



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**TÜRKİYE'DE KÜLTÜRÜ YAPILAN ECHINACEA
PURPUREA (L.) MOENCH VE ECHINACEA
PALLIDA (NUTT.) NUTT. TÜRLERİ
ÜZERİNDE
FARMAKOGNOZİK ARAŞTIRMALAR**

Ali Rifat GÜLPINAR

**FARMAKOGNOZİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Murat KARTAL**

2009- ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Farmakognozi Yüksek Lisans Programı
Çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.
Tez savunma tarihi: 16.07.2009

Prof. Dr. Gülçin SALTAN
Ankara Üniversitesi
Jüri Başkanı

Doç. Dr. Murat KARTAL
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. İlkay ORHAN
Gazi Üniversitesi

Doç. Dr. M. Levent ALTUN
Ankara Üniversitesi

Doç. Dr. Alev TOSUN
Ankara Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
Şekiller Dizini	xi
Çizelgeler Dizini	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Botanik Kısım	3
1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri	3
1.1.2. Asteraceae (Compositae) Familyası	3
1.1.3. <i>Echinacea</i> Cinsinin Genel Morfolojik Özellikleri	4
1.1.4. <i>Echinacea</i> Türlerinin Yayılışı	5
1.1.5. <i>Echinacea purpurea</i> ve <i>Echinacea pallida</i> Tür Özellikleri	8
1.1.5.1. <i>Echinacea purpurea</i> Tür Özellikleri	8
1.1.5.2. <i>Echinacea pallida</i> Tür Özellikleri	8
1.1.6. <i>Echinacea</i> Türlerinin Tarihçesi	9
1.2. Genel Bilgiler	12
1.2.1. <i>Echinacea</i> Türlerinin Kimyasal Bileşimi	12
1.2.1.1. <i>Echinacea</i> Türlerinden İzole Edilen Kimyasal Bileşikler	12
1.2.1.1.1 Alkamidler	13
1.2.1.1.2. Kafeik asit türevleri	19
1.2.1.1.3. Polisakkaritler	23
1.2.1.1.4. Glukoproteinler	24
1.2.1.1.5. Flavonoidler	24
1.2.1.1.6. Alkaloidler	27
1.2.1.1.7. Hidrokarbonlar	28
1.2.1.1.8. Uçucu Yağ ve Terpenik bileşikler	31
1.2.2. <i>Echinacea</i> Türleri Üzerinde Daha Önce Yapılan Çalışmalar	36
1.2.2.1. Biyolojik Çalışmalar	36
1.2.2.1.1. <i>In vitro</i> Çalışmalar	36
1.2.2.1.2. <i>In vivo</i> Çalışmalar	54
1.2.2.2. Klinik Çalışmalar	61
1.2.2.3. <i>Echinacea</i> Bileşiklerinin Farmakokinetiği	69
1.2.3. Avrupa ve Amerika Farmakopesi'nde <i>Echinacea purpurea</i> ve <i>E. pallida</i> için istenen kriterler	71
1.2.4. <i>Echinacea</i> türlerinin etken bileşiklerinin analiz yöntemleri	75
1.2.4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK)	75
1.2.4.2. Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi (SK-KS)	79
1.2.4.3. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi (GK-KS)	84
2. GEREÇ VE YÖNTEM	90
2.1. Bitkisel Materyal	90
2.2. Yöntem	90

2.2.1. <i>Echinacea</i> Türlerinde Farklı Ekstrelerin Hazırlanması	90
2.2.1.1. <i>Echinacea</i> Türlerinde Farmakope (Avrupa Farmakopesi) Analizi İçin Ekstre Hazırlanması	90
2.2.1.2. <i>Echinacea</i> Türlerinde Değişik Polaritede Çözücüler Kullanılarak Ekstre Hazırlanması	91
2.2.2. Ekstrelerde YBSK ve SK-MS Yöntemi ile Fenolik Asitlerin Miktar Tayini	93
2.2.2.1. YBSK Yöntemi	93
2.2.2.2.1. Ekstrelerin Eldesi	93
2.2.2.2.2. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	95
2.2.2.2.3. Analiz Yöntemi	95
2.2.2.2. SK-KS Yöntemi	96
2.2.2.2.1. Ekstrelerin Eldesi	96
2.2.2.2.2. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması	97
2.2.2.2.3. Analiz Yöntemi	97
2.2.2.2.3.1. YBSK Şartları	97
2.2.2.2.3.2. KS Şartları	98
2.2.3. <i>Echinacea purpurea</i> ve <i>E. pallida</i> çiçeklerinde uçucu yağ analizlerinin yapılması	99
2.2.3.1. Uçucu yağ elde edilmesi	99
2.2.3.2. Analiz Yöntemi	99
2.2.3.2.1. GK Şartları	99
2.2.3.2.2. GK-KS Şartları	100
2.2.4. Ekstrelerde Total Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi	102
2.2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması	102
2.2.4.2. Tayin Yöntemi	102
2.2.5. Ekstrelerde Total Flavonoit Miktarının Belirlenmesi	104
2.2.5.1. Çözeltilerin Hazırlanması	104
2.2.5.2. Tayin Yöntemi	104
2.2.6. Ekstrelerde Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi	106
2.2.6.1. DPPH Yöntemi	106
2.2.6.1.1. Tayin Yöntemi	106
2.2.6.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması	107
2.2.6.2. Metal Şelasyon Aktivite Tayini	107
2.2.6.2.1. Tayin Yöntemi	107
2.2.6.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması	108
2.2.7. Ekstrelerde Antikolinesteraz Aktivite Tayini	109
2.2.7.1. Tayin Yöntemi	109
2.2.7.2. Çözeltilerin Hazırlanması	109
3. BULGULAR	110
3.1. Fenolik Asit Miktar Tayinine Ait Bulgular	110
3.1.1. YBSK Bulguları	112
3.1.2. SK-KS Bulguları	117
3.1.3. Değişik Polaritede Hazırlanan Ekstrelerle Ait Bulgular	118
3.2. Uçucu Yağ Analizine Ait Bulgular	122
3.3. Total Fenol ve Flavonoit İçeriğine Ait Bulgular	127
3.4. Antioksidan Aktiviteye Ait Bulgular	128

3.5. Antikolinesteraz Aktiviteye Ait Bulgular	130
4. TARTIŞMA	131
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	140
ÖZET	143
SUMMARY	144
KAYNAKLAR	145
ÖZGEÇMİŞ	

ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında ülkemizde ilk defa Konya’da kültürü yapılan, tüm dünyada tıbbi ve ekonomik açıdan büyük öneme sahip, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. türlerinin Türk ilaç sanayisinde değerlendirilmesi ve ekonomimize kazandırılması açısından ilk araştırmalar yapılmıştır.

Tez konumun seçilmesinde, çalışmalarımın yönlendirilmesinde her türlü yardım ve desteğini gördüğüm, üzerimde büyük emeği olan Sayın Hocam, Ağabeyim Doç. Dr. Murat KARTAL’a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım süresince her türlü anlayış, ilgi ve yardımlarını gördüğüm Farmakognozi Anabilim Dalı Başkanımız Sayın, Prof. Dr. Gülçin SALTAN’a benim Araştırma Görevlisi olarak kabul edilmemdeki emeklerinden dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında ve yüksek lisans eğitimim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım, Sayın Prof. Dr. Engin ŞARER, Prof. Dr. Belma KONUKLUGİL, Doç. Dr. Mehmet Levent ALTUN, Doç. Dr. Alev TOSUN ve Doç. Dr. Betül SEVER YILMAZ’a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda kullandığım bitki materyalinin kültürünü gerçekleştiren, Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Öğretim üyesi Sayın Doç. Dr. Yüksel KAN Hocam ve ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Biyoaktivite çalışmalarım sırasında büyük yardım ve destek gördüğüm, desteğini her anlamda hissettiğim Gazi Üniversitesi Farmakognozi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Doç.Dr. İlkay ORHAN Hocama ve değerli arkadaşım Ecz. Fatma Sezer ŞENOL’a teşekkürlerimi sunarım.

Çek Cumhuriyeti’nde yaptığım çalışmalarda bana her konuda yardımcı olan Brno Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dekanı Milan Zemlicka, Dr. Karel Smejkal, Uzm. Emil Svajdlenka ve Ecz. Petra Hribova’ya teşekkürlerimi sunarım.

Başta GK-KS analizleri olmak üzere yüksek lisansa başladığım günden beri bilgi ve tecrübesini benimle sonuna kadar paylaşan, her konuda kayıtsız destek ve yardımını gördüğüm ablam Uzm. Ecz. Sinem ASLAN’a teşekkürlerimi sunarım.

Eski oda arkadaşım, yeni komşum, tecrübe ve bilgisinden çok fazla yararlandığım, kendisinden çok fazla şey öğrendiğim, ağabeyim Uzm. Ecz. Alper GÖKBULUT'a teşekkürlerimi sunarım. Yine bilgisinden ve tecrübelerinden yararlandığım ağabeyim Uzm. Ecz. Mahmut ASKER'e teşekkürlerimi sunarım

Yüksek lisans dönemi boyunca her türlü yardım ve desteğini gördüğüm, ablam Uzm. Ecz. Özlem BAHADIR'a, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Uzm. Ecz. Ülkü Gökçen KABAN ve Ecz. Serkan ÖZBİLGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin yazım aşamasında yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen arkadaşım Özge GÜREL'e, teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans yapma kararını verirken kafamda ilk kıvılcımları yakan ve ilk ilhamı veren Prof. Dr. Doğu NEBİOĞLU ve Dr. Ecz. Özge İNAL'a ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak beni bugünlere getiren ve hep destekleyen, hatırasını özlem ve gururla taşıdığım babam Mustafa GÜLPINAR'a, annem Nurcan GÜLPINAR'a, varlıkları bana her zaman güç ve güven veren ağabeylerim Mete, Kamil ve Ömer GÜLPINAR'a sonsuz minnettarlığımı ve teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER ve KISALTMALAR

5NFAA	3-(5-nitro-2-furil) akrilik asit
α	Alfa
AAH/ALI	Akut Akciğer Hasarı/Acute Lung Injury
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABHS	Antikora bağlı hücrel sitotoksisite
ABTS	2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sulfonat)
AChE	Asetilkolinesteraz
AFTIR	After Flowing Through Immobilized Receptor (Sabitlemiş Reseptörden Geçiş Sonrası)
AGPs	Arabinogalaktan-proteinleri
a/h	Ağırlık/Hacim
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (Kazanılmış immün-yetmezlik sendromu)
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATC	Asetiltiyokolin iyodür
β	Beta
BEAS-2B	Dönüştürmüş İnsan Bronşiyal Hücre Dizisi
C	Karbon
$^{\circ}\text{C}$	Celcius (santigrat)
CB	Kannabinoit reseptörleri
CHCl_3	Kloroform
CFU	Colony-Forming Unit
cm	Santimetre
C_{max}	Bir ilacın kanda ulaştığı en yüksek plazma konsantrasyonu
CO_2	Karbon dioksit
COLO320	Kolon kanser hücre serisi
COX	Cyclooxygenase
DAD	Diode Array Detector
dak	Dakika
DK	Doğal Katil (Hücre)
DNA	Deoksiribonükleik asit
DPPH	2,2-difenil-1,2-pikril hidrazil
DTNB	5,5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)
EC_{50}	Half Maximal Effective Concentration
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ELF	Etopozit, Lökovorin, 5-Fluorourasil
EP6	European Pharmacopeia 6 th edition (Avrupa Farmakopesi 6. Baskı)
EPS	<i>E. purpurea</i> hücre kültüründen saflaştırılmış polisakkaritler
ESI	Electron Spray Ionization
EtOH:H ₂ O 70:30	70:30 h/h Etanol:Su ekstresi
eV	Elektron Volt
FEB	Fonasyon Eşik Basıncı
γ	Gama

g	Gram
GA	Gallik asit
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
h/h	Hacim/Hacim
HeLa	Serviks kanser hücresi
HIV	Human Immunodeficiency Virus (Bağıklık Sisteminin Çökmesine Neden Olan Virüs)
HSV	Herpes simplex virüsü
IC ₅₀	The half maximal inhibitory concentration (<i>in vitro</i> testlerde)
IDN 5405	Poligalakturonik asit omurgası ve kısmen karboksimetillenmiş ramnogalakturonan dallanmalarıyla karakterize, <i>E. angustifolia</i> 'ya özgü bir polisakkarit.
IFN	İnterferon
IgA	İmmüoglobülin A
IgM	İmmüoglobülin M
IL-1	İnterlökin-1
IL-2	İnterlökin-2
IL-4	İnterlökin-4
IL-6	İnterlökin-6
IL-10	İnterlökin-10
IL-12	İnterlökin-12
i.m.	İntramüsküler
i.p.	İntraperitoneal
IV	Influenza virüsü
i.v.	İntravenöz
kg	Kilogram
KKKH	Koyun Kırmızı Kan Hücreleri
LOX	5-lipoksijenaz
LPS	Lipopolisakkarit
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
m ²	Metrekare
MA	Molekül Ağırlığı
MCF-7	Meme kanser hücresi
MeOH	Metanol
mg	Miligram
ml	Mililitre
µm	Mikrometre
µM	Mikromolar
mm	Milimetre
MIA PaCa-2	Pankreatik kanser hücre serisi
MIC	Minimum Inhibitory Concentration
MIP	Makrofaj İnhibitör Protein
MLV	Mürin Lösemi Virüs
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
nm	Nanometre
NOS	Nitrik oksit sentaz
NO	Nitrik oksit

NSAE	Non-Steroidal Anti-Enlamafuvar
NTF/NF κ B	Nükleer Transkripsiyon Faktör
PE	Petrol eteri
PE \rightarrow MeOH	Aynı bitkisel materyalden petrol eteri ekstraksiyonu sonrası metanol kullanılarak elde edilen ekste
PMKH	Periferel mononükleer insan kan hücreleri
PMN	Peritonal mürin makrofaj
PGE2	Prostagalandin E2
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
OA	Oleik Asit
QE	Kersetin
RC _{tr} /RC _c	Örnek Regresyon Katsayısı/Kontrol Regresyon Katsayısı
R.Ç.P.	Rastgele, Çift Körlü ve Plasebo Kontrollü
RI	Retansiyon İndisi
RV	Rinovirüs
s.c.	Subkütan
sIL-2R	İL-2 reseptörü
SK-KS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
THP-1	İnsan Akut Monositik Lösemi Hücre Dizisi
T-hücresi	Timus Hücresi
T _{max}	Bir ilacın en yüksek kan konsantrasyonuna ulaşması için geçen süre
TNF	Tümör Nekroze Edici Faktör
USP	United States Pharmacopeia (Amerikan Farmakopesi)
UV	Ultraviyole
ÜSYE	Üst Solunum Yolu Enfeksiyonları
VE	Vokal Ekonomi
YBSK	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. <i>Echinacea</i> türlerinin Kuzey Amerika'daki dağılımına ait harita	6
Şekil 2. <i>Echinacea</i> türlerinde bulunan alkamidler	15
Şekil 3. <i>Echinacea</i> türlerinde bulunan kafeik asit ve türevleri	21
Şekil 4. <i>Echinacea</i> türlerinde tespit edilmiş başlıca flavonoidler	25
Şekil 5. <i>Echinacea</i> türlerinde bulunan alkaloidler	27
Şekil 6. <i>Echinacea</i> türlerinde bulunan hidrokarbon bileşikleri	28
Şekil 7. <i>Echinacea</i> uçucu yağı bileşiminde bulunan başlıca terpenik bileşikler	34
Şekil 8. Gelişmiş bir YBSK sisteminin bölümleri	78
Şekil 9. Kütle Spektrometresi ve kısımlarının şematik gösterimi	80
Şekil 10. Örnek olarak bir SK-KS cihazı	83
Şekil 11. Gaz Kromatografında maddelerin ayrılması (A) ve kaydedicide pikler halinde görülmesi (B)	86
Şekil 12. GK-KS cihazının şematik olarak görünümü	88
Şekil 13. Örnek olarak bir GK-KS cihazı	89
Şekil 14. <i>E. purpurea</i> herba ve radix kromatogramları ve standart madde (klorojenik asit ve kafeik asit) kromatogramları (EP6 yöntemiyle).	112
Şekil 15. EP6'da açıklanan yöntemle göre kromatogramda kaftarik asit ve kikorik asitin görülmesi beklenen retansiyon zamanları ve pikleri	112
Şekil 16. <i>Echinacea purpurea</i> herba, ticari ekstresinden elde edilen kromatogram ve standart madde (klorojenik asit ve kafeik asit) kromatogramları (EP6 yöntemiyle)	113
Şekil 17. Çalışmada elde edilen (soldaki büyük spektrumlar) ve literatürden (Pellati ve ark., 2005) elde edilen (sağ üstteki küçük spektrumlar) DAD-UV spektrumları	113
Şekil 17a. Klorojenik Asit	113
Şekil 17b. Kafeik Asit	114
Şekil 17c. Kaftarik Asit	114
Şekil 17d. Kikorik Asit	115
Şekil 18. <i>E. pallida</i> herba ve radix kromatogramları ve standart madde (klorojenik asit ve kafeik asit) kromatogramları (EP6 yöntemiyle)	115
Şekil 19. EP6'da açıklanan yöntemle göre beklenen <i>E. pallida</i> kromatogramı, ekinakozitin beklenen retansiyon zamanı ve piki	116
Şekil 20. Çalışmada elde edilen (soldaki büyük spektrum) ve literatürden (Pellati ve ark., 2005) elde edilen (sağ üstteki küçük spektrum) ekinakozite ait DAD-UV spektrumları	116
Şekil 21. Klorojenik asit ve kafeik asite ait SK-KS verileri	117
Şekil 22. Kaftarik asit ve kikorik asite ait SK-KS verileri	117
Şekil 23. Standart madde (klorojenik asit ve kafeik asit)	118

kromatogramı (EP6 yöntemiyle)	
Şekil 24. <i>E. purpurea</i> Radix MeOH ekstresine ait kromatogram	118
Şekil 25. <i>E. purpurea</i> Radix EtOH:Su (70:30) ekstresine ait kromatogram	119
Şekil 26. <i>E. purpurea</i> Radix kloroform ekstresine ait kromatogram	119
Şekil 27. <i>E. purpurea</i> Radix petrol eteri ekstresine ait kromatogram	120
Şekil 28. <i>E. pallida</i> Radix MeOH ekstresine ait kromatogram	120
Şekil 29. <i>E. purpurea</i> çiçek uçucu yağ GK kromatogramı	124
Şekil 30. <i>E. pallida</i> çiçek uçucu yağ GK kromatogramı	125

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1. Kuzey Amerika’da doğal olarak yetişen dokuz <i>Echinacea</i> türü ve İngilizce isimleri (1968’de McGregor tarafından yapılan sınıflandırma)	5
Çizelge 2. 1968’de McGregor tarafından yapılan sınıflandırma ve 2002’de Binns ve arkadaşlarınca yapılan gözden geçirilerek yeniden düzenlenen <i>Echinacea</i> sınıflandırmalarının karşılaştırması	6
Çizelge 3. Dünya üzerinde <i>Echinacea</i> türlerinin kültürünü yapan başlıca ülkeler ve buldukları kıtalar (Letchamo ve ark., 2002)	7
Çizelge 4. <i>E. angustifolia</i> ’nın Amerikan yerlileri tarafından tıbbi amaçla başlıca kullanım alanları (Schar, 1999)	10
Çizelge 5. <i>Echinacea purpurea</i> uçucu yağ kompozisyonu	31
Çizelge 6. <i>Echinacea pallida</i> uçucu yağ kompozisyonu	32
Çizelge 7. <i>Echinacea angustifolia</i> uçucu yağ kompozisyonu	33
Çizelge 8. Tıbbi olarak kullanılan <i>Echinacea</i> türlerinin uçucu yağ miktarları (Gruenwald ve ark., 2004)	33
Çizelge 9. Avrupa Farmakopesi’nde (EP6) <i>Echinacea purpureae</i> <i>Herba</i> , <i>Echinacea purpureae</i> <i>Radix</i> ve <i>Echinacea pallidae</i> <i>Radix</i> için istenen kriterler	71
Çizelge 10. Amerikan Farmakopesi’nde (USP) <i>Echinacea purpureae</i> <i>Herba</i> , <i>Echinacea purpureae</i> <i>Radix</i> ve <i>Echinacea pallidae</i> <i>Radix</i> için istenen kriterler	73
Çizelge 11. Amerikan Farmakopesi’nde (USP) yer almış <i>Echinacea purpurea</i> ve <i>Echinacea pallida</i> ekstraları	74
Çizelge 12. Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen <i>Echinacea</i> ekstraları ve ekstre verimleri	92
Çizelge 13. Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen <i>Echinacea</i> ekstraları ve YBSK örnekleri	94
Çizelge 14. Avrupa Farmakopesi’nde <i>Echinacea</i> için verilmiş gradient elüsyon	96
Çizelge 15. SK-KS ile <i>Echinacea</i> ekstralarında fenolik asit teşhisi için geliştirilen gradient elüsyon	98
Çizelge 16. GK Sıcaklık Programı	100
Çizelge 17. GK-KS Sıcaklık Programı	100
Çizelge 18. Total Fenolik Madde Miktar Tayini için elde edilen <i>Echinacea</i> ekstraları, örneklerin konsantrasyonları ve Gallik Asit Konsantrasyonu	103
Çizelge 19. Total Flavonoid Miktar Tayini için elde edilen <i>Echinacea</i> ekstraları, örneklerin konsantrasyonları ve Kersetin Konsantrasyonu	105
Çizelge 20. Farmakope analizinde <i>Echinacea purpurea</i> ve <i>E. pallida</i> türlerinde kafeik asit türevlerinin miktar tayinlerine ait bulgular	111
Çizelge 21. Değişik polaritedeki <i>Echinacea</i> ekstraları ve kafeik asit türevleri miktarları	121
Çizelge 22. <i>Echinacea</i> çiçeklerinde uçucu yağ analizine ait bulgular	122

Çizelge 23. <i>Echinacea purpurea</i> ve <i>E. pallida</i> ekstrelerinde total fenolik ve flavonoit içeriklerine ait bulgular	126
Çizelge 24. <i>Echinacea</i> ekstrelerinin 2,2-difenilpikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü aktivitesi	127
Çizelge 25. <i>Echinacea</i> ekstrelerinin demir bağlama kapasitesi	128
Çizelge 26. <i>Echinacea</i> ekstrelerinin asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi	129
Çizelge 27. <i>E. purpurea</i> ve <i>E. pallida</i> 'da miktar tayini bulguları ve Avrupa Farmakopesi'nde istenen miktarlar	130
Çizelge 28. <i>Echinacea purpurea</i> ve <i>E. pallida</i> çiçeklerinde uçucu yağ kompozisyonu	132
Çizelge 29. Tez çalışmasındaki uçucu yağ analizinde miktarları belirlenen major bileşenler	133
Çizelge 30. Bazı <i>Echinacea</i> ekstrelerinin (DPPH) serbest radikal süpürücü aktivitesi	134
Çizelge 31. Bazı <i>Echinacea</i> ekstreleri ve kafeik asit türevleri miktarları	136
Çizelge 32. <i>Echinacea</i> ekstrelerinden demir bağlama kapasitesi yüksek olanlar	136
Çizelge 33. Bazı <i>Echinacea purpurea</i> ve <i>E. pallida</i> ekstrelerinde total fenolik ve flavonoit içerikleri	137



Echinacea purpurea (L.) Moench (Konya)



Echinacea pallida (Nutt.) Nutt (Konya)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Echinacea türleri Asteraceae familyasından Kuzey Amerika orijinli bitkiler olup fitoterapi ve homeopatide kullanılmaktadır (Bruneton, 1999). Çiçek tablaları koni şekline benzediğinden dolayı bitkiye “Cone Flower” ismi verilmiştir. *Echinacea* türlerine; Black Sampson, Hedgehog, Purple Coneflower, Red Sunflower, Rudbeckia gibi farklı isimler verilmekte kullanılan türe bağlı olarak kökleri, yaprakları veya tüm bitki kullanılmaktadır (Gruenwald ve ark., 2004). *Echinacea* türleri Amerika yerlileri tarafından haricen yara iyi edici; dâhilen ise baş ağrısı, mide ağrısı ve öksürük kesici olarak kullanılmıştır. Farmakolojik olarak bu endikasyonlarda kullanımı kanıtlanmasa da immünostimülan etkileri birçok deneysel yöntemle ortaya çıkarılmıştır (Bruneton, 1999). Kanıtlanmış anti-bakteriyel, anti-enflamatuvar, bağışıklık sistemini güçlendirici ve yara iyileştirici özellikleri vardır (Gruenwald ve ark., 2004).

Günümüzde özellikle 3 *Echinacea* türünün (*E. angustifolia* DC, *E. pallida* (Nutt.) Nutt., *E. purpurea* (L.) Moench) preparatları bitkisel ilaç olarak değerlendirilmektedir (Mazza ve Cottrel, 1999). Ülkemizde de bu *Echinacea* türleri; drog olarak veya preparat halinde ithal edilmekte ve farklı farmasötik formlarda kullanılmaktadır. *Echinacea* bitkisi herbası ve köklerinden hazırlanan preparatlar sıklıkla tekrar eden üst solunum yolu ve üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde yardımcı olarak kullanılmaktadır. Özellikle enfeksiyon hastalıklarında vücut direncinin doğal olarak artmasına ve harekete geçmesine yardımcı olur. Soğuk algınlığı, grip ve nezleye karşı koruyucu ve tedavi edicidir (Schar, 1999; Upton ve ark., 2007). *Echinacea*’ya olan talep hem ülkemizde hem de dünyada her geçen gün artmaktadır.

Echinacea türlerinin tüketimi Amerika, Avrupa ve diğer ülkelerde önemli derecede artmıştır. Bugün, *Echinacea* türlerinden elde edilen ekstre ve preparatlar Avrupa ülkeleri ile birlikte A.B.D’de bitkisel ilaç pazarından yüksek bir paya sahiptir. A.B.D’de *Echinacea* preparatlarının yıllık satışı 1997’de 365 milyon doları bulmuş,

Avrupa’da ise 1998’deki *Echinacea* preparatlarının yıllık satışının 120 milyon dolar civarında olduğu bildirilmiştir. 1998’de tüm Batı Dünyası’nda *Echinacea* preparatlarının satışının 1 milyar dolara yakın olduğu tahmin edilmektedir (Miller ve Yu, 2004; Schaar 1999). 2006 yılında A.B.D.’deki toplam satış 129 milyon dolara gerilemiştir. Ancak *Echinacea*’ya olan bu büyük talebin 2008’le birlikte yeniden yükselişe geçeceği tahmin edilmektedir (McIntire, 2008). *Echinacea* türleri ile ilgili ham maddeye talebin artışı ile birlikte *Echinacea*’nın kültür alanları her geçen gün artmaktadır.

Türkiye Konya ekolojik koşullarında yürütülen 3 yıllık kültür deneme sonuçlarına göre, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. türlerinin İç Anadolu Bölgesi koşullarında yetiştirilebileceği ortaya çıkmıştır. Bununla birlikte bitkinin özellikle küresel ısınmanın en fazla görüldüğü İç Anadolu Bölgesi’nde yetiştirilmesi Türkiye’nin hemen her bölgesinde yetiştirilebileceği potansiyeli görülmektedir. *Echinacea* türlerinin endüstriyel kullanımı için Türkiye’nin nitelikli hammadde temini konusunda hiçbir zorlukla karşılaşmayacağı görülmektedir.

Ayrıca ülkemizde ve dünyada gün geçtikçe artan bir şekilde bitkiler ve bitkilerden hazırlanan ürünler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Standardize ekstrelerin hazırlanması ve bunların Avrupa Farmakopesi kalitesinde üretilmesi ülkemiz bitkisel ilaç sanayiinin ham madde teminini yerli kaynaktan elde edilmesi açısından önem taşımaktadır. Ülkemizde de bu ürünlerin üretilebileceğinin ortaya konması ve ülke ekonomimize yeni bir sektör yaratılması konusunda öncü olmak amaçlanmıştır.

1.1. Botanik Kısım

1.1.1. Bitkinin Sistematikteki Yeri

Bölüm	:	Spermatophyta
Altbölüm	:	Angiospermae
Sınıf	:	Dicotyledones
Altsınıf	:	Sympetalae
Takım	:	Campanulales
Familya	:	Asteraceae (Compositae)
Subfamilya	:	Tubuliflorae (Asteroideae, Tubiflorae)
Oymak	:	<i>Heliantheae</i>
Cins	:	<i>Echinacea</i>
Tür	:	<i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench <i>Echinacea pallida</i> (Nutt.) Nutt.

(Davis, 1975; Heywood ve ark. 2007)

1.1.2. Asteraceae (Compositae) Familyası

Yeryüzünde 1000'e yakın cins ve 20000'e yakın tür ile temsil edilen, çiçekli bitkilerin en zengin familyasıdır. Yurdumuzda Asteraceae familyasına ait 133 kadar cins, 1156 tür yetişmektedir (Davis ve ark., 1988). Bitkilerin çoğu (tek yıllık, iki yıllık ya da çok yıllık) otsudur (Davis, 1975). Çalı ya da ağaç formunda olanların sayısı azdır. Yapraklar ya alternan ya da oppozit dizilmiş veya hepsi tabandadır. Çiçek durumu kapitulumdur; çiçek tabanında braktelerden meydana gelmiş bir involukrum bulunur. Durumdaki çiçekler ya erdişi ya da tek eşeyli, aktinomorf veya zigomorftur. Çiçeklerde kaliks; papus, halka, veya pul biçimindedir ya da yoktur. Korolla 5 petalli, simpetal, tüp biçiminde veya dil şeklinde uzanmıştır. Stamen 5 tane ve singeneziktir. Ovaryum alt durumlu, iki karpelden meydana gelmiş tek ovüllü; meyva tipi akendir, tepesinde bazen bir papus bazen bir kaliks artığı bulunur.

Familiya bitkilerinin çoğu Asteraceae tipi salgı tüyü ve örtü tüyü taşır (Tanker ve ark., 2007).

Asteraceae Antartika dışında tüm dünyada yayılma gösteren bir familyadır. Akdeniz bölgesi; Meksika; Güney Afrika; Afrika'nın otluk, çalılık ve ağaçlık ekosistemleri; Güney Amerika ve Avustralya gibi tropik ve subtropik yarı kurak floraların önemli üyeleridir. Ayrıca arktik, arktik dağ, ılıman ve dağlık floralarda da sıklıkla bu familyaya rastlanmaktadır. Ancak tropikal yağmur ormanlarında Asteraceae türlerine yeteri kadar rastlanmamaktadır (Heywood ve ark., 2007).

Familiya üç altfamilyaya ayrılmaktadır. Bunlar : Barnadesioideae, Cichorioideae ve Asteroideae'dir (Heywood ve ark., 2007).

1.1.3. *Echinacea* Cinsinin Genel Morfolojik Özellikleri

Echinacea kelimesi Yunanca denizkeşanesi ya da kirpi anlamına gelen "echinos" sözcüğünden gelmektedir. *Echinacea* cinsi bu ismi olasılıkla çiçek tablasındaki sivri dikenimsi çiçeklerinden almaktadır (Mistríková ve Vaverkova, 2007).

Echinacea türleri, boyları 10-60 cm'e ulaşan çok yıllık otsu bitkilerdir. Gövde, dikey kazık kök (*E. angustifolia*) ya da saçak kökten yükselir (*E. purpurea*). *Echinacea*, basit ya da dallanmış bir gövdeye sahip olabilir. *Echinacea* cinsi dikenimsi çiçekçikleri ve koni biçimindeki çiçek tablasıyla karakterize edilmektedir. Dilsü çiçekçikler beyazdan pembeye ve koyu mora giden bir renk aralığına sahiptir. Tüpsü çiçekçiklerin rengi kırmızı-kahverengiden yeşile gidebilir. Yapraklar lanseolattan ovata çeşitlilik gösterir (Mistríková ve Vaverkova, 2007).

Echinacea türleri kendini yenileyebilme ve kuraklığa dayanıklılık özelliğine sahiptir ancak çok hızlı büyümektedir (Mistríková ve Vaverkova, 2007).

1.1.4. *Echinacea* Türlerinin Yayılışı

Echinacea bir Kuzey Amerika bitki cinsidir. Kuzey Amerika’da dokuz tür doğal olarak yetişmektedir. Bunlardan yalnız üçü; *E. angustifolia* DC. var. *angustifolia*, *E. pallida* (Nutt.) Nutt. ve *E. purpurea* (L.) Moench tıbbi olarak kullanılmaktadır. *E. angustifolia* DC. var. *strigosa* McGregor, *E. atrorubens* Nutt., *E. paradoxa* (Norton) Britton var. *neglecta* McGregor, *E. paradoxa* (Norton) Britton var. *paradoxa*, cinsin endemik türleridir. Orta-Batı Amerika doğal yetişen *Echinacea* türleri açısından en zengin bölgedir (güneyde Minnesota’nın Ozark Dağları’ndan doğuda Oklahoma’nın otlaklarına uzanır). Ancak *Echinacea* için tamamen Orta-Batı Amerika bitkisidir denemez. Amerika Birleşik Devletleri’nin Atlantik Drenaj bölgesinden, Orta-güney Kanada’ya kadar uzanan bölge *Echinacea* türlerinin doğal yetiştiği alandır (McKeown, 1999).

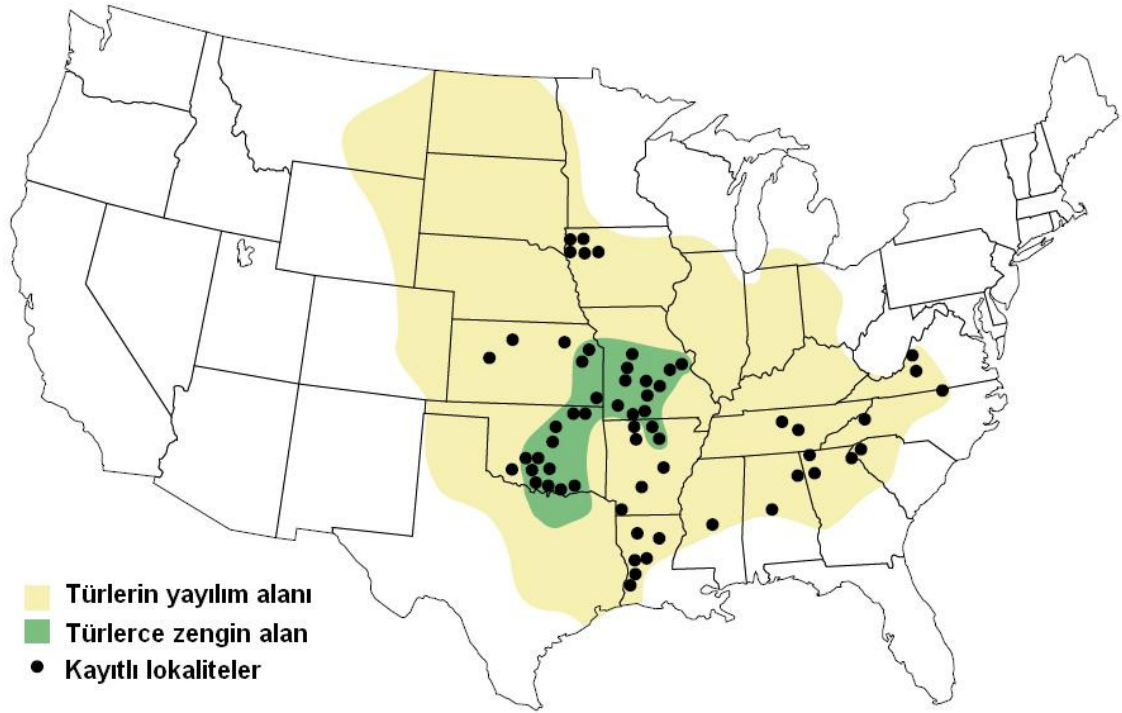
Çizelge 1. Kuzey Amerika’da doğal olarak yetişen dokuz *Echinacea* türü ve İngilizce isimleri (1968’de McGregor tarafından yapılan sınıflandırma)

Latince İsim	İngilizce İsim
<i>Echinacea angustifolia</i> *	Narrow-leaf Coneflower
<i>Echinacea atrorubens</i>	Topeka Purple Coneflower
<i>Echinacea laevigata</i>	Smooth Coneflower, Smooth Purple Coneflower
<i>Echinacea pallida</i> *	Pale Purple Coneflower
<i>Echinacea paradoxa</i>	Yellow Coneflower, Bush’s Purple Coneflower
<i>Echinacea purpurea</i> *	Purple Coneflower, Eastern Purple Coneflower
<i>Echinacea sanguinea</i>	Sanguine purple coneflower
<i>Echinacea simulata</i>	Wavyleaf Purple Coneflower
<i>Echinacea tennesseensis</i>	Tennessee Coneflower

(*)= Farmakolojik potansiyele sahip *Echinacea* türleri

Çizelge 2. 1968’de McGregor tarafından yapılan sınıflandırma ve 2002’de Binns ve arkadaşlarınca yapılan gözden geçirilerek yeniden düzenlenen *Echinacea* sınıflandırmalarının karşılaştırması (Arnason ve ark., 2006)

Mc Gregor (1968)	Binns ve ark. (2002)
<i>Echinacea angustifolia</i>	<i>E. pallida</i> var. <i>angustifolia</i>
<i>Echinacea atrorubens</i>	<i>E. atrorubens</i> var. <i>atorubens</i>
<i>Echinacea laevigata</i>	<i>E. laevigata</i>
<i>Echinacea pallida</i>	<i>E. pallida</i> var. <i>pallida</i>
<i>Echinacea paradoxa</i>	<i>E. atrorubens</i> var. <i>paradoxa</i>
<i>Echinacea paradoxa</i> var. <i>neglecta</i>	<i>E. atrorubens</i> var. <i>neglecta</i>
<i>Echinacea purpurea</i>	<i>E. purpurea</i>
<i>Echinacea sanguinea</i>	<i>E. pallida</i> var. <i>sanguinea</i>
<i>Echinacea simulata</i>	<i>E. pallida</i> var. <i>simulata</i>
<i>Echinacea tennesseensis</i>	<i>E. pallida</i> var. <i>tennesseensis</i>



Şekil 1. *Echinacea* türlerinin kuzey Amerika’daki dağılımına ait harita (McKeown, 1999).

Ekonomik ve tıbbi açıdan önemi ile birlikte başta Avrupa ülkeleri olmak üzere, Latin Amerika'dan Afrika'ya, Orta-Doğu'dan Asya'ya, dünyanın büyük bir bölümünde *Echinacea* türlerinin kültürü yapılmaktadır (Letchamo ve ark., 2002).

Çizelge 3. Dünya üzerinde *Echinacea* türlerinin kültürünü yapan başlıca ülkeler ve buldukları kıtalar (Letchamo ve ark., 2002).

Kültürün Yapıldığı Kıta	Kültürün Yapıldığı Ülkeler
Kuzey Amerika	Amerika Birleşik Devletleri, Kanada
Güney Amerika	Kosta Rika, Şili
Avrupa	Avusturya, Almanya, Finlandiya, Norveç, Yugoslavya, Rusya
Afrika	Mısır, Tanzanya, Güney Afrika Cumhuriyeti, Botswana
Avusturalya	Avusturalya, Yeni Zelanda

Avrupa'da ülkemiz dışında *Echinacea* kültürü yapan onsekiz ülke bulunmaktadır.

Bunlar:

Almanya

Polonya

Ukrayna

İsviçre

Slovakya

Rusya

İtalya

Çek Cumhuriyeti

Finlandiya

Avusturya

Macaristan

Norveç

Slovenya

Bulgaristan

Danimarka

Romanya

Litvanya

İskoçya

(Miller ve Yu, 2004)

1.1.5. *Echinacea purpurea* ve *Echinacea pallida* Tür Özellikleri

1.1.5.1. *Echinacea purpurea* Tür Özellikleri

Çok yıllık otsu bitkilerdir. Gövde dik, güçlü, dallanmış, 60-180 cm uzunluğunda, az ya da çok yumuşak tüylü veya tüysüzdür. Taban yaprakları ovattan ovat-lanseolata kadar, tepesi akut, kenarları keskin ya da yumuşak testere dişleri şeklinde girintili; yaprak sapları 25 cm'ye kadar, lamina 20x15 cm genişliğinde ve tabana doğru daralır, çoğunlukla tabanda kalp şeklinde, dekurrent, 3-5 damarlıdır; gövde yaprakları aşağıda saplı, üstte sapsız 7-20 cm uzunluğunda 1,5-8 cm genişliğinde, iki yüzeyde pürüzlü; brakteler linear lanseolat, tabana doğru daralan, dış yüzeyi tüylü, sonradan zarımsıdır. Çiçek başları 1,5-3 cm uzunluğunda, 5-10 mm genişliğinde; morumsu kırmızı renktedir. Brakteoller 9-13 mm uzunluğunda ve bunun yarısı kadar uzunlukta kılçıklıdır. Tüpsü çiçeklerin korollası 4,5-5,5 mm uzunluğunda olup loblar 1 mm uzunluğundadır. Aken 4-4,5 mm; polen taneleri sarı, 19-21 µm çapında haploittir (WHO Monographs, 1999; Demirezer ve ark., 2007).

1.1.5.2. *Echinacea pallida* Tür Özellikleri

Gövdesi basit nadiren dallanmış, 40-90 cm boyunda, az ya da çok yumuşak tüylü; yapraklar oblong-lanseolattan uzun eliptiğe kadar, koyu yeşil, iki yüzü de az ya da çok tüylü, 3 damarlı; taban yapraklar 10-35 cm uzunluğunda, 1-4 cm genişliğinde; gövde yaprakları 10-25 cm uzunluğunda, 1,25 cm genişliğinde, tepesi akut, yapraklar aşağıda saplı, yukarıda sapsız, brakteler lanseolattan dar oblonga kadar değişen şekillerde, 8-17 mm uzunluğunda, 2-4 mm genişliğinde, az ya da çok tüylü, siliar (kirpiksi tüylü), 3 veya 4 seri halinde kademeli olarak brakteollere dönüşmüştür. Dilsî çiçekler geriye doğru kıvrılmış, 4-9 cm uzunluğunda, 5-8 mm genişliğinde morumsu, pembe veya beyaz renktedir. Brakteoller 1-1,3 cm, 2,5-3,5 mm uzunluğunda aristaldir. Tüpsü çiçeklerin her biri 8-10 mm uzunluğunda, loblar 2-3

mm; aken 3,7-5 mm, tüysüz, papus tepesi dişlidir. Polen taneleri beyaz renkte ve 24-28,5 µm çaplıdır. (WHO Monographs, 1999; Demirezer ve ark., 2007).

1.6. *Echinacea* Türlerinin Tarihçesi

Echinacea türleri Amerika yerlileri tarafından yüzyıllardan beri diş ağrısı, boğaz ağrısı, soğuk algınlığı, kuduz, yılan sokması, yara ve yanıklara karşı kullanılmıştır (Mat, 2002). Kuzey Amerika’da yapılmış arkeolojik kazılarda 1600’lü yıllara ait *Echinacea* örnekleri ile karşılaşmıştır (Hobbs, 1994). Kızılderili kabilelerince *E. angustifolia* tüm hastalıklara karşı ilaç “as a cure-all” olarak kabul edilmekteydi (Bown, 2002). Ancak Amerikan yerlilerinin tıbbi bitkiler konusundaki bilgi birikiminin çoğu Avrupalıların kıtaya gelmeleri ve kolonizasyonu sürecinde kaybolmuştur. Avrupalılar kıtaya gelişleriyle birlikte yerli Amerikan kabilelerini gelenekleriyle birlikte büyük ölçüde yok etmiştir. Bunun sonucu olarak, *Echinacea* hakkında Amerikan yerlilerinin bildiklerinin sadece bir kısmı bilinmektedir (Schar, 1999).

Bununla birlikte diğer kolonicilerin aksine Shakers isimli Amerikan kommünü (*E. angustifolia* kullanmışlar) yok etmek yerine yerlilerin geleneksel tedavi yöntemlerine ilgi göstermiş ve bazı kayıtlar tutmuşlardır (1837). Bu kayıtlar *Echinacea*’nın Kızılderililer tarafından nasıl kullanıldığına dair kanıtlar ve ipucu vermektedir (Schar, 1999).

Kolonicilere ait ilk tarihi kayıtlarda iki *Echinacea* türüne rastlanmaktadır. Bunlar A.B.D.’nin doğu kıyısında yetişmekte olan *E. purpurea* ve batıda bulunan *E. angustifolia*’dır. Doğal olarak koloniciler ilk olarak *E. purpurea* ile karşılaşmış ve *E. purpurea* botanik açısından bahsi geçen ilk *Echinacea* türü olmuştur (Schar, 1999). *Echinacea* türleriyle ilgili ilk kaynak ise 1762’de yayınlanan “Flora Virginica (L.T. Gronovius)’nın ikinci baskısıdır (Hobbs, 1994). 1830’da Raffinesque Siyu-kızılderilileri’nin sifilis tedavisinde *E. angustifolia*’yı kullandıklarından bahsetmiştir.

1835'te Riddell ve 1848'de botanikçi Asa Gray *E. purpurea* 'dan söz etmektedir (Schar, 1999).

Tarihi kayıtlar Amerikan yerlilerinin *Echinacea* türleri arasında en çok değer verdiği tür olarak *E. angustifolia*'yı göstermektedir. Diğer yandan bu insanların *E. purpurea* ve *E. pallida*'yı kullandığına dair herhangi bir kayıda rastlanmamıştır. İlgili metinler *E. angustifolia*'nın Amerikan yerlilerince tıbbi kullanımı ile ilgili iki noktaya işaret etmektedir. İlki bitkinin kökleri kullanılması, ikincisi ise kullanılan materyalin taze olmasıdır. Aşağıda *E. angustifolia*'nın Kızılderililer tarafından hangi sağlık sorunlarına karşı kullanıldığı tablo halinde verilmiştir (Schar, 1999).

Çizelge 4. *E. angustifolia*'nın Amerikan yerlileri tarafından tıbbi amaçla başlıca kullanım alanları (Schar, 1999).

İyileştirici Ajan olarak	Ağrıkessici olarak	Enfeksiyöz hastalıkların tedavisi
Göz iltihabı	Yanıkta acıyı hafifletme	Bademciklerin şişmesi
Göz rahatsızlıkları	Sıcağa karşı hassasiyeti azaltma	Kabakulak
Yılan sokması	Baş ağrısı	Kuduz
Böcek sokması	Diş ağrısı	
Enfekte yaralar/ Septik sorunlar	Mide ağrısı	
Egzema	Kramplar	
Yanıklar	Hazımsızlık	
	Epilepsi	

1870'lerde Nebraska'da Alman asıllı Dr. H.F.C. Meyer *Echinacea*'yı ilk kez tıp dünyasına tanıtan isim olmuştur (Hobbs, 1994). Bitkinin kullanımını yerlilerden öğrenen Meyer, *E. angustifolia* köklerinden hazırladığı tentürü, yani kan temizleyici "blood purifier" ilacını romatizma, migren, ağrı, yılan sokması, yaralar, hazımsızlık, bitki zehirlenmeleri, zehirli yılan sokması, sifilis, gangren, malarya, difteri, hemoroit gibi bir çok hastalığın tedavisinde kullanmıştır (Mat, 2002). Meyer'den önceki literatürde *Echinacea*'dan çok az bahsedilse de, Meyer'in *E. angustifolia*'yı keşfi ve bundan hazırladığı ilacı, patentini alarak tanıtması araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Hobbs, 1994). Meyer'in ilacı, 1887'de Dr. John King ve Ecz. John Uri Lloyd'un dikkatini çekmiş ve böylece *Echinacea* üzerindeki ilk bilimsel çalışma King ve Lloyd tarafından yapılmıştır. Önceleri *E. angustifolia* kökleri kullanılırken, daha sonra *E.*

pallida kökleri de kullanılmaya başlanmış (Mat, 2002) ve 1916'da (1916-1950) her iki tür de National Formulary of US'de ofisinal olarak yer almıştır (Bown, 2002).

Echinacea kullanımı 19. yy. sonları ve 20. yy. başlarında A.B.D.'de dönemin önemli araştırmacıları tarafından araştırılmış ve tedavi yöntemi olarak benimsenmiştir. Bununla beraber bu dönemdeki *Echinacea* kullanımı daha çok geleneksel kullanıma ait verilere ve az sayıdaki klinik çalışmaya dayanmaktaydı (Mills ve Bone, 2000).

Avrupa'da en yaygın kullanımına rastlanan ülke Almanya'dır (Baret, 2003). 1939'da (Bown, 2002) Dr. Gerhald Madaus Almanya'ya *E. angustifolia* tohumları getirmek ve kültür amacıyla Amerika'ya gitmiştir. Ancak daha sonradan bir hata sonucu getirdiği tohumların *E. purpurea*'ya ait olduğu anlaşılmıştır. Bu yanlışlık, o tarihten itibaren *E. purpurea*'yı Alman bitkisel ilaç pazarının (Avrupa'nın bu alandaki en büyüğü) hakimi haline getirmiştir (Barrett, 2003).

Ancak *Echinacea*'nın yükselişi sürekli olmamıştır. 1930'larda antibiyotiklerin sahneye çıkması ve neredeyse yüzde yüz tedavi oranına sahip olması nedeniyle doğal olarak *Echinacea*'ya olan ilgi düşüşe geçmiştir. 1930-1960 arası dönem "*Echinacea*'nın Karanlık Çağı" olarak açıklanmaktadır. 1960-1970'lerde araştırma dünyası kansere odaklanmaya başlamıştır. Bilim adamları bağışıklık sisteminin kanser hücrelerinin denetlenmesinden sorumlu olduğunu farketmiş ve immünoestimülan bitkiler (İçlerinde *Echinacea*'nın da bulunduğu) üzerinde araştırmalar yapılmıştır. 1980'lerde antibiyotik kullanımıyla ilgili ciddi sorunların ortaya çıkması insanları bitkisel-alternatiflere yönlendirmiştir. Bunun sonucu *Echinacea* tekrar gündeme gelmiş, kitaplar yazılmış yeni ürünler tanıtılmıştır. Takip eden gelişmeler 1979'da minör bir ürün olan çeşitli *Echinacea* ürünlerini 1997'de A.B.D.'de 365 milyon dolarlık toplam satışa ulaştırmıştır (Schar, 1999).

1.2.Genel Bilgiler

1.2.1. *Echinacea* Türlerinin Kimyasal Bileşimi

1.2.1.1. *Echinacea* Türlerinden İzole Edilen Kimyasal Bileşikler

Echinacea, Asteraceae familyasının küçük bir cinsidir. *Echinacea* türleri arasında üçü (*E. angustifolia* DC. var. *angustifolia*, *E. pallida* (Nutt.) ve *E. purpurea* (L.) Moench) bağışıklık sistemini güçlendirici (immünostimülan etki) etkilerinden ötürü ticari olarak tıbbi kullanıma sahiptir. Bunun bir sonucu olarak, *Echinacea* ile ilgili fitokimyasal veriler bu üç türle sınırlıdır.

Echinacea türleri, immünostimülan etkiye katkısı olan dört grup bileşik içermektedir.

Bunlar:

Alkemitler (Alkilamitler),

Glukoproteinler,

Polisakkaritler,

Kafeik asit türevleri,

olarak belirlenmiştir.

Bu etkili bileşiklerin yanında *Echinacea* türleri, flavonoit, uçucu yağ, hidrokarbon ve alkaloit içermektedir (Miller ve Hu, 2004).

1.2.1.1.1. Alkamitler

Alkamitler lipofilik maddeler olup (Baum ve ark. 2006), bir ya da daha fazla çifte bağa, birden üçe kadar asetilenik bağlantının eşlik ettiği yağ asiti amitleridir (Miller ve Yu, 2004). Bu maddeler *Echinacea* türlerinde 1'den 25'e kadar numaralar verilerek tespit edilmiştir (Bauer ve Remiger, 1989). Alkamitler *E. purpurea* ve *E. angustifolia* köklerinin karakteristik bileşikleridir. Bauer ve Remiger'in 1989'da, Sloley ve arkadaşlarının 2001'de yaptığı çalışmalarda, *E. pallida* köklerinde alkamitler çok düşük miktarda bulunmuştur (Bauer ve Remiger, 1989; Sloley ve ark., 2001). Bu nedenle alkamitler majör kök bileşikleri olarak *E. purpurea* ve *E. angustifolia* kök tozlarının *E. pallida* kök tozlarından ayırt edilmesinde kullanılmaktadır (Miller ve Yu, 2004). Topraküstü kısımlarda ise tıbbi olarak kullanılan üç *Echinacea* türü için alkamit içeriği karakteristik farklar taşımamaktadır (Bauer ve Remiger, 1989).

