

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *Phryna ortegioides* TÜRÜNDEN ETKEN İLAÇ
ÖNCÜLLERİ VE SERUM ALBUMİNE BAĞLANMA
KAPASİTELERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT AYDIN

KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. İBRAHİM HALİL GEÇİBESLER

BİNGÖL-2017

T.C.
BİNGÖL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENDEMİK *Phryna ortegioides* TÜRÜNDEN ETKEN İLAÇ
ÖNCÜLLERİ VE SERUM ALBUMİNE BAĞLANMA
KAPASİTELERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Murat AYDIN

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 10/07/2017 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr.
İbrahim Halil GEÇİBESLER

Üye



Prof. Dr.
Ahmet ÇETİN

Üye



Yrd. Doç. Dr.
İbrahim DEMİRTAŞ

Jüri-Başkanı



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim Yasin ERDOĞAN

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca bilgi ve birikiminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. İbrahim Halil GEÇİBESLER'e derin minnet ve şükranlarımı sunarım. Bingöl Üniversitesi Rektörlüğüne (Proje No: BÜBAP-21-322-2015), Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Kurumu'na (TUBİTAK Proje No: 115Z088) destek sağladığı için teşekkür ederim.

Çalışmalarında yardımcı olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu çalışmada gerçekleştirilen, bitki örneklerinin ekstraksiyonu, test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma, saflaştırma işlemlerinin yapıldığı Bingöl Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Araştırma Laboratuvar çalışanlarına, biyolojik aktivite testleri sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesinde yardımcı olan değerli Hocamız Sayın Doç. Dr. Mahmut TOPRAK'a ve yüksek lisans öğrencisi Seda KARABULUT'a, Bingöl Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvar çalışanlarına, saflaştırılan bileşiklerin kimyasal yapı karakterizasyonu aydınlatılmasında yardımcı olan Çankırı Karatekin Üniversitesi'ne, bitkisel materyalinin tür teşhisi Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Lütfi BEHÇET'e teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimim esnasında maddi ve manevi her türlü desteği benden esirgemeyen değerli aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Murat AYDIN
Bingöl 2017

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	v
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ	xv
ÖZET.....	xvi
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ	1
1.1. Botanik Kısım	2
1.1.1. Caryophyllaceae Familyasının Genel Özellikleri	2
1.1.2. <i>P. ortegioides</i> Taksonun Genel Özellikleri	3
1.1.3. Fitokimyasallar ve Biyokullanılabilirlikleri	3
1.1.3.1. Fenolik Asitler	5
1.1.3.2. Flavonoidler	5
1.1.3.3. Steroitler.....	7
1.1.4. Floresans Spektroskopi ve Floresans Maddeler	8
1.1.5. Serum Albümin	10
1.1.5.1. HSA (İnsan Serum Albümini)	11
1.1.5.2. BSA (Hayvan Serum Albümini).....	12
1.1.6. İlaç Öncülleri ve Özellikleri	12

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	14
2.1. <i>P. ortegioides</i> Taksonu Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar	14
2.2. <i>P. ortegioides</i> Taksonu Üzerine Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler.....	17
3.1.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler	17
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	18
3.2. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması.....	19
3.2.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Çözeltiler	19
3.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler	19
3.2.3. Biyolojik aktivite için Örneklerin Hazırlanması	19
3.3. Bitkisel Materyal	19
3.4. Kullanılan Saflaştırma Metotları	20
3.4.1. Ekstraksiyon İşlemi	20
3.4.2. Fraksiyonlandırma İşlemi	20
3.4.3. Vakum Kromatografisi	20
3.4.4. Kolon Kromatografisi.....	21
3.4.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	21
3.5. Biyolojik Aktivite Testi	22
3.5.1. Protein-Doğal Ürün Etkileşimi.....	22
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	23
4.1. Ekstraksiyon Verimi Bulguları.....	23
4.2. Fraksiyonlandırma İşlemine Ait Bulgular	24

4.3. Diklormetan Fraksiyonuna Uygulanan Sütun Kromatografisine Ait Bulgular.....	25
4.4. Sekonder Metabolitlerin Saflaştırılmasına ait bulgular	26
4.5. İzole Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri.....	29
4.5.1. 7,5'-dimetoksiizoetin (1) Bileşiği.....	29
4.5.2. Homoorientin-6''-4-O-metil- <i>myo</i> -inositol (2) Bileşiği.....	41
4.5.3. İzoorientin (3) Bileşiği	60
4.5.4. Genkvanin (4) Bileşiği	62
4.5.5. (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (5) Bileşiği	64
4.5.6. Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (6) Bileşiği	66
4.5.7. D-(+)-pinitol (7) Bileşiği	68
4.5.8. 3-O- β -D-glukopiranozil spinasterol (8) Bileşiği	70
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	90
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	98

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

μg	: Mikrogram
μM	: Mikromolar
1:1	: Birebir oran
$^{13}\text{C-NMR}$: Karbon-13 Nükleer Manyetik Rezonans
1D	: Bir Boyutlu
$^1\text{H-NMR}$: Proton-Nükleer Manyetik Rezonans
2D	: İki Boyutlu
2D-FL	: İki Boyutlu Florometre Spektrumu
3D	: Üç Boyutlu
3D-FL	: Üç Boyutlu Florometre Spektrumu
A375	: İnsan Melanoma Tümörü
A549	: İnsan Akciğer Adenokarsinomi
ara	: Arabinoz
BSA	: Bovine (Hayvan) Serum Albümi
COSY	: Correlated Spectroscopy
De Few	: İnsan B Lenfoma
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DMSO- d_6	: Dötero-dimetilsülfoksit
EtOAc:MeOH	: Etilasetat:metanol
FT-IR	: Fourier Dönüşümü İnfrared Spektroskopi
g	: Gram
GC-MS	: Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
glc	: Glukoz

HMBC	: Heteronükleer Çoklu Bağ Korelasyonu
HPLC-TOF/MS	: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı/Kütle Spektrometresi
HRESIMS	: Yüksek Çözünürlüklü Elektrosprey İyonizasyon Kütle Spektrometre
HSA	: Human (İnsan) Serum Albümi
HSQC	: Heteronükleer Single Kuantum Korelasyonu
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	: Kapling (Eşleşme) Sabiti
L	: Litre
M	: Molarite
m/z	: Kütle/yük oranı
MeOH	: Metanol
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
<i>n</i>	: Normal
nm	: Nanometre
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NOESY	: Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
<i>P. ortegioides</i>	: <i>Phryna ortegioides</i>
ppm	: Parts Per Million (Milyonda Bir Birim)
ROESY	: Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy
TOCSY	: Total Correlated Spectroscopy
UV-VIS	: Ultraviyole Görünür Bölge Spektroskopisi
v/v	: Hacimsel oran
α	: Alfa
β	: Beta
δ_C	: Karbon Kimyasal Kayma Değeri (ppm)
δ_H	: Hidrojen Kimyasal Kayma Değeri (ppm)

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	<i>Phryna ortegioides</i> bitkisinin arazi görüntüsü.....	3
Şekil 1.2.	Bitkilerde primer ve sekonder metabolizma arasındaki ilişkiler	4
Şekil 1.3.	Fenolik asit türlerinin genel yapısı.....	5
Şekil 1.4.	Flavonoit bileşiklerinin genel yapısı ((A) Benzoil halkası ve Sinnamoil halkası (B))	6
Şekil 1.5.	Flavonoit bileşiklerin alt sınıflarının kimyasal yapıları	7
Şekil 1.6.	Steroidlerin genel karbon iskeleti	8
Şekil 1.7.	Jablonski diyagramı	9
Şekil 1.8.	BSA ve HSA'nın üç boyutlu yapıları	12
Şekil 2.1.	<i>P. ortegioides</i> türünden izole edilen yeni oleanane tipi saponin bileşikler.....	15
Şekil 4.1.	<i>P. ortegioides</i> 'in toprak üstü kısımlarına uygulanan ekstraksiyon işlemi.....	23
Şekil 4.2.	<i>P. ortegioides</i> 'den elde edilen metanol:diklormetan (v/v; 1:1) ham ekstresinin fraksiyonlandırma işlemi.....	24
Şekil 4.3.	Fraksiyonlandırma işlemi neticesinde elde edilen kuru fraksiyonlar	25
Şekil 4.4.	Kolon kromatografisinden alınan fraksiyonlara ait İTK kromatogramları.....	25
Şekil 4.5.	SFC fraksiyonundan bileşiklerin saflaştırılması için uygulanan işlem basamakları	27
Şekil 4.6.	<i>P. ortegioides</i> türünden izole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları.....	28
Şekil 4.7.	İzolasyon işleminde kullanılan kolon kromatografi standları.....	29
Şekil 4.8.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin kimyasal yapısı	29
Şekil 4.9.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) ¹ H-NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	31
Şekil 4.10.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	32

Şekil 4.11.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin ^{13}C -DEPT NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; DMSO- d_6).....	33
Şekil 4.12.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin HMBC korelasyonları	34
Şekil 4.13.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) ^1H - ^{13}C -gHMBC-NMR spektrumu (^1H :600 MHz; ^{13}C : 125 MHz; DMSO- d_6).....	35
Şekil 4.14.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin ^1H - ^{13}C -gHSQC-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 125 MHz; DMSO- d_6).....	36
Şekil 4.15.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin ^1H - ^1H -gCOSY-NMR spektrumu ^1H : 600 MHz; DMSO- d_6).....	37
Şekil 4.16.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin FT-IR spektrumu	38
Şekil 4.17.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin HRESIMS kromatogramı.....	39
Şekil 4.18.	7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin UV-VIS spektrumu.....	40
Şekil 4.19.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	41
Şekil 4.20.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; DMSO- d_6).....	43
Şekil 4.21.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; DMSO- d_6).....	44
Şekil 4.22.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ^{13}C -DEPT-NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; DMSO- d_6).....	45
Şekil 4.23.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin HMBC korelasyonları.....	46
Şekil 4.24.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ^1H - ^{13}C -gHMBC-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 125 MHz; DMSO- d_6).....	47
Şekil 4.25.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ^1H - ^{13}C -gHSQC-NMR spektrumu (^1H :600 MHz; ^{13}C : 125 MHz; DMSO- d_6).....	48
Şekil 4.26.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ^1H - ^1H -gCOSY-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; DMSO- d_6).....	49
Şekil 4.27.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ^1H - ^1H -NOESY-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; DMSO- d_6).....	50

Şekil 4.28.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ¹ H- ¹ H-ROESY-NMR spektrumu (3-8 ppm arası; ¹ H: 600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	51
Şekil 4.29.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ¹ H- ¹ H-ROESY-NMR spektrumu (2,6-4,8 ppm arası; ¹ H: 600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	52
Şekil 4.30.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ¹ H- ¹ H-ROESY-NMR spektrumu (6,5-7,6 ppm arası; ¹ H: 600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	53
Şekil 4.31.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ¹ H- ¹ H-TOCSY-NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)	54
Şekil 4.32.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin ROESY ve NOESY korelasyonları	55
Şekil 4.33.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiği için mümkün olan en düşük enerjili üç boyutlu kimyasal yapısı	56
Şekil 4.34.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin FT-IR spektrumu.....	57
Şekil 4.35.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin HRESIMS kromatogramı	58
Şekil 4.36.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiğinin UV-VIS spektrumu.....	59
Şekil 4.37.	İzoorientin (3) bileşiğinin kimyasal yapısı	60
Şekil 4.38.	İzoorientin (3) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (¹ H:600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	61
Şekil 4.39.	İzoorientin (3) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C:125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	61
Şekil 4.40.	Genkvanin bileşiğinin (4) kimyasal yapısı	62
Şekil 4.41.	Genkvanin (4) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (¹ H:600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	63
Şekil 4.42.	Genkvanin (4) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C:125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	63
Şekil 4.43.	(2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (5) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	64

Şekil 4.44.	(2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (5) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (¹ H:600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)	65
Şekil 4.45.	(2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (5) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)	65
Şekil 4.46.	Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (6) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	66
Şekil 4.47.	Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (6) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	67
Şekil 4.48.	Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (6) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	67
Şekil 4.49.	D-(+)-pinitol (7) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	68
Şekil 4.50.	D-(+)-pinitol (7) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (¹ H:600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	69
Şekil 4.51.	D-(+)-pinitol (7) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C:125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	69
Şekil 4.52.	3- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil spinasterol (8) bileşiğinin kimyasal yapısı.....	70
Şekil 4.53.	3- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil spinasterol (8) bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu (¹ H: 600 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆)	71
Şekil 4.54.	3- <i>O</i> -β-D-glukopiranozil spinasterol (8) bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu (¹³ C: 125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	71
Şekil 4.55.	(A) Farklı konsantrasyonlardaki 7,5'-dimetoksiizoetin (1) molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5x10 ⁻⁶ M). (C) HSA (5x10 ⁻⁶ M) + 7,5'-dimetoksiizoetin (1) sisteminin (50 µg/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5x10 ⁻⁶ M). (E) HSA (5x10 ⁻⁶ M) + 7,5'-dimetoksiizoetin (1) sisteminin (50 µg/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ _{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ _{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ _{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ _{ex}) göstermektedir.....	76

Şekil 4.56. (A) Farklı konsantrasyonlardaki homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir..... 78

Şekil 4.57. (A) Farklı konsantrasyonlardaki izoorientin (4) molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + izoorientin (4) sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + izoorientin (4) sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir..... 80

Şekil 4.58. (A) Farklı konsantrasyonlardaki genkvanin (4) molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + genkvanin (4) sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + genkvanin (4) sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir..... 82

Şekil 4.59. (A) Farklı konsantrasyonlardaki (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir..... 84

Şekil 4.60. (A) Farklı konsantrasyonlardaki eriodiktiyol-7,4'-dimetileter molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + eriodiktiyol-7,4'-dimetileter sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + eriodiktiyol-7,4'-dimetileter sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir..... 86

Şekil 4.61. (A) Farklı konsantrasyonlardaki D-(+)-pinitol molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + D-(+)-pinitol sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + D-(+)-pinitol sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) 88

Şekil 4.62. (A) Farklı konsantrasyonlardaki 3-*O*- β -D-glukopiranozil spinasterol molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + 3-*O*- β -D-glukopiranozil spinasterol sisteminin (50 μ g/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + 3-*O*- β -D-glukopiranozil spinasterol sisteminin (50 μ g/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir..... 90

TABLolar LİSTESİ

Tablo 4.1.	Metanol:diklormetan (1:1) çözücü sisteminde ekstraksiyon işlemi için kullanılan bitkisel materyal, harcanan çözücü miktarları ve elde edilen ekstrakt miktarı.....	24
Tablo 4.2.	Fraksiyonlandırma işleminde kullanılan organik çözücü miktarları ve fraksiyon verimleri.....	25
Tablo 4.3.	Diklormetan fraksiyonunun kromatografik çalışmaları için kullanılan hareketli faz gradient oranları ve harcanan çözücü miktarları	26
Tablo 4.4.	7,5'-dimetoksiizoetin bileşiminin ¹ H, ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri ve HMBC korelasyonları (¹ H: 600 MHz; ¹³ C: 125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	30
Tablo 4.5.	Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol (2) bileşiminin ¹ H ve ¹³ C-NMR kimyasal kayma değerleri ve HMBC korelasyonları (¹ H: 600 MHz, ¹³ C: 125 MHz; DMSO- <i>d</i> ₆).....	42
Tablo 4.6.	Sekonder metabolit-HSA etkileşimleri için stern-volmer değerleri	73
Tablo 4.7.	Sekonder metabolit-HSA etkileşimleri için bağlanma sabiti (K _b) ve bağlanan kısım sayısı (n) verileri.....	74

ENDEMİK *Phryna ortegioides* TÜRÜNDEN ETKEN İLAÇ ÖNCÜLLERİ VE SERUM ALBÜMİNE BAĞLANMA KAPASİTELERİ

ÖZET

Bingöl ilinde Ortaköy Köyü steplerinde yayılış gösteren tıbbi değer taşıyan *Caryophyllaceae* familyasına ait olan endemik *P. ortegioides* türünün doğal sekonder metabolitleri kromatografik teknikler kullanılarak saflaştırılmıştır. İzolasyon çalışmaları neticesinde 7,5'-dimetoksiizoetin (1), homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2), izoorientin (3), genkvanin (4), (2R,3R)-(+)-dihidrokanferol-7,4'-dimetileter (5), eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (6), D-(+)-pinitol (7) ve 3-O-β-D-glukopiranozil spinasterol (8) bileşikleri endemik *P. ortegioides* türünden ilk defa izole edilmiştir. İzole edilen bileşikler arasında 7,5'-dimetoksiizoetin (1) ve homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşikleri yeni flavon türevi bileşikler olarak literatüre kazandırılmıştır. Bileşiklerin kimyasal yapıları bir boyutlu (1D), iki boyutlu (2D) ¹³C ve ¹H-NMR teknikleri, HPLC-TOF/MS, GC-MS, UV-VIS, FT-IR ve C, H, N elementel analiz spektrometreleri kullanılarak kimyasal yapı karakterizasyonları gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan doğal bileşiklerin ilaç salınım özellikleri insan serum albümin (HSA) proteini kullanılarak iki (2D-FL) ve üç (3D-FL) boyutlu florimetrik ölçümler ile analiz edilmiştir. İn vitro floresans çalışma sonuçlarına göre özellikle fonksiyonel polar gruplar ihtiva eden flavonoid türevli bileşikler HSA proteini ile yüksek oranda etkileşim göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: *Phryna ortegioides*, endemik, HSA, florometre, kromatografi, sekonder metabolit.

ACTIVE DRUG PRECURSORS SUCH AS ENDEMIC *Phryna ortegioides* AND SERUM ALBUMIN BINDING CAPACITIES

ABSTRACT

Natural secondary metabolites of the endemic *Phryna ortegioides* species belonging to the *Caryophyllaceae* family, which has medicinal value spreading in the Ortaköy village in Bingöl province, have been purified using chromatographic techniques. As a result of isolation studies, which are compound of names 7,5'-dimethoxyisoetin (1), homoorientin-6''-4-*O*-methyl-*myo*-inositol (2), isoorientin (3), genkwanin (4), (2R,3R)-(+)-dihydrokaempferol-7,4'-dimethylether (5), eriodictyol-7,4'-dimethylether (6), D-(+)-pinitol (7), 3-*O*- β -D-glucopyranosyl spinasterol (8) compounds were isolated for the first time from the endemic *P. ortegioides* species. Among the isolated compounds, 7,5'-dimethoxyisoetin (1) and homoorientin-6''-4-*O*-methyl-*myo*-inositol (2) compounds have been introduced into the literature as novel flavonoid compounds. The chemical structures of the compounds were performed by one-dimensional (1D), two-dimensional (2D) ^{13}C and ^1H -NMR techniques, HPLC-TOF/MS, GC-MS, UV-VIS, FT-IR and C, H, N elemental analysis spectrometers. Drug release properties of the purified natural compounds were analyzed by two (2D-FL) and three (3D-FL) dimensional fluorimetric measurements using human serum albumin (HSA) protein. *In vitro* fluorescence studies have shown that flavonoid-derived compounds, especially functional polar groups, interact with HSA protein at high levels.

Keywords: *Phryna ortegioides*, endemic, HSA, fluorometer, chromatography, secondary metabolite.

1. GİRİŞ

Bitkisel kökenli yeni biyoaktif bileşiklerin çeşitliliği ve modern tıpta kullanılan ilaçların çoğunun tıbbi aromatik bitkilerden elde edilen doğal ürünler olmasından dolayı farmakoloji, eczacılık, tıp, biyoloji ve kimya bilimlerinde oldukça popüler bir araştırma konusu olmaktadır. Tıbbi değere sahip olan bitkiler, fenolik bileşikler, azotlu bileşikler, vitaminler, terpenoidler ve alkaloidler gibi yüksek biyolojik aktivite gösteren bileşikler içermektedirler. Bu bileşiklerin saflaştırılması, kimyasal yapılarının karakterizasyonu, biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi ve kullanım sahalarının araştırılması oldukça önemlidir. Bunlara ek olarak ülkemizdeki endemik bitki çeşitliliği de göz önüne alındığında bu önem daha da belirginleşmektedir. Bu bağlamda bakıldığında bitkiler ve bitkilerden saf olarak elde edilecek biyoaktif bileşikler şeker hastalığı, tansiyon, kalp rahatsızlığı ve kanser gibi günümüz hastalıklar için ilaç öncül bileşenleri olma yönünde çok önemli doğal kaynaklardır. Bu hastalıkların tedavi edilmesi sürecinde verilen bu ilaç etken maddelerinin hedef bölgelere kan serumunda ve vücudumuzun pek çok dokusunda bulunan taşıyıcı proteinler aracılığı ile sağlanmaktadır. Bitkilerden elde edilen saf bileşiklerin vücudumuzda bulunan bu protein ve enzim gibi makro moleküllere bağlanma mekanizması ve bağlanma kapasitelerinin belirlenmesi ile elde edilen saf bileşiklerin biyoyumluluğu ve kovalent konjugasyonları hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır. İnsan serum albümin (HSA) veya hayvan serum albümin (BSA) gibi taşıyıcı proteinlerin bitkisel kökenli saf bileşikler ile modifikasyonu *in vivo* koşullardaki kararlılığın artmasını sağlayarak onların biyolojik aktivitelerini çarpıcı bir şekilde değiştirebilmektedir. Böylece, fonksiyonel bitki etken maddeleri proteinlerle kovalent bağlanması aktivitesi yükseltilmiş birçok biyoaktif makro moleküllerin oluşmasını ve hedefleyici olarak davranmasını sağlayabilmektedir. Taşıyıcı proteinlere bağlanma kapasiteleri belirlenmemiş düşük molekül ağırlığına sahip bu bitki kökenli etken maddelerin kan serumunda çözünmeme ve organizmada birikimi gibi sorunlar klinik çalışmalara geçmeden önce gerçekleştirilecek olan *in vitro* çalışmalar ile önlenebilir.

Sonuç olarak, tez çalışması ile aşağıda ana hatları çizilen hedeflere ulaşmak amaçlanmaktadır:

- i) Tıbbi familya içerisinde yer alan ve Bingöl İli'ne endemik olan *P. ortegioides* türünün ve bu türden elde edilecek yeni ve etkili biyoaktif bileşikleri literatüre kazandırmak.
- ii) İlaç etken maddesi olarak kullanılabilirliklerinin *in vitro* deneyler ile ortaya konulması.
- iii) Metanol: diklormetan ekstresinin içermiş olduğu yeni ve aktif sekonder metabolitlerin ileri kromatografi teknikleri ile saflaştırılması.
- iv) Doğal sekonder metabolitlerin kimyasal yapı karakterizasyonlarının ileri spektroskopi teknikleri ile yapılması.
- v) İzole edilen yeni ve aktif doğal sekonder metabolitler, metanol:diklormetan ekstresi ve alt fraksiyonlarının HSA proteinine bağlanma kapasitesinin iki (2D-FL) ve üç (3D-FL) boyutlu floresans ölçümleri alınarak bunlar arasındaki sinerjik ve antagonistik etkilerin ortaya konması amaçlanmaktadır.

1.1. Botanik Kısım

1.1.1. Caryophyllaceae Familyasının Genel Özellikleri

Caryophyllaceae (Karanfilgiller) familyası, Türkiye'de 32 cins ve 509 tür ile temsil edilmektedir. Bu türlerin 217'si Türkiye'ye endemik olup endemizm oranı %42,63'tür. *Caryophyllaceae* familyası yıllık veya çok yıllık, genellikle otsu, nadiren çalimsı ya da küçük ağaçsı bitkilerden oluşan geniş bir familyadır (Şekil 1.1). Çok soğuk ortamlardan kurak ortamlara kadar pek çok habitatta yaşayabilen kozmopolit türleri içerir. (Seçmen vd. 2004; Kandemir vd. 2009).



Şekil 1.1. *Phryna ortegioides* bitkisinin arazi görüntüsü (Gecibesler 2016)

1.1.2. *P. ortegioides* Taksonun Genel Özellikler

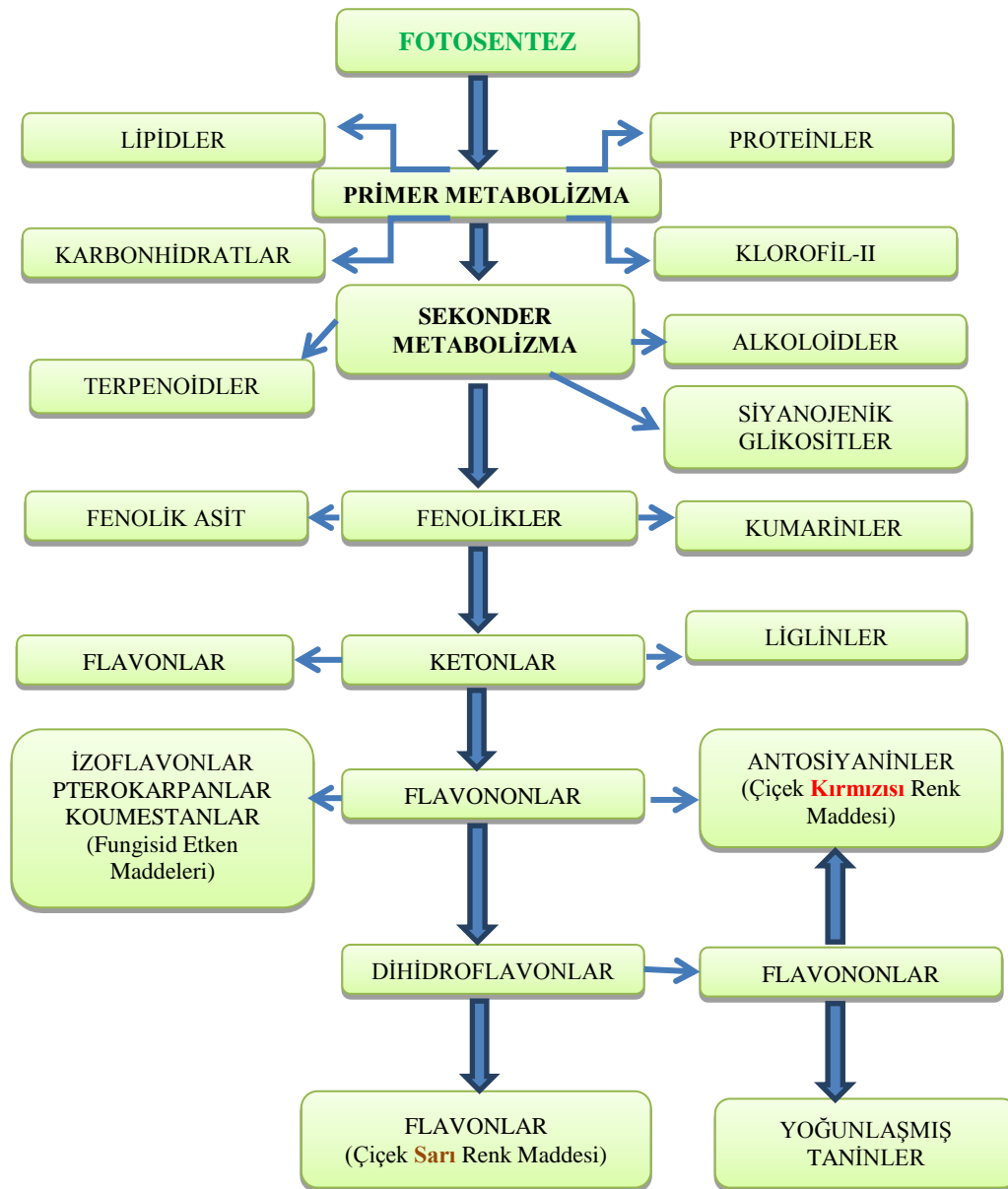
P.ortegioides taksonu *Caryophyllaceae* familyasına ait olup Türkiye için monotipik ve endemik bir türdür (Gecibesler vd. 2016). *P. ortegioides* türünün başlıca sinonimleri *Tunica ortegioides* (Fisch ve Mey 2013), *Saponaria ortegioides* (Fisch ve Mey 2013) *Gypsophila ortegioides* (Fisch ve Mey 2013) Boiss taksonlarıdır (Kılıç vd. 2013).

1.1.3. Fitokimyasallar ve Biyokullanılabilirlikleri

Fitokimya terimi Yunancada bitki manasında gelen “*phyton*” ve kimya manasına gelen “*chemeia*” kelimelerinden türetilmiş olup bitkinin içerdiği kimyasalları ifade etmektedir. Bitki içerisinde bulunan organik kimyasallar primer ve sekonder metabolitler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Karbonhidrat, protein ve yağlar bitkinin primer metabolitlerini oluşturmaktadır. Bitkilerin metabolik faaliyetleri sonucu primer metabolit ürünlerinden biyolojik yollarla üretilen fenolik asit, terpen, kumarin, alkoloit, flavon, Steroit ve kinon gibi bileşik türleri ise sekonder metabolitleri oluşturmaktadır. Sekonder metabolitler bitkilerde renk, koku, tat ve biyolojik aktivite gibi pek çok önemli role sahiptir. Günümüzde modern tıbbın kullanmış olduğu birçok ilaç etken maddesi bitkilerden elde edilmiş sekonder metabolitlerdir. Örneğin kanser tedavisinde kullanılan

vinblastin etken maddesi “Cezayir menekşesi” olarak bilinen bitkiden, sıtma tedavisinde kullanılan kinin etken maddesi “kınakına” bitkisinden ve ağrı kesici olarak kullanılan aspirinin etken maddesi asetilsalisilik asit ise “söğüt” ağacından izole edilmiştir. Yukarıdaki bahsedildiği gibi tıbbi değeri olan bileşikler ihtiva eden bitkiler, sentetik ilaç yapımında kullanılan biyoaktif doğal ürün kaynağı olarak, farmakoloji alanında ilaçların önemli bir kaynağını oluşturmaktadır.

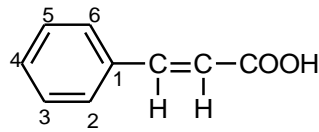
Fonksiyonel özelliğe sahip olan bitki fitokimyasallarından bazılarını aşağıdaki şekil 1.2’deki gibi bilgi verilebilir.



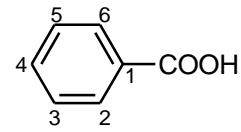
Şekil 1.2. Bitkilerde primer ve sekonder metabolizma arasındaki ilişkiler (Morris ve Robbins 1997)

1.1.3.1. Fenolik Asitler

Fenolik asitler genel olarak bir benzen halkasının bir veya daha fazla sayıda hidroksil grubu ihtiva eden bileşikleridir. Fenolik asitler karbon iskeletlerine göre doğada fenil propan (C_6-C_3) yapısındaki hidroksisinnamik asitler ve fenil metan (C_6-C_1) yapısındaki hidroksibenzoik asitler halindeki türevleri şeklinde bulunurlar (Schuster ve Herrmann 1985; Maier vd. 1990; Huang vd. 1992; Acar 1998; Cemeroglu vd. 2001) (Şekil 1.3).



Hidroksisinnamik asit



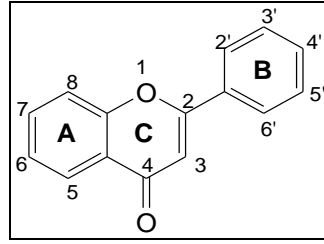
Hidroksibenzoik asit

Şekil 1.3. Fenolik asit türlerinin genel yapısı

Fenolik asitler geniş spektrumlu biyolojik aktiviteye sahiptirler (Croft ve Ann 1998). Bu biyolojik aktivitelere örnek olarak anti-inflamatuar, anti-kanser, anti-mutajenik, anti-diyabetik, anti-oksidan aktiviteler gösterdikleri literatürde rapor edilmiştir (Kampa vd. 2004; Tarnawski vd. 2006). Bunların yanı sıra fenolik asitler, kardiyovasküler hastalıklar tedavisinde, kötü huylu kolesterolün önlenmesinde, kronik romatizmal hastalıkların tedavisinde, damar tıkanıklığını ve yaşlanmayı geciktirme gibi etkilerinin olduğu literatür kayıtlarına girmiştir (Halliwell vd. 1993; Milbury vd. 2006; Garrido vd. 2008; Sarıkaya 2009; Mandalari vd. 2010; Milbury vd. 2010).

1.1.3.2. Flavonoitler

Flavonoit bileşiklerin ana iskeleti bir propan zincirinin iki ucunda fenil halkası ihtiva eden $C_6-C_3-C_6$ karbon iskeletine sahip 15 karbonlu bileşiklerdir. Flavonoit bileşiklerindeki aromatik halkalardan A halkası benzoil ve B halkası sinnamoil halkası olarak ifade edilirken, C halkası ise heterohalka olarak ifade edilmektedir. Bu tür bileşiklerin karbon atomlarının numaralandırması ise A ve C halkaları için oksijen atomundan başlanarak numaralandırılır. B halkasındaki karbon atomları ise üssü (') sayılarla numaralandırılmaktadır (Şekil 1.4).

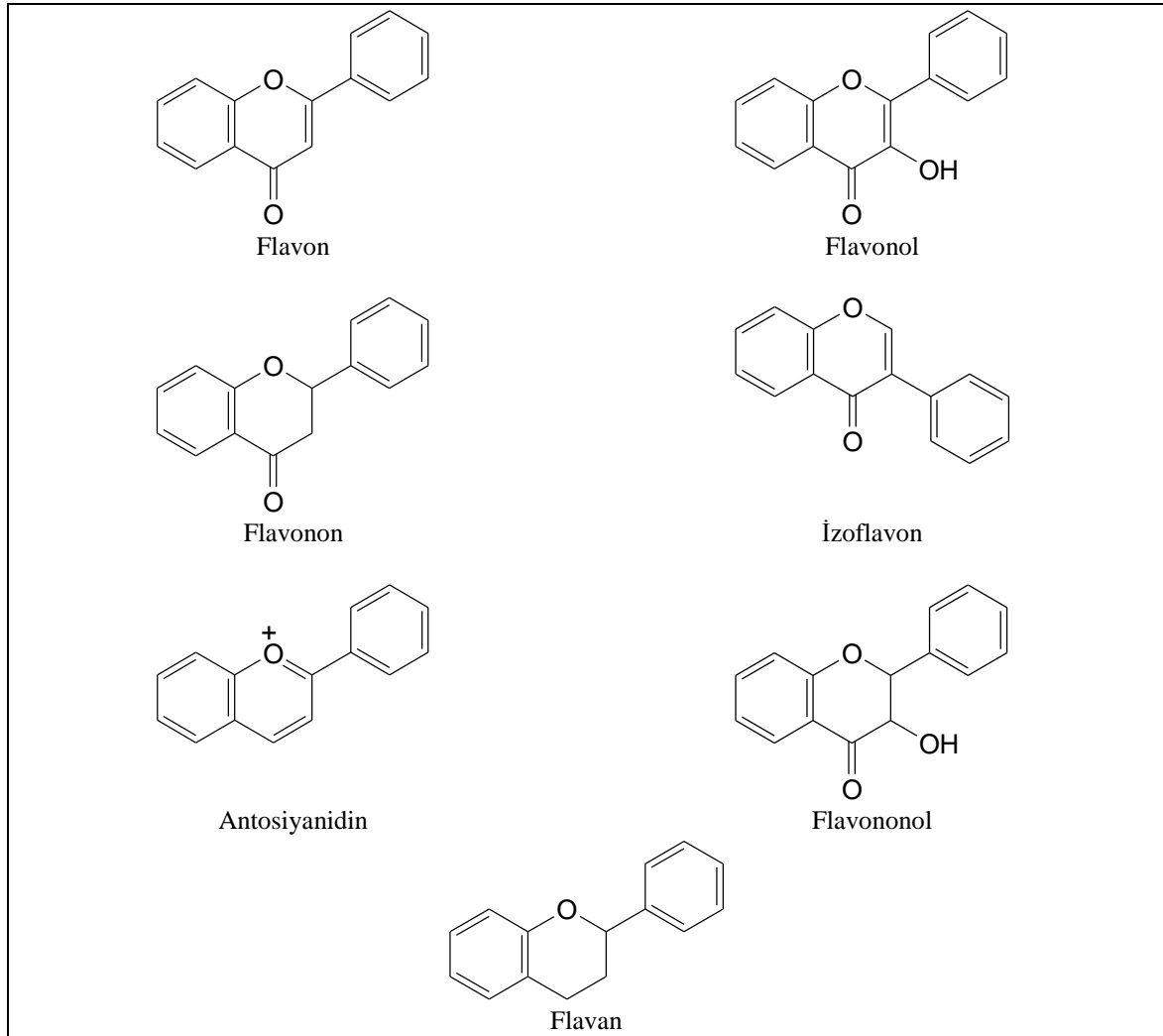


Şekil 1.4. Flavonoit bileşiklerinin genel yapısı ((A) Benzoil halkası ve Sinnaoil halkası (B))

Flavonoit bileşiklerinin şeker birimleri ihtiva eden türevleri flavon glikozitler olarak isimlendirilmektedir. Bu glikozit yapılar ise flavon-*C*-glikozit ve flavon-*O*-glikozit olarak ikiye ayrılırlar. Şeker birimi ihtiva etmeyen yapıları ise aglikon formdaki flavonoitler olarak isimlendirilirler. Tıbbi aromatik değeri olan pek çok bitkinin bünyesinde önemli oranda flavonoit bileşiklerinin aglikon formu veya glikozit formları mevcuttur. Glikozidik formdaki flavonoit bileşiklerinden *O*-glikozit formu asidik ortamda kolay bir şekilde hidroliz edilebilir iken *C*-glikozit formları genellikle hidroliz edilememektedir. Ayrıca glikozidik formları alkol ve suda kolaylıkla çözünebilirken bazı aglikon formları su ve alkolde kısmen çözünür hatta çözünmezler.

