

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SATUREJA PILOSA* VE *SATUREJA İCARICA* BİTKİLERİNİN
SEKONDER METABOLİTLERİNİN VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Betül KİRAZ KİNOĞLU

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet Ceyhan Gören

TEMMUZ 2021

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

***SATUREJA PILOSA* VE *SATUREJA İCARICA* BİTKİLERİNİN SEKONDER
METABOLİTLERİNİN VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Betül KİRAZ KINOĞLU
(185313003)**

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Anabilim Dalı

Farmakognozi ve Doğal Ürünler Kimyası Tezli Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN

TEMMUZ 2021

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 185313003 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Betül KİRAZ KINOĞLU, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “*SATUREJA PÍLOSA VE SATUREJA İCARICA* BİTKİLERİNİN SEKONDER METABOLİTLERİNİN VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN**

Bezmialem Vakuf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Murat KARTAL**

Bezmialem Vakuf Üniversitesi

Prof. Dr. Mehmet ALTUN

İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa

Teslim Tarihi **: 7 Eylül 2021**
Savunma Tarihi **: 7 Temmuz 2021**



Kıymetli Eşim, Çocuklarım ve Annem'e...

ÖNSÖZ

Hayat yolculuğumda, en büyük hayalim olan akademik yolun ilk adımını köklü küresel yankıları olan Covid-19 pandemisine tanıklık ederek bir yandan da bu tanıklığın olumsuzluklarını yaşayarak tamamlamış bulunmaktayım.

Öncelikle tezimde başından sonuna kadar bilgi birikimi, tecrübesi ve disipliniyle bana yol gösteren, kendisini akademik hayatımda her zaman örnek alacağım, öğrencisi olmaktan hep gurur duyacağım, kıymetli hocam, Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN'e sonsuz şükranlarımı sunuyorum..

Ayrıca deneysel çalışmalarda yardımını esirgemeyen Dr.Halil Şenol beyefendiye, aktivite testlerimde yardımcı olan ve her konuda bana limitsiz destek veren Dr. Gülbahar Özge Alim Toraman'a , arkadaşlığını ve desteğini esirgemeyen Begüm Zengin'e ,

İLMER'in yetenekli ekibi, LC-HRMS analizlerimi gerçekleştiren Şule Yalçın ve NMR operatörü Ahmet Balcı'ya,

Mesleğime dair bütün kazanımlarımın gizli kahramaları kıymetli hocalarım Prof.Dr. Selahattin SERİN ve Prof.Dr. Ayşegül GÖLCÜ'ye

Benden dualarını esirgemeyen görünmez dağ babama ve canım kardeşime, bu yolculuğun bütün zorluğunu yüklenen hayat arkadaşım Kubilay Kınoğlu'na ve bu süreçte en büyük fedakarlığı yapan minik yavrularıma teşekkürlerimi sunuyorum...

Temmuz 2021

Betül Kiraz KINOĞLU
(Kimyager)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Betül KİRAZ KINOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ	iii
BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	i
TABLolar	v
ŞEKİLLER	vi
1.GİRİŞ	1
1.1 Lamiaceae Familyası.....	1
1.2 Türkiye’de <i>Satureja</i>	2
1.3 <i>Satureja icarica</i> ve <i>Satureja pilosa</i>	17
2. GENEL BİLGİLER	22
2.1 Terpenler	22
2.1.1 Hemiterpenler.....	25
2.1.2 Monoterpenler	26
2.1.2.1 Asiklik Monoterpenler	26
2.1.2.2 Monosiklik Monoterpenler.....	28
2.1.2.3 Bisiklik Monoterpenoidler	29
2.1.3 Seskiterpenler	30
2.1.3.1 Farnesanlar	33
2.1.3.2 Monosiklik Farnesan Seskiterpenler	33
2.1.3.3 Polysiklik Farnesan Seskiterpenleri	34
2.1.4 Diterpenler	35
2.1.4.1 Trisiklofitanlar.....	37
Pimaranlar ve İzopimaranlar	37
2.1.5 Sesterterpenler.....	38
2.1.5.1 Asiklik Sesterterpenler	38
2.1.5.2 Monosiklik Sesterterpenler	39
2.1.5.3 Polisklik Sesterterpenler.....	39
2.1.6 Triterpenler.....	40
2.1.6.1 Lineer triterpenler.....	41
2.1.6.1 Gonan tipi tetrasiklik triterpenler	41
2.1.6.3 Bakaran Tipi Pentasiklik Triterpenler	43
2.1.6.4 Hopan Tipi Pentasiklik Triterpenler.....	45
2.1.6.5 Diğer pentasiklik triterpenler	46
2.1.7. Tetraterpenler	47
2.1.8 Politerpenler ve Prenilkinonlar	49
2.2 Fenolik Bileşikler	50
2.2.1 Basit Fenolikler	54
2.2.2 Fenolik Asitler ve Aldehitler.....	55
2.2.3 Asetofenonlar ve Fenilasetik Asitler	55
2.2.5 Kumarinler	57

2.2.6 Flavonoidler	57
2.2.6.1 Flavanonlar.....	58
2.2.6.2 Flavanonoller.....	58
Şekil 2.46 : Taksifolin.....	59
2.2.6.3 Lökoantosiyandinler.....	59
2.2.6.4 Flavonlar	60
2.2.6.5 Antosiyandin ve Deoksiantosiyandinler	60
2.2.6.6 Antosiyaninler	62
2.2.7 Lignanlar	62
2.2.8 Tanenler	63
2.3 Kromatografi	63
2.3.1 Sıvı kromatografi	64
2.3.1.1 Mobil Faz	64
2.3.1.2 Degazör	65
2.3.1.3 Pompa.....	65
2.3.1.4 Numune Enjeksiyonu	65
2.3.1.5 Kolon.....	66
2.3.1.6 Dedektör.....	67
2.3.2 LC-MS	68
2.4 Analitik Metot Validasyonu	69
2.4.1 Validasyon Parametreleri	69
2.4.1.1 Özgünlük (specificity).....	70
2.4.1.2 Ölçüm Aralığı (Range).....	70
2.4.1.3 Doğrusallık (Linearity)	70
2.4.1.4 Gözlemlenebilme ve Tayin sınırı (LOD/LOQ).....	70
2.4.1.5 Doğruluk (Accuracy)	71
2.4.1.5 Analizlerde Ölçüm Belirsizliği	72
2.5 Asetilkolinesterazlar ve Alzheimer Hastalığı	72
2.6 Antioksidanlar	75
2.6.1 Antioksidan Tayin Yöntemleri.....	77
2.6.1.1 ORAC deneyi	77
2.6.1.2 TRAP deneyi.....	78
2.6.1.3 TOSC deneyi.....	78
2.6.1.4 Krosin ağartma deneyi	78
2.6.1.5 Folin - Ciocalteu testi	79
2.6.1.6 FRAP testi	79
2.6.1.7 CUPRAC Deneyi	79
3.DENEYSEL BÖLÜM	80
3.1 Bitkisel Materyal.....	80
3.2 Kullanılan Kimyasallar	80
3.3 Ekstrelerin Hazırlanması.....	81
3.4 Kromatografik Yöntemler.....	83
3.4.1 Flaş Kromatografi	83
3.4.2 İnce tabaka kromatografisinde (İTK).....	83
3.5 Sekonder Metabolitlerin Analizi	83
3.5.1 LC-HRMS metot geliştirme.....	83
3.5.2 Metot validasyonu	84
3.6 Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi.....	88
3.6.1 AChE aktivite testi	88
3.6.1.1 Reaktiflerin hazırlanışı	88

3.6.1.2 AChE % inhibisyon testi.....	88
3.6.2 BChE aktivite testi	89
3.6.2.1 Reaktiflerin hazırlanışı	89
3.6.2.2 BChE % İnhibisyon Testi	89
3.7 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri	89
3.7.1 CUPRAC Yöntemi.....	89
3.7.2 ABTS Yöntemi	90
3.7.3 DPPH Yöntemi	91
4.BULGULAR.....	92
4.1 Sekonder Metabolit Analiz Sonuçları	92
4.2 Asetikolinesteraz ve Bütirikolinesteraz Aktivite Tayin Sonuçları.....	100
4.3 Antioksidan Aktivite Tayin Sonuçları	105
4.4 Saf Bileşiklerin İzolasyonu ve Yapı tayini.....	107
4.4.1 SPY-D-4-2-a. Oleanolik asit=3 β -hidroksi-olean-12-en-28-oik asit.....	107
4.4.2 SPY-D-4-2-b. ursolik asit= 3 β -hidroksi-12-ursen-28-oik asit	111
5.TARTIŞMA	113
KAYNAKLAR	115
EKLER.....	125
ÖZGEÇMİŞ.....	143

SEMBOLLER

α	: Alfa
β	: Beta
γ	: Gama
g	: Gram
<i>m/z</i>	: Kütle/elektron
kg	: Kilogram
mL	: Mililitre
μL	: Mikrolitre
%	: Yüzde

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 1.1 : Türkiyedeki Satureja Türleri.....	3
Tablo 1.2 : <i>Satureja</i> Türleri solvent ekstralarının sekonder metabolit ve aktivite taraması.	15
Tablo 1.3 : Satureja icarica hakkında yapılan çalışmalar.....	18
Tablo 1.4 : Satureja pilosa hakkındaki çalışmalar.	20
Tablo 2.1 : Terpenlerin sınıflandırılması.	23
Tablo 2.2 : Terpenlerdeki Temel İzomeriler.	25
Tablo 2.3 : Monoterpenlerin sınıflandırılması.	26
Tablo 2.4 : Seskiterpenlerin sınıflandırılması.	32
Tablo 2.5 : Diterpenlerin sınıflandırılması.	36
Tablo 2.6 : Sesterterpenler.	38
Tablo 2.7 : Triterpenlerin sınıflandırılması.	41
Tablo 2.8 : Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.....	54
Tablo 3.1 : Bitki örnekleri hakkında toplanma ve depolama bilgileri.	80
Tablo 3.2 : Bitki ekstralarının kodları.	82
Tablo 3.3 : LC-HRMS Validasyon Parametreleri.....	86
Tablo 4.1 : <i>Satureja icarica</i> LC-HRMS sekonder metabolit tarama sonuçları.....	93
Tablo 4.2 : Satureja pilosa LC-HRMS sekonder metabolit tarama sonuçları.....	95
Tablo 4.3 : AChE Aktivite Deney Sonuçları.....	101
Tablo 4.4 : AChE Aktivite Deney Sonuçları.....	102
Tablo 4.5 : Bitki ekstralarının toplam antioksidan kapasitelerinin (TAC) CUPRAC, ABTS-6 persülfat ve DPPH yöntemleriyle ölçümü.	105

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : <i>S. icarica P.H.Davis</i>	17
Şekil 1.2 : <i>Satureja pilosa Velen</i>	19
Şekil 2.1 : İzoprenin baş-kuyruk bağlanması	22
Şekil 2.2 : İzoprenin baş-kuyruk bağlanması	24
Şekil 2.3 : Hemiterpen örnekleri.....	26
Şekil 2.4 : 2,6-dimetiloktan molekül numaralandırması	27
Şekil 2.5 : Doymamış monoterpenik alkooller ve aldehit örnekleri.....	27
Şekil 2.6 : Trien örnekleri.....	28
Şekil 2.7 : Tri- ve Tetra- Sülfidler ve Monoterpenoid Furanlar	28
Şekil 2.8 : Simenler	29
Şekil 2.9 : Bisiklik monoterpenoidler	29
Şekil 2.10 : Karen ve tujan yapıları	30
Şekil 2.11 : Pinenler.....	30
Şekil 2.12 : Farnesan ana iskeleti ve bazı türevleri	33
Şekil 2.13 : Siklofarnesanol ve absisik asit.....	34
Şekil 2.14 : Bisabolan iskeleti ve türevleri	34
Şekil 2.15 : Humulan çekirdek yapısı ve karyofillan örnekleri.....	34
Şekil 2.16 : Pimaran yapıları	37
Şekil 2.17 : Abietan ve sikloabietan iskeleti.....	38
Şekil 2.18 : 3,7,11,15,19-pentametilikosan türevi.....	38
Şekil 2.19 : sikloheksan sesterterpen iskeleti.	39
Şekil 2.20 : (+)-salvisiriakolid	39
Şekil 2.21 : (+)-şelanta-6 α ,13 α ,19-triol	40
Şekil 2.22 : Skalaran.....	40
Şekil 2.23 : Skualen	41
Şekil 2.24 : Damaran ve protostan iskeletleri	42
Şekil 2.25 : Steroidlerin çekirdek iskeleti Gonan.....	42
Şekil 2.26 : Lanosterol.....	42
Şekil 2.27 : Kukurbitasin B.	43
Şekil 2.28 : Bakaran tipi pentasiklik triterpen iskelet yapıları.....	44
Şekil 2.29 : Ursolik asit ve oleanolik asit.	45
Şekil 2.30 : Hopan tipi pentasiklik triterpenler.....	46
Şekil 2.31 : Epoksiskualen, onoseran, serratan yapısı.....	47
Şekil 2.32 : Çift bağın beta,gama, teta pozisyonu.	47
Şekil 2.33 : Likopen ve β -karoten yapıları.	48
Şekil 2.34 : Karotenoidlerin ayrılma konumları	48
Şekil 2.35 : Megastigman ve İnonon yapıları.....	49
Şekil 2.36 : Vitamin K1	49
Şekil 2.37 : Flavonoidlerin ve fenoliklerin olası biyosentez yolağı.	51
Şekil 2.38 : Fenole bağlanan fonksiyonel grup konumları.....	54
Şekil 2.39 : Fenolik asit örnekleri.....	55

Şekil 2.40 : Asetofenon ve fenilasetik asit örnekleri.	55
Şekil 2.41 : Sınnamik asitler.	56
Şekil 2.42 : Klorojenik asit.	56
Şekil 2.43 : Kumarin.	57
Şekil 2.44 : Genel flavonoid yapısı.	58
Şekil 2.45 : Naringenin.	58
Şekil 2.46 : Taksifolin.	59
Şekil 2.47 : Lökoantosiyanın örnekleri.	59
Şekil 2.48 : Flavon örnekleri.	60
Şekil 2.49 : Genistein, daidzein.	60
Şekil 2.50 : Antosiyanın örnekleri.	61
Şekil 2.51 : Apigeninin, Luteolinidin.	61
Şekil 2.52 : Kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit.	62
Şekil 2.53 : Lignan örnek yapıları.	62
Şekil 2.54 : Temel olarak tanenler.	63
Şekil 2.55 : Örnek HPLC kolonu.	66
Şekil 2.56 : Doğal Antioksidanlar.	76
Şekil 2.57 : Orac deneyi mekanizması.	78
Şekil 2.58 : Krosin ağartma deneyi mekanizması.	79
Şekil 2.59 : Folin - Ciocalteu testi mekanizması.	79
Şekil 4.1 : SİD-D LC-MS sekonder metabolit kromatogramı.	97
Şekil 4.2 : SİY-D LC-HRMS Sekonder metabolit kromatogramı.	98
Şekil 4.3 : SİD-A LC-HRMS kromatogramı.	99
Şekil 4.4 : S.ıcarica ve S.pilosa ekstrelerinin 200µg/mL konsantrsyonda AChE ve BChE inhibisyon grafiği.	103
Şekil 4.5 : S.ıcarica ve S.pilosa ekstrelerinin 100µg/mL konsantrsyonda AChE ve BChE inhibisyon grafiği.	103
Şekil 4.6 : S.ıcarica ve S.pilosa ekstrelerinin 50µg/mL konsantrsyonda AChE ve BChE inhibisyon grafiği.	104
Şekil 4.7 : S.ıcarica ve S.pilosa ekstrelerinin 25µg/mL konsantrsyonda AChE ve BChE inhibisyon grafiği.	104
Şekil 4.8 : Bitki ekstrelerinin (TAC) CUPRAC, ABTS-persülfat ve DPPH yöntemleriyle ölçüm sonuçlarının grafiği.	106
Şekil 4.9 : Oleanolik asit.	107
Şekil 4.10 : SPY-D-4-2-a. Oleanolik asit=3β-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit 1H-NMR.	109
Şekil 4.11 : SPY-D-4-2-a. Oleanolik asit=3β-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit 13C-NMR.	110
Şekil 4.12 : Ursolik asit.	111
Şekil 4.13 : SPY-D-4-2-b. ursolik asit= 3β-hidroksi-12-ursen-28-oik asit 1H-NMR.	112

***SATUREJA PİLOSA* VE *SATUREJA İCARİCA* BİTKİLERİNİN SEKONDER METABOLİTLERİNİN VE BİYOLOJİK AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

ÖZET

Bu çalışmada, *Satureja pilosa* ve *Satureja icarica* bitkilerinin sekonder metabolitlerinin belirlenmesi ve biyolojik aktivitelerinin değerlendirilmesi hedef alınmıştır. Türkiye’de doğal olarak yetişen Lamiaceae familyası üyesi *Satureja* cinsinin iki türü olan *Satureja pilosa* ve *Satureja icarica* türlerinin yaprak ve dal kısımları ayrı ayrı olacak şekilde diklorometan, aseton, metanol ekstraktları ardışık olarak maserasyon ve soxhalet cihazıyla ekstraktları alınmıştır. Daha sonra elde edilen tüm ekstraktlarda LC-HRMS ile gerçekleştirilecek sekonder metabolit taraması ve miktar tayini için analitik yöntem geliştirilerek metod validasyonu yapılmıştır. Ellidokuz sekonder metabolit için analitik tayin metodu geliştirildi. *S. İcarica* ve *S. Pilosa*’nın aseton ekstresinde rosmarinik asit ana sekonder metabolit bileşeni olarak tespit edilmiştir. Bunu yanında *S. Pilosa* ve *S. İcarica*’nın yaprak ekstresinde hederagenin, *S. Pilosa* ve *S. İcarica*’nın dallarının diklorometan ekstresinde penduletin, ayrıca *S. İcarica*’nın yaprağının aseton ekstresinde (+)-tarns taxifolin analiz edilen en yüksek miktardaki sekonder metabolit olmuştur. Yine tüm ekstraktların asetilkolinesteraz, bütirilkolinesteraz ve antioksidan aktivite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Antikolinesteraz aktivite tayininde ise *S. Pilosa* bitkisi için en yüksek AChE inhibisyonunu, 200µg/mL konsantrasyonda %87,5 ile bitki yaprağının methanol ekstresi gösterirken, en yüksek BChE inhibisyonunu 200µg/mL konsantrasyonda %72,6 ile bitki yaprağının diklorometan ekstresi göstermiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak Galantamin kullanılmış olup, AChE ve BChE inhibisyon değerleri 200µg/mL konsantrasyonda sırasıyla, %89,5 ve %87,9 olarak tespit edilmiştir. *S. İcarica* için AChE inhibisyonunu, 200µg/mL konsantrasyonda %88,7 ile bitkinin dal kısmının methanol ekstresi gösterirken, en yüksek BChE inhibisyonunu 200µg/mL konsantrasyonda %70,2 ile bitki yaprağının diklorometan ekstresi göstermiştir. Çalışmada pozitif kontrol olarak Galantamin kullanılmış olup, AChE ve BChE inhibisyon değerleri 200µg/mL konsantrasyonda sırasıyla, %89,5 ve %87,9 olarak tespit edilmiştir. Ekstraktların toplam antioksidan kapasiteleri (TAC) DPPH, CUPRAC ve ABTS yöntemleriyle ölçüldü. Spektrofotometrik TAC sonuçları birbirleri arasında iyi korelasyon göstermiştir. SİD-Ac-a ekstresi, üç farklı yöntemle göre en yüksek TAC değerine sahip olduğu belirlendi.

Satureja pilosa ve *Satureja icarica* türleri hakkında uçucu yağları konusunda yeterli çalışma yapılmış olmasına rağmen bu türlerin kapsamlı bir şekilde sekonder metabolitlerinin tanımlandığı bir çalışma literatürde yoktur. Bu bakımdan literatürdeki ilk sekonder metabolit tanımlama çalışması olacak olan bu çalışma fitokimyasal açıdan yüksek derecede özgünlüğe sahiptir.

Anahtar kelimeler: *Satureja pilosa*, *Satureja icarica*, sekonder metabolit, LC-HRMS, AChE, BChE, antioksidan

DETERMINATION OF SECONDARY METABOLITES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF *SATUREJA PILOSA* AND *SATUREJA ICARICA*

SUMMARY

The aim of this study is to evaluate the biological activities of *Satureja pilosa* and *Satureja icarica* plants and the detection of their secondary metabolites. The dichloromethane, acetone and methanol extracts of *Satureja pilosa* and *Satureja icarica* species being the two species of *Satureja* genus which is the member of Lamiaceae Family that naturally grows in Turkey were taken consecutively from the regions of leaves and branches of the plants separately by the help of maceration and Soxhlet devices. The method validation was done after that for every extract by developing an analytical technique for secondary metabolite quantifying and scanning with LC-HRMS. An analytical determination method was developed for fifty-nine secondary metabolites. In the acetone extracts of the *S. icarica* and *S. pilosa*; the rosmarinic acid was detected as the main phenolic component; besides this, hederagenin in the *S. pilosa* and *S. icarica* leaf extracts; penduletin in the dichloromethane extracts of the branches of *S. pilosa* and *S. icarica* and the (+)-trans taxifolin was detected as the secondary metabolite having the highest content. For every extract, acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and antioxidation activity experiments were performed. Among the determinations of anticholinesterase activities; the highest AChE inhibition for *S. pilosa* plant was methanol extract of plant leaf with 87.5% in 200 µg/mL concentration and the highest BChE inhibition was the dichloromethane extract of the plant leaf with 72.6 % in 200 µg/mL concentration. Galantamin was used as the positive control in the study and the values of AChE and BChE inhibition values in 200 µg/mL concentration were detected as 89.5 % and 87.9% respectively. The highest AChE inhibition for *S. icarica* plant was methanol extract of plant branch with 88.7 % in 200 µg/mL concentration and the highest BChE inhibition was the dichloromethane extract of the plant leaf with 70.2 % in 200 µg/mL concentration. Galantamin was used as the positive control in the study and the values of AChE and BChE inhibition values in 200 µg/mL concentration were detected as 89.5 % and 87.9% respectively. Total antioxidant capacity (TAC) of the extracts were measured by DPPH, CUPRAC and ABTS methods. Spectrophotometric TAC results correlated well with each other. SID-Ac-a extract was determined to have the highest TAC value according to three different methods.

Although there were sufficient number of studies about the ethereal oils of *Satureja pilosa* and *Satureja icarica* plants; it was seen that there were no studies defining the secondary metabolites of these species in a wider extent. From this point of view this study possesses a higher degree of originality in terms of phytochemistry being the first study to define the secondary metabolites.

Keywords: *Satureja pilosa*, *Satureja icarica*, secondary metabolite, LC-HRMS, AChE, BChE, antioxidant

1.GİRİŞ

Geçmişte tedavinin en önemli kaynağı olan tıbbi bitkiler sentetik ilaçların gelişmesiyle ilaç sanayisinde önemlerini belli ölçüde kaybetmiştir. Ancak bitkilerle tedavi son 20-30 yılda hızla gelişen bir akım olarak hem ülkemizde hem de diğer ülkelerde büyük rağbet görmeye başlamıştır. Bunun nedeni; uygulanan medical tedavinin yan etkilerini azaltmak, kişilerin kendi sağlıklarını korumak için daha aktif rol almak istemesi, uygulanan medikal tedavilere güvensizliğin artması, geleneksel tedavi yöntemlerinin başarı göstermesi olarak sıralanabilir [1]

Diğer taraftan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) bu yönelimi; gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde tıbbi bitkilerin ilaçlara alternatif olarak düşünülmesinin yanında ülkelerin kendi doğal kaynakları ile uyumlu bir sağlık teknolojisi geliştirmeleri ve gelişmiş ülkelere bağımlı olmaktan kurtulmaları açısından da önemli bulmaktadır [1].

Bu açıdan bakıldığında ülkemiz, değişkenlik gösteren iklim yapısı ve coğrafi koşulları ayrıca üç farklı fitocoğrafik bölgenin kesişim noktası olmasından dolayı tıbbi ve aromatik bitki türü çeşitliliği açısından zengin bir flora hazinesine sahiptir. Bu zenginliğin önemi araştırmalar arttıkça daha da çok açığa çıkmaktadır [2]. Türkiye’de bulunan bitki türlerinin bazılarında çalışmalar detaylandırıldığı gibi - mesela *Salvia* türleri [3–5] - henüz hakkında çalışmalar yapılmamış türler de halen mevcuttur.

1.1 Lamiaceae Familyası

Çalışmamıza konu olan bitkilerin mensup olduğu aile angiospermlilerin en önemli familyalarından birisi olan Lamiaceae (Labiatae), tüm dünyada yaklaşık 200 cins ve 3000 türle temsil edilen geniş bir ailedir. Labiatae familyası dünyanın birkaç bölgesinin dışında tüm habitat ve yüksekliklerde yetişmekte olup Kuzey Kutbu’ndan Himalayalar’a kadar, Güneydoğu Asya’dan Hawaii’ye kadar ayrıca Avustralya’da, tüm Afrika’da ve Amerika’da da yayılış göstermektedir [6].

Lamiaceae familyası Türkiye’de takson sayısına göre üçüncü, tür sayısına göre dördüncü büyük ailedir. Son güncelleme tarihi 1 Şubat 2017 olan verilere göre ailenin ülkede 48 cins ve 782 türü (603 tür, 179 alttür ve varyasyonları) mevcuttur ve bu

türlerin 346 'sı (271 tür, 75 alttür ve varyasyonları) endemiktir (%44,2). Ayrıca 19'u endemik (%82) 23 hibrit türü vardır. Araştırmalar Türkiye'nin Eski Dünya'daki Lamiaceae çeşitliliğinin merkezlerinden biri olduğunu göstermiştir. Ek olarak, Türkiye, Dünya Lamiaceae'sindeki tüm üyelerin yaklaşık % 10'una sahiptir [7].

Bu aile üyelerinde gövdeler enine kesitte genellikle dört köşelidir. Yapraklar birbirlerine dik olarak, her çift bir önceki gruba dik açıyla (karşılıklı çapraz, her nodan karşılıklı bir çift) çıkmakta ya da dairesel dizilmektedir. Bu familya çiçekleri tipik olarak üst dudak ve alt dudak şeklinde oluşmuş taç yapraklara sahiptir. Çiçekler bilateral simetrik, 5 birleşik taç (kaliks genellikle 5 loplu üst lop 3, alt lop 2 dişli olduğu nadiren 1-1 4-1 loplu şeklinde loplu örnekler de vardır) ve 5 birleşik çanak yapraklara sahiptir [8].

Halk arasında ballıbabagiller olarak adlandırılan familyanın en tanınan üyeleri nane, lavanta, adaçayı, kekik olmakla beraber; içeriklerinde bulunan uçucu yağlar başta olmak üzere sahip oldukları sekonder metabolitlerle antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, analjezik, anti-inflamatuar etkilerinden dolayı tıbbi ve ticari olarak önem arz eden bitkilerdendir [9,10]

1.2 Türkiye'de *Satureja*

Satureja (Aile: *Lamiaceae*, Alt aile: *Nepetoideae*, Oymak: *Mentheae*, Altoymak: *Menthinae*) cinsi ismi, ilk kez Romalı yazar Pliny'nin "Natural History" kitabında bitkinin lezzet artırıcı baharat olarak kullanımına atıfta bulunmak için Latince "satureia" kelimesinden türetilmiştir. Kelime "yemeğe lezzet katan", "iştah artırıcı" anlamında kullanılmıştır [11]. *Satureja* dünya çapında yaklaşık 200 tür içerir [12,13]. *Satureja* cinsi türleri çok yıllık bitkilerdir. Genellikle yarıçalımsı-çalımsı olup, gövdeleri 10-100 cm boyunda ve gövdelerinin toprağa yakın kısmı sert odunsu yapıya sahiptirler. *Satureja* türlerinin hemen hemen hepsi, Lamiaceae'ye özgü tüylerin (sapsız-salgılı tüyler) kimyasal içeriği sebebi ile aromatik olarak vasıflandırılır. Türlerin yaprakları dar şeritsi, ters-yumurtamsı, dar mızraksı şekillerde olup, çoğunlukla kenarlardan alt yüze doğru katlanmıştır. Çiçek düzenlerinde 2 veya daha fazla çiçek yer alır. Çanak yaprakları iki dudaklı veya düzenlidir. Taç yaprakları iki dudaklıdır. Çiçek rengi, beyaz, lila, pembe veya soluk mor renklerinde olabilmektedir. Cinsin türleri kuzey yarımkürede, büyük çoğunluğu Akdeniz havzasında (Güney Avrupa, Kuzey Afrika, Fas, Libya, İspanya, Yunanistan, Türkiye,), olmak üzere Suudi

Arabistan, Balkanlar, Rusya'nın güneyi, Kafkasya, Irak ve İran'da yayılış göstermektedir. Türkiye, 17 tür (6'sı endemik) ile en fazla türün yayılış gösterdiği ülkedir[14]. *Satureja*, *Lamiacea* familyasının en geniş yayılım gösteren türlerindedir. Genel olarak "Sivri kekik" şeklinde adlandırılan *Satureja*, Türkiye'deki Akdeniz'in doğu kesimi ve Ege bölgesi başta olmak üzere, neredeyse tüm bölgelerde kendini göstermektedir. Kurak, güneşli, taşlı ve kayalık yerlerde yaşayan yıllık veya çok yıllık yarı gür aromatik bitkilerdir. *Satureja* türleri güçlü aromatik özelliklerinden ve görsel özelliklerinden dolayı halk arasında yaygın olarak sindirime yardımcı, idrar söktürücü [15], çay, süs amaçlı veya baharat olarak kullanılmaktadır [16].

Yine yöresel olarak; kekik, sivri kekik, kılıç kekik, limon kekik, kokuluçay, dereçayı, çibriska gibi isimlerle anıldığı rapor edilmiştir. Kekik etnik olarak sadece *Satureja* türlerine verilen bir isim değildir. *Thymus*, *Origanum*, *Coridothymus* ve *Thymbra* türlerine de halk arasında kekik denilmektedir [16].

Türkiye'deki *Satureja* türlerinden ilk kez Boissier 1879'da 'Flora Orientalis' kitabında bahsetmiştir. Boissier kitabında 8'i endemik olmak üzere 15 türden bahsetmiştir [17]. Günümüzde Türkiye Florası'na kayıtlı 17 *Satureja* türü Tablo 1.1'de gösterilmiştir.

Tablo 1.1: Türkiyedeki *Satureja* Türleri.

Türkiye'deki <i>Satureja</i> Türleri #		
1	<i>Satureja aintabensis</i> P.H. Davis	Antep kaya kekiği (Endemik)
2	<i>Satureja amani</i> P.H. Davis	Amanos kekiği (Endemik)
3	<i>Satureja avromanica</i>	
4	<i>Satureja boissieri</i> Hausskn. ExBoiss.	Cantiri
5	<i>Satureja cilicica</i> P.H. Davis.	Kınalı kekik (Endemik)
6	<i>Satureja cuneifolia</i> Ten.	Kaya kekiği
7	<i>Satureja hortensis</i> L.	Çibriska, koç otu(5)
8	<i>Satureja icarica</i> P.H. Davis	Ada kekiği
9	<i>Satureja macrantha</i> C.A.Mey.	Sülün kekiği
10	<i>Satureja parnassicasubsp. sipylea</i> P.H. Davis	Arı kekiği (Endemik)
11	<i>Satureja pilosa</i> Velen.	Eybe kekiği
12	<i>Satureja spicigera</i> (K.Koch) Boiss.	Çorba kekiği
13	<i>Satureja spinosa</i> L.	Dikenli kekiği
14	<i>Satureja thymbra</i> L.	Halil İbrahim zahteri
15	<i>Satureja wiedemanniana</i> (Ave-Lall.) Velen	Yedi kekik
16	<i>Satureja coerulea</i> Janka	Istranca kekiği (Endemik)
17	<i>Satureja metastasianta</i> Rech. f.	

<https://www.bizimbitkiler.org.tr/list.html> verileri kullanılmıştır.

Türkiye’de yetişen *Satureja* türleri hakkında, 26.03.2021 tarihi itibarı ile “Google Akademik” veri tabanı incelenerek, Türkiye ve yakın coğrafyada yapılan çalışmaların hangi eksen etrafında yoğunlaştığına dair veriler elde edildi. Ülkemizde varlığı tespit edilen *Satureja* türleri hakkında yapılan çalışmalar çoğunlukla türlerin uçucu yağ bileşenleri ile uçucu yağlarının biyolojik aktiviteleri üzerine yoğunlaştığı, çok az çalışmanın konusunun bitkinin sekonder metabolit içeriği hakkında olduğu belirlenmiştir. Aşağıda, ülkemizde ve yakın coğrafyada yapılan çalışmalar esas alınarak bu literatür araştırmasının kısa bir özeti verilmiştir.

Antep bölgesi için endemik bir tür olan *Satureja aintebensis* hakkında Azaz, A.D. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Türkiye’de farklı bölgelerden toplanan bazı *Satureja* türlerinin uçucu yağlarının GC-MS ile analizi sonucunda ana bileşenler; p-simen (59.0%), timol (17.5%), γ -terpinen (8.4%), linalool (8.4%) olarak rapor edilmiştir. Ayrıca uçucu yağların antibakteriyal ve antifungal özellikleri incelenmiştir. Yapılan testlerde uçucu yağların bakteri ve fungal üremeyi inhibe ettiği belirtilmiş ve gıda bozulmasına neden olan mikroorganizmalara karşı da aktif olduğu rapor edilmiştir [18]. Bitki hakkında yapılan bir diğer çalışmada araştırmacılar aralarına *S.aintebensis*’in de bulunduğu bazı bitki türlerinin uçucu yağlarının ana bileşenleri tespit edilmiş ve içerik,p-simen(33%), timol (32%) şeklinde rapor edilmiştir [19]. Ayrıca uçucu yağların insektisidal aktivitesi de değerlendirilmiştir [19]. Bitki hakkında yapılan Askun ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı bitki türleri ile beraber *S.aintebensis* sekonder metabolitleri yönünden incelenmiştir. Petrol eteri, MeOH, etil asetat ile ardışık ekstraktları alınmış ve sekonder metabolitleri incelenerek MeOH içeriği; en yüksek oranda rosmarinik asit olmak üzere, gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, sirinjik asit, viteksin, naringin, rutin hidrat, hesperidin, apigenin-7-glikozit, oleuropein, quersetin, naringenin, luteolin şeklinde rapor edilirken, etil asetat ekstresinden yüksek oranda yine rosmarinik asit olmakla beraber; gallik asit, klorojenikasit, kafeik asit, p-kumarik asit, ferulikasit, naringin, rutin hidrat, apigenin-7-glikozit, oleuropein, quersetin, naringenin, luteolin varlığı rapor edilmiştir. Bunun yanında tüberkiloz suşlarına karşı aktif olduğu da rapor edilmiştir [20].

Satureja boissierie hakkında yapılan bir çalışmada Adıyaman’dan toplanan bitki örneklerinden elde edilen uçucu yağının GC-MS ile ana bileşenleri tespit edilmiş ve karvakrol (40.8%), γ -terpinen (26.4%), ve p-cymene (14.5%) olarak rapor edilmiştir [21]. Bitki hakkında yapılan bir diğer çalışmada Adıyaman’dan toplanan bitki

numunesinin hidrodistilasyonu ile elde edilen uçucu yağın GC-MS ile yapılan analizde ana bileşenler; karvakrol (%45), p-cymene (%36), γ -terpinen (%7), timol (%2) olarak rapor edilmiştir. Yapılan antimikrobiyal aktivite testinde anlamlı bir sonuç elde edilemediği bildirilmiştir[18]. Öke F. ve ekibi yaptıkları bir çalışmada *Satureja boissieri* uçucu yağının GC-MS ile yapılan analizinde ana bileşenler p-simen (%23), γ -terpinen (%23), timol (%19) ve karvakrol (%21) olarak rapor edilmiş. Bitkiden elde edilen saf bileşikler, p-simen ve timol, HeLa hücre hattına karşı mükemmel sitotoksik etkiler sergilediği rapor edilmiştir [22]. Aras ve ekibi tarafından *S. boissieri* yapraklarının etanol ve su ekstraktlarının sekonder metabolitleri UHPLC-ESI-MS / MS ile tanımlandı ve hesperidin (5051 ± 247 ppb) ve rosmarinik asit (4364 ± 214 ppb) kantitatif olarak karakterize edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca antifungal ve antioksidan aktivite yönünden yüksek etkinlik gösterdiği bildirilmiştir. İran kaynaklı iki çalışmada *Satureja boissieri* örneklerinin uçucu yağının kimyasal bileşimi GC-MS ile belirlenmiş ve ana bileşenler karvakrol (%28-70), γ -terpinen (%7-17), p-simen (%6-17) ve β -karyofilen (%4) şeklinde rapor edilirken bir bitkideki ana bileşenlerden biri timol (%30) olarak rapor edildi[23,24]. Kavcı tezinde aralarında *Satureja boissieri*'nin de olduğu bazı *Satureja* türlerinin uçucu yağının AChE aktivitesini tartışmıştır[25]. Cacın ve ekibi tarafından *Satureja boissieri*'ninde içinde bulunduğu bazı bitki türlerinin uçucu yağlarının yağ asitleri araştırılmış ve *S.boissieri*'de yüksek oranda linolenik asit, palmitik asit ve linoleik asit olduğu rapor edilmiştir[26]. Yapılan taramada *Satureja boissieri* hakkında yapılan ülkemizde sekonder metabolitlerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Türkiye'de Orta Akdeniz ve Doğu Akdeniz bölümünde yayılım gösteren *Satureja amani* Türkiye ve bölge için endemik olarak kayıtlara geçmiştir. Bitki hakkında yapılan literatür taramasında kimyasal içerikleri hakkında yapılan Kazakistan kaynaklı bir çalışma dışında yayına rastlanmamıştır. Bu çalışmada *S. amani*, *S. montana* ve *S. illyrica*'nın vitamin, amino asit ve yağ asitleri içeriklerinin kıyaslaması yapılmış, bu bitkiler arasında C vitamini açısından en yüksek bitkinin *S. amani* olduğu rapor edilmiştir. Üç türde de en yüksek orana sahip amino asit, glutamik asit olarak rapor edilirken yağ asidi kompozisyonu tartışılmıştır[27]. Türkiye'de yapılan *S. hortensis* ile ilgili bir tez çalışmasında[28] *S. Amani* için Kökdil ve ekibinin bir çalışma yaptığından bahsedilmiş ancak yayında konu ile ilgili rapora rastlanmamıştır.

Akdeniz bölgesine Adana bölümü için endemik olduğu bildirilen (bizimbitkiler.org) *Satureja cilicica* hakkında Hasan Maral ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, Ermenek'ten toplanan bitkinin sadece uçucu yağ yüzdesi %1.64 olarak rapor edilmiştir[29]. G. Özkan ve arkadaşları'nın *Satureja cilicica*'nın tereyağına ilavesi ile antioksidan etkisini inceledikleri araştırmalarında tereyağını farklı sıcaklıklarda iki ay depolamışlardır. Tereyağının 20. 40. ve 60. günlerinde uçucu yağın antioksidan aktivitesini değerlendirmek için oksidasyon stabilitesini, kimyasal özelliklerini ve laktik asit bakteri miktarı incelenmiş ve bitkinin, tereyağı oksidasyonunun önlenmesinde aktif olduğu rapor edilmiştir[30]. Dönmez ve arkadaşları bitki patojenleri hakkında içerisinde *Satureja cilicica*'nın da bulunduğu bazı *Satureja* türlerinin uçucu yağlarının in vitro ve in vivo denemelerini rapor etmişlerdir[31]. Askun ve arkadaşları *S. cilicica*'nın da içerisinde bulunduğu bazı *Satureja* türlerinin aktif bileşenleri ve biyolojik aktiviteleri araştırılmış ve sınırlı sayıda sekonder metabolitlerini (ana bileşen olarak hesperidin ve rosmarinik asit) rapor etmişlerdir. Ayrıca biyolojik aktiviteleri değerlendirilerek, farklı *Satureja* türleriyle beraber *S.cilicica*'nın ekstrelerinin konsantrasyona bağlı antifungal aktiviteleri tartışılmıştır [32]. Schulz ve arkadaşları Türkiye'den toplanan aralarında *S.cilicica*'nın da bulunduğu *Satureja* türlerinin uçucu yağının kimyasal içeriğini ATR/FT-IR and NIR-FT-Raman spektroskopisi ile tayin etmişler ve ana bileşenlerini karvakrol(19%), timol(23%), p-simen(20%), γ -terpinen(13%) şeklinde rapor etmişlerdir [33]. Bitki hakkında yapılmış detaylı sekonder metabolit analizine ilişkin Aşkun T.'nin çalışması dışında bir rapor bulunamamıştır [32].

Güney Marmara bölümü, Asıl Ege bölümü, İç Batı Anadolu, Konya bölümü, Antalya bölümü, Adana bölümünde yayılım gösteren *Satureja cuneifolia*, Ülkemizde hakkında birçok çalışmanın yapıldığı, ticari değere sahip türlerden biridir. Uçucu yağı ve biyolojik aktiviteleri hakkında çok sayıda çalışma mevcuttur. F. Öke ve ekibi Isparta civarından topladıkları *Satureja cuneifolia*'dan elde edilen uçucu yağın kimyasal içerik analizini; karvakrol (50%) ve p-cymene (22%) şeklinde rapor etmişlerdir. Ayrıca bitkinin tüm gıda kaynaklı olan ve gıda bozucu etkiye sahip olan bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir. Antioksidan aktivitesi araştırılan bitkinin uçucu yağı metanolik ekstresi ile kıyaslanmış ve metanolik ekstraktın antioksidan özelliğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir [34]. Bir diğer çalışmada Eskişehirden toplanan bitkinin su ile ekstresinin HepG2 insan karaciğer kanser hücresi üzerindeki

etkisi araştırılmış, deneyler sonucunda kanser hücrelerinde belirgin şekilde bir ölüm gözlemlendiği rapor edilmiştir [35]. Dönmez M.F. ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *S. cuneifolia*'dan elde edilen uçucu yağın fasulye patojenleri üzerinde etkileri araştırılmış ve bitkideki patojen gelişimini %100 engellediği rapor edilmiştir [31]. M. Altun ve arkadaşları Çanakkale civarından toplanan bitkinin uçucu yağının analizini ekstarksiyonla eş zamalı olacak şekilde Thermal desorption GC-MS ile gerçekleştirmişler ve ana bileşenleri, timol (%36), p-simen (%18), γ -terpinen (%14) şeklinde tespit edildiği rapor edilmiş [36]. Taslimi P. ve arkadaşları tarafından Antalya- Burdur civarından toplanan bitkinin metanolik ve su ekstraktının LC-MS ile sekonder metabolit içeriği araştırılmış. Metanolik ekstraktında rutin, su ekstraktında kaempferol-3-O-rutinosid ana bileşen olarak tespit edilmiştir. İki ekstraktın yüksek antioksidan özellik gösterdiği ve ayrıca ACHe ve BCHe inhibisyon potansiyelinin referans takrine göre düşük olduğunu ancak metanol ekstraktının BCHe inhibisyon etkisinin araştırmaya değer olduğu bildirilmiştir [37]. Turgut Taşkın ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada Balıkesir bölgesinden toplanan bitkinin su ve metanol ekstraktının in-vitro anti-ürez, antioksidan, antikolinesteraz, sitotoksik ve antiinflamatuvar potansiyelleri araştırılmış, metanol ekstraktının belirgin derecede farklı olarak biyolojik aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [38]. *S. cuneifolia* ve *S. montana*'nın kıyaslandığı Hırvatistan kaynaklı bir diğer çalışmada *S. cuneifolia* uçucu yağının ana bileşenleri olarak kubenen (8.7%), spatulenol ve karyofillen, bileşiklerinin tespit edildiği ve bu bileşiklere limonen, α -pinen'in eşlik ettiği rapor edilmiştir. Ayrıca *S. cuneifolia*'nın uçucu yağının antifungal aktiviteye sahip olduğu veriler doğrultusunda rapor edilmiştir [39]. Yakın coğrafyaya ait bir çalışmada İtalya'nın güneyinden toplanan 12 farklı *S. cuneifolia* örneklerinin uçucu yağlarının ana bileşenleri linalol, borneol, α -pinen olarak rapor edilmiştir. Ayrıca yağ oranlarının kimyasal kompozisyonda yaptığı değişimi değerlendirmek için farklı su miktarları ile sulanmış bitkilerin içerikleri araştırılmış, toprakta artan su miktarının borneol kemotipinin oluşumunda, azalan su miktarının da linalool ve α -pinen varlığında etkili olduğu rapor edilmiştir [40].

İstanbul bölümü ve Çatalca-Kocaeli bölümünde yayılım göstermekte olan *S. coerulea* Janka hakkında Azaz ve arkadaşları *S. coerulea*'nın da içinde bulunduğu yukarıda bahsedilen çalışmada [18] uçucu yağın ana bileşenleri β -karyofillen (%11), karyofillen oksit (%8), borneol (%6), germakren-D (%5), limonen (%4), β -borbonen (%4),

spatulenol (%3) olarak rapor edilmiştir. Çiçek açma döneminde toplanan bitkilerin uçucu yağlarının antibakteriyel ve antifungal olarak zayıf bir etki gösterdiği bildirilmiştir. Askun ve arkadaşları *S. coerulea*'nın da içerisinde bulunduğu bazı *Satureja* türlerinin aktif bileşenleri ve biyolojik aktivitelerini değerlendirdikleri çalışmalarında, metanol ekstresinde rosmarinik asit, karvakrol yüksek miktarda olmak üzere 10 sekonder metabolit rapor edilmiştir ve diğer *Satureja* türleriyle beraber *S.coerulea*'nın da solvent ekstralarının aktivitesinin konsantrasyona bağlı olduğu ve yüksek konsantrasyonlarda güçlü fungusidal etkilere ve daha düşük konsantrasyonlarda fungistatik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir [32]. Kırklareli'nden toplanan bitki örnekleri Tümen G. ve arkadaşları tarafından ilk toplandığı günden 15 ve 20 gün sonraki hasatların uçucu yağının GC-MS ile kimyasal analiz yapılmış ve; mirsen (%1-4),limonen (%2-5),timol(%1-8), germakren-D (%13-21) ,borneol (%4-8) şeklinde rapor edilmiştir[41].

Ülkemizin tüm bölümlerinde yayılım gösteren *Satureja hortensis* hakkında literatürde bir çok çalışma rapor edilmiştir. Ancak bu çalışmalar ekseriyetle uçucu yağ analizleri, solvent ekstralarının ve uçucu yağlarının biyolojik aktiviteleri ile sınırlıdır. Yurtdışı kaynaklı bitkinin sekonder metabolitlerini araştıran yalnız bir çalışma tespit edilebildiği halde ülkemizin tüm bölgelerinde yayılım gösteren bu türün sekonder metabolitleri hakkında yerli bir çalışmaya rastlanmamıştır. Alan ve arkadaşları tarafından Bingöl'e yörelerden toplanan *S. hortensis*'in uçucu yağının ve farklı solvent ekstralarının antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirilmiştir [42]. Popovici ve arkadaşları *S. hortensis*'in uçucu yağının GC-MS ile, soxhalet cihazıyla elde edilen etanolik ekstraktının LC-MS ile kimyasal içeriğini tespit edip ekstraların biyolojik aktivitelerini araştırmışlar ve sonuçları; γ -terpinen (%4), o-simen (%15), β -karyofillen (%2), timol (%14), karvakrol (%13) şeklinde rapor edilmiştir. Uçucu yağ ve etanol ekstresinin yüksek antioksidan etki gösterdiği, uçucu yağın ve etanolik ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinin çoğu bakteride yüksek olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca 11 sekonder metabolit tespit edildiği bildirilmiştir [43]. Arslan ve arkadaşları Ankara civarında kültürü yapılan *S. hortensis*'in gelişiminin dört farklı evresindeki kuru yaprak, uçucu yağ ve karvakrol verimini değerlendirmişlerdir. En yüksek karvakrol veriminin (%60) çiçeklenme döneminde olduğunu rapor etmişlerdir [44]. Tozlu ve ekip arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *Satureja hortensis* L. uçucu yağı GC-FID/GC-MS ile yaptığı içerik analizinde karvakrol oranını %56 olarak rapor

edilmiştir. Bu çalışmada bitkinin uçucu yağının insektisidal aktivitesi de tartışılmıştır [45]. Bitki hakkında Ukrayna kaynaklı sekonder metabolitlerini araştıran bir çalışmada da ana bileşenin rosmarinik asit olduğu rapor edilmiştir [46]. Chkhikvishvili ve ekibinin yaptığı çalışmada bitkinin rosmarinik asit ve hesperidin ve naringin gibi kısıtlı sayıda sekonder metabolit tespit edilmiş ve bitkinin anti-enflamatuar ve sitoprotektif özellikleri tartışılmıştır [47].

Ülkemizde Erzurum-Kars bölümü ve yukarı Murat-Van bölümünde yayılış gösteren *Satureja macrantha* C.A. Mey. hakkında kimyasal profilini inceleyen yerli çalışmalar bulunmamakla birlikte İran'da da yetişen *S.mactartha* hakkında Sefidkon ve arkadaşları, bitkinin uçucu yağının kimyasal analizini yaparak ana bileşenlerini *p*-simen (% 26), limonen (% 16) ve timol (% 8) olarak rapor etmişlerdir [48]. 2011 yılında İran kaynaklı yayımlanan bir çalışmada, Labiatae familyasına ait *Satureja macrantha* C. A. Mey.'in de aralarında bulunduğu 29 türün rosmarinik asit içeriklerinin HPLC-diod array yöntemiyle belirlenip kıyaslanmıştır [49]. Gouhari ve arkadaşları tarafından türün ham ektresinden izole edilen 4 sekonder metabolit ¹³C-NMR, FTIR ve EIMS yöntemleriyle tespit edildiği raporlanmıştır [50].

Irak için endemik olarak rapor edilen *Satureja metastasiantha*, Hakkari'de T.Dirmenci tarafından tür tespiti yapılarak Türkiye Florasına kayıt ettirilmiştir [14]. Şemdinli yakınlarında toplanan bitkinin uçucu yağının GC-FID/GC-MS ile yapılan kimyasal analizinde ana bileşenler *p*-simen (%22), timol (%21), karvakrol (%18), γ -terpinen (%12) olduğu Carıkcı ve ekibi tarafından rapor edilmiştir. Bununla birlikte bitkinin metanolik ekstraktının uçucu yağından daha fazla antioksidan özellik gösterdiği tespit edilmiş ayrıca orta derecede antimikrobiyal özelliğinin gözlemlendiği belirtilmiştir. Buna ilave olarak bitkinin metanolik ekstraktı ve uçucu yağının AChE aktivitesi değerlendirilmiş ve kontrol Galantaminden yaklaşık üçte bir oranında daha az etkili olduğu rapor edilmiştir [51].