E. purpurea köklerinde, trideka-2E,7Z-10,12-diinik asit izobütülamit dışında hepsinin 2,4-di-en tipinde olduğu 10 alkamit tespit edilmiştir (Miller ve Yu, 2004). Majör bileşenler olarak, *E. purpurea* ve *E. angustifolia* köklerinde, izomerik (2E,4E,8Z,10E/Z)-N-izobütildodeka-2,4,8,10-tetraenamitler bulunmaktadır. Stuart ve Wills'in 2000'de yaptığı çalışmada, % 100 metanolle elde edilmiş *E. purpurea* kök ekstresinde, izomerik (2E,4E,8Z,10E/Z)-N-izobütildodeka-2,4,8,10-tetraenamit miktarı toplam alkamit miktarının % 45'i (10E: % 32, 10Z: % 13) olarak açıklanmıştır (Stuart ve Wills, 2000). Yine *E. angustifolia* köklerinde tespit edilen üç alkamit daha *E. purpurea* köklerinde bulunmaktadır (Bauer ve ark. 1988b, Miller ve Yu, 2004).

E. purpurea topraküstü kısımlarında, izomerik (2E,4E,8Z,10E/Z)-N-izobütildodeka-2,4,8,10-tetraenamitler majör alkamitler olarak bulunmaktadır (Miller ve Yu, 2004). Hem kök hem de topraküstü kısımları bu izomerleri % 0,004-0,039 oranında içermektedir (Bauer ve Remiger, 1989). Bunun yanında *E. purpurea* köklerinde bulunan en az 10 alkamit eser miktarda da olsa topraküstü kısımlarında

bulunmaktadır. Değişik şartlarda yapılan çalışmalarda *E. purpurea* kurutulmuş topraküstü kısımlarındaki toplam alkamit miktarının % 0,001-% 0,38 arasında değişebildiği görülmüştür. Bu miktarlar iklimsel şartlar, yetiştirme, kurutma ve saklama şartları ve analitik yöntemlere göre farklılık göstermektedir (Upton ve ark. 2007).

E. pallida köklerinde alkamit varlığı ve profili *E. purpurea* ve *E. angustifolia*'ya göre farklıdır (Bauer ve Remiger 1989). *E. pallida* köklerinde çok düşük alkamit konsantrasyonuna karşılık *E. pallida* köklerinde ana lipofilik bileşikler olarak poliasetilenik bileşikler bulunmaktadır (Bauer ve Remiger 1989; Bauer ve ark. 1988a; Miller ve Yu, 2004). Jakobson tarafından 1967'de *E. pallida* ve *E. angustifolia* köklerinde majör alkamit olarak tespit edilen "Ekinasein" (echinacein) isimli izobütil amit, Bauer ve Remiger tarafından yapılan araştırmalarda ekinasein bu iki türde de tespit edilememiştir (Jakobson, 1967; Bauer ve Remiger, 1989). *E. pallida* köklerinde ve topraküstü kısımlarındaki sınırlı alkamit varlığına örnek olarak izomerik dodeka-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenik asit-izobütilamitler (kök) ve dodeka-2E,4E,8Z,10E-tetraasetilizobütilamit (topraküstü kısımlar) verilebilir (Gruenwald ve ark., 2004).

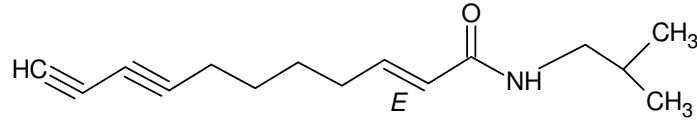
E. angustifolia köklerinde majör olarak bulunan alkamitler, izomerik (2E,4E,8Z,10E/Z)-N-izobütildodeka-2,4,8,10-tetraenamitlerdir (Miller ve Yu, 2004). İzomerik (2E,4E,8Z,10E/Z)-N-izobütil dodeka-2,4,8,10-tetraenamitler *E. angustifolia* köklerinde % 0,009-0,151 topraküstü kısımlarında ise % 0,001-0,03 oranlarında bulunmuştur (Bauer ve Remiger, 1989). Yapılan *in vitro* çalışmada izomerik (2E,4E,8Z,10E/Z)-N-izobütildodeka-2,4,8,10-tetraenamitler, belirgin biçimde LOX ve siklooksijenaz inhibitör etki göstermiş ancak bu etkinin total *n*-hekzan ekstresinden daha düşük olduğu görülmüştür (Müller-Jakic ve ark., 1994). Bunun yanında alkamitler fagositozun uyarılmasında *in vitro* düşük etkinlik sergilemesine rağmen *in vivo* etkinliği daha yüksek bulunmuştur (Goel ve ark., 2002; Miller ve Yu, 2004).

Letchamo ve ark. (2002), dört farklı *Echinacea* türünde (üçü tıbbi olarak kullanılan türler olmak üzere), izobütülamitlerin bitki kısımlarındaki dağılımlarını azalan sırayla; testa > kökler > rizom > gövde ve dallar > tüpsü çiçekçikler > yapraklar > dilsî çiçekçikler = endosperma şeklinde bildirmiştir.

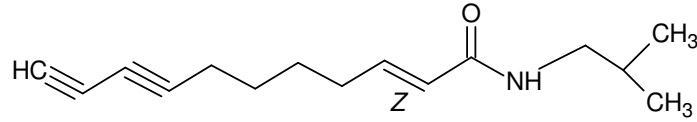
Alkamitler lipofilik bileşikler olarak alkollü ekstrelerde bulunur. Bunun yanında sulu ekstrelerde ve bitkinin sıkılmasıyla elde edilen özsuda sadece eser miktarlarda bulunabilmektedir (Upton ve ark., 2007).

Şekil 2. *Echinacea* türlerinde bulunan alkamitler

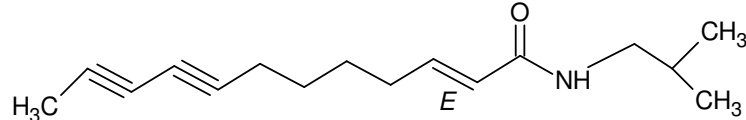
1. (E)-N-izobütülundek-2-en-8,10-diinamit



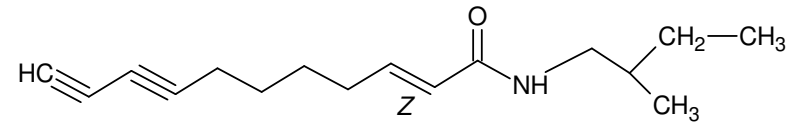
2. (Z)-N-izobütülundek-2-en-8,10-diinamit



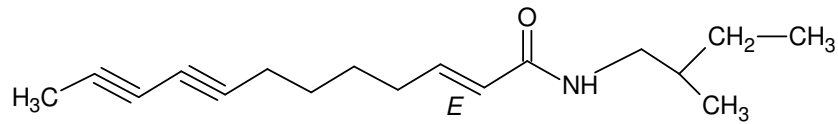
3. (E)-N-izobütildodek-2-en-8,10-diinamit



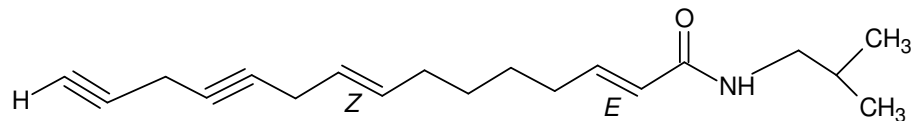
4. (Z)-N-(2-metilbütil)-undek-2-en-8,10-diinamit



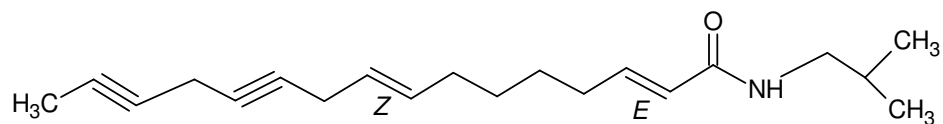
5. (E)-N-(2-metilbütil)-dodek-2-en-8,10-diinamit



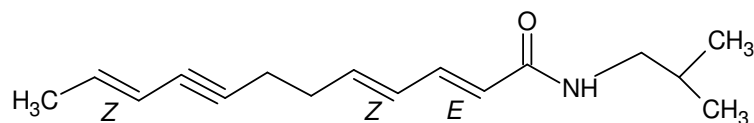
6. (2E,9Z)-N-izobütilpentadeka-2,9-dien-12,14-diinamit



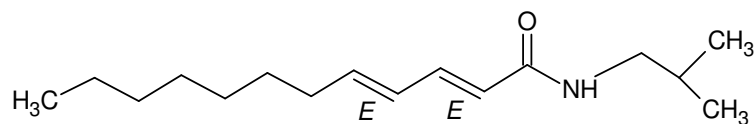
7. (2E,9Z)-N-izobütilheksadeka-2,9-dien-12,14-diinamit



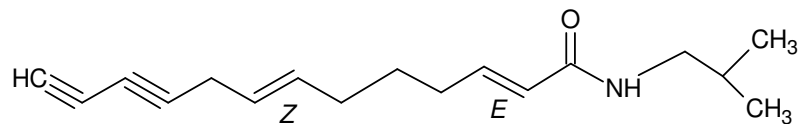
8. (2E,4Z,10Z)-N-izobütildodeka-2,4,10-trien-8-inamit



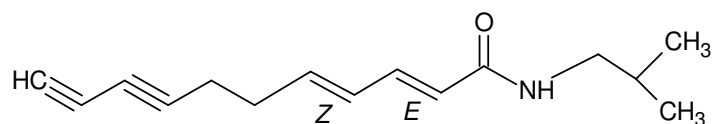
9. (2E,4E)-N-izobütildodeka-2,4-dien-8,10-diinamit



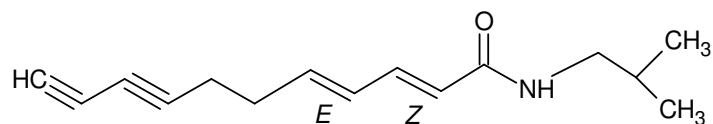
10. (2E,7Z)-N-izobütiltrideka-2,7-dien-10,12-diinamit



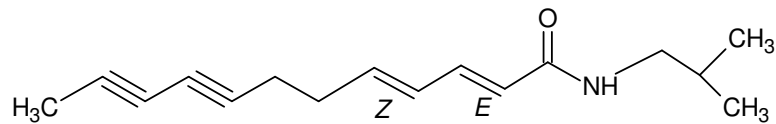
11. (2E,4Z)-N-izobütilundeka-2,4-dien-8,10-diinamit



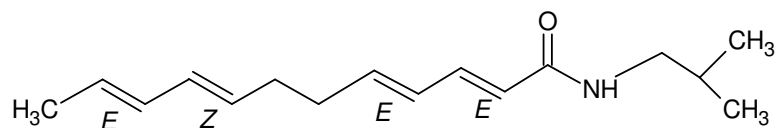
12. (2Z,4E)-N-izobütilundeka-2,4-dien-8,10-diinamit



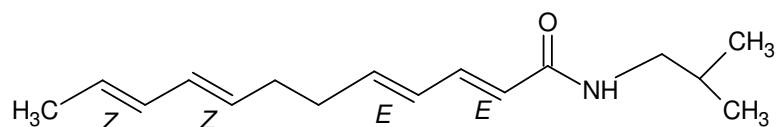
13. (2E,4Z)-N-izobütildodeka-2,4-dien-8,10-diinamit



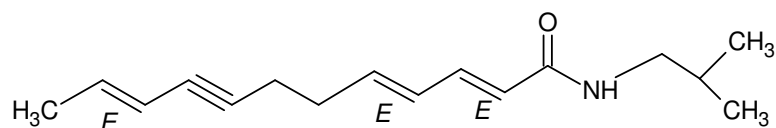
14. (2E,4E,8Z,10E)-N-izobütildodeka-2,4,8,10-tetraenamit



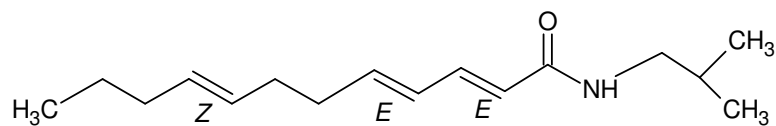
15. (2E,4E,8Z,10Z)-N-izobütildodeka-2,4,8,10-tetraenamit



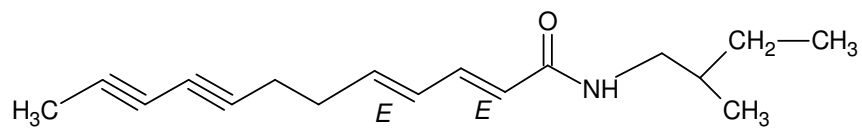
16. (2E,4E,10E)-N-izobütildodeka-2,4,10-trien-8-inamit



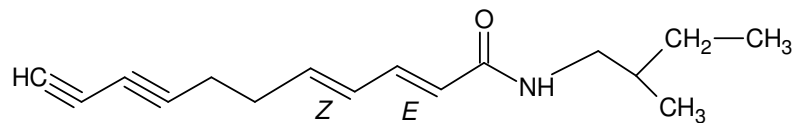
17. (2E,4E,8Z)-N-izobütildodeka-2,4,8-trienamit



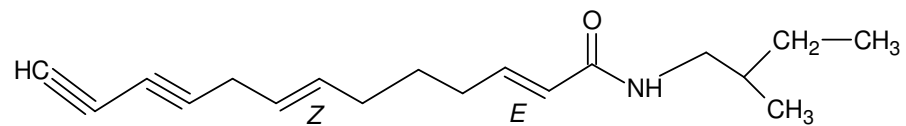
18. (2E,4Z)-N-(2-metilbütil)-dodeka-2,4-dien-8,10-diinamit



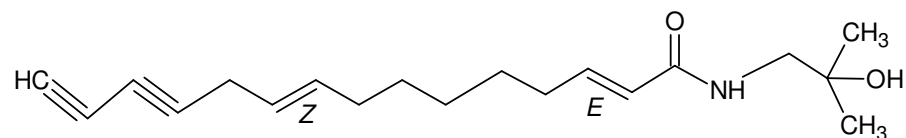
19. (2E,4Z)-N-(2-metilbütil)-undeka-2,4-dien-8,10-diinamit



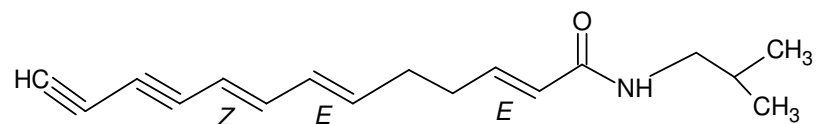
20. (2E,7Z)-N-(2-metilbütül)-trideka-2,7-dien-8,10-diinamit



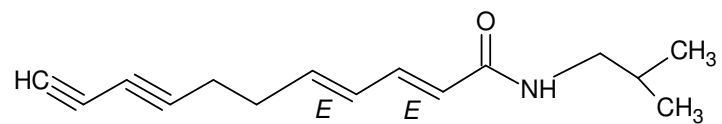
21. (2E,9Z)-N-(2-hidroksi-2-metilpropil)-pentadeka-2,9-dien-8,10-diinamit



22. (2E,6E,8Z)-N-izobütültrideka-2,6,8-trien-10,12-diinamit



23. (2E,4E)-N-izobütülundeka-2,4-dien-8,10-diinamit



1.2.1.1.2. Kafeik asit türevleri

Kafeik asit türevleri (kafeoil-kinik asit ve kafeoil-tartarik asit esterleri), *E. purpurea*, *E. pallida* ve *E. angustifolia*'nın karakteristik fenolik bileşikleridir. Yapılarındaki çeşitlilik, bu üç taksondan hazırlanan hem taze hem de ticari amaçla hazırlanan ekstralarının elde edilmesine olanak sağlar (Miller ve Yu, 2004).

E. purpurea topraküstü kısımlarının temel kafeik asit türevi, kikorik asit (2,3-*O*-dikafeoil-tartarik asit) ve kaftarik asittir (2-*O*-kafeoil-tartarik asit) (Perry ve ark. 2001). Bununla birlikte 2-*O*-kafeoil-3-*O*-feruloil tartarik asit, kikorik asit metil ester, 2,3-*O*-diferuloil tartarik asit, 2-*O*-feruloil tartarik asit ve 2-*O*-kafeoil-3-*O*-kumaroil tartarik asit *E. purpurea* topraküstü kısımlarında bulunmaktadır. Madde miktarları, kültür şartları, toplanma zamanı, saklama koşulları ve analiz yöntemi ile farklılıklar göstermektedir. Buna göre kurutulmuş *E. purpurea* topraküstü kısımlarındaki kikorik asit miktarı % 0,52-4,93 arasındadır (Letchamo ve ark. 2002, Perry ve ark. 2001, Upton ve ark. 2007). Yapılan çalışmalarda en yüksek kikorik asit oranına şu ana kadar Rusya'da kültüre alınan *E. purpurea* topraküstü kısımlarında rastlanmıştır (Letchamo ve ark. 2002). Kaftarik asit ise % 0,18-0,82 arasında bulunmaktadır (Perry ve ark. 2001). Kurutulmuş *E. purpurea* topraküstü kısımlarında ekinakozit (< % 0,08), klorojenik asit (% 0,01-0,08) ve sinarin (< % 0,01) çok düşük miktarlarda tespit edilmiştir (Binns ve ark. 2002; Letchamo ve ark. 1999, 2002; Perry ve ark. 2001).

E. purpurea köklerinde majör kafeik asit türevi olarak kikorik asite, ikincil olarak da kaftarik asite rastlanmaktadır (Perry ve ark. 2001). Kurutulmuş *E. purpurea* köklerinde % 0,6-2,4 civarında kikorik asit bulunmaktadır (Gruenwald ve ark., 2004; Stuart ve Wills, 2000). Madde miktarları, kültür şartları, toplanma zamanı, saklama koşulları ve analiz şartları ile değişim göstermekle birlikte çiçeklenme evresinde ve olgunlaşmış bitkinin tüm kısımlarında kikorik asit miktarlarının daha genç olan bitki kısımlarına göre yüksek olduğu görülmektedir (Stuart ve Wills, 2000 ; Upton ve ark.,

2007). Çiçekli zamanda toplanan *E. purpurea*'da toplam kikorik asit dağılımının, %35 çiçek ve yapraklarda, % 20 kökte, % 10 gövde ve dallarda olduğu bulunmuştur (Stuart ve Wills, 2000). *E. purpurea* köklerinde kaftarik asit miktarı ise % 0,24-0,41 oranında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Binns ve ark. 2002; Perry ve ark. 2001).

E. pallida yaprak ve dallarında majör bileşen kikorik asittir (Cheminat ve ark., 1988). Ekinakozit kurutulmuş köklerde % 0,5-1,2 oranında majör bileşik olarak kikorik asitten (% 0,04-0,05) daha yüksek (Bauer ve ark., 1988a; Binns ve ark., 2002; Pellati ve ark., 2005), çiçeklerde ve yapraklarda ise eser miktarda bulunmaktadır (Cheminat ve ark., 1988). Minör fenolik maddeler olarak *E. pallida* topraküstü kısımları klorojenik asit, izoklorojenik asit ve verbaskozit içermekte (Gruenwald ve ark., 2004); *E. pallida* köklerinde ise 6-kafeoil ekinakozit minör olarak bulunmaktadır (Miller ve Yu, 2004).

E. angustifolia topraküstü kısımları, kikorik asit, klorojenik asit, izoklorojenik asit, verbaskozit, ekinakozit ve sinarin içerir (Gruenwald ve ark., 2004; Kabganian ve ark., 2002). Ekinakozit majör kafeik asit türevi olarak, çiçekler (% 0,07) ve yapraklarda (% 0,09) da bulunmakla birlikte en fazla gövdede (% 0,14) mevcuttur. Sinarine ise çiçekte bulunmamakla beraber minör kafeik asit türevi olarak gövde (% 0,01) ve yapraklarda (% 0,04) rastlanmıştır (Kabganian ve ark., 2002). *E. angustifolia* köklerinde (*E. pallida*'da da olduğu gibi) yine majör kafeik asit türevi ekinakozittir (% 0,5-1). *E. angustifolia*'da sinarin (% 0,08-1) varlığı *E. pallida*'dan ayırt edilmesini sağlar. Bunun yanında çok düşük kikorik asit konsantrasyonuna sahip olması *E. angustifolia* köklerinin *E. purpurea* köklerinden ayırt edilebilmesini sağlayan özelliklerindedir. Ekinakozit ve kikorik asit miktarları da, *E. purpurea* ve *E. pallida* köklerini ayırt edebilmek için belirleyici özelliklerdendir (Bauer ve ark., 1988a; Binns ve ark., 2002; Kabganian ve ark., 2002; Pellati ve ark., 2005; Perry ve ark., 2001; Miller ve Yu, 2004).

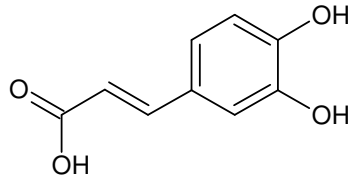
Kikorik asit immunostimulan ve anti-enflamatuvar etkilere sahiptir (Upton ve ark., 2007). Kikorik asit, ekinakozit, kaftarik asit ve klorojenik asit gibi kafeik asit türevlerinin antioksidan özellikte oldukları bulunmuştur (Hu ve ark., 2000; Miller ve

Yu, 2004). Çeşitli antioksidan aktivite çalışmalarında ekinakozitin diğer kafeik asit türevlerine göre belirgin antioksidan etkiye sahip olduğu ve bununla beraber (en yüksek ekinakozit konsantrasyonuna sahip olması nedeniyle) *E. pallida*'nın da *E. purpurea* ve *E. angustifolia*'ya göre daha belirgin antioksidan etkiye sahip olduğu görülmüştür (Maffei-Facino ve ark., 1995; Hu ve Kitts, 2000).

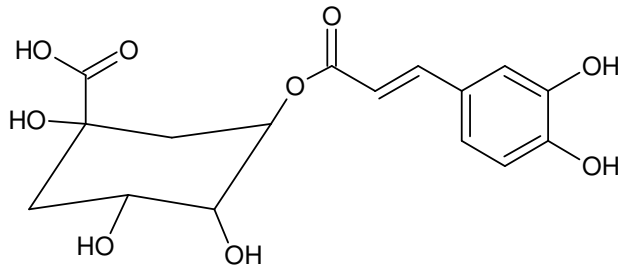
Kafeik asit türevleri hidrofilik (polar) bileşikler olup, sulu, sulu-alkollü ekstrelerde ya da sıkılarak elde edilen bitki öz suyunda bulunmaktadır (Upton ve ark., 2007).

Şekil 3. *Echinacea* türlerinde bulunan kafeik asit ve türevleri

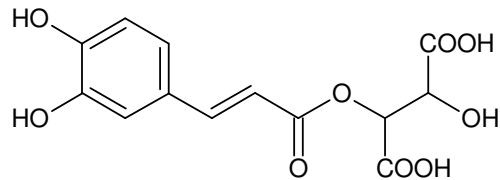
Kafeik asit

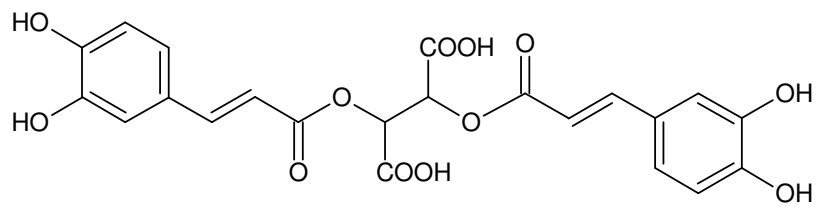
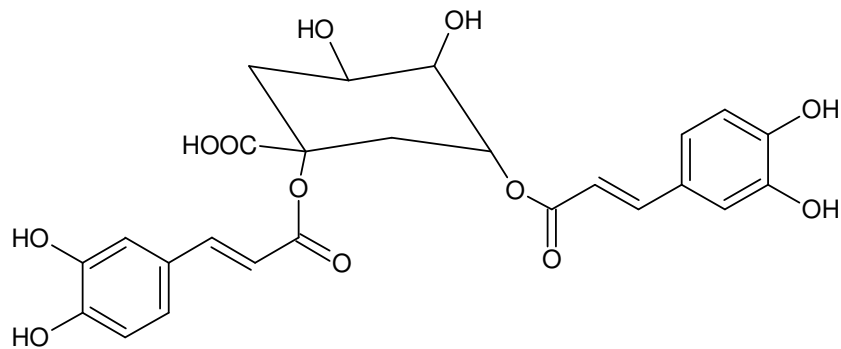
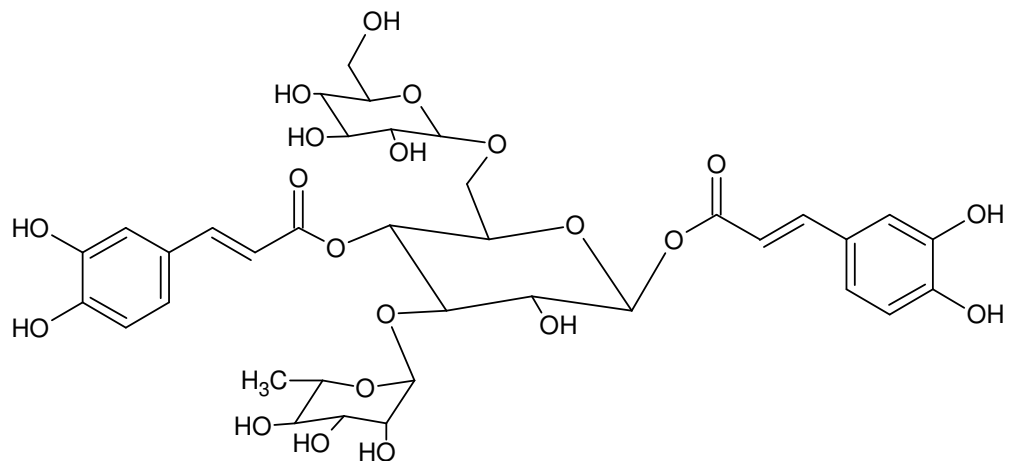


Klorojenik Asit



Kaftarik Asit



Kikorik Asit**Sinarin****Ekinakozit**

1.2.1.1.3. Polisakkaritler

E. purpurea topraküstü kısımlarından, “PS-I” ve “PS-II” adı verilen, immünoestimulan özellikte iki grup polisakkarit izole edilmiştir. PS-I, 4-*O*-metilglukuronoarabinoksilan (Ortalama MA: 35,000) yapısında, PS-II ise asitik arabinoramnogalaktan (Ortalama MA: 50,000) yapısında polisakkaritlerdir . Bu polisakkaritlerin hem *in vitro* hem de *in vivo* çalışmalarda belirgin immünoestimulan aktiviteleri tespit edilmiştir (Gruenwald ve ark., 2004; Stimpel ve ark., 1984; Proksch ve Wagner, 1987; Miller ve Yu, 2004). *E. purpurea* köklerinden de bir polisakkarit fraksiyonu izole edilmiştir ancak ayrıntılı analizi yapılmamış olsa da *E. purpurea* topraküstü kısımlarındaki polisakkarit kompozisyonuna benzerlik gösterdiği bildirilmiştir. Polisakkaritlerin bitki ekstraktlarından izole edilmesinin güçlüğü ve maliyetliliği ve dolaylı olarak aktivite çalışmalarının tekrarlanabilirliğinin zorlaşması araştırmacıları doku kültürü yoluyla izolasyona yöneltmiştir. Ancak yapı olarak bitki ve doku kültüründen elde edilen polisakkaritler farklılık göstermektedir. Bunun nedeni ise polisakkaritlerin doku kültürü hücre duvarının birincil bileşeni olmasıdır (Miller ve Yu, 2004).

E. purpurea hücre kültüründen izole edilen bir fukogalaktoksiloglukanın (MA: 25,000) fagositozu *in vitro* ve *in vivo* olarak artırdığı, yine hücre kültüründen izole edilen bir asitik arabinogalaktanın (MA: 75,000) makrofajları tümör nekroze edici faktör salınımı için stimüle ettiği bildirilmiştir (Wagner ve ark. 1988).

Sıkılarak elde edilen *E. purpurea* öz suyundan pektin benzeri bir polisakkarit, yaprak ve gövdesinden bir ksiloglukan (MA: 79,500) izole edilmiştir. *E. angustifolia* köklerinde inüline rastlanmıştır (Miller ve Yu, 2004). Bonadeo ve ark. (1971) *E. angustifolia*’dan büyük oranda, bir asitik mukopolisakkarit (echinacin B olarak adlandırdıkları) içeren bir polisakkarit karışımını izole etmiştir.

Kurutulmuş *E. purpurea* topraküstü kısımları % 0,52-1,3, kökler % 0,35-1,55 oranında polisakkarit içeriğine sahiptir. Total polisakkarit miktarı bitkinin ikinci yılında birinci yılına oranla daha yüksektir. PS-I çiçeklenmenin başlamasıyla birlikte topraküstü kısımlarda yüksek miktarlara ulaşır. PS-II miktarı ise çiçeklenme ile birlikte çiçek ve yapraklarda düşüşe geçer (Upton ve ark., 2007).

Polisakkaritlere sulu ya da düşük dereceli alkolle hazırlanmış *Echinacea* ekstralarında daha sıklıkla rastlanmaktadır.

1.2.1.1.4. Glukoproteinler

Glukoproteinler genellikle arabinogalaktanlarla, hücre duvarı yapısında bir arada bulunurlar (Egert ve Besucher, 1992). *E. purpurea* ve *E. angustifolia* köklerinden üç adet glukoprotein (MA: 17,000, 21,000, 30,000) izole edilmiştir. Glukoproteinlerin majör proteinleri, aspartat, glisin, glutamat ve alanindir. Ana şeker molekülleri ise, arabinoz (% 64-84), galaktoz (% 1,9-5,3) ve glukozaminlerdir (% 6). *E. purpurea* ve *E. angustifolia* kökleri glukoprotein miktarı açısından benzerlik göstermektedir. *E. pallida* kökleri glukoprotein miktarı ise diğer iki türe göre belirgin şekilde düşüktür (Miller ve Yu, 2004).

Glukoproteinler ve polisakkaritler, *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda immünostimülan etkinlik göstermiştir. Ancak bu bileşiklerin oral biyoyararlanımları konusu kesinlik kazanmamıştır (Upton ve ark., 2007).

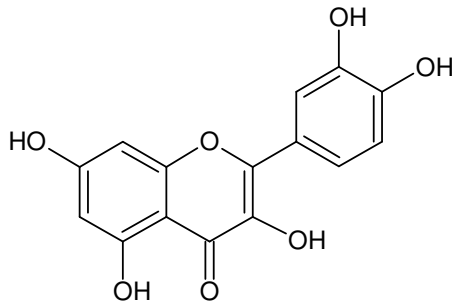
1.2.1.1.5. Flavonoidler

E. purpurea topraküstü kısımlarının içeriğinde bir çok kersetin ve kemferol glukoziti varlığı tespit edilmiştir (Upton ve ark., 2007). *E. purpurea* yaprakları % 0,48 flavonoid (kersetin türevleri ve rutin) içermektedir. *E. angustifolia* topraküstü kısımlarında majör flavonoidin rutinden (% 0,019-0,032) ziyade patuletin-3-O-

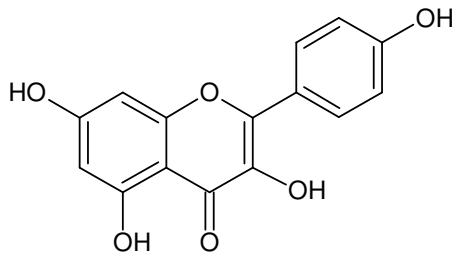
rutinozit (% 0,11-0,24) olduğu tespit edilmiştir. *E. purpurea* ve *E. pallida*'da ise majör flavonoitin rutin olduğu (rutin: % 0,038-0,060; patuletin-3-*O*-rutinozit: % 0,015-0,21) görölmektedir (Lin ve ark., 2002). Bununla birlikte, *E. purpurea* ve *E. pallida* çiçeklerinde majör antosiyanidin pigmentleri olarak iki bileşik; siyanidin 3-*O*-(β -D-glukopiranozit) ve 3-*O*-(6-*O* -malonil- β -D-glukopiranozit) tespit edilmiştir (Cheminat ve ark., 1989).

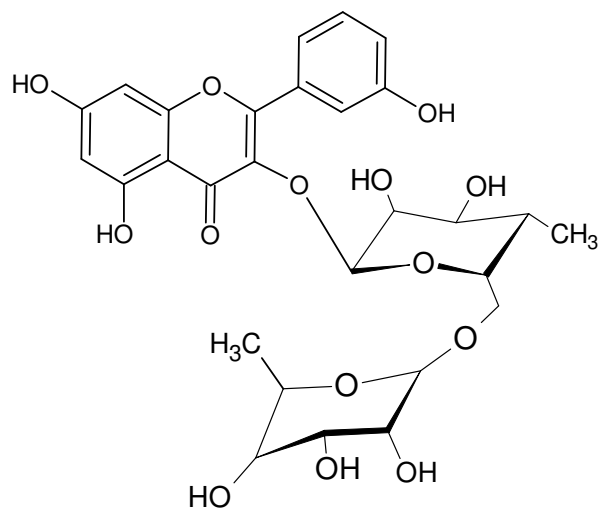
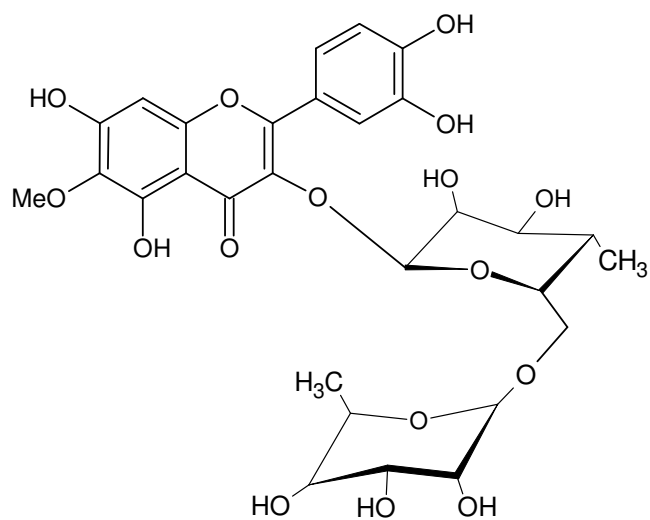
şekil 4. *Echinacea* türlerinde tespit edilmiş başlıca flavonoitler

Kersetin



Kemferol



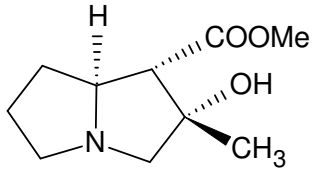
Rutin**Patuletin-3-O-rutinozit**

1.2.1.1.6. Alkaloitler

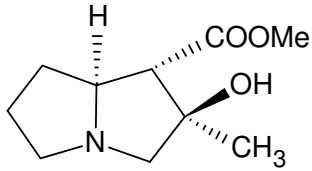
Echinacea türlerinde tespit edilmiş iki düşük toksisiteli pirolizidin alkaloiti mevcuttur. Bunlar tussilagin ve izotussilagin ve doymamış (1.C-2.C arasında çifte bağ) nesin halkası taşınamaları nedeniyle hepatotoksisiteyi düşüktür (Röder, 1995). Bu iki bileşik 1984'te *E. purpurea* ve *E. angustifolia* tüm bitki ekstraktlarında tespit edilmiştir. Majör bileşik olan tussilagin *Echinacea* türleri içinde en yüksek % 0,006 konsantrasyonda kurutulmuş bir *E. angustifolia* kök preparatında tayin edilmiştir (Upton ve ark., 2007; Miller ve Yu, 2004).

Şekil 5. *Echinacea* türlerinde bulunan alkaloitler

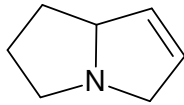
Tussilagin



İzotussilagin



Doymamış nesin halkası

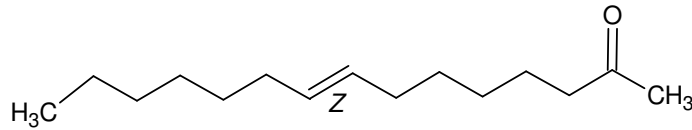


1.2.1.1.7. Hidrokarbonlar

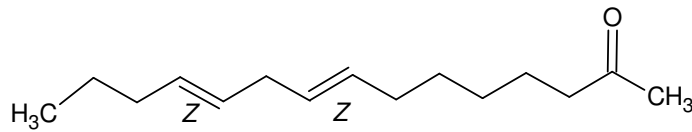
Hidrokarbonlar *E. pallida* köklerinin karakteristik bileşenleridir. Ketoalken ve ketoalkin (poliasetilenler) yapısında on bir bileşik tespit edilmiştir. *E. pallida* köklerinde tetradeka-8Z,-ene-11,13-di-in-2-on, pentadeka-8Z-en-11,13-di-in-2-on, pentadeka-8Z,13Z,-dien-11-in-2-on, pentadeka-8Z,11E,13E-trien-2-on, pentadeka-8Z,11Z,13E-trien-2-on, pentadeka-8Z,11Z-dien-2-on majör olarak bulunan ketoalkenler ve ketoalkinlerdir (Bauer ve ark., 1988a). *E. angustifolia* köklerinde (Z)-pentadeka-1,8-dien tespit edilmiştir. *E. angustifolia* köklerinde bulunan bir ester olan dodeka-2,4-dien-1-il izovalerat, *E. purpurea* köklerinde de bulunan bir poliasetilen bileşiğidir (Miller ve Yu, 2004). Poliasetilenler stabil bileşikler değildir ve kuru bitkide kolaylıkla oksidasyona uğrarlar. Başta hekzan ekstresi olmak üzere, sulu alkolle hazırlanmış ekstrelerde de tespit edilmişlerdir (Miller ve Yu, 2004; Upton ve ark., 2007).

Şekil 6. *Echinacea* türlerinde bulunan hidrokarbon bileşikleri

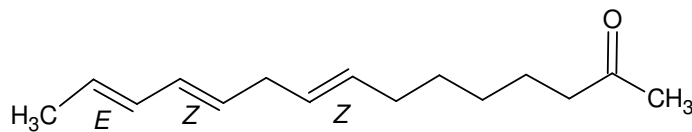
1. (Z)-pentadeka-8-en-2-on



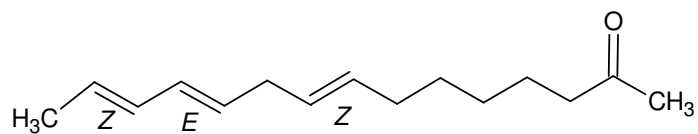
2. (11Z)-pentadeka-8,11-dien-2-on 8Z,



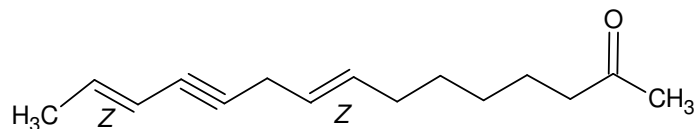
3. (8Z,11Z,13E)-pentadeka-8,11,13-trien-2-on



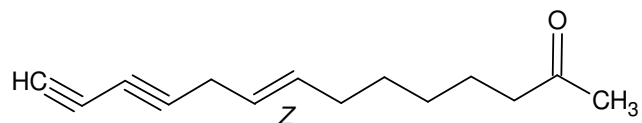
4. (8Z,11E,13Z)- pentadeka-8,11,13-trien-2-on



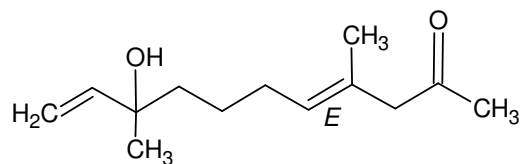
5. (8Z,13Z)- pentadeka-8,13-dien-11-in-2-on



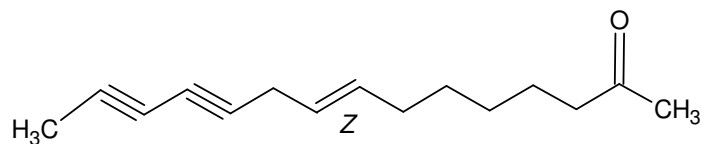
6. (Z)-tetradeka-8-en-11,13-diin-2-on



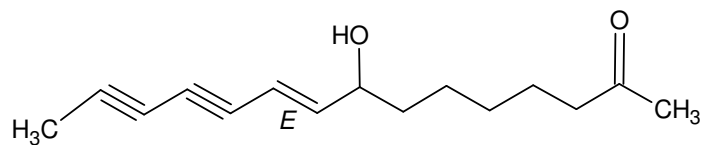
7. (E)-10-hidroksi-4,10-dimetildodeka-4,11-dien-2-on



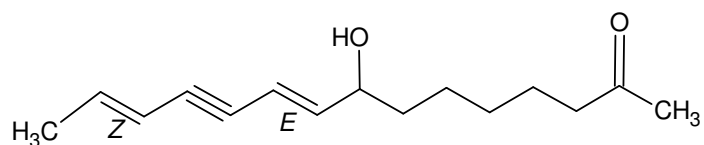
8. (Z)-pentadeka-8-en-11,13-diin-2-on

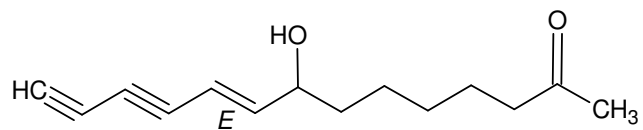


9. (E)-8-hidroksi-pentadeka-9-en-11,13-diin-2-on



10. (9E,13Z)-8-hidroksi-pentadeka-9,13-dien-11-in-2-on



11. (E)-8-hidroksi-tetradeka-9-en-11,13-diin-2-on

1.2.1.1.8. Uçucu Yağ ve Terpenik bileşikler

Echinacea türlerinde uçucu yağ miktarı ve içeriği, elde edildiği bitki kısmı, iklimsel şartlar, yetiştirme, kurutma ve saklama şartları ve analitik şartlara göre çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenle *E. purpurea*, *E. pallida* ve *E. angustifolia* uçucu yağ miktarları ve içeriği Çizelge 5. Çizelge 6., Çizelge 7. ve Çizelge 8.'de kısaca özetlenmeye çalışılmıştır.

Çizelge 5. *Echinacea purpurea* uçucu yağ kompozisyonu

Bitki ve Kısımları	<i>Echinacea</i> Türleri Uçucu Yağında Bulunan Başlıca Terpenik ve Uçucu Bileşikler	Kaynak
<i>E. purpurea</i>		
Herba (Tamamı)	Germakren D, germakren alkol, borneol, bornilasetat, pentadeka-8-en-2-on, karyofillen, karyofillen epoksit	Gruenwald ve ark., 2004
Aken (Meyve)	Karvomenten (% 16,4), germakren D (% 11,1), α -pinen (% 5,7), β -pinen (% 7,8), karyofillen (% 4,6), mirsen (% 6,8)	Schulthess ve ark., 1991
Çiçek	Nerolidol (% 6,6), α -pinen (% 5,1), germakren D (%4,8), α -fellandren (%4,3), β -pinen (% 7,8)	Holla ve ark., 2005
	Germakren D (% 7,2-33,5), mirsen (% 10,5-26,1), β -pinen (%<0,1-13), α -pinen (% 1,7-10,3), β -karyofilen (% 0,5-9,3), 1,8-pentadekadien (% 1,0-7,5), kübeben (% 0,3-7,0)*	Thappa ve ark., 2004*
	Germakren D (%57), β -karyofilen (%4,6), α -fellandren (%3,2), α -kadinol (%2,4)	Mirjalili ve ark., 2006
Yaprak	β -Mirsen, 3-hekzen-1-ol asetat, α -pinen, 2-metil4-pental, 3-hekzen-1-ol (<i>cis</i>), 2-hekzenal (<i>trans</i>), limonen	Mazza ve Cottrel, 1999
Gövde	β -Mirsen, α -pinen, limonen, β -pinen, sabinen, kamfen, osimen	Mazza ve Cottrel, 1999
Kök	Karyofillen, karyofillen epoksit, dodeka-2,4-dien-1il-izo-valerat, germakren D	Gruenwald ve ark., 2004
	α -Fellandren, 2-metilbütanal, 3- metilbütanal, <i>p</i> -simen	Mazza ve Cottrel, 1999

(*)Bu çalışmada temmuz ayından aralığa kadar olan dönemde uçucu yağ kompozisyonundaki değişim incelenmiştir.

Çizelge 6. *Echinacea pallida* uçucu yağ kompozisyonu

Bitki ve Kısımları	<i>Echinacea</i> Türleri Uçucu Yağında Bulunan Başlıca Terpenik ve Uçucu Bileşikler	Kaynak
<i>E. pallida</i>		
Herba (Tamamı)	1,8-Pentadekadien	Gruenwald ve ark., 2004
Aken (Meyve)	α -Pinen (% 15,5), β -pinen (% 15,0), 1,8-pentadekadien (% 8,8), germakren D türevi (% 6,2), karvomenten (%4,1)	Schulthess ve ark., 1991
Çiçek	Germakren D (%51,4), spatulenol (%4,3), α -kadinol (%4,3), (Z,Z)-farnesol (%3,4)	Mirjalili ve ark., 2006
	β -Mirsen, β -pinen, α -pinen, kamfen, <i>trans</i> -osimen	Mazza ve Cottrel, 1999
Yaprak	β -Mirsen, 3-hekzen-1-ol asetat, β -pinen, 3-hekzen-1-ol (<i>cis</i>), 2-metil-4-pental α -pinen	Mazza ve Cottrel, 1999
Gövde	β -Mirsen, β -pinen, kamfen, α -pinen, 3-hekzen-1-ol (<i>cis</i>), limonen	Mazza ve Cottrel, 1999
Kök	Pentadeka-8Z-en-2-on, 1,8Z-pentadekadien, 1-pentadekan	Gruenwald ve ark., 2004
	2-Metilbütanal, 3- metilbütanal, limonen, kamfen, β -mirsen	Mazza ve Cottrel, 1999

(**)Total iyon kromatogramında alan miktarı

Çizelge 7. *Echinacea angustifolia* uçucu yağ kompozisyonu

Bitki ve Kısımları	<i>Echinacea</i> Türleri Uçucu Yağında Bulunan Başlıca Terpenik ve Uçucu Bileşikler	Kaynak
<i>E. angustifolia</i>		
Herba (Tamamı)	Epışiyobunol, β -farnesen, α -pinen, β -pinen, mirsen, karvomenten, karyofillen	Gruenwald ve ark., 2004
Aken (Meyve)	β -Pinen (% 19,5), α -pinen (% 16,7), β -farnesen (%4,8), mirsen (3,6), epışiyobunol (3,5), karvomenten (%2,6)	Schulthess ve ark., 1991
Çiçek	Germakren D (%49,6), β -karyofilen (% 7,4), α -humulen (%2,8), spatulenol (%2,7), β -bizabolen (%2,4), δ -kadinen (%2,4), bornil asetat (%2,3)	Mirjalili ve ark., 2006
	β -mirsen, α -pinen, limonen, <i>trans</i> -osimen, kamfen, β -pinen	Mazza ve Cottrel, 1999
Yaprak	β -Mirsen, limonen, 3-hekzen-1-ol (<i>cis</i>), 2-metil-4-pental, 3-hekzen-1-ol asetat, kamfen, β -pinen	Mazza ve Cottrel, 1999
Gövde	β -Mirsen, limonen, α -pinen, kamfen, sabinen (1025), β -pinen	Mazza ve Cottrel, 1999
Kök	Dodeka-2,4-dien-1il-izo-valerat	Gruenwald ve ark., 2004
	3-Metilbütanal,2-metilbütanal, kamfen, 7-dodekenol, <i>p</i> -simen, α -fellandren	Mazza ve Cottrel, 1999

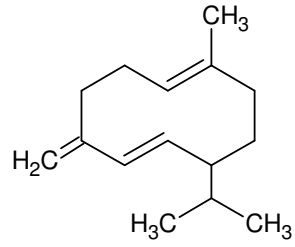
Echinacea türleri uçucu yağ bileşiminin daha da özetlenmesi gerekirse majör terpenik bileşikler olarak germakren D, β -mirsen, α -pinen ve β -pinen öne çıkmaktadır. Bunun yanında karyofillen, karyofillen epoksit ve α -fellandren *Echinacea* türleri uçucu yağ bileşiminde bulunabilecek başlıca terpenik bileşiklerdir.

Çizelge 8. Tıbbi olarak kullanılan *Echinacea* türlerinin uçucu yağ miktarları (Gruenwald ve ark., 2004)

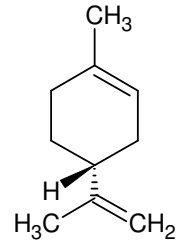
	Herba	Kök
<i>E. purpurea</i>	% 0,08-0,32	% 0,2
<i>E. pallida</i>	% 0,1	% 0,2-2
<i>E. angustifolia</i>	< % 0,1	<% 1

Şekil 7. *Echinacea* uçucu yağı bileşiminde bulunan başlıca terpenik bileşikler

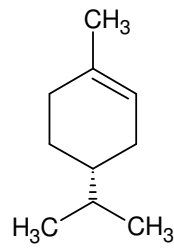
Germakren D



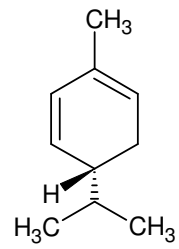
Limonen



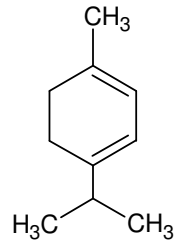
Karvomenten



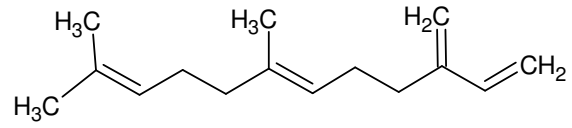
α -Fellandren



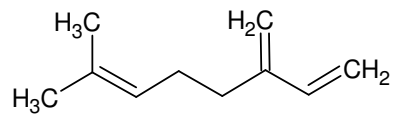
Terpinen



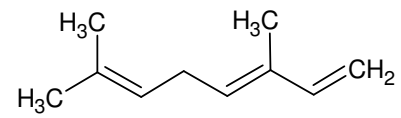
β -Farnesen



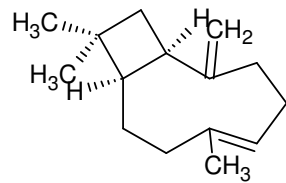
Mirsen



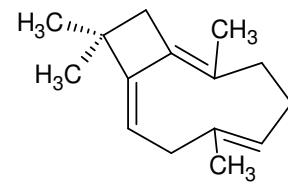
β (trans)-Osimen

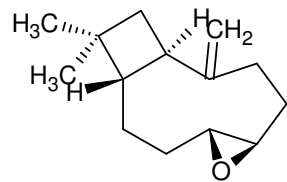
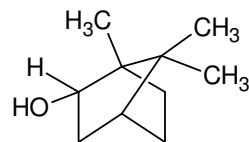
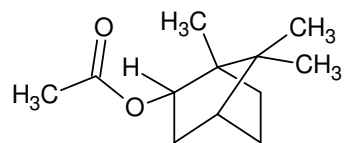
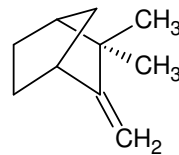
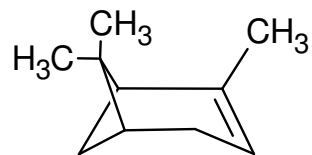
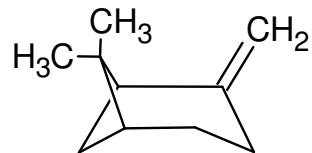


Karyofillen



Humulen



Karyofillen epoksit**Borneol****Bornil asetat****Kamfen** **α -Pinen** **β -Pinen**

1.2.2. *Echinacea* Türleri Üzerinde Daha Önce Yapılan Çalışmalar

1.2.2.1. Biyolojik Çalışmalar

1.2.2.1.1. *In vitro* Çalışmalar

Bağışıklık sistemi üzerine etkiler

E. purpurea hücre kültüründen saflaştırılmış polisakkaritlerin (EPS) makrofajlar üzerindeki etkilerinin incelendiği bu *in vitro* çalışmada, EPS uygulanan makrofajların oksijen radikalleri ve IL-1 üretimi ve salımı artmıştır. Bunun yanında EPS, T-lenfositleri üzerinde hiçbir etki göstermemiş, B-lenfositlerin ise az da olsa proliferasyonunu artırmıştır. Bu polisakkaritler *in vitro* olarak nontoksik özellikte olduğu ve muhtemelen makrofaj sistem hücrelerini *in vivo* olarak aktive edebileceği bildirilmiştir (Stimpel ve ark., 1984).

Wagner ve arkadaşları (1988), *E. purpurea* hücre kültüründen, iki fukogalaktoksiloglukan (MA: 10000-25000) ve bir asitik arabinogalaktan (MA: 75000) saflaştırmıştır. Fukogalaktoksiloglukanlardan biri (MA: 25000) fagositozu *in vitro* olarak artırmış, arabinogalaktan ise makrofajları TNF (Tümör Nekroze edici Faktör) salımını artırmak suretiyle stimüle etmiştir (Wagner ve ark., 1988).