Flavonoitler bitki fitokimyasalları arasında çok geniş fenolik bileşik sınıfını temsil etmekte olup bu sınıflar içermiş oldukları fonksiyonel gruplara göre alt gruplara ayrılırlar. Flavonoit bileşiklerinin alt sınıflarının başlıcaları flavon, flavan, flavonol, flavonon, flavononol, izoflavon, biflavon, neoflavon, antosiyanin, proantosiyainidin, kalkon ve auron bileşikleri bu sınıfın üyeleridir (Şekil 1.5).

Flavon bileşiklerinin A halkasında 5 ve 7 pozisyonunda hidoksilasyon genellikle karakteristiktir. B halkasında ise genellikle 4', 3',4', veya 3',4',5' pozisyonlarının hidoksilasyonları karakteristiktir (Croft 1998).



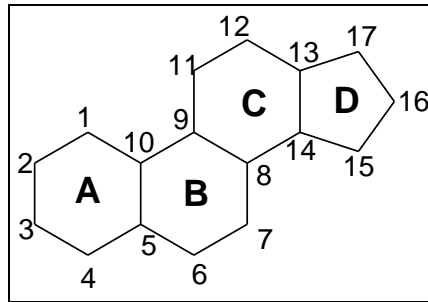
Şekil 1.5. Flavonoit bileşiklerin alt sınıflarının kimyasal yapıları

Flavonoit bileşikleri için farklı araştırmacılar tarafından antioksidan, antimikrobiyal, antiviral (Baek vd. 2000), antikanser (Caltagirone vd. 2000; Gao vd. 2006), etkilerinin yanı sıra şeker hastalığı, yaşlanma, kalp rahatsızlıkları, hemoroid, varis, kılcal damar hastalıkları, kemik erimesi (Hegarty vd. 2000), Parkinson ve alzheimer hastalığı (Youdim ve Joseph 2001) gibi pek çok hastalığın fizyolojik araştırmalarında olumlu sonuçları rapor edilmiştir.

1.1.3.3. Steroitler

Tetrasiklik triterpenlerin alt sınıfı olan Steroitlerin karbon iskeleti aşağıdaki şekilde gösterildiği gibi siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir (Şekil 1.6). Bitki ve

hayvanlarda yaygın olarak bulunan steroidler önemli biyolojik aktivitelere sahiptirler. Yüksek yapılı bitkilerde fitosterol, sitosterol, stigmasterol, kampesterol; maya ve mantarlarda ergosterol; deniz canlıları ve alglerde fukosterol gibi steroidler bulunur. İnsan ve memeli hayvanlarda en yaygın ve sağlığımız açısından önemli bir yere sahip olan steroid ise kolesterol olup, bunun yanı sıra mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları (kortizon), D2 vitamini (kalsiferol) ve cinsiyet hormonları (progesteron, östrojen, androjen, testosteron) steroid sınıfı bileşikleri oluşturmaktadır. (Hansen 2003).



Şekil 1.6. Steroitlerin genel karbon iskeleti

Bitkisel Steroitlerdeki fonksiyonel gruplardan hidroksil grubu C-3 pozisyonunda, çifte bağ C-5 pozisyonunda ve yan zincir dallanması ise genellikle C-17 pozisyonunda mevcuttur. C-3 pozisyonunda süstitüe olan hidroksil grubu halkadaki metil grupları ile dik açı yapmaları durumunda A ve B halkaları cis konumundadır. Bu konumdaki hidroksil grubu düzlemin üstündedir yani β şeklindedir. Diğer taraftan eğer hidroksil grubu metil gruplarına paralel ise A ve B halkaları trans konumda olup hidroksil grubu α şeklindedir. Steroitlerdeki yan zincir konformasyonu ise genellikle β şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle trans birleşirler (Cram ve Hammond 1964).

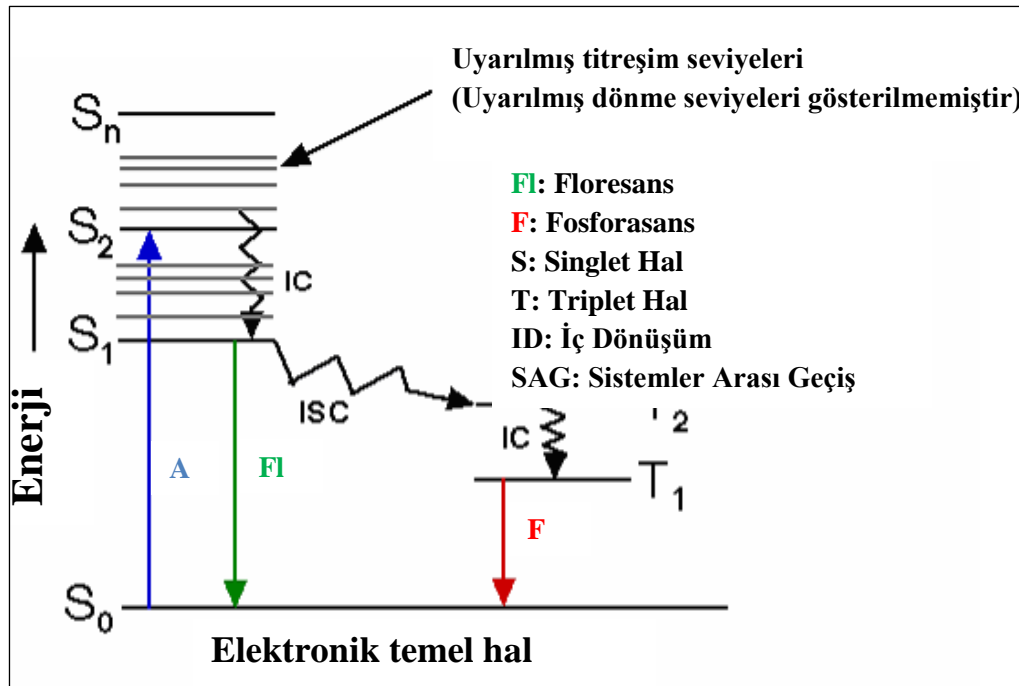
1.1.4. Floresans Spektroskopisi ve Floresans Maddeler

Floresans spektroskopisi biyokimya, çevre kimyası, klinik kimya, ilaç analizi, genetik analiz, biyomoleküler uygulamalar gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Floresans olayının teorik olarak açıklanması Jablonski diyagramı ile izah edilebilir (Şekil 1.7). Diyagramdan görüleceği gibi belirli bir dalga boyundaki ışının bir molekül tarafından absorpsiyonu sonucu, molekül temel enerji durumundan uyarılmış duruma geçer. Daha

sonra almış olduğu bu enerjiyi radyasyon (ışık ile) ya da radyasyonsuz olarak ortama aktararak tekrar kararlı durum olan temel duruma döner. Uyarılmış molekülün enerjisini ortama radyasyon olarak yayması olayına **Fotolüminesans** ya da **Lüminesans** denilmektedir. Lüminesans, uyarılmış halde bulunan molekülün ışıklı bir şekilde temel hale geçmesi molekülün enerji seviyesinin tipine göre iki şekilde olabilir: Floresans veya fosforesans.

Floresans: Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki bir singlet sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa **Floresans** denir.

Fosforesans: Uyarılmış bir triplet sistemden temel haldeki bir singlet sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa ise **Fosforesans** denir (Rendell ve Mowthorpe 1987).



Şekil 1.7. Jablonski diyagramı (Rendell 1987)

Floresan maddeler veya floroforlar, floresans spektroskopisi için önemli bir alan oluştururlar. Bir florofor molekülünün karakteristik iki spektrum kaydedilir:

- ✓ Uyarılma (eksitasyon) spektrumu (floresans dalga boyu sabit tutularak uyarılma dalga boylarının taranması).

- ✓ Floresans (emisyon) spektrumu (belli bir dalga boyunda uyarılma yapılarak emisyon şiddetinin dalga boyuna karşın taranması).

Protein-mikromolekül etkileşiminde birçok spektroskopik yöntem kullanılmaktadır. Florfor molekülünün çevresi bu molekülün floresans spektrumunu etkilemektedir. Şayet iki molekül etkileşirse florfor molekülünün çevresinde bir değişim meydana gelecek ve bu değişimde florfor molekülünün floresans spektrumunu etkileyecektir. Ayrıca proteinin üç boyutlu yapısında meydana gelen her hangi bir değişiklikte floresans spektrumunda değişikliğe neden olmaktadır. Bu yüzden floresan spektroskopisi protein-molekül etkileşmelerinde oldukça çok kullanılmaktadır. Bir proteinin florimetrik yöntemle çalışılabilmesi için floresans özelliğe sahip amino asit uç içermesi gerekir. Proteinlerin floresans ve absorpsiyon özellikleri üç aromatik amino asitten kaynaklanır. Bunlar fenilalanin, triptofan ve tirozin atığıdır. Serum albümin, vücutta bulunan birçok mikromolekül ile bağlanarak taşıyıcı, depolayıcı ve dağıtıcı olarak görev yapar. Albüminlerin floresans sönüm çalışmaları ile protein-mikromolekül etkileşimleri hakkında detaylı bilgiler açıklanabilmektedir.

1.1.5. Serum Albümin

Proteinler yapısal özelliklerine göre basit, bileşik ve türev proteinler olarak sınıflandırılırlar. Basit protein sınıflarından serum albümin proteinleri başta kan plazmasında olmak üzere doku sıvısı, kas, deri, gözyaşı, ter, mide suyu ve safrada bulunmaktadır. İnsan ve diğer memeli hayvanlarda önemli miktarlarda bulunmaktadır. Albümin proteinleri fizyolojik koşullarda biyomolekül ve iyonları taşıma görevini üstlenmişlerdir. En önemli işlevi ise kan ile doku sıvıları arasında suyun dengelenmesini sağlamaktır. Büyük proteinler kılcal damarlardan geçemedikleri için kandaki sıvıların sızma eğilimini dengelerler. Bu yüzden albümin, kılcal damarlardan dokulara su ve suda çözünür maddelerin geçmesine neden olan kolloid osmotik basıncı (onkotik basınç) düzenleyen başlıca proteindir. Osmotik basıncın %70'i albümin tarafından karşılanır, bu yüzden albümin damarların içiyle dışındaki dokular arasındaki sıvının dengelenmesinde gereklidir. Kan protein seviyelerinin düşmesi halinde, örneğin idrara protein geçme (proteinüri) veya kötü beslenmeden dolayı, dokularda su birikmesi, yani ödem oluşur. Serum albümini çeşitli ağır metal iyonlarına bağlanarak onların kandaki miktarını kontrol

eder. Albümin proteininde iki metal iyonu bağlanma yeri vardır ve bunlara çinko, bakır, kadmiyum, cıva, altın, gümüş ve nikel dâhil olmak üzere çeşitli iyonlar bağlanabilir. Kalsiyum ve magnezyum da albümine bağlandığından albümin bu iki iyonun kandaki miktarlarına etki edebilir. Albümin belirtilen iyonlar dışında hormonlar ve ilaçların etkin maddeleri ile bağ yapabilirler. Bu nedenle serum albüminler ile küçük moleküllerin bağlanma çalışmaları protein yapısı ve dinamiği, bağlanma mekanizmalarının aydınlatılması açısından ilgi çekicidir.

Albüminlerin floresans sönüm çalışmaları, serum albümin ile floresan ucun etkileşiminin incelenmesi açısından oldukça önemlidir (Bi vd. 2004; Shaikh vd. 2007; Akbay vd. 2010). Bu çalışmalar ile albümin floresansının sönümüne neden olan molekül ile bağlanma mekanizmaları açıklanabilir, yeni floresan uçların dizayn edilmesine de olanak sağlar.

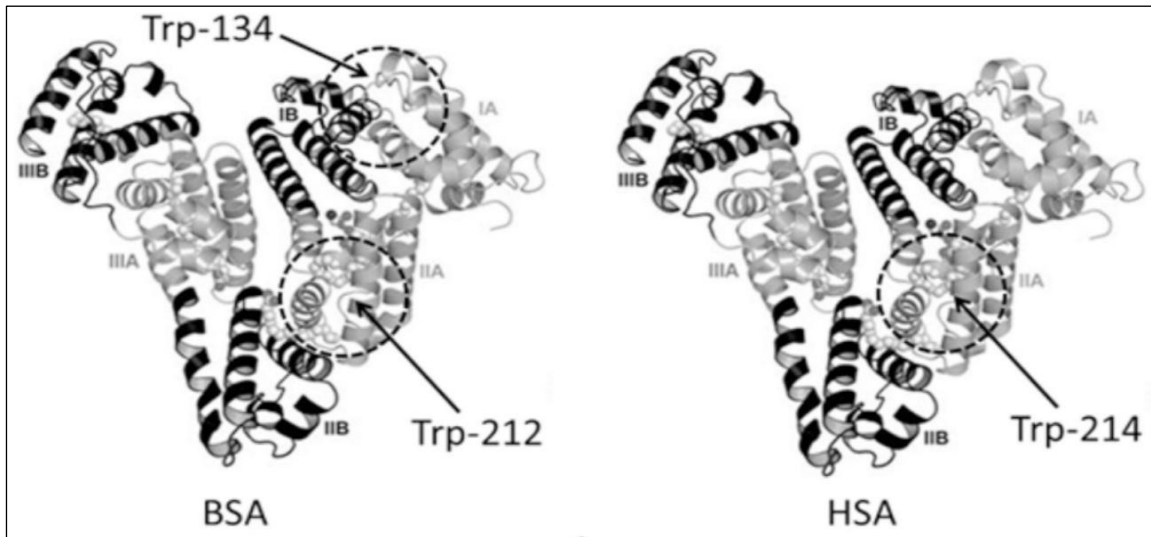
1.1.5.1. HSA (İnsan Serum Albümini)

HSA (insan serum albümin) proteini primer yapısının iyi bilinmesi nedeniyle en çok çalışılan proteinlerden biridir. Tersiyer yapısı X-ışını kristalografi ile tayin edilmiştir. Son yıllarda HSA'ya bağlı birçok ilacın yüksek ayırıcılı kristal yapıları incelenmiştir. Bu çalışmalar sadece proteinin üç boyutlu yapısını aydınlatmakla kalmayıp bileşik ya da iyonun proteine bağlanma uçlarının anatomisini derinlemesine ortaya koymuştur. HSA, 585 amino asit uçtan oluşan tekli polipeptit zincir içeren bir monomerdur. Küresel bir protein olduğu bilinen HSA, üç homolog α -heliks domaini (I, II ve III) içerir. Her domain de iki tane (A ve B) alt domaini (subdomain) içerir. Subdomain A altı, subdomain B dört α -heliksten oluşur. HSA, %67 α -heliks ve 17 disülfid bağları ile karakterize edilmiştir.

Yüksek karalılığa sahip olmasına rağmen, çevre faktörlerine (pH, iyonik kuvvet, çözücü ve viskozite gibi) duyarlı üç boyutlu yapısı ile esnek bir proteindir. Bu yapısal esneklik protein-ligand etkileşiminde önemli bir faktördür. Bu özelliği ile endojen ve ekzojen ligandların biyomakromoleküle bağlanma çalışmasında, HSA iyi bir model oluşturur (Wang vd. 2006; Hou vd. 2007). Moleküler seviyedeki bu tür reaksiyon mekanizma çalışmaları, ilaçların biyoyumumluluğu ve kullanımı üzerinde klinik bilgileri destekler.

1.1.5.2. BSA (Hayvan Serum Albümini)

BSA (Hayvan serum albümin) proteini *in vitro* koşullardaki molekül-protein çalışmalarında en çok çalışılan bir diğer model plazma proteindir (Wei vd. 2006; Li vd. 2007; Naik 2009;). Üç boyutlu yapısının HSA'ya (yaklaşık %76 oranında) benzediği bilinmektedir. Spektroskopik açıdan tek fark içerdikleri triptofan sayılarıdır. HSA'da tek triptofan (Trp-214) subdomain IIA'da; BSA'da ise iki triptofan uçtan biri (Trp-134) subdomain IA'da diğeri (Trp-212) subdomain IIA'da yer almaktadır (Şekil 1.8). Trp-134 molekülün yüzeyinde yer alırken, Trp-212 protein içindeki hidrofobik bağlanma cebinde yer alır (Zhou vd. 2007).



Şekil 1.8. BSA ve HSA'nın üç boyutlu yapıları (Moreira 2015)

1.1.6. İlaç Öncülleri ve Özellikleri

İlaç öncül madde terimi yani "Prodrug" ya da "Proagent" kavramları ilaçların fizikokimyasal özelliklerini, biyouyumluluklarını ve toksik etkilerini farmakolojik açıdan değiştiren kimyasal ajanlardır. İlaçla tedavi yöntemlerini geliştirmek ve tedavilerde karşılaşılan sorunların çözümü için pek çok öncül madde tasarlanmıştır (Albert 1958; Han 2000).

İlaç etken maddesinin vücut içerisinde hedef doku ve organlara taşınmasını optimize etmek için ilaç öncüllerinin tasarlanması oldukça önemlidir. Hastalıklarla tedavi

sürecinde birçok ilaç etken maddelerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeni ile hedef bölgeye ulaşmaması, kimyasal kararlılıklarının düşük olması, suda çözünmeme, toksik etkiye sebep olma ve dokularda birikim gibi durumlar farmakolojik açıdan kısıtlamalara sebebiyet vermektedir. Yukarıda bahsedilen kısıtlamaların önüne geçebilmek için ilaç öncü maddelerin protein ve enzim gibi makromoleküller ile kovalent konjugasyon ilişkilerinin ortaya konulması gerekmektedir. Klinik çalışmalar öncesinde gerçekleştirilecek olan makro moleküller ile ilaç öncüllerinin *in vitro* koşullardaki optimizasyon çalışmalarının yapılması elzemdir.

Bazı ilaç öncü maddeler hücre dışında aktivasyona uğrayarak sağlıklı hücre içerisine nüfuz edememektedir (Haisma vd. 1992; Greco ve Dachs 2001). Böyle hücre dışında aktivasyona uğrayan ilaç öncü maddelerin hücre içinde aktif olmaları için sağlıklı doku hücrelerine serbestçe difüze olmaları gerekmektedir. Bu da enzim substrat ilişkisi gereği ancak bir makro molekül ya da spesifik iyonlar aracılığı ile sağlanmaktadır.

İlaç öncü moleküllerin normal dokularda toksisiteye neden olmaması için sağlıklı dokunun enzimleri ile aktivasyona uğramamalıdır. Dokuya spesifik bir aktivite gözlemek için o dokunun enzimi ilaç öncülü ile birlikte dizayn edilmeli veya diğer dokularda aynı enzimden yüksek konsantrasyonda bulunması gerekmektedir. Bunlara ek olarak ilaç öncüllerinin fizyolojik koşullarda kimyasal yapısının bozulmaması arzu edilen özellikler arasındadır (Stella ve Himmelstein 1982; Han 2000; Xu ve McLeod 2001).

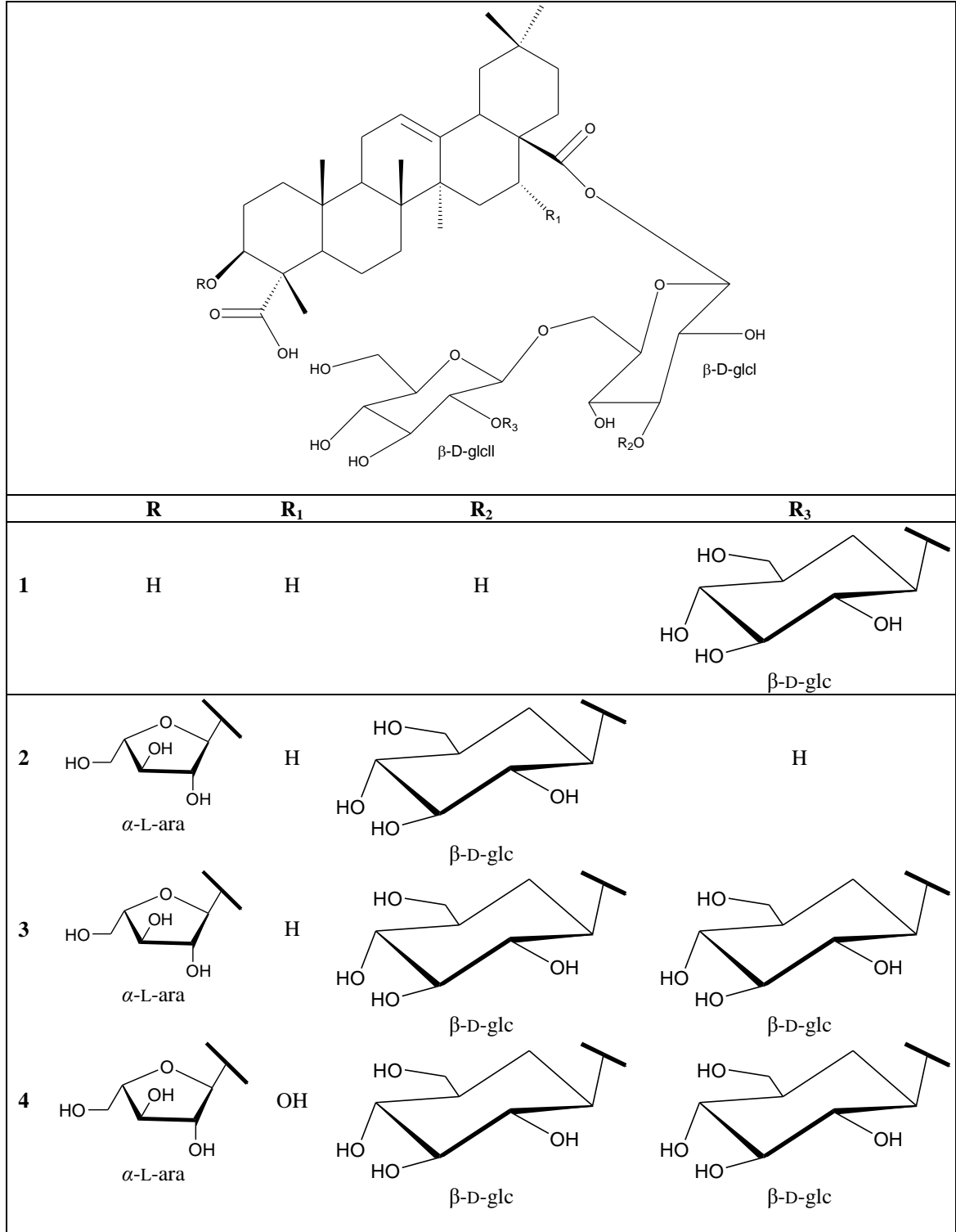
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *P. ortegioides* Taksonu Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

P. ortegioides taksonu monotipik ve endemik bir tür olduğu için üzerinde sınırlı sayıda çalışma vardır bunları da aşağıdaki şekilde özetlemek mümkündür.

Kılıç ve arkadaşları *P. ortegioides* türünün toprak üstü kısımlarının uçucu yağ bileşenlerini analiz etmişlerdir. GC-MS analiz sonuçlarına göre materyalin toprak üstü kısımlarından %90,9 verimle elde edilen uçucu yağ kompozisyonunda toplamda yirmi bileşen tanımlamışlardır. Ana bileşen olarak %26,6 germakren D, %19,1 borneol ve %9,2 bisiklogermakren bileşikleri belirlenmiştir (Kılıç vd. 2013).

Horo ve arkadaşları *P. ortegioides*'in metanolik ekstraktlarından yedi tane oleanane tipi saponin bileşikleri izole etmişlerdir. Bunlardan en önemli dört tanesi şekil 2.1'de gösterildiği gibi yeni oleanane tipi saponin bileşiklerdir (Horo vd. 2015).



Şekil 2.1. *P. ortegioides* türünden izole edilen yeni oleanane tipi saponin bileşikler (Horo vd. 2015)

Gecibesler ve arkadaşları *P. ortegioides* türünün toprak üstü kısımlarındaki lipofilik bileşenleri tanımlamışlardır. Kolon kromatografisi ile ayrılan toplam on yedi fraksiyon

içindeki majör yağ asitleri palmitik asit (%39,5), araşidik asit (%15,96), stearik asit (%13,35), linoleik asit (%9,86), oleik asit (%9,45), α -linoleik asit (%7,68) miyristik asit (%2,65) ve behenik asit (%1,55) olarak analiz edilmiştir (Gecibesler vd. 2016).

2.2. *P. ortegioides* Taksonu Üzerine Yapılan Biyolojik Aktivite Çalışmaları

Bitki kökenli doğal kaynaklardan izole edilerek bileşiklerin ve ekstrelerinin biyolojik aktiflikleri hakkında bilgi vermek o türün biyokullanılabilirlikleri açısından son derece önemlidir.

Horo ve arkadaşları *P. ortegioides*'in toprak üstü kısımlarından izole ettikleri yedi tane oleanane tipi saponin bileşiğın, antikanser aktivitesini A549 (insan akciğer adenokarsonomi), A375 (human melanoma tümörü) ve De Few (insan B lenfoma) kanser hücrelerine karşı antiproliferatif aktivitelerini araştırmışlardır İzole edilen dört yeni oleanane tipi saponin bileşiğın uyguladıkları konsantrasyonlarda önemli bir aktivite göstermediğini rapor etmişlerdir (Horo vd. 2015).

Gecibesler ve arkadaşları tarafından *P. ortegioides*'in toprak üstü kısımlarından elde ettikleri metanol:diklormetan ekstresinin ve bu ekstreden kaba ayırım sonucu izole ettikleri diklormetan, etil asetat ve bütanol fraksiyonlarının antioksidan aktivitelerini araştırmışlardır. En etkili fraksiyonun diklormetan fraksiyonu olduğunu ve diğer fraksiyonlarında önemli derecede antioksidan aktivite gösterdiğini rapor etmişlerdir. Etkili fraksiyon içerisindeki lipofilik bileşiklerin alt fraksiyonlara ayırarak bunların da kendi aralarındaki antioksidan aktivitelerini mukayeseli bir şekilde ortaya koymuşlardır. Özellikle diklormetan fraksiyonu yüksek antioksidan aktivite göstermiştir (Gecibesler vd. 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışmada gerçekleştirilen, bitki örneklerinin ekstraksiyonu, test numunelerinin hazırlanması, fraksiyonlandırma, ayırma, saflaştırma işlemleri Bingöl Üniversitesi Kimya Bölümü Organik Kimya Araştırma Laboratuvarında yapıldı. Biyolojik aktivite testleri ise Bingöl Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Saflaştırılan bileşiklerin kimyasal yapı karakterizasyonu ise Çankırı Karatekin Üniversitesi ve Bingöl Üniversitesi Kimya Bölümü Araştırma Laboratuvarlarında yapıldı.

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

3.1.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

Serik Sülfat Belirteci $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich)

Kolon Dolgu Maddeleri:

Silika jel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck)

Silika jel GF₂₅₄ (Merck)

Etanol, *n*-bütanol, kloroform, hekzan, etil asetat, metanol, metilen klorür gibi teknik çözücüler literatürde belirtilen yöntemlere göre destile edildikten sonra NMR ve GC-MS yöntemleri ile saflıklarını kontrol edilerek kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

^{13}C -NMR	: Agilent 125 MHz Spektrometre
^1H -NMR	: Agilent 600 MHz Spektrometre
Buzdolabı	: 4°C, Arçelik
Dairesel sallayıcı	: Gerhardt
Değişik cam malzemeler	: Farklı markalarda
Derin dondurucu	: -86°C, Hettich/ Nuaire
Desikatör	: Bitki özütleme işlemi için
Dispenser	: Isopenser
Döner buharlaştırıcı	: IKA
Erime Noktası	: Elektrotermal 9100
Etüv	: Memmert 100-800
FT/IR	: Perkin-Elmer
GC-MS	: Agilent
Hassas terazi	: Precisa/Denver
Hazır İTK plakaları	: Silica gel 60 F ₂₅₄
HPLC-TOF/MS	: Perkin-Elmer
Isıtmalı su banyosu	: Wise Clean
İnkubator CO ₂ Water-jacketed	: Nuaire US Autoflow
Laboratuvar tipi öğütücü	: 400W
Manyetik karıştırıcı	: IKA
Mikrobiyolojik emniyet kabini	: Bilser
Otomatik pipetler	: Rainin
pH metre	: Hanna
Saf su cihazı	: GFL 2004
Santrifüj	: Hettich Universal 320
Steril kabin	: Esco class II type A2
Ultrasonik banyo	: Wise Clean WUC-D06H
UV lambası	: Camag
UV-VIS Spektroskopisi	: Shimadzu/Jasco V650
Vakum pompası	:
Vorteks	: IKA MS3 Basic

3.2. Kullanılan Kimyasal Çözeltiler ve Hazırlanması

3.2.1. İzolasyon İşleminde Kullanılan Çözeltiler

Serik Sülfat Belirteci

12 g amonyum seryum sülfat dihidrat $(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich) 50 mL derişik sülfürik asit (H_2SO_4) ile çözüldü, hacmi saf su ile 500 mL'ye tamamlandı.

3.2.2. Biyolojik Aktivite Çalışmalarında Kullanılan Çözeltiler

HSA Çözeltisi

- 5 μM 'lık HSA çözeltisinin hazırlanması: 66,5 mg HSA alınarak, pH'sı 7,4 olan tampon çözelti ile hacmi 200 mL'ye tamamlandı.
- Fosfat Tamponu Çözeltisi: Sodyum hidroksit ve fosforik asit kullanılarak çözeltinin pH'sı 7,4'e ayarlandı.

3.2.3. Biyolojik aktivite için Örneklerin Hazırlanması

Her bir örneğin metanol içerisinde konsantrasyonu 1 mg/mL olacak şekilde hazırlanıp seyreltme işlemi bu stok çözelti kullanılarak fosfat tamponu ile yapıldı. Oluşan yeni çözeltiler 0,22 mikron'luk filtreler kullanılarak falkon (10 mL) tüplerine süzöldü ve +4°C'de muhafaza edildi.

3.3. Bitkisel Materyal

Bingöl İli Ortaköy Köyü ve çevresinde doğal habitatlarında 1000-2100 m yüksekliklerde step alanlarda yetişmekte olan *P. ortegioides* türü, temmuz-ağustos ayları 2013 tarihinde çiçeklenme dönemi takip edilerek araziden toplanmıştır. Türün doğal yetişme habitatı tahrip edilmeden toplamaya özen gösterildi. Bitkisel materyalinin tür teşhisi Bingöl Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Botanik Anabilim dalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Lütfi BEHÇET tarafından yapıldı. Bitkisel materyale ait örnek

BIN-7415 herbaryum numarası ile Bingöl Üniversitesi herbaryumunda depolandı. Araziden uygun bir biçimde toplanan *P. ortegioides*'in toprak üstü kısmı, baskısız kâğıt üzerine serilerek rutubetsiz ve gölgeli ortamda kurutuldu. Kurutulan bitkisel materyalin türünün toprak üstü kısmı laboratuvar tipi değirmende tanecik boyutu 3 cm geçmeyecek şekilde öğütülerek fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışmalarında kullanılmak için uygun hale getirildi.

3.4. Kullanılan Saflaştırma Metotları

3.4.1. Ekstraksiyon İşlemi

Kurutulmuş ve küçük parçalara ayrılmış bitkisel materyal bir desikatörde metanol: diklormetan (1:1; v/v) çözücü sisteminde, 3 gün aralıklarla maserasyon yöntemine göre ekstraksiyon işlemi gerçekleştirildi. Çözücüler döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı.

3.4.2. Fraksiyonlandırma İşlemi

Doğal sekonder metabolitlerin ekstre karışımından izolasyon işlemi hedef daraltmak için ucuz ve kolay bir teknik olan fraksiyonlandırma işleminden faydalanılmıştır. Bu işlem için çözücüsü uzaklaştırılmış metanol:diklormetan ekstresinin su içerisinde çözünmesi sağlandı. Çözünmüş olan sulu faz 2 L'lik ayırma hunisine alınarak ekstre karışımı apolardan polara doğru artan çözücü sistemi kullanılarak fraksiyonlandırma işlemine tabi tutuldu. Fraksiyonlandırma işlemi sırasında hekzan, kloroform, etil asetat, *n*-bütanol ve su kullanıldı. Her bir fraksiyon ayrı ayrı toplandı ve çözücüler döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı.

3.4.3. Vakum Kromatografisi

Vakum kromatografisi, genel anlamda kaba bir süzme işlemidir. Bitkiden elde edilen ham ekstraktlar silikajele emdirildi. Kolonda dolgu maddesi olarak düşük tanecik boyutlu silika jel kullanıldı. Düşük polariteli çözücü sistemlerinden başlanarak yüksek polariteli çözücü sistemleri ile süzme işlemi vakum altında yapıldı. Her bir fraksiyon ayrı ayrı toplanarak deriştirildi. Böylece ham bitki ekstraktından kaba bir ayırım sağlanmış oldu.

Kullanılan mobil fazın hacmi ve polaritesi ayrılmak istenen madde karışımına göre ayarlanabildi. Vakum kromatografisi, ham bitki ekstraktının fraksiyonlandırılmasında kullanıldı.

3.4.4. Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografi uygulamaları için farklı ebatlarda ve özellikle kolonlardan faydalanılmıştır. Fraksiyonlandırma işlemi sonucunda elde edilen hedef ekstredeki bileşenlerin ayrılması için kolon kromatografisi işlemi uygulandı. Kolon kromatografisi cam kolonlarda dolgu maddesini kuru yükleme/bulamaç yaparak gerçekleştirildi. Ekstre uygun bir çözücüde çözüldü ve ardından içine bir miktar silika jel eklendi. Ekstre içindeki çözücü döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılarak ekstrenin silika jel tarafından emilmesi sağlandı. Silikajel ve ekstrenin içinden çözücünün tamamen uzaklaştırılabilmesi için oda sıcaklığında bir gece bekletildi. Kolona ilk olarak silika jel dolduruldu ve bir hortum yardımıyla kolon çeperlerine yavaş yavaş vurularak silika jelin kolon içine iyice oturması sağlandı. Silikajelin kolon içindeki üst tabakası düzleştirildikten sonra toz silika jel ve ekstre karışımı kolona doldurulmuş oldu. Ekstre-silika jel karışımından oluşan tabakanın üst yüzeyi düzleştirildi ve bu tabakanın üzerine cam pamuk dikkatli bir şekilde yerleştirildi. Kolon kromatografisinde ayırımı yapılacak karışımlar önce ince tabaka kromatografisi ile incelendi. Buradan elde edilen sonuçlar doğrultusunda uygun çözücüler; sabit mobil faz veya gradient elüsyon yöntemleri ile kolon kromatografisinde kullanıldı.

3.4.5. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İnce tabaka kromatografisi işlemi için silika jel 60 F₂₅₄ adsorbantı ile kaplanmış hazır alüminyum plaklar kullanılmıştı. Numuneler kılcal boru yardımı ile plakanın alt ucundan 1 cm yukarıda ve 0,5 cm aralıklarla tatbik edilmişti. Kromatografi tankına yerleştirilen plakların uygun çözücü sistemi ile 7-10 cm kadar sürüklenmesi sağlandı. Plakalar üzerindeki bileşenlere ait spotların takibi 254 ve 366 nm dalga boylarında UV ışık altında yapıldı. Ayrıca spotların takibi için serik sülfat belirteci plakalar üzerine püskürtülerek 110-120°C'de 3-4 dk ısıtma işleminin ardından belirginleşen spot lekeleri değerlendirildi. Spotların yürüme hız değerleri (R_f) ve UV ışık altında aynı fiziksel

görünümüne sahip spotlar aynı maddeler olarak değerlendirildi. Bu çalışmada İTK uygulamaları kolon kromatografisi ile toplanan fraksiyonlardan aynı olanlarını birleştirmek için ve maddenin saflık değerini kalitatif olarak değerlendirmek için kullanıldı.