Ülkemizde Güney Marmara bölümünde yayılım gösteren ve adını, tür tespitinin yapıldığı Sipil Dağı'ndan alan *Satureja parnassica* subsp. *sipylea* P.H.Davis bitkisini Fatih Satıl ve ekibi morfolojik olarak inceleyip, bunun yanında uçucu yağının kimyasal içeriğini de araştırmışlardır. Sonuçları; linalool (%23-21), terpinen-4-ol (%7-12), borneol (%6-5), *trans*-sabiennenhidrat (%1-19) şeklinde bildirmişlerdir[52]. Tümen ve çalışma arkadaşları ise bitkinin uçucu yağının ana bileşenlerini araştırıp içeriğini; karvakrol (%43), *p*-simen (%20) şeklinde bildirmişlerdir [53].

Satureja pinosa L. türü ise Ülkemizde Antalya yöresinde yayılım göstermektedir. Türkiye ve yakın coğrafyamızda yayılış gösteren tür hakkında Choriaopoulos ve arkadaşları tarafından Girit adasından topladıkları bitkinin uçucu yağının antibakteriyel aktivitesi tartışılmış ve gıda koruyucu olarak kullanılabilirliği raporlanmıştır [54]. Tabanca ve arkadaşları Türkiye'nin güneyinden topladıkları çiçeklenme dönemindeki iki farklı bölgede yetişen *S. spinosa*'nın uçucu yağının kimyasal içeriğini araştırmışlar ve her iki bitki için ana bileşeni linalool (61.5% ve 47.4%) olarak rapor etmişlerdir [55]. Kavcı 2020 hazırladığı tezinde *Satureja* türlerinin biyolojik aktivitelerini değerlendirmiştir. Araştırmada *S. spinosa*'nın diğer bitkilerden (*Satureja aintabensis*, P.H. Davis, *S. Boissieri* Hausskn. exBoiss., *S. icarica* P.H. Davis, *S. macrantha* C.A. Mey.) daha yüksek AChE aktivite gösterdiğini rapor etmiştir[25].

Ülkemizde Asıl Ege bölümü, İç Batı Anadolu bölümü, Antalya bölümü ve Adana bölümünde yayılım gösteren *S.thymbra* ile ilgili Öztürk ve ekibinin yaptığı bir çalışmada, uçucu yağın AChE ve BChE aktivitesi araştırılmıştır. Ayrıca uçucu yağın antioksidan aktivitesi değerlendirilmiştir. Bu çalışmada uçucu yağın kimyasal içeriği; karvakrol (%34,6), γ -terpinen (%22,9), p-simen (%13,0) ve timol (%12,8) olarak rapor edilmiş ve p-simen dışındaki bileşiklerin her iki aktivite testinde de aktif olduğu bildirilmiştir. Çalışmada, bitkinin uçucu yağının ve bazı bileşenlerinin AChE inhibitör aktivitesi de araştırılmıştır [56]. A.C.Gören ve çalışma arkadaşlarının *S.thymbra* ve *S.cuneifolia* tohumlarından elde ettikleri sabit yağın yağ asidi metil esterlerinin (FAME'ler) kimyasal bileşimi GC / MS ile analiz edilerek *S. thymbra* tohumlarından başlıca 9-oktadekenoik asit metil ester (%43.9), heksadekanoik asit metil ester (%11.4), 9,12,15-oktadekatrienoik asit metil ester (Z,Z,Z) (%30.2), ve oktadekanoik asit metil ester (%14.1) elde edildiği rapor edilirken, *S.Cuneifolia*'nın FAME'leri ise heksadekanoik asit metil ester (metil palmitat, 34.6%),9-oktadekenoik asit metil ester (%10.1), 9,12,15-oktadekatrienoik asit metil ester (Z,Z,Z) (%6.3) ve oktadekanoik asit metil ester (%1.8) şeklinde rapor edilmiştir [57]. Tür hakkındaki bir diğer çalışmada Skendi ve ekibi Yunanistan'dan toplanan içerisinde *Satureja thymbra*'nın da bulunduğu bitkilerin metanol ve su ekstralarında karvakrol ve timol dahil olmak üzere 24 sekonder metabolitin, HPLC-DAD cihazı ile sekonder metabolit içeriğinin yanında, bitkilerin metanolik ve su ekstralarının antioksidan aktiviteleri tartışılmıştır[58].

Ülkemizde Güney Marmara bölümü, Batı Karadeniz bölümü, Orta Karadeniz bölümü, Asıl Ege bölümü, Yukarı Sakarya bölümü ve Orta Kızılırmak bölümünde yayılım gösteren *Satureja wiedemanniana* (Ave-Lall.) Velen hakkında Sampson ve ekibi tarafından Türkiye'den toplanan bitkilerle yapılmış bir çalışmada tür değerlendirilmiş ve uçucu yağ içeriği; karvakrol (%40), timol (%14) şeklinde rapor edilmiş ve insektisidal aktivitesi değerlendirilmiştir [19]. Başer ve ekibi farklı bölgelerden topladıkları *Satureja wiedemanniana*'nın uçucu yağının kimyasal içerik analizi sonucunu; mirsen (%0,1-2.2), α -terpinen (%0,2-2.6), (Z)- β -o-simen (%0,2-3.1), γ -terpinen (%0.002-18.5), (E)- β -o-simen (%0,2-1.1), p-simen (%2,4-29.7) şeklinde bildirmişlerdir. Bununla beraber uçucu yağın antibakteriyel özellikleri çalışmada tartışılmıştır [59]. Ezer ve ekibi bitkinin uçucu yağının kimyasal içerik analizini karyofillen oksit (%8.5), borneol (%8.3), germakren-D (%8.1), limonen (%7.7), spatulenol (%7.7), o-karyofillen (%6.5) ve β -bisabolene (%6.0) şeklinde rapor etmişlerdir[60]. Yücel ve çalışma arkadaşları *S. wiedemanniana* uçucu yağının ana bileşenin p-simen (11.6%) olduğunu bildirmişler ve bitki uçucu yağının antibakteriyel özelliklerini tartışarak tavuk eti için gıda koruyucu olabilme özelliği tartışılmıştır [61]. Yine Yücel ve ekibi kırmızı et için *S. wiedemanniana*'nın doğal gıda koruyucu olma aktivitesini değerlendirmişleridir [62]. Tür hakkında sekonder metabolitlerinin araştırıldığı herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. (19.03.2021 Google Akademik)

Bir diğer tür olan *Satureja spicigera* , ülkemizde Orta Karadeniz bölümü, Doğu Karadeniz bölümü ve Erzurum-Kars bölümünde yayılım göstermektedir. F. Eftekhar ve arkadaşları tarafından İran'dan topladıkları *S.spicigera*'nın çiçekli kısımlarının hidrodistilasyonla elde edilen uçucu yağının GC-MS ile yapılan analizinde ana bileşen olarak karvakrol (%53,7) ve timol (%36) olarak tespit edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca antibakteriyel özellik gösterdiği ve özellikle antibiyotiklere dirençli bir organizma olan *P.aeruginosa* 'ya karşı uçucu yağın orta derecede inhibisyon sağladığı rapor edilmiştir [63]. Eminağaoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada *S.spicigera* ve *S. cuneifolia*'dan elde edilen uçucu yağ ile metanolik ekstraktın antibakteriyel etkileri araştırılmıştır. Uçucu yağların GC-MS ile yapılan incelemeleri sonunda *S.spicigera*'nın ana bileşenleri karvakrol (%42,5), γ -terpinen (%21,5), p-simen (%20,9) olarak rapor edilmiş. Ayrıca *S.cuneifolia* ve *S. spicigera*'nın uçucu yağ ve metanol ekstraktlarının antioksidan aktiviteleri de tartışılmıştır [64]. M.Farzeneh ve arkadaşları tarafından İran'da topladıkları *S.hortensis*, *S.spicigera*, ve

S.khuzistanica 'nın uçucu yağlarının kimyasal profili GC-FID ve GC-MS ile belirlenip, çilek yetiştirirken oluşabilen fungal patojenlere karşı etkileri araştırılmıştır. Ana bileşenler timol (%29,5), p-simen (%23,4), γ -terpinen (%15,2), karvakrol (%9) olarak belirlenmiştir. Ayrıca *S.khuzitanica*'ya kıyasla antifungal özelliği daha düşük konsantrasyonlarda da gösterebildiği rapor edilmiştir [65]. Tür hakkındaki bir diğer çalışmada İran'ın kuzeybatısından toplanan bitkinin kromatografik ve spektral metotlarla tayini yapılan timokinon (1), timol (2), karvakrol (3), β -sitosterol (4), ursolik asit (5), oleanolik asit (6), nubigenol ve 5,4-dihidroksi-3-metoksiflavanone-7-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranozitleşiklerinin meme kanserleri üzerindeki aktivitesi tartışılmıştır. 5,4-dihidroksi-3-metoksiflavanone-7-(6-O- α -L-ramnopiranosil)- β -D-glucopiranozitle bileşiğinin kanser hücrelerine çok belirgin toksik etkisi rapor edilmiştir [12]. Bitki hakkında yapılan literatür araştırmasında bitkinin sekonder metabolitlerini aydınlatan ülkemizde yapılan çalışma olmadığı tespit edilmiştir. (07.01.2021, Web of Science).

Satureja pilosa, Ülkemizde Güney Marmara bölümü, Asıl Ege bölümü ve İç Batı Anadolu bölümü dolaylarında yayılım gösteren bir tür olup, türün kimyasal bileşenleri üzerine yalnızca dört adet çalışma yapılan literatür araştırması ile belirlenmiştir. (07.01.2021, Web of Science). Bu çalışmalardan Tümen ve arkadaşları tarafından [41] uçucu yağ içeriğini karvakrol (% 53.5) , geraniol (%4.5), timol (%0.2), p-simen (%17.4), γ -terpinen (%4.2), borneol (%2.6) olarak bildirilirken , Azaz ve ekibi [18] uçucu yağın kimyasal içeriğini karvakrol (% 42.1), p-simen (%8.1), geraniol (%7.6), borneol (%4.7) olarak rapor etmişlerdir. 2014 yılında Bulgaristan'da kültüre edilen 28 bitki hakkında Nikolova ve arkadaşlarının [66] yaptığı bir çalışmada ise *S.pilosa*'ya ait veriler tartışılmıştır. Çalışmada bitkinin metanol ekstresinin flavonoidleri ve falavonoid glikozitleri araştırılmış ve eser miktarda apigenin ve luteolin 7-O-glikozit'in tespit edildiği ifade edilmiştir. Ayrıca çalışmada bitkinin antioksidan ve antibakteriyel özelliği de tartışılmıştır. *S.pilosa* 'nın sekonder metabolitleri hakkında detaylı bir çalışma tespit edilememiştir. Bir diğer Bulgaristan kaynaklı çalışmada 33 ayrı Bulgaristan lokasyonundan toplanan bitkinin uçucu yağının kimyasal analizi yapılmış ve sonuçlar kemotaksonomik açıdan değerlendirilmiştir. Çalışmada bitkinin ana bileşeni karvakrol ve timol olduğu rapor edilmiş, ayrıca türün antisivrisinek aktivitesi araştırılarak tartışılmıştır[67].

Satureja icarica türü ise ülkemizde Güney Marmara bölümünde yayılım göstermekte olup, türün sekonder metabolitlerinin incelenmesi açısından sınırlı sayıda çalışma tespit edilmiştir. Tümen ve arkadaşları farklı noktalardan toplanan *S. icarica*'nın uçucu yağının kimyasal içeriğini; karvakrol (%52-59.2) , p-simen(% 13.1-17), timol (%1.8-8.4), Υ -terpinen (%5.9-6.9) olarak rapor etmişlerdir [41]. Azaz ve ekibi 2002 yılında yaptıkları çalışmada türün uçucu yağının kimyasal içeriğini karvakrol (%59.2), p-simen(%15.7), Υ -terpinen (%4.4), borneol (%4.5) olarak rapor etmişlerdir [18]. Bu iki çalışmada da tür *S. pilosa* ile beraber araştırmaya tabi tutulmuştur . 2012 yılında Askun ve ark. Bazı *Satureja* türlerinin sekonder metabolit içeriklerini araştırmak için yaptıkları çalışmada *S. icarica*'ya da yer vermişler ve bitkinin metanolekstraktında, gallik asit, kateşin, kafeik asit, epikateşin, *p*-kumarik asit, ferulik asit, vitexin, rutin, naringin, hesperidin, apigenin-7-glucoside, rozmarinik asit, eriodictiyol, kersetin, naringenin, luteolin, apigenin ve karvakrol (Tablo 3) tespit etmişlerdir[32]. *S. icarica* uçucu yağının patojen bakterilerden *Pseudomonasaeruginosa* üzerinde diğer yağlara göre daha iyi inhibe edici bir aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır. *Enterobacter aerogenes* üzerinde *S. icarica* uçucu yağının orta derecede bir aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [59]. Askun ve ekibi *S. icarica*'nın metanolik ekstraktının antibakteriyel ve antifungal özelliklerini değerlendirmiş, metanolik ekstraktının çeşitli seviyelerde antifungal ve antibakteriyel etki gösterdiğini rapor edilmiştir [20].

Ülkemizde son yıllarda teşhisi yapılarak kayıt altına alınan *Satureja avromanica* türünde ise uçucu yağın kimyasal kompozisyonu ile ilgili olarak Abdali ve ekibinin yaptığı bir çalışmada, ana bileşenler; n-pentakosane (%24), spatulenol (%12), α -bourbonen (%11) ve n-dokosane (%11) olarak rapor edilmiştir. Aynı çalışmada spesifik olarak rozmarinik asit içeriği incelenmiş olup total fenolik miktarına bakılmıştır [68]. İran kaynaklı başka bir çalışmada doğal olarak yetişen ve kültürü yapılan *Satureja avromanica*'nın ekildikten sonra ilk iki yıl toplanan hasatlarının uçucu yağ içeriği sırayla timol (% 32-13), karvakrol (% 24-48), γ -terpinen (% 5-8) ve p-simen (% 18-10) olarak belirlenmiştir [69]. Hoshidari ve ekibinin bir diğer çalışmasında İran'ın farklı bir bölgeden toplanan bitkinin uçucu yağ içeriği timol (%84), karvakrol (%5), and p-simen (%4) olarak bildirilmiştir [70]. Bitki hakkında ülkemizde yapılan bir çalışma tespit edilmemiştir.

Ülkemizdeki *Satureja* türleri üzerine yapılan literatur taramasında türlerin ACHe ve BCHe aktiviteleri hakkında yapılan çalışmalar da araştırılmıştır. Tüm türlerin

antialzheimer aktivitelerinin araştırılmalarına konu olmadığı tespit edilmiştir. Ülkemizdeki *Satureja* türleri ve yapılan AChE, BChE ve antioksidan (AO) aktivite araştırmaları ve sekonder metabolitlerinin araştırıldığı alışmalar (Tablo 1.2) de özetlenmiştir. Tabloda yer almayan türler hakkında belirtilen çalışmalar literatür araştırmamızda tespit edilmemiştir.



Tablo 1. 2 : *Satureja* Türleri solvent ekstralarının sekonder metabolit ve aktivite taraması.

Tür Adı	Sekonder Metabolit	Yöntem ve Solvent	ACHe ve BChE	AO
<i>S. cilicica P.H. Davis</i>	Rosmarinik asit, kafeik asit, naringin, hesperidin, eriyodiktiyol, kersetin, naringenin, luteolin, apigenin	HPLC[32]-MeOH	#	[30]
<i>S. cuneifolia Ten.</i>	Rutin ,fumarik asit,luteolin,Quercetin,agetin-3.6-dimethylether,siyanidin klorid ,gallikasit, epikateşin,apigenin, kafeik asit, klorojenik asit , kaempferol, pyrogallol,kaempferol-3-O-rutinoside, kateşin, ellagik asit , t-ferulik asit, rosmarinikasit, luteolin-5-O-glucoside, luteolin-7-O-glucoside	LC-MS/MS[37]-MeOH,Su	[37, 38]	[34,37,38,42]
<i>S. icarica P.H.Davis</i>	Karvakrol ,apigenin, hesperidin,kateşin, kafeikasit,rosmarinik asit	HPLC[32]-MeOH	[25]	
<i>S. pilosa Velen.</i>	Luteolin 7-glukozit,apigenin	TLC[64]-MeOH	#	[66]
<i>S. coerulea Janka</i>	Rosmarinik asit, kateşin,kafeikasit,ferulik asit,viteksin,naringenin,luteolin, karvakrol	HPLC[32]-MeOH	#	
<i>S. spicigera (K.Koch) Boiss</i>	Thymol ,carvacrol , β -sitosterol , ursolik asit , oleanolik asit , nubigenol, 5,7,3,5-Tetrahidroksiflavanone, 5,4dihidroksi-3-metoksiflavanone-7-(6-O- α -Lrhamnopyranosyl)- β -D-glucopyranoside	CC, TLC,2DNMR , HR-ESI-TOFMS[12]- Etil Asetati,MeOH	#	[64]
<i>S. thymbra L.</i>	rosmarinikasit,naringenin , kafeikasit,luteolin 7,4-di-O-glucuronide, luteolin 7-O-rutinoside, aromadendrin, salvianolicacidA,apigenin , lithospermicacid, eriodictyol, apigenin 7-O-glycoside	HPLC-DAD-ESI-MS/MS[69]-EtOH	[54]	[71]

Tablo 1.2 (Devam) : Satureja Türleri solvent ekstralarının sekonder metabolit ve aktivite taraması.

Tür Adı	Sekonder Metabolit	Yöntem ve Solvent	ACHe ve BChE	AO
<i>S. aintebensis</i>	gallik asit, klorojenik asit, kafeik asit, p-kumarik asit, feulikasit, naringin, rutin hidrat, apigenin-7-glikozit, oleuropein, quersetin, naringenin, luteolin	LC-MS [20]-(ardışık) petrol eteri, etil asetat, metanol	[25]	#
<i>S. hortensis L.</i>	Karvakrol , rosmarinik asit, Apigenin-7-glucoside, Quercitrin, Hyperoside ve kafeik asit , luteolin, apigenin, rutin, hesperidin, apigenin-7-glukozit	HPLC-DAD / UPLC-MS- Kloroform, etilasetat, etanol, [46,47]	#	[43]
<i>S. avromanica</i>	#	#	#	[72]
<i>S. metastasianta</i>	#	#	[51]	[51]
<i>S. macrantha</i>	Ursolik asit, oleanolik asit, karyofillen oksit, timol [50]-rosmarinik asit [49]	NMR, FTIR, EIMS [50]-HPLC-diod array [49]	[25]	[50]
<i>S. spinosa</i>	#	#	[25]	#
<i>S. boissierie,</i>	#	#	[25]	#

literatürde çalışmaya rastlanmamıştır

1.3 Satureja icarica ve Satureja pilosa

G.Tümen vd. 2000’de yaptıkları çalışmayla Balıkesir ve Çanakkale de topladıkları bitki numunelerinin *S.pilosa* ve *S.icarica* olduğunu tespit etmişlerdir [73].

Halk arasında “Ada kekiği” [41]olarak bilinen *S.icarica* uzun ömürlü, sağlam odunsu gövdesi 3-4 cm çapında üst kısımları daha kalındır. Bazal kısımda yukarı doğru tüysüz, koyu kahverengi kabuk küçük parçalar halinde dökülmektedir. Çiçekli gövde sayısız, basit veya dallı 5-12 cm, artan, kıvrık-ergin kıllarla yoğun bir şekilde çevrelenmiştir (Şekil 1.1’de gösterin *S.icarica* görseli [71] numaralı kaynaktan alıntıdır.)



Şekil 1.1 : *S.icarica* P.H.Davis

Tablo 1.3 : Satureja icarica hakkında yapılan çalışmalar.

	Uçucu Yağ Ana Bileşen	Sekonder Metabolit İçeriği	AChE ve BChE	Diğer Aktivite
Kavcı, 2020	-	-	(MEOH),AChE aktivitesi göstermemiş ;BChE 3.18±0.18 (mg GALAE/g) ünü vermemişreferans için galantamin ölçüm	Tirozinaz inhibitör aktivite,Antidiabetik
Tümen,G.Krimer, N.1998	Karvakrol (3 ayrı Si)	-	-	-
Askun T, 2012	-	Kateşin, kafeik asit, ferulik asit, vitexin, naringin,hesperidin, ,rosmarinik asit, eriodiktiyol, naringenin, luteolin, apigenin, karvakrol (MEOH)	-	Antimikrobiyal
Dülger B 2008	-	(MeOH)	-	Antifungal, (MeOH)
Azaz, Demirci, 2002	Karvakrol	-	-	EO, antimikrobiyal

EO: uçucu yağ

Bitki hakkında yapılan çalışmalar Tablo 1.3'te özetlenmiştir. Bitkinin uçucu yağ içeriği Tümen [41] ve Azaz'ın [18] çalışmalarında değerlendirilmiştir ve uçucu yağındaki ana etken madde karvakrol olarak raporlanmıştır. Dülger B. ve ekibinin yaptığı çalışmada ise sadece bitkinin metanolik ekstraktının antifungal etkisi değerlendirilmiştir [74]. Sekonder metabolit içeriği ile ilgili çalışma Askun T. ve ekibi tarafından gerçekleştirilmiş olup metanol ekstraktında 12 sekonder metabolit raporlanmıştır. AChE ve BChE aktivitesini Kavcı tezinde araştırmış ve bitkinin MEOH ekstresinin , AChE aktivitesi göstermediğini ve BChE aktivitesinin 3.18 ± 0.18 (mg GALAE/g) olarak tespit edildiğini rapor etmiştir [25]. Tür hakkında antioksidan aktivitesine ilişkin bir araştırmaya rastlanmamıştır.

Halk arasında “eybe kekiği”[41]olarak bilinen *Satureja pilosa* küçük çalı, 10-25 cm uzunluğunda. Sağlam, odunsu kökü 2-4 cm çapında, üst kısımlarda daha kalındır. Odunsu ve tabanda çok dallı, silindirik, tüsüz, kabuk koyu kahverengi çabuk düşen yapıya sahip. Çiçeklenme çok sayıda olup çiçek yaprakları sapsız, başak benzeri bir yapı oluşturmaktadır(Şekil 1.2’de gösterilen *S.pilosa* görseli [73] numaralı kaynaktan alıntıdır.)



Şekil 1.2 : *Satureja pilosa* Velen

Satureja pilosa halk arasında limon kekik, dereçayı, sivri kekik isimleriyle de anıldığı literatürde bildirilmiştir ve yaprakları çay şeklinde demlenerek tüketilmektedir. Mide rahatsızlıkları,soğuk algınlığı, öksürük, grip tedavisinde kullanılmaktadır [75,76].

Tablo 1.4 : *Satureja pilosa* hakkındaki çalışmalar.

	Uçucu Yağ Ana Etken Madde	Sekonder Metabolit	Aktivite
Tümen,G.Krimer,N.1998	Karvakrol	-	-
Azaz,D.2002	Karvakrol	-	-
Nikolova, M. 2009		Apigenin ve luteolin 7-O- glikozit	Antioksidan ,antibakteriyal
SemerdjievaI. 2020	Karvakrol- timol (33 bitki)		Anti Sivrisinek

Satureja pilosa'nın ülkemizde ve yakın coğrafyada kimyasal içeriğini araştıran dört çalışma literatür taramasında tespit edilmiştir (Tablo 1.4). Bu çalışmalardan üçü uçucu yağının içeriği hakkında olup ana bileşeni Azaz ve ekibi[18] ile Tümen ve ekibi [41]karvakrol olarak rapor ederken Bulgaristan kaynaklı Semerdejiva ve ekibin yaptığı çalışmada 33 farklı lokasyondan toplanan *Satureja pilosa*'nın uçucu yağının ana bileşenleri karvakrol ve timol olarak rapor edilmiştir [67]. Bitki hakkındaki tek sekonder metabolit araştırması Nikolova ve ekibi tarafından yapılmış olup eser oranda apigenin ve luteolin 7-O-glikozit rapor edilmiştir [66]. Bitkinin biyolojik aktivite araştırmalarında baktığımızda Tablo 4: de belirtildiği üzere antisivrisinek, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri hakkında çalışmalar tespit edilmiş olup anti Alzheimer aktivitesi değerlendirilmediği tespit edilmiştir.

Bitkilerin öncelikle etnik kullanımı ve sonrasında tıbbi ve aromatik olarak kullanılmasının yegâne nedeni bünyesindeki eşsiz sekonder metabolitlerdir. Bitkilerdeki bu biyolojik olarak aktif metabolitler genellikle üç büyük grupta sınıflandırılmış olup bunlar; terpenler, alkaloidler ve fenolikler olarak adlandırılmaktadır [77]. Lamiaceae familyası monoterpen, diterpen ve seskiterpenler açısından zengin aromatik metabolitler taşıyan bir familyadır [78]. Bu çalışmada

Satureja icarica ve *Satureja pilosa*'nın sekonder metabolitleri ve bu bitkilerin antioksidan, asetilkolinesteraz ve bütirikolinesteraz inhibitör aktiviteleri incelenecektir.

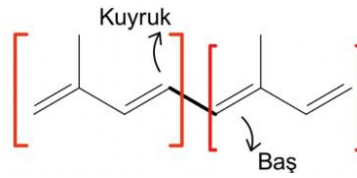


2. GENEL BİLGİLER

2.1 Terpenler

Terpen kelimesi terbentinden gelmektedir ve terbentin çam ağacının reçinesine ya da reçine bileşenlerinde verilen ad olarak tanımlanır. Yapısında bulunan olefinik bağı belirtmek için “en” eki kullanılır. Terpen ve terpenoid terimleri aynı anlamda kullanılsa da farklı anlam taşırlar. Terpenoid, terpenin oksijen içeren grupları taşıyan moleküllerdir. Bitkilerdeki uçucu yağların temel bileşeni terpenlerdir [77].

Termal bozunmaları sırasında izopren açığa çıkar bu da bizim terpenin temel yapıtaşının izopren olduğu bilgisini verebilir. İzopren üniteleri birbirine baş-kuyruk (çoğunlukla) şeklinde bağlanırlar (Şekil 2.1). Bu kural doğru bir şekilde yönlendirse de kurala uymayan bileşikler vardır. Örneğin; karotenler kuyruk-kuyruğa bağlanır. Yapısındaki izopren sayısına göre terpen, isim alır. Ayrıca doğal olarak bulunan her tür terpenin oksijen içeren türleride vardır ve bunların temelde alkol, aldehit veya keton formları mevcuttur[76].



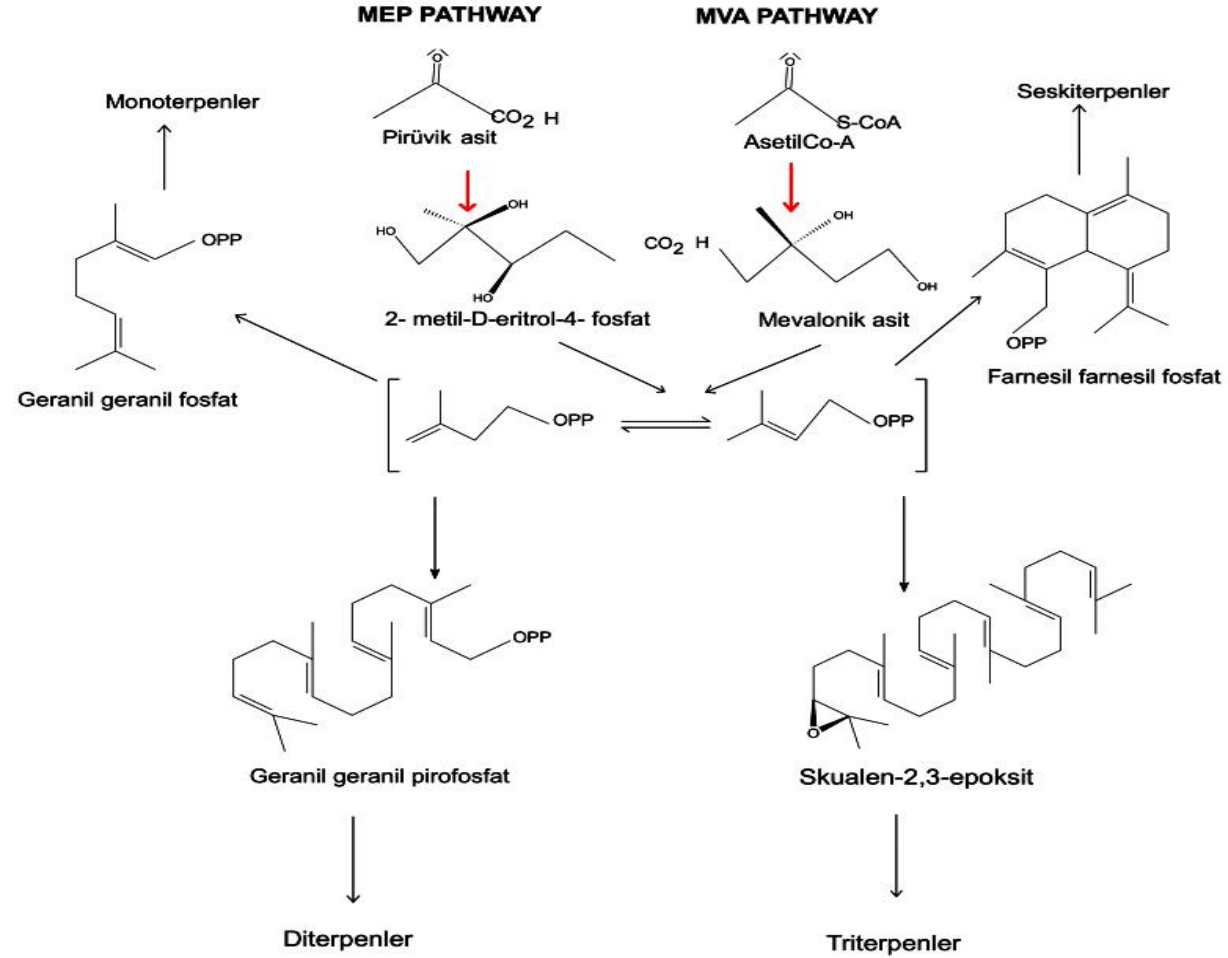
Şekil 2.1 : İzoprenin baş-kuyruk bağlanması

Terpenler yapılarındaki izopren üniteleri sayısına göre adlandırılır ve sınıflandırılırlar (Tablo 2.1).

Tablo 2.1 : Terpenlerin sınıflandırılması.

İsim	İzopren Sayısı	C sayısı	Genel Formül
Hemiterpenler	1	5	C ₅ H ₈
Monoterpenler	2	10	C ₁₀ H ₁₆
Seskiterpenler	3	15	C ₁₅ H ₂₄
Diterpenler	4	20	C ₂₀ H ₃₂
Sesterterpenler	5	25	C ₂₅ H ₄₀
Triterpenler	6	30	C ₃₀ H ₄₈
Tetraterpenler (karotenler)	8	40	C ₄₀ H ₆₄
Politerpenler	>8	>40	(C ₅ H ₈) _n

Terpenler için iki metabolik yolak tanımlanır; mevalonat yolağı ve metil eritrol fosfat yolağı (non-mevalonat yolağı) (Şekil 2.2’de gösterilen mekanizma [75] nolu kaynaktan derlenmiştir). Mevalonat yolağı stoplazmada, metileritrol fosfat (MEP) yolağı koloplastta gerçekleştiğı düşünölmektedir[77]. Mevalonik asit ATP ile bir triterpen olan skualene dönüştürölmüştür. Reaksiyon ortamından monofosfat ve trifosfata ayrışmıştır. Terpenlerin oluşumu sırasında karboksil grubundaki karbon atomunun dekarboksilasyonla ayrıldığı gözlenmiştir. Mevalonik asit ATP ile dekarboksilasyon ve dehidratsyona uğrayarak, yapısı izoprene çok benzeyen izopentenil pirofosfata dönüştürmektedir. İzopentenil pirofosfat(IPP) enzimler yardımıyla karbokatyon mekanizmalarının kapsamlı kullanımı ve daha sonra Wagner-Meerwein yeniden düzenlemeleri ile açıklanır ve daha büyük moleküllu terpenler elde edilir [79,80].

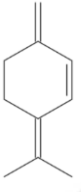
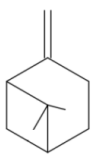
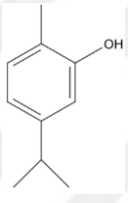
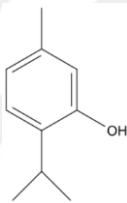
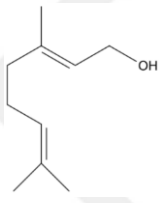
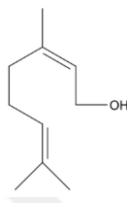
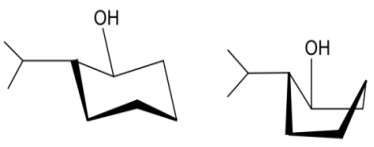
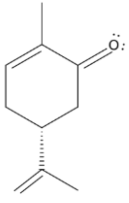
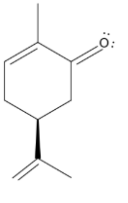


Şekil 2.2 : İzoprenin baş-kuyruk bağlanması

Terpenler uçucu yağların temel bileşenleri olarak karşımıza çıkar. Terpen uçucu yağları mono- ve seski- olmak üzere bu iki gruba ait terpelerden oluşmaktadır. Monoterpenler 140-180 °C’de, seskiterpenler >200 °C kaynama noktasına sahiptirler. İzomeri bitkilerden elde edilen terpenler arasında yaygındır. Temelde terpenlerin beş izomeri formu vardır; (Tablo 2.2)

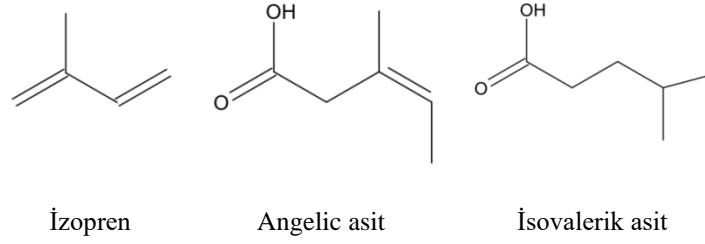
- Yapısal izomeri
- Steroizomeri
- Pozisyonel
- Konformasyonel
- Geometrik[81]

Tablo 2.2 : Terpenlerdeki Temel İzomeriler.

Yapısal İzomeri		Pozisyonel İzomeri		Geometrik İzomeri	
Myrecene	B-pinene	Karvakrol	Timol	Geraniol	Nerol
					
Konformasyonel İzomeri				Steroizomeri	
(-)-mentol kayık f. koltuk f.		(-)-mentol		R-(-)-Karvon	S-(+)-karvon
					

2.1.1 Hemiterpenler

Bilinen 50’ye yakın hemiterpen vardır. Birçok bitkide hemiterpen mevcuttur. Örnek olarak tiglic asit, angelic asit verilebilir (Şekil 2.3) [82].



Şekil 2.3 : Hemiterpen örnekleri

2.1.2 Monoterpenler

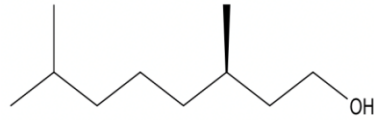
Monoterpenler (10 C içeren) iki izopren ünitesinden oluşan yapılardır. Geleneksel olarak, monoterpenler, sadece belirli bitkiler (örneğin; Labiatae, Pinaceae, Umbelliferae) tarafından büyük miktarlarda üretilen ve biriken uçucu yağların bileşenleri olarak düşünülmüştür. Şimdi, monoterpenler daha yüksek yapılı bitkilerde her yerde bulunur. Klasik esansiyel yağ taşıyan bitkiler, diğer bitkilerde küçük metabolitler olarak bulunan bu bileşiklerin büyük miktarlarını biriktirmeye uyarlanmış özel salgı yapılarına sahip olmaları bakımından benzersizdir. Monoterpenlerin bir allelopatik veya allelokimikrol oynadığı genel olarak kabul edilir[83]. Monoterpenlerin sınıflandırılması Tablo 2.3’de verilmiştir.

Tablo 2.3 : Monoterpenlerin sınıflandırılması.

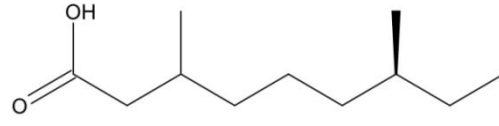
Monoterpenler		
1.Asiklik	2.Monosiklik	3.Bisiklik
a. Alkol	a. Siklobütan	a. Karenler ve tujanlar
b. Aldehit	b. Siklopentan	b. pinanlar
c. Trienler	c. Sikloheksan	c. Kamfenler ve
d. Tri- ve tetra- sülfidler	d. Simenler	Fençanlar
e.Monoterpenoidfuranlar		d. kannabinoidler

2.1.2.1 Asiklik Monoterpenler

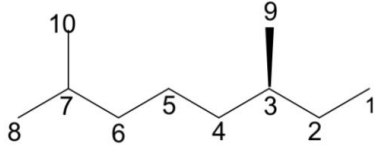
Yaklaşık 1500 monoterpen rapor edilmiştir. Baş-kuyruk bağı yaparak 2,6 dimetiloktan dan türetilir. Düz zincirli ve izomerik yapılar gösterir. (*R*)-3,7-Dimethyloctanol ıtırın güzel kokulu bileşenidir. 2-6 dimetilloktanoik asit (Şekil 2.4) bazı kuşların mumsu tüylerinde bulunur[82].



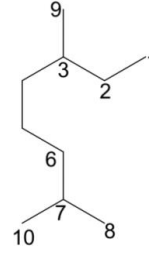
(R)-3,7-dimetiloktanol



2,6 dimetiloktanoik asit



2,6-dimetiloktan

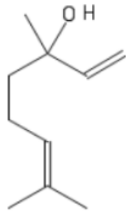


2,6-dimetiloktan

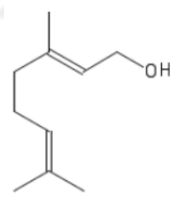
Şekil 2.4 : 2,6-dimetiloktan molekül numaralandırması

Asiklik Monoterpenik Alkol ve Aldehitler

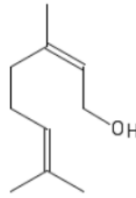
Doymamış monoterpen alkol ve aldehitler parfümeride önemli rol oynarlar [82]. Şekil 2.5’de örnekleri verilmiştir.



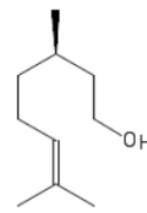
Rac.linalool



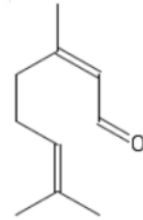
Geraniol(E)



Nerol(Z)



(R)-(+)-
citronellol

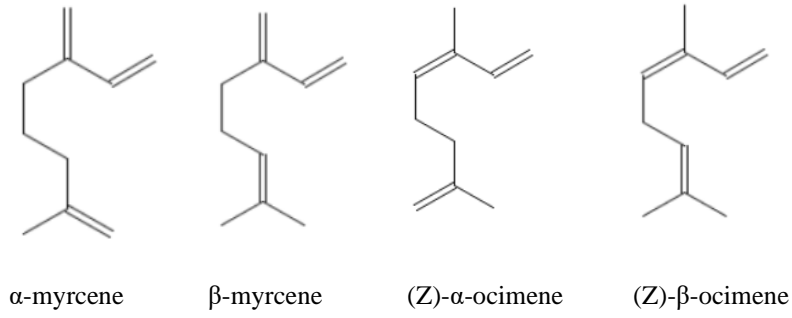


Neral(Z)

Şekil 2.5 : Doymamış monoterpenik alkoller ve aldehit örnekleri

Trienler

β -mirsen ve o-cimenin (Şekil 2.6) konfigürasyon izomerleri gibi asiklik monoterpenoid trienler fesleğen yağlarında bulunur[82].

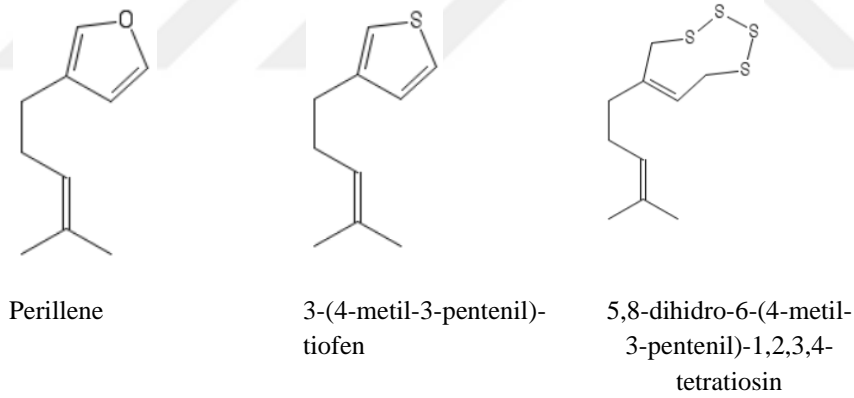


Şekil 2.6 : Trien örnekleri.

Tri- ve Tetra- Sülfidler ve Monoterpenoid Furanlar

Kükürt içeren kısımlar halka yapıdadır. şerbetçi otunda bulunan (1,2,3-trithiepine ve 1,2,3,4-tetrathiocine) siklik tri- ve tetra sülfidlerdir[82].

Perillen (Şekil 2.7) b-myrcene den türeyen bir monoterpenoid furandır. *Perilla citrodora*'dan elde edilen esansiyel yağın bir bileşenidir. Bazı böceklerde savunma feromonu olarak görev alır. gül yağının koku bileşeni gül furanı şerbetçi otunda bulunan (1,2,3-trithiepine ve 1,2,3,4-tetrathiocine) siklik tri- ve tetra sülfidlerdir [82].

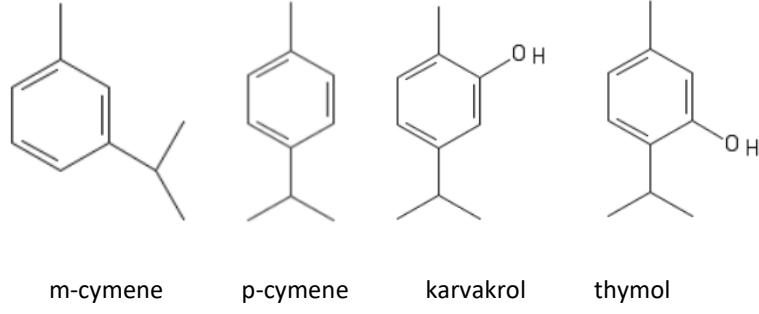


Şekil 2.7 : Tri- ve Tetra- Sülfidler ve Monoterpenoid Furanlar

2.1.2.2 Monosiklik Monoterpenler

Simenler

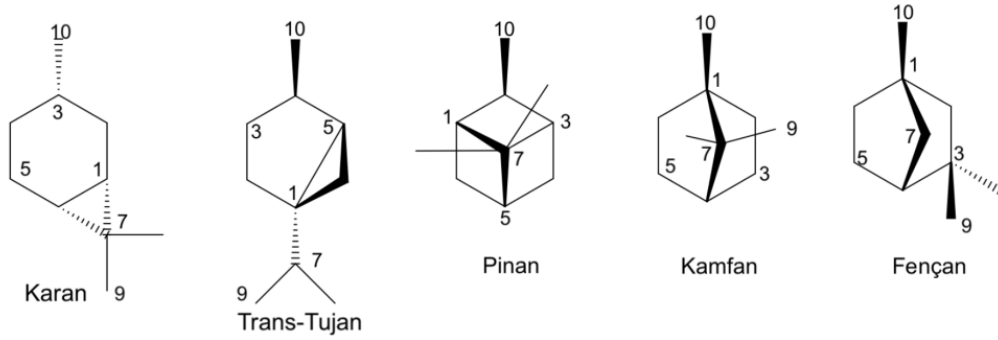
Benzoid mentanlardır. *m*-cymene, *p*-cymene (Şekil 2.8), *o*-pozisyonu henüz tespit edilmemiştir. Karvakrol mercanköşk, origanum, satireja ve kekik yağlarından izole edilir ve dezenfektan olarak uygulanır. Timol kekik yağında (*Thymus vulgaris*, *Labiatae*) bulunur ve *Ortodon angustifolium*(*Labiatae*) tohumlarından elde edilen eterik yağın baskın bileşenidir; topikal antiseptik ve antihelmintik olarak uygulanır[82].



Şekil 2.8 : Simenler

2.1.2.3 Bisiklik Monoterpenoidler

Bisiklik siklopropanlar karan ve thujane, bisiklik siklobutanpinan ve bishanekamphane, izosamphane ve feñan (Şekil 2.9) gibi heptanlar, doğal olarak meydana gelen bisiklikmonoterpenlerin en önemli iskeletleridir[82].

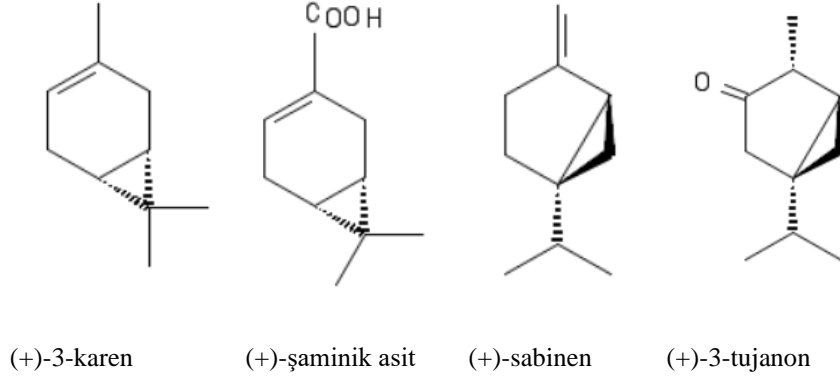


Şekil 2.9 : Bisiklik monoterpenoidler

Karenler ve Tujanlar

Göknar (*Abies*), ardıç (*Juniperus*) ve narenciyede de kimyasal tespiti yapılmıştır. *Pinus silvestris*'in eterik yağı da enantiomer (-) -3-karen içerir (Şekil 2.10).

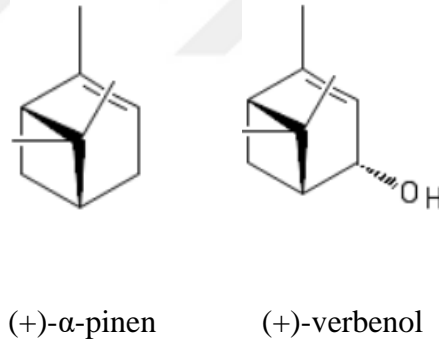
Bitkilerde tujan türevleri daha boldur. Hayat ağacının genç dallarından (*Thuja occidentalis*, *Cupressaceae*) ve diğer bitki familyalarının yağlarından da (*Pinaceae*, *Labiatae*, *Asteraceae*) elde edilen tujanlar (thujone ve 4-epimer izothujone), mentole benzer bir koku verir, ancak yutulduğunda kasılmalara neden olur [82].



Şekil 2.10 : Karen ve tujan yapıları

Pinenler

Çeşitli çam ağaçlarının (*Pinuscaribaea*, *P. palustris*, *P. pinaster*) gövdesinden ve büyük ölçekte selüloz üretimi yoluyla elde edilen terebentin yağının içeriğinde (terebentin sülfatlanmış yağı) %70'den fazla α - ve %20 β -pinen (Şekil 2.11) varlığı kimyasal analizlerde tespit edilmiştir. Her iki regioizomer enantiyomeri diğer birçok kozalakta (*Pinaceae*) mevcuttur[82].



Şekil 2.11 : Pinenler

2.1.3 Seskiterpenler

Karbon sayısı 15 olan bir diğer ifade ile üç izopren ünitesine sahip moleküllerdir. Linear, monosiklik, bisiklik, andpolisiklik yapıda bulunur[82]. Bazı seskiterpenler, absisik asit, furanoid fitoaleksinler, lakton antifeedantları ve çok sayıda mantar antibiyotiği dahil olmak üzere yüksek ve düşük yapılı bitkilerde iyi tanımlanmış ve temel roller oynar. Çoğu seskiterpen için spesifik bir fonksiyon gösterilmemiştir; bununla birlikte, bu bileşiklere bir allopatik veya allelokimik rol yaygın olarak atfedilir. Seskiterpenler metabolik olarak inert değildir, ancak hızla sentezlenir ve katabolize edilirler ve bu nedenle metabolizmada dinamik

bir rol oynayabilir. Seskiterpenlerin katabolizması hakkında neredeyse hiçbir şey bilinmemektedir [83]. Tablo 2.4’de seskiterpenlerin sınıflandırılması gösterilmiştir



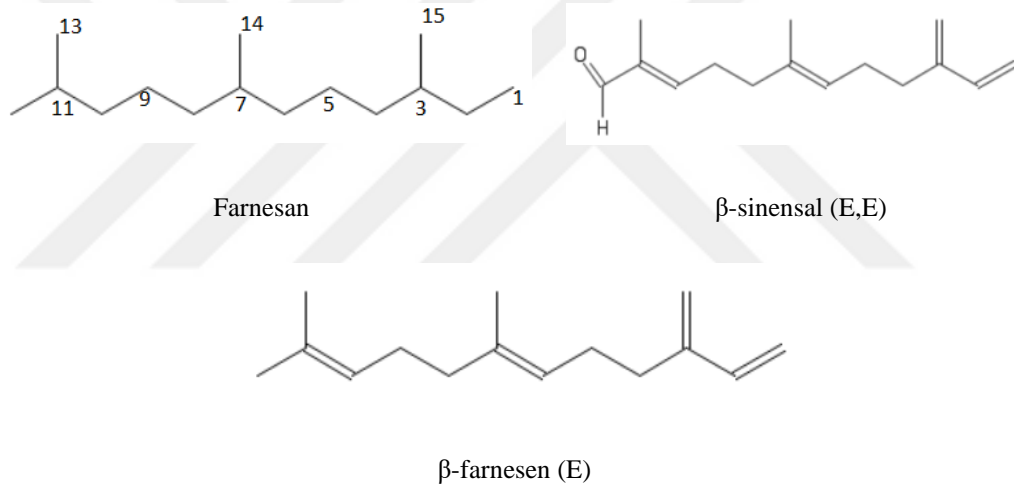
Tablo 2.4 : Seskiterpenlerin sınıflandırılması.