İnsan makrofajlarının *in vitro* sitokin üretimini artırıcı etkileri incelenmek üzere iki *E. purpurea* ekstresi hazırlanmıştır. İlki *Echinacea purpurea* topraküstü kısımlarının tazeyken preslenerek elde edilen öz su, diğeri ise yine bu şekilde elde edilmiş ama daha sonra kurutulmuş ve deney esnasında tekrar çözülerek kullanılan kuru ekstredir. ELISA cihazında 72 saatlik inkübasyon sürecinde, interlökin-1 (IL-1), TNF- α , IL-6 ve IL-10 üretimi gerçekleşen sitokinler olmuştur. Sitokin üretimi stimüle edilmeyen

hücrelere göre belirgin derecede yüksek bulunmuştur. Taze sıkılmış öz su ile kuru ekstre benzer etkinlik göstermiştir (Burger ve ark., 1997).

E. purpurea topraküstü ve *Panax ginseng* kök ekstreleri sağlıklı, kronik yorgunluk sendromlu ya da kazanılmış immün-yetmezlik sendromlu (AIDS) hastalarından alınan periferik mononükleer insan kan hücreleri (PMKH) üzerindeki hücrel immünostimülasyon yetileri incelenmiştir. Deneyde, eksteler varlığında (değişen konsantrasyonlarda) ve yokluğunda K562 hücrelerine karşı DK (Doğal Katil) hücre etkinliği ve insan herpes virüs 6 ile enfekte H9 hücrelerine karşı antikora bağlı hücrel sitotoksikite (ABHS) test edilmiştir. İki ekstre de benzer konsantrasyonlarda belirgin şekilde tüm gruplarda DK etkinliğini ($\geq 0,1-10 \mu\text{g}/\text{kg}$ konsantrasyonda) ve ABHS'yi güçlendirmiştir. Dolayısıyla *E. purpurea* ve *Panax ginseng* ekstreleri hem sağlıklı hem de baskılanmış immün sistem fonksiyonlarını güçlendirmiştir (See ve ark., 1997).

E. purpurea ve *Glycyrrhiza glabra* kök ekstrelerinin kombinasyonu olan Revitonil® isimli preparat ve içeriğindeki *E. purpurea* ve *Glycyrrhiza glabra* kök ekstrelerinin ayrı ayrı *in vitro* immünostimülasyon potansiyelleri araştırılmıştır. İnsan granülositlerinin kullanıldığı *in vitro* fagositik aktivite testinde, tek başına *E. purpurea* ekstresi 100 μg -1 mg/ml konsantrasyonda % 15-40 fagositoz oranı göstermiştir. *R. liquiritiae* ekstresinde fagositik aktivite, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda %20, 1 mg/ml konsantrasyonda %46 oranında artmıştır. Revitonil® ise 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ konsantrasyonda %44-53 ile en yüksek stimülasyon oranlarını göstermiştir. Revitonil® ayrı ayrı *E. purpurea* ve *G. glabra* ekstrelerinden daha güçlü immünostimulan etki göstermiş ve bunun sonucu olarak bu iki türün ekstreleri arasında sinerjizma olduğu varsayımına gidilmiştir (Wagner ve Jurcic, 2002).

Farklı lektinlerle (Con A, PHA, PWM), aktive edilen insan lenfositlerinin proliferasyonu üzerinde *E. purpurea* sulu kök ekstresinin aktivitesi *in vitro* olarak incelenmiştir. Her bir lektinin lenfosit proliferasyonundaki artış oranı ek olarak *E. purpurea* ekstresinin uygulanmasıyla daha da yüksek değerlere ulaşmıştır (Chaves ve ark., 2003).

Gan ve arkadaşları, bitki kısmının belirtilmediği sulu *E. purpurea* ekstresinin doğal katil (DK) hücreler üzerindeki *in vitro* etkinliğini üzerine araştırmalar yapmıştır. Çalışmada akım sitometri yöntemi kullanılarak, DK hücrelerinin etkinleştirilmesi, sitotoksosite, DK-hedef bağlantısı ve katil hücre sıklığı test edilmiştir. Bu çalışma sulu *E. purpurea* ekstresinin DK hücre sitotoksitesinde güçlü bir aktivatör olduğunu göstermiştir. *E. purpurea* DK hücre-hedef konjugatlarının sayısını artırmış ve DK hücre lizisini aktive etmiştir (Gan ve ark., 2003).

Randolph ve arkadaşları (2003), THP-1 (İnsan Akut Monositik Lösemi Hücre Dizisi) hücrelerine, *E. purpurea* herba, *E. purpurea* kök ve *E. angustifolia* kök ekstrelerinin *in vitro* olarak uygulanması sonucu oluşan cevabı incelemiştir. Elde edilen veriler *Echinacea* ekstreleriyle yapılan 6 saatlik uygulamanın, IL-1 α , IL-1 β , IL-8, IL-10, TNF- α , intraselüler adhezyon molekülü salımını artırdığını göstermiştir (Randolph ve ark., 2003).

Egert ve Beuscher, *Echinacea purpurea* ekstresinden elde edilen yüksek molekül ağırlıklı (arabinogalaktan/polisakkarit) fraksiyonun antijen özgülüğü ve antikor üretimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Çalışmanın sonucu olarak *Echinacea* arabinogalaktan proteinleri antikor miktarını özgül olarak artırmıştır (Egert ve Beuscher 1992). Classen ve arkadaşları, sıkılarak hazırlanan *Echinacea purpurea* öz suyundan bir AGPs (arabinogalaktan-proteinleri) fraksiyonu alarak antijen özgülüğü ve antikora bağlanması açısından farklı AGPs ile yarışmalı olarak incelemiştir. Elde edilen sonuçlar, ilgili antikorların *E. purpurea* öz suyuna ait arabinogalaktan-proteinleri tanıdığını göstermiştir. Antijen özgülüğünde arabinogalaktan-proteinlerin karbonhidrat yapılarındaki (başta galaktoz kısmı olmak üzere) farklılık belirleyici olmuştur. Sıkılmış *Echinacea purpurea* herba özütlerinde antijen AGPs ilişkisinin kullanışlı bir kalite kontrol yöntemi olabileceği belirtilmiştir (Classen ve ark., 2004).

E. pallida köklerinden ve *E. purpurea* süspansiyon kültüründen izole edilen değişik AGPs'nin fare lenfositlerinin çoğalması, IgM (İmmüoglobülin M) üretimi ve fare makrofaj hücrelerinin nitrit ile IL-6 (İnterlökin 6) üretimi üzerine etkileri *in vitro*

olarak çalışılmıştır. *E. pallida* köklerinden izole edilen ve saflaştırılan arabinogalaktan proteinleri bütün değerlendirme sistemlerinde yüksek etkinlik göstermiştir. *E. purpurea* kültüründen izole edilen arabinogalaktan proteinleri hücrelerin proliferasyonunu etkilememiş, IgM, nitrit ile IL-6 üretimini açısından etkisi zayıf bulunmuştur. AGPs yapısal özelliklerine bağlı olarak immunomodülatör etkinlikte farklılıklar göstermektedir (Classen ve ark, 2006).

Adherent ve non-adherent fare splenositlerinin, *in vitro* ortamda, *E. purpurea* (su, alkol ve sulu alkolde çözünen ekstraları) örnekleri ile inkübe edildikten sonra sitokin üretimi araştırılmıştır. Non-adherent splenositler *E. purpurea* sulu ekstresine (1 mg/ml ekstre) cevaben belirgin şekilde IL-6 üretmiştir. IL-6 cevabı %44-50'lik alkollü ekstrede gözlenmemiştir. Sulu ekstre yine non-adherent splenositlerde IL-10, TNF- α ve MIP-1 α (Makrofaj İnhibitör Protein-1 α) üretimini sağlamış, adherent splenositlerde belirgin olarak sadece TNF- α ve MIP-1 α üretimi gözlenmiştir. Hiçbir splenosit topluluğunda IFN- γ (İnterferon- γ), IL-2 ya da IL-12 üretimi gözlenmemiştir. Bağışıklık cevabı ve aktivasyonu açısından, *E. purpurea* ekstralarının muhtemel terapötik potansiyellerini non-adherent lenfositler üzerinden gösterdiği sonucuna varılmıştır (Hwang ve ark., 2004).

E. angustifolia köklerinden hazırlanan Polinacea™ isimli (>%4) ekinakozit, (>%5) yüksek molekül ağırlıklı polisakkarit (IDN 5405) ve <% 0,1 izobütülamit fraksiyonu içeren standardize bir hidroalkolik ekstrenin *in vitro* ortamda, bağışıklık sistemi üzerine etkisi incelenmiştir. IDN 5405, poligalakturonik asit omurgası ve kısmen karboksimetillenmiş ramnogalakturonan dallanmalarıyla karakterize, *E. angustifolia*'ya özgü bir polisakkarittir. Deneyde hücrelerde beklenmedik bir immünolojik cevabı önlemek amacıyla Polinacea™ örneği, bakteriyel lipopolisakkaritten arındırılmış olarak (LPS) kullanılmıştır. Polinacea™'nın mürin T-lenfosit hücre kültüründe, proliferasyon oranını ve IFN- γ üretimini artırmak suretiyle bağışıklık sistemini güçlendirdiği gözlemlenmiştir. Polinacea™ NO (Nitrikoksit) salımı konusunda herhangi bir etkinlik göstermemiştir. Araştırmacılar Polinacea™

'nın başışıklık üzerindeki etkinliğinin öncelikli olarak T-hücreleriyle etkileşimine ve IDN 5405 varlığına bağlı olduğunu bildirmiştir (Morazzoni ve ark., 2005).

E. purpurea, *E. pallida* ve *E. angustifolia* kültürlerinden izole edilen melanin, *in vitro* olarak, toll benzeri reseptörlere bağlı olarak monositlerde NTF (Nükleer Transkripsiyon Faktör) salımını, fare hücrelerinde IFN- γ üretimini ve Peyer plakalarında IL-6 ve IgA üretimini artırmıştır. Ancak *Echinacea* ekstrelerinde yaygın olarak kullanılan çözücülerde çok az miktarda çözünen melaninin bu ekstrelerde bulunma ihtimali düşüktür (Pugh ve ark., 2005).

E. purpurea, *E. pallida*, *E. angustifolia*, *E. sanguinea* ve *E. tennesseensis* köklerinden farklı ekstreler (%50 etanol tentürü, soğuk su ekstresi, infüzyonu) hazırlanmış ve dört farklı başışıklık deneyi (TNF- α , IL-10 ve IL-12 salımı ve PMKH proliferasyonu) gerçekleştirilmiştir. Ekstreler en fazla TNF- α stimülasyonu göstermiştir. %50'lik tentür en güçlü immünostimülan etkiyi göstermiş, türler içinde ise en yüksek etki *E. angustifolia*'da gözlenmiştir. En düşük etki *E. sanguinea*'da kaydedilmiştir (Senchina ve ark., 2005).

E. purpurea topraküstü kısımlarından değişik alkol:su oranlarında (95:5, 75:25, 50:50, 25:75 h/h) hazırlanan hidroalkolik ekstrelerin *in vitro* immünomodülatör etkileri değerlendirmeye alınmıştır. Ekstrelerin, fitohemaglutinin ve forbol miristat asetat ile stimüle edilmiş, insan Jurkat-T-hücrelerinin başışıklık cevabı üzerindeki etkinliği araştırılmıştır. Ekstreler içinde (95:5) etanol:su ekstresi konsantrasyona bağlı olarak IL-2 salımını belirgin olarak inhibe etmiş ancak hücrelerin yaşam kabiliyetini etkilememiştir. Yapılan SK-KS (Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi) analizlerine de dayanarak bu inhibitör etkinin kafeik asit türevlerinden ziyade bitkideki alkamit varlığıyla ilişkilendirilmiştir (Sasagawa ve ark., 2006).

Wang ve arkadaşlarının (2006) yaptığı akım sitometrik çalışmada bitkinin değişik kısımlarından (tüm bitki, kök, yaprak+gövde, çiçek) hazırlanmış % 70 *E. purpurea* etanol (% 70) ekstreleri kullanılmıştır. İnsan dendritik hücrelerinden kemokin

salımının ekstreler tarafından inhibisyonu ya da stimülasyonu gözlemlenmiştir. Yaprak ile gövde ekstresi kemokin salımını aşağı çekerken kök ekstresi artırmıştır. Bu çalışma, *E. purpurea* ekstrelerinin dendritik hücrelerinin kemokin salımında ayarlayıcı rol oynadığını göstermiştir (Wang ve ark., 2006).

E. purpurea topraküstü kısımlarından sıkılıp, ardından püskürterek kurutma yöntemiyle elde edilen bitki öz suyu kuru ekstresi ve % 50 etanol ile hazırlanan *E. purpurea* kök (1:9 a/h) tentürünün, enfekte edilmemiş hücreler ve rinovirüs-enfekte hücrelerde, farklı transkripsiyon faktörlerinin üretimi üzerindeki etkinlikleri *in vitro* araştırılmıştır. *E. purpurea* ekstreleri enfekte edilmemiş BEAS-2B hücrelerinde 30'dan fazla transkripsiyon faktörünün (NTF, AP-1, AP-2 ve STAT proteinleri gibi pro-enflamatuvar faktörlerden oluşan) miktarını yükseltirken enfekte hücrelerde bu etki tersine dönmüş ve bu seviyeleri düşürmüştür. Elde edilen sonuçlar *Echinacea* tedavisinin yararlı etkisini açıklamaya yardımcı olmaktadır (Sharma ve ark., 2006).

E. purpurea (topraküstü) sulu ekstresi ve sinarin, bitkisel ekstrelerin farmasötik özelliklerinin test edilmesinde yeni bir yöntem olan AFTIR (After Flowing Through Immobilized Receptor) ile T-hücre reseptörü olan CD28'e seçici bağlanmaları açısından değerlendirilmiştir. *E. purpurea* ekstresi AFTIR'dan geçirildikten sonra CD28'e bağlanan maddenin sinarin olduğu Yüzey Plazmon Rezonans yöntemiyle tespit edilmiştir. Sinarinin, CD28 reseptörüne, T-hücre aktivitesinde gerekli bir molekül olan ve etkinliğini CD28 reseptörüne bağlanarak gösteren CD80'den daha güçlü bağlanarak IL-2 salınmasının azalmasına neden olduğu saptanmıştır (Dong ve ark., 2006). Dong ve arkadaşları 2008'de benzer bir çalışma ile sinarinin büyük bir immüno-supresyon potansiyeline sahip olduğunu, etki mekanizmasını ortaya çıkararak bildirmiştir (Dong ve ark., 2008). Bu iki çalışma yaygın ve bilinen etkisinin tersine *Echinacea purpurea*'nın immüno-supresif olduğundan bahsetmektedir. Ancak sinarin, kurutulmuş *E. purpurea* herbasında en fazla % 0,01 oranında bulunmaktadır (Upton ve ark., 2007).

McCann ve arkadaşları yedi farklı *Echinacea* türünden hazırlanan tentürlerin immünomodülatör özelliklerini araştırmak amacıyla, periferik mononükleer insan

kan hücreleri (PMKH) kullanıldığı *in vitro* deneyler gerçekleştirilmiştir. Araştırma iki yöntem üzerinden yürütülmüştür. Birinci yöntemde, sadece *Echinacea* tentürleri uygulanmış, hücre proliferasyonu, IL-10, IL-12 ve TNF- α üretimi incelenmiştir. İkinci yöntemde ise, influenza aşısı yapılan insanlardan alınan hücrelere *in vitro* ortamda *Echinacea* tentürleri ve influenza virüs verilerek PMKH sitokin (IL-2, IL-10 ve interferon- γ) üretimindeki değişiklikler incelenmiştir. İlk deneyde *E. angustifolia*, *E. pallida*, *E. paradoxa* ve *E. tenneseensis* tentürlerinin PMKH proliferasyonunu ve IL-10 salınımını stimüle ettiği gözlenmiştir. *E. sanguinea* ve *E. simulata* sadece proliferasyonu stimüle etmiştir. *E. purpurea* sadece IL-10 salınımını stimüle etmiştir. Hiçbir tentür IL-12 ve TNF- α düzeyini etkilememiştir. İkinci deneyde *E. pallida*, *E. paradoxa*, *E. sanguinea* ve *E. simulata* tentürleri influenza-özgül IL-2'nin düşmesine neden olmuş, ekstraların hiçbiri IL-10 ya da TNF- α 'yı etkilememiştir (McCann ve ark., 2007).

E. purpurea ve *E. angustifolia* köklerinden elde edilen etanolik ekstralar, kikorik asit ve alkamit fraksiyonlarının fare makrofaj hücrelerinde oluşan immün cevapları düzenleyici aktiviteleri *in vitro* olarak incelenmiştir. Çalışmada nükleer transkripsiyon faktör salımı (NTF/NFKB), TNF- α ve NO biyomarkör olarak belirlenmiştir. İmmün cevap oluşturmak için LPS (lipopolisakkarit) kullanılmış, ekstre ve fraksiyonlar yukardaki üç parametreye göre değerlendirilmiştir. LPS'siz şartlarda hiçbir örnek belirgin etkinlik göstermezken LPS'ye karşı oluşan cevabı genel olarak belli oranda düşürmüştür. Hücreler forbol miristat asetat ile stimüle edildiğinde ise NTF ve NO düzeyleri değişmemiş sadece kikorik asit ve izole edilen bir alkamit TNF- α inhibisyonu yapmıştır (Mathias ve ark., 2007). Mathias ve arkadaşları tarafından 2008'de yapılan benzer çalışmada bu sefer etkinlik sadece T-hücreleri üzerinde araştırılmıştır. Ancak sonuçlar açısından ekstre ve fraksiyonlar arasında etki farklılıkları hatta zıtlıklar görülmüştür. Konsantrasyona bağlı olarak, kikorik asit ve bir 2,4-dien alkamit NTF salınımını indüklemiş, bir 2-en alkamit ise belirgin inhibisyon yapmıştır. Ortaya çıkan bu zıt sonuçlar etkinin, ekstre nin fitokimyasal içeriğinin yanında her bir bileşenin aktivitesi ve ekstrede ne oranda bulunduğu na da bağlı olduğunu göstermektedir (Mathias ve ark., 2008).

E. purpurea topraküstü kısımları ve köklerinden elde edilen polisakkaritçe zengin ekstre peritoneal mürin makrofaj (PMM) aktivasyonu açısından incelenmiştir. Bu amaçla PMM hücreleri polisakkaritçe zengin *E. purpurea* ekstresiyle kültüre edilmiş, ELISA kullanılarak sitokin üretimi ölçülmüştür. Endotoksin içermeyen *E. purpurea* ekstresinin, PMM hücrelerinde IL-6, IL-12, TNF- α ve NO üretimini *in vitro* olarak artırarak immün cevabı aktive ettiği bulunmuştur (Sullivan ve ark., 2008).

E. angustifolia köklerine ait süper kritik CO₂ ekstresinden hareketle izole edilen 12 alkamit, anandamite yapısal benzerlikleri nedeniyle kemirgen kannabinoit reseptörlerine (CB1 ve CB2) afiniteleri açısından incelenmiştir. Denede kullanılan alkamitler CB2 reseptörüne afinite göstermiştir. *Echinacea* alkamitlerinin immünomodülatör etkisinin bu mekanizma ile açıklanabileceği düşünülmektedir (Woelkart ve ark., 2005b). *E. pallida* poliasetilenleri ve sentetik analoglarına ait, kannabinoit reseptör afinitelerinin incelendiği başka bir *in vitro* çalışmada doğal poliasetilenler bu reseptörlerden hiçbirinde agonistik etki göstermemiştir. Buna rağmen sentetik poliasetilenlerden bazıları her iki reseptöre de afinite göstermiştir (Egger ve ark., 2008).

Anti-enflamatuvar etki

Clifford ve arkadaşlarının (2002) *E. purpurea* alkamitlerinin anti-enflamatuvar etkinliğini araştırdığı aktivite çalışmasında, siklooksijenaz I ve II (COX I ve II) enzimlerinin inhibisyon miktarı çeşitli non-steroidal anti-enflamatuvar (NSAE) (aspirin, ibuprofen, naproksen, selebreks gibi) ilaçlarla karşılaştırmalı olarak ölçülmüştür. Sonuçlar *Echinacea* alkamitlerinin 100 μ g/ml konsantrasyonda COX I ve COX II'yi sırasıyla % 36-60 ve % 15-46 oranlarında inhibe etmiştir (Clifford ve ark., 2002).

Müller-Jakic ve arkadaşları (1994), yaptıkları *in vitro* çalışmada *E. angustifolia* köklerinden hazırlanan *n*-hekzan ekstresi ve bu bitkiden izole edilmiş 8 alkamitin COX ve LOX (5-lipoksijenaz) enzimleri üzerindeki inhibitör etkilerini incelemiştir.

Çalışmada *E. angustifolia* *n*-hekzan kök ekstresi her iki enzimi de (50 µg/ml konsantrasyonda % 62,4 COX, 11,5 µg/ml konsantrasyonda % 81,8 LOX inhibisyonu) belirgin olarak inhibe etmiştir. 8 alkamitin tümü az ya da çok COX inhibisyonu göstermiş fakat sadece bir kısmı LOX inhibisyonu yapmıştır. İzomerik karışım olan (1:1) dodeka-2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenik asit-izobütilamitler, tek başına alkamitler arasında en yüksek ikili etkinliği göstermiş olsalar da (50 µg/ml konsantrasyonda % 54,7 COX, 50 µM konsantrasyonda % 62,2 LOX inhibisyonu) ekstrenin etkinliği daha yüksek bulunmuştur. Başka bir *in vitro* çalışmada ise *E. purpurea*, *E. pallida* ve *E. angustifolia* % 95 etanol kök ekstrelerinden çekilen *n*-hekzan ekstreleri yine LOX inhibisyonu göstermiştir (Merali ve ark., 2003).

Chen ve arkadaşları 2005'te dodeka-2Z,4E,10Z-trien-8-inoik asit izobütilamit (*E. angustifolia* köklerinden) ve dodeka-2Z,4E-dien-8,10-di-inoik asit izobütilamit (*E. purpurea*, *E. pallida* köklerinden) olarak isimlendirilen iki yeni alkamit tespit etmiştir. Bu iki yeni alkamit ile birlikte daha önce izole edilen 9 alkamit, lipopolisakkarit (LPS) ile aktive edilmiş makrofaj (mürin makrofaj suşu: RAW264.7) inhibitör etkinliği ve sitotoksiteleri açısından değerlendirilmiştir. Makrofaj inhibisyon tayininde LPS kaynaklı nitrik oksit (NO) üretiminin ölçümü amacıyla Greiss yöntemi kullanılmıştır. Hücre ömrü ve sitotoksite ölçümü ise MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromid) yöntemi ile yapılmıştır. Her bir alkamitin ayrı olarak denendiği gibi tüm alkamitleri uygun oranda içeren total alkamit örneği de değerlendirilmiştir. Alkamitlerin NO inhibe eden konsantrasyonunun hücre ölümünü indükleyen konsantrasyondan daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu bilgiler alkamitlerin LPS kaynaklı makrofaj aktivasyonunu hücre ölümüne neden olmadan baskıladığını göstermiş, bu bileşiklerin antienflamatuvar potansiyelini ortaya koymuştur (Chen ve ark., 2005).

E. angustifolia köklerinden hazırlanan süper kritik CO₂ ekstresi ve bu ekstreten izole edilen alkamitler COX II etkinliği ve salımı üzerindeki etkileri açısından bir *in vitro* deneyde araştırılmış ve değerlendirilmiştir. Sonuçlar CO₂ ekstresi ve bu ekstreten izole edilen belirli alkamitlerin COX II salımını baskılamak yerine COX II etkinliğini inhibe ederek, enflamasyon bölgesinde COX II kaynaklı PGE₂

(Prostaglandin E₂; ilgili bölgede ağrı ve enflamasyondan sorumlu bileşiklerdendir) oluşumunu engellediğini göstermiştir (Hinz ve ark.,2007).

E. purpurea, *E. pallida* ve *E. angustifolia* köklerinden hazırlanan farklı etanol ekstralarının (% 70, 95, 100) RAW264.7 hücrelerinde PGE₂ inhibisyonu *in vitro* olarak ölçülmüş ve anti-enflamatuvar etkileri değerlendirilmiştir. Deneyde 15 µg/ml konsantrasyonda etanolik *E. pallida* ve *E. angustifolia*, *E. simulata* ve *E. sanguinea* kök ekstraları belirgin PGE₂ inhibitör etki göstermiştir. *E. purpurea* ve *E.tenneseensis* ekstraları ise düşük etkinlik göstermiştir. Ayrıca önceki çalışmalarda saf alkamitlerin belirgin PGE₂ inhibitör etkinin en düşük 10 µM konsantrasyonda görüldüğü belirtilmiştir. Ancak aktif bulunan *Echinacea* ekstralarında tek bir alkamitin miktarı 2,8 µM'ı geçmemektedir. Bu bağlamda tespit edilen antienflamatuvar aktivitenin tek bir alkamite bağlanamayağı ve bir sinerjizmanın varlığı ortaya konmuştur (LaLone ve ark., 2007).

E. purpurea, *E. pallida* ve *E. angustifolia* köklerinden hazırlanan etanol ekstralarının, LPS ile stimüle edilmiş RAW264.7 makrofajlarda NO ve TNF-α üzerine etkileri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Ekstreler 10-200 µg/ml konsantrasyonda uygulanmıştır. Sonuçlar elde edildiğinde *E. purpurea* ve *E. pallida*'nın doza bağlı olarak NO üretimini ve TNF-α salımını inhibe ettiği görülmüş *E. angustifolia* ise daha zayıf etkinlik göstermiştir. Sonuçlar çalışmada kullanılan bütün *Echinacea* türlerinin enflamasyon medyatörlerinin salımını belirgin derecede azalttığını göstermiştir (Zhai ve ark., 2007).

Yine LPS kaynaklı makrofaj (mürin makrofaj suşu: RAW264.7.) inhibisyonunun araştırıldığı sonraki bir çalışmada, *E. purpurea*, *E. pallida* ve *E. angustifolia* köklerinden elde edilen etanol ekstraları ve bunlardan elde edilen değişik polaritedeki fraksiyonlar incelenmiştir. Greiss yöntemi ile NO üretiminin inhibisyonu ve immüno blotting yöntemi ile NO üretiminden sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) salımı incelenmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Çalışma sonunda üç türün de etkinlik gösterdiği gözlenmiştir. Kafeik asit türevlerini içeren polar fraksiyon NOS ile aynı substrata bağlanan ve anti-enflamatuvar etkinlikte payı olan arginazı aktive

ederken, alkamit içeren lipofilik fraksiyonun NO üretimi ve NOS salımını inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışma, *Echinacea* anti-enflamatuvar etkinliğinin makrofajları alternatif bir aktivasyona yönelten alkamit ve kafeik asit türevlerinin sinerjik etkisine bağlı olabileceğine işaret etmektedir. Geleneksel *Echinacea* kullanımının enflamatuvar rahatsızlıklardaki başarısının ardındaki mekanizmanın aydınlatılmasına bu bulgular yardım edecektir (Zhai ve ark., 2009).

Antioksidan Etki

Hu ve Kitts'in 2000'de yaptığı çalışmada hafifçe suyla temizlendikten sonra dondurarak kurutulmuş *E. purpurea*, *E. pallida* ve *E. angustifolia* köklerinden elde edilmiş olan metanol ve kloroform ekstreleri değerlendirmeye alınmıştır. ABTS ve DPPH radikallerini süpürücü etkileri tayin edilen ekstreler içinde en yüksek etkinlik *E. pallida* metanol ekstresinde (0,8 mg/ml konsantrasyonda; ABTS: % 55 üzeri, DPPH: % 80 üzeri inhibisyon) ölçülmüştür. *E. purpurea* ve *E. angustifolia* ise aynı konsantrasyonda, ABTS inhibisyonunda %30'un altında DPPH inhibisyonunda ise %40'ın altında kalmıştır. Bu çalışmada *E. pallida* ekstresinin *E. purpurea* ekstresine üstünlüğü *E. pallida*'daki ekinakozit varlığı olarak görülmektedir. Ancak çalışmada elde edilen YBSK verileri *E. pallida* ve *E. angustifolia* ekstrelerindeki ekinakozit miktarının birbirine yakın olduğunu göstermektedir (Hu ve Kitts, 2000).

E. purpurea çiçekli topraküstü kısımlarına ait metanol, aseton ve etil asetat ekstreleri ile birlikte farklı bitkilerin de dâhil edildiği çalışmada DPPH radikal süpürücü etkinlik açısından değerlendirmeye alınmıştır. *E. purpurea*'dan hazırlanan aseton ekstresinin 2,5 µg/ ml konsantrasyonda (% 14,2) metanol (% 6,8) ve etil asetat ekstrelerine (% 3,5) göre daha etkin radikal süpürücü olduğu sonucuna varılmıştır. Yine aynı konsantrasyonda başta *Salvia officinalis* (% 92,6) olmak üzere *Salvia sclerea*, *S. glutinosa*, *S. pratensis*, *Geranium macrorrhizum* ve *Juglans regia* gibi türlerde tespit edilen DPPH radikal süpürücü etkinliğe göre *Echinacea* ekstrelerinin etkinliği zayıf kalmıştır. Bununla birlikte total fenolik miktar tayinleri yapıldığında *Echinacea* ekstrelerinin fenolik miktarları diğer türlere göre düşük bulunmuştur.

Çalışmada total fenolik içeriği ile radikal süpürücü etkinlik arasında bağlantı olduğu gözlenmiştir (Miliauskas ve ark., 2004).

Pellati ve arkadaşlarının (2004) yaptığı çalışmada, *E. purpurea*, *E. pallida* ve *E. angustifolia* köklerinden hazırlanan % 80 metanol ekstrelelerinde kafeik asit türevlerinin analizi yapılmış ve ekstrelerle birlikte saf *Echinacea* kafeoil türevlerinin (kaftarik asit, klorojenik asit, kafeik asit, sinarin, ekinakozit, kikorik asit) DPPH radikal süpürücü aktiviteleri tayin edilmiştir. Tek tek bu fenolik maddelere bakıldığında en güçlü radikal süpürücü etkinlik, ekinakozitte ($EC_{50}= 6,6 \mu M$) (en fazla *E. pallida*'da bulunan) ikinci olarak kikorik asitte ($EC_{50}= 8,6 \mu M$) ve takiben sinarinde ($EC_{50}= 11,0 \mu M$) gözlenmiştir. Deneyde kullanılan kafeoil türevlerinden klorojenik asit kafeik asit ve kaftarik asit birbirine yakın radikal süpürücü etkinlik göstermiştir. En düşük etkinlik ise kaftarik asitte ($EC_{50}= 20,5 \mu M$) gözlenmiştir. Bitki ekstrelerinde ise bu sıralama *E. purpurea* ($EC_{50}= 134 \mu g/ml$) > *E. pallida* ($EC_{50}= 167 \mu g/ml$) > *E. angustifolia* ($EC_{50}= 231 \mu g/ml$) şeklinde bulunmuştur. Total fenolik madde miktarlarına bakıldığında ise yine *E. purpurea* (23,23 mg/ml) > *E. pallida* (17,83 mg/ml) > *E. angustifolia* (10,49 mg/ml) sıralaması oluşmuştur. Bu bulgular *Echinacea* ekstrelerinin total fenolik içeriği ile radikal süpürücü etkinlik arasında bir bağlantı olabileceğini düşündürmektedir (Pellati ve ark., 2004).

Pellati ve arkadaşlarının yaptığı diğer bir çalışmada ise 9 *Echinacea* türü (10 takson) kullanılarak hazırlanan % 80 metanol kök ekstrelerinin DPPH radikal süpürücü etkileri araştırılmıştır. Deney esnasında bu örneklerine ait kafeik asit türevleri teşhis edilmiş ve miktarları belirlenmiştir. En güçlü DPPH radikal süpürücü aktiviteyi, köklerinde en yüksek miktarda kafeik asit türevi içeren *E. paradoxa* (Norton) Britton var. *paradoxa* ve takiben *E. paradoxa* var. *neglecta* göstermiştir. Bu iki türün de majör kafeik asit türevinin ekinakozit olduğu tespit edilmiştir. Bu türleri takiben en yüksek aktiviteyi üçüncü en yüksek kafeik asit miktarına sahip *E. purpurea* izlemiştir. *E. laevigata*, *E. simulata*, *E. pallida* ve *E. angustifolia* yakın etkinlik göstermiştir. *E. paradoxa* (Norton) Britton var. *paradoxa* ve *E. paradoxa* var. *neglecta* endemik türler olmalarına rağmen metanolik kök ekstrelerinin *E. laevigata* ve *E. simulata* ile birlikte farmasötik olarak değerlendirilme potansiyeli ortaya

konmuştur. *Echinacea* türlerine ait serbest radikal süpürücü etki, kafeik asit türevlerinin miktarlarıyla ilişkili bulunmuş, *Echinacea* türlerinin serbest radikal kaynaklı rahatsızlıklara karşı koruyucu etkisine işaret edilmiştir (Pellati ve ark., 2005).

E. purpurea yaprak, gövde ve kök ekstrelerinin antioksidan etkileri, alkamitler ve kikorik asitle karşılaştırmalı olarak ölçülmüştür. Ölçümlerde, 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) radikal süpürücü etki ve lipid emülsiyonun peroksidasyonundaki oksijen tüketimi üzerine etkileri değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda alkamitler tek başlarına yukarıdaki iki konuda da etkinlik göstermemiştir. Bunun yanında kikorik asitin lipid emülsiyonun peroksidasyonu üzerindeki antioksidan etkisini artırdığı gözlemlenmiştir. Kikorik asit ise deneyin gerçekleştirildiği iki yöntemde de antioksidan etkinlik göstermiştir. *Echinacea purpurea* yaprak, gövde ve köklerinden hazırlanan metanol:su (70:30 h/h) ekstrelerinin, lipid emülsiyonun peroksidasyonundaki oksijen tüketimi üzerine etkileri, değişen kikorik asit miktarlarına rağmen ciddi bir fark göstermemiştir. Bu farklı organlar arasında en yüksek DPPH süpürücü etki ise yaprak ekstresinde (diğer organlara göre yaklaşık 4 misli kikorik sit içermektedir) tespit edilmiştir. Kikorik asit iyi bilinen bir antioksidan olan rozmarinik asitle de karşılaştırılmış ve iki yöntemde de antioksidan aktivite konusunda rozmarinik asite göre belirgin bir fark gözlenmemiştir (Thygesen ve ark., 2007).

Kollajen koruyucu etki

Echinacea türlerinin tipik bileşikleri olan kafeoil türevlerinden; kikorik asit, ekinakozit, sinarin, kafeik asit, klorojenik asit ve rutin serbest radikallerin tetiklediği, Tip III kollajen yıkımına karşı *in vitro* kollajen koruyucu etkileri araştırılmıştır. Sonuçlar kollajen koruyucu etki miktarının konsantrasyona da bağlı olarak, kikorik asit ($EC_{50}= 16,48 \mu M$) > ekinakozit ($EC_{50}= 18,54 \mu M$) > sinarin ($EC_{50}= 29,87 \mu M$) > kafeik asit ($EC_{50}= 37,75 \mu M$) > rutin ($EC_{50}= 70,26 \mu M$) > klorojenik asit ($EC_{50}= 87,08 \mu M$) şeklinde olduğunu göstermiştir. *Echinacea*

köklerinden topikal kullanım için hazırlanacak formülasyonların, oksidatif stresin önemli bir rol oynadığı UV kaynaklı deri hasarında koruyucu ya da tedavi edici bir seçenek olabileceği belirtilmiştir (Maffei-Facino ve ark., 1995).

Antifungal etki

Echinacea ekstrelerinin bazı patojen mantarlar üzerindeki fototoksik ve toksik (ışıktan bağımsız) etkileri bir *in vitro* çalışmada araştırılmıştır. Değişik *Echinacea* ekstrelerinden, ayırma hunisi ile *n*-hekzan fazına çekilmiş fraksiyonların *Candida shehata* üzerindeki fototoksik ve toksik etkileri incelenmiş ve değerlendirilmiştir. *n*-hekzan fraksiyonları *E. purpurea* ve *E. pallida* kök ve topraküstü kısımlarının alkollü ekstrelerinden, iki *Echinacea* tentüründen ve *Echinacea* infüzyonundan (tüm bitki kısımlarından eşit miktarda *E. purpurea* ve *E. angustifolia* içeren infüzyon poşeti) hazırlanmıştır. Sonuçlar en yüksek inhibitör (fototoksik ve ışıktan bağımsız toksik etki) etkinin *E. purpurea* köklerinden hazırlanan ekstrelerce gerçekleştiğini göstermiştir. *E. purpurea* ve *E. pallida* köklerinin ise topraküstü kısımlarına göre (etkisiz bulunmuş) etkinlikte belirgin üstünlüğüyle karşılaşılmıştır. Yine infüzyonuna ait örnekte etki görülmemiştir. Işıktan bağımsız antifungal etkinlikse sadece *E. purpurea* kök ekstresinde gözlenmiştir (Binns ve ark., 2000).

Merali ve arkadaşları (2003), değişik *Echinacea* türlerinden hazırlanan (% 95 etanol kök ekstrelerinden *n*-hekzana çekilen) ekstrelerin, bazı patojen mantarlar (*Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, *Trichophyton tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum gypseum*, *Pseudallescheria boydii*) üzerindeki fototoksik ve toksik (ışıktan bağımsız) antifungal etkinlikleri disk duyarlılık yöntemi ile incelenmiştir. Deneyde kullanılan türler arasında ticari türlerden sadece *E. pallida* ve *E. angustifolia* bulunmaktadır. Bu çalışmaya göre, topikal ve sistemik antifungal uygulamalar açısından *Echinacea* varyetelerinden en kullanışlı olanları *E. pallida* var. *simulata*, *E. pallida* var. *sanguinea*, *E. pallida* var. *pallida*, *E. atrorubens* var. *atrorubens* ve *E. atrorubens* var. *neglecta* olarak görülmektedir (Merali ve ark., 2003).

Sitotoksik etki

Hyalüronidaz enzimi, kanser hücrelerinin etrafındaki koruyucu tabakanın yok edilmesinde rol oynamaktadır. Bu sebeple *Echinacea* türlerinin anti-hyalüronidaz etkinliklerinin dolaylı olarak kanser hücrelerinin parçalanmasını önleyebileceği düşünülmektedir (Huntimer ve ark., 2003). Bu bilgi ışığında farklı polaritede çözücülerle hazırlanmış *E. angustifolia* kök ekstralarının kanser hücreleri (serviks kanser hücresi “HeLa” ve meme kanser hücresi “MCF-7”) üzerindeki proliferatif etkileri ve doksorubisin (kanser hücrelerinde apoptoza neden olan bir antikanser ilaç) ile etkileşimleri *in vitro* olarak araştırılmıştır. Deneyde *E. angustifolia* ekstraları ve tek başına denenilen *Echinacea* fenolikleri (kikorik asit, ekinakozit, sinarin) doksorubisinin HeLa ve MCF-7 hücre-öldürücü etkisine direnç göstermiş ve engel teşkil etmiştir. Kanser kemoterapisi devam ederken *Echinacea* kullanımının hücre proliferasyonunu etkileyerek risk oluşturabileceği ve bu konudaki çalışmaların yoğunlaşması gerekliliği belirtilmiştir (Huntimer ve ark., 2006).

E. purpurea, *E. pallida* ve *E. angustifolia* köklerinden hazırlanan *n*-hekzan ekstralarının pankreatik kanser hücre serisi “MIA PaCa-2” ve kolon kanseri hücre serisi “COLO320” üzerindeki *in vitro* sitotoksik ve pro-apoptozik etki potansiyeli zamana ve doza bağlı araştırılmıştır. 72 saatlik, 1-300 µg/ml dozda değerlendirmeye alınan tüm *Echinacea* ekstraları hücrelerin yaşam oranlarını doza bağlı olarak azaltmıştır. Diğer iki türün aksine lipofilik ekstresinde ağırlıklı olarak poliasetlen bileşikler içeren ve eser miktarda alkamid taşıyan *E. pallida* köklerinin bu çalışmada kullanılan en etkin örnek olduğu görülmüştür. Yine bu çalışmada köklerinin, MIA PaCa-2 ve COLO320 hücrelerinde kaspaz 3/7 etkinliğini ve çekirdeksel DNA parçalanmasını artırması, apoptozu uyarabileceğini göstermiştir (Chicca ve ark., 2007).

Antimutajenik etki

Çeşitli fenolik asitlerle birlikte kafeik asit, ferulik asit ve kikorik asitin antimutajenik etkisini araştırmak amacıyla, histidin üretemeyen *Salmonella typhimurium* TA 100 suşunun kullanıldığı Ames testi yapılmıştır. Çalışmada mutajenik ajan olarak 3-(5-nitro-2-furil) akrilik asit (5NFAA) ve sodyum azid kullanılmış, deneyde kullanılan fenolik maddelerden gallik asit her iki mutajeni de yüksek oranda (5mg/ml dozda sırasıyla, %50 ve % 80) inhibe etmiştir. Aynı konsantrasyonda ferulik asit ve kafeik asit %50 oranında 5NFAA inhibisyonu göstermiş, sodyum azid inhibisyonu ise %30-35 arasında kalmıştır. Kikorik asit bu deneyde antimutajenik etki göstermemiş bununla birlikte 5NFAA etkinliğini de %20 civarında artırmıştır (Birošová ve ark.,2005).

Antiviral etki

Veziküler stomatit virüsü ile enfekte edilmiş fare L-929 hücrelerine kikorik asit, ekinakozit ve kafeik asit uygulanmış ve antiviral etkileri değerlendirilmiştir. Tüm maddeler birbirine yakın ve doza bağlı antiviral etkinlik göstermiş ancak kafeik asit içlerindeki en toksik madde olarak belirlenmiştir. Kafeik asitle tedavi edilen 500 µg/ml dozda hücrelerin sadece % 1'i hayatta kalabilmiş bu oran kikorik asitte %48 olarak gözlenmiştir (Cheminat ve ark., 1988).

Echinacea türlerinin içeriğinde bulunan kafeik asit, klorojenik asit ve *Echinacea purpurea*'nın majör kafeik asit türevi olan *L*-kikorik asitin, HIV-1 integras enzim inhibisyonu yapma potansiyeli araştırılmıştır. HIV-1 integras enzimi HIV(Human Immunodeficiency Virus / İnsan Bağışıklık Yetmezlik Virüsü) DNA'sının konakçı hücre genomuna yerleşmesini ve virüsün kendi DNA kopyasını yapmasını sağlayan bir enzimdir. Analiz sonucunda kafeik asit ve klorojenik asitte herhangi bir anti-HIV aktivite saptanmamıştır. *L*-kikorik asit ise bu deneyde yer almış kafeik asit türevleri içinde en güçlü anti-HIV etkinlik gösteren bileşik olmuştur (Robinson ve ark., 1996).

Başka bir çalışmada, *L*-kikorik asitin, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) kullanılarak, 500 nM - 10 µM konsantrasyon aralığında HIV-1 integras enzim

inhibisyonu yapma potansiyeli araştırılmıştır. İnhibisyon 1 μ M üzerinde gözlenmiştir. Sonuçlar *L*-kikoric asitin, *in vitro* olarak, HIV-1 integraz'a karşı yarışmasız (non-kompetitif) ve geri dönüşlü bir inhibitör olduğunu ve *in vivo* HIV integrasyonunu inhibe ettiğini göstermektedir (Reinke ve ark., 2004).

Vimalanathan ve arkadaşlarının yaptığı bir *in vitro* çalışmada, *E. purpurea* çiçeklerinden, yapraklarla gövdesinden ve herbasından farklı polaritedeki çözücülerle hazırlanmış ekstrelerin antiviral etkileri incelenmiştir. Çalışmada, farklı polaritedeki bu ekstrelerin, herpes simplex virüsü (HSV), influenza virüsü (IV) ve rinovirüse (RV) karşı antiviral etkinliği ölçülmüştür. Hazırlanan bu ekstrelerden bazıları HSV ve IV karşı antiviral etkinlik gösterirken RV'e karşı etkinlik göstermemiştir. Farklı yöntemlerle elde edilen sulu ekstreler (40°C ve 80°C), % 70 etanol ile hazırlanan ekstre ve bu ekstreten etil asetata çekilerek elde edilen fraksiyonda antiviral etki görülmüş ve etki açısından çeşitlilik gözlenmiştir. Bu çeşitlilik ekstrenin elde edildiği bitki kısımlarına göre de kendini göstermektedir. Farklı organlardan elde edilmiş farklı polaritedeki ekstre ve fraksiyonların antiviral etkinlik göstermesi etkiden sorumlu birden çok bileşiğin olduğuna işaret etmektedir (Vimalanathan ve ark., 2005).

Yukarıdaki çalışmanın devamı niteliğindeki başka bir çalışmada, *E. purpurea*, *E. pallida* ve *E. angustifolia* köklerinden elde edilmiş farklı polaritedeki ekstre ve fraksiyonların antiviral aktiviteleri incelenmiştir. *E. purpurea* köklerinden hazırlanan sulu ekstrelerde (düşük kikoric asit ve alkamit içeriklerine rağmen) güçlü anti-HSV ve anti-IV etki saptanmış ancak RV'e karşı etkinlik saptanamamıştır. Bu iki virüse karşı, etanolik ve bundan elde edilen etil asetat fraksiyonu zayıf olsa da etki bulunmuştur. *E. angustifolia* köklerinde sulu ekstrelere ait hiçbir antiviral etki tespit edilmemiştir. Bununla birlikte etanol ekstresinden elde edilen etil asetat fraksiyonunda her üç virüse karşı etkinlik saptanmıştır. *E. pallida* köklerinde ise hiçbir antiviral etki ile karşılaşılmasıdır. Bu çalışma değişik *Echinacea* türlerinden hazırlanan değişik ürünlerin antiviral seyirleri arasında farklılıklar olabileceğini göstermektedir (Hudson ve ark., 2005).

Antihiyalüronidaz etki

Maffei-Facino ve arkadaşları (1993), *E. angustifolia* köklerinden değişik polaritede çözücülerle hazırlanan ekstralar ve bazı kafeoil türevlerinin antihiyalüronidaz etkilerini araştırmıştır. Çalışmada yer alan ekstralar içinde en yüksek etkinliği sırasıyla etil asetat, butil asetat ve kloroform ekstraları göstermiştir. Etil asetat ekstresinde de tespit edilen kafeoil türevlerinden kikorik asit ve kaftarik asitte en güçlü antihiyalüronidaz etki saptanırken, sinarin ve klorojenik asit etki açısından bu iki bileşiğin çok gerisinde kalmıştır.

Taze *E. purpurea* topraküstü kısımlarından preslenerek elde edilen bitki özünün hyalüronidaz inhibe edici etkisi *Streptococcus mucosus* kültüründe incelenmiştir. Bakteride hyalüronidaza bağlı (hyalüronik asitin depolimerizasyonu sonucu) dekapsülasyon, 0,1 ml *Echinacea* bitki özünün 0,3 ml test çözeltisine eklenmesiyle azalmıştır (ESCOP, 2003).

Diğer Etkiler

Starvaggi-Cucuzza ve arkadaşları (2008), fare ve sığır meme epitel hücrelerini Polinacea™ (standardize ticari *E. angustifolia* kök ekstresi) ile tedavi etmiş ve hücreler yaşam süresi ve hücre farklılaşması açısından değerlendirilmiştir. *E. angustifolia* kök ekstresi meme-epitel fizyolojisini stimüle etmiştir. Bu sonuçlar meme gelişimi ve süt üretimi açısından *E. angustifolia* kök ekstresinin dikkate alınabileceğini göstermiştir. Ancak hamilelik ve emzirme döneminde *Echinacea* preparatlarının meme fizyolojisi üzerindeki stimüle edici etkisinden faydalanabilmek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir (Starvaggi-Cucuzza ve ark., 2008).

1.2.2.1.2. *In vivo* Çalışmalar

Echinacea kültürlerinden saflaştırılmış polisakkarit fraksiyonlarının, fagositik etkileri ve granülosit göçü üzerindeki etkileri, birbirini takip eden *in vivo* çalışmalarda araştırılmıştır. İnsan ve farelerle yapılan bu iki çalışmada da *Echinacea* polisakkaritlerinin, fagosit proliferasyonunu ve granülosit göçünü artırmak suretiyle fagosit etkinliğini artırdığı gözlenmiştir (Roesler ve ark., 1991a; 1991b).

E. angustifolia kök etanol ekstresi enjekte edilen sıçanlarda antijen-spesifik IgG ve IgM üretimindeki değişim, altı haftalık bir *in vivo* çalışmada araştırılmıştır. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında *E. angustifolia* ekstresi uygulanan grupta, antijenle tekrar karşılaşma sonucu Ig G üretiminin daha çabuk arttığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmiştir. Ig M üretimi yine *E. angustifolia* grubunda daha yüksek çıksa da belirgin bir farkla karşılaşılmamıştır. Sonuçlar *Echinacea*'nın bağışıklık güçlendirici etkisini, antijen-spesifik immünoglobülin üretimini artırarak gösterdiğine işaret etmektedir (Rehman ve ark., 1999).

Currier ve Miller (2001), piyasada bulunan ticari bir *E. purpurea* kök ekstresinin oral olarak lösemili farelerde, doğal katil (DK) hücre üretimindeki (lösemili hücreler, DK hücreler için iyi bilinen bir hedeftir) rolünü araştırmıştır. Ayrıca ekstreyle tedavi edilmeyen lösemili fareler kontrol grubunu oluşturmuştur. Löseminin başlangıcından itibaren farelere *E. purpurea* uygulanmış, dokuzuncu gün ve üçüncü ayda fareler örneklenmiştir. Kontrol grubuna ait farelerden hiçbiri lösemi başlangıcından üç ay sonra hayatta kalamamıştır. Dokuzuncu günde *E. purpurea* grubunda kontrol grubunun 2,5 katı DK hücre artışı gözlenmiş, üçüncü ayda bu düzey değişmeden kalabilmiştir (Currier ve Miller, 2001). Takip eden çalışmalarında ise (Currier ve Miller 2002) fareler bu kez öldürülmüş, tümör hücreleriyle aşılansmış ve lösemi oluşturulmuştur. Yine lösemnin başlangıcıyla birlikte tedavi grubuna oral *E. purpurea* kök ekstresi verilmiştir. Deneyin 100. gününde *Echinacea* grubundaki farelerin %55'inin kontrol grubundaki (sadece aşılansmış) farelerin ise %30'unun hayatta kaldığı bildirilmiştir. *Echinacea* grubunda, DK hücre sayılarının ilk 9 günde

daha düşük ancak 3 ay sonunda kontrol grubundan çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonucu olarak tek başına aşlamadan ziyade kombine tedavinin daha etkin olabileceği ve *Echinacea*'nın DK hücre stimüle edici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (Currier ve Miller 2002).

E. purpurea'dan izole edilen kikorik asitin, polisakkarit ve alkamit fraksiyonlarının makrofaj aktivitesi üzerindeki etkisi sağlıklı Sprague-Dawley cinsi sıçanlar kullanılarak araştırılmıştır. Hayvanlara oral olarak, değişen dozlarda, dört gün boyunca bu *E. purpurea* bileşenleri verilmiştir. Bu bileşenlerin içinde alkamitler, 12 µg/kg (vücut ağırlığı)/gün dozda alveolar makrofajların fagositik etkinliğini artırmıştır. Bu sonuçlara göre alkamitlerin tek başlarına kullanıldığında ÜSY enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olabileceği düşünülmüştür (Goel ve ark., 2002).

E. purpurea ve *E. pallida* etanol kök ekstreleri ve ekinakozit derileri tahriş edilmiş sıçanlara topikal olarak uygulanmış, antienflamatuvar ve yara iyileştirici etkileri incelenmiştir. Tedavi edilen hayvanların dokuları, deneyin 24., 48. ve 72. saatlerinde yaranın büyüklüğü, rengi ve genel durumu açısından değerlendirmeye alınmış ve deney bitiminde (72 saat) bu dokular kesilip çıkarılarak histolojik incelemeler yapılmıştır. *E. pallida* etanol ekstreleri (100 mg/ml) ve ekinakozit (0,4 mg/ml), kontrol grubuna göre belirgin antienflamatuvar ve yara iyileştirici etki göstermiştir. *E. purpurea* ekstresi (100 mg/ml) tedavinin özellikle ilk 24 saatlik bölümünde iyi bir antienflamatuvar ve yara iyileştirici etki göstermiş, ancak 48. ve 72. saatlerde enflamasyondaki düşüş ve yaralı dokunun iyileşme süreci durmuştur. *E. pallida* ve ekinakozit gruplarında 48. ve 72. saatlerde enflamasyonun azalması ve yaranın iyileşmesi belirgin şekilde *E. purpurea* ekstresi ve kontrol grubuna göre üstünlük göstermeye başlamıştır. Bilindiği gibi *E. purpurea* kökleri, *E. pallida* köklerinin aksine sadece eser miktarda ekinakozit içermektedir. *E. pallida* kök ekstresinin gösterdiği sikatrizan aktivite büyük ihtimalle *E. pallida* majör bileşenlerinden ekinakozite ait antihyaluronidaz aktiviteye bağlıdır (Speroni ve ark., 2002).

