

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



***SİDERİTİS HİSPIDA* P. H. DAVIS BİTKİSİNİN
FİTOKİMYASAL ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEMET AÇAR

BALIKESİR, OCAK - 2016

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI**



***SİDERİTİS HİSPIDA* P. H. DAVIS BİTKİSİNİN
FİTOKİMYASAL ANALİZLERİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEMET AÇAR

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Turgut KILIÇ (Tez Danışmanı)

Prof. Dr. Akın AZİZOĞLU

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

BALIKESİR, OCAK - 2016

KABUL VE ONAY SAYFASI

Demet AÇAR tarafından hazırlanan “*SİDERİTİS HİSPİDA P. H. DAVIS BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL ANALİZLERİ*” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 08.01.2016 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. Turgut KILIÇ



Üye
Prof. Dr. Akın AZİZOĞLU



Üye
Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Doç. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması TÜBİTAK tarafından 113Z710 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

***SIDERİTİS HİSPIDA* P. H. DAVIS BİTKİSİNİN FİTOKİMYASAL
ANALİZLERİ
YÜKSEK LİSANS TEZİ
DEMET AÇAR
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI
(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. TURGUT KILIÇ)
BALIKESİR, OCAK - 2016**

TÜBİTAK 113Z710 No'lu proje kapsamında desteklenen bu çalışmada Türkiye için endemik bir tür olan *Sideritis hispida* P. H. Davis bitkisinin fitokimyasal olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla bitkinin uçucu yağ analizi yapılmış, hazırlanan hekzan, aseton ve metanol ekstraları fenolik ve diterpenik bileşikler yönünden incelenmiştir.

Uçucu yağ analizleri GC/MS ile yapılmış olup, temel bileşenler α -kadinol (%41.1), α -kadinen (%13.3) ve karyofilen (%5.0) olarak belirlenmiştir.

LC/MS-MS ile yapılan fenolik bileşik analizlerinde ana bileşenler hekzan ekstresi için salvigenin ($323,78 \pm 22,04$) mg/kg, hekzan sonrası aseton ve aseton sonrası metanol ile doğrudan hazırlanan aseton ve metanol ekstraları için ise klorojenik asit olup miktarlarının sırasıyla ($801,79 \pm 111,03$), ($1651,9 \pm 228,75$), ($1122,11 \pm 155,38$), ($1042,51 \pm 144,36$) mg/kg olduğu belirlenmiştir. Ayrıca infüzyon ve dekoksasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstralarının de fenolik analizi yapılmış olup, temel bileşenlerin infüzyon yöntemi için t-ferulik asit ($93,66 \pm 6,54$ mg/kg), dekoksasyon yöntemi için ise fumarik asit ($614,18 \pm 42,59$ mg/kg) olduğu belirlenmiştir.

Hazırlanan ekstralardan 6 tane diterpen, 1 tane steroid izole edilmiş olup yapıları spektroskopik yöntemlerle ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, HMQC, HMBC); Siderol (*ent-7 α -asetil-18-hidroksikaur-15-en*) (1), Sidol (*ent-3 β -asetil-7 α ,18-dihidroksikaur-16-en*) (2), Eubotriol (*ent-7 α ,15 β ,18-trihidroksikaur-16-en*) (3), 7-asetil sideroksol (*ent-7 α -asetoksi-18-hidroksi-15 β ,16 β -epoksikauran*) (4), Linearol (*ent-3,7-dihidroksi,18-asetoksi-kaur-16-en*) (5), Sideroksol (*ent-7 α -18-dihidroksi-15 β ,16 β -epoksi kauran*) (6), stigmasterol ((*3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R*)-17-[(*E,2R,5S*)-5-etil-6-metilhept-3-en-2-il]-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17 dodekahidro-1*H*-sikllopenta[*a*]fenantren-3-ol)) (7) olarak belirlenmiştir.

Ham ekstraların antimikrobiyal, antioksidan ve anti-Alzheimer aktivite testleri yapılmış olup, çalışılan mikroorganizmalardan sadece *Candida albicans*'a karşı hekzan ve aseton ekstraları zayıf aktivite gösterirken, DPPH, CUPRAC ve β -karoten linoleik asit yöntemiyle yapılan antioksidan aktivite testlerine göre ise aseton ve metanol ekstraları oldukça aktif bulunmuştur. Ekstraların hiçbirisi AChE enzimini inhibe etmezken BChE enzimine karşı en iyi inhibisyon değeri metanol ekstresinde gözlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELER: *Sideritis hispida* P. H. Davis, Uçucu yağ, Fenolik bileşik, Diterpen, Antimikrobiyal aktivite, Antioksidan aktivite, Anti-Alzheimer aktivite

ABSTRACT

PHYTOCHEMICALS ANALYSIS OF *SIDERITIS HISPIDA* P. H. DAVIS
MSC THESIS
DEMET AÇAR
BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
CHEMISTRY
(SUPERVISOR: PROF. DR. TURGUT KILIÇ)
BALIKESİR, JANUARY 2016

In this study, which was supported by TÜBİTAK project number 113Z710, aimed to investigate *Sideritis hispida* P. H. Davis endemic to Turkey in terms of phytochemistry. For this purpose, the essential oil of the plant was analyzed, and the hexane, acetone and methanol extracts prepared from plants were investigated in terms of phenolic and diterpenic compounds.

The analyses of the essential made with GC/MS, α -cadinol (41.1%), α -cadinene (13.3%) and caryophyllene (5.0%) were determined as main components.

The analyze of phenolic compounds made with LC/MS-MS, for the hexane extract salvigenin (323,78±22,04 mg/kg) determined as a main compound, for the acetone and methanol extract that was prepared after hexane, and directly prepared acetone and methanol extracts, chlorogenic acid was the main compound and the amount of these compound as follow; (801,79±111,03), (1651,9±228,75), (1122,11±155,38), (1042,51±144,36) mg/kg. Furthermore the water extract which were prepared infusion and decoction method also analyzed in terms of phenolic compounds and t-ferrulic acid was found to be main component of the infusion (93,66±6,54 mg/kg), fumaric acid was found to be main components of the decoction method (614,18±42,59 mg/kg).

Six diterpenes and one steroid isolated from the extracts and their structure were elucidated using spectral methods ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, COSY, HMQC, HMBC); Siderol (*ent-7 α -acetyl-18-hydroxykaur-15-ene*) (1), Sidol (*ent-3 β -acetyl-7 α ,18-dihydroxykaur-16-ene*) (2), Eubotriol (*ent-7 α ,15 β ,18-trihydroxykaur-16-ene*) (3), 7-acetyl sideroxol (*ent-7 α -acetoxy-18-hydroxy-15 β ,16 β -epoxykauran*) (4), Linearol (*ent-3,7-dihydroxy,18-acetoxy-kaur-16-ene*) (5), Sideroxol (*ent-7 α -18-dihydroxy-15 β ,16 β -epoxykauran*) (6), stigmasterol ((3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*E*,2*R*,5*S*)-5-ethyl-6-methylhept-3-ene-2-yl]-10,13-dimethyl-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17 dodecahydro-1*H*-cyclopenta[*a*] phenanthrene-3-ol)) (7).

The antimicrobial, antioxidant and anti-Alzheimer's activity test of crude extracts were studied, in all the studied microorganisms, the hexane and acetone extracts have showed weak activity against only *Candida albicans*, according to the DPPH, CUPRAC and β -carotene-linoleic acid assays acetone and methanol extracts have showed strong antioxidant activity. None of the extracts have inhibited the enzyme AChE, the best inhibition values against BChE enzyme was observed in the methanol extracts.

KEYWORDS: *Sideritis hispida* P. H. Davis, Essential oil, Phenolic component, Diterpene, Antimicrobial activity, Antioxidant activity, Anti-Alzheimer activity

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
SEMBOL LİSTESİ.....	ix
ÖNSÖZ.....	x
1. GİRİŞ.....	111
1.1 Bitkinin Özellikleri.....	12
1.1.1 Labiatae (Lamiaceae) Familyası.....	12
1.1.2 Sideritis Cinsi.....	12
1.1.3 Sideritis hispida P.H. Davis.....	13
1.2 Sideritis Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı.....	16
1.3 Sideritis Cinsi Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar.....	19
1.4 Uçucu Yağlar.....	20
1.5 Terpenler.....	23
1.5.1 Terpenlerin Sınıflandırılması ve Biyosentezi.....	25
1.5.1.1 İzopentenil Pirofosfatın Oluşumu.....	26
1.5.1.2 Monoterpenler.....	29
1.5.1.2.1 Asiklik Monoterpenler.....	31
1.5.1.2.2 Monosiklik Monoterpenler.....	31
1.5.1.2.3 Bisiklik Monoterpenler.....	32
1.5.1.3 Seskiterpenler.....	33
1.5.1.3.1 Asiklik Seskiterpenler.....	33
1.5.1.3.2 Monosiklik Seskiterpenler.....	34
1.5.1.3.3 Bisiklik Seskiterpenler.....	34
1.5.1.3.4 Trisiklik Seskiterpenler.....	35
1.5.1.4 Diterpenler.....	35
1.5.1.4.1 Biyogenetik Sınıflandırma.....	38
1.5.1.4.2 Asiklik Diterpenler.....	38
1.5.1.4.3 Monosiklik Diterpenler.....	39
1.5.1.4.4 Bisiklik Diterpenler.....	39
1.5.1.4.4.1 Labdanlar.....	39
1.5.1.4.4.2 Klerodanlar.....	40
1.5.1.4.5 Trisiklik Diterpenler.....	41
1.5.1.4.5.1 Pimaranlar.....	41
1.5.1.4.5.2 Abietanlar.....	42
1.5.1.4.5.3 Kassarlar.....	43
1.5.1.4.5.4 Rosanlar.....	44
1.5.1.4.6 Tetrasiklik Diterpenler.....	44
1.5.1.4.6.1 Kaurenler.....	47
1.5.1.4.6.2 Beyerenler.....	49
1.5.1.5 Sesterpenler.....	50
1.5.1.6 Triterpenler.....	50
1.5.1.7 Tetraterpenler.....	51

1.5.1.8	Politerpenler	52
1.6	Fenolik Bileşikler	54
1.6.1	Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması	54
1.6.1.1	Flavonoid Olmayanlar (Fenolik Asitler)	54
1.6.1.2	Flavonoidler	55
1.6.1.2.1	Antosiyanidinler	56
1.6.1.2.2	Flavonlar ve Flavonollar	56
1.6.1.2.3	Flavanonlar	57
1.6.1.2.4	Kateşinler	57
1.6.1.2.5	Proantosiyanidinler	58
2.	DENEYSEL BÖLÜM	60
2.1	Materyal	60
2.1.1	Bitkisel Materyal	60
2.1.2	Kimyasal Materyal	60
2.2	Yöntem	60
2.2.1	Ekstraksiyon	61
2.2.2	Kromatografi	61
2.2.2.1	Kolon Kromatografisi	61
2.2.2.2	İnce Tabaka Kromatografisi	61
2.2.2.3	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi	62
2.3	Spektroskopik Yöntemler	62
2.3.1	NMR (¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, COSY, HMQC, HMBC)	62
2.4	Kullanılan Belirteçler	63
2.4.1	Seryum (IV) Sülfat Belirtecinin Hazırlanması	63
2.5	Uçucu Yağların Elde Edilmesi ve Analizi	63
2.6	Fenolik Bileşiklerin Elde Edilmesi ve Analizi	63
2.6.1	Test Çözeltilerinin Hazırlanması	64
2.6.2	Kromatografik Koşullar	64
2.6.3	HPLC Metodu ve LC-MS/MS Prosedürünün Optimizasyonu	65
2.6.4	Deneyleerin Validasyonu ve Belirsizliğin Değerlendirmesi	67
2.7	Biyolojik Aktivite	69
2.7.1	DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi	69
2.7.2	Lipid Peroksidasyonu İnhibisyonu Aktivitesi (β-Karoten- Linoleik Asit Yöntemi)	70
2.7.3	Cu ⁺² İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC)	71
2.7.4	Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi	72
2.7.5	Antimikrobiyal Aktivite	72
3.	BULGULAR	74
3.1	Sideritis hispida'dan Elde Edilen Uçucu Yağ Bileşenleri	74
3.2	Sideritis hispida'dan Elde Edilen Terpen Bileşenleri	77
3.2.1	Siderol (ent-7α-asetil-18-hidroksikaur-15-en) (1)	77
3.2.2	Sidol (ent-3β-asetil-7α,18-dihidroksikaur-16-en) (2)	91
3.2.3	Eubotriol (ent-7α,15β,18-trihidroksikaur-16-en) (3)	95
3.2.4	7-asetil sideroksol (ent-7α-asetoksi-18-hidroksi-15β,16β- epoksikauran) (4)	103
3.2.5	Linearol (ent-3,7-dihidroksi,18-asetoksi-kaur-16-ene) (5)	108
3.2.6	Sideroksol (ent-7α,18-dihidroksi-15β,16β-epoksikauran)	113
3.3	Diğer Bileşikler	116
3.4	Sideritis hispida'dan Elde Edilen Fenolik Bileşikler	116
3.5	Biyolojik Aktivite Sonuçları	119

3.5.1	DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları.....	119
3.5.2	β -Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları	120
3.5.3	Cu ⁺² İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC) Sonuçları	121
3.5.4	Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları.....	122
3.5.5	Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları.....	123
4.	SONUÇ VE ÖNERİLER	125
5.	KAYNAKLAR.....	128

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1:	<i>Sideritis hispida</i> P. H. Davis a) Çiçek durumu, b) Habitat	15
Şekil 1.2:	İzopren (2-metilbüta-1,3-dien)	24
Şekil 1.3:	Mirsen molekülünün oluşumu	24
Şekil 1.4:	α -pinen molekülünün oluşumu	24
Şekil 1.5:	Adenozintrifosfat (ATP)	26
Şekil 1.6:	Koenzim A	27
Şekil 1.7:	Malonil-CoA oluşumu.....	27
Şekil 1.8:	İzopentenil pirofosfat oluşumu.....	28
Şekil 1.9:	İzopentenil pirofosfat denge reaksiyonu	29
Şekil 1.10:	Bazı monoterpenler	30
Şekil 1.11:	2,6-dimetiloktan	31
Şekil 1.12:	Bazı asiklik monoterpenler.....	31
Şekil 1.13:	Bazı monosiklik monoterpenler	32
Şekil 1.14:	Sabinen	32
Şekil 1.15:	Bazı seskiterpenler	33
Şekil 1.16:	Farnesol	34
Şekil 1.17:	α -bisabolol.....	34
Şekil 1.18:	Karyofilen.....	35
Şekil 1.19:	Bazı trisiklik seskiterpenler.....	35
Şekil 1.20:	Diterpenlerin biyosentezi için önerilen mekanizmalar.....	37
Şekil 1.21:	Diterpenlerin pirofosfat grubunun ayrılmasıyla siklizasyonu	38
Şekil 1.22:	Fitol	38
Şekil 1.23:	Virodolis A.....	39
Şekil 1.24:	Bazı labdanlar.....	40
Şekil 1.25:	Backbone ve Friedo düzenlenmesi ile klerodanların oluşumu.....	40
Şekil 1.26:	Bisiklik diterpenler	41
Şekil 1.27:	Pimaranların oluşumu	42
Şekil 1.28:	Bazı pimaranlar	42
Şekil 1.29:	Abietanların oluşumu	43
Şekil 1.30:	Bazı abietanlar	43
Şekil 1.31:	Kassan türevleri.....	44
Şekil 1.32:	Rosan türevleri	44
Şekil 1.33:	Karbokatyon ara ürününden; <i>ent</i> -beyeren, <i>ent</i> -atisen, <i>ent</i> -trakiloban, <i>ent</i> -kauren oluşumları.....	46
Şekil 1.34:	Bazı tetrasiklik diterpenler	47
Şekil 1.35:	Kauren ve <i>ent</i> -kauren iskeletleri	48
Şekil 1.36:	Linearol'ün <i>ent</i> -kauren ve kauren gösterimi.....	48
Şekil 1.37:	Bazı diterpenlerin numaralandırılması	49
Şekil 1.38:	Staken	50
Şekil 1.39:	Bazı sesterpenler	50
Şekil 1.40:	Skualen molekülünün oluşumu	51
Şekil 1.41:	Bazı tetraterpenler	52
Şekil 1.42:	A vitamini.....	52
Şekil 1.43:	Kauçuk (<i>cis</i> -1,4-poliizopren)	53
Şekil 1.44:	Flavonoidlerin genel yapısı	55

Şekil 1.45: Flavanon genel yapısı.....	57
Şekil 1.46: Kateşinlerin kimyasal yapıları.....	58
Şekil 1.47: Prosiyanidin ve prodelfidin'in kimyasal yapısı.....	59
Şekil 2.1: Galantamin	72
Şekil 3.1: Uçucu yağ GC/MS analiz sonuçları	74
Şekil 3.2: Sideritis hispida uçucu yağında bulunan 3 bileşen.....	75
Şekil 3.3: Siderol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	79
Şekil 3.4: Siderol bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	80
Şekil 3.5: Siderol bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (APT).....	81
Şekil 3.6: Siderol bileşiğinin COSY spektrumu-1	82
Şekil 3.7: Siderol bileşiğinin COSY spektrumu-2	83
Şekil 3.8: Siderol bileşiğinin COSY spektrumu-3	84
Şekil 3.9: Siderol bileşiğinin COSY spektrumu-4	85
Şekil 3.10: Siderol bileşiğinin HMBC spektrumu-1	86
Şekil 3.11: Siderol bileşiğinin HMBC spektrumu-2	87
Şekil 3.12: Siderol bileşiğinin HMBC spektrumu-3	88
Şekil 3.13: Siderol bileşiğinin HMQC spektrumu-1	89
Şekil 3.14: Siderol bileşiğinin HMQC spektrumu-2	90
Şekil 3.15: Siderol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu	93
Şekil 3.16: Siderol bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu (APT).....	94
Şekil 3.17: Eubotriol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.....	97
Şekil 3.18: Eubotriol bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu.....	98
Şekil 3.19: Eubotriol bileşiğinin HMBC spektrumu	99
Şekil 3.20: Eubotriol bileşiğinin HMQC spektrumu-1.....	100
Şekil 3.21: Eubotriol bileşiğinin HMQC spektrumu-2.....	101
Şekil 3.22: Eubotriol bileşiğinin HMQC spektrumu-3.....	102
Şekil 3.23: 7-asetil sideroksol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.....	105
Şekil 3.24: 7-asetil sideroksol bileşiğinin metil kısmı ¹ H NMR spektrumu	106
Şekil 3.25: 7-asetil sideroksol bileşiğinin metil kısmı ¹³ C NMR spektrumu	107
Şekil 3.26: Linearol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu-1	110
Şekil 3.27: Linearol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu-2.....	111
Şekil 3.28: Linearol bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	112
Şekil 3.29: Sideroksol bileşiğinin ¹ H NMR spektrumu.....	114
Şekil 3.30: Sideroksol bileşiğinin ¹³ C NMR spektrumu	115
Şekil 3.31: Stigmasterol.....	116
Şekil 3.32: Salvigenin ve klorojenik asit	117
Şekil 3.33: Ekstrelerin fenolik bileşik içerikleri.....	117
Şekil 3.34: Fumarik asit ve ferulik asit.....	119
Şekil 3.35: Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları	120
Şekil 3.36: Bitki ekstrelerinin lipid peroksidasyon % inhibisyonu sonuçları.....	121
Şekil 3.37: Ekstrelerin Cu ⁺² indirgeme kapasitesi (CUPRAC) sonuçları	122
Şekil 3.38: Antikolinesteraz AChE ve BChE aktivite sonuçları (% inhibisyon)	123
Şekil 4.1: <i>Sideritis hispida</i> 'dan izole edilen diterpen bileşikleri.	126

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1: <i>Sideritis</i> türlerinin halk arasında kullanılan yöresel adları.....	17
Tablo 1.2: Uçucu yağların içeriğinde bulunan bileşiklerin sınıflandırılması	22
Tablo 1.3: Terpenlerin sınıflandırılması	25
Tablo 1.4: Fenolik asitlerin kimyasal yapıları	55
Tablo 1.5: Antosiyanidinlerin yapıları.....	56
Tablo 1.6: Flavon ve flavonol yapıları	57
Tablo 2.1: Seçilen bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri.....	66
Tablo 2.2: Validasyon ve belirsizlik parametreleri.....	68
Tablo 3.1: Uçucu yağ bileşenlerinin sınıflandırılması.....	74
Tablo 3.2: Uçucu yağ GC/MS analiz sonuçları	76
Tablo 3.3: Ekstrelerin içerdiği fenolik bileşik grupları	116
Tablo 3.4: Ekstrelerin içerdiği fenolik bileşikler.....	118
Tablo 3.5: Su ekstralarının içerdiği fenolik bileşikler	119
Tablo 3.6: Ekstrelerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları (% inhibisyon).....	120
Tablo 3.7: Ekstrelerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları	121
Tablo 3.8: Ekstrelerin Cu ⁺² İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC) Sonuçları.....	122
Tablo 3.9: Antikolinesteraz AChE ve BChE aktivite sonuçları (% inhibisyon)	123
Tablo 3.10: Antimikrobiyal aktivite sonuçları.	124

SEMBOL LİSTESİ

α	: Alfa
β	: Beta
ψ	: Psi
Δ, δ	: Delta
γ	: Gama
μm	: Mikrometre
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
kg	: Kilogram
mmol	: Milimol
M	: Molar
mM	: MiliMolar
mTorr	: MiliTorr
ppm	: Part Per Million
mHz	: MegaHertz
Hz	: Hertz
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
t	: Triplet
d	: Dublet
s	: Singlet
m	: Multiplet

ÖNSÖZ

113Z710 nolu proje kapsamında bu tezi destekleyen TÜBİTAK'a,

Yüksek Lisans çalışmalarım boyunca desteğini üzerimden esirgemeyen, değerli hocam Sayın Prof. Dr. Turgut KILIÇ 'a,

Lisans yıllarımdan başlayarak yol göstericiliğini ve vaktini en yoğun zamanlarında dahi benden esirgemeyen Dr. Sema ÇARIKÇI'ya teşekkür ederim.

Balıkesir Üniversitesi'ne adım attığım ilk gün kaderin vesilesi olduğunu düşündüğüm bir şekilde karşıma çıkan dostum Sinem DERELİ'ye senelerdir yanımda olduğu için teşekkür ederim.

Hayatımda her zorlukta beni koruyan ve yüksek lisans da dahil olmak üzere okul hayatımın her aşamasında yanımda olup, birçok zorluğa rağmen maddi manevi desteklerini hiçbir zaman üzerimden esirgemeyen annem ve babam Fatma ve Nutullah AÇAR'a ve hayatımın neşe kaynağı kardeşlerim Elif, İsmail ve İlknur AÇAR'a sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Tarihte bilinen ilk yazılı bulgular bitkilerin, özellikle hastalıkların tedavisinde etkin bir şekilde kullanıldığını göstermiştir [1]. Bunun yanı sıra gıda endüstrisinde, parfümeri, kozmetikte de bitkilerin birçok özelliğinden faydalanılmıştır. Günümüzde de insanlar sanayileşmenin getirdiği birçok sağlık sorunuyla bitkisel ürünleri kullanarak başa çıkmaktadırlar [2].

Sideritis L. cinsini de barındıran Labiatae Lindl. (Labiatae Juss.) familyası bitki aleminin çeşitli habitat ve yükseltilerde yetişmesi özelliğinden dolayı geniş yayılım gösteren ve asıl yetişme alanı Akdeniz havzası olan familyasıdır [3]. *Sideritis* cinsi % 78 lik bu endemizm oranı ile Türkiye’de yetişen bitkiler arasında en yüksek endemizme sahip olan cinslerden birisi olup 46 tür, 12 alt tür ve 2 varyete ile temsil edilmektedir [4-6].

Sideritis L. cinsi adını Yunanca *Sideros* (demir) kelimesinden; metalden yapılan silahların sebep olduğu yaraları iyileştirmek amacıyla kullanılmış olmasından dolayı almıştır [7]. Bu özelliğinin yanısıra sinir sistemi uyarıcısı, antispazmodik, analjezik, karminatif, sedatif, antienflamatuar, antikonvulsan etkilerinden dolayı halk arasında öksürük kesici ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde çay şeklinde kullanılmakta ve adaçayı, dağçayı adlarıyla bilinmektedir [8].

Ülkemizde *Sideritis* türleri ile ilgili birçok çalışma mevcuttur. Yapılan morfolojik, anatomik ve palinolojik çalışmaların [9-12] yanısıra uçucu yağları üzerine pek çok araştırma mevcuttur [13-14]. Terpenler ve fenolik bileşikler üzerinde yapılan araştırmalar ise son yıllarda artmıştır [15-18].

Bu çalışmada ise Karaman-Mut yöresinde yetişen *Sideritis hispida* P. H. Davis bitkisinin fitokimyasal yönden incelenmesi amaçlanmıştır.

1.1 Bitkinin Özellikleri

1.1.1 Labiatae (Lamiaceae) Familyası

Adaçayı, kekik, nane gibi birçok faydalı bitkileri içinde barındıran angiospermlilerin en önemli familyalarından birisi olan Labiatae, 200'den fazla cins ve 3000'i aşkın türle temsil edilen geniş bir ailedir. Labiatae familyası dünyanın birkaç bölgesinin dışında Kuzey Kutbu'ndan Himalayalar'a, Güneydoğu Asya'dan Hawai ve Avustralya'ya, tüm Afrika'ya ve Amerika'nın kuzeyi ve güneyine kadar çeşitli habitat ve yükseltilerde yetişmesi özelliğinden dolayı geniş yayılım göstermektedir [11].

Güneybatı Asya'da, Yunanistan dışında Labiatae (Lamiaceae) familyasının yaklaşık 66 cins ve 1100 türü bulunmaktadır. Dünya toplamının 1/3'üne karşılık gelen familyanın bölgedeki endemizm oranı % 70'in üzerindedir. Güneybatı Asya'daki 66 cinsin 9'u Yeni Dünya'da (Amerika ve Avustralya kıtaları) bulunmaktadır. *Scutellaria* ve *Teucrium* ise en yaygın örneklerini oluşturmaktadır [11].

Ülkemizde ise bu familyanın 45 cinsi, 546 türü ve 730 taksonu bulunup kayıt altına alınmıştır. Bunlardan 28 tür yaygın, 2470 tür endemik olup endemizm oranı % 42.2'dir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, yeni ilavelerle tür sayısı 558'e takson sayısı ise 742'ye çıkmıştır [11].

Tıbbi ve aromatik bitkiler bakımından Akdeniz ve Ege bölgesi çok zengin olup özellikle *Micromeria*, *Origanum*, *Salvia*, *Sideritis*, *Thymus* ve *Thymbra* bu bölgelerde yetişen aromatik Labiatae üyeleridir ve deniz seviyesinden 4400 m'ye kadar çeşitli yüksekliklerde tespit edilmiştir.

1.1.2 *Sideritis* Cinsi

Sideritis cinsi tek ve çok yıllık olmak üzere 150'den fazla bitki türünü bünyesinde barındırmaktadır [19]. Ülkemizde de son olarak *S. ozturkii* Z. Aytaç & Aksoy ile takson sayısı 46 tür, 12 alt tür ve 2 varyete ile toplam 54'e yükselmiştir [20]. Bu 46 türün 42 tanesi *Empedoclia*, 3 tanesi *Burgsdorfia*, 1 tanesi de *Hesiodia*

seksiyonuna aittir [21]. *Empedoclia* seksiyonunun gen merkezi % 80'lik endemizm oranı ile Türkiye'dir.

Sideritisler; tek ya da çok yıllık otlar veya küçük çalılar yapısında olan, gövdeleri dik ve yükseltici, dört köşe, pilos ya da tomentos tüylü nadiren tüysüz, salgı bezli ya da salgı bezine sahip olmayan, yapraklar basit parçalı, kenarları tam ya da krenat – dentat, saplı ve ya sapsız cinslerdir. Vertasillastrum (4-) 6 (10) çiçekli, seyrek ya da yoğun dizilişli. Brakteoller eksik. Brakteler yaprağa benzer, geniş kaliks tübünü saklayıcı, kaliks tubular – çan şekilli bazen bilabiat, 5 – 10 damarlı, 5 dikensi dişli, dişler eşit ya da üstteki alttaki dört dişten daha geniş, korolla genellikle sarı, bazen beyaz ya da kırmızı. Korolla tübü kaliks içinde, bilabiat, üst dudak hemen hemen dik, tam ya da iki parçalı (trifit) ortadaki daha geniş ve daha derin, stamenler 4 didinam, korolla tübü içinde, alt stamenler üst stamenlerden daha uzundur. Anterler 2 gözlü ve çoğunlukla şekli bozulmuştur. Stilus korolla tübü içinde, silindirik, ginobazik bifit, üst lob uçta küt, alt lob geniş ve üst lobu sarar. Ovaryum üst durumlu 4 gözlü nuks ovat tepede küt yuvarlak ve tüysüzdür.

Sideritis cinsinin Türkiye'de rastlanan bölümleri için tayin anahtarı;

- 1) Bitkiler tek yıllık. Brakteler az çok tam, yaprak gibi. Kaliks az çok 2 dudaklı, üst dış alttaki dört dişten daha geniş ve daha büyük. Sect. *Hesiodia* Benth.
- 2) Tabanda odunsu çok yıllık otlar. Brakteler tam (nadiren en aşağıda serulat), sarıcı, yaprak gibi değil. Kaliks hemen hemen eşit dişli. Sect. *Empedoclia* (Rafin) Benth [5].

1.1.3 *Sideritis hispida* P.H. Davis

Çok yıllık otsu, tabanda odunsu. Gövde dik, 35-90 cm, basit veya nadiren dallanmış, gövdenin alt kısmı yoğun uzun dik 3 mm'ye kadar dağınık hispit örtü ve yoğun kısa salgı tüylü, üst kısımları ise hemen hemen örtü tüysüz ve yoğun salgı tüylü. Yaprakların her iki yüzü, seyrek uzun örtü ve özellikle damarlar boyunca kısa salgı tüylü, belirgin ağsı damarlı; alt yaprakları, sapsız veya kısa saplı, sap 0.5-1 cm, lamina eliptik-oblanseolat, 4.5-5 x 0.7-11 cm, tepesi akutmukronat, mukro sarımsı baticı c. 1mm kenarı serrat, serrulat-krenat, tabanı attenuat; orta yapraklar sapsız,

linear lanseolattan lanseolata kadar, 1.7-6.8 x 0.7-1.2 cm, tepesi akut, 0.5-2.5 mm sarımsı baticı mukrolu, kenarı tam veya hafif serrat, tabanı obtus, trunkat veya + kordat; üst yapraklar sapsız, genişçe lanseolat, 3-3.7 x 0.8-1.3 cm tepesi akutmukronat, 0.1-2 mm sarımsı baticı mukrolu, kenarı tam, tabanı amplexikaul; yapraklar çiçek durumuna doğru kademeli olarak küçülür ve brakte halini alır, alt kısımlarda internodyumlardan uzun, üsttü kısa. Internodyumlar 2-6 cm boyunda, alttakiler daha kısa. Çiçek durumu basit veya dallanmış. Vertisillatlar 2-8 (-10), her vertisillat 6 çiçekli, vertisillatlar arası (1-) 4-5 (-6.5) cm. Brakteler siliat, dış yüzü tüysüz veya seyrek kısa salgı tüylü, orta damar boyunca seyrek örtü tüylü, iç yüzü tüysüz veya seyrek kısa örtü ve salgı tüylü, belirgin ağsı damarlı, kenarı tam; alt brakteler kordat, orbikulat-reniform, akumenle birlikte 2-3.1 x 1.3-2 cm, akumen 8-16 mm; orta brakteler orbikulat-kordat, orbikulat-reniform, akumenle birlikte 1.5-2.3 x 1.8-2.6 cm, akumen baticı, 4-12 mm; üst brakteler orbikulat-reniform, akumenle birlikte 1.4-1.8 x 1.2-1.6 cm, akumen baticı 5-6 mm. Kaliks 10-12 mm, dişler lanseolat, 3-4 x 1-1.5 mm, dış yüzü seyrek uzun dik örtü ve kısa salgı tüylü, dişlerin ucu 1-2 mm boyunda, tüysüz, sarı renkli mukrolu, iç yüzü seyrek örtü ve salgı tüylü; tüp 6.5-8.5 mm, dış yüzü yoğun salgı tüylü, iç yüzü boğaz kısmında halka şeklinde uzun örtü tüylü, boğazın alt kısmında tüpün ortasına kadar küçük dik örtü tüylü. Korolla sarı, 11-14 mm, kaliksten uzun; tüpün üst kısmı ve lopların dış yüzü yoğun basık örtü tüylü; üst dudağın iç yüzü seyrek kısa örtü tüylü, alt dudağın iç yüzü lopların birleşme yerlerinde örtü tüylü tüpün iç kısmında filamentlerin alt bölgesindeki tüyler tam halka şeklinde değil, üst dudağın iç kısmı kahverengi çizgili. Fındıkçık, ovat, 3-4 mm, 3 köşeli, küçük tüberküllü, açık kahverengi.

Çiçeklenme Zamanı: Temmuz-Eylül

Habitat ve Yetiştirme Yüksekliği: Kalkerli yamaçlar, step;950-1450 m

Türkiye Yayılışı: Orta Toroslar

Fitocoğrafik Bölgesi: İran-Turan elementi

Endemizm: Endemik



(a)



(b)

Şekil 1.1: *Sideritis hispida* P. H. Davis a) Çiçek durumu, b) Habitat.

1.2 *Sideritis* Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı

Dünyada bitkilerin kullanıldığına dair sayısız tarihi kanıtlara rastlanmıştır [22]. Arkeolojik bulgulara göre ilk çağlarda yaşayan insanlar, besin elde etmek ve sağlık sorunlarını gidermek için öncelikle bitkilerden faydalanmışlardır [23].

Günümüzde ise bu bitkiler ve yeni türleri geleneksel tedavilerde kullanılmakla birlikte dünya üzerinde geleneksel tıpta tüm bitkilerin % 10'unun kullanıldığı tahmin edilmektedir [24].

Halk arasında “dağ çayı” olarak bilinen *Sideritis* türleri Anadolu’da bazı bölgelerde tat verici ve hastalıklara karşı etkileriyle çay olarak kullanılmaktadırlar. Demleme yoluyla elde edilen çay gaz giderici, diüretik, antispazmodik, bağırsak düzenleyici ve öksürüğe karşı etkileri sebebiyle tüketilmektedir [25]. *Sideritis libanotica* subsp. *kurdica*, *S. athoa*, *S. lanata* ve *S. pefoliata* türlerinin de sulu ekstraktlarının farelerde sinir sistemi uyarıcısı ve anti-stress aktiviteleri gösterdiği bulunmuştur [26]. *Sideritis* türlerinin yetiştikleri bölgeler ve buna göre aldığı yöresel isimler Tablo 1.1’de verilmektedir [12,27].

Tablo 1.1: *Sideritis* türlerinin halk arasında kullanılan yöresel adları.

TÜR	MAHALLİ ADI	KULLANILDIĞI BÖLGE
<i>S. albiflora</i>	Dağ çayı, Bozlan	Muğla, Marmaris, Köyceğiz, Dalaman
<i>S. amasiaca</i>	Tosbağa otu, Dağ çayı	Çorum
<i>S. arguta</i>	Yayla çayı, Dağ çayı, Kara çay	Antalya, Gündoğmuş
<i>S. argyrea</i>	Eşek çayı, Acı çay	Antalya, Gündoğmuş, Alanya
<i>S. athoa</i>	Kedi kuyruğu çayı	Balıkesir, Kazdağı, Eybek Dağı
<i>S. brevibracteata</i>	Dağ çayı	Alanya
<i>S. brevidens</i>	Adaçayı, Özel çay	İçel, Gülnar
<i>S. caeseria</i>	Dağ çayı	Sivas, Kayseri, Sarız
<i>S. condensate</i>	Dağ çayı, Kozalı kekik, Kozalı çay, Eşek çayı	Antalya, Manavgat, Akseki, Isparta
<i>S. congesta</i>	Anamur adaçayı, Yayla çayı, Dağ çayı	Antalya, Alanya
<i>S. dichotoma</i>	Sarıkız çayı	Balıkesir, Kazdağı
<i>S. erythrantha</i> var. <i>erythrantha</i>	Boz ot	Isparta
<i>S. erythrantha</i> var. <i>cedretorum</i>	Dağ çayı	Antalya, Serik
<i>S. erythrantha</i> var. <i>cedretorum</i>	Yayla çayı	Antalya, Alanya
<i>S. germanicopolitana</i>	Tosbağa çayı	Amasya
<i>S. hispida</i>	Dağ çayı	Kayseri
<i>S. huber-morathii</i>	Dağ çayı	Hatay, Yayla dağ
<i>S. lanata</i>	Dağ çayı	Manisa, Kula
<i>S. leptoclada</i>	Kızlan çayı	Muğla, Marmaris, Köyceğiz, Dalaman
	Kırtıl çayı	Denizli, Eskere
	Dağ çayı	Denizli, Acıpayam
<i>S. libanotica</i>	Bozla çayı, Dağ çayı, Yayla çayı	Antalya, Elmalı
	Altınbaş, Ada çayı	Mersin
	Yara out	Van, Bitlis, Siirt, Hakkâri, Urfa
<i>S. libanotica</i> ssp. <i>curdica</i>	Dağ çayı	Maraş
<i>S. libanotica</i> ssp. <i>libanotica</i>	Altınbaş, Adaçayı, Dağ çayı	Hatay, İskenderun, Arsuz

Tablo 1.1: (devam) *Sideritis* türlerinin halk arasında kullanılan yöresel adları.

TÜR	MAHALLİ ADI	KULLANILDIĞI BÖLGE
<i>S. libanotica</i> ssp. <i>linearis</i>	Altınbaş	Kayseri, Maraş, Konya
	Acem arpası, Çalı çayı, Bozlan çayı	Muğla, Köyceğiz, Fethiye
	Çay otu, Akdağ çayı	Konya, Akdağ
	Düğümlü çay	Afyon
	İnce çay	Antalya, Elmalı, Alanya, Akseki
	Yayla çayı, Acem arpası	Mersin, Erdemli
	Çay otu	Denizli, Çivril, Baklan; Konya, Ermenek; Afyon, Çay
<i>S. lycia</i>	Dağ çayı	Antalya, Burdur
<i>S. montana</i> ssp. <i>montana</i>	Ballı ot, Dağ çayı, Kuyruk çayı	Kırklareli
<i>S. niveotomentosa</i>	Dokuz düğmeli	İçel, Gülnar
<i>S. ozturkii</i>	Kızıl çay, Ada çayı	Konya, Çamlık Kasabası, Kızıldağ
<i>S. perfoliata</i>	Dağ çayı, Yayla çayı, Cazık çayı	Antalya, Alanya; Bornova
	Elduran otu, Kandil çayı	Balıkesir, Bergama
<i>S. Phrygia</i>	Çay otu	Afyon, Çay
<i>S. pisidica</i>	Dağ çayı, Eldiven çayı, Eldivan çayı	Antalya, Elmalı
	Çay çalbası	Muğla, Antalya
	Hava otu, Dallı adaçayı	Konya, Beyşehir
	Yayla çayı, Akdağ çayı	Fethiye
<i>S. rubiflora</i>	Dağ çayı	İçel, Anamur
<i>S. scardica</i> ssp. <i>scardica</i>	Dağ çayı	Kırklareli
<i>S. sipylea</i>	Adaçayı, Sivri çay	İzmir, Ödemiş, Kemalpaşa; Manisa
<i>S. stricta</i>	Dağ çayı	Antalya, Selge
	Tilki kuyruğu, Dokuz donlu	Kepez, Korkuteli
<i>S. syriaca</i> ssp. <i>nusariensis</i>	Boz kekik	Mersin, Anamur
<i>S. syriaca</i> ssp. <i>violascens</i>	Topuklu çay	Antalya, Alanya
<i>S. imolea</i>	Balbaşı, Sivri çayı	İzmir, Ödemiş, Bozdağ
<i>S. trojana</i>	Kazdağı çayı	Çanakkale, Bayramiç
	Sarıköz çayı	İzmir, Ödemiş, Bozdağ
<i>S. vulcanica</i>	Nezle çayı	Elazığ
<i>S. vuralii</i>	Boz çay	İçel, Anamur

1.3 *Sideritis* Cinsi Üzerine Yapılan Fitokimyasal Çalışmalar

Sideritis türleri üzerine ülkemizde yapılan çalışmalarda 1995 yılında *S. akmanii* Z. Aytaç, M. Ekici & A. Dönmez ve *S. gülendamiaie* H. Duman & F. A. Karavelioğulları yeni tür olarak tanımlanmış, Kırklareli'den toplanan *S. scardica* Griseb. subsp. *scardica*'nın ise yeni bir takson olduğu bildirilmiştir. 1998 yılında yapılan çalışmalar ile *S. caesarea* H. Duman, Z. Aytaç & Başer ile *S. vuralii* H. Duman & Başer türleri tanımlanmıştır. 2000 yılında ise *S. ozturkii* Z. Aytaç & A. Aksoy türü tanımlanmış ve *Sideritis* türlerinin ülkemizdeki tür sayısı toplamda 46'ya ulaşmıştır [20,28-30].

Sideritis cinsine ait bitkilerde bulunan uçucu yağlar üzerine birçok çalışma mevcuttur [31-35]. Yunanistan'da yetişen beş *Sideritis* türünün uçucu yağ bileşenlerinin antimikrobiyal aktiviteleri çalışılmış ve bu bitkilerin uçucu yağlarının güçlü antimikrobiyal aktivite gösterdikleri rapor edilmiştir [36].

Ayrıca bu cins içerisinde bulunan bitkiler fenolik bileşik ve terpen içerikleri ile de karakterize edilmektedirler [37-52].

Türkiye'de yetişen *Sideritis* türleri üzerinde yapılan araştırmalar incelendiğinde 22 türden 15'inde linearol, 13'ünde 7-epicandicandiol, 11'inde siderolün varlığı gözlenmektedir [53].

Sideritis türleri sinir sistemi uyarıcısı, antispazmodik, antiinflamatuvar, karminatif, analjezik, sedatif, stomaşik, antikonvülsan etkileri ile soğuk algınlıklarında öksürük kesici ve gastrointestinal hastalıkların tedavisinde kullanılmakta ve bu amaçla çay şeklinde tüketilmektedir. Ayrıca çalışmalar antifeedant, antistres, antioksidan, antibakteriyel etkilerinin de bulunduğunu göstermiştir [8,25,26,54-58]. *Sideritis* türlerinden (*Sideritis akmanii*, *S. niveotomentosa*, *S. brevidens*, *S. rubriyora*, *S. gulendarii*) elde edilen diterpenlerden epoksi yapısında olan bir bileşiğin böcek kovucu etkiye sahip olduğu görülmüştür [54].

1.4 Uçucu Yağlar

Bitkiler tarafından üretilen sekonder metabolitlerden biri olan uçucu yağlar; sıvı halde bulunan, kuvvetli kokulu, uçucu, su buharı ile sürüklenebilen ve bu nedenle genellikle su buharı destilasyonu ile elde edilen, yağ benzeri karışımlardır [59]. Bitki metabolizmasında, yararlı böcekleri kendine çekme (etkileme), zararlı mikroorganizmalara ve otçullara karşı da onların iştahlarını azaltarak kendini koruma gibi çeşitli ve önemli rolleri vardır [60].

Farklı bileşenleri bünyelerinde bulunduran uçucu yağların içerdikleri maddelerin özelliğine göre etkileri değişebilmekle beraber bir çoğu antimikrobiyal etkiye sahiptir [61]. Ayrıca antiseptik, antibakteriyel, antiviral, antifungal, analjezik, yatıştırıcı, anestetik [60] özelliklerinden faydalanılmak üzere tıpta dermatoloji, üroloji, uyku ve sinir bozuklukları gibi çeşitli alanlarda sıkça kullanılmaktadırlar [62].