Seskiterpenler			
FarnesanSesk.	Monosiklik Farnesan Sesk.	Polisiklik Farnesan Sesk.	Diğer Polisiklik Seskiterpenler
	Siklofarnesanlarvebisabolenler	Karyofillenler	Pinguisanlar
	Germakrenler ve elemenlar	Udesmanlar ve furanoudesmanlar	Presilfiperfolianlar, Silfiperfolianlar, Isokomanlar Silfinanlar,
	Humulanlar	Eremofilanlar, furanoeremofilanlar, valeranlar Kadinanlar Drimanlar Guayanlar ve sikloguayanlar Pikrotaksanlar Dukanlar ve izodukanlar Protoiludanlar, iludanlar Karasmanlar, izolaktaranlar, laktaranlar Akaronlar Çarmigranlar Sedranlar ve izosedranlar	

2.1.3.1 Farnesanlar

2,6,10- trimetildodekan ya da farnesan, bilinen 10000 kadar seskiterpen ailesinin üyesidir. α -farnesenin (E, E) -izomeri, elma, armut ve diğer meyvelerin aromalarının ve dış kabuklarının bir bileşenidir. Terrestrol olarak bilinen -2,3-Dihidrofarnesol, erkek bombus arısı *Bombus terrestris*'in işaretleme feromonudur. Farnesen, *Citrus sinensis*'in (*Rutaceae*) olgun meyvelerinin taze kabuklarından elde edilen portakal yağının lezzetine katkıda bulunur; *Citrus reticulata* ve *C.aurantium*'dan (*Rutaceae*) elde edilen yağda %0.2 α -sinensal içerir.

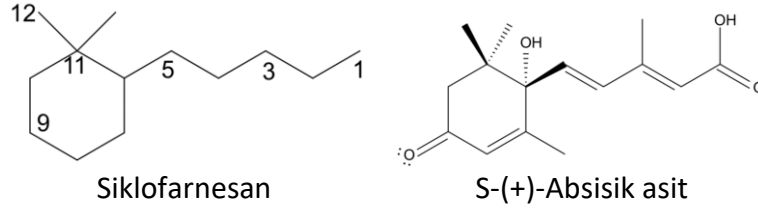
Bazı furanoid farnesan türevlerinin zincirleri, furan halkaları ile sonlandırılır. Bazı deniz salyangozlarından ve tatlı patatesten izole edilen dendrolasin, karınca *Dendrolasius fuliginosus*'un bir alarm ve savunma feromonudur[82]. Şekil 2.12'de farnesan türevlerinin örnekleri gösterilmiştir.



Şekil 2.12 : Farnesan ana iskeleti ve bazı türevleri

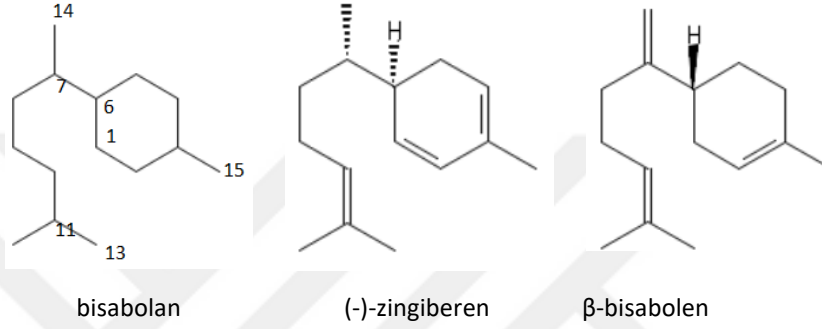
2.1.3.2 Monosiklik Farnesan Seskiterpenler

Farnesan'ın C-6 ve C-7 karbon atomları bir halkayı kapattığında siklofarnesanlar (Şekil 2.13) açığa çıkar. Lahana, patates, gül ve pamuk meyvelerinin erken dönemlerinde meydana gelen absisik asit bu gruba dahildir. Absisik asit, bitki büyüme hormonlarının bir antagonisti olarak davranır ve çiçeklenmeyi, meyvelerin düşmesini ve yaprakların dökülmesini kontrol eder.



Şekil 2.13 : Siklofarnesane ve absisik asit.

C1 ve C6'nın kapanmasıyla bisabolon oluşur. Bitki kökenli 100'den fazla bisabolon (Şekil 2.14) türevi bilinmektedir [82].

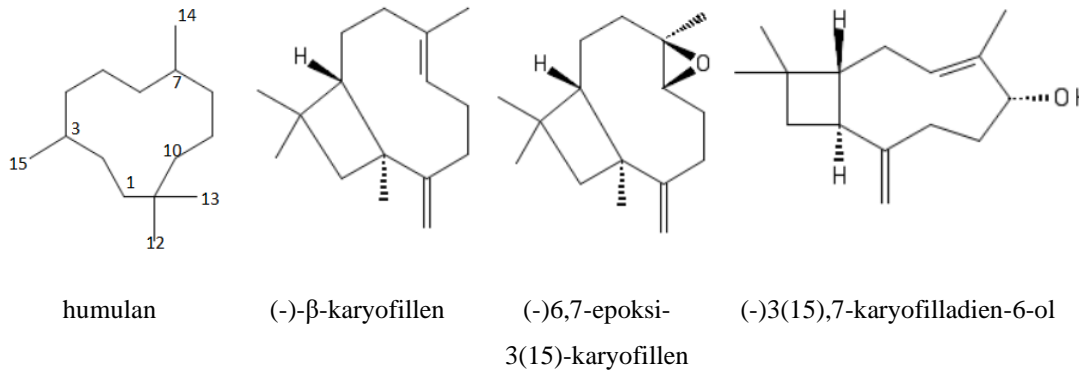


Şekil 2.14 : Bisabolon iskeleti ve türevleri

2.1.3.3. Polysiklik Farnesane Seskiterpenleri

Doğal ürünler arasında bulunan 30 karyofillen, C-2 ve C-10'un bir siklobütan halkasını kapattığı humulanlardan türetilir[82].

Yaklaşık 30 doğal karyofillen (Şekil 2.15), humulanların siklobütan halkasının C-2 ve C-10 yaklaşmasıyla oluşur. (-)- β -Karyofillen, karanfil yağında (%10'a kadar) bulunur. Tarçın, narenciye, okaliptüs, adaçayı ve kekik yağlarında karyofillenler bulunur. Parfümeride, sakızların lezzetlendirilmesinde kullanılır. Aynı zamanda diş analjezik, karminatif ve sinir uçlarını uyarıcı olarak kullanılırlar[82].



Şekil 2.15 : Humulan çekirdek yapısı ve karyofillen örnekleri

2.1.4 Diterpenler

Diterpen iskeleti, genellikle geraniogerani pirofosfatın (GGPP) kendi içinde düzenlenmesiyle oluřtuđu dűřünűlen bűyűk bir C₂₀ bileřikleri grubudur. Esas olarak mantar ve daha yűksek bitki kűkenlidirler ve gymnosperm reęine asitlerini ve gibberellinleri (GA) ięerirler. Gibberellinler ilk ۆnce bir bitki patojenik mantar tarafından űretilen fitotoksinler olarak keřfedildikleri ve daha sonra ۆnemli bitki bűyűme hormonları oldukları gűsterildikleri ięin ilgi ęekicidir [83]. Diterpenler kendi ięinde ařaęıdaki gibi sınıflandırılabilirler [82]. Diterpenlerin sınıflandırılması Tablo2.5’de verilmiřtir.



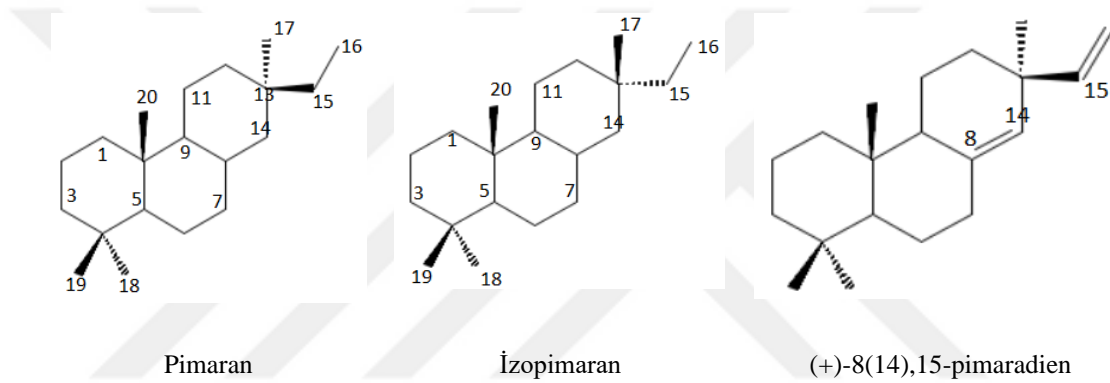
Tablo 2.5 : Diterpenlerin sınıflandırılması.

DİTERPENLER							
Fitanlar	Siklofitanlar	Bisiklofitanlar	Trisiklofitanlar	Tetrasiklofitanlar	Sembranlar ve siklosembrianlar	Prenilseskiterpenleri	Ginkgolidler
	Labdanlar	Pimaranlar ve İzopimaranlar Abietanlar ve Totaranlar Kassanlar, Cleistanthanlar izokopalanlar	Beyranlar Kauranlar ve villanovanlar Atisanlar Giberellanlar Grayanatoksanlar	Beyranlar Kauranlar ve villanovanlar Atisanlar Giberellanlar Grayanatoksanlar	Sembranlar Kasbanlar Latiranlar Jatrofanlar Tiglianlar Ramnofolanlar,Dafnanlar Unisellanlar, Asbestinanlar Biaranlar Dolabelanlar Dolastanlar fuzikokanlar Vertisilanlar, taksanlar Trinervitanlar, Kempanlar	Ksenikanlar, Ksenifillanlar Prenilgermakranlar, Lobanlar Preniludesmanlar, Bifloranlar Prenildrimanlar Prenilguayanlar, Prenilaromadendranlar Sfenolobanlar	

2.1.4.1 Trisiklofitanlar

Pimaranlar ve İzopimaranlar

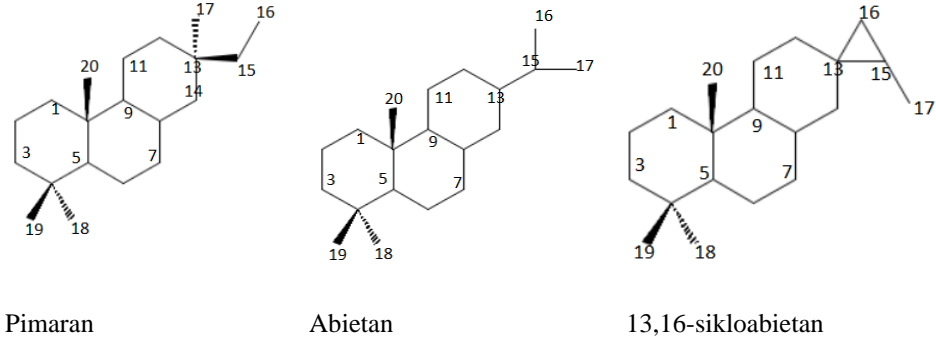
Pimaranlar ve izopimaranlar, perhidrofenantren temel iskeletine sahip 13,17-siklolanlardır ve sadece C-13'deki konfigürasyonlarında farklılık gösterirler. Yeniden düzenlenmiş ve siklize edilmiş pimaranlar arasında rosanlar (C-20 metil grubunun C-10'dan C-9'a kayması), parguaranlar (3,18-siklopimaranlar), eritroksilanlar (C-4 ila C-5 arasındaki rosanın metil grubu C-19) ve devadaranlar (4,19-sikloeritroksilanlar) bulunur. Podokarpanlar, karbon atomları 15-17 (15,16,17-trinorpimaranlar) düzenlenerek pimaranlardan (Şekil 2.16) açığa çıkar. Pimaranlar çoğunlukla çam türlerinde kendini gösterir [82].



Şekil 2.16 : Pimaran yapıları

Abietanlar ve Totaranlar

Abietanlar pimeralardan C13 deki metilin C15'e göç etmesiyle oluşur. Bununla birlikte, bitkilerde, geranil geranildifosfatın siklizasyonundan ortaya çıkarlar. İlgili parent diterpen hidrokarbonlar arasında, 13 -16-sikloabietanlar, metil grubu C-15'ten C-16'ya göç eden 17 (15-16) -abeo-abietanlar ve totaranlardır. İzopropil grubu C-13'ten C-14'e göç ettiğinde de abietandan totaranlar oluşur (Şekil 2.17). Kozalaklı ağaçlarda çok sayıda türevleri vardır [82].



Şekil 2.17 : Abietan ve sikloabietan iskeleti.

2.1.5 Sesterterpenler

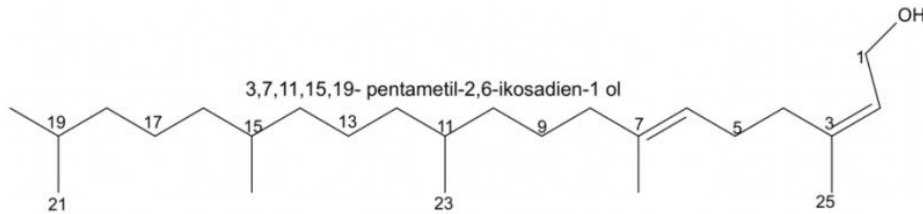
Sesterterpenler beş izopren biriminden oluşurlar. Bu bileşikler terpenlere göre daha ender bulunurlar. 150 den fazla sesterterpen bilinmektedir[82]. Tablo 2.6’da sesterterpenlerin sınıflandırılması verilmiştir.

Tablo 2.6 : Sesterterpenler.

Sesterterpenler		
Asiklik	Monosiklik	Polisiklik
		Bisiklik
		Trisiklik
		Tetra ve pentasiklik

2.1.5.1 Asiklik Sesterterpenler

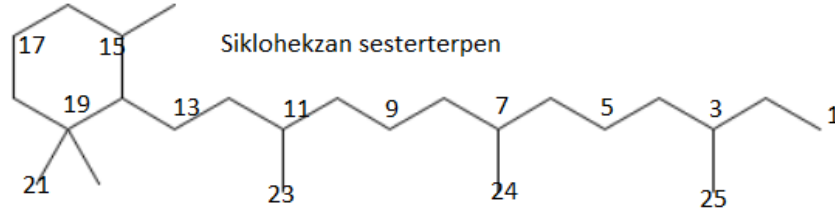
Bilinen 150’den fazla sesterterpen vardır. Nadiren yüksek bitkilerde meydana gelir. Örneğin 3,7,11,15,19-pentametilikosan (Şekil 2.18), patatesin(*Solanum tuberosum*) yapraklarında bulunmaktadır[82].



Şekil 2.18 : 3,7,11,15,19-pentametilikosan türevidir.

2.1.5.2 Monosiklik Sesterterpenler

C14 ve C19 bağının oluşumuyla oluştukları düşünülmektedir[82]. Şekil 2.19'de sikloheksan sesterterpen iskeleti gösterilmiştir.

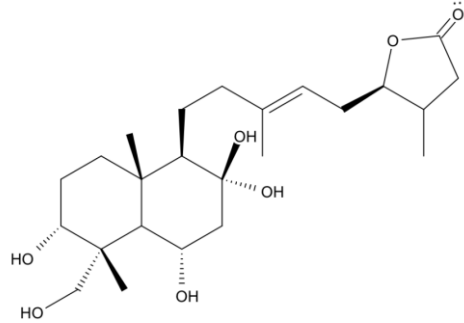


Şekil 2.19 : sikloheksan sesterterpen iskeleti.

2.1.5.3 Polisiklik Sesterterpenler

Bisiklik Sesterterpenler

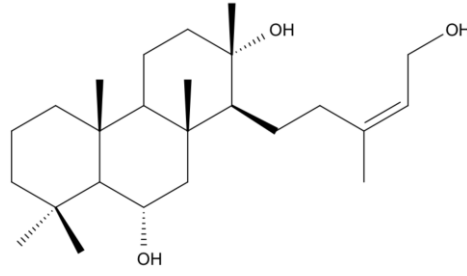
Bisiklik sesterterpenlerin ana hidrokarbon iskeletleri, ağırlıklı olarak bazı seskiterpenlerden türetilir [82]. Örnek olarak; *Salvia syriaca*'dan elde edilen (+)-salvisiriakolid (Şekil 2.20) verilebilir[82].



Şekil 2.20 : (+)-salvisiriakolid

Trisiklik Sesterterpenler

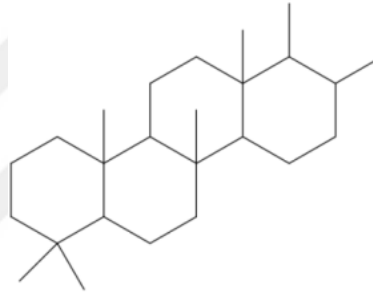
Bugüne kadar bilinen trisiklik sesterterpenler , şelantan ve ofiobolan gibi yan zinciri prenilenmiş çekirdek yapılarıdır[82]. Eğrelti otundan elde edilen (+)- şelantatriol (Şekil 2.21) örnek olarak verilebilir.



Şekil 2.21 : (+)-şelanta-6 α ,13 α ,19-triol

Tetra ve pentasiklik sesterterpenler

4,4,8,17,18-Tetrametil homoandrostan, skalaran olarak adlandırılan (Şekil 2.22) ve steroidlerin gonane çekirdeği ile ilişkili olan, bugüne kadar bilinen tetrasiklik sesterterpenler çoğunun çekirdek yapısıdır.



Şekil 2.22 : Skalaran.

2.1.6 Triterpenler

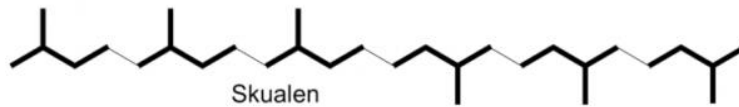
Triterpenler ve triterpenoidler terimleri genellikle aynı 30 karbonlu terpen bileşiklerini tanımlamak için kullanılır, ancak her iki ifade arasında farkın belirtilmesi gerek. Triterpen, doğal olarak oluşan terpenleri tanımlamak için toplu bir terim olarak kullanılsa da, daha geniş bir ifade olan triterpenoid, örneğin; iyononlar gibi doğal bozunma ürünlerini ve ayrıca terpen alkol, aldehytler, ketonlar, asitler, esterler, epoksitler gibi doğal ve sentetik türevleri de kapsar. En basit tritepen skualendir (Şekil 2.23) [84]. Triterpenler Tablo 2.7 deki gibi sınıflandırılabilir[82].

Tablo 2.7 : Triterpenlerin sınıflandırılması.

Triterpenler (Ttp)					
Lineer Ttp	Gonan tipi tetrasiklikTtp	Bakaran tipi PentasiklikTtp	Hopan tipi PentasiklikTtp	Diğer PentasiklikTtp	İridaller
	Protostanlar, fusidanlar	Bakaranlar, lupanlar	Hopanlar, Neopanlar	Stiktanlar, Arboranlar	
	Damaranlar	Oleananlar	Fernanlar	Onoseranlar ve Serratanlar	
	Apoturikallanlar	Taksaranlar, Ursanlar	Adiananlar, Filikanlar		
	Tirukallanlar ve yufanlar	Glutinanlar, friedelanlar, paçisananlar	Gamaseranlar		
	Lanostanlar				
	Sikloartanlar				
	Kukurbitanlar				

2.1.6.1 Lineer triterpenler

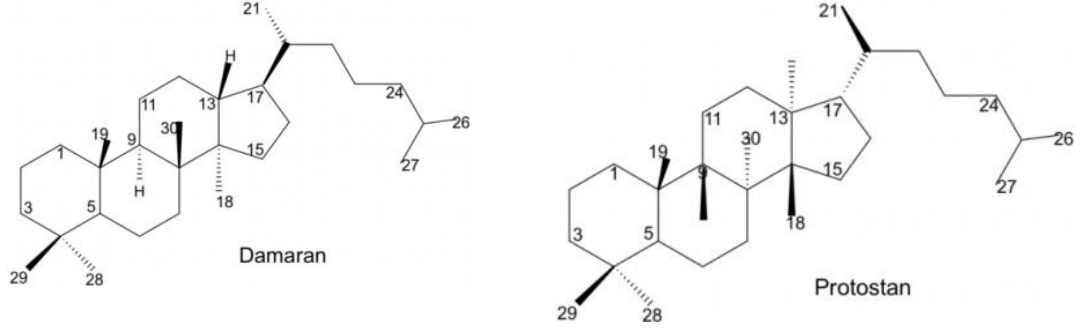
Triterpenler 6 izopren ünitesinden oluşan sekonder metabolitlerdir. Literatürde belirtilen yaklaşık 5000 triterpen vardır. Bunların çoğu skualen ve kuyruk kuyruğa bağlı iki farnesanolüskualenden yola çıkarak açığa çıkar. Protonlanmış 2,3-epoksiskualen, protostanlar ve damaranlar gibi polisiklik triterpenlerin çıkış maddesidir[82].



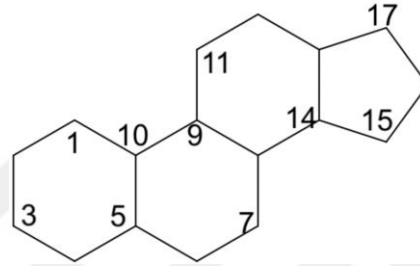
Şekil 2.23 : Skualen

2.1.6.1 Gonan tipi tetrasiklik triterpenler

2,3-epoksiskualenin siklizasyonu, steroid olarak bilinen tetrasiklik gonan ile damaran (Şekil 2.24, Şekil 2.25) ve protostan stereoizomerlere öncülük eder. 29-norprotostanlara fusidanlar denir. Damaran, C-18 metil grubunun C-14'ten C-13'e göçünü içeren apoturikallana dönüşür. Bir diğer metil kayması da C8'den C14'e gerçekleşir. Böylece apoturucallan, tirukallana dönüşür[82].

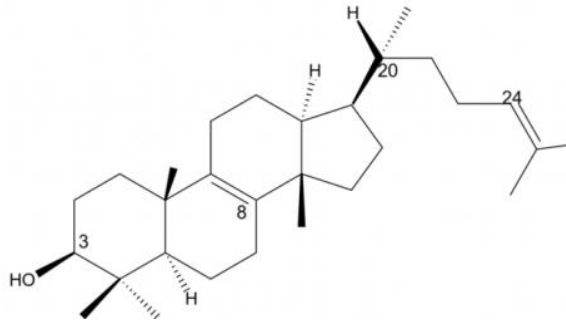


Şekil 2.24 : Damaran ve protostan iskeletleri



Şekil 2.25 : Steroidlerin çekirdek iskeleti Gonan.

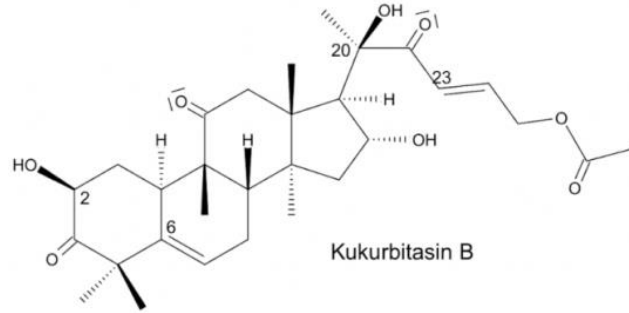
Tirukallanlar ve 20-epimerik euphanlar sıklıkla Euphorbiaceae'de bulunur. Örneğin; yaygın olarak lanosterol olarak bilinen (+)-Lanosta-8,24-dien-3 β -ol, kozmetikte merhem bazı olarak kullanılan, emülgatör, saç kremi ve yağlayıcı olan lanolin'in önemli bir bileşenidir. Lanosterol (Şekil 2.26) aynı zamanda maya ve diğer mantarlarda, *Euphorbiaceae*'de ve diğer çeşitli yüksek bitkilerde bulunur.



Şekil 2.26 : Lanosterol.

Doğal olarak bulunan yaklaşık 50 kükürbitanın adı, antik çağlardan beri bilinen salatalık ve kabaklar gibi salatalık bitkilerinin Latin terimi olan *Cucurbitaceae*'den

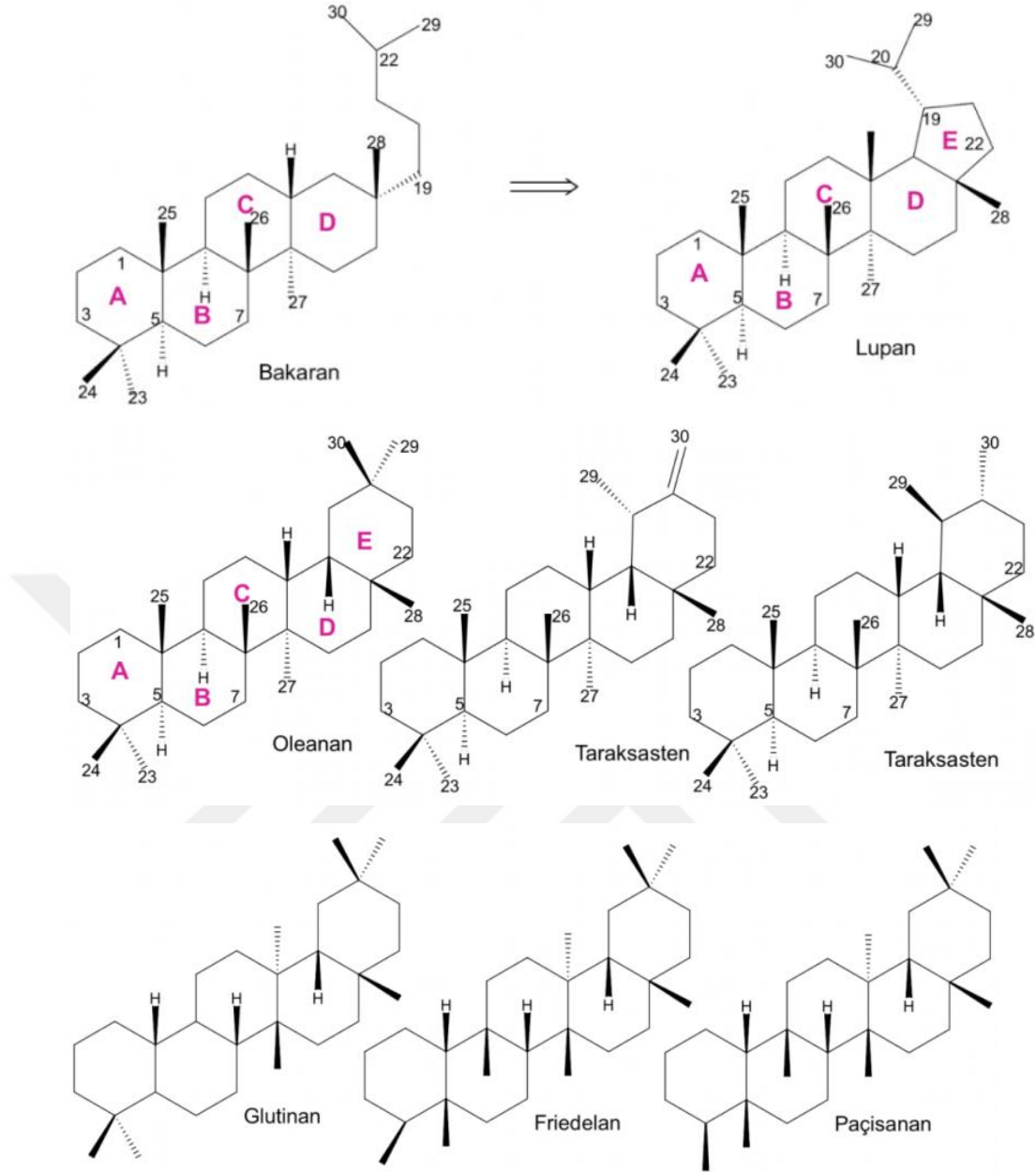
kaynaklanmaktadır. En sık izole edilen temsilcilerden biri (+)-kukurbitasin B'dir (Şekil 2.27). Kukurbitasinler salatalıkların hoş olmayan acı tadını şekillendirir *Cucumis sativus*'un bazı temsilcilerinin antihipertonik, antiromatizmal olduğu ve ayrıca HIV'e karşı aktif oldukları bildirilmektedir[82].



Şekil 2.27 : Kukurbitasin B.

2.1.6.3 Bakaran Tipi Pentasiklik Triterpenler

2,3 epoksiskualenin bir diğer siklizasyonu Wagner-Meerwein düzenlenmesiyle 6 üyeli D halkasını oluşturup tetrasikliktriterpen ara kationunu oluşturur. Tetrasiklik bakaranın yeniden siklizasyonu ile yani C-18'in C-21'e bağlanmasıyla pentasikliklupanın E halkası olur. Karbon atomu C-21'i C-19'dan C-20'ye kaydırarak lupan içindeki siklopentan halkası E'nin 6 üyeli halka olarak yeni E'yi oluşturması oleanana yol açar. Oleanan, sikloheksan halkası E ile çeşitli diğer pentasikliktriterpenlere metil kaymalarına uğrayabilir. Bu, taraxeran (C-14'ten C-13'e C-27), multifloran (C-8'den C-14'e C-26), glutinan (C-10'dan C-9'a C-25) , friedelan (C-4 ila C-5 arasında C-24) ve paçisanan (C-17 ila C-16 arasında C-28) oluşumu ile sonuçlanır [82] (Şekil 2.28) .



Şekil 2.28 : Bakaran tipi pentasiklik triterpen iskelet yapıları.

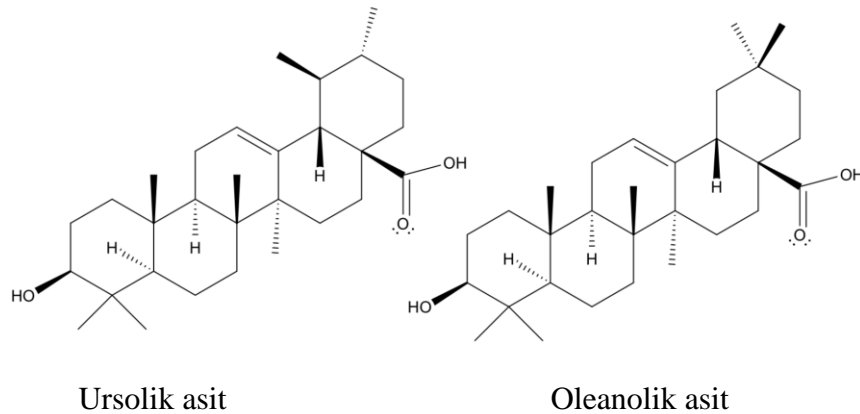
Eğrelti otundan elde edilen (+) - 12,21-bakaradien gibi bakaran triterpenleri nadirdir. İlk lupan triterpen, lupin tohumları *Lupinus luteus'un* (*Leguminosae*) kabuğundan izole edildi ve bu nedenle lupeol olarak adlandırılır. Bu triterpen, *Apocynaceae* ve *Leguminosae* kabuklarında, incir ağaçları ve kauçuk bitkilerinin lateksinde de bulunur. Diğer lupan türevlerine *Salvia* türlerinde rastlanır [82].

Oleananlar sıklıkla bitkilerde yüzey aktif glikozitler (saponinler) olarak ortaya çıkar, sabunlar gibi köpüklü sulu çözeltiler oluşturur ve hidroliz olduktan sonra şekeriz triterpenleri aglikon (sapogeninler olarak adlandırılır) olarak verir. Oleananlar

şampuan, diş macunu ve film üretiminde ticari köpük üreten hammadde olarak, beslenme ve farmasötik teknolojisinde emülgatör olarak kullanılır. (+) -Oleanolik asit (Şekil.62), zeytin ağaçlarının *Olea europaea* (Oleaceae), yapraklarında, şeker pancarı, Ginseng kökleri ve ökseotunda (*Viscum album*, Viscaceae) serbest halde oluşur.

Bugüne kadar 25 kadar taraksastan ağırlıklı olarak *Asteraceae*'den izole edilmiştir. Karahiniba denilen *Taraxacum officinale*'den izole edilen ardinediol ve ψ -taraksasterol ve aynısefadan *Calendula officinalis*, öksürük otu *Tussilago farfara*'dan izole edilen faradiol bu grubun temsilcileridir.

Bitki kaynaklı 150'den fazla ursan rapor edilmiştir. Örneğin (+)-3 β -hidroksiursan-28-oik asit, zakkum *Nerium oleander*'in yapraklarında bulunan bir triterpendir. (+)-3 β -hidroksi-12-ursen-28-oik asit, çoğunlukla ursolik asit (Şekil 2.29) olarak blinen ve ilk olarak ayı üzümünün meyve yapraklarından elde edilen ursanların en önde gelen temsilcilerindedir. Ayrıca orman gülü *Rhododendron* türlerinde, kızılıcak *Vaccinium macrocarpon*'da (*Ericaceae*) ve elma, armut, kuru erik ve diğer meyvelerin koruyucu balmumu kaplamasında bulunur. Ursolik asidin antilösemik ve sitotoksik aktiviteleri olduğu bildirilmektedir; aynı zamanda farmasötiklerde ve gıdalarda bir emülgatör olarak kullanılır ve elmaların balmumu katmanından ekstrakte edilen pomolik aside benzer yapıya sahiptir. Ursolik asit ve oleanolik asit birbirinin izomeridir[82].

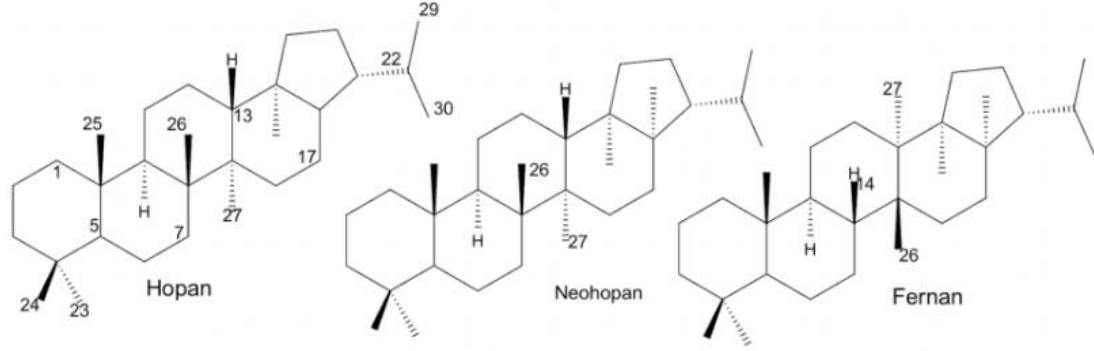


Şekil 2.29 : Ursolik asit ve oleanolik asit.

2.1.6.4 Hopan Tipi Pentasiklik Triterpenler

Pentasiklik triterpen iskeleti hopan, skualenin 2-3 çift bağının protonasyonundan doğan beş katlı koltuk konformasyonundaki karbenyum iyonu 2,7-, 6,11-, 10,15-, 14,19-, ve 18,22 karbonlarının siklizasyonu ile oluşur. Hopandaki metil kayması daha sonra neopanin (C18'deki metil C17'ye), fernan (C14'deki metil C13'e ve C8'deki

metil C14'e) (Şekil 32), adianan (C10'daki metil C9'a) ve son olarak filikanın(C4'deki metil C5'e) oluşmasına neden olur. Başka bir yolla hopanın siklopentan halkası, karbon atomu C-17'nin C-21'den C-22'ye kaymasını içeren genişlemeyle gammaceran (Şekil 2.30) üretilir.

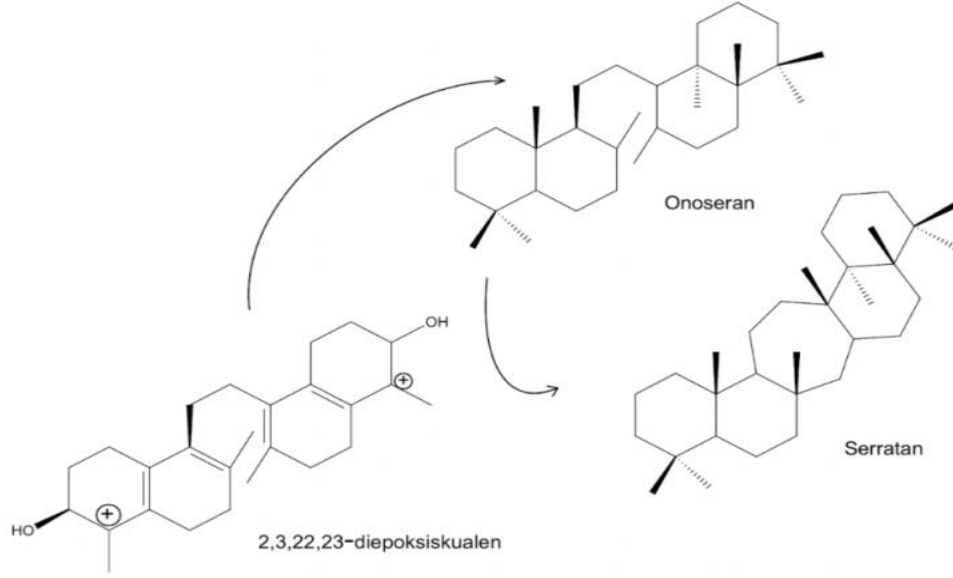


Şekil 2.30 : Hopan tipi pentasiklik triterpenler.

2.1.6.5 Diğer pentasiklik triterpenler

2,3 epoksiskualenin halka açılması ve protonasyonundan açığa çıkan karbenyum iyonu ve Wagner-Meerwein yeniden düzenlenmesini içeren halka genişlemesi stiktan iskeletine öncülük eder. Terminal sikloheksan halkası E'yi daraltan yeniden düzenlenme stiktanı arborinana çevirir.

2,3-/22,23-diepoksiskualen'den kaynaklanan dikasyonun bir diğer siklizasyon tipi öncelikle her iki ucu da içeren onoceran iskeletini oluşturur, son olarak yedinci halkanın eklenmesiyle serratan formasyonu (Şekil 2.31) oluşur.

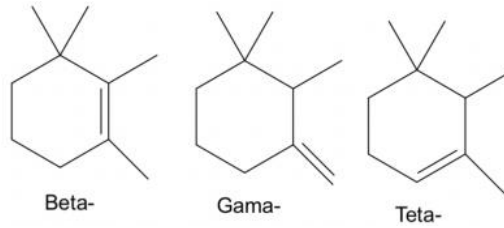


Şekil 2.31 : Epoksiskualen, onoseran, serratan yapısı.

2.1.7. Tetraterpenler

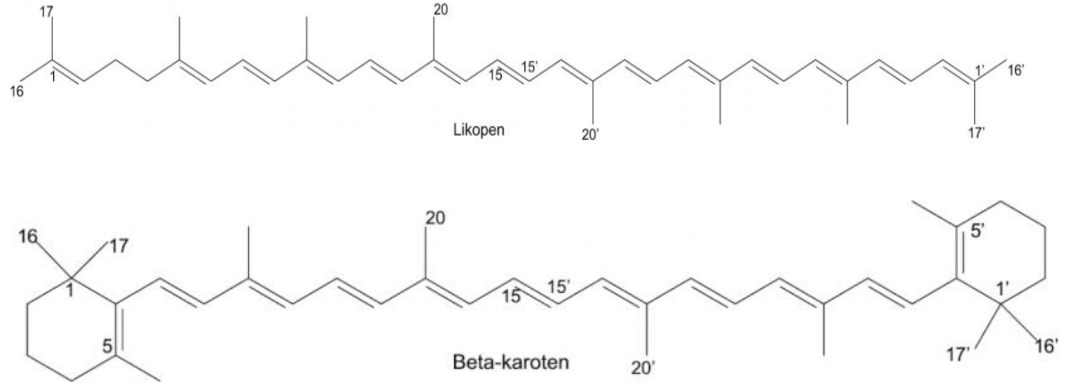
Sekiz izopren ünitesinden oluşan yapılardır. Karetonoidler, apokarotenoidler, diapokaretonoidler, megastigmanlarolam üzere dört ana başlıkta incelenebilir[82].

Karotenoid olarak bildirilen 600 kadar doğal bileşik vardır. Sekiz izopren biriminden oluşur. Uç gruplarının düzenlenmesine göre alfa, beta, gama.. gibi isimler alır (Şekil 2.32). A vitamininin senteziyle yakından ilgilidir. Karotenoidlerin kademeli degradasyonu sonucu apokarotenaller ve ketonik ürünler gibi bozulma ürünlerinin izolasyonu gerçekleştirilebilmiştir[85].



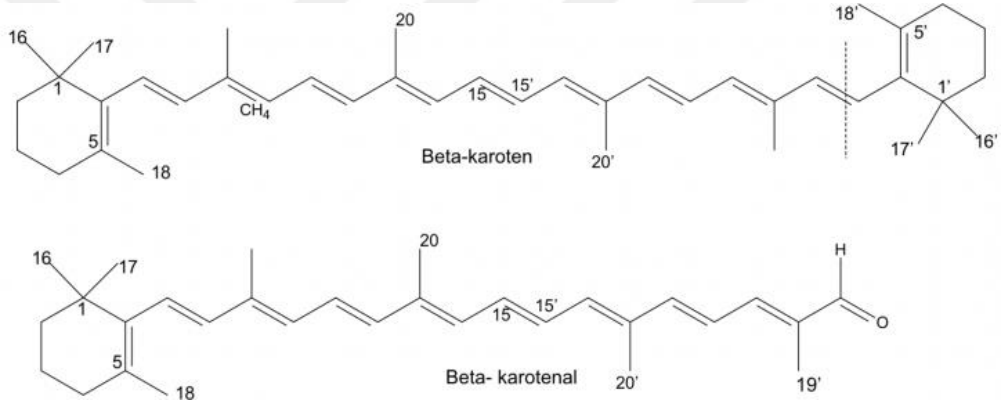
Şekil 2.32 : Çift bağın beta, gama, teta pozisyonu.

Likopen karetonoidlerin kırmızı renkli örneklerindedir. Domateste bulunur. Turuncu kırmızı β -karoten (Şekil 2.33) havuçtan elde edilir. Bitkilerin yapraklarında fotosentez için renk filtreleri olarak hizmet ederler, sonbaharda yaprakların sarı ve kırmızı rengine neden olurlar. Çiçek renkleri olarak, karotenoidlerantosiyanidinler ve flavonoidlerle karşılaştırıldığında küçük bir rol oynar.



Şekil 2.33 : Likopen ve β -karoten yapıları.

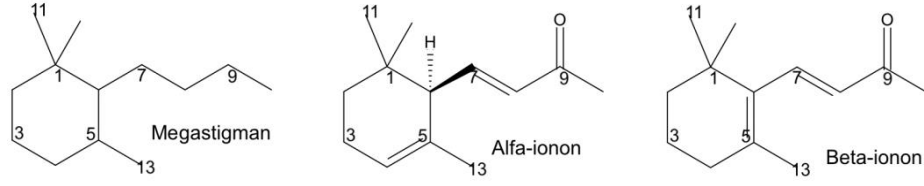
Terminal parçalarının ayrılmasıyla karotenoidlerden oluşan terpenoidlere apokarotenoidler denir. Ayrılma konumu, karotenoidlerin numaralandırma sistemini belirler [82]. Şekil 2.36’da beta-karoten ve beta-karotenal yapıları gösterilmektedir.



Şekil 2.34 : Karotenoidlerin ayrılma konumları

İyi bilinen 8,8’-diapokarotenoidler gardenya türlerinde, çiğdem türlerinde ve çeşitli mimoza türlerinde kendini gösterir [82].

Megastigman iskeleti (Şekil 2.35) karbon 1, 5 ve 6’da yerleşik bir benzen halkası ve C6’ya bağlı 4 karbonlu bir doymamış alifatik zincir ile karakterize edilir. Megastigmanlar karbon 7’de (damaskon serisi) ya da karbon 9’da oksijen atomu bulunan (ionon serisi) 13 karbonlu norizoprenoidlerdir[82].



Şekil 2.35 : Megastigman ve İonon yapıları.

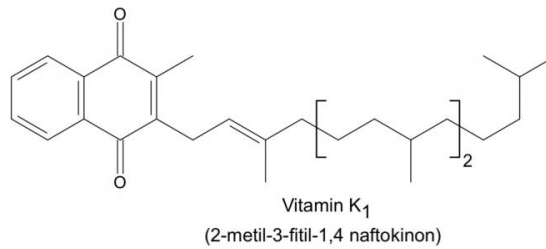
İononlar hoş kokularından dolayı parfümeride kullanılan izolatlardır [82].

2.1.8 Politerpenler ve Prenilkinonlar

Politerpen olarak sınıflandırılan izoprenoidler, 8 ya da daha fazla izopren ünitesine sahiptirler. Politerpenlerin en bilinen üyesi kauçuktur. Kauçuk, diğer adıyla lateks daha çok tropik bölgelerde yetişen ağaçlardan elde edilen bir politerpendir. Ağacın gövdesine atılan çizikler sonrası yarıklardan lateks sızmaya başlar. Doğal kauçuk, izoprenin 1,4 katılma polimeri olarak görülebilir. Doğal kauçuğun oluşumunda, izopren birimleri baş-kuyruğa bağlanır ve tüm ikili bağlar cis'tir[86].

Prenilkinonlar 10'dan fazla izopren ünitesi içeren terpen bileşikleridir. Fenilalanin ve tirozinden amino asitlerinden türetilen, lipitte çözünebilen çeşitli prenilbenzokinonlar hemen hemen tüm aerobik organizmaların (bakteri, bitki, hayvan) hücrelerinde meydana gelir ve bu nedenle ubikinon (latince Ubique = her yerde) olarak adlandırılır. Mitokondride solunum süreçleri sırasında elektron taşınmasına katılan koenzimlerdir ve ışığa maruz kaldıklarında ubichromenollere ve ubichromanollere sükzile olurlar. Şekil.72'de ubikinonlara örnek olarak koenzim-Q10 gösterilmiştir[82].

Vitamin K (Şekil 2.36) serileri ("koagülasyon" vitaminleri) kimyasal olarak prenil-1,4-naftokinonları olarak sınıflandırılır. Yeşil bitkilerin tüketilmesiyle vücuda alınır, solunum süreçleri sırasında ve karaciğerdeki glikoproteinlerin biyosentezinde oksidatif fosforilasyona katılırlar ve kan için pıhtılaşma ajanları olarak hayati önem taşırlar[82].



Şekil 2.36 : Vitamin K1

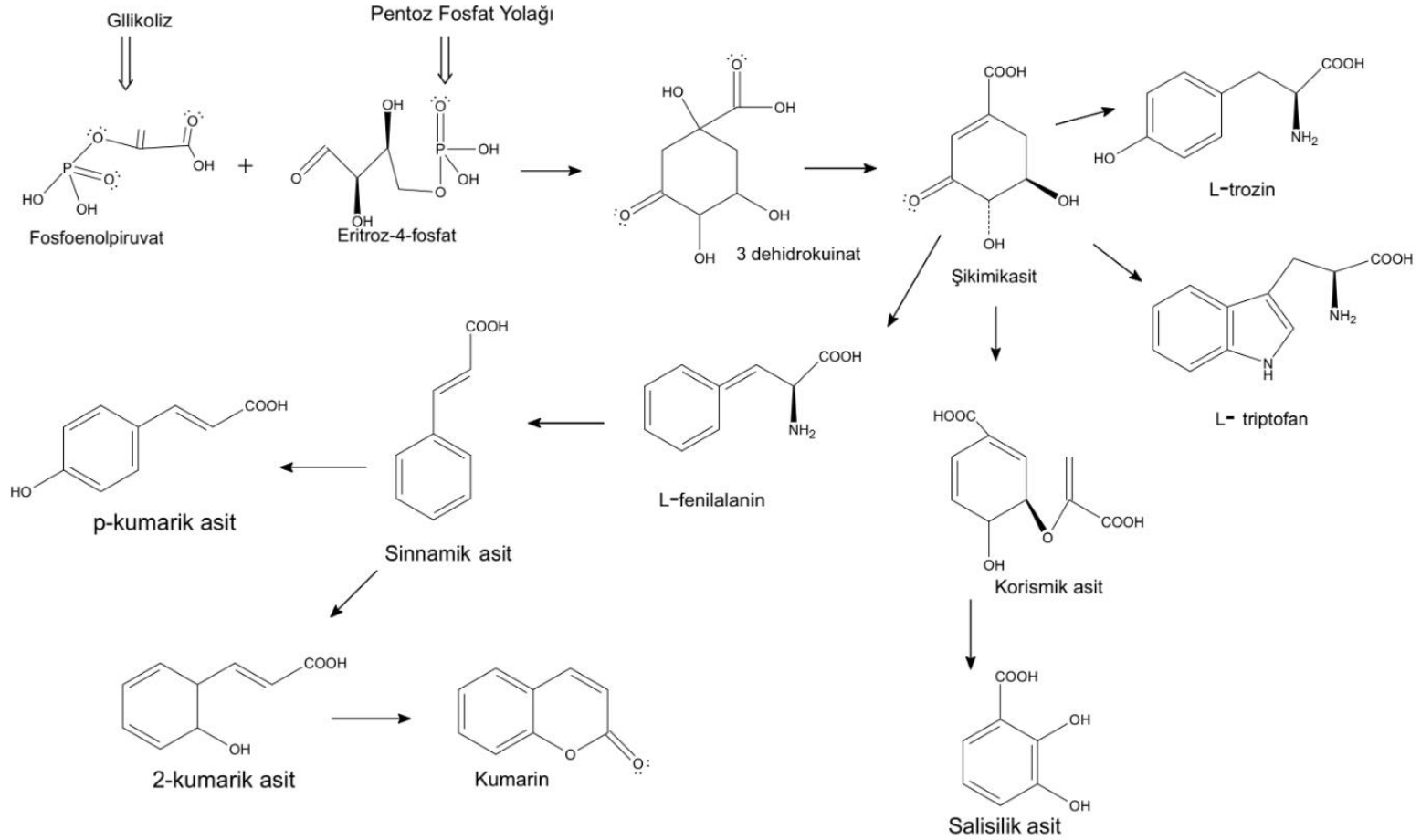
2.2 Fenolik Bileşikler

Aromatik halkaya bir ya da daha fazla hidroksil grubunun direkt bağlı olduğu yapılara fenolik bileşikler denir. Fenolün kimyasal özelliği fenolik hidroksilin hidrojeninin halkadan etkilenerek kararsız yapıda olmasındandır [87]. Değişik flavonoidler arasındaki farklar; bağlanan hidroksil gruplarının sayısından, doymamışlık derecesinden ve halkaya katılan oksijen ve oksijenli türevlerin sayısından kaynaklanmaktadır. Heterosiklik halka şeklinde olan C halkasında meydana gelen değişmeler flavanoidleri, en yaygınları flavonol ve flavonlar olmak üzere; flavonoller, flavonlar, flavanonlar, flavanoller (veya kateşinler), izoflavon, flavanonoller ve antosiyanidinler olarak ana bileşik gruplarına ayırır[88].