Farelerde karbon-klerens yöntemi ile yapılan bir araştırmada, % 8 *E. purpurea* ve % 7 *Glycyrrhiza glabra* kök ekstresi içeren Revitonil® isimli tablet üzerinde

immünolojik incelemeler yapılmıştır. Ayrıca Revitonil® ile karşılaştırmak amacıyla *E. purpurea* kök % 45 etanol ekstresi ve *Glycyrrhiza glabra* sulu kök ekstresinin tek başlarına karbon klerensi ölçülmüştür. Yapılan YBSK analizlerinde, deneyde kullanılan *E. purpurea* ekstresinde % 3,17 kikorik asit, *Glycyrrhiza glabra* ekstresinde % 4,94 glisirizinik asit ve Revitonil® tablette % 0,3 kikorik asit ve % 0,34 glisirizinik asit bulunduğu tespit edilmiştir. Oral uygulama sonrası yapılan değerlendirmede 2,2 mg/30g/gün fare dozunda Revitonil® ($RC_{tr}/RC_c= 2,0$) yüksek bir etkinlik sergilemiştir. Tek başlarına 1,1 mg/30g fare dozunda *E. purpurea* ($RC_{tr}/RC_c= 1,7$) ve 0,15 mg/30g fare dozunda *G. glabra* ($RC_{tr}/RC_c= 1,5$) ekstreleri Revitonil®'den düşük etkinlik göstermiştir. Deneyde kullanılan Revitonil® tablet dozunun bu iki ekstreyi de çok daha düşük miktarda içeriyor olmasına rağmen daha etkili olması bu iki ekstrenin birlikte sinerjik etki oluşturduğunu ve fagositozu daha iyi stimüle ettiğini göstermiştir (Wagner ve Jurcic, 2002).

E. purpurea'nın % 10 etanol ile hazırlanmış kök infüzyonunun, Orta Amerika yılan türü *Bothrops asper* venomuna karşı fare antijen cevabı üzerindeki etkisi *in vivo* olarak çalışılmıştır. Deneyde üç grup fare kullanılmıştır. İlk gruba sadece venom, ikinci gruba venom ile birlikte sodyum aljinat (adjuvan olarak), üçüncü gruba ise venom ile birlikte *Echinacea* ekstresi subkutan olarak verilmiştir. Deney sonunda ikişer hafta aralıklarla fare kuyruklarından kan örnekleri alınmış, anti-venom antikor seviyeleri ölçülmüştür. Üçüncü grup, ikinci kan alma zamanında (4 hafta sonra) anti-venom antikorların miktarını diğer iki gruba göre daha belirgin olarak yükseltmiştir. Elde edilen sonuçlar ışığında, atlardan antiserum üretimine ait immünizasyon protokolünde, *E. purpurea* kök ekstresinin immünoestimulan olarak kullanılması gerektiği bildirilmiştir (Chaves ve ark., 2003).

Dişi İsviçre farelerinin kullanıldığı bir *in vivo* deneyde, *E. purpurea* herbasından hazırlanan %50 gliserin ekstresinin, özgül IgM antikor oluşturma tepkisi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Üst solunum yolu enfeksiyon başlangıcına benzer immün cevap oluşturmak için farelere 4 gün boyunca i.p. yolla koyun kırmızı kan hücreleri (KKKH) uygulanmıştır. KKKH ile 4 günlük bağışıklamayı takiben 4 gün boyunca oral yolla 0,08, 0,4 ve 0,8 ml/kg/gün dozda *E. purpurea* ekstresi verilmiş ve özgül

IgM antikor oluşturma tepkisi ölçülmüştür. 0,4 ve 0,8 ml/kg/gün dozdaki uygulamalarda belirgin IgM oluşumu gözlenmiştir. Deneyde ayrıca *E. purpurea*'nın hastalığın başlangıcındaki etkinliği araştırılmıştır. Ekstre ilk olarak 0,6 ml/kg/gün dozunda 4 günlük KKKH bağışıklamasıyla birlikte uygulanmış ve 4 gün daha devam ederek *Echinacea* tedavisi 8 gün sürmüştür. İkinci olarak 4 günlük KKKH bağışıklamasının bitimininden 1 saat sonra 0,6 ml/kg/gün dozda oral yolla *E. purpurea* ekstresi uygulanmış ve bu tedavi 4 gün sürmüştür. Dört gün devam eden *E. purpurea* tedavisi özgül IgM antikor oluşturma tepkisini belirgin olarak artırmış 8 günlük tedavide ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sonuç olarak *Echinacea*'nın hastalığın başlangıcında kullanımının daha etkili olduğuna değinilmiştir. Ayrıca gliserin ekstresinin etki potansiyeli gösterdiği, bu konuda yapılacak daha fazla çalışma ile uygun oranların bulunması ve etanolik ekstrelerle karşılaştırılması gerekliliği ortaya konmuştur (Freier ve ark., 2003).

Bir başka *in vivo* çalışmada 18-65 yaşlarında, sağlıklı ve sigara içmeyen insanlara günde üç kere 1518 mg/gün *Echinacea* tabletleri verilmiş ve periferel lökositlerdeki gen-salımı incelenmiştir. Örneklemeler ikinci ve onikinci günlerde yapılmış ve sonuçlar değerlendirilmiştir. İnterlökin-1 β , tümör nekroze edici faktör- α ve interlökin-8 salımı beşinci güne kadar düşüşe geçmiş ancak on ikinci güne doğru yükselerek başlangıç seviyesine geri dönmüştür. Yalnızca interferon- α 2 salımı tüm örneklerde son güne kadar sürekli artış göstermiştir. Deney sırasında antiviral ve antienflamatuvar cevaplar gözlenmiştir. Elde edilen veriler *Echinacea*'nın soğuk algınlığı ve grip semptomlarının süresinin ve şiddetinin azaltabilme yeteneğinin, meydana getirdiği gen salım cevabına bağlı olduğunu göstermektedir (Randolph ve ark., 2003).

Farelerde yapılan karbon klerens testinde 5 mg *E. purpurea* herba etanolik ekstresi içeren 30 ml normal salin (% 0,9 sodyum klorür) çözeltilisi 2 gün boyunca 3x10 ml/kg/gün dozda uygulanmıştır. *E. purpurea* grubunun karbon klerensi kontrol grubuna göre 1,5 kat yükselmiştir. Aynı ekstrenin kloroform fraksiyonunda 1,6 su fraksiyonunda ise 1,3 kat yüksek karbon klerensi gözlenmiştir. Aynı çalışmada *E. purpurea* herba tentürü 3x0,17 ml/gün dozda 2 gün boyunca uygulanmış ve karbon

klerensi kontrol grubuna göre 2,1 kat yüksek bulunmuştur. Başka bir çalışmada, farelerle yapılan karbon klerens testinde, *E. pallida* kökü % 90 etanol ekstresi oral olarak iki gün boyunca 0,5 ml/kg/gün dozunda uygulanmış ve fagositozun 2,2 kat arttığı gözlenmiştir. Ayrıca etanollü ekstreden elde edilen lipofilik fraksiyonun hidrofilik fraksiyondan daha etkin olduğu bulunmuştur (ESCOP, 2003).

E. purpurea ve *E. pallida* köklerinden saflaştırılan polisakkarit ve glikoproteinleri içeren yüksek molekül ağırlıklı fraksiyon, intravenöz olarak çeşitli dozlarda (50, 100, 500 µg/hayvan) verilmiş ve sıçanlarda IL-1 (*E. purpurea* ve *E. pallida*), IL-6 (sadece *E. purpurea*) sitokinlerinin üretimini artırmıştır. Bu fraksiyonların sıçanlara oral uygulanması Peyzer'in plak hücrelerinde antikor üretimini artırmıştır (ESCOP, 2003).

Sıçanlarda yapılan modifiye yayma deneyinde, bitkinin (*E. purpurea*) topraküstü kısımlarından sıkılarak elde edilen 7:1 oranında konsantre edilmiş 0,04 ml öz suyu subkutan yolla hayvanlara verilmiş ve antiyaluronidaz etkinlik araştırılmıştır. Sonuçlar *E. purpurea* antiyaluronidaz etkinliğinin 1 mg kortizonla karşılaştırılabilecek ölçüde olduğunu göstermiştir (ESCOP, 2003).

Kobaylara subkutan yoldan, hayvanlar enfekte edilmeden *E. purpurea* topraküstü kısımlarından sıkılarak elde edilen 0,3 ml özüt uygulanmış ve *Streptococcus* enfeksiyonunun yayılımının ve şiddetinin azaldığı gözlenmiştir. 10 hayvanlık tedavi grubunda ölüm gözlenmezken, kontrol grubunda 1 hafta içinde bazı ölümler gözlenmiştir (ESCOP, 2003).

E. purpurea'nın süt bezi salgısı üzerindeki immünolojik işlevi perinatal dönemdeki inekler üzerinde incelenmiştir. İneklerin yemlerine beklenen yavrulama zamanından 10 gün önce başlayarak 3 hafta boyunca 300 g/gün/hayvan dozunda tüm bitki olarak *E. purpurea* eklenmiştir. Yavrulama sonrası 1., 3. ve 6. haftalarda deney ve kontrol gruplarından toplanan süt örneklerinde somatik hücre sayımı yapılmış, ineklerden alınan kolostrum örneklerindeki Ig-α ve Ig-β miktarları ölçülmüştür. Ayrıca buzağılardan tek seferde ve annelerinden yavrulama sonrası 1., 3. ve 6. haftalarda

alınan kan örneklerinde Ig- α , β ve γ miktarları ölçülmüştür. Sonuç olarak sadece ineklere ait kan örneklerinde Ig- γ miktarında kontrol grubuna göre belirgin bir artış gözlenmiştir. Perinatal dönemdeki inekler üzerinde *E. purpurea*'nın süt bezi salgısı üzerindeki immünolojik etkinliğinin anlaşılabilmesi için daha fazla çalışma gerekmektedir (Dymnicka ve ark., 2004)

E. angustifolia köklerinden hazırlanan Polinacea™ isimli (>%4) ekinakozit, (>%5) yüksek molekül ağırlıklı polisakkarit (IDN 5405) ve <% 0,1 izobütülamit fraksiyonu içeren standardize bir hidroalkolik ekstrenin *in vivo* ortamda, bağışıklık sistemi üzerine etkisi incelenmiştir. Deneyde *Candida albicans* enfeksiyonlu, normal fareler ve siklosporin-A ile bağışıklık sistemleri baskılanan farelerde, 1 g/kg vücut ağırlığı (oral) dozda Polinacea™ kullanılmış ve hayatta kalma süreleri değerlendirilmiştir. Her iki grupta da Polinacea™ ile tedavi edilen farelerin yaşam sürelerinde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Bu çalışmada yer alan *in vitro* sonuçlar da göz önünde tutulduğunda Polinacea™ 'nın hem normal hem de immüsuprese farelerde *Candida albicans* enfeksiyonunu önlemede T hücre cevabı oluşturması önemli rol oynadığı bulunmuştur (Morazzoni ve ark., 2005).

Rousseau ve arkadaşları (2006), koyalarda ses teli hasarına karşı ekinakozitin bilinen antiyaluronidaz aktivitesi nedeniyle piyasada bulunan bir *Echinacea* standardize ekstresinin yara iyileştirici etkisini araştırmıştır. Hasarlı bölgeye değişik dozlarda bu ekstreten topikal olarak uygulanmış, ses tellerindeki hyaluronan ve kollajen düzeyleri gibi histolojik incelemelerin yanı sıra sesle ilgili incelemeler (fonasyon eşik basıncı: FEB ve vokal ekonomi: VE) de yapılmıştır. Histolojik incelemelerde, ses tellerindeki hyaluronan ve kollajen düzeyleri açısından tedavi edilen grupla kontrol grubu arasında anlamlı bir fark gözlenmemesine rağmen *Echinacea* tedavisi alan gruba ait FEB ve VE değerlerinde kontrol grubuna göre belirgin bir gelişim ve düzelme gözlenmiştir. Elde edilen bulgular *Echinacea* tedavisinin ses teli hasarlarına karşı faydalı olabileceğini göstermektedir (Rousseau ve ark., 2006).

Mürin lösemi virüs (MLV) kaynaklı lösemi oluşturulmuş fareler üzerinde oral yolla verilen toz edilmiş *E. purpurea* yapraklarının etkinliği araştırılmış, kontrol grubuna tedavi uygulanmamıştır. Tedavi alan gruptaki farelerin yaşam süreleri uzamış ve thymus lenfomasının büyümesi baskılanmış ve thymus'daki MLV proliferasyonu inhibe edilmiştir. Ayrıca tedavi grubunda IFN- γ üretimi belirgin şekilde artmış, TNF- α ve IL-12 üzerinde çok küçük bir etkinlik gözlenmiştir. Diğer bir çalışmada ise malign tümör hücreleri ile aşılınmış farelere, bitki kısmı belirtilmemiş sulu *E. purpurea* ekstresi uygulanmıştır. Tedavi grubunda tümör büyümesi ve tümör maksimum boyutunda gerileme görülmüştür. Bununla birlikte artmış DK hücre etkinliği de bildirilmiştir (Upton ve ark. 2007).

Zhai ve arkadaşları (2007a), immünomodülatör özelliklerini araştırmak amacıyla, *E. purpurea*, *E. pallida* ve *E. angustifolia* alkollü kök ekstralarını, kırmızı kan hücreleriyle (koyundan) bağışıklanmış fareler üzerinde denemiştir. Farelere 7 gün boyunca 130 mg/kg vücut ağırlığı *Echinacea* ekstraları ya da kontrol verilmiştir. Biyolojik etkileri fare kan örneklerinde artan CD49+ ve CD19+ lenfosit yüzdesi ve DK hücre sitotoksitesi şeklinde gözlemlenen *Echinacea* türleri arasında benzerlikler ve farklılıklar ortaya çıkmıştır. *E. pallida* ve *E. angustifolia* ile tedavi edilen fareler belirgin şekilde daha yüksek T-hücre proliferasyon artışı göstermiştir. Ek olarak ekstraların üçü de interferon- α üretimini anlamlı olarak artırmış ancak tümör nekroze edici faktör- γ ve interlökin (IL)-1 β salımını inhibe etmiştir. *E. pallida* ve *E. angustifolia* ile tedavi edilen farelerde daha yüksek IL-4 ve artan IL-10 üretimi gözlemlenmiştir. Tüm sonuçlar bir arada incelendiğinde *Echinacea*'nın geniş etki alanına sahip bir immünomodülatör olduğu sonucuna varılmıştır. Özellikle *E. pallida* ve *E. angustifolia*'nın daha yüksek antiinflamatuvar etki potansiyeline sahip olabileceği belirtilmiştir (Zhai ve ark., 2007a).

Ekinakozit, radikal süpürücü etkisine dayanarak, oleik asit (OA) kaynaklı akut akciğer hasarına (AAH/ALI, acute lung injury/ARDS, akut respiratory distress syndrome) karşı koruyucu olarak sıçanlarda denenmiştir. Elde edilen sonuçlar, hayvanların hayatta kalması ve yan etkisiz fayda görmesinde ekinakozitin başarılı olduğunu göstermiştir. Antiinflamatuvar ve akciğerlerde hasar önleyici etkinlik

gösteren ekinakozitin, antioksidan özelliği önemli bir rol oynamıştır. Bu *in vivo* çalışmada, ekinakozitin koruyucu olarak, akciğerlerde kimyasallar tarafından meydana gelen akut hasarlara karşı ümit verici bir ilaç olduğuna değinilmiştir (Zhang ve ark., 2007).

İntravenöz yolla *Listeria monocytogenes* enjekte edilmiş farelere bir gün önce 250, 500 ve 750 µg/gün dozlarda *E. purpurea* kök ve toprak üst kısımlarından izole edilen bir polisakkarit fraksiyonu (EP) oral olarak uygulanmaya başlanmış ve EP tedavisi 3 gün devam ettirilmiştir. Üçüncü günün sonunda farelerden kan örnekleri alınmış ve fare kanında *Listeria monocytogenes* sayısı (CFU: colony forming unit/ koloni oluşturma birimi olarak) ölçülmüştür. 750 µg/gün doz EP uygulanan, farelere ait kan örneklerinde *Listeria monocytogenes* sayısı (CFU: colony forming unit/ koloni oluşturma birimi olarak) kontrol grubuna göre anlamlı biçimde düşmüş, EP'nin *in vivo* etkinliği kanıtlanmıştır (Sullivan ve ark., 2008).

1.2.2.2.Klinik Çalışmalar

Soğuk algınlığının önlenmesi ve tedavisi

Rastgele, plasebo kontrollü, ve çift körlü (R.Ç.P.) bir klinik çalışmada *E. pallida* kök tentürünün grip benzeri üst solunum yolu enfeksiyonlarında (ÜSYE) kullanımı ve etkinliği araştırılmıştır. Hastalığı başlayalı en fazla üç gün olmuş viral ya da bakteriyel enfeksiyonlu 160 hasta 8 ila 10 gün arası 90 damla/gün (900 mg/gün ekstre) tentür ve plasebo almış ve tedavi sonunda belirti skorları ölçülmüştür. Hastaların viral enfeksiyon mu yoksa bakteriyel enfeksiyon mu geçirdikleri alınan kan örnekleriyle belirlenmiştir. Tedavi grubundan viral enfeksiyonlu olan hastalarda ortalama 9,1 günde, bakteriyel enfeksiyonlu hastalarda 9,8 günde ve plasebo gruplarında ortalama 13 günde iyileşme gözlenmiş, sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. *Echinacea*'nın viral ya da bakteriyel ÜSYE tedavisinde yararlı olduğu bu R.Ç.P. çalışmada ortaya konmuştur (Dorn ve ark., 1997).

Yine soğuk algınlığına karşı Echinacin™ etkinliğinin ölçüldüğü başka bir R.Ç.P. çalışmada, soğuk algınlığının başlangıcındaki 120 hastaya ilk gün 2 saatte bir 20 damla, takip eden günlerde 3x20 damla/gün dozda 10 günü aşmayan plasebo veya Echinacin™ tedavisi uygulanmıştır. Echinacin™'le tedavi edilen hastalar plasebo grubuna göre belirgin şekilde soğuk algınlığı sonrası daha çabuk iyileşmeye başlamıştır. İyileşmeleri nedeniyle tedaviyi kesen hastaların oranının ise Echinacin™ grubunda yine plasebo grubuna göre belirgin olarak yüksek olduğu bildirilmiştir. Tedavi Echinacin™ grubunda ortalama 6 günde kesilmiş plasebo grubunda ise 10 günü bulmuştur. Tedavi sırasında hiçbir spesifik yan etki bildirilmemiştir. Sonuç olarak soğuk algınlığının ilk işaretleriyle birlikte Echinacin™ alınmasının güvenli ve etkili bir tedavi yöntemi olduğu ortaya konmuştur (Hoheisel ve ark.,1997).

Melchart ve arkadaşlarının (1998), yaptığı R.Ç.P. çalışmada 302 gönüllü (18-65 yaş) hastaya 12 hafta süreyle her pazartesiden cumaya 2x50 damla/gün dozda *E. angustifolia* kök ekstresi (%30 etanol ile 1:11 ekstre:bitki oranında elde edilen), *E. purpurea* kök ekstresi (%30 etanol ile 1:11 ekstre:bitki oranında elde edilen) ve plasebo verilmiştir. Hastalığa yakalanma süresi *E. angustifolia* grubunda 66 gün, *E. purpurea* grubunda 69 gün ve plasebo grubunda 65 gün olarak saptanmıştır. Sonuç olarak deneyde kullanılan *Echinacea* preparatlarında anlamlı profilaktik etki gözlenmemiştir. Bu etkinin kanıtlanabilmesi için daha geniş örnek sayısı ile yeni çalışmaların yapılması gerektiği bildirilmiştir (Melchart ve ark., 1998).

Brinkeborn ve arkadaşları (1999) tarafından yapılan R.Ç.P. çalışmada soğuk algınlığına yakalanmış 246 hastaya 3x2 tablet/gün farklı *Echinacea* preparatı verilmiştir. Hastalara kendilerini iyi hissedene kadar, ancak 7 günü aşmayacak şekilde, Echinaforce™ tablet (Ef: her tablette % 95 *E. purpurea* herba ile %5 *E. purpurea* kök sulu alkol ekstresi), yedi kat daha yüksek konsantrasyonda Echinaforce™ (KEf), sadece *E. purpurea* kök ekstresi içeren tablet formülasyonu (EPk: alkol ekstresi) veya plasebo tabletleri verilmiştir. Hastaların şikâyetleri, önceden belirlenen 12 soğuk algınlığı belirtisi dikkate alınarak takip edilmiştir. Ef ve KEf, EPk ve plaseboya göre istatistiksel olarak anlamlı biçimde daha etkin bulunmuştur. Yan etki açısından da *E. purpurea* tedavi grupları ve plasebo arasında

anlamli bir fark oluşmamıştır. Echinaforce™ soğuk algınlığının standart semptomatik tedavisinde kendisini dũřuk riskli ve etkili bir alternatif olarak gũstermiřtir (Brinkeborn ve arkadaşları 1999).

Grimm ve Mũller (1999) R.Ç.P. alışmalarında bir önceki yıl tten fazla soğuk algınlığı ya da solunum yolu enfeksiyonu geçirmiş hastalarla çalışmıştır. Kullanılan sıvı *E. purpurea* ekstresi (Echinacin™/Echinagard™), köklerinden içermeyen taze sıkılmış iekli toprakstũ kısımlarının %20 etanolle stabilize edilmesiyle hazırlanmıştır. Toplam 109 hastaya 2x4 ml/gũn dozda 8 hafta boyunca Echinacin™ veya plasebo uygulanmış, insidans, şiddet ve hastalık sũreleri takip edilmiştir. Sonuçlar ışığında Echinacin™ ve plasebo arasında anlamli bir fark gözlenmemiştir (Grimm ve Mũler, 1999).

Lindenmuth ve Lindenmuth (2000) tarafından yapılan R.Ç.P. Çalışmada soğuk algınlığı veya gribin erken belirtileri ile başvuran 95 hastaya 1-5 gũn sũreyle gũnde 5-6 fincan *Echinacea purpurea* herba (1065 mg), *Echinacea purpurea* kök kuru sulu ekstresi (37,5 mg), *Echinacea angustifolia* herba (30,0 mg) içeren *Echinacea Plus*® Tea infũzyonu verilmiştir. Deney grupları etkinlik, semptom sũresi ve etkinin grũlme sũresi açısından değerlendirilmiştir. Tedavi grubu etkinlikte plasebo grubuna karşı anlamli bir stœnlũk göstermiştir. Soğukalgınlığı ve grip başlangıcında *Echinacea* ayı içilmesinin, semptomları plaseboya göre daha kısa sũrede iyileştirdiği bildirilmiştir (Lindenmuth ve Lindenmuth 2000).

Soğuk algınlığı ilk belirtileri ile başvuran 80 yetişkin hastaya Echinacin™ veya plasebo verilmiş, ilaç alanlar 6 gũnde iyileşirken plasebo alanlar 9 gũnde iyileşmiş ve yan etki grũlmemiřtir. Sonuç olarak *E. purpurea*'nın iyi tolere edilen ve soğuk algınlığı semptomlarını hafifletmede plaseboya göre daha etkili bir ilaç olduğu saptanmıştır (Schulten ve ark., 2001).

Barrett ve arkadaşları (2002), soğuk algınlığının erken dönemde tedavisindeki *Echinacea* etkinliğini R.Ç.P. bir klinik çalışmada araştırmıştır. Soğuk algınlığı

başlangıcındaki 148 üniversite öğrencisine *E. purpurea* herbası (%25) ve kökü (%25) ve *E. angustifolia* kök (%50) ekstresi içeren kapsüller verilmiştir. Yapılan analizlerde kapsüllerin içeriğinde % 0,26 ekinakozit, % 0,77 kikorik asit, % 0,82 alkamit, % 0,03 klorojenik asit, % 0,33 kafeoil tartarik asit tespit edilmiştir. *Echinacea* kapsülleri hastalığın ilk günü 6x1 g/gün dozda, takip eden günlerde ise 3x1 g/gün dozda plasebo ile birlikte en fazla 10 gün boyunca uygulanmıştır. Değerlendirmenin hastalık süresi ve belirti ciddiyeti açısından yapıldığı çalışmada *Echinacea* kapsülleri hiçbir ölçütte plasebo tedavisine göre istatistiksel olarak anlamlı bir üstünlük göstermemiştir. Deney sonucu olarak *Echinacea*'nın bu öğrenciler üzerinde belirli bir yarar ya da zarar sağlamadığı bildirilmiştir (Barrett ve arkadaşları 2002).

R.Ç.P. çalışmada üst solunum yolu enfeksiyonu olan 180 hasta 3 gruba ayrılmıştır. Birinci gruba günde 450 mg *E. purpurea* köke eşdeğer tentür; ikinci gruba 900 mg köke eşdeğer tentür, üçüncü gruba ise plasebo verilmiştir. 900 mg köke eşdeğer tentür alan hastalarda semptomlar önemli derecede azalmıştır. Etkiler yüksek doz alan grupta 3-4 gün sonra görülmeye başlamış tam etki 8-10 gün sonra oluşmuştur. Bu süreç içinde düşük doz alan grup ile plasebo grubu arasından anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Bu çalışmaya göre terapötik doz *E. purpurea* 1:5 tentüründen enfeksiyon sırasında günde 9 ml kullanılması gerekir (ESCOP, 2003).

E. purpurea'nın ÜSYE'nda hastalık süresinin ya/ ya da şiddetinin düşürülmesinde etkin olup olmadığı yaşları 2 ila 11 arasındaki çocuklarda yapılan R.Ç.P. çalışmada araştırılmıştır. Taze sıkıldıktan sonra kurutulan *E. purpurea* özütü, etken madde içermeyen bir şurupta çözülerek plasebo kontrolüyle birlikte sağlıklı çocuklara 2x3,75 ml/gün (2-5 yaş arası) ve 2x5 ml/gün (6-11 yaş arası) dozlarında verilmiştir. 4 ay süren deneyde 407 çocukta toplam 707 ÜSYE ortaya çıkmıştır. Bunların 337'si tedavi grubunda görülmüştür. Hastalık süresi ve semptom şiddet skorlarının tedavi ve plasebo gruplarında çok yakın olduğu görülmüştür. *Echinacea* tedavisi alan gruptaki çocuklarda yan etki olarak % 7,1'inde deri döküntüsü görülmüştür. Bu dozdaki *E. purpurea* kullanımının 2-11 yaşlarındaki çocuklardaki ÜSYE tedavisinde etkili olmadığı ve ciltte döküntü riski oluşturacağı sonucuna varılmıştır (Taylor ve ark., 2003).

Soğuk algınlığı tedavisindeki etkinliğini araştırmak amacıyla taze *E. purpurea*'nın çeşitli kısımlarından hazırlanan standardize sıvı ekstre Echinilin™ (0,25 mg/ml alkamit, 2,5 mg/ml kikorik asit ve 25 mg/ml polisakkarit içeren) R.Ç.P. çalışmada, yaşları 18-65 arası değişen önceki yıl iki ya da daha fazla soğuk algınlığı geçirmiş, 282 hastada denenmiştir. Hastalarda (128 tanesi) soğuk algınlığıyla ilgili ilk belirtinin ortaya çıkışıyla Echinilin™ verilmeye başlanmış, yedi gün boyunca uygulanan tedavide ilk gün 10x4 ml takip eden 6 günde ise 4x4 ml/gün doz uygulanmıştır. Deney sonunda günlük toplam belirti skoru ve tedaviye cevap oranı Echinilin™ grubunda anlamlı biçimde plaseboya üstünlük sağlamıştır. Erken dönemde standardize bir *Echinacea* formülasyonunun uygulanmasının ÜSYE semptomlarını hafiflettiği belirtilmiştir (Goel ve ark.,2004).

Standardize *E. purpurea* herba preparatı EchinaFresh® soğuk algınlığının şiddeti ve süresi üzerindeki etkisi açısından R.Ç.P. bir klinik çalışmada araştırılmıştır. EchinaFresh® 100 mg, % 2,4 β-1,2-D-fruktofuranozitlere göre standardize edilmiş ve liyofilize edilerek kurutulmuş, *E. purpurea* herba taze sıkılmış özütünü içermektedir. 14 gün boyunca 128 hastanın soğuk algınlığı semptomlarının ortaya çıkışından hafiflemesine kadar EchinaFresh® ya da plasebo kapsüllerinden günde 3 defa almaları sağlanmış ve hangi grubun tedaviyi daha önce bıraktığı ve belirti skorları kaydedilmiştir. Ancak tedavi grubu ile plasebo grubu arasında hiçbir ölçütte anlamlı bir etkinlik farkı gözlenmemiştir. İleriki çalışmaların farklı formülasyonlar ve dozajlar denenerek etkinin araştırılması gerekmektedir (Yale ve Liu, 2004).

Goel ve arkadaşlarının 2005'te yaptığı R.Ç.P. çalışmada Echinilin™, ilk gün 8x5 ml takip eden 6 günde ise 3x5 ml/gün dozda aynı şekilde seçilen 150 hastaya soğuk algınlığının başlama evresinde uygulanmıştır. Yine bu çalışmada da günlük toplam belirti skoru ve tedaviye cevap oranı plaseboya karşı belirgin Echinilin™ etkinliği ile sonuçlanmıştır. Ayrıca hastalardan alınan kan örneklerinde belirgin olarak artan toplam beyaz kan hücreleri, monosit, netrofil ve doğal katil hücre miktarı da Echinilin™ etkinliğini destekler niteliktedir. Hastalık sürecinin ilerleyen bölümünde ise Echinilin™ tedavisinin nötrofillerce enfeksiyon sonucu artan süperoksit salımını

suprese ettiği bildirilmiştir. Echinilin™ bağışıklık sistemini güçlendiren ve serbest radikal süpürücü etkisi ile, soğuk algınlığı semptomlarına karşı hızlı bir çözüm olarak önerilmiştir (Goel ve ark.,2005).

Kanada'da yapılan bir açık etiketli çalışmada çocuklarda meydana gelen ÜSY enfeksiyonlarında *E. purpurea* herba sıvı ekstresinin etkinliği ve güvenilirliği araştırılmıştır. Deneyde 10 gün boyunca 2-5 yaşlarındaki çocuklara 3x2,5 ml/gün 6-12 yaşlarındakilere ise 2x5 ml/gün doz verilmiştir. Etkinlik, çalışmanın küçük boyutlarda olması nedeniyle kesin biçimde değerlendirilememiş olsa da hiçbir allerjik ya da yan etki gözlenmemiş, hiçbir güvenilirlik sorunu ortaya çıkmamıştır (Saunders ve ark., 2007).

O'neil ve arkadaşlarının (2008) yaptığı R.Ç.P. çalışmada *E. purpurea* veya plasebo kapsülleri verilen 90 hastada ÜSYE belirtilerinin görülme sıklığı takip edilmiştir. Kış aylarında yapılan deneyde hastalar sekiz hafta boyunca 2x3 kapsül/gün doz almış bu süreçte belirtiler her haftalık takip edilmiştir. Deney sonunda 58 hasta değerlendirmeye alınmış bunlardan 28'u *Echinacea* grubunda 30'u plasebo grubunda yer almıştır. Sekiz haftada *Echinacea* grubundaki hastalar 9 günü hasta olarak geçirirken plasebo grubundaki hastalar kişi başı 14 günü hasta olarak geçirmiştir. Sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (O'neil ark., 2008).

Diğer Klinik Çalışmalar

Echinacea'nın egzersizle indüklenmiş bağışıklık sistemi üzerindeki etkilerini araştırmak amacıyla R.Ç.P. olarak 42 sağlıklı atlete 28 gün boyunca Echinacin®, magnezyum takviyesi (magnezyum hidrojen fosfat + magnezyum hidrojen sitrat= 43 mg Mg⁺⁺ eşdeğer) ya da plasebo verilmiştir. Çalışmada atletlerin kan hücre populasyonu incelenmiş, kan ve idrar örneklerinde IL-6, sIL-2R (IL-2 reseptörü) miktarları ölçülmüştür. Atletler 29 ve 30. günlerde triatlon yarışına girmiştir. Kan ve idrar örnekleri tedaviden 1 saat sonra ve yarışmadan 20 saat sonra alınmıştır. Echinacin®, plaseboyla karşılaştırıldığında idrar sIL-2R seviyesindeki düşüşü ve

serum sIL-2R seviyesindeki egzersiz kaynaklı düşüşü belirgin olarak artırmıştır. Serum ve idrarda egzersiz kaynaklı IL-6 ve kortizol artışının Echinacin® grubunda daha yüksek olduğu gözlenmiş ve plaseboyla aralarındaki fark anlamlı bulunmuştur. Echinacin® ile yapılan ön tedavi kandaki T-lenfosit ve DK hücre popülasyonunda belirgin değişimler meydana getirmemiştir. Echinacin® kullanan atletlerden hiç birinde ÜSYE ile karşılaşılma, magnezyum grubunda 3/13, plasebo 4/13 oranında ÜSYE gözlenmiştir. Bu çalışmada Echinacin®'in meydana getirdiği etkiler, monosit/makrofaj stimülasyonunun bir sonucu olarak düşünülmektedir (Berg ve ark., 1998).

Melchart ve arkadaşlarının (2002) yaptığı açık, prospektif, pilot çalışmada *E. purpurea* topraküstü kısımları hücre kültüründen izole edilen polisakkaritlerin kanser kemoterapisi kaynaklı lökopeniyi önleyip önlemeyeceği araştırılmıştır. ELF (etopozit, lökovorin ve 5-fluorourasil) kemoterapisi alan 15 mide kanserli hastaya kemoterapi başlamadan 3 gün önce başlayacak şekilde 10 gün boyunca 2 mg/gün i.v. yolla bu polisakkaritlerden verilmiş kontrol grubunu ise sadece ELF kemoterapisi alan hastalar oluşturmuştur. Kemoterapiyi takip eden 14 ve 16'ncı günlerde kontrol grubuyla karşılaştırıldığında tedavi grubunun kan örneklerindeki lökosit sayısı yüksek çıkmış ancak anlamlı bir artış gözlenmemiştir. *Echinacea*'nın kanser kemoterapisi kaynaklı lökopeniyi önleyebilme ihtimalinin olduğu, etkinlik ve güvenilirliğinin ileriki çalışmalarla araştırılması gerektiği sonucuna varılmıştır (Melchart ve ark., 2002).

Başka bir R.Ç.P. çalışmada 48 hastaya rino-virüs tip-39 uygulamasından 7 gün önce 3x2,5 ml/gün dozda Echinagard® ya da plasebo vermeye başlanmış ve toplam tedavi 14 gün sürmüştür. *Echinacea* tedavi grubundaki hastaların % 92'sinde plasebo grubunun ise % 96'sında rino-virüs enfeksiyonu meydana gelmiş, bu hastaların sırasıyla %59 ve % 82'sinde klinik soğuk algınlığı belirtileri gelişmiştir. Ancak sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Bununla birlikte çalışmanın küçük boyutta olması istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar almayı zorlaştırmaktadır. İleriki çalışmalarda daha geniş boyutta araştırmalarla *Echinacea* etkinliği ve

potansiyelinin açıklığa kavuşturulması gerektiği şeklinde bir yorum yapılmıştır (Sperber ve ark., 2004).

Nükseden vajinal mantar enfeksiyonlarına karşı Echinacin® etkinliği, Coeugnet ve Kühnast (1986) tarafından araştırılmıştır. *Candida* enfeksiyonu kanıtlanmış kadınlar önce topikal ekonazol tedavisi görmüştür. Takip eden 10 hafta boyunca hastalara oral (3x30 damla/gün n=60), ya da enjekte edilerek (haftada 2 kere 0,5 ve 2 ml; i.v. n=20, i.m. n=60, s.c. n=20) Echinacin® verilmiş 43 hasta kontrol grubunu oluşturmuştur. 10 haftalık sürede ve takiben hastaların 6 aylık gözlenme sürecinde, enfeksiyonun tekrar edip etmediği ve Merieux Multiteste (antijenik deri reaksiyonu) verdiği cevap ölçülmüştür. Tüm Echinacin® gruplarında 6 aylık süreç boyunca deri reaktivitesinde artış gözlenmiştir. Kontrol grubunun % 60'ında, oral tedavi grubunun % 17'sinde, i.v. ve s.c. grupların % 15'inde i.m. grubun % 5'inde vajinal kandidiyazis nüksü görülmüştür. Oral yolla Echinacin® uygulanan grupta hiçbir yan etki gözlenmemiştir. Parantral uygulamalar içinde ise yan etki sıklığı en yüksek olan grubun i.m. Echinacin® grubu olduğu bildirilmiştir (Upton ve ark., 2007).

1.2.2.3. *Echinacea* Bileşiklerinin Farmakokinetiği

Şu ana kadar yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, *Echinacea* türlerinden izole edilen bileşiklerin tek başlarına, total bitki ekstresi kadar yüksek immünoestimulan etki gösteremedikleri görülmektedir. Bunun yanında *Echinacea* türlerinden izole edilen farklı etken madde grupları, farklı ama birbiriyle bağlantılı biyolojik aktivite (immünoestimulan, antienflamatuvar, analjezik, antioksidan) göstermektedir. Yani *Echinacea* içeriğindeki bileşiklerin kombine etki oluşturduğu, etkilerin birbirini tamamladığı düşünülmektedir. Ancak mevcut veriler, kafeik asit türevlerinin sindirim epitelinin geçemezken alkamidlerin geçebildiğini bildirmektedir (Upton ve ark., 2007).

Matthias ve arkadaşları (2005a, 2005b), *E. purpurea* ve *E. angustifolia* köklerinden hazırlanan kurutulmuş etanol ekstreleri kombine içeren tabletlerin verildiği 9 sağlıklı gönüllüye ait plazma örneklerini incelemiştir. Her tablet yaklaşık 10,92 mg toplam alkamid 32,5 mg kafeik asit türevi içermektedir. Plazma örneklerinin hiçbirinde kafeik asit türevlerine rastlanmamıştır. Diğer yandan alkamidler hızlıca absorbe edilmiş, 20. dakikadan 12 saate kadar tedavi sonrası plazmada tespit edilebilirliklerini korumuşlardır. En yüksek kan konsantrasyonuna (T_{max}) 2,3 saatte ulaşmış ve pik konsantrasyonu (C_{max}) 336 ng/ml olarak bildirilmiştir (Matthias ve ark., 2005a; 2005b). Agnew ve arkadaşları (2005), 11 sağlıklı gönüllüde aynı ürünün kullanımından bir saat sonra plazmalarında sadece tetraen alkamidleri tespit etmiştir (Agnew ve ark., 2005).

Benzer bir çalışmada, Woelkart ve arkadaşları (2005), 11 gönüllüye 2,5 ml *E. angustifolia* % 60 etanolik kök ekstresinden vermiş ve alkamid T_{max} değerlerini 20-30 dakika olarak bildirmiştir (Woelkart ve ark., 2005). Woelkart ve arkadaşları (2008a), majör *Echinacea* alkamidleri olan, izomerik (2E,4E,8Z,10E/Z)-tetraenik asit izobütillamidlerin farmakokinetiğini incelemiştir. Gönüllü erkek ve kadınlara, % 95 *Echinacea* herba ekstresi + % 5 *Echinacea* etanolik kök ekstresi (yardımcı madde: laktöz monohidrat) içeren (EPLa) ve % 95 *Echinacea* herba ekstresi + % 5

Echinacea etanolik kök ekstresi (yardımcı madde: sorbitol ve β -siklodekstrin) içeren (EP- β) iki tablet, bir de % 95 *Echinacea* herba ekstresi + % 5 *Echinacea* etanolik kök ekstresi içeren boğaz spreyi (EPSp) verilmiştir. Tüm ürünlerde 2E,4E,8Z,10E/Z-tetraenoik asit izobütülamitlerin benzer C_{max} (0,2 ng/ml civarı) değerleri elde edilmiştir. 2E,4E,8Z,10E/Z)-tetraenoik asit izobütülamitlerin T_{max} değerleri EPLa, EP- β ve EPSp gruplarında sırasıyla 28, 68 ve 55 dakika olarak bulunmuştur. Ayrıca majör *Echinacea purpurea* alkamitleri olan (2E,4E,8Z,10E/Z)-tetraenoik asit izobütülamitlerin farklı farmasötik formlarda sindirim sisteminde absorbe olduğu görülmüştür (Woelkart ve ark., 2008a).

Matthias ve arkadaşları (2004), *E. purpurea* ve *E. angustifolia* % 60 etanolik kök ekstresinde bulunan alkamitlerin, bir sindirim epitel benzetimi olan, Caco-2 (insan kolon kanser hücre dizisi) tabakasından geçebildiğini bildirmiştir. Kafeik asit türevleri ise sindirim absorpsiyonu yok denecek kadar az geçiş göstermiştir (Matthias ve ark., 2004). Benzer bir çalışma Jager ve arkadaşları (2002) tarafından yapılmış *in vitro* çalışmada tetraenlerin kolon kaynaklı epitel hücrelerinden absorbe edildiği bildirilmiştir (Jager ve ark., 2002; Upton ve ark., 2007).

Yukarıdaki çalışmalarda tablet ve sıvı ekstrelerinden alkamit alımının sıvı ekstrede daha hızlı olduğu görülmektedir. Buna bağlı olarak sıvı ekstre uygulamasında ağız ve özofagusun da hızlı alkamit absorpsiyonunda rolü olduğu düşünülebilir. Bunun yanında yalnızca alkamit absorpsiyonu, immünolojik etkinlik açısından, sindirim yoluyla absorpsiyonun gerekli olup olmadığı konusunda merak uyandırmaktadır. Ek olarak etkinin oral uygulama sonrası sindirim duvarlarını geçerek sistemik etkiye neden olan reseptörlerin uyarılması şeklinde ortaya çıkabileceği de düşünülmektedir (Upton ve ark., 2007).

Glukoproteinler ve polisakkaritlere ait farmakokinetik veri şu anda mevcut değildir. Bunun nedenleri olarak analitik yöntemlerin eksikliği ve polisakkaritlerin genel olarak absorpsiyon öncesi sindirim enzimlerince yıkılması ve sadece monosakkaritlerin sindirim membranlarından geçebilmesi gösterilebilir (Upton ve ark., 2007).

1.2.3. Avrupa ve Amerikan Farmakopesinde *Echinacea purpureae Herba*, *Echinacea purpureae Radix* ve *Echinacea pallidiae Radix* için istenen kriterler

Çizelge 9. Avrupa Farmakopesi'nde (EP6) *Echinacea purpureae Herba*, *Echinacea purpureae Radix* ve *Echinacea pallidiae Radix* için istenen kriterler

	<i>Echinacea purpureae herba</i>	<i>Echinacea purpureae radix</i>	<i>Echinacea pallidiae radix</i>
İçerik	Kaftarik asit ve kikorik asit toplamı en az % 0,1 olmalıdır.	Kikorik ve kaftarik asit toplamı en az % 0,5 olmalıdır.	Kuru drog en az % 0,2 ekinakozit içermeli
Teşhis ve Tanıma			
A	60-150 cm boyunda çok yıllık yeşil bir bitkidir. Gövde yeşilden kırmızıya, dik ve az dallıdır.	Rizom 15 cm uzunluğunda, dallanmış, yüzeyde kırmızımsıdan koyu kahverengine gider. Çok sayıda kök spiral şeklinde kıvrılır, hafif kahveden koyu kahverengine gider.	Kökler ve rizom 4-20 mm çapta silindirik, spiral şeklinde, uzunlamasına ve derine kıvrılmış kırmızımsı kahverengi den gri-kahverengi giden renktedir
B	Tozu yeşildir. Mikroskop incelemesi kloralhidrat R ile yapılır. Beyazımsı-yeşil lifler, yaprak yüzeyinde anomositik ve anizositik stoma bulunur	Tozu hafif yeşil ile pembemsi bejdir. Mikroskopik incelemesi kloral hidrat R ile yapılır. Açık-kahverengi çok sayıda ipliksi lif, kareden dikdörtgene hücrelerin çevirdiği, 180 µm çapında sarı yağ damlacıklı salgı boşlukları görülür.	Tozu grimsi-kahverenginden hafif sarıya gider. Mikroskopik incelemesi kloralhidrat R ile yapılır. Kısa odunlaşmış lifler (100-300 µm) tek ya da toplu halde bulunur; sarımsı-turuncu içeriğe sahip oleorezin kanallarına ait parçalar bulunur.
C	İTK uygulamasında referans çözeltileri olarak fronta yakınlıklarına göre kafeik asit R (güçlü mavi floresan leke) ve klorojenik asit R (güçlü floresan mavi leke) kullanılır. Örnek çözeltisi ultrasonik metanol ekstresi, anhidr-formik asit, su, metiletilketon, etil-asetat (3:3:9:15 H/H/H/H) hareketli faz, İTK <i>silikajel plakası R</i> (5-40 µm/ 2-10 µm) sabit fazdır.	İTK uygulaması; diğer <i>Echinacea</i> türlerinden ve <i>Parthenium integrifolium</i> 'dan ayırmak için yapılır. Referans çözeltileri fronta yakınlıklarına göre; kafeik asit, sinarin ve ekinakozittir. Örnek çözeltisi ultrasonik metanol ekstresi, anhidr-formik asit, su, metiletilketon, etil-asetat (3:3:9:15 H/H/H/H) hareketli faz, İTK <i>silikajel plakası R</i> (5-40 µm/ 2-10 µm) sabit fazdır. Test çözeltisinde sinarin ve ekinakozit lekeleri görülmemeli.	İTK uygulaması; diğer <i>Echinacea</i> türlerinden ve <i>Parthenium integrifolium</i> 'dan ayırmak için yapılır. Test çözeltisi droğun ultrasonik diklorometan ekstresidir. Referans çözeltisi olarak fronta yakınlıklarına göre β-sitosterol (mordan pembeye giden lekedir (test çözeltisinde bu pozisyonda grimsi mavi leke olmamalıdır); <i>N</i> -izobütül-dodeka-tetraenamit grimsi mavi lekedir (test çözeltisinde olmamalıdır). Hareketli faz: anhidr-formik asit, sikloheksan, etil asetat, toluen (0,9:3:6:24 H/H/H/H). Sabit faz: İTK <i>silikajel plakası R</i> (5-40 µm/ 2-10 µm)
D	Sıvı Kromatografisi: pikler sırasıyla; kaftarik asit, kafeik asit, sinarin, ekinakozit, kikorik asit	Sıvı Kromatografisi: pikler sırasıyla; kaftarik asit, klorojenik asit, kafeik asit, sinarin, ekinakozit, kikorik asit	Sıvı Kromatografisi: pikler sırasıyla kaftarik asit, klorojenik asit, kafeik asit, sinarin, ekinakozit, kikorik asit
E	Belirtilmemiş	İTK uygulaması: Test çözeltisi droğun ultrasonik diklorometan ekstresidir. Referans çözeltisi olarak fronta yakınlıklarına göre β-sitosterol (mordan pembeye giden lekedir (test çözeltisinde bu pozisyonda grimsi mavi leke olmamalıdır); <i>N</i> -izobütül-dodeka-tetraenamit grimsi mavi lekedir (test çözeltisinde olmalıdır). Hareketli faz: anhidr-formik asit, sikloheksan, etil asetat, toluen	

Çizelge 9. Avrupa Farmakopesi'nde (EP6) *Echinacea purpureae Herba*, *Echinacea purpureae Radix* ve *Echinacea pallidae Radix* için istenen kriterler (Devam)

		(0,9:3:6:24 H/H/H/H). İTK silikajel plakası R (5-40 µm/ 2-10 µm) sabit fazdır.	
Yabancı maddeler	Belirtilmemiş	En fazla % 3 olmalıdır.	En fazla % 3 olmalıdır.
Kurutmada kayıp	Toz drogta en fazla % 10 olmalıdır	Toz drogta en fazla % 10 olmalıdır	Toz drogta en fazla % 12 olmalıdır.
Toplam kül miktarı	En fazla % 12 olmalıdır	En fazla % 9 olmalıdır	En fazla % 7 olmalıdır
Hidroklorik asitte çözünebilen kül miktarı	Belirtilmemiş	En fazla % 2 olmalıdır.	En fazla % 2 olmalıdır.

Çizelge 10. Amerikan Farmakopesinde (USP) *Echinacea purpureae Herba*, *Echinacea purpureae Radix* ve *Echinacea pallidae Radix* için istenen kriterler

	<i>Echinacea purpureae herba</i>	<i>Echinacea purpureae radix</i>	<i>Echinacea pallidae radix</i>
İçerik	% 1,0'den az kikorik asit ve % 0,01'den az dodekatetraenoik asit izobütülamit içermemelidir.	Kaftarik, kikorik, klorojenik asit ve ekinakozit toplamı üzerinden en az % 0,5 toplam fenolik madde içermelidir. Ayrıca % 0,025'den az alkamit içermemelidir.	Kaftarik, kikorik, klorojenik asit ve ekinakozit toplamı üzerinden en az % 0,5 toplam fenolik madde içermelidir.
Botanik Özellikler			
Makroskobik	Sıklıkla 90 nadiren 180 cm boyunda dik, kalın, kaba tüylü gövdeye sahiptir.	Silindirik kökler düzensiz dallanmıştır. Dış yüzeyi koyu kahverengi, boydan boya damarlı; kısa ve sağlamdır.	Dış yüzey solgun sarımsı-kahverengi; silindirimsi uca doğru konileşir, spiral şeklinde kıvrılır.
Mikroskobik	Yaprak: Stomalar 28-35 µm yaprağın üst kısmında yoğunudur; mezofil sünger ve palizat parenkiması olarak ayrılmıştır. Üst yüzeyde çok sayıda her biri bir epiderma hücresinden çıkmış 3-5 hücreli dikenler bulunmaktadır.	Rizom ve kökler geniş bir ksilemle çevrili dış kabuğa sahiptir. Kabukta sizogen reçine kanalları yerleşmiştir. Rizom lif ve taş hücreleri içerir. Çok az nişasta içerir. Kalsiyum okzalit kristalleri mevcuttur.	Rizom ve kökler geniş bir ksilemle çevrili dış kabuğa sahiptir. İntraselüler boşluklarda 40-180 µm çapında sizogen oleorezin kanalları 40-180 µm yerleşmiştir.
Tanma deneyleri			
A	İTK Uygulaması: Test çözeltisi % 70 alkol ile hazırlanan ekstredir. Hareketli faz: etil asetat, formik asit, su (17:2:1) karışımıdır. Test çözeltisinde kikorik asit (sarımsı yeşil Rf 0,75) ve kaftarik asit (sarımsı yeşil leke Rf 0,45) olmalı. En fazla eser miktarda ekinakozit (Rf 0,1) görülebilir.	İTK Uygulaması: Test çözeltisi % 70 alkol ile hazırlanan ekstredir. Hareketli faz: etil asetat, formik asit, su (17:2:1) karışımıdır. Test çözeltisinde kikorik asit (sarımsı yeşil Rf 0,75) ve kaftarik asit (sarımsı yeşil leke Rf 0,45) olmalı. En fazla eser miktarda ekinakozit (Rf 0,1) görülebilir.	İTK Uygulaması: Ekinakozit (Rf 0,14) varlığının tespiti için yapılır. Ayrıca sinarin'e ait karakteristik leke test çözeltisinde bulunmamalıdır. Hareketli faz: etil asetat, formik asit, su (17:2:1) karışımıdır.
B	Kikorik asit ve kaftarik asit içeriği ve sıvı kromatografisi: Test çözeltisinden elde edilen anlamlı pikler standart çözeltisinde kikorik asit ve kaftarik asit piklerine tekabül etmelidir.	İTK Uygulaması: İzobütülamitler; dodeka-2E,4E,8Z,10E-tetraenoikasit-izobütülamit, dodeka-2E,4E,8Z,10Z-tetraenoikasit-izobütülamit(mavi-siyah leke) ve birkaç tane (<i>E.pallida</i> 'da bulunmayan) doymamış α,β,γ,δ izobütülamit (menekşe rengi leke) görülmelidir.	İTK Uygulaması: Ketoalken varlığının belirlenmesi için yapılır. Test çözeltisinde ketoalkenlere ait yeşil, kahverengi, viyola lekeler β-sitosterol (Rf 0,6-0,8) lekесinin yukarısında görülür.
C	Dodekatetraenoik asit izobütülamit içeriği ve sıvı kromatografisi: Dodekatetraenoik asit izobütülamitlere ait iki izomerin test çözeltisinde belirlenmesi açıklanmıştır.	Farmakopede verilen formüle göre ayrı ayrı kaftarik, kikorik, klorojenik asitler ve ekinakozit yüzdeleri hesaplanır.	Toplam Fenolik İçeriği ve Sıvı kromatografisi: Kromatogramda 1,3-dikafeoilkinik asit'e ait herhangi bir pik alanı ekinakozite ait pik alanının en fazla % 1'i kadar olabilir.
Uçucu Yağ İçeriği	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	1-2ml/100g'dır.
Alkamit İçeriği ve Sıvı Kromatografisi	Belirtilmemiş	Kromatogramda referans çözeltisiyle örtüşen 10 majör alkamit piki belirlenir. Ve ayrı ayrı verilen formüle göre yüzdeleri hesaplanır	Belirtilmemiş
Kurutmada kayıp	En fazla % 12	En fazla % 10	En fazla % 10
Yabancı Organik Madde	En fazla % 3,5	En fazla % 3	En fazla % 3
Toplam Kül Miktarı	En fazla % 10	En fazla % 7	En fazla % 7
Asitte çözünebilen kül miktarı	En fazla % 2,5	En fazla % 4	En fazla % 4
Ağır Metaller	Gramında 10µg'dan fazla içermemeli	En fazla % 0,001	En fazla % 0,001
Mikrobiyal sayım	Gramında en yüksek total aerobik mikrop sayısı 10 ⁵ cfu olmalı, total küf ve maya sayısı 1000 cfu, enterobakteriyal miktarı 1000 cfu'dan fazla olmamalıdır.	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş

Çizelge 11. Amerikan Farmakopesinde (USP) yer almış *Echinacea purpurea* ve *Echinacea pallida* ekstreleri

USP30	<i>Echinacea pallida</i> Toz Ekstresi	<i>Echinacea purpurea</i> Toz Ekstresi
	<i>Echinacea pallida</i> köklerinin, hidroalkolik karışımlar ya da uygun çözücüler kullanılarak ekstraksiyonu sonucu elde edilir. Ham bitkiden toz ekstreye geçişte 2:1-8:1 arası bir oran oluşur.	Kurutulmuş <i>E. purpurea</i> köklerinden, <i>Echinacea purpurea</i> topraküstü kısımlarından ya da bu ikisinin karışımı olarak hazırlanır. Hidroalkolik karışımlar ya da diğer çözücüler ile ekstraksiyonu yapılır. Ham bitkiden toz ekstreye geçişte 2:1-8:1 arası bir oran oluşur.
İçerik	% 4,0 ten az % 5,0'ten fazla toplam fenol (kaftarik asit, klorojenik asit, kikorik asit ve ekinakozit) içeremez.	% 4,0 ten az toplam fenol (kaftarik asit, klorojenik asit, kikorik asit ve ekinakozit) içeremez. % 0,025 ten az dodekatetraenoik izobütülamit içermez.

