

**TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN  
SOLANUM DULCAMARA (SOLANACEAE)  
BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL  
İNCELENMESİ VE ANTİHİPERGLİSEMİK  
AKTİVİTESİNİN TAYİNİ**

**Elif ÇUKUROVA**

**Yüksek Lisans Tezi  
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Temine ŞABUDAK  
2013**

**T.C.**

**NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN SOLANUM DULCAMARA (SOLANACEAE)  
BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İNCELENMESİ VE ANTİHİPERGLİSEMİK  
AKTİVİTESİNİN TAYİNİ**

**Elif ÇUKUROVA**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN: Doç. Dr. Temine ŞABUDAK**

**TEKİRDAĞ-2013**

**Her hakkı saklıdır**

Doç. Dr. Temine ŞABUDAK danışmanlığında, Elif ÇUKUROVA tarafından hazırlanan “Trakya Bölgesinde Yetişen *Solanum dulcamara* (*Solanaceae*) Bitkisinin Fitokimyasal İncelenmesi ve Antihiperglisemik Aktivitesinin Tayini“ isimli bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Kimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Juri Başkanı :

*İmza :*

Üye :

*İmza :*

Üye :

*İmza :*

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu adına

Prof. Dr. Fatih KONUKCU  
**Enstitü Müdürü**

## ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

### TRAKYA BÖLGESİNDE YETİŞEN SOLANUM DULCAMARA (SOLANACEAE) BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL İNCELENMESİ VE ANTİHİPERGLİSEMİK AKTİVİTESİNİN TAYİNİ

Elif ÇUKUROVA

Namık Kemal Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Temine ŞABUDAK

Bu çalışmada, Trakya bölgesinde yetişen *Solanum dulcamara* (*Solanaceae*) bitkisinin ham ekstralarında antihiperглиsemik (antidiabetik) aktivite tayini ile fitokimyasal açıdan incelenmesi, sekonder metabolitlerinin izolasyonu, moleküler yapılarının açıklanması amaçlanmıştır.

Çalışma kapsamında çalışılan *Solanum dulcamara* bitkisi, Trakya bölgesinde Temmuz-Ağustos 2012'de, Edirne (Söğütlük) civarından toplanmıştır. *S. dulcamara* bitkisinin meyve ve yaprakları, n-hekzan, diklorometan, etil asetat ve metanol ile polarite artış sırasına göre oda sıcaklığında maserasyon yöntemine göre ekstrakte edilmiştir. *S. dulcamara*'nın yaprak ve meyvelerinden elde edilen metanol ekstraları, diabeti olan sıçanlar üzerine uygulanarak, ekstraların antihiperглиsemik etkisi araştırılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre, meyve ve yaprak ekstralarının hiperглиsemi üzerine olumlu etkilerinin olmadığı tespit edilmiştir.

Bu çalışmada hem meyve hem de yaprak ekstraları, silikajel dolgu maddeleri içeren kolonlarda, ilk ayırımına tabi tutulmuştur. Buradan elde edilen fraksiyonlara ince tabaka kromatografisi (TLC) uygulanarak, benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. TLC sonucunda, belirlenen alt fraksiyonlar, ters faz kolonlu preparatif HPLC'de saflaştırılmıştır. İzole edilen saf maddelerin yapıları, 1D, 2D NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, DEPT, HMBC, HSQC) teknikleri, IR ve ESI-MS kullanılarak kimyasal yapıları açıklanmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda, *S. dulcamara*'nın yaprak ve meyve eksteresinden, bir biflavonoid (6,2',3'',5'',4'''-pentahidroksi-3,7''-biflavon), üç withanolide, bir steroid bileşiği olmak üzere toplam 5 bileşik izole edilmiştir. Bunlardan, biflavon bileşiği ise, doğal ürünlerden ilk kez izole edilen, yeni bir biflavonoid bileşiği olarak literatüre geçecektir.

**Anahtar Kelimeler:** *Solanaceae*, *Solanum dulcamara*, flavonoid, antihiperглиsemik aktivite, withanolide.

2013, 133 Sayfa

## ABSTRACT

MSc. Thesis

### PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION OF SOLANUM DULCAMARA (SOLANACEAE) PLANT WHICH GROWING IN TRAKYA REGION AND DETERMINATION OF ITS ANTIHYPERGLYCEMIC ACTIVITY

Elif ÇUKUROVA

Namık Kemal University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry

Supervisor : Assoc. Prof.Dr. Temine ŞABUDAK

The aim of this work was the isolation and structure elucidation of flavonoids, and other secondary metabolites from *Solanum dulcamara* (Solanaceae) and investigation of its antioxidant activities.

Plants were collected in their flowering time (July and August 2012) in Edirne (Söğütlük) later it were separated, fruit and leaves. The air dried plant parts (fruit and leaves) were macerated with n-hexane in room temperature. The solvent will be evaporated under vacuum. The residue were be extracted by diethylether, ethyl acetate and methanol, respectively. The methanol extracts of leaves and fruits of *S. dulcamara* were investigated for the antihyperglycemic effect on the diabetic rats. As a result of this study, fruit and leaf extracts have been found not to have beneficial effects on hyperglycemia.

In this work, the methanol extracts of leaves and fruits of *S. dulcamara* were subjected on silicagel/polyamid column and polar subfractions will be applied to the preparative RP-HPLC for the purifications of the polar compounds. For less polar compounds small sized column chromatography were used. Structure elucidation of the purified compounds were carried out by means of spectroscopic techniques such as 1D and 2D NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, DEPT, HMBC, HSQC) techniques, IR and ESIMS.

As the result of this study, it was isolated a biflavonoid (6,2',3",5",4""pentahydroxy-3,7"-biflavon), three withanolides and a steroid compound from the fruit and leaf extract of *S. dulcamara*. The biflavone compound was isolated from natural products for the first time in this study.

**Keywords:** Solanaceae, *Solanum dulcamara*, flavonoid, antihyperglycemic activity, withanolide.

2013, 133 Pages

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

COSY	Correlation Spectroscopy
$\delta$	Kimyasal kayma
d	Dublet
dd	Duble dublet
ddd	Triple dublet
GC	Gaz kromatografisi
HMBC	Heteronuclear Multi Bond Coherence
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
HPTLC	Yüksek performans ince tabaka kromatografisi
Hz	Hertz
IR	İnfrared (Kızıl ötesi)
J	Yarılma sabiti
$\lambda$	Dalga boyu
m	Multiplet
MHz	Megahertz
MS	Kütle spektroskopisi
$\nu$	Frekans
NA	Naturstoffreagenz reaktifi
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
ppm	Per part million
t	Triplet
TLC	İnce tabaka kromatografisi
UV	Ultraviyole (Mor ötesi)

# İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET .....	i
ABSTRACT.....	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
<b>1. GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI.....</b>	<b>1</b>
<b>2. KURUMSAL TEMELLER VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....</b>	<b>4</b>
2.1. Bitkinin Tanımı, Yayılışı ve Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	4
2.1.1. <i>Solanaceae</i> Familyasının Özellikleri.....	4
2.1.2. Trakya Bölgesinde <i>Solanaceae</i> Familyası.....	6
2.1.3. <i>Solanum</i> Cinsinin Genel Özellikleri.....	6
2.1.4. <i>Solanum dulcamara</i> Türünün Genel Özellikleri.....	7
2.1.5. <i>Solanaceae</i> Familyası Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	9
2.1.6. <i>Solanum</i> Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	13
2.1.7. <i>Solanum dulcamara</i> Türü Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	21
2.2. Flavonoidler.....	24
2.2.1. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşu ve Kullanımları.....	24
2.2.2. Flavonoidlerin Yapısal Özellikleri ve Sınıflandırılması.....	26
2.2.3. Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri.....	28

2.2.4. Flavonoidlerin Biyosentezi.....	29
2.2.5. Flavonoidlerde Yapı Çeşitliliği.....	31
2.3. Flavonoid ve Fenolik Bileşiklerin Ayırma ve Saflaştırma Metodları.....	34
2.3.1. Ekstraksiyon Teknikleri.....	34
2.3.2. Flavonoid ve Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Analiz Yöntemleri.....	38
2.3.2.1. Kağıt Kromatografisi.....	38
2.3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi.....	41
2.3.2.3. Kolon Kromatografisi.....	43
2.3.2.4. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi).....	45
2.4. Flavonoid ve Fenolik Bileşiklerin Yapı Açıklama Yöntemleri.....	46
2.4.1. Ultraviyole Spektroskopisi.....	46
2.4.2. İnfrared Spektroskopisi.....	48
2.4.3. <sup>1</sup> H-NMR Spektroskopisi.....	48
2.4.4. <sup>13</sup> C-NMR Spektroskopisi.....	49
2.4.5. Kütle Spektroskopisi.....	49
2.5. Steroidler.....	51
2.5.1. Steroidlerin Tanınmaları.....	52
2.6. Şeker Hastalığı ( <i>Diabetes Mellitus</i> ).....	52
2.6.1. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi.....	52
2.6.2. Diabetes Mellitus'un Tanımı.....	53
2.6.3. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması.....	53
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>57</b>
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	57



3.2. Kullanılan Cihazlar.....	57
3.2.1. UV Lambası.....	57
3.2.2. Infrared Spektrofotometresi.....	57
3.2.3. HPLC.....	57
3.2.4. NMR Spektrometresi.....	57
3.2.5. Kütle Spektrometresi.....	57
3.3. Kullanılan Belirteçler.....	58
3.4. Deneysel Bölüm.....	58
3.4.1. Bitkinin Toplanması.....	58
3.4.2. Bitkinin Ekstraksiyonu.....	58
3.4.3. Yaprak ve Meyve Ekstrelerinde Antihiperглиsemik Aktivite Tayini.....	59
3.4.3.1. Akut Toksikite Testi.....	59
3.4.3.2. Diyabetes Mellitusun İndüksiyonu.....	60
3.4.3.3. Deneysel Model.....	60
3.4.3.4. İstatistiksel Analiz.....	61
3.4.5. İzolasyon ve Saflaştırma.....	61
3.4.5.1. <i>Solanum dulcamara</i> Bitkisinin Meyve-Metanol Ekstresi.....	61
3.4.5.2. <i>Solanum dulcamara</i> Bitkisinin Yaprak-Metanol Ekstresi.....	62
<b>4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....</b>	<b>63</b>
4.1. Yaprak ve Meyve Ekstrelerinde Antihiperглиsemik Aktivite Tayini.....	63
4.1.1. Akut Toksikite Testi.....	63
4.1.2. Diyabetes Mellitusun İndüksiyonu.....	63
4.2. Flavonoidler.....	64

4.2.1. 1 Numaralı Bileşik (SDMM-A): 6,2',3",5",4"pentahidroksi-3,7"-biflavon.....	64
4.3. Steroidler.....	77
4.3.1. 2 Numaralı Bileşik (SDMM-420-b-1): 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide.....	77
4.3.2. 3 Numaralı Bileşik (SDMM-420-b-3): 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide.....	91
4.3.3. 4 Numaralı Bileşik (YME-B): 6,16,23-trihidroksi-withanolide.....	103
4.3.4. 5 Numaralı Bileşik (YME-51-a): $\beta$ –Sitosterol.....	116
4.4. Elde edilen bileşiklerin spektral özellikleri.....	118
4.4.1. Flavonoidler.....	118
4.4.1.1. 1 Numaralı Bileşik: (SDMM-A) 6,2',3",5",4"pentahidroksi-3,7"-biflavon.....	118
4.4.2. Steroidler.....	118
4.4.2.1. 2 Numaralı Bileşik (SDMM-420-b-1): 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide.....	118
4.4.2.2. 3 Numaralı Bileşik (SDMM-420-b-3) 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide.....	119
4.4.2.3. 4 Numaralı Bileşik (YME-B): 6,16,23-trihidroksi-withanolide.....	120
4.4.2.4. 5 Numaralı Bileşik (YME-51-a) $\beta$ -Sitosterol.....	120
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....</b>	<b>121</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>124</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>132</b>
<b>TEŞEKKÜR.....</b>	<b>133</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. <i>Solanum dulcamara</i> yaprak.....	8
Şekil 2.2. <i>Solanum dulcamara</i> çiçek.....	8
Şekil 2.3. <i>Solanum dulcamara</i> olgunlaşmış ve olgunlaşmamış meyve.....	9
Şekil 2.4. 6 $\alpha$ -chloro-5 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihydroxywithaferin A bileşiği.....	9
Şekil 2.5. Phyperunolide A bileşiği.....	10
Şekil 2.6. 28-hydroxywithanolide E bileşiği.....	10
Şekil 2.7. Perulactone C bileşiği.....	11
Şekil 2.8. 5 $\beta$ , 6 $\alpha$ , 14 $\alpha$ , 17 $\beta$ , 20 $\beta$ -pentahydroxy-1oxo-20S,20R-witha-2,24-dienolide bileşiği.....	11
Şekil 2.9. 7 $\beta$ ,16 $\alpha$ -diacetoxy-4 $\beta$ ,20R-dihydroxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide bileşiği.....	12
Şekil 2.10. (4S,22R)-16 $\alpha$ -acetoxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-4 $\beta$ ,17 $\alpha$ - dihydroxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide bileşiği.....	13
Şekil 2.11. a) Ethyl $\beta$ -D-thevetopyranosyl-(1-4)- $\beta$ -D-oleandropyranoside bileşiği b) Ethyl- $\beta$ -D-thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-oleandropyranoside bileşiği.....	13
Şekil 2.12. Kamferol bileşiği.....	15
Şekil 2.13. m-kumarik asit bileşiği.....	15
Şekil 2.14. Quersetin-3-O-glukozid bileşiği.....	16
Şekil 2.15. O-methylsolanocapsine bileşiği.....	20
Şekil 2.16. $\beta$ -solamarin bileşiği.....	21
Şekil 2.17. 15 $\alpha$ -hidroksi-soladulcidin bileşiği.....	21
Şekil 2.18. a) Sitosterol bileşiği b) Stigmasterol bileşiği.....	22
Şekil 2.19. a) Kampesterol bileşiği b) Kolestrol bileşiği.....	22

Şekil 2.20. a) Soladulcoside A bileşiği b) Soladulcoside B bileşiği.....	23
Şekil 2.21. a) Solanine bileşiği b) Solasodine bileşiği.....	23
Şekil 2.22. Quercetin-3-rhamnoglucoside.....	24
Şekil 2.23. Genel flavonoid iskeleti.....	26
Şekil 2.24. Flavonoid bileşiklerinin farklı iskelet yapıları ile oluşan sınıfları.....	27
Şekil 2.25. 2-fenilbenzopiran yapısı.....	28
Şekil 2.26. Flavonoid bileşiklerinin biyosentezi.....	30
Şekil 2.27. Flavonoid bileşiklerinin benzoil (A) ve sinnoil (B) halkası.....	31
Şekil 2.28. Flavonoid yapılarında süstitüentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları.....	33
Şekil 2.29. Biflavonoid bileşiklerine örnekler.....	34
Şekil 2.30. Bitki örneklerinden seçici ekstraksiyon yöntemi ile izolasyon şeması.....	36
Şekil 2.31. Fenolik bileşiklerin bitkilerden izolasyonu için ikinci yöntem.....	37
Şekil 2.32. Flavonoidlerde Retro-Diels Alder parçalanması.....	50
Şekil 2.33. Flavonoidlerin ikinci parçalanma yolu.....	50
Şekil 2.34. Siklopentanoperhidrofenantren yapısı.....	51
Şekil 2.35. Kolesterol'ün yapısı.....	52
Şekil 4.1. 6,2',3",5",4""pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin yapısı.....	64
Şekil 4.2. 6,2',3",5",4""pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin HMBC etkileşimleri.....	67
Şekil 4.3. 6,2',3",5",4""pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	68
Şekil 4.4. 6,2',3",5",4""pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	69
Şekil 4.5. 6,2',3",5",4""pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	70
Şekil 4.6. 6,2',3",5",4""pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	71
Şekil 4.7. 6,2',3",5",4""pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin DEPT spektrumu.....	72

Şekil 4.8. 6,2',3",5",4"'pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin HSQC spektrumu.....	73
Şekil 4.9. 6,2',3",5",4"'pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu.....	74
Şekil 4.10. 6,2',3",5",4"'pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin ESI-MS spektrumu.....	75
Şekil 4.11. 6,2',3",5",4"'pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin ESI-MS spektrumu.....	75
Şekil 4.12. 6,2',3",5",4"'pentahidroksi-3,7"-biflavon bileşiğinin HMBC spektrumu.....	76
Şekil 4.13. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin yapısı.....	77
Şekil 4.14. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin HMBC etkileşimleri.....	79
Şekil 4.15. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin IR spektrumu.....	79
Şekil 4.16. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	80
Şekil 4.17. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	81
Şekil 4.18. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	82
Şekil 4.19. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	83
Şekil 4.20. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin DEPT spektrumu.....	84
Şekil 4.21. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin HSQC spektrumu.....	85
Şekil 4.22. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu.....	86
Şekil 4.23. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu.....	87
Şekil 4.24. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin ESI-MS spektrumu.....	88
Şekil 4.25. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin HMBC spektrumu.....	89
Şekil 4.26. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin HMBC spektrumu.....	90
Şekil 4.27. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin yapısı.....	91
Şekil 4.28. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC etkileşimleri.....	93
Şekil 4.29. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin IR spektrumu.....	93
Şekil 4.30. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	94

Şekil 4.31. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	95
Şekil 4.32. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin DEPT spektrumu.....	96
Şekil 4.33. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HSQC spektrumu.....	97
Şekil 4.34. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu.....	98
Şekil 4.35. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu.....	99
Şekil 4.36. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin ESI-MS spektrumu.....	100
Şekil 4.37. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin ESI-MS spektrumu.....	100
Şekil 4.38. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC spektrumu.....	101
Şekil 4.39. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC spektrumu.....	102
Şekil 4.40. 6,16,23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin yapısı.....	103
Şekil 4.41. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC etkileşimleri.....	105
Şekil 4.42. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin IR spektrumu.....	105
Şekil 4.43. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	106
Şekil 4.44. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	107
Şekil 4.45. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup> H NMR spektrumu.....	108
Şekil 4.46. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	109
Şekil 4.47. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin DEPT spektrumu.....	110
Şekil 4.48. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HSQC spektrumu.....	111
Şekil 4.49. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu.....	112
Şekil 4.50. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY spektrumu.....	113
Şekil 4.51. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin ESI-MS spektrumu.....	114
Şekil 4.52. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC spektrumu.....	115
Şekil 4.53. β -Sitosterol bileşiğinin yapısı.....	116

Şekil 4.54.  $\beta$ -Sitosterol bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu.....117

## 1.GİRİŞ VE ÇALIŞMANIN AMACI

Varoluşundan beri insan, etrafında olan biten her şeyi anlamaya, sistemini çözmeye, hayatın tüm bilinmezliklerini keşfetmeye çalışmış ve işe yakın çevresinden başlamıştır. Paleolitik dönemde insanlar kendi besinlerini üretemedikleri için çevresinde bulunan sebze, meyve, çiçek veya köklerle beslenmeye çalışmışlardır. Bu çalışmaları deneme yanılma yoluyla yapmış ve zamanla kendisine zarar vermeyen ya da zarar verenleri ayırt etmiştir.

Git gide çevresindeki bitkileri yakından tanımış ve farklı amaçlarla da kullanmaya başlamıştır. Bitkilerin boyama özelliğini keşfetmesiyle de kıyafetlerini, kullandıkları kap kaçaklarını, halılarını ve kilimlerini renklendirmiştir. Tarih öncesi çağlarda bile sanatla iç içe yaşayan insanoğlu yaşadıklarını mağara duvarlarına resmetmiştir ve bunu yaparken de yine bitkilerden yararlanmıştır.

Bugün sıklıkla tükettiğimiz çayında keşfide yıllar öncesine dayanır. M.Ö. 2737 yılında Çin İmparatoru Shen Yung sıcak suyun üstüne düşen çay yaprağının demlenmesine şahit olmasıyla çay insanlık tarihindeki yerini almış olur.

Ateşin keşfinden sonra ağaç ve çalıları yakan insanlar bazı bitkilerin güzel kokular yaydığını fark etti ve uzun uğraşlarının sonucunda tütsüyü yapmayı öğrendiler. Çinliler'in Neolitik Dönem'de tütsü yakmayı bildiği ve M.Ö. 2000'den itibaren de dinsel amaçla kullandıkları tarihi belgelerle kanıtlanmıştır. Güzel kokuları seven insanoğlunun parfümle tanışması da Sümerler'in damıtma ve ekstraksiyon tekniklerini keşfi sayesinde olmuştur. Sümerler, damıtma cihazını M.Ö. 3500' den sonra kullandıkları biliniyor.

Bitkilerin bu şekilde iyi niyetli kullanımlarının yanı sıra kötü amaçlı kullanımları da sürekli karşımıza çıkmaktadır. Tarih boyunca yürütülen entrikaların, politik cinayetlerin gizli kahramanları hep bitkilerden hazırlanan zehirler olmuştur.

İnsanoğlu yaşadığı hastalıkları tedavi etmek içinde yine çevresinde bulduğu bitkilerden yararlanmıştır. Değişik bitkilerin farklı kısımlarını kullanarak örneğin, yapraklarını, çiçeklerini, dallarını, meyvelerini, tohumlarını, köklerini veya kabuklarını kurutmadan ya da taze olarak su ile kaynatarak ya da soğuk demleme yöntemi ile çay olarak tüketmişlerdir. Farklı bir yol izleyerek ezip macun veya lapa şeklinde merhem ya da ilaç olarak kullanmışlardır. Hastalıkları tedavi ettiğine inanılan bitkilerin kullanım dozları çok



önemlidir. Belirli bir miktarı o hastalığı tedavi edebiliyorken, bu miktardan fazla alınması halinde zehirlenmeye ya da ölüme neden olabilmektedir.

Son 200 yıldır ilerleyen teknoloji, bilim ve eczacılık teknikleri sayesinde bitkilerde hastalıkları tedavi edici özellik gösteren etken maddeler izole edilip, sentetik yollarla üretimi mümkün olmaktadır. Her ne kadar hızla artan nüfus karşısında çok olumlu bir gelişme kabul edilse de, sentetik yollarla üretilen ilaçların yol açtığı ciddi yan etkiler ve bu ilaçların üretildiği fabrikaların neden olduğu çevre kirliliği insanlığa karşı büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bu sebeplerden dolayı bitkilerle tedavi tekrardan insanların gözdesi haline gelmiştir.

Bitkisel doğal ürünlere olan ilgi son zamanlarda bir hayli artış göstermiştir. Bitkilerin göstermiş oldukları antioksidan, antikarsinojenik, antiallerjenik, antimikrobiyal, antifungal, analjezik etkilerden dolayı da bilim insanlarının ilgisini çekmektedir. Bu sebeple araştırma yapılacak bitkinin seçimi önemlidir ve çeşitli şekillerde yapılabilir:

1. Aktif bileşik içerdiği bilinen bitkilerle aynı familyada yahut cinste olan türler seçilebilir.
2. Gelişigüzel seçilen bir bitkiden hazırlanan ekstrelerden aktivite gösterenler seçilebilir.

Çalışma konumuz olan Solanaceae familyasında yer alan bitkiler, insanlar ve hayvanlar için büyük önem taşımaktadır. Bu familya bitkilerinden tropan alkoloitleri taşıyanlar eczacılıkta kullanılır ve zehirlidir. Sebze olarak kullanılan bitkiler yönünden de önemli bir familyadır. Bu bitkiler hayvan sağlığı ve beslenmesinde de önemli bir yere sahip olup (Foo ve ark. 2000), insan sağlığı açısından da bazı türlerin antiulserojenik, antifungal, diüretik, analjezik, febrifugal, antiflojistik, antimikrobiyal, antiinflamatauar özelliği, karaciğer hasarına ve kansere karşı koruyucu etki gösterdiği belirtilmiştir (Lin ve ark. 2008, Jainu ve ark. 2006, Lin ve ark. 1995, 2000, Sridhar ve ark. 2011, Emboden ve ark. 1979, Duke ve ark. 1985, Son ve ark. 2003, Vijayan ve ark. 2004). Çalışma konumuz olan bitki, *Solanum dulcamara*, idrar arttırıcı, hafif uyutucu, romatizma ağrılarını giderici, terletici, balgam söktürücü, deri hastalıklarında kan temizleyici ve hafif müshil etkileri nedeniyle halk arasında kullanıldığı bilinmektedir. (Baytop 1999, Baytop 1963, Tanker ve ark. 1998).

Çalışmamızda Trakya bölgesinde yetişen *Solanum dulcamara* (Solanaceae) bitkisinin yaprak ve meyve ekstrelerinde antihiperglisemik (antidiabetik) aktivite tayini ile fitokimyasal açıdan incelenmesi, sekonder metabolitlerinin izolasyonu, moleküler yapılarının açıklanması

amaçlanmıştır. Bitkinin meyve ekstresinde antihiperglisemik aktivite tayini ilk defa bu çalışmayla literatüre sunulacaktır. *S. dulcamara*'nın fitokimyasal incelenmesi literatürde mevcutken; Türkiye'de ise *S. dulcamara*'nın fitokimyasal incelenmesi ilk defa bu çalışmayla gerçekleşmiş olacak ve coğrafi farklılıkların, bu familyadaki bitkilerin kemotaksonomik sınıflandırılmasına etkiside incelenmiş olacaktır.

## 2. KURAMSAL TEMELLER VE ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

### 2.1. Bitkinin Tanımı, Yayılışı ve Üzerine Yapılan Çalışmalar

#### 2.1.1. *Solanaceae* Familyasının Özellikleri

*Solanaceae* familyası, bir veya çok yıllık, otsu, tırmanıcı, çalı veya ağaç formunda bitkiler içeren bir taksondur. Bu familya bitkilerinden tropan alkaloitleri taşıyanlar eczacılıkta kullanılır ve zehirlidir. Ayrıca sebze olarak kullanılan bitkiler yönünden de önemli bir familyadır. *Solanaceae* familyasından yeryüzünde 85 cins ve 2200 den fazla tür bulunur. Türkiye’de ise, 9 cins ve 31 tür doğal olarak yetişir. Bunların yanında kültürü yapılmakta olan bitkiler de bulunmaktadır (Tanker 2007).

Bu familya daha çok Avustralya, Orta ve Güney Amerika’ da yayılış gösterir. Yaprakları boyut ve şekil yönünden çok değişken, basit veya parçalıdır. Çiçekleri hermafrodit, çoğunlukla aktinomorf, bazılarında ise hafif zigomorfitur. Kaliks gamosepal, 5 loblu ve kalıcı; korolla gamopetal tubulat, kampanulat, bazen bilabiata, 5 parçalı. Stamen 5 tane. Ovaryum üst durumlu 2, bazen 4 gözlü 2 carpellidir. Çiçek formülü:  $a K(5) C(5) A5 G(2)$ . Meyva çok tohumlu bakka veya kapsüldür. Gövdedeki iletim demetleri bikollateraldir (Tanker 2007). *Hyoscyamus* (banotu, gavurhaşaşı) cinsi, bir, iki veya çok yıllık otsu bitkilerdir. Yaprakları basit veya loplular; çiçekleri biraz zigomorf; çiçek durumu uzamış bir salkımdır. Kaliks tüpsü, tepede 5 dişli ve kalıcıdır. Meyva, kaliks tüpü içinde, kapaklı bir kapsüle (piksidyum) tipindedir (Tanker 2007).

*H.niger*’in yaprakları sapsız, çiçekleri kirli sarıdır. Meyva döneminde kaliks orta bölgede daralmış, alt kısmı şişkindir. Bu tür yurdumuzda yol kenarları ve tarla içlerinde yaygın olarak yetişmektedir. Bitki çiçekliyken toplanıp kurutulmuş yaprakları Folia Hyoscyami T.K. (Banotu yaprağı), birçok kodeks ve farmakopede kayıtlı olan bir drogdur; hiyosiyamin ve skopolamin alkaloitleri içerir; skopolaminden dolayı atıştırmacı ve ağrı kesici etkileri vardır; hem haricen, hem de dahilen kullanılan bir drogdur. Bitkinin kökleri Radix Hyoscyami ve tohumları Semen Hyoscyami de aynı amaçlarla verilir. Yaprakları tütüne karıştırılarak nefes darlığına karşı, sigara olarak da kullanılır (Tanker 2007).

*H.reticulatus* yurdumuzda yetişen diğer bir *Hyoscyamus* türüdür, çiçekleri kirli-mor renklidir; Orta ve Doğu Anadolu’ da tarlalarda yetişir (Tanker 2007).

*H.aureus'* un çiçekleri sarı renkli ve boğazı mor lekelidir. Güney Anadolu'da kayalarda ve tarihi yerlerin duvarlarında yetişir (Tanker 2007).

*H.albus'* ta çiçekler yeşilimsi-beyaz renklidir. Akdeniz bölgesinde kaya ve duvar diplerinde rastlanır. *H.leptocalyx'* in çiçekleri altın sarısı renklidir; Güney-doğu Anadolu'da kaya ve duvarlar üzerinde yetişir. *H.pusillus*, çiçekleri sarı renkli olan türdür; Anadolu'nun kuru yamaçlarında yetişen yıllık bir bitkidir. Bu türlerin hepsi de alkaloid taşır ve zehirli bitkilerdir (Tanker 2007).

*Datura stramonium* (tatula, boru çiçeği) yol kenarları, çöplük ve viraneliklerde oldukça yaygın olan, tek yıllık otsu bir bitkidir. Boyu 0.5-2 m gövdesi dallanmış; yaprakları mavimsi-yeşil renkli, büyük, ovat ve topludur. Kaliks tüp şeklinde uzun, korolla beyaz renkli ve huni biçimindedir. Meyva ceviz büyüklüğünde, üzeri dikenli, 4 yarıkla açılan septisit kapsüldür; kaliks düşücü fakat taban kısmı kalıcıdır. Folia Stramonii T.K. (Tatula yaprağı),

*D.stramonium*: un çiçek açma zamanı toplanıp kurutulmuş yapraklarıdır; hiyosiyamin, atropin ve skopolamin içerir. Drog antispazmodik etkilidir. Sigara halinde nefes darlığında kullanılır. Tohumları da aynı etkilere sahiptir (Tanker 2007).

*D.metel*, vatanı Meksika olduğu halde tropiklerde ve Akdeniz bölgesine de yayılmış bir türdür; *D.stramonium*'dan önemli farkı, meyvası dikenli değil, kabartılıdır, çok yıllık bir bitkidir. Korollası sigara halinde, nefes darlığında kullanılır. Skopolamin kaynağı olarak yetiştirilir (Tanker 2007).

*D.innoxia* da Orta Amerika bitkisidir, Adana-Hatay çevresinde tabiileşmiştir. Bunun da meyvaları uzun dikenli ve tüylüdür (Tanker 2007).

*Nicotiana* (tütün) türleri, Amerika kökenli kültür bitkileridir. Yaprakları basit, çiçekleri tepede salkım durumundadır; meyva küçük ve kapsül tipindedir (Tanker 2007).

*N. tabacum* (tütün), boyu yaklaşık 1 m kadar olan bir kültür bitkisidir; 17. yüzyılda Avrupa'ya, oradan da yurdumuza getirilmiştir; halen yurdumuzda ve dünyanın birçok ülkesinde yaprakları için kültürü yapılmaktadır. Yaprakları büyük, ovat-lanseolat; çiçekleri tüpsü, pembe veya yeşilimsi-beyaz renklidir. Folia Nicotianae (tütün yaprakları), bitki çiçekliyken toplanıp kurutulmuş yapraklarıdır; başlıca nikotin alkaloidini taşır. Nikotin sıvı, uçucu ve çok zehirli bir alkaloiddir. Mukozadan absorbe olduğundan sigara içilen ortamda, sigara içmeyenler de aynı derecede etkilenir. Uzun süre sigara içenlerde kalp-damar ve

akciğer hastalıkları çok yaygındır. Tütün yaprakları işlendikten sonra sigara ve püro haline getirilir. Ayrıca yapraklardan hazırlanan ekstreler insektisit preparatlara girer (Tanker 2007).

*N.rustica* (delitütün, hasankeyf tütünü); 1-1.5 m boyunda, tek yıllık bir bitkidir. Yaprakların yüzeyi buruşuk; çiçekleri yeşilimsisarı renklidir. Gaziantep ve K.Maraş çevrelerinde yetiştirilir, keyif verici olarak çiğnenir. Yapraklarından pipo ve nargile tütünü hazırlanır. Nikotin oranı *N. Tabacum*'dan yüksektir (Tanker 2007).

*Capsicum annuum* (biber, paprika), sebze olarak da kültürü yapılan bir yıllık bir bitkidir. Kapsüle benzeyen bakka tipinde meyvaları vardır. Bu meyvalar Fructus Capsici T.K. (Kırmızı biber) yeşil iken C vitamini yönünden çok zengindir. Acı biber çeşitleri kapsaisin alkaloidi taşır. Bu alkaloidin cildi yakıcı ve kan çekici etkisi vardır; bu nedenle dışarıdan romatizma ağrılarını gidermede kullanılır (Tanker 2007).

### **2.1.2. Trakya Bölgesinde Solanaceae Familyası**

*Solanaceae* familyası, tıbbi ve ekonomik yönlerden önemli bir familyadır. Ülkemizin Trakya bölgesini ve İstanbul'un Anadolu cephesini içine alan kısmında, bu bölgenin florası ile ilgili çalışmalara ve şahsî araştırmalarımıza göre, bu familyada, yerli ve yetiştirilmiş olarak bulunan bitkilerin 10 cins altında toplandığı görülür: *Atropa*, *Datura*, *Hyoscyamus*, *Lycium*, *Physalis*, *Solanum*, *Lycopersicum*, *Capsicum*, *Nicotiana*, *Petunia*. Bu cinslerin ve bunların altında görülen türlerin özellikleri belirtilmiş, yayılışları kaydedilmiş ve tayin anahtarları tertip edilmiştir (Baytop 1971).

*Solanum dulcamara* L., *S. nigrum* L. ve *Solanum Moench* bütün bölgede yetişir. *Solanum alatum* örnekleri, olgunlaşmış turuncu meyvaları bulunmasa dahi, sapı çok hücreli ve başı tek hücreli salgı tüyleri taşımasıyla *S. nigrum* dan ayırt edilir (Baytop 1971).

### **2.1.3. Solanum Cinsinin Genel Özellikleri**

*Solanum* türleri bir veya çok yıllık, otsu veya çalı formunda bitkilerdir. Yaprakları basit veya pennat parçalıdır. Korolla rotat; anterler tüp şeklinde birbirine yaklaşmış veya birleşmiştir.

Bazı biber çeşitleri, renkli ve uzun süre kalıcı meyvaları nedeniyle saksılarda süs bitkisi olarak yetiştirilir. Bu familyada sebze olarak kullanılan ve bu amaçla kültürü yapılan bitkiler de vardır. Bunlar, *Solanum tuberosum* (patates), *S.melongena* (patlıcan), *Lycopersicum esculentum* (domates) dur (Tanker 2007).

#### 2.1.4. *Solanum dulcamara* Türünün Genel Özellikleri

*Solanum dulcamara* halk arasında yabanyasemini veya sofur olarak adlandırılmakta, çiçekleri mor, meyvesi kırmızı renkli olan, tırmanıcı çok yıllık bir bitkidir. İdrar arttırıcı, hafif uyutucu, romatizma ağrılarını giderici, terletici, balgam söktürücü, deri hastalıklarında kan temizleyici ve hafif müshil etkileri nedeniyle halk arasında kullanıldığı bilinmektedir (Baytop 1999, Baytop 1963; Tanker ve ark. 1998).

*S.dulcamara*, 1-2 m ye kadar yükselen yarı çalimsı bitkilerdir. Gövde olgunlaşmış, ancak genç dallar otsu ve tırmanıcı, az çok köşeli, köşeler bariz yollar halindedir. Dalların genç uçları tüylüdür. Yapraklar alternan dizilişli, saplı, sap boyu laminanın 1/2-1/3 ü kadardır. Lamina tam, ovat-lanseolat, 10 cm ye kadar uzunlukta, tepede sivri veya uzun olarak sivrilmiş, tabanca hafifçe kalp şeklinde veya trunkat, veya kulakçık şeklinde karşılıklı iki loplulu veya yalnız tek tarafta bulunan bir loplulu laminanın her iki yüzü de kısa ve seyrek tüylüdür. Çiçekler saplı, sap çiçek boyu kadar veya daha uzundur. Çiçekler gevşek ve sarkık bir durum halinde toplanmış, durum –saplı, 3-25 çiçekli, panikulaya benzer şekilde, genç dallar üzerinde, nodustaki yaprağın kaerşı tarafındadır. Meyve kısa yumurtamsı, parlak, kırmızı, sarkık, takriben 1 cm boyundadır. Meyve sapı tepede tecriden kalınlaşmıştır. Meyve kaliksi küçüktür. Tohum yassı, böbrek şeklinde, üzeri bal peteği gibi alımsı, 2-3 mm çapındadır (Baytop 1971).



Şekil 2.1. *Solanum dulcamara* yaprak



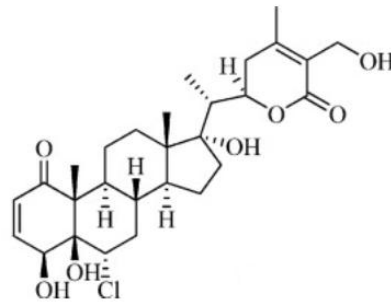
Şekil 2.2. *Solanum dulcamara* çiçek



Şekil 2.3. *Solanum dulcamara* olgunlaşmış ve olgunlaşmamış meyve

### 2.1.5. *Solanaceae* Familyası Üzerine Yapılan Çalışmalar

Tong ve arkadaşları (2011), yapmış oldukları çalışmada *Withania somnifera* bitkisinden daha önce de izole edilmiş olan dokuz farklı withanolidin yanı sıra ilk defa klorlu withanolid olan  $6\alpha$ -chloro- $5\beta$ ,  $17\alpha$ -dihydroxywithaferin A (Şekil 2.4.) izole etmişlerdir.

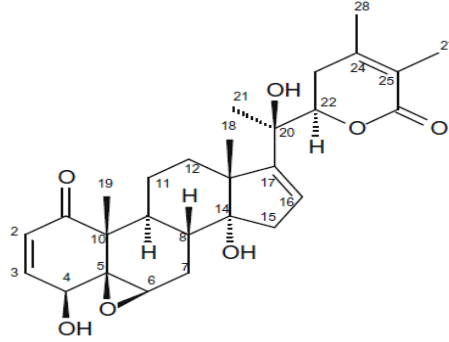


Şekil 2.4.  $6\alpha$ -chloro- $5\beta$ ,  $17\alpha$ -dihydroxywithaferin A bileşiği



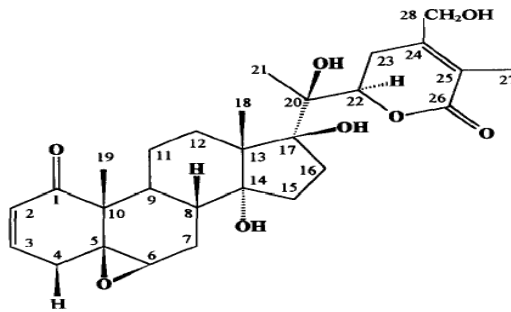
Çin halkı tarafından kanser, astım, sıtma, hepatit ve romatizma gibi hastalıkların tedavisinde sıkça kullanılan *Physalis peruviana* bitkisi üzerinde yapılan çalışmalar sonucu on yeni withanolid izole edilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında 1D ve 2D NMR, IR ve HR-MS gibi spektroskopik yöntemler kullanılmıştır (Fang ve ark. 2012).

*Physalis peruviana* bitkisiyle yürütülen çalışmalar sonucunda ilk defa izole edilen phyperunolide A (Şekil 2.5.) phyperunolide B, phyperunolide C, phyperunolide D, peruvianoxide, phyperunolide E ve phyperunolide F bileşiklerinin yanı sıra on farklı withanolid daha izole edilmiştir. Bulunan bu bileşiklerden phyperunolide A, 4 $\beta$ -hydroxywithanolide E, withanolide E ve withanolide C'nin akciğer kanseri (A549), meme kanseri (MDA-MB-231 ve MCF7) ve karaciğer kanserine (Hep G2 ve Hep 3B) karşı sitotoksik etki gösterdiği kanıtlanmıştır (Lan ve ark. 2009).



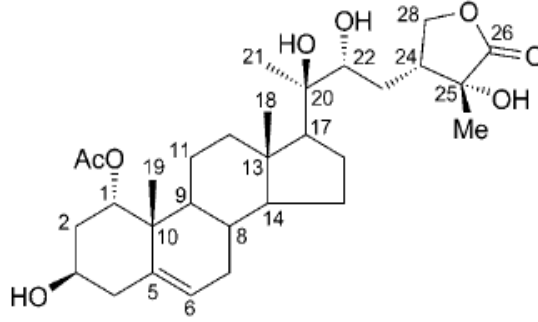
Şekil 2.5. Phyperunolide A bileşiği

Dinan ve arkadaşları (1997), *Physalis peruviana* 'nın çiçek çanak yaprakları ile yapmış oldukları izolasyon çalışmalarında 1D, 2D, <sup>13</sup>C NMR, COSY 45, HMBC ve HMQC gibi spektroskopik yöntemleri de kullanarak bu tür için yeni olan iki withanolidi (28-hydroxywithanolide E ve 4 $\beta$ -hydroxywithanolide E (Şekil 2.6.) izole edip yapılarını aydınlatmışlardır.



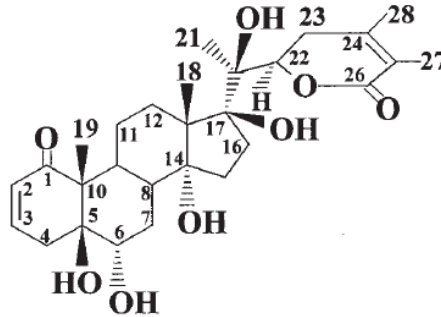
Şekil 2.6. 28-hydroxywithanolide E bileşiği

*Physalis peruviana* ile yapılan bir başka çalışmada perulactone, perulactone B, blumenol A ve (+)-(S)-dehydrovomifoliol yanı sıra ilk defa perulactone C (Şekil 2.7.) ve perulactone D izole edilmiştir. 1D ve 2D NMR, HMBC, HSQC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, ROESY ve HR-MS spektroskopik yöntemler kullanılarak yapıları aydınlatılmıştır ( Fang ve ark. 2009).



Şekil 2.7. Perulactone C bileşiği

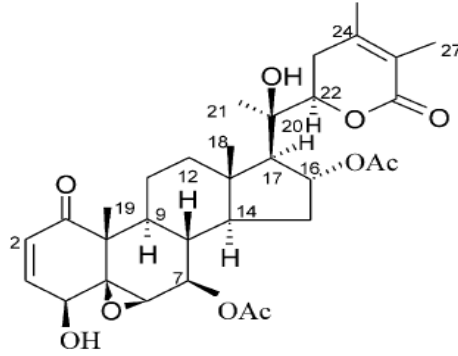
Meyveleri Mısır halkı tarafından ateş düşürücü, idrar söktürücü ve antiromatizmal olarak kullanılan *Withania somnifera* bitkisinin meyveleri ile yapılan çalışmalar sonucunda iki yeni steroidal lakton olan  $5\beta$ ,  $6\alpha$ ,  $14\alpha$ ,  $17\beta$ ,  $20\beta$ -pentahydroxy-1oxo-20S,20R-witha-2,24-dienolide (Şekil 2.8.) ve  $6\alpha$ ,  $7\alpha$ -epoxy- $5\alpha$ ,  $14\alpha$ ,  $17\alpha$ ,  $23\beta$ -tetrahydroxy-1-oxo-22R-witha-2,24-dienolide'nin yanı sıra scopoletin ve aesculetin olarak bilinen iki kumarinde ilk defa izole edilmiştir. Stigmasterol ve sitosterol de izole edilen bileşikler arasında yerini almıştır. İzole edilen bu bileşiklerin spektroskopik incelemeleri UV, IR,  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, HRFAB, FAB ve EI-MS yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Ahmad 2002).



Şekil 2.8.  $5\beta$ ,  $6\alpha$ ,  $14\alpha$ ,  $17\beta$ ,  $20\beta$ -pentahydroxy-1oxo-20S,20R-witha-2,24-dienolide bileşiği

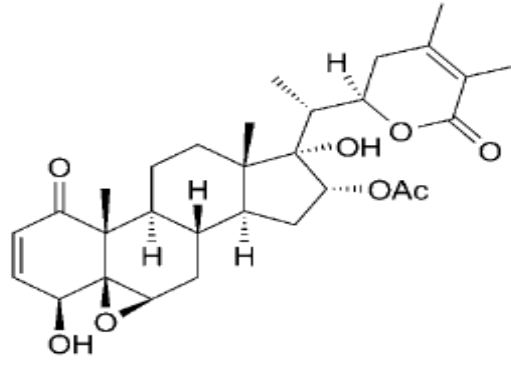
Habtemariam ve arkadaşları (1993), *Discopodium penninervium* bitkisinin yaprak ekstreleri ile yapmış oldukları çalışmada  $16\alpha$ -acetoxy- $5\beta,6\beta$ -epoxy- $17\alpha$ -hydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide,  $5\beta,6\beta$ -epoxy- $16\alpha,17\alpha$ -dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide ve  $16\alpha$ -acetoxy- $5\beta,6\beta$ -epoxy-1-oxowitha-2,24-dienolide bu bitki için yeni olan üç withanolidi izole etmişlerdir.

Sitotoksik aktivite gösteren *Acnistus arborescens*'in yaprak ekstresinden  $7\beta$ -acetoxy- $4\beta,20R$ -dihydroxy- $5\beta,6\beta$ -epoxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide,  $7\beta,16\alpha$ -diacetoxy- $4\beta,20R$ -dihydroxy- $5\beta,6\beta$ -epoxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide (Şekil 2.9.) ve  $7\beta,16\alpha$ -diacetoxy- $5\beta,6\beta$ -epoxy- $20R$ -hydroxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide bileşikleri izole edilmiştir ve yapılarının aydınlatılmasında 1D ve 2D NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HMBC), HSQC ve NOESY gibi spektroskopik yöntemler kullanılmıştır (Minguzzi ve ark. 2002).



**Şekil 2.9.**  $7\beta,16\alpha$ -diacetoxy- $4\beta,20R$ -dihydroxy- $5\beta,6\beta$ -epoxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide bileşiği

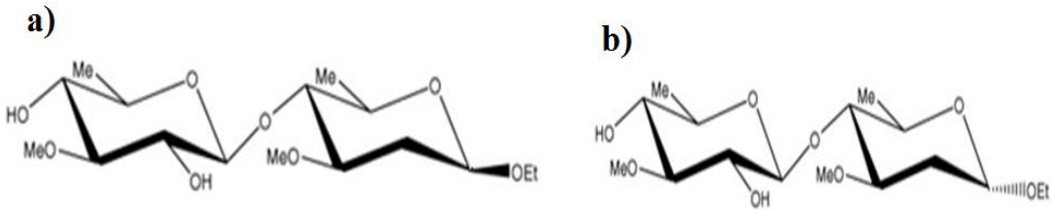
Lafeta ve arkadaşları (2010), *Aureliana fasciculata* bitkisinin yaprak MeOH ekstresi üzerinde yapmış oldukları çalışmalar sonucunda (4S,22R)- $16\alpha$ -acetoxy- $5\beta,6\beta$ -epoxy- $4\beta,17\alpha$ -dihydroxy-1-oxowitha-2,24-dienolide (aurelianolide A) ve (4S,22R)- $16\alpha$ -acetoxy- $4\beta,17\alpha$ -dihydroxy-1-oxowitha-2,5,24-trienolide (aurelianolide B) (Şekil 2.10.) iki yeni withanolid izole etmişlerdir. Bileşiklerinin yapılarının belirlenmesinde de  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, HMBC, HSQC,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY ve NOESY gibi spektroskopik yöntemler kullanılmıştır.



Şekil 2.10. (4S,22R)-16 $\alpha$ -acetoxy-5 $\beta$ ,6 $\beta$ -epoxy-4 $\beta$ ,17 $\alpha$ -dihydroxy-1-oxo-witha-2,24-dienolide bileşiği

### 2.1.6. *Solanum* Türleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

Chen ve arkadaşları (2009), *Solanum nigrum* bitkisinin toprak üstü kısmından 2 yeni disakkarit izole edilmiştir. Bu disakkaritler; ethyl- $\beta$ -D-thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-oleandropyranoside (Şekil 2.11.a.) ve ethyl- $\beta$ -D-thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-oleandropyranoside (Şekil 2.11.b.) bileşikleridir. Bu yapılar,  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , 2D NMR ve ESIMS spektroskopisiyle aydınlatılmıştır.



Şekil 2.11. a) Ethyl  $\beta$ -D-thevetopyranosyl-(1-4)- $\beta$ -D-oleandropyranoside bileşiği b) Ethyl- $\beta$ -D-thevetopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-oleandropyranoside bileşiği

Mahmoud ve arkadaşları (1989), *Solanum nigrum* 'un sadece yaprakları ile çalışmışlar ve yapraklarından iki yeni quercetin glikozit tespit etmişlerdir. Bunlar 3-O-(2-Gal- $\alpha$ -rhamnosyl)- $\beta$ -glucosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -galactoside ve quercetin-3-O- $\alpha$ -rhamnosyl (1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -galaktoside'dir. Daha önce izole edilen, quercetin-3-glucosyl (1 $\rightarrow$ 6) galaktosid, 3-gentiobiosid, 3-galaktosid ve 3-glukosid bileşikleri bu çalışmada bulunmuştur. Bileşiklerin yapıları FAB MS,  $^1\text{H}$  NMR and  $^{13}\text{C}$  NMR analizi ile tespit edilmiştir.

Ravi ve arkadaşları (2009), *S. nigrum* 'un metanol ekstresinde fitokimyasal ve farmolojik çalışmalar yapmıştır. Yaptığı çalışmada, kimyasal testlerle, kalitatif olarak ekstrenin fitokimyasal içeriğini (alkaloid, flavonoid, saponin, yağ, glikozit, kumarin, tannin) araştırmış ve ekstrenin hayvanlar üzerinde anti-inflamatuar aktivitesini tayin etmiştir.

*Solanum nigrum* ve *Solanum incanum* bitkileri üzerinde yapılan çalışmalarda, bitkinin kök, meyve, yapraklarında ve farklı zamanlarda toplanan bitki kısımlarında, alkaloid miktarındaki değişim araştırılmıştır. *Solanum nigrum* 'un, en küçük boyuttaki yapraklarında, en yüksek alkaloid miktarı gözlenmiştir. Ayrıca *Solanum nigrum* 'un alkaloid konsantrasyonu ve miktarı, bitkinin toplanma zamanındaki yaş artışına bağlı olarak azaldığı belirlenmiştir (Eltayeb ve ark. 1997).

Thenmozhi ve arkadaşları (2011), *Solanum nigrum* 'un kuru yapraklarını, çeşitli solventlerle (su, etanol, metanol, kloroform) ekstraksiyonunu yaparak, bu ekstrelerin, kimyasal testlerle, kalitatif olarak fitokimyasal içeriğini (alkaloid fenol, flavonoid, steroid, saponin, glikozid, indirgen şeker, protein, kardinolit) araştırmışlardır. Ayrıca, ekstrelerin antioksidan aktivitesini tayin ederek, yaprak ekstresinin antioksidan aktivitesini daha yüksek bulmuşlardır.

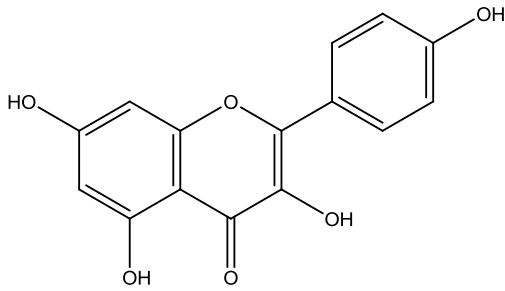
Gandhiappan ve arkadaşları (2012), Solanaceae familyasındaki *S. anguivi*, *S. pubescence*, *S. torvum*, *S. trilobatum*, *S. surratense* ve *S. nigrum* bitkilerinin antioksidan aktivitelerini, DPPH serbest radikal giderim aktivitesi metoduna göre, tayin etmişlerdir. En yüksek antioksidan aktivite, *S. anguivi* bitkisinde bulunurken, en düşük antioksidan aktivite *S. nigrum* bitkisinde gözlenmiştir.

*Solanum nigrum* ve *Solanum incanum*'un küçük yaprakları yüksek alkaloid konsantrasyonuna sahiptir. Kıyaslandığında maksimum alkaloid miktarı *Solanum incanum*'un yapraklarındadır ve *Solanum nigrum*'un yaklaşık 2 katıdır. Bitki yaşının artmasıyla yapraklardaki alkaloid miktarının değişme tarzı da iki bitkide farklılık gösterir. *Solanum nigrum*'un köklerindeki alkaloid konsantrasyonu saplarına göre daha yüksektir ve bu miktar *Solanum incanum*'un saplarındaki konsantrasyon oranı kadardır. *Solanum nigrum*'un olgunlaşmamış küçük meyveleri büyük miktarda solasodin içerir fakat konsantrasyon ve meyvedeki ham miktarı bitki yaşının artmasıyla azalma gösterir (Eltayeb ve ark. 1997).