3.5. Biyolojik Aktivite Testi

3.5.1. Protein-Doğal Ürün Etkileşimi

Ekstrelerin ve izole edilen doğal sekonder metabolitlerin HSA'ya bağlanma özelliklerinin değerlendirilmesi için florimetrik ölçümler kullanıldı (Namiesnik vd. 2014). İki boyutlu (2D-FL) ve üç boyutlu (3D-FL) floresans ölçümleri 1 cm'lik kuartzlarda ve bir termostat banyosu ve dakikada 1000 nm tarama hızı ile uyarım ve emisyon aralıkları 5 nm'ye ayarlanarak alınmıştır. Floresans ölçümleri için 3 mL HSA çözeltisi (5 μ M) ve 150 μ L farklı konsantrasyonlarda (6,25-500 μ g/mL) hazırlanan her bir sekonder metabolit ile karıştırıldı. 2D-FL ölçümleri 285 ile 500 nm dalga boyu aralığında 280 nm'de uyarılarak kaydedilmiştir. 3D-FL spektral datalar aşağıdaki şartlar altında ölçülecek emisyon dalga boyu 220 ve 450 nm'de kaydedildi. Başlangıç uyarım dalga boyu 8 nm'lik artış ile 210 nm'ye ayarlandı. Diğer tarama parametreleri ise 2D-FL emisyon spektradaki aynı olarak ayarlandı. Protein etkileşimi için HSA protein çözeltisinin konsantrasyonu 5 μ M olacak şekilde pH'sı 7,4 fosfat tamponu içerisinde hazırlandı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Ekstraksiyon Verimi Bulguları

Metanol:diklormetan (1:1) çözücü sisteminde maserasyon yöntemine göre gerçekleştirilen ekstraksiyon işlemi neticesinde %7,945 verim ile 317,8 g kuru ekstrakt elde edilmiştir.

Ekstaksiyon verimi aşağıdaki denkleme göre hesaplanmıştır.

$$\%V = \frac{C}{M} \times 100 \quad (4.1)$$



Şekil 4.1. *P. ortegioides*'in toprak üstü kısımlarına uygulanan ekstraksiyon işlemi

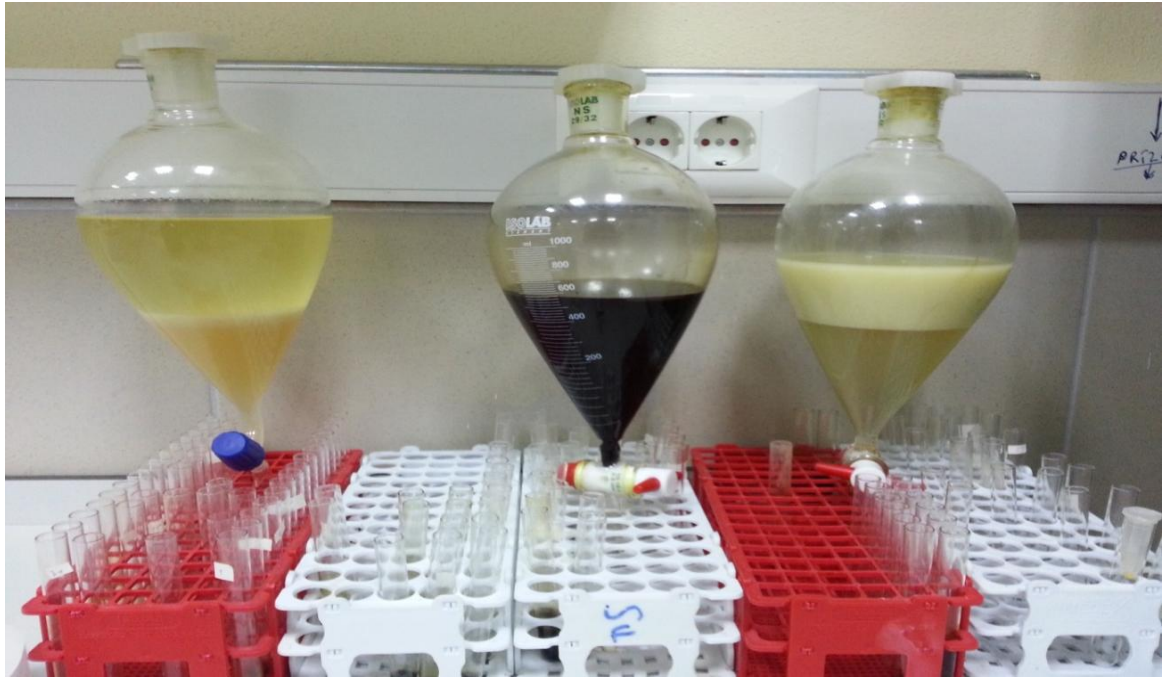
Denklemdede, verim (V), ekstraksiyon sonucu elde edilen ekstrakt miktarı (C), ekstraksiyon işlemi için alınan kuru bitki miktarı (M) olarak alınmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Metanol:diklormetan (1:1) çözücü sisteminde ekstraksiyon işlemi için kullanılan bitkisel materyal, harcanan çözücü miktarları ve elde edilen ekstrakt miktarı

Kuru bitki miktarı (kg)	Çözücü miktarı (L)	Kuru ekstrakt miktarı (g)	Verim (%)
4,00	100,00	317,8	7,945

4.2. Fraksiyonlandırma İşlemine Ait Bulgular

İzolasyon işlemlerini daha seçici ve anlaşılabilir kılmak için elde edilen ham kuru ekstreyi diklormetan, etilasetat ve *n*-bütanol gibi organik çözücüler kullanılarak polarite sırasına göre fraksiyonlandırma işlemi neticesinde farklı fizikokimyasal özelliklere sahip sekonder metabolit karışımlarını içeren ana fraksiyonlar elde edilmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. *P. ortegiodes*'den elde edilen metanol:diklormetan (v/v; 1:1) ham ekstresinin fraksiyonlandırma işlemi

Elde edilen ana fraksiyonlar için kullanılan çözücü miktarları, ana fraksiyon miktarları ve verimleri tabloda verilmiştir.

Tablo 4.2. Fraksiyonlandırma işleminde kullanılan organik çözücü miktarları ve fraksiyon verimleri

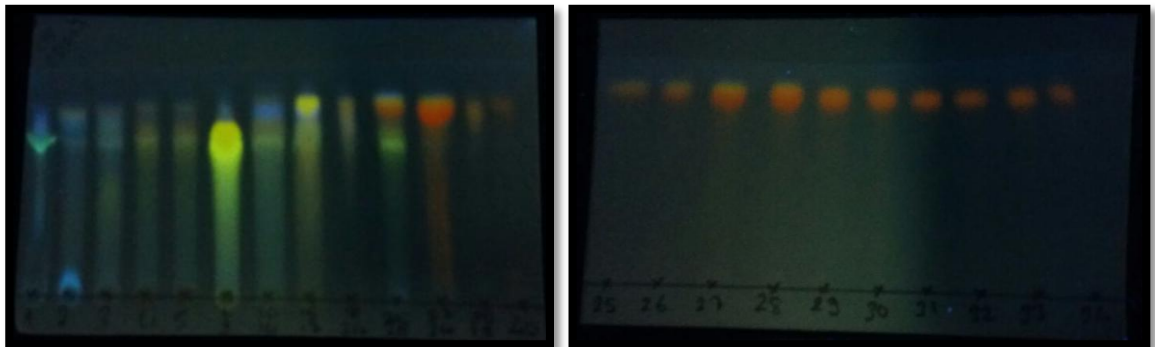
Fraksiyonlar	Çözücü Miktarı (L)	Kuru Fraksiyon miktarı	Verim (%)
Diklormetan fraksiyonu	9,6	227,8	76,49
<i>n</i> -butanol fraksiyonu	4,2	19,4	6,51
Etil asetat fraksiyonu	5,4	40,6	13,63
Su fraksiyonu	2,0	10,0	3,36



Şekil 4.3. Fraksiyonlandırma işlemi neticesinde elde edilen kuru fraksiyonlar

4.3. Diklormetan Fraksiyonuna Uygulanan Sütun Kromatografisine Ait Bulgular

Diklormetan fraksiyonu için gerçekleştirilen kolon kromatografisi işlemi neticesinde toplamda 211 tane fraksiyon elde edilmiştir. Bu fraksiyonlar içerisinde hedef bileşiklere ulaşmada hedef küçültmek için mevcut fraksiyonlar ince tabaka kromatografisi işlemine tabi tutularak birleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Kolon kromatografisinden alınan fraksiyonlara ait İTK kromatogramları

Diklormetan fraksiyonunun kromatografik çalışmaları için kullanılan çözücü türleri, hareketli faz olarak kullanılan çözücü oranları ve miktarları tabloda verilmiştir (Tablo 4.3).

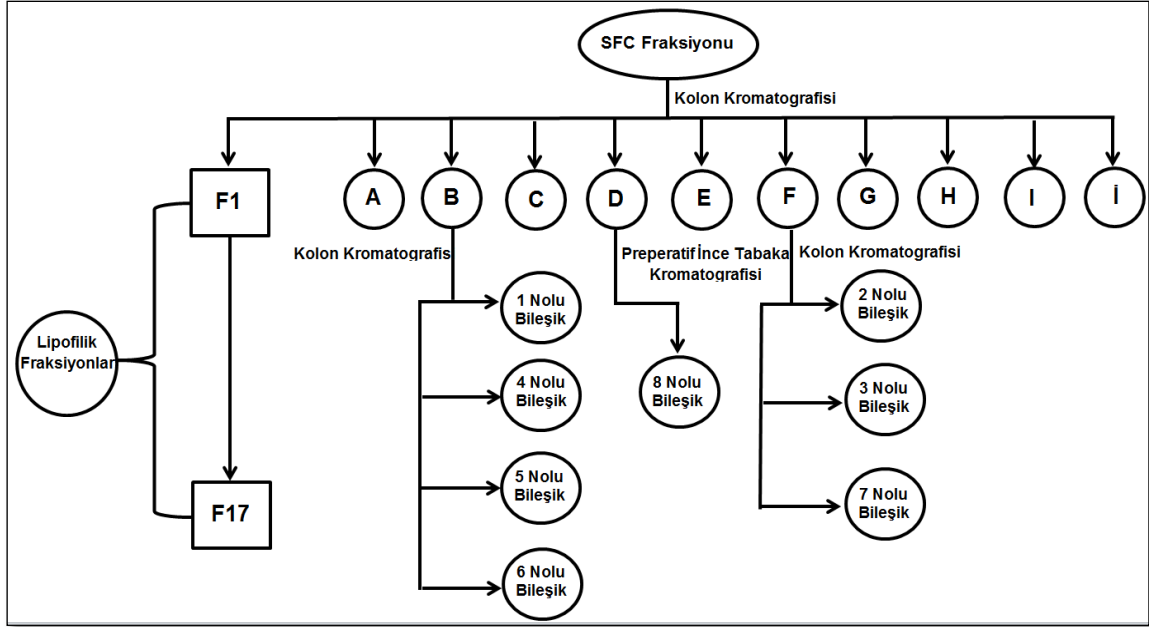
Tablo 4.3. Diklormetan fraksiyonunun kromatografik çalışmaları için kullanılan hareketli faz gradient oranları ve harcanan çözücü miktarları

Kullanılan hareketli faz	Hacimsel oran (v:v; L)	Çözücü miktarı (L)
Hekzan		18
Hekzan: Etil asetat	9:1	8
Hekzan: Etil asetat	8:2	9
Hekzan: Etil asetat	7:3	6
Hekzan: Etil asetat	6:4	8
Hekzan: Etil asetat	5:5	6
Hekzan: Etil asetat	4:6	5
Hekzan: Etil asetat	3:7	4
Hekzan: Etil asetat	2:8	3
Hekzan: Etil asetat	1:9	7
Etil asetat		24
Etil asetat: Metanol	9:1	9
Etil asetat: Metanol	8:2	11
Etil asetat: Metanol	7:3	8
Etil asetat: Metanol	6:4	6
Etil asetat: Metanol	5:5	8
Etil asetat: Metanol	4:6	4
Etil asetat: Metanol	3:7	5
Etil asetat: Metanol	2:8	6
Etil asetat: Metanol	1:9	14
Metanol		22

4.4. Sekonder Metabolitlerin Saflaştırılmasına Ait Bulgular

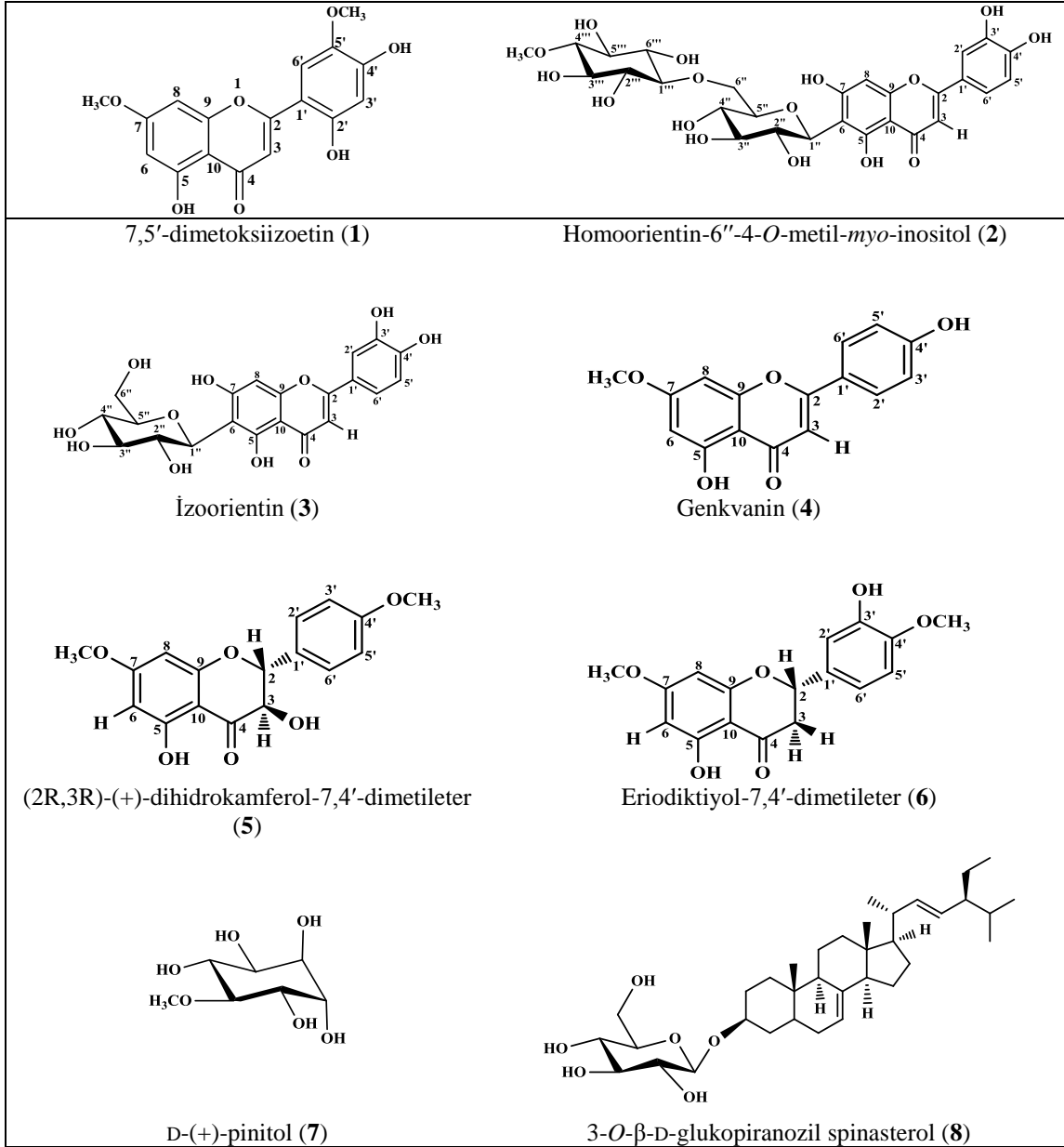
Diklormetan (SFC) fraksiyonundan elde edilen B kodlu fraksiyona kolon kromatografisi uygulanmıştır. Kolon kromatografisi için hareketli faz olarak apolardan polara doğru diklormetan:metanol gradienti uygulanmıştır. Kromatografik işlemler neticesinde 63 nolu fraksiyondan 7,5'-dimetoksiizoetin (17,3 mg, 1) bileşiği kristallendirilerek elde edilmiştir. 98 numaralı fraksiyondan genkvanin (28,7 mg, 4) bileşiği ve 131 numaralı fraksiyondan ise (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (13,8 mg, 5) bileşiği izole edilmiştir. Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter bileşiği ise 143 ve 176 numaralı fraksiyonlarda yoğun bir biçimde fakat karışım halinde gelmişti. Bundan dolayı bu fraksiyonlar birleştirilerek ufak bir kolon yapılmaya karar verildi. Bu işlem için 1x30 cm bir cam kolon ve silika jel dolgu maddesi kullanarak hacimce 7:2 oranındaki metanol:diklormetan çözücü sisteminde oluşan hareketli faz ile elüe edilmesi neticesinde 24 ve 56 numaralı

fraksiyonlardan kristallendirilerek eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (11,5 mg, 6) bileşiği elde edilmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. SFC fraksiyonundan bileşiklerin saflaştırılması için uygulanan işlem basamakları

F kodlu fraksiyondan silika jel kolon kromatografisi ile EtOAc:MeOH; 9:2 (v:v) sistemi ile başlayıp EtOAc:MeOH; 0:1, v/v çözücü sistemi kullanılarak homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (20,4 mg, 2), D-(+)-pinitol (123 mg, 7) ve izoorientin (54,5 mg, 3) bileşikleri izole edilmiştir. E kodlu fraksiyona ise 20x20 ebatların cam silika jel plaklar kullanılarak preparatif ince tabaka kromatografisi uygulanarak hacimce 2:7 oranında *n*-hekzan:EtOAc çözücü sisteminde yürütülerek 3-O-β-D-glukopiranozil spinasterol (14,1 mg, 8) bileşiği elde edilmiştir (Şekil 4.5).



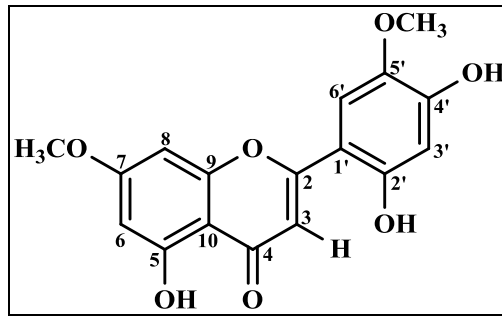
Şekil 4.6. *P. ortegoides* türünden izole edilen bileşiklerin kimyasal yapıları



Şekil 4.7. İzolasyon işleminde kullanılan kolon kromatografi standları

4.5. İzole Edilen Bileşiklerin Spektral Özellikleri

4.5.1. 7,5'-dimetoksiizoetin Bileşiği (1)



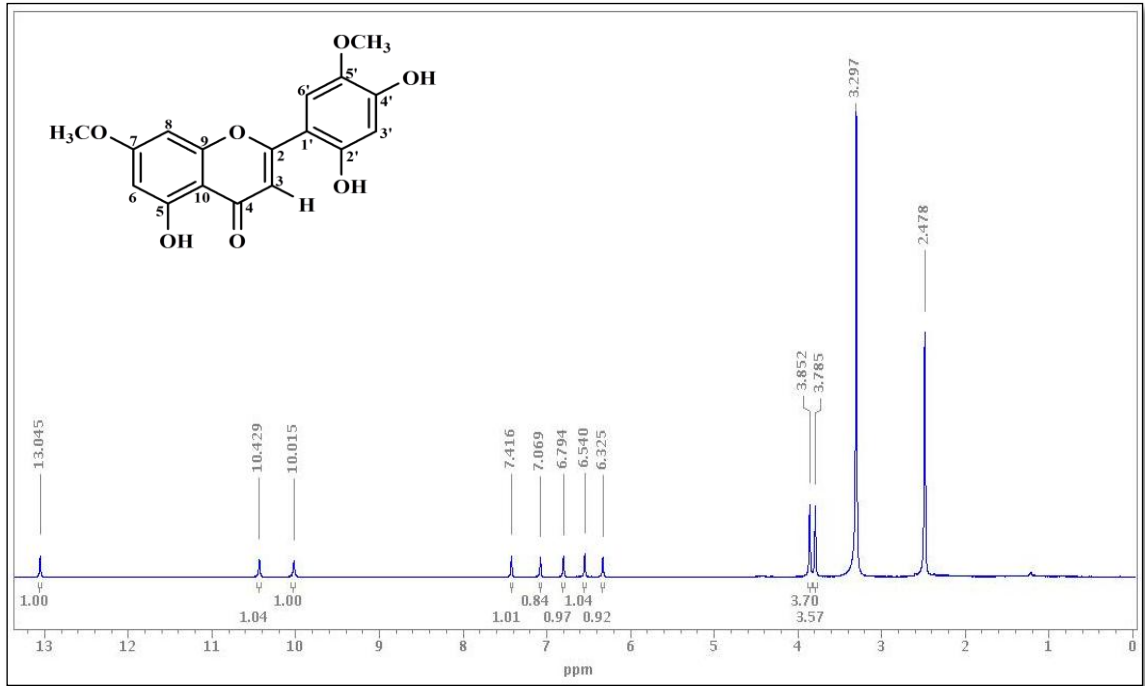
Şekil 4.8. 7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiğinin kimyasal yapısı

7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşiği turuncumsu renkte amorf görümlü olarak elde edildi. Bileşiğin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda toplamda on adet proton rezonansı gözlenmiş olup kimyasal kayma değerleri tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.4. 7,5'-dimetoksiizoetin bileşğinin ^1H ve ^{13}C -NMR kimyasal kayma değeri ve HMBC korelasyonları (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 125 MHz; DMSO- d_6)

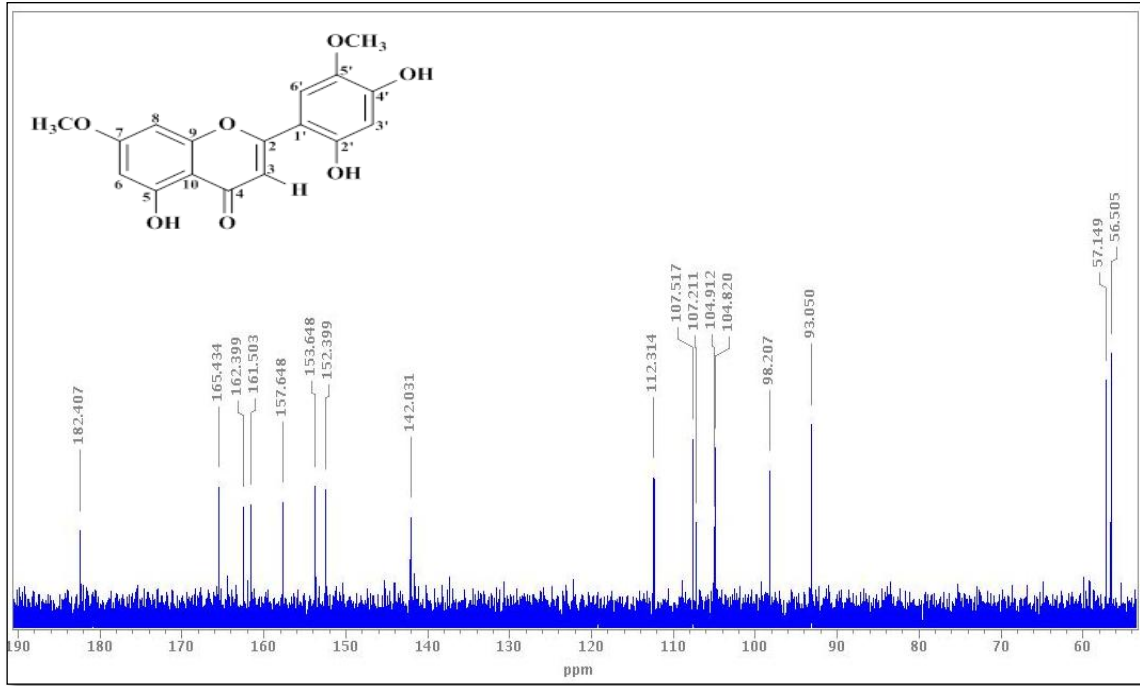
No	δ_{H} (J, Hz)	δ_{C}	HMBC (H→C)
2	-	162,39	H-3, H-2', H-5'
3	7,08 (s)	107,51	
4	-	182,40	H-3
5	13,04 (s, OH)	161,50	H-6, OH-5
6	6,32 (d, $J = 2,1$ Hz)	98,24	H-8, OH-5
7	-	165,42	H-8, H-6, OCH ₃ -5, OH-5
8	6,79 (d, $J = 2,1$ Hz)	93,05	H-6
9	-	157,64	H-8
10	-	104,91	H-3, H-6, H-8, OH-5
OCH ₃	3,85 (s)	56,50	
1'	-	107,21	H-3', H-6', H-3
2'	10,48 (s, OH)	153,64	H-3', H-6'
3'	6,53 (s)	104,82	
4'	10,05 (s, OH)	152,39	H-3', H-6'
5'	-	142,03	H-6', H-3'
6'	7,42 (s)	112,31	
OCH ₃	3,78 (s)	57,14	

7,5'-dimetoksiizoeatine ait ^1H -NMR spektrumunda iki aromatik dublet protonu H-6 ve H-8 pozisyonunda kimyasal kayma değerleri ile $\delta_{\text{H}}=6,32$ ppm (^1H , $J=2,1$ Hz) ve 6,79 ppm (^1H , $J=2,1$ Hz) rezonans olduğu belirlenmiştir. Bir flavon iskeleti aromatik halka protonları için karakteristik olan bu rezonanslara ek olarak flavon iskeletinin B halkasına ait singlet sinyalleri $\delta_{\text{H}}=7,42$ ppm (H-2', ^1H , s), 10,48 ppm (OH, s), 6,53 ppm (H-5', ^1H , s) ve 10,05 ppm (OH, s)'de rezonans oldukları tespit edilmiştir (Şekil 4.9).

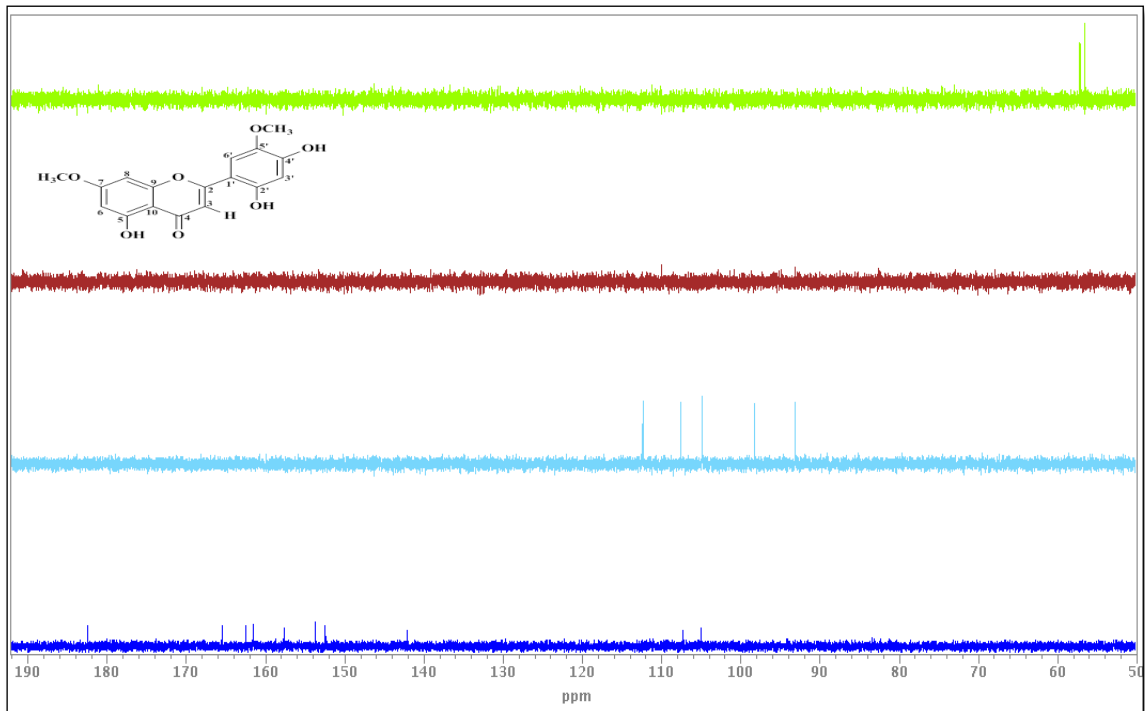


Şekil 4.9. 7,5'-dimetoksiizoeatin (^1H -NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

7,5'-dimetoksiizoeitin ^{13}C -NMR (Şekil 4.10) ve DEPT-NMR spektrumlarında (Şekil 4.11) iki metoksi beş metin ve on kuarterner karbon olmak üzere toplam 17 karbon atomu rezonansı tespit edilmiştir. Burada flavon iskeletine özel karbonil grubu ($-\text{C}=\text{O}$) $\delta_{\text{C}}=182,4$ ppm (C-4) de, ve iki metoksi grubu ($-\text{OCH}_3$) 56,50 ppm (7- OCH_3) ve 57,14 ppm (5'- OCH_3) de rezonans olmuştur.

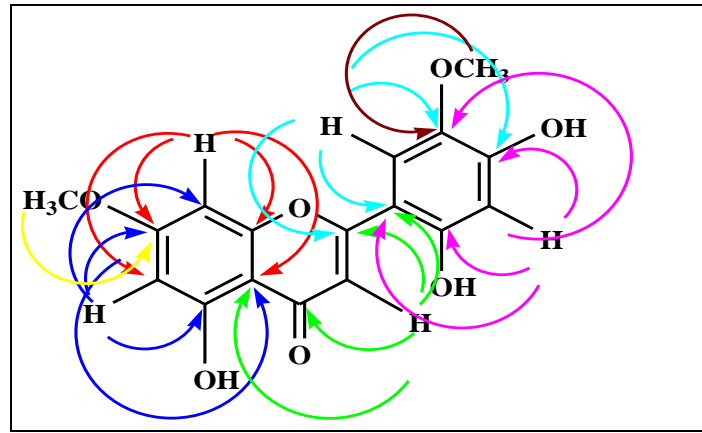


Şekil 4.10. 7,5'-dimetoksiizoeitin (1) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

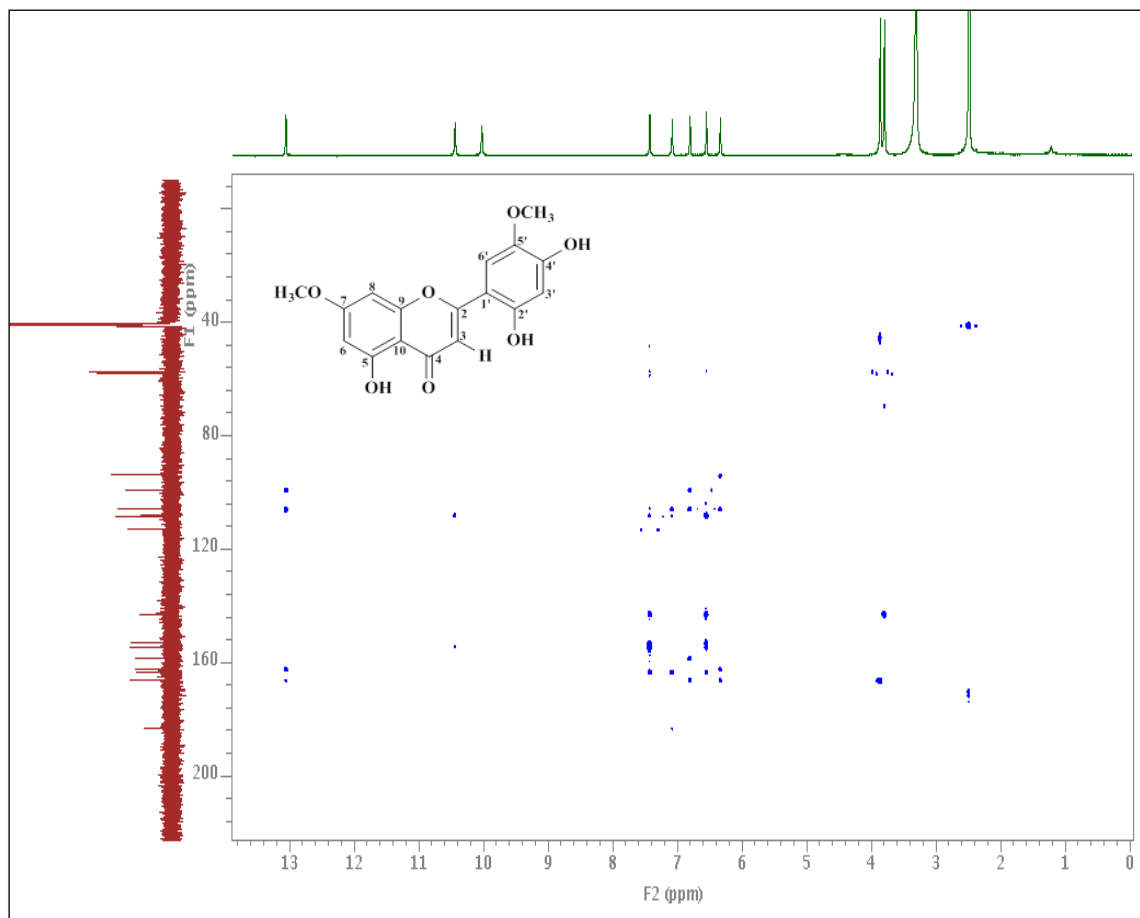


Şekil 4.11. 7,5'-dimetoksiisoeugenin (1) bileşiğinin ^{13}C -DEPT NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)

7,5'-dimetoksiizoeitin bileşiği için gHMBC-NMR spektrumunda hedef karbon atomunun en fazla dört bağ üzerinden gerçekleşebilen karbon-proton etkileşimleri gözlenmiştir. Spektrumdan belirlenen karbon proton uzak mesafe etkileşimleri şekil 4.11'de gösterilmiştir. A halkasındaki süstitüe grupların varlığı HMBC spektrumundaki H-6 pozisyonundaki protonun C-5 ($\delta_C=161,50$ ppm), C-7 ($\delta_C=165,42$ ppm) ve C-10 ($\delta_C=104,91$ ppm) karbonları ile H-8 pozisyonundaki protonun C-6 ($\delta_C=98,24$ ppm), C-7 ($\delta_C=165,42$ ppm), C-9 ($\delta_C=157,64$ ppm) ve C-10 ($\delta_C=104,91$ ppm) karbonları ile olan etkileşimleri ile doğrulandı. Şekil 4.11.'deki gibi B halkasındaki süstitüsyonlar ise H-2' pozisyonundaki protonun C-1' ($\delta_C=107,21$ ppm), C-3' ($\delta_C=104,82$ ppm) C-4' ($\delta_C=152,39$ ppm) ve C-2 ($\delta_C=162,39$ ppm) karbonları ile H-5' protonun C-4' ($\delta_C=152,39$ ppm) ve C-6' ($\delta_C=112,31$ ppm) karbonları ile olan etkileşimleri HMBC (Şekil 4.11.) spektrumundan doğrulanmıştır. Ayrıca C halkasındaki H-3 protonu C-4 ($\delta_C=182,40$ ppm), C-10 ($\delta_C=104,91$ ppm) C-1' ($\delta_C=107,21$ ppm) ve C-2 ($\delta_C=162,39$ ppm) karbonları ile olan etkileşimlerini HMBC spektrumunda görmek mümkündür (Şekil 4.12).

