ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

Kickxia lanigera VE *Kickxia spuria* BİTKİLERİNDE AKTİVİTE VE İZOLASYON ÇALIŞMALARI

Fatih GÜL

KİMYA ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2020

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Fatih GÜL tarafından hazırlanan "***Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* Bitki Ekstrelerinde Aktivite ve İzolasyon Çalışmaları**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Kimya Anabilim Dalı'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Ramazan ERENLER

Doç. Dr. Ayşe ŞAHİN YAĞLIOĞLU

Dr. Öğr. Üyesi Ahmet Cenk ANDAÇ

Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "***Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* Bitki Ekstrelerinde Aktivite ve İzolasyon Çalışmaları**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsünden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel intihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (02.02.2020).

ÖZET

Doktora tezi

Kickxia lanigera VE *Kickxia spuria* BİTKİ EKSTRELERİNDE AKTİVİTE VE İZOLASYON ÇALIŞMALARI

Fatih GÜL

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

Bu çalışmada Elazığ ili Baskil ilçesinden toplanan *Kickxia lanigera* (KL) ve *Kickxia spuria* (KS) bitki ekstrelerinin fitokimyasal analizi yapıldı ve ekstrelerin biyolojik aktivitesi incelendi. Aktivitesi yüksek olan $CHCl_3$ ve EA ekstrelerinden sekonder metabolitler saflaştırılarak NMR, TOF/MS gibi tekniklerle yapıları aydınlatıldı. GC-MS analizleri sonucunda hekzan ve $CHCl_3$ ekstrelerindeki yağ asidi oranının % 62.5 ve 93.73, hidrokarbon oranının ise % 26.5 ve % 1.86 olduğu belirlendi. HPLC-TOF/MS analizleri sonucunda $CHCl_3$ ve BuOH ekstresinin standart fenolikler açısından fakir olduğu, EA ekstresindeki ana bileşenlerin (mg/kg bitki cinsinden) miktarları ise sinamik asit (5.92), hesperidin (4.7), apigetrin (4.5) ve *p*-kumarik asit (2.8) olduğu tespit edildi. Antikanser test sonucunda KL bitkisinin $CHCl_3$ ekstresinin, hekzan, EA ve BuOH ekstrelerinden ve 5-FU'den aktif olduğu belirlendi. Antioksidan test sonucunda H_2O_2 giderme aktivite testinde KS bitkisinin sap kısmının en aktif olduğu ($A_{0.5}$=27.18 μg/mL) tespit edildi. Kromatografik işlemler ile KL bitkisinin $CHCl_3$ ekstresinden bir tanesi yeni 8 flavonoid (Mosloflavon, Baicalein 5,6,7-trimethyl ether, Salvigenin, Chrysin, Acacetin, Jaceosidin, Hispidulin) ve 1 steroid (Daucosterol) olmak üzere 9, EA ekstresinden ise 2 (Luteolin ve Apigenin) flavonoid olmak üzere toplam 11 bileşik saflaştırıldı. Saflaştırılan bileşiklerin antioksidan aktiviteleri incelendi ve indirgeme gücü aktivitesinde Mosloflavon'un (IC_{50}=82.78±0.05), H_2O_2 giderme aktivitesinde Chrysin'in (IC_{50}=24.17±2.00) ve yeni bileşiğin (IC_{50}=26.90±2.56) standartlardan yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edildi.

2020, 173 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Kickxia lanigera*, *Kickxia spuria*, biyolojik aktivite, izolasyon, karakterizasyon

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

ACTIVITY AND ISOLATION STUDIES ON *Kickxia lanigera* AND *Kickxia spuria* PLANT EXTRACTS

Fatih GÜL

Cankiri Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisors: Prof. Dr. İbrahim DEMİRTAŞ

In this study, phytochemical analysis of *Kickxia lanigera* (KL) and *Kickxia spuria* (KS) plant extracts collected from Elazığ Baskil carried out and biological activity of the plant extracts were examined. Secondary metabolites were purified from $CHCl_3$ and EA extracts with high activity and their structures were elucidated by techniques such as NMR, TOF / MS. As a result of GC-MS analysis, it was determined that the fatty acid ratio in hexane and $CHCl_3$ extracts was 62.5% and 93.73%, and the hydrocarbon ratio was 26.5% and 1.86%. As a result of HPLC-TOF / MS analyzes, $CHCl_3$ and BuOH extract were poor in terms of standard phenolics, and the amount of main components (in mg/kg plant) in EA extract are cinnamic acid (5.92), hesperidin (4.7), apigetrin (4.5) and *p*-coumaric acid (2.8). In anticancer test, it was determined that the $CHCl_3$ extract of the KL plant was more active than hexane, EA and BuOH extracts and 5-FU. In the H_2O_2 removal activity test, the stem part of the KS plant was found to be the most active (A0.5 = 27.18 µg / mL) as a result of the antioxidant test. With chromatographic methods 8 flavonoids (Mosloflavone, Baicalein 5,6,7-trimethyl ether, Salvigenin, Chrysin, Acacetin, Jaceosidin, Hispidulin and New Compound) and 1 steroid (Daucosterol) were purified from $CHCl_3$ extract and 2 flavonoids (Luteolin and Apigenin) from EA extract of KL plant. The antioxidant activities of the purified compounds were examined and it was determined that Mosloflavone (IC50 = 82.78 ± 0.05) in the reduction power activity, Chrysin (IC50 = 24.17 ± 2.00) and New Compound (IC50 = 26.90 ± 2.56) in the H_2O_2 scavenging activity had higher activity than the standards.

2020, 173 pages

Key Words: *Kickxia lanigera*, *Kickxia spuria*, Biological Activity, Isolation, Characterization

TEŞEKKÜR

Çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen hocam Prof Dr İbrahim DEMİRTAŞ'a, bitkilerin toplanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Lütfi BEHÇET ve Dr. Öğr. Üyesi. H. İbrahim Geçibesler'e, antiproliferatif aktivite testlerinde yardımcı olan Doç. Dr. Ayşe Şahin YAĞLIOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Muhammed ALTUN ve Arş. Gör. Serkan KOLDAŞ'a, kıymetli fikirlerini esirgemeden sunan, değerli arkadaşım Öğr. Gör. Ali Rıza TÜFEKÇİ'ye, bu aşamaya gelmemde bana emeği geçen tüm hocalarıma, hakkı hiçbir zaman ödenemeyecek olan anneme ve babama, sevgili eşime, kardeşlerime, adını burada sayamadığım ve katkısı olan herkese ayrıca şükranlarımı sunarım.

Fatih GÜL

Çankırı, Ocak 2020

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT ii
TEŞEKKÜR iii
İÇİNDEKİLER iv
SİMGELER DİZİNİ vi
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
1. GİRİŞ 1
2. KURAMSAL TEMELLER 4
2.1. Scrophulariaceae (Sıraca otugiller) familyası 4
2.2. Plantaginaceae (Sinirotugiller) familyası 4
2.3. *Kickxia* türü ile ilgili genel bilgiler 6
2.3.1 *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* türleri 8
3. MATERYAL VE YÖNTEM 18
3.1. Bitkilerin Hazırlanması 18
3.2. Bitkilerin Ekstraksiyonu 19
3.3. Bitki Ekstrelerinin Fitokimyasal Analizi 21
3.3.1. Bitki Ekstrelerinin GC-MS Analizleri 21
3.3.2. Ekstrelerin HPLC-TOF/MS analizleri 22
3.4. Bitki Ekstrelerinin Antiproliferatif Aktivitesi 23
3.5. Antioksidan aktivitelerinin incelenmesi 24
3.5.1. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi: 24
3.5.2 Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini 24
3.5.3. İndirgeme Gücü Tayini 25
3.5.4. H_2O_2 giderme aktivitesi 25
3.6. Bitkilerin kültüre edilmesi 25
3.7. Saflaştırma İşlemleri 26
4. BULGULAR 29
4.1. *Kickxia lanigera* ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları 29
4.2. *Kickxia lanigera* ekstrelerinin HPLC-TOF/MS Analiz Sonuçları 31
4.2.1. Kalitatif Analizler 31
4.2.2. Kantitatif Analizler 34
4.2.2.1. HPLC-TOF/MS analizleri 34
4.2.2.2. HPLC-UV Analizleri 36
4.3. *Kickxia lanigera* ekstrelerinin Antiproliferatif Aktivite Sonuçları 40

4.4. Antioksidan test sonuçları 42
4.5. Ekstrelerin ^{1}H-NMR spektrumları 46
4.6. Flavonların NMR spektrumları hakkında genel bilgi 48
4.6.1. Saflaştırılan bileşiklerin NMR analizi 50
4.7. Bitkilerin Kültüre Edilmesi 157
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 160
KAYNAKLAR 175
ÖZGEÇMİŞ 184

SİMGELER DİZİNİ

Simgeler ve Kısaltmalar	Açıklamalar
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
BuOH	Bütanol
$CHCl_3$	Kloroform
dk	Dakika
EA	Etil asetat
GC-MS	Gaz kromatografisi-Kütle Spektroskopisi
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KL	*Kickxia lanigera*
KS	*Kickxia spuria*
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
ppb	Milyarda bir (Çözeltiler için)
ppm	Milyonda bir (Çözeltiler için)
ppm	Kimyasal kayma değeri (NMR için)
TOF	Time of Flight (Uçuş zamanlı)

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1 *Plantago bellardii* bitkisi 5
Şekil 2. 2 *K. Elantine* ve *K. Spuria* bitkileri 6
Şekil 2. 3 *Kickxia* türünün dünyadaki dağılımı 7
Şekil 2. 4 *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* bitkilerinin Türkiye'de yetiştiği bölgeler .9
Şekil 2. 5 *Kickxia ramosissima* bitkisinden saflaştırılan bileşikler 10
Şekil 2. 6 *K. ramosissima* bitkisi 11
Şekil 2. 7 *K. commutata* bitkisi 12
Şekil 2. 8 *K. elatine, K. spuria* ve *K. commutata* bitkilerinden saflaştırılan bileşikler... 12
Şekil 2. 9 *Kickxia elatine* bitkisinden izole edilen fenolik bileşikler 13
Şekil 2. 10 *Kickxia spuria* bitkisindeki uçucu bileşenlerin kimyasal yapıları 14
Şekil 2. 11 *Kickxia aegyptiaca* (L.) Nábělek bitkisinden saflaştırılan bileşikler 15
Şekil 2. 12 *Kickxia spuria* bitkisinden saflaştırılan bileşikler 15
Şekil 2. 13 *Kickxia spuria* bitkisinden saflaştırılan bileşikler 16
Şekil 2. 14 *Kickxia lanigera* bitkisinden izole edilen polimetoksiflavonlar 17
Şekil 3. 1 *Kickxia lanigera* bitkisi 18
Şekil 3. 2 *Kickxia spuria* bitkisi 19
Şekil 3. 3 Bitkilerin ekstraksiyonu 20
Şekil 3. 4 Ekstraksiyon Şeması 21
Şekil 3. 5 Yağ asidi esterleştirme reaksiyonu 21
Şekil 3. 6 Bitkilerin kültüre edilmesi 26
Şekil 3. 7 Saflaştırma İşlemleri 27
Şekil 4. 1 KL bitkisinin hekzan ve $CHCl_3$ ekstrelerinin FID kromatogramları 30
Şekil 4. 2 KL ekstrelerinin total iyon kromatogramları (TIC) 32
Şekil 4. 3 KL ekstrelerinde tespit edilen standart fenoliklerin molekül yapıları 35
Şekil 4. 4 KS bitkisinin sap ve yaprak kısımlarının fitokimyasal analiz sonuçları 38
Şekil 4. 5 KL bitki ekstrelerinin fitokimyasal analiz sonuçları 39
Şekil 4. 6 *Kickxia lanigera* ekstrelerinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi 41
Şekil 4. 7 Reaktif ROS ve RNS türlerin oluşumu 43
Şekil 4. 8 $DPPH^{\cdot}$ Radikalinin giderilme mekanizması 43
Şekil 4. 9 KL ekstrelerinin NMR spektrumları 47
Şekil 4. 10 Flavon yapısındaki bir ve iki boyutlu etkileşimler 49
Şekil 4. 11 *Kickxia lanigera* bitkisinden saflaştırılan bileşikler 50
Şekil 4. 12 Aromatik bileşiklerdeki mezomerik ve indüktif etki 51
Şekil 4. 13 Mosloflavon yapısı 52
Şekil 4. 14 Mosloflavon'un ^{1}H-NMR spektrumu 54
Şekil 4. 15 Mosloflavon'un ^{13}C-NMR spektrumu 55
Şekil 4. 16 Mosloflavon'un COSY spektrumu 56
Şekil 4. 17 Mosloflavon'un DEPT spektrumu 57
Şekil 4. 18 Mosloflavon'un HSQC spektrumu 58
Şekil 4. 19 Mosloflavon'un HMBC spektrumu 59
Şekil 4. 20 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in kimyasal yapısı 60
Şekil 4. 21 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in ^{1}H-NMR spektrumu 62
Şekil 4. 22 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in ^{13}C-NMR spektrumu 63
Şekil 4. 23 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in COSY spektrumu 64
Şekil 4. 24 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in DEPT spektrumu 65

Şekil 4. 25 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in HSQC spektrumu 66
Şekil 4. 26 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in HMBC spektrumu 67
Şekil 4. 27 Salvigenin'in kimyasal yapısı 68
Şekil 4. 28 Salvigenin'in ^{1}H-NMR spektrumu 70
Şekil 4. 29 Salvigenin'in ^{13}C-NMR spektrumu 71
Şekil 4. 30 Salvigenin'in COSY spektrumu 72
Şekil 4. 31 Salvigenin'in HSQC spektrumu 73
Şekil 4. 32 Salvigenin'in HMBC spektrumu 74
Şekil 4. 33 Chrysin'in kimyasal yapısı 75
Şekil 4. 34 Chrysin'in ^{1}H-NMR spektrumu 76
Şekil 4. 35 Chrysin'in ^{13}C-NMR spektrumu 77
Şekil 4. 36 Chrysin'in DEPT spektrumu 78
Şekil 4. 37 Chrysin'in COSY spektrumu 79
Şekil 4. 38 Chrysin'in HSQC spektrumu 80
Şekil 4. 39 Chrysin'in HMBC spektrumu 81
Şekil 4. 40 Acacetin'in ^{1}H-NMR spektrumu 84
Şekil 4. 41 Acacetin'in ^{13}C-NMR spektrumu 85
Şekil 4. 42 Acacetin'in DEPT spektrumu 86
Şekil 4. 43 Acacetin'in COSY spektrumu 87
Şekil 4. 44 Acacetin'in HSQC spektrumu 88
Şekil 4. 45 Acacetin'in HMBC spektrumu 89
Şekil 4. 46 Jaceosidin'in kimyasal yapısı 90
Şekil 4. 47 Jaceosidin'in ^{1}H-NMR spektrumu 92
Şekil 4. 48 Jaceosidin'in ^{13}C-NMR spektrumu 93
Şekil 4. 49 Jaceosidin'in DEPT spektrumu 94
Şekil 4. 50 Jaceosidin'in COSY spektrumu 95
Şekil 4. 51 Jaceosidin'in HSQC spektrumu 96
Şekil 4. 52 Jaceosidin'in HMBC spektrumu 97
Şekil 4. 53 Hispidulin'in kimyasal yapısı 98
Şekil 4. 54 Hispidulin'in ^{1}H-NMR spektrumu 100
Şekil 4. 55 Hispidulin'in ^{13}C-NMR spektrumu 101
Şekil 4. 56 Hispidulin'in DEPT spektrumu 102
Şekil 4. 57 Hispidulin'in COSY spektrumu 103
Şekil 4. 58 Hispidulin'in HSQC spektrumu 104
Şekil 4. 59 Hispidulin'in HMBC spektrumu 105
Şekil 4. 60 Daucosterol'ün kimyasal yapısı 106
Şekil 4. 61 Daucosterol'ün ^{1}H-NMR spektrumu 107
Şekil 4. 62 Daucosterol'ün 13C-NMR spektrumu 108
Şekil 4. 63 Daucosterol'ün DEPT spektrumu 109
Şekil 4. 64 Daucosterol'ün COSY spektrumu 110
Şekil 4. 65 Daucosterol'ün HSQC spektrumu 111
Şekil 4. 66 Daucosterol'ün HMBC spektrumu 112
Şekil 4. 67 Yeni bileşiğin kimyasal yapısı 115
Şekil 4. 68 Yeni bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Aromatik Bölge) 117
Şekil 4. 69 Yeni bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Şeker Bölgesi) 118
Şekil 4. 70 Yeni bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Alifatik Bölge) 119
Şekil 4. 71 Yeni bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumu (Aromatik Bölge) 120
Şekil 4. 72 Yeni bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumu (Alifatik ve Şeker Bölgesi) 121