1.2.4. *Echinacea* Türlerinin Etken Bileşiklerinin Analiz Yöntemleri

1.2.4.1. Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK/HPLC)

Kromatografi bir karışımdaki bileşenlerin biri hareketli diğeri sabit iki faz arasındaki dağılım dengelerine dayanan analiz yöntemidir. Bileşenler hareketli faz tarafından sabit faz üzerinde sürüklenir. Hareketli faz ile etkileşimi fazla olan bileşenin sürüklenme hızı da fazladır (Wilard ve ark., 1981).

Kromatografik yöntemlerde hareketli faz gaz, sıvı ya da süperkritik akışkandır, sabit faz ise sıvı ya da katı olabilir. Kromatografinin sınıflandırılması ise hem hareketli faza (Sıvı kromatografi-SK/LC, Gaz kromatografisi-GK/GC) hem de sabit faza (dağılım ve adsorbsiyon kromatografisi) göre yapılabilir. Kromatografik yöntemlerde ayırım, sabit faz sıvı ise dağılım, katı ise adsorbsiyon prensibi üzerinden gerçekleşir. Bunun yanında hareketli faz ile sabit fazın birbirine nasıl temas ettirildikleri esas alınarak başka bir sınıflandırma da (Kolon Kromatografisi ve Düzlemsel Kromatografi) yapılabilir (Skoog ve ark., 1998; Wilard ve ark., 1981).

Sıvı kromatografinin geliştiği ilk yıllarda, bilim adamları, kolon veriminin, dolguda kullanılan taneciklerin boyutunun azaltılması ile önemli ölçüde artacağını fark etmiştir. Tanecik çapı 3-10 µm kadar küçük olan dolgu maddelerinin üretim teknolojisinin gelişmesi ve kullanılması 1960 sonlarında başarıya ulaşmıştır. Bu teknoloji klasik yer çekimi akışlı cam kolonlardaki durumun aksine, yüksek basınçta çalışan gelişmiş cihazlara ihtiyaç göstermiştir (Skoog ve ark., 1998).

YBSK sabit fazı içeren kolonda analizi yapılacak madde ya da karışımın yüksek bir basınçta hareketli faz (sıvı) ile sürüklenmesi prensibine dayanan kromatografik analiz yöntemidir. Analiz örneğini içeren sıvı çözelti sisteme enjeksiyon yoluyla uygulanır ve kolona hareketli fazın akışında çözünerek sürüklenir. Kolondan geçen

madde ya da maddelerin çıkışı özel kimyasal ve/veya fiziksel etkileşimler neticesinde belli bir gecikme ile gerçekleşir. Bu gecikmeye retansiyon denir. Maddelerin kimyasal ve fiziksel davranış farkları retansiyon farkı oluşturur ve ayrımı sağlar (Meyer, 1999; Wilard ve ark., 1981).

YBSK bütün analitik ayırma yöntemleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Bunun nedenleri ise:

- Duyarlılığı
- Doğruluğu yüksek miktar tayinlerine kolayca uyarlanabilmesi
- Uçucu olmayan ve sıcakta kolayca bozunan maddelerin ayrılmasında uygun olması
- Sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir.

YBSK'nin uygulanabileceği maddelere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal organik türevler ve çeşitli inorganik bileşikler gösterilebilir (Skoog ve ark., 1998).

YBSK temel olarak şu kısımlardan oluşur:

Rezervuar içinde hareketli fazın olduğu ve hareketli fazın pompa tarafından çekilerek sisteme yönlendirildiği ilk birimdir. Hareketli fazı olarak kullanılacak çözücü ve çözücü karışımları sabit fazın ve analizi yapılacak maddelerin polaritesine göre seçilir.

Pompa, 0,1 ml/dak. ile 10 ml/dak. arasında sabit bir akış, 350-500 bar civarında da basınç sağlamalıdır. İzokratik akış (hareketli faz bileşimi sabittir), gradient akış (akış zamana göre değişen çözücü bileşimi kullanılır) olmak üzere iki tip akış gerçekleştirebilirler.

Enjeksiyon Birimi analiz örneğinin sisteme verildiği ve hareketli faz akışıyla birlikte kolona yönlendiği kısımdır. Enjeksiyon manuel ya da otomatik enjektörler ile gerçekleştirilir.

Kolon sabit fazın bulunduğu ve ayrımın gerçekleştiği birimdir. YBSK kolonlarının çoğu 316-derece paslanmaz çelikten (östenit-krom-nikel-molibden çeliği) yapılmaktadır. Amerikan Demir ve Çelik Enstitüsü (American Iron and Steel Institute (AISI) standartlarına uygun olarak kimyasal korozyon ve normal YBSK basıncına dayanıklıdır. Kolon çapı 2-5 mm olanlar genellikle analitik amaçlarla kullanılmaktadır. 10 mm ila 24,5 mm arası çaptaki daha geniş kolonlar ise preparatif çalışmalarda kullanılır. Uzunluğu 5,10,15 ya da 25 cm olan kolonlar, 10 µm ve altı mikropartikül sabit faz kullanıldıysa tercih edilir. Kolon uzunluğu artınca retansiyon hacmi de artar bu da elüattaki pik konsantrasyonunu düşürüp tespit limitini zayıflatır. Bu nedenle preparatif amaçlarla uzunluğu 1 m'ye kadar kolonlar ile çalışılır. Kolon dolguları normal faz ve ters faz olmak üzere iki temel gruba ayrılmaktadır. Normal faz YBSK (NP-HPLC) esas polarite farkı ile ayırım ve analiz olan ilk sistemdir. Sabit fazı silika ya da alümina partiküller üzerine tutturulmuş su ya da trietilenglikol gibi oldukça polar maddeler oluşturmaktadır. Bu yöntem polar sabit faz ve non-polar hareketli fazdan meydana gelmektedir. Ters faz YBSK (RP-HPLC) ise adından da anlaşılacağı gibi; non-polar sabit faz ve polar hareketli fazdan oluşan YBSK sistemidir. Sabit faz olarak en çok kimyasal olarak bağlanmış oktadesilsilan (ODS), 18 karbon atomlu *n*-alkan (C-18) kullanılır.

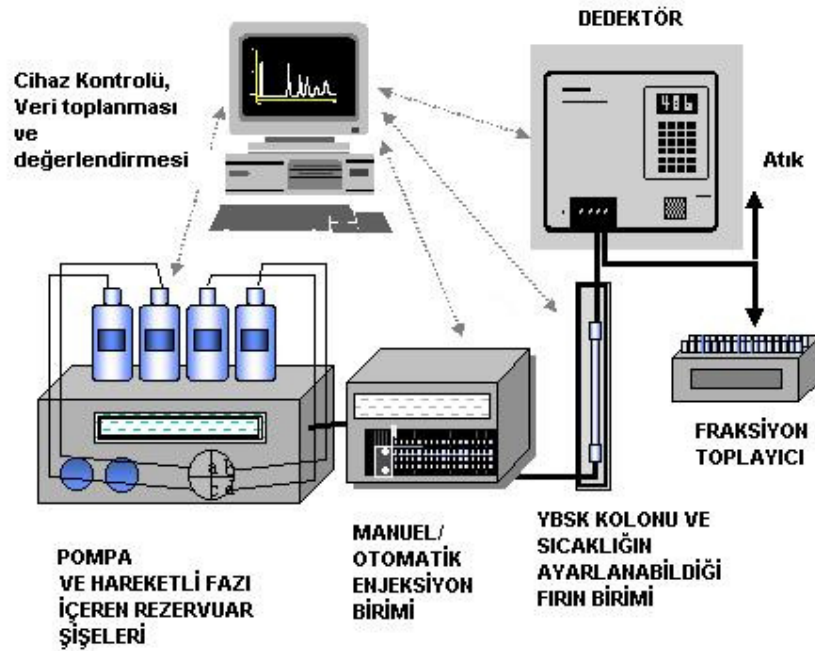
Dedektörün görevi, örnekteki bileşenlerden biri ayrılıp kolondan çıktığında tespit etmektir. Hareketli faz kompozisyonundaki değişimi farkederek, bunu konsantrasyonla orantılı elektriksel bir sinyale dönüştürür ve bu sinyallerden kromatogramı oluşturur.

Dedektör Türleri:

- UV Dedektörler
 - Sabit dalga boyunda
 - Değişken dalga boylarında
 - Diod-Array Dedektörler (DAD)

- Refraktif İndeks Dedektörler
- Floresans Dedektörler
- Elektrokimyasal Dedektörler
- Buharlaştırıcı Işık Saçılım (evaporative light scattering) Dedektörleri
- Kondüktivite Dedektörü

Kaydedici dedektörden gelen sinyalleri kromatograma dönüştürerek kaydeder. Basit bilgisayar yazıcısından çok az karmaşık olabildikleri gibi gelişmiş yazılımlı bilgisayarlar ve bilgisayar programları da olabilirler (Meyer, 1999; Skoog ve ark., 1998; Wilard ve ark., 1981).



Şekil 8. Gelişmiş bir YBSK sisteminin bölümleri

YBSK çok sayıda analitik teknikle kombine edilerek kullanılabilir ancak bu tekniklerin içinde en önemlileri spektroskopik yöntemlerle birleştirilmiş olarak kullanılan YBSK uygulamalarıdır.

YBSK'nın birlikte kullanılabildiği başlıca spektroskopik yöntemler:

- UV spektrometresi (YBSK -UV/DAD)
- YBSK –NMR (nükleer manyetik rezonans)
- SK-KS (kütle spektrometresi)

(Meyer, 1999)

1.2.4.2. Sıvı Kromatografisi – Kütle Spektrometrisi (SK-KS/LC-MS)

Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (YBSK/HPLC/LC) ve kütle spektrometresinin (KS/MS) bir arada kullanıldığı analiz yönteminin adıdır. SK-KS bileşenlerinden YBSK'den önceki bölümde (Bkz. 2.5.1.) bahsedilmiştir. Bu bölümde ise kütle spektrometrisi ve SK-KS yöntemini hakkında bilgi verilecektir.

Kütle spektrometrisi, halen kullanımda bulunan analitik yöntemler arasında en geniş uygulama alanına sahiptir.

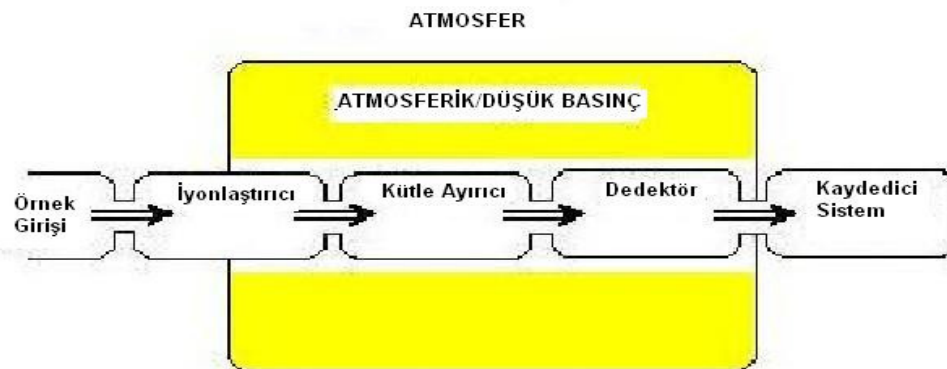
- Maddelerin elementel bileşiminin belirlenmesinde
- İnorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında
- Karmaşık karışımların kalitatif ve kantitatif analizlerinde
- Katı yüzeylerinin yapı ve bileşimlerinin aydınlatılmasında
- Bir örnekteki atomların izotopik oranlarının bulunmasında oldukça yararlı bir yöntemdir (Skoog ve ark., 1998).

Kütle spektrometrisinin temelleri 1912'lere dayanmaktadır. 1950'lerden sonra ve 1960'lı yıllarda UV, NMR ve IR spektrometrelerinden alınan verileri tamamlamak için kullanılmaya başlaması, mükemmel bir analiz yöntemini ortaya çıkarmış, kullanım alanını genişletmiştir (Skoog ve ark., 1998; Willard ve ark., 1981).

Esas olarak; düşük basınçta, gaz haline dönüştürülmüş madde moleküller arası çarpışmalar en alt düzeyde olacak şekilde bir tüpten geçirilir. Ve bu moleküller enerji düzeyi ayarlanmış elektronlar tarafından bombardımana tutulur. Bu enerji molekülün iyonizasyon potansiyelini aştığında molekülden 1 elektron ayrılır ve “+” yüklü molekül oluşur (m^+ : moleküler iyon; radikal halinde bir iyondur ve mol ağırlığı molekülün kendisiyle aynıdır). Bombardıman enerjisi artırıldıkça bu iyonlardaki aşırı enerji bağlara ulaşır ve bağı kopararak yeni bir “+” yüklü iyon (m_1^+) ve yüksüz bir molekül (m_2) açığa çıkarır. Temel anlamda, *kütle spektrometresi*, analize konu maddeyi elektronlarla bombardıman eder ve sonucu, kütle/yük(m/z) oranlarına göre, pozitif iyon parçaları halinde kantitatif olarak kaydeder. Bu kayda da *kütle spektrumu* denir (Gündüz, 1990; Skoog ve ark., 1998; Wilard ve ark., 1981). Ek olarak günümüzde birçok iyon kaynağı negatif iyon üretebilmektedir (Ardrey, 2003).

Kütle Spektrometreleri başlıca şu kısımlardan oluşur:

- Örnek girişi
- İyon Kaynağı (İyonlaştırıcı)
- Kütle Ayırıcı
- Dedektör
- Kaydedici Sistem



Şekil 9. Kütle Spektrometresi ve kısımlarının şematik gösterimi

SK-KS yönteminde *örnek girişi* bir YBSK cihazına bağlanmıştır. Bağlantı sistemin anahtarı niteliğindedir ve bazı temel problemleri doğurur (Skoog ve ark., 1998; Wilard ve ark., 1981). Bunlardan birincisi YBSK'da yüksek çözücü hacmi ile çalışılması ikincisi ise KS 'nin vakum gerektirmesidir. Bu problem, kolondan çıkan elüatın sadece küçük bir kısmının KS cihazına gönderilmesi ile giderilebilmiştir. Akış hızları 10-50 µl/dak. olan mikro-gözenekli kolonların kullanılması ile YBSK doğrudan KS cihazına bağlanabilir. Diğer bir bağlantı çeşidinde; elüat püskürtülerek çözücüsü buharlaştırılır, analit hareketli bir tel ya da şerit üzerinde toplanarak iyon kaynağına gönderilir. Püskürtme ve çözücüyu uzaklaştırma işleminden sonra iyonlaştırma doğrudan aynı bölümde de gerçekleşebilir (Skoog ve ark., 1998).

SK-KS 'de kullanılan *İyon Kaynakları* iki temel gruba ayrılır:

- Gaz Faz İyon Kaynakları
 - Elektron impakt (EI)
 - Kimyasal iyonizasyon (CI)

- Desorpsiyon İyon Kaynakları
 - Elektronsprey iyonizasyonu (ESI)
 - Termosprey iyonizasyon (TSP)
 - Hızlı atom bombardımanı (FAB)
 - Atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon (APCI)
 - Atmosferik basınçta fotoiyonizasyon (APPI)

(Ardrey, 2003; Balogh, 2005)

Kütle ayırıcılar, farklı kütle/yük oranlarını (küçük kütle farklarını dahi) ayırabilmek kullanılan cihazlardır. Ölçüm için yeterli sayıda iyon geçişini sağlayabilmelidirler (Skoog ve ark., 1998).

Kütle ayırıcı çeşitleri:

- Manyetik alanlı spektrometreler
 - Yalnızca manyetik alan içerenler (tek odaklı spektrometreler)
 - Hem manyetik alan hem de elektriksel alan içerenler (çift odaklı spektrometreler)
- Kuadripol spektrometreler (dört kutuplu spektrometreler).
- Uçuş zamanlı spektrometreler (TOF)
- İyon tuzağı
- Fourier transform-iyon siklotron rezonansı (FT-ICR)

(Ardrey, 2003; Skoog ve ark., 1998).

SK-KS iyonizasyon kaynakları yumuşak iyonizasyon kaynakları olarak adlandırılmaktadır. Bunun nedeni çok az bir parçalanmayla sadece birincil moleküler iyonların elde edilebilmesidir. *Kütle ayırıcılar* tek bir cihazda ardışık olarak da kullanılabilen tekniklerdir. SK-KS bileşik kütle ayırıcılar molekül ağırlığı yanında molekülün yapısı hakkında bilgi sağlanması yani daha fazla parçalanma sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.

Bileşik kütle ayırıcılar:

- Üçlü Kuadripol KS
- Hibrit KS (çift odaklı - kuadripol - kuadripol)
- Kuadripol - Uçuş zamanlı KS

Bununla birlikte uçuş zamanlı kütle ayırıcıları ve iyon tuzağı kütle ayırıcıları tek başlarına olsalar da birincil iyonla birlikte çok sayıda yavru iyon meydana getirebilmektedir (Ardrey, 2003).

Kütle spektrometresinde *dedektörün* görevi yüzeyinden bir iyon geçtiğinde ya da yüzeyine çarptığında oluşan akımı veya şarjı kaydetmektir. İyonlar tarafından dedektörde oluşan sinyal m/z olarak kaydedilir ve kütle spektrumu elde edilir.

Başlıca MS dedektörleri:

- Faraday Cup Dedektörleri
- Elektron Çoğaltıcılar
- Kanal Elektron Çoğaltıcılar
- Fotoğrafik Plaka
- Sintilasyon Tipi Dedektörler

(Skoog ve ark., 1998; Willard ve ark., 1981)



Şekil 10. Örnek olarak bir SK-KS cihazı

1.2.4.3. Gaz Kromatografisi - Kütle Spektrometrisi (GK-KS/GC-MS)

Gaz Kromatografisinde (GK/GC) örnek buharlaştırılmak suretiyle kromatografik kolona uygulanmaktadır. İnert bir hareketli gaz faz ile sürüklenme ve ayırım gerçekleşir. Diğer kromatografik yöntemlerin aksine hareketli faz örneğin içindeki moleküllerle etkileşime girmez. Tek işlevi örneği kolon boyunca taşımaktır (Skoog ve ark., 1998).

İki tür GK yöntemi bulunmaktadır:

- Gaz Katı Kromatografisi (GKK/GSC)
- Gaz Sıvı Kromatografisi (GSK/GLC)

GKK diğer yöntemin aksine fazla uygulama alanı bulamamaktadır. Polar moleküllerin kalıcı denebilecek ölçüde alıkonma problemi yaşaması ve adsorbsiyon olayının doğrusal olmayışı nedeniyle kuyruklanmanın aşırı oranda gerçekleşmesi ve bunlara bağlı olarak yalnızca küçük molekül ağırlıklı moleküllerin ayırımını yapabilmesi uygulama alanlarını daraltmıştır. GKK 'nde aktif kömür, alüminyum oksit, silikajel gibi maddeler kullanılmaktadır (Gündüz, 1999; Skoog ve ark., 1998).

GSK ise ayırımın gaz halinde hareketli faz ve bir katının yüzeyine tutturulmuş sıvı durgun faz arasında dağılımı üzerine kurulduğu bir sistemdir. GSK birçok alanda daha fazla kullanım bulduğu için kısaltılarak GK (GC) olarak da isimlendirilmektedir (Skoog ve ark., 1998).

Bir Gaz Kromatografisi sırasıyla taşıyıcı gaz, enjeksiyon birimi, kolon-fırın sistemi, dedektör ve kaydedici veri sistemi olmak üzere beş temel kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar şematik olarak Şekil 12'de verilmiştir (Skoog ve ark., 1998).

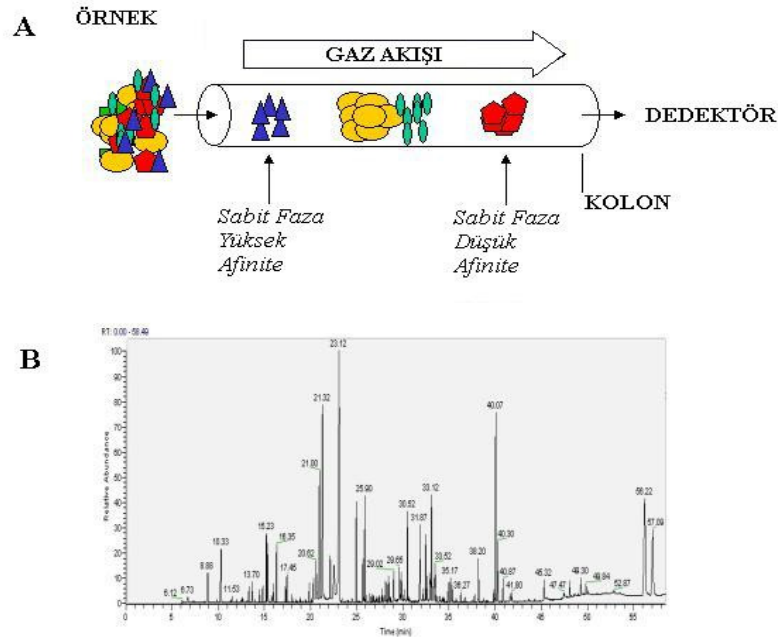
Taşıyıcı gaz, kimyasal olarak inert olmalıdır. Genelde taşıyıcı gaz olarak helyum, azot, hidrojen , argon ya da karbondioksit kullanılabilir. Gaz seçimi dedektör tipine ve gazın saflığına göre yapılmaktadır. Dedektörün çalışma prensibi ısı iletkenliği üzerine ise ısı iletkenliği yüksek helyum gazı kullanılır. Ancak helyum pahalı bir gazdır. Hidrojen ise yanıcılığı nedeniyle pek tercih edilmez (Gündüz, 1999).

Enjeksiyon biriminin görevi, kolon verimi nedeniyle örneğin uygun miktarda ve buhar halinde bir defada verilmesini sağlamaktır. Yavaş enjeksiyon ve fazla miktarda örnek verilmesi pik genişlemesi ve düşük ayırma gücüne neden olur. Enjektör bir silikon lastik diyaframdan ya da bir septumdan geçerek kolon girişindeki hızlı buharlaştırıcı kısmına gelir. Buradaki yüksek ısı ile gaz fazına geçerek kolona gönderilir. Ayrıca gaz halindeki örnekler de özel yapılmış gaz tutucu şiringalar ile sisteme verilip analizi gerçekleştirilebilir (Gündüz, 1999; Skoog ve ark., 1998).

GK'de iki tip *kolon* kullanılır; dolgulu kolon ve kılcal (açık boru) kolonlar. Dolgulu kolonlarla yapılan çalışmalar çoğunlukta olsa da artık dolgulu kolonlar yerlerini bazı özel uygulamalar hariç daha verimli ve hızlı kılcal kolonlara devretmektedir. Dolgulu kolonların boyları 2-3 m çapları ise 2-4 mm'dir. Sıvı sabit faz katı bir destek materyaline tutturulmuştur. Kılcal kolonlar sabit fazın kolona uygulanış biçimine göre farklılık göstermektedir. Uzunlukları 10 metreden 1000 metreye kadar değişebilir. İç çapları ise 0,1-0,75 mm arasındadır. Sabit faz kolon duvarına kaplanmış ya da çok ince bir destek materyaline tutturulmuş olabilmektedir. GK kolonlarında sabit faz olarak kullanılan maddelere polidimetil siloksan, poli(fenilmetildimetil) siloksan (% 10 fenil), poli(disiyano allildimetil) siloksan örnek olarak verilebilir (Skoog ve ark., 1998).

Ayrırma etki eden önemli parametrelerden biri de kolon sıcaklığıdır. Bu sebeple kolon 10-30 cm çapında spiraller halinde *fırın* denen ve sıcaklığın kontrol edildiği bölümde bulunur. En az hata ile çalışabilmesi için sıcaklığın 0,1 °C duyarlılıkla ayarlanabilir olması gerekir. Ayrım sırasında kaynama noktası aralığı geniş örnekler

için analiz esnasında kolon sıcaklığı sürekli ya da basamaklı olarak artırılır, bu işleme *sıcaklık programlanması* denir (Skoog ve ark., 1998).



Şekil 11. Gaz Kromatografında maddelerin ayrılması (A) ve kaydedicide pikler halinde görülmesi (B).

GK'de kullanılan *dedektörlere* örnek olarak, *Alev İyonlaşma Dedektörü (AİD-FID)*, *Isı İletkenlik Dedektörü*, *Kükürt Kemilüminesans Dedektörü*, *Elektron Yakalama Dedektörü*, *Atomik Emisyon Dedektörü*, *Termiyonik Dedektör*, *Alev Fotometrik Dedektör* ve *Fotoiyonlaşma Dedektörleri* örnek olarak verilebilir. *Alev İyonlaşma Dedektörü (AİD-FID)* GK dedektörleri arasında en yaygın kulanıma sahip olanıdır. Kolondan gelen gaz, hidrojen ve hava ile karıştırılarak yakılır. Bu alevde yanan organik maddelerin çoğu iyonlar meydana getirir. Konsantrasyonla orantılı olarak bu iyonlar belli bir elektrik akımı oluşturarak dedektör tarafından tespit edilmekte ve kaydedicide pikler halinde görülmektedir (Skoog ve ark., 1998).

McMaster ve McMaster (1998), GK'ne ait bazı dezavantajlardan söz etmektedir. Bunlardan birisi gaz kromatografisinde sadece uçucu ve uçucu hale gelebilen bileşiklerle çalışılabilmesidir. Ancak baskın problem olarak ise dedektörlerce ayrılan

maddelerin teşhisinin sadece retansiyon zamanlarına dayanmasından bahsetmektedirler. Bunun yanında kütle spektrometresi molekül ağırlığı ve yapısı hakkında bilgi vermesine rağmen verilen örnek bir karışımsa pek kullanışlı değildir.

Bir karışımı bileşenlerine ayırmak ve bu bileşenlerin kalitatif, kantitatif analizlerini yapmak ve molekül ağırlığı ve yapısı hakkında veri sağlamak amacıyla GK-KS sistemleri (ve tabii ki SK-KS) geliştirilmiştir (McMaster ve McMaster, 1998). Fakat iki sistem arasındaki basınç uyumsuzluğu sorunu kendini göstermiş ve çeşitli yollarla çözümlenmiştir. Zaman içinde geliştirilen yöntemlerden ilki akışı bölücü yöntemdir. Bu sistemde gaz kromatografik akışın % 1-5'lik kısmı bölünerek KS cihazına iletilmektedir. Daha sonra taşıyıcı gaz moleküllerinin düşük boyutlu olmasından faydalanılarak geliştirilen akış ayırıcılar geliştirilmiştir. Akış ayırıcılar GK kolonundan gelen akışı düşük basınçta por büyüklüğü belli bir cam elekten geçirerek küçük moleküllü taşıyıcı gazı elerken KS cihazına giriş yapan moleküllerin miktarını artırmaktadır (Settle, 1997). Bunu takiben jet ayırıcı sistemler geliştirilmiştir. Kolondan çıkan ağır moleküllerin çoğu, vakum altında tam karşındaki ve KS iyon kaynağına bağlı tüpe gönderilirken hafif taşıyıcı gaz molekülleri etrafa saçılarak ayrılmaktadır (Skoog ve ark., 1998). Artık yaygın olarak GK kolon çıkışı doğrudan iyon kaynağına bağlayan sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemin çalışması, gaz akışının uygun derecede düşük olmasına ve kütle spektrometresinin bu gaz akışının üstesinden gelecek kadar vakum üretebilmesine bağlıdır. (Settle, 1997).

GK-KS cihazlarında kullanılan iyonlaştırma yöntemleri ve iyon kaynakları şunlardır:

- Elektronsprey İyonizasyonu (ESI/ESI)
- Kimyasal İyonizasyon (CI)
- Hızlı Atom Bombardmanı (FAB)
- Alan İyonizasyonu (FI)

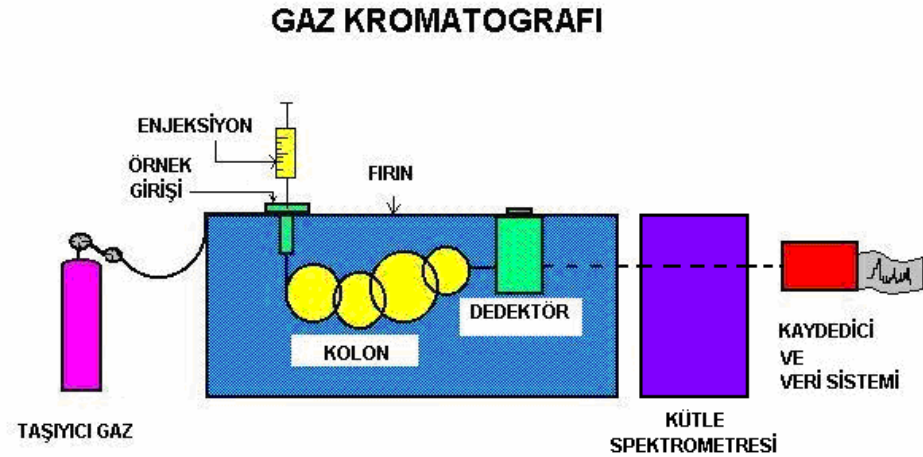
Bu iyon kaynaklarının içinde en yaygın kullanımı olan yöntem Elektronsprey iyonizasyonu'dur (McMaster ve McMaster,1998).

Kütle ayırıcılarına göre ise;

- Kuadripol GK-KS
- İyon Tuzağı GK-KS
- Üçlü Kuadripol GK-KS
- Manyetik Sektör GK-KS
- Uçuş zamanlı GK-KS
- Fourier Dönüşüm GK-KS sistemleri bulunmaktadır.

(McMaster ve McMaster,1998).

Molekül ağırlığı ve kütle spektrumundan molekül yapısının teşhisi çok tecrübeli ve uzmanlaşmış kişilerin yapabileceği bir iştir. Bununla birlikte günümüzde çok sayıda yazılı ya da bilgisayar ortamına aktarılmış veri tabanı bulunmaktadır. Kütüphane denen bu veri tabanları, molekül ağırlığı ve parçalanma spektrumlarını karşılaştırmada kullanılabilir. Analizi yapılan örnek ile ilgili kütüphanede bir eşleşme sağlanıp teşhis gaz kromatogramından elde edilen retansiyon zamanı ve kütle spektrumu ile doğrulanabilir (McMaster ve McMaster,1998).



Şekil 12. GK-KS cihazının şematik olarak görünümü



Şekil 13. Örnek olarak bir GK-KS cihazı

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Bitkisel materyal

Echinacea purpurea ve *Echinacea pallida* kültürleri 2007 yılı temmuz ayı sonunda **Konya Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi** Tarla Bitkileri bölümü uygulama tarlasından kültürü yapıldıktan sonra toplanmış ve **Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi** herbaryumunda saklanmıştır. Herbaryum numaraları: AEF 23845 (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) AEF 23846 (*Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt.) olarak kaydedilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. *Echinacea* Türlerinde Farklı Ekstrelerin Hazırlanması

2.2.1.1. *Echinacea* Türlerinde Avrupa Farmakopesi Analizi İçin Ekstre Hazırlanması

Farmakopedeki yöntem aynen kullanılmıştır; 100 ml balon joje içinde 0,5 gram civarında toz drog 15 dakika boyunca 80 ml metanol (% 70 h/h) ile ultrasonik banyoda ekstre edilmiştir. Ardından yine metanol (% 70 h/h) ile seyreltilerek hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Gözle görülür katı parçacıklar çöktükten sonra sıvı kısım 0,45 µ membran filtreden süzölmüş ve YBSK analizi için vıyallere aktarılmıştır.

Örnek Tartımları:

Echinacea purpurea Herba: 0,512 g

Echinacea purpurea Radix: 0,530 g

Echinacea pallida Herba: 0,520 g

Echinacea pallida Radix: 0,511 g

Avrupa Farmakopesi yöntemini uygulamak amacıyla yukarıda tartımları da verilen dört örnek hazırlanmıştır. Elimizdeki *Echinacea* türlerinin yanısıra ticari amaçla üretilmiş *Echinacea purpurea* herba kuru ekstresinden (0,47 g) aynı yöntemle hazırlanmış test çözeltisi karşılaştırma amaçlı analiz edilmiştir.

2.2.1.2. *Echinacea* Türlerinde Değişik Polaritede Çözücüler Kullanılarak Ekstre Hazırlanması

Toz edilmiş *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* kök ve topraküstü kısımlarından yaklaşık 100'er g alınarak değişik polaritede çözücüler ve çözücü karışımları kullanılarak 2,5 saat Soxhlet apereyinde ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon çözücülerini metanol (MeOH), etanol:su (EtOH:H₂O, 70:30 h/h), kloroform (CHCl₃), petrol eteri (PE) olarak belirlenmiştir. Ayrıca petrol eteri ekstraksiyonunun yapıldığı aynı bitkisel materyale petrol eteri ekstraksiyonu sonrası bu sefer metanolla (PE → MeOH) aynı Soxhlet ekstraksiyonu yeniden uygulanmıştır. Her bir Soxhlet ekstraksiyonunda 300'er ml çözücü kullanılmıştır. Ancak özellikle topraküstü kısımların hacimli olmaları 100 g droğun 250 ml'lik Soxhlet apereylerinde ekstre edilmesine olanak tanımamıştır. Bu nedenle her bir Soxhlet cihazına 50'şer g civarı drog yerleştirilerek ayrı ekstraksiyon iki defada gerçekleştirilmiş ve daha sonra ekstreler birleştirilmiştir. Daha sonra ekstrelerin çözücülerini rotavaporda kuruluğa kadar uçurulmuş verimleri hesaplanmıştır. Dört drog ve beş çözücüden toplam 20 ekstre elde edilmiştir (Kim ve ark., 2000).

Çizelge 12. Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen *Echinacea* ekstreleri ve ekstre verimleri

	Ekstraksiyon çözücüsü	Kullanılan toz drog (g)	Elde edilen ekstre (g)	Ekstre verimleri %(g/g)
<i>E. purpurea Radix</i>	Metanol	49,03+50,62=99,65	11,22	11,26
	Etanol:su(70:30 h/h)	48,41+48,78=97,19	5,9	6,07
	Kloroform	50,33+51,09=101,42	2,238	2,2
	Petrol eteri	43,23+51,35=100,55	0,877	0,871
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	49,23+51,35=100,55	10,21	10,15
<i>E. purpurea Herba</i>	Metanol	50,00+50,60=100,6	6,215	6,17
	Etanol:su(70:30 h/h)	50,11+50,74=100,85	7,137	7,07
	Kloroform	50,88+50,95=101,83	2,106	2,06
	Petrol eteri	50,29+52,33=102,62	1,108	1,07
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	50,29+52,33=102,62	2,33	2,27
<i>E. pallida Radix</i>	Metanol	49,71+47,76=97,47	9,33	9,57
	Etanol:su(70:30 h/h)	49,64+45,85=95,49	7,07	7,4
	Kloroform	51,03+51,19=102,22	2,352	2,3
	Petrol eteri	45,60+50,19=95,79	1,215	1,27
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	45,60+50,19=95,79	7,1	7,41
<i>E. pallida Herba</i>	Metanol	50,69+50,4=101,09	8,2	8,11
	Etanol:su(70:30 h/h)	51,74+51,44=103,18	9,957	9,65
	Kloroform	61,20+40,02=101,22	1,062	1,04
	Petrol eteri	46,13+52,43=98,56	0,656	0,665
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	46,13+52,43=98,56	3,674	3,72

2.2.2. Ekstrelerde YBSK ve SK-KS Yöntemi ile Fenolik Asitlerin Teşhisi ve Miktar Tayini

2.2.2.1. YBSK Yöntemi

2.2.2.1.1. Ekstrelerin Eldesi

Farmakopedeki yöntem aynen kullanılmıştır; 100 ml balon joje içinde 0,5 g civarında toz drog 15 dakika boyunca 80 ml metanol (% 70 h/h) ile ultrasonik banyoda ekstre edilmiştir. Ardından yine metanol (% 70 h/h) ile seyreltilerek hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Gözle görülür katı parçacıklar çöktükten sonra sıvı kısım 0,45 µ membran filtreden süzölmüş ve YBSK analizi için viyallere aktarılmıştır.

Echinacea purpurea Herba: 0,512 g

Echinacea purpurea Radix: 0,530 g

Echinacea pallida Herba: 0,520 g

Echinacea pallida Radix: 0,511 g

Avrupa Farmakopesi yöntemini uygulamak amacıyla yukarıda tartımları da verilen dört örnek hazırlanmıştır. Elimizdeki *Echinacea* türlerinin yanısıra ticari amaçla üretilmiş liyofilize *Echinacea* bitki ekstresinden (0,47 g) aynı yöntemle hazırlanmış test çözeltisi karşılaştırma amaçlı analiz edilmiştir.

Toz edilmiş *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* kök ve topraküstü kısımlarından yaklaşık 100'er g alınarak değişik polaritede çözücüler ve çözücü karışımları kullanılarak 2,5 saat Soxhlet apereyinde ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon çözücülerini metanol (MeOH), etanol:su (EtOH:H₂O, 70:30 h/h), kloroform (CHCl₃), petrol eteri (PE) olarak belirlenmiştir. Ayrıca petrol eteri ekstraksiyonunun yapıldığı aynı bitkisel materyale petrol eteri ekstraksiyonu sonrası bu sefer metanolla (PE → MeOH) aynı Soxhlet ekstraksiyonu yeniden

uygulanmıştır. Ekstraksiyon yöntemi Bölüm 2.2.1.2.'de anlatılmıştır (Kim ve ark., 2000).

Çizelge 13. Soxhlet ekstraksiyonu ile elde edilen *Echinacea* ekstrelere ve YBSK örnekleri

	Ekstraksiyon çözücüsü	Ekstre Miktarı (mg)	Çözücü karışımı (DMSO:MeOH)	Hacim (ml)
<i>E. purpurea</i> Radix	Metanol	13,3	0,1:0,9	1,0
	Etanol:su (70:30 h/h)	11,4	0,1:0,9	1,0
	Kloroform	10,1	0,1:0,9	1,0
	Petrol eteri	12,3	0,1:0,9	1,0
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	12,6	0,1:0,9	1,0
	Metanol	9,7	0,1:1	1,1
<i>E. purpurea</i> Herba	Etanol:su (70:30 h/h)	10,6	0,1:0,9	1,0
	Kloroform	9,7	0,1:0,9	1,0
	Petrol eteri	11,8	0,1:0,9	1,0
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	9,6	0,1:1	1,1
	Metanol	13,6	0,1:0,9	1,0
	Etanol:su (70:30 h/h)	12,3	0,1:0,9	1,0
<i>E. pallida</i> Radix	Kloroform	9,2	0,1:0,9	1,0
	Petrol eteri	11,7	0,1:0,9	1,0
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	11,1	0,1:0,9	1,0
	Metanol	10,6	0,1:0,9	1,0
	Etanol:su (70:30 h/h)	10,4	0,1:0,9	1,0
	Kloroform	10,6	0,1:0,9	1,0
<i>E. pallida</i> Herba	Petrol eteri	11,7	0,1:0,9	1,0
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	12,1	0,1:0,9	1,0

Soxhlet yöntemiyle hazırlanan ekstrelelere ait kafeik asit türevleri de Avrupa Farmakopesinde belirtilmiş YBSK yöntemiyle analiz edilmiştir. Ancak farklı polaritedeki bu ekstrelerin YBSK örnekleri hazırlanırken çözünürlüğü artırmak

amacıyla DMSO ve metanolün belli oranlardaki karışımlarından faydalanılmıştır. Analiz için her ekstreden ne kadar alındığı ve hangi çözücü karışımı kullanıldığı Çizelge 13.'te gösterilmiştir. Hazırlanan örnekler 0,45µ membran filtreden süzölmüş ve YBSK analizi için viyallere aktarılmıştır.

2.2.2.1.2. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Farmakope analizi için 10 ml'lik balon joje içinde 10 mg civarında klorojenik asit (Farmakope analizi için: 10,4 mg-Soxhlet ekstreleri için: 9,4 mg) ve 10 mg kafeik asit (Farmakope analizi için: 10,8 mg-Soxhlet ekstreleri için: 9,9 mg) 15 dakika boyunca metanol (% 70 h/h) ile ultrasonik banyoda çözülmüş ve hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 4 ml 100 ml'lik balon joje'ye alınıp hacim yine metanol (% 70 h/h) ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltisi YBSK analizi için viyallere aktarılmıştır.

2.2.2.1.3. Analiz yöntemi

Analiz için Agilent 1200 Series YBSK sistemi ve Zorbax OD S4, (250 x 4.6mm, 5µm partikül büyüklüğü) tipi kolon kullanılmıştır. Kafeik asit ve türevlerinin miktar tayini için Avrupa Farmakopesi'nde açıklanmış olan YBSK analiz yöntemi seçilmiştir. Hareketli faz % 0,1 H₃PO₄ (Hareketli faz A) ve Asetonitril (Hareketli faz B) akış hızı 1,5 ml/dak. ve akış tipi gradient elüsyon olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon hacmi ise 10 µl'dir. Diyod Array Dedektör (DAD) ile 330 nm dalga boyunda çalışılmıştır.

Çizelge 14. Avrupa Farmakopesi'nde *Echinacea* analizi için verilmiş Gradient Elüsyon

Zaman(Dak)	% A	%B	Akış Hızı
0	90	10	1,5 ml/dak
13	78	22	1,5 ml/dak
14	60	40	1,5 ml/dak
20	60	40	1,5 ml/dak

2.2.2.2. SK-KS Yöntemi

Echinacea için Avrupa Farmakopesinde belirtilmiş YBSK yönteminde fenolik asitlere ait bağıl retansiyon zamanlarına ek olarak bu bileşiklerin teşhisini kolaylaştırmak amacıyla SK-KS'e başvurulmuştur. Miktar tayini yapılacak bileşiklerin molekül ağırlıklarının bilinmesi teşhislerini netleştirmiştir.

2.2.2.2.1. Ekstrelerin eldesi

100 ml balon joje içinde 0,5 gram civarında toz drog 15 dakika boyunca 80 ml metanol (% 70 h/h) ile ultrasonik banyoda ekstre edilmiştir. Ardından yine metanol (% 70 h/h) ile seyreltilerek hacim 100 ml'ye tamamlanmıştır. Gözle görülür katı parçacıklar çöktükten sonra sıvı kısım 0,45µ membran filtreden süzölmüş ve SK-KS analizi için viyallere aktarılmıştır.

Teşhis amacıyla *Echinacea purpurea Radix* ve *E. pallida Radix*'e ait YBSK örnekleri kullanılmıştır.

2.2.2.2. Standart Çözeltilerinin Hazırlanması

Farmakope analizi için 10 ml'lik balon joje içinde 10,4 mg klorojenik asit ve 10,8 mg kafeik asit 15 dakika boyunca metanol (% 70 h/h) ile ultrasonik banyoda çözülmüş ve hacim 10 ml'ye tamamlanmıştır. Bu çözeltiden 4 ml 100 ml'lik balon joje'ye alınıp hacim yine metanol (% 70 h/h) ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan standart çözeltisi YBSK analizi için viyallere aktarılmıştır.

2.2.2.3. Analiz yöntemi

Analiz için Agilent 1200 Series YBSK sistemi ile birleştirilmiş tek kuadropollü, multimod iyonizasyon (ESI ve APCI) Agilent MSD (LC/MSD VL, Model No:G1956A) kullanılmıştır.

2.2.2.3.1. YBSK Şartları

Zorbax OD S4, (250 x 4,6 mm, 5 µm partikül büyüklüğü) tipi kolon kullanılmıştır. Kafeik asit ve türevlerinin miktar tayini için Avrupa Farmakopesinde açıklanmış olan YBSK analiz yöntemi seçilmiştir. Hareketli faz % 0,15 Formik asit (hareketli faz A) ve Asetonitril (hareketli faz B) akış hızı 1,5 ml/dak. ve akış tipi Gradient Elüsyon olarak belirlenmiştir. Enjeksiyon hacmi ise 10 µl'dir. Diode Array Dedektör (DAD) ile 330 nm dalga boyunda çalışılmıştır.

Çizelge 15. SK-KS ile *Echinacea* ekstralarında fenolik asit teşhisi için geliştirilen Gradient elüsyon

Zaman(dak.)	% A	%B	Akış Hızı
0	90	10	1,5 ml/dak
18	70	20	1,5 ml/dak
20	60	40	1,5 ml/dak

2.2.2.2.3.2. KS Şartları

SIM negatif modda 70 eV Elektron Sprey İyonizasyonu (ESI) uygulanmıştır. Kurutucu gaz akışı 12 l/dak, kurutucu gaz sıcaklığı 250 °C, püskürtücü basıncı 40 psi.g, buharlaştırıcı sıcaklığı 200 °C , kapiller voltaj 2000 V MS şartlarını oluşturmaktadır. Kurutucu gaz olarak Claind marka LC-MS 1 Azot jeneratöründen elde edilen azot kullanılmıştır.

2.2.3. *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* Çiçeklerinde Uçucu Yağ Analizlerinin Yapılması

2.2.3.1. Uçucu Yağ Elde Edilmesi

Echinacea uçucu yağı 100'er g taze *E. pallida* ve *E. purpurea* taze çiçeklerinden Clevenger Cihazı kullanılarak 500 ml su ile 3,5 saatlik hidrodistilasyon işlemi sonucunda elde edilmiştir. *Echinacea purpurea* çiçeklerinden 0,3 ml *E. pallida* çiçeklerinden ise 0,2 ml uçucu yağ elde edilmiştir. Uçucu yağı cihazdan almak için hekzan (100 µl) kullanılmış ve uçucu yağlar analiz edilene kadar -20 °C'de saklanmıştır.

2.2.3.2. Analiz Yöntemi

Echinacea purpurea ve *E. pallida* çiçekleri uçucu yağı için kullandığımız GK ve GK-KS yöntemi uçucu yağlar için kullandığımız standart yöntemimizdir.

2.2.3.2.1. GK Koşulları

Cihaz: Agilent 6890N Network GC system

Kolon: Agilent 19091N-136 (HP Innowax Capillary; 60,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

Taşıyıcı Gaz: Helyum

Akış Hızı: 1 ml/dak

Enjeksiyon Hacmi 1 µl

Split Oranı: 60:1

Enjektör Sıcaklığı: 250 °C

FID Sıcaklığı: 250 °C

Çizelge 16. GK Sıcaklık Programı

Sıcaklık °C	Artış Oranı	Tutulma Zamanı(dak.)	Total Zaman(dak.)
60	-----	10	10
220	4	10	60
240	1	-----	80

2.2.3.2.2. GK-KS Koşulları

Cihaz: Agilent 6890N Network GC system combined with Agilent 5973 Network Mass

Selective Detector (GC-MS)

Kolon: Agilent 19091N-136 (HP Innowax Capillary; 60,0 m x 0,25 mm x 0,25 µm)

Taşıyıcı Gaz: Helyum

Akış Hızı: 1,2 ml/min

Enjeksiyon Hacmi 1 µl

Split Oranı: 60:1

Enjektör Sıcaklığı: 250 °C

Kütle Tarama Aralığı (m/z): 35-450 Atomik Kütle ünitesi (AMU)

İyonlaştırma: Electron Impact (EI) Ionization (70 eV)

Çizelge 17. GK-KS Sıcaklık Programı

Sıcaklık °C	Artış Oranı	Tutulma Zamanı(dak.)	Total Zaman(dak.)
60	-----	10	10
220	4	10	60
240	1	-----	80

Echinacea uçucu yağının bileşenlerinin teşhisi kütle spektrumlarının Wiley ve Nist GC-MS Kütüphaneleriyle karşılaştırılması ve retansiyon indislerinin n-alkan'lara bağlı olarak ilgili literatürden sağlanan verilerle (Kivcak ve ark., 2007; Trillini ve ark., 2007; Mirjalili ve ark., 2006; Thappa ve ark., 2003) karşılaştırılması yoluyla yapılmıştır. Uçucu yağ bileşenlerinin yüzde miktarları normalizasyon metodu kullanılarak GK pik alanlarından hesaplanmıştır.

Retansiyon İndisinin Hesaplanması:

$$I = \left[\frac{\log V_n^u - \log V_n^x}{\log V_n^{x+1} - \log V_n^x} \right] + 100x$$

V_n^u = RI hesaplanacak maddenin retansiyon hacmi

V_n^{x+1} = RI hesaplanacak maddeden sonra gelen hidrokarbonun retansiyon hacmi

V_n^x = RI hesaplanacak maddeden önce gelen hidrokarbonun retansiyon hacmi

x = RI hesaplanacak maddeden önce gelen hidrokarbonun karbon sayısı

$x + 1$ = RI hesaplanacak maddeden sonra gelen hidrokarbonun karbon sayısı

2.2.4. Ekstrelerde Total Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

2.2.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Toz edilmiş *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* kök ve topraküstü kısımlarından yaklaşık 100'er g alınarak değişik polaritede çözücüler ve çözücü karışımları kullanılarak 2,5 saat Soxhlet apereyinde ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon çözücüleri metanol (MeOH), etanol:su (EtOH:H₂O, 70:30 h/h), kloroform (CHCl₃), petrol eteri (PE) olarak belirlenmiştir. Ayrıca petrol eteri ekstraksiyonunun yapıldığı aynı bitkisel materyale petrol eteri ekstraksiyonu sonrası bu sefer metanolle (PE → MeOH) Soxhlet ekstraksiyonu yeniden uygulanmıştır. Ekstraksiyon yöntemi Bölüm 2.2.1.2.'de anlatılmıştır (Kim ve ark., 2000).

Hazırlanan her ekstrenin yaklaşık 15 mg'ı 3'er ml metanolle ultrasonik banyoda 30 dakika tutularak çözülmeye çalışılmıştır. Ekstrelerin bazıları tam çözülememiş ve çözünmeyen parçacıklar 0,45 µ membran filtreden geçirilerek ayrılmıştır. Ekstrelerden bu yolla hazırlanan 5 mg/ml 'lik çözeltiler total fenolik madde miktar tayini için kullanılmıştır. Ekstreler verimleri ve konsantrasyonları Çizelge18.'de verilmiştir (Singleton ve Rossi, 1965; Smejkal ve ark., 2007).