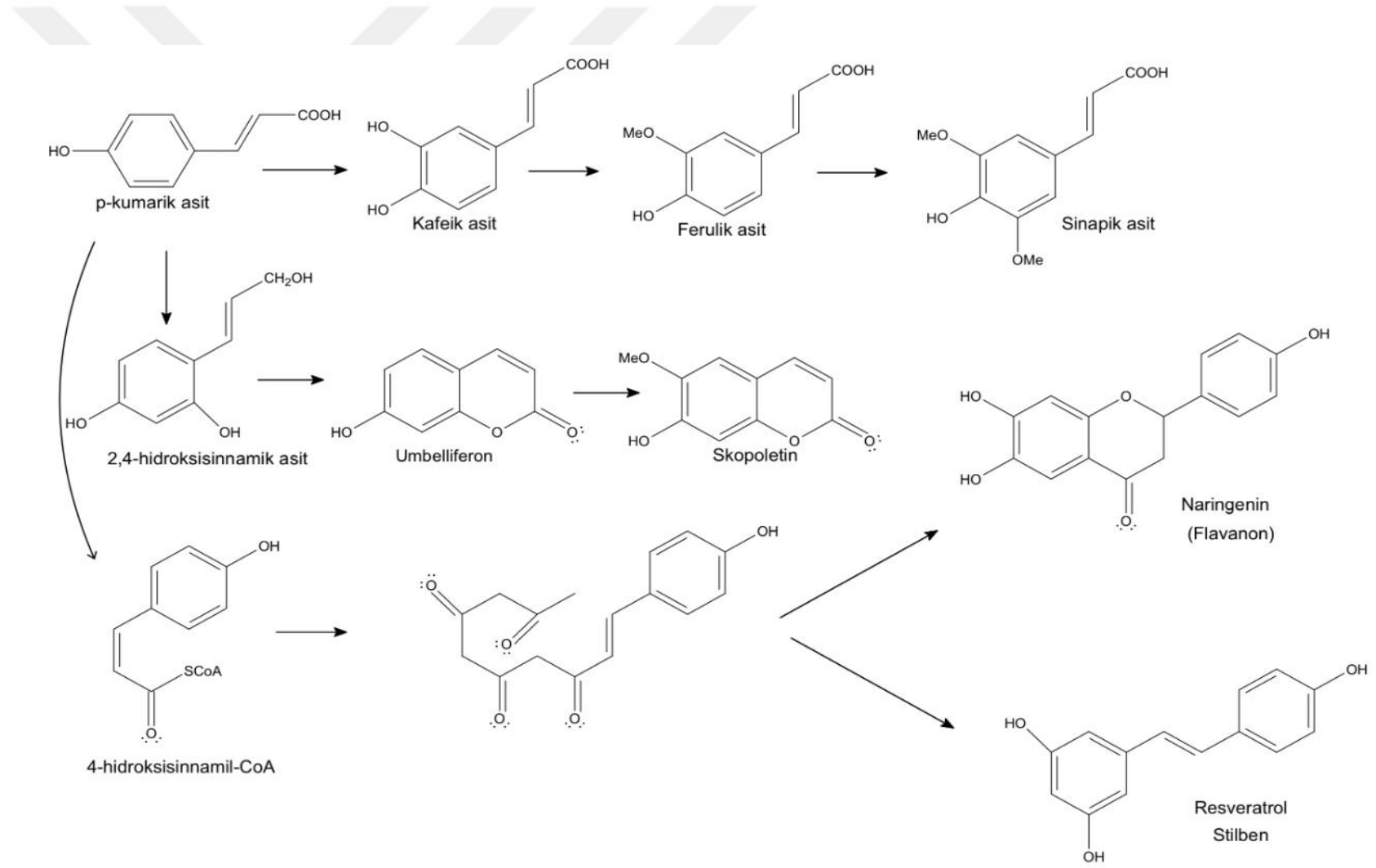
Fenolik bileşikler, şikimik asit yolağı ve malonik asit yolu olan iki temel yol ile elde edildiğı düşünölmektedir [89].

Şikimik asit yolağı aromatik bileşiklerin biyosentezinde karbonhidrat metabolizmasına bağılıdır. Fosfoenolpiruvat ve eritroz-4-fosfat ara ürünleri birçok aromatik sekonder metabolitlerin öncüsü olan ara ürünlere dönüştürölür (Şekil 2.37). Şikimik asit yolu sadece mikroorganizmalar ve bitkilerde bulunur. Hayvanlarda bulunmayan bu yol ile fenilalanin, trozin ve triptofan türetilir [90].

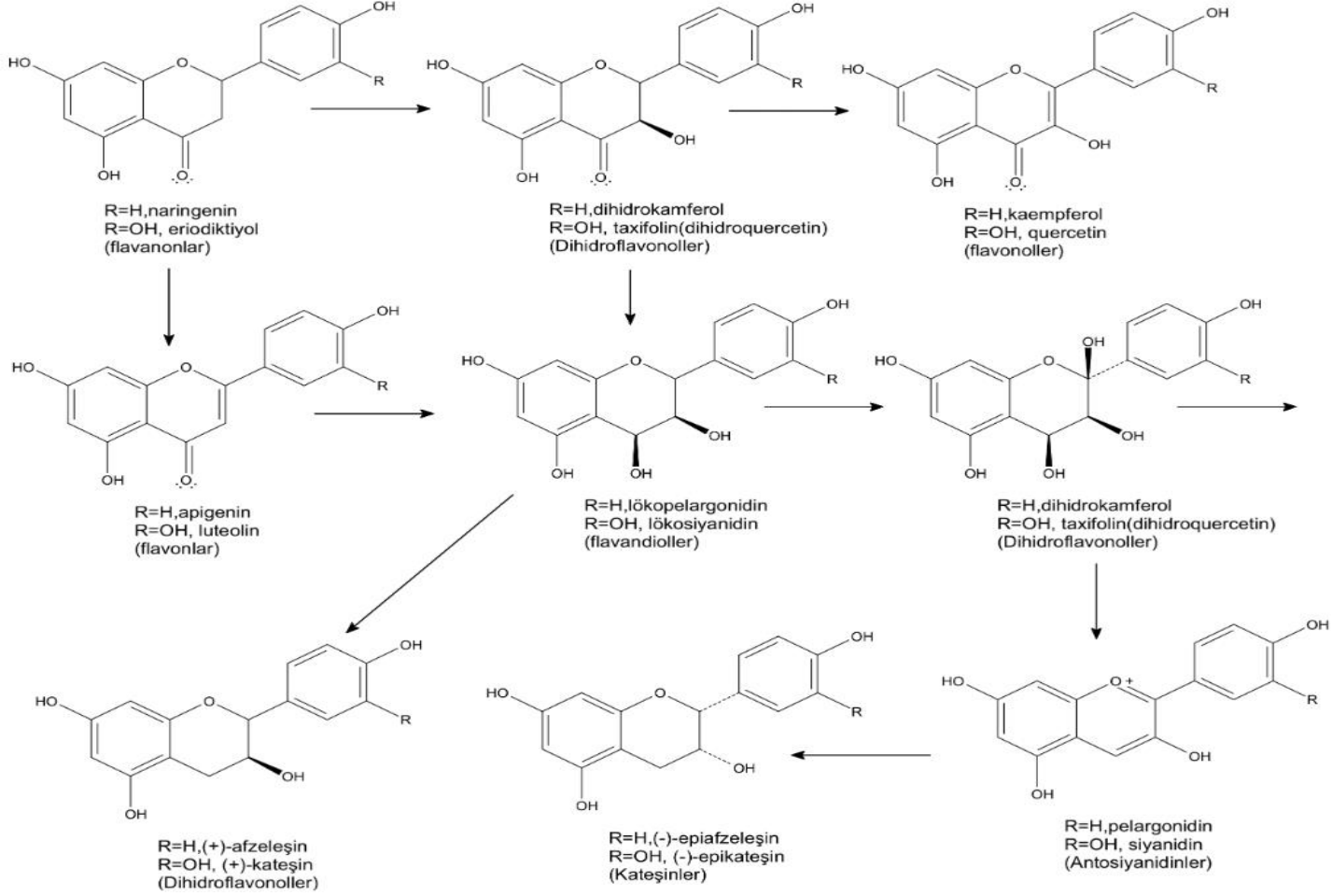
Bitkilerdeki sekonder bileşiklerin büyük bir kısmı sinamik asit formuna amonyum molekülünün eliminasyonu yolu ile fenilaleninden türetilir [89].



Şekil 2.37 : Flavonoidlerin ve fenoliklerin olası biyosentez yolağı.



Şekil 2.37 (devam) : Flavonoidlerin ve fenoliklerin olası biyosentez yolağı [89].



Şekil 2.37 (devam) : Flavonoidlerin ve fenoliklerin olası biyosentez yolu [89]

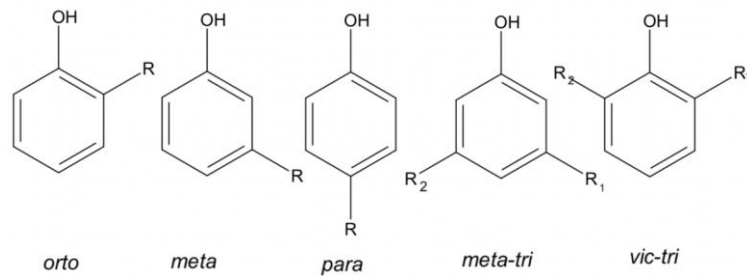
Fenolik bileşikler farklı şekillerde sınıflandırılmıştır Harborne ve arkadaşları 1964 deki çalışmasında fenolik bileşikler Tablo 2.8’de sınıflandırılmıştır[91].

Tablo 2.8 : Fenolik Bileşiklerin Sınıflandırılması.

Yapı	Sınıf
C6	Basit fenolikler
C6 – C1	Fenolik asitler ve ilişkili bileşikler
C6 – C2	Asetofenonlar ve fenil asetik asitler
C6 – C3	Sinnamikasitler, sinnamilaldehitler, sinnamil alkoller
C6 – C3	Kumarinler, izokumarinler ve kromonlar
C15	Flavanlar
C15	Flavonlar
C15	Flavanonlar
C15	Flavanoller
C15	Antosiyanidinler
C15	Antosiyaninler
Lignanlar, neolignanlar	Dimerler ve oligomerler
Tanenler	Oligomerler ya da polimerler

2.2.1 Basit Fenolikler

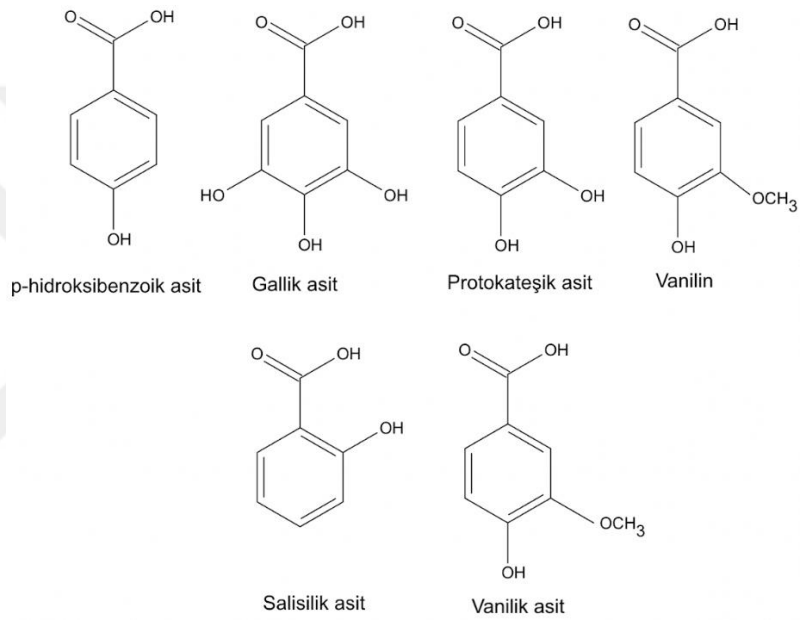
Basit fenolikler, fonksiyonel gruplardan biri hidroksil olmak kaydıyla benzen halkasına orto, meta, para modelinde konumlanan yapılardır (Şekil 2.38) [87].



Şekil 2.38 : Fenole bağlanan fonksiyonel grup konumları.

2.2.2 Fenolik Asitler ve Aldehitler

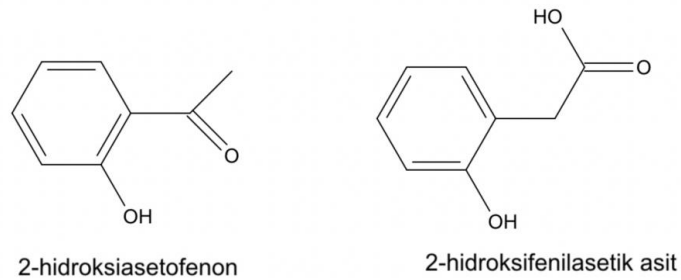
Genel olarak fenolik asitler bir fonksiyonel karboksilik aside sahip fenoller olarak tanımlanır. Bununla birlikte bitki metabolitleri tarif edilirken, organik asitlerin bir farklı grubu olarak görülür. Doğal olarak fenolik asitler hidroksibenzoik ve hidroksisünamik asitler olarak iki belirgin temel karbon iskeleti içerir. Temel iskelet yapısı aynı kalmasına rağmen, aromatik zincirdeki hidroksil grubunun sayısı ve pozisyonu çeşitleri oluşturuyor[92]. Fenolik asitlere gallik asit, protokateşik asit, salisilik asit, vanilik asit (Şekil 2.39) örnek olarak gösterilebilir. Karboksil grubu yerine aldehit grubuna sahip olan vanilin gibi hidroksibenzoik aldehitler de vardır.



Şekil 2.39 : Fenolik asit örnekleri.

2.2.3 Asetofenonlar ve Fenilasetik Asitler

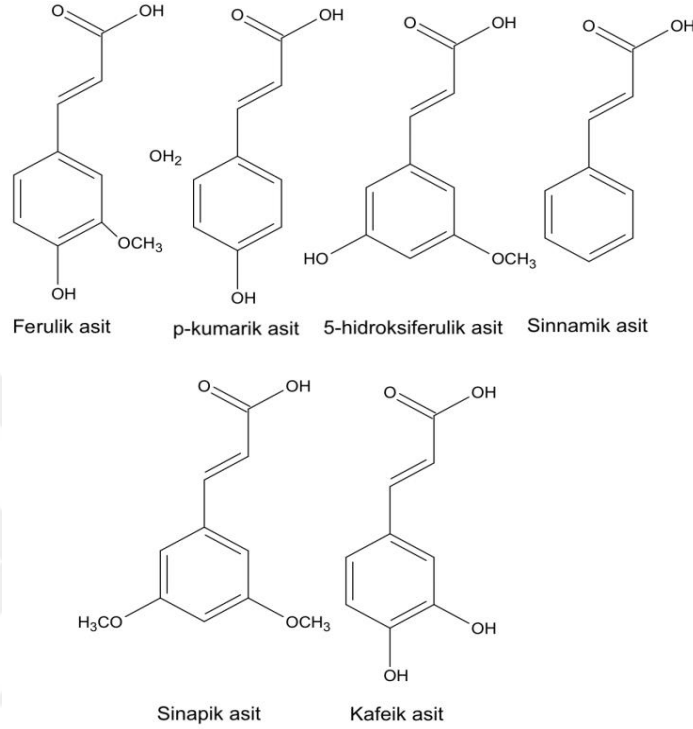
Fenonlar, doğada az rastlanan C₆-C₂ bileşikleridir. 2-hidroksiasetofenon (Şekil 2.40) ve 2-hidroksifenilasetik asit bu grubun üyelerindedir [87].



Şekil 2.40 : Asetofenon ve fenilasetik asit örnekleri.

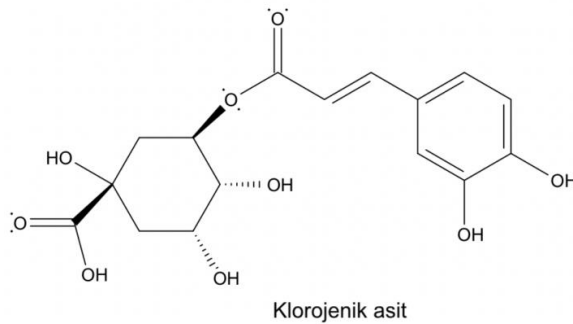
2.2.4 Sinnamik Asitler

C6-C3 yapısında altı yaygın sinnamik asit vardır. Tüm bitkiler en azından üç tanesini içerir. Bunlar; sinnamik asit, p-kumaraik asit, kafeik asit, ferulik asit, 5-hidroksiferulik asit ve sinapinik asit (Şekil 41)



Şekil 2.41 : Sinnamik asitler.

Sinnamik asitler yaygın olarak kuinik asit, şikimik asit ve tartarik asitin esterleri olarak bulunur. Örneğin; klorojenik asit (Şekil 2.42), kuinik asit ve kafeik asitin esteridir.

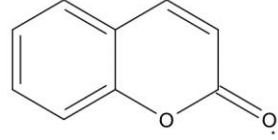


Şekil 2.42 : Klorojenik asit

Sinnamik esterler, şeker esterleri ya da başka organik asitlerin esterleri türevi olarak bulunur [87].

2.2.5 Kumarinler

Kumarinler C6-C3 iskeletine sahiptir ancak C3 ünitesinin bir parçası olarak bir oksijen heterosiklik yapısına sahiptir. UV toleransının yanı sıra hastalık ve haşere direncinde de rol oynayan çok sayıda kumarin vardır [87]. Şekil 2.43’de kumarin molekülü gösterilmektedir.



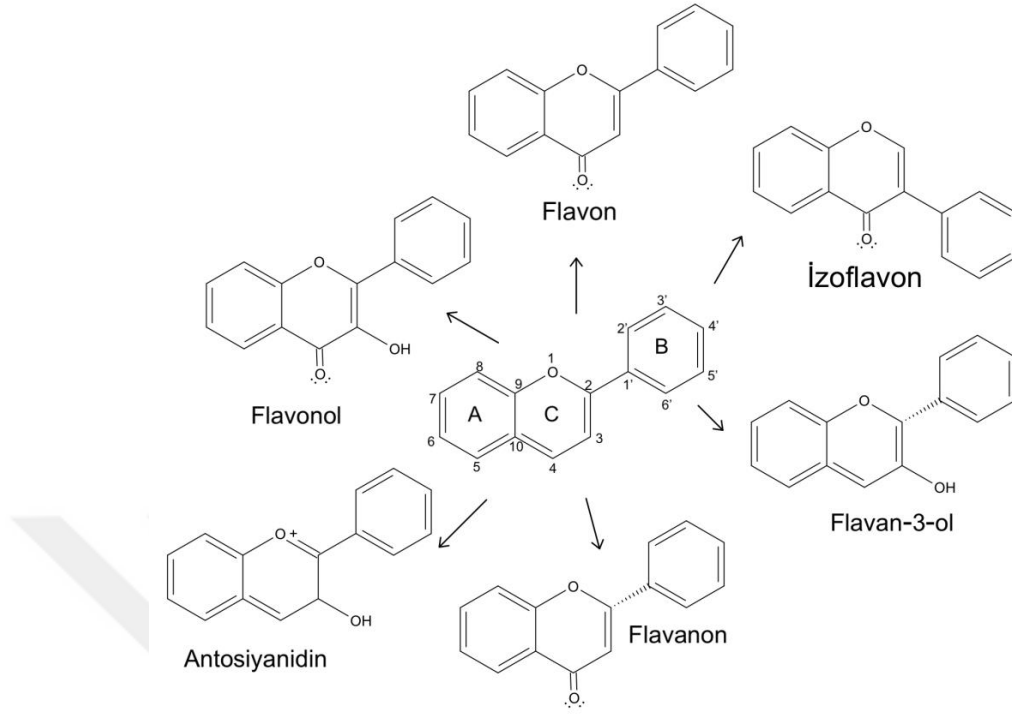
Kumarin

Şekil 2.43 : Kumarin

2.2.6 Flavonoidler

Bu isim sarı renkli olmalarından dolayı “sarı” anlamına gelen “flavus” sözcüğünden türetilmiştir. Yapıları nedeniyle polifenolik bileşikler olarak kabul edilir [93].

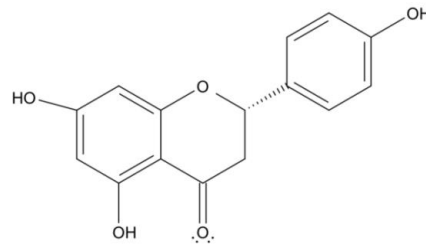
Flavonoidler, bitkilerde bulunan fenolik bileşiklerin en önemli grubunu oluşturmaktadır ve C6-C3-C6 difenilpropan iskeletiyle kurulan bir kimyasal yapıya sahiptirler. Ortadaki piran halkasındaki değişikliklere göre farklı gruplara ayrılırlar [94]. Şekil2.44’te flavonoidlerin çekirdek yapısı ve genel flavonoid yapıları gösterilmiştir



Şekil 2.44 : Genel flavonoid yapısı

2.2.6.1 Flavanonlar

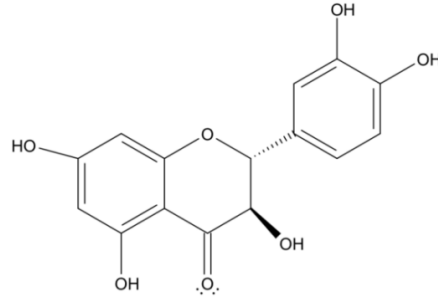
C halkasında C-C doymuş bağı vardır. Naringenin (Şekil 2.45) bu grubun önemli üyelerindendir.



Şekil 2.45 : Naringenin.

2.2.6.2 Flavanonoller

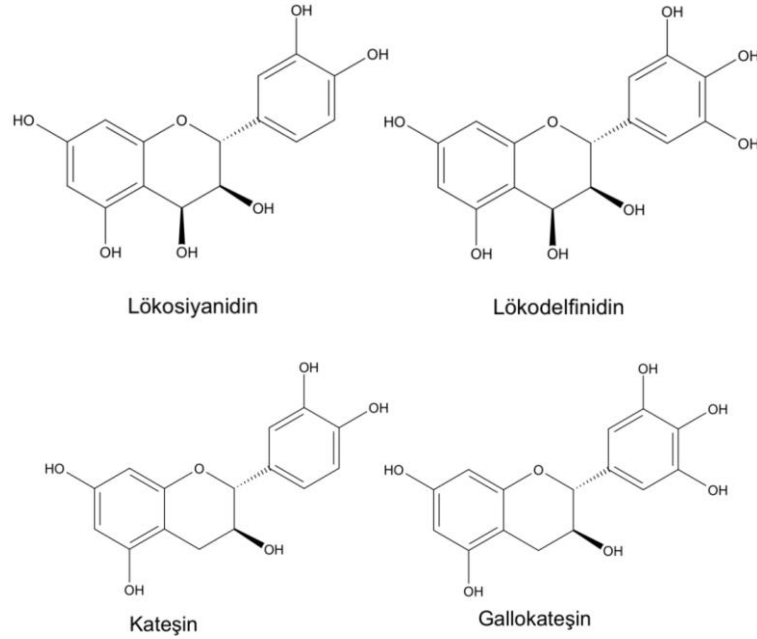
Flavanonoller dihidroflavanoller olarak da bilinir ve sıklıkla gövdenin merkeze yakın kısmında taninlerle meydana gelir. Örneğin; dihidrokersetin olarak bilinen taksifolin (Şekil 2.46) [87].



Şekil 2.46 : Taksifolin.

2.2.6.3 Lökoantosiyainidinler

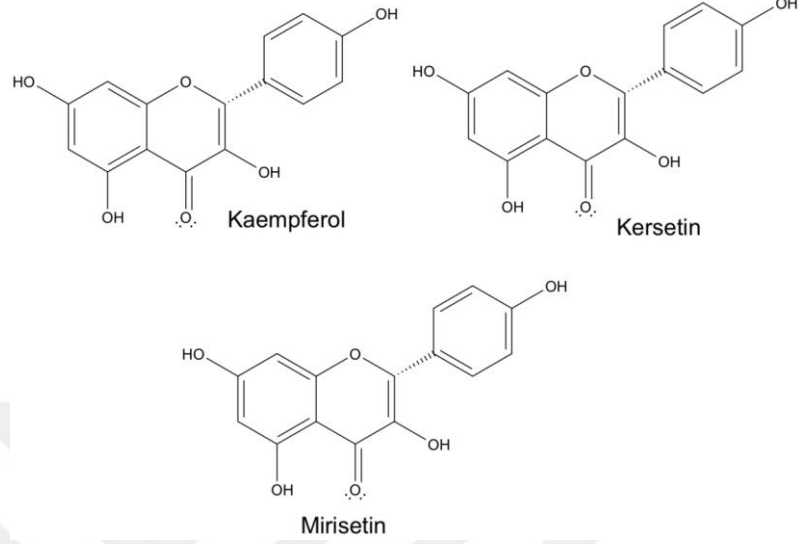
Tamamen doymuş heterosiklleri nedeniyle, lökoantosiyainidinler, flavan-3-ol'ler ile birlikte flavanlar olarak adlandırılır. Flavan-3-ol'lerin örnekleri kateşinvegallokateşindir. İkinci bileşikteki "gallo", B-halkası üzerindeki tri-hidroksi modeline karşılık gelir. Diğer flavonoidlerin çoğunun aksine, flavanlar, serbest aglikonlar olarak veya aglikonların polimerleri olarak bulunurlar, yani glikosile edilmezler. C4 üzerindeki keton oksijeninin indirgenmesi yoluyla flavanonollerden sentezlenirler. Örnekler lökosiyainidin ve lökodelfinidindir (Şekil 2.47). Bu bileşikler genellikle bitkinin gövdesinde bulunur ve kondense tanenlerin oluşumunda rol oynar [87].



Şekil 2.47 : Lökoantosiyainidin örnekleri.

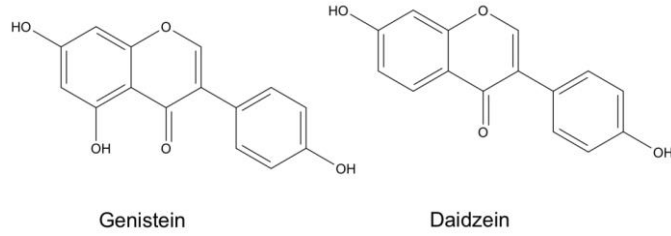
2.2.6.4 Flavonlar

Flavonlarheterosiklik halkasında keton grubu ve doymamış karbon-karbon bağı içerirler. En yaygın örnekleri kaempferol, quercetin, myricetindir (Şekil 2.48)[82].



Şekil 2.48 : Flavon örnekleri.

Flavonların B halkasının C halkasındaki 3. Karbona bağlanmasıyla isoflavonoidler meydana gelir. İzoflavonoidler fitoöstrojenik özellik gösterirler. Bu grubun en yaygın örneği genistein, daidzein (Şekil 2.49) [82,95].

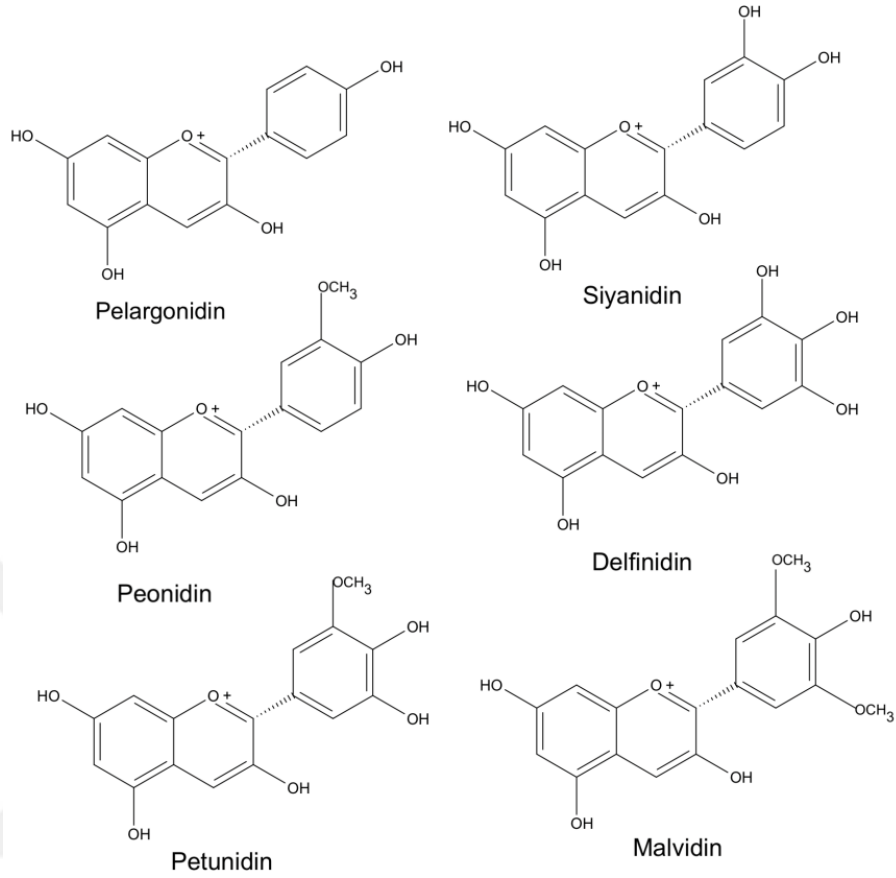


Şekil 2.49 : Genistein, daidzein.

2.2.6.5 Antosiyanidin ve Deoksiantosiyanidinler

Antosiyanidinlerin C halkası bir pirilyum katyonudur. Aşağıdaki yaygın olarak dağılmış renkli bileşikler dışında, antosiyanidinler tipik olarak serbest aglikonlar olarak bulunmazlar; pelargonidin (turuncu-kırmızı), siyanidin (kırmızı), peonidin (gül kırmızısı), delfinidin (mavi- menekşe), petunidin (mavi-mor) ve malvidin (mor) (Şekil 2.50). En yaygın antosiyanidin, cyanidindir. Bu bileşikler, yapraklar veya çiçek yaprakları gibi renkli bitki dokularının vakuollerinde bulunur. Pigmentin rengi pH'a, mevcut metal iyonlarına ve bağlanan şeker ve metoksikombinasyonuna bağlıdır.

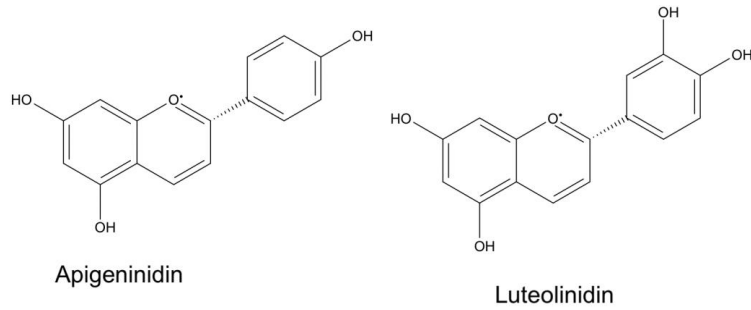
Birkaç antosiyanidin kombinasyonunun varlığından da farklı renkler ortaya çıkabilir[87].



Şekil 2.50 : Antosiyanidin örnekleri.

Diğer antosiyanidinler de iki gruba ayrılabilir:

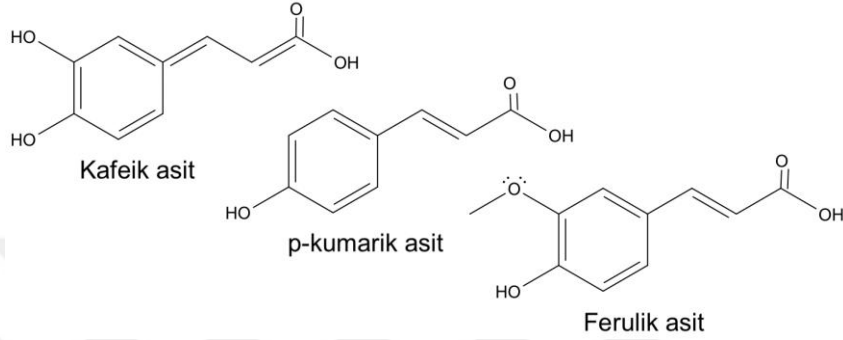
1. C5 veya C7 pozisyonunun metoksi grubuyla sübtütie olanlar,
 2. C3 pozisyonunda bir hidroksil grubu içermeyen deoksiantosiyanidinler
- Apigeninidin,luteolinidin (Şekil 2.51), deoksiantosiyanidilere örnektir [87].



Şekil 2.51 : Apigeninidin, Luteolinidin.

2.2.6.6 Antosiyaninler

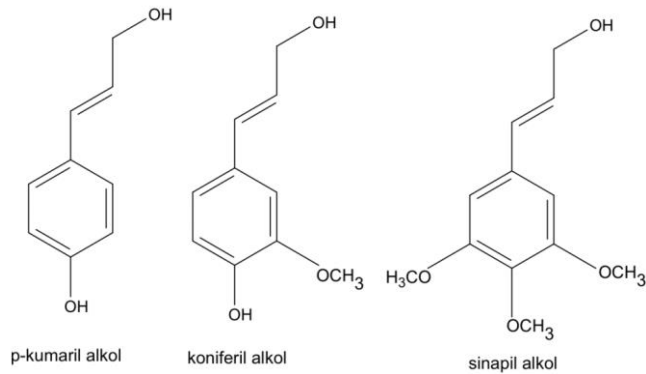
Antosiyaninler, antosiyanidinlerin suda çözünür glikozitleridir. En yaygın glikozit, 3-glikozittir. İkinci bir şeker varsa, hemen hemen her zaman 5-hidroksil pozisyonundadır. En yaygın şeker glikoz olsa da, bazen arabinoz gibi diğer şekerlerin varlığı da gözlenir. p-kumarik asit, kafeik asit ve ferulik asit (Şekil 2.52) bu grubun örneklerindedir[86].



Şekil 2.52 : Kafeik asit, p-kumarik asit, ferulik asit.

2.2.7 Lignanlar

Lignanlar, monolignollerin p-kumaril alkol, koniferil alkol ve sinapil alkol (Şekil 2.53) gibi birleşmesinden kaynaklanan dimerler veya oligomerlerdir. Koniferil alkol, linyanbiyosentezinde kullanılan en yaygın monolignoldür. Lignanlar eğrelti otlarında, açık tohumlularda ve anjiyospermlerde bulunur. Odunsu saplarda ve tohumlarda bulunurlar ve böcek caydırıcı olarak rol oynarlar. Bu bileşiklerin bazıları tıbbi özelliklere sahiptir[82].

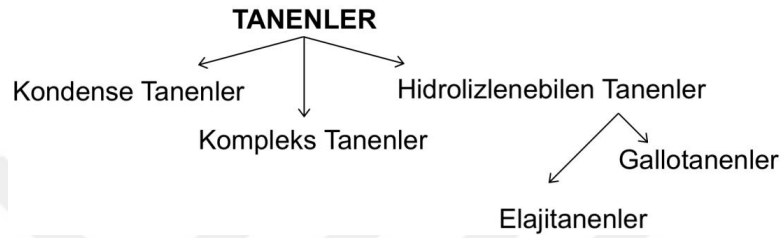


Şekil 2.53 : Lignan örnek yapıları.

2.2.8 Tanenler

Tanenler, geniş bir çeşitliliğe sahip bir grup bileşik içerir. Proteinleri bağlama ve parçalam özellikleri vardır. Üç gruba ayrılabilir; kondense tanenler, hidrolize olabilen tanenler ve kompleks tanenler (Şekil 2.54) [87]

Yoğunlaştırılmış tanenler ayrıca proantosiyanidinler olarak da adlandırılır. Flavan-3-ol (kateşin) birimlerinden oluşan oligomerik veya polimerikflavonoidlerdir[87].



Şekil 2.54 : Temel olarak tanenler.

Kompleks tanenler, bir kateşin biriminin bir gallotannin veya bir ellagitannin birimine glikosidik olarak bağlandığı tanenler olarak tanımlanır [87].

Gallotanenler ve elajitanenler en basit hidrolize edilebilir tanenlerdir Gallik asit ve elajikesit bu grubun en önde gelen örneğidir.

2.3 Kromatografi

Kromatografi, Yunanca chroma (renk) ve graphein (yazmak) sözcüklerinin birleşmesiyle oluşmuş olup, ilk kez 1903 yılında Rus botanikçi Michael Tsvett tarafından renkli bitki pigmentlerini ayırma amaçlı kullanılmıştır. Günümüzde kullanılan kromatografi , kimyasal bir matriksin uygun bir çözücü ile fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre etkileşerek bileşenlerine ayrılması işlemleri için genel olarak kullanılan terimdir. Çözücü mobil faz olarak adlandırılırken, çözücünün içinden geçtiği ortam sabit faz olarak adlandırılmaktadır [96]. Kromatografik temelli yöntemler ayrılma mekanizmalarına göre;

- 1) Adsorpsiyon kromatografisi
- 2) Dağılım (Partisyon) kromatografisi
- 3) İyon değiştirme kromatografisi
- 4) Moleküler eleme kromatografisi (Jel krom.)

5) Afinit kromatografisi (Kimyasal krom.) şeklinde sınıflandırılabilir.

Kromatografi metodu uygulama biçimine göre;

1) Kağıt kromatografisi

2) İnce tabaka kromatografisi (İTK)

3) Sütun (kolon) kromatografisi (CC)

4) Gaz kromatografisi (GC)

5) Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) şeklinde sınıflandırılabilir.

Kromatografinin esas hedefi belirli bir matriksin kimyasal içeriğinin ve miktarının belirlenmesidir. Mobil faz sıvı, gaz veya süper kritik akışkan olabilirken, sabit faz silika kaplı alüminyum tabakadan, kapiller cam tüplere kadar değişik materyallerden oluşabilir [96,97].

2.3.1 Sıvı kromatografi

Sıvı kromatografisi (LC), tüm analitik ayırma tekniklerinin en yaygın kullanılanıdır. Son 50 yılda LC büyük gelişme kaydederek cam kolonlardan yüksek basınçta çalışan sofistike sistemlere evrildi. Bugün, neredeyse tüm LC, basınçlı akış kullanılarak yapılmaktadır ve LC ve HPLC (yüksek performanslı sıvı kromatografisi) kısaltmaları birbirinin yerine kullanılmaktadır [97,98].

HPLC bir sıvıda çözülmüş matriksin, kolona yerleştirilmiş sabit faz ile farklı etkileşimler yaparak sabit fazda farklı hızlarda ilerlemesi ve farklı zamanlarda kolondan ayrılması esasına dayanır. HPLC ayırma mekanizmasına ve durgun faz tipine göre sınıflandırılır. Partisyon, jel kromatografi, adsorbsiyon bunlara örnek verilebilir. Bu modern cihazların yüksek duyarlılık, uçucu olmayan bileşiklerin anaiz edilebilmesi, işlem süresinin kısa sürmesi, düşük konsantrasyonlarda dahi duyarlı olması, analizin oda koşullarında gerçekleşebilmesi gibi avantajlarının yanı sıra yüksek maliyetli olması en büyük deavantajıdır [99].

Günümüzde kullanılan HPLC cihazlarının ana bileşenleri; mobil faz rezervuarı, degazer, pompa, enjeksiyon valfi, kolon, dedektör olarak sıralanabilir [100].

2.3.1.1 Mobil Faz

Matriksi kolona taşıyan ve kolonda yani sabit faz içinde hareket fazıdır. Mobil faz elüe edilmek istenen analite göre ve kullanılan kolona göre değişiklik göstermektedir.

Mobil fazın seçimi elüsyonu direkt etkiler. Mobil fazın sisteme uygulama yöntemleri; izokratik, gradiyent ve politipik olarak adlandırılır.

İzokratik elüsyonda analit sistemin başından sonuna aynı mobil fazla ayrıştırılır. Böylece matriksteki bileşikler kolonda aynı anda, farklı hızlarda geç ederler.

Gradiyenetelüsyon; polariteleri birbirinden farklı birden fazla mobil fazların, elüsyonda kullanıldığı sistemlerdir. Kolondan geçen hareketli fazın polaritesi sistematik bir şekilde değiştirilir.

Politipik mobil faz, karışık tip kromatografilerde uygulanabilecek bir yöntemdir. Aynı kolonu kullanarak farklı kromatografik yöntemler uygulanabilir [100,101].

2.3.1.2 Degazör

Hareketli fazın iletimi esnasında oluşan hava kabarcıklarını ve çözünmüş olan havayı sistemden uzaklaştırmak için kullanılır. Havanın sistemden uzaklaşmaması dedektör sinyalinin bozulmasına ve ölçüm hatalarına yol açar [100].

2.3.1.3 Pompa

Likit kromatografide pompa çözücü sisteminin sabit basınç yardımıyla tüm sistemdeki sürekli akışı sağlar. Çözücü sistemi olarak kullanılan kimyasalların korozyonuna karşı dayanıklı olması, %0.5 veya daha iyi bir akış tekrarlanabilirliğini yapabilmesi, dakikada 10 μ L – 2mL mobil faz akışını sağlayabilmesi gibi sistemin sürekliliğini sağlayıcı özelliklere sahip istenir [98].

2.3.1.4 Numune Enjeksiyonu

Çoğunlukla valf enjektörü olarak bilinen tek tip enjektör tercih edilir. Döngü enjektörü (bazen valf enjektörü olarak da bilinir), sıvı bir numuneyi sisteme dahil etmenin bir yoludur ve içine geleneksel bir şırınga kullanılarak numunenin belirli bir hacimde enjekte edildiği bir halkadan oluşur. Kolonu mobil faz ile dengede tutmak ve kromatografik performansı korumak için numune enjeksiyonu yapılırken, valf yoluyla kolona istenen akış hızında mobil faz da pompalanır. "Enjeksiyon" gerektiğinde, dönen anahtar hareket ettirilir ve akış sisteme dahil edilir, böylece numune kolonun üstüne aktarılır ve mobil fazla sanki yıkanırçasına muamele edilerek elüsyon gerçekleştirilir [98].

2.3.1.5 Kolon

Kolon, HPLC ayırma işlemlerinin kalbidir. Ayrımın istenen netlikte olması kolonun özelliklerine bağlıdır. Stabilesi yüksek bir kolon ile yapılan HPLC, güvenilir sonuç veren, tekrarlanabilir bir yöntem geliştirmede çok önemlidir. Mobil faz, çalışmanın yapılacağı matriks ve kolonun dolgu maddesinin yani sabit fazın fiziksel ve kimyasal özellikleri göz önünde bulundurularak belirlenir. Sabit fazın partikül büyüklüğü, partikül şekli Polar moleküller polar moleküllerle, apolar moleküller apolar moleküllerle daha çok etkileşime girer. Kolondaki hareket bu prensip etrafında şekillenir. Sabit faz polar olup mobil faz apolar olduğunda kolondan ilk önce apolar moleküller çıkacaktır. Sabit faz apolar olup mobil faz polar olduğunda kolondan ilk önce polar moleküller çıkacaktır. HPLC kolonlarının çoğu 5-25 cm boyunda, iç çapı 3-5 mm ve kolona (Şekil 2.55’de örnek kolon gösterilmiştir) yerleştirilen sabit fazın partikül çapı 3-5 µm arasındadır. Sabit fazın; saflığı, patikülşekli, partikül büyüklüğü, yüzey alanı, por büyüklüğü gibi özellikleri kolonun aktifliğinde etkilidir[98,102,103]. Kolona analit yüklenmeden önce mobil faz ile şartlandırma yapılır. Bu kolondaki etkileşecek dolgu maddesinin yüzey alanını artırır ve analizi olumsuz etkileyecek kalıntıları uzaklaştırır. Bu aşama analitin sabit faza düzgün tutunmasını sağladığı gibi analizle ilgisi olmayan piklerin bertaraf edilmesini sağlar[104].



Şekil 2.55 : Örnek HPLC kolonu .

Adsorbsiyon temelinde ayırım yapan HPLC sistemleri normal faz ve ters faz olmak üzere ikiye ayrılır.

Normal faz HPLC; mobil fazın, sabit fazdan daha az polar olduğu bir HPLC sistemidir. Düşük polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Kolon dolgu maddesi olarak polar yapıdaki silikajel-Polimer ve üzerine -CN, -NO₂ veya -NH₂ bağlanmış olan dolgu maddeleri kullanılır. Ters faz HPLC; mobil fazın sabit fazdan daha polar olduğu HPLC sistemidir. Yüksek polariteye sahip molekül kolondan ilk çıkar. Kolon dolgu maddesi Silikajel-Polimer ve üzerine C18, oktil veya fenil grupları, metil, etil ve -NH₂ grupları bağlanmış dolgu maddeleri kullanılır[98,100]. İyon değiştirme, kiral ayırma ve boyut dışalama diğer HPLC tekniklerindedir ve bu sistemlere uygun kolonlar kullanılır.

2.3.1.6 Dedektör

Dedektörler, kolondan ayrılan maddelerin referans maddelerle kıyaslanıp elde edilen sinyalleri kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan araçlardır. Dedektörler kolon sonrasına monte edilir. HPLC için ideal bir dedektör; geniş konsantrasyon aralığında, yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, hedeflenen madde için seçiciliğe sahip olmalı. Dedektör seçimi HPLC yönteminin başarısı için çok önemlidir. UV, floresan, elektrokimyasal, iletkenlik ve kırılma indisi dedektörleri dahil olmak üzere farklı dedektörler kullanılmaktadır ve her birinin belirli avantajları ve dezavantajları vardır [98,101].

UV en çok kullanılan dedektör olup, mor ötesi görünür bölge cihazları ile aynı teknik yapıdadır. Normal UV Dedektörlerde analitin geçtiği hücrede bir UV lambası, bir monokromator, fotodiyat dedektör bulunur. Analitin absorpsiyon yaptığı dalga boyu seçilerek bu dalga boyunda çalışılır. Ancak UV dedektörünün kullanılabilmesi için analitin de belli özelliklerde olması gerekir. Her analit için UV dedektör kullanılmaz. UV dedektörünün sinyal verebilmesi için analitin yapısında π - π^* geçişlerinin yeterli oranda mevcut olması gerekmektedir (kromofor grup içermeli). π - π^* geçişlerinin olmadığı organik bileşikler UV dedektörle tespit edilemez. Alkoller ve karbohidratlar yüksek derişimde dedekte edilebilir [105].

Kimyasal analizlerde kullanılan dedektörler analizde kullanılan aletin “göz”leridir. LC kullanan, analitik analiz yapan uzmanlar için MS, en çok tercih edilen dedektörlerdendir. MS dedektörü en temelde iyonlaştırma, iyon filtreleme ve analiz şeklinde bölümlere ayrılabilir. İyonlaştırma yönteminde farklı yöntemler kullanılmaktadır. Elektrosprey iyonizasyon (ESI), Kimyasal İyonizasyon (CI), Hızlı Atom Bombardımanı (FAB), ve Atmosferik Basınç İyonizasyon (API) yöntemi MS’de iyonlaştıma için kullanılan yöntemlerdendir. API yöntemi LC-MS sistemi için kullanılan yaygın bir iyonizasyon metodudur. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyon (APCI) iki API tekniğidir [100,106]. ESI, kısmi yüke sahip ve uçucu özellikte olmayan analitler için uygun bir iyonizasyon metodudur. Bu yöntemle çalışılması en uygun analitler; proteinler, peptitler, nükleik asitler, farmasetikler ve doğal ürünler sayılabilir [97]. Sisteme gelen analit voltaj uygulanan bir iğneden püskürtülerek damlacıklara ayrılır ve iyonlaşan analit transfer odacığına yol alırken çözücü buharlaşarak sistemden uzaklaşır. m/z analizörlerinde ise

2-D dört kutuplu,3-D dört kutuplu iyon tutcu, sürükleyici tüp veya TOF cihazları , iyon siklatron rezonans cihazları (ICR) gibi cihazlar mevcuttur [106].

2.3.2 LC-MS

Sıvı kromatografide (LC), ilgilenilen bileşik (ler), karmaşık bir karışımın parçası olarak bulunur ve kromatografik tekniğin rolü, bu karışımın bileşenlerinin tanımlanmasına veya nicel analizine izin verecek şekilde ayrılmasını sağlamaktır. Kromatografinin tek başına temel sınırlaması, bir karışımın bileşenlerinin birbirlerinden tamamen ayrılırsalar bile kesin bir şekilde tanımlanamamasıdır. Tanımlama, benzer deneysel koşullar altında belirlenen referans malzemelerinkilerle bilinmeyen numunenin alıkonma süresinin (Rt) karşılaştırılmasına dayanır. Bununla birlikte, var olan o kadar çok bileşik vardır ki, bir bilinmeyen ve bir referans malzemenin örtüşen özellikleri, deneysel hata sınırları dahilinde özdeş olsa bile, analist, iki bileşiğin aynı olduğunu kesin olarak söyleyemez. Analist için bir dizi kromatografik koşul mevcut olmasına rağmen, bir karışımın tüm bileşenlerinin tam olarak ayrılmasını sağlamak her zaman mümkün değildir ve bu, ilgili analit (ler) in kesin ve doğru kantitatif tayinini engelleyebilir. Bu tek başına kullanıldığında LC tekniğinin handikapıdır [97].

Kütle spektrometrisinin gücü, birçok bileşiğin kütle spektrumlarının, tam bir kesinlikle olmasa bile, yüksek derecede bir güvenle tanımlanmalarına izin verecek kadar spesifik olması gerçeğinde yatmaktadır. Bununla birlikte, ilgilenilen analit bir karışımın parçası olarak karşılaşırsa, elde edilen kütle spektrumu mevcut tüm bileşiklerden iyonları içerecektir ve özellikle ilgilenilen analit bu karışımın küçük bir bileşeni ise, herhangi bir kesinlik derecesi ile tanımlama imkansız değilse de çok daha zor hale gelecektir. Kromatografinin ayırma kabiliyetini, kütle spektrometresinin tanımlama yeteneği ile birleştirmek çok başarılı bir hibrit teknolojinin açığa çıkmasını sağlamıştır. Öyle ki LC ve MS cihazlarının tek başına kullanıldığında açığa çıkan karanlık noktalar beraber LC-MS olarak kullanıldığında tamamen ortadan kalkmaktadır [97].

