T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

IRIS SUAVEOLENS'TEN ELDE EDİLEN BİLEŞİKLERİN YAPI TAYİNİ VE ANTİOKSİDAN AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ

KİMYAGER
IŞIL HACIBEKİROĞLU

DANIŞMAN
DOÇ. DR. UFUK KOLAK

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI
GENEL KİMYA PROGRAMI

İSTANBUL-2009

ii

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

04 / 08 / 2009

Prof.Dr.Tamer Demiralp
Enstitü Müdürü (Vekil)

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Genel Kimya
Programın seviyesi : Yüksek Lisans (x) Doktora ( )
Anabilim Dalı : Analitik Kimya
Tez Sahibi : Işıl Hacıbekiroğlu
Tez Başlığı : Iris suaveolens'ten Elde Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi
Sınav Yeri : İ.Ü. Eczacılık Fakültesi B Blok Seminer Salonu
Sınav Tarihi : 28.07.2009

Tez Sınav Jürisi

1.Prof. Dr. Gülaçtı Topçu (Başkan), İstanbul Teknik Üniv., Fen-Edebiyat Fak., Kimya Bölümü, Organik Kimya AD.

2. Doç. Dr. Ufuk Kolak (Danışman), İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Analitik Kimya AD, Genel Kimya Bilim Dalı.

3.Doç. Dr. Ümit Salan, Marmara Üniv., Fen-Edebiyat Fak., Kimya Bölümü, Organik Kimya AD.

4.Doç. Dr. Zeynep Aydoğmuş, İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Analitik Kimya AD.

5.Doç. Dr. Olcay Sağırlı, İstanbul Üniv., Eczacılık Fak., Analitik Kimya AD.

iii

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 çalışmayla 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 olmadığı beyan ederim.



Işıl Hacıbekiroğlu

İTHAF

Bugünümün yaşanmasında büyük emekleri olan
Anneme ve Babama ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının hazırlanmasında bilgisinden ve deneyiminden yararlandığım, sabrına ve disiplinine hayran olduğum, ilgisini benden esirgemeyen, beni her konuda teşvik eden ve cesaretlendiren, her konuda kendisini örnek aldığım çok değerli bilim insanı, danışman hocam Sayın Doç. Dr. Ufuk Kolak'a teşekkür ederim.

Tezimde kullandığım bitkinin toplanmasındaki yardımlarından ötürü, Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Çiler Meriç'e, ayrıca topladığım bitkiyi teşhis eden Sayın Yrd. Doç. Dr. Necmettin Güler'e çok teşekkür ederim.

Beni laboratuarına kabul eden, tez çalışmamda laboratuarının bütün imkanlarını kullanmamı sağlayan, bilgisiyle ve hoşgörüsüyle verdiği destekten ötürü Almanya Köln Üniversitesi Biyokimya Enstitüsü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Franz-Josef Marner'e ve teknik yardımlarından dolayı teknik asistan Sayın Bernadette Hanisch'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tez çalışmam sırasında önerileri ve yardımcı fikirleri ile bana destek olan Araş. Gör. Mehmet Boğa'ya teşekkür ederim.

Bitkimin toplanmasında bana çok yardımcı olan, emek veren, beni motive eden, desteğini her zaman hissettiğim, güzel insan Eren Gazioğlu'na teşekkürlerimi sunarım.

Beni bugünlere getiren, emek veren, hayatımın her aşamasında maddi ve manevi destek olan canım annem, canım babam ve canım kardeşime en içten sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2907

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI……...…..II
BEYAN……...……İİİ
İTHAF……İV
TEŞEKKÜR.....V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ.....X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET ..... XVİİ
ABSTRACT.....XVİİİ
ZUSAMMENFASSUNG / RESUME ..... XİX
Iris suaveolens Boiss. & Reuter'in Fotoğrafı……...……XX
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Botanik Bilgiler.....2
2.1.1. Iridaceae Familyası 2
2.1.2. *Iris* L. Cinsi 2
2.1.3. *Iris suaveolens* Boiss. & Reuter.....4
2.2. *Iris* Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı.....5
2.3. *Iris* Türleri ile Yapılan Kimyasal Çalışmalar ve Aktivite Tayinleri 5
2.4. Antioksidanlar.....6
2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması 7
2.4.1.1. Birincil Antioksidanlar.....7
2.4.1.2. İkincil Antioksidanlar.....10
2.4.2. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 12
2.5. Sekonder Metabolitler.....12
2.5.1. Flavonoitler 14
2.5.1.1. İzoflavonlar 16
2.5.2. Steroitler.....17
2.5.3. Fenolik Bileşikler.....18

2.5.3.1. Basit Fenoller ve Fenolik Asitler 20
2.5.3.2. Fenilpropanoitler 20
2.5.3.3. Kinonlar 22
2.5.4. Yağ Asitleri 23
3. GEREÇ VE YÖNTEM 24
3.1. Bitkisel Materyal 24
3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler 24
3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler 24
3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması 24
3.2.2.1. Toplam Fenolik Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler 24
3.2.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler 25
3.2.2.3. *β*–Karoten Renk Açılım Yönteminde Kullanılan Çözelti 25
3.2.2.4. Metal Bağlama Yönteminde Kullanılan Çözeltiler 25
3.2.2.5. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Yönteminde Kullanılan 25
Çözeltiler 25
3.2.2.6. CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltiler 26
3.2.2.7. İnce Tabaka Kromatografisinde Kullanılan Belirteç 26
3.2.2.8. UV Kayma Belirteçlerinin Hazırlanması 26
3.3. Cihazlar ve Gereçler 26
3.4. Ekstrelerin Hazırlanması 27
3.5. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarlarının Belirlenmesi 27
3.5.1. Toplam Fenolik Miktar Tayini 27
3.5.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini 28
3.6. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri 29
3.6.1. *β*-Karoten Renk Açılım Yöntemi 29
3.6.2. Metal Bağlama Yöntemi 29
3.6.3. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Yöntemi 30
3.6.4. CUPRAC Yöntemi 30
3.6.5. İstatistik Hesaplamalar 30
3.7. Kromatografik Yöntemler 30
3.7.1. Sütun Kromatografisi 30
3.7.2. İnce Tabaka Kromatografisi 30
3.7.3. Analitik HPLC Çalışma Şartları 31

3.7.4. Preparatif HPLC Çalışma Şartları 31
3.7.5. MPLC Çalışma Şartları 31
3.7.6. LC-MS Çalışma Şartları 32
3.8. Spektroskopik Yöntemler 32
3.8.1. UV Spektroskopisi 32
3.8.2. NMR Spektroskopisi 32
4. BULGULAR 33
4.1. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri Sonuçları 33
4.2. Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları 33
4.2.1. *β*-Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonucu 33
4.2.2. Metal Bağlama Yöntemi Sonucu 34
4.2.3. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Sonucu 34
4.2.4. CUPRAC Yöntemi Sonucu 35
4.3. *I. suaveolens*'in Petrol Eteri ve Kloroform Ekstrelerinin Kimyasal İçerikleri 36
4.3.1. *I. suaveolens*'in Petrol Eteri Ekstresinin (ISUP) Fraksiyonlandırılması 36
4.3.2. ISUP'tan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri 37
4.3.2.1. ISUP 1= 7*β*-Hidroksistigmast-4-en-3-on 37
4.3.2.2. ISUP 2= *β*-Sitosterol 43
4.3.2.3. ISUP 3= 3-Hidroksiiriskinon 46
4.3.2.4. ISUP 4= Asetovanilon 51
4.3.2.5. ISUP 5= *cis*-Vaksenik Asit 55
4.3.3. *I. suaveolens*'in Kloroform Ekstresinin (ISUC) Fraksiyonlandırılması 59
4.3.4. ISUC'tan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri 64
4.3.4.1. ISUC 1= Tectorigenin 64
4.3.4.2. ISUC 2= İrilon 72
4.3.4.3. ISUC 3= Nigricin 78
4.3.4.4. ISUC 4= İriskumaonin metil eter 83
4.3.4.5. ISUC 5= Soforanarin A 90
4.3.4.6. ISUC 6= *cis*-Epoksiconiferil alkol 93
4.3.4.7. ISUC 7= Coniferaldehit 99
4.3.4.8. ISUC 8= *p*-Hidroksiasetofenon 104
4.4. Saf Maddelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları 108
4.4.1. *β*-Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonucu 108

4.4.2. CUPRAC Yöntemi Sonucu.....109
5. TARTIŞMA.....110
KAYNAKLAR.....111
ÖZGEÇMİŞ.....116

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması 19
Tablo 2-2: Doğal olarak oluşan Δ^9-alkenoik asitler 23
Tablo 2-3: Doğal olarak oluşan Δ^9 haricindeki diğer doymamış alkenoik asitler 23
Tablo 4-1: Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları [a] 33
Tablo 4-2: ISUP 1 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$, 125 MHz) 39
Tablo 4-3: ISUP 3 bileşiğinin ^{1}H- ve ^{13}C-NMR değerleri ($CDCl_3$) 48
Tablo 4-4: ISUP 4 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri (CD_3COCD_3, 125 MHz) 52
Tablo 4-5: ISUC 1 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri (CD_3OD, 125 MHz) 66
Tablo 4-6: ISUC 2 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$+CD_3OD, 125 MHz) 74
Tablo 4-7: ISUC 3 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$+CD_3OD, 125 MHz) 80
Tablo 4-8: ISUC 4 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri (CD_3OD, 125 MHz) 85
Tablo 4-9: ISUC 6 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$, 125 MHz) 94
Tablo 4-10: ISUC 7 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$, 125 MHz) 100
Tablo 4-11: ISUC 8 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri (CD_3COCD_3, 125 MHz) 105

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Birincil antioksidanlar 10
Şekil 2-2: İkincil antioksidanlar 11
Şekil 2-3: Sekonder metabolitlerin oluşumu……..…...13
Şekil 2-4: 2-Fenil benzopiran 14
Şekil 2-5: Flavonoit iskeletleri 14
Şekil 2-6: Bant I ve Bant II'yi veren gruplar 15
Şekil 2-7: İzoflavonlar 16
Şekil 2-8: Steroitlerin iskelet yapısı 17
Şekil 2-9: Kolesterol 18
Şekil 2-10: Basit fenol ve fenolik asitler 20
Şekil 2-11: Bazı fenilpropanoit bileşikler 21
Şekil 2-12: Bazı kinoit bileşikler 22
Şekil 3-1: Pirokatekol ölçü eğrisi 28
Şekil 3-2: Kersetin ölçü eğrisi 29
Şekil 4-1: *I. suaveolens*'in rizomlarından hazırlanan ekstrelerin *β*-karoten renk açılım yöntemi ile antioksidan aktiviteleri 34
Şekil 4-2: *I. suaveolens*'in rizomlarından hazırlanan ekstrelerin metal bağlama yöntemi ile antioksidan aktiviteleri 35
Şekil 4-3: *I. suaveolens*'in rizomlarından hazırlanan ekstrelerin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri 35
Şekil 4-4: 7*β*-Hidroksistigmast-4-en-3-on 37
Şekil 4-5: ISUP 1 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH) 38
Şekil 4-6: ISUP 1 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)……..…...40
Şekil 4-7: ISUP 1 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$,125 MHz).....41
Şekil 4-8: ISUP 1 bileşiğinin HMQC spektrumu ($CDCl_3$).....42
Şekil 4-9: *β*-Sitosterol……..……43
Şekil 4-10: ISUP 2 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)……...……..44
Şekil 4-11: ISUP 2 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)…….…...45
Şekil 4-12: 3-Hidroksiiriskinon…….....…...46
Şekil 4-13: ISUP 3 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)…….……...…….47
Şekil 4-14: ISUP 3 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)…….…….....49

Şekil 4-15: ISUP 3 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 125 MHz)……..……..50
Şekil 4-16: Asetovanilon……..51
Şekil 4-17: ISUP 4 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)……..……52
Şekil 4-18: ISUP 4 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3COCD_3, 500 MHz)……...53
Şekil 4-19: ISUP 4 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3COCD_3, 125 MHz)…….……54
Şekil 4-20: *cis*-Vaksenik asit……..…....……...55
Şekil 4-21: ISUP 5 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)……..56
Şekil 4-22: ISUP 5 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz).....57
Şekil 4-23: ISUP 5 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 125 MHz).....58
Şekil 4-24: Fraksiyon 16-17'nin HPLC kromatogramı……..…..…...59
Şekil 4-25: Fraksiyon 19'un HPLC kromatogramı……...……..60
Şekil 4-26: Fraksiyon 24-26'nın HPLC kromatogramı……...…. 60
Şekil 4-27: Fraksiyon 16-17-3'ün HPLC kromatogramı…….61
Şekil 4-28: Fraksiyon 16-17-5'in HPLC kromatogramı……..62
Şekil 4-29: Fraksiyon 24-26-8'in HPLC kromatogramı……..63
Şekil 4-30: Tectorigenin…….....…….…..64
Şekil 4-31: ISUC 1 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları……..65
Şekil 4-32: ISUC 1 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).....67
Şekil 4-33: ISUC 1 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz)…….68
Şekil 4-34: ISUC 1 bileşiğinin HMQC spektrumu (CD_3OD)…….....……69
Şekil 4-35: ISUC 1 bileşiğinin HMBC spektrumu (CD_3OD)..... 70
Şekil 4-36: ISUC 1 bileşiğinin LC-MS kromatogramı..... 71
Şekil 4-37: İrilon..... 72
Şekil 4-38: ISUC 2 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları..... 73
Şekil 4-39: ISUC 2 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD, 500 MHz)..... 75
Şekil 4-40: ISUC 2 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD, 125 MHz)..... 76
Şekil 4-41: ISUC 2 bileşiğinin LC-MS kromatogramı..... 77
Şekil 4-42: Nigricin 78
Şekil 4-43: ISUC 3 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları..... 79
Şekil 4-44: ISUC 3 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz)..... 81
Şekil 4-45: ISUC 3 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD, 125 MHz).....82
Şekil 4-46: İriskumaonin metil eter 83
Şekil 4-47: ISUC 4 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları..... 84

Şekil 4-48: ISUC 4 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz).....86
Şekil 4-49: ISUC 4 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz)..... 87
Şekil 4-50: ISUC 4 bileşiğinin HMQC spektrumu (CD_3OD)..... 88
Şekil 4-51: ISUC 4 bileşiğinin HMBC spektrumu (CD_3OD).....89
Şekil 4-52: Soforanarin A 90
Şekil 4-53: ISUC 5 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları 91
Şekil 4-54: ISUC 5 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)..... 92
Şekil 4-55: *cis*-Epoksiconiferil alkol 93
Şekil 4-56: ISUC 6 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH) 94
Şekil 4-57: ISUC 6 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)..... 95
Şekil 4-58: ISUC 6 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 125MHz)..... 96
Şekil 4-59: ISUC 6 bileşiğinin HMQC spektrumu ($CDCl_3$)..... 97
Şekil 4-60: ISUC 6 bileşiğinin HMBC spektrumu ($CDCl_3$)..... 98
Şekil 4-61: Coniferaldehit..... 99
Şekil 4-62: ISUC 7 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH) 100
Şekil 4-63: ISUC 7 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu ($CDCl_3$, 600 MHz)..... 101
Şekil 4-64: ISUC 7 bileşiğinin DEPT spektrumu (CD_3OD, 150 MHz)…….....….102
Şekil 4-65: ISUC 7 bileşiğinin LC-MS kromatogramı..... 103
Şekil 4-66 :*p*-Hidroksiasetofenon 104
Şekil 4-67: ISUC 8 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH) 105
Şekil 4-68: ISUC 8 bileşiğinin ^{1}H-NMR spektrumu (CD_3COCD_3, 500 MHz) 106
Şekil 4-69: ISUC 8 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3COCD_3, 125 MHz) 107
Şekil 4-70: Saf maddelerin *β*-karoten renk açılım yöntemi ile antioksidan aktiviteleri 108
Şekil 4-71: Saf maddelerin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri..... 109

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

$A^{\bullet}$	: Antioksidan radikaller
ABTS	: 2,2′-Azinobis (3-etilbenzotrazolin-6-sülfonat)
AH	: Birincil antioksidanlar
APT	: Attached proton test
BHA	: Bütillenmiş hidroksi anisol
BHT	: Bütillenmiş hidroksi toluen
CUPRAC	: Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi
DCFA-DA	: Diklorofloresin-diasetat
DEPT	: Distortionless Enhancement by Polarizations Transfer
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DPPH	: 1,1-Difenil-2-pikrilhidrazil
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
FCR	: Folin Ciocalteu fenol reaktifi
Ferrozin	:3-(2-piridil)-5,6-bis-(4-fenilsülfonik asit)-1,2,4-triazin monosodyum tuzu
FRAP	: Demir (III) indirgeme antioksidan gücü
HMBC	: Heteronuclear multiple bond coherence
HMQC	: Heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
IR	: Infrared spektroskopisi
ISUC	: *Iris suaveolens*'in kloroform ekstresi
ISUM	: *Iris suaveolens*'in metanol ekstresi
ISUP	: *Iris suaveolens*'in petrol eteri ekstresi

İTK : İnce tabaka kromatografisi

LC-MS : Sıvı kromatografisi kütle spektroskopisi

ln : Doğal logaritma

MPLC : Orta basınçlı sıvı kromatografisi

NADH : Nikotinamitadenindinükleotit

NBT : Nitroblutetrazolyum

Nc : Neokuproin

NMR : Nükleer magnetik rezonans

$O_2^{\bullet}$: Süperoksit radikali

$OH^{\bullet}$: Hidroksil radikali

ORAC : Oksijen radikalini absorplama kapasitesi

PE : Fikoeritrin

PEs : Pirokatekole eşdeğer

PMS : Fenazinmetasülfat

Q : Kersetin

QEs : Kersetine eşdeğer

$R^{\bullet}$: Alkil radikalleri

$RO^{\bullet}$: Alkoksi radikalleri

$ROO^{\bullet}$: Peroksit radikalleri

ROOH : Hidroperoksitler

ROS : Reaktif oksijen türleri

$RS^{\bullet}$: Tiyil radikalleri

$RSO^{\bullet}$: Sülfenil radikalleri

$RSO_2^{\bullet}$: Tiyil peroksit radikalleri

s : Saat

TMS : Tetrametilsilan

TOC : α-Tokoferol

TOSC : Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi

TRAP : Toplam radikal tutma parametresi

Tween-40 : Polioksietilensorbitan monopalmitat

UV : Ultraviyole spektroskopisi

ÖZET

Hacıbekiroğlu, I. (2009). *Iris suaveolens*'ten Elde Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Genel Kimya Programı. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Iridaceae familyasının bir üyesi olan *Iris* cinsinin Türkiye'de 16'sı endemik olmak üzere 46 türü bulunmaktadır. *Iris* türlerinin rizomları halk arasında idrar arttırıcı ve kusturucu, tohumları ise gaz söktürücü, kabız ve midevi olarak kullanılmaktadır. *Iris* türleri süs bitkisi olarak yetiştirilmelerinin yanı sıra menekşeye benzer kokuları olduğundan kozmetik ve parfüm endüstrisinde de kullanılmaktadır. *Iris* türlerinin rizomları iridal tipi triterpenler ve izoflavonlar başta olmak üzere flavon, flavanon, ksanton ve kinonlar gibi sekonder metabolitleri içermektedir.

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *Iris suaveolens* Boiss. & Reuter bitkisinin rizomlarından hazırlanan petrol eteri, kloroform ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik miktarları pirokatekole, toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak tayin edildikten sonra antioksidan aktiviteleri *β*-karoten renk açılım, metal bağlama, süper-oksit anyon radikali giderim ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak belirlendi. Antioksidan aktiviteleri yüksek olan petrol eteri ve kloroform ekstrelerinden kromatografik yöntemler kullanılarak sekonder metabolitler saflaştırılıp spektroskopik yöntemler kullanılarak yapıları aydınlatıldı. Petrol eteri ekstresinden beş, kloroform ekstresinden sekiz olmak üzere toplam onüç madde elde edildi. Elde edilen saf maddelerin antioksidan aktiviteleri *β*-karoten renk açılım ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlendi. *β*-Karoten renk açılım yönteminde en yüksek aktiviteyi 7*β*-hidroksistigmast-4-en-3-on ve coniferaldehitin, CUPRAC yönteminde en yüksek etkiyi coniferaldehitin gösterdiği tespit edildi.

Bu tez çalışması ile *I. suaveolens* Boiss. & Reuter bitkisinin kimyasal içeriği, ekstrelerin ve bazı saf maddelerin antioksidan aktiviteleri ilk kez incelendi.

Anahtar Kelimeler: *Iris suaveolens,* Iridaceae, sekonder metabolit, yapı tayini, antioksidan aktivite.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2907

ABSTRACT

Hacıbekiroğlu, I. (2009). Structure Determination of Compounds Isolated From *Iris suaveolens* with Antioxidant Activity. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Analytical Chemistry, General Chemistry Programme. Master Thesis. Istanbul.

There are forty six *Iris* species (Iridaceae) in Turkey, sixteen of them are endemic. In traditional medicine, their rhizomes have been used as diuretic and vomitive, their seeds as carminative and constipative. These species have been cultivated as ornamental plants and they have been also used in cosmetic and perfume industries. Their rhizomes are rich in iridal type triterpenes and isoflavones, other secondary metabolites, flavones, flavanones, xanthones and quinones have been also isolated from *Iris* species.

In this thesis, the petroleum ether, chloroform and methanol extracts were prepared from the rhizomes of *I. suaveolens* Boiss. & Reuter. Total phenolic and flavonoid contents of these extracts were determined as pyrocatechol and quercetin equivalents, respectively. The antioxidant activity of the extracts was determined by using *β*-carotene bleaching, metal chelating, superoxide anion radical scavenging and CUPRAC methods. Secondary metabolites were isolated from the petroleum ether and chloroform extracts, spectroscopic methods were used for their structure determination. Five compounds were obtained from the petroleum ether extract and eight from chloroform extract. *β*-Carotene bleaching and CUPRAC methods were used for the determination of antioxidant activity of the isolated compounds. Both 7*β*-hydroxystigmast-4-en-3-one and coniferaldehyde showed high activity in *β*-carotene bleaching method, while coniferaldehyde exhibited the best effect in CUPRAC assay.

The pyhtochemical investigation of *I. suaveolens* with antioxidant activity of its extracts and some isolated compounds were performed for the first time in this study.

Key Words: *Iris suaveolens*, Iridaceae, secondary metabolite, structure determination, antioxidant activity.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 2907

ZUSAMMENFASSUNG / RESUME

Hacıbekiroğlu, I. (2009). Bestimmung der Struktur der Verbindung erhalten aus *Iris suaveolens* und Bestimmung die Antioksidante Aktivitaeten. Istanbul Universitaet, Gesundheitwissenschaftliches Institut. Analytische und Gemeine Chemie. Meistere These. Istanbul.

Es gibt sechsundvierzig Spezies (Iridaceae) Schwertliliengewaechse in der Türkei, sechzehn von diesen sind endemisch. Ihre Rhizome wurden in der traditionale Medizin als diuretikum und vomitiv benutzt und ihre Samen wurden als karminativum und konstipative benutzt. Diese Spezies sind als eine ornamentale Planz gewachsen und wurden ebenfalls in den kosmetischen und parfümen Industrien benutzt. Ihre Rhizome sind reich am iridal Typ Triterpenen und Isoflavonen, Flavonen, Flavanonen, Xanthonen and Quinonen wurden ebenfalls von anderen *Iris* Spezies isoliert.

In dieser Abschlussarbeit wurden der Petrolaether, das Chloroform und das Methanol extract aus den Rhizome von *I. suaveolens* Boiss. & Reuter. erstellt. Die ganze phenolic und flavonoid Inhalte dieser Extrakte wurden beziehungsweise als Brenzkatechin und Quercetin Aequivalenten festgelegt. Die Antioxidante Aktivitaet der Inhalte dieser Extrakte wurde mit der Nutzug von *β*-Carotene Bleichend, Metall Chelatbilner, Superoxide Anion Radikale spülung und CUPRAC methoden. Sekundaermetaboliten wurden aus dem Petrolaether und das Chloroform Extrakten isoliert und Spektroskopische Methoden wurden für die Strukture Festlegung benutzt. Fünf Verbindungen wurden aus dem Petrolaether Extrakt bekommen und acht wurden aus dem Chloroform Extrakt bekommen. *β*-Carotene Bleichend und CUPRAC Methoden wurden für die Festlegung der Antioxidante Aktivitaeten der isolierte Verbindungen. 7*β*-Hydroxystigmast-4-en-3-on und coniferaldehyde zeigten die höhste Aktivitaet in der *β*-Carotene Bleichend Methode. Coniferaldehyde zeigte die beste Wirkung im CUPRAC Assay.

Die phytochemische Untersuchung von *I. suaveolens*, die Antioxidante Aktivitaet von seinen Extrakten wurden zum ersten Mal in dieser Arbeit ausgeführt.

Schlüsselwörter: *Iris suaveolens,* Iridaceae, Sekundaere Metabolit, Bestimmung der Struktur, Antioxidante Aktivitaet.

Diese Arbeite wurde unterstützt von Istanbul Universitaet Wissenschaftliche Forschungsprojekte Einheit Nr: 2907



Iris suaveolens Boiss. & Reuter

Edirne-Lalapaşa 18.04.2008

Foto: Işıl Hacıbekiroğlu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eski çağlardan beri bitkiler, halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Zengin bitki örtüsüne sahip olan ülkemizde de bitkilerin tıbbi amaçla kullanılmaları oldukça yaygındır.

Tedavi amacıyla kullanılan bitkilerin içerdikleri sekonder metabolitlerin saflaştırılarak yapılarının aydınlatılması, bunların farmakolojik ve biyolojik aktivitelerinin belirlenmesi sonucunda birçok hastalığın tedavisinde kullanılan ilaçlar bulunmuştur.

İnsan ömrünün uzamasıyla birlikte kronik hastalıkların artması, kanser ve kalp-damar hastalıklarına bağlı ölüm oranlarının yüksek olması günümüzde antioksidanlara olan ilgiyi arttırmıştır. Bunun nedeni, antioksidan bakımından zengin gıdaların tüketilmesinin ve/veya doğal antioksidanların beslenme takviyesinde kullanılmalarının hücresel yaşlanmayı ve birçok kronik hastalığın oluşumunu geciktirdiğinin veya önlediğinin bilimsel olarak kanıtlanmış olmasıdır.

Ülkemizde 46 türü bulunan *Iris* L. cinsi başta izoflavon ve iridal tipi triterpenler olmak üzere fenolik bileşikler, ksantonlar ve stilbenler içerirler (Farag ve ark. 2009). *Iris* türlerinin halk arasında rizomları ve tohumları tedavi amacıyla kullanılmaktadır (Baytop 1984 pp. 384-385). Bu yüksek lisans tez çalışmasında, *Iris suaveolens* Boiss. & Reuter bitkisinin rizomlarından hazırlanan petrol eteri, kloroform ve metanol ekstrelerinin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarlarının belirlenerek β-karoten renk açılım, metal bağlama, süperoksit anyon radikali giderim ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak antioksidan aktivitelerinin tayin edilmesi, aktivitesi yüksek çıkan ekstrelerden kromatografik yöntemler kullanılarak saf madde elde edilmesi, saf maddelerin spektroskopik yöntemlerle yapılarının aydınlatılması ve antioksidan aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Botanik Bilgiler

2.1.1. Iridaceae Familyası

Tropikal ve sub-tropikal bölgede yayılış gösteren Iridaceae familyasında yaklaşık 80 cins bulunmaktadır (Kandemir 2006). Bu familyada, soğanlı, rizomlu ya da kormuslu bitkiler bulunur. Bitkiler dik ve büyük, yapraklar orta damarı boyunca ikiye katlı, eksen üzerine sapsız olarak karşılıklı iki sıra üzerine aynı planda ve tabanlarıyla biri diğerini örter durumda sık dizilişli, bunların birkaçı dik, diğerleri sarkık, geriye kıvrılmış haldedir ve çoğunlukla orta damarlarının üstü tüylüdür. Kaliks ve korolla iki sıra üzerine dizili ve zigomorftur. Sitamenler 3 tane, periant dışarıda ve sitamenlerin karşısındadır. Stilus 3 parçalıdır. Çiçekler hermafrodit, aktinomorf veya zigomorftur (Mathew 1984 pp. 381). Bu familyanın en önemli cinslerinden biri olan *Iris* L. cinsi 5 altcins ile temsil edilir: *Iris, Limniris, Susiana, Scorpiris, Hermodactyloides* (Kandemir 2006).

2.1.2. *Iris* L. Cinsi

Rizomlu veya soğanlı bir cinstir. Yapraklar çoğunlukla düz-yassı, orta damar boyunca ikiye katlı, oluklu, 4 köşeli veya silindiriktir. Çiçekler sapsız veya kısa saplı, periant segmentleri 6 tanedir. Anterler 3 tane ve dış segmentlerin karşılarında, dışa yöneliklerdir. *Iris* cinsinin Türkiye'de 16'sı endemik olmak üzere 46 türü bulunmaktadır (Mathew 1984 pp. 382).

Endemik Türler

- *Iris danfordiae*
- *Iris galatica*
- *Iris histrioides*
- *Iris junonia*
- *Iris kerneriana*
- *Iris nectarifera var. mardinensis*

- *Iris nectarifera var. nectarifera*
- *Iris pamphylica*
- *Iris purpureobractea*
- *Iris sari*
- *Iris sprengeri*
- *Iris stenophylla subsp. allisonii*
- *Iris stenophylla subsp. stenophylla*
- *Iris taochia*
- *Iris unguicularis subsp. carica var. carica*
- *Iris xanthospuria*

Endemik Olmayan Türler

- *Iris albicans*
- *Iris attica*
- *Iris aucheri*
- *Iris barnumae*
- *Iris caucasica subsp. caucasica*
- *Iris caucasica subsp. turcica*
- *Iris gatesii*
- *Iris germanica*
- *Iris histrio*
- *Iris iberica subsp. elegantissima*
- *Iris iberica subsp. lycotis*
- *Iris kirkwoodii*
- *Iris lazica*
- *Iris masia*

- *Iris orientalis*
- *Iris paradoxa*
- *Iris persica*
- *Iris reichanbachiana*
- *Iris pseudacorus*
- *Iris pseudocaucasica*
- *Iris reticulata var. bakeriana*
- *Iris reticulata var. reticulata*
- *Iris schachtii*
- *Iris sibirica*
- *Iris sintenisii*
- *Iris sofarana*
- *Iris spuria subsp. musulmanica*
- *Iris suaveolens*
- *Iris unguicularis subsp. carica*
- *Iris unguicularis subsp. carica var. syriaca*

2.1.3. *Iris suaveolens* Boiss. & Reuter

Çok yıllık otsu bir bitkidir. 8-14 (-25) cm uzunluğunda, yapraklar 0,4-1 (-1,3) cm genişliğinde, orak şeklinde kıvrık, grimsi yeşil bazen kenarları mor renklidir. Gövde çok kısadır ve 1-2 terminal çiçek bulunur. Brakte ve brakteol kayık şeklinde, 3,5-7 cm, ikisi de hemen hemen eşittir. Çiçekler mor veya sarı renkli, morumsu veya kahverengimsi ayaları vardır. Tüyler sarı, krem veya mordur. Kayalık arazilerde ya da çalılık yamaçlarda, 30-1400 m yükseklikte yetişir. Mart-Nisan aylarında çiçeklenir. Balkanlar ve Doğu Akdeniz elementidir. Türkiye'nin batı ve kuzeybatısında yetişir (Mathew 1984 pp. 395-396).

2.2. *Iris* Türlerinin Halk Arasında Kullanılışı

Iris türleri halk arasında süsen, navruz gibi isimlerle bilinmektedir. Halk arasında *Iris* türlerinin rizomları idrar arttırıcı ve kusturucu, tohumları ise gaz söktürücü, kabız ve midevi olarak kullanılmaktadır (Baytop 1984 pp. 384-385). Ayrıca bu türler süs bitkisi olarak yetiştirilmekte ve menekşeye benzer kokuları olduğundan kozmetik endüstrisinde kullanılmaktadır (Orhan ve ark. 2002). Avrupa piyasasında çocuklar için özel olarak hazırlanmış bir tür süsen kök bulunmaktadır. Bu tür, diş çıkaran çocuklara verilir. Çocuklar bu parçaları çiğneyerek diş etlerinin kaşıntısını giderirler (Baytop 1984 pp. 384-385).

Bazı *Iris* türleri antienflamatuar, antidot, emetik, laksatif, hemostatik ajan olarak, ayrıca bakteriyel enfeksiyon ve kanser tedavisinde kullanılırlar (Farag ve ark. 2009). *Iris* türlerinin rizomlarının antineoplastik, antioksidan, antitümör, antiplasmodiyal, antitüberküloz, antispazmodik, emenagog ve diüretik etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Kandemir 2006). Çeşitli *Iris* türlerinden izole edilen bazı benzokinonlar modern Çin tıbbında antikanser ajanları olarak kullanılmaktadır (Choudhary ve ark. 2001).

2.3. *Iris* Türleri ile Yapılan Kimyasal Çalışmalar ve Aktivite Tayinleri

Iris türleri flavon, izoflavon, flavanon, ksanton, iridal, stilben, peltoginoit, kinon ve triterpen tipli bileşikler içermektedirler (Farag ve ark. 2009).

Farag ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *I. spuria*'nın rizomlarından iki yeni izoflavon glikozit elde edilmiştir: tectorigenin 7-*O*-*β*-*D*-glikopiranozit-4'-*O*-[*β*-*D*-glikopiranozil-(1‴→6‴)-*β*-*D*-glikopiranozit] ve iristectorigenin B 4'-*O*-[*β*-*D*-glikopiranozil-(1‴→ 6‴)-*β*-*D*-glikopiranozit] (Farag ve ark. 2009).

I. nigricans'ın rizomlarından yeni izoflavonlar: nigricin ve nigricanin (Al-Khalil ve Al-Eisawi 1994) ve ksantonlar: noratriol, bellidifolin, mangiferin, desmetilbellidifolin, 7-*O*-metilmangiferin, 1,6-dihidroksi-3,7-dimetoksiksanton ve nigricansit elde edilmiştir (Al-Khalil ve ark. 1995).

I. germanica rizomlarından izoflavonoit bileşikler (irisolidon, irigenin, iridin) ve asetovanilon, sitosterol, *α*-amirin ve *β*-amirin elde edilmiştir (Ali ve ark. 1983). Atta-ur-Rahman ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise *I. germanica*'dan izole edilen 5,7-dihidroksi-3-(3'-hidroksi-4',5'-dimetoksi)-8-metoksi-4*H*-1-benzopiran-4-on, 5,7dihidroksi-3-(3'-hidroksi-4',5'-dimetoksi)-6-metoksi-4*H*-1-benzopiran-4-on, 5,7-dihidroksi-3-

(4'-hidroksi)-6-metoksi-4*H*-1-benzopiran-4-on, 5-hidroksi-3-(4'-hidroksi)-6,7-metilendioksi-4*H*-1-benzopiran-4-on, 5-hidroksi-3-(4'-metoksi)-6,7-metilendioksi-4*H*-1-benzopiran-4-on, 5-metoksi-3-(4'-hidroksi)-6,7-metilendioksi-4*H*-1-benzopiran-4-on, 5,7-dihidroksi-3-(3'-hidroksi-4'-metoksi)-6-metoksi-4*H*-1-benzopiran-4-on, 5,7-dihidroksi-3-(3'-metoksi-4'-hidroksi)-6-metoksi-4*H*-1-benzopiran-4-on ve isopeonol'un antienflamatuar aktiviteleri belirlenmiştir (Atta-ur-Rahman ve ark. 2003). 1982 yılında Marner ve arkadaşları *I. germanica*'dan iki yeni triterpen, irigermanal ve iridogermanal, elde etmişlerdir (Marner ve ark. 1982)

2003 yılında Orhan ve arkadaşları *I. germanica*'nın rizomlarından hazırladıkları çeşitli ekstrelerin antibakteriyal, antifungal, insektisidal ve fitotoksik aktivitelerini tayin etmişlerdir (Orhan ve ark. 2003). Yine *I. germanica'*dan yeni bir epoksitlenmiş iridal bileşik izole edilmiştir (Bonfils ve ark. 1998).

1999 yılında Farag ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *I. carthaliniae'*nın rizomlarından iki yeni izoflavonoit biosit, tectorigenin 4'-glikozil (1→6) glikozit ve iristectorigenin B 7-glikozil-(1→6) glikozit, bir yeni izoflavonoit monosit, 4'-metiltectorigenin 7-glikozit ve bir yeni flavon glikozit, 6,4'-dimetoksi-5-hidroksiflavon 7-glikozit, tectoridin ve tectorigenin 4'-glikozit izole edilmiştir (Farag ve ark. 1999).

Marner ve arkadaşlarının *I. sibirica* ile yaptıkları çalışmada, yeni bir iridal bileşik (6*R*, 10*S*, 11*S*)-17,29-didehidroiridal elde etmişlerdir (Marner ve ark. 1995).

Choudhary ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada *I. bungei'*den dört yeni flavon, irisflavon A-D, ve yeni bir izoflavon, irilin D izole edilmiştir (Choudhary ve ark. 2001).

*I. pseudopumila'*nın rizomlarından izole edilen izoflavonların yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri belirlenmiştir (Rigano ve ark. 2007).

2.4. Antioksidanlar

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller, oksijenden oluşan radikallerdir. Çeşitli reaksiyonlar sonucu oluşan reaktif oksijen türleri, serbest radikallerin oluştuğu radikal zincir reaksiyonlarını başlatabilirler ve hücrede karbon merkezli organik radikaller ($R^{\bullet}$), peroksi radikalleri ($ROO^{\bullet}$), alkoksi radikalleri ($RO^{\bullet}$), tiyil radikalleri ($RS^{\bullet}$), sülfenil radikalleri ($RSO^{\bullet}$), tiyil peroksi radikalleri ($RSO_2^{\bullet}$) gibi

çeşitli serbest radikallerin oluşumuna neden olurlar. Reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumu enflamasyon, radyasyon, yaşlanma, normalden yüksek oksijen basıncı, ozon, azot dioksit, kimyasal maddeler ve ilaçlar gibi bazı uyarıların etkisiyle artar.

Serbest radikaller hücrelerin lipit, protein, DNA, karbonhidrat ve enzim gibi tüm önemli bileşiklerine etki ederler. Süperoksit radikali ($O_2^{\bullet -}$) ve hidroksil radikali ($OH^{\bullet}$) sitoplazma, mitokondri, nükleus ve endoplazmik retikulum membranlarında lipit peroksidasyonunu başlatırlar. Membranlarda lipit peroksidasyonunun meydana gelmesi sonucu membran geçirgenliği artar. Serbest radikallerin etkisiyle proteinlerdeki sistein sülfhidril grupları ve diğer amino asit kalıntıları okside olarak yıkılır. Serbest oksijen radikallerinin tüm bu etkilerinin sonucunda hücre hasarı olur. Hücrede reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve serbest radikallerin artışı hücre hasarının önemli bir nedenidir. Oluşan bu hücre hasarları sonucunda bağırsak rahatsızlıkları, kalp-damar hastalıkları, Parkinson, kanser, eklem rahatsızlıkları, yüksek tansiyon, Alzheimer gibi çeşitli hastalıklar meydana gelebilir. Vücuttaki antioksidan savunma mekanizmaları bu hasarların ortaya çıkmasını önlemekte veya en aza indirmektedir (Haroguchi 2001 pp. 339-377). Antioksidanlar,

- Radikal oluşumunun sınırlandırılmasından,
- Radikal reaksiyonlarının sona ermesinden,
- Oluşan radikallerin etkisiz hale getirilmesinden,
- Hasarlı moleküllerin ortadan kaldırılmasından sorumlu moleküllerdir.

2.4.1. Antioksidanların Sınıflandırılması

2.4.1.1. Birincil Antioksidanlar

Birincil antioksidanlar (tip–1 veya zincir kırıcı antioksidanlar) otooksidasyonun başlangıç aşamasını erteleyen veya engelleyen ya da otooksidasyonun ileri aşamasını yarıda kesen serbest radikal alıcılarıdır. Bir lipit (alkil) radikali ($R^{\bullet}$) oluşturmak için, doymamış yağdan α-metilenik hidrojen ayrıldığında otooksidasyon başlar.

$$RH \longrightarrow R^{\bullet} + H^{\bullet}$$

Oluşan lipit radikali çok reaktiftir, ilerleyen aşamalarda peroksi radikali ($ROO^{\bullet}$) oluşturmak için oksijenle reaksiyona girer.

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} + H^{\bullet}$$

Reaksiyonun ilerleyen aşamalarında peroksi radikalleri lipitle reaksiyona girerek hidroperoksit ve yeni bir kararsız lipit radikali oluştururlar.

$$ROO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROOH + R^{\bullet}$$

Daha sonra bu lipit radikali başka peroksi radikali oluşturmak üzere oksijen ile reaksiyona girecektir. Bu oksidatif mekanizma kendiliğinden katalizlenir ve böylece otooksidasyon devam eder.

$$R^{\bullet} + O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet} + H^{\bullet}$$

Hidroperoksitler (ROOH) kararsızdırlar ve bozunarak radikaller oluştururlar. Bu da reaksiyonun hızlanmasına neden olur (Reische ve ark. 2002 pp.335-542).

$$ROOH \longrightarrow RO^{\bullet} + HO^{\bullet}$$

Birincil antioksidanlar (AH) lipit radikali ($R^{\cdot}$) ve peroksi radikalleriyle ($ROO^{\cdot}$) reaksiyona girerler ve onları daha kararlı, radikal olmayan ürünlere çevirirler. Birincil antioksidanlar lipit radikallerine hidrojen atomları verirler ve lipit türevleri ile antioksidan radikaller meydana getirirler ($A^{\cdot}$). Hidrojen verici olarak birincil antioksidanlar peroksi radikallerine lipitlerden daha çok ilgi gösterirler. Bu yüzden otooksidasyon reaksiyonunda oluşan peroksi ($ROO^{\cdot}$) ve oksi ($RO^{\cdot}$) serbest radikalleri birincil antioksidanlar tarafından giderilirler. Antioksidanlar lipit radikalleriyle doğrudan da etkileşebilirler.

$$ROO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROOH + A^{\bullet}$$

$$RO^{\bullet} + AH \longrightarrow ROH + A^{\bullet}$$

$$R^{\bullet} + AH \longrightarrow RH + A^{\bullet}$$

Hidrojenin verilmesiyle oluşan antioksidan radikali lipitlerle çok az reaksiyona girer. Oksijen veya lipitlerle antioksidan radikalinin reaksiyonu çok yavaş olduğundan

reaksiyon hızı azalır. Kararlı rezonans hibritler oluşturmak için fenol halkasının çevresindeki ortaklanmamış elektronun delokalizasyonu ile antioksidan radikali kararlı hale getirilir. Antioksidan radikaller peroksi, oksi ve diğer antioksidan radikaller ile sonlandırma reaksiyonlarına katılabilme yeteneğine sahiptirler.

$$ROO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROOA$$
$$RO^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow ROA$$
$$A^{\bullet} + A^{\bullet} \longrightarrow AA$$

Katı ve sıvı yağlarda antioksidan dimerlerin oluşumu göze çarpar ve bu oluşum fenolik antioksidan radikallerin kolayca sonlandırma reaksiyonlarına uğradığını gösterir. Antioksidan dimerler, radikal olmayan şekillerinde ne kadar uzun süre kalırlarsa otokatalitik serbest radikal zincir mekanizmasını o kadar etkili şekilde durdururlar.

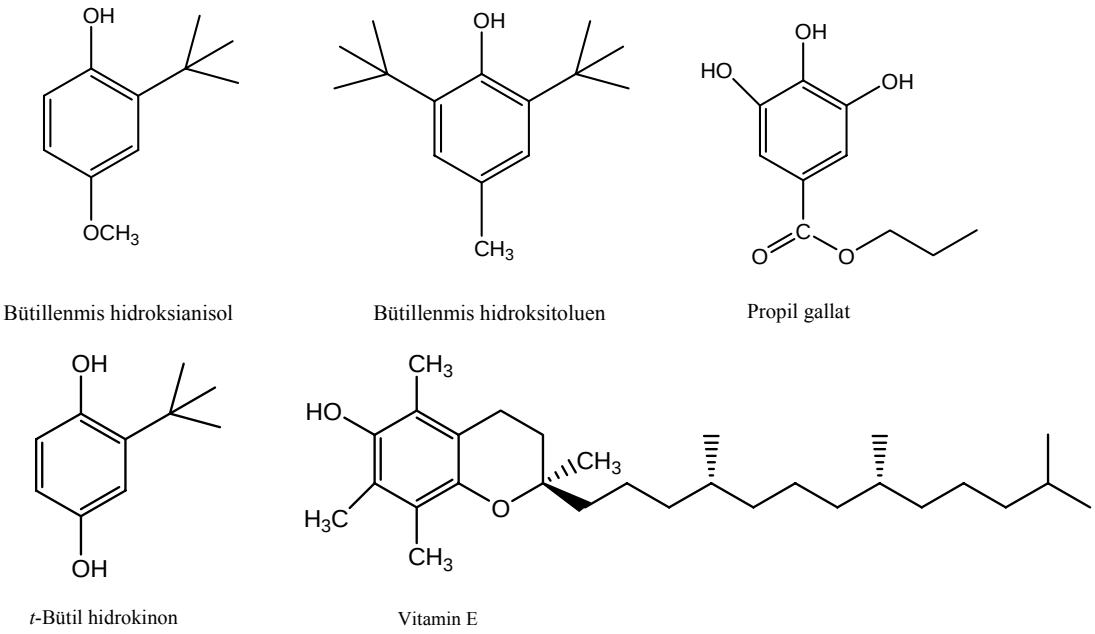
$$RO^{\bullet} + RH \longrightarrow ROH + R^{\bullet}$$

Otooksidasyonun başlangıcından önce, antioksidanların tüketildiği ve serbest radikallerin oluştuğu indüksiyon zamanı olmalıdır. Bu yüzden birincil antioksidanlar, otooksidasyon basamakları meydana gelmeden oksidasyonun indüksiyon ve başlangıç aşamalarında ilave edilirlerse daha etkili olurlar.