Uçucu yağlar bitkinin çiçek, yaprak, meyve, odunsu kısımları ile sap ve kabuk kısımları gibi çeşitli organlarında bulunmaktadır. Örneğin; gül yağı *Rosa damascena Mill.* bitkisinin çiçeğinden, nane yağı ise *Mentha piperita* bitkisinin sap, yaprak ve çiçek kısımlarından elde edilmektedir [63].

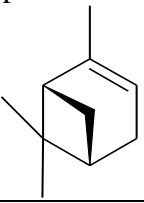
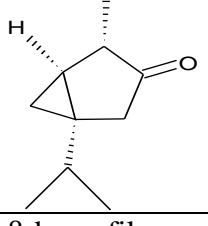
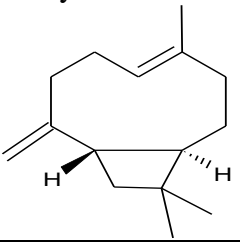
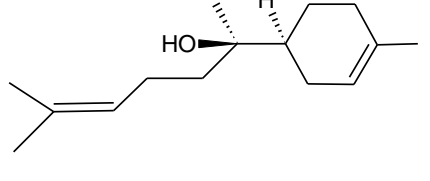
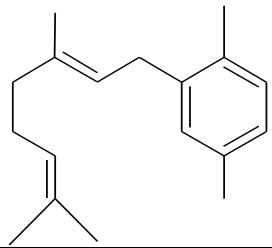
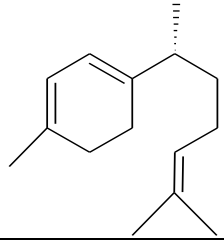
Bitkisel kaynaklardan elde edilen uçucu yağlar büyük miktarda terpen ihtiva etmekle beraber aldehit, alkol, fenol, ester gibi çeşitli bileşik grupları ile azotlu ve kükürtlü bileşikleri de içermektedir [64].

Lamiaceae familyasına ait bitkiler uçucu yağ bakımından zengindir ancak *Sideritis* türleri için yapılan çalışmalar bu türlerin yağ içeriğinin familyanın diğer üyelerine göre zayıf olduğunu göstermiştir [57].

2002 yılında K. H. C. Başer Empedoclia seksiyonuna ait *Sideritis* türlerinin uçucu yağları üzerine yaptığı çalışmada, bu türleri uçucu yağ bileşimine göre; monoterpenlerce zengin, oksijenlenmiş monoterpenlerce zengin, seskiterpenlerce zengin, oksijenlenmiş seskiterpenlerce zengin, diterpenlerce zengin ve diğerleri olmak üzere 6 gruba ayırmıştır (Tablo 1.2) [65]. Ayrıca yüksek yağ verimi elde edilen bitkilerin uçucu yağ bileşimi monoterpenlerce zengin bulunurken, düşük yağ

verimine sahip bitkilerin ise seskiterpen bileşiklerince zengin olduğu belirlenmiştir [56].

Tablo 1.2: Uçucu yağların içeriğinde bulunan bileşiklerin sınıflandırılması [65].

Sınıf	Yapısı	Örnek
Monoterpen İki izopren ünitesinden oluşup $C_{10}H_{16}$ molekül formülüne sahiptirler [66].	a)Oksijensiz Monoterpenler	α -pinen 
	b)Oksijenli Monoterpenler	α -tujon 
Seskiterpenler Üç izopren ünitesinin bağlanmasıyla oluşup $C_{15}H_{24}$ molekül formülüne sahiptirler [27].	a)Oksijensiz Seskiterpenler	β -karyofilen 
	b)Oksijenli Seskiterpenler	α -bisabolol 
Diterpenler Dört izopren ünitesinin bağlanmasıyla oluşup $C_{20}H_{32}$ molekül formülüne sahiptirler [27].		Gerasimen 
Diğer Uçucu yağlarda bulunan minör bileşenlerdir [67].	Kükürt ve azotlu bileşikler ile aromatik bileşikler.	Ar-kurkumen 

1.5 Terpenler

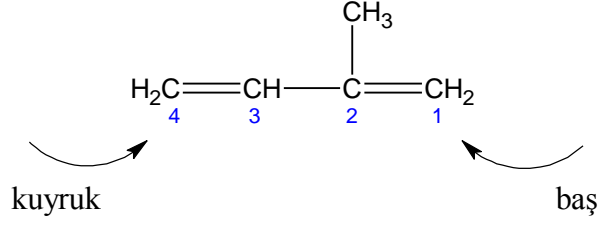
Terpenler, sekonder metabolitler içinde en yaygın sınıfı oluşturan ve birkaç örneği dışında çoğunlukla bitkiler tarafından oluşturulan organik molekül sınıfıdır. İsmi kozalaklı çam ağacından elde edilen reçine içerisinde bulunan “turpentin” bileşiğinden alır ve -en ise yapılarında olefinik bağa sahip olduklarını göstermektedir. Terpenler bitkilerden elde edilebildiği gibi bazı deniz canlılarından da elde edilebilmektedirler [68,69].

Neredeyse bütün terpenler termal bozunma ürünü olarak izopren molekülünü vermiştir ve bu da bütün terpenlerin iskelet yapısının izopren ünitesinden oluştuğu fikrinin doğmasına sebep olmuştur. İzopren kuralı olarak bilinen bu görüş ilk olarak Leopold Ruzicka¹ tarafından gösterilmiştir. Ayrıca, Ingold (1925) doğal terpenlerdeki izopren ünitelerinin (Şekil 1.2) “baştan kuyruğa” olmak üzere birbirine katıldığını söylemiştir. Bu kuralın her ne kadar oldukça kullanışlı olduğu kanıtlanırsa da, sabit bir kural değil de yol gösterici bir prensip olduğu düşünülebilir çünkü bu konuda karotenlerin merkezlerinden kuyruk kuyruğa bağlanması, ayrıca bazı terpenlerin içerdikleri karbon sayısının beşin katı olmaması ve karbon sayısı beşin katı olupta izopren molekülüne bölünemeyen terpenlerin varlığı istisnai durumları oluşturmaktadır [70].

Terpenler iki izopren (2-metil-1,3-bütadien) molekülünün baş-kuyruk kondenzasyonu reaksiyonu sonucu meydana gelmektedirler.

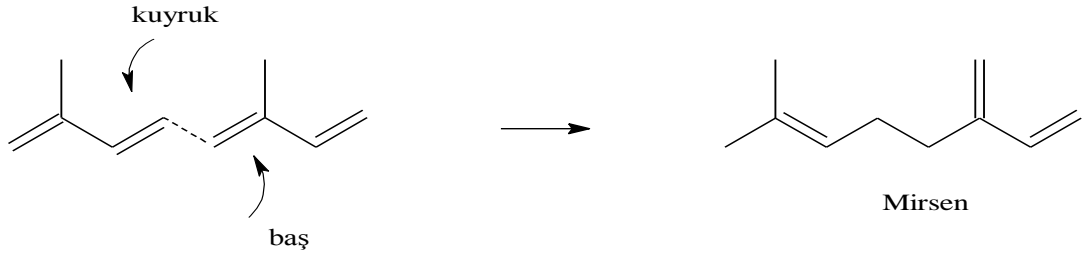
Bu kurala göre izopren ünitesinde bulunan 1 nolu karbon (dallanmış tarafta bulunan) baş olarak adlandırılırken, 4 nolu karbon (dallanmanın olmadığı tarafta bulunan) kuyruk olarak adlandırılır.

¹ Leopold Ruzicka (1887 – 1976); b. Vukovar (Yugoslavya); PH. D, 1910 Karlsruhe; Profesör, İsveç Federal Enstitüsü (ETH), Zürih, (1923- 1926 ve 1929- 1957), Nobel ödülü, 1939



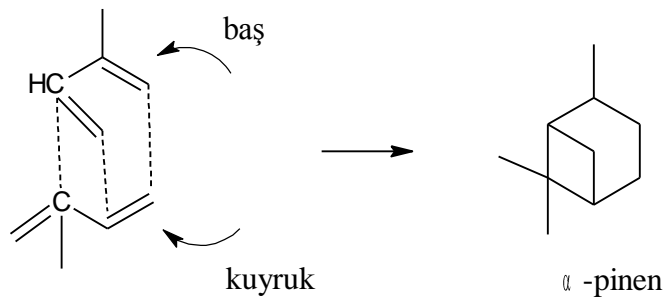
Şekil 1.2: İzopren (2-metilbüt-1,3-dien).

Mirsenin'in iki izopren ünitesinin baş – kuyruk kondenzasyonu ile oluşması Şekil1.3'de örnek olarak verilmiştir.



Şekil 1.3: Mirsenin molekülünün oluşumu.

α -pinen de benzer şekilde baş-kuyruk kondenzasyonu ile oluşmaktadır (Şekil 1.4) [71].



Şekil 1.4: α -pinenin molekülünün oluşumu.

Uçucu yağlarda bulunan ve oksijen içermeyen terpenik maddelere hidrokarbür denilmekte, ayrıca oksijen içeren türleri de bulunup temelde alkol, aldehit veya keton formlarından oluşmaktadırlar. Yapıları ise dallanmış zincir biçiminde ya da siklik yapı (halkalı yapı) şeklinde olabilmektedir [72].

1.5.1 Terpenlerin Sınıflandırılması ve Biyosentezi

Terpenler ana maddeleri olan izopren ünitelerinin biyosentezi yoluyla oluşup bu birimlerin sayısına göre sınıflandırılmaktadırlar. Bu tanımdan yola çıkarak iki izopren ünitesinin biyosentezi yoluyla oluşan 10 karbonlu moleküller monoterpenler, 15 karbonlu moleküller seskiterpenler ve 20 karbonlu moleküller ise diterpenler olarak adlandırılmaktadırlar (Tablo 1.3).

Tablo 1.3: Terpenlerin sınıflandırılması.

İzopren Sayısı	Sınıfı	Karbon Sayısı
1	Hemiterpenler	5
2	Monoterpenler	10
3	Seskiterpenler	15
4	Diterpenler	20
5	Sesterpenler	25
6	Triterpenler	30
8	Tetraterpenler(Karotenoidler)	40
N	Politerpenler	(5) _n

Terpenler fiziksel özelliklerine göre iki grupta incelenmektedir [73].

Uçucu terpenler; su buharı destilasyonu ile sürüklenebilen küçük molekülü monoterpenler ve bazı seskiterpenlerdir.

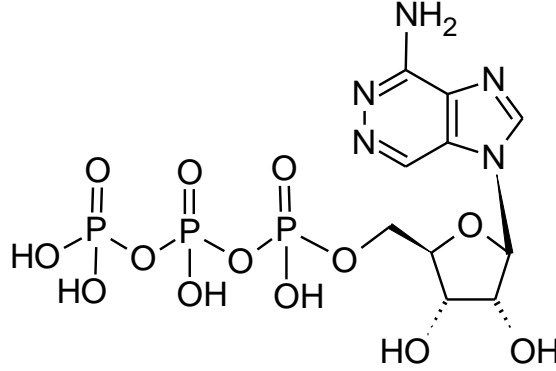
Uçucu olmayan terpenler; büyük molekülü seskiterpenler, diterpenler, sesterpenler, triterpenler ve politerpenlerdir.

Uçucu yağların içerisinde monoterpen yapısında olan maddelerle, bazı seskiterpenik maddelere rastlanmaktadır. Bazı seskiterpenler ile diterpen, triterpen ve politerpenler ise uçucu olmayan terpenlerdir. Su buharı ile sürüklenemedikleri için elde etme sırasında uçucu yağa geçemezler. Diterpenler ile triterpenler ise bitkilerin sakız ve reçinelerinden elde edilmektedir. Tetraterpenler (karotenler) ise düzenlenmiş bir gruptur ve ayırıcı grup olarak davranabilirler. Kauçuk ise en çok bilinen politerpendir [70].

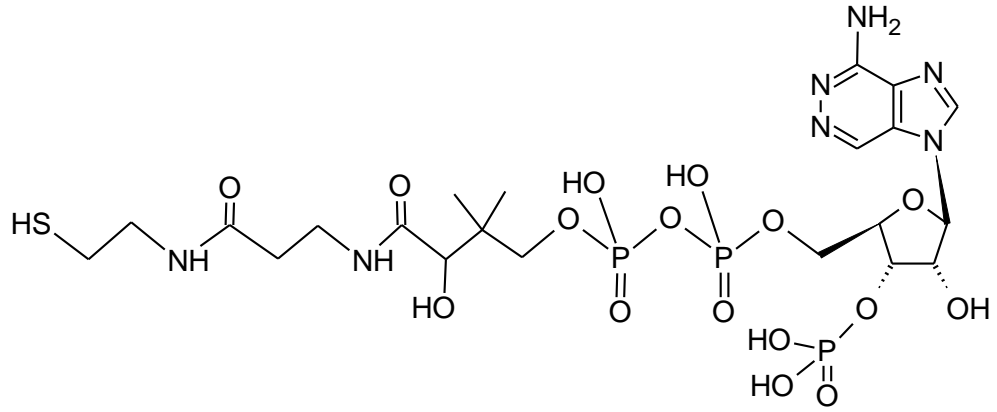
1.5.1.1 İzopentenil Pirofosfatın Oluşumu

Terpenlerin oluşum reaksiyonları dört aşamada incelenmektedir. İlk aşamada terpenleri oluşturmak için tek başına aktiviteye sahip olmayan izopren molekülünün biyokimyasal reaksiyon verebilecek izopentenil pirofosfat molekülünü oluşturması; ikinci aşama olarak oluşan izopentenil pirofosfatın terpen sınıfının (C₅)_n izopren iskelet yapısını oluşturması; üçüncü olarak bu yapıların terpen iskeletini vermek için halkalaşma düzenlenmesi vermesi ve son aşama olarak da terpenleri verecek olan hidroksilasyon ve oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleşmesi [53].

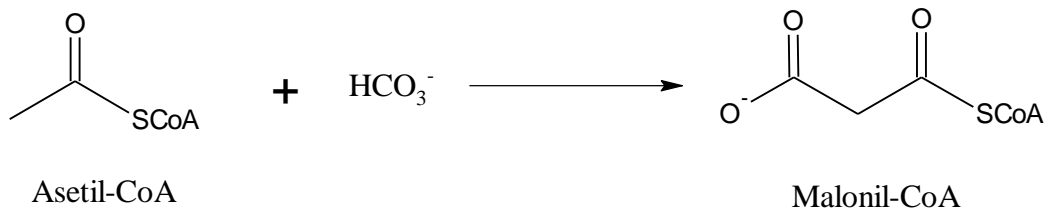
Reaksiyon incelendiğinde asetil-CoA'nın bikarbonat anyonu ile Malonil-CoA'yı oluştururken, iki asetil-CoA molekülü de birbiriyle kondenzasyona uğrayarak asetoasetil-CoA molekülünü oluşturduğunu ve böylece asetoasetil-CoA ve malonil-CoA'nın da birbirleri ile kondenzasyona uğrayarak ATP (Şekil 1.5) eşliğinde izopentenil pirofosfat'ı oluşturduğunu görülmektedir (Şekil 1.8) [74].



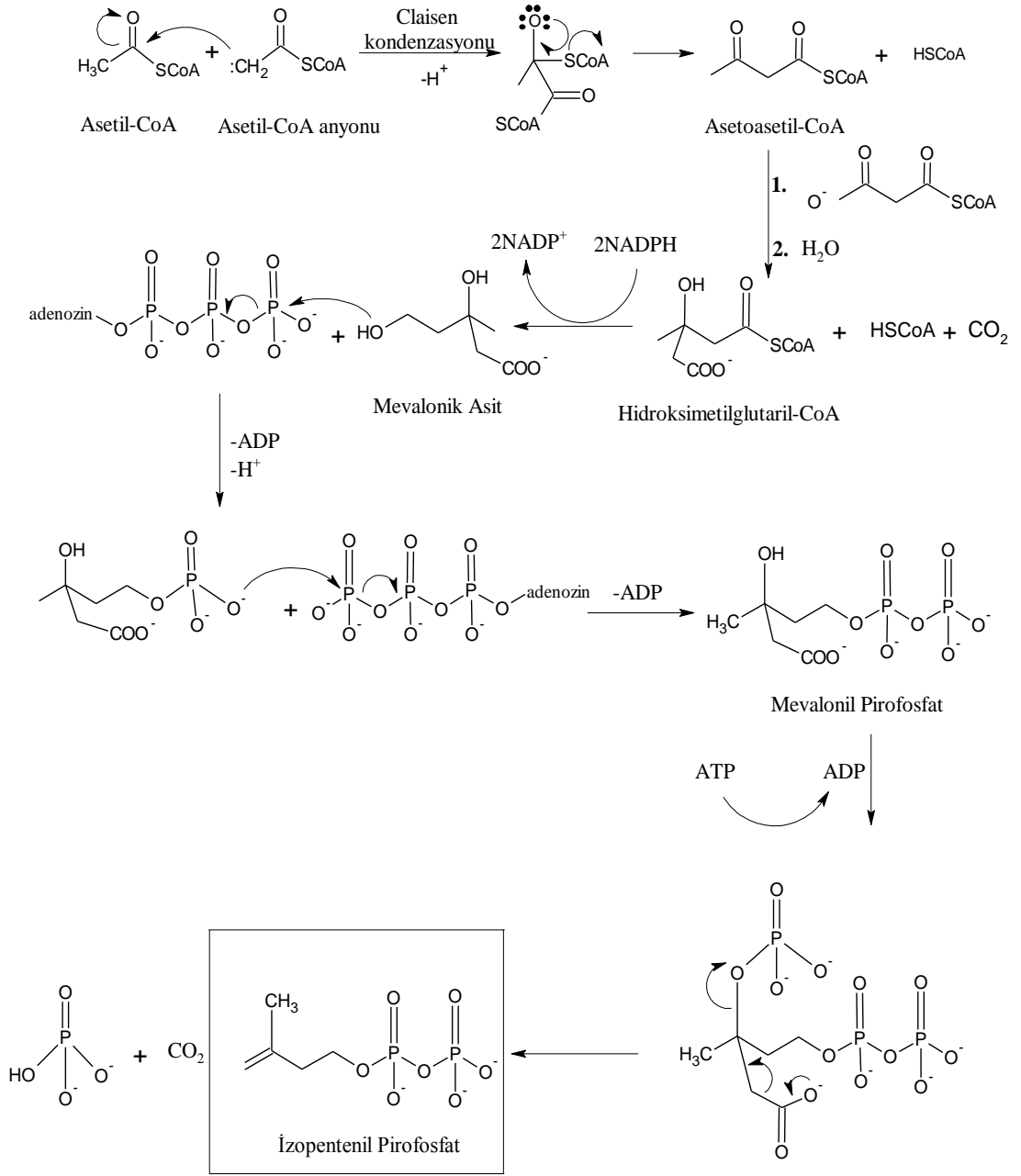
Şekil 1.5: Adenozintrifosfat (ATP).



Şekil1.6: Koenzim A.

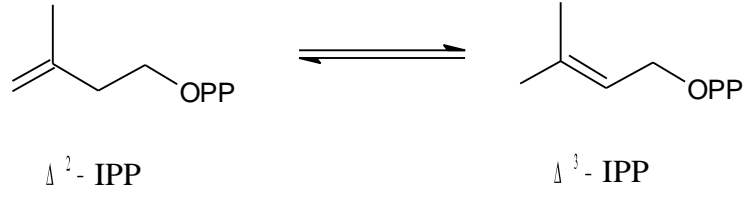
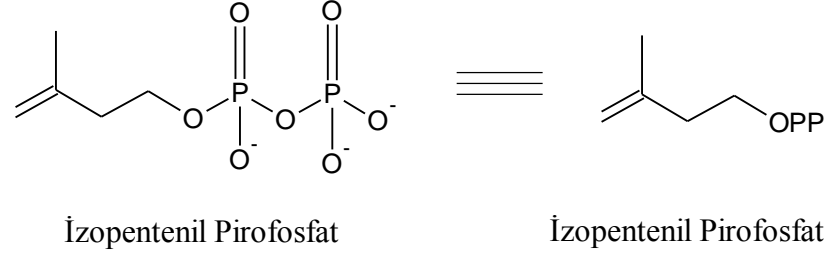


Şekil 1.7: Malonil-CoA oluşumu.



Şekil 1.8: İzopentenil pirofosfat oluşumu.

Reaksiyonun devamında ise izopentenil pirofosfat, izopentenil pirofosfat izomeraz enzimi eşliğinde izomerizasyona uğrayarak dimetil allil ester ile bir denge oluşturur (Şekil 1.9). İzomerizasyon, izopentenil pirofosfata protonun Markownikoff kuralına göre katılmasıyla oluşan karbokatyon ara ürününün Zaitseff kuralına göre düzenlenmesi ile gerçekleşmektedir [69].



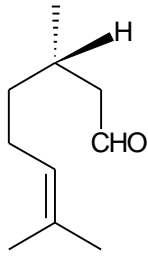
Şekil 1.9: İzopentenil pirofosfat denge reaksiyonu.

1.5.1.2 Monoterpenler

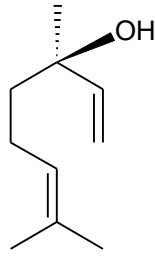
İki izopren ünitesinin baş-kuyruk bağı ile bağlanmasıyla oluşan monoterpenler, yapısal olarak birbirlerinden farklı olmakla beraber Şekil 1.10'da gösterildiği gibi asiklik mircen, monosiklik p-mentan ve bisiklik bornan, karan, fençan, pinan ve tujan'ı içermektedirler.

Birçok monoterpenin doğada tek izomeri olmasına rağmen bazı bitkilerde iki izomerin bulunması durumuna da rastlanmaktadır. Buna örnek olarak da (+) ve (-)- α -pinen'in tüm Pinus türlerinde bulunması verilebilir [66,75].

Mirsan sınıfı

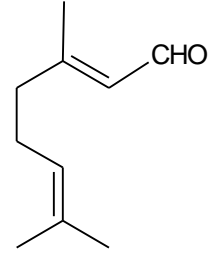


(+)-Sitronelal



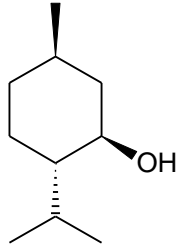
(+)-Linalool

Geranial sınıfı

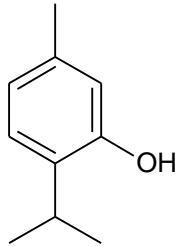


Geranial

Mentan sınıfı

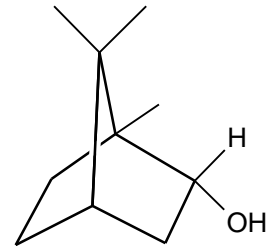


Mentol



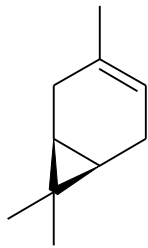
Timol

Bornan sınıfı



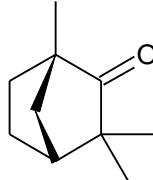
(+)-Borneol

Karan sınıfı



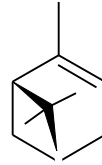
(-)-Kar-3-en

Fençan sınıfı



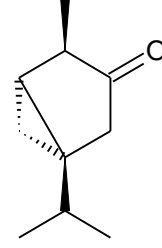
(-)-Fençon

Pinan sınıfı



(+)- α -Pinen

Tujon sınıfı

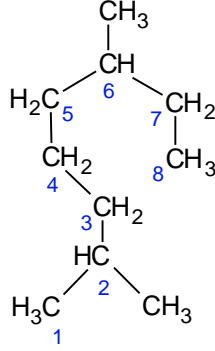


(-)-Tujon

Şekil 1.10: Bazı monoterpenler.

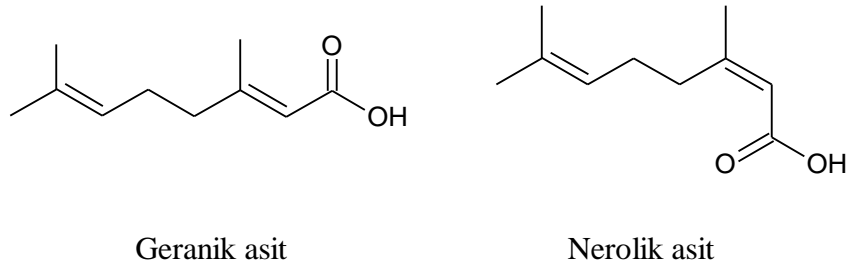
1.5.1.2.1 Asiklik Monoterpenler

2,6-dimetiloktan (Şekil 1.11) iskeletini taşıyan ve üç çifte bağ bulunan monotерpenlerdir. Oksijenli türevleri primer alkol, tersiyer alkol, ester ve aldehit grupları taşıyabilir, monoetilenik ya da dietilenik olabilir [63].



Şekil 1.11: 2,6-dimetiloktan.

Şekil 1.12’de verilen geranik asit, nerolik asit asiklik monotерpenlere birer örnektir [76].

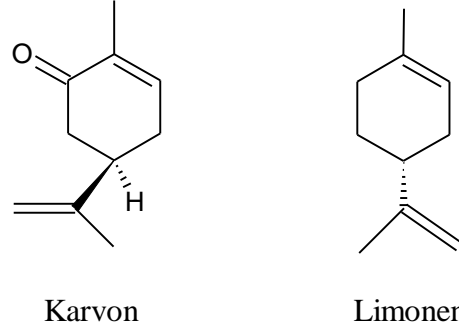


Şekil 1.12: Bazı asiklik monotерpenler.

1.5.1.2.2 Monosiklik Monoterpenler

Çoğunlukla p-mentan iskeleti taşıyan bu bileşiklerde çifte bağ iki tanedir. Oksijenli türevleri ise sekonder veya tersiyer alkol, ester, keton, epoksit ve peroksit grupları taşıyabilir. Bu bileşikler dietilenik, monoetilenik veya doymuş yapıda olabilir. Monosiklik monotерpenlere örnek mentol, timol, karvakrol ve limonen verilebilir.

Örnek olarak *Cuminum cyminum* (Umbelliferae) bitkisinden elde edilen kimyon uçucu yağı içerisinde limonen ve keton grubu taşıyan bir monoterpen olan karvon bulunmaktadır (Şekil 1.13) [72].

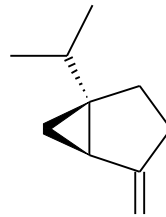


Şekil 1.13: Bazı monosiklik monoterpenler.

1.5.1.2.3 Bisiklik Monoterpenler

Genellikle sabinen, karen, pinen, ya da kamfen iskeletinden türeyen bisiklik monoterpenler genellikle bir çifte bağ taşımaktadırlar. Oksijenli türevleri sekonder alkol, ester ya da keton grupları taşıyan bileşikler monoetilenik veya doymuş olabilirler [77].

Juniperus sabina (Cupressaceae) bitkisinden elde edilen uçucu yağ içeriğinde bulunan sabinen (Şekil 1.14) bisiklik monoterpenlere bir örnektir. Küçük dozlarda menstruasyon bozukluklarına neden olan bu uçucu yağ, yüksek dozlarda bağırsak ve böbreklerde bozukluklara sebep olmakta ve ölümlü sonuçlanan zehirlenmelere yol açmaktadır. Bu nedenle, içeriden kullanılmayan bu yağ dışarıdan, pomat ya da solüsyon halinde, siğil tedavisinde ve saç çıkarmak için uygulanan ilâçlara katılmaktadır [72].



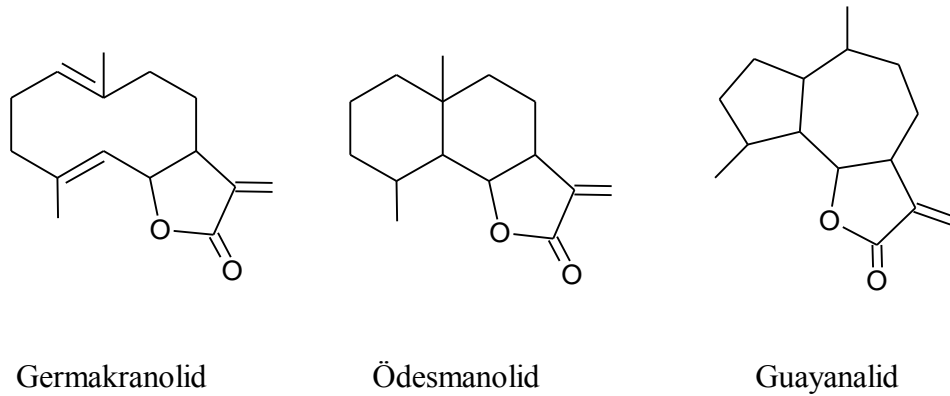
Şekil 1.14: Sabinen.

1.5.1.3 Seskiterpenler

Seskiterpenler 15 C'lu bileşikler olup, uçucu yağların büyük bir bölümünü oluştururlar ve terpenlerin en geniş sınıfıdır [66,68,74].

Seskiterpen laktonlarının diğer seskiterpenlerden farkı α -metilen- γ -lakton sisteminin varlığıdır. Epoksitlerde olduğu gibi α - β doymamış karbonil grubu içeren yapılar da bulunmaktadır ve bu fonksiyonel grup enzimlerdeki amino grupları ve tiyol'de olduğu gibi biyolojik nükleofil için reaktif reseptör yeri olarak görev görmektedir. Bu bileşikler için geniş bir biyolojik aktivite spektrumu rapor edilmiştir. Örneğin; antimikrobiyal ve antitümör aktivitesi bulunmakla beraber bazıları memeliler için oldukça toksiktir [66].

Seskiterpen laktonları içeriklerinde bulunan karbosiklik iskelet yapısına göre üç grupta incelenir: 10 üyeli halka germakranolidler, birbirine bağlanmış iki adet altılı halka eudesmanolidler ve yedi üyeli halkaya bağlanmış beşli bir halka olan guaianolidler [27]. Şekil 1.15'de seskiterpenlere ait germakranolidler ödesmanolidler guaianolidler yapıları verilmektedir.

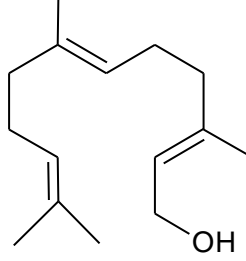


Şekil 1.15: Bazı seskiterpenler.

1.5.1.3.1 Asiklik Seskiterpenler

Farnesol (Şekil 1.16), asiklik seskiterpen yapısında bir bileşiktir. Renksiz ve leylak kokusundadır. Kına çiçeği, misk, gül, zambak, portakal çiçeği gibi esansiyel yağlarda da bulunmaktadır. Kozmetik endüstrisinde hoş koku vermek amacıyla

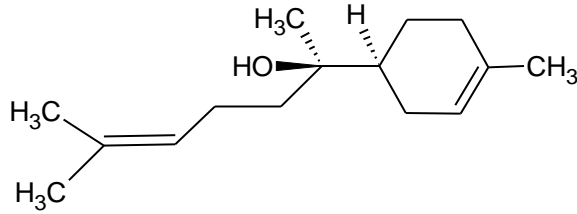
kullanılmaktadır. Aynı zamanda bazı böceklerde hormon görevi görüp kurtçuktan güve şekline form dönüşümünü başlatmaktadır [70,78].



Şekil 1.16: Farnesol.

1.5.1.3.2 Monosiklik Seskiterpenler

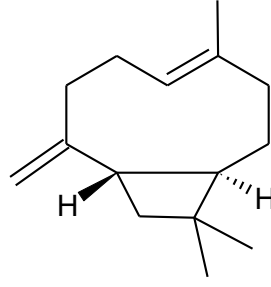
α -bisabolol (Şekil 1.17), papatya (*Matricaria chamomilla*) ve adaçayı (*Salvia runcinata*) uçucu yağları içinde ana bileşen olarak bulunan ve yapısında alkol gurubu olan monosiklik bir seskiterpenidir. Levomenol olarak da bilinen α -bisabolol antienflamatuar, antibiyotik, analjezik, antioksidan, mide koruyucu ve cilt yatıştırıcı etkileri bulunan bir bileşiktir [79-84].



Şekil 1.17: α -bisabolol.

1.5.1.3.3 Bisiklik Seskiterpenler

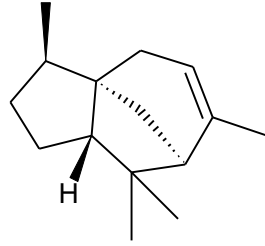
Karanfil (*Syzygium aromaticum*) bitkisinden elde edilen yağ içerisinde bulunan karyofilen (Şekil 1.18) doğal bir bisiklik seskiterpenidir [53]. Zayıf aromatik tada sahip olduğundan dolayı kozmetik endüstrisinde ve yiyeceklerde katkı malzemesi olarak kullanılmaktadır [85].



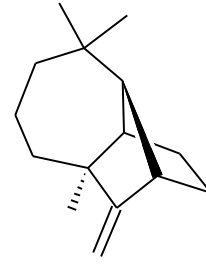
Şekil 1.18: Karyofilen.

1.5.1.3.4 Trisiklik Seskiterpenler

Şekil 1.19'da gösterildiği gibi sedren ve longifolen olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır [70].



Sedren



Longifolen

Şekil 1.19: Bazı trisiklik seskiterpenler.

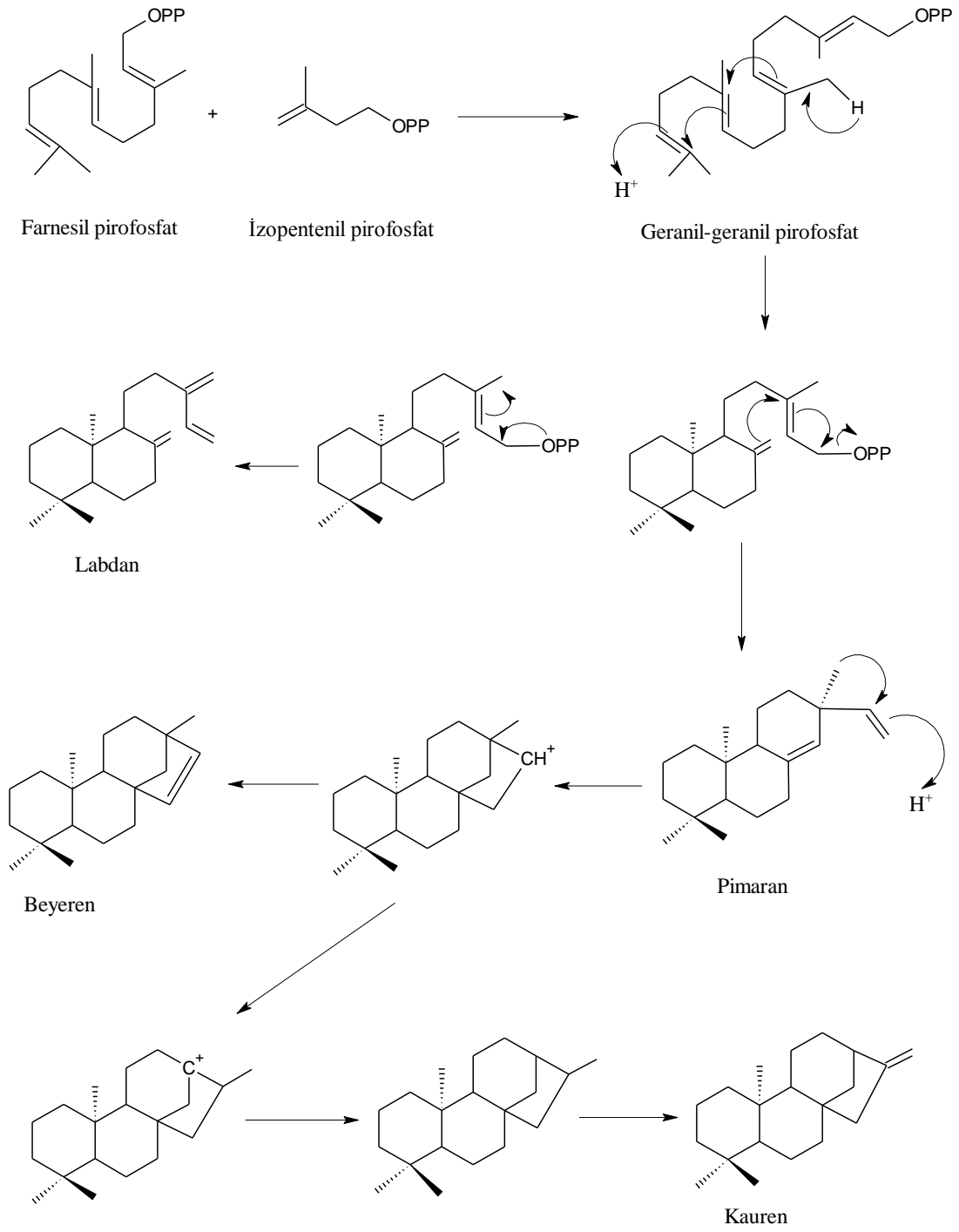
1.5.1.4 Diterpenler

Dört izopren ünitesinden oluşan diterpenler en basit haliyle $C_{20}H_{32}$ molekül formülüne sahiptirler. Esasında bitki ve mantar orijinli bileşikler olmalarına rağmen deniz ve böcek dünyasında da bulunmaktadır [53]. Yapılarının çok çeşitli olması, bitkilerden izole edilmesi ve kompleks diterpen karışımlarının ayrılması değişik ekstraksiyon sistemleri ve ayırma yöntemlerinin gelişmesine yol açmıştır [86].

Diterpenler, 2E, 6E, 10E geranil-geranil pirofosfattan türeyen izoprenoid ürünlerin en çok bulunan üyeleridir ve sınıflandırılmaları biogenetik prensiplerine bağlıdır [53].

Triterpen ve steroidlerden farklı olarak kolay oksitlenme görülen yapılardır. Bu nedenle diterpenlerde komşu grup desteğinden dolayı yapısal reaksiyonlarda birçok farklılık gözlenmektedir. Ayrıca gruplar arasında bağ yapmayan iç etkileşmeler, özellikle 1,3 diaksial etkileşmeler bulunmaktadır. Köprülü halka sistemlerinin bulunuşu, özellikle tetrasiklik diterpenlerde non-klasik karbokasyon oluşumunu destekler ve Wagner-Meerwein düzenlenmesi gözlenmektedir [16].

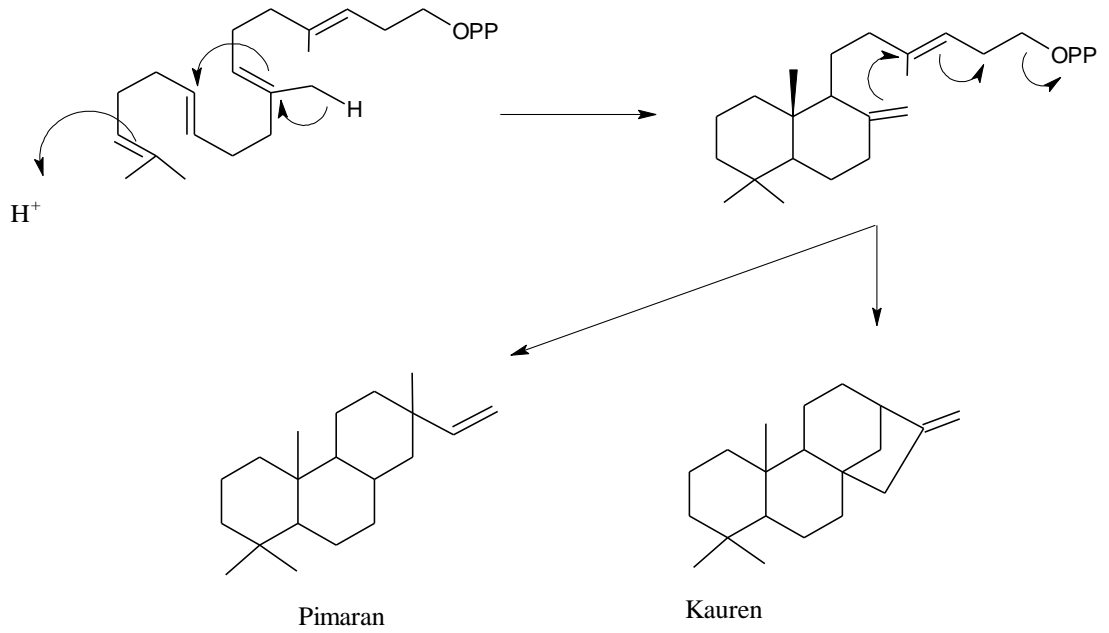
Sideritis türleri içerisinde genellikle kauren diterpenler yaygın olarak bulunmaktadır. Kauren diterpenlerin yanı sıra az miktarda da olsa labdan, pimaran ve beyeren diterpenler de içermektedirler. Ülkemizde mevcut olan bir diğer Labiatae familyası üyesi *Salvia* türlerinde abietanlar [87], *Teucrium* ve *Ajuga* türlerinde ise kloredan ve neokloredanlar yaygın olarak bulunmaktadır [88]. Şekil 1.20' da diterpenlerin biyosentezi için mekanizmalar önerilmiştir [86].



Şekil 1.20: Diterpenlerin biosentezi için önerilen mekanizmalar.

1.5.1.4.1 Biyogenetik Sınıflandırma

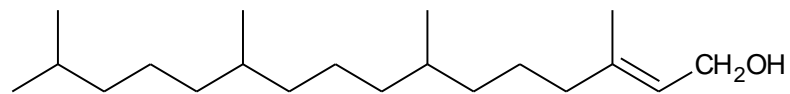
Halkalı yapıdaki diterpenlerin sınıflandırılması biyogenetik yaklaşımlar temel alınarak yapılmaktadır. Siklizasyon izopropil ünitesinde, asidik ortamda enzim sayesinde oluşan karbokatyona çifte bağ elektronlarının saldırması ile başlamakta ve bisiklik perhidronaftalin türevlerinin oluşumu sağlanmaktadır. Sonraki aşamalarda -OPP grubunun ayrılmasıyla ardışık siklizasyonlar başlamakta ve bunları çeşitli düzenlemeler takip ederek daha az gerimli yapılar oluşmaktadır. Bu oluşumlar Şekil 1.21’ de bir örnekte gösterilmiştir [89].



Şekil 1.21: Diterpenlerin pirofosfat grubunun ayrılmasıyla siklizasyonu.

1.5.1.4.2 Asiklik Diterpenler

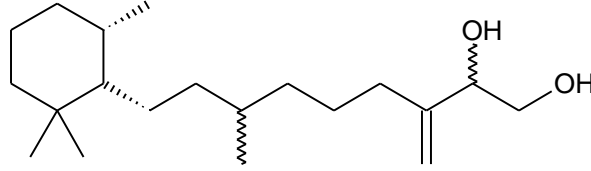
Halkalı yapıya sahip olmayan bu diterpenler yirmi karbon ve bağlı süstitüentlere göre yirminin üzerinde karbona sahip olan doymuş ya da doymamış yapılarıdır [70]. Şekil 1.22’de gösterilen fitol asiklik diterpenlere örnek olarak gösterilebilir.



Şekil 1.22: Fitol.

1.5.1.4.3 Monosiklik Diterpenler

Deniz yosunlarından elde edilen bu diterpenler karasal bitkilerde çok yaygın değildir. Nadir rastlanan bu yapılara örnek olarak bir kırmızı alg olan *Laurencia viridis*'den elde edilen Virodolis A (Şekil 1.23) verilebilir [90].

