ÖZTÜRK'e ve Prof. Dr. Ufuk KOLAK'a teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım *S. verticillata* subsp *amasiaca* bitkisinin toplanması ve teşhis edilmesinde, Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Ufuk ÖZGEN'e ve diğer bir çalışma bitkim olan *Salvia adenophylla* Hedge&Hub.-Mor'un teşhis ve toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyelerinden Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ'ye teşekkür ederim.

Organik sentez çalışmalarını bana sevdiren, keyifli ve bir o kadar da öğretici olan, yüksek bilgi ve tecrübesinden yararlandığım Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hasan SEÇEN'e ve onun şahsında Erzurum'da kaldığım süre boyunca ilgi ve alakalarını benden esirgemeyen, her konuda bana yardımcı olmaya çalışan tüm Kimya bölümüne teşekkür ederim.

Tezimin tamamlanmasında, tüm NMR spektral analizlerini yapan ve bizim bu konuda kendisine çok zahmet verdiğimiz Boğaziçi Üniversitesi İleri Araştırmalar Laboratuvarından Dr. Ayla TÜRKEKUL'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimime başladığım süre zarfında tanıştığım, aynı laboratuvarı paylaştığım, bilgi ve tecrübesini hiç bıkmayıp usanmadan benimle paylaşan, tezimin tamamlanmasında önemli katkısı olan, dostluğuyla hayatım boyunca yanımda olacağına inandığım çok sevgili Yüksek Kimyager Fatemeh BAHADORI'ye ve aramıza daha sonra katılan tüm laboratuvar arkadaşlarıma katkı ve desteklerinden ötürü çok teşekkür ederim.

Ve beni bugünlere getiren, üzerime titreyip emek veren, hayatımın tüm evrelerinde maddi ve manevi destek olan, her konuda beni cesaretlendirip teşvik eden, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim canım aileme en içten sevgi ve saygılarımı sunarak sonsuz teşekkür ederim.

Haziran 2010

Seda Damla HATIPOĞLU

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
KISALTMALAR	xi
SEMBOLLER	xiii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xv
ŞEKİL LİSTESİ.....	xvii
ŞEMA LİSTESİ.....	xxi
ÖZET.....	xxiii
SUMMARY	xxv
1. GİRİŞ	1
1.1 Tezin Amacı	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Botanik Bilgiler	3
2.1.1 Lamiaceae (Labiatae) familyası	3
2.1.2 <i>Salvia</i> cinsi	3
2.1.3 <i>Salvia adenophylla</i> Hedge & Hub.-Mor	3
2.1.4 <i>Salvia verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> (Freyn&Bornm) Bornm	4
2.2 <i>Salvia</i> Türlerinin Halk Arasındaki Kullanışı.....	5
2.3 <i>Salvia</i> Türleri ile Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Aktivite Çalışmaları	6
2.4 Sekonder Metabolitler	11
2.4.1 Terpenler	12
2.4.2 Steroitler.....	20
2.4.3 Fenolik bileşikler	21
2.4.4 Flavonoitler	23
2.5 Antioksidanlar	26
2.5.1 Antioksidanların sınıflandırılması	32
2.5.1.1 Birincil antioksidanlar.....	32
2.5.1.2 İkincil antioksidanlar	33
2.5.2 Antioksidan aktivite yöntemleri.....	34
2.6 Antikolinesterazlar	35
2.6.1 AChE ve BChE inhibitörleri.....	35
2.6.2 Antikolinesteraz aktivite yöntemleri.....	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1 Bitkisel Materyaller	41
3.2 Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler	41
3.2.1 Kimyasal maddeler ve çözücüler	41
3.2.2 Çözeltilerin hazırlanması	42
3.2.2.1 Toplam fenolik miktar tayininde kullanılan çözeltiler.....	42
3.2.2.2 Toplam flavonoit miktar tayininde kullanılan çözeltiler.....	42
3.2.2.3 Antioksidan aktivite tayin yönteminde kullanılan çözeltiler	42
3.2.2.4 Antikolinesteraz aktivite yönteminde kullanılan çözeltiler.....	42

3.2.2.5 İnce tabaka kromatografisinde kullanılan belirteç çözeltisi	43
3.2.2.6 Jones reaktifi çözeltisinin hazırlanışı	43
3.3 Cihaz ve Gereçler	44
3.4 Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçerik Miktar Tayinleri	44
3.4.1 Toplam fenolik miktar tayini	44
3.4.2 Toplam flavonoit miktar tayini	45
3.5 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	46
3.5.1 DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi yöntemi	46
3.5.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu aktivitesi yöntemi	47
3.6 Antikolinesteraz Aktivite Yöntemi	48
3.6.1 Ellman yöntemi	48
3.6.1.1 AChE aktivite testi	49
3.6.1.2 BChE Aktivite testi	50
3.7 İstatiksel Hesaplamalar	50
3.8 Kromatografik Yöntemler	50
3.8.1 Kolon kromatografisi	50
3.8.2 İnce tabaka kromatografisi	51
3.9 Spektroskopik Yöntemler	51
3.9.1 UV spektroskopisi	51
3.9.2 IR spektroskopisi	51
3.9.3 NMR spektroskopisi	51
4. DENEYSEL BÖLÜM	53
4.1 Bitkilerin Ekstre Edilmesi	53
4.2 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Fenolik Miktar İçeriklerinin Belirlenmesi	54
4.2.1 Toplam fenolik miktar tayini	54
4.2.2 Toplam flavonoit miktar tayini	54
4.3 Antioksidan Aktivite Yöntemleri	54
4.3.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesinin belirlenmesi	54
4.3.2 Lipid peroksidasyon aktivitesinin belirlenmesi	55
4.4 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi	56
4.4.1 AChE % inhibisyon testi	56
4.4.2 BChE % inhibisyon testi	56
4.5 <i>S. adenophylla</i> ve <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> Bitkilerinin İzolasyonu ve Saflaştırma Çalışmaları	57
4.5.1 <i>S. adenophylla</i> bitkisinin aseton ve metanol ekstralarının fraksiyonlandırılması	57
4.5.2 <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> bitkisinin kök ve toprak üstü aseton ve metanol ekstralarının fraksiyonlandırılması	57
4.6 Oleanolik Asidin Potansiyel Aktif Yarı Sentezik Türevlerinin Sentezi	59
4.6.1 3-asetil-oleanolik asit sentezi	59
4.6.2 3-okso-oleanolik asit sentezi	59
4.6.3 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit sentezi	60
4.6.4 3-asetil-oleanoil-28-klorür sentezi	60
4.6.5 3-asetil-oleanoil-28-morfolid sentezi	61
4.6.6 Oleanolik asit 3-metil eter sentezi	62
5. BULGULAR	63
5.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Sonuçları	63
5.2 Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları	64
5.2.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	64

5.2.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi sonuçları.....	65
5.2.3 Antikolinesteraz aktivitesi sonuçları	66
5.3 <i>S. adenophylla</i> ve <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> Ekstresi Fraksiyonlarının Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarları ile DPPH ve Lipid Peroksidasyon İnhibisyon Aktivite Sonuçları	67
5.3.1 <i>S. adenophylla</i> aseton (Sad) ve metanol (SadM) ekstresinin fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarı	67
5.3.2 Sad ve SadM ekstresinin fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	68
5.3.3 Sad ve SadM ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi sonuçları	69
5.3.4 <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> kök aseton (SV), kök metanol (SVM) ve toprak üstü aseton+metanol (SVT) ekstresi fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları.....	70
5.3.5 SV ve SVM ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	71
5.3.6 SV ve SVM ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi sonuçları	72
5.4 <i>S. adenophylla</i> ve <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> Bitkilerinin Aseton ve Metanol Ekstrelerinden İzole Edilen Saf Bileşikler ve Yapı Tayini	73
5.4.1 <i>S. adenophylla</i> ve <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> bitkilerinden izole edilen saf bileşikler ve miktarları (% verim)	73
5.4.2 Saf bileşiklerin yapı tayini	74
5.4.2.1 Sad11.1= α -amirin=Urs-12-en-3 β -ol	74
5.4.2.2 Sad 3b-9= Oleanolik asit=3 β -hidroksi-olean-12-en-28-oik asit	76
5.4.2.3 Sad 7CK= Ursolik asit=3 β -hidroksi-urs-12-en-28-oik asit.....	77
5.4.2.4 Sad 3b-8= 3 β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid	79
5.4.2.5 Sad24-6-3= Asetofenon-4-O- β -glukopiranozit.....	81
5.4.2.6 SV3.8= Ferruginol= 8,11,13-abietatrien-12-ol	82
5.4.2.7 SV7.3.1= Horminon=7 α ,12-dihidroksi-8,12-abietadien-11,14-diol .	83
5.4.2.8 SV7.3.1.1=7 α -asetil-horminon.....	84
5.4.2.9 SV8.4= β -sitosterol=Stigmast-5-en-3-ol.....	85
5.4.2.10 SV8.4.1= Stigmasterol=Stigmast-5,22-dien-3-ol.....	86
5.4.2.11 SV8.2= 3-asetil- β -amirin	87
5.4.2.12 SVT91.2= Salvigenin=5-hidroksi-6,7,4'-trimetoksiflavon.....	88
5.4.2.13 SVT96.3.4= 6-hidroksi-apigenin-7,4'-dimetileter	89
5.6 İzole Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları.....	90
5.6.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları.....	90
5.6.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi sonuçları.....	91
5.6.3 Antikolinesteraz aktivite sonuçları.....	92
5.7 Yarı Sentetik Oleanolik Asit Türevlerinin Deneysel Sonuçları.....	94
5.7.1 3-asetil-oleanolik asit (2).....	94
5.7.2 3-okso-oleanolik asit (4)	94
5.7.3 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit (5)	94
5.7.4 3-asetil-olean-28-morfolid (6).....	94
5.7.5 Oleanolik asit 3-metil eter (7)	94
5.8 Yarı Sentetik Oleanolik Asit Türevlerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları	95
5.8.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları.....	95
5.8.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi sonuçları.....	96

5.8.3 Antikolinesteraz aktivite sonuçları.....	98
6. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	101
KAYNAKLAR.....	103
EKLER.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	163

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
NADH	: Nikotinamitadenin dinükleotit
NMR	: Nükleer magnetik rezonans
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•	: Tiyil radikalleri
RSO•	: Sülfenil radikalleri
RSO2•	: Tiyil peroksit radikalleri
s	: Saat
Sad	: <i>Salvia adenophylla</i> 'nın aseton ekstresi
SadM	: <i>Salvia adenophylla</i> 'nın metanol ekstresi

SV	: <i>Salvia verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> 'nın kök aseton ekstresi
SVM	: <i>Salvia verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> 'nın kök metanol ekstresi
SVT	: <i>Salvia verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> 'nın toprak üstü aseton+metanol ekstresi
subsp	: Subspecies
TMS	: Tetrametilsilan
TOC	: α -Tokoferol
Tween-40	: Polioksietilensorbitan monopalmitat
UV	: Ultraviyole spektroskopisi

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

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1 : Terpenlerin sınıflandırılması	12
Çizelge 2.2 : Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması	22
Çizelge 5.1 : Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar tayinleri sonuçları.	63
Çizelge 5.2 : Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi sonuçları	64
Çizelge 5.3 : Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları.	65
Çizelge 5.4 : Ekstrelerin antikolinesteraz % inhibisyon sonuçları.	66
Çizelge 5.5 : Sad ekstrelerinin fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları.	67
Çizelge 5.6 : SadM ekstrelerinin fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları.	68
Çizelge 5.7 : SV ekstrelerinin fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları.	70
Çizelge 5.8 : SVM ekstrelerinin fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları.	71
Çizelge 5.9 : <i>S. adenophylla</i> bitkisinden izole edilen saf bileşikler ve miktarları.	73
Çizelge 5.10 : <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> bitkisinden izole edilen saf bileşikler ve miktarları.	74
Çizelge 5.11 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin ^1H ve ^{13}C NMR δ değerleri	79
Çizelge 5.12 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları.	90
Çizelge 5.13 : İzole saf bileşiklerin lipid peroksidasyon % inhibisyonu sonuçları. ...	91
Çizelge 5.14 : İzole saf bileşiklerin antikolinesteraz % inhibisyon sonuçları.	92
Çizelge 5.15 : Yarı sentetik oleanolik asit türevlerinin DPPH serbest radikal giderim % inhibisyon aktivitesi sonuçları.	95
Çizelge 5.16 : Yarı sentetik oleanolik asit türevlerinin lipid peroksidasyon % inhibisyon aktivitesi sonuçları	96
Çizelge 5.17 : Yarı sentetik oleanolik asit türevlerinin antikolinesteraz % inhibisyon aktivitesi sonuçları.	98

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1 : <i>Salvia adenophylla</i> bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölge	4
Şekil 2.2 : <i>Salvia verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölge	4
Şekil 2.3 : Sugiol bileşiği.....	7
Şekil 2.4 : Forskalinon bileşiği	7
Şekil 2.5 : Candidissiol bileşiği	7
Şekil 2.6 : 12-demetilmultikaulin, 12-demetilmultiortokinon ve 12-metildehidroasetilhorminone bileşikleri.....	8
Şekil 2.7 : 4,12-dihidroksisapiraparakinon, ferruginol, 6,7-dehidroroyleanon bileşikleri.....	8
Şekil 2.8 : İğuestol bileşiği	9
Şekil 2.9 : Karnosik asit bileşiği	9
Şekil 2.10 : Rosmarinik asit bileşiği	10
Şekil.2.11 : Ursolik ve oleanolik asit bileşikleri.....	10
Şekil 2.12 : Sekonder metabolitlerin oluşumu.....	11
Şekil 2.13 : Terpenlerin oluşumu	13
Şekil 2.14 : <i>Salvia</i> ’lardaki seskiterpen örnekleri	14
Şekil 2.15 : <i>S. pomifera</i> ve <i>S. haypargeia</i> bitkilerinden abietan diterpen örnekleri .	15
Şekil 2.16 : <i>S. napifolia</i> ’dan izole edilen iki yeni ferruginol derivesi	16
Şekil 2.17 : Melisodorik asit bileşiği	16
Şekil 2.18 : 7 β -hidroksisandrakopimarik asit, 14-oxopimarik asit bileşikleri	17
Şekil 2.19 : Manoiloksit, isopimarik asit, 7-oxo-13-epi-pimaran-8,15-dien-18-oik asit bileşikleri	17
Şekil 2.20 : Salvilösolit metil ester ve salvilösolit-6,23-lakton bileşikleri	18
Şekil 2.21 : Yosgadensolid A ve yosgadensolid B bileşikleri	18
Şekil 2.22 : 6-dehidroksiyosgadensenol ve 6-dehidroksi-13-epi-yosgadensenol bileşikleri.....	18
Şekil 2.23 : <i>Salvia</i> türlerinden elde edilen bazı triterpenler	19
Şekil 2.24 : Salvilymiton ve salvilymitol bileşikleri	20
Şekil 2.25 : β -Karoten bileşiği	20
Şekil 2.26 : Steroitlerin iskelet yapısı	21
Şekil 2.27 : 2-Fenil benzopiran yapısı	23
Şekil 2.28 : Flavonoit sübtütentlerinin en yaygın yerleşme pozisyonları	25
Şekil 2.29 : Flavonoit iskeletleri	25
Şekil 2.30 : α -Tokoferolün lipit serbest radikallerini söndürdüktan sonra tokoferoksil radikaline dönüşmesi.....	29
Şekil 2.31 : Birincil antioksidanlar	33
Şekil 2.32 : İkincil antioksidanlar	34
Şekil 2.33 : Alzheimer hastalığının artan evrelerine göre beyin üzerine etkileri	36

Şekil 3.1 : Standart olan pirokatekol bileşiğinin açık yapısı.....	44
Şekil 3.2 : Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kersetinin açık yapısı	45
Şekil 3.3 : Galantamin bileşiği.....	48
Şekil 3.4 : Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması	49
Şekil 4.1 : 3-asetil-oleanolik asit sentezi	59
Şekil 4.2 : 3-okso-oleanolik asit sentezi	60
Şekil 4.3 : 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit sentezi	60
Şekil 4.4 : 3-asetil-oleanoil-28-klorür sentezi.....	61
Şekil 4.5 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid sentezi	61
Şekil 4.6 : Oleanolik asit 3-metil eter sentezi	62
Şekil 5.1 : <i>S. adenophylla</i> ve <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> bitkilerinin aseton ve metanol ekstralarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi	65
Şekil 5.2 : <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> aseton ve metanol ekstralarının lipid peroksidasyon % inhibisyonu.....	66
Şekil 5.3 : <i>S. adenophylla</i> ve <i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i> aseton ve metanol ekstralarının AChE ve BChE % inhibisyonu	67
Şekil 5.4 : Sad ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyonu.....	68
Şekil 5.5 : SadM ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyonu.....	69
Şekil 5.6 : SadM ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon % inhibisyonu	69
Şekil 5.7 : SV ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyonu.....	71
Şekil 5.8 : SV ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyonu.....	72
Şekil 5.9 : SV ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon % inhibisyonu.....	72
Şekil 5.10 : SVM ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon % inhibisyonu	73
Şekil 5.11 : α -amirin bileşiği	74
Şekil 5.12 : Oleanolik asit bileşiği	76
Şekil 5.13 : Ursolik asit bileşiği.....	77
Şekil 5.14 : 3 β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid (ursolik asit lakton) bileşiği	79
Şekil 5.15 : Asetofenon-4-O- β -glukopiranozit bileşiği	81
Şekil 5.16 : Ferruginol bileşiği	82
Şekil 5.17 : Horminon bileşiği.....	83
Şekil 5.18 : 7 α -asetil-horminon bileşiği.....	84
Şekil 5.19 : β -sitosterol bileşiği	85
Şekil 5.20 : Stigmasterol bileşiği	86
Şekil 5.21 : 3-asetil- β -amirin bileşiği	87
Şekil 5.22 : Salvigenin bileşiği	88
Şekil 5.23 : 6-Hidroksi-apigenin-7,4'-dimetileter bileşiği.....	89
Şekil 5.24 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi	90
Şekil 5.25 : Saf maddelerin β -karoten renk açılım yöntemi ile lipid peroksidasyon inhibisyon aktiviteleri.....	91
Şekil 5.26 : İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu	93
Şekil 5.27 : İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu	93
Şekil 5.28 : Yarı sentetik saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi ..	95
Şekil 5.29 : Yarı sentetik saf bileşiklerin lipid peroksidasyon aktivitesi.....	97
Şekil 5.30 : Yarı sentetik saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu.....	99
Şekil 5.31 : Yarı sentetik saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu	99

Şekil A.1 : α -amirin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	115
Şekil A.2 : α -amirin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)	116
Şekil A.3 : α -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu	117
Şekil A.4 : α -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR (DEPT) spektrumu	118
Şekil A.5 : α -amirin bileşiğinin gCOSY NMR spektrumu.....	119
Şekil A.6 : α -amirin bileşiğinin gHMQC spektrumu	120
Şekil B.1 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	121
Şekil B.2 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı).	122
Şekil B.3 : Oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.....	123
Şekil B.4 : Oleanolik asit bileşiğinin HSQC NMR spektrumu	124
Şekil B.5 : Oleanolik asit bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (alifatik bölge).....	125
Şekil B.6 : Oleanolik asit bileşiğinin HMBC NMR spektrumu	126
Şekil B.7 : Oleanolik asit bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (alifatik bölge)	127
Şekil C.1 : Ursolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	128
Şekil C.2 : Ursolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)	129
Şekil C.3 : Ursolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu	130
Şekil D.1 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28, 13β -olid bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	131
Şekil D.2 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28, 13β -olid bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı).....	132
Şekil D.3 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28, 13β -olid bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu	133
Şekil D.4 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28, 13β -olid bileşiğinin gHSQC spektrumu.....	134
Şekil D.5 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28, 13β -olid bileşiğinin IR spektrumu	135
Şekil E.1 : Asetofenon-4- <i>O</i> - β -glukopiranozit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	136
Şekil E.2 : Asetofenon-4- <i>O</i> - β -glukopiranozit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı).....	137
Şekil F.1 : Ferruginol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.....	138
Şekil F.2 : Ferruginol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı).....	139
Şekil G.1 : Horminin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	140
Şekil H.1 : 7-asetil-horminin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	141
Şekil I.1 : β -sitosetrol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	142
Şekil J.1 : Stigmasterol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.....	143
Şekil J.2 : Stigmasterol bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu	144
Şekil K.1 : 3-asetil- β -amirin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.....	145
Şekil K.2 : 3-asetil- β -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.....	146
Şekil L.1 : Salvigenin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	147
Şekil M.1 : 6-hidroksi-apigenin-7,4'-dimetileter bileşiğinin ^1H NMR spektrumu .	148
Şekil N.1 : 3-asetil-oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	149
Şekil N.2 : 3-asetil- oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	150
Şekil O.1 : 3-okso-oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	151
Şekil O.2 : 3-okso-oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu	152
Şekil O.3 : 3-okso-oleanolik asit bileşiğinin IR spektrumu	153
Şekil P.1 : 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.....	154
Şekil P.2 : 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit bileşiğinin ^{13}C NMR(APT)spektrumu	155
Şekil P.3 : 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit bileşiğinin IR spektrumu.....	156
Şekil R.1 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşiğinin ^1H NMR spektrumu	157
Şekil R.2 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu	158
Şekil R.3 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşiğinin IR spektrumu.....	159
Şekil S.1 : Oleanolik asit 3-metil eter bileşiğinin ^1H NMR spektrumu.....	160
Şekil S.2 : Oleanolik asit 3-metil eter bileşiğinin IR spektrumu	161

ŞEMA LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şema 2.1 : Antioksidan türleri.....	31

SALVIA ADENOPHYLLA VE SALVIA VERTICILLATA SUBSP. AMASIACA BİTKİLERİNDEKİ SEKONDER METABOLİTLERİN AKTİVİTE ODAKLI İZOLASYONU VE YARI SENTETİK TÜREVLERİNİN ANTİOKSİDAN VE ANTİKOLİNESTERAZ AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

Salvia türleri terpenik bitkilerce zengin olan Lamiaceae (Labiatae) familyası bitkileridir. Dünyada 900'ü aşkın *Salvia* türü, Türkiye'de ise 90 kadar *Salvia* türü doğal olarak yetişmektedir. Bu 90 türün ise yarısı endemik, yani yöreye hastır. *Salvia* türlerinin kimyasal yapısı gerek yurt dışı gerekse yurt içindeki bazı çalışma grupları tarafından incelenmektedir.

Salvia türlerinin sekonder metabolitleri başlıca terpenoit, steroit, flavonoit ve diğer fenolik bileşiklerden ibarettir. Özellikle taşıdıkları di- ve triterpenler nedeniyle antienflamatuvar, antiviral, hepatotoksik, sitosoksik/antitümör aktivitesinin yanı sıra taşıdıkları flavonların antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik vb. pek çok aktiviteye sahip olduğu bilinen bir gerçektir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, ilk aşamada *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor. (toprak üstü) ve *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* bitkilerinin (kök ve toprak üstü) sırasıyla aseton ve metanol ekstraları hazırlandı. Bu ekstraların toplam fenolik miktarları pirokatekole ve toplam flavonoit 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 asetilkolinesteraz (AChE) ve bütürlükolinesteraz (BChE) enzimlerine karşı belirlendi. Aktif *Salvia* ekstralarının başlıca sekonder metabolitlerini oluşturan triterpenoitler, flavonoitler ve steroit yapıdaki bileşikler izole edilerek saflaştırıldı, saf bileşiklerin yapıları çeşitli spektroskopik (başlıca NMR, kütle, IR ve UV) yöntemlerle belirlendi. *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* kök aseton ekstresinden altı, kök metanol ekstresinden iki, toprak üstü aseton+metanol ekstresinden dört madde olmak üzere farklı on madde elde edildi. Bu bileşikler terpenik yapıdaki ferruginol, horminin, asetilhorminin, oleanolik asit ve ursolik asit, 3-asetil- β -amirin, steroid yapıdaki β -sitosterol ve stigmasterol ile flavon yapısındaki salvigenin ve 6-hidroksi-apigenin-7,4'-dimetileter den ibaretti. *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor. aseton ekstresinden ise dört, metanol ekstresinden bir olmak üzere toplam beş madde elde edildi. Elde edilen saf maddelerin ikisi diğer bitkiden de elde edilen oleanolik ve ursolik asit, diğerleri ise triterpenik yapıdaki α -amirin ve 3- β -hidroksi-urs-11-en-28,13- β -olid ve basit bir şekerli fenolik bileşik olan Asetofenon-4-O- β -glukopiranozit olarak belirlendi.

Bu saf bileşiklerin antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri ekstraler için kullanılan yöntemler ile incelendi.

İkinci aşamada ise, bu iki *Salvia* türünden izole edilen ve genelde *Salvia* türlerindeki ana bileşen olan triterpenik yapıdaki oleanolik asit den hareketle altı farklı türevi 3-asetil-oleanolik asit, 3-okso-oleanolik asit, 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit, 3-asetil-oleanoil-28-klorür, 3-asetil-oleanoil-28-morfolid, oleanolik asit 3-metil eter hazırlandı ve yapıları spektroskopik analizlerle belirlendi ve antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteleri incelendi.

Bu çalışma, İstanbul Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33103

Ayrıca bu tez çalışması Tubitak Bilimsel Araştırma Grubu (TBAG) tarafından da desteklenmiştir. Proje No: 107T592

BIOACTIVITY DIRECTED ISOLATION OF SECONDARY METABOLITES OF *SALVIA ADENOPHYLLA* AND *SALVIA VERTICILLATA* SUBSP. *AMASIACA* PLANTS AND INVESTIGATION OF THEIR ANTIOXIDANT AND ANTICHOLINESTERASE ACTIVITIES INCLUDING SEMI-SYNTHETIC DERIVATIVES

SUMMARY

Salvia species are Lamiaceae (=Labiatae) family plants which are rich in terpenoids. Over 900 *Salvia* species grown throughout the world while there are 90 *Salvia* species in Turkey, and 45 of them are endemic. Chemical constituents of *Salvia* species have been studying by some of researchers from both Turkey and abroad.

Secondary metabolites of *Salvia* species consist of terpenoids, steroids, flavanoids and other phenolics. It is a known fact that *Salvia* species exhibit anti-inflammatory, antiviral, hepatotoxic, cytotoxic/antitumor activities due to their di- and triterpenic constituents as well as antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and etc. properties of their flavonoid constituents.

In this study, in the first step, *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor. (aerial parts) and *Salvia verticillata* ssp. *amasiaca* (roots + aerial parts) plants will be exhausted by acetone, and subsequently by methanol. Total phenolic and flavonoid contents of each extract were determined as pyrocatechol and quercetin equivalents, respectively. The antioxidant activity of the extracts was established by using two test systems, β -carotene bleaching for lipid peroxidation inhibition, and DPPH free radical scavenging methods. Extracts were also screened for the anticholinesterase activity by Ellman method against acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BChE) enzymes. The triterpenoids, steroids and flavonoids, which form of the main secondary metabolites of the active *Salvia* extracts, were isolated and purified, and structures of the pure compounds will be elucidated by spectroscopic methods, namely NMR, mass, infrared and ultraviolet spectroscopic techniques. The six compounds were isolated from the roots acetone extract of *Salvia verticillata* ssp. *amasiaca* while two compounds from its roots methanol extract and four compounds from its aerial parts (acetone + methanol) extract. Their structures were identified as terpenoids ferruginol, horminone, acetylhorminone, oleanolic acid and ursolic acid, 3-acetyl- β -amyirin, steroids β -sitosterol and stigmasterol, and flavones salvigenin and 6-hydroxy-apigenin-7,4'-dimethyl ether.

The aerial parts of *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor. afforded five compounds, four of them from its acetone extract, and only one from its methanol extract. The two of the them were identified to be oleanolic acid and ursolic acid which were also isolated from the other plant. Structures of the other three compounds were elucidated as triterpenoids α -amyirin and 3- β -hydroxy-urs-11-en-28,13- β -olide, and a simple phenolic compound with sugar moiety Acetophenone-4-*O*- β -glucopyranoside. Antioxidant and anticholinesterase activities of the pure compounds were also investigated by the same methods used for the extracts.

In the second step, it is aimed to prepare by semi-synthetically more active derivatives of triterpene oleanolic acid which is the main constituent of the two extracts as well as of the most of *Salvia* species, and six derivatives of oleanolic acid 3-acetyl-oleanolic acid, 3-oxo-oleanolic acid, 3-oxime-olean-12-en-oic acid, 3-acetyl -oleanoyl-28-chloride, 3-acetyl-oleanoyl-28-morpholide, oleanolic acid-3-metil ether were prepared, and their structures were determined by spectroscopic methods and their antioxidant and anticholinesterase activities were also investigated.

The present work was supported by the Research Found of Istanbul Technical University Project No: 33103

In addition to this work was supported by the TUBITAK. Project No: TBAG 197T592.



***Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor.**

Denizli 08.06.2008 - Foto : Ferhat Celep



***Salvia verticillata* L. subsp. *amasiaca* (Freyn&Bornm.) Bornm.**

Erzurum 06.10.2008 - Foto : Seda Damla Hatipoğlu

1. GİRİŞ

1.1 Tezin Amacı

Tıbbi bitkiler eski çağlardan beri halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan biyolojik aktivite gösteren materyallerdir. *Salvia* türlerinin sekonder metabolitleri başlıca terpenoit, steroid, flavanoit ve diğer fenolik bileşiklerden ibarettir. *Salvia* bitkisi eski çağlardan beri halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve çay olarak içilmektedir. Ayrıca bazı ülkelerde baharat olarak da kullanılmaktadır. Özellikle taşıdıkları di- ve triterpenler nedeniyle antienflamatuvar, antiviral, hepatotoksik, sitosoksik/antitümör aktivitelerinin yanı sıra taşıdıkları flavonların antioksidan, antimikrobiyal, sitotoksik vb. pek çok aktiviteye sahip olduğu bilinen bir gerçektir.

Bu tez çalışmasında şimdiye kadar kimyasal olarak çalışılmamış Türkiye'ye endemik bir tür olan *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor ve Türkiye'de yaygın olarak yetişen *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* türlerinin aseton ve metanol ekstraherinin hazırlanarak antioksidan (DPPH serbest radikal giderimi ve lipid peroksidasyonu inhibisyonu) ve antikolinesteraz (AChE ve BChE inhibisyonu) aktivitelerinin incelenmesi, başlıca sekonder metabolitlerinin (terpenoitler, flavonoitler ve steroid yapıdaki bileşikler) izole edilmesi ve bunların çeşitli kromatografik yöntemlerle saflaştırılarak yapılarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Daha sonra bu iki *Salvia* türünde yüksek oranda bulunan triterpenik bileşikler olan oleanolik asit (veya ursolik asit) in daha aktif olabilecek yarı sentetik türevlerinin hazırlanarak antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Oksidasyonun, kanser ve bağışıklık sisteminin zayıflaması ve hatta yaşlanma ile ilgili pek çok hastalık (Alzheimer vb. hafıza kaybı ve bunama ile birlikte seyreden) da önemli bir rol oynadığı bilinen bir gerçektir. Bir TÜBİTAK projesi çerçevesinde araştırdığımız *Salvia* türlerinin antioksidan ve antikolinesteraz etkili bileşiklerinin izolasyonu ve yapı tayini çerçevesinde bir seri *Salvia* türünün antioksidan ve antikolinesteraz aktiviteden sorumlu bileşiklerini elde etmeyi hedefledik.

Kolinesterazlar olarak bilinen asetilkolinesteraz (AChE) ve bütirilkolinesteraz (BChE) enzimlerinin, özellikle de AChE'nin Alzheimer hastalığının patojenezinde rol oynayan ana enzimlerden biri olduğu varsayıldığından bu tez çalışmasında iki *Salvia* türünün önce ekstralarının ve daha sonra da bu ekstralardan izole edilen bileşiklerinin *in vitro* olarak hem antioksidan, hem de anti kolinesteraz etkilerini inceledik. Daha önceki yıllarda gerek bizim gerekse dünyadaki diğer bazı çalışma gruplarının farklı aktivitelerini inceleyerek potansiyel ilaç ajanı olarak düşünülen ve 2000 yılında doğal antiaging ajan olarak Chem & Industry dergisinde lanse edilen ursolik asit ve onun izomeri olan oleanolik asit hem Türkiye'de yetişen pek çok *Salvia* türünün ana bileşenidir hem de bu çalışmanın materyali olan iki bitkiden de yüksek verimle elde edilmiştir. Fakat bu triterpenik asitlerin orta derecede antikolinesteraz aktivite göstermesi nedeniyle potansiyel aktif türevlerini hazırlamayı amaçladık ve oleanolik asitten hareketle altı farklı türevini sentezleyerek antioksidan ve antikolinesteraz aktivitelerini inceledik ve hazırladığımız türevlerden oleanolik asit 3-metil eter hariç hepsi oleanolik asitten çok daha yüksek, hatta galantamin ile yarışır düzeyde asetilkolinesteraz aktivite göstermişlerdir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Botanik Bilgiler

2.1.1 Lamiaceae (Labiatae) familyası

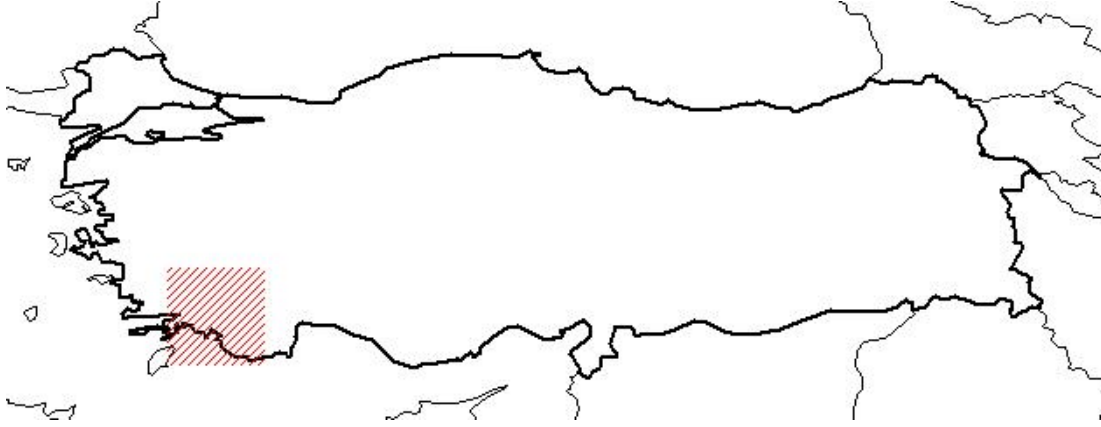
Salvia cinsi, Lamiaceae familyasının bir üyesidir. Lamiaceae familyasında bir, iki ya da çok yıllık otsular veya çalimsılar bulunur. Bu bitkiler salgı tüyü taşırlar ve kokuludurlar. Lamiaceae familyası tıpta ve parfümeride kullanılan birçok uçucu yağ içeren bir familya olarak önem taşımaktadır. Uçucu yağ, yaprak epiderması üzerindeki salgı tüylerinde bulunur. Başlı sekiz hücreli pul şeklindeki salgı tüyleri bu familya için karakteristiktir (Baytop, 1996). 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 (Davis, 1982). 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 (Başer, 2006). Lamiaceae familyasındaki birçok türün hem süs bitkisi olarak hem de tıbbi özelliklerinden dolayı kültürü yapılmaktadır.

2.1.2 *Salvia* cinsi

Çoğunlukla aromatik, otsu, yarı çalimsı veya çalimsı, çok yıllık, nadiren iki veya 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 (Davis, 1982).

2.1.3 *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor

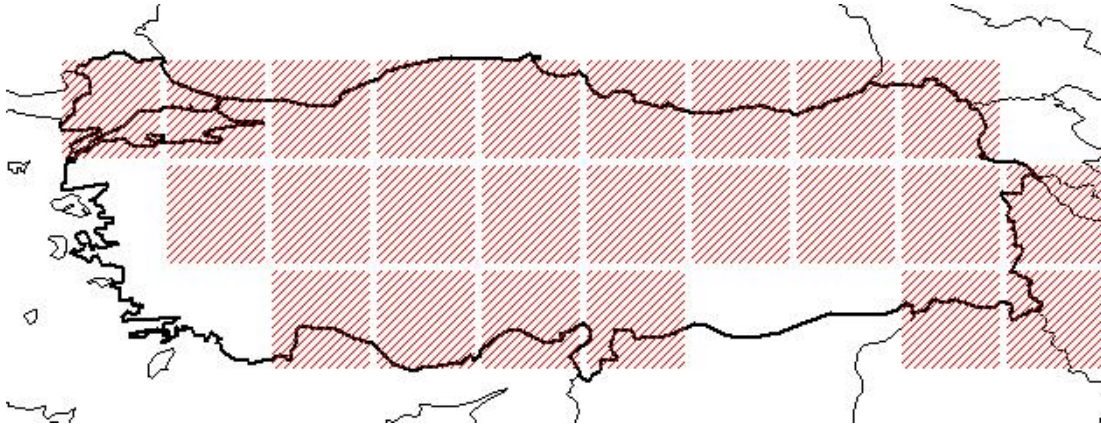
S. adenophylla bitkisi çok yıllık otsu bir bitkidir, makilerde ve meşe ormanlarında 950-1180 m yükseltilerde bulunur. Çiçeklenme mevsimi Mayıs-Haziran aylarıdır. Endemiktir yani sadece bulunduğu yöreye has olarak ülkemizde Güney Batı Anadolu bölgesinde Burdur-Denizli illerinde dağılım göstermektedir.



Şekil 2.1 : *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölge

2.1.4 *Salvia verticillata* L. subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm

Yaprakları oblong, eliptik veya oblong ovat, yuvarlak veya hemen hemen kordattır, tüy örtüsü kısa ve az çok törpümsü tüylüdür. Boyu 15-50 cm olan bitki az dallanmıştır. Çiçeklenme mevsimi Mayıs-Eylül aylarıdır. Kafkasya, İran ve Kuzey Irak’ta bulunan bu alt tür özellikle ülkemizde çok yaygındır. Başlıca Kuzen Anadolu olmak üzere Orta, Doğu ve Güney Anadolu’da baştan başa yaygın olup Batı Anadolu’nun da bazı yörelerinde yayılış göstermektedir (Davis, 1982).



Şekil 2.2 : *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* bitkisinin Türkiye’de bulunduğu bölgeler

2.2 *Salvia* Türlerinin Halk Arasındaki Kullanılışı

1. Genel bir anti-enflamatuar olarak kullanılır
2. Gece terlemelerine karşı ve ateş düşürücü olarak kullanılır (Fluck 1988), (Lust 1986).
3. Antiseptik özellikleri nedeniyle boğaz iltihaplanmalarında özellikle ağız ve dil yaralarında gargara olarak kullanılır (British Herbal Pharmacopoeia 1983).
4. Karın ve mide ağrılarına karşı ve spazm giderici olarak hazımsızlık sorunlarında kullanılır (Evans 1989).
5. Hamilelik boyunca rahim kaslarının uyarılmasını engellemek için kullanılır (Fluck 1988; Mills 1989).
6. Cinsel güçsüzlüğün giderilmesinde kullanılır (Phelps-Brown, 1993).
7. Dermatolojide dudak uçuklarında, ağız, yüz, el, ayak, parmak siğillerinin giderilmesinde, şiş, kesik, yaralı ve diğer sorunlu derilerin iyileşmesinde kullanılır (Boyd, 1984) ve antifungal olarak da kullanılır (Stuart, 1986).
8. Grieve (1984) romatizmal ağrılarda merhem olarak da kullanıldığını belirtmiştir. Bu merhem kas ağrılarında, sert eklemLerin gevşetilmesinde ve siyatikte de kullanılmaktadır (Back, 1987).
9. Yara iyileştiricisi olarak kullanılır. İçerdiği tanenlerden ötürü kanama durdurucu ve antienflamatuar olarak kullanılır (Grieve, 1984).
10. Varisli damarların iyileşmesinde ve bacaklarda bulunan siğillerin giderilmesinde kullanılır (Trattler, 1985).
11. Saç dökülmelerinde ve organik saç boyalarında kullanılır (Valnet 1986).
12. İnsektisit olarak da kullanılmaktadır (Valnet, 1986).
13. Sinir sistemi ile ilgili rahatsızlıklarda örneğin titreme, bas dönmesi, bunalım gibi depresif rahatsızlıklarda da kullanılır (Lust, 1986).

14. Alzheimer hastalığının tedavisinde ve benzer şekilde hafıza kaybı ile seyreden nörolojik rahatsızlıkların tedavisinde kullanılma potansiyeline sahiptir (Onlooker, 1995).
15. Emziren loğusa annelerin sütlerinin artırılması amacıyla kullanılır (Leung, 1980).

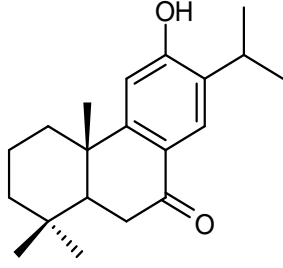
2.3 *Salvia* Türleri İle Yapılan Kimyasal Araştırmalar ve Aktivite Çalışmaları

Antibiyotiklerin keşfine kadar, *Salvia* şifalı bitki çayları karışımlarında kullanılıyordu, tüberküloz hastalığında ve ateşli gece terlemelerine karşı hastalara öneriliyordu. Bitkinin uçucu yağları hala yemeklerde tatlandırıcı sos olarak, likörlü çikolatalarda esans olarak kullanılmaktadır. Bunu yanı sıra antioksidan ajan olarak kullanılmaktadır. *Salvia officinalis* L. çeşitli biyolojik aktiviteler gösterir. Örneğin, antibakteriyel, mikostatik, virütik, astingent ve antihidrotik olarak aktivite gösterirler (Anonyms, 1994). *Salvia* türleri içerdiği aktif bileşenler ile akut ve kronik bronşitin de tedavisinde kullanılmaktadır. Hayvanlarda yapılan çalışmalarda *Salvia* ekstraktları ayrıca merkezi sinir sistemi (CNS) ile ilgili hastalıklarda da kullanılmaktadır (Newall ve diğ.,1996). *S. haematodes* Wall. bitkisinin önemli antidepresant özellikleri bulunmuştur (Akbar ve diğ., 1985). *S. desoleana* Atzei&Picci türünün geleneksel tıpta regl düzenleyicisi olduğu ayrıca sindirim ve CNS rahatsızlıklarında kullanıldığı bildirilmiştir (Peano ve Satta, 1992). *Salvia*'nın dünyada bilinen 900'ü aşkın türü vardır. Bitkinin toprak üstü kısımları içerdiği monoterpenlerin yanı sıra flavonoit ve triterpenler de içerir. Diterpenoitler ise esas olarak bitkilerin kök kısmında bulunur. *Salvia*'ların aktivite mekanizmalarını açıklamak için bu bitkilerden izole edilen bileşiklerin yapı-aktivite ilişkileri (SAR) üzerine ilişkili birçok çalışma yapılmaktadır.

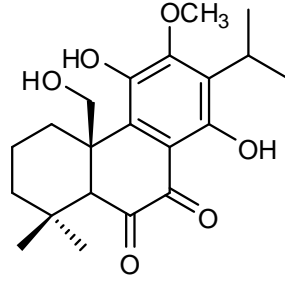
Antimikrobiyal Aktiviteler

Çoğunlukla bitkinin uçucu yağları ile birlikte monoterpenlerin içerdiği bileşenlerin antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. *S. officinalis* L., *S. lavandulifolia* Vahl., *S. triloba* = *S. fruticosa* Mill. gibi *Salvia* türleri uçucu yağ bakımında zengindir (Biondi ve diğ., 1993).

S. albocaerulea Lidl.'den izole edilen sugiol bileşiği (Şekil 2.3) Gram-pozitif bakterilerine karşı antibakteriyel aktivite göstermiştir.

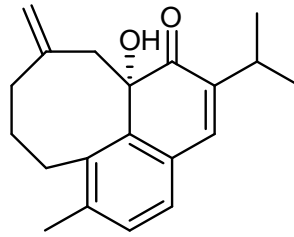


Şekil 2.3 : Sugiol bileşiği



Şekil 2.4 : Forskalinon bileşiği

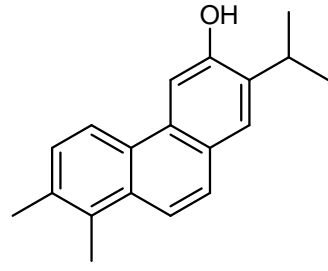
Diğer bir antibakteriyel aktivite gösteren abietan diterpen ise forskalinon'dur. (Şekil 2.4) Bu bileşik *S. forskahlei* L., bitkisinden izole edilmiştir (Ulubelen ve diğ., 1996). *Salvia ceratophylla* bitkisinden izole edilen diterpenlerin özellikle candidissiol bileşiğinin yüksek antibakteriyel aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Gören, 2001).



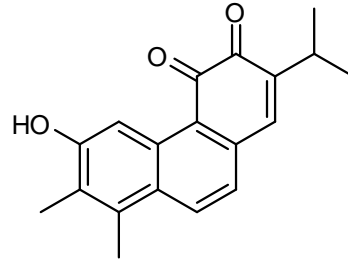
Şekil 2.5 : Candidissiol bileşiği

Antitüberküloz Aktivitesi

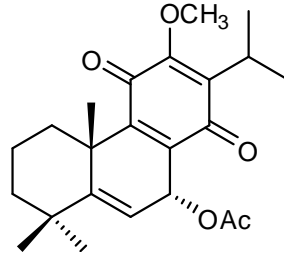
S. multicaulis bitkisinden izole edilen norditerpenoit ve diterpenoitler; 12-demetilmultikaulin, 2-demetilmultiortokinon ve 12-metil-5-dehidroasetilhorminonun (Şekil 2.6) antibiyotiklerle yarışır düzeyde yüksek antitüberküloz aktivite gösterdiği grubumuz tarafından belirlenmiştir (Ulubelen ve diğ., 1997).



12-demetilmultikaulin



2-demetilmultiortokinon

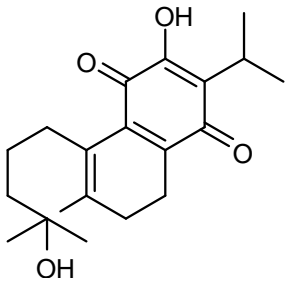


12-metil-5-dehidroasetilhorminon

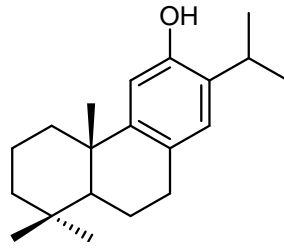
Şekil 2.6 : 12-demetilmultikaulin, 2-demetilmultiortokinon ve 12-metil-5-dehidroasetilhorminon

Kardiyovasküler Aktivitesi

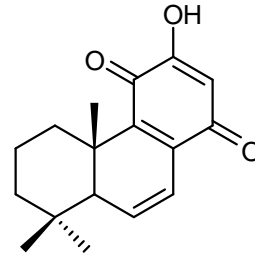
Salvia eriophora bitkisinin köklerinden izole edilen aethiopinone, salvipisone, horminon, asetilhorminon, ferruginol, 4,12-dihidroksisapriparakinone, salvilimbiol gibi çeşitli diterpen bileşikler üzerinde kardiyovasküler aktivite testi uygulanarak içlerinden 4,12-dihidroksisapriparakinon bileşiğinin oldukça yüksek kardiyovasküler aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (Ulubelen ve diğ., 2002).



4,12-dihidroksisapriparakinon



Ferruginol

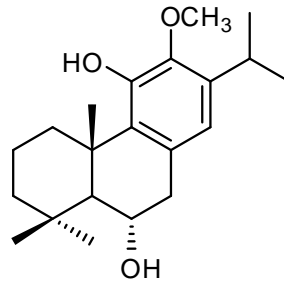


6,7-dehidroroyleanon

Şekil 2.7 : 4,12-dihidroksisapriparakinon, ferruginol, 6,7-dehidroroyleanon bileşikler

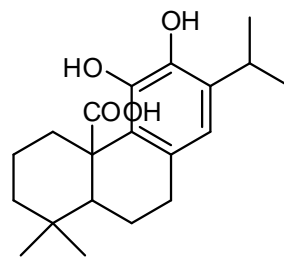
Antioksidan, Antienflamatuar ve Antikanser Aktivitesi

Salvia barrelieri bitkisinin kök kısmından izole edilen taksodion, ferruginol, iguestol ve demetilinororoleanon diterpen bileşikleri DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi, Lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi, ABTS katyon radikal giderimi aktivitesi, süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi ve CUPRAC metodları gibi çeşitli antioksidan yöntemleri ile aktiviteleri incelenmiştir. Oldukça yüksek antioksidan aktivite gösteren bileşiklerin içinden ayrıca iguestolün standartlardan (BHT, α -TOC) daha yüksek süperoksit anyon radikal giderim aktivitesi gösterdiği tespit edilmiştir (Kolak ve diğ., 2009).



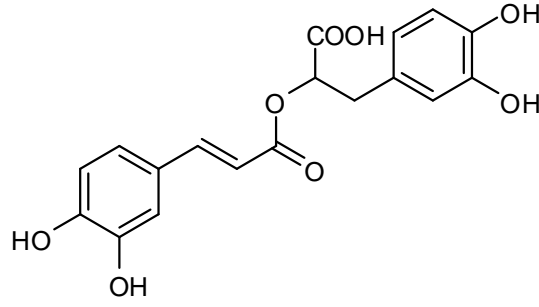
Şekil 2.8 : İguestol bileşiği

Salvia türleri flavonoit ve diğer fenolik bileşiklerin yanı sıra fenolik yapıdaki abietan diterpenler nedeniyle antioksidan aktivitesine sahip bitkilerdir (Chipault ve diğ., 1956). Bunlardan en iyi bilinen ve ilk keşfedilenlerinden biri karnosik asittir.



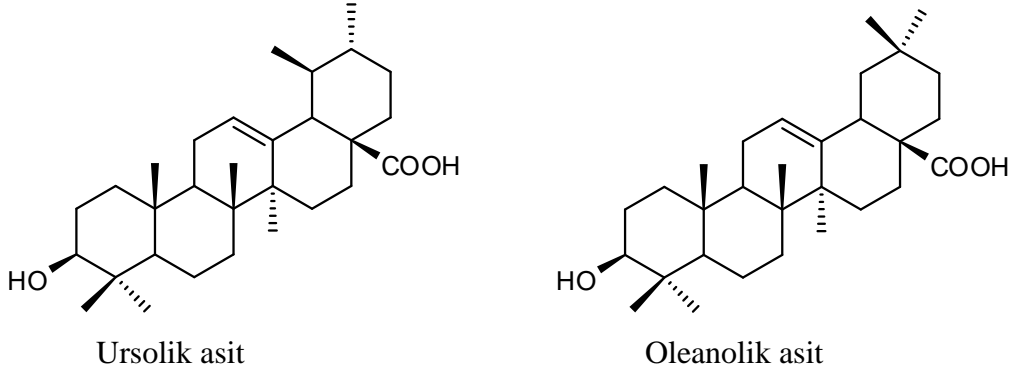
Şekil 2.9 : Karnosik asit bileşiği

Salvia türlerinde de bulunan yüksek antioksidan özellik gösteren dimerik yapıdaki rosmarinik asitin (2-O-(3,4-Dihidroxy-E-cinnamoyl)) DPPH serbest radikal giderim aktivitesi incelendiğinde askorbik asit ile yarışır düzeyde olduğu belirlenmiştir. ($IC_{50}=2,7\mu\text{g/mL}$)



Şekil 2.10 : Rosmarinik asit bileşiği

Ursolik asit ve oleanolik asit gibi triterpen yapıdaki bileşikler ise kuvvetli sitotoksik aktiviteye sahiptirler (Lee ve diğ., 1987) (Fang ve Mc Laughlin, 1989).



Şekil 2.11 : Ursolik ve oleanolik asit bileşikleri

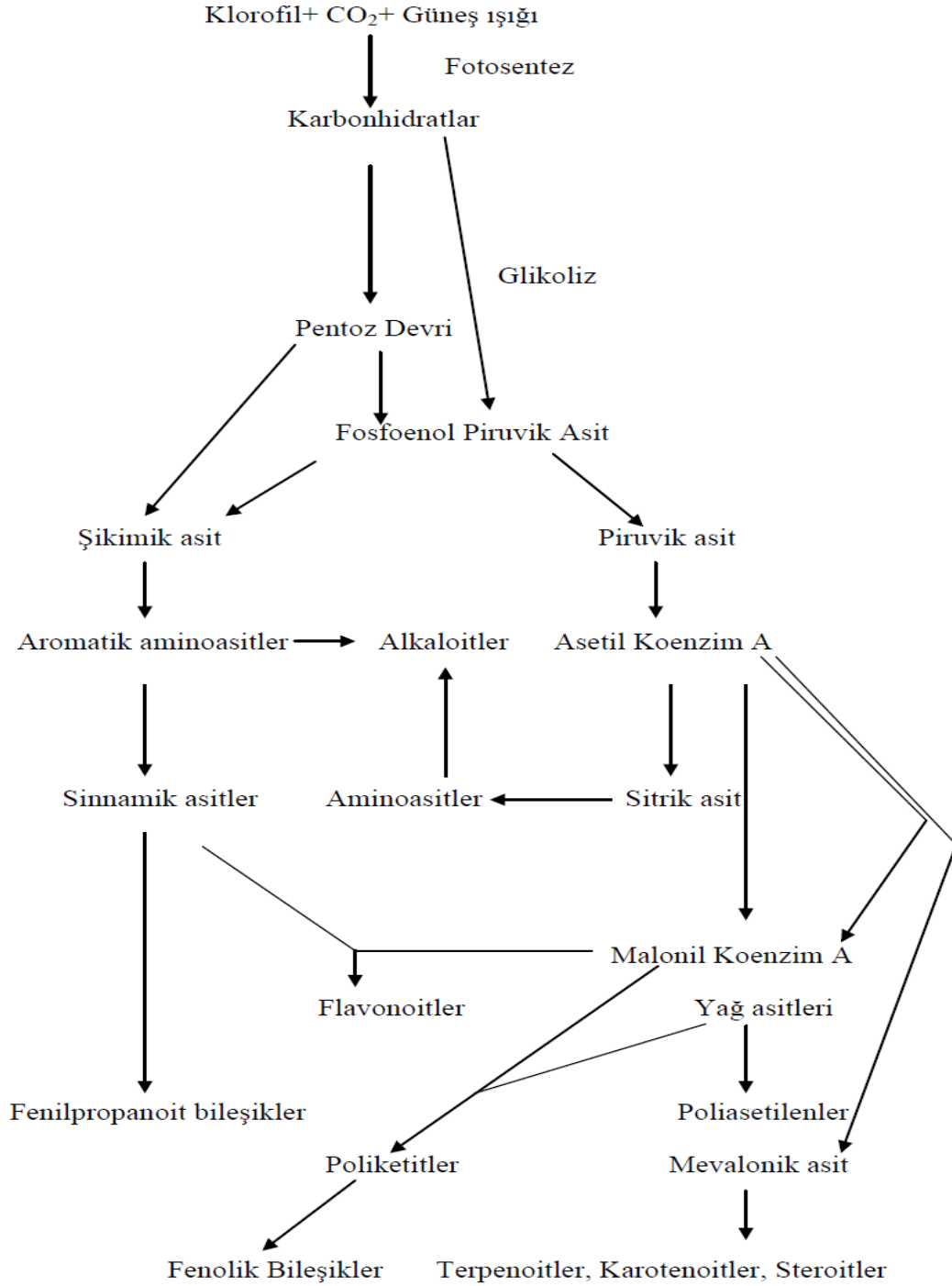
Merkezi Sinir Sistemi Aktivitesi (Central Nervous System Aktivitesi = CNS)

Yapılan in vitro çalışmalar göstermiştir ki diterpen benzeri yapılar örneğin karnosik asit ve karnosol bileşikleri beyin dokularının içerisindeki GABA reseptörleri ile bağlanarak aktif inhibitör olarak merkezi sinir sisteminde kullanılırlar (Rutherford ve diğ., 1992).

Yapılan biyoaktivite çalışmalarında bazı *Salvia* türlerinin antimitojenik (Natake ve diğ., 1989), antiülser (Murakami ve diğ., 1990), antispasmodik (Todorov ve diğ., 1984), hipoglisemik (Shabana ve diğ., 1990) ve hepatoprotektif (karaciğer koruyucu) aktiviteye de sahip oldukları belirtilmiştir (Kang ve diğ., 1997).

2.4 Sekonder Metabolitler

Yaşamsal faaliyetler için gerekli olan primer metabolitlerden (aminoasitler, basit karakterli lipidler ve yağlar, basit şekerler) enzimatik yollarla sekonder metabolitler oluşur. Sekonder metabolitlerin oluşumu Şekil 2.12'de gösterilmiştir (Geissman ve Crout, 1969).