Radikal gidermeye ilaveten birincil antioksidanlar, hidroperoksitleri hidroksi bileşiklerine indirgeyebilirler. Bununla beraber birincil antioksidanların esas antioksidatif mekanizması radikal gidermedir.

Birincil antioksidanlar, çeşitli halka sübstitüsyonlarına sahip mono veya polihidroksi fenollerdir. Fenoldeki hidroksil grubuna göre orto ve para konumuna elektron veren grupların sübstitüsyonundan oluşan indüktif etki bileşiğin antioksidan aktivitesini arttırır. Fenolik antioksidanlar, hidroksil grubunun elektron yoğunluğunu arttırarak onun reaktifliğini azaltır. Hidroksil grubuna göre para konumunda etil veya bütil grupların sübstitüsyonu, antioksidan aktiviteyi arttırır. Bununla beraber sterik engelleme nedeniyle para pozisyonlardaki uzun zincir veya dallanmış alkil gruplarının varlığı antioksidan etkiyi azaltabilir. Orto pozisyonlardaki dallanmış alkil gruplarının sübstitüsyonları kararlı rezonans yapılar oluşturarak fenolik antioksidanın etkisini arttırırlar ve antioksidan radikalinin reaksiyonlara katılma yeteneğini azaltırlar.

Sentetik birincil antioksidanlara örnek olarak bütillenmiş hidroksianisol, bütillenmiş hidroksitoluen, propil gallat ve *t*-bütil hidrokinon verilebilir. Tokoferoller ve karotenoitler doğal kaynaklı birincil antioksidanlardır (Şekil 2-1).



Şekil 2-1: Birincil antioksidanlar

2.4.1.2. İkincil Antioksidanlar

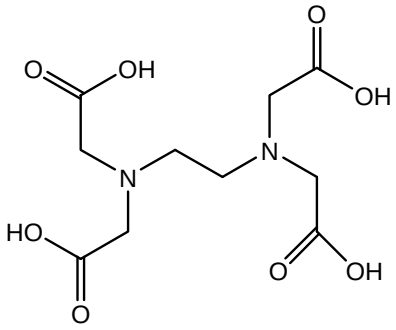
İkincil (tip–2 veya koruyucu antioksidanlar) antioksidanlar çok çeşitli reaksiyon mekanizmalarına sahiptirler. Bu antioksidanlar oksidasyon hızını yavaşlatırlar, fakat serbest radikalleri daha kararlı ürünlere dönüştürmezler. İkincil antioksidanlar prooksidan metallerle kelat yapabilirler ve onları deaktive edebilirler, hidroksiperoksitlerin radikal olmayan türlere parçalanmasını sağlayabilirler, singlet oksijeni deaktive edebilirler, ultraviyole radyasyonu absorbe edebilirler veya oksijen giderici olarak davranabilirler. Bu antioksidanlar, genellikle birincil antioksidanların aktivitesini arttırırlar. Sitrik asit, askorbik asit, askorbil palmitat, lesitin, tartarik asit, EDTA ve *β*-karoten ikincil antioksidanlara örnek olarak verilebilir (Şekil 2-2).

İkincil antioksidanlar en önemli etki mekanizmalarına göre başlıca üç gruba ayrılabilirler:

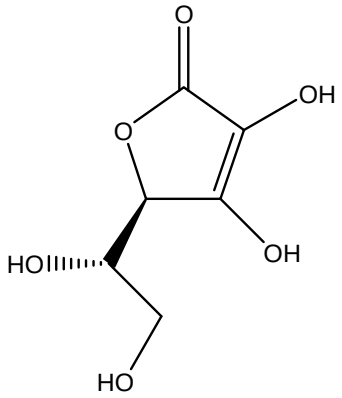
a) Kelat Yapıcılar: Sitrik asit, fosforik asit, etilendiamintetraasetik asit (EDTA), tartarik asit

b) Oksijen Gidericiler ve İndirgeme Ajanları: Askorbik asit, askorbil palmitat, eritorbik asit, sodyum eritorbat, sülfitler.

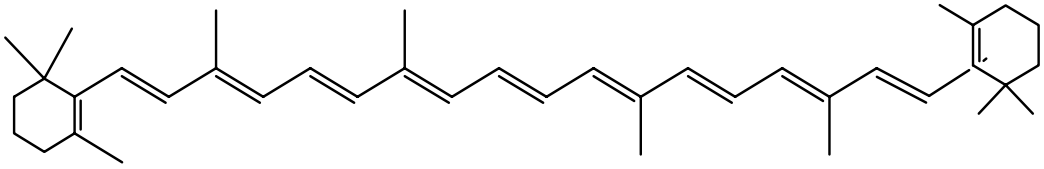
c) Singlet Oksijen Gidericiler: Karotenoitler (*β*-Karoten, likopen ve lutein)



Etilendiamintetraasetik asit



Askorbik asit



Vitamin A

Şekil 2-2: İkincil antioksidanlar

Antioksidanlar doğal ve sentetik antioksidanlar olarak da sınıflandırılabilirler. Günümüzde en çok kullanılan sentetik antioksidanlar, BHA (Bütillenmiş hidroksianisol) ve BHT (Bütillenmiş hidroksitoluen)'dır. Sentetik antioksidanların ve bunların yan ürünlerinin başta kanser olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olabileceklerinin belirlenmesi, bunların yerine kullanılabilecek doğal antioksidanların bulunmasına yönelik araştırmaların artmasına yol açmıştır (Cosio ve ark. 2006).

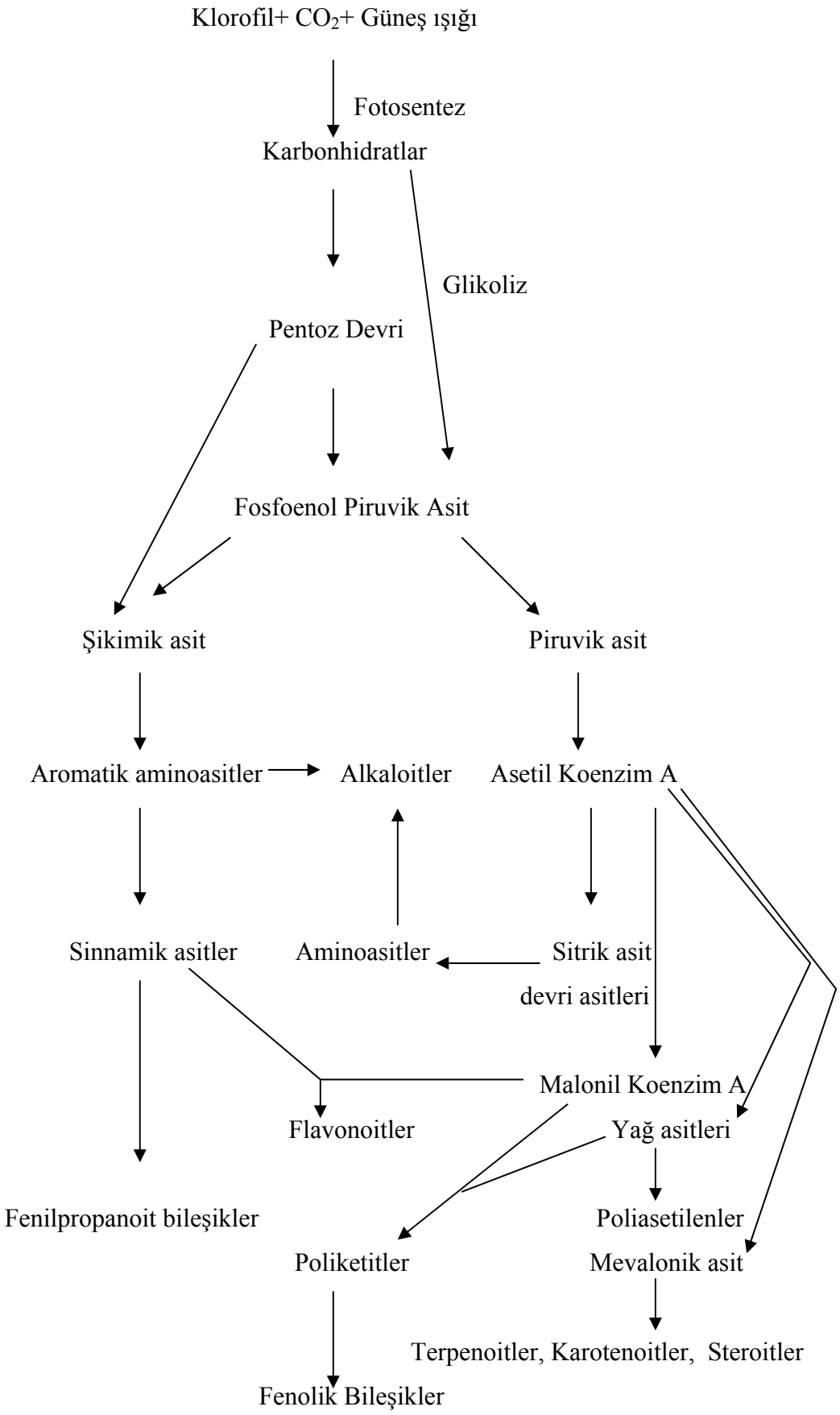
2.4.2. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

Antioksidan aktivitenin tayin edilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerden bazıları şunlardır:

- CUPRAC (Bakır (II) iyonu indirgeme antioksidan kapasitesi) yöntemi (Apak ve ark. 2004).
- FRAP (Demir (III) iyonu indirgeme antioksidan gücü) yöntemi (Benzie ve Strain 1996).
- Folin Ciocalteu yötemi (Singleton ve ark. 1999).
- TRAP (Toplam radikal tutma parametresi) yöntemi (Wayner ve ark. 1985).
- Luminol yöntemi (Whitehead ve ark.1992).
- DCFH-DA (Diklorofloresin-diasetat) yöntemi (Valkonen ve Kuusi 1997).
- Fikoeritrin (PE) esaslı yöntemler (Ghiselli ve ark. 1995).
- Krosin yöntemi (Tubaro ve ark.1998).
- DPPH serbest radikali giderim aktivitesi yöntemi (Blois 1958).
- ORAC (Oksijen radikal absorbans kapasitesi) yöntemi (Prior ve Cao 1999).
- TOSC (Toplam oksiradikal süpürme kapasitesi) yöntemi (Winston ve ark.1998).
- Siklik voltametri yöntemi (Kohen ve ark. 1999).
- β-Karoten renk açılım yöntemi (Miller 1971).
- Süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yöntemi (Liu ve ark. 1997).
- ABTS katyon radikali giderim aktivitesi yöntemi (Re ve ark. 1999).
- Metal bağlama yöntemi (Dinis ve ark. 1994).

2.5. Sekonder Metabolitler

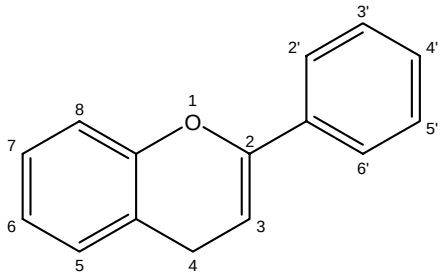
Yaşamsal faaliyetler için gerekli olan primer metabolitlerden (aminoasitler, basit karakterli lipitler ve yağlar, basit şekerler) enzimatik yollarla sekonder metabolitler oluşur. Sekonder metabolitlerin oluşumu Şekil 2-3'te verildi (Geissman ve Crout 1969 pp. 4)



Şekil 2-3: Sekonder metabolitlerin oluşumu

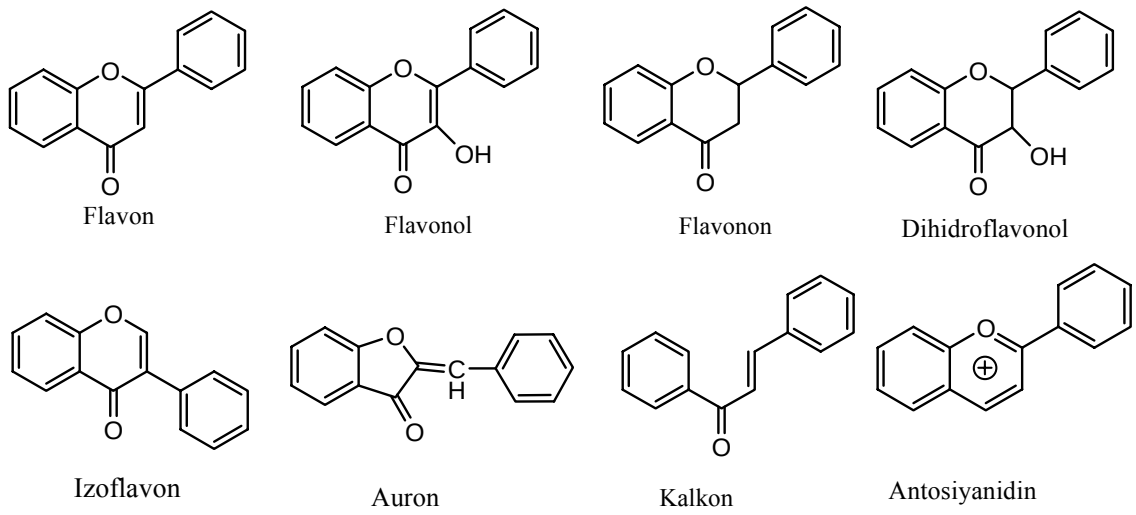
2.5.1. Flavonoitler

Flavonoitler 2-fenil benzopiran yapısındadır.



Şekil 2-4: 2-Fenil benzopiran

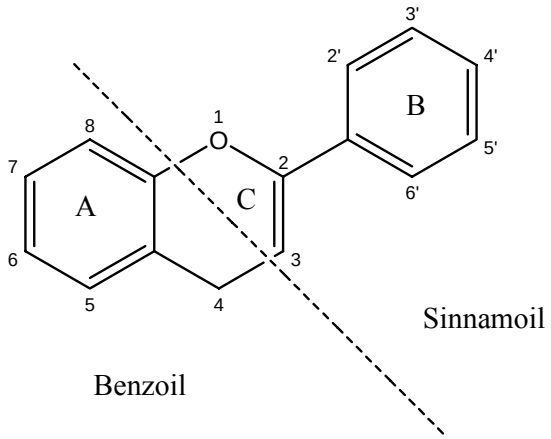
Flavonoitler bitkilerin fotosentezle oluşturdukları ve hayati gereksinimleri için kullandıkları karbonhidrat, amino asitler gibi birincil metabolitlerden türerler. Karbon iskeleti C6–C3–C6 şeklinde olan flavonoitlerin ana iskeletinde 15 karbon bulunur (Şekil 2-4) (Geissman ve Crout 1969 pp. 217). Flavonoit iskeletleri Şekil 2-5'te gösterildi.



Şekil 2-5: Flavonoit iskeletleri

Flavonoitlerin UV spektrumunda, biri uzun diğeri ona göre daha kısa dalga boyunda olmak üzere iki absorpsiyon bandı gözlenir. Uzun dalga boyundaki banta Bant I adı verilir ve bu bant flavonoit yapısının B halkasıyla (sinnamoil grubu) ilişkilidir. Daha kısa dalga boyundaki bant, Bant II olarak isimlendirilir ve flavonoit yapısının A

halkası (benzoil grubu) ile ilişkilidir (Mabry ve Markham 1975 pp. 46-47) (Şekil 2-6).



Şekil 2-6: Bant I ve Bant II'yi veren gruplar

Flavonoitlerin A ve B halkalarında hidroksil sayısı arttıkça bantlar uzun dalga boylarına kayarlar. Özellikle 3, 5 ve 4′ konumlarındaki hidroksil grupları metillendikleri ya da glikozitlendiklerinde Bant I ve Bant II hidroksil grubu serbest olan bileşiğe göre daha kısa dalga boyuna kayar (Mabry ve ark. 1970 pp. 41-44).

Flavonlarda, Bant I 304–350 nm arasında, flavonollerde ise 3-OH grubu serbest ise 352–385 nm arasında, eğer hidroksil grubu serbest değilse 328–357 nm arasında izlenir. B halkasında oksijen fonksiyonunun artması Bant I'in, A halkasında 6 ile 8 konumunun oksidasyonu Bant II'nin daha uzun dalga boyuna kaymasına neden olur. Örneğin; 6-OCH_3 olduğunda Bant II 270-275 nm aralığında görülürken, 6-OH olduğunda 280-285 nm aralığında gözlenir. Flavon ve flavonollerde B halkasında 3′ ve 4′ konumlarında oksijenasyon söz konusu ise Bant II genellikle ikiye bölünür (Mabry ve ark. 1970 pp. 41-61).

UV kayma belirteçleri (sodyum metoksit, alüminyum klorür, seyreltik HCl, sodyum asetat, borik asit) ile alınan spektrumlar flavonoitlerin yapı tayininde önemli bilgiler verir. Sodyum metoksit, flavon üzerindeki tüm hidroksil gruplarını iyonize eder.

Sodyum metoksit ile alınan spektrumdaki Bant I, MeOH'de alınan spektrumdaki Bant I'den daha uzun dalga boyuna (~50-60 nm) kayarsa ve şiddeti artarsa 4′ konumunda –OH grubunun bulunduğu anlaşılır.

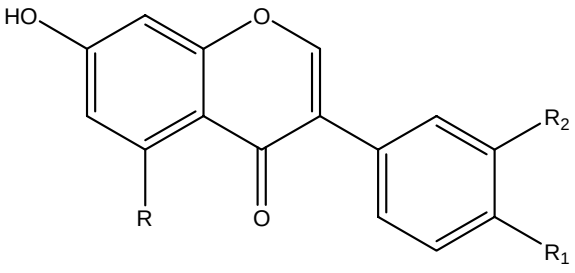
Alüminyum klorür, A halkasında 3 ve 5 konumundaki serbest hidroksil grupları ve B halkasındaki *o*-dihidroksi grupları ile ayrı ayrı kelat oluşturur. Seyreltik HCl ilavesiyle B halkasındaki *o*-dihidroksi grupları ile oluşan kelat bozunur. Ayrıca,

$AlCl_3$/HCl spektrumunda Bant I'in metanol spektrumundaki Bant I'e oranla 34-50 nm daha uzun dalga boyuna kayması 5-OH ve 6-H olduğunu, 25-30 nm kayması 5-OH, 6-OH olduğunu, 16-25 nm uzun dalga boyuna kayması 5–OH ve 6–OCH_3 olduğunu gösterir (Mabry ve ark. 1970 pp. 41-61).

Sodyum asetat, sodyum metoksitten daha zayıf bir baz olduğu için asidik karakterdeki 3, 7 ve 4′ hidroksillerini etkiler. Flavon ve flavonollerde 7 konumunda –OH grubu varsa Bant II 5–20 nm uzun dalga boyuna kayar. Ancak flavonlarda C–6 veya C-8'de oksijen fonksiyonu varsa bu durum görülmeyebilir. 4′ konumunda –OH ve 7 konumunda metoksi veya şeker varsa Bant I, sodyum metoksit ile alınan spektrumdaki Bant I ile aynı dalga boyunda çıkar. Borik asit ilavesinde, flavon ve flavonollerde B halkasında *o*–dihidroksi grupları varsa bunlar borik asit ile kelat oluştururlar ve Bant I 12–30 nm daha uzun dalga boyuna kayar (Mabry ve ark. 1970 pp. 41-61).

2.5.1.1. İzoflavonlar

İzoflavonlar, flavonlarla biyogenetik olarak ilişkilidirler fakat onlardan farklı olarak düzenlenmiş bir C_{15} iskeleti içerirler ve 3-fenilkromanın türevleri olarak kabul edilirler. B halkası flavonoit iskeletinin merkez halkasının 3 pozisyonuna bağlanmıştır. İzoflavonlar, doğal izoflavonoitler arasında en sık rastlanan sekonder metabolitlerdir (Geissman ve Crout 1969 pp. 212-213).160'ın üzerinde izoflavon aglikonu vardır. Şekil 2-7'de izoflavonlara örnekler verildi.



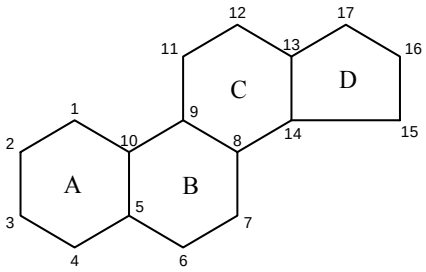
	R	**R_1**	**R_2**
Daidzein	H	OH	H
Formononetin	H	OCH_3	H
Genistein	OH	OH	H
Biochanin-A	OH	OCH_3	H

Şekil 2-7: İzoflavonlar

İzoflavonların yapı tayininde UV spektroskopisi önemlidir. İzoflavonların B halkasında konjugasyon az olduğundan Bant II daha şiddetli, Bant I ise omuz şeklinde veya daha düşük şiddette izlenir. Bant II 245-275 nm'de, Bant I 300-340 nm'de izlenir. IR, ^{1}H-NMR, kütle gibi spektral teknikler izoflavonların yapısını belirleyici olsa da ^{13}C-NMR bu alanda daha sık kullanılan bir tekniktir (Dewick 1982 pp. 535-537). İzoflavonların yapı tayininde UV ve NMR birbirini tamamlayan tekniklerdir. İzoflavonların ^{1}H-NMR spektrumunda C halkasındaki H-2 7,6-7,8 ppm'de *singlet* (CCl_4), 8,5-8,7 ppm'de *singlet* (DMSO) ve 7,8-8,1 ppm'de *singlet* ($CDCl_3$) olarak görülür.

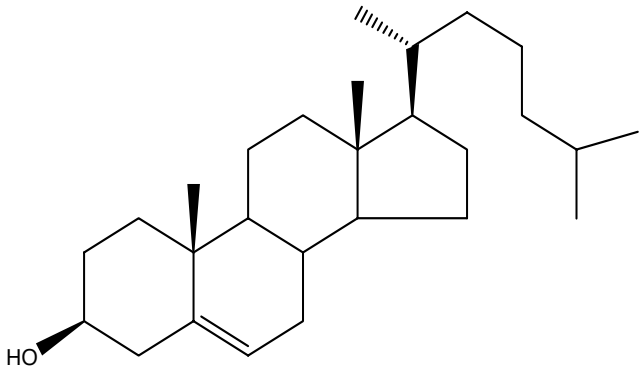
2.5.2. Steroitler

Bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunan bileşiklerdir. Mide ve safra asitleri, kalp glikozitleri, adrenal korteks hormonları ve cinsiyet hormonları steroit sınıfı bileşiklerdir. Steroitlerin karakteristik halka yapısı siklopentanoperhidrofenantren halka sistemidir (Şekil 2-8).



Şekil 2-8: Steroitlerin iskelet yapısı

Bitkisel steroitler genellikle, C-3'te OH, C-5'te çifte bağ, C-17'de yan zincir taşırlar. C-3'teki OH grubu, halkadaki metil gruplarıyla dik açı yaparsa A ve B halkaları *cis* şeklinde birleşmişlerdir. Bu konumdaki OH grubu *β* şeklindedir. OH grubu metil gruplarına paralel ise A ve B halkaları *trans* yapıda olup OH grubu *α* şeklindedir. Yan zincirin konfigürasyonu ise steroitlerde genellikle *β* şeklindedir. B ile C halkaları ve C ile D halkaları genellikle *trans* birleşirler (Cram ve Hammond 1964 pp. 671-673). Çok iyi bilinen bir steroit olan kolesterolun formülü Şekil 2-9'de verildi.



Şekil 2-9: Kolesterol

UV spektrumu steroitlerin yapı tayini için fazla bilgi vermez. Steroitlerin çifte bağları genel olarak izole durumdadır ve 200-210 nm aralığında kuvvetli bir uç absorpsiyon yaparlar. IR spektrumunda, hidroksil grupları 3000-3500 cm^{-1}'de, alifatik C-H bağları 2850-2900 cm^{-1}'de görülür. Parmak izi bölgesi karışık ve karakteristiktir. ^{1}H NMR spektrumunda, metil pikleri 0-1,5 ppm aralığında, metilen pikleri 1,5-2,5 ppm aralığında çıkar. Steroitlerde metilen pikleri çok karmaşık ve yaygındır. O nedenle metilen pikleri yerine metilen zarfı denilir. Hidroksil grubuna komşu hidrojenler 3,5-4,5 ppm'de, doymamışlık pikleri 5-6 ppm'de izlenir. Kütle spektrumunda $[M]^{+}$, $[M\text{-}CH_3]^{+}$, $[M\text{-}H_2O]^{+}$, ayrıca [M-yan zincir]$^{+}$ veya [M-D+yan zincir]$^{+}$ pikleri görülür.

2.5.3. Fenolik Bileşikler

Fenolik bileşikler bir veya daha fazla hidroksil grubu taşıyan aromatik bileşiklerdir. Bitkilerden 8000'in üzerinde fenolik bileşik elde edilmiştir (Geissman ve Crout 1969 pp. 137-166)

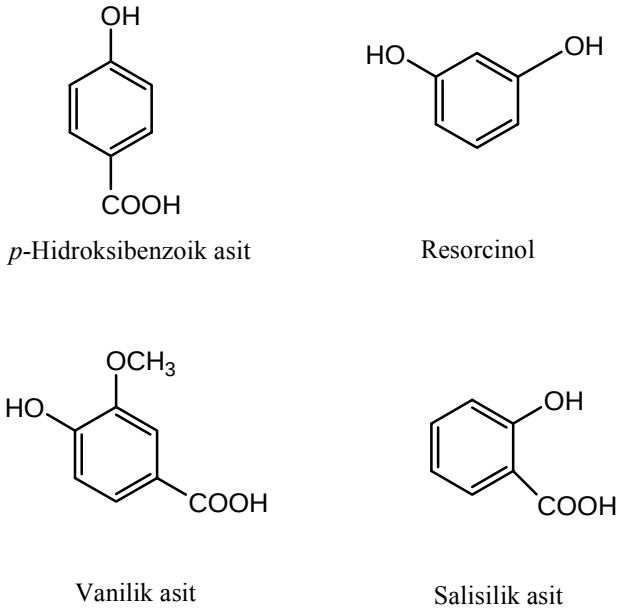
Fenolik bileşikler iskeletlerindeki karbon atomu sayılarına göre sınıflandırılırlar (Tablo 2-1).

Tablo 2-1: Bitkisel fenolik bileşiklerin sınıflandırılması

C atomu	İskelet	Sınıf	Örnek
6	C_6	Basit fenoller	Hidrokinon
		Benzokinonlar	2,6-Dimetoksibenzokinon
7	C_6-C_1	Fenolik asitler	Salisilik asit
8	C_6-C_2	Asetofenonlar	3-Asetil-6-OMe-benzaldehit
		Fenilasetik asitler	*p*-Hidroksifenilasetik asit
9	C_6-C_3	Hidroksisinnamik asitler	Kafeik asit
		Fenilpropenler	Eugenol
		Kumarinler	Umbelliferon
		İzokumarinler	Bergenin
		Kromonlar	Eugenin
12	C_6-C_4	Naftakinonlar	Juglon
13	C_6-C_1-C_6	Ksantonlar	Mangiferin
14	C_6-C_2-C_6	Stilbenler	Lunularik asit
		Antrokinonlar	Emodin
15	C_6-C_3-C_6	Flavonoitler	Kersetin
		İzoflavonoitler	Genistein
18	$(C_6$-$C_3)_2$	Lignanlar	Pinoresinol
30	$(C_6$-C_3-$C_6)_2$	Biflavonoitler	Amentoflavon
n	$(C_6$-$C_3)_n$	Ligninler	
	$(C_6)_n$	Kateşol melaninleri	
	$(C_6$-C_3-$C_6)_n$	Taninlerle kondense olmuş flavonlar	

2.5.3.1. Basit Fenoller ve Fenolik Asitler

Basit fenollerden hidrokinon, bitkilerde yaygın olarak bulunur. Diğer serbest fenollere ise daha az rastlanır. Fenolik asitler daha çok ester veya glikozitleri halinde bulunurlar (Şekil 2-10) (Geissman ve Crout 1969 pp. 137-166).



p-Hidroksibenzoik asit Resorcinol

Vanilik asit Salisilik asit

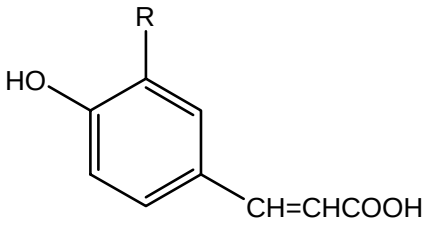
Şekil 2-10: Basit fenol ve fenolik asitler

2.5.3.2. Fenilpropanoitler

Fenilpropanoitler, aromatik halkaya bağlı üç karbonlu yan zincir taşırlar. Hidroksisinnamik asitler, hidroksikumarinler, fenilpropenler ve lignanlar fenilpropanoit bileşiklerdir (Şekil 2-11). Bunlardan en yaygın olarak bulunanı ligninlerin yapı taşını oluşturan hidroksisinnamik asitlerdir (Geissman ve Crout 1969 pp. 137-166).

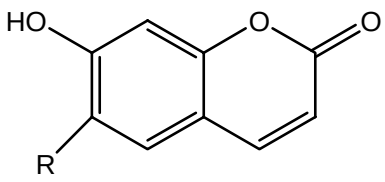
Kumarinler, bitkilerde yaygın olarak bulunurlar. Fenilpropenler, bitkilerin koku ve tatlarına katkıda bulunurlar. Bunlar yağda çözündükleri için diğer fenolik bileşiklerden ayrılırlar.

Hidroksisinnamik asitler



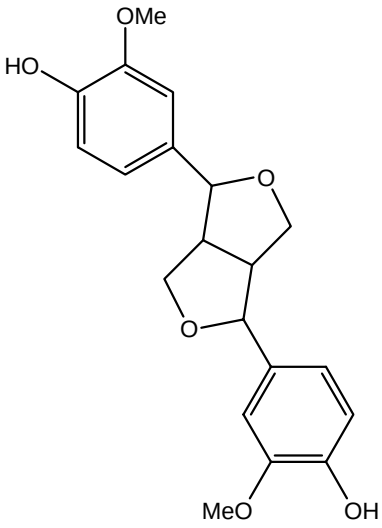
	R
p-Kumarik asit	H
Kafeik asit	OH

Kumarinler



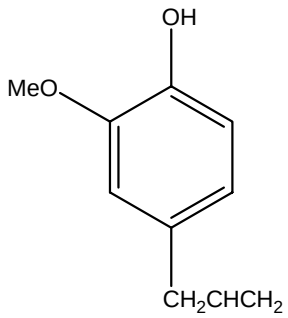
	R
Umbeliferon	H
Aesculetin	OH
Scopoletin	OMe

Lignanlar



Pinoresinol

Fenilpropenler

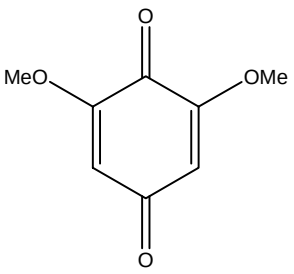


Eugenol

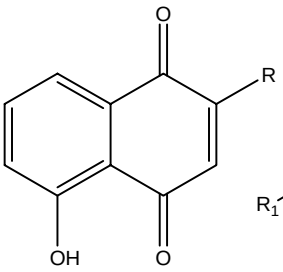
Şekil 2-11: Bazı fenilpropanoit bileşikler

2.5.3.3. Kinonlar

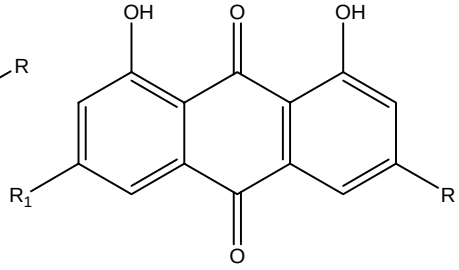
Kinoit yapıdaki doğal pigmentler soluk sarıdan kırmızı veya kahverengiden siyaha kadar değişen renklerdedir. Hidroksikinonların tuzları mor, mavi veya yeşil renklidir. Kinonlar yüksek bitkilerde renge az katkıda bulunurlar. Çünkü kinonlar diğer pigmentler tarafından renklerin kapatıldığı kabuk, kök veya yapraklarda bulunurlar. Doğal kinonlar canlılarda oksidasyon-redüksiyon prosesinde rol alırlar. Dörtyüz ellinin üzerinde kinoit yapıda bileşik bilinmektedir (Şekil 2-12). Kinonlar 4 gruba ayrılırlar: benzokinon, naftakinon, antrakinon ve izoprenoit kinon (Geissman ve Crout 1969 pp. 137-166).



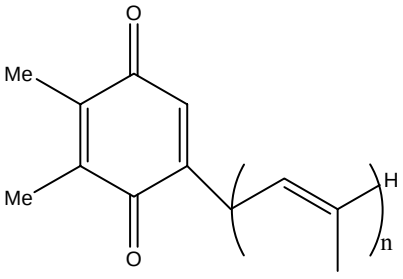
2,6-DiMetoksibenzokinon



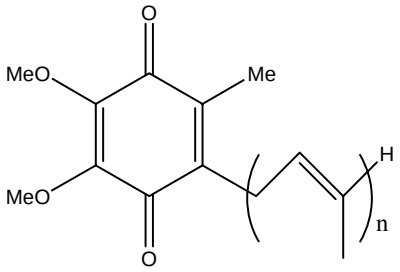
	R
Juglon	H
Plumbagin	Me



	R	R_1
Aloeemodin	CH_2OH	H
Physcion	Me	OMe



Plastakinon (n=3-9)



Ubikinon (n=1-12)

Şekil 2-12: Bazı kinoit bileşikler

2.5.4. Yağ Asitleri

Yağ asitleri uzun zincirli karboksilik asitlerdir. Doymuş ve doymamış yağ asitleri, gliserol (katı ve sıvı yağlar), uzun zincirli alkoller (vakslar), şeker türevleri (glikolipitler), ve bazı fosfor içeren moleküllerle (fosfolipitler) esterleşmiş olarak meydana gelirler. Doymamış yağ asitleri, hidroksi asitler, ketoasitler ve bu fonksiyonel gruplardan iki ya da daha fazlasını içeren asitler bitkilerde ve hayvanlarda yaygın olarak bulunurlar. Birçok doymamış yağ asidi bazı yapısal benzerliklere sahip olmalarına rağmen bunları sınıflandırmak oldukça zordur (Tablo 2-2, 2-3). (Geissman ve Crout 1969 pp. 66-67)

Tablo 2-2: Doğal olarak oluşan Δ^9-alkenoik asitler

İsim	Yapı
Gadoleik	$CH_3(CH_2)_9CH=CH(CH_2)_7COOH$
Oleik	$CH_3(CH_2)_7CH=CH(CH_2)_7COOH$
Palmitoleik	$CH_3(CH_2)_5CH=CH(CH_2)_7COOH$
Miristoleik	$CH_3(CH_2)_3CH=CH(CH_2)_7COOH$
Δ^9-undesenoik	$CH_3CH=CH(CH_2)_7COOH$
Δ^9-desenoik	$CH_2=CH(CH_2)_7COOH$

Tablo 2-3: Doğal olarak oluşan Δ^9 haricindeki diğer doymamış alkenoik asitler

Yaygın isim	Sistematik isim
Linderik	Δ^4-dodesenoik asit
Lauroleik	Δ^5-dodesenoik asit
Tsuzuik	Δ^4-tetradesenoik asit
Petroselinik	Δ^6-octadesenoik asit
Vaksenik	Δ^{11}-octadesenoik asit

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bitkisel Materyal

Iris suaveolens Boiss. & Reuter 18.04.2008 tarihinde Edirne'nin Lalapaşa ilçesinden toplandı ve Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Necmettin Güler tarafından teşhis edildi. Bitki örneği Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Herbaryumu'nda EDTU 9625 kodu ile saklanmaktadır.

3.2. Kimyasal Maddeler, Çözücüler ve Çözeltiler

3.2.1. Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Silikajel 60 (0,063-0,200 mm; 70-230 mesh ASTM, Merck KGaA 1.07734), ince tabaka plakları (Alufolien Kieselgel 60F_{254}, Merck KGaA 1.05554), *β*-karoten, linoleik asit, Tween–40 (polioksietilensorbitan monopalmitat), bakır (II) klorür dihidrat ($CuCl_2.2H_2O$), kersetin, pirokatekol, fenazin metasülfat, sodyum metoksit Sigma'dan, Folin Ciocalteu Fenol Reaktifi Applichem GmbH (Darmstadt, Almanya)'den, etil alkol, potasyum asetat, toluen, bütillenmiş hidroksitoluen, seryum (IV) sülfat tetrahidrat, alüminyum nitrat nonahidrat, sodyum dihidrojenfosfat dihidrat, sülfürik asit, alüminyum klorür, sodyum asetat, borik asit Merck'ten, *α*-tokoferol Aldrich'ten, etilendiamintetraasetik asit, nitrobluetetrazolyum, nikotinamidadenindinükleotit Fluka'dan, neokuproin, ferrozin Sigma-Aldrich'ten, demir (II) klorür, petrol eteri, metanol, aseton, amonyum asetat, sodyum karbonat, disodyum hidrojenfosfat dihidrat Riedel de Haen'den, kloroform, diklorometan, dietileter Carlo Erba'dan, HPLC metanol Roth'tan, prep. HPLC metanol Bayer AG (Leverkusen, Almanya)'den, heptan, hekzan Fisher Scientific'den temin edilmiştir. Kullanılan bütün kimyasal maddeler ve çözücüler analitik saflıktadır.

3.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

3.2.2.1. Toplam Fenolik Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- % 2'lik Sodyum karbonat çözeltisinin hazırlanması: 1 g Na_2CO_3 50 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile hacmine tamamlandı.

- Folin-Ciocalteu Fenol Reaktifi (Fosfotungistik-fosfomolibdik asit + $CuSO_4$): Satın alındığı şekilde kullanıldı.

3.2.2.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayininde Kullanılan Çözeltiler

- % 10'luk Alüminyum nitrat çözeltisinin hazırlanması: 1,76 g $Al(NO_3)_3.9H_2O$ 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.
- 1 M Potasyum asetat çözeltisinin hazırlanması: 0,98150 g CH_3COOK 10 mL'lik balon jojeye koyuldu ve bir miktar deiyonize su ile çözüldü. Çözünme tamamlandıktan sonra deiyonize su ile balonun hacmine tamamlandı.

3.2.2.3. *β*–Karoten Renk Açılım Yönteminde Kullanılan Çözelti

- *β*–Karoten çözeltisinin hazırlanması: 1,8 mg *β*–karoten tartıldı ve kloroformda çözüldü. 180 µL linoleik asit ve 1440 µL Tween-40 ilave edildi. Kloroform rotaevaparatörde uçurulduktan sonra, oksijen gazı ile doyurulmuş destile su ilave edildi ve kuvvetlice çalkalandı.

3.2.2.4. Metal Bağlama Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- Demir (II) klorür çözeltisinin hazırlanması: 7,68 mg $FeCl_2$ 20 mL suda çözülerek $FeCl_2$ çözeltisi hazırlandı.
- Ferrozin (3-(2- piridil)-5,6-bis-(4-fenilsülfonik asit)-1,2,4-triazin monosodyum tuzu) çözeltisinin hazırlanması: 49,2 mg ferrozin 20 mL suda çözülerek hazırlandı.

3.2.2.5. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- 100 mM Fosfat tamponunun hazırlanması: 0,1 M $Na_2HPO_4.2H_2O$ ve 0,1 M $NaH_2PO_4.2H_2O$ 4:1 oranında karıştırıldı ve pH: 7,4'e ayarlandı.
- 468 µM NADH çözeltisinin hazırlanması: 8,3 mg NADH tartılarak 25 mL fosfat tamponu (100 mM, pH=7,4) ile çözüldü.
- 60 µM PMS çözeltisinin hazırlanması: 1,84 mg PMS, 10 mL fosfat tamponunda (100 mM, pH=7,4) çözülerek 600 µM PMS hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltiden 1mL alınıp 10 mL'ye tamponla tamamlandı.
- 50 µM NBT çözeltisinin hazırlanması: 4,1 mg NBT tartılarak 100 mL fosfat tamponu (100 mM, pH=7,4) ile çözüldü.

3.2.2.6. CUPRAC Yönteminde Kullanılan Çözeltiler

- Bakır (II) klorür dihidrat çözeltisinin hazırlanması: 42,62 mg $CuCl_2.2H_2O$ tartılarak 25 mL suda çözüldü.
- Amonyum asetat tamponunun hazırlanması: 1,927 g NH_4OAc tartılarak 25 mL suda çözüldü, pH= 7'ye ayarlandı.
- Neokuproin çözeltisinin hazırlanması: 76,6 mg neokuproin tartılarak 50 mL % 96'lık alkolde çözüldü.

3.2.2.7. İnce Tabaka Kromatografisinde Kullanılan Belirteç

- Serik sülfat belirtecinin hazırlanması: 2,0 g seryum (IV) sülfat tetrahidrat 100 mL % 10'luk H_2SO_4'de çözülerek hazırlandı. Belirteç, uygun çözücü sisteminde yürütülen ince tabaka plaklarına pulvarizatör kullanılarak püskürtüldü.

3.2.2.8. UV Kayma Belirteçlerinin Hazırlanması

- Sodyum metoksit çözeltisinin hazırlanması: 2,5 g metalik sodyum 100 mL spektroskopik saflıktaki metanole eklendi ve hidrojen gazının tamamının çıkması beklendi.
- Alüminyum klorür çözeltisinin hazırlanması: 5,0 g nem içermeyen susuz $AlCl_3$ 100 mL spektroskopik saflıktaki metanole dikkatlice eklenerek çözüldü. Çözünme oda şartlarında yaklaşık 24 saatte tamamlandı.
- Hidroklorik asit çözeltisinin hazırlanması: 50 mL derişik HCl 100 mL deiyonize su ile karıştırılarak hazırlandı.
- Susuz sodyum asetat ve susuz borik asit toz halde kullanıldılar.