Şekil 4. 73 Yeni bileşiğin COSY-1 spektrumu 122
Şekil 4. 74 Yeni bileşiğin COSY-2 spektrumu 123
Şekil 4. 75 Yeni bileşiğin TOCSY spektrumu 124
Şekil 4. 76 Yeni bileşiğin TOCSY-2 spektrumu 125
Şekil 4. 77 Yeni bileşiğin DEPT spektrumu (Aromatik Bölge-1) 126
Şekil 4. 78 Yeni bileşiğin DEPT spektrumu (Aromatik Bölge-2) 127
Şekil 4. 79 Yeni bileşiğin DEPT spektrumu (Alifatik ve Şeker Bölgesi) 128
Şekil 4. 80 Yeni bileşiğin HSQC spektrumu (Aromatik Bölge) 129
Şekil 4. 81 Yeni bileşiğin HSQC spektrumu (Alifatik Bölge) 130
Şekil 4. 82 Yeni bileşiğin HMBC spektrumu (Aromatik Bölge) 131
Şekil 4. 83 Yeni bileşiğin HMBC spektrumu (Şeker Bölgesi) 132
Şekil 4. 84 Yeni bileşiğin HMBC spektrumu (Alifatik Bölge) 133
Şekil 4. 85 Yeni bileşiğin MS spektrumu ve iyonlaşma ürünleri 139
Şekil 4. 86 Yeni bileşiğin iyonlaşma ürünleri 140
Şekil 4. 87 Luteolin'in kimyasal yapısı 141
Şekil 4. 88 Luteolin'in ^{1}H-NMR spektrumu 143
Şekil 4. 89 Luteolin'in ^{13}C-NMR spektrumu 144
Şekil 4. 90 Luteolin'in DEPT spektrumu 145
Şekil 4. 91 Luteolin'in COSY spektrumu 146
Şekil 4. 92 Luteolin'in HSQC spektrumu 147
Şekil 4. 93 Luteolin'in HMBC spektrumu 148
Şekil 4. 94 Apigenin'in kimyasal yapısı 149
Şekil 4. 95 Apigenin'in ^{1}H-NMR spektrumu 151
Şekil 4. 96 Apigenin'in ^{13}C-NMR spektrumu 152
Şekil 4. 97 Apigenin'in DEPT spektrumu 153
Şekil 4. 98 Apigenin'in COSY spektrumu 154
Şekil 4. 99 Apigenin'in HSQC spektrumu 155
Şekil 4. 100 Apigenin'in HMBC spektrumu 156
Şekil 4. 101 Bitkilerin laboratuvar ve arazi koşullarında kültüre edilmesi 158
Şekil 5. 1 Saflaştırma şeması 161
Şekil 5. 2 *Mosla soochowensis* ve *Popowia cauliflora* bitkileri 162
Şekil 5. 3 *Helichrysum teretifolium* bitkisi 163
Şekil 5. 4 *Zeyhera tuberculosa* ve *Callicarpa japonica* bitkileri 163
Şekil 5. 5 Acacetin ihtiva eden bazı bitki türleri 166
Şekil 5. 6 *Plantago hakusanensis* bitkisi 167
Şekil 5. 7 Bitki ekstrelerinin fitokimyasal analiz ve aktivite şeması 171
Şekil 5. 8 *Rheum emodi* bitkisi ve saflaştırılan bileşikler 173

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3. 1 GC-MS analiz koşulları 22
Çizelge 3. 2 HPLC-TOF analizlerinde kullanılan mobil fazlar 23
Çizelge 4. 1 KL Bitkisinin hekzan ve $CHCl_3$ ekstresindeki bileşenler ve oranları..... 31
Çizelge 4. 2 *Kickxia lanigera* ekstrelerindeki fenoliklerin miktarı..... 36
Çizelge 4. 3 KL ve KS bitkilerinin toplanma dönemlerine ve bitki kısımlarına göre fenolik bileşiklerinin değişimi..... 40
Çizelge 4. 4 Bitki örneklerinin antioksidan test sonuçları 44
Çizelge 4. 5 Daucosterol bileşiğinin NMR verileri 114
Çizelge 4. 6 Yeni bileşiğin NMR verileri 135
Çizelge 4. 7 Menthiafoloil grubunun deneysel ve literatür NMR verileri 138

1. GİRİŞ

Primer metabolitler (karbohidrat, yağ, protein vb.); bitkilerin hayatını devam ettirebilmesi için gerekli olan metabolik süreçlerde (büyüme, gelişme, üreme vb.) direkt görev olan bileşiklerdir. Doğal ürün ve fitokimyasal olarak da isimlendirilen bitki kimyasalları için kullanılan "sekonder metabolit" tanımı ise bu süreçlerde direkt olarak görev almadığı için kullanılmaktadır. Primer metabolitlerin kimyasal yapısından dolayı görevi, sentezi ve yapıları neredeyse bütün canlı organizmalarında ortaktır ve çok fazla değişiklik göstermezler. Sekonder metabolitlerde ise bu durum söz konusu olmadığı için bitkiler çok çeşitli fitokimyasalları bünyesinde bulundurmaktadır. Bu çeşitlilik, bitkilerin familyası, cinsi ve türü ile bitkilerin yetiştiği coğrafik koşulların (sıcaklık, toprak içeriği, yükseklik vb.) etkisiyle daha da artmaktadır.

Sekonder metabolitler terpenoit, alkaloid ve fenolikler olmak üzere üç ana sınıfa ayrılmaktadır. Bu bileşikler; bitkiler tarafından metabolik süreçleri esnasında üretilmektedir ve bundan dolayı önceden metabolik artık olarak düşünülmekteydi. Fakat bitkilerin bu bileşikleri kendini oluşturan organizmayı korumak için hayati bir görev üstlendiği anlaşıldı. Sonraki çalışmalar sonucunda, bitkilerin fitokimyasalları; diğer canlılara (bakteri, mantar, böcek, amip, bitki, büyük hayvan) karşı rekabet etme, metal taşınımı ve bitki ve hayvanların mikroorganizmalar ile ortak yaşama aracı olarak kullandığı rapor edilmiştir (Demain and Fang 2000).

Bitkiler içerdikleri primer metabolitlerden dolayı temel besin kaynağı olarak kullanılmasının yanı sıra, ihtiva ettikleri sekonder metabolitlerden dolayı da tedavi amaçlı kullanılmaktadır. İnsanoğlu hastalıkları tedavi amaçlı yaptığı çalışmalar, çok eski tarihe dayanmaktadır (Rates 2001). Bitkilerin bu amaçla kullanımı ise insanlık tarihi kadar eskidir. Yüzyıllar boyunca hastalıklara karşı tedaviyi bulmak için yapılan çalışmaların sonucu olarak bitkilerin tıbbi olarak kullanılabileceği ortaya çıkmıştır. Bitkilerdeki biyoaktif özellikli sekonder metabolitlerin tanımlanması bitki kökenli maddelerin kullanılmasına yol açmaktadır.

Bilim ve teknoloji alanındaki gelişim, modern tıbbın gelişmesini sağlamıştır. Fakat günümüzde kullanılan birçok ilacın yan etkilere (özellikle de toksik özelliğinden kaynaklanan) sahip olduğu anlaşılmaya başlanmıştır. Alternatif tıpta bitkilerin bilinçli bir şekilde tüketildiğinde ise bu etki oldukça düşük seviyede kalmaktadır.

Tarihsel olarak bitkisel ilaçlar renklendirici, yara lapaları, pudra ve çay olarak kullanılmıştır. Tıbbi bitkilerden elde ilaçların keşfi kanser ve kardiyovasküler hastalıkları için çeşitli hedeflere karşı yeni ve önemli hedefler sağlamaya devam etmektedir (Ramawat *et al.* 2009). Bitkilerin tıbbi özellikleri "sekonder metabolit" adı verilen aktif bileşiklerin olmasından kaynaklanmaktadır.

Tıbbi bitkiler veya onların ekstreleri çok eski zamandan beri kullanılmaktadır ve analjezik (morfin), antihipertansif (reserpine), antineoplastik (vinblastin ve taxol) gibi değerli ilaçlar sağlamaktadır. Tıbbi bitkilerin geleneksel ve etnobotanik kullanımları bize aktif bileşiklerin izolasyonu konusunda bir bilgi kaynağı olarak hizmet etmektedir.

Günümüzde yaklaşık 250000 tür bitkinin farmakolojik aktiviteleri incelenmemiştir (Ramawat *et al.* 2009). Türkiye coğrafik etkiler sonucunda çok farklı tıbbi bitki içeren zengin floraya sahip olmasına rağmen bu zenginliği yeterince kullanamamaktadır. Bu amaçla bu tez çalışması kapsamında, fazla çalışma yapılmamış olan *Kickxia lanigera* bitkisinin farklı polaritelerdeki organik çözücülerde elde edilen ekstrelerinin kimyasal içeriği GC-MS ve HPLC-TOF/MS cihazları ile analiz edilmiş, ekstrelerin HeLa kanser hücresine karşı antiproliferatif ve antioksidan (toplam antioksidan, indirgeme gücü, H_2O_2 ve DPPH· radikali giderme) aktiviteleri incelenmiştir. Biyolojik aktivite testleri sonucunda, bitki ekstrelerinin (özellikle $CHCl_3$ ve EA) aktiviteye sahip olduğu, belirlenmiştir**.** Antiproliferatif aktivitesi yüksek olan $CHCl_3$ ve EA ekstrelerine kromatografik yöntemler uygulanarak saflaştırılan bileşiklerin antioksidan aktivitelerinde ekstrelerden genel olarak daha düşük aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Bitki materyallerinin tedarik zorluğu ve bitkilerin doğadaki coğrafik dağılımını olumsuz etkileyen mevsimsel faktörleri en aza indirgemek için yapılan bitkilerin kültüre etme çalışmaları sonucunda, *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria*

bitkilerin tohumlarından yeni bitki materyalleri elde edilerek kültüre etme işlemi başarıyla sonuçlanmıştır. Ayrıca morfolojik özellikleri çok benzeyen, çiçek rengi gibi küçük farklılıklar içeren *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* bitkilerinin antioksidan aktiviteleri ve HPLC-DAD yöntemi ile kimyasal analizleri yapılmış, yapılan çalışmalar sonucunda kimyasal içeriğinin farklı olduğu ve bu farklılığın ekstrelerin aktivitelerinin farklılaşmasına neden olduğu belirlenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Scrophulariaceae (Sıraca otugiller) familyası

Sıraca otugiller (Scrophulariaceae), genellikle otsu, çalımsı ya da nadiren ağaç formunda olan çiçekli bitkileri içeren bir familyadır.

Geçmişte, Scrophulariaceae familyasına ait yaklaşık 275 cins ve 5.000'den fazla bitki türü içerdiği düşünülmüştür. Fakat yapılan taksonomik çalışmalar sonucunda familyaya ait birçok bitki türü, Plantaginaceae, Orobanchaceae gibi bilinen ve diğer yeni familyalara transfer edilmektedir.

2.2. Plantaginaceae (Sinirotugiller) familyası

Sinirotugiller ailesi olarak bilinen Plantaginaceae familyası, Lamiales (çok yıllık, aromatik kokulu, hermafrodit çiçekli bitkiler) düzenindeki çiçekli bitkiler ailesidir. Genişletilmiş Plantaginaceae familyası, yaklaşık 94 cins ve yaklaşık 1900 türden oluşur. Dünyanın hemen her yerinde yayılış gösteren bu familya Türkiye'de Alburan (*Albraunia*), Asi balıkağzı (*Misopates*), Aslanağzı (*Antirrhinum*), Balıkağzı (*Chaenorhinum*), Dilbersaçı (*Callitriche*), Fukaraotu (*Kickxia*), Göksırımotu (*Pseudolysimachion*), Hüdaverdiotu (*Gratiola*), Kayagüzeli (*Wulfenia*), Kısrakkuyruğu (*Hippuris*), Küre çiçeği (*Globularia*), Mavişot (*Veronica*), Nakkaşotu (*Cymbalaria*), Nevruzotu (*Linaria*), Sinirotu (*Plantago*), Süpürgeotu (*Anarrhinum*), Sururotu (*Lagotis*), Yüksükotu (*Digitalis*) olmak üzere 18 cinse ev sahipliği yapmaktadır. Günümüzde Plantaginaceae, çoğunlukla ılıman bölgelerde meydana gelen çeşitli ve kozmopolit bir ailedir. Bitkiler genellikle otlar ve çalılardır ve ailenin sınırlarını belirlemek zordur. Plantaginaceae familyasının sistematik yeri aşağıdaki gibidir.

Âlem (Kingdom)	:Plantae
Altalem (Subkingdom)	:Tracheobionta
Bölüm (Division)	:Magnoliophyta
Sınıf (Class)	:Magnoliopsida
Altsınıf (Subclass)	: Asteridae
Takım (Order)	:Plantaginales

Plantaginaceae familyasına ait bitkilerin yaprakları tek çeneklilerde olduğu gibi paralel damarlanma sistemine sahiptir, ancak ana damarlar arasında ağsı damarlanma görülür. Yapraklar karşılıklı veya spiral şeklinde dizilmiştir. Çiçekleri çok çeşitli şekillerde olup genellikle iki dudaklı, dört parçalı veya oldukça küçülmüştür.

Plantaginaceae familyasının en büyük üyesi olan *Plantago* bitkisinin polenleri üzerinde yapılan çalışmalar, Kuzey Avrupa ülkelerine yaklaşık 4000 yıl önce taş çağında, ilk ilkel tarım alanlarının kuruluşu döneminde geldiğini göstermektedir (Samuelsen 2000). 'Planta' Latince'de ayak tabanı anlamına gelmektedir. Bu adlandırma, bitkinin cins adı olan Plantago'ya da adapte edilmiştir. Kızılderililer *P. major*'a Avrupalıların gittikleri her yerde bulunmalarından ötürü 'beyaz adamın ayak izi' adını vermişlerdir. *P. major* yüzyıllardır bilinen eski tıbbi bitkilerden biridir. İskandinavya'da yara iyileştirici özelliğiyle bilinir, Norveççe ve İsveççe'de bitkinin ortak olarak kullanılan adı (groblad) 'iyileştirici yapraklar' manasına gelmektedir (Samuelsen 2000).



