

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



**BAZI FLAVON TÜREVLERİNİN ENZİM KATALİZLİ  
SENTEZİ VE AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BÜŞRA ÇABAŞ**

**BALIKESİR, TEMMUZ - 2017**

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



**BAZI FLAVON TÜREVLERİNİN ENZİM KATALİZLİ  
SENTEZİ VE AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BÜŞRA ÇABAŞ**

**Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Turgut Kılıç (Tez Danışmanı)**

**Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ**

**Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK**

**BALIKESİR, TEMMUZ - 2017**

## KABUL VE ONAY SAYFASI

BÜŞRA ÇABAŞ tarafından hazırlanan “BAZI FLAVON TÜREVLERİNİN ENZİM KATALİZLİ SENTEZİ VE AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 17.07.2017 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. Halil İbrahim UĞRAŞ

Üye  
Yrd. Doç. Dr. Semra IŞIK



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 Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi tarafından 2015/65 nolu proje ile desteklenmiştir.**

## ÖZET

**BAZI FLAVON TÜREVLERİNİN ENZİM KATALİZLİ SENTEZİ VE  
AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BÜŞRA ÇABAŞ  
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. TURGUT KILIÇ)**

**BALIKESİR, TEMMUZ - 2017**

Bu çalışmada;

İlk aşamada bir flavonoid olan kaempferol molekülünün açıl türevinin enzim katalizli reaksiyon ile bölge seçimli olarak sentezlenmesi amaçlanmıştır. Reaksiyonda enzim olarak *Candida antarctica*'dan elde edilen akrilik reçine lipaz (Lipase acrylic resin from *Candida antarctica*, CAL-A) ve *Pseudomonas fluorescens*'den elde edilen amano lipaz (Amano Lipase from *Pseudomonas fluorescens*, PSL), açılleyici ajan olarak da etil asetat ve vinil asetat kullanılmıştır. Elde edilmesi beklenen hedef molekül, 7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4-on (B-1) molekülünün yapısı <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektroskopileri kullanılarak incelenmiştir.

İkinci aşamada ise kaempferol molekülünün açıl türevi, enzim kullanılmadan asetik anhidrit ve piridin kullanılarak sentezlenmiştir. Hedeflenen ve elde edilen 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4-on (B-2) molekülünün yapısı FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektroskopileri kullanılarak aydınlatılmıştır.

Üçüncü aşamada ise kaempferol molekülü ve elde edilen açıl türevinin enzimatik ve biyolojik aktiviteleri incelenmiştir. Fizyolojik önemleri oldukça yüksek olan ksantin oksidaz (XO) enziminin afinite etkisi ve karbonik anhidraz (CA) enzimine inhibisyon etkisi incelenirken, antioksidan aktivite tayini için, (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) DPPH serbest radikali giderim aktivitesi, lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi ( $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit) ve Cu<sup>+2</sup> indirgeme kapasitesi (CUPRAC) yöntemleri kullanılmıştır. Ayrıca bu bileşiklerin asetil kolinesteraz ve bütiril kolinesteraz inhibisyon etkileri (Antikolinesteraz aktivitesi) incelenmiş olup yapılan aktivite çalışmalarında, sentezlenen 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4-on (B-2) bileşiğinin, çıkış maddesi olan kaempferole göre daha düşük aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.

**ANAHTAR KELİMELER:** Kaempferol, flavonoid, CAL-A, PSL, anti-alzheimer aktivite, antioksidan aktivite, enzim katalizli.

## ABSTRACT

### ENZYME-CATALYZED SYNTHESIS OF SOME FLAVONOIDS DERIVATIVES AND INVESTIGATION OF THEIR ACTIVITIES

MSC THESIS

BÜŞRA ÇABAŞ

BALIKESİR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE

CHEMISTRY

(SUPERVISOR: PROF. DR. TURGUT KILIÇ)

BALIKESİR, JUNE 2017

In this study,

In the first step, the acyl derivative of kaempferol molecule, a flavonoid, is aimed to be synthesized region-selectively by enzyme-catalyzed method.

In the reaction, Lipase acrylic resin from *Candida antarctica*, (CAL-A) and Amano Lipase from *Pseudomonas fluorescens* (PSL), were used as enzymes, and ethyl acetate and vinyl acetate were used as acylating agents. The structure of the expected molecule 7-acetoxy-3,5-dihydroxy-2-(4'-acetoxyphenyl) chromen-4-on (B-1) was determined using <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy.

In the second step, the acyl derivative of the kaempferol was synthesized with by using acetic anhydride and pyridine without using the enzyme. The structure of targeted and gained molecule; 3,5,7-triacetoxy-2-(4'-acetoxyphenyl) chromen-4-on (B-2) was identified by FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR spectroscopy.

In the third step, the enzymatic and biological activities of the kaempferol molecule and the obtained acyl derivative were investigated. When the affinity effect of xanthine oxidase (XO) enzyme and the inhibition effect of carbonic anhydrase (CA) enzyme which have high physiological importance are investigated, for antioxidant activity three methods were used: DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical scavenging activity, lipid peroxidation inhibition activity (β-carotene-linoleic acid method) and Cu<sup>+2</sup> reduction capacity (CUPRAC) methods. In addition, acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibition activity (Anticholinesterase activity) of these molecules were investigated. Activity studies had showed that the synthesized 3,5,7-triacetoxy-2-(4'-acetoxyphenyl) chromen-4-one (B-2) has weaker activity then kaempferol.

**KEYWORDS:** Kaempferol, flavonoid, CAL-A, PSL, anticholinesterase activity, antioxidant activity, enzyme-catalyzed

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>i</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>ii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>iii</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>SEMBOLE ve KISALTMALAR LİSTESİ</b> .....	<b>viii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>x</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. FLAVONOİDLER</b> .....	<b>2</b>
2.1 Flavonoidlerin Yapı ve Özellikleri .....	2
2.2 Flavonoid Sınıfları.....	6
2.2.1 Flavonlar .....	6
2.2.1.1 Hidroksil ve Metoksil İçeren Flavonlar .....	7
2.2.1.2 C-Metilflavonlar.....	11
2.2.1.3 Metilendioksiflavonlar .....	11
2.2.1.4 Prenil İçeren Flavonlar .....	12
2.2.2 Flavonoller .....	12
2.2.2.1 Mono-O-süstitüe Flavonoller .....	13
2.2.2.2 Di-O-süstitüe flavonol.....	13
2.2.2.3 Tri-O-süstitüe Flavonoller.....	13
2.2.2.4 Tetra-O-süstitüe Flavonoller .....	14
2.2.2.5 Penta-O-süstitüe Flavonoller.....	14
2.2.3 Flavanonlar .....	15
2.2.4 İzoflavonoidler .....	16
2.2.5 Kalkonoidler .....	18
2.2.6 Antosiyanidinler.....	20
2.2.7 Flavonoid Glikozitler .....	21
2.2.8 Neoflavonoidler .....	21
2.3 Flavonoidlerin İzolasyonu ve Analiz Teknikleri.....	22
2.3.1 Flavonoidlerin Bitkilerden İzolasyonu .....	22
2.3.2 Flavonoidlerin Kromatografik Analiz Yöntemleri .....	22
2.3.2.1 Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografisi (ITK).....	22
2.3.2.2 Kolon Kromatografisi .....	23
2.3.3 Flavonoidlerin Morötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis).....	23
2.3.4 Flavonoidlerin Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi.....	24
2.3.4.1 Proton Manyetik Rezonans ( <sup>1</sup> H-NMR) Spektroskopisi .....	24
2.3.4.2 Karbon-13 Manyetik Rezonans ( <sup>13</sup> C-NMR) Spektroskopisi .....	25
2.3.5 Flavonoidlerin Kütle Spektroskopisi (MS).....	25
<b>3. BİYOLOJİK AKTİVİTE</b> .....	<b>27</b>
3.1 Flavonoidlerin Biyolojik Aktiviteleri .....	27
<b>4. KAEMPFEROL</b> .....	<b>29</b>
<b>5. ENZİMATİK SENTEZ</b> .....	<b>31</b>
5.1 Flavonoidlerin Enzimatik Sentezi .....	31

5.2	Enzimatik Sentezin Avantajları.....	33
<b>6.</b>	<b>DENEYSEL BÖLÜM .....</b>	<b>35</b>
6.1	Kimyasal Materyaller .....	35
6.2	Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri .....	35
6.3	Sentez Bölümü .....	36
6.3.1	Çözücülerin Saflaştırılması.....	36
6.3.2	Asetik Anhidrit Sentezi.....	36
6.3.3	7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on Sentezi (B-1) .....	38
6.3.4	3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on (B-2) Sentezi .....	39
6.4	Kromatografik Yöntemler .....	40
6.4.1	Kolon Kromatografisi .....	40
6.4.2	İnce Tabaka Kromatografisi .....	40
6.4.3	Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi.....	41
6.5	Spektroskopik Yöntemler.....	41
6.5.1	Infrared Spektroskopisi (IR).....	41
6.5.2	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi ( <sup>1</sup> H-NMR, <sup>13</sup> C-NMR).....	42
6.6	Biyolojik Aktivite.....	42
6.6.1	DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi.....	42
6.6.2	Lipid Peroksidasyonu İnhibisyonu Aktivitesi ( $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi) .....	43
6.6.3	Cu <sup>+2</sup> İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC) .....	45
6.6.4	Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi.....	45
6.7	Kaempferol ve B-2 moleküllerinin enzim aktivitelerinin incelenmesi ..	46
6.7.1	Ksantin Oksidaz(XO) Enzimi Üzerine Afinite Etkisinin İncelenmesi.....	46
6.7.2	Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi Aktivite Tayini .....	47
6.7.2.1	CO <sub>2</sub> -Hidrataz Aktivitesi .....	47
<b>7.</b>	<b>BULGULAR .....</b>	<b>49</b>
7.1	Kaempferol.....	49
7.1.1	Kaempferolün FT-IR spektrumu .....	49
7.2	3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on (B-2).....	50
7.2.1	B-2'nin FT-IR Spektrumu .....	50
7.2.2	B-2'nin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu.....	51
7.2.3	B-2'nin <sup>13</sup> C-NMR Spektrumu.....	55
7.3	7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'asetoksifenil) kromen-4-on (B-1) .....	60
7.4	Kaempferol ve B-2 Moleküllerinin Enzim Aktiviteleri .....	65
7.4.1	Kaempferol Bileşikliğinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Afinite Etkisi.....	65
7.4.2	Karbonik Anhidraz(CA) Enzimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi .....	66
7.5	Biyolojik Aktivite Sonuçları .....	67
7.5.1	DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları .....	67
7.5.2	$\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları .....	68
7.5.3	Cu <sup>+2</sup> İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC) Sonuçları.....	69
7.5.4	Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları.....	70
<b>8.</b>	<b>SONUÇ VE TARTIŞMA .....</b>	<b>72</b>
<b>9.</b>	<b>KAYNAKLAR.....</b>	<b>74</b>



## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

Şekil 2.2: Flavonoidlerin genel iskeleti. ....	2
Şekil 2.3: Auron.....	3
Şekil 2.4: (1)Flavan, (2)Flavon.....	3
Şekil 2.5: İzoflavan. ....	3
Şekil 2.6: (1)İzoflavan, (2)3-Fenilkumarin, (3)Pterokarpan. ....	4
Şekil 2.7: (1)1,1- Difenilpropan, (2)Neoflavonoid.....	4
Şekil 2.8: Flavonların genel gösterimi.....	6
Şekil 2.9: Mono- <i>O</i> -süstitüe flavon örnekleri.....	7
Şekil 2.10: Di- <i>O</i> -süstitüe flavon örnekleri. ....	8
Şekil 2.11: Tri- <i>O</i> -süstitüe flavon örnekleri.....	8
Şekil 2.12: Tetra- <i>O</i> -süstitüe flavon örnekleri. ....	9
Şekil 2.13: Penta- <i>O</i> -süstitüe flavon. ....	9
Şekil 2.14: Hekza- <i>O</i> -süstitüe flavon.....	10
Şekil 2.15: Hepta- <i>O</i> -süstitüe flavon. ....	10
Şekil 2.16: <i>C</i> -Metilflavon. ....	11
Şekil 2.17: Metilendioksiflavon.....	11
Şekil 2.18: Prenil içeren flavon. ....	12
Şekil 2.19: Flavonollerin genel gösterimi.....	12
Şekil 2.20: Mono- <i>O</i> -süstitüe flavonol. ....	13
Şekil 2.21: Di- <i>O</i> -süstitüe flavonol örnekleri. ....	13
Şekil 2.22: Tri- <i>O</i> -süstitüe flavonol örnekleri. ....	14
Şekil 2.23: Tetra- <i>O</i> -süstitüe flavonol örnekleri.....	14
Şekil 2.24: Penta- <i>O</i> -süstitüe flavonoller.....	15
Şekil 2.25: Flavanonların genel gösterimi.....	15
Şekil 2.26: Flavanon örnekleri.....	15
Şekil 2.27: (1)1,2-Fenilpropan, (2)3-Fenilkroman. ....	16
Şekil 2.28: Antosiyanidin yapısı ve örnekleri.....	20
Şekil 2.29: Aglikon yapısı. ....	21
Şekil 2.30: Apigenin 7- <i>O</i> -β-D-glukopiranozit yapısı. ....	21
Şekil 2.31: Neoflavonoidlerin genel yapısı. ....	21
Şekil 2.32: Neoflavonoid.....	22
Şekil 2.33: Flavonoidlerde A ve B halkaları. ....	24
Şekil 4.1: Kaempferol. ....	29
Şekil 6.1: Asetik Anhidrit sentezinde kullanılan damıtma düzenekleri. ....	37
Şekil 6.2: Asetik anhidrit molekülünün FT-IR spektrumu. ....	37
Şekil 6.3: Kaempferol asetat sentezinde kullanılan düzenekler. ....	40
Şekil 6.4: Galantamin. ....	46
Şekil 7.1: Kaempferol molekülünün FT-IR spektrumu. ....	49
Şekil 7.2: 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on ..... 50	50
Şekil 7.3: 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on molekülünün FT-IR spektrumu.....	50
Şekil 7.4: 2,3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on (B-2). ....	51
Şekil 7.5: B-2 molekülünün <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (0-12 ppm). ....	52
Şekil 7.6: B-2 molekülünün <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (2.0-2.6 ppm). ....	53
Şekil 7.7: B-2 molekülünün <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (6.2-8.2 ppm). ....	54

<b>Şekil 7.8:</b> B-2'nin <sup>13</sup> C-NMR spektrumu (0-200 ppm).....	56
<b>Şekil 7.9:</b> B-2'nin <sup>13</sup> C-NMR spektrumu (19-32 ppm).....	57
<b>Şekil 7.10:</b> B-2'nin <sup>13</sup> C-NMR spektrumu (123-130 ppm).....	58
<b>Şekil 7.11:</b> B-2'nin <sup>13</sup> C-NMR spektrumu (151-170.5 ppm).....	59
<b>Şekil 7.12:</b> 7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'asetoksifenil) kromen-4-on (B-1). 60	
<b>Şekil 7.13:</b> B-1'in <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (0-8 ppm).....	61
<b>Şekil 7.14:</b> B-1'in <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (6.8-8.2 ppm).....	62
<b>Şekil 7.15:</b> B-1'in <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (1-2.4 ppm).....	63
<b>Şekil 7.16:</b> B-1'in <sup>13</sup> C-NMR spektrumu (0-200 ppm).....	64
<b>Şekil 7.17:</b> Kaempferol'ün Ksantin Oksidaz enzimi üzerine afinite etkisi. ....	65
<b>Şekil 7.18:</b> B-2'nin Ksantin Oksidaz enzimi üzerine afinite etkisi. ....	65
<b>Şekil 7.19:</b> Kaempferol molekülünün Enzimler üzerine inhibisyon etkisi grafiği.....	66
<b>Şekil 7.20:</b> B-1 molekülünün enzimler üzerine inhibisyon etkisi grafiği.....	67
<b>Şekil 7.21:</b> Moleküllerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları (% İnhibisyon) .....	68
<b>Şekil 7.22:</b> Moleküllerin lipid peroksidasyon % inhibisyonu. ....	69
<b>Şekil 7.23:</b> Ekstrelerin Cu <sup>+2</sup> indirgeme kapasitesi (CUPRAC) sonuçları.....	70
<b>Şekil 7.24:</b> Moleküllerin antikolinesteraz aktivite sonuçları (% İnhibisyon)...	71

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa

<b>Tablo 2.1:</b> Flavonoidlerin C3 iskelet yapısına göre sınıflandırılması. ....	5
<b>Tablo 2.3:</b> İzoflavonoid sınıfları.....	17
<b>Tablo 2.4:</b> Kalkonoid sınıfları. ....	19
<b>Tablo 2.5:</b> Flavonoidlerin UV-Vis absorpsiyon alanları. ....	24
<b>Tablo 2.6:</b> Flavonoidlerde bulunan bazı protonların kimyasal kayma değerleri.....	25
<b>Tablo 7.1:</b> Kaempferol ve B-1 bileşiklerinin IC <sub>50</sub> değerleri.....	67
<b>Tablo 7.2:</b> Moleküllerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları ...	68
<b>Tablo 7.3:</b> Moleküllerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları. ....	69
<b>Tablo 7.4:</b> Moleküllerin Cu <sup>+2</sup> indirgeme kapasitesi (CUPRAC) sonuçları.....	69
<b>Tablo 7.5:</b> Moleküllerin AChE ve BChE aktivite sonuçları (% İnhibisyon)....	70

## SEMBOL ve KISALTMALAR LİSTESİ

UV- Vis	: Ultraviyole Görünür Bölge
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
MS	: Mass Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
IR	: Infrared Spektroskopisi
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
CUPRAC	: Cu <sup>+2</sup> İndirgeme Kapasitesi
DTNB	: Dithiobisnitro-benzoate
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
CAL-A	: Lipase acrylic resin from <i>Candida antarctica</i>
CAL-B	: Lipase B <i>Candida antarctica</i> , recombinant from <i>Aspergillus oryzae</i>
PSL	: Amano Lipase from <i>Pseudomonas fluorescens</i>
XO	: Ksantin Oksidaz
B-2	: 3,5,7-triasetoksi-2-(4-asetoksifenil) kromen-4-on
B-1	: 7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4-on
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
AChE	: Asetilkolinesteraz
BChE	: Bütilkolinesteraz
DMF	: Dimetilformamid
BHT	: Bütilenmiş hidroksi toluen
BTA	: Bütilenmiş hidroksi anisol
CA	: Karbonik Anhidraz
EÜ	: Enzim Ünitesi
$\alpha$	: Alfa
$\beta$	: Beta
O	: Orto
°C	: Santigrat Derece
°A	: Angstrom
$\Delta, \delta$	: Delta
mm	: Milimetre
cm	: Santimetre
nm	: Nanometre
mg	: Miligram
$\mu$ g	: Mikrogram
mmol	: Milimol
M	: Molar
mM	: Milimolar
dk	: Dakika
ppm	: Part per million
rpm	: Revolutions per minute
mHz	: Megahertz
Hz	: Hertz
mL	: Mililitre
$\mu$ L	: Mikrolitre

<b>t</b>	: Triplet
<b>d</b>	: Doublet
<b>s</b>	: Singlet
<b>m</b>	: Multiplet
<b>kDa</b>	: Kilodalton

## ÖNSÖZ

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma ve Projeler Birimi tarafında desteklenmiş olup, Balıkesir Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı laboratuvarlarında tamamlanmıştır. Çalışmalarında bana her türlü olanağı sağlayan Kimya Anabilim Dalı Başkanlığı'na teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimin hazırlanmasında danışmanlığımı üstlenen, bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren sayın hocam Prof. Dr. Turgut KILIÇ'a teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında benden ilgisini esirgemeyen, bana her konuda yol gösteren, laboratuvar çalışmalarında destek olan Dr. Sema ÇARIKÇI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisansa başladığım günden beri yanımda olan, yardımını, ilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili Yusuf AKBAY'a sonsuz teşekkürler.

Laboratuvar çalışmalarım sırasında birlikte çalıştığım, her konuda bana yardımcı olan arkadaşım Merve ÖNCÜ'ye, lisansüstü eğitimim boyunca hep yanımda olan arkadaşlarım Ceren UÇAR, Eda KIZILTEPE, Başak GÖRGÜLÜ ve Kübra SİLAY'a çok teşekkür ederim.

Her anımda yanımda olduklarını hissettiren, bana her konuda destek olan ablam Arzu ÇABAŞ DURAN, eniştem ÜMİT DURAN ve yeğenlerime çok teşekkür ederim.

Son olarak büyük fedakârlıklar göstererek bu günlere gelmemi sağlayan, sevgi ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, annem Zahide ÇABAŞ'a ve babam Mesut ÇABAŞ'a sonsuz teşekkürler.

Balıkesir-2017

Büşra ÇABAŞ

## 1. GİRİŞ

Flavonoidler bitki kaynaklı bileşiklerdir ve doğada yaygın olarak bulunurlar [1-2]. Limon kabuğundan 1936 yılında elde edilen flavonoid türevlerinin, P vitamini adı altında [3-4], kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması, flavonoidlere verilen önemi arttırmıştır. Bunun sonucunda flavonoidlerle yapılan çalışmalar hız kazanmış ve 1970'li yıllarda çalışmaların kapsamı genişlemiştir [4]. Bu araştırmaların sonucu olarak bugün bitkilerden 4000'den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır [5]. Flavonoid türü bileşikler sahip oldukları antialerjenik [6], antioksidan [7], antimikrobiyal (antibakteriyel [8-9], antiviral [10], antifungal [11]), antikanser [7-12] ve diğer biyolojik ve farmakolojik özelliklerinden dolayı son yılların ilgi odağı haline gelmişlerdir [13].

Flavonoidlerin endüstriyel uygulamaları yanısıra tıpta, alyuvar ve akyuvarların miktarlarını artırması [14], kolesterol seviyesini dengelemesi [15], hipodinamik olarak bilinen kalp zayıflığını kuvvetlendirmesi ve nabız seviyesini normalleştirmesi [16] gibi özellikleri bulunmaktadır. Bu bakımından yeni flavonoid kaynaklarının açığa çıkarılması ve bunların sentetik uygulamalarının yapılması son derece önemlidir.

Sentetik organik kimyada gerçekleştirilen reaksiyonun yüksek verimli olması, istenen en önemli unsurlardan biridir. Bu verimi arttıracak etmenlerin başında katalizör kullanımı gelmektedir. Özellikle flavonoidler gibi doğal ürünler bitkilerde enzimatik reaksiyonlarla sentezlendiği için, sentetik uygulamalarda enzim katalizli türevlerinin oluşturulması verim artırmak amacıyla kullanılır.

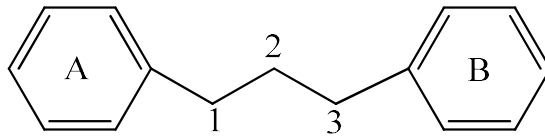
Enzimatik reaksiyonların sahip olduğu avantajlar düşünülürse, biyolojik aktif maddelerin türevlendirilmesi, bu türevlerinin aktivitelerinin incelenmesi oldukça önemlidir.

## 2. FLAVONOİDLER

Bitkilerin ikincil metabolitlerinden olan flavonoidler, doğada bulunan fenolik bileşiklerin en geniş sınıfını oluşturmaktadır. Günümüzde bitkilerden yaklaşık 4000' den fazla flavonoid izole edildiği bilinmektedir. Bitkilerde bulunan bu bileşiklere genellikle meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak ve dallarda rastlanır. Flavonoidlerin bitkilerde antioksidan, ışıktan korunma, savunma ve enzim inhibitörü gibi birçok fonksiyona sahip olduğu yapılan çalışmalarla belirlenmiştir [17-18-19]. Flavonoidler aynı zamanda bitkileri hastalıklara karşı koruma, enerji dönüşümlerine yardımcı olma, büyüme hormonlarına etki etme ve fotosentezi düzenleme özelliklerine de sahiptirler [20]. Bunun dışında flavonoidler, antialerjenik [10], antioksidan [7], antimikrobiyal, antibakteriyel [8-9], antiviral [10], antifungal [11], antikanser [7-12] gibi birçok biyolojik ve farmakolojik aktiviteye sahiptirler.

### 2.1 Flavonoidlerin Yapı ve Özellikleri

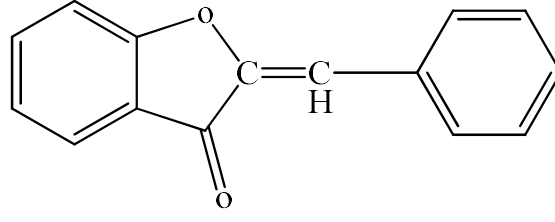
Flavonoidler, iki fenil halkasının propan zinciri ile bağlanması sonucu oluşan 15 karbon atomundan meydana gelen (C6 - C3 - C6) bileşiklerdir [1]. Flavonoidlerin genel gösterimi şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1: Flavonoidlerin genel iskeleti.

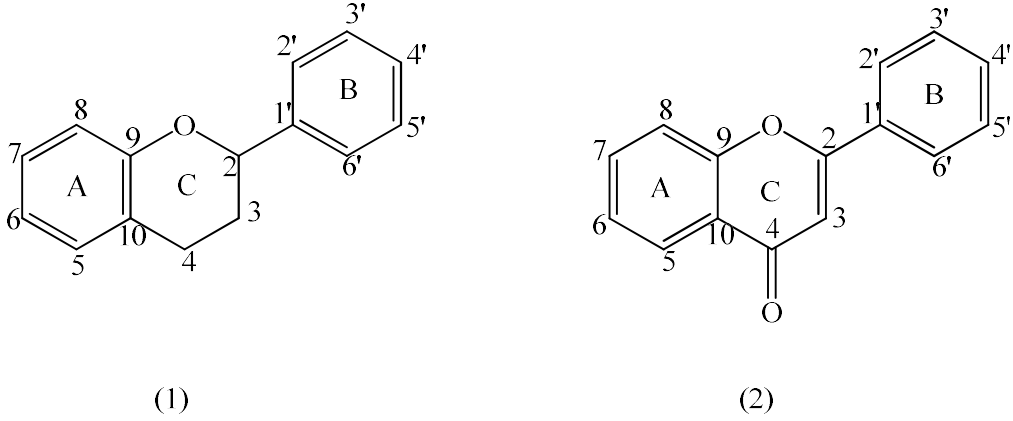
Flavonoidlerin genel yapısındaki propan zinciri, herhangi bir oksijen atomu üzerinden, fenil halkası(A) ile birleşerek beş veya altı üyeli üçüncü bir halka oluşturabilir. Fenil gruplarının propan zincirine 1 ve 3 pozisyonlarında bağlanmasıyla üç halkalı trisiklik bir yapı oluşur. Beş üyeli halkanın eklenmesi ile oluşan yapıya auron, türevlerine ise auronoidler denir.





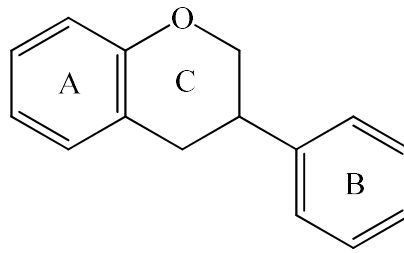
Şekil 2.2: Auron.

Altı üyeli halkanın eklenmesi ile oluşan yapı ise, halkanın yükseltgenme basamağına bağlı olarak flavan ve flavon olarak isimlendirilir. Yaygın olarak flavon türevleri flavonoidler, flavan türevleri ise flavanoidler denir.

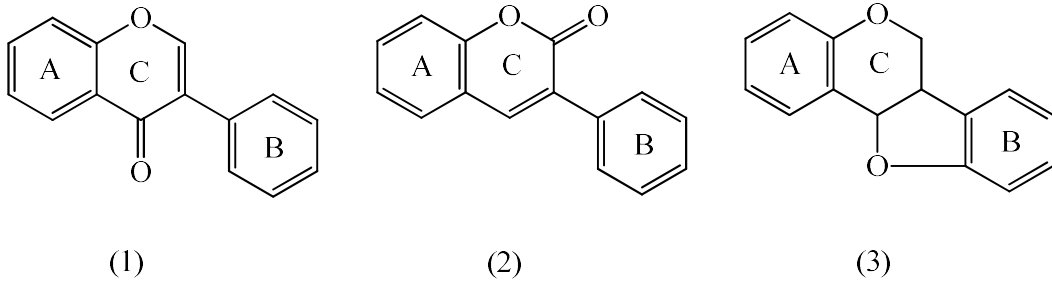


Şekil 2.3: (1)Flavan, (2)Flavon.

Fenil gruplarının propan zincirine 1 ve 2 pozisyonlarında bağlanması ve propan zincirinin uçtaki karbon atomunun (C-3) oksijen atomu üzerinden aromatik halka ile halkalaşması sonucu oluşan yapıya izoflavan denir. İzoflavandaki C halkasının düzenlenmelerine göre izoflavon, 3-fenilkumarin ve pterokarpan yapıları oluşur.