3.3. Cihazlar ve Gereçler

- ✓ Döner Buharlaştırıcı (Rota Evaporatör, Büchi R200 A, İsviçre)
- ✓ Ultraviyole Spektrofotometresi (Shimadzu UV–1601, Japonya)
- ✓ LC-MS Cihazı (LC Finnigan Mat, HP 1100)
- ✓ MPLC Cihazı (Basınç pompası: Büchi 681, UV-Vis: Knauer)
- ✓ Prep. HPLC Cihazı (Basınç pompası: Knauer K-1800, UV-Vis: Knauer)
- ✓ Analitik HPLC Cihazı (HP-1040 A, LC pompası: Kontron Analytic 410)
- ✓ Nükleer Manyetik Rezonans Cihazı (NMR), (Bruker DRX 500 MHz ve DRX 600 MHz, Varian Unity Inova 500 MHz)

- ✓ Hassas terazi (Scaltec SBA 31)
- ✓ Manyetik Karıştırıcı (Heidolph MR 3001, Almanya)
- ✓ Ultrasonik Banyo (Fisher Scientific)
- ✓ pH-metre (Thermo, Amerika Birleşik Devletleri)
- ✓ Ultra saf su cihazı (Younglin Instrument, aquaMAX-Ultra, Kore)
- ✓ Etüv (Binder)
- ✓ UV kabini (Camag)
- ✓ Otomatik pipetler (20–200 µL, 100–1000 µL, 1000–5000 µL) (Eppendorf, Almanya)
- ✓ Azot ve Oksijen Tüpleri

3.4. Ekstrelerin Hazırlanması

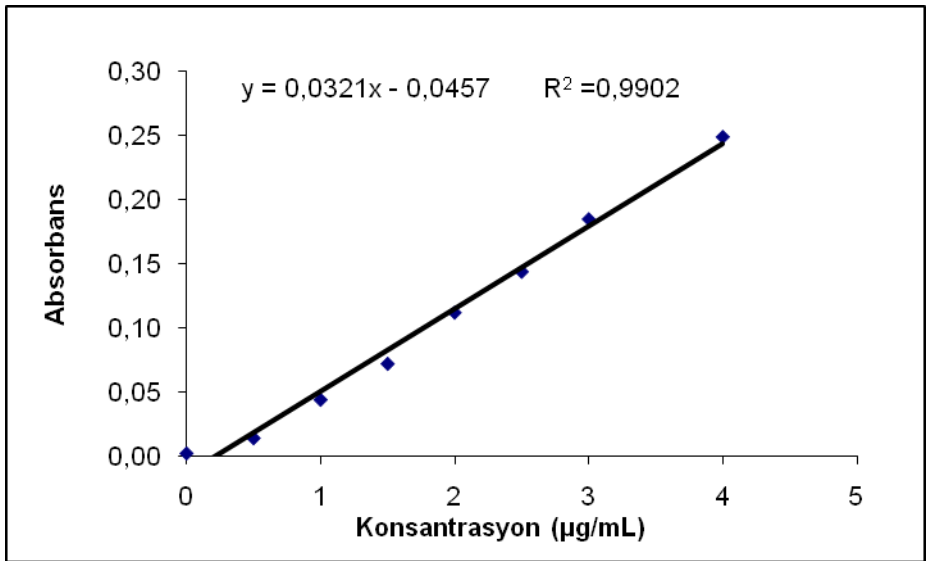
Iris suaveolens'in toprak üstü kısımları ve rizomları birbirinden ayırıldı. Taze rizomlar (1,1039 kg) musluk suyundan geçirilerek temizlendi ve küçük parçalara ayırılıp blenderdan geçirildi. İyice parçalanan rizomlar önce petrol eteri (3x24 s), sonra kloroform (5x24 s) ve en son olarak da metanol (6x24 s) ile oda sıcaklığında masere edildi. Petrol eteri ekstresi 2,69 g, kloroform ekstresi 14,09 g, metanol ekstresi 52,35 g olarak elde edildi.

3.5. Ekstrelerin Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktarlarının Belirlenmesi

3.5.1. Toplam Fenolik Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri Folin-Ciocalteu reaktifi kullanılarak pirokatekole eşdeğer olarak belirlendi (Slinkard ve Singleton 1977). Üç miligram olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlandı. 1000 ppm olarak hazırlanan pirokatekol çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri etanolle 200 µL'ye tamamlandı. Hazırlanan bu karışımlara su, FCR reaktifi ve 3 dk sonra %2'lik Na_2CO_3 çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 2 saat süresince oda sıcaklığında çalkalandı ve örneklerin absorbansları 760 nm'de okundu. Ekstrelerin toplam fenolik içerikleri standart pirokatekol grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı (Şekil 3-1).

Absorbans= 0,0321 pirokatekol (µg)- 0,0457 (R^2=0,9902)

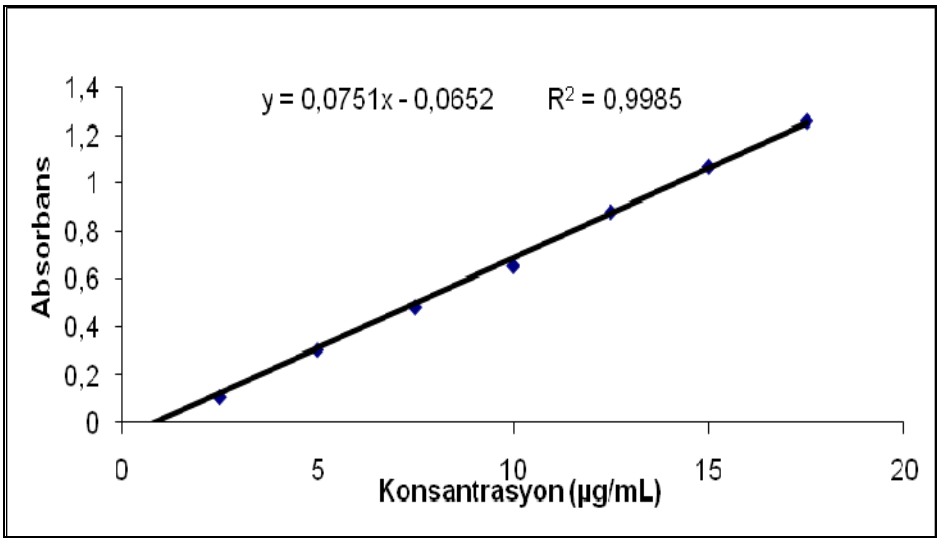


Şekil 3-1: Pirokatekol ölçü eğrisi

3.5.2. Toplam Flavonoit Miktar Tayini

Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları kersetine eşdeğer olarak alüminyum nitrat yöntemi ile belirlendi (Moreno ve ark. 2000). Üç miligram olarak tartılan maddelerin etanolde 1000 ppm'lik çözeltileri hazırlandı. Her bir örnekten 100 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Kersetinin 1000 ppm'lik çözeltisinden 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 µL alınarak hacimleri % 80'lik etanol ile 4,8 mL'ye tamamlandı. Bu karışımlara 100 µL 1M potasyum asetat eklendikten hemen sonra 100 µL %10'luk alüminyum nitrat çözeltisinden ilave edildi. Karışımlar 40 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 415 nm'de absorbansları okundu. Ekstrelerin toplam flavonoit miktarları standart kersetin grafiğinden elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılarak belirlendi. Her bir örnekten üç paralel ölçüm yapıldı (Şekil 3-2).

Absorbans = 0,0751 kersetin (µg) – 0,0652 (R^2= 0,9985)



Şekil 3-2: Kersetin ölçü eğrisi

3.6. Antioksidan Aktivite Tayin Yöntemleri

3.6.1. *β*-Karoten Renk Açılım Yöntemi

Toplam antioksidan aktivite, linoleik asit oksidasyonundan ileri gelen konjuge dien hidroperoksitlerinin inhibisyonunun ölçülmesine dayanan *β*-karoten-linoleik asit yöntemiyle belirlendi (Miller 1971). Bu yöntem, *β*-karotenin renginin açılmasına dayanan bir yöntemdir. *α*- Toc, BHT, kersetin ve örnek çözeltilerinin üzerine, son konsantrasyon 20, 40, 80 µg/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 metanol kullanıldı. Tüpler 50°C'de inkübasyona bırakıldı ve kontrol olarak kullanılan tüpteki *β*-karotenin rengi kaybolunca kadar (yaklaşık 120 dk) inkübasyona devam edildi. Absorbans yine 490 nm'de ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi.

3.6.2. Metal Bağlama Yöntemi

Metal bağlama aktivitesi Fe (II)-Ferrozin yöntemine göre belirlendi (Dinis ve ark. 1994). Hazırlanan örnek çözeltilerinin ve standartların üzerine, son konsantrasyon 25, 50, 100 µg/mL olacak şekilde, demir (II) klorür ve ferrozin reaktifleri eklendi. 10 dk inkübasyondan sonra 562 nm'de örneklerin absorbansları okundu. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi.

3.6.3. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Yöntemi

Örneklerin süperoksit anyon radikali giderim aktiviteleri NADH-PMS-NBT sistemine göre belirlendi (Liu ve ark. 1997). Bu yöntemde örnek içeren çözeltilerin üzerine fosfat tamponu, NADH ve NBT çözeltilerinden koyuldu. Reaksiyon PMS'nin ilavesi ile başlatıldı. Metanol kontrol olarak kullanıldı. 5 dk sonra karışımın 560 nm'de absorbansı ölçüldü. Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi.

3.6.4. CUPRAC Yöntemi

CUPRAC yönteminde, örneklerdeki antioksidan bileşikler varlığında Cu(II)-Neokuproin (Nc) kompleksi, renkli Cu(I)-Nc kelatına indirgenir ve bu kelatın 450 nm'de absorbansı ölçülür. Hazırlanan örnekler ve standartların üzerine, son konsantrasyonları 25, 50, 100 µg/mL olacak şekilde Cu (II), neokuproin ve NH_4OAc tamponu ilave edildi ve 1 saat sonra 450 nm'de absorbans ölçüldü (Apak ve ark. 2004). Örneklerin absorbans değerleri kontrole karşı değerlendirildi.

3.6.5. İstatistik Hesaplamalar

Antioksidan aktivite sonuçlarında elde edilen veriler 3 paralel testin ortalama ± standart sapması olarak verildi. Sonuçlar Student-*t* testine göre % 95 güven sınırları içinde bulundu. Konsantrasyon ile absorbanslar arasında ölçü eğrileri çizildi ve ilgili regresyon denklemleri bulundu. Ekstrelerin toplam fenolik ve flavonoit miktarları, ilgili regresyon denklemleri yardımıyla hesaplandı.

3.7. Kromatografik Yöntemler

3.7.1. Sütun Kromatografisi

Ekstreleri fraksiyonlandırmak ve bu fraksiyonlardan saf madde elde etmek amacıyla sütun kromatografisi yöntemi kullanıldı. Sütun dolgu maddesi olarak silikajel kullanıldı. Ekstreler az miktarda uygun çözücüde çözülerek silikajel (Merck 1.07734) ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan karışım dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş, ekstre miktarına uygun olarak seçilmiş ve silika jel ile doldurulmuş sütunun üst kısmına yerleştirildi.

3.7.2. İnce Tabaka Kromatografisi

İnce tabaka kromatografisinde (İTK), silika jel hazır plaklardan (20 x 20 cm) yararlanıldı (Merck 1.05554). Ekstrelerin sütun kromatografisi ile ayrılmasıyla elde

edilen fraksiyonların karşılaştırılmasında İTK plakları kullanıldı. Maddeleri saflaştırmak için preperatif ince tabaka kromatografisinden yararlanıldı.

3.7.3. Analitik HPLC Çalışma Şartları

*I. suaveolens'*in rizomlarının yüksek antioksidan aktivite gösteren kloroform ekstresi önce silikajel sütundan geçirilerek fraksiyonlandırıldı. Bu fraksiyonlardan saf madde elde etmek ve bu maddelerin saflık kontrollerini yapmak için analitik HPLC kullanıldı. Analitik HPLC çalışma şartları aşağıda verildi.

Analitik HPLC Çalışma Şartları

Kolon: Ters faz kolon, VP 250/10 NUCLEODUR C-18 Pyramid, 5 µM

Dedektör: UV dedektör

Çözücü: Su: Metanol (20:80)

Kolon akış hızı: 2.00 mL/dk

Enjeksiyon miktarı: 50 µL

3.7.4. Preparatif HPLC Çalışma Şartları

Kloroform ekstresinden elde edilen ve miktarları 500 mg'a kadar olan fraksiyonları saflaştırmak için preparatif HPLC kullanıldı. Preperatif HPLC şartları aşağıda verildi.

Preparatif HPLC Çalışma Şartları

Kolon: Ters faz kolon, VP 250/10 NUCLEODUR C-18 Pyramid, 5 µM

Dedektör: UV dedektör

Çözücü: Su: Metanol (20:80)

Kolon basıncı: 185 [0,1 MPa]

Kolon akış hızı: 4.00 mL/dk

Enjeksiyon miktarı: 200 µL

3.7.5. MPLC Çalışma Şartları

*I. suaveolens'*in kloroform ekstresinin miktarları 1,0 g'dan fazla olan fraksiyonlarının saflaştırılmasında kullanıldı. MPLC'nin çalışma şartları aşağıda verildi.

MPLC Çalışma Şartları

Kolon: Ters faz kolon, C-18, Tanecik boyutu: 10-40 mm, kolon uzunluğu 25 cm,

Çap: 3 cm

Dedektör: UV dedektör

Çözücü: Su: Metanol (80:20'den başlanarak kolona eklendi)

Kolon basıncı: 30 bar

Kolon akış hızı: 8.00 mL/dk

3.7.6. LC-MS Çalışma Şartları

Kloroform ekstresinden maddelerin saflaştırılmasında ve bunların molekül ağırlıklarının belirlenmesinde kullanıldı. LC-MS'in çalışma şartları aşağıda verildi.

LC-MS Çalışma Şartları

Kolon: Ters faz kolon, RP-18, Lichrospher 100, 5µm

Çözücü: Su:Metanol (80:20)

Basınç: 172 bar

Sıcaklık: 20^0C

Enjeksiyon: 10 µL

Dedektör: UV dedektör

Kolon akış hızı: 1 mL/dk

3.8. Spektroskopik Yöntemler

3.8.1. UV Spektroskopisi

Saf maddeler metanolde çözülerek köre karşı UV spektrumları alındı.

3.8.2. NMR Spektroskopisi

Kromatografik yöntemlerle saflaştırılan bileşiklerin ^{1}H-NMR, DEPT, APT, HMBC, HMQC spektrumları alındı. Referans olarak tetrametilsilan (TMS) ve çözücü olarak döterokloroform ($CDCl_3$), döterometanol (CD_3OD) ve döteroaseton (CD_3COCD_3) kullanıldı.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, *I. suaveolens*'in rizomlarından hazırlanan petrol eteri (ISUP), kloroform (ISUC) ve metanol (ISUM) ekstrelerinin antioksidan aktivite tayinleri *β*-karoten renk açılım, metal bağlama, süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi ve CUPRAC yöntemleriyle yapıldı. Ayrıca tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları da sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi.

I. suaveolens'in rizomlarının petrol eteri, kloroform ve metanol ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri ve kimyasal içeriklerinin incelenmesi ilk kez bu tez çalışması ile yapıldı.

4.1. Toplam Fenolik ve Toplam Flavonoit Miktar Tayinleri Sonuçları

Tüm ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları sırasıyla pirokatekol ve kersetine eşdeğer olarak belirlendi. Kloroform ekstresinin fenolik miktarının ve metanol ekstresinin flavonoit miktarının diğer ekstrelerden daha fazla olduğu belirlendi (Tablo 4-1).

Tablo 4-1: Ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları [a]

	Flavonoit Miktar (µgQEs/mg ekstre)[b]	**Fenolik Miktar (µgPEs/mg ekstre)[c]**
ISUP	57,11±0,45	139,0447 ±0,50
ISUC	246,82 ±0,56	**437,6947 ±0,82**
ISUM	**528,15 ±0,68**	266,4071 ±1,00

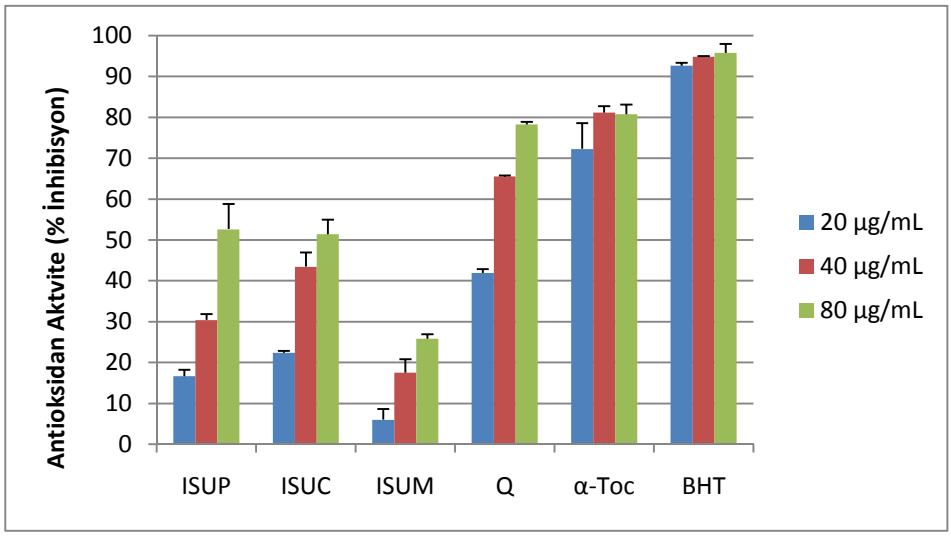
a: Değerler 3 paralel ölçümün ortalaması ve standart sapması olarak verilmiştir.
b: Kersetine eşdeğer flavonoit içerik. (y=0,0751x-0,0652 R^2=0,9985)
c: Pirokatekole eşdeğer fenolik içerik. (y=0,0321x-0,0457 R^2=0,9902)

4.2. Ekstrelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

4.2.1. *β*-Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonucu

I. suaveolens'in rizomlarından hazırlanan petrol eteri, kloroform ve metanol ekstrelerinin *β*-karoten renk açılım yöntemine göre antioksidan aktiviteleri üç farklı konsantrasyonda (20, 40, 80 µg/mL) yapıldı. *β*-karoten renk açılım yönteminde 20 ve 40 µg/mL konsantrasyonlarda kloroform ekstresinin diğer ekstrelerden daha yüksek

aktivite gösterdiği, 80 µg/mL'de ise petrol eteri ve kloroform ekstrelerinin hemen hemen aynı etkiye sahip oldukları belirlendi. Her üç ekstrenin standart olarak kullanılan kersetin, *α*-tokoferol ve BHT'den daha düşük etki gösterdiği tespit edildi (Şekil 4-1).



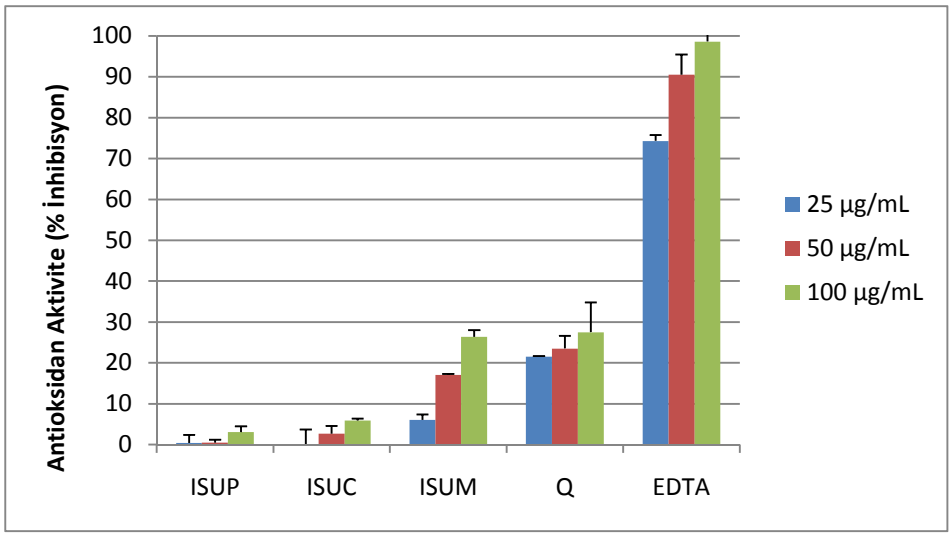
Şekil 4-1: *I. suaveolens*'in rizomlarından hazırlanan ekstrelerin *β*-karoten renk açılım yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

4.2.2. Metal Bağlama Yöntemi Sonucu

Bu yöntemde, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan ekstrelerin antioksidan aktiviteleri kersetin ve EDTA ile karşılaştırıldı. 100 µg/mL konsantrasyonda kersetin kadar etkili olan metanol ekstresinin her üç konsantrasyonda EDTA'dan daha az etkili olduğu tespit edildi. Petrol eteri ve kloroform ekstrelerinin ise hiç aktivite göstermedikleri belirlendi (Şekil 4-2).

4.2.3. Süperoksit Anyon Radikali Giderim Aktivitesi Sonucu

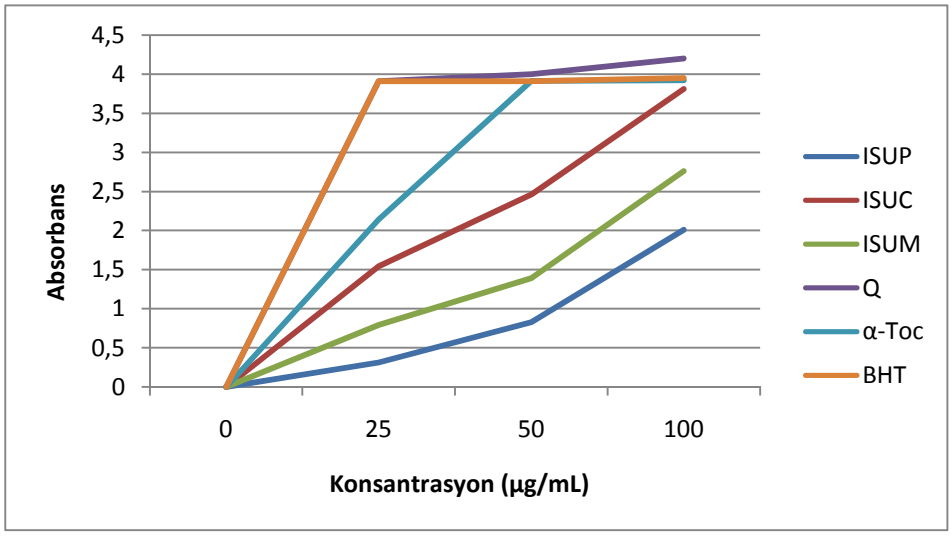
I. suaveolens'in rizomlarından hazırlanan petrol eteri, kloroform ve metanol ekstrelerinin süperoksit anyon radikali giderim aktiviteleri üç farklı konsantrasyonda (25, 50, 100 µg/mL) belirlendi. Standart olarak gallik asit kullanıldı. Bu yöntemde hiçbir ekstre aktivite göstermedi.



Şekil 4-2: *I. suaveolens*'in rizomlarından hazırlanan ekstrelerin metal bağlama yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

4.2.4. CUPRAC Yöntemi Sonucu

I. suaveolens'in rizomlarından hazırlanan petrol eteri, kloroform ve metanol ekstrelerinin CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri üç farklı konsantrasyonda (25, 50, 100 µg/mL) belirlendi. Standart olarak kersetin, α-tokoferol ve BHT kullanıldı. Bu yöntemde, diğer ekstrelerden daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilen kloroform ekstresinin 100 µg/mL konsantrasyonda *α*-tokoferol ve BHT kadar etki gösterdiği belirlendi (Şekil 4-3).



Şekil 4-3: *I. suaveolens*'in rizomlarından hazırlanan ekstrelerin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

4.3. *I. suaveolens*'in Petrol Eteri ve Kloroform Ekstrelerinin Kimyasal İçerikleri

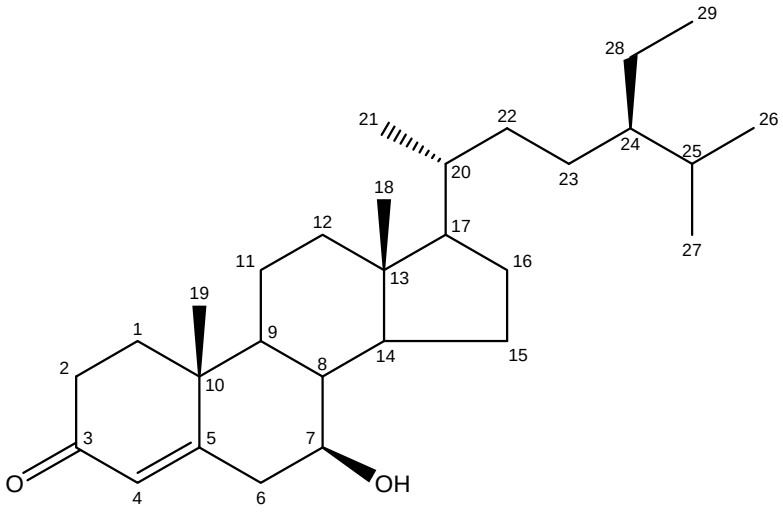
I. suaveolens'in rizomlarından hazırlanan petrol eteri ekstresinin *β*-karoten renk açılım yönteminde, kloroform ekstresinin *β*-karoten renk açılım ve CUPRAC yöntemlerinde en yüksek aktiviteyi gösterdikleri, süperoksit anyon radikali giderim aktivitesi yönteminde ise ekstrelerin etki göstermedikleri belirlendi. Toplam fenolik miktar bakımından kloroform ekstresinin en zengin ekstre olduğu tespit edildi. Bu sonuçlar doğrultusunda, *I. suaveolens* rizomlarının petrol eteri ve kloroform ekstrelerinden saf madde elde edilmesi yoluna gidildi.

4.3.1. *I. suaveolens*'in Petrol Eteri Ekstresinin (ISUP) Fraksiyonlandırılması

ISUP silika jel içeren sütunda fraksiyonlandırıldı. Elüsyona % 100 petrol eteri ile başlandı ve % 25 çözücü polaritesi arttırılarak sırasıyla kloroform, aseton ve metanol ile devam edildi. % 100 metanole ulaşılınca elüsyon tamamlandı. İTK ile benzer fraksiyonlar birleştirildi. Toplam 8 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlara sütun ve preparatif ince tabaka kromatografisi yöntemleri uygulanarak toplam 5 saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapı tayinleri spektroskopik yöntemler kullanılarak yapıldı.

4.3.2. ISUP'tan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri

4.3.2.1. ISUP 1= 7*β*-Hidroksistigmast-4-en-3-on



Şekil 4-4: 7*β*-Hidroksistigmast-4-en-3-on

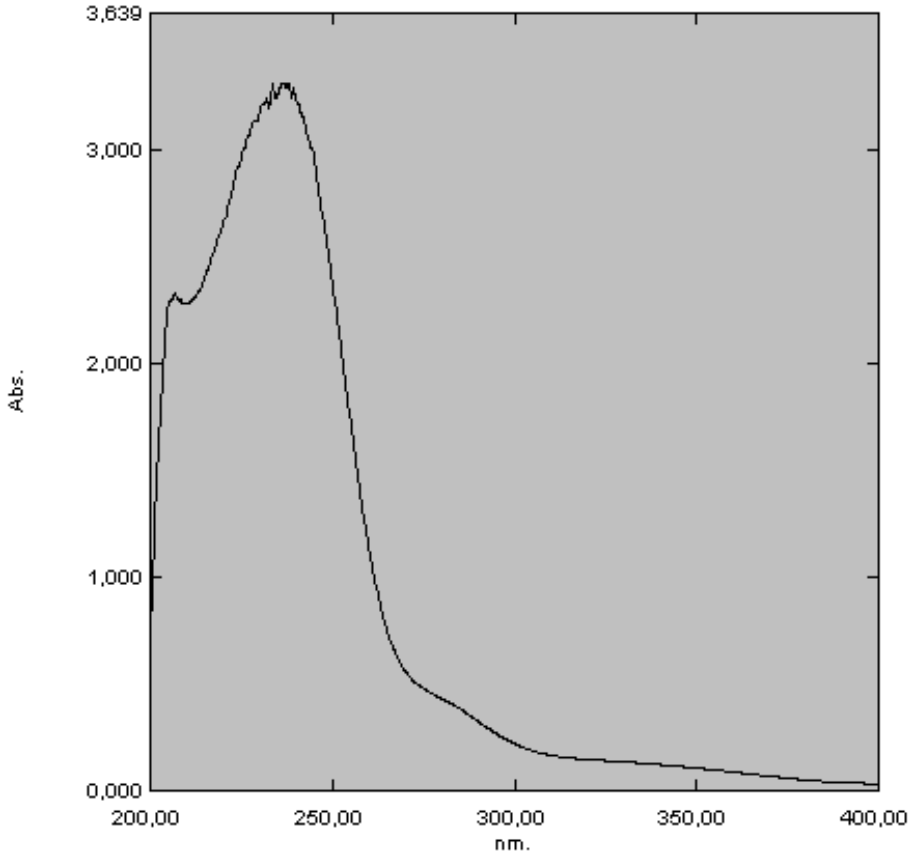
Beyaz renkli olan ISUP 1 bileşiği katı halde elde edildi (1,5 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında açık kahverengimsi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 228 ve 246 nm'de absorpsiyon bantları izlendi (Şekil 4-5).

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, 500 MHz) (Şekil 4-6) izlenen metil pikleri bileşiğin bir steroit olabileceğini düşündürdü; δ 0.68 (3H, *s*, Me-18), 1.31 (3H, *s*, Me-19), 0.95 (3H, *d, J*=6.35 Hz, Me-21), 0.83 (3H, *d*, *J*=6.1 Hz, Me-26), 0.75 (3H, *d*, *J*=6.1 Hz, Me-27), 0.86 (3H, *t*, *J*=6.83 Hz, Me-29). δ 5.75'de vinilik proton (H-4), δ 3.58'de H-7*α* ve δ 4.28'de hidroksil grubu izlendi. ^{13}C NMR (APT) değerleri Tablo 4-2'de verildi (Şekil 4-7).

UV, ^{1}H NMR, APT ve HMQC (Şekil 4-8) spektrumları değerlendirildiğinde ISUP 1'in bir steroit olduğu belirlendi.

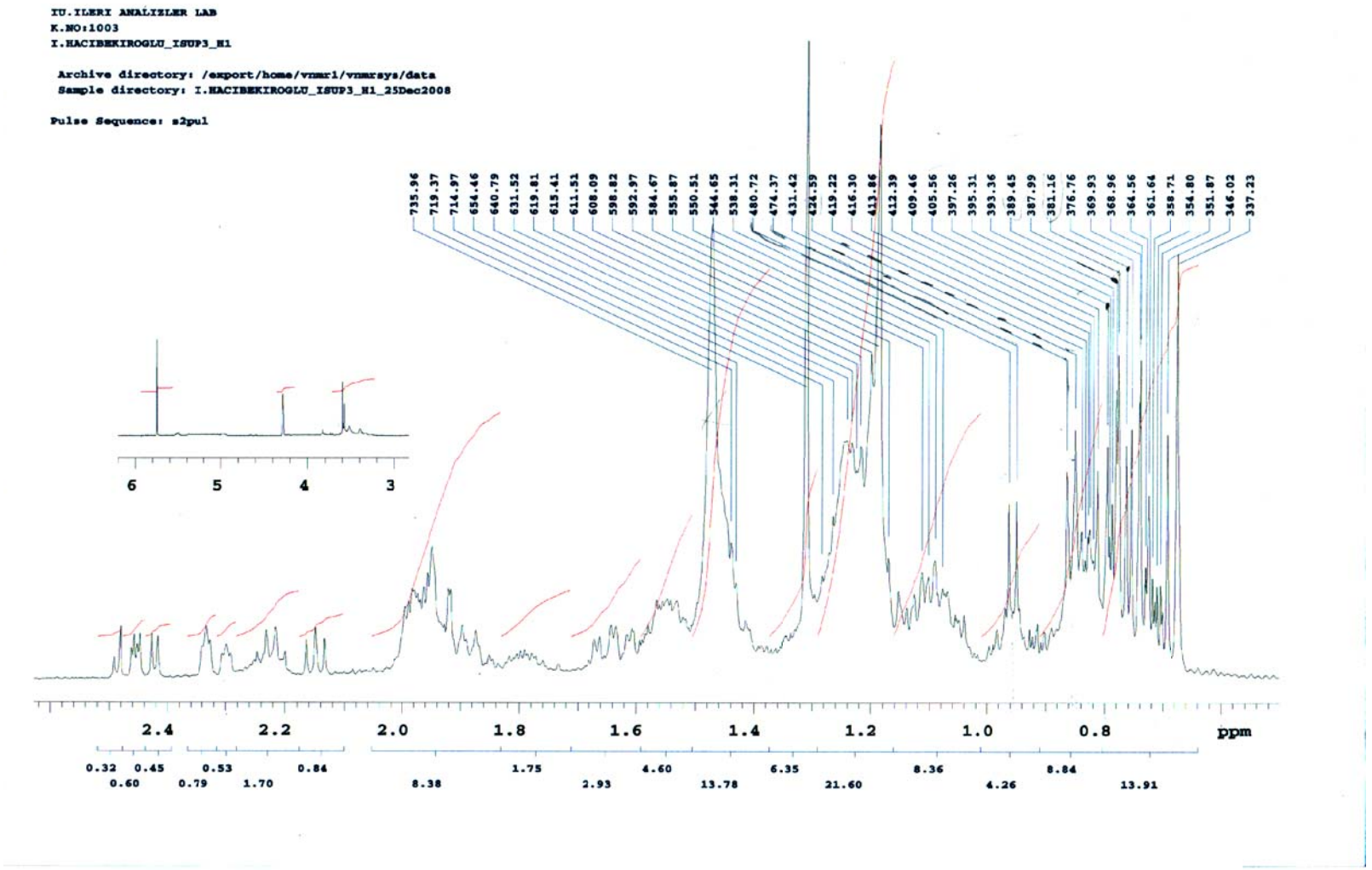
ISUP 1'in spektral değerleri literatürde verilen değerlerle karşılaştırıldığında bileşiğin yapısı 7*β*-hidroksistigmast-4-en-3-on olarak belirlendi (Carcache-Blanco ve ark. 2006) (Şekil 4-4). ISUP 1, *Iris* türlerinden ilk kez elde edildi.



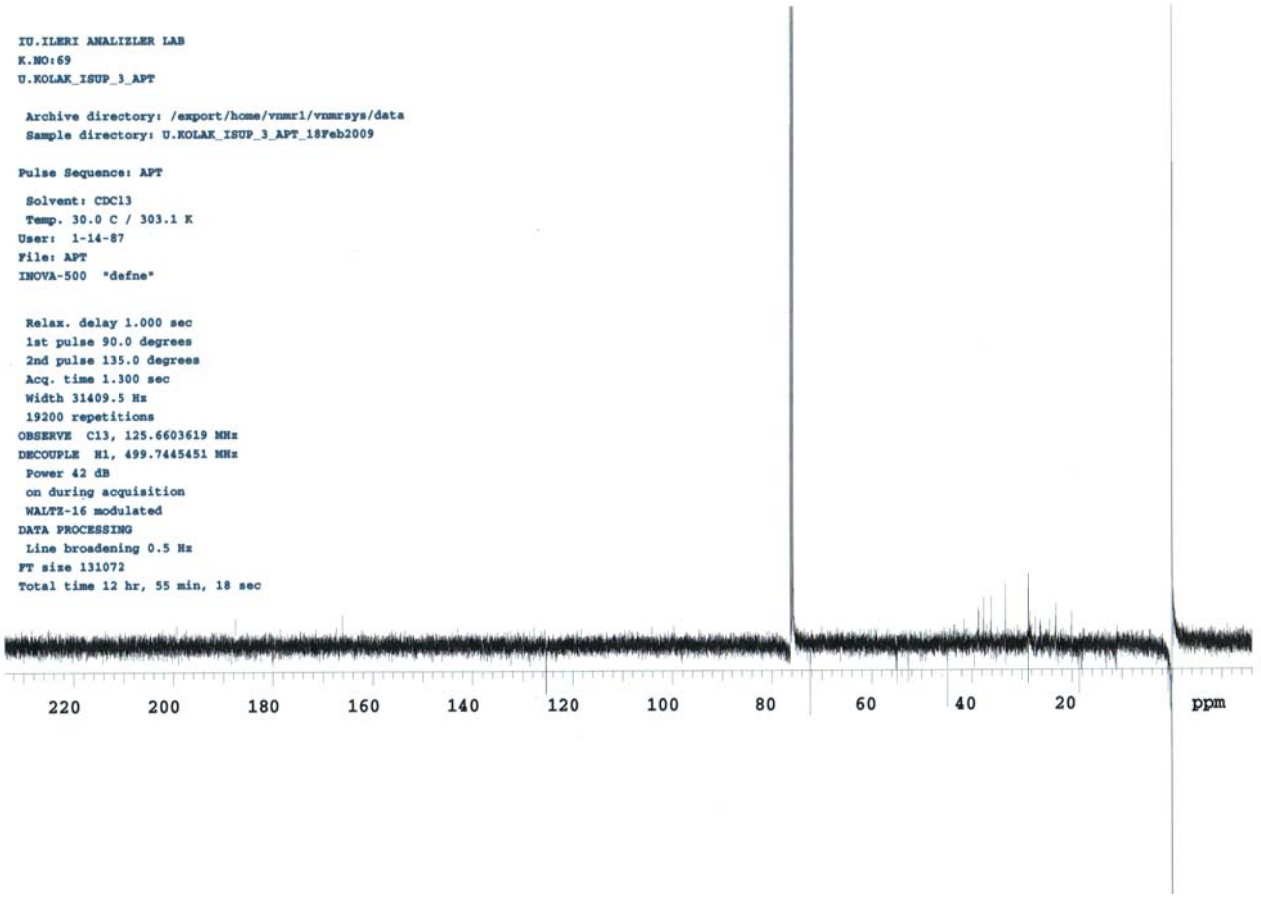
Şekil 4-5: ISUP 1 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)

Tablo 4-2: ISUP 1 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$, 125 MHz)

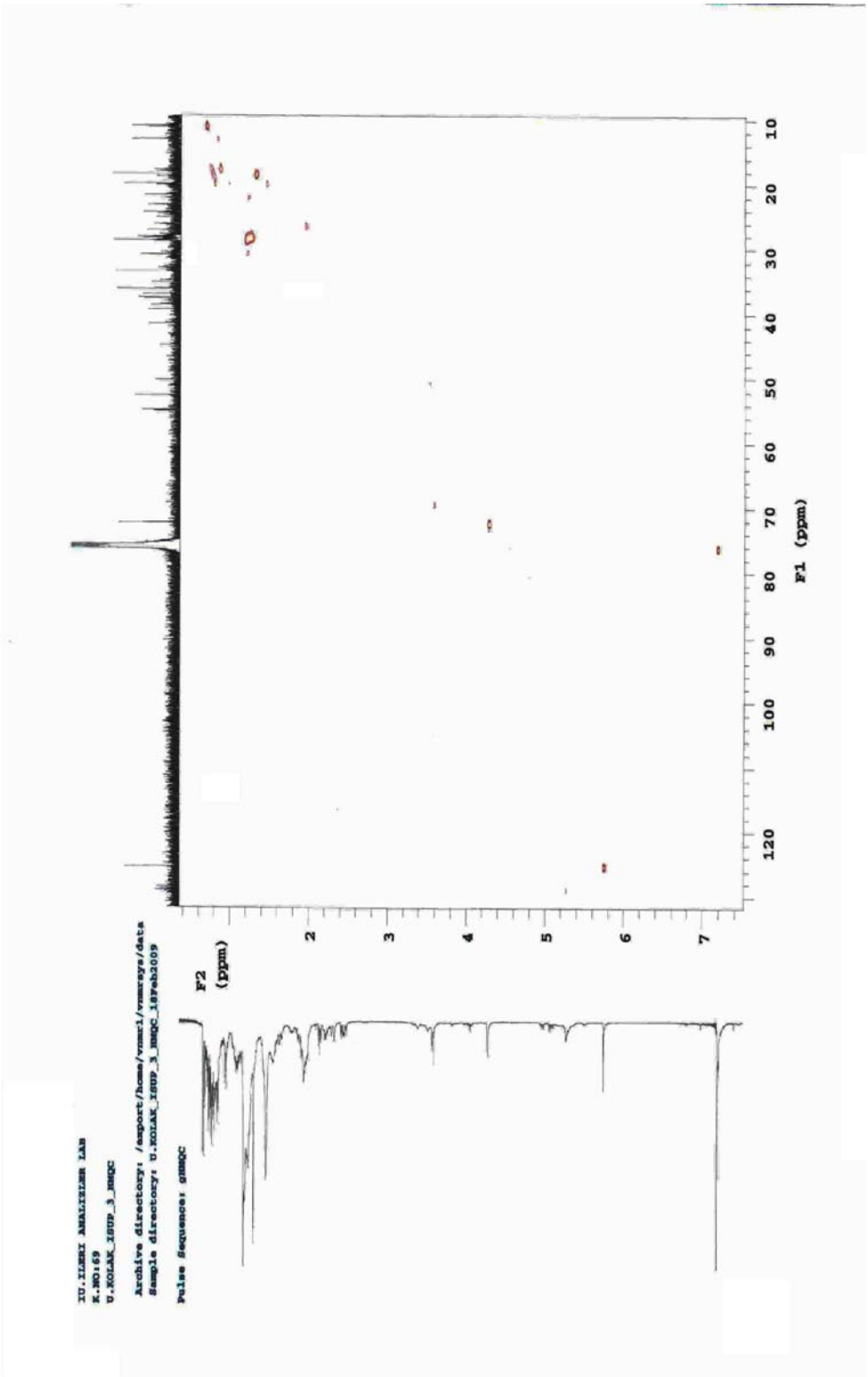
Pozisyon	^{13}C NMR
1	38.63 *t*
2	33.27 *t*
3	199.23 *s*
4	125.37 *d*
5	168.27 *s*
6	37.60 *t*
7	72.34 *d*
8	33.10 *d*
9	52.65 *d*
10	36.13 *s*
11	20.00 *t*
12	41.53 *t*
13	44.34 *s*
14	54.91 *d*
15	24.38 *t*
16	27.18 *t*
17	55.03 *d*
18	11.02 *q*
19	18.80 *q*
20	39.43 *d*
21	18.04 *q*
22	36.13 *t*
23	26.23 *t*
24	45.00 *d*
25	28.75 *d*
26	20.10 *q*
27	18.51 *q*
28	23.16 *t*
29	13.08 *q*



Şekil 4-6: ISUP 1 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)

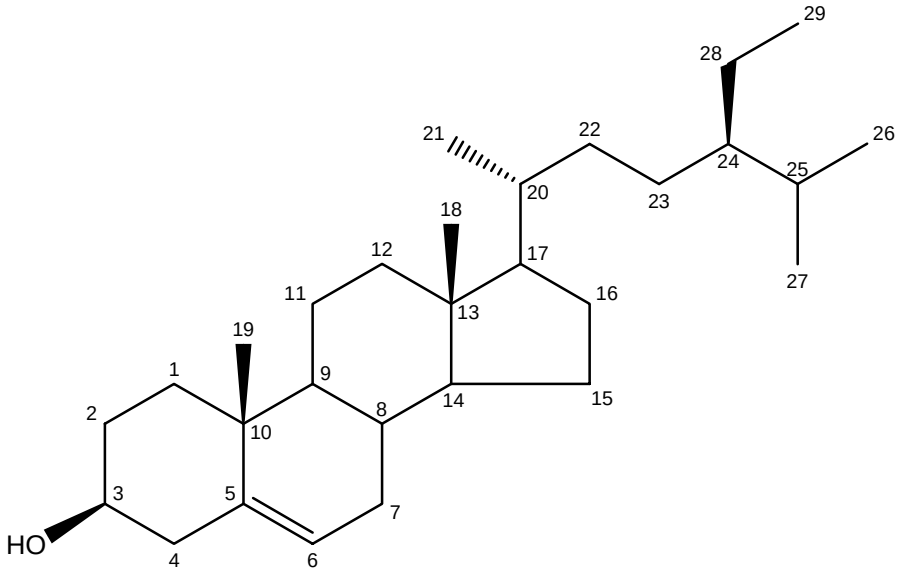


Şekil 4-7: ISUP 1 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$ 125 MHz)



Şekil 4-8: ISUP 1 bileşiğinin HMQC spektrumu ($CDCl_3$)

4.3.2.2. ISUP 2= *β*-Sitosterol



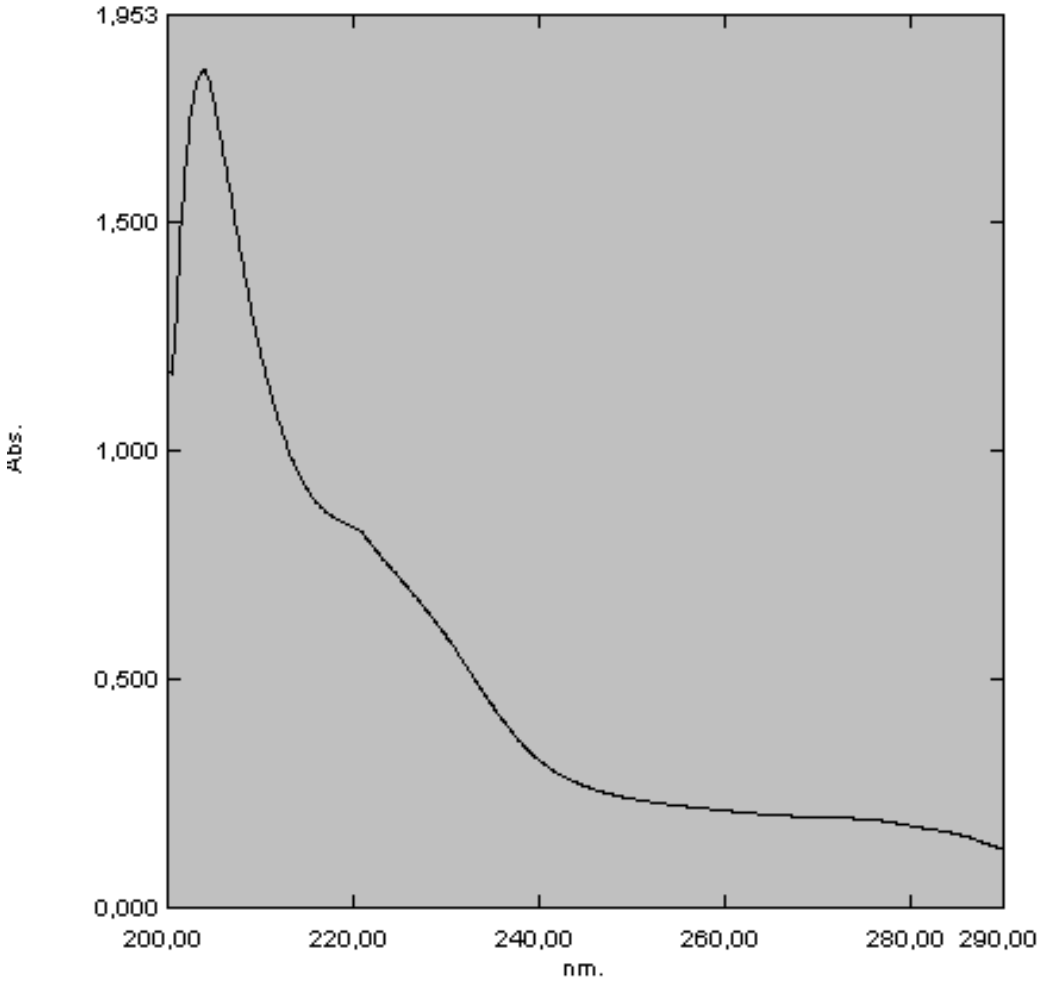
Şekil 4-9: *β*-Sitosterol

Renksiz olan ISUP 2 bileşiği 4,5 mg olarak elde edildi. Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında önce turkuaz sonra kahverengi renk aldı.