2.2.4.2. Tayin Yöntemi

Total fenolik madde miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçümler Synergy HT okuyucu (BIO-TEK) kullanılarak 96'lı plakta yapılmıştır. 10 µl test çözeltisi (5 mg/ml ekstre/metanol) üzerine 30 µl Folin-Ciocalteu reaktifi (Fluka 47641) (1:2 oranında su ile seyreltilmiş) ve 220 µl Na₂CO₃'ün sudaki %3,5'luk çözeltisi eklenmiştir. Reaksiyon için karışım iyice çalkalanmış ve iki saatlik inkübasyonun ardından 760 nm'deki absorbansları ölçülmüştür. Total fenolik madde miktarının tayini gallik asit kalibrasyon denklemi ile yapılmıştır. Sonuçlar 100 gram

kuru ekstredeki Gallik Asit Eşdeğeri (GAE) olarak belirlenmiştir (Singleton ve Rossi, 1965; Smejkal ve ark., 2007).

Çizelge 18. Total Fenolik Madde Miktar Tayini için elde edilen *Echinacea* ekstreleri, örneklerin konsantrasyonları ve Gallik Asit Konsantrasyonu

	Ekstraksiyon çözücüsü	Kullanılan Ekstre	Konsantrasyon (mg/ml)
<i>E. purpurea Radix</i>	Metanol	14,93 mg/3ml	4,98
	Etanol:su (70:30 h/h)	16,45 mg/3ml	5,48
	Kloroform	16,44 mg/3ml	5,48
	Petrol eteri	13,29 mg/3ml	4,43
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	17,96 mg/3ml	5,99
<i>E. purpurea Herba</i>	Metanol	15,65 mg/3ml	5,22
	Etanol:su (70:30 h/h)	17,72 mg/3ml	5,91
	Kloroform	15,57 mg/3ml	5,19
	Petrol eteri	15,62 mg/3ml	5,21
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	17,84 mg/3ml	5,95
<i>E. pallida Radix</i>	Metanol	16,40 mg/3ml	5,47
	Etanol:su (70:30 h/h)	16,34 mg/3ml	5,45
	Kloroform	18,70 mg/3ml	6,24
	Petrol eteri	14,88 mg/3ml	4,96
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	15,46 mg/3ml	5,15
<i>E. pallida Herba</i>	Metanol	15,15 mg/3ml	5,05
	Etanol:su (70:30 h/h)	17,48 mg/3ml	5,83
	Kloroform	12,38 mg/3ml	4,13
	Petrol eteri	13,14 mg/3ml	4,38
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	18,34 mg/3ml	6,11
Gallik Asit		10,22 mg/50ml	0,2044

2.2.5. Ekstrelerde Total Flavonoit Miktarının Belirlenmesi

2.2.5.1. Çözeltilerin Hazırlanması

Toz edilmiş *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* kök ve topraküstü kısımlarından yaklaşık 100'er g alınarak değişik polaritede çözücüler ve çözücü karışımları kullanılarak 2,5 saat Soxhlet apereyinde ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır. Ekstraksiyon çözücülerini metanol (MeOH), etanol:su (EtOH:H₂O, 70:30 h/h), kloroform (CHCl₃), petrol eteri (PE) olarak belirlenmiştir. Ayrıca petrol eteri ekstraksiyonunun yapıldığı aynı bitkisel materyale petrol eteri ekstraksiyonu sonrası bu sefer metanolle (PE → MeOH) aynı Soxhlet ekstraksiyonu yeniden uygulanmıştır. Ekstraksiyon yöntemi Bölüm 2.2.1.2.'de anlatılmıştır (Kim ve ark., 2000).

Hazırlanan her ekstrenin yaklaşık 15 mg'ı 3'er ml metanolle ultrasonik banyoda 30 dakika tutularak çözülmeye çalışılmıştır. Ekstrelerin bazıları tam çözülmemiş ve çözünmeyen parçacıklar 0,45 µ membran filtreden geçirilerek ayrılmıştır. Ekstrelerden bu yolla hazırlanan 5 mg/ml 'lik çözeltiler total flavonoit miktar tayini için kullanılmıştır. Ekstreler verimleri ve konsantrasyonları Çizelge 19.'da verilmiştir (Woisky ve Salatino, 1998).

2.2.5.2. Tayin Yöntemi

Total flavonoit miktarı spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Ölçümler Synergy HT okuyucu (BIO-TEK) kullanılarak 96'lı plakta yapılmıştır. 50 µl test çözeltisi (5 mg/ml ekstre/metanol) üzerine 25 µl alüminyum klorit çözeltisi (metanoldeki % 1,3'lük çözeltisi) (1:2 oranında su ile seyreltilmiş) ve 200 µl metanol eklenmiştir. Bununla birlikte her örneğin alüminyum kloritsiz kontrol örneği eksik hacim metanolle tamamlanarak hazırlanmıştır. Reaksiyon için karışım iyice çalkalanmış ve 30 dakikalık inkübasyonun ardından 425 nm'deki absorbansları ölçülmüştür.

Ölçümler sonunda örnek (A örnek) ve kontrole (A kontrol) ait absorban değerlerindeki fark hesaplanmıştır (A örnek - A kontrol = A sonuç). Total flavonoit miktarının tayini kersetin kalibrasyon denklemi ile yapılmıştır. Sonuçlar 100 gram kuru ekstredeki Kersetin Eşdeğeri (QE) olarak belirlenmiştir (Woisky ve Salatino, 1998).

Çizelge 19. Total Flavonoit Miktar Tayini için elde edilen *Echinacea* ekstraları, örneklerin konsantrasyonları ve Kersetin Konsantrasyonu

	Ekstraksiyon çözücüsü	Kullanılan Ekstre	Konsantrasyon (mg/ml)
<i>E. purpurea Radix</i>	Metanol	14,93 mg/3ml	4,98
	Etanol:su(70:30 h/h)	16,45 mg/3ml	5,48
	Kloroform	16,44 mg/3ml	5,48
	Petrol eteri	13,29 mg/3ml	4,43
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	17,96 mg/3ml	5,99
<i>E. purpurea Herba</i>	Metanol	15,65 mg/3ml	5,22
	Etanol:su(70:30 h/h)	17,72 mg/3ml	5,91
	Kloroform	15,57 mg/3ml	5,19
	Petrol eteri	15,62 mg/3ml	5,21
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	17,84 mg/3ml	5,95
<i>E. pallida Radix</i>	Metanol	16,40 mg/3ml	5,47
	Etanol:su(70:30 h/h)	16,34 mg/3ml	5,45
	Kloroform	18,70 mg/3ml	6,24
	Petrol eteri	14,88 mg/3ml	4,96
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	15,46 mg/3ml	5,15
<i>E. pallida Herba</i>	Metanol	15,15 mg/3ml	5,05
	Etanol:su(70:30 h/h)	17,48 mg/3ml	5,83
	Kloroform	12,38 mg/3ml	4,13
	Petrol eteri	13,14 mg/3ml	4,38
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	18,34 mg/3ml	6,11
Kersetin		9,6505 mg/100ml	

2.2.6. Ekstrelerde Antioksidan Aktivitenin Belirlenmesi

2.2.6.1. DPPH Yöntemi

2.2.6.1.1. Tayin Yöntemi

Ekstrelerin ve saf maddelerin DPPH serbest radikal süpürücü aktivitesi, 2,2-difenil-1,2-pikril hidrazil (DPPH) (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Almanya) radikale karşı, koyu-viyole renkten açık-sarı renge dönüşümün UV/görünür bölgede 515 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesiyle tayin edilmiştir. Çalışmada uygulanan yöntem göre; 6×10^{-5} M DPPH solüsyonu ölçümlerden önce hazırlanmış ve ekstre solüsyonlarından 77 μ l alınarak, üzerlerine 3'er ml DPPH solüsyonu ilave edilmiştir. Daha sonra ekstre ve DPPH solüsyonları, karanlıkta, oda sıcaklığında 15 dakika bekletilerek inkübe edilmiştir. Kör olarak metanol kullanılarak tüm solüsyonların absorbanları 515 nm'de UV spektrofotometrede (Unico 4802 UV/Vis double beam spectrophometer, USA) okunmuştur. Tüm ekstreler için deney üç paralelli olarak uygulanmış, bütil hidroksi anisol (BHA, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Almanya) ve gallik asit referans madde olarak kullanılmıştır (Miliauskas ve ark., 2004).

% inhibisyon ise aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100$$

A_B = DPPH stok solüsyonunun absorbanı, A_A = Örnek solüsyonunun absorbanı

2.2.6.1.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Ekstre ve Standart Madde Dilüsyonları

Echinacea ekstrelerinden 20'şer mg tartılıp önce metanolle 10 ml ye tamamlanmış ve 2 mg/ml konsantrasyonda 10 ml çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden hareketle 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ve 0,0625 mg/ml' lik dilüsyonları hazırlanmıştır.

2.2.6.2. Metal Şelasyon Aktivite Tayini

2.2.6.2.1. Tayin Yöntemi

Echinacea purpurea ve *E. pallida* ekstrelerinin metal şelasyon yapıcı aktivitesi, Chua ve ark.'nın (2008) yöntemine göre tayin edilmiştir. Buna göre; örneklere (200 µl) 3550 µl metanol ilave edilmiş ve 50 µl 2 mM FeCl₂ solüsyonu ile inkübe edilmiştir. Karışıma 200 µl 5 mM ferrozin ilavesi ile reaksiyon başlatılmış ve oda sıcaklığında 10 dk beklemeye bırakılmıştır. Karışımın absorbansı Unico 4802 UV-visible double beam spektrofotometre (ABD) kullanılarak 562 nm'de ölçülmüştür.

% Ferrozin-Fe²⁺inhibisyonu ise aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = [(AB-AA)/AB] \times 100$$

AB= Stok çözeltisinin absorbansı (analiz örneği/referans dışında tüm reaksiyon ajanlarını içeren reaksiyonun absorpsiyonu), AA= Örnek çözeltisinin absorbansı

2.2.6.2.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Ekstre ve Standart Madde Dilüsyonları

Echinacea ekstrelerinden 20'şer mg tartılıp önce metanolle 10 ml ye tamamlanmış ve 2 mg/ml konsantrasyonda 10 ml çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltilerden hareketle 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ve 0,0625 mg/ml' lik dilüsyonları hazırlanmıştır.

2.2.7. Ekstrelerde Antikolinesteraz Aktivite Tayini

2.2.7.1. Tayin Yöntemi

Aktivite tayini Ellman ve arkadaşları tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır. 96 kuyucuklu mikrolaktaki bütün kuyucuklara 140 µl 0,1 mM fosfat tamponu (pH 8,6) konmuş, ilk ve son 3 kuyucuğa kontrol grubu olarak sadece etanol eklenmiştir. 3 paralelli yapılan deneyde örnekler için her dilüsyondan 20 µl halinde geriye kalan kuyucuklara üçerli eklenmiştir. Sonra AChE enzim solüsyonları 20 µl halinde tüm kuyucuklara eklenmiştir. Hazırlanan plaklar 10 dk. 25-30° C’de ELISA mikrolak okuyucuda inkübe edilmiştir. 10 dk. sonunda tüm kuyucuklara 10 µl 5,5-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) çözeltisi ve takiben 10 µl substrat çözeltisinden eklenmiştir. Reaksiyon başlamış ve oluşan sarı rengin absorbanısı 412 nm dalga boyunda ölçülmüştür (VersaMax tunable microplate reader, Softmax® Pro Software, Molecular Devices, ABD). Referans madde olarak galantamin (Sigma) kullanılmıştır (Ellman ve ark., 1961).

% İnhibisyon ise aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ İnhibisyon} = 100 - (A_A / A_B \times 100)$$

A_A = Örneklerin ortalama absorbanısı, A_B = Kontrol değerlerinin ortalama absorbanısı

2.2.7.2. Çözeltilerin Hazırlanması

Ekstre ve Standart Madde Dilüsyonları

Echinacea ekstrelerinden 20’şer mg tartılıp önce metanolle 10 ml ye tamamlanmış ve 2 mg/ml konsantrasyonda 10 ml çözelti elde edilmiştir. Bu çözeltiden hareketle 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml ve 0,0625 mg/ml’ lik dilüsyonları hazırlanmıştır.

3. BULGULAR

3.1. Fenolik Asit Miktar Tayinine Ait Bulgular

Echinacea purpurea ve *E. pallida* türlerinde kafeik asit türevlerinin miktar tayinleri için Avrupa Farmakopesi 6 'da açıklanmış olan YBSK yöntemi ile çalışılmış ve hesaplamalar için Avrupa Farmakopesi 6'da bulunan ilgili formüller kullanılmıştır. Kromatogramlarda madde piklerinin teşhisi için Avrupa Farmakopesi *Echinacea* monograflarında verilen bağıl retansiyon zamanlarından, SK-KS (SK-KS yöntemi EP yönteminden modifiye edilerek uygulanmıştır) ve literatürdeki (Pellati ve ark. 2005) DAD-UV spektrum verilerinden faydalanılmıştır.

Avrupa Farmakopesi *Echinacea* monograflarında kaftarik asit, kikorik asit ve ekinakozit miktar tayini hesaplamaları için aşağıdaki formüller kullanılmıştır.

Kaftarik asit

$$\frac{A1xC2x100x0,881}{A2xC1}$$

Kikorik asit

$$\frac{A3xC2x100x0,695}{A2xC1}$$

A1= test çözeltisinden elde edilmiş ve kaftarik asite denk gelen pikin alanı

A2= referans çözeltisinde klorojenik asite denk gelen pikin alanı

A3= test çözeltisinde kikorik asite denk gelen pikin alanı

C1= test çözeltisinin mg/ml konsantrasyonu

C2= klorojenik asitin referans çözeltisindeki mg/ml konsantrasyonu

0,695= kikorik asit ve klorojenik asit arasındaki pik korelasyon faktörü

0,881= kaftarik asit ve klorojenik asit arasındaki pik korelasyon faktörü

Ekinakozit

$$\frac{A1 \times 0,0376 \times 100 \times 2,221}{A2 \times C1}$$

$A2 \times C1$

A1= test çözeltisinden elde edilmiş ve ekinakozite denk gelen pikin alanı

A2= referans çözeltisinde klorojenik asite denk gelen pikin alanı

C1= test çözeltisinin mg/ml konsantrasyonu

C2= klorojenik asitin referans çözeltisindeki mg/ml konsantrasyonu

2,221= ekinakozit ve klorojenik asit arasındaki pik korelasyon faktörü

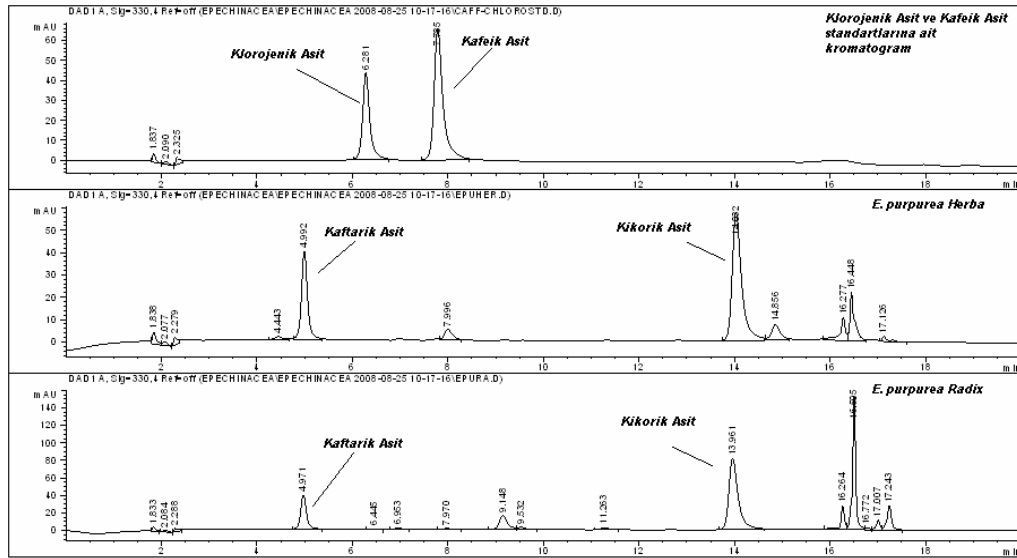
Farmakope Analizine Ait Bulgular

Çizelge 20. Farmakope analizinde *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* türlerinde kafeik asit türevlerinin miktar tayinlerine ait bulgular.

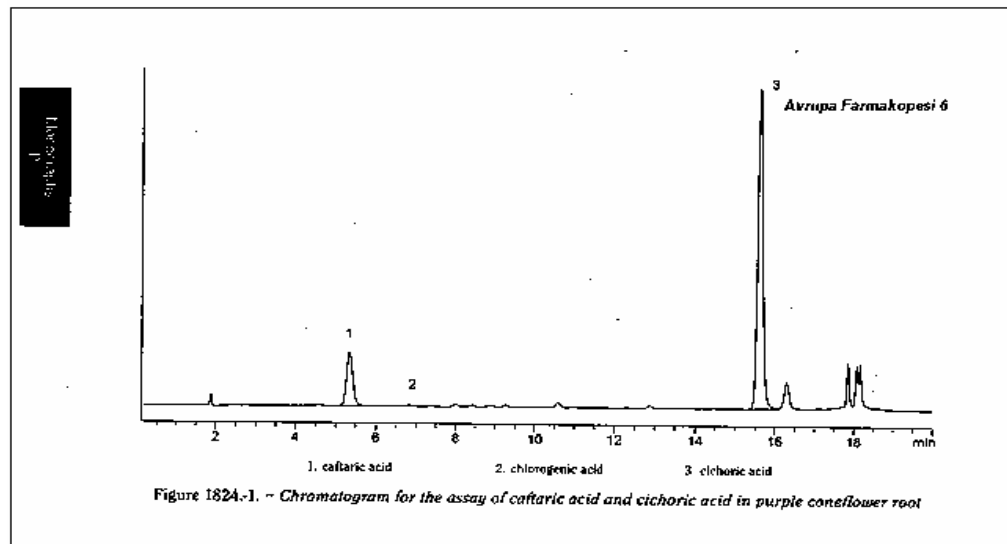
<i>E. purpurea</i>	Kaftarik Asit (%)	Kikorik Asit (%)	Ekinakozit (%)	Toplam (%)
Radix	0,5137 ±0,0050	1,3007 ±0,0025	-	1,8143 ±0,0075
Herba	0,5493 ±0,0015	0,9687 ±0,0021	-	1,5180 ±0,0010
<i>E. pallida</i>	Kaftarik Asit (%)	Kikorik Asit (%)	Ekinakozit (%)	Toplam (%)
Radix	-	-	0,2230±0,0040	0,2230 ±0,0040
Herba	0,1157 ±0,0015	0,2430 ±0,0030	-	0,3587 ±0,0015
			Pik alanı	Konsantrasyon (mg/ml)
Klorojenik Asit			466,5	0,0416
Kafeik Asit			876,6	0,0432

3.1.1. YBSK Bulguları

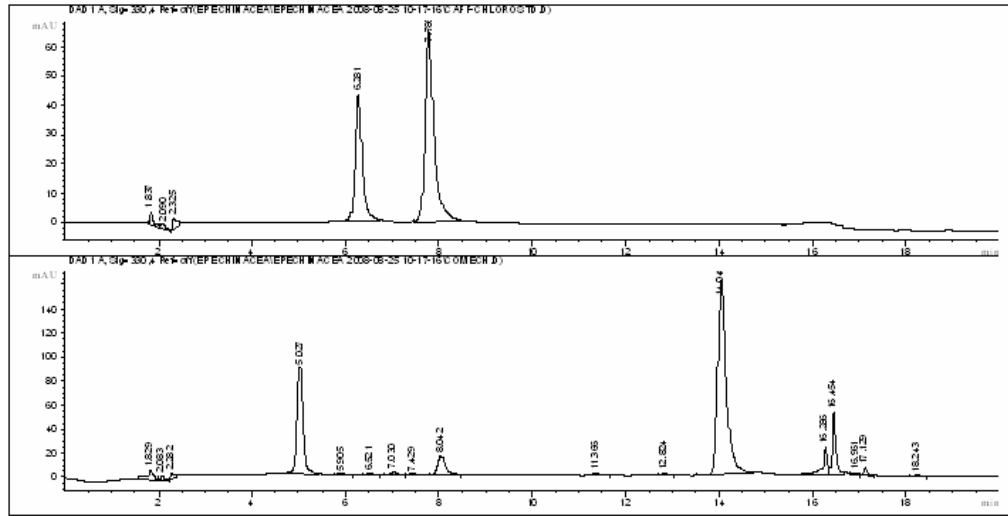
Şekil 14. *E. purpurea* herba ve radix kromatogramları ve standart madde (klorojenik asit ve kafeik asit) kromatogramları (EP6 yöntemiyle).



Şekil 15. EP6'da açıklanan yöntemle beklenen *E. purpurea* kromatogramı, kaftarik asit ve kikorik asitin görülmesi beklenen retansiyon zamanları ve pikleri.

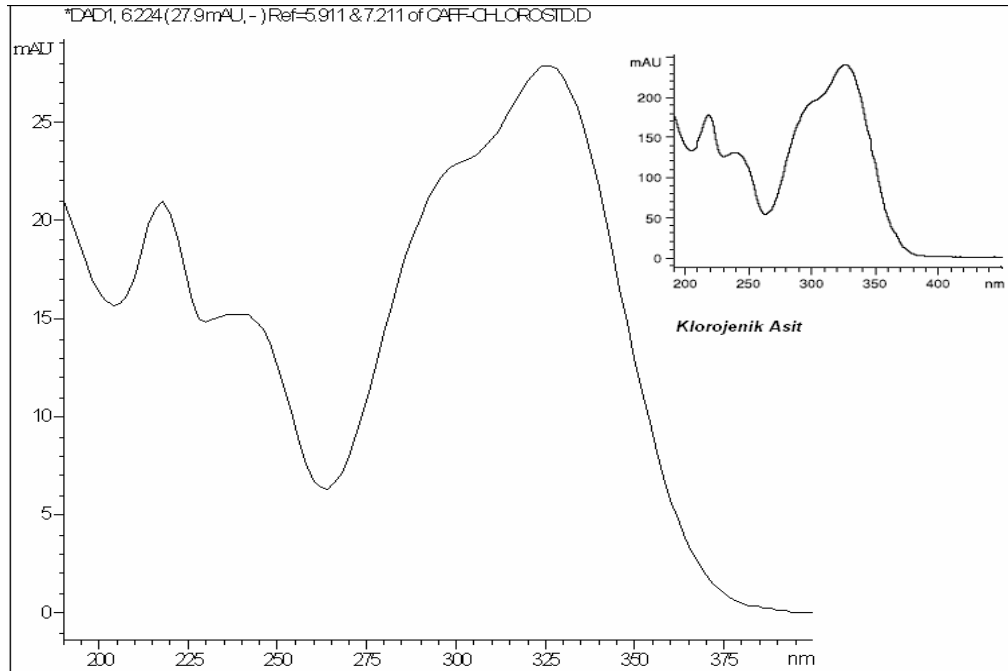


Şekil 16. *Echinacea purpurea* herba, ticari ekstresinden elde edilen kromatogram ve standart madde (klorojenik asit ve kafeik asit) kromatogramları (EP6 yöntemiyle).

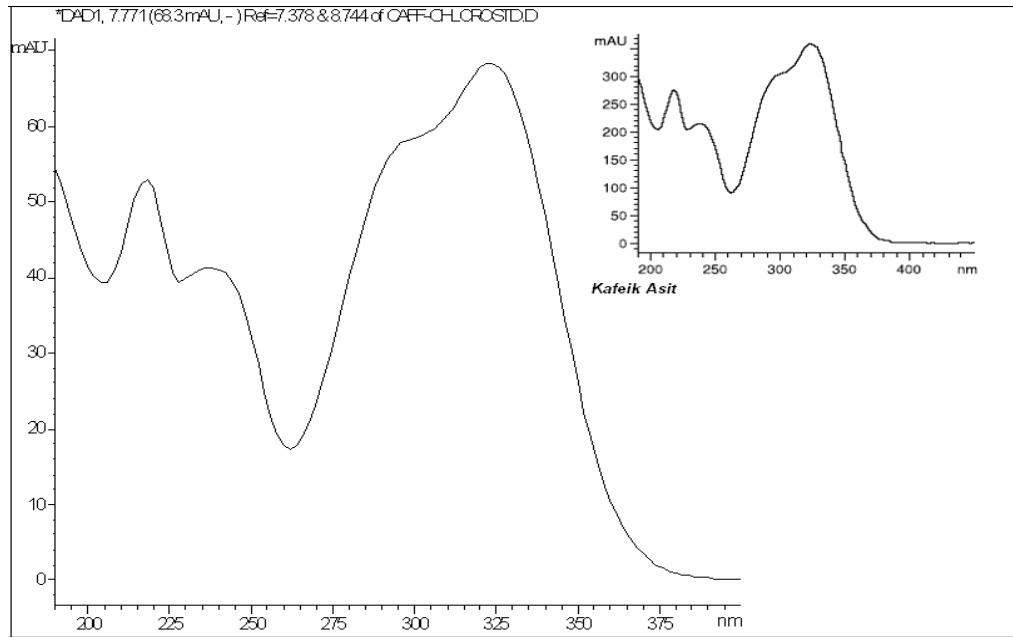


Şekil 17a, 17b, 17c, 17d. Çalışmada elde edilen (soldaki büyük spektrumlar) ve literatürden (Pellati ve ark., 2005) elde edilen (sağ üstteki küçük spektrumlar) DAD-UV spektrumlarıdır.

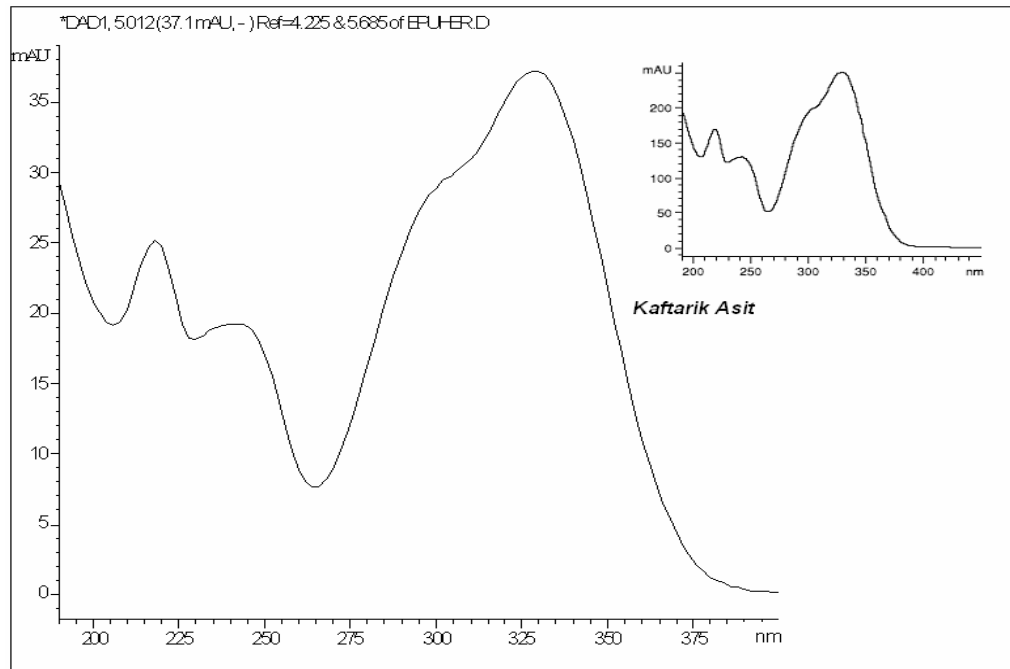
Şekil 17a. Klorojenik asit



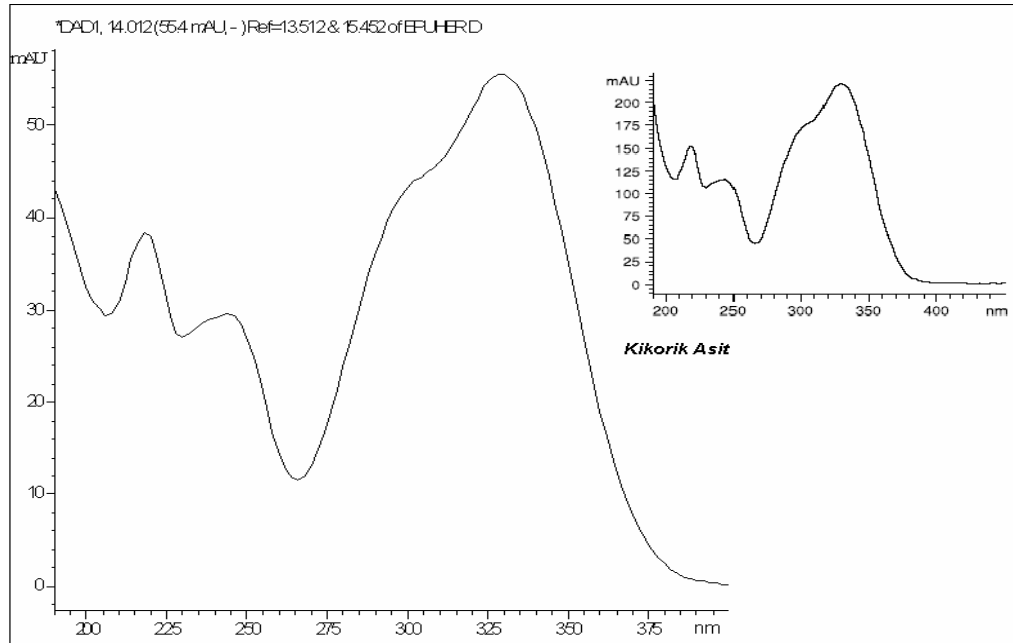
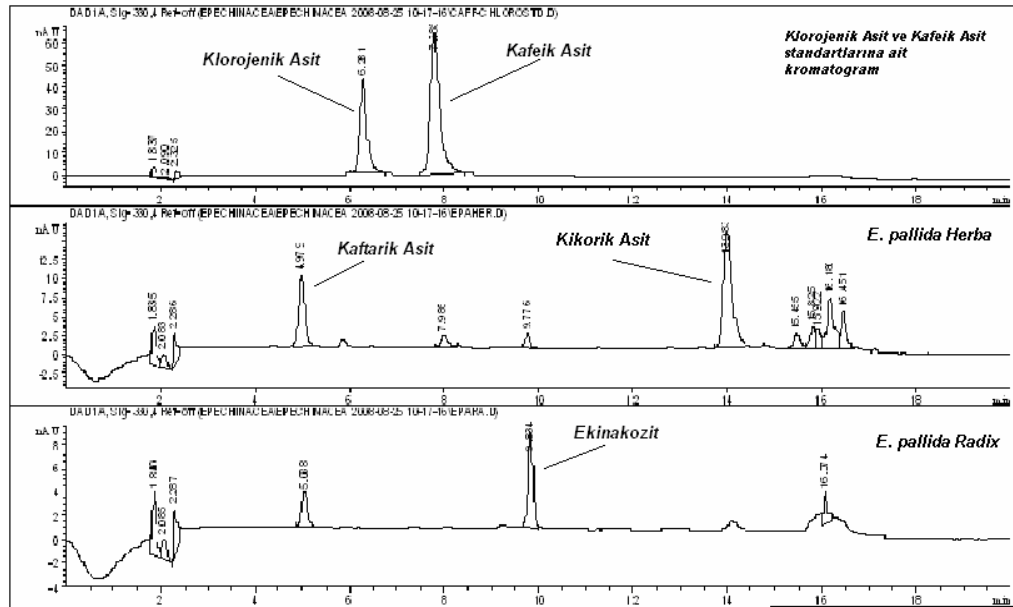
Şekil 17b. Kafeik asit



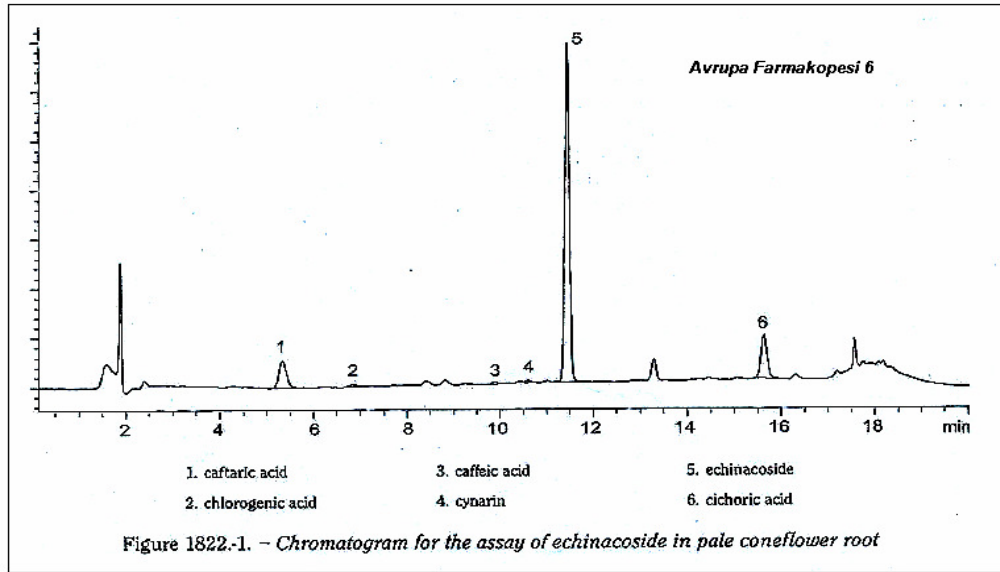
Şekil 17c. Kaftarik asit



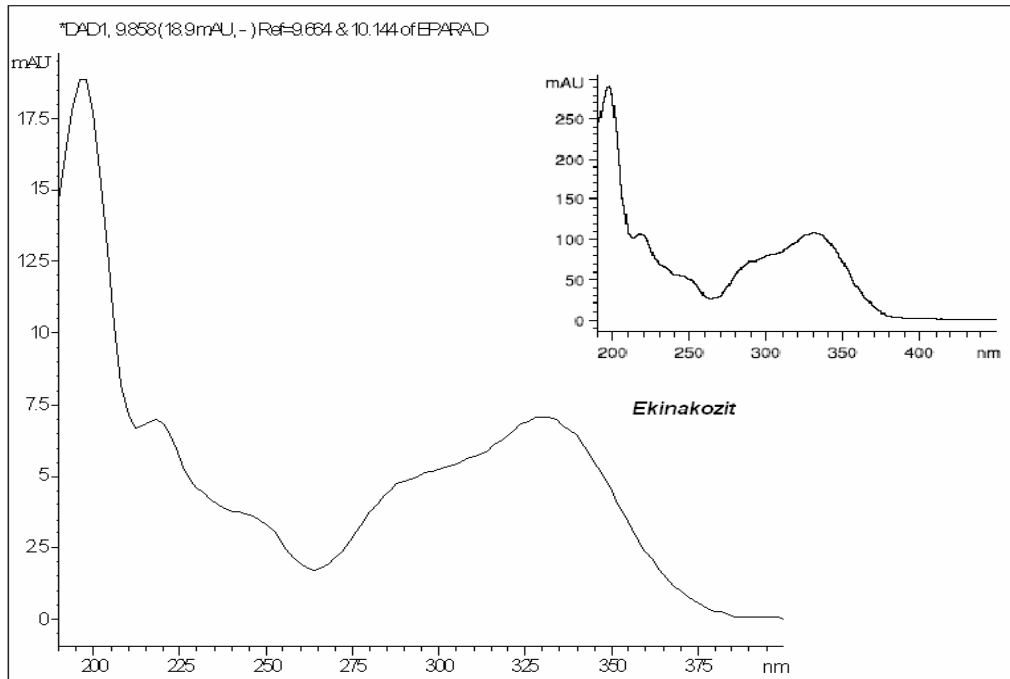
Şekil 17d. Kikorik asit

Şekil 18. *E. pallida* herba ve radix kromatogramları ve standart madde (klorojenik asit ve kafeik asit) kromatogramları (EP6 yöntemiyle).

Şekil 19. EP6'da açıklanan yöntemle göre beklenen *E. pallida* kromatogramı, ekinakozitin beklenen retansiyon zamanı ve piki

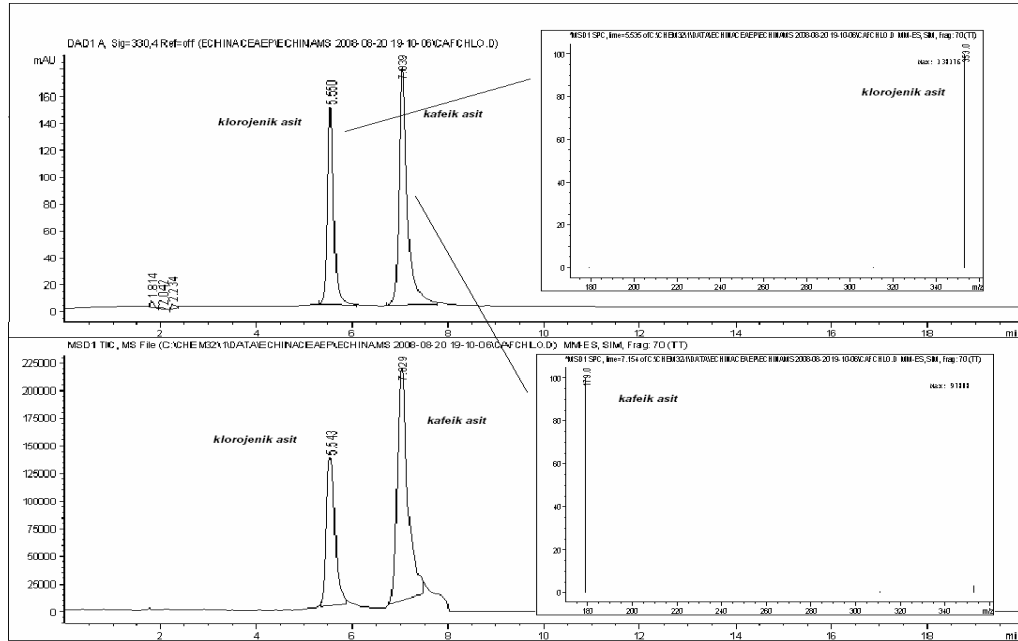


Şekil 20. Çalışmada elde edilen (soldaki büyük spektrum) ve literatürden (Pellati ve ark., 2005) elde edilen (sağ üstteki küçük spektrum) ekinakozite ait DAD-UV spektrumları

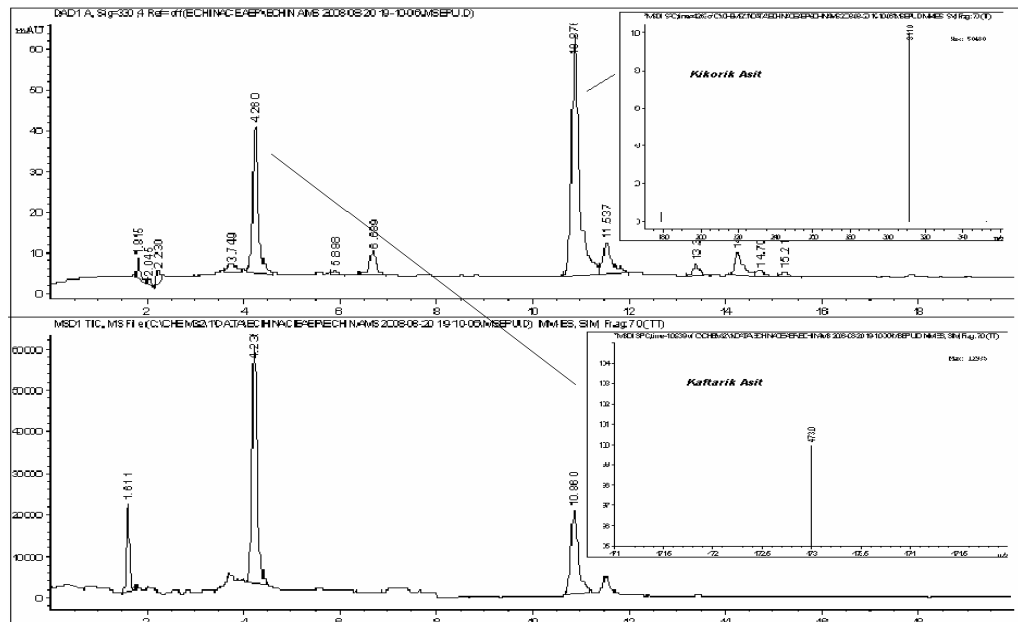


3.1.2. SK-KS Bulguları

Şekil 21. Klorojenik asit ve kafeik asite ait SK-KS verileri

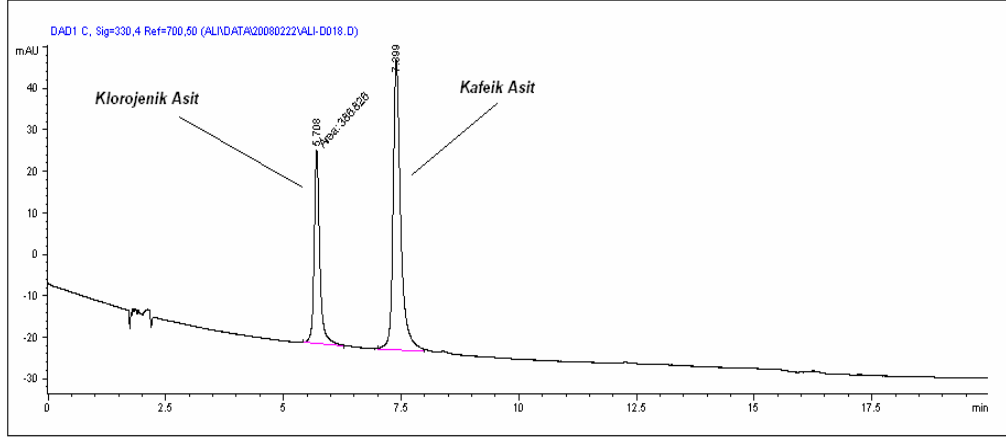


Şekil 22. Kaftarik asit ve Kikorik asite ait SK-KS verileri

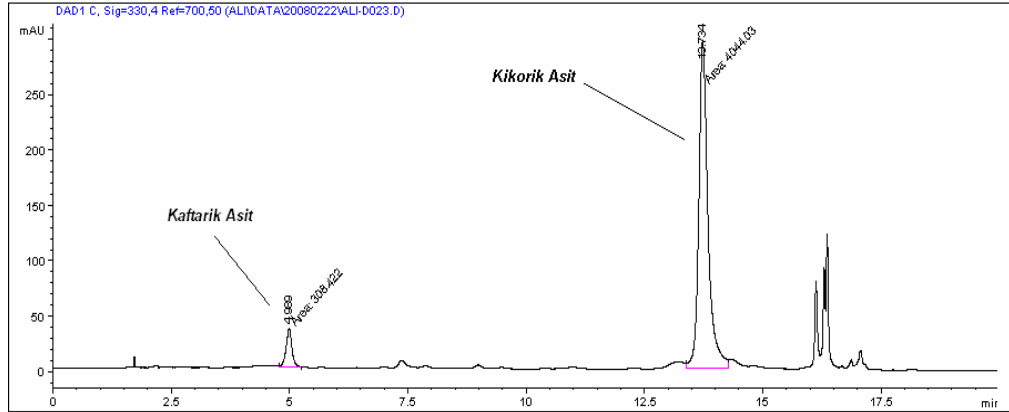


3.1.3. Değişik Polaritede Hazırlanan Ekstrelelere Ait Bulgular

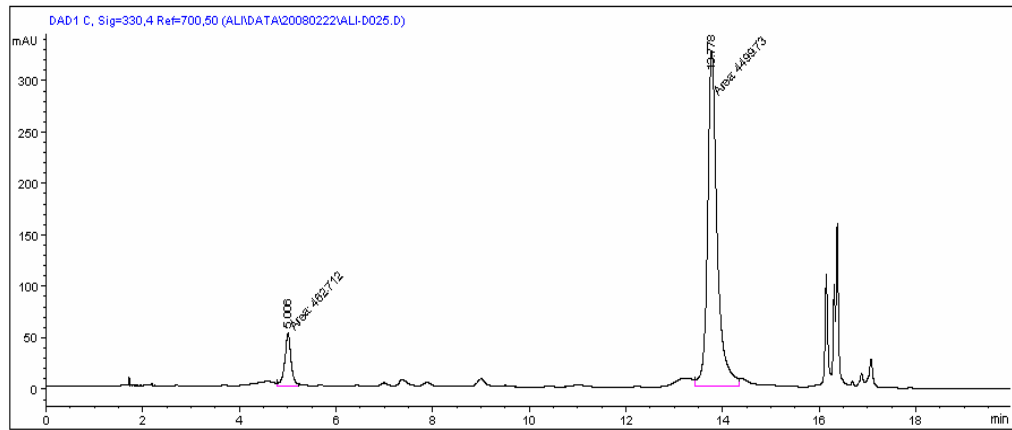
Şekil 23. Standart madde (klorojenik asit ve kafeik asit) kromatogramı (EP6 yöntemiyle).



