

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ORMAN GÜLÜ BİTKİSİNİN ÇİÇEĞİNDEN ORGANİK
BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Çiğdem IŞIK

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Ahmet TUTAR

Ocak 2012

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ORMAN GÜLÜ BİTKİSİNİN ÇİÇEĞİNDEN ORGANİK
BİLEŞİKLERİN İZOLASYONU VE BİYOLOJİK
AKTİVİTELERİNİN İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimyager Çiğdem IŞIK

Enstitü Anabilim Dalı : KİMYA

Bu tez 19/01/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Ahmet TUTAR
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Ramazan
ERENLER
Üye


Yard. Doç. Dr. Kudret
YILDIRIM
Üye



TEŞEKKÜR

Bilgisini ve deneyimini, teknik donanım ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen ve çalışmamın olumlu sonuçlanmasında en büyük pay sahibi, sayın danışman hocam Prof. Dr. Ahmet TUTAR'a

NMR spektrumu alımında ve yapılarının yorumlanmasındaki katkılarından dolayı İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü öğretim üyesi Prof. Dr.Gülaçtı TOPÇU' ya

NMR ölçümlerini yapan Yard. Doç. Dr. Mehmet NEBİOĞLU ve Araş. Gör. Fatih SÖNMEZ'e

Tez çalışmamın tüm aşamasında her türlü desteği veren, post doktora öğrencisi Melek GÜL'e

Ayrıca, grubumuz doktora öğrencisi Makbule YILMAZ ve yüksek lisans öğrencileri Gülnur YAZICI, ve Neşe ALTUNTAŞ'a

Bu çalışmayı destekleyen Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na

Desteğini hiç bir zaman eksik etmeyen aileme

Teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xi
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Orman Gülleri (<i>Rhododendron</i>).....	3
2.1.1. <i>Rhododendron luteum</i>	7
2.1.2. <i>Rhododendron caucasicum</i>	8
2.1.3. <i>Rhododendron smirnovii</i>	9
2.1.4. <i>Rhododendron ungerii</i>	10
2.1.5. <i>Rhododendron ponticum</i> L. (Mor çiçekli orman gülü).....	11
2.2. Terpenlerin Tanımlanması ve Sınıflandırılması.....	13
2.3. İzopren Kuralı.....	14
2.4. Terpenlerin Doğadaki Rolü.....	15
2.5. Terpenlerin Ekstraksiyonu ve Kullanılması.....	20
2.6. Doğal İlham Kaynağı.....	21
2.7. Antioksidanlar.....	22
2.7.1. Reaktif oksijen türleri (ROS).....	22

2.7.2. Süperoksit radikali (O ₂ ⁻).....	22
2.7.3. Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂).....	23
2.7.4. Hidroksil radikali (OH [*]).....	24
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE METOT.....	26
3.1. Materyal.....	26
3.1.1. Bitkinin toplanması.....	26
3.1.2. Bitkinin kurutulması ve depolanması.....	26
3.1.3. Kullanılan çözücüler ve kimyasallar.....	26
3.1.4. Saflaştırma.....	27
3.1.5. Kromatografik yöntemler.....	27
3.1.5.1. Kolon kromatografisi.....	27
3.1.6. Spektroskopik yöntemler.....	29
3.1.7. UV lambası ve kabini.....	29
3.1.8. Rotari evaporator.....	29
3.1.9. Hassas terazi.....	29
3.2. Metot.....	30
3.2.1. Kurutma işlemi.....	30
3.2.2. Ekstraksiyon.....	30
3.2.3. Soxhlet ekstraksiyonu.....	30
BÖLÜM 4.	
DENEYSEL BULGULAR.....	32
4.1. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları.....	32
4.1.1. <i>Rhododendron ponticum</i> L. (Mor çiçekli orman gülü)	
üzerinde yürütülen ekstraksiyon ve izolasyon çalışmaları...	32
4.1.1.1. Ekstraksiyon.....	32
4.1.1.2. Ön fraksiyonlama.....	32
4.1.1.3. İzolasyon.....	33
4.2. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular.....	34

4.2.1. İzole Edilen pentosiklik triterpenoid ve fitosterolun yapı tayinleri.....	34
4.3. Aktivite Çalışmaları.....	42
4.3.1. Aktivite tayin yöntemleri.....	42
4.3.1.1. DPPH serbest radikali antioksidan giderim aktivitesi yöntemi.....	42
4.3.1.2. Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (β - karoten-linoleik asit yöntemi).....	43
4.4. Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi.....	45
4.4.1. AChE % inhibisyon testi.....	45
4.4.2. BChE % inhibisyon testi.....	45
BÖLÜM 5.	
SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	48
KAYNAKLAR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	54

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

AChE	: Asetilkolinesteraz
α	: Alfa
β	: Beta
BChE	: Bütirilkolinesteraza
CAS	: Chemical Abstracts Service
COSY	: Correation Spektroskopu
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
d	: Dublet
dd	: Dubletin Dubleti
ddd	: Dubletin Dubletinin Dubleti
dt	: Dubletin Triplet
γ	: Gama
G	: Gram
HETCOR	: Heteronuclear Correlation
IR	: Infrared Spektroskopisi
İTK	: İnce Tabaka Kromatografisi
¹³ C-NMR	: Karbon 13-Nükleer Manyetik Rezonans
KK	: Kolon Kromatografisi
mL	: Mililitre
Ppm	: Milyonda Bir Kısım
m	: Multiplet
¹ H-NMR	: Proton-Nükleer Manyetik Rezonans
s	: Singlet
t	: Triplet

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1.	<i>Rhododendron simsii</i> 'den izole edilen bileşikler.....	2
Şekil 2.1.	Grayanatoksin molekülleri.....	5
Şekil 2.2.	Kumarinler.....	6
Şekil 2.3.	Flavon türevleri.....	6
Şekil 2.4.	Flavonoid türevleri.....	7
Şekil 2.5.	<i>Rhododendron luteum</i>	8
Şekil 2.6.	<i>Rhododendron caucasicum</i>	9
Şekil 2.7.	<i>Rhododendron smirnovii</i>	10
Şekil 2.8.	<i>Rhododendron urgemii</i>	10
Şekil 2.9.	<i>Rhododendron ungemii</i>	11
Şekil 2.10.	<i>Rhododendron ponticum</i>	12
Şekil 2.11.	İzoprenin kimyasal yapısı.....	15
Şekil 2.12.	Çeşitli fonksiyonel terpenoid örnekleri.....	16
Şekil 2.13.	Bitkiler tarafından üretilen çeşitli fonksiyonel terpenler.....	17
Şekil 2.14.	Kimyasal haberciler olarak kullanılan terpen örnekleri.....	18
Şekil 2.15.	Bazı terpen feromonları.....	19
Şekil 2.16.	Ticari amaçla kullanılan bazı terpenler.....	20
Şekil 2.17.	Göğüs ve yumurtalık kanseri tedavisinde etkili bir ajan olarak görev alan terpen.....	21
Şekil 3.1.	Soxhlet ekstraksiyonu.....	31
Şekil 4.1.	β -Sitosterol $^1\text{H-NMR}$ spektrumu.....	34
Şekil 4.2.	β -Sitosterol $^{13}\text{C-NMR}$ ve APT Spektrumları.....	35
Şekil 4.3.	β -Sitosterol TOCSY spektrumu	37
Şekil 4.4.	β -Sitosterol HETCOR spektrumu.....	37
Şekil 4.5.	β -Sitosterol IR spektrumu.....	38
Şekil 4.6.	Ursolik asidin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu	39

Şekil 4.7.	Ursolik asidin ¹³ C-NMR Spektrumları.....	40
Şekil 4.8.	Ursolik asidin APT spektrumu.....	40
Şekil 4.9.	Ursolik asidin COSY spektrumu.....	41
Şekil 4.10.	Ursolik asidin IR spektrumu.....	42
Şekil 4.11.	DPPH serbest radikal giderim aktivitesi.....	46
Şekil 4.12.	Beta-karoten Linoleik Asit (Lipid peroksidasyon inhibisyon aktivitesi).....	47

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Terpenlerin sınıflandırılması.....	14
Tablo 4.1.	β -Sitosterol karbon ve proton kimyasal kayma değeri.....	36
Tablo 4.2.	Ursolik asidin ¹ H- NMR dataları.....	39

ÖZET

Anahtar kelimeler: Mor çiçekli orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.), Ursolik asid, β -sitosterol

Orman gülü (*Rhododendron*) *Ericaceae* familyasına ait olup dünya 1000, ülkemizde 10 türü yetişmektedir. Kocaeli'nin Kartepe ilçesinden toplanan Orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.) bitkisinin çiçekleri; hekzan, metilen klorür ve metanolde ekstre edildi. Hekzan ve metilen klorür ekstrelerinden kromatografik yöntemlerle iki bileşik izole edilerek spektroskopik metodlarla yapıları belirlendi. Hekzan ekstresinden β -sitosterol elde edilirken metilen klorür ekstresinden ursolik asit izole edildi. Hekzan, metilen klorür ve metanol ekstrelerinin antioksidan aktivite testleri gerçekleştirildi. Yapılan DPPH serbest radikal giderme aktivite, lipid peroksidasyon inhibisyon aktivite ve antikolinesteraz aktivite sonuçlarına göre, metanol ekstresi bütün testlerde orta derecede aktivite gösterirken hekzan ve metilen klorür ekstreleri aktivite göstermediği gözlemlendi. İzole edilen bileşiklerin yapıları IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT, DEPT), 2-D NMR teknikleriyle belirlendi.

ISOLATION OF ORGANIC COMPOUNDS FROM THE FLOWERS OF *RHODODENDRON PONTICUM* L. AND INVESTIGATION OF THEIR BIOLOGICAL ACTIVITIES

ABSTRACT

Key words: *Rhododendron ponticum* L., Ursolic acid, β -Sitosterol

Rhododendron (*Ericaceae*) comprises almost 1000 species distributed worldwide and among them, over 10 species are grown in Turkey. The flowers of the plant collected from Kocaeli-Kartepe was extracted with hexane, dichloromethane, and methanol. Two compounds, β -sitosterol and ursolic acid were isolated from the hexane and dichloromethane extracts respectively by chromatographic techniques. The DPPH free radical scavenging, lipid peroxidation and anticolinesterase activity tests of hexane, dichloromethane and methanol extracts were carried out. Although methanol extract exhibited the moderate activity in all tests, hexane and dichloromethane extracts did not show significant activities. The isolated compounds were identified by spectroscopic methods including IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ (APT, DEPT), 2-D NMR techniques.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Orman gülleri (*Rhododendron*) bitkiler aleminin, tohumlu bitkiler bölümünün, fundagiller (*Ericaceae*) familyasına ait odunsu, her dem yeşil veya yaprağını döken, çoğunlukla çalı halinde bitkilerdir. Kuzey yarım kürenin ılıman ve serin bölgelerinde yaklaşık 600 türü bir o kadar da varyete ve formları bulunmaktadır. Bu taksonlardan şimdiye kadar tesbit edilebilen 10 adeti (5 ana tür, 4 melez tür, 1 form) ülkemizde özellikle Doğu Karadeniz yöresinde doğal olarak bulunmakta ve en çok mor çiçekli olanları yetişmektedir [1].

Bazı orman gülü türlerinin narkotik, diş ağrıları ve romatizma ağrılarına [2] karşı kullanılmasının yanı sıra antiinflamatuvar ve antioksidan olarak kullanılmaktadır [3]. Mesela, *Rhododendron simsii* yapraklarından bazı antioksidan maddeler izole edilmiş ve bu maddeler 19, 24-dihidroksiurs-12-en-3-on-28-oik asit (1) ve 7-O-β-D-apiofuranozil-(1→6)-β-D-glukopiranozil matteucinol (2) bileşikleri olarak tanımlanmıştır [4]. Chosson ve arkadaşları *Rhododendron ferrugineumun* çiçeği üzerinde yaptıkları çalışma da yeni bir florasetofenon 4'-glukozid belirlemişlerdir [5]. *Rhododendron ponticum* L. yapraklarının anti-inflamatuvar ve ağrı kesici etkiye sahip oldukları tespit edilmiştir [6].

Bu çalışmada Kocaeli İli Kartepe İlçesi Maşukiye Beldesi'nden toplanan mor renkli orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.) çiçeklerindeki bileşikler izole edilerek yapıları aydınlatıldı ayrıca çiçeklerin farklı çözücüdeki ekstralarının antioksidan aktiviteleri gerçekleştirildi.

BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

2.1. Orman Gülleri (*Rhododendron*)

Rhododendron cinsine ait bitkiler Güney Batı Asya'da, Himaliya'dan Tibet, Burma, Çin, Tayland, Filipinler, Yeni Gine, Kuzey Amerika, Avrupa ve Türkiye'de yetişmektedir [7].

Orman güllerinin herdem yeşil veya yapraklarını döken, ilkbahar ve yaz başlarında açan mor, sarı, kırmızı, pembe çok güzel renklere sahip, katmerli, yarı katmerli veya düz çiçekleri olan çeşitli tür ve hibritleri peyzaj uygulamalarında çok geniş şekilde kullanılmaktadır. Bu bitkilerin büyük yapraklı olanları kuytu ve gölge yerleri tercih ederken küçük yapraklı olanları ise daha güneşli yerleri severler. Orman gülleri gölgede iyi büyüselerde iyi bir çiçeklenme gösteremezler. Güneye ve batıya bakan yerler bu bitkiler için fazla güneşli ve sıcakken doğuya bakan yerler sabah güneşinden faydalanmayı sağladığı için tercih edilir. Kuzeye bakan yerlerde ise pek gölgelenmeye gerek kalmaz. Orman gülleri güneşli ve sıcak yerlerde genelde uzun boylu ağaçların altlarını tercih ederler. Bu bitkiler doğrudan güneş altında veya sıcak yerlerde yetiştirildiklerinde çiçekleri süratle solar. Geç çiçeklen orman güllerini bilhassa güneş yanmalarına karşı korunmak için öğleden sonra kısmen gölge alan yerler aranmalıdır. Bu bitkilerin sığ köklere sahip olmaları kuraklığa karşı hassas olmalarının önemli bir nedenidir. Yapraklarını döken türler dökmeyenlere kıyasla soğuğa daha dayanıklıdır. Orman gülleri genellikle asit (4,5-5,5 pH) ve rutubetli toprakları tercih eder. Bu bitkiler durgun suya karşı kısa süre için de olsa hassas olduklarından, iyi drenajlı yerlere veya su tutmayan yüksek kısımlara dikilmelidir [8].

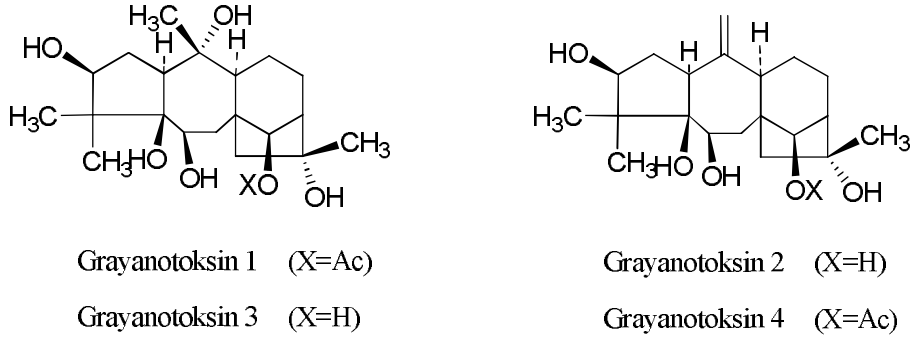
Orman güllerinin budanmaya gereksinimleri yoktur. Yinede geç ilkbahar veya yazın yeni sürgün uçlarından kırpılırlarsa çiçek üretimi artıp bitkinin dolgunlaşması ve kompaktlaşması sağlanabilir. Çiçekler solduktan sonra uzaklaştırılırsa, gelecek yıl için çiçeklenme oranı daha yüksek olur. Orman gülleri tohum, çelik, kalem aşılı ve daldırma ile üretilirler [9].

Halk ilacı olarak da kullanılan orman gülünün ağrı kesici, idrar söktürücü, romatizma ağrılarını giderici etkileri mevcuttur. *Rhododendron*'un bazı türleri taşıdığı zehirli maddelerden dolayı tehlikeli olup, zehirlenmelere sebep olmaktadır [10].

Rhododendron türleri Türkiye'de Karadeniz Bölgesi'nin bol yağış alan dağlık kısımlarında bulunur. Doğal olarak yetişen 5 ormangülü türü vardır. Buna ilaveten birçok melez ormangülü taksonu tespit edilmiştir.