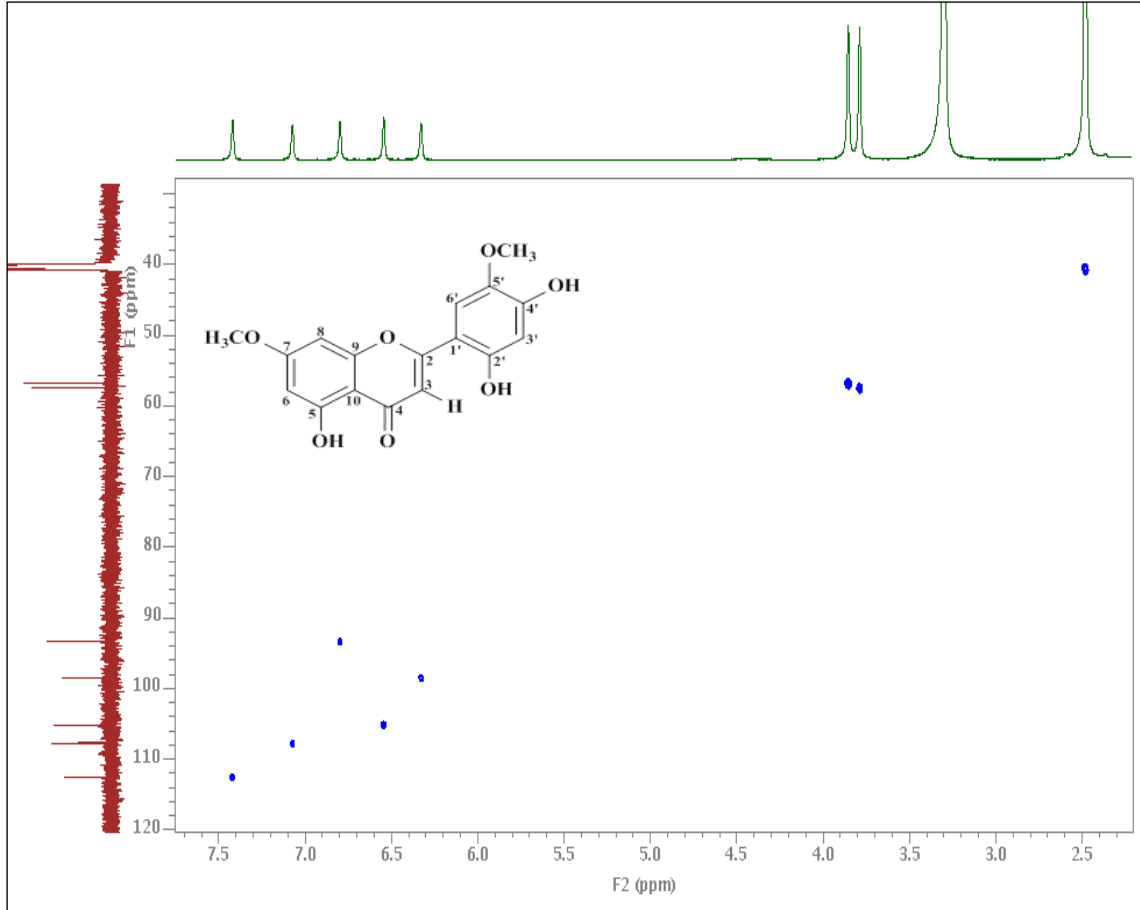


Şekil 4.12. 7,5'-dimetoksiizoeitin (1) bileşiğinin HMBC korelasyonları



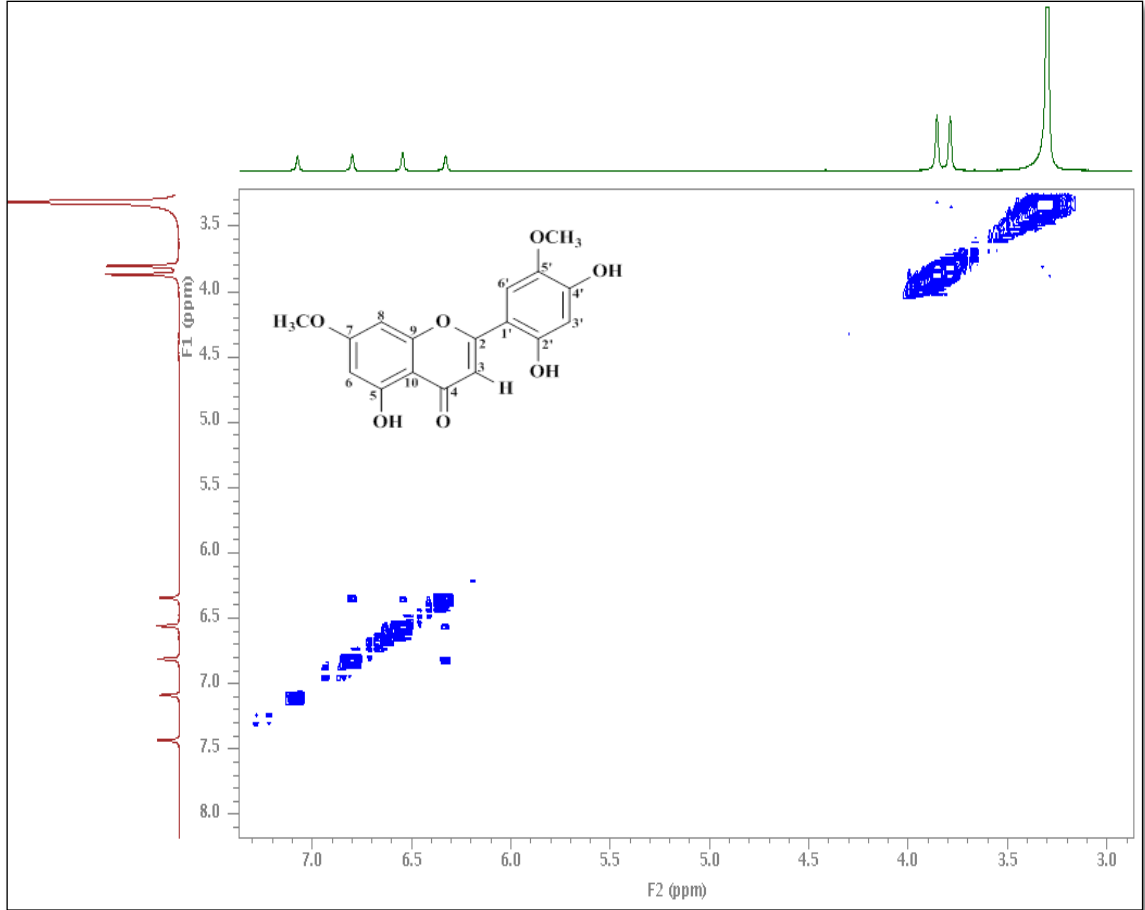
Şekil 4.13. 7,5'-dimetoksiisoeugenin (1) ^1H - ^{13}C -gHMBC-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)

Bileşğin ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR spektrumunda ilgili karbona ve proton etkileşimleri gözlenmiştir. Benzoil halkasındaki H-6' protonun (7,42 ppm) C-6' deki karbon (112,31 ppm) ve H-3' protonun (6,53 ppm) C-3' deki karbon (104,82 ppm) ile olan etkileşimlerini ^1H - ^{13}C -HSQC-NMR spektrumunda gözlenmiştir (Şekil 4.14)



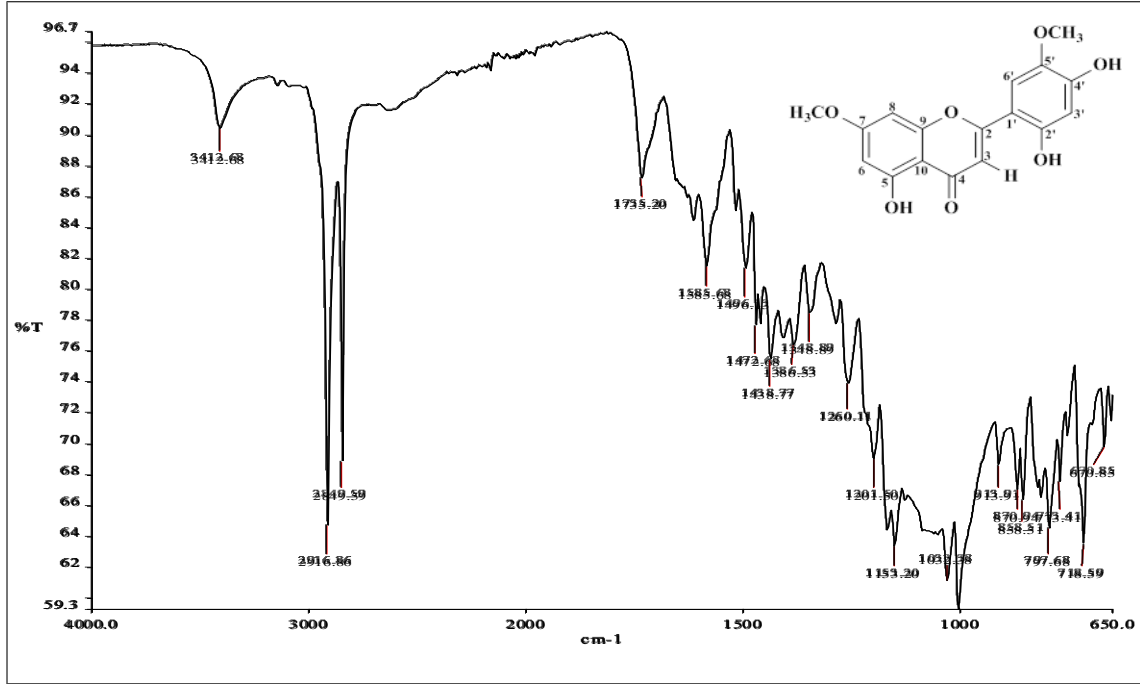
Şekil 4.14. 7,5'-dimetoksiizoetin (1) bileşğinin ^1H - ^{13}C -gHSQC-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

7,5'-dimetoksiizöetin (1) bileşimine ilişkin proton-proton etkileşimleri ^1H - ^1H -COSY-NMR spektrumunda şekil 4.15'de verildiği gibi gözlenmiştir.



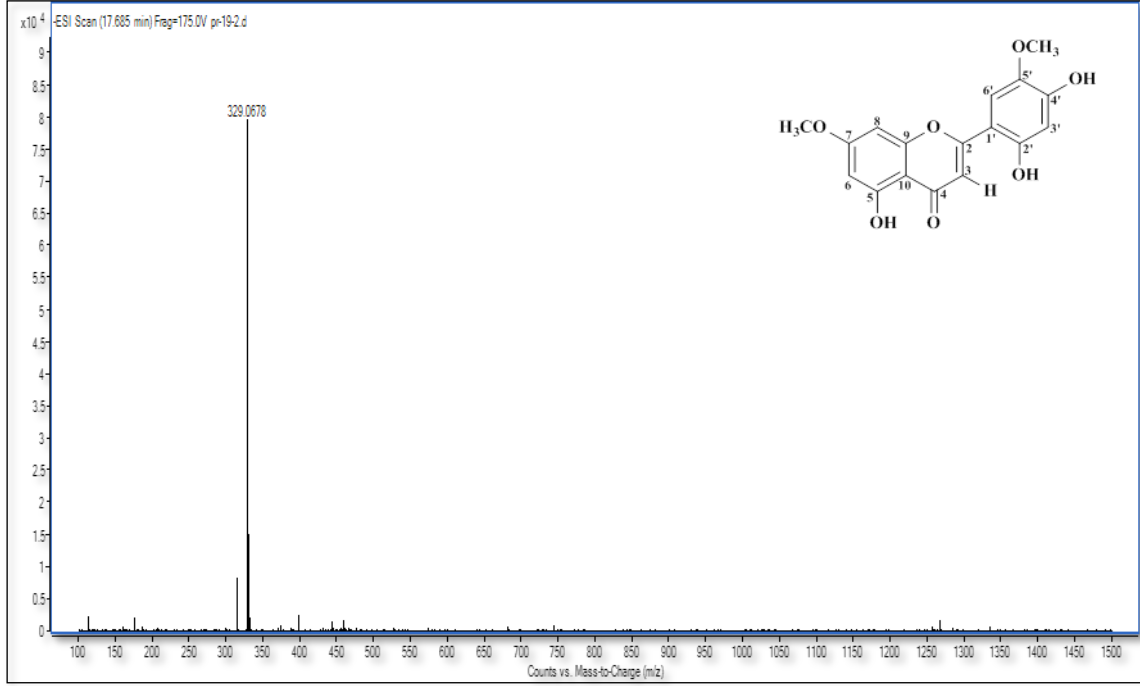
Şekil 4.15. 7,5'-dimetoksiizöetin (1) bileşiminin ^1H - ^1H -gCOSY-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

7,5'-dimetoksiizoeitinin FT-IR spektrumunda hidroksil grubu (3412 cm^{-1}), karbonil grubu (1735 cm^{-1}) ve olefinik gruplara (1153 cm^{-1}) fonksiyonel gruplara ait absorpsiyon bantları gözlemlendi (Şekil 4.16).



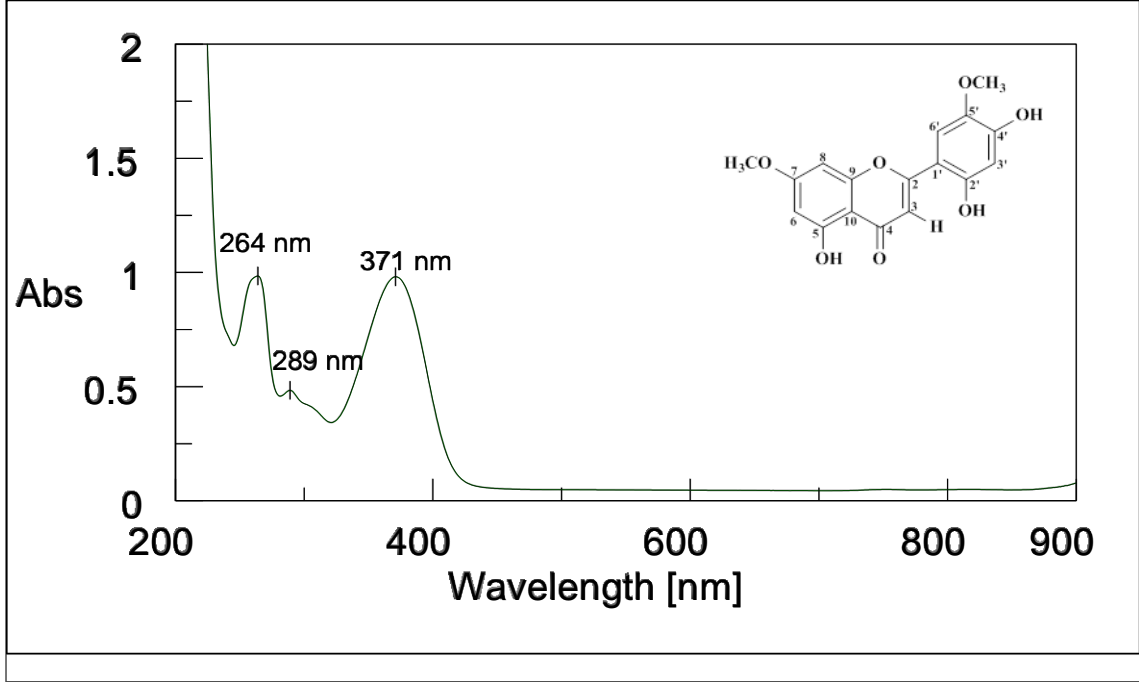
Şekil 4.16. 7,5'-dimetoksiizoeitin (1) bileşiğinin FT-IR spektrumu

Bileşiğe ait negatif HRESIMS spektrumundan moleküler iyon piki $[M-H]^-$ at m/z 329,0678 (hesaplanan 329,0667) olarak belirlendi ve bileşiği temsil eden formül ise $C_{17}H_{14}O_7$ şeklinde olduğu belirlendi (Şekil 4.17).



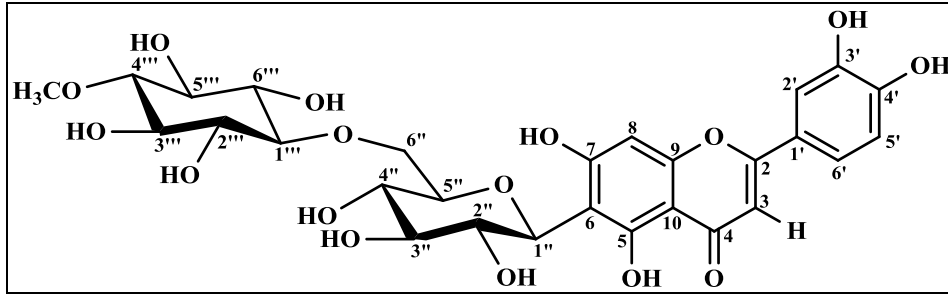
Şekil 4.17. 7,5'-dimetoksiisoeugenin (1) bileşiğininin HRESIMS kromatogramı

7,5'-dimetoksiizoeletin UV-VIS maksimum absorpsiyon bantları ise λ_{\max} (MeOH) 264, 289 ve 371 nm'de kaydedildi (Şekil 4.18). Bu absorpsiyon bantları bir flavon iskeleti için karakteristiktir.



Şekil 4.18. 7,5'-dimetoksiizoeletin (1) bileşiğinin UV-VIS spektrumu

4.5.2. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol Bileşiği (2)

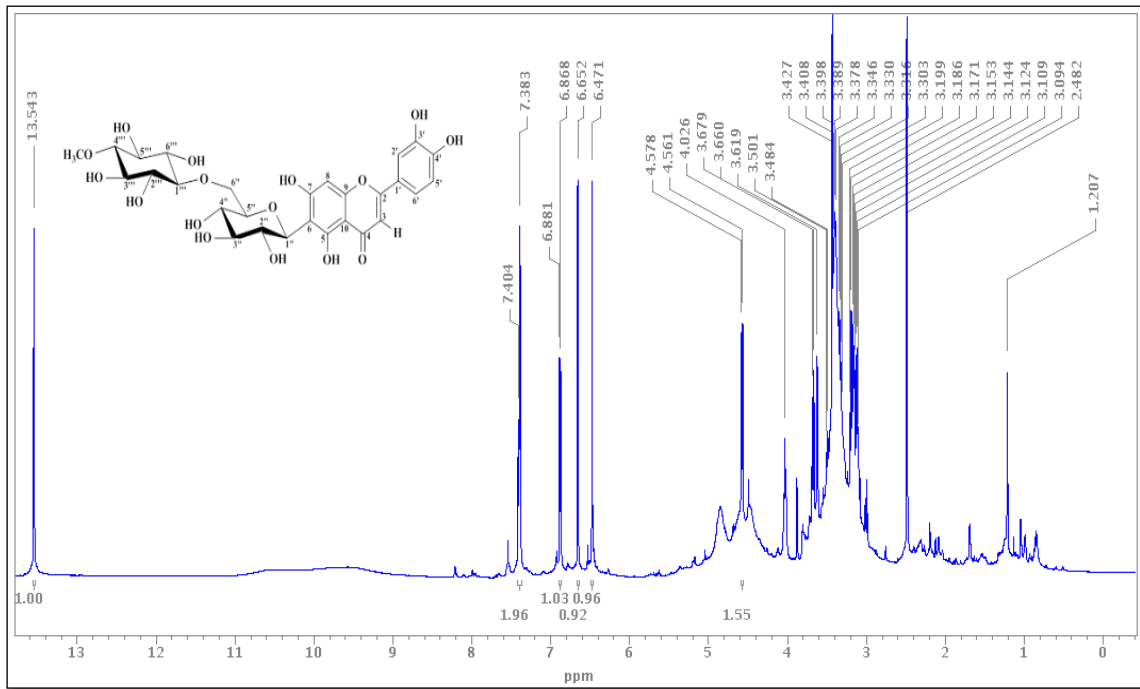


Şekil 4.19. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğinin kimyasal yapısı

Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol bileşiği açık sarı renkli katı olarak elde edildi. Bileşiğe ait proton spektrumu incelendiğinde flavonoit bileşiklerin karakteristik A ve B halkalarında bulunan fenolik protonların 6,65 (H-3), 6,46 (H-8), 7,37 (H-2'), 7,39 (H-5') ve 6,86 (H-6') ppm'de rezonans oldukları görülmektedir (Şekil 4.19). Bu protonlardan H-3, H-8 ve H-2' protonları singlet verirken, H-5' ve H-6' protonları dublet vermiştir (Şekil 4.20). 6 pozisyonundan substitüe olan glikoz grubunun protonları 3,10 (H-4'') ile 4,56 (H-1'') ppm aralığında gelirken, inositol grubunun protonları ise (H-4'') 2,98 ile (H-2'') 3,60 ppm aralığında rezonans olmuştur. Bileşiğe ait proton ve karbon atomlarının ayrıntılı kimyasal kayma değerleri ve karbon proton çekideği uzak mesafe etkileşimlerini gösteren ^{13}C - ^1H -HMBC korelasyonları tablo 4.5'de verilmiştir.

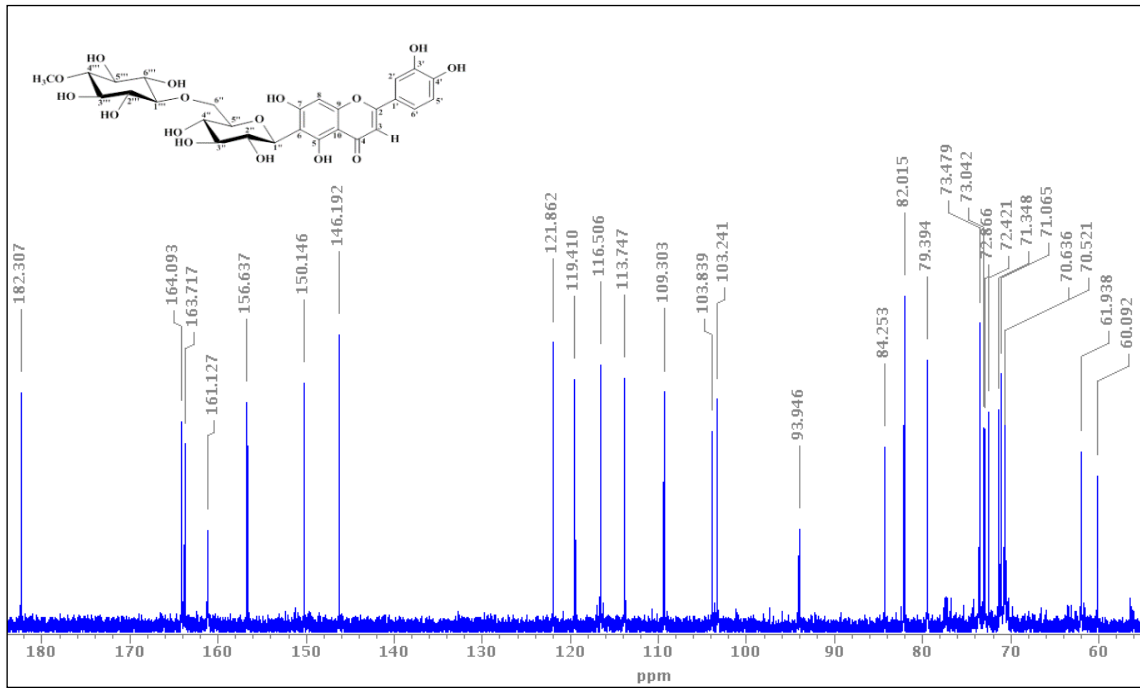
Tablo 4.5. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşğın ¹H ve ¹³C-NMR kimyasal kayma değerleri ve HMBC korelasyonları (¹H: 600 MHz; ¹³C: 125 MHz; DMSO-*d*₆)

No	δ_H (J, Hz)	δ_C	HMBC (H→C)
2	-	164,09	H-3, H-2', H-5'
3	6,65 (s)	103,23	
4	-	182,30	H-3
5	13,54 (s, OH)	161,12	H-1'', OH-5
6	-	109,30	H-8, H-1'', OH-5
7	-	163,71	H-8, H-1''
8	6,46 (s)	93,94	
9	-	156,63	H-8
10	-	103,91	H-3, H-8, OH-5
OCH ₃		-	
1'	-	121,86	H-3, H-2', H-6'
2'	7,37 (s)	113,66	H-5', H-6'
3'	-	146,19	H-2', H-5', H-6'
4'	-	150,14	H-2', H-5', H-6'
5'	7,39 (d, J = 8,0)	116,53	H-5', H-6'
6'	6,86 (d, J = 8,0)	119,40	H-5'
OCH ₃		-	
1''	4,56 (d, J = 9,6)	73,47	H-5, H-6, H-7, H-2'', H-3''
2''	4,02	70,63	H-1'', H-3''
3''	3,18	79,50	H-1'', H-4''
4''	3,10	71,14	
5''	3,14	71,05	H-3'', H-6'', H-1'''
6''	H _a -3,65, H _b -3,38	61,93	H-4'', H-5''
1'''	3,15 (d, J = 6,0)	82,01	
2'''	3,60	72,86	
3'''	3,32	73,04	
4'''	2,98	84,25	
OCH ₃	3,42 (s)	60,09	
5'''	3,49	70,52	
6'''	3,16	72,42	

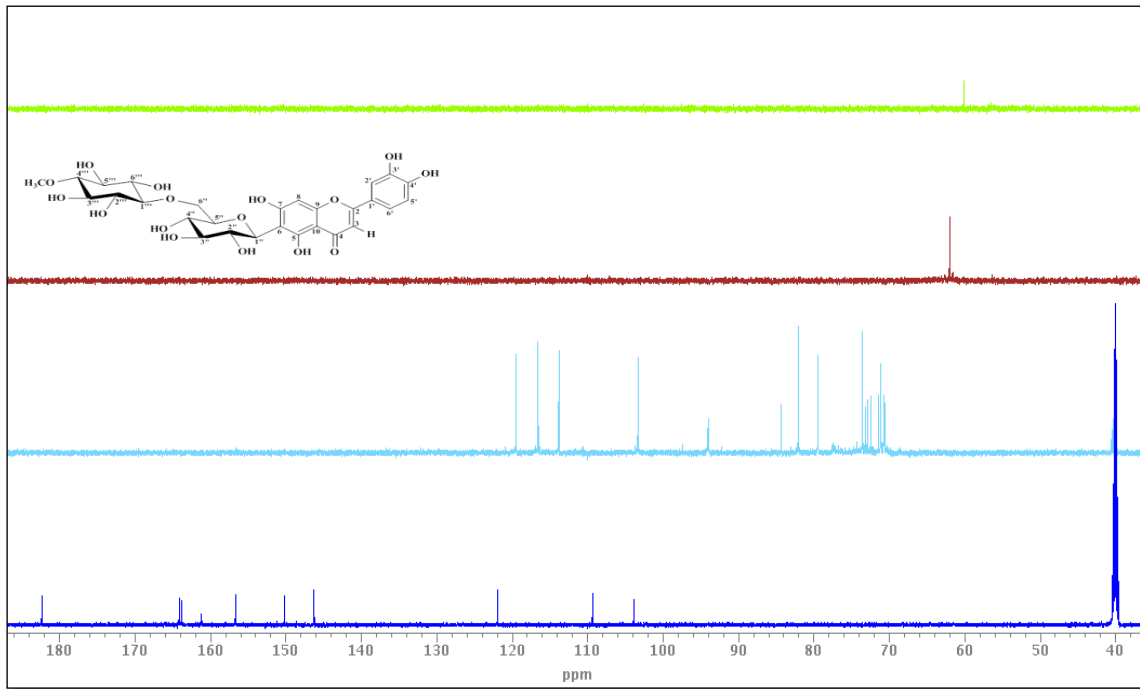


Şekil 4.20. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (¹H: 600 MHz; DMSO-*d*₆)

Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumunda toplam yirmi sekiz karbon atomu rezonansı gözlenmiştir. Bu karbonlardan bir flavon iskeleti için karakteristik olan karbonil grubunun $\delta_{\text{C}}=182,3$ ppm (C-4) de, ve hidroksil grubu ile süstitüe olmuş kuarternar karbon atomları 161,12 ppm (C-5), 163,71 (C-7), 146,2 (C-3') ve 150,1 (C-4') de rezonans oldukları gözlenmiştir (Şekil 4.21). Bileşikte metoksi grubun varlığı $\delta_{\text{C}}=60,09$ ppm'deki kimyasal kayma değeri ile doğrulanmıştır.

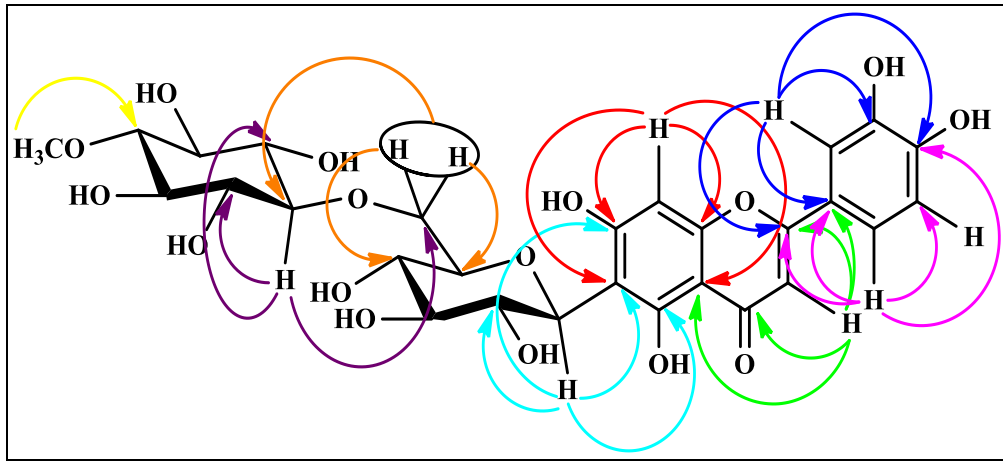


Şekil 4.21. Hemoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

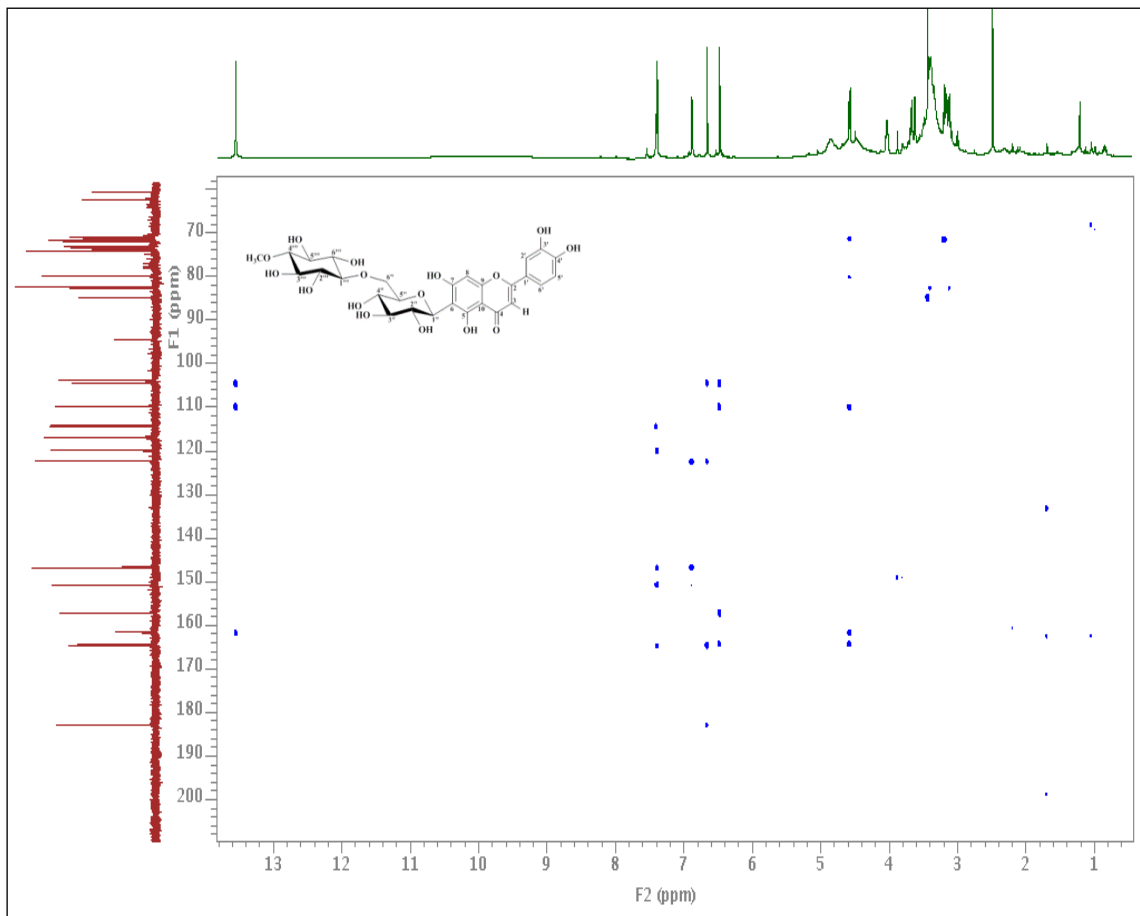


Şekil 4.22. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğinin ^{13}C -DEPT-NMR spektrumu (^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

Bileşiğin HMBC spektrumunda H-3 pozisyonundaki iki boyutlu spesifik rezonanslar $\delta_C=182,3$ ppm (C-4), 164,1 (C-2), 103,9 (C-10), ve 121,9 (C-1') karbonları ile gerçekleşen uzak mesafe etkileşimleri ile doğrulanmıştır. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğindeki başlıca HMBC etkileşimleri ilk olarak H-2' ($\delta_H=7,37$ ppm) protonunun C-2 ($\delta_C=164,1$ ppm), C-1' ($\delta_C=121,9$ ppm), C-2' ($\delta_C=113,7$ ppm) ve C-3' ($\delta_C=146,2$ ppm) karbonları ile etkileşimleri, ikinci olarak H-2' ($\delta_H=7,37$ ppm) protonunun C-2 ($\delta_C=164,1$ ppm), C-1' ($\delta_C=121,9$ ppm), C-2' ($\delta_C=113,66$ ppm) ve C-3' ($\delta_C=146,19$ ppm) karbonları ile olan etkileşimleri, üçüncü olarak H-1'' ($\delta_H=4,56$ ppm; d, $J=9,6$ Hz) protonunun C-2'' ($\delta_C=70,6$ ppm), C-5 ($\delta_C=161,1$ ppm), C-6 ($\delta_C=109,3$ ppm) ve C-7 ($\delta_C=163,7$ ppm) karbonları ile olan korelasyonları yapıda C-glikozit formunda bir glukopiranozil grubunun olduğunu göstermiştir. Son olarak H-1''' ($\delta_H=3,15$ ppm; d, $J=6,0$ Hz) protonunun C-2''' ($\delta_C=72,9$ ppm) ve C-6''' ($\delta_C=72,4$ ppm) karbonları ile olan korelasyonlar flavon C-glikozit yapısındaki glikoz birimine ikinci bir grubun bağlı olduğu fikrini verdi. HMBC spektrumundaki -CH₃O ($\delta_H=3,42$ ppm) grubu ile C-4''' ($\delta_C=84,2$ ppm) karbonu arasında gerçekleşen diğer bir korelasyon ise metoksi grubunun C-4''' pozisyonundaki karbona bağlı olduğunu teyit etmemize yardımcı oldu (Şekil 4.23).