Şekil 2. 1 *Plantago bellardii* bitkisi (URL-1)

Süs bitkisi olarak yaygın kullanılan "Aslanağzı (*Antirrhinum* L.)", yine süs bitkisi olarak kullanımının yanı sıra aynı zamanda bünyesinde oldukça zehirli maddeler olmasına rağmen kalp ilaçlarının yapımında kullanılan "Yüksükotu (*Digitalis* L.)" ve tıbbi özelliklere sahip "Sinirotu (*Plantago* L.)" cinslerine ait bitkiler bu ailede yer alır.

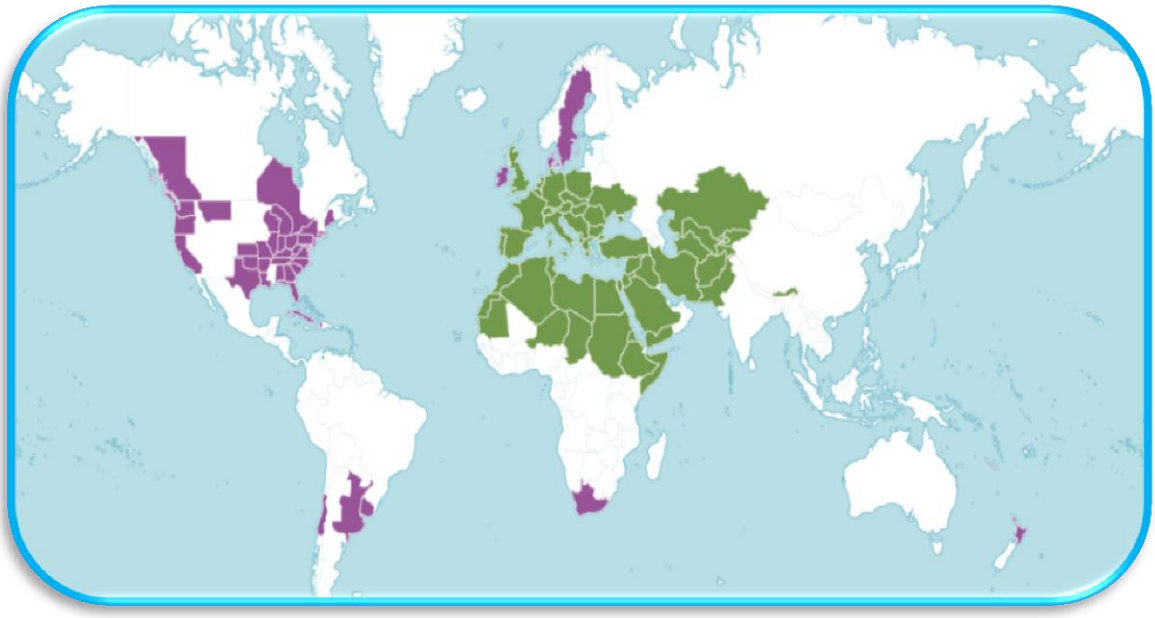
2.3. *Kickxia* türü ile ilgili genel bilgiler

Kickxia; Belçikalı botanikçi Jean Kickx anısına verilen bir isim olup, Plantaginaceae familyasına ait bir bitki cinsidir. Yaygın olarak cancerworts (kanser suyu/kanser bitkisi) ve fluellinler (sürünen bitki) olarak bilinen çeşitli bitki türlerini içerir. Bu bitkiler çoğunlukla Avrupa'nın yerlisidir, ancak iki tür, *K. elatine* ve *K. spuria*, başka yerlerde istilacı yabani otlar olarak bilinmektedir.



Şekil 2. 2 *K. Elantine* (URL-2) ve *K. Spuria* (URL-3) bitkileri

Kickxia türünün dünyadaki dağılımını gösteren dünya haritası Şekil 2.3'de gösterilmektedir ve yeşil bölgeler tabii, mor olanlar başka bölgelerden getirilip yetiştirilen bölgeleri temsil etmektedir.



Şekil 2. 3 *Kickxia* türünün dünyadaki dağılımı (URL-4)

Ülkemizde "fukaraotu" ismiyle bilinen bu tür, sarı renkli çiçeklere sahip tek yıllık otsu bir bitkidir. Haziran ve Ağustos ayları arasında çiçek açar, mahsüllerin (mısır, patates) yabancı otları olarak ya da nadasa bırakılmış tarlalar, atık yerler ve kıyı çakıllarında yetişir.

Dünyada The Plant List verilerine göre tescil edilen 10 türden 5 tanesi (*Kickxia commutata* subsp. *commutata*, *Kickxia commutata* subsp. *Graeca*, *Kickxia elatine* subsp. *crinita*, *Kickxia lanigera*, *Kickxia spuria* subsp. *integrifolia*) Türkiye'de yetişmektedir. Kabul edilen diğer türler ise *Kickxia acerbiana* (Boiss.) Täckh. & Boulos, *Kickxia caucasica* (Muss.Puschk. ex Spreng.) Kuprian, *Kickxia cirrhosa* (L.) Fritsch, *Kickxia pseudoscoparia* V.W.Sm. & D.A.Sutton ve *Kickxia sagittata* (Poir.) Rothm.(URL-5) bitkileridir.

Kickxia türünün taksonomisi ile ilgili literatürde yer alan çalışmalarda; bu türün birbirine çok yakın olan Plantaginaceae ve Scrophulariaceae familyalarına ait olduğu çalışmalar yer almaktadır. Örneğin 2018'de yayınlanan bir çalışmada *Kickxia spuria* bitkisinin saflaştırılan iridoid bileşiklerinden dolayı kemotaksonomik açıdan

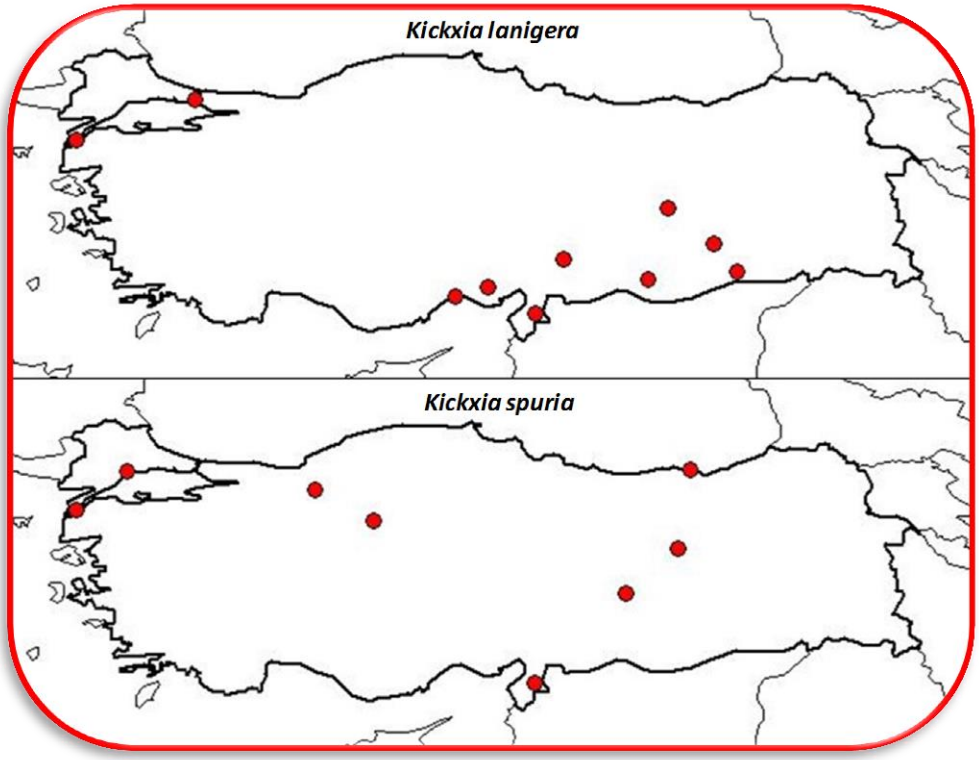
Plantaginaceae familyasına (Venditti *et al.* 2018) ait olduğu, aynı bitki üzerine yapılan diğer çalışmada ise polen morfolojisi bakımından Scrophulariaceae ailesine dâhil olmaları doğrultusunda görüş bildirilmektedir (Al Masoudi *et al.* 2020). Ayrıca *Kickxia* cinsi Türkiye bitkileri veri tabanı Flora of Turkey (6. Cilt; 674-677 sayfalar) kaynak kitabı ve Tübives online veri tabanında Scrophulariaceae familyasına dahil edilse de, "The Integrated Taxonomic Information System" (ITIS), The Plant List (TPL), World Flora Online gibi uluslararası kabul görmüş online siteler ve literatürdeki son çalışmalarda (Agelet and Vallès 2001; Ajmal Ali 2018; Farid *et al.* 2019; Gairola *et al.* 2019) ise Plantaginaceae familyasına ait olduğu rapor edilmiştir. Scrophulariaceae familyasına ait olduğu iddia edilen literatürlerin ve TUBIVES'in güncel olmadığı göz önünde bulundurulduğunda, şu an itibarıyla *Kickxia* cinsinin Plantaginaceae familyasına ait olduğu söylenebilir.

2.3.1 *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* türleri

Kickxia lanigera (DESF.) Hand.-Mazz. (Handel-Mazzetti) bitkisi terofit (tohum ya da sporla üreyen, kış ayları gibi zor çevre koşullarını tohum halinde geçirerek yaşamını sürdürebilen bitkiler) formunda olan tek yıllık otsu bir bitkidir. Çiçeklenme dönemi temmuz-eylül aylarıdır ve 0-1200 m yükseklikte bağlar, nadas tarlaları ve çorak yerlerde yayılım gösterir. Endemik olmayan bitki, Türkiye'de **"**tüylü fukaraotu" olarak bilinir ve genellikle Akdeniz bölgesinde, dünya genelinde ise güneybatı Avrupa ve Asya ile Kuzeybatı Afrika kıtalarında yetişmektedir. Bu bitkinin *Antirrhinum cordatum* Buch ex Chav., *Antirrhinum lanigerum* (Desf.) Willd., *Elatine lanigera* Moench ex Steud., *Elatinoides lanigera* (Desf.) Cout. ve *Linaria lanigera* Desf. gibi bilinen sinonimleri de bulunmaktadır (URL-6).

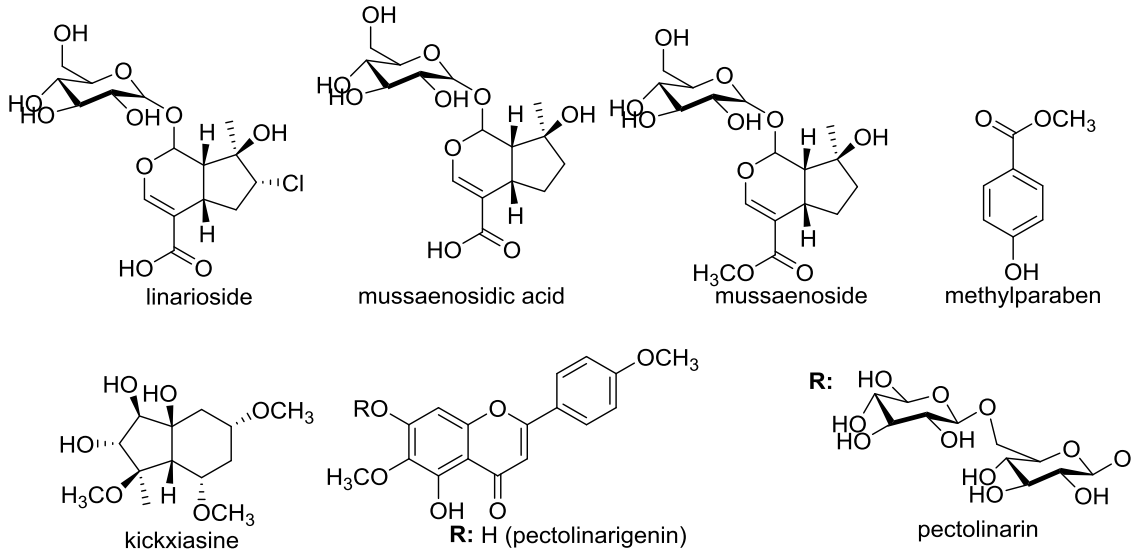
Kickxia spuria (L.) DUMORT bitkisi (sivri fukaraotu), *Kickxia lanigera* bitkisine benzer özellikte olup yayılım gösterdiği bölgeler (Güney, Batı ve Orta. Avrupa, Kuzey Afrika, Batı Suriye, Kıbrıs) bakımından farklılık gösterir. Bu bitki literatürde ayrıca *Antirrhinum spurium* var. *integrifolium* Brot. ve *Kickxia racemigera* (Lange) Rothm. olarak da bilinmektedir (Venditti *et al.* 2018). TUBIVES verilerine göre *Kickxia*

lanigera ve *Kickxia spuria* bitkilerinin Türkiye'deki yayılış gösteren bölgeleri Şekil 2.4'de gösterilmektedir.



Şekil 2. 4 *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* bitkilerinin Türkiye'de yetiştiği bölgeler (URL-7)

Pakistan'da iltihap giderici ve şeker hastalığının tedavisinde kullanılan *Kickxia ramosissima* (*Nanorrhinum ramosissimum*) bitkisi üzerine yapılan (Amin *et al.* 2017) çalışmada, toprak üstü kısmından değişik kromatografik (kolon ve flaş) yöntemler ve ekstraksiyon yöntemleri uygulanmıştır. Saflaştırma işlemleri sonucunda 4 iridoid (kickxiasine, mussaenosidic acid, mussaenoside ve linarioside), 2 flavonoid (pectolinarin ve pectolinaringenin) ve fenolik (methylparaben) olmak üzere 7 tane madde saflaştırılarak NMR, UV ve HR-FABMS gibi spektroskopik yöntemler ile yapıları belirlenmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5 *Kickxia ramosissima* bitkisinden saflaştırılan bileşikler

Aynı çalışmada yapılan aktivite testleri sonucunda saflaştırılan pectolinarigenin bileşiğinin orta seviyede antimikrobiyal aktiviteye ve MRC-5 hücresine sitotoksik etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. Başka bir çalışmada (Jan and Khan 2016) aynı bitkinin metanol ekstresi analiz edilmiş, tannin, flavonoid, alkaloid, kumarin, kalp glikozidleri, saponin, terpenoid ve filobatanin içerdiği ve kafeik asit, rutin, kateşin ve mirisetin varlığı kanıtlanmıştır. Biyolojik aktivite testler sonucunda bitkinin ateş düşürücü ve ağrı kesici özelliklere sahip olduğu bulunmuştur.