- Sarıçiçekli ormangülü (*Rhododendron luteum*) Batı, Orta ve Doğu Karadeniz
- Mor çiçekli ormangülü (*Rhododendron ponticum*) Bütün Karadeniz sahili boyunca.
- Kafkas ormangülü (*Rhododendron caucasicum*) Rize, Trabzon, Artvin
- Pembeçiçekli ormangülü (*Rhododendron smirnowii*) Rize, Artvin
- Beyaz çiçekli ormangülü (*Rhododendron ungerii*) Artvin

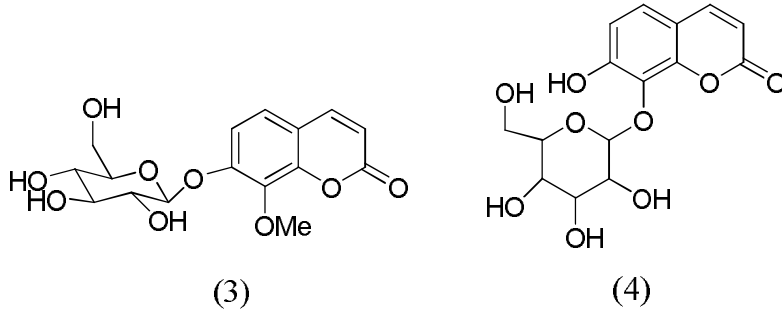
Bal zehirlenmeleri *Rhododendron* türlerinde bulunan grayanotoksin bileşiklerinden (Şekil 2.1) kaynaklanmaktadır. Zehirlenmeler nadiren gerçekleşir ve grayanotoksin zehirlenmesi, bal zehirlenmesi veya rhododendron zehirlenmesi diye adlandırılır. Grayanotoksinler polihidroksil içeren halkalı diterpenlerdir. Grayanotoksinler hücre membranındaki hücrenin aktive ve deaktive olmasına rol oynayan reseptör bölgelerinden olan özel sodyum iyon kanallarına bağlanırlar ve böylece inaktivasyonu engelleyip uyarılmış hücreleri depolarize olarak kalmalarına neden olur.



Şekil 2.1. Grayanotoksin molekülleri

Karadeniz bölgesinde üretilen ballar genellikle grayanotoksin içerir ve zehirlenmelere sebep olur. Grayanotoksinleri içeren bir bal “Deli balı” diye adlandırılır. Deli Balı, yenildiğinde boğazda yanma hissi uyandırması ve keskin tadının olması özelliklerinden dolayı bölge insanı tarafından diğer ballardan kolaylıkla ayırt edilebilmektedir. İlkbaharda üretilen bal diğer mevsimlere göre daha yüksek konsantrasyonda grayanotoksin içermekte ve toksisitesi daha yüksek olmaktadır [11]. Deli balı mide ağrısı, bağırsak bozuntusu, yüksek tansiyon, şeker hastalığı rahatsızlıklarına karşı yerel bir halk ilacı olarak kullanılmaktadır [11, 12]. Bu zehirlenmeleri Karadeniz Bölgesinde yetişen *Rhododendron luteum* ve *Rhododendron ponticum* bitkileriyle ilgili olduğu tespit edilmiştir [12, 13].

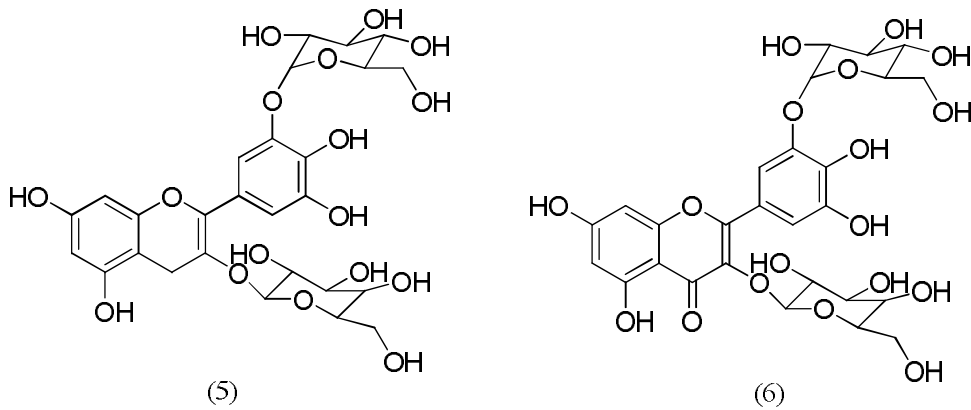
Rhododendron lepidotum'un köklerinin metanol ekstresi üzerinde yapılan çalışmada iki yeni kumarin glikozidi (Şekil 3) izole edilmiş [14] ve bu bileşikler: 7-O-β-D-glukopiranozil-8-metoksibenzopiranon (3) ve 7-hidroksi-8-O-β-glikozilbenzopiranon (4) olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Kumarinler

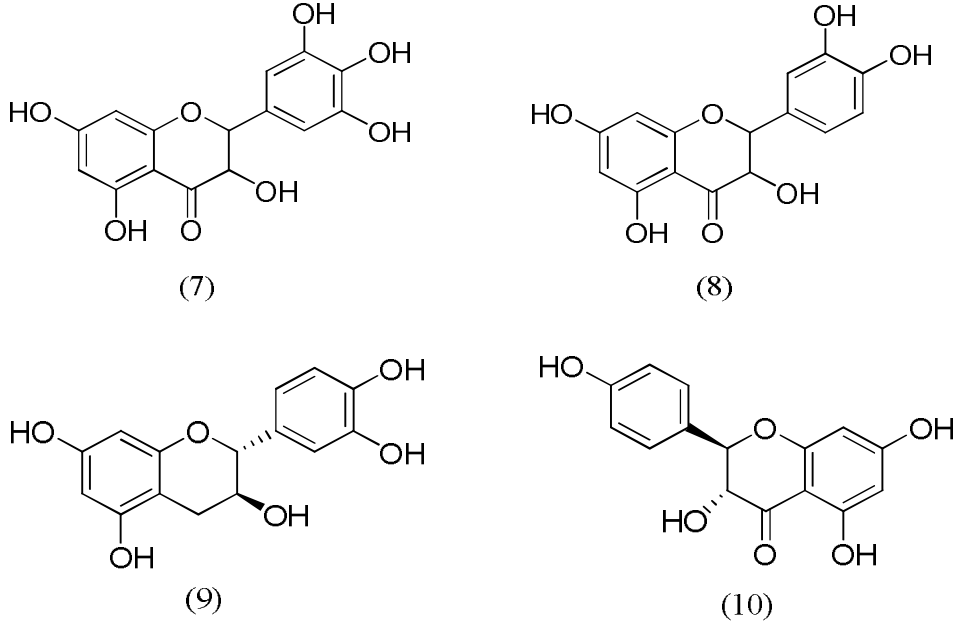
Diğer bir çalışmada Innocenti ve arkadaşları *Rhododendron anthopogon* türünün uçucu yağ bileşenlerini GC-MS ile belirleyerek bu bileşenlerin biyolojik özelliklerini ortaya koymuşlardır. Bu bileşikler α -tujen, α -pinen, camfen, β -pinen, β -mirsen, *p*-simen, limonen, *cis*-osimen, γ -terpinen, α -kopaen, *trans*- β -karyofillen, α -humulen, *Allo*-aromandren, germasren, α -amorfen, α -muurolen, δ -kadinen olarak tanımlanmışlardır [15].

Rhododendron irroratum türü üzerinde yapılan çalışmada iki flavon glikozit (Şekil 2.3) izole edilmiş ve bu bileşikler mirisetin-3-O- β -D-galactozid-3'-O- α -D-glucosit (5) ve mirisetin-3-O- β -D-galactozid-3'-O- α -D-galactozit (6) olarak tanımlanmıştır [16].



Şekil 2.3. Flavon türevleri

Rhododendron decorum türü üzerinde yapılan çalışmada ise biyolojik öneme sahip mirsetin (7), kuersetin (8), kateşin (9) ve dihidrokaempferol (10) flavonoidleri izole edilerek yapıları aydınlatılmıştır [17].



Şekil 2.4. Flavonoid Türevleri

2.1.1. *Rhododendron luteum*

En çok 3-4 metreye kadar uzayabilen, çoğunlukla 1-1,5 m yüksekliğinde, sık dallı, altın sarısı renkli çiçekleri olan ve çiçekleri çok keskin kokulu bir bitkidir. Türkiye’de doğal olarak yetişen ormangülleri içerisinde kışın yaprağını döken tek türdür (Şekil 2.5). Bu tür yetiştirme yeri yüksekliğine göre Nisan sonundan başlayarak Haziran ayı başına kadar çiçek açar ve çiçek açma bitkinin yapraklanmasından evvel olur. Sonbaharda bitkinin yaprakları dökülmeden evvel kırmızımsı bir renk alır.

Rhododendron luteum çiçek ve yapraklarında ötürü değerli bir süs bitkisidir. Bitkinin yayılış alanı Kafkasya ve Türkiye’dir. Bu tür Karadeniz sahilleri boyunca yaygın olarak tam kapalı olmayan orman altlarında, orman kenarı ve orman içi açıklıklarında ve orman sınırı üstünde alpin kesimlerde (2200 m ye kadar) bulunur [18, 19, 20]. Bitki çoğunlukta, mor çiçekli ormangülü ve diğer türlerin aksine güneşli

yerleri ve güney yamaçları sever. Bu yüzden daha çok kuzey yamaçlarda bulunan ladin meşçereleri altında değil, güney yamaçlarda bulunan sarıçam meşçereleri altında daha çok görülür. Ladin meşçereleri altında hakim odunsu diri örtü türü *Rhododendron ponticum*'dur [21, 22]. Yapılan bir çalışmaya göre *Rhododendron luteum* bitkisinin meşçere altında % 20 ışık entasitesi olan siper derecelerinde gelişme imkanı bulabildiği ifade edilmektedir [23].



Şekil 2.5. *Rhododendron luteum*

2.1.2. *Rhododendron caucasicum*

Rhododendron caucasicum birkaç metre boyunda, herdem yeşil, yaprakları deri gibi sert ve içe doğru kıvrık, diğer türlere göre daha küçük olan bir bitkidir. Bitkinin genç sürgünleri ve yaprağının altı pas renkli tüylerle örtülüdür. *Rhododendron caucasicum* çiçekleri beyaz veya açık krem renklidir (Şekil 2.6.). Bitki Kafkasya ile Doğu Karadeniz'in doğu kesimlerindeki yüksek dağlık mıntikalarda (1850 m ile 3000 m ler arasında) bulunur ve genellikle serin ve nemli yerleri sever. Kafkas orman güllerinin çeşitli kültür formları park ve bahçelerde mevcuttur [18].



Şekil 2.6. *Rhododendron caucasicum*

2.1.3. *Rhododendron smirnovii*

Rhododendron smirnovii herdem yeşil çalı ya da 5-6 m boyunca küçük bir ağaççıktır. Bitkinin yaprakları uzun ve kenarları ince dişlidir. Çiçekleri gül pembesi rengindedir. *Rhododendron smirnovii* Mayıs-Haziran aylarında çiçek açar ve bitki çiçeklerinden ötürü kültüre alınmıştır.

Rhododendron smirnovii doğal melezlerinin dışında öteki türlerle yapay olarak çeşitli melezleri elde edilmiştir (Şekil 2.7). Bitkinin vatanı Kafkasya ve Türkiye'nin Doğu Karadeniz yöresidir.



Şekil 2.7. *Rhododendron smirnovii*

2.1.4. *Rhododendron ungerii*

Rhododendron ungerii, *Rhododendron smirnovii*'ye çok benzer. Ancak bu bitki yapraklarının düz kenarlı ve uçlarının sivri oluşu, çiçeklerinin açık pembe, beyaz ve içlerinde yeşil beneklerin bulunuşu ile ayrılmaktadır (Şekil 2.8-9). *Rhododendron ungerii* yerel bir yayılışa sahiptir ve Kafkaslar ile Kuzey Doğu Anadolu'da yayılır.



Şekil 2.8. *Rhododendron ungerii*

Bu bitki de öteki türler gibi kültüre alınmıştır. Bitki genellikle ladin ormanlarından bazen de kayın ve diğer ormangülleri ile birlikte 1000-2000 m yükseklikler arasında yayılır [18, 19].



Şekil 2.9. Rhododendron ungueri

2.1.5. *Rhododendron ponticum* L. (Mor çiçekli orman gülü)

Bu bitki çoğunlukla 3-4 m boyunda ve sürünücü gövdeler kadar boylanabilen küçük bir ağaççıktır. *Rhododendron ponticum* bitkisinin yaprakları herdem yeşil ve deri gibi sert, çiçeleri leylak kırmızı (mor) renkli ve iç kısmı kahverengi lekeli.

Mayıs ve Haziran aylarında çiçek açan bu bitki çiçek ve yapraklarından ötürü dekoratif bir süs bitkisidir (Şekil 2.10). Bitkinin ana türden başka bir çok değişik formu vardır [18, 19]. Bu bitki gölge yerleri, derin hatta nemli toprakları sever.

Bu orman gülü türü özellikle tahrip edilmiş veya aşırı müdahale edilmiş bozuk karakterdeki ormanlık alanlarda aşırı yayılım göstererek toprağı sıkıca örttüğü için bu gibi ormanların gençleştirilmesi çalışmalarında bir engel teşkil eder.

Bitki yoğun gölgesi, asit karakterdeki döküntüsü ve yapraklardaki toksin madde nedeniyle, altında ve yanındaki flora ve faunayı uzaklaştırır [24, 23].

Bitki *Rhododendron luteum*'a göre sıcaklık isteğı daha fazladır ve daha çok Fagetum (Kayın) zonunda bulunur. Karadeniz Bölgesi'nde sahilden başlayarak 1800-2100 m

yüksekliklere kadar çıkar. Tüm Karadeniz sahilleri boyunca batıda İstırancalar'a kadar uzansa da, en bol olduğu kesim Kuzey Doğu Anadolu dağlarıdır. Bitki buralarda yapraklı ve iğne yapraklı ormanlarda meşçere altında ve açılan alanlarda yaygın olarak tek başına ya da diğer orman altı florası ile birlikte bulunur [18, 19].



Şekil 2.10. *Rhododendron ponticum*

Orman altında gün ışığının % 42'sinden yararlanarak dahi hayatini devam ettirebilmektedir. Fakat iyi bir büyüme için % 5-10 arasında ışık ister. Ormangülü 10-12 yaşından önce çiçek vermez, yani tohum tutmaz. Bir kök ormangülü her yıl yaklaşık 1 milyon tohum verir [18, 25, 26].

Bu bitkinin dünyada genel yayılış alanı Portekizdir. Bitki İspanya'dan Türkiye'ye kadar uzanan yerlerde ve Kafkasya'da doğal olarak yetişir. Ayrıca Suriye ve Lübnan'ın dağlarında da az miktarda bulunmaktadır.

2.2. Terpenlerin Tanımlanması ve Sınıflandırılması

Bitkiler ve hayvanlar farklı organik bileşiklerin geniş bir yelpazesini içerirler. Bitki ve hayvanların kimyasal bileşikleri primer ve sekonder metabolitler olarak sınıflandırılır. Tüm türler için yaygın olan primer metabolitler proteinler, nükleik asitler, lipitler ve karbonhidratlar gibi sınıflara ayrılır. Bu sınıflandırma üyelerinin kimyasal yapılarına göre belirlenir. Sekonder metabolitler ‘‘doğal ürünler’’ olarak da adlandırılır.

Doğal ürünler terpenlere, alkaloidler, çeşitli aromatik bileşikler ve poliketidler gibi bileşikler dahildir. Sınıflandırma maddelerin nelerden oluştuğuna bağlı olarak yapılmıştır. Bu sentezler, biyosentetik ya da biyogenetik yollar olarak adlandırılır. Spesifik sekonder metabolitlerin yaygın olan birçok türü olabilir ya da yalnızca bir organizma tarafından üretilebilir. İlgili türler sekonder metabolit ürünün modelleri sıklıkla ilişkilendirilir ve böylece bir tür sekonder metabolit ve onun ürününe bağlı olarak sınıflandırılır. Bazen benzer fiziksel görünüme sahip bitkiler bulunduğu botanikçiler sınıflandırma için ürettikleri sekonder metabolitlerin farklılığından yararlanırlar. Örneğin iki çiçek benzer görünümlü olabilir, bunlardan biri kokusuz iken diğeri içerdiği terpen sayesinde hoş bir kokuya sahip olabilir.