Bir detektör olarak kütle spektrometresinin bir avantajı, benzer alıkonma süresine sahip bileşiklerin iyonlaştırılarak farklılaşmasına izin verebilmesidir. LC ve MS sistemlerinin beraber kullanımı için analitik metotlar geliştirilerek iki cihazın uyumu en üst seviyeye çıkarılır [98].

2.4 Analitik Metot Validasyonu

Metot validasyonu, ölçüm için kullanılacak bir prosedürün istenen hedef için kullanılabilirliğini nesnel yollarla değerlendirilerek uygun parametrelerle raporlanarak kanıtlanmasıdır[107]. Metot validasyonu, nicel ölçüm standardizasyonu yapılacak analitik bir yöntem geliştirildiğinde, laboratuarda çalışılmakta olan metotta değişikliğe gidildiğinde, validasyonu yapılmış bir yöntem farklı bir laboratuvarında uygulanacağı zaman veya farklı bir kişi ya da farklı bir ölçüm aletinde uygulanacağı zaman, iki metodu kıyaslamak ve metot etkinliğinde zamanla değişim tespit edildiğinde uygulanmalıdır [108].

2.4.1 Validasyon Parametreleri

Performans karakteristikleri için öncelikle aşağıdaki temel geçerli kılma (validasyon) parametrelerinin belirlenmesi gerekir. Uygulanamayan parametreler varsa “uygulanamaz” ifadesi kullanılır. Metot için farklı parametreler değerlendirmeye katılması gerekiyorsa bu parametrelerde validasyona dahil edilir. Nicel analizler için metot doğrulama için kullanılan parametreler;

- Özgünlük (Specificity)
- Doğrusallık (Linearity)
- Gözlenebilme sınırı (LOD; Limit of Detection), Tayin sınırı (LOQ; Limit of Quantification)
- Ölçüm Aralığı (Range)
- Doğruluk
 - Kesinlik
 - Tekrarlanabilirlik
 - Tekrarüretilebilirlik (laboratuarlar arası)
 - Gerçeklik
 - Bias
 - Geri kazanım

şeklinde sıralanabilir [109,110].

2.4.1.1 Özgünlük (specificity)

Uygulanacak metodun aranan maddeyi karışım ortamında doğru ve spesifik olarak kalitatif ve kantitatif tayinini yapabilmesidir. Yani aranan maddeye ait nicel değerleri saptayabilmesidir. Referans madde analiz edilir ve daha sonra bu referans madde farklı matiksler içeren numunelere eklenerek LC kromatogram pikleri incelenir ve özgünleştirilir [109].

2.4.1.2 Ölçüm Aralığı (Range)

Gerçek matriksiçindeanalitin kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla tespit edilebildiği konsantrasyon aralığıdır. Referansın farklı konsantrasyonlarının ölçümleri sonucunda belirlenen doğrudan sapmanın olmadığı aralık olarak da tanımlanabilir[111].

2.4.1.3 Doğrusallık (Linearity)

Ölçüm sonuçlarının matriks ortamındaki hedef maddekonsantrasyonu ile sinyal arasındaki ilişkinin doğru orantılı olduğu ölçüm aralığıdır. Doğrusal aralık kalibrasyon eğrileri tespit edilerek belirlenir belirlenir. Deneysel verilerin doğrusal bir eğriye ne kadar iyi uyduğunun en iyi ölçütü, regresyon analiz işleminde hesaplanmış “determinasyon katsayısıdır (R²).” R² = 1 olması, deneysel verilerin kusursuzbir doğrusal eğri sağlandığının kanıtıdır. Ne kadar çok veri noktası varsa, R² ’nin güvenilirliği o kadar yüksektir [100,111].

2.4.1.4 Gözlemlenebilme ve Tayin sınırı (LOD/LOQ)

Metoda ait tayin sınırı (Limit of Detection, LOD) hedef maddenin tanımlanabildiği en düşük analitderişimidir. Gözlemlenebilme sınırını belirlemek için farklı hesaplamalar yapılmaktadır. Örneğin; en düşük derişimdeki analit sinyali ile kör numunenin sinyali ölçülerek sinyalin gürültüye oranı hesaplanmaktadır. Bu oranın 3’e 1 ya da 2’e 1 olması kabul edilebilir değerlerdendir [112].

Tayin limiti (Limit of Quantification, LOQ) ise hedef maddenin kantitatif analizinin yapılabilirdiği en düşük analitderişimidir. Tayin limiti LOD değerinin 3.3 katı olarak hesaplandığı gibi standart sapmanın eğime oranının 10 katı şeklinde de hesaplanmaktadır [112].

Metot validasyonu çalışmalarında hesaplanan LOD ve LOQ'nun mutlaka doğrulanması gerekir. Bunun için kör örnek içine bu konsantrasyonlarda spike yapılır [108].

2.4.1.5 Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk parametresi iki alt başlıkta incelenir. Bunlar gerçeklik ve kesinliktir. Doğruluk tespit edilen ölçüm ile gerçek değer birbiri ile örtüşmesinin bir ölçüsüdür.

Gerçeklik (Trueness)

Gerçeklik için sistematik hata (bias) hesabı yapılır. Sistematik hata bir analitik bir metodunun gerçek sonuçla örtüşen değeri verebilme kabiliyetinin ölçüsüdür. Bias değerinin belirlenebilmesi için doğru olduğu kabul edilen referans ölçüm miktarı bilinmelidir. Gerçek değer sertifikalı referans materyallerden (SFM), geçerli bir metodun ölçümü sonucu veya yeterlilik testleri sonucunda elde edilebilir. Bu üç hesaplama şekli için ortak nokta gerçek değer başka laboratuvarlarda da yapılan analizler sonucunda elde edilmiş olmasıdır. Gerçekliğin tespiti için SFM, valide edilmiş bir metot ve yeterlilik testinin bulunmadığı durumlarda geri kazanım (recovery) hesaplaması kullanılır. Geri kazanım hesaplamasının kolaylığı orjinalmatrikste analiz yapılarak hesaplanabilmesidir. Geri kazanımı hesaplamak için orijinal matriks yani validasyon çalışmasının yapıldığı matriks, hedef analit ile spike yapılır. Geri kazanım hesaplamalarının %110-80 arası olduğu çalışmalarda metodun gerçeğe yakın sonuçlar verdiği yorumu yapılabilir [108].

Kesinlik (precision)

Kesinlik analiz sonuçlarının birbiri ile örtüşmesinin bir ölçüsüdür. Bu analiz özellikle konsantrasyona bağlı analizler olmalıdır. Kesinlik terimi analiz sonuçları arasındaki yakınlığı ifade eder. Kesinlik doğruluğun bir parametresi olarak rastgele hataların dağılımını gösterir. Kesinlik ölçümünü 4 faktör etkilemektedir. Bunlar zaman, kalibrasyon, analizi yapan kişi (aynı veya değişik operatörler) ve analiz malzemeleri (analizde aynı veya değişik ekipmanların kullanılıp kullanılmadığı) olup bu etkenlerin gösterdiği farklılaşmaya göre kesinlik de değişmektedir [113]. Tekrarlanabilirlik ve tekrarüretilebilirlik kesinliğin ölçüldüğü iki parametredir [114].

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralığında yapılan ölçümlerin birbirine yakınlığının ölçülmesidir. Tekrar üretilebilirlik, farklı zaman ve numune ile farklı laboratuvarda yapılan ölçümlerin birbirine yakınlığıdır. [114]

2.4.1.5 Analizlerde Ölçüm Belirsizliği

Ölçülen büyüklüğe anlamlı olarak ilişkilendirilen değerlerin dağılımını karakterize eden, ölçümün sonucuyla ilişkili bir parametredir. Standart sapma olarak ifade edildiğinde ölçüm belirsizliği standart belirsizlik olarak adlandırılır ve genellikle “u” ile gösterilir. Raporlama için genişletilmiş bir belirsizlik olan “U” kullanılır. Belirsizlik birden fazla kaynaktan kaynaklanabilir. Analitik sonuçlarda rastgele varyasyon görmek yaygındır ve çoğu analist kalibrasyon için referans materyalleri kullanır, bu nedenle hem rastgele hata hem de referans materyal belirsizliği sonuçtaki belirsizliğe katkıda bulunur. Belirsizlik birden fazla kaynaktan kaynaklanabilir. Analitik sonuçlarda rastgele varyasyon görmek yaygındır ve çoğu analist kalibrasyon için referans materyalleri kullanır, bu nedenle hem rastgele hata hem de referans materyal belirsizliği sonuçtaki belirsizliğe katkıda bulunur. Aynı belirsizlikleri kullanmak ve birleştirmek için birkaç adım gereklidir:

1. Net bir "ölçülen büyüklük" tanımını yazın; yani, ölçülen örneğin net olarak belirlenmesi
2. Tüm ilgili belirsizlik kaynaklarının (ağırlık ölçümü, hacim ölçümü, sıcaklık vs.) kesin olarak belirlenmesi
3. Her bir belirsizlik kaynağının standart bir belirsizliğe dönüştürülmesi

Tespit edilen tüm standart belirsizliklerin birleştirilmesi ve hatta gerekirse uygun bir kapsan faktörü ile çarpılması [115].

2.5 Asetilkolinesterazlar ve Alzheimer Hastalığı

Dünya genelinde yaklaşık 15 milyon insanı etkileyen ve yaşlı insanlar içerisinde en sık bunama neden olan önemli bir sağlık sorunudur. Alzheimer hastalığı, beynin hipokampus ve neokorteks gibi yüksek mental fonksiyonların meydana geldiği bölgelerinde nöron kayıpları ile karakterize ilerleyici bir nörodejeneratif hastalıktır. Klinik semptomların ortaya çıkışından ölüm arasında geçen sürenin ortalama 8.5 yıl olduğu bildirilmiştir[116].Hastalık, hafızda kayıp, düşüncede daralma ve kişilik özelliklerinin değişimi olarak kendini göstermektedir [117].

Alzheimer hastalığının oluşum mekanizmasında Beta Amiloid proteinlerinin ve Tau proteinlerinin nöron hücresi içerisinde birikimi gösterilmiştir. Beta Amiloid proteini, amiloidprekürsör proteininin (APP) yıkım ürünü olarak oluşur. Alzheimer hastalarında, oluşan Beta Amiloid proteininin hücre dışına atılması problemin ana kaynağını teşkil etmektedir. Alzheimerlı hastalarda olduğu gibi sağlıklı bireylerde de beta-amiloid üretilmektedir ancak Alzheimerlı hastalarda beta-amiloidlerin yıkımında ve hücre dışına atılmasında sorun yaşanmaktadır. Bu nedenle hücre içerisinde Beta Amiloid protein birikimi meydana gelir. Bu birikim nöron hücresinde oksidatif strese neden olmaktadır. Hücre içerisinde artan oksidatif stres apoptotik yolların aktivasyonuna neden olarak nöron hücrelerinin ölümüne neden olmaktadır [118]. Alzheimer hastalığının oluşumuna neden olduğu öne sürülen bir diğer mekanizma ise hücre içerisinde nöfibriller lifler olarak adlandırılan hiperfosforiletau proteinlerinin nöron hücresinde birikimidir. Yine hücre içinde plaklar halinde biriken nörofibriller lifler apoptotik yolları aktifleyerek nöron hücresinin ölümüne neden olmaktadır [119]. Nöron hücresi içerisinde amiloid proteini ve tau proteinlerinin birikimi kognitif fonksiyonları açısından sağlıklı insanlarda da gözlenebilir. Ancak Alzheimer hastalarında hücre içi plak birikiminin yanısıra hücre ölümünün neden olduğu artmış enflamasyon, nöral hücrelerin kaybı ile birlikte nöronalsinapsların da kaybına yol açmaktadır. Nöronalsinapslardaki kayıplar ise nöronlar arası iletişimde önemli bir rol oynayan kolinerjik sistemde bozulmalara neden olmaktadır [120].

Kolinerjik sistem hem periferik hem santral olmak üzere tüm sinir sisteminde mevcuttur. Salgıladıkları nörotransmitter ile nöron hücreleri arasında uyarıların iletilmesini sağlarlar [121]. Beyindeki bilişsel fonksiyonların yürütüldüğü merkezlerde kolinerjik nörotransmitterlerin bol bulunması nedeniyle bu bölgelerdeki kolinerjik nörotransmitterlerin kaybının Alzheimer hastalığında gözlenen kognitif fonksiyon kaybına katkıda bulunduğu öne sürülmüştür [120]. İnsan beyinde temel olarak Asetilkolin (ACh) ve Glutamat olmak üzere 2 kolinerjik nörotransmitter bulunur [122].

Asetilkolin (ACh) insan vücudunda kolinerjik sistemin en önemli ve en bol bulunan nörotransmitteridir [121]. İnsan beyinde yaygın ve bol bulunmasından dolayı kolinerjik sistemin dikkat, öğrenme, uyku, uyanıklık, hafıza, stres cevabı gibi önemli nöronal süreçlerde ve kritik fizyolojik olaylarda görev alması sürpriz değildir [123].

Ayrıca yapılan çalışmalarda, Alzheimer hastalarında kolinerjik nöronların kaybının hafıza kaybı gibi bilişsel fonksiyonlarda kayba neden olduğu gösterilmiştir [124].

Ach sentezi kolinerjik nöronların sitoplazmasında asetilkolintransferaz enzimi aracılığıyla kolin ve AsetilKoenzim A moleküllerinden gerçekleşir. Daha sonra sentezlenen asetilkolinsinaptik veziküller aracılığıyla hücre içerisinde depo edilir [125]. Nöron hücresi uyarıldığında sinaptik veziküllerdeki asetilkolinsinaptik aralığa dökülerek hedef reseptörlerinin uyarılması sağlanır. Ancak sinaptik aralıktaki asetilkolinin fizyolojik koşullarda uyarılma işlevinin son bulması için ivedilikle inaktive edilmesi gerekir. Bu işlem ise asetilkolinesteraz enzimi aracılığıyla gerçekleştirilerek Ach'nin kolin ve asetata yıkılması sağlanır [126]. Ach'in insan nörolojik sisteminde etkilediği Nikotinik ve Muskarinin olmak üzere iki reseptör grubu vardır. Her iki reseptör tipi hem periferik hem de santral nöron sistemde bulunmaktadır ve pek çok alt tipe sahiptirler[127]. Reseptörlerin uyarılması sonucu meydana gelen olaylar, reseptörün nöronda bulunduğu yere (presinaptik ya da postsinaptik), uyarılan nöronun sahip olduğu reseptör alt tipine ve uyarılan nöronun vücutta bulunduğu yere göre değişmektedir [128]. Santral sinir sisteminde bulunan nikotinik reseptörler Acharafından uyarıldığında, çok önemli nöronal olaylarda görev alan glutamat, GABA, dopamin, serotonin ve norepinefrin gibi farklı nörotransmitterlerin salınımını sağlar[129,130]. Alzheimer hastalarında gözlenen hafıza kaybı, öğrenme eksikliği gibi bilişsel fonksiyonlardaki bozulmanın şiddeti, frontal lob, nükleus bazalis ve hipokampal bölgelerdeki sinaptik iletimdeki kayıplarla oldukça ilişkili olduğu gösterilmiştir [131,132]. Ayrıca, dopamin, serotonin ve norepinefrin salgılanmasını etkilediği için Alzheimer hastalığında gözlenen apati ve depresyon gibi psikolojik semptomlardan da sorumlu tutulmuştur [133]. Tüm bu etkilerinden dolayı Alzheimer hastalarında, Ach konsantrasyonunun normal seviyelerde tutulması tedavi hedefi olarak belirlenmiştir. Sinaptik aralıktaki Ach yıkımını önlemek ve Ach miktarının belirli bir düzeyde kalabilmesi için ilk önce Ach'nin yıkımını sağlayan asetilkolinesteraz enziminin inhibisyonu hedeflenmiştir [134]. Güncel asetilkolinesteraz inhibitörleri gerçekten de kognitif semptomlarını azaltmak ve hastalığın ilerlemesini durdurmak suretiyle hastaların hayat kalitesinde gözle görülür bir iyileşme sağlamışlardır. Ancak bu iyilik halinin 1-3 yıl gibi bir süre ile sınırlı kalması bilim adamlarını yeni molekül arayışlarına zorlamaktadır [135].

Glutamaterjik hipoteze göre, Alzheimer hastalarında bilişsel gerileme, glutamat tarafından N-metil-D-aspartat (NMDA) reseptörlerinin aşırı aktivasyonundan kaynaklanan nöronal hasar sonucu oluşmaktadır. Öğrenme ve hafızada çok önemli olan NMDA reseptörlerinin sürekli düşük seviyeli aktivasyonu, sinaptik yarıktaki astroglial hücrelerin glutamat geri alımındaki eksikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir [136].

2.6 Antioksidanlar

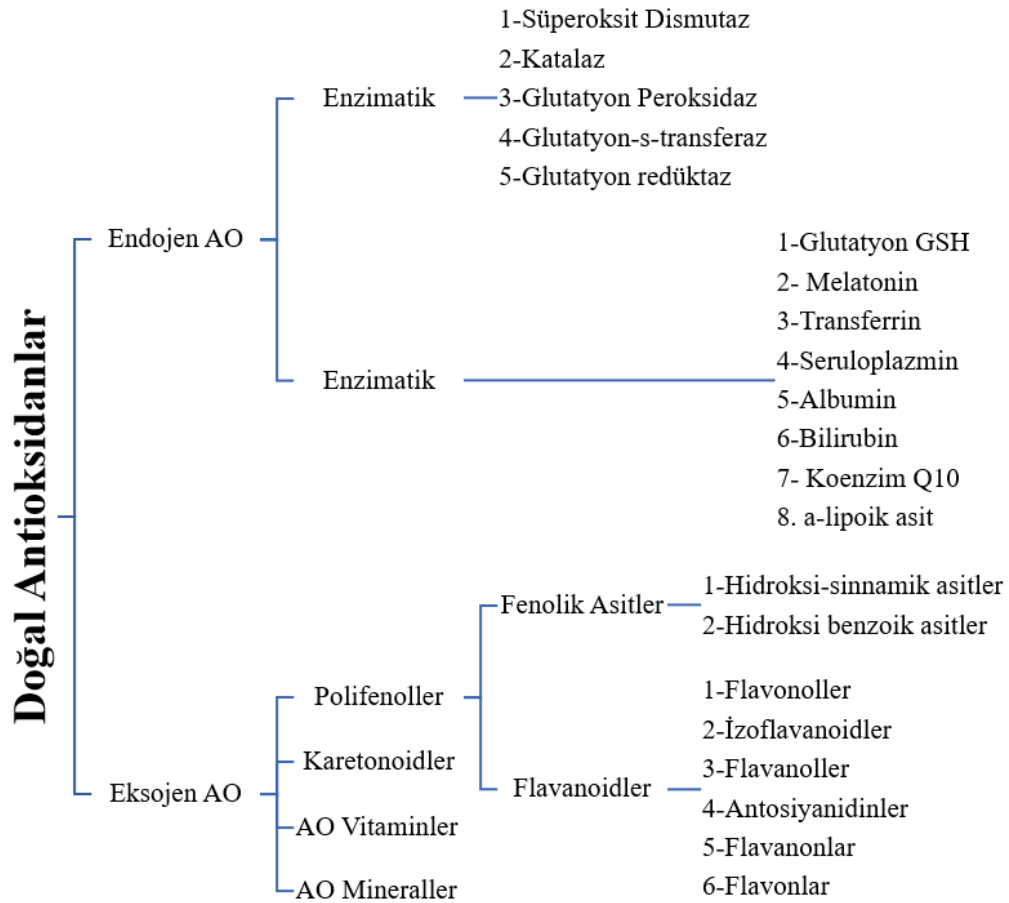
Canlı metabolizmasında antioksidanlarla oksidanlar arasında oksidanlar lehine yıkım metabolizmalarını destekleyen “oksidatif stres” olarak adlandırılan bir denge mevcuttur. [137].Vücuda solunum yoluyla alınan oksijenin mitokondride gerçekleşen reaksiyonları esnasında reaktif ara ürünler açığa çıkardığı tespit edilmiştir[138]. Açığa çıkan bu reaktif oksijenli ürünler vücudun temel biyokimyasallarını (nükleik asit, protein gibi) oksidayona uğratarak vücutta tahribata yol açan mekanizmalar oluşturabilir. Oksidatif stresin denilen bu tahribatların, oksidasyonu destekleyen ciddi bir dengesizlik, aşırı ROS ve serbest radikal üretiminden veya antioksidan savunma sisteminin zayıflamasından kaynaklandığı söylenmektedir. Şiddetli oksidatif stres hücre hasarına neden olabilir. Bu nedenle oksidatif stresin önlenmesi, sağlık ve hastalığın önlenmesi için önemli olabilir [139]. Antioksidanlar serbest radikal oluşumunu ve serbest radikaller tarafından oluşan bu tahribatı ortadan kaldırılabilen,onarabilen, ve hücre hasarını engelleyebilen maddelerdir[140]. Antioksidanların olumlu etkileri sayesinde insan vücudu, gastrointestinal hastalıklardan infertiliteye, kardiyovasküler hastalıklardan kansere kadar geniş bir hastalık spektrumundan korunmuş olur [141].

Antioksidan savunma;

1. serbest radikallerin açığa çıkmasını önlemek,
2. ürün halindeki serbest radikallerin temizlenmesi,
3. radikallerin verdiği hasarı onarmak,
4. Sekonder radikal üreten zincir reaksiyonlarının durdurulması
5. Endojen antioksidan kapasitenin artırılması

olarak beş başlıkta kendini gösterir[142]. Antioksidanlar vücutta üretildiği gibi (glutatyon, Melatonin, Biluribin, Albumin), dışarıdan besin yoluyla da alınabilir[137].

Antioksidanlar doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılır[143]. Doğal antioksidanlar (Şekil 2.56), bitki ve hayvan dokularında bulunan ve ekstrakte edilebilen bileşenlerdir. Bitkiler, doğal antioksidan bileşiklerin temel kaynağını oluşturmaktadır. Fenolik maddeler doğal antioksidanların en önemli gruplarını oluştururlar. Bunlar bitkilerin tüm kısımlarında görülebilen basit fenolik ya da polifenolik yapıda maddelerdir. Flavonoidler başta olmak üzere, kumarinler, sinamik asit türevleri, terpenler, tokoferoller, fenolik asitler bitki antioksidanlarının önde gelenleridir. Bu nedenle yıllardır besinlerin koku ve tat gibi özelliklerini arttırmak için katkı olarak kullanılan baharat ve aromatik bitkiler sahip oldukları sekondermetabolitler ve etkileri araştırılıp öğrenildikçe giderek daha çok önem kazanmaktadır [144].



Şekil 2.56 : Doğal Antioksidanlar.

2.6.1 Antioksidan Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivite (AOA) ve total antioksidan kapasite (TAC) deneyleri iki şekilde katagorize edilebilir;

1. Model sistemlerde mevcut oksidasyon eğiliminin ölçülmesi; bu deneyler hidrojen atomu transferi (HAT) ya da tek elektron transferi (SET) sistemine dayanır
2. Radikal yakalama deneyleri

Hidrojen atom transferine dayalı analizler, bir antioksidanın bir hidrojen atomu (H) vererek serbest radikalleri söndürme kapasitesini ölçer. Etkili bir fenolik antioksidan, serbest radikallerin oksidasyonuna karşı koruyucu bir etkiye sahip olması için hızlı reaksiyona girmelidir [145]. HAT esaslı antioksidan ölçümleri normalde antioksidanlar gibi ROO• radikali ile reaksiyon verebilen bir floresan prob kullanır, bu nedenle antioksidan aktivite, bir antioksidan yokluğunda ve varlığında probun floresans bozunma eğrisi ölçülerek rekabet kinetiğinden belirlenebilir. HAT bazlı analizlerin tipik örnekleri arasında ORAC, TRAP ve TOSC analizleri ve krosin ağartma testi bulunur [146].

2.6.1.1 ORAC deneyi

Peroksil radikali tarafından gerçekleşen oksidasyonun inhibisyonunu görüntüleyen ve radikal zincir kırma yoluyla antioksidan aktivite ölçüm yapan deneylerdir. Bu tahlil, başlangıçta 2,2'-azobis (2-metilpropionamidin) dihidroklorür (AAPH) bir serbest radikal oluşturucu olarak ve β -fikoeritrin'i hedef molekül olarak kullanmıştır, ancak ikincisi son yıllarda floresein ile yer değiştirmiştir. Yeni ORAC testi ayrıca standart olarak trolox (suda çözünebilen E vitamini analogu) olarak kullanır ve AOA olarak ORAC değeri trolox eşdeğeri olarak ifade edilir [146]. Şekil 2.57'de Orac deney mekanizması gösterilmiştir.



AH: Hidrojen verici antioksidan

Şekil 2.57 : Orac deneyi mekanizması.

2.6.1.2 TRAP deneyi

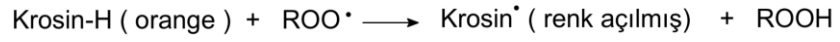
TRAP testi, antioksidanların peroksil radikalleri ile bir hedef prob arasındaki reaksiyonu inhibe etme kabiliyetine dayanmaktadır; bu, başlangıçta ABAP'nin termal ayrışması ile indüklenen peroksidasyon sürecinde O₂'nin (sonda olarak) tüketilmesidir. O₂ alımının gecikme süresi, yani indüksiyon süresi, kantitatif olarak ölçülebilir ve TRAP değerinde plazma örneklerinin TAC'sini ifade etmek için kullanılabilir (Wayner ve diğerleri, 1985). Bu yöntem o zamandan beri daha geniş bir prob, başlatıcı ve son nokta ölçüm aralığı kullanılarak birçok versiyona dönüştürülmüştür [146].

2.6.1.3 TOSC deneyi

TOSC testi, ROS için α -keto - γ - metiyolbütirik asit (KMBA) ile rekabet eden antioksidan bileşiklerin varlığında etilen oluşumunun inhibisyonuna dayanır (bir kontrol reaksiyonu headspace gaz kromatografisi (GC) ile izlenir).GC kullanımı, bu yöntemin yüksek verimli bir tahlil olarak geliştirilmesini engeller [146].

2.6.1.4 Krosin ağartma deneyi

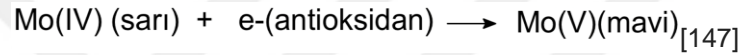
Bu tahlil, bir antioksidan ile doğal olarak oluşan bir karotenoid türevi olan krosinin rekabetçi kinetik reaksiyonuna dayanmaktadır. β -Karoten de kullanılır, ancak 470 nm'de β - karotenin renklerinin giderilmesinin birden fazla yolla meydana gelebilmesi nedeniyle, krosin genellikle sonuçların yanlış yorumlanmasını önlemek için kullanılır. ET (elektron transferi) analizleri olarak da adlandırılan tek elektron transfer tabanlı deneyler, bir antioksidanın metal iyonlarını, karbonilleri ve radikalleri azaltmak için bir elektron transfer etme kabiliyetini tespit eder. Antioksidan etkinin SET mekanizmaları aşağıdaki reaksiyonlarla özetlenebilir [148]. Deney mekanizması Şekil 2.58'de gösterilmiştir.



Şekil 2.58 : Krosin ağartma deneyi mekanizması.

2.6.1.5 Folin - Ciocalteu testi

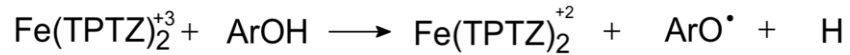
FC yöntemi, alkali (karbonat) solüsyondaki fenol bileşiklerinin bir molibdotungstosfatheteropolyanyon reaktifi ile oksidasyonuna dayanır ve 750-765 nm'de absorbanans yaparak renkli bir ürün verir (Singleton ve ark. 1999). Fenolikler ile özel ilişkilendirilebilirlik nedeniyle, bu yöntem aynı zamanda genellikle toplam fenolik içerik (TPC) tahmini için kullanılır [146]. Mekanizma Şekil 2.59'da gösterilmiştir.



Şekil 2.59 : Folin - Ciocalteu testi mekanizması.

2.6.1.6 FRAP testi

FRAP testi, Fe²⁺ ile renkli bir kompleks oluşturan tripiridiltriazintridentatligand varlığında antioksidanlar tarafından Fe³⁺'nin Fe²⁺'ya indirgenmesine dayanır (Şekil 2.60).



Şekil 2.60: FRAP testi mekanizması

TPTZ, 2,4,6-tripiridil-S-triazin ligandını belirtir ve Fe (II) kompleksinin absorpsiyon maksimum dalga boyu (λ_{max}) 593 nm'dir [149]. Bu yöntem, hem gıda hem de biyolojik sıvı numunelerinde bir antioksidanın indirgeme gücünü değerlendirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır [146].

2.6.1.7 CUPRAC Deneyi

Bu yöntemde 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Neokuproin) ve Cu (II) aynı ortama koyulur. Antioksidanın Cu (II)'yi indirgemesi sonucu oluşan Cu (I)'in neokuproinie yaptığı kompleks 450 nm dalga boyunda maksimum absorbanans verir. Bu yöntem hem hidrofilik hem de lipofilik sistemlere uygulanabilir, kolay ve pratiktir [150].

3.DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Bitkisel Materyal

Bitkisel materyallerimiz Balıkesir Üniversitesi öğretim üyesi Prof.Dr. Tuncay Dirmenci tarafından aşağıda belirtilen yer ve zamanda toplanıp, teşhisi yapılmış ve örnekleri Balıkesir Üniversitesi NEF Botanik Laboratuvarına belirtilen kodlarla konulmuştur. Tablo 3.1’de bitki örneklerinin toplanması hakkındaki bilgiler özetlenmiştir.

Tablo 3.1 : Bitki örnekleri hakkında toplanma ve depolama bilgileri.

Tür İsmi	ToplanmaYeri	ToplanmaZamanı	Yükseklik	Herbaryum Numarası
<i>S.icarica</i> P.H.Davis	Gökçeada	20-25 Ağustos	200-300m	5166
<i>S.pilosa</i> Velen.	Balıkesir: Edremit, Kazdağı	20-25 Ağustos	1400m	5245

3.2 Kullanılan Kimyasallar

LC-HRMS fenolik madde kalibrasyonu için kullanılan referanslar;

Ascorbic acid(≥ 99 % Sigma-Aldrich), (-)-Epigallocatechin(>97 % TRC Canada), (-)-Epigallocatechingallate(>97 % TRC Canada), (+)-Catechin(>97 % TRC Canada), Chlorogenic acid, Fumaricacid(≥ 99 % Sigma-Aldrich), (-)-Epicatechin(≥ 90 % Sigma-Aldrich), (-)-Epicatechin Gallate(>97 % TRC Canada), Verbascoside(86.31% HWI ANALYTIK GMBH), Chicoricacid(>97 % TRC Canada) , Theophylline(≥ 99 % Sigma-Aldrich), Orientin(>97 % TRC Canada), Caffeic acid(≥ 98 % Sigma-Aldrich), Caffeine(≥ 99 % Sigma-Aldrich), (+)-*transtaxifolin*(>97 % TRC Canada), Luteolin-7-

rutinoside(>97% Carbosynthlimited) , Vanilicacid(\geq 97 % Sigma-Aldrich), Naringin (\geq 90 % Sigma-Aldrich) , Sinapinic acid (\geq 98% Carbosynth) , Luteolin 7-glucoside (>97% TRC Canada), p-Coumaric acid(\geq 98 % Sigma-Aldrich) , Hesperidin (\geq 98% J&K) , Rutin (\geq 94% Sigma-Aldrich) , Rosmarinic acid (\geq 96 % Sigma-Aldrich) , Hyperoside(>97% TRC Canada), Resveratrol(>99% TRC Canada) , a-cyano-4-hydroxycinnamic acid (\geq 98% Carbosynth) , Dihydrokaempferol(>97% Phytolab), Oleuropein(\geq 98 % Sigma-Aldrich) , Apigenin 7-glucoside(>97% EDQM CS) , Ellagicacid(>97% TRC Canada), Quercitrin(>97% TRC Canada), Myricetin(>95% Carl Roth GmbH + Co), Nepetin-7-glucoside(>97% Phytolab), Benzidamine (pharmactive -) , Scutellarein(>97% TRC Canada), Quercetin (\geq 95% Sigma-Aldrich) , Herniarin(>98% Carl Roth GMBH), 4-Hydroxy benzoic acid(\geq 99 % Sigma-Aldrich), Salicylic acid(\geq 98 % Sigma-Aldrich), Naringenin (\geq 95 % Sigma-Aldrich) , Luteolin(95% Sigma-Aldrich), Nepetin(98% Supelco), Genistein (>97% TRC Canada), Kaempferol(>90% Sigma-Aldrich), 3'-O-Methyl quercetin(>97% TRC Canada), Apigenin(>97% TRC Canada) , Hispidulin(>97% TRC Canada), Isosakuranetin(>97% Phytolab), Penduletin(>97% Phytolab), Glycyrrhizicacid(>97% TRC Canada), Sinensetin(>97% TRC Canada), CAPE (Caffeic Asit Phenethyl Ester) (\geq 97% europeanpharmacopoeiareferencstandard) , Capsaicin(\geq 98 % Sigma-Aldrich) , Rhamnocitrin(>97% Phytolab), Chrysin(\geq 96% Sigma-Aldrich), Acacetin(>97% TRC Canada), Dihydrocapsaicin(\geq 97 % Sigma-Aldrich) , QuillaicAcid (>97% TRC Canada), Sarsasapogenin(>98% TRC Canada) , Gypsogenic acid(>97% TRC Canada), Emodin(90% Sigma-Aldrich), Shatavarin(\geq 85 % Sigma-Aldrich) ,Hederagenin(>97% TRC Canada), (-)- caryophyllene oxide(\geq 99% chemika) ,Syringic acid(\geq 95 % Sigma-Aldrich)

Kullanılan çözücüler;

Metanol(\geq %99.5 Tekkim), diklorometan (\geq %99.5 Tekkim), aseton(\geq %99.5 Tekkim)

3.3 Ekstrelerin Hazırlanması

Satureja pilosa ve *Satureja icarica* bitkileri gölgede iyice kurutulduktan sonra yaprakları ve dal kısımları ayrıldı. Dal kısımları toz haline getirildi.

Yaprak ve dal kısımları ilk olarak DCM ile oda sıcaklığında 3 gün ard arda 24 saatlik maserasyonla elde edilen numuneler birleştirilip çözücüleri Heidolph rotary evaporatorde uçuruldu.

Çeker ocakta kurutulan *Satureja pilosa* ve *Satureja icarica*'nın yaprak ve gövde kısımlarından kartuşlar oluşturuldu ve soxhalet cihazında asetonla beyazlaşana kadar (ortalama 3 saat) sifon yapıldı. Daha sonra çözücü Heidolph rotary evaporatorde uçurulup ham ekstreler kendi içlerinde birleştirildi.

İyice kurutulan *Satureja pilosa* (SP) ve *Satureja icarica* (Sİ) (Tablo 3.2'de ekstre kodları verimiştir) yaprak ve dal kısımlarını içeren kartuşlar son olarak soxhalet cihazında MeOH ile renk kayboluncaya kadar (yaklaşık 3 saat) sifon yapıldı.

Ayrıca her bitkinin yaprak ve dal kısımlarından 10g tartım alınarak MeOH ekstresi elde edildi.

Satureja pilosa yaprağının diklorometan ekstresi (SPY-D) ham ekstresi klorofilden uzaklaştırmak için heksan ile muamele edilip santrifüjlendi. Heksan fazı ayrı bir jodede toplanıp rotary evaporatörde kurutuldu.

Tablo 3.2 : Bitki ekstrelerinin kodları.

<i>S. pilosa</i> yaprak DCM	SPY-D
<i>S. pilosa</i> yaprak aseton	SPY-A
<i>S. pilosa</i> yaprakmetanol	SPY-M-a
<i>S. pilosa</i> yaprakmetanol direkt	SPY-M
<i>S. pilosa</i> dal DCM	SPD-D
<i>S. pilosa</i> dal aseton	SPD-A
<i>S. pilosa</i> dal metanol	SPD-M-a
<i>S. pilosa</i> dal metanol direkt	SPD-M
<i>S. icarica</i> yaprak DCM	SİY-D
<i>S. icarica</i> yaprak aseton	SİY-A
<i>S. icarica</i> yaprak metanol	SİY-M-a
<i>S. icarica</i> yaprak Metanol	SİY-M
<i>S. icarica</i> dal DCM	SİD-D
<i>S. icarica</i> dal aseton	SİD-A
<i>S. icarica</i> dal metanol	SİD-M-a
<i>S. icarica</i> dal metanol direkt	SİD-M

3.4 Kromatografik Yöntemler

3.4.1 Flaş Kromatografi

Heksanla yıkanan SPY-D ekstresini fraksiyonlara ayırmak için flash kromatografi kullanıldı. Bu teknik, Reveleris X2 Flash Kromatografi cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Kolon maddenin miktarına bağlı olarak belirlendi. 4g silika 40µm'lık kolonlar kullanıldı. İstenen ayırıştırmaya ulaşabilmek için TLC yaparak çözücü sistemi belirlendi ve Rf değerleri tespit edildi. Ayırıştırmamanın yapılacağı sistemle kolon şartlandırıldı . Kolondan elüe edilen maddeler sabit bir akış hızıyla, istenen hacimde otomatik bir fraksiyon toplayıcı yardımıyla toplandı.

Toplanan fraksiyonlar TLC ile kontrol edildi ve gerekli analizler yapıldı. Yeterli miktarda olmayan saf maddelerin miktarlarını arttırmak amacıyla flaş kromatografi aynı şartlarda tekrarlandı.

3.4.2 İnce tabaka kromatografisinde (İTK)

Flaş kromatografiden elde edilen farksiyonlara silika alüminyum plaklarda farklı sistemlerde İTK yapıldı. Triterpen varlığının tespiti için Serik sülfat belirteci kullanıldı ve 105° de yakılarak önce menekşe sonra kahverenk olan spot gözlemlendi daha sonra spotlar preperatif TLC yaparak saflaştırıldı.

3.5 Sekonder Metabolitlerin Analizi

3.5.1 LC-HRMS metot geliştirme

Analizler, elektrosprey iyonizasyonlu (ESI) LC-HRMS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın başlangıcında optimizasyon yapılarak referans analit olarak kullanılan maddeler için uygun olan pozitif veya negatif iyonlaşma modları (m/z) belirlenmiştir. Optimizasyon, analitin direkt MS cihazına verilip iyonlaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Böylece analitler MS cihazına tanıtılmış oldu.

Daha sonra analitlerin karışım şeklinde metanolde çözülerek 80 ppm stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stoktan seyreltilerek 10,7,5,3,1,0.5,0.3, 0.1, 0.05, 0.01 ppm çözeltileri hazırlanıp LC-HRMS cihazına verilmiştir. Denemeler sonunda resolüsyonu en başarılı şekilde gerçekleştiren Troyasil C18 HS- 150 x 3 mm 5 µ kolonu LC'de kullanıldı. Hareketli faz olarak; (mobil faz A) % 1 formik asit – H₂O ,(mobil faz B) %1 formik

asit – MeOH şeklinde kullanıldı. Mobil fazların akış gradienti, ayrılamanın en iyi olduğu uygun gradient belirlenerek;

Gradient Time	Flow(mL/min)	% B
0.00	0.35	50
1.00	0.35	50
3.00	0.35	100
6.00	0.35	100
7.00	0.35	50
15.00	0.35	50

şeklinde uygulanmıştır. Ayrılma esnasında MS’de kullanılan parametreler;

Sistem: Thermo ORBITRAP Q-EXACTIVE

İyonKaynağı: ESI

KütleTaramaAralığı: 100-900 *m/z*

Sheathgas flow rate : 45

Auxgasflow rate : 10

Sprey voltage (kV) : 3.80

Capillarytemp. (°C) : 320

Auxgasheatertemp (°C) : 320

S-lens RF level : 50.0

Tanımlamalar: İLMER Kütüphanesi

şeklindedir.

3.5.2 Metot validasyonu

Farklı konsantrasyonlarda 3 tekrarlı yapılan ölçümler değerlendirilerek her bir analit için; ölçümlerin aritmetik ortalaması etrafındaki dağılım olan standart sapma tespit edilerek tekrarlanabilirliğin belirlenmesi amacıyla değişen konsantrasyon faktörünü ortadan kaldırıp çalışma aralığının tespiti için %RSD hesaplanmıştır. Çok sayıdaki ölçüm sonucunun gerçek değere yakınlığını belirlemek için % recovery(geri kazanım) hesaplanmıştır. Tayin limiti (LOD) olarak belirlenmiştir. Bu değer 3.3 katı LOQ (kantitatif tayin limiti) olarak belirlenmiştir ve istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır.

Analitlerin her bir konsantrasyon için verdiği absorpsanlar esas alınarak excell programı yardımıyla bilinmeyen analit konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan lineer regresyon denklemi ve bu denklemin doğrusal bir eğriyi sağlayıp sağlanamadığını doğrulamak için kullanılan R^2 hesaplandı. Bu denklemde doğrudan

aşırı sapmaya neden olan veriler hesaplama dışı bırakılarak doğrudaki noktalar üzerinden lineer aralık olarak adlandırılan çalışma aralığı belirlendi. Hesaplanan bu parametreler Tablo 3.3'te gösterilmiştir.



Tablo 3.3 : LC-HRMS Validasyon Parametreleri.

Madde Adı	Molekül Formülü	m/z	İyonizasyonModu	Lineer aralık	Lineer regresyon denklemleri	LOD/LOQ	R ²	Recovery	%RSD	U (%)
1 Ascorbicacid	C ₆ H ₈ O ₆	175,0248	Negatif	0.5-10	y=0.00347x-0.00137	0.39/1.29	0,9988	96,2	2,93	3,94
2 (-)-Epigallokateşin	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	307,0812	Pozitif	0.3-5	y=0.00317x+0.000443	0.17/0.57	0,9947	102,22	3,18	3,09
3 (-)-Epigallokateşingallate	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₁	459,0922	Pozitif	0.3-7	y=0.00182x+0.000026	0.1/0.33	0,9989	94,76	4,20	3,76
4 Klorojenikasit	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	353,0878	Negatif	0.05-10	y=0.00817x+0.000163	0.02/0.06	0,9994	96,68	3,93	3,58
5 Fumarikasit	C ₄ H ₄ O ₄	115,0037	Negatif	0.1-10	y=0.00061x-0.0000329	0.05/0.17	0,9991	97,13	2,95	2,88
6 Chicoricacid	C ₂₂ H ₁₈ O ₁₂	473,0726	Negatif	0.1-10	y=0.00237x-0.000218	0.03/0.1	0,9993	101,08	1,92	2,28
7 Orientin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0933	Negatif	0.1-10	y=0.00757x+0.000347	0.01/0.03	0,9993	96,22	4,16	3,67
8 Caffeicacid	C ₉ H ₈ O ₄	179,0350	Negatif	0.3-10	y=0.0304x+0.00366	0.08/0.27	0,9993	94,51	3,23	3,74
9 Caffeine	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	195,0877	Pozitif	0.05-7	y=0.122x+0.00366	0.01/0.03	0,9987	92,89	3,65	3,06
10 (+)- <i>trans</i> staxifolin	C ₁₅ H ₁₂ O ₇	303,0510	Negatif	0.3-10	y=0.0289x+0.00537	0.01/0.03	0,9978	91,66	3,26	3,35
11 Luteolin-7-rutinoside	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1512	Negatif	0.1-10	y=0.00879x+0.000739	0.01/0.03	0,9988	93,05	3,84	3,06
12 Vanilicacid	C ₈ H ₈ O ₄	167,0350	Negatif	0.3-10	y=0.00133x+0.0003456	0.1/0.33	0,9997	98,66	4,74	3,49
13 Naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	579,1719	Negatif	0.05-10	y=0.00576x-0.000284	0.01/0.03	0,9991	101,91	3,86	4,20
14 Luteolin 7-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0933	Negatif	0.1-7	y=0.0162x+0.00226	0.01/0.03	0,9961	96,31	3,56	4,14
15 p-Coumaricacid	C ₉ H ₈ O ₃	163,0401	Negatif	1+10	y=0.000324x-0.0000641	0.32/1.02	0,9988	117,01	4,01	3,31
16 Hesperidin	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	609,1825	Negatif	0.05-10	y=0.00423x+0.0000138	0.01/0.03	0,9994	96,14	3,23	3,79
17 Rosmarinik asit	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	359,0772	Negatif	0.05-10	y=0.00717x-0.0003067	0.01/0.03	0,9992	99,85	4,16	3,77
18 Hyperoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	Negatif	0.05-10	y=0.0072x-0.00003096	0.01/0.03	0,9995	96,62	3,77	3,46
19 Dihydrokaempferol	C ₁₅ H ₁₂ O ₆	287,0561	Negatif	0.3-7	y=0.0756x+0.0118	0.01/0.03	0,995	95,37	3,75	2,86
20 Apigenin 7-glucoside	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	431,0984	Negatif	0.3-7	y=0.0246x+0.00306	0.01/0.03	0,9962	96,07	4,61	3,59
21 Ellagicacid	C ₁₄ H ₆ O ₈	300,9990	Negatif	0.05-10	y=0.0085x-0.000612	0.03/1	0,9994	101,49	3,90	4,20
22 Quercitrin	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0933	Negatif	0.05-10	y=0.0179+0.0003331	0.01/0.03	0,999	97	4,76	3,78
23 Quercetin	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301,0354	Negatif	0.1-10	y=0.0509x+0.00467	0.01/0.03	0,9978	96,41	2,90	2,95
24 Salicylicacid	C ₇ H ₆ O ₃	137,0244	Negatif	0.3-10	y=0.0361x+0.00245	0.01/0.03	0,9982	92,88	3,97	1,89
25 Naringenin	C ₁₅ H ₁₂ O ₅	271,0612	Negatif	0.1-10	y=0.0281x+0.00182	0.01/0.03	0,9995	86,65	1,52	4,20
26 Luteolin	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	Negatif	0.1-10	y=0.117x+0.00848	0.01/0.03	0,9981	96,98	4,77	3,42

Tablo 3.3 (Devam) : LC-HRMS Validasyon Parametreleri.

Madde Adı	Molekül Formülü	m/z	İyonizasyonModu	Lineer aralık	Lineer regresyon denklemleri	LOD/LOQ	R ²	Recovery	%RSD	U (%)
27 Kaempferol	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	285,0405	Negatif	0.5-7	y=0.0827x+0.00953	0.01/0.03	0,9958	90,25	3,58	3,56
28 Apigenin	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	269,0456	Negatif	0.3-10	y=0.104x+0.0199	0.01/0.03	0,9998	81,55	4,07	2,87
29 Hispidulin	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	301,0707	Pozitif	0.05-10	y=0.02614x+0.0003114	0.01/0.03	0,9993	98,36	2,91	3,41
30 Isosakuranetin	C ₁₆ H ₁₄ O ₅	285,0769	Negatif	0.05-10	y=0.0235x+0.000561	0.01/0.03	0,9992	96,56	3,7	3,98
31 Penduletin	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343,0823	Negatif	0.3-10	y=0.0258x+0.00253	0.01/0.03	0,9991	83,43	4,59	3,2
32 Kafeik asit fenil ester	C ₁₇ H ₁₆ O ₄	283,0976	Negatif	0.3-7	y=0.255x+0.0477	0.01/0.03	0,9964	94,42	3,66	3,13
33 Chrysin	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	253,0506	Negatif	0.05-7	y=0.0964x-0.0002622	0.01/0.03	0,999	87,92	2,36	3,24

3.6 Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi

3.6.1 AChE aktivite testi

Asetilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi tayini için enzim olarak asetilkolinesteraz, substrat olarak ise asetiltiyokolin iyodür kullanılmıştır. Metot olarak ise Ellman metodu kullanılmıştır [151].

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

3.6.1.1 Reaktiflerin hazırlanışı

DTNB: 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7,5 mg NaHCO₃ 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 ml pH=7 tamponu ile hacmi 4 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 mL pH=8 tamponu eklendi.

Substrat: 32,8 mg asetilkolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 ml pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

Enzim Çözeltisi: 0,2 mg asetilkolinesteraz enzimi 3 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözülerek hazırlandı.

3.6.1.2 AChE % inhibisyon testi

Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu.

Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi.

10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (20 µL) her bir kuyucuğa ilave edildi.

Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan V_{max} değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.

Aktivite gösteren bileşiklerin seri halinde, 0,5 mM dan 0,125 mM'a kadar seyreltilmiş çözeltileri hazırlanarak IC₅₀ değerleri de aynı işlemler tekrarlanarak hesaplandı.

3.6.2 BChE aktivite testi

Butirilkolinesteraz inhibitör aktivitesi için enzim olarak butirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanılmaktadır.

3.6.2.1 Reaktiflerin hazırlanışı

DTNB: 16 mg DTNB 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü, 7,5 mg NaHCO₃ 1 mL fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü ve iki çözelti karıştırıldı. Daha sonra 2 mL pH=7 tamponu ile hacmi 4 mL'ye tamamlandı. Kullanmadan önce 4 mL pH=8 tamponu eklendi.

Substrat: 4 mg butirilkolin iyodür 8 mL deiyonize suda çözüldü. Kullanmadan önce 8 mL pH=8 tamponu ile hacmi 16 mL'ye tamamlandı.

Enzim Çözeltisi: 0,2 mg butirilkolinesteraz enzimi 1,8 mL fosfat tamponunda (pH=8) çözülerek hazırlandı.

3.6.2.2 BChE % İnhibisyon Testi

Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve enzim çözeltisinden 20 µL konuldu.

Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi

10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat (20 µL) her bir kuyucuğa ilave edildi. Standart olarak galantamin kullanıldı.

Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve absorbanslardan V_{max} değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.

3.7 Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Absorbans ölçümleri, Varian CARY 1E UV-görünür alan spektrofotometresi (CA, USA) kullanılarak yapılmıştır.