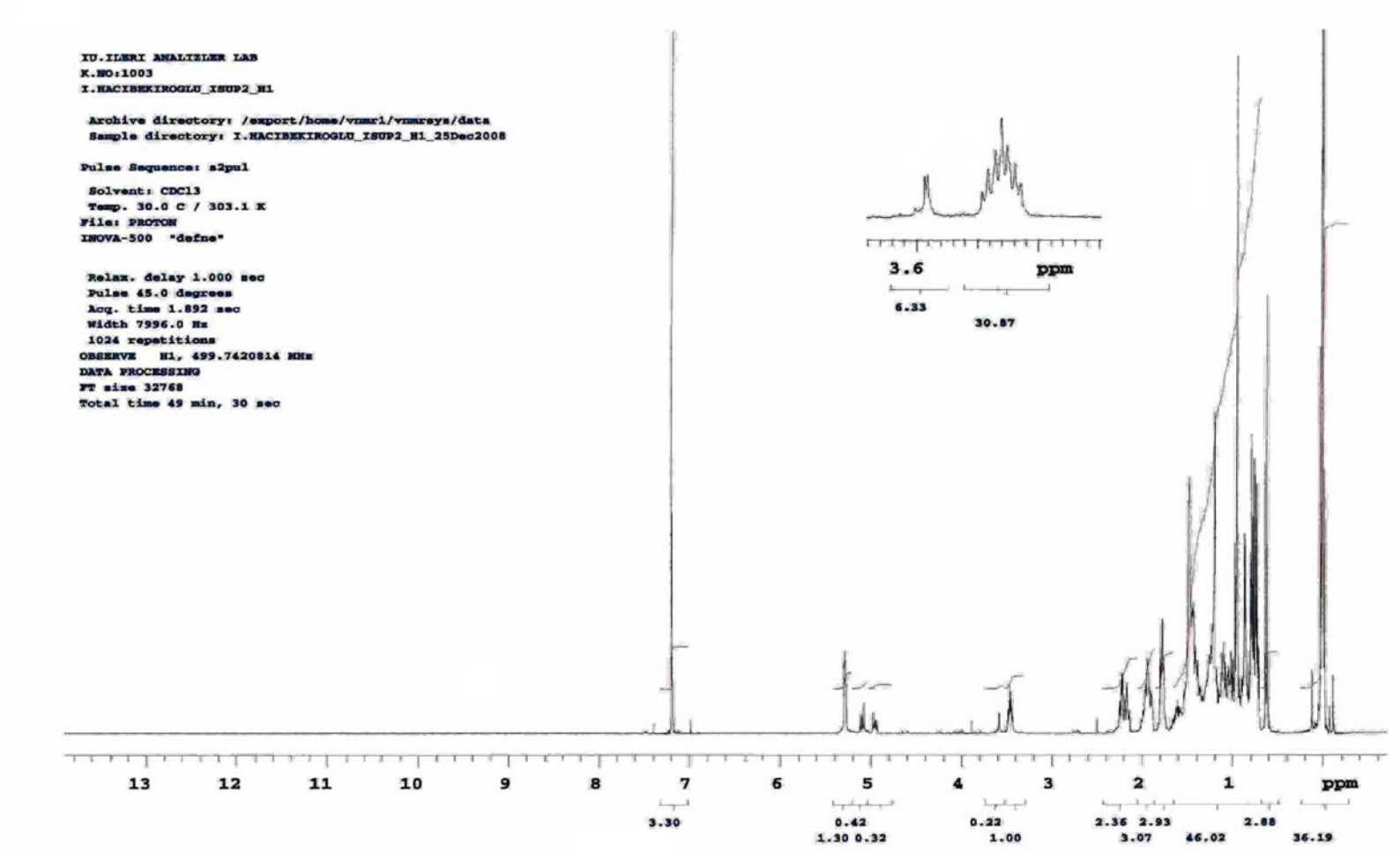
UV spektrumunda (MeOH) 203 nm'de uç absorpsiyon bandı görüldü (Şekil 4-10).

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, 500 MHz) (Şekil 4-11) δ 0.61 (3H, *s*, Me-18), 0.96 (3H, *s*, Me-19), 0.93 (3H, *d*, *J*=6.43 Hz, Me-21), 0.84 (3H, *d*, *J*=6.84 Hz, Me-26), 0.80 (3H, *d*, *J*=6.84 Hz, Me-27) ve 0.78'de (3H, *t*, *J*=7.82 Hz, Me-29) metil pikleri, 3.48'de (1H, *m*) H-3*α* piki ve 5.29'da (1H, *m*, H-6) vinilik protona ait sinyal izlendi.

İnce tabaka kromatografisinde yapılan karşılaştırma sonucunda standart madde ile aynı olduğu belirlenen ISUP 2 bileşiğinin, spektral değerleri literatürde verilen değerler ile uyumlu olduğu belirlendi ve yapısı *β*-sitosterol olarak tespit edildi (Şekil 4-9) (Kolak ve ark. 2005).

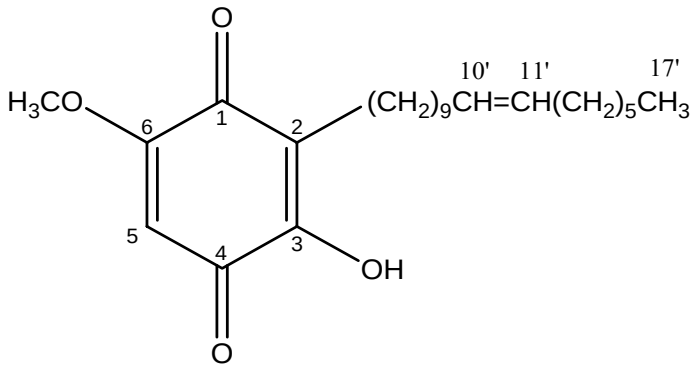


Şekil 4-10: ISUP 2 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)



Şekil 4-11: ISUP 2 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)

4.3.2.3. ISUP 3= 3-Hidroksiiriskinon

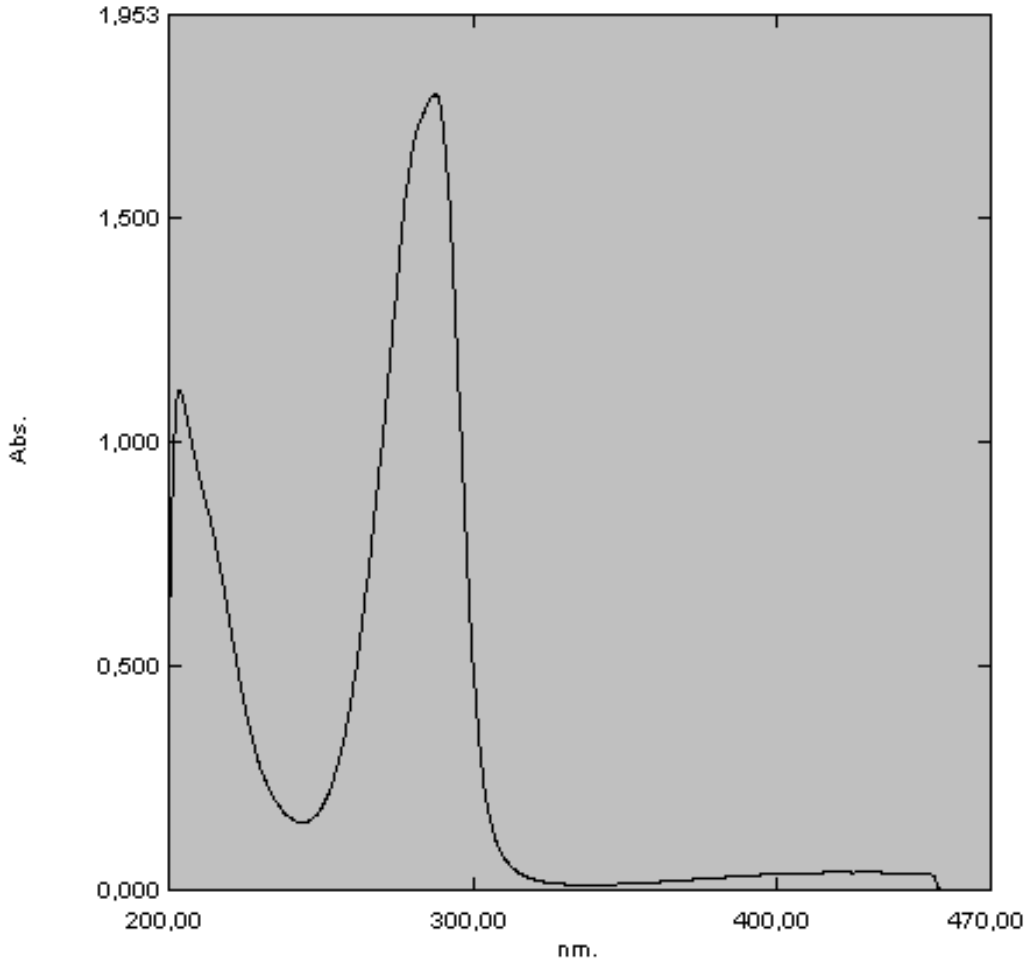


Şekil 4-12: 3-Hidroksiiriskinon

Turuncu renkli olan ISUP 3 bileşiği katı halde elde edildi (24 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında koyu kahverengi renk aldı.

Metanolde alınan UV spektrumunda (Şekil 4-13) 203, 287 ve 422 (sh) nm'de izlenen absorpsiyon bantları ile ^{13}C NMR (APT)'de δ 181.81 ve 180.65'de çıkan pikler ISUP 3 bileşiğinin kinoit yapıda olduğunu gösterdi. Bileşiğin ^{1}H- ($CDCl_3$, 500 MHz) ve ^{13}C- NMR (APT) ($CDCl_3$, 125 MHz) değerleri Tablo 4-3'de verildi (Şekil 4-14, 4-15).

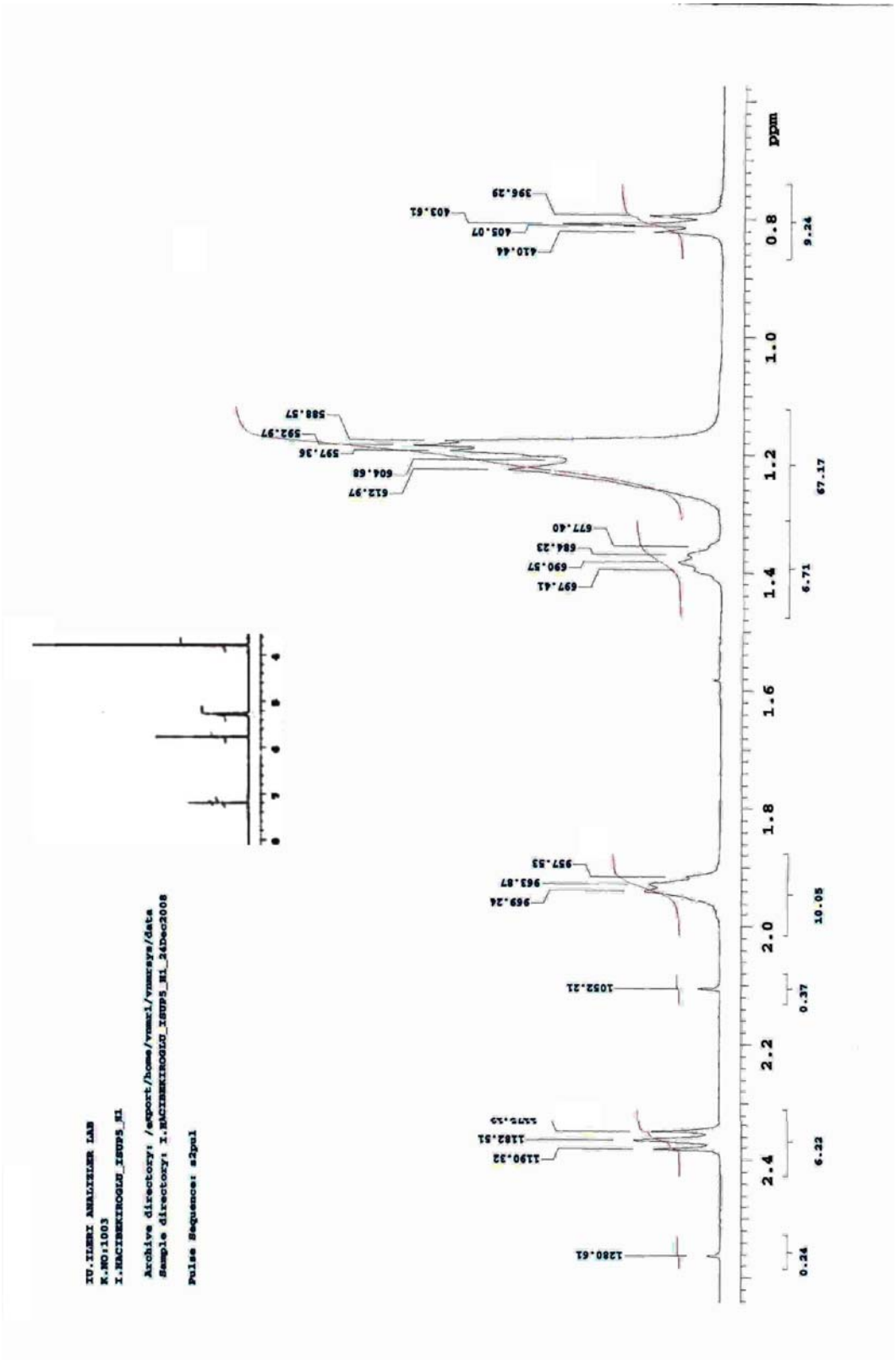
Spektral değerleri literatürde verilen değerler ile karşılaştırıldığında ISUP 3 bileşiğinin 2-[(*Z*)-10-heptadesenil]-3-hidroksi-6-metoksi-*p*-benzokinon yapısındaki 3-hidroksiiriskinon olduğu belirlendi (Seki ve ark. 1995) (Şekil 4-12).



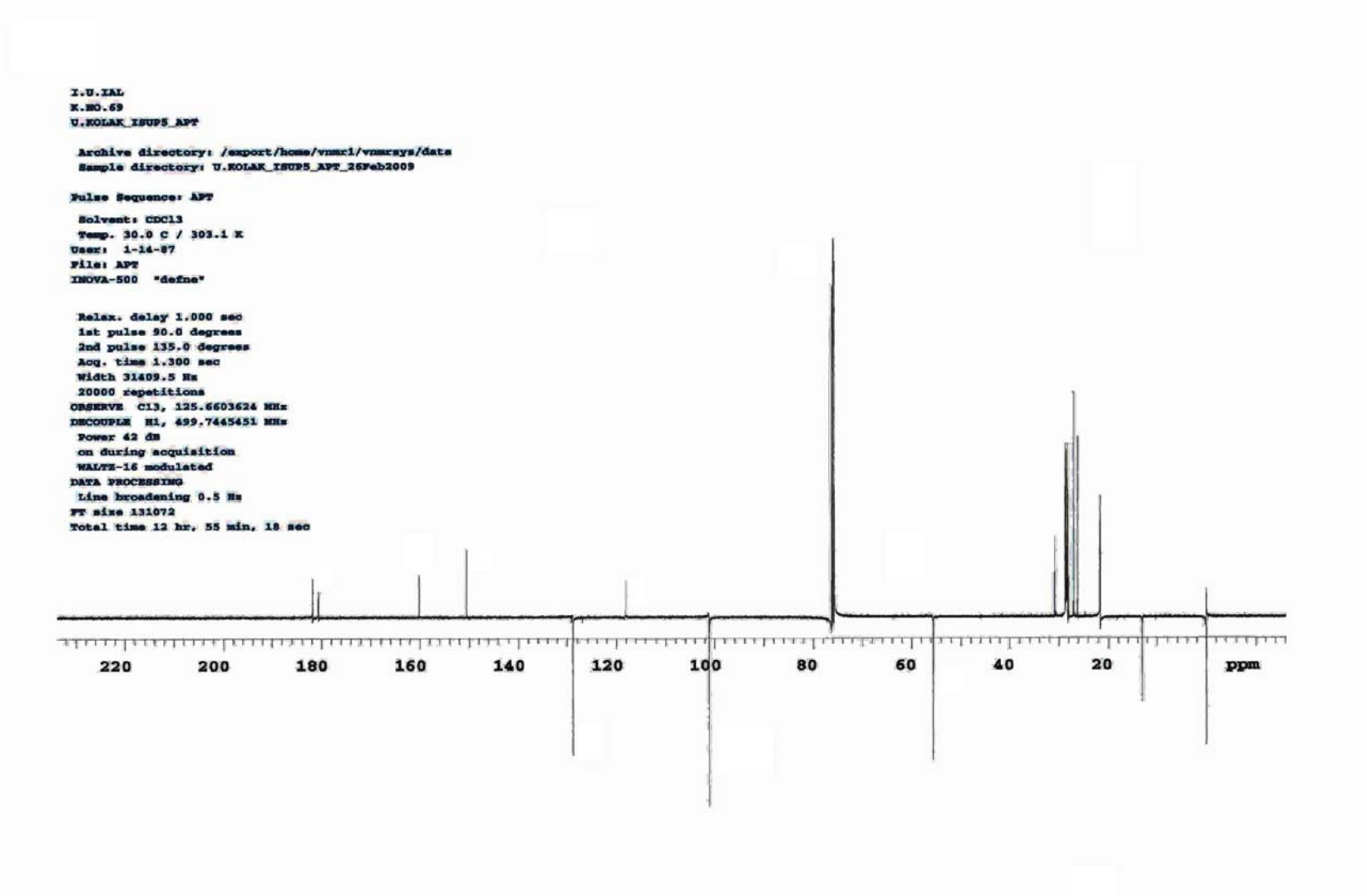
Şekil 4-13: ISUP 3 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)

Tablo 4-3: ISUP 3 bileşiğinin ^{1}H- ve ^{13}C-NMR değerleri ($CDCl_3$)

Pozisyon	^{1} H	^{13}C
1	-	181.81 *s*
2	-	118.28 *s*
3	-	150.50 *s*
4	-	180.65 *s*
5	5.76 *s*	101.14 *d*
6	-	160.16 *s*
1'	2.37 *t* (7.8 Hz)	21.63 *t*
2'	1.38 *m*	28.19 *t*
3'-7'	1.22 *br s*	28.74-28.20 *t*
8'	1.22 *br s*	30.89 *t*
9'	1.94 *m*	27.00 *t*
10'	5.27 *m*	128.92 *d*
11'	5.27 *m*	128.89 *d*
12'	1.94 *m*	26.20 *t*
13'	1.22 *br s*	30.77 *t*
14'	1.22 *br s*	28.76 *t*
15'	1.22 *br s*	30.91 *t*
16'	1.22 *br s*	21.68 *t*
17'	0.82 *t* (7.3 Hz)	13.07 *q*
OMe	3.78 s	55.71 *q*

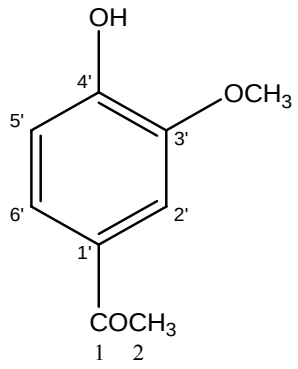


Şekil 4-14: ISUP 3 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)



Şekil 4-15: ISUP 3 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 125 MHz)

4.3.2.4. ISUP 4= Asetovanilon



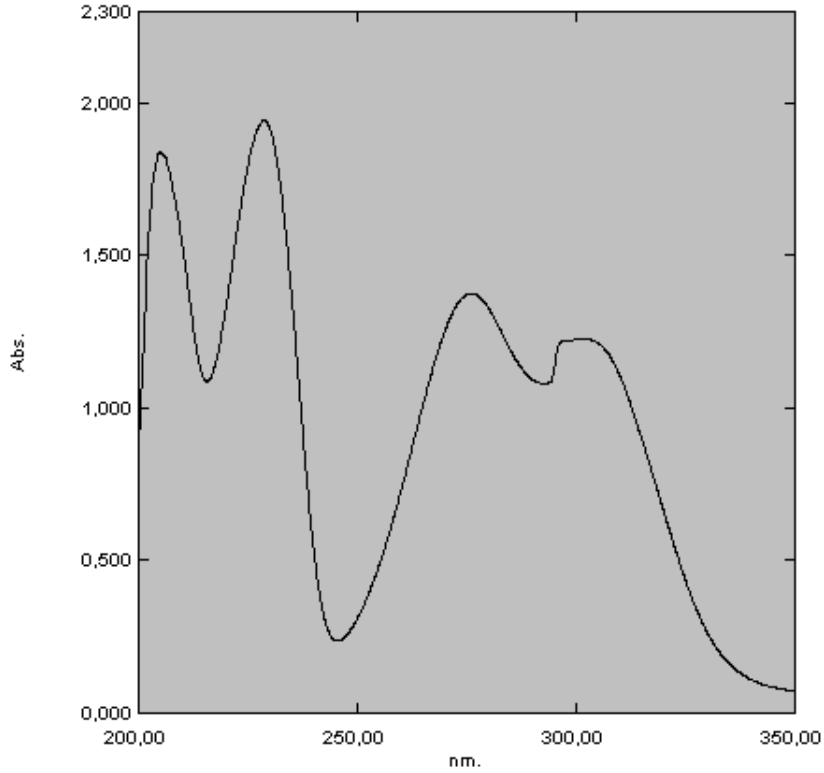
Şekil 4-16: Asetovanilon

Renksiz olan ISUP 4 bileşiği katı halde elde edildi (10 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 205, 228, 275 ve 301 nm'de bantlar görüldü (Şekil 4-17).

^{1}H NMR spektrumunda (CD_3COCD_3, 500 MHz) (Şekil 4-18) δ 7.40'da (1H, *d*, *J*=1.95 Hz) H-2', 6.78'de (1H, *d*, *J*=7.81 Hz) H-5', 7.42'de (1H, *dd*, *J*=1.95;7.81 Hz) H-6', 3.80'de (3H, *s*) metoksi grubu ve 2.38 (3H, *s*) CO$\underline{CH_3}$ piki izlendi. ISUP 4 bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) değerleri Tablo 4-4'de verildi (Şekil 4-19).

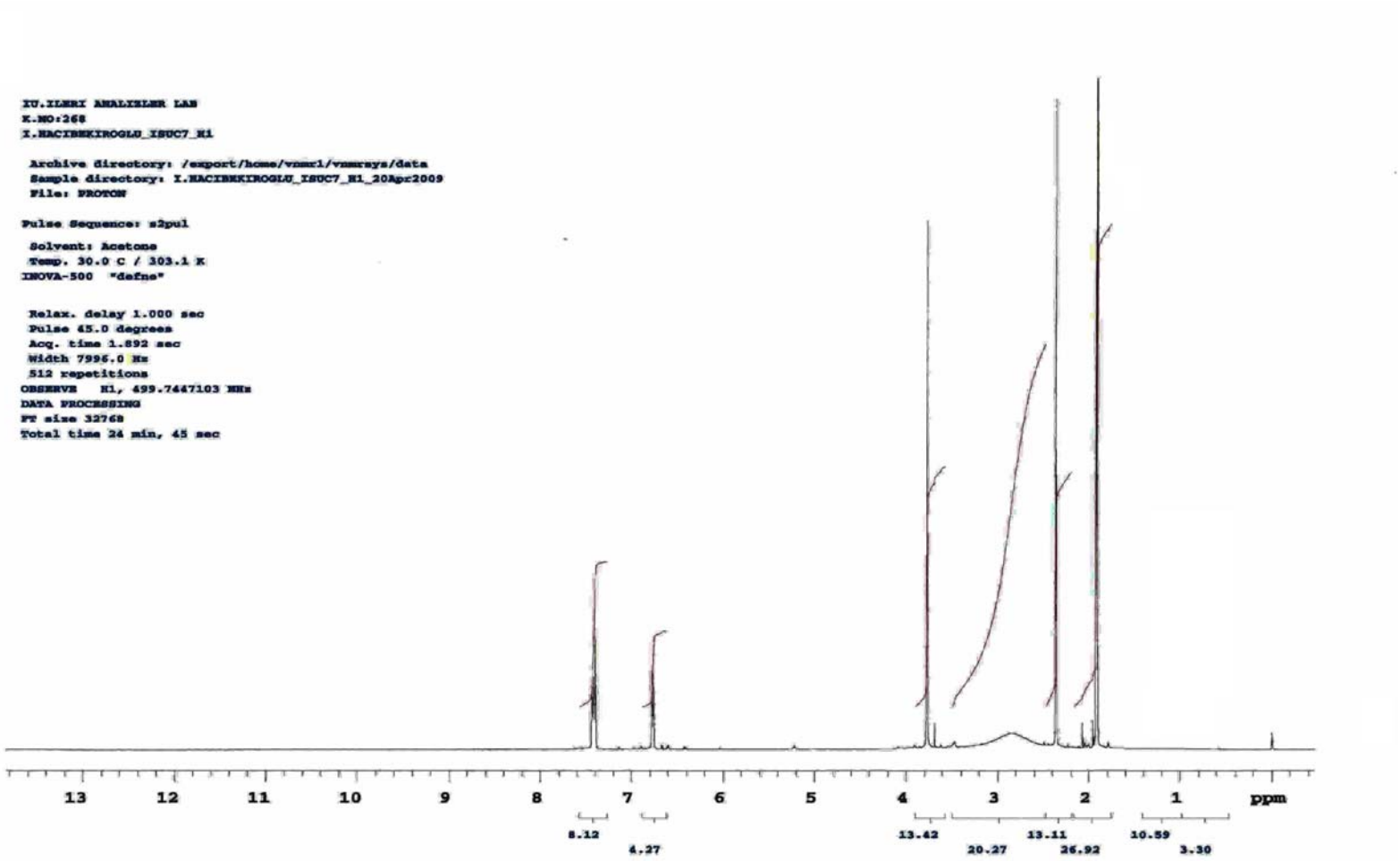
Spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırılan ISUP 4 bileşiğinin asetovanilon olduğu belirlendi (Crestini ve D'Auria 1997) (Şekil 4-16).



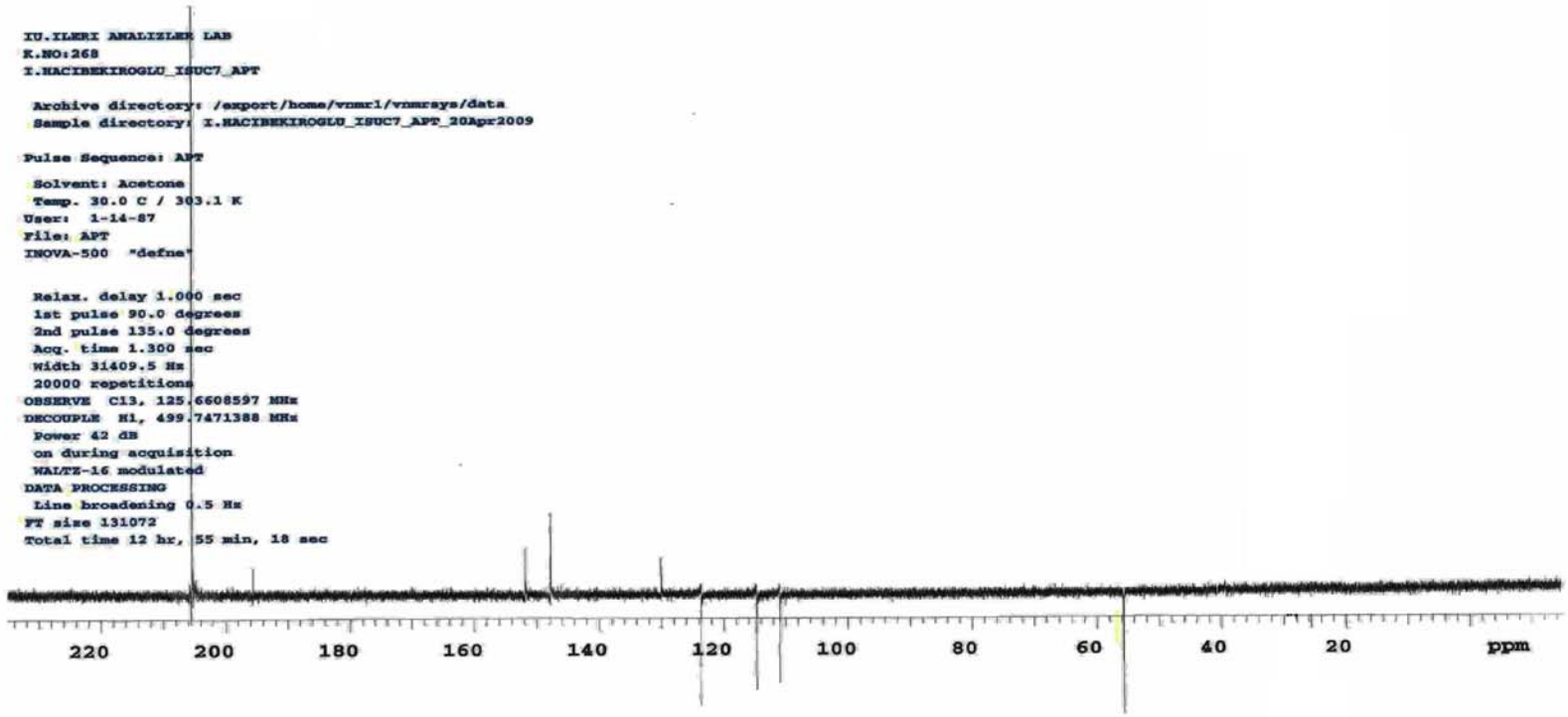
Şekil 4-17: ISUP 4 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)

Tablo 4-4: ISUP 4 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri (CD_3COCD_3, 125 MHz)

Pozisyon	^{13}C
1	195.51 *s*
2	25.56 *q*
1'	130.01 *s*
2'	110.96 *d*
3'	147.70 *s*
4'	151.82 *s*
5'	114.69 *d*
6'	123.62 *d*
OCH_3	55.63 *q*

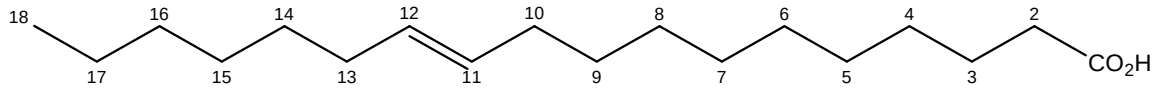


Şekil 4-18: ISUP 4 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (CD_3COCD_3, 500 MHz)



Şekil 4-19: ISUP 4 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3COCD_3, 125 MHz)

4.3.2.5. ISUP 5= *cis*-Vaksenik Asit



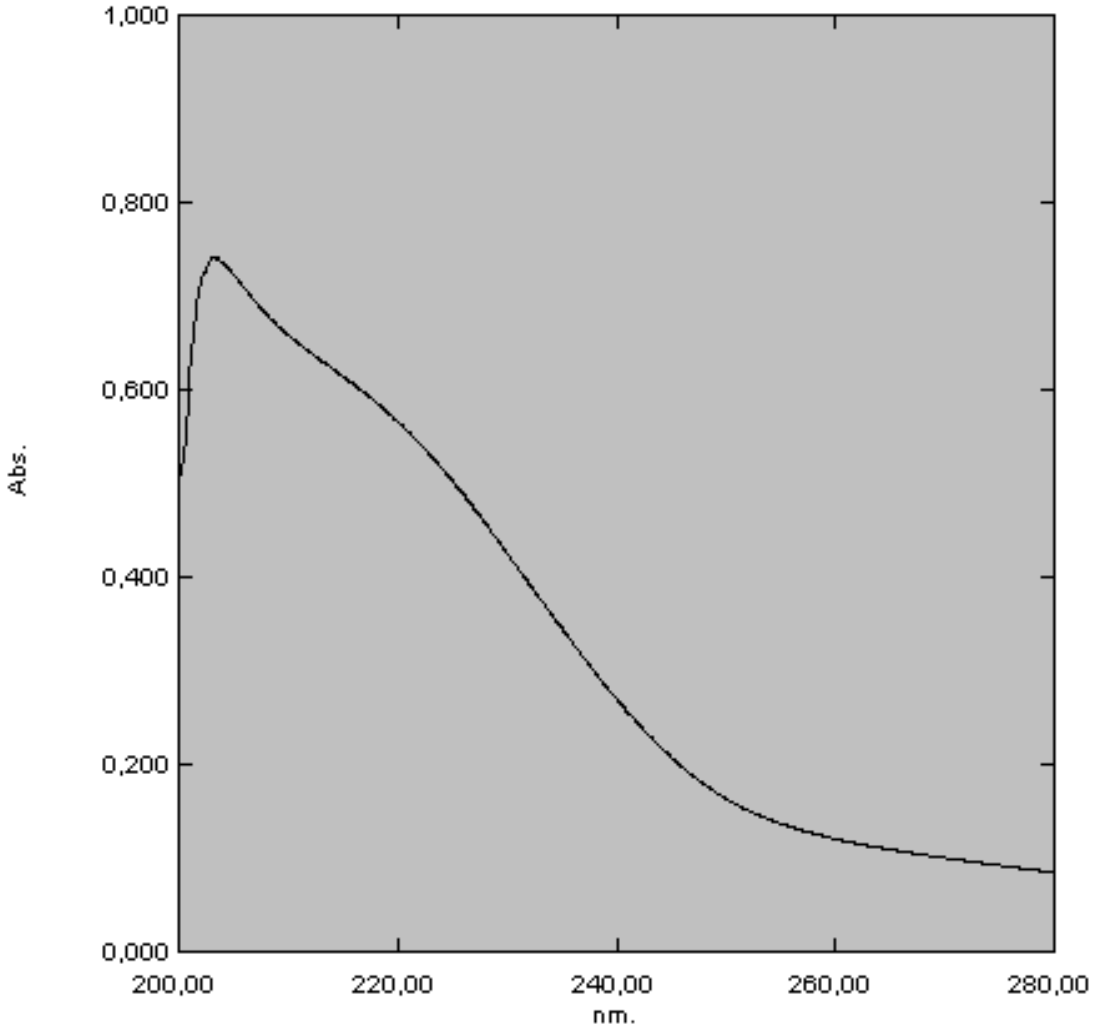
Şekil 4-20: *cis*-Vaksenik asit

Renksiz olan ISUP 5 bileşiği viskoz halde edildi (1,6 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülmeyen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında açık sarı renk aldı.

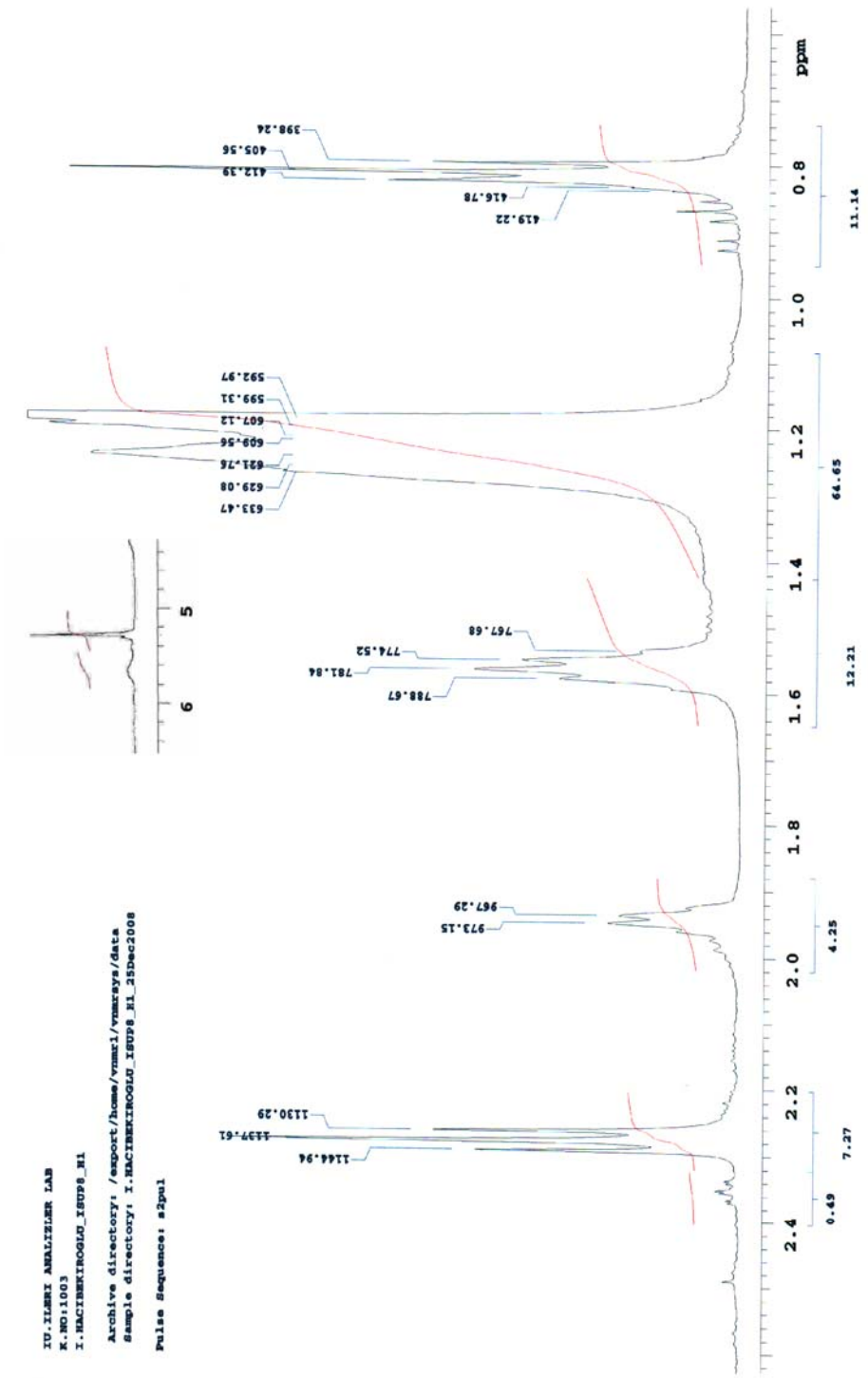
UV spektrumunda (MeOH) 203 nm'de uç absorpsiyon görüldü (Şekil 4-21).

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, 500 MHz) (Şekil 4-22) δ 2.28'de (2H, *t*, *J*=7.33 Hz) H-2, 1.94'de (4H, *m*) H-10 ve H-13, 5.2-5.3'te (2H, *m*) H-11 ve H-12, 1.58'de (2H, *pentet*, *J*=7.83 Hz) H-17, 0.81'de (3H, *t*, *J*=7.32 Hz) Me-18 ve 1.12-1.30'da (20H, *m*) metilen pikleri izlendi. ^{13}C NMR (APT) (Şekil 4-23) değerleri, δ 179.82 (COOH), 129.03 ve 128.73 (C-11 ve C-12), 32.83 (C-2), 30.92-21.68 (13x CH_2), 13.09 (C-18).

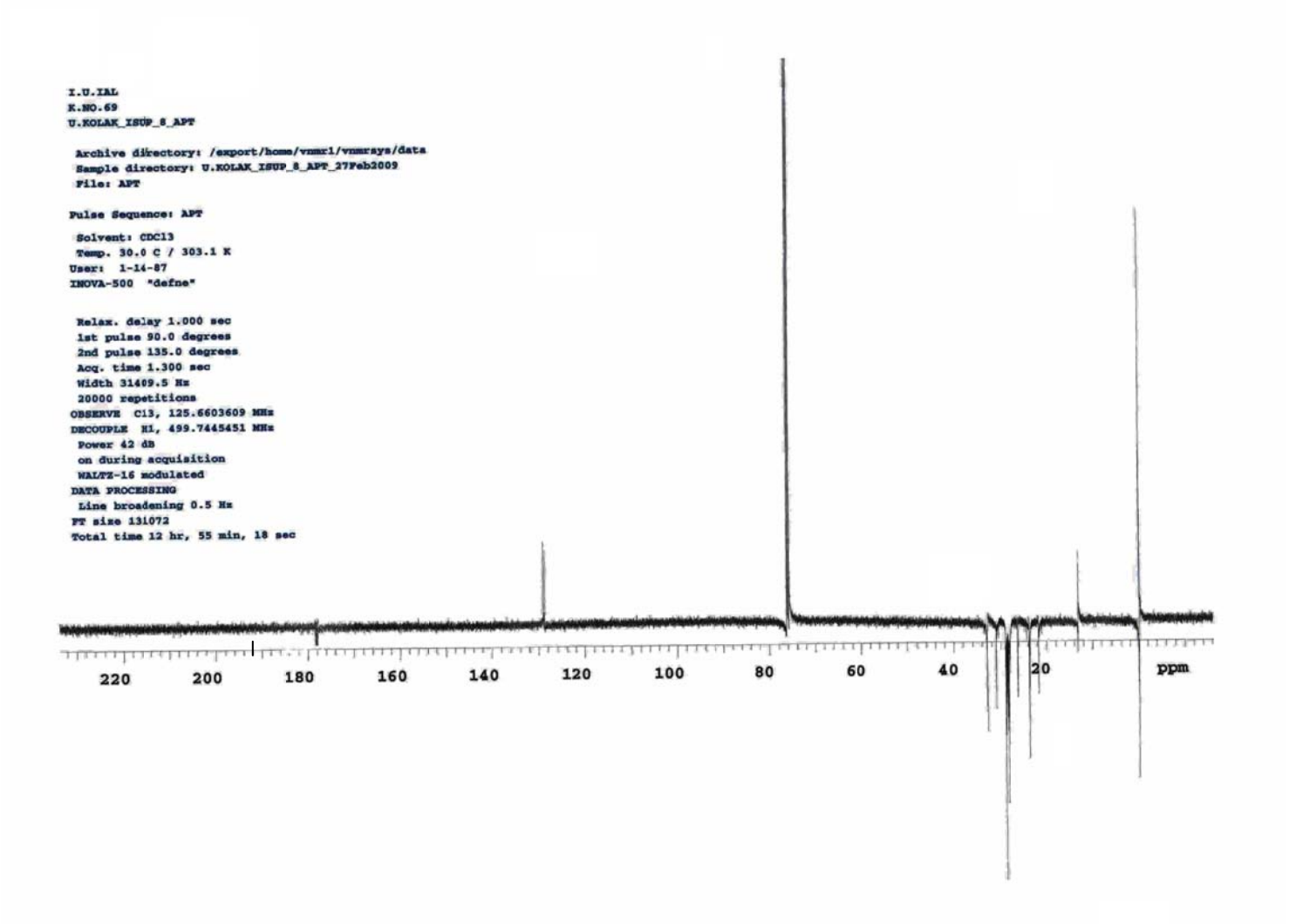
Literatürde verilen spektral değerler ile karşılaştırıldığında ISUP 5 bileşiğinin *cis*-octades-11-enoik asit yapısındaki *cis*-vaksenik asit olduğu belirlendi (Duffy ve ark. 2006) (Şekil 4-20). ISUP 5, *Iris* türlerinden ilk kez elde edildi.