Şekil 2.12 : Sekonder metabolitlerin oluşumu

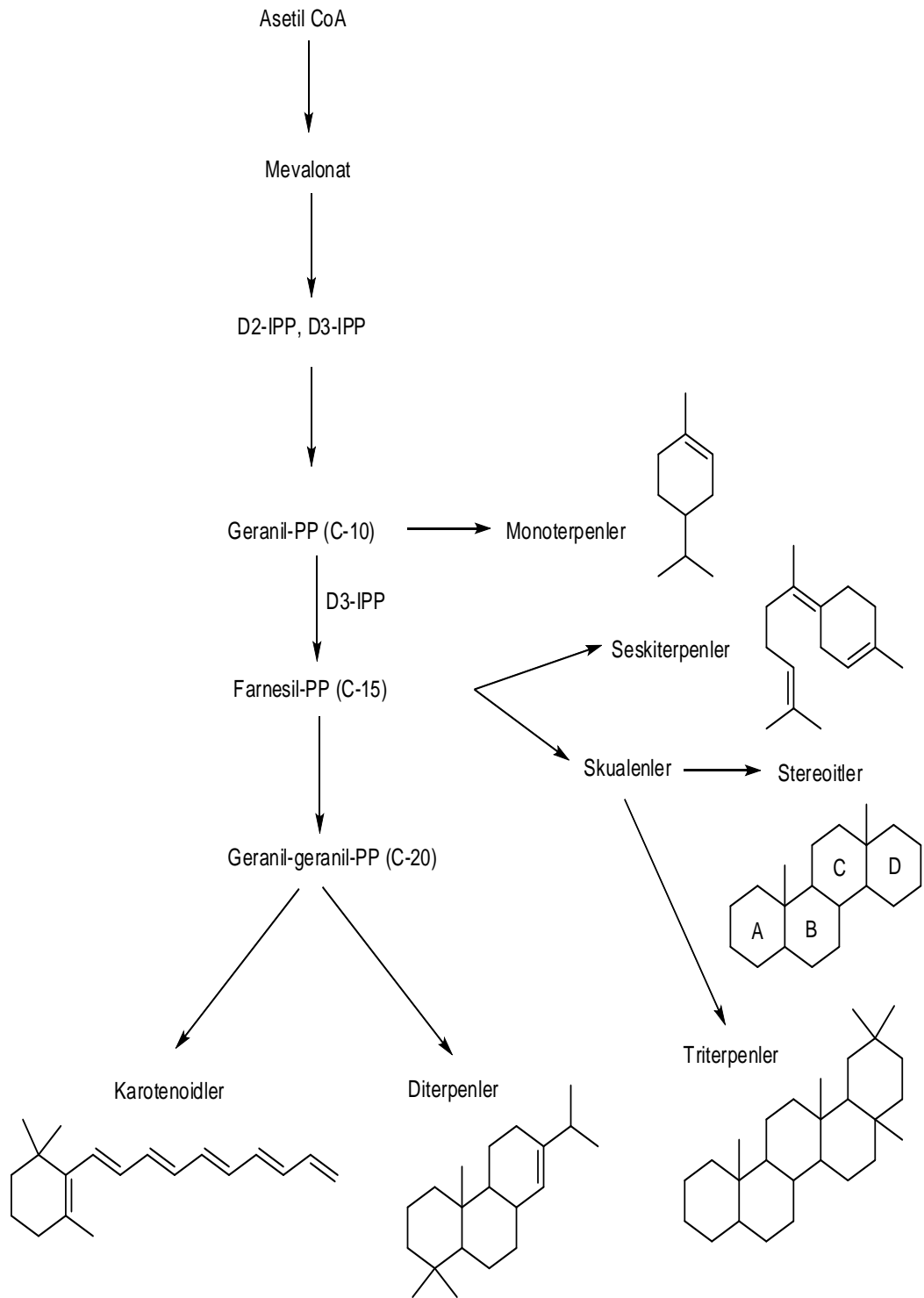
2.4.1 Terpenler

Terpenler doğal bileşikler içerisinde en yaygın olan bileşikler olup yapıları oldukça farklılık gösteren küçük organik moleküllerdir. 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 (Topcu ve diğ., 2001).

Literatür araştırmaları ve bizim deneyimlerimiz göstermiştir ki, *Salvia* türlerinin ana bileşenleri flavanoit ve terpenoitler olmaktadır. 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 (Boiteau ve diğ., 1969).

Çizelge 2.1 : Terpenlerin sınıflandırılması.

İzopren sayısı	Karbon sayısı	Sınıfı
1	5 C	Hemiterpenler
2	10 C	Monoterpenler
3	15 C	Seskiterpenler
4	20 C	Diterpenler
5	25 C	Sesterpenler
6	30 C	Triterpenler
8	40 C	Tetraterpenler
n	(5C)n	Politerpenler



Şekil 2.13 : Terpenlerin oluşumu

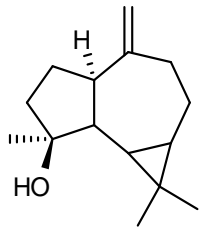
Monoterpenler (C₁₀)

İki izopren ünitesinin bağlanmasından oluşan on karbonlu bileşiklerdir.

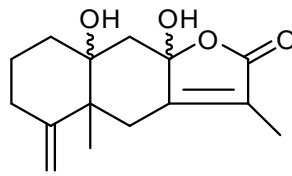
Monoterpenlerde otuzsekiz farklı iskelet tipine rastlanmıştır. Bunların çoğu düzenli tiptedir, yani iki izopren molekülü ‘baş-kuyruk’ bağı ile bağlıdır. Birçok monoterpenin doğada tek bir izomeri bulunur. Fakat aynı bitkide iki izomerin bulunması haline sıkça rastlanır. Monoterpenlerin en yaygın kullanılanları α -pinen ve β -pinen’dir. Çam ağaçlarında bulunurlar ve plastik sanayinin hammaddesi, parfümeri sanayinin ise başlangıç maddesi olarak kullanılırlar. Bunun yanı sıra monoterpenler antispazmolitik, 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 (Manitto, 1981).

Seskiterpenoitler (C₁₅)

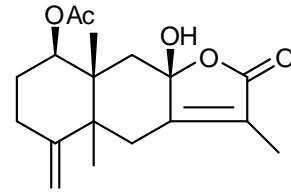
Seskiterpenoitler *Salvia* türlerinde nadir olarak bulunurlar. *S.yosgadensis* bitkisinden izole edilen seskiterpen spathulenol, seskiterpen lakton olan istanbulin D, 1β -acetoxy- 8β -hydroxyeudesman-4(15),7-dien-8,12-olid bunların başlıca örnekleridir (Topcu ve Ulubelen, 1996).



spathulenol



istanbulin D



1β -acetoxy- 8β -hydroxy-
eudesman-4(15),7-dien-8,12-olid

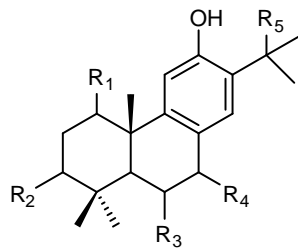
Şekil 2.14 : *Salvia* lardaki seskiterpen örnekleri

Diterpenoitler (C₂₀)

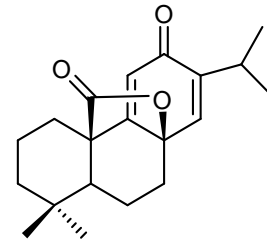
Salvia türleri abietan, klerodan, pimaran ve labdan tipli diterpenoitler içerirler.

Abietan Diterpenoitler

Türkiye’de yetişen *Salvia* türlerinde birçok biyolojik aktiviteye sahip yeni abietan diterpenoitler izole edilmiştir. Örneğin Hypargenin A ve B (Şekil 6,7) antibakteriyel aktivite gösterirler. Bu ürünler *S. hypargeia* bitkisinden izole edilirken (Ulubelen et al., 1988) ilginç bir abietan diterpenoid olan wiedalakton (Şekil 2.15) *S. wiedemanni* Boiss. bitkisinden izole edilmiştir (Ulubelen ve diğ., 1991).



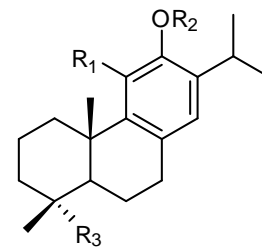
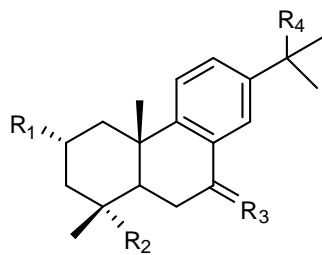
hypargenin A; R₁=R₂=O, R₂=R₅=H, R₃=βOH



wiedalakton

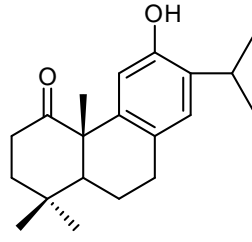
hypargenin B; R₁=R₂=R₃=H, R₄=O, R₅=OH

S. pomifera’dan yeni yedi diterpenoid A-G *S. napifolia* Jacq bitkisinden ise 1-okso-ferruginol ve 6-okso-ferruginol (Şekil 2.15) izole edilmiştir (Ulubelen ve Topcu, 1992b).

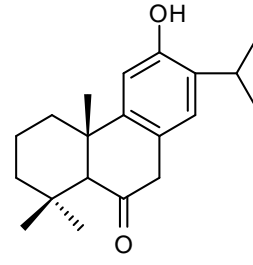


	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		R ₁	R ₂	R ₃
A	H	CH ₂ OH	H	H	B	H	H	CH ₂ OAc
C	OH	Me	H	H	D	OH	Me	COOH
E	OH	Me	O	H				
F	OH	Me	O	OH				
G	H	CH ₂ OAc	O	H				

Şekil 2.15 : *S. pomifera* ve *S. haypargeia* bitkilerinden abietan diterpen örnekleri



1-oksoferruginol

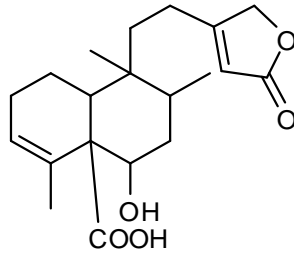


6-oksoferruginol

Şekil 2.16 : *S. napifolia* 'dan izole edilen iki yeni ferruginol derivesi

Clerodan Diterpenoidler

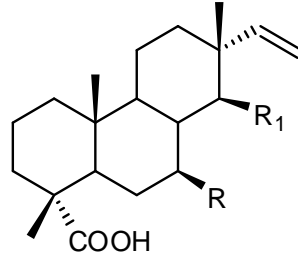
Amerikan *Salvia* türleri çoğunlukla klerodan tipli diterpenoitler içerirken nadir olarak da abietan diterpenoit içerirler. Bir Meksika bitkisi olan *S. melissodira* Lag. ve *S. languiduline* (Şekil 2.17) den bir klerodan diterpenoit olan melisodorik asit izole edilmiştir (Rodriguez-Hahn ve diğ., 1973).



Şekil 2.17 : Melisodorik asit bileşiği

Labdan ve Pimaran Diterpenoitler

Bu tip diterpenoitler diğ er Lamiaceae familyası bitkilerinde bulunmasına rağmen *Salvia* türlerinde nadir olarak bulunurlar. *S. wiedemanni* bitkisinin toprak üstü kısımlarından 7 β -hidroksisandrakopimarik asit ve 14-oksopimarik asit (Şekil 2.18) abietan diterpenoitler ile birlikte izole edilmiştir (Topcu ve Ulubelen, 1990), (Topcu ve Ulubelen, 1991).

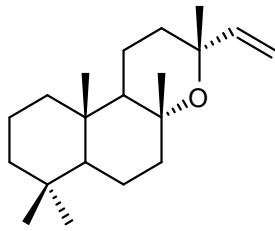


7 β -hidroksisandrakopimarik asit : R=OH, R₁=H, Δ ⁸⁽¹⁴⁾

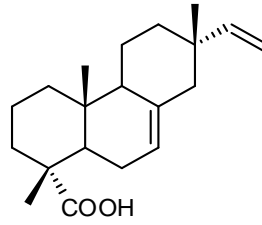
14-oksopimarik asit : R=H, R₁=O

Şekil 2.18 : 7 β -hidroksisandrakopimarik asit, 14-oksopimarik asit bileşikleri

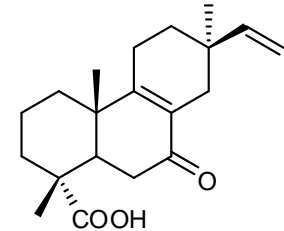
Yine bir labdan diterpen olan manoiloksit (manoyloxide) (Şekil 2.19) *S.candidissima* susp. *occidentalis*'in ürünüdür. Doğu Akdeniz bölgesine endemik olan *S.heldrichiana* Boiss. bitkisinden üç pimarane diterpen; isopimarik asit, 7 β -hidroksisandrakopimarik asit ve 7-okso-13-*epi*-pimarane-8,15-dien-18-oik-asit (Şekil 2.19) izole edilmiştir (Ulubelen ve diğ., 1995b).



manoiloksit



isopimarik asit

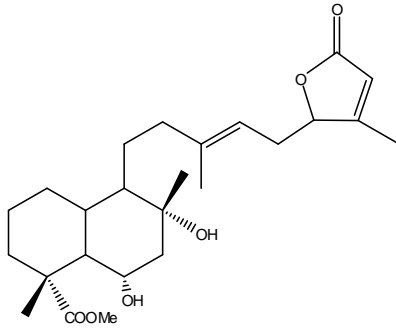


7-okso-13-*epi*-pimarane-8,15-dien-18-oik-asit

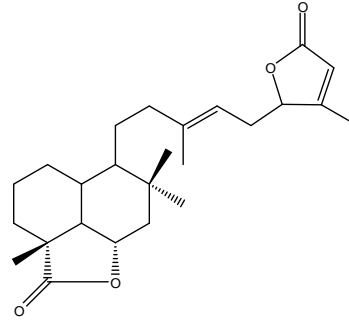
Şekil 2.19: Manoiloksit, isopimarik asit, 7-okso-13-*epi*-pimarane-8,15-dien-18-oik asit bileşikleri

Sesterterpenoidler (C₂₅)

S. hypoleuca Benth. bitkisinden salvilösolid metil ester (Şekil 2.20) salvilösolid-6,23-lakton (Şekil 2.20) elde edilmiştir (Rustaiyan ve diğ., 1982) (Rustaiyan ve diğ., 1988).



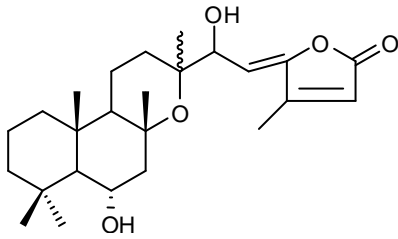
salvilösolit metil ester



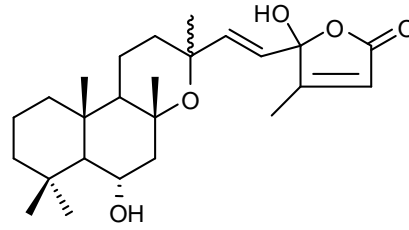
salvilösolit-6,23-lakton

Şekil 2.20 : Salvilökolit metil ester ve salvilökolit-6,23-lakton bileşikleri

Anadolu'da yetişen *S. yosgadensis* bitkisinden de yeni sesterterpen laktonlar elde edilmiştir, Bunlar yosgadensolit A ve B olarak adlandırılmıştır (Topcu ve diğ., 1996a).



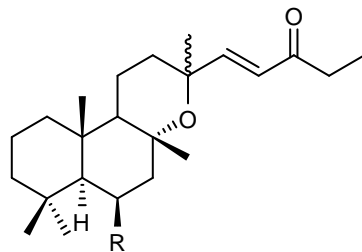
yosgadensolit A



yosgadensolit B

Şekil 2.21 : Yosgadensolit A ve yosgadensolit B bileşikleri

Salvia limbata C.A. bitkisinden ise iki yeni dinorsesterterpen 6-dehidroksiyosgadensenol ve 6-dehidroksi-13-*epi*-yosgadensenol elde edilmiştir (Ulubelen ve diğ., 1996).



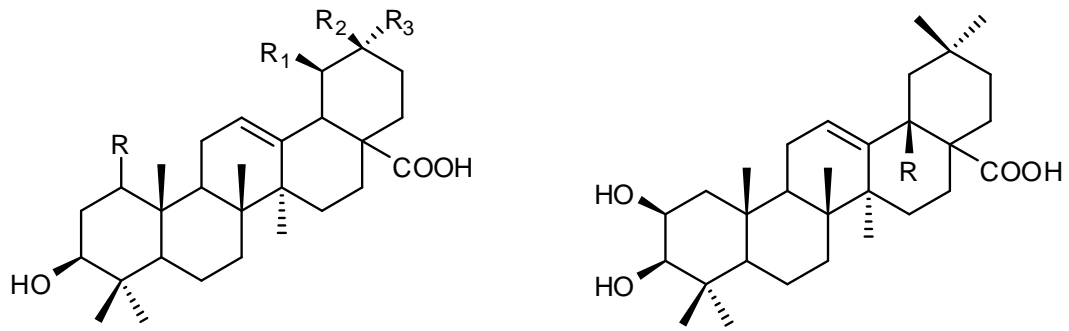
6-dehidroksiyosgadensenol: 13 β Me, R=H

6-dehidroksi-13-*epi*-yosgadensenol: 13 α Me, R=H

Şekil 2.22 : 6-dehidroksiyosgadensenol ve 6-dehidroksi-13-*epi*-yosgadensenol bileşikleri

Triterpenoitler (C₃₀)

Hemen hemen tüm *Salvia* türlerinde yaygın olarak bulunan triterpenoitler; ursolik asit ve oleanolik asit (Şekil 2.23) *S. officinalis* L. den izole edilmiştir. (Briekorn ve Schlumprecht, 1951). Sonraki yıllarda çalışma grubumuz *S. virgata* Jacq bitkisinden yeni bir triterpenoit olan virgatik asit (virgatik asit) (Ulubelen and Ayanoğlu 1976) ve *S. pinnata* L.'den 2 β ,3 β ,11 α -trihydroxy olean-13(18)-en izole etmişlerdir (Şekil 2.23) (Ulubelen and Topçu 1984). Devam eden çalışmalarda Anadolu'da yetişen *Salvia* türlerinden grubumuz tarafından çoğu *S. kronenburgii* olmak üzere toplam 30'u aşkın farklı triterpen elde edilmiştir (Topcu ve diğ., 2004).



Ursolik asit; R=H, R₁=R₂=Me, R₃=H

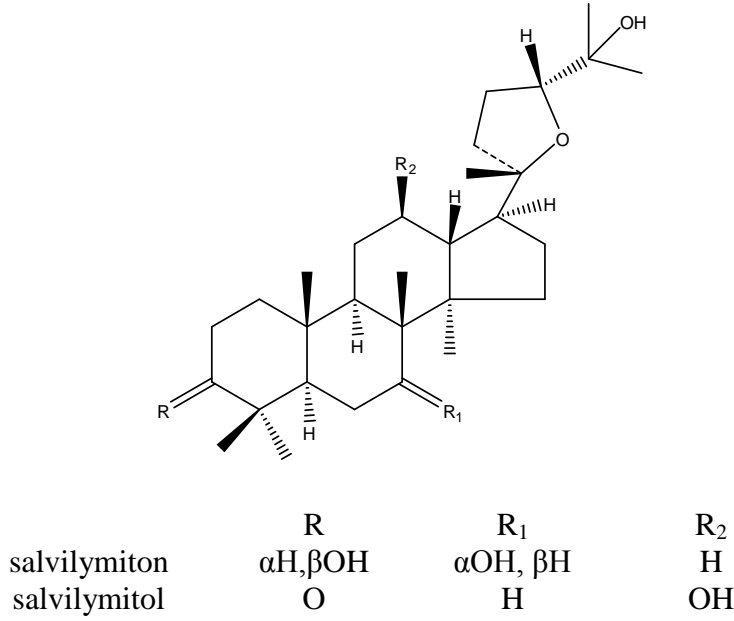
2 β ,3 β ,11 α -trihydroxy olean-13(18)-en

Oleanolik asit; R=R₁=H, R₂=R₃=Me

Virgatik asit; R=O, R₁=H, R₂=R₃=Me

Şekil 2.23 : *Salvia* türlerinden elde edilen bazı triterpenler

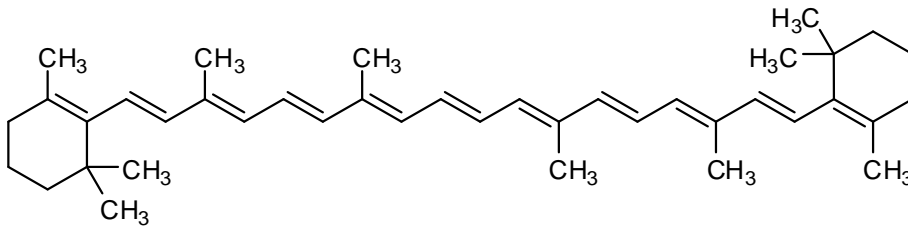
Dammaran tipli triterpenoitler de ayrıca *Salvia* türlerinin toprak üstü kısımlarından izole edilmiştir, fakat şu ana değin Türkiye'de yetişen *Salvia* türlerinden elde edilememiştir. Örneğin salvilymitone ve salvilymitol (Şekil 2.24) *S. hierosolymitana*'dan izole edilmiştir (Pedreros ve diğ., 1990).



Şekil 2.24 : Salviolymiton ve salviolymitol bileşikleri

Tetraterpenler (Karotenler=C₄₀)

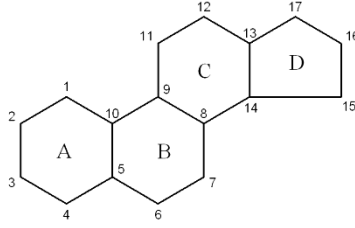
40 karbonlu terpenlerdir. Karotenoidler en önemli tetraterpenlerdir. Asiklik, mono- ve bisiklik tetraterpenler de mevcuttur.



Şekil 2.25 : β -Karoten bileşiği

2.4.2 Steroitler

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 2.26).



Şekil 2.26 : Steroitlerin iskelet yapısı

Bitkisel steroidler genellikle, C-3'te OH, C-5'te çifte 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 (Cram ve Hammond, 1964).

2.4.3 Fenolik bileşikler

Fenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan aromatik bileşiklerdir. Bu bileşikler bitkilerin ikincil metabolizma ürünleri olarak tanımlanmaktadır. Bitkilerden 8000'in üzerinde fenolik bileşik elde edilmiştir (Geissman ve Crout, 1969).

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 (Oguz, 2008). Bitkisel gıdalarda bulunan fenolik maddeler; fenolik asitler, flavonoidler, lignanlar ve stilbenler gibi alt gruplara ayrılmaktadır.

Fenolik bileşikler iskeletlerindeki karbon atomu sayılarına göre sınıflandırılırlar.

Çizelge 2.2 : Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması.

<u>C atomu</u>	<u>İskelet</u>	<u>Sınıf</u>	<u>Örnek</u>
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	Hidroksisinnamik 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 olmuş flavonlar	

2.4.4 Flavonoitler

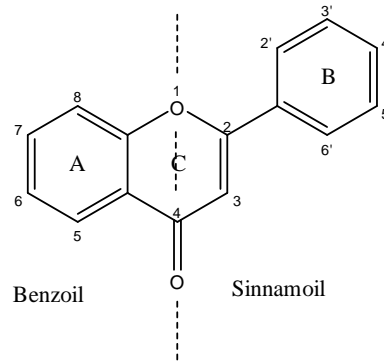
Flavonoitler fenolik bileşiklerin en geniş ve en önemli grubudur (Acar, 1998). Günümüze kadar 5000'den fazla flavonoit tanımlanmış ve en az 10 kimyasal alt grup olarak sınıflandırılmıştır. Çam ve Hısıl (2003) flavonoitlerin bitkilerin fotosentezle oluşturduklarını ve hayati gereksinimleri için kullandıkları karbonhidrat, amino asitler gibi birincil metabolitlerden türemiş olduklarını belirtmişlerdir. Karbon iskeleti $C_6-C_3-C_6$ şeklinde olan flavonoitlerin ana iskeletinde 15 karbon bulunur. Flavon bileşiklerinin kimyasal olarak antioksidan özellik göstermelerinin aşağıda özetlenen üç nedenden dolayı kaynaklanmakta olduğu düşünülmektedir (Oguz, 2008).

1. Aromatik halka yapılarındaki hidroksil grupları sayesinde hidrojen vererek redoks reaksiyonuna girebilirler ve bu sayede serbest radikalleri yok edebilirler.
2. Aromatik, heterosiklik ve çoklu doymamış bağlardan oluşan yapılarıyla stabil bir delokalizasyon sistemi oluştururlar.
3. Metal kelatlama kapasitesine sahip yapısal grupları vasıtasıyla OH^- ve O^{2-} gibi reaktif oksijen türlerinin oluşumunu engelleyebilirler.

Tıbbi açıdan öneme sahip pek çok bitki türünde flavonoitlerin aktif ingredientler olduğu düşünülmektedir. Bitkilerde genellikle glikozitler şeklinde bulunan flavonoitler hidrolitik aktivite ve kimyasal stabiliteye sahip bileşiklerdir (Oguz, 2008).

Flavonoidlerde Yapı Çeşitliliği

Flavonoitler 2-fenil benzopiran yapısındadır.



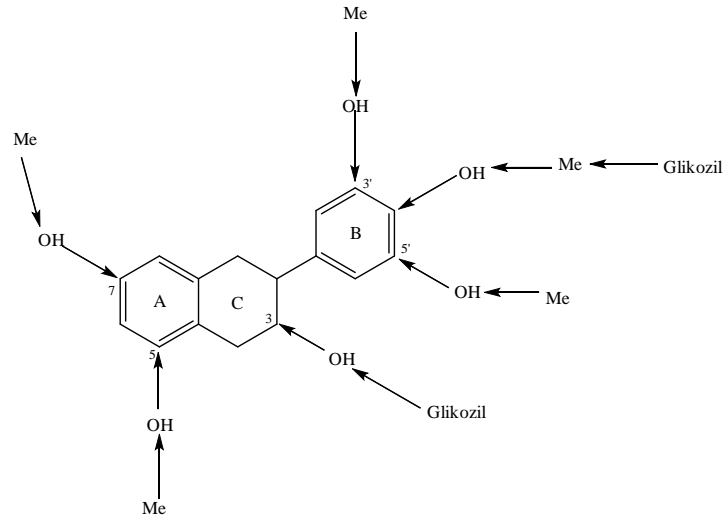
Şekil 2.27 : Flavonoitlerin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası

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.

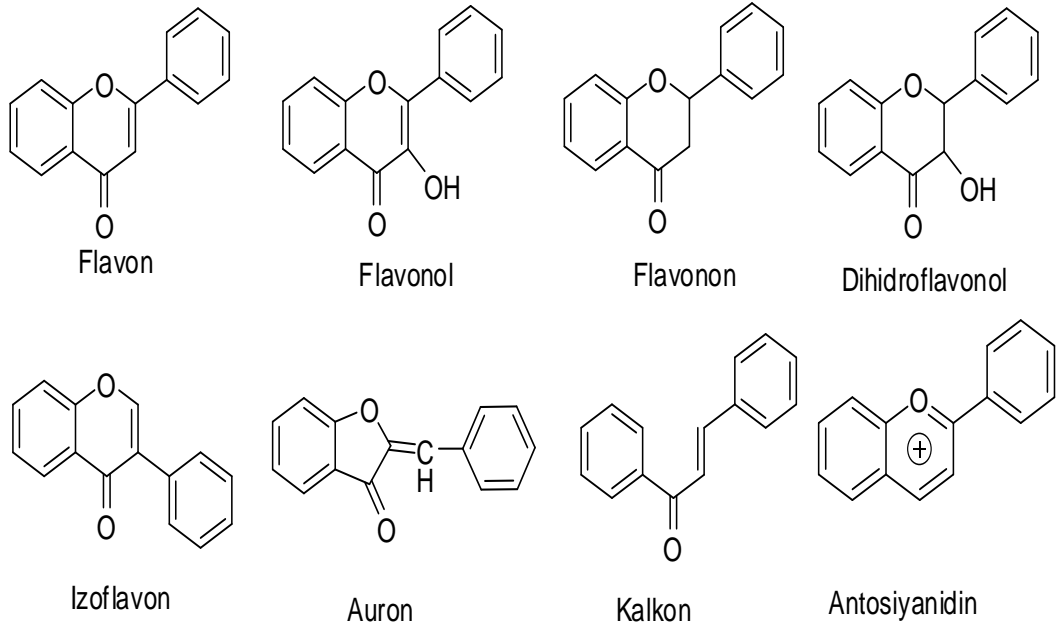
Flavonoidlerdeki yapı çeşitliliği, sadece difenilpropan iskeletinin farklı yapılarda düzenlenmesiyle sınırlı kalmamaktadır. Ayrıca, her sınıf içinde, molekülün aromatik (A ve B) halkalarına bağlanan süstitüentlerin sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonları flavonoidlerde gözlenen yapı çeşitliliğine neden olmaktadır. Flavonoid yapılarında gözlenen en yaygın süstitüentler hidroksil gruplarıdır. Flavonoid yapısında hidroksil gruplarının bulunması biyosentetik yolun sonucudur. Doğal flavonoidlerin en fazla yedi hidroksil gurubu içerdiği bilinmektedir. A halkasının genellikle C-5 ve C-7 pozisyonlarında hidroksillenmeye yatkın olduğu gözlenmektedir. Ancak, A halkasının başka pozisyonlarda da hidroksillendiği flavonoidler, doğada yaygın olarak bulunmaktadır. B halkasında ise genellikle C-4' pozisyonu, çoğu kez C-3' ve C-5' pozisyonlarının hidroksillendiği gözlenmiştir. C-3' ve C-5' pozisyonundaki hidroksil grupları çoğu kez metillenmiş halde bulunmaktadırlar. Hidroksil grubu bulundurmeyen aromatik halkalar yada C-2' pozisyonunda hidroksil grubu bulunduran flavonoidler doğada nadir olarak bulunmaktadırlar. Flavonoidlerin yapısındaki hidroksil gurupları, reaktif özelliklerinden dolayı, kolaylıkla alkillenmekte ya da glikozillenmektedirler. Bu nedenle, flavonoidlerin metoksi ve glikozil türevlerine bitkilerde sık rastlanır. Metoksi flavonoidlerin yapılarında birden yediye kadar metoksi grubuna rastlanılmaktadır. Doğada en çok mono-, di- veya trimetoksi flavonoidler gözlenmektedir. Flavonoidlerin C-5 ve C-7 pozisyonlarındaki hidroksil grupları nadir hallerde metillenmiş olarak bulunurlar.

Flavonoit yapılarında süstitüentlerin genel yerleşme pozisyonları Şekil 2.28 de verilmiştir.



Şekil 2.28 : Flavonoit yapılarında sübstitüentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları

Başlıca flavonoit iskeletleri Şekil 2.29'da verilmiştir (Geissman ve Crout, 1969).



Şekil 2.29 : Flavonoit iskeletleri

2.5 Antioksidanlar

Oksijen canlılar için hayati derecede önem arz eden bir elementtir. Oksijen, havadan solunum ile alındıktan sonra mitokondrilerdeki elektron taşıma sisteminde aşamalı bir indirgenme işlemine girer ve suya metabolize olur (Cadenas ve Davies, 2000). 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 (Gülçin ve diğ., 2003).

Oldukça reaktif olan bu oksijen türleri vücudumuzdaki ve besinlerdeki lipitleri, proteinleri, karbonhidratlar ve nükleik asitleri oksidasyona uğratabilir ve canlı organizma için zararlı olabilecek oksidasyon ürünleri oluşturabilirler. Bu yaygın olarak “Oksidatif Stres” şeklinde de ifade edilmektedir. Oksidatif strese neden olan başlıcaları ise reaktif oksijen ve azot türleridir (Papas, 1996).

Çizelge 2.3 : Oksidatif strese neden olan reaktif oksijen ve azot türleri.

Reaktif Türler	Radikaller	Formülü	Nonradikaller	Formülü
Reaktif Oksijen Türleri (ROS)	Süperoksit	$O_2^{\cdot -}$	Hidrojen peroksit	H_2O_2
	Hidroksi	OH^{\cdot}	Hipokloröz asit	$HOCl$
	Peroksi	ROO^{\cdot}	Hipobromöz asit	$HOBr$
	Alkoksi	RO^{\cdot}	Ozon	O_3
	Hidroperoksi	HOO^{\cdot}	Singlet oksijen	$^1\Delta_g \ ^1O_2$
Reaktif Azot Türleri (RNS)	Nitrik oksit	NO^{\cdot}	Nitröz asit	HNO_2
	Azot dioksit	NOO^{\cdot}	Nitrozil katyonu	NO^+
			Nitroksi anyonu	NO^-
			Diazot tetraoksit	N_2O_4
			Peroksinitrit	$ONOO^-$
			Peroksinitröz asit	$ONOOH$
			Nitronyum katyonu	NO_2^+
			Alkiperoksit nitritler	$ROONO$

Reaktif oksijen türleri tarafından en fazla etkilenen moleküllerin, hücre membranının ana bileşeni olan lipitler olduğu düşünülmektedir. Organizmada yeterli miktarda reaktif atom ya da molekül varlığında lipit peroksidasyonu kolaylıkla başlar. Oksijenin sebep olduğu lipit oksidasyonu tipik bir radikalik zincir reaksiyonudur (Aruoma ve Cuppett, 1997). Lipit peroksidasyonu, hücrenin hayati fonksiyonları için de zararlıdır (Davie, 2000). Proteinler de lipitler gibi oksidatif stresten etkilenirler. Proteinlerin oksidasyonu genellikle OH[•] tarafından başlatılır ve sürecin seyri oksijen, süperoksit ya da onun protonlanmış hali olan HO₂[•] tarafından belirlenir (Berlett ve Stadtman, 1997). Diğer reaktif türler de protein oksidasyonunda yer alabilirler (Dalle-Donne ve diğ., 2003). Reaktif oksijen türleri amino asit rezidülerinin yan zincirlerini de oksitleyebilir. Bu şekilde istenmeyen protein-protein etkileşimleri oluşabilir ve proteini parçalayabilecek şekilde protein iskeletini oksitleyebilirler. Benzer oksidatif hasarlar serbest geçiş metal iyonlarının varlığında da olmaktadır (Berlett ve Stadtman, 1997; Stadtma, 2002).

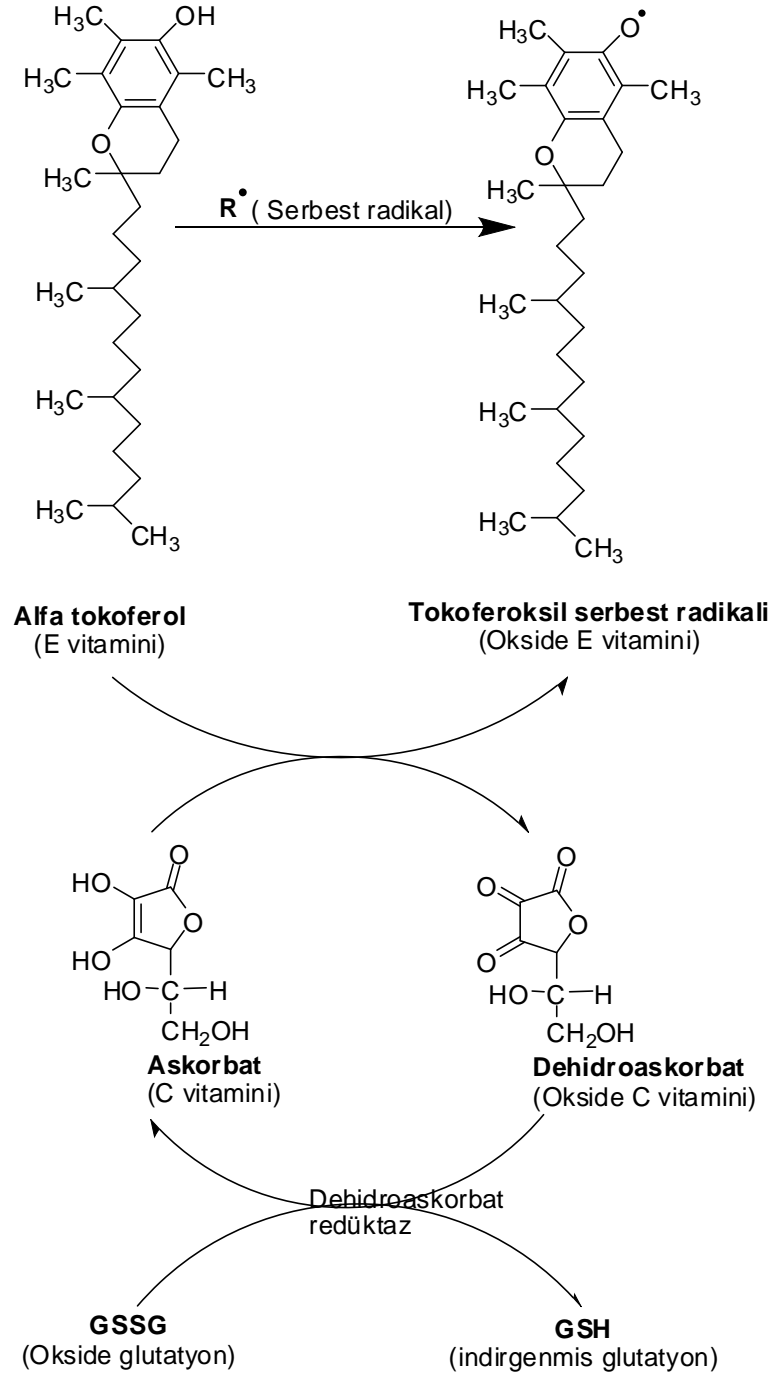
Protein yan zincirlerinde bulunan özellikle prolin, arginin, lizin ve treonin amino asitleri oksitlendiği zaman aldehitler ve ketonlarda olduğu gibi karbonil grupları oluşur. Bu gruplar kimyasal olarak kararlıdır ve proteinlerin oksidatif parçalanmasında da oluşabilmektedirler (Dalle-Donne ve diğ., 2003). Ayrıca kanser çeşitleri, parkinson ve alzheimer gibi birçok hastalığın DNA'nın oksidatif hasarından kaynaklandığı bildirilmiştir (Evans ve diğ., 2004). Canlılarda oksidan etkiye karşı iki çeşit savunma sistemi vardır. Bunlar endojen ve ekzojen antioksidan etkilerdir. Endojen antioksidan sistem, antioksidan enzimler, hasarlı molekülleri uzaklaştıran proteazlar ve fosfolipazlar gibi sistemler, yeni bileşikler sentezleyen sistemler, tamir sistemleri, hemoglobin, miyogloblin, ferritin ve seruloplazmin gibi metal bağlayıcılar gibi alt sistemlerden oluşur. Ayrıca glutatyon ve ürik asit gibi vücut içi küçük molekül kütleli bileşikler de birer antioksidan olarak görev yaparlar. Dış kaynaklı olarak alınan antioksidanlar vücut içi antioksidan sisteme destek olur. Dışarıdan alınan antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere iki grupta incelenebilir. Sentetik olarak kullanılanlar bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA), tersiyerbütillhidrokinon (TBHQ), propil galat (PG), troloks ve diğer sentetik antioksidanlardır (Mavi, 2005). En yaygın olarak kullanılan bu sentetik antioksidanların bazı yan etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Branen, 1975; Imaida ve diğ., 1983). Bunun sonucu olarak tüketiciler bunların sağlık açısından

güvenirlikleri hakkında ciddi endişeler taşımaktadır (Ito ve diğ., 1983; Gülçin ve diğ., 2004a; 2004b). Örneğin BHT non-toksik olmakla beraber, karaciğerde sitokrom P-450 sistemine hasar verdiği için 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 atılmadığı adipoz dokuda depolandığını göstermiştir (Halliwell ve Gutteridge, 1989).

Sentetik antioksidanlar geniş bir kullanım alanına sahip olmasına rağmen, bu istenilmeyen yan etkilerinden dolayı son zamanlarda kullanımları ciddi bir şekilde sınırlandırılmıştır (Gülçin ve diğ., 2005). Birer doğal antioksidan olan α -tokoferol ve askorbik asit, BHA, BHT, TBHQ ve PG gibi sentetik antioksidanlardan daha düşük aktivite göstermelerine rağmen, besin maddelerinin üretim ve muhafazasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Osawa ve Namiki 1981; Nisihina ve diğ., 1991).

Doğal antioksidanlar bitkilerin bütün kısımlarında doğal bir şekilde meydana gelmektedir. Bunlar karotenoidler, vitaminler, fenoller, flavonoidler, glutatyon ve endojen metabolitleri içerir. Bitkisel kaynaklı antioksidanlar singlet ve triplet oksijen söndürücüsü, serbest radikal gidericisi, peroksit parçalayıcısı, enzim inhibitörleri ve sinerjistler olarak fonksiyon görürler (Larson, 1988). Sebze ve meyveler de birçok antioksidan içerirler (Cao ve diğ., 1996). Doğal antioksidan bileşikler; sebzelerde, kabuklu ve kabuksuz meyvelerde, tohumlarda, yapraklarda, çiçeklerde, köklerde ve kabuklarda bol miktarda bulunmaktadır (Pratt ve Hudson, 1990). Bundan dolayı Ames (1993) bol miktarda sebze ve meyve tüketimi hastalıklara yakalanma riskini azalttığı gibi, kanserde ve ölüm oranında düşüş meydana getirmekte olduğunu belirtmiştir. En önemli doğal antioksidanlar arasında askorbik asit, tokoferoller, karotenoidler ve skualen sayılabilir. Askorbik asit, bitkilerde ve bazı memelilerin karaciğerinde glukozdan sentezlenir. Askorbik asit bazı enzimlerde kofaktör olarak görev yapar. Bunlardan en önemlisi, kollagenin biyosentezinde yer alan prolinin hidroksiprolin enzimatik hidroksilasyonu gibi hidroksilasyon reaksiyonlarına katılmasıdır. Ayrıca askorbik asit dopamin- β -hidroksilaz aktivitesi için de gereklidir (Padayatty ve diğ., 2003). Askorbik asitin en önemli özelliği indirgeyici bir molekül olmasıdır. Askorbik asit Fe^{3+} 'ü Fe^{2+} 'ye indirgeyebilir. *İn vivo* olarak indirgeyici özelliğinden dolayı, bazı organik radikallerin söndürülmesinde de önemli rolü vardır. Ayrıca α -tokoferol lipit serbest radikallerini söndürdükten sonra Şekil 2.30'da

görüldüğü gibi tokoferoksil radikaline dönüşmektedir. Tokoferoksil radikali ise askorbik asit tarafından tekrar yenilenir ve tekrar α -tokoferole dönüştürülmektedir.



Şekil 2.30 : α -Tokoferolün lipid serbest radikallerini söndürdükten sonra tokoferoksil radikaline dönüşmesi

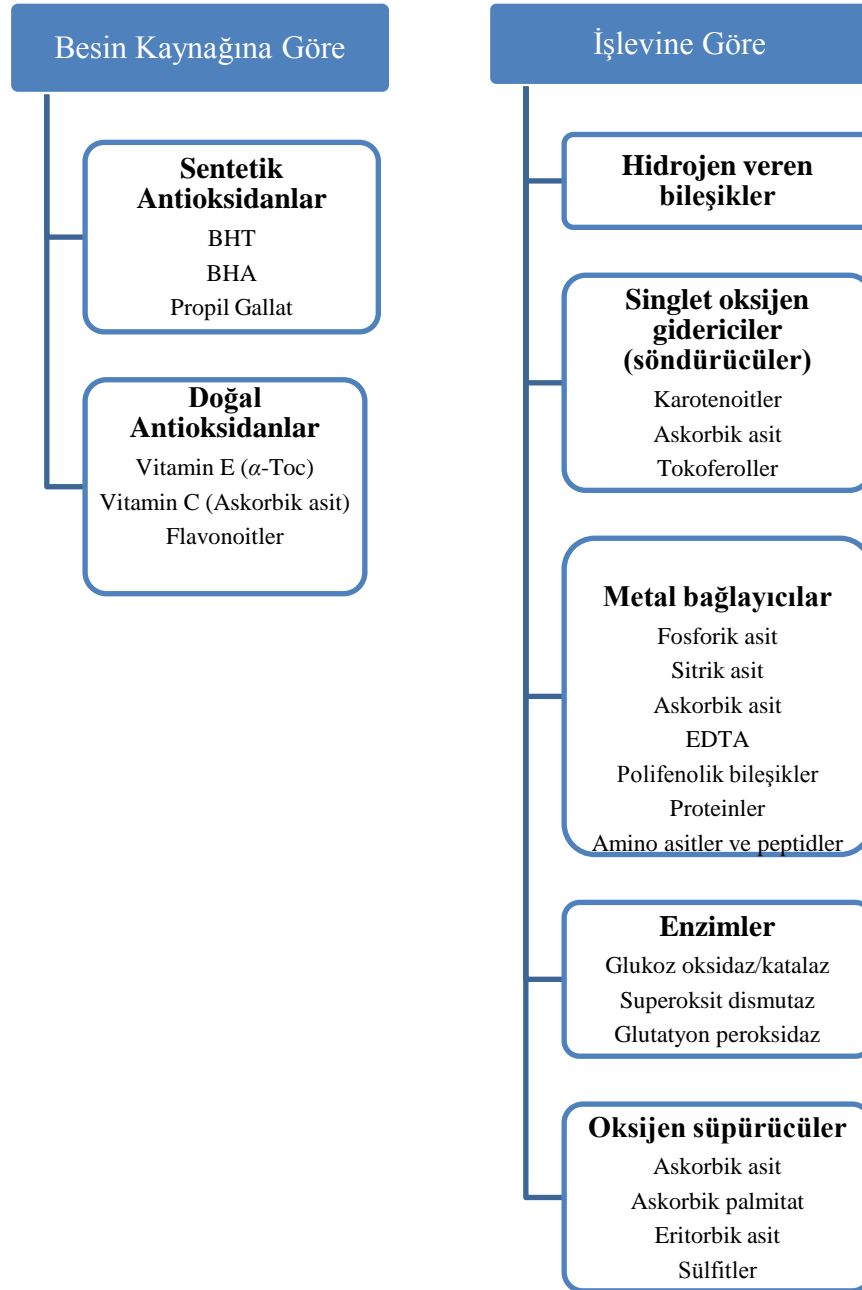
Şekil 2.25'de açık yapısı verilen β -karoten bitkilerde bulunan ve α -tokoferol gibi peroksil ve alkoksil radikalleri ile reaksiyona girebilen bir moleküldür. Bu sebeple lipid peroksidasyonun zincir reaksiyonunu engelleyebilir. Ayrıca iyi bir singlet

oksijen söndürücüdür (Halliwell ve Gutteridge, 1989). Vücutta depolanarak A vitaminine de dönüştürülen bu kırmızımsı-turuncu pigment çok güçlü bir antioksidandır ve birçok kanser türüne yakalanma riskini azaltmasıyla ünlüdür. Havuç, ıspanak ve brokoli gibi yeşil yapraklı sebzeler ile kayısı ve şeftali gibi meyvelerde fazlasıyla bulunur (Müftüoğlu, 2003).

Flavonoitler ise, bitkiler tarafından sentezlenen fenolik yapıdaki bileşiklerdir. Fenolik yapılarından dolayı antioksidan özellik göstermektedirler. Bazı flavonoitler, etkili bir şekilde hücreleri ve dokuları reaktif oksijen türlerinin olumsuz etkilerinden korur (Groot ve Rauen, 1998). Fenolik antioksidanlar, hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu arttırarak onun reaktifliğini azaltır. Hidroksil grubuna göre para konumunda etil veya bütil 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 radikalinin reaksiyonlara katılma yeteneğini azaltırlar. Diğer iki önemli doğal antioksidan ise karotenler ve skualendir. Karotenler hücreyi ışık, hava ve diğer foto sensitizasyon etkilerinden koruyan ve bu ortamlarda antioksidan olarak görev yapan bileşiklerdir (Krinsky, 1989). Skualen ise bir serbest radikal söndürücüsü olmakla beraber aynı zamanda singlet oksijen söndürücü olarak da görev yapmaktadır (Kohno ve diğ., 1995).

Doğal antioksidanların yanı sıra sentetik antioksidanlar da mevcuttur. Bunlar genellikle gıda sektöründe, gıdaların raf ömrünün uzatılması amacı ile kullanılır. Gıda maddelerinde, peroksidasyon prosesini geciktirmek veya önlemek ancak antioksidan bileşiklerin ilavesiyle mümkün olabilir. Bu ise pahalı bir metottur. Gıda maddelerinin bozulmalarını engellemek için yıllardan beri sentetik antioksidan olarak bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), bütillenmiş hidroksianisol (BHA) ve tersiyer-bütillhidrokinon (TBHQ) kullanılmaktadır. Fenolik bileşik olmaları, onların etkili birer antioksidan olmalarını sağlar. Maliyet nedeniyle doğal kaynaklı antioksidanlar yerine sentetik antioksidanlar yirminci yüzyılın başlarından beri kullanılmaktadır. Ancak sentetik antioksidanların toksik ve kanserejen olabileceğini Haigh ve Van Esch (1986) yaptıkları çalışma ile ortaya koymuş ve bunun sonucunda bazı ülkelerde kullanılmalarına dair ciddi sınırlama veya yasaklar getirilmiştir. Sentetik antioksidanlar hakkındaki bu şüpheler, doğal antioksidanlara olan eğilimi

arttırmış ve bu alandaki çalışmalar ise bitki kaynaklı antioksidanlar üzerinde yoğunlaşmıştır. Doğal kaynaklı E ve C vitamini uzun yıllardır besinlerde ayrı ayrı veya sinerjistik etkiden dolayı birlikte antioksidan olarak kullanılmaktadır. Ancak tokoferol ve askorbik asidin antioksidan aktivitesi nispeten sentetik antioksidanlardan daha düşüktür (Nishina, 1991). Antioksidan türleri aşağıdaki diyagramda gösterildiği üzere besin kaynaklarına ve işlev mekanizmasına göre ikiye ayrılırlar;



Şema 2.1 : Antioksidan türleri

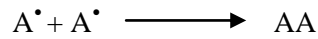
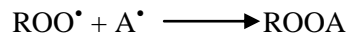
2.5.1 Antioksidanların sınıflandırılması

Antioksidanlar işleyiş mekanizmalarına göre sınıflandırılırlar

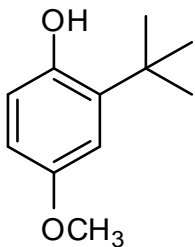
2.5.1.1 Birincil antioksidanlar

Birincil antioksidanlar (tip-1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını ertelleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır.

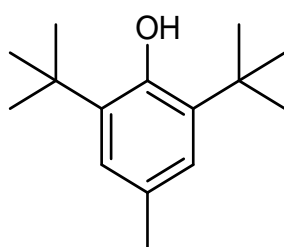
Birincil antioksidanlar (AH) lipit radikali (R•) ve peroksi radikalleriyle (ROO•) reaksiyona girerler ve onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Birincil antioksidanlar lipit radikallerine hidrojen atomları verirler ve lipit türevleri ile antioksidan radikaller meydana getirirler (A•). Hidrojen verici olarak birincil antioksidanlar peroksi radikallerine lipitlerden daha çok ilgi gösterirler. Bu yüzden otooksidasyon reaksiyonunda oluşan peroksi (ROO•) ve oksid (RO•) serbest radikalleri birincil antioksidanlar tarafından giderilirler. Antioksidanlar lipit radikalleriyle doğrudan da etkileşebilirler (Reische ve diğ., 2002).



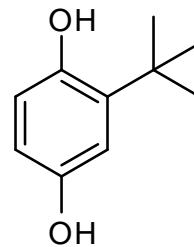
Sentetik birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol (BHA), bütillenmiş hidroksitoluen (BHT), propil gallat ve *t*-bütill hidrokinon verilebilir. Tokoferoller ve karotenoidler doğal kaynaklı birincil antioksidanlardır (Reische ve diğ., 2002).



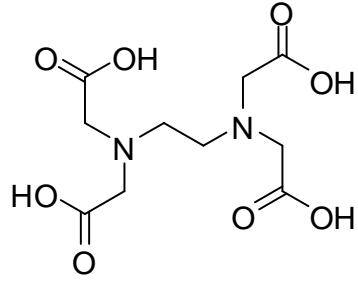
BHA



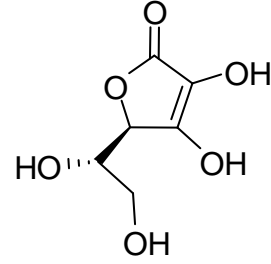
BHT



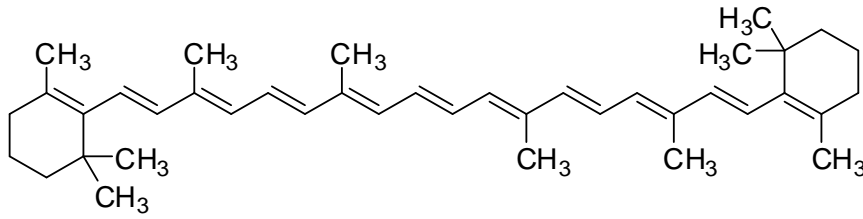
t-Bütill hidrokinon



EDTA



Askorbik asit



Vitamin A (β -karoten)

Şekil 2.32 : İkincil antioksidanlar

2.5.2 Antioksidan aktivite tayin yöntemleri

Antioksidan aktivitenin tayin edilmesi amacıyla kullanılan başlıca yöntemler kullanım sıklığına göre aşağıda verilmiştir.

- ✓ DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi (Blois, 1958).
- ✓ β -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi (β -Karoten renk açılım yöntemi) (Miller, 1971).
- ✓ ORAC (Oksijen radikal absorbands kapasitesi) yöntemi (Prior ve Cao, 1999).
- ✓ ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi (Re ve diğ., 1999).
- ✓ Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi (Liu ve diğ., 1997).
- ✓ FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) yöntemi (Benzie ve Strain, 1996).
- ✓ TRAP (Toplam radikal tutma parametresi) yöntemi (Wayner ve diğ., 1985).
- ✓ CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi (Apak ve diğ., 2004).
- ✓ Metal bağlama yöntemi (Dinis ve diğ., 1994).
- ✓ Luminol yöntemi (Whitehead ve diğ., 1992).
- ✓ DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi (Valkonen ve Kuusi, 1997).

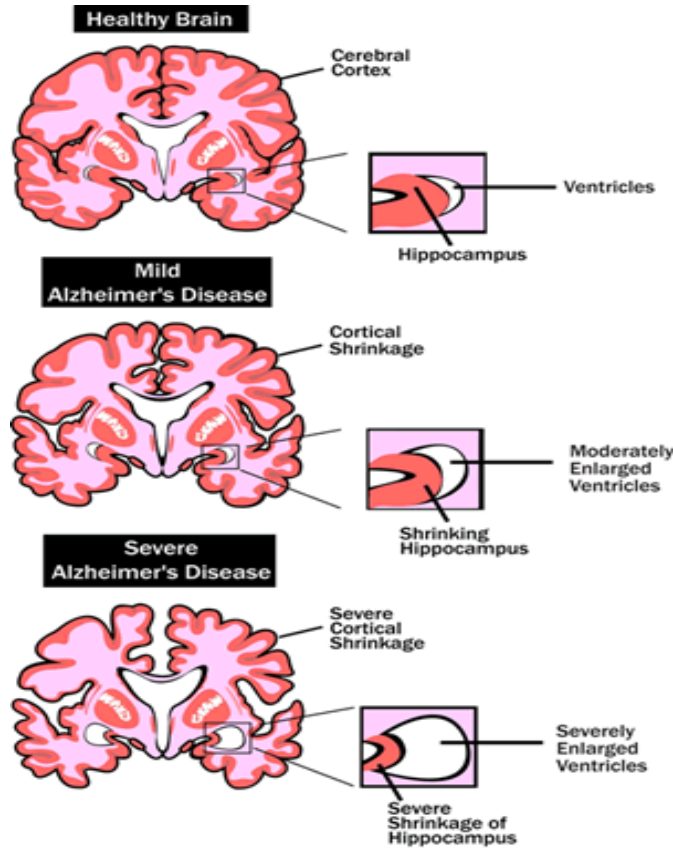
- ✓ Fikoeritrin (PE) esaslı Yöntemler (Ghiselli ve diğ., 1995).
- ✓ Krosin yöntemi (Tubaro ve diğ., 1998).
- ✓ TOSC (Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi) yöntemi (Winston ve diğ., 1998).
- ✓ Siklik voltametri yöntemi (Kohen ve diğ., 1999).
Ayrıca toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarlarını belirlemek amacıyla kullanılan Yöntemler de antioksidan aktivite tayin Yöntemleri arasında kabul edilmektedir.
- ✓ Folin Ciocalteu yöntemi (Singleton ve diğ., 1999).
- ✓ Aluminyum nitrat yöntemi (Moreno ve diğ., 2000).

2.6 Antikolinesterazlar

2.6.1 AChE ve BChE inhibitörleri

Alzheimer hastalığı ilk kez 1906'da Alman nöropsikiyatrist Alois Alzheimer tarafından düşünce kontrolü, hafıza ve konuşma yetisi gibi bazı fonksiyonların yer aldığı beyin bölümünde, karmaşık mesajları milyonlarca sinir hücresi arasında taşıyan kimyasalların (nörotransmitter) düzeyinin azalması ve sinir hücrelerinin yok olması ile, normal düşünme ve hafıza yetilerinin kaybolduğu bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Alzheimer, 1906).

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. Bu değişiklikler bazı nörolojik ve nöropsikiyatrik hastalıklarla birlikte hafıza kaybıyla sonuçlanan geri dönüşümsüz fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Semptomlar ayrıca beynin diğer bölgeleri ve serebral kortekste kolinerjik transmisyonun kaybı ile de alakalıdır (Mann,1989).