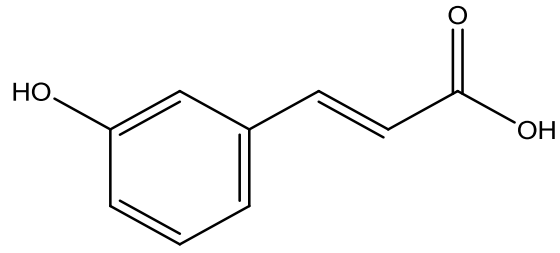
Rawani ve arkadaşları (2010), *Solanum nigrum* yaprakları 6 farklı solventle (petrol eteri, benzen, etil asetat, kloroform:metanol 1:1, aseton ve saf alkol) ekstrakte edilip,

ekstrelerin hastalık taşıyan *Culex quinquefasciatus* türüne karşı antilarvasidal aktivitesi araştırılmıştır. Saf ekstrelerin konsantrasyonları değiştirilerek larval ölüm oranları incelenmiştir. En yüksek ölüm oranı, %0.5 konsantrasyondaki ekstrelerin, 24, 48 ve 72 saat hastalık taşıyan *Culex quinquefasciatus* ile muamelesinde gözlenmiştir.

Hsiu-Chen Huang ve arkadaşları (2010), *Solanum nigrum*'un meyve, yaprak ve saplarında, standart maddeler kullanarak HPLC ile polifenolik bileşikleri ve antosiyanidinleri tespit etmişlerdir. *Solanum nigrum* yapraklarının, yüksek oranda, gentisik asit, luteolin, apigenin, kamferol (Şekil 2.12.) ve m-kumarik asit (Şekil 2.13.) içerdiğini bulmuşlardır. Ayrıca, bu çalışmada *Solanum nigrum*'un meyve, yaprak ve sap ekstrelerinin, meme kanseri hücrelerine (AU565-MCF7) karşı, sitotoksik etkileri araştırılmıştır. *S. nigrum* yapraklarının su ekstresinin, meme kanseri hücrelerini (AU565-MCF7) önleyici etkisi olabileceğini belirtmişlerdir.

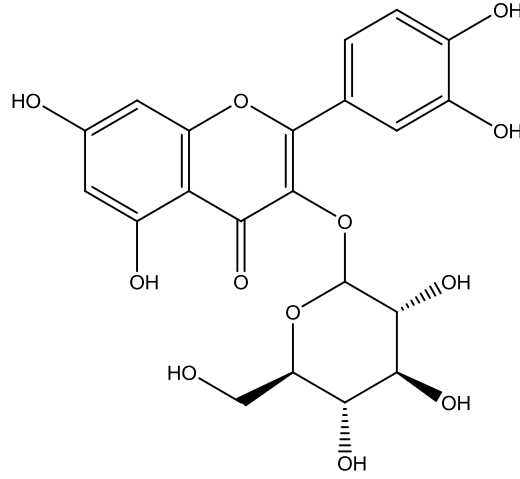


Şekil 2.12. Kamferol bileşiği



Şekil 2.13. m-kumarik asit bileşiği

Kuzey Amerikada yetişen on bir *Solanum* türünün (*S. americanum*, *S. sarrachoides*, *S. villosum*, *S. nigrum* vb.) yapraklarından, 10 flavonoid izole edilmiştir. Bu bileşiklerin kimyasal yapılarının tayini, UV spektrofotometresi ile gerçekleştirilmiştir. *Solanum nigrum*'dan, sadece quersetin-3-*O*-glukozid (Şekil 2.14.) ve quersetin-3-*O*-diglukozid bileşikleri bulunmuştur (Shilling ve ark. 1984).



**Şekil 2.14.** Quersetin-3-O-glukozid bileşiği

Sei-Jung Lee ve arkadaşları (2005), halk arasında, karaciğer koruyucu ve kanser önleyici olarak bilinen, *Solanum nigrum*'un, etanol ekstresinden 150 kDa glikoprotein izole etmişler ve izole edilen bu glikoproteinin, detoksik enzim aktivitesi ve lipidemik plazma değerlerinin modülasyonunu araştırmışlardır. Yapılan çalışma sonucunda, *Solanum nigrum*'un, etanol ekstresinden izole edilen bu glikoproteinin, kolestrol düşürücü olarak kullanılabileceğini açıklamışlardır.

Luo ve arkadaşları (2009), solar enerji dönüşüm ile ilgili çalışmada, *Solanum nigrum*, *C. indica* ve *S. splendens* bitkilerinin ekstrelerinden elde edilen, doğal boyaları kullanılarak, boya-duyarlı güneş pilleri oluşturmuşlardır. Çalışmada, *S. nigrum*, *C. indica* ve *S. splendens* ekstrelerinden elde edilen doğal bitki boylarıyla duyarlı hale getirilen hücrelerin, enerji dönüşümü verimleri sırasıyla % 29, % 26, % 13 ve % 31 olarak bulunmuştur. Doğal boyaların yapı analizlerinde ve ışık absorpsiyonları ölçümlerinde, FTIR ve UV-VIS spektroskopisi kullanılmıştır.

Halk arasında, *Solanum nigrum* L. meyvelerinin astım tedavisinde ilaç olarak kullanıldığı eski kitaplarda yer almaktadır (Nirmal ve ark. 2012). Nirmal ve arkadaşları (2012), *Solanum nigrum* meyvelerinin petrol eteri, etanol ve su ekstrelerinin (50, 100 ve 200 mg/kg, i.p.) astım hastalığının tedavisinde kullanılabilecek antihistaminik bir ilaç olma potansiyelini, hayvanlar üzerinde araştırmışlardır. Bitkinin petrol eteri ekstresinin, artan lökosit ve eozinofil hücre sayısını düşürmekle birlikte süt allerjenine karşı maksimum koruma sağladığını, buna karşılık klonidin mast hücreleri degranülasyonuna neden olduğunu

açıklamışlardır. Petrol eteri ekstresi histamin kaynaklı kas kasılmasına karşı diğer ekstrelerden daha fazla direnç göstermiştir.

Sridhar ve arkadaşları (2011), *Solanum nigrum* bitkisinin, yaprak, kök, tohum ve meyve ekstrelerinde, antifungal aktivite tayini yapmışlardır. Tüm ekstreler içerisinde, tohumların etilasetat ekstresi en yüksek antifungal aktiviteyi göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, kimyasal testlerle, kalitatif olarak ekstrelerin fitokimyasal içeriğinde (alkoloid, flavonoid, fenol, steroid, tannin) araştırılmıştır.

*Solanum nigrum*'un meyve ve yapraklarının; emoliyon (ağrı hafifletici), anti-flojistik (iltihap önleyici), diüretik (idrar söktürücü), diyaforetik (terletici), febrifugal (ateş düşürücü), narkotik (uyuşturucu), pürgatif (bağırsak boşaltıcı) ve sedatif (sakinleştirici) etkilerinin olduğu saptanmıştır (Emboden 1979).

*Solanum nigrum* yapraklarının petrol eteri, kloroform, benzen, metanol ve etanol ekstrelerinin, laboratuvar ortamında 6 mikroorganizma üzerinde antimikrobiyal aktivitesi araştırılmıştır. Bu 6 mikroorganizma, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus* ve *Pseudomonas* türleridir. Çalışma sonucunda, *Solanum nigrum*'un minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) *Shigella*'da 0,072 g olduğu bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada, kimyasal testlerle, kalitatif olarak ekstrelerin fitokimyasal içeriğinde (kardiyak glikozitleri, terpenler, şekerler, saponinler, antrokinonlar, flavonoid, tannin) araştırılmıştır (Priyadarshini ve Growth 2012).

Heo ve arkadaşları (2004), *Solanum nigrum L.* bitkisinden, izole ettikleri glikoproteinlerin, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) radikali, hidroksil radikali ( $\bullet\text{OH}$ ), ve superoksit anyonu ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) gibi radikalleri, süpürücü aktivitesini araştırmışlardır.

Raju ve arkadaşları (2003), karaciğerde oluşan hasarlara karşılık olarak *Solanum nigrum* meyvelerinin etanol ekstresinin, yüksek hepatoprotektif (karaciğer koruyucu) etkisini araştırmışlardır. Aktivite, serum aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT), alkalik fosfataz (ALP) ve toplam bilirubin gibi biyokimyasal parametreler kullanılarak değerlendirilmiştir. Farelerden alınan karaciğer numunelerindeki histopatolojik değişimler incelenmiş ve kontrol edilmiştir.

Duke ve Ayensu (1985), *Solanum nigrum* yaprak, kök ve sap ekstrelerinin analjezik, antienflamatuar, vazodilatör ve antispazmodik etkisini araştırarak, kanser yaraları, çıbanlar ve ak deri hastalığının tedavisinde kullanılabileceğini göstermişlerdir.



Lin ve arkadaşları (1995, 2000), *Solanum alatum*'un sulu ekstresinin, ödem ve karaciğer hasarına karşı etkisini araştırmışlardır. Ekstrenin (100 veya 200 mg/kg vücut ağırlığı), antiinflamatuvar ve hepatoprotektif aktiviteler gösterdiğini ve dozun 200 mg olduğunda bu etkilerin daha belirgin olduğunu ortaya çıkarmışlardır. Narkoz gibi histolojik değişiklikler, yağ değişiklikleri, balonlaşma dejenerasyonu, lenfosit ve kupffer hücreleri santralvenler etrafında inflamatuvar ve infiltrasyon eş zamanlı olarak *Solanum alatum*'un sulu ekstresi ile tedavi edilmiştir.

*Solanum nigrum*'un olgunlaşmış meyvelerinden hazırlanan metanol ekstresinde, MCF-7 insan meme kanser hücrelerinin büyüme-inhibitör etki mekanizması araştırılmıştır. MCF-7 hücre proliferatif kapasitesinin *Solanum nigrum*'un etanol ekstresinin varlığında kuvvetle bastırıldığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmaların sonucunda *Solanum nigrum*'un meyve ekstresinin antioksidan ve kanser önleyici olarak kullanılacağı açıklanmıştır ( Son ve ark. 2003).

Jainu ve arkadaşları (2006), *Solanum nigrum*'un antiülserojenik ve ülser iyileştirici etkisini gözlemlemek için fareler üzerinde yaptıkları deneylerin sonucunda, *Solanum nigrum* ekstresinin farelerdeki gastrit salgı hacmini, asitliği ve pepsin salgısını azalttığını ortaya koymuşlardır. Buna ek olarakta, *Solanum nigrum*'un (200 ve 400 mg/kg), 7 gün süren tedavi sonucunda ülseri tedavi edici etkisi olduğunu tespit etmişlerdir.

*Solanum nigrum*, Çin tıbbında hepatoprotektif ve antiinflamasyon etkilerinden dolayı kullanılan bir bitkidir. Yapılan bu çalışmada karbon tetraklorürün neden olduğu karaciğer hasarına karşı *Solanum nigrum*'un su ekstresinin koruyucu etkisi araştırılmıştır. Deneyler sonucunda *Solanum nigrum* ekstresinin lenfositlerin infiltrasyonu, hepatik nekroz ve farelerde karbon tetraklorürün neden olduğu karaciğer lezyonları insidansını azalttığı gözlenmiştir. Çalışma sonucunda *Solanum nigrum* ekstresinin farelerde CCl<sub>4</sub>'ün yol açtığı oksidatif hasara karşı, karaciğeri koruyabileceği gösterilmiştir ( Lin ve ark. 2008).

*Solanum nigrum* ve *Leonotis leonorus* bitkilerinin yapraklarından hazırlanan aseton, metanol ve su ekstreslerinin beslenme, fitokimyasal, antioksidan ve antibakteriyel potansiyeli değerlendirilmiştir. İki bitkinin yapraklarının; kül, nem içeriği, ham protein, ham lipid, ham lif ve karbonhidrat bakımından oldukça zengin olduğu gözlenmiştir. Elementel analiz ile yapraklarındaki sodyum, potasyum, kalsiyum, magnezyum, demir, çinko, fosfor, bakır, manganez ve azot içerdiği tayin edilmiştir. Alkaloid, ve saponin bileşiminin orta seviyede

olduğu, polifenoller bakımından zengin olduğu ve antioksidan etkiye sahip olduğu gözlenmiştir (Jimoh ve ark. 2010).

*Solanum pseudocapsicum*'un antimikrobiyal etkiye sahip, yeni streoid alkaloidleri, alkol ekstrelerinden izole edilmiştir (Mitscher ve ark. 1975).

*Solanum pseudocapsicum*'un olgunlaşmamış meyvelerinin metanol ekstresinin toplam alkaloid fraksiyonunda in vitro sitotoksik ve antitümör özellikleri araştırılmıştır. Yapılan çalışmalar sonucunda hayvan modellerinde daha fazla araştırma yapılması gerektiğine karar verilmiştir (Vijayan ve ark. 2002).

*Solanum pseudocapsicum*'un yapraklarının metanol ekstresinin, toplam alkaloid fraksiyonun; Dalton farelerindeki Lenfoma Asit modeline karşı in vivo antitümör aktivitesi test edilmiştir. Toplam alkaloid fraksiyonu 2.5 ve 5.0 mg/kg vücut ağırlığındaki dozlarda antitümör aktivitesi gözlenmiştir (Badami ve ark. 2003).

Vijayan ve arkadaşları (2004), antimikrobiyal, antiviral, antispazmodik ve antihipertansif etkileri bilinen *Solanum pseudocapsicum*'un farklı kısımlarının, toplam alkaloid miktarını, sitotoksik ve antitümör etkilerini araştırmışlardır. *Solanum pseudocapsicum*'un yaprak, meyve, kök, tohum ve gövdesinin metanol ekstrelerinde bu araştırma yapılmıştır. En yüksek alkaloid miktarının *Solanum pseudocapsicum*'un yaprak kısmında olduğunu açıklamışlardır.

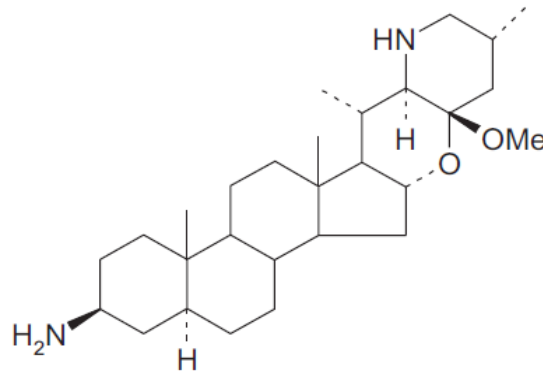
*Solanum pseudocapsicum* yapraklarının, metanol ekstresinde, toplam alkaloid miktarı ve hepatoprotektif etkinin test edildiği çalışmada, antihepatotoksik etki gözlenmiştir (Vijayan ve ark. 2003).

*Solanum pseudocapsicum* geleneksel tıpta kullanılan zehirli bir bitkidir. *Solanum pseudocapsicum*'un meyvesinde, GC-MS ve fotometrik yöntemler kullanılarak yapılan kimyasal analizde, ekstrenin %99.80' ni oluşturan 25 tane bileşen tespit edilmiştir. Önemli bileşenleri, alkaloid ( %38.55), hidrokarbon (%22.18), yağ asidi (%19.38), alkol (%13.27) ve karboksilli asit türevleri (%3.73) olarak bulunmuştur. Bunların dışında da önemli miktarda azot ve fosfor içermektedir. Elde edilen sonuçlar *Solanum pseudocapsicum*'un insanlarda dahil olmak üzere hayvanlar üzerindeki toksik etkilerini açıklamaktadır. Ayrıca bitkinin ilaç endüstrisinde, ham madde olarak kullanılabilereği belirtilmiştir (Aliero ve ark. 2005).

Badami ve arkadaşları (2005), güçlü sitotoksik, antikanser ve hepaprotektif etkileri bilinen *Solanum pseudocapsicum*'un ilk defa yaprak ekstralarında, antioksidan aktivite tayinini yapmışlardır. Ham metanol ekstresinde yaptıkları fitokimyasal testler sonucunda alkaloidleri, glikozitleri, tanenleri ve flavonoidleri bulmuşlardır. Buldukları bu bileşiklerin bazılarının antioksidan aktiviteye sahip olduğu bilinmektedir.

*Solanum pseudocapsicum*'un olgunlaşmamış meyvelerinin, GC-MS ile analizinde, 21 bileşik (alkan, alkol, aldehit ve terpenoid) bulunmuştur. Ekstrenin, dekan (%41.06), undekan (%29.26), monoterpene (%14.79), seskiterpen (%3.21) ve fitolden oluştuğu gözlenmiştir (Aliero, v.d., 2006). Aynı çalışma grubu, bu bitkinin kökleri ile yaptığı çalışmada da, %26.8 oranında yağ asitlerini bulmuştur (Aliero ve ark. 2007).

Dongre ve arkadaşları (2007), daha önce birçok steroid alkaloidlerinin izole edildiği *Solanum pseudocapsicum*'dan *O*-methylsolanocapsine'nin (Şekil 2.15.) izolasyonunu gerçekleştirmişlerdir.

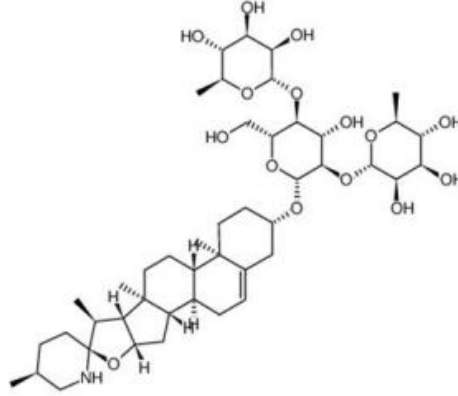


**Şekil 2.15.** *O*-methylsolanocapsine bileşiği

*Solanum cilistum* bitkisinin yaprak ekstresinden yapılan çalışmalar sonucunda dört yeni withanolid izole edilmiştir. Bu bileşikler silistol a, silistol b, silistol b ve silistol d'dir (Zhu ve ark. 2001).

### 2.1.7. *Solanum dulcamara* Türü Üzerine Yapılan Çalışmalar

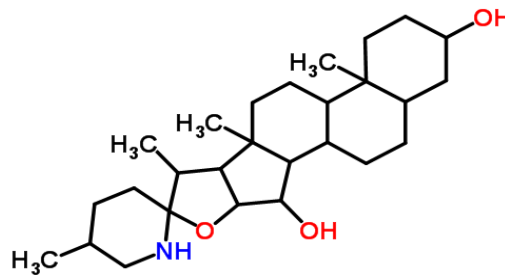
Boll (1963), *Solanum dulcamara*'dan, alkaloid glikozitlerini, ince tabaka kromatografisi ve kağıt kromatografisini kullanarak izole etmiştir. İzole edilen bileşikler,  $\beta$ -solamarin ve  $\gamma$ -solamarin' dir (Şekil 2.16.).



Şekil 2.16.  $\beta$ -solamarin bileşiği

*Solanum dulcamara*'dan izole edilen  $\beta$ -solaminenin, fareler üzerinde yapılan deneyler sonucunda tümör inhibitörü olarak kullanılabileceği görülmüştür (Kupchan ve ark. 1965).

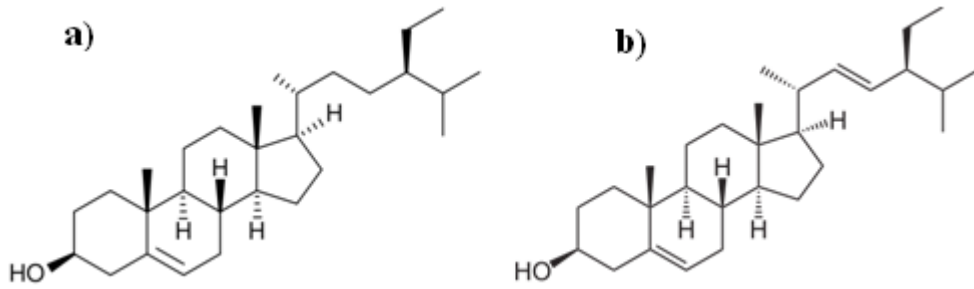
*Solanum dulcamara*'nın köklerinden, 4 yeni alkaloid izole edilmiştir. Bunlar  $15\alpha$ -hidroksi-soladulcidin (Şekil 2.17.),  $15\alpha$ -hidroksi-solasodin,  $15\alpha$ -hidroksi-tomatidine ve  $15\alpha$ -hidroksi-tomatidenol'dur (Rönsch 1966)



Şekil 2.17.  $15\alpha$ -hidroksi-soladulcidin bileşiği

Tukalo (1970), *Solanum dulcamara*'dan izole ettiği, alkaloid glikozitleri ilk defa IR ve UV spektrumlarını alarak incelenmiştir.

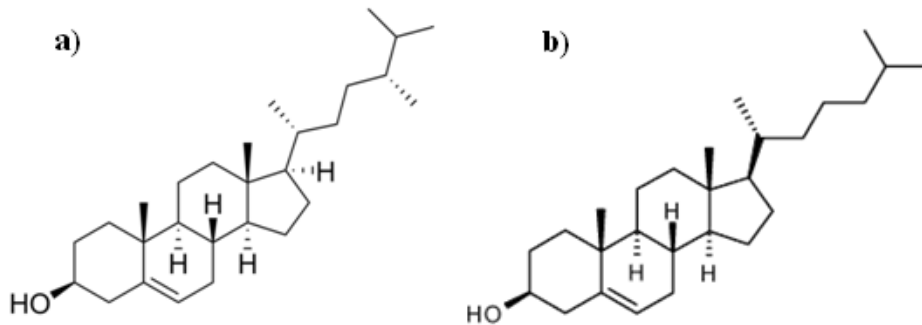
Kostens (1972), *Solanum dulcamara*'nın yapraklarında, parafin hidrokarbonların varlığını araştırmıştır. Aynı çalışma grubu, bu bitkinin yapraklarında, streol glikozitler ve streol glikozit yağ esterlerini tayin etmiştir (Kostens ve Willuhn 1973). Kostens ve arkadaşları (1973), *Solanum dulcamara*'nın kök, sap, yaprak, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış meyvelerinde yaptıkları analizlerde, kolestrol, sitostreol, stigmastreol, brassikastreol, isofukostreol ve 24-metilenkolesterol bulmuştur. En bol bulunan bileşenler ise kolesterol, sitosterol (2.18.a.) ve stigmasterol (Şekil 2.18.b.) (%77-84) dür. Bitkinin tüm parçalarında steroller, serbest esterler, glikozitler ve açillenmiş glikozitlerin mevcut olduğunu ortaya çıkmıştır.



Şekil 2.18. a) Sitosterol bileşiği

b) Stigmasterol bileşiği

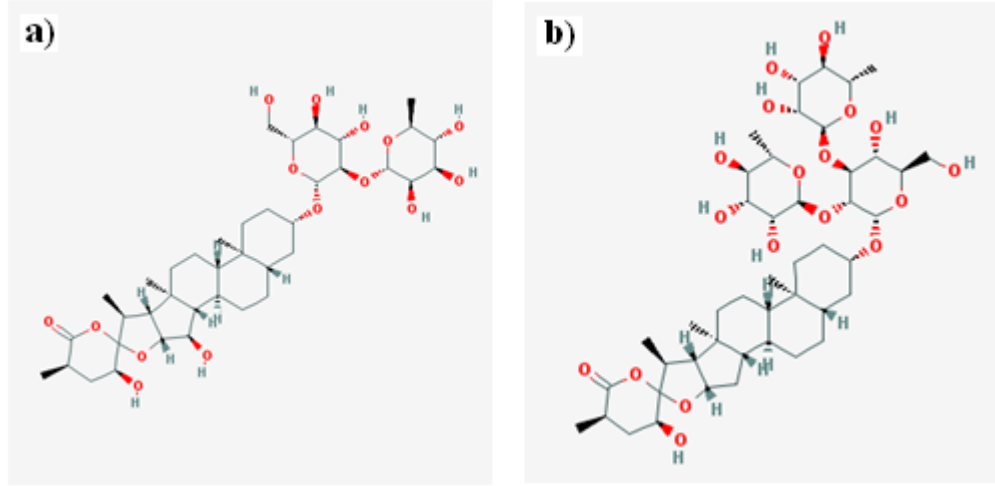
*Solanum dulcamara*'nın doku kültürlerinde 4,4-dimetilsterol, sikloartenol, sikloartanol, 24-dihidrolanosterol, 24-metilensikloartanol, kolestrol (Şekil 2.19.b.), 24-metilenkolesterol, kampesterol (Şekil 2.19.a.), stigmasterol (Şekil 2.18.b.), isofukosterol ve sitosteroller, GC ve GC/MS ile tayin edilmiştir (Willuhn 1982).



Şekil 2.19. a) Kampesterol bileşiği

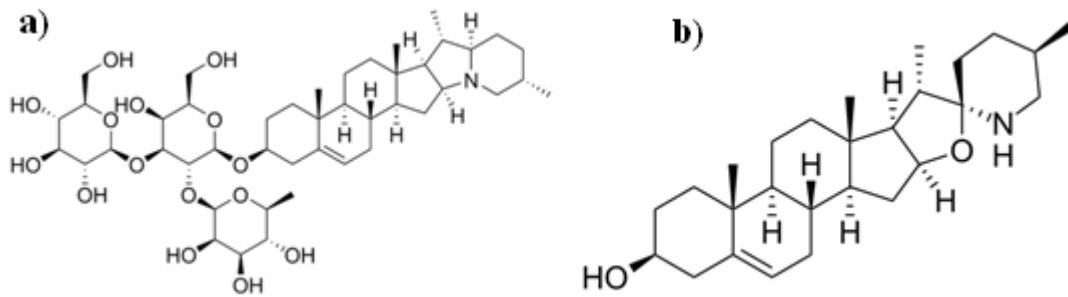
b) Kolestrol bileşiği

Yamashita ve arkadaşları (1991), *Solanum dulcamara* üzerinde yaptıkları araştırmada, yeni streoidal glikozitler (soladulcosides A (Şekil 2.20.a.) ve soladulcosides B (Şekil 2.20.b.)) bulmuşlardır.



Şekil 2.20. a) Soladulcoside A bileşiği b) Soladulcoside B bileşiği

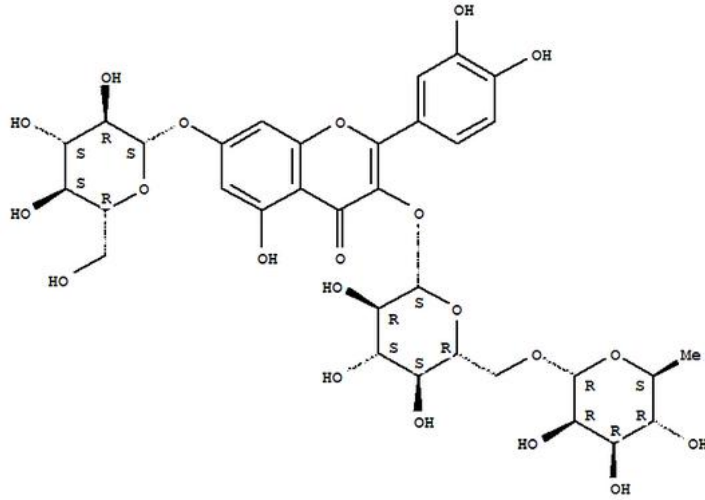
*Solanum dulcamara* bitkisinin kök, gövde, yaprak, çiçek, meyve ve tohum gibi bütün parçalarında alkaloidler bulunmuştur. Solanine (Şekil 2.21.a) (olgunlaşmamış meyvede), solasodine (Şekil 2.21.b.) (çiçekte) ve solamarine (kökte) alkaloidlerinin, antibakteriyal aktivesi incelenmiştir. *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* bakterileri bu araştırma için seçilmiştir. Her üç alkaloid de, *E.coli* ve *S.aureus*'un büyümelerini engellemiştir. Fakat en yüksek aktivite, *E.aerogenes*'e karşı gözlenmiştir (Padma ve ark. 2009).



Şekil 2.21. a) Solanine bileşiği b) Solasodine bileşiği

Nwachukwu ve arkadaşları (2010), *Solanum dulcamara*'nın yaprak ekstresinin, diyabetik farelerde kan şekeri düzeyi üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Ayrıca fitokimyasal testler sonucunda alkaloidlerin, flavonoidlerin, reçinenin, glikozitlerin, saponinlerin ve karbohidratların varlığını ortaya çıkarmışlardır. *Solanum dulcamara*'nın metanol ve su ekstraktlarının önemli antihiperglisemik özelliğe sahip olduğunu gözlemişlerdir.

Walkowiak ve arkadaşları (1990), *Solanum dulcamara* bitkisiyle yapmış oldukları çalışmalar sonucu kuersetin, kamferol, quercetin-3-rhamnoglucoside, kaemplerol-3-glucoside (Şekil 2.22.) bileşiklerini izole etmişlerdir.



Şekil 2.22. Quercetin-3-rhamnoglucoside bileşiği

## 2.2. Flavonoidler

### 2.2.1. Flavonoidlerin Doğada Bulunuşu ve Kullanımları

Doğada bir milyar yıldan beri var oldukları tahmin edilen flavonoidlerin (Swain 1975) bu süreç boyunca sürekli gelişme gösteren organizmalarla karşılıklı etkileşim halinde oldukları varsayılmaktadır.

Bakteri ve yosunların büyük bir kısmında bulunmayan flavonoidler, mantarlardan en yüksek yapılı bitkilere kadar geniş ölçekli bir yayılım göstermektedirler. Flavonoidler sahip oldukları biyolojik etkileri sayesinde bitkilerin sekonder metabolitleri arasında en önemli bileşik sınıfını oluşturmaktadırlar.

1936 yılında limon kabuğundan elde edilen flavon bileşiklerinin, P-vitamini ismiyle anılan, kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması, flavonoid bileşiklerine verilen önemi arttırmıştır. Bu sebepten dolayı flavonoid bileşiklerine karşı olan ilgi 1940'lardan itibaren çoğalmaya başlamıştır (Ryzsnyak ve Szent-Georgy 1936). 1970'li yıllardan itibaren giderek önemini arttırmıştır. Yürütülen çalışmalar sonucu flavonoid bileşiklerinin çok çeşitli biyokimyasal ve farmakolojik aktivite gösterdikleri anlaşılmıştır. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidant (Bors ve Saran 1987, Larson 1988), antimikrobiyal (Pratt ve Hudson 1990), antiviral, antiülserojenik, hipolidemik, hepatoprotektif, (Wagner 1989, Wagner ve ark. 1991, Hikino ve Kiso 1988), özelliklere ve iltihaba karşı etkiye (Moroney ve ark. 1988) sahip oldukları açıklanmıştır. Bunun yanında flavonoidlerin (kersetin ve kamferolun) antimitojenik ve antikarsinojenik etkilere sahip oldukları *in vitro* ve *in vivo* şartlarda belirlenmiştir (Kato ve ark. 1983, Huang ve ark. 1983, Verma ve ark. 1988, Deschner ve ark. 1991). Bu güne kadar yapılan araştırmalar sonucunda bitkilerden 4000'den fazla flavonoid bileşiği izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.

Bitkilerde rastlanan bu bileşikler, ilk fark edildiklerinde çiçeklerin mavi, kırmızı, turuncu, mor ve benzeri renklerinden sorumlu olan pigmentler olarak biliniyorlardı. Flavonoid bileşiklerine çoğunlukla bitkilerin çiçek, yaprak, gövde, kök, kabuk, dal, meyve gibi tüm organlarında rastlanmaktadır.

Flavonoidler bitkilerde sahip olduğu özellikler arasında antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan koruma gibi önemli özellikler vardır (Harborne ve ark. 1975, Harborne ve Mabry 1982). Bunlar haricinde flavonoid bileşikleri, bitkilerde fotosenteze ve büyüme hormonlarına etki ederler. Ayrıca solunumu ve enerji dönüşümünü düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunma özelliklerine sahiptirler (Smith ve Banks 1986). Yakın zamanda yapılan araştırmalarda (Firmin ve ark. 1986, Peters ve ark. 1986) flavonoid bileşiklerinin bitkilerde azotun tutulmasını düzenleyen bakteriyel genlerde yer aldıkları anlaşılmıştır. Bu özellik, flavonoid bileşikleri ile genler arasında yakın bir ilişki olduğunu düşündürmektedir.

Bu bileşiklerin antioksidan özellikleri, çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri, metaller ile tepkimede bulunma ve tabaklama maddelerinin (tanenlerin) bileşenine katılmalarından, besin, tekstil, deri, metalürji, tıp, ziraat gibi alanlarda kullanılma olasılıklarının artmasından dolayı son yıllarda flavonoid bileşiklerinin endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılması amacıyla yürütülen çalışmaların sayısı artmaktadır.



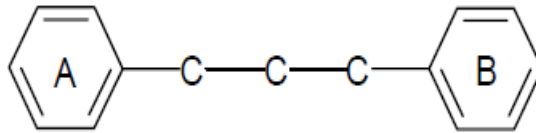
Bazı flavonoid bileşiklerinin UV ışınlarından koruma özelliğine sahip olmaları sebebi ile kozmetik ürünlerde, özellikle kremlerde önemli bir katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Metal iyonları ile reaksiyon verme kapasitesine sahip olduklarından analitik amaçla uranyum, zirkonyum, titan ve diğer metallerin tayininde kullanılabilirler.

Flavonoid bileşiklerinin C vitamini ile birlikte et ve et ürünlerinin proteolizini hızlandırdığı görülmüştür. Bu nedenden dolayı flavonoid bileşiklerinin et ve konserve sanayisinde de kullanılması söz konusudur (Harmandar ve Bilaloğlu, 1999).

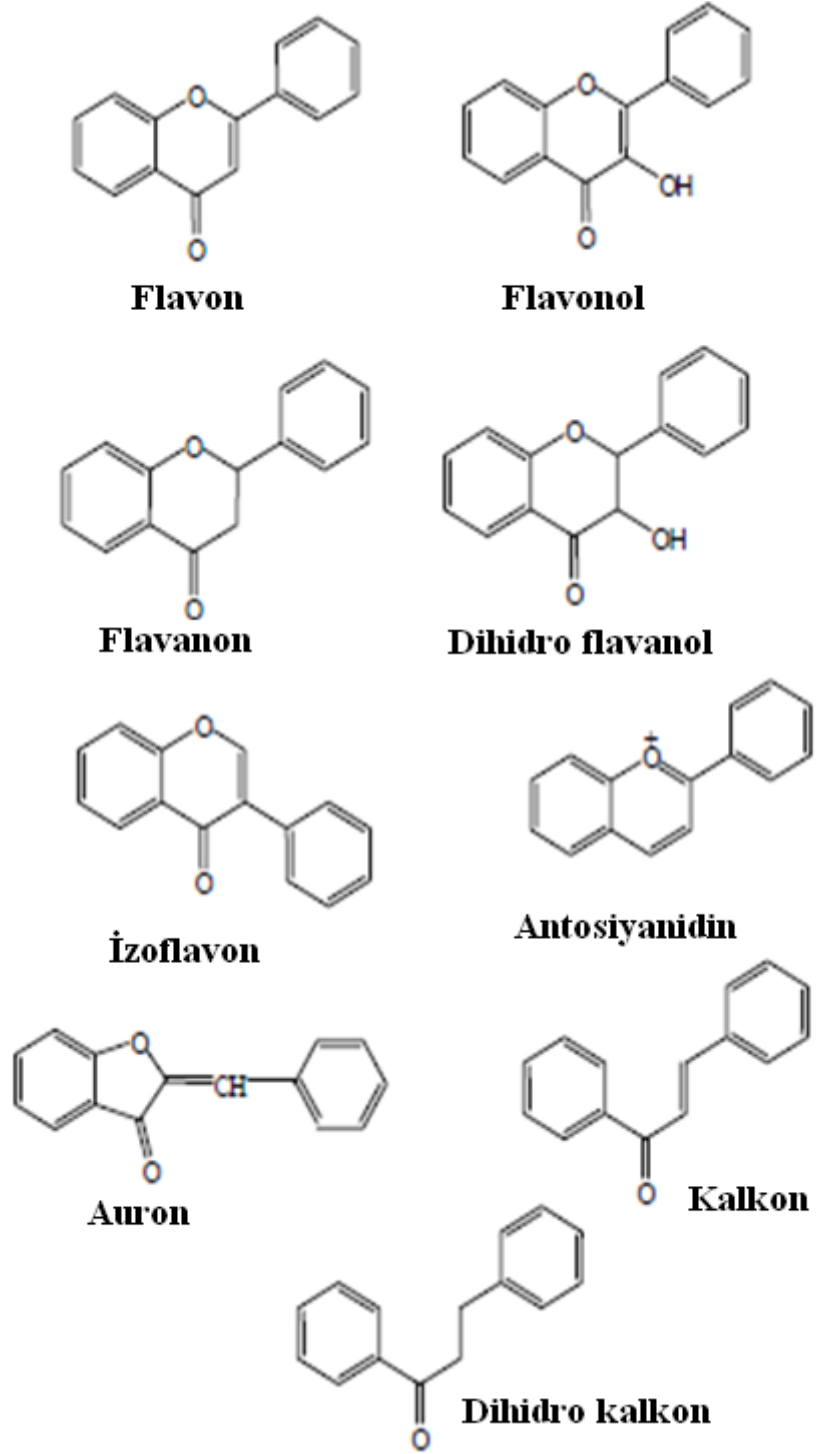
Günümüzde bitkilerden izole edilen 4000'den fazla flavonoid özellikli bileşik bilinmekte ve flavonoid içeriği bakımından henüz incelenmemiş on binlerce bitki türü bulunmaktadır.

### 2.2.2. Flavonoidlerin Yapısal Özellikleri ve Sınıflandırılması

Flavonoid bileşiklerinin karbon iskeleti, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesi sonucu oluşturmaktadır. 15 karbon atomu içeren flavonoid iskeleti  $C_6-C_3-C_6$  konfigürasyonunda düzenlenmiştir (Şekil 2.23.). Üç karbonlu propan zincirinin üçüncü bir halka oluşturması, fenil gruplarının farklı pozisyonlarda bağlanması veya farklı şekiller alması sonucu flavonoid bileşiklerinin çeşitli sınıfları oluşmaktadır (Şekil 2.24.).

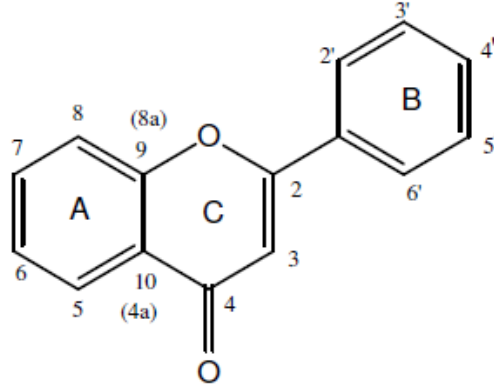


Şekil 2.23. Genel flavonoid iskeleti



Şekil 2.24. Flavonoid bileşiklerinin farklı iskelet yapıları ile oluşan sınıfları

Flavon yapılarındaki aromatik halkalar **A** ve **B**, heterohalka ise **C** ile gösterilir (Şekil 2.25.) **A** ve **C** halkalarındaki (benzopiran çekirdiğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. **B** halkasındaki atomlar ise (') rakamlarla numaralandırılır. Bazı araştırmacılar flavonoid yapısındaki C-9 ve C-10 atomlarını C-8a ve C-4a olarak da göstermektedirler.



Şekil 2.25. 2-fenilbenzopiran yapısı

Flavonoidler kimyasal bakımdan 2-fenilbenzopiran yapısı gösterirler (Mabry, 1970) (Şekil 2.25.).

### 2.2.3. Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri

Flavonoidlerin belirlenen ilk biyolojik özelliği kılcal damar duvarlarına olumlu etkileridir (Ryzsnyak ve Szent-Greorgy 1936). Bu bileşiklerin kılcal damarlara olumlu etkisi, genellikle kan sızdırmanın önlenmesi, kırılgnalık ve geçirgenliğin ortadan kalkması gibi özellikler şeklinde olmuştur (Jeney ve Uri 1954). Flavonoid bileşiklerinden olan flavon ve flavonoller (Vogel 1971), katekinler (Zaprometov 1964), lökoantosiyanidinler (Tayeau 1962) ve flavanonların (Vogel 1971) kılcal damar tedavisinde etkili oldukları gözlenmiştir. Borkowski flavonoid bileşiklerinin kan damarlarına olumlu etkisinin, spazmolitik özelliklerinden kaynaklandığını bulmuştur (Borkowski ve Krug 1960).

Flavonoidlerin kanın bileşenleri üzerine etkisi olduğu görülmüştür. Örneğin, *Hedusarum* L. türünün toplam flavonoid bileşiklerinin eritropezi (eritrosit oluşumu) arttırdığı ve kanda lökositlerin (akyuvarlar) miktarını çoğalttığı gözlenmiştir (Ruş ve Kulikov 1971). 3-metilflavonoid bileşiklerinin kanın forumlu elementlerine (bu elementler kan hücrelerinin agregasyon ve sedimentasyonunu önlerler) etki gösterdikleri de açıklanmıştır (Robbins 1973).

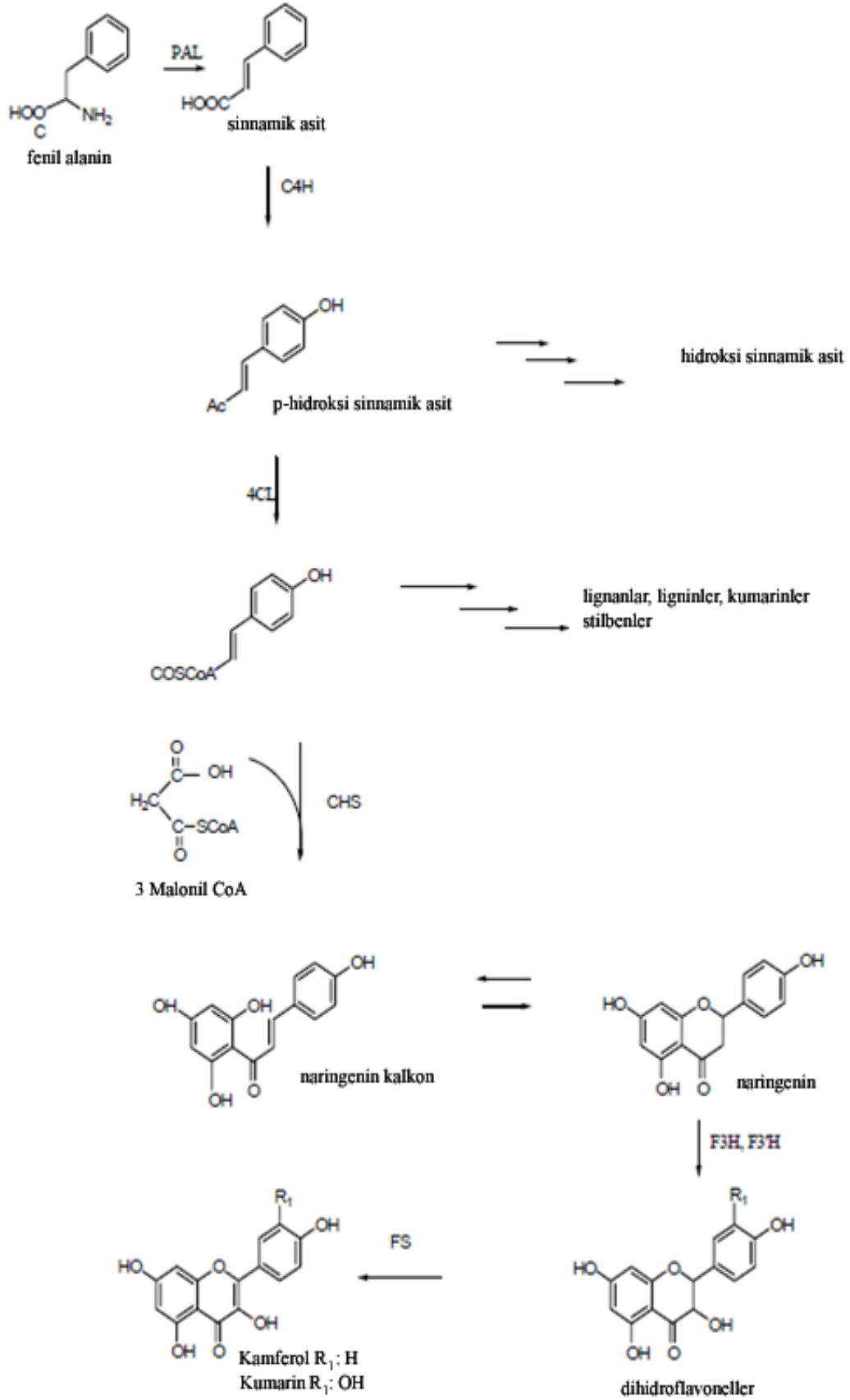
Flavonoidler kan damarlarına etkilerinin yanı sıra, zayıf kardiyotonik (kalp kuvvetlendirici) maddeler olarak da bilinirler. Bunlar kalp ritimlerinin kısılmasını sınırlama ve genliğini artırma özelliği gösterirler. Farklı bir araştırma sonucuna göre kersetin, rutin ve bazı flavonol bileşikleri zayıf (hipodinamik) kalbi kuvvetlendirme, nabızı normalleştirme özelliğine sahip oldukları bulunmuştur (Jeney ve Uri 1954). Bazı flavonoid bileşiklerinin zayıf hipotansif etki gösterdikleri de açıklanmıştır.

Flavonoid bileşiklerinin bilinen en önemli özelliklerinden biri de, karaciğer fonksiyonuna olumlu etki etmeleridir. Flavonoid bileşiklerinin safra salgılamasını hızlandırdıkları, karaciğerin barbiturat (Xadjay 1972) ve arsenik (Davidovic ve Klostermann 1954) gibi bileşiklere karşı detoksikasyonunu etkiledikleri gözlenmiştir. Flavonoid bileşiklerinin detoksikasyon özelliğinin, idrar sökücü özelliği olmasından ileri geldiği anlaşılmıştır (Borkowski ve Krug 1960). Bazı flavonoid bileşikleri bağırsakların çalışmasını olumlu bir şekilde etkileyerek, sindirim aşamasına olumlu etki gösterirler.

Gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu flavonoid bileşiklerinin çok yönlü biyolojik ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidant özelliğe (Bors ve Saran 1987, Larson 1988), antimikrobiyal (Pratt ve Hudson 1990), antiülserojenik, antiviral, hepatoprotektif, hipolidemik (Wagner 1989, Wagner ve ark. 1991, Hikino ve Kiso 1988) ve iltihaba karşı etkiye (Moroney ve ark. 1988) sahip oldukları açıklanmıştır. Bunlardan başka flavonoidlerin (kersetin ve kamferolun) antimitojenik ve antikarsinojenik etkilere sahip oldukları *in vitro* ve *in vivo* şartlarda belirlenmiştir (Kato ve ark. 1983, Huang ve ark. 1983, Verma ve ark. 1988, Deschner ve ark. 1991).

#### **2.2.4. Flavonoidlerin Biyosentezi**

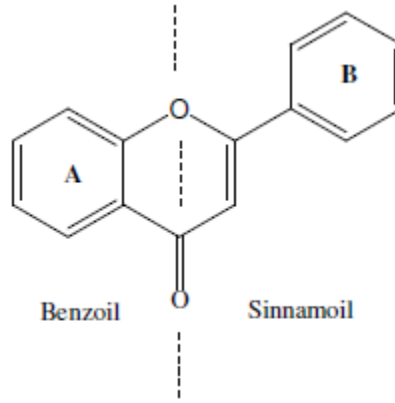
Bitkilerin sekonder metabolitleri arasında yer alan flavonoid bileşikleri, bitkilerin enerji dönüşümü ile elde ettikleri ve yaşamsal ihtiyaçlarını karşıladıkları karbohidrat, aminoasitler gibi primer metabolitlerden türerler (Şekil 2.26.) (Burbulis 1996). Bitkilerin fotosentez yapması sonucunda oluşturulan bütün karbonların yaklaşık olarak %2'sinin flavonoid bileşiklerine veya ilgili diğer bileşiklere dönüştürüldüğü varsayılmaktadır (Smith 1986).



Şekil 2.26. Flavonoid bileşiklerinin biyosentezi

Flavonoidlerin biyosentez araştırmaları sonucunda elde edilen verilere göre, fenilalanin gibi aminoasitlerin enzimatik deaminasyonundan oluşan sinnamik asit türevlerinin, asetil CoA ile kondenzasyonundan ya da malonil CoA kondenzasyonundan oluştukları tespit edilmiştir (Dewick 2001, Harborne 1975).

Malonil koenzim A'dan gelen kısım benzeoil (A) halkasını, sinnamik asitinden gelen kısım ise sinnamoil (B) halkasını meydana getirmektedir (Sekil 2.27.) (Mabry 1970).



**Şekil 2.27.** Flavonoid bileşiklerinin benzoil (A) ve sinnamoil (B) halkası

Biyosentez sırasında kalkan/flavon izomerizasyonu, çevrilme, oksidasyon, glikozillenme ve alkilasyon gibi birçok ara reaksiyonlar da bulunur. Vitamin aktivitesine sahip olan flavon türleri genellikle biyoflavonoid bileşikleri şeklinde adlandırılırlar. Tıbbi literatürde ve klinik terminolojide vitamin P deyiimi flavonoidlere göre daha yaygın olarak kullanılmaktadır (Harmandar ve Bilaloglu 1999).

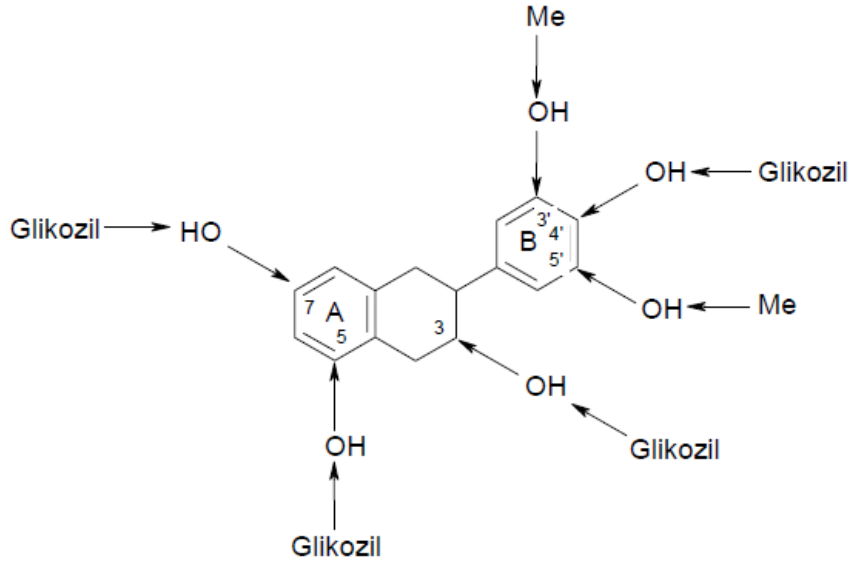
### 2.2.5. Flavonoidlerde Yapı eşitliliği

Flavonoid bileşiklerinde yapı çeşitliliği, sadece difenilpropan iskeletinin farklı yapılarla düzenlenmesiyle sınırlı değildir. Ayrıca, her sınıf içinde, molekülün aromatik (A ve B) halkalarına bağlanan sübstitüentlerin sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonları flavonoid bileşiklerinde gözlenen yapı farklılıklarına sebep olmaktadır.

Flavonoid bileşiklerinin yapısında en yaygın gözlenen süstitüentler hidroksil gruplarıdır. Flavonoid bileşiklerinin yapısında hidroksil gruplarının bulunması biyosentez sonucudur. Doğal flavonoid bileşiklerinin en fazla yedi hidroksil gurubu içerdiği anlaşılmıştır. A halkasının genellikle C-5 ve C-7 pozisyonlarında hidroksil bağlanmasına yatkın olduğu gözlenmektedir. Ancak, A halkasına başka pozisyonlarda da hidroksil bağlanan flavonoid bileşikleri de doğada yaygın olarak bulunmaktadır. B halkasında ise genellikle C-4' pozisyonu, çoğu kez C-3' ve C-5' pozisyonlarına hidroksil bağlandığı gözlenmiştir. C-3' ve C-5' pozisyonundaki hidroksil grupları çoğu kez metillenmiş halde bulunmaktadırlar. Hidroksil grubu bulundurmeyen aromatik halkalar ya da C-2' pozisyonunda hidroksil grubu bulunduran flavonoid bileşikleri doğada çok nadir olarak bulunmaktadırlar.

Flavonoid bileşiklerinin yapısındaki hidroksiller, reaktif olarak aktif olmalarında dolayı, kolaylıkla alkillenmekte yada glikozillenmektedirler. Bu nedenle, flavonoid bileşiklerinin metoksi ve glikozil türevleri bitkilerde sık gözlenir. Metoksi flavonoid bileşiklerinin yapılarında birden yediye kadar metoksi grubuna rastlanılabilmektedir. Doğada en çok mono-, di- veya trimetoksi flavonoid bileşikleri gözlenmektedir. Flavonoid bileşiklerinin C-5 ve C-7 pozisyonlarındaki hidroksil gruplarına nadir hallerde metil bağlanmış olarak bulunurlar.