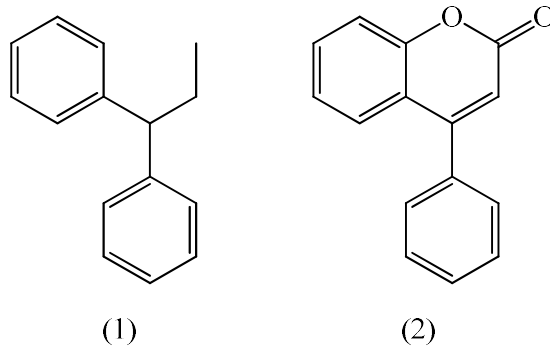


Şekil 2.4: İzoflavan.



Şekil 2.5: (1)İzoflavon, (2)3-Fenilkumarin, (3)Pterokarpan.

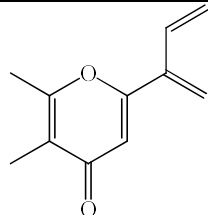
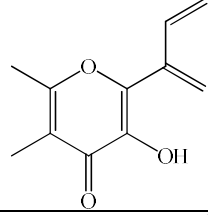
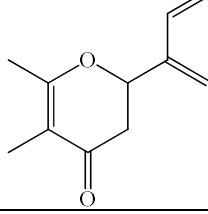
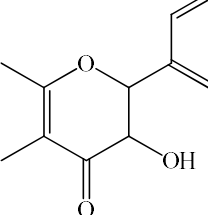
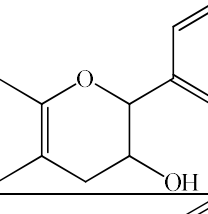
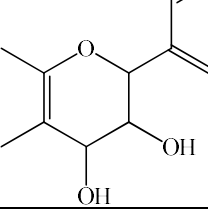
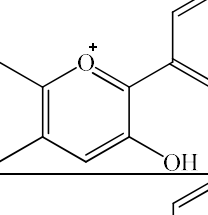
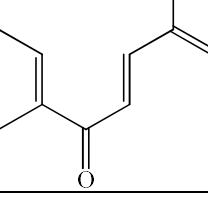
Fenil gruplarının propan zincirine 1 ve 1 pozisyonlarında bağlanmasıyla oluşan ve 1,1-difenilpropan iskeleti içeren bileşik sınıfına neoflavonoid denir.



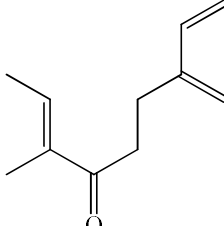
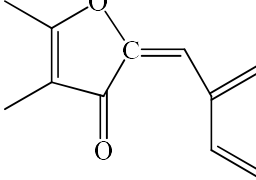
Şekil 2.6: (1)1,1- Difenilpropan, (2)Neoflavonoid.

(C6 - C3 - C6) yapısına sahip doğal bileşikler, fenil gruplarının propan zincirine bağlanma durumuna göre flavonoid, izoflavonoid ve neoflavonoid olmak üzere üç gruba toplanırlar ve bu gruplar C3 sisteminin yapısına göre çeşitli alt sınıflara ayrılır.

**Tablo 2.1:** Flavonoidlerin C3 iskelet yapısına göre sınıflandırılması.

Flavonoid Sınıfları	C3 İskeletinin Yapısı
FLAVONLAR	
FLAVONOLLER	
FLAVANONLAR (Dihydroflavonlar)	
FLAVANONOLLER (Flavonon-3-oller)	
FLAVAN-3-OLLER (Katekinler)	
FLAVAN-3,4-DİOLLER (Leucocyanidinler)	
ANTOSİYANİDİNLER	
KALKONLAR	

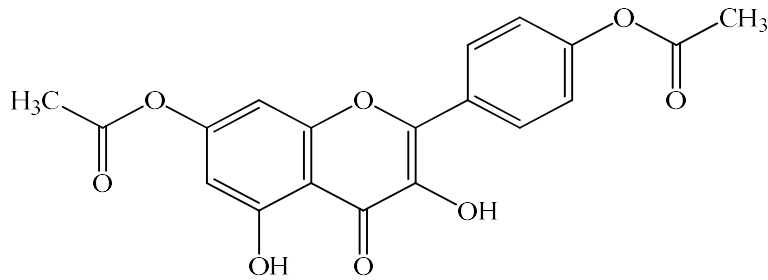
**Tablo 2.2:** (devamı.).

DİHİDROKALKONLAR	
AURONLAR	

Flavanonlar, flavanonoller, flavan-3-oller, ve flavan-3,4-dioller flavan türevleridir. Kalkonoidler, dihidrokalkonoidler ve auronoidler gerçekte flavonoid değildir fakat kimyasal yapısı ve biyosentetik özellikleri yönünden flavonoidlerle benzerlik gösterdikleri için flavonoid sınıflarının içinde yer alırlar.

## 2.2 Flavonoid Sınıfları

### 2.2.1 Flavonlar



**Şekil 2.7:** Flavonların genel gösterimi.

Flavonoidlerin yaygın olarak rastlanan bir alt sınıfıdır. C2 ve C3 atomları arasında çift bağın olması flavonların karakteristik bir özelliğidir. Bugüne kadar bitkilerden yaklaşık 300'ün üstünde flavon izole edildiği ve bunların flavanonların 2,3-dehidro türevleri olduğu bilinmektedir [21].

Flavonların en basit türevleri aromatik halkalarda hidroksil ve metoksil grupları içerirler. Yapılarında yalnızca oksijenle bağlı süstitüent içerdiklerinden bu tür flavonlara *O*-süstitüe flavonlar da denir [22].

Doğada çok yaygın olarak bulunan flavonlar kendi aralarında dört grupta incelenirler.

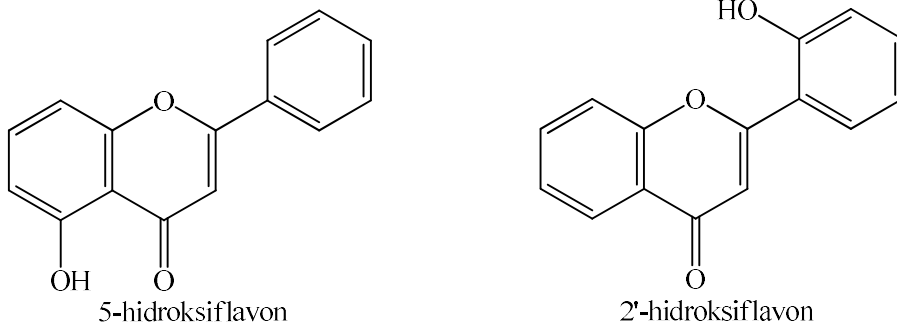
- 1) Hidroksil ve Metoksil İçeren Flavonlar
- 2) *C*-Metilflavonlar
- 3) Metilendioksiflavonlar
- 4) Prenil İçeren Flavonlar

### 2.2.1.1 Hidroksil ve Metoksil İçeren Flavonlar

Bu gruba *O*-süstitüe flavonlarda denir ve bağlı olan hidroksil veya metoksil gruplarının sayısına göre yedi farklı alt sınıfa ayrılırlar.

#### 2.2.1.1.1 Mono-*O*-süstitüe Flavonlar

Yapısında bir hidroksil veya bir metoksil grubu bulunduran flavonlara mono-*O*-süstitüe flavonlar denir. Doğada yaygın bir şekilde bulunmazlar. 5-hidroksiflavon ve 2'-hidroksiflavon bu gruba örnek olarak verilebilir.

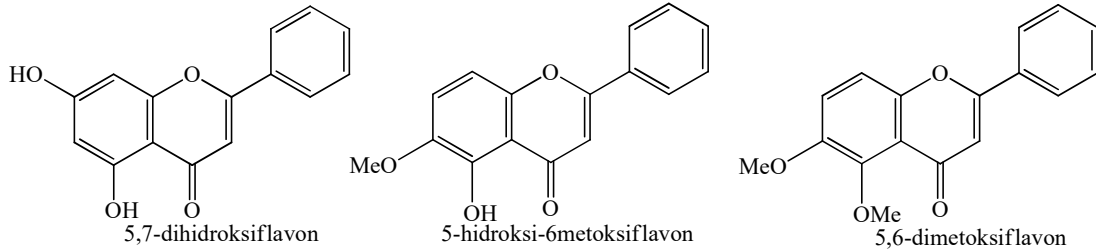


Şekil 2.8: Mono-*O*-süstitüe flavon örnekleri.

### 2.2.1.1.2 Di-O-sübstitüe Flavonlar

Yapısında iki hidroksil ya da iki metoksil bulunduran veya bir hidroksil ve bir metoksil içeren flavonlara di-O-sübstitüe flavonlar denir.

Bu gruptaki flavonlar çeşitli bitkilerden izole edilebilir. Örneğin *Scutellaria galericulata* [23], *S. rivularis* [24], *S. discolor*, *Pinus morrisonicol* [25], *Cistus populifolius* [26] gibi türlerden izole edilen 5,7-Dihidroksiflavon (chrysin) bu türün doğada yaygın olarak rastlanan bir üyesidir. Bunun dışında *Primula pulverulenta* [27] bitkisinden izole edilen 5-hidroksi-6-metoksiflavon ve 5,6-dimetoksiflavon di-O-sübstitüe flavonlara örnek olarak verilebilir.

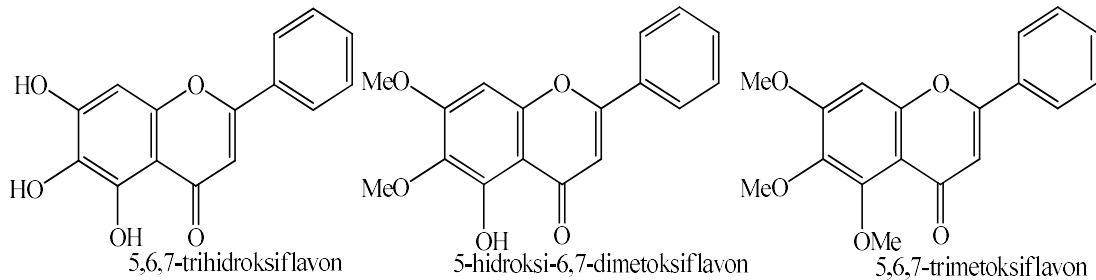


Şekil 2.9: Di-O-sübstitüe flavon örnekleri.

### 2.2.1.1.3 Tri-O-sübstitüe Flavonlar

Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı üç olan flavonlara tri-O-sübstitüe flavonlar denir ve doğada yaygın olarak bulunurlar.

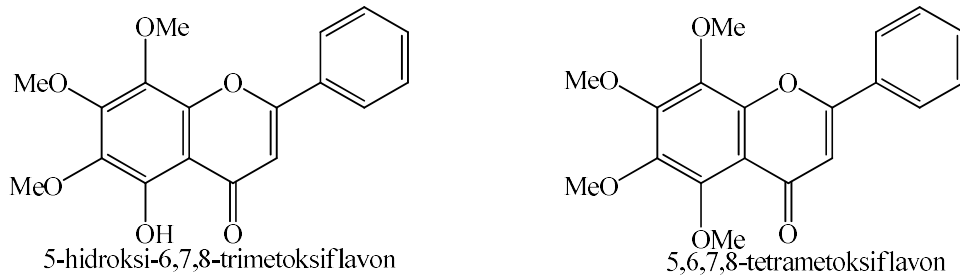
*Scutellaria litwinovii* [28], *S. scordiifolio* [29] ve *S. scandens* [30] türlerinden elde edilen 5,6,7-trihidroksiflavon(baicalein) ve bu bileşiğin 6-metoksi, 6,7-dimetoksi [31] ve 5,6,7-trimetoksi [32] türevleri tri-O-sübstitüe flavonlara örnek olarak verilebilir.



Şekil 2.10: Tri-O-sübstitüe flavon örnekleri.

#### 2.2.1.1.4 Tetra-*O*-sübstütie Flavonlar

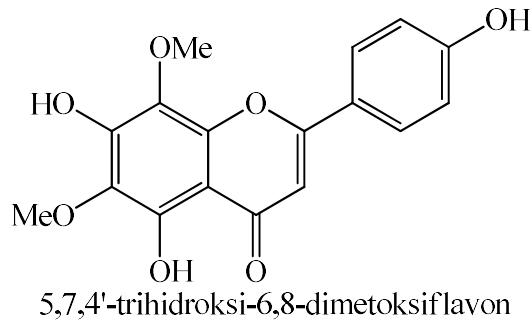
Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı dört olan flavonlara tetra-*O*-sübstütie flavonlar denir ve hidroksillenmiş halleri ve metoksi türevleri doğada bulunurlar. Tüm pozisyonlarda hidroksillenen tetrahidroksiflavon henüz bitkilerden izole edilmemiştir fakat bunun metoksi türevleri olan 5-hidroksi-6,7,8-trimetoksiflavon(alnetin) ve 5,6,7,8-tetrametoksiflavon çeşitli bitkilerden izole edilmiş olup bu gruba örnek olarak verilebilirler [32].



Şekil 2.11: Tetra-*O*-sübstütie flavon örnekleri.

#### 2.2.1.1.5 Penta-*O*-sübstütie Flavonlar

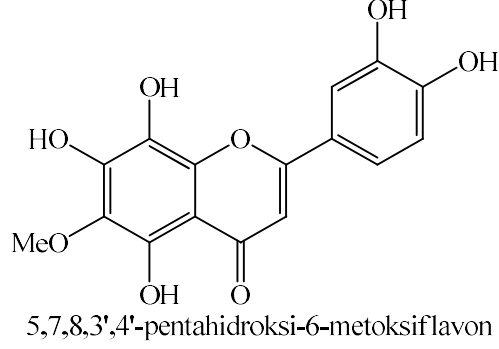
Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı beş olan flavonlara penta-*O*-sübstütie flavonlar denir. *Ambrosia deltoidea* ve *Gardenia lucida* türlerinden izole edilen 5,7,4'-trihidroksi-6,8-dimetoksiflavon örnek olarak verilebilir [33-34].



Şekil 2.12: Penta-*O*-sübstütie flavon.

### 2.2.1.1.6 Hekza-O-sübstitüe Flavonlar

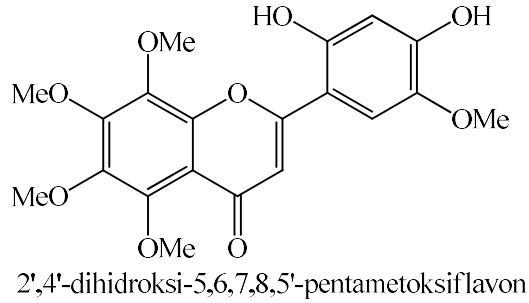
Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı altı olan flavonlara hekza-O-sübstitüe flavonlar denir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda bu türün tamamı hidroksi içeren türevleri hiçbir bitkiden izole edilmemiş olup farklı bitkilerde metoksil içeren türevlerine rastlanmıştır [35]. *Hemizonia* türünden izole edilen [36] 5,7,8,3',4'-pentahidroksi-6-metoksiflavon örnek olarak verilebilir.



Şekil 2.13: Hekza-O-sübstitüe flavon.

### 2.2.1.1.7 Hepta-O-sübstitüev Flavonlar

Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı yedi olan flavonlara denir. Bu türde aynı hekza-O-sübstitüe flavonlarda olduğu gibi tamamı hidroksi içeren hepta-O-sübstitüe flavonlar türevleri hiçbir bitkiden izole edilmemiş olup farklı bitkilerde metoksil içeren türevlerine rastlanmıştır. *Ageratum Tomentosum* türünden izole edilen [37] 2',4'-dihidroksi-5,6,7,8,5'-pentametoksiflavon örnek olarak verilebilir.

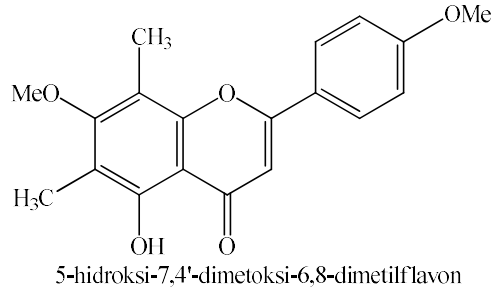


Şekil 2.14: Hepta-O-sübstitüev flavon.



### 2.2.1.2 C-Metilflavonlar

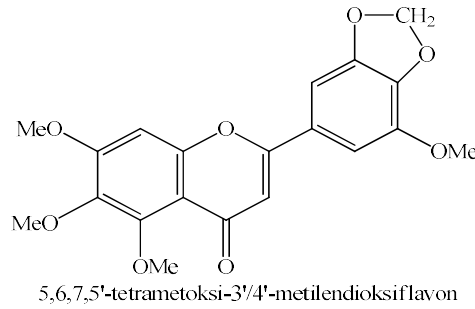
Hidroksil ve metoksil içeren flavonların aril halkalarından herhangi bir tanesine bir veya iki metil grubunun bağlanmasıyla oluşan flavonlardır. Doğada bulunan C-Metil flavon sayısı oldukça azdır. C-Metilflavonlarda metil grubunun bağlanma pozisyonları çoğunlukla C-3, C-6 ve C-7 şeklindedir. *Artemisia austriaca* türünden izole edilen 5-hidroksi-7,4'-dimetoksi-6,8-dimetilflavon bu gruba örnek teşkil eder [38].



Şekil 2.15: C-Metilflavon.

### 2.2.1.3 Metilendioksiflavonlar

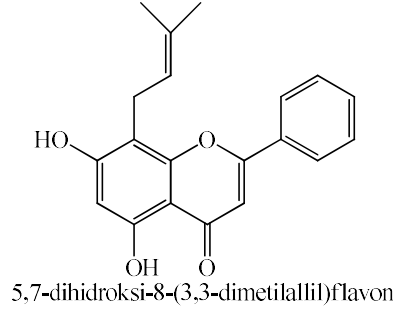
Hidroksil ve metoksil içeren flavonların yapılarında metilendioksi (-OCH<sub>2</sub>O-) grubu içeren türevleridir. Doğada bulunan metilendioksiflavonların sayısı çok olmamakla birlikte genellikle *Ageratum* türünden izole edilmişlerdir [37]. 5,6,7,5'-tetrametoksi-3'/4'-metilendioksiflavon bu gruba örnek gösterilebilir.



Şekil 2.16: Metilendioksiflavon.

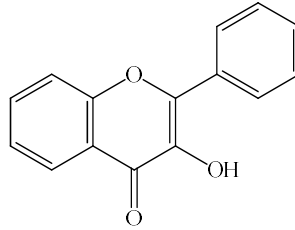
#### 2.2.1.4 Prenil İçeren Flavonlar

Bazı bitki türleri yapılarında 1,1-dimetilallil ( $\text{Me}_2\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-$ ), 3,3 dimetilallil ( $\text{Me}_2\text{CHCH}=\text{CH}-$ ) grupları içeren flavonlar bulundurlar. Bu allilleri içeren flavonollere genel olarak prenillenmiş flavonlar denir. *Planatus acerifolia* bitkisinden izole edilen 5,7-dihidroksi-8-(3,3-dimetilallil)flavon örnek verilebilir (Şekil 2.17) [39].



Şekil 2.17: Prenil içeren flavon.

#### 2.2.2 Flavonoller

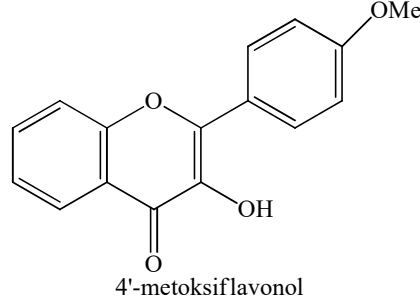


Şekil 2.18: Flavonollerin genel gösterimi.

Flavonollerde C-2 pozisyonunda hidroksil grubu bulunur. Flavonoller, flavonoidlerin doğada en fazla bulunan ve C halkasının en fazla yükseltgendiği alt sınıfıdır. Flavonoller de hidroksil ve metoksil içeren flavonlar gibi yapısındaki hidroksil ve metoksil gruplarının sayısına göre sınıflandırılabilirler fakat C-2 pozisyonundaki hidroksil grubu flavonollerin yapı iskeletinde yer aldığı için sınıflama yapılırken dikkate alınmaz.

### 2.2.2.1 Mono-*O*-süstitüe Flavonoller

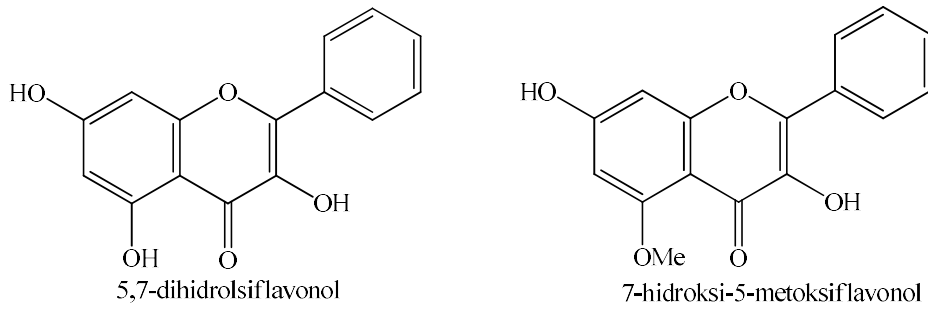
Yapısında bir hidroksil veya bir metoksil grubu bulunduran flavonollere denir. Doğada yaygın bir şekilde bulunmazlar. *Milletia zechiana* türünden elde edilen 4'-metoksiflavonol bu tür bileşikler örnek verilebilir [40].



Şekil 2.19: Mono-*O*-süstitüe flavonol.

### 2.2.2.2 Di-*O*-süstitüe flavonol

Yapısında iki hidroksil ya da iki metoksil bulunduran veya bir hidroksil ve bir metoksil içeren flavonollere di-*O*-süstitüe flavonol denir. 5,7-dihidroksiflavonol (galangin) [41] ve 7-hidroksi-5-metoksiflavonol [42], bu grubun çeşitli bitkilerden izole edilmiş üyeleridir.

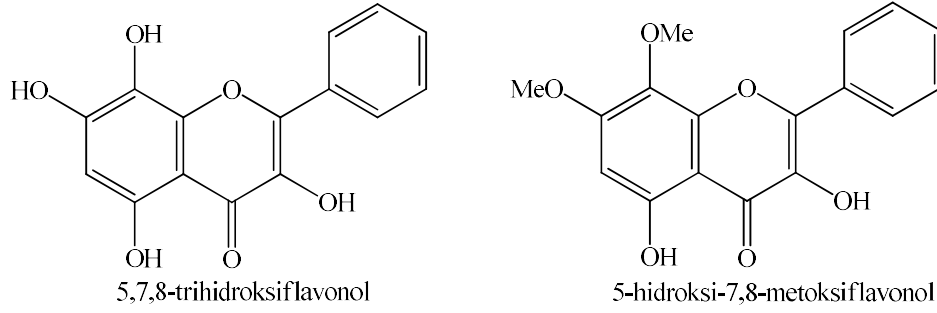


Şekil 2.20: Di-*O*-süstitüe flavonol örnekleri.

### 2.2.2.3 Tri-*O*-süstitüe Flavonoller

Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı üç olan flavonollere tri-*O*-süstitüe flavonol denir. Bugüne kadar farklı bitkilerde birçok tri-*O*-süstitüe flavonol ve metoksillenmiş türevleri izole edilmiştir. Bunlara örnek olarak *Pityrogramma*

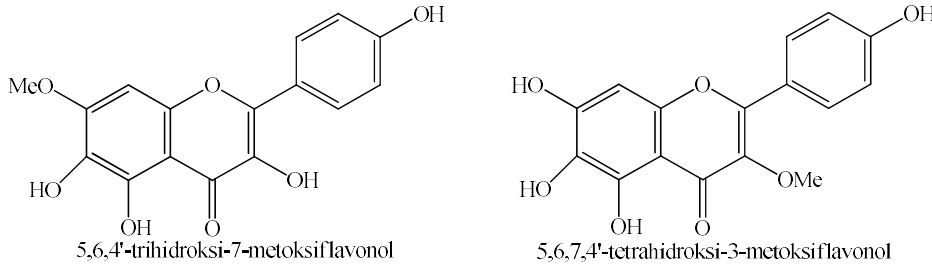
*triangularis* türünden izole edilen 5,7,8-trihidroksiflavonol [42] ve *Achyrocline* [41] türünden izole edilen 5-hidroksi-7,8-metoksiflavonol verilebilir.



Şekil 2.21: Tri-*O*-süstitüe flavonol örnekleri.

#### 2.2.2.4 Tetra-*O*-süstitüe Flavonoller

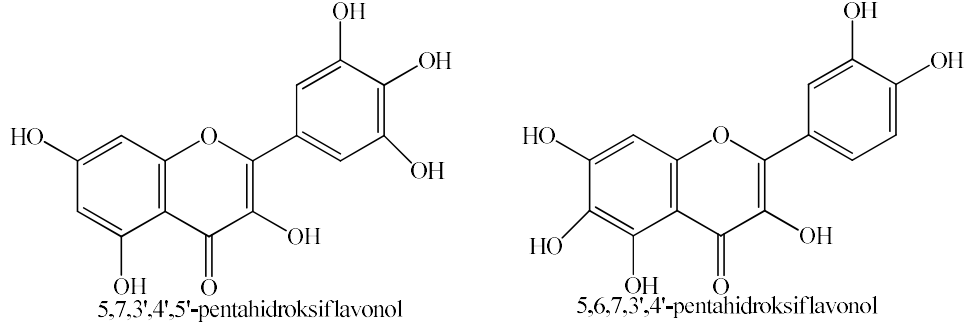
Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı dört olan flavonollere tetra-*O*-süstitüe flavonol denir. *Ageratina saltillensis* türünden izole edilen [43] 5,6,4'-trihidroksi-7-metoksiflavonol bu gruba örnek teşkil eder. Doğada bu grubun metoksi türevleri daha yaygın bir şekilde bulunur. 5,6,7,4'-tetrahidroksi-3-metoksiflavonol, *Eriodictyon trihocalyx* türünden izole edilen bir metoksi türevidir [44].



Şekil 2.22: Tetra-*O*-süstitüe flavonol örnekleri.

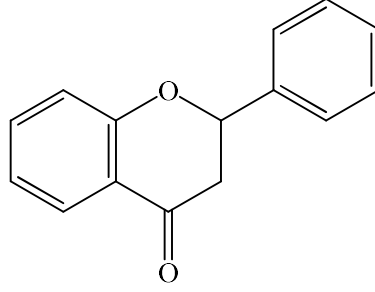
#### 2.2.2.5 Penta-*O*-süstitüe Flavonoller

Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı beş olan flavonollere penta-*O*-süstitüe flavonol denir. Günümüzde birkaç doğal üyesi bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak 5,7,3',4',5'-pentahidroksiflavonol (myricetin) ve 5,6,7,3',4'-pentahidroksiflavonol (quercetagenin) verilebilir.



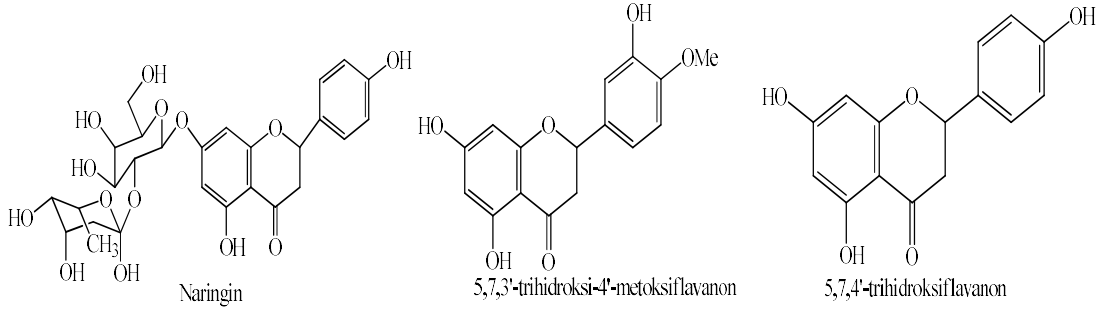
Şekil 2.23: Penta-*O*-süstitüe flavonoller.

### 2.2.3 Flavanonlar



Şekil 2.24: Flavanonların genel gösterimi.