Şekil 2.33 : Alzheimer hastalığının artan evrelerine göre beyin üzerine etkileri

1980' li yılların başında yapılan araştırmalarda beyin kenarında küresel birikintiler (plak) veya liflerin (fibriller) oluştuğu tespit edilmiştir. Bu artık madde (plak) yığılmasına beta-A4 proteini (42 aminoasitten oluşur) ve APP proteinin (amyloid precursor protein) sebep olduğu belirtilmiştir. APP, sağlıklı nöronlar tarafından üretilen normal proteinlerdir. APP nin tanımlanmasıyla vücudumuzun en az üç çeşit enzim ürettiği belirlenmiştir. Bunlara alfa, beta ve gama salgıları adı verilir. Alfadan farklı olarak, beta ve gama enzimleri, birlikte hareket ederek, adına beta amiloid (A-beta) denilen daha kısa, daha yapışkan bir protein üretirler. Beta amiloidler, nöronların etrafındaki sıvının içinde birikerek plakalar oluştururlar.

Beyindeki bu beta-A4 ve APP proteinlerine amiloidler denir. Amiloidler (Amyloidler) beyin hücreleri arasındaki haberleşmeyi önler ve beyin hücrelerinin yavaş yavaş ölmesine neden olurlar (Daniel ve diğ., 2002).

Alzheimer hastalarında beta amiloid (A-beta) üretimi sağlıklı bir birey ile aynı olmakla birlikte, beta amiloidlerin dışarı atılmasında sorun yaşanmaktadır. Normal

olarak beta amiloidler hücrenin dışına çıktığı zaman erir, ancak bazen erimesi mümkün olmayan ve adına “fibril” denilen birikintiler oluştururlar. Bu fibriller 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 fibriller de benzer reaksiyonlara zemin hazırlar. Nöronun küresel gövdesi, akson denilen ince uzantılarla kaplıdır. Bunlar diğer hücrelerle bağlantı kurmaya yarar. Adına mikrotüp denilen iç yapıların çevresinde oluşan uzantılar, dolaşım sistemi olarak görev yapar; besinleri taşır ve kimyasal mesajları iletir. Bu sistemi, adına tau denilen bir çeşit yapışkanlı protein bir arada tutar. Tau molekülleri, mikrotüplerin kenarlarına sıkıca yapışır. Alzheimer söz konusu olduğunda, tau molekülleri ayrılır ve kendiliğinden düğümler oluşturur. Bu durumda mikrotüpler parçalara ayrılır ve nöronlar ölür (Lanari ve diğ., 2006).

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu oksidatif stresin hücre tahribatıyla sonuçlanan biyomoleküllerin oksitlenmesine neden olduğu bilinmektedir (Piazzini ve diğ., 2008). Toksik beta amiloidlerin 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 (Hartman, 2010).

Sonuç olarak; oksidatif stres Alzheimer hastalığının ilk adımlarından biri olup, hastalıkta patojenik bir rol oynama durumuna sahiptir (Piazzini ve diğ., 2008).

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 veya başka sinirlerdeki bilgiyi taşıyan asetilkolin görevini yaptıktan sonra asetilkolin esteraz 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 (Dane ve diğ., 2004).

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 salgılaması

frenlenirse sinir hücrelerinin ölümünün yavaşlayacağı ve Alzheimer hastasının sağlık durumunun kötüleşmeyeceği düşünülmektedir (Dane ve diğ., 2004).

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 asetilkolin'in parçalanmasını önlemektedir (John ve Standridge, 2004).
- N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptör antagonistleri ise öğrenme ve bellek fonksiyonları açısından önem taşıyan bir transmitter olan glutat'ı düzenleyici etkiye sahiptir (John ve Standridge, 2004). Halen Alzheimer hastalığı tedavisinde FDA tarafından onaylanmış tek NMDA orta ve ciddi Alzheimer tedavisinde kullanılan memantindir (Xilong ve diğ., 2006).

Vücutta asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) olmak üzere iki tane kolinesteraz enzimi bulunmaktadır (Hartman, 2010) Normal erişkin beyinde AChE yaygın olarak bulunurken, BChE sınırlı miktarlarda bulunmaktadır (Demans, 2002). Asetilkolinesteraz enzimi uyarılabilen tüm dokularda bulunurken, butirilkolinesteraz enzimi ise merkezi ve periferik sinir sistemi, karaciğer ve plazmada bulunmaktadır (Hartman, 2010). Kolinerjik nöronlarda AChE, hücre gövdesinde, aksonlarda ve dentritik uzantıların proksimalinde yer alır. BChE ise hücre gövdesinde ve dendritlerde bulunur. Beyindeki kolinesteraz aktivitesinin %80'inden AChE, geriye kalan %20'sinden BChE'nin sorumlu olduğu düşünülmektedir. AChE'nin kolinerjik iletimdeki rolü oldukça iyi bilinmekle birlikte BChE'nin rolü yeterince anlaşılmış değildir. Sinir sistemi gelişiminin erken dönemlerinde BChE düzeyleri yüksektir, ilerleyen evrelerde ise bu düzey düşmektedir. Normal beyinde sinaptik asetilkolin hidrolizinin esas olarak AChE tarafından yapıldığı, BChE'nin buna çok az katkısının olduğu kabul edilmektedir (Demans, 2002).

Günümüzde Alzheimer hastalığının semptomatik tedavisinde donepezil (Kelly ve diğ., 1997), galantamine (Scott ve diğ., 2000), ve rivastigmine (Gottwald ve Rozanski, 1999), (Mukherjee ve diğ., 2007) kullanılmaktadır. Nivalin ® adı ile satılan ve ardından Reminyl® adı ile lisansı onaylanan ilaç (Orhan ve Şener, 2003) galantamin alkaloidinin hidrobromür tuzu şeklinde piyasaya sunulmaktadır (Lopez ve diğ., 2002).

AChE inhibitörleri ile ilgili çalışmaların çoğu, galantamin gibi asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesine sahip alkaloidler üzerine yoğunlaşmıştır. Bugüne kadar 35'ten fazla alkaloidin AChE inhibisyon aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir. Bu aktiviteye sahip olduğu belirlenen diğer bileşenler ise terpenoidler, glikozidler ve kumarinler olarak bildirilmiştir (Mukherjee ve diğ., 2007)

Acanthaceae, Apocynaceae, Amaryllidaceae, Angelicae, Araceae, Asclepiadaceae, Berberidaceae, Buxaceae, Combretaceae, Compositae, Coniferae, Cyperaceae, Ebenaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fumariaceae, Gentianaceae, Guttiferae, Lamiaceae, Leguminosae, Liliaceae, Lycopodiaceae, Malvaceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Molluginaceae, Moraceae, Musaceae, Nelumbonaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Sapotaceae, Solanaceae ve Tamaricaceae, AChE inhibisyon potansiyeline sahip bitkilerin yer aldığı familyalar olarak bildirilmiştir (Mukherjee ve diğ., 2007).

Fakat bunların içinde özellikle alkaloid taşıyan familyalar Lycopodiaceae ve Solanaceae'dir. Bitkisel kaynaklardan potansiyel AChE inhibitörlerinin tanımlanmasına yönelik etnofarmakolojik yaklaşımlar ve biyoanalizler gün geçtikçe artmaktadır. AChE ve BChE inhibitörlerinin aktivitelerinin belirlenmesine yönelik pek çok yöntem, Ellman tarafından 1961'de tanımlanan Ellman reaksiyonlarına dayanmaktadır (Mukherjee ve diğ., 2007), (Ellman ve diğ., 1961).

2.6.2 Antikolinesteraz aktivite tayin yöntemleri

- ✓ Michel Yöntemi (Akram Jamshidzadeh ve ark. 2008).
- ✓ Ellman Yöntemi (Ellman ve ark. 1961).
- ✓ De la Huerge Yöntemi (Akram Jamshidzadeh ve ark. 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Bitkisel Materyaller

- ✓ Salvia adenophylla Hedge & Hub.-Mor bitkisi 08.06.2008 tarihinde Denizli; Çavdır-Tefenni arası 8-10 km.'den (yükseltisi 1300-1400m) toplanmıştır. Bitki örneği Balıkesir Üniversitesi Herbarium'nda Dirmenci 2808 & Kılıç kodu ile saklanmaktadır.
- ✓ Salvia verticillata subsp *amasiaca* bitkisi 06.08.2008 tarihinde Erzurum'un Merkez-İspir yolu arası 45.km'den toplandı. Bitki örneği Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbarium'nda AEF 25536 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, okzalil klorür, metil iyodür, tetrahidrofuran, sodyum hidrür, Benzen, Morfolin.
- ✓ 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 jøjeye 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 flavonoit 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 jøjeye 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 jøjeye 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 çözüdür.

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

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 çözeltilerden 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.

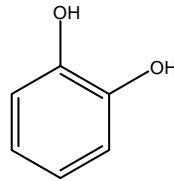
3.3 Cihazlar ve Gereçler

- 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 Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit İçerik Miktar Tayinleri

3.4.1 Toplam fenolik miktar tayini

Numunelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlenir (Slinkard ve Singleton 1977). Standart fenolik bileşik olarak kullanılan pirokatekolün açık yapısı Şekil 3.1'de görüldüğü gibidir.



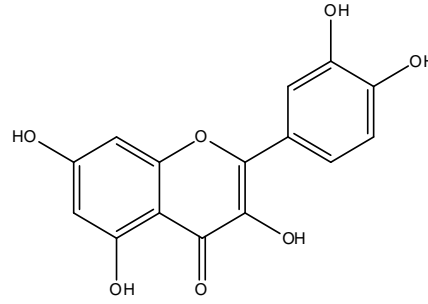
Pirokatekol

Şekil 3.1 : Standart olan pirokatekol bileşiğinin açık yapısı

3 mg olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlanır. 1000 ppm olarak hazırlanan pirokatekol çözeltilisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri etanolle 200 µL'ye tamamlanır. Hazırlanan bu karışımlara su, FCR reaktifi ve 3 dk sonra %2'lik Na₂CO₃ çözeltilisinden ilave edilerek karışımlar 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalanır ve örneklerin absorbanları 760 nm'de okunur. Numunelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlenir.

3.4.2 Toplam flavonoit miktar tayini

Flavonoitler iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden meydana gelen difenil propan yapısındaki fenolik bileşiklerdir. Standart flavonoit bileşik olarak kullanılan kesretinin açık yapısı Şekil 3.2'de görüldüğü gibidir.



Kersetin

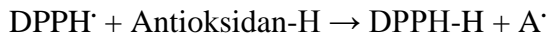
Şekil 3.2 : Standart ve kuvvetli bir antioksidan olan kesretinin açık yapısı

Bu yöntemde numunelerin toplam flavonoit miktarları kesretine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi (Moreno ve ark. 2000). 3 mg olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlanır. Her bir örnekten 100 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlanır. Kesretinin 1000 ppm'lik çözeltilisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlanır. Bu karışımlara 100 µL 1M potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µL %10'luk alüminyum nitrat çözeltilisinden ilave edilerek karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de absorbanları okunur. Numunelerin toplam flavonoit miktarları kesretin grafiğinden elde edilen eşitlik kullanılarak belirlenir.

3.5 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

3.5.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi

Antioksidanlar radikallere proton vererek absorpsiyonu azaltırlar (Turkoglu ve diğ., 2006). Bu çalışmada serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir. Bitki ekstralarının, fraksiyonların 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’nin 517 nm’deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenir. Tepkime mekanizması aşağıdaki gibidir.



Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH[·] derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalinin rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal giderim aktivitesi olarak gösterilir.

Bu amaçla 50 µg ve 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:

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

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

DPPH’nin rengi açıldığı için absorpsiyonda azalma olur

Reaksiyon karışımının düşük absorpsiyon göstermesi serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu belirtir.

3.5.2 Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (β -karoten-linoleik asit yöntemi)

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 (Miller, 1971). Bu yöntem, β -karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. Antioksidan maddenin varlığında bu tepkimenin oluşumu engellendiğinden veya oluşan bozunma ürünleri antioksidan tür tarafından temizlendiğinden β -karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.

Linoleik asit + (O₂-H₂O) + β -karoten → Konjuge dienler ve diğer bozunma ürünleri

↓

β -karoten → renk açılımı

Linoleik asit + (O₂-H₂O) + β -karoten + antioksidan madde → rengin korunması

α -Toc, BHT, kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 10, 25, 50, 100 μ g/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 alkol 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:

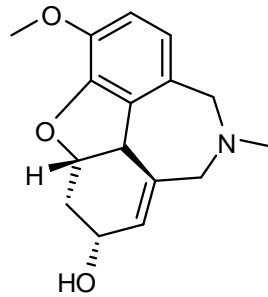
$$AA (\% \text{ inhibisyon}) = (R_{kontrol} - R_{örnek}) / R_{kontrol} \times 100 \quad (3.3)$$

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

3.6 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi

3.6.1 Ellman yöntemi

Asetilkolinesteraz ve bütirilkolinesteraz inhibisyon aktiviteleri Ellman metodu olarak (Ellman ve diğ., 1961) bilinen spektrofotometrik yöntem temel alınarak ölçüldü (Kıvrak ve diğ., 2009). Enzim olarak elektrik balığından elde edilen asetilkolinesteraz ve at serumundan elde edilen bütirilkolinesteraz enzimleri, substrat olarak asetilkolin iyodür ve bütirilkol iniyodür, aktivitenin ölçümü için sarı renkli 5,5'-ditiyobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanıldı. 96 kuyucuklu mikrolakaların herbir kuyucuğuna 0,1 M pH=8 fosfat tamponundan 130 µL, 10 µL numune, AChE veya BChE çözeltisinden ise 20 µL ilave edildi. 25 °C de 10 dakika inkübasyona bırakıldı. Daha sonra üzerine 20 µL DTNB çözeltisi ve 20 µL asetilkoliniyodür veya bütirilkolin iyodür ilave edildi. Sırasıyla asetilkolin iyodür veya bütirilkolin iyodürün enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoik asit anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlendi. Kontrol olarak etanol, standart olarak ise Şekil 3.3'de açık yapısı gösterilen galantamin kullanıldı.



Şekil 3.3 : Galantamin bileşiği

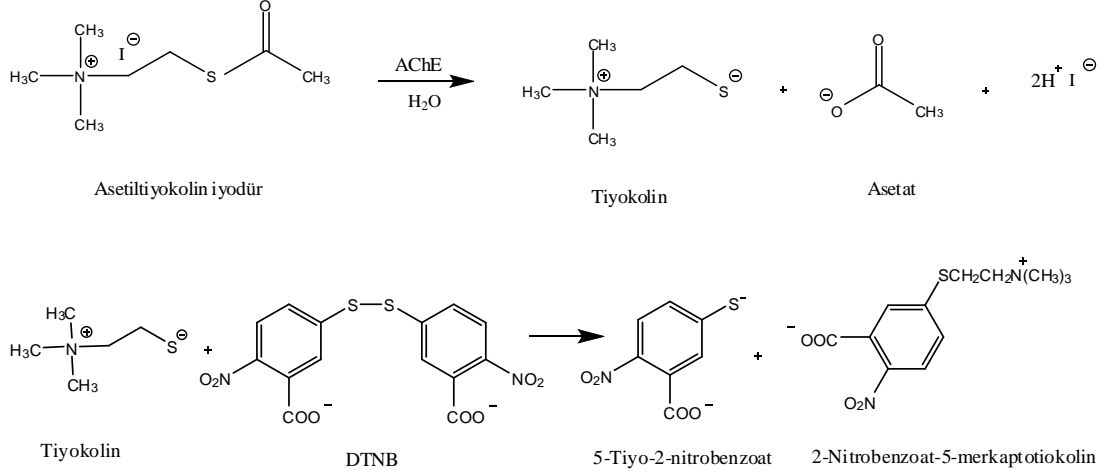
Antikolinesteraz aktivitesi, kontrole göre % inhibisyon olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\% \text{ inhibisyon} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (3.4)$$

(A= Absorbans)

AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak asetilkolinesteraz enzimi, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Reaksiyon şematik olarak Şekil 3.4'te gösterilmektedir:



Şekil 3.4 : Asetilkolinesteraz inhibisyon reaksiyonunun işleyiş mekanizması

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

Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH=8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan 10 µL çözeltilerden ve asetil kolinesteraz (AChE) enzim çözeltisinden 20 µL konulur. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edilir. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve asetilkolin iyodür (AcI) 20 µL herbir kuyucuğa ilave edilir. Standart olarak Galanthus bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanılır. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okunur ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanlardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edilir. Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0.125 mM'a kadar seyreltilmiş solüsyonları hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplanır.

3.6.1.1 BChE aktivite testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanılmaktadır. Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), numunelerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden 10 µL ve Butirilkolinesteraz (BChE) enzimi çözeltisinden 20 µL konulur. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edilir. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat olarak butirilkolinoyodür (BuI) 20 µL herbir kuyucuğa ilave edilir. Standart olarak *Galanthus* bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanılır. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okunur ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edilir. Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM'dan 0.125 mM'a kadar seyreltilmiş solüsyonları hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplanır.

3.7 İstatistiksel Hesaplamalar

Aktivite sonuçlarında elde edilen veriler 3 paralel testin ortalama ± standart sapması olarak verildi. Sonuçlar Student-*t* testine göre % 95 güven sınırları içinde bulundu. Konsantrasyon ile absorbanslar arasında ölçü eğrileri çizildi ve ilgili regresyon denklemleri bulundu. 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 nonpolar 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 (İTK), hazır Aluminyum silikajel plaklardan (20 x 20 cm) (Merck 1.05554) ve cam plaklardan (20 x 20 ; 20 x 10) yararlanıldı. Cam plakları hazırlamada adsorban olarak Silikajel HF₂₅₄ kullanıldı. Ekstrelerin sütun kromatografisi ile ayrılmasıyla elde edilen fraksiyonların karşılaştırılmasında İTK plakları kullanıldı. Maddeleri saflaştırmak için preparatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

3.9 Spektroskopik Yöntemler

3.9.1 UV spektroskopisi

Saf maddeler metanolde çözülerek köre karşı 200–500 nm dalga boyları arasında UV spektrumları alındı.

3.9.2 IR spektroskopisi

Thermo FTIR Nicolet 6700 cihazında çalışılmıştır.

3.9.3 NMR spektroskopisi

Kromatografik Yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin ¹H NMR, ¹³C NMR, DEPT, COSY, HMBC, HMQC spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform (CDCl₃), döterometanol (CD₃OD) ve döterodimetilsülfoksit (CD₃SOCD₃) kullanıldı.

4. DENEYSEL BÖLÜM

4.1 Bitkilerin Ekstre Edilmesi

✓ *Salvia adenophylla*

Salvia adenophylla bitkisinin toprak üstü kısımları (1800g) gölgede kurutulduktan sonra bitki değirmeninde küçük parçalar haline getirelerek öğütüldü. Toz haline getirilen bitki oda sıcaklığında direkt olarak önce aseton ile iki kez masere edildi, asetonunda tüketilen bitki daha sonra metanol ile iki kez masere edildi, çözücüler rotavapor da uçurularak ekstreler elde edildi.

S. adenophylla aseton ekstresi; 109g, (% Verim 6,1)

S. adenophylla metanol ekstresi; 51,34g (% Verim 2,85)

✓ *Salvia verticillata subsp. amasiaca*

Salvia verticillata subsp amasiaca bitkisinin toprak üstü (1500g) ve kök (900g) kısımları birbirinden ayrılarak gölgede kurutulduktan sonra İstanbul Üniversitesi Orman Fakültesi'nde öğütülüp toz haline getirildi. Toz bitkinin kök ve toprak üstü kısımları ayrı ayrı önce direkt aseton ile iki kez masere edildi daha sonra direkt asetonunda tüketilen kök ve toprak üstü kısımları yine ayrı ayrı metanol ile iki kez masere edildi. Çözücüler rotavaporda uçurulduktan sonra aşağıda ki ekstreler elde edilmiştir.

S. verticillata subsp amasiaca kök aseton ekstresi; 14g, (% Verim 1,56)

S. verticillata subsp. amasiaca kök metanol ekstresi; 12g (% Verim 1,33)

S. verticillata subsp. amasiaca toprak üstü aseton ekstresi; 75g (% Verim 5)

S. verticillata subsp. amasiaca toprak üstü metanol ekstresi; 41g (% Verim 2,73)

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.

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

4.2.2 Toplam flavonoit 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 flavonoit miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı.

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

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 radikaldir. DPPH'nin 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 (Miller, 1971). 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:

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

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

4.4 Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi

4.4.1 AChE % inhibisyon testi

Mikroplakadaki etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve asetil kolinesteraz (AChE) enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve asetilkolin iyodür (AcI) 20 µL herbir kuyucuğa ilave edildi. Standart olarak galantamin 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

4.4.2 BChE % inhibisyon testi

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

Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH=8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden 10 µL ve Bütirilkolinesteraz (BChE) enzimi çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat olarak bütirilkolinoyodür (BuI) 20 µL herbir kuyucuğa ilave edilidi Standart olarak yine galantamin kullanıldı. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilip 412 nm dalga boyunda absorbans okunurak ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplandı ve aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.

4.5 *S. adenophylla* ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* Bitkilerinin İzolasyon ve Saflaştırma Çalışmaları

4.5.1 *Salvia adenophylla* bitkisinin aseton (sad) ve metanol ekstrelerinin (sadm) fraksiyonlandırılması

✓ *S. adenophylla* aseton ekstresinin (Sad) fraksiyonlandırılması

S. adenophylla bitkisinin toprak üstü kısımları (1800g) gölgede kurutulduktan sonra oda sıcaklığında iki kez aseton ile masere edilerek 109 g ekstre elde edildi. Aseton 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 13 adet fraksiyon (herbiri için ortalama 750 mL çözücü kullanarak) elde edilmiştir.

✓ *S. adenophylla* metanol ekstresinin (SadM) fraksiyonlandırılması

Bitkinin aseton ile tüketilmesinin ardından metanol ile tüketilerek elde edilen metanol ekstresi (51.344g) adsorban maddesi poliklar olan bir kolonda fraksiyonlarına ayrıldı. Bu işlem sırasında çözücü sistemi olarak %100 CHCl₃ ve ardından sırasıyla CHCl₃ 'a artan polaritede MeOH (%2, %5,%10,%15,%25 ve%50) ilave edilmiş ve en son %100 MeOH kullanılmıştır. Her bir çözücü sistemiyle alınan fraksiyonlar İTK ile kontrol edilerek benzerlik gösteren fraksiyonlar birleştirilmiş ve toplamda 8 fraksiyon elde edilmiştir.

4.5.2 *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* bitkisinin kök ve toprak üstü aseton ve metanol ekstrelerinin fraksiyonlandırılması

✓ *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* kök aseton ekstresinin (SV) fraksiyonlandırılması

Salvia verticillata subsp. *amasiaca* bitkisinin köklerinden elde edilen aseton ekstresi (14g) 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 19 fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlara kolon ve

preparatif ince tabaka kromatografisi Yöntemleri uygulanarak toplam 6 saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik Yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

✓ ***Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* kök metanol ekstresinin (SVM) fraksiyonlandırılması**

Salvia verticillata subsp. *amasiaca* bitkisinin köklerinden elde edilen metanol ekstresi (12g) kurutulduktan sonra silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırıldı. Elüsyona %100 diklorometan ile başlanmış polarite belli oranda arttırılarak önce %100 asetona ardından da %100 metanole kadar devam edilmiştir. Yapılan İTK ile benzerlik gösteren fraksiyonlar birleştirilerek toplamda 10 fraksiyon elde edilmiştir.

✓ ***Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* toprak üstü aseton+metanol (SVT) ekstresinin fraksiyonlandırılması**

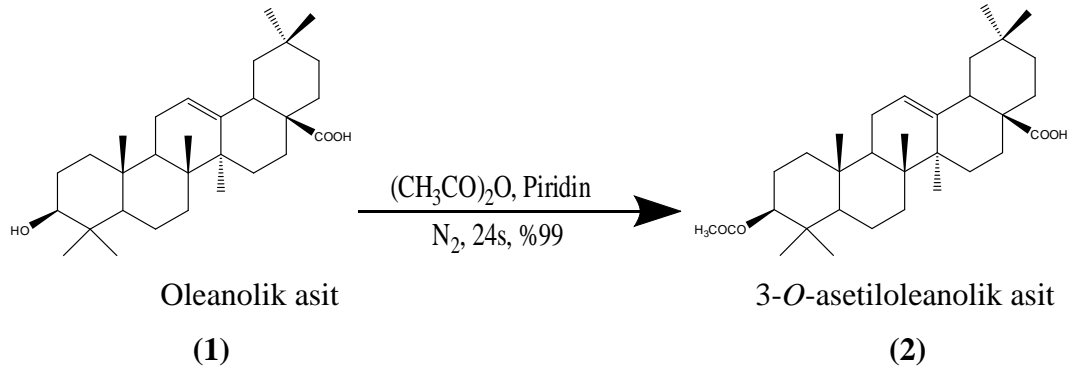
S. verticillata subsp. *amasiaca* bitkisinin toprak üstü kısımları da gölgede kurutulduktan sonra maserasyon yöntemiyle (oda sıcaklığında iki kez aseton ve ardından da iki kez metanol ile tüketilerek) 41,438 g aseton ve 75,481 g metanol ekstresi elde edilmiştir. Bitkinin toprak üstü aseton ve metanol ekstrelerinin İTK sonucuna ve aynı zamanda da gösterdiği benzer aktivite verilerine dayanarak birleştirilmesine karar verilmiştir. Toplam ekstre (116,91g) silikajelin adsorban olarak kullanıldığı bir kolon üzerinden fraksiyonlandırılmıştır. Elüsyona %100 petrol eteri ile başlanmış ve polarite belli oranda arttırılarak %100 diklorometana geçilmiş, bundan sonra da polarite aseton ile arttırılıp %100 metanole kadar devam edilerek İTK sonuçlarına göre benzerlik gösteren fraksiyonların birleştirilmesi sonucu toplamda 20 fraksiyon elde edilmiştir.

4.6 Oleanolik Asidin Potansiyel Aktif Yarı Sentetik Türevlerinin Sentezi

S. verticillata subsp. *amasiaca* bitkisinden ursolik asit az elde edilmesine rağmen oleanolik asit daha çok elde edilmiştir (450mg). Elde edilen oleanolik asit kolon kromatografisi ile saflaştırıldı ve altı farklı türevi sentezlendi.

4.6.1 3-asetiloleanolik asit sentezi

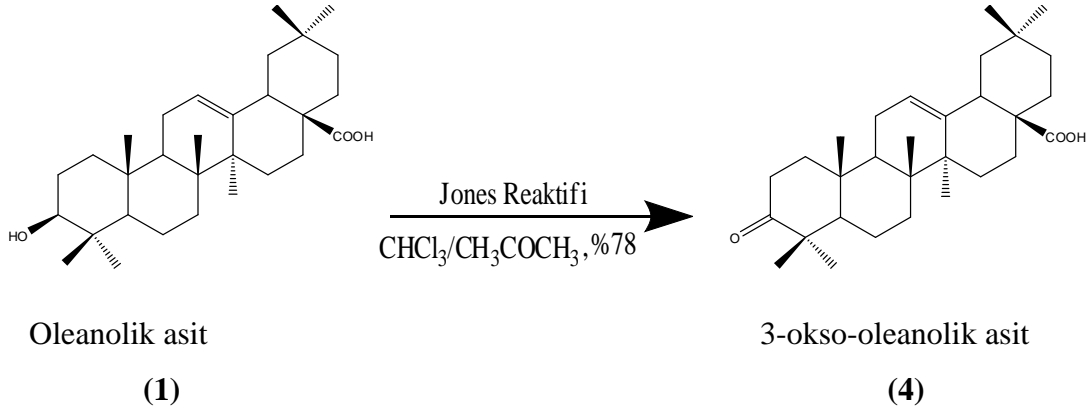
100 mg (0,2 mmol) oleanolik asit (**1**) 2,5 mL piridin içerisinde çözüldü. İçerisine 2,5 mL asetik anhidrit ilave edilerek bu karışım N₂ atmosferine alınıp oda sıcaklığında 24 saat karışmaya bırakıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı ve karışım 250 mL'lik ayırma hunisine alınarak su ve DCM (15mL*2) ile ekstraksiyon yapıldı. Organik fazı topladıktan sonra asitliğinin giderilmesi için su ile birkaç kez (20mL*5) yıkandı, sulu fazın pH 1 kontrol edildikten sonra organik faz Na₂SO₄ ile kurutuldu çözücü rotavaporda uçuruldu, son olarak da ürün 3-4 defa toluen ile muamele edilerek çözücüsü rotavaporda uçuruldu ve (Şekil 4.1) ürün elde edildi.



Şekil 4.1 : 3-asetiloleanolik asit sentezi

4.6.2 3-okso-oleanolik asit sentezi

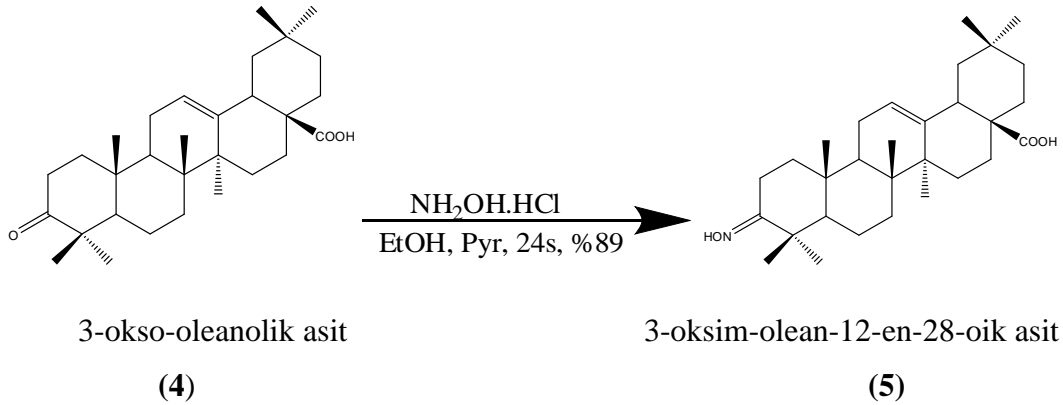
100 mg (0,2 mmol) OA (**1**) 5 mL aseton içerisinde çözüldü. Karışım buz banyosuna alınıp Jones reaktifinden renk turuncudan yeşile dönene kadar damla damla ilave edildi. Karışım buz banyosundan çıkarılıp oda sıcaklığında 1 saat karışmaya bırakıldı. Reaksiyon TLC ile kontrol edilerek sonlandırıldı. Su ve diklorometan ile muamele edilerek organik faz Na₂SO₄ ile kurutulur ve çözücüsü rotavaporda uçularak beyaz katı ürün (**2**) (Şekil 4.2) elde edildi.



Şekil 4.2 : 3-okso-oleanolik asit (3-dehidro-oleanolik asit) sentezi

4.6.3 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit sentezi

3-okso-oleanolik asit (4, 75mg) 50 mL'lik balona alınıp içerisine 28 mg $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ilave edildi. Bu karışım 1 mL EtOH içerisinde çözüldü ve 0,6 mL piridin ilave edilerek reaksiyon kapalı N_2 sisteminde 24 saat karışmaya bırakıldı. TLC yapılarak reaksiyonun bittiği gözlemlendi ve su-diklorometan ile ekstraksiyon yapılarak ürün (5) elde edildi.

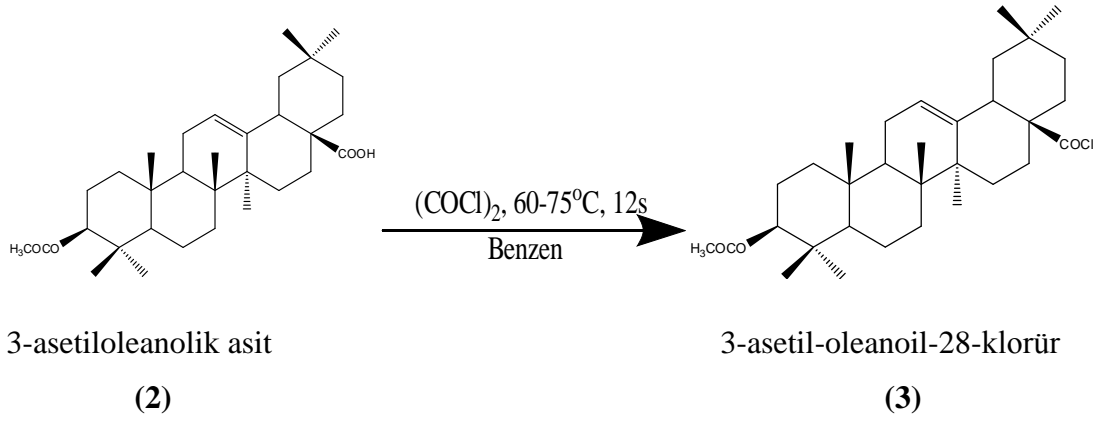


Şekil 4.3 : 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit sentezi

4.6.4 3-asetil-oleanoil-28-klorür sentezi

3-asetiloleanolik asit (2, 50 mg) 1,5 mL benzen çözücüsü içerisinde çözüldü, Karışımın üzerine 0,06 mL okzalilklorür ilave edilip oda sıcaklığında kapalı N_2 sisteminde 12 saat karışmaya bırakıldı. Reaksiyonun sürekliliği TLC ile takip edildi.

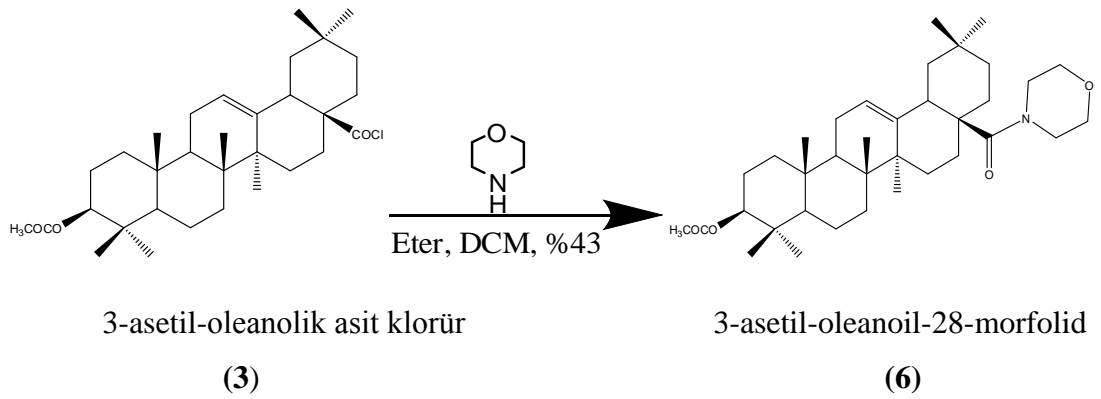
Reaksiyonun bittiği gözlemlendikten sonra çözücü fazlalığı rotavaporda uçurularak ürün (3) elde edildi (Liu ve diğ., 2008).



Şekil 4.4 : 3-asetil-oleanoil-28-klorür sentezi

4.6.5 3-asetil-oleanoil-28-morfolid sentezi

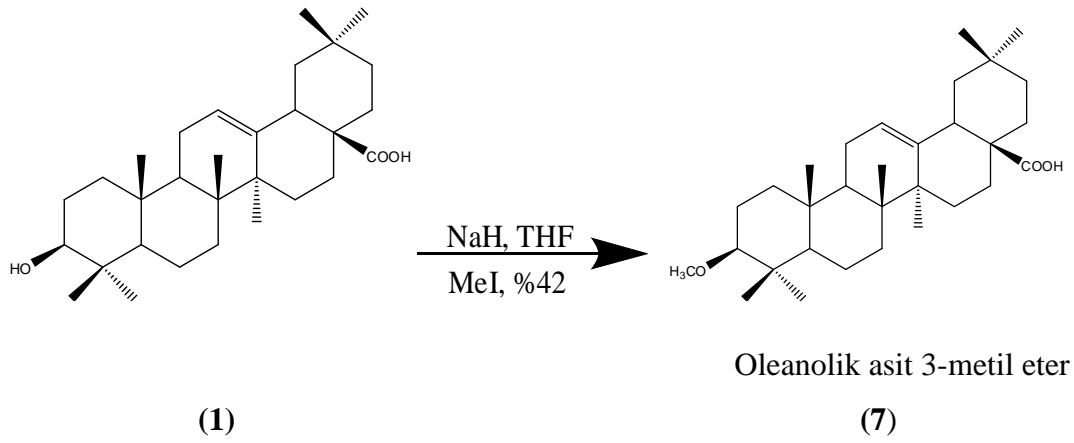
3-asetil-oleanoil-28-klorür (3, 63,1mg) 2 mL (eter:DCM) (4:1) çözücü sisteminde çözülerek içerisine 104 µL morfolin ilave edildi ve karışım oda sıcaklığında 5 saat karışmaya bırakıldı, TLC yaparak reaksiyonu sonlandırdıktan sonra fazla çözücü rotavaporda uçuruldu ve beyaz katı ürün (6) elde edildi.



Şekil 4.5 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid sentezi

4.6.6 Oleanolik asit 3-metil eter sentezi

NaH (70mg) 5 mL THF içerisinde çözüldü. Bu karışım buz banyosuna alınarak balonun içerisine 5 mL THF’de çözülen oleanolik asit (1) (70mg) eklendi. Bu karışım aynı sıcaklıkta 1 saat karıştırıldı ve daha sonra balona MeI (300µL, 4,82 mmol) damla damla ilave edilerek reaksiyon 16 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 uçurularak ürün (7) elde edildi (Kwon ve diğ., 2009).



Şekil 4.6 : Oleanolik asit 3-metileter sentezi

5. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca* bitkisinin kök ve toprak üstü kısımlarından ayrı ayrı hazırlanan aseton ve metanol ekstralarının ve *Salvia adenophylla* Hedge & Hub.-Mor. bitkisinin toprak üstü kısımlarının aseton ve metanol ekstralarının 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 ekstraların toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları da sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. *Salvia verticillata* subsp. *amasiaca*'dan elde edilen kök aseton, kök metanol, toprak üstü (aseton + metanol) ekstralarının ve *Salvia adenophylla*'dan elde edilen aseton ve metanol ekstralarının taşıdığı sekonder metabolitler izole edilerek saflaştırılan bileşiklerin yapıları IR, 1D- ve 2D-NMR ve kütle spektroskopik yöntemleriyle belirlendi. Ekstrelerden yüksek verimde elde edilen triterpenik asitlerden oleanolik asitin altı yarı sentetik türevi hazırlanarak aktiviteleri araştırıldı ve sonuçlar aşağıda verildi.

5.1 Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Sonuçları

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

Çizelge 5.1 : Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları.

Ekstreler	Toplam Flavonoit Miktarı (μg kersetin eşdeğer) /mg Ekstre	Toplam Fenolik Miktarı (μg pirokatekol eşdeğer) /mg Ekstre
Sad aseton ekstresi	18,58 \pm 0,65	90,91 \pm 2,57
Sad metanol ekstresi	25,32 \pm 2,50	92,12 \pm 1,78
SV kök aseton ekstresi	19,37 \pm 0,45	477,27 \pm 12,86
SV kök metanol ekstresi	15,64 \pm 0,56	374,24 \pm 4,29
SV toprak üstü aseton ekstresi	20,71 \pm 0,27	216,67 \pm 0,00
SV toprak üstü metanol ekstresi	15,05 \pm 0,83	275,76 \pm 2,14

5.2 Ekstrelerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

5.2.1 DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları

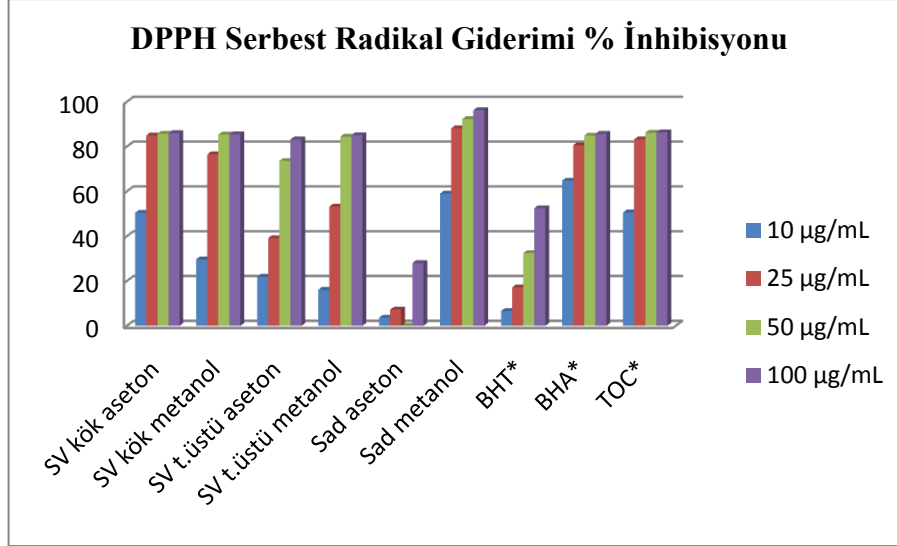
Salvia adenophylla aseton ve metanol ekstreleri ile *S. verticillata* subsp. *amasiaca* kök aseton, metanol ve toprak üstü aseton ve metanol ekstreleri ve DPPH serbest radikali giderim aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) tayin edildi. Standart olarak kullanılan BHT, BHA ve α-tokoferole göre aktivite karşılaştırmaları yapıldı.

S. adenophylla (Sad) ekstrelerinin ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* (SV) ekstrelerinin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyon olarak Çizelge 5.2 de verilmiştir.

Çizelge 5.2 : Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

DPPH Serbest radikal Giderimi Aktivitesi (%İnhibisyon)				
Ekstreler	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Sad aseton	3.64	7.22	19.44	28.01
Sad metanol	59.03	88.16	92.28	96.2
SV kök aseton	50,45	84,99	85,67	86,00
SV kök metanol	29,68	76,52	85,33	85,44
SV toprak üstü aseton	21,90	39,16	73,59	83,18
SV toprak üstü metanol	16,03	53,16	84,42	85,10
BHT*	6,59	17,16	32,39	52,50
BHA*	64,77	80,57	84,89	85,68
TOC*	50,57	83,18	86,14	86,36

*standart



Şekil 5.1 : *S. adenophylla* ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* bitkilerinin aseton ve metanol ekstralarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi

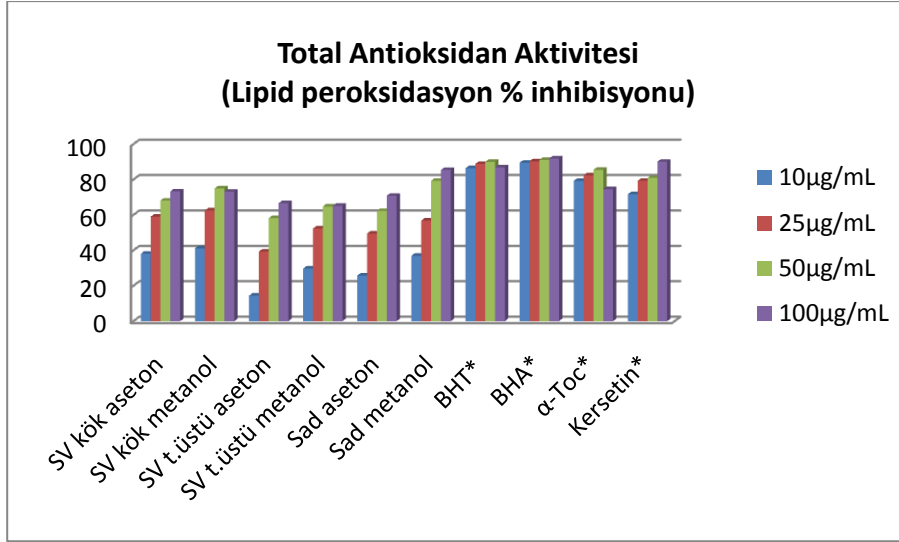
5.2.2 Lipid peroksidasyon inhibisyonu (β -karoten renk açılım) yöntemi sonuçları

S. verticillata subsp. *amasiaca* ve *S. adenophylla* bitkilerinden hazırlanan aseton ve metanol ekstraları 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, α - tokoferol ve kersetin kullanıldı.

Çizelge 5.3 : Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları

Lipid Peroksidasyon % İnhibisyonu				
Ekstreler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
Sad aseton	25,73±2,83	38,25±0,92	59,36±2,55	70,84±1,14
Sad metanol	36,92±1,03	50,32±0,78	72,16±2,96	85,41±2,31
SV kök aseton	38,07±7,52	59,04±0,83	68,11±0,32	73,28±0,00
SV kök metanol	41,13±3,20	62,53±1,69	74,97±0,76	73,14±2,40
SV t.üstü aseton	14,42±4,70	39,33±5,76	58,19±0,02	66,63±1,00
SV t.üstü metanol	29,71±7,30	52,34±1,68	64,78±0,83	65,13±2,49
BHT*	86,39±2,19	88,81±0,39	90,00±0,36	86,87±0,36
BHA*	89,48±0,36	90,26±0,00	91,09±0,04	91,90±0,12
α -Toc*	79,22±3,13	82,34±2,07	85,45±0,08	74,59±0,36
Kersetin*	71,67±7,31	79,28±0,73	80,88±2,78	90,04±0,01

*standart



Şekil 5.2 : *S. verticillata* subsp. *amasiaca* aseton ve metanol ekstrelerinin lipid peroksidasyon % inhibisyonu

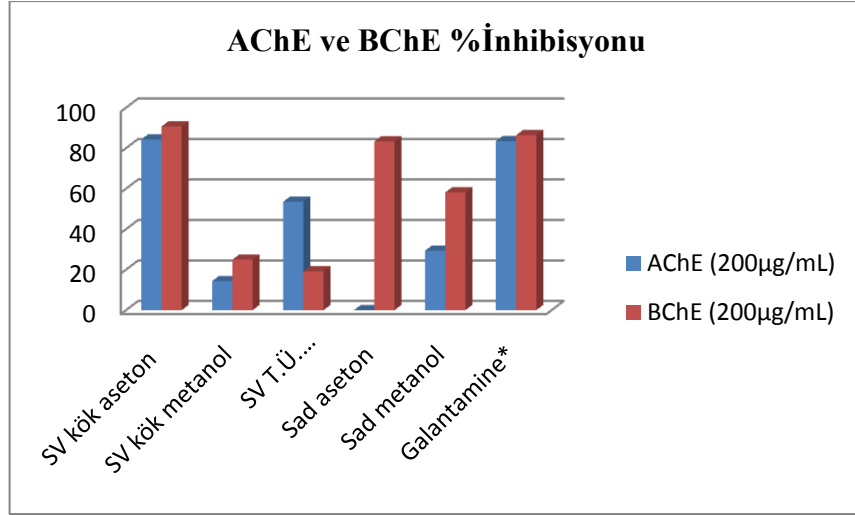
5.2.3 Antikolinesteraz aktivite sonuçları

S. adenophylla ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* kök ve toprak üstü aseton ve metanol ekstrelerinin AChE ve BChE % inhibisyon değerleri Çizelge 5.4' de verilmiştir.

Çizelge 5.4 : Ekstrelerin antikolinesteraz aktivite sonuçları (% inhibisyon)

Ekstreler	AChE (200µg/mL)	BChE (200µg/mL)
Sad aseton	38,76±2,48	83,29±6,41
Sad metanol	29,32±0,06	58,13±1,12
SV kök aseton	84,28±1,55	90,71±1,13
SV kök metanol	14,33±3,54	24,94±0,17
SV T.Ü. aseton+metanol	53,48±2,92	19,13±4,60
Galantamine*	83,46±0,20	86,41±0,53

*standart



Şekil 5.3 : *S. adenophylla* ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* aseton ve metanol ekstrlerinin AChE ve BChE sonuçları (% inhibisyon)

5.3 *S. adenophylla* ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* Ekstrelerinin

Fraksiyonlarının Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit miktar, DPPH ve Lipid Peroksidasyon İnhibisyon Aktivite Sonuçları

5.3.1 *S. adenophylla* aseton (Sad) ve metanol ekstresinin (SadM)

fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları

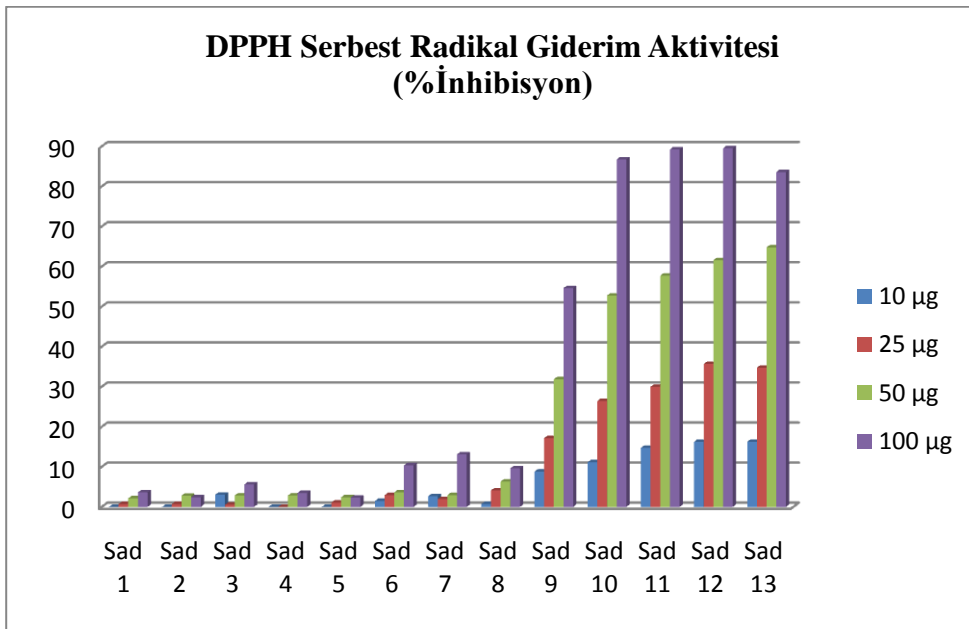
Çizelge 5.5 : Sad ekstresi fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarı sonuçları

Fraksiyonlar	Toplam Fenolik Miktarı (µg pirokatekole eşdeğer)/mg Ekstre	Toplam Flavonoit Miktarı (µg kersetine eşdeğer)/mg Ekstre
Sad 1 (P.E %100)	85.18±1.73	2,53±1.50
Sad 2 (P.E, DCM (%75:%25))	90.72±1.60	10,13±2.83
Sad 3 (P.E, DCM (%50:%50))	82.92±4.40	13,52±1.92
Sad 4 (P.E, DCM (%25:%75))	57.87±2.70	16,01±0.86
Sad 5 (DCM %100)	73.23±1.77	11,38±2.04
Sad 6 (DCM, Aseton(%95:%5))	35.85±0.85	12,38±1.04
Sad 7 (DCM, Aseton(%80:%20))	38.84±1.42	11,90±0.93
Sad 8 (DCM, Aseton (%50:%50))	40.32±4.01	13,28±2.67
Sad 9 (Aseton %100)	58.85±2.40	16,07±1.56
Sad 10 (Aseton, MeOH (%95:%5))	65.71±0.86	19,83±0.56
Sad 11 (Aseton, MeOH (%80:%20))	90.60±4.21	15,22±3.43
Sad 12 (Aseton, MeOH (%50:%50))	44.00±1.48	10,13±2.56
Sad 13 (MeOH %100)	23.44±0.00	18,58±1.25

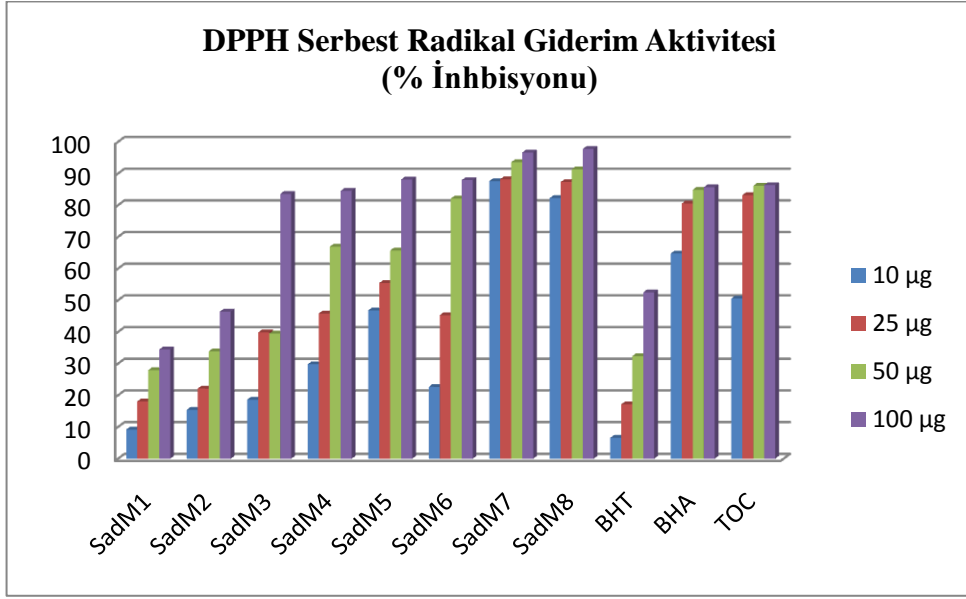
Çizelge 5.6 : SadM ekstresi fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarı sonuçları

Fraksiyonlar	Toplam Fenolik Miktarı (μg pirokatekole eşdeğer) /mg Ekstre	Toplam Flavonoit Miktarı (μg kersetine eşdeğer) /mg Ekstre
SadM1	104,55±4,29	14,70±0,24
SadM2	150,00±4,29	15,52±0,31
SadM3	196,97±6,43	14,54±0,24
SadM4	157,58±15,00	14,63±0,74
SadM5	253,03±0,00	18,04±0,19
SadM6	263,64±10,71	16,68±1,17
SadM7	331,82±0,00	16,37±0,43

5.3.2 Sad ve SadM ekstresinin fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları (%İnhibisyon)

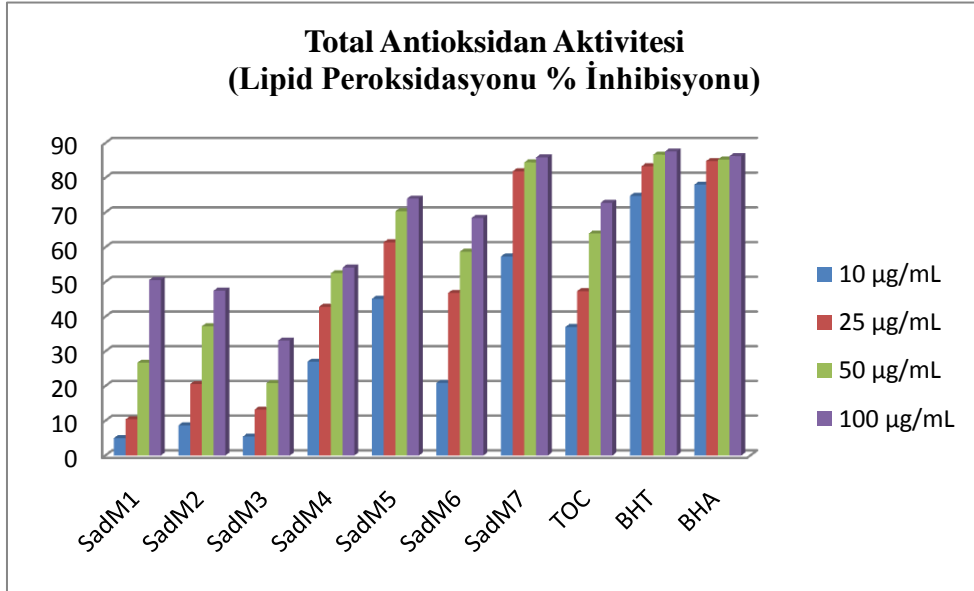


Şekil 5.4 : Sad ekstresi fraksiyonların DPPH radikali giderim aktivitesi (% inhibisyonu)



Şekil 5.5 : SadM ekstesi fraksiyonlarının DPPH radikali giderim aktivitesi (% inhibisyonu)

5.3.3 *S. adenophylla* aseton (Sad) ve *S. adenophylla* metanol (SadM) ekstrlerinin fraksiyonlarının lipid peroksidasyonu % inhibisyonu



Şekil 5.6 : SadM ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyonu % inhibisyonu

5.3.4 *S. verticillata* subsp. *amasiaca* kök aseton (SV) kök metanol (SVM) ve toprak üstü aseton+metanol (SVT) ekstresi fraksiyonlarının toplam fenolik miktarı ve toplam flavonoit miktarı

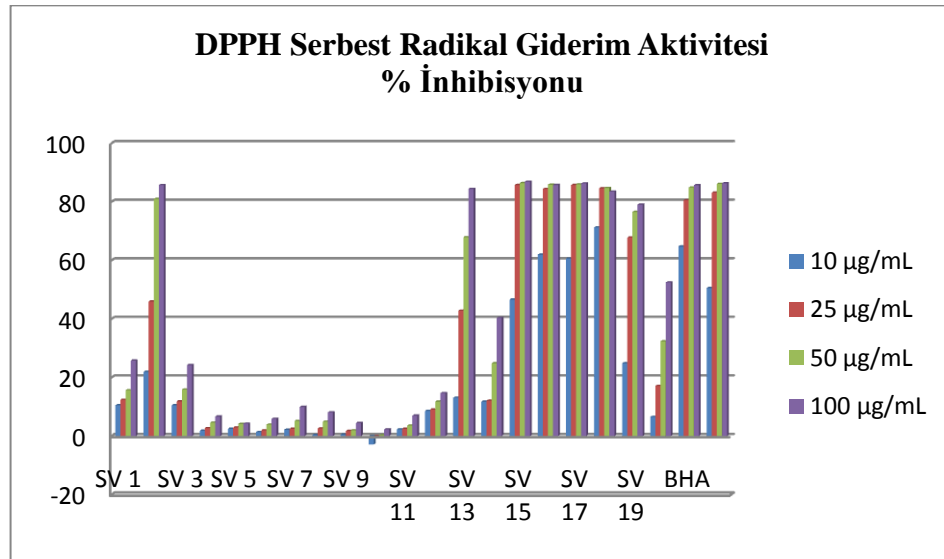
Çizelge 5.7 : SV ekstresinin fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktar sonuçları