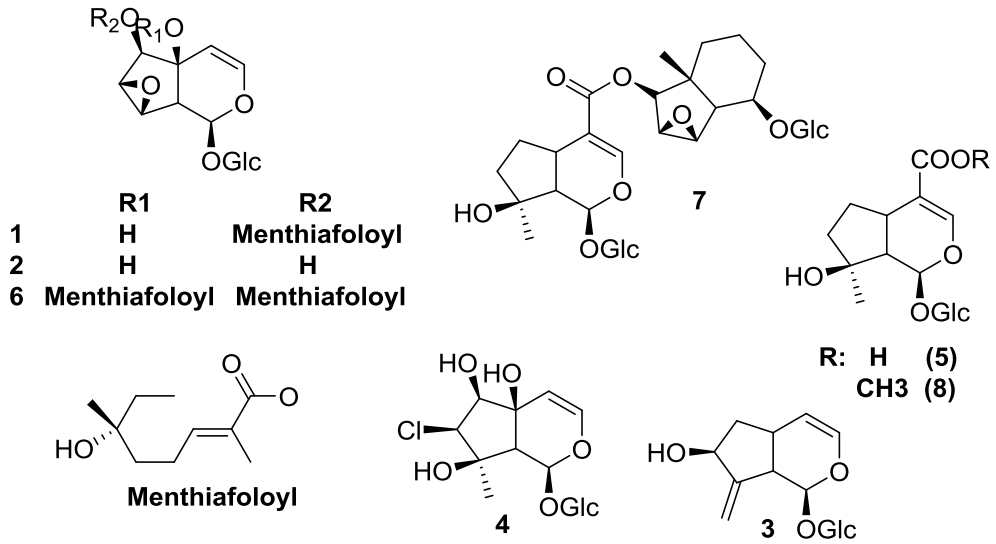
Şekil 2. 6 *K. ramosissima* bitkisi (URL-8)

Handjieva (Handjieva *et al.* 1995) tarafından yapılan bir araştırmada, Bulgaristan'da dağılım gösteren *Kickxia elatine, K. spuria* ve *K. commutata* bitkilerin MeOH ekstrelerine kromatografik işlemler uygulanmıştır.



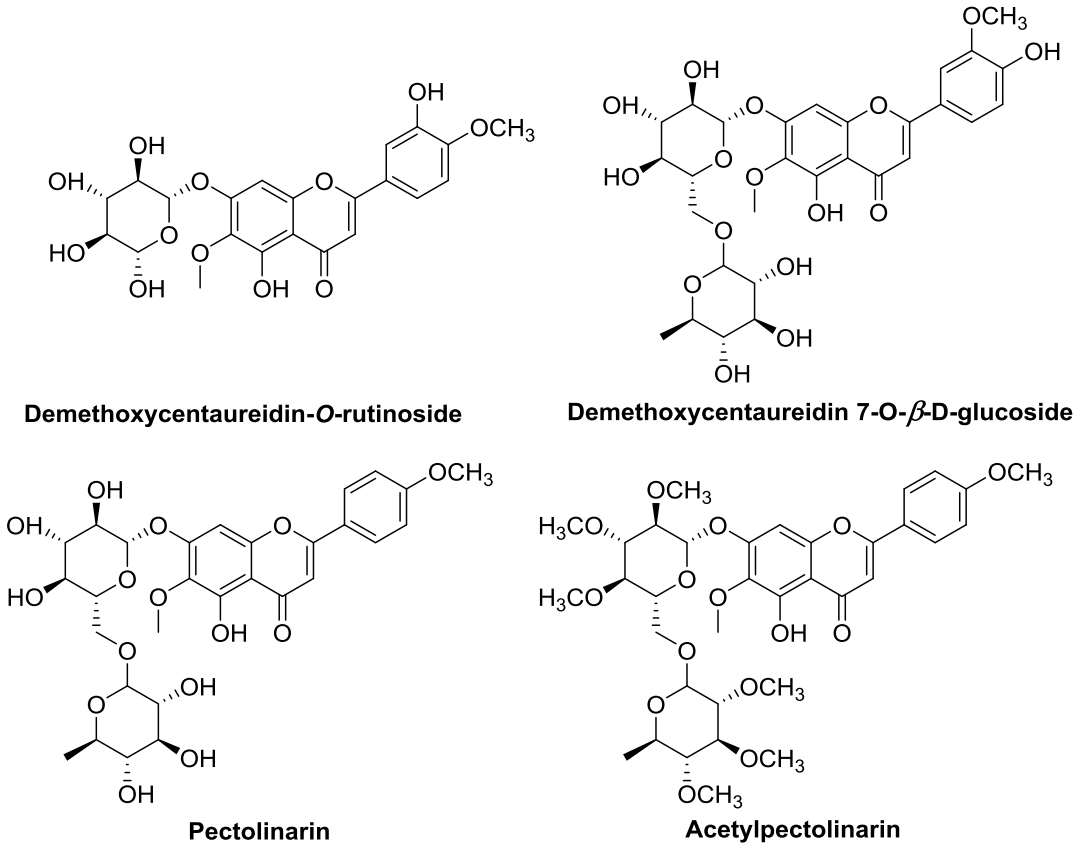
Şekil 2. 7 *K. commutata* bitkisi (URL-9)

Bu çalışma sonucunda bitki ekstrelerinden kickxioside (1), antirrinoside (2), antirride (3), linarioside (4), mussaenosidic acid (5), 5-*O*-Menthiafoloylkickxioside (6), kickxin (7) ve mussaenoside (8) olmak üzere 8 tane iridoid glikozit izole edilmiştir (Şekil 2. 8).



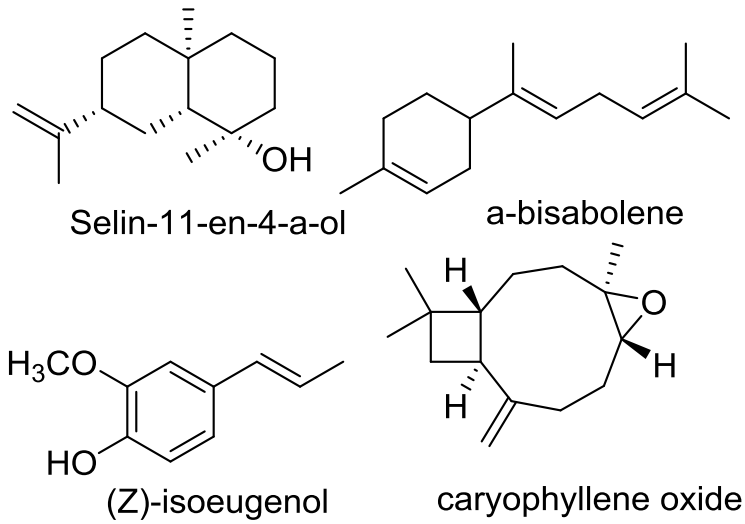
Şekil 2. 8 *K. elatine, K. spuria* ve *K. commutata* bitkilerinden saflaştırılan bileşikler

Yuldashev (Yuldashev 1996) tarafından yapılan bir diğer araştırmada *Kickxia elatine* (L.) bitkisinden biri yeni (demethoxycentaureidin 7-O-β-D-glucoside) ve literatürde bilinen 3 bileşik (Pectolinarin, Acetylpectolinarin ve demethoxycentaureidin-*O*-rutinoside) olmak üzere izole 4 bileşik saflaştırılmıştır.



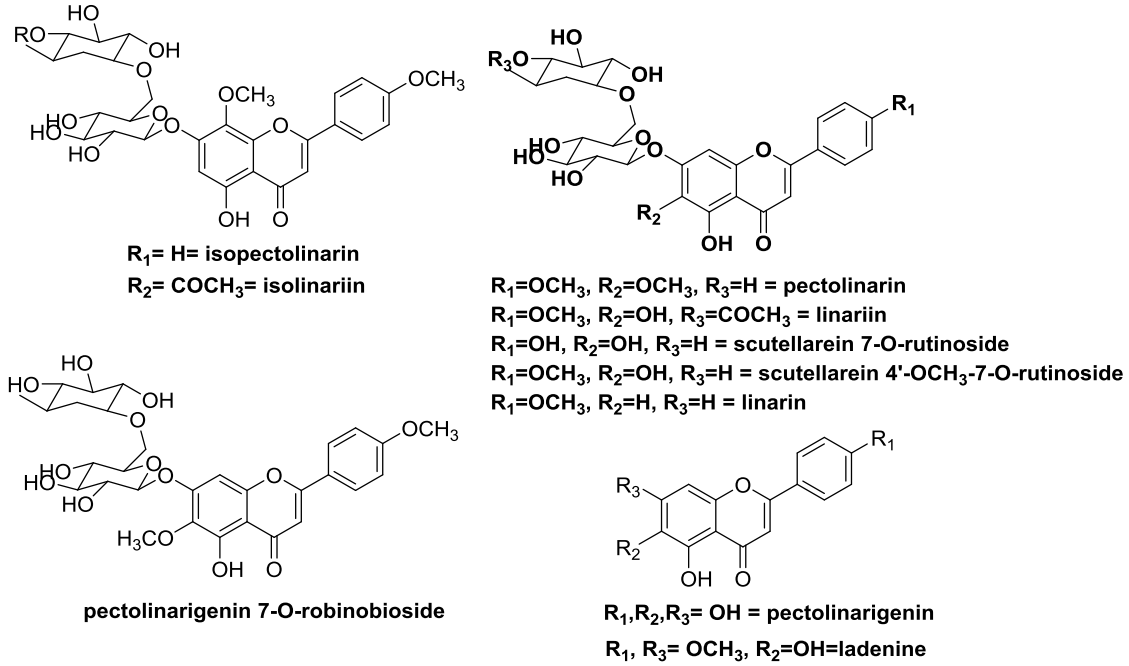
Şekil 2. 9 *Kickxia elatine* bitkisinden izole edilen fenolik bileşikler

Semnani ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada İran'da yetişen *Kickxia spuria* (L.) Dum. bitkisinin toprak üstü kısımlarına su buharı destilasyonu işlemi uygulanmıştır. Çalışma sonucunda uçucu yağ verimi % 0.4, uçucu yağ karışımındaki temel bileşenlerin ise selin-11-en-4α-ol (% 19.4), caryophyllene oxide (% 8.9), (*Z*)-isoeugenol (% 8.3) ve *β*-bisabolene (% 5.2) olduğu tespit edilmiştir.(Morteza Semnani *et al.* 2008)



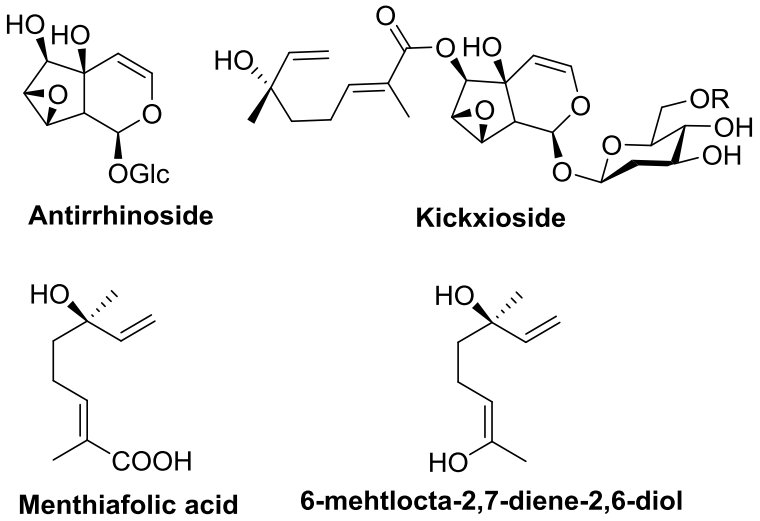
Şekil 2. 10 *Kickxia spuria* bitkisindeki uçucu bileşenlerin kimyasal yapıları

Farid ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *Kickxia aegyptiaca* (L.) Nábělek bitkisinden iki yeni bileşik (isoscutellarein ve isolinariin), 8 bilinen (ladenine, pectolinarigenin, pectolinarin, linariin, pectolinarigenin 7-*O*-robinobioside, scutellarein 7-*O*-rutinoside ve scutellarein) olmak üzere toplam 10 bileşik izole edilmiştir. Yapılan antikanser testleri sonucunda bitki ekstrelerin ve saflaştırılan bileşiklerin meme (MCF-7) ve kolon (HCT-116) kanseri hücre hatlarına karşı etkileri incelenmiş, pectolinarigenin bileşiğinin yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir (Farid *et al.* 2019).



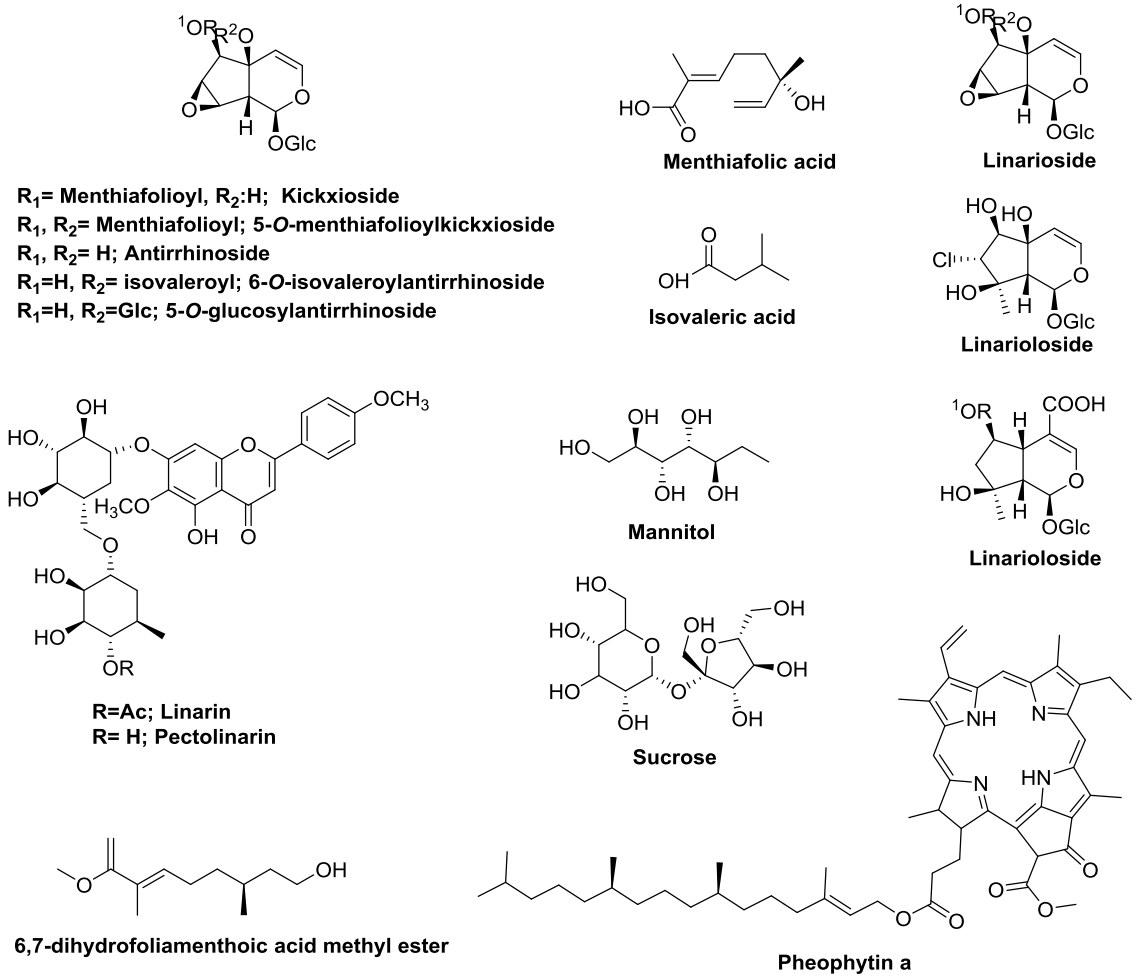
Şekil 2. 11 *Kickxia aegyptiaca* (L.) Nábělek bitkisinden saflaştırılan bileşikler

Literatürde yer alan bir çalışmada İtalya'da yayılış gösteren *Kickxia spuria* bitkisinden antirrhinoside ve kickxioside (Nicoletti *et al.* 1987), aynı grubun aynı bitki üzerine yaptığı diğer bir çalışmada (Nicoletti *et al.* 1989) ise Menthiafolic acid ve 6-mehtlocta-2,7-diene-2,6-diol bileşikleri saflaştırılarak yapıları aydınlatılmıştır (Şekil 2.12).