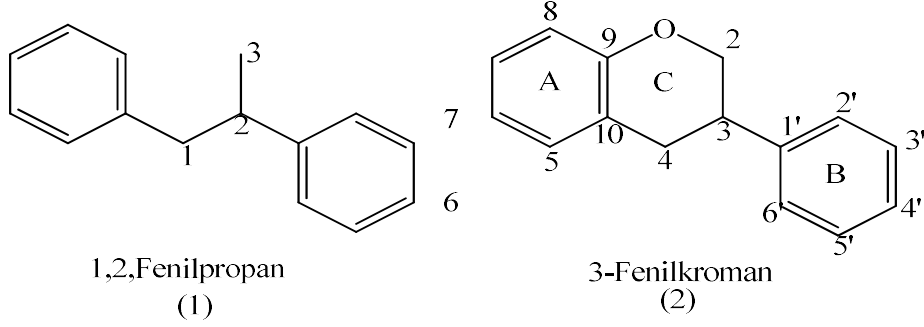
Flavon ve flavonollerden farklı olarak C halkasında çift bağ bulundurmazlar. Yapısındaki C-2 atomunun asimetrik olması nedeniyle, iki optik izomer ya da rasemik karışım şeklinde bulunurlar. Doğada flavanonlara genellikle glikozillenmiş türevleri halinde rastlanır. Bu glikozitler özellikle turunçgillerde yaygın olarak bulunurlar [22]. En önemlileri birçok bitki türünden izole edilen [22-45-46] naringin, hesperidin (5,7,3'-trihidroksi-4'-metoksiflavanon) ve naringenin (5,7,4'-trihidroksiflavanon).



Şekil 2.25: Flavanon örnekleri.

## 2.2.4 İzoflavonoidler

İzoflavonoidler 1,2-difenilpropan iskeleti içerirler ve bu yapıdaki C-3 karbonunun oksijen üzerinden A halkası ile siklikleşmesi sonucu oluşan 3-fenilkroman genel iskeletinden meydana gelirler.

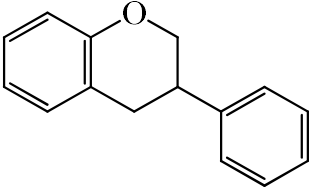
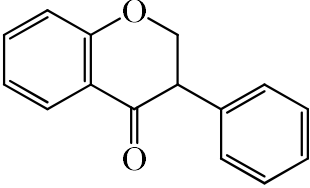
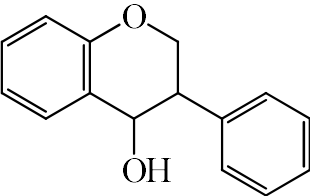
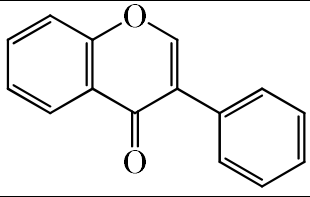
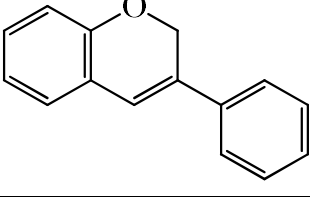
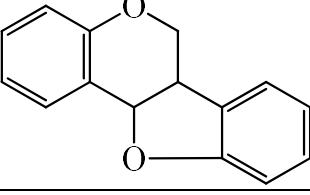
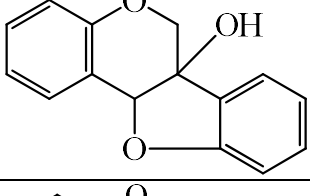
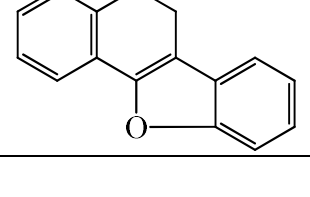


Şekil 2.26: (1)1,2-Fenilpropan, (2)3-Fenilkroman.

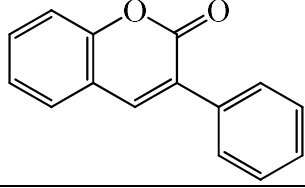
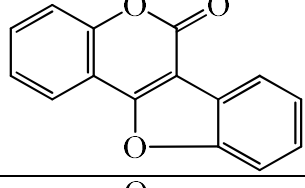
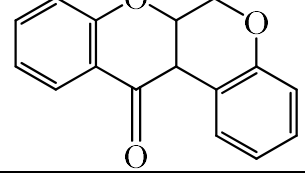
İzoflavonoidler çeşitli bağlanmalar sonucu alt sınıflara ayrılırlar (Tablo 2.3). Bunlar;

1. İzoflavanlar
2. İzoflavanonlar
3. İzoflavanoller
4. İzoflavonlar
5. İzoflav-3-enler
6. Pterokarpanoidler
  - Pterokarpan
  - 6a-Hidroksipterokarpan
  - Pterokarpen
7. 3-Arilkumarinler
8. Kumestanlar
9. Rotenoidler

**Tablo 2.3:** İzoflavonoid sınıfları.

İzoflavonoid Sınıfı		Genel Yapıları
	İzoflavanlar	
	İzoflavanonlar	
	İzoflavanoller	
	İzoflavonlar	
	İzoflav-3-enler	
Pterokarpanoidler	Pterokarpan	
	6-a Hidroksipterokarpan	
	Pterokarpen	

**Tablo 2.3:** (devamı.).

3-Arilkumarinler	
Kumestanlar	
Rotenoidler	

### 2.2.5 Kalkonoidler

Flavonoidlerin temel iskeleti olan C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> yapısına sahip bileşikler olmalarına karşın esasen bir flavonoid sınıfı değildir. Biyogenetik ve kimyasal özellikleri açısından flavonoidlere çok benzer durum gösterirler bundan dolayı flavonoidlerin alt sınıflarından sayılırlar [17]. Yapısında iki aromatik halka bulunan kalkonoidler piran halkası oluşturmayan flavonoidler olarakta bilinirler.

Kullanım alanları arasında yapay tatlandırıcı, ısı ve ışık izolasyon maddesi olarak kullanımı yer almaktadır [47].

Çok geniş alt sınıfları bulunur (Tablo 2.4). Bunlar;

#### 1) Kalkonlar

- Basit Kalkonlar
- Kinokalkonlar
- Alkillenmiş Kalkonlar
- β-Kalkonlar
- β-Metoksikalkonlar

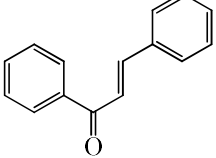
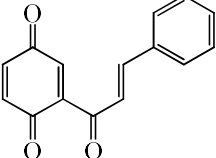
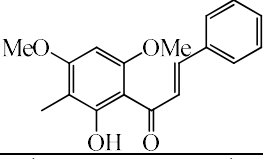
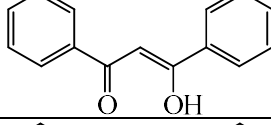
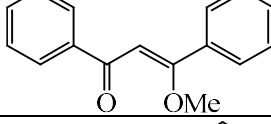
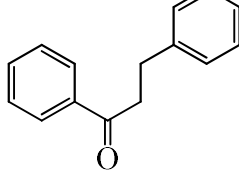
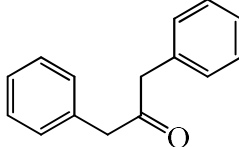
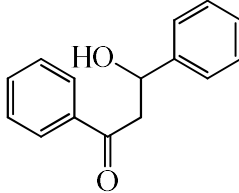
#### 2) Dihidroalkonlar (Kalkanonlar)

- β'-Kalkanonlar
- α-Kalkanonlar

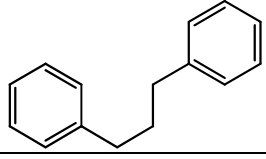
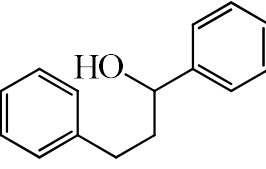


- Kalkononollar
- 3) Kalkanoidler
- Kalkanlar
  - Kalkanollar

**Tablo 2.4:** Kalkonoid sınıfları.

Kalkonoid Sınıfı		Genel Yapısı
Kalkonlar	Basit Kalkonlar	
	Kinokalkonlar	
	Alkillenmiş Kalkonlar	
	$\beta$ -Kalkonlar	
	$\beta$ -Metoksikalkonlar	
Kalkanonlar (Dihidrochalkonlar)	$\beta'$ -Kalkanonlar	
	$\alpha$ -Kalkanonlar	
	Kalkanonollar	

**Tablo 2.5:** (devamı.).

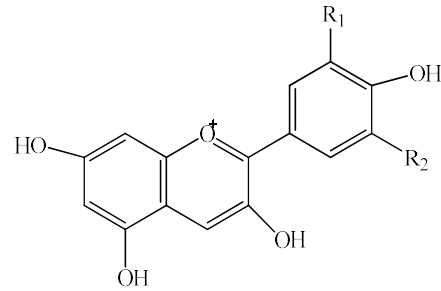
Kalkonoidler	Kalkanlar	
	Kalkanoller	

### 2.2.6 Antosiyanidinler

Antosiyanidinler meyve, sebze ve çiçeklerde lacivert, pembe, kırmızı, turuncu ve mor tondaki renklerden sorumlu, suda çözünmeyen pigmentler olarak bilinmektedir [22]. Renklerden sorumlu pigmentler olduğundan, boyar madde olarak, gıda endüstrisinde ve eczacılıkta farklı şekide kullanılırlar [48].

Antosiyanidinler, doğada serbest halde bulunmak yerine, şekerlerle glikozit yapmış olarak bulunurlar ve şeker bağlanmış haline antosiyaninler adı verilir. Günümüze kadar bitkilerden elde edilen bazı antosiyanidinler [22-48-49] ve yapıları Şekil 2.27’de verilmiştir.

<b>Antosiyanidin</b>	<b>R<sub>1</sub></b>	<b>R<sub>2</sub></b>
Malvinidin	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Siyanidin	OH	H
Delfinidin	OH	OH
Peonidin	OCH <sub>3</sub>	H
Petunidin	OCH <sub>3</sub>	OH
Pelargonidin	H	H

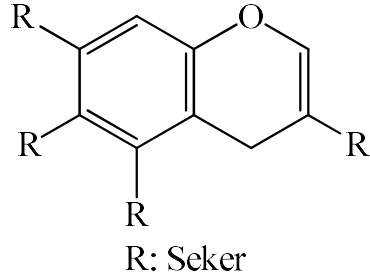


**Şekil 2.27:** Antosiyanidin yapısı ve örnekleri.

Antosiyaninler, bir antosiyanidin iskeleti, şeker ve çoğu zaman küçük ve fenolik organik asitlerden oluşur [50]. Şeker kısmı çoğunlukla odun şekeri olarak bilinen ksiloz ve basit bir monosakkarit olan galaktozdan oluşur. Organik asitler ile türevleri, kafeik ve ferrulik asit gibi asitlerle açillenmesi sonucu oluşur [51-48-52]. Yapılan çalışmalarda açillenmiş antosiyaninlerin, açillenmemiş olanlara göre daha kararlı olduğu belirlenmiştir [22].

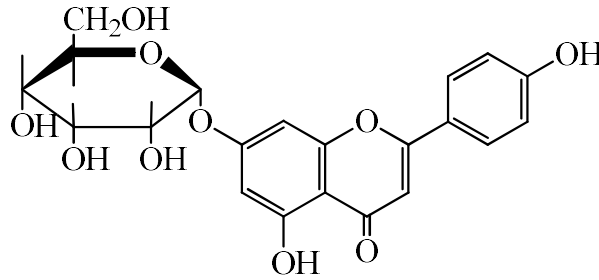
### 2.2.7 Flavonoid Glikozitler

Flavonoid glikozitleri, bir aglikon halkasının (Şekil 2.28) değişik pozisyonlarına bir veya daha fazla şeker bağlanmasıyla oluşan yapılardır.



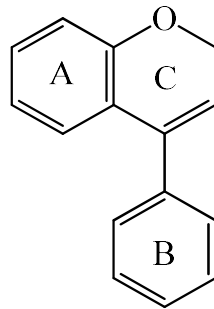
Şekil 2.28: Aglikon yapısı.

Aglikon halkasının hemen hemen her pozisyonuna şekerler bağlanabildiğinden birçok türevleri mevcuttur. Apigenin 7-O-β-D-glukopiranozit bu sınıfa örnek olarak verilebilir.



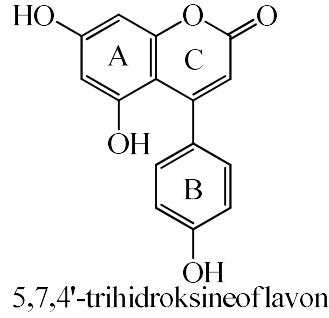
Şekil 2.29: Apigenin 7-O-β-D-glukopiranozit yapısı.

### 2.2.8 Neoflavonoidler



Şekil 2.30: Neoflavonoidlerin genel yapısı.

1,1-difenilpropan türevleri olan neoflavonoidler, bu yapıdaki uç karbon atomunun oksijen atomu üzerinden A halkası ile halkalaşması sonucu oluşur. Biyogenetik ve kimyasal yönden flavonoidlere benzerlik gösterdikleri için Flavonoid alt sınıflarında yer alırlar. *Passiflora serratodigitata* türünden izole edilen [53] 5,7,4'-trihidroksineoflavon bu gruba örnek verilebilir.



Şekil 2.31: Neoflavonoid.

## 2.3 Flavonoidlerin İzolasyonu ve Analiz Teknikleri

### 2.3.1 Flavonoidlerin Bitkilerden İzolasyonu

Flavonoidlere birçok bitkisel organda rastlanır ve her bitkisel organda flavonoidlerin bileşenleri nitel ve nicel olarak farklıdır. Bu yüzden flavonoidlerin izolasyonunda, her bitkinin özelliği dikkate alınarak çeşitli izolasyon yöntemleri kullanılmıştır. En yaygın olarak rastlanan yöntem, seçici ekstraksiyon yöntemidir [21].

### 2.3.2 Flavonoidlerin Kromatografik Analiz Yöntemleri

#### 2.3.2.1 Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kağıt kromatografisi yüksek duyarlılık özelliği ile flavonoidler nitel analizinde büyük rol oynar. Kromatografik analiz için kullanılacak kağıdın özelliği çok önemlidir. Bundan dolayı yüksek saflık ve birçok özelliğe sahip selüloz filtre kağıdı tercih edilir. İnce tabaka kromatografisi ise çoğunlukla fenolik

bileşiklerin tüm sınıflarını ayırmak amacıyla kullanılan bir yöntemdir. İnce tabaka kromatografisinde adsorban olarak genellikle silikajel kullanılır. Bu teknik çoğu zaman kağıt kromatografisi yerine de kullanılabilir. Ancak flavonoidlerin analizi göz önünde bulundurulduğunda ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisini tamamlayan bir yöntemdir [54]. Kağıt kromatografisinin, kromatografi kağıdı üzerinde flavonoid izlerini ince tabaka kromatografisine göre daha belirgin göstermesi tercih sebebidir.

### **2.3.2.2 Kolon Kromatografisi**

Bitkilerden elde edilen ekstraktların saflaştırılması, ayrılması ve küçük miktarların bile saf olarak elde edilebilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Kolon kromatografisinde selüloz, silikajel, poliamid gibi adsorbanlar kullanılabilir.

Poliamid: Bu bileşikteki  $-NH_2$  ve  $C=O$  gruplarının, flavonoidlerdeki  $-OH$  gruplarıyla hidrojen bağı yapmasından dolayı en çok kullanılan absorbandır [55].

Silikajel: Genellikle izoflavonlar, flavanonlar ve dihidroflavonollerin analizinde tercih edilir [56].

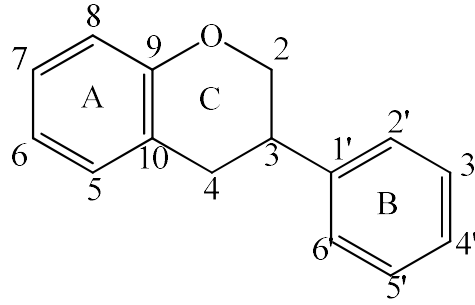
Selüloz: Genellikle flavonoid glikozitlerinin analizinde kullanılır.

### **2.3.3 Flavonoidlerin Morötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-Vis)**

Morötesi ve görünür bölge spektroskopisi çok az miktarda maddenin analizini yapabilmesi açısından, flavonoidlerin yapı analizi için basit ve kullanışlı bir yöntemdir. Flavonoidlerde, morötesi ve görünür bölge spektroskopisi ile hidroksil gruplarının yeri ve bu hidroksillere bağlı şeker veya başka grupların bağlandığı yerler, bunların örnek çözeltilere kaydırma reaktifleri eklenmesi ile oluşan absorpsiyon spektrumlarındaki pik değerlerine göre belirlenir [21] (Tablo 2.5).

Flavonoidlerin morötesi ve görünür bölge spektroskopisinde genellikle B halkası ile ilişkili olan ve şerit I olarak adlandırılan uzun dalga boylu bir pik, A

halkası ile ilişkili olan ve şerit II olarak adlandırılan kısa dalga boylu bir pik görülür [57].



Şekil 2.32: Flavonoidlerde A ve B halkaları.

Tablo 2.6: Flavonoidlerin UV-Vis absorpsiyon alanları.

Flavonoid Sınıfı	Şerit I (nm)	Şerit II (nm)
Flavonlar	310-350	250-280
Flavonoller (3-OH süstitüe)	330-360	250-280
Flavonoller (3-OH serbest)	350-385	250-280
İzoflavonlar	310-330	245-275
İzoflavonlar (5-deoksi-6,7-dioksijenlenmiş)	320	-
Flavanon ve Dihidroflavonoller	300-330	275-295
Kakonlar	340-390	230-270 (düşük şiddetli)
Auronlar	380-430	230-270 (düşük şiddetli)
Antosiyanidinler	465-560	270-280

### 2.3.4 Flavonoidlerin Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)

#### Spektroskopisi

#### 2.3.4.1 Proton Manyetik Rezonans (<sup>1</sup>H-NMR) Spektroskopisi

Yapı tayinlerinde yaygın olarak tercih edilen <sup>1</sup>H-NMR, uzun yıllardır flavonoidlerin yapılarının incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem

önceleri döterokloroform ( $\text{CDCl}_3$ ) ve karbondetriklorür ( $\text{CCl}_4$ ) gibi çözücülerde çözünebiilen, düşük polariteli, metillenmiş ve asetilenmiş flavonoidlerin analizinde kullanılıyordu. Çözücü olarak heksadöterodimetilsülfoksit ( $\text{DMSO-d}_6$ ) kullanılmaya başlanmasıyla [58], flavonoidlerin bu yöntem ile incelenmesi büyük önem kazandı. Bu nedenle günümüzde flavonoid incelemelerinde,  $^1\text{H-NMR}$  spektroskopisi yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemle incelen bazı flavonoid protonları ve kimyasal kayma değerleri Tablo 2.6'te verilmiştir.

**Tablo 2.7:** Flavonoidlerde bulunan bazı protonların kimyasal kayma değerleri.

Kimyasal Kayma (ppm)	Proton Türleri
0	Tetrametilsilan
0-0.5	Trimetilsilil eter grupları
1.0	Ramnozün C- $\text{CH}_3$ (geniş dublet)
1.7	Prenilin (- $\text{CH}_2\text{-CH}=\text{C}(\text{CH}_3)$ ) metil grupları
2.0	Asetat (- $\text{OCOCH}_3$ ) ve aromatik C- $\text{CH}_3$
2.0-3.0	Flavanonların H-3'ü
3.5-4.0	Pek çok şeker C-H
6.0	Metilendioksi (- $\text{O-CH}_2\text{-O}$ ) protonları
6.0-8.0	A ve B halka protonları
7.5-8.0	İzoflavonların H-2'si
12-14	5-OH (yalnız, $\text{DMSO-d}_6$ çözücü olarak kullanıldığında)

#### 2.3.4.2 Karbon-13 Manyetik Rezonans ( $^{13}\text{C-NMR}$ ) Spektroskopisi

Flavonoidlerin çok çeşitli alt sınıflarının bulunması, farklı özelliklerde C atomları içermelerine neden olur. Bundan dolayı flavonoidlerin temel karbon iskelet tiplerini ve aromatik halka üzerinde bulunan süstitüe grup sayısını araştırarak farklı karbon tipleri hakkında bilgi elde edilebilir.

#### 2.3.5 Flavonoidlerin Kütle Spektroskopisi (MS)

Flavonoidlerin yapı tayininde, en önemlisi de molekül ağırlıklarının saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. Az miktar ile çalışma kolaylığı ile flavonoid analizlerinde sıkça rastlanan bir metottur.

Flavonoidlerin moleköl ağırlıklarını kütle spektroskopisi ile tayin etmek için, moleküllerin vakumlu ortamda gaz haline geçmesi ve kararlı olması gerekmektedir. Flavonoidlerin yüksek moleköl ağırlıklı bileşikler olması nedeniyle buharlaşma sıcaklıkları birçok bileşiğe göre fazladır, yüksek sıcaklıklarda kararlı hale ulaşırlar ve analiz edilirler. Fakat flavonoid glikozitler, antosiyanidinler polaritelerinin yüksek olması nedeniyle uçucu değillerdir [21]. Bu bileşiklerin çeşitli türevleri alınarak kütle spektroskopisinde analizleri yapılır ancak türevlerdeki ilave parçalanmalardan dolayı her zaman sağlıklı sonuçlar elde edilmez.



### 3. BİYOLOJİK AKTİVİTE

#### 3.1 Flavonoidlerin Biyolojik Aktiviteleri

Serbest radikallerin lipid, protein ve nükleik asitlere karşı oksidatif olarak zarar veren, hücre içindeki yapıları etkileyerek DNA'nın yapısını bozan ve kanser, kalp hastalıkları, akciğer hastalıkları, katarakt gibi pek çok hastalığa neden olan gruplar olduğu bilinmektedir [59-60-61]. Antioksidantlar, serbest radikalleri kendi yapılarına bağlayarak, verdikleri zararları engellerler [62-63].

Bütillenmiş hidroksi toluen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi sentetik antioksidanların toksik ve kanserojen özellik gösterdiği ortaya çıktıktan [64-65-66] sonra kullanılmalarına sınırlamalar getirilmesi, doğal antioksidan kaynağı olan bitkilere karşı ilginin artmasına neden olmuştur [67-68].

Günümüzde flavonoidler başta olmak üzere bitki kaynaklı antioksidanlar, serbest radikal tutucu, peroksit parçalayıcı [69] ve enzim inhibitörü gibi birçok fonksiyonda kullanılırlar [46] ve sağlık üzerine olumlu etki sağlarlar.

Proteggente ve arkadaşları çilek, kırmızı erik ve ahududu ekstraktlarından elde edilen fenolik bileşiklerin antioksidan aktivitelerini yüksek düzeyde olduğunu açıklamışlardır [70]. Ayrıca üzümü meyvelerde bulunan flavonoidlerden antosiyanin, kuersetin, kaempferol ve mirisetin de antioksidan aktiviteye sahip olduğu açıklanmıştır [62-71].

Flavonoidlerin mutasyonu engelleyici özellikleri olduğu da bilinmektedir. Bu bileşiklerin farklı türleri araştırılmış ve kuersetin, mirisetin, kaempferol gibi flavonoidlerin yüksek mutajen aktivite gösterdiği açıklanmıştır [72-73].

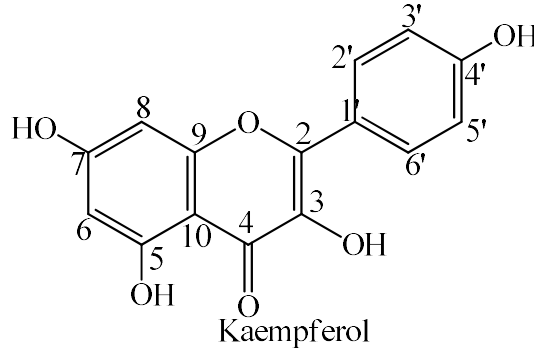
Ayrıca 1940'lı yıllardan beri flavonoidlerin çeşitli virüslere karşı etkileri araştırılmaktadır [74]. Flavonoidlerin aglikon yapısında, C-3 pozisyonunda bulunan hidroksil grubu antivirüs aktiviteye katkıda bulunan karakteristik bir özelliktir [75]. Yapılan çalışmalarda, quercetin, morin, apigenin, katekin, hesperidin, naringenin ve rutin gibi flavonoidlerin antivirüs aktivitelerinin olduğu belirlenmiştir [74].

Diyetle alınan flavonoidlerin bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdiği bilinmektedir ve bu koruyucu etkinin genellikle antioksidan bileşiklerden kaynaklandığı öne sürülmektedir [76-77]. *Polanisia dodecandra* türünden izole edilen 5,3'-dihidroksi-3,6,7,8,4'-pentametoksiflavonolün, *in vitro* şartlarda merkezi sinir sistemi kanserine, akciğer kanseri hücrelerine, yumurtalık kanseri hücrelerine, kalın barsak kanseri hücrelerine, böbrek kanseri hücrelerine ve iki farklı lösemi hücresine sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir [78].

Flavonoidlerin memelilerin enzim sistemlerine etkileri de *in vitro* şartlarda araştırılmıştır [21]. Birçok flavonoidin patolojik olaylara karışan lipooksijenaz, siklooksijenaz [79], protein tirozin kinaz [80], adenozin deaminaz gibi enzimlere etkileri incelenmiştir.

#### 4. KAEMPFEROL

Kaempferol, 5,7,4'-trihidroksiflavonol olarak isimlendirilir. Flavonoidlerin, flavonol alt sınıfında yer alır. Yapısında 3,5,7 ve 4' pozisyonlarında hidroksil (-OH) grubu içerir. Yapısı Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: Kaempferol.

Doğal bir flavonol türü olan kaempferol, (3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)kromen-4-on) ya da (3,5,7-trihidroksi-2-(4-hidroksifenil)-4H-1-benzopiran-4-on) , 276-278 °C erime noktasına sahip sarı renkli bir kristaldir. C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub> molekül formülüne sahip olan bileşiğin mol ağırlığı 286.23 g/mol'dür. Sudaki çözünürlüğü çok az olmakla birlikte, sıcak etanol, etil eter ve asetonda oldukça iyi çözünür.

Kaempferol, *Aloe vera*, *Coccinia grandis*, *Cuscuta chinensis*, *Euphorbia pekinensis*, *Glycine max*, *Hypericum perforatum*, *Moringa oleifera*, *Rosmarinus officinalis*, *Sambucus nigra*, ve *Toona sinensis* gibi bitkilerde bol miktarda bulunur [81-82-83]. Bunun yanı sıra diyetle alınan bitkisel kökenli gıdalarda oldukça yaygın olarak bulunur. Bu gıdalar arasında başlıca elma, üzüm, domates, yeşil çay, patates, soğan, brokoli, brüksel lahanası, kabak, salatalık, marul, yeşil fasulye, şeftali, böğürtlen, ahududu ve ıspanak bulunur [81-84-85].

Birçok bitki ve bitkisel gıdada bulunan kaempferol günümüze kadar çok sayıda araştırmanın konusu olmuştur. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda

kaempferolün birçok özellikleri araştırılmış ve antioksidan, antiülser, antifungal, antitümör [86-87-88-89] gibi biyolojik özelliklere sahip olduğu gözlenmiştir.

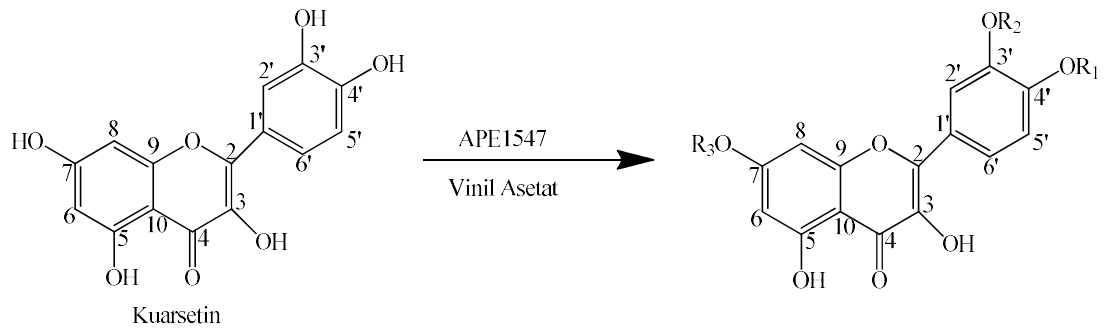
## 5. ENZİMATİK SENTEZ

### 5.1 Flavonoidlerin Enzimatik Sentezi

Flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin bu tür bileşiklerin antialerjenik [10], antioksidan [11], antimikrobiyal (antibakteriyel [12-13], antiviral [14], antifungal [15], antikanser [11-16] etki gösterdikleri bulunmuştur. Flavonoidlerin bu derece çok yönlü biyolojik aktiviteleri dolayısıyla, laboratuvar ortamında bu bileşiklerin türevlerinin sentezi büyük önem taşımaktadır.