Şekil 4-21: ISUP 5 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)



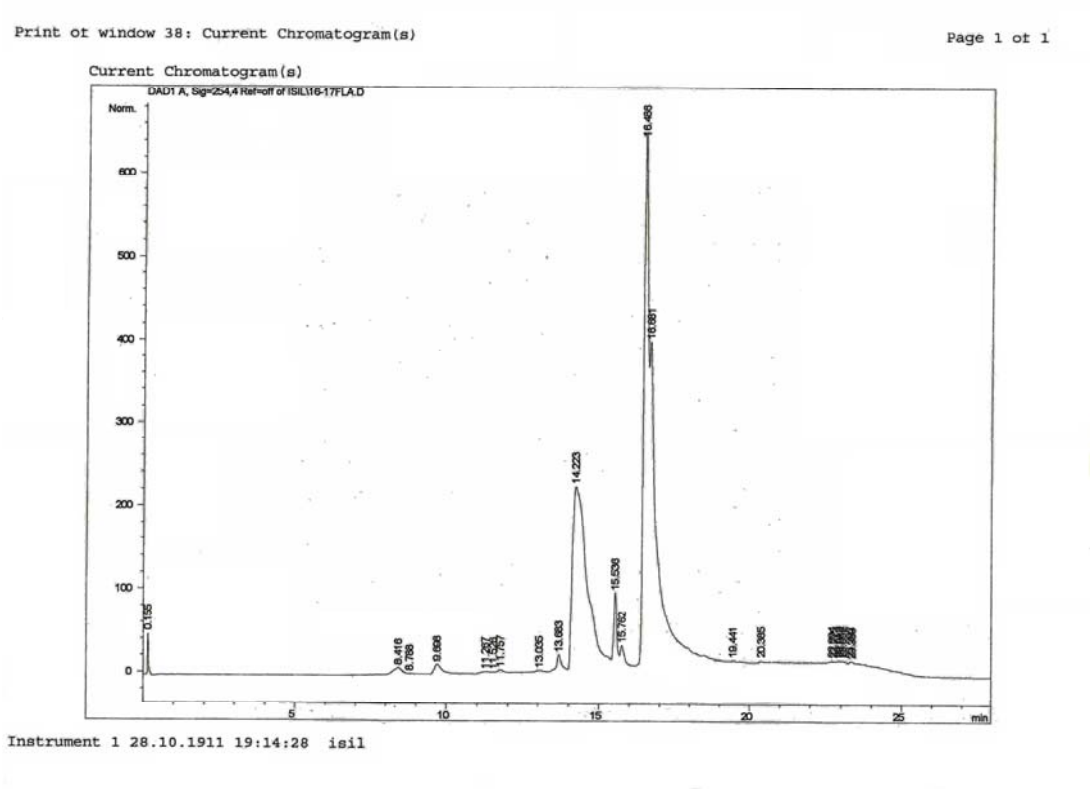
Şekil 4-22: ISUP 5 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)



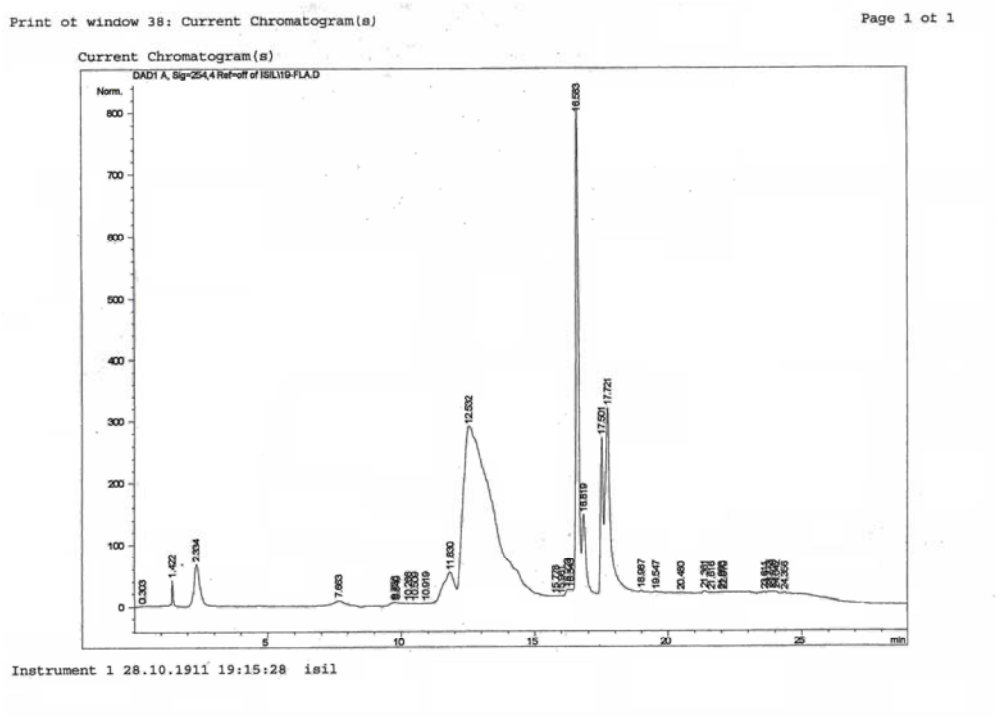
Şekil 4-23: ISUP 5 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 125 MHz)

4.3.3. *I. suaveolens*'in Kloroform Ekstresinin (ISUC) Fraksiyonlandırılması

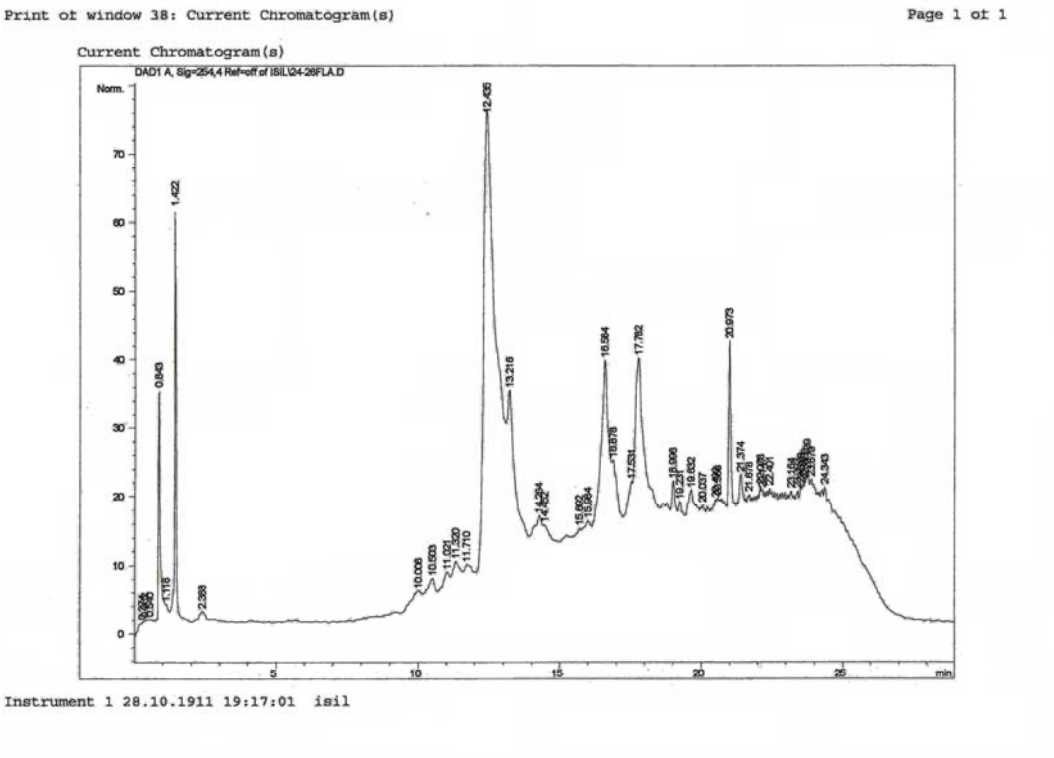
ISUC silika jel içeren sütunda fraksiyonlandırıldı. Elüsyona % 100 petrol eteri ile başlandı ve % 10 çözücü polaritesi arttırılarak sırasıyla kloroform, aseton ve metanol ile devam edildi. % 100 metanole ulaşılınca elüsyon tamamlandı. İTK ile benzer fraksiyonlar birleştirildi. Toplam 10 fraksiyon elde edildi. Bu fraksiyonlardan 16-17, 19 ve 24-26 analitik HPLC'ye uygulandı, Şekil 4-24, 4-25 ve 4-26'da bu üç fraksiyona ait kromatogramlar verildi. Bu kromatogramlar yardımıyla fraksiyonların MPLC ve preparatif HPLC'deki ayırımlarında kullanılan çözücü sistemi belirlendi.



Şekil 4-24: Fraksiyon 16-17'nin HPLC kromatogramı

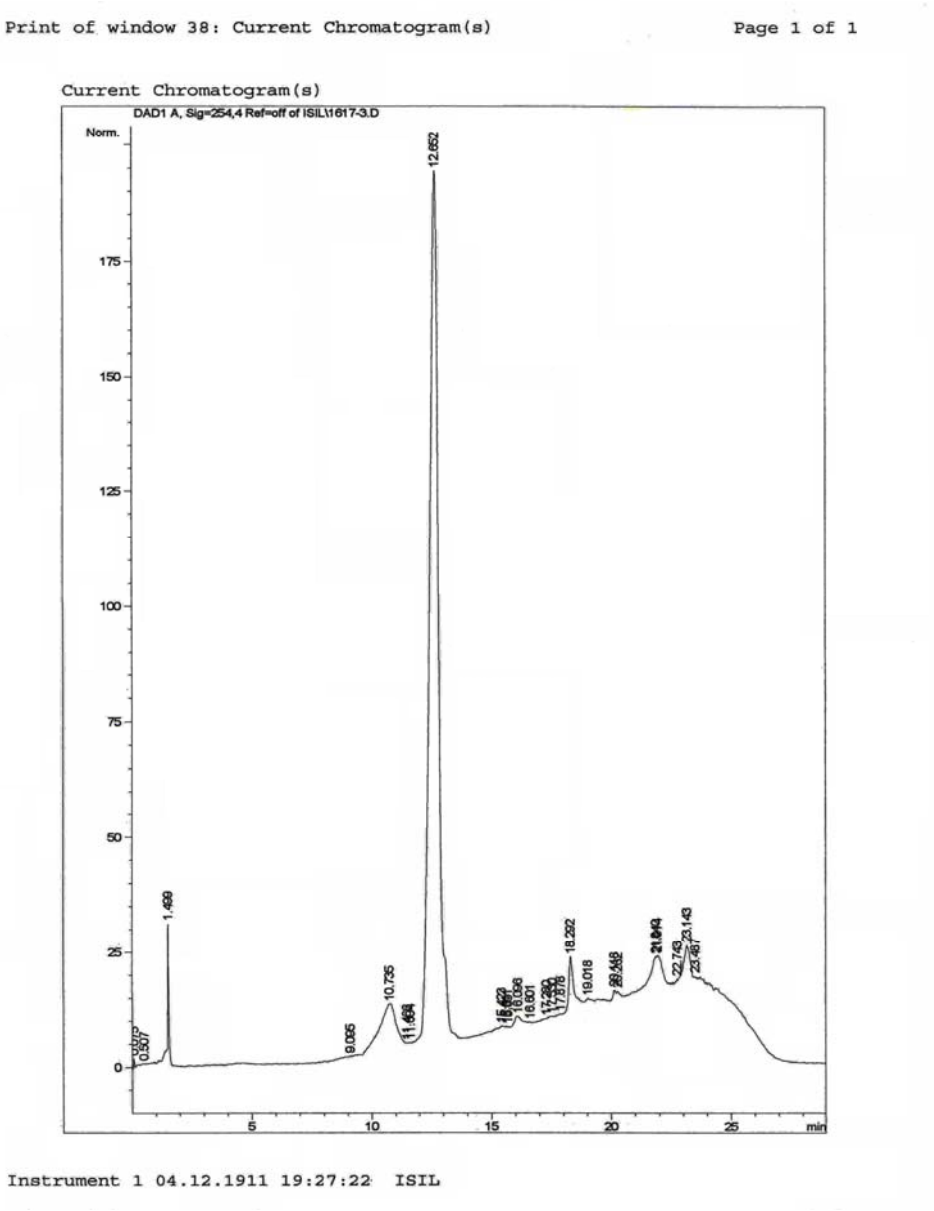


Şekil 4-25:Fraksiyon 19'un HPLC kromatogramı

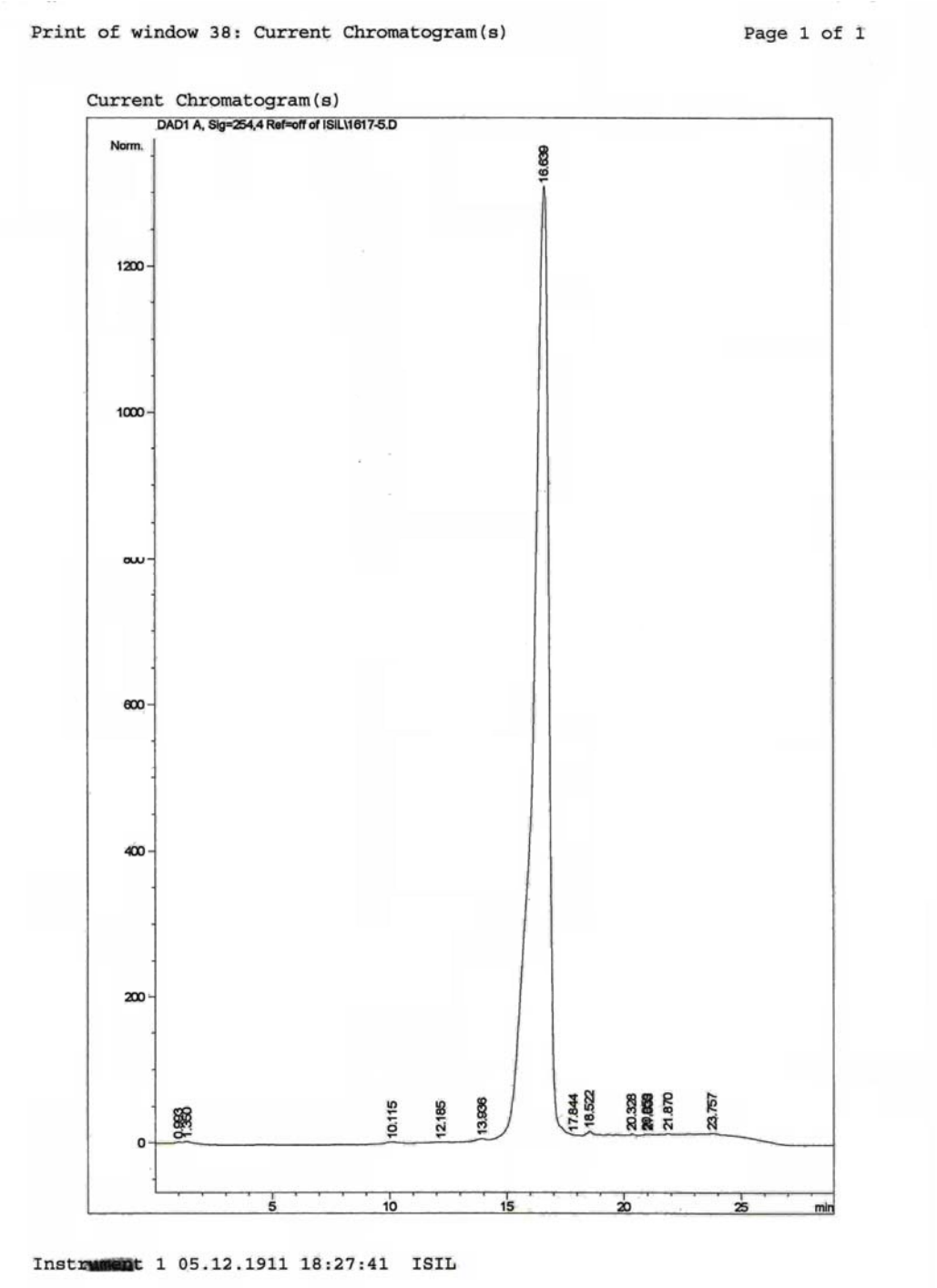


Şekil 4-26: Fraksiyon 24-26'nın HPLC kromatogramı

Fraksiyon 16-17 (2,59 g) MPLC'de ters faz kolona uygulandı, su:MeOH (70:30) çözücü sistemi ile elüsyona başlandı ve polarite %10 düşürülerek metanolle devam edildi. %100 metanole ulaşılınca ayırım tamamlandı. Toplanan fraksiyonların saflıkları analitik HPLC'de kontrol edildi. Ayrılmayan fraksiyonlar preparatif HPLC'ye uygulandı. Bu ayırım sonucunda fraksiyon 16-17-3'ten ISUC 7 (coniferaldehit), 16-17-5'ten ISUC 1 (tectorigenin) saf olarak elde edildi. Bu maddelere ait HPLC kromatogramları Şekil 4-27 ve Şekil 4-28'de verildi.



Şekil 4-27: Fraksiyon 16-17-3'ün HPLC kromatogramı

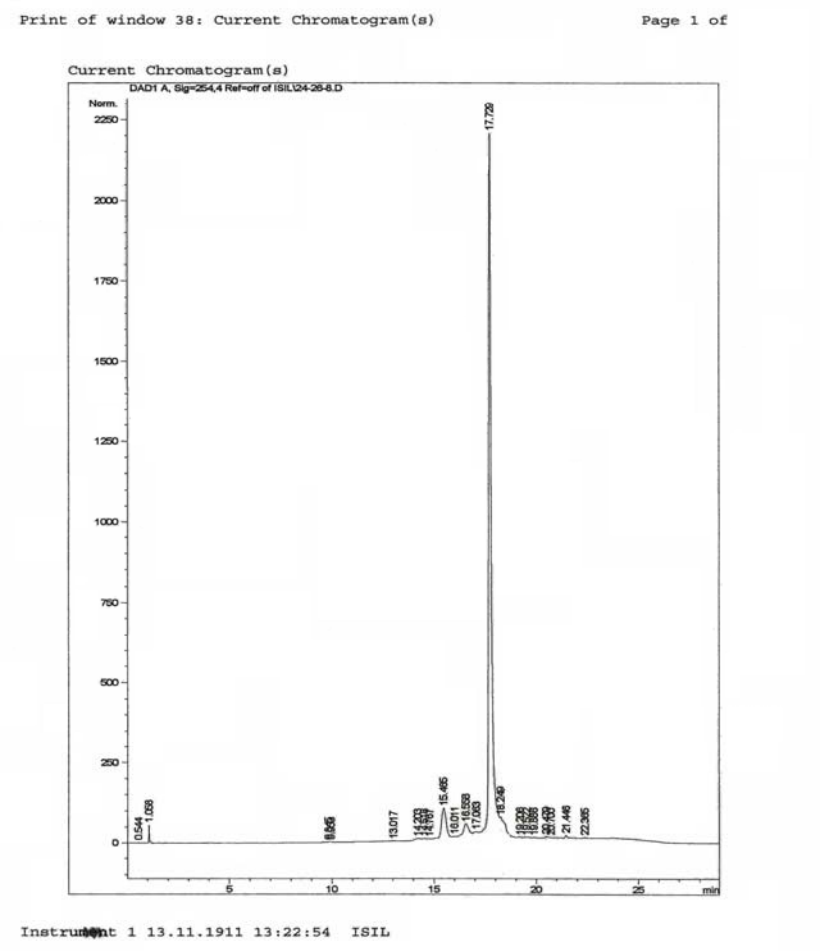


Şekil 4-28: Fraksiyon 16-17-5'in HPLC kromatogramı

Preparatif HPLC'de ayrılmayan fraksiyonlardan preparatif ince tabaka plakları kullanılarak saf maddeler elde edildi; ISUC 4 (iriskumaonin metil eter), ISUC 6 (*cis*-epoksiconiferil alkol).

Fraksiyon 19 (2,93 g) MPLC'de ters faz kolonda ayrıldı. Ayırmaya su:MeOH (60:40) ile başlandı, polarite %10 düşürülerek metanolle devam edildi. %100 metanole ulaşılınca ayırım tamamlandı. Toplanan fraksiyonların saflıkları analitik HPLC'de kontrol edildi. Fraksiyon 19'dan elde edilen 19-10 nolu fraksiyon (90 mg) preparatif HPLC'de su: MeOH (80:20) çözücü sistemi ile ayrıldı. Preparatif İTK yapılarak saflaştırılan maddeler; ISUC 3 (nigricin), ISUC 5 (soforanarin A), ISUC 8 (*p*-hidroksiasetofenon).

Fraksiyon 24-26 (260 mg) preparatif HPLC'de ters faz kolonla 80:20 su:MeOH sistemi ile ayrıldı. Toplanan fraksiyonların saflıkları analitik HPLC'de kontrol edildi. Bu fraksiyonlardan 24-26-8 (ISUC 2= irilon) saf olarak elde edildi. 24-26-8'in HPLC kromatogramı Şekil 4-29'da gösterilmektedir.

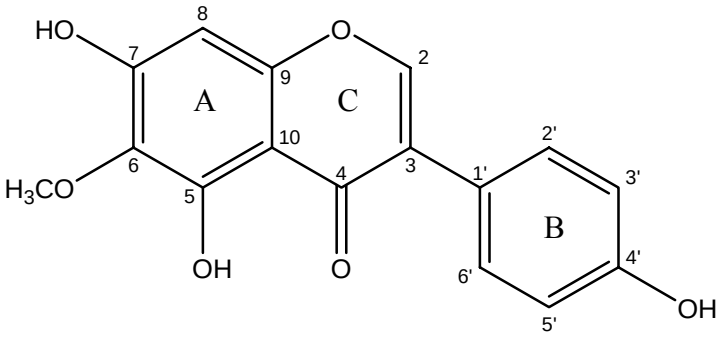


Şekil 4-29: Fraksiyon 24-26-8'in HPLC kromatogramı

ISUC'tan toplam 8 saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapıları spektroskopik yöntemler (UV, ^{1}H- ve ^{13}C-NMR (APT), HMQC, HMBC, Kütle) kullanılarak aydınlatıldı.

4.3.4. ISUC'tan Elde Edilen Saf Maddelerin Yapı Tayinleri

4.3.4.1. ISUC 1= Tectorigenin



Şekil 4-30: Tectorigenin

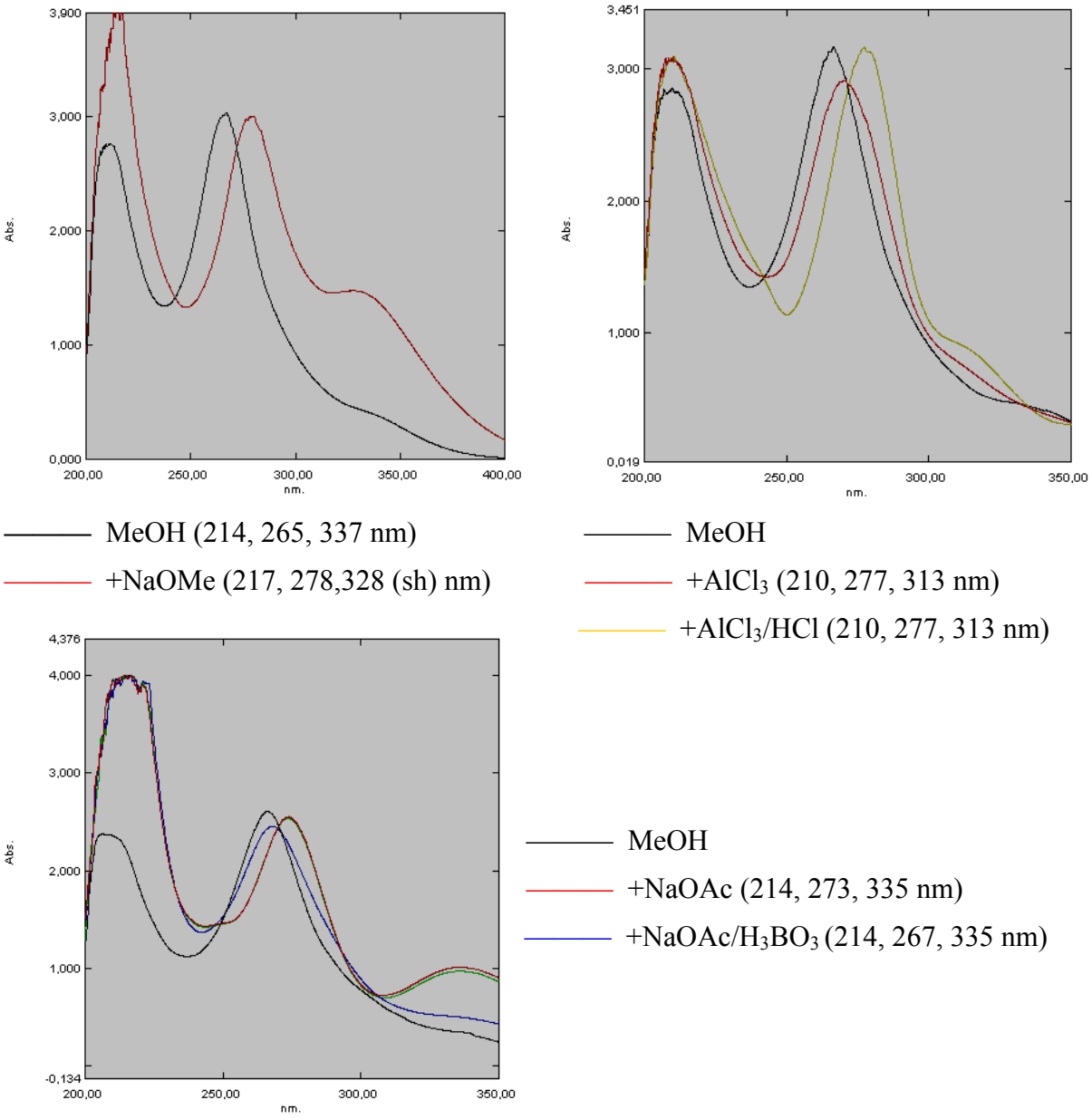
Sarı renkli olan ISUC 1 bileşiği katı halde elde edildi (11,5 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) (Şekil 4-31) 214, 265 ve 337 nm'de absorpsiyon bantları izlendi. 265 nm'de çıkan bant bileşiğin bir izoflavon olduğunu gösterdi. ISUC 1'in metanoldeki çözeltisine NaOMe ilavesiyle alınan spektrumda 217, 278 ve 328 (sh) nm'lerde izlenen bantlar B halkasında 3',4'-dihidroksi grubunun olmadığını gösterdi. MeOH+$AlCl_3$+HCl spektrumunda Bant II'nin (277 nm) MeOH'deki Bant II'ye göre (265 nm) 12 nm batokromik kayma göstermesi 5-OH olduğunu gösterdi. MeOH+NaOAc spektrumunda 214, 273, 335 nm'lerde absorpsiyon bantları izlendi. Bant II'nin (273 nm), MeOH'deki Bant II'ye göre (265 nm) 8 nm batokromik kayma göstermesi C-7'de hidroksil grubu olduğunu gösterdi.

^{1}H NMR spektrumunda (CD_3OD, 500 MHz) (Şekil 4-32) izoflavonların karakteristik piki olan H-2 protonu 7.96 ppm'de izlendi. 7.27 ppm'de (2H, *dd, J*=1.95; 6.84 Hz, H-2' ve H-6') ve 6.74 ppm'de (2H, *dd, J*=1.95; 6.84 Hz, H-3' ve H-5') piklerinin izlenmesi B halkasında 4' konumunun dolu olduğunu gösterdi. 3.79 ppm'de (*s*, OMe)

metoksi grubuna ait pik ve 6.34 ppm'de (1H, *s*) H-8 piki izlendi. ^{13}C NMR (APT) değerleri Tablo 4-5'te verildi (Şekil 4-33). ISUC 1'in HMQC ve HMBC spektrumları Şekil 4-34 ve 4-35'te verildi. LC-MS kromatogramında bileşiğin molekül ağırlığı 299 $[M-1]^+$ olarak belirlendi (Şekil 4-36).

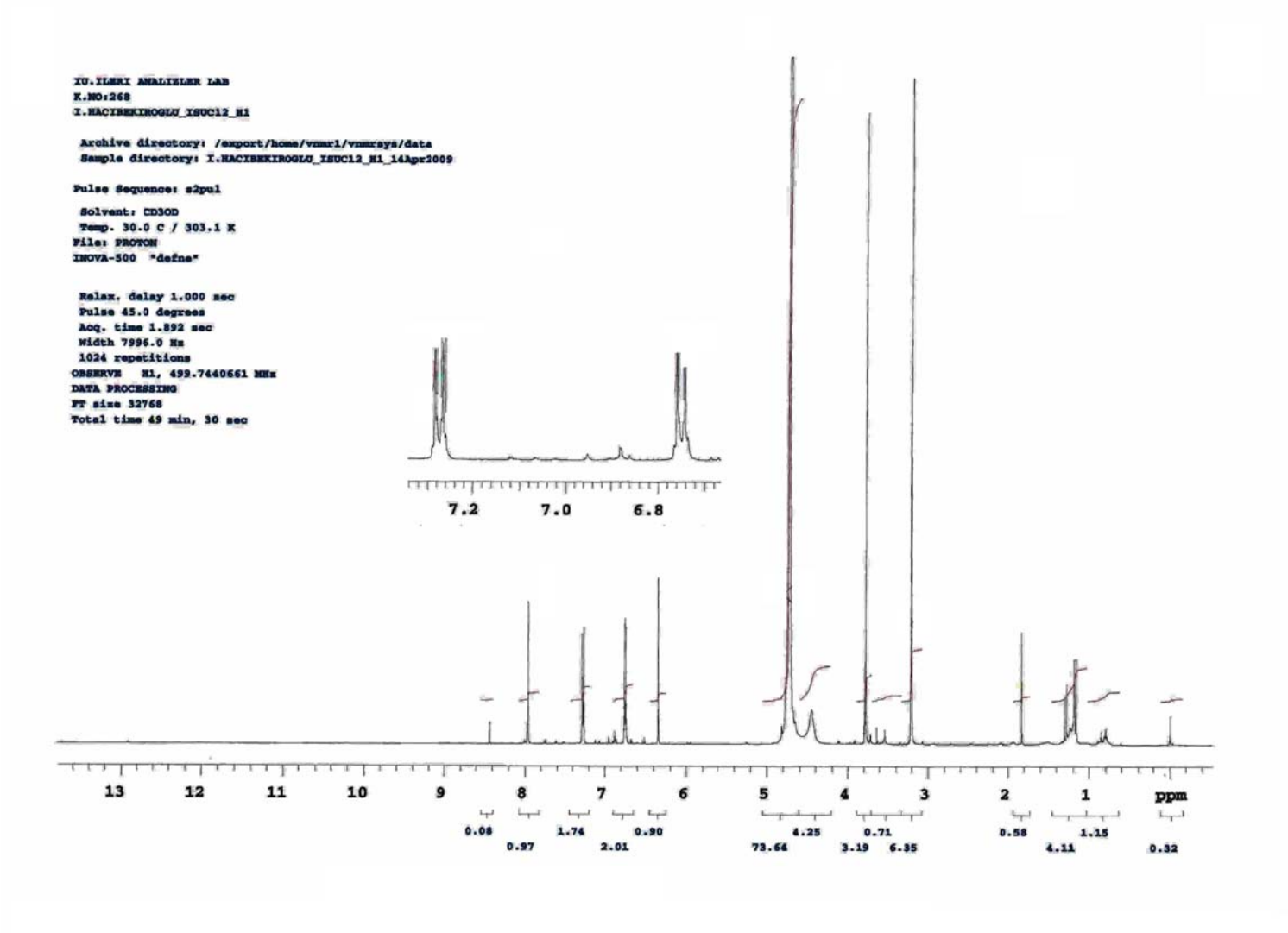
ISUC 1'in spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırıldı ve bileşiğin tectorigenin olduğu belirlendi (Hanawa ve ark. 1991) (Şekil 4-30).



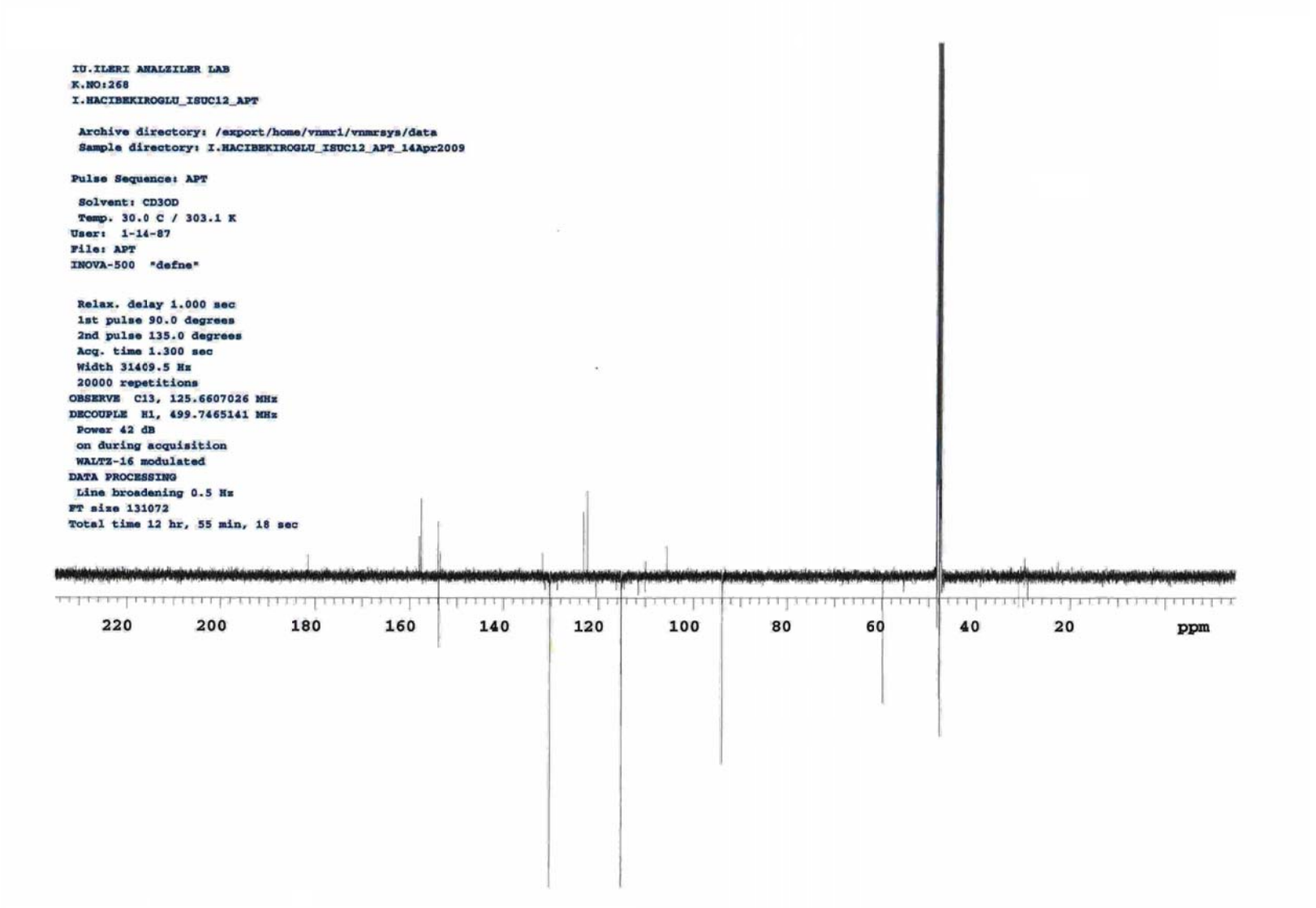
Şekil 4-31: ISUC 1 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları

Tablo 4-5: ISUC 1 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri (CD_3OD, 125 MHz)

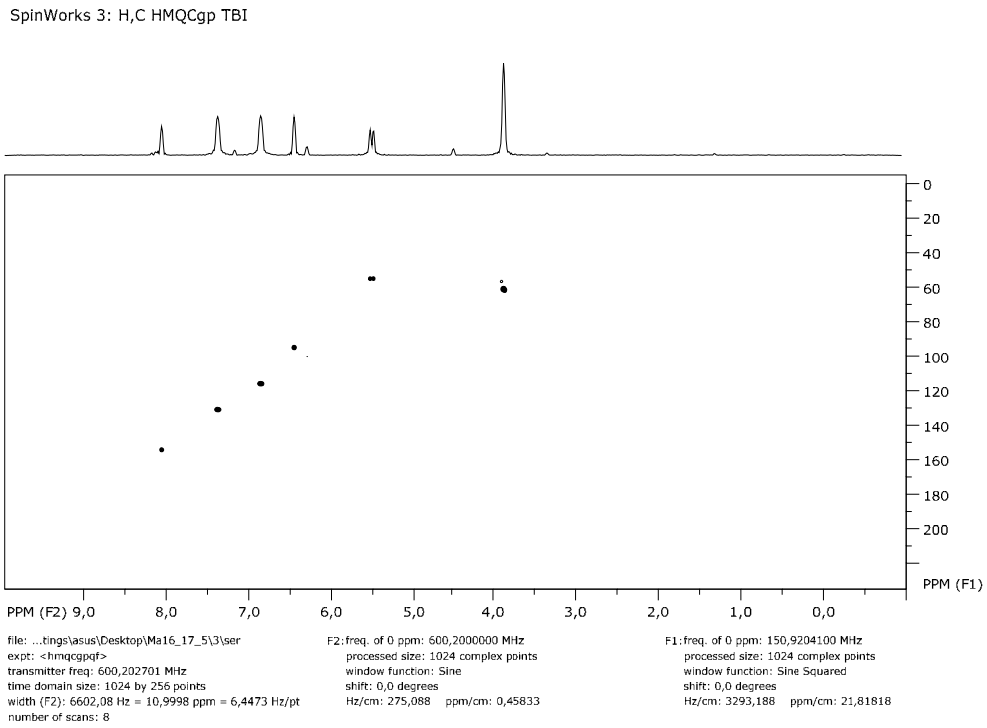
Pozisyon	^{13}C
2	153.77 *d*
3	123.08 *s*
4	181.44 *s*
5	153.92 *s*
6	131.76 *s*
7	157.62 *s*
8	93.90 *d*
9	153.40 *s*
10	109.99 *s*
1'	122.15 *s*
2'	131.20 *d*
3'	115.12 *d*
4'	157.95 *s*
5'	116.17 *d*
6'	130.20 *d*
OCH_3	59.74 *q*



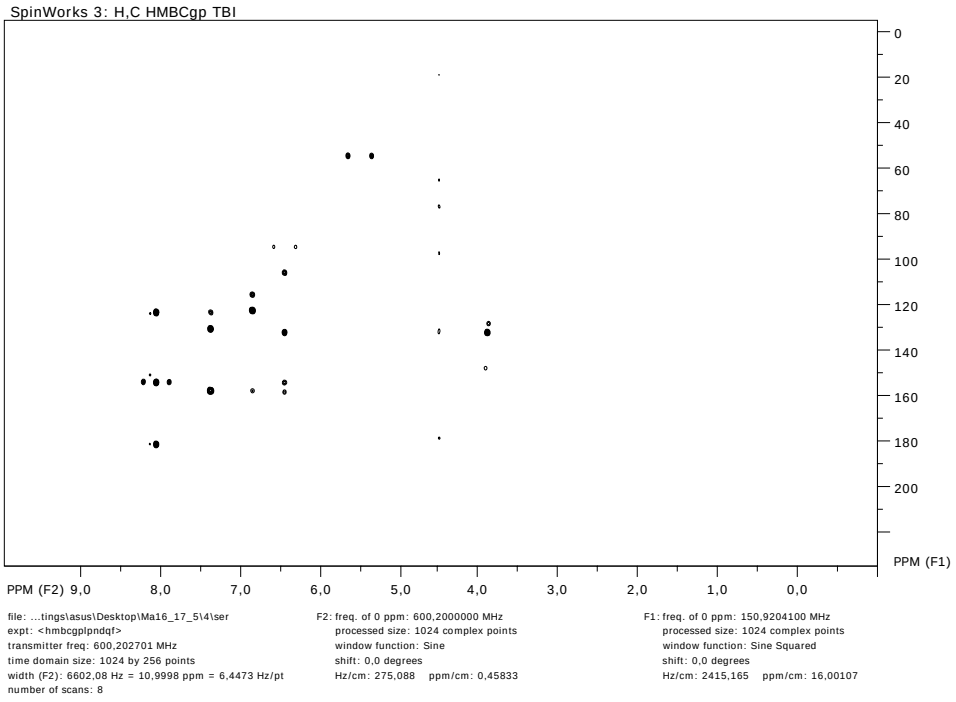
Şekil 4-32: ISUC 1 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz)



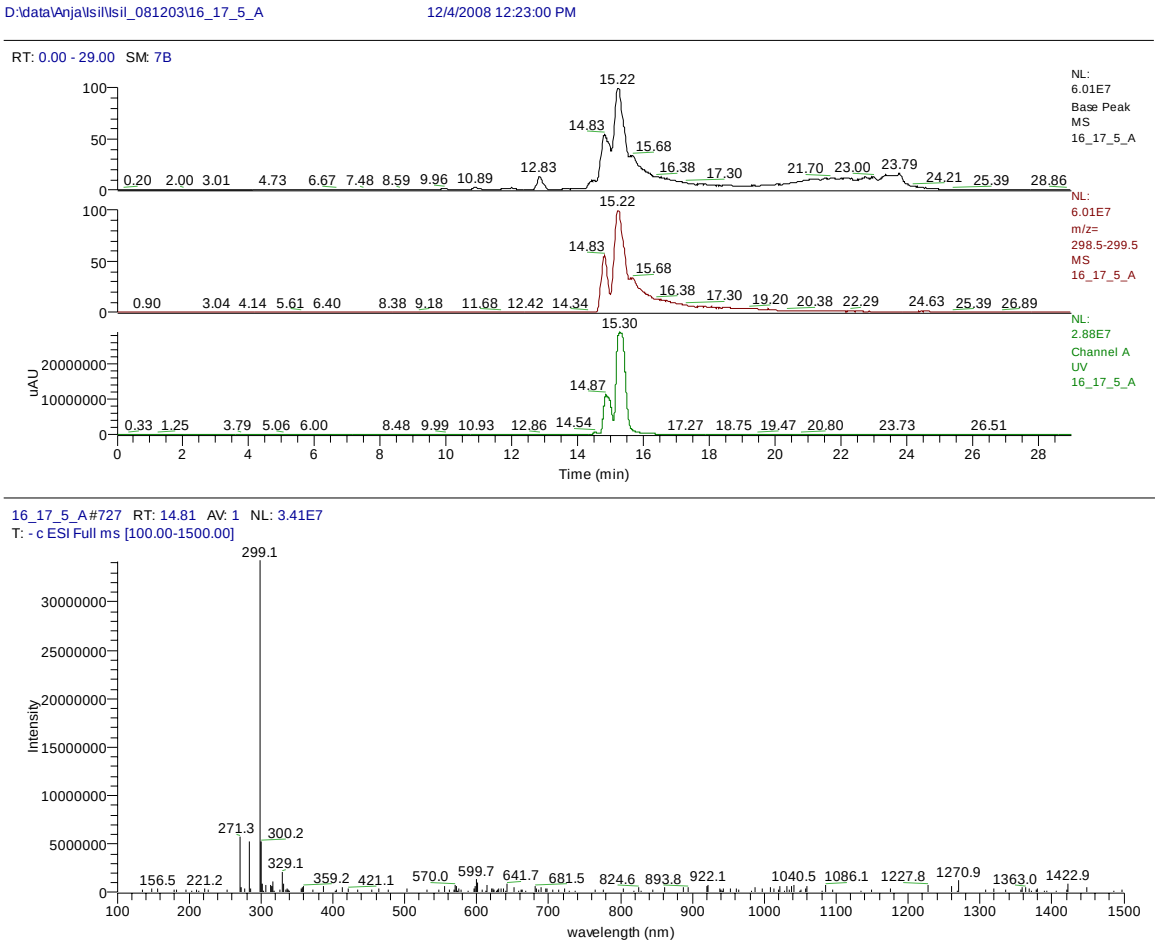
Şekil 4-33: ISUC 1 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3OD, 125 MHz)



Şekil 4-34: ISUC 1 bileşiğinin HMQC spektrumu (CD_3OD)

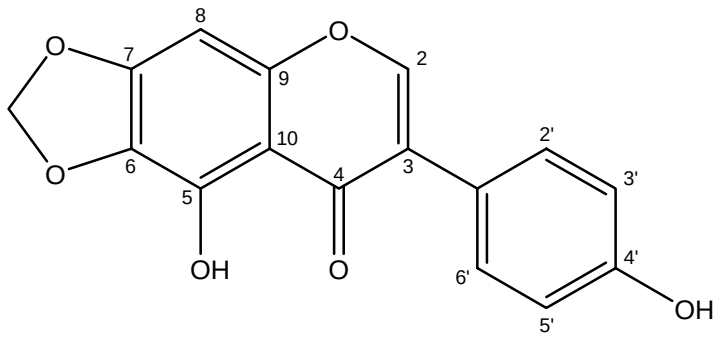


Şekil 4-35: ISUC 1 bileşiğinin HMBC spektrumu (CD_3OD)



Şekil 4-36: ISUC 1 bileşiğinin LC-MS kromatogramı

4.3.4.2. ISUC 2= İrilon



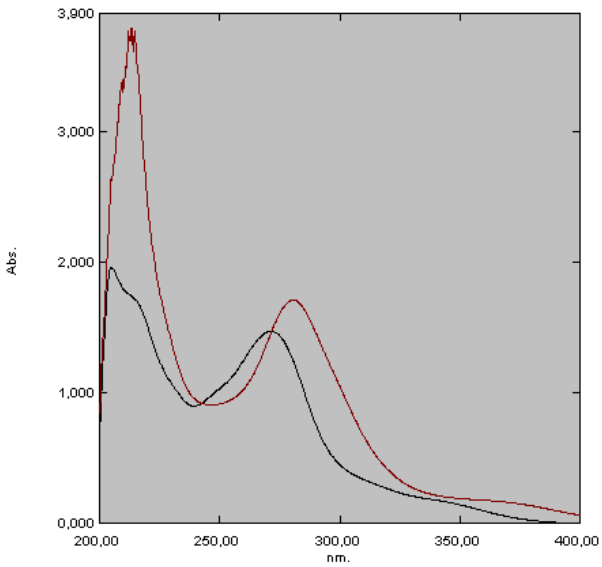
Şekil 4-37: İrilon

Sarı renkli olan ISUC 2 bileşiği katı halde elde edildi (24 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

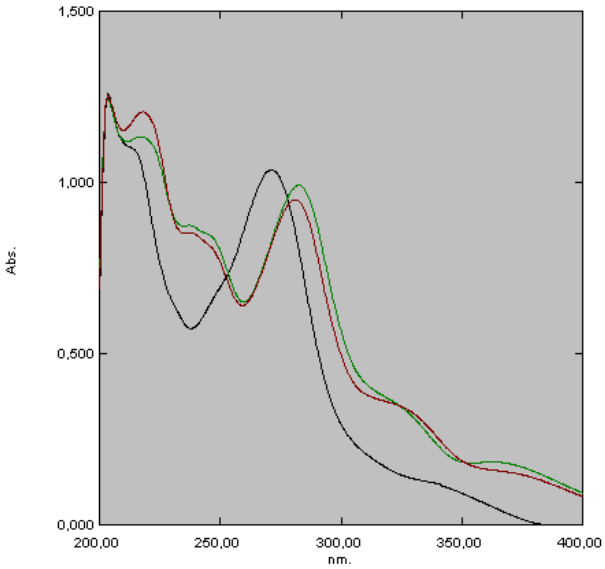
UV kayma belirteçleri ile alınan spektrumlarda (Şekil 4-38); MeOH: 205, 265 nm; +NaOMe: 213, 280 nm; MeOH+$AlCl_3$: 216, 237, 280, 326 nm; MeOH+$AlCl_3$+ HCl: 216, 237, 282, 363 nm; MeOH+NaOAc: 216, 248 (sh), 271, 344 nm; MeOH+NaOAc+ H_3BO_3: 216, 248 (sh), 271, 344 nm'lerde izlenen absorpsiyon bantları bileşiğin 5-OH, C-7'de oksijen fonksiyonu ve C-4' konumunda hidroksil grubu bulunan bir izoflavon olduğunu gösterdi.