Flavonoid bileşiklerinin yapılarında süstitüentlerin genel yerleşme pozisyonları Şekil 2.28. de verilmiştir. Bitkilerde flavonoid bileşiklerine genellikle mono-O-glikozitler halinde rastlanılmaktadır. Fakat di- ve trisakkaritlerle glikozillenmiş flavonoid bileşiklerine de doğada sık olarak rastlanılmaktadır. Bitkilerde rastlanan flavonoid glikozitlerin diğer bir türünü de C-glikozitler oluşturmaktadır (Bilaloğlu 1999).

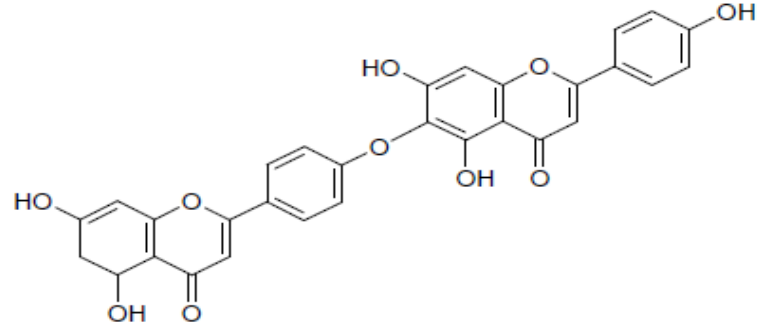


**Şekil 2.28.** Flavonoid yapılarında süstitüentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları

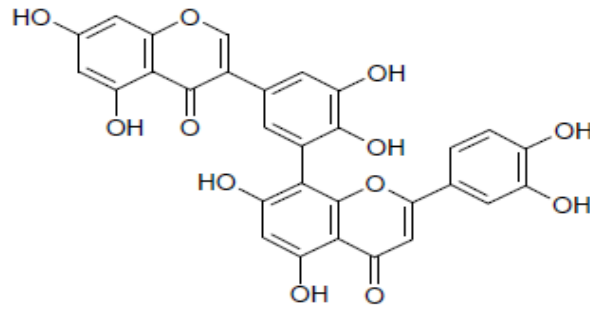
Bitkilerde flavonoid bileşiklerinin dimer türleri de yaygındır. Bu tür bileşikler biflavonoid bileşikleri olarak isimlendirilirler. Biflavonoidler monomer flavonoid moleküllerinin kondenzasyonu sonucu oluşurlar. Çoğu flavonoid bileşikleri bu tür reaksiyonlara girme özelliğine sahiptirler. Biflavonoid yapılarında, flavonoid birimleri birbiriyle -O-C- veya -C-C- bağı ile bağlanmışlardır (Şekil 2.29.). Biflavonoidler ilk olarak 1970'li yıllarda bulunmuştur. Monomer birimleri -C-C- ve -O- bağılı biflavonoidlere ait örnekler aşağıda verilmiştir (Harmandar ve Bilaloğlu 1999).

İnsan sağlığı açısından da çok önemli bir yere sahip olan biflavonoidler hakkında yapılan çalışmalar sonucunda güçlü antioksidan (Edremitlioğlu ve ark. 2011, Magalingam ve ark. 2013), antiviral (Keivan ve ark. 2011, Khachatoorian ve ark. 2012), antidiabetik (Ramjith ve ark. 2013) ve antimikrobiyal (Hooper ve ark. 2011) aktivitelerini gösterdiği bulunmuştur.





Hinokiflavone



Bryoflavone

Şekil 2.29. Biflavonoid bileşiklerine örnekler

## 2.3. Flavonoid ve Fenolik Bileşiklerin Ayırma ve Saflaştırma Metodları

### 2.3.1. Ekstraksiyon Teknikleri

Bitki örneklerinden fenolik bileşiklerin izolasyon çalışmaları çoğunlukla seçici ekstraksiyon yöntemiyle yapılır. Bu yöntemle fenolik bileşikler, bitki örneğinden farklı çözücülerle, polaritenin artış sırası ile, ardarda ekstraksiyon yapılarak izole edilirler.

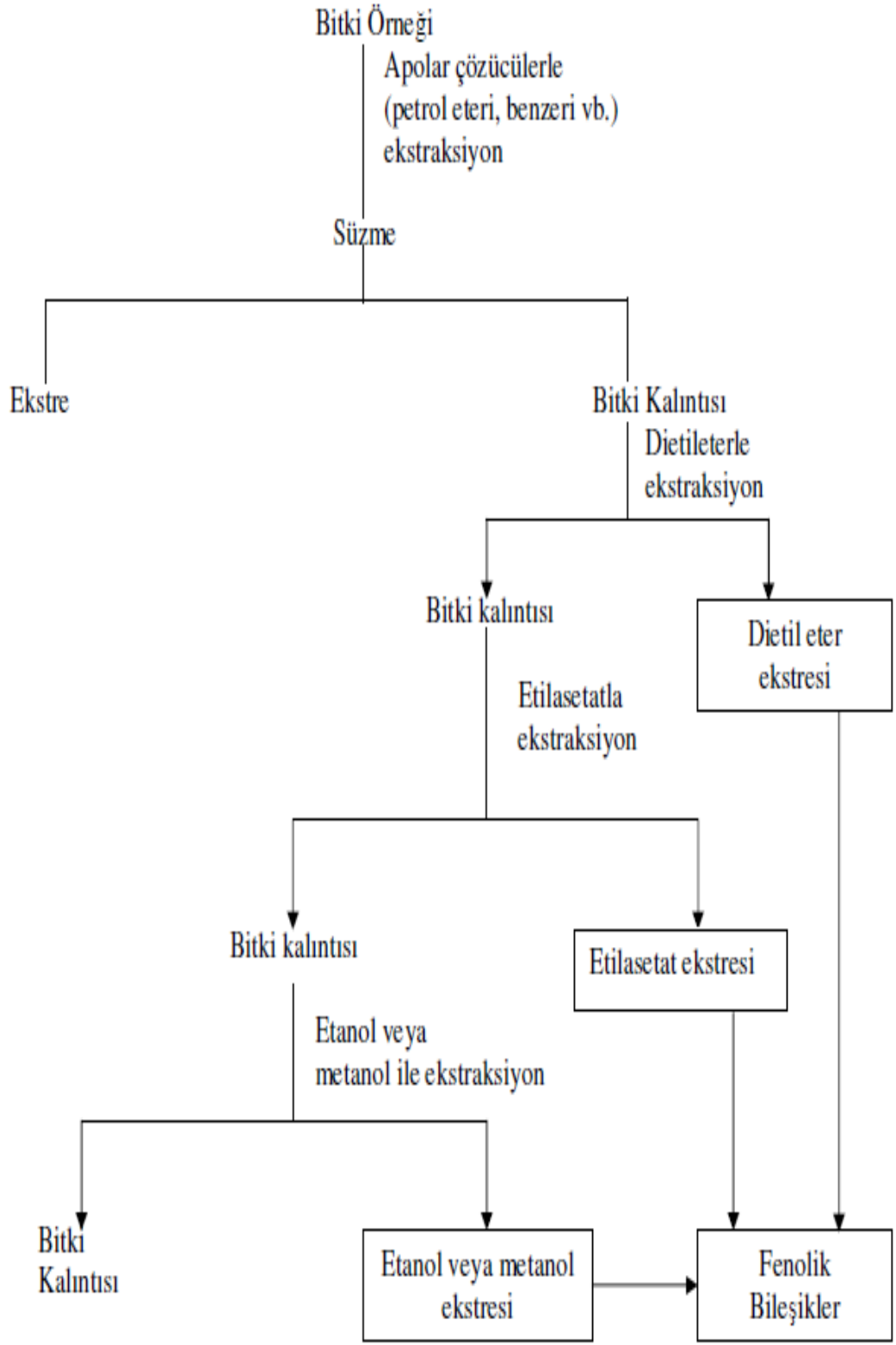
Böyle bir ekstraksiyon yapılırken, bitki örneğini lipofil karakterli bileşiklerden (klorofil, karotenoidler, steroller, yağlar, vakslar vb.) arıtmak için önce petrol eteri veya hekzanla işlem yapılması gerekir. Daha sonra bitki kalıntısı artan polaritede çözücülerle; dietil eter, etil asetat, etanol veya metanol ve bunların farklı konsantrasyonlarla sulu çözeltileri ile ardarda ekstre edilir. Seçici ekstraksiyon yöntemi ile bitkilerden fenolik bileşiklerin izolasyonu şematik olarak Şekil 2.30.'de verilmiştir.

Başka bir yöntem ise şöyle açıklanabilir: Bitki örneği önce apolar çözücü ile muamele edilerek lipofil bileşiklerden arındırılır. Sonra ise, düşük molekül ağırlıklı alkolle (metanol

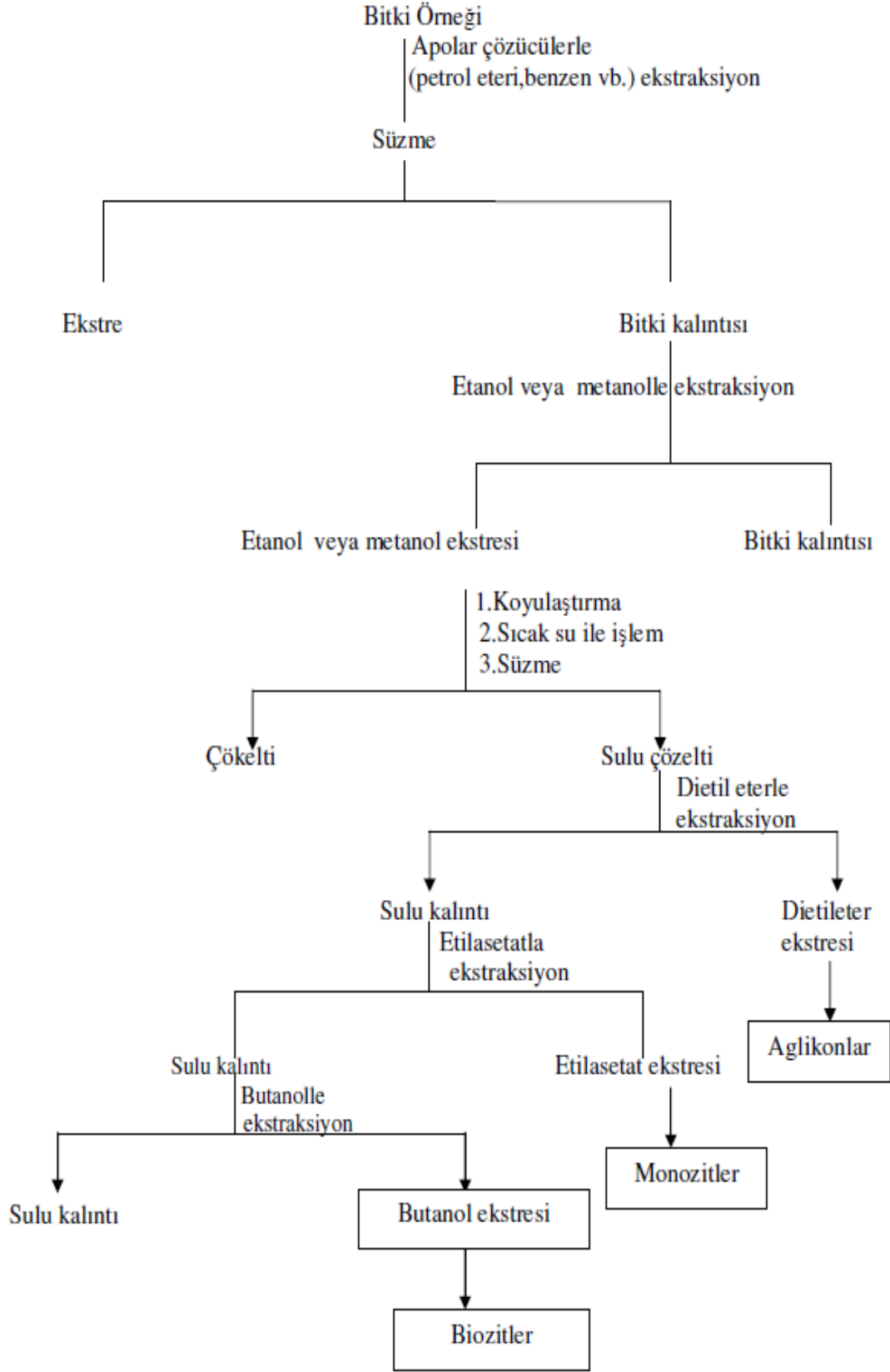
veya etanol) veya bunların sulu çözeltileriyle birkaç kez ekstre edilir. Bu yöntem şematik olarak Şekil 2.31.'de gösterilmiştir (Harmandar ve Bilaloglu 1999).

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

Antosiyoninlerin bitkilerden izolasyonu, kimyasal özelliklerinden dolayı fenolik bileşiklerin ekstraksiyon yöntemlerinden kısmen farklıdır. Bu bileşiklerin bitkilerden izolasyonu için asidik özellikli çözücü sistemlerinin kullanılması gerekir. Antosiyoninlerin ekstraksiyonu genellikle HCl'in farklı konsantrasyonlarda metanol ve etanol çözeltileri ile yapılır. Antosiyoninlerin metanol ve etanolün %1'lik HCl çözeltileriyle iyi bir verimle ekstrakte edildiği gösterilmiştir (Harmandar ve Bilaloglu 1999).



Şekil 2.30. Bitki örneklerinden seçici ekstraksiyon yöntemi ile izolasyon şeması



Şekil 2.31. Fenolik bileşiklerin bitkilerden izolasyonu için ikinci yöntem

### **2.3.2. Flavonoid ve Fenolik Bileşiklerin Kromatografik Analiz Yöntemleri**

Fenollü bileşiklerin analizinde kağıt, ince tabaka, kolon kromatografisi, yüksek basınçlı likid kromatografisi (HPLC), kağıt üzerinde elektroforez teknikleri önemli yer tutmaktadır.

Fenolik bileşiklerin kromatografik tekniklerle incelenme yöntemleri Karrer ve Strong tarafından geliştirilmiştir. Bu araştırmacılar daha önce de antosiyaninlerin kalsiyum sülfat ve alüminyum oksit kolonlarından ayrılmasının mümkün olduğunu göstermiştir (Karrer ve Strong 1936).

#### **2.3.2.1. Kağıt Kromatografisi**

Kromatografik incelemelerde kullanılan kağıt türünün özelliğinin büyük önemi vardır. Bu nedenle, kağıt kromatografisi tekniklere özel saflığa sahip, selüloz filtre kağıdı kullanılır. Yüksek kaliteli kromatografik kağıt türlerinden biri Whatman No:4'dür. Bu kağıt türü saflığına ve ayırma yeteneğine göre Whatman No:1'e yakındır. Ancak Whatman No:1'e göre yoğunluğu fazladır ve bu nedenle yüzeyine daha fazla miktar karışım uygulanabilir. Aynı zamanda bu kağıt türünde ayrılma diğer türlere göre daha çabuk ve etkili olur.

Kağıt kromatografisi ile analizlenen karışımın bileşenlerine ayrılmasına etki eden faktörlerden birisi de çözücü sisteminin özellikleridir.

Kağıt kromatografisi tekniği ile fenolik bileşiklerin ayrılmasında yaygın bir şekilde kullanılan çözücü sistemlerinin bazıları Çizelge 2.1.'de gösterilmiştir. Kağıt kromatografisi miligram miktardaki bileşiklerin izolasyonunda da faydalıdır (Dey ve Harborne 1989).

**Çizelge 2.1.** Kağıt Kromatografisinde Kullanılan Çözücü Sistem (Dey ve Harborne 1989)

<b>Sistemin Bileşenleri ve Simgesi</b>	<b>Bileşenlerin Oranı</b>	<b>Ayrılacak Bileşikler</b>
n-Butanol-asetik asit-su (BAW)	4:1:5 (üst faz)	Tüm fenolik bileşikler
n-Butanol-etanol-su (BEW)	20:5:11 (homojen)	Flavonoid glikozidler
n-Butanol-2N HCl (BuHCl)	1:1 (üst faz)	Antosiyaninler
n-Butanol-2N amonyak (BN)	1:1 (üst faz)	Sinamik asitler, Kumarinler, ksantonlar, Biflavonoid ve basit fenolikler
Fenol-su (PhOH)	4:1 (homojen)	Özellikle metillenmiş flavonoidler
Benzen-propiyonik asit-su (BPA)	2:2:1 (üst faz)	Fenolik asitler
Benzen-asetik asit su	125:72:3 (homojen)	İzoflavonlar ve metillenmiş flavonlar
2-propanol-amonyak-su	8:1:1 (homojen)	Fenolik asitler
Asetik asit-der. HCl-su (Forestal)	30:3:10 (homojen)	Flavonoid aglikonlar
Su veya %5-15 sulu HOAc	-	Flavonoid glikozitler, Basit fenoller ve flavononlar
Kloroform-asetik asit-su (CAW)	13:6:1 (homojen)	Flavonoller ve flavonlar

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

Kromatograma önce UV ışığında ve sonra NH<sub>3</sub> buharları ile muamele edildikten sonra tekrar UV ısında bakılması lekelerin yerlerinin belirlenmesini sağlar. Flavonoidlerin çoğunluğu UV ısın etkisinde floresans yapar veya floresansı absorblarlar. UV ısında flavon ve flavonol glizkozitlerin lekeleri mor renkte görünür, kromatogram NH<sub>3</sub> buharlarına tutulduktan sonra sarı veya sarımsı yeşil renge dönüşürler. Bu yöntemden faydalanarak, flavonoidlerin ön teşhisine ait sonuçlar Çizelge 2.1.'de verilmiştir.

**Çizelge 2.2.** Flavonoid bileşiklerinin kağıt kromatografisinde renk reaksiyonları ve yapı ilişkisi (Dey ve Harborne 1989)

UV	UV/NH <sub>3</sub>	UV/NA	Yapı
Koyu Mor	Sarı	Sarı	a)Flavon 5-OH ve 4'-OH
	Sarı-yeşil	Sarı	b)Flavon 5-OH ve 4'-OH, 3-OR
	Sarı	Oranj	c)Flavon 5-OH , 3', 4'-OH
	Sarı-yeşil	Oranj	d)Flavonol 5-OH , 3', 4'-OH, 3-OR
Koyu Mor	Renk değişmez	Kahve-mor	a)Flavon 5-OH ve 4'-OH
	Kahve-mor	Kahve-mor	b)Flavon 5-OH ve 4'-OH, 3-OR
	Kahve-mor	Mor	c)Flavonol 5-OH, 4'-OH, 6-OR
Soluk Sarı	Renk değişmez	Sarı	a)Flavonol 3-OH, 5-OH ya da 5-OR
	Renk değişmez	Oranj	b)Flavonol 3-OH, 3', 4'-OH
Açık Mavi	Sarı-yeşil	Sarı-yeşil	a)Flavon 5-OR
	Mavi-yeşil-floresans	Sarı	b)Flavonol 5-OR, 3-OR
	Mavi-yeşil-fluoresans	Oranj	c)Flavonol 5-OR , 3', 4'-OH

### 2.3.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi (TLC) genellikle, fenolik bileşiklerin tüm sınıflarını ayırmak için uygulanır. Fakat temel uygulaması, hidrofilik olmayan fenolik bileşiklerin silika jel ince tabakada ayrılmasıdır. Bunlar metillenmiş flavonlar, tüm kinon tipleri ve özellikle izoprenillenmiş izoflavonoidlerdir. Ancak hidrofilik fenolik bileşikler de mikrokristalin selüloz veya poliamid TLC plaklarında ayrılabilirler. İnce tabaka kromatografisinin kağıt kromatografisine üstünlüğü daha çok sayıda çözücü seçimi şansı olması ve ayırma hızının geliştirilebilmesidir. Ayırma gücü ince tabaka kromatografisinde kağıt kromatografisinden daha iyidir. Bu özellikle HPTLC olarak bilinen ve adsorban olarak çok küçük boyutta silikajel partikülleri kullanılan teknikte söz konusudur (Dey ve Harborne 1989).

İnce tabaka kromatografisinde sellüloz da yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu adsorban kromatografik özelliklerine göre kağıda benzer. Ancak kağıt kromatografisinden farklı olarak birbirine yakın bileşiklerin daha iyi ayrılmasını sağlar.

Fenolik bileşikler ince tabakada yürütüldükten ve levhadan çözücü tümüyle uçtukten sonra kromatograma UV ışıktaki bakılır. Flavonoidler 254 nm'de UV'yi yansıtmazlar ancak 366 nm'de yapı özelliklerine bağlı olarak mor, sarı, yeşil, veya mavi floresans gösterirler. Fenolik karboksilli asitler (örneğin kafeik, klorojenik asit vb.) ve kumarinler kromatogramda UV ışın etkisi ile mavi floresans verirler.

İnce tabakada spotları açığa çıkarmak amacı ile çeşitli reaktiflerden faydalanılır. Bu reaktiflerden biri iki çözelti sisteminden oluşan Natural Products Polyethylene Glycol Reagent (NP/PEG)'dir. Bu reaktif difenilborikasidin  $\beta$ -aminoetil eterinin %1'lik metanol ve polietilen glikol-4000'nin %5'lik etanol çözeltisini içerir. Bu reaktifler kromatograma sırası ile püskürtülür. NP/PEG reaktifi ile işlemden sonra UV-366 nm'de flavon ve flavanol glikozidler çoğunlukla portakal sarısı veya sarı-yeşil, flavonon glikozidler ise esmer-yeşil floresans gösterirler. Fenol karboksilli asitler ise, açık mavi lekeler olarak görünürler (Harmandar ve Bilaloglu 1999).

Çizelge 2.3.'de fenolik bileşiklerin ana sınıfları için, TLC'de kullanılabilecek uygun çözücü sistemleri verilmiştir (Harmandar ve Bilaloglu 1999).



**Çizelge 2.3.** Fenolik bileşiklerin TLC ile ayrımında kullanılabilir absorbanlar ve çözücü sistemleri (Harmandar ve Bilaloglu 1999)

Sınıf	Adsorban	Çözücü Sistemi	Belirleme Metodu
Antosiyanidinler	Selüloz	Der. HCl-HOAc-H <sub>2</sub> O	Gün ışığında renkli
Antosiyaninler	Selüloz	n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O (4:1:5)	Gün ışığında renkli
Auronlar	Selüloz	n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O (4:1:5)	Gün ışığında renkli
Biflavonoidler	Silikajel	Toluen-HCO <sub>2</sub> Et-HCOOH (5:4:1)	Gün ışığında renkli
Kalkonlar	Selüloz	n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	Gün ışığında renkli
Kumarinler	Selüloz	%10 HOAc	UV'de renkli
Dihidroalkonlar	Selüloz	H <sub>2</sub> O	UV'de renkli
Flavanonlar	Selüloz	%5 HOAc	UV'de renkli
Flavonlar, Flavanol, Aglikonlar	Selüloz	HOAc-der HCl-H <sub>2</sub> O (30:3:10)	UV'de renkli
Glikozidler	Selüloz	n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	UV'de renkli
Glikoflavonlar	Silikajel	EtoAc-piridin-su-MeOH (16:4:2:1)	UV'de renkli
Hidroksisinnamik asitler (Serbest)	Selüloz	Benzen-HOAc-H <sub>2</sub> O (6:7:3)	UV'de renkli
Hidroksisinnamik asitler (Esterleşmiş)	Silikajel	Toluen-HCO <sub>2</sub> Et-HCO <sub>2</sub> H (2:1:1)	UV'de renkli
İzoflavonlar	Silikajel	CHCl <sub>3</sub> -MeOH (89:11)	Folin-Ciocateu
Lignanlar	Silikajel	EtOAc-MeOH (19:1)	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Fenolik asitler	Silikajel	HOAc: CHCl <sub>3</sub> (1:9)	Folin
Fenilpropenler	Silikajel	Hekzan: CHCl <sub>3</sub> (3:2)	Vanilin / H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Fenoller	Selüloz	Benzen-MeOH-HOAc (45:8:4)	Folin
Proantosiyandinler	Selüloz	İzo-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O	Kısa UV
Antrakınonlar	Silikajel	EtOAc-MeOH-H <sub>2</sub> O	Gün ışığında renkli
Stilbenler	Selüloz	n-BuOH-HOAc-H <sub>2</sub> O (4:1:5)	UV'de renkli
Ksantonlar	Silikajel	CHCl <sub>3</sub> :HOAc (4:1)	UV'de renkli

### 2.3.2.3. Kolon Kromatografisi

Bitkilerden elde edilen ekstrelerin ön saflaştırılması, bileşenlerin birbirinden ayrılması ve aynı zamanda bileşiklerin miligram miktarlarda saf halde elde edilmesi için kolon kromatografisi kullanılır. Kolon kromatografisinde, selüloz, iyon değiştirici reçineler, silika jel, poliamid ve sefadeks gibi adsorbanlar kullanılır. Kolon kromatografisinde kullanılan bazı adsorbanların özellikleri aşağıda verilmiştir.

**Silikajel:** Silikajel kolonlar düşük polariteli aglikon flavonoidleri, az sayıda hidroksil grubu taşıyan fenolik bileşikleri ayırmak için daha uygundur. Kolonu konsantre HCl ile yıkamak silikajelin yapısında bulunan eser miktardaki Fe iyonlarını uzaklaştırır. Aksi takdirde bu iyonlar hidroksillenmiş aglikon flavonoidlerin kolona tutunmasına neden olur. Düşük polariteye sahip çözücülerin kullanılması tavsiye edilir. Benzen:kloroform (1:1) oranından  $CHCl_3$ 'a ve artan oranda EtOAc'a gidilir. En yaygın olarak kullanılan silikajel adsorban Kieselgel 60, 70-230 mesh (Merck) tir (Markham 1975).

**Selüloz:** Selüloz kolonlar özellikle flavanoidler olmak üzere tüm fenolik bileşik sınıflarını ve bunların glikozidlerini ayırmak için yararlı bir adsorbandır. Solvent kullanımına bağlı olarak adsorbsiyon ve partisyon kromatografisi uygulanabilir. Selüloz kolonun sınırlı ayırma kapasitesini arttırmak için silika jelselüloz (1:1;w/w) karışımı kullanılabilir (Van de Catelle ve ark. 1976). Selüloz kolondan elüsyon kağıt kromatografisinde uygulanan çözelti sistemleri ile yürütülebilir. Ya da farklı oranlarda metanol ve su içeren çözücü sistemleri kullanılır. Selüloz adsorbanların en yaygın olanları mikrokristal selüloz (Merck, Macheray ve Nagel) ve Whatman CF-11 dir.

**Poliamid:** Poliamid kolonlar da fenolik bileşiklerin diğer bitki metabolitlerinden ayrılmasında kullanılan diğer bir seçenektir. Polikaprolaktam, polihekzametilen diamidoadipinat, polivinilpirolidon gibi poliamid reçineler kullanılır. Poliamid adsorbanların diğer adsorbanlar karşısındaki bazı üstünlükleri yüksek adsorban yeteneği ve elüsyonda basit çözücü sistemlerinin kullanılmasıdır. Genellikle ilk sırada su, sonra su-alkol karışimleri ve sonunda saf alkoller kullanılır (Hörhammer 1964). Bu kolonların tek dezavantajı kolon kullanımdan önce yıkanmaz ise çözünebilir poliamid fraksiyona bulaşabilir. Poliamid kolonlar kullanımdan sonra da yıkanarak tekrar kullanılması sağlanabilir (Markham 1982).

Flavonoidlerin poliamid adsorbanlardan elüsyonu için su, etil veya metil alkol, aseton, formamid veya metil alkol, aseton, formamid, veya dimetil formamid gibi polar çözücüler kullanılır. İzoflavon, flavon, flavonol glikozidler poliamid kolondan etanol veya metanolün artan orandaki çözeltileri ile elüe olurlar. Metoksi aglikonlar kloroform-etilasetat (3:1),

kloroform-metanol-n-butanol-aseton (20:10:5:1), kloroformmetanol (3:1) çözücü sistemleri yardımıyla elüsyon edilebilirler (Li ve ark. 1988).

Poliamid kolonlar ikinci aşama saflaştırmada da kullanılabilirler gibi ilk basamakta fraksiyonlandırma amacı ile de kullanılabilir (Wollenweber ve ark. 1985).

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

**Sefadeks jel:** Genellikle sefadeks LH-20 kullanılır fakat LH-60 ve G-25 sefadekslerin kullanımı da yaygındır. Kolon kromatografisi, TLC veya kağıt kromatografisi yoluyla izole edilen maddeler genellikle adsorbandan kaynaklanan kirlilikleri de taşırlar. Fakat sefadeks-LH-20 kolonlar elüsyon sırasında kirlilik taşımazlar bu yüzden son saflaştırma işlemleri için uygundur (Mc Cormick ve ark. 1985). Elüsyon genellikle metanol ile gerçekleştirilir. Fakat etanol-su veya metanol-su çözücü sistemleri de flavonol glikozidleri izole etmek için kullanılır (Sakushima ve Nishibe 1988).

Sefadeks LH-20 sadece organik çözücülerle de çalışma imkanı verdiği için suda çözünmeyen maddelerin ayrılması için uygundur. LH harfleri bu jelin hem lipofil hem de hidrofil çözeltilerde şişmesini gösteren bir simgedir.

**Ters Faz Kolon Kromatografisi:** Pahalı olmakla birlikte, polisakkarit bulaşmış glikozidleri saflaştırmak ve özellikle NMR deneylerinden sonra glikozidleri DMSO'dan ayırmak için oldukça faydalıdır. Örnek, sulu çözeltisi halinde kolona uygulanır ve doğrudan su ile yıkanır. DMSO kolondan su ile uzaklaştırılırken, glikozid kolondan MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) çözücü sistemi ile toplanır. Kolon yaklaşık 3 cm civarında olmalıdır. Çünkü kolonun akış hızı oldukça yavaştır. Aksi takdirde makul bir akış hızı için kolona biraz basınç uygulanmalıdır. Ters faz kolon kromatografisinde kullanılan adsorbanlar genellikle Lichroprep RP-8, RP-18 gibi adsorbanlardır (Markham 1982).

**İyon Değiştirici Reçineler:** Son zamanlarda fenolik bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılmasında iyon değiştirici reçinelerden de yararlanılmaktadır. Bu yöntem en çok flavonoidlerin ve fenolik bileşiklerin, suda çözünmez diğer fenolik olmayan safsızlıklardan ayrılması için uygundur (Lam ve Shaw 1970). Ekstrakt ön saflaştırma amacı ile iyon değiştirici reçine yüklenmiş kolondan uygun çözücü sistemi ile (%0,5-5 HOAc, %1 HCOOH veya su) yıkanır. Bu amaçla Zeokarb 222, Amberlit XAD-7, Amberlit CG-50, HP-20 vb. reçineler kullanılır. Kolonda kalan pigmentleri temizlemek için asetik asidin %10'lik metanolde hazırlanmış %2-5'lik çözeltisi ile yıkanarak ayrılırlar (Harmandar ve Bilaloglu 1999).

#### 2.3.2.4. HPLC (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)

HPLC' nin diğer kromatografik yöntemlere avantajı mükemmel bir kalitatif ve kantitatif ayrılma sağlamasıdır. HPLC'nin temel uygulaması benzer yapıya sahip 5-10 bileşenden oluşan karışımların ayrılmasıdır.

Fenolik bileşiklerin HPLC ile ayrılmasında pek çok farklı kolon dolgu maddesi ve çözücü sistemi kullanılmasına rağmen iki temel yöntem vardır.

1)Non-polar fenolik bileşiklerin silika kolonlarda izokritik elüsyonla kromatografisi

2)Polar fenolik bileşiklerin ters faz silika kolonlarda gradient veya izokritik elüsyonla kromatografisi.

Metillenmiş flavonların Lichrosorb Si-60 kolonda sabit heptan:etanol, (3:1) ile elüe edilmesi tipik bir izokritik ayırmadır (Bianchini ve Gaydou 1980).

Flavonoid glikozidlerin M.Bondapak C18 kolonda su:asetik asit:metanol'ün değişen oranlarında elüe edilmesi gradient elüsyona bir örnek olarak gösterilebilir (Harborne ve Bradley 1984).

Ultraviyole dedektörler HPLC'de en yaygın kullanılan dedektörlerdir. Elektrokimyasal dedektörler de daha hassas ve seçici olabilirler (Hayes ve ark. 1987). HPLC'de kullanılan basınç 34 MPa'dır. Son yıllarda kullanılan refraktif indeksin belirlenmesi prensibine dayalı olarak çalışan RI dedektörleri de UV aktif özellik göstermeyen bileşiklerin izolasyonunda önemli kolaylıklar sağlamaktadır.

Ters faz HPLC'de glikozidler, aglikonlardan önce elüe olurlar ve daha çok hidroksil taşıyan aglikonlar, az hidroksil taşıyan aglikonlardan önce elüe olurlar (Hayes ve ark. 1987).

C<sub>18</sub> kolon (oktadesil triklorosilan) ve M. Bonda pak C<sub>18</sub> kolon çoğunlukla kullanılan kolonlardır. Fakat C<sub>8</sub> ve diğer kolon dolgu maddeleri de kullanılır. HPLC'de kullanılan farklı tipteki kolonlar ve çözücü sistemleri Çizelge 2.4.'te verilmiştir (Hayes ve ark. 1987).

**Çizelge 2.4.** HPLC’de kullanılan farklı tipteki kolonlar ve çözücü sistemleri

Bitki Kaynağı	Kolon	Çözücü sistemi
<i>Ametanchier alnifolia</i>	LiChrosorb RP-18	%5 formik asit ve MeOH (Gradient)
<i>Camellia ssp.</i>	Nucleosil C <sub>18</sub>	%0,1 HClO <sub>4</sub> içeren %35’lik MeOH (suda)
<i>Empetrum nigrum</i>	M Bondapak C <sub>18</sub>	H <sub>2</sub> O-MeOH-formik asit (37:8:5)
<i>Gerbera CV.</i>	Radial Pak A(C <sub>18</sub> )	H <sub>2</sub> O, MeCN ve %1,5 H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> içeren asetik asit (Gradient)
<i>Vaccinium spec.</i> (meyve)	RP ODS (Tridom Chem.)	MeOH-HOAc-su (37:10:53)
<i>Rubus spec.</i>	Resolve C <sub>18</sub>	0,1 M fosfat tamponu (PH:2) ve MeCN (Gradient)
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Aquapore RP	H <sub>2</sub> O, MeOH ve MeCN (Gradient)
<i>Vaccinium vitisidaea</i>	ODS Hypersil	%10 formik asit içeren su ve MeOH (Gradient)
<i>Vitis vinifera</i>	Zorbax ODS	%10 formik asit içeren su ve MeOH (Gradient)
<i>Port wine</i>	Sphenisorb-Hexyl	%0.6 HClO <sub>4</sub> ve MeOH (gradient)
<i>Vaccinium uliginosum</i>	Supelcosil LC-18	%10 formik asit içeren su ve MeOH (Gradient)

## 2.4. Flavonoid ve Fenolik Bileşiklerin Yapı Açıklama Yöntemleri

### 2.4.1. Ultraviyole Spektroskopisi

Ultraviyole spektroskopisi fenolik yapıların belirlenmesi ve yapı özellikleri hakkında önemli bilgiler verir. Tüm fenolik bileşikler UV bölgede 230-290 nm’de bir veya daha fazla karakteristik absorpsiyon gösterirler. Bir baz etkisi ile iyonlaşmaya bağlı olarak absorbansta 15-50 nm’lik geniş bir batokromik kayma gösterirler. Bu tür ölçümler, ilk taramalar sırasında bilinmeyen bitki içeriğinin fenolik doğasının belirlenmesinde önemlidirler.

Fenolik bileşiklerin tipik spektral değerleri Çizelge 2.5.’de gösterilmiştir (Harborne ve Boardley 1984).

Basit fenoller ve fenolik asitler 230-290 nm arasında bir veya iki güçlü band gösterirler. Hidroksi sinnamik asitler 310-332 nm’de keskin bir absorpsiyon piki verirler. Fakat flavonoidler hem 255-285 nm aralığında hem de 310-390 aralığında olmak üzere iki band verirler. 6 ve 8-hidroksiflavonoller, kalkon ve auronlar 380-430 nm aralığında görünür bölgeye doğru kayan adsorbsiyon bandı verirler. Antosiyaninler 500 nm üzerinde bir band ile karakterize olurlar. Kinon pigmentleri de diğer fenolik bileşiklerden ultraviyole bölgedeki karmaşık spektral bandları ve uzun dalga boyunda zayıf absorpsiyon pikleri ile ayrılırlar.

Flavonoid yapılarında bulunan hidroksil gruplarının pozisyonunu belirlemek için molekülün kromofor sistemine değişik reaktiflerin etkisinden geniş bir şekilde yararlanılır. Bu amaçla NaOMe, NaOAc, NaOAc/H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>, AlCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>/HCl gibi iyonlaştırıcı ve kompleks oluşturucu reaktifler kullanılır (Markham 1982).

**Çizelge 2.5.** Fenolik Bileşiklerin UV Spektroskopisinde max Degerleri

Bileşik Sınıfı	$\lambda$ max (nm)	
Basit Fenoller	266-295	
Fenolik Asitler	235-305	
Hidroksi sinnamik asitler	227-245, 310-332	
Hidroksi kumarinler	c.210, 250-260, 280-303, 312-351	
Stilbenler	300-310, 320-330	
Fenantrenler	265-270, 272-280, 300-306, 310-315	
Flavonoidler	İsoflavonlar	255-265, 310-330
	Flavononlar	c.225, 275-290, 310-330
	Flavon, biflavonlar	250-270, 330-350
	Flavonoller	250-270, c.300, 350-390
	Kalkonlar	240-260, 365-390
	Auronlar	240-270, 390-430
	Antosiyaninler	267-275,475-545
Ksantonlar	230-245, 250-265, 305-330, 340-400	
Benzokinonlar	260-290, 375-410	
Naftakinonlar	220-250, 250-290, 330-340, 400-430	
Antrakinonlar	220-230, 252-260, 267-279, 430-450	

### 2.4.2. İnfrared Spektroskopisi

Non-polar fenolik bileşikler infrared spektral ölçümleri için genellikle kloroformda çözülürler. Pek çok diğer fenolik bileşiğin KBr ile karıştırılarak diskleri hazırlanır ve ölçüm yapılır. Aslında IR spektroskopisi fenolik bileşiklerin karakterizasyonunda yaygın bir şekilde kullanılmaz. Ancak karbonil grubu taşıyan fenolik bileşikler için faydalıdır. Çünkü karbonil absorpsiyon bandının durumundan serbest bir hidroksil grubuna bağlı olup olmadığı anlaşılır (Dey ve Harborne 1989).

### 2.4.3. <sup>1</sup>H-NMR Spektroskopisi

Proton ve karbon-13 NMR spektroskopisi için 5-10 mg örnek gereklidir. Çözücünün seçimi fenolik bileşiğin polaritesine bağlı olmalıdır.

CDCl<sub>3</sub> düşük polariteli aglikonlar için ideal çözücüdür. Ancak flavonoidlerin çoğunu çözmek için pek uygun değildir. Genellikle C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, DMSO-d<sub>6</sub>, CD<sub>3</sub>OD, D<sub>2</sub>O gibi çözücüler polar fenolik bileşikleri çözmek için daha uygundur.

<sup>1</sup>H-NMR spektrumu fenolik bileşiklerin aromatik halka protonlarını ve sübstitüentlerin durumunu gösterir. Aromatik halka protonları 5.00- 8.00 ppm arasında gözlenirler. Orto etkileşimlerde  $J=8-9$  Hz, meta etkileşimlerde  $J=2-3$  Hz'dir. Metoksi grupları 3.8-3.9 ppm civarında singlet olarak görülür. Eğer bir seker grubu bağlı ise monoglikozidlerde şeker protonları 3.0-4.0 ppm arasında gözlenirken sekerin H-1' protonu daha aşağı alanda 4.8-6.0 ppm arasında dublet olarak görülür. Birbirine bağlı iki şeker varsa, halkaya bağlı şekerin H-1' protonu aromatikliğin etkisi ile aşağı alana kayar (5.1-5.9 ppm). İkinci şekerin H-1" protonu daha alifatik karakter gösterdiğinden 4.5-5.0 ppm civarında multiplete benzer pik verir. H-1'/H-2' etkileşme sabiti poliglikozit yapısındaki hangi şekerin aglikona bağlandığının göstergesidir. Bu etkileşme sabiti aynı zamanda  $\beta$  ve  $\alpha$  glikozit bağının isaretidir. Örneğin  $\beta$ -glukopiranozidlerin 'H-1'/H-2' etkileşme sabiti 7-8 Hz,  $\alpha$ -glukopiranozidlerinki ise 3-4 Hz olduğundan  $\alpha$ - veya  $\beta$ - bağlı glukopiranozidler birbirinden kolayca ayırdedilebilirler. Sinamik asit türevlerinde, sinamoil grubunun varlığı 6.15-6.64 ppm ve 7.43-7.81 ppm civarında  $J=16$  Hz'lik yarıma sabitleri ile, (*E*)  $\alpha$ ,  $\beta$ - çift bağa karşılık gelen bir çift dublet ile belirlenmektedir.

#### 2.4.4. <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopisi

<sup>13</sup>C-NMR spektroskopisi, özellikle glikozidlerde, şekerlerin sırası ve bağlanma noktaları ya da glikozil grubundaki açıl gruplarının cinsi ve yerlerini incelemeye yararlıdır. 250 ppm'lik geniş bir alanda karbon sinyalleri gözlenir. Genellikle diğer veriler yeterli bilgi vermediğinde kullanılır. Polisakkaritlerde; şekerlerin sırası ve bağlanma noktaları ya da glikozil grubundaki açıl gruplarının cinsi ve yerlerini incelemeye yararlıdır.

Spektrumda; sp<sup>3</sup> karbonları ortalarda 76.8-67.1 ppm arasında, oksijene bağlı olmayan sp<sup>2</sup> karbonları daha aşağıda bir alanda çıkarlar. Oksijene komsu sp<sup>3</sup> karbonları ise 101.5-100.7 ppm arasında çıkarlar.

Fenolik bileşiklerin çoğunluğu aromatik halkalarında OH, OCH<sub>3</sub>, OCH<sub>2</sub>O, CH<sub>3</sub>, izoprenil ve şeker fonksiyonları içerir. Fenolik bileşiklerin çekirdeğine bu tür farklı süstitüentlerin bağlanması yeni karbon rezonanslarının ortaya çıkmasına neden olur. Sonuçta süstitüentlerin sayısına bağlı olarak aromatik kuarterner karbon sinyallerinin sayısında artma olur. O-glukozillenme bağlandığı karbon sinyalinin 2 ppm civarında yukarı, orto ve özellikle para pozisyonlarında bulunan karbon sinyallerinin ise aşağı alana 1-4 ppm kaymasına neden olur. C-glukozillenme ise aglikona bağlandığı karbon atomu sinyalinin 10 ppm aşağı alana kaymasına neden olduğu halde diğer atomların sinyallerini etkilemez.

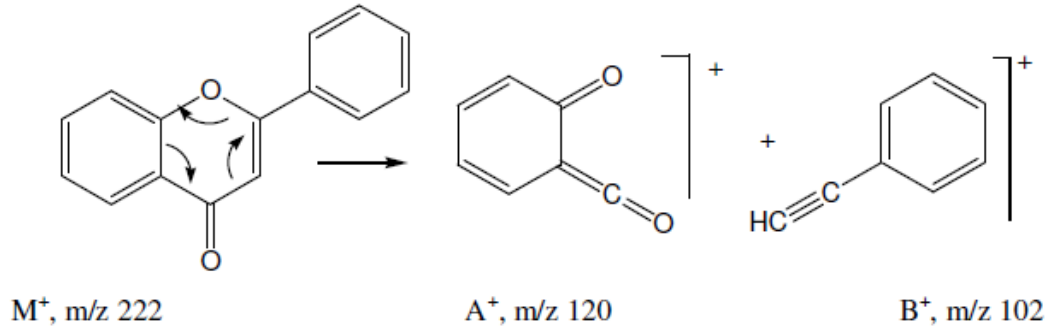
#### 2.4.5. Kütle Spektroskopisi

Kütle spektroskopisi fenolik bileşiklerin molekül ağırlığının tayininde önemli bir yöntemdir. Kütle spektroskopisinin diğer tekniklere göre başlıca üstünlüğü analiz için çok az miktarda maddenin (0.1 mg) yeterli olmasıdır. Kütle spektroskopisinin değişik ve mükemmel teknikleri geliştirilmiştir. Elektron bombardımanı kütle spektroskopisi (EI-MS) küçük molekül ağırlıklı, uçucu flavonoid aglikonların molekül ağırlıklarını başarı ile tayin edebilmektedir. Ancak, yüksek polarlığa sahip ve molekül ağırlığı büyük, uçucu olmayan glikozillenmiş flavonoidler veya biflavonoidler gibi fenolik bileşiklerin molekül ağırlığının belirlenmesinde tercih edilen teknik hızlı atomik bombardıman tekniği FAB-MS'dir. Ancak son zamanlarda buharlaşmayı kolaylaştıran, türevleri elde etmeye gerek duymayan geliştirilmiş alternatif iyonlaşma teknikleri alan desorbsiyonu (FD), kimyasal iyonlaşma desorbsiyonu (DCI), hızlı atomlarla bombardıman (FAB), plazma desorbsiyonu (PD), lazer desorbsiyonu (LD) ve ikinci dereceden iyonlaşma (SI) polar ve ısıya dayanıksız bileşiklerin incelenmesinde başarı ile uygulanmaktadır.



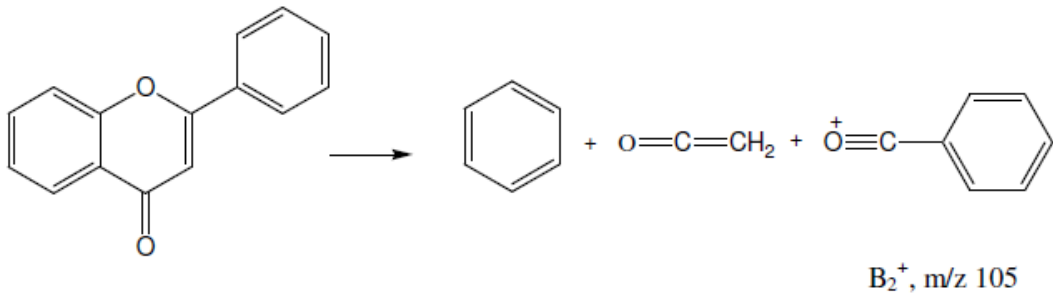
Kütle spektrumunda flavonoid aglikon ve glikozidlerinin yapıları hakkında önemli bilgiler sağlanır. Flavonoid aglikonlarının çoğu şiddetli moleküler iyon piki  $[M]^+$  verirler. Bu ana pike ek olarak, flavon aglikonları  $[M-H]^+$  ve  $[M-CO]^+$  piklerini verirler. Metoksi flavon olması halinde  $[M-CH_3]^+$  ve  $[M-CO-CH_3]^+$  pikleri gözlenir (Harborne ve Mabry 1975).

Flavonlarda en önemli parçalanma ürünü Retro-Diels Alder (RDA) reaksiyonu ile oluşur. Bu reaksiyon mekanizma I olarak adlandırılır (Şekil 2.32.).



**Şekil 2.32.** Flavonoidlerde Retro-Diels Alder parçalanması

İkinci fragmentasyon ürünü flavonoller için önemli bir mekanizmadır (Mekanizma II) (Şekil 2.33.).

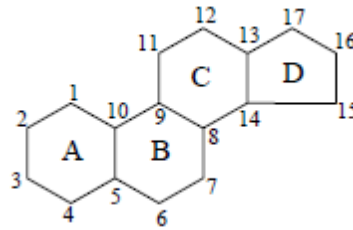


**Şekil 2.33.** Flavonoidlerin ikinci parçalanma yolu

Mekanizma I'de iki yüklü iyon oluşur ( $A_1^+$  ve  $B_1^+$ ) Mekanizma II'de bir tek yüklü iyon oluşur ( $B_2^+$ ).

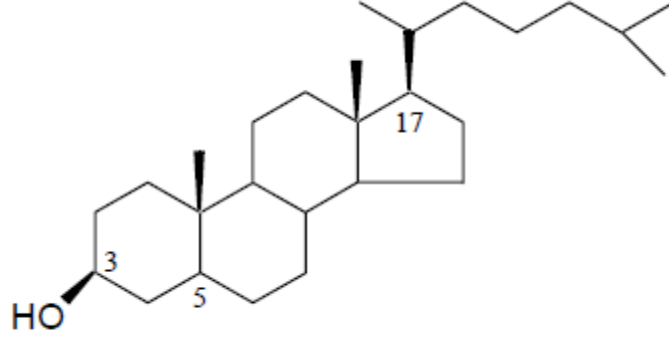
## 2.5. Steroidler

Bitki ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Steroid grubunun içinde, steroller, vitamin D, mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları, karsinojik hidrokarbonlar, bazı saponinler yer almaktadır. Steroidlerin temel yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir ve genelde 29 C atomu ya da 27 C atomundan oluşur (Şekil 2.34.). Bu halka, dört halkanın birleşmesi ile oluşmuştur. Halka sistemi A halkasından başlayarak numara ve harflerle işaretlenir. Substitüentler genellikle C<sub>3</sub>, C<sub>7</sub>, C<sub>12</sub> de bulunur (Cram 1964).



Şekil 2.34. Siklopentanoperhidrofenantren yapısı

Bitkisel steroidler genellikle C-3 de hidroksil, C-5 de çifte bağ ve C-17 de yan zincir taşırlar. Bu bileşiklerde halka üyesi atomlar iki paralel düzlem içerisinde bulunurlar ve bunlara bağlı gruplar arasında da, aynen sikloheksan türevlerinde olduğu gibi, *cis* ve *trans* durumlar meydana çıkmaktadır. Bu durumun belirlenmesi, C-10 daki CH<sub>3</sub> grubu ile C-3 deki hidroksil grubuna bakılarak yapılır. C-3 teki hidroksil grubu, C-10 daki metil grubu ile dik açı yaparsa *cis* yapı mevcuttur ve bu konuma  $\beta$  şekli denir. Eğer C-10 daki metil ve C-3 teki hidroksil grubu paralel olursa *trans* yapı ya da  $\alpha$  şekli söz konusudur. Yan zincirin konfigürasyonu steroidlerde genellikle  $\beta$  şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle *trans* bağlanmıştır (Cram 1964). Çok iyi bilinen bir steroid olan kolestrolün formülü aşağıda verilmektedir (Şekil 2.35.).



Şekil 2.35. Kolesterol'ün yapısı

### 2.5.1. Steroidlerin Tanımları

Steroidler, bitkiden değişik polaritede çözücülerle ekstrakte edilirler. Genellikle polar olmayan çözücüler kullanılır. Ancak steroid molekülünün hidroksil ve karboksil gibi gruplar içermesi veya steroid molekülüne glikozit bağlı olması durumunda alkol, etilasetat gibi daha polar çözücüler kullanılır.

Steroidlerin yapıları spektroskopik ve kimyasal yöntemlerle tayin edilmektedir.

<sup>1</sup>H NMR spektrumunda, metil pikleri 0.00-1.5 ppm arasında, metilen bantları 1.0- 2.5 ppm arasında çıkar. Steroidlerde metilen pikleri çok karmaşık ve yaygındırlar. Bu nedenle metilen bantları yerine metilen zarfı denilmektedir. Hidroksile komşu hidrojenler 3.5-4.5 ppm de ve doymamışlık bantları 5-6 ppm de görülürler.

Kütle spektrumunda en önemli bantlar,  $M^+$ ,  $[M-CH_3]^+$ , hidroksil grubu varsa  $[MH_2O]^+$  parçalanma ürünleridir. Diğer parçalanma ürünleri ise,  $[M-D \text{ halkası} + \text{yan zincir}]$ ,  $[M-D \text{ halkası} + H]^+$ ,  $[M-D \text{ halkası} + H-H_2O]^+$  bantlarıdır (Budzikiewicz ve ark. 1964).

## 2.6. Şeker Hastalığı (Diabetes Mellitus)

### 2.6.1. Diabetes Mellitus'un Tarihçesi

Şeker hastalığı (Diabetes Mellitus (DM)) antik çağlardan bu yana insanların hayatını olumsuz etkilemiştir. M.Ö.1500 yıllarda Mısır'da yaşamış olan Ebers papiruslarında fazla idrar yapılan, idrar yoluyla şeker kaybedilen bir hastalık olarak tanımlanmıştır. Milattan 200 yıl sonra Cappodocia'lı Areateus hastalığa "Diabetes" ismini vermiştir. Günümüzde tıp literatüründe de kullanılan bu isim, Diabetes ve Mellitus kelimeleri Yunanca akıp gitmek

anlamına gelen dia+betes ve bal kadar tatlı anlamına gelen mellitus kelimelerinden türetilmiştir (Ahmed 2002). İbni Sina milattan sonra (M.S.) 1000'li yıllarda şeker hastalığının herediter karakterini, damar komplikasyonlarını ve idrarının bal tadında olduğunu söyleyerek şeker hastalığını günümüz tanımlamasına yakın bir şekilde tanımlamıştır. 1674 yılında Th. Willis idrarda şeker varlığını göstermiştir. Langerhans 1860'da pankreasta hormon salgılayan adacıkları tarif etmiş, 1875'de Claud Bernard “diabetik fonksiyon” diye adlandırılan arka beyin fonksiyonu ile glikozüri oluşumunu ortaya çıkarmıştır (Bağrıaçık 1999). 1889 yılında Minkowski'nin pankreatektomi yaptığı bir köpeğin diyabetik oluşu ile hastalığın pankreas ile ilgisi ortaya çıkarılmıştır. 1908 yılında G.L. Zuelzer'in ve 1918 yılında J. Paulesco'nun pankreas ekstreleri ile diyabet tedavisine yönelik yürüttükleri çalışmalar diyabete yeni yönler kazandırmıştır. 1921'de Banting ve Best'in insülini bulmalarıyla hastalığın patogenezinin ortaya çıkarılmasında büyük bir adım atmışlardır (Bağrıaçık 1999 ve Bostancı 1999).