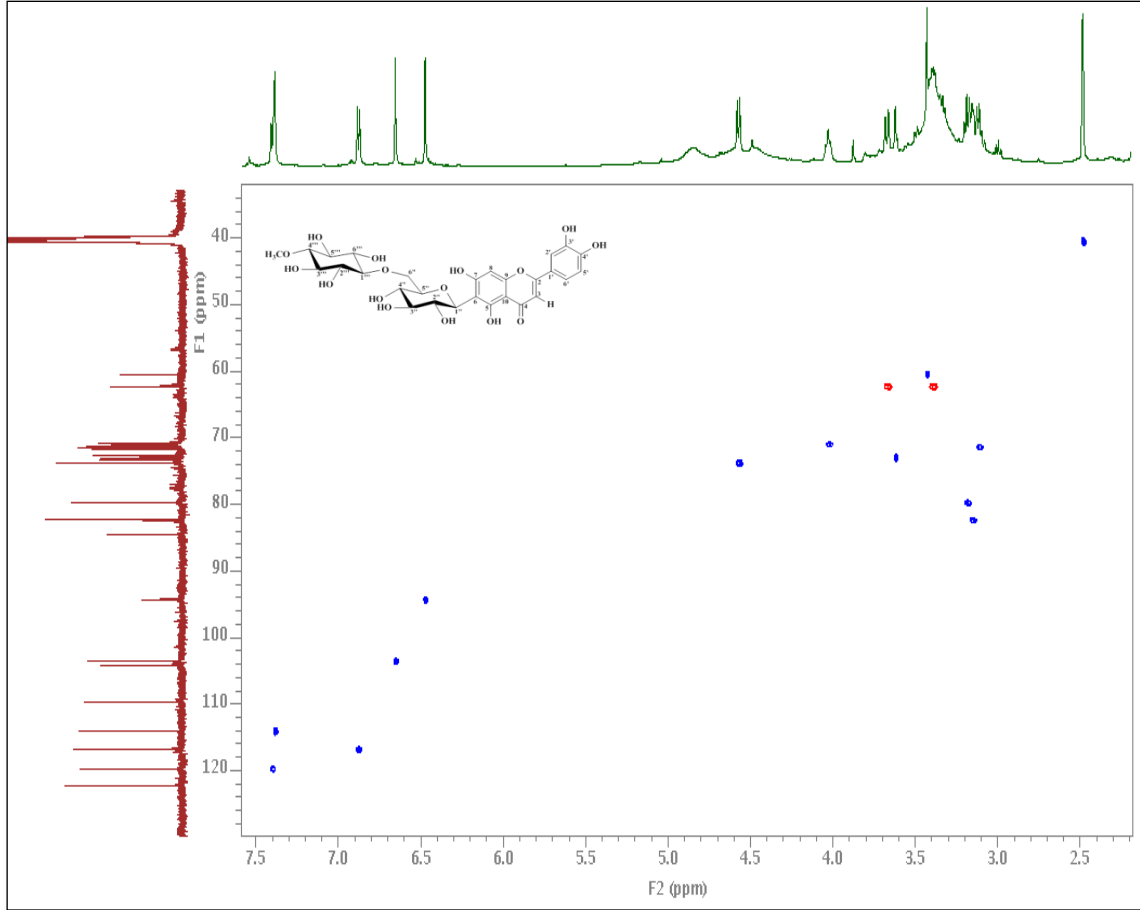


Şekil 4.23. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğinin HMBC korelasyonları



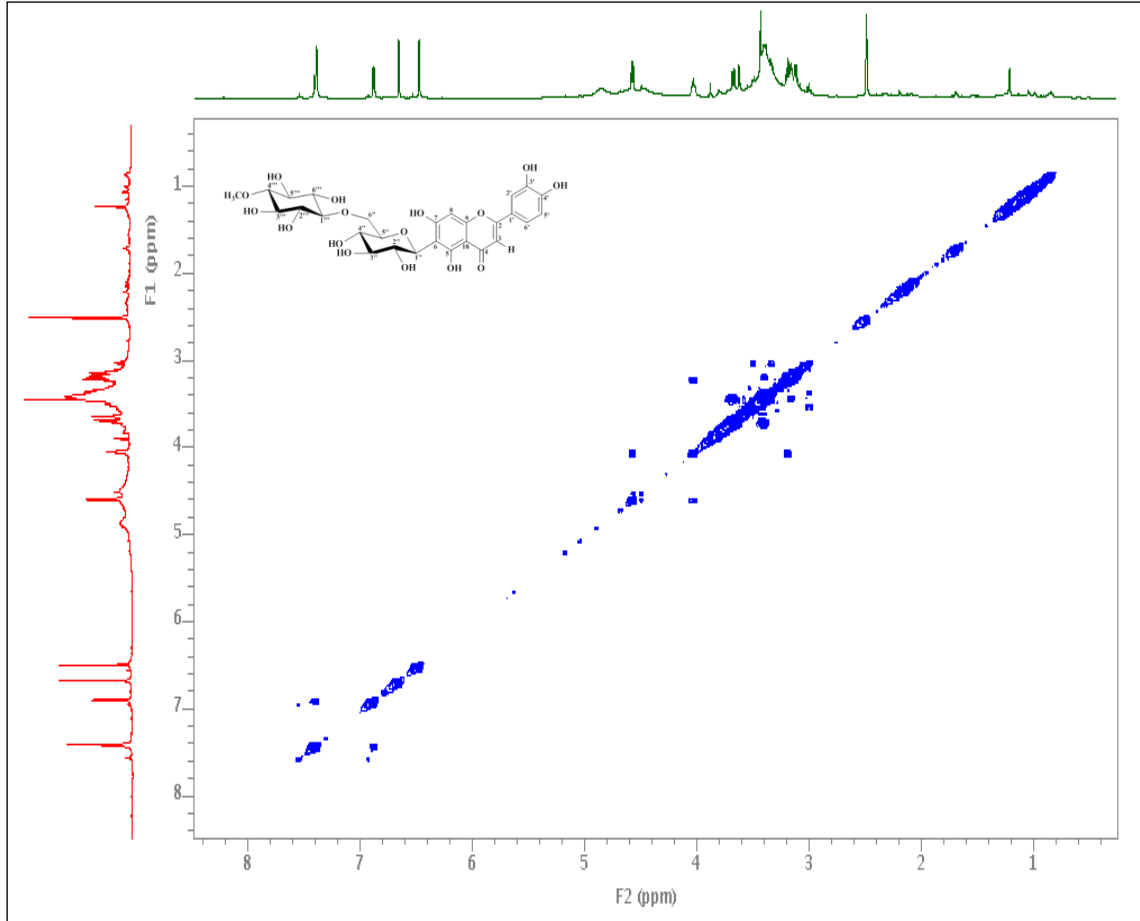
Şekil 4.24. Homorientin-6''-4-O-metil-myo-inositol (2) bileşiğinin ^1H - ^{13}C -gHMBC-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

Ayrıca H-3 pozisyonundaki protonun C-3 karbonu ile heteronükleer single kuantum korelasyonu (HSQC) $\delta_C=103,23$ ppm'deki kimyasal kayma değeri ile HSQC spektrumundan doğrulanmıştır. HSQC spektrumundaki ^1H - ^{13}C korelasyonları metin ve metilen gruplarından kaynaklanan bütün rezonansları ayırt etmemize yardımcı oldu (Şekil 4.25).



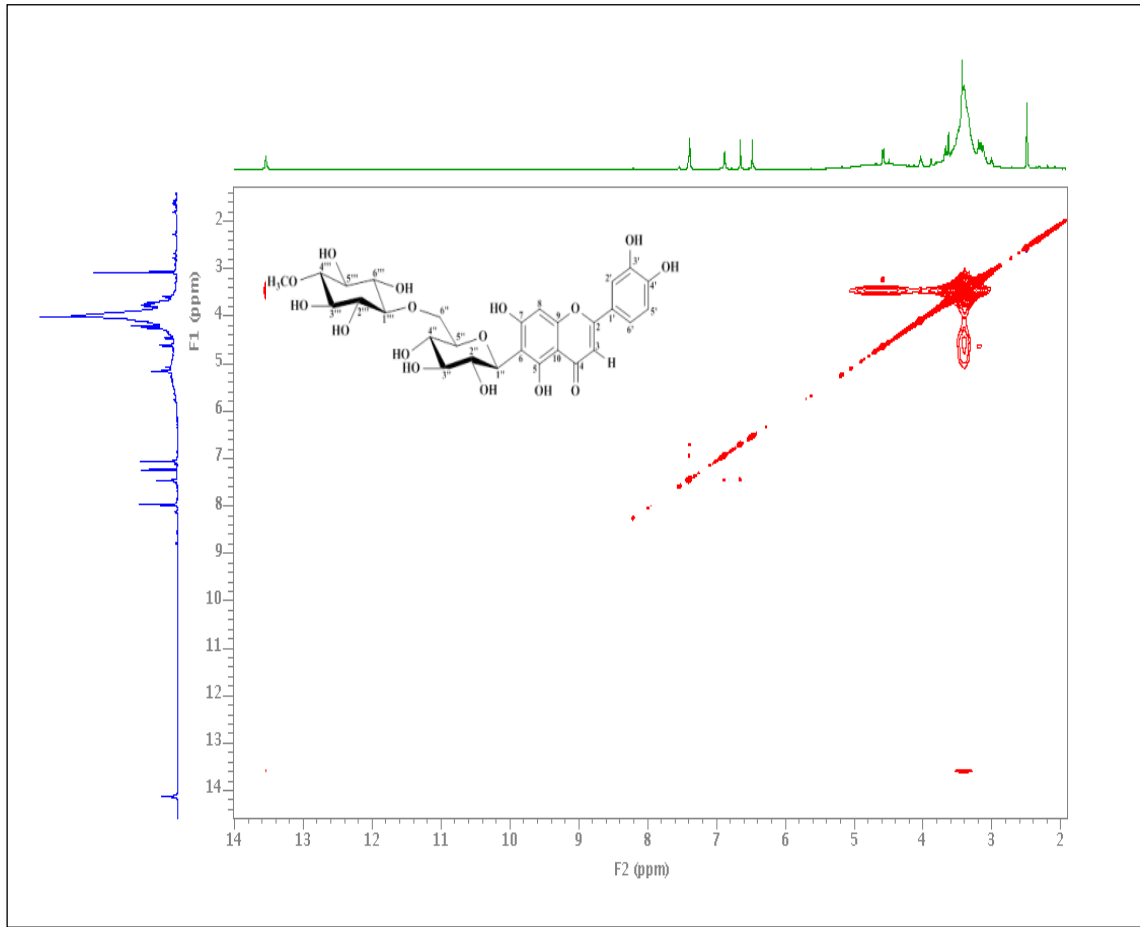
Şekil 4.25. Homoorientin-6''-4-O-metil-myoinositol (2) bileşiğinin ^1H - ^{13}C -gHSQC-NMR spektrumu (^1H :600 MHz; ^{13}C : 125 MHz DMSO- d_6)

Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol bileşigindeki bütün iki boyutlu ^1H - ^1H etkileşimleri ^1H - ^1H -COSY-NMR spektrumu ile takip edildi ve bu spektrum özellikle flavon iskeletine bağlı glikoz grubu ve glikoz grubuna bağlı inositol grubunun aydınlatılmasında önemli bilgiler sağladı (Şekil 4.26).



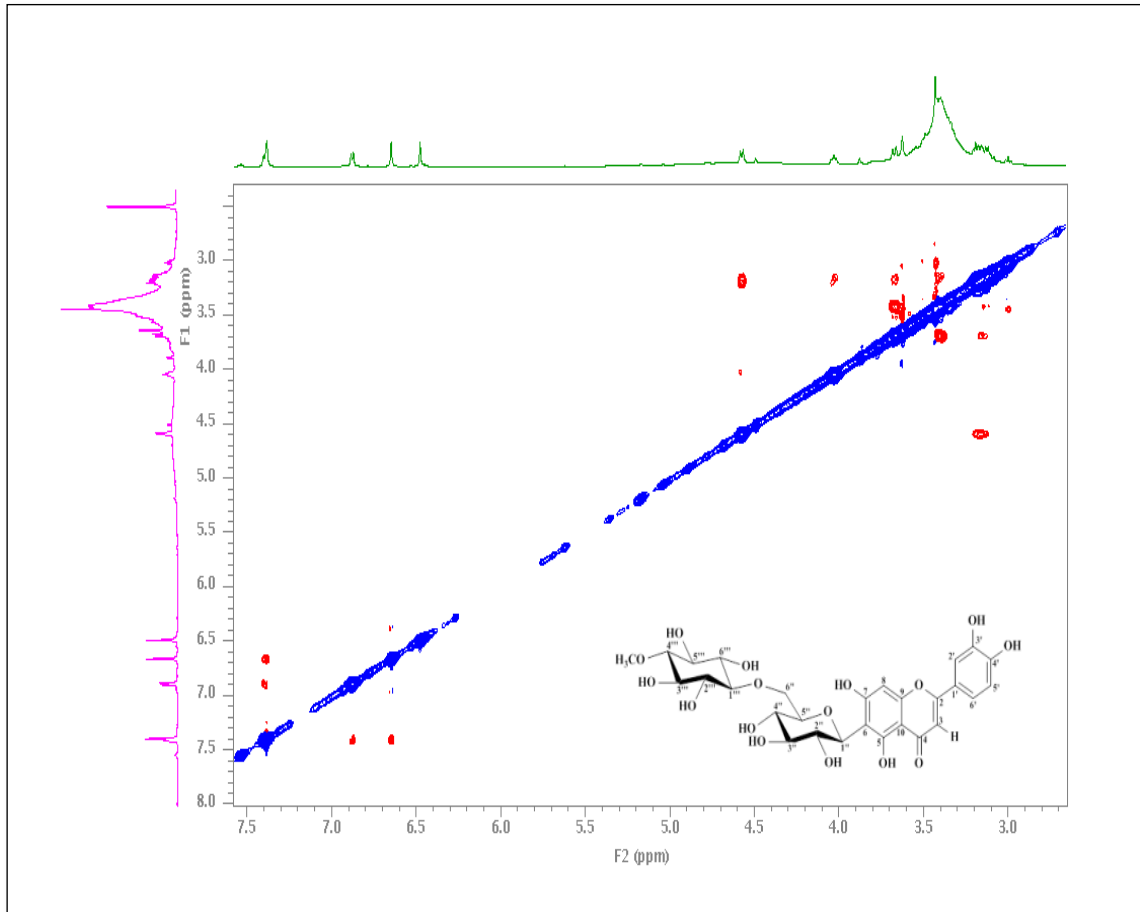
Şekil 4.26. Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) bileşiginin ^1H - ^1H -gCOSY-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

Glikoz ve glikoz grubuna bağılı *O*-metil-*siklo*-inositol grubunun süstitüsyonları ^1H - ^{13}C -HMBC spektrumundaki H-1'' protonu ve C-6 karbonu arasındaki etkileşimlerden, ^1H - ^1H -NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) spektrumundaki H-6'' ve H-5 protonları arasındaki etkileşimlerden, metoksi grubunun δ_H 3,42 (s) protonları H-8 pozisyonundaki proton ile ^1H - ^1H NOESY korelasyonları ve H-4''' pozisyonundaki proton ile ^1H - ^1H ROESY korelasyonlarının varlığı C-4''' pozisyonunda yerleştiği doğrulandı (Şekil 4.27).

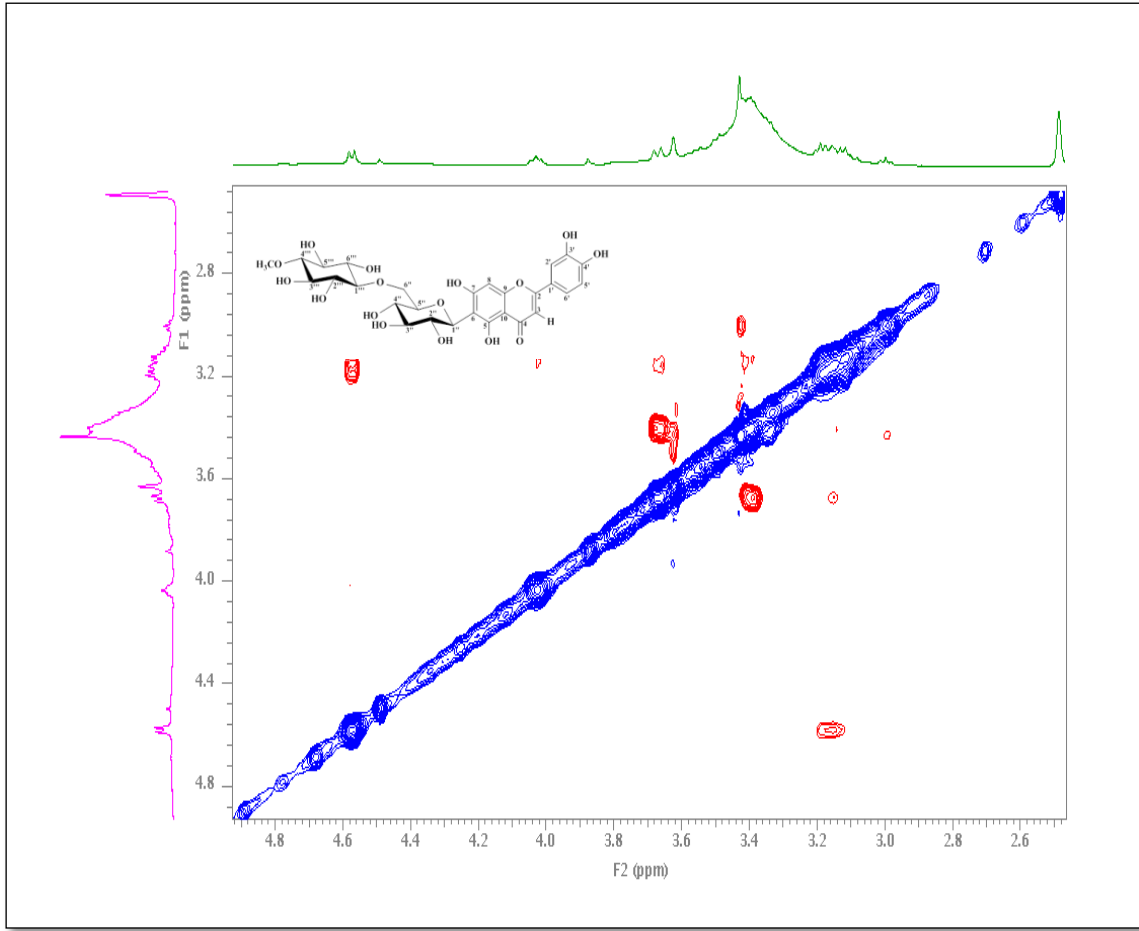


Şekil 4.27. Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) bileşiminin ^1H - ^1H -NOESY-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; $\text{DMSO}-d_6$)

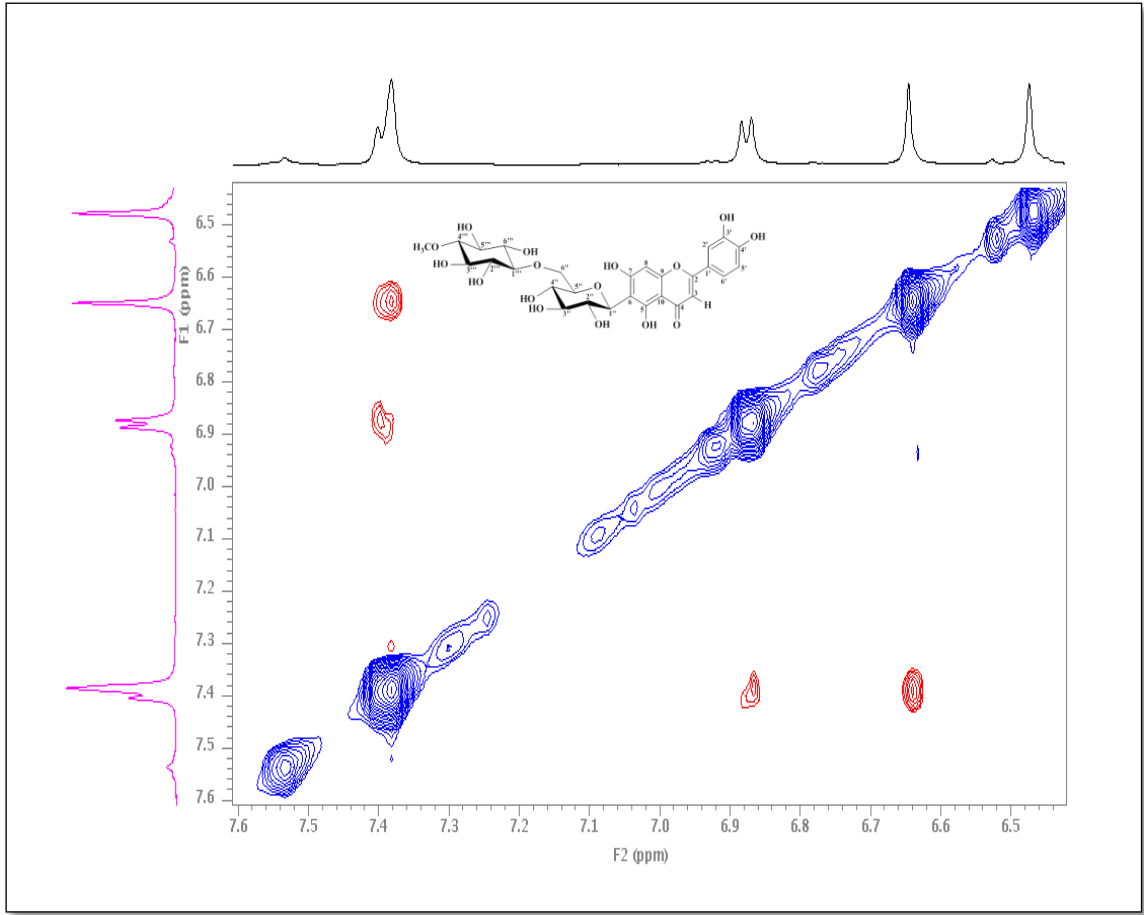
Glikoz grubuna bağılı O-metil-siklo-inositol grubunun C-6'' pozisyonundan bağılı olduğu 1H-1H ROESY (Rotating frame Overhauser Effect Spectroscopy) spektrumundaki H-3''' ve H-6'' protonlarını etkileşimi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.23). Ayrıca 1H-1H NOESY spektrumunda H-1'' ve H-3'' protonları arasında, H-3 ve H-5' protonları arasında ve son olarak H-5' ve H-6' protonları arasında olmak üzere üç tane uzak mesafe etkileşimleri gözlenmiştir. ROESY spektrumundaki uzaysal korelasyonları incelendiğinde Ha-6''/Hb-6'' protonları geminal ve H-5''/H-2'' pozisyonundaki protonlar ise uzak mesafe etkileşimleri göstermiştir. 1H-1H NOESY spektrumundaki H-2' ve H-5' protonlarının da etkileşimleri teyit edilmiştir (Şekil 4.25.). Böylelikle Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol bileşiğinin yapısı flavon-O- metil-*siklo*-inositol-C-glikozit olarak belirlenmiş oldu. (Şekil 4.28-29-30).



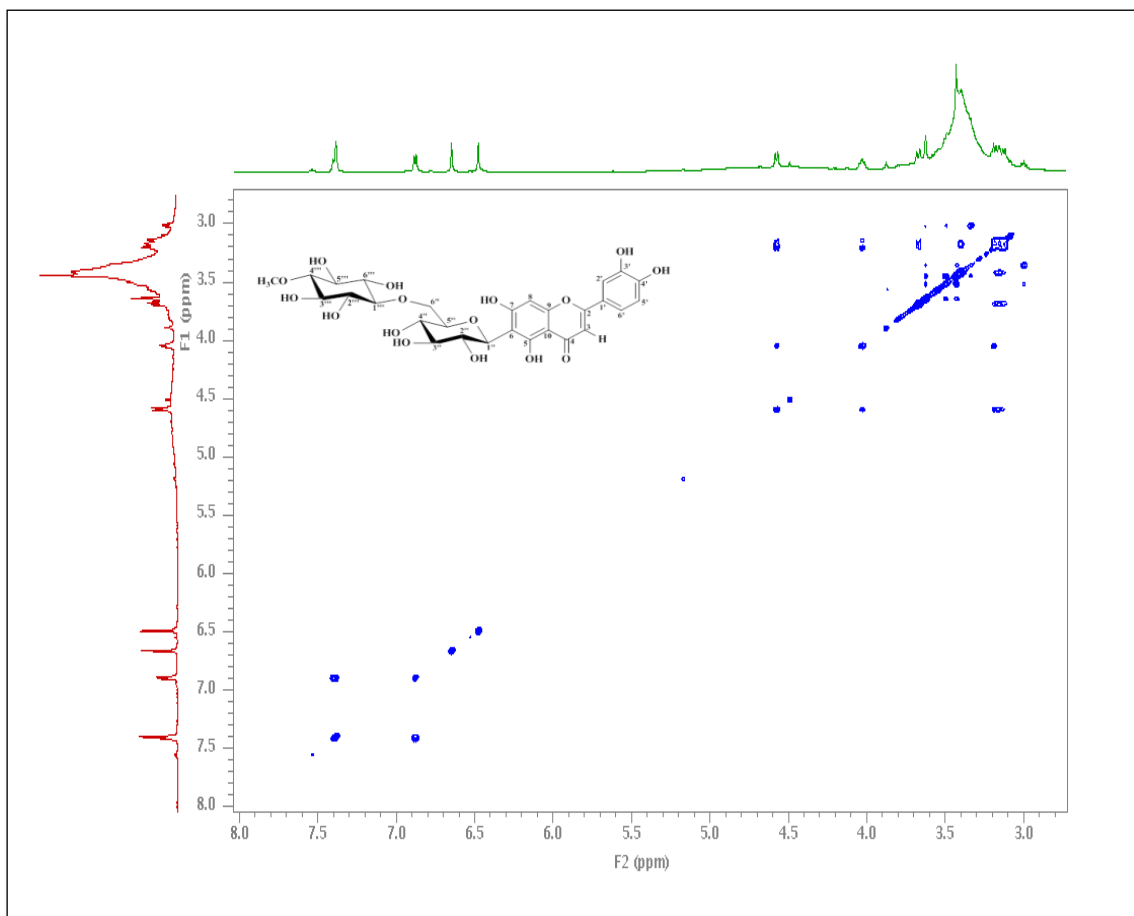
Şekil 4.28. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğinin ^1H - ^1H -ROESY-NMR spektrumu (3-8 ppm arası; ^1H : 600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)



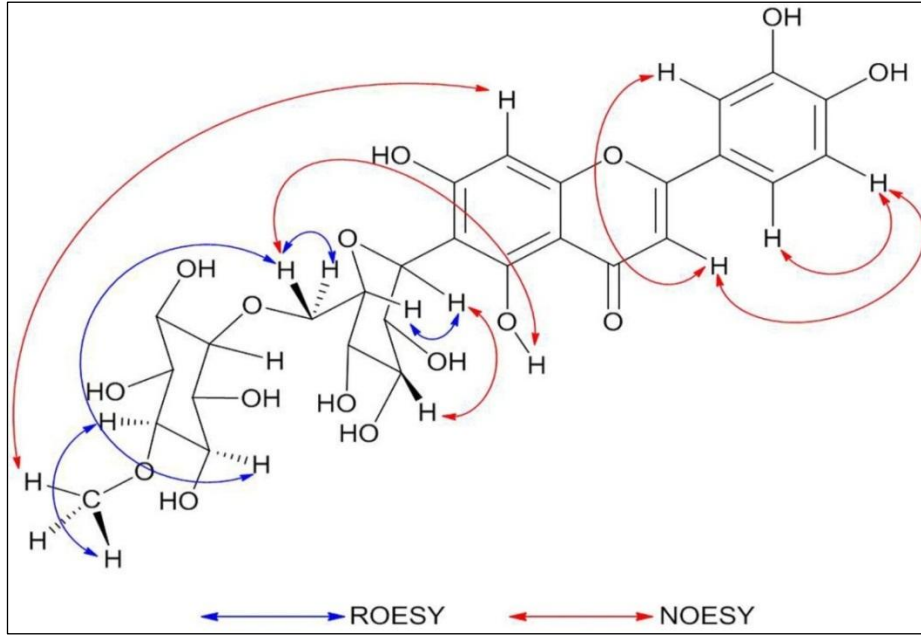
Şekil 4.29. Homoorientin-6''-4-O-metil-myo-inositol (2) bileşiğinin ^1H - ^1H -ROESY-NMR spektrumu (2,6-4,8 ppm arası; ^1H : 600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)



Şekil 4.30. Homoorientin-6''-4-O-metil-myo-inositol (2) bileşiminin ^1H - ^1H -ROESY-NMR spektrumu (6,5-7,6 ppm arası; ^1H : 600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)

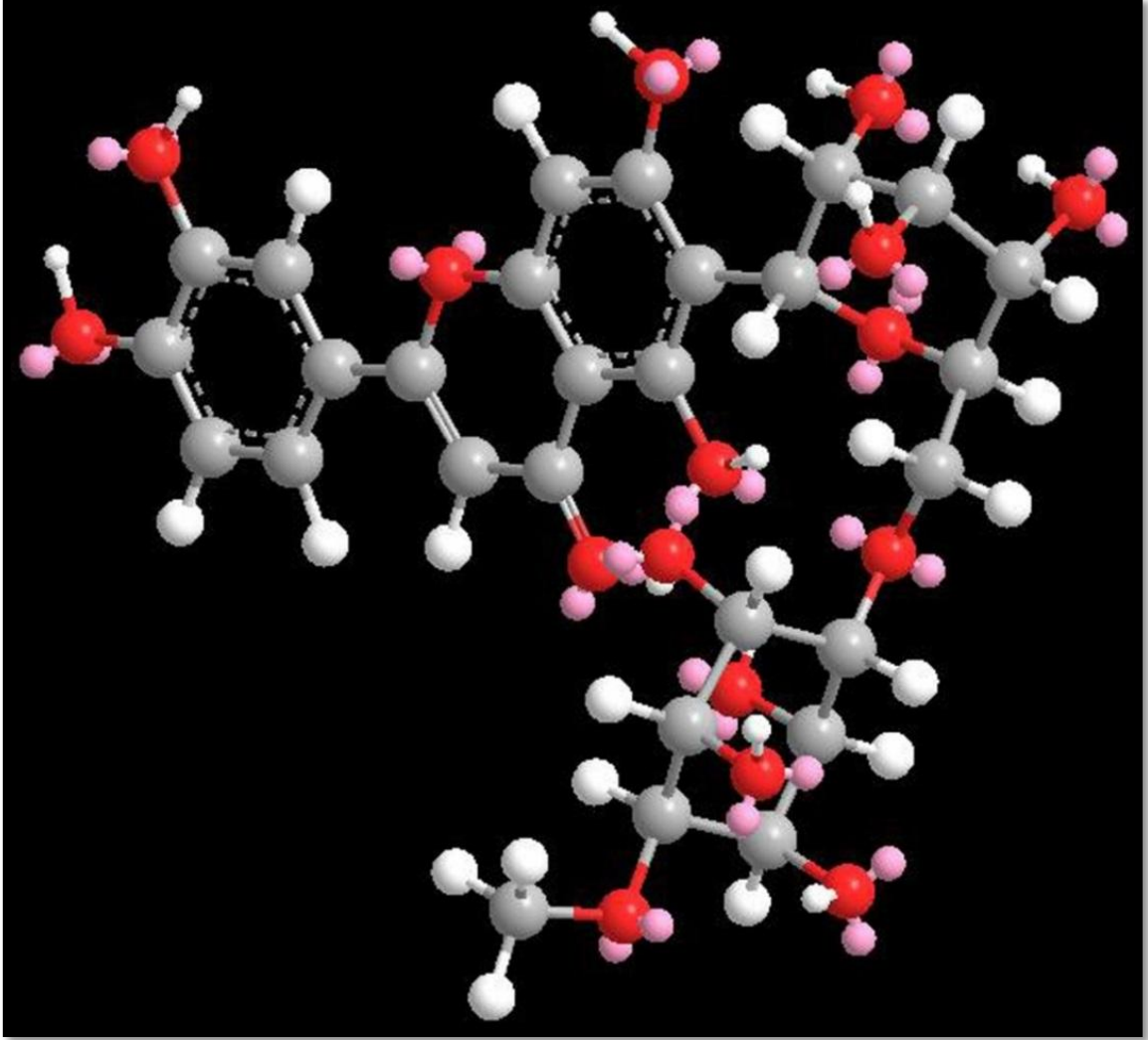


Şekil 4.31. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğinin ^1H - ^1H -TOCSY-NMR spektrumu (^1H : 600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)



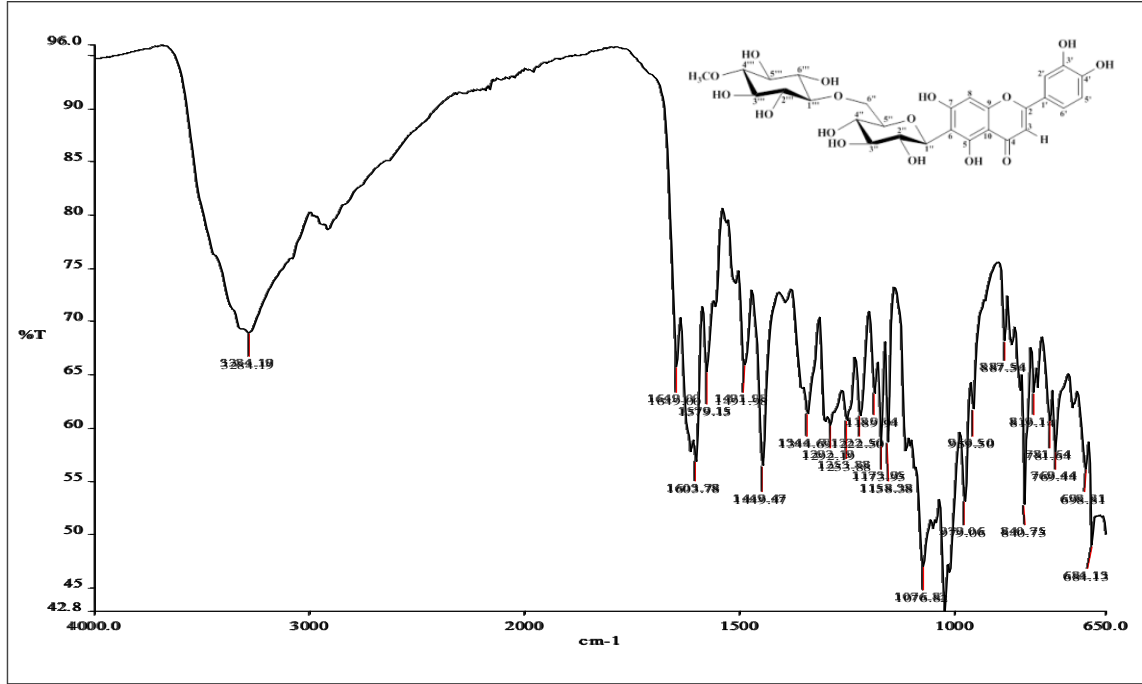
Şekil 4.32. Homoorientin-6''-4-O-metil-*myo*-inositol (2) bileşiminin ROESY ve NOESY korelasyonları

Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) bileŒiđi için mümkün olan endŒk enerjili  boyutlu kimyasal yapı Œekil 4.33'de gösterildiği gibidir.



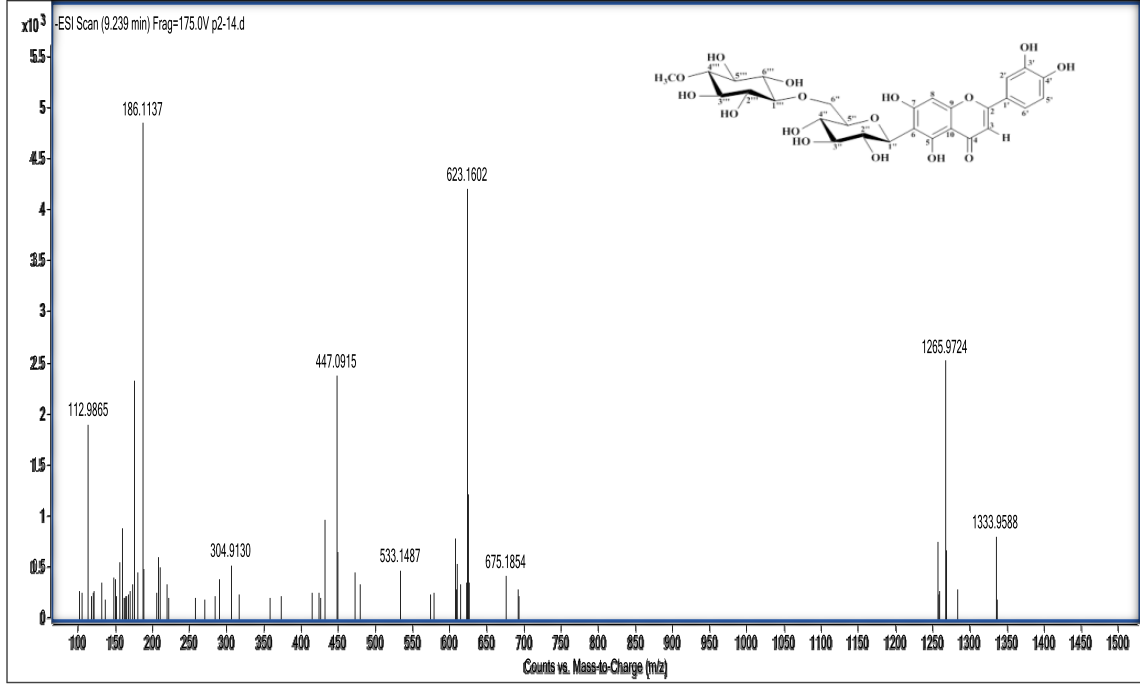
Œekil 4.33. Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) bileŒiđi için mümkün olan en dŒk enerjili  boyutlu kimyasal yapısı

Bileşğin FT-IR spektrumu 3284 cm^{-1} 'de hidroksil grubuna (O-H) ait geniş bir gerilme titreşimi ve 1649 cm^{-1} 'de karbonil grubunu temsil eden keskin bir gerilme bandı gözlenmiştir (Şekil 4.34).