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz) (Şekil 4-39) izoflavonların karakteristik piki olan H-2 protonu 7.82 ppm'de izlendi. δ 7.30 (2H, *brd, J*=8.30 Hz, H-2' ve H-6') ve 6.82'deki (2H, *brd, J*=8.30 Hz, H-3' ve H-5') pikler B halkasında 4' konumunun dolu olduğunu gösterdi. 6.44 ppm'de (1H, *s*) H-8 protonuna ait pik izlendi. 6.02 ppm'deki (2H, *brs*, O$\underline{CH_2}$O) pik A halkasına oksimetilen grubunun bağlı olduğunu gösterdi. 6.02 ppm'deki pikin 102.91 ppm'e karşılık geldiği görüldü. ^{13}C NMR (APT) değerleri Tablo 4-6'da verildi (Şekil 4-40). LC-MS kromatogramında bileşiğin molekül ağırlığı 297 $[M-1]^{+}$ olarak belirlendi (Şekil 4-41).

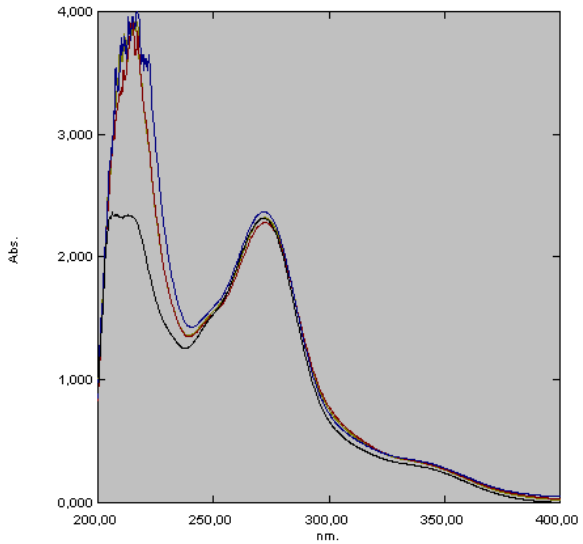
ISUC 2'in spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırıldı ve bileşiğin irilon olduğu belirlendi (Al-Khalil ve ark. 1994) (Şekil 4-37).



MeOH (205, 265 nm)
+NaOMe (213, 280 nm)



MeOH
+ $AlCl_3$ (216, 237, 280, 326 nm)
+$AlCl_3$/HCl (216, 237, 282, 363 nm)

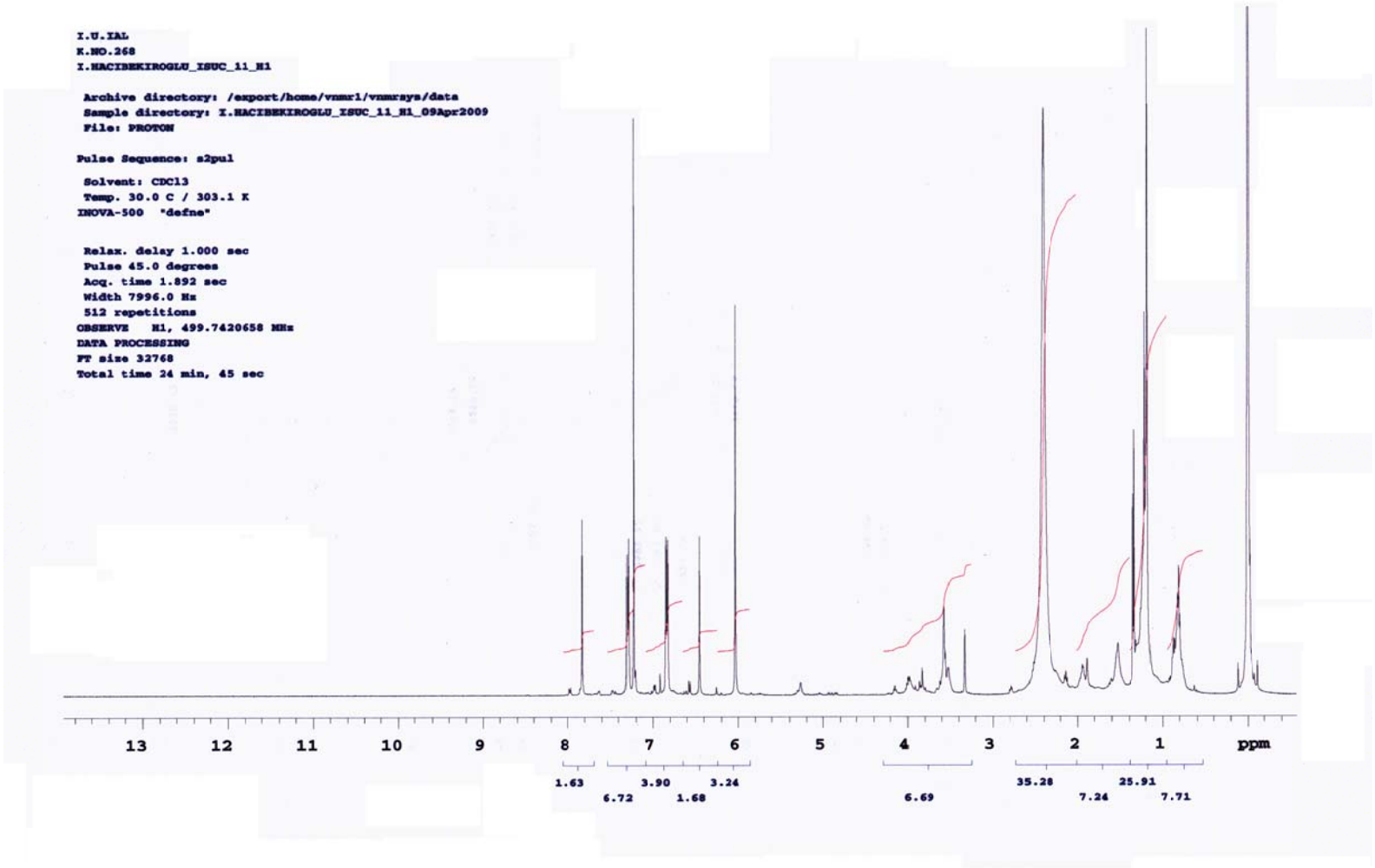


MeOH
+NaOAc (216, 248 (sh), 271, 344 nm)
+NaOAc/H_3BO_3 (216, 248 (sh), 271, 344 nm)

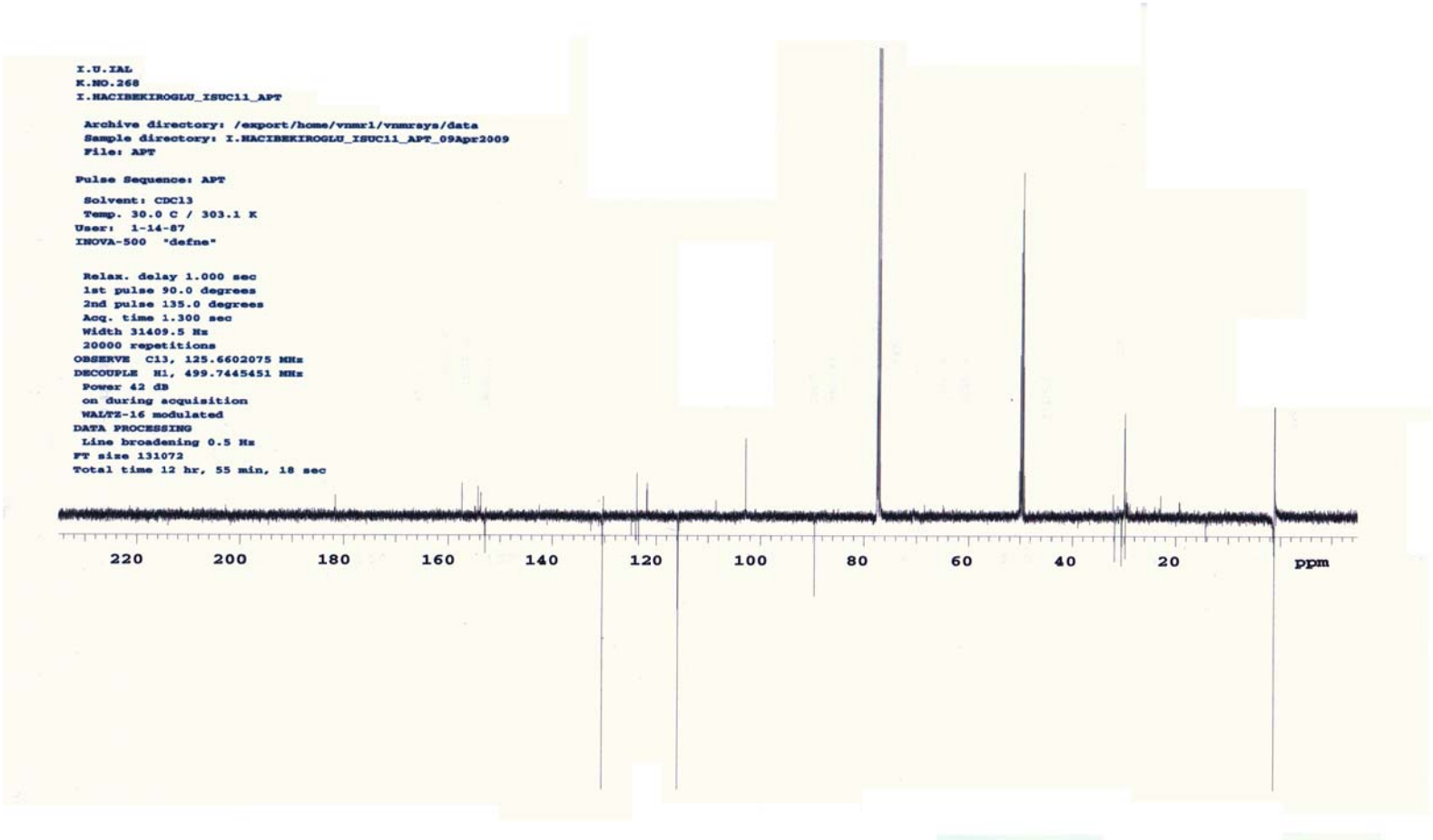
Şekil 4-38: ISUC 2 bileşiğinin kayma belirteçleri alınan UV spektrumları

Tablo 4-6: ISUC 2 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$+CD_3OD, 125 MHz)

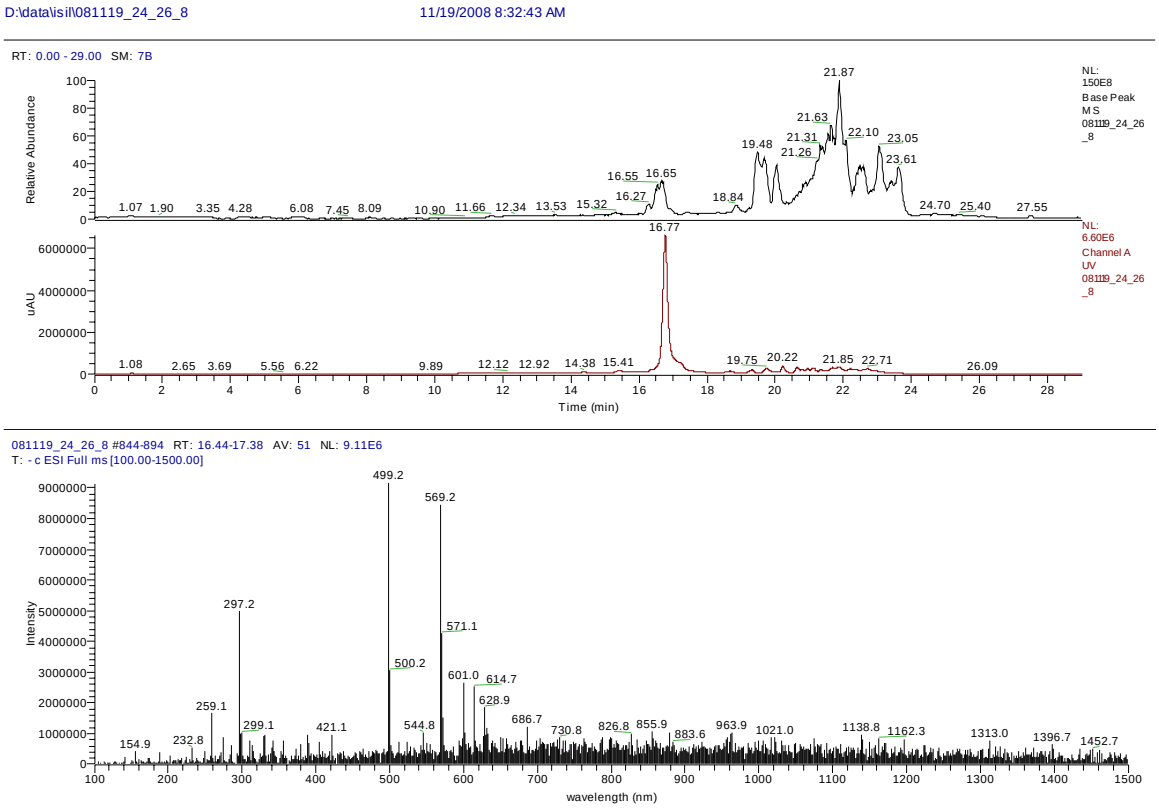
Pozisyon	^{13}C
2	152.97 *d*
3	123.83 *s*
4	181.66 *s*
5	153.83 *s*
6	142.33 *s*
7	157.28 *s*
8	89.51 *d*
9	154.31 *s*
10	108.51 *s*
1'	121.92 *s*
2'	130.42 *d*
3'	115.62 *d*
4'	157.39 *s*
5'	115.79 *d*
6'	130.30 *d*
O$\underline{CH_2}$O	102.91 *t*



Şekil 4-39: ISUC 2 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD, 500 MHz)

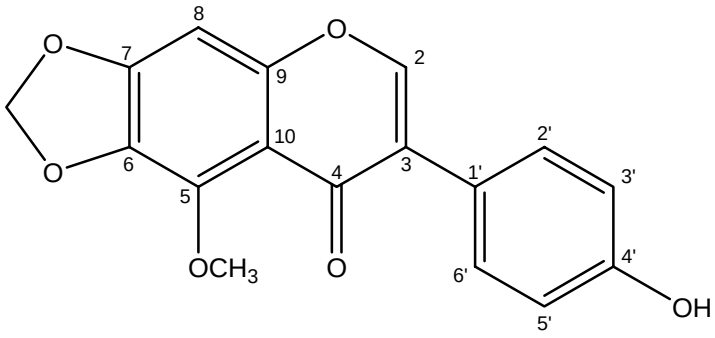


Şekil 4-40: ISUC 2 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$+ CD_3OD, 125 MHz)



Şekil 4-41: ISUC 2 bileşiğinin LC-MS kromatogramı

4.3.4.3. ISUC 3= Nigricin



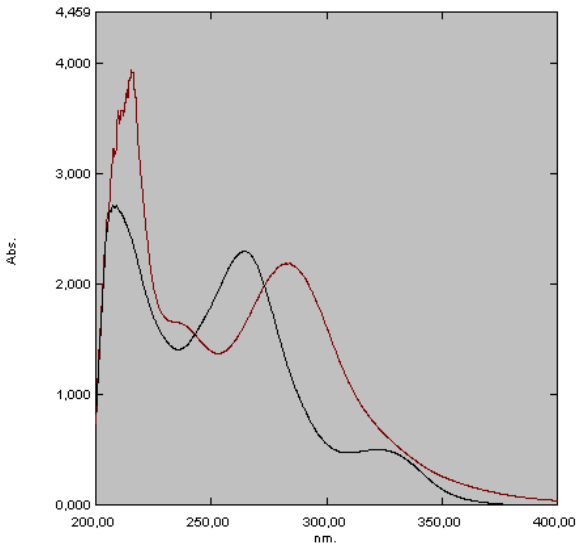
Şekil 4-42: Nigricin

Sarı renkli olan ISUC 3 bileşiği katı halde elde edildi (8,2 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında renklenme olmadı.

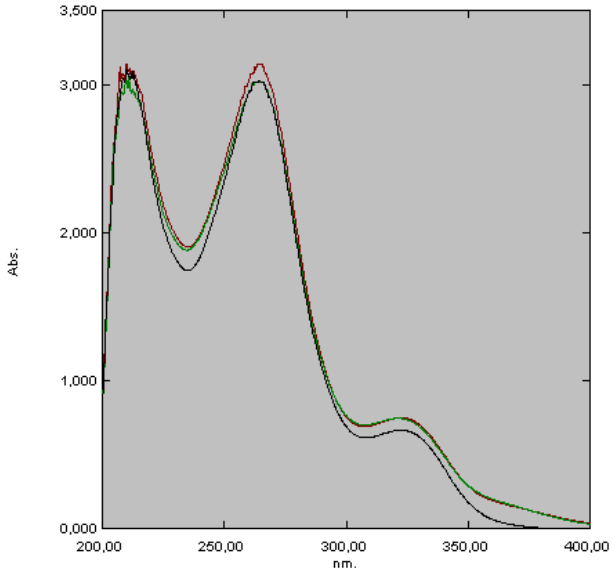
UV spektrumunda (Şekil 4-43) MeOH: 205, 265 ve 338 nm; +NaOMe: 209, 215, 238, 282 nm; MeOH+$AlCl_3$: 209, 262, 321 nm; MeOH+$AlCl_3$+HCl: 209, 262, 321 nm; MeOH+NaOAc: 213, 265, 327 nm; MeOH+NaOAc+H_3BO_3: 213, 265, 327 nm'de absorpsiyon bantları izlendi.

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz) (Şekil 4-44) H-2 protonu 7.73 ppm'de singlet olarak, 7.27 ppm'de (2H, *dd, J*=1.95; 6.35 Hz) H-2' ve H-6', 6.80 ppm'de (2H, *dd, J*=1.95; 6.35 Hz) H-3' ve H-5', 6.57 ppm'de H-8, oksimetilen protonları 6.00 ppm'de (2H, *brs*) ve 4.00 ppm'de (3H, *s,* OCH_3) C-5'teki metoksi grubu izlendi. MeOH+$AlCl_3$+HCl ile alınan spektrumdaki Bant II'nin (262 nm) MeOH ile alınan spektrumdaki Bant II (265 nm) ile yaklaşık olarak aynı yerde çıkması C-5'te metoksi grubunun bulunduğunu gösterdi. Ayrıca ^{13}C-NMR'da C-4'ün 175 ppm civarında çıkması C-5'te metoksi grubunun bulunduğunu doğruladı (Şekil 4-45). ^{13}C-NMR (APT) değerleri Tablo 4-7'de verildi.

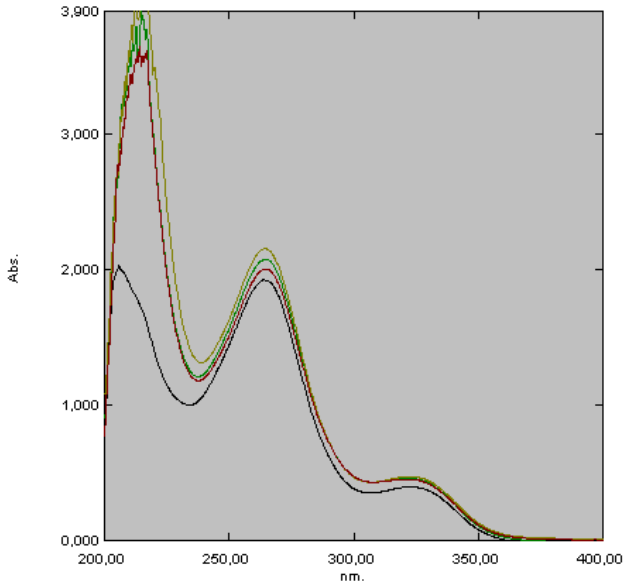
ISUC 3'ün spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırıldı ve bileşiğin nigricin olduğu belirlendi (Al-Khalil ve ark. 1994) (Şekil 4-42).



MeOH (205, 265, 338 nm)
+NaOMe (209, 215, 238, 282 nm)



MeOH
+$AlCl_3$ (209, 262, 321 nm)
+$AlCl_3$/HCl (209, 262, 321 nm)

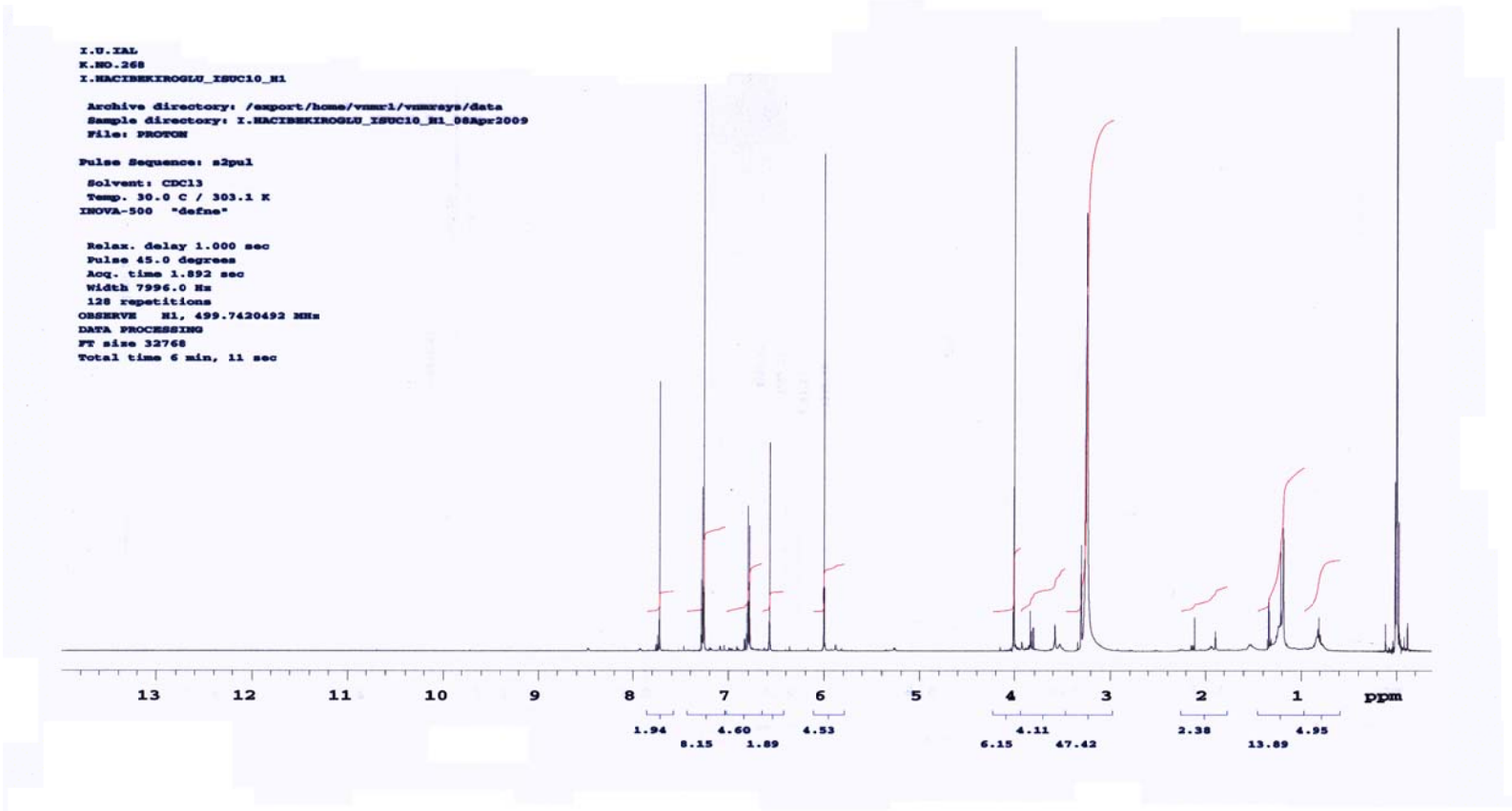


MeOH
+NaOAc (213, 265, 327 nm)
+NaOAc/ H_3BO_3 (213, 265, 327 nm)

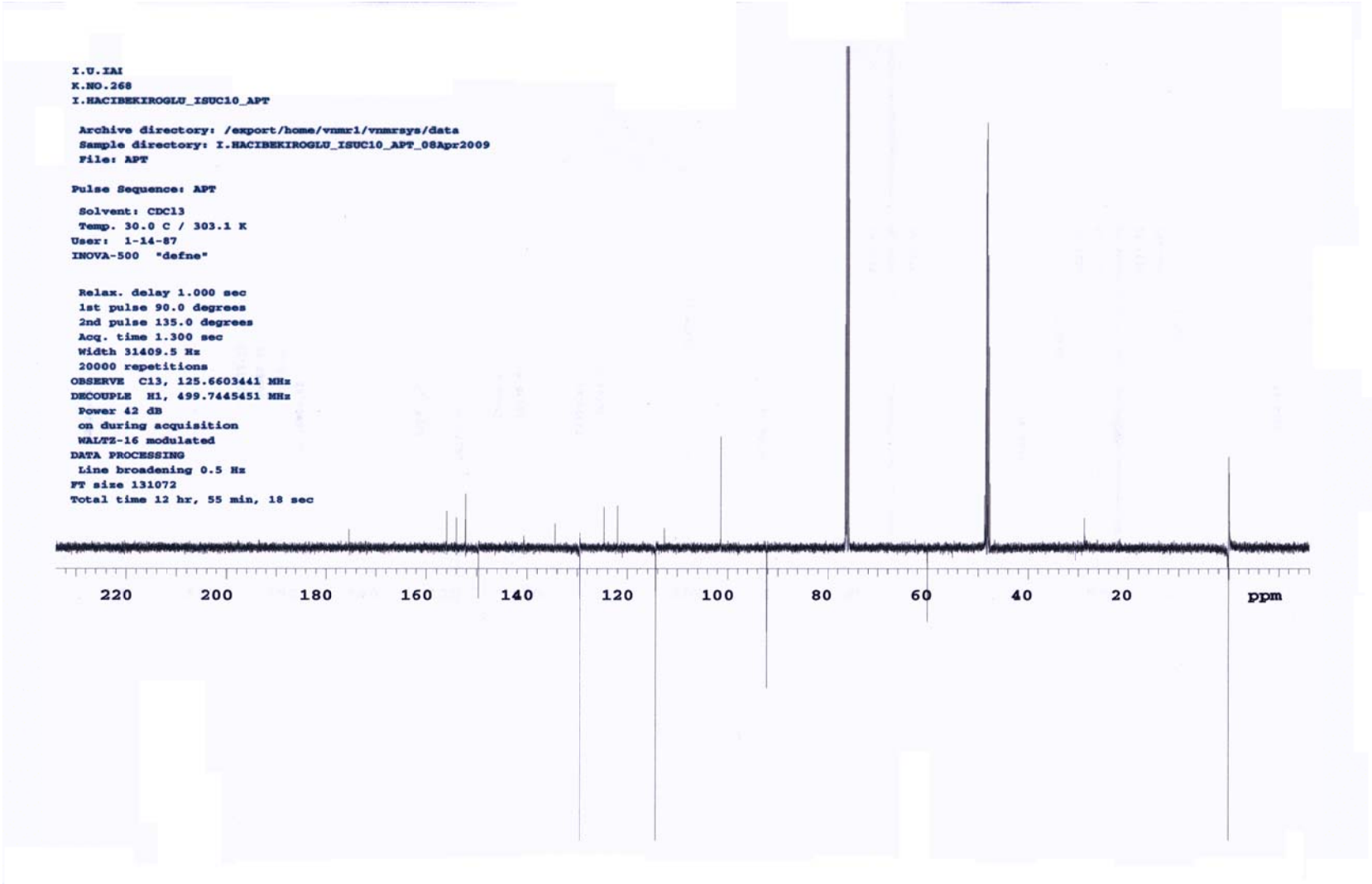
Şekil 4-43: ISUC 3 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları

Tablo 4-7: ISUC 3 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$+CD_3OD, 125 MHz)

Pozisyon	^{13}C
2	149.65 *d*
3	124.67 *s*
4	175.27 *s*
5	152.15 *s*
6	134.34 *s*
7	153.98 *s*
8	92.19 *d*
9	153.03 *s*
10	112.56 *s*
1'	121.99 *s*
2'	129.49 *d*
3'	114.36 *d*
4'	155.99 *s*
5'	114.36 *d*
6'	129.49 *d*
OCH_3	60.01 *q*
O$\underline{CH_2}$O	102.40 *t*

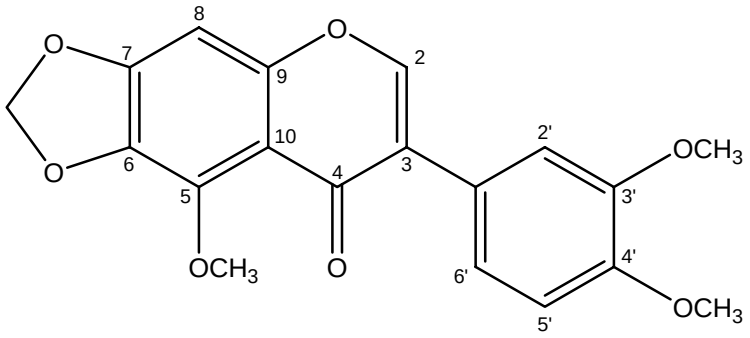


Şekil 4-44: ISUC 3 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD, 500 MHz)



Şekil 4-45: ISUC 3 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$+CD_3OD, 125 MHz)

4.3.4.4. ISUC 4= İriskumaonin metil eter



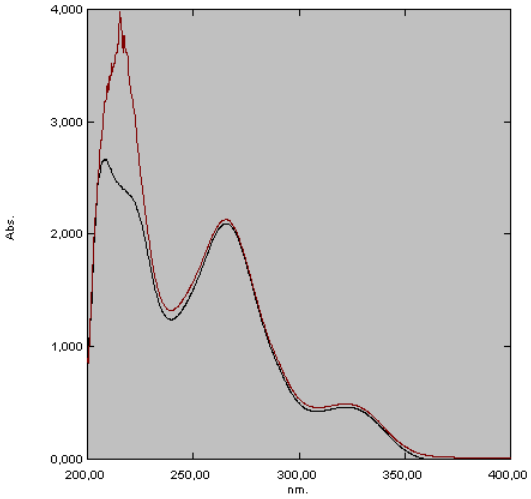
Şekil 4-46: İriskumaonin metil eter

Beyaz renkli olan ISUC 4 bileşiği katı halde elde edildi (30 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

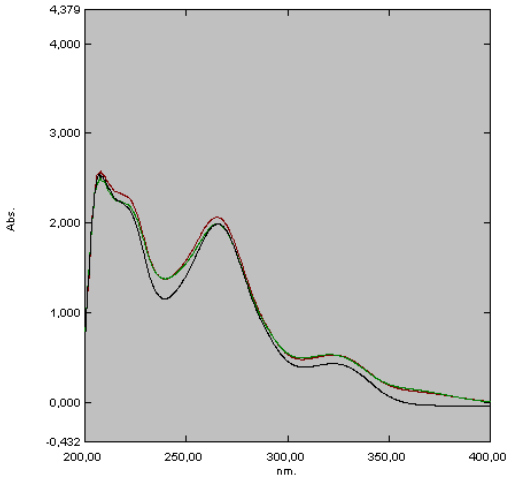
UV spektrumunda (Şekil 4-47) MeOH: 205, 266, 321 nm; +NaOMe: 209, 266, 321 nm; MeOH+$AlCl_3$: 205, 266, 321 nm; MeOH+$AlCl_3$+HCl: 205, 266, 321 nm; MeOH+NaOAc: 214, 220, 266, 321 nm; MeOH+NaOAc+H_3BO_3: 214, 220, 266, 321 nm'de absorpsiyon bantları izlendi.

^{1}H NMR spektrumunda (CD_3OD, 500 MHz) (Şekil 4-48) izoflavonların karakteristik piki olan H-2 protonu 7.73 ppm'de izlendi. 7.12 ppm'de (1H, *d, J*=1.96 Hz, H-2'), 6.83'te (1H, *d, J*=8.30 Hz, H-5'), 6.94'te (1H, *dd*, *J*=1.96; 8.29 Hz, H-6') izlenen pikler B halkasında 3' ve 4' konumlarının dolu olduğunu gösterdi. 6.57 ppm'de (1H, *s*) H-8 protonu, 6.00 ppm'de (2H, *brs*, O$\underline{CH_2}$O) izlenen pik A halkasında oksimetilen grubunu ve 4.01 ppm'deki pik (3H, *s,* OCH_3) C-5'te metoksi grubunu gösterdi. ^{13}C NMR (APT) değerleri Tablo 4-8'de (Şekil 4-49), HMQC ve HMBC spektrumları Şekil 4-50 ve 4-51'de verildi.

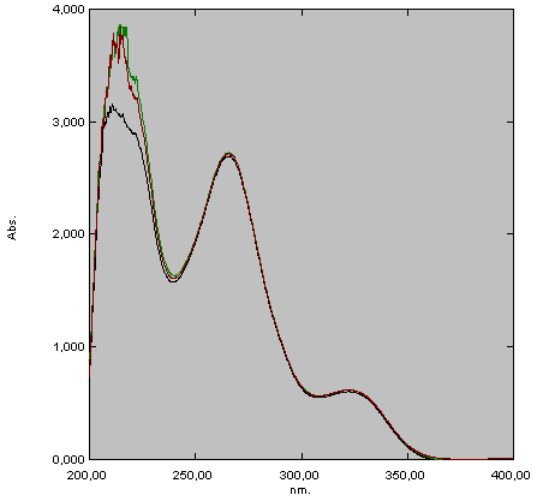
ISUC 4'ün spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırıldı ve bileşiğin iriskumaonin metil eter olduğu belirlendi (Veitch ve ark. 2003) (Şekil 4-46).



MeOH (205, 266, 321 nm)
+NaOMe (209, 266, 321 nm)



MeOH
+$AlCl_3$ (205, 266, 321 nm)
+$AlCl_3$/HCl (205, 266, 321nm)

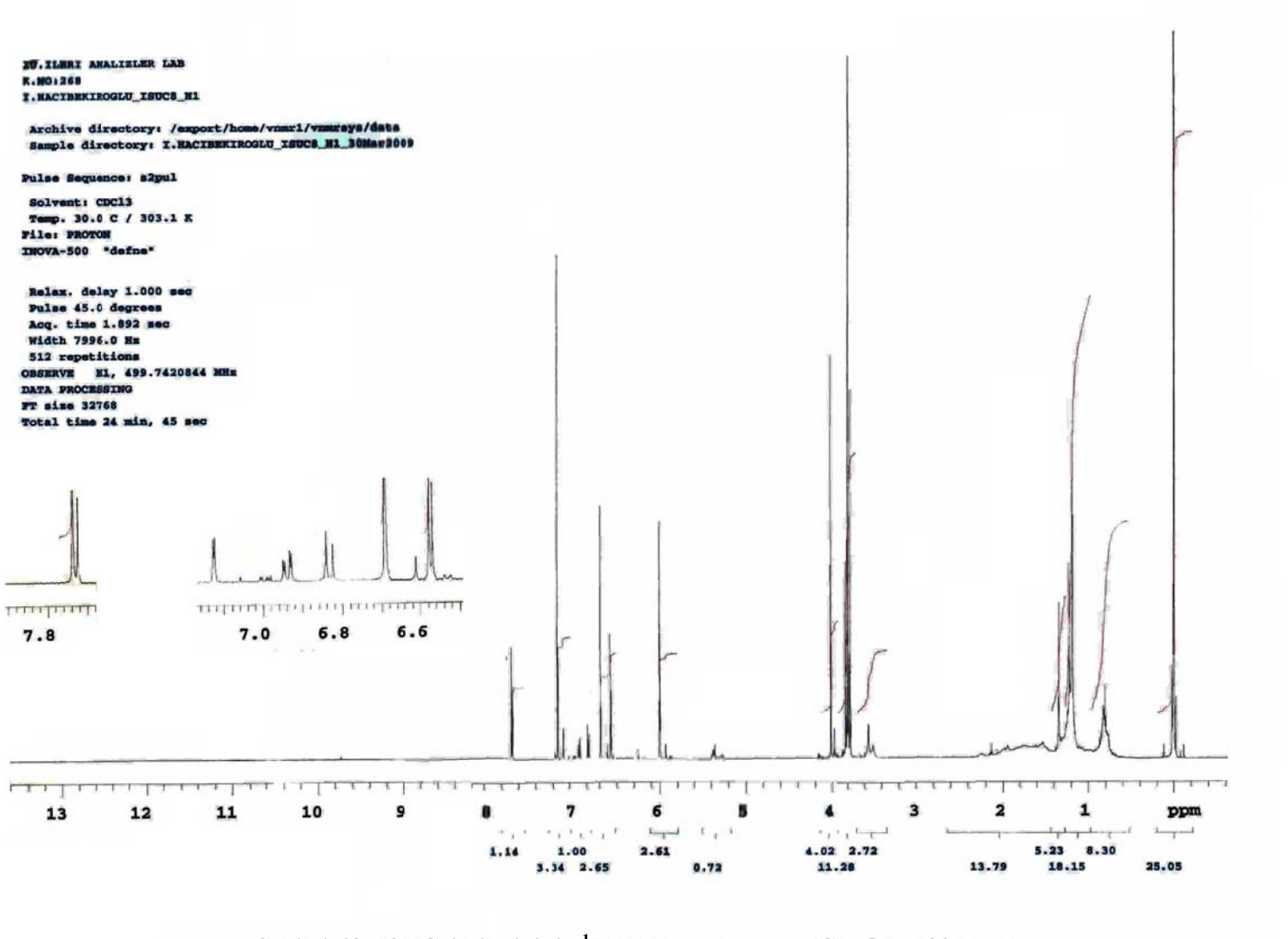


MeOH
+NaOAc (211, 214, 220, 266, 321 nm)
+NaOAc/ H_3BO_3 (211, 214, 220, 266, 321 nm)

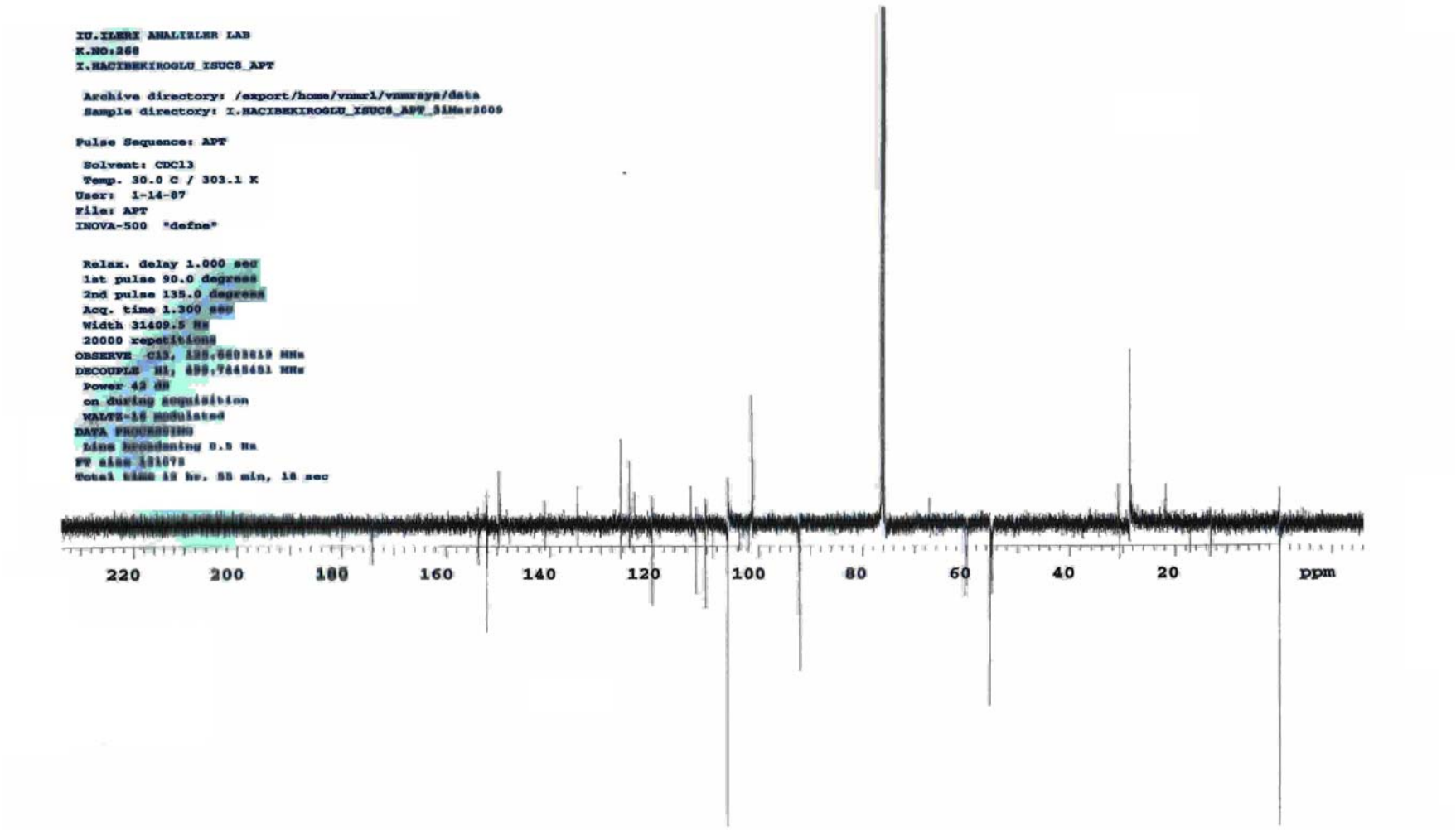
Şekil 4-47: ISUC 4 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları

Tablo 4-8: ISUC 4 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri (CD_3OD, 125 MHz)