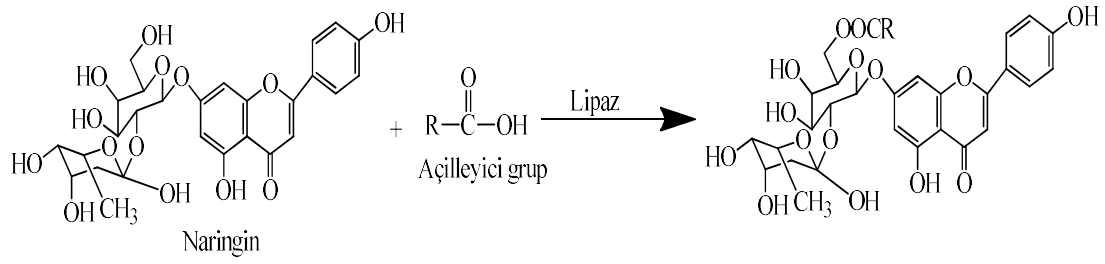
Sentetik organik kimyada gerçekleştirilen reaksiyonun yüksek verimli olması en önemli unsurlardan biridir. Bu verimi arttıracak katalizör kullanımı gibi etmenler araştırmaların temelini oluşturan en önemli unsurlardandır. Özellikle flavonoidler gibi doğal ürünlerin sentezi konusunda yapılan çalışmalara bakıldığında, bu maddeler bitkilerde enzimatik reaksiyonlarla sentezlendiği için, enzim katalizli türevlerinin oluşturulması yönündedir. Günümüzde flavonoidlerin enzimatik sentezlerine çok sık rastlanır.

Xie ve arkadaşları bir flavonoid olan quercetin molekülünün açılmasında farklı enzimler kullanmış ve en aktif enzimi seçerek bölge seçiciliklerini belirlemiştir [90].

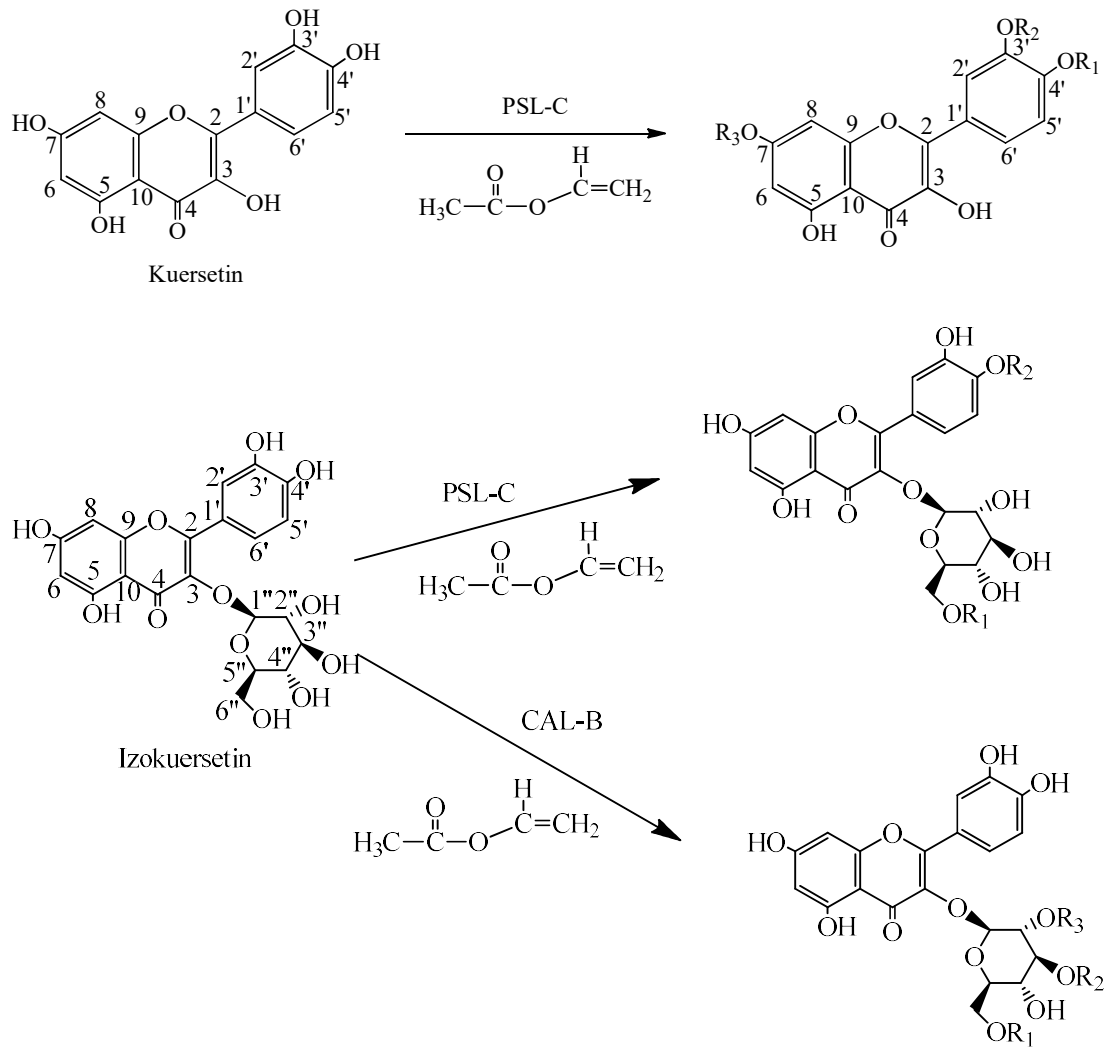


Kontogianni ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada naringin molekülünden lipaz enzimi kullanılarak açılma çalışmaları yapılmıştır. Enzimatik

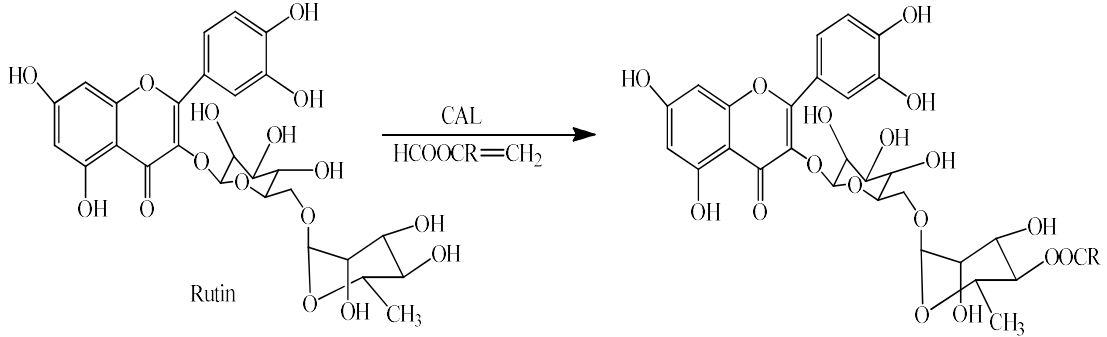
açılme farklı çözücülerde yapılarak, çözücülerin açılme etki incelenmiştir [91].



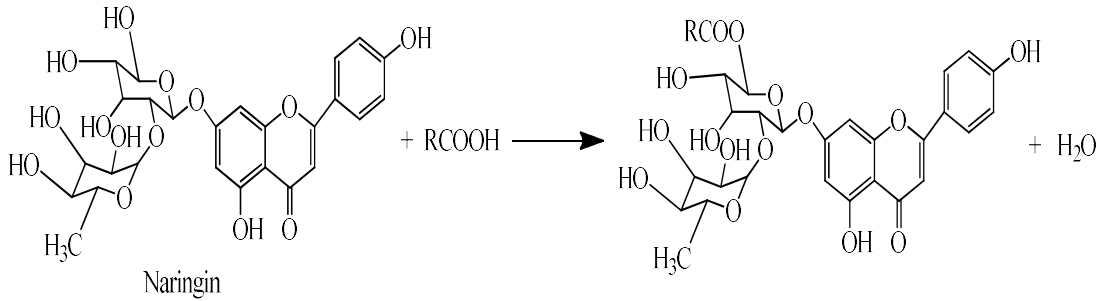
Latıfa Chebil ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada quercetin ve isoquercetin moleküllerinin, lipaz enzimleri (PSL-C, CAL-B) kullanılarak açılme çalışmaları yapılmıştır [92].



Bu çalışmada çeşitli açıl ajanları lipaz enzimi katalizörlüğünde test edilmiş ve sadece vinil esterlerinin reaktif olduğu görülmüştür ve bölge seçicilikleri belirlenmiştir [92].



Bu çalışmada rutin ve naringin moleküllerinin açıl esterleri lipaz enzimi katölizörlüğünde, açıl donörü ve iyonik sıvı kullanılarak sentezlenmiştir. Reaksiyon sonucunda elde edilen rutin türevinin antioksidan ve antiaterojenik aktiviteleri gözlenmiştir [93].



Bu çalışmada naringin molekülünün lipaz katölizörlüğünde bölge seçici açılleme reaksiyonları, açıl ajanı olarak yağ asitleri kullanılmasıyla A. Kontogiani ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. Dekanoik asit ile elde edilen naringin esterlerinin kinetik çalışmaları yapılmıştır [94].

## 5.2 Enzimatik Sentezin Avantajları

Reaksiyonlarda enzimlerin katalizör olarak kullanılmalarının birçok avantajı vardır [95]. Enzimlerin bu avantajları aşağıda sıralanmıştır.

**a. Enzimler çok hızlı çalışan biyokatalizörlerdir.**

Enzimle gerçekleştirilen reaksiyonlar, enzimsiz reaksiyonlara göre  $10^8$ - $10^{10}$  kat daha hızlıdır. Bu oran bazen  $10^{12}$  düzeyine kadar çıkabilir ve bu hız kimyasal katalizörlerin ulaşamayacağı bir hızdır [96].

**b. Enzimler ılımlı koşullarda çalışan katalizörlerdir.**

Enzimatik reaksiyonlar, pH 5-8 arasında (genellikle pH 7) ve sıcaklık 20-40°C (genellikle 30°C) arasında gerçekleşir. Enzimlerle gerçekleştirilen reaksiyonlarda bu ılımlı koşullar sayesinde istenmeyen yan reaksiyonların oluşması önlenmiş olur [96].

**c. Enzimler aynı ortamda birbirlerini etkilemeden çalışabilen katalizörlerdir.**

Çoğu enzimin çalışma koşullarının aynı veya benzer olması nedeniyle aynı ortamda çeşitli biyokatalitik reaksiyonlar gerçekleştirilebilir. Bunun yanı sıra multienzim sistemleri ile ardışık reaksiyonlar gerçekleştirilebilmesi de deney süreçlerini kolaylaştıran bir avantajdır [96].

**d. Enzimler geniş substrat seçiciliğine sahiptirler.**

Enzimlerin substrat seçiciliğinin geniş olması, enzimlerin doğal substratları olmayan sentetik substrata sahip moleküllere de etki etmesini sağlayan önemli bir özelliğidir [96].

**e. Enzimlerin seçicilik özellikleri vardır.**

Enzimler seçiciliği yüksek moleküllerdir. Fonksiyonel grubun tek tipi üzerine seçicilik göstermesinin yanı sıra kompleks üç boyutlu yapıları sayesinde aynı substrat molekülün farklı bölgelerindeki fonksiyonel gruplara da seçicilik gösterirler. Enzimlerin substratta kiral seçiciliği olması nedeniyle enantiyomerlik istenen reaksiyonlarda da sıklıkla kullanılır [96].

Enzimatik reaksiyonlar, sağladığı avantajlar nedeniyle çok sık tercih edilirler. Organik sentez yöntemleriyle gerçekleştirilmesi zor olan reaksiyonlar enzimatik olarak daha kolay, hızlı ve yüksek verimle gerçekleştirilebilir [97].



## 6. DENEYSEL BÖLÜM

### 6.1 Kimyasal Materyaller

Kaempferol, piridin, CAL-A, CAL-B, PSL, 4 °A moleküler elek Alfa Aesar ve Sigma Aldrich firmalarından ticari olarak temin edilmiş ve reaksiyonlardan önce gerekli saflaştırma işlemleri uygulanmıştır.

Kullanılan tüm çözücüler ve açıl sağlayıcı ajanlar (etil asetat, vinil asetat, asetonitril, aseton) Sigma Aldrich ve Merck firmalarından ticari olarak alınmış ve kurutma işlemi yapılarak reaksiyon ortamında kullanılmıştır.

Açıl ajanı olarak kullanılan asetik anhidrit organik kimya araştırma laboratuvarında sentezlenmiştir.

Ayırma ve saflaştırma işlemlerinde kullanılan silikajel 60G (Kieselgel 60G 0.063-0.200), ince tabaka kromatografisinde kullanılan silikajel kaplı alüminyum plaklar (DC alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub>) ve preparatif ince tabaka kromatografisi için plaklara çekilen Silikajel 60G ve Silikajel 60 F<sub>254</sub> Merck firmasından temin edilmiştir.

### 6.2 Cihazlar ve Laboratuvar Gereçleri

**Çalkalamalı Su Banyosu:** Termal H11960 marka kullanılmıştır.

**Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı:** Heidolph MR-Hei Standart marka kullanılmıştır.

**Evaporatör:** Heidolph 2 Laborota 4001-efficient marka kullanılmıştır.

**Hassas Terazî:** Sartorius TE2145 Max 2109 marka kullanılmıştır.

**Mantolu Isıtıcı:** M-TOPO MS-E104 marka kullanılmıştır.

**Ultrasonik Banyo:** Bandelin Sonorex marka kullanılmıştır.

**UV Lamba:** CAMAG 254-366 nm kullanılmıştır.

**Etüv:** Memmert UNB400 kullanılmıştır.

**Vakum Pompası:** Rocker Chemker 400 kullanılmıştır.

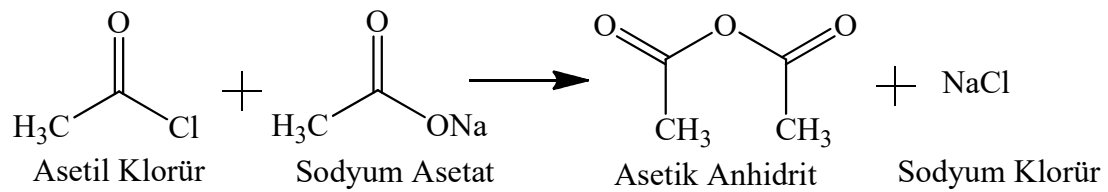
### 6.3 Sentez Bölümü

Sentez için kullanılan çözücü ve açıl ajanlarının reaksiyon öncesi gerekli kurutma ve saflaştırma işlemleri yapıldı. Sonrasında bu çözücüler ve açıl ajanları kullanılarak sentez reaksiyonları gerçekleştirildi.

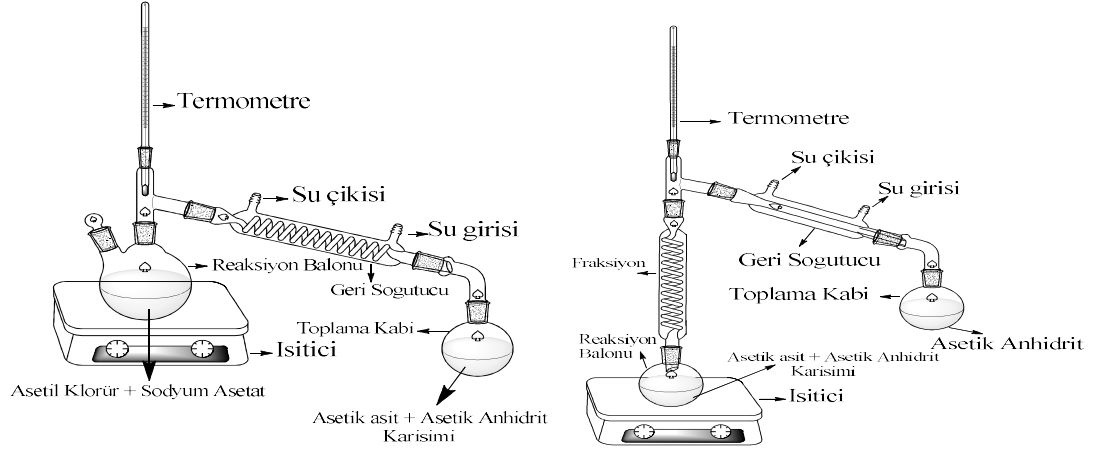
#### 6.3.1 Çözücülerin Saflaştırılması

- 4 °A 24 saat bekletilerek aktivasyon işlemi gerçekleştirildi. moleküler elek, 150 °C'lik etüvde
- Etilasetat, vinilasetat, aseton, asetonitril içerisine moleküler elek eklenerek manyetik karıştırıcıda 5 gün süreyle karıştırıldı ve çözücülerin içindeki suyun moleküler elek tarafından çekilmesi sağlandı.
- Ticari olarak satın alınan pridin ve asetil klorür fraksiyonlu destilasyon düzeneğinde kaynama noktalarında saflaştırıldı.
- Sodyum asetat-3-hidrat, 40 °C'lik etüvde 7 gün süreyle bekletilerek sodyum asetat haline getirildi. Elde edilen sodyum asetat molekülü 200 °C'lik 4 saat bekletilerek aktivasyon işlemi gerçekleştirildi.

#### 6.3.2 Asetik Anhidrit Sentezi



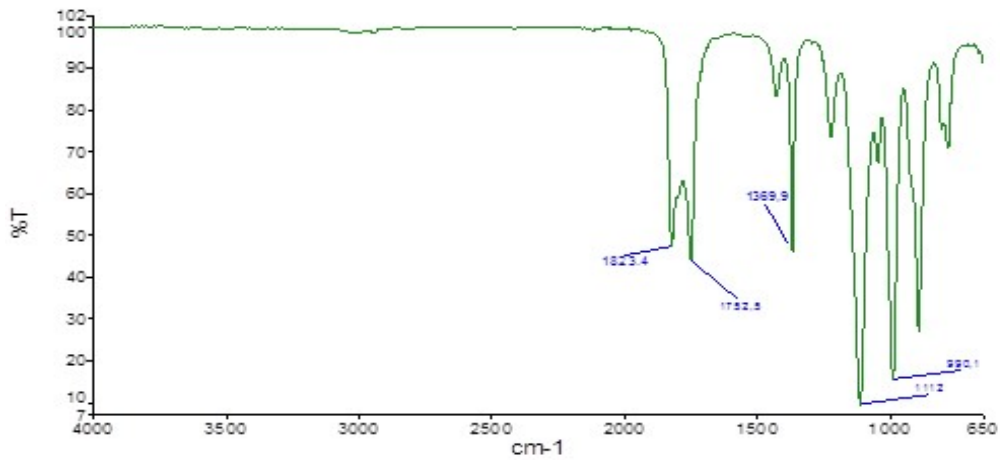
0.975 mol sodyum asetat, 200 °C'lik etüvde dört saat kurutuldu. Kurutulan sodyum asetat bir balonun içine alındı ve sıcaklık kontrolü için buz banyosuna yerleştirildi. 0.764 mol asetil klorür sıcaklık kontrol edilerek yavaş yavaş balona eklendikten sonra damıtma işlemi uygulandı. Damıtma sonucu elde edilen karışım fraksiyonlu damıtma işlemine tabii tutuldu [21]. (Şekil 6.1).



**Şekil 6.1:** Asetik Anhidrit sentezinde kullanılan damıtma düzenekleri.

Sentezlenen asetik anhidrit molekülünün FT-IR spektrumu alınarak literatürdeki spektrumlarla karşılaştırılmış, sentezin gerçekleştiği doğrulanmış ve açılme reaksiyonlarında kullanılmıştır. Sentezlenen asetik anhidritin FT-IR spektrumu Şekil 6.2’de verilmiştir.

FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 1823-1752 (Anhidrit gerilimi C=O iki band), 1370 (C-O-C-asimetrik gerilimi), 1112-990 (C-O gerilimi).

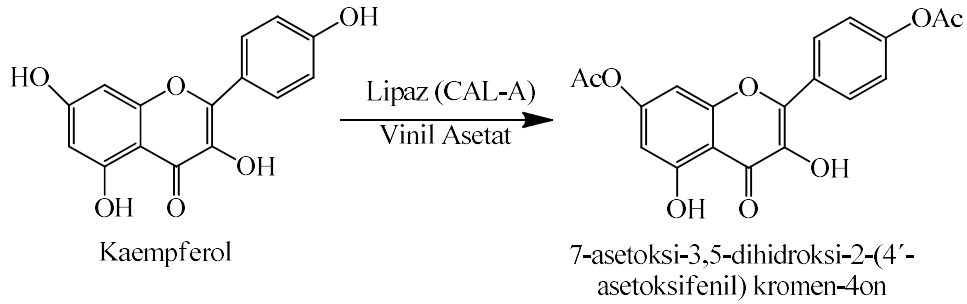


**Şekil 6.2:** Asetik anhidrit molekülünün FT-IR spektrumu.

### 6.3.3 7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on Sentezi (B-1)

7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on molekülünün sentezinde açıl sağlayıcı ajan olarak etil asetat ve vinil asetat, enzim olarak CAL-A ve PSL kullanılarak toplamda üç farklı deneme yapılmıştır.

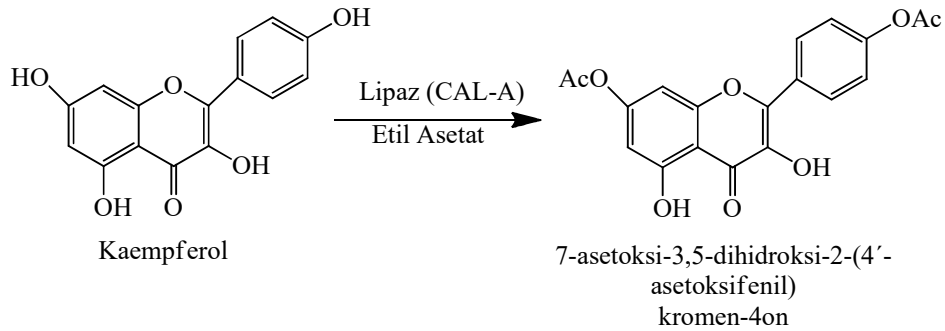
#### • Vinil Asetat Kullanılarak Yapılan Sentez



Kaempferol (0.139g), vinil asetat (1.15ml), aseton (50ml) ve lipaz (CAL-A) (0.500g) vida kapaklı plastik viyallere alındı. Ortamın nem oranını düzenlemek için 2.500g 4 °A moleküler elek reaksiyon ortamına eklendi ve çalkalayıcılı su banyosunda 60 °C ve 200 rpm hızda reaksiyon başlatıldı [93].

Çeşitli aralıklarla reaksiyon ortamından örnekler alınarak İTK analizleri yapıldı. Dokuz gün sonunda reaksiyon sonlandırıldı. Kolon ve ince tabaka kromatografisi kullanılarak saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi.

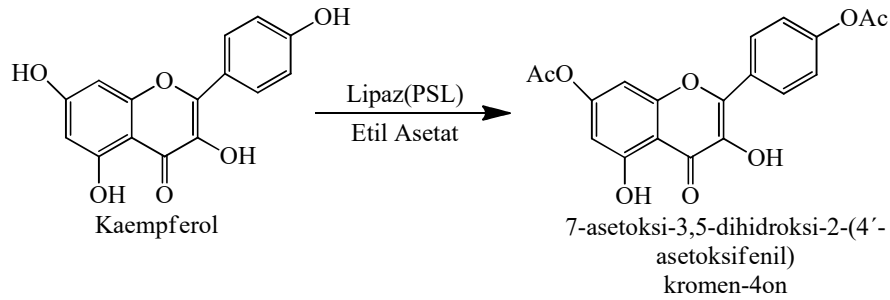
#### • Etil Asetat Kullanılarak Yapılan Sentez



Kaempferol (55mg), etil asetat (0.9ml), asetonitril (9ml) ve lipaz (CAL-A) (0.100g) vida kapaklı plastik viyallere alındı. Ortamın nem oranını düzenlemek için 0.900g 4<sup>0</sup>A moleküler elek reaksiyon ortamına eklendi ve çalkalıyıcılı su banyosunda 50<sup>0</sup>C ve 175 rpm hızda reaksiyon başlatıldı [106].

Çeşitli aralıklarla reaksiyon ortamından örnekler alınarak İTK analizleri yapıldı. Dört gün sonunda reaksiyon sonlandırıldı ve kolon, ince tabaka kromatografisi kullanılarak saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi.

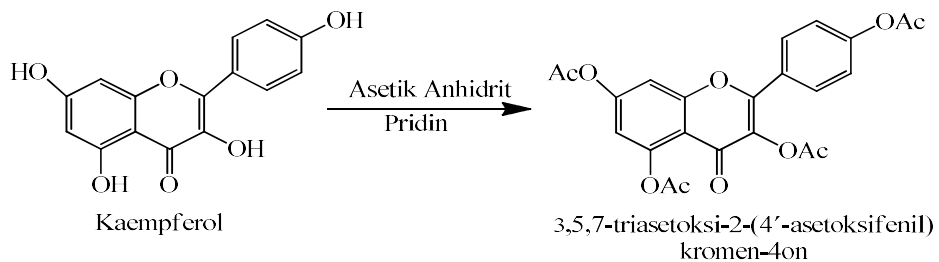
#### • PSL Kullanılarak Yapılan Sentez



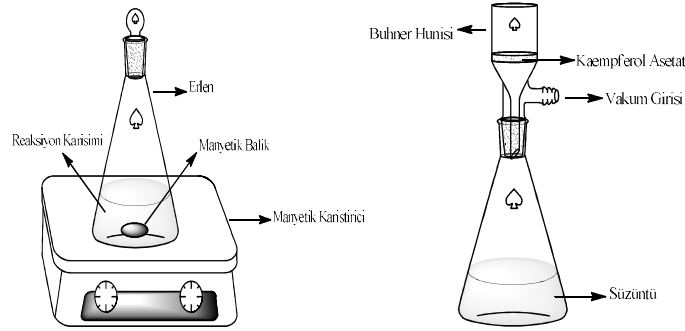
Kaempferol (0.0579g), etil asetat (0.5ml), aseton (20ml) ve lipaz (PSL) (0.200g) vida kapaklı cam viyallere alındı. Ortamın nem oranını düzenlemek için 1g 4<sup>0</sup>A moleküler elek reaksiyon ortamına eklendi ve reflaks düzeneğinde 40<sup>0</sup>C ve 200 rpm da reaksiyon başlatıldı [107].

Çeşitli aralıklarla reaksiyon ortamından örnekler alınarak İTK analizleri yapıldı. Sekiz gün sonunda reaksiyon sonlandırıldı ve gerekli saflaştırma işlemleri gerçekleştirildi.

#### 6.3.4 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on (B-2) Sentezi



Kaempferol (0.1747mmol), pridin (2.5 ml) ve asetik anhidrit (2.5 ml) reaksiyon kabına alınarak sentez başlatıldı. Reaksiyon 24 saat boyunca, manyetik karıştırıcıda 250 rpm hızda karıştırılarak gerçekleştirildi. Reaksiyon ortamından farklı zamanlarda örnekler alınarak İTK analizleri yapıldı. Reaksiyon sonlandırıldıktan sonra karışım 20 ml soğuk saf su üzerine karıştırılarak eklendi ve 1 saat boyunca saf su içerisinde bekletildi. Çöken kaempferol asetat Buchner hunisi ile süzülerek alındı. Katı kurutuldu ve İTK ile saflaştırıldı [105].



Şekil 6.3: Kaempferol asetat sentezinde kullanılan düzenekler.

## 6.4 Kromatografik Yöntemler

### 6.4.1 Kolon Kromatografisi

Kolon kromatografisi yöntemi, sentezlenen bileşiklerin ayırma işlemlerinin gerçekleştirilmesinde kullanıldı. Yöntemde adsorban olarak Merck firmasının, parçacık büyüklüğü 0.040-0.060 mm (230-400 mesh E.) olan silikajel 60G kullanıldı. Adsorban dibinde pamuk bulunan cam kolonlara, hekzan ile karıştırılarak yüklendi. Ayrılacak madde adsorbanın üzerine yerleştirilen cam pamuğunun üzerine dikkatli bir şekilde ilave edildi. Uygun çözücü sistemi ile yıkanarak fraksiyonların ayrılması sağlandı.

### 6.4.2 İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisi yöntemi, reaksiyonların ilerleyişlerini kontrol etmek amacıyla ve ayırma işlemlerinde sıklıkla kullanılmıştır. Çalışmalarda silikajel

kaplı hazır alüminyum plaklar (DC – Alufolien Kieselgel 60 F<sub>254</sub> Merck) kullanıldı. Plaklara tatbik edilen maddeler uygun çözücü sistemlerinde yürütülüp, UV(254 nm) ışık altında maddelere ait lekeler incelenerek sentezler süresince reaksiyonlardaki gelişmeler ve elde edilen maddelerin saflıkları gözlemlendi.