3.7.1 CUPRAC Yöntemi

CUPRAC toplam antioksidan kapasite (TAC) tayin yönteminin [150] esaslı, 2,9-dimetil-1,10-fenantrolin (Nc)'in Cu(II) ile oluşturduğu Cu(II)-Nc kompleksinin

antioksidan bileşikler varlığında 450 nm’de maksimum absorbans veren Cu(I)-Nc kelatına indirgenmesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, bir deney tüpü içerisine 10 mM Cu(II) çözeltisi, 7.5 mM Nc çözeltisi ve 1 M NH₄CH₃COO tamponundan sırasıyla 1’er mL eklendi. Üzerine (x) mL 1 mg/mL bitki ekstraktı ve (1.1-x) mL H₂O ilave edilip iyice çalkalandı. Toplam hacim 4.1 mL olacak şekilde çözeltiler hazırlandıktan sonra tüpler oda koşullarında ağzı kapalı olarak 30 dakika boyunca bekletildi. İnkübasyon sonunda referans çözeltiliye karşı, oluşan Cu(I)-Nc kelatının renginin karakteristik dalgaboyu olan 450 nm’de absorbans değerleri ölçüldü.

Aşağıdaki yöntemlere göre TR’un molar absorptivitesi:

$$\epsilon_{TR} = 1.67 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (CUPRAC yöntemi);}$$

$$\epsilon_{TR} = 2.6 \times 10^4 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (ABTS yöntemi);}$$

$$\epsilon_{TR} = 4.65 \times 10^3 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1} \text{ (DPPH yöntemi).}$$

Bitki ekstraktlarının troloks ekivalenti antioksidan kapasiteleri (mmol TR g⁻¹ cinsinden) aşağıdaki denkleme (3.1) göre hesaplandı:

$$\text{TAC (mmol TR g}^{-1}\text{)} = (A_f / \epsilon_{TR}) (V_f / V_s) (1 / c) \quad (3.1)$$

c = bitki ekstraktı konsantrasyonu

V_s = Bitki ekstraktından analiz için alınan hacim

V_f = Reaktifler ilave edildikten sonraki son hacim

A_f = Ölçülen absorbans değeri

3.7.2 ABTS Yöntemi

Bu yöntem [152]; 2,2’-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonat) (ABTS) kromojen radikal katyonunun absorbansının hidrojen verici antioksidanlar tarafından inhibe edilmesine dayanan bir TAC yöntemidir. Kullanıma hazır hale gelen mavi-yeşil renkli ABTS^{•+} çözeltisi EtOH ile 1:10 oranında dilüe edildi. Bu yöntemde 1 mL ABTS^{•+} çözeltisine ve 4 mL EtOH ilave edilip 734 nm’de 6. dakika sonundaki absorbans değerleri tespit edildi. Daha sonra 1 mg/mL bitki ekstraktlarından (x mL) örnek alınıp üzerine 1 mL ABTS^{•+} çözeltisi ve (4-x) mL EtOH ilave edildi. Ardından aynı dalgaboyunda 6. dakikadaki absorbansı ölçüldü. Radikalin başlangıç absorbans

değerinden bitki ekstraktının bulunduğu çözeltinin absorbansı çıkarılarak ΔA değerleri elde edildi. TAC_{ABTS} sonuçları, mmol TR/g olarak verilmiştir.

3.7.3 DPPH Yöntemi

Bu yöntem [153]; antioksidanların kararlı bir serbest radikal olan DPPH \cdot (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) radikalini süpürücü etkilerini ölçmeye dayalı bir yöntemdir. Bu radikal hidrojen donörlerle etkileştiğinde hidrazine indirgenir. Bu yöntemde, bir deney tüpü içerisine 2.65 mL MeOH ve 1 mL 0.1 mM DPPH çözeltisi eklenip 30 dakika oda koşullarında bekletildikten sonra başlangıç DPPH \cdot çözeltisinin absorbans değerleri ölçüldü. Başka bir deney tüpüne, bitki ekstraktı (x mL), 2.65 mL MeOH ve 1 mL 0.1 mM DPPH çözeltisi ilave edilip 30 dakika sonra absorbans değerleri kaydedildi. Radikalin absorbans değerinden örneğin bulunduğu çözeltinin absorbansı çıkarılarak ΔA değerleri elde edildi. TAC_{DPPH} sonuçları, mmol TR/g olarak verilmiştir.

4.BULGULAR

4.1 Sekonder Metabolit Analiz Sonuçları

Metanolde çözülen *Satureja pilosa* ve *Satureja icarica* DCM, aseton ve metanol ardışık ekstreleri direkt alınan tüm bitkinin MeOH ekstreleri LC-HRMS cihazına verildi. Ekstrelerde 59 sekonder metabolitin taraması yapıldı. *S.pilosa*'nın ekstrelerinde 22-30, *S.icarica*'nın ekstrelerinde 21-30 bileşik raporlanmıştır. *S.pilosa*'nın ekstrelerinde 22-30, *S.icarica*'nın ekstrelerinde 21-30 bileşik raporlanmıştır. *S.pilosa*'nın tüm aseton ve metanol, *S.icarica*'nın tüm metanol ekstrelerinde ve SİD-Ac ekstresinde en yüksek miktardaki sekonder metabolit rosmarinik asit olarak tespit edilirken, SİY-D naringenin, SPY-D,SPD-D,SİD-D ekstrelerinde ise penduletin tespit edilen en yüksek miktardaki sekonder metabolit olmuştur. *S.icarica* için yüksek basit fenolik ve fenolik asitlerin miktarı 2774,50 mg/kg ile tüm bitkinin direkt MeOH ekstresinde tespit edildi. Yine aynı bitkinin SİY-A ekstresinde en yüksek toplam flavanoid 41717,67 mg/kg olarak tespit edildi. Bu toplam flavanoidin 10767,10 mg/kg'ı flavanoid glikoziti olarak tespit edildi. *S.pilosa* için en yüksek basit fenolik ve fenolik asitlerin miktarı 1081,20 mg/kg şeklinde tüm bitkinin Direkt MeOH ekstresinde tespit edildi. Yine aynı bitkinin tüm bitki direkt MeOH ekstresinde en yüksek toplam flavanoid 23154,02 mg/kg olarak tespit edildi. Bu toplam flavanoidin 20570,42 mg/kg'ı flavanoid glikoziti olarak tespit edildi. Sonuçlar Tablo 4.1 ve Tablo 'de verilmiştir. Aşağıda ekstrelerin LC-HRMS kromatogramları da verilmiştir.

Tablo 4.1 : *Satureja icarica* LC-HRMS sekonder metabolit tarama sonuçları.

<i>Satureja icarica</i>								
Madde Adı	DCM (mg/kg)		Ace (mg/kg)		MeOH (mg/kg)		MeOH (mg/kg) direkt	
	Yaprak	Dal	Yaprak	Dal	Yaprak	Dal	Bütün Bitki	
1 Ascorbic acid	<LOD	14,76	208,59	160,84	100,23	321,71	2774,50	
2 (-)-Epigallokateşingallate	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	8,43	<LOD	<LOD	
3 Chlorogenic acid	0,44	5,32	145,58	180,87	194,66	356,40	267,69	
4 Fumaric acid	<LOD	<LOD	1333,59	<LOD	1881,30	3392,58	3600,62	
5 Chicoric acid	2,22	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
6 Orientin	<LOD	0,05	25,08	13,23	12,84	4,66	29,34	
7 Caffeic acid	9,68	23,95	1057,97	6128,91	200,21	1408,48	1231,62	
8 Caffeine	0,39	1,57	6,43	2,46	0,63	1,17	<LOD	
9 (+)- <i>trans</i> taxifolin	271,87	12,24	12012,22	613,93	146,89	24,21	871,35	
10 Luteolin-7-rutinoside	9,48	139,84	9764,40	22920,01	6533,41	10530,45	29972,00	
11 Vanilic acid	<LOD	79,00	<LOD	738,31	486,42	4843,15	1411,97	
12 Naringin	1,35	12,77	2857,02	1446,95	1764,55	280,52	1425,81	
13 Luteolin 7-glucoside	0,27	1,94	631,56	163,68	224,37	122,82	1178,94	
14 Hesperidin	13,22	76,56	6254,04	4062,19	2322,30	1396,70	6658,48	
15 Rosmarinic acid	<LOD	506,89	3029,91	80242,87	22277,63	40973,28	37910,09	
16 Hyperoside	<LOD	1,19	359,83	197,09	117,13	90,13	246,32	
17 Dihidrokaempferol	985,52	22,38	4117,36	310,56	55,21	10,39	802,99	
18 Apigenin 7-glucoside	0,62	0,56	184,88	30,77	35,01	11,80	62,55	
19 Ellagic acid	<LOD	7,26	1804,37	456,42	10,73	13,30	<LOD	
20 Quercitrin	<LOD	0,05	186,27	56,07	34,52	16,49	58,00	
21 Quercetin	21,98	<LOD	1139,17	50,31	26,20	6,81	66,28	

Tablo 4.1 (devam) : *Satureja icarica* LC-HRMS sekonder metabolit tarama sonuçları.

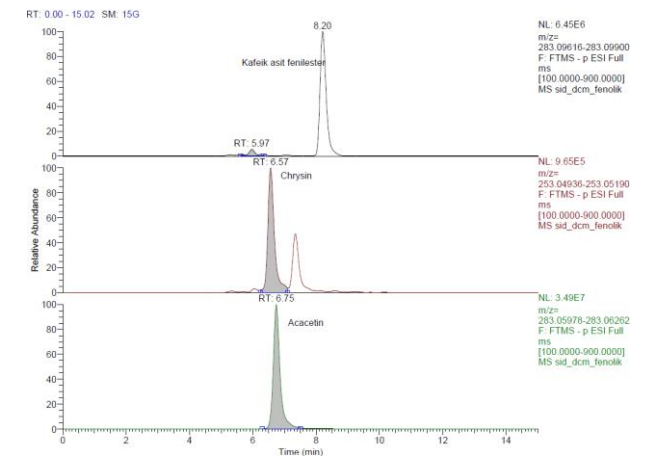
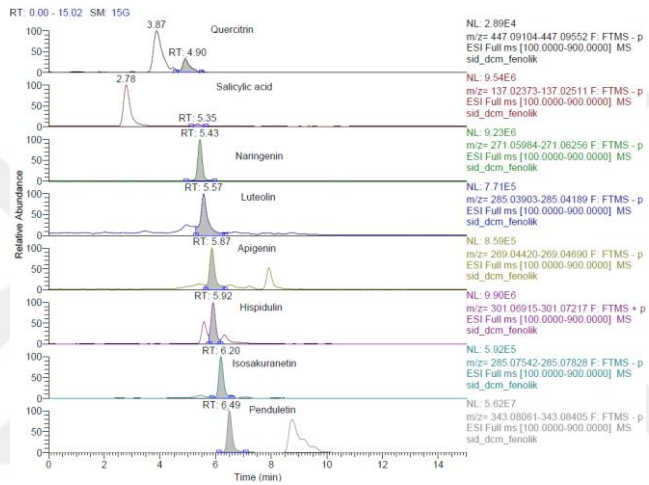
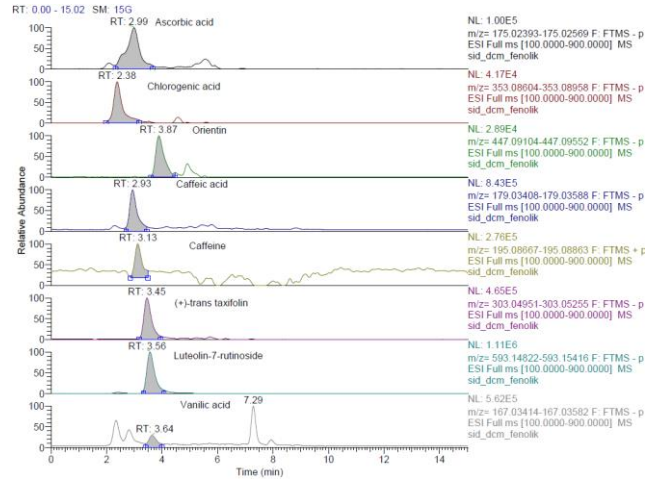
<i>Satureja icarica</i>							
Madde Adı	DCM (mg/kg)		Ace (mg/kg)		MeOH (mg/kg)		MeOH (mg/kg) direkt
	Yaprak	Dal	Yaprak	Dal	Yaprak	Dal	Bütün Bitki
22 Salicylic acid	11,27	9,34	74,41	89,63	33,23	77,88	162,60
23 Naringenin	7000,02	196,35	10039,20	1149,03	225,71	70,98	1439,93
24 Luteolin	58,90	3,70	1883,02	592,37	132,56	299,02	431,53
25 Apigenin	205,28	4,14	1744,91	256,42	100,14	58,89	154,87
26 Hispidulin	<LOD	238,90	1686,19	1794,07	209,41	833,21	152,59
27 Isosakuranetin	64,87	16,18	82,79	7,79	4,25	1,74	7,97
28 Penduletin	5803,82	1396,69	2285,52	512,42	72,47	54,14	862,03
29 Kafeik asit fenilester	22,37	16,86	10,80	3,09	0,06	0,13	<LOD
30 Chrysin	25,19	7,23	14,69	7,56	0,80	2,54	1,97
31 Acacetin	2361,61	592,67	2137,06	358,08	73,30	51,69	726,18
Basit fenolik ve fenolik asitler	<LOD	14,76	208,59	160,84	100,23	321,71	2774,50
Toplam flavonoid	8579,1383	388,41316	41717,67	26150,711	7514,8257	11154,397	35040,414
Flavonoid glikoziti	10,37	142,38	10767,10	23170,53	6827,31	10681,56	31271,50

Tablo 4.2 : Satureja pilosa LC-HRMS sekonder metabolit tarama sonuçları.

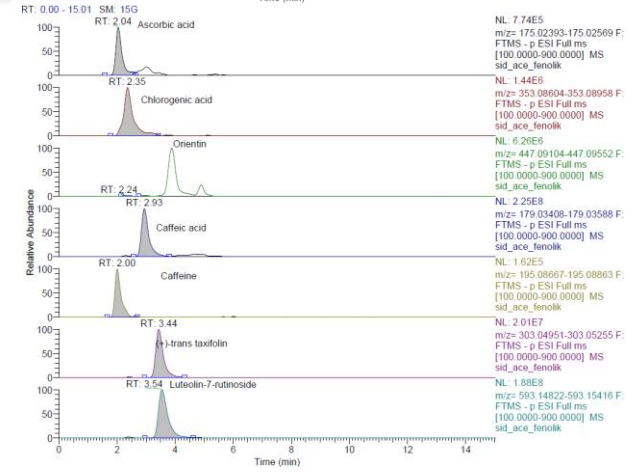
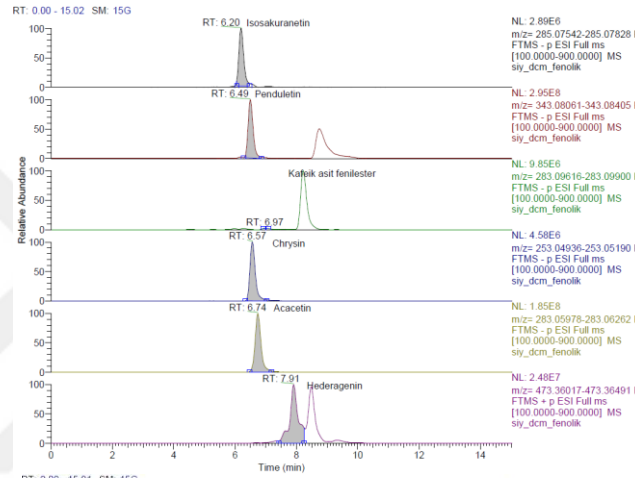
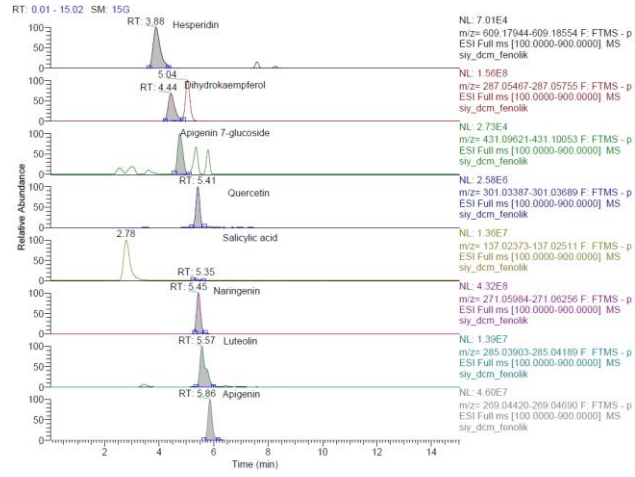
		<i>Satureja pilosa</i>						MeOH
		DCM (mg/kg)		Ace (mg/kg)		MeOH (mg/kg)		(mg/kg)
								direkt
Madde Adı		Yaprak	Dal	Yaprak	Dal	Yaprak	Dal	Bütün Bitki
1	Ascorbic acid	<LOD	20,08	52,26	58,55	110,71	123,31	1081,20
2	(-)-Epigallocatechin	<LOD	<LOD	197,20	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
3	(-)-Epigallocateşin gallate	<LOD	2,20	<LOD	1,09	37,49	2,80	<LOD
4	Chlorogenic acid	2,00	10,46	48,55	129,39	208,78	246,52	163,57
5	Fumaric acid	<LOD	203,97	237,90	459,82	2922,00	2480,38	5392,74
6	Chicoric acid	2,49	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
7	Orientin	<LOD	0,51	8,62	1,94	18,95	1,70	43,02
8	Caffeic acid	11,18	17,83	396,15	1623,05	285,83	488,46	3820,65
9	Caffeine	3,05	1,98	9,08	1,04	1,14	1,19	<LOD
10	(+)- <i>trans</i> taxifolin	109,10	3,65	519,45	345,71	61,56	0,00	230,91
11	Luteolin-7-rutinoside	20,06	227,60	3254,77	6332,72	5117,59	3474,71	19618,39
12	Vanilic acid	<LOD	82,54	<LOD	<LOD	797,65	1391,24	534,21
13	Naringin	4,37	58,94	1817,91	1210,47	5591,66	246,89	12574,01
14	Luteolin 7-glucoside	0,93	7,39	231,17	192,60	313,61	89,21	827,93
15	Hesperidin	70,98	630,02	4627,72	11800,81	155,67	4951,52	16917,60
16	Rosmarinic acid	<LOD	903,57	10144,53	51086,79	38867,40	27245,10	41361,51
17	Hyperoside	<LOD	4,85	123,36	191,82	208,50	44,56	215,21
18	Dihydrokaempferol	766,82	9,84	546,90	188,57	35,61	3,43	323,37
19	Apigenin 7-glucoside	1,50	1,15	22,60	12,97	23,04	5,56	59,95
20	Ellagic acid	<LOD	1,84	2,72	40,92	2,35	3,41	<LOD

Tablo 4.2 (devam) : *Satureja pilosa* LC-HRMS sekonder metabolit tarama sonuçları.

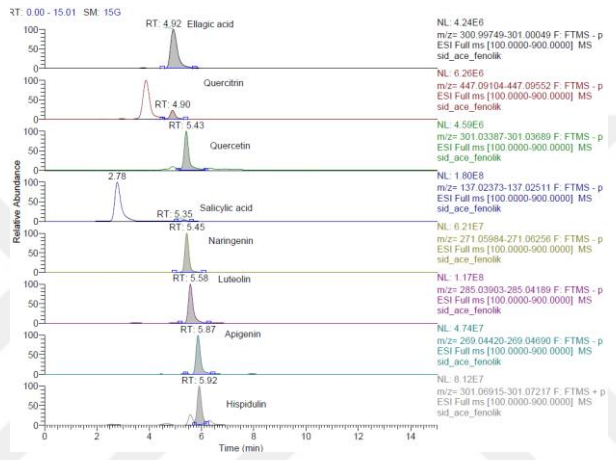
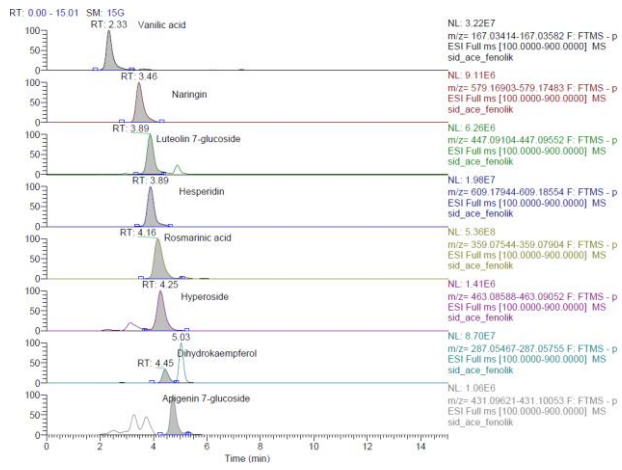
		<i>Satureja pilosa</i>						MeOH (mg/kg) direkt
		DCM (mg/kg)		Ace (mg/kg)		MeOH (mg/kg)		
	Madde Adı	Yaprak	Dal	Yaprak	Dal	Yaprak	Dal	Bütün Bitki
21	Quercitrin	<LOD	0,78	30,15	35,89	43,56	9,95	64,15
22	Quercetin	10,34	0,54	64,39	25,49	8,53	1,07	52,22
23	Salicylic acid	29,22	9,13	<LOD	56,88	60,66	62,49	187,62
24	Naringenin	7381,01	141,43	1917,05	1058,32	269,03	5,44	873,08
25	Luteolin	64,27	5,56	828,83	367,46	237,03	105,65	880,65
26	Apigenin	212,91	3,97	410,88	157,84	104,61	16,44	222,45
27	Hispidulin	1562,85	233,99	3078,37	1486,16	824,67	384,77	274,34
28	Isosakuranetin	473,29	97,77	181,73	95,25	48,06	1,24	27,38
29	Penduletin	21190,16	3590,01	948,25	757,77	136,15	85,40	3869,07
30	Kafeik asit fenilester	45,30	22,58	1,16	1,57	0,13	0,23	<LOD
31	Chrysin	25,04	7,71	66,76	8,10	1,31	2,73	0,93
32	Acacetin	2456,43	447,18	338,52	197,13	68,49	30,80	287,77
	Basit fenolik ve fenolik asitler	<LOD	20,08	52,26	58,55	110,71	123,31	1081,20
	Toplam flavonoid	8591,99	409,62	8090,14	8725,66	6215,49	3714,20	23154,02
	Flavonoid glikoziti	22,49	236,92	3538,69	6574,18	5497,80	3579,43	20570,42



Şekil 4.1 : SİD-D LC-MS sekonder metabolit kromatogramı.



Şekil 4.2 : SİY-D LC-HRMS Sekonder metabolit kromatogramı.



Şekil 4.3 : SİD-A LC-HRMS kromatogramı.

4.2 Asetikolinesteraz ve Bütirilkolinesteraz Aktivite Tayin Sonuçları

Satureja pilosa ve *Satureja icarica* türlerine ait ekstreler ve ursolik asit ve oleanolik asit, AChE ve BChE enzimlerine karşı inhibisyonları farklı konsantrasyonlarda Ellman metoduyla ölçülmüş ve sonuçlar % inhibisyon değeri olarak verilmiştir. Standart olarak galantamin kullanılmıştır. Yapılan literatür araştırmasında *Satureja pilosa* için AChE aktivitesi hakkında bilgi veren bir çalışma bulunamamıştır. *S. icarica*'nın ise Kavcı tezinde[25] AChE aktivitesini araştırmış ve bitkini AChE aktivitesi göstermediğini, BchE aktivitesini ise 3.18 ± 0.18 mg GALAE/g şeklinde rapor etmiştir. Çalışmamızda her iki bitkinin ekstrelerinin de yüksek AChE aktivitesi gösterdiğini tespit ettik. Bu yönteme ait bulgular Tablo 4.3 ve Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.3 : AChE Aktivite Deney Sonuçları.

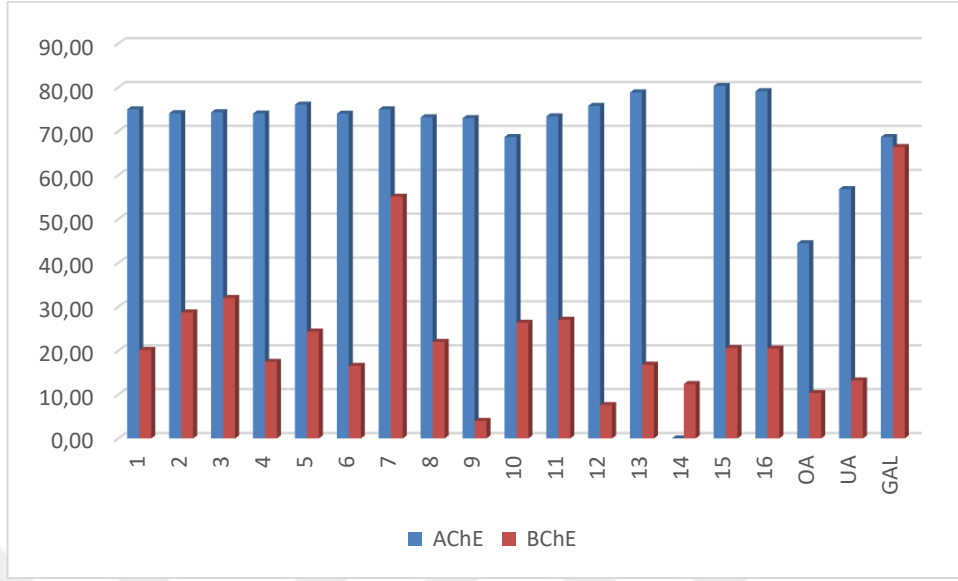
Asetilkolinesteraz (AChE) (% Inhibisyon)																			
Con.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	OA	UA	GAL
200µg/mL	81	81,3	80,3	79	80,3	78	82	80	78	82	81	84	81,9	88,7	87,5	83,1	82,1	71,9	89,5
100µg/mL	77	77,7	77,8	76,2	78,9	77	78	76	77	77,1	78	81	80,4	80	83,3	81,3	79,7	72,2	80
50 µg/mL	75,4	76	75,9	75,4	77,8	75	77	75	75	74,1	76	78	78,9	78,9	81,1	80,8	55,6	68,9	79,5
25 µg/mL	75	74,1	74,3	74	76,1	74	75	73	73	68,7	73	76	78,9	-	80,3	79,1	44,5	56,8	68,7

1.SPY-M-a 2.SPY-A; 3.SİY-A; 4.SİD-A; 5.SİD-D; 6.SPD-D; 7.SİY-D; 8.SPD-A; 9.SİY-M-a; 10.SPY-D; 11.SPD-M-a; 12.SİD-M-a; 13.SPD-M; 14.SİD-M; 15.SPY-M; 16.SİY-M; UA:Ursolik asit; OA:Oleanolik asit; GAL:Galantamin

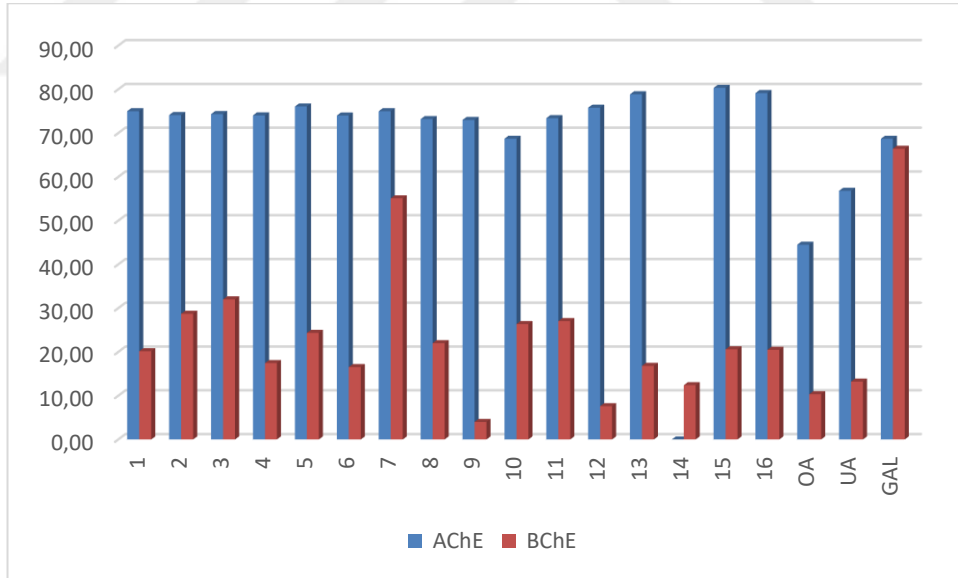
Tablo 4.4 : AChE Aktivite Deney Sonuçları.

Bütirikolinesteraz (BchE)(% inhibisyon)																			
Con.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	OA	UA	GAL
200µg/mL	30,8	40	68,4	55,3	52	45	70,2	48,9	24	72,6	51,8	25	38,6	24	43	34,6	25,2	42	87,9
100µg/mL	26,61	38	57,3	30,2	45,3	34,4	62,5	38,9	12	64,2	39,3	20	31,8	18	35	30,2	23	38,7	82,4
50 µg/mL	23,22	30,1	48,9	23,6	35,5	26,4	58,9	30,4	10,2	53,8	33,6	14	22,5	16	25	26,8	21,5	30,3	74,9
25 µg/mL	20,16	28,7	32	17,5	24,4	16,5	55,1	22	4	26,4	27	7,6	16,8	12	21	20,5	10,3	13,2	66,4

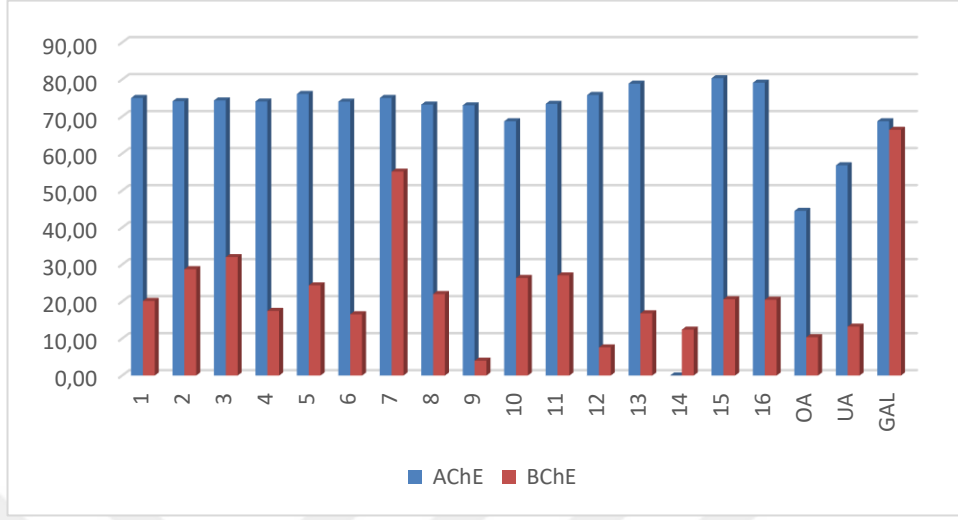
1.SPY-M-a 2.SPY-A; 3.SİY-A; 4.SİD-A; 5.SİD-D; 6.SPD-D; 7.SİY-D; 8.SPD-A; 9.SİY-M-a; 10.SPY-D; 11.SPD-M-a; 12.SİD-M-a; 13.SPD-M; 14.SİD-M; 15.SPY-M; 16.SİY-M; UA:Ursolik asit; OA:Oleanolik asit; GAL:Galantamin



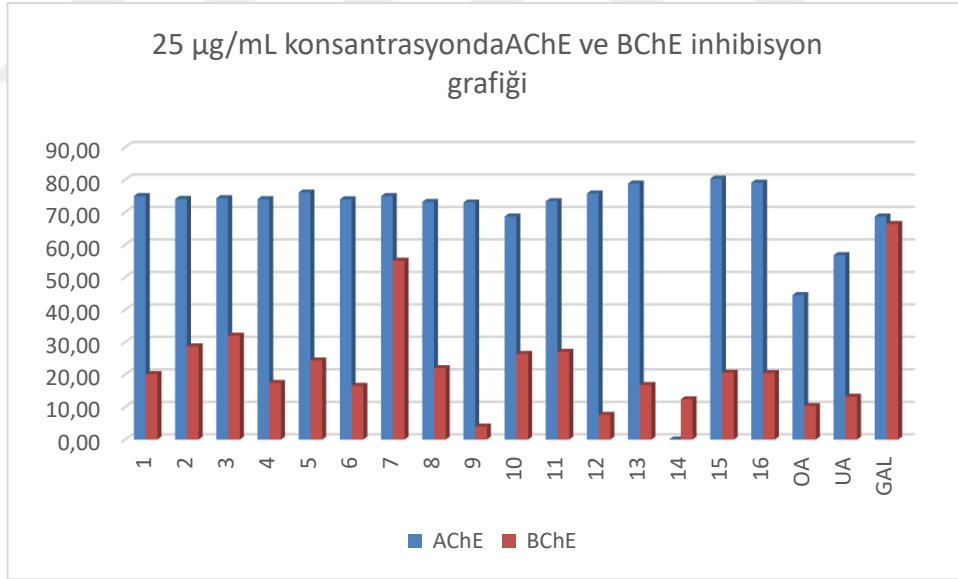
Şekil 4.4 : S.icarica ve S.pilosa ekstrlerinin 200µg/mL konsantrsyonda AChE ve BChE inhibisyon grafiği.



Şekil 4.5 : S.icarica ve S.pilosa ekstrlerinin 100µg/mL konsantrsyonda AChE ve BChE inhibisyon grafiği.



Şekil 4.6 : S.icarica ve S.pilosa ekstralarının 50µg/mL konsantrsyonda AChE ve BchE inhibisyon grafiği.



Şekil 4.7 : S.icarica ve S.pilosa ekstralarının 25µg/mL konsantrsyonda AChE ve BchE inhibisyon grafiği.

4.3 Antioksidan Aktivite Tayin Sonuçları

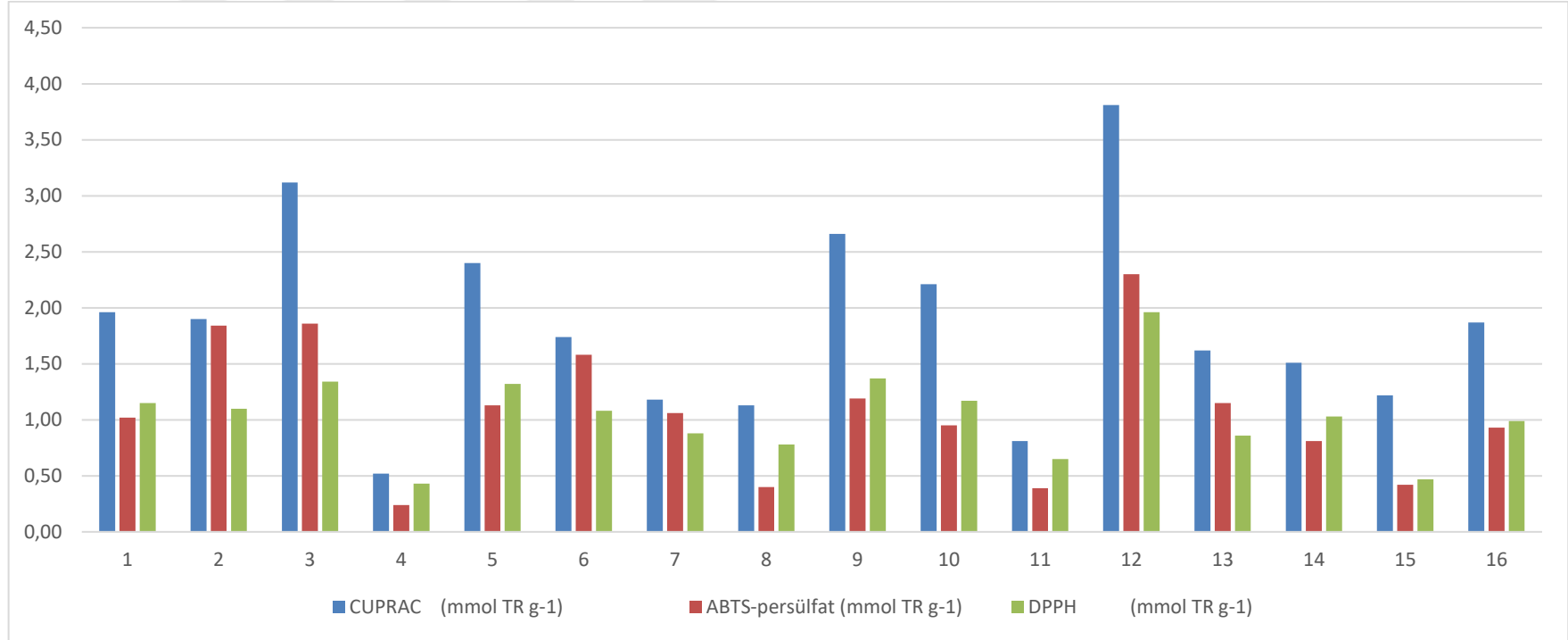
Bitki ekstralarının TAC değerleri CUPRAC, ABTS-persülfat ve DPPH yöntemleri uygulanarak mmol TR g-1 cinsinden belirlenmiştir (Tablo 4.5). TAC sonuçları birbiriyle karşılaştırılmıştır.

Spektrofotometrik TAC sonuçları birbirleri arasında iyi korelasyon göstermiştir. TAC_{ABTS} ve TAC_{DPPH} 'ın bir fonksiyonu olarak TAC_{CUPRAC} sonuçlarının lineer korelasyon katsayıları (r^2) sırasıyla 0.901 ve 0.824 olarak bulunmuştur. (n-2) serbestlik derecesi için, test edilen değişkenler arasında anlamlı bir korelasyon olduğunu doğrulamıştır. SİD-A ekstresi, üç farklı yöntemle göre en yüksek TAC değerine sahiptir.

Tablo 4.5 : Bitki ekstralarının toplam antioksidan kapasitelerinin (TAC) CUPRAC, ABTS-6 persülfat ve DPPH yöntemleriyle ölçümü.

Örnek	TAC_{CUPRAC} (mmol TR g-1)	$TAC_{ABTS-persülfat}$ (mmol TR g-1)	TAC_{DPPH} (mmol TR g-1)
1	1.96±0.07	1.02±0.04	1.15±0.04
2	1.90±0.05	1.84±0.06	1.10±0.03
3	3.12±0.11	1.86±0.03	1.34±0.04
4	0.52±0.02	0.24±0.01	0.43±0.01
5	2.40±0.07	1.13±0.09	1.32±0.11
6	1.74±0.03	1.58±0.05	1.08±0.09
7	1.18±0.05	1.06±0.05	0.88±0.04
8	1.13±0.04	0.40±0.01	0.78±0.02
9	2.66±0.12	1.19±0.08	1.37±0.12
10	2.21±0.11	0.95±0.02	1.17±0.10
11	0.81±0.02	0.39±0.01	0.65±0.03
12	3.81±0.17	2.30±0.12	1.96±0.11
13	1.62±0.07	1.15±0.07	0.86±0.02
14	1.51±0.06	0.81±0.03	1.03±0.04
15	1.22±0.02	0.42±0.01	0.47±0.01
16	1.87±0.11	0.93±0.03	0.99±0.07

1.SPD-M; 2.SPD-M-a; 3.SPD-Ac-a; 4.SPD-D; 5.SPY-M-a; 6.SPY-M; 7.SPY-Ac-a; 8.SPY-D; 9.SİD-M-a; 10.SİD-M; 11.SİD-D; 12.SİD-Ac-a; 13.SİY-M; 14.SİY-M-a; 15.SİY-D; 16.SİY-Ac-a

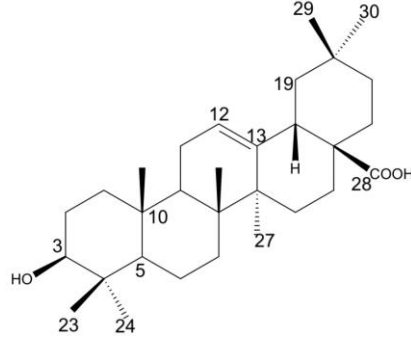


Şekil 4.8 : Bitki ekstralarının (TAC) CUPRAC, ABTS-persülfat ve DPPH yöntemleriyle ölçüm sonuçlarının grafiği.

1.SPD-M; 2.SPD-M-a; 3.SPD-Ac-a; 4.SPD-D; 5.SPY-M-a; 6.SPY-M; 7.SPY-Ac-a; 8.SPY-D; 9.SİD-M-a; 10.SİD-M; 11.SİD-D; 12.SİD-Ac-a; 13.SİY-M; 14.SİY-M-a; 15.SİY-D; 16.SİY-Ac-a

4.4 Saf Bileşiklerin İzolasyonu ve Yapı tayini

4.4.1 SPY-D-4-2-a. Oleanolik asit=3β-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit



Şekil 4.9 : Oleanolik asit.

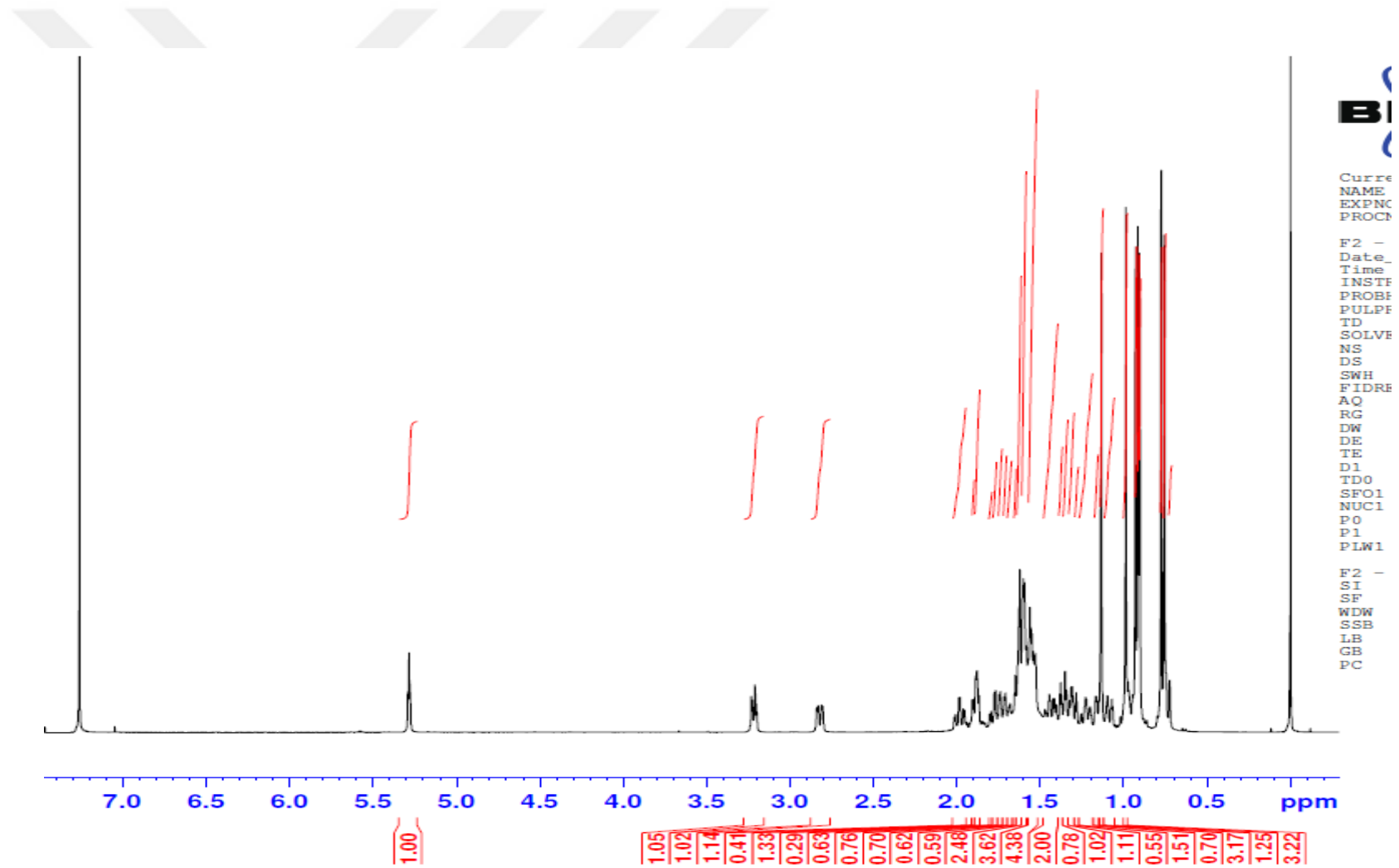
Kloroform: aceton (1:1) çözücü sisteminden 4. Fraksiyonda gelen beyaz renkli bileşik katı toz halde elde edildi. Silika jel kaplı TLC plakta UV lambada (254nm) spot gözlemlenmedi, serik sülfat belirteci püskürtülüp 105°C’de yakıldığında spot önce koyu sarı daha sonra menekşe renk aldı.

¹H NMR spektrumunda 0.72-1.15 ppm arasında çıkan 7 metil sinyali yapının bir triterpen olduğu konusunda fikir vermiştir. Bileşiğin ¹³C-NMR spektrumu incelendiğinde 180.02 ppm de çıkan pik yapıda karboksilik asit olduğunu düşündürdü. 3.20’ppm deki dd şeklinde izlenen pik 3 numaralı C’da yine ikincil bir -OH grubunun varlığını gösterdiğini düşündürdü. Spektral veriler elimizdeki bileşiğin -OH, karboksilik asit ve çifte bağ, bu triterpenin oleanolik asit veya ursolik asit olduğunu düşündürdü. Ursolik asitin oleanolik asitten tek farkı ¹H NMR spektrumunda 7 metil grubundan 5’ inin singlet, diğer 2 metil grubunun ise dublet olarak izlenmesidir. Birbirinin izomeri olan oleanolik asit ile ursolik asiti ¹H NMR da ayıran en karakteristik özellik budur.

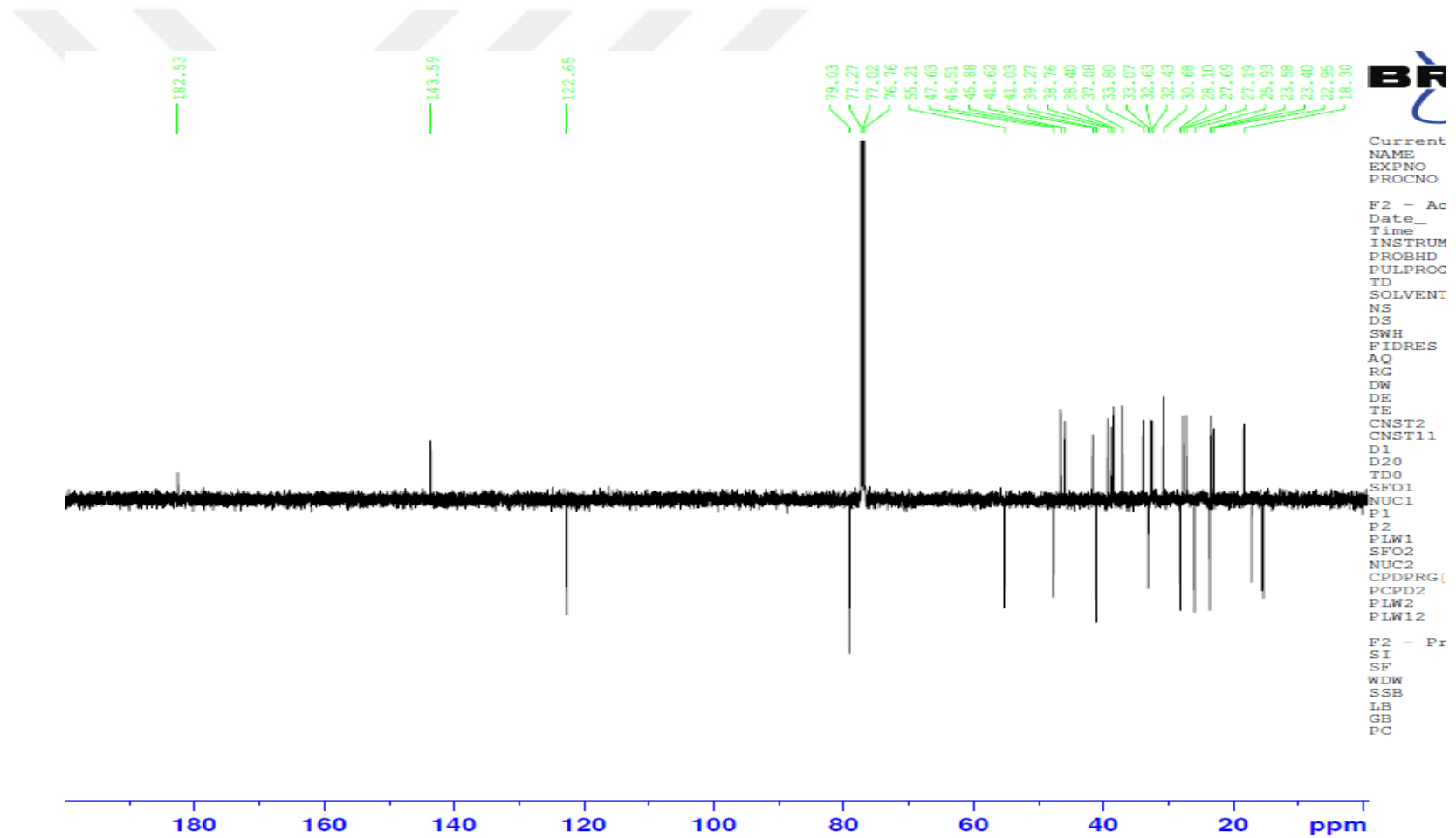
5.27 ppm’deki dar triplet ise (3.7 Hz) moleküldeki C12’deki olefinik bağ için spesifiktir. H-19 ile etkileşen H-18 sinyalinin verdiği yarımla ve kayma değeri de yine oleanolik asit için oldukça karakteristik. Nitekim bileşiğin β konumundaki H-18 sinyali C-19 protonlarıyla 4.1 ve 9.6 Hz lik etkileşim değeri vererek karakteristik bir dd piki 2.8 ppm’de gözlenmiştir.

Tüm spektral veriler ve literatür verilerine dayanarak ayrıca standart örnekle de ince tabaka kromatografisinde kıyaslanarak yapının kesin olarak oleanolik asit (Şekil 4.9) olduğu tespit edilmiştir.