Fraksiyonlar	Toplam Fenolik Miktarı (μg pirokatekole eşdeğer)/mg Ekstre	Toplam Flavonoit Miktarı (μg kersetine eşdeğer)/mg Ekstre
SV 1	96,97 \pm 2,14	13,59 \pm 0,13
SV 2	159,09 \pm 4,29	11,70 \pm 0,26
SV 3	146,97 \pm 4,29	11,37 \pm 0,19
SV 4	114,65 \pm 1,75	12,85 \pm 0,13
SV 5	113,64 \pm 0,00	11,05 \pm 0,11
SV 6	128,79 \pm 0,00	12,76 \pm 0,25
SV 7	107,58 \pm 4,29	17,17 \pm 0,22
SV 8	122,73 \pm 4,29	12,76 \pm 1,82
SV 9	74,24 \pm 0,00	11,30 \pm 0,28
SV 10	96,97 \pm 2,14	10,84 \pm 0,07
SV 11	81,82 \pm 2,14	11,15 \pm 0,07
SV 12	98,48 \pm 0,00	11,62 \pm 0,39
SV 13	216,67 \pm 0,00	13,86 \pm 0,10
SV 14	109,09 \pm 6,43	11,78 \pm 0,04
SV 15	525,76 \pm 4,29	17,53 \pm 4,26
SV 16	556,06 \pm 0,00	21,53 \pm 2,43
SV 17	725,76 \pm 30,00	27,73 \pm 11,73
SV 18	692,42 \pm 17,14	28,30 \pm 3,28
SV 19	400,00 \pm 6,43	21,07 \pm 0,19

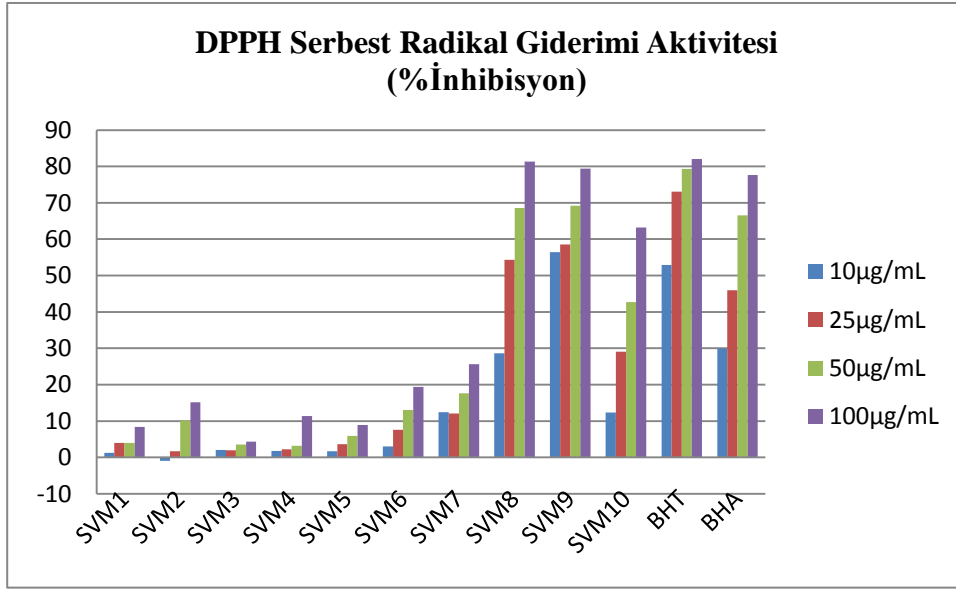
Çizelge 5.8 : SVM ekstresi fraksiyonlarının toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarı sonuçları

Fraksiyonlar	Toplam Fenolik Miktarı (μg pirokatekole eşdeğer) /mg Ekstre	Toplam Flavonoit Miktarı (μg kersetine eşdeğer) /mg Ekstre
SVM 1	23,37 \pm 2,70	19,92 \pm 0,85
SVM 2	40,27 \pm 2,39	17,73 \pm 1,49
SVM 3	26,37 \pm 1,36	12,05 \pm 0,58
SVM 4	11,41 \pm 0,91	11,94 \pm 0,21
SVM 5	13,26 \pm 2,39	15,21 \pm 0,28
SVM 6	24,22 \pm 1,35	16,51 \pm 0,18
SVM 7	20,31 \pm 0,49	14,05 \pm 0,21
SVM 8	145,42 \pm 5,57	48,20 \pm 2,99
SVM 9	185,77 \pm 6,71	77,98 \pm 3,06
SVM 10	25,88 \pm 2,96	14,71 \pm 1,31

5.3.5 SV ve SVM ekstresinin fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

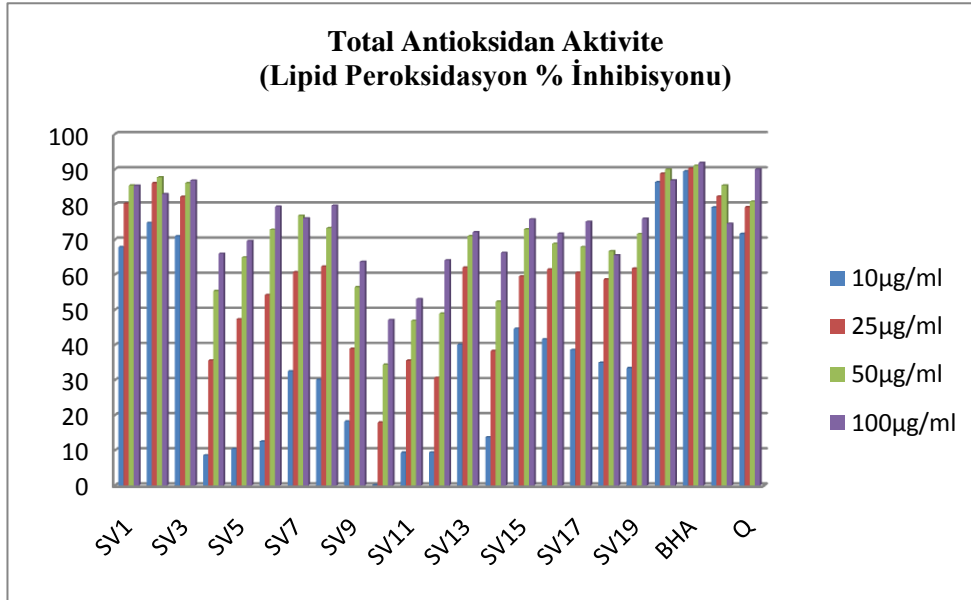


Şekil 5.7 : SV ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbet radikal giderim aktivitesi (% İnhibisyon)

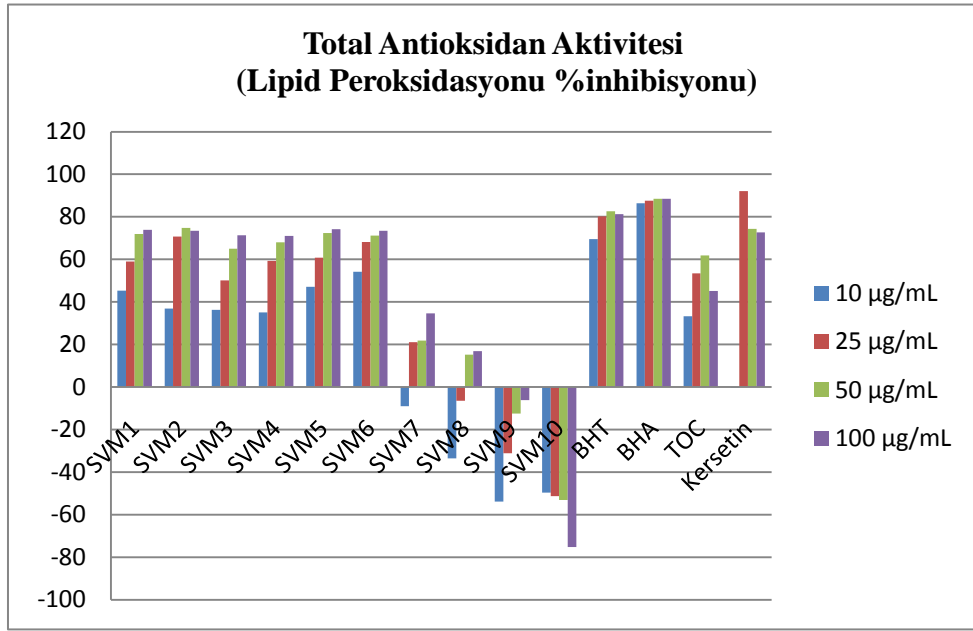


Şekil 5.8 : SVM ekstresi fraksiyonlarının DPPH serbest radikal giderim aktivitesi (%) inhibisyon

5.3.6 SV ve SVM ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon % inhibisyon aktivitesi sonuçları



Şekil 5.9 : SV ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon % inhibisyonu



Şekil 5.10 : SVM ekstresi fraksiyonlarının lipid peroksidasyon % inhibisyonu

5.4 *S. adenophylla* ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* Bitkisinin Aseton ve Metanol Ekstrelerinden İzole Elde Edilen Saf Bileşikler ve Yapı Tayini

5.4.1 *S. adenophylla* ve *S. verticillata* subsp. *amasiaca* bitkilerinden izole edilen saf bileşikler ve miktarları

Çizelge 5.9 : *Salvia adenophylla* bitkisinden izole edilen saf bileşikler ve miktarları

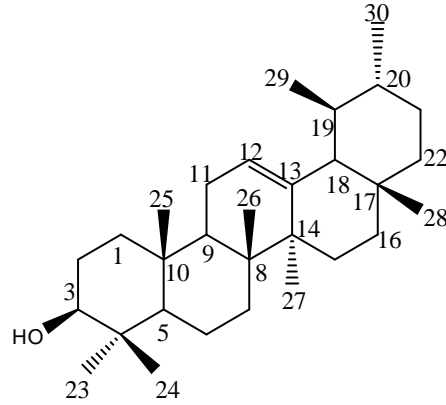
<i>Salvia adenophylla</i>			
Aseton ekstresi	Miktar	Metanol ekstresi	Miktar
α -amirin	15 mg	Asetofenon-4- <i>O</i> - β -glukopiranozit	8 mg
oleanolik asit	200 mg		
ursolik asit	490 mg		
ursolik asit laktonu	12 mg		

Çizelge 5.10 : *S. verticillata* subsp. *amasiaca* bitkisinden izole edilen saf bileşikler ve miktarları

<i>S. verticillata</i> subsp. <i>amasiaca</i>					
Kök aseton	Miktar	Kök metanol	Miktar	Toprak üstü aseton+metanol	Miktar
Ferruginol	9 mg	Oleanolik asit	50 mg	Salvigenin	14 mg
Horminon	14 mg	Ursolik asit	35 mg	6-hidroksi-apigenin-7,4'-dimetil eter	12 mg
7-asetil-horminon	6 mg			Oleanolik asit	365 mg
3-asetil- β -amirin	7 mg			Ursolik asit	150 mg
β -sitosterol	30 mg				
Stigmasterol	16 mg				

5.4.2 Saf bileşiklerin yapı tayinleri

5.4.2.1 Sad11.1= α -amirin= Urs-12-en-3 β -ol



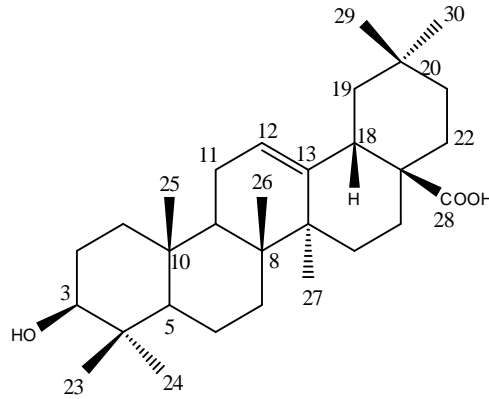
Şekil 5.11 : α -amirin bileşiği

Bu bileşik renksiz kristaller halinde (15 mg) elde edilmiştir ve erime noktası 186°C olarak bulunmuştur. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) izlenmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında kahverengi renk aldı. UV (MeOH) spektrumunda 210 nm’de uç absorpsiyon göstermiştir. IR spektrumu 3400 cm⁻¹ hidroksil grubuna ait, 1650 cm⁻¹’de doymamışlık, 1455 cm⁻¹’de ise metil gruplarının gerilim titreşim bantlarını göstermiştir.

¹H NMR spektrumunda (EK A.1, Şekil A.1) δ 0.92 (3H, s), 0.94 (3H, s), 0.98 (3H, s), 0.78 (3H, s), 1.08 (3H, s, H-27) ve 0.86 (6H, d, $J=6.24$ Hz, 2CH₃), 0.79 (3H, s,) de görülen 8 metil sinyalinin ikisinin dubletler, diğerlerinin singletler halinde izlenmesi bileşiğin ursan tipi bir triterpen olduğuna işaret etmiştir. Bileşiğin ¹³C (BB) NMR spektrumu (EK A.3, Şekil A.3) 30 C atomu taşıdığını, DEPT NMR spektrumu (EK A.4, Şekil A.4) ise bunların 8'inin metil, 9'unun metilen, 7'sinin metin ve 6 sının katerner karbondan ibaret olduğunu göstermiştir. ¹H NMR spektrumunda bileşikteki tek bir hidroksil grubunun varlığı 3.22 ppm'de (1H, dd, $J=5;10$ Hz) izlenen proton sinyali ile ve yine bileşikte bir çifte bağın varlığı 5.26 ppm'de (1H, bs, $J=2.5$ Hz) izlenen (H-12) sinyali ile anlaşılmıştır. Hidoksil grubunun ursan ve oleanen tipi triterpenlerde ilk yerleşeceği yer biyogenetik olarak C-3 konumu olduğundan öncelikle bu grup C-3'e yerleştirilmiştir. Yapılan 2D NMR (¹H-¹H gCOSY, gHMQC) spektral analizleriyle ve H-3'ün yaptığı etkileşim sabiti değerlerine dayanarak bu hidroksilin C-3 de beta konumunda olduğu belirlenmiştir. Çifte bağın yerinin ise C-12 ile C-13 arasında olduğu kütle spektrumunda retro-Diels Alder parçalanma pikleriyle izlenmiştir. Ayrıca H-12'nin etkileşim sabitleri (J değerleri) de bunu doğrulamaktadır.

Tüm spektral veriler bileşiğin ursan iskeletine sahip ve diğer bazı *Salvia* türlerinden de daha önce izole edilen α -amirin (3 β -hydroxy-urs-12-en) olduğunu göstermiştir. Nitekim bileşik hem standart madde ile TLC de, hem de literatürdeki spektral değerleri ile tamamen uyumluluk göstermiştir (Menezes ve diğ., 1997).

5.4.2.2 Sad 3b-9= Oleanolik asit= 3 β -hidroksi-olean-12-en-28-oik asit



Şekil 5.12 : Oleanolik asit bileşiği

Beyaz renkli olan bu bileşik katı 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 pembe-mor renk aldı.

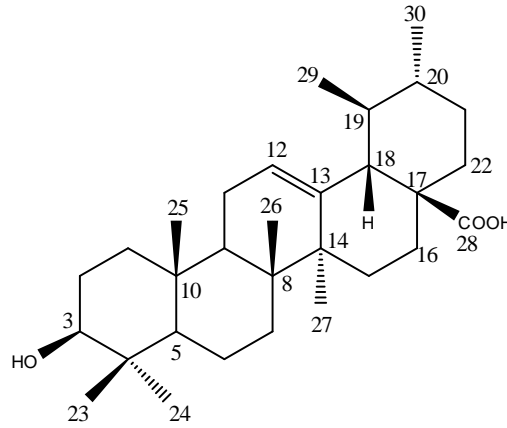
¹H NMR spektrumunda (EK B.1, Şekil B.1) 0.68-1.30 ppm arasında çıkan metil pikleri singletler şeklindedir. Tüm metillerin singletler halinde izlenmesi bileşiğin oleanan iskeletine sahip olduğuna işaret etmiştir. 3.15 ppm deki dublet dublet ($J= 4,5$ ve $9,5$ Hz) hidroksile komşu alfa protona, 5.22 ppm deki triplet ($J=2,5$ Hz) ise bir olefinik protona (vinilik protona) işaret etmektedir. Ayrıca 2.76 ppm de izlenen $J=2,5$ ve $J=12$ Hz’lik dd etkileşim gösteren pikin ise H-18 protonuna ait olduğu ve hatta bu sinyalin bu kadar aşağı alanda izlenmesinin nedeni ise C-17’ye bağlı (-COOH) asit grubundan ileri geldiği düşünülmüştür. Birbirinin izomeri olan oleanolik asit ile ursolik asiti birbirinden ¹H NMR da ayıran en karakteristik pikler H-19 ve H-20 ye bağlı metil sinyalleri ve H-19 protonu ile etkileşen H-18 sinyalinin verdiği bölünme ve kayma değeridir. Oleanolik asitde H-18 beta sinyali bu bileşikte de izlendiği gibi daima 2,5 ve 12 Hz lik karakteristik dublet dubletler halinde 2.8 ppm civarında izlenir. Gerek bu protonlar gerekse bileşikteki tüm protonlar ve bunları taşıyan karbonlar gHMQC NMR tekniğiyle belirlenmiş, gHMBC tekniğiyle de protonların iki ve üç bağ uzaklıktaki karbonlarla gösterdiği korelasyon sonucunda

yapının C iskeleti kesinlik kazanmış ve katerner karbonlar da saptanmıştır. IR spektrumunda 3467 cm^{-1} de (OH), 1689 cm^{-1} de ($-\text{C}=\text{O}$), 1362 cm^{-1} de (gem dimetil), 1079 ve 1106 cm^{-1} de (C-O) bantları bulunmaktadır. 1689 cm^{-1} deki karbonil bandı bileşiğin bir karboksilli asit olabileceğini göstermektedir.

Nitekim ^{13}C NMR'ın da da (EK B.3, Şekil B.3) asit karbonili 182.17 ppm de, Δ^{12} çifte bağ karbonları 122.87 ve 143.79 da, hidroksil taşıyan karbon (C-3) ise 79.22 de izlenmiştir. Tüm spektral ve literatür verilerine dayanarak yapının yine *Salvia* türlerinde çok rastlanan 3β -hidroksiolean-12-en-28-oik asit (oleanolik asit) olduğu belirlenmiştir.

Ayrıca standart örnekle de İTK da farklı çözücü sistemlerinde kıyaslanarak yapının kesin olarak oleanolik asit olduğu ispatlanmıştır.

5.4.2.3 Sad7CK= Ursolik asit= 3β -hidroksi-urs-12-en-28-oik asit



Şekil 5.13 : Ursolik asit bileşiği

Beyaz renkli kokusuz olan bu bileşik katı halde elde edildi ve erime noktası $290\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak bulundu. Silikajel plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C 'de yakıldığında pembe-mor renk aldı.

^1H NMR spektrumunda (CDCl_3 , 600 MHz) (EK C.1, Şekil C.1) 0.75-1.05 ppm ler arasında izlenen beş metil singletinin yanı sıra 0.86 ppm de ve 0.78 ppm de J değerleri 6,6 Hz olan iki dublet metilinin varlığı bileşiğin ursan yapısında olduğunu göstermektedir.

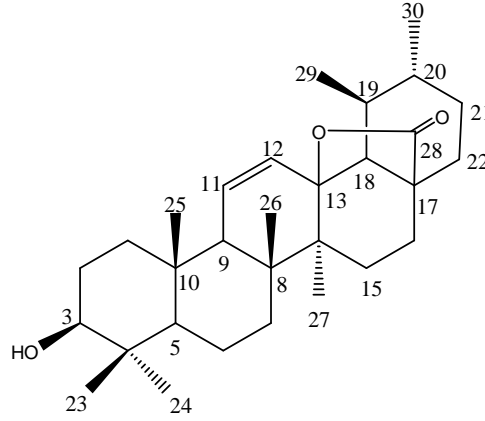
Oleanolik asit ve ursolik asit bileşiklerinin IR ve kütle spektral bulguları hemen hemen aynı olduklarından bu spektrumlara dayanarak bu bileşik ayırt edilemez, ancak saflaştırma işlemleri sonucu bileşiğin ^1H NMR spektrumunda C-19 ve C-20 deki metil gruplarının dubletler şeklinde ve dolayısıyla ^{13}C NMR da metilen (CH_2) ve metin (CH) sayılarının oleanolik asitten farklı olarak gözlenmesi bu bileşiğin ursan yapısında olduğunu göstermektedir.

IR spektrumunda 3440 cm^{-1} de (OH), 1695 cm^{-1} de (HO-C=O), 1375 cm^{-1} de (gem dimetil) ve $1050, 1035\text{ cm}^{-1}$ (C-O) bantları bulunmaktadır. Bu nedenle bileşikte en az bir hidroksil ve bir asit grubunun varlığı düşünülmüştür. Nitekim ^1H NMR spektrumunda 3 ppm civarında izlenen dd ($J=4,5$ ve $9,5$ Hz) sinyali hidroksile komşu protona (H-3 α), 5.26 ppm deki dar triplet sinyali ise vinilik bir protona (H-12) işaret etmiştir.

Bileşiğin iki metil grubunun NMR da dublet olarak izlenmesinin dışında oleanolik asit ile hemen hemen aynı spektral değerleri vermesi ve yüksek rezolüsyonlu kütle spektrumunda moleküler pikinin m/z 456.3597 ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ için hesaplanan 456.3603) da izlenmiştir.

Yapılan literatür taraması ve bileşiğin ince tabaka kromatografisinde standart ursolik asit bileşiği ile aynı R_f değerinde izlenmesi yapının yine *Salvia* türlerinde çok sık rastlanan ursolik asit (3 β -hidroksi-urs-12-en-28-oik asit) olduğunu kanıtlamıştır.

5.4.2.4 Sad3b-8= 3 β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid



Şekil 5.14 : 3 β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid (ursolik asit lakton) bileşiği

Çizelge 5.11 : 3 β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid ^1H ve ^{13}C NMR δ değerleri

Sad 3b-8: Ursolik asit laktonunun ^1H ve ^{13}C NMR Değerleri (δ)					
	^1H	^{13}C		^1H	^{13}C
C-1	1.90;1.03	38.1	C-19	1.81	38.0
C-2	1.72	27.0	C-20	0.92	40.67
C-3	3.25	79.0	C-21	1.63	30.9
C-4		39.0	C-22	1.84;1.80	31.4
C-5	0.78	54.3	C-23	1.01	27.6
C-6	1.60	17.7	C-24	0.82	14.9
C-7	1.56	31.2	C-25	1.30	19.6
C-8		42.1	C-26	1.10	18.9
C-9	1.97	53.0	C-27	1.20	16.1
C-10		36.71	C-28		180.0
C-11	5.56	128.8	C-29	0.93	17.8
C-12	5.99	133.4	C-30	0.96	17.9
C-13		90.50			
C-14		42.33			
C-15	1.76;1.24	25.5			
C-16	2.17;1.42	22.9			
C-17		46.0			
C-18	1.68	60.6			

Beyaz renkli toz halinde elde edildi (12 mg) Silika jel plakta UV lamba altında (254nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

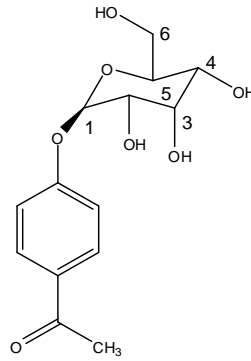
¹H NMR spektrumunda (EK D.2, Şekil D.2) 7 adet metil sinyalinin ve ¹³C NMR (BB) spektrumunda (EK D.3, Şekil D.3) 30 adet karbon sinyalinin izlenmesi yapının bir triterpen olabileceğine işaret etti. Metil gruplarından ikisinin 0.96 (6 Hz) ve 1.03 (7,4 Hz) ppm de dubletler halinde diğerlerinin ise singlet halinde izlenmesi yapının ursan iskeletine sahip bir triterpene ait olacağını gösterdi. Nitekim C-19 ve C-20 ye ait piklerin 39 ppm de izlenmesi *Salvia* larda sıkça rastlanan ursan yapısında bir triterpen olduğuna işaret etti.

Triterpenlerde, özellikle ursan ve oleanan tipli triterpenlerde biyogenetik olarak ilk süstitüent genellikle 3 numaralı karbon atomuna yerleşmeyi tercih etmektedir. Nitekim 3.25 ppm'de (dd, J=5 ve 11,2 Hz) izlenen sinyal H-3'e ait olabileceği anlaşılmıştır. HSQC (H-3, 3,25→79ppm, C-3) ve HMBC (H-3→27ppm, C-2) NMR spektrumunda izlenen direkt (1 bağ) ve indirekt (2- veya 3 bağ) korelasyonlar ile bu OH grubunun C-3' te olduğu kesinlik kazanmıştır ve *J* değerleri ise önceki üç triterpene izlendiği gibi OH grubunun beta konumunda olduğunu göstermektedir. ¹³C NMR ında 79,0 ppm de izlenen karbon sinyalinin yanı sıra 90,50 ppm de izlenen bir katerner karbonunun izlenmesi ve IR spektrumunda asit karbonilinin izlenmemesi, fakat bir lakton grubuna ait olabilecek karbonil sinyalinin (1765 cm⁻¹) varlığı ve ¹H NMR spektrumunda 8 metil yerine 7 metil sinyalinin izlenmesi yapıdaki bir metilin hatta asitin büyük olasılıkla laktone dönüşmüş olabileceğine işaret etti. Bu nedenle 90,5 ppm de ve 180.0 ppm de izlenen her iki karbon sinyali lakton grubunun varlığını doğruladı.

Ayrıca aşağı alanda rezonans olan iki proton sinyali 5.56 ppm (dd, J=10,6;J=3,4Hz, 1H) ve 5.99 ppm (brd, J=10,3 Hz, 1H) in olefinik protonlara ait olduğu HMQC spektral analizleriyle belirlendi, bu AB proton çiftinin yapıda yerleşebileceği yerler, piklerin bölünme şekillerine bakılarak Δ^1 , Δ^6 , Δ^{11} , Δ^{21} olabilirdi. Fakat HMBC NMR spektrumunda, bu olefinik sinyallerden biri olan 5.99 ppm' e ait sinyalin HMBC spektrumunda 90,5 ppm deki karbon sinyali ile bir korelasyon göstermesi bu çifte bağın ancak C-11 ile C-12 arasında olabileceğine işaret etti.

Bu durumda C-28 de ki asit grubunun laktonize olarak C-13'e bağlandığı anlaşıldı. Tüm spektral veriler dikkate alınarak bu bileşiğin yapısının 3 β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid olduğu belirlenmiştir. Hatta yapılan literatür taramasında bu bileşiğin ursolik asit laktonu olarak daha önce *Eucalyptus* türlerinden izole edilip bilim dünyasına sunulmuş olduğu saptandı (Wang ve Fujimato, 1993).

5.4.2.5 Sad 24-6-3 = Asetofenon-4-*O*- β -glukopiranozit



Şekil 5.15 : Asetofenon-4-*O*- β -glukopiranozit bileşiği

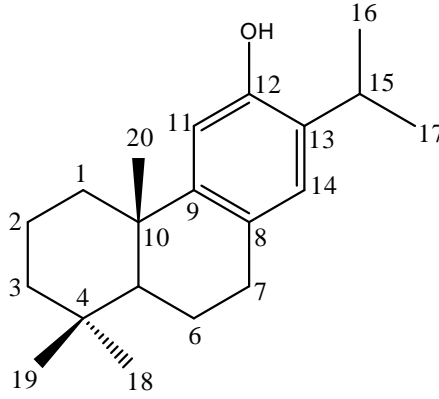
Basit bir fenolik glikoziti olan asetofenon-4-*O*- β -glukopiranozit sadece *S. adenophylla* metanol ekstresinden elde edilmiştir.

¹H NMR spektrumunda 4.93 (dd, $J=7,5$ Hz, 1H), 7.07 (brd, $J=8,88$ Hz, 2H), 7.88 (brd, $J=8,89$ Hz, 2H) 2.46 (s, 3H).

¹H NMR spektrumunda (EK E.1, Şekil E.1) 7.07 ve 7.88 ppm de dublet dubletler halinde 2'şer protonluk aromatik proton sinyallerinin izlenmesi ve J değerlerinin sırası ile $J=8,88$ ve $J=8,89$ Hz olması yapıda *p-di* süstitüe bir benzen halkasının varlığına işaret etti. 3 ile 4 ppm arasında ise 6 protona ait sinyalin gözlenmesi bileşikte çok sayıda oksijenli grubun varlığını düşündürdü. Nitekim 3.6 ppm (dd, $J=5,47$ ve 12,1 Hz) ve 3.8 ppm (dd, $J=12,1$ Hz; 2,35 Hz) de izlenen metilen çiftine ait protonlar şekerin 6 numaralı karbonun protonlarına ait olduğunu, 12,1 Hz lik geminal kaplıglerinin yanı sıra C-5 protonu ile verdikleri küçük etkileşim sabitlerini gösterdi. 4.93 ppm de izlenen dublet ($J=7,5$ Hz) ise bu protonun anomerik bir karbon protonuna ait olduğunu gösterdi, J değeri ise şekerin β bağlı olduğunu belirtti. Bu şekerin glukoz olduğu, literatürde benzene direkt O- bağlı şekerlerle yaptığımız literatür taraması sonucu ile belirlenmiş buna p- konumunda bağlı olan diğer

sübstitüentin varlığı ise hem ^1H NMR spektrumunda 3H'e karşılık gelen 2.46 ppm de bir singlet metil sinyalinin izlenmesi hem de IR spektrumunda karbonil bantlarının 1688 cm^{-1} izlenmesi bu sübstitüentin COCH_3 olduğuna işaret etti. Yapılan literatür taraması sonucu ile bileşiğin asetofenon-4- O - β -glukopiranozit olduğu doğrulanmıştır.

5.4.2.6 SV3.8= Ferruginol; 8,11,13-Abietatrien-12-ol



Şekil 5.16 : Ferruginol bileşiği

Yağsı bileşik halinde elde edilen (9 mg) silika jel plakta UV lamba altında (254nm) kahverengi görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C 'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

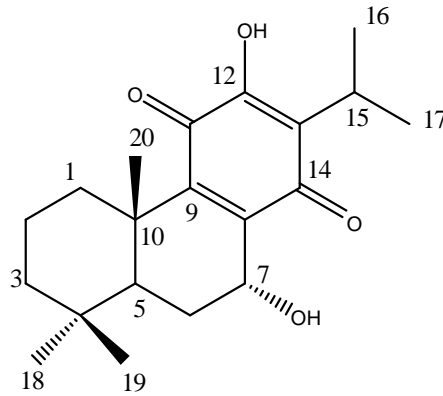
UV spektrumunda 222 ve 280 nm'lerde maximum absorpsiyon bantları izlendi. Bu yapıda bir aromatikliğin varlığına işaret etti.

IR spektrumunda 3385 cm^{-1} 'de hidroksil grubu, 2867, 1616 ve 1507 cm^{-1} 'de aromatik yapıya ait titreşim bantları izlendi.

^1H NMR spektrumunda (CDCl_3 , 400MHz) (EK F.2, Şekil F.2) üç metil sinyali 0.91, 0.94 ve 1.17 ppm de singletler halinde ve iki metil sinyali dubletler halinde 1.22 ve 1.24 ppm de izlendi. Aslında iki dublet metil protonlarına ait sinyaller birbirine çok yakın rezonans olduklarından triplet şeklinde görüldü. Spektrumda 3.10 ppm de izlenen metil sinyalinin bu iki metil dubleti ile yaptığı etkileşim sonucu septet şeklinde izlenmesiyle bir isopropil grubunun varlığı anlaşıldı. 6.61 ve 6.81 ppm de izlenen singlet sinyalleri halkada bir aromatikliğin varlığını kuvvetlendirdi.

^1H NMR’da diğerkarakteristik sinyaller 2.8 ppm civarında izlenmiştir. Bunlardan 2.85 ppm’ de izlenen ddd ($J=1,8;7;17$ Hz) ve 2.77 ppm de multiplert benzilik metilen (CH_2-7) proton çiftine işaret etmiştir. $\text{H}-1\beta$ protonu ise 2.18 ppm de dt olarak izlenmiştir. ($J=2,0$ ve 12,5 Hz) Kütle spektrumunda moleküler piki kapalı formülü olan ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}$) ye karşılık gelen m/z 286 da izlenmiştir, tüm spektral verileri göz önüne alınarak yapının *Salvia* türlerinde yaygın ve biyolojik aktivitesi yüksek bir abietan diterpen olan ferruginol olduğu belirlenmiştir.

5.4.2.7 SV7.3.1= Hormininon; 7 α ,12-dihidroksi-8,12-abietadiene-11,14-dion



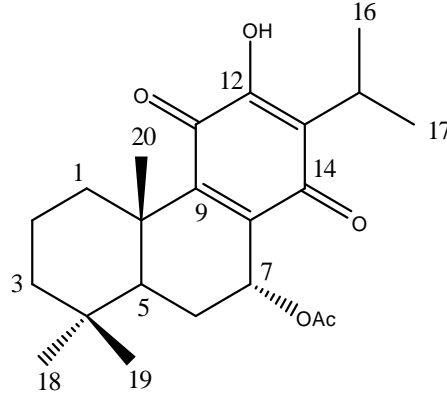
Şekil 5.17 : Hormininon bileşiğı

Sarı renkli olan bu bileşik katı halde elde edildi (14 mg), erime noktası 178-180°C olarak bulundu. Silika jel plakta UV lamba altında (254nm) kıvılkahverenkli görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında kahverengi renk aldı.

^1H NMR spektrumunda (EK G.1, Şekil G.1) karakteristik olarak beş metil sinyali (0.90, 0.98, 1.21, 1.21 ve 1.22) sinyalinin izlendi. Bunlardan 1.21 deki metil sinyallerinin 7.03 Hz lik dubletler halinde ve 3.16 ppm de bir ise metin protonun septet ($J=7,42$ Hz, H-15) halinde izlenmesi yapıda bir isopropil grubunun varlığını göstermiştir, bu sinyaller yapının abietan bir diterpen olabileceğine işaret etmiş, fakat herhangi bir aromatik proton sinyali izlenmemesine rağmen 7.21 ppm deki geniş singletin D_2O ilavesi ile kaybolması aromatik bir OH varlığını düşündürmüştür. Ayrıca 4.72 ppm’ de ($J=3\text{Hz}$, H-7) dublet şeklinde izlenen benzilik protonun OH grubuna bağlı olduğu gözlenmiştir. Karakteristik H-1 metilen pikleri 2.69 ppm’ de dd ($J=12,88$ Hz) halinde izlenmiştir. Nitekim UV spektrumunda max absorbanlarının

218, 272 ve 400 nm’lerde izlenmesi yapısının aromatik, hatta kinoid olabileceğini göstermiştir. IR spektrumunda 3358 cm⁻¹’de hidroksil grubu, karakteristik olarak da *p*-kinon halkası için 1680 cm⁻¹ karbonil bantları izlenmiştir.

5.4.2.8 SV7.3.2= 7 α -asetilhorminon; 7 α -asetil-12-hidroksi-8,12-abietadiene-11,14-dion



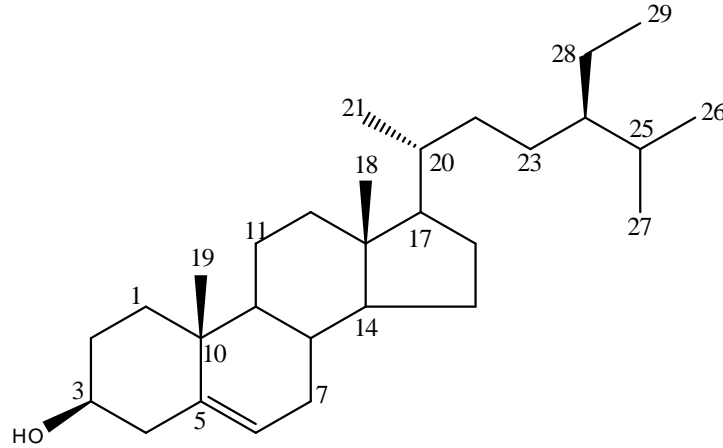
Şekil 5.18 : 7 α -asetilhorminon bileşiği

Sarı renkli olan bu bileşik kristal halde elde edildi (6 mg) silika jel plakta UV lamba altında (254nm) kızıl kahverengi görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında açık kahverengi bir renk aldı.

UV spektrumunda 215, 272 ve 402 nm’lerde maximum absorpsiyon bantları görüldü. IR spektrumunda 3290 cm⁻¹’de hidroksil grubunu, 1715 ve 1240 cm⁻¹’de asetil karbonilini, 1652 ve 1634 cm⁻¹’de *p*-kinoit yapıyı, 1604 ve 1455 cm⁻¹’de doymamışlık bantlarını gösterdi.

Bu bileşiğin NMR sinyalleri horminon bileşiğinin değerleriyle çok benzerlik göstermiş, tek fark olarak 4.72 ppm de izlenen pik yerine 5.92 ppm de hemen hemen aynı bölünme şekline sahip bir sinyal ve yanı sıra bir asetil metili 2.05 ppm de izlenmiştir. Bu sinyaller yapıda C-7 de iki hidroksil grubunun yerine bir asetil grubunun varlığına işaret ederek yapı 7 α -asetil-horminon olarak saptanmıştır.

5.4.2.9 SV8.4 = β -sitosterol; Stigmast-5-en-3-ol



Şekil 5.19 : β -sitosterol bileşiği

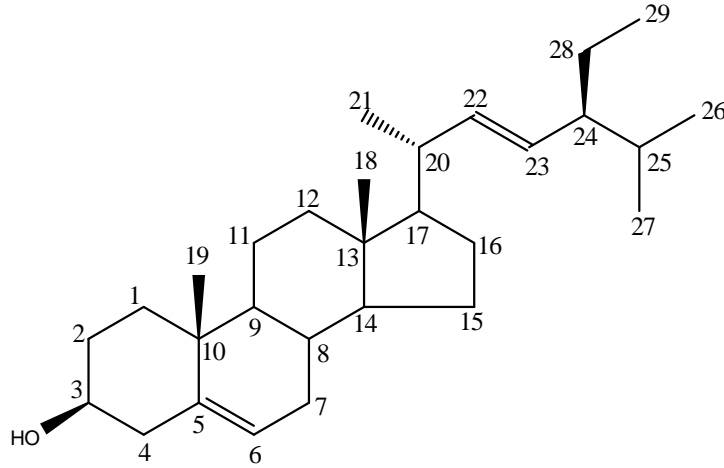
Beyaz renkli bileşik 30 mg olarak elde edildi ve erime noktası 138-139°C olarak belirlendi. Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında önce turkuaz sonra çok karakteristik kahverengi-kırmızı bir renk aldı.

¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 400 MHz) (EK I.1, Şekil I.1) δ 0.68 (3H, s, Me-18), 0.81 (3H, d, $J=6.64$ Hz, Me-27), 0.83 (3H, d, $J=7.03$ Hz, Me-26), 0.85 (3H, t, $J=7.81$ Hz, Me-29), 0.92 (3H, d, $J=6.25$ Hz, Me-21) ve 1.01'de (3H, s, Me-19) izlenen metil sinyalleri bileşiğin steroidal bir iskelete sahip olduğunu izlenimini verdi. δ 3.52'de (1H, *m*, H-3 α) izlenen proton sinyali bileşikte bir hidroksil veya başka bir oksijenli grubun varlığına işaret etti. Yapıda bir olefinik proton ise 5.35 ppm (1H, *m*, H-6) de izlendi.

IR spektrumunda 3445, 3305, 2925, 2860, 1643, 1375, 1063, 955, 835 cm⁻¹ de izlenen sinyaller de yapıda hidroksil ve doymamışlık olduğunu gösterdi. Yapının tüm spektral bulguları bitkiler aleminde ve *Salvia* türlerinde yaygın olarak bulunan sitosterole işaret ettiğinden bileşiğin HR-EIMS'i de alınarak moleküler pikin *m/z* 414.3857 de bulunması (C₂₉H₅₀O için hesaplanan teorik değer 414.3861) bu bileşiğin β -sitosterol olduğunu doğrulamıştır.

Nitekim ince tabaka kromatografisinde yapılan karşılaştırma sonucunda da standart madde ile aynı R_f değerinde ve aynı karakteristik renkte izlenmiştir.

5.4.2.10 SV8.4.1= Stigmasterol; Stigmasta-5,22-dien-3-ol

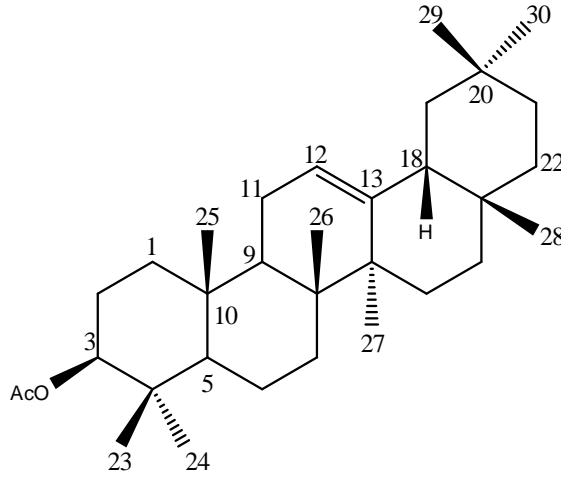


Şekil 5.20 : Stigmasterol bileşiği

Beyaz toz halinde elde edilen bu bileşik 16 mg olarak elde edildi. Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında önce turkuaz sonra kahverengi-kırmızı bir renk aldı.

¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 400 MHz) (EK J.1, Şekil J.1) proton sinyalleri β -sitosterol ile çok büyük benzerlikler göstermiştir, hatta metil proton sinyallerinin tamamen aynı ppm lerde izlenmesi bu bileşimde bir steroid olduğuna işaret etmiştir. C-3 proton sinyali benzer şekilde 3.53 ppm de izlenmiştir. C-5 ve C-6 arasındaki çift bağ bulunduğu olefinik proton sinyalinin 5.34 ppm’ de izlenmiştir. Bu çift bağın yanısıra yapıda ikinci bir çift bağ varlığı δ 5.05 (dd, $J=16$ ve 5 Hz) ve 5.16 (dd, $J=16$ ve 7 Hz) de sırasıyla izlenen sinyaller ile anlaşılmıştır. Bölünme şekilleri ve bir trans etkileşime işaret eden 16 Hz lik J değerleri göz önüne alındığında Δ^5 stigmastan iskeleti üzerinde bu bağın yerleşebileceği yerin yan zincirinde sadece Δ^{22} konumunda yerleşmesi gerektiği anlaşılmıştır. Sonuç olarak bu steroidin de yine *Salvia* türlerinde yaygın olarak bulunan stigmasterol (stigmasta-5,22-dien-3-ol) olduğu kesinlik kazanmıştır.

5.4.2.11 SV8.2= 3-asetil- β -amirin=Olean-12-en-3 β -asetat



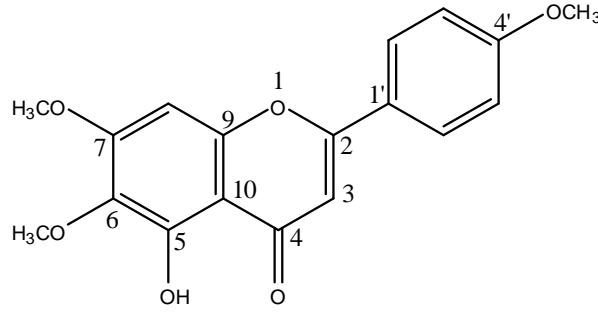
Şekil 5.21 : 3-asetil- β -amirin

Beyaz katı olan bu bileşik 7 mg olarak elde edildi. Silikajel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında önce kahverengi bir renk aldı.

Alınan ^1H NMR spektrumunda (EK K.1, Şekil K.1) sekiz metil singletinin izlenmesi yapının oleanan iskeletine sahip bir triterpen olabileceğine işaret etmiştir. 5.28 ppm’de izlenen singletimsi dar triplet ($J=2$ Hz) proton sinyali ise olefinik bir grubun varlığını göstermiştir. Bu çift bağın yeri proton sinyalinin bölünme şekline bakılarak araştırılmıştır. Oleanane iskeletine sahip yapılarda biyogenetik olarak ilk çift bağın yeri daima C-12 ile C-13 arasında yerleştiğinden, kimyasal kayması ve J değeri de göz önüne alınarak çift bağın yeri C-12 ve C-13 arasında olduğu kesinlik kazanmıştır.

Sekiz metil grubuna ilaveten 2.05 ppm’de izlenen metilin bir asetat metili sinyaline ait olduğu düşünülmüş, 4.50 ppm’de izlenen proton sinyali (dd, 1H, $J=6.5$ ve 11 Hz, H-3) ise bileşikte asetil grubunun varlığını doğrulamış ve böylece bu bileşiğin 3-asetil- β -amirin olduğu belirlenmiştir. ^{13}C NMR spektrumunda (EK K.2, Şekil K.2) 81.70 ppm de asetile komşu karbonun (C-3) ve çift bağlarının 122.08 (C-12) ve 144.0 (C-13) ppm de asetil karbonilinin 171.93 ppm de izlenmesi bunu açıkça göstermiştir. Tüm spektral veriler ve yapılan literatür çalışmaları da bu bileşiğin 3-asetil- β -amirin olduğunu göstermiştir.

5.4.2.12 SVT91.2= Salvigenin; 5-hidroksi-6,7, 4'-trimetoksiflavon



Şekil 5.22 : Salvigenin bileşiği

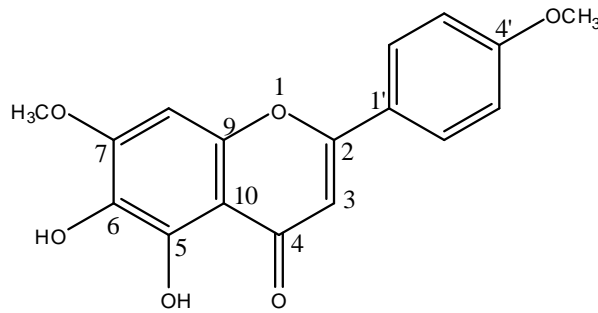
Sarı renkli kristaller halinde, UV ışık altında (366 nm) ise koyu-mor renkli olarak gözlenmiştir (14 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C’de yakıldığında sarı-kahverengi renk aldı. Gerek UV ışık altında 366 nm de koyu mor renkli olarak gözlenmesi, gerekse UV spektrumunda 277 ve 330 nm deki karakteristik absorpsiyon bantları vermesi bileşiğin bir flavonoid olabileceğine işaret etmiştir.

¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 400 MHz) (EK L.1, Şekil L.1) 6.55 (1H, *s*, H-8), 6.59 (1H, *s*, H-3), 7.02 (2H, *d*, *J*=8,59 Hz, H-3’ ve H-5’), 7,85 (2H, *d*, *J*=8.98, H-2’ ve H-6’), 12.79 (1H, *s*, 5-OH)

¹H NMR spektrumunda aromatik alanda iki singlet protonu 6.55 ve 6.59 ppm de ve her biri ikişer protonluk iki genişlemiş dubleti 7.02 ve 7.85 ppm de izlenmiştir. UV ışık (366 nm) altındaki rengi ve UV absorpsiyon bantlarının yanı sıra ¹H NMR spektrumundaki 12.79 ppm de izlenen hidrojen bağı yapmış OH grubunun varlığı flavonoitlerdeki C-5 hidroksil grubunun varlığına işaret etmiş ve B halkasındaki karakteristik genişlemiş dublet sinyallerinin multiplisitesi ile kimyasal kayma değerleri yapının p-süstitüe bir flavon olduğunu göstermiştir. Biyogenetik olarak flavonlarda genelde C-5 de (12,5 ppm) ve C-7 de OH grubu gözlenir. C-5 deki hidroksilin başka bir grup olarak izlenmesi çok nadirken C-7 deki hidroksil yerine farklı süstitüentlerde yerleşebilir. ¹H NMR spektrumunda δ 3.89, 3.93 ve 3.97 de 3’er protonluk singletler halinde izlenen üç metoksi grubunun lokasyonu ise B halkasındaki C-4’ ve A halkasındaki C-6 ve C-7 olarak tespit edilmiştir. Çünkü metoksilerden birinin C-4’ da olacağı B halkası protonlarının multiplisitelerinden kesindi ve ¹H NMR da izlenen iki aromatik proton singletinden biri mutlaka H-3’e ait olmalıydı, diğeri ise ya H-8 veya H-6’ya ait olabilirdi. İkinci metoksi bu durumda

mutlaka C-7 de, fakat diğeri ise ya C-8 ya da C-6 da olmalıydı. ¹H NMR sinyallerinin kayma değerleri ve HRESI-MS de izlenen moleküler piki *m/z* 328.0940 (C₁₈H₁₆O₆ için hesaplanan 328.0946) ne dayanarak bu bileşiğin *Salvia* türlerinde çok yaygın olan bileşiğin salvigenin olduğu saptanmıştır ve standart salvigenin ile R_f değeri ve NMR değerleri kıyaslanarak yapı doğrulanmıştır (Kolak ve diğ., 2009).

5.4.2.13 SVT96.3.4= 6-hidroksi-apigenin-7,4'-dimetileter; 5,6-dihidroksi-4',7-dimetoksiflavone



Şekil 5.23 : 6-hidroksi-apigenin-7,4'-dimetileter

Bileşik koyu sarı amorf bir bileşiktir (12 mg). Silika jel plakta UV (366 nm) ışık altında koyu mor (purple), serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 105°C'de yakıldığında sarı renk gözlemlendi. UV lambası altındaki rengi mor (purple) ve UV (MeOH) absorpsiyon bantları salvigenine benzer olarak 268 ve 328 nm de izlenmiştir.

¹H NMR spektrumunda (CDCl₃, 400 MHz) (EK M.1, Şekil M.1) B halkası protonlarının tıpkı salvigeninde izlendiği şekilde genişlemiş dubletler olarak δ 6.96 (2H, d, J=8,59 Hz, H-3' ve H-5') ve 7.81 (2H, d, J=8,95 Hz, H-2' ve H-6') de izlenmesi ve diğer NMR sinyalleri iskeletin bir flavon olduğuna işaret etmiştir. Nitekim 6.56 ve 6.58 ppm de iki singlet ve C-4 keton ile 5-OH' in yaptığı H bağı da 12.8 ppm'de izlenmiştir. İki metoksi sinyali ise 3.93 ve 3.97 ppm de singletler halinde izlenmiş ve bunlarında yine H-8 ve H-3 protonlarına karşılık geleceği salvigenin ¹H NMR spektrumuyla yapılan kıyaslamadan da açıkça izlenmiştir. Bu durumda salvigenindeki üç metoksi yerine iki metoksi grubunun yerleşmesi yapıda bir fazla süstitüent daha olması gerektiğine işaret etmiş, bu süstitüent de doğal olarak C-6 ya yerleşecek bir grup, büyük olasılıkla bir hidroksil grubudur. İki

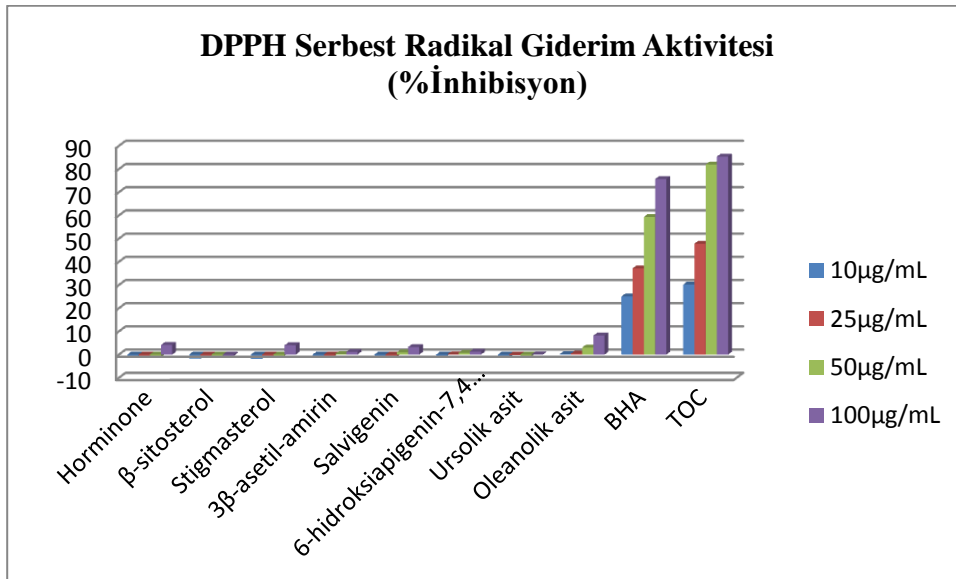
metoksi grubu ise yine salvigenindeki gibi 4' ve 7 konumlarında olmalıydı. Sonuç olarak bu maddenin yapısı bir apigenin türevi olan daha önce *Salvia* türlerinden de izole edilmiş olan 6-hidroksiapigenin-7,4'-dimetileter olarak belirlendi.

5.6 İzole Saf Bileşiklerin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

5.6.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

Çizelge 5.12 : 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
Horminone	-0,85	-1,05	-1,07	4,14
β -sitosterol	-1,78	-1,29	-0,63	-0,49
Stigmasterol	-1,87	-0,89	-0,51	4,02
3-asetil- β -amirin	-1,07	-0,48	0,24	1,16
Salvigenin	-1,29	-0,90	0,95	3,26
6-hidroksiapigenin-7,4'-dimetileter	-0,45	0,10	0,71	1,29
Ursolik asit	-1,38	-0,22	-0,71	0,13
Oleanolik asit	0,19	0,41	3,02	8,19
BHA	25,05	37,21	59,37	75,69
TOC	30,20	47,80	81,97	85,37

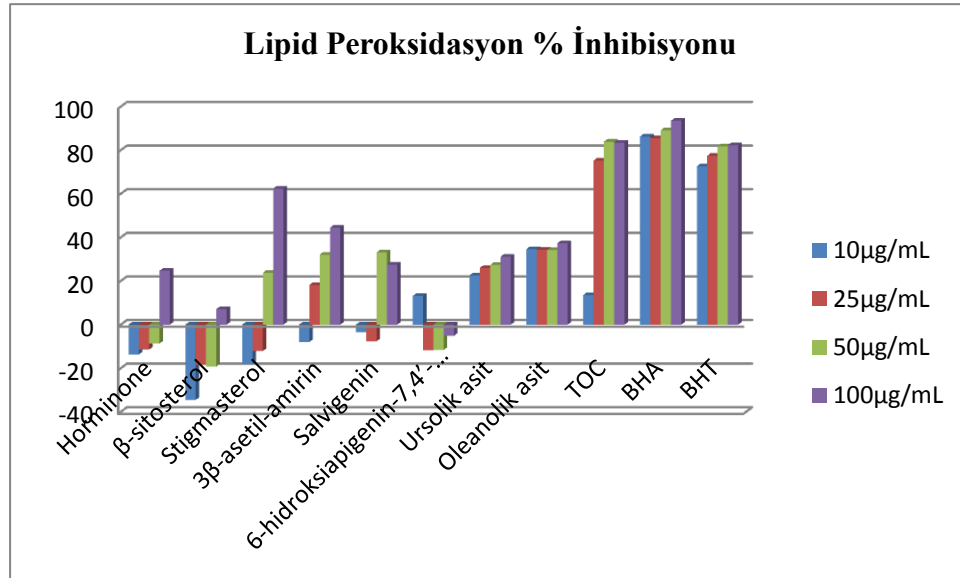


Şekil 5.24 : İzole saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderimi % inhibisyon aktivitesi

5.6.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon (β -karoten renk açılımı) aktivitesi sonuçları

Çizelge 5.13 : İzole saf maddelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon aktivitesi sonuçları

Lipid Peroksidasyon% İnhibisyonu				
Saf Maddeler	10 μ g/mL	25 μ g/mL	50 μ g/mL	100 μ g/mL
Horminone	-13,71	-11,37	-8,69	24,72
β -sitosterol	-34,54	-18,43	-19,19	7,15
Stigmasterol	-18,11	-12,11	23,81	62,39
3-asetil- β -amirin	-7,99	18,19	32,08	44,49
Salvigenin	-3,48	-7,66	33,10	27,52
6-hidroksiapigenin-7,4'-dimetileter	13,16	-11,74	-11,63	-5,13
Ursolik asit	22,60	26,01	27,36	31,14
Oleanolik asit	34,61	34,31	34,23	37,35
TOC	13,54	75,22	83,90	83,45
BHA	86,29	85,48	89,12	93,54
BHT	72,63	77,41	81,80	82,26



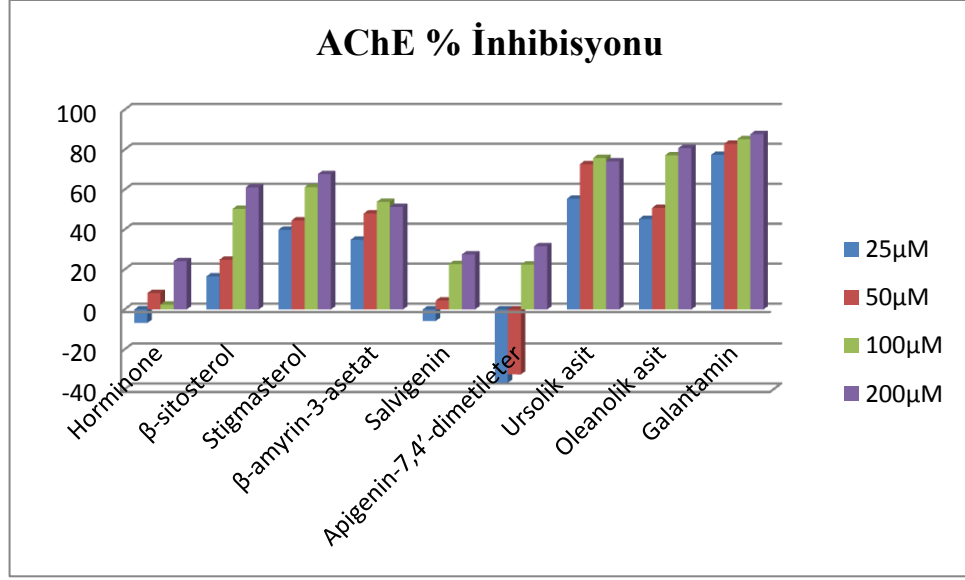
Şekil 5.25 : Saf maddelerin β -karoten renk açılım yöntemi ile lipid peroksidasyon inhibisyon aktiviteleri

Bu yöntemde 10, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarda 3 paralel çalışılma yapıldı. TOC, BHA ve BHT standart olarak kullanıldı. Bileşikler 10 ve 25 µg/mL gibi düşük konsantrasyonlarda antioksidan aktivite göstermemiş, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında ise göreceli olarak kısmen aktivite göstermiştir, özellikle triterpen bileşikler oleanolik asit, ursolik asit, 3-asetil- β -amirin ve stigmasterol aktif bulunmuşlardır.