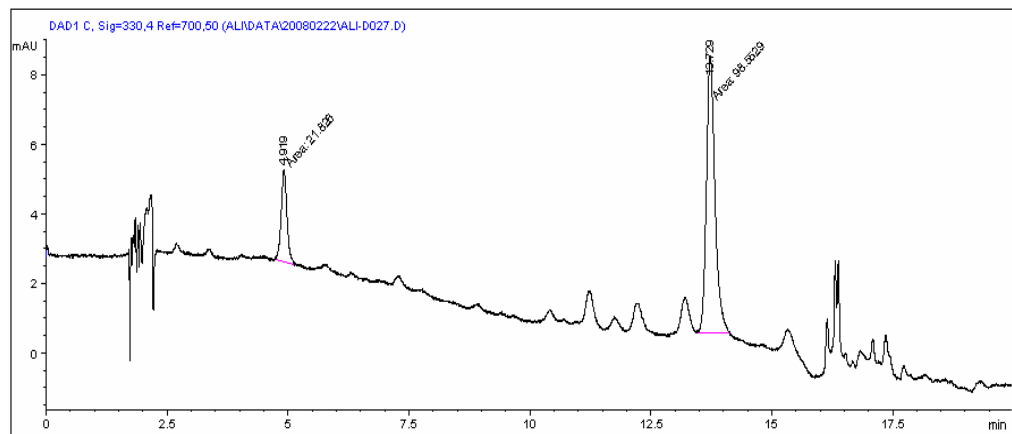
Şekil 24. *E.purpurea* Radix MeOH ekstresine ait kromatogram



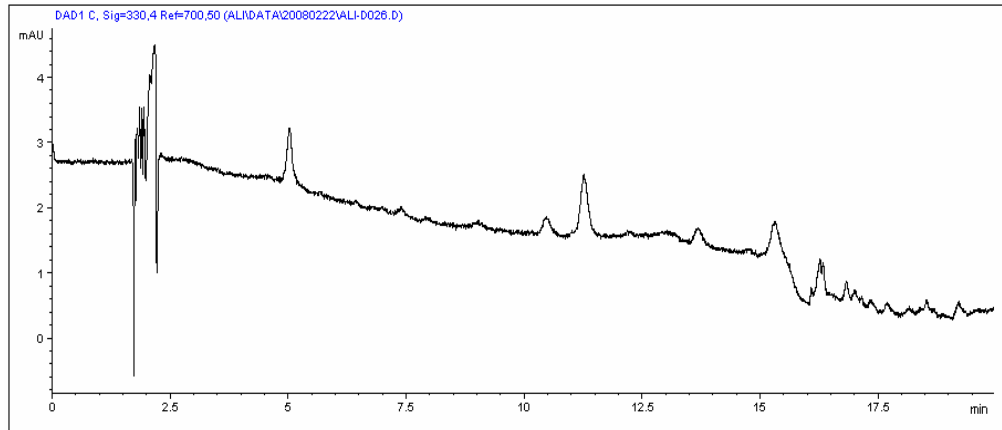
Şekil 25. *E.purpurea* Radix EtOH:H₂O (70:30) ekstresine ait kromatogram



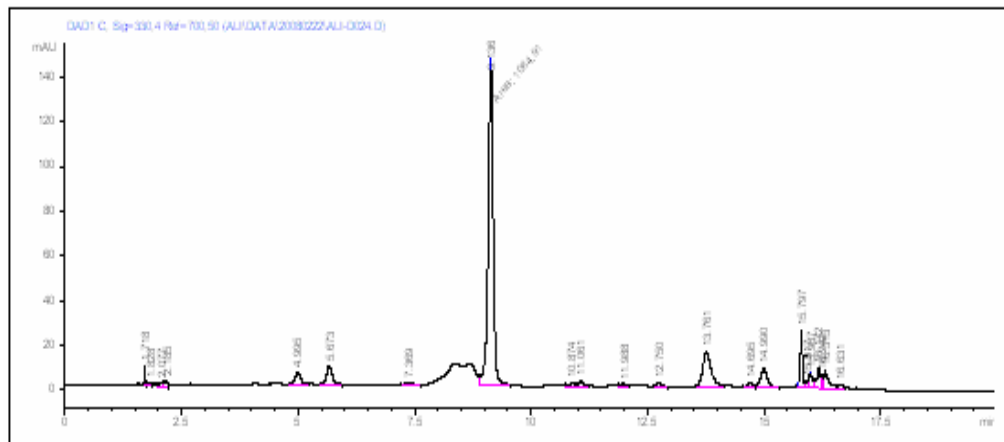
Şekil 26. *E.purpurea* Radix kloroform ekstresine ait kromatogram



Şekil 27. *E.purpurea* Radix petrol eteri ekstresine ait kromatogram



Şekil 28. *E.pallida* Radix MeOH ekstresine ait kromatogram



Çizelge 21. Değişik polaritedeki *Echinacea* ekstreleri ve kafeik asit türevleri miktarları

	Ekstraksiyon Çözücüsü	Kaftarik Asit(%)	Kikorik Asit(%)
<i>E. purpurea Radix</i>	Metanol	0,1974 ±0,0012	2,0492 ±0,0053
	Etanol:su (70:30 h/h)	0,3466 ±0,0009	2,6621 ±0,0081
	Kloroform	0,0185 ±0,0001	0,0665 ±0,0004
	Petrol eteri	0,0000 ±0,0000	0,0000 ±0,0000
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	0,1637 ±0,0005	1,7047 ±0,0077
<i>E. purpurea Herba</i>	Metanol	0,2324 ±0,0015	1,9725 ±0,0056
	Etanol:su (70:30 h/h)	0,4171 ±0,0013	3,1550 ±0,0107
	Kloroform	0,0735 ±0,0002	0,2027 ±0,0006
	Petrol eteri	0,0258 ±0,0002	0,0485 ±0,0004
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	0,0542 ±0,0002	0,3944 ±0,0010
<i>E. pallida Radix</i>		Ekinakozit(%)	
	Metanol	1,8612 ±0,0018	
	Etanol:su(70:30 h/h)	1,9342 ±0,0050	
	Kloroform	0,0262 ±0,0001	
	Petrol eteri	0,0000 ±0,0000	
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	2,1340 ±0,0056	
<i>E. pallida Herba</i>		Kaftarik Asit(%)	Kikorik Asit(%)
	Metanol	0,0570 ±0,0003	0,4380 ±0,0624
	Etanol:su(70:30 h/h)	0,2828 ±0,0074	1,0460 ±0,0029
	Kloroform	0,0114 ±0,0001	0,0261 ±0,0002
	Petrol eteri	0,0105 ±0,0002	0,0117 ±0,0002
	Metanol (Petrol eterinden sonra)	0,1073 ±0,0005	0,8110 ±0,0021
Standartlar	(Pik Alanı)	Konsantrasyon (mg/ml)	
Klorojenik Asit	386,826	0,0376	
Kafeik Asit	784,5	0,0396	

3.2. Çiçeklerde Uçucu Yağ Analizine Ait Bulgular

Çizelge 22. *Echinacea* çiçeklerinde uçucu yağ analizine ait bulgular

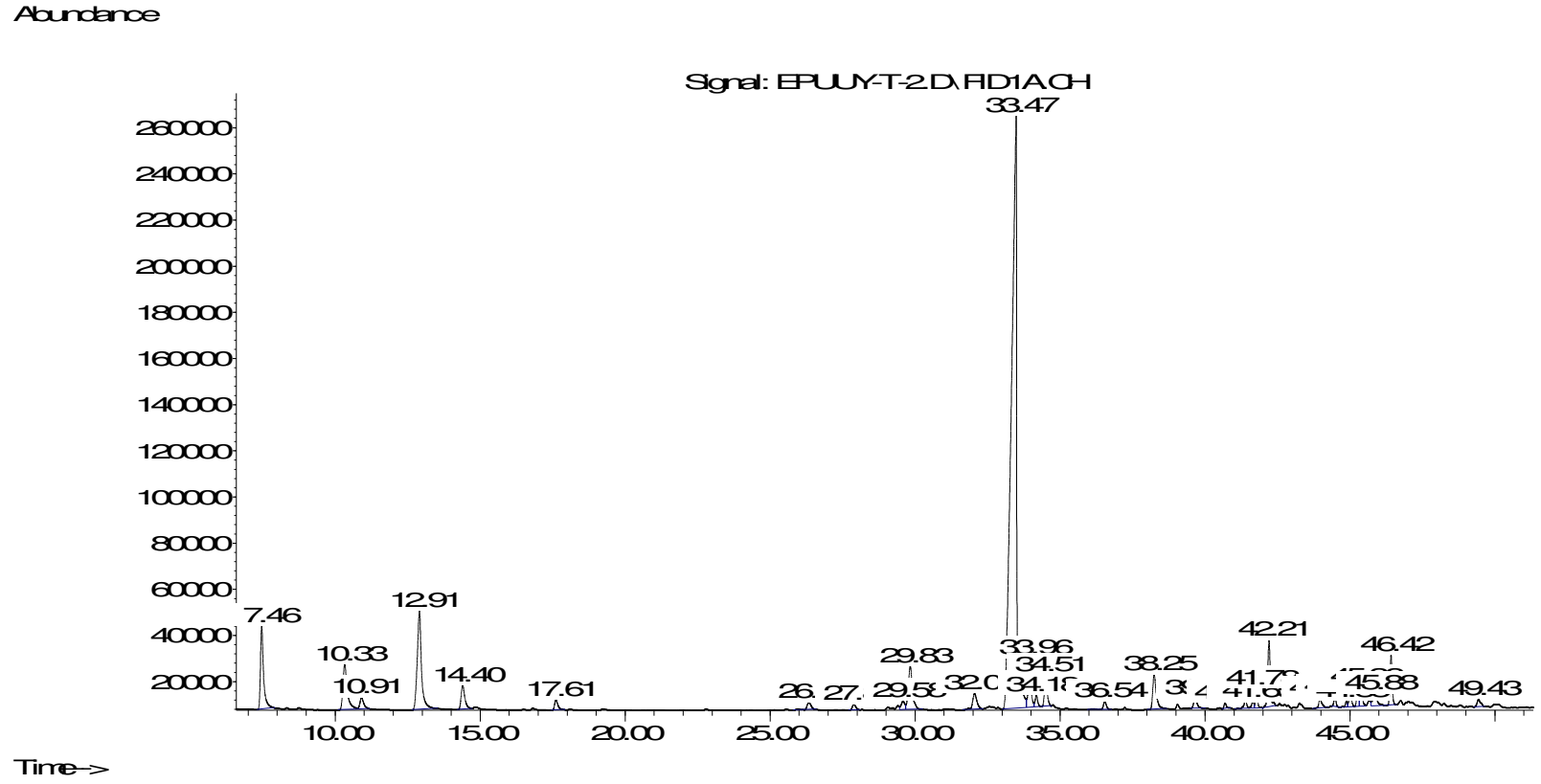
	Bileşik	RI ^a	(%) Alan (<i>E. purpurea</i>)	(%) Alan (<i>E. pallida</i>)
1	α -pinen	1005	4,24	1,46
2	Kamfen	1042	0,10	0,33
3	β -pinen	1088	3,31	1,49
4	Sabinen	1103	0,86	0,64
5	β -mirsen	1144	-	1,39
6	α -fellandren	1145	7,06	0,83
7	Limonen	1177	1,53	3,41
8	1,8-sineol	1185	-	0,21
9	β -fellandren	1185	0,24	-
10	Cis- β -osimen	1229	0,09	0,31
11	β -simen	1246	0,55	0,10
12	α -terpinolen	1256	0,10	0,02
13	Nonanal	1367	0,06	-
14	Perillen	1386	-	0,08
15	Trans-limonen oksit	1427	-	0,05
16	α -kopaen	1462	0,53	0,45
17	β -burbonen	1487	-	0,05
18	β -cubeben	1507	0,34	0,49
19	Linalol	1515	-	0,16
20	Pinokarvon	1542	-	0,07
21	Bornil Asetat	1552	0,11	5,17
22	β -elemen	1564	0,57	0,56
23	β -karyofillen	1573	3,13	3,36
24	Alloaromadendren	1622	-	0,07
25	α -humulen	1650	1,29	1,17
26	γ -muurolen	1671	-	0,34
27	Germakren-D	1700	51,60	25,35
28	Bisiklogermakren	1718	2,35	-
29	Delta-kadinen	1738	1,75	1,64
30	Kadina-1,4-dien	1762	-	0,06
31	Germakren-B	1813	0,40	0,22
32	Şibunon	1900	-	1,17
33	α -kalakoren	1913	-	0,18
34	1,5-epoksisalvial-4(14)-ene	1924	0,25	1,35
35	β -iyonon	1936	-	0,39
36	10-epikübebol	1945	-	1,47
37	İzokaryofillenoksit	1970	0,19	0,61
38	Karyofillenoksit	1979	-	3,37
39	Salvial-4(14)-ene-1-on	1998	0,72	0,52
40	(E) Nerolidol	2019	2,48	1,93
41	Humulenepoksit II	2030	-	0,93
42	Germakren-D-4-ol	2037	-	2,47
43	1-epi-kübenol	2051	0,49	0,49
44	Spatulenol	2111	0,76	1,99
45	T-kadinol	2156	0,98	-
46	T-muurool	2172	2,23	-
47	α -kadinol	2218	-	2,13
48	Heptakozaan	2670	-	0,56

Çizelge 22. *Echinacea* çiçeklerinde uçucu yağ analizine ait bulgular (Devam)

Monoterpen Hidrokarbonlar	17,53	10,06
Oksijene Monoterpenler	0,11	6,13
Toplam Monoterpenler	17,64	16,19
Seskiterpen Hidrokarbonlar	62,15	35,84
Oksijene Seskiterpenler	7,91	16,35
Toplam Seskiterpenler	70,06	52,19
<i>Hidrokarbonlar</i>	-	0,56
<i>Aromatik Hidrokarbonlar</i>	0,55	-

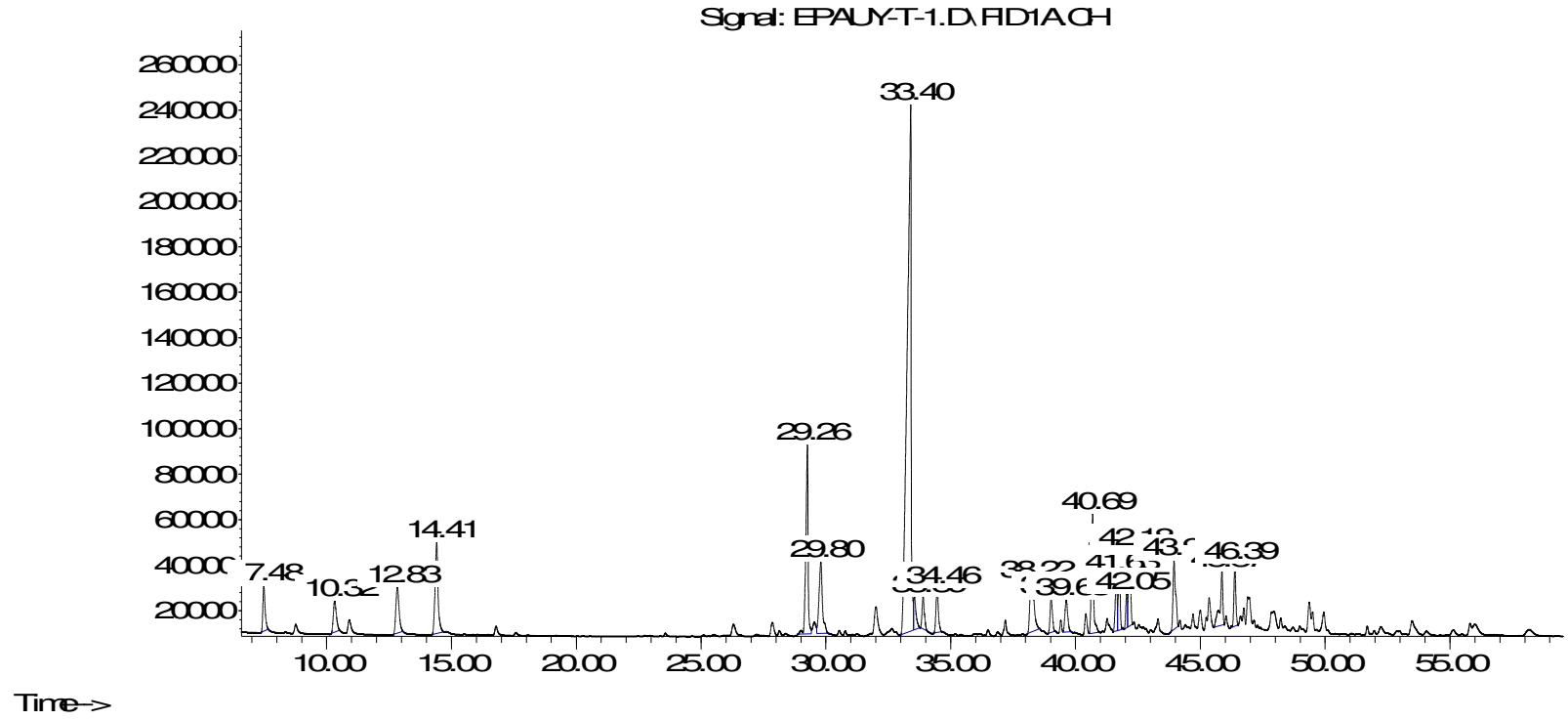
^a= retansiyon indisi

Şekil 29. *E. purpurea* çiçek uçucu yağ GK kromatogramı



Şekil 30 *E. pallida* çiçek uçucu yağ GK kromatogramı

Abundance



3.3. Total Fenol ve Flavonoit İçeriğine Ait Bulgular

Çizelge 23. *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* ekstrelerinde total fenolik ve flavonoit içeriklerine ait bulgular

Ekstre	Total Poli Fenol İçeriği (GAE g/100 g) ^a	Total Flavonoit İçeriği (QE g/100 g) ^b
<i>E. purpurea</i>		
Radix MeOH	3,0 ± 0,2	0,70 ± 0,08
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	4,6 ± 0,4	0,55 ± 0,04
Radix kloroform	-	0,04 ± 0,03
Radix PE	-	0,01 ± 0,01
Radix PE→MeOH	4,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Herba MeOH	3,0 ± 0,1	0,18 ± 0,01
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	5,3 ± 0,4	0,18 ± 0,01
Herba kloroform	-	4,5 ± 0,7
Herba PE	-	0,8 ± 0,2
Herba PE→MeOH	4,6 ± 0,6	0,9 ± 0,1
<i>E. pallida</i>		
Radix MeOH	3,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	5,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Radix kloroform	-	0,04 ± 0,03
Radix PE	-	0,01 ± 0,01
Radix PE→MeOH	4,4 ± 0,5	2,2 ± 0,2
Herba MeOH	3,4 ± 0,3	0,09 ± 0,03
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	4,3 ± 0,7	0,07 ± 0,01
Herba kloroform	-	3,7 ± 0,9
Herba PE	-	0,8 ± 0,1
Herba PE→MeOH	4,9 ± 0,8	0,05 ± 0,01

^a.100 g ekstredeki gram cinsinden gallik asit (GA) eşdeğeri

^b 100 g ekstredeki gram cinsinden kersetin (QE) eşdeğeri

3.4. Antioksidan Aktiviteye Ait Bulgular

Çizelge 24. *Echinacea* ekstrelerinin 1,1-difenilpikrilhidrazil (DPPH) serbest radikal süpürücü aktivitesi

Ekstre\Dilüsyonlar	% DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite±S.E.M. ^a			
	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml	2,0 mg/ml
<i>E. purpurea</i>				
Radix MeOH	7,68±0,47	15,41±0,43	26,54±2,41	47,26±3,13
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	16,30±0,32	21,71±1,24	32,79±2,71	68,75±1,62
Radix kloroform	11,88±0,52	13,05±0,22	17,72±0,52	21,75±0,32
Radix PE	10,93±0,88	11,77±0,54	12,32±0,34	15,13±0,87
Radix PE→MeOH	8,95±0,83	17,43±0,50	32,20±3,22	56,76±1,89
Herba MeOH	16,70±0,50	22,70±1,37	36,37±0,88	61,37±106
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	19,77±0,71	27,70±0,72	41,74±1,11	56,32±1,06
Herba kloroform	-	6,07±0,17	8,02±0,57	10,43±0,46
Herba PE	- ^b	-	2,45±1,08	5,45±0,99
Herba PE→MeOH	12,21±1,39	20,86±0,26	33,29±0,73	53,77±2,37
<i>E. pallida</i>				
Radix MeOH	14,92±0,38	22,95±1,16	31,14±1,58	47,21±3,59
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	10,85±0,76	17,07±0,60	27,53±0,39	46,53±1,48
Radix kloroform	15,88±0,98	23,06±0,40	32,81±0,63	49,03±1,13
Radix PE	11,14±0,60	11,44±0,99	14,45±0,22	16,43±1,21
Radix PE→MeOH	15,88±0,98	23,06±0,40	32,81±0,63	49,03±1,13
Herba MeOH	5,26±0,79	10,05±0,64	17,62±0,96	31,36±2,39
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	12,63±0,71	20,33±0,95	32,27±1,54	53,32±3,59
Herba kloroform	-	2,37±0,71	5,85±0,77	8,44±0,01
Herba PE	10,62±0,55	11,41±0,38	11,67±0,50	12,53±0,65
Herba PE→MeOH	15,79±1,89	20,91±0,58	30,14±0,07	43,27±1,24
Kafeik asit	93,21±0,22	94,51±0,44	95,72±0,64	96,36±0,52
Klorojenik asit	90,43±1,66	93,76±0,48	95,56±0,38	96,56±0,14
Referanslar				
Bütilhidroksi anisol (BHA)	-- ^c	77,99±0,48	81,60±1,67	82,94±0,68
Gallik asit	--	91,61±0,06	92,57±0,10	93,19±0,10

^aS.E.M.: Standart ortalama hata (Standard error mean), ^b -: Aktivite yok, ^c -: Test edilmedi

Çizelge 25. *Echinacea* ekstrelerinin demir bağlama kapasitesi

Ekstre\Dilüsyonlar	% Demir Bağlama Kapasitesi±S.E.M. ^a			
	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml	2,0 mg/ml
<i>E. purpurea</i>				
Radix MeOH	- ^b	-	-	3,19±0,96
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	-	3,86±1,29
Radix kloroform	-	-	17,95±0,92	28,37±2,24
Radix PE	-	-	27,50±2,69	37,43±2,71
Radix PE→MeOH	-	-	-	-
Herba MeOH	-	-	-	17,11±0,78
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	14,23±2,90	37,20±1,56
Herba kloroform	34,27±3,76	44,00±2,85	56,90±2,75	81,31±1,72
Herba PE	-	-	-	7,30±0,14
Herba PE→MeOH	10,37±1,85	10,93±1,31	12,96±1,89	18,76±1,08
<i>E. pallida</i>				
Radix MeOH	-	5,59±0,71	9,81±1,53	15,42±2,67
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	-	9,18±1,60
Radix kloroform	-	-	9,46±1,38	31,99±1,37
Radix PE	29,63±1,95	30,90±0,71	48,57±2,11	46,07±1,66
Radix PE→MeOH	-	5,20±1,07	9,30±0,32	13,87±1,30
Herba MeOH	-	-	-	-
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	23,17±3,52	35,73±0,29
Herba kloroform	-	-	9,46±1,38	31,99±1,37
Herba PE	26,70±1,70	30,83±1,50	37,70±2,12	55,10±3,53
Herba PE→MeOH	-	-	-	5,15±0,20
Kafeik asit	93,19±0,25	94,47±0,48	95,67±0,61	96,30±0,50
Klorojenik asit	69,90±1,65	93,73±0,45	95,50±0,36	96,53±0,15
Referanslar				
Bütihidroksi anisol (BHA)	-- ^c	32,05±1,62	26,94±1,48	21,71±1,10

^aS.E.M.: Standart ortalama hata (Standard error mean), ^b-: Aktivite yok, ^c--: Test edilmedi

3.5. Antikolinesteraz Aktiviteye Ait Bulgular

Çizelge 26. *Echinacea* ekstrelerinin asetilkolinesteraz inhibitör aktivitesi

Ekstre\Dilüsyonlar	% Asetilkolinesteraz İnhibitör Aktivite \pm S.E.M. ^a			
	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml	2,0 mg/ml
<i>E. purpurea</i>				
Radix MeOH	- ^b	5,93 \pm 0,69	6,31 \pm 0,18	11,30 \pm 2,06
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	15,54 \pm 0,71	15,60 \pm 3,59
Radix kloroform	-	-	8,67 \pm 0,95	15,19 \pm 1,34
Radix PE	-	-	11,30 \pm 0,88	11,70 \pm 0,69
Radix PE→MeOH	-	-	-	9,44 \pm 0,32
Herba MeOH	-	2,70 \pm 0,09	9,76 \pm 0,55	10,47 \pm 1,94
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	8,57 \pm 1,17	9,28 \pm 2,32
Herba kloroform	7,32 \pm 0, 0,23	13,54 \pm 0,54	19,42 \pm 0,69	27,73 \pm 2,73
Herba PE	13,28 \pm 1,88	13,49 \pm 0,21	14,01 \pm 0,25	28,25 \pm 1,65
Herba PE→MeOH	-	-	12,51 \pm 2,92	24,22 \pm 3,72
<i>E. pallida</i>				
Radix MeOH	-	10,79 \pm 0,53	15,07 \pm 0,42	15,87 \pm 2,60
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	12,15 \pm 1,78	10,86 \pm 0,45	11,59 \pm 0,97	12,06 \pm 2,24
Radix kloroform	-	-	18,89 \pm 2,26	19,22 \pm 2,84
Radix PE	-	-	11,71 \pm 0,02	34,77 \pm 1,92
Radix PE→MeOH	-	-	11,60 \pm 0,13	15,31 \pm 1,31
Herba MeOH	-	3,86 \pm 0,30	9,34 \pm 0,16	14,05 \pm 1,22
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	-	10,78 \pm 0,18
Herba kloroform	5,22 \pm 0,97	7,78 \pm 0,04	10,09 \pm 1,19	21,72 \pm 2,98
Herba PE	-	-	-	22,12 \pm 2,91
Herba PE→MeOH	-	-	-	14,14 \pm 0,01
Kafeik asit	-	-	11,66 \pm 0,50	18,18 \pm 2,89
Klorojenik asit	-	-	11,79 \pm 0,37	16,89 \pm 1,38
Referans				
Galantamin	-- ^c	--	98,97 \pm 0,24	--

^aS.E.M.: Standart ortalama hata (Standard error mean), ^b-: Aktivite yok, ^c--: Test edilmedi

4. TARTIŞMA

Bu tez çalışması ile Türkiye’de ilk defa Konya’da Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi’nde geniş çapta kültürü yapılan *Echinacea purpurea* (L.) Moench. ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. üzerinde farmakognozic araştırmalar yapılmıştır. Günümüzde tıbbi ve ekonomik açıdan değeri çok yüksek olan *Echinacea* türlerinin ülkemizde yetiştirilebiliyor olması bizim için bir gurur kaynağıdır.

Ancak bu bitkilerden tıbbi olarak yararlanabilmek ve ülke ekonomisine kazandırmak için ülkemizde ve dünyada kabul edilen başvuru kaynağı olarak Avrupa Farmakopesi’nin belirlediği kalite özelliklerine uygunluğunun saptanması gerekmektedir. Bu nedenle çalışmada ülkemizde kültürü gerçekleşen *E. purpurea* ve *E. pallida* türlerinin fitokimyasal içeriği Avrupa Farmakopesi’nde bildirilen YBSK yöntemi kullanılarak, hesaplanan etken madde miktarlarının, istenen düzeylerde olup olmadığı araştırılmıştır.

Avrupa Farmakopesi’ne göre *E. purpurea* köklerinde kikorik asit ve kaftarik asit miktarları toplamı kuru drogta % 0,5’in altında, herbasında % 0,1’in altında olmamalıdır. Kurutulmuş *E. pallida* kökleri ise % 0,2’den az ekinakozit içermemelidir. Çizelge 27.’de çalışmamızda elde ettiğimiz fitokimyasal bulgular verilmiştir. *Echinacea* türlerinin içerdiği bileşiklerin teşhisinde Avrupa Farmakopesi’nde verilen relatif retansiyon zamanlarından, SK-KS’den elde edilen molekül ağırlıklarından (SK-KS yöntemi EP yönteminden modifiye edilerek uygulanmıştır) ve literatürdeki (Pellati ve ark. 2005) DAD-UV spektrum verilerinden faydalanılmıştır.

Elde edilen bulgular, *E. pallida* herbasının ekinakozit içermediğini (yurt dışında kültüre edilenlerle uyum içerisindedir), ölçülen kikorik asit ve kaftarik asit miktarlarının ise *E. purpurea* herba ve kökleri ile karşılaştırıldığında daha düşük olduğunu göstermiştir. *E. pallida* köklerinde ekinakozit miktarı Avrupa

Farmakopesi'nde belirtilen limit miktarın üstünde bulunmuş ve Avrupa Farmakopesi'ne uygun olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 27. *E. purpurea* ve *E. pallida*'da miktar tayini bulguları ve Avrupa Farmakopesinde istenen miktarlar

<i>E. purpurea</i>	Kaftarik Asit(%)	Kikorik Asit (%)	Ekinakozit (%)	Toplam (%)
Radix	0,5137 ±0,0050	1,3007 ±0,0025	-	1,8143 ±0,0075
Herba	0,5493 ±0,0015	0,9687 ±0,0021	-	1,5180 ±0,0010
<i>E. pallida</i>	Kaftarik Asit(%)	Kikorik Asit (%)	Ekinakozit (%)	Toplam (%)
Radix	-	-	0,2230±0,0040	0,2230 ±0,0040
Herba	0,1157 ±0,0015	0,2430 ±0,0030	-	0,3587 ±0,0015
EP6	Kaftarik Asit(%)	Kikorik Asit(%)	Ekinakozit(%)	Toplam(%)
<i>E. purpurea</i> Kök	+	+	-	0,5
<i>E. purpurea</i> Herba	+	+	-	0,1
<i>E. pallida</i> Kök	-	-	+	0,2

E. purpurea herba ve köklerinde hesaplanan kikorik asit ve kaftarik asit miktarları hem ayrı olarak hem de toplamda Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen miktarların çok üstünde bulunmuş ve Avrupa Farmakopesi'ne uygun olduğu tespit edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarda kurutulmuş *E. purpurea* topraküstü kısımlarındaki kikorik asit miktarı % 0,52-4,93 arasında değiştiği bildirilmiştir (Letchamo ve ark. 2002, Perry ve ark. 2001, Upton ve ark. 2007). Kaftarik asit miktarları ise % 0,18-0,82 arasında değişmektedir (Perry ve ark. 2001). Kurutulmuş *E. purpurea* köklerinde kikorik asit miktarının % 0,6-2,4 arasında olduğu kaydedilmiştir (Gruenwald ve ark., 2004; Stuart ve Wills, 2000). *E. purpurea* köklerindeki kaftarik asit miktarı ise % 0,24-0,41 oranında değişiklik gösterdiği bildirilmiştir (Binns ve ark. 2002; Perry ve ark. 2001).

Kurutulmuş *E. pallida* köklerinde ekinakozit miktarı % 0,5-1,2 oranında bulunmaktadır (Bauer ve ark., 1988a; Binns ve ark., 2002; Pellati ve ark., 2005). Ekinakozit, *E. pallida* çiçeklerinde ve yapraklarında ise eser miktarda bulunmaktadır (Cheminat ve ark.,1988). Binns ve arkadaşlarının yaptığı fitokimyasal çalışmada kurutulmuş *E. pallida* herbasındaki ekinakozit, kikorik asit ve kaftarik asit miktarları sırasıyla % 0,056, % 0,118 ve % 0,023 olarak bildirilmiştir (Binns ve ark., 2002).

Daha önce yapılan çalışmalarla karşılaştırma yaparken, madde miktarlarının kültür şartları, toplanma zamanı, saklama koşulları ve analiz yöntemine göre farklılıklar gösterdiğini göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Elde ettiğimiz bulgulara göre, Türkiye’de kültürü yapılan *Echinacea purpurea* (L.) Moench. ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. içeriğindeki kafeik asit türevlerinden kikorik asit, kaftarik asit ve ekinakozitin miktar açısından hem Avrupa Farmakopesi’ne hem de daha önce literatürlerde bildirilen miktarlarla uyum içerisinde olduğu görülmüştür.

Daha önce yapılan çalışmalarda *E. purpurea* ve *E. pallida* çiçeklerinin uçucu yağ kompozisyonuna ilişkin veriler Çizelge 28’de açıklanmıştır. Önceki çalışmalarla karşılaştırmayı kolaylaştırmak için tez çalışmamızda, uçucu yağ analizinde tespit edilen majör uçucu yağ bileşenleri de Çizelge 29.’da görülmektedir.

Çizelge 28. *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* çiçeklerinde uçucu yağ kompozisyonu

Bitki ve Kısımları	Başlıca Terpenik ve Uçucu Bileşikler	Kaynak
<i>E. purpurea</i>		
Çiçek	Nerolidol (% 6,6), α-pinen (%5,1), germakren D (%4,8), α-fellandren (%4,3), β-pinen (% 7,8)	Holla ve ark., 2005
	Germakren D (% 7,2-33,5), mirsen (% 10,5-26,1), β-pinen (%<0,1-13), α-pinen (% 1,7-10,3), β-karyofilen (% 0,5-9,3), 1,8-pentadekadien (%1,0-7,5), kübeben (% 0,3-7,0)*	Thappa ve ark., 2004*
	Germakren D (%57), β-karyofilen (%4,6), α-fellandren (%3,2), α-kadinol (%2,4)	Mirjalili ve ark., 2006
<i>E. pallida</i>		
Çiçek	Germakren D (%51,4), spatulenol (%4,3), α-kadinol (%4,3), (Z,Z)-farnesol (%3,4)	Mirjalili ve ark., 2006
	β-mirsen, β-pinen, α-pinen, kamfen, trans-osimen**	Mazza ve Cottrel, 1999

(*)Bu çalışmada temmuz ayından aralığa kadar olan dönemde uçucu yağ kompozisyonundaki değişim incelenmiştir.(**) Bu çalışmada maddeler en yüksek miktardan düşük miktarlara doğru sıralanmıştır.

Gerek kendi çalışmamız, gerekse önceki çalışmalarda her iki türde de majör uçucu yağ bileşeni olarak germakren-D'yi görmekteyiz. Bununla birlikte uçucu yağ kompozisyonundaki farklılıklar kültür şartları, analiz yöntemi ve toplanma zamanı gibi etkenlere bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Thappa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Temmuz ayından Aralık ayına kadar olan dönemde toplanan *E. purpurea* çiçeklerinin uçucu yağ kompozisyonundaki değişim incelenmiştir ve farklar Çizelge 28.'de gösterilmiştir (Thappa ve ark., 2004).

Çizelge 29. Tez çalışmasındaki uçucu yağ analizinde miktarları belirlenen majör bileşenler.

	Bileşik	Ri^a	(%) Alan (<i>E. purpurea</i>)	(%) Alan (<i>E. pallida</i>)
1	α -pinen	1005	4,24	1,46
3	β -pinen	1088	3,31	1,49
6	α -fellandren	1145	7,06	0,83
7	Limonen	1177	1,53	3,41
21	Bornil Asetat	1552	0,11	5,17
23	β -karyofillen	1573	3,13	3,36
27	Germakren-D	1700	51,60	25,35
28	Bisiklogermakren	1718	2,35	-
38	Karyofillenoksit	1979	-	3,37
40	(<i>E</i>) Nerolidol	2019	2,48	1,93
42	Germakren-D-4-ol	2037	-	2,47
46	T-muurool	2172	2,23	-
47	α -kadinol	2218	-	2,13

Çalışmamızda yer alan *Echinacea* türlerini karşılaştırdığımızda majör olarak germakren-D'yi görmekteyiz. Fakat *E. purpurea* uçucu yağında % 7,06 oranında α -fellandren bulunurken *E. pallida*'da bu oran % 0,83'tür. Ayrıca α -pinen ve β -pinen *E. purpurea* uçucu yağında öne çıkarken *E. pallida* uçucu yağında biraz daha düşük miktardadır. İki uçucu yağ da yakın konsantrasyonda β -karyofillen içermektedir. *E. pallida* uçucu yağında germakren-D dışında bornil asetat öne çıkmaktadır. *Echinacea* uçucu yağı üzerinde daha önce yapılan çalışmalarda bornil asetat varlığı farklı türlerde ve farklı organlarda belirlenmiş olsa da *E. pallida* çiçeklerinde daha önce tespit edilmemiştir. *E. pallida* uçucu yağında limonen, karyofillen oksit, germakren-D-4-ol varlığı ve yüzde miktarları çalışmamızda kullandığımız *E. purpurea* uçucu yağı ve *E. pallida* uçucu yağı arasındaki başlıca farklılardan birkaçı olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada yapılan antioksidan aktivite tayini çalışmaları, DPPH serbest radikal süpürücü etki ve metal şelasyon aktivite tayin yöntemleri kullanılarak yapılmıştır. Deneylede farklı polaritede çözücülerle hazırlanmış *E. purpurea* ve *E. pallida* topraküstü ve kök ekstraları kullanılmıştır. Ayrıca ekstralardan elde edilen aktivite sonuçlarıyla fitokimyasal içerikleri arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi için deneyde kullanılan 20 ekstrenin YBSK, SK-KS analizleri, total fenolik madde ve total flavonoit tayini yapılmıştır.

Echinacea ekstralarında alınan sonuçlar DPPH serbest radikal süpürücü aktivitenin çok güçlü olmadığını göstermektedir. 20 ekstreden sadece 6'sı %50'nin üzerinde etkinlik göstermiştir. Ekstreler arasında en yüksek süpürücü aktiviteyi *E. purpurea* kök % 70 etanol ekstresi (2mg/ml konsantrasyonda % 68,75) göstermiştir. *E. pallida*'da en yüksek aktivite %53,32 ile herbadan hazırlanan % 70 etanol ekstresinde (2mg/ml konsantrasyon) tespit edilmiştir. Çizelge 34. ve Çizelge 35.'e bakıldığında etkinin daha yüksek olduğu ekstralarda kafeik asit türevlerinin ve polifenol içeriğinin diğerlerine göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Daha önce yapılan bir çalışmada *E. purpurea* ve *E. pallida* metanollü kök ekstralarının DPPH radikal süpürücü aktiviteleri araştırılmıştır. *E. pallida* ekstresi 0,8 mg/ml konsantrasyonda % 80 inhibisyon yaparken aynı konsantrasyonda *E. purpurea* ekstresinin inhibisyonu % 40'ın altında kalmıştır (Hu ve Kitts, 2000).

Pellati ve arkadaşları *E. purpurea* ve *E. pallida* % 80 metanollü kök ekstralarının yanında tek başına ekinakozit, kikorik asit ve kaftarik asitin de DPPH radikal süpürücü aktivitesini araştırmıştır. Saf maddeler içinde en güçlü etkinlik ekinakozitte ($EC_{50}= 6,6 \mu M$), ikinci olarak kikorik asitte ($EC_{50}= 8,6 \mu M$) ve en düşük kaftarik asitte ($EC_{50}= 20,5 \mu M$) saptanmıştır. Ekstreler arasında *E. purpurea* ($EC_{50}= 134 \mu g/ml$), *E. pallida* ($EC_{50}= 167 \mu g/ml$) ekstresine göre daha etkili bulunmuştur (Pellati ve ark., 2004). 2005'te yapılan başka bir çalışmada *E. purpurea* ve *E. pallida* % 80 metanollü kök ekstralarının DPPH radikal süpürücü aktivitesi araştırılmış, *E. purpurea*'nın ($EC_{50}= 139 \mu g/ml$), *E. pallida* ($EC_{50}= 249 \mu g/ml$) ekstresine göre yine daha etkili olduğu bulunmuştur (Pellati ve ark., 2005).

Miliauskas ve arkadaşları 2,5 mg/ml konsantrasyondaki *E. purpurea* herba aseton (%14,2), metanol (% 6,8) ve etil asetat (%3,5) ekstralarının DPPH radikal süpürücü aktivitelerinin, *Salvia officinalis* (% 92,6), *Salvia sclerea*, *Geranium macrorrhizum* ve *Juglans regia* gibi türlerde tespit edilen DPPH radikal süpürücü aktivitelere göre zayıf kaldığını bildirmiştir (Miliauskas ve ark., 2004).

Daha önce yapılan çalışmalara bakıldığında DPPH radikal süpürücü aktivitenin farklı bitkilere göre düşük olması ve *E. purpurea* ekstralarının *E. pallida* ekstralarına göre daha aktif bulunması elde edilen bulgularla paralellik göstermektedir.

Çizelge 30. Bazı *Echinacea* ekstralarının (DPPH) serbest radikal süpürücü aktivitesi

Ekstre\Dilüsyonlar	% DPPH Serbest Radikal Süpürücü Aktivite±S.E.M. ^a			
	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml	2,0 mg/ml
<i>E. purpurea</i>				
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	16,30±0,32	21,71±1,24	32,79±2,71	68,75±1,62
Radix PE → MeOH	8,95±0,83	17,43±0,50	32,20±3,22	56,76±1,89
Herba MeOH	16,70±0,50	22,70±1,37	36,37±0,88	61,37±106
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	19,77±0,71	27,70±0,72	41,74±1,11	56,32±1,06
Herba PE →MeOH	12,21±1,39	20,86±0,26	33,29±0,73	53,77±2,37
<i>E. pallida</i>				
Radix kloroform	15,88±0,98	23,06±0,40	32,81±0,63	49,03±1,13
Radix PE →MeOH	15,88±0,98	23,06±0,40	32,81±0,63	49,03±1,13
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	12,63±0,71	20,33±0,95	32,27±1,54	53,32±3,59

^aS.E.M.: Standart ortalama hata (Standard error mean), ^b-: Aktivite yok, ^c--: Test edilmedi

Kikorik asitin DPPH radikal inhibisyon miktarının rosmarinik asitle benzerlik gösterdiği ve *Echinacea* türlerinde bulunan kafeik asit türevleri içinde ekinakozitten sonraki en yüksek etkinliğe sahip olduğu daha önceki çalışmalarda bulunmuştur (Pellati ve ark., 2004; Thygesen ve ark., 2007.). Düşük DPPH radikal süpürücü aktivitenin nedenlerinden biri de ekstradaki düşük kikorik asit miktarı olarak düşünülebilir.

Çizelge 31. Bazı *Echinacea* ekstraları ve kafeik asit türevleri miktarları

Ekstre	Ekinakozit (%)	Kaftarik asit (%)	Kikorik asit (%)
<i>E. purpurea</i>			
Radix MeOH	-	0,1974 ±0,0012	2,0492 ±0,0053
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	-	0,3466 ±0,0009	2,6621 ±0,0081
Radix PE → MeOH	-	0,1637 ±0,0005	1,7047 ±0,0077
Herba MeOH	-	0,2324 ±0,0015	1,9725 ±0,0056
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	-	0,4171 ±0,0013	3,1550 ±0,0107
Herba kloroform	-	0,0735 ±0,0002	0,2027 ±0,0006
Herba PE → MeOH	-	0,2324 ±0,0015	0,3944 ±0,0010
<i>E. pallida</i>			
Radix MeOH	0,0735 ±0,0002	-	-
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	1,9342 ±0,0050	-	-
Radix kloroform	0,0262 ±0,0001	-	-
Radix PE → MeOH	2,1340 ±0,0056	-	-
Herba kloroform	-	0,0114 ±0,0001	0,0261 ±0,0002
Herba PE	-	0,0105 ±0,0002	0,0117 ±0,0002
Herba PE → MeOH	-	0,1073 ±0,0005	0,8110 ±0,0021

Echinacea türlerine ait ilk metal-şelasyon aktivite tayini bu çalışmada yapılmıştır. Bu konuda daha önce yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır. Ekstrelerden alınan sonuçlara bakıldığında çok yüksek aktivite görülememiştir. Ancak *E. purpurea* herba kloroform ekstresi en yüksek şelasyon aktivitesini (% 81,31) göstermiştir. *E. purpurea* herba kloroform ekstresi, *E. pallida* herba kloroform ekstresi ile birlikte en yüksek total flavonoit içeriği saptanan örneklerdir. Bunun yanında bu iki kloroform ekstresi çok düşük miktarda kaftarik asit ve kikorik asit içermektedir.

Çizelge 32. *Echinacea* ekstralarından demir bağlama kapasitesi yüksek bulunanlar

Ekstre\ Dilüsyonlar	% Demir Bağlama Kapasitesi ± S.E.M. ^a			
	0,25 mg/ml	0,5 mg/ml	1,0 mg/ml	2,0 mg/ml
<i>E. purpurea</i>				
Radix kloroform	-	-	17,95±0,92	28,37±2,24
Radix PE	-	-	27,50±2,69	37,43±2,71
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	14,23±2,90	37,20±1,56
Herba kloroform	34,27±3,76	44,00±2,85	56,90±2,75	81,31±1,72
<i>E. pallida</i>				
Radix kloroform	-	-	9,46±1,38	31,99±1,37
Radix PE	29,63±1,95	30,90±0,71	48,57±2,11	46,07±1,66
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	-	-	23,17±3,52	35,73±0,29
Herba PE	26,70±1,70	30,83±1,50	37,70±2,12	55,10±3,53

^aS.E.M.: Standart ortalama hata (Standard error mean), ^b-: Aktivite yok, ^c--: Test edilmedi

Çizelge 33. Bazı *Echinacea purpurea* ve *E. pallida* ekstralarında total fenolik ve flavonoid içerikleri

Ekstre	Total Polifenol İçeriği (GAE g/100 g) ^a	Total Flavonoid İçeriği (QE g/100 g) ^b
<i>E. purpurea</i>		
Radix MeOH	3,0 ± 0,2	0,70 ± 0,08
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	4,6 ± 0,4	0,55 ± 0,04
Radix PE → MeOH	4,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Herba MeOH	3,0 ± 0,1	0,18 ± 0,01
Herba EtOH:H ₂ O (70:30)	5,3 ± 0,4	0,18 ± 0,01
Herba kloroform	-	4,5 ± 0,7
Herba PE → MeOH	4,6 ± 0,6	0,9 ± 0,1
<i>E. pallida</i>		
Radix MeOH	3,0 ± 0,2	1,2 ± 0,2
Radix EtOH:H ₂ O (70:30)	5,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1
Radix kloroform	-	0,04 ± 0,03
Radix PE → MeOH	4,4 ± 0,5	2,2 ± 0,2
Herba kloroform	-	3,7 ± 0,9
Herba PE	-	0,8 ± 0,1
Herba PE → MeOH	4,9 ± 0,8	0,05 ± 0,01

Anti-kolinesterazlar Alzheimer tedavisinde kullanılan ilaçlardır. Asetilkolinin yıkımını inhibe ederek santral ve periferik kolinerjik fonksiyonu güçlendirmektedir (Alaşehirli, 2005). *E. purpurea* ve *E. pallida* ekstralarında anti-asetilkolinesteraz aktivite tayini Ellman ve arkadaşları tarafından geliştirilen spektrofotometrik yöntemle yapılmıştır (Ellman ve ark., 1961). Bu çalışma *Echinacea* türlerine ait ilk anti-asetilkolinesteraz aktivite çalışmasıdır. Ancak deneyde test edilen *E. purpurea* ve *E. pallida*'ya ait hiçbir ekstrede anlamlı bir aktiviteyle karşılaşılmasıdır.

Soğuk algınlığında *Echinacea* ürünlerinin geniş kullanımı bulunmaktadır. Ancak bu ürünleri kullanan hekim, eczacı, ve tüketici, *Echinacea* başlığı altında temin edilebilen ürünlerin, kullanılan bitki türü ve bitki kısmına, ekstraksiyon yöntemine ve içeriğe eklenmiş başka bileşenlere göre değişkenlik gösterdiğinin farkında değildir. Soğuk algınlığı ve *Echinacea* ile ilgili 300 üzerinde (farmakolojik aktivite) makale bulunmaktadır (Caruso ve Gwaltney, 2005). Bu yüksek rakama rağmen çalışmalarda elde edilen sonuçlar sapmalar ve zıtlıklar göstermektedir (Woelkart ve ark., 2008b). Ürün çeşitliliğinin kimyasal içeriğe de yansması bu ürünlerin terapötik olarak karşılaştırılmasına olanak vermemektedir (Woelkart ve ark., 2008b). Bu nedenle soğuk algınlığında *Echinacea* kullanımı ile ilgili klinik çalışmalar değerlendirilmiş ve sorunları ele alınmıştır.

Bu sorunlar şu şekilde özetlenebilir:

- Yapılan çalışmalarda hedef ve sonuç ölçütlerinin (ön tedavi, bireysel tedavi ya da tedavi çalışmaları) farklılığı dolayısıyla karşılaştırma yapılamaması,
- Deney gruplarında ilk hastalık belirtilerinin gözlenmesini takiben tedavinin başlangıç zamanında farklılıkların olması,
- Yapılan klinik çalışmaların önemli bir miktarında kullanılan ürün ya da ekstre hakkında bilginin yetersiz olması ya da hiç olmaması,

şeklinde özetlenebilir (Linde ve ark., 2009; Woelkart ve ark., 2008b).

Linde ve arkadaşları 2006'da yayınladıkları ve güncelledikleri (2009) derlemede (Cochrane Review) yukarıda açıklanan sorunları göz önünde tutarak, soğuk algınlığında *Echinacea* kullanımı ile ilgili değerlendirme ölçütleri belirlemiş ve yapılan 52 klinik çalışmadan ancak 16 (2'si henüz yayınlanmamış) klinik çalışmayı değerlendirme ölçütlerine uygun bulmuştur. Bu derlemede yer alan yayınlanmış 14 çalışmadan sadece bir tanesinde *Echinacea*, tedavi grubu olarak değil aktif kontrol olarak kullanılmıştır (Linde ve ark., 2009). Geriye kalan 13 çalışmanın özetleri önceki Bölüm 1.2.2.2.'de sunulmuştur.

Cochrane Derlemesi (Linde ve ark.2009) her ne kadar 2009'da güncellenmiş olsa da içeriğe en son 2007 Eylül'ünde yayınlanmış çalışmalar dahil edilmiş, elde edilen yeni kanıtlar ışığında asıl güncelleme ve düzeltmeler, derlemenin tartışma ve sonuç kısımlarında yapılmıştır. Bu sebeple 2007 Eylül'den sonraki klinik çalışmalar yeni olmaları nedeniyle Linde ve arkadaşlarının ölçütleri dikkate alınmadan Bölüm 1.2.2.2.'de özetlenmiştir.

Bu tez çalışmasında Cochrane Derlemesi dikkate alınarak özetlenen klinik çalışmalarda kullanılan *Echinacea* ekstre ve preparatları genelde plasebodan istatistiksel olarak daha etkili bulunmuştur. Ancak soğuk algınlığında *Echinacea* kullanımı ile ilgili istatistiksel olarak anlamlı pozitif sonuçların alınmadığı çok sayıda çalışma olduğu da görülmektedir. Schoop ve arkadaşlarının (2006) yaptığı derlemede bu çalışmalarda etkinliğin düşük bulunması, örnekleme hacminin yeterli olmamasına bağlanmaktadır (Schoop ve ark., 2006). Ancak içeriği tam olarak tespit edilmiş (bütün etkili bileşikleri bilinen) standardize *Echinacea* ekstrelerinin etkinliğini değerlendirmek için iyi tasarlanmış ve uygun örnek hacmine sahip klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Piyasada bulunan *Echinacea* ürünlerinin büyük çoğunluğu klinik çalışmalarla test edilmemiştir. Bu konuda tüketicilerin seçici davranması, kimyasal içeriği tam olarak bilinen, standardize, etkinliği ve güvenilirliği klinik çalışmalarla test edilmiş ürünleri tercih etmesi önerilmektedir.

Linde ve arkadaşlarının derlemesinde yer alan çalışmalarda pozitif sonuçlar, herba preparatlarının kullanıldığı deneylerde kök preparatlarının kullanıldığı deneylere göre daha fazladır. Pozitif sonuç alınan sadece bir çalışmada, preparatın içeriğinde herba ve kök birlikte bulunmaktadır. Toplamda ise bu 13 çalışmanın 8'i pozitif sonuç veya sonuçlar içermektedir. Klinik çalışmalar ve buna eşlik eden biyolojik aktivite çalışmaları *Echinacea* ekstrelerinin etkili olduklarını göstermektedir. Bununla birlikte yapılan çalışmalar *E. purpurea* herba ve tüm bitki preparatlarının, kök preparatlarına göre daha etkili olduğunu düşündürmektedir. Bilinenin aksine etkinlik konusunda taze sıkılmış *E. purpurea* herba özütünün alkollü ekstrelerle aralarında belirgin bir fark yoktur.

Randomize klinik çalışmalarda *Echinacea* preparatlarının iyi tolere edildiği bildirilmiştir. *Echinacea* ile ilgili en muhtemel yan etki alerjik reaksiyonlardır. Duyarlı kişilerde *Echinacea* kullanımına bağlı alerjik reaksiyonlar oluşabilir (Linde ve ark., 2009). Bir klinik çalışmada *Echinacea* kullanımının çocuklarda döküntüye neden olduğunu bildirilmiştir (Taylor ve ark., 2003). Güvenilirlik açısından *Echinacea*'nın immün sistem rahatsızlığı olan hastalarda ve 1 yaş altı çocuklarda kullanımı önerilmemektedir. Hamilelikte kullanımı ile ilgili çalışmalarda yan etki gözlenmemiştir. Ancak bu konuda sınırlı sayıda çalışma bulunması nedeniyle gebelerin hekimleri önermedikçe kullanması sakıncalı görülmektedir (HPMC, 2008).

Echinacea preparatlarının 8 haftadan fazla kullanımı önerilmemektedir. Ancak uzun süreli *Echinacea* alımının zararlı olabileceği konusunda bir kanıt henüz yoktur. Bu

sınırlamanın nedeni uzun süreli kullanımla ilgili herhangi bir çalışmanın olmamasıdır.

Echinacea türlerinin fitokimyasal olarak içeriğinde farklı polaritede birçok etken madde bulundurması, bunlardan bazılarının ısıya dayanaksız olması, ekstraksiyon çözücüsü ve ekstraksiyon yöntemi seçimini önemli kılmaktadır. Daha önce yapılan biyolojik aktivite çalışmalarında *Echinacea* ekstrelerinin, bu ekstrelerden izole edilen saf maddelerden daha aktif olduğu görülmektedir. Yani *Echinacea* fitokimyasalları etki konusunda birbirini tamamlamakta, kombine etki göstermektedir. Polar polisakkaritler (immünoestimulan), kafeik asit türevleri (anti-oksidan) ve non-polar alkamidlerin (ağrı kesici, anti-enflamatuvar) bir ekstreye aynı anda çekilebilmesi gerekmektedir. Gerek bu çalışmada elde edilen bulgular, gerekse literatür bilgilerine dayanarak ekstraksiyon için gerekli çözücünün % 50-80'lik alkol olması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Echinacea purpurea herba ve köklerinden hazırlanan formülasyonlar için fitokimyasal veriler, klinik çalışmalar ve yayınlanmış monograflardan hareketle şu dozlar önerilmektedir:

Herba

Taze sıkılmış özüt (% 21,6 etanolde): 7,5-10 ml/gün

Kurutulmuş toz bitkisel materyal: 2,5-6 g/gün

Sıvı ekstre (1:1 g/ml, % 70 etanol): 3-5,5 ml/gün (tüm bitkiden)

Kök

Kurutulmuş toz bitkisel materyal: 1,5-4,5 g/gün

Tentür (1:5 g/ml, % 70 etanol): 7,5-22,5 ml/gün

Echinacea pallida köklerinden hazırlanan formülasyonlar için fitokimyasal veriler, klinik çalışmalar ve yayınlanmış monograflardan hareketle şu dozlar önerilmektedir:

Kök

Tentür (1:5 g/ml, % 50 etanol): 4,5 ml/gün (900 mg kuru droğa eşdeğer)

Echinacea türlerinin tıbbi faydalarının yanında ekonomik olarak çok büyük bir değere sahiptir. *Echinacea purpurea* (L.) Moench. ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. türlerinin ülkemizde kültürünün yapıyor olması ülke ekonomisi açısından büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması Konya ekolojik şartlarında yetiştirilen *Echinacea purpurea* ve *Echinacea pallida*'nın Türk ilaç sanayii için nitelikli birer hammadde olabileceği konusundaki başlangıç çalışmalarını içermektedir. Kalite, kimyasal içerik ve biyolojik aktivite çalışmalarında alınan sonuçlar, Avrupa Farmakopesi ve mevcut literatürle paralellik göstermektedir.

Bundan sonra yapılacak çalışmalarda, Türkiye'de yetişen *Echinacea* türlerinden standardize ekstre ve ekstrelerinin eldesi ve uygun farmasötik formlarda piyasaya sunulması, hem yurt içi hem de yurt dışı pazarlarında yer alması sağlanarak Türk ilaç sanayiine ve ekonomisine kazandırılması hedeflenmelidir.

Ülkemizde de bu ürünlerin üretilebileceği açıkça ortadadır.

ÖZET

Türkiye'de Kültürü Yapılan *E. purpurea* (L.) Moench ve *E. pallida* (Nutt.) Nutt Türleri Üzerinde Farmakognozik Araştırmalar

Echinacea türleri Asteraceae familyasından Kuzey Amerika orijinli bitkiler olup fitoterapi ve homeopati'de kullanılmaktadır. *Echinacea* türleri Amerika yerlileri tarafından haricen yara iyi edici; dahilen ise baş ağrısı, mide ağrısı ve öksürük kesici olarak kullanılmıştır. Farmakolojik olarak bu endikasyonlarda kullanımı kanıtlanmasa da immünostimülan etkileri birçok deneysel yöntemle ortaya çıkarılmıştır. *Echinacea* bitkisi herbası ve köklerinden hazırlanan preparatlar tekrar eden üst solunum yolu ve üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde yardımcı olarak kullanılmaktadır. Bugün, *Echinacea* türlerinden elde edilen ekstre ve preparatlar Avrupa ülkeleri ile birlikte A.B.D'de bitkisel ilaç pazarından yüksek bir paya sahiptir. Türkiye Konya ekolojik koşullarında yürütülen 3 yıllık kültür deneme sonuçlarına göre, *Echinacea purpurea* (L.) Moench. ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. türlerinin İç Anadolu Bölge'si koşullarında yetiştirilebileceği ortaya çıkmıştır. Ülkemizde üretilen *Echinacea* ürünlerinin, ilaç sanayi tarafından değerlendirilmesi, ülke ekonomimiz açısından önem taşımaktadır.

Bu çalışmada ülkemizde *E. purpurea* ve *E. pallida* kök ve herbalarındaki bazı kafeik asit türevlerinin (kaftarik asit, kikorik asit, ekinakozit) miktarları Avrupa Farmakopesi'nde bildirilen YBSK yöntemi kullanılarak araştırılmıştır. Hesaplanan etken madde miktarlarının, Avrupa Farmakopesi'ne ait alt sınırların üstünde olduğu bulunmuştur.

Echinacea purpurea ve *E. pallida* çiçeklerinin uçucu yağ kompozisyonu araştırılmış, her iki türde de majör uçucu yağ bileşeni olarak germakren-D bulunmuştur.

DPPH serbest radikal süpürücü etki ve metal şelasyon aktivite (ilk defa) tayin yöntemleri kullanılarak antioksidan aktivite çalışmaları yapılmıştır. Deneylede 4 farklı çözücüyle (metanol, etanol:su-70:30, kloroform, petrol eteri ve petrol eteri sonrası metanol) kullanarak Soxhlet cihazında elde edilmiş, *E. purpurea* ve *E. pallida* topraküstü ve kök ekstraları kullanılmıştır. DPPH radikal süpürücü aktivite, ekstrelerde düşük (% 68 en yüksek) bulunmuştur. Metal şelasyon aktivitesi ise *E. purpurea* herba kloroform ekstresi (% 81) dışında yine yüksek çıkmamıştır. Ayrıca ekstrelerden elde edilen aktivite sonuçlarıyla fitokimyasal içerikleri arasındaki ilişkinin anlaşılabilmesi için deneyde kullanılan 20 ekstrenin YBSK, SK-KS analizleri, total fenolik madde ve total flavonoit tayini yapılmıştır. Aktivitesi yüksek ekstrelerin kafeik asit türevleri, polifenol içeriği ve flavonoit içeriğinin diğer ekstrele göre daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Antikolinesteraz aktivitenin tayini amacıyla 4 farklı çözücüyle (metanol, etanol:su-70:30, kloroform, petrol eteri ve petrol eteri sonrası metanol) hazırlanmış *E. purpurea* ve *E. pallida* topraküstü ve kök ekstraları kullanılmış ancak hiçbir ekstre etkinlik göstermemiştir. Bu çalışma *Echinacea*'ya ait ilk antikolinesteraz aktivite çalışmasıdır.