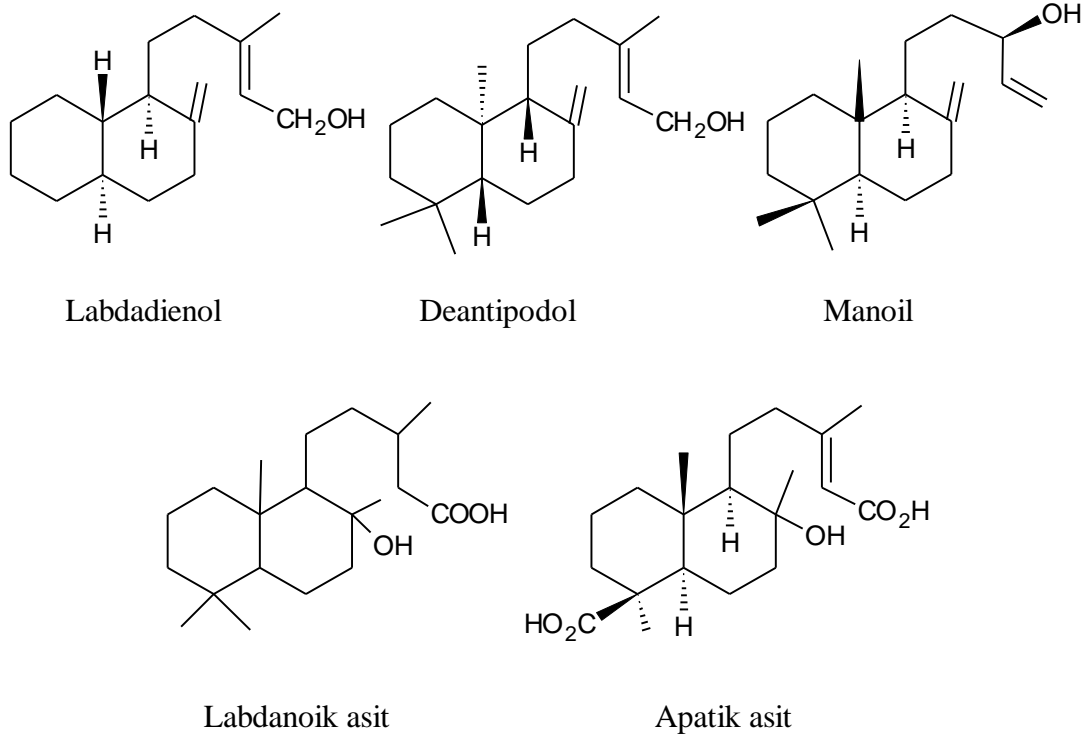


Şekil 1.23: Virodolis A.

1.5.1.4.4 Bisiklik Diterpenler

1.5.1.4.4.1 Labdanlar

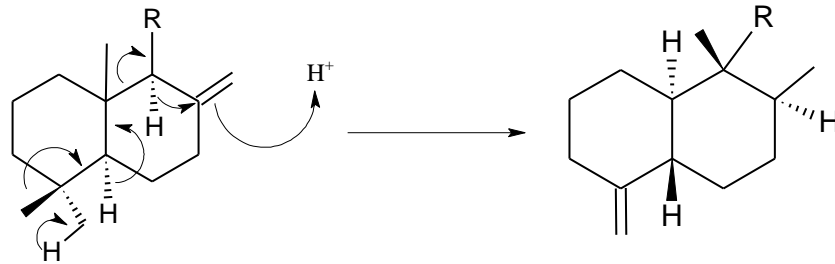
Geranil-geranil pirofosfatın enzimatik siklizasyonu bisiklik bir labdan ara ürününü verir ve triterpenler ile steroidlerden farklı olarak diterpenlerin karakteristik özelliği bu aşamada ortaya çıkmaktadır (bkz. Şekil 1.21). Hem normal hem deantipodal A/B halka kaynaşması gösterirler ve bu durum siklaz enzim yüzeyi üzerinde zincir çıkış bileşiğinin farklı sarılma modları üzerinden oluşmaktadır. Her iki serinin de yaygın örnekleri bulunmaktadır. Aynı bitki içerisinde birbiri yanında gerçekleşen her iki seriye de rastlanmıştır. Ayrıca diterpenlerin büyük çoğunluğunun H-9 ile C-10 metil grubu arasında bir trans ilişkisi göstermesine rağmen, H-9 ve C-10 metil grubu arasında bir cis ilişkisi gösteren bir bisiklik çıkış bileşiği üzerinden türemiş bileşik örnekleri de bulunmaktadır. Örneğin; plöromutilin ve afidikolin. Labdadienol'ün daha sonraki modifikasyonları manoil benzeri bileşiklere ve labdanoik asit ve apatik asit türevlerine dönüşebilmektedir. Bu seride C-13'te yeni bir optikçe aktif merkez haline dönüşmektedir [71]. Şekil 1.24'de bazı labdanlar örnek olarak verilmiştir.



Şekil 1.24: Bazı labdanlar.

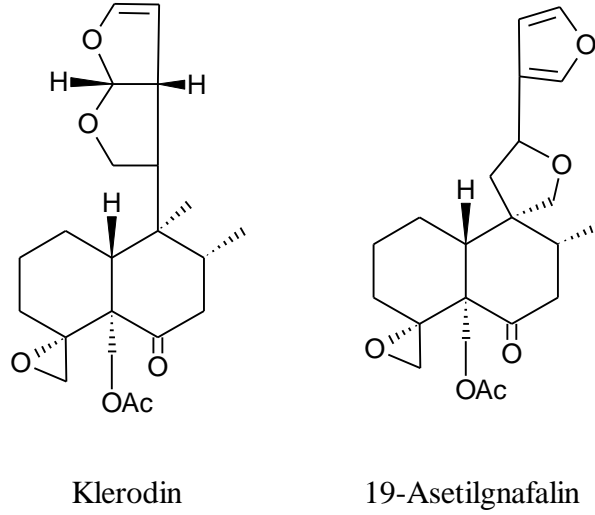
1.5.1.4.4.2 Klerodanlar

Bir seri backbone veya Friedo düzenlenmeleri (Şekil 1.25) sonucunda elde edilen yapılarıdır ve bu düzenlenmeler C-8 çift bağının protonlanması ve C-9'dan C-8'e hidrür kayması ile başlar, arkasından C-10'dan C-9'a bir metil grubunun kayması gerçekleşmektedir. C-5'den C-10'a daha ileri bir hidrür kayması ve C-4'den C-5'e bir metil kayması ile düzenlenme tamamlanmaktadır. Bu iskelet tipi içinde birçok stereokimyasal varyasyonlar bulunmaktadır. Ancak her iki enantiomerik seri gerçekleşmekle kalmaz, H-8 ve C-9 süstitüenti arasında hem cis hem de trans ilişkisi bulunduran bileşiklere de rastlanmaktadır [71].



Şekil 1.25: Backbone ve Friedo düzenlenmesi ile klerodanların oluşumu.

A/B halkasının cis ve trans birleşmesinin örnekleri bulunmaktadır. Stereokimyanın dikkatlice belirlenmesi yapısal çalışmanın önemli bir kısmını oluşturmaktadır. X-Ray analizine göre orijinal yapı klerodin olarak bulunmuştur ve tam stereokimyası Şekil 1.26'daki gibi olmalıdır. 400'ü aşkın klerodan ve neo-klerodan türevidir bilinmektedir ve çoğu *Teucrium* türlerinden elde edilmişlerdir [89].



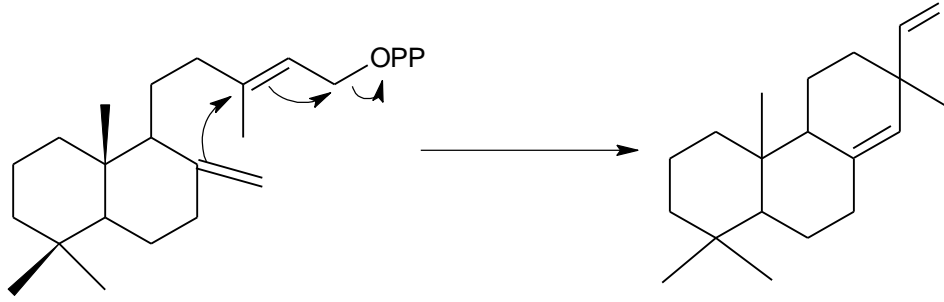
Şekil 1.26: Bisiklik diterpenler.

1.5.1.4.5 Trisiklik Diterpenler

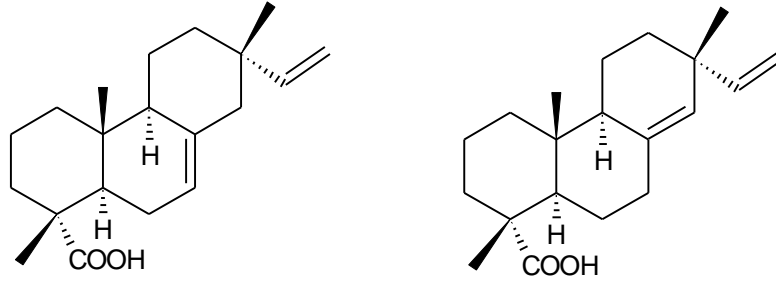
Trisiklik diterpenler Pimaranlar (Pimarenes), Abietanlar (Abietans), Kassanlar (Cassanes), Rosanlar (Rosanes) olmak üzere dört iskelet yapısına sahiptir.

1.5.1.4.5.1 Pimaranlar

Pimaradienler, ayrılan grup pirofosfatın aktivasyonu sonucu oluşan yapılardır ve merkezi çift bağın son pozisyonu değişik şekillerde olabilmektedir. Pimaradien iskeletine sahip olan diterpenler yaygın bir şekilde görülürler ve izopimarik asit, sandrakopimarik asit örnek olarak verilebilir [27]. Şekil 1.27'de pimaranların oluşumu, Şekil 1.28'de ise bazı pimaranlar gösterilmiştir.



Şekil 1.27: Pimaranların oluşumu.



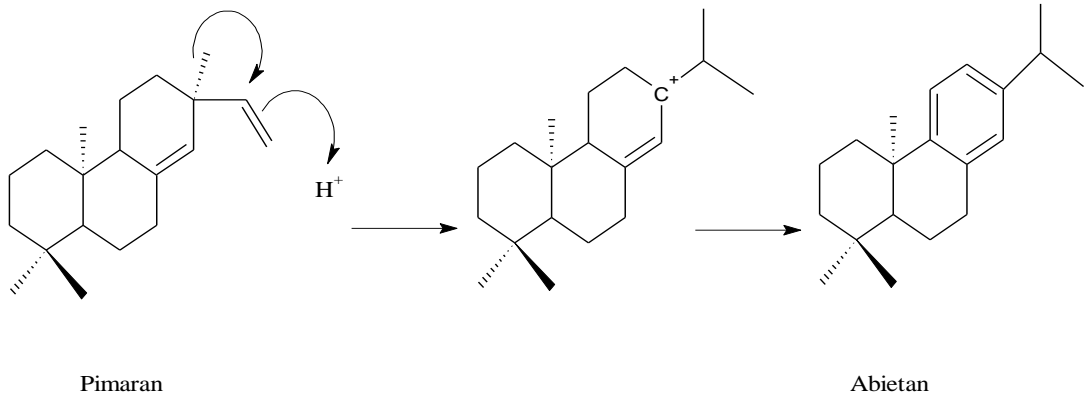
İzopimarik asit

Sandrokopimarik asit

Şekil 1.28: Bazı pimaranlar.

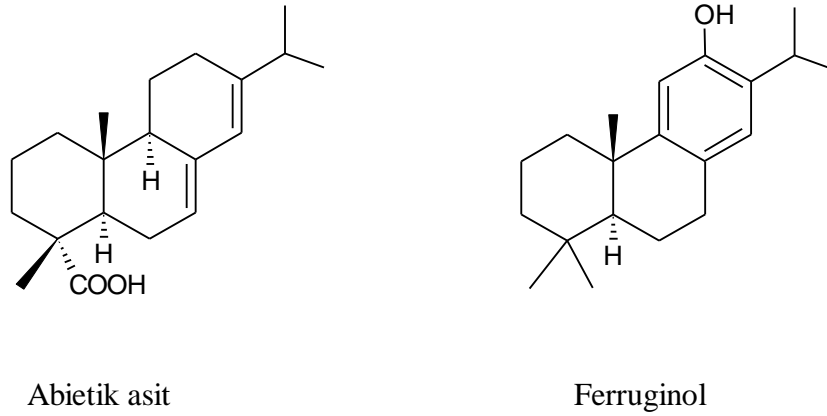
1.5.1.4.5.2 Abietanlar

Abietanlar, trisiklik pimaradienlerin metil grubunun göç etmesiyle oluşmaktadırlar (Şekil 1.29) [89].



Şekil 1.29: Abietanların oluşumu.

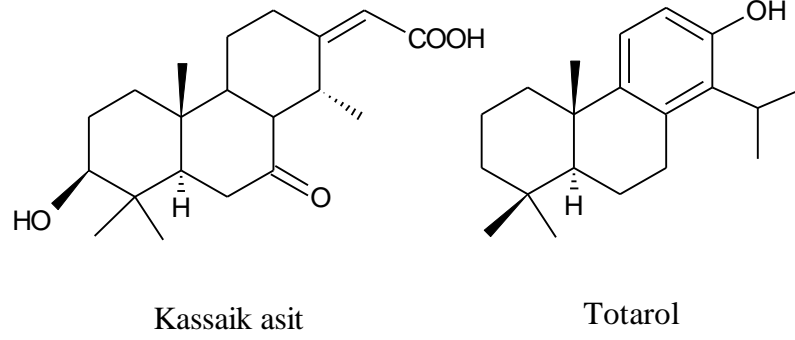
En çok bilinen örneği abietik asittir ve yapıda bulunan C halkası fenolik hale geçerek ferruginol gibi aromatik abietanları oluşturur (Şekil 1.30) [89].



Şekil 1.30: Bazı abietanlar.

1.5.1.4.5.3 Kassanlar

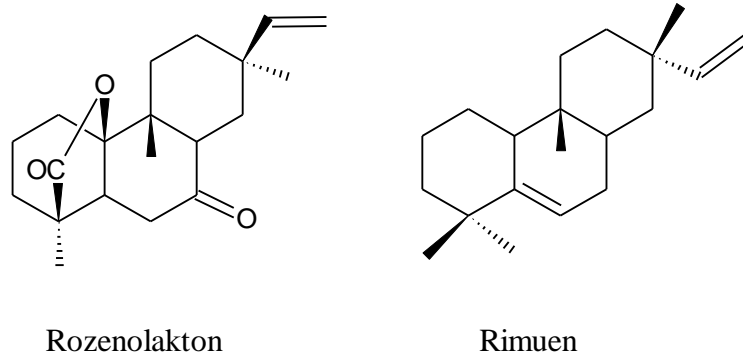
Kassanların yapılarında gerçekleşen düzenlenmeyle C-13' deki metil grubu C-14' e göçer ve bu tip diterpenlere *Erithrophleum* 'den elde edilen kassaik asit örnek verilebilir. *Podocarpus totora*'dan izole edilen totarol'de olduğu gibi izopropil grubunun C-12 ve C-14'e bağlanmış olduğu diterpenler de izole edilmişlerdir (Şekil 1.31) [71].



Şekil 1.31: Kassan türevleri.

1.5.1.4.5.4 Rosanlar

Friedo ya da Backbone tipi bir düzenlenme reaksiyonu içeren alternatif bir halkalaşma ile oluşmaktadır ve *Trichothecium roseum*'dan olan Rozenalakton gibi rosan diterpenler görülebilir. *Erythoxylon*'dan elde edilen bazı yükseltgenme ürünleri ile birlikte rimuen yapısı elde edilmiştir (Şekil 1.32) [71].



Şekil 1.32: Rosan türevleri.

1.5.1.4.6 Tetrasiklik Diterpenler

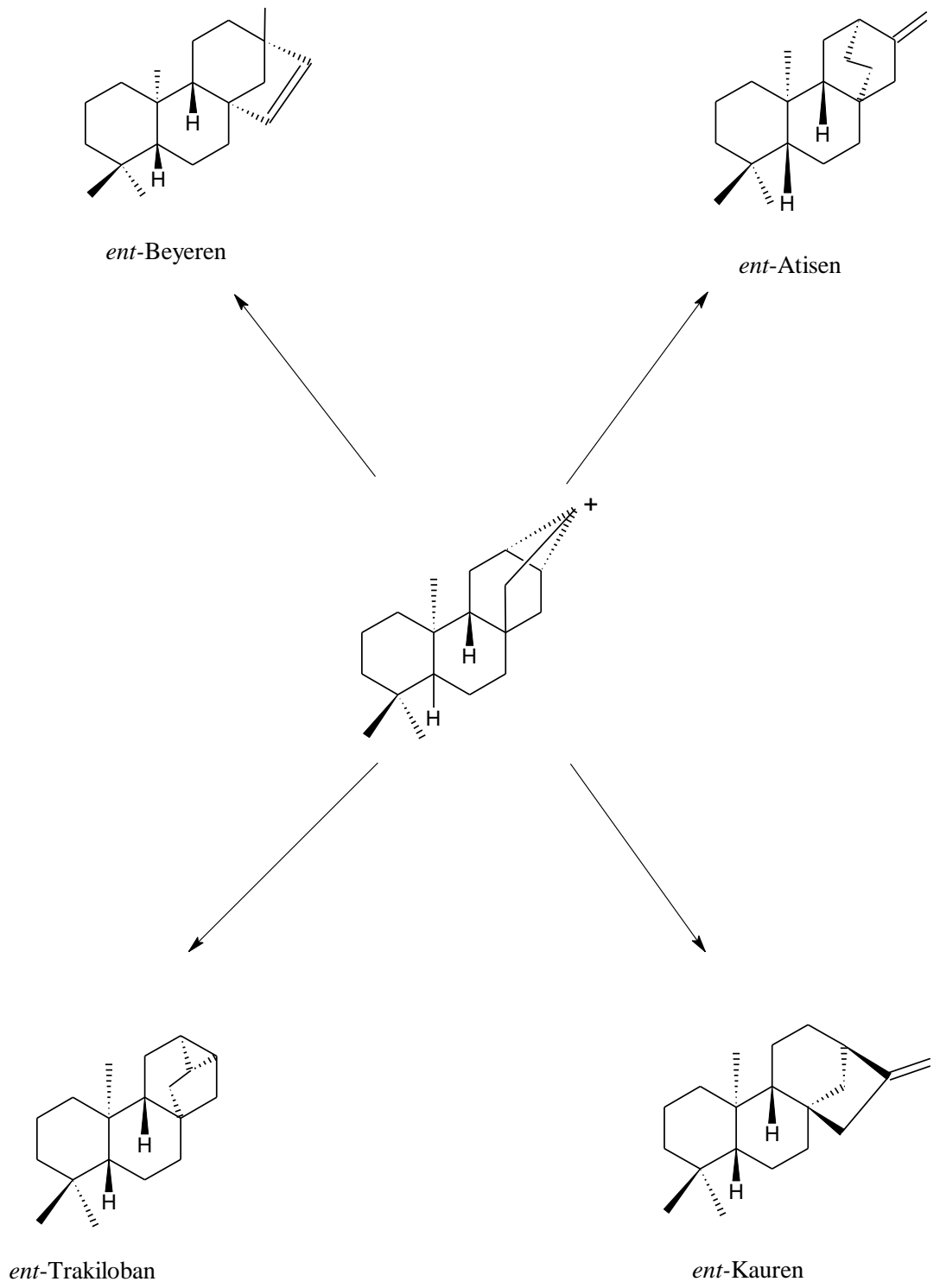
Tetrasiklik diterpenlerin pimaradienlerin klasik olmayan bir karbokatyon ara ürününe siklizasyonu ile oluştuğu ve karbokatyon, kauren, atiseren veya beyeren serisi bileşikleri veya beş halkalı pentasiklik siklokauren diterpenlerini oluşturacak şekilde düzenlendiği düşünülmekteydi (Şekil 1.33).

Ancak iyon veya eşdeğer ürün doğrudan bisiklik diterpenler serisinden oluşturulmaktadır ve giberallik asit, giberallin gibi büyüme hormonları, enmein ve

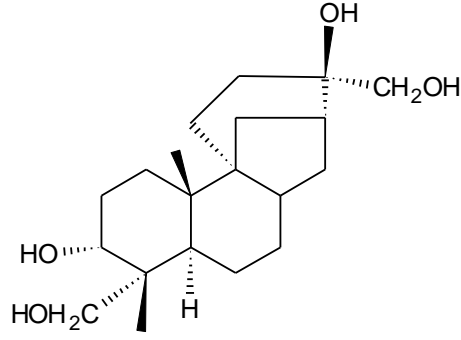
grayanotoksin serisi bileşikler daha yüksek derecede oksitlenmiş üyeleri oluşturmaktadır. Giberallin bitki hormonunun sentezi üzerinde çalışılmış olmasına rağmen bu serinin diğer biyosentetik bileşikleri hakkında daha az bilgi bulunmaktadır.

Giberallin bitki hormonları; Giberallin A₁₃ gibi yirmi karbon atomlu normal diterpenler ve gibberallik asitte olduğu gibi C-20' nin kaybolup A halkasının 19 →10 γ lakton halkası ile köprülendiği tetrasiklik diterpenler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Ayrıca çok sayıda hidroksillenmiş kaurenler de mevcuttur ve bunlardan birçoğu *ent-kaur* -16-en- 19-oik asitin türevleridir. Daha kompleks ve yüksek düzeyde oksijenlenmiş bir grup abonit alkaloidlerini oluşturur ve bu alkaloidler *Delphinium* ve *Aconitum* türlerinde bulunmaktadır.

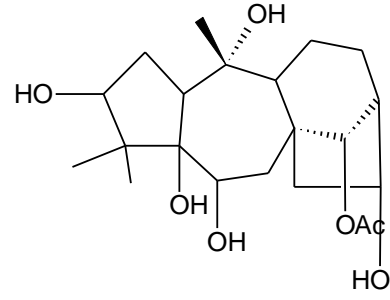
Bu bileşiklerde C-17 karbon atomu kaybolur ve *atisen* iskeletinde ise C-7, C-9 ve C-14'e göç edip yedi üyeli bir halka oluşmaktadır. 10- β -metil ve 9- β hidrojenine sahip bisiklik pirofosfatın değişik bir siklizasyonu sonucu H-9'dan H-8'e düzenlenmesi üzerinden afidocolin serisi bileşikler oluşmaktadır. Bu bileşikler spesifik DNA polimeri inhibitörleri olarak bilinmektedirler [89]. Bazı tetrasiklik diterpenler Şekil 1.34'te verilmektedir.



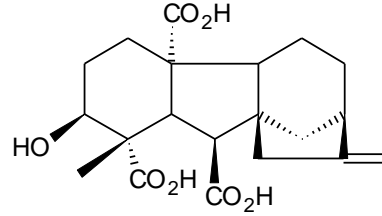
Şekil 1.33: Karbokatyon ara ürününden; *ent*-beyeren, *ent*-atisen, *ent*-trakiloban, *ent*-kauren oluşumları.



Afidokolin



Grayanotoksin



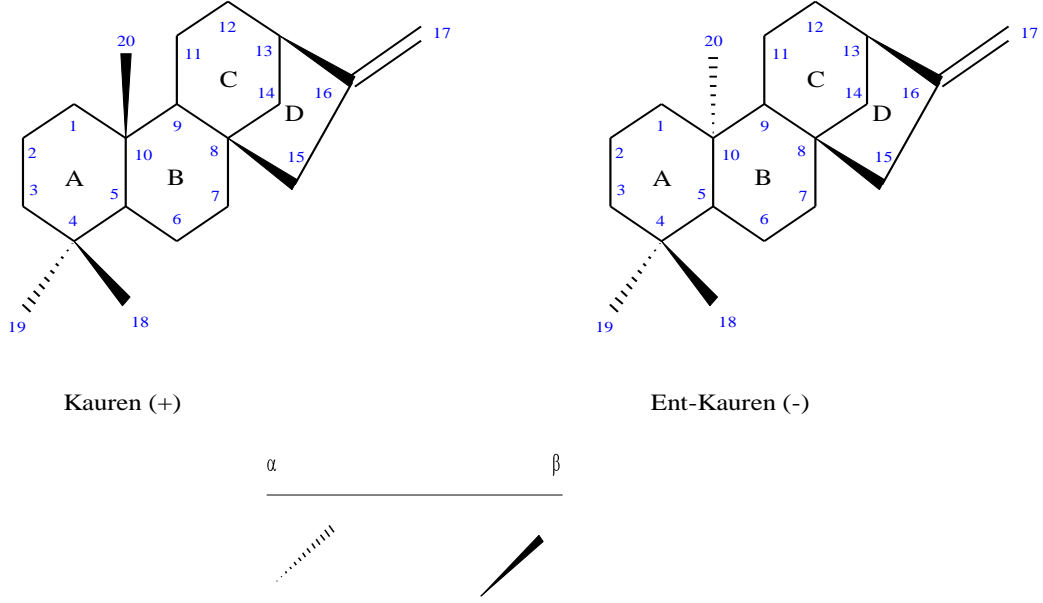
Giberellin A₁₃

Şekil 1.34: Bazı tetrasiklik diterpenler.

1.5.1.4.6.1 Kaurenler

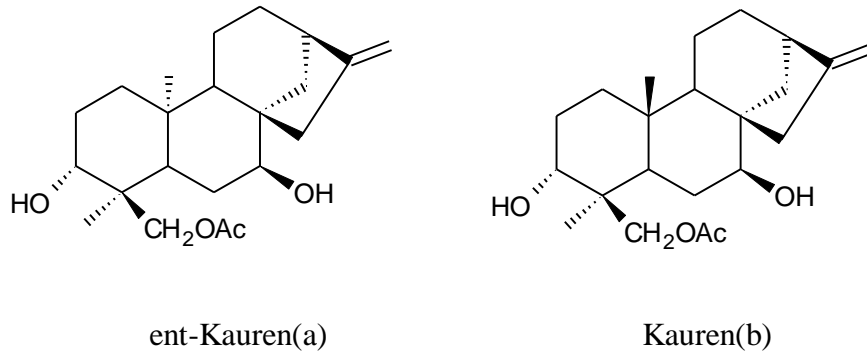
Geranil-geranil pirofosfatın kendi arasında düzenlemeye uğraması sonucu oluşan bileşiklerden biri de tetrasiklik diterpenlerdir, kauren iskeletine sahip olan yapılarda bu sınıflandırmaya dahil edilmektedir. Kauren diterpenler 20 karbona sahip yapılardır ancak sahip oldukları süstitüentlere göre karbon sayıları değişebilmektedir.

Kauren bileşiklerinin adlandırılmasına A halkasından başlanıp B halkası, C ve D halkaları ile devam edilir. Metil grupları 18, 19 ve 20 numaraya sahip olacak şekilde numaralandırılır. Bu noktada önemli olan 20 nolu metilin önde (β) veya arkada (α) olmasıdır. 20 nolu metil arkada ise bu bileşik *ent*-Kauren, önde ise kauren olarak isimlendirilir ve *ent*-kauren yapıya sahip halka üzerindeki süstitüentler her zaman bulunduğu konumun tersi konumla okunur (Şekil 1.35) [73].



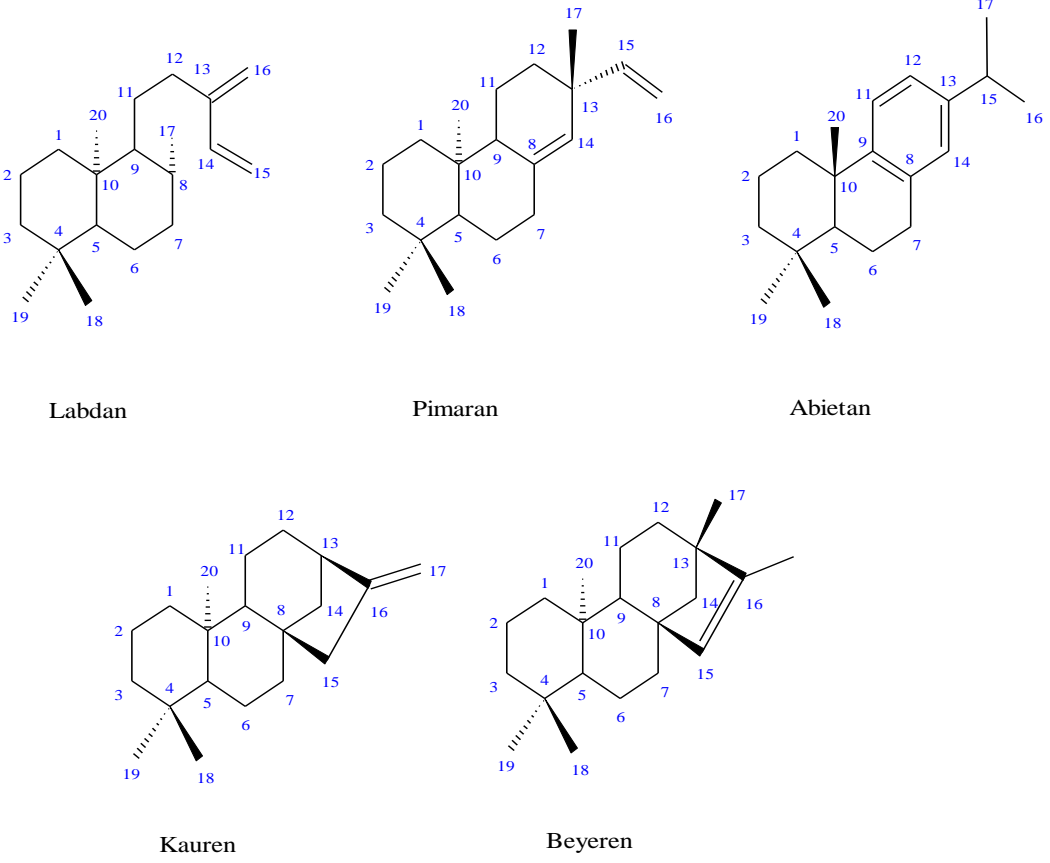
Şekil 1.35: Kauren ve *ent*-kauren iskeletleri.

Ent-kauren iskeletine sahip **a** bileşiği *ent*-3 β ,7 α -dihidroksi-18-asetilkaur-16-en, **b** bileşiği ise 3 α ,7 β - dihidroksi-18-asetilkaur-16-ene olarak adlandırılır. **a** yapısında 20 nolu karbon arkada yani α pozisyonundadır. Bu bileşikteki 3 nolu karbondaki hidroksil grubu β , 7 nolu karbondaki hidroksil grubu ise α olarak adlandırılır. Molekül yapısı incelendiğinde aslında 3 nolu hidroksilin gerçekte α , 7 nolu hidroksilin ise β olduğu görülür. **b** yapısına baktığımızda sübstitüentlerin okunuşunda da gerçekte olduğu pozisyonda olduğu görülmektedir (Şekil 1.36)[71].



Şekil 1.36: Linearol'un *ent*-kauren ve kauren gösterimi.

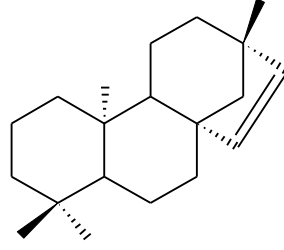
Aynı adlandırma kuralı labdan, pimaren ve beyeren yapıları için de geçerlidir (Şekil 1.37).



Şekil 1.37: Bazı diterpenlerin numaralandırılması.

1.5.1.4.6.2 Beyerenler

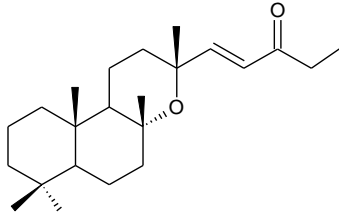
Beyeren diterpenlerin adlandırmasında *ent* sistemi geçerlidir. Beyerenlerin belirgin özelliği kaurenlerde bulunan 17 numaralı metil grubunun C-15'e değil C-13'e bağlı olması ve çift bağın ise C-14 ile C-15 arasında bulunmasıdır. Bu yapılara ise staken (Şekil 1.38) verilebilir [71].



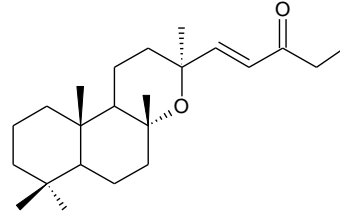
Şekil 1.38: Staken.

1.5.1.5 Sesterpenler

Beş izopren ünitesinden oluşup 25 karbon içerirler ve geranil-geranil pirofosfata bir izopren birimi daha katılmasıyla oluşurlar [71]. *Salvia limbata*'dan Şekil 1.39'da gösterilen 6-dehidroksiyosgadensenol ve 6-dehidroksi-13-epi-yosgadensenol isimli sesterpenler izole edilmiştir [91].



6-Dehidroksiyosgadensenol



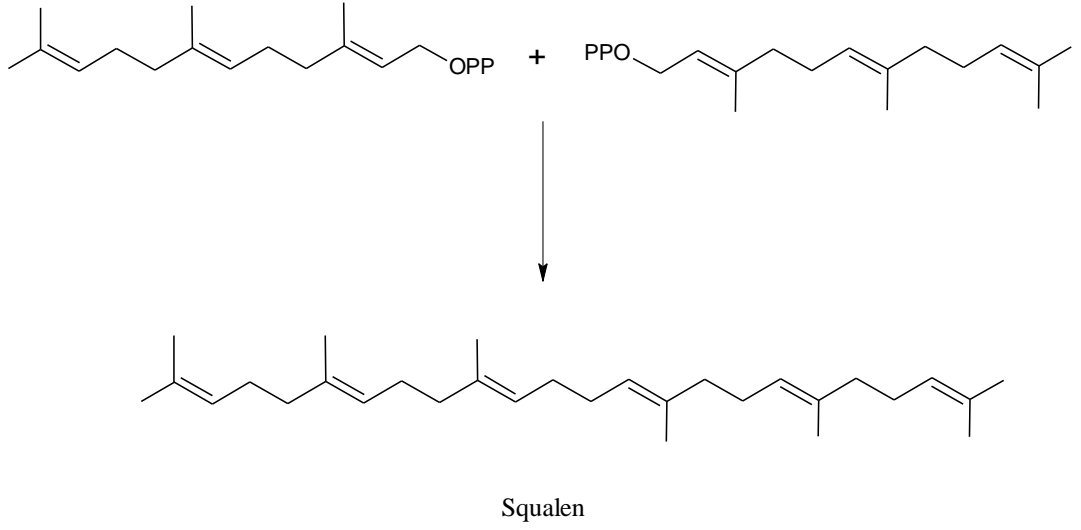
6-Dehidroksi-13-epi-yosgadensenol

Şekil 1.39: Bazı sesterpenler.

1.5.1.6 Triterpenler

Altı izopren ünitesinin bağlanmasıyla oluşup $C_{30}H_{48}$ molekül formülüne sahip yapılardır. Köpekbalığının karaciğerinden elde edilen yağın ana bileşeni olan skualen (Şekil 1.40) düz zincirli (asiklik) bir triterpendir ve iki çift farnesil pirofosfat molekülünün indirgenmesi ile oluşmaktadır. Molekül yapısı incelendiğinde, molekülün merkezinde birbirine kuyruk kuyruğa bağlı iki izopren molekülü olduğu görülmektedir [70].

İlk olarak köpekbalığı karaciğerinin yağından elde edilmiş olan skualen bu kaynağın yanı sıra kepekli pirinç, buğday filizi, zeytin gibi bitkisel kaynaklardan da elde edilmektedir [27].



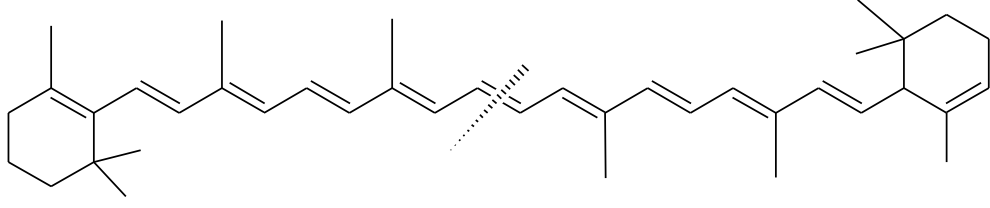
Şekil 1.40: Skualen molekülünün oluşumu.

1.5.1.7 Tetraterpenler

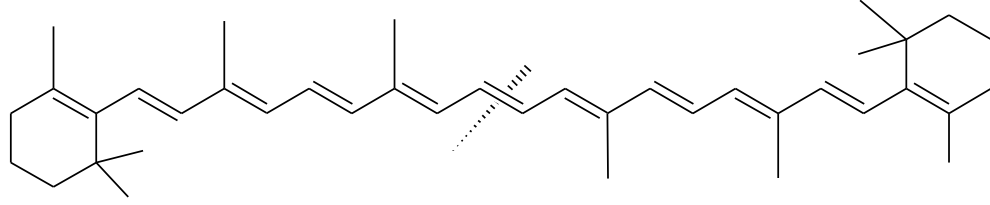
Tetraterpenler sekiz izopren ünitesi içeren yapılardır ve $C_{40}H_{56}$ molekül formülüne sahiptirler [27]. Karotenler (Şekil 1.41) izopren moleküllerinin kuyruk – kuyruğa bağlı olduğu tetraterpenlerdir [16].

Karotenoidler bitki ve hayvan orijinli gıda maddelerinde özellikle de meyve ve sebzelerde bulunmaktadır [92]. Yapılarında bulunan konjuge bağ sayısı arttıkça renk yoğunluğu da artmaktadır [93].

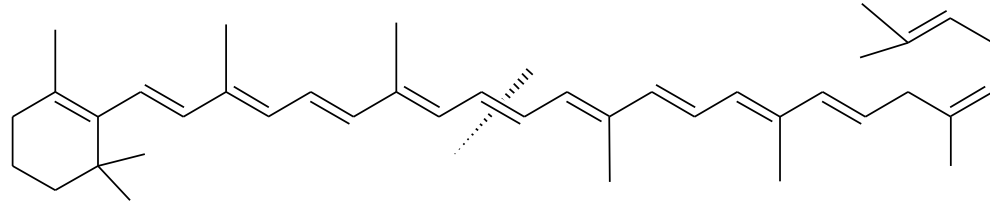
Karotenoidler içerisinde en yüksek provitamin A (Şekil 1.42) aktivitesine β -karoten sahiptir [94]. Bunun nedeni ise diğer karotenoidlerden farklı olarak yapısının her iki ucunda β -iyonon halkasının bulunmasıdır [95].



α -Karoten

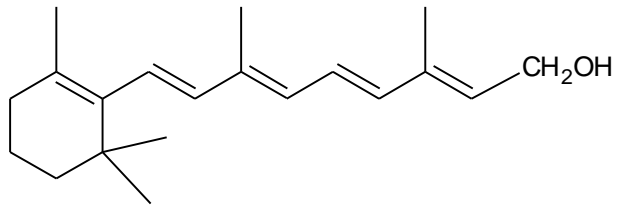


β -Karoten



γ -Karoten

Şekil 1.41: Bazı tetraterpenler.



Şekil 1.42: A vitamin.

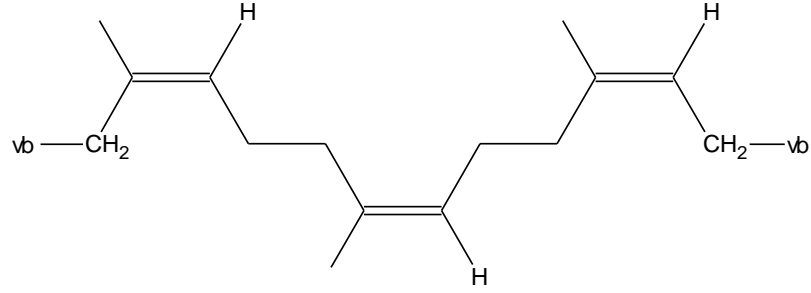
1.5.1.8 Politerpenler

Politerpenler çok sayıda izopren ünitesinin bağlanıp uzun bir zincir oluşturması ile meydana gelmektedirler. En bilinen üyesi olan kauçuk, lateks adıyla

da bilinmekte ve daha çok tropik bölgelerde yetişen ağaçlardan elde edilmektedir. Ağacın gövdesinde açılan bir kesikten lateks sızmaya başlar. Asetik asit eklenmesi kauçuğu çözeltiden ayrılmasını sağlayacak şekilde pıhtılaştırır ve şekil verilip, son olarak ılık hava akımında kurutulur ve ya tütülenir.

Kauçuğun (*cis*-1,4-poliizopren) (Şekil 1.43) yıkıcı destilasyonu ana ürün olarak izopren yapısını verir; bu da kauçuğun izoprenin bir polimeri olduğu fikrine neden olmuştur ve saf kauçuğun analizleri ile moleküler yapının $(C_5H_8)_n$ olduğu doğrulanmıştır.

Doğal kauçuk da izoprenin 1,4 katılma polimeri olarak düşünülebilir. Oluşumunda, izopren birimleri baş-kuyruğa bağlanır ve tüm ikili bağlar *cis*'tir [77].



Şekil 1.43: Kauçuk (*cis*-1,4-poliizopren).

1.6 Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler, benzen halkasına bir ya da daha fazla hidroksil (-OH) grubunun bağlandığı aromatik bileşiklerdir. Bitkiler bünyelerinde, ikincil metabolit olarak adlandırılan ve kendilerini zararlılara karşı korumada rol aldığı düşünülen çok sayıda fenolik bileşik içermektedirler [96].

Canlılar, metabolizma işleyişi sonucu üretilen reaktif oksijen türleri tarafından sürekli olarak oksidatif strese maruz kalmaktadır. Genellikle dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektronu bulunan ve bu nedenle yüksek reaktiviteye sahip yapılardır. Bu da hücrelerde bulunan DNA, lipit, protein gibi molekülleri zarara uğratan birçok hastalığa sebebiyet vermektedir [97,98].

Meyve ve sebzelerde bulunan fenolik bileşikler radikalik yapıdaki moleküllerin peroksidasyonunu inhibe ettikleri için antioksidan olarak kullanılmaktadırlar [99]. Vücutta kalkan görevi yapan bu kimyasal bileşiklerin özelliği, kendi elektronlarını vererek serbest radikalleri nötralize etmeleri ve bu sırada serbest radikal haline gelmemeleridir [100].

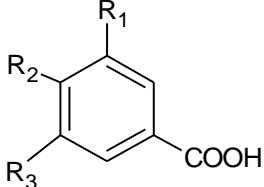
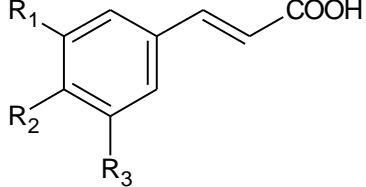
1.6.1 Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması

Fenolik bileşikler yapılarına göre sınıflandırıldığında flavonoid olmayanlar ve flavonoidler olmak üzere iki gruba ayrılırlar [101].

1.6.1.1 Flavonoid Olmayanlar (Fenolik Asitler)

Fenolik asitler, hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asitler olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Hidroksibenzoik asitler C₆-C₁ fenilmetan yapısına sahip maddelerdir ve bitkisel kaynaklarda eser miktarda bulunurlar. Hidroksisinamik asitler ise C₆-C₃ fenilpropan yapısındadırlar ve halkaya bağlanan OH grubunun konumu ve yapısına göre farklı özellik gösterirler. Fenolik asitlerin kimyasal yapıları Tablo 1.2'de görülmektedir [96,102].

Tablo 1.4: Fenolik asitlerin kimyasal yapıları.