### **2.6.2. Diabetes Mellitus'un Tanımı**

Diabetes mellitus (DM), sindirim bezi görevi yapan pankreasın, insülin salgısının kısmen veya tamamen azalmasıyla ortaya çıkan ve karbonhidrat, yağ ve protein mekanizmalarını etkileyen kronik bir hastalıktır (Bağrıaçık 1997).

Hiperglisemi, kanda glikoz seviyesinin yükselmesiyle ifade edilen bir terimdir. Devamlı yüksek kan glikozu, vücut yeterli insülin salgılayamadığında veya insülin uygun bir şekilde kullanılmadığı zaman olabilmektedir (Mohnike ve ark. 1993).

Diyabetin üç önemli bulgusu vardır. Bunlar;

Polifaji: Aşırı beslenmedir. Hasta özellikle karbonhidratlar başta olmak üzere fazla gıda alır. Glikozun kullanılmaması ve idrarla dışarı atılması, bu bulgunun nedenidir.

Polidipsi: Çok su içmektir. Hasta idrarla glikoz atarken beraberinde suyu da atmak durumundadır. Atılan suyun tekrar yerine konması ancak çok su içmek suretiyle olur.

Poliüri: Çok idrara çıkmaktır. Polidipsi'nin sonucudur (Bağrıaçık 1997).

### **2.6.3. Diabetes Mellitus'un Sınıflandırılması**

Diabetes mellitus'un etiyolojik bir sınıflandırılması aşağıdaki gibi yapılmıştır.

I. Tip 1 Diyabet ( $\beta$  hücre hasarı, tam olarak insülin eksikliğine yol açar.)

a-İmmün sistem vasıtası ile

b-İdiopatik olarak

II. Tip 2 Diyabet (Rölatif insülin eksikliği ile predominant insülin direncinden, insülin direnci ile predominant salgı bozukluğuna kadar olan vakaları kapsar.)

III. Diğer spesifik tipler

a-β hücre fonksiyonunun genetik hata sonucu bozulması

b-İnsülin aktivitesinde genetik hata oluşması

c-Ekzokrin pankreas hastalıkları

d-Endokrinopatiler

e-İlaçlar veya kimyasal nedenler

f-Enfeksiyonlar

g-İmmün sistemle ilişkili fakat bu forma girmeyen grup

h-Diyabet ile ilişkili diğer genetik sendromlar.

IV. Gebelikte görülen DM (Gestasyonel DM) (Bağrıaçık 1983)

**Tip 1 Diyabet:** Bütün diyabetikler arasında %10 civarında olan ve daha çok çocuklarda görülen hücre kaynaklı, otoimmün yıkım sonucu pankreatik beta hücrelerin insülin sekresyonunun bozulmasıyla karakterize bir hastalıktır. Hastalık kronik olup belirtileri ortaya çıkmadan en az 3-8 yıl önce hastalık başlamıştır (Özyazar 1997).

Bu hastalıkta glikoz, diyetle alınıp bağırsaklardan emilerek kana geçer ve karaciğere ulaşır. Burada glikoliz, glikojenez, lipogenez mekanizmaları çalışmadığından kan glikoz seviyeleri ayarlanamaz. Karaciğerde insülin\glukagon oranının düşük olması yağ dokusunda lipoliz'in kontrol edilemeyen bir şekilde artmasına neden olur. Dolaşımdaki serbest asitlerinin artması sonucu keton cisimleri ve VLDL sentezi artar. Yağ asitleri sentezinin azalmasına bağlı olarak hipertrigliseridemi tablosu ortaya çıkar. Artan trigliseridler, lipoprotein lipaz enzimi ile kandan temizlenir. Enzim aktivitesi insülin \glukagon oranına bağlı olup enzim aktivitesinde bir hata sonucu kanda hiperşilomekronemi ortaya çıkar. Diyabetli hastalarda her doku devamlı açlık durumundadır. Bu nedenle hastaya dışarıdan insülin takviyesi yapılması gerekmektedir. Aksi takdirde hasta birkaç hafta ya da bir aydan fazla yaşayamaz. Tip I diyabet her iki cinsten görülme oranı eşittir. Beyaz ırkta daha çok görülür (Committee Report 1997).

**Tip 2 Diyabet:** İnsüline bağlı olmayan diyabettir. Öncelikle 40 yaşını geçmiş kimselerde kendini gösterir. Diyabetlilerin %90-95'ini oluşturur. Pankreas beta-hücreleri sayıca azalmamıştır. Bu hücrelerin insülin yapma ve salgılama yeteneklerinde azalma görülür.

Yemek yedikten sonra vücudumuzdaki total glikoz kullanımının büyük kısmı insüline bağımlı olmayan dokular tarafından (beyin %50, gastrointestinal sistem %25) gerçekleştirilir. Geriye kalan %25'lik bölüm ise bata kas dokusu olmak üzere insüline bağımlı dokular tarafından kullanılır.

Glikoz alımını veya infüzyonunun takiben plazma glikoz düzeyindeki yükselmeye yanıt olarak pankreas beta hücresinden insülin sekresyonu artarak bir yandan oluşan hiperinsülinemi ve hiperglisemi karaciğer, bağırsak ve periferik dokularda glikoz alımını artırırken, diğer yandan da karaciğer glikoz üretimini baskı altına alır. Bu özet metabolizma dengesine göre insülinin yapıp salgılandığı beta hücresi düzeyinde, insülinin etki ettiği kas dokusu ve karaciğerde herhangi bir bozukluk söz konusu olduğunda glikoz entoleransının gelişeceği aşıkardır.

Tip II diyabetin tüm bulgularıyla oluşması iki majör defektin yani insülin direncinin ve beta hücresi fonksiyonunun bozukluğunun birlikte gelişmesiyle gerçekleşir.

Tip II Diabet insidansının çok yüksek olduğu toplumlarda ( Amerika yerlileri, Meksika kökenli Amerikalılar) ilk saptanan bozukluk erken dönemde insülin duyarsızlığıdır. Beta hücresi kan glikoz ayarını sağlayabilecek düzeyde insülin salgılayamadığı anda açlık kan glikoz düzeyi yükselecek ve diyabet yerleşecektir. Bu anlatılan genelde şişman Tip II diyabetli hastalarda ilk bozukluk beta hücresi düzeyinde olup hastalık kendini başlangıçta bir insülin sekresyonu bozukluğu olarak gösterir.

Bazı durumlarda insülin sekresyonundaki bozukluk o denli ağır olabilir ki; diyabet insülin direnci olmaksızın da gelişebilir. Bu kişiler genellikle zayıftırlar. Diyabetli kişilerde yaklaşık %10 oranında yavaş ilerleyen Tip I diyabet olabileceği için Tip II diyabet gibi görünebilen Tip I diyabeti ayırmak için kanda adacık hücresine ve GAD' a karşı antikoları ölçmek çok önemlidir (İlkova 1997).

Risk faktörleri: Oturgan hayat, ailede diyabet öyküsü, sık gebelik ve iri bebek doğurma, gebelikte diyabet öyküsü, etnik yapı, Asya-Afrika vs. kökenli olma, stres, 40 yaş üzeri ve şişman olanlar.

Belirteleri: Poliüri, polifaji, polidipsi, yorgunluk, kuru ve kaşıntılı cilt, bulanık görme, sık sık infeksiyon gelişmesi, ellerde veya ayaklarda uyuşma, karıncalanma, ciltteki kesiklerin veya yaraların çok yavaş iyileşmesi, cinsel sorunlar (Gallagher 2003, Colowick 1965 ve Özyay 2004).

**Gebelikte Görülen Diabetes Mellitus:** Gebelik esnasında gelişen ve gebelik diyabeti olarak adlandırılan hastalıktır. Genellikle hamilelikten sonra kaybolur. Hastaların yarısından çoğunda ise tip II diyabet olarak görülmektedir.

Gebelikte bebeğin beslenmesini sağlayan plasentanın salgıladığı ve bebeğin gelişimi için çok önemli olan bazı hormonlar, insülin etkisini engelleyerek, insülin direnci yaratabilir. Gebelik diyabeti; gebelik sona erdikten sonra, kadınların çoğunda ortadan kaybolur. Ancak hamilelik de diyabet öyküsü olan kadınlar, yaşamları boyunca diyabet olma riski taşıdıklarından sürekli kontrol edilmelidir. Bu kadınların en az %50'si, ileriki yıllarda tip II diyabetli olacaklardır (Bağrıaçık 1997, Özay 2004).

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Silika jel 60 (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM, Merck KGaA\* 1.07734), ince tabaka plakları (Alufolien Kieselgel 60F<sub>254</sub>, Merck KGaA 1.05554), etanol, metanol, n-hekzan, metilen klorür, etilasetat, n-butanol, aseton, dietileter (Tekkim), Poliamid (Fluka-02395), sephadex (Sigma-G100120), metanol (Merck-106028), DMSO (Merck-103424), Streptozocin (Sigma-S0130), Glibenclamide (Sigma-G0639), Asetonitril (Merck-100030), Citric acid monohydrate (Fluka-94068), Sodyumsitrat tribazikdihidrat (Merck-71402), Dietyl eter (Teknik), Glukometre(İME-DC), NA (Difenil borik asit- $\beta$ -aminoetil ester, Teknik) ve NH<sub>3</sub> (Teknik) belirteçleri kullanılmıştır.

#### 3.2. Kullanılan Cihazlar

**3.2.1. UV Lambası:** Kromatografi plağındaki lekeler Desega Minuvis UV lambası kullanılarak tayin edilmiştir.

**3.2.2. Infrared Spektrofotometresi:** IR spektrumları Shimadzu IR-470 spektrofotometresinde alınmıştır

**3.2.3. HPLC:** Preperatif HPLC çalışmaları Shimadzu, Prominence LC-8AD/20A; kolon: Shim-Pack Prep-ODS (C18); part no: 228-00815-91; kolon no: 2025B14 (15  $\mu$ m particle diameter, 100 Å pore diameter); pompa: A pompası: LC-8A, B pompası: LC-8A; toplam akış hızı: 10 mL/min özelliklerine sahip cihazla yapılmıştır.

**3.2.4. NMR Spektrometresi:** <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumları Bruker NMR,500 MHz cihazı kullanılarak alınmıştır. Çözücü olarak CDCl<sub>3</sub> ve MeOD kullanılmıştır.

**3.2.5. Kütle Spektrometresi:** Kütle spektrumları; ESI-MS Thermo Finnigan LCQ Advantage Max LC/MS/MS cihazıyla alınmıştır.



### 3.3. Kullanılan Belirteçler

**NA Belirteci:** (Naturstoffreagenz A: Difenil borik asit-b-aminoetil ester) 100 mg toz NA bileşiği 100 ml metanolde çözülerek hazırlandı.

**Serik Sülfat Belirteci:** 2 g  $Ce(SO_4)_2 \cdot 4H_2O$  100ml %10'luk  $H_2SO_4$  içinde çözülmesi ile hazırlandı. Belirteç püskürtüldükten sonra kromatografi plağı  $100^\circ C$ 'de 5-10 dakika lekeler oluşuncaya kadar bekletildi.

**Amonyak ( $NH_3$ ) Buharları:** Kromatografi plakları  $NH_3$  şişesinin ağzı açılarak  $NH_3$  buharında birkaç dakika bekletildi.

### 3.4. Deneysel Bölüm

#### 3.4.1. Bitkinin Toplanması

Çalışılacak bitkinin yerlerinin tespiti için, Haziran-Temmuz (2012) ayları arasında Trakya bölgesinde arazi çalışmaları yapılmıştır. Yapılan arazi çalışması sonucunda, belirlenen bölgelerden (Edirne-Söğütlük) Temmuz-Ağustos 2012 tarihinde toplanmıştır.

Bitki toplandıktan sonra, bitkinin tanımlanma işlemi, Trakya Ün. Biyoloji Bölümünde, Botanik Ana Bilim Dalında öğretim üyesi olan Yrd. Doç. Dr. Necmettin Güler tarafından yapılmış ve bitkiye Herbaryum numarası verilmiştir (EDTU 13162). Toplanan yapraklar, bir hafta boyunca açık havada kurutulmuştur. Kurutulan yaprak miktarı 500 g olarak belirlenmiştir. Bitkinin olgunlaşmış meyveleri, iki hafta boyunca açık havada kurutulmuştur. Kurutulan meyve miktarı 400 g olarak belirlenmiştir.

#### 3.4.2. Bitkinin Ekstraksiyonu

Kurutulan yaprak ve meyveler küçük parçalara ayrıldıktan sonra, maserasyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. Ekstraksiyona, n-hekzan ile başlanmış, ardından da bitki kalıntıları polarite artış sırasına göre, diklormetan, etil asetat ve metanol ile ekstrakte edilmiştir. Daha sonra çözücüler evaporatörde uçurularak, ham ekstreler elde edilmiştir. Ham ekstre miktarları;

*Solanum dulcamara* yaprak ( n-hekzan) ekstresi: 25,369 g

*Solanum dulcamara* yaprak (diklormetan) ekstresi: 28.75 g

*Solanum dulcamara* yaprak ( etil asetat) ekstresi: 56.47 g

*Solanum dulcamara* yaprak ( metanol) ekstresi: 96.44 g

*Solanum dulcamara* meyve ( n-hekzan) ekstresi: 1.37 g

*Solanum dulcamara* meyve ( diklormetan) ekstresi: 8.48 g

*Solanum dulcamara* meyve ( etil asetat) ekstresi: 12.67 g

*Solanum dulcamara* meyve ( metanol) ekstresi: 65.93 gramdır.

### **3.4.3. Yaprak ve Meyve Ekstrelerinde Antihiperglisemik Aktivite Tayini**

Bu çalışmada *Solanum dulcamara* bitkisinden elde edilen 4 ham ekstreten sadece meyve-metanol ve yaprak-metanol ekstresiyle çalışılması planlanmıştır. Buradaki amacımız, polar maddelerin polar ekstrelerde olma ihtimalini düşünerek, buradaki polar maddelerin antihiperglisemik aktivitesini tayin etmek ve bu maddeleri izole etmektir. Ayrıca yapılan literatür araştırmasında (Nwachukwu 2010) polar ekstrede (MeOH) *S. dulcamara* yaprağının antihiperglisemik aktivite gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu nedenle bu çalışma da bitkinin yöresel farklılığından dolayı hem yaprak hem de meyve ile antihiperglisemik aktivite tayini amaçlanmıştır ve her iki ekstre, şeker hastalığına yakalanan sıçanlara uygulanarak aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

#### **3.4.3.1. Akut Toksikite Testi**

Yaprak metanol ekstreleri için uygulanacak doz, Nwachukwu ve arkadaşlarının (2010) yapmış olduğu çalışmaya göre belirlenirken meyve ekstrelerinin uygulanacak dozunu belirlemek için Lorke (1983) tarafından tanımlanan akut toksisite testi yapılmıştır. Testin ilk aşamasında 3 grupta 3'er Balb-c fare kullanılmıştır.

1. Grup: 10 mg/kg meyve ekstresi
2. Grup: 100 mg/kg meyve ekstresi
3. Grup: 1000 mg/kg meyve ekstresi

Oluşturulan gruplar 15 gün boyunca takip edilmiştir. Testin bu aşamasında ölüm görülmemiştir. Testin ikinci aşamasında 3 farklı doz birer fareye uygulanmıştır.

1. Grup: 1600 mg/kg meyve ekstresi
2. Grup: 2900 mg/kg meyve ekstresi
3. Grup: 5000 mg/kg meyve ekstresi

Testin bu aşamasında da 15 günlük gözlem sonucu ölüm görülmemiştir. Akut toksisite testi değerlendirilerek meyve ekstresi için LD<sub>50</sub>>5000 mg/kg sonucuna ulaşılmıştır.

#### **3.4.3.2. Diyabetes Mellitusun İndüksiyonu:**

Sıçanlara intraperitoneal yolla 50mg/kg streptozosin uygulanmıştır. Streptozosinin (50mg/kg) i.p. enjeksiyonundan bir hafta sonra sıçanların kuyruk veninden kan alınmış, kan glikoz düzeyleri 250mg/dL'nin üzerinde olanlar diyabetik kabul edilerek çalışmaya alınmıştır.

#### **3.4.3.3. Deneysel Model:**

Toplam 30 adet erkek Wistar albino sıçan her grupta 5 hayvan olacak şekilde 6 gruba ayrılmıştır.

Grup A kontrol etanol

Grup B 50mg/kg yaprak metanol ekstresi *solanum dulcamara* (MESD)

Grup C 100mg/kg yaprak MESD

Grup D 50 mg/kg meyve MESD

Grup E 100 mg/kg meyve MESD

Grup F 0,07mg/kg glibenclamide

Tüm ekstreler ve glibenklamid sıçanlara gastrik lavaj yoluyla verilmiştir. Gastrik lavaj uygulamasından hemen önce bazal kan glikoz düzeyleri belirlenmiş ve gastrik lavaj uygulaması 0. dakika kabul edilerek 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde tüm hayvanların kan glikoz düzeyleri kuyruk veninden ölçülmüştür. Kan glikoz düzeyi ölçümünde İME-DC cihazı kullanılmıştır (n=Gruptaki sıçan sayısı).

#### **3.4.3.4. İstatistiksel Analiz:**

Veriler ortalama  $\pm$  standart sapma olarak verilmiştir. Gruplar arası farklılığın belirlenmesi için Karışık Ölçümler İçin İki Faktörlü ANOVA testi kullanılmıştır.  $P < 0,05$  değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

#### **3.4.5. İzolasyon ve Saflaştırma:**

##### **3.4.5.1. *Solanum dulcamara* Bitkisinin Meyve-Metanol Ekstresi:**

Bu projede, *S. dulcamara*'nın meyve-MeOH ve yaprak-MeOH ekstrelerinden, daha yüksek antihiperглиsemik aktiviteli ekstrenin izolasyon çalışmasında kullanılması planlanmıştır. Ancak, bu çalışmada yaprak ve meyve ekstrelerinin, yüksek kan şekerini, azaltıcı etkisi görülememiştir. Bu nedenle, izolasyon çalışmasında, bitkinin hem meyve, hem de yaprak ekstreleriyle birlikte çalışılmıştır.

*S. dulcamara*'nın meyve-metanol ekstresi (15,03 g) öncelikle 8 cm çaplı 70 cm yüksekliğinde cam kolonda poliamid dolgu maddesi kullanarak, önce %100 su ile kolon kromatografisine başlandı. Kolona, %20 lik artışlar ile %100 lük metanole kadar, ardından %30 luk artışlarla % 60 lük asetona kadar elüsyon yapılmıştır. Kolon kromatografisi sonucunda, 50 mL lik erlenlerde, 107 fraksiyon toplanmıştır. Çözücüler buharlaştırıldıktan sonra, her bir fraksiyonun içeriği ince tabaka kromatografisi ile UV lambasında kontrol edilmiştir. Her bir TLC plakasına, amonyak püskürtülerek UV de (254/366nm) bakılmış, ardından NA belirteci püskürtülerek UV de bakılmış ve flavonoid/fenolik bileşiklere ait olan renkli spotlar (mor, sarı, mavi) belirlenmiştir. Yapılan ince tabaka kromatografisine göre, benzer fraksiyonlar birleştirilerek, 8 alt fraksiyon (SDMM-1, SDMM-2, SDMM-3, SDMM-4, SDMM-5, SDMM-6, SDMM-7 ve SDMM-8) elde edilmiştir. Bu kademedan sonra, SDMM-2 ve SDMM-4, preparatif RP-HPLC'de, % 100 H<sub>2</sub>O içeren çözücü sisteminden başlayıp, %100 metanol ile sonlanan gradient sistemlerde ayırma tabi tutulmuştur. SDMM-4 alt fraksiyonundan; 1 numaralı, 6,2',3",5",4"-pentahidroksi-3,7"-biflavon (0,08 mg) ve 3

numaralı, 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide (0,048 mg) bileşikleri; SDMM-2 alt fraksiyonundan ise; 2 numaralı, 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide (0,042 mg) bileşiği izole edilmiştir.

### 3.5.2. *Solanum dulcamara* Bitkisinin Yaprak-Metanol Ekstresi:

*Solanum dulcamara* meyve-metanol eksteresinin yapışkan olması sebebiyle kolon kromatografisinde bazı aksaklıklar yaşanmış ve çözücü akışı, kolonun altından vakum yapılarak sağlanmıştır. Yaprak-metanol ekstresinin izolasyon çalışmasında aynı sorunla karşılaşmamak için, yaprak-metanol ekstresi kısımlandırılmıştır. Bu amaçla, *S. dulcamara* yaprak-metanol ekstresi, bir miktar su ile çözüldükten sonra, eter, etil asetat ve n-bütanol ile ekstraksiyona tabi tutulmuştur. Elde edilen ekstre miktarları; *S. dulcamara* yaprak-eter ekstresi: 16.56 g, *S.dulcamara* yaprak-etil asetat ekstresi: 3.69 g, *S.dulcamara* yaprak- n-bütanol ekstresi: 43.07 gramdır. Flavonoid belirteçlerini kullanarak yapılan TLC sonuçlarına göre, yapraktaki izolasyon çalışması için, yaprak-etil asetat ekstresi seçilmiştir.

*S. dulcamara*'nın yaprak-etil asetat ekstresi (3.69 g), 10 cm çaplı 70 cm yüksekliğinde cam kolonda, silikajel dolgu maddesi kullanarak kolon kromatografisi uygulanmıştır. %100 diklormetan ile başlamak üzere %10'a kadar %2' lik artışlar, %50' ye kadar % 5' lik artışlar ile daha sonra %10' luk artışlar ile %100 etil asetata kadar devam edilmiştir. Ardından, % 20lik artışlar ile %100lük metanole kadar polarite arttırılmıştır. Kolondan, 50 mL lik erlenler kullanılarak, 157 fraksiyon alınmıştır. Çözücüleri buharlaştırıldıktan sonra her bir fraksiyonun içeriği ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilmiştir. İnce tabaka kromatografisi uygulanıp, amonyak ve NA belirteçleri püskürtüldükten sonra, UV spektrofotometresinde bakılmış ve benzer fraksiyonlar birleştirilmiştir. Bu şekilde 5 alt fraksiyon (YME-1, YME-2, YME-3, YME-4 ve YME-5) elde edilmiştir. Bu kademedan sonra, belirlenen spotlara göre, YME-5 kodlu alt fraksiyona, preparatif ters faz kolonlu (ODS) HPLC'de, %90 luk MeOH/H<sub>2</sub>O içeren çözücü sisteminden başlayıp, %100 metanol ile sonlanan gradient sistemlerde ayırma tabi tutulmuştur. HPLC den, 2-3 madde karışımı halinde gelen küçük fraksiyonlarada, preparatif TLC uygulanmıştır. YME-5 fraksiyonundan; 4 numaralı, 6,16,23-trihidroksi-withanolide (165 mg) ve 5 numaralı,  $\beta$ -Sitosterol (23 mg) bileşikleri izole edilmiştir.

## **4. ARAŞTIRMA BULGULARI**

### **4.1. Yaprak ve Meyve Ekstrelerinde Antihiperglisemik Aktivite Tayini**

#### **4.1.1. Akut Toksikite Testi**

Yaprak metanol ekstreleri için uygulanacak doz, Nwachukwu ve arkadaşlarının (2010) yapmış olduğu çalışmaya göre belirlenmiş, meyve ekstrelerinin uygulanacak dozunu belirlemek inse Lorke (1983) tarafından tanımlanan akut toksisite testi yapılmıştır.

Testin bu aşamasında da 15 günlük gözlem sonucu ölüm görülmemiştir. Akut toksisite testi değerlendirilerek meyve ekstresi için  $LD > 5000$  mg/kg sonucuna ulaşılmıştır.

#### **4.1.2. Diyabetes Mellitusun İndüksiyonu:**

Sıçanlara intraperitoneal yolla 50mg/kg streptozosin uygulaması yapıldıktan bir hafta sonra, sıçanların kuyruk veninden kan alınmış, kan glikoz düzeyleri 250mg/dL'nin üzerinde olanlar diyabetik kabul edilerek çalışılmıştır.

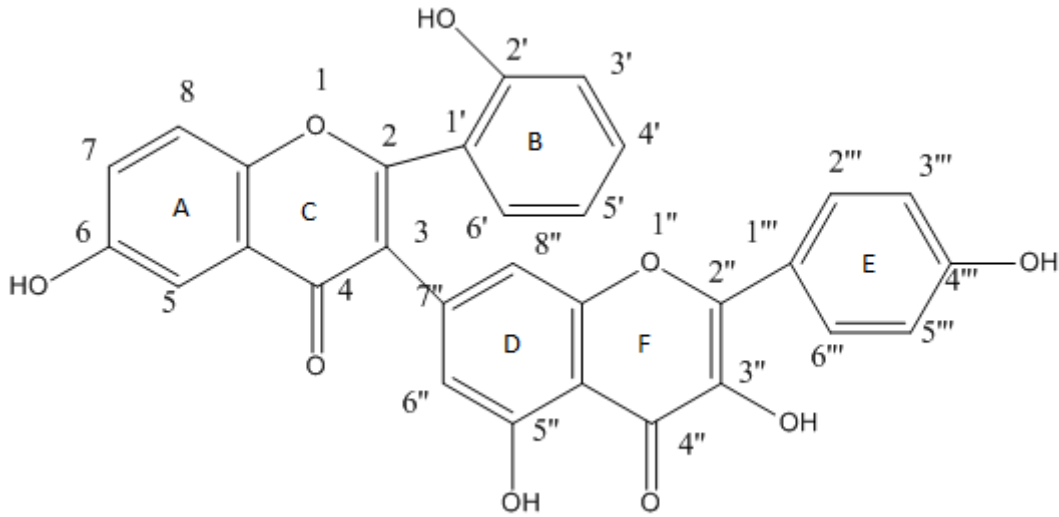
Tüm ekstreler ve glibenklamid sıçanlara gastrik lavaj yoluyla verilmiştir. Gastrik lavaj uygulamasından hemen önce bazal kan glikoz düzeyleri belirlenmiş ve gastrik lavaj uygulaması 0. dakika kabul edilerek 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde tüm hayvanların kan glikoz düzeyleri kuyruk veninden llmştr. Kan glikoz düzeyi ölüm sonuçları izelge 4.1.'de sunulmuştur. Kan glikoz düzeyi ölümünde İME-DC cihazı kullanılmıştır (n=Gruptaki sıçan sayısı).

**Çizelge 4.1.:** Sıçanların kan glikoz düzeyi ölçüm sonuçları

Kan Şekeri Düzeyi	Kontrol (n=4)	50 mg/kg Yaprak Ektresi (n=5)	100 mg/kg Yaprak Ektresi (n=3)	50 mg/kg Meyve Ektresi (n=4)	100 mg/kg Meyve Ektresi (n=3)	0,07 mg/kg Glibenclamide (n=5)
Başlangıç	541,5±78,5	518,4±62,8	484,0±159,5	481,7±124,3	586,6±23,0	569,8±43,5
1. Saat	461,5±93,4	459,0±198,2	408,0±228,6	431,0±177,3	535,0±82,6	548,6±47
2. Saat	550,0±62,4	548,0±64,5	600±0	595,2±9,5	542,0±56,5	449,8±97,8
4. Saat	591,0±18,0	587,8±27,2	502,6±168,5	548,2±66,7	584,6±26,5	497,6±59,2
8. Saat	590,7±18,5	567,4±22,8	478,0±21,3	541,7±72,6	415,0±34,3	453,8±72,5
24. Saat	596,0±5,6	532,2±94,5	450,0±201,4	458,0±100,5	489,0±97,2	581,4±29,6

## 4.2. Flavonoidler

### 4.2.1. 1 Numaralı Bileşik (SDMM-A): 6,2',3'',5'',4'''pentahidroksi-3,7''-biflavon



**Şekil 4.1.** 6,2',3'',5'',4'''pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin yapısı

1 numaralı bileşik sarı renkli katı halde, silikajel plakta 254nm UV ışık altında görülmemiş, 366 nm UV ışık altında mor renkli olarak görülmüştür. İlk önce NH<sub>3</sub> buharıyla

muamele edilmiş ardından NA belirteci püskürtülmüş ve 366 nm UV ışık altında bakıldığında her iki seferde de mor renkli olarak görülmüştür. TLC de, EtOAc çözücü sisteminde yürütülmüştür.

<sup>1</sup>H NMR spektrumunda (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.) bileşiğin A halkasındaki proton sinyalleri 6.51 ppm de (1H, d, J=8.3 Hz) H-8 in H-7 ile orto etkileşimi; 6.89 ppm de (1H, dd, J=2.4, 8.3 Hz) H-7 nin H-8 ile orto, H-5 ile meta etkileşimi; 7.11 ppm de (1H, d, J=2.5 Hz) H-5 in H-7 ile meta etkileşimi olarak görülmüştür. Bu durum, A halkasının, ABX sistemi oluşturduğunu ve C-6 konumunun kapalı olduğunu göstermiştir. B halkasındaki aromatik protonlarda sırasıyla 7.68 ppm de (1H, dd, J=1.3, 7.1 Hz, H-3'), 7.44 ppm de (1H, dd, J=5.8, 6.6 Hz, H-4'), 7.63 ppm de (1H, ddd, J=2.4, 5.7, 5.7 Hz, H-5') ve 7.53 ppm de (1H, dd, J=3.3, 5.7 Hz, H-6') gözlenmiştir. B halkasındaki proton etkileşimleri, C-2 konumunun kapalı olduğunu göstermiştir. Molekülün D halkasındaki, H-8'' ve H-6'' protonları ise 6.85 ppm de iki protona denk gelen bir singlet vermiştir (Harmandar ve Bilaloğlu, 1999). E halkasındaki aromatik proton sinyalleri 7.05 ppm de (1H, dd, J=2.5, 8.3 Hz, H-2'''), 7.42 ppm de (1H, dd, J=1.6, 8 Hz, H-3'''), 7.13 ppm de (1H, dd, J=2.5, 8.9 Hz, H-5''') ve 7.35 ppm de (1H, dd, J=2.4, 7.9 Hz, H-6''') tespit edilmiştir. <sup>1</sup>H NMR spektrumunda, aromatiklik bölgesinde gözlenen, bu çok sayıdaki proton etkileşimleri, birbirine bağlı olan iki flavonoid halkasının varlığını (Biflavonoid) düşündürmüştür.

<sup>13</sup>C NMR, DEPT ve HSQC spektrumunda (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.) 1 numaralı bileşiğin 105.54 ppm (C-8), 124.28 ppm (C-7), 123.34 ppm (C-5), 129.23 ppm (C-3'), 127.14 ppm (C-4'), 128.34 ppm (C-5'), 132.03 ppm (C-6'), 125.08 ppm (C-6''/C-8''), 124.79 ppm (C-2'''), 124.69 ppm (C-5'''), 128.15 ppm (C-3''') ve 125.38 ppm (C-6''') de aromatik karbonlar tespit edilmiştir. Karbonil karbonları 170.49 ppm de (C-4) ve 171.28 ppm de (C-4'') gözlenirken, oksijene komşu diğer aromatik karbonlara ait pikler ise 142.62 ppm (C-6), 136.49 ppm (C-2'), 152.43 ppm (C-5''), 134.78 ppm (C-3'') ve 147.42 ppm (C-4''') de gözlenmiştir.

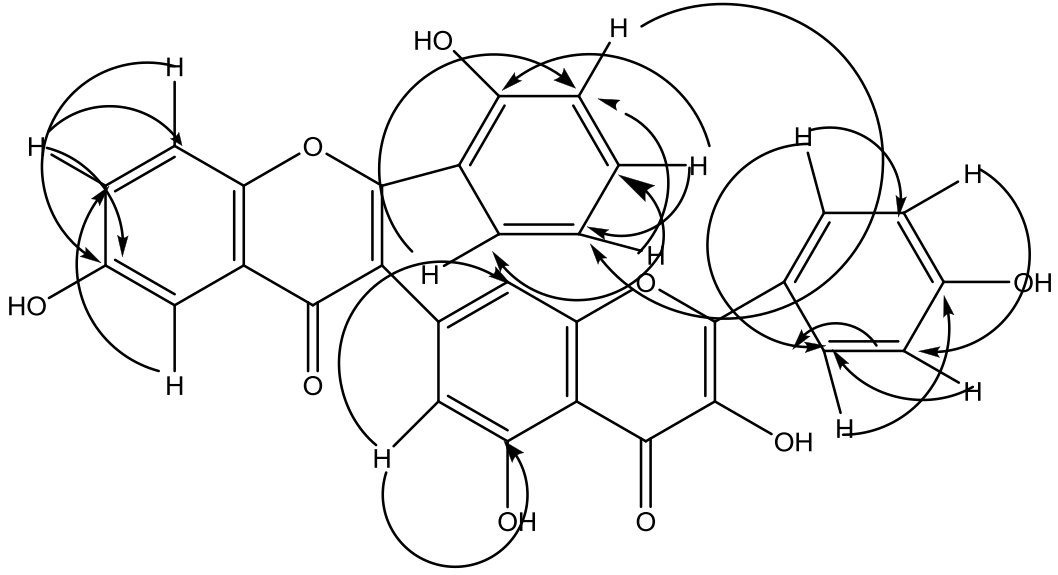
<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumunda (Şekil 4.9.) A halkasında 6.89 ppm deki (1H, dd, J=2.4, 8.3 Hz) H-7 protonunun, 6.51 ppm deki (1H, d, J=8.3 Hz) H-8 protonu ve 7.11 ppm deki (1H, d, J=2.5 Hz) H-5 protonuyla etkileştiği görülmüştür. B halkasında ise 7.44 ppm de (1H, dd, J=5.8, 6.6 Hz) H-4' protonunun, 7.68 ppm deki (1H, dd, J=1.3, 7.1 Hz) H-3' protonu, 7.63 ppm deki (1H, ddd, J=2.4, 5.7, 5.7 Hz) H-5' protonu ile etkileşimleri gözlenmiştir. Ayrıca 7.53 ppm deki (1H, dd, J=3.3, 5.7 Hz) H-6' protonunun 7.63 ppm deki (1H, ddd, J=2.4, 5.7, 5.7



Hz) H-5' ve 7.44 ppm de (1H, dd, J=5.8, 6.6 Hz) H-4' protonuyla etkileşimleri de mevcuttur. Molekül E halkasındaki protonlarının etkileşimine baktığımızda 7.42 ppm deki (1H, dd, J=1.6, 8 Hz) H-3''' protonu, 7.05 ppm deki ( 1H, dd, J=2.5, 8.3 Hz) H-2''' protonu ve 7.13 ppm deki ( 1H, dd, J=2.5, 8.9 Hz) H-5''' protonuyla etkileşim yaptığı; 7.35 ppm deki (1H, dd, J=2.4, 7.9 Hz) H-6''' protonunun, 7.13 ppm deki ( 1H, dd, J=2.5, 8.9 Hz) H-5''' protonuyla ve 7.05 ppm deki ( 1H, dd, J=2.5, 8.3 Hz) H-2''' protonuyla  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY etkileşimi yaptığı belirlenmiştir.

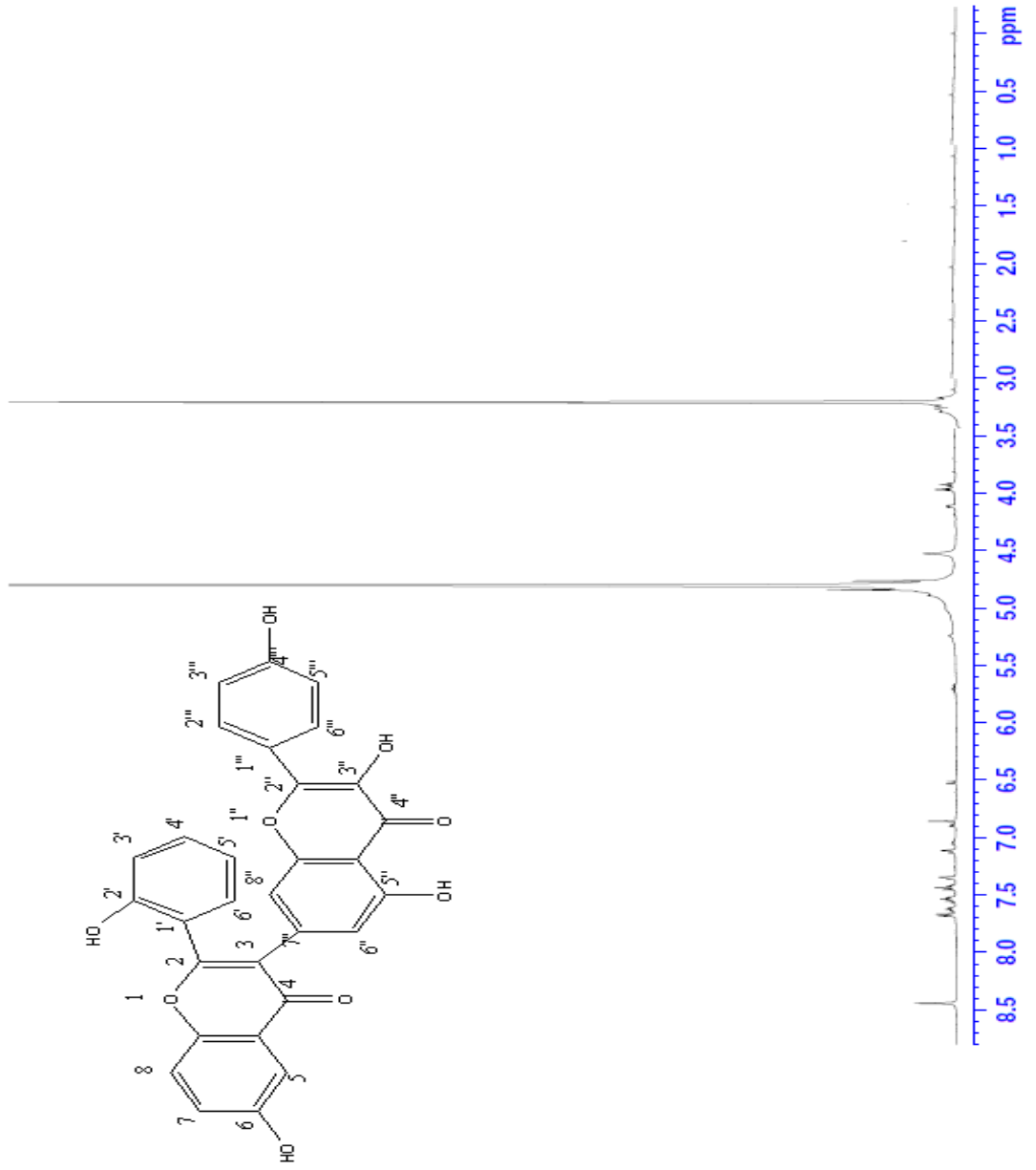
1 numaralı bileşiğin, ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11.), moleküler iyon piki  $m/z$  545  $[(\text{M}+2)+\text{Na}]^+$  (%17) olarak izlenmesi, bileşiğin kapalı formülünün  $\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_8$  olduğunu kanıtlamıştır. Bunun yanında,  $m/z$  250  $[(\text{M}-3) - \text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_4]^+$  (%9) ve  $m/z$  269  $[(\text{M}-3) - \text{C}_{15}\text{H}_9\text{O}_5]^+$  (%13) piklerinin gözlenmesi, biflavonoid molekülünden ayrılan iki tane flavonoid yapısının varlığını desteklemiştir. Moleküldeki, beş tane hidroksil grubunun varlığı,  $m/z$  455  $[(\text{M}+\text{Na}) -(5\times\text{H}_2\text{O})]^+$  (%100) pikinin, temel pik olarak görülmesiyle ispatlamıştır.

1 numaralı bileşiğin HMBC spektrumuna (MeOD,  $\delta$ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.12.) bakıldığında 6.85 ppm de (1H, s) H-8'' protonunun, 157.39 ppm de C-2 karbonuyla ve 117.20 ppm deki C-3 karbonuyla, HMBC etkileşiminin gözlenmesi, biflavonoid molekülünün C-3 ile C-7'' konumlarından bağlı olduğunu kanıtlamıştır. 1 numaralı bileşiğin diğer HMBC etkileşimleri Şekil 4.2. de gösterilmiştir.

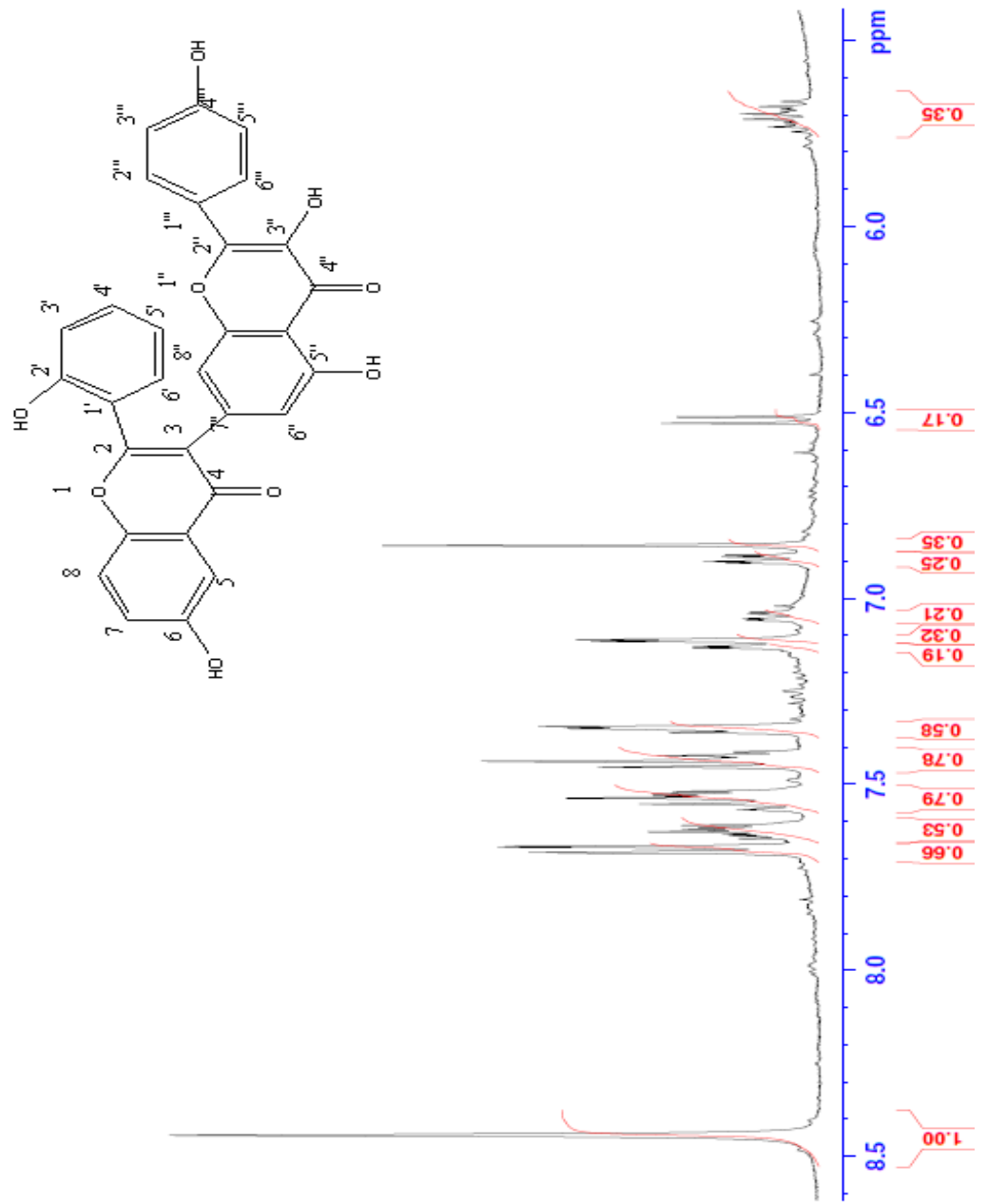


**Şekil 4.2.** 6,2',3'',5'',4'''pentahidroksi-3,7''-biflavon HMBC etkileşimleri

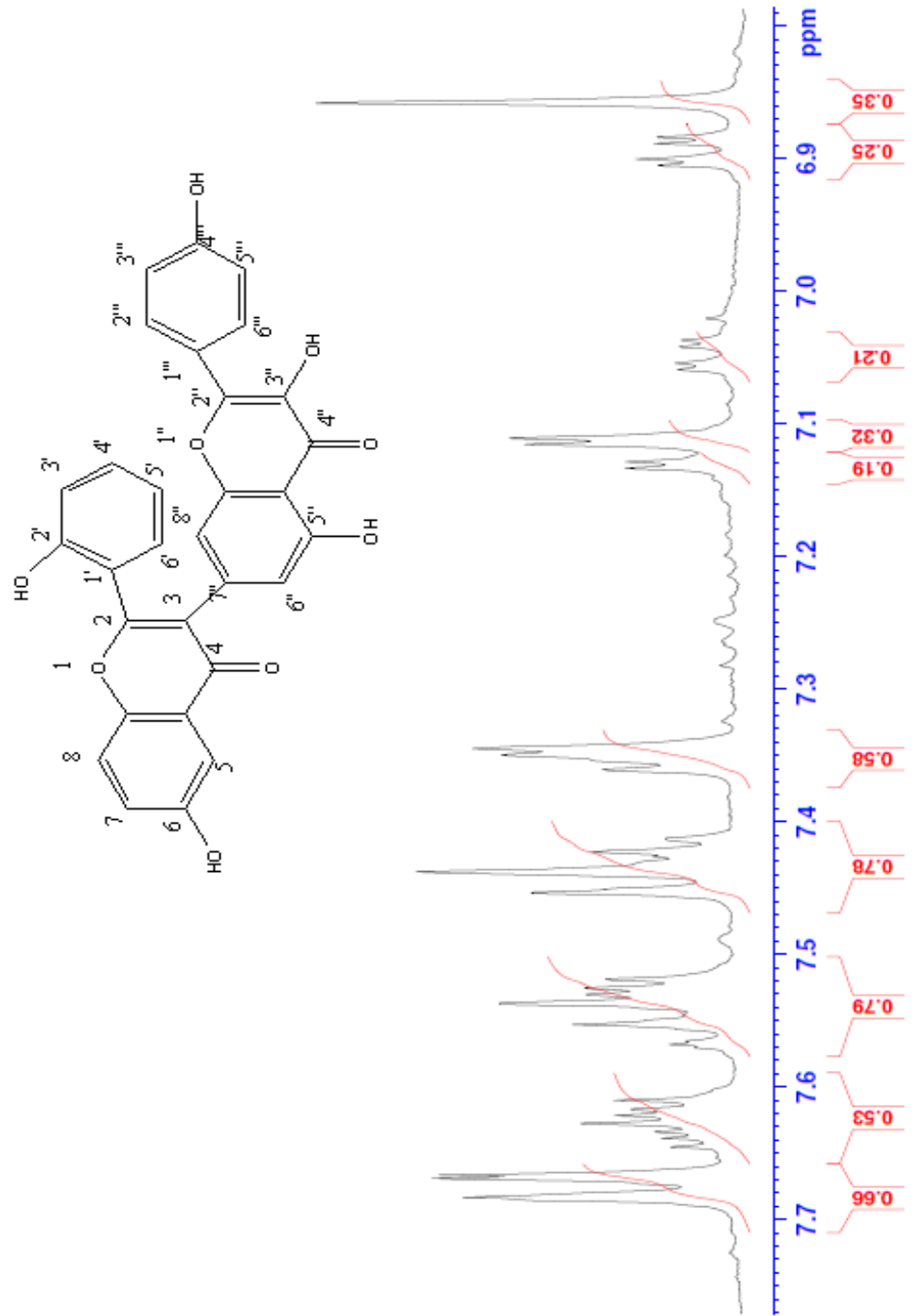
Tüm spektroskopik veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda 1 numaralı bileşiğin yapısının; 6,2',3'',5'',4'''pentahidroksi-3,7''-biflavon olduğuna karar verilmiştir. Bu bileşik *Solanum dulcamara* bitkisinden ilk defa izole edilen bir bileşiktir.