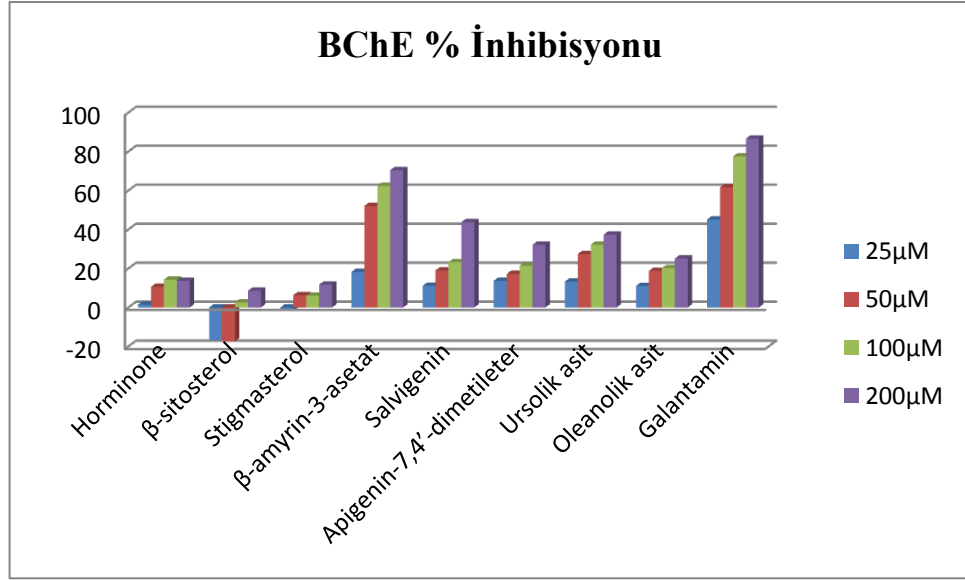
5.6.3 Antikolinesteraz aktivite sonuçları

Çizelge 5.14 : İzole saf maddelerin antikolinesteraz % inhibisyon aktiviteleri sonuçları

Saf Maddeler	AChE				BChE			
	Konsantrasyon (µM)							
	25	50	100	200	25	50	100	200
Horminon	-6,76	8,21	2,50	24,18	1,51	10,56	14,30	13,64
β-sitosterol	16,55	24,92	50,39	61,16	-16,88	-17,41	2,59	8,61
Stigmasterol	39,93	44,61	61,29	67,78	-1,89	6,31	6,01	11,70
3-asetil-β-amirin	34,88	48,07	53,89	51,36	18,26	52,11	62,47	70,47
Salvigenin	-5,77	4,47	22,72	27,61	11,09	19,04	23,25	43,79
6-hidroksi-apigenin-7,4'-dimetileter	-36,74	-32,52	22,48	31,71	13,70	17,23	21,43	32,18
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	77,43	82,98	85,31	87,81	45,17	61,73	77,49	86,66



Şekil 5.26 : İzole saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu



Şekil 5.27 : İzole saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu

5.7 Yarı Sentetik Oleanolik Asit Türevlerinin Deneysel Bulguları

5.7.1 3-asetiloleanolik asit (2)

Verim %99, beyaz katı, E.N: 200°C, ¹H-NMR (EK N.1, Şekil N.1) δ ; 5.21 (t, 1H, H-12), 4.42 (t, 1H, H-3), 2,75 (dd, 1H, H-18) 1.98 (s, 3H, CH₃COO). ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ; 15.7 (C-25), 15.9 (C-26), 17.5 (C-24), 18.7 (C-6), 21.7 (H₃CCOO), 23.4 (C-11), 23.8 (C-30), 23.9 (C-27), 26.3 (C-16), 27.6 (C-15), 28.1 (C-2), 28.5 (C-23), 31.0 (C-21), 32.8 (C-29), 33.1 (C-19), 33.4 (C-7), 34.2 (C-22), 37.5 (C-10), 38.8 (C-8), 39.2 (C-1), 39.7 (C-4), 41.4 (C-20), 42.1 (C-14), 46.3 (C-9), 46.9 (C-17), 48.1 (C-18), 55.6 (C-5), 80.6 (C-3), 123.1 (C-12), 143.9 (C-13), 171.5 (H₃CCOO-), 182.6(C-28).

5.7.2 3-okso-oleanolik asit (4)

Verim %78, beyaz katı, E.N: 187°C, ¹H-NMR (250 MHz, CDCl₃) (EK O.1, Şekil O.1) δ; 5.28 (t, 1H, H-12), 2.82 (dd, 1H, J=3 ve 15Hz, H-18), 1.12 (s, CH₃), 1.06 (s, CH₃), 1.03 (s, CH₃), 1.01 (s, CH₃), 0.96 (s, CH₃), 0.98 (s, CH₃), 0.79 (s, CH₃) ¹³C-NMR (EK O.2, Şekil O.2) δ (125 MHz, CDCl₃) δ; 217.7 (C-3), 183.3 (C-28), 143.4 (C-13), 122.1 (C-12).

5.7.3 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit (5)

Verim %89, renksiz katı, 1H NMR (400 MHz, CD₃COCD₃) (EK P.1, Şekil P.1) δ; 0.79 (s, CH₃), 0.86 (s, CH₃), 0.88 (s, CH₃), 0.97 (d, J=8.2 Hz, CH₃), 0.99 (d, J= 8.2 Hz, CH₃), 1.07 (s, CH₃), 1.12 (s, CH₃), 2.77 (dd, J=9.76, H-18), 5.24 (t, H-12). ¹³C-NMR (APT) (125 MHz, CDCl₃+CD₃OD) (EK P.2, Şekil P.2) δ; 180.71 (C-28), 166.91 (C-3), 143.81 (C-13), 122.19 (C-12)

5.7.4 3-asetil-olean-28-morfolid (6)

Verim %43, beyaz katı, ¹H-NMR (EK R.1, Şekil R.1) δ: 5.27 (t. 1H, H-12) 4.49 (t, 1H, H-3) 3.08 (dd,1H, H-18) 2.04 (s, 3H, CH₃COO) ¹³C-NMR (APT) (EK R.2, Şekil R.2) δ;175.2 (Cq-28), 171.0 (OCOCH₃), 144.6 (Cq-13), 121.5 (CH-12), 80.9 (CH-3), 66.9 (OCH₂), 55.4 (CH-5), 47.7 (CH-18), 47.4 (N-CH₂), 43.5 (CH-9).

5.7.5 Oleanolik asit3-metil-eter (7)

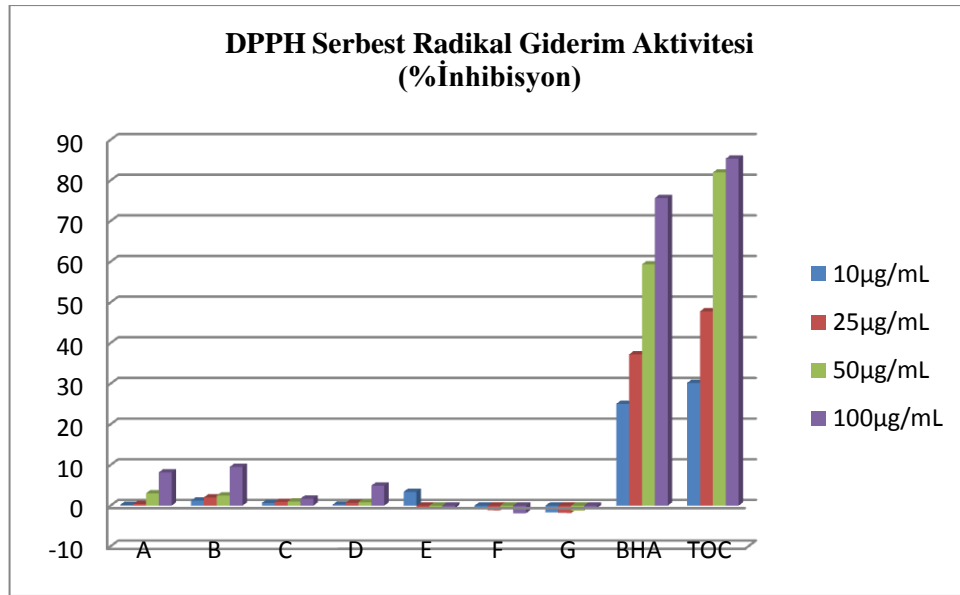
Verim %42, ¹H-NMR (EK S.1, Şekil S.1) δ: 5.26 (t, 1H, H-12), 3.60 (s, 3H, OCH₃) 3.19 (t, 1H, H-3), 2.83 (dd, 1H, H-18)

5.8 Yarı Sentetik Oleanolik Asit Türevlerinin Antioksidan Aktivite Sonuçları

5.8.1 DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları

Çizelge 5.15 : Yarı sentetik oleanolik asit türevlerinin DPPH serbest radikal giderim aktiviteleri sonuçları (% inhibisyon)

DPPH Serbest Radikal Giderim % İnhibisyonu Aktivitesi				
Yarısentetik Saf Maddeler	10µg/mL	25µg/mL	50µg/mL	100µg/mL
Oleanolik asit	0,19	0,41	3,02	8,19
3-asetiloleanolik asit	1,25	2,03	2,47	9,53
3-okso-oleanolik asit	0,67	0,93	1,00	1,74
3-oksim-olean-12-en-28-oik asit	0,28	0,73	0,85	4,93
3-asetil-oleanoil-28-klorür	3,40	-0,27	-0,74	-0,54
3-asetil-oleanoil-28-morfolid	-0,73	-1,15	-0,39	-1,88
Oleanolik asit 3-metileter	-1,65	-1,80	-1,22	-0,61
BHA	25,05	37,21	59,37	75,69
TOC	30,20	47,80	81,97	85,37



Şekil 5.28 : Yarı sentetik saf bileşiklerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi

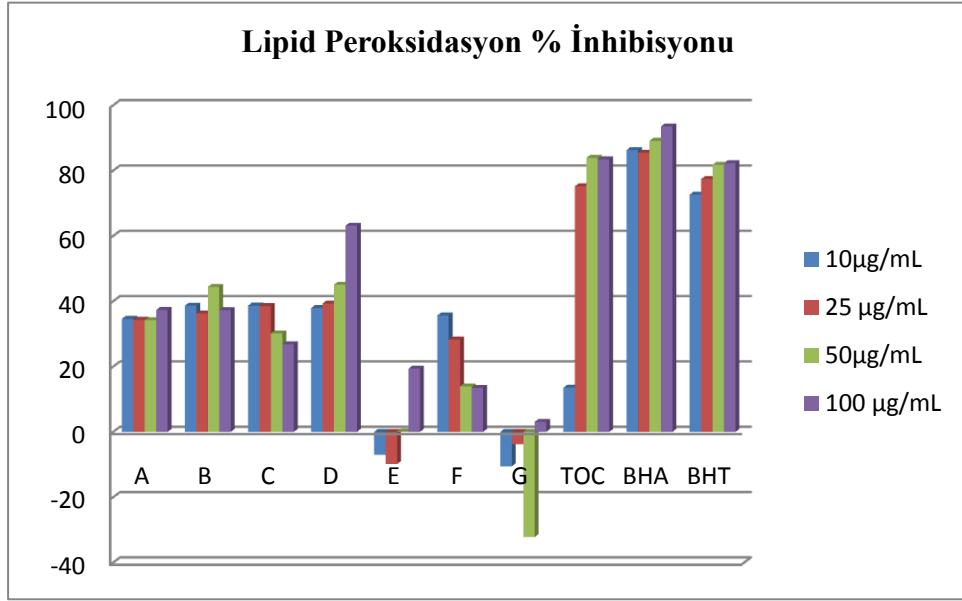
Oleanolik asit	A
3-asetiloleanolik asit	B
3-okso-oleanolik asit	C
3-oksim-olean-12-en-28-oik asit	D
3-asetil-oleanoil-28-klorür	E
3-asetil-oleanoil-28-morfolid	F
Oleanolik asit 3-metileter	G

5.8.2 Lipid peroksidasyon inhibisyon (β -karoten renk açılım) aktivitesi sonuçları

Bu bileşiklerin antioksidan aktiviteleri lipid peroksidasyon % inhibisyonu (β -karoten renk açılım) ve DPPH serbest radikal giderimi aktivitesi Yöntemlerine göre belirlendi. Antikolinesteraz aktivite ise Ellman metodu kullanılarak belirlendi.

Çizelge 5.16 : Yarı sentetik oleanolik asit türevlerinin lipid peroksidasyon % inhibisyon aktiviteleri sonuçları

Lipid Peroksidasyon %İnhibisyonu				
Yarı Sentetik Maddeler	10μg/mL	25 μg/mL	50μg/mL	100 μg/mL
Oleanolik asit	34,61	34,31	34,23	37,35
3-asetil-oleanolik asit	38,65	36,26	44,41	37,30
3-okso-oleanolik asit	38,67	38,52	30,17	26,83
3-oksim-olean-12-en-28-oik asit	37,94	39,32	45,07	63,12
3-asetil-oleanoil-28-klorür	-7,01	-9,85	0,14	19,39
3-asetil-oleanoil-28-morfolid	35,65	28,27	13,94	13,50
Oleanolik asit 3-metileter	-10,53	-3,79	-32,20	3,10
TOC	13,54	75,22	83,90	83,45
BHA	86,29	85,48	89,12	93,54
BHT	72,63	77,41	81,80	82,26



Şekil 5.29 : Yarı sentetik saf bileşiklerin lipid peroksidasyon aktivitesi

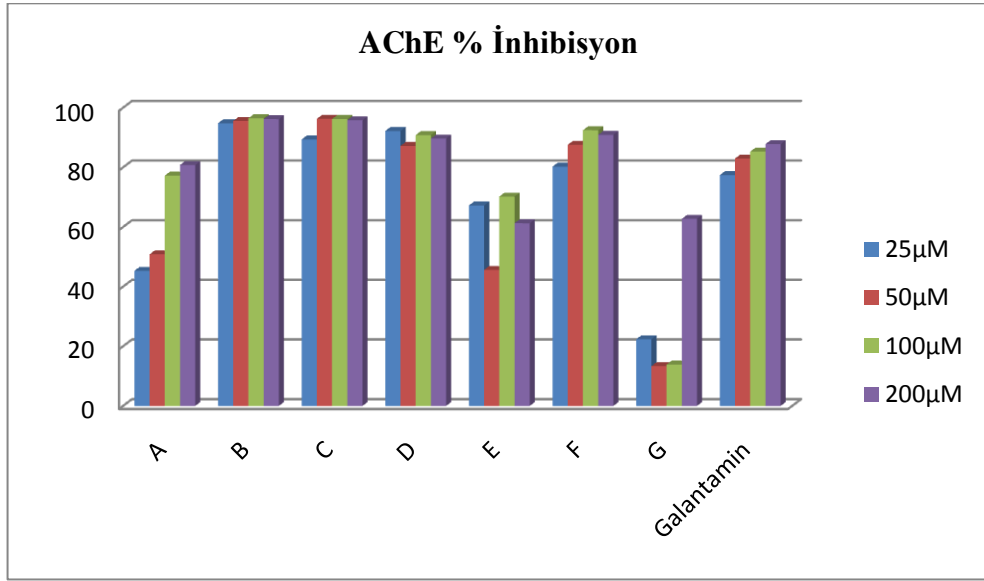
Oleanolik asit	A
3-asetiloleanolik asit	B
3-okso-oleanolik asit	C
3-oksim-olean-12-en-28-oik asit	D
3-asetil-oleanoil-28-klorür	E
3-asetil-oleanoil-28-morfolid	F
Oleanolik asit 3-metileter	G

5.8.3 Yarı sentetik oleanolik asit türevlerinin antikolinesteraz aktivite sonuçları

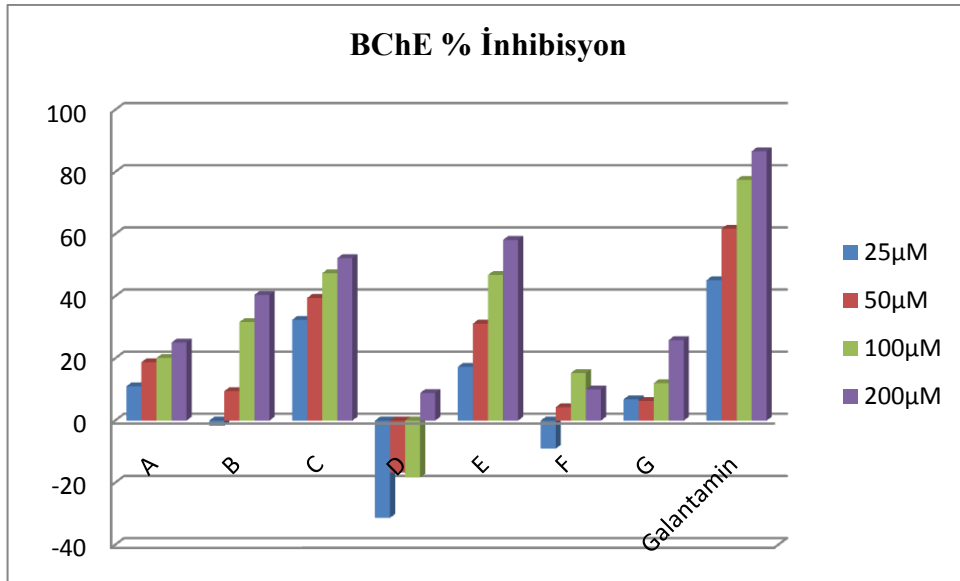
Çizelge 5.17 : Yarı sentetik oleanolik asit türevlerinin antikolinesteraz % inhibisyon aktivite sonuçları

Yarı sentetik saf bileşikler	AChE				BChE			
	Konsantrasyon (µM)							
	25	50	100	200	25	50	100	200
Oleanolik asit	45,32	50,86	77,26	80,81	11,02	18,80	20,16	25,11
3-asetil-oleanolik asit	94,82	95,58	96,50	96,20	-1,66	9,49	31,69	40,48
3-okso-oleanolik asit	89,39	96,29	96,26	95,83	32,40	39,49	47,45	52,28
3-oksim-olean-12-en-28-oik asit	92,23	87,21	90,85	89,68	-31,31	-16,74	-18,31	8,88
3-asetil-oleanoil-28-klorür	67,25	45,65	70,22	61,28	17,30	31,20	46,87	58,15
3-asetil-oleanoil-28-morfolid	80,27	87,58	92,48	90,93	-9,04	4,32	15,31	10,02
Oleanolik asit 3-metileter	22,36	13,36	13,91	62,74	6,85	6,33	12,04	25,92
Galantamin	77,43	82,98	85,31	87,81	45,17	61,73	77,49	86,66

Oleanolik asit	A
3-asetiloleanolik asit	B
3-okso-oleanolik asit	C
3-oksim-olean-12-en-28-oik asit	D
3-asetil-oleanoil-28-klorür	E
3-asetil-oleanoil-28-morfolid	F
Oleanolik asit 3-metileter	G



Şekil 5.30 : Yarı sentetik saf bileşiklerin AChE % inhibisyonu



Şekil 5.31 : Yarı sentetik saf bileşiklerin BChE % inhibisyonu

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

Grubumuzun *Salvia* türleri üzerindeki çalışmalarının devamı niteliğindeki bu tez çalışmasında iki *Salvia* türünün antioksidan ve antikolinesteraz aktivite odaklı olarak akif bileşenlerinin izolasyonu ve yapılarının belirlenmesi yönünde çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Seçilen türlerden biri endemik ve çok dar bir alanda yetişen *Salvia adenophylla*'dır. Diğeri ise Türkiye'de yaygın olarak yetişen *Salvia verticillata*'dır. Bu türün iki alt türünden biri olan *S. verticillata* subsp. *verticillata* daha önce kimyasal olarak grubumuz tarafından çalışılmasına rağmen seçtiğimiz bu alt tür *S. verticillata* subsp. *amasiaca* kimyasal olarak ilk kez bu tez çerçevesinde çalışılmıştır.

Her iki bitkiden toplam on üç farklı bileşik izole edilerek yapıları ağırlıklı olarak NMR ve diğer spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir. İzole edilen bileşiklerden hemen hepsi daha önce diğer bazı *Salvia* türlerinden elde edilmiş olmasına rağmen sadece triterpenoit yapısındaki 3- β -hidroksi-urs-11-en-28,13- β -olit ilk kez *Salvia* türlerinden izole edilmiştir, ayrıca *S. adenophylla* metanol ekstresinden elde edilen tek bileşik olan şekerli fenolik bileşik 4-*O*- β -glukosil-asetofenonun da *Salvia* türlerinden elde edildiğine dair bir kayıt bulunmamaktadır ve bu son iki bileşiğin miktarları ancak yapı tayini için yeterli olduğundan aktiviteleri incelenememiştir. Aslında *S. adenophylla* metanol ekstresinden elde edilen bileşiklerin çoğunun polar bileşikler olması nedeniyle kolon ve prep TLC ile birbirinden ayrılması mümkün olamamıştır, bu bileşikler ancak prep. HPLC ile birbirlerinden ayrılabilceğinden ve bölümümüzde prep HPLC mevcut olmadığından saflaştırma işlemleri tamamlanamamıştır.

Flavonlar da dahil olmak üzere saf bileşiklerin DPPH testinde hemen hemen hiç serbest radikal giderim aktivitesi göstermemesi ilginçtir. Buna karşın total antioksidan aktivite ölçümüne dayanan lipid peroksidasyon inhibisyon testinde 3-asetil- β -amirin ve stigmasterol ile ursolik ve oleanolik asitler göreceli olarak aktivite göstermişlerdir. Antikolinesteraz aktivite sonuçlarına gelince, BChE enzimine saf bileşikler pek bir etki göstermemelerine rağmen AChE enzimine karşı özellikle

ursolik asit ve oleanolik asit oldukça yüksek aktivite gösterirken 3-asetil- β -amirin ve stigmasterol orta derecede aktivite göstermişlerdir. Bu deneyler bize AChE inhibisyonu ile lipid peroksidasyon inhibisyonu arasında bir paralellik olduğunu ve demansla seyreden Alzheimer gibi nörolojik hastalıklardaki oksidasyon olayı ve oksidatif stresin etkisini göstermesi bakımından da önemlidir. Zaten bu ilişkiyi göstermek amacıyla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar devam etmektedir (Perluigi ve diğ., 2009).

Her iki bitkiden de ana bileşenler olarak elde edilen oleanolik asit ve ursolik asit Anadolu'da yetişen *Salvia* türlerinin özellikle toprak üstü kısımlarından genelde yüksek verimle elde edilmişlerdir. Fakat *S. adenophylla* dan ursolik asit daha yüksek verimle elde edilirken diğer *Salvia* türünden oleanolik asit daha yüksek elde edilmiştir. Daha önceki çalışmalarla çok farklı biyolojik aktiviteleri belirlenmiş olan bu iki triterpen asidi yüksek oranda taşıyan iki *Salvia* türünün daha belirlenmesi bakımından da bu çalışma önem arz etmektedir. Bu nedenle bu iki triterpenik asitten oleanolik asiti seçerek potansiyel aktif altı farklı türevini sentezledik. İzole edilen saf bileşikler gibi oleanolik asit türevleri de DPPH serbest radikal giderim aktivitesi göstermemişlerdir. Buna karşın bu türevler oleanolik asit 3-metil eter, 3-asetil-oleanoil-28-klorür ve 3-asetil-oleanoil-28-morfolid hariç genelde orta derecede lipid peroksidasyon inhibisyonu göstermişlerdir. Nitekim bu türevlerden oleanolik asit 3-metil eter hariç hepsi oleanolik asitten çok daha yüksek, hatta galantaminden bile yüksek düzeyde asetilkolinesteraz aktivite göstermişlerdir. Hazırlanan oleanolik asit türevlerinin antikolinesteraz aktivite sonuçları ile lipid peroksidasyon aktivite sonuçları arasındaki paralellik izole edilen saf bileşiklerin gösterdiği paralellikle benzer niteliktedir, bu da ayrıca oksidasyon ile nörolojik hastalıklar, ve hatta oksidatif strese bağlı diğer hastalıklar arasında bir ilişki olduğuna işaret etmektedir. Buna en iyi örnek izole edilen diterpenlerden ferruginoldür, çünkü bu bileşiğin daha önce pek çok kanser hücrelerine karşı aktivite gösterdiği belirlenmiş ve bu çalışmada da oldukça yüksek lipid peroksidasyon inhibisyonu ve antikolinesteraz aktivite gösterdiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, antioksidan-antikolinesteraz ve yapı-aktivite ilişkisini daha iyi anlayabilmek için *Salvia* türlerinden elde edilen di- ve triterpenler üzerindeki araştırmaların yeni türevlerinde hazırlanarak devam etmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Acar, J.**, 1998. Fenolik Bilesikler ve Dogal Renk Maddeleri. Gıda Kimyası, Ed: Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 435-452.
- Akbar, A., Tariq, M., Nisa, M.**, 1985. Pharmacological studies on *Salvia haematodes* Wall. *Acta Trop.* **42 (4)**, 371–374.
- Alzheimer A.**, 1906. Über einen eigenartigen schweren Krankheitsprozess der Hirnrinde. *Zentralbl Nervenkrankheiten*, **25**, 1134.
- Ames, B. M., Shigena, M. K., Hagen, T. M.**, 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of ageing. *Proceedings of national Academy of Sciences USA*, **90**, 7915-7922.
- 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 Aufbereitung-kommission für den humanmedi zinischen Bereich, phytotherapeutische Therapie-richtung und Stoffgruppe (Kommission E), Bundesinstitut fr Arzneimittel und Medizinprodukte Berlin, pp. 464.
- Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E.**, 2004. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 7970-7981.
- Aruoma, O. I. and Cuppett, S. L.**, 1997. Antioxidant Methodology in vivo and in vitro Concept. *AOCS Press*, p 241.
- Back, P.** 1987. *The Illustrated Herbal*. HamLyn Publishers through Octopus Books printed in Hong Kong by Mandarin
- Başer, K., H., C., Kırimer N.**, 2006. Essential Oils of Lamiaceae Plants of Turkey. *Acta Horticulturae*, **723**, 163–171.
- Baytop, A.**, 1996. *Farmasötik Botanik Ders Kitabı*, 4. Baskı. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, Yayın No: 3637.
- Baytop, A.**, 1977. *Farmasotik Botanik*, Baha Matbaası.
- Benzie, I. F. F. and Strain, J. J.** 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, **239**, 70-76.
- Berlett, B. S. and Stadtman, E. R.**, 1997. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stres. *The Journal of Biological Chemistry*, **272**, 20313-20316.
- Biondi, D., Cianci, P., Geraci, C., Ruberto, G.** 1993. Antimicrobial Activity and Chemical Composition of Essential Oils from Sicilian Aromatic Plants. *Flavour and Fragrance Journal*, **8**, 331–337.
- Blois, M. S.** 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1199-1200.

- Boiteau, P., Pasich, B., Ratsimamanga, R. Les.,** 1969. Triterpenoides. *Gauthier-Villars Paris*, p 3-5.
- Boyd, Eddie L., et al.** 1984. *Home remedies and the black elderly*. Ann Arbor: Institute of Gerontology and College of Pharmacy, University of Michigan.
- Branen, A.L.,** 1975. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **52**, 59-63.
- Brieskorn, C. H. and Schlumprecht, I.** 1951. Constituents of *Salvia officinalis*, VIII. Isolation of ursolic acid. *Arch, der Pharm.* **284**, 239–242. British Herbal Pharmacopoeia, The 1983. B.H.M.A
- Burlando, P., Rosso, R., Cadavid, L. G., and Salas, J. D.,** 1993: Forecasting of Short-term Rainfall Using ARMA Models. *Journal of Hydrology*. **144**, pp. 193-211.
- Cadenas, E., and Davies, K. J. A.,** 2000. Mitochondrial Free Radical Generation, Oxidative Stress, And Aging, *Free Radical Biology & Medicine*, **29**, 222–230.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R.L.,** 1996. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 3426-3431.
- Chipault, J., Mizumo, G. and Lundberg, W.** 1956. The antioxidant properties of spices in foods. *Food Technol*, **10**, 209–211.
- Cram, D. J. and Hammond, G. S.,** 1964. *Organic Chemistry*. New York: McGraw-Hill Book Company, 671-673.
- Çam, M. ve Hıslı, Y.,** 2003. Gıdalardaki Flavonoidler ve Önemleri. 3. Gıda Mühendisliği Kongresi, Ankara.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R.,** 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, **329**, 23-38.
- Dane, R. L. et al.,** 2004. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease, *European Journal of Pharmacology*, **486**, 9– 17.
- Daniel, S. A. et al.** 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies, *Neurobiology*, **68**, 209–245.
- Davis, P.,H.,** 1982. *Flora of Turkey and the East Egean Islands*. Vol.7, Edinburg: Edinburgh University Press; pp.335-346.
- Davies, K. J. A.,** 2000. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*, **50**, 279-289.
- Demans Dergisi** 2002. Alzheimer Hastalığı Tedavisinde Kullanılan Kolinesteraz İnhibitörleri, 2, 5-9.
- Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. ve Almeida, L. M.** 1994. Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **315**, 161-169.
- Evans, W. C.,** 1989. *Trease and Evans, Pharmacognosy*. 13th edition. Balliere Tindall.

- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M.,** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol*, **7**, 88-95.
- Evans, M. D., Dizdaroglu, M., Cooke, M.S.,** 2004. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research*, **567**, 1-61.
- Fang, X. P. and Mc Laughlin, J. L.,** 1989. Ursolic acid, a cytotoxic component of the berries of *Vaccinium vitis-idaea*. *Fitoterapia*, **61 (1)**, 176-177.
- Fluck, H.,** 1988. *Medicinal Plants*. W. Foulsham & Co. Ltd.
- Geisman, T. A., and Crout, D. H. G.,** 1969. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. California: Freeman, *Cooper and Company*, **4**, **66**, **67**, 137-166, 212, 213, 217.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A.** 1995. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine*, **18**, 29-36.
- Goren, A. C., Topcu, G., Oksuz, S., Kokdil, G., Voelter, W. and Ulubelen, A.,** 2001. Diterpenoids from *Salvia ceratophylla*, *Natural Product Letters*, **16(1)**, 47-52.
- Grieve, M.** 1984. *A Modern Herbal*. Savvas Publishing.
- Gottwald, M. D., Rozanski, R. I.,** 1999. Rivastigmine a brainregion selective acetylcholinesterase inhibitor for treating Alzheimer's disease: review and current status, *Expert Opin. Invest. Drugs*, **8**, 1673-1682.
- Groot, H., Rauen, M.,** 1998. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundamental Clinic Pharmacology*, **12**, 249-255.
- 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**, 371-382.
- Gülçin, İ., Mshvildadze, V., Gepdiremen, A., Elias, R.** 2004a. Antioxidant activity of saponins isolated from ivy: α -Hederin, hederasaponin-C, hederacolchiside-E and hederacolchiside F. *Planta Medica*, **70**, 561-563.
- Gülçin, İ.,** 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, **56**, 491-499.
- Gülçin İ, Şat İG, Beydemir Ş, Elmastaş M, Küfrevioğlu Ö. İ.** 2004. Comparison of Antioxidant Activity of Clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb) Buds and Lavender (*Lavandula stoechas* L.). *Food Chem*, **87**, 393-400.
- Haigh, R.,** 1986. Safety and necessity of antioxidants: EEC approach. *Food and Chemical Toxicology*, **24**, 1031-1036
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.C.,** 1989. Free Radicals in Biology and Medicine, *Clarendon Press*, **543**, Oxford.
- Hanson, W. I., Hocking, G. M.,** 1957. *Economic Botany*, **11**, 64.
- Hartman, R. E.,** Actions of Bioactive Phytochemicals in Cell Function and Alzheimer's Disease Pathology. *Taylor & Francis Group, LLC*, 2010, chapter 16.

- Imaida, K., Fukushima, S., Shivai, T., Ohtani, M., Nakanishi, K., Ito, N.**, 1983. Promoting activities of buthylated hydroxyanisole and buthylated hydroxytoluene on 2-stage urinary bladder carcinogenesis and inhibition of γ - glutamyl trans peptidase-positive foci development in the liver of rats. *Carcinogenesis*, **4**, 969–978.
- Ito, N., Fukushima, S., Hasegawa, A., Shibata, M., Ogiso, T.**, 1983. Carcinogenicity of buthylated hydroxyanisole in F344 rats. *Journal of the National Cancer Institute*, **70**, 343-347.
- Jamshidzadeh A, Niknahad H, Mohammadi-Bardbori A., Talati, M.**, 2008. Comparative measurement of serum acetyl cholinesterase enzyme using three different methods. *Toxicology Letters*, **180**, 237.
- John, B., Standridge, M. D.**, 2004. Pharmacotherapeutic Approaches to the Treatment of Alzheimer's Disease, *Clinical Therapeutics*, **26**, 5.
- Kang, H.S., Chung, H.Y., Jung, J.H., Kang, S.S., Choi, J.S.** 1997. Antioxidant effect of *Salvia miltiorrhiza*. *Arch. Pharmacol. Res.*, **20** (5), 496–500.
- Kelly, C.A., Harvey, R.J., Cayton, H.**, 1997. Drug treatments for Alzheimer's disease. *Br. Med. J.* **314**, 693–694.
- Kivrak, I., a, Duru M. E., Ozturk M., Mercan N., Harmandar M., Topcu, G.,** 2009. Antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial constituents from the essential oil and ethanol extract of *Salvia* *potentillifolia*. *Food Chemistry*, **116**, 470–479.
- Kohen, R., Beit-Yannai, E., Berry, E. M., Tirosh, O.** 1999. Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. *Methods in Enzymology*, **300**, 285-296.
- Kohno, Y., Egawa, Y., Itoh, S., Nagagaoka, S., Takahashi, M., Mukai, K.** 1995. Kinetic study of quenching reaction of singlet oxygen and scavenging reaction of free radical by squalene in *n*-butanol. *Biochemica and Biophysica Acta*, **1256**, 52–56.
- Kolak, U., Kabouche, A., Ozturk, M., Kabouche, Z., Topcu, G. and Ulubelen, A.**, 2009. Antioxidant Diterpenoids from the Roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochem. Anal.*, **20**, 320-327.
- Kolak, U., Hacibekiroglu, I., Ozturk, M., Ozgokce, F., Topcu, G., Ulubelen, A.**, 2009. Antioxidant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Turk J Chem*, **33**, 813-823.
- Krinsky, N. I.**, 1989. Antioxidant function of carotenoids. *Free Radical Biology and Medicine*, **7**, 617–635.
- 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), 119-123.
- Lanari, A., et al.** 2006. Neurotransmitter deficits in behavioural and psychological symptoms of Alzheimer's disease. *Mech Ageing Dev*, **127**, 158–165.
- Larson, R. A.**, 1988. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*; **27**, 969–978.
- Lee, A.R., Chang, W.L., Lin, H.C., King, M.L.** 1987. Isolation and bioactivity of newtanshinones. *J. Natural Products*, **50**, 157–61.
- Leung, A.Y.** 1980. Encyclopedia of Common Natural Ingredients used in food, drugs and cosmetics. 1st. edition. *John Wiley*.
- Liu, F., Ooi, V. E. C. ve Chang, S. T.** 1997. Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, **60**, 763-771.

- Liu, D., Meng, Y., Zhao, J. and Chen L.,** 2008. Synthesis and Antitumor Activity of Novel Amide Derivatives of Ursolic Acid. *Chem. Res. Chinese Universities*, **24(1)**, 42-46.
- Lopez, S., Bastida, J., Viladomat, F., Codina, C.,** 2002, Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Some Amaryllidaceae Alkaloids and *Narcissus* Extracts, *Life Sciences*, **71**, 2521–2529.
- Lust, L.** 1986. *The Herb Book*. 16th. impression, Bantam Publishing
- Manitto, P.,** 1981. Biosynthesis of natural products, Ellis harwood Ltd., Connecticut, p 255-262.
- Mann, D. M.,** 1989. The pathogenesis and progression of the pathological changes of Alzheimer's disease, *Ann Med*, **21**, 133–136.
- Mavi, A.,** 2005. İnsan eritrosit ve lökositlerinden süperoksit dismutaz enziminin saflaştırılması ve bazı ilaçların enzim üzerine etkilerinin incelenmesi. Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, s.52–53.
- Menezes, F. S., Borsatto, A. S., Pereira, N. A., Matos F. J. A, and Kaplan M. A. C.,** 1998. Chamoedrydiol, an ursane triterpene from marsypianthes chamaedrys, *Phytochemistry*, **48(2)**, 323-325.
- Miller, H. E.** 1971. A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **48**, 91.
- Mills, Simon, Y.** 1989. The A-Z of Modern Herbalism, A comprehensive guide to Practical Herbal Therapy. Thorsons (retitled)
- Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A.** 2000. Comparison of the free radical-scavenging activity of *Propolis* from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology*, **71**, 109–114.
- Mukherjee, P.K., Kumar, V., Mal, M., Houghton, P. J.,** 2007, Acetylcholinesterase Inhibitors from Plants, *Phytomedicin*, **14**, 289–300.
- Murakami, S., Kijima, H., Isobe, Y., Muramatsu, M., Aihara, H., Otomo, S., Li, L., Ai, C.** 1990. Effect of *Salvianolic Acid A*, a depside from Roots of *Salvia Miltiorrhiza*, on Gastric H⁺,K⁺-ATPase. *Planta Med.*, **56 (4)**, 360–363.
- Müftüoğlu, O.,** 2003. Yaşasın hayat, *Doğan Kitapçılık*, İstanbul.
- Natake, M., Kanazawa, K., Mizuno, M., Ueno, N., Kobayashi, T., Danno, G., Minamoto, S.** 1989. Herb-water extracts markedly suppress the mutagenicity of Trp-P-2. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53 (5)**, 1423–1425.
- Newall, C. A., Anderson, L. A. and Phillipson, J. D.** 1996. *A guide for Health-care Professionals*, London.
- Nishina, A., Kubota, K., Kameoka, H., Osawa, T.,** 1991. Antioxidizing component, Musizin, in *Rumex japonicus* Houtt. *Journal of the American Oil Chemists Society*, **68**, 735-739.
- Oguz, A.,** 2008. Bazı Çerez Gıdaların Antioksidan Kapasiteleri. Gaziosmanpaşa Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans Tezi, Tokat, 2008.
- Onlooker.** 1995. Sage against age. *The Pharmaceutical Journal*, **255**, p. 708
- Orhan, İ., Şener, B.,** 2003. Bioactivity-directed Fractionation of Alkaloids from some Amaryllidaceae Plants and Their Anticholinesterase Activity, *Chemistry of Natural Compounds*, **39 (4)**, 383-386

- Osawa, T., Namiki, M.A.**, 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of eucalyptus leaves. *Agricultural and Biological Chemistry*, **45**, 735–739.
- Padayatty, S.J., Katz, A., Wang, Y.H., Eck, P., Kwon, O., Lee, J.H., Chen, S.L., Corpe, sC., Dutta, A., Dutta, S.K., Levine, M.**, 2003. Vitamin C as an antioxidant: Evaluation of its role in disease prevention. *Journal of the American College of Nutrition*, **22**, 18–35.
- Papas, A. M.** 1996. Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids*, **31**, 77–82.
- Parejo, I., Viladomat, F., Bastida, J., Rosas-Romero, A., Flerlage, N., Burillo, J., and Codina, C.**, 2002. Comparison Between the Radical Scavenging Activity and Antioxidant Activity of Six Distilled and Nondistilled Mediterranean Herbs and Aromatic Plants. *J Agric Food Chem.*, **50**, 6882-6890.
- Peana, A. and Satta, M.** 1992. Effects of the essential oil from *Salvia desoleana* and *Salvia sclarea* on the CNS. *Ars Pharmaceutica*, **33 (1–4)**, 458–461.
- Pedresos, S., Rodriguez, B., de la Torre, M.C., Bruno, M., Savona, G., Perales, A. and Torres, M.** 1990. Dammarane triterpenes of *Salvia hierosolymitana*. *Phytochemistry*, **29**, 919–922.
- Perluigi, M., Sultana, R., Cenini, G., Di Domenico, F., Memo, M., Pierce, W. M., Coccia, R., Butterfield, D. A.**, 2009. Redox proteomics identification of 4-hydroxynonenal-modified brain proteins in Alzheimer's disease: Role of lipid peroxidation in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proteomics Clinical Applications*, **3**, 682-693.
- Phelps, B. O.**, 1993. (A reprint of the long-lost classic). *The Complete Herbalist*. Newcastle Publishing (Van Nuys, California).
- 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**, 423–426.
- Pratt, D. E., Hudson, B. J. F.**, 1990. Natural antioxidants not exploited commercially in food antioxidants.; Hudson B.J.F., Ed.; *Elsevier*; Amsterdam, pp 17-192.
- Prior, R. L. and Cao, G.** 1999. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine*, **27**, 1173-1181.
- Reische, D. W., Lillard, D.A., Eitenmiller, R. R., Akoh, C. C., and Min, D. B.**, 2002. *Food Lipids Chemistry, Nutrition and Biotechnology*, 489-516.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.**, 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, **26**, 1231-1237.
- Rodriguez-Hahn, L., Martinez, G. and Romo, J.** (1973). Estructura del acido melisodorico, un diterpeno aislado de *Salvia melissofora* Lag, *Rev. Latinoamer.Quim.*, **4**, 93–100.

- Rutherford, D.M., Nielsen, M.P.C., Hansen, S.K., Witt, M.R., Bergendorff, O., Sterner, O.** 1992. Isolation and identification from *Salvia officinalis* of two diterpenes which inhibit t-butylbicyclophosphoro, Sthionate binding to chloride channel of rat cerebrocortical membranes in vitro. *Neuroscience Letters*, **135** (2), 224–226.
- Rustaiyan, A. and Koussari, S.** 1988. Further sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*, **27**, 1767–1769.
- Rustaiyan, A., Niknejad, A., Nazarians, L., Jakupovic, J. and Bohlman, F.**, 1982. Sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry*, **21**, 1812–1813.
- Scott, L.J., Goa, K.L.**, 2000. Galantamine: a Review of Its Use in Alzheimer's Disease, *Drugs*, **60**, 1095–1122.
- Shabana, M.M., Mirhom, Y.W., Genenah, A.A., Aboutabl, E.A., Amer, H.A.** 1990. Study into Wild Egyptian Plants of Potential Medicinal Activity. Ninth Communication: Hypoglycaemic Activity of some Selected Plants in Normal Fasting and Alloxanised Rats. *Arch. Exper. Vet. Med.*, **44** (3), 389–394.
- Singleton, V. L., Orthofer, R. ve 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**, 152–178
- Slinkard, K. and Singleton, V. L.** 1977. Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, **28**, 49–55.
- Stadtman, E. R.**, 2002. Importance of individuality in oxidative stress and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, **33**, 597–604.
- Stuart, M.** 1986. *The Encyclopaedia of Herbs and Herbalism*
- Taylor, M. J. and Richardson, T.**, 1980. Antioxidant activity of cysteine and protein sulfhydryls in a linoleate emulsion oxidized by hemoglobin. *J Food Sci*, **30**, 1223–1227.
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H. A., Aydin, E.**, 2007. Antioxidant Potentials and Rosmarinic Acid Levels of The Methanolic Extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chem*, **100**, 985–989.
- Todorov, S., Philianos, S., Petkov, V., Harvala, C., Zamfirova, R., Olimpiou, H.** 1984. Experimental pharmacological study of three species from genus *Salvia*. *Acta Physiol. Pharmacol Bulg.*, **10** (2), 13–20.
- Topçu, G., Bodige, S.G., Gören, A.C., Kılıç, T., Yıldız, Y.K., Watson, W.H., CCDC**, 2001. 158699 (Chambridge Crystallographic Data Centre), *Private Communication*, 1078.
- Topçu, G., Uibelen, A., Tam, T.C.-M. and Tao-Che**, 1996a. Norditerpenes and Norsester terpenes from *Salvia yosgadensis*. *J. Nat. Prod.* **59**, 113–116.
- Topçu, G. and Uibelen, A.** 1996. Abietane and rearranged abietane diterpenes from *Salvia montbretii*. *J. Nat. Prod.* **59**, 734–737.
- Topçu, G. and Uibelen A.** 1991. Diterpenoids from *Salvia wiedemannii*. *Phytochemistry*, **30**, 2412–2413.
- Topçu, G. and Uibelen, A.** 1990. Diterpenoids from *Salvia wiedemannii*. *Phytochemistry*, **29**, 2346–2348.
- Trattler, R.** 1985. *Better Health through Natural Healing*. Thorsons Publishers
- Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F.** 1998. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology and Medicine*, **24**, 1228–1234.

- Turkoglu A, Kivrak I, Mercan N, Duru ME, Gezer K, Turkoglu H.** 2006. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Morchella conica* Pers.. *Afr J Biotechnol*; **5** (11),1146-1150.
- Ulubelen, A., Birman, H., Oksuz, S., Topcu, G., Kolak, U., Barla, A. and Voelter, W.**, 2002. Cardioactive Diterpenes from the Roots of *Salvia eriophora*, *Nat. Prod. Chem.*, **714**, 1201-1204.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Chai, H. B. and Pezuto, M. J.**, 1998. Cytotoxic Activity of Diterpenoids Isolated from *Salvia hypergia*, *Pharmaceutical Biology*, **36**(5), 1-4.
- Ulubelen, A., Topcu, G. and Johansson, C.B**, 1997. Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. *J. Nat. Prod.*, **60** (12), 1275–1280.
- Ulubelen, A., Sönmez, U., Topcu, G., Johansson, C.B.**, 1996. An abietane diterpene and two phenolics from *Salvia forskahlei*. *Phytochemistry*, **42** (1), 145–147.
- Ulubelen, A. Topçu, G., Sönmez, U., Eris, C. and Özgen, U.**, 1996. Norsesiterpenes and diterpenes from the aerial parts of *Salvia limbata*. *Phytochemistry*, **43**, 431–434.
- Ulubelen, A., Topçu, G. and Tan, N.** 1995b. Diterpenoids from *Salvia heldrichiana*. *Phytochemistry*, **40**, 1473–1475.
- Ulubelen, A., Topçu, G., Chen, S., Ca., P. and Snyder, J. K.** 1991. A new abietane diterpene from *Salvia wiedemannii* Boiss. *J. Org. Chem.* **56**, 7354–7356.
- Ulubelen, A., Evren, N., Tuzlacy, E. and Johansson, C.**, 1988. Diterpenoids from the roots of *Salvia hypargeia*. *J. Nat. Prod.* **51**, 1178–1183.
- Ulubelen, A. and Topçu, G.** 1984. Terpenoids from *Salvia pinnata*. *Phytochemistry*, **23**, 133–134.
- Ulubelen, A. and Ayanoglu, E.** 1976. Vergatic acid, a new pentacyclic triterpene from *Salvia virgata* *Phytochemistry* 15, 309–311.
- Valkonen, M. ve Kuusi, T.** 1997. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research*, **38**, 823-833.
- Valnet, J.** 1986. *The Practice of Aromatherapy*. C.W. Daniel Co. Ltd.
- Van Esch, G. J.**, 1986. Toxicology of tert-butyl-hydroquinone (TBHQ). *Food and Chemical Toxicology*, **24**, 1063–1066.
- Wang, H. and Fujimoto, Y.**, 1992. Triterpene Esters from *Eucalyptus Tereticornis*. *Phytochemistry*, **33**(1), 151-153.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Locke, S.** 1985. Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters*, **187**, 33-37..
- Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G. ve Maxwell, S. R. J.**, 1992. Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta*, **266**, 265-277.
- Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A.**, 1998. A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, **24**, 480-493.
- Xilong Z.** 2006. In vitro galantamine-memantine co-application: Mechanism of beneficial action, *Neuropharmacology*, **51**, 1181-1191.

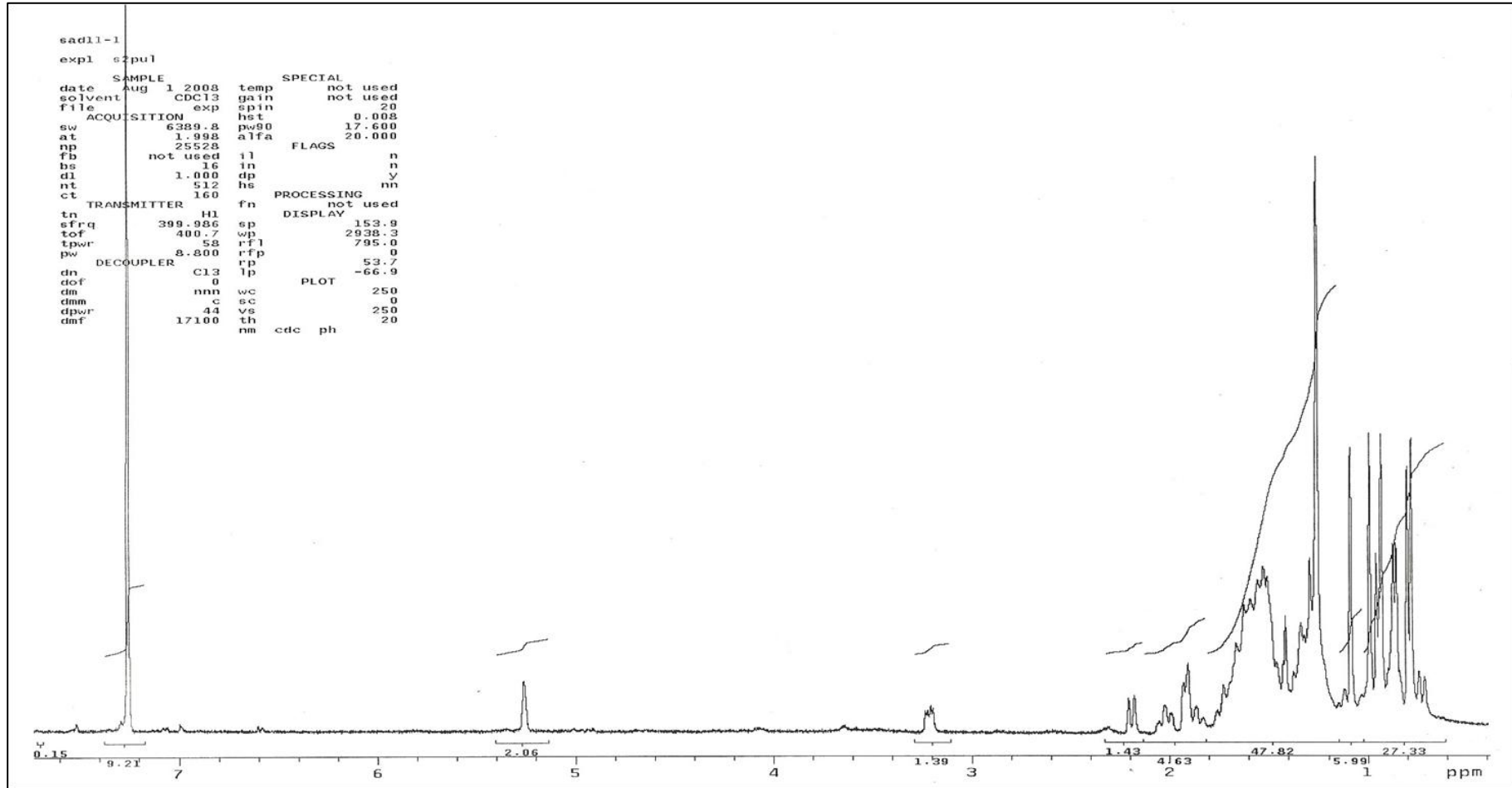
Yamazaki, E., Inagaki, M., Kurita, O., Inoue T., 2007. Antioxidant Activity of Japanese Pepper (*Zanthoxylum piperitum*) Fruit, *Food Chem*, **100**, 171-177.