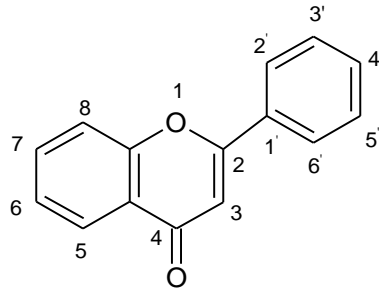
							
Benzoik Asit	R₁	R₂	R₃	Sinamik Asit	R₁	R₂	R₃
<i>p</i> -OH benzoik asit	H	OH	H	<i>p</i> -kumarik asit	H	OH	H
Pirokateşuik asit	H	OH	OH	Kafeik asit	H	OH	OH
Vanilik asit	CH ₃ O	OH	H	Ferulik asit	CH ₃ O	OH	H
Sirincik asit	CH ₃ O		CH ₃ O	Sinapik asit	CH ₃ O	OH	CH ₃ O
Gallik asit	OH	OH	OH				

1.6.1.2 Flavonoidler

Flavonoidler, antimikrobiyal, antiviral, antiülserojenik, sitotoksik, mutajenik, antiinflamatuvar, antihipertansif ve özellikle antioksidan etkilere sahiptir ve bu nedenle araştırmacıların dikkatini çekmektedir [103,104].

Flavonoidler bünyelerinde 15 karbon atomu içeren, difenilpropan (C₆-C₃-C₆) yapısına sahip, karbon iskeletleri iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan gıdalarda ise en yaygın olarak bulunan polifenollerdir [96].

Flavan türevleri olan flavonoidlerin genel yapısı Şekil 1.44'de görülmektedir [105].



Şekil 1.44: Flavonoidlerin genel yapısı.

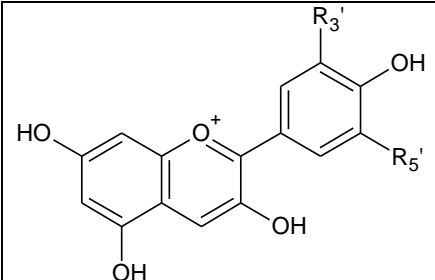
Flavonoidler yapısal olarak beş gruba ayrılırlar;

- 1) Antosiyanidinler
- 2) Flavonlar ve flavonollar
- 3) Flavanonlar
- 4) Kateşinler
- 5) Proantosiyanidinler

1.6.1.2.1 Antosiyanidinler

Doğada serbest halde değil de şekerlerle glikozidik halde bulunup antosiyanin adını alırlar. Antosiyaninler meyve ve sebzelerin pembe, kırmızı ve mor tondaki renkleri veren suda çözünebilir niteliğe sahip pigmentlerdir [106]. Yaygın olarak bitkilerde bulunan antosiyanidinlerin yapıları Tablo 1.5’te verilmiştir [106,107].

Tablo 1.5: Antosiyanidinlerin yapıları.

	Antosiyanidinler	R₃'	R₅'
	Pelargonidin(Pg)	H	H
	Siyanidin(Cy)	OH	H
	Peonidin(Pn)	OCH ₃	H
	Delfinidin(Dp)	OH	OH
	Petunidin(Pt)	OCH ₃	OH
	Malvinidin(Mv)	OCH ₃	OCH ₃

1.6.1.2.2 Flavonlar ve Flavonollar

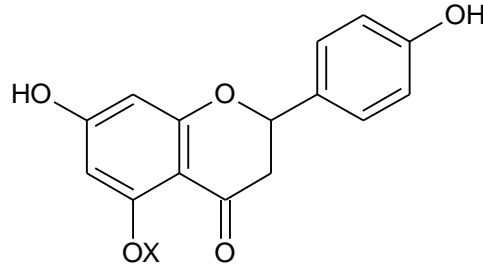
Tablo 1.6’deki gibi orta halkanın 3. karbon atomuna flavonlarda (H), flavonollarda (OH) grubu bağlı durumdadır. Flavon ve flavonollar da antosiyanidinler gibi şekerlerle glikozit halinde bulunmaktadırlar [96,106].

Tablo 1.6: Flavon ve flavonol yapıları

Flavonol (X=OH)	R ₁	R ₂	Flavonlar (X=H)	R ₁	R ₂
Kamferol	H	H	Apigenin	H	H
Kuersetin	OH	H	Luteolin	OH	H
Mirsetin	OH	OH	Krisoeriol	OCH ₃	H
İzoramnetin	OCH ₃	H	Trisin	OCH ₃	OCH ₃

1.6.1.2.3 Flavanonlar

Şekil 1.45’de görüldüğü gibi flavonlardan farkı yapılarında ortadaki halkada çift bağın bulunmamasıdır. Glikozit formları özellikle turunçgillerde yaygın olarak bulunmaktadır. En önemlileri naringin, hesperidin ve naringeninidir [96,106].

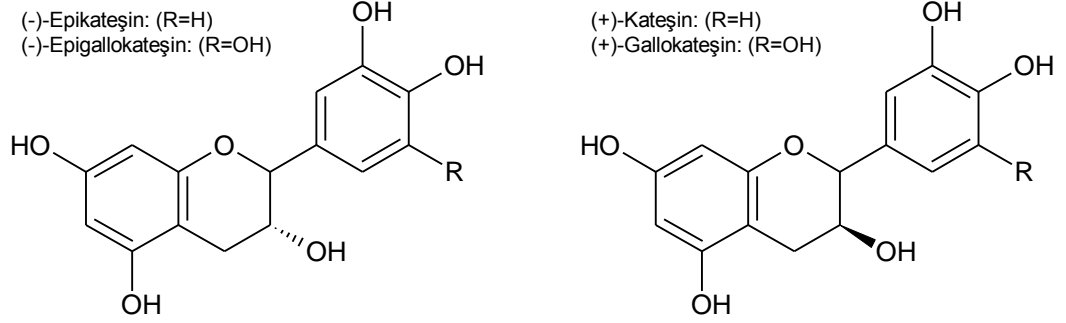


Şekil 1.45: Flavanon genel yapısı.

1.6.1.2.4 Kateşinler

Flavan-3,4-diol’ler ve flavan-3-ol’ler yapılarında hidroksil grubu ve üçüncü karbon atomunda doymuş bağ içerirler. (+)-kateşin, (-)-epikateşin, (+)-gallokateşin ve (-)-epigallokateşin meyvelerde bulunmaktadır [108]. Kateşinler, hem kimyasal hem de enzimatik yolla hava oksijeni ile kondanse olarak proantosiyandinleri oluştururlar [109].

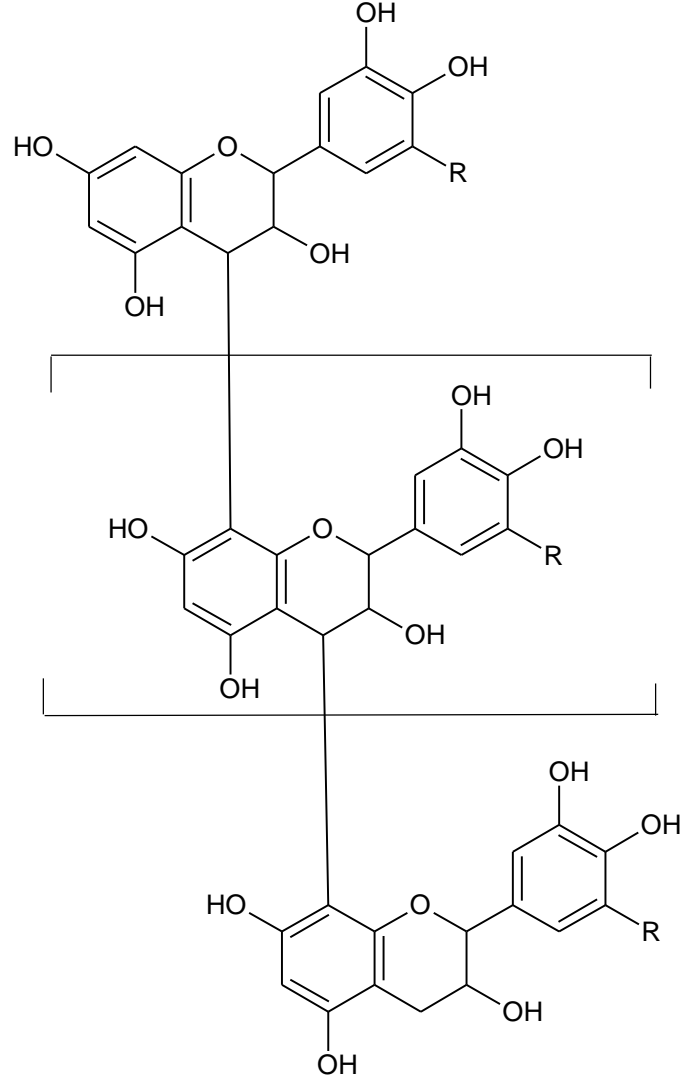
Yaygın olarak bulunan kateşinlerin kimyasal yapıları Şekil 1.46'da verilmiştir. [110,111].



Şekil 1.46: Kateşinlerin kimyasal yapıları.

1.6.1.2.5 Proantosiyanidinler

Kateşinlerden oluşan polimerik yapılara proantosiyanidinler adı verilir. Bu yapılar eğer epikateşin ve kateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prosiyanidin, kateşin ve gallokateşin kondensasyonu ile oluşuyorsa prodelfinidin adını alır. Bitkisel gıdalarda yaygın olarak bulunan proantosiyanidinler; (-)-epikateşin ve (+)-kateşin kombinasyonlarından oluşan yapılardır [109]. Şekil 1.47'de Prosiyanidin ve prodelfinidin'in kimyasal yapısı görülmektedir [112].



Şekil 1.47: Prosiyanidin ve prodelfidin'in kimyasal yapısı.

2. DENEYSEL BÖLÜM

2.1 Materyal

2.1.1 Bitkisel Materyal

Sideritis hispida P. H. Davis bitkisi Karaman–Mut arası 16. km’de 09.07.2014 tarihinde toplandı ve Doç. Dr. Tuncay DİRMENCİ tarafından teşhis edilerek bir örneği Balıkesir Üniversitesi NEF Botanik Laboratuvarı’na konuldu.

2.1.2 Kimyasal Materyal

Kolon kromatografisi için silikajel 60G (Kieselgel 60G 0.063-0.200 Merck), ince tabaka ve preparatif ince tabaka kromatografisi için silikajel kaplı Alüminyum plaklar (DC alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck), plaklar için ise Silikajel 60G ve Silikajel 60 F₂₅₄ (Merck) kullanıldı.

Ayırma ve saflaştırma işlemleri sırasında Hekzan (C₆H₁₄), Diklorometan (CH₂Cl₂), Kloroform (CHCl₃), Etil Asetat (CH₃CO₂C₂H₅), Aseton ((CH₃)₂CO), Metanol (CH₃OH) çözümleri kullanıldı.

2.2 Yöntem

Bitki kimyası çalışmalarında izlenen yöntem;

- Bitkilerin çiçeklenme döneminde toplanması ve teşhis edilmesi,
- Bitkilerin gölgede kurutulması ve çözücüyle daha iyi etkileşebilmesi için toz haline getirilmesi,
- Bitkilerin uygun çözücülerle ekstraksiyonu,
- Hazırlanan ekstrelerden çeşitli yöntemlerle organik maddelerin izole edilmesi,
- Elde edilen maddelerin çeşitli spektroskopik yöntemler (IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, MS) kullanılarak yapılarının tayin edilmesi,

- Gerek bitki ekstralarının gerekse ekstralardan elde edilen saf maddelerin aktivite (antibakteriyel, antiviral, antifungal, sitotoksik, anti tümör v.b.) tayini aşamalarından geçmektedir.

2.2.1 Ekstraksiyon

Gölgede kurutulduktan sonra öğütölüp toz haline getirilen 2000 g *S. hispida* P. H. Davis bitkisi önce hekzan daha sonra da sırasıyla aseton ve metanol içerisinde iki hafta süreyle masere edilerek rotary evaporatörde çözücülerinin kuruluğa kadar uçurulmasıyla miktarları 14 g hekzan (verim % 0.7), 22 g aseton (verim % 1.1), 82 g (verim % 4.1), metanol olmak üzere ham ekstraktlar elde edildi.

2.2.2 Kromatografi

2.2.2.1 Kolon Kromatografisi

Yöntem, maserasyona tabi tutularak elde edilen bitki ekstralarının fraksiyonlara ayrılması amacıyla kullanıldı.

Elde edilen ekstralar az miktarda kloroformda çözüldü ve bu çözeltilere parçacık büyüklüğü 0.040-0.060 (230-400 mesh E. Merck) olan silikajel 60G (Merck) ilave edilip homojen bir karışım elde edebilmek için sık sık karıştırılarak çözücüsü uçuruldu. Bu işlem bitkiden elde edilen üç ekstreya de uygulandı ve paketlenme yöntemine göre hazırlanmış ekstraktlar, en altına cam pamuğu yerleştirilmiş, ekstre miktarına göre 2/3'ü aynı tip silikajelle doldurulmuş kolona konuldu. Yıkamaya hekzan ile başlanıp artan polariteye göre diklorometan, kloroform, aseton ile devam edilip metanolla kolon sona erdirildi. Bu işlemle elde edilen fraksiyonların miktarlarına göre daha küçük boyuttaki kolonlar kullanılarak yeniden kolon yapılıp ayırma işlemine devam edildi.

2.2.2.2 İnce Tabaka Kromatografisi

Kolon kromatografisi yöntemi ile elde edilen fraksiyonlar silikajel kaplı hazır alüminyum plaklara (DC – Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₄ Merck) tatbik edilerek uygun çözücü sistemlerinde yürütölüp UV(254 nm) ışık altında maddelere ait lekeler

incelendi. Seryum (IV) sülfat belirteci püskürtülen plaklar 105°C'lik etüvde yakılıp benzer R_f değerine sahip olanlar birleştirilerek kolon kromatografisinden elde edilen bütün fraksiyonlar inceleninceye kadar işleme devam edildi.

2.2.2.3 Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi

Preparatif ince tabaka kromatografisini ince tabaka kromatografisinden ayıran en önemli özellik madde miktarına göre uygulanabilir olmasıdır. Silikajel kaplı hazır alüminyum plaklara miktarı az olan fraksiyonlar tatbik edilirken preparatif ince tabaka kromatografisi ise miktarı 30 mg'dan fazla olan fraksiyonları ayırmak için kullanıldı.

Preparatif ince tabaka kromatografisi plaklarını hazırlamak için 100 g silikajel 60G ve 50 g silikajel 60 HF₂₅₄ adsorbanları 300 ml distile su ile bir balon içerisinde çalkalandı. Homojen bir hal alan karışım CAMAG cam plak çekme aleti ile 20 cm x 20 cm boyutlarındaki cam plaklara 0.5 mm kalınlığında çekilerek önce oda sıcaklığında kurutulup daha sonra 1 saat süre ile 105°C'de aktive edildi. Daha sonra fraksiyonlar bir cam plağa 15-20 mg olacak şekilde tatbik edilip uygun çözücü sistemlerinde yürütüldü. Maddelere ait bantlar UV(254nm) ışık altında incelendi ve R_f değeri farklı olan maddeler birbirinden ayrıldı. Bu işlem maddeler saflaştırılincaya kadar devam etti.

2.3 Spektroskopik Yöntemler

2.3.1 NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR, COSY, HMQC, HMBC)

Saf olarak elde edilen maddelerin spektrumları, TÜBİTAK UME, Kimya Grubu Laboratuvarları Varian 600 MHz NMR cihazında alındı. Referans bileşik olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılmış olup CDCl₃, C₃D₆O, CD₃OD çözücülerinden uygun olanı seçilmiştir.

2.4 Kullanılan Belirteçler

Terpenleri belirlemek amacıyla Seryum (IV) sülfat belirteci kullanıldı.

2.4.1 Seryum (IV) Sülfat Belirtecinin Hazırlanması

10 g seryum (IV) sülfat tartılarak üzerine 100 ml distile su eklendi. Çözününceye kadar çalkalanıp üzerine yavaş bir şekilde 50 ml derişik sülfürik asit ilave edildi. Soğuyan karışım 500 ml oluncaya kadar distile su ilave edildi.

2.5 Uçucu Yağların Elde Edilmesi ve Analizi

S. hispida P. H. Davis bitkisinin uçucu yağını elde etmek amacıyla Clevenger aparatı takılmış su buharı destilasyonu düzeneğinin balonuna su ve yaklaşık olarak 150 gram bitki konularak 2-8 saat kaynatıldı. GC-MS ile analiz edilinceye kadar yağlar soğukta saklandı.

GC-MS cihazında ise helyum dakikada 1 ml (1ml/dk) sabit akış hızında olmak üzere 1 µL örnek enjekte edildi. Gaz kromatografisinde sıcaklık ayarı 5 dakika boyunca 50 °C'de tutulup, 5 dakikada 250 °C'ye çıkarılıp 10 dakika boyunca bu sıcaklıkta tutuldu, kütle spektroskopisinde ise transfer hattı 220 °C'ye ayarlandı. Analizler DB-5 30 m x 0.25mmID x 0.25 µm kolonu barındıran Thermo Scientific TSQ GC-MS/MS cihazı ile yapıldı.

2.6 Fenolik Bileşiklerin Elde Edilmesi ve Analizi

Bitkinin barındırdığı fenolik madde içeriğini tespit etmek amacıyla ilk adım olarak öğütülen bitkiden 100 g alınıp önce 2 L Hekzan içerisinde 15 gün maserasyona tabi tutulduktan sonra süzülüp çözücüsü buharlaştırılarak kuru ekstre elde edildi (Shi 1.1). Hekzandan çıkarılan bitkiye sırasıyla aseton (Shi 1.2) ve metanol (Shi 1.3) eklenerek aynı işlemler uygulandı. Ayrıca iki adet 100 g'lık bitki de hazırlanıp doğrudan aseton (Shi 2) ve metanolle (Shi 3) muamele edilerek ekstreler elde edildi.

Ekstrelerin fenolik içeriğini belirlemek için analizler LC-MS/MS cihazı ile yapıldı. Analizlerde standart olarak Fumarik asit (99%, Sigma- Aldrich), Pirogallol (98%, Sigma- Aldrich), Rutin (94%, Sigma- Aldrich), Klorojenik asit (95%, Sigma- Aldrich), Gallik asit (99%, Merck), Siringik asit (95%, Sigma- Aldrich), t-ferulik asit (99%, Sigma- Aldrich), Kafeik asit(98%, Sigma- Aldrich), Pelargonin klorür (98%, Sigma- Aldrich), Kuersitrin (97%, Sigma- Aldrich), Salisilik asit (99%, Sigma- Aldrich), p-kumarik asit (98%, Sigma- Aldrich), Luteolin-7-O-glu (99%, Applichem), Rosmarinik asit (96%, Sigma- Aldrich), Siderol (98%, Sigma- Aldrich), Apigenin (95%, Sigma- Aldrich), Kamferol (96%, Sigma- Aldrich), Linearol (98%, Sigma- Aldrich), İsorhamnetin (98%, ExtraSynthese, Genay-France) bileşikleri kullanıldı.

Stok çözeltiler sırasıyla 10 mg/L, 0.1 mg/L, 5 mg/L olacak şekilde HPLC saflıkta metanol(Merck) ile, kalibrasyon çözeltileri ise doğrusal bir aralıkta yine metanol ile hazırlandı. Seyreltmeler otomatik pipet ve A sınıfı cam volümetrik şişeler kullanılarak yapıp yine cam kaplarda -20°C'de saklandı. 100 mg/L yeni hazırlanmış kurkumin çözeltisinden 50 µL iç standart (IS) olarak bütün deneylerde kullanıldı.

2.6.1 Test Çözeltilerinin Hazırlanması

50 mg ekstre cam şişe içerisinde 5 ml etanol-su (50:50 v/v) karışımında çözülüp yine etanol-su (50:50 v/v) karışımında 1 saat süre ile geri soğutucu altında kaynatıldı ve 1 ml alınıp 5 ml'lik volümetrik şişeye aktarıldı. Daha sonra 50 µL kurkumin çözeltisi eklenip üzeri metanol ile tamamlandı. Elde edilen çözeltiden 1 ml alınarak kapaklı örnek şişesine aktarıldı ve 10 µL örnek LC'ye enjekte edildi. Örnekler deney boyunca 15°C'de saklandı.

2.6.2 Kromatografik Koşullar

Deneyler Synergy Max C18 kolon (250 x 2 mm i.d., 5µm parçacık büyüklüğü) donanımlı Zivak® HPLC ve Zivak® Tandem Gold üçlü kuadropol (İstanbul,Türkiye) cihazı ile yapıldı. Taşıyıcı faz su (A, 0.1 % formik asit) ve

metanol (B, 0.1 % formik asit) olmak üzere akış hızı 0.25 ml/dk olacak şekilde ayarlandı.

Kolon sıcaklığı 30°C ve örneğin enjeksiyon hacmi 10 µL olmak üzere gradiyent sistem 0-1.00 dk 55% A ve 45% B, 1.01-20.00 dk 100% B son olarak da 20.01-23.00 dk 'da 55% A ve 45% B oranlarında ayarlanıp deneyler gerçekleştirildi.

2.6.3 HPLC Metodu ve LC-MS/MS Prosedürünün Optimizasyonu

En iyi taşıyıcı faz sistemi olarak asitlendirilmiş gradiyent metanol ve su sistemi belirlendi. Bu sistemin iyonizasyon miktarı ve bileşiklerin ayrılması için yeterli bir sistem olduğu belirlendi. Küçük ve nispeten polar antioksidanların iyonlaşması Elektrosprey İyonizasyon(ESI) ile elde edilmiş olup iyonizasyon tekniği ve çarpışma enerjileri nicel kütle spektrometresi analizleri için en önemli parametrelerdir. Üçlü kuadropol kütle spektrometresi yaygın olarak parçalanmış iyonun stabilizasyonuna bağlı olarak kullanılan bir sistem olduğundan tercih edilmiştir [113]. Optimum ESI parametreleri 2.40 mTorr CID gaz basıncı, 5000.00 V ESI iğne voltajı, 600.00 V ESI koruma voltajı, 300.00 °C kurutucu gaz sıcaklığı, 50.00 °C API kolon fırını sıcaklığı, 55 ψ nebulizatör gaz basıncı ve 40.00 ψ kurutucu gaz basıncı olarak belirlenmiş ve Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1: Seçilen bileşiklerin LC-MS/MS parametreleri.

Bileşikler	Ana İyon	Parçalanma İyonu	Çarpışma Enerjisi (V)
Gallik asit	168,6	124	13
Kamferol	287	152,3	30
Salvigenin	329	295,8	15
Eubotriol	343	343	13
Penduletin	345,2	311	25
Kuersitrin	471,9	309,9	16
Fumarik asit	115	71	8
Pirogallol	125	80	16
Salisilik asit	136,7	92,5	10
p-OH benzoik asit	136,7	92,6	12
Vanilin	150,7	135,4	12
p-Kumarik asit	163,2	118,7	14
Kafeik asit	179	135	10
t-ferulik asit	193	133	15
Siringik asit	196,7	181,4	12
Isorhamnetin	315	300	15
Kuersetagetin-3,6-dimetileter	345,1	329,5	16
Klorojenik asit	353	191	14
Rozmarinik asit	359,2	160,5	15
Luteolin-7-glukozid	447	284,5	14
Luteolin-5-glukozid	447	289,5	20
Ursolik asit	455,6	455,1	10
Izokuersetin	463,3	300	25
7-asetil sideroksol	385,4	325	16
Linearol	385	385	30
1-okso-salvibretol	313	295	14
Rutin	609	301	16
Liriodendrine	766	603	35
Siderol	369	309	18
Pelargonin Klorür	595	271	30
Pelargonin	271,2	121	34
Apigenin	269	151	22
Saponarin	595	415	18
Kurkumin*	369,3	176,9	20
* İç standart olarak kullanılmıştır.			

2.6.4 Deneylerin Validasyonu ve Belirsizliğin Değerlendirmesi

Bileşiklerin validasyonu için kurkumin iç standart olarak kullanılmıştır. Validasyon parametreleri doğrusalılık, tekrar edilebilirlik, belirleme limiti (BL) kuantifikasyon limiti (KL) olarak belirlendi.

Her bir bileşik için yöntemin doğrusalılığı standart çözeltinin analizi ile belirlenmiştir. Her bileşiğin doğrusalılık aralıkları verilmiştir. Korelasyon katsayısı $r^2 \geq 0.99$ olarak bulunmuştur. Ayrıca rapor edilen bileşikler için Lineer regresyon eşitliği x derişim, y ise pik alanını göstermek üzere Tablo 2.2’de belirtilmiştir.

Yöntemin doğruluğu her bileşiğin üç derişimi için tekrarlanmasıyla değerlendirilmiş ve iyi bir kesinlik ve sonuçlar gereksiz tekrardan kaçınılarak sağlanmıştır.

Yukarıdaki bileşikler için LC-MS/MS metodunda BL ve KL 0.5-50 mg/L olarak hesaplanmıştır. BL değerini standart sapmadan 3 kat daha büyükken, KL değerinin ise 10 kat büyük olduğu belirlendi.

Lineer aralıktaki her bir analitin ve rapor edilen metodun derişimi kalibrasyon eğrisi ile bulunmuştur. Son olarak, hesaplanan derişim aşağıdaki eşitlikle mg/kg ham örnek olarak çevrilmiştir.

$$Miktar (mg/kg) = \frac{C_a}{m} \times \frac{V_{son}}{V_{ilk}} \times 1000 \quad (2.1)$$

C_a ; mg/L olarak kalibrasyon eğrisi ile bulunan analit konsantrasyonu,

V_{son} ; Analizden önce seyreltilen son hacim,

m ; Ekstrenin g cinsinden miktarı,

V_{ilk} ; Örneğin ilk hacmi

LC-MS / MS metodunun kuantifikasyon belirsizliği ve kaynaklarının değerlendirilmesi için EURACHEM/CITAC kılavuzu kullanılmıştır [114]. En fazla katkı kalibrasyon eğrisinden gelmektedir. Belirsizliğin değerlendirilmesinin detaylı açıklaması literatürde açıklanmıştır [115].

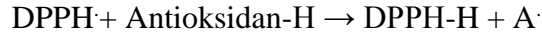
Tablo 2.2: Validasyon ve belirsizlik parametreleri.

	Bileşikler	Lineer Regresyon Eşitlikleri	R ²	BL (mg/L)	KL (mg/L)	RSD (%)
1	Gallik asit	$y=(8,15E+15)x+(4,32E+14)$	0,9848	0,002	0,008	4,85
2	Kamferol	$y=(8,11E+15)x+(4,07E+14)$	0,9841	0,002	0,008	5,47
3	Salvigenin	$y=(3,55E+16)x+(8,62E+14)$	0,9912	0,036	0,119	5,21
4	Eubotriol	$y=(4,37E+16)x+(5,50E+16)$	0,9917	0,310	1,035	3,33
5	Penduletin	$y=(5,15E+16)x+(1,55E+16)$	0,9915	0,089	0,297	9,47
6	Kuersitrin	$y=(1,01E+16)x+(1,92E+15)$	0,9918	0,001	0,002	4,28
7	Fumarik asit	$y=(2,02E+16)x+(6,21E+15)$	0,9912	0,003	0,01	5,44
8	Pirogallol	$y=(1,33E+15)x+(5,24E+15)$	0,9803	0,001	0,002	5,47
9	Salisilik asit	$y=(1,03E+15)x+(6,76E+16)$	0,9917	0,211	0,704	0,21
10	p-OH benzoik asit	$y=(4,35E+16)x+(9,83E+15)$	0,9939	0,002	0,007	4,78
11	vanilin	$y=(3,47E+16)x+(5,62E+15)$	0,9982	0,019	0,064	6,57
12	p-Kumarik asit	$y=(1,02E+17)x+(5,48E+16)$	0,9917	0,006	0,021	6,39
13	Kafeik asit	$y=(1,17E+17)x+(1,15E+15)$	0,9923	0,028	0,093	8,04
14	t-Ferulik asit	$y=(2,52E+15)x+(9,15E+15)$	0,9822	0,047	0,158	5,21
15	Siringik asit	$y=(1,09E+16)x+(3,93E+15)$	0,9917	0,022	0,073	8,39
16	İzorhamnetin	$y=(7,39E+16)x+(5,10E+16)$	0,9608	0,088	0,294	3,67
17	Kuersetageetin-3,6-dimetile	$y=(6,82E+15)x+(4,85E+14)$	0,9873	0,022	0,074	0,10
18	Klorojenik asit	$y=(1,00E+17)x+(8,21E+15)$	0,9894	0,445	1,483	5,45
19	Rozmarinik asit	$y=(6,29E+16)x+(4,94E+15)$	0,9933	0,022	0,072	3,73
20	Luteolin-7-glukozid	$y=(4,49E+16)x+(1,14E+16)$	0,9899	0,022	0,072	8,56
21	Luteolin-5-glukozid	$y=(6,96E+16)x+(3,39E+16)$	0,9792	0,010	0,034	1,12
22	Ursolik asit	$y=(4,78E+14)x+(2,26E+15)$	0,9861	0,008	0,027	0,30
23	İzokuersetin	$y=(1,15E+17)x+(2,15E+16)$	0,9959	0,199	0,665	9,42
24	7-asetil sideroksol	$y=(5,61E+15)x+(1,69E+16)$	0,9917	0,070	0,234	5,44
25	Linearol	$y=(5,10E+16)x+(7,39E+16)$	0,9912	0,003	0,010	0,54
26	1-okso-salvibretol	$y=(1,69E+16)x+(5,61E+15)$	0,9942	0,002	0,008	1,04
27	Rutin	$y=(7,72E+15)x+(8,79E+07)$	0,9901	0,010	0,034	7,90
28	Liriodendrin	$y=(5,50E+16)x+(4,37E+16)$	0,9806	0,088	0,294	3,67
29	Siderol	$y=(5,54E+16)x+(4,67E+16)$	0,9917	0,310	1,035	3,33
30	Pelargonin klorür	$y=(1,14E+16)x+(4,49E+16)$	0,9899	0,022	0,072	8,56
31	Pelargonin	$y=(1,14E+16)x+(4,49E+16)$	0,9900	0,022	0,072	2,56
32	Apigenin	$y=(5,54E+16)x+(3,79E+16)$	0,9803	0,150	0,501	4,01
33	Saponarin	$y=(5,24E+15)x+(1,33E+15)$	0,9971	0,044	0,148	2,45

2.7 Biyolojik Aktivite

2.7.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi

Antioksidanların işleyişleri radikallere proton vererek absorpsiyonu azaltmasına dayanmaktadır. Bu çalışmada serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir. Bitki ekstraktlarının serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. DPPH, 517 nm’de karakteristik absorpsiyona sahip olan kararlı serbest bir radikaldir. DPPH’nin 517 nm’deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenir. Tepkime mekanizması aşağıdaki gibidir.



Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH \cdot derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalinin rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal giderim aktivitesi olarak gösterilir [116].

DPPH radikal giderim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla öncelikle derişimi 0.1 mM olacak şekilde metanol içerisinde hazırlandı ve bu çözeltiden 4 ml, 1 ml örnek çözeltisine eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm’de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% inhibisyon)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (2.2)$$

A_{kontrol} : Kontrolün Absorbansı

$A_{\text{örnek}}$: Örneğin Absorbansı

DPPH’nin rengi açıldığı için absorpsiyonda azalma olur. Reaksiyon karışımının düşük absorpsiyon göstermesi serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu belirtir.

2.7.2 Lipid Peroksidasyonu İnhibisyonu Aktivitesi (β -Karoten- Linoleik Asit Yöntemi)

Toplam antioksidan aktivite olarak da isimlendirilen lipit peroksidasyon inhibisyonu linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β -karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlendi [117]. Bu yöntem, β -karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. Antioksidan maddenin varlığında bu tepkimenin oluşumu engellendiğinden veya oluşan bozunma ürünleri antioksidan tür tarafından temizlendiğinden β -karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.

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

↓

β -karoten → renk açılımı

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

1 ml kloroform içerisinde bulunan 0.5 mg β -karotene 25 μ L linoleik asit ve 200 mg Tween 40 emülgatör karışımı eklendi. Kloroform vakum altında buharlaştırıldıktan sonra oksijenle doyurulmuş 100 ml su ile kuvvetli bir şekilde çalkalanmasıyla elde edilen karışımdan 4000 μ L arklı konsantrasyonlarda örnek çözeltisi içeren tüplere koyuldu. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 470 nm'de ölçüldü. Tüpler 50°C'de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki β -karotenin rengi kayboluncaya kadar (yaklaşık 120 dk) inkübasyona devam edildi. BHT ve α -tokoferol standart olarak kullanıldı. Absorbans yine 470 nm'de ölçüldü. β -karoten renk açılım oranı (R), aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t} \quad (2.3)$$

ln: Doğal Logaritma

a: Başlangıç Absorbansı

b: İnkübasyondan Sonraki Absorbans

t: İnkübasyon Süresi (dk)

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA(\%inhibisyon) = \frac{R_{kontrol} - R_{örnek}}{R_{kontrol}} \times 100 \quad (2.4)$$

$R_{kontrol}$: Kontrolün Renginin Açılma Hızı

$R_{örnek}$: Örneğin Renginin Açılma Hızı

2.7.3 Cu^{+2} İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC)

Cuprac deneyi küçük değişiklikler yapılarak 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildi. 1 mM DMF, 10 mM $CuCl_2$, 7,5 mM Neocuproine, 1 M NH_4CH_3COO (pH 7,0) çözeltileri ve distile su 1:1:1:0,6 oranlarında karıştırılıp etanol içindeki 25 ul bileşik çözeltisiyle (seyreltme oranı 1:20) plakalara koyuldu. 30 dk bekletilip 450 nm'de Beckman Coulter DTX 880 Multimode Detection System'e karşı ölçüldü. TEAC CUPRAC sonucu, referans olarak trolox (TR) üzerinden mmol TR g^{-1} olarak verilmiştir. Etanol negatif, kurkumin ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kurkuminin TEAC_{CUPRAC} değeri 0,9 mmol TR g^{-1} olarak hesaplandı [118-120]. Bileşiklerin TEAC_{CUPRAC} değerleri referanslar kullanılarak hesaplandı [119,120].

Bitki ekstresinin TEAC değeri;

$$(\text{mmol TR } g^{-1}) = (\text{Absorbance} / \epsilon_{TR}) (205/25) (20/1) (2/0,02) \quad (2.5)$$

$\epsilon_{TR} = 16700$ ^[118] (Cihaz kaynaklı absorbans)

(205) = Toplam hacim

(25) = Ortama eklenen bileşik hacmi

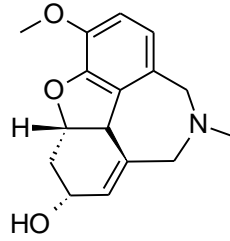
(20/1) = Seyreltme faktörü

(2) = Bitki ekstresindeki çözücü hacmi(ml)

(0,02) = Bitki ekstresinin ağırlığı(g)

2.7.4 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi

Asetil- ve bütiril kolinesterazın inhibitör aktiviteleri Ellman, Courtney, Andres ve Featherston tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemle ölçüldü [121]. Antikolinesteraz aktivitesinin DTNB metoduyla ölçüldüğü deneyde asetilkolin iyodür ve bütirilkolin iyodür reaksiyonda substrat olarak kullanıldı. 100 ve 50 mikrolitre 100 mM (ph 8.0) sodyum fosfat tamponu AChE ya da BChE ile karıştırılıp 15 dk 25°C inkübe edilip 0.5 mM DTNB eklendi. Reaksiyon asetiltiyokolin iyodür (0.71 mM) ya da bütiriltiyokolin klorür (0.2 mM) ilavesiyle başlatıldı. Sırasıyla asetilkolin iyodür veya bütirilkolin klorürün enzimatik hidrolizi ile açığa çıkan tiyokolinin DTNB ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan sarı renkli 5-tiyo-2-nitrobenzoat anyonu 412 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak izlendi. Kontrol olarak metanol kullanıldı. Standart olarak, *Galanthus* bitkisinden izole edilen alkaloid tipi ilaç olan Galantamin kullanıldı [122].



Şekil 2.1: Galantamin.

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

$$(\%inhibisyon) = \frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \times 100 \quad (2.6)$$

A: Absorbans

2.7.5 Antimikrobiyal Aktivite

Bitkinin hekzan, aseton ve metanol ekstraları hazırlandı. Antibakteriyel aktiviteyi belirlemek için Disk Difüzyon Deneyi (Kirby – Bauer Metodu) uygulanırken [123,124] *Escherichia coli* DSMZ1103, *Staphylococcus aureus*

DSMZ1104, *Candida albicans* DSMZ1386, *Mycobacterium smegmatis* ATCC14468 bakterileri kullanıldı. Dimetil sülfoksit (DMSO) negatif kontrol olarak, ketokonazol, streptomisin, oksasilin, gentamisin ise pozitif kontrol olarak kullanıldı.

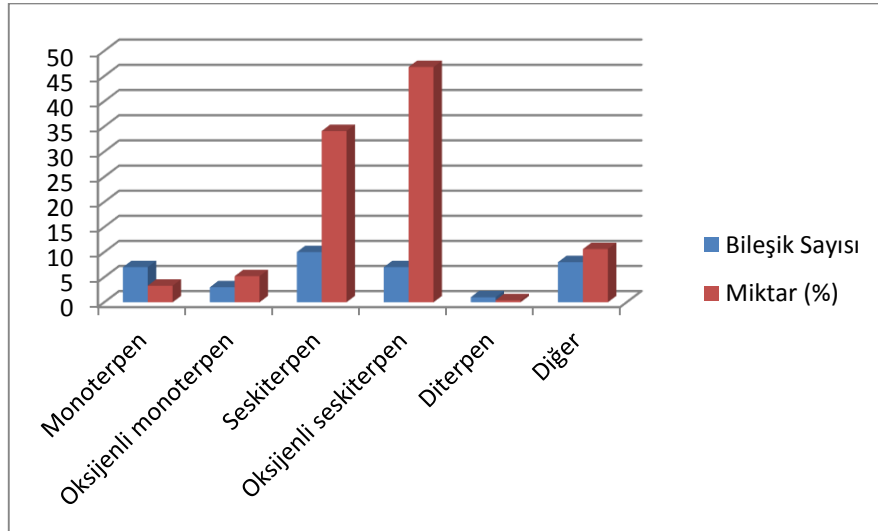
3. BULGULAR

3.1 *Sideritis hispida*'dan Elde Edilen Uçucu Yağ Bileşenleri

Sideritis hispida'nın uçucu yağının GC-MS ile yapılan analizleri sonucu elde edilen bileşiklerden % 3.3'ünün monoterpen, % 5.2'sinin oksijenli monoterpen, % 34.1'ini seskiterpen, % 46.8'inin oksijenli seskiterpen, % 0.4'ünün diterpen ve % 10.6'sının ise diğer gruba ait bileşikler olduğu bulunmuş ve bu sınıflandırma Tablo 3.1'de verilmiştir.

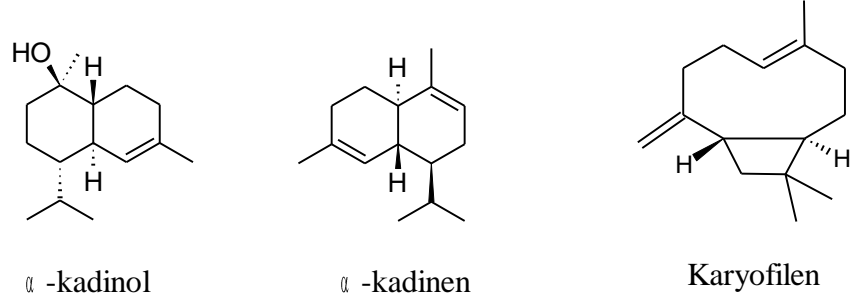
Tablo 3.1: Uçucu yağ bileşenlerinin sınıflandırılması.

Bileşik Sınıfı	Bileşik Sayısı	Miktar (%)
Monoterpen	7	3.3
Oksijenli monoterpen	3	5.2
Seskiterpen	10	34.1
Oksijenli seskiterpen	7	46.8
Diterpen	1	0.4
Diğer	8	10.6
Toplam	36	100.4



Şekil 3.1: Uçucu yağ GC/MS analiz sonuçları.

En fazla bulunan üç bileşik ise α -kadinol (%41.1), α -kadinen (%13.3) ve karyofilen (%5.0) olarak belirlenmiş ve bu yapılar ve Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2: *Sideritis hispida* uçucu yağında bulunan üç bileşen.

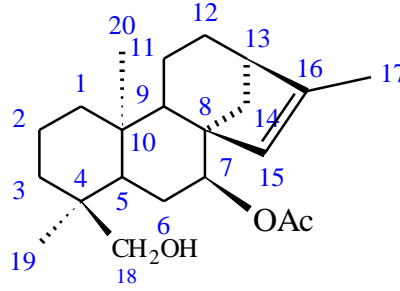
Tablo 3.2: Uçucu yağ GC/MS analiz sonuçları.

Bileşik Sınıfı	KI	RT	Bileşikler	<i>S. hispidi</i> (%)
Monoterpenler	939	5.44	α -pinen	0,4
	979	7.55	β -pinen	0,1
	1025	8.60	Simen	0,1
	1029	8.75	Limonen	2,4
	1037	9.20	β -osimen	0,1
	1060	9.82	τ -terpinen	0,1
	1089	10.81	Terpinolen	0,1
Oksijenli Monoterpenler	1177	13.51	4-terpineol	2,4
	1189	13.89	α -terpineol	2,5
	1243	15.42	Karvon	0,3
Seskiterpenler	1377	19.10	Kopaen	2,4
	1388	19.27	β -burbonen	0,7
	1410	19.89	α -gurjunen	1,7
	1409	20.10	Karyofilen	5,0
	1455	21.00	α -humulen	1,1
	1457	21.15	β -farnesen	0,4
	1485	21.70	Germakren-D	1,4
	1480	22.00	τ -muurolen	2,6
	1514	22.52	gama-kadinen	5,5
	1539	22.69	α -kadinen	13,3
Oksijenli Seskiterpenler	1583	24.03	Karyofilen oksit	1,1
	1593	24.22	Viridiflorol	0,9
	1590	24.47	Ledol	0,1
	1636	25.10	δ -kadinol	1,6
	1660	25.36	α -kadinol	41,1
	1675	26.02	Valeranon	0,5
	1686	26.30	α -bisabolol	1,5
Diterpenler	1943	29.70	Fitol	0,4
Diğer	1098	10.39	Nonanal	0,1
	971	6.87	3-metil nonan	2,5
	1100	11.28	Undekan	2,1
	1157	11.38	Nonen-1-ol	2,5
	979	7.16	1-okten-3-ol	0,8
	991	7.72	3-oktanol	0,1
	1063	10.10	2-metil dekan	0,2
	1289	16.65	Bornil asetat	2,3

3.2 *Sideritis hispida*'dan Elde Edilen Terpen Bileşenleri

Sideritis hispida P. H. Davis bitkisinden daha önce diğer *Sideritis* türlerinde bulunmuş olan maddeler izole edilmiş olup bunlar toplamda 6 tanedir. Bu bileşikler (1) Siderol (*ent-7 α -asetil-18-hidroksikaur-15-en*), (2) Sidol (*ent-3 β -asetil-7 α ,18-dihidroksikaur-16-en*), (3) Eubotriol (*ent-7 α ,15 β ,18-trihidroksikaur-16-en*), (4) 7-asetil sideroksol (*ent-7 α -asetoksi-18-hidroksi-15 β ,16 β -epoksikauran*), (5) Linearol (*ent-3,7-dihidroksi,18-asetoksi-kaur-16-ene*), (6) Sideroksol (*ent-7 α -18-dihidroksi-15 β ,16 β -epoksikauran*) 'dir.

3.2.1 Siderol (*ent-7 α -asetil-18-hidroksikaur-15-en*) (1)



Siderol bileşiği *Sideritis hispida* bitkisinin aseton ve metanol ekstrelerinden beyaz toz halinde elde edilmiş olup toplam miktarı 125 mg şeklindedir.

¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.3) singletler halinde dört adet metil izlenmiştir. Bunlardan ikisi daha üst alanda δ 0.71 ve 1.07 ppm 'de gözlemlenen piklerdir. 2.07 ppm' de ise asetil metiline ait olan protonlar, 1.69 ppm' de ise vinilik metil sinyali gözlemlenmiştir. H-13 protonu ise 16-en kaurenlere nispeten biraz daha üst alanda δ 2.30'de multiyet olarak izlenirken 18 nolu karbondaki hidroksimetilen piki ise δ 2.99 ve 3.32'da (J=11.5Hz) dubletler halinde izlenmiştir. δ 4.69 ppm' de asetile komşu H-7 protonu triplet (J=2.5 Hz) olarak gözlenmiştir. 5.26 ppm' de izlenen singlet ise bir çifte bağın varlığına işaret etmektedir.

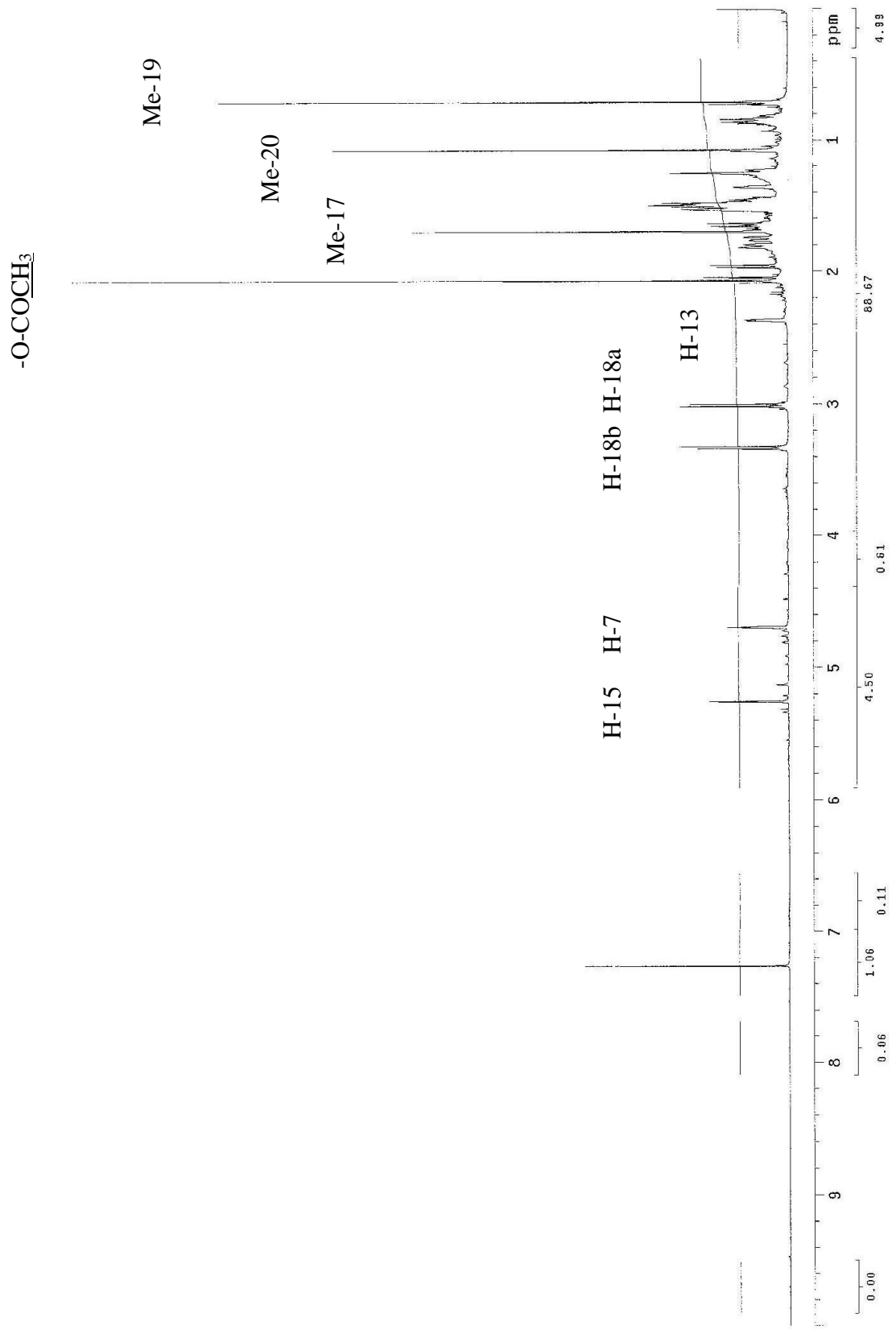
¹³C-NMR spektrumu APT tekniği ile alınmış olup (Şekil 3.5) 4 metil, 8 metilen, 5 metin ve 5 kuaterner karbon olmak üzere toplam 22 adet karbon piki izlenmiştir. Metil karbonları, δ 15.36, 17.35 ve 17.76' larda, asetil metili ise 21.45'de izlenmiştir. Karakteristik hidroksimetilen (C-18) karbonu ise 71.33' de

gözlenmiştir. Yapıda bulunan çifte bağın ekzosiklik olmadığını gösteren en büyük delillerden biri 129.81' de izlenen C-15 karbonuna ait olan pikttir. Çifte bağın kuaterner karbon (C-16) sinyali ise 143.74 ppm' de, asetil grubun karbonil karbonu ise 170.82 ppm' de izlenmiştir.

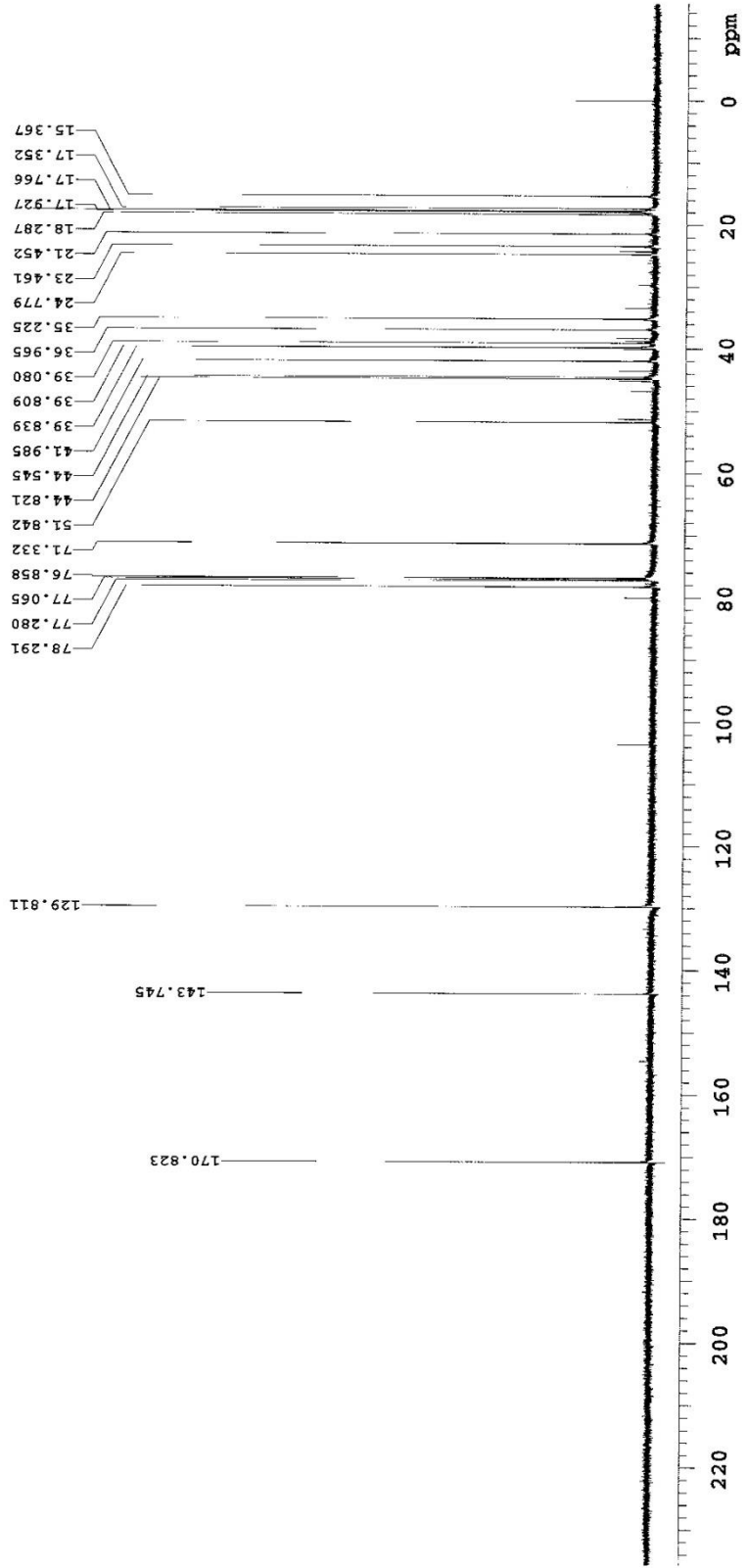
Bileşiğe ait spektral verileri ve literatür değerleri karşılaştırıldığında yapının, *Sideritis* türünden izole edilmiş olan ve daha önce yapılan çalışmalardan da elde edilen **Siderol** (*ent-7 α -asetil-18-hidroksi-kaur-15-ene*) bileşiği olduğu belirlenmiştir [12,31,40,45,46,71,73,77].

¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃): δ 5.26 (1H, s, H-15), 4.69 (1H, t, $J=2.5$ Hz, H-7), 2.99 (1H, d, $J=11.5$ Hz, H-18a), 3.32 (1H, d, $J=11.5$ Hz, H-18b), 2.30 (1H, m, H-13), 2.07 (3H, s, OAc), 1.69 (3H, s, Me-17), 1.07 (3H, s, Me-20), 0.71 (3H, s, Me-19)

¹³C-NMR (150.82 MHz, CDCl₃): δ 44.54 (C-1), 18.28 (C-2), 35.22 (C-3), 36.96 (C-4), 44.54 (C-5), 23.46 (C-6), 78.29 (C-7), 51.84 (C-8), 44.82 (C-9), 39.08 (C-10), 17.92 (C-11), 24.77 (C-12), 39.80 (C-13), 39.83 (C-14), 129.81 (C-15), 143.75 (C-16), 15.36 (C-17), 71.33 (C-18), 17.35 (C-19), 17.76 (C-20), 21.45 (O-COCH₃), 170.83 (O-COCH₃)

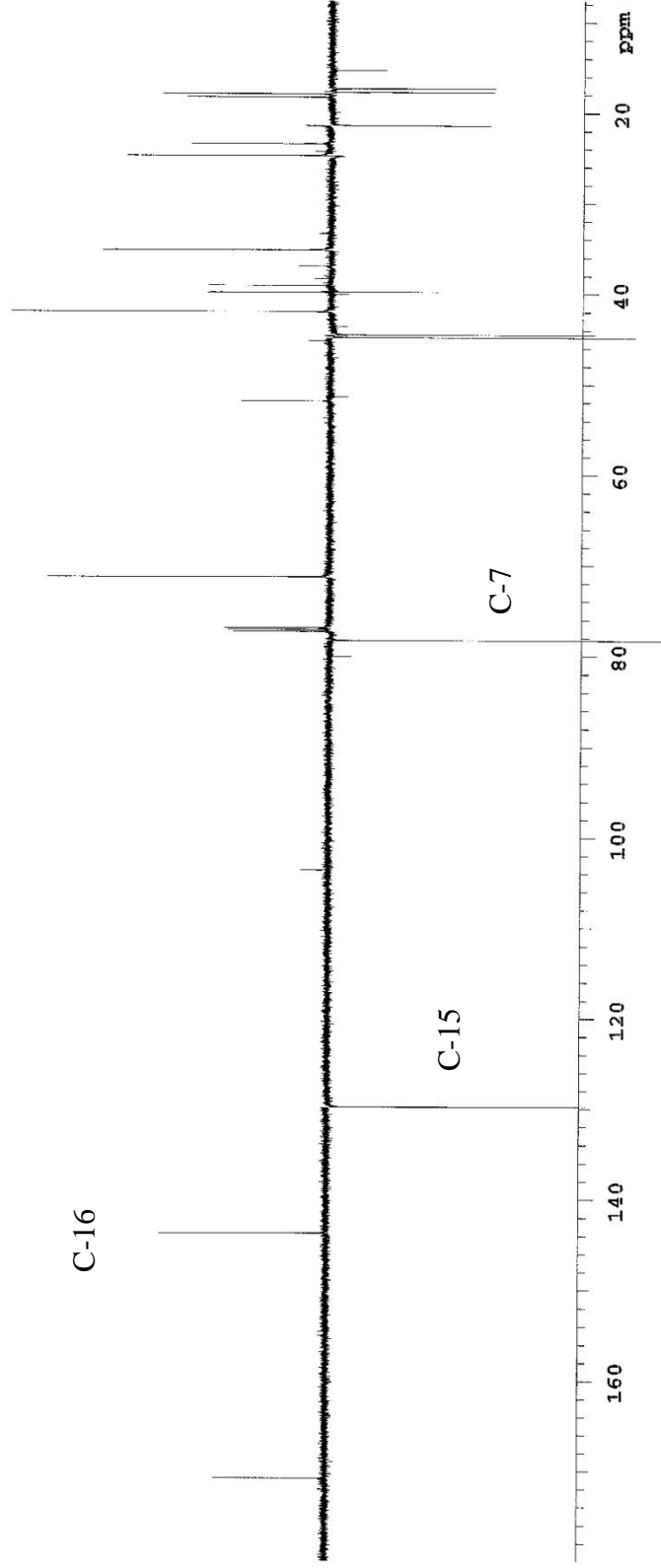


Şekil 3.3: Siderol bileşiğinin ¹H NMR spektrumu.



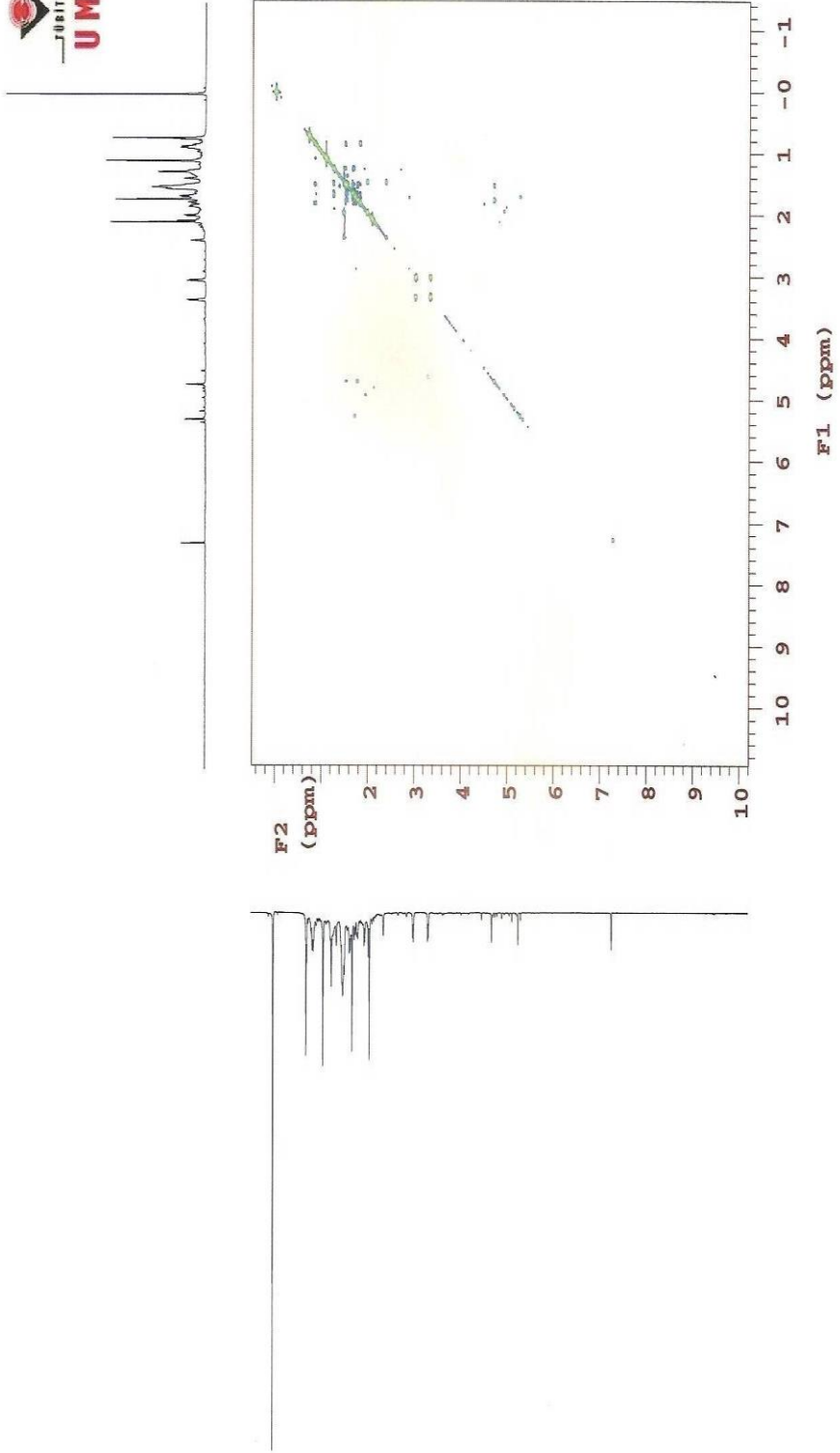
Şekil 3.4: Siderol bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu.

C-18

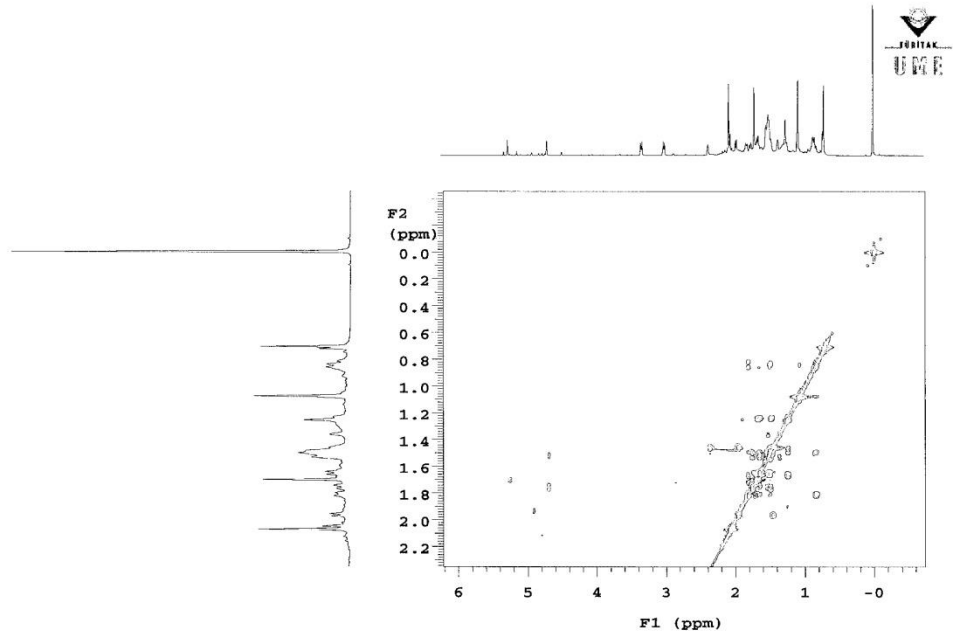


Universiti Malaysia
2802009

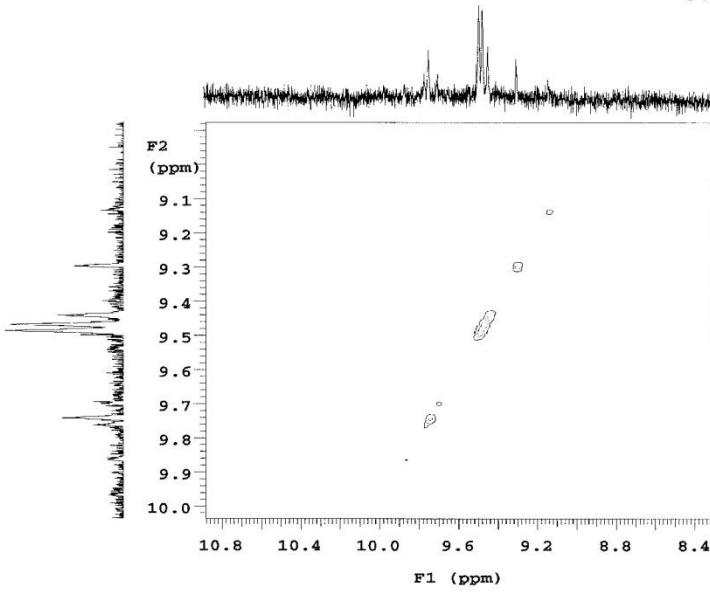
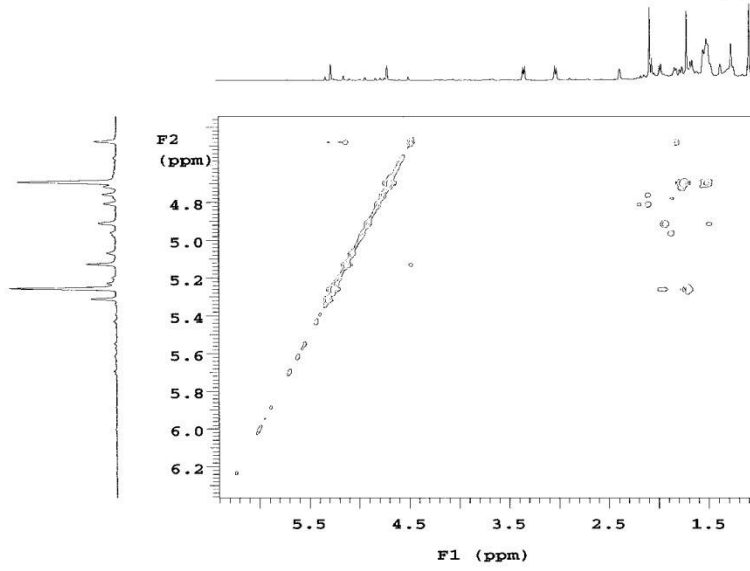
Şekil 3.5: Siderol bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu (APT).



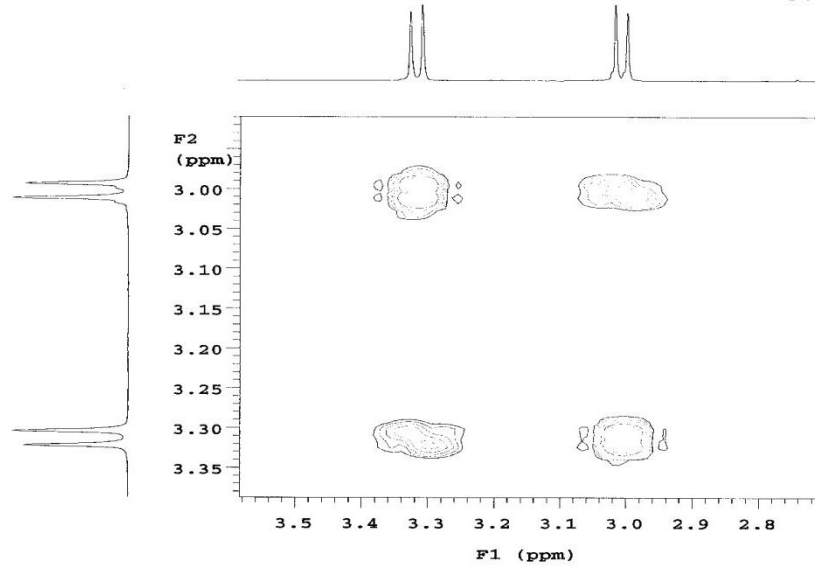
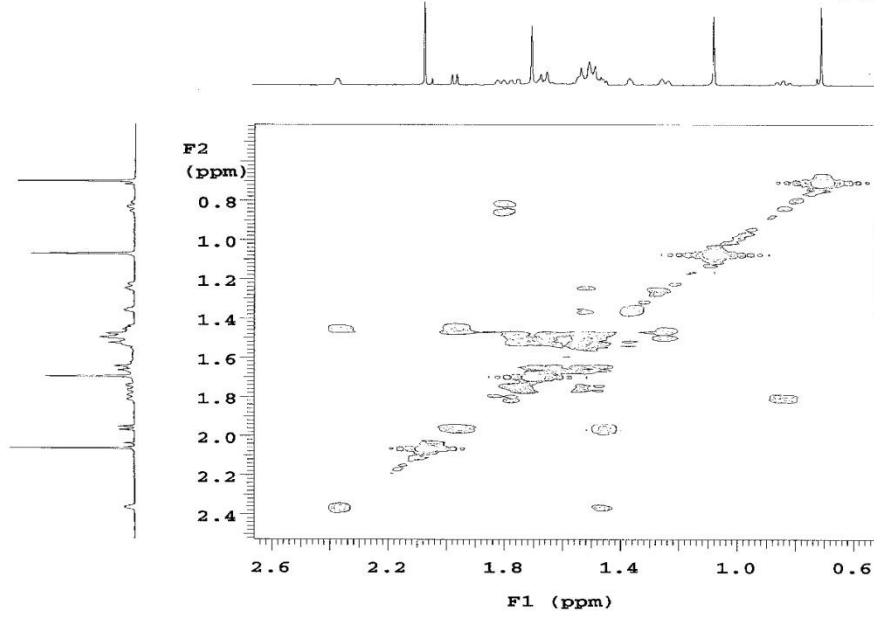
Şekil 3.6: Siderol bileşiğinin COSY spektrumu-1.



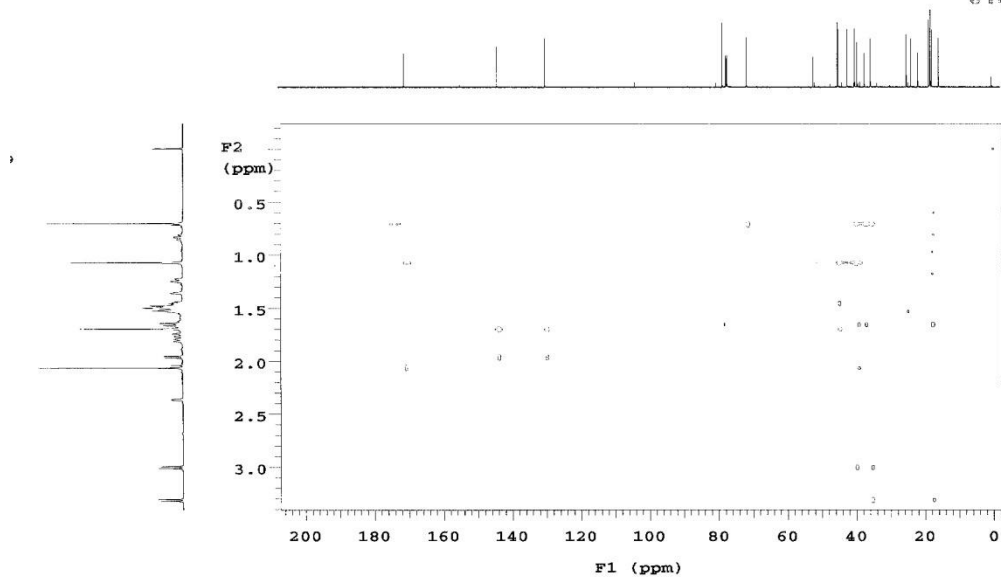
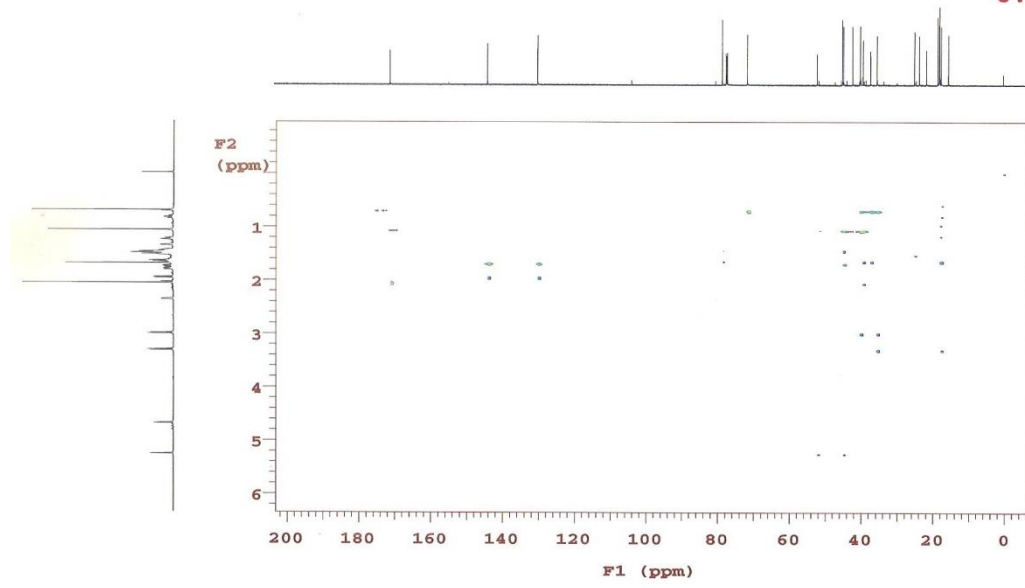
Şekil 3.7: Siderol bileşiğinin COSY spektrumu-2.



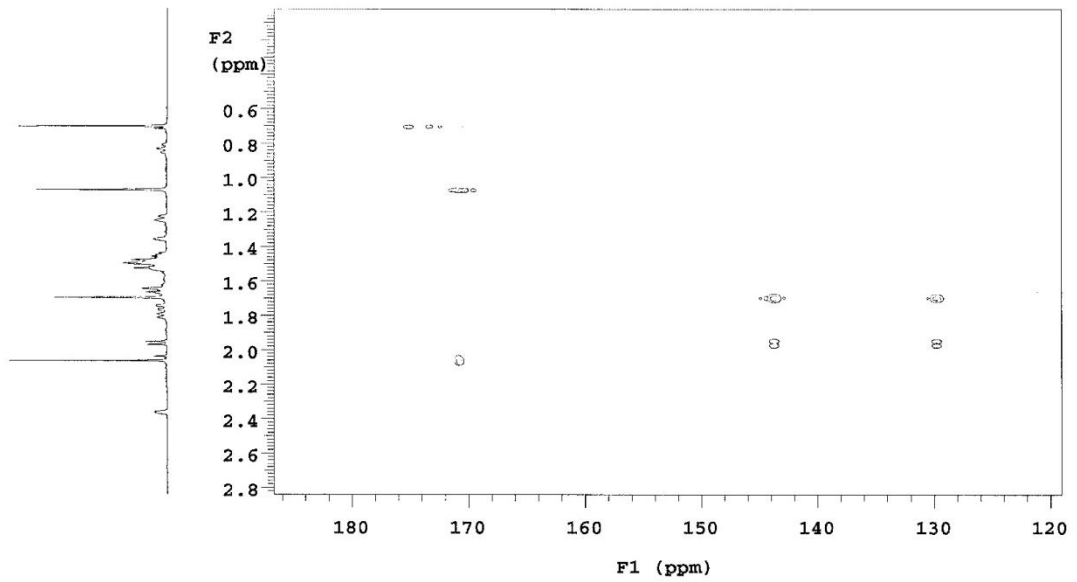
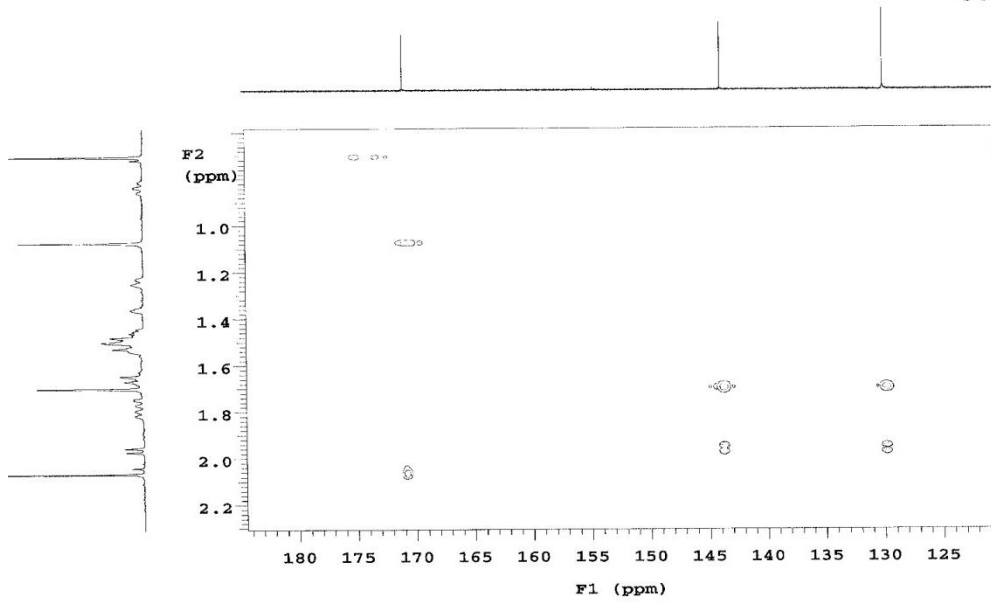
Şekil 3.8: Siderol bileşiğinin COSY spektrumu-3.



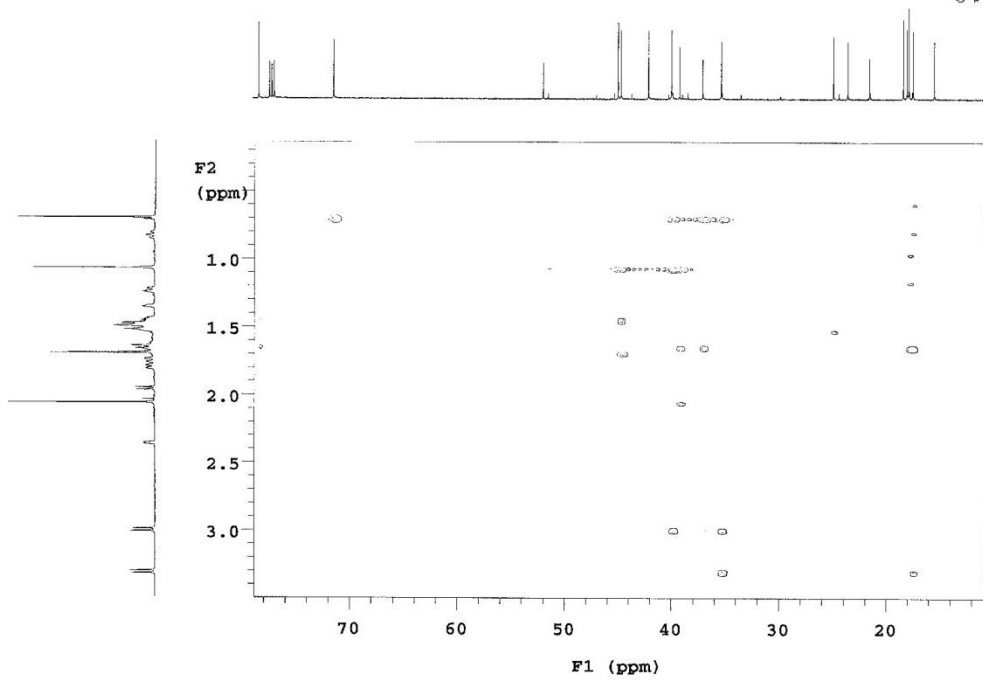
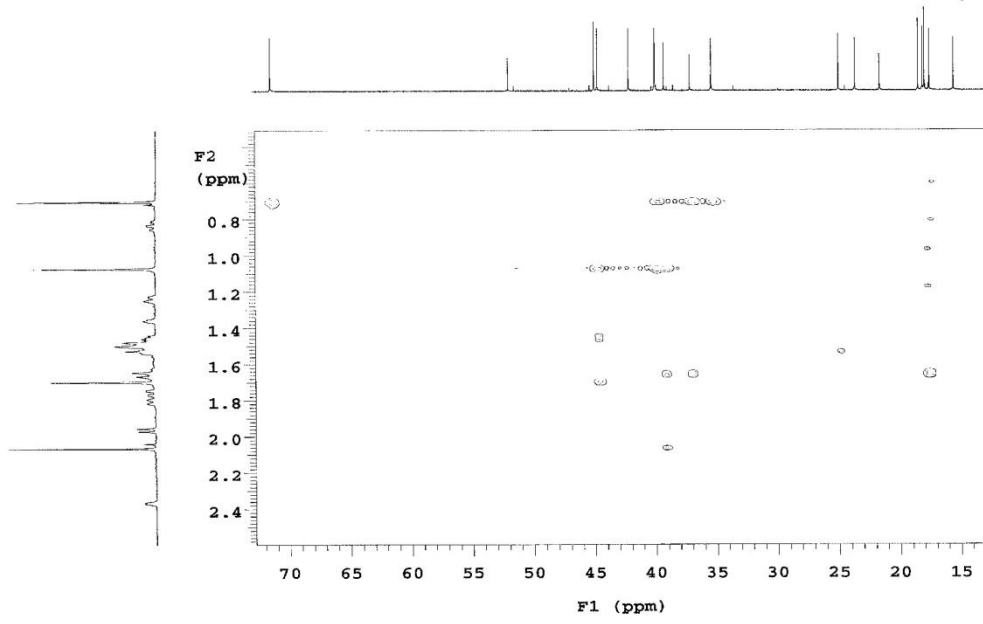
Şekil 3.9: Siderol bileşiğinin COSY spektrumu-4.



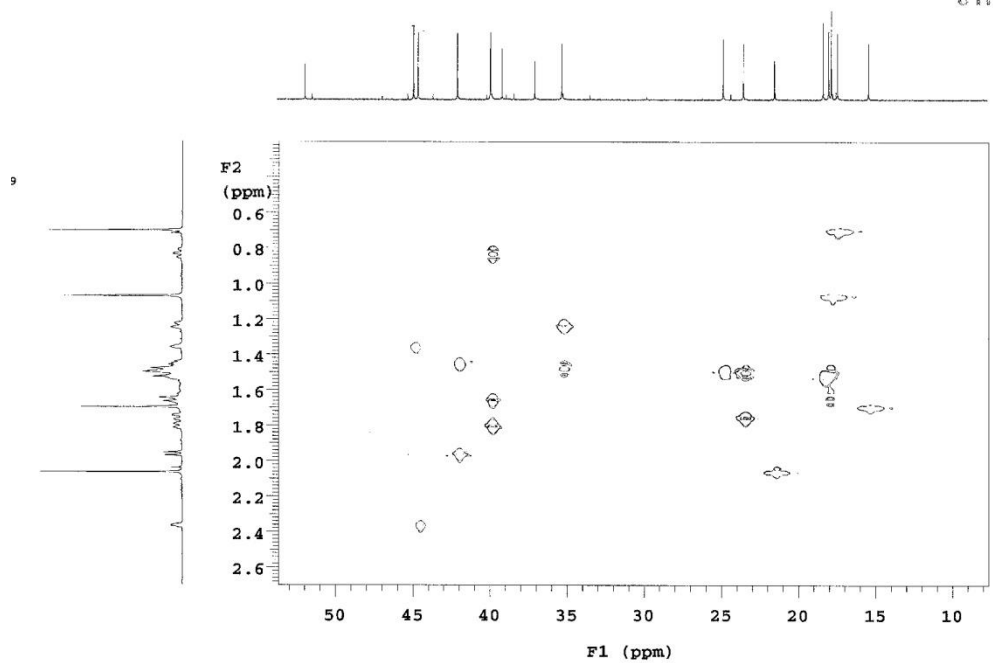
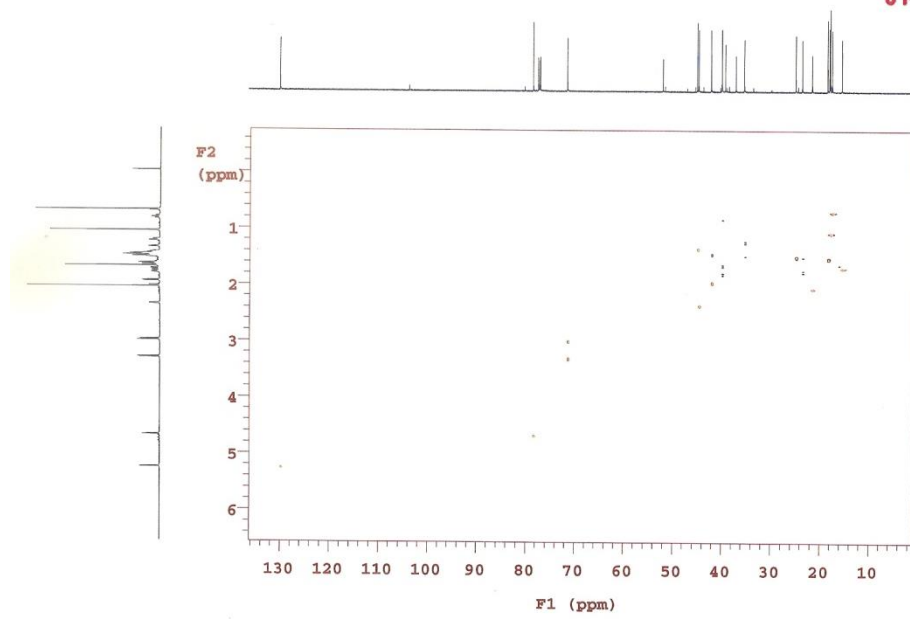
Şekil 3.10: Siderol bileşiğinin HMBC spektrumu-1.