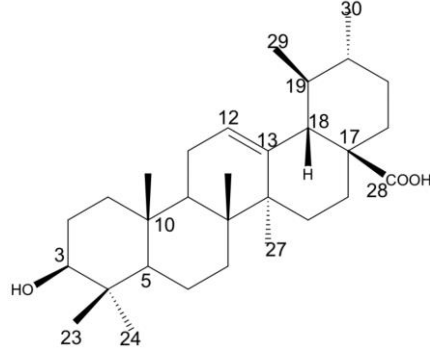


Şekil 4.10 : SPY-D-4-2-a. Oleanolik asit=3 β -hidroksi-olean-12-en-28-oik asit 1H-NMR.



Şekil 4.11 : SPY-D-4-2-a. Oleanolik asit=3β-hidroksi-olean-12-en-28-oik asit ¹³C-NMR.

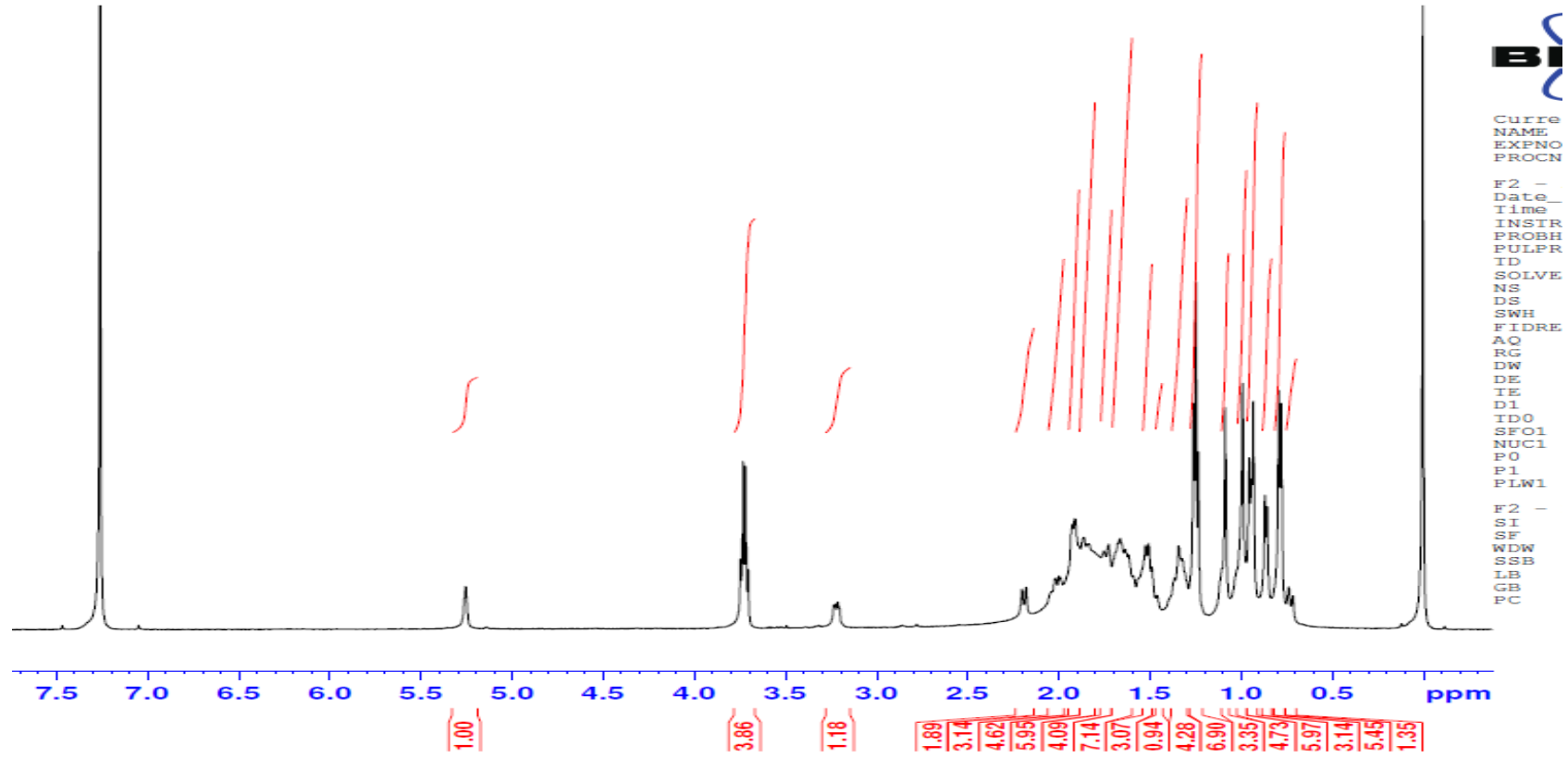
4.4.2 SPY-D-4-2-b. Ursolik asit= 3β-hidroksi-12-ursen-28-oik asit



Şekil 4.12 : Ursolik asit.

Kloroform: aceton (1:1) çözücü sisteminden 4. Fraksiyonda gelen beyaz renkli bileşik katı toz halde elde edildi. Silikajel TLC plakta UV lamba altında (254nm) gözlenmeyen spot, serik sülfat belirteci püskürtülüp 105°C’de yakıldığında menekşe renk aldı.

¹H NMR spektrumunda bu kez 0.77-1.08 ppm ler arasında beş metil singleti ve 0.86 ppm ile 0.78 ppm de çıkan 6,3 ve 6.7 Hz lik iki metil dupleti (sırasıyla Me-29 ve Me-30) bileşiğin ursan yapısında bir triterpen olduğunu düşündürdü. Referans ursolik asitle TLC yapılan ve ¹H-NMR bulguları incelenip literatür verileri ile karşılaştırıldığında birbiri ile örtüşen veriler, bize bu yapının *Satureja* türlerinden daha önce de izole edilen ve ursolik asit (Şekil 4.12) olduğunu göstermiştir.



Şekil 4.13 : SPY-D-4-2-b. Ursolik asit= 3 β -hidroksi-12-ursen-28-oik asit 1H-NM

5.TARTIŞMA

Literatür taramasında *Satureja pilosa*'nın sekonder metabolitleri hakkında Nikolova'nın yaptığı çalışma [66], *Satureja icarica*'nın sekonder metabolitleri hakkında ise Askun T.'nin yaptığı [32] çalışma tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda *S.pilosa*'nın 2, *S.icarica*'nın ise 12 sekonder metaboliti rapor edilmiştir. Çalışmamızda ise 59 sekonder metabolit için ekstraler araştırıldı ve *S.pilosa*'nın ekstrelerinde 22-30, *S.icarica*'nın ekstrelerinde 21-30 bileşik raporlandı. *S.pilosa*'nın tüm aseton ve metanol, *S.icarica*'nın tüm metanol ekstrelerinde ve SİD-Ac ekstresinde en yüksek miktardaki sekonder metabolit rosmarinik asit olarak tespit edilirken, SİY-D naringenin, SPY-D,SPD-D,SİD-D ekstrelerinde ise penduletin tespit ettiğimiz en yüksek miktardaki sekonder metabolit olmuştur.

Bitkilerin aktivitelerine baktığımızda Nikolova ve ekibinin [66] yaptığı çalışmada *S.pilosa*'nın antioksidan ve antibakteriyel, Semerdijevave ekibin [67] yaptığı çalışmada bitkinin antisivrisinek aktivitesini araştırırken, Kavcı tezinde *S.icarica*'nın AChE ve BChE aktivitelerini değerlendirmiş ve bitkinin AChE aktivitesi göstermediğini rapor ederken trozinaz inhibisyon ve antidiyabetik aktivitelerini de değerlendirmiştir[25]. Bunun yanı da Askun T. ve ekibi [32] ve Azaz D.ve ekibi[18] çalışmalarında *S.icarica*'nın antimikrobiyal, Dülger ve ekinin yaptığı [74] çalışmada da *S.icarica*'nın antifungal aktivitesi tartışılmıştır. Kısaca *S.pilosa* hakkında AChE aktivite testi çalışılmamış olup *S.icarica* hakkında ise bir çalışmanın olduğu verilerin eşdeğer galantamin şeklinde değerlendirildiği tespit edilmiştir. *S.icarica* hakkında antioksidan özelliğini araştıran bir çalışma kaydına literatür taramasında ulaşılammıştır ancak *S.pilosa*'nın antioksidan özelliklerini araştıran sadece Nikolova'nın [64] çalışması tespit ettiğimiz tek çalışma olmuştur.

Bu çalışmalara mukabil çalışmamızda iki bitkinin de AChE inhibisyon aktivite testlerinde kontrol galantamine yakın, hatta düşük konsantrasyonda SİD-M ekstresi hariç, iki bitkinin tüm ekstrelerinin galantaminden daha aktif olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanısıra bitki ekstrelerinin toplam antioksidan kapasiteleri CUPRAC, ABTS ve

DPPH yöntemleriyle ölçülmüştür. Veriler arasındaki uyum istatistiksel olarak incelenerek iyi bir uyum gösterdiği çalışmamızda tespit edilmiştir.

Çalışmamız, özellikle her iki bitkinin dal ve yaprağının kapsamlı sekonder metabolit profilinin detaylı araştırılması ve bitkilerden *S.pilosa*'nın daha önce hiç çalışılmamış olan AChE inhibitör aktivitesinin ve *S.icarica* için daha önce çalışılmamış yöntemle AChE inhibitör aktivitesinin araştırılması ve yüksek aktivite gösterdiğinin tespit edilmesine dair verileriyle ve *S.pilosa* ve *S.icarica* için yapılan antioksidan kapasite testleri ve sonuçları itibarıyla *Satureja icarica* ve *Satureja pilosa* hakkındaki yapılacak çalışmalara öncülük etmesi açısından yüksek önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- [1] N, Arslan. (2016) *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler, Türkiye Tohumcular Birliği Derg.* 17 (2016) 66–69.
- [2] İ. Arif, B. Gürbüz, (2010) *Türkiye florasında bulunan Salvia türleri ve tehlike durumları, Tarla Bitk. Merk. Araştırma Enstitüsü Derg.* 19 (2010) 30–35.
- [3] T, Aşkun. K.H.C. Başer, G. Tümen, M. Kürkçüoğlu, *Characterization of essential oils of some Salvia species and their antimycobacterial activities, Turkish J. Biol.* 34 (2010) 89–95.
- [4] Ü, Karık. Ege ve Batı Akdeniz Florasındaki Anadolu Adaçayı (*Salvia fruticosa* Mill.) Populasyonlarının Bazı Verim ve Kalite Özellikleri, (2015).
- [5] İ, Gökhan. E,Ö, Vural., B,Ç, Şenkal., Ü, Bingöl, A. İpek, A.R. Tüfekçi, F. Gül, (2014) *Türkiye Florasında Endemik Olan Salvia Albimaculata'nın Uçucu Yağ Bileşenleri Ve Oranları, Int. J. Agric. Nat. Sci.* 7 (2014) 25–27.
- [6] A. Kaya, (1997) *Türkiye'de yetişen Acinos Miller türleri üzerinde morfolojik anatomik ve kimyasal araştırmalar,*
- [7] F, Celep., T, Dirmenci. (2017) Systematic and Biogeographic overview of Lamiaceae in Turkey, *Nat. Volatiles Essent. Oils.* 4 14–27.
- [8] C. Tez,(2011) *Türkiye'de yayılış gösteren Sideritis L.(Lamiaceae) cinsinin Empedoclia seksiyonuna ait taksonların its çekirdek ribozomal DNA dizilerine dayalı filogenetik analizi, Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü,*
- [9] H, Baydar.(2019) *Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi, Nobel,*
- [10] B, Gürdal. Ş, Kültür., (2013) *An ethnobotanical study of medicinal plants in Marmaris (Muğla, Turkey), J. Ethnopharmacol.* 146 113–126.
- [11] Grieve, M. (1971). *Mandrake. A Modern Herbal', Dover publication INC, New York, 2.*
- [12] A,R, Gohari., S,N, Ostad., F, Moradi-Afrapoli., M, Malmir., S, Tavajohi., H,Akbari., S, Saeidnia., *Evaluation of the cytotoxicity of Satureja spicigera and its main compounds, Sci. World J.* 2012 (2012).
- [13] Saeidnia, S., Gohari, A. R., Manayi, A., & Kourepaz-Mahmoodabadi, M. (2015). *Satureja: ethnomedicine, phytochemical diversity and pharmacological activities.*
- [14] Dirmenci, T., Yıldız, B., & Öztekin, M. (2019). *Türkiye Florası İçin Yeni Bir Tür Kaydı: Satureja metastasiantha Rech. f.(Ballıbabagiller/Lamiaceae). Bağbahçe Bilim Dergisi,* 6(1), 54-58.
- [15] T, Baytop., (1999) *Türkiye'de Bitkiler ile Tedavi., Nobel Tıp Kitap Evleri,*
- [16] Satıl, F., & Kaya, A. (2007). *Leaf anatomy and hairs of Turkish Satureja L.(Lamiaceae).*
- [17] Boissier, *Flora Orientalis,* <<https://archive.org/details/floraorientaliss04bois/page/2/mode/2up.>>
- [18] Azaz, A. D., Demirci, F., Satıl, F., Kürkçüoğlu, M., & Başer, K. H. C. (2002). *Bazı Satureja uçucu yağlarının antimikrobiyal aktiviteleri. 14. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, 29-31.*
- [19] Sampson, B. J., Tabanca, N., Kirimer, N. E., Demirci, B., Baser, K. H. C., Khan,

- I. A., & Wedge, D. E. (2005). *Insecticidal activity of 23 essential oils and their major compounds against adult Lipaphis pseudobrassicae* (Davis)(Aphididae: Homoptera). *Pest Management Science: formerly Pesticide Science*, 61(11), 1122-1128.
- [20] Askun, T., Tekwu, E. M., Satil, F., Modanlioglu, S., & Aydeniz, H. (2013). *Preliminary antimycobacterial study on selected Turkish plants (Lamiaceae) against Mycobacterium tuberculosis and search for some phenolic constituents. BMC complementary and alternative medicine*, 13(1), 1-11.
- [21] Kurkcuglu, M., Tumen, G., & Baser, K. H. C. (2001). *Essential oil constituents of Satureja boissieri from Turkey. Chemistry of Natural Compounds*, 37(4), 329-331.
- [22] Oke-Altuntas, F., Demirtas, I., Tufekci, A. R., Koldas, S., Gul, F., Behcet, L., & Gecibesler, H. I. (2016). *Inhibitory effects of the active components isolated from Satureja boissieri Hausskn. Ex Boiss. On human cervical cancer cell line. Journal of Food Biochemistry*, 40(4), 499-506.
- [23] Sajjadi, S. E., & Baluchi, M. (2002). *Chemical composition of the essential oil of Satureja boissieri Hausskn. ex Boiss. Journal of Essential Oil Research*, 14(1), 49-50.
- [24] Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z., & Ahmadi, S. (2007). *The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of Satureja rechingeri Jamzad. Food chemistry*, 100(3), 1054-1058.
- [25] Kavci, E. (2020). *Satureja L.(Lamiaceae) cinsinde yer alan bazı taksonların enzim inhibisyon özellikleri ve karyolojileri üzerine bir çalışma* (Master's thesis, Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [26] Cacan, E., Kokten, K., & Kilic, O. (2018). *Leaf fatty acid composition of some Lamiaceae taxa from Turkey. Progress in nutrition*, 20(1-S), 231-236.
- [27] Nurtazina, A. N., Khalmenova, Z. B., & Umbetova, A. K. (2016). *Comparative analysis of vitamins and amino and fatty acids from several Satureja plant species. Chemistry of natural compounds*, 52(4), 686-688.
- [28] Çoban, Z. D. (2019). *Farklı lokasyon ve sıra arası mesafelerinin sater (satureja hortensis l.) bitkisinin verim ve kalite özelliklerine etkisi* (Master's thesis, Namık Kemal Üniversitesi).
- [29] Maral, H., Murat, T. Ü. R. K., ÇALIŞKAN, T., & KIRICI, S. (2017). *Chemical composition and antioxidant activity of essential oils of six Lamiaceae plants growing in Southern Turkey. Natural Volatiles and Essential Oils*, 4(4), 62-68.
- [30] Ozkan, G., Simsek, B., & Kuleasan, H. (2007). *Antioxidant activities of Satureja cilicica essential oil in butter and in vitro. Journal of food engineering*, 79(4), 1391-1396.
- [31] M,F, Dönmez., B,U, Şahin., A,U, Bozhüyük. (2020) *Satureja Türlerinden Elde Edilen Uçucu Yağ ve Ekstrelerinin Fasulyede Bakteriyel Patojenlere Karşı Antibakteriyel Etkisi*, J. Agric. 3 57–70.
- [32] Aşkun, T., Tümen, G., Satil, F., & Karaarslan, D. (2012). *Active constituents of some Satureja L. species and their biological activities.*
- [33] Schulz, H., Özkan, G., Baranska, M., Krüger, H., & Özcan, M. (2005). *Characterisation of essential oil plants from Turkey by IR and Raman spectroscopy. Vibrational Spectroscopy*, 39(2), 249-256.
- [34] Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S., & Altundag, S. (2009). *Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of Satureja cuneifolia*

- Ten. Food Chemistry*, 112(4), 874-879.
- [35] **Yücel, D.** (2018). Cytotoxic effects of *Satureja cuneifolia* extract in liver cancer cell line (HepG2). *Biological Diversity and Conservation*, 11(2), 42-46.
- [36] **Altun, M., & Goren, A. C.** (2007). Essential oil composition of *Satureja cuneifolia* by simultaneous distillation-extraction and thermal desorption GC-MS techniques. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 10(2), 139-144.
- [37] **Taslimi, P., Köksal, E., Gören, A. C., Bursal, E., Aras, A., Kılıç, Ö., Gülçin, İ.** (2020). Anti-Alzheimer, antidiabetic and antioxidant potential of *Satureja cuneifolia* and analysis of its phenolic contents by LC-MS/MS. *Arabian journal of chemistry*, 13(3), 4528-4537.
- [38] **Taskin, T., Dogan, M., Sahin, T., & Senkardes, I.** (2020). In vitro anti-urease, antioxidant, anticholinesterase, cytotoxic and in vivo anti-inflammatory potential of *Satureja cuneifolia* Ten. *Notulae Scientia Biologicae*, 12(2), 222-232.
- [39] **Bezić, N., Skočibušić, M., & Dunkić, V.** (2005). Phytochemical composition and antimicrobial activity of *Satureja montana* L. and *Satureja cuneifolia* Ten. essential oils. *Acta Botanica Croatica*, 64(2), 313-322.
- [40] **Tommasi, L., Negro, C., De Bellis, L., & Miceli, A.** (2008). Essential oil variability of *Satureja cuneifolia* Ten. growing wild in Southern Puglia (Italy). *Journal of Essential Oil Research*, 20(4), 295-302.
- [41] **Tümen, G., Kirimer, N., Ermin, N., & Baser, K. H. C.** (1998). The essential oils of two new *Satureja* species from Turkey: *Satureja pilosa* and *S. icarica*. *Journal of Essential Oil Research*, 10(5), 524-526.
- [42] **Yusuf, Alan., Savcı, A., Çakmak, B., & Havva, K.** (2016). Determination of the antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja hortensis* ingredients. *Yüzyüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 21(2), 167-177.
- [43] **Popovici, R. A., Vaduva, D., Pinzaru, I., Dehelean, C. A., Farcas, C. G., Coricovac, D., ... & Stanca, H. T.** (2019). A comparative study on the biological activity of essential oil and total hydro-alcoholic extract of *Satureja hortensis* L. *Experimental and therapeutic medicine*, 18(2), 932-942.
- [44] **Arslan, D. K. Y.** (2011). Ankara ekolojik koşullarında sater (*Satureja hortensis* L) bitkisinde uçucu yağ ve bileşenlerinin ontogenetik varyabilitesinin belirlenmesi. *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 8(2), 29-36.
- [45] **Tozlu, E., Cakir, A., Kordali, S., Tozlu, G., Ozer, H., & Akcin, T. A.** (2011). Chemical compositions and insecticidal effects of essential oils isolated from *Achillea gypsicola*, *Satureja hortensis*, *Origanum acutidens* and *Hypericum scabrum* against broadbean weevil (*Bruchus dentipes*). *Scientia horticultrae*, 130(1), 9-17.
- [46] **Shanida, M., Golembiovska, O., Hudz, N., & Wieczorek, P. P.** (2018). Phenolic compounds of herbal infusions obtained from some species of the Lamiaceae family. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*, 31(4), 194-199.
- [47] **Chkhikvishvili, I., Sanikidze, T., Gogia, N., Mchedlishvili, T., Enukidze, M., Machavariani, M., ... & Rodov, V.** (2013). Rosmarinic acid-rich extracts of summer savory (*Satureja hortensis* L.) protect Jurkat T cells against oxidative stress. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013.
- [48] **Sefidkon, F., & Jamzad, Z. J.** (2010). Chemical composition of the essential oil of two Iranian *Satureja* species (*S. edmondi* and *S. isophylla*). *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, (Supplement 2), 91-91.

- [49] Shekarchi, M., Hajimehdipoor, H., Saeidnia, S., Gohari, A. R., & Hamedani, M. P. (2012). Comparative study of rosmarinic acid content in some plants of Labiatae family. *Pharmacognosy magazine*, 8(29), 37.
- [50] Gouhari, A. R., Haji, A. A., Saeidnia, S., Shafiei, A., & Ebrahimi, E. S. (2005). Cytotoxic terpenoids from *Satureja macrantha* CA Mey.
- [51] Carikci, S., Goren, A. C., Dirmenci, T., Yalcinkaya, B., Erkucuk, A., & Topcu, G. (2020). Composition of the essential oil of *Satureja metastasiantha*: a new species for the flora of Turkey. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 75(7-8), 271-277.
- [52] Satil, Fatih., Tümen, G., Akçelik, A., & Baser, K. H. C. (2002). Comparative morphological, anatomical, ecological and chemical studies on endemic *Satureja parnassica* subsp. *sipylea* from Turkey. *Acta Botanica Croatica*, 61(2), 207-220.
- [53] Tümen, G., Sezik, E., & Baser, K. H. C. (1992). The essential oil of *Satureja parnassica* heldr. & sart. ex boiss subsp. *Sipylea* PH Davis. *Flavour and fragrance journal*, 7(1), 43-46.
- [54] Chorianopoulos, N. G., Lambert, R. J. W., Skandamis, P. N., Evergetis, E. T., Haroutounian, S. A., & Nychas, G. J. (2006). A newly developed assay to study the minimum inhibitory concentration of *Satureja spinosa* essential oil. *Journal of applied microbiology*, 100(4), 778-786.
- [55] Tabanca, N., Kürkcüoğlu, M., Baser, K. H. C., Tümen, G., & Duman, H. (2004). Composition of the Essential Oils of *Satureja spinosa* L. *Journal of Essential Oil Research*, 16(2), 127-128.
- [56] Öztürk, M. (2012). Anticholinesterase and antioxidant activities of Savoury (*Satureja thymbra* L.) with identified major terpenes of the essential oil. *Food Chemistry*, 134(1), 48-54.
- [57] Gören, A. C., Bilsel, G., Altun, M., & Satil, F. (2003). Fatty acid composition of seeds of *Satureja thymbra* and *S. cuneifolia*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(7-8), 502-504.
- [58] Skendi, A., Irakli, M., & Chatzopoulou, P. (2017). Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. *Journal of applied research on medicinal and aromatic plants*, 6, 62-69.
- [59] Azaz, A. D., Kürkcüoğlu, M., Satil, F., Can Baser, K. H., & Tümen, G. (2005). In vitro antimicrobial activity and chemical composition of some *Satureja* essential oils. *Flavour and Fragrance Journal*, 20(6), 587-591.
- [60] Ezer, N., Vila, R., Cañigüeral, S., & Adzet, T. (1995). Essential Oil of *Satureja wiedemanniana* (Lallem.) Velen. *Journal of Essential Oil Research*, 7(1), 91-93.
- [61] Yucel, N., & Aslim, B. (2011). Antibacterial activity of the essential oil of *Satureja wiedemanniana* against *Bacillus* species isolated from chicken meat. *Foodborne pathogens and disease*, 8(1), 71-76.
- [62] Yucel, N., Aslim, B., & Özdoğan, H. (2009). In vitro antimicrobial effect of *Satureja wiedemanniana* against *Bacillus* species isolated from raw meat samples. *Journal of medicinal food*, 12(4), 919-923.
- [63] Eftekhari, F., Raei, F., Yousefzadi, M., Ebrahimi, S. N., & Hadian, J. (2009). Antibacterial activity and essential oil composition of *Satureja spicigera* from Iran. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 64(1-2), 20-24.
- [64] Eminagaoglu, O., Tepe, B., Yumrutas, O., Akpulat, H. A., Daferera, D., Polissiou, M., & Sokmen, A. (2007). The in vitro antioxidative properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch.) Boiss.

- and *Satureja cuneifolia* ten. *Food Chemistry*, 100(1), 339-343.
- [65] Farzaneh, M., Kiani, H., Sharifi, R., Reisi, M., & Hadian, J. (2015). *Chemical composition and antifungal effects of three species of Satureja (S. hortensis, S. spicigera, and S. khuzistanica) essential oils on the main pathogens of strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology*, 109, 145-151.
- [66] Nikolova, M., & Dzhurmanski, A. (2009). *Evaluation of free radical scavenging capacity of extracts from cultivated plants. Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 23(sup1), 109-111.
- [67] Semerdjieva, I. B., Zheljaskov, V., Cantrell, C. L., Astatkie, T., & Ali, A. (2020). *Essential oil yield and composition of the Balkan endemic Satureja pilosa Velen.(Lamiaceae). Molecules*, 25(4), 827.
- [68] Abdali, E., Javadi, S., Akhgari, M., Hosseini, S., & Dastan, D. (2017). *Chemical composition and biological properties of Satureja avromanica Maroofi. Journal of food science and technology*, 54(3), 727-734.
- [69] Hooshidari, F., Sefidkon, F., & Naderi, M. (2017). *The essential oils components of wild and cultivated Satureja avromanica Maroofi in Kurdistan province of Iran. Iranian Journal of Horticultural Science*, 48(1), 149-159.
- [70] F, Hooshidary., F, Sefidkon., M, Naderi., G,H, Taoghi., (2015) *The Essential Oil Content and Composition Of Satureja Avromanica Maroofi in Kurdistan*,
- [71] Tsimogiannis, D., Choulitoudi, E., Bimpilas, A., Mitropoulou, G., Kourkoutas, Y., & Oreopoulou, V. (2017). *Exploitation of the biological potential of Satureja thymbra essential oil and distillation by-products. Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 4, 12-20.
- [72] Ranjbar, A., Mehri, N., Ghasemi, H., Dastan, D., Kazemi Najafabadi, F., Dekhodaie, N., & Kheiripour, N. (2020). *Evaluation of the protective effects of hydroalcoholic extract of Satureja avromanica against malathion-induced oxidative stress in the liver: An experimental study. Pharmaceutical and Biomedical Research*, 6(1), 37-44.
- [73] Tümen, G., SATIL, F., Duman, H., & Başer, K. H. C. (2000). *Two new records for turkey: Satureja icarica PH Davis, Satureja pilosa Velen. Turkish Journal of Botany*, 24(3), 211-214.
- [74] Dülger, Başaran., & Hacıoglu, N. (2008). *Antifungal activity of endemic Satureja icarica.*
- [75] Güner, Ö., & Selvi, S. (2016). *Balıkesir aktarlarında satılan yabancı tıbbi bitkiler ve Kullanım özellikleri. Biyolojik Çeşitlilik ve Koruma*, 9(2), 96-101.
- [76] Satıl, F., Dirmenci, T., & Tümen, G. (2006). *Kazdağı Milli Parkının öncelikli koruma alanlarının sınıflandırılması ve önemli bitkileri. Kazdağları II. Ulusal Sempozyumu, Çanakkale*, 391.
- [77] Petrović, J., Stojković, D., & Soković, M. (2019). *Terpene core in selected aromatic and edible plants: Natural health improving agents. In Advances in food and nutrition research (Vol. 90, pp. 423-451). Academic Press.*
- [78] Bozari, S., Çakmak, B., & Havva, Kurt. (2017). *Satureja hortensis bitkisinin uçucu yağlarının hordeum vulgare l. tohumları üzerine genotoksik etkileri. KSÜ Doğa Bilimleri Dergisi*, 20(3), 185-192.
- [79] Tidten-Luksch, N., Grimaldi, R., Torrie, L. S., Frearson, J. A., Hunter, W. N., & Brenk, R. (2012). *IspE inhibitors identified by a combination of in silico and in vitro high-throughput screening. PloS one*, 7(4), e35792.
- [80] Torul, O. (1981). *Doğu Karadeniz bölgesi kayın ve ladini soxhlet ve*

süperkritik gaz ekstraktlarındaki terpenler (Doctoral dissertation, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Fen Bilimleri Enstitüsü).

- [81] **Ludwiczuk, A., Skalicka-Woźniak, K., & Georgiev, M. I.** (2017). *Terpenoids*. In *Pharmacognosy* (pp. 233-266). Academic Press.
- [82] **Breitmaier, E.** (2006). *Terpenes: Importance, general structure, and biosynthesis*. *Terpenes: Flavors, fragrances, pharmaca, pheromones*, 1, 1-3.
- [83] **Loomis, W. D., & Croteau, R.** (1980). *Biochemistry of terpenoids*. In *Lipids: structure and function* (pp. 363-418). Academic Press.
- [84] **Muffler, K., Leipold, D., Scheller, M. C., Haas, C., Steingroewer, J., Bley, T., Neuhaus, H.E., Mirata, M.A., Schrader, J., Ulber, R.** (2011). *Biotransformation of triterpenes*. *Process Biochemistry*, 46(1), 1-15.
- [85] **Tiwari, B. K., Brunton, N. P., Brennan, C. (Eds.)**. (2013). *Handbook of plant food phytochemicals: sources, stability and extraction*. John Wiley & Sons.
- [86] **Behr, A., Seidensticker, T.** (2020). *Elastomers from Nature!-Polyterpenes*. In *Chemistry of Renewables* (pp. 235-248). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [87] **Vermerris, W., Nicholson, R.** (2007). *Phenolic compound biochemistry*. Springer Science & Business Media.
- [88] **Kolaç, T., Gürbüz, P., Yetiş, G.** (2017). *Doğal ürünlerin fenolik içeriği ve antioksidan özellikleri*. İnönü Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu Dergisi, 5(1), 26-42.
- [89] **Dewick, P. M.** (2002). *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. John Wiley & Sons.
- [90] **Weaver, K. H. L., Herrmann, K. M.** (1999). *The shikimate pathway*. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 473-503.
- [91] **Harborne, J. B.** (1964). *Biochemistry of phenolic compounds*. Academic Press, London.
- [92] **Robbins, R. J.** (2003). *Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- [93] **Kahraman, A., Serteser, M., Koken, T.** (2002). *Flavonoidler*. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 3(1).
- [94] **Fraga, C. G. (Ed.)**. (2009). *Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology (Vol. 1)*. John Wiley & Sons.
- [95] **Potischman, N., Freudenheim, J. L.** (2003). *Biomarkers of nutritional exposure and nutritional status: an overview*. *The Journal of nutrition*, 133(3), 873S-874S.
- [96] **Burcu, E., & Dinçel, A. S.** (2018). *Kromatografiye giriş, yüksek performanslı sıvı kromatografi kullanımında basit ipuçları*. *Journal of Health Services and Education*, 2(2), 51-57.
- [97] **Skoog, D., Holler, F., Nieman, T., Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H.** (2000). *Enstrümantal analiz ilkeleri*. Ankara, Turkey.
- [98] **Ardrey, R. E.** (2003). *Liquid chromatography-mass spectrometry: an introduction (Vol. 2)*. John Wiley & Sons.
- [99] **Url-1**
<<https://inovatifkimyadergisi.com/hplc-ve-ilac-sanayinde-uygulamalari.>>
- [100] **Url-2**
<https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/78812/mod_resource/content/0/HPLC.pdf#:~:text=HPLC ünitesi%3A Degasser%2C pompa%2C,olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır.>

- [101] **Url-3**
< http://docs.neu.edu.tr/staff/serdar.susever/11 HPLC_97.pdf.>
- [102] **Ahuja, S., Rasmussen, H. (Eds.).** (2011). *HPLC method development for pharmaceuticals*. Elsevier.
- [103] **Kıvanç, S. Ö.** (2013). *Süne-Kıml (eurygaster spp. ve/veya aelia spp.) zararlı görmüş unların kek, bisküvi ve ekmeklerde akrilamid ve hidrosimetilfurfural (hmf) oluşumuna etkisi*.
- [104] **Binici, B.** (2008). *Yağmur suyunda PAH ve pestisit tayini ve alıcı ortam modellemesi* (Master's thesis, Kocaeli Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- [105] **Swartz, M.** (2010). *HPLC detectors: a brief review*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 33(9-12), 1130-1150.
- [106] **Koppelaar, D. W., Barinaga, C. J., Denton, M. B., Sperline, R. P., Hieftje, G. M., Schilling, G. D., Andrade, F.J., Barnes, J.,H., IV, I., V.** (2005). *MS detectors*.
- [107] **Karaman, A. D., Akalın, A. S.** (2008). *Süt teknolojisinde metot validasyonu ve uygulamaları*. Türkiye, 10, 749-51.
- [108] **Yılmaz, A.** (2012). *Kimyasal analizlerde metot validasyonu ve verifikasyonu*. TURKLAB Rehber, (01).
- [109] **Bayraç, C., Camızci, G.** (2020). Hplc metodu ile patulin tayininde tek laboratuvar metot validasyon çalışması. Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi **Mühendislik Bilimleri Dergisi**, 9(1), 285-296.
- [110] **Url-4**
<https://secure.turkak.org.tr/TURKAKSITE/docs/bilgilendirme_kilavuzlari/METODUN_GEÇERLİ_KILINMASI_VE_DOGRULANMASI_ICIN_BILGILENDIRME_KILAVUZU_20052019_1625.pdf.>
- [111] **Url-5**
<<http://www.kmoetkinlik.org/ICPC16/present/10.pdf>.>
- [112] **Url-6**
<<http://www.eurachem.org/Guides/Pdf/Valid.Pdf>.> (1998).
- [113] **Ramsey, M. H., Potts, P. J., Webb, P. C., Watkins, P., Watson, J. S., Coles, B. J.** (1995). *An objective assessment of analytical method precision: comparison of ICP-AES and XRF for the analysis of silicate rocks*. Chemical Geology, 124(1-2), 1-19.
- [114] **Url-7**
<https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_TR.pdf.>
- [115] **Ellison, S. L., Barwick, V. J., Farrant, T. J. D.** (2009). *Practical statistics for the analytical scientist: a bench guide*. Royal Society of Chemistry.
- [116] **Esiri, M. M.** (1996). *The basis for behavioural disturbances in dementia*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, 61(2), 127.
- [117] **Francis, P. T., Palmer, A. M., Snape, M., Wilcock, G. K.** (1999). *The cholinergic hypothesis of Alzheimer's disease: a review of progress*. Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 66(2), 137-147.
- [118] **Hardy, J.** (1997). *Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease*. Trends in neurosciences, 20(4), 154-159.
- [119] **Neary, D., Snowden, J., Mann, D.** (2005). *Frontotemporal dementia*. The Lancet Neurology, 4(11), 771-780..
- [120] **Bartus, R. T., Dean, R. 3., Beer, B., Lippa, A. S.** (1982). *The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction*. Science, 217(4558), 408-414.
- [121] **Wolf, N. J., Butcher, L. L.** (2011). *Cholinergic systems mediate action from*

- movement to higher consciousness. Behavioural brain research, 221(2), 488-498.*
- [122] **Liston, D. R., Nielsen, J. A., Villalobos, A., Chapin, D., Jones, S. B., Hubbard, S. T., Shalaby, I.A., Ramirez, A., Nason, D., White, W. F.** (2004). *Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease.* European journal of pharmacology, 486(1), 9-17.
- [123] **H Ferreira-Vieira, T., M Guimaraes, I., R Silva, F., M Ribeiro, F.** (2016). *Alzheimer's disease: targeting the cholinergic system.* Current neuropharmacology, 14(1), 101-115.
- [124] **Whitehouse, P. J., Price, D. L., Struble, R. G., Clark, A. W., Coyle, J. T., Delon, M. R.** (1982). *Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain.* Science, 215(4537), 1237-1239.
- [125] **Roghani, A., Feldman, J., Kohan, S. A., Shirzadi, A., Gundersen, C. B., Brecha, N., Edwards, R. H.** (1994). *Molecular cloning of a putative vesicular transporter for acetylcholine.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 91(22), 10620-10624.
- [126] **Augustinsson, K. B., Nachmansohn, D.** (1949). *Distinction between acetylcholine-esterase and other choline ester-splitting enzymes.* Science, 110(2847), 98-99.
- [127] **Role, L. W., Berg, D. K.** (1996). *Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses.* Neuron, 16(6), 1077-1085.
- [128] **Fenster, C. P., Rains, M. F., Noerager, B., Quick, M. W., Lester, R. A.** (1997). *Influence of subunit composition on desensitization of neuronal acetylcholine receptors at low concentrations of nicotine.* Journal of Neuroscience, 17(15), 5747-5759.
- [129] **Radcliffe, K. A., Fisher, J. L., Gray, R., & Dani, J. A.** (1999). *Nicotinic modulation of glutamate and GABA synaptic transmission in hippocampal neurons.* Annals of the New York Academy of Sciences, 868(1), 591-610.
- [130] **Clarke, P. B. S., Reuben, M.** (1996). *Release of [3H]-noradrenaline from rat hippocampal synaptosomes by nicotine: mediation by different nicotinic receptor subtypes from striatal [3H]-dopamine release.* British journal of pharmacology, 117(4), 595-606.
- [131] **Wilcock, G. K., Esiri, M. M., Bowen, D. M., Smith, C. C. T.** (1982). *Alzheimer's disease: correlation of cortical choline acetyltransferase activity with the severity of dementia and histological abnormalities.* Journal of the neurological sciences, 57(2-3), 407-417.
- [132] **Selkoe, D. J.** (2002). *Alzheimer's disease is a synaptic failure.* Science, 298(5594), 789-791.
- [133] **Rosenberg, P. B., Nowrangi, M. A., Lyketsos, C. G.** (2015). *Neuropsychiatric symptoms in Alzheimer's disease: what might be associated brain circuits?.* Molecular aspects of medicine, 43, 25-37.
- [134] **Raina, P., Santaguida, P., Ismaila, A., Patterson, C., Cowan, D., Levine, M., Booker, L. Oremus, M.** (2008). *Effectiveness of cholinesterase inhibitors and memantine for treating dementia: evidence review for a clinical practice guideline.* Annals of internal medicine, 148(5), 379-397.
- [135] **Sun, Y., Lai, M. S., Lu, C. J., Chen, R. C.** (2008). *How long can patients with mild or moderate Alzheimer's dementia maintain both the cognition and the therapy of cholinesterase inhibitors: a national population-based study.*

- European journal of neurology, 15(3), 278-283.
- [136] **Francis, P. T.** (2005). *The interplay of neurotransmitters in Alzheimer's disease*. CNS spectrums, 10(S18), 6-9.
- [137] **Sies, H.** (1997). *Physiological society symposium: Impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress*. Experimental physiology, 82(2), 291-5.
- [138] **Gülçin, İ., Oktay, M., Kireççi, E., Küfrevioğlu, Ö. İ.** (2003). *Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (Pimpinella anisum L.) seed extracts*. Food chemistry, 83(3), 371-382.
- [139] **Papas, A. M.** (1996). *Determinants of antioxidant status in humans*. Lipids, 31(1Part1), S77.
- [140] **Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S. R., De, B.** (2010). *Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect*. International journal of pharmaceutical sciences review and research, 3(1), 91-100.
- [141] **Karabulut, H., Gülay, M. Ş.** (2016). *Antioksidanlar*. Veterinary Journal of Mehmet Akif Ersoy University, 1(1), 65-76.
- [142] **Gutteridge, J. M.** (1995). *Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage*. Clinical chemistry, 41(12), 1819-1828.
- [143] **Khan, M. I. R., Khan, N. A. (Eds.)**. (2017). *Reactive oxygen species and antioxidant systems in plants: role and regulation under abiotic stress*. Springer Singapore.
- [144] **Naczki, M., Shahidi, F.** (2003). *Phenolic compounds in plant foods: chemistry and health benefits*. Preventive Nutrition and Food Science, 8(2), 200-218.
- [145] **Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., Çapanoğlu, E.** (2016). *Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays*. Journal of agricultural and food chemistry, 64(5), 997-1027.
- [146] **Shahidi, F., Ambigaipalan, P.** (2017). **Antioxidants 14 in oxidation control**. Measurement of Antioxidant Activity and Capacity: Recent Trends and Applications, 287.
- [147] **Büyüktuncel, E.** (2013). *Toplam fenolik içerik ve antioksidan kapasite tayininde kullanılan başlıca spektrofotometrik yöntemler*.
- [148] **Wright, J. S., Johnson, E. R., DiLabio, G. A.** (2001). *Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants*. Journal of the American Chemical Society, 123(6), 1173-1183.
- [149] **Benzie, I. F., Strain, J. J.** (1996). *The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay*. Analytical biochemistry, 239(1), 70-76.
- [150] **Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., & Karademir, S. E.** (2004). *Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method*. Journal of agricultural and food chemistry, 52(26), 7970-7981.
- [151] **Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres Jr, V., Featherstone, R. M.** (1961). *A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity*. Biochemical pharmacology, 7(2), 88-95.
- [152] **Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans,**

- C. (1999). *Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay*. *Free radical biology and medicine*, 26(9-10), 1231-1237.
- [153] **Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F.** (1998). *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 76(2), 270-276.

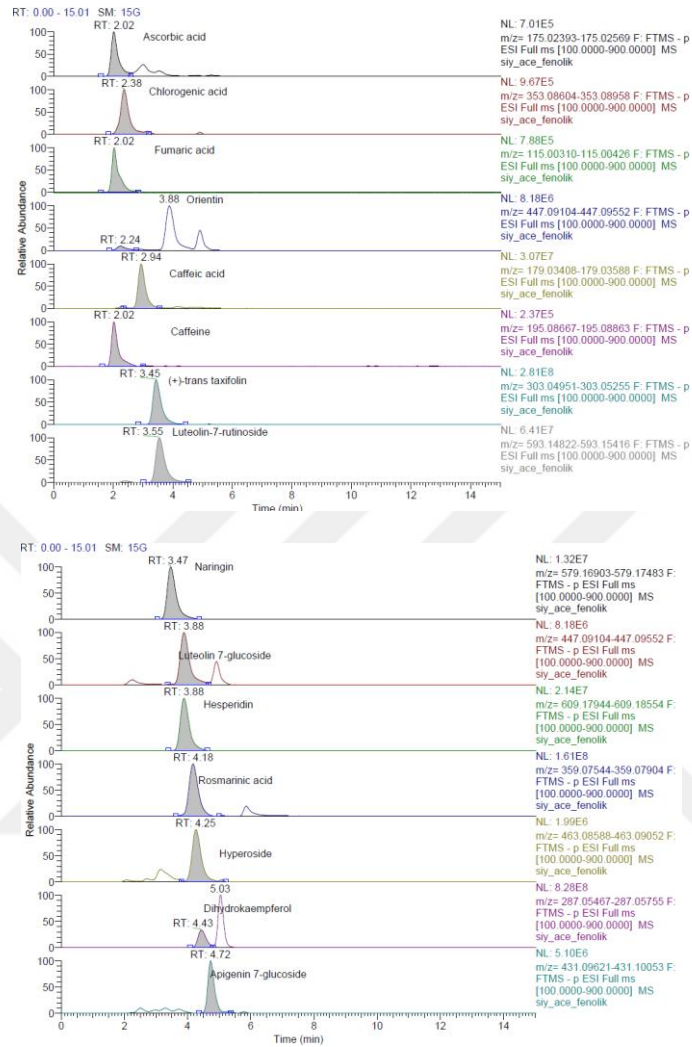


EKLER

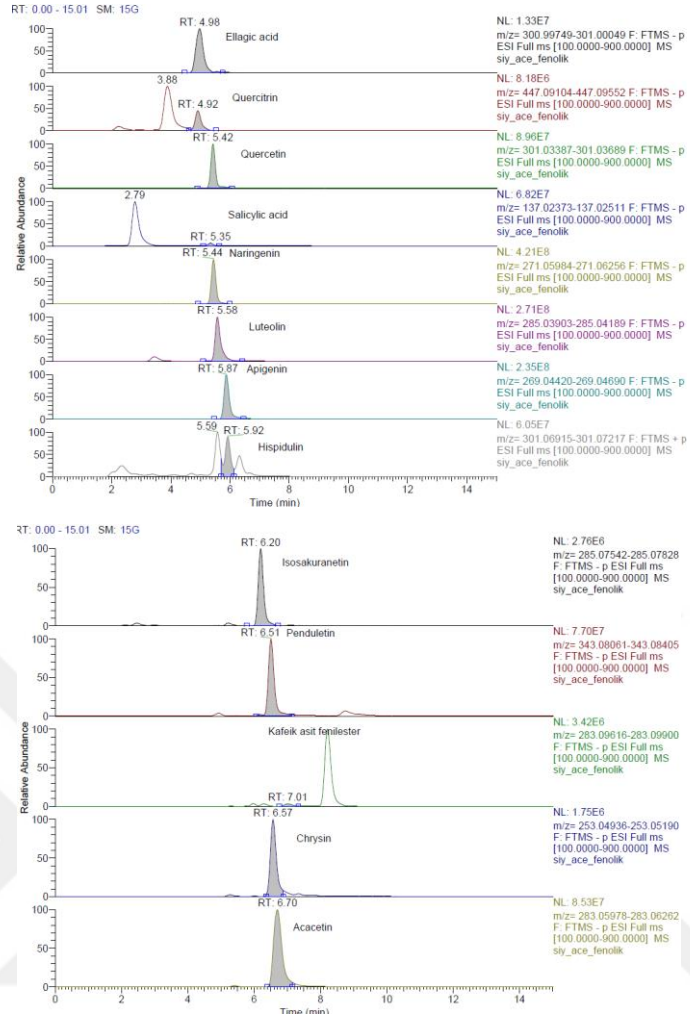
EK A : LC-HRMS Kromatogramları



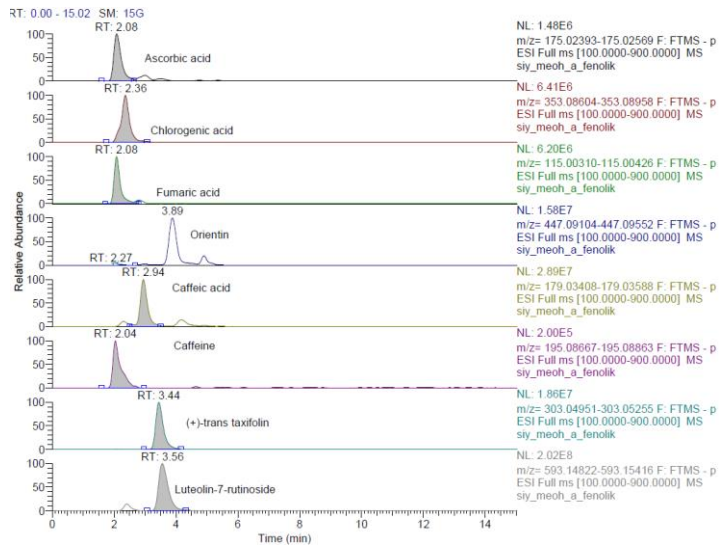
EK A



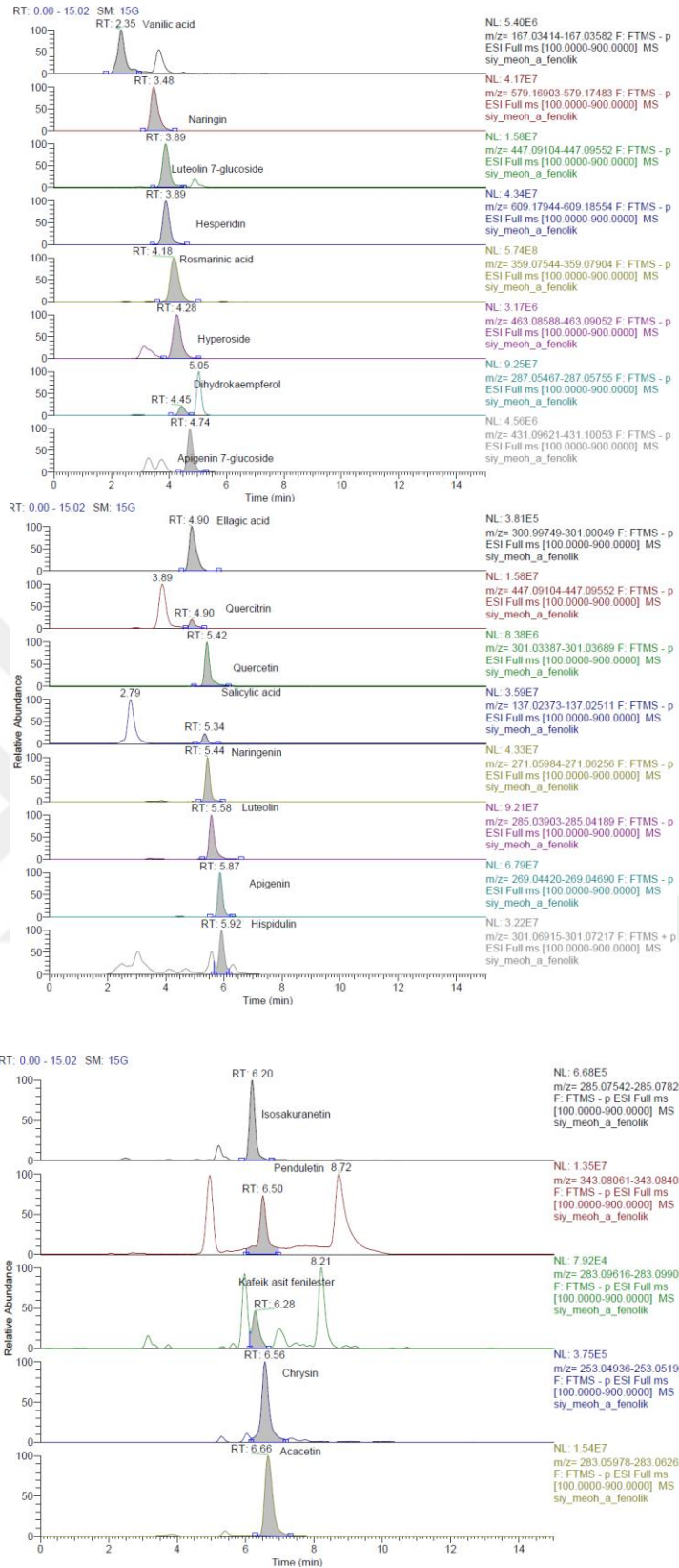
Şekil A.1 : SİY-A LC-HRMS kromatogramı



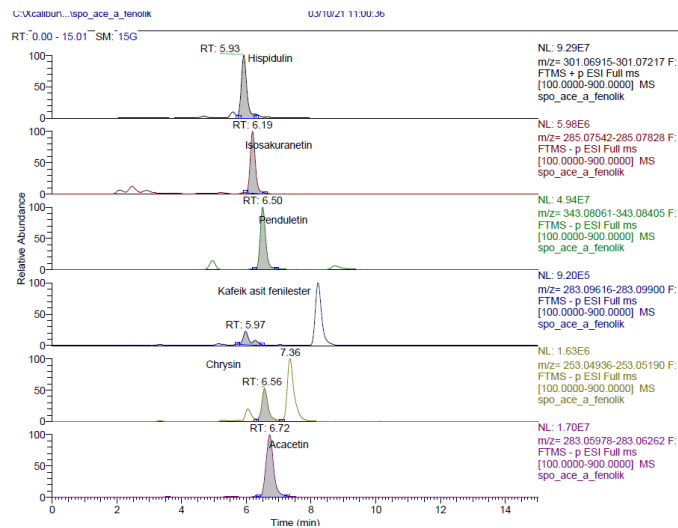
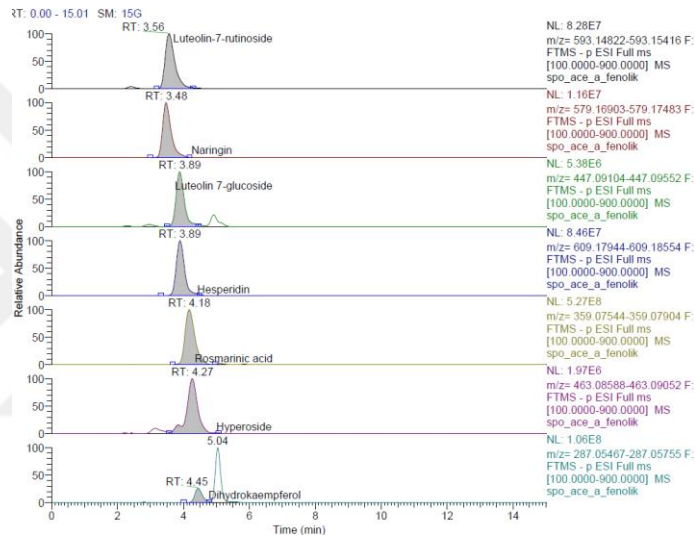
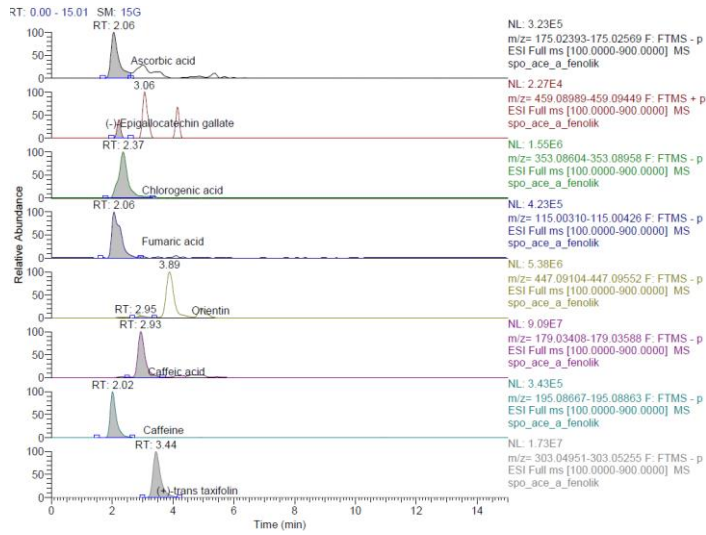
Şekil A.1 (devam) : SIY-A LC-HRMS kromatogramı