### **6.4.3 Preparatif İnce Tabaka Kromatografisi**

Preparatif ince tabaka kromatografisinin, ince tabaka kromatografisine göre en büyük avantajı fazla miktarda madde ayırıp saflaştırmak için kullanılmasıdır. Hazır olarak alınan ve alüminyum üzerine kaplanmış olan silikajel içeren ince tabaka kromatografisi miktarı az olan fraksiyonlara uygulanırken preparatif ince tabaka kromatografisi ise miktarı 30 mg'dan fazla olan fraksiyonları ayırmak için kullanıldı.

Preparatif ince tabaka kromatografisi plaklarını hazırlama yöntemi;

100 g silikajel 60G ve 50 g silikajel 60 HF<sub>254</sub> adsorbanları 300 ml destile su ile bir balon içerisinde homojen bir hal alana kadar çalkalandı. CAMAG cam plak çekme aleti kullanılarak 20 cm x 20 cm boyutlarındaki kare cam plaklara 0.5 mm kalınlığında hazırlanan homojen karışım çekilerek önce oda sıcaklığında kurutuldu daha sonra cam plaklara etüve alınarak 1 saat süre ile 105 °C'de aktive edildi. Son olarak fraksiyonlar bir cam plağa 15-20 mg olacak şekilde uygulanarak, uygun çözücü sistemlerinde yürütüldü. Plaka yüzeyinde maddelere ait bantlar UV (254nm) ışık altında incelendi ve R<sub>f</sub> değeri farklı olan maddeler birbirinden ayrıldı. Bu işlem maddeler saflaştırılınca kadar tekrar edildi.

## **6.5 Spektroskopik Yöntemler**

### **6.5.1 Infrared Spektroskopisi (IR)**

Infrared (IR) spektroskopisi; moleküllerin IR ışığını absorpsiyonuyla, titreşim ve dönme enerji seviyelerine uyarılmalarının ölçümüne dayanır. Bu yöntem ile moleküler bağ karakterizasyonu yapılarak; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar, iki bileşiğin aynı olup olmadığı,

yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik veya alifatik olup olmadığı belirlenebilir.

Çalışmamızda elde edilen maddelerin IR spektrumları, Perkin Elmer Spectrum 65 markalı FT-IR cihazında alınmıştır.

### **6.5.2 Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi ( <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR)**

Nükleer manyetik rezonans günümüzde, bileşiklerinin yapılarının aydınlatılmasında en çok kullanılan yöntemdir. Atom numarası ve/veya kütle numarası tek sayı olan atomların, çekirdeklerinin dış bir manyetik alanın etkisi altındayken uygun radyo frekansındaki bir foton ile rezonansa gelmesi ilkesine dayanarak çalışır. NMR tekniği ile bir bileşikte atomların bağlanma şekilleri, kimyasal bağların niteliği gibi yapısal özelliklerin aydınlatılması mümkündür. Analiz için örnekler dötero dimetilsülfoksit veya kloroform gibi dötero çözücüler kullanılarak hazırlanır.

Çalışmamızda elde edilen maddelerin NMR spektrumları, TÜBİTAK UME, Kimya Grubu Laboratuvarları Varian 600 MHz NMR cihazında alındı. Referans bileşik olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılmış olup, çözücü olarak da CDCl<sub>3</sub> tercih edilmiştir.

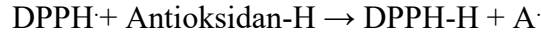
## **6.6 Biyolojik Aktivite**

### **6.6.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Yöntemi**

Vücutta yükseltgenmeye neden olan serbest radikalleri tutarak vücutta yükseltgenmenin zararlı etkilerini engelleyen moleküller olan antioksidanlar radikallere elektron vererek absorpsiyonu azaltırlar. Bu çalışmada antioksidan aktiviteleri 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) serbest radikali kullanılarak belirlenmiştir. DPPH serbest radikali 517 nm’de karakteristik absorpsiyona sahip bir radikaldir. Bu serbest radikalın 517 nm’deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmaya



bağlı olarak antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenir. Antioksidan aktivitenin varlığını belirleyen tepkime aşağıdaki gibidir.



Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH<sup>·</sup> derişimi spektrofotometrik yöntemlerle ölçülür ve DPPH radikalinin rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal giderim aktivitesi olarak belirlenir [98].

Radikal giderim aktivitesini belirlemek için öncelikle, metanol içerisinde 0.1 mM DPPH çözeltisi hazırlandı ve 1ml örnek çözeltisine hazırlanan DPPH çözeltisinden 4ml eklendi. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyona bırakıldı ve sonrasında 517 nm'de absoransı ölçüldü. Ölçülen absorans değerleri kontrolün absoransına karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi hesaplanırken aşağıdaki eşitlik kullanıldı.

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% inhibisyon)} = \frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \times 100 \quad (6.1)$$

$A_{\text{kontrol}}$ : Kontrolün Absoransı

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

DPPH'm rengindeki açılmaya bağlı olarak absorbsiyon değerinde azalma gözlenir ve reaksiyon karışımının düşük absorbsiyon göstermesi, serbest radikal giderim aktivitesinin yüksek olduğunu gösterir.

### **6.6.2 Lipid Peroksidasyonu İnhibisyonu Aktivitesi ( $\beta$ -Karoten-Linoleik Asit Yöntemi)**

Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi toplam antioksidan aktivite olarak da bilinir. Lipit peroksidasyon inhibisyonu, linoleik asit yükseltgenmesiyle konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan  $\beta$ -karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlendi [99]. Bu yöntem,  $\beta$ -karotenin alkol içerisindeki çözeltisinin sarı rengindeki açılmaya dayanan bir yöntemdir. Yöntemin çalışma mantığı ise ortamda bulunan antioksidan, lipit peroksidasyonunu engellemekte veya reaksiyon sonucu ortaya çıkan serbest radikaller, antioksidan tarafından

temizlenmektedir. Bundan dolayı alkol içindeki  $\beta$ -karoten çözeltisinin sarı renginde herhangi bir değişme olmamaktadır.

Linoleik asit + (O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O) → Konjuge dienler ve diğer serbest radikaller

↓

$\beta$ -karoten → renk açılımı

Linoleik asit + (O<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O) +  $\beta$ -karoten + antioksidan → rengin korunması

1 ml kloroform içerisinde bulunan 0.5 mg  $\beta$ -karotene 25  $\mu$ 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  $\mu$ L farklı konsantrasyonlarda örnek çözeltisi içeren tüplere koyuldu. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbanları 470 nm’de ölçüldü. Tüpler 50°C’de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki  $\beta$ -karotenin rengi kayboluncaya kadar (yaklaşık 120 dk) inkübasyona devam edildi. BHT ve  $\alpha$ -tokoferol standart olarak kullanıldı. Absorbans yine 470 nm’de ölçüldü.  $\beta$ -karoten renk açılım oranı (R), aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{A}{A^1}}{t} \quad (6.2)$$

ln: Doğal Logaritma

A: Başlangıç Absorbansı

A<sup>1</sup>: İnkübasyondan Sonraki Absorbans

t: İnkübasyon Süresi (dk)

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA(\%inhibisyon) = \frac{R_{kontrol} - R_{örnek}}{R_{kontrol}} \times 100 \quad (6.3)$$

R<sub>kontrol</sub>: Kontrolün Renginin Açılma Hızı

R<sub>örnek</sub>: Örneğin Renginin Açılma Hızı

### 6.6.3 Cu<sup>+2</sup> İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC)

Cuprac deneyi küçük değişiklikler yapılarak 96 kuyucuklu plakalarda gerçekleştirildi. 1 mM DMF, 10 mM CuCl<sub>2</sub>, 7,5 mM Neocuproine, 1 M NH<sub>4</sub>CH<sub>3</sub>COO (pH 7,0) özelteleri ve distile su 1:1:1:0,6 oranlarında karıştırılıp etanol içindeki 25 µL bileşik çözeltisiyle (seyreltme oranı 1:20) plakalara konuldu. 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<sup>-1</sup> olarak verilmiştir. Etanol negatif, kurkumin ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Kurkuminin TEAC<sub>CUPRAC</sub> değeri 0,9 mmol TR g<sup>-1</sup> olarak hesaplandı [100-102]. Bileşiklerin TEAC<sub>CUPRAC</sub> değerleri referanslar kullanılarak hesaplandı [101-102].

Sentezlenen Maddenin TEAC değeri;

$$(\text{mmol TR g}^{-1}) = (\text{Absorbance} / \epsilon_{\text{TR}}) (205/25) (20/1) (2/0,02) \quad (6.4)$$

$\epsilon_{\text{TR}} = 16700$  <sup>[118]</sup> (Cihaz kaynaklı absorbans)

(205) = Toplam hacim

(25) = Ortama eklenen bileşik hacmi

(20/1) = Seyreltme faktörü

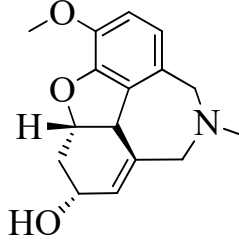
(2) = Sentezlenen maddenin çözücü hacmi(ml)

(0,02) = Sentezlenen maddenin ağırlılığı(g)

### 6.6.4 Antikolinesteraz Aktivite Tayin Yöntemi

Asetil ve bütiril kolinesterazın inhibitör aktiviteleri Ellman, Courtney, Andres ve Featherston tarafından geliştirilen spektroskopik yöntemle ölçüldü [103]. 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 [104].



Şekil 6.4: Galantamin.

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

$$(\%inhibisyon) = \frac{A_{kontrol} - A_{örnek}}{A_{kontrol}} \times 100 \quad (6.5)$$

A: Absorbans

## 6.7 Kaempferol ve B-2 Moleküllerinin Enzim Etkilerinin İncelenmesi

Çalışmamızda kaempferol ve B-2 moleküllerinin ksantin oksidaz (XO) ve karbonik anhidraz (CA) enzimleri üzerine etkisi incelenmiştir.

### 6.7.1 Ksantin Oksidaz (XO) Enzimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Ksantin oksidaz (XO, EC 1.1.3.22), yağ globül mebranında yer alan ve molibden içeren kompleks bir flavoenzimdir. XO'nun ürik asit metabolizmasına etki ettiği ve pürin metabolizmasında yer alan bir katalizör enzim olarak görev yaptığı bilinmektedir. Ayrıca oksijeni indirgeyerek hidrojen peroksit, süperoksit gibi reaktif oksijen kaynakları oluşturabildiği ve aynı zamanda nitriti, nitrit okside indirgeyerek

kuvvetli antimikrobiyal etki gösteren peroksinitrit oluşumunda rolü olduğu bilinmektedir. Bundan dolayı enzimin incelenmesi oldukça önemlidir.

Ksantin oksidaz enzimi, işlem görmemiş sütün toluen ve EDTA çözeltisi ile blender yardımıyla karıştırılmasından sonra, sırasıyla %38'lik ve %50'lik amonyum sülfat çöktürmesi işlemleri uygulandı. Elde edilen enzimin moleküller üzerine etkileri incelendi.

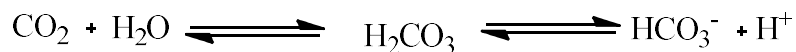
## 6.7.2 Karbonik Anhidraz (CA) Enzimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

### 6.7.2.1 CO<sub>2</sub>-Hidrataz Aktivitesi

Karbonik anhidraz enzimi (CA) bütün organizmalarda bulunan Zn<sup>+2</sup> iyonu bulduran bir metaloenzimdir (karbonat hidroliyz E.C.4.2.1.1). İlk olarak sığır eritrositlerinde keşfedilen CA, canlılarda CO<sub>2</sub> molekülünün hidratasyonunu ve HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> iyonunun dehidratasyonunu katalizleyen bir enzimdir.

Eritrosit CA'sının en önemli fonksiyonu doku kılcal damarlarında metabolizma ürünü olan CO<sub>2</sub>'yi H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'e, akciğer de ise H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>'ün CO<sub>2</sub>'e dönüşmesini katalizleyerek, solunum olayında yer almasıdır. Bunun dışında CA, tükürük üretimi, safra üretimi, tat ve koku almada, kas fonksiyonlarının düzenlenmesinde ve pankreas özsuyu üretiminden görevli bir enzimdir. Vücuttaki birçok yaralı etkisinin yanında glokoma hastalığına (göz tansiyonu) neden olması, bazı izoenzimlerin tümör oluşumuna etki ettiği belirlenmiştir. Bu olumsuzlukları gidermenin en etkili yolu CA enziminin inhibisyonudur.

Karbonik anhidraz enziminin tayini, CO<sub>2</sub>-hidrataz aktivitesi yöntemiyle gerçekleştirildi. Bu yöntem karbondioksitin hidratasyonu sonucu açığa çıkan hidronyum iyonundan dolayı pH değeri 10.0'dan 7.4'e düşme süresinin ölçülmesine dayanır. Yöntemde indikatör olarak pH=7.4'te renk değiştiren fenol kırmızısı, tampon olarak da pH değeri 10.0 olan karbonat tamponu (0.15 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> / 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) kullanılmıştır.



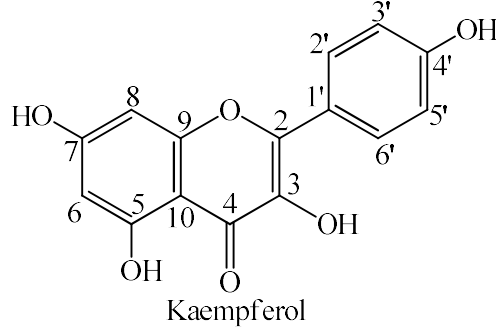
Reaksiyon tüpüne sira sıyla 2 ml indikatör ve 1.5 ml doyun karbondioksit  zeltisi ekledi. Daha sonra 0.1 ml enzim  zeltisi ile aynı anda 0.4 ml karbonat tamponu tüpe ilave edildi. Bu aşamada kronometre çalıştırılarak rengin kırmızıdan sarıya geçme süresi ( $T_c$ ) kaydedildi. K r olarak kullanılan ortamda enzim yerine 0.1 ml saf su kullanılarak aynı işlemler gerçekleştirildi ve rengin değişmesi için geçen süre ( $T_0$ ) kaydedildi. Bu yönteme göre CA enzim aktivitesi için bir enzim  nitesi (E ), enzimsiz olarak meydana gelen CO<sub>2</sub> hidratasyon süresini yarıya indiren enzim miktarı olarak ifade edilir. Buna göre;

$$E  = \frac{T_0 - T_c}{T_c}$$

formülü kullanılarak enzim  zelteleri için E  değeri hesaplandı.

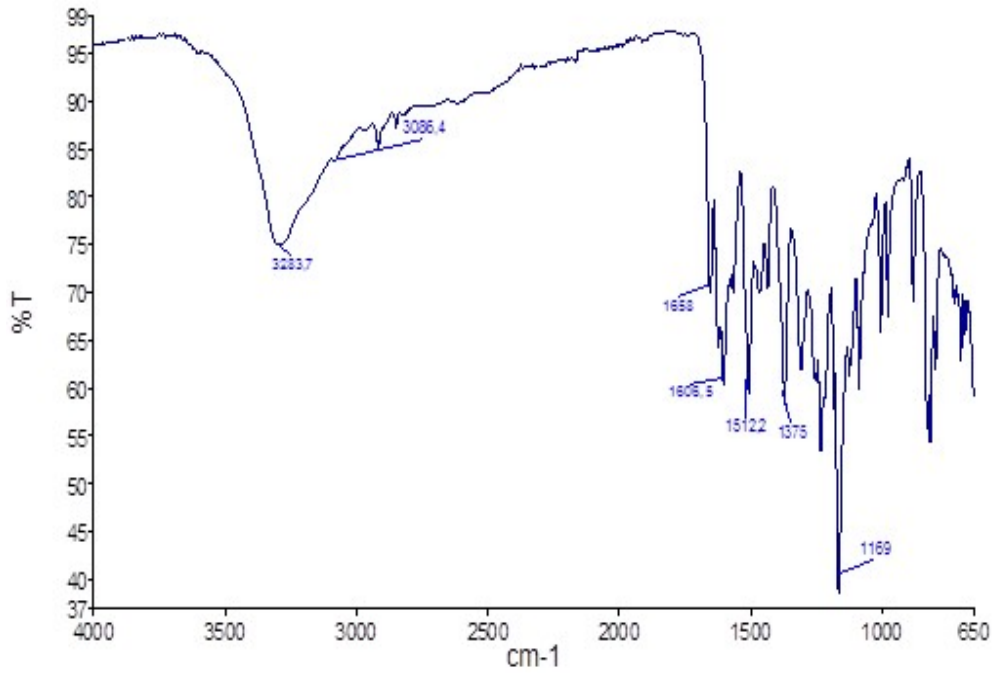
## 7. BULGULAR

### 7.1 Kaempferol



#### 7.1.1 Kaempferolün FT-IR spektrumu

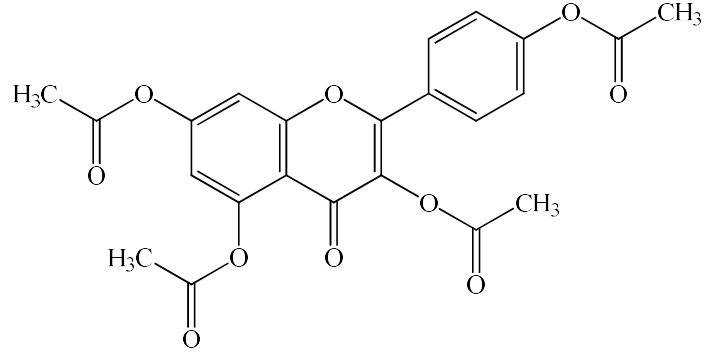
FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3283 (-OH gerilimi), 3086 (Aromatik -C-H gerilimi), 1658-1606 (C-C=O gerilimi), 1512 (Aromatik C=C gerilimi), 1375 (C-O-C- asimetric gerilimi), 1169 (C-O gerilimi).



Şekil 7.1: Kaempferol molekülünün FT-IR spektrumu.

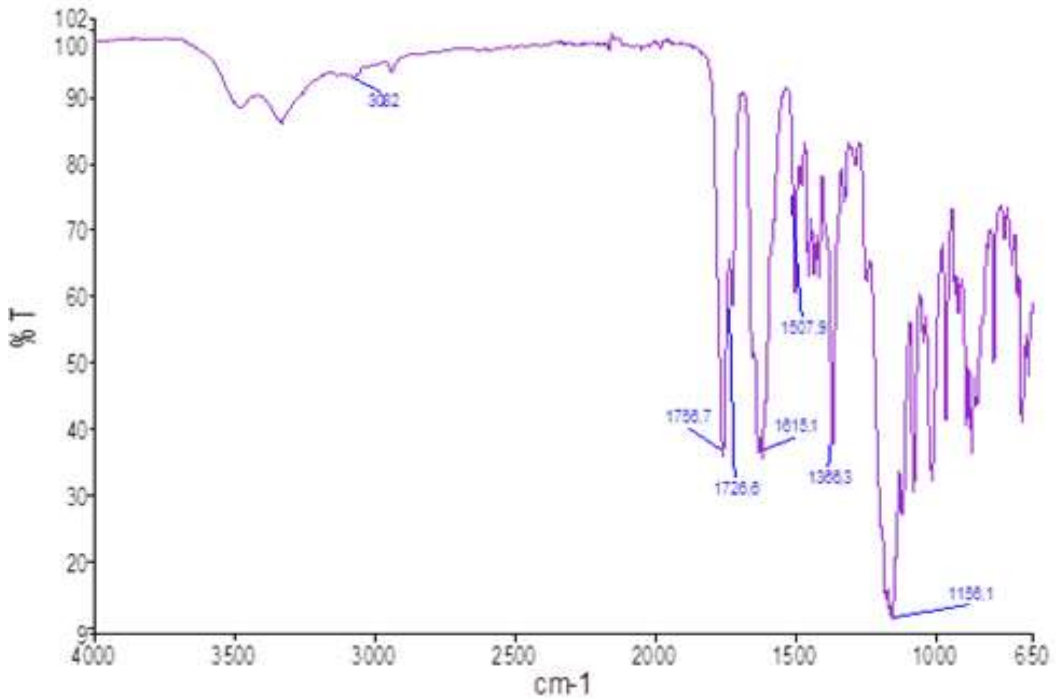
## 7.2 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on (B-2)

### 7.2.1 B-2'nin FT-IR Spektrumu



Şekil 7.2: 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on.

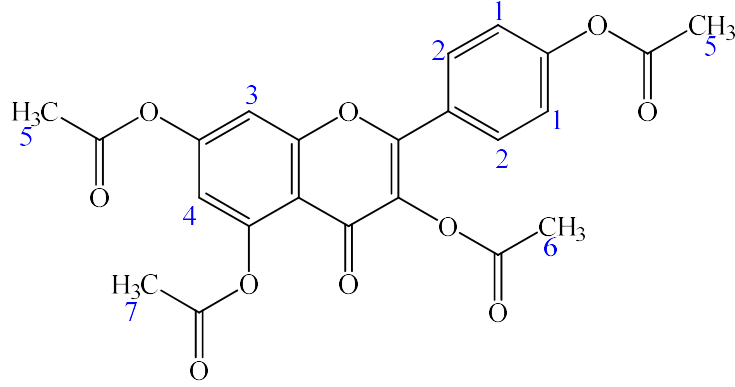
FT-IR ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3082 (Aromatik  $\text{-C-H}$  gerilimi), 1756-1726 ( $\text{O-C=O}$  karbonil gerilimi), 1615 ( $\text{C-C=O}$  gerilimi), 1507 (Aromatik  $\text{C=C}$  gerilimi), 1366 ( $\text{C-O-C}$  asimetric gerilimi), 1156 ( $\text{C-O}$  gerilimi).



Şekil 7.3: 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on molekülünün FT-IR spektrumu.



## 7.2.2 B-2'nin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu

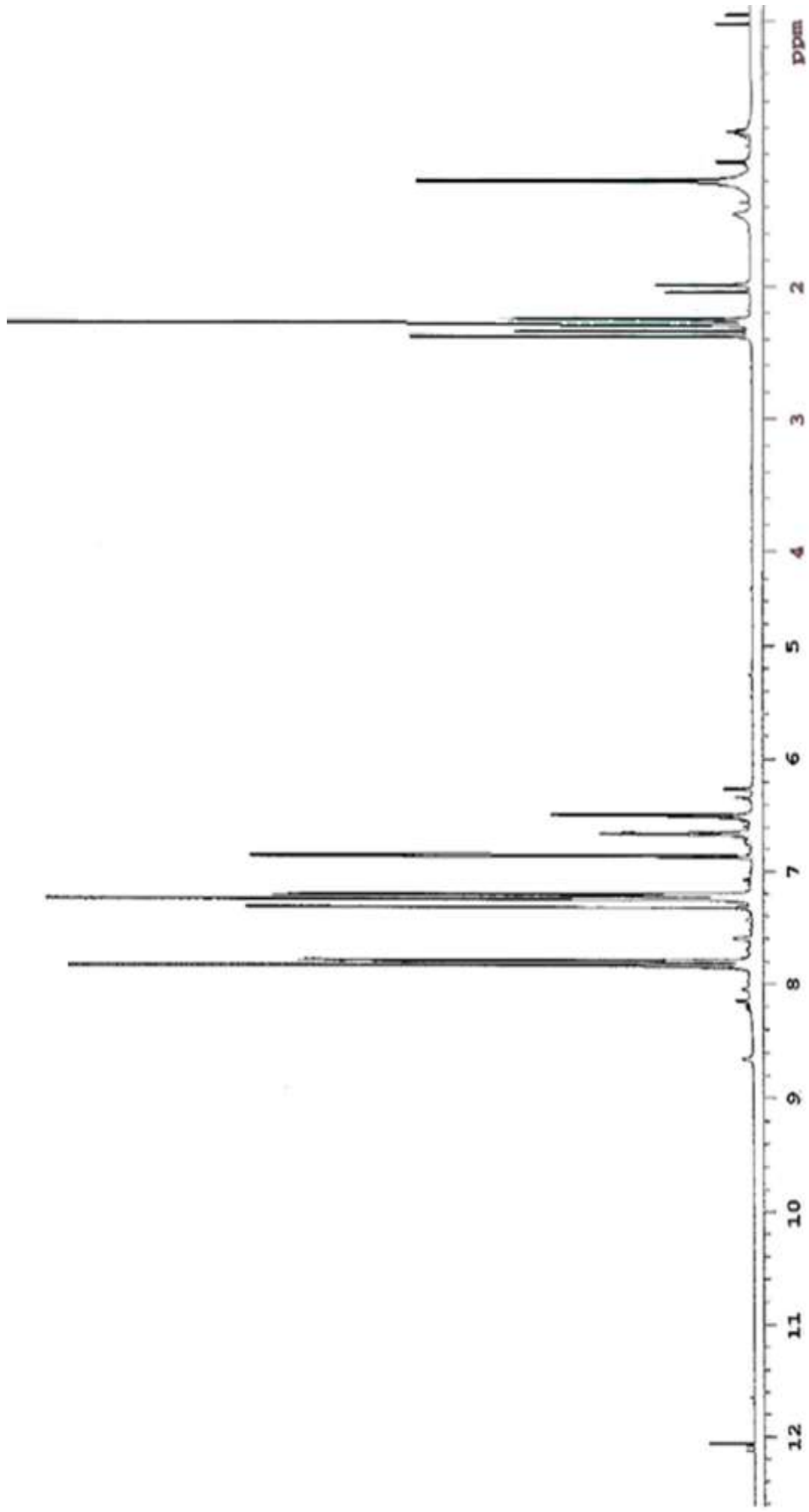


Şekil 7.4: 3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on (B-2).

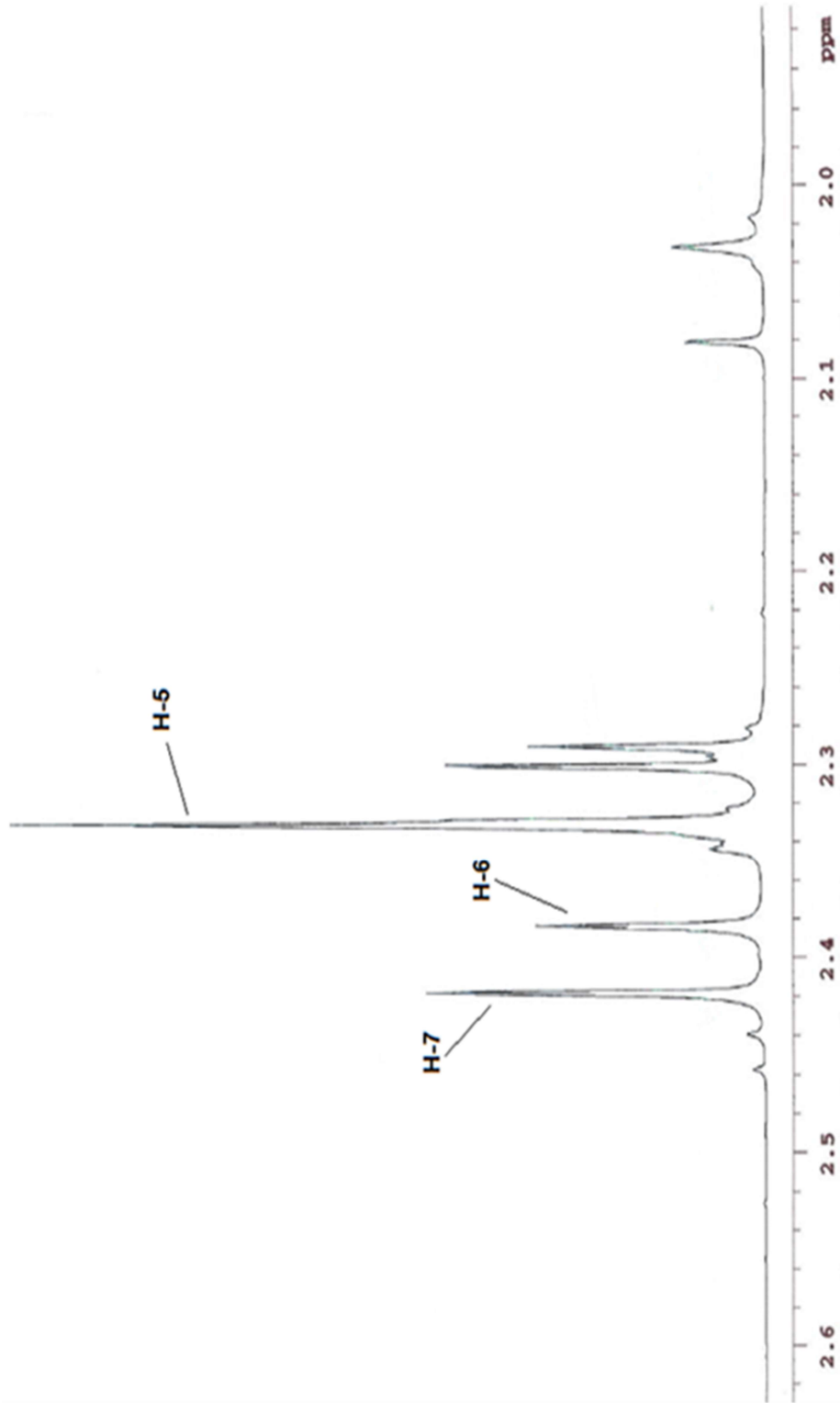
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.82 (2H, d, H-2), 7.78 (1H, s, H-4), 7.32 (1H, s, H-3), 7.23 (1H, s, H-1), 2.42 (3H, s, H-7), 2.39 (3H, s, H-6), 2.33 (6H, s, H-5).