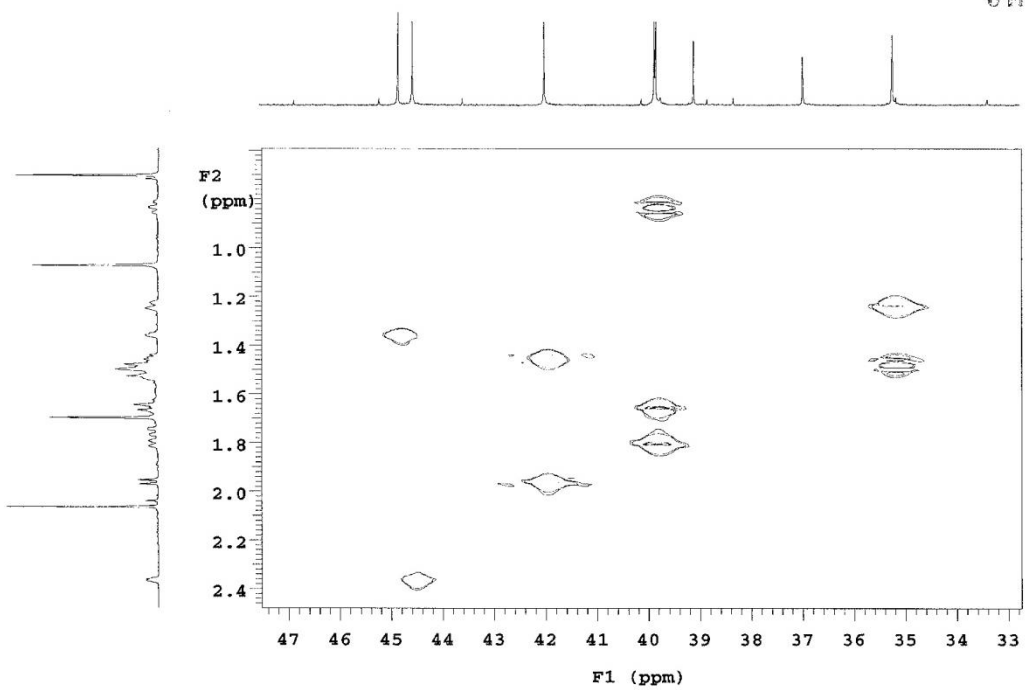
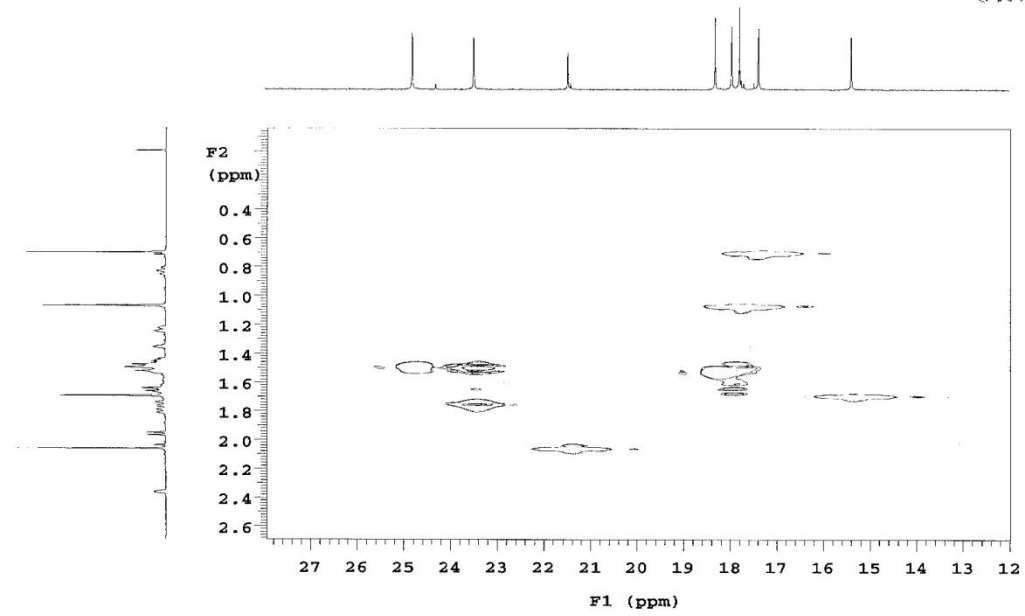
Şekil 3.11: Siderol bileşiğinin HMBC spektrumu-2.



Şekil 3.12: Siderol bileşiğinin HMBC spektrumu-3.

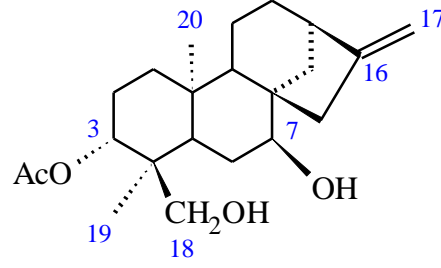


Şekil 3.13: Siderol bileşiğinin HMQC spektrumu-1.



Şekil 3.14: Siderol bileşiğinin HMQC spektrumu-2.

3.2.2 Sidol (*ent*-3 β -asetil-7 α ,18-dihidroksikaur-16-en) (2)



Sidol bileşiği *Sideritis hispida* bitkisinin aseton ekstresinden 2,8 mg miktarında elde edilmiştir.

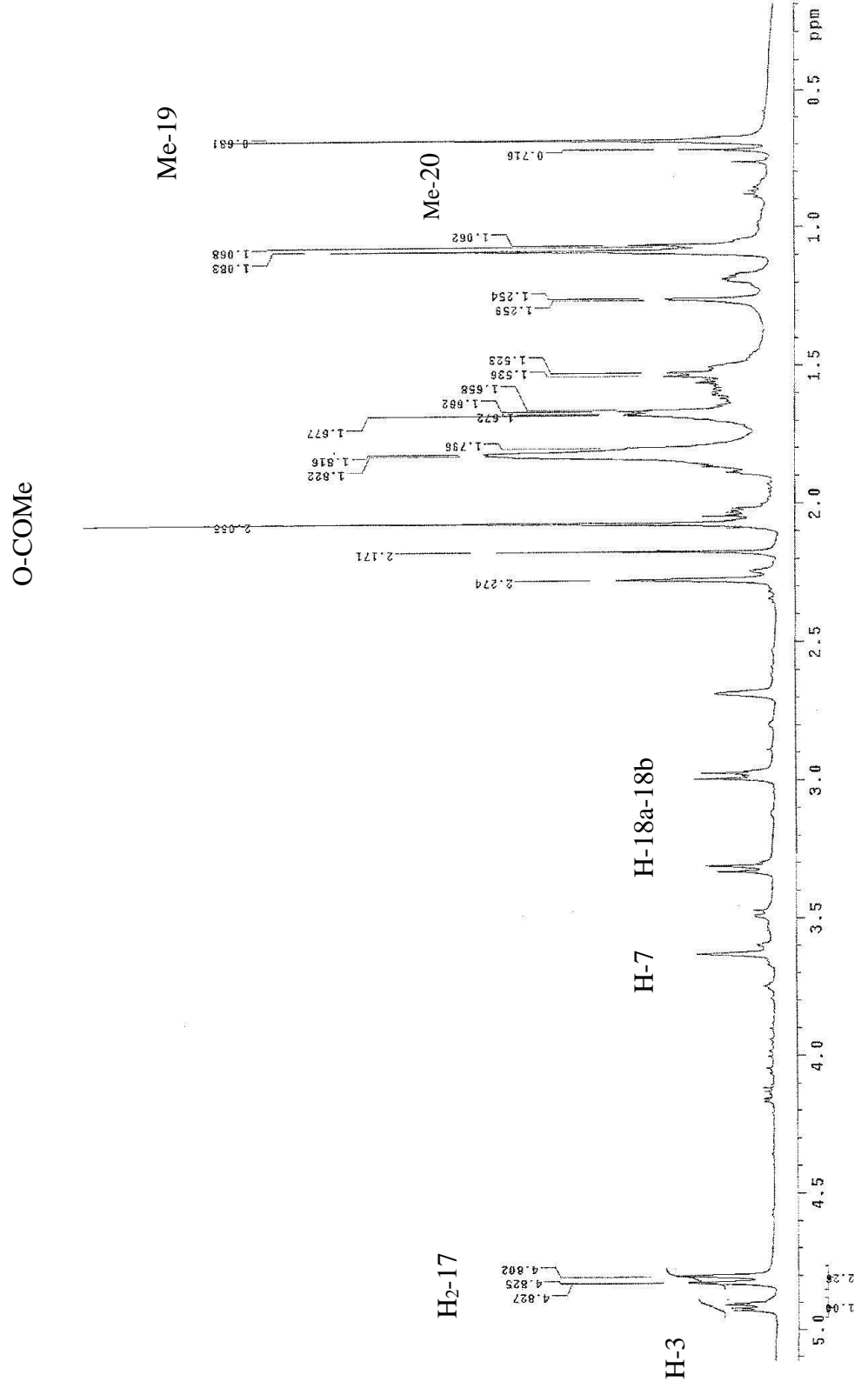
Bileşiğe ait ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.15) iki metil sinyali δ 0.68 ve 0.72'de ve bir asetil metili δ 2.06'da singletler halinde gözlemlenmiştir. Ekzosiklik metilen protonlarının δ 4.80 ve 4.82 de genişlemiş singletler halinde olduğu gözlenirken, bir hidroksimetin protonunun ise δ 3.62'de triplet ($J=3$ Hz) halinde olduğu gözlemlenmiştir. Asetil grubuna komşu olduğu düşünölen metin protonu sinyali ise δ 4.90'da dubletin dubleti ($J=5$ Hz ve 11 Hz) şeklinde gözlenmiştir. Bir hidroksi metilen proton çifti ise δ 2.97 ve 3.32'de 12 Hz'lik dubletler halinde gözlenmiştir.

¹³C-NMR spektrumu APT tekniği ile alınmış olup (Şekil 3.16) beş metin, dokuz metilen, beş kuarterner karbon sinyali izlenmiştir. Metin karbonlarından δ 74.50 ve δ 76.90'da gözlenen ikisi moleküldeki mevcut sekonder hidroksil ve asetil gruplarının varlığını doğrularken, hidroksimetilen grubunun karbonu δ 64.14'de izlenmiştir. Kauren iskeleti için karakteristik olan ekzosiklik metilen grubunun karbonları ise δ 103.64 ve 153.90'da izlenmiştir.

Bileşiğe ait spektral verileri ve literatür değerleri karşılaştırıldığında yapının, *Sideritis* türünden izole edilmiş olan ve daha önce yapılan çalışmalardan da elde edilen **Sidol** (*ent*-3 β -asetil-7 α ,18-dihidroksikaur-16-en) bileşiği olduğu belirlenmiştir [12, 31, 45,48,71,73].

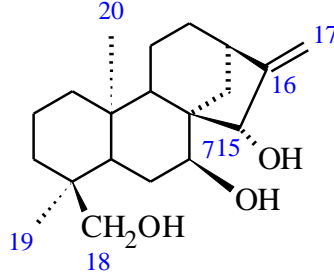
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 4.90 (1H, dd, $J=5$ ve 11 Hz, H-3), 4.80-4.82 (2H, s, H₂-17), 3.62 (1H, t, $J=3$ Hz, H-7), 3.32 (1H, d, $J=12$ Hz, H-18a), 2.97 (1H, d, $J=12$ Hz, H-18b), 2.68 (1H, m, H-13), 2.06 (3H, s, OAc), 0.72 (3H, s, Me-20), 0.68 (3H, s, Me-19)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.82 MHz, CDCl_3): δ 38.40 (C-1), 23.41 (C-2), 74.50 (C-3), 43.62 (C-4), 37.38 (C-5), 26.47 (C-6), 76.90 (C-7), 50.21 (C-8), 50.23 (C-9), 38.10 (C-10), 17.36 (C-11), 33.57 (C-12), 44.07 (C-13), 39.09 (C-14), 44.8 (C-15), 153.90 (C-16), 103.64 (C-17), 64.14 (C-18), 12.82 (C-19), 15.37 (C-20), 21.23 (O-COCH₃), 170.83 (O-COCH₃)



Şekil 3.15: Sidol bileşiğinin ¹H NMR spektrumu.

3.2.3 Eubotriol (*ent*-7 α ,15 β ,18-trihidroksikaur-16-en) (3)



Eubotriol bileşiği *Sideritis hispida* bitkisinin metanol ekstresinden 2,5 mg miktarında elde edilmiştir.

Bileşiğe ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.17) iki metil sinyali 0.71 ve 1.04 ppm'de gözlenmiştir. 2.97 ($J=12$ Hz) ve 3.52 ($J=12$ Hz) ppm'lerde gözlenmiş olan AB sistemine ait protonlar karakteristik (C-18) hidroksimetilen grubunun varlığına işaret etmiştir. 3.92 ppm'de gözlenen triplet ($J=2.5$ Hz) H-7 protonuna, 4.12 ppm'de gözlenen genişlemiş singlet ise H-15 protonuna işaret etmiştir. 5.10 ve 5.23 ppm'lerde gözlenen singletler ise halka dışı metilen (H-17) protonlarının varlığını göstermiştir.

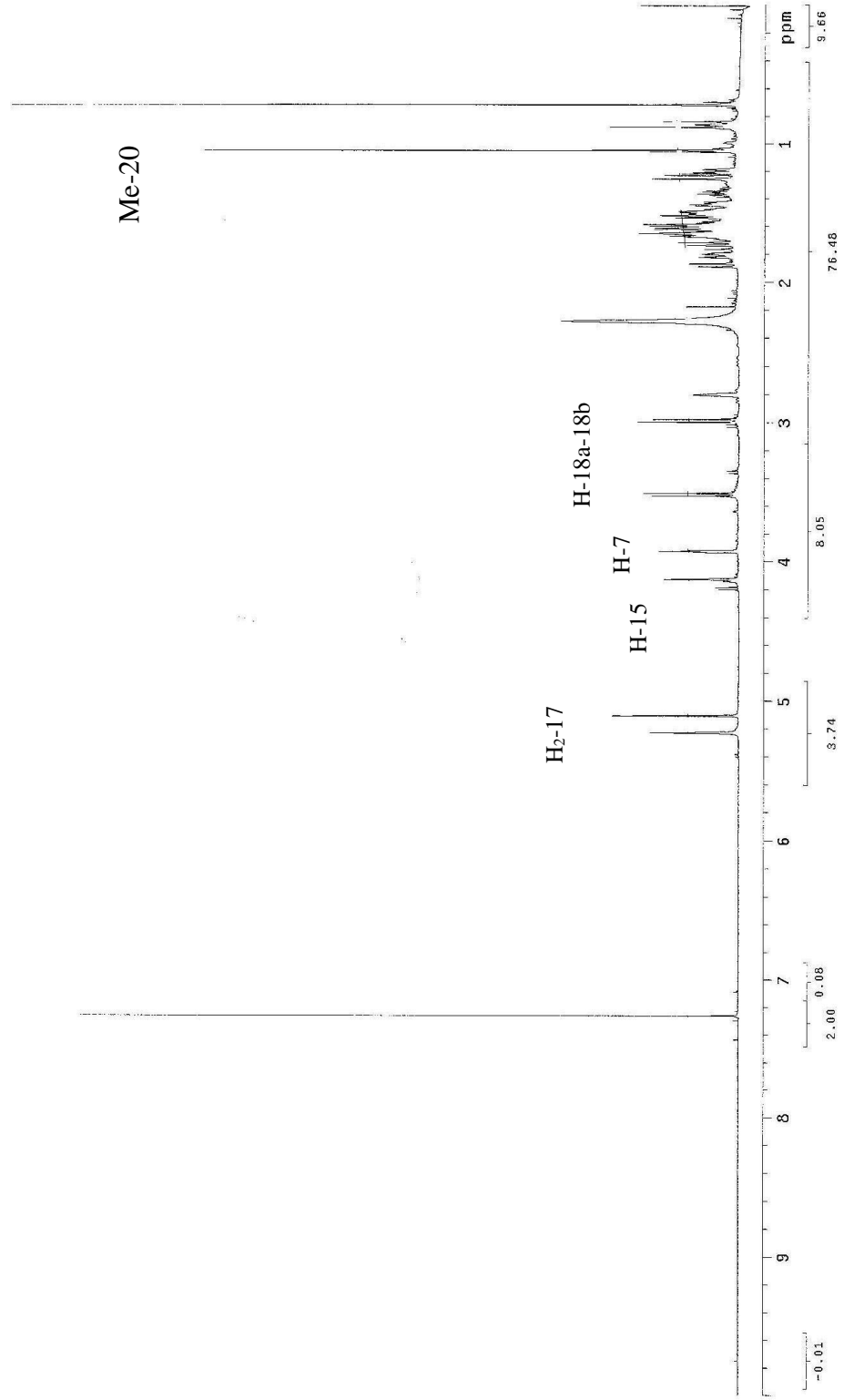
$^{13}\text{C-NMR}$ spektrumu APT tekniği ile alınmış olup (Şekil 3.18) oksijene komşu olan C-7 ve C-15 karbonlarına ait sinyaller 71.30 ve 71.31 ppm' lerde gözlenirken karakteristik C-18 karbonuna ait sinyal 63.70 ppm' de gözlenmiştir. Ekzosiklik metilen grubunun karbonları ise kauren iskeleti için karakteristik olarak 107.60 ve 157.80 ppm'lerde gözlenmiştir.

Bileşiğe ait spektral verileri ve literatür değerleri karşılaştırıldığında yapının, *Sideritis* türünden daha önce yapılan çalışmalardan da elde edilen bilinen bir diterpen olan **Eubotriol** (*ent*-7 α ,15 β ,18 trihidroksikaur-16-en) olduğu belirlenmiştir [12, 46, 48, 71, 73,].

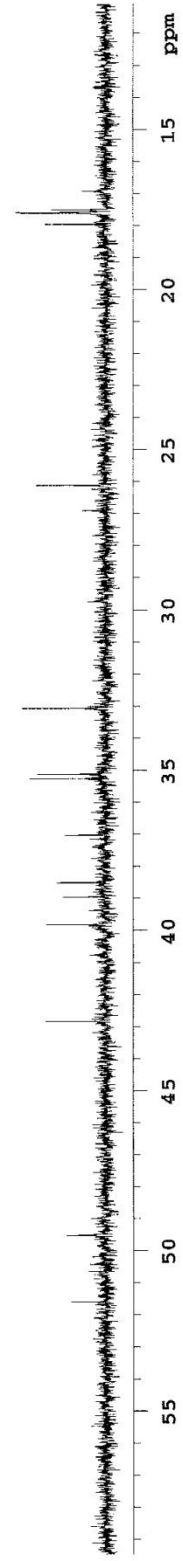
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 5.10-5.23 (2H, s, H₂-17), 4.12 (1H, s, H-15), 3.92 (1H, t, $J=2.5$ Hz, H-7), 3.52 (1H, d, $J=12$ Hz, H-18a), 2.97 (1H, d, $J=12$ Hz, H-18b), 1.04 (3H, s, Me-20), 0.71 (3H, s, Me-19)

^{13}C -NMR (150.82 MHz, CDCl_3): δ 42.79 (C-1), 18.18 (C-2), 35.05 (C-3), 36.95 (C-4), 44.54 (C-5), 26.16 (C-6), 71.30 (C-7), 51.74 (C-8), 44.82 (C-9), 38.50 (C-10), 17.60 (C-11), 27.01 (C-12), 39.90 (C-13), 39.14 (C-14), 71.31 (C-15), 157.80 (C-16), 107.60 (C-17), 63.70 (C-18), 17.00 (C-19), 17.60 (C-20)

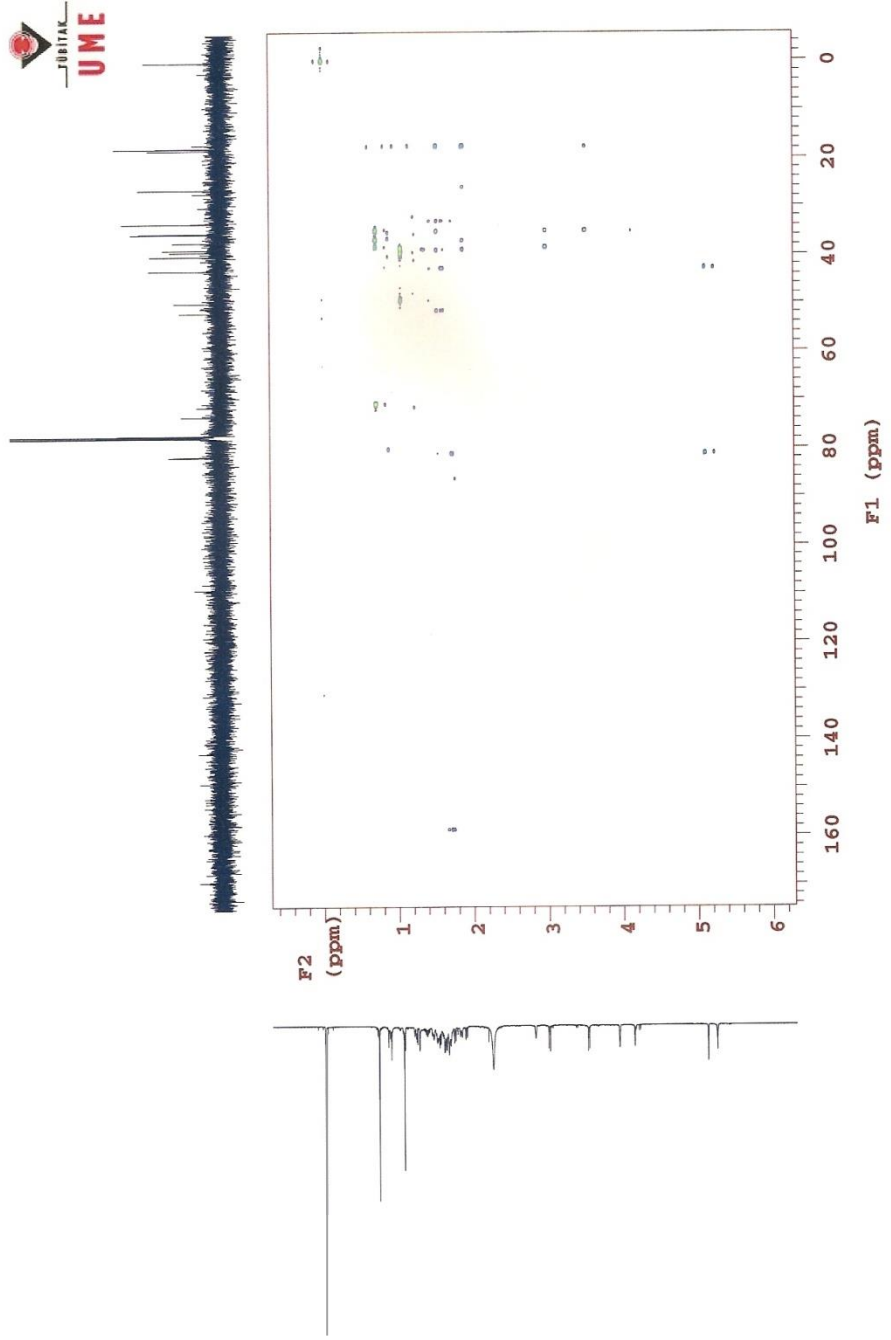
Me-19



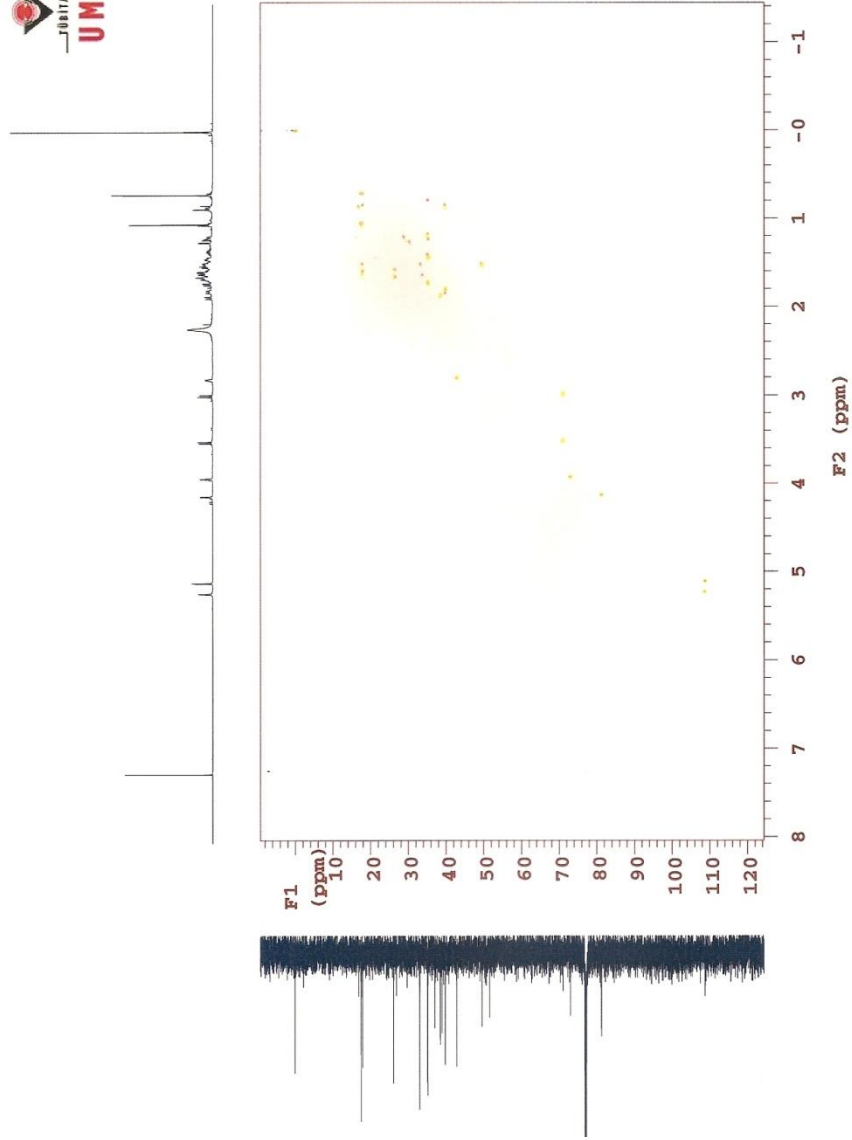
Şekil 3.17: Eubotriol bileşiğinin ¹H NMR spektrumu.



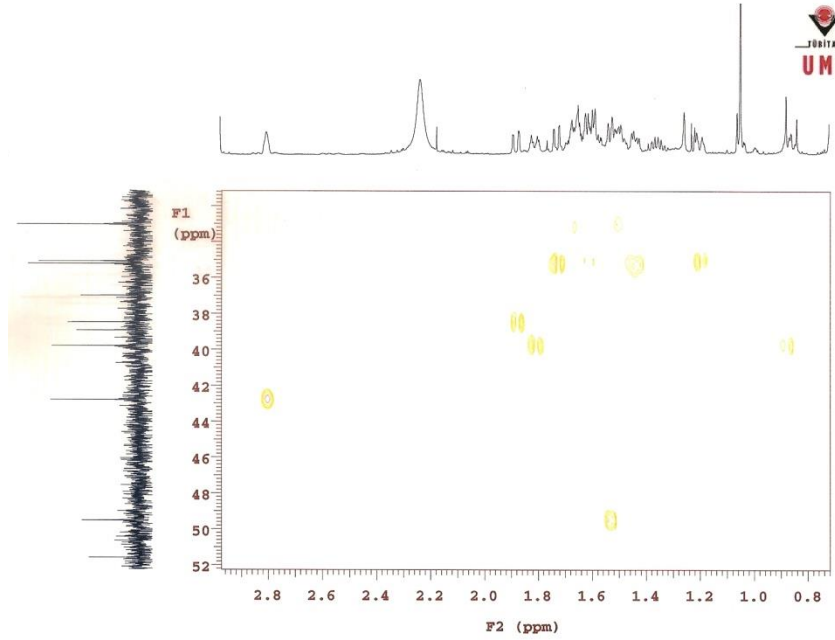
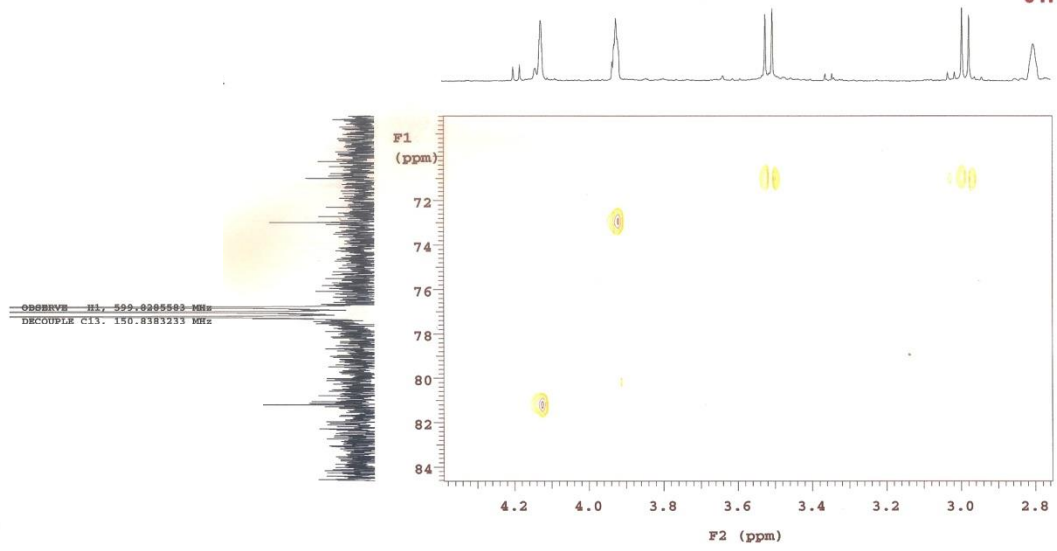
Şekil 3.18: Eubotriol bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu.



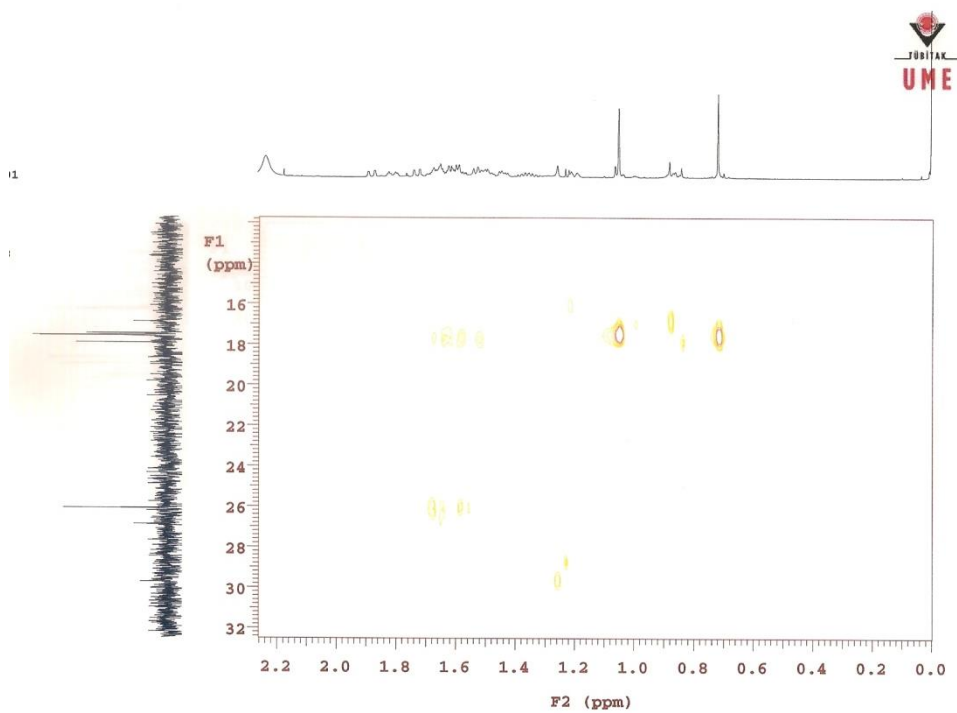
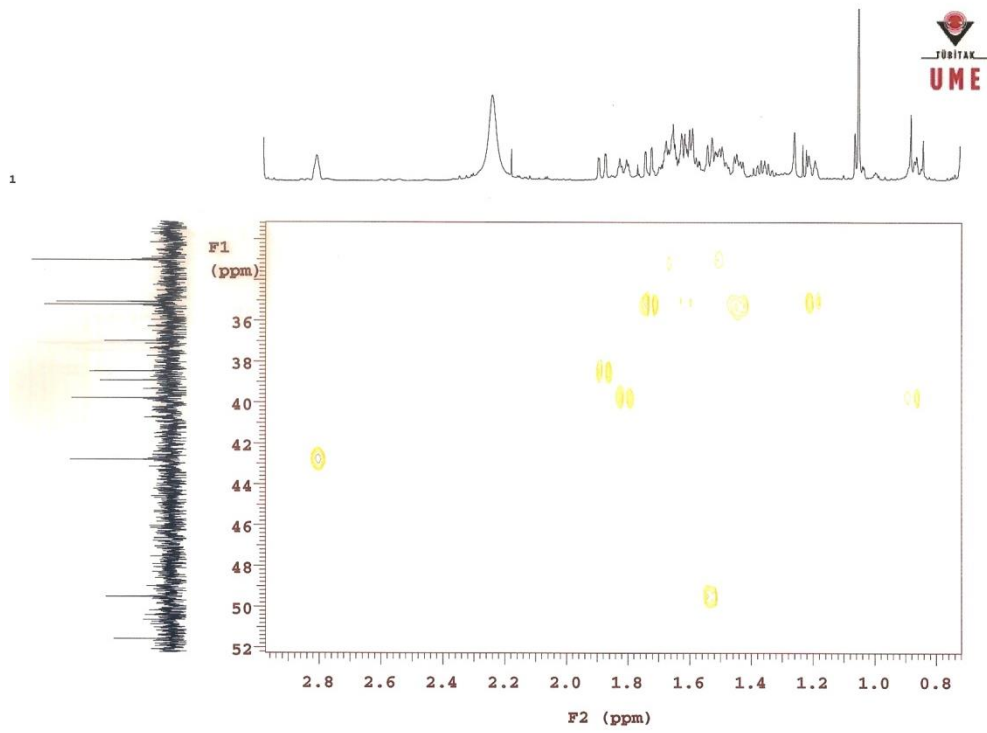
Şekil 3.19: Eubotriol bileşiğinin HMBC spektrumu.



Şekil 3.20: Eubotriol bileşiğinin HMQC spektrumu-1.

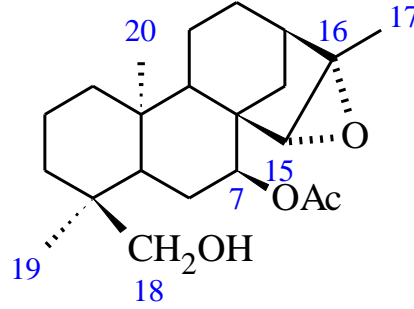


Şekil 3.21: Eubotriol bileşiğinin HMQC spektrumu-2.



Şekil 3.22: Eubotriol bileşiğinin HMQC spektrumu-3.

3.2.4 7-asetil sideroksol (*ent*-7 α -asetoksi-18-hidroksi-15 β ,16 β -epoksikauran) (4)



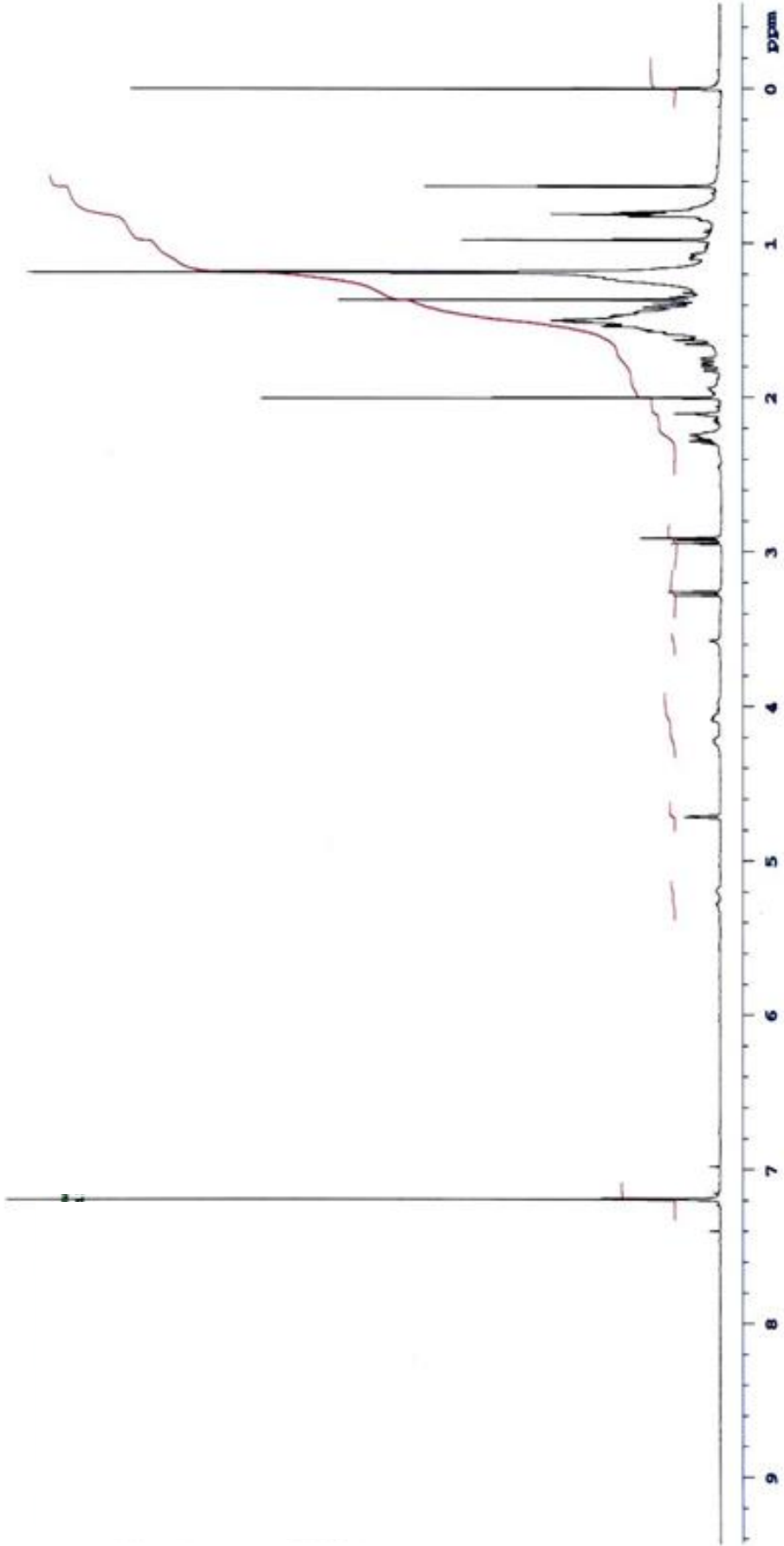
7-asetil sideroksol bileşiği *Sideritis hispida* bitkisinin metanol ekstresinden 3,9 mg miktarında elde edilmiştir.

Bileşiğe ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.23 ve Şekil 3.24) üç adet metil sinyali δ 0.63 ve 0.97 ve 1.36'da singlet halinde gözlenirken bir asetil metiline karşılık gelen sinyal 1.99 ppm' de gözlenmiştir. 4.71 ppm' de gözlenen dar triplet bir hidroksilden ziyade bir asetoksi grubuna komşu bir protona işaret edip diterpenlerde H-7 α protonunun bölünme şekline uygun olduğu gözlemlendiğinden H-7 de bir asetil grubunun yer aldığı düşünülmüştür. ($J=2.5$ Hz). δ 2.93 ve 3.26 ppm' de ($J =12$ Hz) izlenen dubletlerin ise C-18 hidroksimetilen grubuna ait olduğu belirlenmiştir. Molekülde çifte bağa ait herhangi bir proton gözlenmezken 2.91 ppm' de gözlenen singlet kauren diterpenlerde C-15 ile C-16 arasındaki bir epoksit mevcudiyetinde H-15 ait karakteristik proton sinyaline işaret etmiştir.

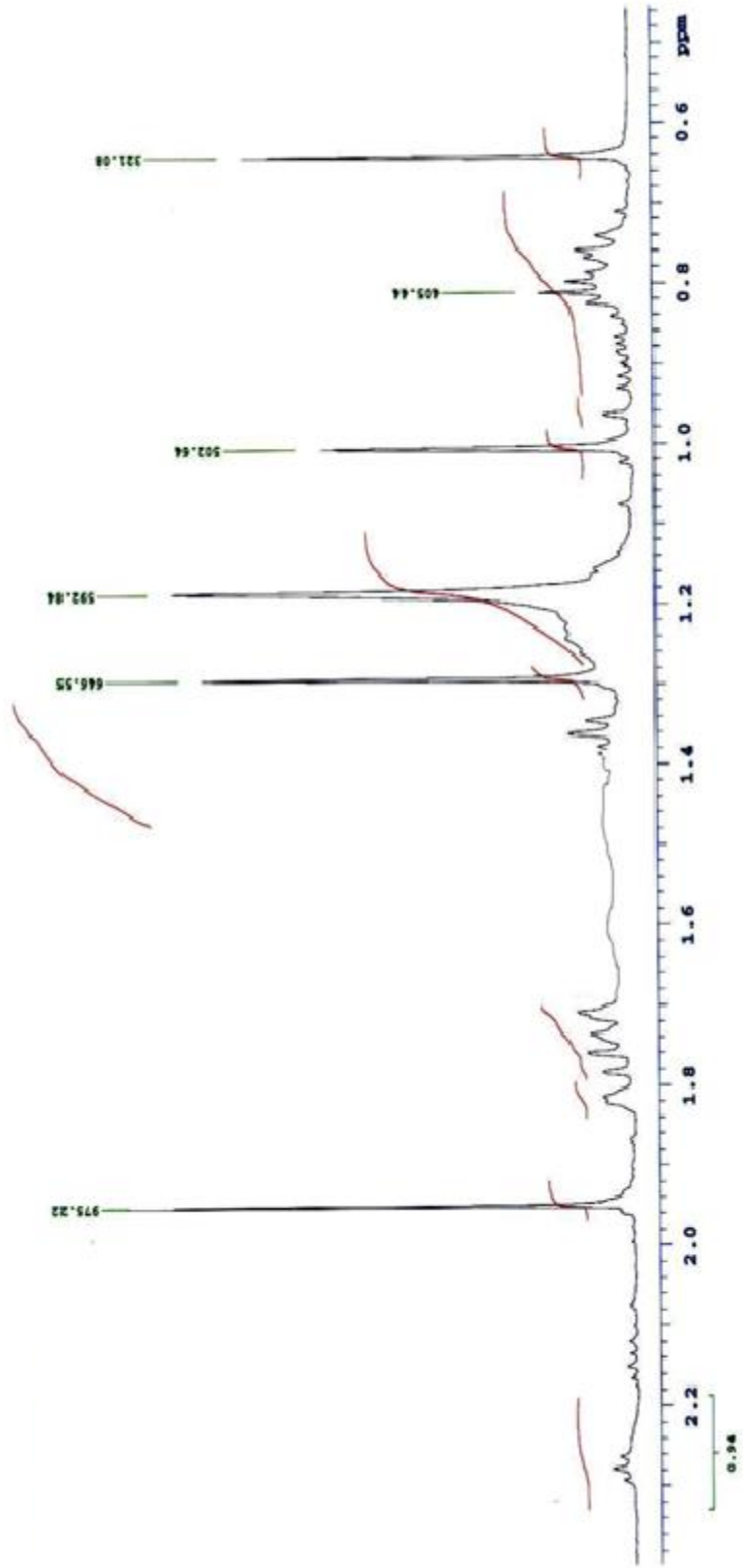
Bileşiğin $^{13}\text{C NMR}$ spektrumunda ise (Şekil 3.25) 4 metil, 8 metilen, 5 metin ve 5 katerner karbon olmak üzere toplam 22 karbon sinyali gözlenmiştir. Molekülde bulunan asetilin bağlı olduğu C-7 karbonuna işaret eden sinyal 75.62 ppm' de gözlenirken, epoksi grubunun metin karbonu (C-15) 63.72 ppm'de, bu grubun katerner karbon sinyali ise 61.7 ppm' de gözlenmiştir. Karakteristik C-18 karbonu 71.8 ppm' de gözlemlenmiştir. Metil sinyalleri 17.9, 17.8 ve 17.7 ppm' lerde, asetil metili ise 21.6 ppm' de gözlemlenmiştir. Asetil karbonili ise 170.5 ppm' de gözlemlenmiştir.