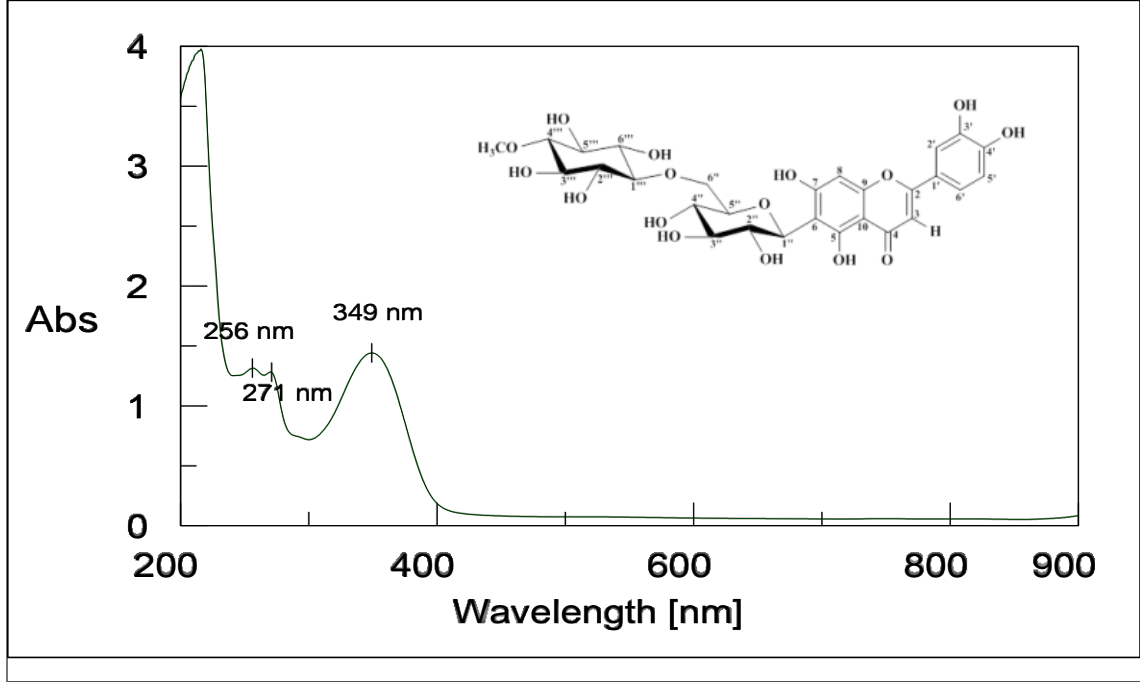
Şekil 4.34. Homoorientin-6''-4-O-metil-myoinositol (2) bileşğinin FT-IR spektrumu

Bileşğin $C_{28}H_{32}O_{16}$ yapısındaki kapalı formülünü temsil eden moleküler iyon piki $[M-H]^-$ m/z 623,1602 (hesaplanan 623,1618) HRESIMS spektrumundan teyit edildi (Şekil 4.35).



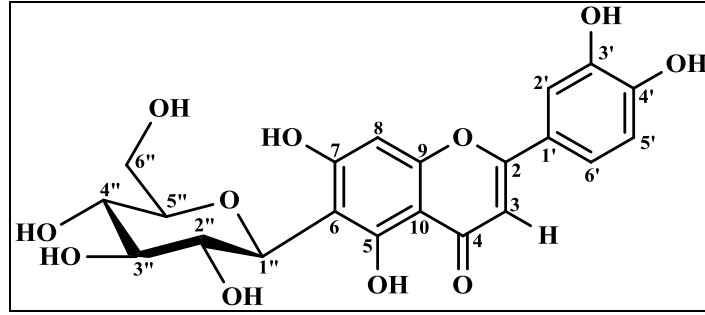
Şekil 4.35. Homorientin-6''-4-O-metil-myoinositol (2) bileşğinin HRESIMS kromatogramı

Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol bileşiğinin UV-VIS spektrumundan maksimum absorpsiyon bantlarının 256, 271 ve 349 nm'de olması bileşiğinin karakteristik bir flavon iskeletine sahip olduğunu göstermekteydi (Şekil 4.36).



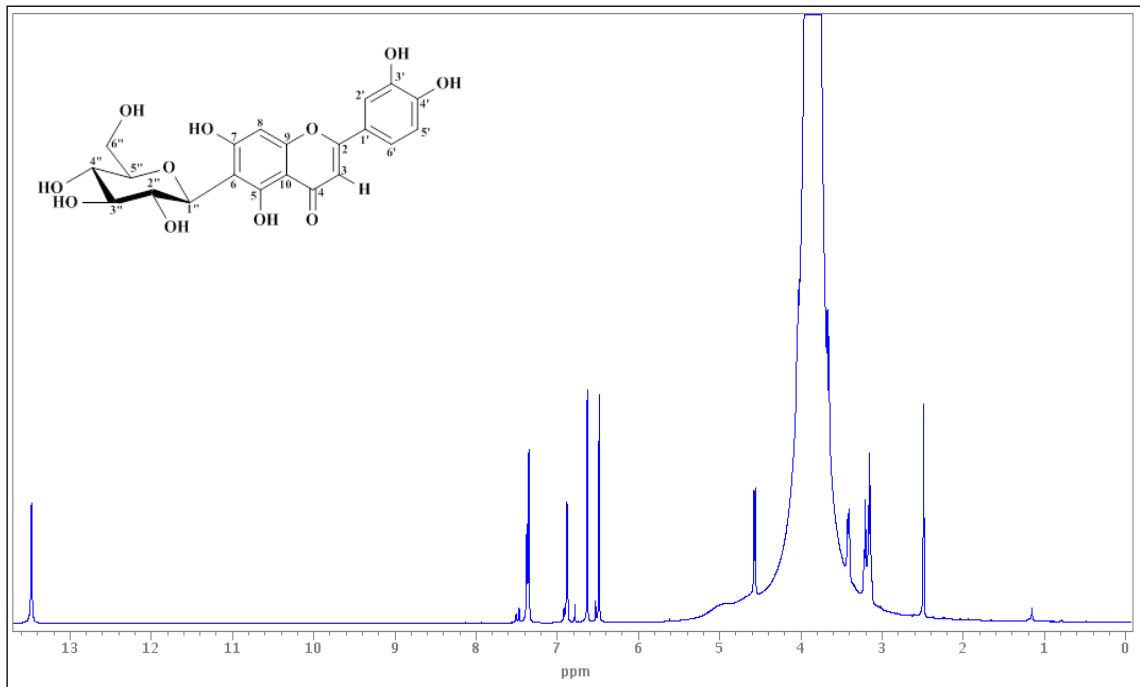
Şekil 4.36. Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) bileşiğinin UV-VIS spektrumu

4.5.3. İzorientin Bileşiği (3)

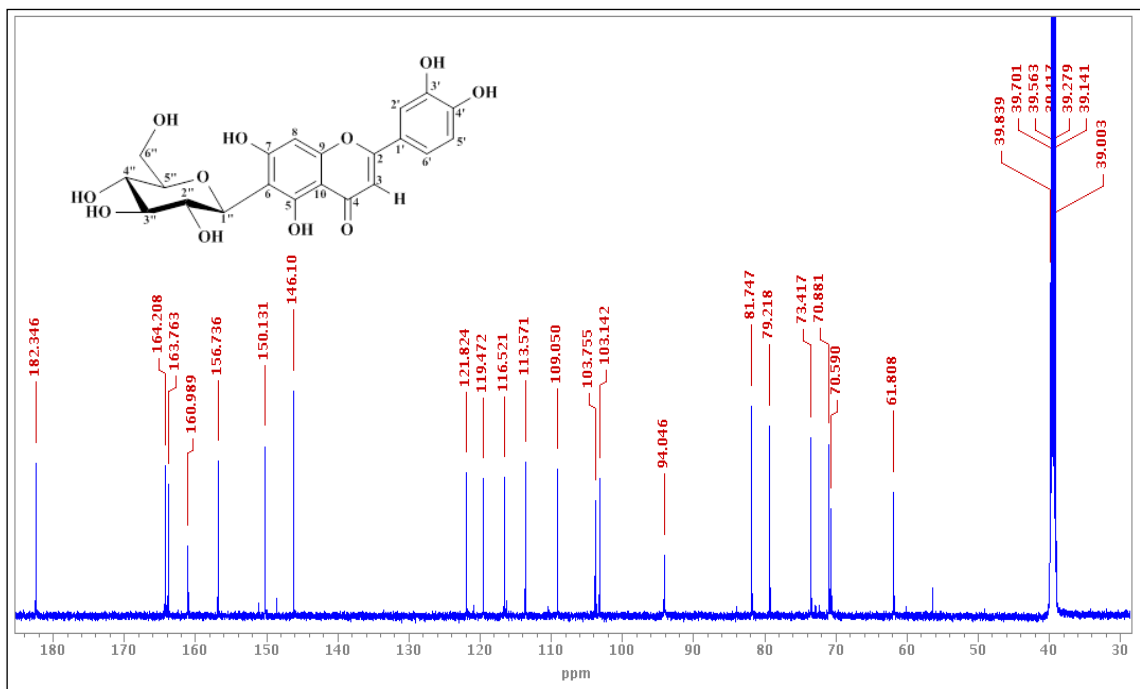


Şekil 4.37. İzorientin (3) bileşiğinin kimyasal yapısı

İzorientin bileşiği sarı renkli amorf toz şeklinde elde edildi. Bileşiğin spektral verileri Oliveira ve arkadaşları tarafından rapor edilen izorientin bileşiğinin spektral verileri ile uyumlu olduğu gözlemlendi (Oliveira vd. 2013). UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ) 251, 272, 347; EIMS m/z 447 [M]⁻; ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ 163,21 (C-2), 102,71 (C-3), 182,27 (C-4), 160,77 (C-5), 108,68 (C-6), 164,39 (C-7), 98,55 (C-8), 156,38 (C-9), 102,66 (C-10), 122,27 (C-1'), 114,35 (C-2'), 146,23 (C-3'), 150,14 (C-4'), 116,03 (C-5'), 119,69 (C-6'), 73,77 (C-1''), 70,15 (C-2''), 79,11 (C-3''), 70,04 (C-4''), 82,33 (C-5''), 62,04 (C-6''). Bileşiğe ait ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları ekler kısmında şekil 4.38 ve şekil 4.39'da verilmiştir.

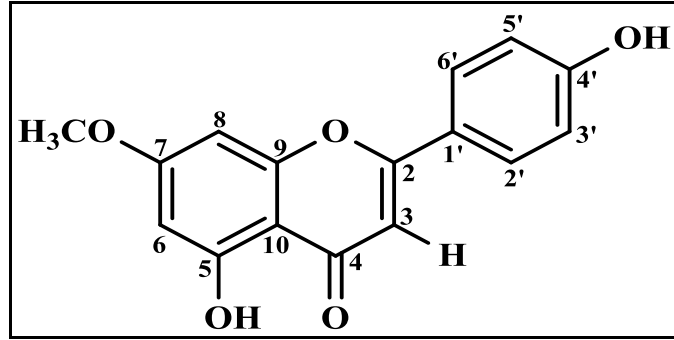


Şekil 4.38. İzoorientin (3) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (^1H : 600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)



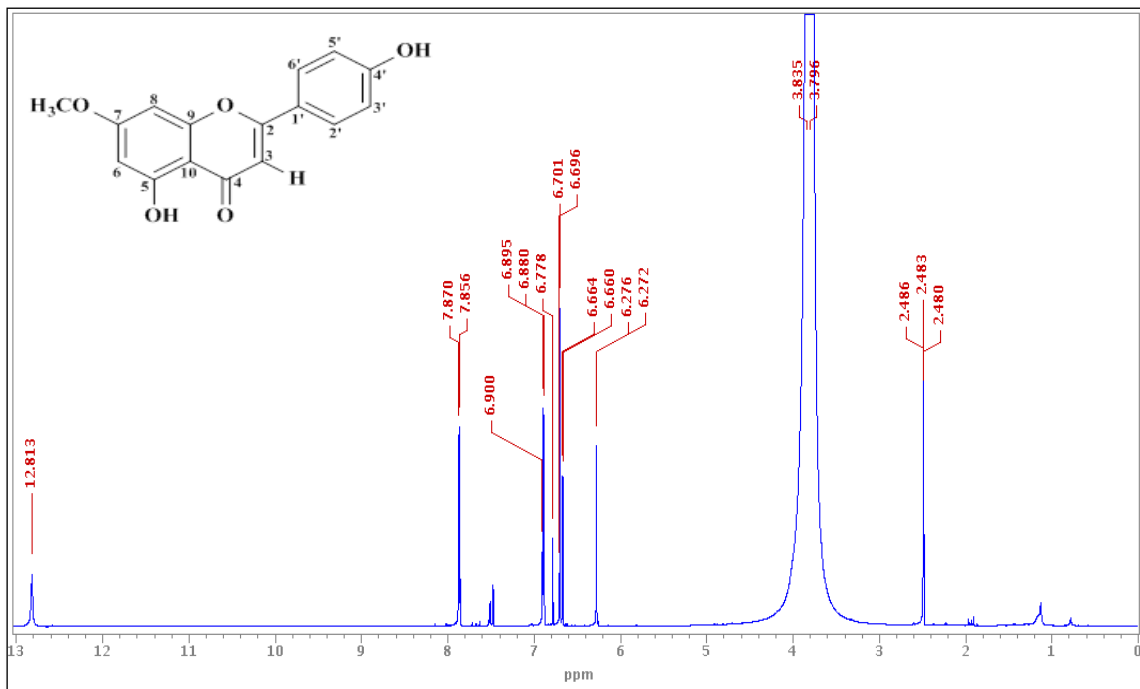
Şekil 4.39. İzoorientin (3) bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)

4.5.4. Genkvanin Bileşiği (4)

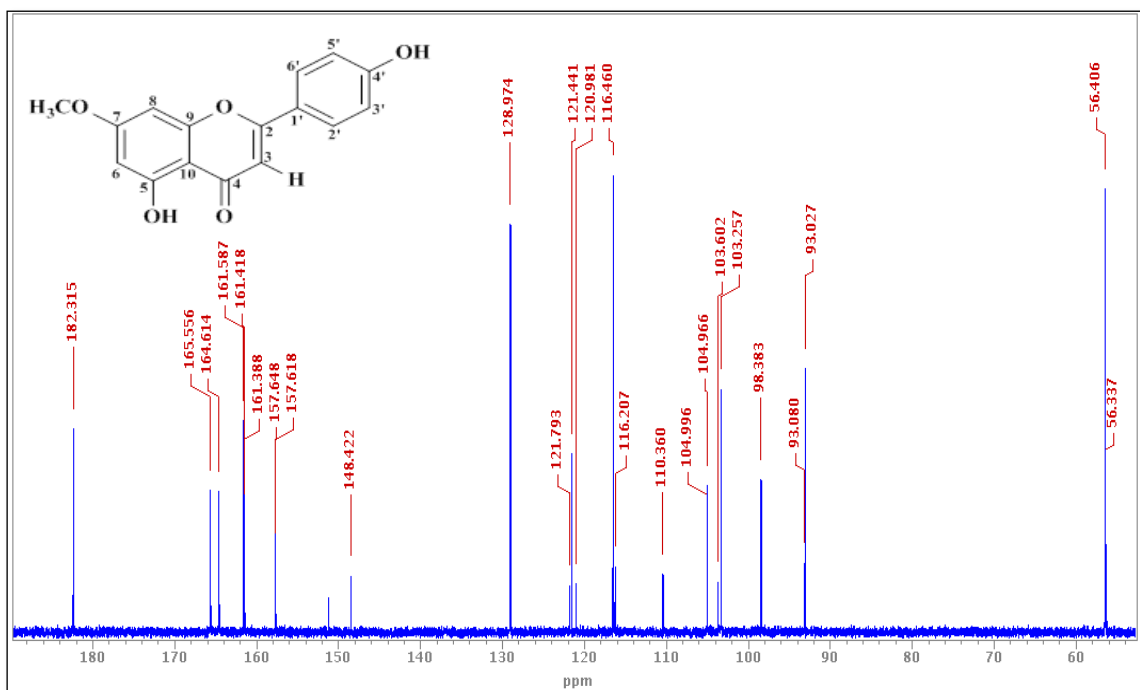


Şekil 4.40. Genkvanin bileşiğinin (4) kimyasal yapısı

Genkvanin bileşiği sarı renkli toz şeklinde elde edildi. Bileşiğin spektral verileri Ray ve arkadaşları tarafından rapor edilen genkvanin bileşiğinin spektral verileri ile uyumlu olduğu gözlemlendi (Ray vd. 2014). FT-IR ν_{max} 3284, 2968, 1611 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} nm ($\log \epsilon$) 236, 267, 368; EIMS m/z 283 $[\text{M}]^-$; ^{13}C -NMR (DMSO- d_6), δ 164,03 (C-2), 103,01 (C-3), 181,88 (C-4), 157,23 (C-5), 97,92 (C-6), 165,14 (C-7), 92,65 (C-8), 161,26 (C-9), 104,66 (C-10), 121,03 (C-1'), 128,34 (C-2'), 115,91 (C-3',C-5'), 161,36 (C-4'), 128,52 (C-6'), 56,04 (OCH_3 -7). Bileşiğe ait ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumları ekler kısmında şekil 4.41 ve şekil 4.42'te verilmiştir.

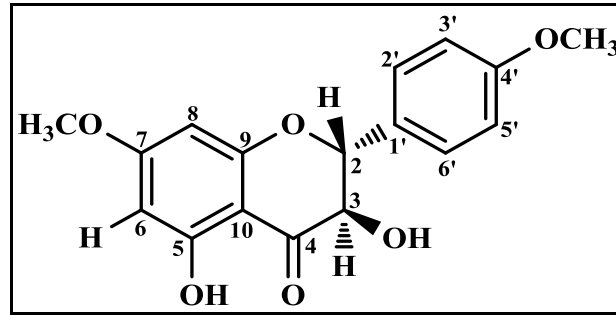


Şekil 4.41. Genkvanin (4) bileşiğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (^1H : 600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)



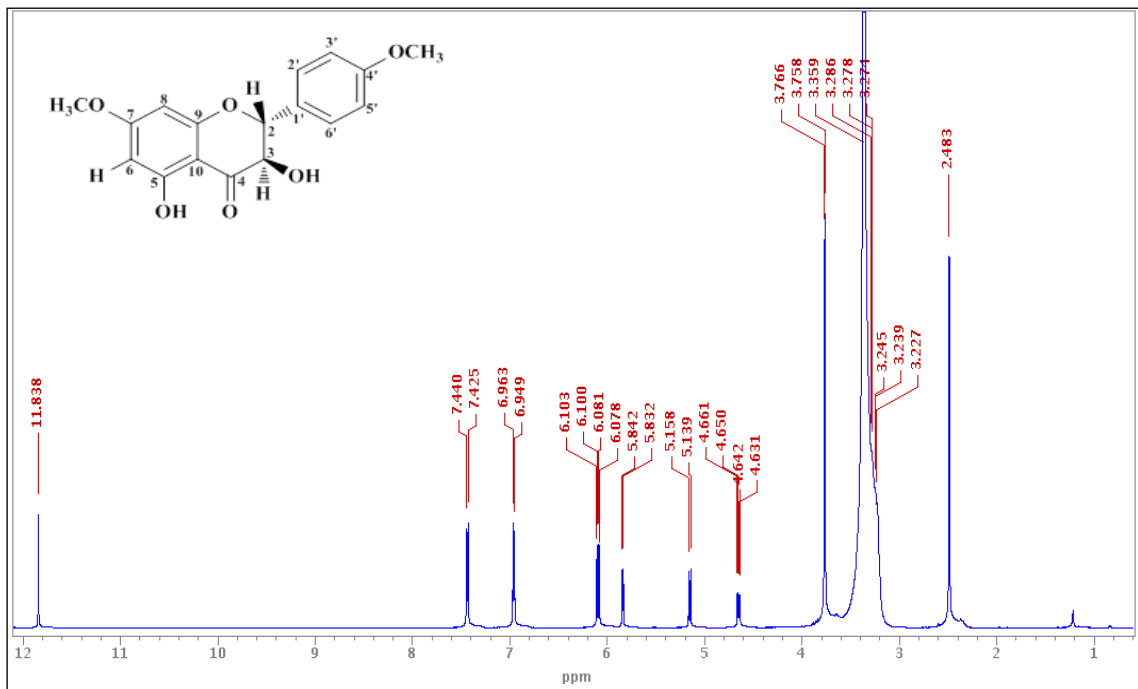
Şekil 4.42. Genkvanin (4) bileşiğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)

4.5.5. (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter Bileşiği (5)

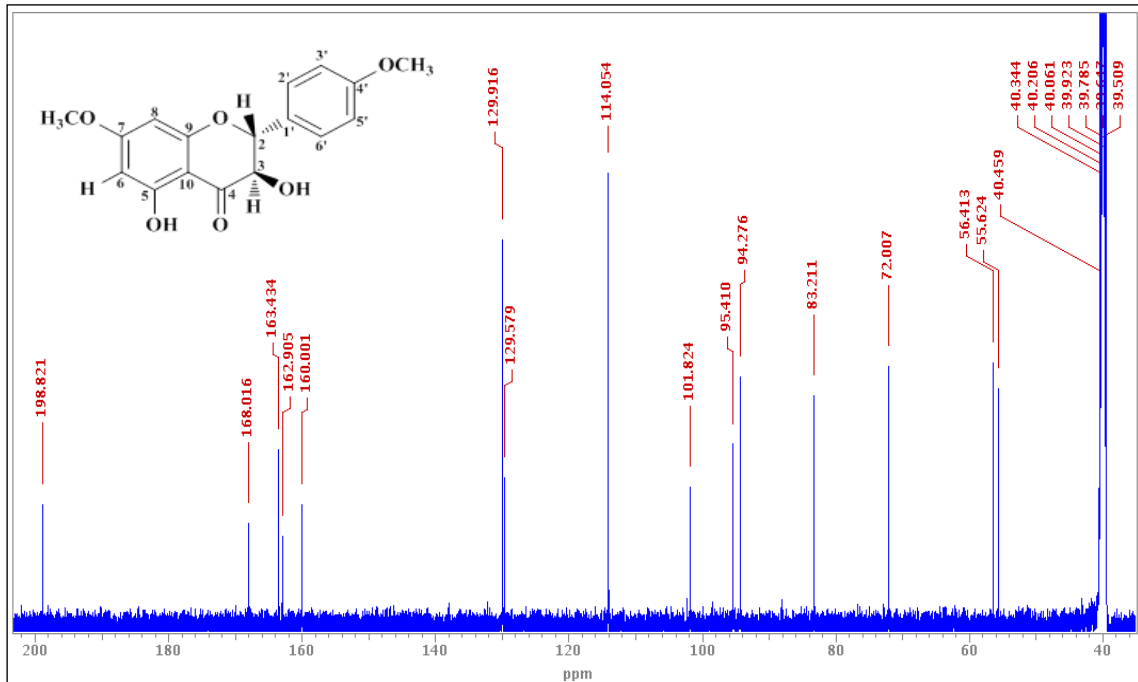


Şekil 4.43. (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (5) bileşiğinin kimyasal yapısı

(2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (5) bileşiği renksiz iğnemsiz kristal şeklinde elde edildi. Bileşiğin spektral verileri Lima ve Polonsky tarafından rapor edilen (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter bileşiğinin spektral verileri ile uyumlu olduğu gözlemlendi (Lima ve Polonsky 1973). UV (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ) 214, 294, 329; mp 183-188°; EIMS m/z 315 [M]⁺; $[\alpha]_D^{24} + 34.48^\circ$ (MeOH, c 0,4575) ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆): δ 145,72 (C-2), 135,67 (C-3), 175,14 (C-4), 160,89 (C-5), 97,92 (C-6), 165,74 (C-7), 92,26 (C-8), 156,81 (C-9), 103,93 (C-10), 123,15 (C-1'), 128,86 (C-2', C-6'), 161,14 (C-4'), 114,03 (C-3', C-5'), 55,88 (OCH₃-7), 55,47 (OCH₃-4'). Bileşiğe ait ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları ekler kısmında Şekil 4.44 ve Şekil 4.45'de verilmiştir.

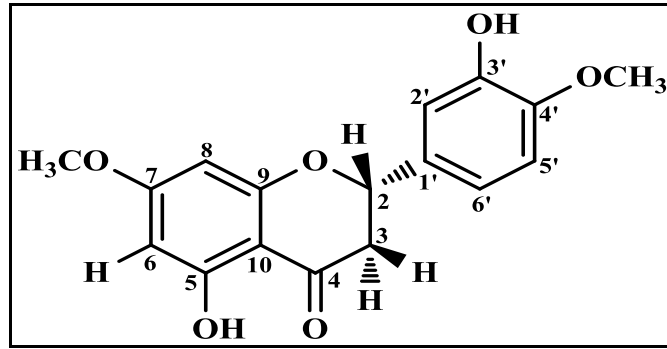


Şekil 4.44. (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (5) bileşğinin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu (^1H :600 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)



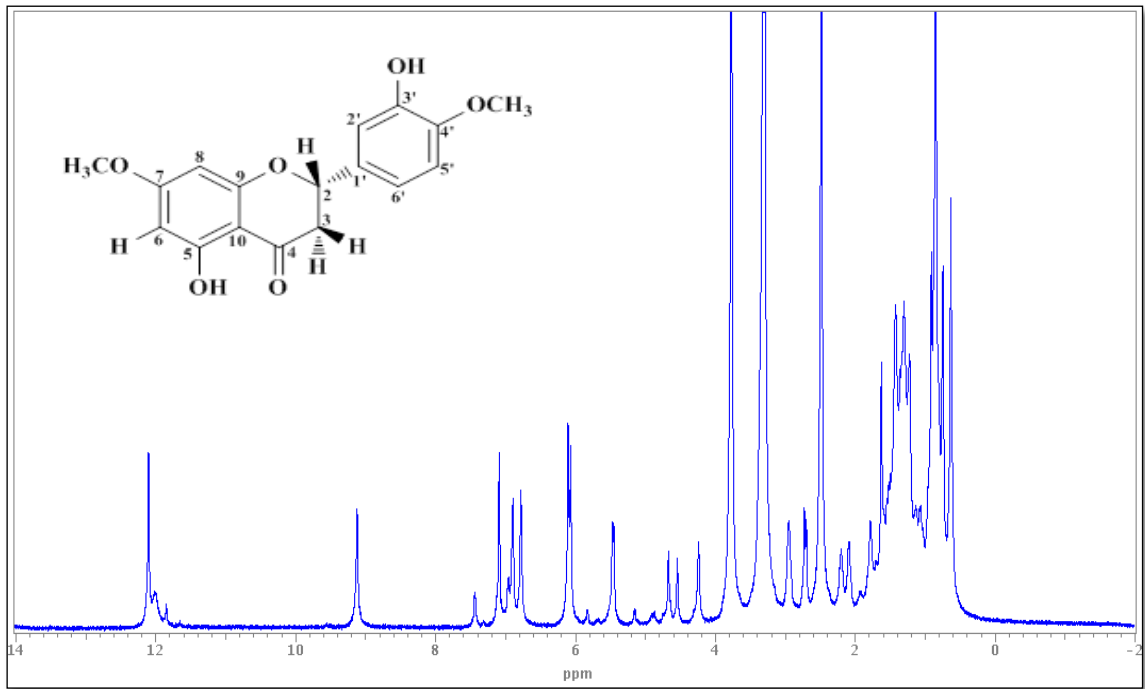
Şekil 4.45. (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (5) bileşğinin $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu (^{13}C : 125 MHz; $\text{DMSO-}d_6$)

4.5.6. Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter Bileşiği (6)

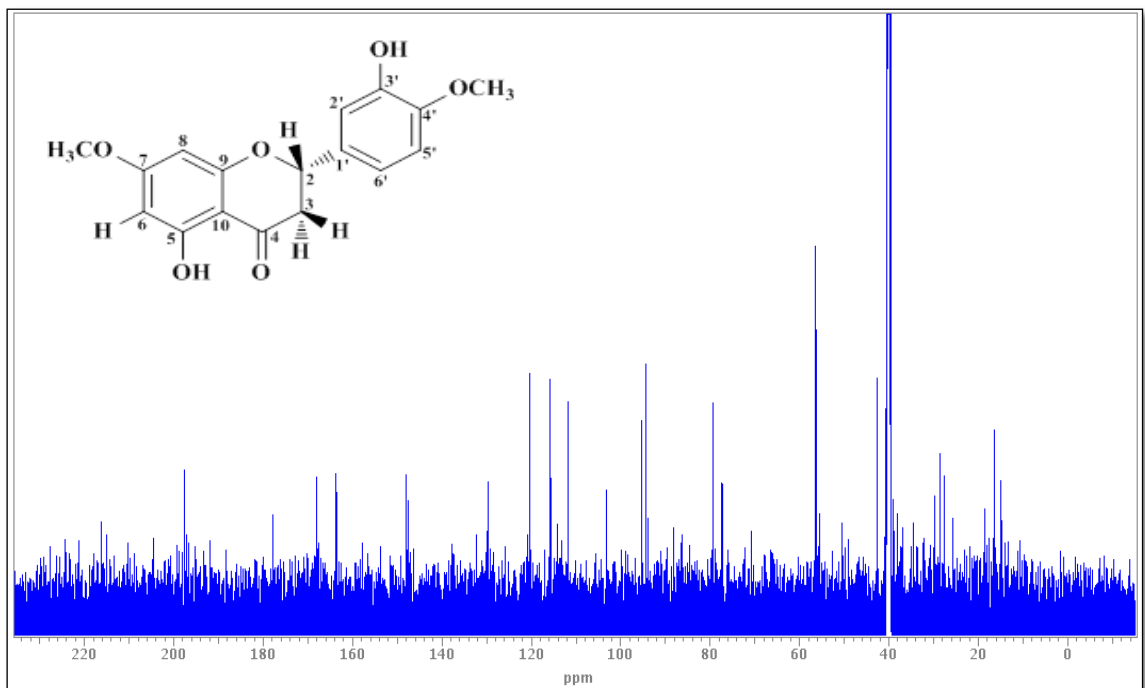


Şekil 4.46. Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (6) bileşiğinin kimyasal yapısı

Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter bileşiği beyaz renkli kristal şekilde elde edildi. Bileşiğin spektral verileri Balza ve arkadaşları tarafından rapor edilen eriodiktiyol-7,4'-dimetileter bileşiğinin spektral verileri ile uyumlu olduğu gözlendi (Balza vd. 1985). UV-VIS (MeOH) λ_{\max} nm (log ϵ) 283, 335; mp=166–167°C; FT-IR ν_{\max} =3455, 2912, 1632 cm^{-1} ; EIMS m/z =315 [M]⁺; mp=164-166°C; $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = -36,10^\circ\text{C}$ (CHCl_3 , $c=0,46$); ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆) δ =44,66 (C-3), 80,94 (C-2), 198,53 (C-4), 165,77 (C-5), 96,25 (C-6), 170,07 (C-7), 95,45 (C-8), 165,14 (C-9), 104,55 (C-10), 133,53 (C-1'), 113,08 (C-2'), 148,34 (C-3'), 149,85 (C-4'), 115,05 (C-5'), 119,61 (C-6'), 56,51 (OCH₃-4'), 56,81 (OCH₃-7). Bileşiğe ait ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları şekil 4.47 ve şekil 4.48'da verilmiştir.

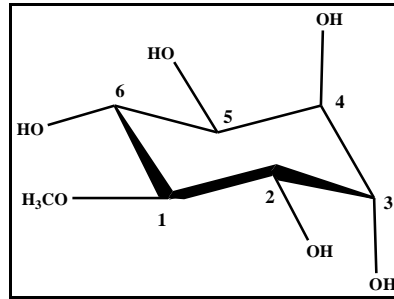


Şekil 4.47. Eriodiktıyol-7,4'-dimetileter (6) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (¹H: 600 MHz; DMSO-*d*₆)



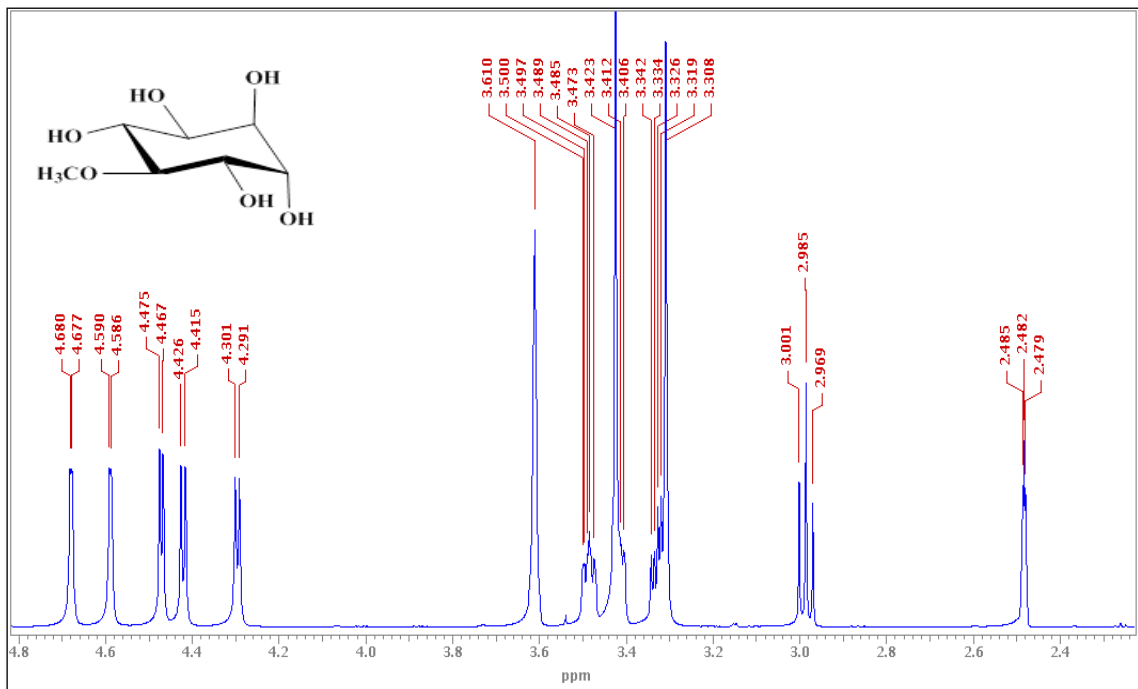
Şekil 4.48. Eriodiktıyol-7,4'-dimetileter (6) bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; DMSO-*d*₆)

4.5.7. D-(+)-pinitol Bileşiği (7)

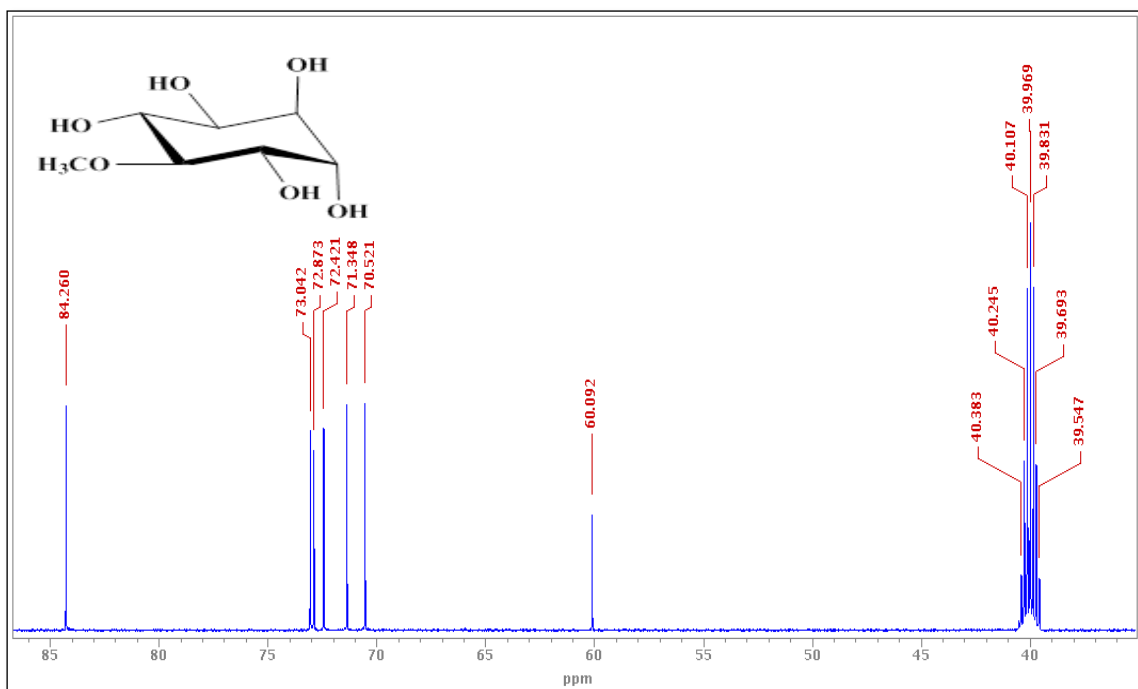


Şekil 4.49. D-(+)-pinitol (7) bileşiğinin kimyasal yapısı

D-(+)-pinitol bileşiği beyaz katı kristal şeklinde elde edildi. Bileşiğin spektral verileri Chaubal ve arkadaşları tarafından rapor edilen D-(+)-pinitol bileşiğinin spektral verileri ile uyumlu olduğu gözlemlendi (Chaubal vd. 2005). FT-IR $\nu_{\max}=3395, 3303, \text{cm}^{-1}$; mp =180-181°C; EIMS $m/z =193 [M]^+$; $[\alpha]_D^{24} +60^\circ\text{C}$ ($\text{H}_2\text{O}, c 1$); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$) $\delta_{\text{C}}=72,37$ (C-1), 71,65 (C-2), 82,93 (C-3), 70,77 (C-4), 71,92 (C-5), 70,05 (C-6), 59,85 (OCH_3). Bileşiğe ait ^1H ve $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumları şekil 4.50 ve şekil 4.51’de verilmiştir.