Terpenler belirli sayıda izopren birimlerinden oluşurlar. İzopren beş karbonlu bir birimdir ve bu nedenle karbon atomlarının sayısı her terpenoid için beş ve beşin katları şeklindedir. Terpenlerin bozulma ürünleri farklı sayıda karbon atomlarını içerebilir. Terebentin içinde bulunan hidrokarbonlar genel olarak terpenler olarak isimlendirilir. Son ek olarak yazılan ‘‘en’’ olefinik bağların varlığını gösterir. Bu maddelerden çoğu iki izopren birimi dolayısıyla on karbon atomu içeren monoterpenlerdir. Benzer şekilde 4 izopren birimi ve 20 karbon atomu içerenler diterpenler olarak adlandırılır. Bu sebeple ailenin basit üyelerinin çoğu hemiterpenler olarak bilinen ve ondan gelen yalnızca bir izopren birimlerini içerir (Tablo 2.1). Yaygın sınıflandırmaya göre terpen ailesi çeşitli gruplarasahiptir. Steroidler ve karotenoidler sırası ile triterpenler ve tetraterpenler ile alakalıdır. Terpen kelimesi

herhangi bir terpenoidi belirtmek için kullanılır. Benzer şekilde izopren terimi sıklıkla terpenoidlerin yerine kullanılır.

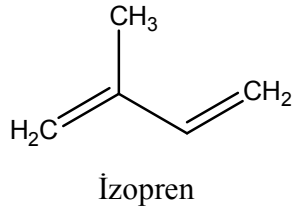
Tablo 2.1. Terpenlerin Sınıflandırılması

	Terpenler	İzopren Sayısı	Karbon Atomları
1	Hemiterpenler	1	5
2	Monoterpenler	2	10
3	Seskiterpenler	3	15
4	Diterpenler	4	20
5	Sesterpenler	5	25
6	Triterpenler	6	30
7	Tetraterpenler	8	40
8	Poliizoprenler	> 8	> 40
9	Karotenoidler	8	40

2.3. İzopren Kuralı

Ruzicka tarafından önerilen izopren kuralı, terpenleri izopren (Şekil 2.11) birimlerinin birlikte katılmasıyla oluşan karbon iskeleti içeren kimyasallar olarak tanımlar. İzopren terpenlerin yapı taşıdır ve 2 metilbüt-1-3-dienden oluşur. 2 metilbütan ailesi bileşikleri incelendiğinde, molekülün bir ucunu dallanmış nanoskalar büyük bir baş, diğer ucunun ise kuyruktan oluştuğunu düşünebilir. Böylece, prensip olarak iki izopren birimi kafa x kafaya, kuyruk x kuyruğa ya da baş-kuyruk kondenzasyonu gösterebilir. Yaygın olarak tercih edilen ise baş-kuyruk birleşmesidir. Arasına, kuyruk kuyruğa bağlanma da meydana gelir. Bu streoidlerin ve karatenoidlerin karakteristik bir özelliğidir. Her iki sınıfta da tamamiyle omurganın merkezinde bir kuyruk-kuyruğa katılma vardır, diğer katılmalarsa baş-kuyruk şeklinde gerçekleşir. Basit C_{5n} iskeletinin oluşmasından sonra, oksijenin ya da

diğer heteroatomların girişiyle, fonksiyonel zincir halkalar oluşturmak amacı ile bükülür.



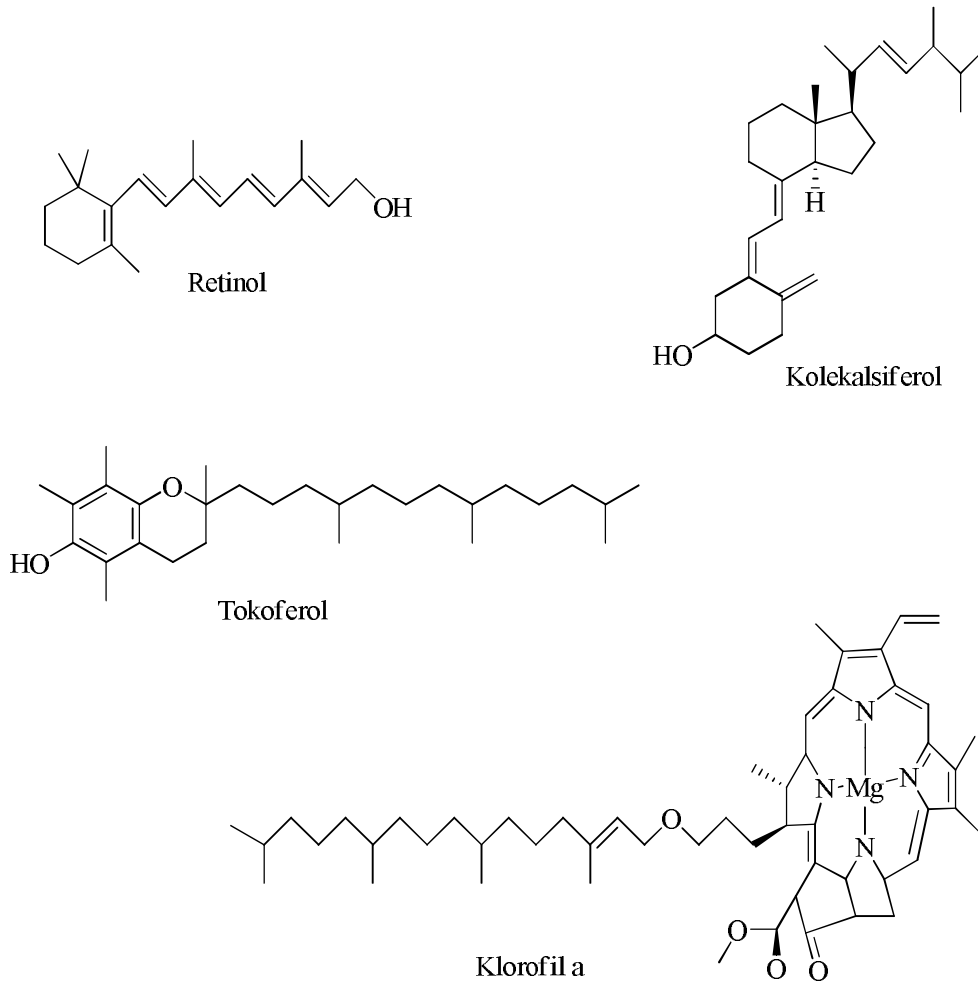
şekil 2.11. İzoprenin kimyasal yapısı

2.4. Terpenlerin Doğadaki Rolü

Terpenler çok farklı bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizma türlerinde gözlenir. Terpenlerin sentez yerleri onları üreten organizmaların üzerindedir. Terpenler canlılarda çeşitli rollere sahiptir. Bu roller genelde fonksiyonel, savunma ve iletişim ile ilgilidir.

şekil 2.12.'de fonksiyonel terpenlerin anlamının bazı örnekleri verilmektedir. Bu terpenler kendini üreten organizmaların metabolik süreçlerinde önemlidir. A vitamini ya da retinol gözde ışığı algılayan pigmentler için öncüdür ve bu nedenle A vitamini görme olayında rol oynar. Vitamin E ya da tokoferoller önemli antioksidanlardır ve hücreleri oksidatif zararlardan korurlar. Kolekalsiferol olarak da bilinen D₃ vitamini vücuttaki kalsiyum metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynayan kalsitriol hormonunun çıkış maddesidir. Yeşil bir pigment olan klorofil-a, bitki yapraklarında bulunur ve fotosentezde önemli bir rol oynar.

Bitki ve hayvanlar kendilerini korumak için terpenleri farklı şekilde kullanır. Muhtemelen, en yaygın iki metod zarar görmüş bitkiler tarafından üretilen ve avcılara karşı bir bitki ya da hayvanı itici kılan bileşiklerin üretimidir. Birçok bitki, zarar gördüğü zaman savunma mekanizması olarak bazı bileşikleri akıtır. Kabuğu zarar gördüğünde ananas ağacı tarafından bulaşıcı organizmalara karşı fiziksel bir bariyer olarak bazı bileşikler üretir.



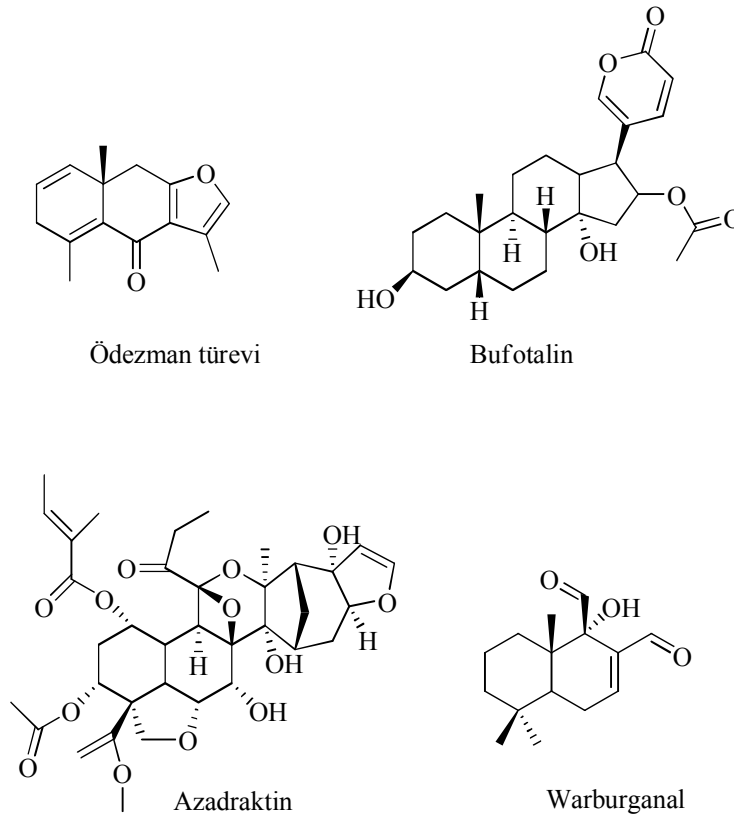
Şekil 2.12. Çeşitli fonksiyonel terpen örnekleri

Benzer bir şekilde, bazı bitkilerin ürettiği kauçuk bir koruyucu salgıdır. *Commiphora abyssinica* bitkisinin ürettiği reçine birçok antifungal ve antibakteriyel bileşik içerir. Bu bileşiklerden biri de Şekil 2.13’de gösterilen ödezman türevidir [27].

Bu tip bileşiklerin rolü bitkinin yaralarını kapamak, bitkiye mantar ve bakterilerin girmesini ve zarar vermesini önlemektir. Reçine hoş bir kokuya sahiptir ve bu sebeple parfüm maddesi olarak kullanılır. Bu reçine mür (laden reçinesi, sarı sakız) olarak bilinir. Ayrıca mür (laden reçinesi) antimikrobiyel özellikleri sebebiyle antiseptik ve koruyucu madde olarak kullanılır. *Basuella* türlerinden elde edilen tütüsü ise başka bir reçine türüdür ve binlerce yıl dini ayinlerde kullanılmıştır.

Şekil 2.13.'de kardiyak bir glikozit olan ve kalp uyarıcı fonksiyonlara sahip Bufotalin de gösterilmektedir. Bu bileşik kurbağalar tarafından kendilerini avlayan diğer hayvanlardan korunmak için üretilir ve bu sayede avcılar kurbağaları iyi bir yemek olarak tercih etmezler.

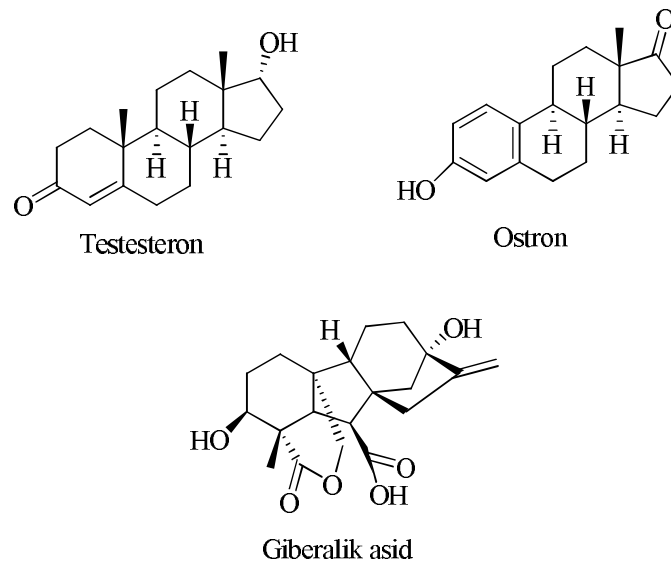
Benzer şekilde bir çok bitki kendilerini otçul hayvanlardan korumak için terpenleri üretir. Bu tip bileşiklerin iki örneği Şekil 2.13.'de gösterilmektedir. İlk bileşik *Melia azadirachta* ve Hindistan yalancı tespih ağaçlarından üretilen bir intektisid olan azadraktindir. Diğer ise *Warburgia* cinsi bitkiler tarafından üretilen warburganal bileşiğidir.



Şekil 2.13. Bitkiler tarafından üretilen çeşitli fonksiyonel terpenler

Warburganal ve bazı durumlarda alerjik bir reaksiyona veya kansorejen etkiye sebep olur. Bu bileşik yüksek toksisite ve hoş olmayan tadından dolayı çift etkili bir önleyicidir.

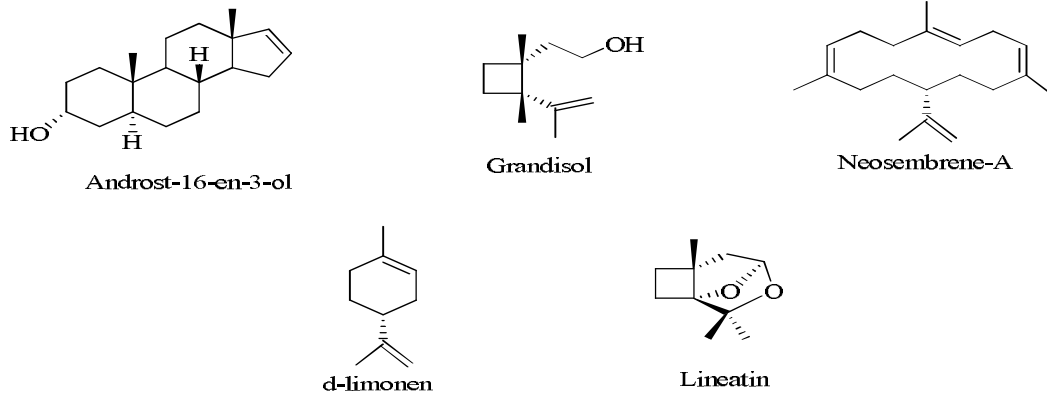
Terpenler, kimyasal haberciler olarak da kullanılır. Bazı hormon örnekleri Şekil 2.14.'de gösterilmektedir. Gibereellik asid bitkilerdeki önemli bir büyüme düzenleyicisidir. Testesteron ve östron memelilerin eşey hormonlarından Testesteron erkek bireylere, östron ise dişi bireylere has hormonlardır. Aynı türler arasında haberleşmeyi sağlayan kimyasal maddelere feromonlar adı verilir. Feromonlar farklı amaçlar için kullanılır ve feromonların en yaygınları eşey feromonlarıdır. Tüm türler feromon kullanmaz. Özellikle, topluluk yaşayan böcekler olan karıncalar, termitler ve arılar feromonları çeşitli amaçlar için kullanılır. Bazı terpen feromonları Şekil 2.15.' da görülmektedir.



Şekil 2.14. Kimyasal haberciler olarak kullanılan terpenoid örnekleri

Karıncalar ve termitler yuva ve besin kaynağı arasında iz feromonlarını bir yol işareti olarak kullanırlar. Bu karıncaların sık sık uzun mesafelerde yürüyüşte görülmelerinin nedenini açıklar. Neosembren-A böyle bir iz feromonudur. Bu bileşik Avustralya' da *Naustitermes exitiosus* türünden üretilir ve termitler tarafından kullanılır.

Kitle halinde yaşayan böcekler feromonları, alarm, toplama, dağılma, grup davranışlarını denetlemek ve grubu uyarma amaçlı kullanırlar. Örneğin D-limonen bazı Avustralya termitlerinin alarm feromonudur ve lineatin *Trypodendron zireotumun* için toplanma feromonudur.