Bileşiğe ait spektral verileri ve literatür değerleri karşılaştırıldığında yapının, *Sideritis* türünden daha önce yapılan çalışmalardan da elde edilen bilinen bir

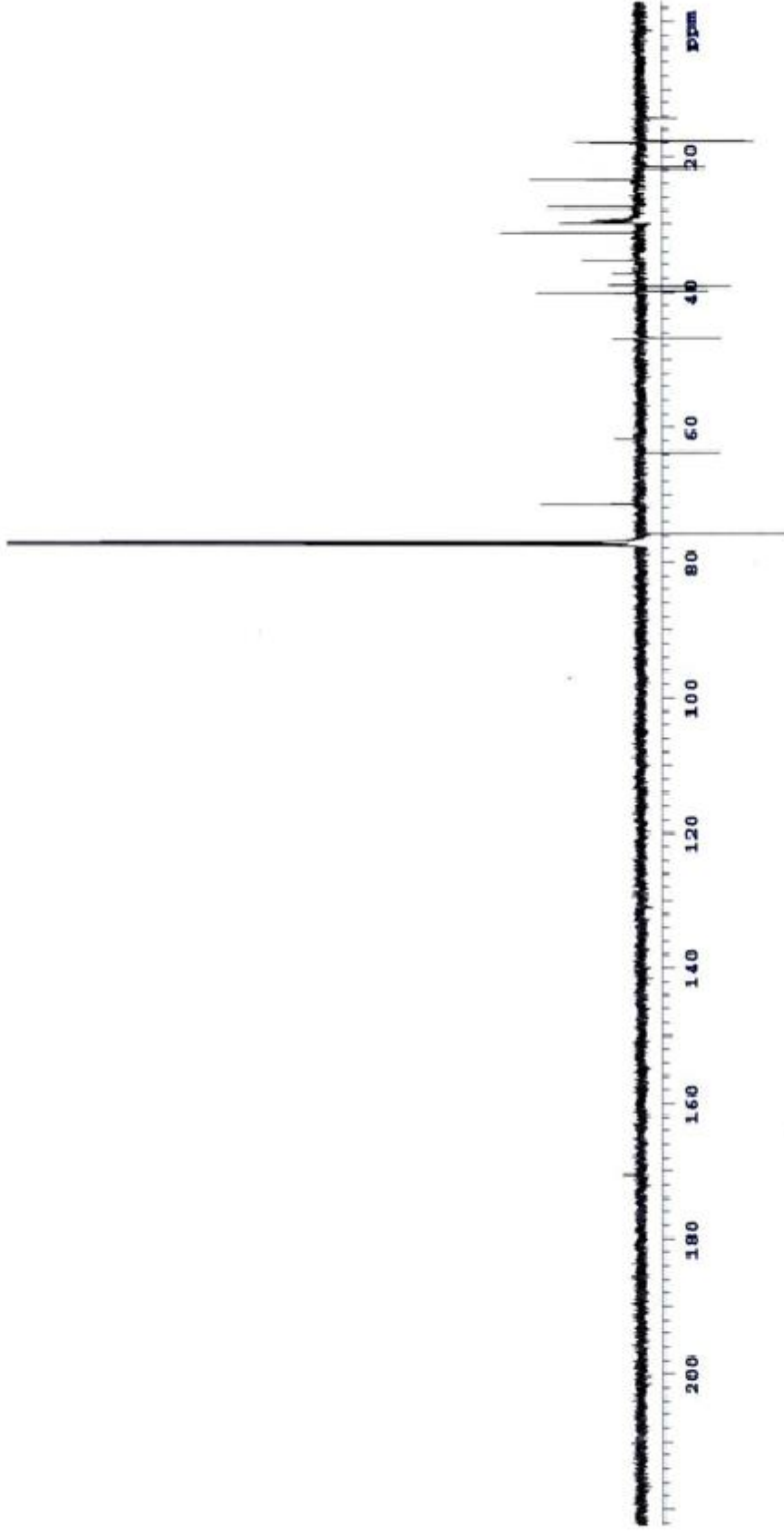
diterpen olan **7-asetil sideroksol** (*ent-7 α -asetoksi-18-hidroksi-15 β ,16 β -epoksikauran*) olarak belirlenmiştir [46].



Şekil 3.23: 7-asetil sideroksol bileşiminin ¹H NMR spektrumu.

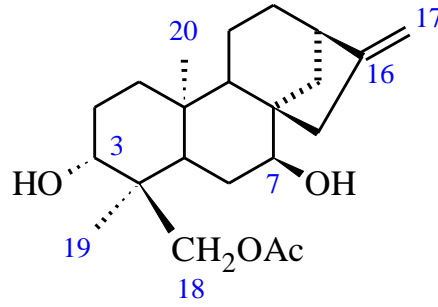


Şekil 3.24: 7-asetil sideroksol bileşiğinin metil kısmı ¹H NMR spektrumu.



Şekil 3.25: 7-asetil sideroksol bileşiğinin ¹³C NMR spektrumu.

3.2.5 Linearol (*ent*-3,7-dihidroksi,18-asetoksi-kaur-16-ene) (5)



Linearol bileşiği *Sideritis hispida* bitkisinin aseton ve metanol ekstrelerinden 105 mg miktarında elde edilmiştir.

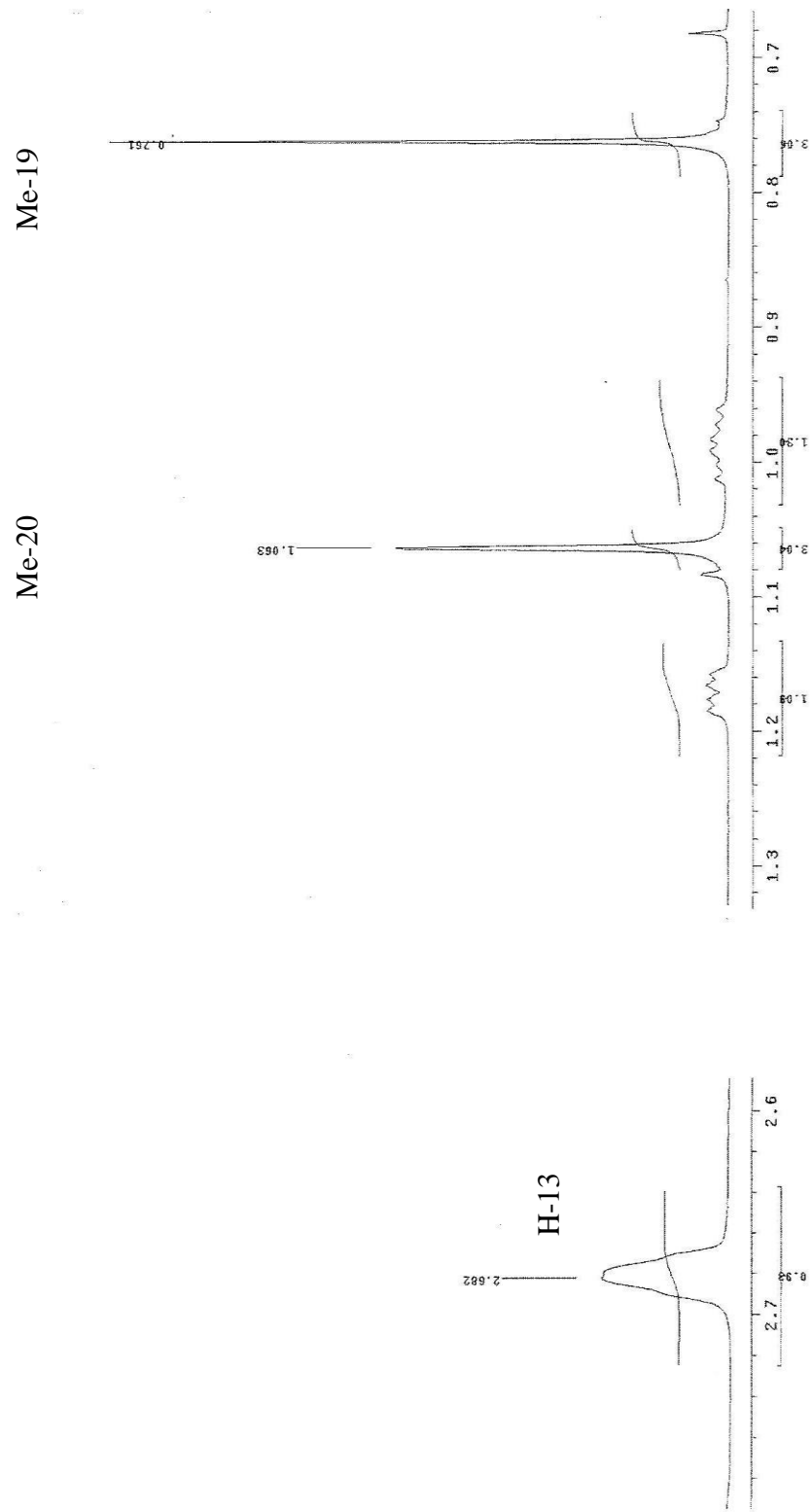
Bileşiğe ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.26 ve 3.27) iki metil sinyali δ 0.76 ve 1.06 ppm'de singlet olarak, asetil grubunun metil sinyali de δ 2.09 ppm'de singlet olarak gözlenmiştir. δ 2.68 ppm'deki multipler pik H-13 protonuna, δ 4.79 ve 4.82 de genişlemiş singletler halinde gözlenen olenifinik proton çifti molekülde ekzosiklik bir çift bağ olduğuna işaret etmiştir. Ayrıca oksijene komşu bir metilen protonlarının varlığı δ 4.00 ve 4.04 $J=11.5$ Hz'lik AB sistemi ile belirlenmiştir. δ 3.53 ppm'de dubletin dubleti ve δ 3.61 ppm'de triplet ($J=2.5$ Hz) olarak izlenen protonların oksijene komşu olduğu düşünülmüştür. Literatür incelemelerinde δ 3.53 ppm'deki sinyalin H-3 β 'ya, δ 3.61 ppm'deki sinyalin ise H-7 α 'ya ait olduğu karar verilmiştir.

Bileşiğe ait $^{13}\text{C-NMR}$ spektrumunda (Şekil 3.28) metil karbonları δ 11.91 ve 17.93 ppm'de gözlenirken asetile bağlı metil karbonu δ 21.15 ppm, asetil karbonil karbonu ise δ 171.82 ppm'de gözlenmiştir. δ 76.84 ve 72.21 ppm'deki sinyaller hidroksil taşıyan bir metin karbonlarına işaret ederken asetil grubunun metilen karbonu ise δ 66.00 ppm'de gözlenmiştir. Ekzosiklik metilen karbonu δ 103.55, bunun katerner karbonu ise δ 154.95 de izlenmiştir.

Bileşiğe ait spektral verileri ve literatür değerleri karşılaştırıldığında yapının, *Sideritis* türünden daha önce yapılan çalışmalardan da elde edilen bilinen bir diterpen olan **Linearol (*ent*-3 β -7 α -dihidroksi-18-asetilkaur-16-en)** olduğu belirlenmiştir [12, 31, 38, 40, 45, 46, 48, 71, 73, 77].

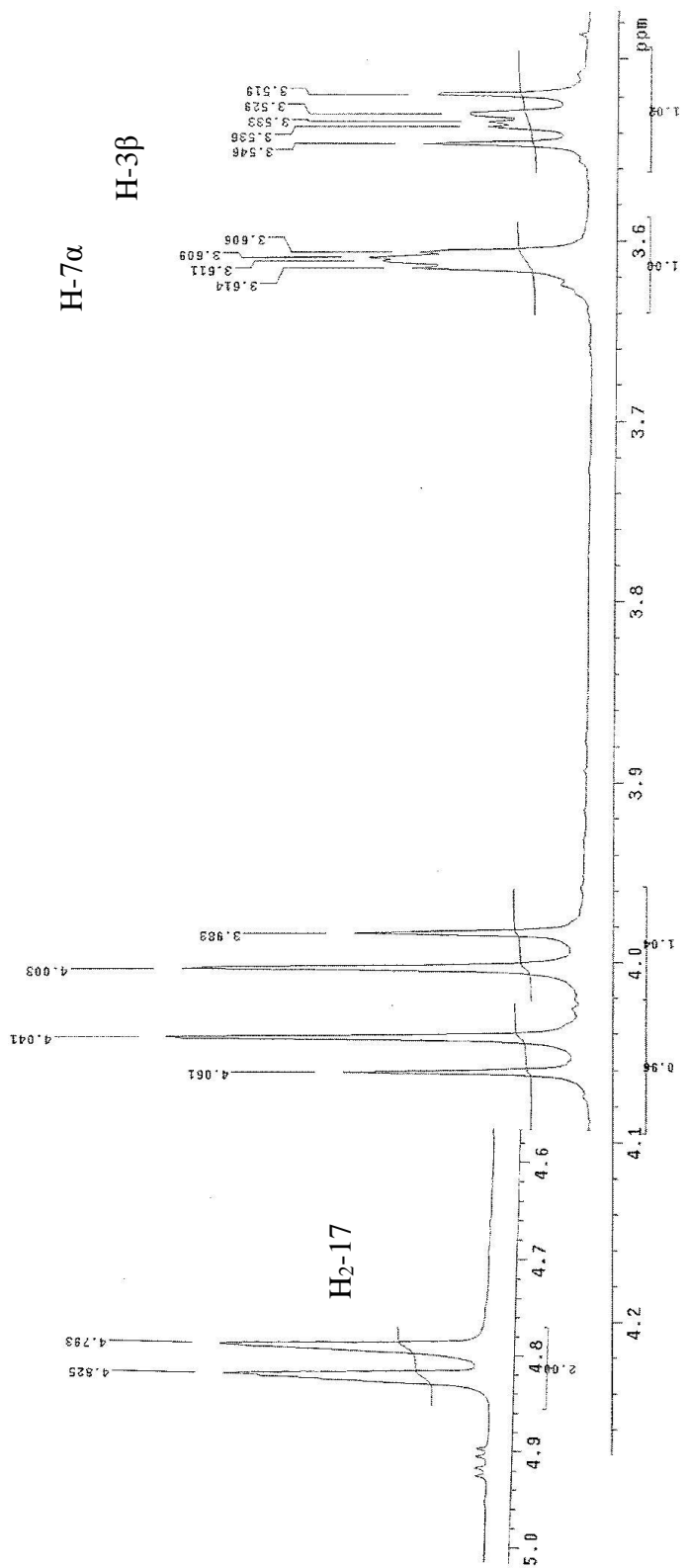
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, CDCl_3): δ 4.82-4.78 (2H, s, H₂-17), 4.04 (1H, d, $J=11.5$ Hz, H-18a), 4.00 (1H, d, $J=11.5$ Hz, H-18b), 3.61 (1H, t, $J=2.5$ Hz, H-7 α), 3.53 (1H, dd, $J=7.5$ Hz ve 9 Hz, H-3 β) 2.68 (1H, m, H-13), 2.09 (3H, s, O-COCH₃), 1.06 (3H, s, Me-20), 0.76 (3H, s, Me-19)

$^{13}\text{C-NMR}$ (150.82 MHz, CDCl_3): δ 38.01 (C-1), 27.68 (C-2), 72.21 (C-3), 38.81 (C-4), 38.01 (C-5), 27.68 (C-6), 76.84 (C-7), 48.21 (C-8), 50.11 (C-9), 37.90 (C-10), 13.92 (C-11), 32.90 (C-12), 44.11 (C-13), 42.01 (C-14), 44.05 (C-15), 154.95 (C-16), 103.55 (C-17), 66.0 (C-18), 11.91 (C-19), 17.93 (C-20), 21.15 (O-COCH₃), 171.82 (O-COCH₃)

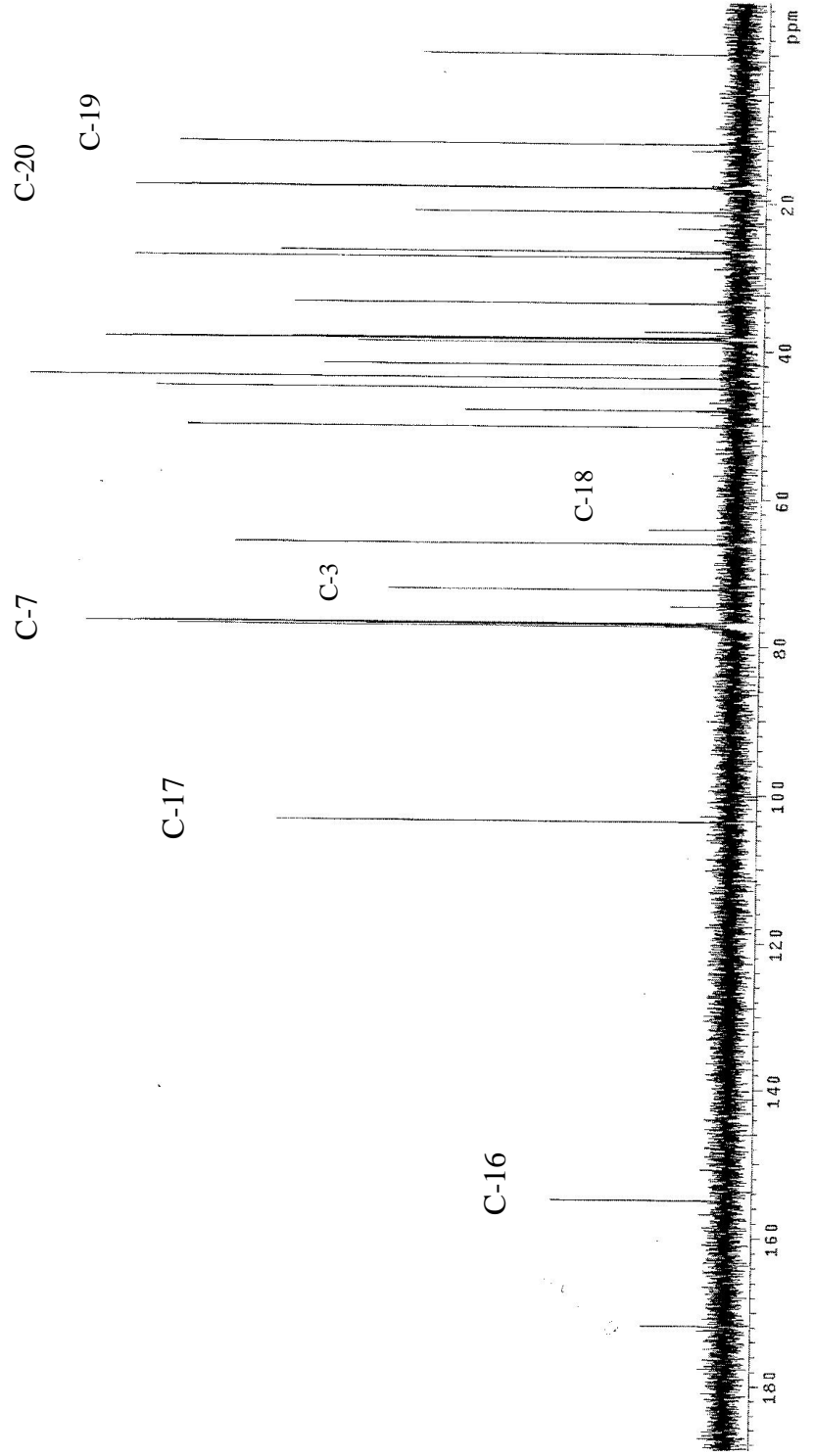


Şekil 3.26: Linearol bileşiğinin ^1H NMR spektrumu-1.

H-18a H-18b

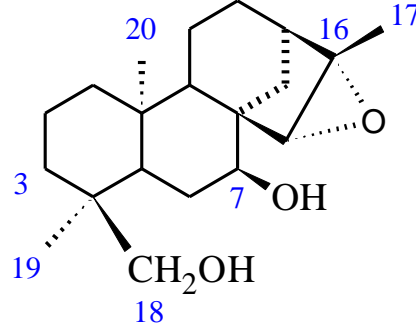


Şekil 3.27: Linearol bileşiğinin ¹H NMR spektrumu-2.



Şekil 3.28: Linearol bileşiminin ^{13}C NMR spektrumu.

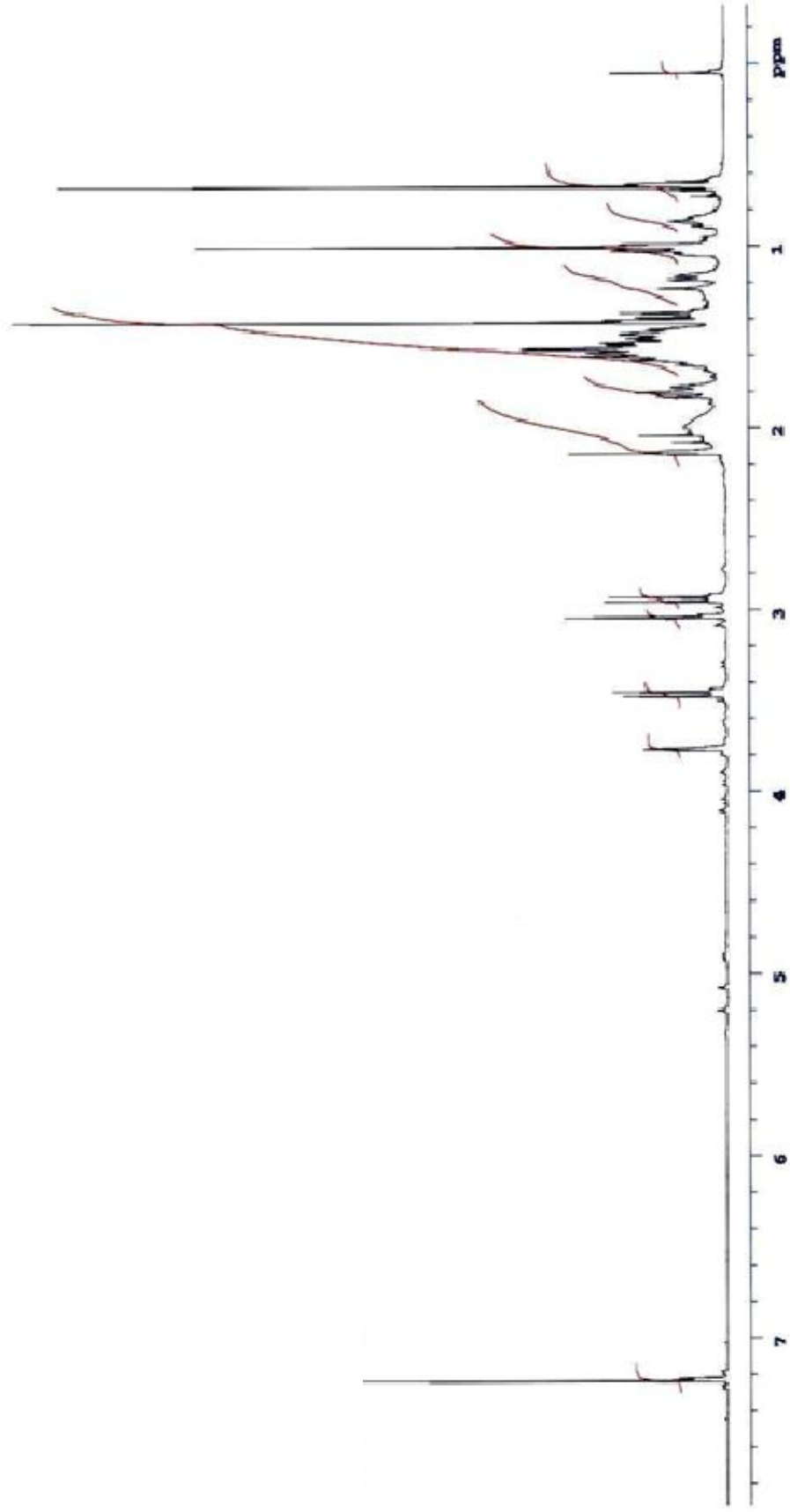
3.2.6 Sideroksol (*ent*-7 α ,18-dihidroksi-15 β ,16 β -epoksikauran) (6)



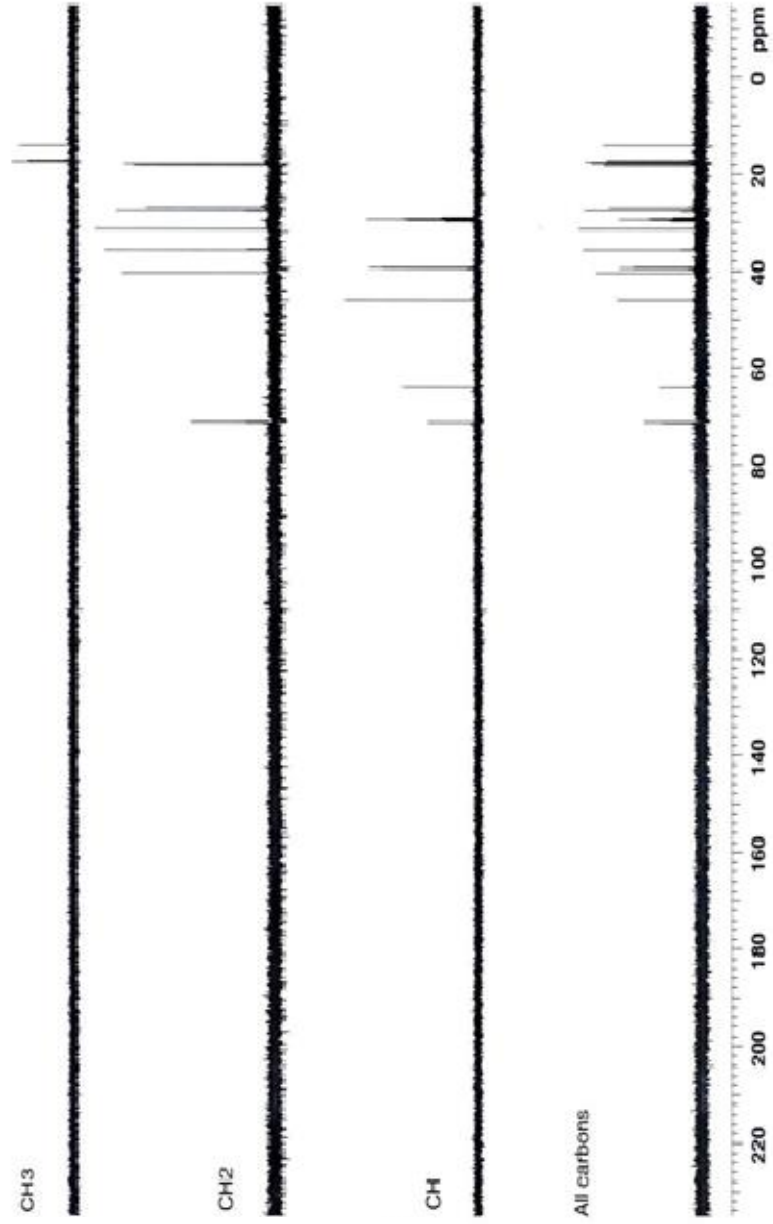
Sideroksol bileşiği *Sideritis hispid*a bitkisinin metanol ekstresinden 3,2 mg miktarında elde edilmiştir.

Bileşiğe ait ¹H-NMR spektrumunda (Şekil 3.29) iki adet metil sinyali δ 0.76 ve δ 1.08'de singletler halinde gözlenirken üçüncü metil sinyali δ 1.40'da olmak üzere yine singlet olarak gözlenmiştir. Üçüncü metilin kimyasal kayması dolayısıyla bu metil grubu oksijene komşu bir metil olmalıydı. Buna ilaveten δ 3.05'de izlenen singlet ve kauren diterpenlerde beklenen ve daha çok C₁₅-C₁₆ veya C₁₆-C₁₇ arasında izlenen çift bağ protonlarının spektrumda görülmemesi molekülün 15 ve 16 nolu karbonları arasında bir epoksi grubunun var olabileceğini düşündürmüştür. Literatür araştırması sonucunda bu molekülün bir epoksi grubuna sahip olduğu ve δ 3.05'de izlenen pikin de H-15 protonuna ait olduğu belirlenmiştir. Yine δ 3.02 ve δ 3.36'da (J=12 Hz) izlenen dubletlerin C-18 hidroksimetilen grubuna ve δ 3.67'de izlenen tripletin de (J=3 Hz) H-7'ye ait olduğu yani C-7' de β konumunda bir sekonder hidroksil grubunun varlığı belirlenmiştir.

Bileşiğin BB ve DEPT teknikleriyle alınan ¹³C NMR spektrumunda (Şekil 3.30) 3 metil, 8 metilen, 5 metin ve 4 kuarterner karbon olmak üzere toplam 20 karbon sinyali gözlemlenmiştir. Moleküldeki sekonder hidroksil grubuna komşu metin karbonuna (C-7) ait sinyal 71.3 ppm' de gözlenirken oksijen taşıyan diğer bir karbon olan C-15 63.8 ppm' de gözlenmiştir. Karakteristik C-18 karbonuna ait sinyal ise 71.2 ppm' de gözlenmiştir. Moleküldeki üç metil karbonuna ait sinyaller 14.1, 17.40 ve 18.1 ppm' de gözlenmiştir.



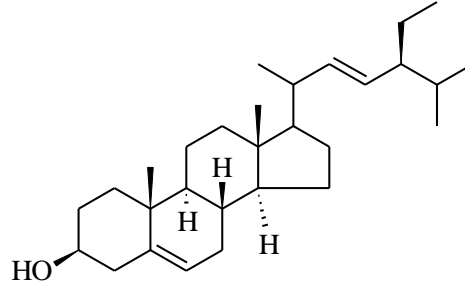
Şekil 3.29: Sideroksol bileşinin ^1H NMR spektrumu.



Şekil 3.30: Siderosol bileşiğinin ^{13}C NMR spektrumu.

3.3 Diğer Bileşikler

Bitkinin aseton ekstresinden steroid yapısına sahip olan **stigmasterol** ((3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*E*,2*R*,5*S*)-5-etil-6-metilhept-3-en-2-il]-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodekahidro-1*H* siklopenta[*a*]fenantren-3-ol) (7) elde edilmiş olup yapısı Şekil 3.31’de verilmiştir.



Şekil 3.31: Stigmasterol.

3.4 *Sideritis hispida*’dan Elde Edilen Fenolik Bileşikler

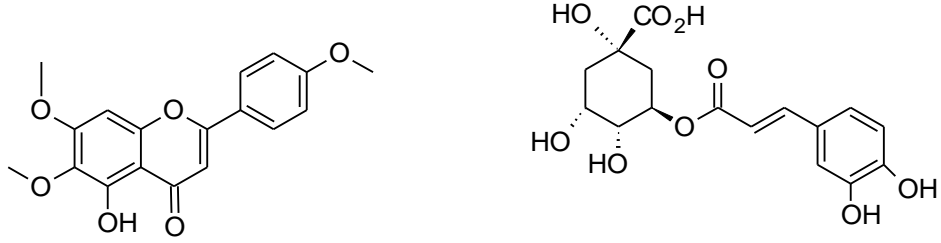
Bitkiden elde edilen ekstraler LC/MS-MS cihazı ile analize tabi tutuldu. Toplamda 19 bileşik belirlenmiş ve bunlardan 10 tanesini fenolik asit, 7 tanesinin flavonoid ve 2 tanesinin de flavonoid glikozid yapısındadır. Ekstrelerin içerdiği bileşik grupları ise Tablo 3.3’de verilmektedir.

Tablo 3.3: Ekstrelerin içerdiği fenolik bileşik grupları.

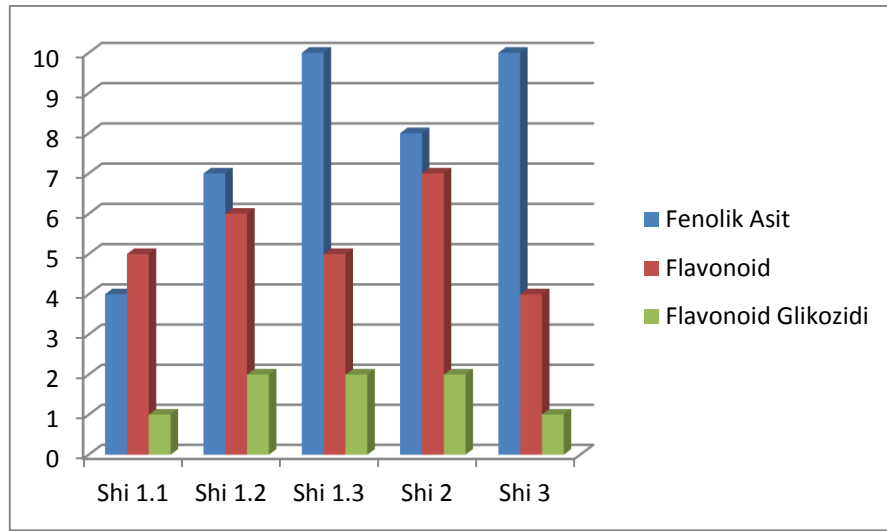
Ekstre	Fenolik Asit	Flavonoid	Flavonoid Glikozidi	Toplam
Shi 1.1	4	5	1	10
Shi 1.2	7	6	2	15
Shi 1.3	10	5	2	17
Shi 2	8	7	2	17
Shi 3	10	4	1	15

En yüksek oranda bulunan maddelerin hekzan ekstresi (Shi 1.1) için salvigenin (323,78±22,04) mg/kg, hekzan sonrası aseton (Shi 1.2) ve aseton sonrası metanol (Shi 1.3) ile doğrudan aseton (Shi 2) ve metanol (Shi 3) ekstraleleri için ise klorojenik asit olup miktarlarının sırasıyla (801,79±111,03), (1651,9±228,75),

(1122,11±155,38), (1042,51±144,36) mg/kg olduğu belirlenmiş ve yapıları Şekil 3.32’ de verilmiştir.



Şekil 3.32: Salvigenin ve klorojenik asit.

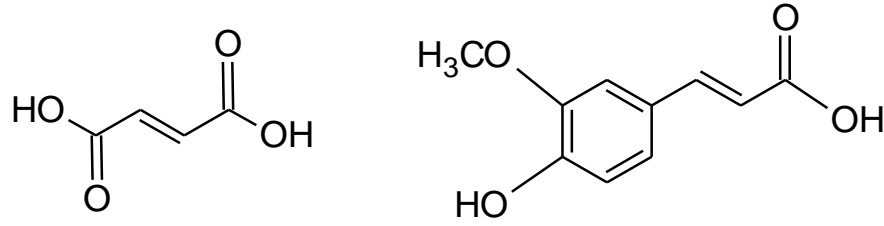


Şekil 3.33: Ekstrelerin fenolik bileşik içerikleri.

Tablo 3.4: Ektrelerin içerdiği fenolik bileşikler.

BİLEŞİK SINIFI	BİLEŞİKLER	Shi 1.1	Shi 1.2	Shi 1.3	Shi 2	Shi 3
Fenolik Asitler	Gallik asit	4,44±0,31	6,77±0,47	5,99±0,42	6,9±0,48	6,05±0,42
	Fumarik asit	-	73,71±5,11	689,51±47,82	103,87±7,2	403,21±27,96
	Pirogallol	-	-	25,15±1,67	-	17,93±1,19
	Salisilik asit	-	-	10,11±4,08	-	19,26±7,77
	p-OH benzoik asit	-	9,77±0,78	10,98±0,87	10,26±0,81	7,68±0,61
	Vanilin	-	9,87±0,9	11,13±1,02	10,3±0,94	13,72±1,25
	Kafeik asit	4,61±0,91	14,85±2,94	15,56±3,08	17,04±3,37	18,27±3,62
	t-ferulik asit	-	-	23,62±1,65	10,92±0,76	80,67±5,64
	Klorojenik asit	9,78±1,35	801,79±111,03	1651,9±228,75	1122,11±155,38	1042,51±144,36
	Rosmarinik asit	3,37±0,26	3,9±0,3	7,61±0,58	5,04±0,39	7,67±0,59
Flavonoidler	İzorhamnetin	11,28±1	13,46±1,19	-	16,83±1,49	-
	Izokuersetin	-	38,97±11,18	45,57±13,08	46,25±13,27	21,6±6,2
	Rutin	1,3±0,09	6,68±0,44	8,35±0,55	10,64±0,7	8,24±0,54
	Liriodendrin	6,73±0,47	14,14±0,98	30,12±2,09	37,77±2,62	22,41±1,55
	Salvigenin	323,78±22,04	34,62±2,36	49,86±3,39	142,25±9,68	41,98±2,86
	Kuersitrin	-	-	18,38±1,17	19,38±1,24	-
	Penduletin	2,8±0,28	0,61±0,06	-	3,9±0,4	-
Flavonoid Glikozidi	Luteolin-7-glukozid	11,77±1,2	26,35±2,68	20,93±2,13	32,49±3,31	9,14±0,93
	Luteolin-5- glukozid	-	8,49±0,55	14,17±0,91	19,67±1,27	-

Bitkiden infüzyon ve dekoksasyon yöntemi ile elde edilen su ekstraları de LC/MS-MS cihazı ile analiz edilmiş olup, infüzyon yöntemi ile elde edilen ekstrada 6 tane fenolik asit belirlenirken dekoksasyon yöntemi için ise 5 tane fenolik asit, 1 tane flavonoid olmak üzere toplamda 7 adet bileşik belirlenmiştir. En yüksek oranda bulunan maddelerin infüzyon yöntemi için t-ferulik asit ($93,66 \pm 6,54$ mg/kg), dekoksasyon yöntemi için ise fumarik asit ($614,18 \pm 42,59$ mg/kg) olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Tablo 3.5’te, bu bileşikler de Şekil 3.34’te verilmektedir.



Şekil 3.34: Fumarik asit ve ferulik asit.

Tablo 3.5: Su ekstralarının içerdiği fenolik bileşikler.

BİLEŞİKLER	İNFÜZYON	DEKOKSİYON
Saponarin	-	$20,44 \pm 1,36$
Gallik asit	$5,35 \pm 0,37$	-
Fumarik asit	$54,2 \pm 3,76$	$614,18 \pm 42,59$
Kafeik asit	$52,02 \pm 10,29$	$11,54 \pm 2,28$
t-ferulik asit	$93,66 \pm 6,54$	$61,28 \pm 4,28$
Siringik asit	$5,35 \pm 0,36$	$13,89 \pm 0,94$
Klorojenik asit	$50,48 \pm 6,99$	$56,4 \pm 7,81$

3.5 Biyolojik Aktivite Sonuçları

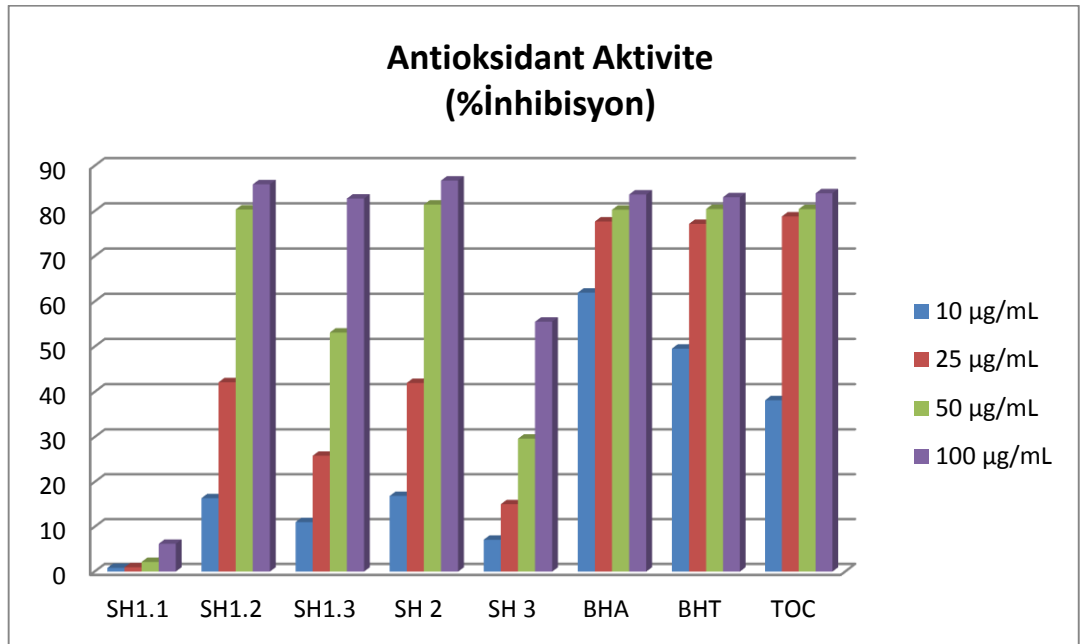
3.5.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları

Ham ekstraların DPPH serbest radikali giderim aktivitesi dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$) belirlenmiştir. Standart olarak kullanılan BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen), BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol) ve α -toc'e (α -tokoferol) göre aktivite karşılaştırmaları yapılmıştır.

Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyon olarak Tablo 3.6’ da verilmiştir.

Tablo 3.6: Ekstrelerin DPPH serbest radikali giderim aktivitesi sonuçları (% inhibisyon).

	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
SH1.1	0,83±0,38	0,96±0,35	2,15±0,36	6,20±0,61
SH1.2	16,38±0,04	42,14±0,92	80,34±0,79	85,91±0,15
SH1.3	11,03±0,61	25,85±0,57	53,11±0,62	82,75±0,42
SH 2	16,88±0,10	41,98±0,43	81,42±0,12	86,74±0,12
SH 3	7,10±0,54	15,04±0,88	29,66±1,03	55,53±0,74
BHA	61,95±0,58	77,68±0,70	80,29±0,38	83,66±0,30
BHT	49,57±0,63	77,16±0,83	80,45±0,60	83,05±0,24
α-toc	38,15±0,32	78,81±0,53	80,43±0,16	83,92±0,23



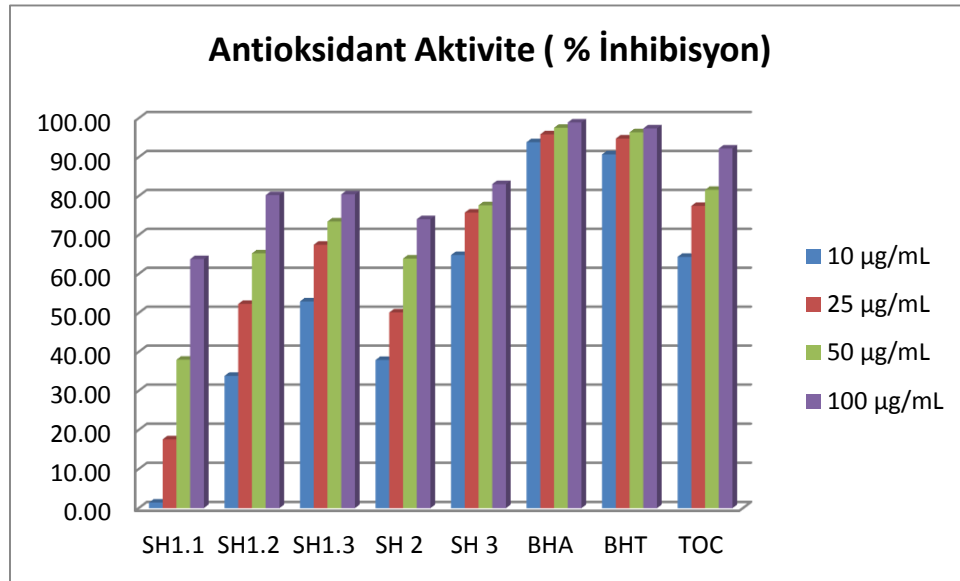
Şekil 3.35: Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları.

3.5.2 β-Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları

Ham ekstrelerin toplam antioksidan aktiviteleri β-karoten renk açılım yöntemine göre dört farklı konsantrasyonda (10, 25, 50, 100 µg/mL) yapılmıştır. Antioksidan aktivite karşılaştırmalarında standart olarak BHT, BHA, α-toc kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

Tablo 3.7: Ekstrelerin Lipid Peroksidasyon % İnhibisyon Sonuçları.