3,5,7-triasetoksi-2-(4'-asetoksifenil) kromen-4on bileşiği, toplam 268.1 mg açık sarı toz halinde elde edilmiştir.

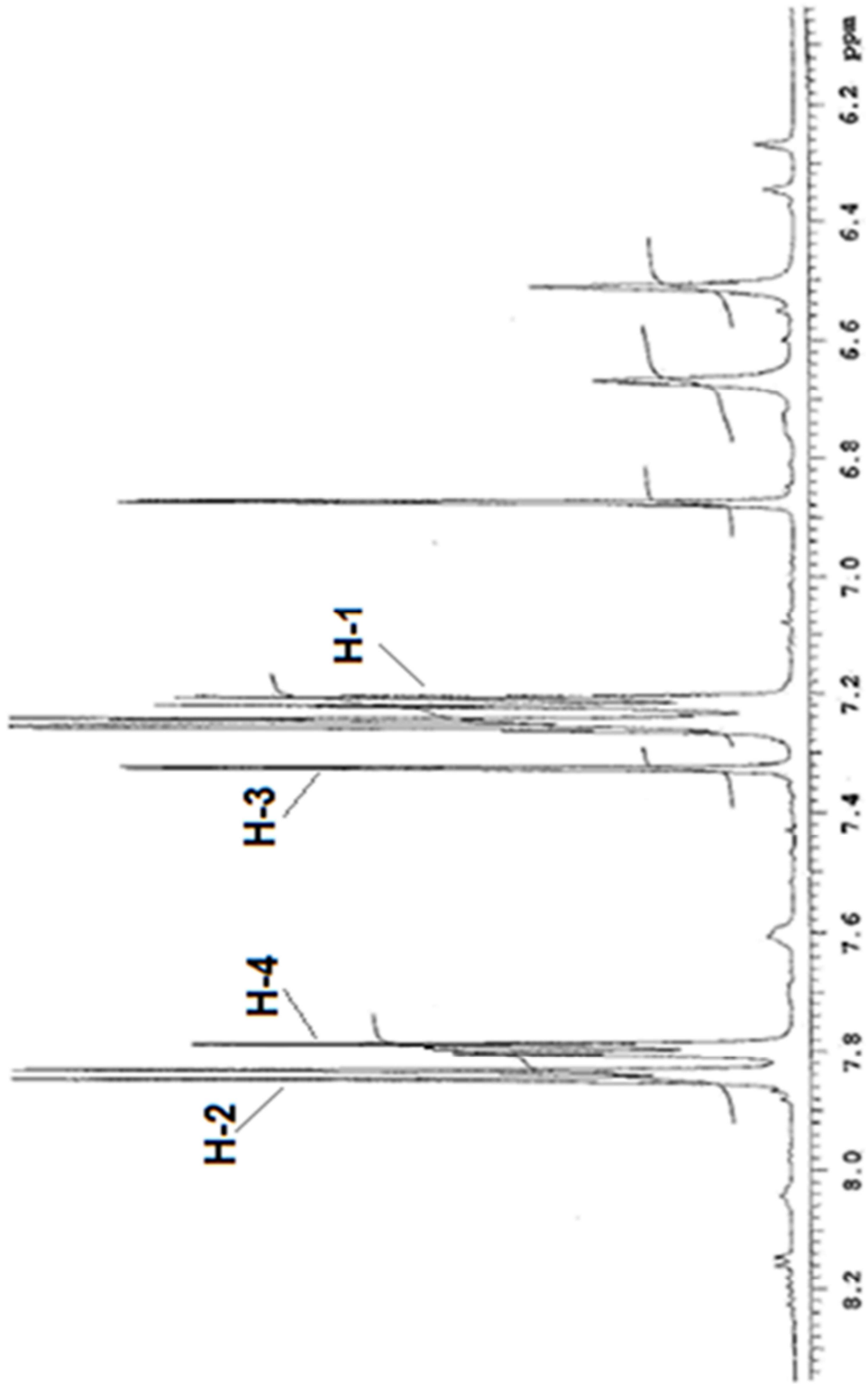
<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda (Şekil 7.7) singletler halinde üç adet metil gözlenmiştir. Bunlardan H-5, H-6 ve H-7 protonlarına ait olan ve δ 2.3-2.4 ppm aralığında gözlenen pikler, kaempferol molekülünde bulunmayan asetil metillerine ait piklerdir ve açılmanın gerçekleştiğinin önemli bir kanıtıdır. δ 7.32 ppm'de singlet halinde izlenen sinyal H-3 protonuna aittir. İki elektronegatif grubun orto konumunda bulunan H-4 protonu δ 7.78 ppm de izlenmiştir. H-2 protonu bağlı olduğu konum dolayısıyla mezomerik olarak elektron kaybetmektedir. Bu durum diğer aromatik protonlara göre daha alt alanda sinyal izlenmesine neden olmuştur. Benzer şekilde H-1 protonu bağlı bulunduğu yerden dolayı mezomerik olarak elektron yoğunluğu artmaktadır. Bu nedenle diğer aromatik protonlara göre daha üst alanda gözlenmiştir. H-1 ve H-2 protonları dublet pikleri halinde sırasıyla, δ 7.23 ve δ 7.82 ppm'de izlenmiştir.



Şekil 7.5: B-2 molekülünün  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu (0-12 ppm).

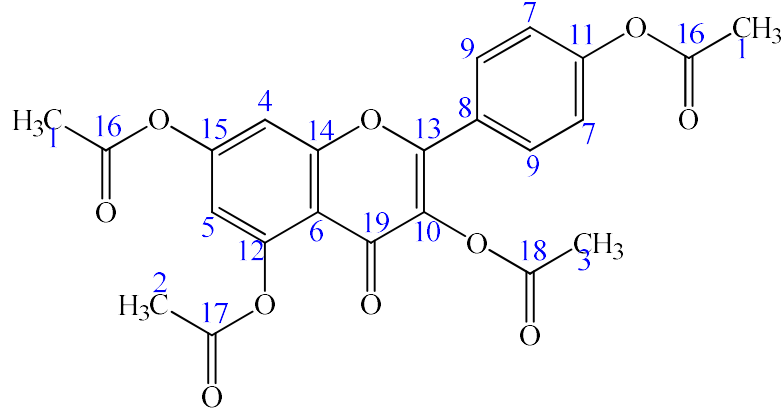


Şekil 7.6: B-2 molekülünün  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu (2.0-2.6 ppm).



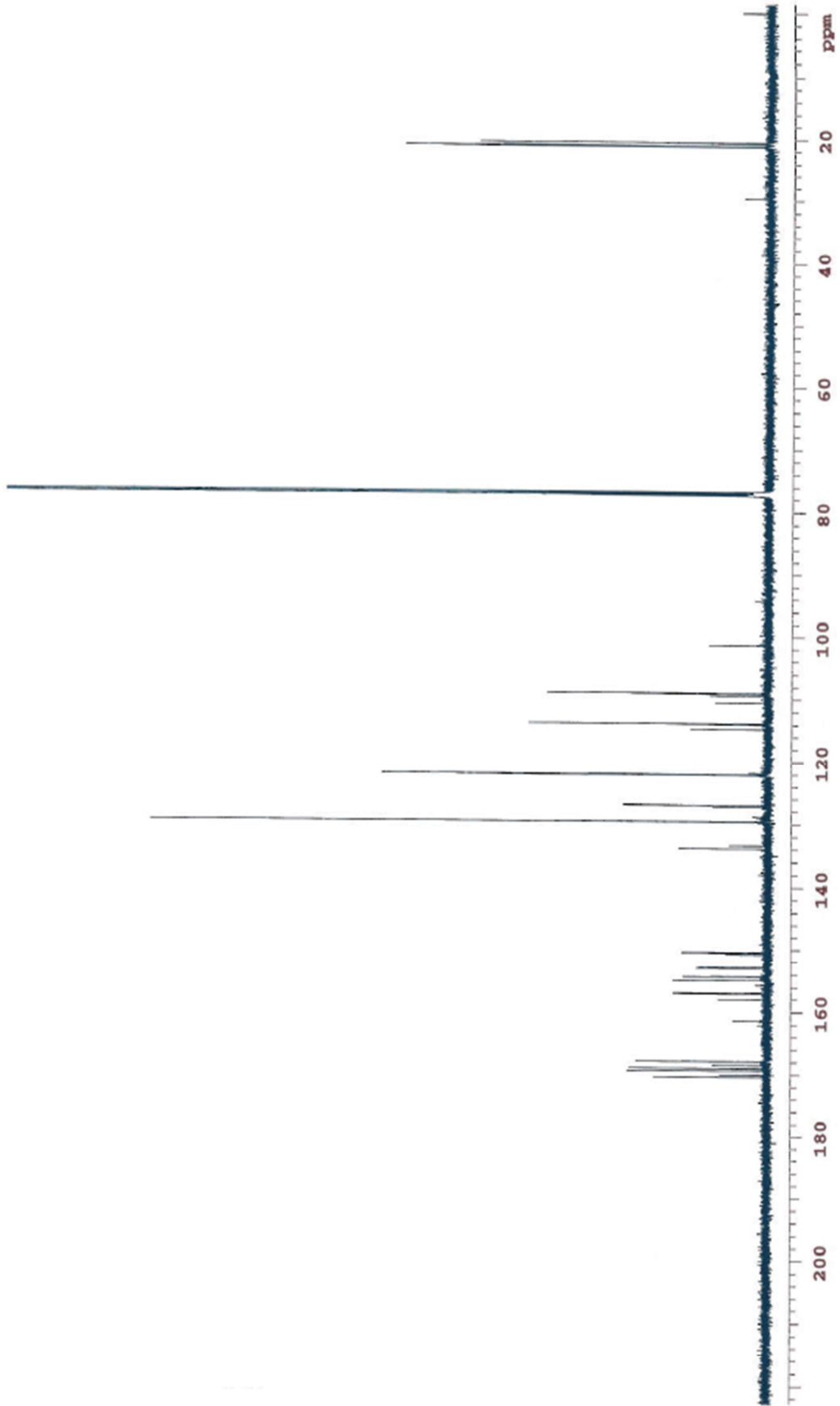
Şekil 7.7: B-2 molekülünün <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (6.2-8.2 ppm).

### 7.2.3 B-2'nin <sup>13</sup>C-NMR Spektrumu

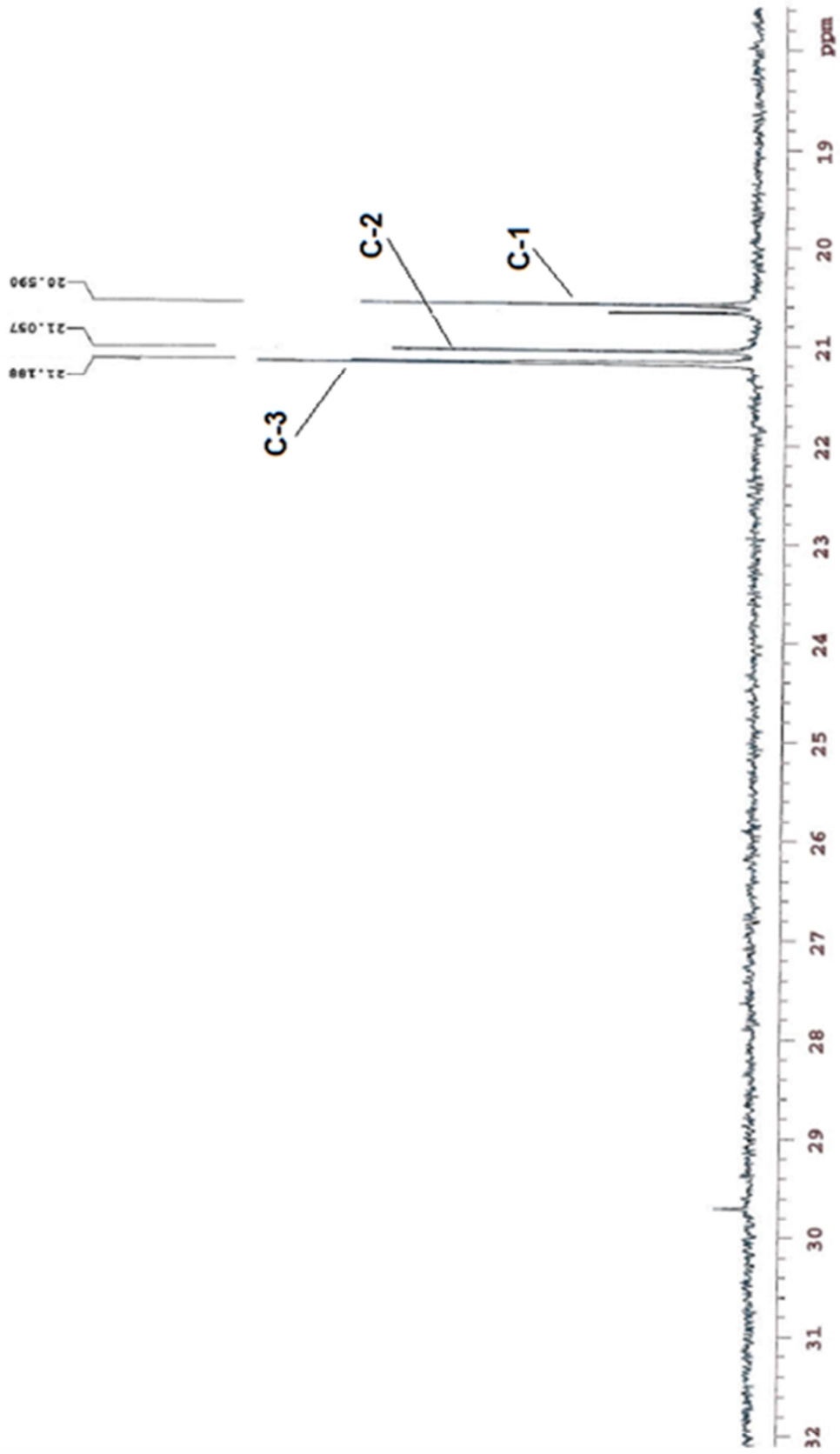


<sup>13</sup>C-NMR (150.82 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 170.343 (C-19), 169.340 (C-18), 168.922 (C-17), 167.312 (C-16), 156.949 (C-15), 154.925 (C-14), 154.289 (C-13), 154.212 (C-12), 152.947 (C-11), 152.732 (C-10), 150.709 (C-6), 150.394 (C-8), 129.663 (C-9), 126.937 (C-7), 122.938 (C-5), 122.876 (C-4), 21.100 (C-3), 21.057 (C-2), 20.590 (C-1).

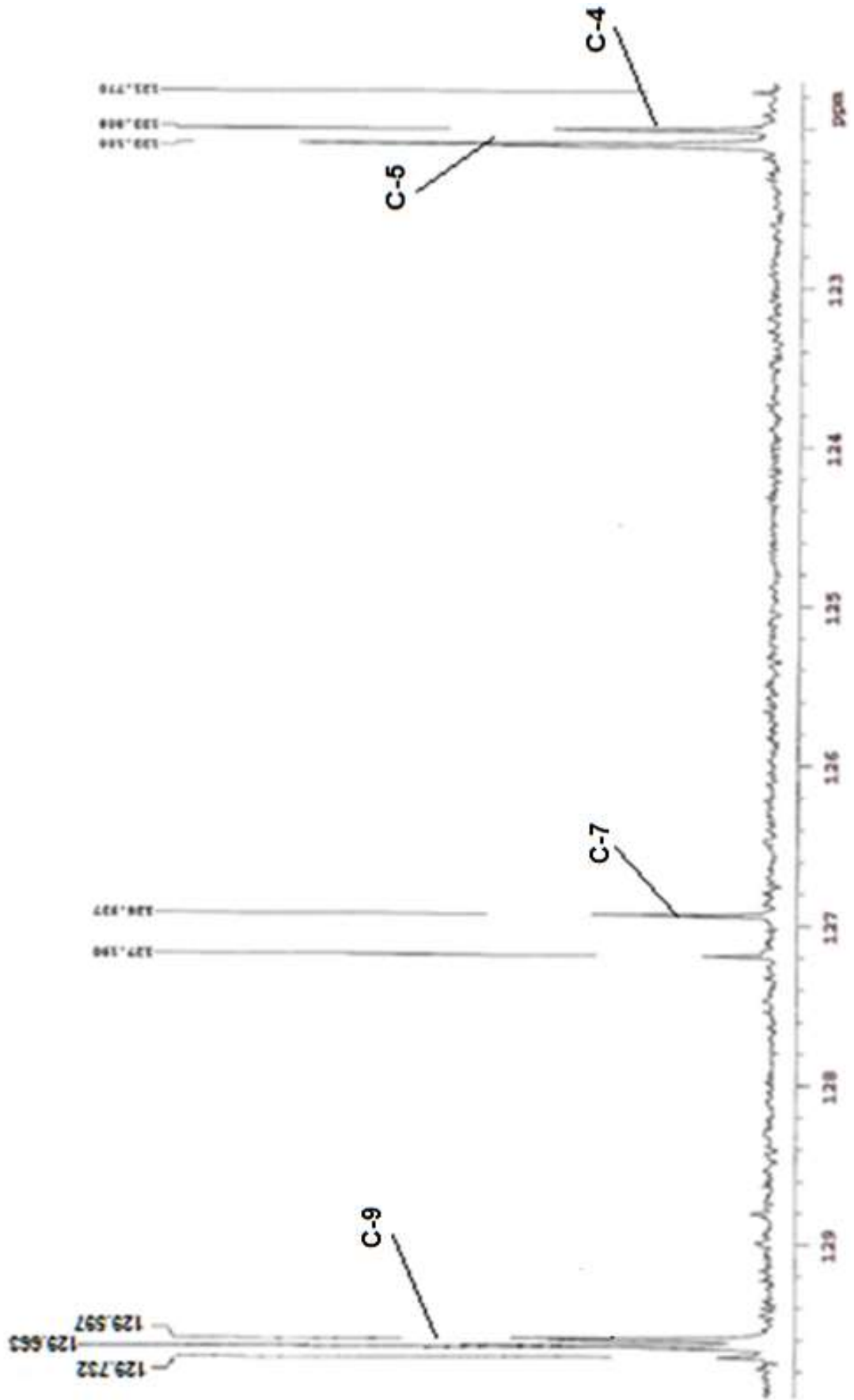
<sup>13</sup>C-NMR spektrumu incelendiğinde (Şekil 7.10) 3 metil, 4 metin ve 12 kuarterner karbon olmak üzere toplamda 19 adet karbon piki izlenmiştir. Metil karbonları, δ20.590, 21.057 ve 21.100 ppm'lerde asetil metili olarak gözlemlenmiştir. Karakteristik C-16, C-17 ve C-18 kuarterner karbonlar ise 167.312, 168.922 ve 169.340 ppm'de gözlemlenmiştir. Bu karbonlar asetil grubuna ait olan kuarterner karbonlardır. C-19 Kuarterner karbonu ise halka içi ketonu konumunda olduğundan en alt alan olan 170.343 ppm değerinde gözlemlenmiştir. C-9 metin karbonları, bağlı olduğu konumdan dolayı mezomerik elektron kaybeder. Bu durum C-9 karbonunun C-7 karbonuna göre daha alt alan olan 129.663 ppm değerinde pik vermesine neden olur. Üzerinde hidrojen bulunmayan aromatik kuarterner karbonlar olan, C-6, C-8, C-13 ve C-14 karbonları hidrojen içermediklerinden dolayı diğer aromatik karbonlara göre daha alt alan olan, sırasıyla, 150.709, 150.394, 154.289 ve 154,925 ppm değerlerinde olduğu gözlemlenmiştir.



Şekil 7.8: B-2'nin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (0-200 ppm).

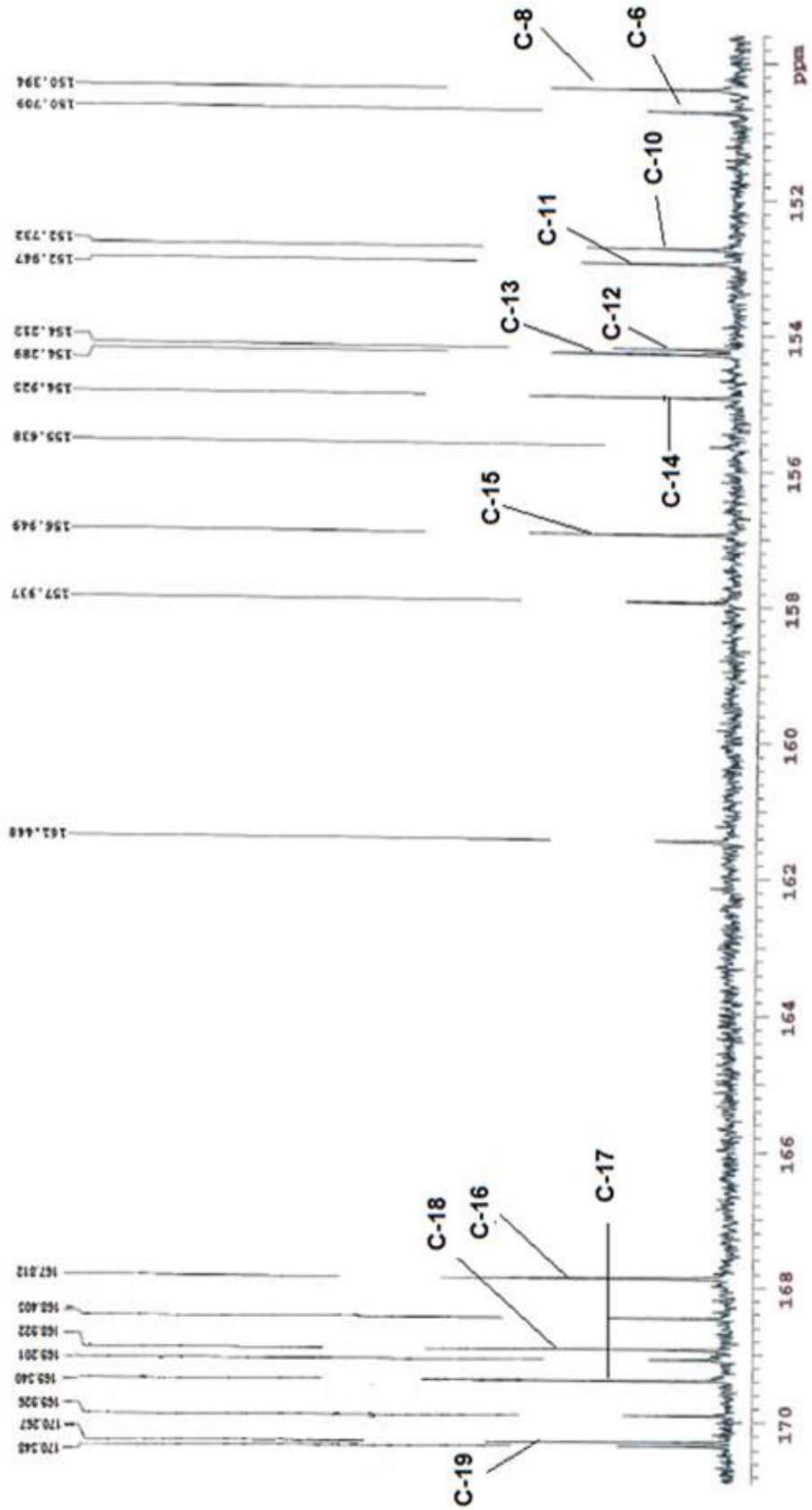


Şekil 7.9: B-2'nin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (19-32 ppm).



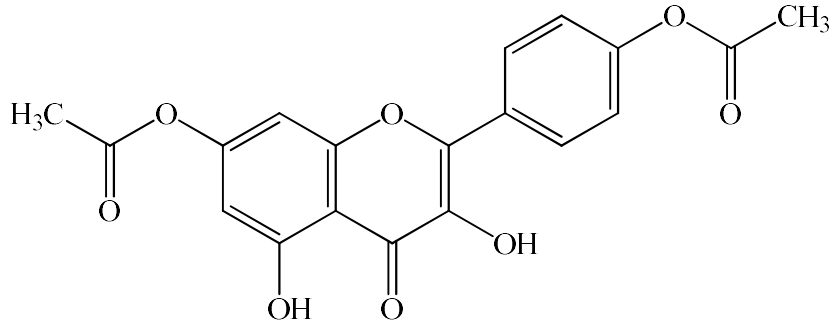
Şekil 7.10: B-2'nin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (123-130 ppm).





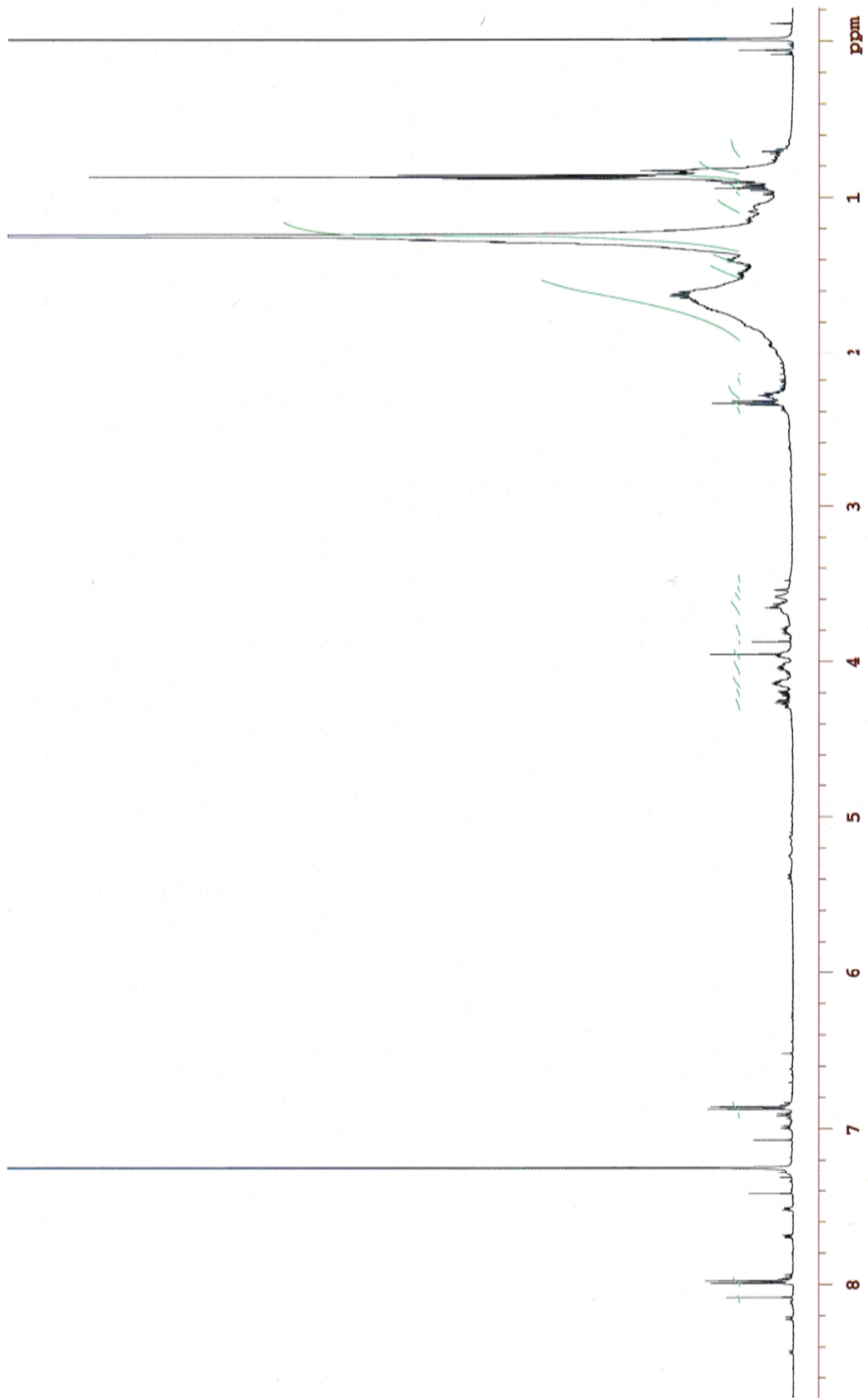
Şekil 7.11: B-2'nin  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (151-170.5 ppm).