EKLER

- EK A.1** : α -amirin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK A.2 : α -amirin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK A.3 : α -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu
EK A.4 : α -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR (DEPT) spektrumu
EK A.5 : α -amirin bileşiğinin gCOSY NMR spektrumu
EK A.6 : α -amirin bileşiğinin gHMQC spektrumu
EK B.1 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK B.2 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK B.3 : Oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu
EK B.4 : Oleanolik asit bileşiğinin HSQC NMR spektrumu
EK B.5 : Oleanolik asit bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (alifatik bölge)
EK B.6 : Oleanolik asit bileşiğinin HMBC NMR spektrumu
EK B.7 : Oleanolik asit bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (alifatik bölge)
EK C.1 : Ursolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK C.2 : Ursolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK C.3 : Ursolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu
EK D.1 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK D.2 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK D.3 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu
EK D.4 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin gHSQC spektrumu
EK D.5 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin IR spektrumu
EK E.1 : Asetofenon-4-*O*- β -glukopiranozit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK E.2 : Asetofenon-4-*O*- β -glukopiranozit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK F.1 : Ferruginol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK F.2 : Ferruginol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)
EK G.1 : Horminon bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK H.1 : 7α -asetil-horminon bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK I.1 : β -sitosetrol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK J.1 : Stigmasterol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK J.2 : Stigmasterol bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu
EK K.1 : 3-asetil- β -amirin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK K.2 : 3-asetil- β -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu
EK L.1 : Salvigenin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK M.1 : 6-hidroksi-apigenin-7,4'-dimetileter bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK N.1 : 3-asetil-oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK N.2 : 3-asetil-oleanolik asit bileşiğinin IR spektrumu
EK O.1 : 3-okso-oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK O.2 : 3-okso-oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu
EK O.3 : 3-okso-oleanolik asit bileşiğinin IR spektrumu
EK P.1 : 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu
EK P.2 : 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit bileşiğinin ^{13}C (APT) NMR spektrumu
EK P.3 : 3-oksim-olean-12-en-28-oik asit bileşiğinin IR spektrumu

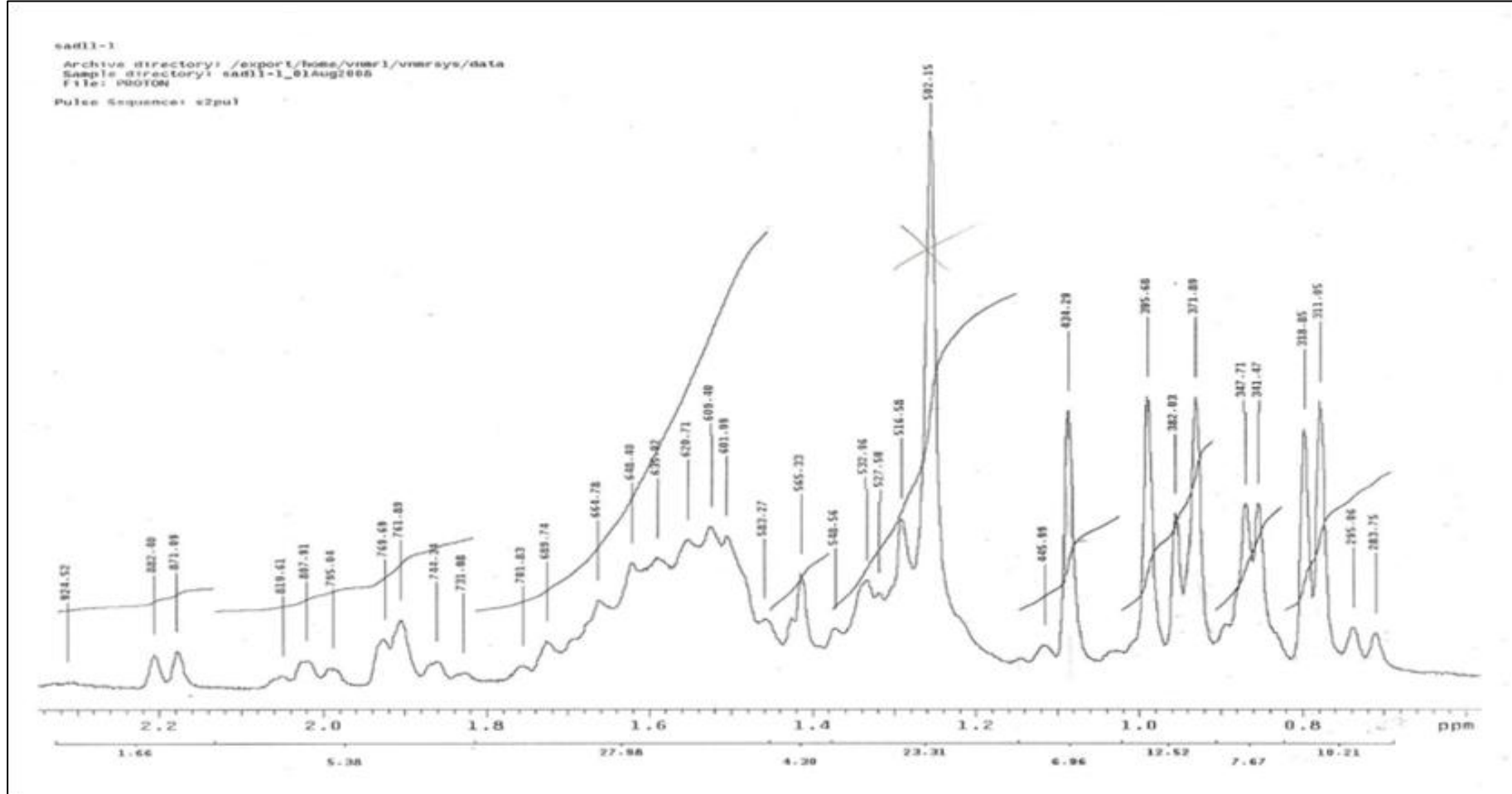
- EK R.1** : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşığının ^1H NMR spektrumu
EK R.2 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşığının ^{13}C NMR spektrumu
EK R.3 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşığının IR spektrumu
EK S.1 : Oleanolik asit 3-metil eter bileşığının ^1H NMR spektrumu
EK S.2 : Oleanolik asit 3-metil eter bileşığının IR spektrumu

EK A.1



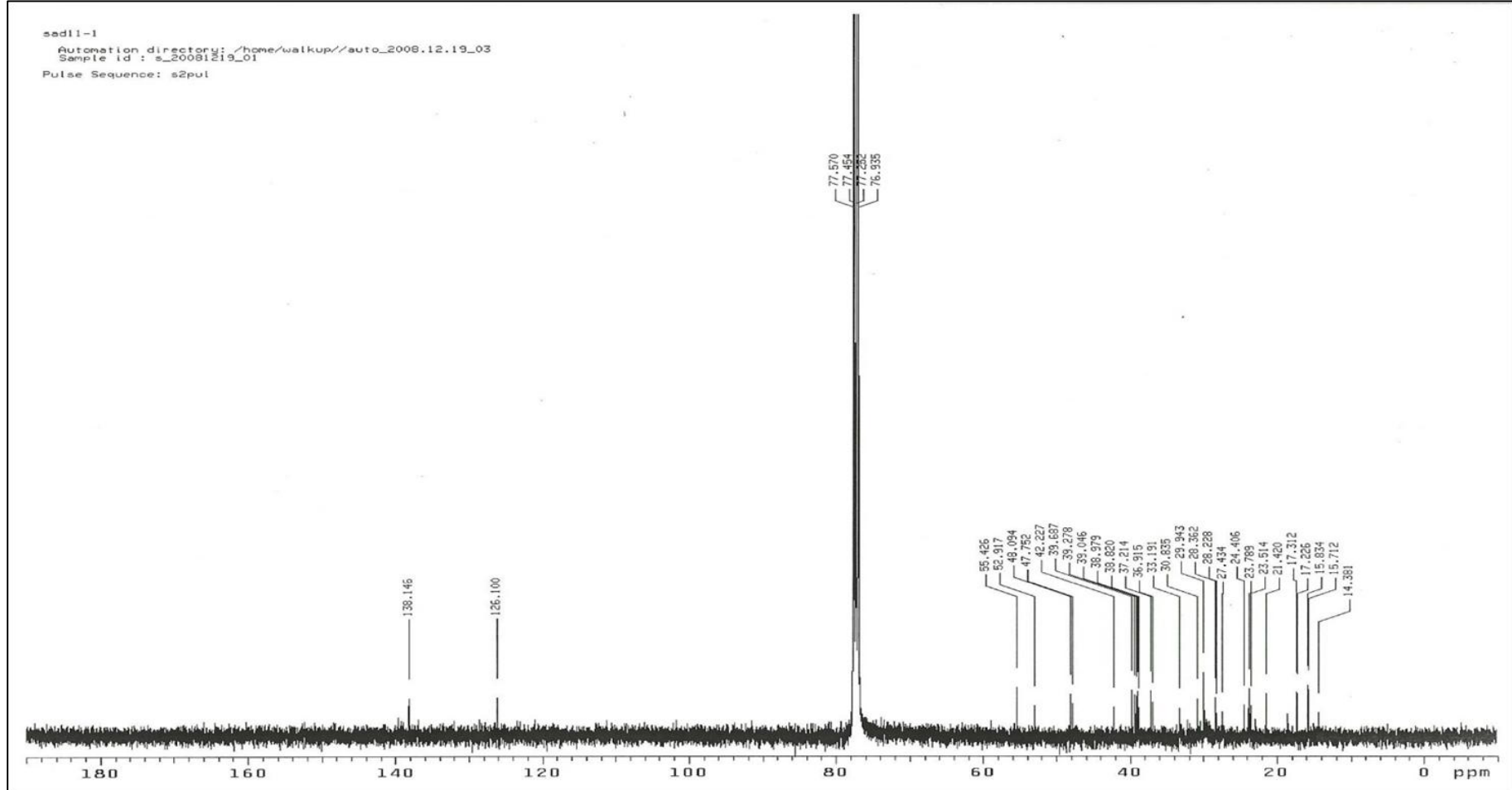
Şekil A.1 : α -amirin bileşiminin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 400 MHz)

EK A.2



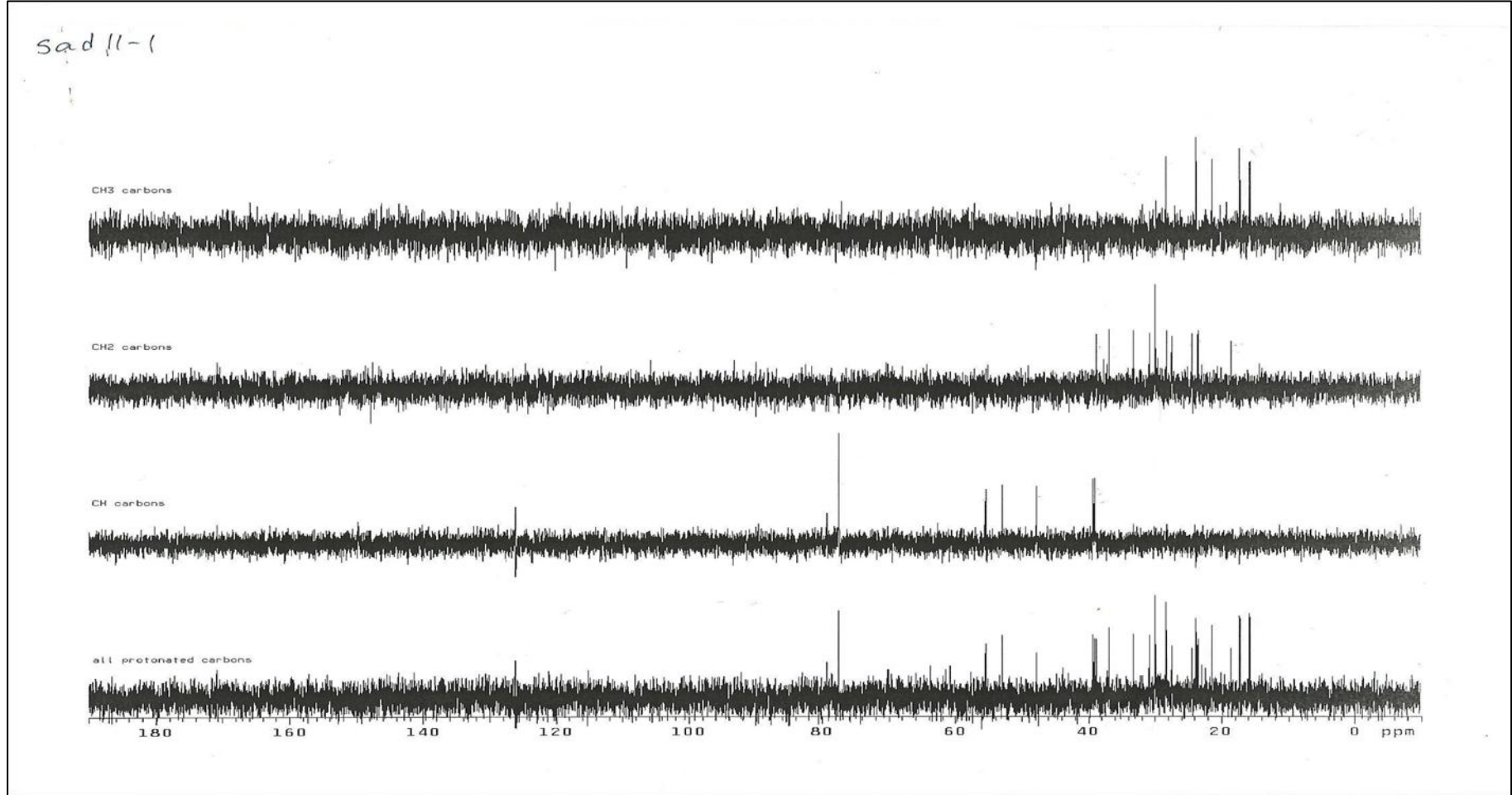
Şekil A.2 : α-amirin bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK A.3



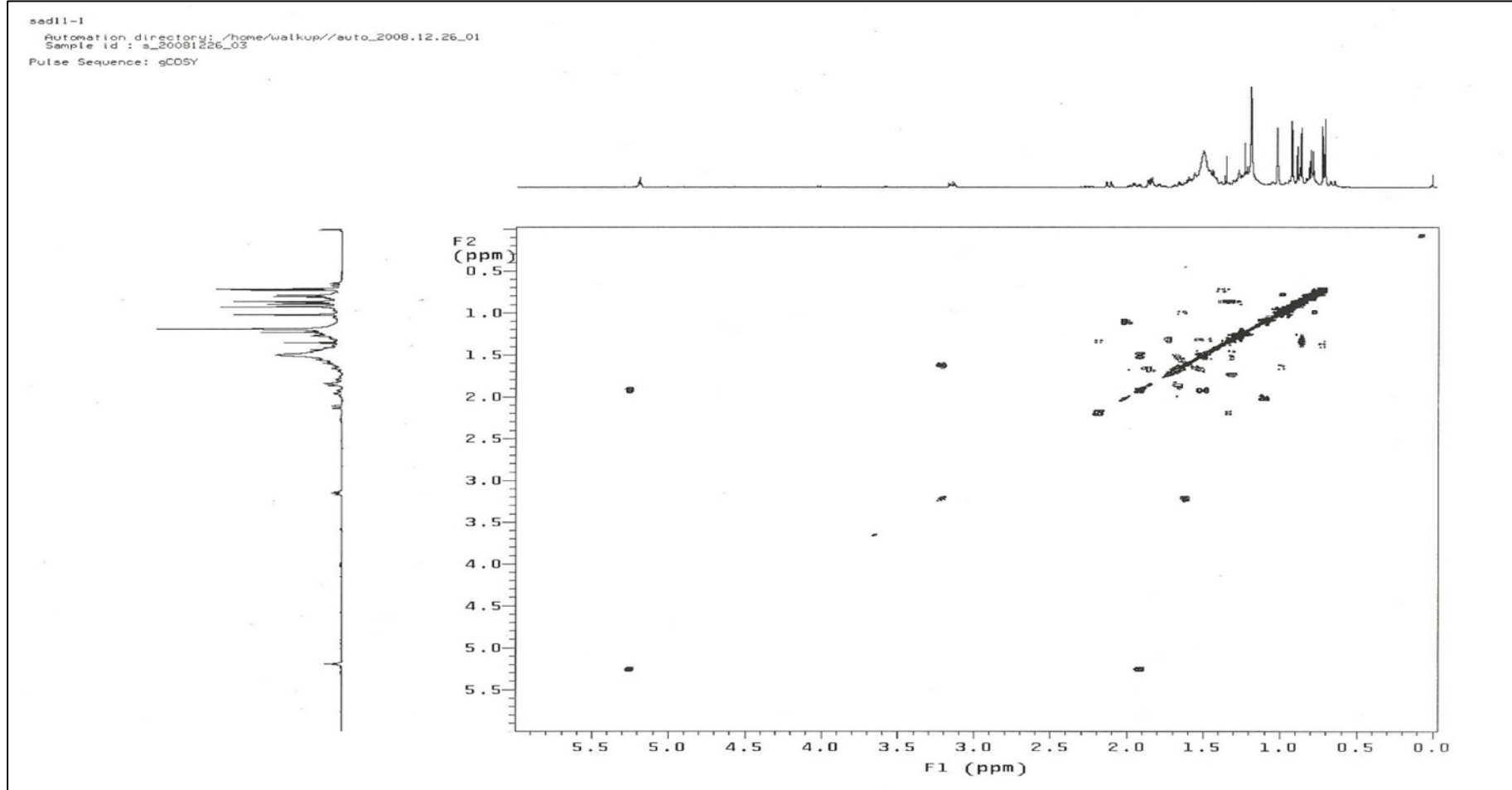
Şekil A.3 : α -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 100 MHz)

EK A.4



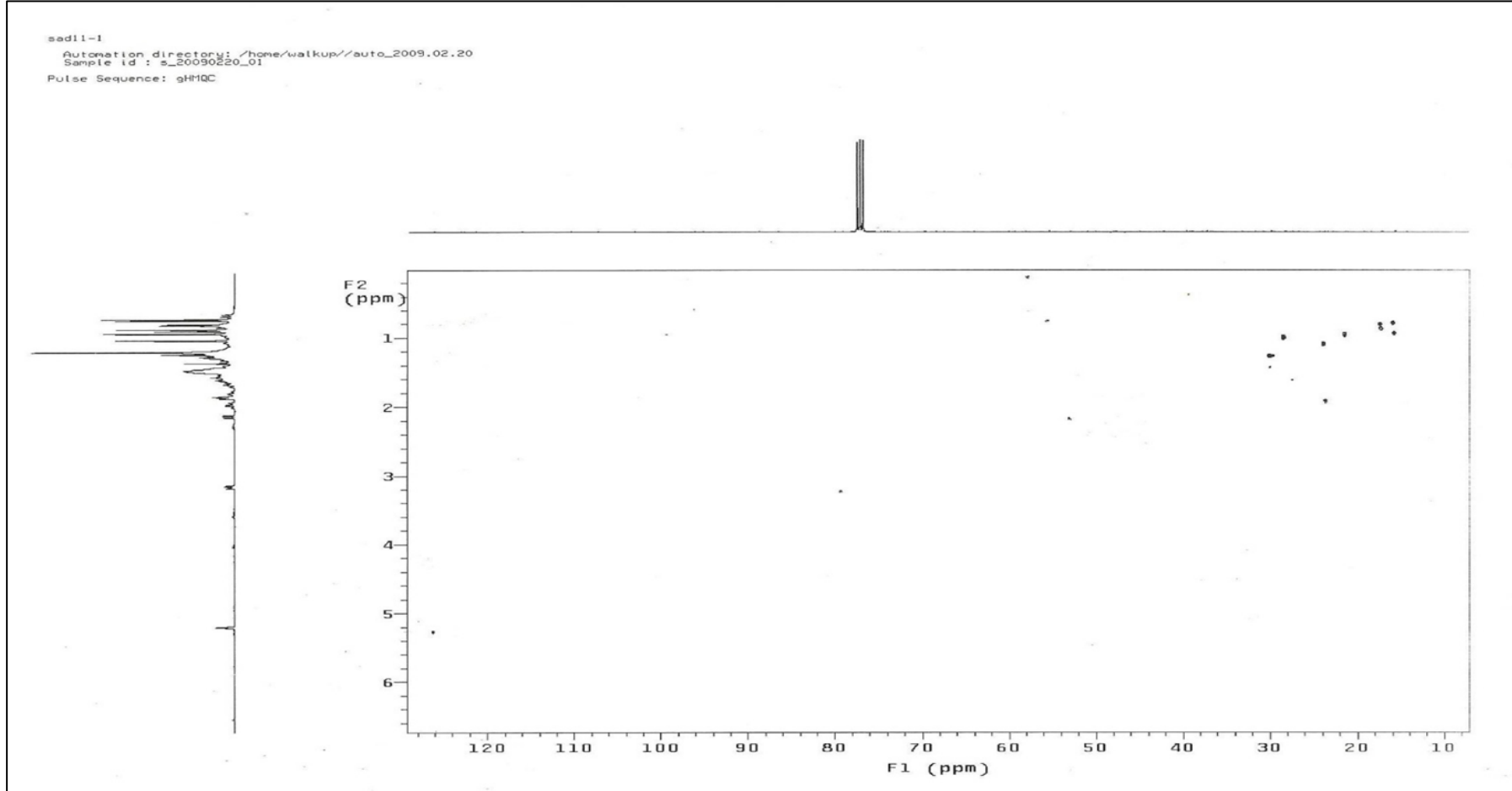
Şekil A.4 : α -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR (DEPT) spektrumu

EK A.5



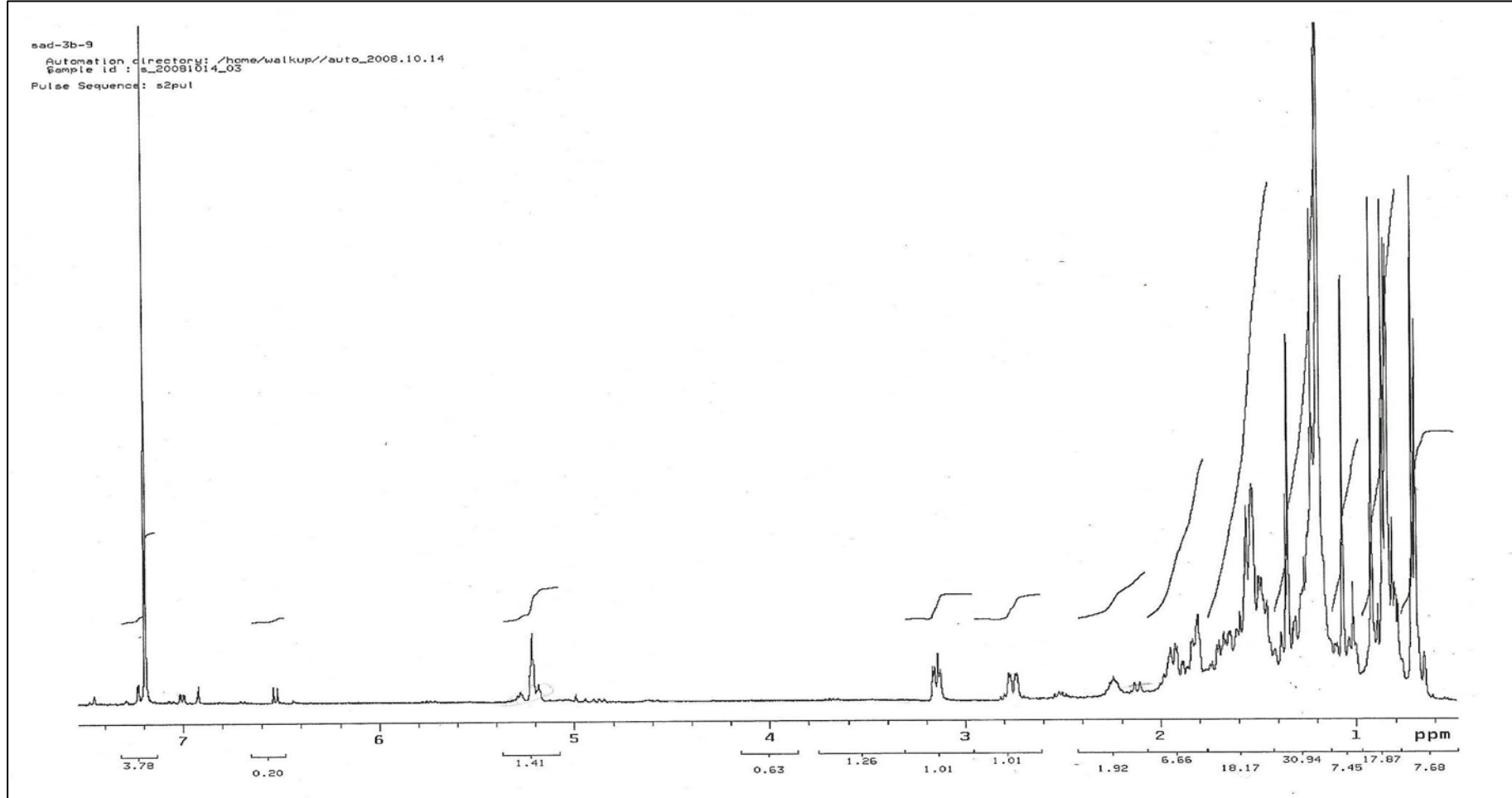
Şekil A.5 : α -amirin bileşiğinin gCOSY NMR spektrumu

EK A.6



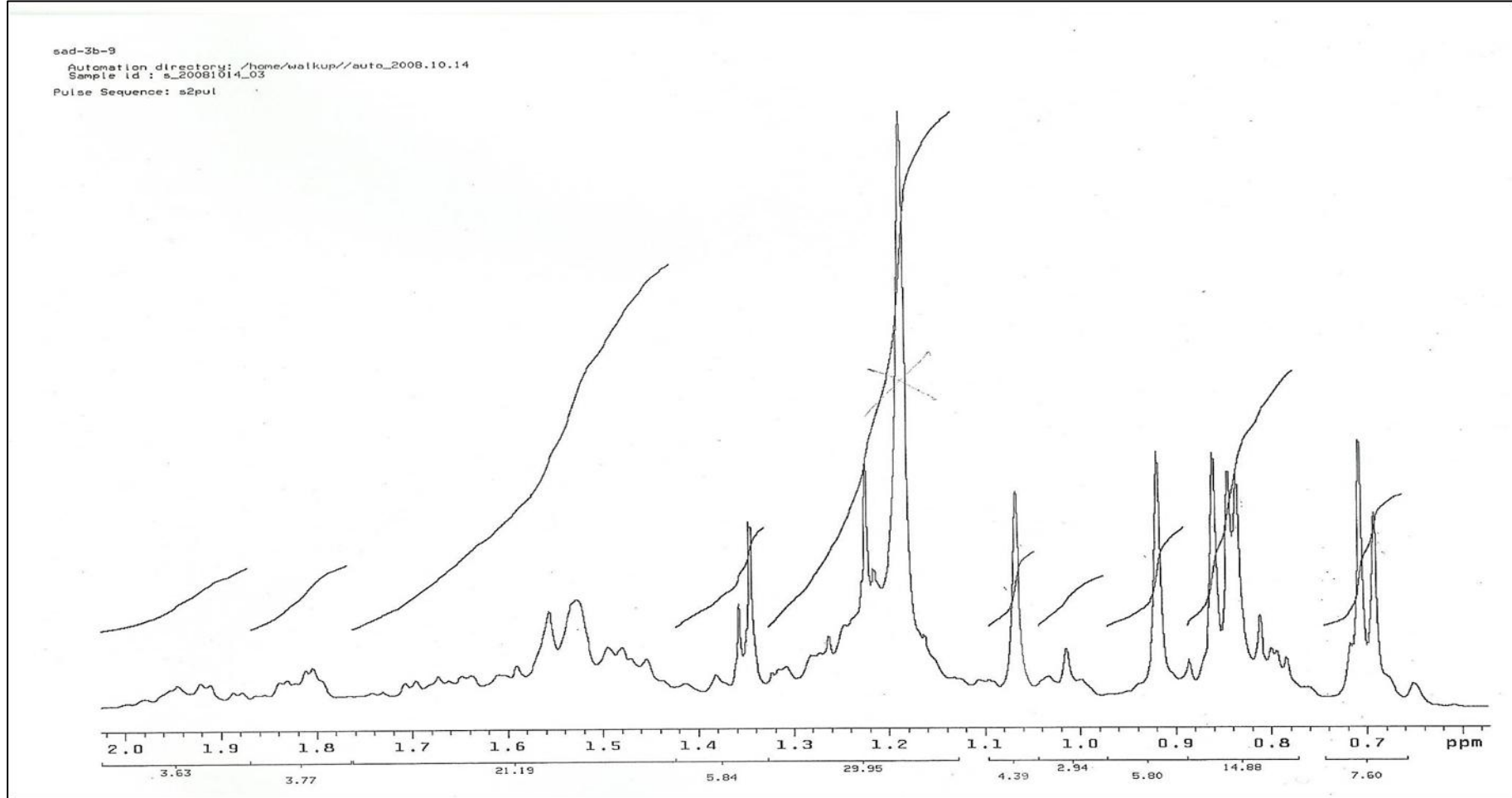
Şekil A.6 : α -amirin bileşiğinin gHMQC spektrumu

EK B.1



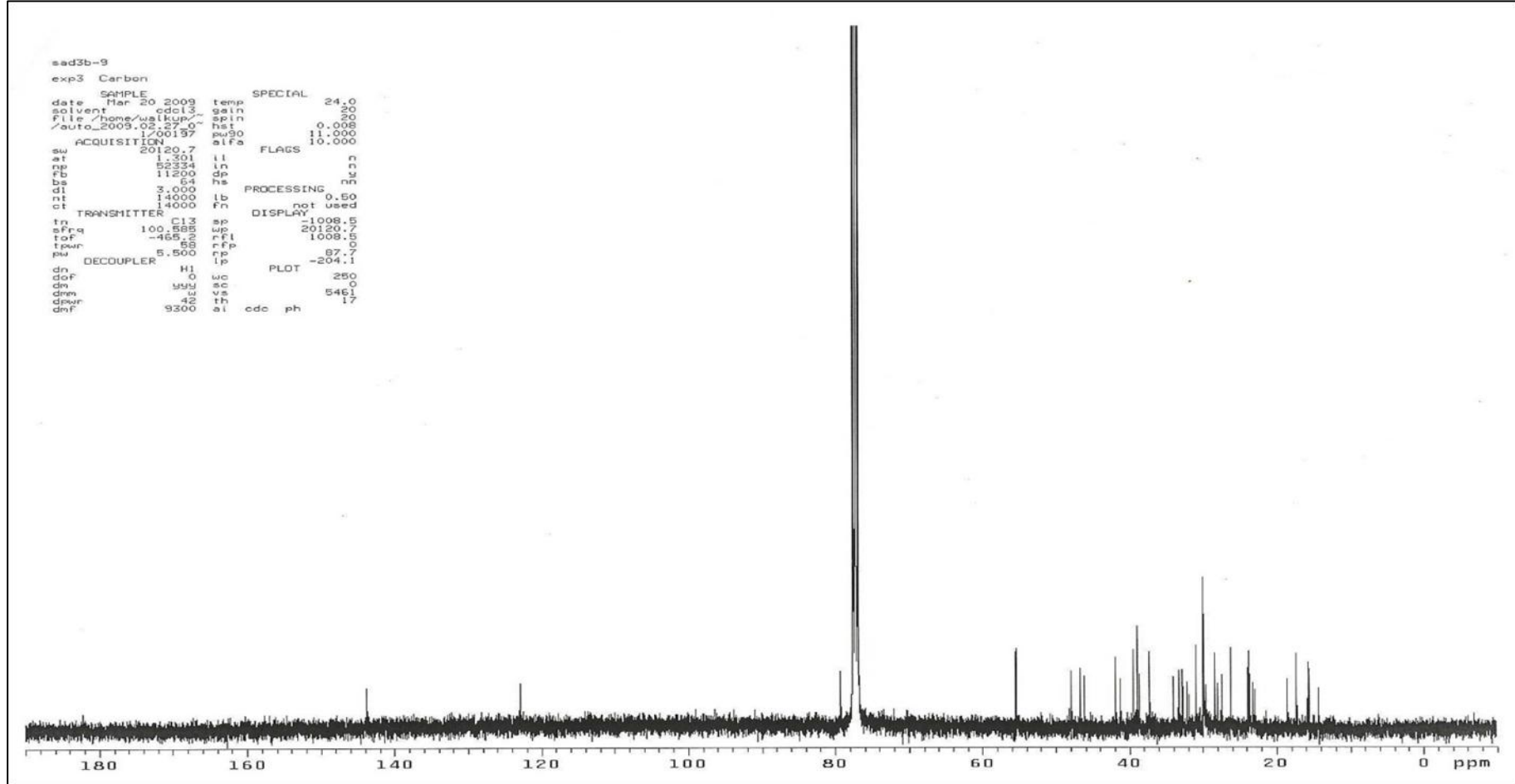
Şekil B.1 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK B.2



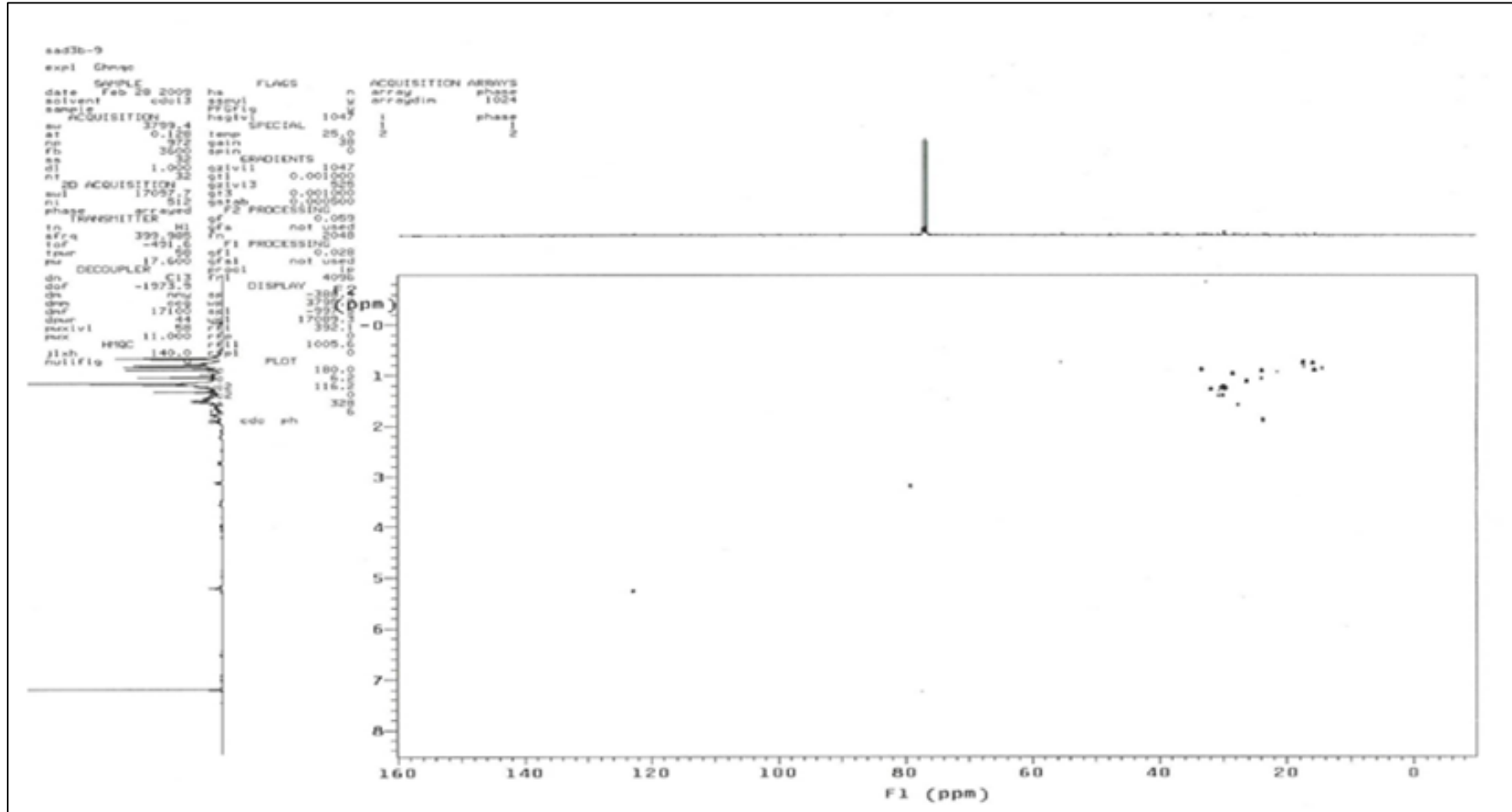
Şekil B.2 : Oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK B.3



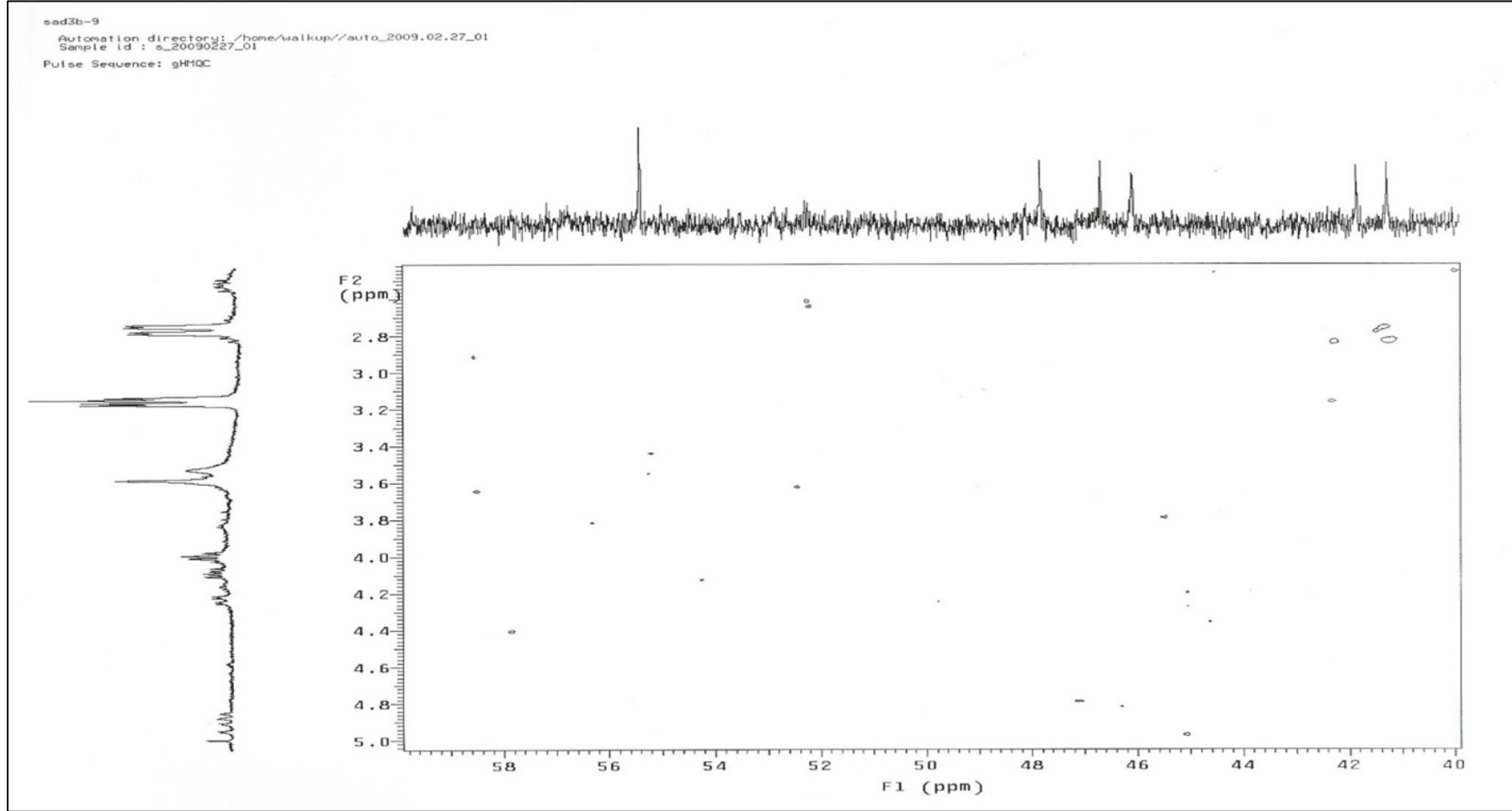
Şekil B.3 : Oleanolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 100 MHz)

EK B.4



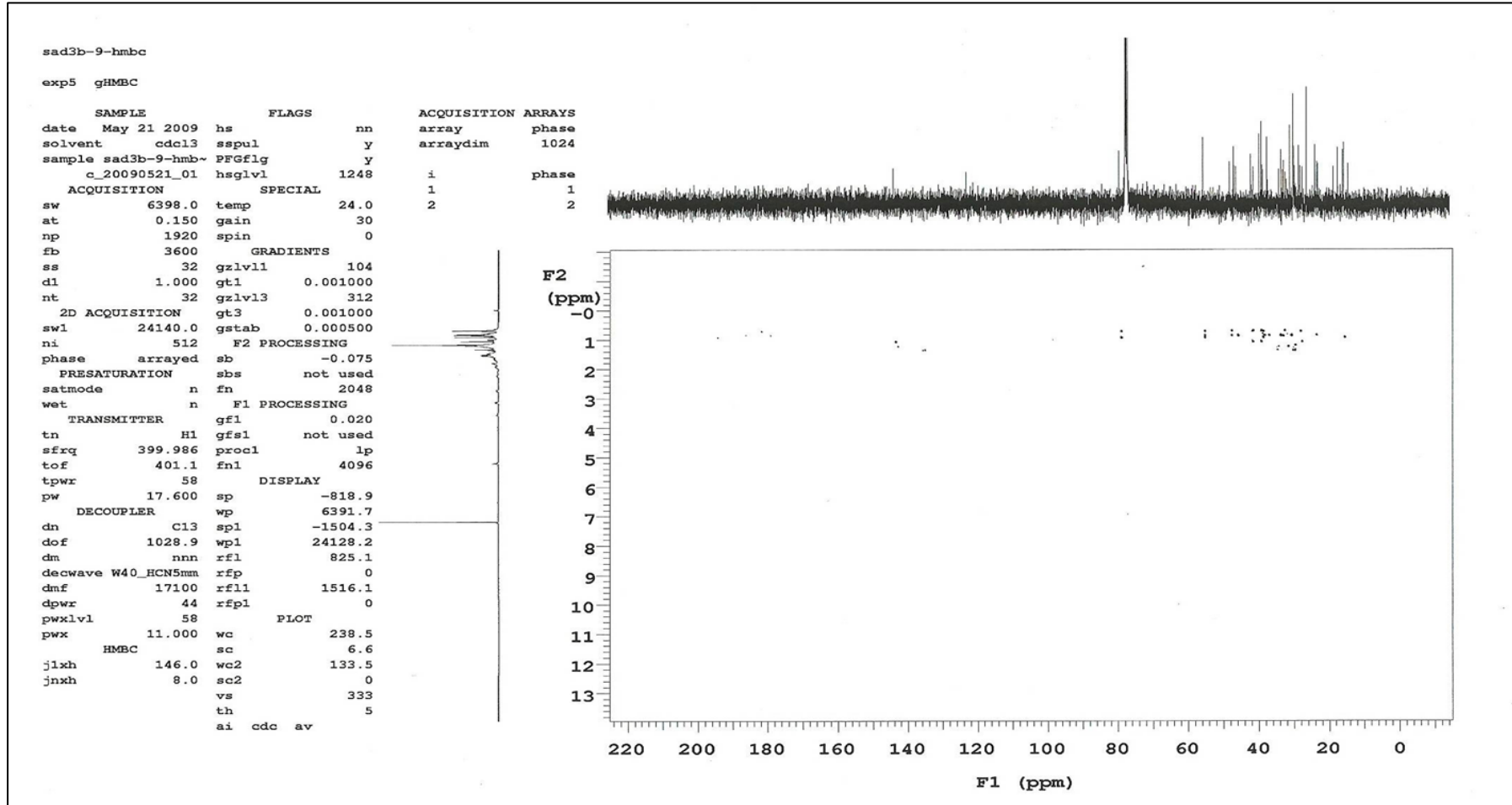
Şekil B.4 : Oleanolik asit bileşiğinin HSQC NMR spektrumu

EK B.5



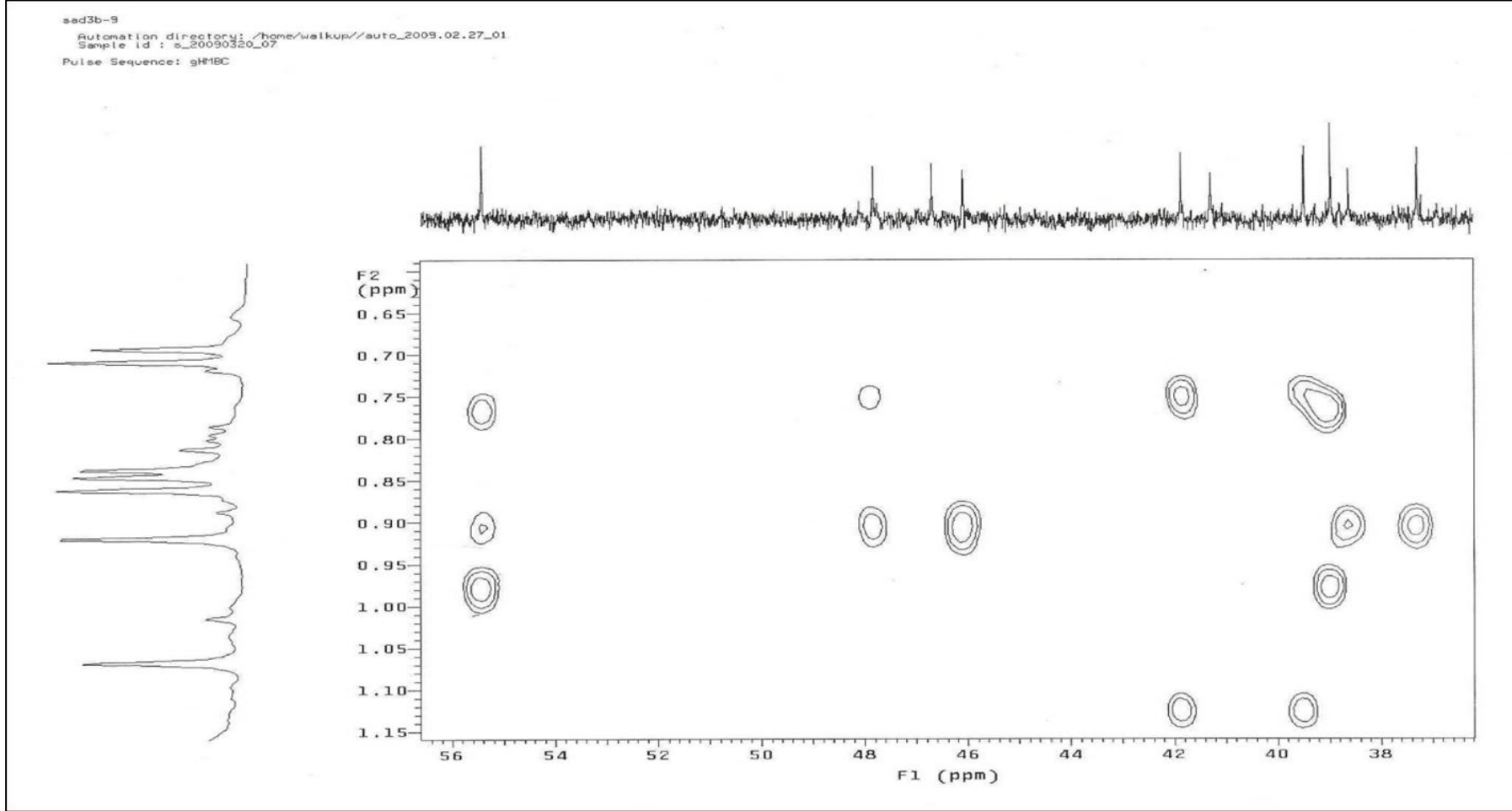
Şekil B.5 : Oleanolik asit bileşiğinin HSQC NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK B.6



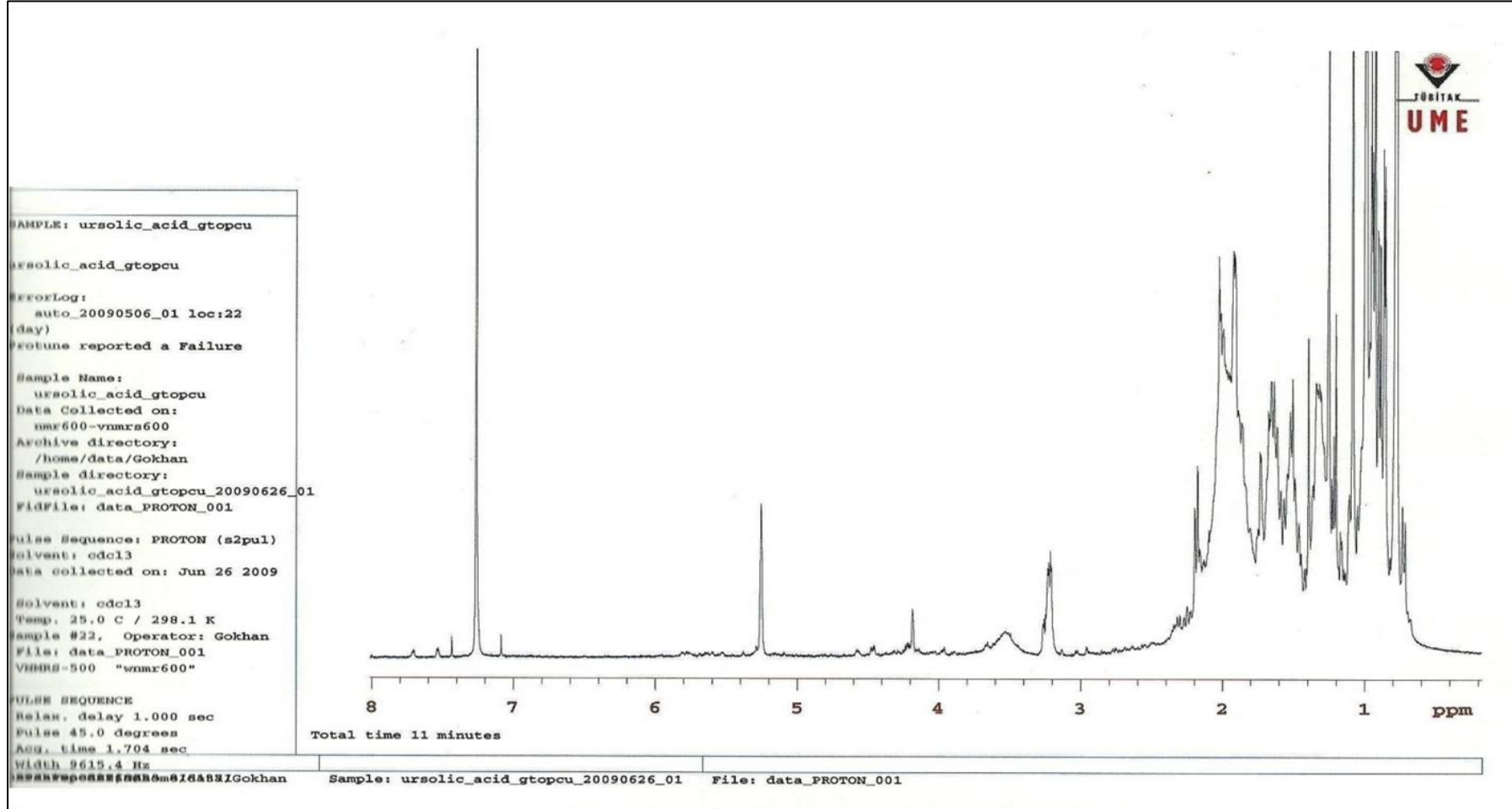
Şekil B.6 : Oleanolik asit bileşiğinin HMBC NMR spektrumu

EK B.7



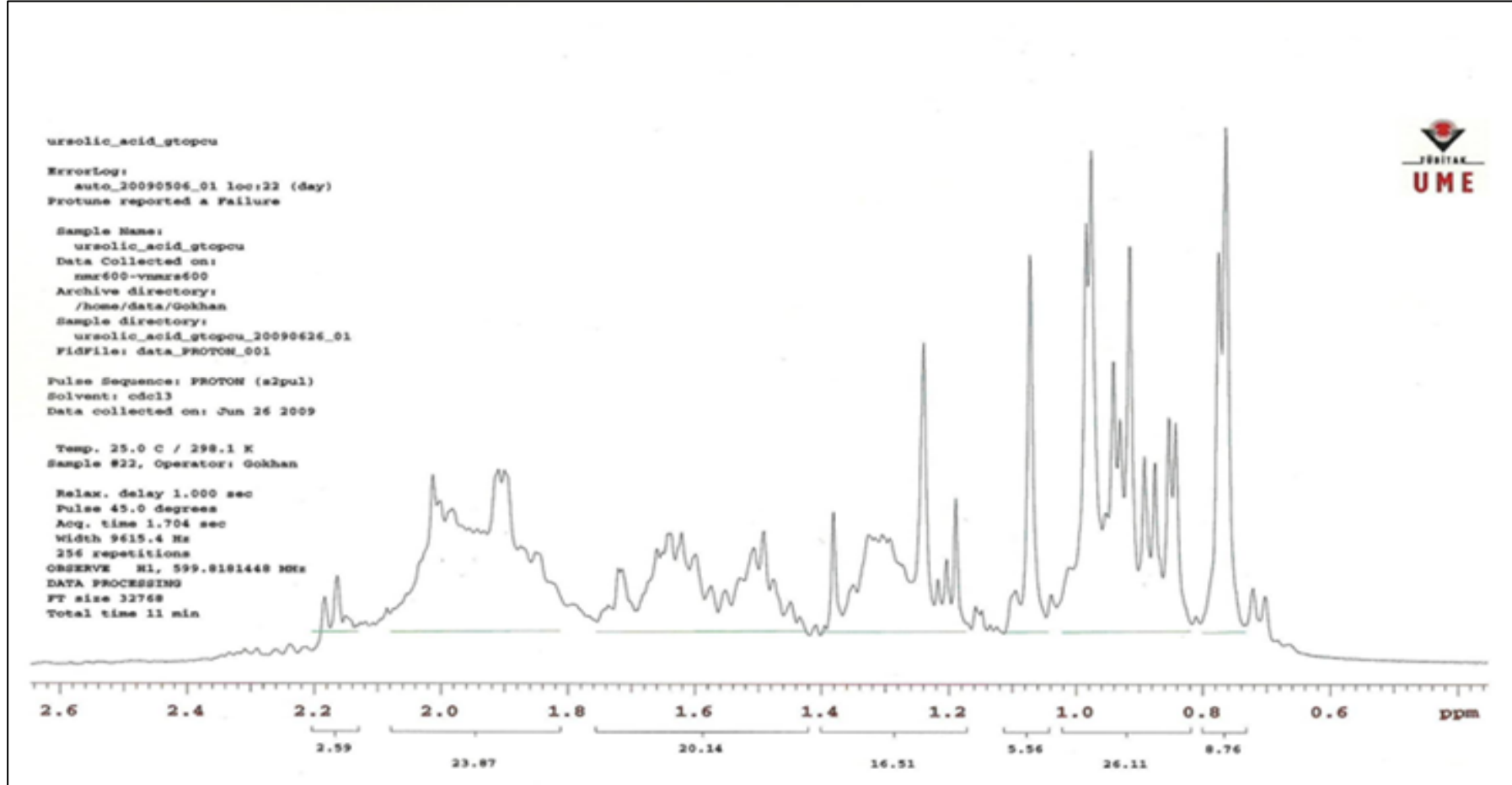
Şekil B.7 : Oleanolik asit bileşiğinin HMBC NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK C.1



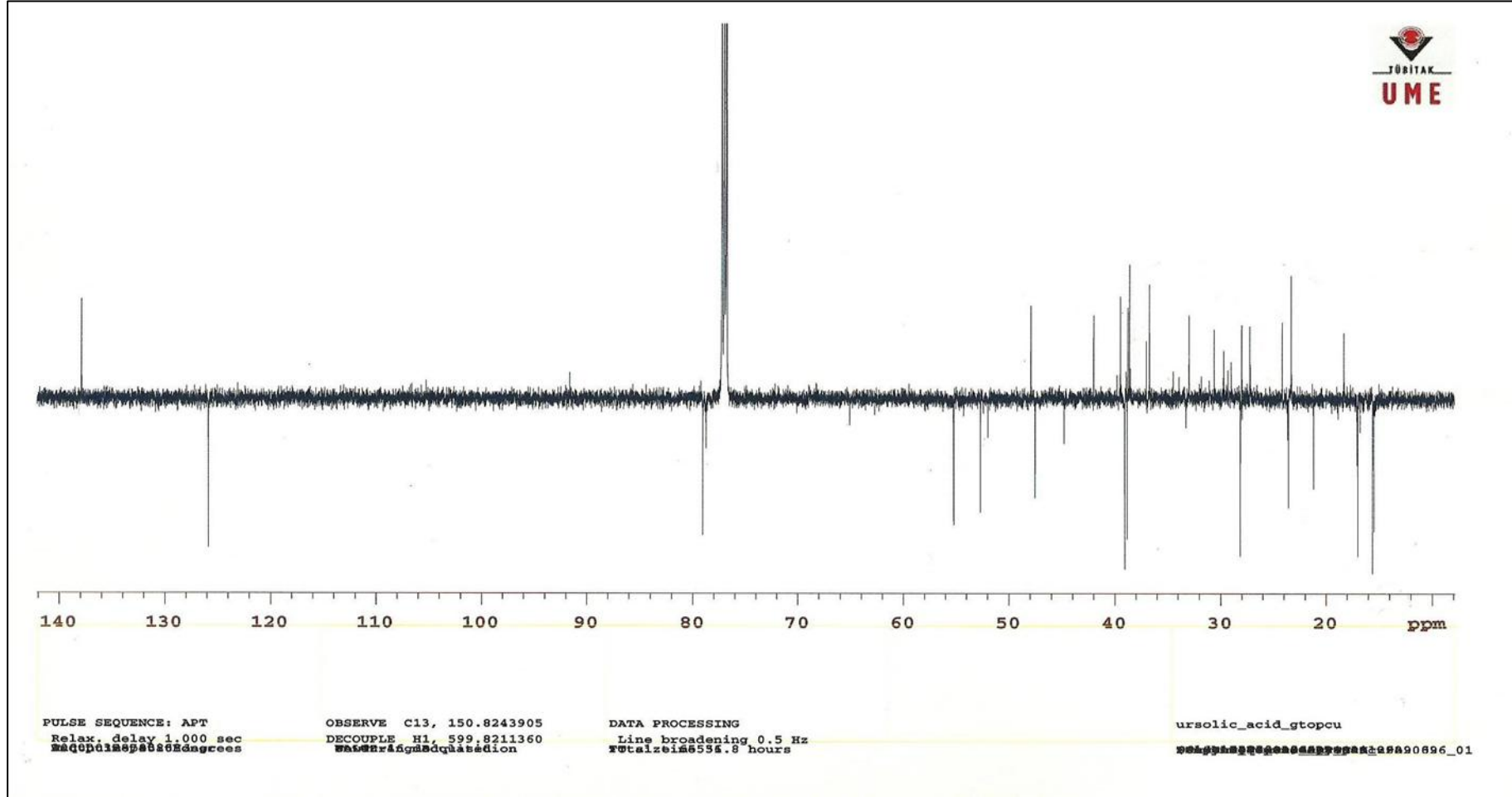
Şekil C.1 : Ursolik asit bileşiminin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)