	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Shi 1.1	1,42±0,06	17,59±0,35	39,97±0,75	63,80±0,57
Shi 1.2	33,82±0,27	52,30±0,66	65,28±0,31	80,24±0,13
Shi 1.3	52,93±0,51	67,49±0,30	73,48±0,61	80,43±0,72
Shi 2	37,90±0,45	50,11±0,55	63,94±0,96	74,05±0,38
Shi 3	64,86±0,38	75,75±0,41	77,63±0,09	83,07±0,22
BHA	93,84±0,38	95,86±0,33	97,54±0,11	98,90±0,69
BTH	90,70±0,37	94,78±0,31	96,38±0,32	97,37±0,16
α-Toc	64,38±0,29	77,47±0,91	81,60±0,25	92,21±0,13



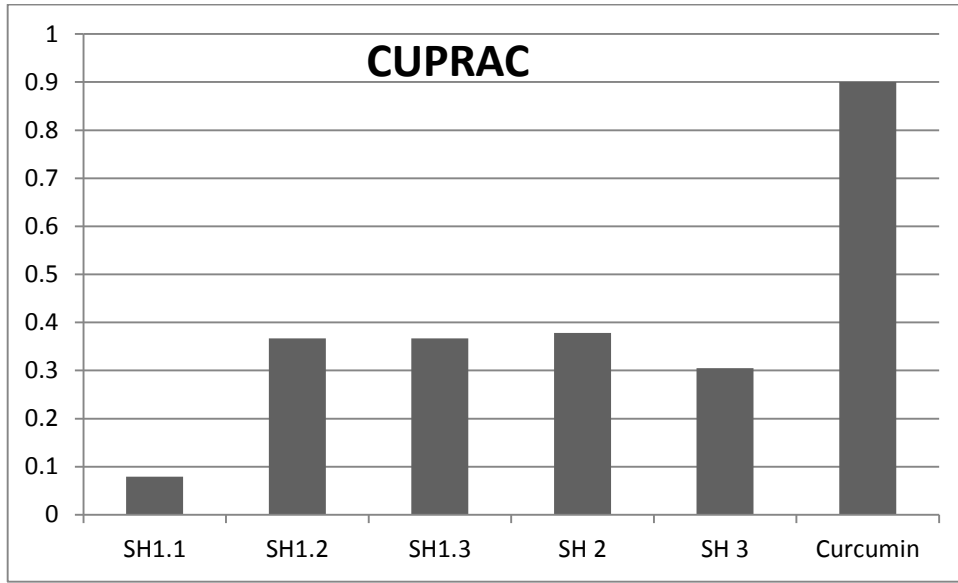
Şekil 3.36: Bitki ekstrelerinin lipid peroksidasyon % inhibisyonu sonuçları.

3.5.3 Cu⁺² İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC) Sonuçları

Ham ekstrelerin antioksidan aktiviteleri Cu⁺² indirgeme kapasitesi yöntemine göre yapılarak karşılaştırmalarında da standart olarak kurkumin kullanılmıştır. Sonuçlar Tablo 3.8’de verilmiştir.

Tablo 3.8: Ekstrelerin Cu⁺² indirgeme kapasitesi (CUPRAC) sonuçları.

Ekstre	TEAC _{CUPRAC}
SH1.1	0,079±0,024
SH1.2	0,367±0,087
SH1.3	0,367±0,074
SH 2	0,378±0,073
SH 3	0,305±0,037



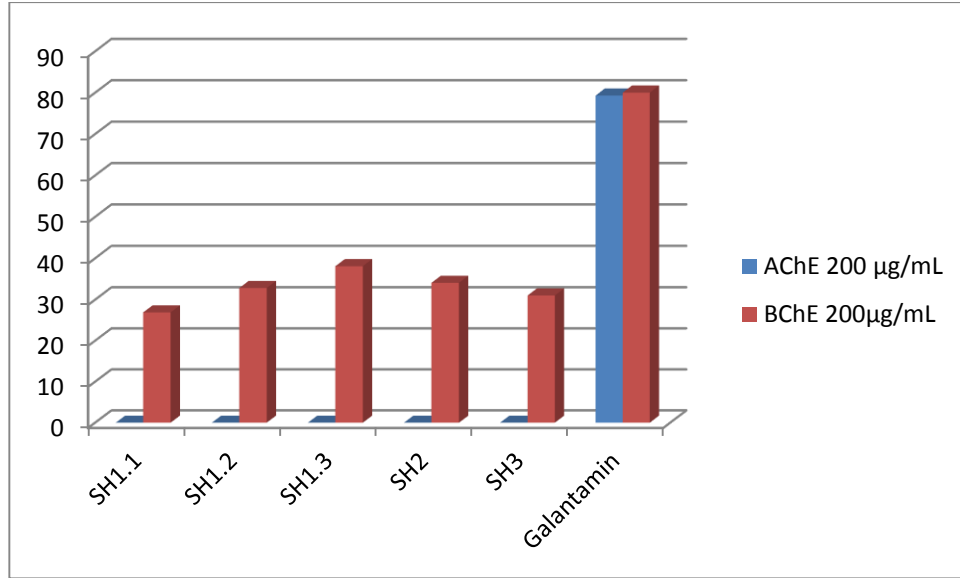
Şekil 3.37: Ekstrelerin Cu⁺² indirgeme kapasitesi (CUPRAC) sonuçları.

3.5.4 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Ham ekstrelerin AChE ve BChE % inhibisyon değerleri 200 µg/mL derişimde ölçülmüş ve standart olarak Galantamin bileşği kullanılmıştır. AChE ve BChE % inhibisyon değerleri Tablo 3.9’da verilmiştir.

Tablo 3.9: Antikolinesteraz AChE ve BChE aktivite sonuçları (% İnhibisyon).

	AChE 200µg/mL	BChE 200µg/mL
SH1.1	-	26,90±0,67
SH1.2	-	32,81±1,14
SH1.3	-	38,09±0,50
SH 2	-	34,07±1,38
SH 3	-	31,02±1,17
Galantamin	79,30±0,23	80,02±0,38



Şekil 3.38: Antikolinesteraz AChE ve BChE aktivite sonuçları (% İnhibisyon).

3.5.5 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Ham ekstrelerin antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için *Escherichia coli* DSMZ1103, *Staphylococcus aureus* DSMZ1104, *Candida albicans* DSMZ1386, *Mycobacterium smegmatis* ATCC14468 kullanılmış olup hekzan ve hekzan sonrası aseton ekstralarının *C. albicans*'a karşı karşı zayıf aktivite gösterdiği gözlemlenmiş ve sonuçlar Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.10: Antimikrobiyal aktivite sonuçları.

	Sh1.1	Sh1.2	Sh1.3	Sh2	Sh3	Ketokonazol
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	-	-	32
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	
<i>Candida albicans</i>	7	8	-	-	-	
<i>M.smegmatis</i>	-	-	-	-	-	
DMSO	-	-	-	-	-	

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

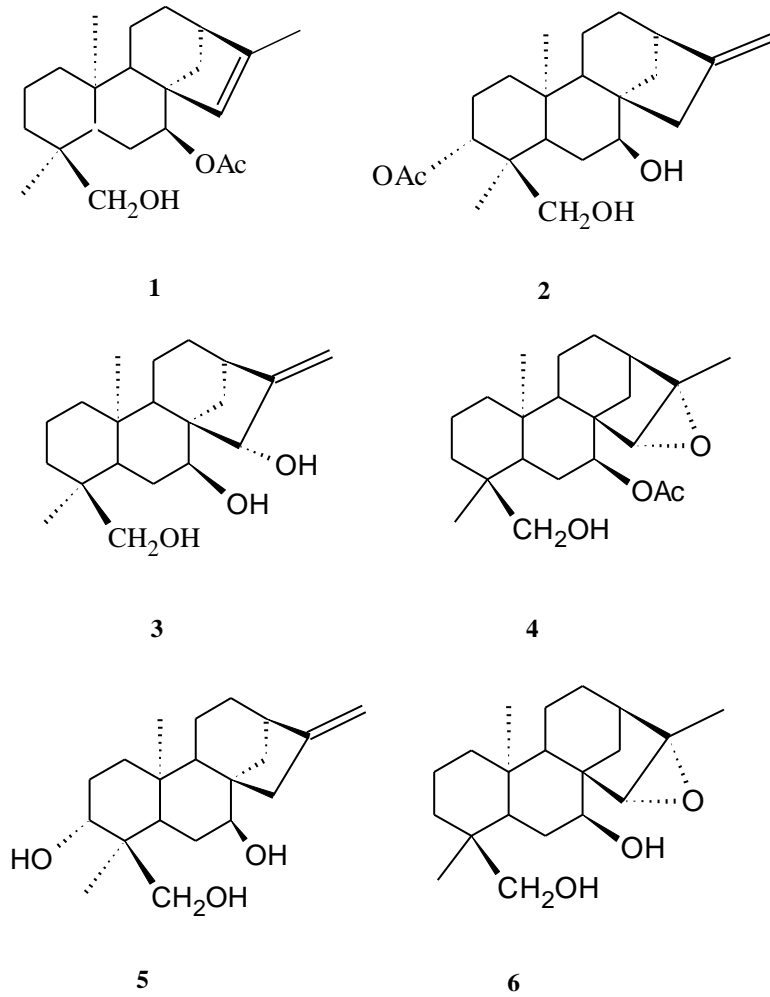
Labiatae familyasına ait *Sideritis* cinsi tek ve çok yıllık olmak üzere 150'den fazla bitki türünü bünyesinde barındırmaktadır [19]. Türkiye'de yetişen bitkiler arasında % 78 lik oran ile en yüksek endemizme sahip olan cinslerden birisi olup 46 tür, 12 alt tür ve 2 varyete ile temsil edilmektedir [4-6]. Bu çalışmada *Sideritis hispida* P. H. Davis bitkisinin fitokimyasal açıdan çalışılması amaçlanmış ve bitki uçucu yağ bileşenleri, fenolik bileşikler ile diterpenik maddeler yönünden incelenmiştir.

Çiçeklenme döneminde toplananan bitki, gölgede kurutularak çalışmalara başlanmıştır. Uçucu yağ eldesi için bitkiden bir miktar alınarak Klevenger aparatı takılmış su buharı destilasyonu yoluyla yağ elde edilmiş ve GC/MS ile analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre en fazla bulunan üç bileşiğin α -kadinol (%41.1), α -kadinen (%13.3) ve karyofilen (%5.0) olduğu belirlenmiştir (bkz. Şekil 3.2).

Bitkinin içerisindeki terpenik maddeleri belirlemek amacıyla önce hekzan, sonra aseton ve metanol ekstraları hazırlanmış ve bu ekstralar kuruluğa kadar yoğunlaştırılarak ham ekstralar elde edilmiştir. Ekstrelerin miktarlarına göre kolon seçilerek kolon kromatografisi yardımıyla fraksiyonlandırılmıştır. Bu fraksiyonlar hazır silika kaplı alümina plaklar yardımıyla kontrol edilmiş, benzer fraksiyonlar birleştirerek miktarına göre tekrar kolon kromatografisi ya da preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemiyle saflaştırılmıştır. İzole edilen saf maddelerin yapıları NMR ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, APT, COSY, HMBC, HMQC) yardımıyla aydınlatılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre izole edilen bileşikler (1) Siderol (*ent-7 α -asetil-18-hidroksikaur-15-en*), (2) Sidol (*ent-3 β -asetil-7 α ,18-dihidroksikaur-16-en*), (3) Eubotriol (*ent-7 α ,15 β ,18-trihidroksikaur-16-en*), (4) 7-asetil sideroksol (*ent-7 α -asetoksi-18-hidroksi-15 β ,16 β -epoksikauran*), (5) Linearol (*ent-3,7-dihidroksi,18-asetoksi-kaur-16-ene*) ve (6) Sideroksol (*ent-7 α ,18-dihidroksi-15 β ,16 β -epoksikauran*)' dir (Şekil 4.1). Ayrıca steroid yapısına sahip stigmasterol ((3*S*,8*S*,9*S*,10*R*,13*R*,14*S*,17*R*)-17-[(*E*,2*R*,5*S*)-5-etil-6-metilhept-3-en-2-il]-10,13-

dimetil-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodekahidro-1*H* siklopenta [*a*] fenantren-3-ol) (7) de (bkz. Şekil 3.31) izole edilmiştir.

Akdeniz bölgesinde geniş yayılım gösteren *Sideritis* türlerinden Batı Akdeniz bölgesinde yetişenleri kauren diterpenlerin yanı sıra labdan, atisen, beyeren ve trakiloban diterpenler [15, 125, 126] de içermelerine rağmen merkezi ve Doğu Akdeniz (İtalya, Yunanistan ve Türkiye) bölgesinde yetişen bitkilerden daha çok *ent*-kauren diterpenler [127-130] elde edilmektedir. Bu çalışma sonucunda da sadece *ent*-kauren diterpenlerin elde edilmiş olması bu görüşü desteklemektedir.



Şekil 4.1: *Sideritis hispidia* 'dan izole edilen diterpen bileşikleri.

Bitkinin fenolik madde açısından incelenmesi amacıyla hekzan (Shi 1.1), hekzan sonrası aseton (Shi 1.2), aseton sonrası metanol (Shi 1.3) ile doğrudan aseton (Shi 2) ve metanol (Shi 3) ekstraları hazırlanmıştır. Bu ekstraların fenolik madde içeriğinin belirlenebilmesi amacıyla LC/MS-MS cihazıyla analizler gerçekleştirilmiştir.

ve bu deneyin sonucunda en yüksek oranda bulunan maddelerin hekzan ekstresi (Shi 1.1) için salvigenin, hekzan sonrası aseton (Shi 1.2) ve aseton sonrası metanol (Shi 1.3) ile doğrudan aseton (Shi 2) ve metanol (Shi 3) ekstraları için ise klorojenik asit olduğu belirlenmiştir (bkz. Şekil 3.32).

İnfüzyon ve dekoksasyon yöntemi ile hazırlanan su ekstresinin fenolik içeriği de LC/MS-MS cihazıyla belirlenmiş ve bitkinin infüzyon yöntemi için t-ferulik asit, dekoksasyon yöntemi için ise fumarik asit bileşiklerini yüksek oranda içerdiği belirlenmiştir (bkz. Şekil 3.34).

Bitkinin toprak üstü kısımlarında hazırlanan hazırlanan hekzan , hekzan sonrası aseton, aseton sonrası metanol ve doğrudan aseton ile metanol ekstraları; DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi, Cu⁺² İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC), Lipid Peroksidasyon İnhibisyonu ve Antikolinesteraz Aktiviteleri yönünden incelenmiştir.

DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi sonuçları değerlendirildiğinde bitkinin polar olmayan hekzan ekstresinde tüm konsantrasyonlar için kayda değer bir aktivite gözlemlenmezken, her iki yöntemle de hazırlanmış aseton ekstraları için özellikle 100 µg/mL konsantrasyonda oldukça iyi aktivite gözlenmiştir (SH1.2: 85,91±0,15, SH 2: 86,74±0,12, BHA: 83,66±0,30, BHT: 83,05±0,24, α-toc: 83,92±0,23). Aseton sonrası metanol ekstresinde 100 µg/mL derişimde iyi bir aktivite gözlemlenirken doğrudan hazırlanan metanol ekstresi ise nispeten daha az aktiviteye sahiptir.

β-karoten renk açılım yönteminin antioksidan aktivite sonuçlarına göre ise doğrudan hazırlanan metanol ekstresi tüm konsantrasyonlarda oldukça iyi bir aktivite gösterirken, 100 µg/mL derişimlerde her iki yöntemle hazırlanmış aseton ve metanol ekstraları iyi aktivite değerlerine sahiptir.

CUPRAC sonuçlarına göre her iki yöntemle hazırlanan aseton ve metanol ekstraları standart bileşik kurkumin ile karşılaştırıldığında orta derecede aktiviteye sahiptir.

Fenolik bileşikler yönünden özellikle fenolik asit bakımından zengin olan ekstraların daha aktif olduğu gözlemlenmiştir.

Ekstrelerin anti-Alzheimer aktivite sonuçları incelendiğinde hiçbir ekstre AChE enzimine karşı inhibisyon göstermezken, BChE enzimine karşı hekzan sonrası metanol ekstresi orta derecede inhibisyona sahiptir.

Antimikrobiyal aktivitenin belirlenebilmesi amacıyla yapılan testlerde ise hekzan ve hekzan sonrası aseton ekstralarının *C. albicans*'a karşı zayıf aktiviteye sahip olduğu, diğer ekstraların de herhangi bir aktivite göstermediği gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak Türkiye için endemik olan ve halk arasında çeşitli hastalıklarda çay olarak tüketilen *Sideritis hispida* P. H. Davis bitkisi fitokimyasal bileşenleri ve aktiviteleri bakımından incelenmiş olup, oldukça iyi antioksidan aktiviteye sahip olduğu, bu aktivitesinin de fenolik bileşenlerce zengin olmasından kaynaklandığı fikri vurgulanmış, sonuçlar bilim dünyasının hizmetine sunulmuştur.

5. KAYNAKLAR

- [1] Baytop, T., *Türkiye’de Bitkiler ile Tedavi*, İstanbul: İstanbul Üni. Yay. No: 3255, Eczacılık Fakültesi No. 40, 240-376, (1984).
- [2] Saleem M., “Chemical and Biological Screening of Some Relatives of Lamiaceae (Labiatae) Family and Marina Algae *Conidium iyengarii*”, P. H. D. Thesis, *University of Karachi*, Karachi, (2000).
- [3] Heywood, V. H., *Flowering Plants of the world*, London: BT Batsford Ltd., 239, (1996).
- [4] Huber-Morath, H., “*Sideritis L.*”, *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, (ed: Davis, P. H.), 7, Edinburgh: University Press, 193, (1982).
- [5] Davis, P. H., Mill, R. R. and Tan K., *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, 10, Edinburgh: University Press, 178-179, (1988).
- [6] Duman, H., “*Sideritis L.*”, *Flora of Turkey and East Aegean Islands (Supplement II)*, (eds: Güner A., Özhatay, N., Ekim, T. and Baser, K.H.C.), 11, Edinburgh: University Press, 5-201, (2000).
- [7] Font Quer, P., *Plantas Medicinales El Dioscorides Renovado*, Barcelona: Ediciones Peninsula, (2000).
- [8] Kırimer, N., Tabanca, N., Tumen, G., Duman, H. and Başer, K. H. C., “Composition of Essential Oils of Four Endemic *Sideritis* Species from Turkey”, *Flavour Fragr. J.*, 14, 421-425, (1999).

- [9] Sezik, E. ve Ezer, N., “Türkiye’de Halk İlacı ve Çay Olarak Kullanılan Bitkiler Üzerinde Morfolojik ve Anatomik Araştırmalar 1., *Sideritis congesta* Davis & Huber-Morath”, *Doğa Bilim Dergisi Tıp*, 7, 163, (1983).
- [10] Başer, K. H. C., Tümen, G., Çakır, H. ve Kaya, A., “Balıkesir Kazdağ Yöresinde Çay Olarak Kullanılan Bitkiler Üzerinde Morfolojik, Anatomik ve Palinolojik Çalışmalar”, *XI. Ulusal Biyoloji Kongresi*, Botanik, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 53-57, (24-27 Haziran 1997).
- [11] Kaya, A., “Türkiyede Yetişen *Acinos* Miller Türleri Üzerinde Morfolojik Anatomik ve Kimyasal Araştırmalar”, Doktora Tezi, *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, (Şubat 1997).
- [12] Şahin, F. P., “Bazı *Sideritis* L. Türleri Üzerinde Farmasötik Botanik ve Fitokimyasal Çalışmalar”, Doktora Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, (2003).
- [13] Kılıç, Ö., “Essential Oil Composition of Two *Sideritis* L. Taxa from Turkey: A Chemotaxonomic Approach”, *Asian J. Chem.*, 26(8), 2466-2470, (2014).
- [14] Kirimer, N., Tabanca, N., Ozek, T., Başer, K. H. C., Tumen, G. and Duman, H., “Composition of the Essential Oils from Five Endemic *Sideritis* species”, *J. Essent. Oil Res.*, 15, 221-225, (2003).
- [15] Gonzalez A. G., Fraga, B. M., Hernandez M. G. and Luis, J. G., “Constituents of Labiatae 17. New Diterpenes from *Sideritis candicans*”, *Phytochemistry*, 12, 2721-2723, (1973).
- [16] Karahan, A., “*Sideritis gulendamiae* H. Duman & F. A. Karavelioğulları Bitkisinin Diterpen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ağustos, (2007).

- [17] Halfon, B., Çiftçi, E. and Topçu, G., “Flavonoid constituents of *Sideritis caesarea*”, *Turk. J. Chem.*, 37, 464-472, (2013).
- [18] Tekeli, Y., “Antioxidant Activities and Phenolic Compounds of Two Endemic Taxa of Labiatae *Sideritis*”, *Rev. Chim. (Bucharest)*, 63(5), 465-469, (2012).
- [19] Mendoza-Heuer, I., “Datos comparativos acerca de especies mediterráneas y macaronésicas del genero *Sideritis*”, *Vieraea*, 61–71, (1977).
- [20] Aytaç, Z. and Aksoy, A., “A New *Sideritis* species (Labiatae) from Turkey”, *Flora Meditt*, 10, 181-184, (2000).
- [21] Duman, H., Kırmıer, N., Ünal, F., Güvenç, A. ve Şahin, P., “Türkiye *Sideritis* L. Türlerinin Revizyonu”, Proje No: TBAG-1853(199T090), (2005).
- [22] Cowan, M. M., “Plant Products as Antimicrobial Agent”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 12(4),564, (1999).
- [23] Koçyiğit, M., “Yalova İlinde Etnobotanik Bir Araştırma”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, (2005).
- [24] Raza, M., “A Role for Physicians in Ethnopharmacology and Drug Discovery”, *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 297-301, (2006).
- [25] Yesilada, E., Ezer, N., “The antiinflammery Activities Some *Sideritis* Species Growing in Turkey”, *Int. J. Crude Drug Res.*, 27, 38, (1989).
- [26] Öztürk, Y., Aydın, S., Öztürk, N. and Başer, K. H. C., “Effects of Extracts from Certain *Sideritis* Species on Swimming Performance in Mice”, *Phytother. Res.*, 10, 70-73, (1996).
- [27] Çöl, Ç., “*Sideritis tmolea* P.H. Davis Bitkisinin Diterpen Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, (2007).

- [28] Başer, H. C., Vural, M., Tmen, G., Akyalçın, H. and Satıl, F., “Two New Records for Flora of Turkey”, *Turkish, J. Botany*, 19(4), 489-490, (1995).
- [29] Duman, H., Aytaç, Z., Ekici, M., Karavelioğulları, F., Dönmez, A. A. and Duran, A., “Three New Species (Labiatae) from Turkey”, *Fl. Medit.*, 5, 221-228, (1995).
- [30] Duman, H., Başer, H. C. and Aytaç, Z., “Two New Species and A New Hybrid from Anatolia”, *Tr. J. of Botany*, 22(1), 51-57, (1998).
- [31] Bondi, L. M., Bruno, M., Piozzi, F., Başer, K. H. C. and Simmonds, S. J., “Diversity and Antifeedant Activity of Diterpenes from Turkish Species of *Sideritis*”, *Biochemical Systematics and Ecology*, 28, 299-303, (2000).
- [32] Aydın, S., Ozturk, Y., Beis, R. and Baser, K. H. C., “Investigation of *Origanum Onites*, *Sideritis congesta* and *Satureja cuneifolia* Essential Oils for Analgesic Activity”, *Phytotherapy Res.*, 10, 342-344, (1996).
- [33] Tunalier, Z., Ozturk, N., Kosar, M., Baser, K. H. C., Duman, H. ve Kirimer, N., “Bazı *Sideritis* Türlerinin Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi”, (Eds: Başer, K. H. C. ve Kirimer, N.), *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Eskiřehir, (29-31 Mayıs 2002).
- [34] Ezer, N., Usluer, G., Gneř, I. and Erol, K., “Antibacterial Activity of Some *Sideritis* Species”, *Fitoterapia*, 65, 549, (1994).
- [35] Ezer, N. and Abbasoğlu, U., “Antimicrobial Activity of Essential Oils of Some *Sideritis* Species Growing in Turkey”, *Fitoterapia*, 67, 474, (1996).
- [36] Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Chinou, I. B. and Mitakou, S., “Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Five Taxa of *Sideritis* from Greece”, *J. Agric. Food Chem.*, 49 (2), 811–815, (2001).

- [37] Todorova, M. N., Christov, R. C. and Evstatieva, L. N., “Essential Oil Composition of Three *Sideritis* from Bulgaria”, *J. Essent. Oil Res.*, 12, 418–420, (2000).
- [38] Sezik, E., Ezer, N., Hueso-Rodriguez, J. A. and Rodriguez, B., “Ent-2- α -Hydroxy-13-epimanoyloxide from *Sideritis perfoliata*”, *Phytochemistry*, 24, 2739, (1985).
- [39] Dişli, A., Yildirir, Y. and Yasar, A., “Galaticat a New Labdane from *Sideritis galatica*”, *J.Fac. of Pharmacy*, 31, 83-85, (2002).
- [40] Topcu, G., Goren, A. C., Kiliç, T., Yildiz, Y. K. and Tümen, G., “Diterpenes from *Sideritis trojana*”, *Natural Product Letters*, 16(1), 33-37, (2002).
- [41] Çarıkçı, S., Çöl, Ç., Kılıç, T. and Azizoğlu, A., “Diterpenoids From *Sideritis tmolea* P. H. Davis” *Rec. Nat. Prod.*, 1(4), 44-50, (2007).
- [42] Erkan, N., Çetin, H. and Ayranci, E., “Antioxidant activities of *Sideritis congesta* Davis et Huber-Morath and *Sideritis arguta* Boiss et Heldr: Identification of Free Flavonoids and Cinnamic Acid Derivatives”, *Food Res. Int.*, 44, 297-303, (2011).
- [43] Kırmızıbekmez, H., Arıburnu, E., Masullo, M., Festa, M., Capasso, A., Yeşilada, E. and Piacenta, S., “Iridoid, Phenylethanoid and Flavonoid Glycosides from *Sideritis trojana*”, *Fitoterapia*, 83, 130–136, (2012).
- [44] Kara, M., Sahin, H., Turumtay, H., Dınc, S. and Gumuscu, A., “The Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Tea with Different Parts of *Sideritis condensata* at Different Steeping Conditions”, *J. Food Nutr. Res.*, 2(5), 258-262, (2014).
- [45] Topcu, G., Goren, A. C., Kiliç, T., Yildiz, Y. K. and Tümen, G., “Diterpenes from *Sideritis argyrea*”, *Fitoterapia*, 72 (1), 1-4, (2001).

- [46] Topçu, G., Gören, A.C., Kılıç, T., Yıldız, Y.K. and Tümen, G., “Diterpenes from *Sideritis sipylea* and *S. dichotoma*”, *Turkish Journal of Chemistry*, 26, (2002), 189-194.
- [47] Kılıç, T., Yıldız, Y. K., Gören, A. C., Tümen, G. and Topçu, G., “Phytochemical Analysis of Some *Sideritis* Species of Turkey”, *Chemistry of Natural Compounds*, 39(5), 453-456 (2003).
- [48] Kılıç, T., Yıldız, Y. K., Topçu, G., Gören A. C., Ay, M., Bodige, S. G. and Watson, W. H., “Crystal Structure Sideroxol from *Sideritis leptoclada*”, *Journal of Chemical Crystallography*, 35(8), 647-650 (2005).
- [49] Aslan, İ., Kılıç, T., Gören, A. C. and Topçu, G., “Toxicity of Acetone Extract of *Sideritis trojana* and 7-epicandiciol, 7-epicandiciol diacetate and 18-acetoxysideroxol Against Stored Pests *Acanthoscelides obtectus* (Say), *Sitophilus granarius* (L.) and *Ephestia kuehniella* (Zell.)”, *Industrial Crops and Products*, 23(2), 171-176, (2006).
- [50] Kılıç, T., “A New and Known Diterpenoids From *Sideritis stricta* Boiss. & Heldr. and Their Biological Activities”, *Molecules*, 11, 257-262, (2006).
- [51] Kılıç, T., Carikci, S., Topcu, G., Aslan, I. and Goren, A.C., “Diterpenoids from *Sideritis condensata*. Evaluation of Chemotaxonomy of *Sideritis* Species and Insecticidal Activity”, *Chemistry of Natural Compounds*, 45(6), 918-920, (2009).
- [52] Çarıkcı, S., Kılıç, T., Azizoğlu, A. and Topçu, G., “Chemical Constituents of Two Endemic *Sideritis* Species from Turkey with Antioxidant Activity”, *Rec. Nat. Prod.*, 6(2), 101-109, (2012).
- [53] Çarıkcı, S., “Bazı *Sideritis* (*Sideritis niveotomentosa*, *Sideritis hololeuca*, *Sideritis brevidens*) Türlerinin Diterpenik Bileşiklerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Balıkesir, (2010).

- [54] Odabaş Köse, E., Deniz, İ. G., Sarıkürkçü, C., Aktaş, Ö. and Yavuz, M., “Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidant Activities of the Essential Oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P.H. Davis) Endemic in Turkey”, *Food Chem Toxicol*, 48(10), 2960-2965, (2010).
- [55] Topçu, G., Barla, A., Gören, A.C., Bilsel, G., Bilsel, M. and Tümen, G., “Analysis of the Essential Oil Composition of *Sideritis albiflora* Using Direct Thermal Desorption and Headspace GC-MS Techniques”, *Turk. J. Chem.*, 29, 525-529, (2005).
- [56] Kırimer, N., Başer, K. H. C., Demirci, B. and Duman, B., “Essential Oils of *Sideritis* Species of Turkey Belonging to Section *Empedoclia*”, *Chem. Nat. Comp.*, 40(1), 53-57, (2004).
- [57] Kırimer, N., Tabanca, N., Demirci, B., Başer, K. H. C., Duman, H. and Aytaç, Z., “The Essential Oil of A New *Sideritis* Species: *Sideritis ozturkii* Aytaç and Aksoy”, *Chemistry of Natural Compounds*, 37, 234-237, (2001).
- [58] Karabörklü, S., “Chemical Characterization of *Sideritis perfoliata* L. essential oil Its Fumigant Toxicity Against Two Pest Insects”, *J. Food, Agri. Environ.*, 12(2), 434-437, (2014).
- [59] Çalikoğlu, E., Kırılan, M. ve Bayrak, A., “Uçucu Yağ Nedir, Nasıl Üretilir ve Türkiye’deki Durumuna Genel Bir Bakış”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, (24-26 Mayıs 2006).
- [60] Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., “Biological Effects of Essential Oils-A Review”, *Food and Chemical Toxicology*, 46, 446-475, (2008).
- [61] Bağcı, E. ve Dığrak, M., “Bazı Gökmar Türleri Uçucu Yağlarının İn Vitro Antimikrobiyal Etkileri”, *Tr. J. of Biology*, 21, 273-281, (1997).

- [62] Svoboda, K. P., Hampson, J., and Hunter, E. A., "Secretory Tissues: Storage and Chemical Variation of Essential Oils in Secretory Tissues of Higher Plants and Their Bioactivity", *J. Aromatherapy*, 9(3): 124-131, (1999).
- [63] Sakar, M. K., Tanker, M., *Fitokimyasal Analizler Tanım, Miktar Tayini ve İzolasyon*, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fak. Yay. No:67, 181, (1991).
- [64] Kılıç, A., "Uçucu Yağ Elde Etme Yöntemleri", *Bartın Orman Fakültesi Dergisi*, 10, 13, (2008).
- [65] Baser, K. H. C., "Aromatic Biodiversity among the Flowering Plant Taxa of Turkey", *Pure Appl. Chem.* 74, 527–545, (2002).
- [66] Robbers, J. E., Speedie, M. K. and Tyler, V. E., *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, (eds: Balado, D., Williams & Wilkins), USA, 81-107, (1996).
- [67] Grassmann, J. and Elstner, E.F., "Essential Oils/Properties and Uses", *Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition*, Elsevier Science Ltd., 2177-2184, (2003).
- [68] Sell, C. S., *A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry*, Cambridge UK: The Royal Society of Chemistry, 2, (2003).
- [69] Hornback, J. M. and Murugaverl, B., *Organic Chemistry 2nd Edition by Hornback*, USA : Thomson Brooks/Cole, 1184-1219, (2006).
- [70] Finar, I. L., B. Sc., Ph. D. (Lond.), A. R. I. C., *Organic Chemistry Vol.2 Stereochemistry and The Chemistry of Natural Products*, London: Longman, 354-358, 440-441, 451,459, (1959).

- [71] Gören, A. C., “Bazı *Sideritis* (*Sideritis Argyrea*, *Sideritis Dichotoma*, *Sideritis Trojana*) Türlerinin Diterpenik Bileşenlerinin İzolasyonu ve Yapılarının Tayini”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Ana Bilim Dalı, Balıkesir, (2002).
- [72] Tanker, M. ve Tanker, N., *Farmakognozi*, 2, Ankara: Ankara Üniv. Eczacılık Fak. Yay. No:65, 282-284, 287, 300, 317, 332, 343-344, (1990).
- [73] Kılıç, T., “*S. lycia* ve *S. leptoclada* Türlerinin Diterpen Bileşiklerinin İzolasyonu ve Karakterizasyonu”, Doktora Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir (2002).
- [74] Hanson, J. R., *Natural Products: the Secondary Metabolites, Tutorial Chemistry Texts*, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 112, (2003).
- [75] Manitto, P., *Biosynthesis of natural products*, Connecticut, United States: Ellis harwood Ltd., 255-262, (1981).
- [76] Heyen, U. and Harder, J., “Geranic acid formation, an initial reaction of anaerobic monoterpene metabolism in denitrifying *Alcaligenes defragrans*”, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 3004–3009, (2000).
- [77] Çarıkçı, S., “*S. condensata* Boiss. & Heldr Bitkisinin Fitokimyasal Analizi”, Yüksek Lisans Tezi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kimya Anabilim Dalı, Balıkesir, (2005).
- [78] Solomons, G. and Fryhle, C., *Organik Kimya, 7. basımdan Çeviri*, (Çev: Okay, G., Yıldır, Y.), İstanbul, 1152-1155, (2002).
- [79] Gomes-Carneiro, M. R., Dias, D. M. M., De Oliveira, A. C. A. X. and Paumgartten, F. J. R., “Evaluation of Mutagenic and Antimutagenic Activities of α -bisabolol in the Salmonella/Microsome Assay”, *Mutat. Res.*, 585, 105-112, (2005).

- [80] Pauli, A., “ α -Bisabolol from Chamomile - A Specific Ergosterol Biosynthesis Inhibitor?”, *Int. J. Aromather.*, 16(1), 21–25, (2006).
- [81] Bhatia, S. P., McGinty, D., Letizia, C. S. and Api, A. M., “Fragrance Material Review on Alpha-bisabolol”, *Food Chem. Toxicol.*, 46, 72-76, (2008).
- [82] Kamatou, G. P. P. and Viljoen, A. M., “A Review of the Application and Pharmacological Properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich Oils’, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 87, 1-7, (2010).
- [83] Seki, T., Kokuryo, T., Yokoyama, Y., Suzuki, H., Itatsu, K., Nakagawa, A., et al., “Antitumor Effects of α -bisabolol Against Pancreatic Cancer”, *Cancer Sci.*, 102, 2199-2205, (2011).
- [84] Maurya, A. K., Singh, M., Dubey, V., Srivastava, S., Luqman, S. and Bawankule, D. U., “ α -(-)-bisabolol Reduces Pro-inflammatory Cytokine Production and Ameliorates Skin Inflammation”, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 15, 173-181, (2014).
- [85] Sköld M., Karlberg, A. T., Matura M. and Börje, A., “The Fragrance Chemical Beta-caryophyllene-air Oxidation and Skin Sensitization”, *Food Chem. Toxicol.*, 44, 538-545, (2006).
- [86] McMurry, J., *Fundamentals of Organic Chemistry*, United Kingdom: Brooks Cole Publishing Company, 1099-1123, (1986).
- [87] Ulubelen, A. and Topçu, G., “Chemical and Biological Investigations of *Salvia* Species Growing in Turkey”, *Studies in Natural Product Chemistry*, 20, 659-718, (1998).
- [88] Ulubelen, A., Topçu, G. and Kolak, U., “Chemical and Biological Evaluation of Genus *Teucrium*”, *Studies in Natural Product Chemistry*, 23, 591-648, (2000).

- [89] Ertaş, A., “Endemik iki *Sideritis* türü *S. arguta* ve *S. congesta*'nın Diterpenik Bileşiklerinin İzolasyonu ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2005).
- [90] Hanson, J. R., “Diterpenoids”, *Natural Product Reports*, 15, 93-110, (1998).
- [91] Ulubelen, A., Topçu, G., Sönmez, U., Eriş, C. and Özgen, U., “Norsesterterpenes and Diterpenes from the Aerial Parts of *Salvia limbata*”, *Phytochemistry*, 43, 431,(1996).
- [92] Storg, P. A., “Food Carotenoids and Cancer Prevention: An Overview of Current Research”, *Trends in Food Science and Tech.*, Vol.8, 406-413, (December 1997).
- [93] Bağdatlıoğlu, N. ve Demirbaker, B., “Gıda İşlemede Karotenoidlerde Meydana Gelen Gelişmeler”, *Gıda*, 9, 48-51, (1999).
- [94] Krinsky, N. I. and Johnson, E. J., “Carotenoid Actions and Their Relation to Health and Disease”, *Mol. Aspects Med.*, 26, 459-516, (2005).
- [95] Woutersen, R. A., Wolterbeek, A. P. M., Appel, M. J., Van der Berg, H., Goldbohm, R. A. and Feron V. J. “Safety Evaluation of Synthetic β -carotene”, *Crit. Rev. Toxicol.*, 29, 515-542, (1999).
- [96] Saldamlı, İ., *Gıda Kimyası*, Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 463-492, (2007).
- [97] Alpkent, Z. ve Demir, M., “Gıdalarda Bulunan Antioksidan Maddeler ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, (24-26 Mayıs 2006).
- [98] Kılınç, K. ve Kılınç, A., “Oksijen Toksisitesinin Aracı Molekülleri Olarak Oksijen Radikalleri”, *Hacettepe Tıp Dergisi*, 33(2), 110-118,(2002).

- [99] Yen, G. C., Duh, P. D. and Tsai, C. L., "Relationship Between Antioxidant Activity and Maturity of Peanut hulls.", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 67-70, (1993).
- [100] Prior, R. L. and Cao, G. H., "Analysis of Botanicals and Dietary Supplements for Antioxidant Capacity, A Review", *Journal of AOAC International*, 83 (4), 950-956 (2000).
- [101] İnce, A. E., "Usage of Microwave and Ultrasound in the Extraction of Essential Oils and Phenolic Compounds", Yüksek Lisans Tezi, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi*, (Şubat 2011).
- [102] Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S., "Phenolic Compounds in Plants and Agriindustrial By-products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses", *Food Chemistry*, 99, 191-203, (2006).
- [103] Dillard, C. J. and German, J. B., "Phytochemicals: Nutraceuticals and Human Health", *J. Sci. Food Agric.*, 80, 1744-1756, (2000).
- [104] Prior, R. L., "Fruits and Vegetables in the Prevention of Cellular Oxidative Damage", *Am. J. Clin. Nutr.*, 78(Suppl), 570-578, (2003).
- [105] Shahidi, F. and Naczk, M., *Food Phenolics*, Lanchester, USA: Technomic Publishing Company Book, 199-225, (1995).
- [106] Cemeroglu, B., *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi*, 1. Cilt, Ankara: Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, 77-88, (2004).
- [107] Göğüş, F. ve Fadiloğlu, S., *Food Chemistry*, Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 319-339, (2006).
- [108] Margalit, I., *Concepts in Wine Technology*, San Francisco: The Wine Appreciation Guild, 263, (2004).

- [109] Nizamlioglu, M. N. ve Nas, S., “Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 5(1), 20-35, (2010).
- [110] Jackson, R. S., *Wine Science: Principles, Practice, Perception*, Academic Press., 633, (2000).
- [111] Fraga, C. G. (Ed.), *Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition and Pharmacology*, New Jersey: Wiley Publication, 593, (2010).
- [112] Fennema, O. R., *Food chemistry-3rd Edition*, New York: Marcel Dekker, 1262, (1996).
- [113] Gören, A. C., Çıkrıkçı, S., Çergel, M. and Bilsel, G., “Rapid Quantitation of Curcumin in Turmeric Via NMR and LC-tandem Mass Spectrometry”, *Food Chemistry*, 113(4), 1239-1242, (2009).
- [114] Williams, A., Rosslein, M. and Ellison, S. L. R. (Eds.), *EURACHEM/CITAC Guide, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement second ed.*, (April 2000).
- [115] Gören, A. C., Bilsel, G. and Bilsel, M., “Rapid and Simultaneous Determination of 25-OH-Vitamin D₂ and D₃ in Human Serum by LC/MS/MS: Validation and Uncertainty Assesment”, *Journal of Chemical Metrology*, 1(1), 1-10, (2007).
- [116] Blois, M. S., “Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical”, *Nature*, 181, 1199–1200, (1958).
- [117] Miller, H. E., “A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 91-98, (1971).

- [118] Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M. and Karademir, S. E., “Mechanism of Antioxidant Capacity Assays and the CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity) Assay”, *Microchimica Acta.*, 160, 413-419, (2008).
- [119] Özyürek, M., Bener, M, Güçlü, K., Dönmez, A. A., Selçuk, S. S., Pırıldar, S., Meriçli, A. H. and Apak, R., “Evaluation of Antioxidant Activity of Crataegus Species Collected from Different Regions of Turkey”, *Records Natural Products*, 6, 263-277, (2012).
- [120] Apak, R., Güçlü, K., Demirata, B., Özyürek, M., Çelik, S. E., Bektaşoğlu, B., Berker, K. I. and Özyurt, D., “Comparative Evaluation of Various Total Antioxidant Capacity Assays Applied to Phenolic Compounds with the CUPRAC Assay”, *Molecules*, 12, 1496-1547, (2007).
- [121] Ellman G. L., Courtney, K. D., Andres, V. and Featherston, R. M., “A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity”, *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95, (1961).
- [122] Hatipoğlu, S., “*Salvia Adenophylla* ve *Salvia Verticillata* Subsp. *Amasiaca* Bitkilerindeki Sekonder Metabolitlerin Aktivite Odaklı İzolasyonu ve Yarı Sentetik Türevlerinin Antioksidan ve Antikolinesteraz Aktivitelerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2010).
- [123] Andrews, J. M., “BSAC Standardized Disc Susceptibility Testing Method (Version 4)”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, 60-76, (2005).
- [124] Türker, H., Yıldırım, B. A., Karakaş, P. F. and Köylüoğlu, H., “Antibacterial Activities of Extracts from Some Turkish Endemic Plants on Common Fish Pathogens”, *Turkish Journal of Biology*, 33, 73-78, (2009).
- [125] Fraga, B. M., Hernandez, M.G., Santana, J. M. H., Artega, J. M., “Diterpenes from *Sideritis ferrensis*”, *Phytochemistry*, 30 (3), (1991), 913-915.

- [126] Algarra, J., Garcia-Granadas, A., Buruaga, A. S. D., Buruaga, J. M. S., “Diterpenoids from *Sideritis varoi*”, *Phytochemistry*, 22(8), 1779-1782, (1983).
- [127] Piozzi F., Bruno M., Rosselli S., Maggio A., “The Diterpenoids From The Genus *Sideritis*”, *Studies in Natural Products Chemistry*, 33, 493-540, (2006).
- [128] Venturella, P., Bellino, A., Marino, M.L., “A Diterpene, Distanol, from *Sideritis distans*”, *Phytochemistry*, 28, 1976-1977, (1989).
- [129] Topçu, G., Gören, A. C., “Biological Activity of Diterpenoids Isolated from Anatolian Lamiaceae Plants”, *Rec. Nat. Prod.*, 1(1), 1-16, (2007).
- [130] Topçu, G., Tümen, G., Kılıç, T., Gören, A. C., Barla, A., Türkmen, Z., and Kingston, D.G. I., “Bioactive Turkish Plant Extracts and Their Constituents”, *Innovations in Chemical Biology*, 6, 61-81, (2009).