Şekil 2.15. Terpen yapıdaki bazı feromonlar

Allelokimyasallar ise farklı türlerin üyeleri arasında mesaj taşır. Bu grup içinde allomenler sinyalin gönderilmesine yarar. Kayromenler ise sinyalin alıcısıdır ve siromenlerle birlikte alıcı ve verici olarak faydalanılır.

Kamfor ve limonen birer allomondur ve bazı ağaçlar tarafından üretilir. Ağaçlar bu terpenlerin varlığı sayesinde böcek saldırılarından korunur. Örneğin, yirminci yüzyılın büyük terpen kimyagerlerinden biri olan Arthur Birch *Araucaria bidwilli* türlerinin ağaçlarından sızan bitki sütü içinde D-limonen bulunduğunu bildirmiştir. Bu ağaçlar aynı bölgede yaşayan termitler için bir alarm feromonu üretir ve D-limonen sayesinde termit saldırılarından korunurlar.

Benzer şekilde, normal beslenme şeklini inhibe eden maddeler sinyal üretici allomenler olarak düşünülebilir. Mirsen bir çam türü tarafından üretilen bir kayromondur ve bileşiğin varlığı kabuk böceğinin (*Dendroctonus brevicomis*) dışısını çeker.

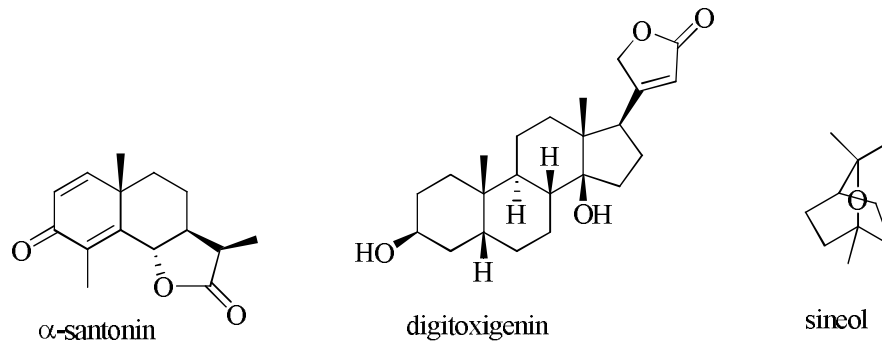
Geraniol gül gibi birçok bitkinin kokusunda bulunur. Çiçeklerdeki bu bileşiğin varlığı böcekleri çeker ve o bitki bir tozlayıcı elde eder, böcekleri çeken bu nektar sinomon olarak sınıflandırılır.

Alışılmadık bir sinyal özelliğine sahip bir diğer terpen nepetolaktondur. Bu iki izomerin bir karışımıdır. Nepetolakton kedi nanesi (*Nepetacataria*) veya Catnipin

yağının temel bileşenidir ve yağın % 70–90'ını oluşturur. Bitki bu bileşiği muhtemelen böcek kovucu olarak üretir.

2.5. Terpenlerin Ekstraksiyonu ve Kullanılması

Terpenlerin ticari kullanımlarının çoğu onların doğal kullanımlarını yansıtır. Terpenler doğal bileşiklerdir ve genelde biyolojik aktiviteleri sebebiyle ilaç ya da haşere kontrol ajanları olarak ticari kullanımları mevcuttur. Örneğin, bazı bitkilerden ekstrakte edilen α -santonin bir kurt düşürücü (antihelmintik) olarak kullanılır. Yüksük otunun terpen glikozitlerinin varlığından dolayı doğal bir zehiri vardır ve bu zehir kalp kası üzerinde güçlü uyarıcı etkiye sahiptir. Yüksük otundan ekstrakte edilen dijitoksin bir kardiyak glikozittir ve bazı kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılır. Kokulu terpenler kozmetik, ev ve temizlik malzemeleri için kokulu bileşen olarak kullanılır. Çeşitli okalıptüs türlerinden elde edilen sineol, parfümeride kullanılmasının yanı sıra burun açıcı olarak da kullanılır (Şekil 2.16.).

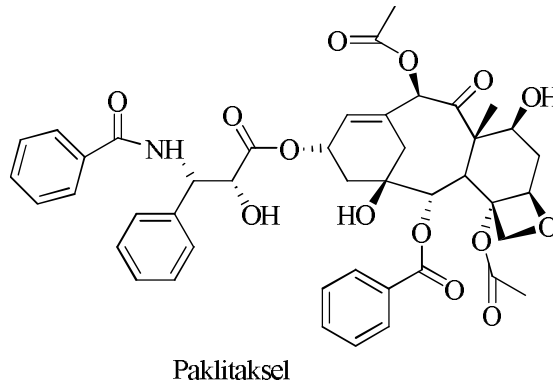


Şekil 2.16. Ticari amaçla kullanılan bazı terpenoidler

Terpenler uygun fiziksel ve kimyasal özelliklerinden yararlanılmak üzere kullanılır. Savunma salgısı olarak kauçuk ağacından üretilen kauçuk bir izopren polimeridir. Kauçuk elastik özelliklerinden dolayı insanlar tarafından yaygın bir şekilde kullanılır. Terebentin uzun zamandır çözücü olarak kullanılmaktadır.

2.6. Doğal İlham Kaynağı

Terpenlerin kimyası çok çeşitli ve zengindir. Bazen doğal kaynaklardaki terpen seviyesi, ticari amaçlı ekstraksiyon yapmak için çok düşük olabilir. *Taxus brevifolia* (bir porsuk ağacı türü) tarafından üretilen paklitaksel ticari adı taksol olarak bilinir (Şekil 2.17.). Paklitaksel göğüs ile yumurtalık kanseri tedavisinde etkili bir ajan olarak kullanılmaktadır. Buna rağmen, ağacın kabuğundaki paklitaksel seviyesi çok düşüktür. Bir hastayı tedavi etmek için gereken paklitaksel üç olgun ağaçtan elde edilebilir. Olgun bir ağacın yetişmesi ise en az birkaç yüz yıl anlamına gelir. Hatta bu hastalıkla maruz kalan hastaların küçük bir yüzdesini tedavi etmek için dünyadaki bütün ağaçlar yetersizdir. Bu nedenle paklitakseli kısmen veya tamamen üretmek için birçok farklı girişim gerçekleştirilmiş ve paklitakselin antikanser aktivite özelliğini gösterecek analoglarını üretmek için yapılan çalışmalar büyük önem kazanmıştır.



Şekil 2.17. Göğüs ve yumurtalık kanseri tedavisinde etkili bir ajan olarak görev alan terpen

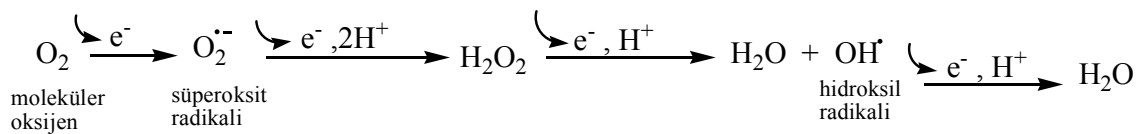
Tabiat kimyagerler için bir ilham kaynağıdır ve bugünün parfümeri maddeleri, ilaçlar ve tarım kimyasalları doğal terpenler ya da onların yakın analoglarından çoğaltılmaktadır.

Bu çalışmada, tüm bu bilgilerden esinlenerek Mor çiçekli orman gülünün ekstraksiyonu, elde edilen organik bileşiklerinin izolasyonu çalışılmıştır [28].

2.7. Antioksidanlar

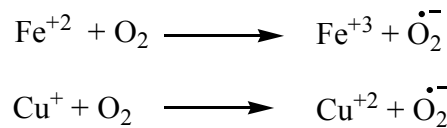
2.7.1. Reaktif oksijen türleri (ROS)

Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizmaları vardır. Reaktif oksijen türleri (ROS), süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^{\cdot})'dir.

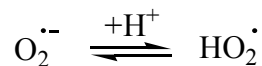


2.7.2 Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$)

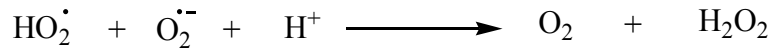
Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) neredeyse tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin otooksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir.



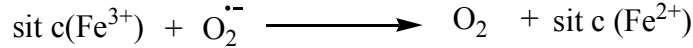
Süperoksit radikali doğrudan zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olarak rol almasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir ve oksidan perhidroksi radikali (HO_2^{\cdot}) oluşturmak üzere protonlanır.



Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince biri okside olurken diğeri ise indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir.



Süperoksit radikali hem oksitleyici hem indirgeyici özelliğe sahiptir. Örneğin ferrisitokrom c ya da nitroblue tetrazolium ile reaksiyonunda indirgeyici olarak davranarak bir elektron kaybeder ve moleküler oksijene okside olur.

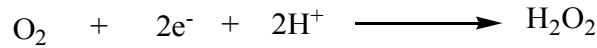
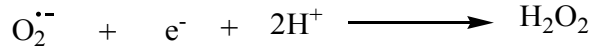


Süperoksit radikali epinefrinin oksidasyonunda oksidan olarak davranarak bir elektron alır ve hidrojen peroksit (H₂O₂) indirgenir.

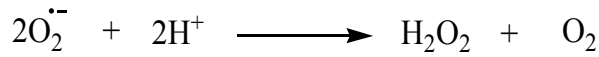
Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO[•]) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit (ONOO⁻) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit (NO₂⁻) ve nitrat (NO₃⁻) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO₂[•]), hidroksil radikali (OH[•]), nitronyum iyonu (NO₂⁺) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki nitrik oksitin (NO[•]) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur [29, 30, 31, 32].

2.7.3. Hidrojen Peroksit (H₂O₂)

Hidrojen peroksit (H₂O₂), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin iki proton (H⁺) ile birleşmesi sonucu meydana gelir.



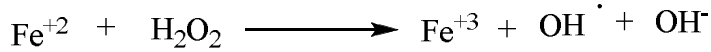
Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksidin asıl üretimi, süperoksidin (O₂^{•-}) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksidin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar.



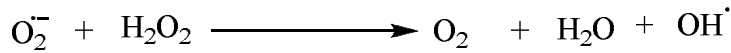
Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana geldiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir ve bu reaksiyon ya kendiliğinden gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz (SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Kendiliğinden dismutasyon pH 4,8'de en hızlıken enzimatik dismutasyon ise kendiliğinden dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH' da daha belirgindir.

Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri (ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{2+} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalının ($\text{O}_2^{\cdot-}$) varlığında Haber-Weiss reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^\bullet) oluşturur.

Fenton reaksiyonu



Haber-Weiss reaksiyonu



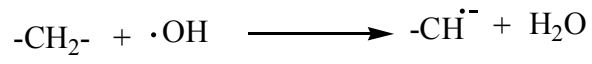
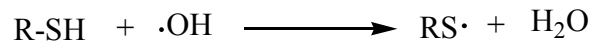
Süperoksit radikalının yağda çözünürlüğü sınırlı olduğu halde hidrojen peroksit yağda çözünür. Bu nedenle hidrojen peroksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan fakat Fe^{2+} içeren membranlarda hasar oluşturabilir [29, 30, 31, 32].

2.7.4. Hidroksil radikali (OH^\bullet)

Hidroksil radikali (OH^\bullet), Fenton reaksiyonu ve Haber-Weiss reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur.

Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir ve yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali muhtemelen reaktif oksijen türlerinin (ROS) en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir

proton kopararak tiyil radikalleri (RS^\bullet), karbon merkezli organik radikaller (R^\bullet), organik peroksitler ($RCOO^\bullet$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur [29, 30, 31, 32].



BÖLÜM 3. MATERYEL VE METOT

3.1. Materyel

3.1.1. Bitkinin toplanması

Tez çalışması kapsamında çalışılan mor çiçekli orman gülü (*Rhododendron ponticum* L.) bitkisi Mayıs 2009 tarihinde Kocaeli'nin Kartepe ilçesi Maşukiye beldesinden toplandı.

3.1.2. Bitkinin kurutulması ve depolanması

Mor çiçekli orman gülünün bitkisinin çiçek kısımları ayrılarak, baskısız kağıtların üstüne serpiştirildi ve gölgeli, havadar, sıcak yerlerde elden geldiğince çabuk kuruldu.

3.1.3. Kullanılan çözücüler ve kimyasallar

Deneyleerde kullanılan çözücü ve kimyasalların hemen hemen tamamı yurt dışından satın alınmak suretiyle temin edildi. Çalışmada Merck, Alfa Aesar, Fluka ve Aldrich marka kimyasal reaktif ve kurutucular kullanıldı. Kristallendirmeler de ithal etme yoluyla temin edilen ve oldukça saf olan çözücüler kullanılırken kolon kromatografisi ve yıkamalarda teknik çözücüler (aseton, diklormetan, kloroform, hekzan, dietil eter ve etil asetat) uygun kurutucular (CaCl_2 , Na_2SO_4 , moleküler elek) üzerinden destile edildikten sonra kullanıldı.

3.1.4. Saflaştırma

Deneyde kullanılan tüm çözücülerin saflaştırma işlemleri literatürde belirtildiği gibi modern yöntemlerle yapıldı [33, 34]. Kristallendirme işlemlerinde yurt dışından getirilen kloroform doğrudan kullanıldı. Kolon kromatografisi çalışmalarında kullanılan kloroform ise yerli olarak temin edilen kloroformdan istifade edildi.

Metilen klorür Kristallendirme işlemlerinde mutlak olarak saf olan ve yurt dışından temin edilen metilen klorür kullanılırken kolon kromatografisi ve ekstraksiyon çalışmalarında ise teknik metilen klorür kullanıldı.

Genelde laboratuvar malzemelerinin temizleme işlemlerinde kullanılan aseton teknik olarak temin edildi.

Kristallendirmelerde mutlak saf olan eter kullanılırken ekstraksiyon işlemlerinde teknik olanı kullanıldı.

Teknik *n*-hegzan CaCl_2 üzerinden fraksiyonlu destilasyon yöntemi ile destile edildikten sonra kolon kromatografisi çalışmalarında kullanıldı. Kristallendirme işlemlerinde mutlak *n*-hegzan doğrudan kullanıldı.

Kolon kromatografisi çalışmalarında teknik etil asetat CaCl_2 üzerinden fraksiyonlu destilasyon sisteminde destile edildikten sonra kullanılırken, saflaştırma ve kristallendirme işlemlerinde ithal çözücü olarak doğrudan kullanıldı.

3.1.5. Kromatografik yöntemler

3.1.5.1. Kolon kromatografisi

Çalışmalarımızda, hazırlanan ekstraktların ön fraksiyonlanması ve bu fraksiyonlarda bulunan maddelerin ayırım ve saflaştırılması amacıyla silika jel gibi dolgu materyallerinin kullanıldığı kolon kromatografisi yöntemlerinden yararlandı. Ön

fraksiyonlama işlemlerinde 50-100 mL olarak toplanılan fraksiyonlar, saflaştırma kademesindeki işlemlerde 5-10 mL'ye düşürüldü.

1. Kolon Kromatografisi

Çalışmamız sırasında ekstraktların ön fraksiyonlanması amacıyla kolon kromatografisi kullanıldı.

Dolgu Materyali : Silika jel (Kieselgel 60, 70-230 mesh, 0.063-0.2 mm, Merck 7734)

Solvent Sistemleri : *n*-Hegzan (C₆H₁₄), C₆H₁₄: CHCl₃, CHCl₃:MeOH (100: 0, 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50)

Yeterli miktarda silika jel, elüsyona başlanacak çözücü sistemi ile süspansiyon haline getirilip bu karışım, alt ucuna pamuk yerleştirilmiş olan cam kolona aktarıldı. Kolondan yeterli miktarda çözücü sistemi geçirilerek, dolgu materyalinin yerleşmesi sağlandı ve adsorbanın üzerinde birkaç mL çözelti kalıncaya kadar beklenerek, kolon numunenin tatbik edilmesi için hazır duruma getirildi.

Numune, elüsyona başlanacak çözücü sisteminin uygun miktarı içinde çözülüp bir pastor pipeti yardımıyla kolona uygulandı. Kolonun musluğu açılarak çözeltinin tamamının adsorbana geçmesi sağlandı. Yüzeyin bozulmasını önlemek amacıyla, tatbikten sonra silika jelin üzerine pamuk yerleştirilmiş ve yavaşça solvent sistemi ilave edilerek elüsyona başlandı.