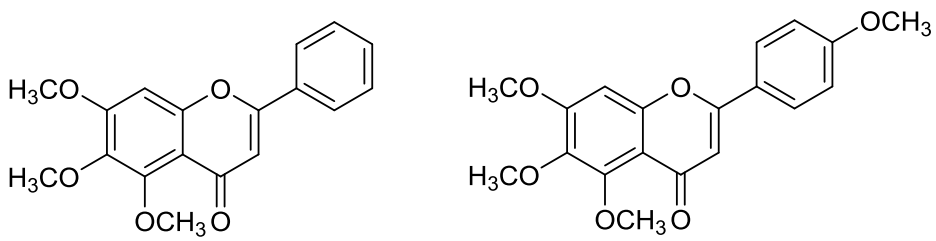
Şekil 2. 12 *Kickxia spuria* bitkisinden saflaştırılan bileşikler

Kickxia spuria bitkisi üzerine yapılan diğer bir çalışmada (Venditti *et al.* 2018), bitkinin etanol ekstresinden 14 madde (pheophytin a, linariin, pectolinarin, 6,7-dihydrofoliamenthoic acid methylester, mannitol, kickxioside, 5-O-menthiafolioylkickxioside, linarioloside, linarioside, mussaenosidic acid, antirrhinoside, 6-O-isovaleroylantirrhinoside, 5-O-glucosylantirrhinoside ve sucrose) saflaştırılmıştır.



Şekil 2. 13 *Kickxia spuria* bitkisinden saflaştırılan bileşikler

Literatürde yer alan diğer çalışmada ise (Pinar 1973) tarafından *Kickxia lanigera* bitkisinden Mosloflavon ve 5,6,7,4'-tetramethoxyflavone olmak üzere 2 polimetoksiflavon bileşik izole edilmiştir.



Mosloflavon **5,6,7,4'-tetramethoxyflavon**

Şekil 2. 14 *Kickxia lanigera* bitkisinden izole edilen polimetoksiflavonlar

Kickxia türüyle ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde literatürde sınırlı sayıda çalışma olduğu, literatürde sadece birkaç türde saflaştırma yapıldığı ve herhangi bir biyolojik aktivite yapılmadığı görülmektedir. Bu çalışmada ve antioksidan ve antikanser gibi önemli biyolojik aktiviteleri incelendiğinden dolayı mevcut çalışma *Kickxia* türüne ait yeni ve önemli bir çalışma niteliği taşımaktadır**.**

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Bitkilerin Hazırlanması

Tez çalışmasında kullanılan *Kickxia lanigera* ve *spuria* bitkileri, Prof. Dr. Lütfi BEHÇET tarafından Elazığ ilinin Baskil ilçesinden, aktivite ve izolasyon işlemi için yeterli, bitki ekosistemini bozmayacak miktarda toplandı ve toplanma zamanları (2012 ve 2017 yılında, çiçeklenme döneminde) kaydedildi.



Şekil 3. 1 *Kickxia lanigera* bitkisi



Şekil 3. 2 *Kickxia spuria* bitkisi

Belirlenen bitkilerin tür teşhislerinin bir kez daha yapılması amacıyla her örnek bütün branşlarını üzerinde barındıracak şekilde temiz kurutma kağıtlarında preslenerek herbaryum için hazırlandı. Ekstraksiyon işlemleri için bitki materyalleri, havadar ve güneş ışığı görmeyen bir ortamda kurumaya bırakıldı. Bu kuru bitkiler ise sıvı azotla parçalanarak ekstraksiyon için hazır hale getirildi.

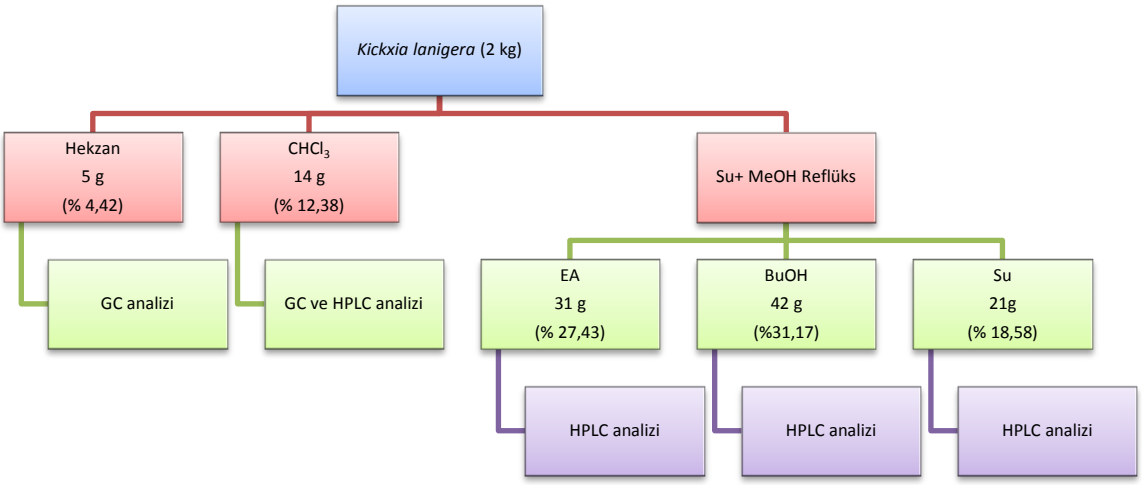
3.2. Bitkilerin Ekstraksiyonu

Bu çalışma kapsamında toplanan bitki örnekleri kurutuldu ve azotla dondurulduktan sonra ezerek öğütüldü. Toz haline getirilen bitki örneklerine ekstraksiyon işlemi uygulandı. Apolar özellikteki maddeleri ekstrakte etmek için *Kickxia lanigera* bitki materyali (2 kg) hekzan ile 2 gün arayla 3 defa ekstrakte edildi. Geriye kalan bitki örnekleri serilerek içindeki hekzan çözücüsü uzaklaştırıldı. Kurutulan bitki örnekleri $CHCl_3$ ile 2 gün arayla 4 defa maserasyon yöntemi ile ekstrakte edildi.



Şekil 3. 3 Bitkilerin ekstraksiyonu

Kalan bitki posası ise MeOH:Su (1:1) karışımında 3 saat boyunca reflüks düzeneğinde kaynatıldı. Karışım oda sıcaklığına kadar soğutularak süzüldü. MeOH:Su karışımındaki MeOH çözücüsü buharlaştırılarak evaporatör ile çektirilerek uzaklaştırıldı. Kalan su fazı ise sırasıyla etil asetat (EA) ve bütanol (BuOH) çözücüleriyle ekstrakte edildi. Bitkinin dört ekstresinin (hekzan, $CHCl_3$, EA ve BuOH) çözücüleri evaporatör ile uzaklaştırılarak ham ekstreleri elde edildi**.**

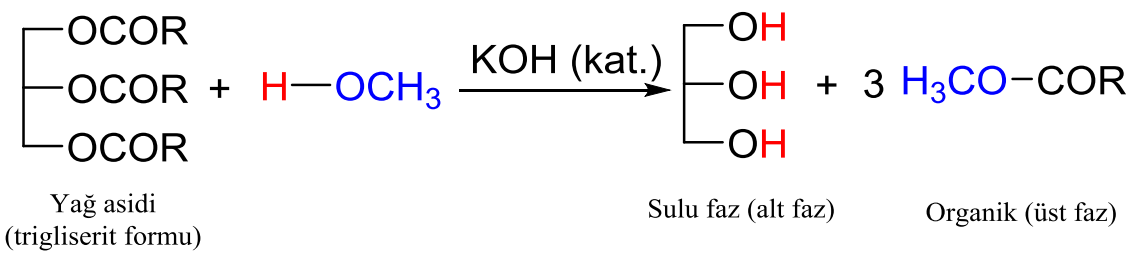


Şekil 3. 4 Ekstraksiyon Şeması

3.3. Bitki Ekstrelerinin Fitokimyasal Analizi

3.3.1. Bitki Ekstrelerinin GC-MS Analizleri

Bitkinin kimyasal içeriğinin belirlenmesi için hekzan ve $CHCl_3$ ekstrelerine esterleştirme işlemi uygulandı. Esterleştirme işlemi için 50 mg bitki ekstreleri 5 mL hekzan ile çözülerek üzerine 5 mL 1M KOH (MeOH'de çözünmüş) ilave edildi ve vorteks cihazı ile 30 saniye boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırıldı. Şekil 3.5 de gösterilen reaksiyona göre karışımlarda oluşan yağ asidi metil esterlerinin bulunduğu üst fazlardan (hekzan fazı) 1 mL alınarak şırınga yardımıyla 0,45 mikronluk filtreden viallere süzüldü ve GC-MS'e verilerek karışımdaki bileşenlerin fitokimyasal analizi gerçekleştirildi.



Şekil 3. 5 Yağ asidi esterleştirme reaksiyonu

Analizler Agilent 5975C inert MSD with triple-Axis Detector model kütle detektörü olan Agilent Technologies Marka 7890A model GC-MS cihazında gerçekleştirildi. Ekstrelerin GC analizlerinde uygulanan GC sıcaklık programlaması (Çizelge 3.1) ve diğer analiz koşulları aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3. 1 GC-MS analiz koşulları

	Artış °C/dk	**Sıcaklık °C**	**Süre (dk)**
Başlangıç		100	10
Aşama 1	5	180	15
Aşama 2	20	300	25
Toplam			62

Diğer Parametreler

İnlet sıcaklığı :250 °C
Split modu :Split (4:1)
Enjeksiyon Hacmi :1 µL
Akış hızı (He) :1mL/min (constant flow)
Kolon özellikleri :30 m *X* 320 µm *X* 0.25 µm; HP-5Ms (%5 fenil metil siloksan)
Detektör sıcaklığı :230 °C
İyonlaştırma modu :EI+
İyonlaştırma voltajı :70 eV
Kullanılan Kütüphaneler :NIST05, Wiley7n
Çalışılan Kütle aralığı :50.0-550.0

3.3.2. Ekstrelerin HPLC-TOF/MS analizleri

Kickxia lanigera bitkisinin fenolik içeriğinin belirlenmesi için kuru ham ekstrelerden bir miktar alınarak (yaklaşık 1 mg civarında) örnek çözeltilerin derişimleri 200 ppm olacak şekilde MeOH'de çözülerek şırınga yardımıyla 0,45 mikronluk filtreden viallere süzüldü ve HPLC-TOF cihazında verildi. Bunun yanında mevcut olan 45 adet fenolik standardın 25, 50, 100, 250, 500, 1000 ve 2500 ppb'lik karışım çözeltileri hazırlandı ve süzülerek HPLC-TOF/MS' e verildi. Standartların farklı derişimdeki çözeltilerinden

elde edilen kalibrasyon eğrilerinden yararlanılarak 200 ppm derişimde verilen örneklerdeki fenoliklerin derişimleri hesaplandı. Bu derişimlerden yararlanılarak fenoliklerin bitkideki miktarları belirlendi. Bitkideki fenoliklerin kalitatif analizleri fenoliklerin alıkonma zamanı ve m/z değerleri ile karşılaştırılarak yapıldı. Fenoliklerin kalitatif ve kantitatif analizleri 1260 infinity LC, 6210 TOF-MS cihazı ile yapılmıştır (Enjeksiyon hacmi: 10 µL, akış hızı 0,6 mL/dk, kolon sıcaklığı 35 ^{0}C, kolon modeli ZORBAX SB-C18 4,6x100mm, 3.5µm).

Bitki ekstrelerinin HPLC-TOF/MS analizleri süresince kullanılan analiz koşulları ile ilgili bilgiler aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3. 2 HPLC-TOF analizlerinde kullanılan mobil fazlar

	Zaman (dk)	%0,1 Formik asitli su (%)	Asetonitril (%)
1	0	90	10
2	1	90	10
3	20	50	50
4	23	20	80
5	25	90	10
6	30	90	10

3.4. Bitki Ekstrelerinin Antiproliferatif Aktivitesi

Kickxia lanigera bitkisinin hekzan, $CHCl_3$, EA ve MeOH ekstresinin HeLa (rahim kanseri hücresi) hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi incelendi. Bu amaçla kuru ham ekstrelerinde bir miktar alınarak derişimi 20 mg/mL olacak şekilde stok çözeltileri hazırlandı.

Besi yeri olarak % 10 fetal bovine serum ve % 2 streptomisin-penisilin içeren DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) kullanıldı ve analizler inkübatör içinde (% 5 CO_2, % 100 nem) 37 ^{O}C' da yapıldı. İlk olarak kuyucuklara 50 µL besi yeri konulan E-Plate 96 15 dk. steril kabinde ve 15 dk. inkübatörde bekletildi ve sonrasında inkübatör içindeki istasyona yerleştirildi ve arka plan (background) okuması yapıldı. Sonrasında

kuyucuklara her bir kuyucukta 2,5x104 adet HeLa hücresi olacak şekilde 100 µL hücre süspansiyonu koyuldu. Bundan sonra plaka yarım saat steril kabinde ve oda koşullarında bekletilerek hücrelerin kuyucuk tabanına yerleşmesi beklendi. Bu plaka istasyona yerleştirilerek 80 dk. boyunca 10 dakika aralıklarla ölçüm yapıldı (Bu sürede hücreler kuyucuk tabanına yerleşerek normal büyüme periyoduna girmiştir). Bundan sonra istasyondan çıkarılan plakanın kuyucuklarına steril DMSO ve besi yeri kullanılarak hazırlanan ekstre çözeltilerinden kuyucuklardaki son derişimler 250, 100 ve 50 µg/mL olacak şekilde çözeltiler eklenmiş ve sonrasında besi yeri ile kuyucuklardaki son hacim 200 µL'ye tamamlandı. Eklemelerden sonra plaka derhal istasyona yerleştirildi ve 48 saat boyunca 10 dakika aralıklarla analiz yapıldı. Testler üçer tekrarlı yapıldı**.**

3.5. Antioksidan aktivitelerinin incelenmesi

3.5.1. Serbest Radikal Giderme Aktivitesi:

Örneklerin serbest radikal giderme aktivitesi DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikali kullanılarak tayin edildi. Aktivite DPPH'nin menekşe/mor rengini giderme kapasiteleri ölçülerek değerlendirildi (Blois 1958). Yöntem, örneğin bir proton veya elektron verebilme yeteneğinin, mor renkli DPPH çözeltisinin rengini açması esasına dayanmaktadır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış 1 mL örnek ve standartların çözeltileri, 1 mL 0,1 mM DPPH· çözeltisi karanlık bir ortamda oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi ve daha sonra 517 nm absorbsiyonu ölçüldü. Örneklerin radikal giderme aktivitesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

DPPH· giderme aktivitesi (%)= [(Ao-A1)/Ao] x 100 (Ao: Kontrolün absorbansı A1:örnek absorbansı)

3.5.2 Toplam Antioksidan Kapasitesi Tayini

Örneklerin toplam antioksidan kapasitesi, spektrofotometrik olarak fosfomolibdenyum yöntemine göre belirlendi. Bu yöntem, ortamda bulunan Mo (VI)′ün indirgeyici örnek tarafından Mo (V)′e indirgenmesi sonucu oluşan yeşil rengin spektrofotometrik olarak ölçümü esasına dayanmaktadır (Mohamed *et al.*, 2007). Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan örneklerin (1 mL) çözeltisi ve 2 mL reaktif çözeltisi (0,6 M sülfürik asit- 28 mM sodyum fosfat- 4 mM′lık amonyum molibdat) deney tüplerinde karıştırılarak 95°C′de 90 dakika inkübe edildi. Örneklerin antioksidan kapasiteleri 695 nm de absorbans değerlerine göre belirlendi.