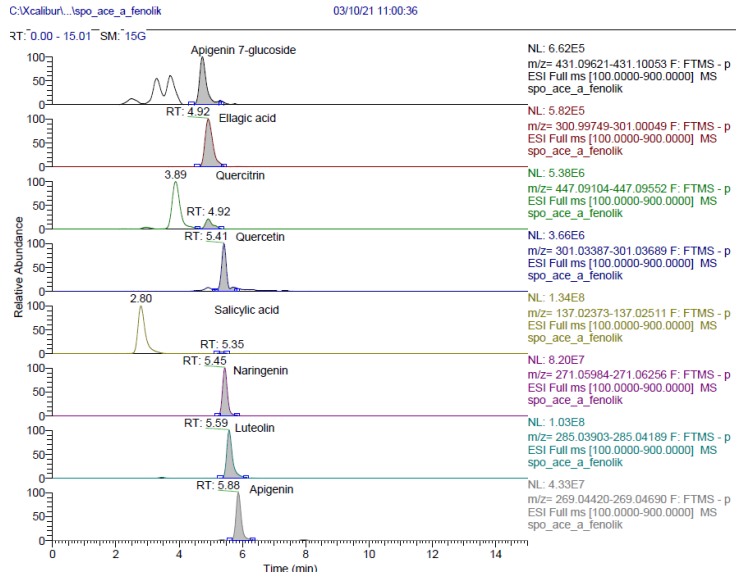
Şekil A.2 : SIY-M LC-HRMS kromatogramı



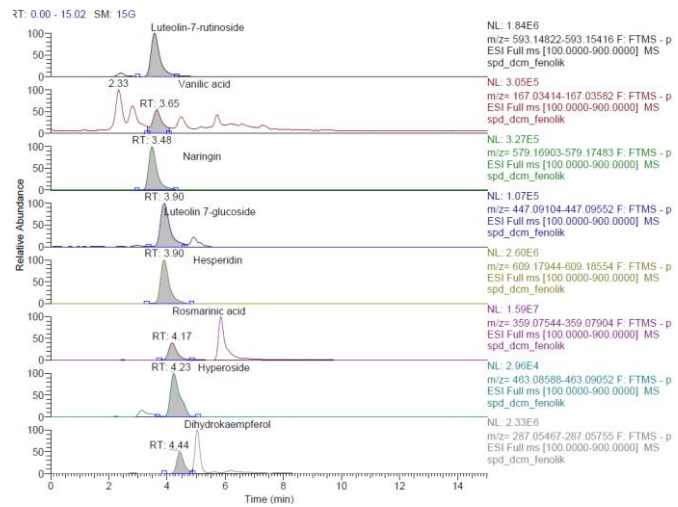
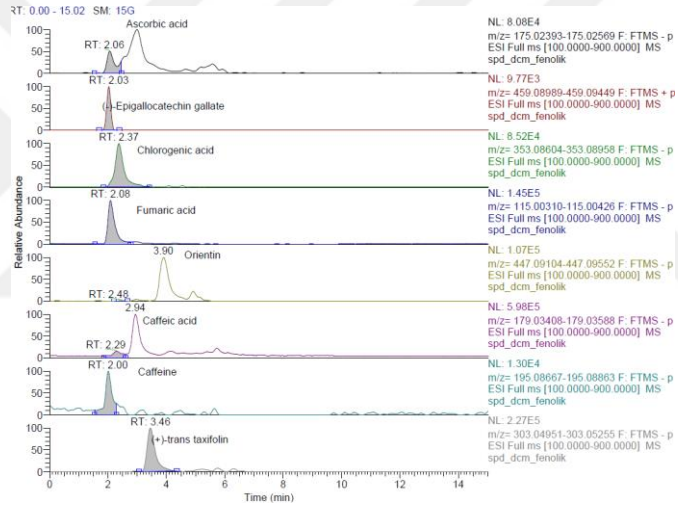
Şekil A.2 (devam) : SiY-M LC-HRMS kromatogramı



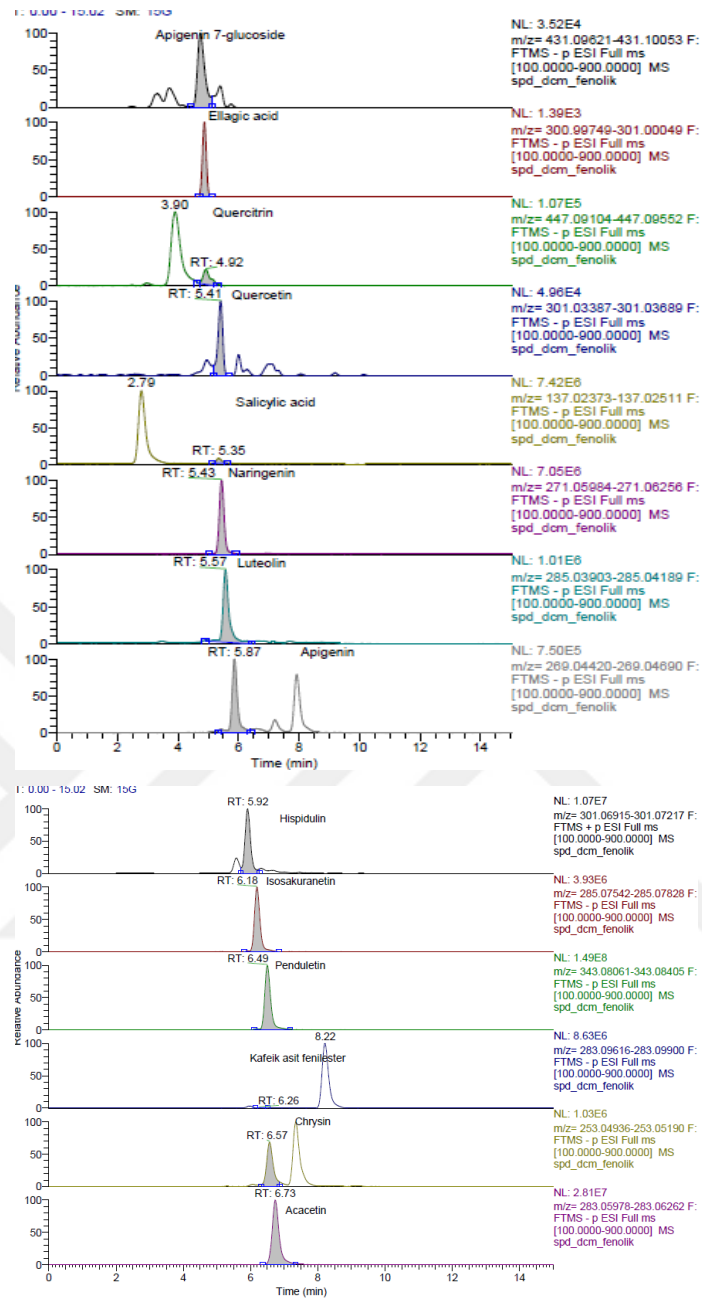
Şekil A.3 : SPD-A LC-HRMS kromatogramı



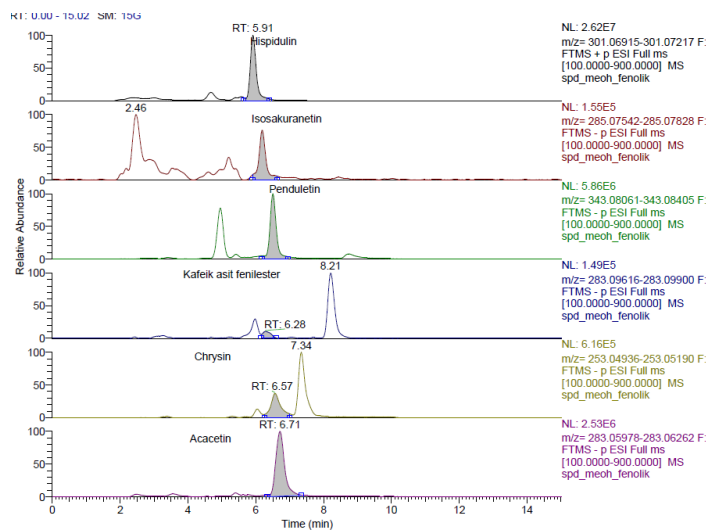
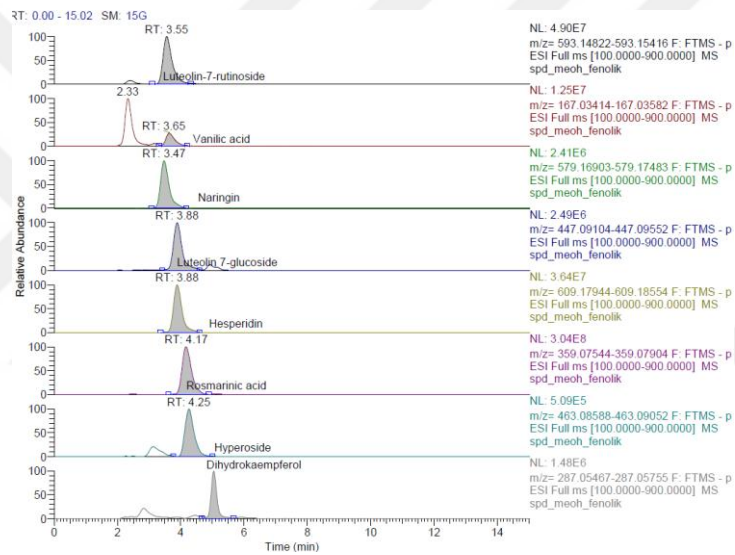
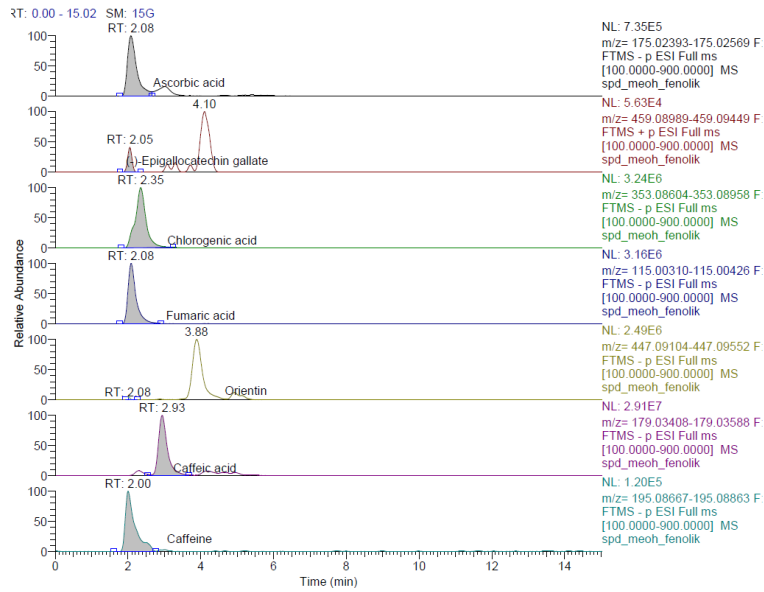
Şekil A.3 (devam) : SPD-A LC-HRMS kromatogramı



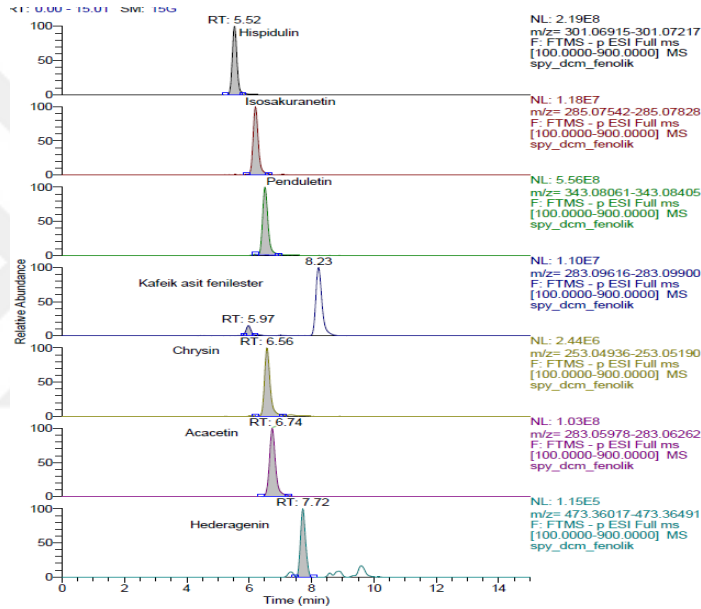
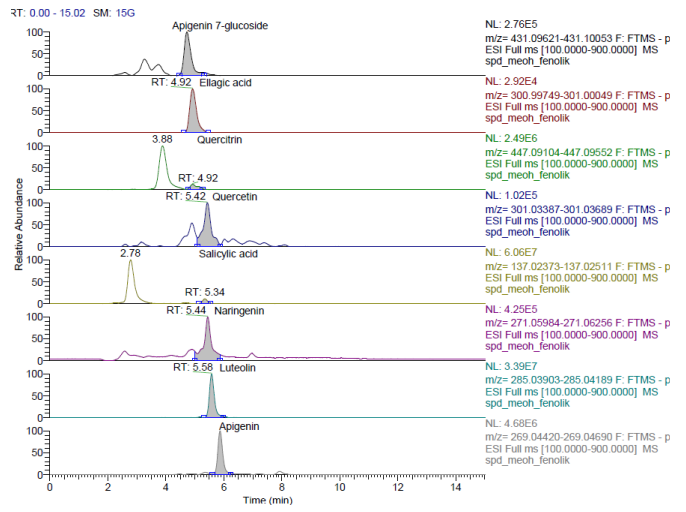
Şekil A.4 : SPD-D LC-MS kromatogramı



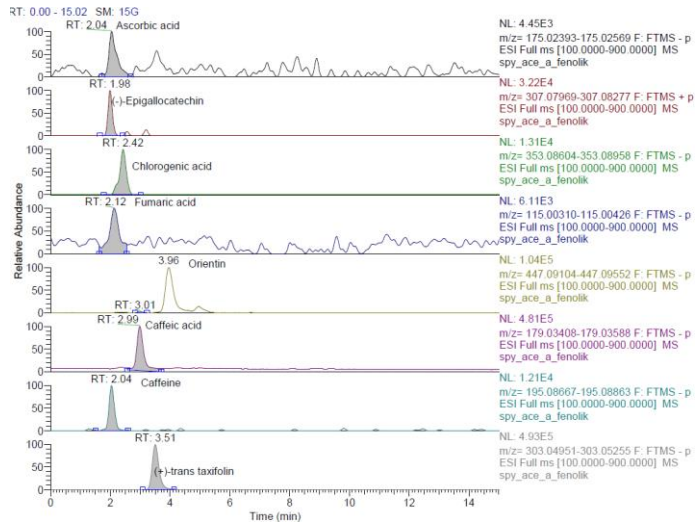
Şekil A.4 (devam) : SPD-D LC-HRMS kromatogramı



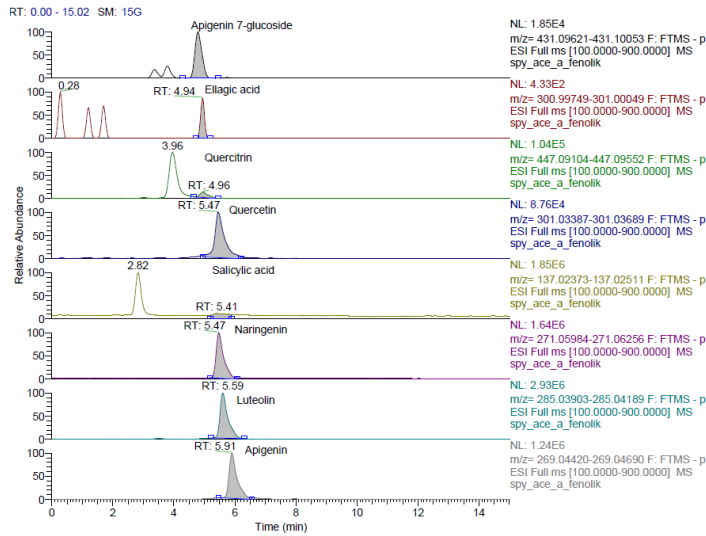
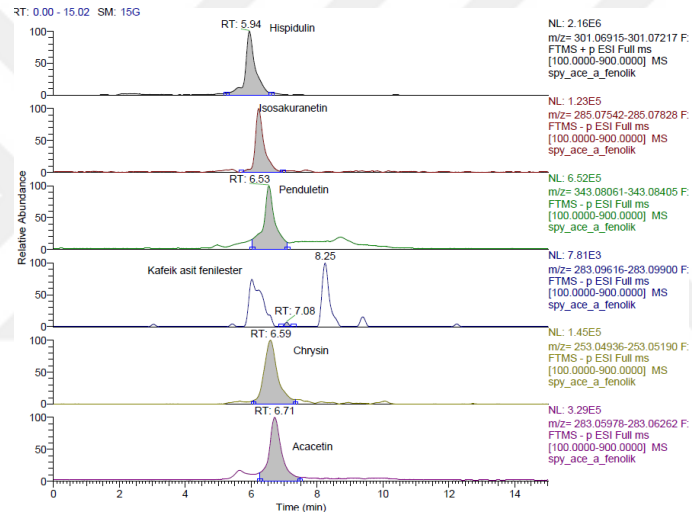
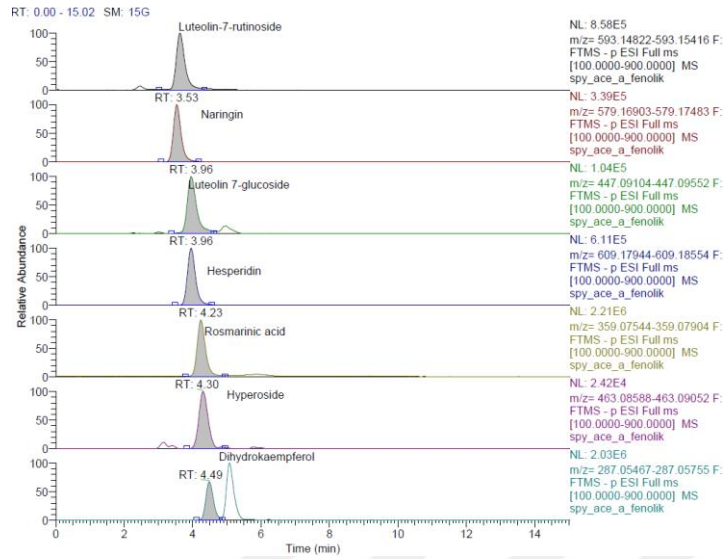
Şekil A.5 : SPD-M-a LC-HRMS kromatogramı



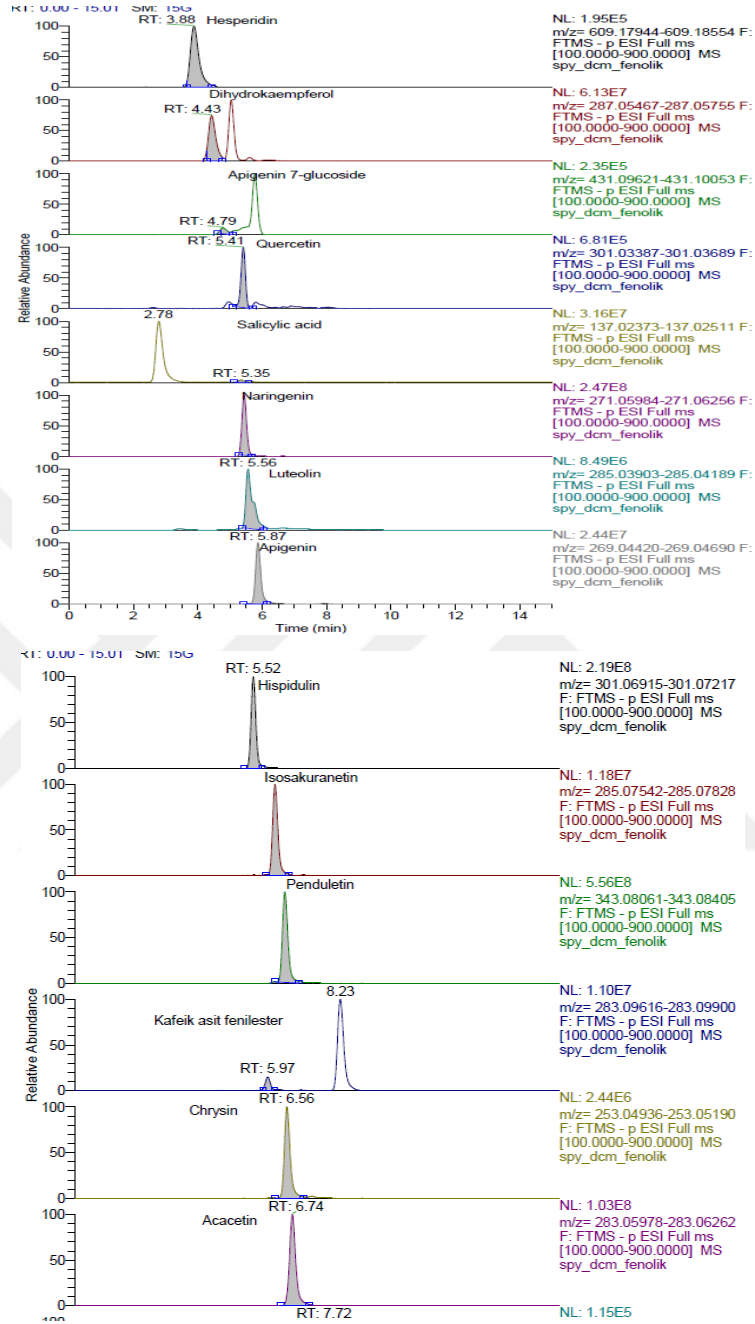
Şekil A.6 : SPD-M-a LC-HRMS kromatogramı



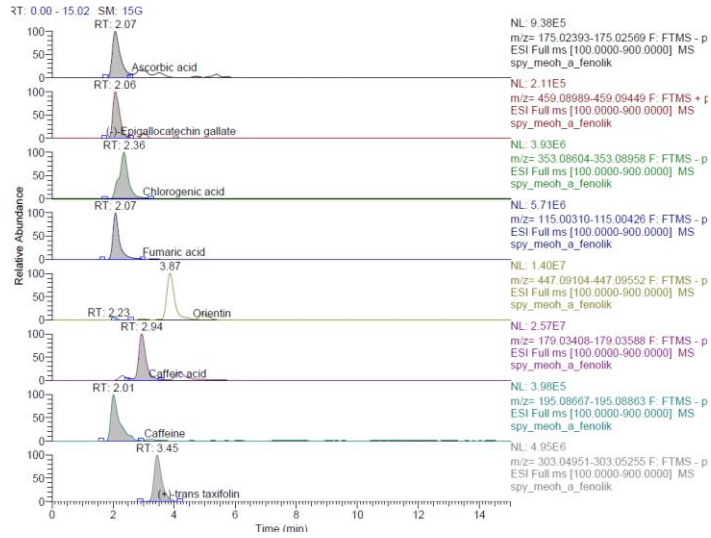
Şekil A.7 : SPY-A LC-MS kromatogramı



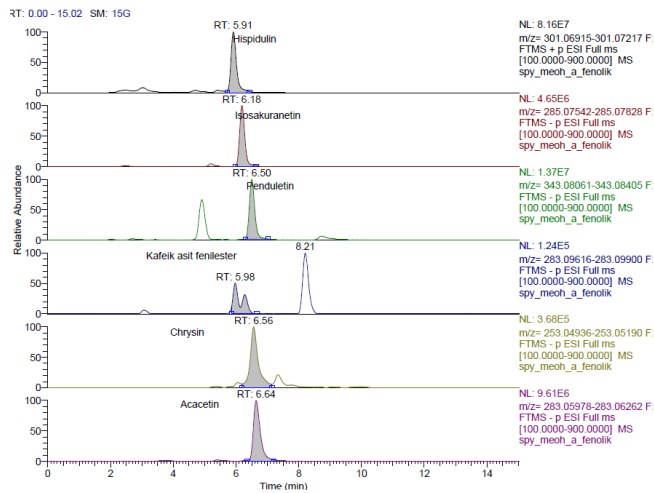
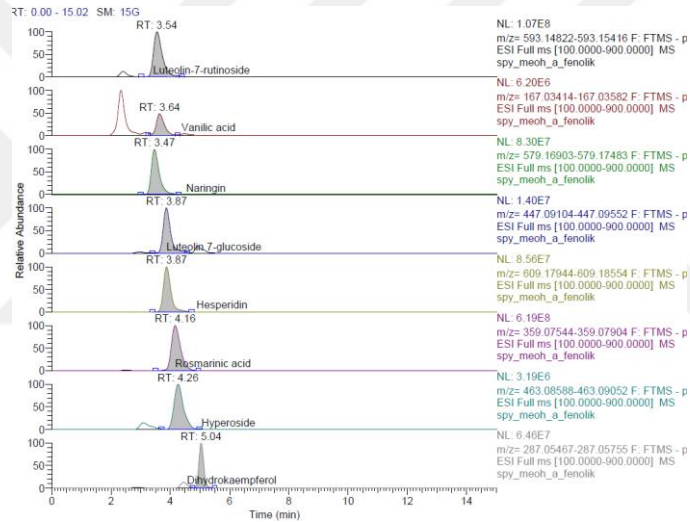
Şekil A.7 (devam) : SPY-A LC-MS kromatogramı



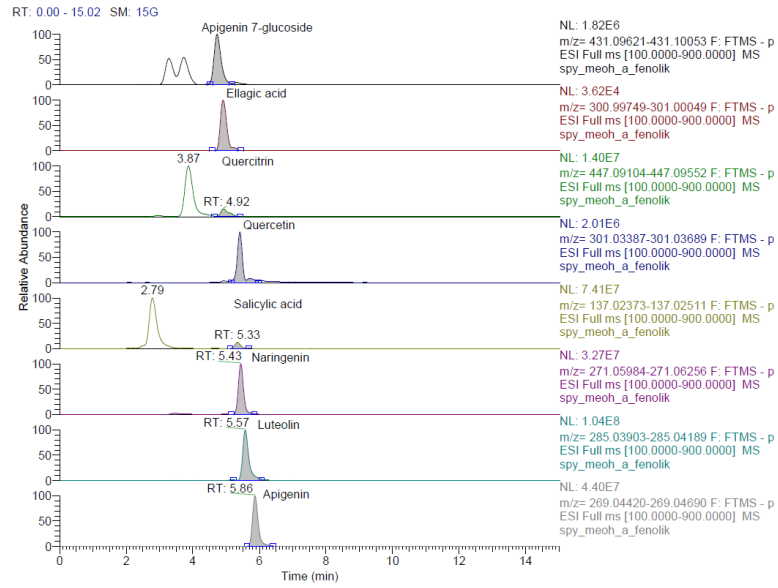
Şekil A.8 : SPY-D LC-HRMS kromatogramı



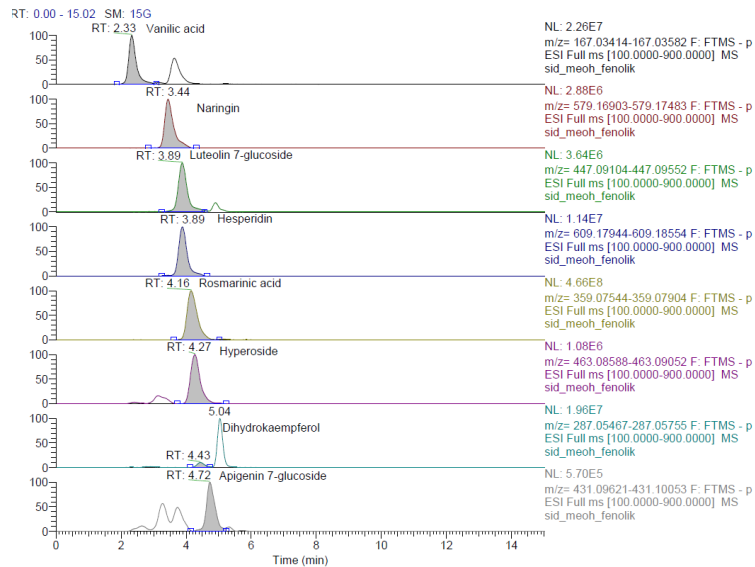
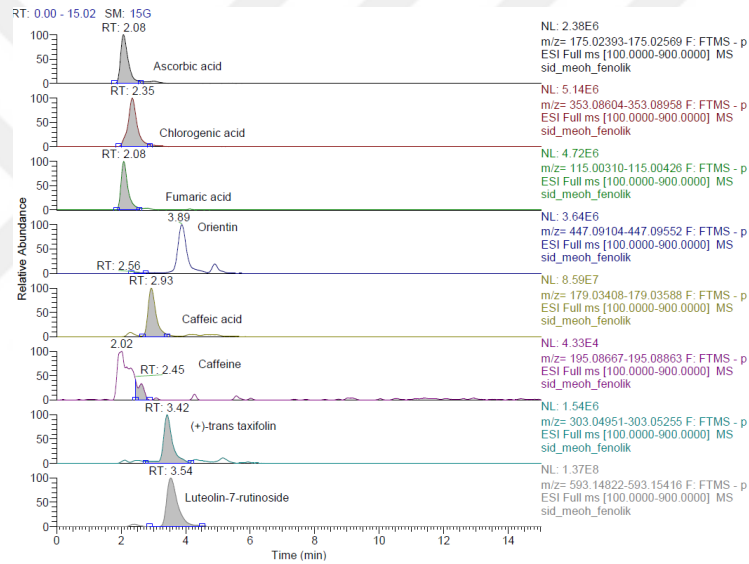
Şekil A.8 (devam) : SPY-D LC-HRMS kromatogramı



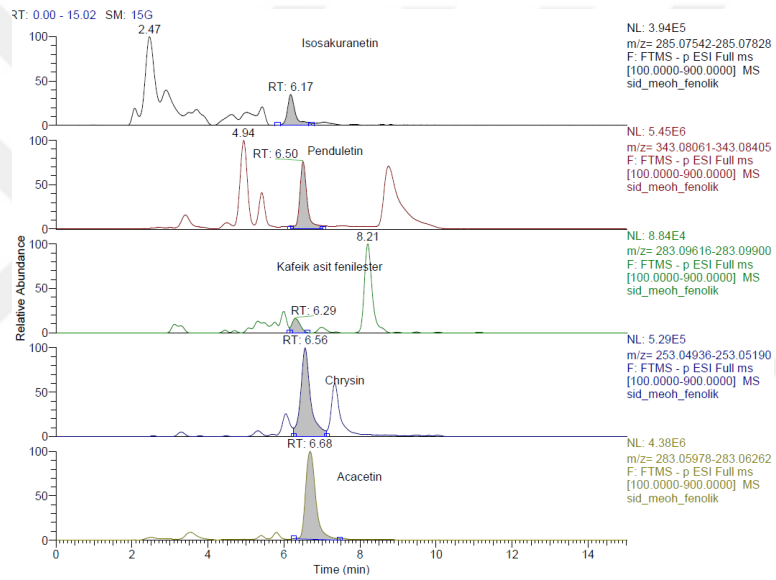
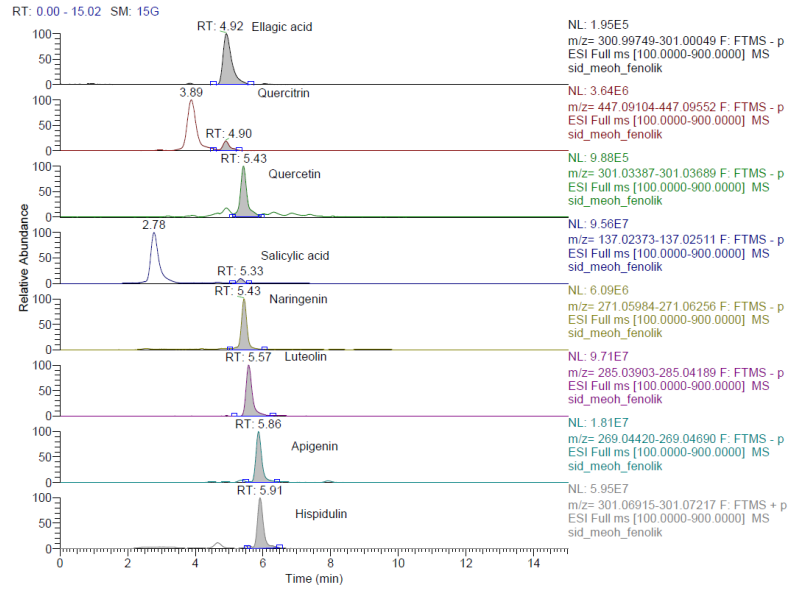
Şekil A.9 : SPY-M-a LC-HRMS kromatogramı



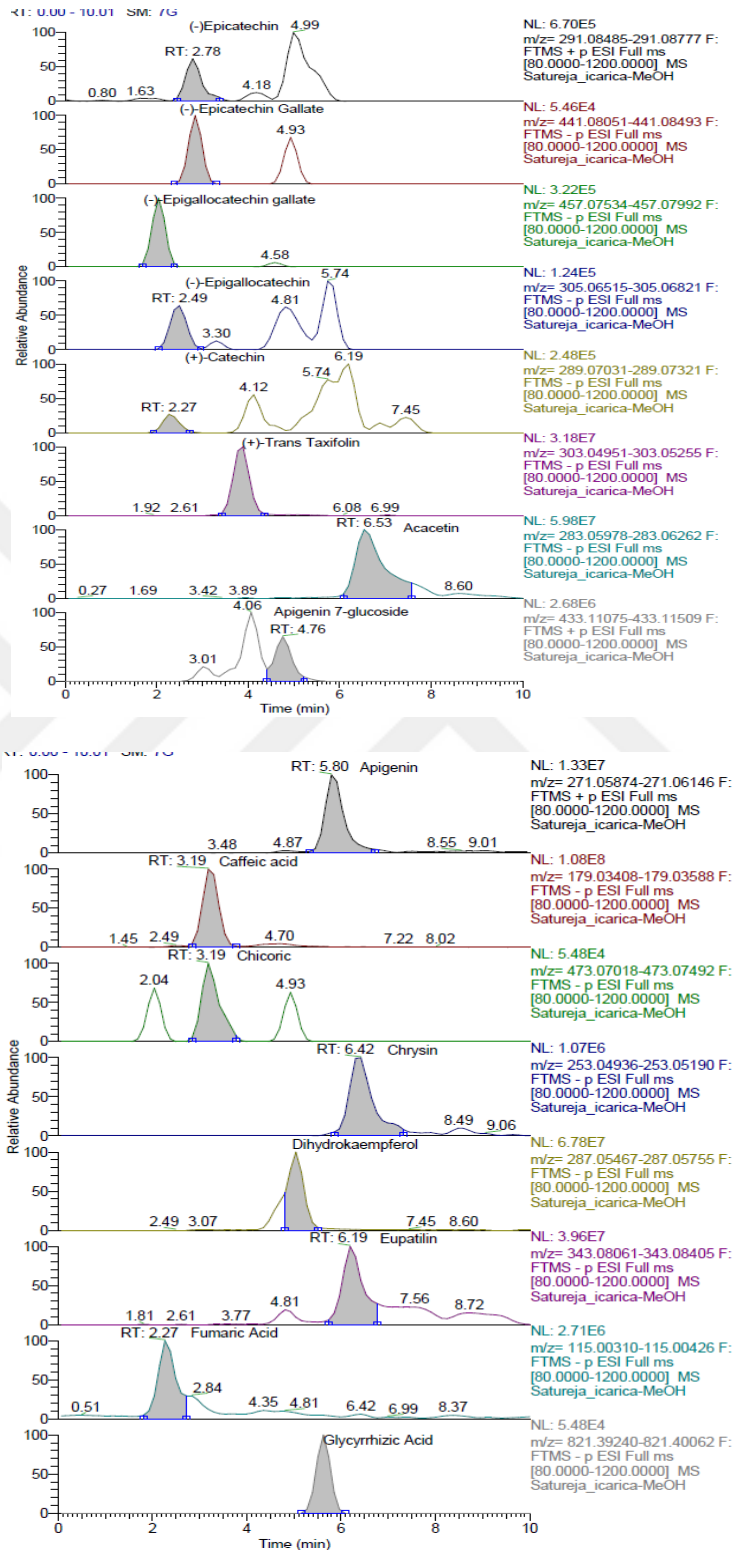
Şekil A.9 (devam) : SPY-M-a LC-HRMS kromatogramı



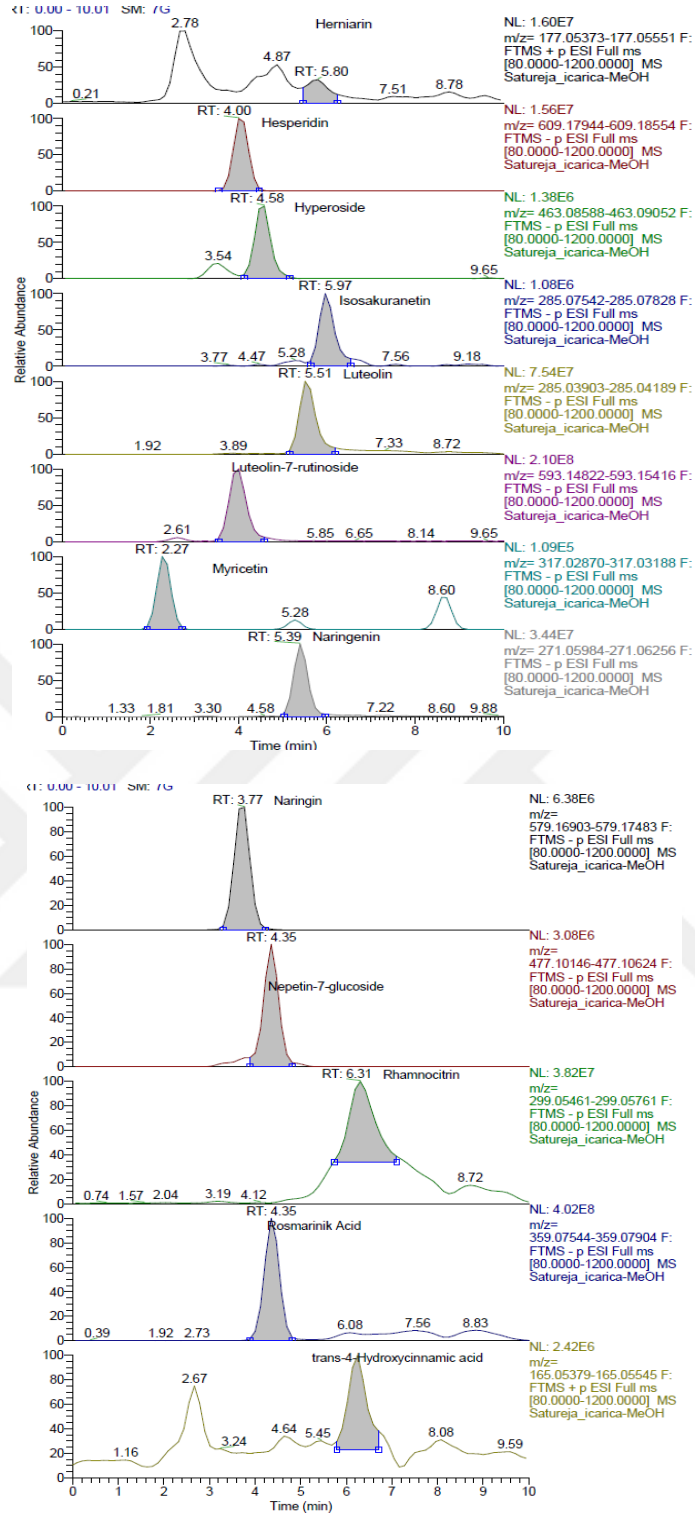
Şekil A.10 : SİD-M-a LC-HRMS kromatogramı



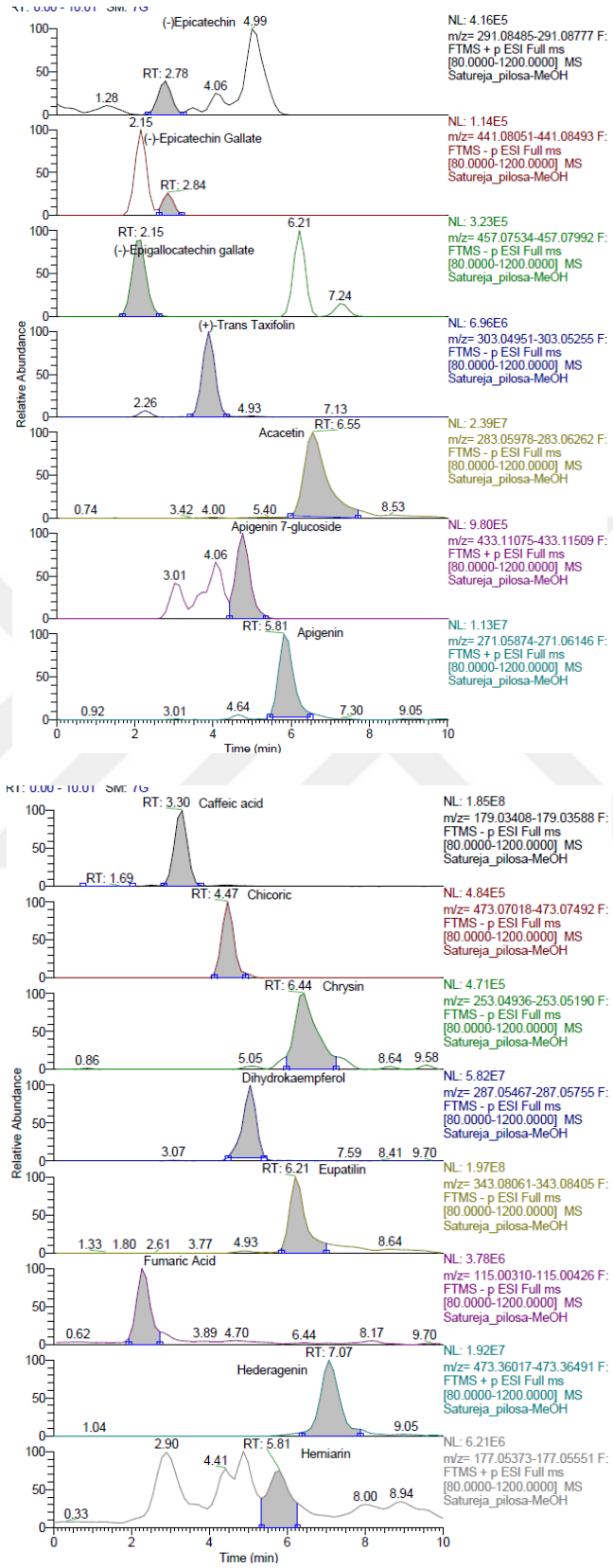
Şekil A.10 (devam) : SİD-M-a LC-HRMS kromatogramı



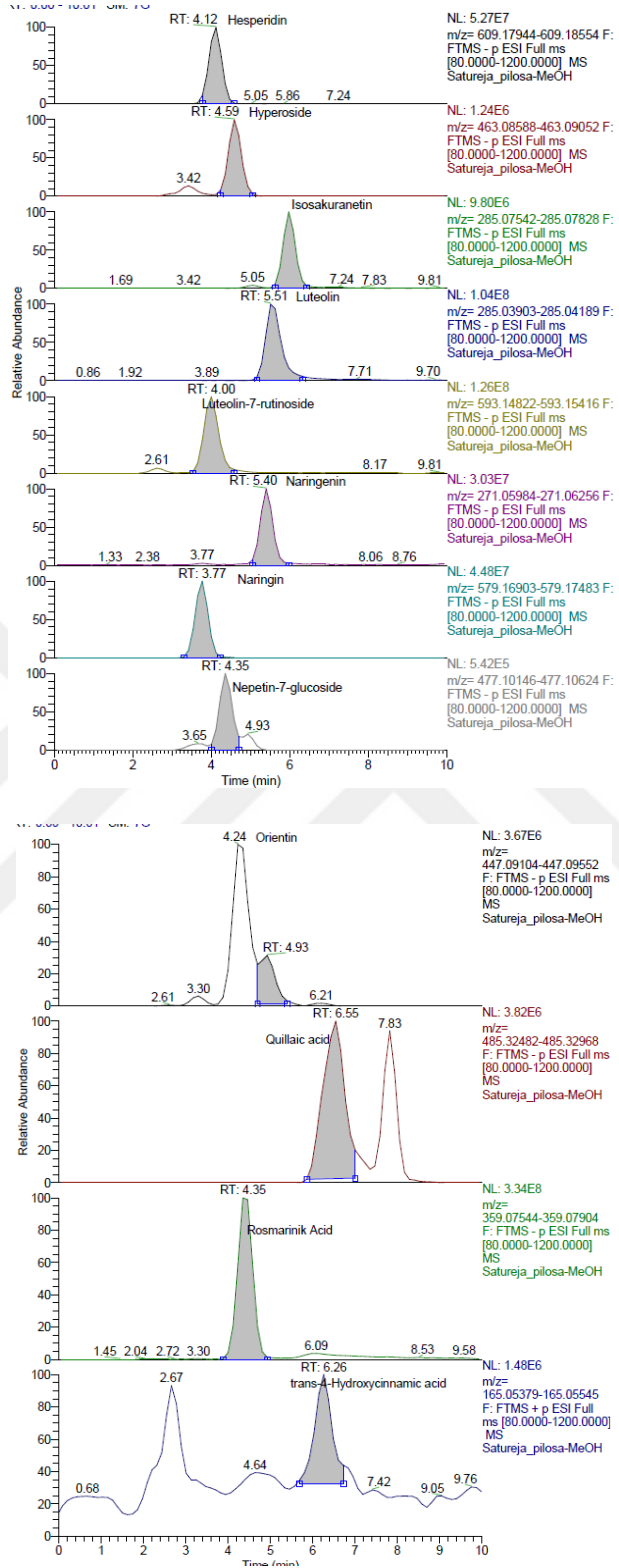
Şekil A.11 : Sİ-D tüm bitki LC-HRMS kromatogramı



Şekil A.11 (devam) : Sİ-D tüm bitki LC-HRMS kromatogramı



Şekil A.12: SP-M tüm bitki LC-HRMS kromatogramı



Şekil A.12 (devam) : SP-M tüm bitki LC-HRMS kromatogramı

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Betül KİRAZ KİNOĞLU

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2002, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi , Kimya Bölümü

YÜKSEK LİSANS TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Betül KİRAZ KİNOĞLU, Ahmet Ceyhan GÖREN** (2021). Satureja Pilosa Velen. Bitkisinin Antikolinesteraz İnhibitör Aktivitesi *6th International Hippocrates Congress On Medical and Health Sciences*, April 30th- May 1th, Turkey.