2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

Kolon kromatografisi çalışmaları sırasında, toplanan fraksiyonların izlenmesi ve bileşiklerin referans maddeler ile karşılaştırılmasında, alüminyum tabanlı, silika jel ile kaplanmış hazır plakalar üzerinde uygulanan, ince tabaka kromatografisi kullanıldı.

Adsorban: silika jel (Alüminyum tabanlı hazır plaka, Kieselgel 60) F254, 0.20 mm, Merck, Art. 5554)

Solvent sistemleri *n*-Hegzan:CHCl₃ (5:1, 3:1, 2:1, 1:1)

Hegzan: MeOH (5:1, 2:1, 1:1, 0:1)

Numuneler pipet yardımı ile,plağın alt ucunun 0.5 mm yukarisına ve tatbik noktaları arasında 0.4 mm olacak şekilde tatbik edildi. İTK kromatogramları CAMAG markalı UV lambası ve kabininde 254 ile 366 nm'de gözlenen floresans seyesinde veya brom iyodüre batırılarak izlendi.

3.1.6. Spektroskopik yöntemler

Çalışmalarımız sonunda saf olarak elde edilen bileşiklerin yapı analizi için gerekli olan ¹H-NMR ve ¹³C-NMR ölçümleri bölümümüzde bulunan Varian Mercury 300 NMR spektroskopisi kullanılarak alındı. Infrared spektrumlar ise bölümümüzde bulunan ATI Mattson Infinity Series FT-IR spektroskopisinden kaydedildi.

3.1.7. UV lambası ve kabini

Reaksiyon takibi CAMAG markalı UV lambası ve kabininde yapıldı. İnce tabaka kromatografisine (TLC, Silika jel 60 F₂₅₄) tatbik edilen reaksiyon numunesi, içerisinde uygun çözücü karışımı bulunan bir tankta belirli bir mesafe yürütüldükten sonra UV lambası altında incelendi.

3.1.8. Rotari evaporatör

Reaksiyon ortamındaki çözücüleri düşük vakumda uzaklaştırmak için Heidolph marka 4003-G3 dik tipli rotari evaporatör kullanıldı.

3.1.9. Hassas terazi

Tartım işlemleri Precisa markalı, 220 g kapasiteli, 0,0001 hassasiyetli hassas terazi ile yapıldı.

3.2. Metot

3.2.1. Kurutma işlemi

Nümune Kocaeli İli Kartepe İlçesi Maşukiye Beldesi'nden toplandı. Toplanma sırasında bitkinin köküyle birlikte toplanmasına dikkat edildi. Toplanan bitki numuneleri güneş ışığına maruz kalmadan gölgede kurutuldu. Kurutulan numunenin kök, gövde, yaprak ve çiçek kısımları ayrı ayrı gruplandırıldı. Gruplanan numunelerin bitki özelliklerini tamamen taşımasına dikkat gösterildi.

3.2.2. Ekstraksiyon

Toplanan mor çiçekli orman gülünün çiçekleri kesilerek gölgede kurutuldu ve değirmende küçük parçalar haline getirildi. Bu işlemden sonra bitkinin çiçek kısmı üçer gün bekletilmek üzere sırasıyla *n*-hegzan, etil asetat ve metanol ile masere edildi. Çözücüler evaporatörde yoğunlaştırıldı ve her bitkiden üç ekstrakt elde edildi. Tüm ekstraktlar üzerinde biyolojik aktivite testleri yapıldı. Testlerin sonucunda, metilen klorür ve hegzan ekstraktları üzerinde çalışılması uygun görüldü.

3.2.3. Soxhlet ekstraksiyonu

Mor çiçekli orman gülü çiçeklerinin toplam yağ içeriğini bulmak için Soxhlet ekstraksiyonu uygulandı. 80 g numune ekstraksiyon kartuşuna yerleştirildi ve 500 ml *n*-hegzan (Merck) kullanılarak 9 saat süre ile ekstrakte edildi (yaklaşık 54 sifon). Ekstraksiyon üç kez tekrarlandı ve sonuçların ortalaması alındı. Elde edilen ekstraktların çözücüleri rotari evaporatörde vakum altında uzaklaştırıldı.



Şekil 3.1. Soxhlet ekstraksiyonu

BÖLÜM 4 . DENEYSEL BULGULAR

4.1. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları

4.1.1. *Rhododendron ponticum* L. üzerinde yürütülen ekstraksiyon ve izolasyon çalışmaları

4.1.1.1. Ekstraksiyon

Mor çiçekli orman gülünün (*Rhododendron ponticum* L.) gölgede kurutulmuş, çiçeği (54 g) toz haline getirildikten sonra, hekzan ile üç gece maserasyona bırakılmış ve üç günün sonunda 35°C de, ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra ekstraktlar birleştirildi ve düşük ısıda (35°C), vakum kullanılarak yoğunlaştırıldı (*n*-Hekzan Ekstraktı: 0.35 g). *n*-Hegzanlı kısmı ekstrakte edildikten sonra kalan çiçek kısmı metilen klorürle üç gece maserasyona bırakılıp üçüncü günün sonunda 35°C de ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra ekstraktlar birleştirildi ve düşük ısıda (35°C), vakum kullanılarak yoğunlaştırıldı (Metilen Klorür ekstraktı: 0.65 g). Metilen klorürlü kısım ekstrakte edildikten sonra kalan çiçek kısmı metanolla üç gece maserasyona bırakıldı ve üçüncü günün sonunda 40°C'de, ekstrakte edildi. Ekstraksiyon işlemi bir kez daha tekrarlandıktan sonra ekstraktlar birleştirilip düşük ısıda (40°C), vakum kullanılarak yoğunlaştırıldı (Metanol ekstraktı: 0,69 g).

4.1.1.2. Ön fraksiyonlama

Kuruluğa kadar uçurulmuş çiçek numunesi hekzan ekstresi 5 ml hekzan içerisinde çözülmüş, silika jel ile hazırlanmış kolon kromatografisine tatbik edildi. Elüsyona *n*-hegzan ile başlanıp *n*-hegzan içinde metilen klorür oranı arttırılarak devam edildi. Bu

esnada kolonun üst kısmında kalan madde spatül yardımıyla alındı. İTK çalışması ile incelenip saf olduğu gözlenen madde daha sonra izole edilmek amacıyla kenara alındı.

Kuruluğa kadar uçurulmuş çiçek numunesi metilen klorür ekstresi 5 ml *n*-hegzan içerisinde çözülüp, silika jel ile hazırlanmış kolona tatbik edildi. Elüsyona *n*-hegzan ile başlanıp *n*-hegzan içinde metilen klorür oranı arttırılarak devam edildi ve 4 ana fraksiyon elde edildi.

Mor çiçekli orman gülü' nün (*Rhododendron ponticum* L.) fraksiyonları :

n-Hegzan fraksiyonu (H) : 0,10 g

Metilen klorür fraksiyonu (M) : 0,35 g

4.1.1.3. İzolasyon

Silika jel üzerinde yürütülen kolon kromatografisi çalışmalarından 1 pentasiklik triterpenoid, 1 fitosterol ve yapısı açıklanamayan bazı bileşikler izole edildi.

Kolon kromatografisinden alınan fraksiyon H (0,10 g) silika jel kolona (30 gr, 85 cm) uygulandı. Vakum altında sıvı kolon kromatografisi ile fraksiyonlama işlemine, çözügen sistemi % 0-100 hegzan-metilen klor ile yapılan kademeli elüsyon şeklinde devam edildi. Ayırma işlemi sonucunda her bir fraksiyona karşılaştırmalı olarak İTK çalışması yapıldı. Ana fraksiyonların İTK profilleri incelenerek uygun fraksiyonlar birleştirildi. 83-84-85-86-87-88 no'lu fraksiyonlar (0,05 g) saf halde elde edildi ve β -sitosterol elde edildi.

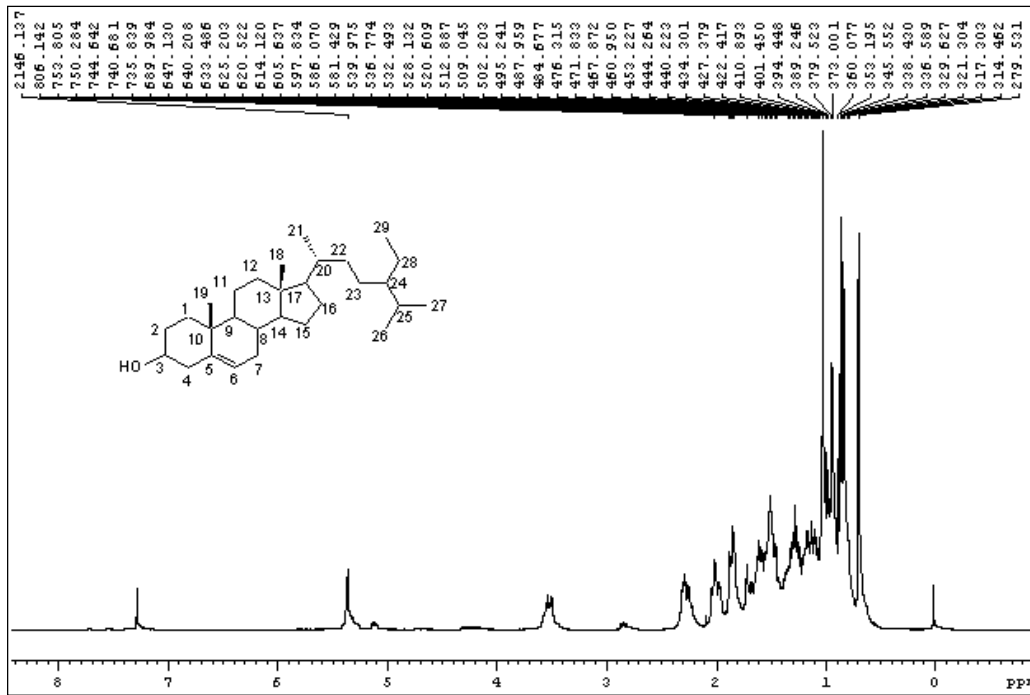
Kolon kromatografisinden alınan fraksiyon M (0,35 g) silika jel kolona (30 gr, 85 cm) uygulandı. Vakum altında sıvı kolon kromatografisi ile fraksiyonlama işlemine, çözügen sistemi % 0-100 hegzan-etilasetat ile yapılan kademeli elüsyon şeklinde devam edildi. Ayırma işlemi sonucunda her bir fraksiyon 15 ml olacak şekilde 150 fraksiyon elde edildi. Her fraksiyona karşılaştırmalı olarak İTK ile bakıldı. Ana

fraksiyonların İTK profilleri incelenerek uygun fraksiyonlar birleştirildi. 17-18 no'lu fraksiyonlardan ursolik asit (0,2 g) saf halde elde edildi.

4.2. Fitokimyasal Çalışmalara Ait Bulgular

Mor çiçekli orman gülü'nün (*Rhododendron ponticum* L.) çiçek kısmından hazırlanan *n*-hegzan ve metilenklorür ekstraktlarının fraksiyonları üzerinde yürütülen kromatografik çalışmalar sonucunda bir pentasiklik triterpenoid ve bir fitosterol izole edildi ve yapıları spektroskopik yöntemler (UV, IR , 1D-, 2D-NMR) kullanılarak aydınlatıldı.

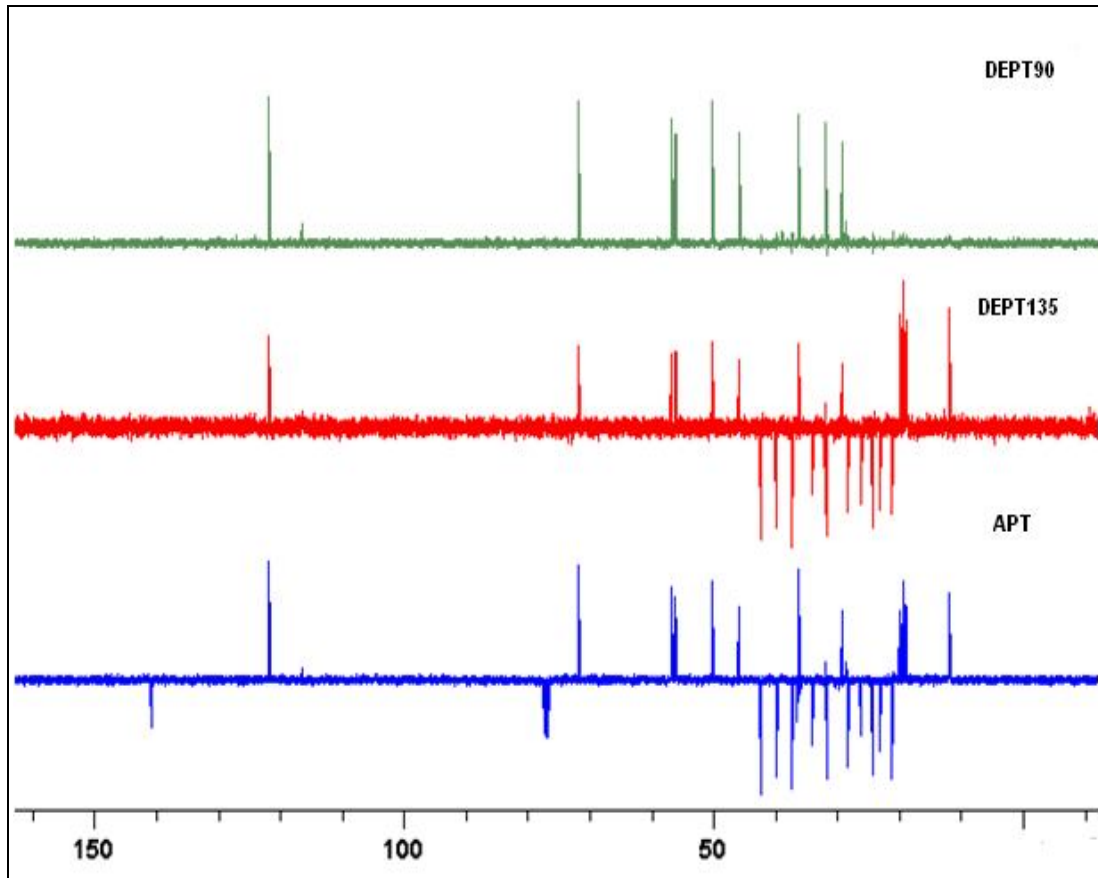
4.2.1. İzole edilen pentosiklik triterpenoid ve fitosterolun yapı tayinleri



Şekil 4.1. β -Sitosterol ^1H -NMR spektrumu

^1H ve ^{13}C -NMR spektrumlarında özellikle yüksek alanda gözlenen sinyaller steroidal veya triterpenik bir yapı için karakteristiktir. Bileşiğin ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde 0.338-3 ppm bölgesinde birbirinden iyi ayrılmamış alifatik proton sinyalleri görüldü. 3.54 ppm'de oksijen atomun komşuluğu nedeniyle düşük alana

kaymış bir multipler ve 5.39 ppm'de olefinik karakteri kanıtlayan bir multipler gözlemlendi. Bu bulgular doğrultusunda yapının alifatik olduğu, bir çift bağ ve bir hidroksil grubu taşıdığı tespit edildi. Spektrumun 0.338-3 ppm aralığı oldukça karmaşık olmasından dolayı Tablo 4.4'te verilen kimyasal kaymalar HETCOR spektrumundan yararlanılarak elde edildi. Elde edilen kimyasal kayma değerlerinin literatürle tam uyum içinde olduğu tespit edildi.