3.5.3. İndirgeme Gücü Tayini

Örneklerin indirgeme gücü kapasitesi Oyaizu metoduna göre belirlenmiştir. (Oyaizu,1986). 1 mL farklı konsantrasyonda hazırlanmış örneklerin 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH 6,6) ve 2,5 mL %1′lik $K_3Fe(CN)_6$ ile karıştırıldı. Karışım 50 °C′ deki su banyosunda 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra 2,5 mL %10′luk trikloroasetik asit (TCA) eklenerek karışım 10 dakika 2500 rpm′ de santrifüjlendi. Elde edilen üst fazın 2,5 mL′ si ile 2,5 mL su ve % 0,1 lik 0,5 mL $FeCl_3$ ile karıştırıldı. Örneklerin indirgeme gücü 700 nm′ de absorbans değerleri ölçüldü ve indirgeme gücü kapasiteleri belirlendi.

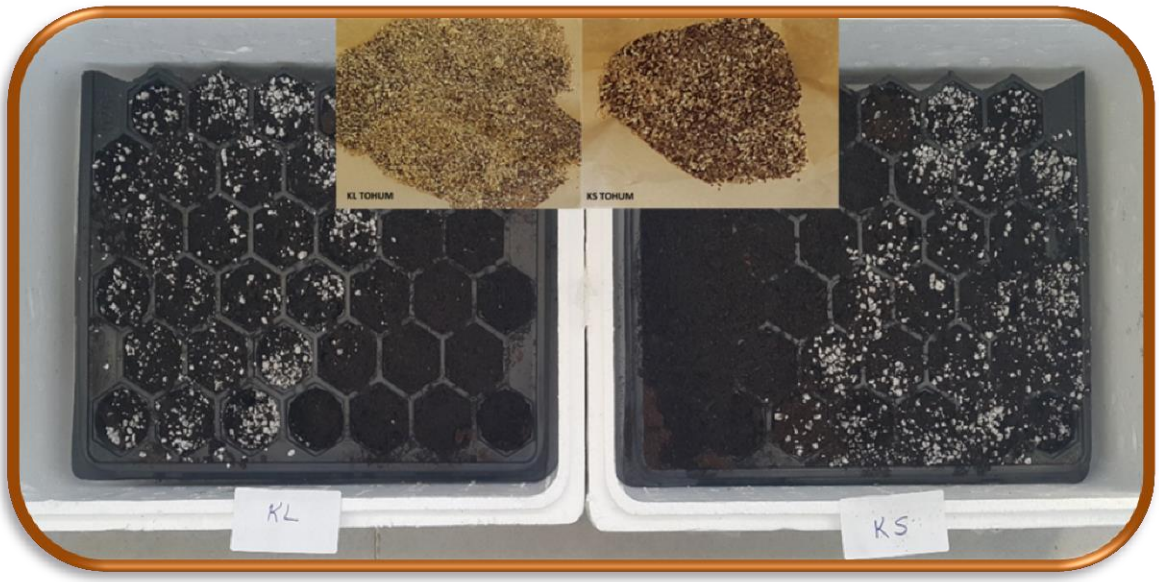
3.5.4. H_2O_2 giderme aktivitesi

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan test örneklerinden alınan 1 mL lik çözeltilerin üzerine fosfat tamponu (pH 7.4) içinde hazırlanmış 0.1 mM H_2O_2, 2-3 damla % 3 lük amonyum molibdat, 10 mL 2M üzerine H_2SO_4 ve 7 mL 1.8M KI çözeltileri eklendi. Karışımın sarı rengi giderilene kadar 5mM $Na_2S_2O_3$ ile titrasyon yapıldı. Aşağıdaki denkleme göre örneklerin % H_2O_2 giderme aktivitesi hesaplandı.

$$\% = [(V_{kontrol} - V_{örnek}) / V_{kontrol}] \times 100$$

3.6. Bitkilerin kültüre edilmesi

Günümüzde özellikle tedavi edici özelliği olan tıbbi bitkilere son yıllarda artan bir ilgi vardır. Fakat çoğu zaman bu tıbbi bitkiler doğada ihtiyacı karşılayacak derecede değildir. Ayrıca bu bitkiler genellikle engebeli bölgelerde yetiştiği için toplanması zor bir süreçtir ve mevsimsel etkilerinden dolayı birçok bitki türü her yıl aynı bölgede yetişmemektedir. Bu gibi problemleri çözmek için kullanılan yöntemlerden birisi bitkilerin kültür altına alınmasıdır. Bu çalışmada-çiçeklenme-tohumlanma döneminde (2017 yılı Eylül ayı) Elazığ ilinin Baskil ilçesinde yetişen *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* bitkileri doğal ortamlardan toplandı ve bitkilerin tohumları elde edildi. Tohumlar çimlenme için yeterli derinlikteki (3-4 cm) torflu topraklara ekildi ve üzeri az miktarda toprakla (1-2 cm) kapatıldı. Ekilen topraklar ihtiyaca göre haftada 2-3 defa sulandı ve çimlenme süresinde aynı koşullarda tutuldu.

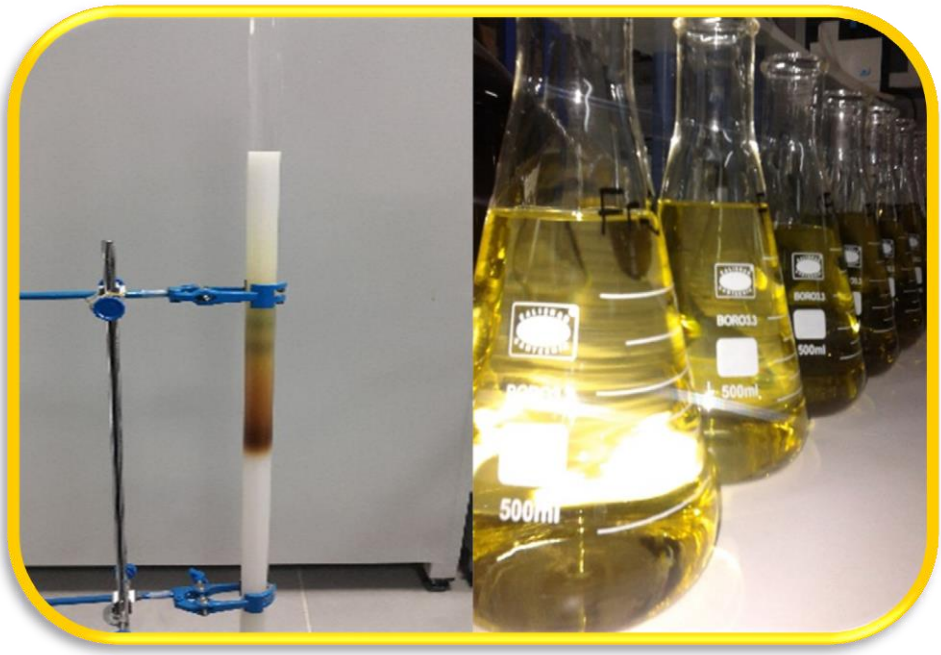


Şekil 3. 6 Bitkilerin kültüre edilmesi

3.7. Saflaştırma İşlemleri

Bu proje kapsamında *Kickxia lanigera* bitkisinin ekstreleri; saflaştırma işlemlerine tabi tutuldu. Bu amaç için saflaştırma işlemine; antikanser testi sonucunda en aktif olduğu tespit edilen $CHCl_3$ ekstresinden başlanmıştır. Nonpolar özellikte olan $CHCl_3$ ekstresi, daha uygun olduğu varsayılarak silikajel 60 (0.063-0.200 mm) kolonuna tatbik edildi.

Silikajel kolonu işleminde ilk olarak *Kickxia lanigera* bitkisinin $CHCl_3$ ekstresi (14 g) silikajel (14 g) karıştırıldı ve kurutuldu. Hekzan ile bulamaç haline getirilen 150 g silikajel, cam kolona (genişlik: 5cm, boy:100 cm) aktarıldı ve üzerine kurutulmuş ekstre: silikajel karışımı ilave edildi. Silikajel kolon dolgu maddesine uygun olarak, kolon kromatografisine hekzan çözücüsünden başlandı. Daha sonra Hekzan: CH_2Cl_2, Hekzan: $CHCl_3$, $CHCl_3$: MeOH çözücü sistemi ile devam edildi. En son kolondan MeOH geçirilerek kromatografik işlem sonlandırıldı. Kolon kromatografisi işlemi boyunca fraksiyonlar yaklaşık 500 ml olarak toplandı ve madde gelmediği tespit edilinceye kadar aynı çözücü sistemi ile devam edildi.



Şekil 3. 7 Saflaştırma İşlemleri

Çizelge 3. 3 Kolon Kromarafisinde kullanılan çözüsü sistemleri ve fraksiyonlar

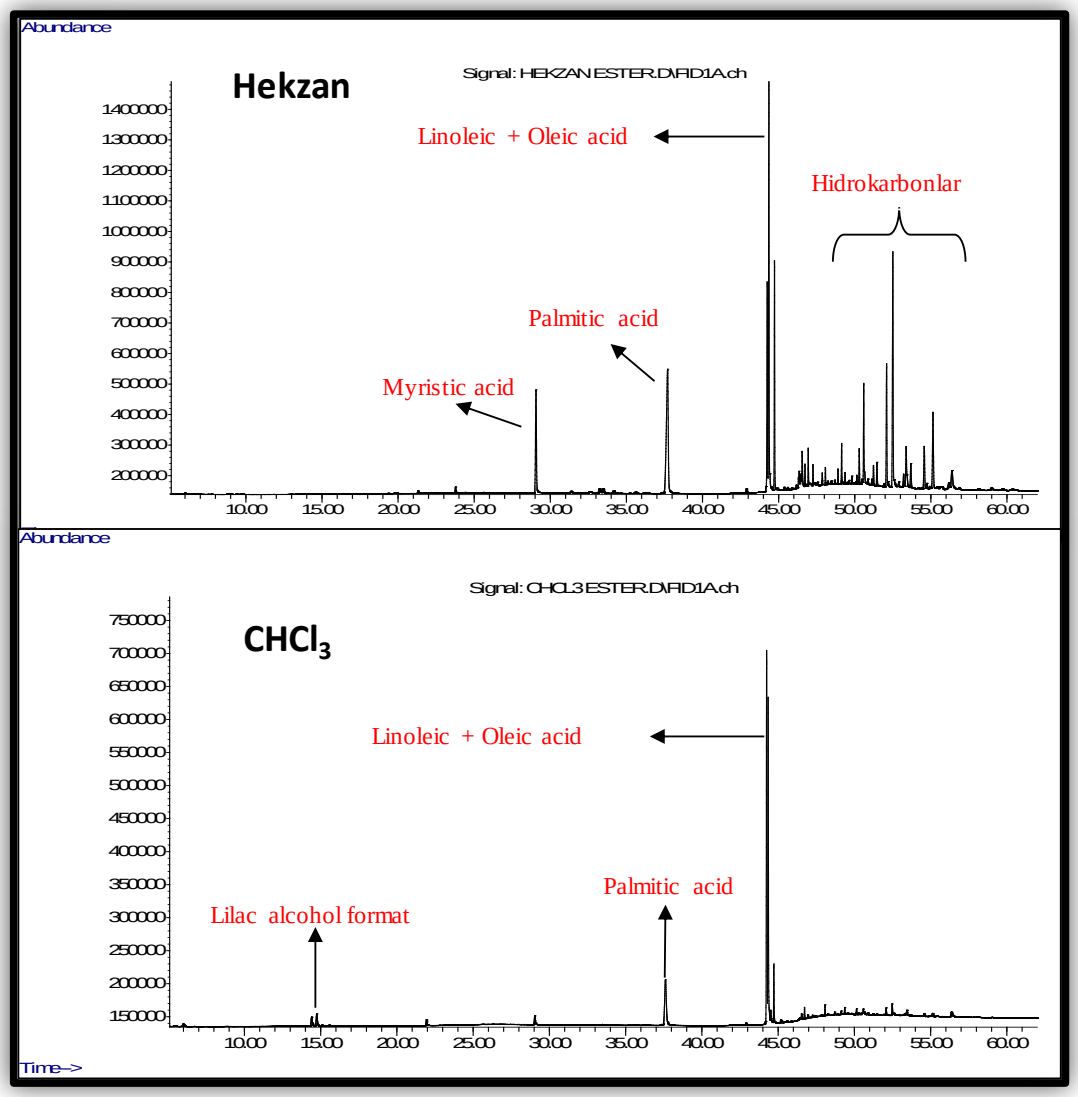
Fraksiyon kodları	Çözücü sistemi	Kul. çözücü miktarı (L)
-	%100 Hekzan	4
-	%85 Hekzan+%15 CH_2Cl_2	3
-	%75 Hekzan+%25 CH_2Cl_2	5
Fr 1-3	%50 Hekzan+%50 $CHCl_3$	4
Fr 4-6	%40 Hekzan+%60 $CHCl_3$	12
Fr 7-11	%20 Hekzan+%80 $CHCl_3$	8
Fr 11-45	%100 $CHCl_3$	14
Fr 46-50	%5 MeOH+%95 $CHCl_3$	6
Fr 51-57	%20 MeOH+%80 $CHCl_3$	8
Fr 58-61	%50 MeOH+%50 $CHCl_3$	2
Fr son	%100 MeOH	5
Toplam		**71**

4. BULGULAR

4.1. *Kickxia lanigera* ekstrelerinin GC-MS Analiz Sonuçları

GC-MS apolar karakterli örneklerin fitokimyasal analizleri için en ideal tekniklerden biridir. Bu teknik kimyasal olarak bozunma sıcaklığından önce buharlaşan veya değişik tekniklerle buhar fazına geçebilen bileşenler için kullanılabilmektedir. Ekstraksiyon için Hekzan ve $CHCl_3$ gibi çözücüleri kullanılması durumunda, bitkilerden bu organik çözücülere genel olarak uçucu yağ ve yağ asidi gibi apolar karakterli maddeler geçmektedir. Uçucu yağ bileşenleri kaynama noktası düşük olmasından dolayı GC-MS ile doğrudan analiz edilebilmektedir.