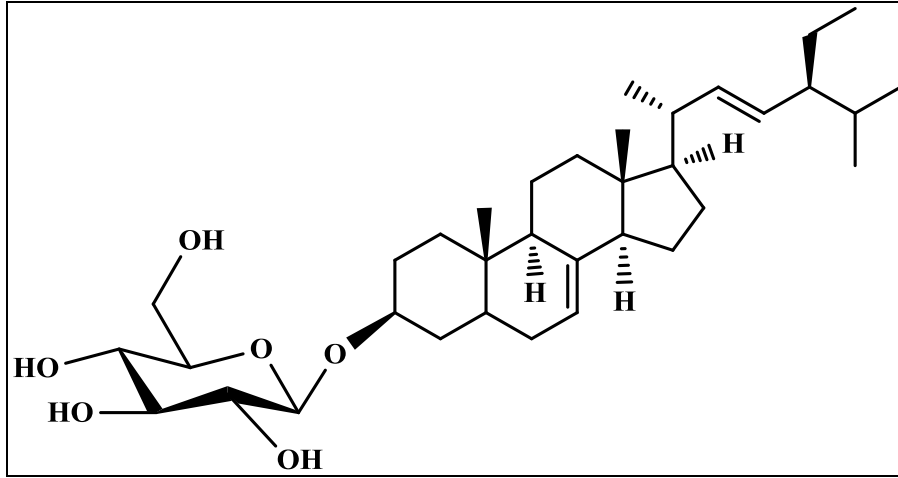


Şekil 4.50. D-(+)-pinitol (7) bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu (¹H: 600 MHz; DMSO-*d*₆)



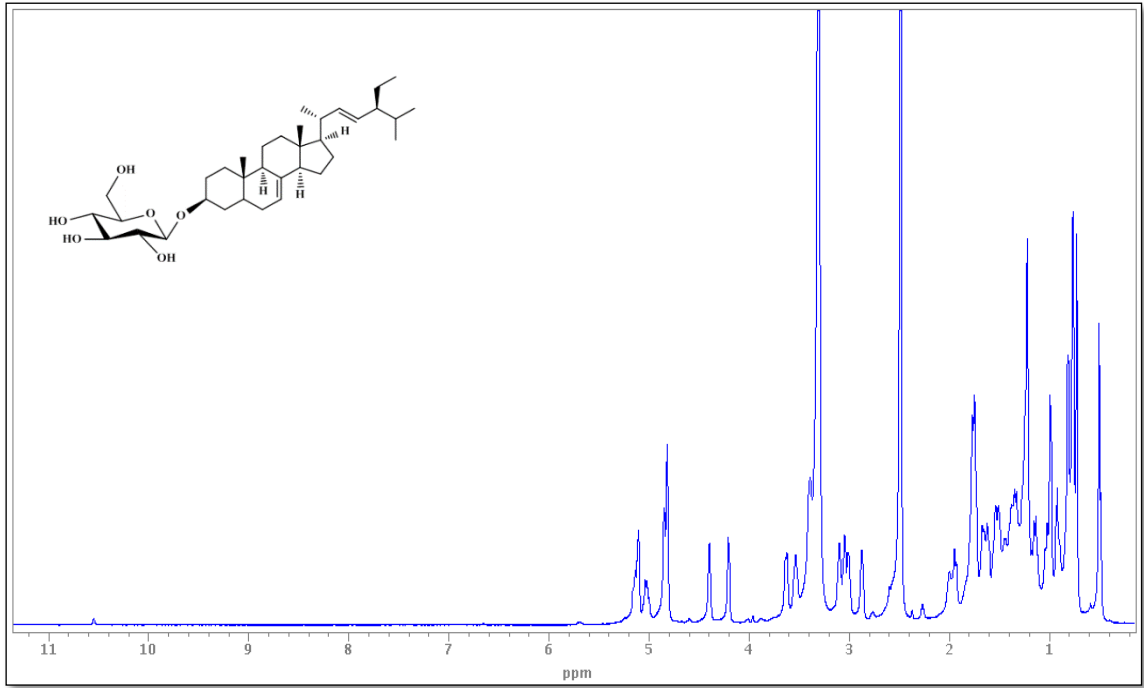
Şekil 4.51. D-(+)-pinitol (7) bileşiğinin ¹³C-NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; DMSO-*d*₆)

4.5.8. 3-O-β-D-glukopiranozil spinasterol Bileşiği (8)

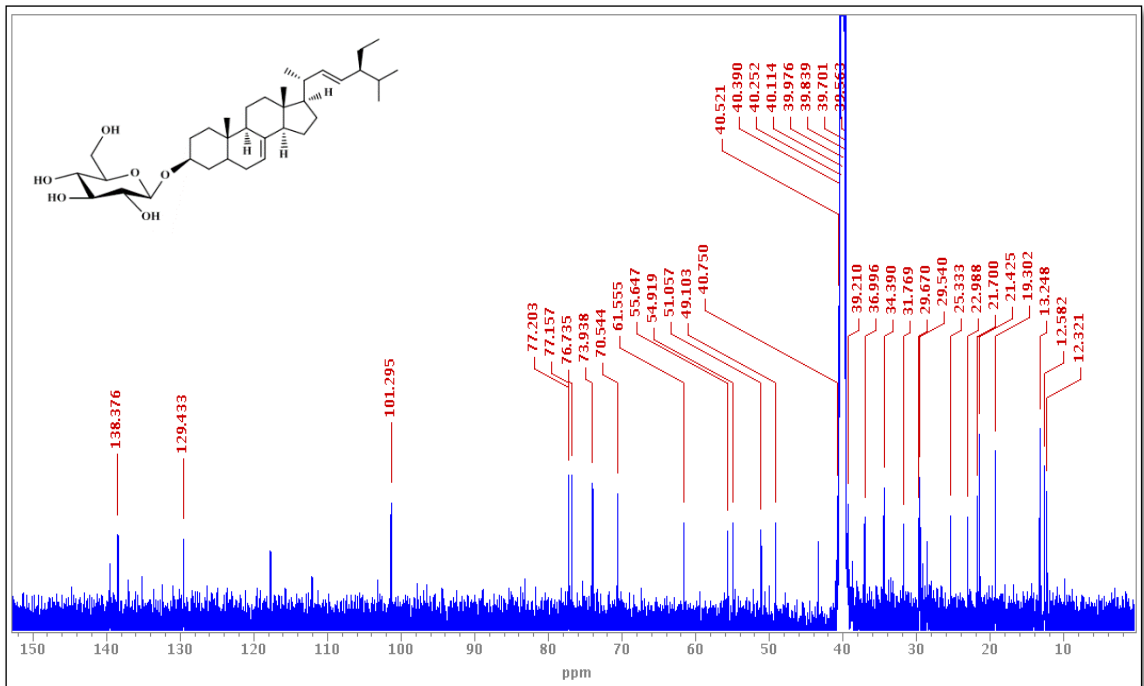


Şekil 4.52. 3-O-β-D-glukopiranozil spinasterol (8) bileşiğinin kimyasal yapısı

3-O-β-D-glukopiranozil spinasterol bileşiği beyaz katı şeklinde elde edildi. Bileşiğin spektral verileri Lee ve arkadaşları tarafından rapor edilen 3-O-β-D-glukopiranozil spinasterol bileşiğinin spektral verileri ile uyumlu olduğu gözlemlendi (Lee vd. 2011). FT-IR ν_{\max} 3345 cm^{-1} ; mp 279-280°C; EIMS m/z 573 [M]⁺; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -12,6° (C₅H₅N, c 0,17); ¹³C-NMR (DMSO-d₆) δ 37,49 (C-1), 30,22 (C-2, C-6), 77,15 (C-3), 34,72 (C-4), 40,34 (C-5), 117,85 (C-7), 139,62 (C-8), 49,76 (C-9), 34,87 (C-10), 21,85 (C-11), 39,74 (C-12), 43,63 (C-13), 55,46 (C-14), 23,58 (C-15), 29,04 (C-16), 56,17 (C-17), 12,45 (C-18), 13,24 (C-19), 41,23 (C-20), 21,98 (C-21), 138,62 (C-22), 129,61 (C-23), 51,56 (C-24), 32,31 (C-25), 19,34 (C-26), 21,42 (C-27), 25,89 (C-28), 12,75 (C-29), 102,37 (C-1'), 78,73 (C-3'), 75,49 (C-2'), 71,85 (C-4'), 78,63 (C-5'), 63,02 (C-6'). Bileşiğe ait ¹H ve ¹³C-NMR spektrumları ekler kısmında şekil 4.53 ve şekil 4.54'de verilmiştir.



Şekil 4.53. 3-*O*-β-D-glukopiranozil spinasterol (8) bileşiminin ¹H-NMR spektrumu (¹H: 600 MHz; DMSO-*d*₆)



Şekil 4.54. 3-*O*-β-D-glukopiranozil spinasterol (8) bileşiminin ¹³C-NMR spektrumu (¹³C: 125 MHz; DMSO-*d*₆)

4.6. İzole Edilen Sekonder Metabolitlerin HSA ile Etkileşimleri

Plazma proteinlerinin büyük bir kısmını teşkil eden serum albüminin doğal ürünlerden elde edilen sekonder metabolitler ile etkileşimlerini açıklamada floresans spektrometri hızlı, kolay ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksek bir yöntemdir. Serum albümin moleküllerinin floresans şiddetindeki azalış bu doğal sekonder metabolitlerin albümin molekülleri ile etkileşim ve bağlanma türü hakkında yararlı bilgiler sağlar. Bu bağlamda tez çalışmasında HSA proteini ile endemik *P. ortegiodies* türünden izole edilen sekonder metabolitlerin etkileşimleri ve albüminin floresans sönüm değişimleri iki ve üç boyutlu floresans spektrometre ile incelendi.

Endemik *P. ortegiodies* türünden izole edilen ve farklı konsantrasyonlarda çözeltileri hazırlanan 7,5'-dimetoksiizozetin, homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol, izoorientin, genkvanin, (2R,3R)-(+)-dihidrokanferol-7,4'-dimetileter, eriodiktiyol-7,4'-dimetileter, D-(+)-pinitol ve 3-*O*-β-D-glukopiranozil spinasterol doğal sekonder metabolitlerinin HSA proteini ile olan etkileşimlerinden elde edilen iki ve üç boyutlu floresans spektrumları elde edildi (Şekil 4.56-63).

2D-FL ölçümleri için emisyon dalga boyu aralıkları 285-500 nm, uyarma dalga boyu 280 nm olarak seçilmiştir. Uyarma ve emisyon slit aralıkları 5 nm ve tarama hızı 1000 nm/dk olarak ayarlanmıştır.

3D-FL ölçümleri için emisyon dalga boyu aralığı 220-450 nm arasında yapılmış olup uyarma dalga boyu ise 210 nm ayarlanıp 8'er nm artırılarak toplamda 25 adet tarama yapılmıştır. Uyarma ve emisyon slit aralıkları 5 nm ve tarama hızı 1000 nm/dk olarak ayarlanmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda HSA proteinin miktarı sabit tutulup ortama artan konsantrasyonlarda doğal sekonder metabolit eklendikçe proteinin floresans şiddetinde bir azalma olduğu gözlenmiştir. HSA'nın floresans şiddetindeki bu azalma sekonder metabolitlerin HSA ile etkileştiğini göstermektedir. Etkileşim sabitini hesaplamak için stern-volmer eşitliği kullanılmıştır. Stern-volmer denkleminde floroforun floresans şiddetini azaltan maddelere kuençır denmektedir.

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] = \tau_0 k_q [Q] \quad (4.2)$$

Bu denklemde, F_0 floroforun kuençir olmadığı andaki floresans şiddeti, F floroforun kuençir varlığındaki floresans şiddetini, $[Q]$ değeri kuençir olarak ortama ilave edilen sekonder metabolit derişimini, K_{SV} Stern-Volmer kuençleşme sabitini, k_q bimolekül kuençleşme hız sabitini ve τ_0 kuençir yokluğundaki floroforun floresans ortalama ömrünü ifade etmektedir.

HSA varlığında kuençir olarak ortama ilave edilen sekonder metabolit derişiminin ($[Q]$) florofor grubun kuençir varlığındaki floresans şiddeti oranlarına (F_0/F) karşı Stern-Volmer grafikleri çizilmiştir. Her bir sekonder metabolit için elde edilen doğrusal grafikten K_{SV} değerleri elde edildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Sekonder metabolit-HSA etkileşimleri için Stern-Volmer değerleri

Sekonder Metabolitler	Doğrusal Regresyon Eşitliği	K_{SV} (M^{-1})	R^2
7,5'-dimetoksiizoetin	$y = 0,1127x + 1$	0,1127	0,9716
Homoorientin-6''-4-O-metil- <i>myo</i> -inositol	$y = 0,3408x + 1$	0,3408	0,8929
İzoorientin	$y = 0,0508x + 1$	0,0508	0,9117
Genkvanin	$y = 0,0146x + 1$	0,0146	0,9729
(2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter	$y = 0,0789x + 1$	0,0789	0,9032
Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter	$y = 0,1691x + 1$	0,1691	0,7256
D-(+)-pinitol	$y = 0,1062x + 1$	0,1062	0,8437
3-O- β -D-glukopiranozil spinasterol	$y = 0,0106x + 1$	0,0106	0,8101

Bağlanma değerinin hesaplanması:

Bir biyomolekülün kuençleşme olayında kompleks oluşturması veya etkileşime girmek birbirinden bağımsız olan birden fazla fonksiyonel grup olduğu dikkate alınırsa kuençerin farklı konsantrasyonlardaki logaritma değerlerine ($\log[Q]$) değerlerine karşı florofor grubun bir kuençir varlığındaki floresans şiddeti logaritma değerleri ($\log(F_0.F/F)$) grafiğe geçirildiğinde kuençirin bağlanma sabiti bulunabilir (Wang vd. 2006).

$$\log\left(\frac{F_0-F}{F}\right) = \log K_b + n \log[Q] \quad (4.3)$$

Bu denklemde K_b değeri bağlanma sabitini, n değeri ise bağlanan kısım sayısını göstermektedir.

5 μM sabit bir konsantrasyonda HSA proteini ve farklı konsantrasyon aralıklarında endemik *P. ortegioides* izolatlarını ihtiva eden sistemlerinin bağlanma sabiti değerleri her bileşik için büyükten küçüğe doğru $59,97 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol) $> 38,12 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (7,5'-dimetoksiizoetin) $> 24,69 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (izoorientin) $> 5,46 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ ((2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter) $> 4,79 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter) $> 1,91 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (D-(+)-pinitol) $> 0,63 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (3-*O*- β -D-glukopiranozil spinasterol) $> 0,024 \times 10^3 \text{ M}^{-1}$ (Genkvanin) olarak bulunmuştur (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Sekonder metabolit-HSA etkileşimleri için bağlanma sabiti (K_b) ve bağlanan kısım sayısı (n) verileri

Sekonder metabolitler	Denklemler	$K_b \times 10^3 (\text{M}^{-1})$	n	R^2
7,5'-dimetoksiizoetin	$y = 1,2868x - 1,4188$	38,12	1,2868	0,9273
Homoorientin-6''-4- <i>O</i> -metil- <i>myo</i> -inositol	$y = 1,6299x - 1,222$	59,97	1,6299	0,8617
İzoorientin	$y = 1,1917x - 1,6074$	24,69	1,1917	0,708
Genkvanin	$y = 1,5451x - 3,1965$	0,63	1,5451	0,9491
(2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter	$y = 1,6912x - 2,2627$	5,46	1,6912	0,9687
Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter	$y = 1,9434x - 2,3189$	4,79	1,9434	0,9629
D-(+)-pinitol	$y = 2,1281x - 2,7188$	1,91	2,1281	0,9583
3- <i>O</i> - β -D-glukopiranozil spinasterol	$y = 2,0178x - 4,6155$	0,024	2,0178	0,9743

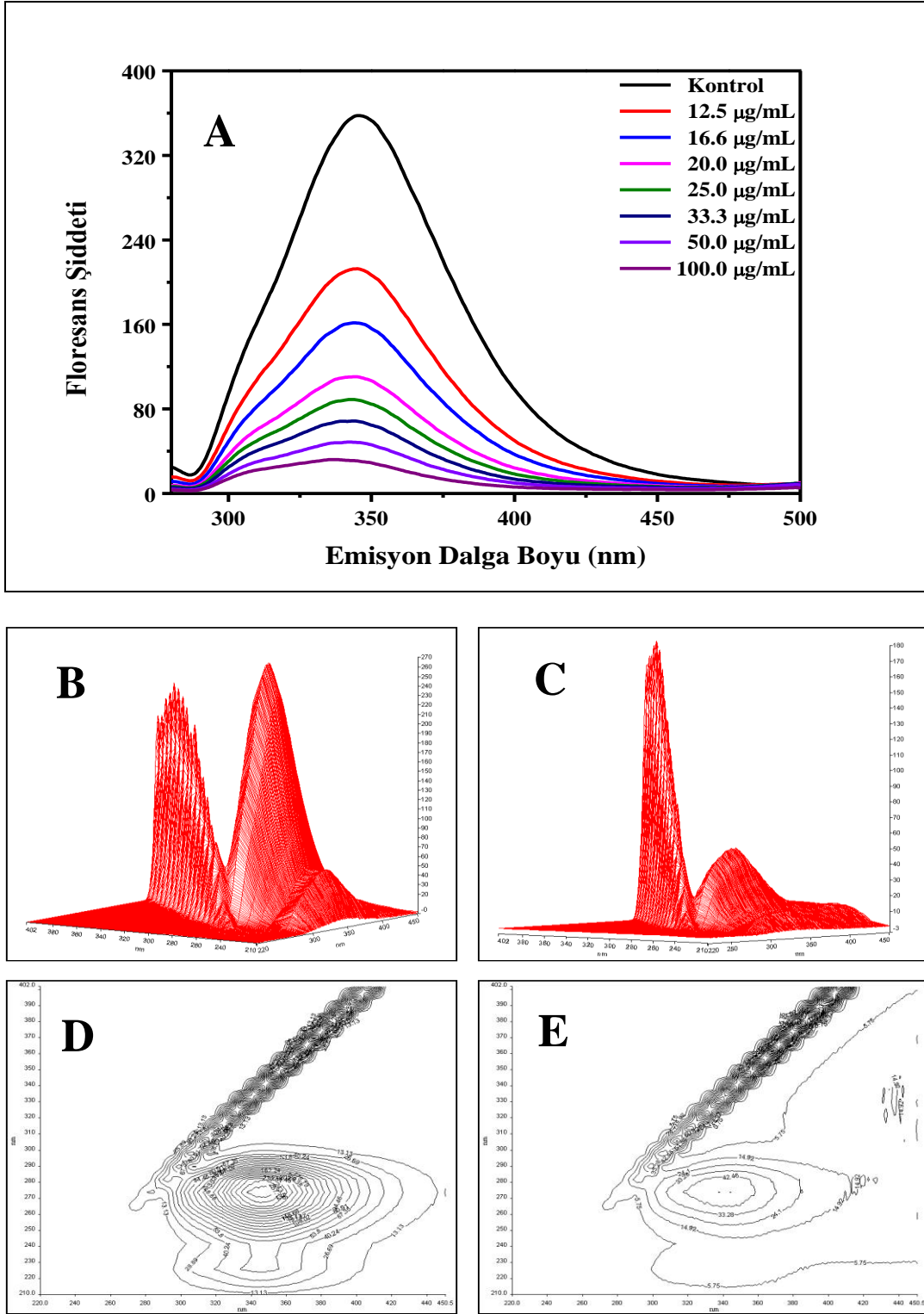
Endemik *P. ortegioides* türünden izole edilen doğal sekonder metabolitlerin HSA proteini ile olan etkileşimleri optimum konsantrasyon aralıklarında emisyon dalga boyu çalışma aralığı ise 285-500 nm arası seçilmiştir. Her bir doğal sekonder metabolitin bu emisyon dalga boyları arasındaki floresans şiddetindeki azalmaya bağlı olarak doğal sekonder metabolitlerin HSA molekülüne bağlanma kapasiteleri kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmiştir. İki boyutlu (2D-FL) ve üç boyutlu (3D-FL) floresans spektrumlarında pozitif kontrol olarak $5\mu\text{M}$ 'lık konsantrasyonda HSA proteini kullanılmıştır. Her bir sekonder metabolitin konsantrasyonu ise HSA proteini ile agregasyona sebep olmayacak şekilde optimize edilmiştir.

Bütün 3D-FL spektral çalışmaları emisyon dalga boyu (λ_{em}) 220-450 nm, uyarma dalga boyu (λ_{ex}) aralığı ise 205-402 nm aralığında kaydedildi.

2D-FL spektroskopi çalışmalarında izole edilen yeni 7,5'-dimetoksiizoetin ($12,5 \mu\text{g/mL}$) + HSA proteini ($5\mu\text{M}$) sistemi için $346,5 \text{ nm}$ 'deki emisyon dalga boyunda floresans şiddeti değeri 211,8 iken aynı emisyon dalga boyundaki HSA proteini ($5\mu\text{M}$) +

7,5'-dimetoksiizoetin (100 µg/mL) sistemdeki floresans şiddeti değeri 30,2'ye düşmüştür. 7,5'-dimetoksiizoetin molekülünün en düşük ve en yüksek konsantrasyondaki floresans şiddeti değerleri, pozitif kontrol olan HSA proteininin floresans şiddeti değeri (357,45) ile kıyaslandığında 7,5'-dimetoksiizoetin molekülünün ortamda bulunan HSA moleküllerinin florofor grupları ile önemli ölçüde etkileştiğini göstermektedir (Şekil 4.55).

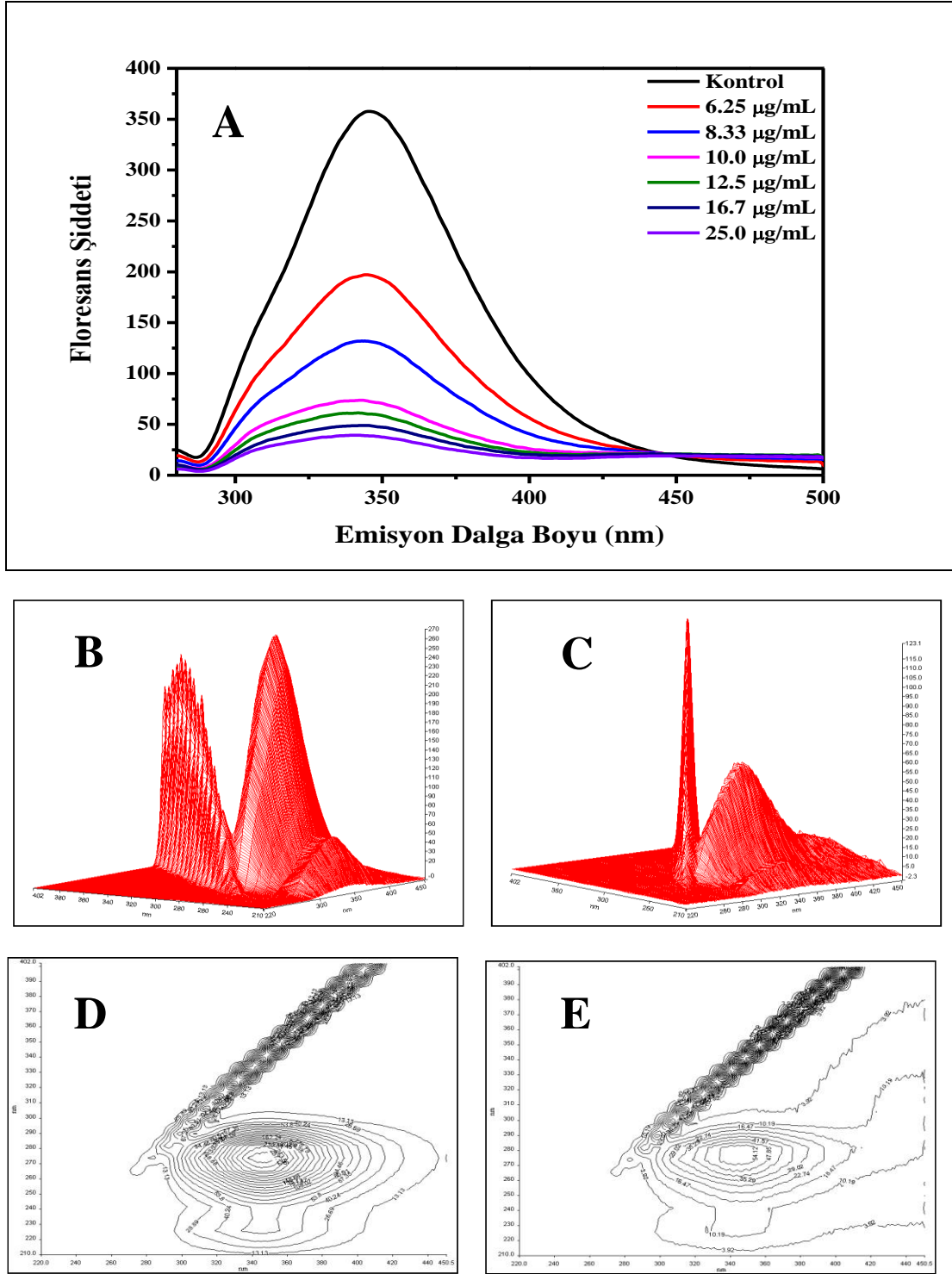
7,5'-dimetoksiizoetin (50 µg/mL) + HSA proteini (5µM) sistemi için floresans şiddeti 42,4 olarak ölçüldü ve bu floresans şiddetinde uyarma dalga boyu 275 nm, emisyon dalga boyu 344 nm olarak kaydedildi ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$:275/344) (Şekil 4.55).



Şekil 4.55. (A) Farklı konsantrasyonlardaki 7,5'-dimetoksiisoeugenol (1) molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteininin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + 7,5'-dimetoksiisoeugenol (1) sisteminin (50 µg/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteininin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + 7,5'-dimetoksiisoeugenol (1) sisteminin (50 µg/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir

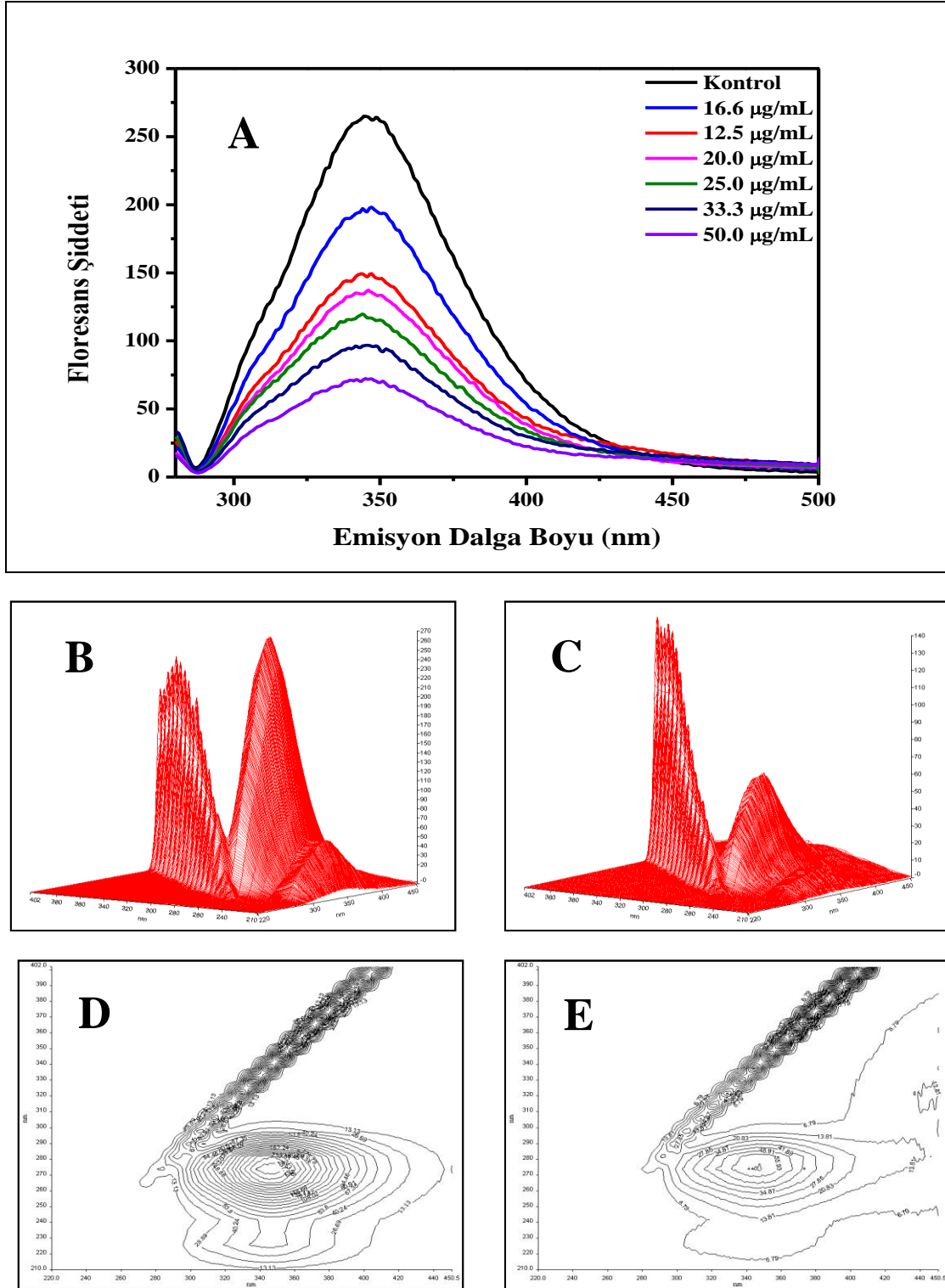
5 μ M HSA proteini ve farklı konsantrasyonlardaki (6,25-25 μ g/mL) homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) bileşimini içeren sistemlerin floresans şiddeti değerleri 38,6 ile 196,9 aralığında 345,5 nm'deki emisyon dalga boyunda kaydedildi.

Homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol (2) bileşimi (16,7 μ g/mL) + HSA proteini (5 μ M) sistemi için 3D-FL ve 3D harita yüzey spektrumlarında floresans şiddeti 54,1 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ değerleri 279/349 olarak ölçüldü (Şekil 4.56).



Şekil 4.56. (A) Farklı konsantrasyonlardaki homoorientin-6''-4-O-metil-myo-inositol (2) molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + homoorientin-6''-4-O-metil-myo-inositol (2) sisteminin (50 µg/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + homoorientin-6''-4-O-metil-myo-inositol (2) sisteminin (50 µg/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir

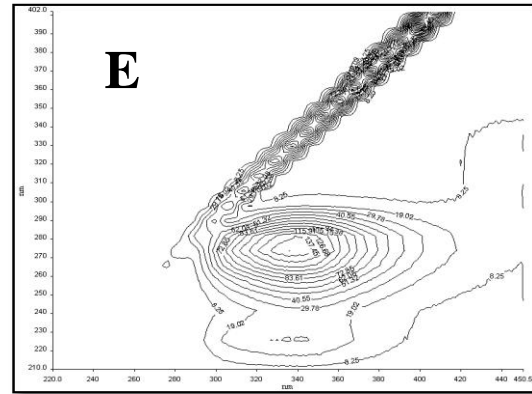
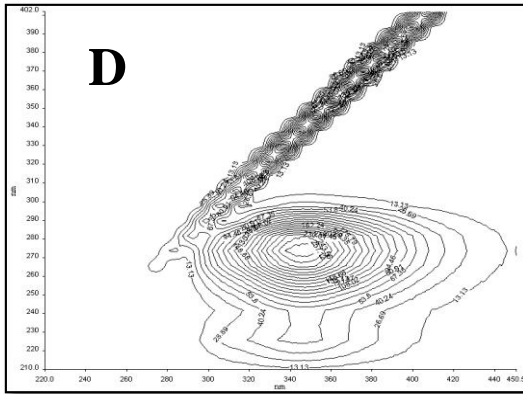
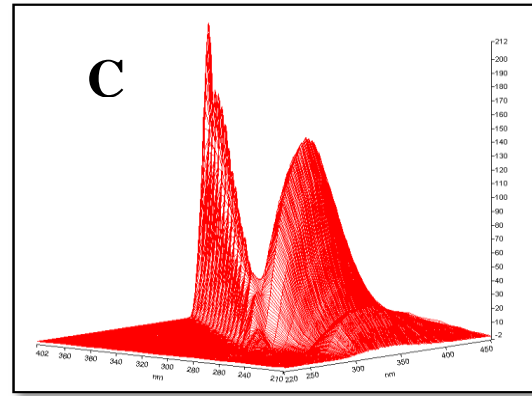
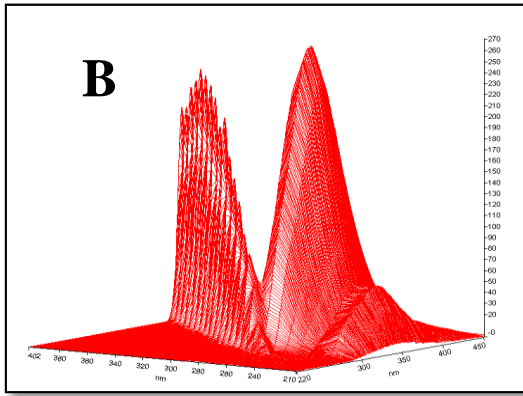
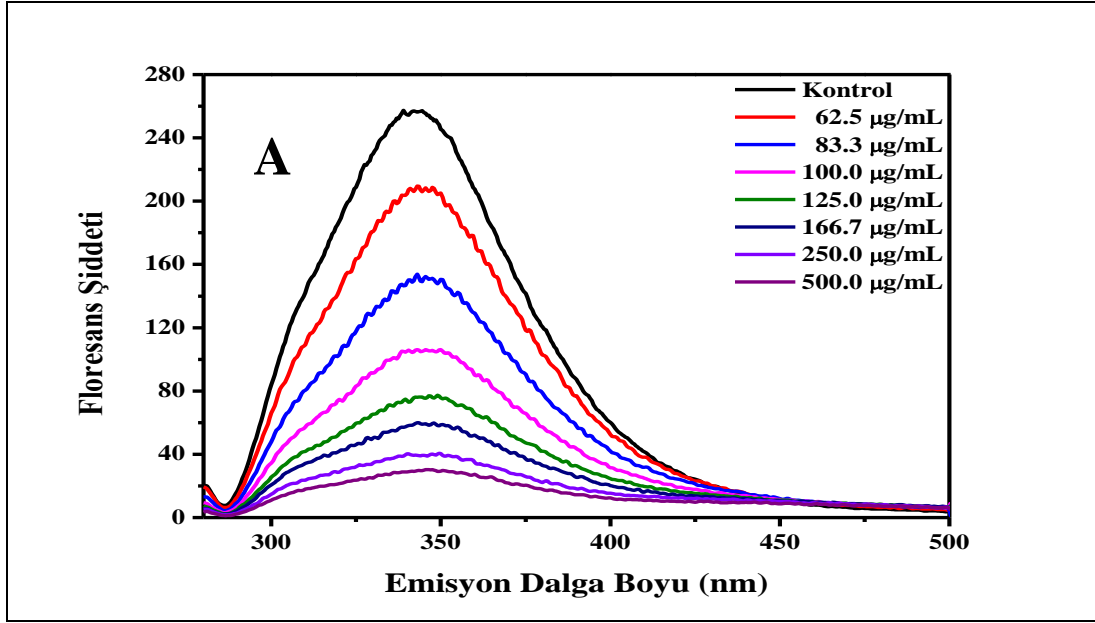
İzoorientin bileşigi + HSA proteini sistemleri için İzoorientinin artan konsantrasyonlarına karşı bu ilgili sistemlerin floresans şiddeti değerlerinde kayda değer azalmalar gözlemlendi. Örneğin izoorientin bileşigi (50 µg/mL) + HSA proteini (5µM) sistemi için floresans şiddeti 71,8 iken emisyon dalga boyu 346 nm olarak ölçüldü (Şekil 4.57).