Şekil 4.2. β -Sitosterol için ^{13}C -DEPT ve APT Spektrumları

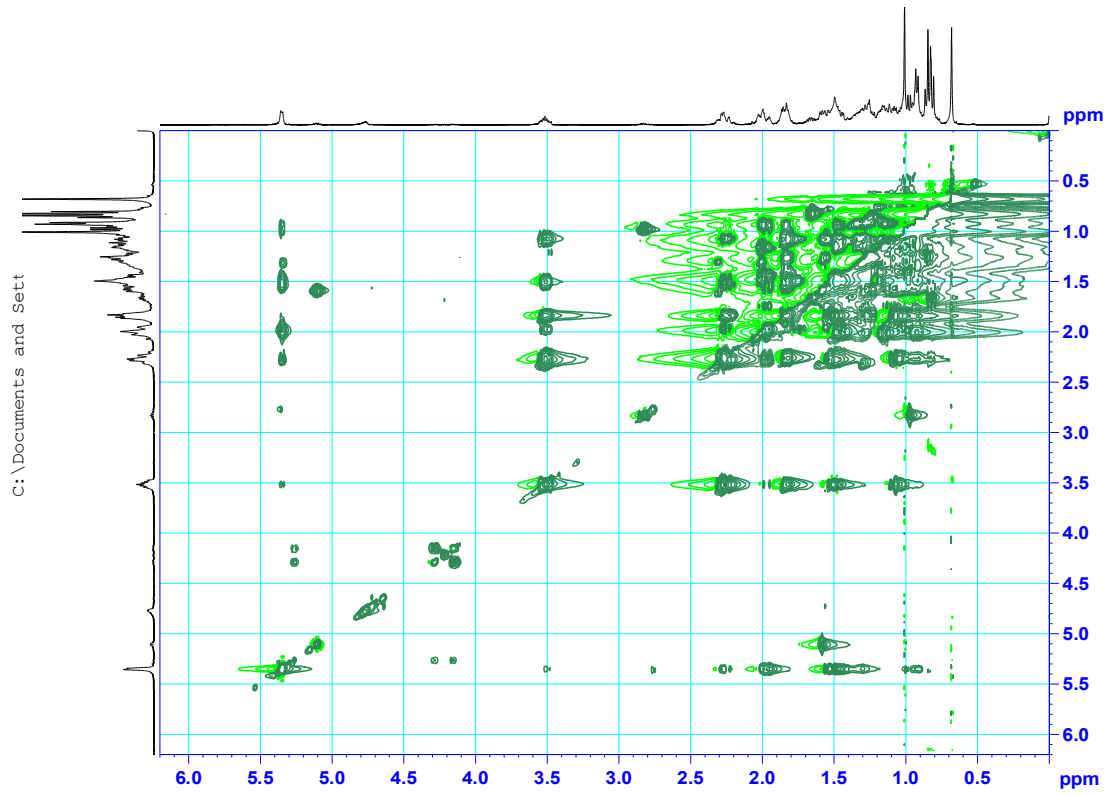
Şekil 4.2' de verilen β -sitosterole ait APT ve DEPT Spektrumları incelendiğinde 140.8 ppm'de rezonans olan C-5 karbonu (APT'de negatif DEPT-135 ve DEPT-90'da yok) ve 121.7 ppm'de rezonans olan C-6 karbonu steroid halkasına spesifiktir. APT spektrumu incelendiğinde moleküle ait 11 tane CH_2 ve 6 tane CH_3 karbonunun pozitif olarak, 9 tane CH ve 3 tane C karbonunun negatif olarak rezonans olduğu gözlemlendi. 31.9 ppm'de rezonans olan 7 (CH_2) ve 8 (CH) numaralı karbonların farklı tip olmasından dolayı çakışmaya rağmen DEPT-135 spektrumundan kolayca

anlaşılabildi. 18.8 ppm'de rezonans olan 21 ve 26 numaralı metil karbonlarının çakışması da HETCOR spektrumundan her iki metil grubu karbonunun farklı protonlarla (1.09 ppm'de 21 nolu karbona bağlı metil protonları ve 0.92 ppm'de rezonans olan 26 nolu karbona ait metil protonları) etkileşiminden anlaşıldı.

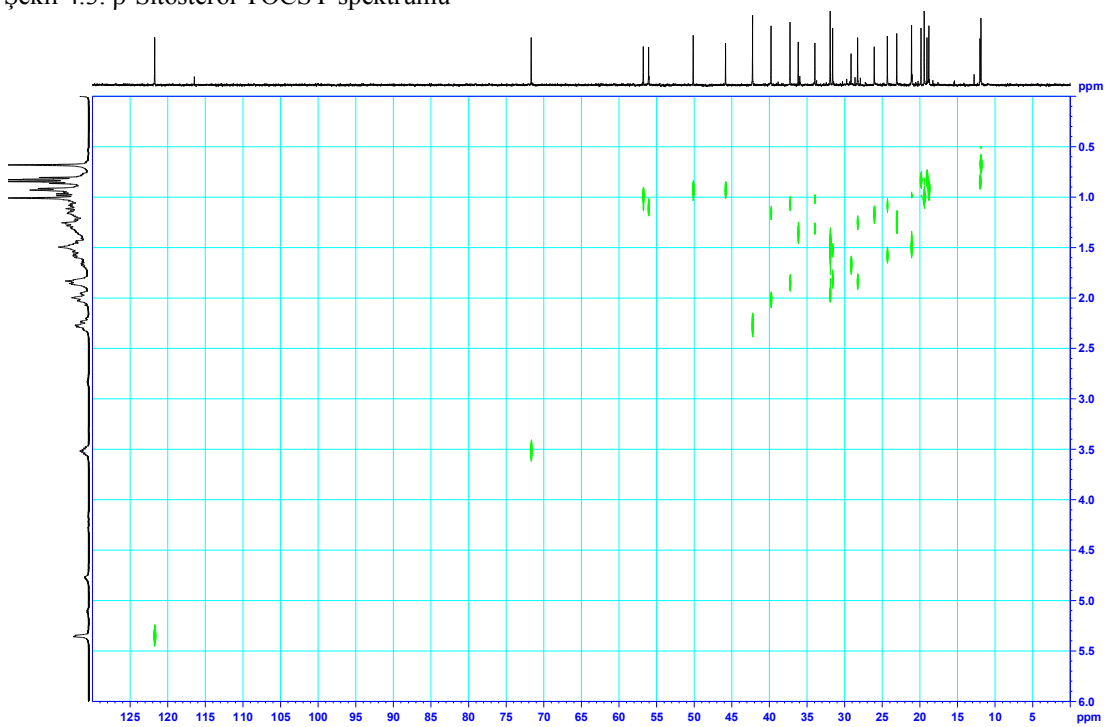
Tablo 4.1'te β -sitosterol'e ait karbon ve protonların kimyasal kayma değerleri ve karbon atomlarının türleri özetlenmiştir. Steroid türevleri gibi kesintisiz proton ağı içeren moleküllerin aydınlatılması için uygun bir yöntem olan TOCSY spektrumundan C-1 ve C-5 proton şebekesi steroidin yapısının belirlenmesinde büyük rol oynamıştır.

Tablo 4. 1. β - Sitosterol karbon ve proton kimyasal kayma değerleri

Karbon No	DEPT, APT	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)	Karbon No	DEPT, APT	δ_C (ppm)	δ_H (ppm)
1	CH ₂	37.3	1.84	16	CH ₂	28.2	1.25-1.83
2	CH ₂	31.6	1.52	17	CH	56.1	1.10
3	CH	71.7	3.54	18	CH ₃	12.0	0.85
4	CH ₂	42.2	2.28	19	CH ₃	19.0	0.81
5	C	140.8	-	20	CH	36.1	1.35
6	CH	121.7	5.34	21	CH ₃	18.8	1.09
7	CH ₂	31.9	1.74	22	CH ₂	33.9	1.01-1.31
8	CH	31.9	1.95	23	CH ₂	26.1	1.16
9	CH	50.1	0.92	24	CH	45.8	0.92
10	C	36.5	-	25	CH	29.2	1.66
11	CH ₂	21.1	1.64-0.97	26	CH ₃	18.8	0.92
12	CH ₂	39.8	1.16-2.00	27	CH ₃	19.4	1.00
13	C	42.3	-	28	CH ₂	23.1	1.25
14	CH	56.8	0.98	29	CH ₃	11.9	0.84
15	CH ₂	24.3	1.08-0.96				

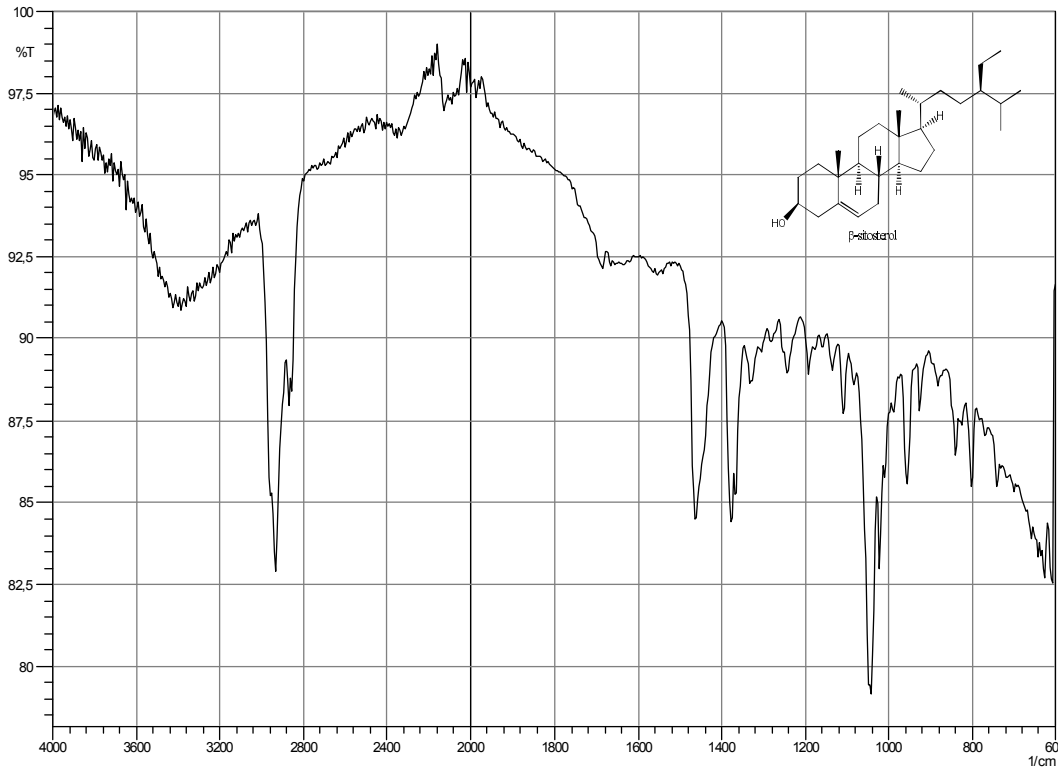


Şekil 4.3. β -Sitosterol TOCSY spektrumu



Şekil 4.4. β -Sitosterol HETCOR spektrumu

β -Sitosterol adlı bileşğin ^{13}C -NMR'ı incelendiğinde 29 karbon atomu taşıdığı tesbit edildi. 72.075'te gözlenen sinyal, yapıda bir oksijen atomunun varlığını gösterirken bu karbon atomuna bağlı olan proton ise 3.52 ppm' de bir sinyal verdi. 140.9 ppm ve 121.9 ppm'lerde gözlenen sinyaller bir çift bağ bulunduğuna gösterdi. 121.9'de gözlenen sinyale ait karbon atomuna bağlı proton 5.35 ppm'de gözlendi. ^1H ve ^{13}C -NMR spektrumlarındaki sinyaller, DEPT ve COSY spekturumu yardımı ile çözümlendiğinde, bu bileşik için elde edilen yapı bulgularının, β -sitosterol'ün literatür bulguları ile uyum içinde olduğu belirlendi. Bileşğin erime noktası $136,6^\circ\text{C}$ olarak tesbit edildi. Bu değer literature değeri ile uyum gösterdi [35] ve bileşğin β -sitosterol olduğu kanıtlandı [36]. IR spektrumu 3360^{-1} 'de hidroksil grubunu, 1690 cm^{-1} ' de asit karbonilini gösterdi (Şekil 4.5).

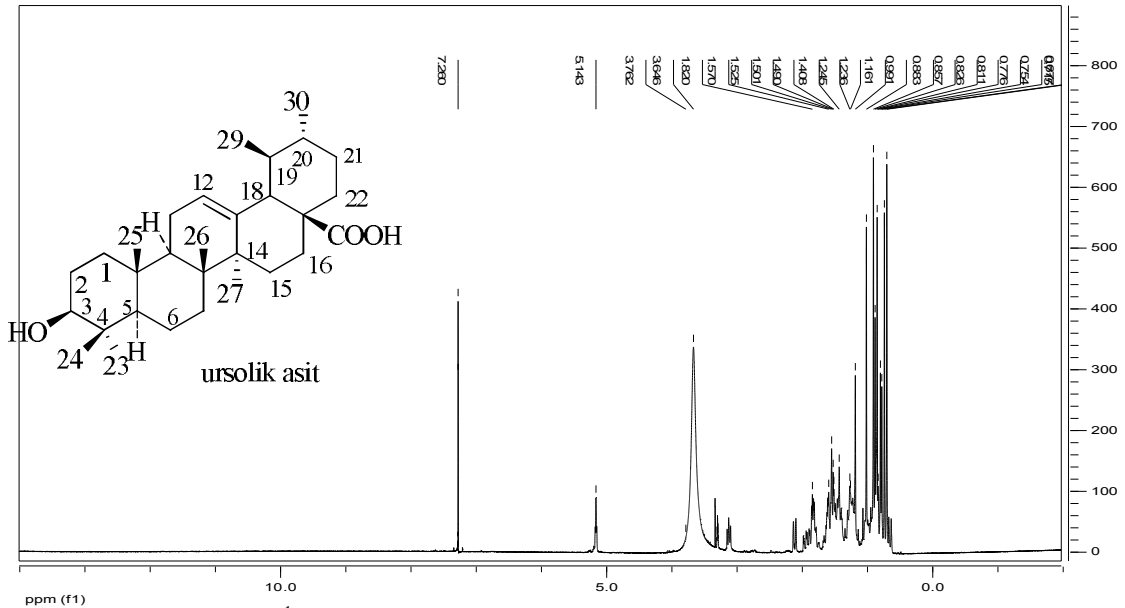


Şekil 4.5. β -Sitosterol IR spektrumu

β -Sitosterol, kimyasal yapısı kolesterole benzeyen fitosterollerden biridir. Bu bileşik beyaz renkli ve mum kıvamındadır. β -Sitosterol, hem tek başına hem diğer benzer fitosterollerle beraber kullanıldığında kandaki kolesterol seviyesini indirir ve bazen hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılır. β -Sitosterolün prostat büyümesi

tedavisinde yararlı olduğu kanısı kesinlik kazanmamıştır. Avrupa ülkelerinde β -sitosterol prostat büyümesi (selim prostat hipertrofisi) tedavisinde kullanılır [37].