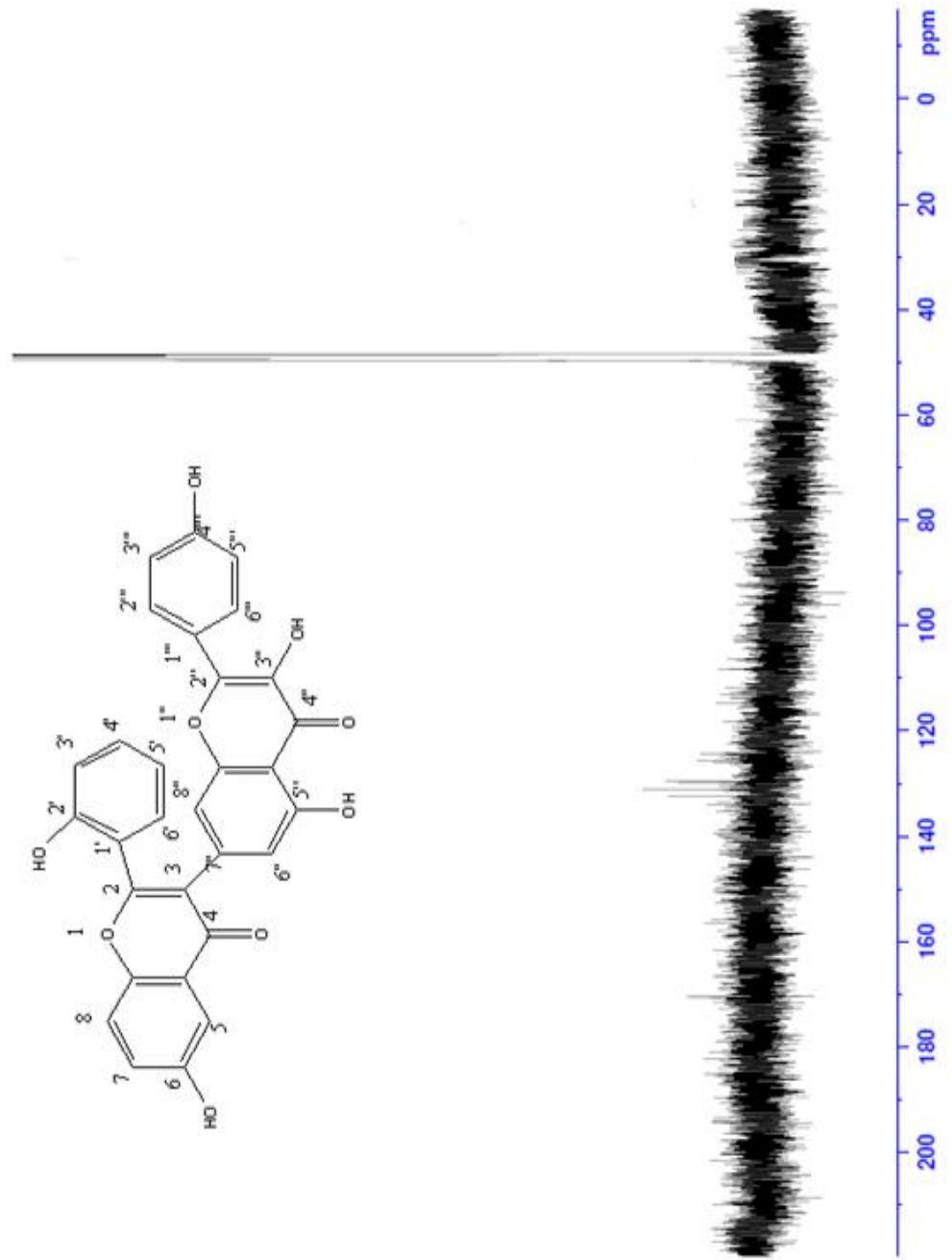
Şekil 4.3. 6,2',3'',5'',4'''pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



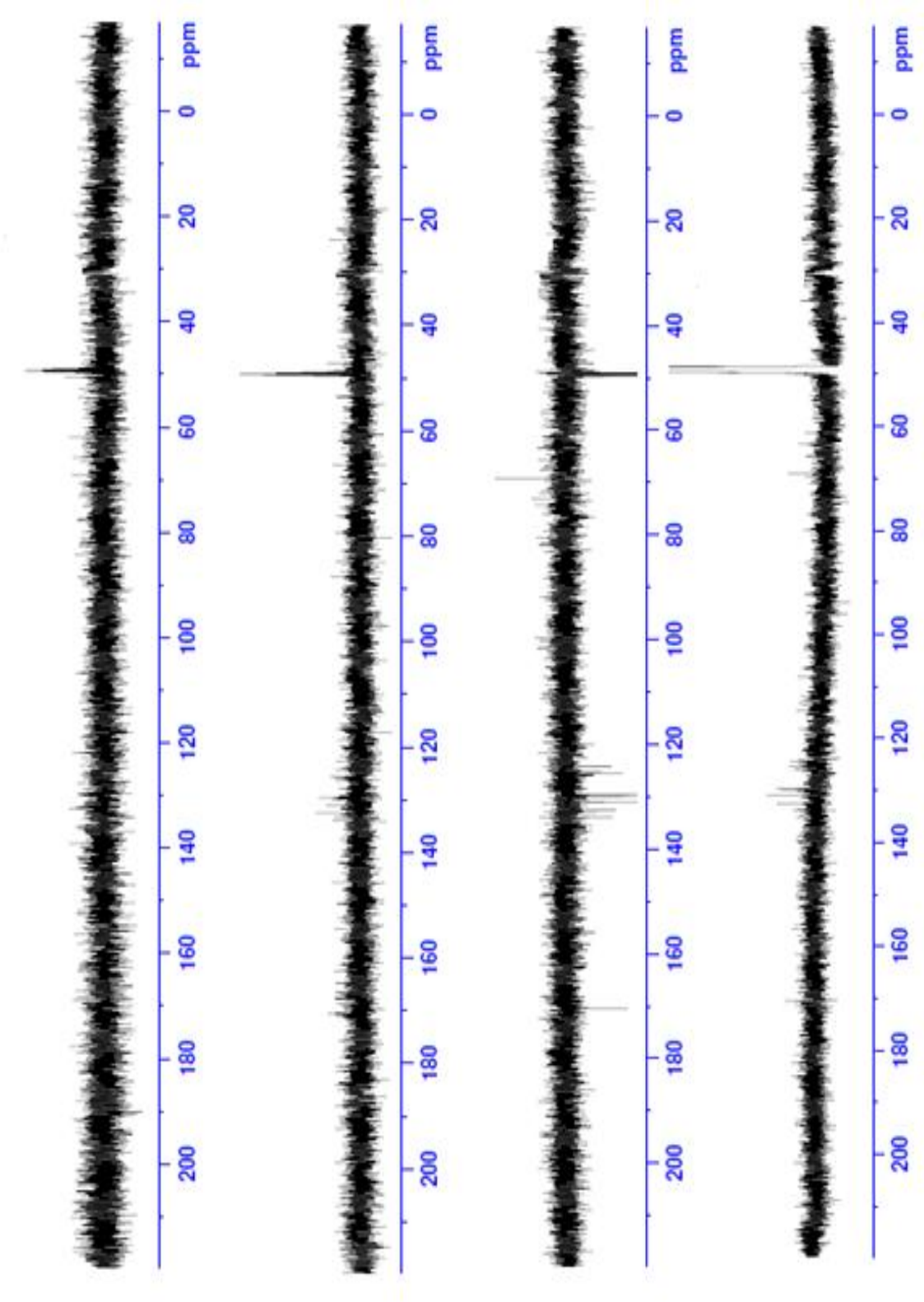
Şekil 4.4. 6,2',3'',5'',4'''pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



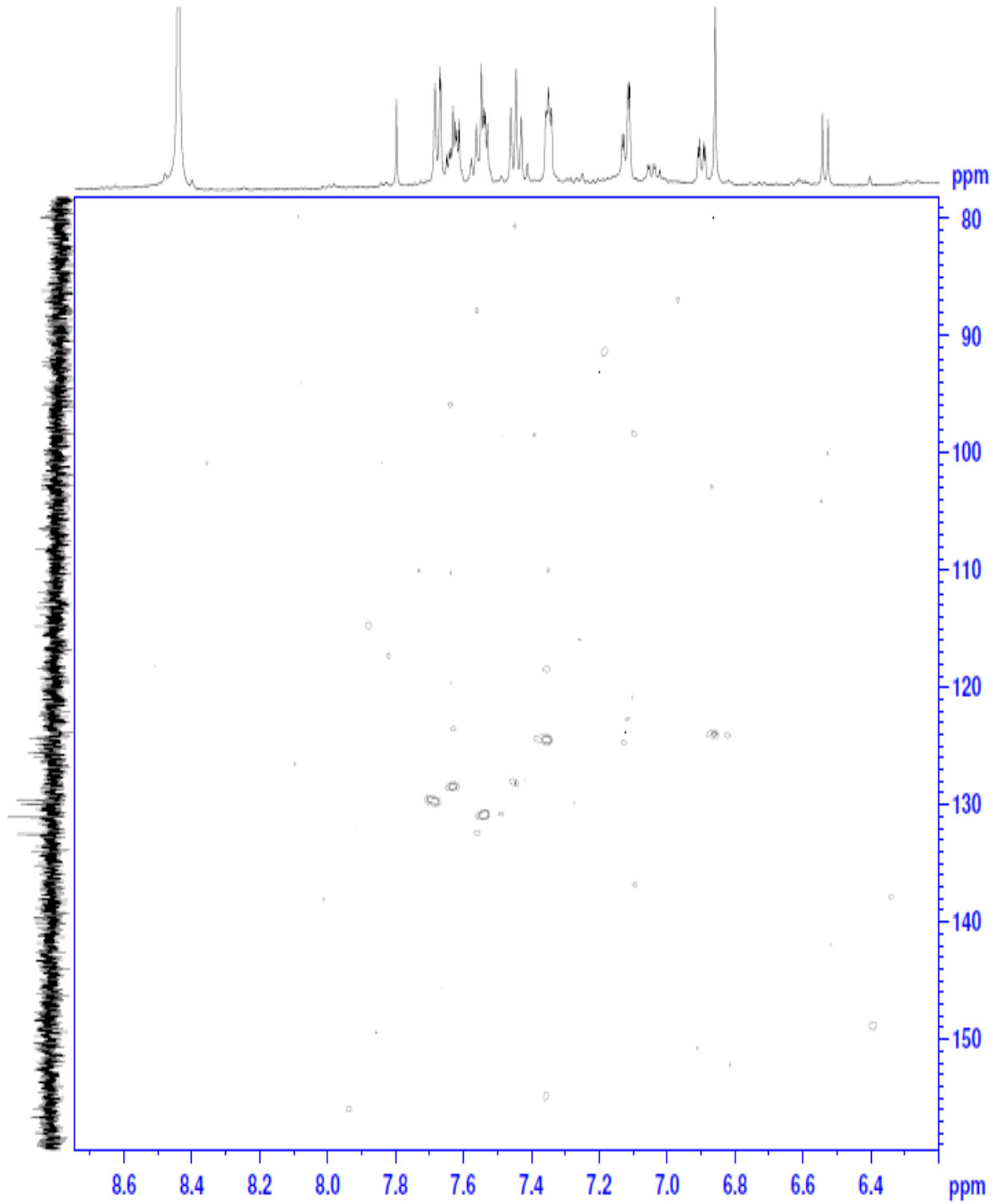
Şekil 4.5. 6,2',3'',5'',4''-pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil 4.6. 6,2',3'',5'',4''pentahidroksi-3,7'-biflavon bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

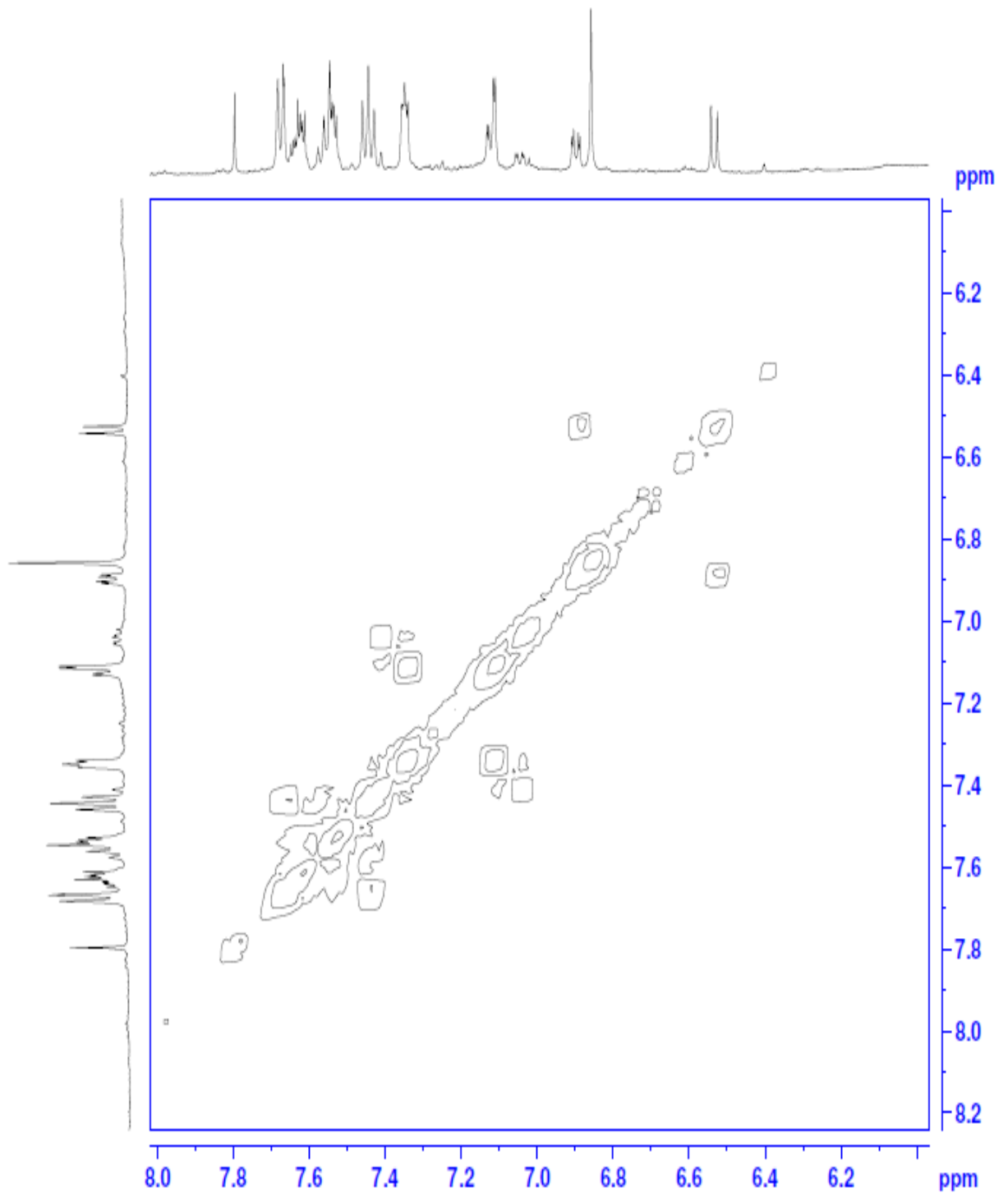


Şekil 4.7. 6,2',3'',5'',4''pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin DEPT spektrumu



Şekil 4.8. 6,2',3'',5'',4'''pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin HSQC spektrumu

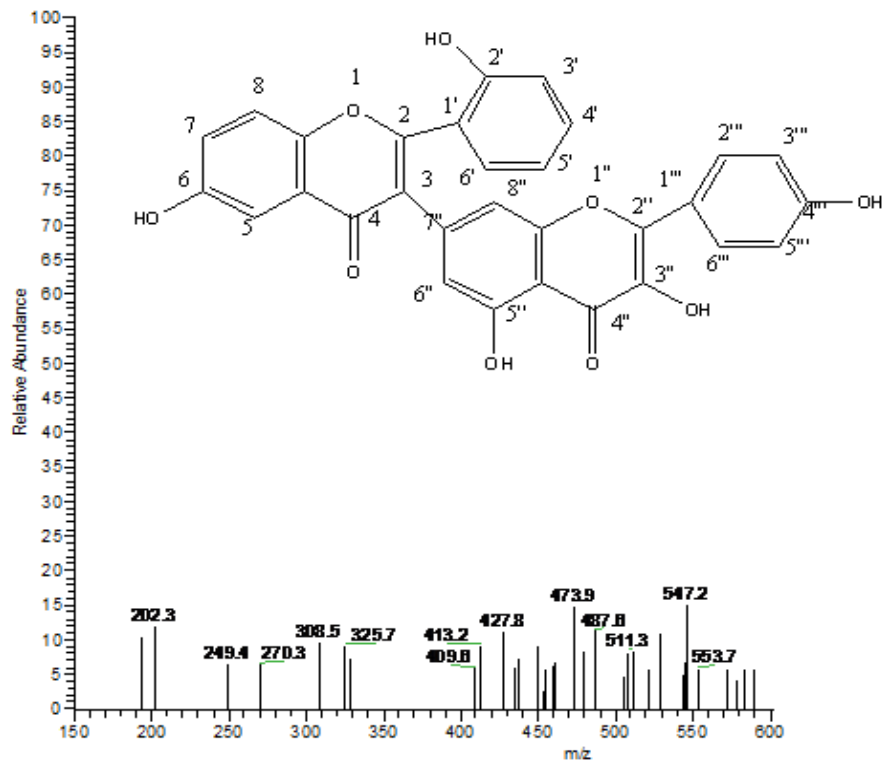




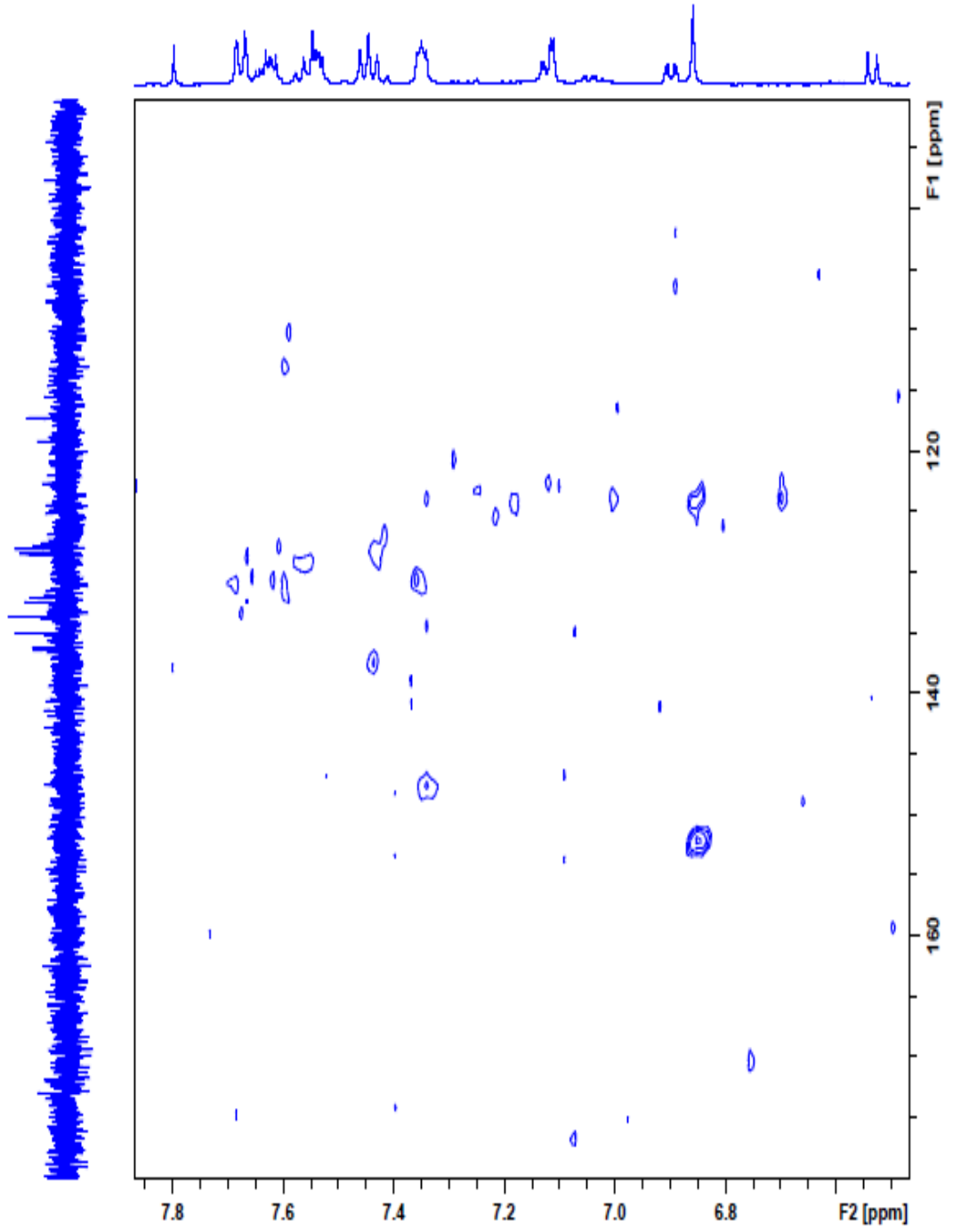
Şekil 4.9. 6,2',3'',5'',4''pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiminin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu



Şekil 4.10. 6,2',3'',5'',4'''-pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin ESI-MS spektrumu



Şekil 4.11. 6,2',3'',5'',4'''-pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin ESI-MS spektrumu



Şekil 4.12. 6,2',3'',5'',4''pentahidroksi-3,7''-biflavon bileşiğinin HMBC spektrumu



s) H-18, 0.82 ppm de (3H, s) H-19; 0.78 ppm de (3H, d) H-21; 0.80 ppm de (3H, d) H-27 ve 0.75 ppm de (3H, d) H-28 olarak tespit edilmiştir.

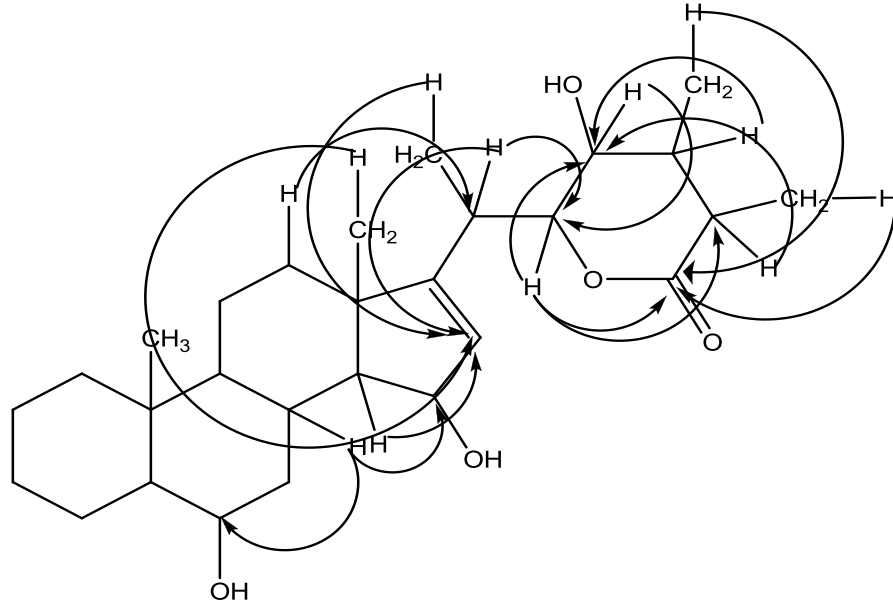
<sup>13</sup>C NMR, DEPT ve HSQC spektrumunda (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.19., Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.), oksijene bağlı C-6, C-15 ve C-23 karbonları 61.20, 69.10 ve 63.46 ppm de tespit edilmiştir. Karbonil karbonu (C-26) 169.05 ppm de görülmüştür. C-16 ve C-17 karbonlarına ait pikler sırasıyla 133.7 ppm ve 140.03 ppm değerlerinde izlenmiştir. Moleküldeki metil gruplarına ait karbonlar ise, 11.73 ppm (C-18), 15.85 ppm (C-19), 14.91 ppm (C-21), 15.34 ppm (C-27) ve 14.82 ppm (C-28) değerlerinde tespit edilmiştir. Molekülün DEPT spektrumunda, 5 tane -CH<sub>3</sub>, 7 tane -CH<sub>2</sub> ve 7 tane -CH (doymuş -CH) karbonları da tespit edilmiştir.

<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumunda (Şekil 4.22 ve Şekil 4.23.), 5.12 ppm deki (1H, brd) H-16 protonun, 3.50 ppm deki (1H, t, J=6.4 Hz) H-15 protonuyla olan etkileşimi; 4.11 ppm deki (1H, t, J=5.6 Hz) H-22 protonunun, 3.42 ppm deki (1H, t, J=6.5 Hz) H-23 ve 1.62 ppm deki (1H, m) H-25 protonlarıyla olan etkileşimleri; 1.43 ppm deki (1H, m) H-20 protonunun, 0.69 ppm deki (3H, s) H-18 protonuyla etkileşimi; 3.42 ppm deki (1H, t, J=6.5 Hz) H-23 protonunun, 1.38 ppm deki (1H, m) H-24 protonuyla olan etkileşimi; 1.62 ppm deki (1H, m) H-25 protonunun, 0.80 ppm deki (3H, d) H-27 protonuyla, 1.38 ppm deki (1H, m) H-24 protonuyla ve 3.42 ppm deki (1H, t, J=6.5 Hz) H-23 protonlarıyla olan etkileşimleri; 1.38 ppm deki (1H, m) H-24 protonunun 0.75 ppm deki (3H, d) H-28 protonuyla etkileşimi; 1.51 ppm deki (1H, m) H-8 protonunun 3.45 ppm deki (1H, t, J=7.4 Hz) H-6 protonuyla olan etkileşimi tespit edilmiştir. Bunun yanında, 0.7-1.7 ppm arasındaki, birbirine komşu olan metin (-CH) ve metilen (-CH<sub>2</sub>) protonlarının etkileşiminde <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumunda mevcuttur.

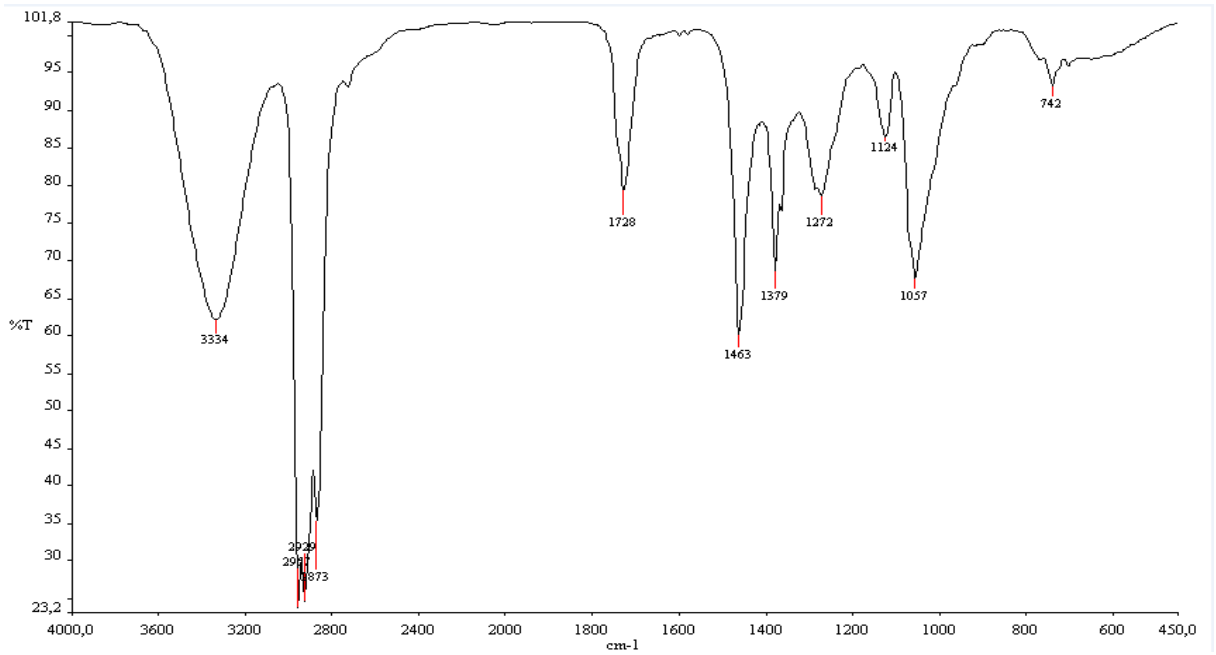
Bileşiğin ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.24.), moleküler iyon piki *m/z* 460 [M]<sup>+</sup> (%3) vererek kapalı formülünün C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub> olduğunu kanıtlamıştır. Önemli parçalanma ürünleri arasında olan *m/z* 412 [(M+3) - (3xOH)]<sup>+</sup> (%10) pikinin gözlenmiş olması, moleküldeki üç hidroksil grubunun varlığını ve *m/z* 413 [(M+3) - 44 (CO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (%10) pikinin görülmeside, moleküldeki lakton halkasının varlığını kanıtlamıştır. Streoidler için önemli bir bölünme olan yan zincirin ayrılmasıyla gözlenen, *m/z* 291 [(M+2) - C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub> (yan zincir)]<sup>+</sup> (%5) pikinin spektrumda görülmüş olması, molekülün streoid yapısında olduğunu desteklemektedir. Ayrıca *m/z* 249 [(M - yan zincir - 4H) - (2xH<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup> (%60) pikinin gözlenmesi, moleküldeki, iki hidroksil grubunun yan zincirde olmayıp, halka üzerinde olduğunu kanıtlamaktadır.

Molekülün HMBC spektrumuna ait veriler Şekil 4.25 ve Şekil 4.26. da, etkileşimleri 4.14. de gösterilmiştir.

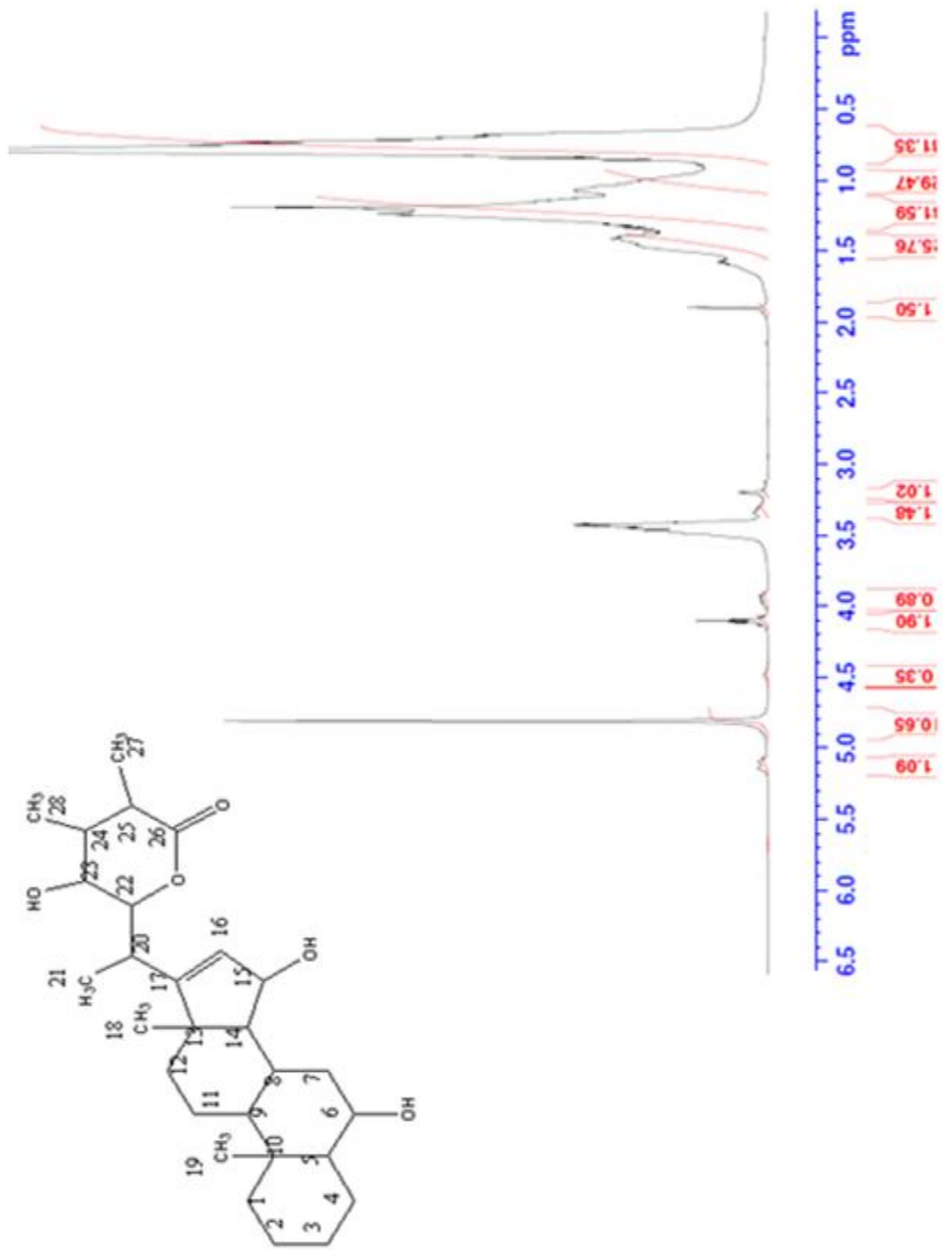
Tüm bu spektroskopik veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda 2 numaralı bileşiğin yapısının; 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide olduğu tayin edilmiştir.



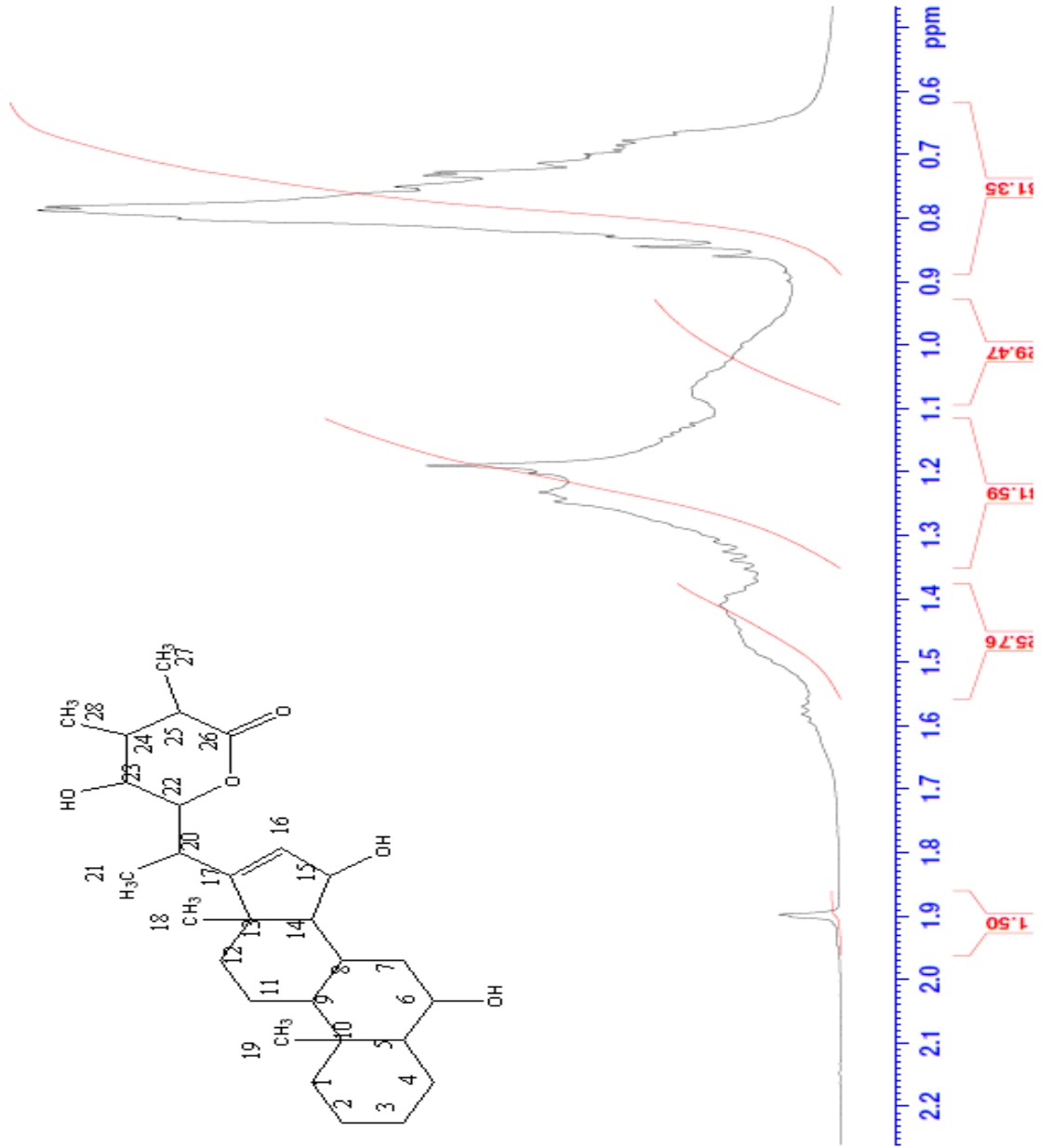
Şekil 4.14. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin HMBC etkileşimleri



Şekil 4.15. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin IR spektrumu

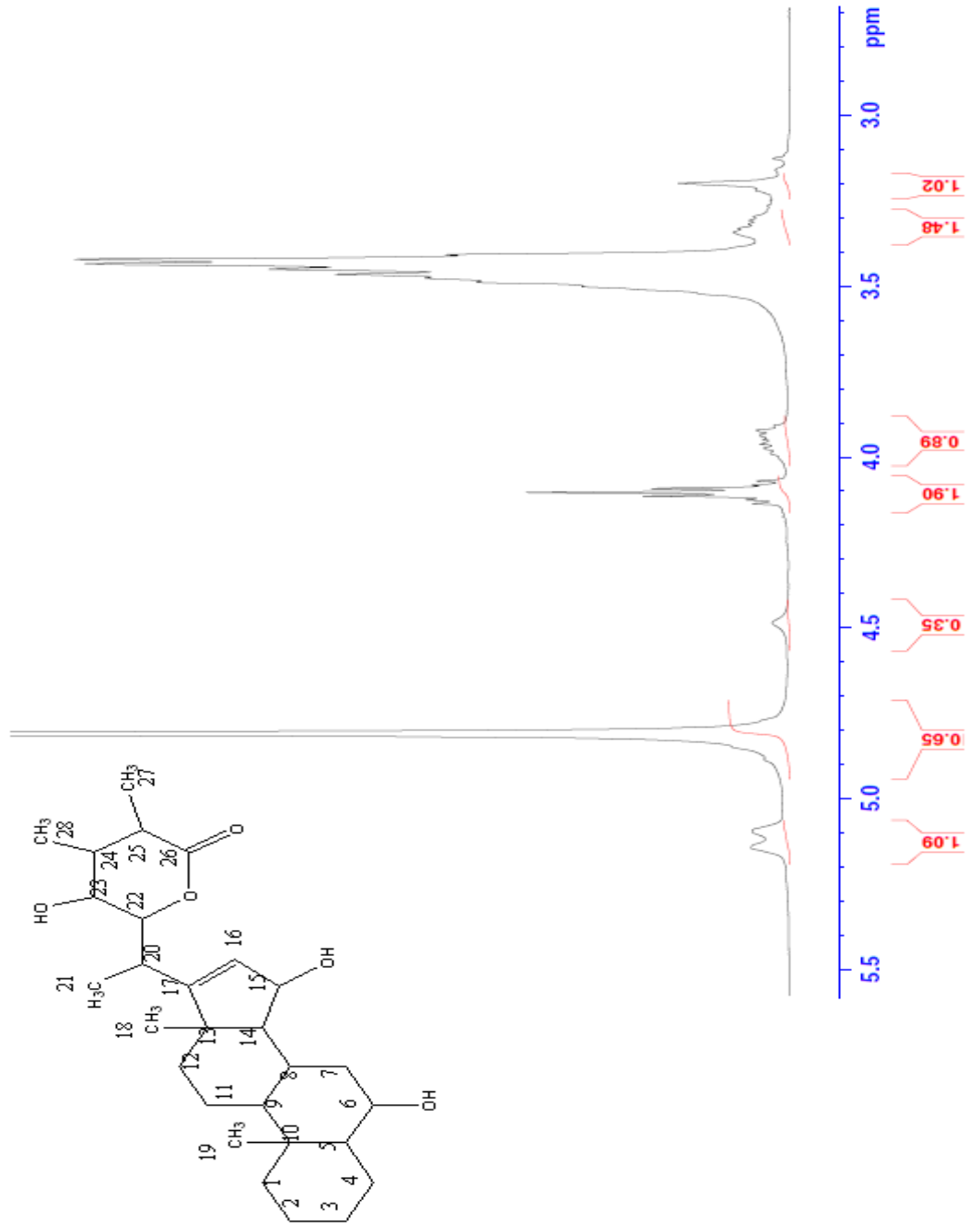


Şekil 4.16. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

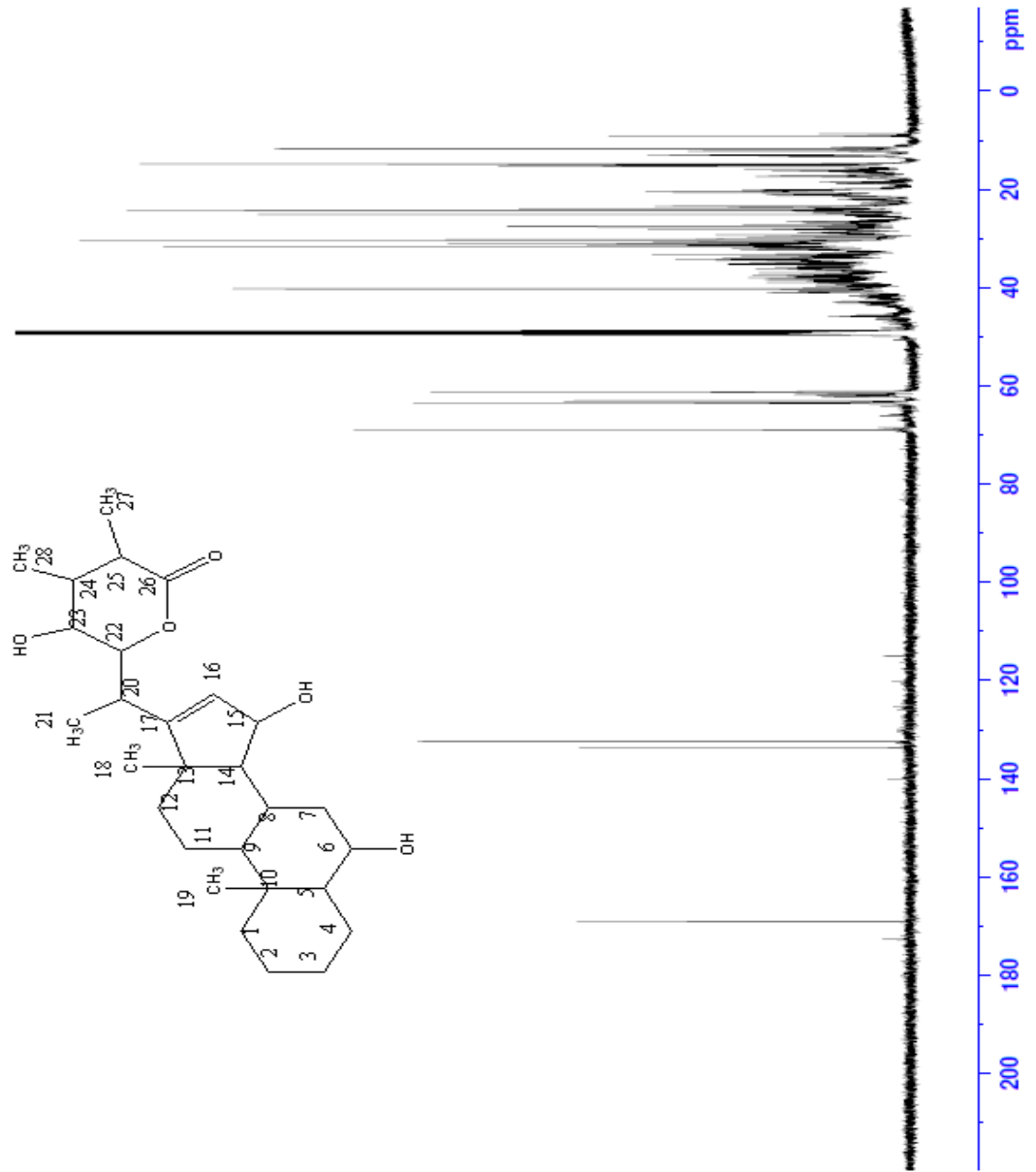


Şekil 4.17. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu

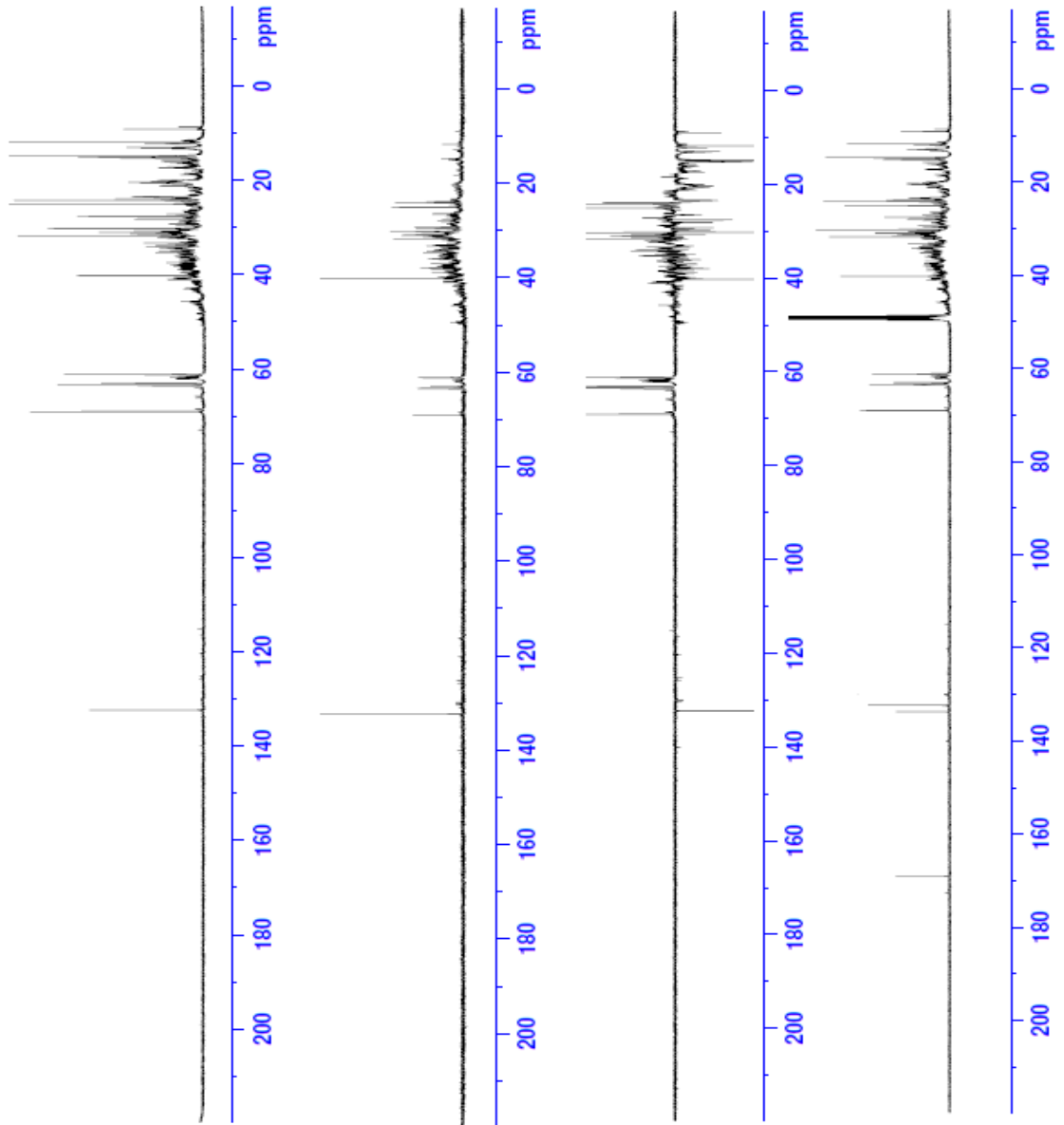




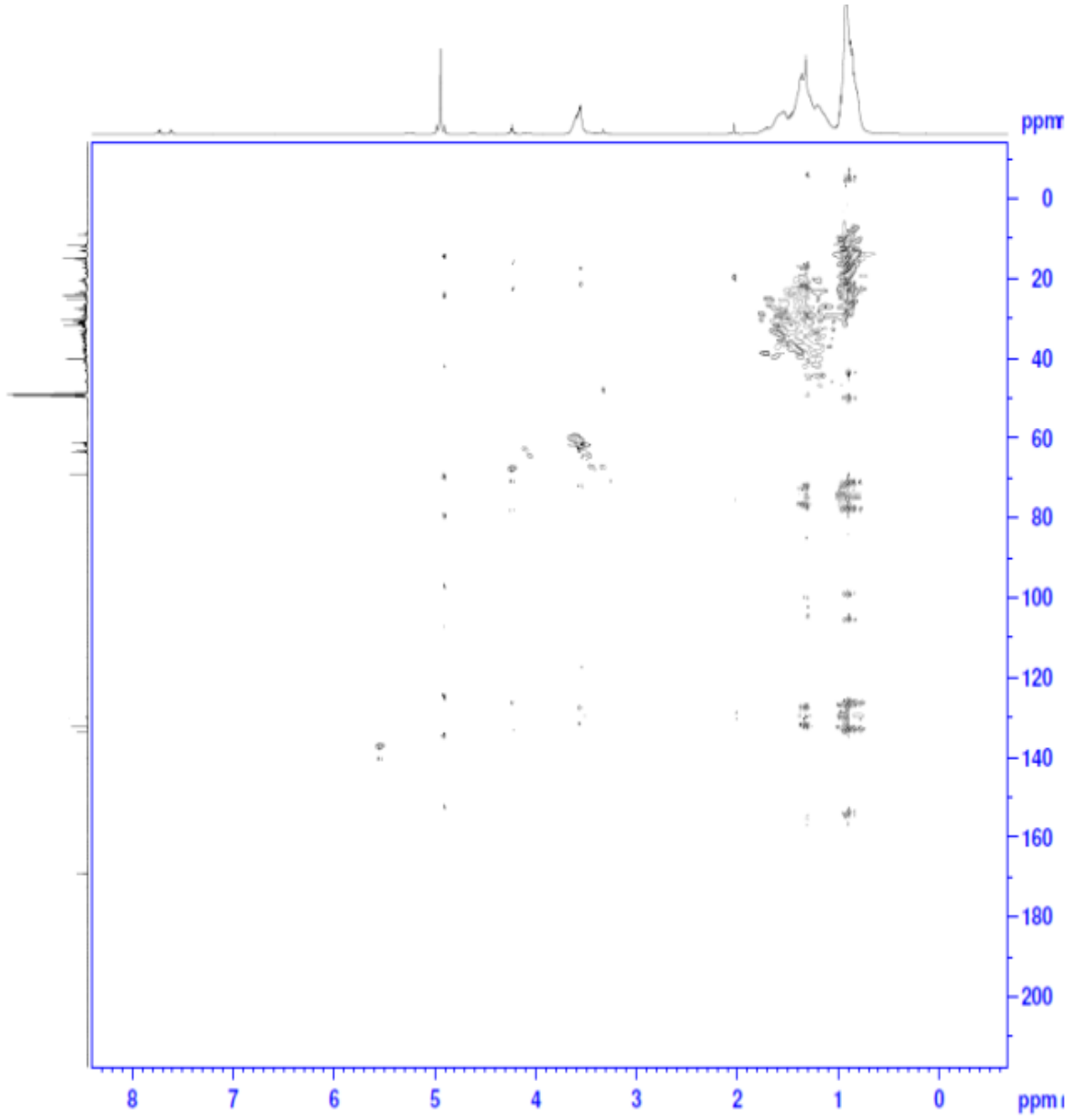
Şekil 4.18. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



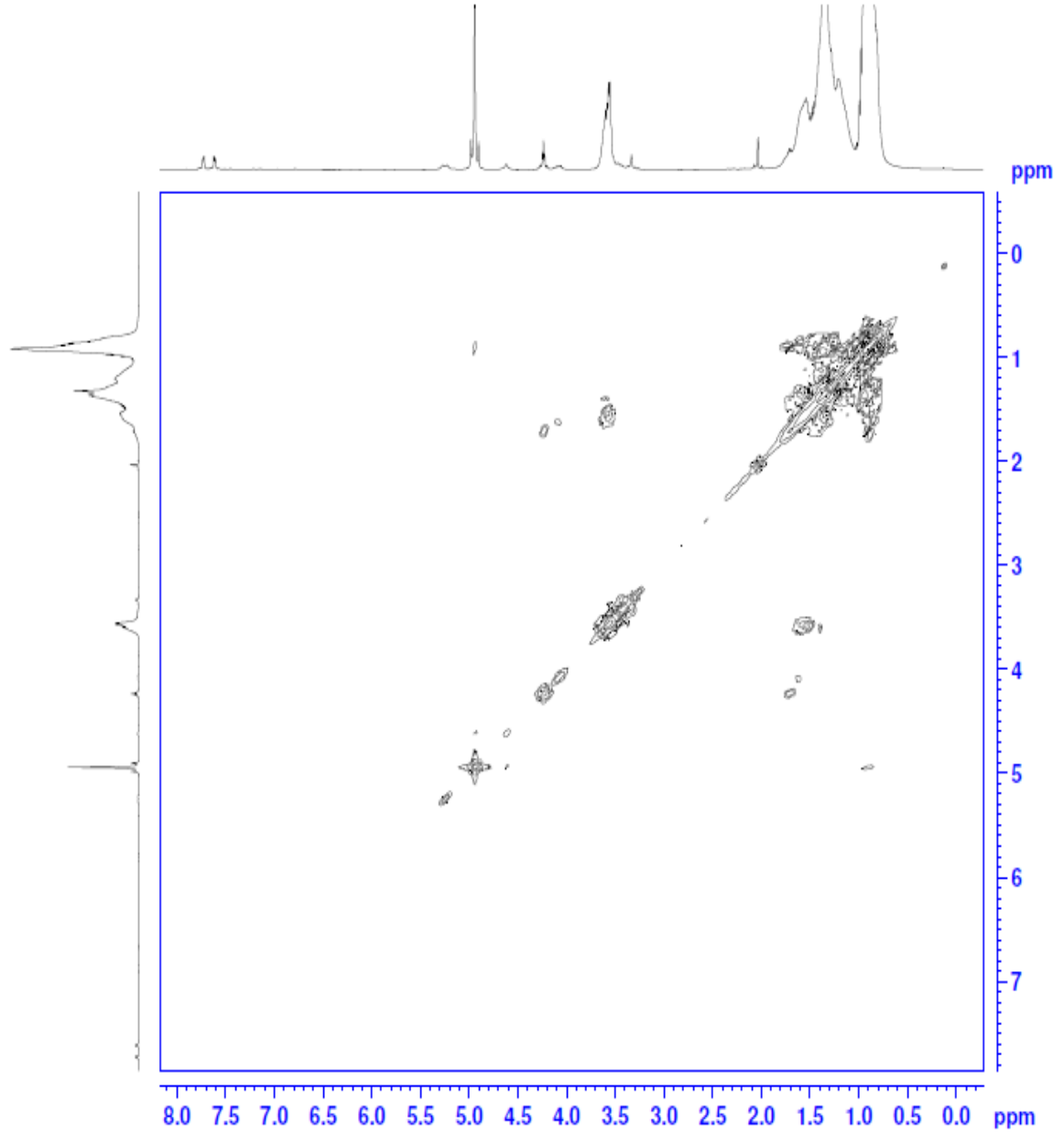
Şekil 4.19. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