EK C.2



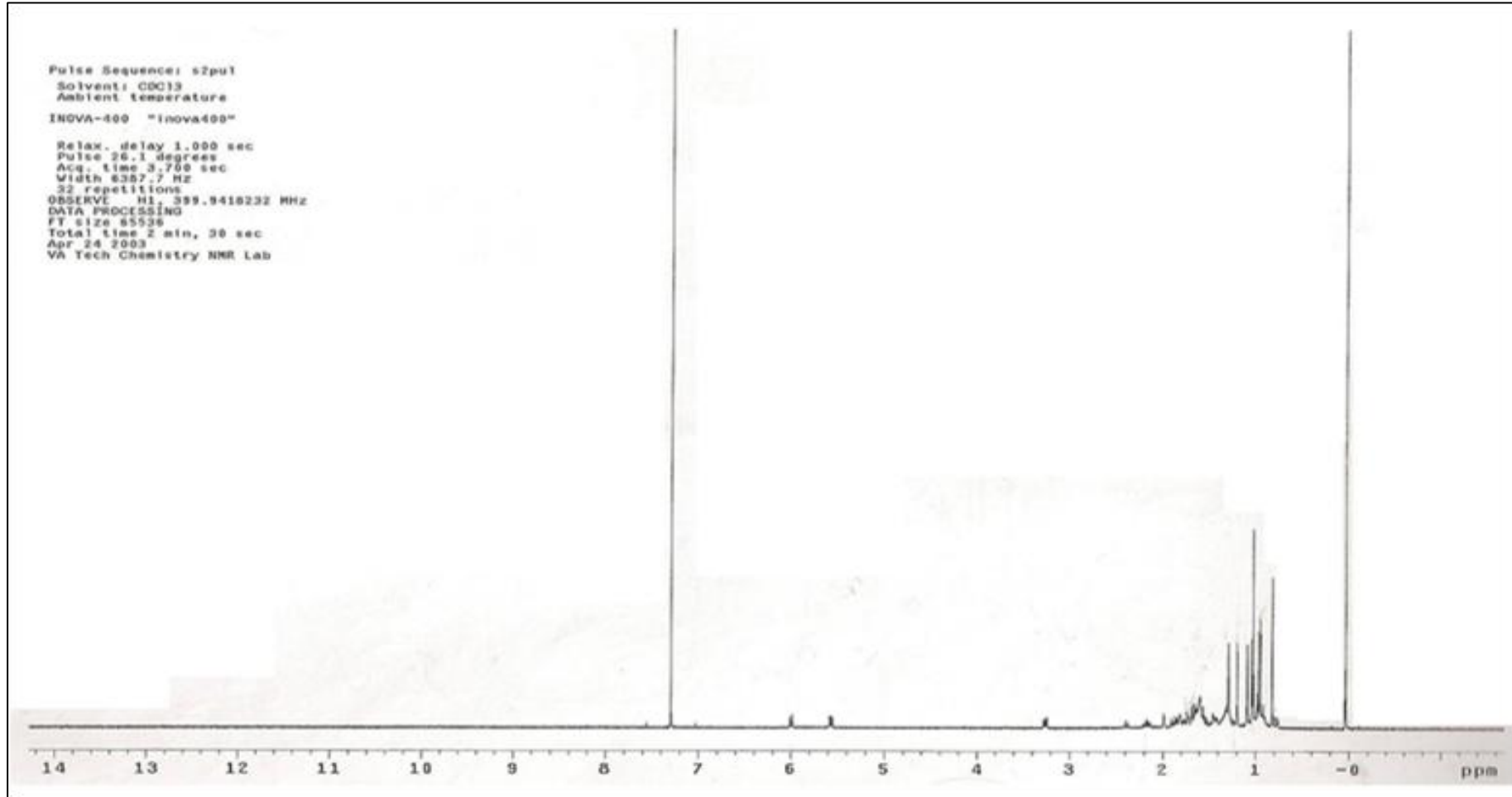
Şekil C.2 : Ursolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK C.3



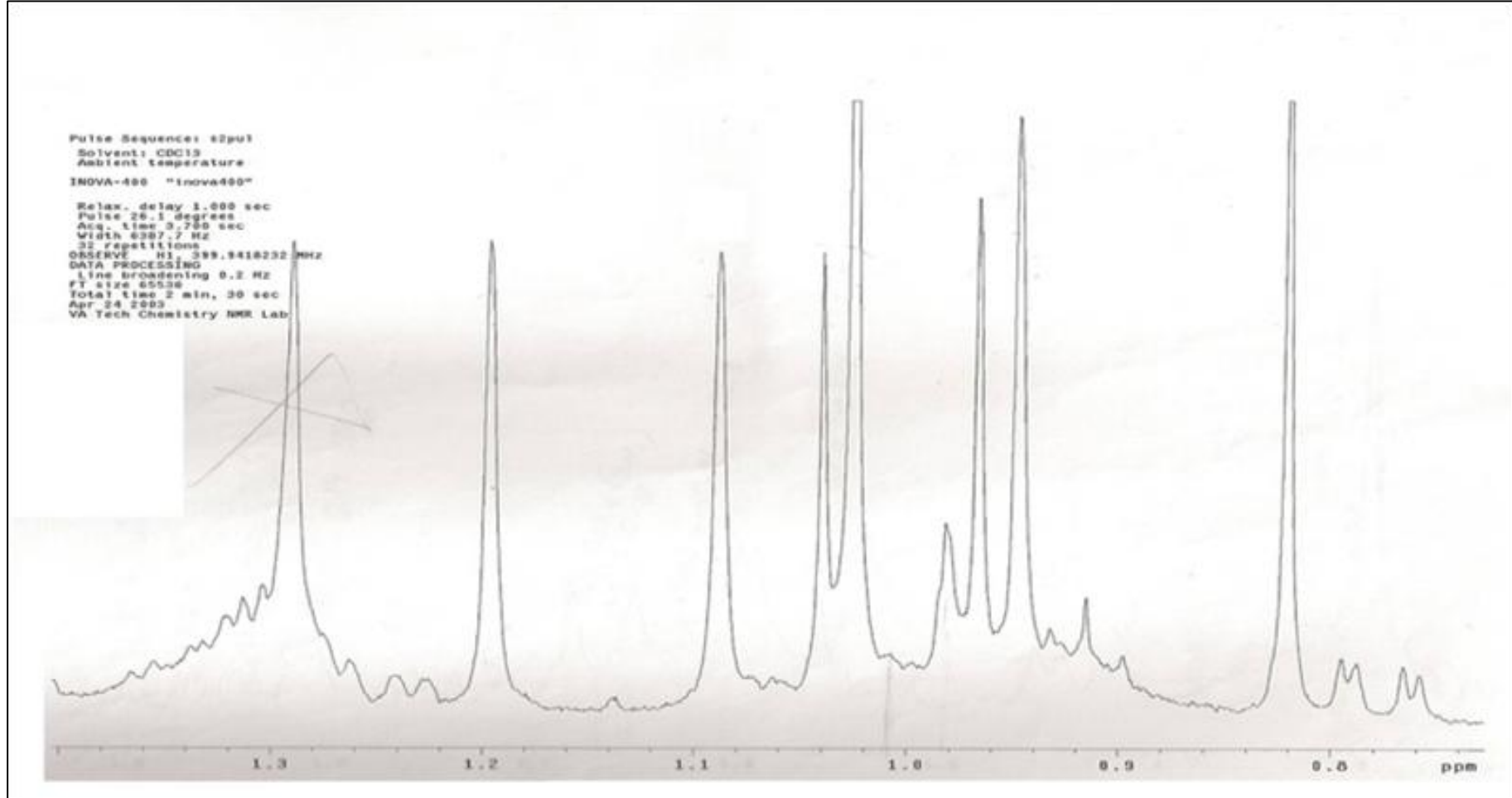
Şekil C.3 : Ursolik asit bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) spektrumu (CDCl_3 , 150MHz)

EK D.1



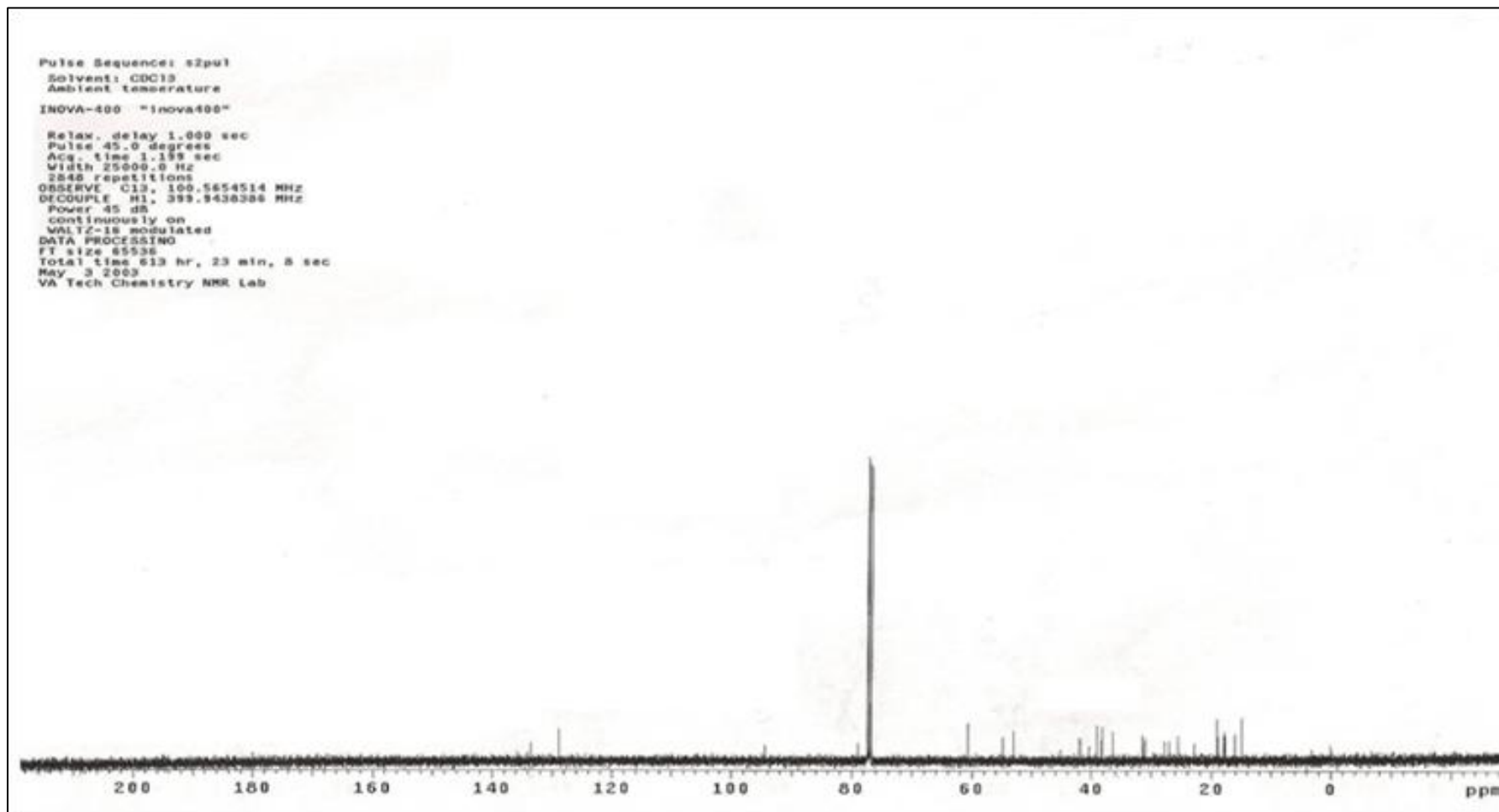
Şekil D.1 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK D.2



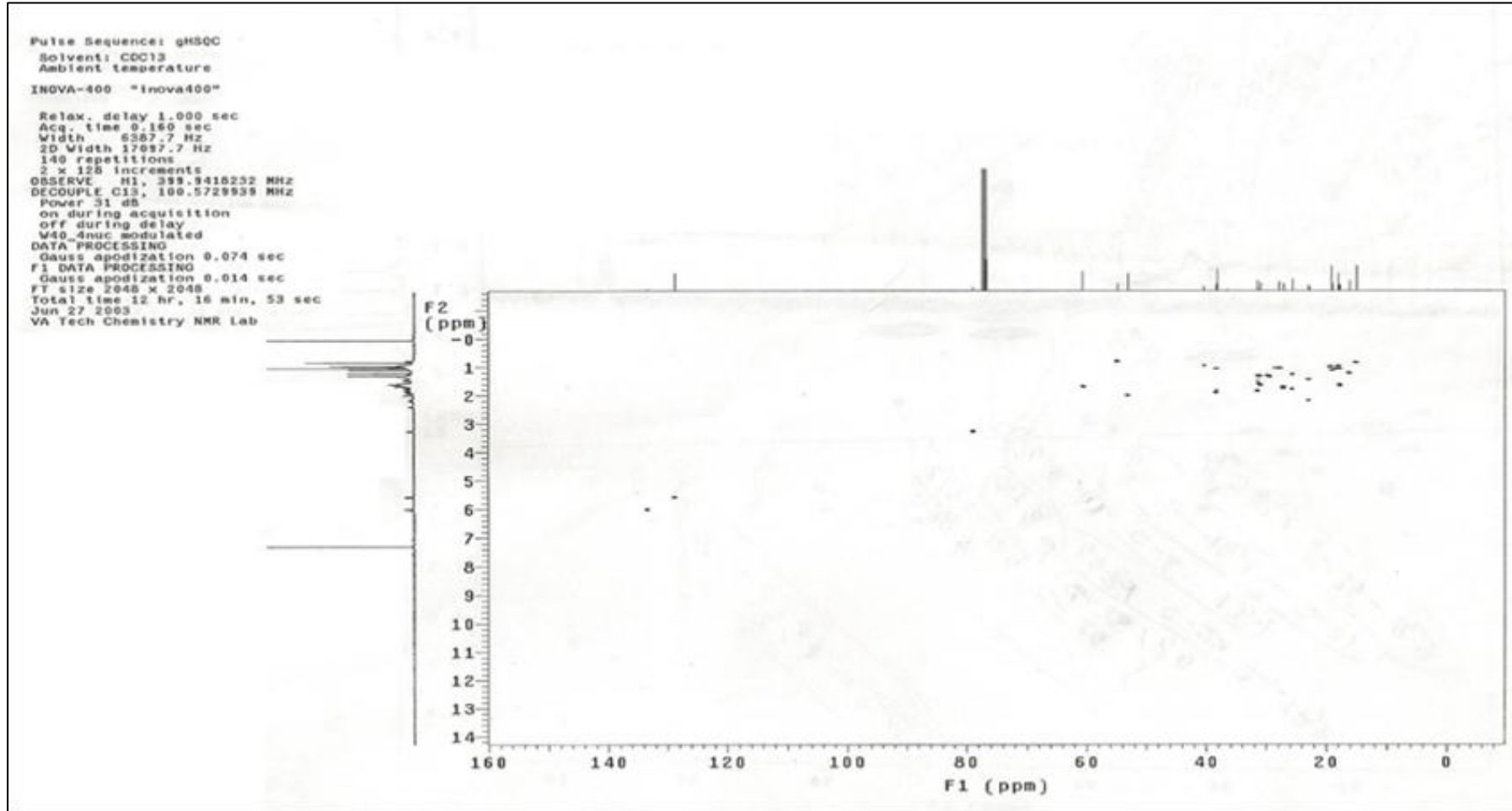
Şekil D.2 : 3 β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK D.3



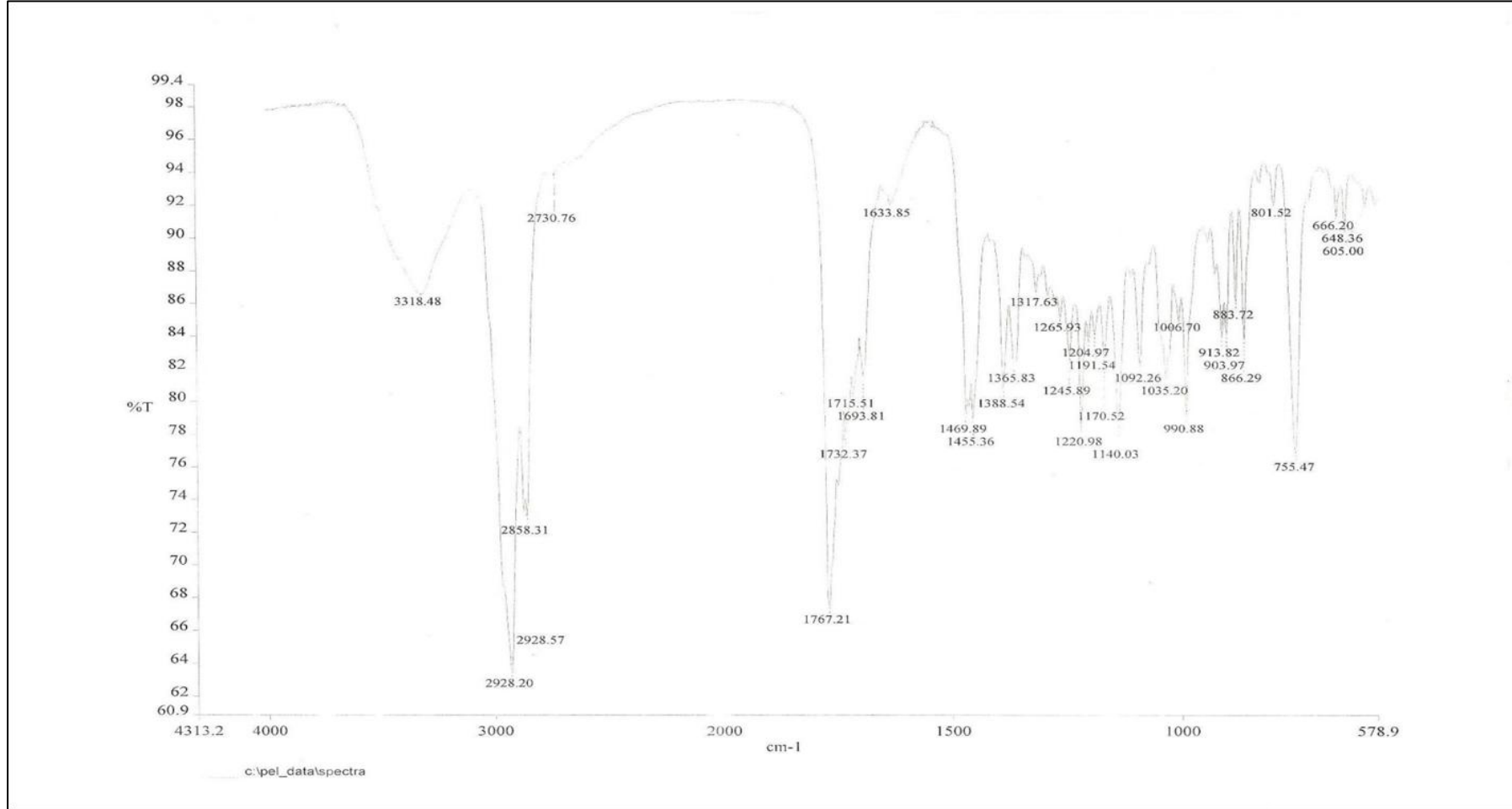
Şekil D.3 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28,13 β -olid bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 100 MHz)

EK D.4



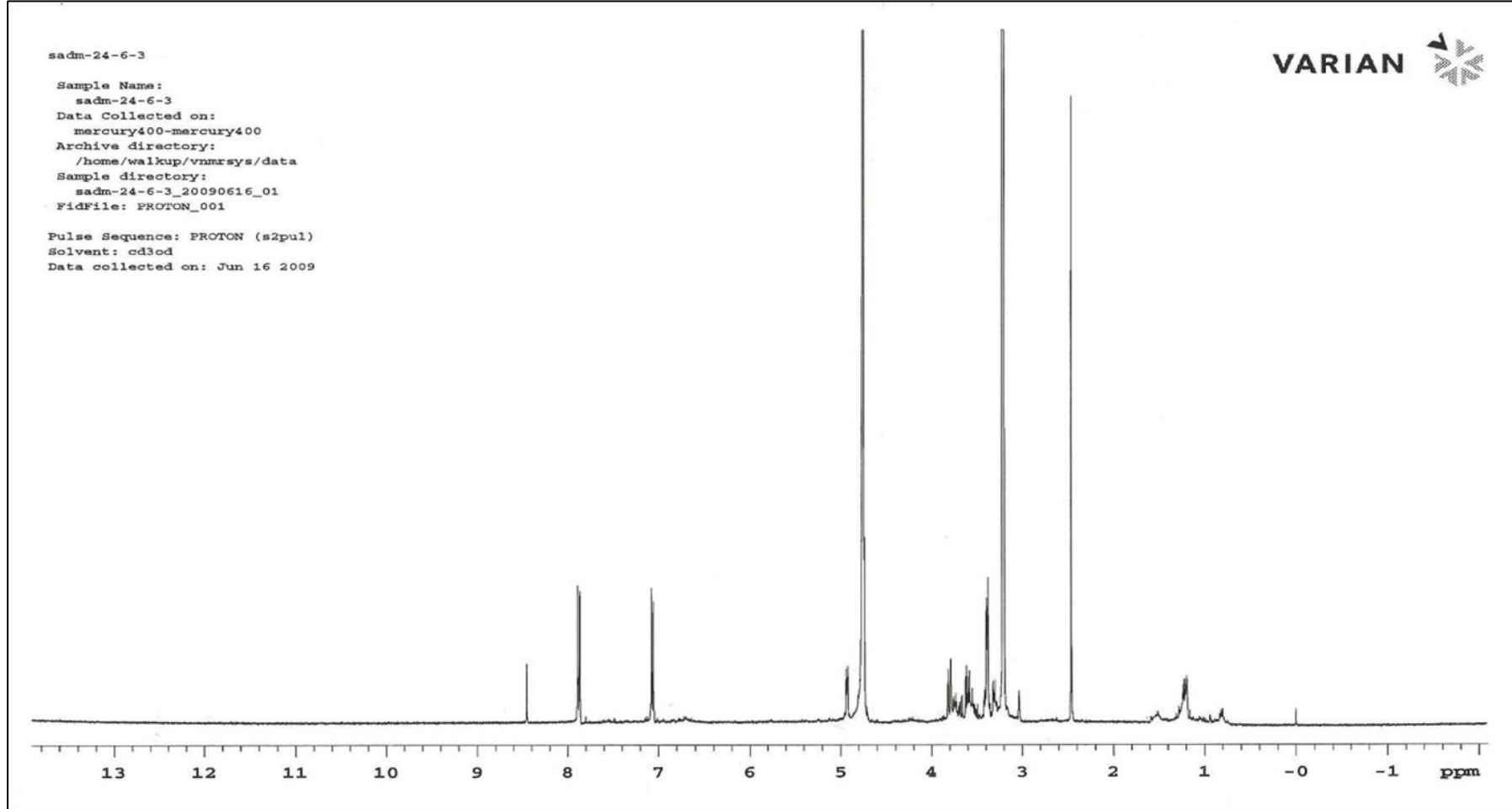
Şekil D.4 : 3β -hidroksi-urs-11-en-28, 13β -olid bileşiğinin gHSQC spektrumu

EK D.5



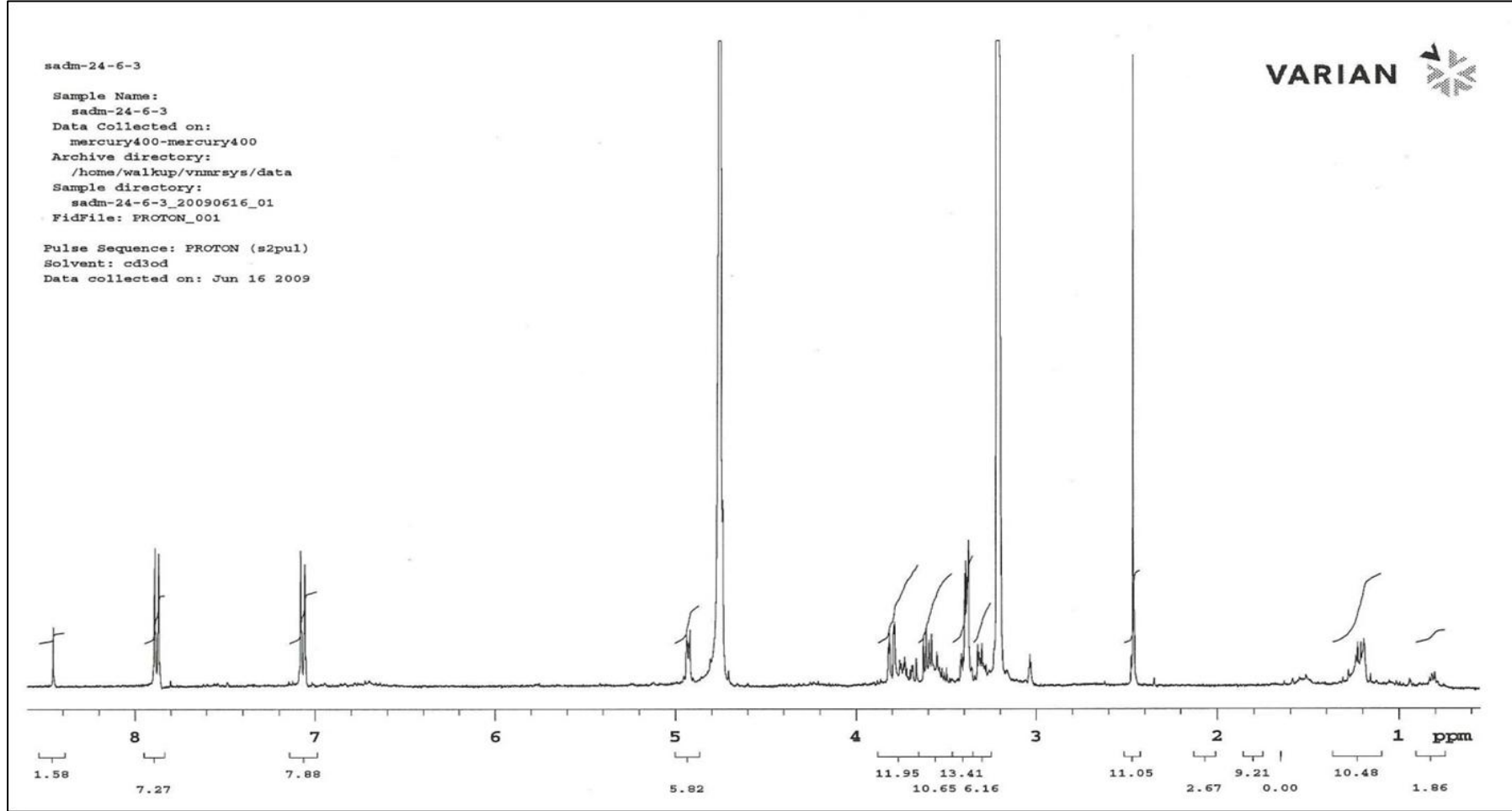
Şekil D.5 : 3β-hidroksi-urs-11-en-28,13β-olid bileşğinin IR spektrumu

EK E.1



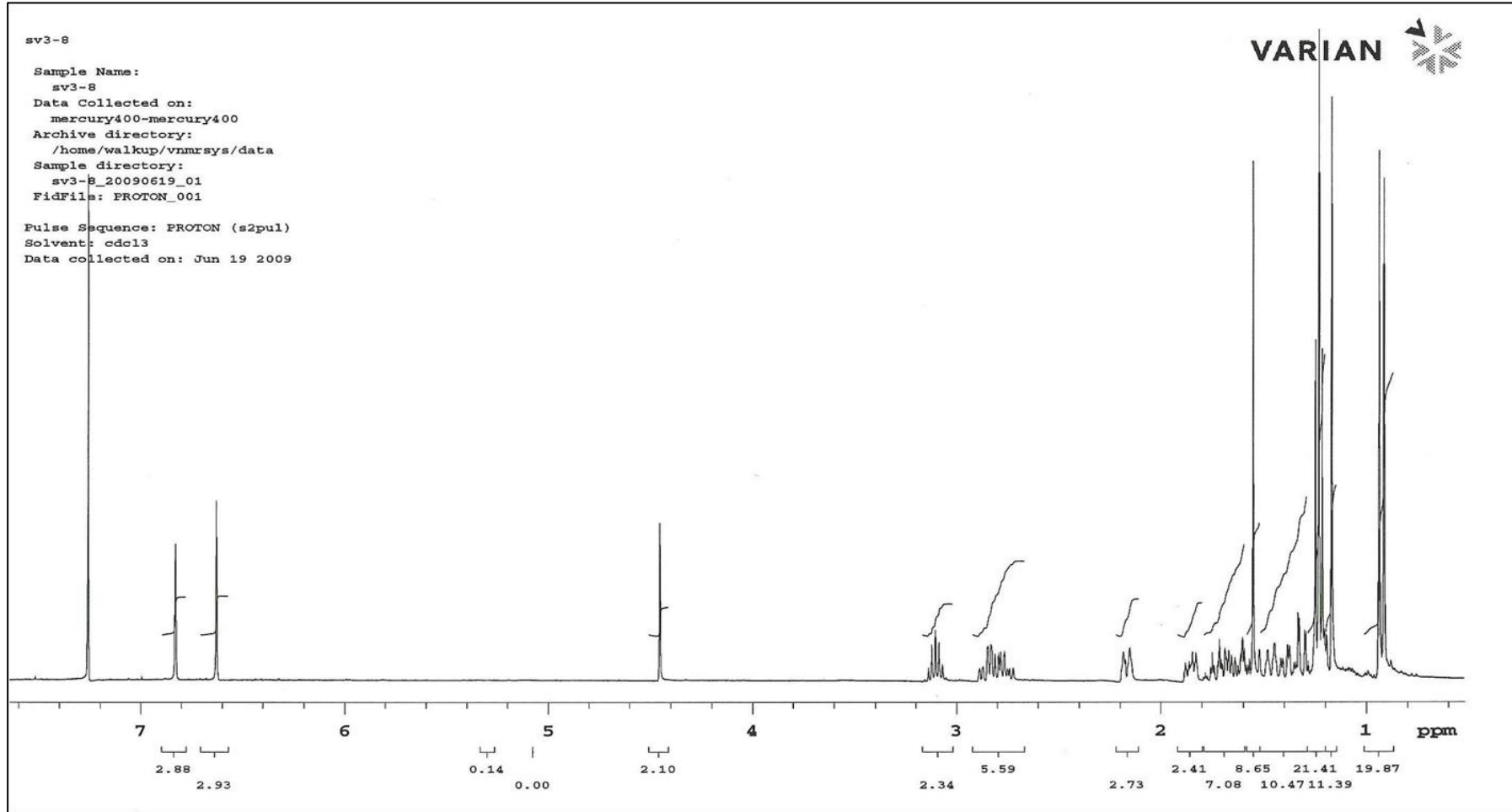
Şekil E.1 : Asetofenon-4-*O*- β -glukopiranozit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK E.2



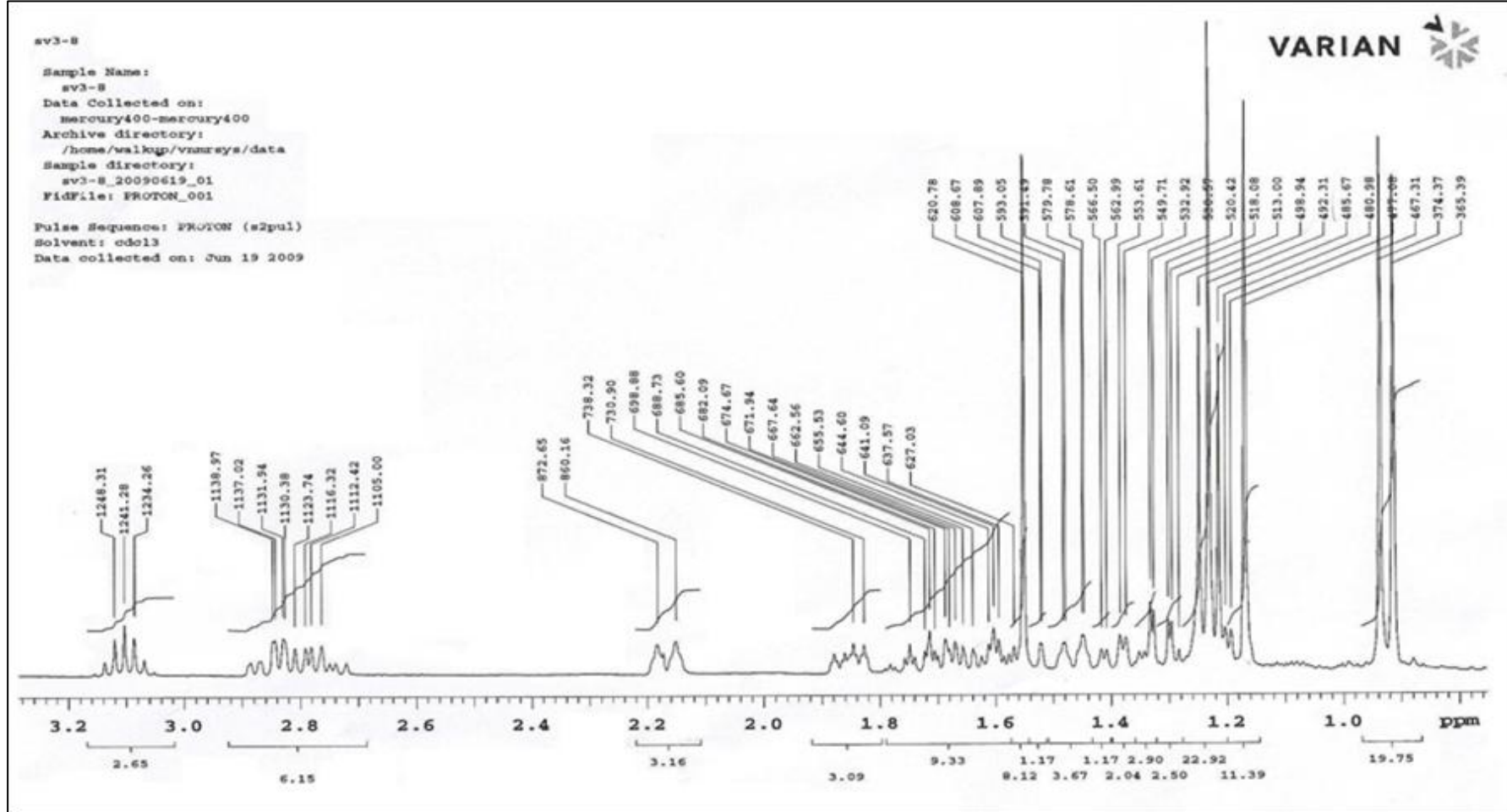
Şekil E.2 : Asetofenon-4-*O*- β -glukopiranozit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK F.1



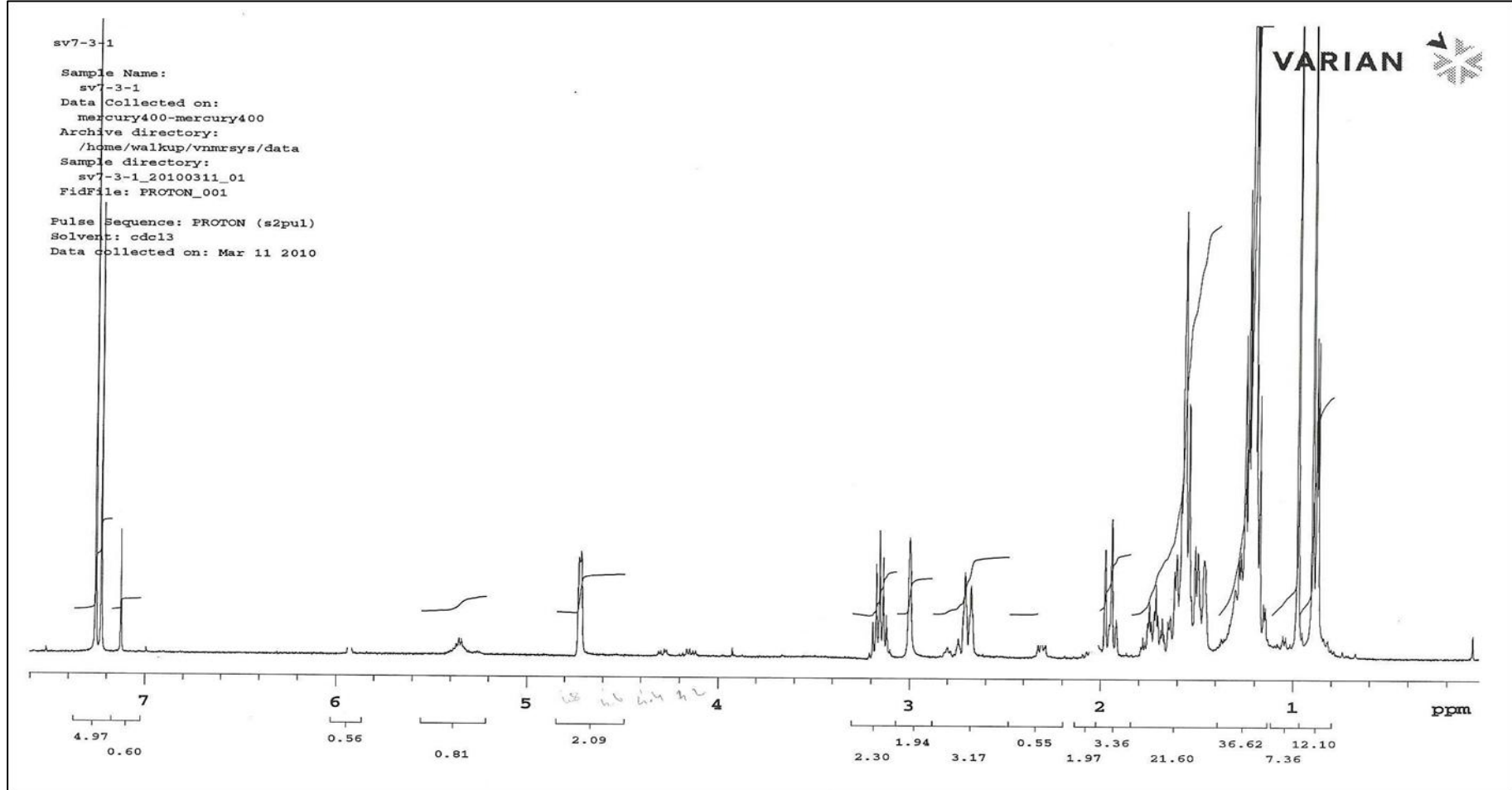
Şekil F.1 : Ferruginol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK F.2



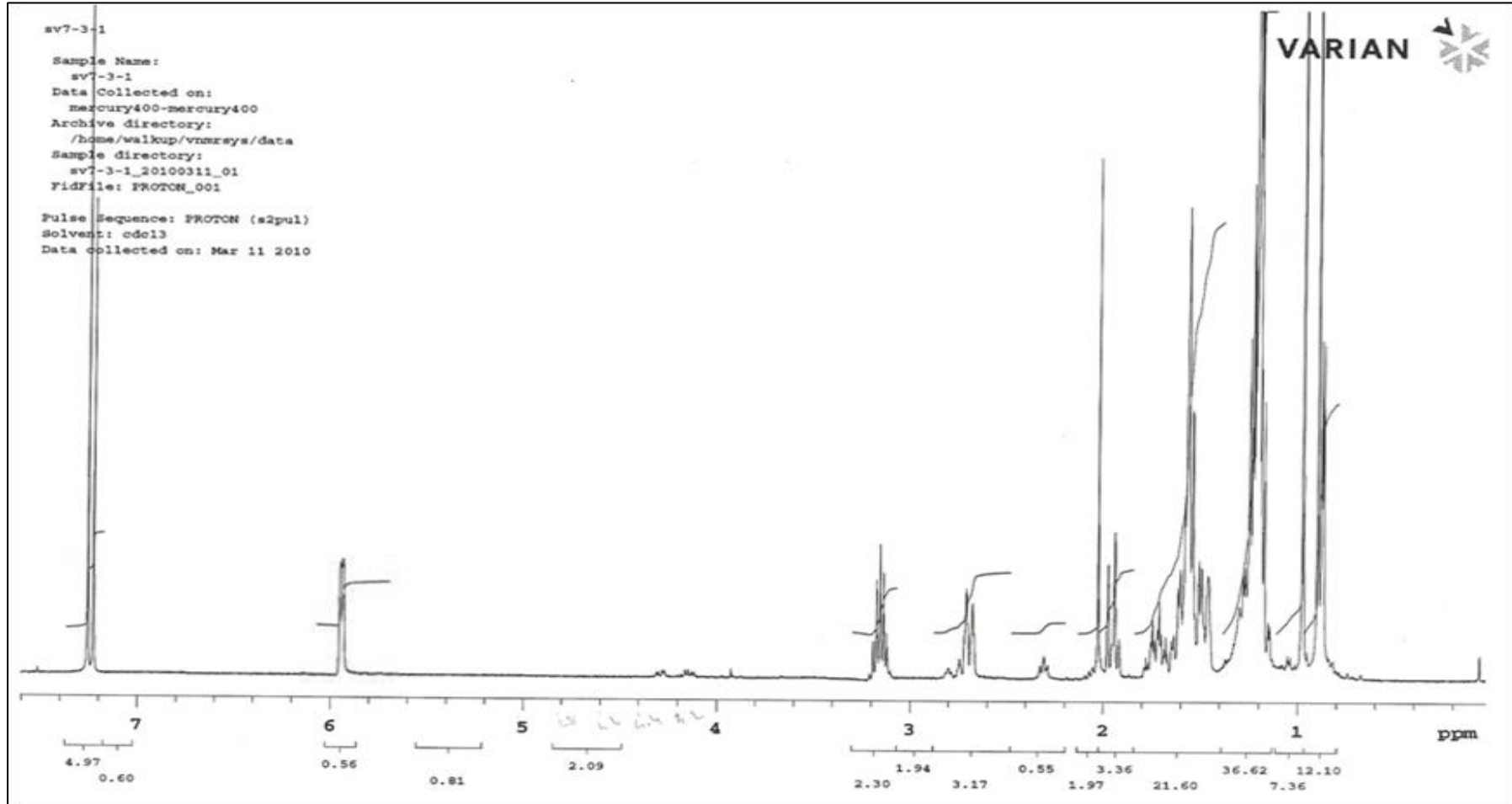
Şekil F.2 : Ferruginol bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (alifatik bölge açılımı)

EK G.1



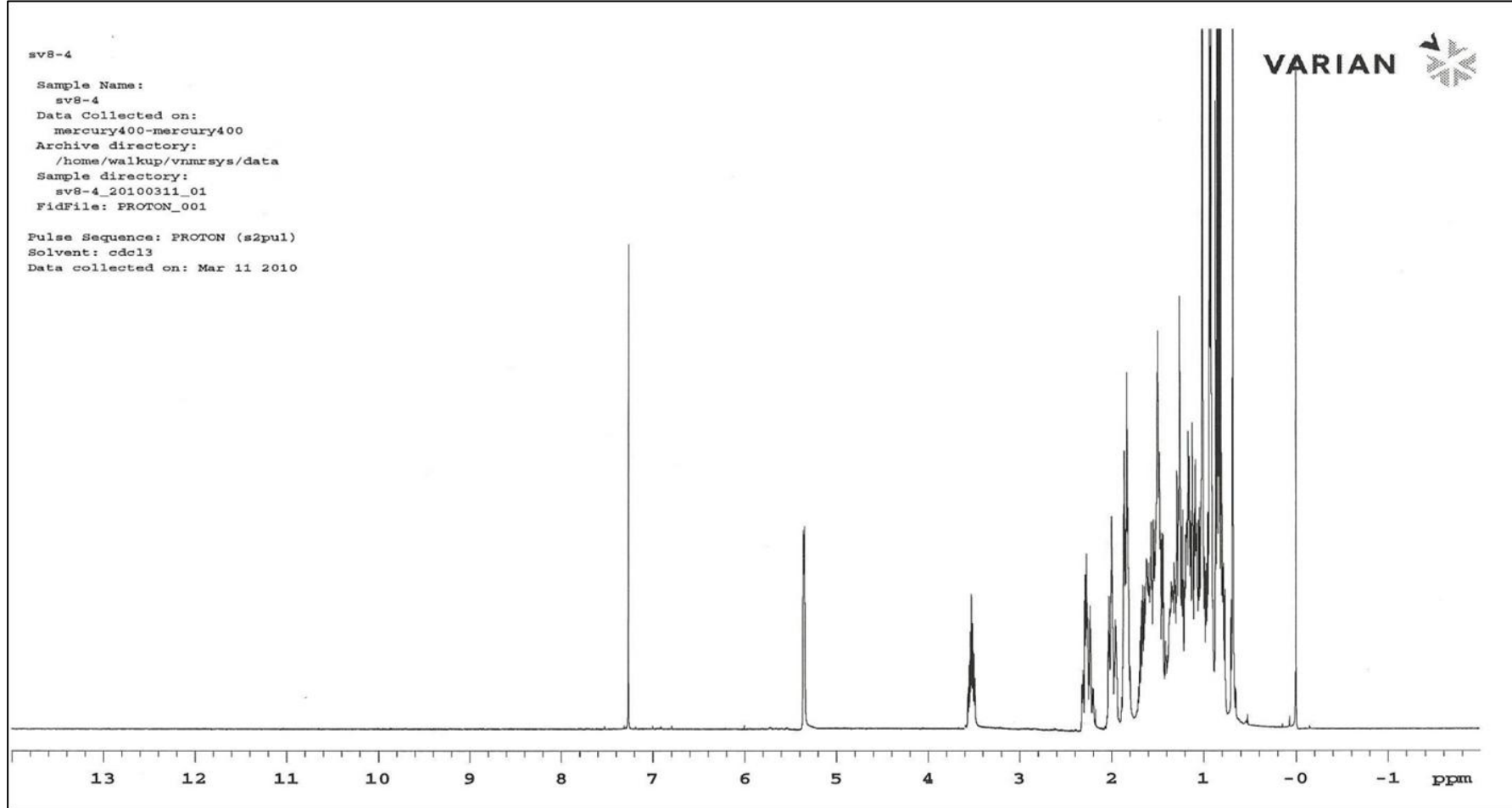
Şekil G.1 : Horminon bileşiğinin ^1H NMR spekrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK H.1



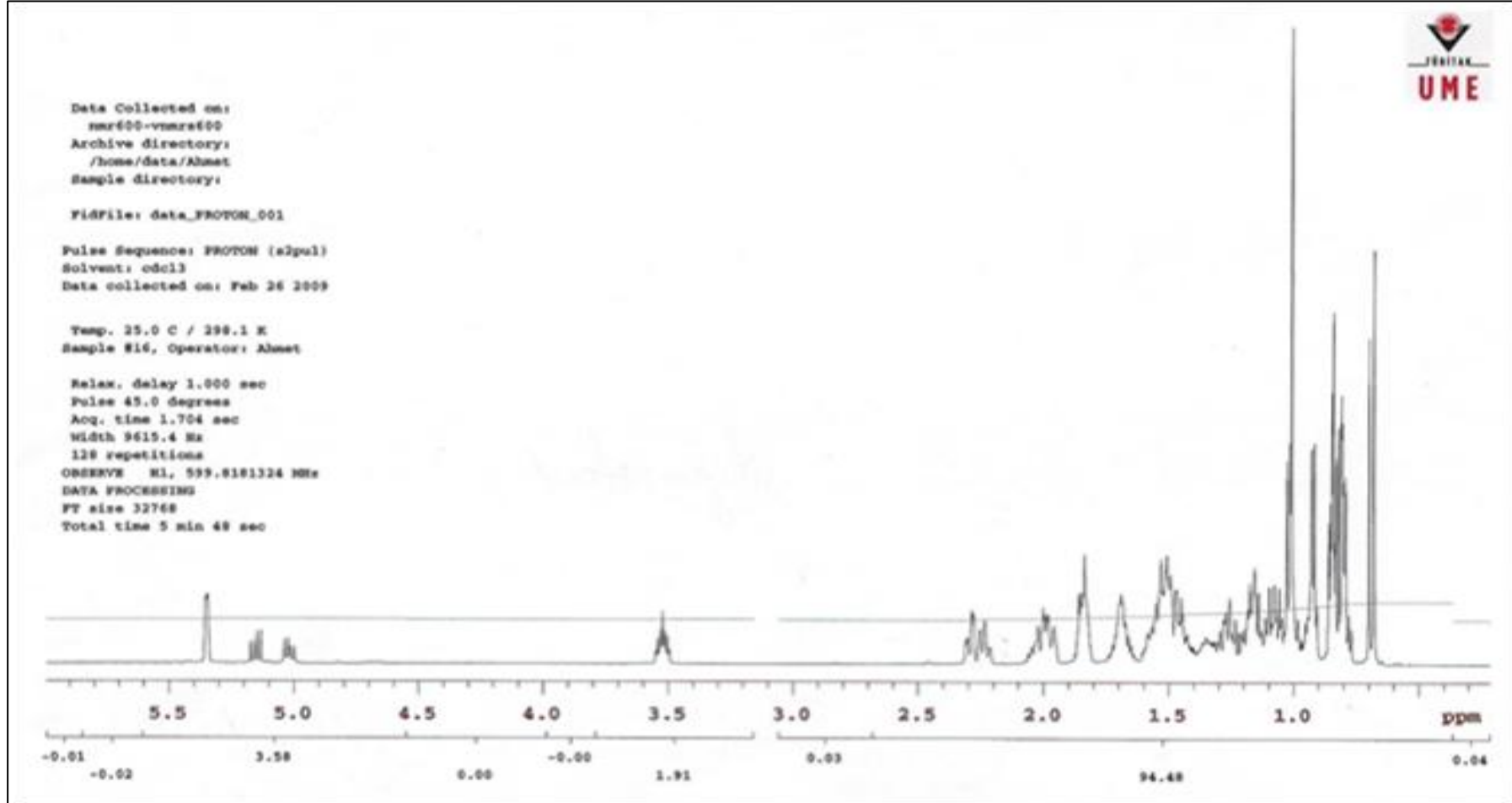
Şekil H.1 : 7 α -asetil- horminon bileşiğinin ^1H NMR spekrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK I.1



Şekil I.1 : β -sitosterol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK J.1



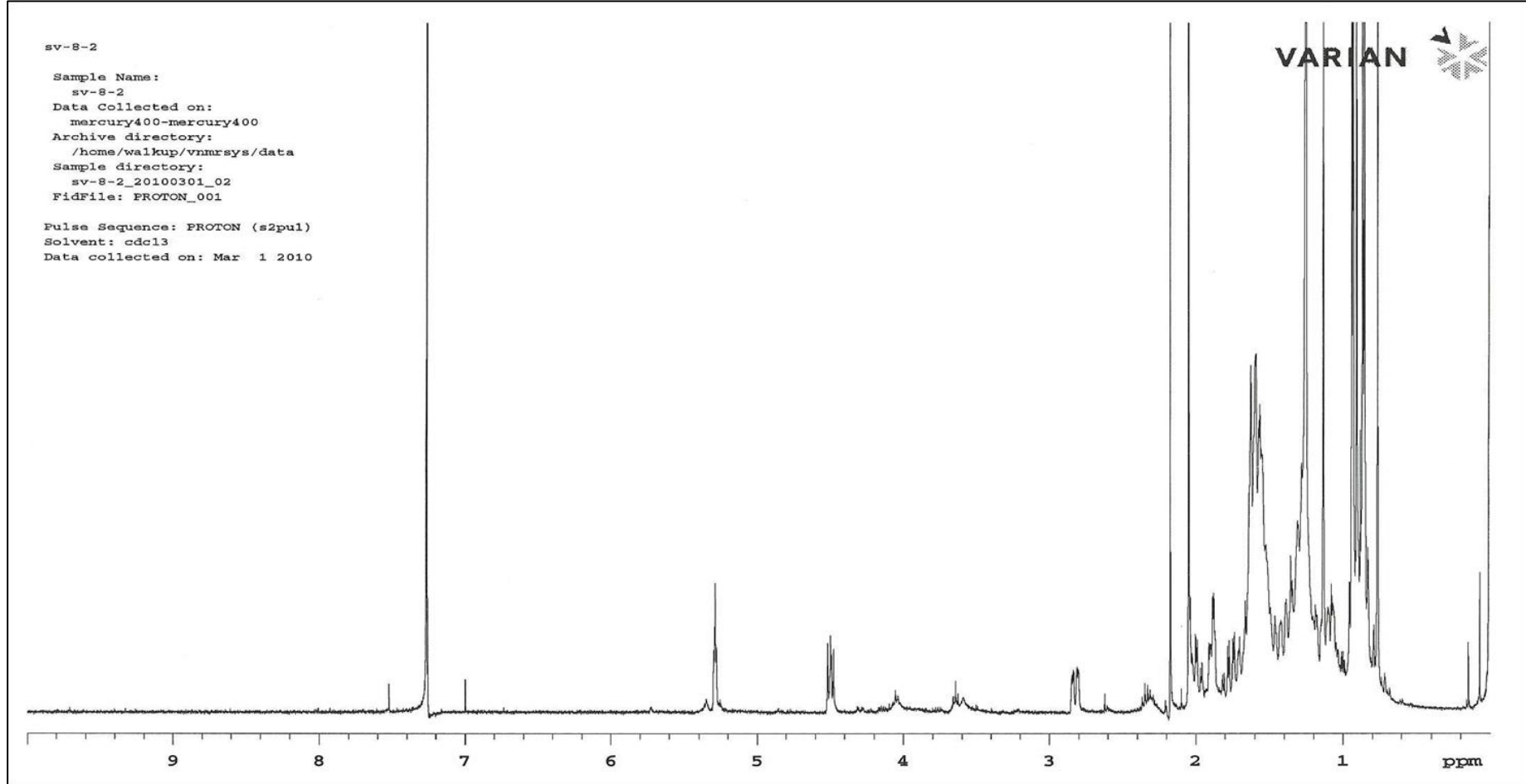
Şekil J.1 : Stigmasterol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 600 MHz)

EK J.2



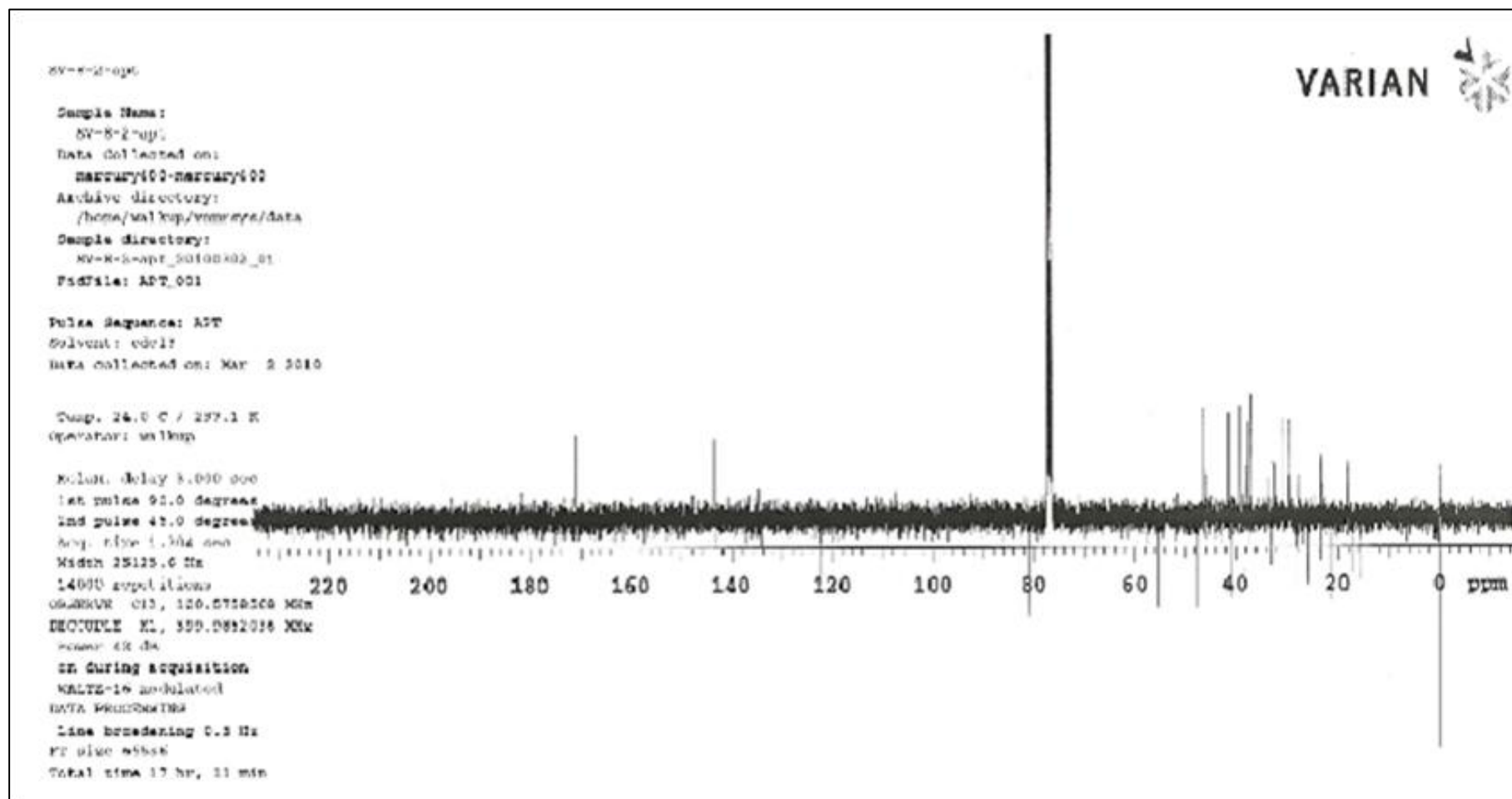
Şekil J.2 : Stigmasterol bileşiminin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 150 MHz)