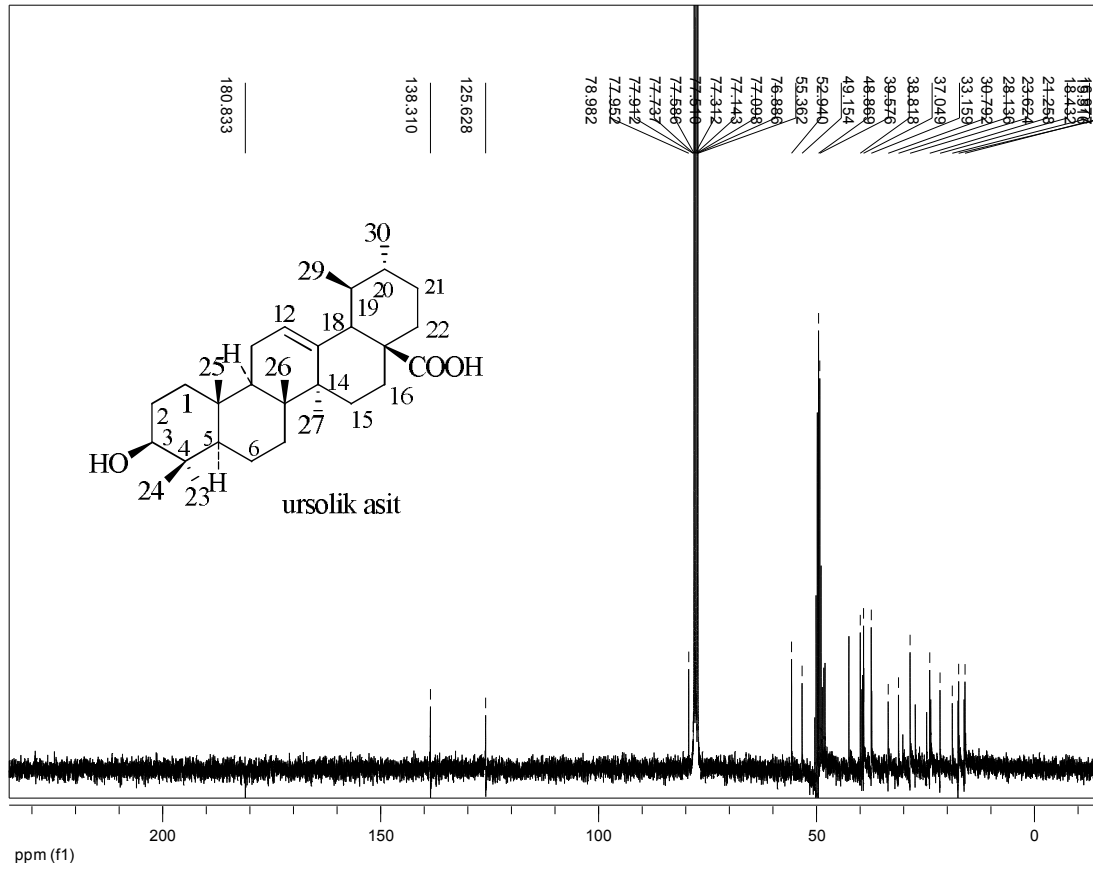
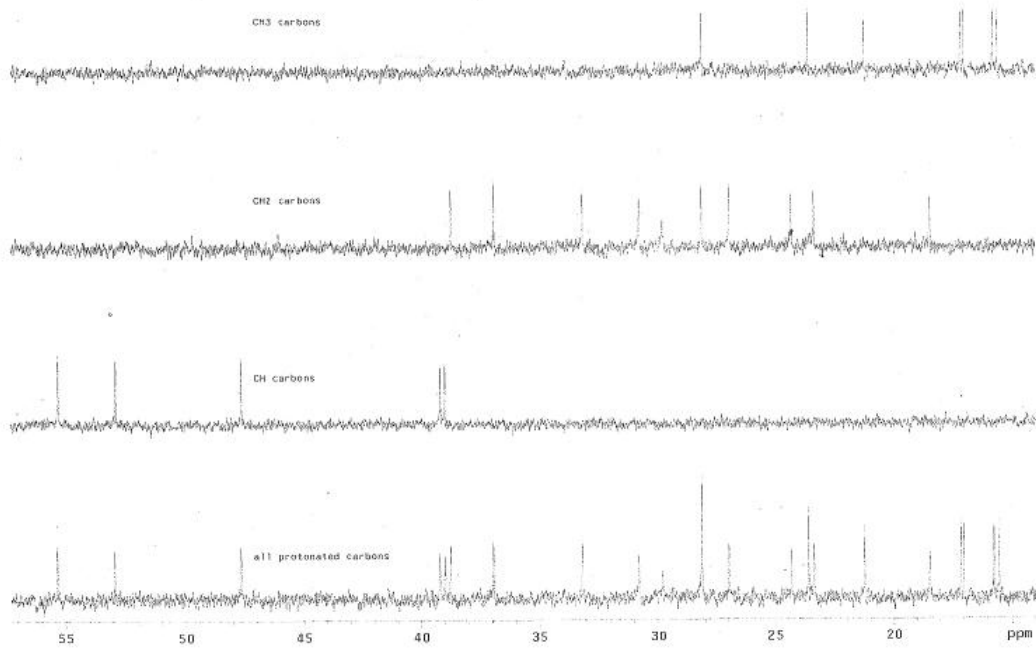
Ursolik asidin $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda, 1.41, 0.880, 0.885, 0.99 ve 1.16 ppm de singlet, 1.821 ve 1.823 ppm'de dublet olarak 3'er proton şiddetinde 7 metil rezonansı gözlemlendi.



Şekil 4.6. Ursolik asidin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

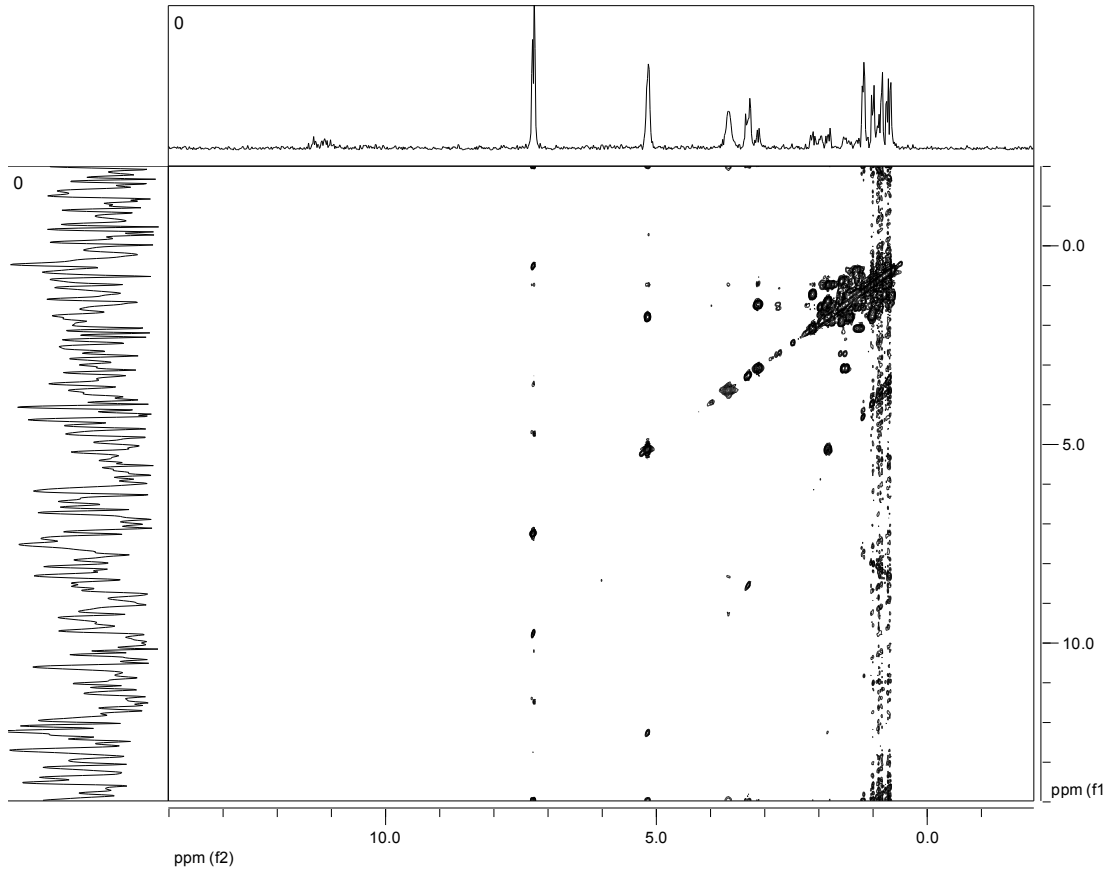
Tablo- 4.2. Ursolik asidin $^1\text{H-NMR}$ değerleri

	$^1\text{H-}\delta$ (ppm)		$^1\text{H-}\delta$ (ppm)		$^1\text{H-}\delta$ (ppm)
1	0.677	8	1.161	15	1.570
2	0.754	9	1.236	16	1.820
3	0.776	10	1.245	17	3.646
4	0.826	11	1.408	18	3.762
5	0.857	12	1.490	19	5.143
6	0.883	13	1.501	20	7.260
7	0.991	14	1.525		

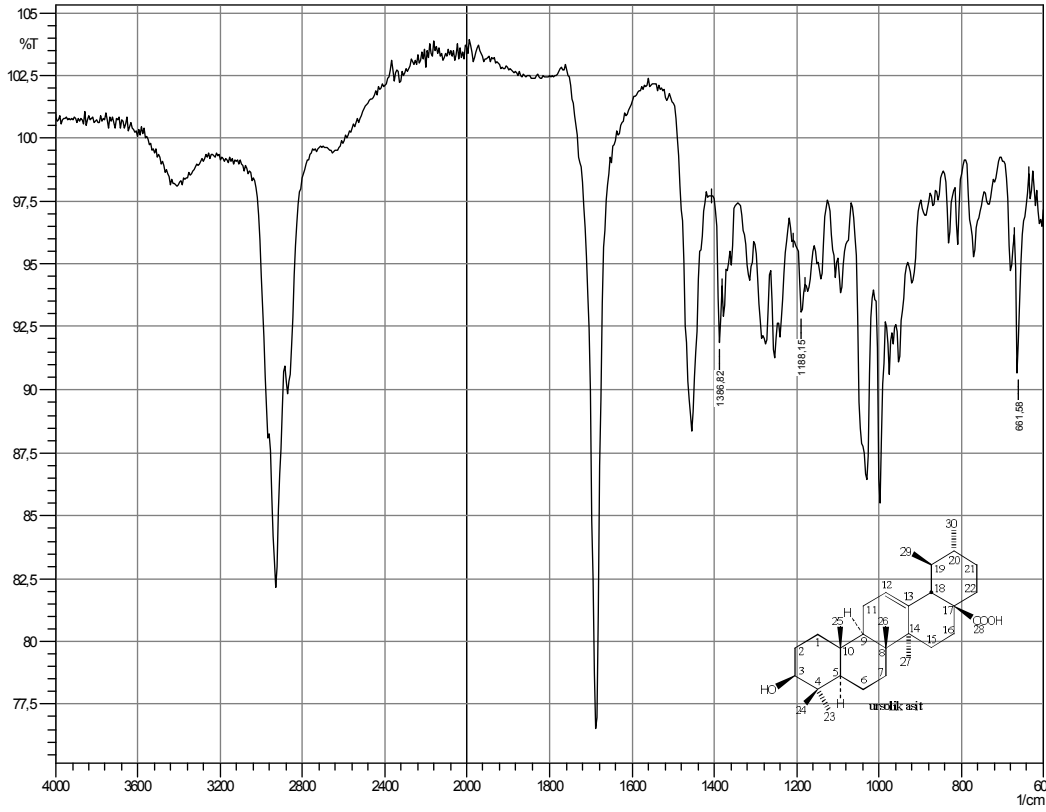
Şekil 4.7. Ursolik Asidin ^{13}C -NMR spektrumu

Şekil 4.8. Ursolik asidin APT spektrumu

^{13}C -NMR spektrumu incelendiğinde, 180.4 ppm'de gözlenen sinyal bir karboksil karbonuna ait olduğu düşünüldü. Triterpenik yapıda $\Delta^{12(13)}$ fonksiyonunun varlığı 125.7 (CH; C-12) ve 138.4 (C; C-13) ile 122.4 (CH; C-12) ve 144.1 (C; C-13) ppm'lerdeki karbon rezonanslarıyla saptandı. Olefinik proton H-12 ise 5,28. (1H, t) ve 5.24 (1H, t) ppm'lerde gözlemlendi. Ursolik asidin ^{13}C -NMR'ında 180 ppm'de çıkan karbon sinyali ursolik asit için belirleyici oldu. Ayrıca spektroskopik bulgular ursolik asit ile uygunluk gösterdi. Erime noktası 284,2 $^{\circ}\text{C}$ olarak tespit edildi ve bu değer literatür değeri ile uyum gösterdi [38]. Bu sonuçlar ile bileşiğin ursolik asit olduğu kanıtlandı.



Şekil 4.9. Ursolik Asidin COSY spektrumu



Şekil 4.10. Ursolik Asidin IR spektrumu

Ursolik asit antimikrobiyal, antitümör ve iltihap kurutucu özellikleri nedeniyle kozmetik ürünlerin içeriğinde yer alır. Bu bileşiğin antibakteriyel, antifungal ve antiHIV özellikleri de vardır. Ursolik asit yanık merhemlerinde de bulunur [39].

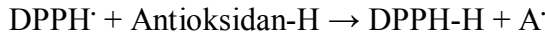
4.3. Aktivite Çalışmaları

4.3.1. Aktivite tayin yöntemleri

4.3.1.1. DPPH serbest radikali antioksidan giderim aktivitesi yöntemi

Antioksidanlar radikallere proton vererek absorpsiyonu azaltırlar [40]. Bu çalışmada serbest radikal giderim aktiviteleri 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil serbest radikali kullanılarak belirlendi. Bitki ekstralarının, fraksiyonların ve saf maddelerin serbest radikali giderim aktiviteleri DPPH serbest radikali kullanılarak belirlendi. DPPH

(1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) 517 nm'de karakteristik absorpsiyonu olan kararlı serbest bir radikaldir. DPPH'nin 517 nm'deki soğurum pikinin şiddetindeki azalmayla orantılı olacak şekilde antioksidan aktivitenin varlığı nitel ve nicel olarak belirlenir. Tepkime mekanizması aşağıdaki gibidir.



Belirli bir inkübasyon süresinden sonra kalan DPPH' derişimi spektrofotometrik olarak ölçülür. DPPH radikalinin rengindeki açılma antioksidan maddenin radikal giderim aktivitesi olarak gösterilir. Bu amaçla 50 µg ve 500 µg arasında değişen konsantrasyonlardaki 1 mL örnek içeren örneklerin üzerine DPPH çözeltisinden 4 mL ilave edildi. Kontrol olarak 1 mL metanol kullanıldı. Oda sıcaklığında 30 dk inkübasyondan sonra 517 nm'de absorbansları ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi. Serbest radikal giderim aktivitesi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{DPPH Giderim Aktivitesi (\% inhibisyon)} = \left(\frac{A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}}{A_{\text{kontrol}}} \right) \times 100 \quad (4.1)$$

A_{kontrol} kontrolün absorbansı, $A_{\text{örnek}}$ örneğin absorbansıdır

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

4.3.1.2. Lipid peroksidasyonu inhibisyonu aktivitesi (β -karoten-linoleik asit yöntemi)

Toplam antioksidan aktivite olarak da isimlendirilen lipid peroksidasyon inhibisyonu, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan β -karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlendi. Bu yöntem, β -karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. Antioksidan maddenin varlığında bu tepkimenin oluşumu

engellendiğinden veya oluşan bozunma ürünleri antioksidan tür tarafından temizlendiğinden β -karotenin alkol içindeki çözeltisinin sarı rengi değişmeden kalacaktır.

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

↓

β -karoten → renk açılımı

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

α -Toc, BHT, kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 10, 25, 50, 100 μ g/mL olacak şekilde, 4 mL β -karoten çözeltisi ilave edildi. Emülsiyon, test tüplerine ilave edilir edilmez spektrofotometre kullanılarak başlangıç absorbansları 490 nm'de ölçüldü. Kontrol olarak alkol kullanıldı. Tüpler 50°C'de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki β -karotenin rengi kayboluncaya kadar (yaklaşık 120 dk) inkübasyona devam edildi. Absorbans yine 490 nm'de ölçüldü. β -karoten renk açılım oranı (R), aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$R = \frac{\ln \frac{a}{b}}{t} \quad (4.2)$$

ln: doğal logaritma, a : başlangıç absorbansı, b : inkübasyondan sonraki absorbans, t : inkübasyon süresi (dk).

Antioksidan aktivite (AA) aşağıdaki eşitliğe göre hesaplandı:

$$AA (\% \text{ inhibisyon}) = (R_{\text{kontrol}} - R_{\text{örnek}}) / R_{\text{kontrol}} \times 100 \quad (4.3)$$

R_{kontrol} kontrolün renginin açılma hızı ve $R_{\text{örnek}}$ örneğin renginin açılma hızıdır.

4.4. Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi

4.4.1. AChE % inhibisyon testi

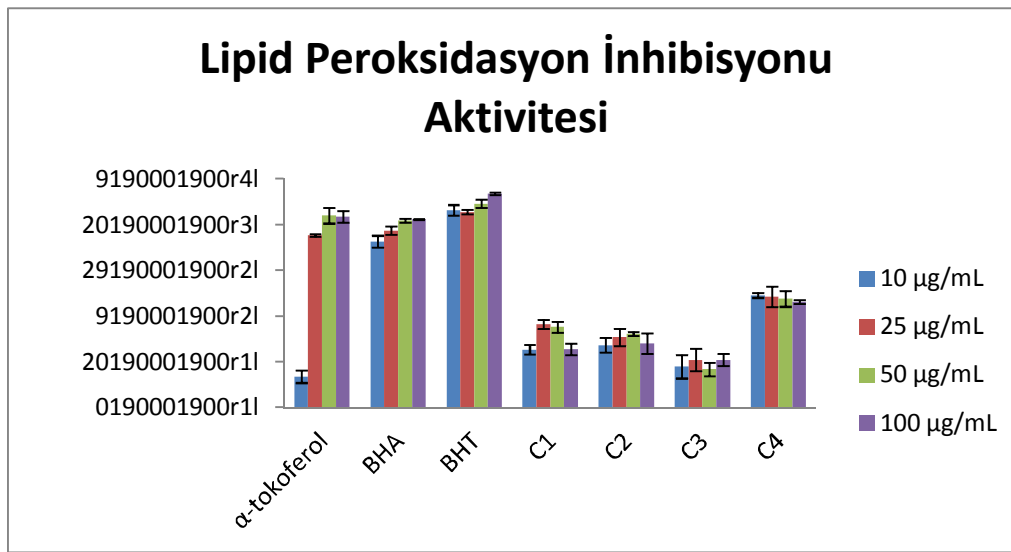
Mikroplakadaki etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerinden 10 µL ve asetil kolinesteraz (AChE) enzim çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve asetilkolin iyodür (Acl) (20 µL) herbir kuyucuğa ilave edildi. Standart olarak galantamin kullanıldı. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilerek 412 nm dalga boyunda absorbans okundu ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplanarak aktivite gösteren bileşikler tespit edildi

4.4.2. BChE % inhibisyon testi

Butirilkolinesteraz inhibisyon aktivitesi için enzim olarak at serumundan elde edilen butirilkolinesteraz enzimi substrat olarak ise butiriltiyokolin iyodür kullanıldı. Mikroplakadaki kuyucuklara 130 µL fosfat tamponu (pH =8), bileşiklerin etanol içinde 0,5 mM konsantrasyonda hazırlanan çözeltilerden 10 µL ve Butirilkolinesteraz (BChE) enzimi çözeltisinden 20 µL konuldu. Bu solüsyon 10 dakika süre ile 25°C de inkübe edildi. 10 dakika sonra 20 µL DTNB reaktifi ve substrat olarak butirilkolinyodür (BuI) (20 µL) herbir kuyucuğa ilave edilidi. Standart olarak yine galantamin kullanıldı. Mikroplaka ELISA okuyucuya yerleştirilip 412 nm dalga boyunda absorbans okunurak ve Softmax Pro Default Protocol adlı bilgisayar programının yardımı ile absorbanslardan Vmax değerleri hesaplandı ve aktivite gösteren bileşikler tespit edildi.