### 7.3 7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'asetoksifenil) kromen-4-on (B-1)

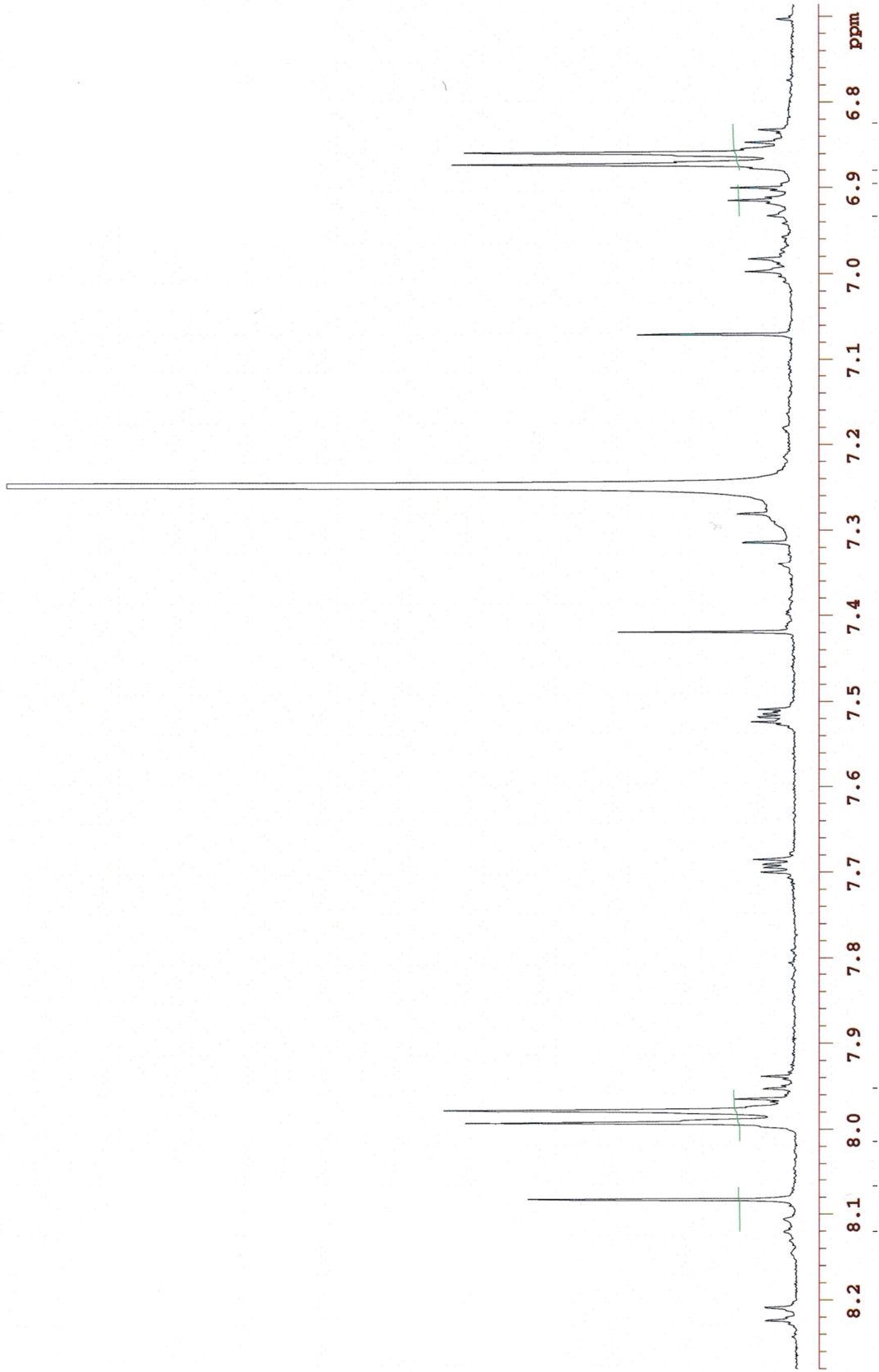


Şekil 7.12: 7-asetoksi-3,5-dihidroksi-2-(4'asetoksifenil) kromen-4-on (B-1).

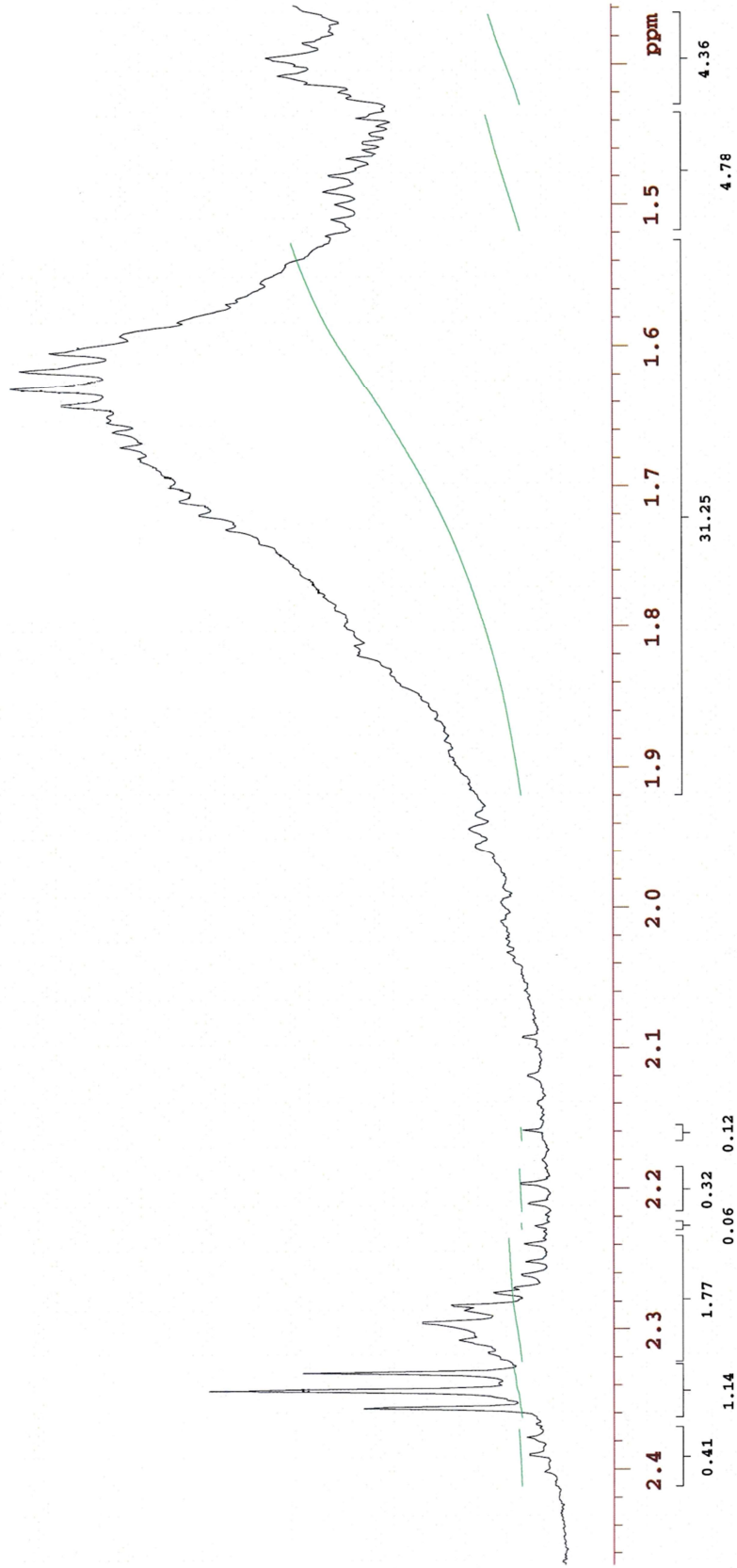
Enzim katalizörlüğünde gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucu elde edilmesi beklenen B-1 molekülüne ait NMR spektrumları (Şekil 7.15, Şekil 7.16, Şekil 7.17 ve Şekil 7.18) incelendiğinde, beklenen reaksiyonun gerçekleşmediği açık şekilde görülmektedir. Enzim katalizli yapılan bu ve benzeri birçok denemede herhangi bir sonuç alınamamıştır.



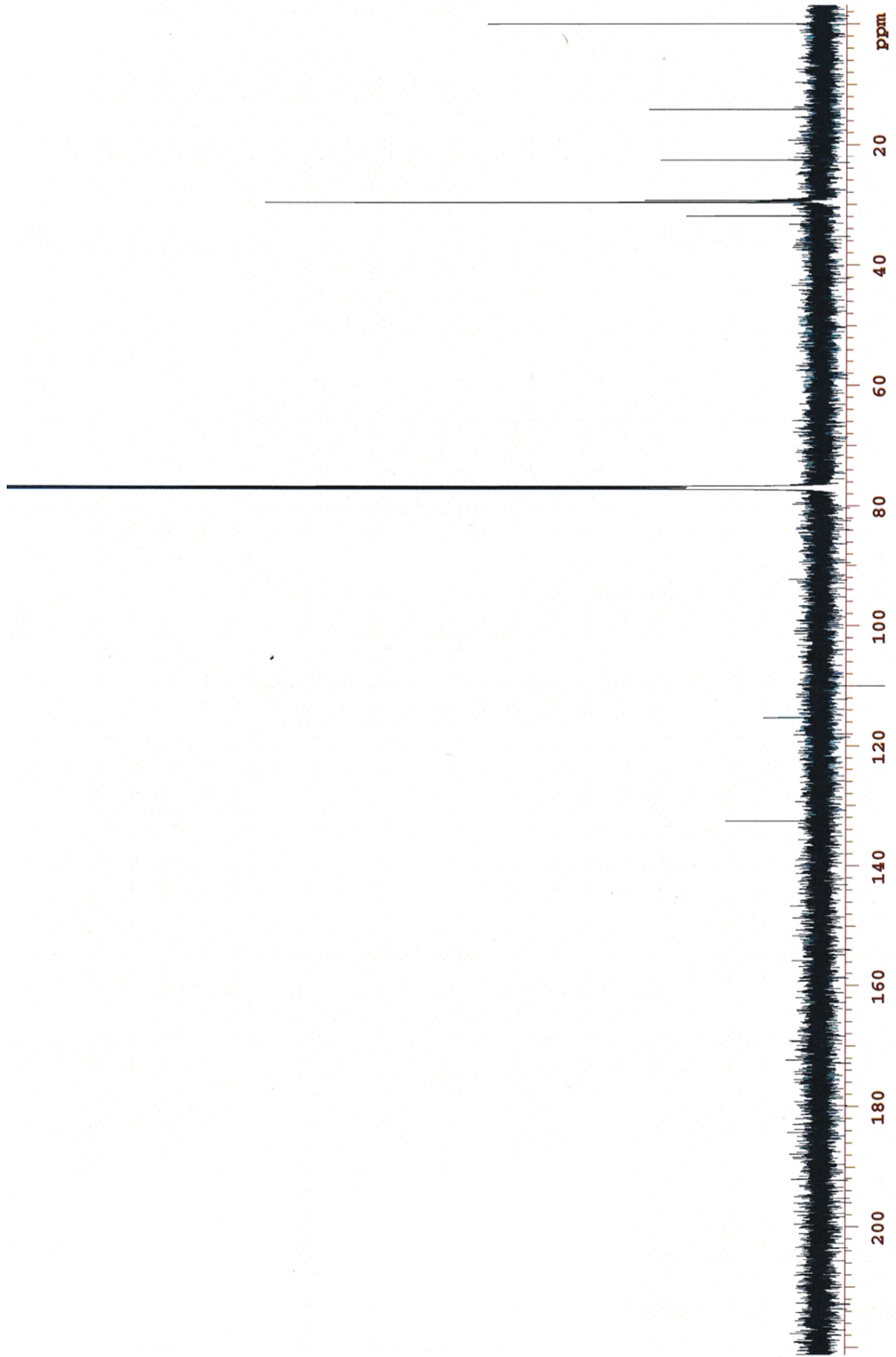
Şekil 7.13: B-1'in <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (0-8 ppm).



Şekil 7.14: B-1'in <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (6.8-8.2 ppm).



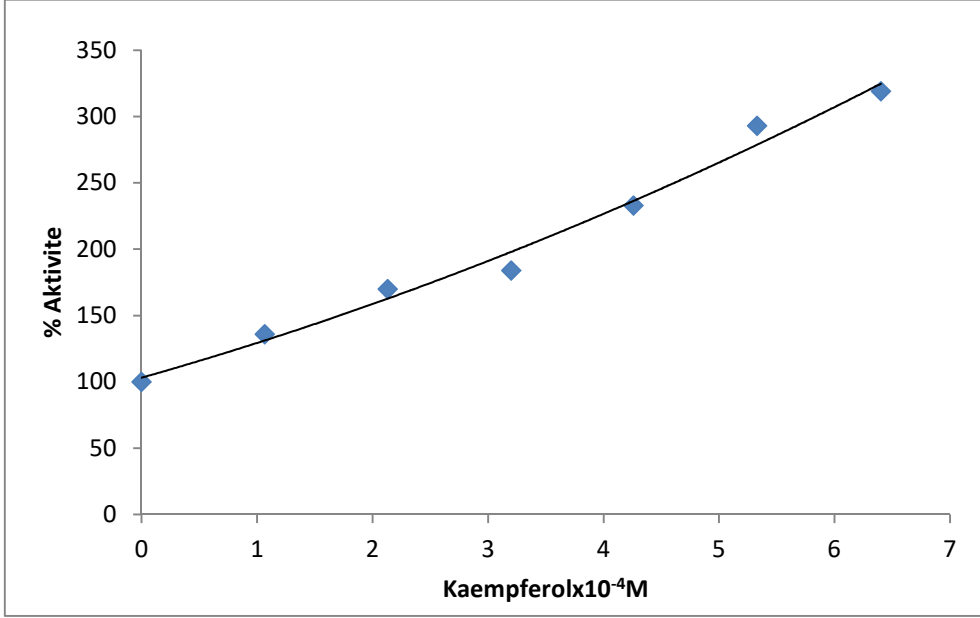
Şekil 7.15: B-1'in <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (1-2.4 ppm).



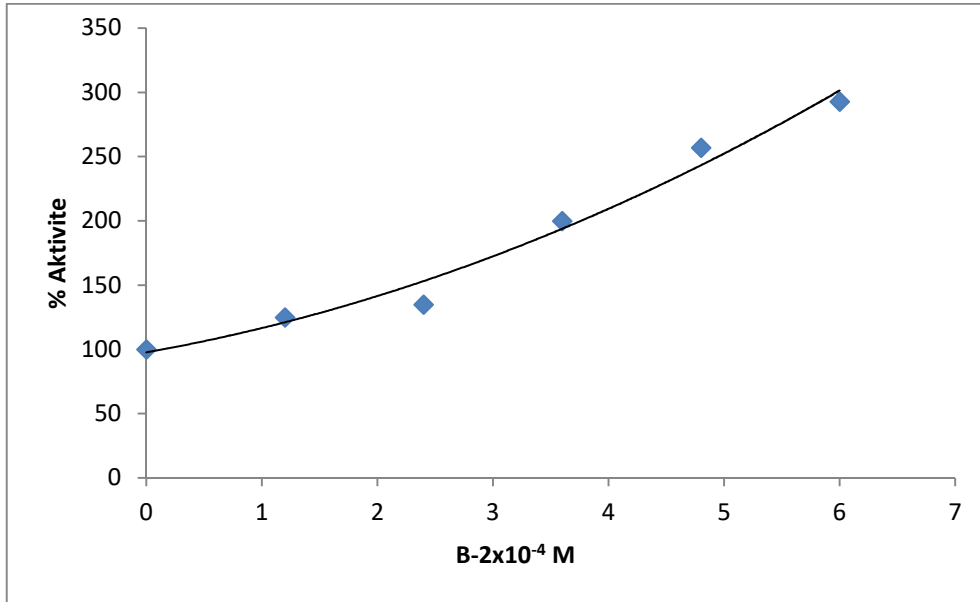
Şekil 7.16: B-1'in  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu (0-200 ppm).

## 7.4 Kaempferol ve B-2 Moleküllerinin Enzim Aktiviteleri

### 7.4.1 Kaempferol Bileşikliğinin Ksantin Oksidaz Enzimi Üzerine Etkisi



Şekil 7.17: Kaempferol'ün Ksantin Oksidaz enzimi üzerine etkisi.



Şekil 7.18: B-2'nin Ksantin Oksidaz enzimi üzerine etkisi.

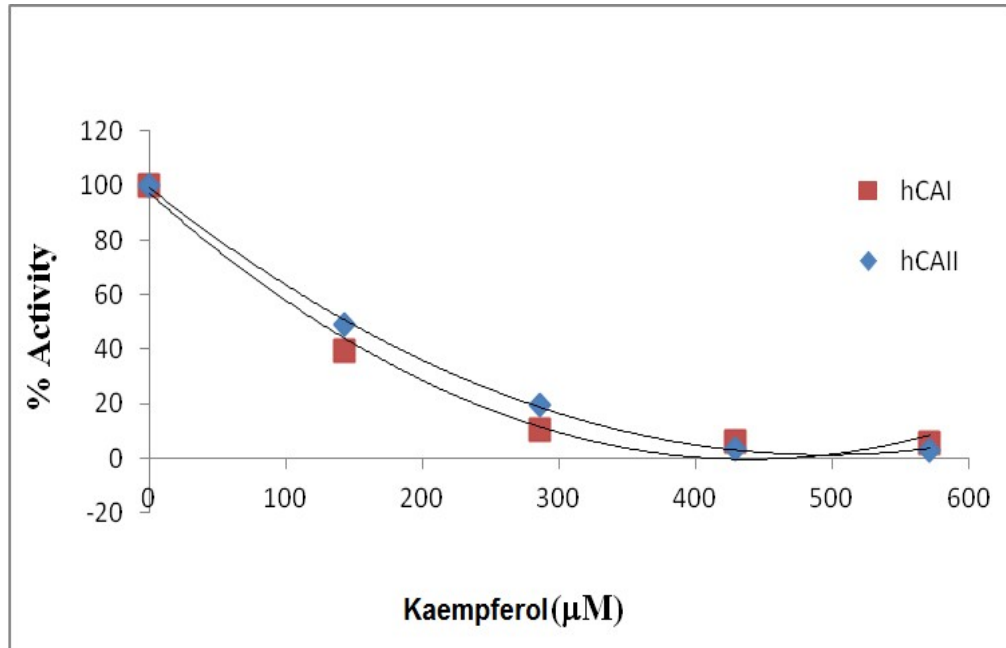
Afinite etkisi incelenen kaempferol ve B-2 moleküllerinin ksantin oksidaz enzimini aktive ettiği grafiklerden anlaşılmaktadır.

#### 7.4.2 Karbonik Anhidraz(CA) Enzimi Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Kaempferol ve B-2 molekülleri için karbonik anhidraz enzim aktivitesi, CA I ve CA II olmak üzere iki izoenzimle uygulanmıştır.

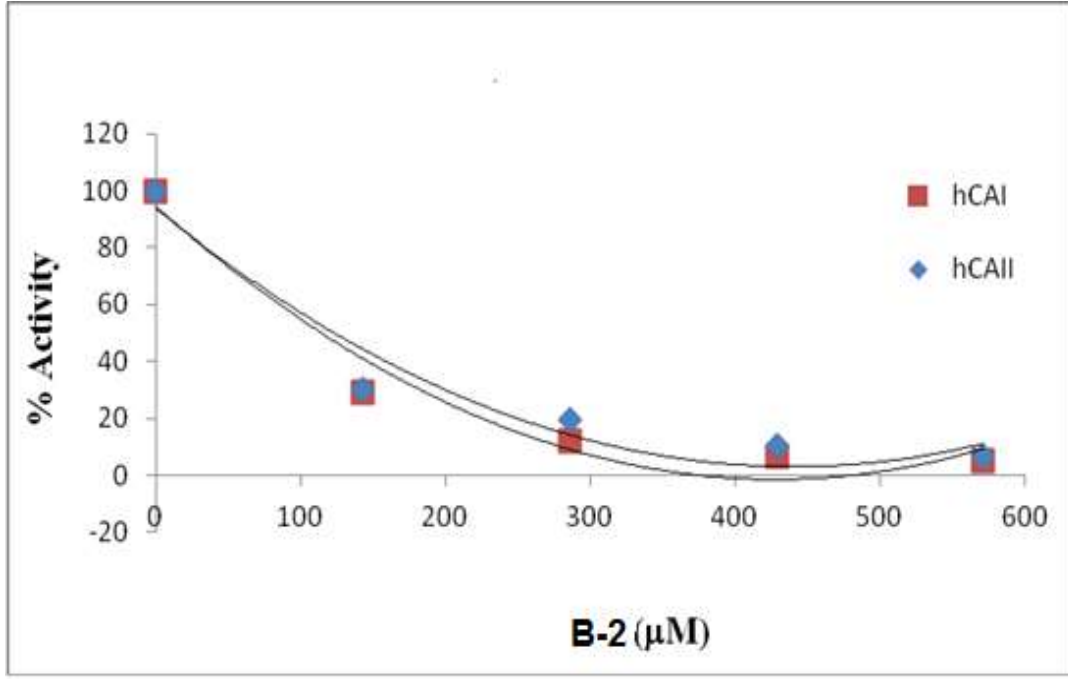
Çalışmamızda kullanılan muhtemel inhibitörlerin  $IC_{50}$  değerlerinin belirlenmesi amacıyla, sabit substrat konsantrasyonunda her bir inhibitör için beş farklı konsantrasyonda elde edilen % aktivasyon-[I] grafikleri çizilip %50 inhibisyona neden olan inhibitör konsantrasyonları belirlenmiştir.

$IC_{50}$  değerlerinin hesaplanabilmesi için Şekil 7.18 ve Şekil 7.19'da verilen eğrilerden yararlanılmıştır.  $IC_{50}$  değerleri Tablo 7.1' da verilmiştir.



Şekil 7.19: Kaempferol molekülünün CA izoenzimlerine etkisi grafiği.





Şekil 7.20: B-2 molekülünün CA izoenzimlerine etkisi grafiği.

Tablo 7.1: Kaempferol ve B-1 bileşiklerinin IC<sub>50</sub> değerleri.

Bileşik	hCA I	hCA II
	IC <sub>50</sub> (µM)	IC <sub>50</sub> (µM)
<b>Kaempferol</b>	123	145
<b>B-2</b>	113	125

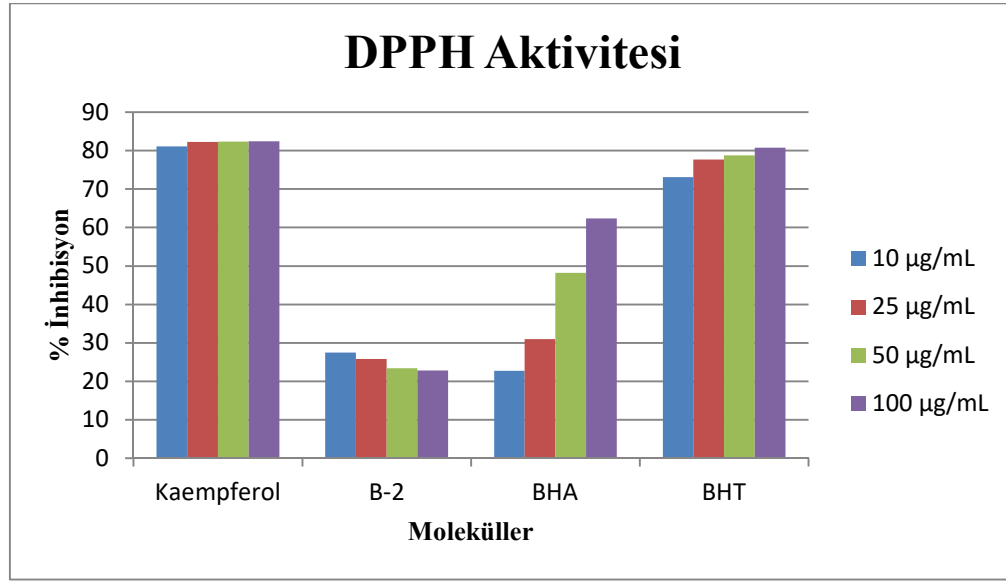
## 7.5 Biyolojik Aktivite Sonuçları

### 7.5.1 DPPH Serbest Radikali Giderim Aktivitesi Sonuçları

Kaempferol ve B-2 moleküllerinin DPPH serbest radikali giderim aktiviteleri 10, 25, 50, 100 µg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonlarda tayin edilmiştir. Standart olarak BHT (Bütillenmiş hidroksi toluen) ve BHA (Bütillenmiş hidroksi anisol) kullanılarak aktivite karşılaştırmaları yapılmıştır. Ekstrelerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi % inhibisyon olarak Tablo 7.2’da verilmiştir.

**Tablo 7.2:** Moleküllerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları (% İnhibisyon).

	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Kampferol	81,09±0,14	82,31±1,04	82,39±0,22	82,49±0,34
B-2	27,47±0,12	25,77±1,2	23,37±2,27	22,79±0,74
BHA	22,75±2,15	30,97±4,14	48,17±3,94	62,39±2,99
BHT	73,09±2,62	77,68±0,74	78,79±0,76	80,82±1,56



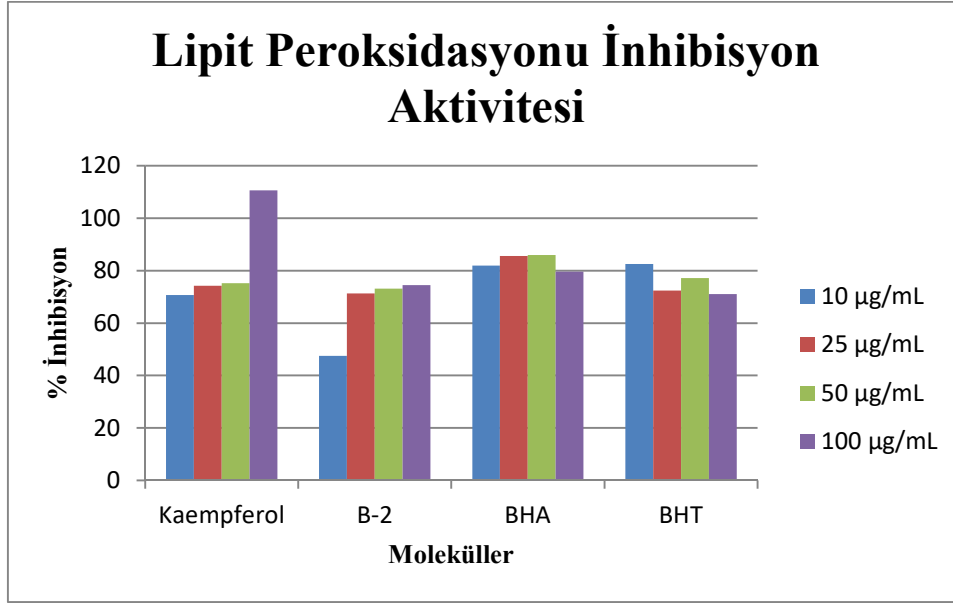
**Şekil 7.21:** Moleküllerin DPPH serbest radikal giderim aktivitesi sonuçları (% İnhibisyon).

### 7.5.2 $\beta$ -Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonuçları

Kaempferol ve B-2 moleküllerinin toplam antioksidan aktiviteleri  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemine göre 10, 25, 50, 100 µg/mL olmak üzere dört farklı konsantrasyonda yapılmıştır. Antioksidan aktivite karşılaştırmalarında standart olarak BHT ve BHA kullanılmıştır. Sonuçlar ise Tablo 7.3'de gösterilmiştir.