Şekil 4.57. (A) Farklı konsantrasyonlardaki izoorientin (4) molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + izoorientin (4) sisteminin (50 µg/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + izoorientin (4) sisteminin (50 µg/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir

Genkvanin (4) bileşigi HSA proteini (5 μ M) ihtiva eden reaksiyon ortamına 62,5-500 μ g/mL aralığında oldukça yüksek konsantrasyonlarda ilave edildiğinde reaksiyon ortamındaki HSA proteininin önemli bir kısmını ancak kuençleştirebilmiştir.

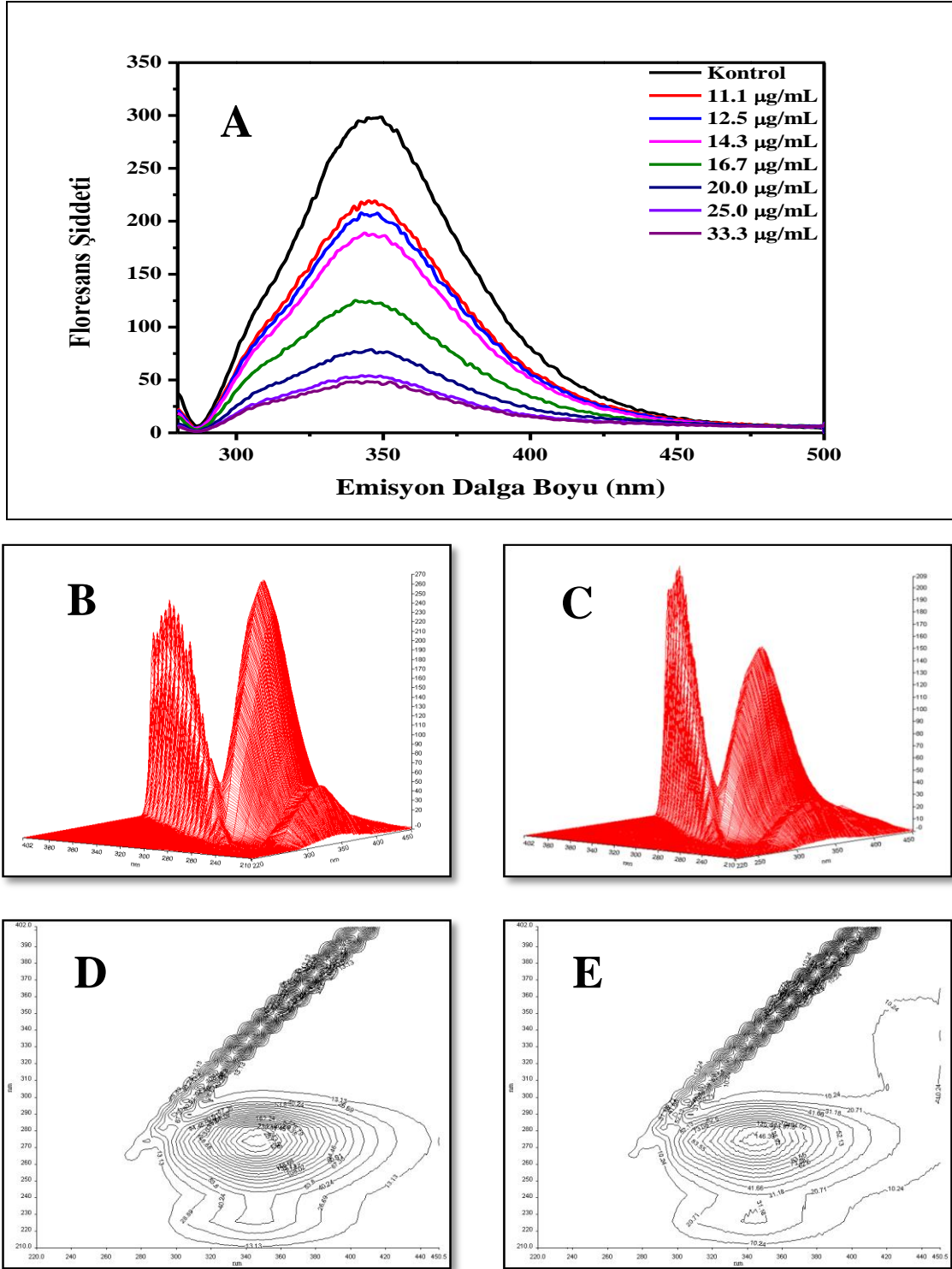
Genkvanin (37,5 μ g/mL) + HSA proteini (5 μ M) sistemi için 3D-FL ve 3D harita yüzey spektrumlarında floresans şiddeti 137,4 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ değerleri 271/342 olarak ölçüldü (Şekil 4.58).



Şekil 4.58. (A) Farklı konsantrasyonlardaki genkvanin (4) molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + genkvanin (4) sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + genkvanin (4) sisteminin (50 $\mu\text{g/mL}$) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenı emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenı uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenı ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenı emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenı uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir

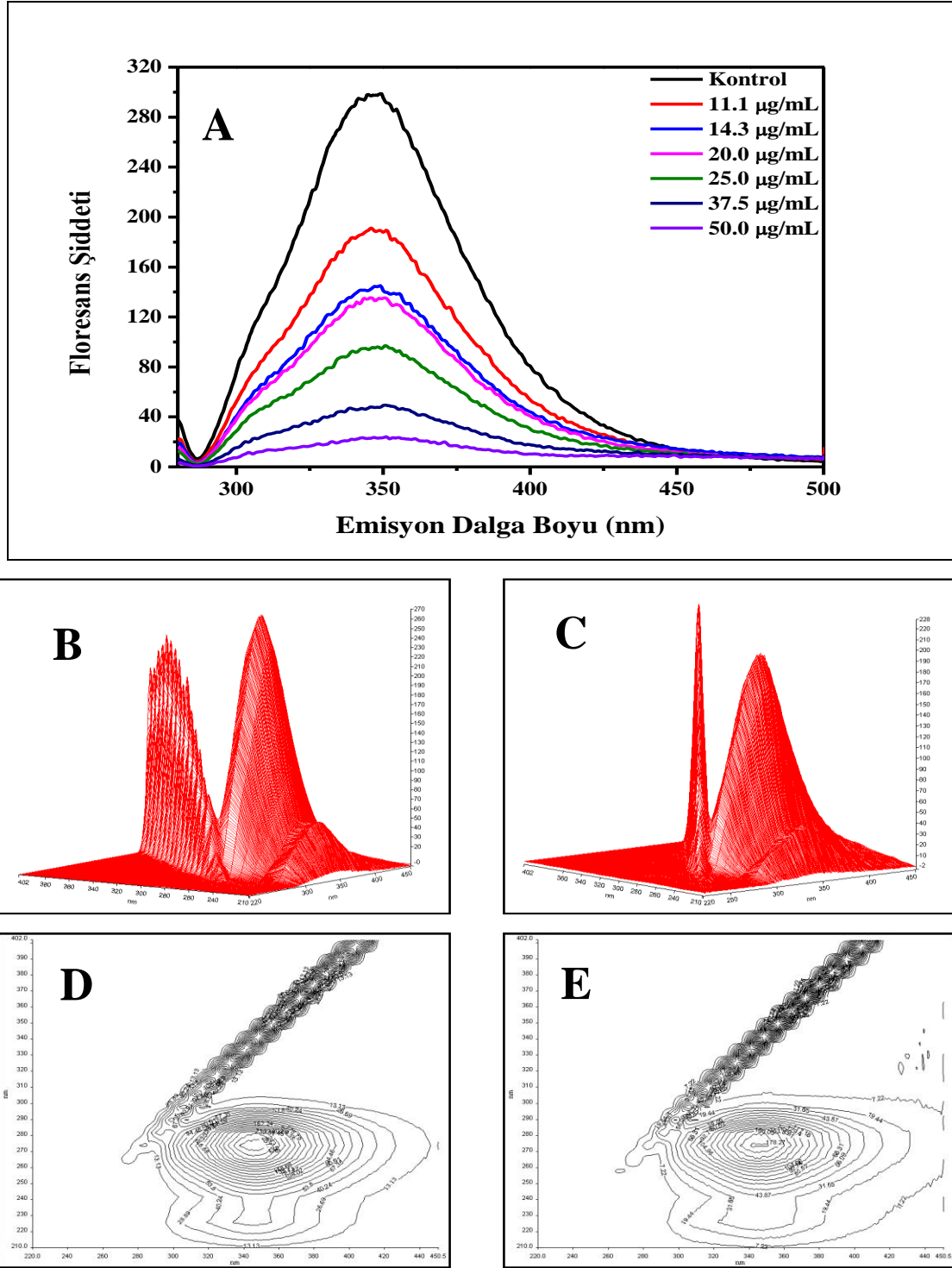
Şekil 4.60. incelendiğinde (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter bileşiği de artan konsantrasyonda HSA proteininin kuençleşmesine neden olmuştur.

(2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter (50 µg/mL) + HSA proteini (5µM) sistemi için 3D-FL ve 3D harita yüzey spektrumlarında floresans şiddeti 146,4 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ değerleri 273/345 olarak ölçüldü (Şekil 4.59).



Şekil 4.59. (A) Farklı konsantrasyonlardaki (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteininin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter sisteminin (50 µg/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteininin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + (2R,3R)-(+)-dihidrokamferol-7,4'-dimetileter sisteminin (50 µg/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir.

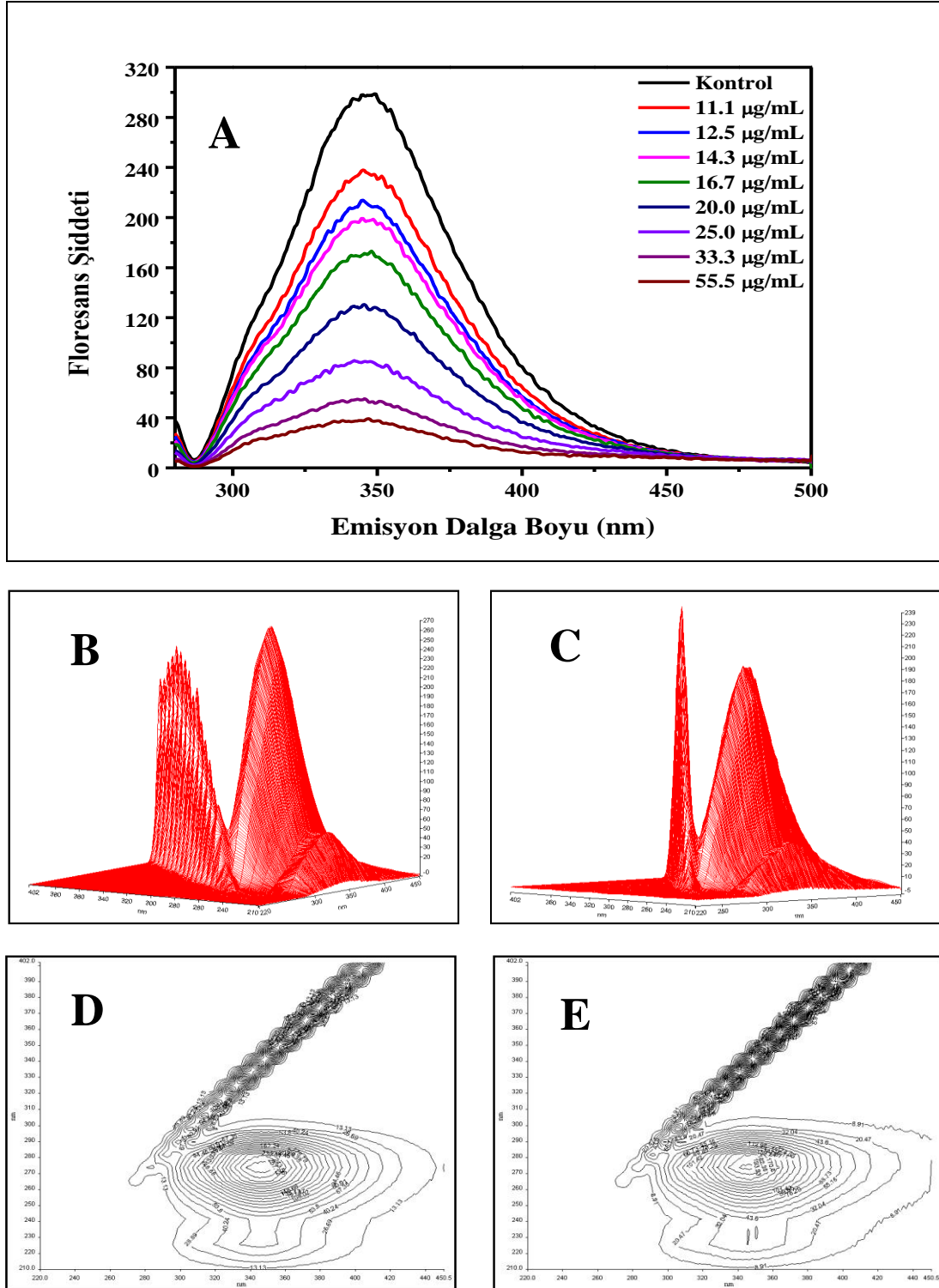
Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (37,5 µg/mL) + HSA proteini (5µM) sistemi için 3D-FL ve 3D harita yüzey spektrumlarında floresans şiddeti 178,2 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ değerleri 273/344 olarak ölçüldü. Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter (50 µg/mL) + HSA proteini (5µM) sistemi için 346 nm'deki emisyon dalga boyunda floresans şiddeti değeri 22,9 olarak ölçülmüştür (Şekil 4.60).



Şekil 4.60. (A) Farklı konsantrasyonlardaki eriodiktiyol-7,4'-dimetileter molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + eriodiktiyol-7,4'-dimetileter sisteminin (50 µg/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + eriodiktiyol-7,4'-dimetileter sisteminin (50 µg/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenı emisyon dalgı boyu (λ_{em}), y eksenı uyarma dalgı boyu (λ_{ex}) z eksenı ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenı emisyon dalgı boyunu (λ_{em}), y eksenı uyarma dalgı boyunu (λ_{ex}) göstermektedir

Halkalı polioller sınıfından bir siklotol türevi olan D-(+)-pinitol bileşiminin 2D-FL spektrumları incelendiğinde D-(+)-pinitol (55 µg/mL)+HSA proteini (5µM) sistemi için floresans şiddeti değeri 38,4 olarak emisyon dalga boyu ise 346 nm olarak kaydedildi.

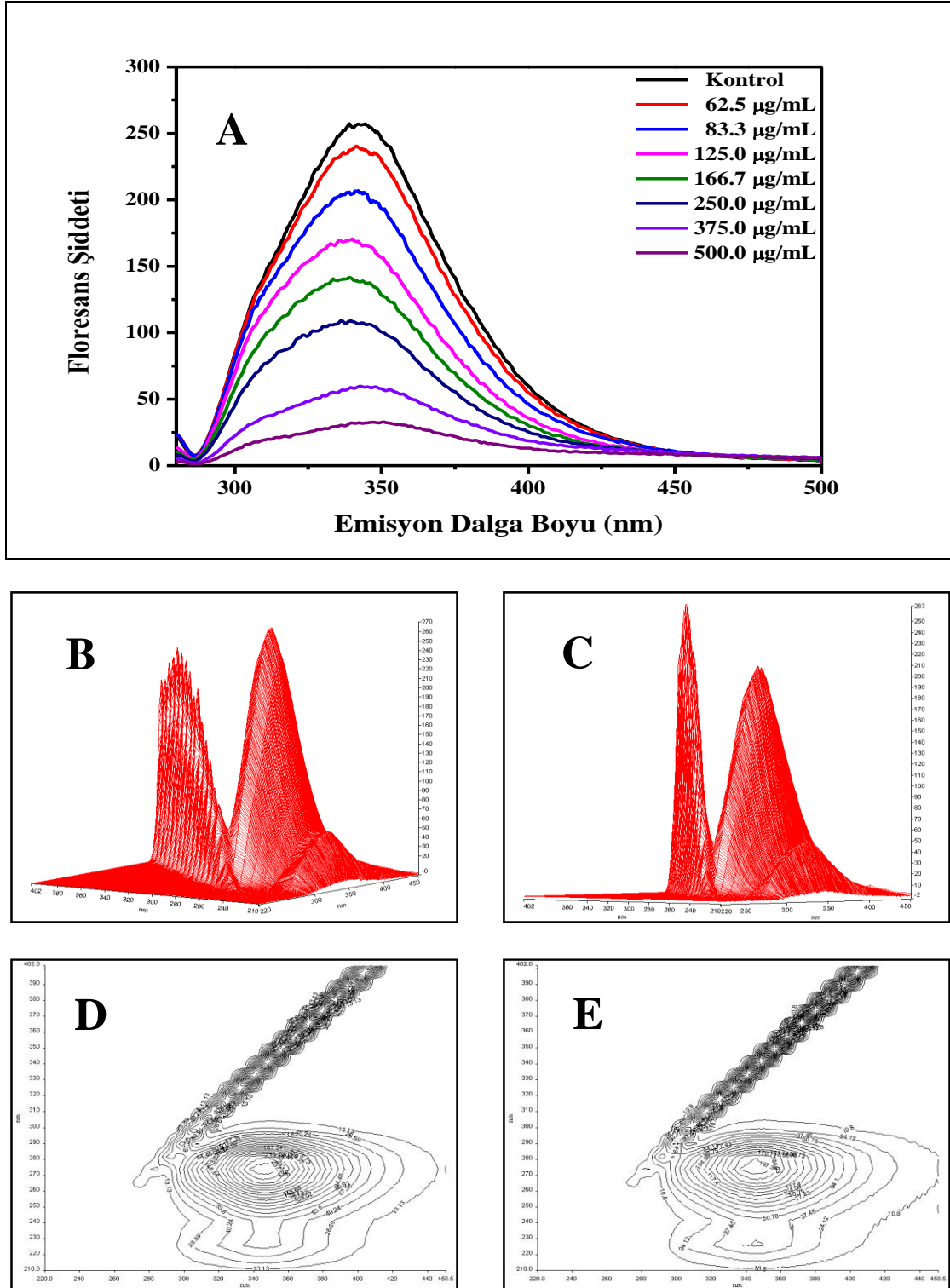
D-(+)-pinitol (33,5 µg/mL)+HSA proteini (5µM) sistemi için 3D-FL ve 3D harita yüzey spektrumlarında floresans şiddeti 193,9 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ değerleri 272/347 olarak ölçüldü (Şekil 4.61).



Şekil 4.61. (A) Farklı konsantrasyonlardaki D-(+)-pinitol molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + D-(+)-pinitol sisteminin (50 µg/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + D-(+)-pinitol sisteminin (50 µg/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir

Son olarak bir glikoz birimi ihtiva eden steroid türü bir bileşik olan 3-*O*- β -D-glukopiranozil spinasterol bileşiminin HSA proteini sistemi içerisindeki floresans şiddetini azaltma değeri 31,9 olarak ölçüldü. Bu floresans değerinde HSA proteinin ortamdaki konsantrasyonu 5 μ M bileşimin konsantrasyonu ise 500 μ g/mL olarak ayarlanmıştır. Bu sistem için uyarma dalga boyu değeri ise 341,5 nm olarak ölçülmüştür.

3-*O*- β -D-glukopiranozil spinasterol (33,5 μ g/mL) + HSA proteini (5 μ M) sistemi için 3D-FL ve 3D-FL harita yüzey spektrumlarında floresans şiddeti 197,3 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ değerleri 271/351 olarak ölçüldü (Şekil 4.62).



Şekil 4.62. (A) Farklı konsantrasyonlardaki 3-*O*-β-D-glukopiranozil spinasterol molekülünün HSA proteini ile etkileşiminden elde edilen 2D-FL spektrumları. (B) HSA proteinin 3D-FL spektrumu (5×10^{-6} M). (C) HSA (5×10^{-6} M) + 3-*O*-β-D-glukopiranozil spinasterol sisteminin (50 µg/mL) 3D-FL spektrumu. (D) HSA proteinin 3D harita yüzey spektrumu (5×10^{-6} M). (E) HSA (5×10^{-6} M) + 3-*O*-β-D-glukopiranozil spinasterol sisteminin (50 µg/mL) 3D harita yüzey spektrumu. 3D-FL spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyu (λ_{ex}) z eksenini ise floresans şiddetini göstermektedir. 3D harita yüzey spektrumlarında x eksenini emisyon dalga boyunu (λ_{em}), y eksenini uyarma dalga boyunu (λ_{ex}) göstermektedir

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Tez çalışması sonucu endemik *P. ortegioides* türünden ikisi yeni olmak üzere altı flavon ve flavon glikozit türevleri, bir halkalı siklitol türevi ve bir tanede steroid glikozit olmak üzere toplam sekiz doğal sekonder metabolit *P. ortegioides* taksonundan ilk defa izole edildi.

İzole edilen bileşiklerin ilaç öncülü bileşikler olarak kullanılabilirliklerini plazma proteini olan ve ilaçların taşınmasında aktif rol alan HSA proteini ile olan etkileşimleri *in vitro* iki boyutlu ve üç boyutlu floresans çalışmaları ile ortaya konuldu.

Çalışma kapsamında yeni olarak izole edilen homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol bileşiği bitkilerden 2016 yılına kadar izole edilmemiştir. Literatür çalışmalar incelendiğinde Flavonoit bileşiklerinin glikozidik formları ve aglikon formları çok yaygın olmasına rağmen homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol bileşiği gibi inositol grubu ihtiva eden flavon bileşikleri literatürde yok denecek kadar azdır. İnositol grubu içeren flavon bileşiklerinin literatür kayıtları incelendiğinde Badr ve arkadaşları tarafından 2016 yılında *Plicosepalus curviflorus* türünden inositol grubu ihtiva eden kateşin gallik asit türevinin izolasyon çalışmasına rastlanmıştır (Badr vd. 2016). Ayrıca tez çalışması kapsamında 7,5'-dimetoksiizoetin bileşiği de yeni bir flavonoit bileşiği olarak literatüre kazandırılmıştır. İzole edilen flavonoit ve onların türevleri içinde dihidrokamferol-7,4'-dimetileter ve eriodiktiyol-7,4'-dimetileter bileşikleri bitki taksonlarında nadir bulunan flavonoit türü bileşikleridir.

Tez çalışmasının biyolojik aktivite kısmında bu doğal sekonder metabolitlerin HSA proteini ile olan etkileşimleri kalitatif ve kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Genkvanin bileşiği hariç olmak üzere flavonoit bileşikleri ve onların türevlerinin HSA proteini ile olan etkileşimleri D-(+)-pinitol ve 3-*O*-β-D-glukopiranozil spinasterol bileşiklerine göre daha başarılı olduklarını söylemek mümkündür. Flavonoit bileşikleri içerisinde de en

fazla hidroksil grubu ihtiva eden flavonoit türevi bileşiklerin HSA proteini ile olan etkileşimleri kayda değer bulunmuştur. Bitki ekstresi ve sekonder metabolitlerin HSA proteini sistemini içerisinde 2D-FL ve 3D-FL çalışmaları incelendiğinde polar fonksiyonel grup ihtiva eden fenolik bileşiklerin ve polar ekstraktların HSA proteini ile daha iyi etkileştiği görülmüştür (Namiesnik vd. 2014; Park vd. 2015; Hamid vd. 2017). Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki polar fonksiyonel grup ihtiva eden sekonder metabolitlerin HSA proteini ile güçlü bir etkileşim kurduğunu da ispatlamaktadır. Sonuç olarak izole edilen bileşiklerin HSA proteinine bağlanma hassasiyetleri büyükten küçüğe doğru olacak şekilde; homoorientin-6''-4-*O*-metil-*myo*-inositol > 7,5'-dimetoksiizoeitin > İzoorientin>(2R,3R)-(+)-dihidrokaempferol-7,4'-dimetileter>Eriodiktiyol-7,4'-dimetileter > D-(+)-pinitol > 3-*O*-β-D-glukopiranozil spinasterol > Genkvanin şeklinde sıralanmıştır.

Bingöl İlinde doğal habitatlarında yetişen endemik *P. ortegioides* türünden izole edilen doğal sekonder metabolitlerin HSA proteinine bağlanma hassasiyetleri yüksek olanlarının özellikle antioksidan, antimikrobiyal, antikanser, antidiyabet ve anti-alzheimer aktivite gibi *in vitro* biyolojik aktivite parametreleri ile daha ileri biyokullanılabilirlikleri test edilebilir. Bunların yanında izole edilen saf bileşiklerin apoptozis ve telomeraz aktiviteleri moleküler düzeyde araştırılarak izole edilen bileşiklerin kimyasal yapı aktivite ilişkileri ortaya konulabilir.

Bitki kökenli doğal saf sekonder metabolitlerin ve bunların yarı sentetik türevleri başta ilaç endüstrisi olmak üzere gıda, kozmetik, tıp, eczacılık, fitoterapi gibi uygulama alanları gittikçe yaygınlaşmaktadır. Dolayısı ile izole edilen bileşiklerin yeni yarı sentetik türevleri elde edilerek bu bileşikler için yeni kullanım alanları oluşturulabilir.

KAYNAKLAR

Acar J (1998) Fenolik bileşikler ve doğal renk maddeleri. Ankara, 435-452, Hacettepe Univ. Yayınları

Akbay N, Topkaya D, Ergün Y, Alp S, Gök E (2010) Fluorescence study on the interaction of bovine serum albumin with two coumarin derivatives, *Journal of Analytical Chemistry* 65, 4: 382-387

Albert A (1958) Chemical aspects of selective toxicity *Nature* 182: 421-423

Badr JM, Ibrahim S R, Abou-Hussein DR (2016) Plicosepalin A, a new antioxidant catechin–gallic acid derivative of inositol from the mistletoe *Plicosepalus curviflorus*, *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(11-12): 375-380

Balza F, Jamieson L, Towers G H N (1985) Chemical constituents of the aerial parts of *Artemisia dracunculus* *J. Nat. Prod.* 48: 339-340

Bi S, Ding L, Tian Y, Song D, Zhou X, Liu X, Zhang H (2004) Investigation of the interaction between Flavonoids and human serum, *Journal of Molecular Structure*, 703, 37-45

Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti F O, Natali P G, Brunetti M, ... &, Piantelli M (2000) Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *International Journal of Cancer* 87(4): 595-600

Cemeroglu B, Yemenicioğlu A, Ozkan M (2001) Fenolik bileşikler: Meyve ve sebzelerin bileşimi, soğukta depolanmaları. Ankara, 78

Chaubal R, Pawar PV, Hebbalkar GD, Tungikar VB, Puranik VG, Deshpande VH, & Deshpande NR (2005) Larvicidal Activity of *Acacia nilotica* Extracts and Isolation of D-(+)-pinitol–A Bioactive Carbohydrate, *Chemistry and Biodiversity* 2: 684-688

Cram DJ and Hammond GS (1964) *Organic Chemistry*. McGraw-Hill Book Company, New York

Croft KD, Ann NY (1998) *Academic Science* 854: 435–442

Croft KD (1998) The chemistry and biological effects of Flavonoits and phenolic acids, *Annals of the New York Academy of Sciences* 854(1): 435-442

Eun-Ah BAE, Han MJ, Mase LEE, & Dong-Hyun KIM (2000) *In vitro* inhibitory effect of some Flavonoits on rotavirus infectivity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 23(9): 1122-1124

Gao K, Henning SM, Niu Y, Youssefian AA, Seeram NP, Xu A, & Heber D (2006) The citrus Flavonoit naringenin stimulates DNA repair in prostate cancer cells. *The Journal of nutritional biochemistry* 17(2): 89-95

Garrido L, Monagas M, Go' mez-Cordove' z C, Bartolome' B (2008) Polyphenols and antioxidant properties of almond skins: influence of industrial processing, *Food Chemistry* 73: C106–C115

Gecibesler IH, Demirtas I, & Behcet L (2016) Antioxidant Activity and Chemical Composition of the Lipophilic Fractions from *Phryna ortegioides*. *Chemistry of Natural Compounds* 52(4): 679-682

Greco O ve Dachs GU (2001) Gene directed enzyme/prodrug therapy of cancer: historical appraisal and future prospectives *J. Cell Physiol. Apr*; 187(1):22-36

Haisma HJ, Boven E, Van Muijen M, De Jong J, Van Der Vijgh WJ, Pinedo HM (1992) A monoclonal antibody- β -glucuronidase conjugate as activator of the prodrug epirubicin-glucuronide for specific treatment of cancer. *Br J Cancer*. 66: 474-478

Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE (1993) Free Radicals, Antioxidants and Human Disease: Where are We Now?, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119, 6: 598-613

Hamid NAA, Mediani A, Maulidiani M, Abas F, Park YS, Leontowicz H, & Gorinstein S (2017) Characterization of metabolites in different kiwifruit varieties by NMR and fluorescence spectroscopy. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 138: 80-91

Han HK (2000) Targeted Prodrug Design to Optimize Drug Delivery *AAPS Pharmsci* 2 (1) article 6

Hansen MB (2003) The enteric nervous system II: gastrointestinal functions. *Pharmacology & toxicology* 92(6): 249-257

Hegarty VM, May HM, & Khaw KT (2000) Tea drinking and bone mineral density in older women. *The American journal of clinical nutrition* 71(4): 1003-1007

Horo I, Masullo M, Falco A, Şenol SG, Piacente S, Alankuş-Çalışkan Ö (2015) New triterpene saponins from *Phryna ortegioides*. *Phytochemistry Letters* 14: 39-44

Hou X, Tong X, Dong W, Dong W, Dong C, Shuang S (2007) Synchronous fluorescence determination of human serum albumin with metil blue as a fluorescence probe, *Spectrochimica Acta A* 66: 552-556

Huang M, Ferraro T (1992) Phenolic compounds in food cancer prevention, *American Chemical Society Symposium Series* 507: 8-35

Kampa M, Alexaki VI, Notas G, Nifli AP, Nistikaki A, Hatzoglou A, Gravanis A (2003) Antiproliferative and apoptotic effects of selective phenolic acids on T47D human breast cancer cells: potential mechanisms of action. *Breast Cancer Research* 6(2): R63

Kandemir A, Genç G ve Genç İ (2009) *Silene dumanii* (*Caryophyllaceae*), a new species from East Anatolia, Turkey. *Annales Botanici Fennici* 46: 71-74

Kılıç Ö, Behçet L, & Bağcı E (2013) Essential oil composition of *Phryna ortegioides* (Fisch. & Mey.) Pax & Hoffm. from Turkey, *E3 Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research* 4(6): 94-98

Lee TH, Lee SM, Lee DY, Son Y, Chung DK, Baek NI, & Kim J (2011) A glycosidic spinasterol from *Koreana stewartia* promotes procollagen production and inhibits matrix metalloproteinase-1 expression in UVB-irradiated human dermal fibroblasts, *Biological and Pharmacetucal Bulletin* 3: 768-773

Li JC, Li N, Wu QH, Wang Z, Ma JJ, Wang C, Zhang LJ (2007) Study on the interaction between clozapine and bovine serum albumin, *J. Molecular Structure* 833: 184-188

Lima OA, Polonsky EJ (1973) Les constituants Flavonoites de *Cephalanthus spathelliferus* *Phytochemistry* 12: 913-916

Maier G, Mayer P, Dietrich H, Wucherpennig K (1990) Polyphenol oxidases and their application in the stabilization of fruit juices, *Flüssiges Obst* 57(4): 230-239

Mandalari G, Tomaino A, Arcoraci T, Martorana M, Lo Turco V, Cacciola F, Rich GT, Bisignano C, Saija A, Dugo P, Cross KL, Parker ML, Waldron KW, Wickham MSJ (2010) Characterization of polyphenols, lipids and dietary fibre from almond skins (*Amygdalus communis* L.), *Journal of Food Composition and Analysis* 23: 166-174

Milbury PE, Chen C, Mandalari G, Tomaino A, Arcoraci T, Martorana M, Lo Turco V, Cacciola F, Rich GT, Bisignano C, Saija A, Dugo P, Cross KL, Parker ML, Waldron KW, Wickham MSJ (2010)

Milbury PE, Chen CH, Dolnikowski GG, Blumberg JB (2006) Determination of Flavonoits and phenolics and their distribution in almonds, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 5027-5033

Naik PN, Chimatadar ST, Nandibewoor ST (2009) Study on the interaction between antibacterial drug and bovine serum albumin; A spectroscopic approach, *Spectrochimica Acta Part A* 73: 841-845

Namiesnik J, Vearasilp K, Nemirovski A, Leontowicz H, Leontowicz M, Pasko P, & Gorinstein S (2014) *In vitro* studies on the relationship between the antioxidant activities of some berry extracts and their binding properties to serum albumin. *Applied biochemistry and biotechnology* 172(6): 2849-2865

Oliveira DMD, Siqueira EP, Nunes YR, & Cota BB (2013) Flavonoits from leaves of *Mauritia flexuosa*, *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23: 614-620

Park YS, Polovka M, Martinez-Ayala AL, González-Aguilar GA, Ham KS, Kang SG, ... & Gorinstein S (2015) Fluorescence studies by quenching and protein unfolding on the interaction of bioactive compounds in water extracts of kiwi fruit cultivars with human serum albumin. *Journal of Luminescence* 160: 71-77

Ray G, Leelamanit W, Sithisarn P, & Jiratchariyakul W (2014) Antioxidative compounds from *Aquilaria crassna* leaf, *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences* 41: 54-58

Rendell D (1987) *Fluorescence and Phosphorescence*, Published on behalf of ACOL, Thames Polytechnic, London

Rendell D ve Mowthorpe DJ (1987) *Fluorescence and phosphorescence spectroscopy*. Published on behalf of ACOL, London by Wiley

Sarıkaya AO (2009) Kestane bal ve propolisinin fenolik asit kompozisyonu ve antioksidan özelliğinin belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi. K.T.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Trabzon

Schuster B ve Herrmann K (1985) Hidroxybenzoic and hidroxicinnamic acid derivatives in soft fruits, *Phytochemistry* 24: 2761-2764

Shaikh SMT, Seetharamappa J, Kandagal PB, Manjunatha DH, Ashoka S (2007) Spectroscopic investigations on the mechanism of interaction of bioactive dye with bovine serum albumin, *Dyes and Pigments* 74: 665-671

Stella VJ ve Himmelstein KJ (1982) Critique of prodrugs and site specific delivery. In: Bundgaard H, ed. *Optimization of Drug Delivery*. Alfred Benzon Symposium 17. Copenhagen, Munksgaard. 134-155

Tarnawski M, Depta K, Grejciun D, Szelepin B (2006) HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract-a natural immunomodulator, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 182-188

Wang YQ, Zhang HM, Zhang GC (2006) Studies of the interaction between palmatine hydrochloride and human serum albumin by fluorescence quenching method, J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41: 1041-1046

Wei YI, Li JQ, Dong C, Shuang SM, Liu DS, Huie CW (2006) Investigation of the association behaviors between biliverdin and bovine serum albumin by fluorescence spectroscopy, Talanta 70: 377-382

Xu G ve McLeod HL (2001) Strategies for enzyme/prodrug cancer therapy. Clin Cancer Res. 7(11): 3314-24

Yıldız K, & Dadandı M (2009) *Silene cirpicii* (*Caryophyllaceae*), a new species from Turkey. Ann. Bot. Fennici 46: 464-468

Youdim KA, & Joseph JA (2001) A possible emerging role of phytochemicals in improving age-related neurological dysfunctions: a multiplicity of effects, Free Radical Biology and Medicine 30(6): 583-594

Zhou B, Qi ZD, Xiao Q, Jia-Xin Dong JX, Zhang YZ, Liu Y (2007) Interaction of loratadine with serum albumins studied by fluorescence quenching method, J. Biochem. Biophys. Methods 70: 743-74

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Elazığ'ın Yazıkonak Beldesi'nde dünya geldi. İlköğrenimini Yazıkonak 8evler İlkokulunda, ortaöğrenimini Korgeneral Hulusi Sayın Lisesi'nde, lisans eğitimini Fırat Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde tamamladı. 2009-2010 yıllarında Fırat Üniversitesi Eğitim Bilimleri Fakültesi'nde Tezsiz Yüksek Lisans yaptı. Şimdi ise Gençlik ve Spor Bakanlığına bağlı Kredi Yurtlar Kurumunda Yurt Yönetim Personeli olarak görev yapmaktadır.