Free Radical Giderim Aktivitesi by DPPH (1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil)

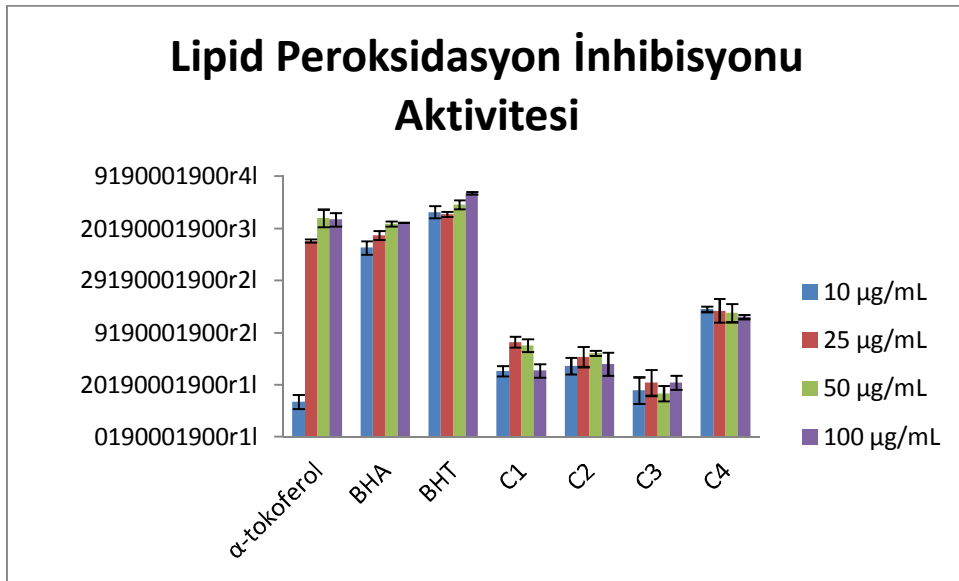
	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	sdrt sap	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
α- tokoferol	13.54	75.22	83.9	83.45		2.74	0.57	3.42	2.57
BHA	72.63	77.41	81.8	82.26		2.56	1.73	0.9	0.08
BHT	86.29	85.48	89.12	93.54		2.31	1	1.75	0.56
C1	25.35	36.46	35.2	25.48		2	2.02	2.44	2.54
C2	27.29	30.74	32.2	28.03		3.15	3.81	0.88	4.5
C3	17.88	20.81	16.75	20.9		5.11	4.94	2.94	2.63
C4	49.12	48.5	47.56	46.16		1.09	4.5	3.45	0.84



Şekil 4.11. DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi

Beta-karoten Linoleik asit (Lipid peroksidasyon inhibisyon ekstresi)

	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	sdrt sap	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
α- tokoferol	13.54	75.22	83.9	83.45		2.74	0.57	3.42	2.57
BHA	72.63	77.41	81.8	82.26		2.56	1.73	0.9	0.08
BHT	86.29	85.48	89.12	93.54		2.31	1	1.75	0.56
C1	25.35	36.46	35.2	25.48		2	2.02	2.44	2.54
C2	27.29	30.74	32.2	28.03		3.15	3.81	0.88	4.5
C3	17.88	20.81	16.75	20.9		5.11	4.94	2.94	2.63
C4	49.12	48.5	47.56	46.16		1.09	4.5	3.45	0.84



Şekil 4.12. Beta-karoten Linoleik Asit (Lipid Peroksidasyon inhibisyon Aktivitesi)

Antikolinesteraz Aktivite Tayini Yöntemi

	AChE%inh±SD		BChE%inh±SD	
C1	-252,99	13,37	1,99	12,53
C2	-263,22	18,26	-263,22	18,26
C3	36,50	6,92	36,50	6,92
C4	-204,19	0,86	-204,19	0,86
Galantamin	87,81	1,54	86,66	2,45

Antikolinesteraz aktivite testleri İki farklı enzime (AChE: asetilkolinesteraz ve BchE: bütirilkolinesteraza) karşı yapıldı. Yukarıdaki sonuçlardan her iki enzimi de pek inhibe etmediği izlenmektedir.

BÖLÜM 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Türkiye’de yetişen orman gülü (*Rhododendron*) türleri üzerindeki araştırmalar özellikle son 10-15 yıldır artış göstermektedir ve bu araştırmalar orman güllerinin uçucu yağları, diterpenik bileşikleri, flavonoid ve diğer fenolik bileşiklerini ve biyolojik aktivitelerini kapsamaktadır. Bu çalışmada, endemik bir tür olan mor çiçekli orman gülü bitkisinin çiçeğinden organik bileşiklerin izolasyonu ve antioksidan aktivitelerinin incelenmesi amaçlandı ve bu doğrultuda bitkilerin *n*-hegzan ve metilen klorür ekstraktlarından bir triterpen, bir steroid ve birkaç yapısı belirlenemeyen uçucu yağ elde edildi. Elde edilen steroidin β -sitosterol triterpenin ise ursolik asit olduğu anlaşıldı.

Bileşiklerin yapı tayininde spektral yöntemlerden yararlanıldı. Bu amaçla IR spektrumları alındı, tek ve çift boyutlu NMR (^1H , ^{13}C , BB, APT ve DEPT) teknikleri kullanıldı. Bilinen bileşikler ince tabaka kromatografisiyle standartlarla mukayese edildi ve erime noktası tayinleri yapıldı.

Mor çiçekli orman gülünün çeşitli ekstraktları üzerinde yapılan aktivite çalışmaları (DPPH Serbest Radikal Giderim Aktivitesi, β -karoten Linoleik Asit (Lipid Peroksidasyon inhibisyon Aktivitesi) sonucunda bu ekstraktların düşük aktiviteye sahip olduğu belirlendi.

İzolasyon sonucu elde edilen β -sitosterol’ün hem tek başına hem diğer benzer fitosterollerle beraber kullanıldığında kandaki kolesterol seviyesini indirdiği ve bazen hiperkolesterolemi tedavisinde kullanıldığı ve sitosterolün prostat büyümesi tedavisinde yararlı olduğu fikri kesinlik kazanmıştır [37]. Avrupa ülkelerinde β -sitosterol prostat büyümesi (iyi huylu prostat hipertrofisi) tedavisinde kullanılır.

Ursolik asit ise antimikrobiyal, antitümör, iltihap kurutucu antibakteriyel, antifungal ve anti-HIV özellikleri gösterir [39].

Bu ve benzeri çalışmalardan çıkacak sonuçlar sayesinde ülkemizdeki tıbbi ve aromatik bitkilerin dış ülkelere ihracatı ile yöre halkına ve ülkemize gelir sağlanabilir. Bunun yanı sıra son yıllarda orman kaynaklarından üretilen tıbbi ve aromatik potansiyelinin, değerlendirme olanaklarının belirlenmesi ekonomik, sosyal ve çevresel yönden pek çok yarar sağlayabilir.

KAYNAKLAR

- [1] TERZIOĞLU, S., MEREV, N., ANŞIN, R., A Study on Turkish *Rhododendron L. Ericaceae*, Tübitak, Turk J. Agric For 25, 311-317, 2001.
- [2] ERDEMOĞLU, N., YESİLADA, E., Bioassay-guided isolation of anti-inflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum L. Leaves*, Journal of Ethnopharmacology, 119, 172–178, 2008.
- [3] BAYTOP, T., Türkiye’de Tıbbi Bitkilerle Tedavi Geçmişte ve Bugün, Nobel Tıp Kitapevleri, İlaveli ikinci Baskı, 1999.
- [4] TAKAHASHI, H., HIRATA, S., MINAMI, H., Triterpene and flavanone glycoside from *Rhododendron simsii*, Phytochemistry, 56 (2001) 875-879, 2000.
- [5] CHOSSON, E., CHABOUD, A., CHULIA, A. J., RAYNAUD, J., A Phloracetophenone Glucoside from *Rhododendron Ferrugineum*, Phytochemistry, Vol. 47, No. I, pp. 87-88, 1997.
- [6] ERDEMOĞLU, N., KÜPELİ AKKOL, E., YEŞİLADA, E., Bioassay-guided isolation of antiinflammatory and antinociceptive principles from a folk remedy, *Rhododendron ponticum L. leaves*, Journal of Ethnopharmacology, 119, 172–178, 2008.
- [7] AVCI, M., *Rhododendrons and Their Natural Occurrences in Turkey*, Coğrafya Dergisi. İstanbul Üniversitesi, 13-29, 2004.
- [8] CHITTENDON, F., F. RHS Dictionary of Plants plus Supplement. Oxford University Pres., 1951.
- [9] SHEPHERD, F. W., Hedges and Screens. Royal Horticultural Society, ISBN 0900629649, 1974.
- [10] FACCIOLA, S., Cornucopia - A Source Book of Edible Plants. Kampong Publications, ISBN 0-9628087-0-9, 1990.

- [11] DİLBER, E., KALYONCU, M., YARIS, N., OKTEN, A., A Case of mad honey poisoning presenting with convulsion: intoxication instead of alternative therapy. *Turk. J. Med. Sci.*, 32, 361-362, 2002.
- [12] GUNDUZ, A., TUREDI, S., UZUN, H., TOPBAS. M., Mad honey poisoning *American Journal of Emergency Medicine*, 24, 595-598, 2006.
- [13] KOCA, I., KOCA. A.F., Poisoning by mad honey: A brief review. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1315–1318, 2007.
- [14] AHMAD, K., REHMAN, S., CHISTI, A. M., SHAWL, A. S., TANEJA, S.C., Chemical Constituents of *Rhododendron lepidotum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46, 195-197, 2010.
- [15] INNOCENTI, G., DALL'ACQUA, S., SCIALINO, G., BANFI, E., SOSA, S., GURUNG, K, BARBERA, M., and CARRARA, M., Chemical composition and biological properties of *Rhododendron* anthopogon essential oil, *Molecules*, 15(4):2326-38, 2010.
- [16] YANG, M. H., LUO, G. J., HUANG, X. F., KONG, L. Y., Flavonol glycosides with a-D-aldohexoses from *Rhododendron irroratum*. *Natural Product Research*, 24, 920–925, 2010.
- [17] JIN, H. Z., CHEN, G., LI, X. F., SHEN, Y. H., YAN, S. K., ZHANG, L., YANG, M., ZHANG, W. D., Flavonoids from *Rhododendron decorum*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 85-86, 2009.
- [18] DAVIS, P. H., Flora or Turkey and the East Aegean Islands. Volume Six (1978) Edinburg. and Volume Eleven (2000), Edinburg. *Phytochemistry*, Vol. 47, No. I, pp. 87-88, 1997.
- [19] GÖKMEN, H., Kapalı Tohumlular Angiosparmae, 2. Cilt, Orman Genel Müdürlüğü Yayınları Seri No: 55, Ankara 1977.
- [20] GÜLEN, İ., Orman gülü (*Rhododendron ponticum*)'nün Kimyevi Metotla Kontrolü Konusunda İngiltere'de Yapılan Çalışmaların Teknik ve Ekonomik Esasları, İst. Üni. Orm. Fak. Dergisi, Seri: B, Cilt XV, Sayı: 1, İstanbul 1965.
- [21] ÇOLAK, A. H., *Rhododendron ponticum* L., Mor çiçekli orman gülü'nün silvikültürel özellikleriüzerine alıştırımlar, İ.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yayınlanmamış doktora tezi, İstanbul, 1997.
- [22] ÜN, R., Organik Kimya, İstanbul Üniversitesi Yayınları, İstanbul, 1990.
- [23] TABBUSH, H. M., WILLIAMSON, D. R., *Rhododendron ponticum* as a Forest Weed, *Forestry Commission Bulletin* 73, London 1987.

- [24] EYÜPOĞLU, A. K., Orman Gülü ve Mücadelesi, Silvikültür Planlama Tekniđi ve Gençleştirme Esasları, Tatbikat Notu, Artvin 1988.
- [25] ŞAHİN, A., CEVAHİR, G., Mor çiçekli ormangülü (*Rhododendron ponticum* L.) ve Kimyasal Mücadele Metotları, OAE Dergisi, Cilt 37, No: 74, Ankara 1999.
- [26] BAILEY, L. H., Manual of Cultivated Plants, Macmillan Publishing Co. Inc., New York 1975.
- [27] DEVON, T. K., and SCOTT A. I., Handbook of Naturally Occurring Compounds, Vol. 2, The Terpenes, Academic Press, London, 1972.
- [28] SELL., S. C., A Fragrant Introduction to Terpenoid Chemistry, Royal Society of Chemistry, 2003.
- [29] AKKUŞ, İ., Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Mimoza Yayınları, Konya, 1995.
- [30] BURTIS, CA., ASHWOOD, ER., Tietz Textbook of Clinical Chemistry. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, 1995.
- [31] TIETZ, N. W., Clinical Guide to Laboratory Tests. W.B. Saunders Company. Philadelphia, Pennsylvania, 1995.
- [32] DAWNKJ, B. M., ALLAN, D. M., COLLEEN, M. S., Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, Maryland, 1996.
- [33] FURNISS, B. S., HANNAFORD, A. J., SMITH, P. W. G., TATCHELL, A. R., Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry, Fifth Edition, Longman, Singapore Pulpishers Pte Ltd, Singapore, 1994.
- [34] ARMAREGO, WLF., PERRIN, D. D., Purification of Laboratory Chemicals, Fourth Edition, Butterworth-Heinemann, Oxford-England, 1997.
- [35] WALSH, L., Method of Producing A Vitamin Product, United State Patents, No: 6, 139, 872, 2000.
- [36] RUBINSTEIN, I., GOAD, L. J, CLAUGE, ADH, MULHEIRN, L. J., The 220 MHz NMR spectra of phytosterols. Phytochemistry, 15:195-200, 1976.
- [37] ÖZBEK, H., *Nepeta Heliotropifolia* Lam. (LABIATAE) Üzerinde Farmakozik Araştırmalar, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum, 2007.

- [38] TRUMBUL, E. R., BIANCHI, E., ECKERT, D. J., WIEDHOPF, M., COLE, J. R., Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (*rosaceae*), *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 65, Issue 9, pages 1407–1408, September 1976.
- [39] KONUKLUGİL, B., BAHADIR, Ö., Bitkisel Kaynaklı Anti- HIV Bileşikler , *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 32 (1) 55-92, 2003.
- [40] TÜRKOĞLU, A., DURU, M. E., MERCAN, N., KIVRAK, İ., GEZER, K., Antioxidant and antimicrobial activities of *Laetiporus sulphures* (Bull.) Murrill. *Food Chemistry*, 1001, 267-273, 2006.

ÖZGEÇMİŞ

Çiğdem IŞIK 23 Temmuz 1984 tarihinde Sakarya'nın Karasu ilçesinde doğdu. İlk öğrenimini Karasu'da orta öğretimini ise Adapazarı'nda tamamladı. Sakarya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden 2008 yılında mezun oldu.