Yağ asit bileşenleri genellikle serbest halde bulunmayıp trigliseritleri halinde bulunmaktadır ve kaynama noktası çok yüksek olduğundan GC-MS ile doğrudan analiz yapılamaz. Bu engeli ortadan kaldırma için metilasyon yöntemi ile trigliseritleri halinde bulunan yağ asitlerini metil esterlerine dönüştürme en sık kullanılan tekniklerden biridir. Bu çalışmada yapılan metilasyon teknikleri sonucunda *Kickxia lanigera* bitkisinin hekzan ve $CHCl_3$ ekstrelerindeki yağ asidi metil esterleri içeren karışımların GC-MS analizleri sonucunda elde edilen FID kromatogramları aşağıda verilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4. 1 KL bitkisinin hekzan ve $CHCl_3$ ekstrelerinin FID kromatogramları

Örneklerdeki bileşenlerin kalitatif analizleri "Supelco 37 component fame-mix" karışımındaki bileşenlerin alıkonma zamanlarından ve W8N05ST, NIST ve WILEY7N kütüphanelerinden yararlanılarak yapılmıştır.

Kantitatif analizler ise piklerin altında kalan alanlardan hesaplanarak yapıldı. Yapılan kantitatif ve kalitatif analizlerin sonucu aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Çizelge 4.1).

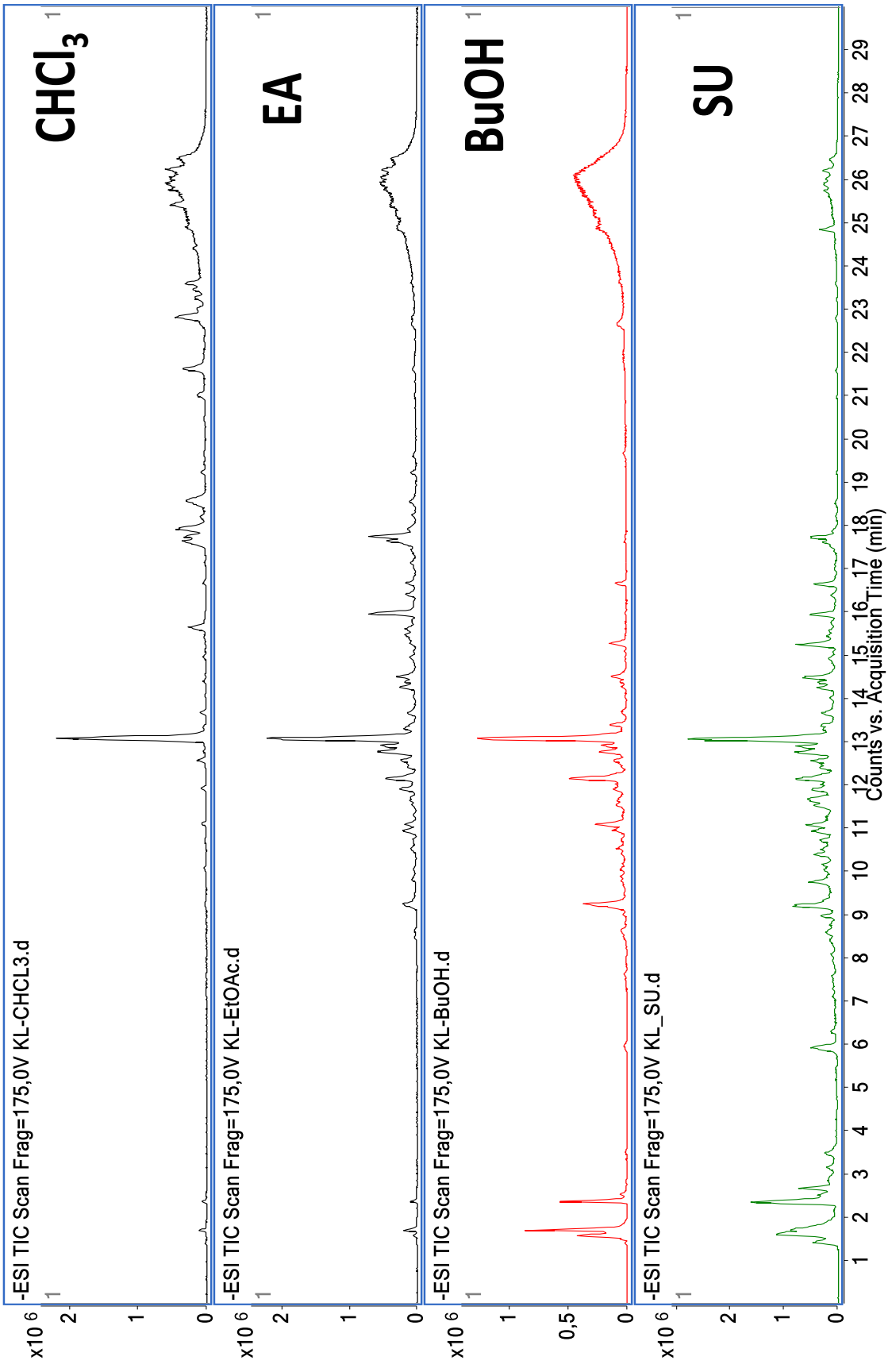
Çizelge 4. 1 KL Bitkisinin hekzan ve $CHCl_3$ ekstresindeki bileşenler ve oranları

Alıkonma Zamanı (dk)	**Bileşik İsmi**	**Hekzan**	**$CHCl_3$**
Yağ Asidi Metil Esterleri			
Doymuş			
29.079	Tetradekanoik Asit	6.82	1.47
37.725	Hekzadekanoik Asit	19.08	13.79
44.751	Octadekanoik Asit	8.12	5.43
46.754	Eikosanoik asit		0.82
	Ara toplam	34.02	21.51
Doymamış			
44.271	9,12-Octadekadienoik Asit	9.72	38.13
44.385	9-Octadekenoik Asit	18.76	34.08
	Ara Toplam	28.48	72.21
	Toplam	**62.5**	**93.73**
Hidrokarbonlar			
44.540	3-Octadeken		1.86
49.163	Heptakosan	1.08	
50.617	Nonakosan	5.24	
52.121	Hentriakontan	6.54	
52.533	Dotriakontan	13.08	
	Ara Toplam	**26.50**	**1.86**
Hidrokarbon Alkoller			
14.419	Lilac alcohol formate C veya D		1.86
14.757	Lilac alcohol formate C veya D (izomer)		2.56
46.565	14-Metil-8-Hekzadekin-1-ol	1.56	
	Toplam	**1.56**	**4.42**

4.2. *Kickxia lanigera* ekstrelerinin HPLC-TOF/MS Analiz Sonuçları

4.2.1. Kalitatif Analizler

HPLC-TOF/MS tekniği etil asetat, bütanol, metanol ve su gibi polar çözücülerden elde edilen polar karakterli bileşikleri içeren ekstrelerin fitokimyasal analizleri için çok kullanışlı tekniktir.



Şekil 4. 2 KL ekstrelerinin total iyon kromatogramları (TIC)

Kromatografik analizlerde ters faz olarak bilinen SB C-18 kolonu kullanılmıştır. Bu kolon dolgu maddesi, klasik kolon kromatografisinde kullanılan silikajele 18 karbonlu hidrokarbonun bağlanmasıyla elde edilmektedir ve bu sonradan eklenen karbon zinciri, dolgu maddenin fiziksel karakterini polardan apolara (yani hidrofilikten hidrofoliğe) dönüştürmektedir. Bu değişim apolar maddelerin benzer olan apolar kolon dolgu maddesi tarafından sıkıca tutulmasına, polar karakterli maddelerin ise daha az şiddette tutulmasına ve kolondan daha erken terk etmesine (yani alıkonma zamanının düşmesine) neden olmaktadır. Dolayısıyla yukarıdaki HPLC-TOF/MS cihazından elde edilen total iyon, kromatogramların (TIC) sol tarafında bulunan maddelerin polar, sağ tarafındaki maddelerin ise nispeten apolar karakterli olduğu söylenebilir.

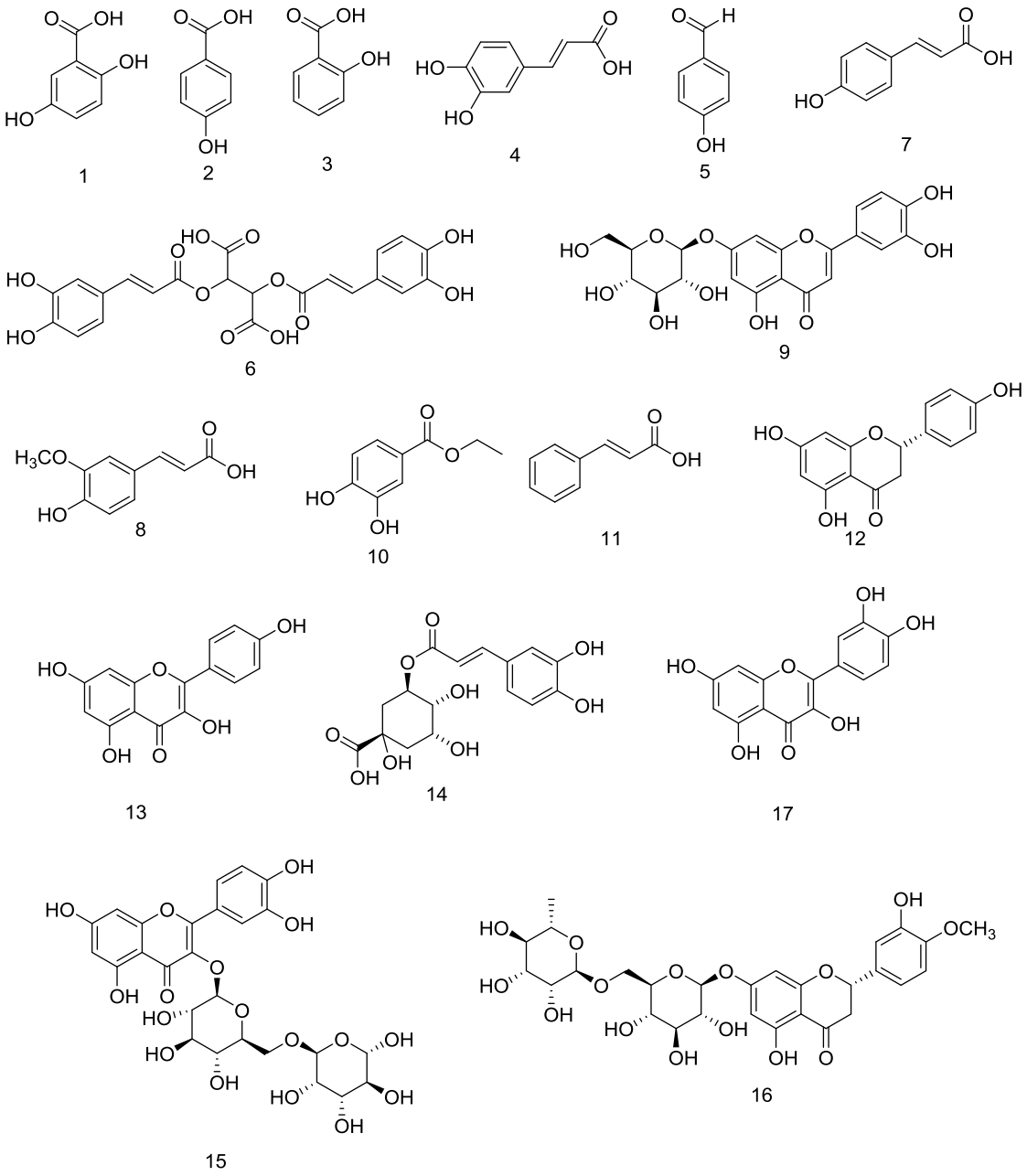
Bitki ekstrelerinin TIC kromatogramları incelendiğinde, *Kickxia lanigera* bitkisinin $CHCl_3$, EA, MeOH ve su ekstrelerinin HPLC-TOF/MS kalitatif analizleri sonucunda alıkonma zamanı yaklaşık 13 dk. olan m/z oranı (-) 573.2246 olan bileşiğin bütün ekstrelerde ana bileşen olduğu belirlenmiştir. $CHCl_3$, EA, BuOH ve su ekstresine doğru bu eğilimin olduğu, özellikle $CHCl_3$ ekstresinde 21-24 dk arasındaki bileşiklerin diğer ekstrelerde neredeyse hiç olmadığı görülmektedir. Bu nedenle ekstraksiyonda kullanılan $CHCl_3$ çözücüsünün bu aralıktaki bütün maddeleri su fazından alabildiği görülmektedir. Bunun yanında TIC kromatogramın 1-6 dk aralığındaki su ve BuOH ekstrelerindeki maddelerin $CHCl_3$ ve EA ekstrelerinde mevcut olmadığı görülmektedir. Başka bir önemli bir nokta ise, kromatogramlarda aynı alıkonma zamanına sahip olan maddelerin daha detaylı yapılan analizler sonucunda neredeyse bütün bileşiklerin farklı *m/z* sahip olduklarının tespit edilmesidir. HPLC-TOF/MS analizleri total olarak incelendiğinde ekstraksiyon işleminin oldukça spesifik olduğu anlaşılmaktadır.

Ayrıca yapılan kalitatif analizler sonucunda fenolik standartların moleküler iyon kütleleri ve alıkonma zamanları karşılaştırılarak bitki ekstrelerinde 17 farklı fenolik bileşiğin bulunduğu belirlenmiştir.

4.2.2. Kantitatif Analizler

4.2.2.1. HPLC-TOF/MS analizleri

Kickxia lanigera bitkisinin $CHCl_3$, EA, BuOH ekstrelerinin kalitatif analizleri sonucunda tespit edilen fenoliklerin ilk önce cihaza verilen 200 ppm'lik çözeltilerindeki derişimleri, bu derişim değerlerinden yararlanılarak da bitki ekstresindeki ve bitkideki miktarları hesaplandı. Fenolik bileşiklerin aşağıdaki mg fenolik/kg bitki olarak Çizelgeda verilmiştir**.**



Şekil 4. 3 KL ekstrelerinde tespit edilen standart fenoliklerin molekül yapıları

Çizelge 4.2 ve Şekil 4.3 incelendiğinde *Kickxia lanigera* bitkisinin genel olarak incelenen standart fenolik bileşikler açısından zengin olmadığı, EA ekstresinin mevcut fenolik bileşikler açısından diğer ekstrelere göre özellikle sinamik asit olmak üzere, hesperidin, apigetrin ve *p*-kumarik asit açısından zengin olduğu tespit edilmiştir. $CHCl_3$ ekstresinde az miktarda naringenin, kamferol, *p*-kumarik asit ve 4-hidroksibenzoik asit, BuOH ekstresinde ise az miktarda hesperidin ve rutin olduğu bulunmuştur. EA

fazındaki sinamik asit, apigetrin ve hesperidin miktarları diğer ekstrelere göre çok daha fazla olduğu görülmektedir.