**Tablo 7.3:** Moleküllerin lipid peroksidasyon % inhibisyon sonuçları.

	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
Kampferol	70,68±1,82	74,23±2,51	75,26±3,48	110,66±6,65
B-2	47,47±14,23	71,27±5,66	73,18±4,45	74,44±5,30
BHA	81,90±1,95	85,54±1,73	85,98±2,42	79,54±4,13
BHT	82,56±5,03	72,38±11,8	77,12±2,93	71,02±1,01



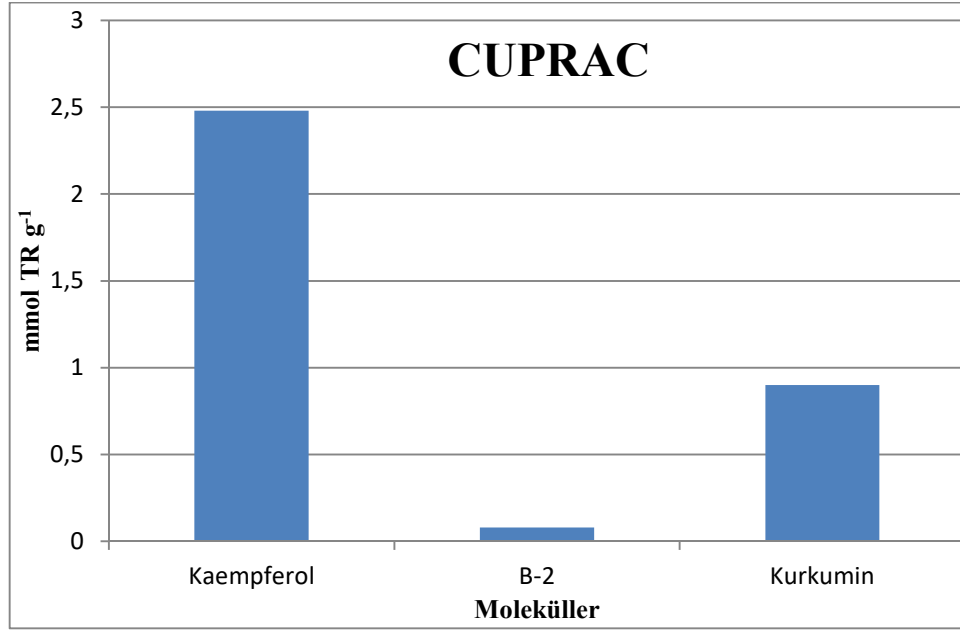
**Şekil 7.22:** Moleküllerin lipid peroksidasyon % inhibisyonu.

### 7.5.3 Cu<sup>+2</sup> İndirgeme Kapasitesi (CUPRAC) Sonuçları

Kaempferol ve B-2 moleküllerinin antioksidan aktiviteleri Cu<sup>+2</sup> indirgeme kapasitesi yöntemine göre yapıp karşılaştırmalarında standart olarak kurkumin kullanılmıştır. Sonuçlar ise Tablo 7.4’de verilmiştir.

**Tablo 7.4:** Moleküllerin Cu<sup>+2</sup> indirgeme kapasitesi (CUPRAC) sonuçları.

Moleküller	mmol TR g <sup>-1</sup>
Kaempferol	2,48±0,42
B-2	0,08±0,01
Kurkumin	0,9



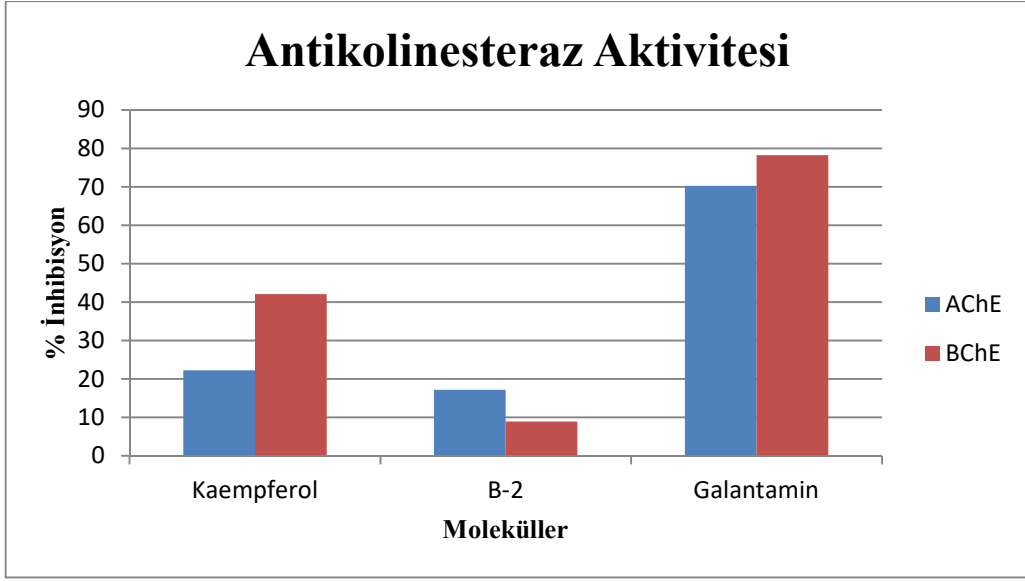
Şekil 7.23: Ekstrelerin Cu<sup>+2</sup> indirgeme kapasitesi (CUPRAC) sonuçları.

#### 7.5.4 Antikolinesteraz Aktivite Sonuçları

Kaempferol ve B-2 moleküllerinin AChE ve BChE % inhibisyon değerleri 200 µg/mL derişimde ölçülmüş ve standart olarak Galantamin bileşiği kullanılmıştır. AChE % ve BChE % inhibisyon değerleri Tablo 7.5’da verilmiştir.

Tablo 7.5: Moleküllerin AChE ve BChE aktivite sonuçları (% İnhibisyon).

	İnhibisyon% (200µg/mL)	
	AChE	BChE
Kaempferol	22,29 ±0,96	42,11 ± 1.707
B-2	17,15 ± 0,51	8,90 ±0,60
Galantamin	70,24±0,98	78,25±1,22



Şekil 7.24: Moleküllerin antikolinesteraz aktivite sonuçları (% İnhibisyon).

## 8. SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada bir flavonol olan kaempferol bileşiğinin enzim katalizli yöntemle bölge seçici olarak ve normal yöntemle seçicilik olmadan açillenme reaksiyonları gerçekleştirilerek, kimyasal yapılarının aydınlatılmış ve bazı biyolojik aktiviteleri araştırılmıştır.

Çalışmamızın öncelikli hedefi enzimatik sentez ile bölge seçimli açıl türevi oluşturmak, elde edilen türevler ile fenolik yapıdaki molekülde hidroksil gruplarının aktivitedeki katkısının belirlenmesi ve elde edilen ürünler üzerinden daha aktif molekülün sentezlenebilmesidir. Ancak, enzimatik katalizli reaksiyon sonucunda ürün elde edilememesi nedeniyle çalışma koşulları gözden geçirilmiş, enzimin çalışması için uygun koşulların sağlanamamasının ürün oluşmama nedenlerinden biri olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla kullanılan enzimler ve çalışma sıcaklıkları değiştirilmiş fakat yine bir ürün elde edilememiştir. Açılleyici olarak kullanılan ajanın etkisi olup olmadığının incelenmesi amacıyla açilleme ajanları da değiştirilmiş fakat bir sonuç alınamamıştır.

İkinci aşamada ise kaempferol molekülünü enzim katalizörlüğü olmadan açilleme reaksiyonu başarıyla gerçekleştirilmiştir. Enzimsiz olarak gerçekleştirilen bu reaksiyonda asetik anhidrit ve pridin kullanılarak elde edilen kaempferolün açıl türevinin yapısı FT-IR, <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektroskopileri kullanılarak aydınlatılmıştır.

Çalışmamızda, fizyolojik olarak oldukça önemli olan ksantin oksidaz enzimi üzerine kaempferol ve B-2 bileşiklerinin etkisi incelenmiştir. B-2 molekülünün, kaempferole göre enzimi daha fazla aktive ettiği görülmektedir. Kaempferol ve B-2 molekülleri de ksantin oksidazın aktivitesini önemli miktarda artırdığı için bu bileşiklerin de ticari önemleri artmaktadır.

Karbonik anhidraz enzimi üzerine kaempferol ve B-2 bileşiklerinin etkisi incelendiğinde, moleküllerin IC<sub>50</sub> değerlerine bakıldığında her iki molekülünde inhibisyon etkisi olduğu görülmektedir [108]. Her iki molekül incelendiğinde B-2

molekülünün, kaempferole göre hCA I ve hCA II izoenzimlerine karşı daha fazla inhibisyon etki gösterdiği saptanmıştır.

Antioksidan aktivite sonuçları incelendiğinde:

DPPH serbest radikali giderim aktivitesi incelenen bileşiklerden kaempferol molekülü, referans olarak alınan BHA ve BHT'ye göre oldukça yüksek antioksidan aktivite gösterirken, kaempferolün açıl türevi olan B-2 molekülünün aktivitesinin referanslara göre orta derecede antioksidan aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir.  $\beta$ -karoten renk açılım yöntemi ile yapılan çalışmalarda ise kaempferol bileşiğinin antioksidan aktivitesinin, DPPH yöntemine göre daha düşük olduğu görülmektedir. B-2 molekülünün bu yöntemle hesaplanan aktivite sonucuna bakıldığında ise referanslara yakın değerlerde aktivite gösterdiği görülmektedir.  $\text{Cu}^{+2}$  indirgeme kapasitesi (CUPRAC) yöntemiyle yapılan çalışmada referans olarak kullanılan kurkumin bileşiğinin aktivitesi 0,9 gözlemlenirken, kaempferol molekülünün aktivitesi yaklaşık üç kat yüksek olarak ölçülmüştür. B-2 molekülünün antioksidan aktivitesinin ise oldukça düşük seviyede olduğu belirlenmiştir.

Antikolinesteraz aktivite sonuçlarına bakıldığında, kaempferolün bütirilkolinesteraz enzimine karşı orta derecede inhibisyon gösterdiği fakat açıl türevi olan B-2 bileşiğinin bu enzime karşı düşük inhibisyona sahip olduğu gözlenirken, asetilkolinesteraz enzimine karşı her iki bileşiğinde düşük inhibisyon gösterdikleri ölçülmüştür.

Sonuç olarak kaempferolün açıl türevi olan B-2 molekülünün genel aktivitesine bakıldığında, çıkış maddesi olan kaempferole göre daha düşük oranda aktivite göstermiş olduğu belirlenmiştir. Fenolik yapıda olan bileşiklerin oluşturduğu radikaller, molekül içerisindeki delokalizasyonunu diğer radikallere göre daha hızlı sağlayarak kararlı forma geçiş yaparlar. Sentez sonrası oluşturduğumuz açıl türevi (B-2) fenolik yapıyı oluşturan bütün hidroksilleri kapadığı için B-2'nin oluşturduğu radikaller kaempferol kadar kararlı olamamaktadır. B-2 molekülünün kaempferole göre daha düşük aktivite göstermesinin nedeni bu şekilde açıklanabilir.

## 9. KAYNAKLAR

- [1] Ryzsnyak, S. and Szent-Georgy, A., *Nature*, 138, 27, (1936).
- [2] Formica, J. V. and Regelson W., "Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids", *Fd. Chem.Toxic.*,33, 1061-1080, (1995).
- [3] Benthath, A., Ruzsnyak, S. T. and Szent-Györgyi, A., "Vitamin P.", *Nature*, 139, 326–327, (1937).
- [4] Sorata, Y., Takahama, U. and Kimura, M., "Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of hematoporphyrin", *Biochim. Biophys. Acta.*, 799, 313-317, (1984).
- [5] Stavric, B., "Role of chemopreventers in human diet", *Clin. Biochem.*, 27(5), 319-332, (1994).
- [6] Yamamoto, Y. and Richard B., "Therapeutic potential of inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway in the treatment of inflammation and cancer", *Journal of Clinical Investigation*, 107 (2), 135–42, (2001).
- [7] Cazarolli, L. H., Zanatta, L., Alberton, E. H., Figueiredo, M. S., Folador, P., Damazio, R. G., Pizzolatti, M. G. and Silva, F. R., "Flavonoids: Prospective Drug Candidates", *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8 (13), 1429–1440, (2008).
- [8] Cushnie, T. P. T. and Lamb, A. J., "Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 38 (2), 99–107, (2011).
- [9] Manner, S., Skogman. M., Goeres. D., Vuorela, P. and Fallarero, A., "Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms", *International Journal of Molecular Sciences*, 14 (10), 19434–19451, (2013).
- [10] Cushnie, T. P. T. and Lamb, A. J., "Antimicrobial activity of flavonoids", *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26 (5), 343–356, (2005).
- [11] Friedman, M., "Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas", *Molecular Nutrition and Food Research*, 51 (1), 116–134, (2007).



- [12] Sousa, R. R., Queiroz, K. C., Souza, A. C., Gurgueira, S. A., Augusto, A. C., Miranda, M. A., Peppelenbosch, M. P., Ferreira, C. V. and Aoyama, H., "Phosphoprotein levels, MAPK activities and NFkappaB expression are affected by fisetin", *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 22 (4), 439–444, (2007).
- [13] Vogel, G., "The effect of drugs of plants origin on capillary permeability and the tymphatic system", *Pharmacognosy and Phytochemistry*, (Eds. Wagner, H., Hörhammer, L.), Berlin, (1971).
- [14] Ruş, A. F., Kulikov, A. A., *Trudı Alt. S.-x. İnstıtua Vet.* 23-32, (1971).
- [15] Şamray, E. F., *Ukr. Biox. J.* 42, 265, (1970).
- [16] Jeney, E., and Uri, J., *Die Pharmazie* 9, 553, (1954).
- [17] Bohm, B. A. in "The Flavonoids", (Eds. Harborne, J. B., Mabry, T. J and Mabry, H.), Chapman and Hall, London (1975).
- [18] Bohm, B. A. in "The Flavonoids:Advences in Research", (Eds. Harborne, J. B., Mabry, T. J and Mabry, H.), Chapman and Hall, London (1982).
- [19] McClure, J. W., (Eds: Cody, V., Middleton, E. And Harborne, J.B.), Alan R. Liss., New-York, 77-85, (1986).
- [20] Smith, D. A., Banks, S. W., " Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins ", *Phytochemistry*, 25 (5), 979-995, (1986).
- [21] Guliyev, V. B. ve Harmandar, M., "Flavonoidler", Aktif Yayın Evi, İstanbul, (1999).
- [22] Cemeroğlu, B., *Meyve ve Sebze İşleme Teknolojisi* 1. Cilt. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları No: 35, Ankara, 77-88 (2004).
- [23] Popova, T. P., Pakaln, D. A. and Litvinenko, V. İ., *Kim. Prirod Soedin* 1,97, (1975).
- [24] Tomimori, T., Miyaichi, Y., İmoto, Y. and Kizu, H., *Shyakugaku Zasshi* 40,432, (1986a).
- [25] Fang, J. M., Chang, C. F., and Cheng, Y. S., *Phytocheistry* , 26,2559, (1987).
- [26] Vogt, T., Proksch, P. And Gulz, P. G., *J. Plant Physiol*, 131,25, (1987).
- [27] Wollenwebr, E., Mann, K., "Neue Flati onoide aus Primelmehl: New Flavonoids from Farinose Primula Exudates", *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, 181, 665-669, (1986).
- [28] Litvinenko, V. İ., Meşeryakov, A. A., Popova, T. P. and Ammosov, A. S., *İzv. AN TSSR. Ser. Biol. Nauki*, 4,40, (1971).

- [29] Popova, T. P., Litvinenko, V. I and Kovalyev, I. P., *Kim prirod. Soed.* 6, 729, (1971).
- [30] Miyaichi, Y., Imoto, Y., Tomimori, T. and Lin, C. C., *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 3720, (1988).
- [31] Khafagy, S. M., Sabry, N. N., Salam, N. A., Seif El-Din, A. D. and Blessington, B., *Acta Pharmacol. Jugosl.* 29, 16, (1979).
- [32] Tomas-Barberan, F. A., Msonthi, J. D. and Hostettman, K., *Phytochemistry* , 27,165, (1988).
- [33] Wollenweber, E, Hradetzky, D., Mann, K., Roitman, J. N., Yatskievych, G., Proksch, M. and Proksch, P., *J. Plant. Physiol.* 131, 27, (1987a).
- [34] Kumari, D.,*Fitoterapia*, 60, 558, (1989).
- [35] El-Ansari, M. A., Barron, D., Bdalla, M. F., Saleh, N. A. M. and Le Quere J. L., *Phytochemistry*, 30, 1169, (1991).
- [36] Tanowitz, B. D., Ledeer, G., Ross, P. N. and Proksch, P., *Biochem. Syst. Ecol.*, 15, 535, (1987).
- [37] Vazquez, M. M., Amaro, A. R. and Joseph-Nathan, P., *Phytochemistry*, 27, 3706, (1988).
- [38] Adekanov, S. M., Aituhanov, K. A. and Golovtsov, N. I., *Khim. Prir. Soedin.*, 148, (1987).
- [39] Kaouadji, M. and Ravanal, P.,*Phytochemistry*, 29, 1348, (1990).
- [40] Parvez, M. and Ogbeide, O. N.,*Phytochemistry*, 29, 2043, (1990).
- [41] Broussalis, A. M., Ferraro, G. E., Gurni, A. And Coussio, J. D., *Biochem. Syst. Ecol.*, 16, 401, (1988).
- [42] Wollenweber, E. and Roitman, J. N., *Z. Naturforsch.*, 46c, 325, (1991).
- [43] Yu, S., Fang, N. And Mabry, T. J., *J. Nat. Prod.*, 49, 1178, (1986).
- [44] Bohm, B. A. and Constant, H.,*Biochem. Syst. Ecol.*, 18, 491, )1990).
- [45] Mericli, A. H., Damdyan, B. and Çubukçu, B., *Sci. Pharm.*, 54, 363, (1986).
- [46] Nizamlioğlu, N. P. and Nas, S., “Meyve ve Sebzelerde Bulunan Fenolik Bileşikler; Yapıları ve Önemleri”,*Electronic Journal of Food Technologies*, 20-35, (2010).
- [47] Dhar, D. N “The Chemistry of CKalkone and Related Compounds”, Wiely-Interscience, New-York, 29, (1981).
- [48] Fennema, O. R.,*Food Chemistry*, Pigment and Other Colorants, 545-584, (1985).

- [49] Göğüş, F., Fadiloğlu, S., *Food Chemistry*, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, 319-339, (2006).
- [50] MacDougall, D. B., *Colour in Food Improving Quality*, Woodhead Publishing Limited. Cambridge, England, 179-221, (2002).
- [51] Shahidi, F., Naczki, M., *Food Phenolics*, Technomic Publishing Company Book, Lancaster, USA, 199-225, (1995).
- [52] Kurılıç, A. C., Clevidence, B. A., Britz, S. J., Simon, P. W., Novotny, J. A., “Plasma and Urine Responses Are Lower for Acylated vs Nonacylated Anthocyanins from Raw and Cooked Purple”, *J. Agric. Food Chem*, 53, 6537-6542, (2005).
- [53] Ulubelen, A. and Mabry, T. J., *Latinoamer. Quim.*, 13, 35, (1982).
- [54] Harborne, J. B., “*The Flavonoids, In, Chromatography, Fundamen and applications of chromatographic and electrophoretic methods*”, (Eds. Heftmann, E.), (1983).
- [55] Hörhammer, L. In: “*Methods of Polyphenol Chemistry*”, (Eds. Pridl Oxford), Pergamon, (1964).
- [56] Li, K. C. and Wagennknecht, A. C., *J. Amer. Chem. Soc.*, 78, 979, (1956).
- [57] Çıkrıkçı, S., “4'-Dioktilamino-3-Hidroksiflavon Temelli Floresans Problemlerin Sentezleri Ve Özelliklerinin İncelenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2005).
- [58] Batterham, T. J. and Highet, R. J., *Aust. J. Chem.*, 17, 428, (1964).
- [59] Saldamlı, İ., “*Gıda Kimyası*”, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, 463-492, (2007).
- [60] Tunalıer, Z., Öztürk, N., Koşar, M., Başer, K. H., Duman, H., ve Kırimler, N., “Bazı Sıderıtıs Türlerinin Antioksidan Etki Ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi”, 14. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Bildiriler, Eskişehir, (2002).
- [61] Demiray, E. Ve Tülek, Y., “Domates Kurutma Teknolojisi ve Kurutma İşleminin Domatesteki Bazı Antioksidan Bileşiklere Etkisi”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (3), 9-20, (2008).
- [62] Aras, Ö., “Üzüm Ve Üzüm Ürünlerinin Toplam Karbonhidrat, Protein, Mineral Madde ve Fenolik Bileşik İçeriklerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Isparta, (2006).

- [63] Karakaya, S., Nehir El, S., “Bazı Bitkisel Çayların Toplam Fenolik Madde İçerikleri, Antioksidan Aktiviteleri ve Siyah Çay Polifenollerinin in vitro Biyoyararlılığı”, *GOÜ. Ziraat Fakültesi Dergisi*, 23 (1), 1-8, (2006).
- [64] Yağcı, C., Toker, M. C. ve Toker, G.,”Bitki Doku Kültürü Yoluyla Üretilen Flavonoitler”, *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 1 (1): 47-58, (2008).
- [65] Köksal, E., “Karnabahar (*Brassica Oleracea* L.) Peroksidaz Enziminin Saflaştırılması ve Karakterizasyonu, Antioksidan Ve Antiradikal Aktivitesinin Belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, (2007).
- [66] Öztürk, N., Tunalı, Z., Koşar, M. ve Başer, K. H., “Petroselinum Crispum, Anethum Graveolens ve Eruca Sativa'nın Antioksidan Etki ve Fenolik Bileşikler Yönünden İncelenmesi”, *14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı*, Bildiriler, Eskişehir, (2002).
- [67] Koca, İ., “Kızılcık ve Trabzon Hurması Pekmezlerinin Üretim Teknikleri”, *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, (2) 33-37, (2007).
- [68] Tzia, C. And Liadakis, G., “Extraction Optimization in Food Engineering”, *Extraction of Natural Antioxidants*, Chapter, 10, (2003).
- [69] Erben-Russ, M., Michel, C., Bors, W. and Saran, M., *J. Phys. Chem.*, 91, 2362, (1987a).
- [70] Proteggente, A. R., Pannala, A. S., Paganga, G., Buren, L. V., Wagner, E., Wiseman, S., Van de Put, F., Dacombe, C. and Rice-Evans, C. “The antioxidant activity of regularly consumed fruit and vegetables reflects their phenolic and vitamin C composition”, *Free Radicals Res.*, 36; 217-233, (2002).
- [71] Pehlivan, M. ve Gülerüz, M., “Ahududu ve Böğürtlenlerin İnsan Sağlığı Açısından Önemi”, *Bahçe*, 33, (1-2): 51–57, (2004).
- [72] Nagao, M., Morita, N., Yahagi, T., Shimizu, M., Kuroyanagi, M., Fukuoka, M., Yoshihira, K., Natori, S., Fujino, T. And Sugimura, T., *Environ. Mutagen*, (1981).
- [73] Hardigree, A. A. and Epler, J. L., *Mutat. Res.*, 58, 231, (1978).
- [74] Selway, J. W. T., in “*Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*”, (Eds: Cody, V., Middleton, E. And Harborne, J. B.), Alan R. Liss., New-York, 521-36, (1986).

- [75] Ishitsuka, H., Ohsawa, T., Ohiwa, T., Uneda, I. and Suhara, Y., *Antimicrob. Agents Chemoter*, 22, 611, (1982).
- [76] Harborne, J. B., in “*Plant Flavonoids in Biology and Medicine*”, (Eds: Cody, B., Middleton, E. and Harborne, J. B.), A.R. Liss, New-York, 15, (1986).
- [77] Hertog, M. G. L., Fesrens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B. and Kromhout, D., *Lancet*, 342, 1007, (1993).
- [78] Shi, Q., Chen, K., Li, L., Chang, J. J., Autri, C., Kozuka, M., Konoshima, T., Estes, J. ., Lin, C. M., Hamel, E., McPall, A. T., McPall, D. R. and Lee, K. H., *J. Nat. Prod.*, 58, 475 (1995).
- [79] Sekiya, K. and Okuda, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 105, 1090, (1982).
- [80] Abou-Shoer, M., Ma, G. E., Li, X. H., Koonchanok, N. M., Gehlen, R. L. and Wang, C. J., *J. Nat. Prod.*, 56, 967, (1993).
- [81] Calderon-Montano, J. M., Burgos-Moron, E., Perez-Guerrero, C., Lopez-Lazaro, M., "A review on the dietary flavonoid kaempferol", *Mini Rev Med Chem.*, 11, (4): 298–344, (2011).
- [82] Donnapee, S., Li, J., Yang, X., Ge, A. H., Donkor, P. O., Gao, X. M., Chang, Y. X., "Cuscuta chinensis lam.: A systematic review on Ethnopharmacology, phytochemistry pharmacology of an important traditional herbal medicine”, *J. Ethnopharmacol*, 157 (C): 292–30, (2014).
- [83] Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., Gilani, A. H., "Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses", *Phytother Res.*, 21, (1): 17–25, (2007).
- [84] Liu, R. H., "Health-promoting components of fruits and vegetables in the diet", *Adv. Nutr.*, 4, (3): 384S–92S, (2013).
- [85] Kim, S. H., Choi, K. C., "Anti-cancer Effect and Underlying Mechanism(s) of Kaempferol, a Phytoestrogen, on the Regulation of Apoptosis in Diverse Cancer Cell Models", *Toxicol Res.*, 29, (4): 229–234, (2013).
- [86] Sarıkürkçü, C., Koçak, M. S., Calapoğlu, M., Ocal, Ç. ve Tepe, B., “Biological and phytochemical evaluation: *Pseudevernia furfuracea* as an alternative multifunctional agent”, *Journal of Functional Foods*, 24, 11–17, (2016).
- [87] Amani, S., Awaad, Shorog, M., Alotiby, Reham M. El-Meligy, Mohamed S., Marzouk, Saleh I., Alqasoumi, Abd El Raheim M., Donia and Nabil H. El-Sayed, “Novel Anti ulcerogenic Effects of Total Extract and Isolated

- Compounds from *Cakile arabica*”, *International Journal of Pharmacology*, 541-548, (2016).
- [88] Freires, I. A., Queiroz, V. C. P. P., Furletti, V. F., Ikegaki, M., de Alencar, S. M., Duarte, M. C. T., Rosalen, P. L., “Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp.”, *Journal de Mycologie Médicale*, 26, 122—132, (2016).
- [89] Shi, X., Liu, D., Zhang, J., Hu, P., Shen, W., Fan, B., Ma Q. and Wang, X., “Extraction and purification of total flavonoids from pine needles of *Cedrus deodara* contribute to anti-tumor in vitro”, *BMC Complementary and Alternative Medicine* 16, 245, (2016).
- [90] Xie X., Zhang C., Xun E., Wang J., Zang H., Wang L. And Wang Z., “Acylation of Quercetin with a Novel Thermophilic Esterase as Biocatalyst”, *Chem. Res. Chinese Universities*, 28(2), 225—229, (2012).
- [91] Kontogianni A., Skouridou V., Sereti V., Stamatis H. And Kolisis F. N., “Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, 59–62, (2003).
- [92] Chebil L., Anthoni J., Humeau C., Gerardin C., Engasser J. M. and Ghoul M., “Enzymatic Acylation of Flavonoids: Effect of the Nature of the Substrate, Origin of Lipase, and Operating Conditions on Conversion Yield and Regioselectivity”, *J. Agric. Food Chem.*, 55, 9496–9502, (2007).
- [93] Katsoura, M. H., Polydra, A. C., Tsinoris, L., Tselepis, A .D. and Stamatis, H., “Use of ionic liquids as media fort the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency”, *Journal of Biotechnology*, 123, 491-503, (2006).
- [94] Kontogianni, A., Skouridou, V., Sereti, V., Stamatis, H. and Kolisis, F. N., “Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 21, 59-62, (2003).
- [95] Gruber, C. C., Lavendera, I., Kroutil, W., Faber, K., *Adv. Syn.Catal.*,348, 1789–1805, (2006).
- [96] Faber, K., “*Biotransformations in Organic Chemistry*”, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, (2004).

- [97] Hanson, B. G., “General Systems Theory Beginning with Wholes”, York University, Canada, (1995).
- [98] Blois, M. S., “Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical”, *Nature*, 181, 1199–1200, (1958).
- [99] Miller, H. E., “A Simplified Method for the Evaluation of Antioxidants”, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 45, 91-98, (1971).
- [100] 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).
- [101] 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).
- [102] 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).
- [103] 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).
- [104] 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).
- [105] Bass, R. J., *J. C. S. Chemical Communications*, 264, (1979).
- [106] Mellou, F., Louthrari, H., Stamatis, H., Roussas, C. and Kolisis F. N., “Enzymatic Esterification of Flavonoids with Unsaturated Fatty Acid: Effect of Novel Esters on Vascular Endothelial Growth Factor Release from K562 Cells”, *Process Biochemistry*, 41, 2029-2034, (2016).
- [107] Xie, X., Zhang, C., Xun, E., Wang, J., Zhang, H., Wang, L., Wang, Z., “Acylation of Quercetin with a Novel Thermophilic Esterase as Biocatalyst”, *Chem. Res. Chinese Universities*, 28, (2), 225-229, (2012).

- [108] Gencer, N., Ergun, A., Demir, D., “In vitro Effects of Some Anabolic Compounds on Erythrocyte Carbonic Anhydrase I and II”, *Journal Of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, posted online, (2011).