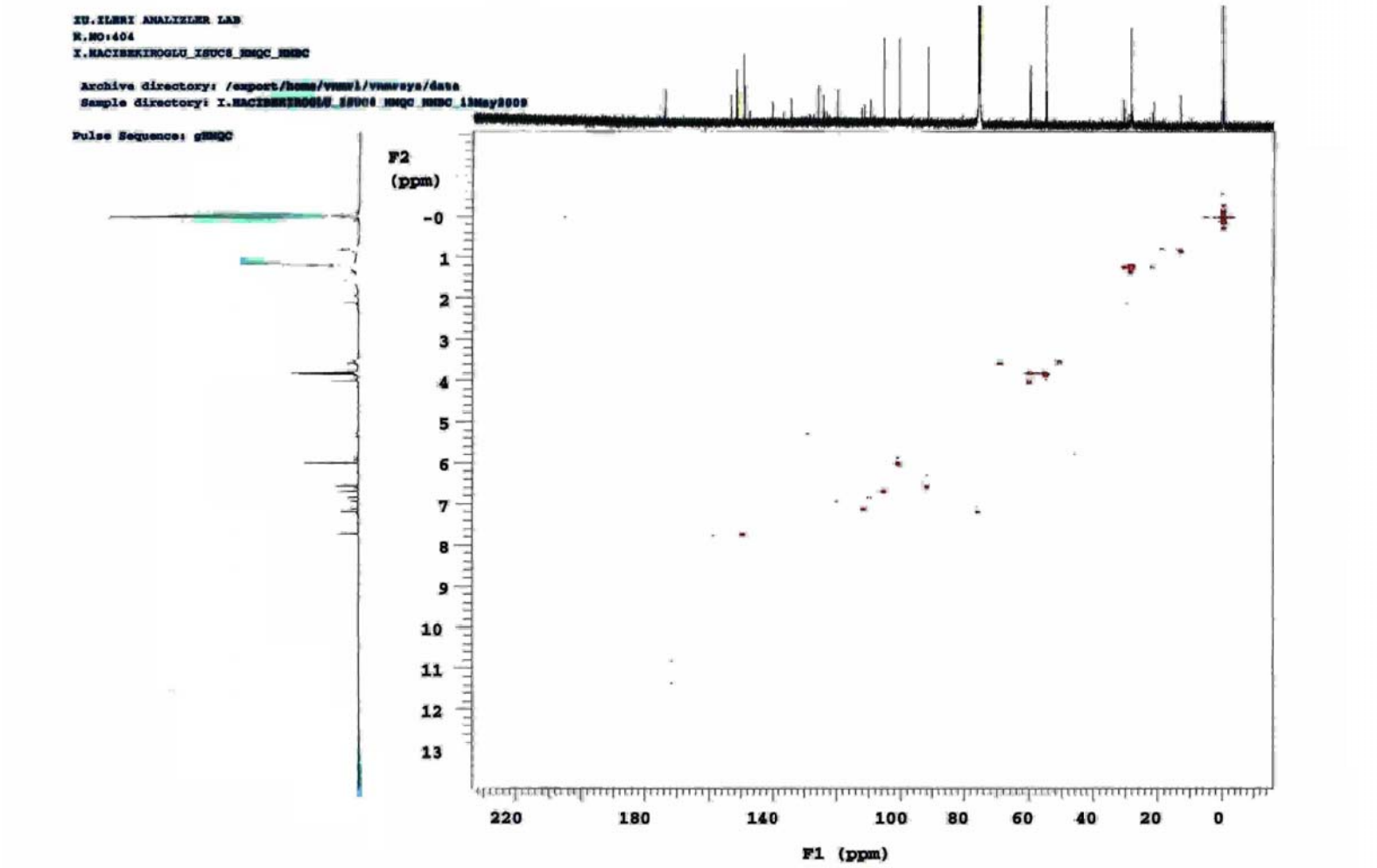
Pozisyon	^{13}C
2	149.74 *d*
3	126.39 *s*
4	174.22 *s*
5	153.67 *s*
6	134.62 *s*
7	153.10 *s*
8	92.24 *d*
9	152.14 *s*
10	112.81 *s*
1'	124.71 *s*
2'	111.94 *d*
3'	149.41 *d*
4'	149.72 *s*
5'	110.11 *d*
6'	123.66 *d*
OCH_3-5	60.27 *q*
OCH_3-3'	55.29 *q*
OCH_3-4'	55.19 *q*
O$\underline{CH_2}$O	101.21 *t*



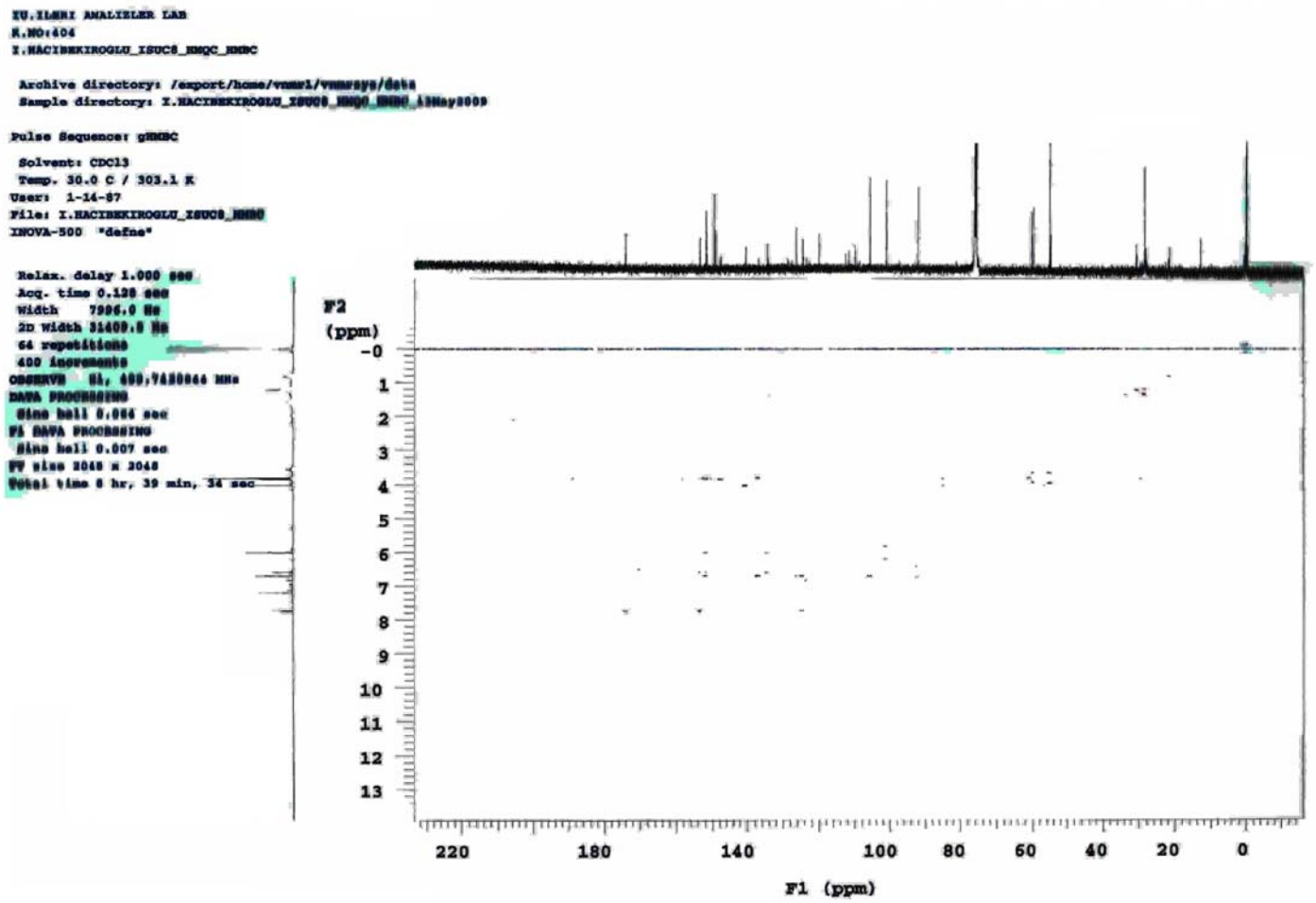
Şekil 4-48: ISUC 4 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (CD_3OD, 500 MHz)



Şekil 4-49: ISUC 4 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3OD. 125 MHz)

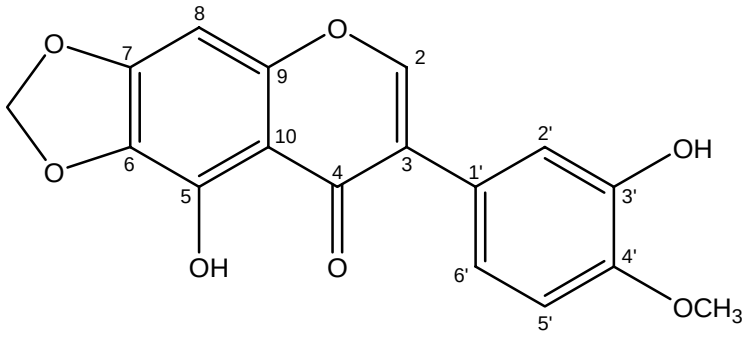


Şekil 4-50: ISUC 4 bileşiğinin HMQC spektrumu (CD_3OD)



Şekil 4-51: ISUC 4 bileşiğinin HMBC spektrumu (CD_3OD)

4.3.4.5. ISUC 5= Soforanarin A



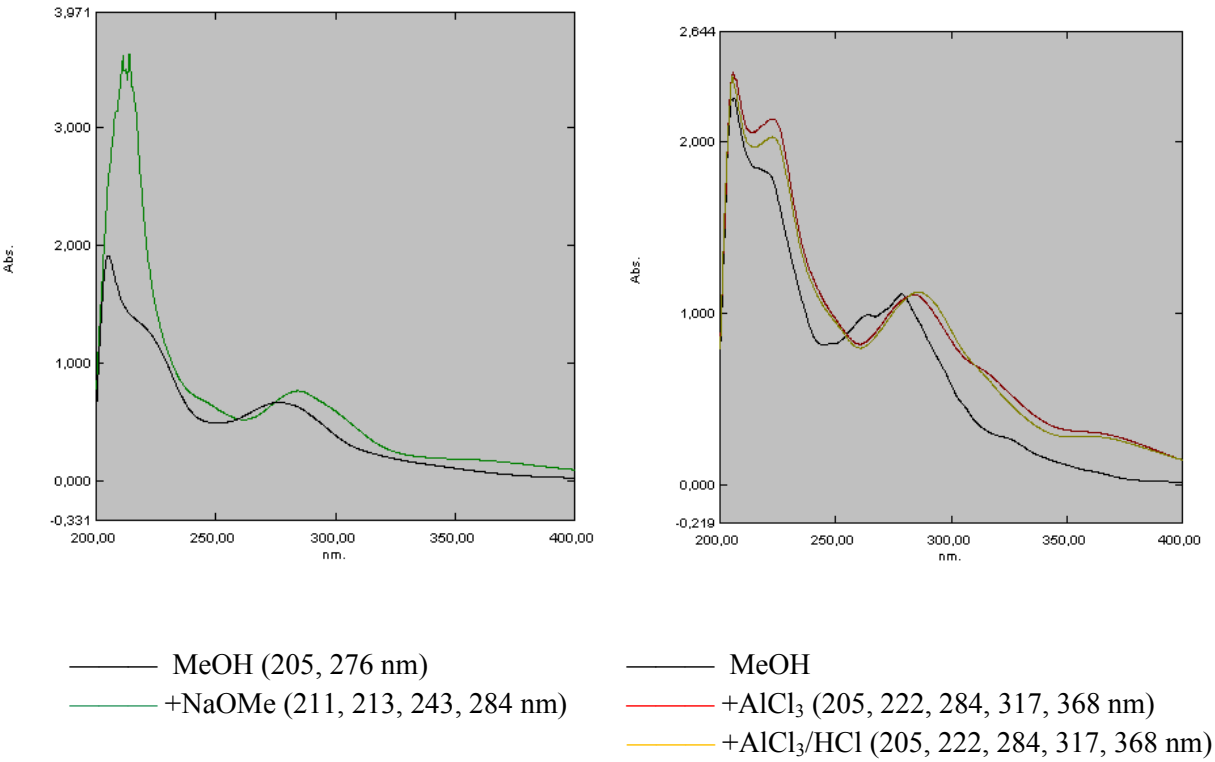
Şekil 4-52: Soforanarin A

Sarı renkli olan ISUC 5 bileşiği katı halde elde edildi (1,9 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında renk görülmedi.

UV spektrumunda (Şekil 4-53) MeOH: 205, 276 nm; +NaOMe: 211, 213, 243, 284 nm; MeOH+$AlCl_3$: 205, 222, 284, 317, 368 nm; MeOH+$AlCl_3$+HCl: 205, 222, 284, 317, 368 nm; MeOH+NaOAc: 213, 217, 274, 349 nm; MeOH+NaOAc+H_3BO_3: 213, 217, 274, 349 nm'de absorpsiyon bantları izlendi.

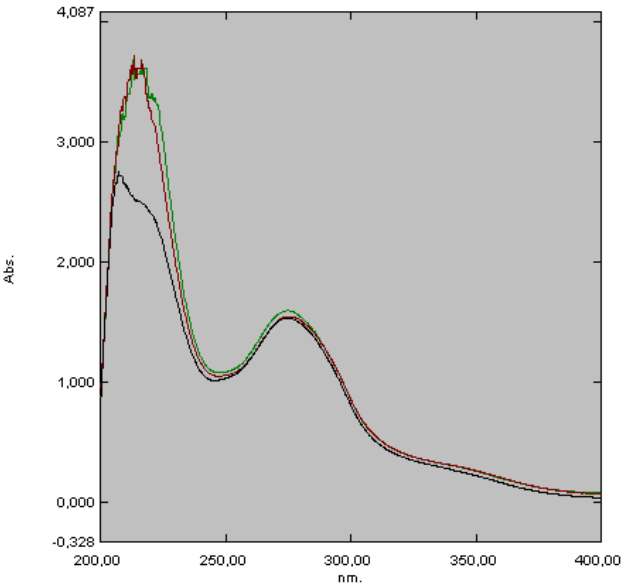
^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, 500 MHz) (Şekil 4-54) izoflavonların karakteristik piki olan H-2 protonu 7.83 ppm'de izlendi. 7.00 ppm'de (1H, *d, J*=2.0 Hz, H-2'), 6.53 ppm'de (1H, *d, J*=8.29 Hz, H-5') ve 6.89 ppm'de (1H, *dd, J*=2.0;8.29 Hz, H-6') izlenen pikler 3' ve 4' konumlarının dolu olduğunu gösterdi. 3.87 ppm'de 4' konumundaki metoksi grubuna ait pik izlendi. 6.44 ppm'de (1H, *s*) H-8 protonu, 6.04 ppm'de (2H, *brs*, O$\underline{CH_2}$O) izlenen pik A halkasında oksimetilen grubunun olduğunu ve 12.7 ppm'deki pik (1H, *s,* OH) C-5'teki OH grubu ile C-4'teki karbonil grubu arasındaki hidrojen bağını gösterdi.

ISUC 5'in spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırıldı ve bileşiğin soforanarin A olduğu belirlendi (Atta-ur-Rahman ve ark. 2004) (Şekil 4-52).



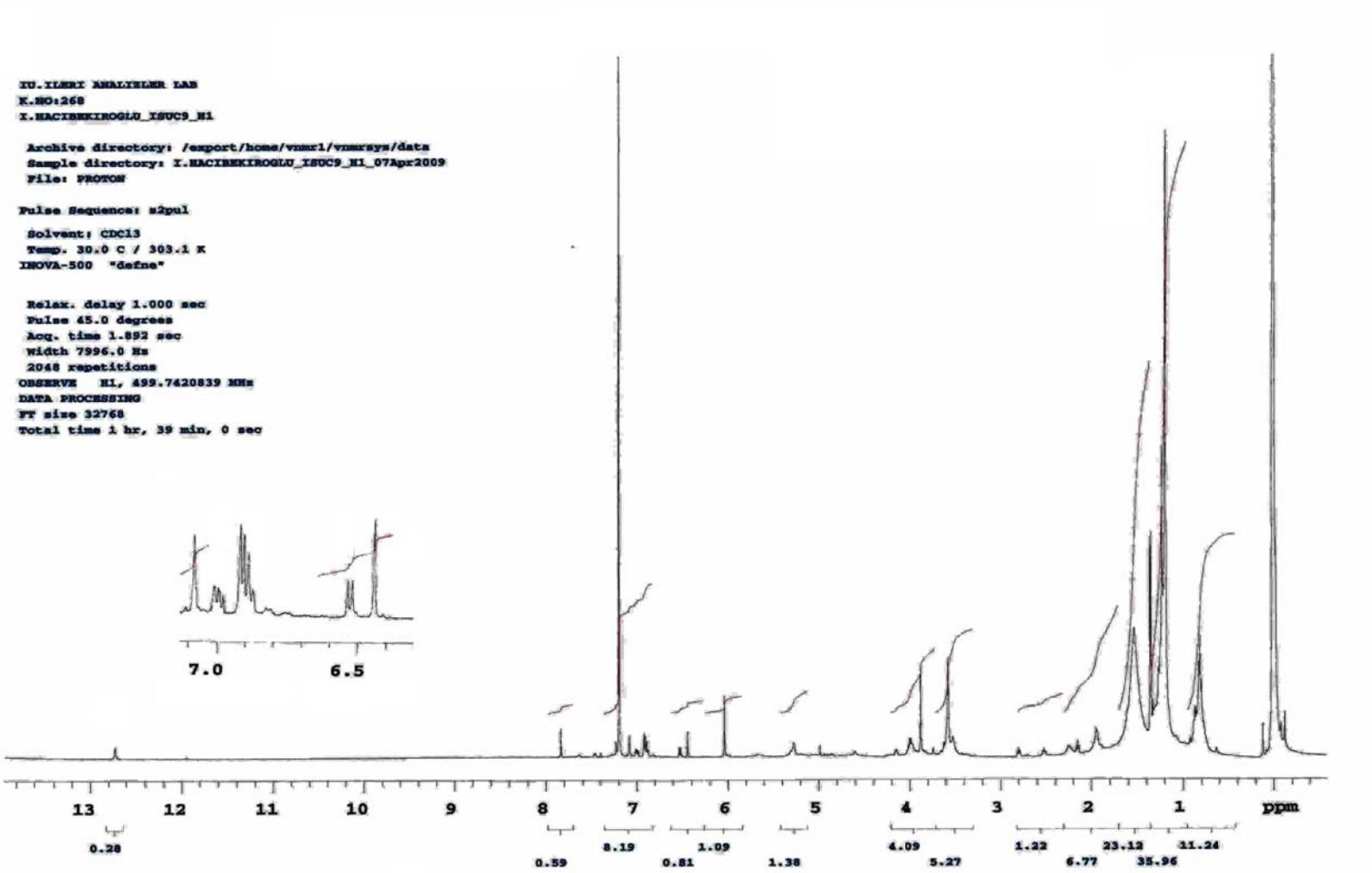
MeOH (205, 276 nm)
+NaOMe (211, 213, 243, 284 nm)

MeOH
+$AlCl_3$ (205, 222, 284, 317, 368 nm)
+$AlCl_3$/HCl (205, 222, 284, 317, 368 nm)



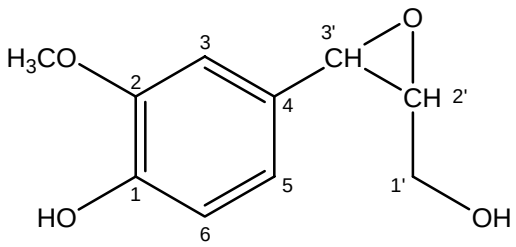
MeOH
+NaOAc (213, 217, 274, 349 nm)
+NaOAc/H_3BO_3 (213, 217, 274, 349 nm)

Şekil 4-53: ISUC 5 bileşiğinin kayma belirteçleri ile alınan UV spektrumları



Şekil 4-54: ISUC 5 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)

4.3.4.6. ISUC 6= *cis*-Epoksiconiferil alkol



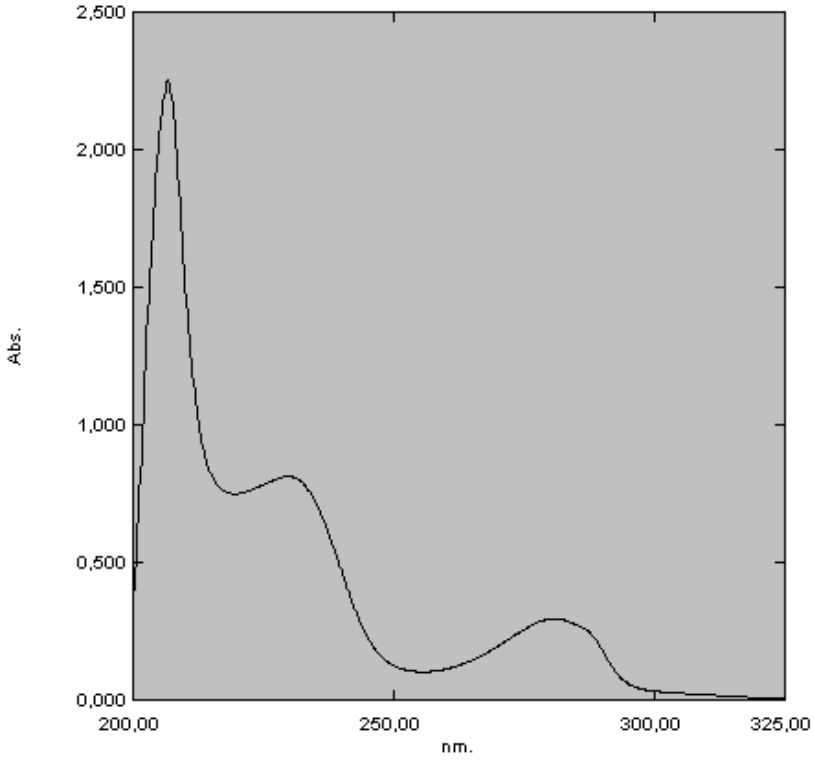
Şekil 4-55: *cis*-Epoksiconiferil alkol

Sarı renkli olan ISUC 6 bileşiği katı halde elde edildi (5 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) 206, 229 ve 280 nm'de bantlar görüldü (Şekil 4-56).

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, 500 MHz) (Şekil 4-57) δ 6.83'te (1H, *d*, *J*=1.46 Hz) H-3, 6.75'te (1H, *dd*, *J*=1.95; 7.32 Hz) H-5, 6.81'de (1H, *d*, *J*=7.80 Hz) H-6, 4.18'de (1H, *dd, J*=6.83; 9.27; Hz) H-1'*a*, 3.81'de (1H, *dd, J*= 3.42; 9.27 Hz) H-1'*b,* 3.03'te (1H, *m*) H-2', 4.67'de (1H, *d, J*=4.39 Hz) H-3' ve 3.84'te (3H, *s*) OCH_3 grubuna ait pik izlendi. ISUC 6 bileşiğinin ^{13}C NMR (APT) değerleri Tablo 4-9'da (Şekil 4-58), HMQC ve HMBC spektrumları Şekil 4-59 ve 4-60'da verildi.

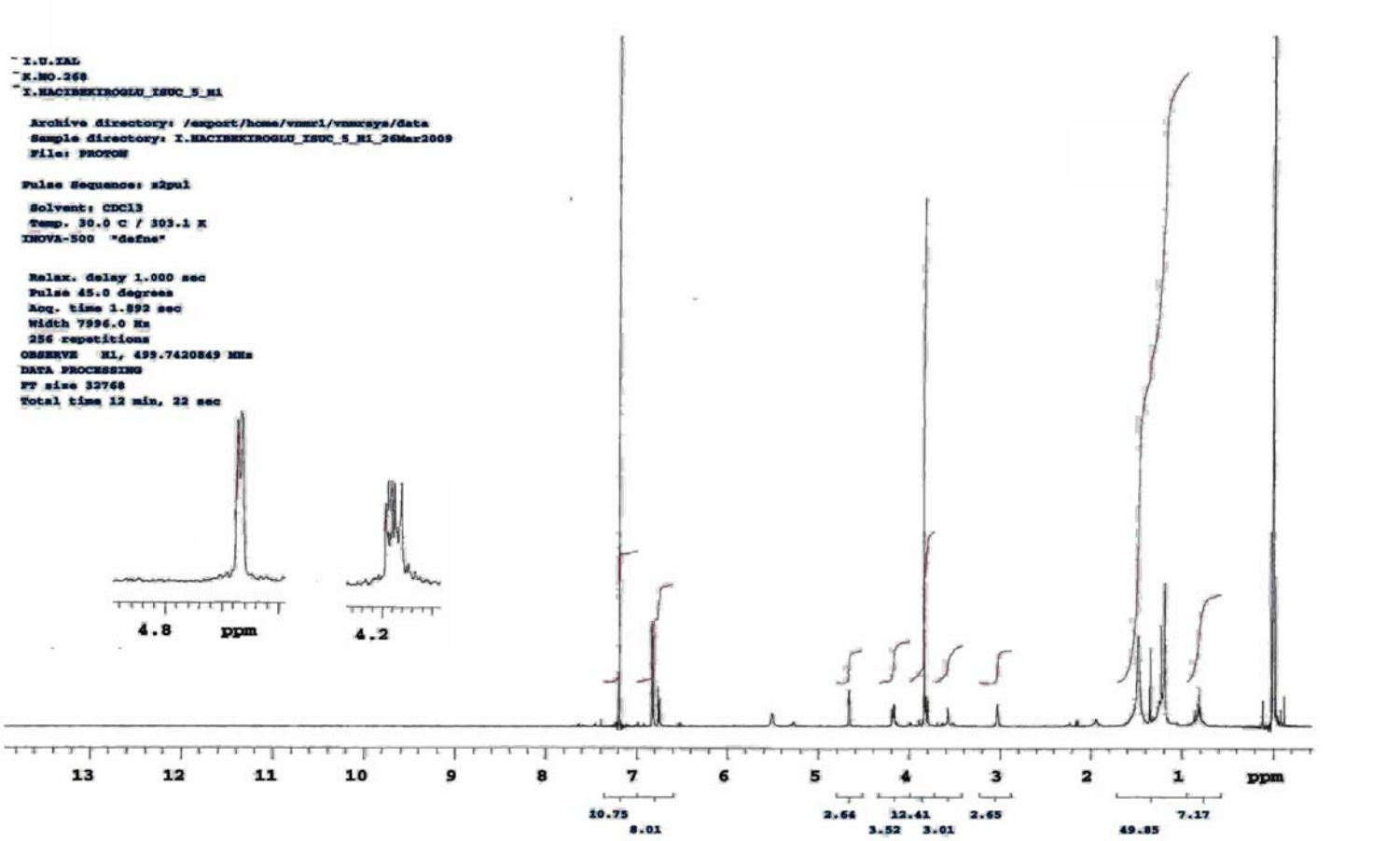
Spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırılan ISUC 6 bileşiğinin *cis*-epoksiconiferil alkol olduğu belirlendi (Guz ve Stermitz 2000) (Şekil 4-55). Bu bileşik *Iris* türlerinden ilk kez elde edildi.



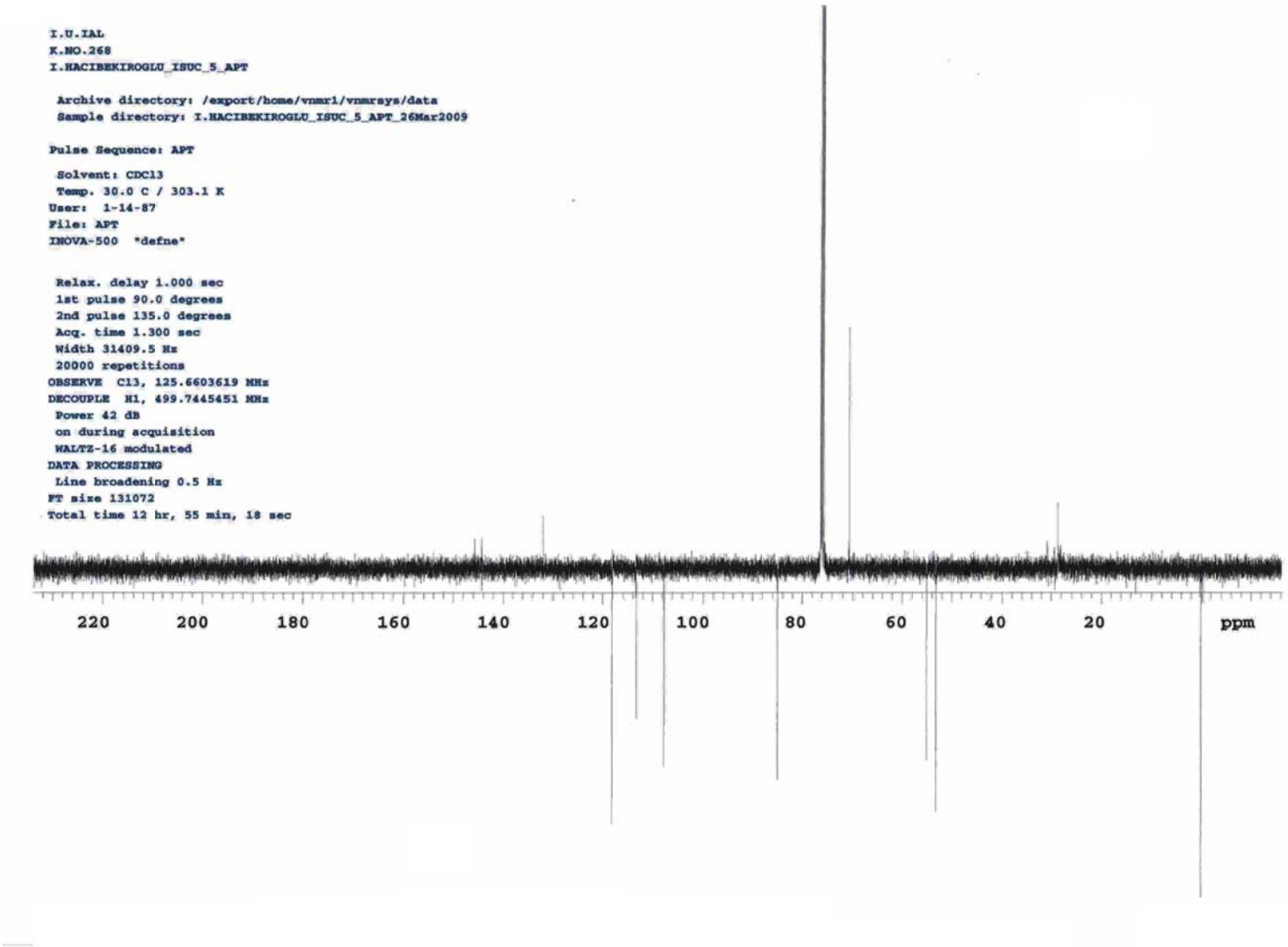
Şekil 4-56: ISUC 6 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)

Tablo 4-9: ISUC 6 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$, 125 MHz)

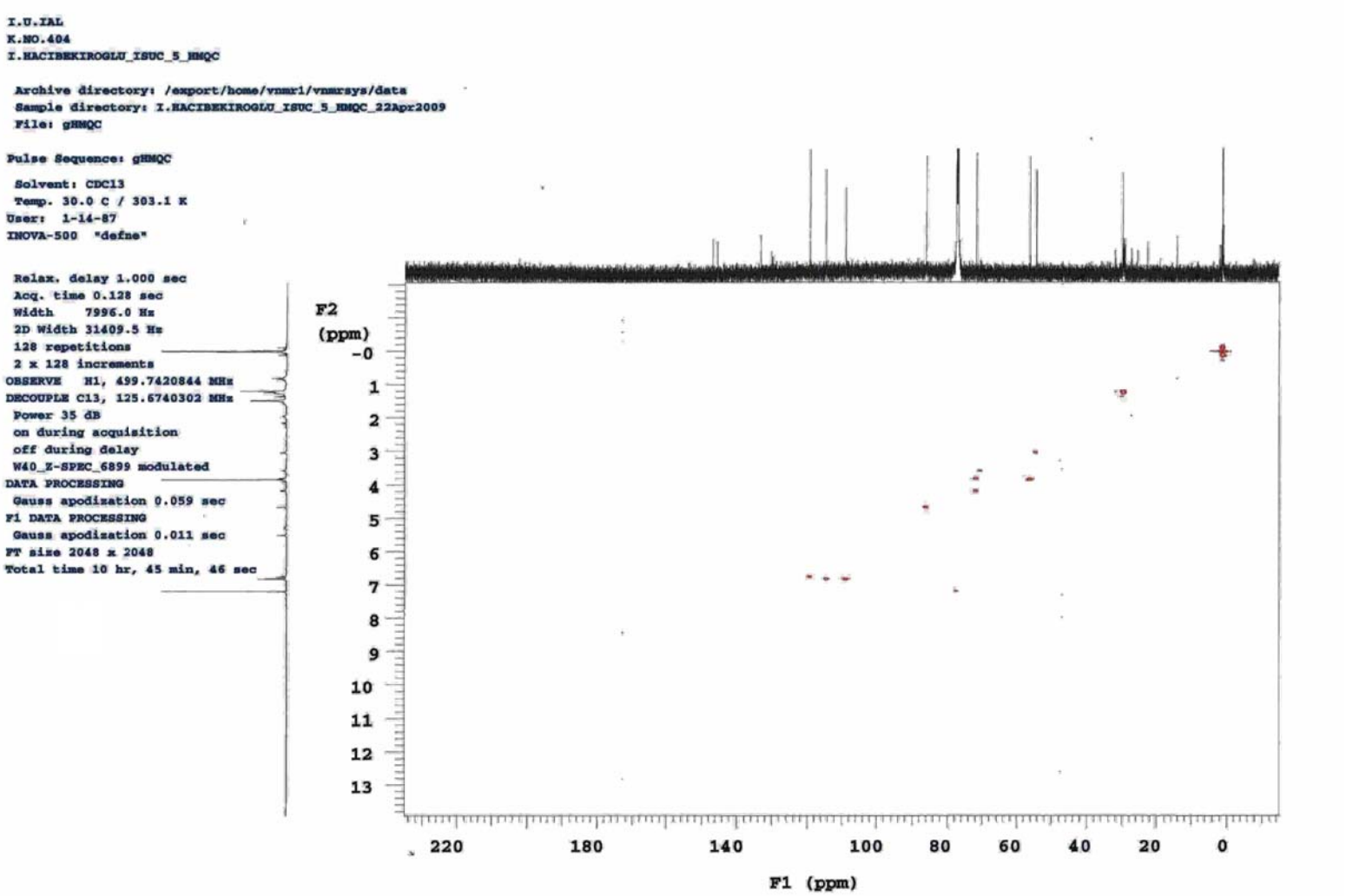
Pozisyon	^{13}C
1	144.28 *s*
2	145.71 *s*
3	107.63 *d*
4	131.98 *s*
5	117.97 *d*
6	113.28 *d*
1'	70.69 *t*
2'	53.20 *d*
3'	84.88 *d*
OCH_3	54.98 *q*



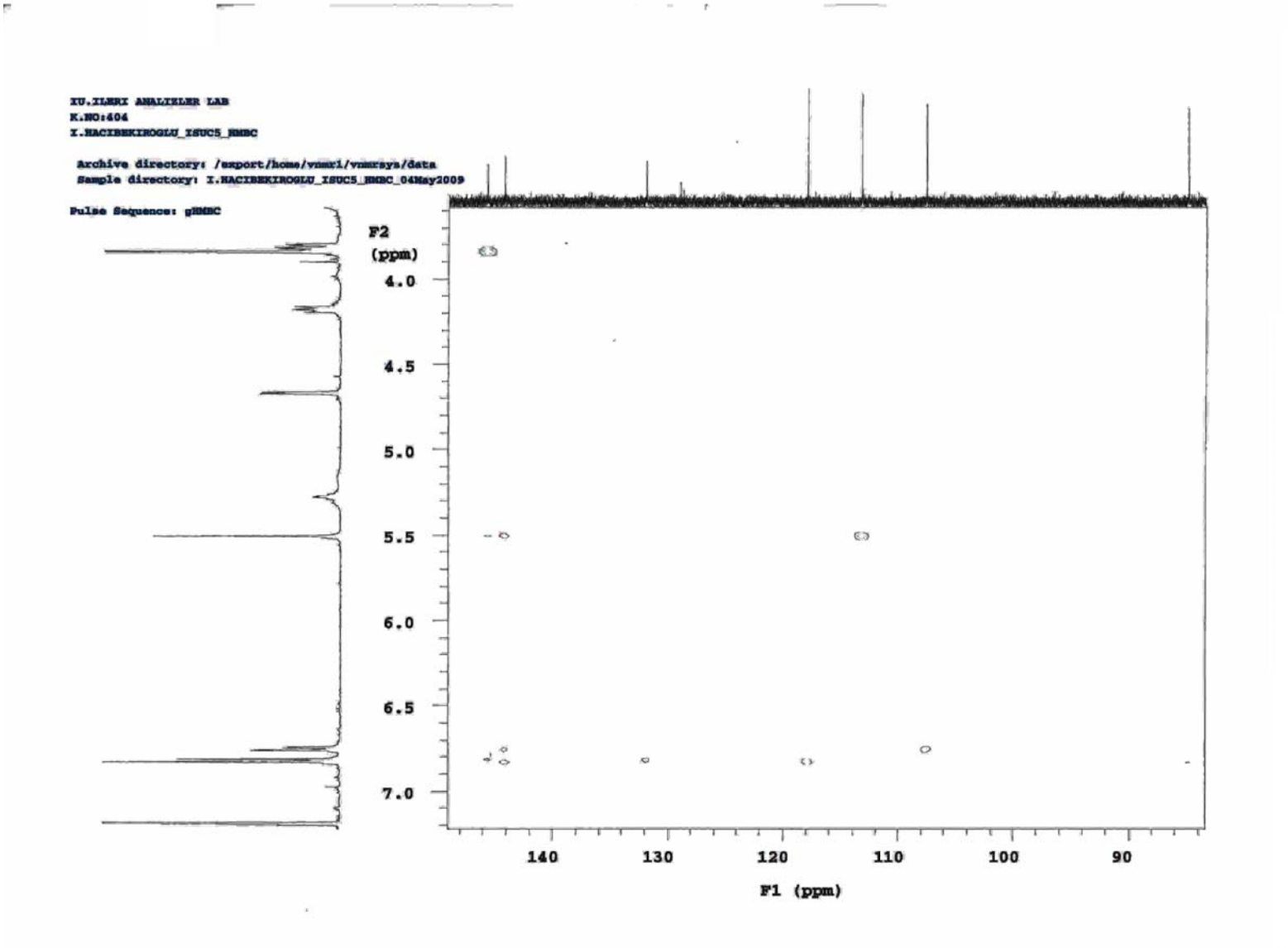
Şekil 4-57: ISUC 6 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 500 MHz)



Şekil 4-58: ISUC 6 bileşiğinin APT spektrumu ($CDCl_3$, 125MHz)

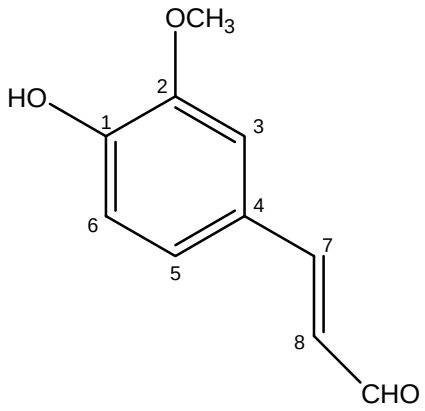


Şekil 4-59: ISUC 6 bileşiğinin HMQC spektrumu ($CDCl_3$)



Şekil 4-60: ISUC 6 bileşiğinin HMBC spektrumu ($CDCl_3$)

4.3.4.7. ISUC 7= Coniferaldehit



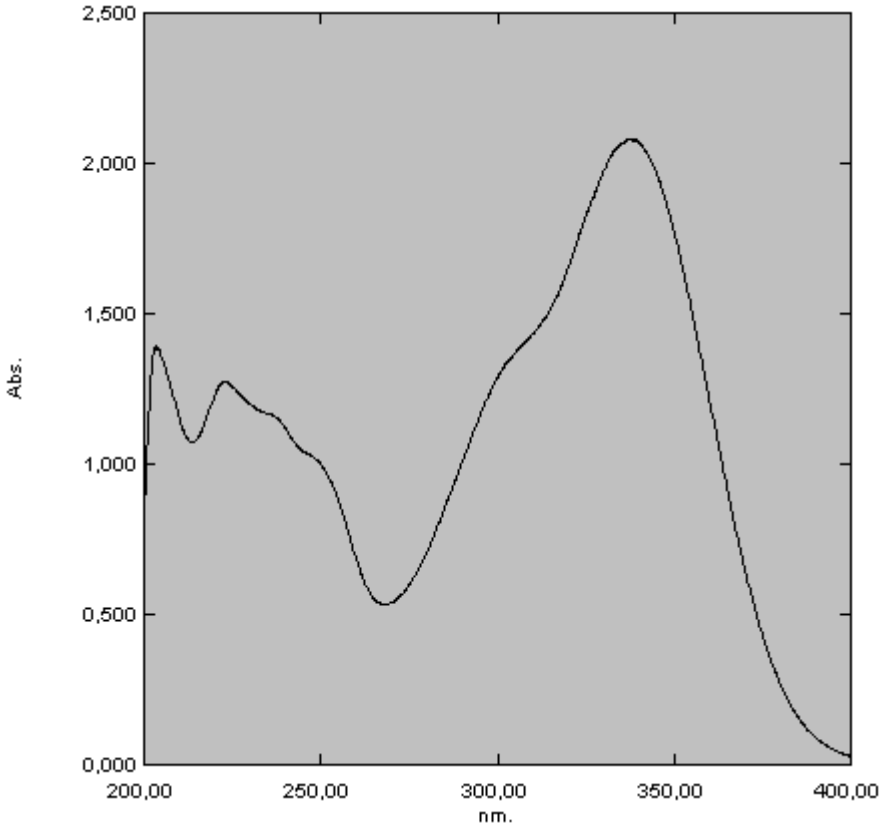
Şekil 4-61: Coniferaldehit

Sarı renkli olan ISUC 7 bileşiği katı halde elde edildi (3,5 mg).

UV spektrumunda (MeOH) 222, 242, 335 nm'de absorpsiyon bantları görüldü (Şekil 4-62).

^{1}H NMR spektrumunda ($CDCl_3$, 600 MHz) (Şekil 4-63); δ 7.08'de (1H, *d*, *J*=1.9 Hz) H-3, 7.15'de (1H, *dd*, *J*=1.9; 8.5 Hz) H-5, 6.97'de (1H, *d*, *J*=8.5 Hz) H-6, 7.42'de (1H, *d*, *J*=15.5 Hz) H-7, 6.60'da (1H, *dd*, *J*=7.8; 15.5 Hz) H-8, 9.66'da (1H, *d*, *J*=7.8 Hz) aldehit grubuna ait pik ve 3.95'te (3H, *s*) OCH_3 pikleri izlendi. ^{13}C NMR (DEPT) değerleri Tablo 4-10'da verildi (Şekil 4-64). LC-MS kromatogramında bileşiğin molekül ağırlığı 177 $[M-1]^+$ olarak belirlendi (Şekil 4-65).