EK K.1



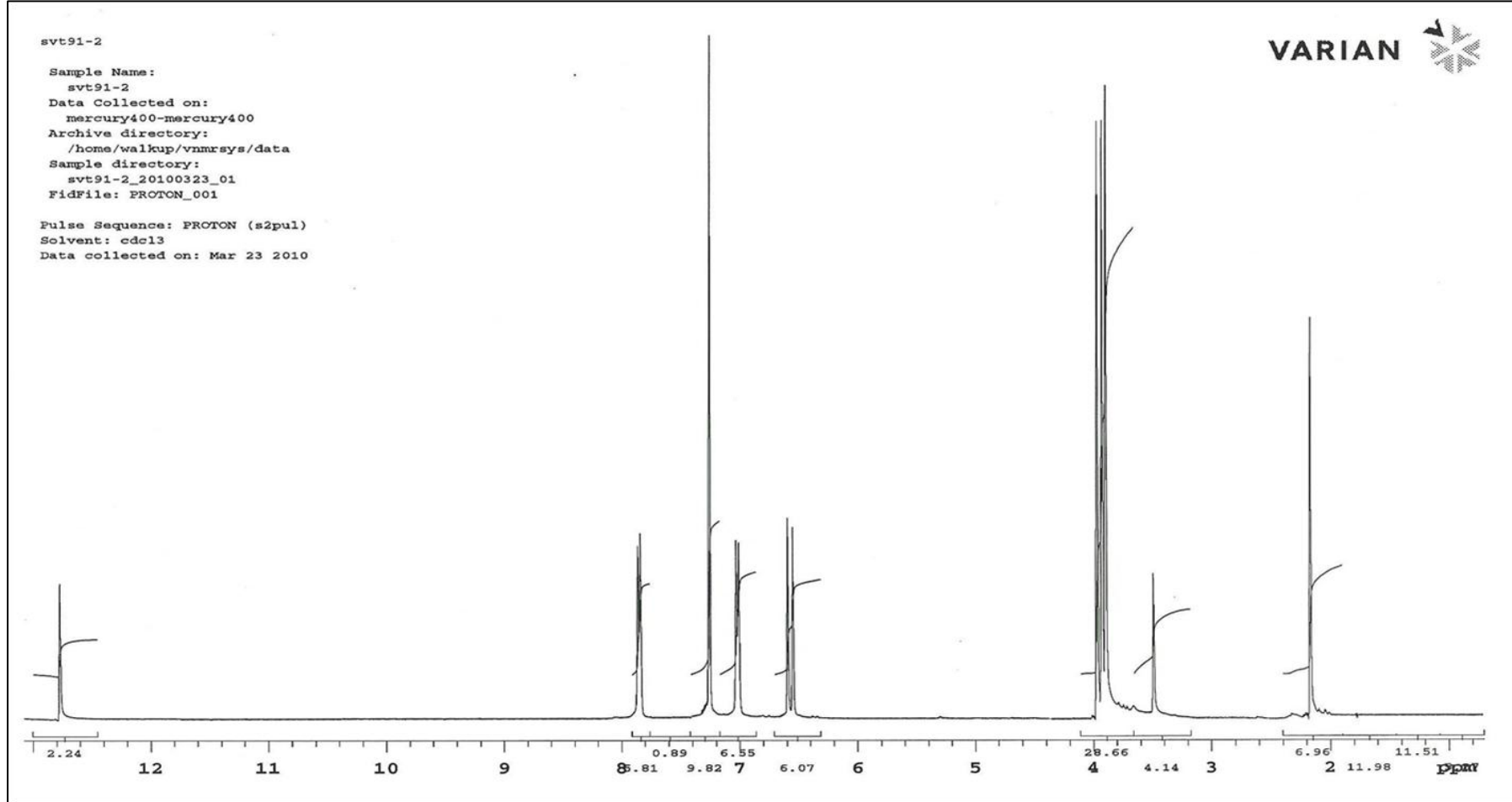
Şekil K.1 : 3-asetil- β -amirin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK K.2



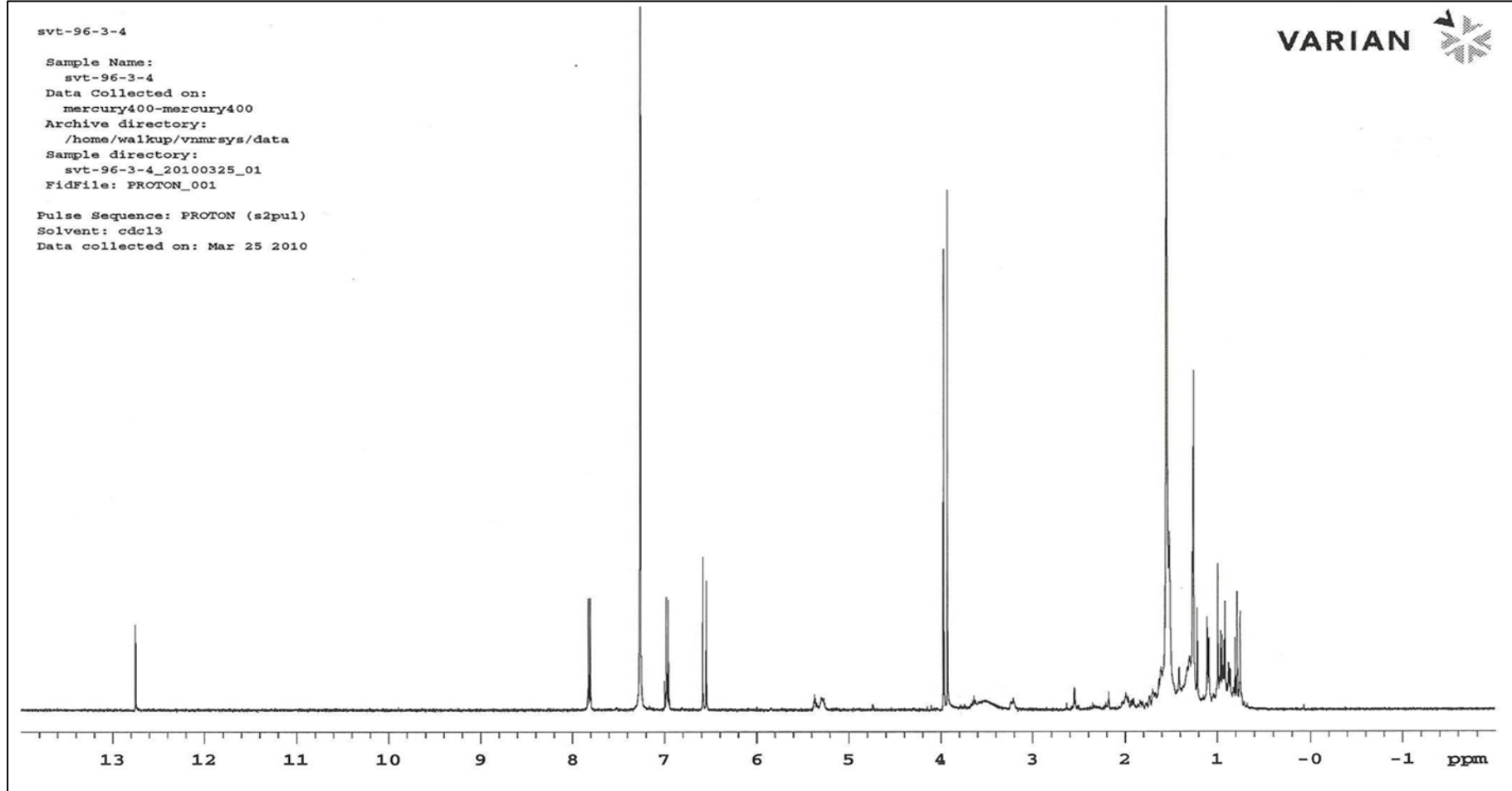
Şekil K.2 : 3-asetil- β -amirin bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 100 MHz)

EK L.1



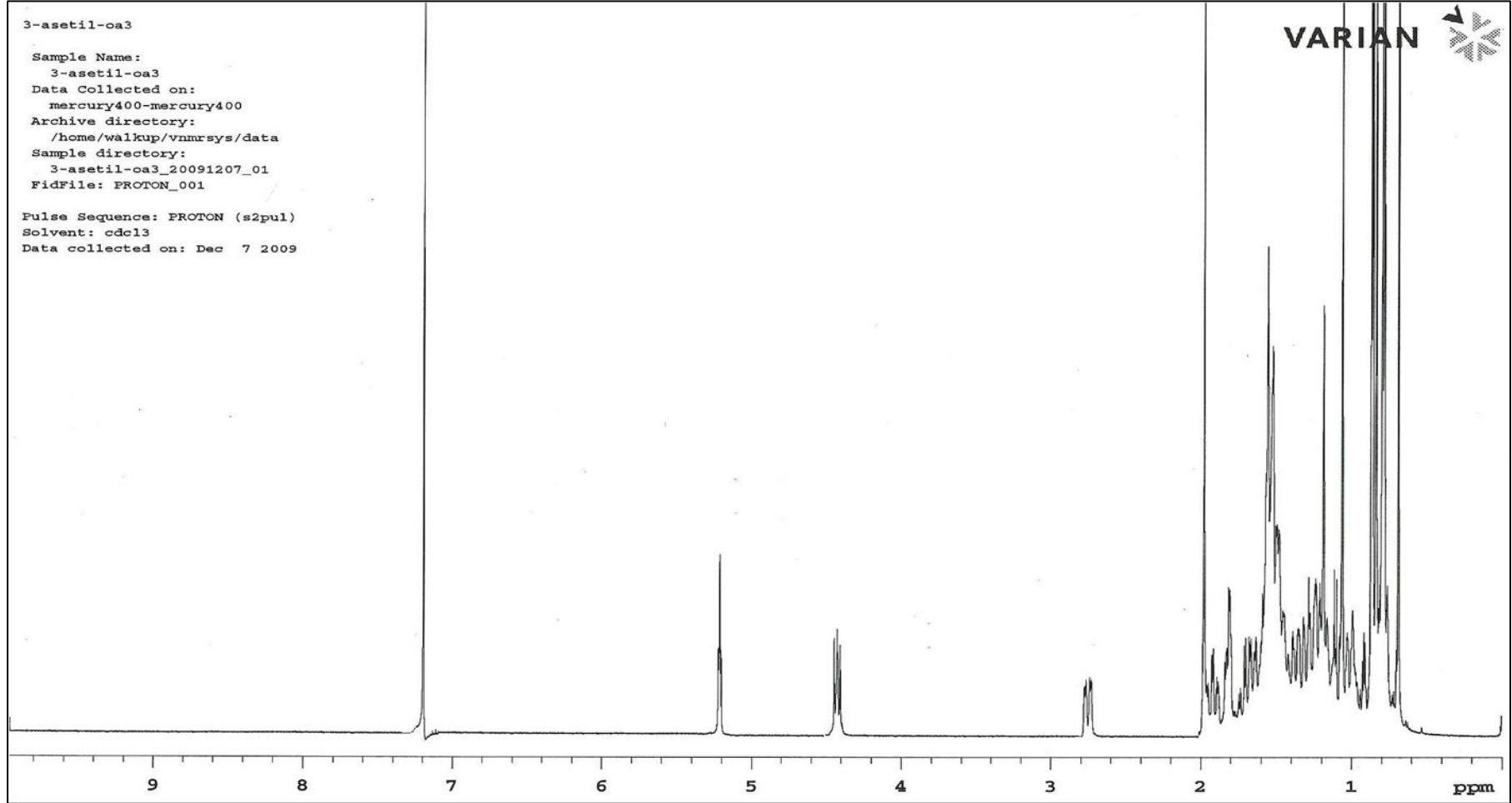
Şekil L.1 : Salvigenin bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK M.1



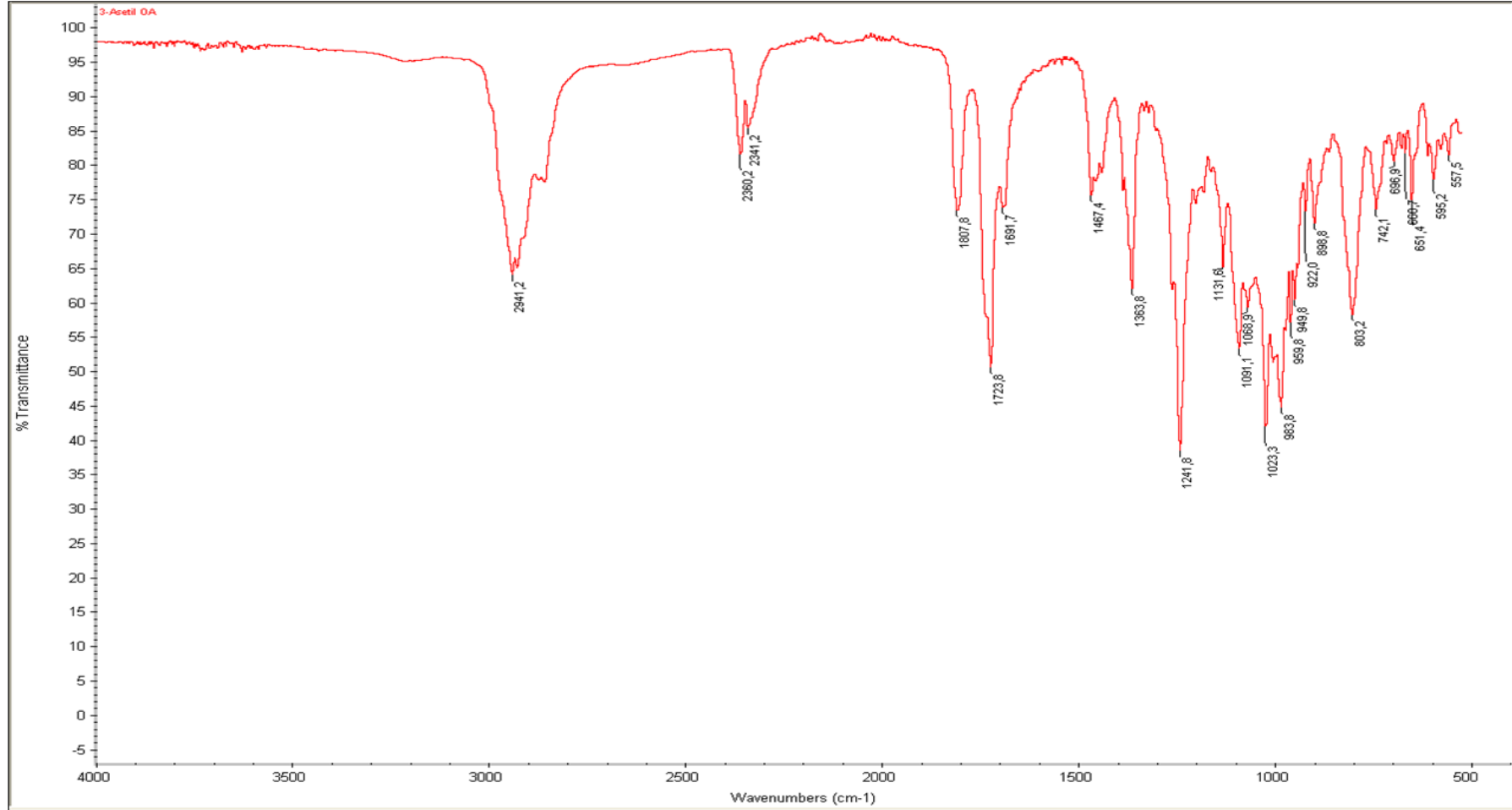
Şekil M.1 : 6-hidroksiapigenin-7,4'-dimetileter bileşiğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400)

EK N.1



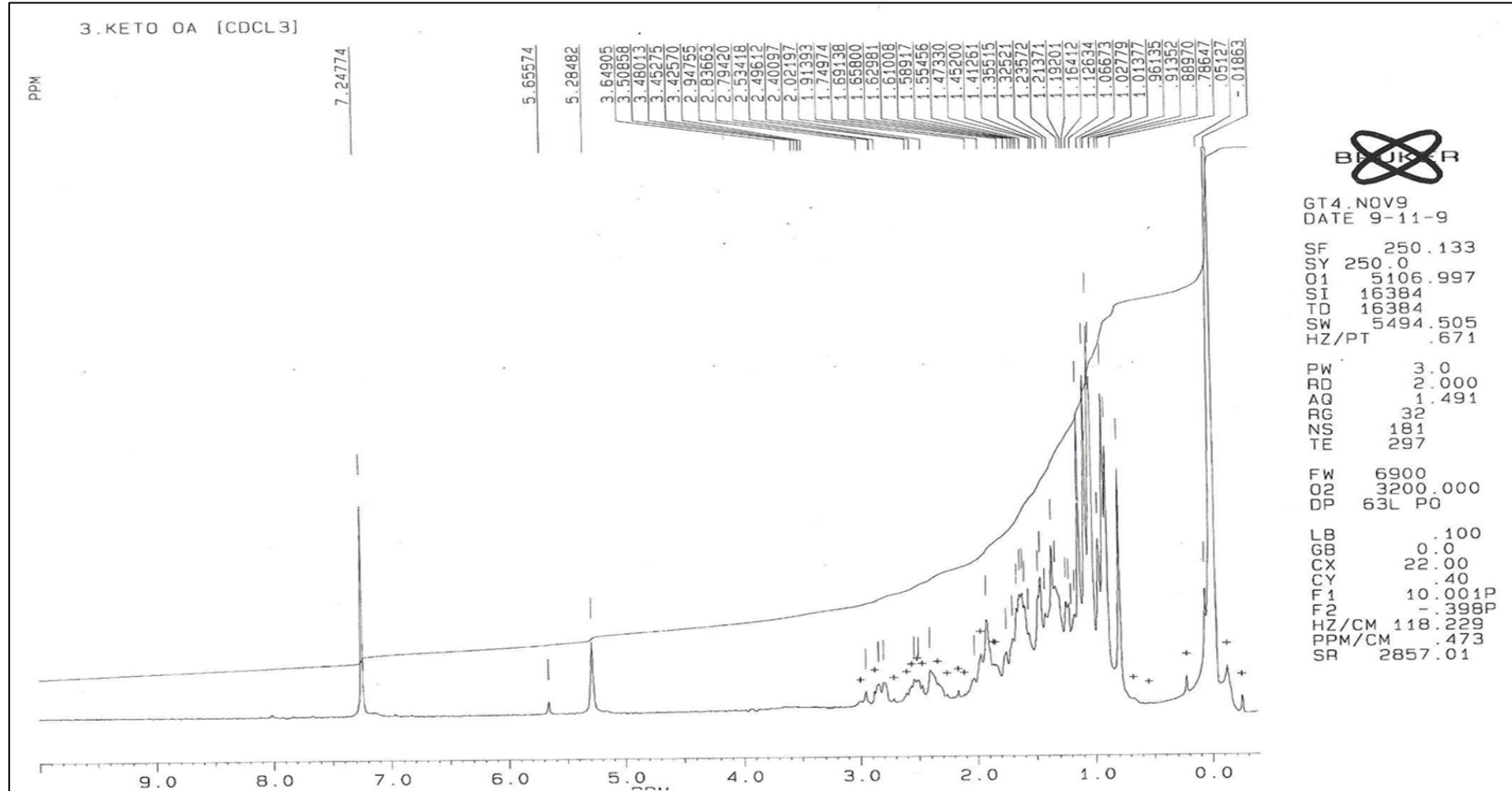
Şekil N.1 : 3-asetil-oleanolik asit bileşiğinin ^1H NMR spektrumu

EK N.2



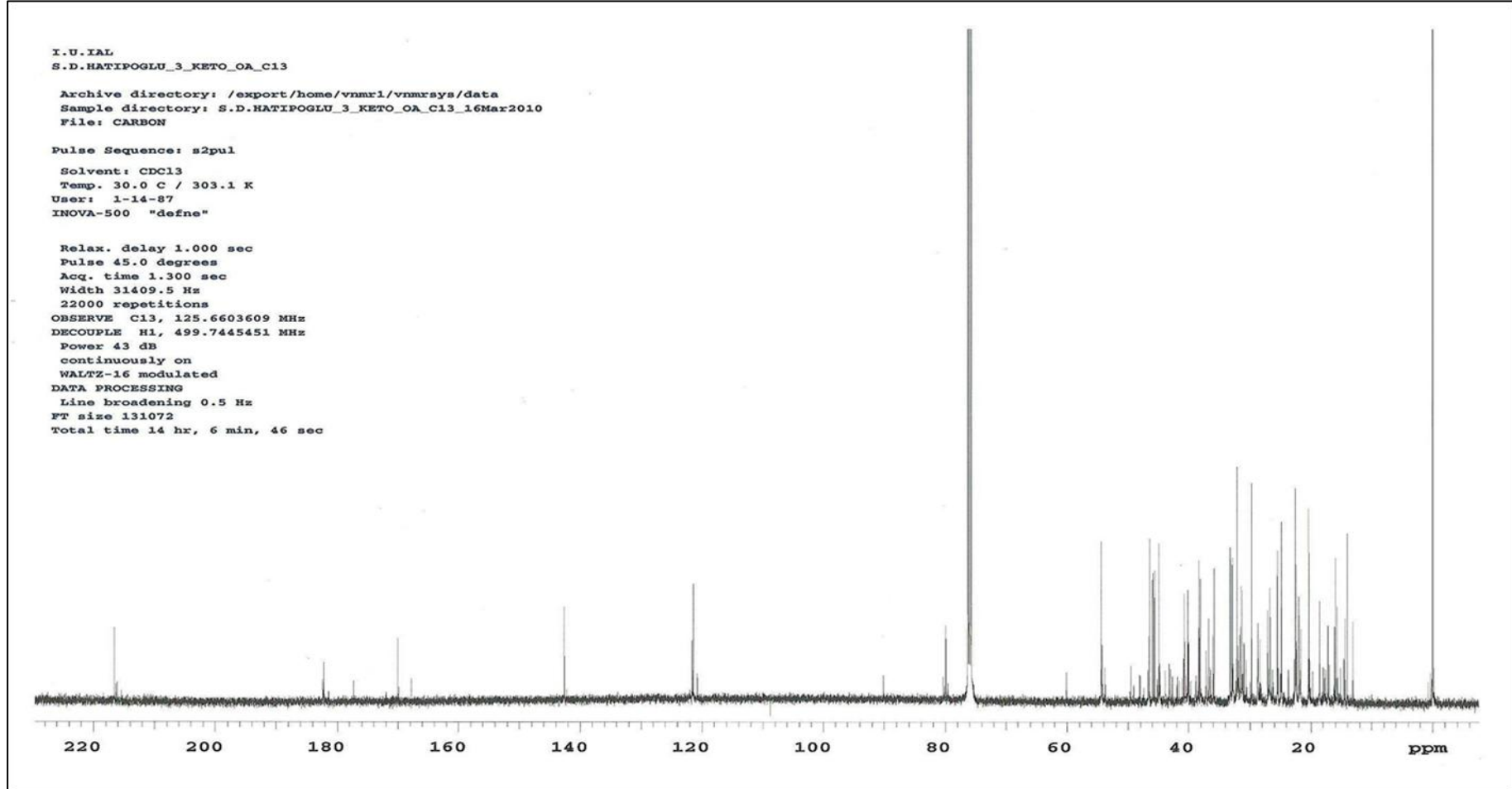
Şekil N.2 : 3-asetil-oleanolik asit bileşiğinin IR spektrumu

EK O.1



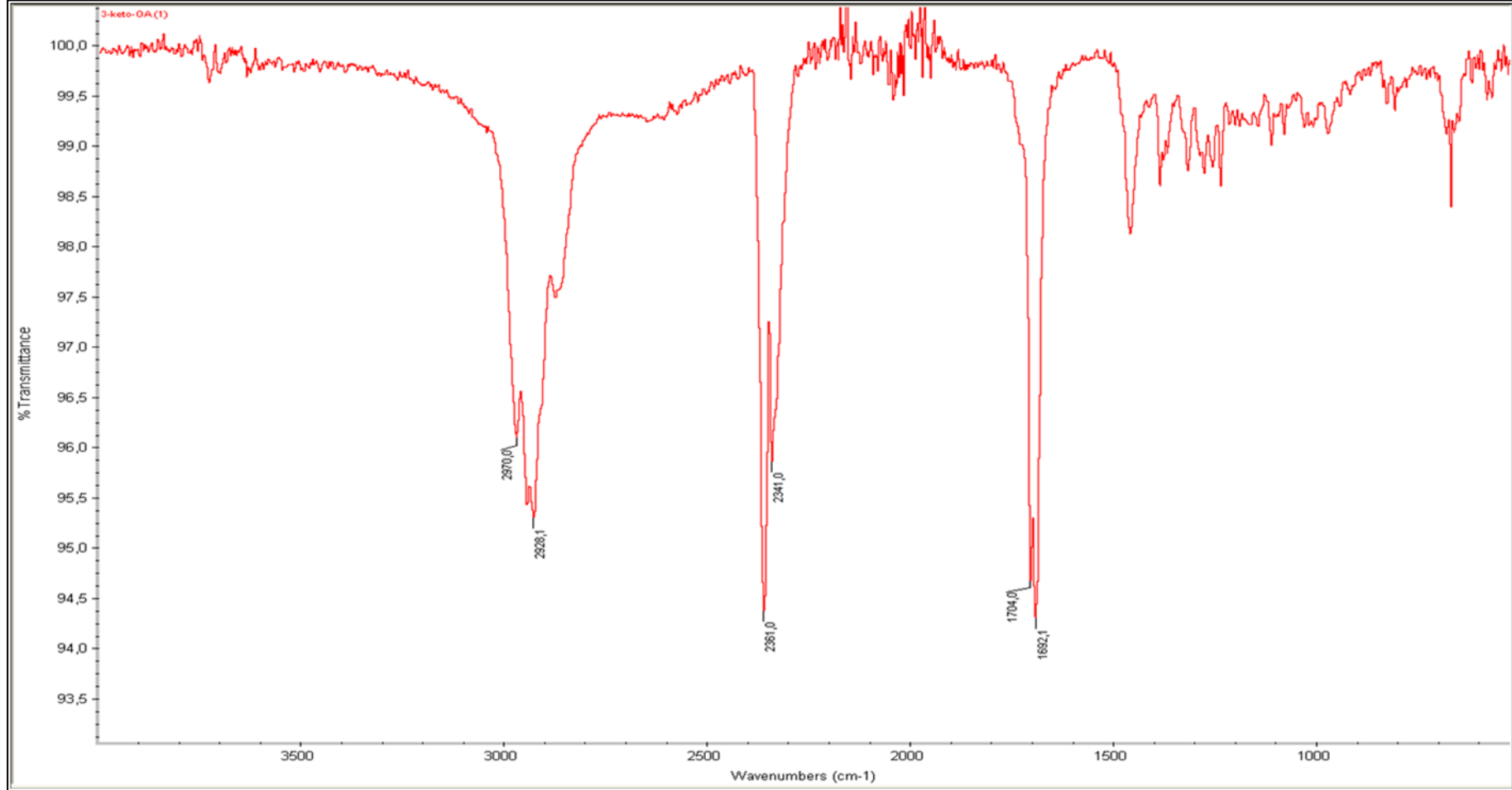
Şekil O. 1 : 3-okso-oleanolik asit ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 250 MHz)

EK O.2



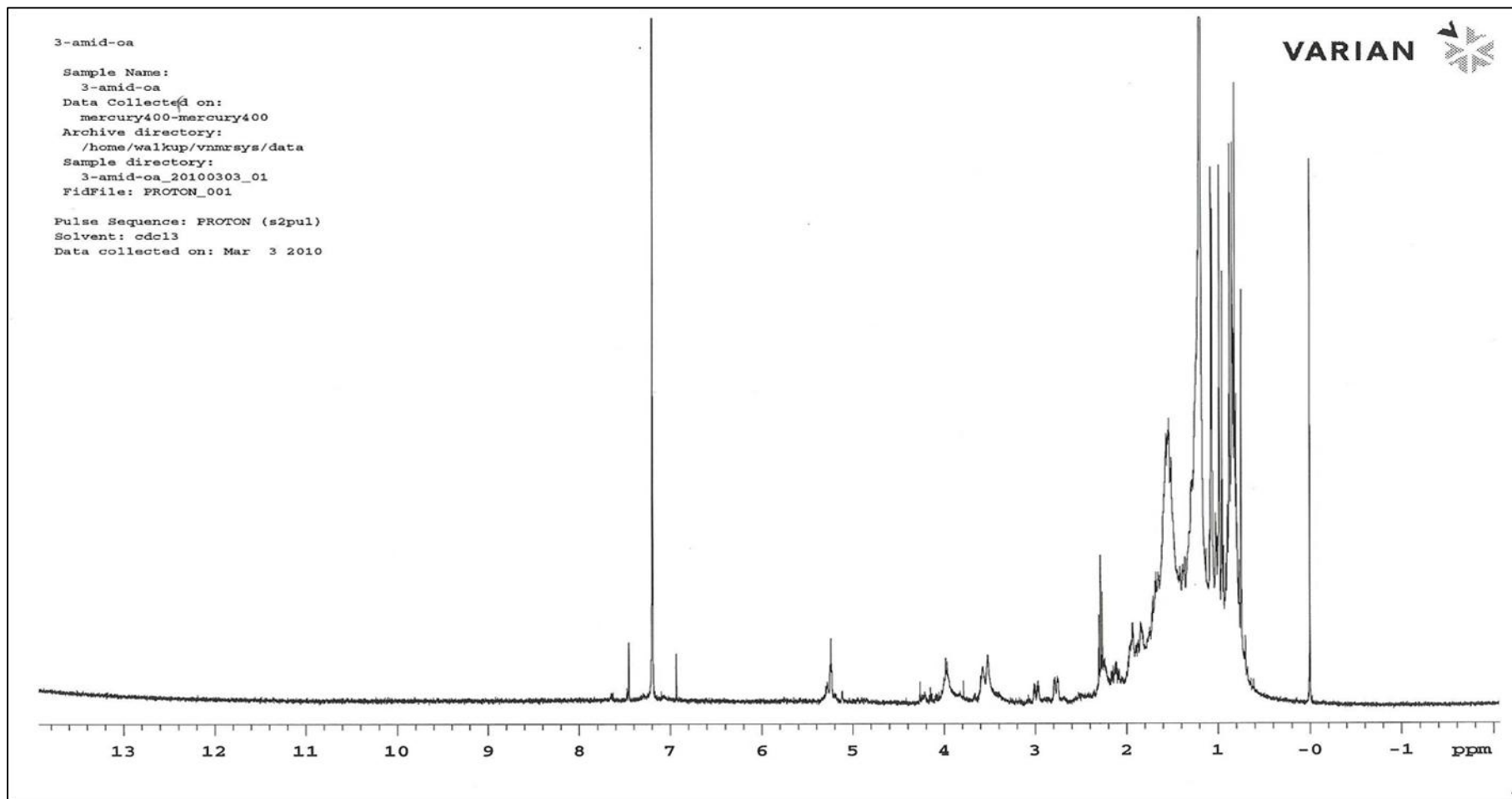
Şekil O.2 : 3-okso-oleanolik asit ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 125 MHz)

EK O.3



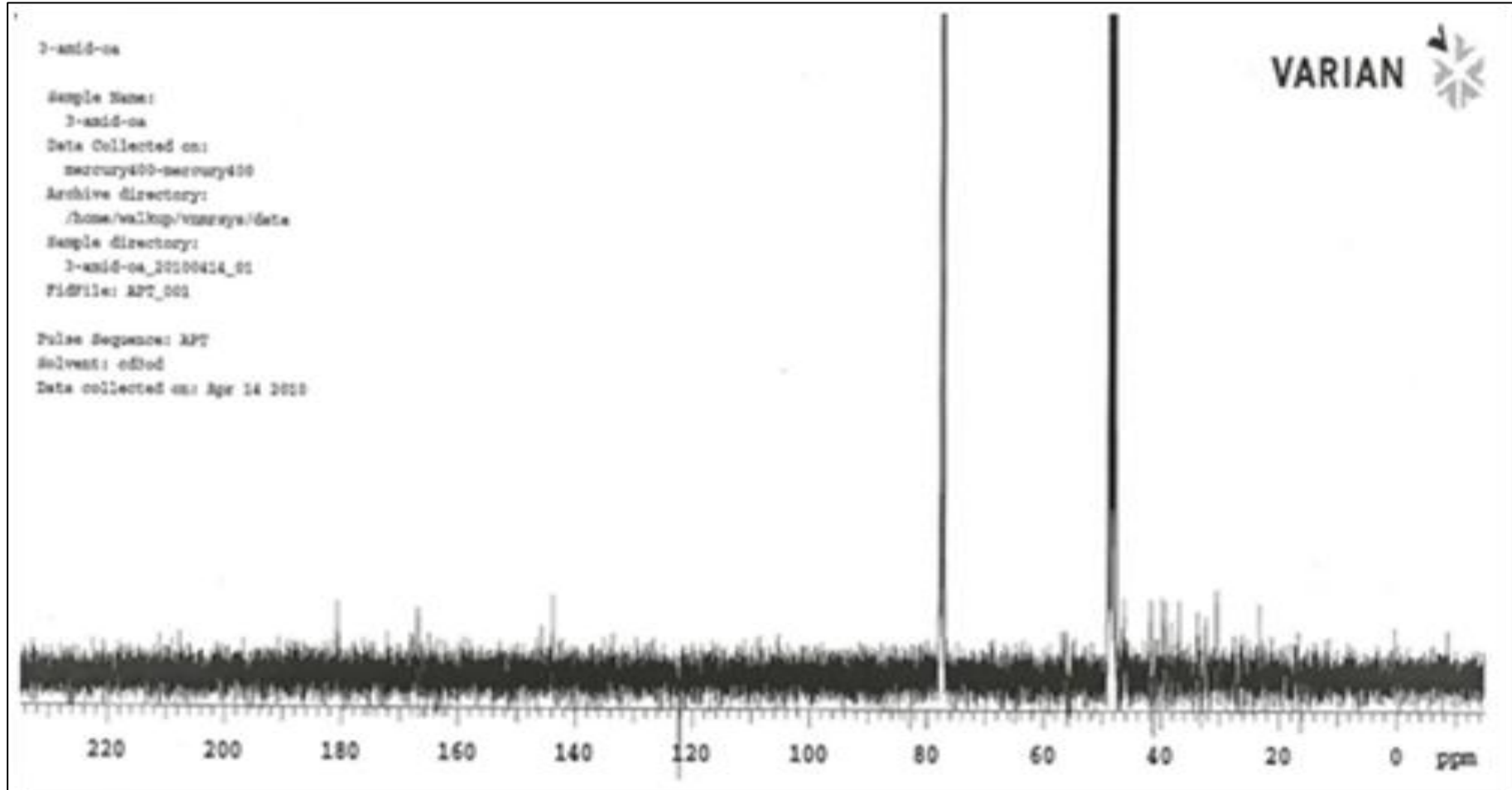
Şekil O. 3 : 3-okso-oleanolik asit bileşiğinin IR spektrumu

EK P.1



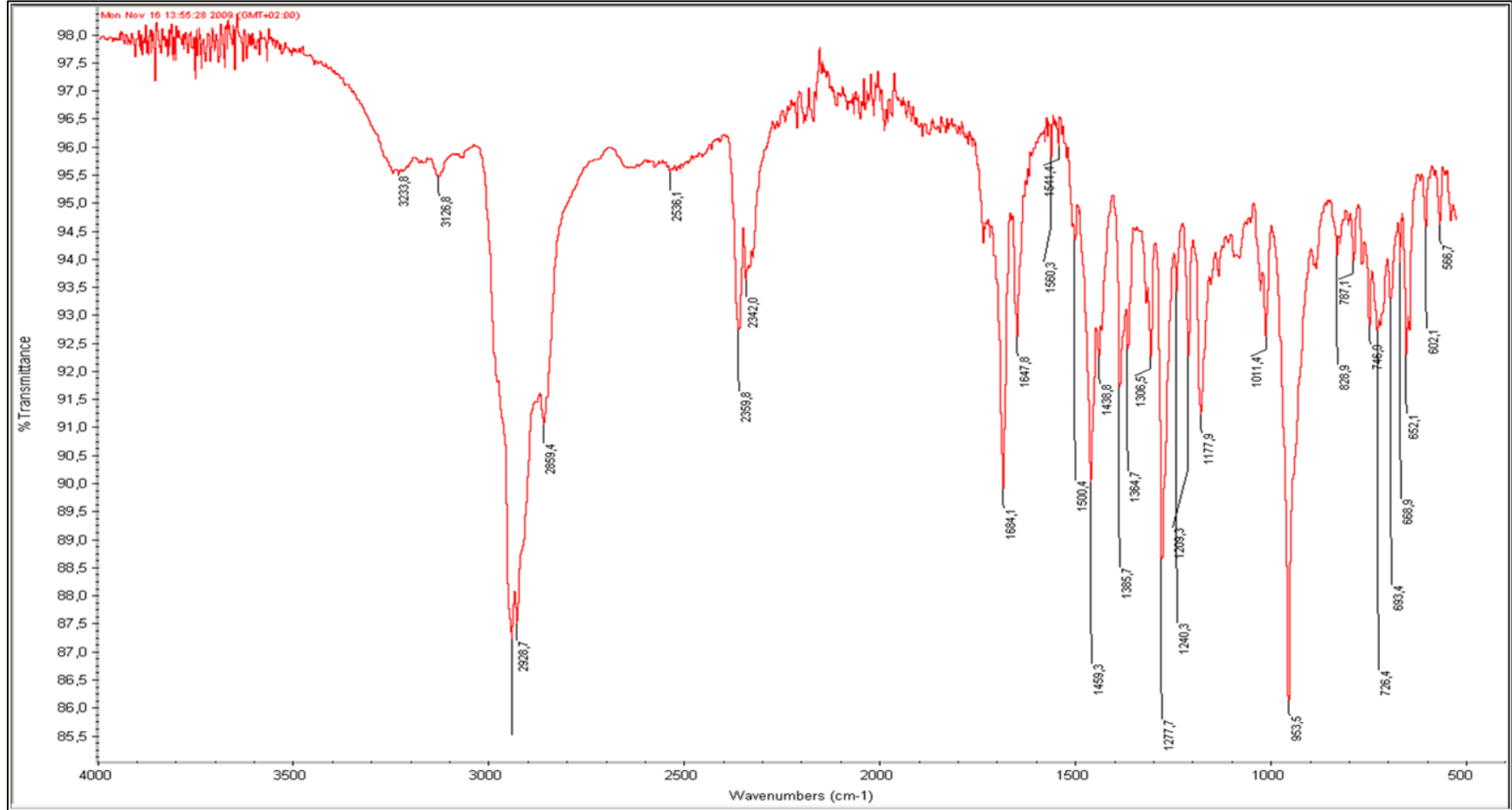
Şekil P.1 : 3-oksım-olean-12-en-28-oik asit bileşğinin ^1H NMR spektrumu (CDCl_3 , 400 MHz)

EK P.2



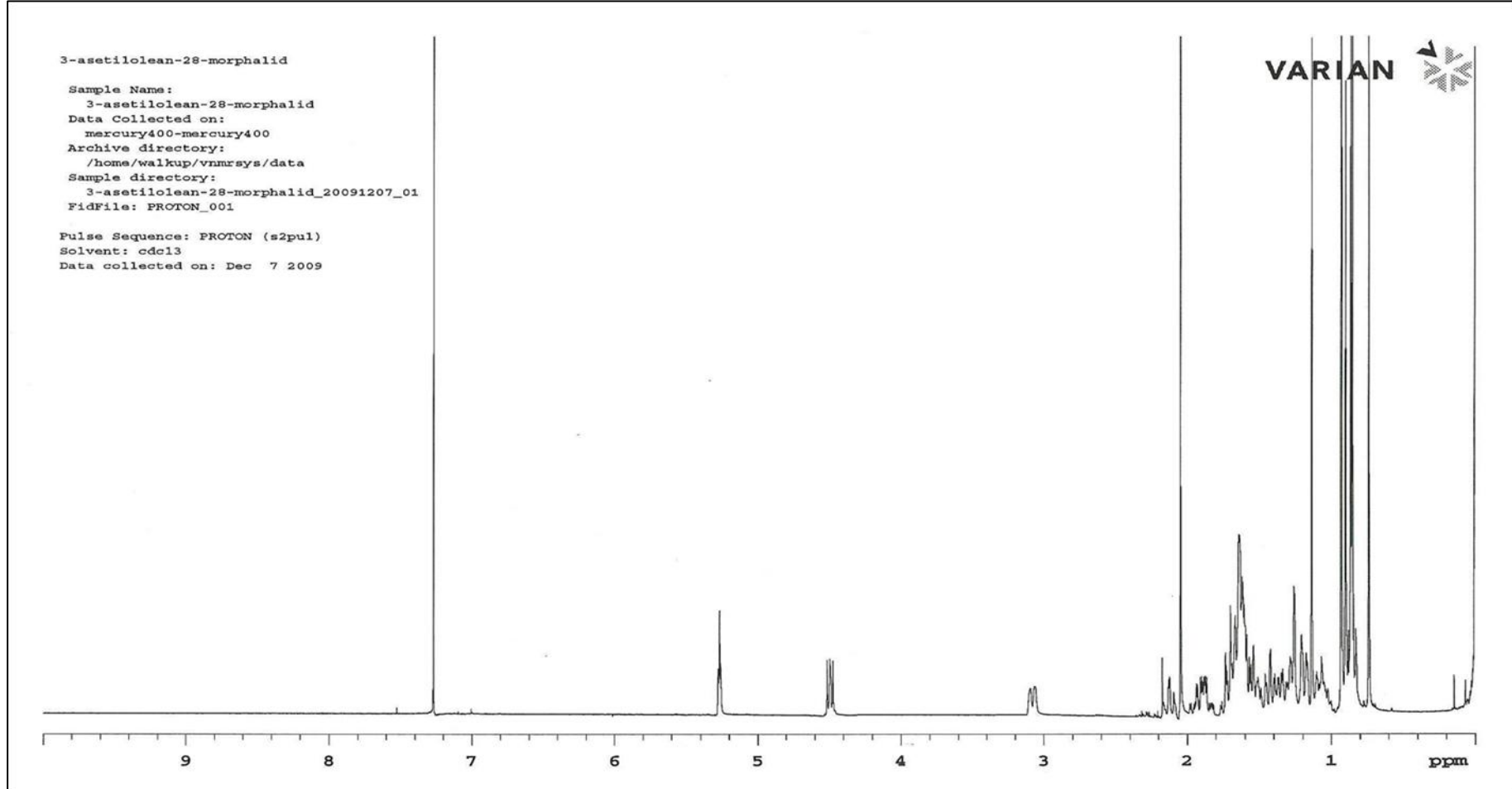
Şekil P.2 : 3-oksım-olean-12-en-28-oik asit bileşğinin ^{13}C (APT) NMR spektrumu (CDCl_3 , $+\text{CD}_3\text{OD}$, 100MHz)

EK P.3



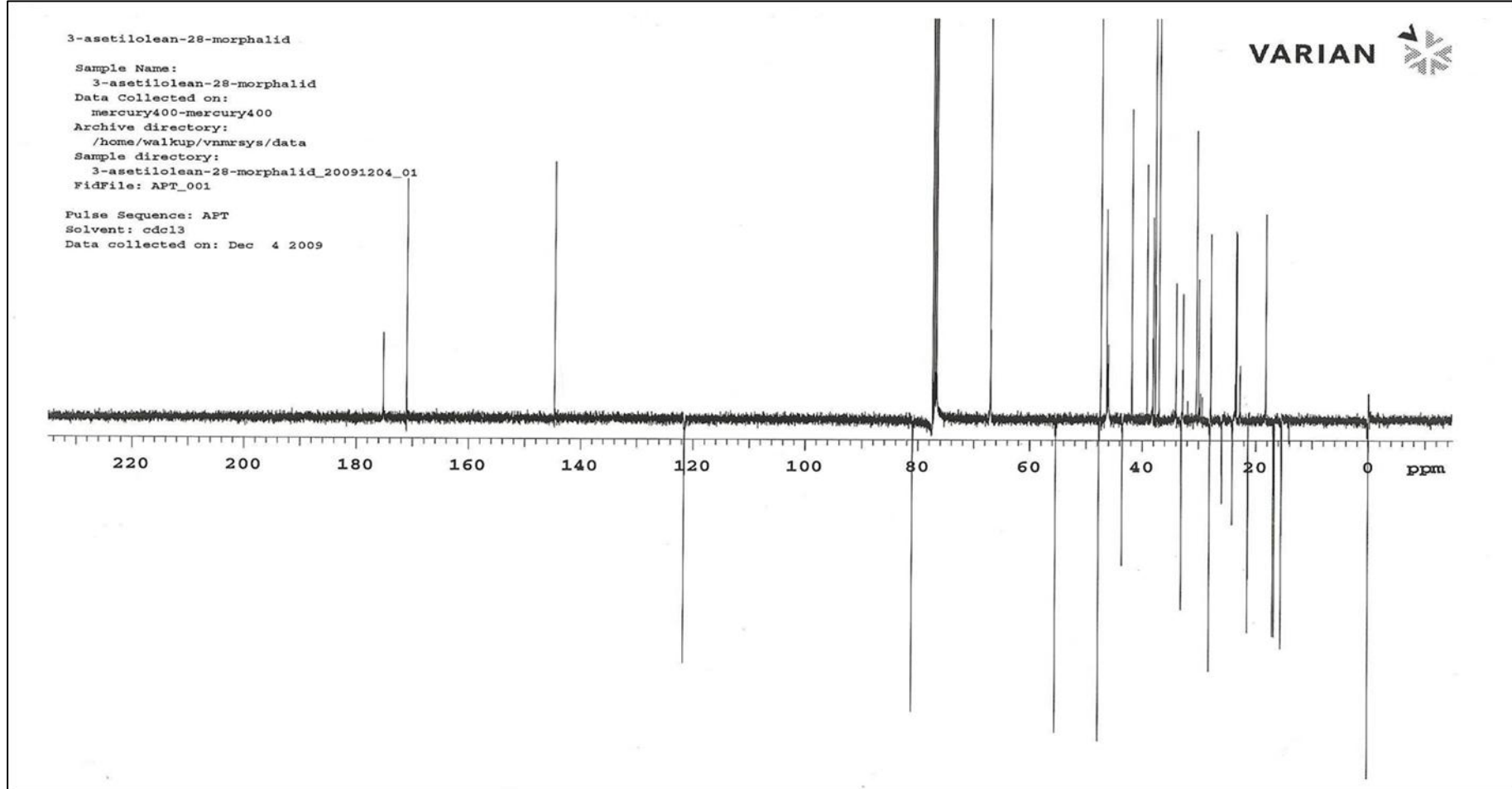
Şekil P.3 : 3-oksım-olean-12-en-28-oik asit bileşğinin IR spektrumu

EK R.1



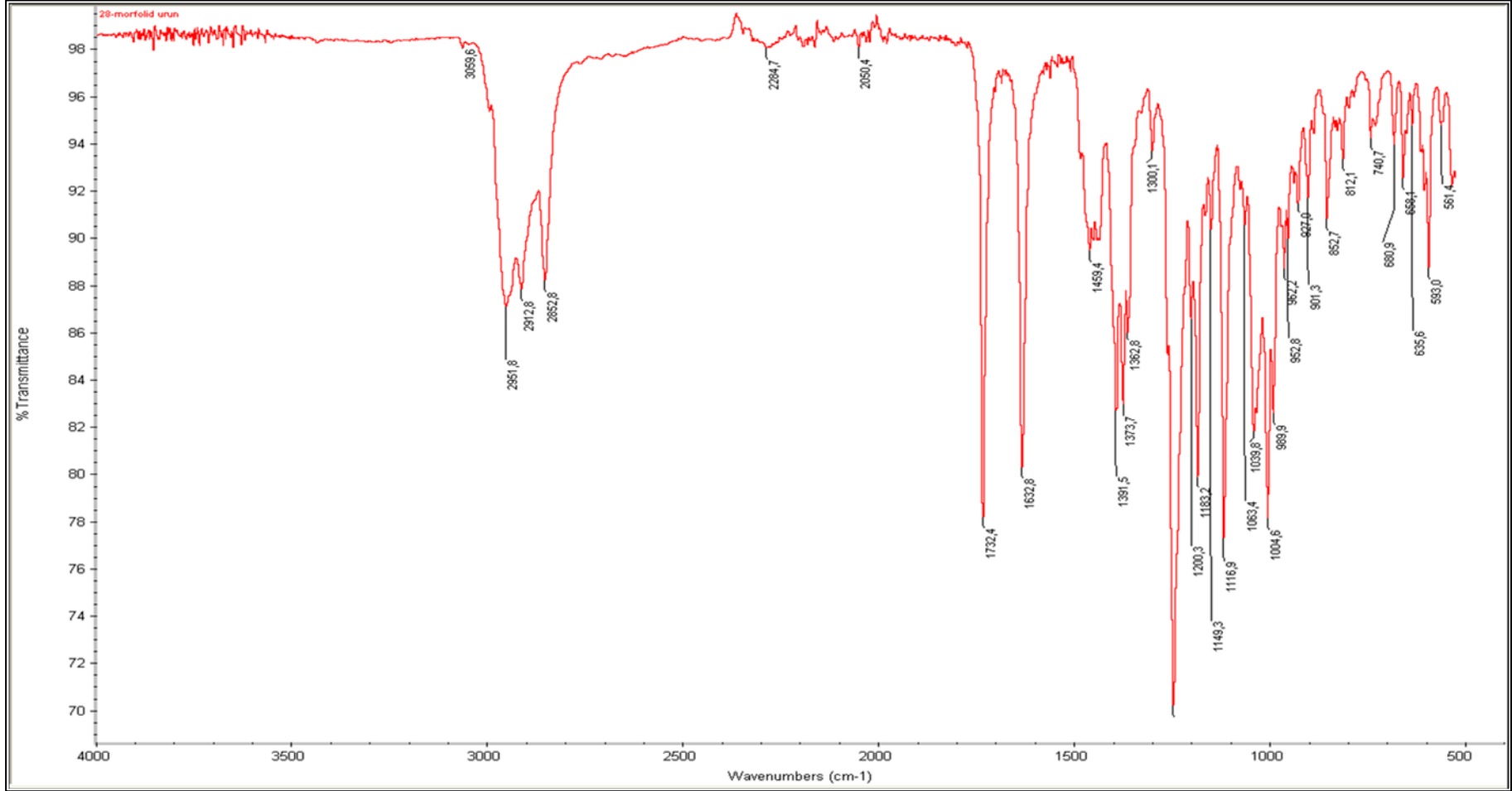
Şekil R.1 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşğinin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 400 MHz)

EK R.2



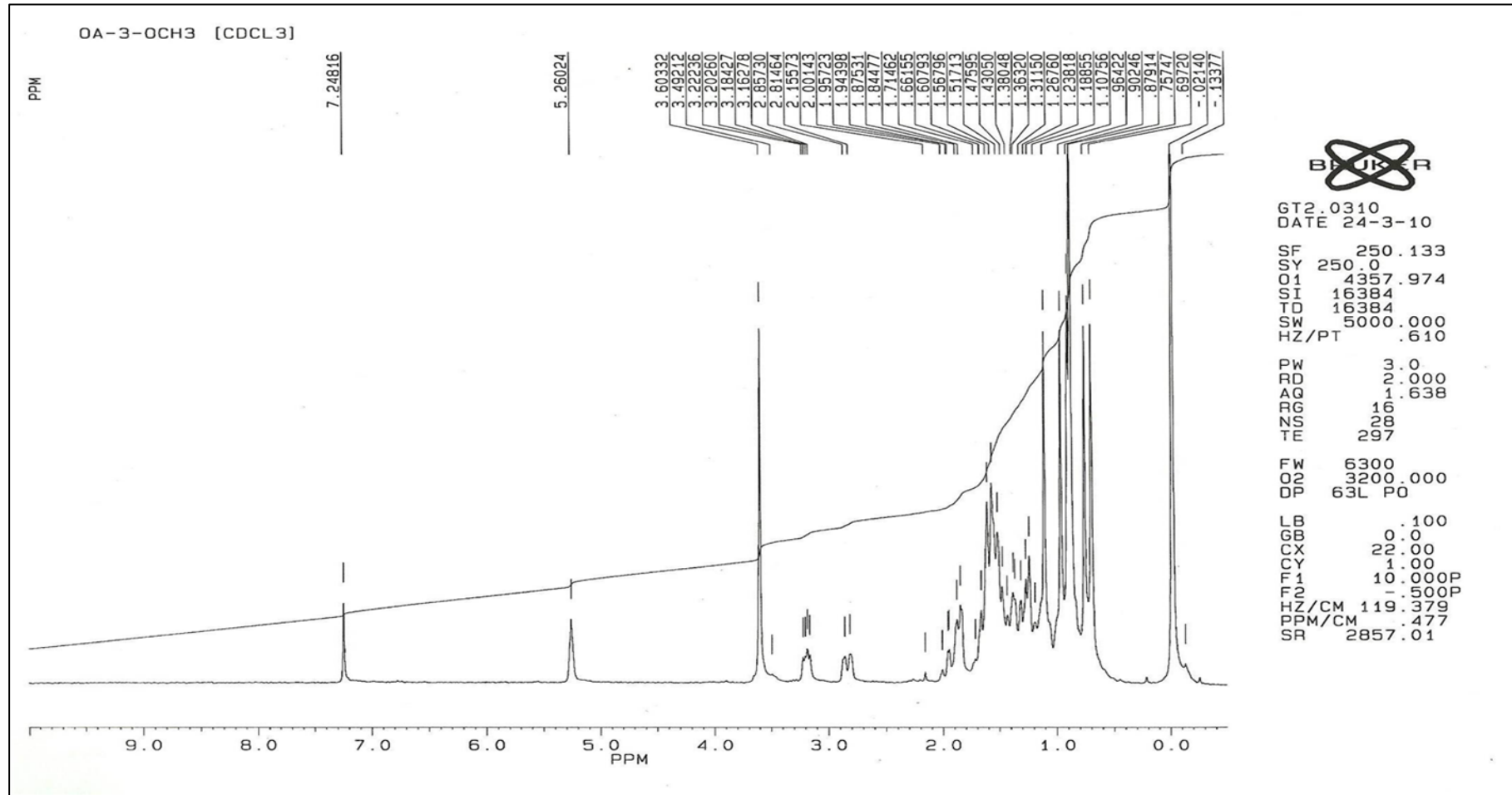
Şekil R.2 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu (CDCl_3 , 100MHz)

EK R.3



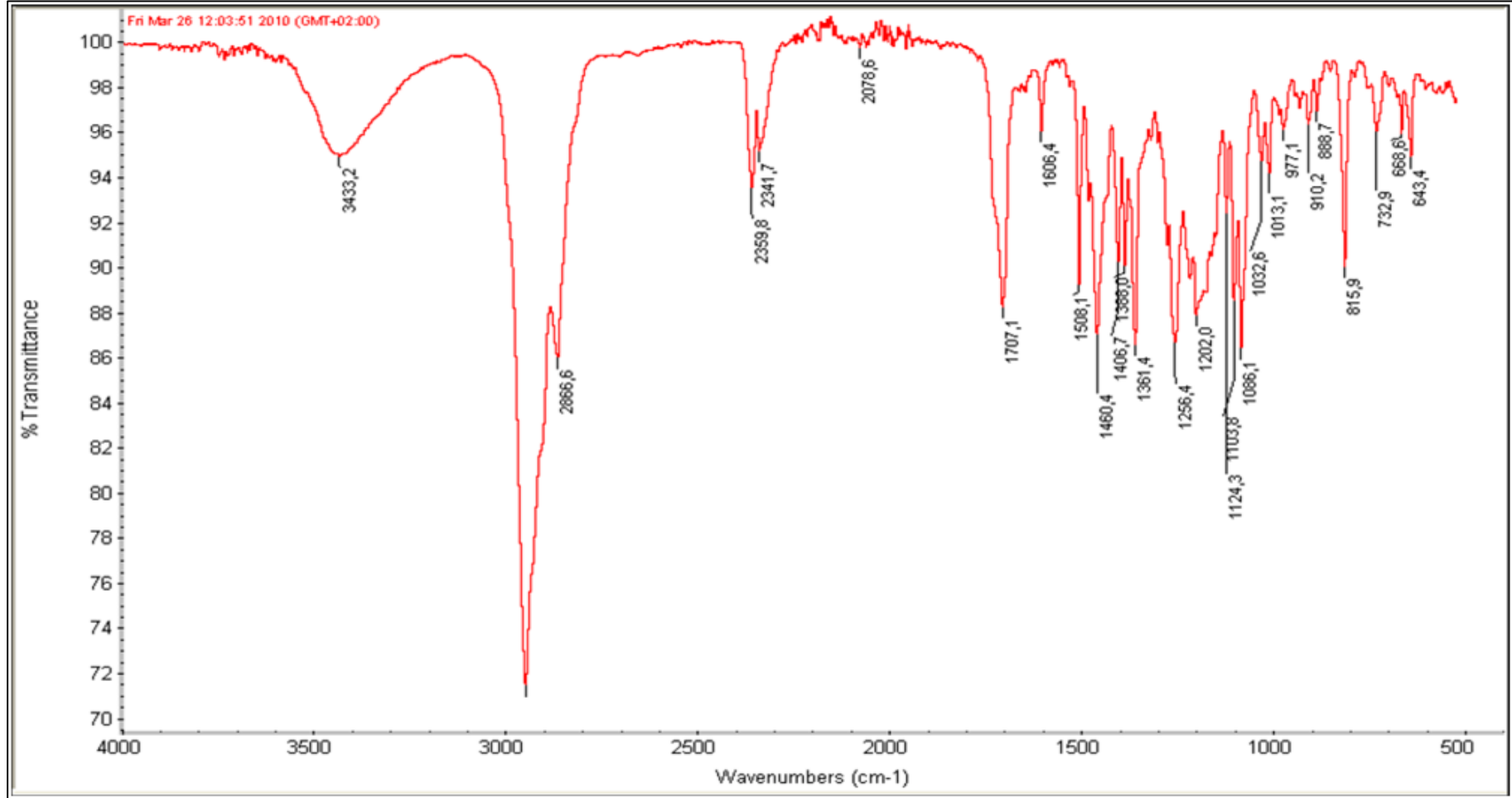
Şekil R.3 : 3-asetil-oleanoil-28-morfolid bileşiğinin IR spektrumu

EK S.1



Şekil S.1 : Oleanolik asit 3-metil eter bileşiğinin ¹H NMR spektrumu (CDCl₃, 250 MHz)

EK S.2



Şekil S.2 : Oleanolik asit 3-metil eter bileşiğinin IR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Seda Damla HATİPOĞLU

Doğum Yeri ve Tarihi: Bursa-1984

Adres:

Lisans Üniversitesi: İstanbul Üniversitesi