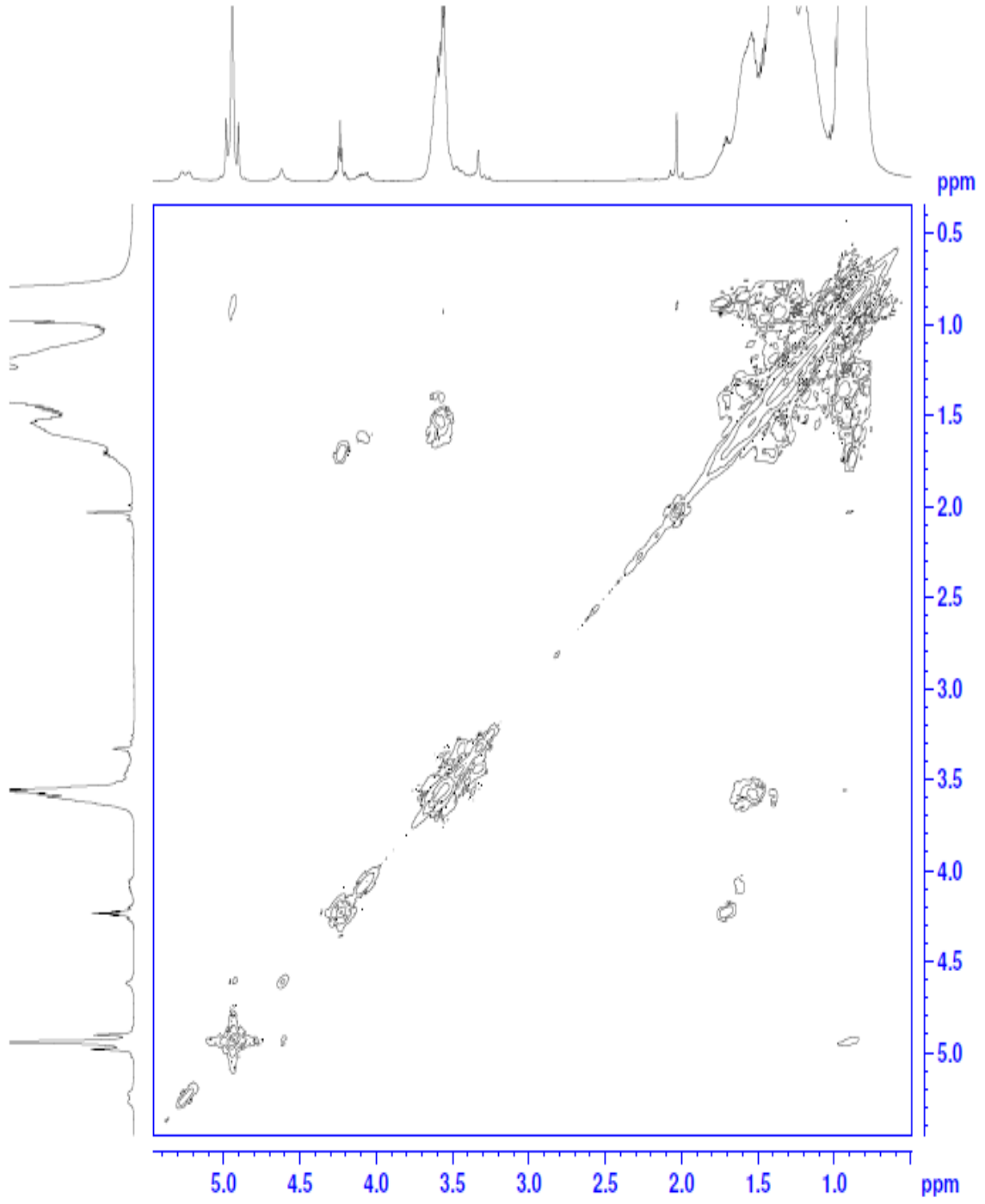
Şekil 4.20. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin DEPT spektrumu



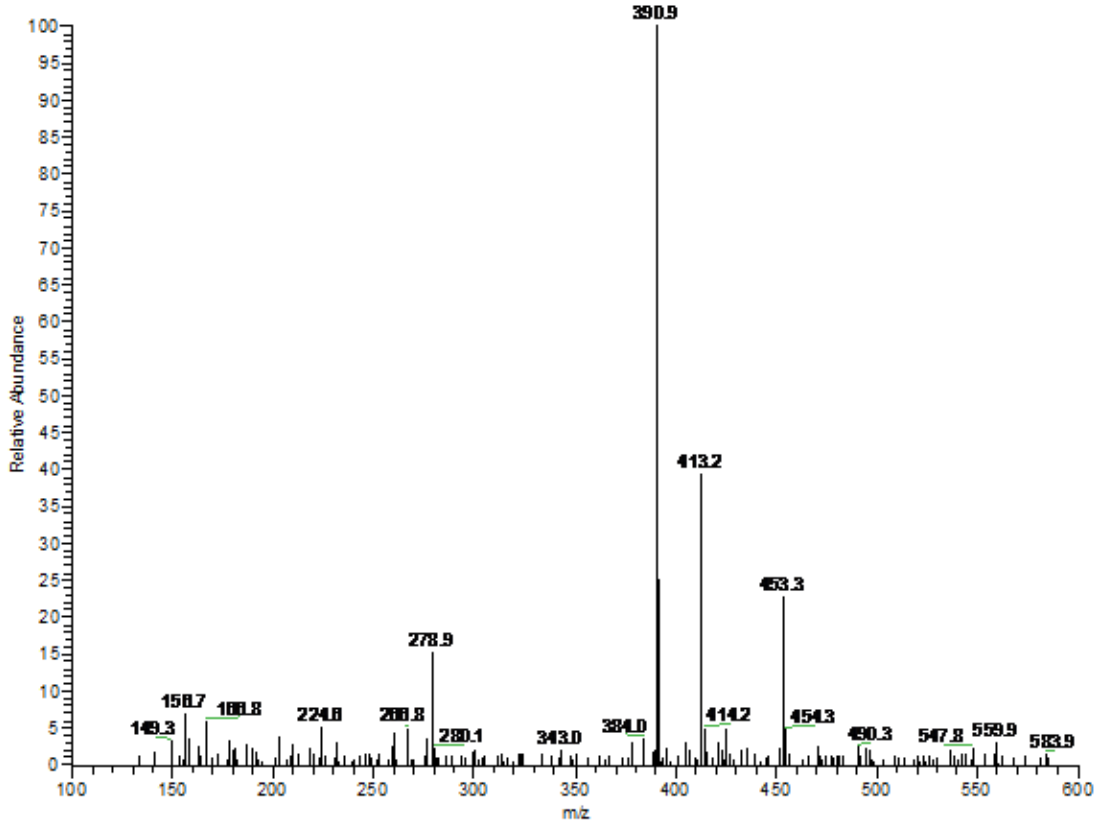
Şekil 4.21. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin HSQC spektrumu



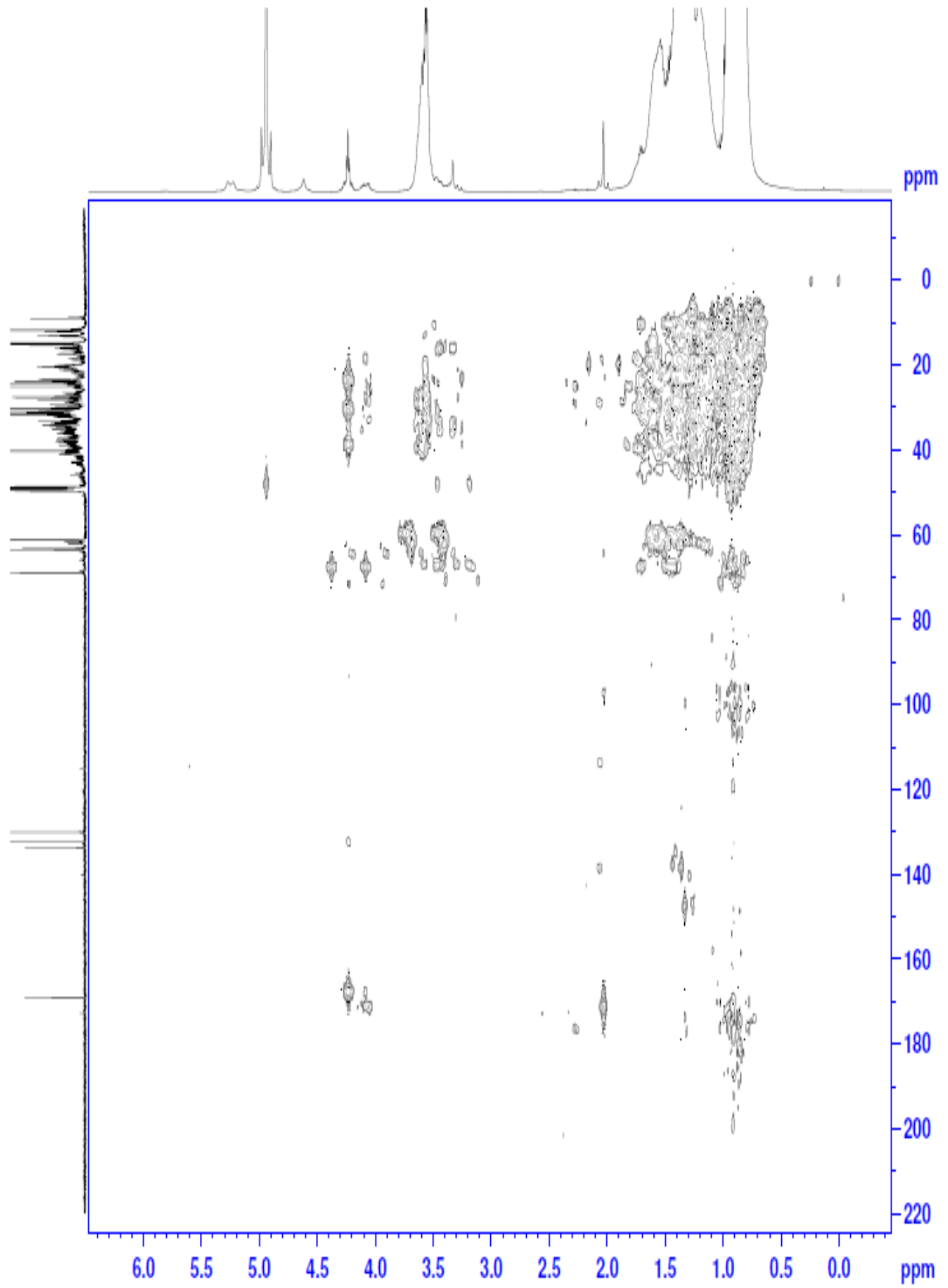
Şekil 4.22. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu



Şekil 4.23. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu

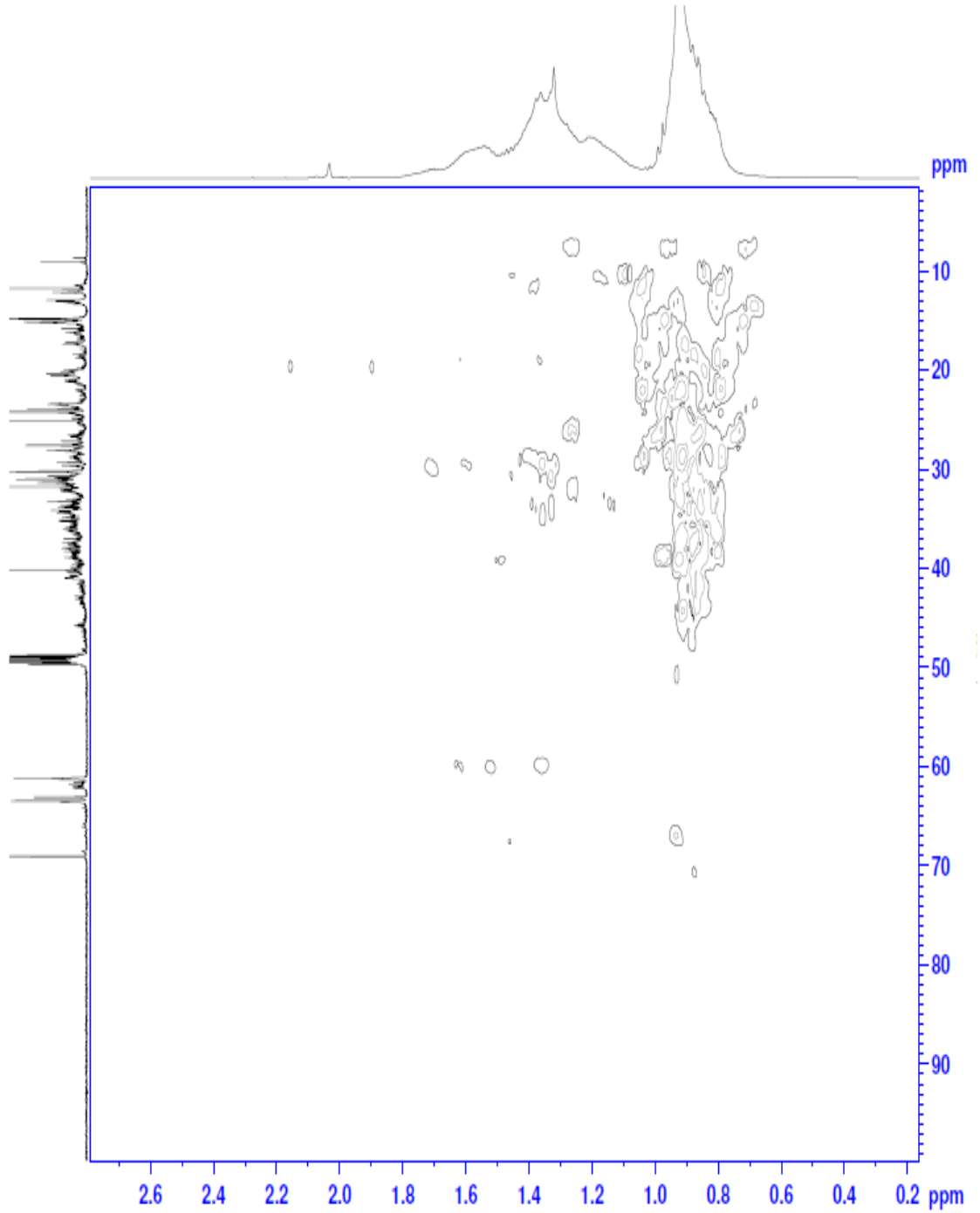


Şekil 4.24. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin ESI-MS spektrumu



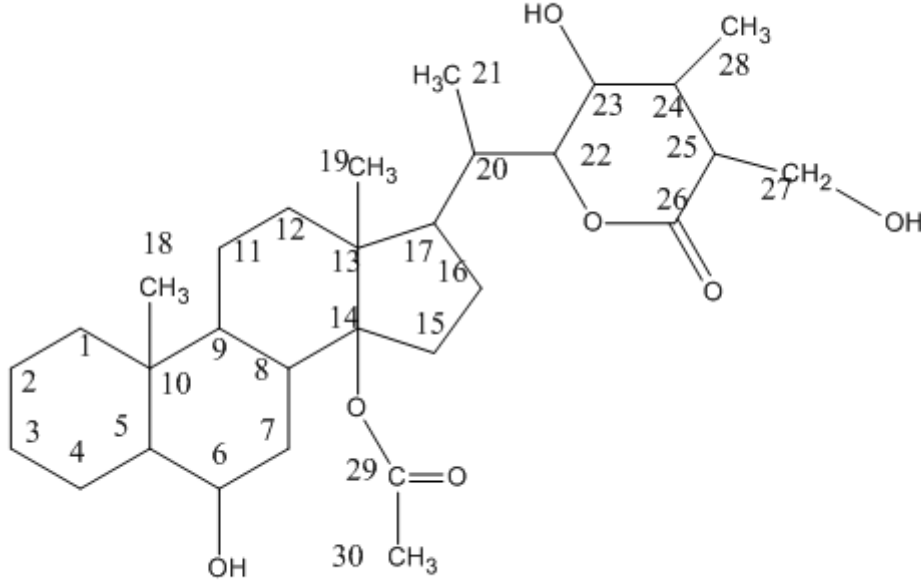
Şekil 4.25. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin HMBC spektrumu





Şekil 4.26. 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide bileşiğinin HMBC spektrumu

#### 4.3.2. 3 Numaralı Bileşik (SDMM-420-b-3): 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide



Şekil 4.27. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin yapısı

Bu bileşik turuncu jel, silikajel plakta 254 ve 366 nm UV ışık altında mavi renkli olan,  $\text{NH}_3$  buharına tutulup, ardından NA belirteci püskürtüldükten sonra 254 ve 366 nm UV ışık altında mavi renkli olarak görülmüştür. TLC de, EtOAc çözücü sisteminde yürütülmüştür.

IR spektrumunda ( $\nu$  max  $\text{cm}^{-1}$ , KBr, Şekil 4.29.)  $3353 \text{ cm}^{-1}$  de hidrojen bağlı hidroksil grubu;  $2929, 2953, 2872 \text{ cm}^{-1}$  de alifatik C-H gerilmesi,  $1462, 1379 \text{ cm}^{-1}$  de  $-\text{CH}_3, -\text{CH}_2, -\text{CH}$  eğilmesi;  $1727 \text{ cm}^{-1}$  de C=O gerilmesi;  $1125, 1056 \text{ cm}^{-1}$  de C-O gerilmesi tespit edilmiştir.

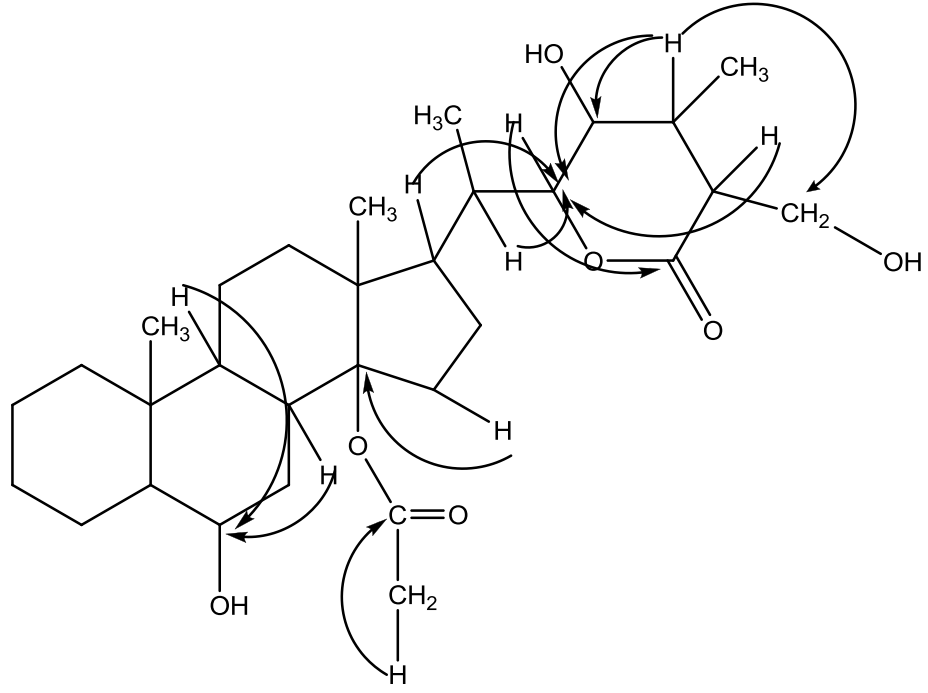
$^1\text{H}$  NMR spektrumunda (MeOD,  $\delta$ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.30.) 3.44 ppm de H-6 (1H, t,  $J=7.4$  Hz), 3.42 ppm de H-23 (1H, t,  $J=6.6$  Hz) protonları gözlenmiştir. 27 numaralı karbondaki metilen protonları (2H) 3.51 ppm de  $J=6.2, 10.3$  Hz lik bir bölünme ile dd olarak tespit edilmiştir. H-22 protonu ise, 4.11 ppm de triplet  $J=5.4$  Hz olarak izlenmiştir. H-18, H-19 ve asetil grubunun metil protonları, sırasıyla 0.72 ppm, 0.82 ppm ve 1,81 ppm de singlet olarak görülmüştür. H-21 ve H-28 protonları ise, 0.78 ppm ve 0.76 ppm de dublet olarak tespit edilmiştir.

<sup>13</sup>C NMR, DEPT ve HSQC spektrumunda (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.31., Şekil 4.32. ve Şekil 4.33.) oksijene bağlı olan 63.05, 64.29, 69.10, 63.42 ve 61.16 ppm de C-6, C-14, C-22, C-23 ve C-27 karbonları sırasıyla izlenmiştir. 168.25 ve 181.20 ppm de C-26 karbonil karbonu ve asetil grubunun karbonil karbonu (C-29) tespit edilmiştir. Bunun yanında, alınan DEPT spektrumunda molekülde 5 tane -CH<sub>3</sub>, 9 tane -CH<sub>2</sub> ve 7 tane -CH karbonu da gözlenmiştir. Moleküldeki metil gruplarına ait karbonlar ise, 11.53 ppm (C-18), 14.86 ppm (C-19), 14.62 (C-21), 14.53 ppm (C-28) ve asetil grubunun metil karbonunda (-COCH<sub>3</sub>), 23.80 ppm de tayin edilmiştir.

<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumunda (Şekil 4.34. ve Şekil 4.35.) 3.42 ppm deki (1H, t, J=6.6 Hz) H-23 protonunun, 1.34 ppm (1H, m) H-24 ve 4.11 ppm deki (1H, t, J=5.4 Hz) H-22 protonlarıyla etkileşmesi; oksijene bağlı karbondaki H-23 protonunun, H-22 ve H-24 ile etkileşimleri görülmüş ve komşuluk ilişkileri kanıtlanmıştır. Bunun yanında 3.51 ppm de çıkan C-27 deki metilen protonlarının, 1.64 ppm deki (1H, m) H-25 protonuyla <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY etkileşimi tespit edilmiştir. 0.7-1.8 ppm arasındaki, birbirine komşu olan metin (-CH) ve metilen (-CH<sub>2</sub>) protonlarının etkileşiminde <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumunda mevcuttur.

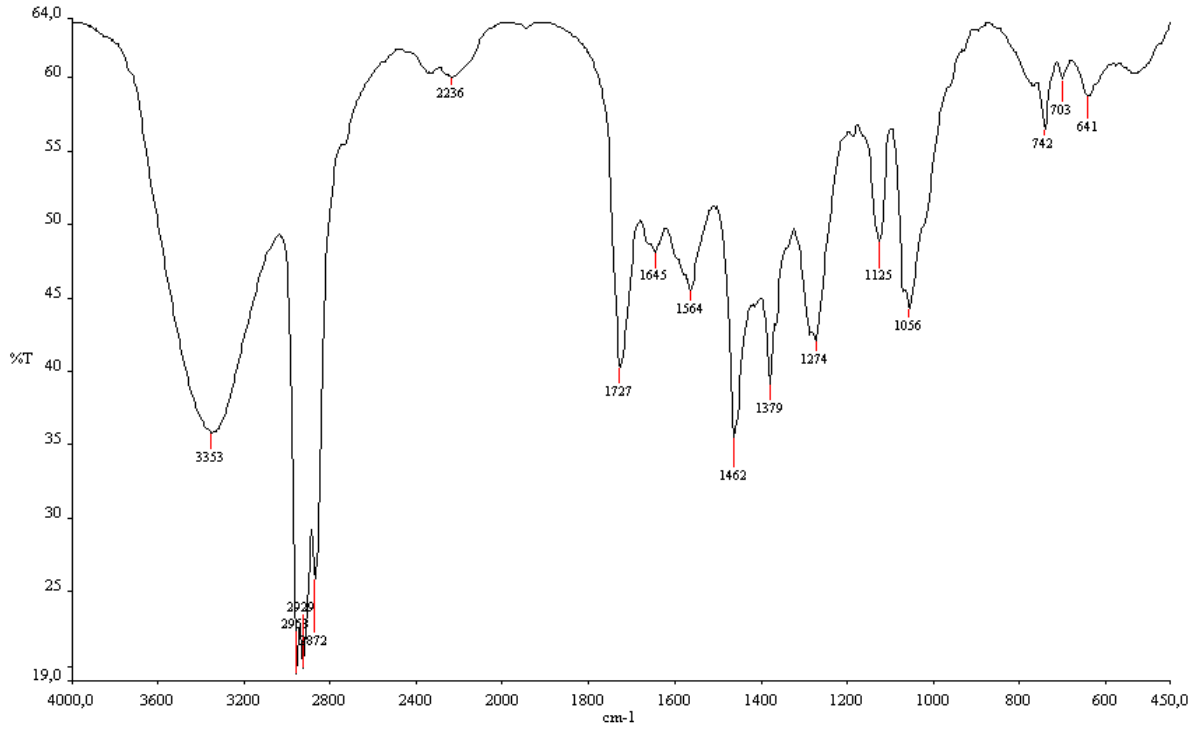
ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.36. ve Şekil 4.37.), moleküler iyon piki *m/z* 520 [M]<sup>+</sup> (%3) pikinin görülmesi, bileşiğin kapalı formülünün C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>7</sub> olduğunu kanıtlamıştır. Önemli parçalanma ürünleri arasında olan *m/z* 413 [(M+3) - OCOCH<sub>3</sub> (asetil) - (3xOH)]<sup>+</sup> (%100) pikinin gözlenmesi molekülde asetil grubunun ve üç hidroksil grubunun varlığını göstermektedir. Yine spektrumdaki *m/z* 369 [(M+3) - OCOCH<sub>3</sub> (asetil) - (3xOH) - (CO<sub>2</sub>)]<sup>+</sup> (%100) piki de moleküldeki; asetil grubunun, üç hidroksil grubunun ve lakton halkasının varlığını kanıtlamaktadır. Stereoidler için önemli bir bölünme olan yan zincirin ayrılmasıyla gözlenen *m/z* 335 [(M+2) - yan zincir (C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>4</sub>)]<sup>+</sup> (%12) ve *m/z* 188 [(M+1) - C<sub>21</sub>H<sub>33</sub>O<sub>3</sub>(333)]<sup>+</sup> (%10) pikinin spektrumda gözlenmeside, molekülün stereoid yapısında olduğunu desteklemektedir.

Molekülün HMBC spektrumuna ait veriler Şekil 4.38. ve Şekil 4.39. da, etkileşimleri Şekil 4.28. de gösterilmiştir.

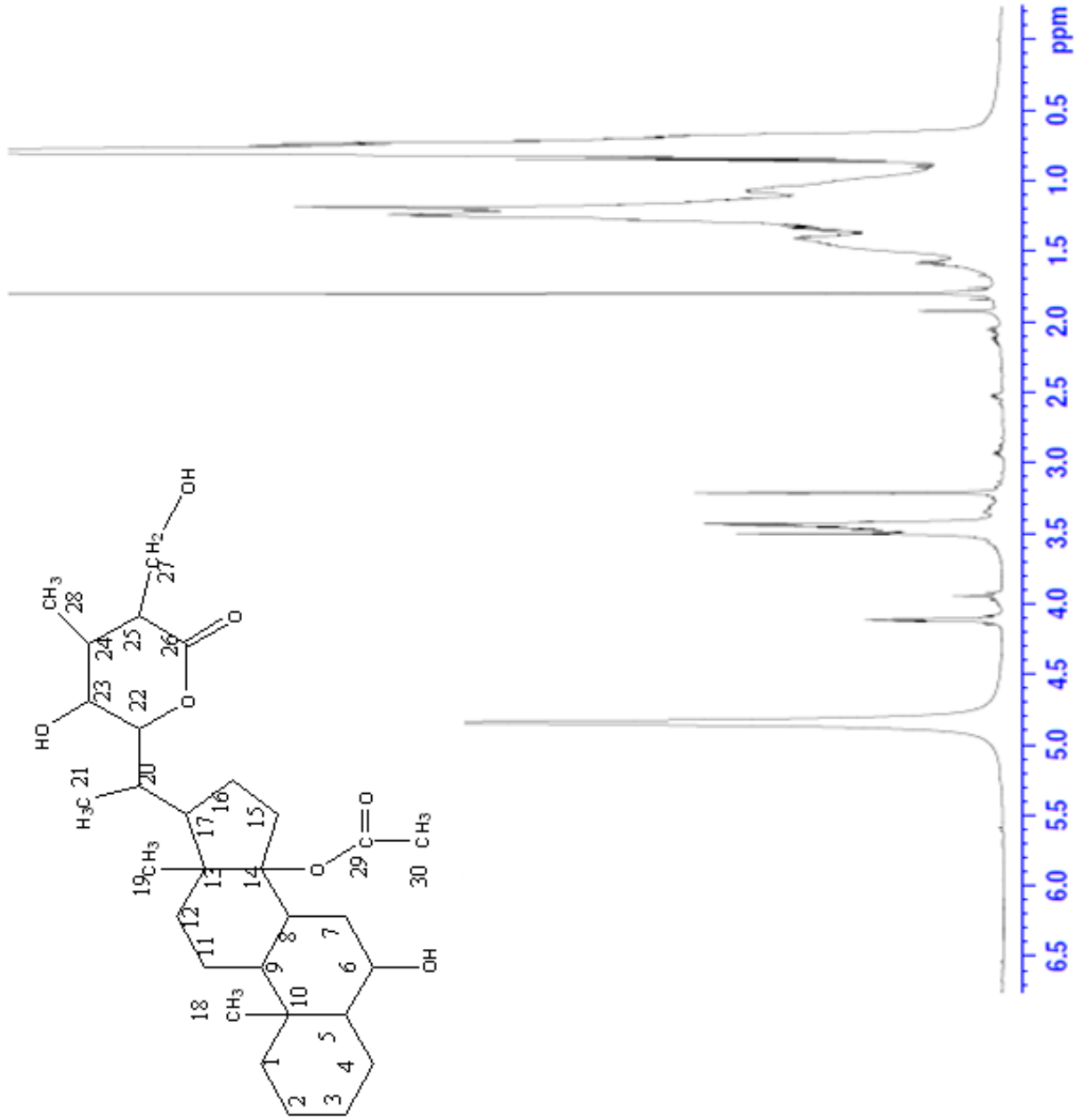


**Şekil 4.28.** 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC etkileşimleri

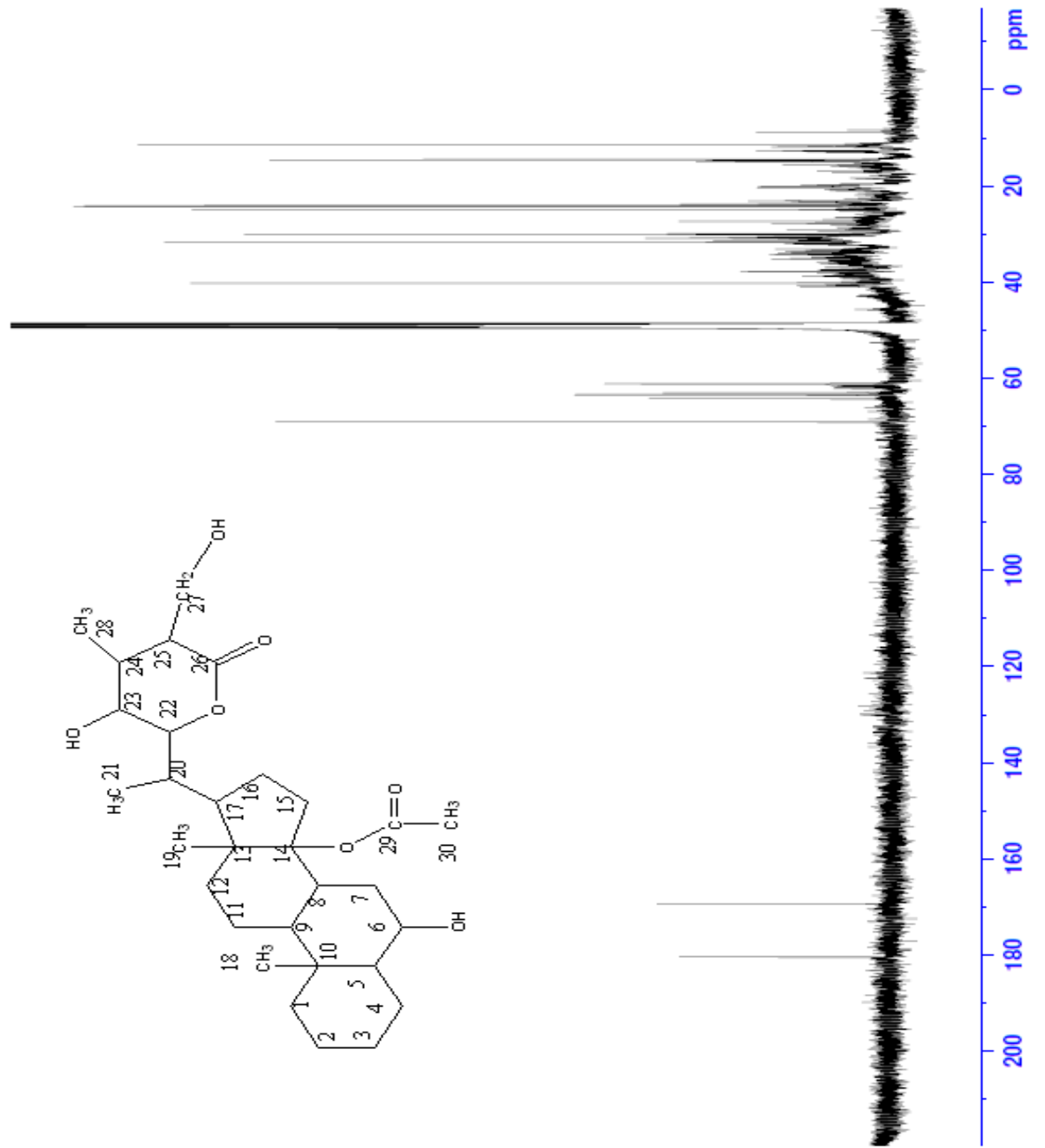
Tüm bu spektroskopik veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda 3 numaralı bileşiğin yapısının; 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide olduğu tayin edilmiştir.



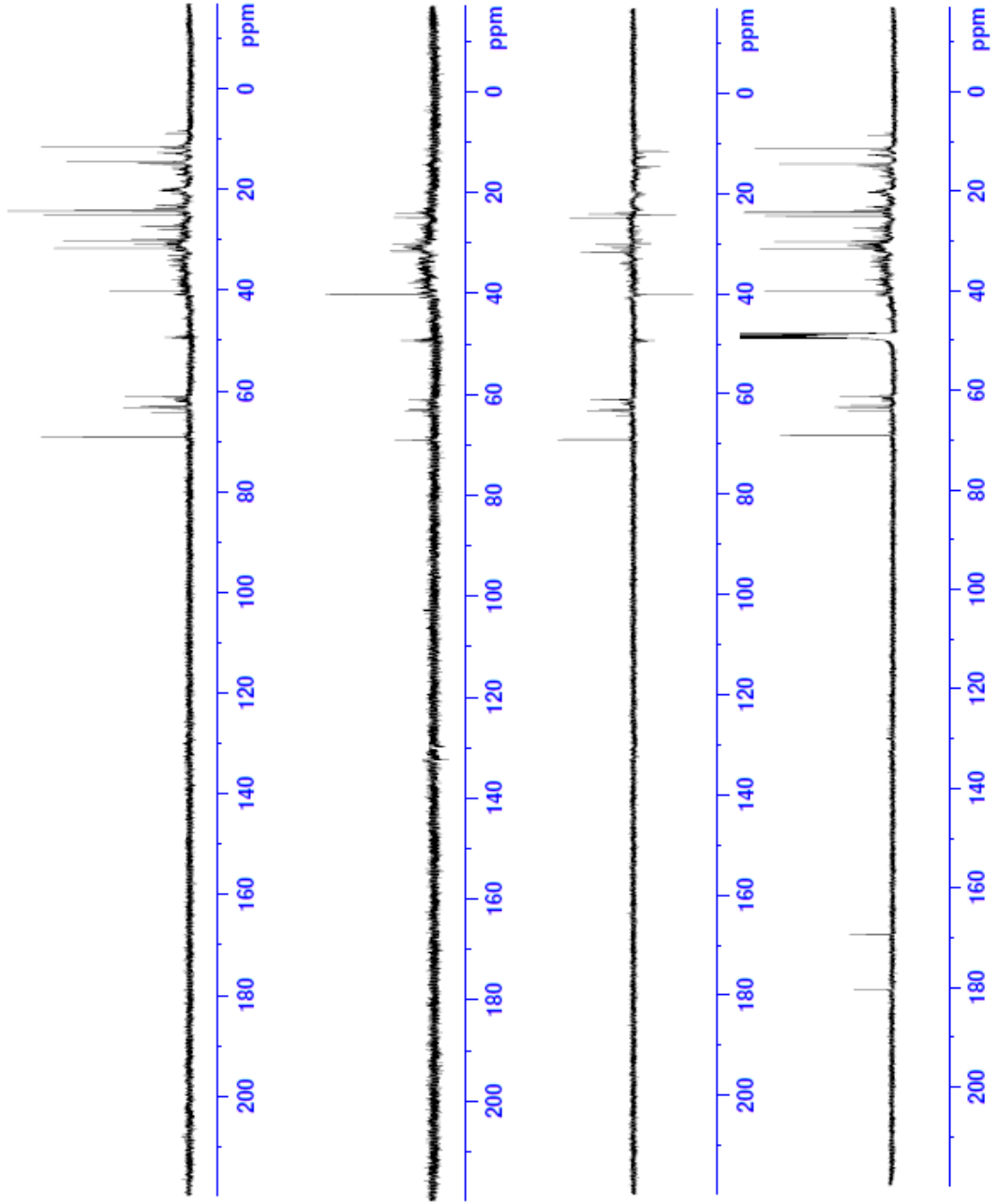
**Şekil 4.29.** 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin IR spektrumu



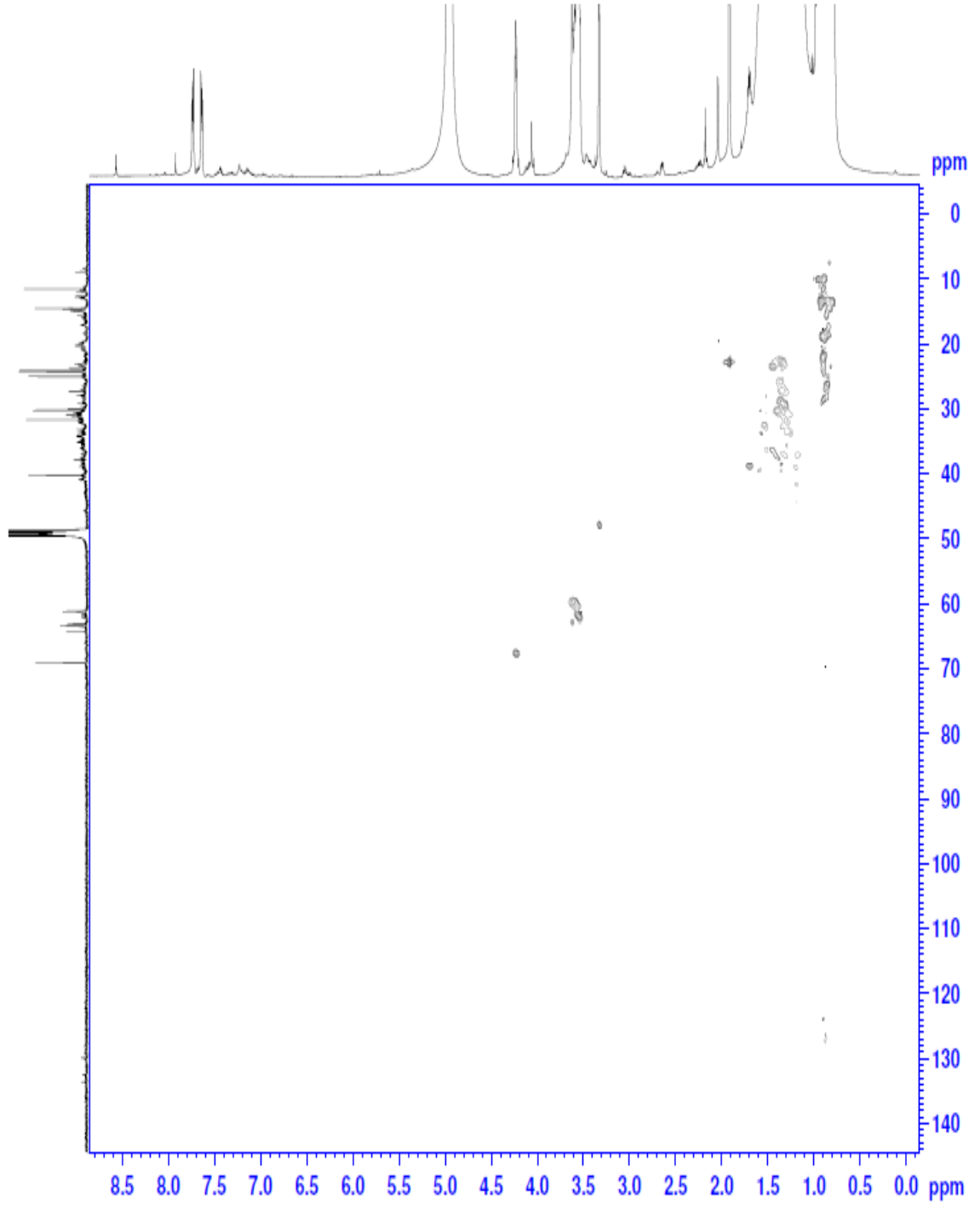
Şekil 4.30. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



Şekil 4.31. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu

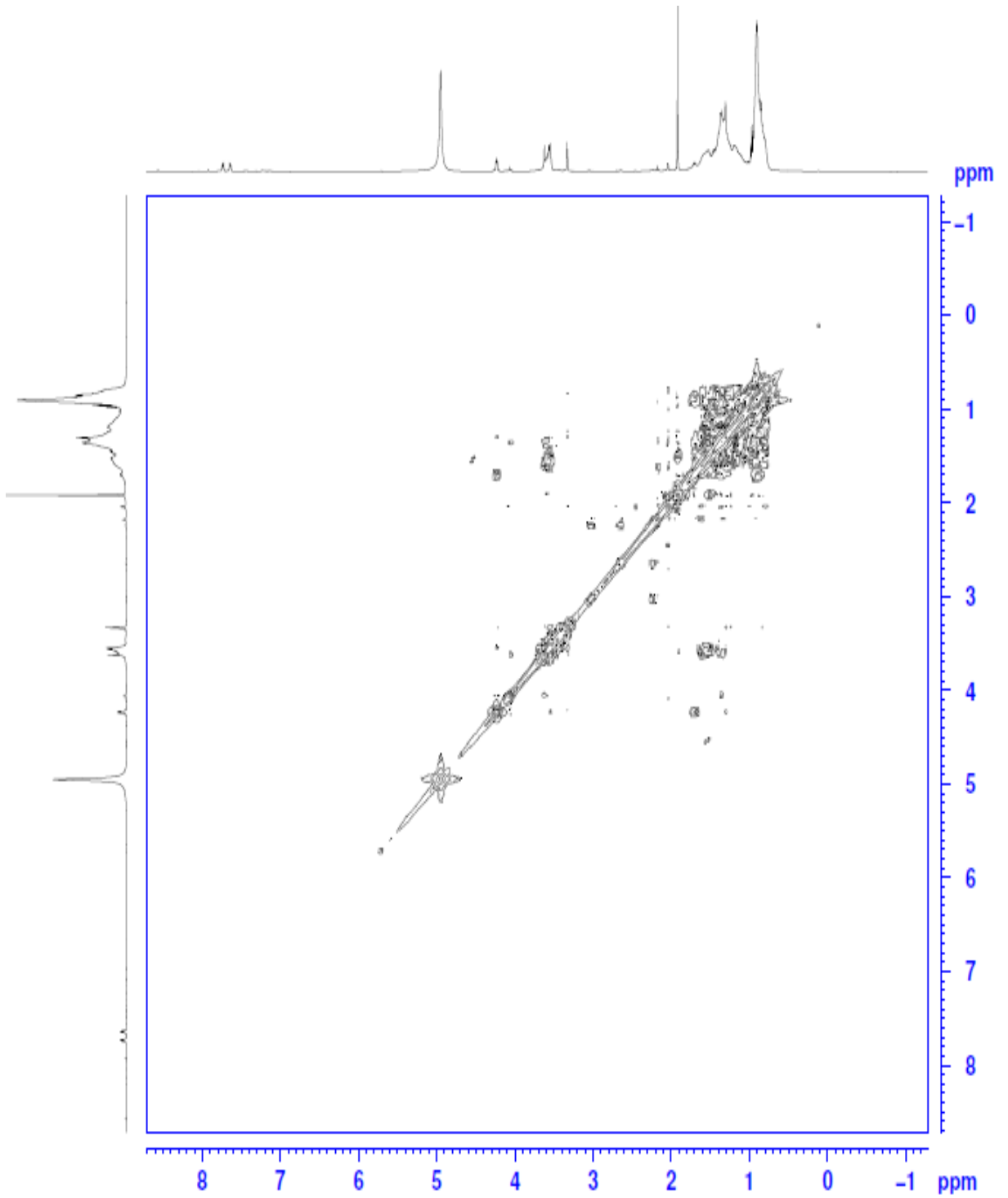


Şekil 4.32. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiminin DEPT spektrumu

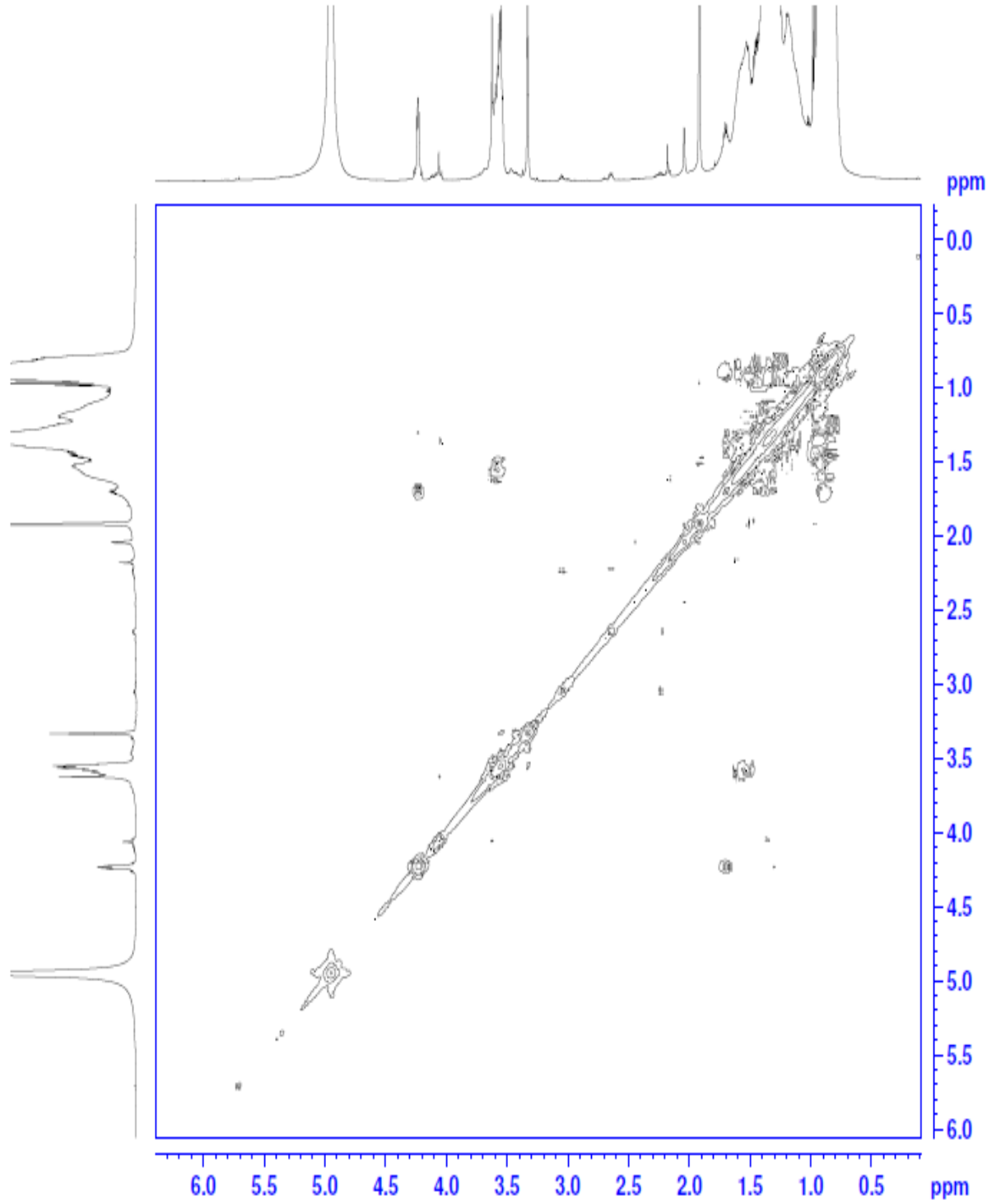


**Şekil 4.33.** 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HSQC spektrumu

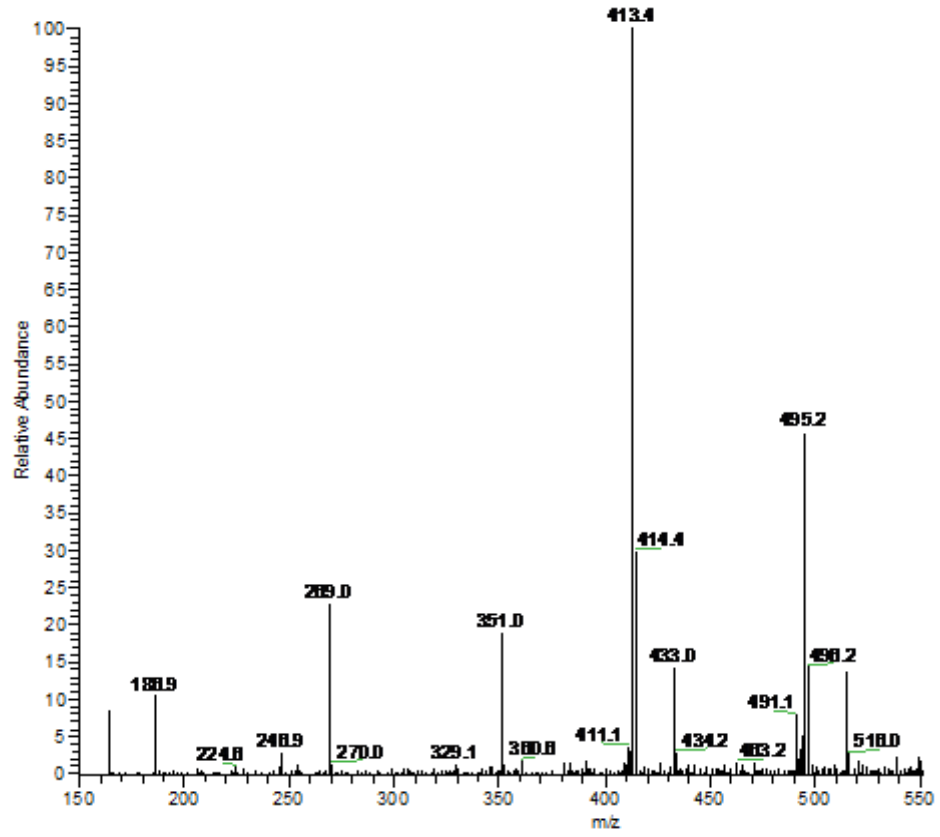




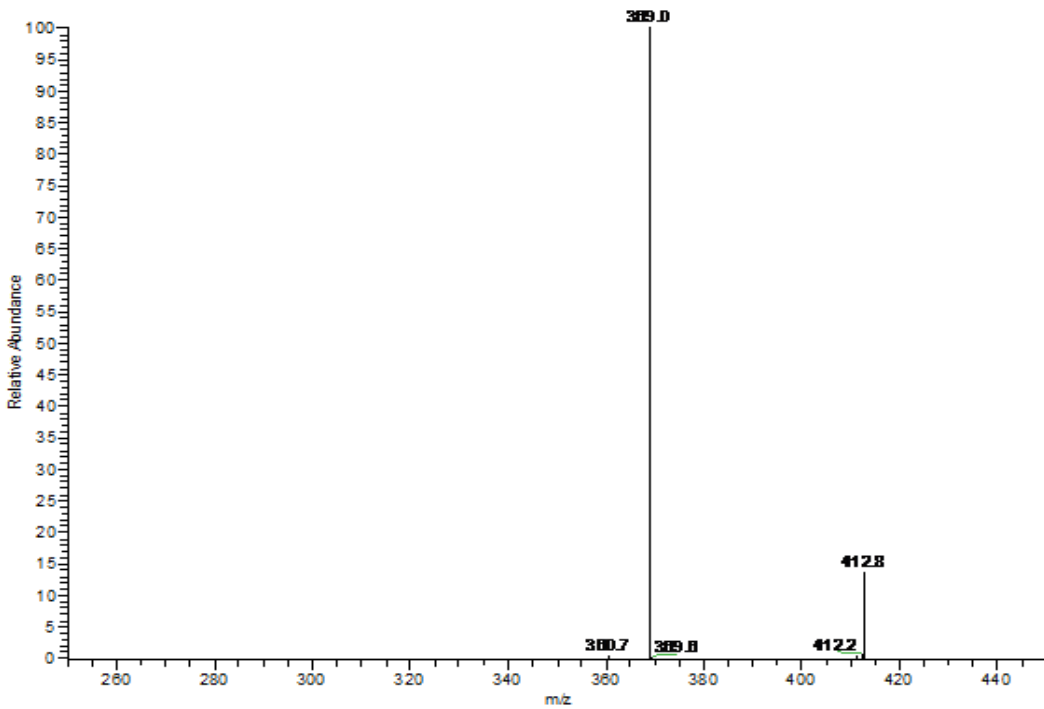
Şekil 4.34. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu



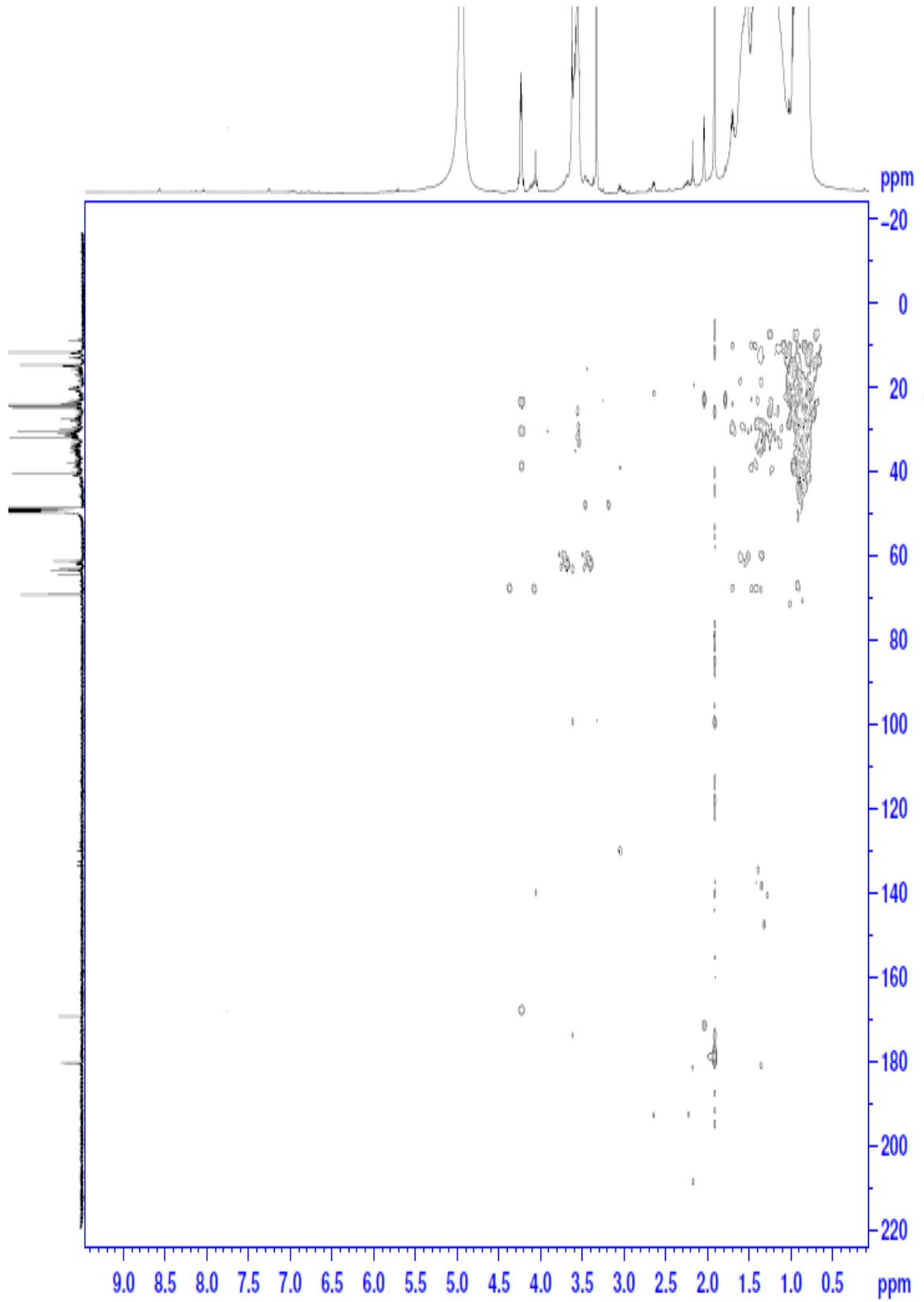
Şekil 4.35. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu



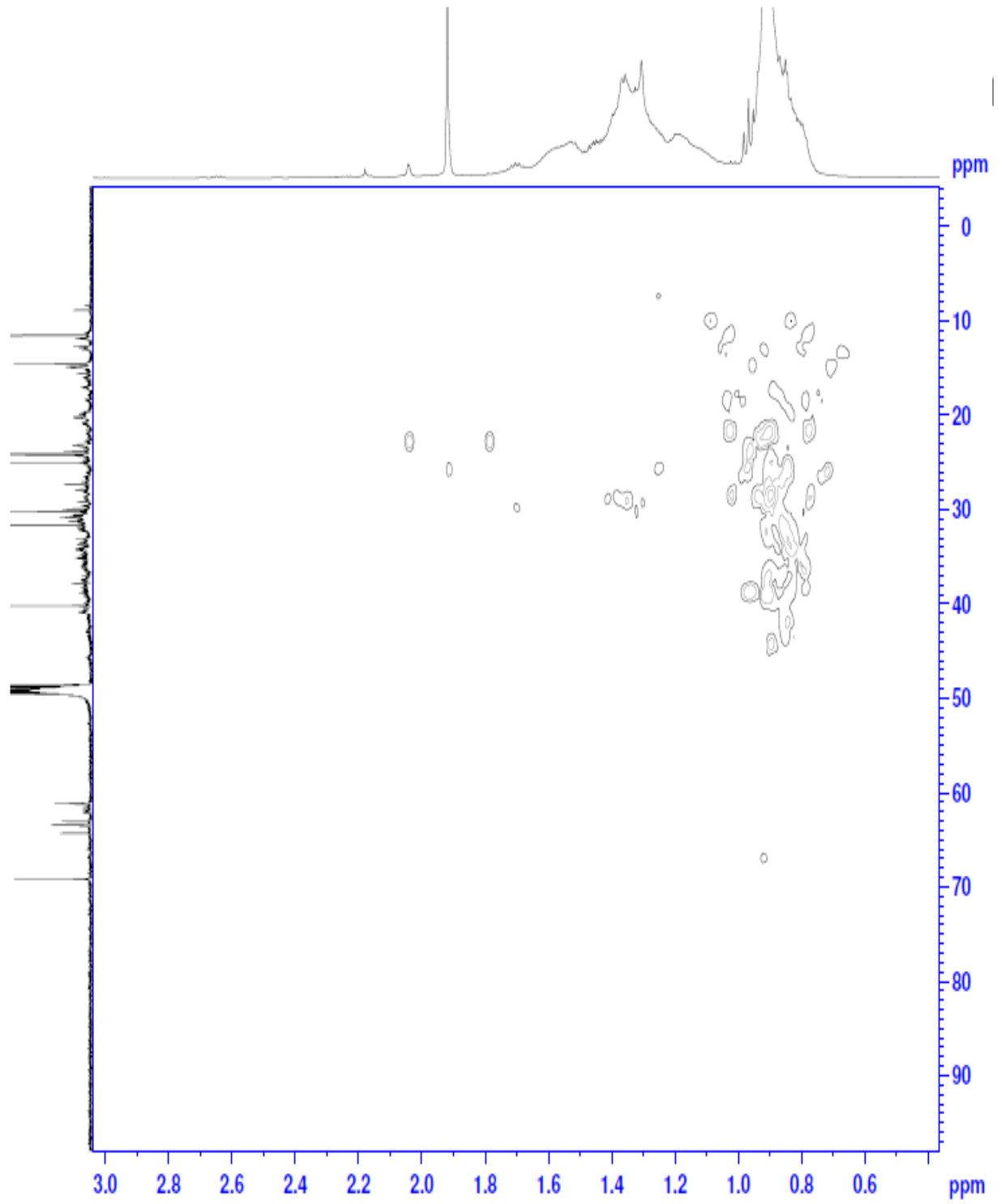
Şekil 4.36. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin ESI-MS spektrumu



Şekil 4.37. 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin ESI-MS spektrumu

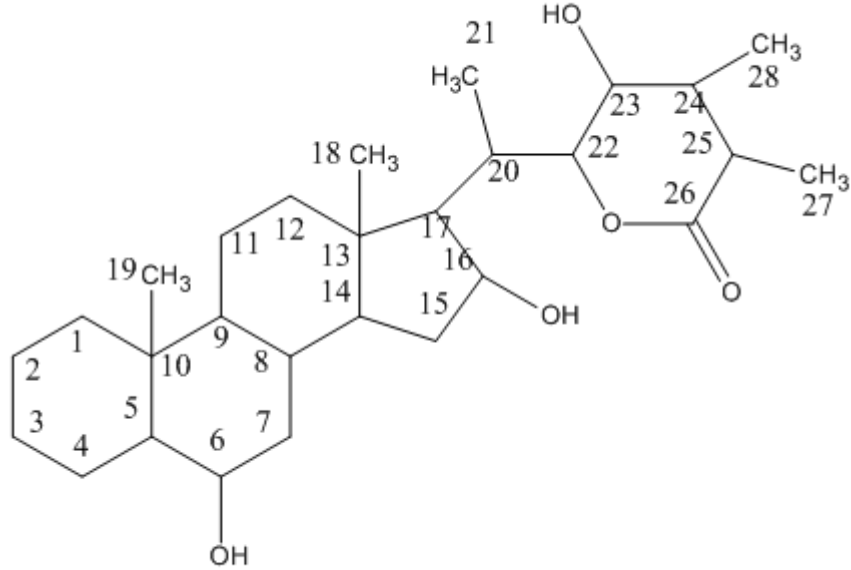


**Şekil 4.38.** 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC spektrumu



**Şekil 4.39.** 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC spektrumu

#### 4.3.3. 4 Numaralı Bileşik (YME-B): 6,16,23-trihidroksi-withanolide



Şekil 4.40. 6,16,23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin yapısı

Bu bileşik koyu turuncu yağimsı, silikajel plakta 254 ve 366 nm UV ışık altında mor renkli, NH<sub>3</sub> buharına tutulup, ardından NA belirteci püskürtüldükten sonra 254 ve 366 nm UV ışık altında koyu mavi renkli olarak görülmüştür. TLC de, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOAc (4:6) çözücü sisteminde yürütülmüştür.

IR spektrumunda ( $\nu$  max cm<sup>-1</sup>, KBr, Şekil 4.42.) 3341 cm<sup>-1</sup> de hidrojen bağlı hidroksil grubu, 2957 ve 2872 cm<sup>-1</sup> de alifatik C-H gerilmesi, 1463, 1379, 1366 cm<sup>-1</sup> -CH<sub>3</sub>, -CH<sub>2</sub>, -CH eğilmesi, 1728 cm<sup>-1</sup> C=O gerilmesi, 1057, 1124, 1273 cm<sup>-1</sup> de C-O gerilmesi tespit edilmiştir.

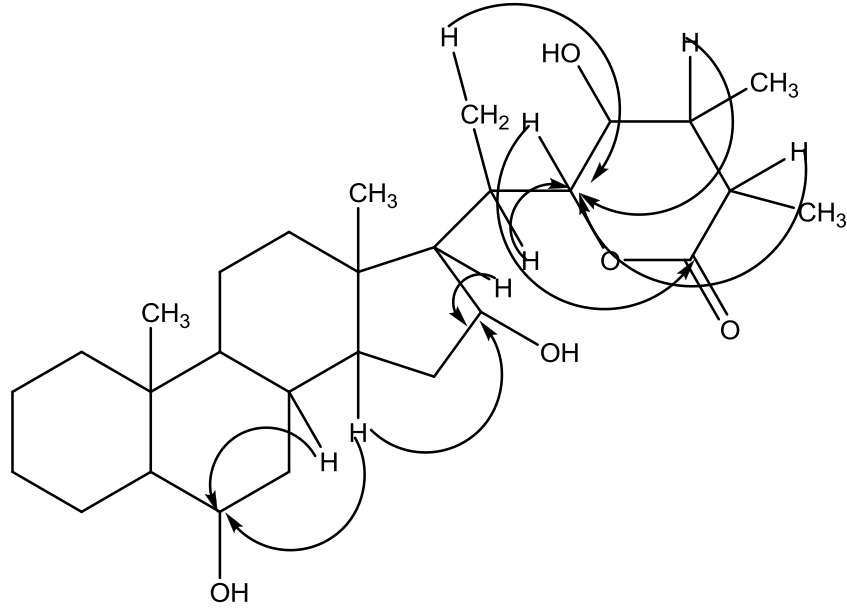
<sup>1</sup>H NMR spektrumunda (CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.43., Şekil 4.44. ve Şekil 4.45.), 3.62 ppm de H-6 (1H, t, J=6 Hz), 3.64 ppm de H-23 (1H, dd, J=6, 7.5 Hz) ve 3.58 ppm de (1H, t, J=6.5 Hz) H-16 protonları izlenmiştir. H-22 protonu ise 4.22 ppm de ddd olarak J=6.5, 6, 6 Hz' lik bir bölünmeyle gözlenmiş ve bu sonuçlar molekülde, 4 tane oksijen bağlı karbon protonlarının varlığını kanıtlamıştır. H-18 ve H-19 metil protonları ise sırasıyla 0.76 ppm de (3H, s) ve 0.90 ppm de (3H, s) görülmüştür. H-21, H-27 ve H-28 protonları ise 0.82 ppm (3H, d), 0.86 ppm de (3H, d) ve 0.78 ppm de (3H, d) olarak tespit edilmiştir.

$^{13}\text{C}$  NMR, DEPT ve HSQC spektrumunda ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ , 500 MHz, Şekil 4.46., Şekil 4.47. ve Şekil 4.48.) oksijene bağlı olan C-6, C-16, C-22 ve C-23 karbonları, sırasıyla 62.72 ppm de, 63.10 ppm de, 68.18 ppm de ve 60.90 ppm değerlerinde görülmüştür. 167.80 ppm de C-26 karbonil karbonu izlenmiştir. Moleküldeki metil gruplarına ait karbonlar ise 10.98 ppm (C-18), 15.36 ppm (C-19), 14.20 ppm (C-21), 14.44 ppm (C-27) ve 14.08 ppm (C-28) değerlerinde izlenmiştir. Bunun yanında, alından DEPT spektrumunda, molekülde 5 tane  $-\text{CH}_3$ , 8 tane  $-\text{CH}_2$  ve 8 tane  $-\text{CH}$  karbonu tespit edilmiştir.

$^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumunda (Şekil 4.49 ve Şekil 4.50.), 4.22 ppm deki H-22 (1H, ddd, 6.5, 6.6 Hz) protonunun, 1.44 ppm (1H, m) H-20 ve 3.64 ppm deki (1H, dd,  $J=6, 7.5$  Hz) H-23 protonlarıyla etkileşmesi; H-23 protonunun, 1.37 ppm deki H-24 (1H, m) protonuyla, 1.68 ppm deki H-25 (1H, m) protonuyla ve 4.22 ppm deki H-22 (1H, ddd, 6.5, 6.6 Hz) protonuyla etkileşmesi tespit edilmiştir. Ayrıca 1.68 ppm deki H-25 (1H, m) protonunun, 1.37 ppm deki H-24 (1H, m) protonuyla etkileşimleri, bu iki protonun komşu olduğunu göstermiştir. 3.58 ppm deki H-16 (1H, t,  $J=6.5$  Hz) protonunun, 1.62 ppm deki H-17 (1H, m) protonuyla yapmış olduğu etkileşimler, bu iki protonun da komşu olduğunu göstermiştir. 3.62 ppm deki H-6 (1H, t,  $J=6$  Hz) protonuyla, 1.33 ppm deki H-5 (1H, m) protonunun etkileşimi tespit edilmiştir. Ayrıca, H-24 protonu (1.37 ppm, 1H, m) ile H-28 (0.78 ppm, 3H, d) protonunun ve H-25 protonu (1.68 ppm, 1H, m) ile H-27 (0.86 ppm, 3H, d) protonunun  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY etkileşimiyle, birbirlerine komşu oldukları kanıtlanmıştır. Ayrıca 0.7-1.7 ppm aralığında, birbirine komşu olan  $-\text{CH}_2/-\text{CH}$  etkileşimlerinde,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumunda görülmüştür.

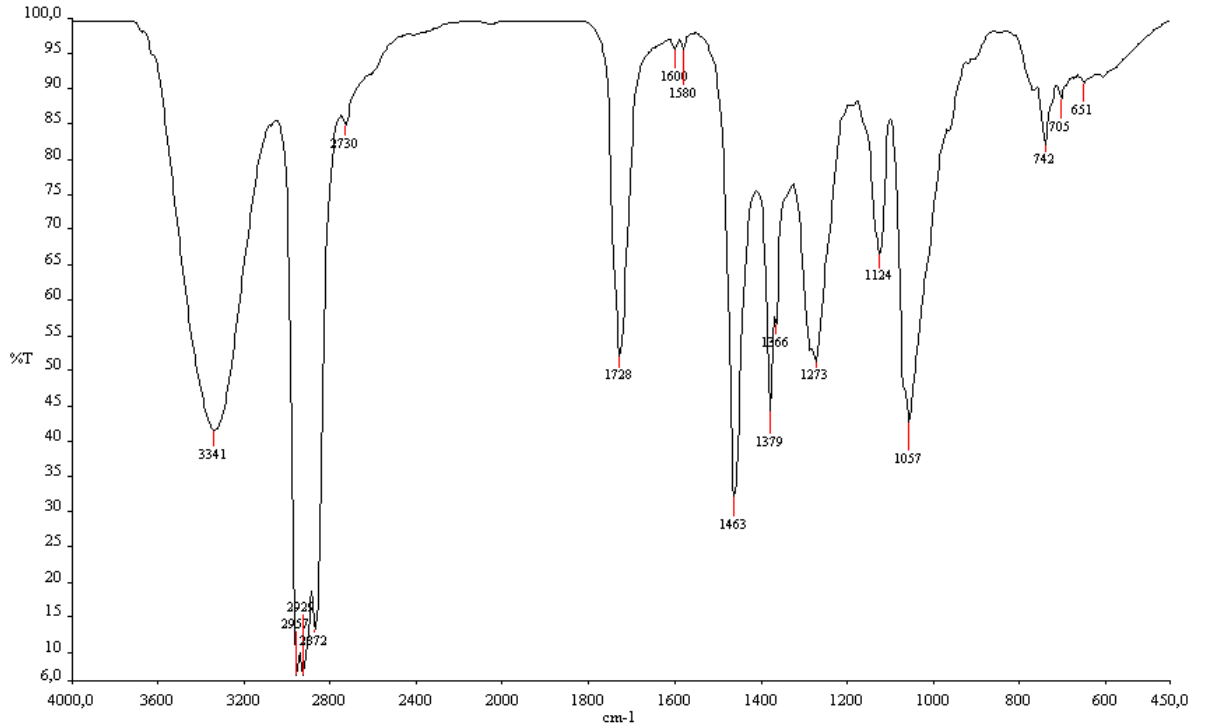
ESI-MS spektrumunda (Şekil 4.51.), moleküler iyon piki  $m/z$  464  $[\text{M}]^+$  (%15) pikinin izlenmesi, kapalı formülünün  $\text{C}_{28}\text{H}_{46}\text{O}_5$  olduğunu göstermiştir. Önemli parçalanma ürünleri arasında,  $m/z$  413  $[(\text{M}+2) - (3\times\text{OH})]^+$  (%100) pikinin gözlenmesi moleküldeki üç hidroksil grubunun varlığını kanıtlarken, spektrumdaki,  $m/z$  419  $[(\text{M}+1) - \text{CO}_2]^+$  (%63) pikinin görülmesi, moleküldeki lakton halkasının varlığını desteklemiştir. Ayrıca,  $m/z$  235  $[(\text{M}+1) - \text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3$  (yan zincir) - D halkası] $^+$  (%15) pikide, hidroksil bağlı bir D halkasının varlığını ortaya koymuştur. Steroidler için önemli bir bölünme olan, yan zincirin ayrılmasıyla gözlenen,  $m/z$  288  $[(\text{M}-3) - \text{C}_9\text{H}_{15}\text{O}_3$  (yan zincir)] $^+$  (%15) ve  $m/z$  173  $[(\text{M}+2) - 291$  ( $\text{C}_{19}\text{H}_{31}\text{O}_2$ )] $^+$  (%6) piklerinin spektrumda gözlenmesi, molekülün steroid yapısında olduğunu desteklemektedir.

Molekülün HMBC spektrumuna ait etkileşimler Şekil 4.41., veriler Şekil 4.52. de gösterilmiştir.



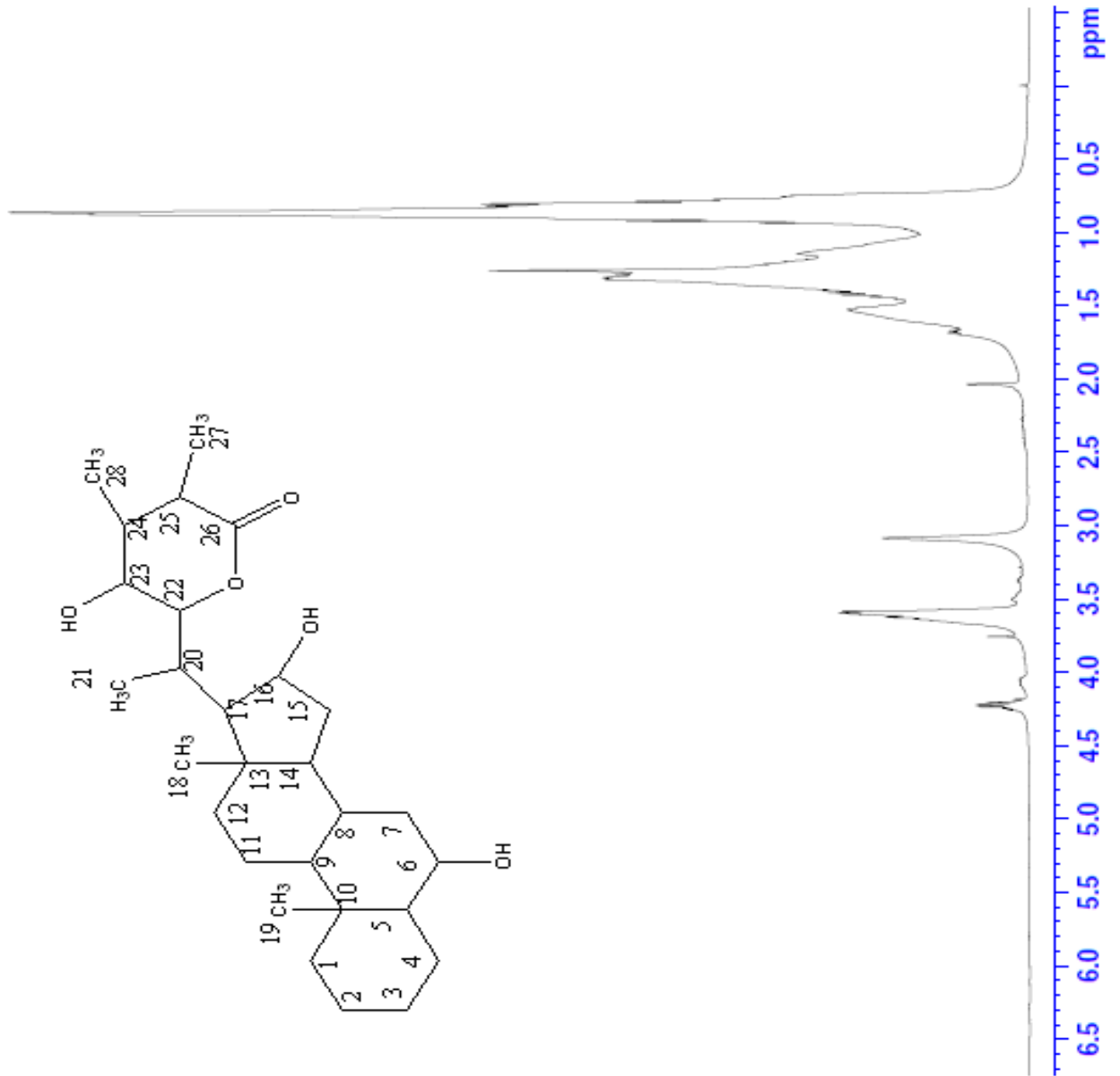
**Şekil 4.41.** 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC etkileşimleri

Tüm bu spektroskopik veriler ve yapılan literatür çalışmaları sonucunda 4 numaralı bileşiğin yapısının; 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide olduğu tayin edilmiştir.

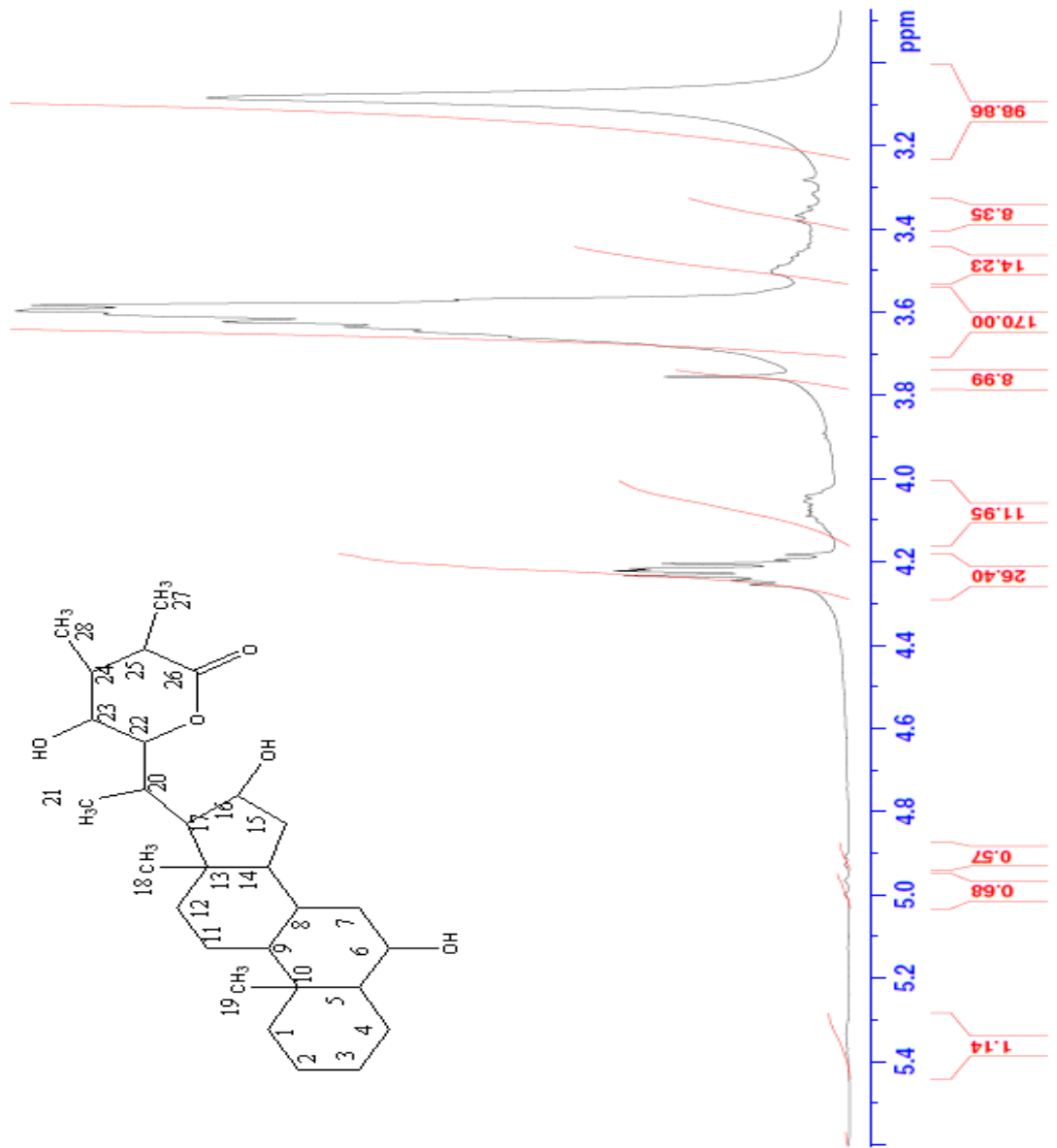


**Şekil 4.42.** 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin IR spektrumu

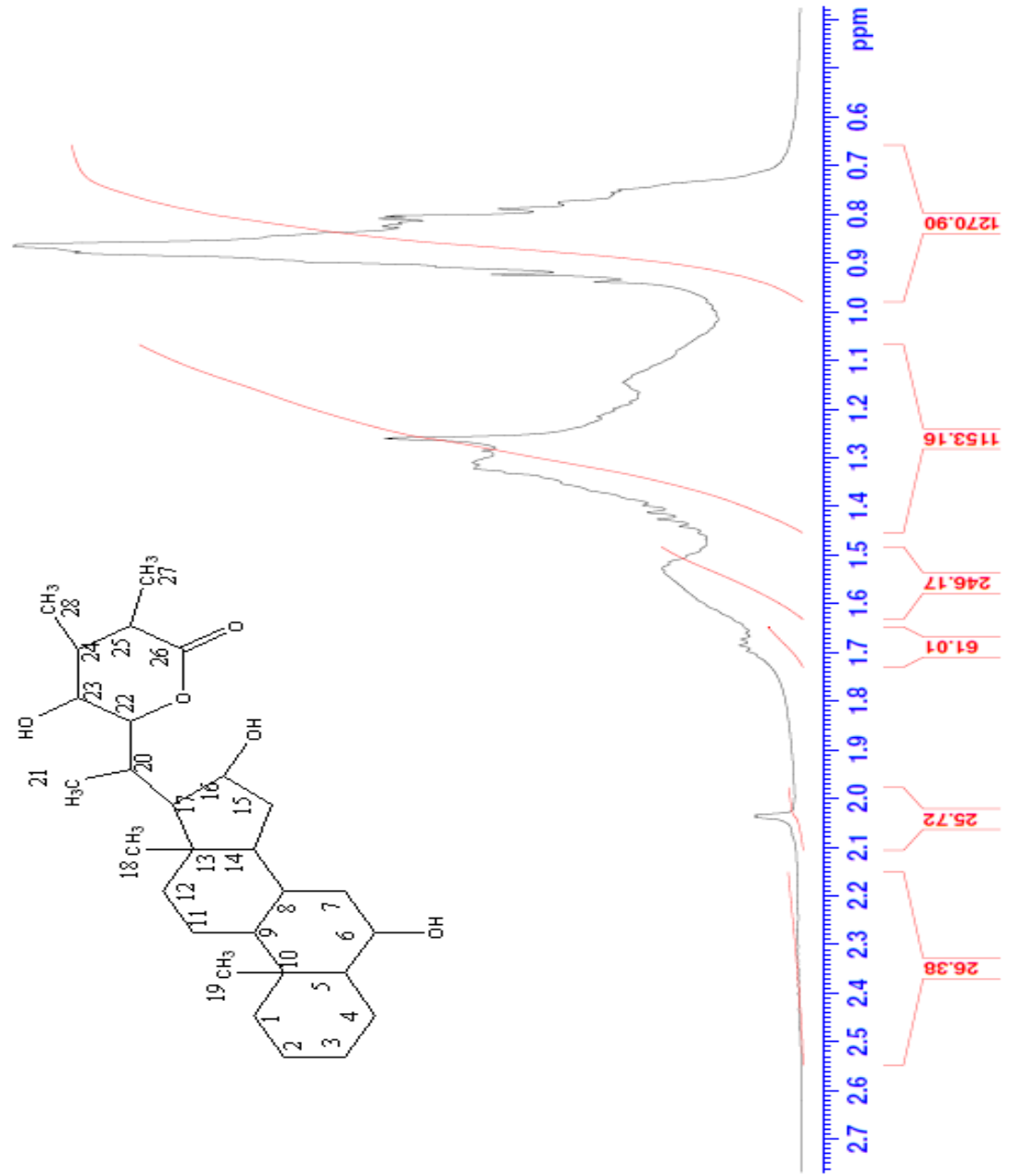




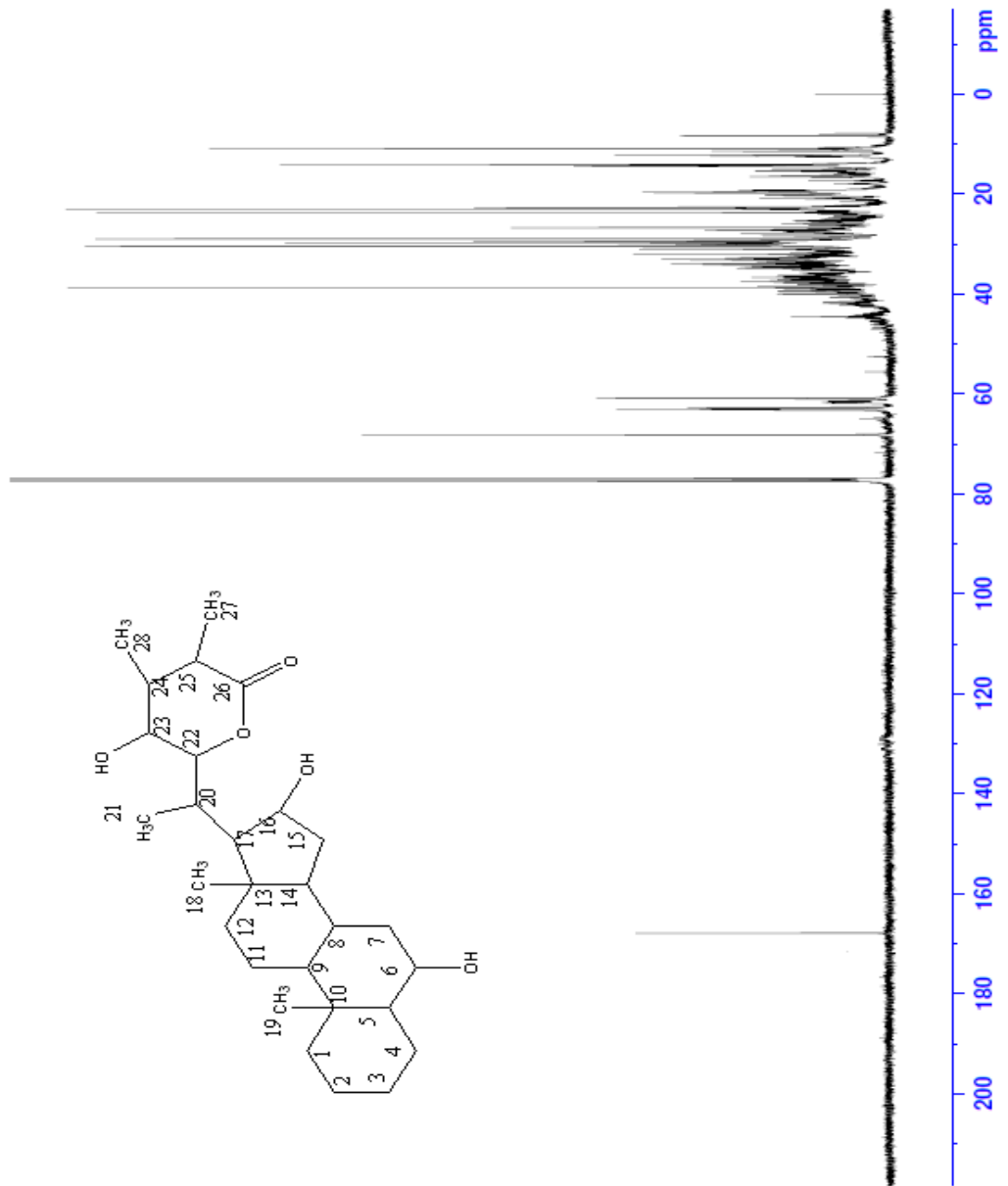
Şekil 4.43. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin  $^1\text{H}$  NMR spektrumu



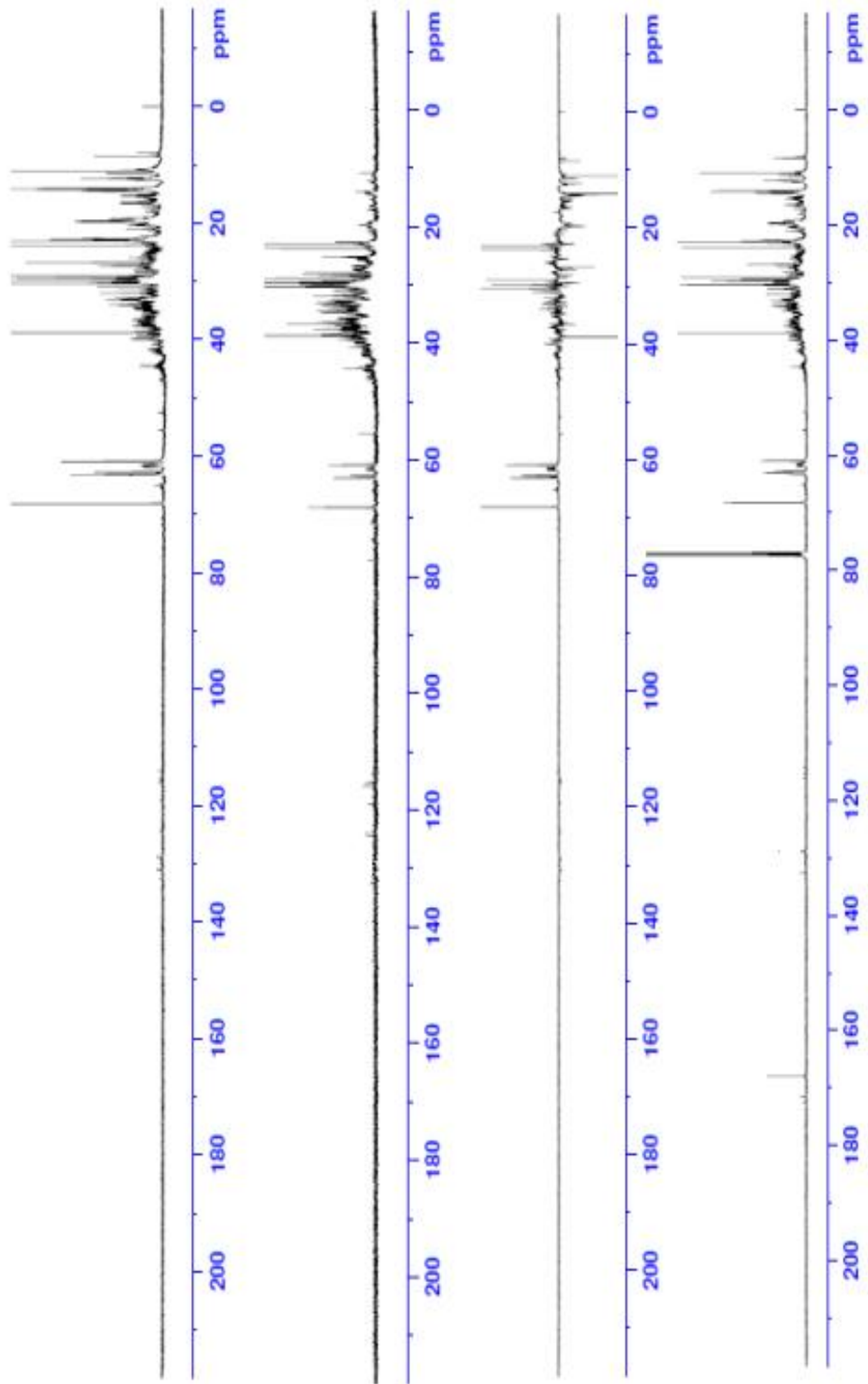
Şekil 4.44. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



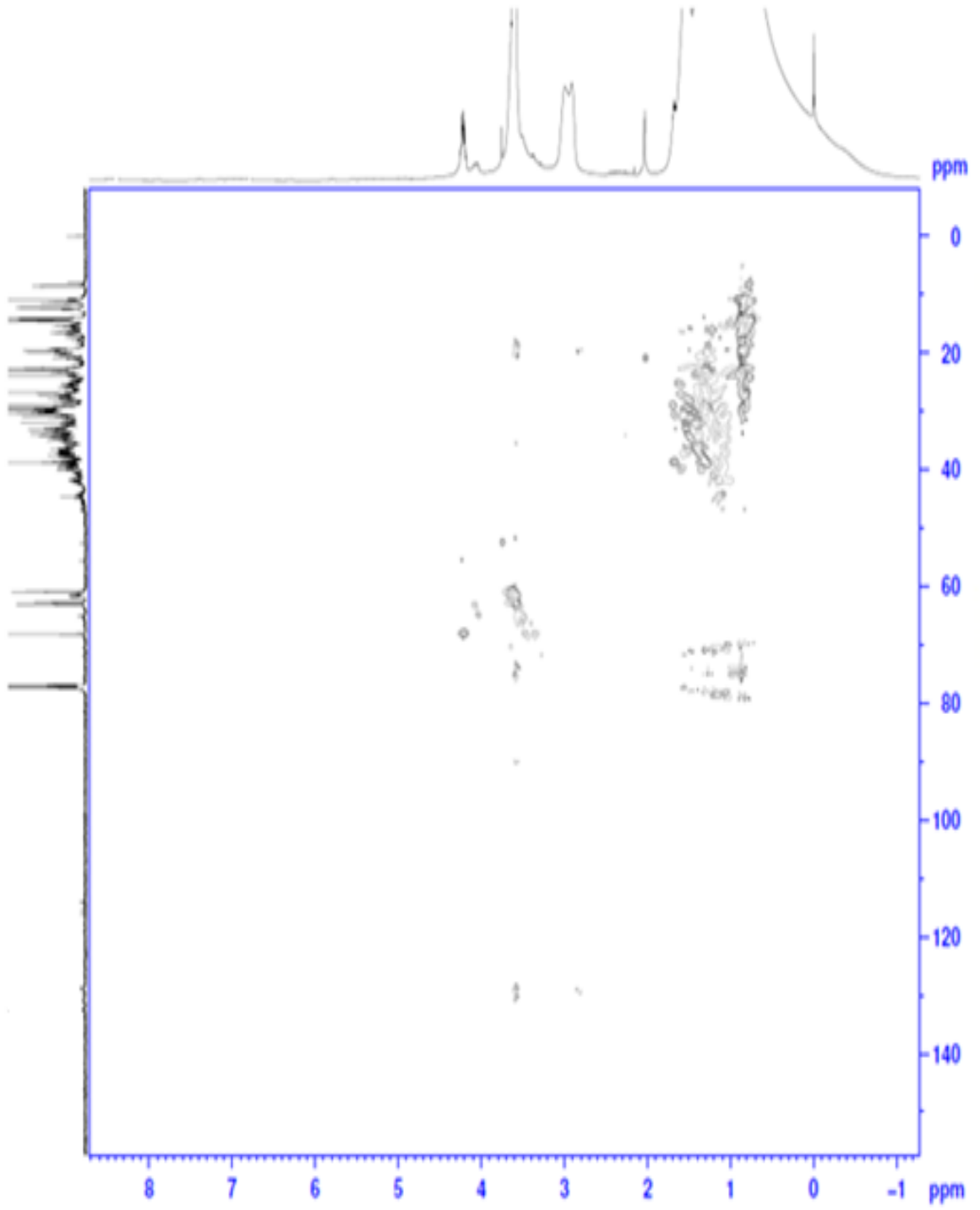
Şekil 4.45. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu



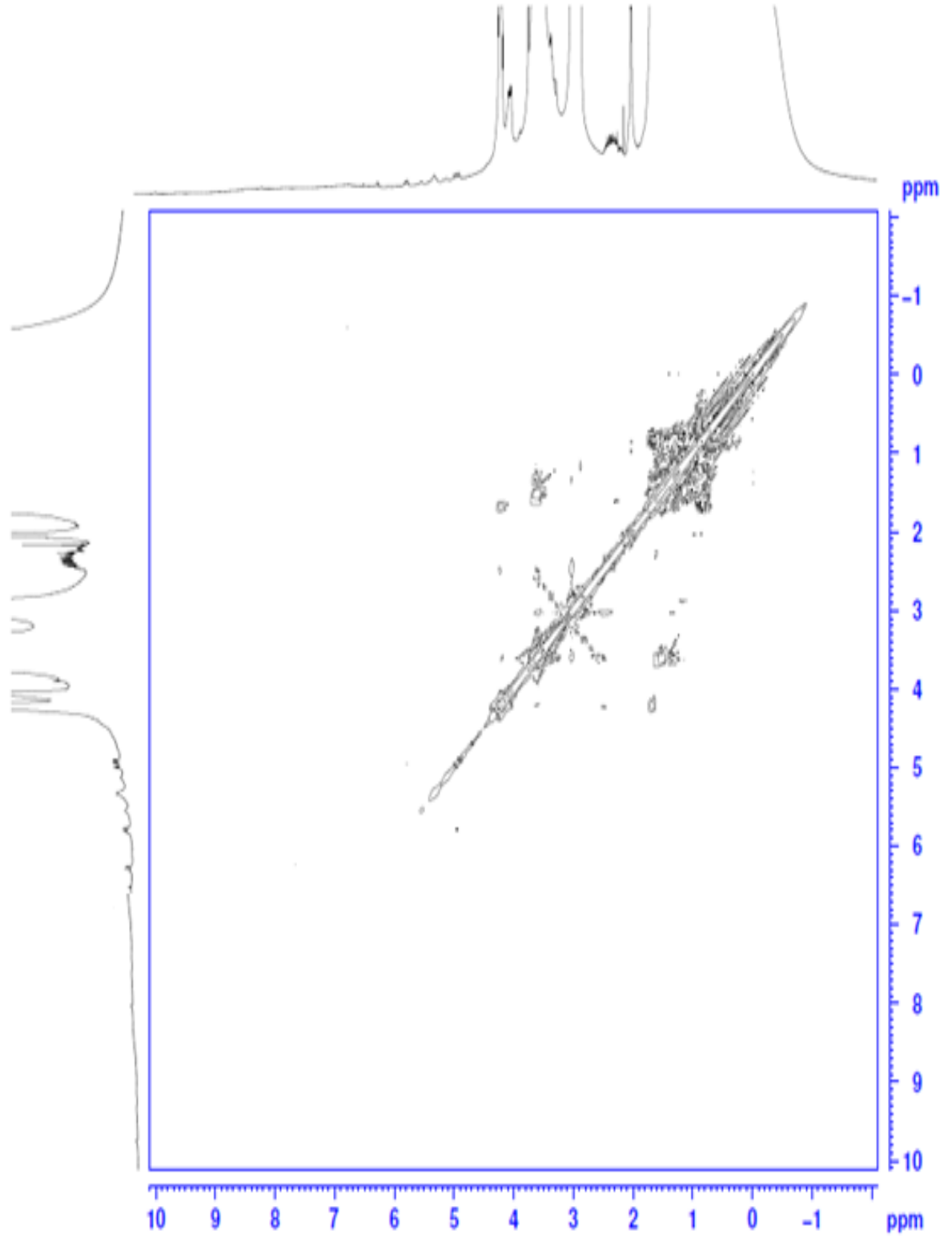
Şekil 4.46. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu



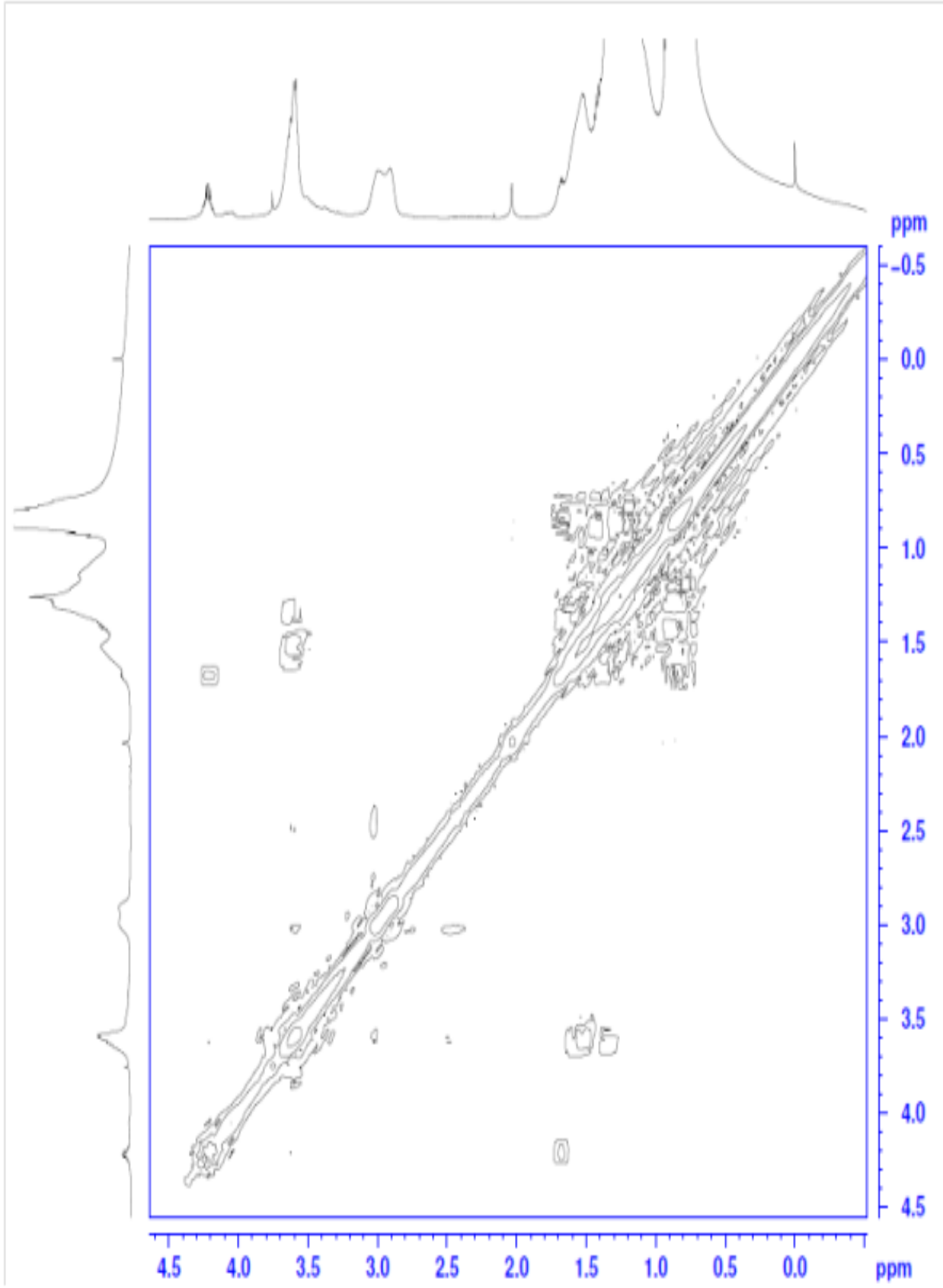
Şekil 4.47. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşğinin DEPT spektrumu