Anahtar Kelimeler: *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida*, alkamidler, kafeik asit, kikorik asit

SUMMARY

Pharmacognosic Research on *Echinacea purpurea* (L.) Moench ve *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt Cultivated in Turkey

Echinacea species of North American origin of the Asteraceae family are the plants which are used in phytotherapy and homeopathy. *Echinacea* species were used by indigenous Americans, externally for wounds; internally for the headaches, stomach pains and coughing. Despite of the unproven pharmacological indications, their immunostimulant effects were experimentally revealed. *Echinacea* preparations which are prepared from root and herb are used as supportive in the treatment of chronic upper respiratory tract infections. Today, the extract obtained from *Echinacea* species and preparations have a great share in the countries of Europe and in the U.S. market of herbal medicines. In Konya (Turkey) ecological conditions 3-year cultivation experiments were carried out and according to the results, it is concluded that *Echinacea purpurea* (L.) Moench. and *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. can be cultivated in the Central Anatolia Region. *Echinacea* products, which are produced in our country should be considered by the Turkish pharmaceutical industry and it is crucial for our economy.

In this study, by using the HPLC method declared in European Pharmacopeia, the content of some caffeic acid derivatives (caftaric acid, cichoric acid, echinacoside) in *E. purpurea* and *E. pallida* was investigated. It was found that the levels of these components are above the minimum limits of European Pharmacopeia.

Volatile oil compositions of the flowers of *Echinacea purpurea* and *E. pallida* were investigated and in both species the major component of the volatile oil was found to be germacrene-D.

Antioxidant activity was carried out using DPPH free radical scavenging activity and metal chelating activity (first time) methods. For the experiments, root and herb extracts of *E. purpurea* and *E. pallida* obtained using Soxhlet extractor with different solvents (methanol, ethanol:water-70:30, chloroform, petroleum ether, methanol after petroleum ether) were employed. Occurrence of scavenging activity of the extracts against DPPH was found to be low, 68 % inhibition being the highest. Maximum metal chelating activity was demonstrated by the chloroform extract of *E. purpurea* herb (81 %). The activity data obtained from the extracts are supported by phytochemical experiments such as HPLC analysis of caffeic acid derivatives, total phenol and total flavonoid contents. The higher antioxidant activity accompanied by higher caffeic acids, higher polyphenol and flavonoid contents.

For anticholinesterase activity, the root and herb extracts of *E. purpurea* and *E. pallida* which were obtained using Soxhlet extractor with different solvents (methanol, ethanol:water-70:30, chloroform, petroleum ether, methanol after petroleum ether) were employed. But there were no significant effects. This is the first anticholinesterase activity study of *Echinacea* species.

Keywords: *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida*, alkaloids, caffeic acid, cichoric acid

KAYNAKLAR

- ABBASI, B.H., SAXENA, P.K., MURCH, S.J., LIU, C.Z. (2007). *Echinacea* biotechnology: challenges and opportunities, *In vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, **43**: 481-492
- AGNEW, L. L., GUFFOGG, S. P., MATTHIAS, A., LEHMANN, R. P., BONE, K. M., WATSON, K. (2005). *Echinacea* intake induces an immune response through altered expression of leucocyte hsp70, increased white cell counts and improved erythrocyte antioxidant defences, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **30**: 363-369
- ALAŞEHİRLİ, B. (2005). Kolinesteraz inhibitörleri (antikolinesterazlar), *Journal of Internal Medical Sciences*, **1**: 47-57
- ARDREY, R.E. (2003). Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. The Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, England: John Wiley and Sons Ltd.
- ARNASON, J.T., BAUM, B.R., BINNS, S.E. (2006). Integrating recent knowledge about the genus *Echinacea*: morphology, molecular systematics, phytochemistry, *HerbalGram*, **72**: 32-46
- BALOGH, M.P. (2005). Emerging technologies in the mass spectrometry arsenal, *Spectroscopy*, **20**: 54-59
- BARRETT, B.P., BROWN, R.L., LOCKEN, K., MABERRY, R., BOBULA, J.A., D'ALESSIO, D. (2002). Treatment of the common cold with unrefined *Echinacea*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Annals of Internal Medicine*, **137**: 939-946
- BARRET, B. (2003). Medicinal properties of *Echinacea*: A critical review, *Phytomedicine*, **10**: 66-86
- BAUER, R., KHAN, I.A., WAGNER H. (1988a). TLC and HPLC Analysis of *Echinacea pallida* and *E. angustifolia* Roots, *Planta Medica*, **54**: 426-430
- BAUER, R., REMIGER, P., WAGNER, E. (1988b). Alkamides from the roots of *Echinacea purpurea*, *Phytochemistry*, **27**: 2339-2342.
- BAUER, R., REMIGER, P. (1989). TLC and HPLC analysis of alkamides of *Echinacea* drugs, *Planta Medica*, **55**: 367-371.
- BERG, A., NORTHOFF, H., KONIG, D., WEINSTOCK, C., GRATHWOHL, D., PARNHAM, M.J., STUHLFAUTH, I., KEUL, J. (1998) Influence of echinacin (EC31) treatment on the exercise-induced immune response in athletes, *Journal of Drug Assessment*, **1**: 625-638
- BINNS, S.E., PURGINA, B., BERGERON, C., SMITH, M.L., BALL, L., BAUM, B.R., ARNASON, J.T., (2000). Light-mediated antifungal activity of *Echinacea* extracts, *Planta Medica*, **66**: 241-244

- BINNS, S.E., LIVESEY, J.F., ARNASON, J.T., BAUM, B.R. (2002). Phytochemical variation in *Echinacea* from roots and flowerheads of wild and cultivated populations, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **50**: 3673-3687
- BIROŠOVÁ, L., MIKULÁŠOVÁ, M., VAVERKOV, Š. (2005). Antimutagenic effect of phenolic acids, *Biomedical Papers of Medicine Faculty University of Palacky Olomouc Czech Republic*, **149**: 489-491.
- BIRT, D.F., WIDRLECHNER, M.P., LALONE, C.A., WU, L., BAE, J., SOLCO, A.K., KRAUS, G.A., MURPHY, P.A., WURTELE, E.S., LENG, Q., HEBERT, S.C., MAURY, W.J., PRICE, J.P. (2008). *Echinacea* in infection, *The American Journal of Clinical Nutrition*, **87**: 488S-492S
- BLOIS, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**: 1199-1200.
- BLUMENTHAL, M., BUSSE, W.R., GOLDBERG, A., GRUENWALD, J., HALL, T., KLEIN, S., RIGGINS, C.W., RISTER, R.S. (1998). *The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines*. Austin, TX: American Botanical Council
- BONADEO, I., BOTTAZZI, G., LAVAZZA, M. (1971). Echinacin b, an active polysaccharide from *Echinacea*, *Revista Italiana Essenze Profumi, Piante Officinali, Aromi, Saponi, Cosmetici, Aerosol*, **53**: 281-295
- BOWN, D. (2002). *New Encyclopedia of Herbs and Their Uses*, p.:199-200. New York: DK Publishing
- BRÄUNIG B, DORN M, KNICK E. (1992). *Echinaceae purpureae* radix: zur stärkung der körpereigenen abwehr bei grippalen infekten, *Zeitschrift für Phytotherapie*, **13**: 7-13.
- BRINKEBORN, R.M., SHAH, D.V., DEGENRING, F.H. (1999). Echinaforce and other *Echinacea* fresh plant preparations in the treatment of the common cold: a randomized, placebo controlled, double-blind clinical trial, *Phytomedicine*, **6**: 1-6
- BRUNETON, J. (1999). *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*, 2nd Ed. Paris: Lavoisier, p.:173-175
- BURGER, R.A., TORRES, A.R., WARREN, R.P., CALDWELL, V.D. HUGHES, B.G. (1997). *Echinacea*-Induced cytokine production by human macrophages, *International Journal of Immunopharmacology*, **19**: 371-379.
- CARUSO, T.J., GWALTNEY, J.M.JR. (2005). Treatment of the common cold with *Echinacea*: a structured review, *Clinical Infectious Diseases*, **40**: 807-810
- CHAVES, F., CHACÓN, M., BADILLA, B., ARÉVALO, C. (2003). Effect of *Echinacea purpurea* (Asteraceae) aqueous extract on antibody response to *Bothrops asper* venom and immune cell response, *Revista De Biologia Tropical (International Journal of Tropical Biology and Conservation)*, **55**: 113-119
- CECH, N.B., TUTOR, K., DOTY, B.A., SPELMAN, K., SASAGAWA, M., RANER, G.M., WENNER, C.A. (2006). Liver enzyme-mediated oxidation of *Echinacea purpurea*

alkylamides: production of novel metabolites and changes in immunomodulatory activity, *Planta Medica*, **72**: 1372-1377

CHEMINAT, A., ZAWATZKY, R., BECKER, H., BROUILLARD, R. (1988). Caffeoyl conjugates from *Echinacea* species: structures and biological activity, *Phytochemistry*, **27**: 2787-2794

CHEMINAT, A., BROUILLARD, R., GUERNE, P., BERGMANN, P., RETHER, B. (1989). Cyanidin 3-malonylglucoside in two *Echinacea* species, *Phytochemistry*, **28**: 3246-3247

CHEN, Y., FU, T., TAO, T., YANG, J., CHANG, Y., WANG, M., KIM, L., QU, L., CASSADY, J., SCALZO, R., WANG, X. (2005). Macrophage activating effects of new alkamides from the roots of *Echinacea* species, *Journal of Natural Products*, **68**: 773-776

CHICCA, A., ADINOLFI, B., MARTINOTTI, E., FOGLI, S., BRESCHI, M.C., PELLATI, F., BENVENUTI, S., NIERI, P. (2007). Cytotoxic effects of *Echinacea* root hexanic extracts on human cancer cell lines, *Journal of Ethnopharmacology*, **110**: 148-153

CHUA, M.T., TUNG, Y.T., CHANG, S.T. (2008). Antioxidant activities of ethanolic extracts from the twigs of *Cinnamomum osmophleum*, *Bioresource Technology*, **99**: 1918-1925

CLASSEN, B., CSÁVÁS, M., BORBÁS, A., DINGERMAN, T., ZÜNDORF, I. (2004). Monoclonal antibodies against an arabinogalactan-protein from pressed juice of *Echinacea purpurea*, *Planta Medica*, **70**: 861-865

CLASSEN, B., MAU, S.L., BACIC, A. (2005). The arabinogalactan-proteins from pressed juice of *Echinacea purpurea* belong to the "hybrid" class of hydroxyproline-rich glycoproteins, *Planta Medica*, **71**: 59-66

CLASSEN, B., THUDE, S., BLASCHEK, W., WACK, M., BODINET, C. (2006). Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*, *Phytomedicine*, **13**: 688-694

CLIFFORD, L.J., NAIR M.G., RANA, J., DEWITT, D.L., (2002). Bioactivity of alkamides isolated from *Echinacea purpurea* (L.) Moench, *Phytomedicine*, **9**: 249-253

COEUGNIET, E., KUHNAST, R. (1986). Recurrent candidiasis. Adjuvant immunotherapy with different formulations of *Echinacea*, *Therapiwoche*, **36**: 3352-3358

COHEN, H.A., VARSANO, I., KAHAN, E., SARRELL, E.M., UZIEL, Y. (2004). Effectiveness of an herbal preparation containing *Echinacea*, propolis and vitamin C in preventing respiratory tract infections in children: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study, *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, **158**: 217-21.

HMPC (COMMITTEE ON HERBAL MEDICINAL PRODUCTS) (2008). Community Herbal Monograph on *Echinacea Purpurea* (L.) Moench, Herba Recens. Erişim: [http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/hmpc/Echinaceae_purpureae_herba/10494506enfin.pdf]

CURRIER, N.L., MILLER, S. (2001). *Echinacea purpurea* and melatonin augment natural-killer cells in leukemic mice and prolong life span, *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (New York, N.Y.), **7**: 241-251

- CURRIER, N.L., MILLER, S. (2002). The effect of immunization with killed tumor cells, with/without feeding of *Echinacea purpurea* in an erythroleukemic mouse model, *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (New York, N.Y.), **8**: 49-58
- DALBY-BROWN, L., BARSETT, H., LANDBO, A.K.R., MEYER, A., MOLGAARD, P., (2005). Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**: 9413-9423
- DAVIS, P.H. (1975). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.5. Edinburgh: Edinburgh University Press
- DAVIS, P.H., MILL, R.R., KIT TAN (1988). Flora of Turkey and the East Aegean Islands, Vol.10. Edinburgh: Edinburgh University Press
- DEMİREZER, Ö.L., ERSÖZ, T., SARAÇOĞLU, İ., ŞENER, B. (2007). Tedavide Kullanılan Bitkiler "FFD Monografıları". NM Medikal, Nobel Tıp Kitabevi, s.: 73-86
- DI CARLO, G., NUZZO, I., CAPASSO, R., SANGES, M.R., GALDIERO, E., CAPASSO, F., CARRATELLI, C.R. (2003). Modulation of apoptosis in mice treated with *Echinacea* and St. John's wort, *Pharmacological Research*, **48**: 273-277
- DIETZ, B., HEILMANN, J., BAUER, R. (2001). Absorption of dodeca-2E,4E,8Z,10-E/Z-tetraenoic acid isobutylamides after oral application of *Echinacea purpurea* tincture, *Planta Medica*, **67**: 863-864
- DONG, G.C., CHUANG, P.H., FORREST, M.D., LIN Y.C., CHEN, H.M. (2006). Immuno-suppressive effect of blocking the CD28 signaling pathway in T-cells by an active component of *Echinacea* found by a novel pharmaceutical screening method, *Journal of Medicinal Chemistry* **49**: 1845-1854
- DONG, G.C., CHUANG, P.H., CHANG, K., JAN, P., HWANG, P.I., WU, H.B., YI, M., ZHOU, H.X., CHEN, H.M. (2008). Blocking effect of an immuno-suppressive agent, cynarin, on CD28 of T-cell receptor, *Phytochemical Research*, **26**: 375-381
- DORN, M., KNICK, E., LEWITH G. (1997). Placebo-controlled, double-blind study of *Echinaceae pallidae* radix in upper respiratory tract infections, *Complementary Therapies in Medicine*, **5**: 40-42
- DYMNICKA, M., ŁOZICKI, A., KOZIOROWSKI, M., KLUPCZYŃSKI J., MICIŃSKI, J., MŚCISZ, A. (2004). The effect of coneflower (*Echinacea purpurea*) on the immunological function of the mammary gland of cows during the perinatal period, *Journal of Animal and Feed Sciences*, **13**(Supplement 2): 9-12
- EGERT, D., BESUCHER, N. (1992). Studies on antigen specificity of immunoreactive arabinogalactan proteins extracted from *Baptisia tinctoria* and *Echinacea purpurea*, *Planta Medica*, **58**: 163-165
- EGGER, M., PELLETT, P., NICKL, K., GEIGER, S., GRAETZ, S., SEIFERT, R., HEILMANN, J., KÖNIG B. (2008). Synthesis and cannabinoid receptor activity of ketoalkenes from

Echinacea pallida and nonnatural analogues, *Chemistry A European Journal* **14**: 10978-10984

- ELLMAN, G.L., COURTNEY, K.D., ANDRES, V., FEATHERSTONE, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochemical Pharmacology*, **7**: 88-95
- EP6, EUROPEAN PHARMACOPOEIA SIXTH EDITION (2007). Council of Europe, Strasbourg: France
- ESCOF (2003). ESCOF Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, 2nd Ed.. Exeter, United Kingdom: European Scientific Cooperative on Phytotherapy. p.: 126-140
- FARINACCI, M., COLITTI, M., SGORLON, S., STEFANON, B., (2008). Immunomodulatory activity of plant residues on ovine neutrophils, *Veterinary Immunology and Immunopharmacology*, **126**: 54-63
- FLAGEL, L.E., RAPP, R.A., GROVER, C.E., WIDRLECHNER, M.P., HAWKINS, J., GRAFENBERG, J.L., ÁLVAREZ, I., CHUNG, G.Y., WENDEL, J.F. (2008). Phylogenetic, morphological, and chemotaxonomic incongruence in the North American endemic genus *Echinacea*, *American Journal of Botany*, **95**: 756-765
- FREIER, D.O., WRIGHT, K., KLEIN, K., VOLL, D., DABIRI, K., COSULICH, K., GEORGE, R., (2003) Enhancement of the humoral immune response by *Echinacea purpurea* in female Swiss mice, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **25**: 551-560
- GAN, X.H., ZHANG, L., HEBER, D., BONAVIDA, B. (2003). Mechanism of activation of human peripheral blood NK cells at the single cell level by *Echinacea* water soluble extracts: recruitment of lymphocyte-target conjugates and killer cells and activation of programming for lysis, *International Immunopharmacology*, **3**: 811-824
- GOEL, V., CHANG, C., SLAMA, J.V., BARTON, R., BAUER, R., GAHLER, R., BASU, T.K. (2002). Alkylamides of *Echinacea purpurea* stimulate alveolar macrophage function in normal rats, *International Immunopharmacology*, **2**: 381-387
- GOEL, V., LOVLIN, R., BARTON, R., LYON, M.R., BAUER, R., LEE, T.D., BASU, T.K. (2004). Efficacy of a standardized *Echinacea* preparation (Echinilin) for the treatment of the common cold: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **29**: 75-83
- GOEL, V., LOVLIN, R., CHANG, C., SLAMA, J.V., BARTON, R., GAHLER, R., BAUER, R., GOONEWARDENE, L., BASU, T.K. (2005). A proprietary extract from the *Echinacea* plant (*Echinacea purpurea*) enhances systemic immune response during a common cold, *Phytotherapy Research*, **19**: 689-694
- GORSKI, J.C., HUANG, S.-M., PINTO, A., HAMMAN, M.A., HILLIGOSS, J.K., ZAHEER, N.A., DESAI, M., MILLER, M., HALL, S.D. (2004). The effect of *Echinacea* (*Echinacea purpurea* root) on cytochrome P450 activity *in vivo*, *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, **75**: 89-100

- GRIMM, W., MÜLLER, H.H. (1999). A randomized controlled trial of the effect of fluid extract of *Echinacea purpurea* on the incidence and severity of colds and respiratory infections, *The American Journal of Medicine*, **106**: 138-143
- GRUENWALD, J., BRENDLER, T., JAENICKE, C. (2004). PDR for Herbal Medicines, 3rd Ed. Montvale, NJ: Thomson Healthcare, p.: 267-274
- GUIOTTO, P., WOELKART, K., GRABNAR, I., VOINOVICH, D., PERISSUTTI, B., INVERNIZZI, S., GRANZOTTO, M., BAUER, R. (2008). Pharmacokinetics and immunomodulatory effects of phytotherapeutic lozenges (bonbons) with *Echinacea purpurea* extract, *Phytomedicine* **15**: 547-554
- GÜNDÜZ T. (1999). Enstrümental Analiz, 5. Baskı. Ankara: Gazi Kitabevi
- HANSEN, T.S., NILSEN, O.G. (2008). *In vitro* CYP3A4 metabolism: inhibition by *Echinacea purpurea* and choice of substrate for the evaluation of herbal inhibition, *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* **103**: 445-449
- HAYASHI, I., OHOTSUKI, M., SUZUKI, I., WATANABE, T. (2001). Effects of oral administration of *Echinacea purpurea* (American herb) on incidence of spontaneous leukemia caused by recombinant leukemia viruses in AKR/J mice, *Nihon Rinshō Men'eki Gakkai Kaishi (Japanese Journal Of Clinical Immunology)*, **24**: 10-20
- HEYWOOD, V. H., BRUMMITT, R. K., CULHAM, A., SEBERG, O. (2007). Flowering Plant Families of the World, Ontario, Canada: Firefly Books, p.: 46-52
- HINZ, B., WOELKART, K., BAUER, R., (2007). Alkamides from *Echinacea* inhibit cyclooxygenase-2 activity in human neuroglioma cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **360**: 441-446
- HILL, L.L., FOOTE, J.C., ERICKSON, B.D., CERNIGLIA, C.E., DENNY, G.S. (2006). *Echinacea purpurea* supplementation stimulates select groups of human gastrointestinal tract microbiota, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **31**: 599-604
- HITES, R.A. (1997). Gas Chromatography Mass Spectrometry. In: *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistr*, Ed.: F. Settle. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice Hall, Chapter 31.
- HOBBS, C. (1994). *Echinacea*: a literature review; botany, history, chemistry, pharmacology, toxicology, and clinical uses, *HerbalGram*, **30**: 33
- HOHEISEL, O., SANDBERG, M., BERTRAM, S., BULITTA, M., SCHÄFER, M. (1997). Echinagard treatment shortens the course of the common cold: a double-blind, placebo-controlled clinical trial, *European Journal of Clinical Research*, **9**: 261-268.
- HOLLA, M., VAVERKOVÁ, S., FARKAS, P., TEKEL, J. (2005). Content of essential oil obtained from flower heads of *Echinacea purpurea* L. and identification of selected components, *Herba Polonica*, **51**: 26-30
- HU, C., KITTS, D.D., (2000). Studies on the antioxidant activity of *Echinacea* root extract, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 1466-1472

- HUDSON, J., VIMALANATHAN, S., KANG, L., AMIGUET, V.T., LIVESEY, J., ARNASON, J.T., (2005). Characterization of antiviral activities in *Echinacea* root preparations, *Pharmaceutical Biology*, **43**: 790-796
- HUNTIMER, E.D., HALAWEISH, F.T. (2003). Determination of the effect of *Echinacea angustifolia* phenolics on the proliferation of cancer cells, Abstracts of Papers, 226th American Chemical Society National meeting, New York, USA, September 7-11
- HUNTIMER, E.D., HALAWEISH, F.T., CHASE, C.C.L. (2006). Proliferative activity of *Echinacea angustifolia* root extracts on cancer cells interference with doxorubicin cytotoxicity, *Chemistry and Biodiversity* **3**: 695-703
- HWANG, S.A., DASGUPTA, A., ACTOR, J.K. (2004). Cytokine production by non-adherent mouse splenocyte cultures to *Echinacea* extracts. *Clinica Chimica Acta* **343**: 161-166
- JACOBSON, M. (1967). The structure of echinacein, the insecticidal component of American coneflower roots, *Journal of Organic Chemistry*, **32**: 1646-2647
- JAGER, H., MEINEL, L., DIETZ, B., LAPKE, C., BAUER, R., MERKLE, H.P., HEILMANN, J. (2002). Transport of alkamides from *Echinacea* species through Caco-2 monolayers, *Planta Medica* **68**: 469-471
- JURKSTIENE, V., KONDROTAS, A.J., KEVELAITIS, E. (2004). Compensatory reactions of immune system and action of purple coneflower (*Echinacea purpurea* (L.) Moench) preparations, *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, **40**: 657-662
- KABGANIAN, R., CARRIER, D.J., ROSE, P.A., ABRAMS, S.R., SOKHANSANJ, S. (2002). Localization of alkamides, echinacoside and cynarin with *Echinacea angustifolia*, *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, **10**: 73-81
- KIM, H.O., DURANCE, T.D., SCAMAN, C.H., KITTS, D. (2000). Retention of caffeic acid derivatives in dried *Echinacea purpurea*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**: 4182-4186
- KIM, L.S., WATERS, R.F., BURKHOLDER, P.M. (2002). Immunological activity of larch arabinogalactan and *Echinacea*: a preliminary, randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Alternative Medicine Review : A Journal of Clinical Therapeutic*, **7**: 138-149
- KIVCAK, B., MERT, T., SAGLAM, H., OZTURK, T., KURKCUOGLU, M., BASER, K.H.C. (2007). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Anthemis wiedemanniana* from Turkey, *Chemistry of Natural Compounds*, **43**: 47-51
- KÖHLER, G., BODINET, C., FREUDENSTEIN, J. (2002). Pharmacodynamic effects and clinical effectiveness of a combination of herbal substances comprised of cone flower, wild indigo and white cedar, *Wiener Medizinische Wochenschrift*, **152**: 393-397.
- LALONE, C.A., HAMMER, K.D.P., WU, L., BAE, J., LEYVA, N., LIU, Y., SOLCO, A.K.S., KRAUS, G.A., MURPHY, P.A., WURTELE, E.S., KIM, O., SEO, K.I., WIDRLECHNER, M.P., BIRT, D.F., (2007). *Echinacea* Species and alkamides inhibit prostaglandin E2 production in RAW264.7 mouse macrophage cells, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **55**: 7314-7322

- LIN, L., QIU, S., LINDENMAIER, M., HE, X., FEATHERSTONE, T., CORDELL, G.A. (2002). Patuletin-3-O-rutinoside from the aerial parts of *Echinacea angustifolia*, *Pharmaceutical Biology*, **40**: 92-95
- LINDE, K., BARRETT, B., BAUER, R., MELCHART, D., WOELKART, K. (2009) *Echinacea* for preventing and treating the common cold. Cochrane Database of Systematic Reviews 2006, Issue 1.
- LINDENMUTH, G.F., LINDENMUTH, E.B. (2000). The efficacy of *Echinacea* compound herbal tea preparation on the severity and duration of upper respiratory and flu symptoms: a randomized, double-blind placebo-controlled study, *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **6**: 327-334
- LETCHAMO, W., LIVESEY, J., ARNASON, T.J., BERGERON, C., KRUTILINA, V.S. (1999). Cichoric acid and isobutylamide content in *Echinacea purpurea* as influenced by flower developmental stages. In: *Perspectives on New Crops and New Uses*, Ed.: Janick, J., Whipkey A. Alexandria, VA: ASHS Press. p.: 494-498
- LETCHAMO, W., POLYDEONNY, L.V., GLADISHEVA, N.O., ARNASON, T.J., LIVESEY, J., AWANG, D.V.C. (2002). Factors affecting *Echinacea* quality. In: *Trends in New Crops and New Uses*, Janick, J., Whipkey A.. Alexandria, VA: ASHS Press. p.: 514-521
- MAFFEI-FACINO, R., CARINI, M., ALDINI, G., SAIBENE, L., PIETTA, P., MAURI, P., (1995). Echinacoside and caffeoyl conjugates protect collagen from free radical-induced degradation: a potential use of *Echinacea* extracts in the prevention of skin photodamage, *Planta Medica*, **61**: 510-514
- MAT, A. (2002). *Echinacea* türleri. 14. *Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı, Bildiriler*, 29-31 Mayıs. Ed.: Başer, K.H.C., Kırımer. N.. Eskişehir
- MATTHIAS, A., BLANCHFIELD, J.T., PENMAN, K.G., TOTH, I., LANG, C.S., DE VOSS, J.J., LEHMANN, R.P. (2004). Permeability studies of alkylamides and caffeic acid conjugates from *Echinacea* using a Caco-2 cell monolayer model, *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, **29**: 7-13.
- MATTHIAS, A., ADDISON, R.S., PENMAN, K.G., DICKINSON, R.G., BONE, K.M., LEHMANN, R.P. (2005a). *Echinacea* alkamide disposition and pharmacokinetics in humans after tablet ingestion, *Life Sciences*, **77**: 2019-2029
- MATTHIAS, A., GILLAM, E.M., PENMAN, K.G., MATOVIC, N.J., BONE, K.M., DE VOSS, J.J., LEHMANN, R.P. (2005b). Cytochrome P450 enzyme-mediated degradation of *Echinacea* alkylamides in human liver microsomes, *Chemico-Biological Interactions*, **155**: 62-70
- MATTHIAS, A., PENMAN, K.G., MATOVIC, N.J., BONE, K.M., DE VOSS, J.J., LEHMANN, R.P. (2005c). Bioavailability of *Echinacea* constituents: caco-2 monolayers and pharmacokinetics of the alkylamides and caffeic acid conjugates, *Molecules*, **10**: 1242-1251
- MATTHIAS, A., ADDISON, R.S., AGNEW, L.L., BONE, K.M., WATSON, K., LEHMANN, R.P. (2007a). Comparison of *Echinacea* alkylamide pharmacokinetics between liquid and tablet preparations, *Phytomedicine*, **14**: 587-590

- MATTHIAS, A., BANBURY, L., STEVENSON, L.M., BONE, K.M., LEACH, D.N., LEHMANN, R.P. (2007b). Alkylamides from *Echinacea* modulate induced immune responses in macrophages, *Immunological Investigations*, **36**: 117-130
- MATTHIAS, A., BANBURY, L., BONE, K.M., LEACH, D.N., LEHMANN, R.P. (2008). *Echinacea* alkylamides modulate induced immune responses in T-cells, *Fitoterapia*, **79**: 53-58
- MAZZA G. (1) ; COTTRELL T. (1999). Volatile components of roots, stems, leaves, and flowers of *Echinacea* species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**: 3081-3085
- McCANN, D.A., SOLCO, A., LIU, Y., MACALUSO, F., MURPHY, P.A., KOHUT, M.L., SENCHINA, D.S. (2007). Cytokine- and interferon-modulating properties of *Echinacea* spp. root tinctures stored at -20 degrees C for 2 years, *Journal of Interferon and Cytokine Research*, **27**: 425-436
- McINTIRE, J. (2008). Herbs for health: Endangered *Echinacea*. Erişim: [<http://sustainablog.org/2008/05/13/herbs-for-health-endangered-echinacea/>]. Erişim tarihi: 18.07.2009
- McKEOWN, K.A. (1999). A review of the taxonomy of the genus *Echinacea*. In: *Perspectives on New Crops and New Uses*, Ed.: Janick, J., Whipkey A. Alexandria, VA: ASHS Press, p.: 482-489
- McMASTER, M., McMASTER, C. (1998). GC/MS A practical user's guide. New York: Wiley-VCH
- MELCHART, D., LINDE, K., WORKU, F., SARKADY, L., HOLZMANN, M., JURCIC, K., WAGNER, H. (1995). Results of five randomized studies on the immunomodulatory activity of preparations of *Echinacea*, *Journal of Alternative and Complementary Medicine* (New York, N.Y.), **1**: 145-160
- MELCHART, D., WALTHER, E., LINDE, K., BRANDMAIER, R., LERSCH, C. (1998). *Echinacea* root extracts for the prevention of upper respiratory tract infections: a double-blind, placebo-controlled randomized trial, *Archives of family medicine*, **7**: 541-545
- MELCHART, D., CLEMM, C., WEBER, B., DRACZYNSKI, T., WORKU, F., LINDE, K., WEIDENHAMMER, W., WAGNER, H., SALLER, R. (2002). Polysaccharides isolated from *Echinacea purpurea* herba cell cultures to counteract undesired effects of chemotherapy - a pilot study, *Phytotherapy Resaerch*, **16**: 138-142
- MERALI, S., BINNS, S., PAULIN-LEVASSEUR, M., FICKER, C., SMITH, M., BAUM, B., BROVELLI, E., ARNASON, J.T. (2003) Antifungal and anti-inflammatory activity of the genus *Echinacea*, *Pharmaceutical Biology*, **41**: 412-420
- MEYER, V.R. (1999). Practical High-Performance Liquid Chromatography, 3rd Ed. New York: John Wiley and Sons Ltd.
- MILIAUSKAS, G., VENSKUTONIS, P.R., VAN BEEK T.A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some and aromatic plant extracts, *Food Chemistry*, **85**: 231-237
- MILLER, C., YU, H. (2004). *Echinacea*: The genus *Echinacea* (Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles, Vol. 39). Florida: CRC Press LLC

- MILLS, S., BONE, K. (2000). Principles and Practice of Phytotherapy. New York: Churchill-Livingstone, p.: 354-362
- MIRJALILI, M.H., SALEHI, P, BADI, H.N., SONBOLI A. (2006). Volatile constituents of the flowerheads of three *Echinacea* species cultivated in Iran, *Flavour and Fragrance Journal*, **21**: 355-358
- MISTRÍKOVÁ, I., VAVERKOVÁ, Š. (2007). Morphology and anatomy of *Echinacea purpurea*, *E. angustifolia* *E. pallida*, and *Parthenium integrifolium*, *Biologia*, **62**: 2-5
- MORAZZONI, P., CRISTONI, A., DI PIERRO, F., AVANZINI, C., RAVARINO, D., STORNELLO, S., ZUCCA, M., MUSSO, T. (2005). *In vitro* and *in vivo* immune stimulating effects of a new standardized *Echinacea angustifolia* root extract (Polinacea), *Fitoterapia*, **75**: 401-411
- MÜLLER-JAKIC, B., BREU, W., PRÖBSTLE, A., REDL, K., GREGER, H., BAUER, R. (1994). *In vitro* inhibition of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkamides from *Echinacea* and *Achillea* species, *Planta Medica*, **60**: 37-40
- NÜSSLEIN B, KURZMANN M, BAUER R, KREIS W (2000). Enzymatic degradation of cichoric acid in *Echinacea purpurea* preparations, *Journal of Natural Products*, **63**: 1615-1618.
- O'NEIL, J., HUGHES, S., LOURIE, A., ZWEIFLER, J. (2008). Effects of *Echinacea* on the frequency of upper respiratory tract symptoms: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Annals of Allergy, Asthma & Immunology : Official Publication of The American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, **100**: 384-388
- PELLATI, F., BENVENUTI, S., MAGRO, L., MELEGARI, M., SORAGNI, F., (2004). Analysis of phenolic compounds and radical scavenging activity of *Echinacea* spp., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **35**: 289-301
- PELLATI, F., BENVENUTI, S., MELEGARI, M., LASSEIGNE, T., (2005). Variability in the composition of anti-oxidant compounds in *Echinacea* species by HPLC, *Phytochemical Analysis* **16**: 77-85
- PELLATI, F., CALÒ, S., BENVENUTI, S. (2007). High-performance liquid chromatography analysis of polyacetylenes and polyenes in *Echinacea pallida* by using a monolithic reversed-phase silica column, *Journal of Chromatography A*, **1149**: 56-65.
- PERRY, N.B., BURGESS, E.J., GLENNIE, V.L. (2001). *Echinacea* standardization: analytical methods for phenolic compounds and typical levels in medicinal species, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **49**: 1702-1706
- PROKSCH, A., WAGNER, H. (1987). Structural analysis of a 4-O-methyl-glucuronoarabinoxylan with immuno-stimulating activity from *Echinacea purpurea*, *Phytochemistry*, **26**: 1989–1993
- PUGH, N.D., BALACHANDRAN, P., LATA, H., DAYAN, F.E., JOSHI, V., BEDIR, E., MAKINO, T., MORAES, R., KHAN, I., PASCO, D.S. (2005). Melanin: dietary mucosal immune modulator from *Echinacea* and other botanical supplements, *International Immunopharmacology*, **5**: 637-647

- PUGH, N.D., TAMTA, H., BALACHANDRAN, P., WU, X., HOWELL, J., DAYAN, F.E., PASCO, D.S. (2008). The majority of *in vitro* macrophage activation exhibited by extracts of some immune enhancing botanicals is due to bacterial lipoproteins and lipopolysaccharides, *International Immunopharmacology*, **8**: 1023-1032
- RANDOLPH, R.K., GELLENBECK, K., STONEBROOK, K., BROVELLI, E., QIAN, Y., BANKAITIS-DAVIS, D., CHERONIS, J. (2003). Regulation of human immune gene expression as influenced by a commercial blended *Echinacea* product: preliminary studies, *Experimental Biology and Medicine*, **228**:1051-1056
- RASO, G.M., PACILIO, M., DI CARLO, G., ESPOSITO, E., PINTO, L., MELI, R. (2002). *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **54**: 1379-1383
- REHMAN, J., DILLOW, J.M., CARTER, S.M., CHOU, J., LE, B., MAISEL, A.S. (1999). Increased production of antigen-specific immunoglobulins G and M following *in vivo* treatment with the medicinal plants *Echinacea angustifolia* and *Hydrastis canadensis*, *Immunology Letters*, **68**: 391-395
- REINKE, R.A., LEE, D.J., McDOUGALL, B.R., KING, P.J., VICTORIA, J., MAO, Y., LEI, X., REINECKE, M.G., ROBINSON Jr., W.E., (2004). L-Chicoric acid inhibits human immunodeficiency virus type 1 integration *in vivo* and is a noncompetitive but reversible inhibitor of HIV-1 integrase *in vitro*, *Virology*, **326**: 203-219
- RININGER, J.A., KICKNER, S., CHIGURUPATI, P., McLEAN, A., FRANCK, Z. (2000). Immunopharmacological activity of *Echinacea* preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells, *Journal of Leukocyte Biology* **68**: 503-509
- ROBINSON Jr., W.E., REINECKE, M.G., ABDEL-MALEK, S., JIA, Q., CHOW, S.A., (1996). Inhibitors of HIV-1 replication that inhibit HIV integrase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**: 6326-6331
- ROUSSEAU, B., TATEYA, I., LIM, X., MUNOZ-DEL-RIO, A., BLESS, D.M. (2006). Investigation of anti-hyaluronidase treatment on vocal fold wound healing, *Journal of Voice*, **20**: 443-451
- ROESLER, J., STEINMÜLLER, C., KIDERLEN, A., EMMENDÖRFFER, A., WAGNER, H., LOHMANN-MATTHES, M.L. (1991a). Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to mice mediates protection against systemic infections with *Listeria monocytogenes* and *Candida albicans*, *International Journal of Immunopharmacology*, **13**: 27-37
- RÖESLER J, EMMENDÖRFFER A, STEINMÜLLER C, LUETTIG B, WAGNER H, LOHMANN-MATTHES ML. (1991b). Application of purified polysaccharides from cell cultures of the plant *Echinacea purpurea* to test subjects mediates activation of the phagocyte system, *International Journal of Immunopharmacology*, **13**: 934-941
- RÖDER, E. (1995). Medicinal plants in Europe containing pyrrolizidine alkaloids, *Pharmazie*, **50**: 83-98
- RYAN, K., RANER, G.M., CHEN, W.Y., BAHAWDORY, M., MACK, T. (2008). Production and Characterization of *Echinacea purpurea* Essential Oil: Exploring Potential Anti-Oxidant

Properties, Abstracts, 60th Southeast Regional Meeting of the American Chemical Society, Nashville, TN, United States, November 12-15

- SASAGAWA, M., CECH, N.B., GRAY, D.E., ELMER, G.W., WENNER, C.A. (2006). *Echinacea* alkylamides inhibit interleukin-2 production by Jurkat T-cells, *International Immunopharmacology*, **6**: 1214-1221
- SAUNDERS, P.R., SMITH, F., SCHUSKY, R.W. (2007). *Echinacea purpurea* L. in children: safety, tolerability, compliance, and clinical effectiveness in upper respiratory tract infections, *Canadian Journal of Physiology Pharmacology*, **85**: 1195-1199
- SCAGLIONE, F., LUND, B., (1995). Efficacy in the treatment of the common cold of a preparation containing an *Echinacea* extract, *International Journal of Immunotherapy*, **11**: 163-166.
- SCHAR, D. (1999). *Echinacea: The Plant That Boosts Your Immune System*. Berkeley, California: North Atlantic Books, Chapter 2.
- SCHOOP, R., KLEIN, P., SUTER, A., JOHNSTON, S.L. (2006). *Echinacea* in the prevention of induced rhinovirus colds: a meta-analysis, *Clinical Therapeutics*, **28**: 174-183
- SCHUBERTH, H.J., RIEDEL-CASPARI, G., LEIBOLD, W. (2002). Flow cytometric testing of immunological effects of a phytomedicinal combination (equimun) and its compounds on bovine leucocytes, *Journal of Veterinary Medicine Series A-Physiology Pathology Clinical Medicine* **49**: 291-298
- SCHULTEN, B., BULITTA, M., BALLERING-BRÜHL, B., KÖSTER, U., SCHÄFER, M. (2001). Efficacy of *Echinacea purpurea* in patients with a common cold: a placebo-controlled, randomised, double-blind clinical trial, *Arzneimittel-Forschung*, **51**: 563-568.
- SCHULTHESS, B., GIGER, E., BAUMANN, T.W. (1991). *Echinacea*: Anatomy, phytochemical pattern and germination of the achene, *Planta Medica*, **57**: 384-388
- SCHWARZ, E., METZLER, J., DIEDRICH, J.P., FREUDENSTEIN, J., BODE, C., BODE, J.C. (2002). Oral administration of freshly expressed juice of *Echinacea purpurea* herbs fail to stimulate the nonspecific immune response in healthy young men: results of a double-blind, placebo-controlled crossover study, *Journal of Immunotherapy*, **25**: 413-20
- SEE, D.M., BROUMAND, N., SAHL, L., TILLES, J.G. (1997). *In vitro* effects of *Echinacea* and *Ginseng* on natural killer and antibody-dependent cell cytotoxicity in healthy subjects and chronic fatigue syndrome or acquired immunodeficiency syndrome patients, *Immunopharmacology*, **35**: 229-235
- SENCINA, D.S., McCANN, D.A., ASP, J.M., JOHNSON, J.A., CUNNICK, J.E., KAISER, M.S., KOHUT, M.L. (2005). Changes in immunomodulatory properties of *Echinacea* spp. root infusions and tinctures stored at 4 degrees C for four days, *Clinica Chimica Acta*, **355**: 67-82
- SINGLETON, V.L., ROSSI JR., J.A., (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, **16**: 144-158.

- SHAH, S.A., SANDER, S., WHITE, C.M., RINALDI, M., COLEMAN C. (2007). Evaluation of *Echinacea* for the prevention and treatment of the common cold: a meta-analysis, *The Lancet Infectious Diseases*, **7**: 473-480
- SHARMA, M., ARNASON, J. T., HUDSON, J. B. (2006). *Echinacea* extracts modulate the production multiple transcription factors in uninfected cells and rhinovirus-infected cells *Phytotherapy Research*, **20**: 1074-1079
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.C., NIEMAN, T.A. (1998). Principles of Instrumental Analysis 5th Ed. Philadelphia: Saunders College Publishers (Çeviri Ed. Esmâ Kılıç, Ankara: Bilim Yayıncılık)
- SLOLEY, B.D., URICHUK, L.J., TYWIN, C., COUTTS, R.T., PANG, P.K., SHAN, J.J. (2001). Comparison of chemical components and antioxidants capacity of different *Echinacea* species, *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **53**: 849-857
- SMEJKAL, K., HOLUBOVA, P., ZIMA, A., MUSELIK, J., DVORSKA M. (2007). Antiradical Activity of *Paulownia tomentosa* (Scrophulariaceae) Extracts, *Molecules*, **12**: 1210-1219
- SPASOV, A.A., OSTROVSKIJ, O.V., CHERNIKOV, M.V., WIKMAN, G. (2004). Comparative controlled study of *Andrographis paniculata* fixed combination, Kan Jang and an *Echinacea* preparation as adjuvant, in the treatment of uncomplicated respiratory disease in children, *Phytotherapy Research*, **18**: 47-53
- SPELMAN, K., BURNS, J., NICHOLS, D., WINTERS, N., OTTERSBERG, S., TENBORG, M. (2006). Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators, *Alternative Medicine Review* **11**: 128-150
- SPERBER, S.J., SHAH, L.P., GILBERT, R.D., RITCHEY, T.W., MONTO, A.S. (2004). *Echinacea purpurea* for prevention of experimental rhinovirus colds, *Clinical Infectious Diseases*, **38**: 1367-1371
- SPERONI, E., GOVONI, P., GUIZZARDI, S., RENZULLI, C., GUERRA, M.C. (2002). Anti-inflammatory and cicatrizing activity of *Echinacea pallida* Nutt. root extract, *Journal of Ethnopharmacology*, **79**: 265-272
- STARVAGGI-CUCUZZA, L., MOTTA, M., ACCORNERO, P., BARATTA, M., (2008). Effect of *Echinacea augustifolia* extract on cell viability and differentiation in mammary epithelial cells, *Phytomedicine*, **15**: 555-562
- STEVENSON, L.M., MATTHIAS, A., BANBURY, L., PENMAN, K.G., BONE, K.M., LEACH, D.L., LEHMANN, R.P. (2005). Modulation of macrophage immune responses by *Echinacea*, *Molecules* **10**: 1279-1285
- STIMPEL, M., PROKSCH, A., WAGNER, H., LOHMANN-MATTHES, M.L. (1984). Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharide fractions from the plant *Echinacea purpurea*, *Infection and Immunity*, **46**: 845-849
- STUART, D.L., WILLS R.B.H. (2000). Alkylamides and cichoric acid levels in plant sections of *Echinacea purpurea* during growth, *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, **7**: 91-101.

- SULLIVAN, A.M., LABA, J.G., MOORE, J.A., LEE, T.D. (2008). *Echinacea*-induced macrophage activation, *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, **30**: 553-574
- TANKER, N., KOYUNCU, M., COŞKUN, M. (2004). *Farmasötik Botanik*. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi, s.: 319.
- TAYLOR, J.A., WEBER, W., STANDISH, L., QUINN, H., GOESLING, J., MCGANN, M., CALABRESE, C. (2003). Efficacy and safety of *Echinacea* in treating upper respiratory tract infections in children: a randomized controlled trial, *The Journal of The American Medical Association*, **290**: 2824-30
- THYGESEN, L., THULIN, J., MORTENSEN, A., SKIBSTED, L.H., MOLGAARD, P., (2007). Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea* alone and in combination, *Food Chemistry*, **101**: 74-81
- THAPPA, R.K., BAKSHI, S.K., DHAR, P.L., AGARWAL, S.G., KITCHLU, S., KAUL, M.K., SURI, K.A. (2004). Significance of changed climatic factors on essential oil composition of *Echinacea purpurea* under subtropical conditions, *Flavour and Fragrance Journal*, **19**: 452-454
- TIRILLINI, B., RICCI, A., PINTORE, G., CHESSA, M., MENGHINI, L., PAGIOTTI, R. (2007). Essential oil composition of *Santolina etrusca* from Italy, *Chemistry of Natural Compounds*, **43**: 44-46
- TURNER, R.B., RIKER, D.K., GANGEMI, J.D. (2000). Ineffectiveness of *Echinacea* for prevention of experimental rhinovirus colds, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **44**: 1708-1709.
- UPTON, R., GRAFF, A. (2007). *American Herbal Pharmacopoeia, Echinacea Purpurea Aerial Parts*, Soctts Valley, USA: American Herbal Pharmacopoeia
- VIMALANATHAN, S., KANG, L., AMIGUET, V.T, LIVESEY, J., ARNASON J.T., HUDSON, J. (2005). *Echinacea purpurea* aerial parts contain multiple antiviral compounds, *Pharmaceutical Biology*, **43**: 740-745
- WAGNER, H., STUPPNER, H., SCHAFFER, W., ZENK, M. (1988). Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures, *Phytochemistry*, **27**: 119-126
- WAGNER, H., BREU, W., WILLER, F., WIERER, M., REMIGER, P., SCHWENKER, G., (1989). *In vitro* inhibition of arachidonate metabolism by some alkamides and prenylated phenols, *Planta Medica*, **55**: 566-567
- WAGNER, H., JURCIC, K. (2002). Immunological studies of Revitonil®, a phytopharmaceutical containing *Echinacea purpurea* and *Glycyrrhiza glabra* root extract, *Phytomedicine*, **9**: 390-397
- WANG, C.Y., CHIAO, M.T., YEN, P.J., HUANG, W.C., HOU, C.C., CHIEN, S.C., YEH, K.C., YANG, W.C., SHYUR, L.F., YANG, N.S. (2006). Modulatory effects of *Echinacea purpurea* extracts on human dendritic cells: a cell- and gene-based study, *Genomics*, **88**: 801-808

- WILLORD, H.H., MERRITT, L., JR., DEAN, J.A., SETTLE, F.A. (1981). Instrumental Methods of Analysis, 6th Ed. New York: D. Van Nostrand Company
- WOELKART, K., KOIDL, C., GRISOLD, A., GANGEMI, J.D., TURNER, R.B., MARTH, E., BAUER, R. (2005a). Bioavailability and pharmacokinetics of alkamides from the roots of *Echinacea angustifolia* in humans, *Journal of Clinical Pharmacology*, **45**: 683-689
- WOELKART, K., XU, W., PEI, Y., MAKRIYANNIS, A., PICONE, R.P., BAUER, R. (2005b). The endocannabinoid system as a target for alkamides from *Echinacea angustifolia* roots, *Planta Medica* **71**: 701-705
- WOELKART, K., DITTRICH, P., BEUBLER, E., PINL, F., SCHOOP, R., SUTER, A., BAUER, R., (2008a). Pharmacokinetics of the main alkamides after administration of three different *Echinacea purpurea* preparations in humans, *Planta Medica*, **74**: 651-656
- WOELKART, K., LINDE, K., BAUER, R. (2008b). *Echinacea* for preventing and treating the common cold, *Planta Medica*, **74**: 633-637
- WOISKY, R., SALATINO, A., (1998). Analysis of propolis some parameters and procedures for chemical quality control, *Journal of Apicultural Research*, **37**: 99-105
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (1999). WHO Monographs on Selected Medicinal Plants, Volume 1, p.: 125-144
- WÖLKART, K., GANGEMI, J.D., TURNER, R.B., BAUER, R. (2004). Enzymatic degradation of echinacoside and cynarine in *Echinacea angustifolia* root preparations, *Pharmaceutical Biology*, **42**: 443-448
- YALE, S.H., LIU, K. (2004). *Echinacea purpurea* therapy for the treatment of the common cold: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial, *Archives of Internal Medicine*, **164**: 1237-1241
- ZHAI, Z., LIU, Y., WU, L., SENCHINA, D.S., WURTELE, E.S., MURPHY, P.A., KOHUT, M.L., CUNNICK, J.E. (2007a). Enhancement of innate and adaptive immune functions by multiple *Echinacea* species, *Journal of Medicinal Food*, **10**: 423-34
- ZHAI, Z., HANEY, D., WU, L., SOLCO, A., MURPHY, P.A., WURTELE, E.S., KOHUT, M.L., CUNNICK, J.E. (2007b). Alcohol extracts of *Echinacea* inhibit production of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha by macrophages *in vitro*, *Food and Agricultural Immunology*, **18**: 221-236
- ZHAI, Z., SOLCO, A., WU, L., WURTELE, E. S., KOHUT, M. L., MURPHY, P. A., CUNNICK, J. E., (2009). *Echinacea* increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW264.7 macrophage cells, indicative of alternative macrophage activation, *Journal of Ethnopharmacology*, **122**: 76-85
- ZHANG, Y. XING, J., AI, T., WEN, T., GUAN, L., ZHAO, J. (2007). Protection of echinacoside against acute lung injury caused by oleic acid in rats, *Free Radical Research*, **41**: 798-805

ÖZGEÇMİŞ

I- BİREYSEL BİLGİLER

Adı: Ali Rifat
Soyadı: GÜLPINAR
Doğum Yeri: İskenderun/HATAY
Doğum Tarihi: 01.11.1983
Medeni Hal: Bekar
Askerlik: Tecilli
Adres: Mertler sok. 52/1 Beştepe/ ANKARA
Cep: 0 505 746 22 85
Ev: 0 312 222 26 31

II- EĞİTİM

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakognozi A.B.D. tezli yüksek lisans
Üniversite: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi (2001 yılında giriş, 2006 yılında mezuniyet)
Lise: İskenderun İbn-i Sina Anadolu Lisesi (2001 yılında mezuniyet)
İlkokul: İskenderun Mithat Paşa İlkokulu

III- ÜNVANLARI

2006- Eczacı

IV- YABANCI DİL

İngilizce, Almanca (Temel Seviye)

V- MESLEKİ DENEYİMİ

Şubat 2007'den bu yana Ankara Üniversitesi Fakültesi Farmakognozi A.B.D. 'nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır.

VI- BİLİMSEL İLGİ ALANLARI

Posterler:

GC-MS Analysis of Essential Oil Composition of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida* Cultivated in Turkey (2006) ISEO, Graz, Avusturya

Türkiye’de Kültürü Yapılan iki *Echinacea* türünün Antikolinesteraz ve Antioksidan Aktivitesi (2008), BİHAT, İstanbul

Cyclotrichium niveum (Boiss.) Manden. et Scheng. Bitkisinin Antikolinesteraz ve Antioksidan Aktivitesi, (2008), BİHAT, İstanbul

Makaleler:

Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties of *Cyclotrichium niveum*, *Thymus praecox subsp. caucasicus var. caucasicus*, *Echinacea purpurea* and *E. pallida* (2009), Food and Chemical Toxicology, Accepted 2 March 2009.

Sözlü Bildiriler:

Türkiye’de *Echinacea* Türlerinin Kültürü ve Önemi (2007). BİHAT, Kuşadası, İzmir.

LC and LC-MS analysis of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida* Cultivated in Turkey (2008). 5th CMAPSEEC, Brno, Czech Republic.

Seminerler:

Pelargonium sidoides D.C. Kökünün Farmakognozi Açısından Önemi ve Kullanılışı (2009)