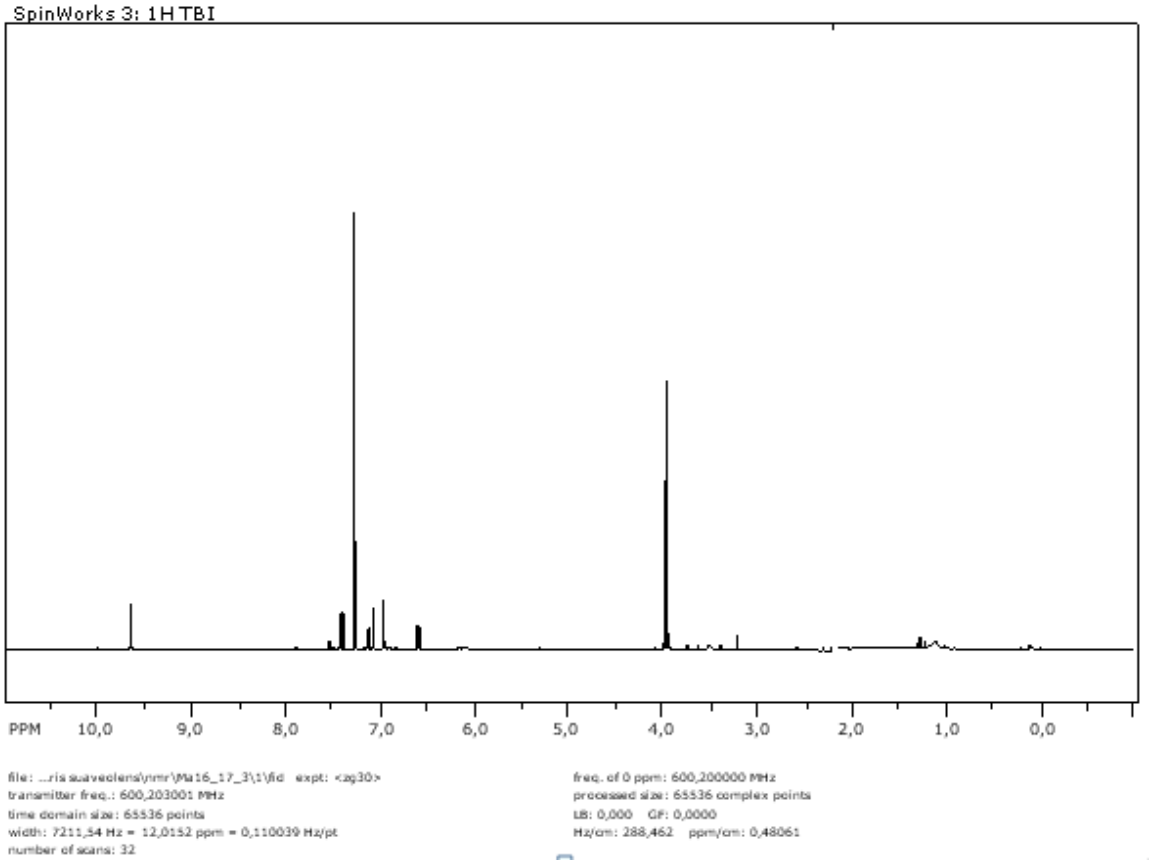
ISUC 7'nin spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırıldı ve bileşiğin coniferaldehit olduğu belirlendi (Sy ve Brown 1999) (Şekil 4-61). Coniferaldehit *Iris* türlerinden ilk kez elde edildi.

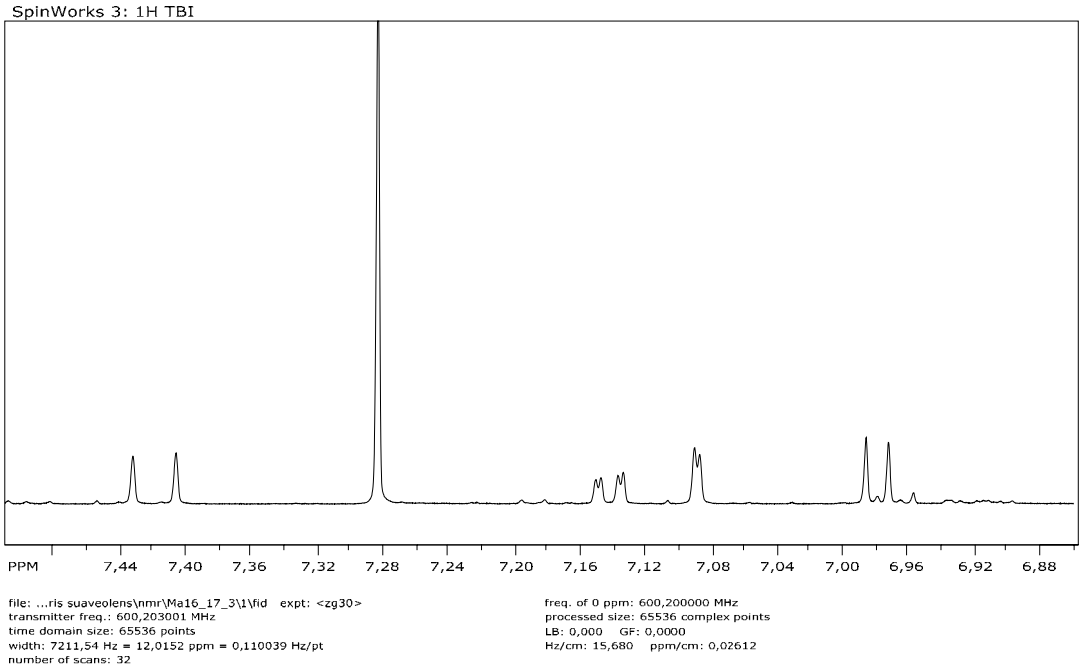


Şekil 4-62: ISUC 7 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)

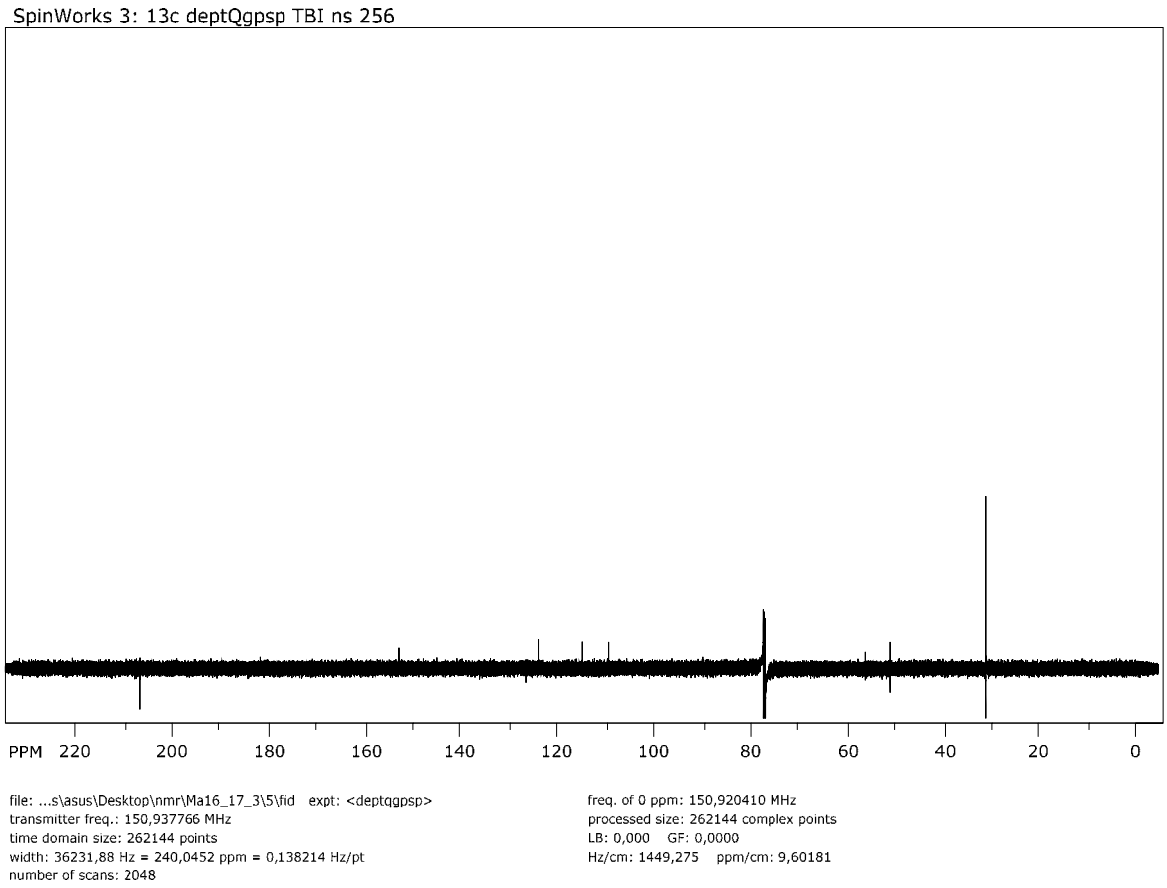
Tablo 4-10: ISUC 7 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri ($CDCl_3$, 125 MHz)

Pozisyon	^{13}C
1	148.92 *s*
2	146.72 *s*
3	109.28 *d*
4	126.73 *s*
5	124.00 *d*
6	115.17 *d*
7	153.26 *d*
8	126.44 *d*
CHO	193.57 *d*
OCH_3	56.03 *q*

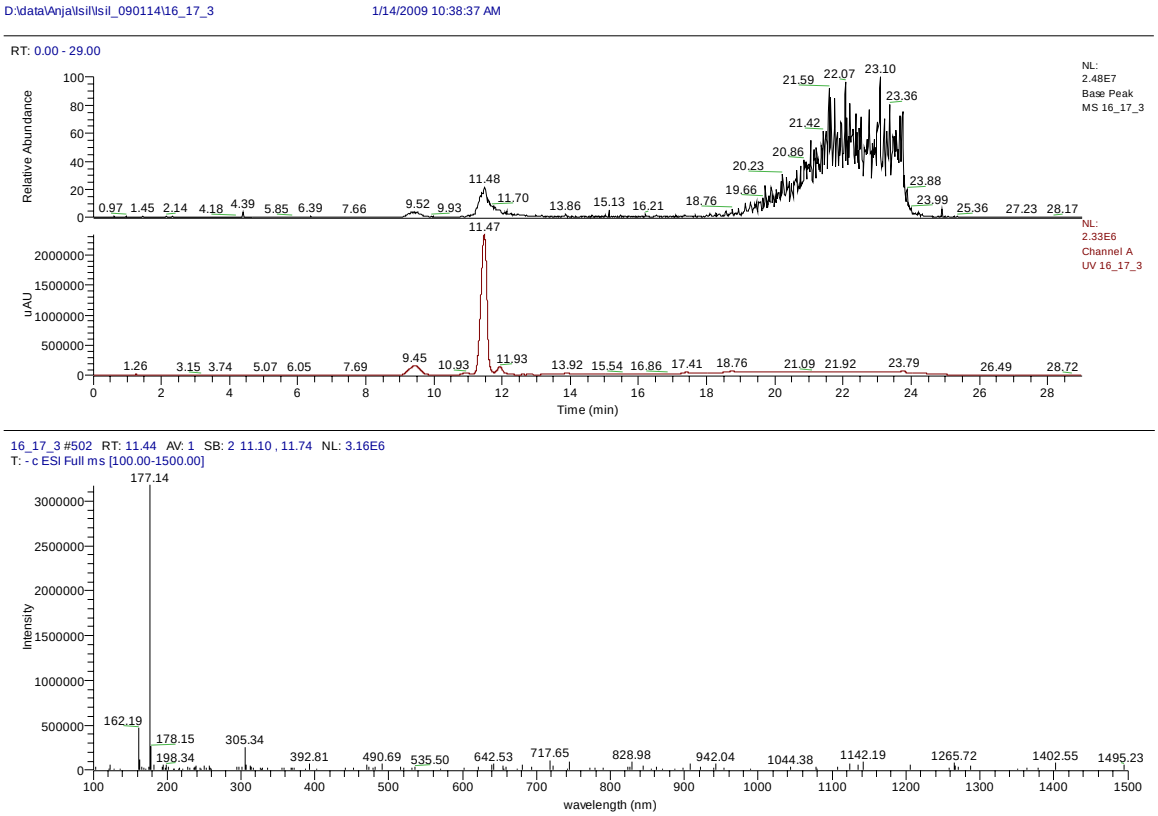




Şekil 4-63: ISUC 7 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu ($CDCl_3$, 600 MHz)

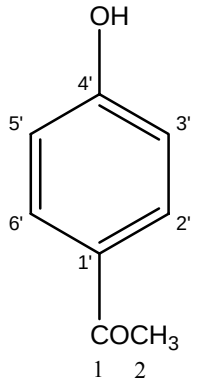


Şekil 4-64: ISUC 7 bileşiğinin DEPT spektrumu (CD_3OD, 150 MHz)



Şekil 4-65: ISUC 7 bileşiğinin LC-MS kromatogramı

4.3.4.8. ISUC 8= *p*-Hidroksiasetofenon



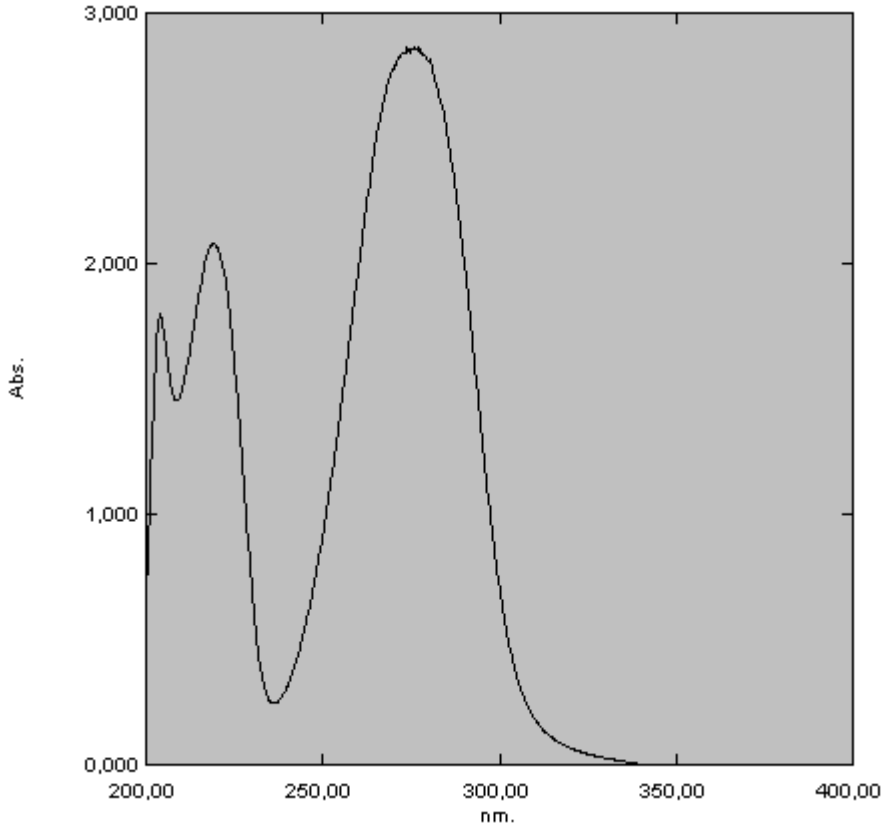
Şekil 4-66 : *p*-Hidroksiasetofenon

Koyu kahverengi renkli olan ISUC 8 bileşiği katı halde elde edildi (11,7 mg). Silika jel plakta UV lamba altında (254 nm) görülen bileşik, serik sülfat belirteci püskürtülüp etüvde 110^{o}C'de yakıldığında kahverengi renk aldı.

UV spektrumunda (MeOH) (Şekil 4-67) 204, 219 ve 277 nm'de absorpsiyon bantları görüldü.

^{1}H NMR spektrumunda (CD_3COCD_3, 500 MHz) (Şekil 4-68); δ 7.74 (2H, *d*, *J*=8.30 Hz, H-2' ve H-6'), 6.78 (2H, *d*, *J*=8.30 Hz, H-3' ve H-5'), 2.4 (3H, *s*, CO$\underline{CH_3}$) pikleri izlendi. ^{13}C NMR (APT) değerleri Tablo 4-11'de verildi (Şekil 4-69).

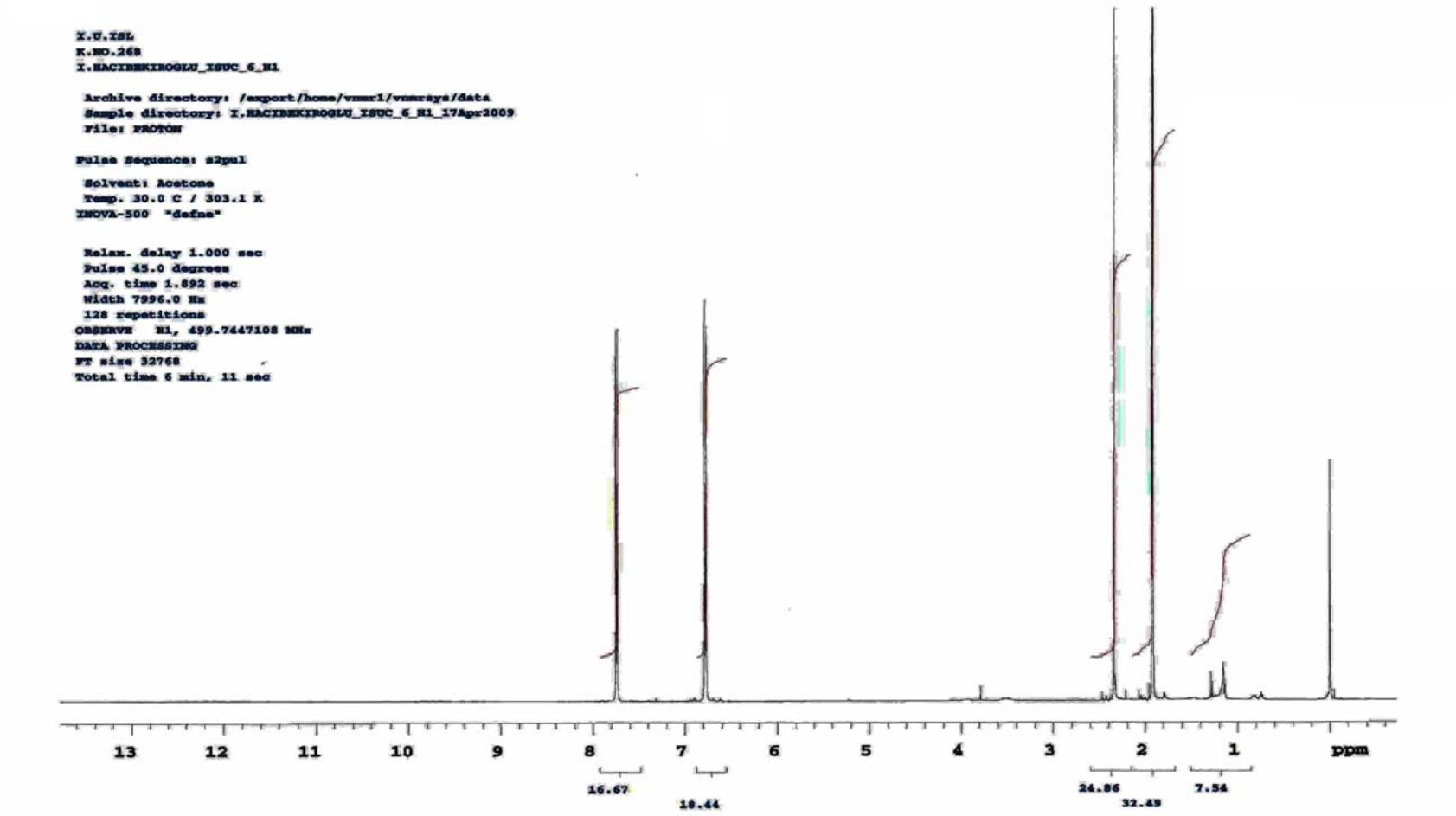
ISUC 8'in spektral değerleri literatürdeki değerler ile karşılaştırıldı ve bileşiğin *p*-hidroksiasetofenon olduğu belirlendi (Senatore ve ark. 1999) (Şekil 4-66). ISUC 8 bileşiği *Iris* türlerinden ilk kez elde edildi.



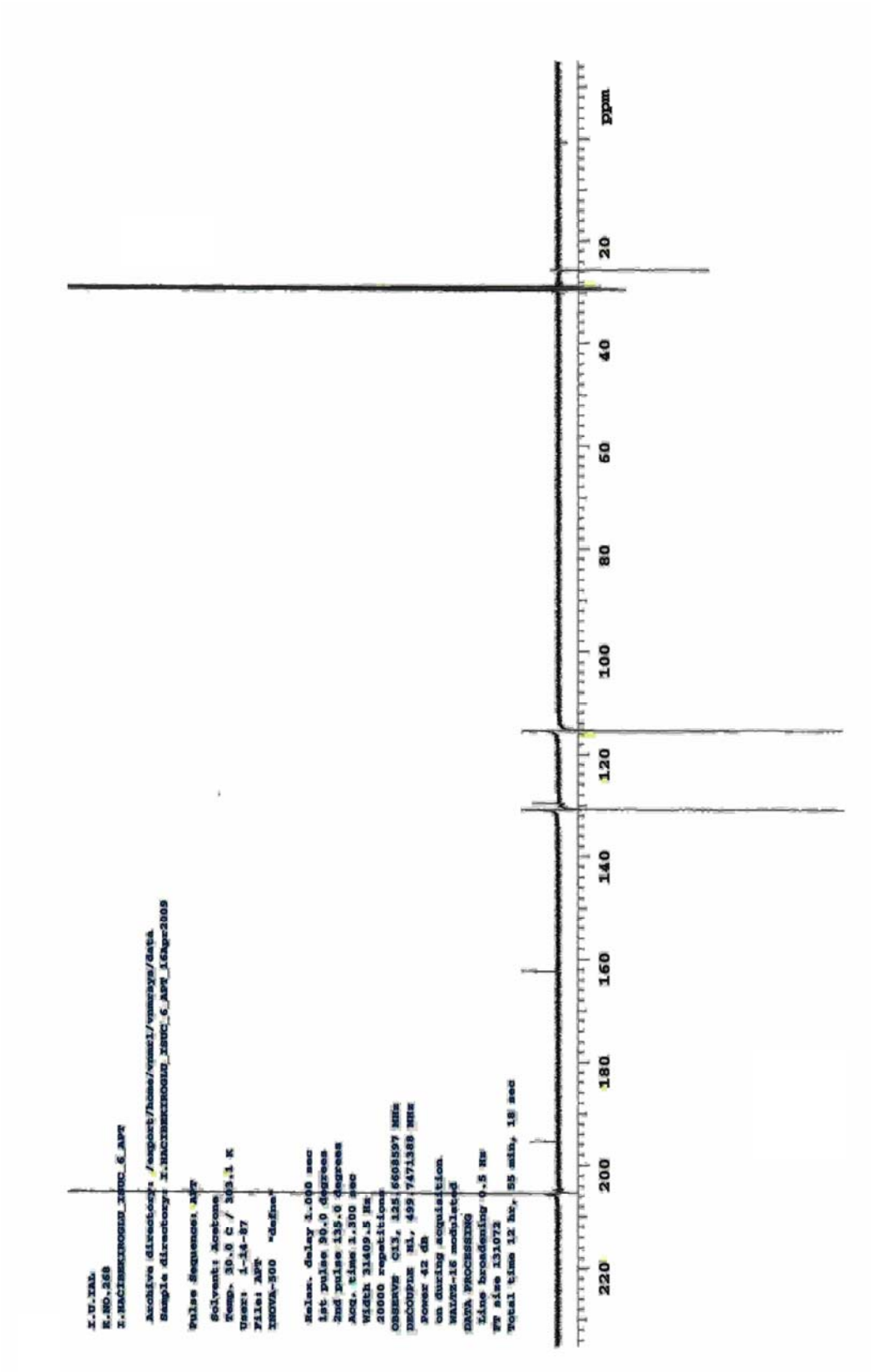
Şekil 4-67: ISUC 8 bileşiğinin UV spektrumu (MeOH)

Tablo 4-11: ISUC 8 bileşiğinin ^{13}C NMR değerleri (CD_3COCD_3, 125 MHz)

Pozisyon	^{13}C
1	195.48 *s*
2	225.78 *q*
1'	129.62 *s*
2'-6'	130.82 *d*
3'-5'	115.34 *d*
4'	162.37 *s*



Şekil 4-68: ISUC 8 bileşiğinin ^{1}H NMR spektrumu (CD_3COCD_3, 500 MHz)

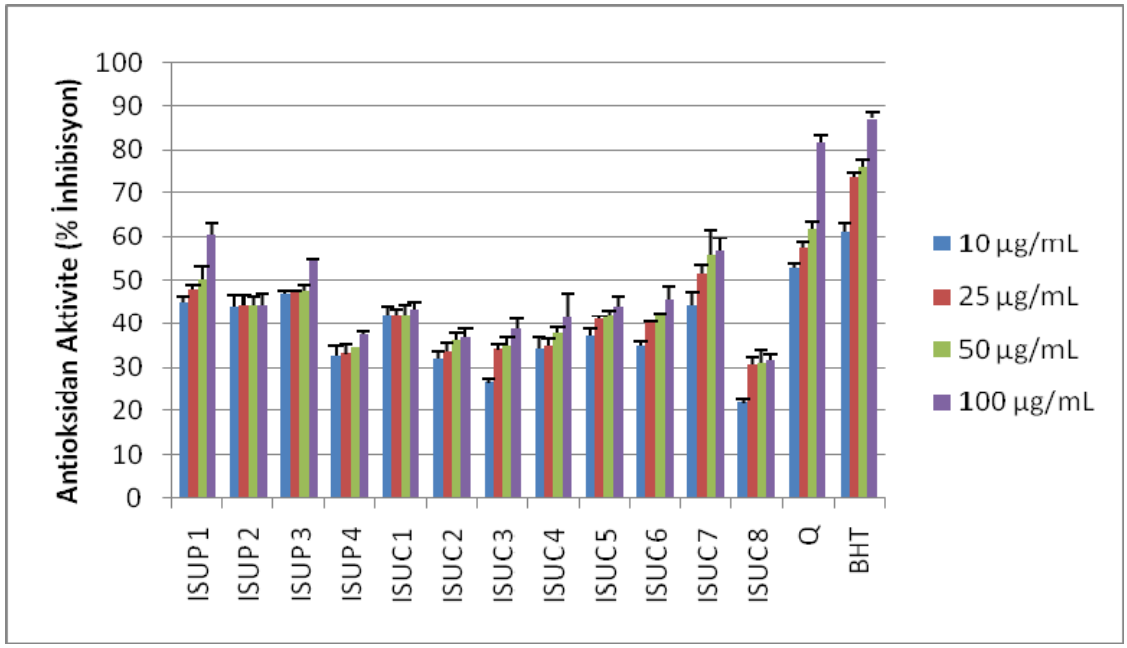


Şekil 4-69: ISUC 8 bileşiğinin APT spektrumu (CD_3COCD_3, 125 MHz)

4.4. Saf Maddelerin Antioksidan Aktivite Sonuçları

Saf maddelerin antioksidan aktiviteleri *β*-karoten renk açılım ve CUPRAC yöntemlerine göre belirlendi.

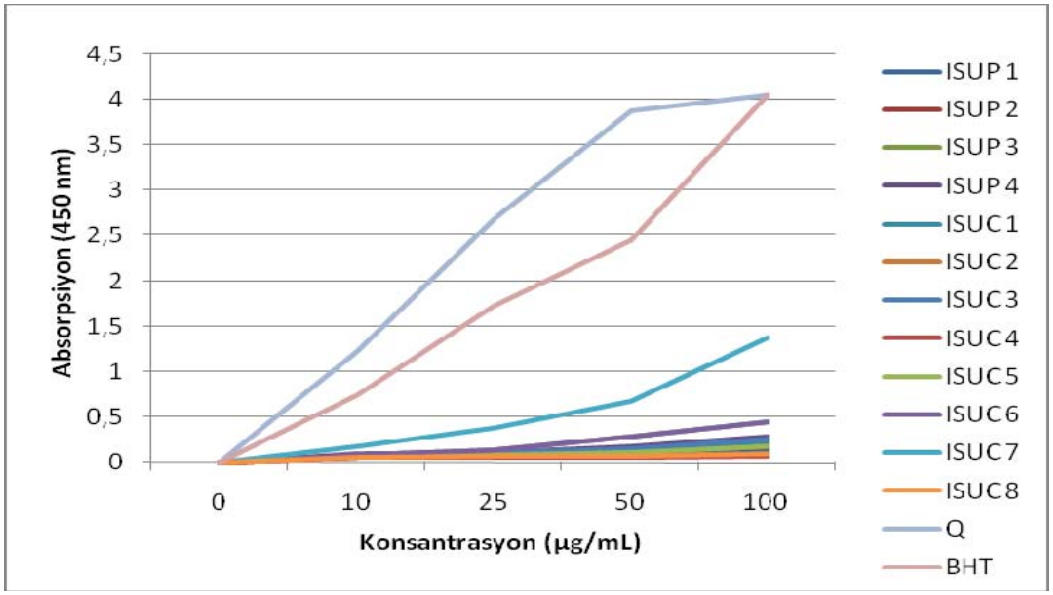
4.4.1. *β*-Karoten Renk Açılım Yöntemi Sonucu



Şekil 4-70: Saf maddelerin *β*-karoten renk açılım yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

Bu yöntemde 10, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarda ve 3 paralel olarak çalışıldı. Kersetin ve BHT standart olarak kullanıldı. 25 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarda en yüksek antioksidan aktiviteyi ISUC 7 (coniferaldehit) gösterirken, 100 µg/mL konsantrasyonda en yüksek etkiyi ISUP 1 (7*β*-hidroksistigmast-4-en-3-on) bileşiği gösterdi. En düşük etkili bileşiğin ISUC 8 (*p*-hidroksiasetofenon) olduğu belirlendi. *cis*-Vaksenik asitin miktarı yetersiz olduğu için bu yöntem ile aktivitesi belirlenemedi.

4.4.2. CUPRAC Yöntemi Sonucu



Şekil 4-71: Saf maddelerin CUPRAC yöntemi ile antioksidan aktiviteleri

ISUP ve ISUC'tan elde edilen saf maddelerin 10, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonlarda CUPRAC yöntemine göre antioksidan aktiviteleri belirlendi. Saf maddelerin hepsi standart olarak kullanılan kersetin ve BHT'den daha düşük aktivite gösterdiler. Saf maddeler arasında ISUC 7'nin (coniferaldehit) en yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlendi. *cis*-Vaksenik asitin miktarı yetersiz olduğu için bu yöntem ile aktivitesi belirlenemedi.

5. TARTIŞMA

Bu yüksek lisans tez çalışmasında, Iridaceae familyasının üyesi olan *Iris suaveolens* Boiss. & Reuter bitkisinin kimyasal içeriği ve antioksidan aktivitesi ilk kez belirlendi. *I. suaveolens*'in rizomları sırasıyla petrol eteri, kloroform ve metanol ile ekstre edildi. Elde edilen ekstrelerin toplam fenolik ve toplam flavonoit miktarları tayin edildikten sonra *β*-karoten renk açılım, metal bağlama, süperoksit anyon radikali giderim ve CUPRAC yöntemleri kullanılarak antioksidan aktiviteleri belirlendi. Antioksidan aktiviteleri yüksek olan petrol eteri ve kloroform ekstrelerinden kromatografik yöntemler kullanılarak saf madde elde edildi. Saf maddelerin yapıları spektroskopik yöntemler yardımıyla aydınlatıldıktan sonra *β*-karoten renk açılım ve CUPRAC yöntemleri ile antioksidan aktiviteleri belirlendi.

Petrol eteri ekstresinden iki steroit (7*β*-hidroksistigmast-4-en-3-on, *β*-sitosterol), bir kinoit (3-hidroksiiriskinon), bir aromatik (asetovanilon) ve bir yağ asidi (*cis*-vaksenik asit) olmak üzere toplam beş bilinen bileşik elde edildi.

Kloroform ekstresinden beş izoflavon (tectorigenin, irilon, nigricin, iriskumaonin metil eter, soforanarin A) ve üç aromatik bileşik (coniferaldehit, coniferil alkol, *p*-hidroksiasetofenon) olmak üzere toplam sekiz bilinen bileşik elde edildi.

Bu bileşiklerden 7*β*-hidroksistigmast-4-en-3-on, *cis*-vaksenik asit, coniferaldehit, coniferil alkol ve *p*-hidroksi asetofenon *Iris* türlerinden ilk kez elde edilirken 7*β*-hidroksistigmast-4-en-3-on, 3-hidroksiiriskinon, *cis*-vaksenik asit, nigricin, iriskumaonin metil eter, soforanarin A, coniferaldehit, *p*-hidroksiasetofenon'nun antioksidan aktiviteleri ilk kez bu tez çalışması ile belirlendi. Saf maddeler arasında en iyi antioksidan aktiviteyi coniferaldehitin gösterdiği tespit edildi.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında, *Iris suaveolens*'in ve bu bitkiden elde edilen bazı maddelerin yüksek antioksidan aktivite gösterdikleri belirlendi. Bu nedenle, diğer *Iris* türlerinin hem kimyasal içerik hem de aktivite bakımından incelenmesi yeni antioksidan özellikte maddelerin bulunması açısından faydalı olacaktır.

KAYNAKLAR

Ali, A. A., El-Emary, N. A., El-Moghazi, M. A., Darwish, F. M., Frahm, A. W. (1983). Three isoflavonoids from *Iris germanica. Phytochemistry*, ***22***, 2061-2063.

Al-Khalil, S., Al-Eisawi, D., Kato, M., Iinuma, M. (1994). New isoflavones from *Iris nigricans*. *Journal of Natural Products*, ***57***, 201-205.

Al-Khalil, S., Tosa, H. ve Iinuma, M. (1995). A Xanthone *C*-glycoside from *Iris nigricans*. *Phytochemistry*, ***38***, 729-731.

Apak, R., Güçlü, K., Özyürek, M., Karademir, S. E. (2004). Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamin C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry,* ***52***, 7970-7981.

Atta-ur-Rahman , Nasim, S., Baig, I., Jalil, S., Orhan, I., Sener, B., Choudhary, M. I. (2003). Anti-inflammatory isoflavonoids from the rhizomes of *Iris germanica*. *Journal of Ethnopharmacology,* ***86***, 177-180.

Atta-ur-Rahman, Nasim, S., Baig, I., Şener, B., Orhan, I., Ayanoğlu, F., Choudhary, M. I. (2004). Two new isoflavonoids from the rhizomes of *Iris soforana*. *Natural Product Research,* ***18***, 465-471.

Baytop, T. (1984). *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi*. İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları, 384-385.

Benzie, I. F. F. ve Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry,* ***239***, 70-76.

Blois, M. S. (1958). Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature,* **181**, 1199-1200.

Bonfils, J. P., Marner, F. J. ve Sauvaire, Y. (1998). An epoxidized iridal from *Iris germanica* var ''Rococo'. *Phytochemistry,* ***48***, 751-753.

Carcache-Blanco, E. J., Cuendet, M., Park, E. J., Su, B. N., Rivero- Cruz, F., Farnsworth, N. R., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. (2006). Potential cancer chemopreventive agents from *Arbutus unedo*. *Natural Product Research,* ***20***, 327-334.

Choudhary, M. I., Nur-e-Alam, M., Baig, I., Akhtar, F., Khan, A. M., Ndögnii, P. Ö., Badarchiin, T., Purevsuren, G., Nahar, N., Atta-ur-Rahman. (2001). Four new flavones and a new isoflavone from *Iris bungei*. *Journal of Natural Products,* ***64***, 857-860.

Cosio, M.S., Buratti, S., Mannino, S., Benedetti, S. (2006). Use of an electrochemical method to evaluate the antioxidant activity of herb extracts from Labiatae family. *Food Chemistry,* ***97***, 725-731.

Cram, D. J. ve Hammond G. S. (1964). *Organic Chemistry*. New York: McGraw-Hill Book Company, 671-673.

Crestini, C. ve D'Auria, M. (1997). Singlet oxygen in the photodegradation of lignin models. *Tetrahedron*, ***53***, 7877-7888.

Dewick, P. M. (1982). Isoflavonoids. İçinde J. B. Harborne ve T. J. Mabry (Eds.), *The Flavonoids*: *Advances in Research*. New York: Chapman and Hall, 535-537.

Dinis, T. C. P., Madeira, V. M. C. ve Almeida, L. M. (1994). Action of phenolic derivatives as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* ***315***, 161-169.

Duffy, P. E., Quinn, S. M., Roche, H. M., Evans, P. (2006). Synthesis of *trans*-vaccenic acid and *cis*-9-*trans*-11- conjugated linoleic acid. *Tetrahedron,* ***62***, 4838-4843.

Farag, S. F., Backheet, E. Y., El-Emary, N. A., Niwa, M. (1999). Isoflavonoids and flavone glycosides from rhizomes of *Iris carthaliniae*. *Phytochemistry,* ***50***, 1407-1410.

Farag, S. F., Kimura, Y., Ito, H., Takayusu, J., Tokuda, H., Hatano, T. (2009). New isoflavone glycosides from *Iris spuria* L. (Calizona) cultivated in Egypt. *Journal of Natural Medicines,* ***63***, 91-95.

Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radical Biology and Medicine,* ***18***, 29-36.

Geissman, T.A. ve Crout, D.H.G. (1969). *Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism*. California: Freeman, Cooper and Company, 4, 66, 67, 137-166, 212, 213, 217.

Guz, N. R. ve Stermitz, F. R. (2000). Spectral comparisons of coniferyl and cinnamyl alcohol epoxide derivatives with a purported *cis*-epoxyconiferyl alcohol isolate. *Phytochemistry,* ***54***, 897-899.

Hanawa, F., Tahara, S. ve Mizutani, J. (1991). Isoflavonoids produced by *Iris pseudacorus* leaves treated with cupric chloride. *Phytochemistry, **30***, 157-163.

Haraguchi, H. (2001). Antioxidative Plant Constituents. İçinde Corrado Tringali (Ed.), *Bioactive Compounds from Natural Sources*. New York: Taylor and Francis; 339-377.

Kandemir, N. (2006). An investigation on the Autecological of endemic *Iris taochia* Woronow Ex Grossh. (Iridaceae) distributed in the North East Anatolia Region. *Journal of Biological Sciences, **9***, 2753-2760.

Kohen, R., Beit-Yannai, E., Berry, E. M., Tirosh, O. (1999). Overall low molecular weight antioxidant activity of biological fluids and tissues by cyclic voltammetry. *Methods in Enzymology, **300***, 285-296.

Kolak, U., Topçu, G., Birteksöz, S., Ötük, G., Ulubelen, A. (2005). Terpenoids and steroids from the roots of *Salvia blepharochlaena. Turkish Journal of Chemistry, **29***, 177-186.

Liu, F., Ooi, V. E. C. ve Chang, S. T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences, **60***, 763-771.

Mabry, T. J. ve Markham, K. R. (1975). Ultraviolet-Visible and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy of Flavonoids. İçinde J. B. Harborne, T. J. Mabry ve H. Mabry (Eds.), *The Flavonoids*. London: Chapman and Hall, 46-47.

Mabry, T. J., Markham, K. R. ve Thomas, M. B. (1970). *The Systematic Identification of Flavonoids.* Berlin: Springer–Verlag, 41-61.

Marner, F. J., Krick, W., Gellrich, B., Jaenicke, L. (1982). Irigermanal and iridogermanal: Two new triterpenoids from rhizomes of *Iris germanica* L. *Journal of Organic Chemistry, **47***, 2531-2536.

Marner, F. J., Simic, K., Scholz, B., Küster, B. (1995). Isolation and structure determination of a new iridal from *Iris sibirica*. *Journal of Natural Products, **58***, 299-301.

Mathew, B. (1984). *Iris* L. İçinde P. H. Davis (Ed.), *Flora of Turkey and East Aegean Islands*, Vol. VIII. Edinburgh: University Press, 381, 382, 395, 396.

Miller, H. E. (1971). A simplified method for the evaluation of antioxidants. *Journal of American Oil Chemists' Society*, **48**, 91.

Moreno, M.I.N., Isla, M.I., Sampietro, A.R., Vattuone, M.A. (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of *Propolis* from several regions of Argentina. *Journal of Ethnopharmacology, **71***, 109–114.

Orhan, İ., Nasim, S., Şener, B., Ayanoğlu, F., Özgüven, M., Choudhary, M.I., Atta-ur-Rahman. (2003). Two isoflavones and bioactivity spectrum of the crude extracts of *Iris germanica* rhizomes. *Phytotherapy Research, **17***, 575-577.

Orhan, İ., Şener, B., Hashimoto, T., Asakawa, Y., Özgüven, M., Ayanoğlu, F. (2002). Iris- tectorone K, a novel monocylic triterpene ester from *Iris germanica* rhizomes growing in Turkey. *Fitoterapia, **73***, 316-319.

Prior, R. L. ve Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology and Medicine, **27***, 1173-1181.

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***, 1231-1237.

Reische, D. W., Lillard, D. A. ve Eitenmiller, R. R. (2002). Antioxidants. İçinde C. C. Akoh, D. B. Min, (Eds.). *Food Lipids*, *Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker Inc, 489-516.

Rigano, D., Formisano, C., Grassia, A., Grassia, G., Perrone, A., Piacente, S., Vuotto, M. L., Senatore, F. (2007). Antioxidant flavonoids and isoflavonoids from rhizomes of *Iris pseudopumila*. *Planta Medica, **73***, 93-96.

Seki, K., Haga, K. ve Kaneko, R. (1995). Phenols and a dioxotetrahydrodibenzofuran from seeds of *Iris pallasii*. *Phytochemistry, **38***, 965-973.

Senatore, F., Nunziata, A., D'Agostino, M., De Feo, V. (1999). Flavonol glycosides and *p*-hydroxyacetophenone from *Chuquiraga spinosa*. *Pharmaceutical Biology, **37***, 366-368.

Singleton, V. L., Orthofer, R. ve Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology, **299***, 152-178.

Slinkard, K. ve Singleton, V. L. (1977). Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, ***28***, 49-55.

Sy, L. K. ve Brown, G. D. (1999). Coniferaldehyde derivatives from tissue culture of *Artemisia annua* and *Tanacetum parthenium*. *Phytochemistry,* ***50***, 781-785.

Tubaro, F., Ghiselli, A., Rapuzzi, P., Maiorino, M., Ursini, F. (1998). Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics. *Free Radical Biology and Medicine,* ***24***, 1228-1234.

Wayner, D. D. M., Burton, G. W., Ingold, K. U., Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. *FEBS Letters,* ***187***, 33-37.

Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G. ve Maxwell, S. R. J. (1992). Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Analytica Chimica Acta,* ***266***, 265-277.

Valkonen, M. ve Kuusi, T. (1997). Spectrophotometric assay for total peroxyl radical-trapping antioxidant potential in human serum. *Journal of Lipid Research,* ***38***, 823-833.

Veitch, N. C., Sutton, P. S. E., Kite, G. C., Ireland, H. E. (2003). Six new isoflavones and a 5-deoxyflavonol glycoside from the leaves of *Ateleia herbert-smithii*. *Journal of Natural Products,* ***66***, 210-216.

Winston, G. W., Regoli, F., Dugas, A. J., Fong, J. H., Blanchard, K. A. (1998). A rapid gas chromatographic assay for determining oxyradical scavenging capacity of antioxidants and biological fluids. *Free Radical Biology and Medicine,* ***24***, 480-493.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Işıl	**Soyadı**	Hacıbekiroğlu
Doğ.Yeri	İstanbul	**Doğ.Tar.**	25.01.1985
Uyruğu	T.C.	**TC Kim No**	47977296562
Email	hacibekiroglu107@hotmail.com	**Tel**	05359744187

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Lisans	Trakya Üniversitesi Kimya Bölümü	2007
Lise	Cibali Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl)**
1.	Stajyer (Üretim)	Sandoz İlaç	2006
2.	Stajyer (Kalite Kontrol)	İbrahim Etem Ulagay İlaç	2005

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**KPDS/ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	İyi	İyi	İyi	62,250	
Almanca	İyi	İyi	İyi	-	70,025 (Köln Üniversitesi Dil Sınavı)

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	75,654	78,856	72,342

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	İyi
Spinworks	İyi
Chem Office	İyi

Yayınları/ Tebliğleri/ Sertifikaları/ Ödülleri

a) Ulusal Kongreler

Hacıbekiroğlu I., Kolak U., *Iris suaveolens*'ten Elde Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini ve Antioksidan Aktivitelerinin Belirlenmesi, XI. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 23-26 Haziran 2009, Gazi Üniversitesi, Ankara (Sözlü).

Kolak U., Hacıbekiroğlu I., Özgökçe F., Topçu G., Ulubelen A., *Salvia poculata* Bitkisinden Elde Edilen Bileşiklerin Yapı Tayini, XI. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 23-26 Haziran 2009, Gazi Üniversitesi, Ankara (Poster).

Öztürk M., Boğa M., Bahadori F., Hatipoğlu S. D., Hacıbekiroğlu I.,Yapar G., Kolak U., Topçu G., Bazı *Salvia* Türlerinin Antioksidan İçeriklerinin Belirlenmesi, 23. Ulusal Kimya Kongresi, 16-18 Haziran 2009, Cumhuriyet Üniversitesi, Sivas (Poster).

b) Sertifikalar

Sertifika	Veren kuruluş	Tarih
Erasmus Pogramı Katılım Sertifikası	Köln Üniversitesi	2009
Erasmus Dil Kursu Bitirme Belgesi	Köln Üniversitesi	2009
Almanca Kurs Bitirme Belgesi (B1)	Goethe Institut	2009
HACCP Gıda Güvenliği Kalite Yönetim Sistemi	Türkiye Kimyagerler Derneği	2008
OHSAS İş Sağlığı ve İş Güvenliği Yönetim Sistemi	Türkiye Kimyagerler Derneği	2008
GMP İyi Üretim Uygulamaları	Türkiye Kimyagerler Derneği	2008
ISO 9001:2000 Kalite Yönetim Sistemi	Türkiye Kimyagerler Derneği	2007
İngilizce Kursu Bitirme Sertifikası (Advance)	Çağdil Yabancı Dil Kursları	2006

Özel İlgi Alanları (Hobileri): Fotoğraf çekmek, seyahat etmek, gitar çalmak, müzik dinlemek, yüzmek.