Şekil 4.48. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HSQC spektrumu

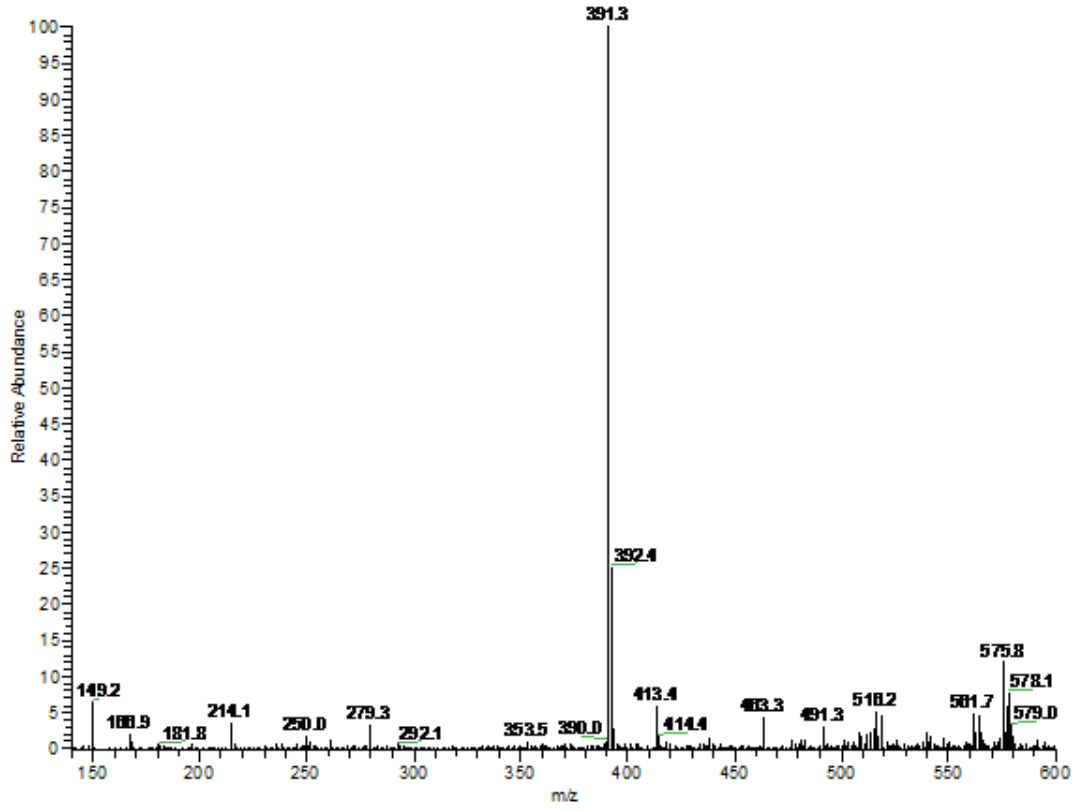


Şekil 4.49. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu

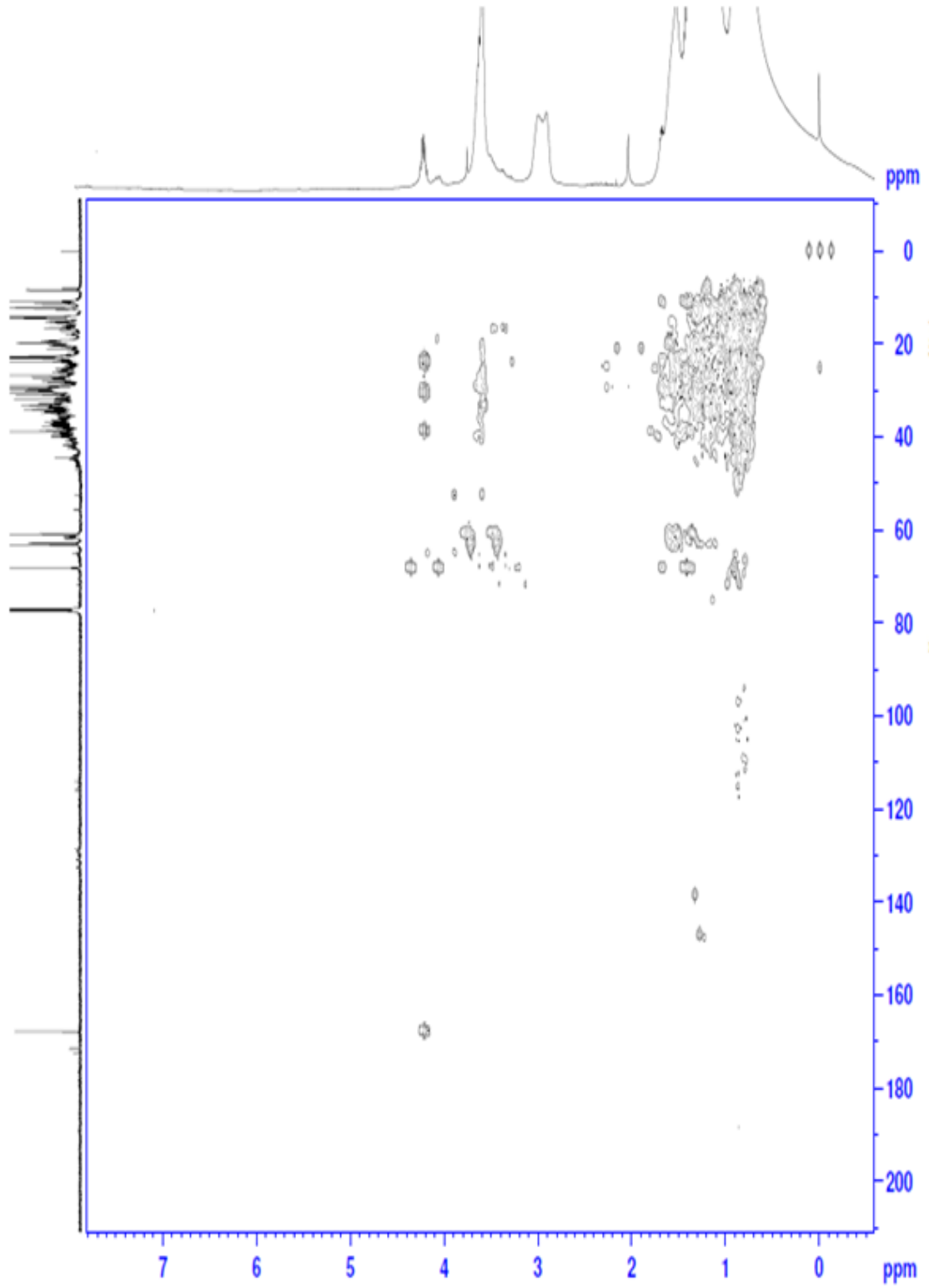


Şekil 4.50. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spektrumu



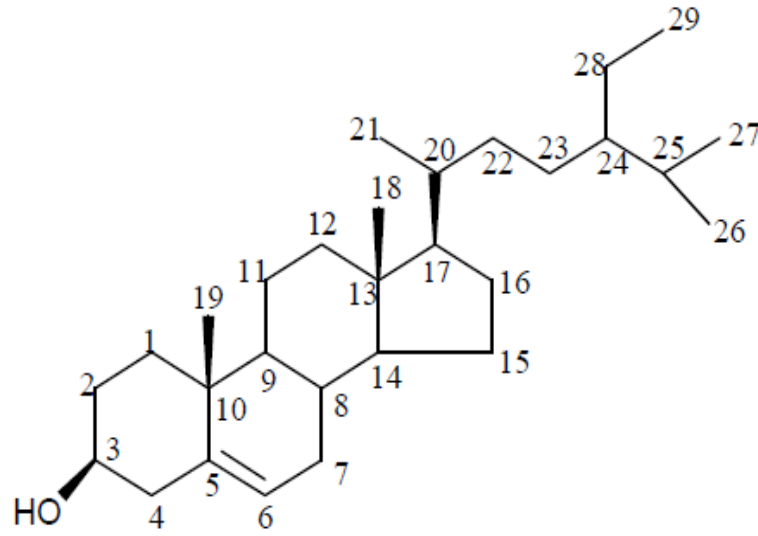


Şekil 4.51. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin ESI-MS spektrumu



Şekil 4.52. 6, 16, 23-trihidroksi-withanolide bileşiğinin HMBC spektrumu

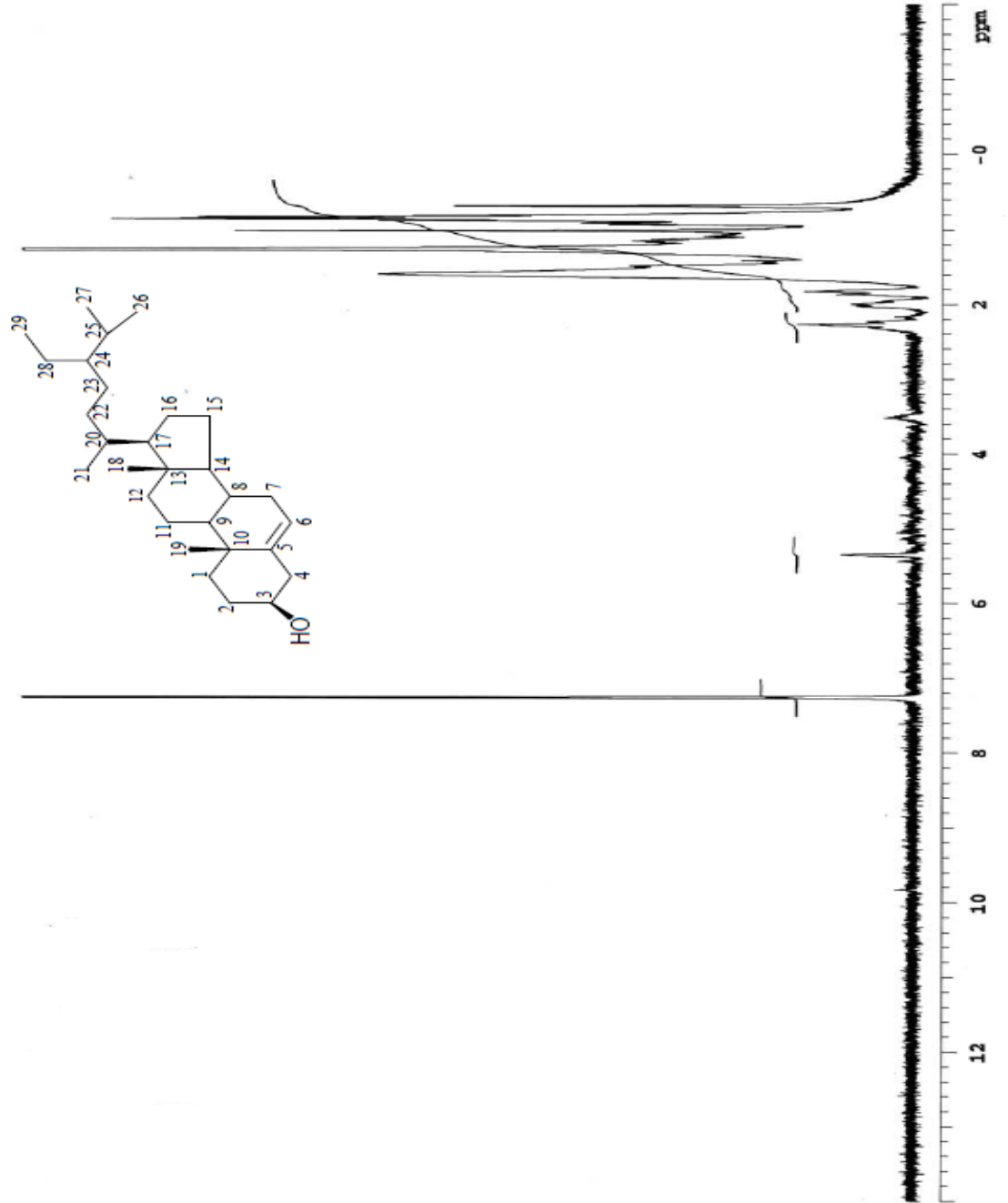
#### 4.3.4. 5 Numaralı Bileşik (YME-51-a): $\beta$ -Sitosterol



Şekil 4.53.  $\beta$ -Sitosterol bileşiğinin yapısı

5 numaralı bileşik renksiz katı bir maddedir. Silikajel plakta UV ışık altında (366 nm) koyu mor renkli,  $\text{NH}_3$  buharına tutulduktan sonra kahverengi, NA belirteci püskürtüldükten sonra turuncu renkli görülmektedir. IR spektrumunda ( $\nu_{\text{max}}$   $\text{cm}^{-1}$ ,  $\text{CHCl}_3$ )  $3400 \text{ cm}^{-1}$  de hidroksil grubu,  $1650 \text{ cm}^{-1}$  de doymamışlık,  $1060\text{-}1070 \text{ cm}^{-1}$  de (C-O) bantları izlenmiştir.

$^1\text{H}$  NMR spektrumunda ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta(\text{ppm})$ , 300 MHz, Şekil 4.54.) 0.68 ppm (3H, s, H-18), 0.92 ppm (3H, d,  $J=6.6 \text{ Hz}$ , H-21), 0.83 ppm (6H, d,  $J=6.6 \text{ Hz}$ , H-26, H-27) ve 1,00 ppm (3H, s, H-19) de metil pikleri izlenmektedir. 3.52 ppm de (1H, m) hidroksile komşu proton olan H-3, 5.34 ppm de (1H, d,  $J=3.5\text{Hz}$ ) vinilik proton H-6 pikleri görülmektedir. Bileşiğin tüm spektroskopik dataları, literatür (Kostens, 1972; Öksüz ve Erdem, 1996; El Sayed v.d., 1998) ile de kıyaslandığında, yapısının daha önce *S. sodomaeum*'dan izole edilen,  $\beta$ -sitosterol olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.54. β -Sitosterol bileşiğinin <sup>1</sup>H NMR spektrumu

## 4.4. Elde edilen bileşiklerin spektral özellikleri

### 4.4.1. Flavonoidler

#### 4.4.1.1. 1 Numaralı Bileşik: (SDMM-A) 6,2',3'',5''',4''''pentahidroksi-3,7''-biflavon

<sup>1</sup>H NMR spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5.): 6.51 (1H, d, J=8.3 Hz, H-8), 6.89 ppm de (1H, dd, J=2.4, 8.3 Hz, H-7), 7.11 ppm de (1H, d, J=2.5 Hz, H-5), 7.68 (1H, dd, J=1.3, 7.1 Hz, H-3'), 7.44 (1H, dd, J=5.8, 6,6 Hz, H-4'), 7.63 (1H, ddd, J=2.4, 5.7, 5.7 Hz, H-5'), 7.53 (1H, dd, J=3.3, 5.7 Hz, H-6'), 6.85 (2H, s, H-8''/H-6''), 7.05 (1H, dd, J=2.5, 8.3 Hz, H-2'''), 7.42 (1H, dd, J=1.6, 8.0 Hz, H-3'''), 7.13 (1H, dd, J=2.5, 8.9 Hz, H-5'''), 7.35 (1H, dd, J=2.4, 7.9 Hz, H-6''').

<sup>13</sup>C NMR, DEPT ve HSQC spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.6., Şekil 4.7., Şekil 4.8.): 170.49 (C-4), 122.34 (C-5), 142.62 (C-6), 124.28 (C-7), 104.54 (C-8), 136.49 (C-2'), 129.23 (C-3'), 127.14 (C-4'), 128.34 (C-5'), 132.03 (C-6'), 134.78 (C-3''), 171.28 (C-4''), 152.43 (C-5''), 125.08 (C-6''/C-8''), 124.79 (C-2'''), 124.69 (C-5'''), 128.15 (C-3'''), 147.42 (C-4'''), 125.38 (C-6''').

<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.9.): 6.89/6.51, 7.11 (H-7/H-8, H-5), 7.42/7.05, 7.13 (H-3'''/ H-2''', H-5'''), 7.35/7.13 (H-6'''/H-5'''), 7.05 (H-6'''/ H-5''', H-2'''), 7.44/7.68, 7.63 (H-4'/ H-3', H-5'), 7.53/7.44, 7.63 (H-6'/ H-4', H-5').

ESI-MS *m/z* (rel.int. %, Şekil 4.10., Şekil 4.11.): 545 [M+Na]<sup>+</sup> (%17) C<sub>30</sub>H<sub>18</sub>O<sub>8</sub>, *m/z* 250 [(M-3)- C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>4</sub>]<sup>+</sup> (%9), 269 [(M-3)- C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup> (%13), *m/z* 455 [(M+Na) - (5xH<sub>2</sub>O)]<sup>+</sup>.

### 4.4.2. Steroidler

#### 4.4.2.1. 2 Numaralı Bileşik (SDMM-420-b-1): 6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide

IR spektrumu (ν max cm<sup>-1</sup>, KBr, Şekil 4.15.): 3334, 2929, 2873, 1728, 1605, 1580, 1124, 1057.

<sup>1</sup>H NMR spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.16., Şekil 4.17., Şekil 4.17.): 3.45 (1H, t, J=7.4 Hz, H-6), 3.50 (1H, t, J=6.4 Hz, H-15), 3.42 (1H, t, J=6.5 Hz, H-23), 4.11 (1H, t, J=5.6 Hz, H-22), 5.12 (1H, brd, H-16), 0.69 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 0.78

(3H, s, H-21), 0.80 (3H, s, H-27), 0.75 (3H, s, H-28), 1.51 (1H, m, H-8), 1.38 (1H, m, H-25), 0.90-1.90 ppm arası (moleküldeki diğer metilen (-CH<sub>2</sub>) ve metin (-CH) protonları).

<sup>13</sup>C NMR, DEPT ve HSQC spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.19., Şekil 4.20., Şekil 4.21.): 61.20 (C-6), 26.53 (C-8), 36.15 (C-12), 36.98 (C-14), 69.10 (C-15), 133.7 (C-16), 140.03 (C-17), 14.73 (C-18), 15.35 (C-19), 40.23 (C-20), 14.91 (C-21), 69.05 (C-22), 63.46 (C-23), 37.96 (C-24), 38.92 (C-25), 169.05 (C-26), 15.34 (C-27), 14.82 (C-28), 20.00-45.00 ppm arası (moleküldeki diğer metilen (-CH<sub>2</sub>), metin (CH) ve kuarterner karbonları).

<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.22., Şekil 4.23.): 5.12/3.50 (H-16/H-15), 4.11/3.42, 1.62 (H-22/H-23, H-25), 1.51/3.45 (H-8/H-6), 1.38/0.75 (H-24/ H-28), 1.43/0.69 (H-20/H-18), 3.42/1.38 (H-23/H-24), 1.62/0.80, 1.38, 3.42 (H-25/H-27, H-24, H-23).

ESI-MS *m/z* (rel.int. %, Şekil 4.24.): *m/z* 460 [M]<sup>+</sup> (%3) C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O<sub>5</sub>, *m/z* 412 [(M+3) - (3xOH)]<sup>+</sup> (%10), *m/z* 413 [(M+3) - CO<sub>2</sub>]<sup>+</sup> (%10), *m/z* 291 [(M+2) - C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub> (yan zincir)]<sup>+</sup> (%5), *m/z* 249 [M - C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>O<sub>2</sub> (yan zincir) - 4H - 2xH<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (%60).

#### 4.4.2.2. 3 Numaralı Bileşik (SDMM-420-b-3) 14-asetil-6,23,27-trihidroksi-withanolide

IR spektrumu (ν max cm<sup>-1</sup>, KBr, Şekil 4.29.): 3353, 2953, 2929, 2872, 1727, 1462, 1379, 1125, 1056..

<sup>1</sup>H NMR spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.30.): 3.44 (1H, t, J=7.4 Hz, H-6), 3.42 (1H, t, J=6.6 Hz, H-23), 3.51 (2H, dd, J=6.2, 10.3, H-27), 4.11 (1H, t, J=5.4 Hz, H-22), 0.72 (3H, s, H-18), 0.82 (3H, s, H-19), 1,81 (3H, s, H-30), 0.78 (3H, d, J=6.9 Hz, H-21), 0.76 (3H, d, J=5.9 Hz, H-28).

<sup>13</sup>C NMR, DEPT ve HSQC spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.31., Şekil 4.32., 4.33.): 63.05 (C-6), 64.29 (C-14), 11.53 (C-18), 14.86 (C-19), 14.62 (C-21), 69.10 (C-22), 63.42 (C-23), 168.25 (C-26), 61.16 (C-27), 14.53 (C-28), 181.20 (C-29), 23.80 (C-30), 20.00-45.00 ppm arası (moleküldeki diğer metilen (-CH<sub>2</sub>), metin (CH) ve kuarterner karbonları).

<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY spektrumu (MeOD, δ(ppm), 500 MHz, Şekil 4.34., 4.35.): 3.42/1.34, 4.11 (H-23/H-24, H-22), 3.51/1.64 (H-27/H-25) 0.70-1.80 ppm arası (moleküldeki birbirine komşu olan metilen (-CH<sub>2</sub>) ve metin (CH) protonlarının etkileşimi).

ESI-MS  $m/z$  (rel.int. %, Şekil 4.36., Şekil 4.37.):  $m/z$  520  $[M]^+$  (%3)  $C_{30}H_{48}O_7$ ,  $m/z$  413  $[(M+3) - OCOCH_3$  (asetil) -  $(3xOH)]^+$  (%100),  $m/z$  369  $[(M+3) - OCOCH_3$  (asetil) -  $(3xOH) - (CO_2)]^+$  (%100),  $m/z$  335  $[(M+2) - yan zincir (C_9H_{15}O_4)]^+$  (%12),  $m/z$  188  $[(M+1) - C_{21}H_{33}O_3(333)]^+$  (%10).

#### 4.4.2.3. 4 Numaralı Bileşik (YME-B): 6,16,23-trihidroksi-withanolide

IR spektrumu ( $\nu$  max  $cm^{-1}$ , KBr, Şekil 4.42.): 3341, 2957, 2872, 1728, 1463, 1379, 1366, 1273, 1124, 1057.

$^1H$  NMR spektrumu ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.43., Şekil 4.44., Şekil 4.45.): 3.62 (1H, t,  $J=6$  Hz, H-6), 3.58 (1H, t,  $J=6.5$  Hz, H-16), 3.64 (1H, dd,  $J=6.0, 7.5$  Hz, H-23), 4.22 (1H, ddd,  $J= 6.5, 6.0, 6.0$  Hz, H-22), 0.76 (3H, s, H-18), 0.90 (3H, s, H-19), 0.82 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-21), 0.86 (3H, d,  $J=6.0$  Hz H-27), 0.78 (3H, d,  $J=6.0$  Hz, H-28).

$^{13}C$  NMR, DEPT ve HSQC spektrumu ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ (ppm), 500 MHz, Şekil 4.46., Şekil 4.47., Şekil 4.48.): 62.72 (C-6), 63.10 (C-16), 10.98 (C-18), 15.36 (C-19), 14.20 (C-21), 68.18 (C-22), 60.90 (C-23), 167.80 (C-26), 14.44 (C-27), 14.08 (C-28), 20.00-45.00 ppm arası (moleküldeki diğer metilen ( $-CH_2$ ), metin (CH) ve kuarterner karbonları).

$^1H-^1H$  COSY spektrumu (Şekil 4.49., Şekil 4.50.): 4.22/1.44, 3.64 (H-22/H-20, H-23), 3.64/1.37, 1.68, 4.22 (H-23/H-24, H-25, H-22), 1.68/1.37 (H-25/H-24), 3.58/1.62 (H-16/H-17), 3.62/1.33 (H-6/H-5), 1.37/0.78 (H-24/H-28), 1.68/0.86 (H-25/H-27), 0.70-1.70 ppm arası (moleküldeki birbirine komşu olan metilen ( $-CH_2$ ) ve metin (CH) protonlarının etkileşimi).

ESI-MS  $m/z$  (rel.int. %, Şekil 4.51.):  $m/z$  464  $[M]^+$  (%15)  $C_{28}H_{46}O_5$ ,  $m/z$  413  $[(M+2) - (3xOH)]^+$  (%100),  $m/z$  419  $[(M+1) - (CO_2)]^+$  (%63),  $m/z$  235  $[(M+1) - C_9H_{15}O_3$  (yan zincir) - D halkası] $^+$  (%15),  $m/z$  288  $[(M-3) - C_9H_{15}O_3$  (yan zincir)] $^+$  (%15),  $m/z$  173  $[(M+2) - 291 (C_{19}H_{31}O_2)]^+$  (%6).

#### 4.4.2.4. 5 Numaralı Bileşik (YME-51-a) $\beta$ -Sitosterol:

$^1H$  NMR spektrumu ( $CDCl_3$ ,  $\delta$ (ppm), 300 MHz, Şekil 4.54.): 0.68 ppm (3H, s, H-18), 0.92 ppm (3H, d,  $J=6.6$  Hz, H-21), 0.83 ppm (6H, d,  $J=6.6$  Hz, H-26, H-27), 1.00 ppm (3H, s, H-19), 3.52 (1H, m H-3), 5.34 ppm (1H, d,  $J=3.5$  Hz, H-6).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, Trakya bölgesinde yetişen *Solanum dulcamara* (Solanaceae) bitkisinin ham ekstrelerinde antihiperглиsemik (antidiabetik) aktivite tayini ile fitokimyasal açıdan incelenmesi, sekonder metabolitlerin, moleküler yapılarının açıklanması amaçlanmıştır.

Literatüre bakıldığında, Solanaceae familyasındaki izolasyon ve saflaştırma çalışmaları sonucunda, steroidler, withanolidler, flavonoidler ve fenolikbileşikler izole edilmiştir.

Kostens (1972), *Solanum dulcamara*'nın (Solanaceae) yapraklarında, parafin hidrokarbonların varlığını araştırmıştır. Aynı çalışma grubu, bu bitkinin yapraklarında, streol glikozitler ve streol glikozit yağ esterlerini tayin etmiştir (Kostens ve Willuhn 1973). Kostens ve arkadaşları (1973), *Solanum dulcamara*'nın kök, sap, yaprak, olgunlaşmış ve olgunlaşmamış meyvelerinde yaptıkları analizlerde, kolestrol, sitostreol, stigmastreol, brassikastreol, isofukostreol ve 24-metilenkolesterol bulmuştur. En bol bulunan bileşenler ise kolesterol, sitosterol ve stigmasterol (%77-84) dür. Bitkinin tüm parçalarında steroller, serbest esterler, glikozitler ve açillenmiş glikozitlerin mevcut olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Tong ve arkadaşları (2011), yapmış oldukları çalışmada *Withania somnifera* (Solanaceae) bitkisinden daha önce de izole edilmiş olan dokuz farklı withanolidin yanı sıra ilk defa klorlu withanolid olan 6 $\alpha$ -chloro-5 $\beta$ , 17 $\alpha$ -dihydroxywithaferin A izole etmişlerdir.

Dinan ve arkadaşları (1997), *Physalis peruviana* 'nın (Solanaceae) çiçek çanak yaprakları ile yapmış oldukları izolasyon çalışmalarında 1D, 2D, <sup>13</sup>C NMR, COSY, HMBC ve HMQC gibi spektroskopik yöntemleri de kullanarak bu tür için yeni olan iki withanolidi (28-hydroxywithanolide E ve 4 $\beta$ -hydroxywithanolide E) izole edip yapılarını aydınlatmışlardır.

Yapmış olduğumuz kromatografik ayırma ve saflaştırma çalışmaları sonucunda, *Solanum dulcamara* (Solanaceae) bitkisinin meyve-metanol ekstresinden, 2 tane steroid (withanolide) (6,15,23-trihidroksi-witha-16-enolide ve 14-asetil-6, 23,27-trihidroksi-withanolide) yapılı olmak üzere toplam 2 bileşik izole edilmiştir.

Hsiu-Chen Huang ve arkadaşları (2010), *Solanum nigrum*'un (Solanaceae) meyve, yaprak ve saplarında, standart maddeler kullanarak HPLC ile polifenolik bileşikleri ve



antosiyanidinleri tespit etmişlerdir. *Solanum nigrum* yapraklarının, yüksek oranda, gentsik asit, luteolin, apigenin, kamferol ve m-kumarik asit içerdiğini bulmuşlardır.

Walkowiak ve arkadaşları (1990), *Solanum dulcamara* bitkisiyle yapmış oldukları çalışmalar sonucunda flavonoid iskeletini taşıyan; kuersetin, kamferol, quercetin-3-rhamnoglucoside, kaemplerol-3-glucoside bileşiklerini izole etmişlerdir.

Yapmış olduğumuz kromatografik ayırma ve saflaştırma çalışmaları sonucunda, *Solanum dulcamara* (Solanaceae) bitkisinin meyve-metanol ekstresinden, 1 tane biflavonoid (6,2',3",5",4"'-pentahidroksi-3,7"-biflavon) yapılı bileşik izole edilmiştir.

Elde edilen bileşiklerin yapılarının açıklanması IR, 1D (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT) NMR, 2D NMR (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HSQC) ve kütle (ESI-MS) spektroskopisi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatürde, Solonaceae familyasındaki izolasyon ve saflaştırma çalışmalarında, steroidler (withanolide) (Fang, v.d., 2010; Dinan v.d.1997; Ahmad, 2002) ve flavonoidler (Mahmoud v.d.,1989; Hsiu-Chen Huang v.d., 2010; Walkowiak v.d., 1990) bulunmuştur.

Ancak, bizim çalışmamızda, *S. dulcamara* bitkisinin meyve-metanol ekstresinden, izole edilen bu üç bileşik, bu bitki türünden ilk kez izole edilmiştir. Bunlardan “ 6,2',3",5",4"'-pentahidroksi-3,7"-biflavon” bileşiği ise, doğal ürünlerden ilk kez b çalışmada izole edilen, yeni bir, biflavonoid bileşiği olarak literatüre geçecektir.

Yapılan kromatografik ayırma ve saflaştırma çalışmaları sonucunda, yaprak-etilasetat ekstresinden, 2 tane steroid (withanolide) (6,16,23-trihidroksi-withanolide ve  $\beta$ -Sitosterol) bileşiği izole edilmiştir.

Elde edilen bileşiklerin yapılarının açıklanması IR, 1D (<sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR, DEPT) NMR, 2D NMR (<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY, HMBC, HSQC) ve kütle (ESI-MS) spektroskopisi teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzole edilen bu bileşiklerden; 6,16,23-trihidroksi-withanolide bileşiği, *S. dulcamara* türünden ilk kez izole edilmiş,  $\beta$ -Sitosterol bileşiği ise daha önce *S. dulcamara* türünden izole edilip (Kostens, 1972; El Sayed v.d., 1998) yapısı aydınlatılmıştır.

Bu çalışmada, ayrıca *Solanum dulcamara* (Solanaceae) bitkisinin ham ekstrelerinde antihiperglisemik (antidiabetik) aktivite tayini araştırılmıştır. *Solanum dulcamara* türünün, meyve-metanol ekstresindeki antihiperglisemik aktivite tayini, ilk kez bu çalışmayla literatüre sunulmuştur.

Literatürde, *Solanum dulcamara* yaprak-metanol ekstresinin antihiperglisemik aktivitesi tayin edilmiş ve kan şekeri düşürücü etkisinin olduğu ve bu etkinin glukoneogenezi ve gastrointestinal sistemden emilimi azaltması, kalan pankreatik B hücrelerinin harekete geçirilmesi yoluyla ortaya çıkabileceği bildirilmiştir (Nwacukwu, DC., vd, 2010).

Bu çalışmada, *S. dulcamara*'nın yaprak ve meyvelerinin metanol ekstrelerinde yapılan antihiperglisemik aktivite tayini sonucunda, yaprak ve meyve ekstrelerinin yüksek kan şekerini azaltıcı etkisi görülmemiştir. Çalışmamızda ortaya çıkan farklı sonucun sebebi olarak, deneysel prosedür sırasında görülen yüksek ölüm oranı ve kan şekeri ölçüm metodunun istatistiksel değerlendirmeyi etkilemesi olabileceği düşünülmüştür.

Tüm bu sonuçlar ışığında, benzer çalışmalarda deneysel prosedürde kullanılacak hayvan sayısı belirlenirken, yüksek ölüm oranı riski hesaba katılarak planlama yapılması uygun olacaktır. Ayrıca kan şekeri ölçüm yöntemi seçilirken, çok yüksek değerlerde de kantitatif sonuç verebilecek bir yöntemin tercih edilmesi istatistiksel karşılaştırmanın daha sağlıklı olarak yapılmasını sağlayacaktır.

Bu çalışmada, *S. dulcamara*'nın yaprak ve meyvenin metanol ekstrelerinden, daha yüksek antihiperglisemik aktivite gösteren ekstrenin izolasyon çalışmasında kullanılması planlanmıştır. Ancak, bu çalışmada yaprak ve meyve ekstrelerinin yüksek kan şekerini azaltıcı etkisi görülemediği. Bu nedenle, izolasyon çalışmasında, bitkinin hem meyve, hemde yaprak ekstreleriyle birlikte çalışılmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışmanın gerçekleştirilmesiyle, Türkiye'de yetişen *Solanum* türlerinin kemotaksonomik bakımdan değerlendirilmesine katkı sağlanarak, biyolojik aktif bileşiklerin izolasyonunda, bu çalışma rol oynamıştır. İzole edilen bileşiklerin moleküler yapılarının açıklanmasında da Organik Kimya bilimine katkı sağlandığı düşünülmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

- Ahmad M (2002). New Withanolides and Other Constituents from the Fruit of *Withania somnifera*. Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem, 6: 267–276.
- Ahmed AM (2002). History of Diabetes Mellitus. Saudi Med J, 23(4): 373-378.
- Aliero AA, Grierson DS, Afolayan AJ (2005). Chemical and nutrient characterization of *Solanum pseudocapsicum* berries. African Journal of Biotechnology, 4(11): 1300-1303.
- Aliero AA, Asekun OT, Grierson DS, Afolayan AJ (2007). Volatile Components from the Roots of *Solanum pseudocapsicum*. Journal of Medicinal Food, 10(3): 557-558.
- Almeida-Lafeta' RC, Ferreira MJP, Emerenciano VP, Kaplana MAC (2010). Withanolides from Aureliana fasciculata var. fasciculata. Helvetica Chimica Acta, 93: 2478-2487.
- Badami S, Manohara Reddy SA, Kumar EP, Vijayan P, Suresh B(2003). Antitumor Activity of Total Alkaloid Fraction of *Solanum pseudocapsicum* Leaves. Phytotherapy Research, 17: 1001-1004.
- Badami S, Prakash O, Dongre SH, Suresh B (2005). In vitro antioxidant properties of *Solanum pseudocapsicum* leaf extracts. Indian J Pharmacol, 37 (4): 251-252.
- Bağrıaçık N (1983). Diabetes Mellitus sınıflandırılması, diabetteki metabolik bozukluklar ile klinik arasındaki ilişkiler. Türk Diyabet Yıllığı, Sayı:5, Cilt: 13, sayfa: 1-14.
- Bağrıaçık N (1997). Diabetes mellitus sempozyumu. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul, s.9-18, s131-143.
- Bağrıaçık N (1999). Diabet ve Metabolizma Hastalıkları. Türk Diabet ve Obezite Vakfı Yayınları, 1, 57-73 ve 120-143 .
- Baytop T (1963). Türkiye'nin Tıbbi ve Zehirli Bitkileri. İ.Ü. Basımevi.
- Baytop A (1971). Trakya ve İstanbul Çevresi Bitkileri Üzerinde Sistemik Araştırmalar II. Solanaceae.
- Baytop T (1999). *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi*. Nobel Tıp Kitabevi, 243, İstanbul.
- Bianchini JP, Gaydou EM (1980). Separation of polymethoxylated flavones by straight-phase high-performance liquid-chromatography. J. Chromatogr., 190: 233-236.
- Bilaloğlu GV, Harmandar M (1999). Flavonoidler. Aktif Yayınevi, İstanbul, 1999.
- Boll PM (1963). Alkaloidal Glycosides from *Solanum dulcamara*. Acta Chem. Scand, 17: 1852-1858.
- Borkowski B, Krug H (1960). Biol. inst. Rosl. Tecz. 6,18.
- Bors W, Saran M (1987). Free Radical Res. Commun. 2, 131.
- Bostancı N (1999). Şeker Hastalığı. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahiliye, 2. Baskı,

- Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH (1964). Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry 2, Holden-day Inc., San Francisco, s. 137.
- Burbulis IE, Iacobucci M, Shirley BW (1996). The Plant Cell. 8: 1013-1025. Chen R, Feng L, Li HD, Zhang H, Yang F (2009). Two novel oligosaccharides from *Solanum nigrum*. Carbohydrate Research (Elsevier), 344: 1775-1777.
- Colowick SP, Kaplan NO (1965). Methods in enzymology. Acad. Press Inc. Publishers, New York, 1: 835-850.
- Committee Report (1997). Report of Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes mellitus. Diabetes care, 20(7): 1183-1197.
- Cram JD, Hammond SG (1964). Organic Chemistry. Mc.Graw-Hill Book Company., Newyork., s.671.
- Davidovich PM, Klosterman GF (1954). Arch. Dermatol. und Syphilis. 199, 10.
- Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL (1991). Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. Carcinogenesis, 7: 1193-1198.
- Dewick PM (2001). Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. John Wiley, Chichester.
- Dey PM, Harborne JB (1989). Methods in Plant Biochemistry, Vol.1, Academic Press, London.
- Dinan LN, Sarker SD, Sik V (1997). 28-hidroxywithanolide E from *Physalis peruviana*. Phytochemistry, 44:509-512.
- Dongre SH, Badami S, Ashok G, Ravi S, Kottani R (2007). In vitro cytotoxic properties of O-methylsolanocapsine isolated from *Solanum pseudocapsicum* leaves. Indian J Pharmacol, 39(4): 208-209.
- Duke JA, Ayensu ES (1985). Medicinal Plants of China, Reference Publications, Inc. ISBN 0-917256-20-4.
- Edremittioğlu M, Andic MF, Korkut O (2011). Quercetin, a Powerful Antioxidant Bioflavonoid, Prevents Oxidative Damage in Different Tissues of Long-Term Diabetic Rats. Balkan Med J, 29: 49-55.
- El Sayed KA, Hamann MT, Abd EI, Rahman HA, Zaghloul AM (1998). New pyrole alkaloids from *S. sodomaeum*. J. Nat. Prod., 61: 848-850.
- Eltayeb EA, Al-Ansari S, Roddick JG (1997). Changes in the steroidal alkaloid during development of *Solanum nigrum* and *Solanum incanum*. Phytochemistry, 46: 489-494.
- Emboden W (1979). Narcotic Plants, Studio Vista, ISBN 0-289-70864-8.
- Fang ST, Li B, Liu JK (2009). Two new withanolides from *Physalis peruviana*. Helvetica Chimica Acta, 92: 1304-1308.
- Fang ST, Liu JK, Li B (2012). Ten new withanolides from *Physalis peruviana*. Steroids, 77: 36-44.

- Firmin JL, Wilson KE, Rossen L, Johnston AWB (1986). Flavonoid activation of nodulation genes in rhizobium reversed by other compounds present in plants. *Nature*, 324: 90-92.
- Foo LY, Lu Y, Molan AL, Woodfield DR, McNabb WC (2000). *Pytochemistry*, 54:539-548.
- Gallagher AM, Flatt PR (2003). The effect of traditional antidiabetic plants on invitro glukose diffusion. *Nutrition Research*, 23: 413-424 .
- Gandhiappan J, Rengasamy R (2012). Comparative study on antioxidant activity of different species of *Solanaceae* family. *Advances in Applied Science Research*, 3: 1538-1544.
- Harborne JB (1964). *Biochemistry of Phenolic Compounds* .Academic Press., London.
- Harborne JB, Marby TJ, Marby H (1975). *The Flavonoids*. Chapman and Hall, London, s.82.
- Harborne, JB, Marby, TJ (1982). *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall, London.
- Harborne JB, Boardley M (1984). Use of high-performance liquidchromatography in the separation of flavonol glycosides and flavonol sulfates. *J.Chromatogr.*, 299: 377-385.
- Harmandar M, Bilaloglu GV (1999). *Flavonoidler*. Aktif Yayinevi, 190.
- Hayes PJ, Smyth MR, Mc Murrough I (1987). Comparison of electrochemical and ultraviolet detection methods in high-performance liquidchromatography for the determination of phenolic-compounds commonly found in beers. *Analyst*, 112: 1197-1207.
- Heo KS, Lee SJ, Lim KT (2004). Cytotoxic effect of glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* L. through the inhibition of hydroxyl radical-induced DNA-binding activities of NF-kappa B in HT-29 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 17: 45-54.
- Hikino H, Kiso Y (1988). *Econ. And Medicinal Plant Research*. Academic Press, London, 2, 39, 698.
- Hooper SJ, Lewis MAO, Wilson MJ, Williams DW (2011). Antimicrobial activity of Citrox® bioflavonoid preparations against oral microorganisms. *British Dental Journal*, 210(1):1-5.
- Hörhammer L (1964). *Methods of Polyphenol Chemistry*. Pridham. Oxford, Pergamon, 89.
- Huang MT, Wood AW, Newmark HL, Sayer JM, Yagi H, Jerina DM, Conney AH (1983). Inhibition Of The Mutagenicity Of Bay-Region Diol-Epoxides of Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons By Phenolic Plant Flavonoids. *Carcinogenesis*, 4: 1631-1636.
- Huang HC, Syu KY, Lin JK (2010). Chemical Composition of *Solanum Nigrum* Linn Extract and Induction of Autophagy by Leaf Water Extract and Its Major Flavonoids in AU565 Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem*, 58: 8699-8708.
- İlkova H (1997). *Diabetes mellitus sempozyumu*. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul, 29-34.

- Jainu M, Srinivasulu C, Devi S (2006). Antiulcerogenic and ulcer healing effects of *Solanum nigrum* (L.) on experimental ulcer models: Possible mechanism for the inhibition of acid formation. *Journal of Ethnopharmacology*, 104: 156-163.
- Jeney E, Uri J (1954). *Die Pharmazie*, 9: 553.
- Jimoh FO, Adedapo AA, Afolayan AJ (2010). Comparison of the nutritional value and biological activities of the acetone, methanol and water extracts of the leaves of *Solanum nigrum* and *Leonotis leonorus*. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 964-971.
- Karrer P, Strong, FM (1936). *Helv. Chim. Acta.* 19, 25.
- Kato R, Nakadate T, Yamamoto S, Sugimura T (1983). Inhibition Of 12-OTetradecanoylphorbol-13 Acetate-Induced Tumor Promotion And Ornithine Decarboxylase Activity By Quercetin - Possible Involvement Of Lipoxygenase Inhibition. *Carcinogenesis*, 4: 1301-1305.
- Keivan Z, Boon-Teong T, Sing-Sin S, Pooi-Fong W, Mohd Rais M, Sazaly A (2011). Antiviral activity of four types of bioflavonoid against dengue virus type-2. *Virology Journal*, 8: 560-566.
- Khachatoorian R, Arumugaswami V, Raychaudhuri S, Yeh GK, Maloney EM , Wang J, Dasgupta A, French SW (2012). Divergent antiviral effects of bioflavonoids on the hepatitis C virus life cycle. *Virology* ,433: 346–355.
- Kostens J, Willuhn G (1972). Die Alkane von *Solanum dulcamara* L. *Archiv der Pharmazie*, 305(12): 944-949.
- Kostens J, Willuhn J (1973). Die quantitative verteilung der sterine und sterinderivate in organen von *Solanum dulcamara*. *Phytochemistry*, 14(9): 2055-2058.
- Kupchan SM, Barboutis SJ, Knox JR, Cam CAL (1965). Beta-Solamarine: Tumor Inhibitor Isolated from *Solanum dulcamara*. *Science*, 150: 1827-1828.
- Lam TH, Shaw M (1970). Removal Of Phenolics From Plant Extracts By Grinding With Anion Exchange Resin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39: 965-968.
- Larson RA (1988). *Phytochemistry*. 27, 969.
- Lee SJ, Ko JH, Lim K, Lim KT (2005). 150 kDa glycoprotein isolated from *Solanum nigrum* Linne enhances activities of detoxicant enzymes and lowers plasmic cholesterol in Mouse. *Pharmacological Research*, 51: 399–408.
- Li R, Fang N, Mabry TJ (1988). Flavonoids and a coumarin of *Macuna sempervirens*, *Phytochemistry*, 27: 1556-1559.
- Lin CC, Lin WC Yang SR, Shieh DE (1995). Anti-inflammatory and hepatoprotective effects of *Solanum alatum*. *Am J Chin Med*, 23: 65-69.
- Lin H, Tseng H, Wang C, Lin J, Lo C, Chou F (2008). Hepatoprotective effects of *Solanum nigrum* Linn extract against CCl4-duced oxidative damage in rats. *Chemico-Biological Interactions*, 171: 283-293.

- Lin SC, Chung TC, Ueng TH, Lin YH, Hsu SH, Chiang CL, Lin CC (2000). The hepatoprotective effects of *Solanum alatum* Moench. on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *American Journal of Chinese Medicine*, 28: 105-114.
- Luo P, Niu H, Zheng G, Bai X, Zhang M, Wang W (2009). From salmon pink to blue natural sensitizers for solar cells: *Canna indica* L., *Salvia splendens*, cowberry and *Solanum nigrum* L. *Spectrochimica Acta Part A*, 74: 936–942.
- Magalingam KB, Radhakrishnan A, Haleagrahara N (2013). Rutin, a bioflavonoid antioxidant protects rat pheochromocytoma (PC-12) cells against 6-hydroxydopamine (6-OHDA)-induced neurotoxicity. *International Journal of Molecular Medicine*, 32(1): 235-240.
- Mahmoud AM, Nawwar A, El-Mousallamy MD, Barakat HH (1989). Quercetin 3-glycosides from the leaves of *Solanum nigrum*. National Research Centre, Dokki, Cairo, Egypt.
- Marbry TJ, Markham KR, Thomas MB (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, New York, s. 46, 48, 51, 258.
- Markham KR (1975). *Isolation Techniques for Flavonoides*, (The Flavonoids. Ed. Harborne, J. B.). London.
- Markham KR (1982). *Techniques of Flavonoid Identification*. Academic Press, London.
- Mc Cormick S, Robson K, Bohm BA (1985). Flavonoids from *Wyethia glabra*. *Phytochemistry*, 24: 1614-1616.
- Minguzzi S, Barata LES, Shin YG, Jonas PF, Chai HB, Park EJ, Pezzuto JM, Cordell GA (2002). Cytotoxic withanolides from *Acnistus arborescens*. *Phytochemistry*, 59: 635–641.
- Mitscher LA, Juvarkar JV, Beal JL (1975). Solacaine, a New Steroidal Alkaloid from *Solanum pseudocapsicum* Possessing Antimicrobial Activity. *Experientia*, 32(4): 415-416.
- Mohnike K, Aynsley-Green A (1993). Hypoglycemia in childhood. *Kinderarztl Prax*, 61(9): p. 316-22.
- Moroney MA, Alcanaz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JRS (1988). Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an antiinflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J. Pharm.Pharmacol.*, 40: 787-791.
- Nirmal SA, Patel AP, Bhawar SB, Pattan SR (2012). Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: Possible role in the treatment of asthma. *Journal of Ethnopharmacology*, 142: 91–97.
- Özay Y (2004). Isırgan otu (*Urtica dioica*), zeytin yaprağı (*Olea europea*), Ökalyptüs (*Eucalyptus globulus*) ve Ökse otu (*Viscum album*)'un Alloksan ile Hiperglisemi Edilmiş Erkek Fareler (*Mus musculus*)'in Kan ve Karaciğerlerindeki Glikoz Seviyelerine Etkileri. Yüksek Lisans Tezi. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kütahya, 108 sayfa.
- Özyazar M (1997). Diabetes mellitus sempozyumu. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, İstanbul, 25-28 ve 111-121.

- Padma K, Sharma B, Bakshi N (2009). Biological activity of alkaloids from *Solanum dulcamara* L. *Natural Product Research*, 23(8): 719-723.
- Peters NK, Forst JW, Long SR (1986). A plant flavone, luteolin, induces expression of rhizobium-meliloti nodulation genes. *Science*, 233: 977-980.
- Pratt DE, Hundson BJB (1990). *Food Antioxidants* Elsevier, London, 171.
- Priyadarshini I, Growther L (2012). Antimicrobial Activity and Phytochemical Screening of *Solanum nigrum*. *The IUP Journal of Life Sciences*, 5: 1-5.
- Raju K, Anbuganapathi G, Gokulakrishnan V, Rajkapoor B, Jayakar B, Manian S (2003). Effect of Dried Fruits of *Solanum nigrum* LINN against CCl<sub>4</sub>-Induced Hepatic Damage in Rats. *Biol. Pharm. Bull*, 26(11): 1618-1619.
- Ramjith US, Roopitha P, Cyril MJ (2013). Isolation anti-diabetic and antioxidant evaluation of aqueous extract of *Cansjera rheedii* leaves. 6(3): 228-234.
- Ravi V, Saleem TSM, Maiti PP, Gauthaman K, Ramamurthy J (2009). Phytochemical and pharmacological evaluation of *Solanum nigrum* Linn. *African Journal of Pharmacology*, 3(9): 454-457.
- Rawani A, Ghosh A, Chandra G (2010). Mosquito larvicidal activities of *Solanum nigrum* L. Leaf extract against *Culex quinquefasciatus* Say. *Parasitol Res*, 107: 1235–1240.
- Robbins RC (1973). *J. Clinical. Pharm.*, 13, 401.
- Ronsch H, Schreiber K (1966). Solanum-Alkaloide, LXV. Über vier neue 15 $\alpha$ -Hydroxy-spirosolan-Alkaloide aus Wurzeln von *Solanum dulcamara* L.. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 694: 169-182.
- Rus AF, Kulikov AA (1971). *Trudi Alt. six. in-ta.*, 23, 32.
- Ryzsnyak S, Szent-Greorgy A (1936). *Nature*. 138, 27.
- Sakushima A, Nishibe S (1988). Mass-Spectrometry In The Structural Determination Of Flavonol Triglycosides From Vinca-Major. *Phytochemistry*, 27: 915-919.
- Shilling EE (1984). Foliar Flavonoids of North American *Solanum* Section *Solanum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 12: 53-55.
- Smith DA, Banks SW (1986). Plant Flavonoids in Biology and Medicine Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationship. *Plant Flavonoids in Biology and Medicine Biochemical, Pharmacological and Structure Activity Relationship*, 213: 113-124.
- Son YO, Kim J, Lim JC, Chung Y, Chung GH, Lee JC (2003). Ripe fruits of *Solanum nigrum* L. inhibits cell growth and induces apoptosis in MCF-7 cells. *Food Chem Toxicol*, 41(10): 1421-1428.
- Sridhar TM, Josthna P, Naidu CV (2011). Antifungal Activity, Phytochemical Analysis of *Solanum nigrum* (L.) - An Important Antiulcer Medicinal Plant. *Journal of Ecobiotechnology*, 3(7): 11-15.



- Swain T (1975). *The Flavonoids*. Chapman and Hall., London, (Eds. Harborne, J. B., Marby, T. J., Marby, M.) 109.
- Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M (1998). *Farmasötik Botanik*. Ankara Ün. Eczacılık Fak Yay., 48, 334-340.
- Tanker N, Koyuncu M, Coşkun M (2007). *Solanacea*, *Farmasötik Botanik*, Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, Ankara, 296-301.
- Tayeau F (1962). *Mejd. konf. Povitamine*. Sofiya. 39.
- Thenmozhi A, Nagalakshmi K, Mahadeva Rao US (2011). Qualitative analysis of phytochemicals, and comparative superoxide radical scavenging along with reducing potency of *Solanum nigrum* using various solvent extract. *International Journal of Green Pharmacy*, DOI: 10.4103/0973-8258.94355.
- Tong X, Huaping Z, Timmermann BN (2011). Chlorinated withanolides from *Withania somnifera*. *Phytochemistry Letters*, 4: 411-414.
- Tukalo EA, Ivanchenko BT (1970). Glycosidic Alkaloids of *Solanum dulcamara*. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*, 7(2): 207-208.
- Van de Catelle K, De Pooter H, Van Sumere, CF (1976). *J. Chromatogr.* 121: 49-63.
- Verma AK, Johnson JA, Gould MN, Tanner M (1988). Inhibition Of 7,12 Dimethylbenz(A)Anthracene-Induced And N-Nitrosomethylurea-Induced Rat Mammary-Cancer By Dietary Flavonol Quercetin. *Cancer Res.*, 48: 5754-5759.
- Vijayan P, Kumar VS, Dhanaraj SA, Badami S, Suresh B (2002). In Vitro Cytotoxicity and Anti-tumor Properties of the Total Alkaloid Fraction of Unripe Fruits *Solanum pseudocapsicum*. *Pharmaceutical Biology*, 40(6): 456-460.
- Vijayan P, Prashanth HC, Viyayaraj P, Dhanaraj SA, Badami S, Suresh B (2003). Hepatoprotective Effect of the Total Alkaloid Fraction of *Solanum pseudocapsicum* Leaves. *Pharmaceutical Biology*, 41(6): 443-448.
- Vijayan P, Preethi V, Prashanth H, Setty C, Hariharapura RC, Godavarthi A, Badami S, Arumugam DS, Bhojraj S (2004). The Cytotoxic Activity of the Total Alkaloids Isolated from Different Parts of *Solanum pseudocapsicum*. *Biol. Pharm. Bull*, 27(4): 528-530.
- Vogel G (1971). *Pharmacognosy and Phytochemistry*. Eds. Wagner, H., Hörhammer, L., Berlin, 731.
- Wagner H (1989). Search for New Plant Constituents with Potential Antiphlogistic and Antiallergic Activity. *Planta Med.*, 55: 235-238.
- Wagner H, Elbi G, Lotter H, Guinea N (1991). *Pharm. Pharmacol.* 1, 15.
- Walkowiak A, Tanioeznik B, Kowalewski Z (1990). Flavonoid compounds from *Solanum dulcamara*. *Herba Pharmica*, 36: 133-137.
- Willuhn G, May S (1982). Triterpene und Steroide in Kalluskulturen von *Solanum dulcamara*. *Planta Medica*, 46(3): 153-158.

- Wollenweber E, Dietz VH, Schilling, G, Favre-Bonvin J, Smith DM (1985). Flavonoids from chemotypes of the goldback fern, *Pityrogrammatriangularis*. *Phytochemistry*, 24: 965-971.
- Xadjay YAI (1972). *Farmakol. i toksikol.* 7, 46.
- Yamashita T, Matsumoto T, Yahara S, Yoshida N, Nohara T (1991). Structures of Two New Steroidal Glycosides, Soladulcosides A and B from *Solanum dulcamara*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 39(6): 1626-1628.
- Zaprometov MN (1964). *Biochimiya Katechinov. M. Nauka.* 295.
- Zhu XH, Ando J, Takagi M, Ikeda T, Yoshimitsu A, Nohara T (2001). Four novel withanolide-type steroids from the leaves of *Solanum cilistum*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 49(11): 1440-1443.

## ÖZGEÇMİŞ

1988 yılında Lüleburgaz'da doğdu. İlköğretim eğitimini General Ferhat Akat İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Orta öğretimini Keirtepe Anadolu Öğretmen Lisesi'nde 4.91/5 ortalamama ile tamamladı. Lisans eğitimini Dokuz Eylül Üniversitesi Buca Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği Bölümü'nde 2.49/4 ortalama ile tamamladı.

Yüksek Lisansını Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Organik Kimya Ana Bilim Dalı'nda tamamladı. 26. Ulusal Kimya Kongresi (2012) ve 1st Mediterranean Symposium on Medicinal and Aromatic Plants (MESMAP-2013) olmak üzere iki ayrı poster sunumu yaptı. Tübitak 1002 ve Namık Kemal Üniversitesi BAP olmak üzere iki farklı projede çalıştı.

## TEŞEKKÜR

Tez aşamasında, yaptığım deneylerde deneyimlerini benden hiçbir zaman esirgemeyen saygıdeğer hocam, tez danışmanım N.K.Ü. Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilimdalı Bölüm Başkanı Doç. Dr. Temine ŞABUDAK'e sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi birikimlerini ve deneyimlerini benimle paylaşan sayın Yrd. Doç. Dr. Yelda YALÇIN GÜRKAN'a ve sayın Doç. Dr. Evren CABI'ye sonsuz teşekkür ve şükranlarımı sunarım.

Deneylem esnasında yardımlarını benden hiçbir zaman esirgemeyen yüksek lisans arkadaşlarım Nuri EREN'e, Enes ALPAY'a ve Gülcan ÇOLAKOĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

TÜBİTAK tarafından 112T019 nolu proje kapsamında sağlanan maddi destek için teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana inanan, eğitim ve öğretim sürecinde benden maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen babam Muammer ÇUKUROVA'ya, annem Nurcan ÇUKUROVA'ya, kardeşim Ebru ÇUKUROVA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elif ÇUKUROVA