Çizelge 4. 2 *Kickxia lanigera* ekstrelerindeki fenoliklerin miktarı

	Fenolik İsmi	$CHCl_3$	EA	BuOH
1	Gentisik asit	tr[a]	1,2[b]	tr
2	4-hidroksibenzoik asit		1,1	tr
3	Salisilik asit		0,11	tr
4	Kafeik asit		0,20	0,11
5	4-hidroksibenzaldehit	0,30	0,41	tr
6	Sisorik asit		0,22	0,14
7	*p*-kumarik asit	0,50	2,8	tr
8	*trans*-ferulik asit		0,11	0,13
9	Apigetrin		4,5	0,17
10	Protokateşik asit etil esteri		0,01	tr
11	Sinamik asit		5,92	0,10
12	Naringenin	0,60	1,60	0,11
13	Kamferol	0,50	0,12	0,09
14	Klorojenik asit	0,15	0,14	2,01
15	Rutin		1,60	0,5
16	Hesperidin		4,7	1,1
17	Kersetin	0,40	0,4	0,08

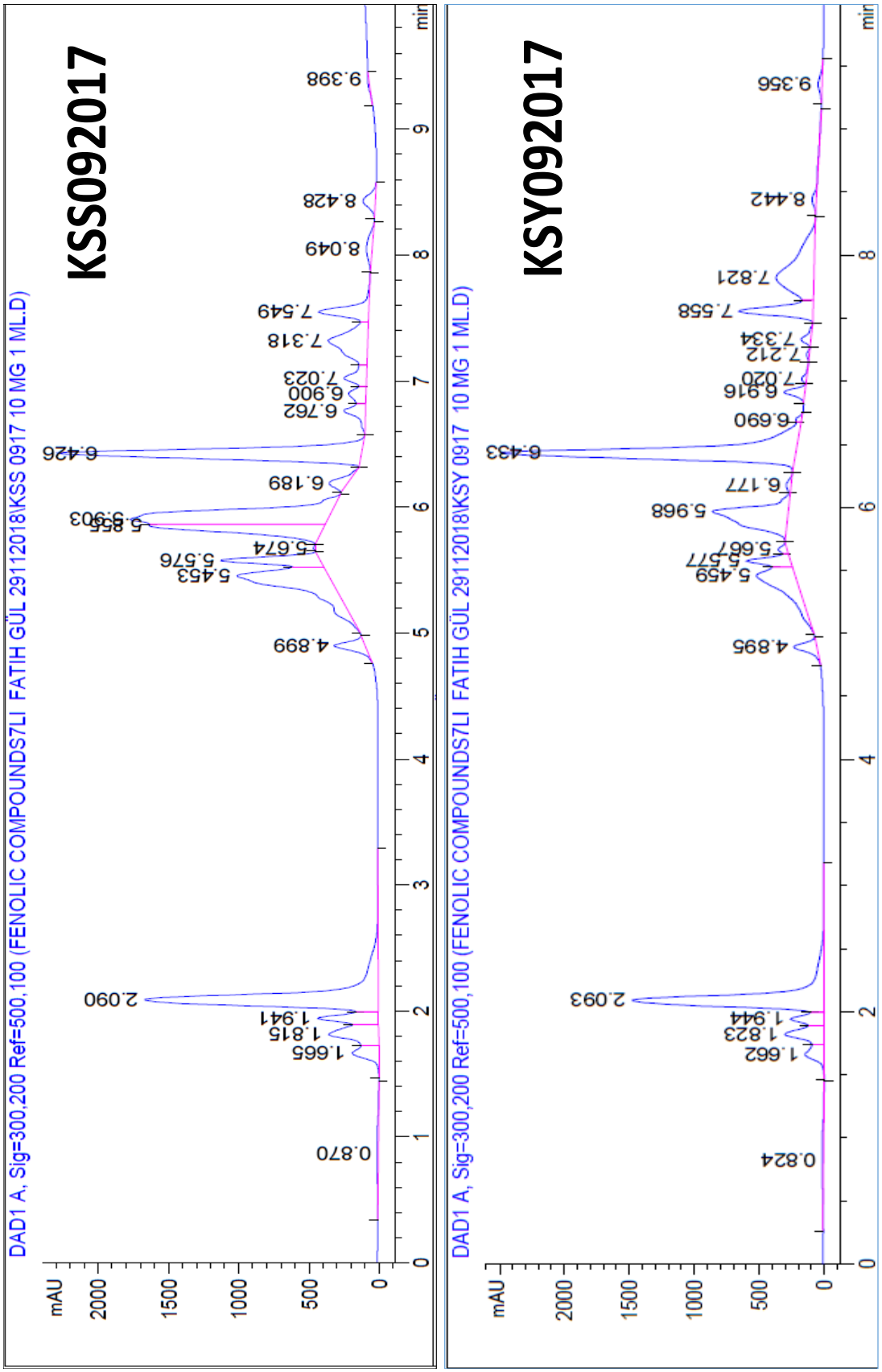
[a] : Bitkideki eser miktarda olduğunu belirtmektedir.
[b] : Bitkideki miktarlar (mg fenolik/kg bitki) cinsinden verilmektedir.

4.2.2.2. HPLC-UV Analizleri

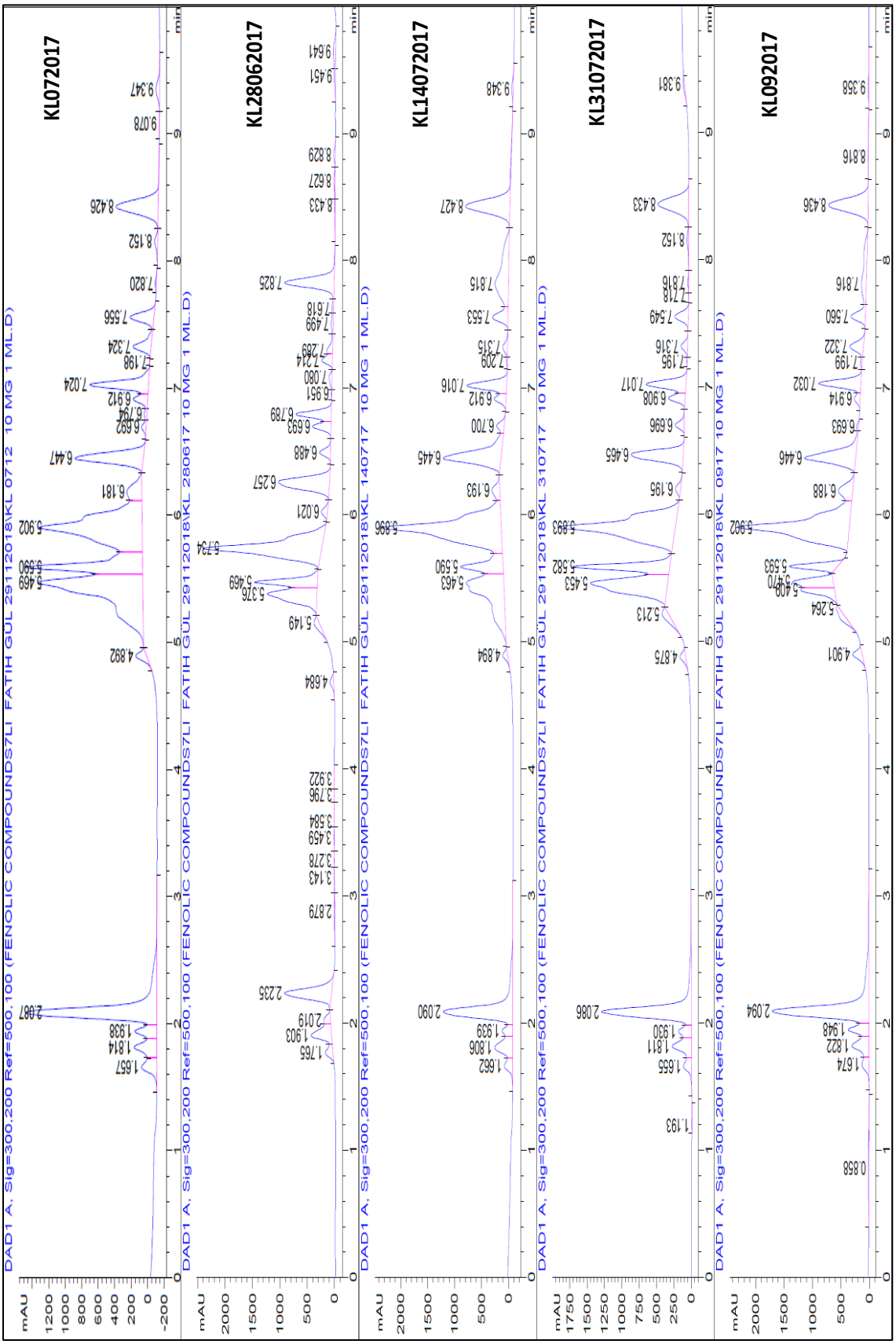
Bu çalışmada fitokimyasal içerikleri karşılaştırmak için; farklı dönemlerde (2012 Temmuz, 28.06.2017, 14.07.2017, 31.07.2017 ve 2017 Eylül) toplanan *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* (2017'de toplanan gövde ve sap kısımları) bitkilerinin HPLC-DAD analizi yapıldı.

Yapılan analizler genel olarak incelendiğinde, *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* bitkilerinin benzer içeriklere sahip olduğu, bütün ekstrelerde ana bileşenlerin gallik asit, *p*-kumarik asit, *trans*-ferulik asit ve kersetin olduğu, klorojenik asit, kateşin ve sirinjik asit (KL28062017 hariç) içermediği görülmektedir.

Kickxia spuria bitkisinin sap ve yaprak kısımları karşılaştırıldığında; sap kısmının gallik asit ve *trans*-ferulik asit, yaprak kısmının *p*-kumarik asit ve kersetin bakımından daha zengin olduğu ve kafeik asit ve *o*-kumarik asit açısından ise benzer derişimlere sahip olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4. 4 KS bitkisinin sap ve yaprak kısımlarının fitokimyasal analiz sonuçları



Şekil 4. 5 KL bitki ekstrelerinin fitokimyasal analiz sonuçları

Kickxia lanigera bitkisi incelendiğinde ise; diğer ekstrelerde ortak ana bileşenlerden birinin (8.43 dk.) KL28062012 ekstresinde olmadığı, aynı ekstrede gallik asit (2.09 dk) ile iki maddenin (6.25, 6.44 ve 7.02 dk.) diğer ekstrelerde daha az olduğu tespit edilmiştir.

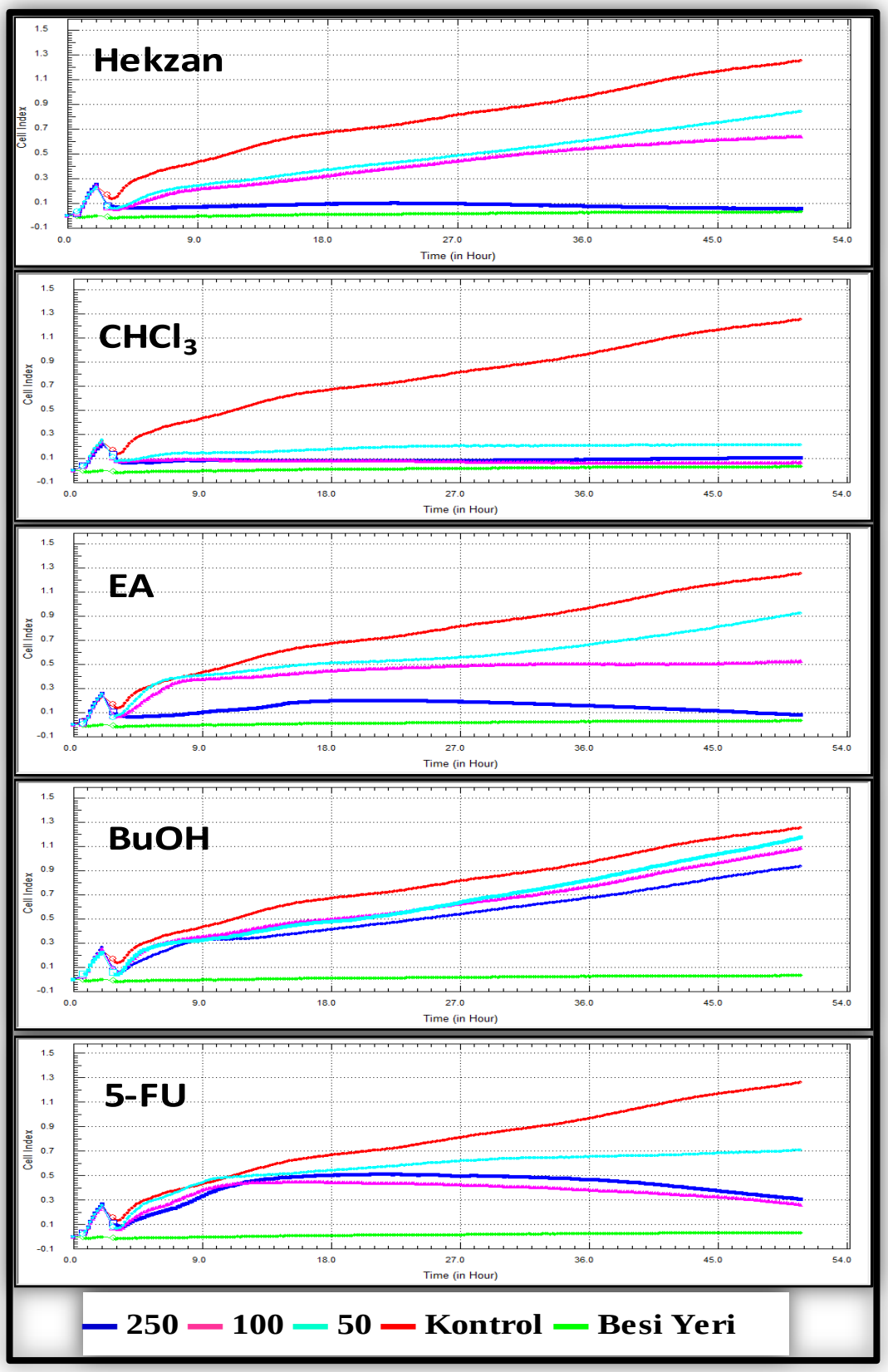
Çizelge 4. 3 KL ve KS bitkilerinin toplanma dönemlerine ve bitki kısımlarına göre fenolik bileşiklerinin değişimi

		Kickxia spuria (Eylül 2017)		*Kickxia lanigera* (2012-2017)				
		Sap	**Yaprak**	2012	2017 (Gün.Ay)			
Standartlar	**RT (dk.)**			**15.07**	**28.06**	**14.07**	**31.07**	**15.09**
Klorojenik asit	1.70	-	-	-	-	-	-	-
Gallik asit	2.08	2275*	1884	2056		1708	1556	2246
Kateşin	3.42	-	-	-	27.73	-	-	-
Sirinjik asit	4.23	-	-	-	-	-	-	-
Kafeik asit	4.89	111	91.40	64.29	37.87	45.51	46	84.14
***p*-kumarik asit**	5.59	1.56	19.90	670.5	1443	376	476	247
***trans*-ferulik asit**	5.90	1800	969	2615	85.93	3750	2702	3179
***o*-kumarik asit**	6.69	29.19	15.05	29.19	146	73.95	66.80	13.44
Kersetin	7.82	70.5	757	11.36	699	687	9.46	261

* Değerler ppb cinsinden verilmiştir.

4.3. *Kickxia lanigera* ekstrelerinin Antiproliferatif Aktivite Sonuçları

Bu çalışmada ayrıca *Kickxia lanigera* bitkisinin hekzan, $CHCl_3$, EA ve BuOH ekstrelerinin HeLa (insan rahim kanser hücresi) hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi incelenmiştir. Aşağıdaki şekilde yapılan antiproliferatif aktivite çalışmasının sonuçları görülmektedir (Şekil 4.4). Şekildeki yeşil renk besiyerini, kırmızı renk kontrolü, turkuaz renk 50 µg/ml, pembe renk 100 µg/ml ve koyu mavi renk ise 250 µg/ml derişimdeki ekstrelerin HeLa hücresine karşı aktivitesini belirtmektedir. Grafikteki dikey eksen plate içinde bulunan hücrenin sayısı ile doğru orantılı olan Cell Index (CI) değerini, yatay eksen ise test süresini (dakika) göstermektedir.



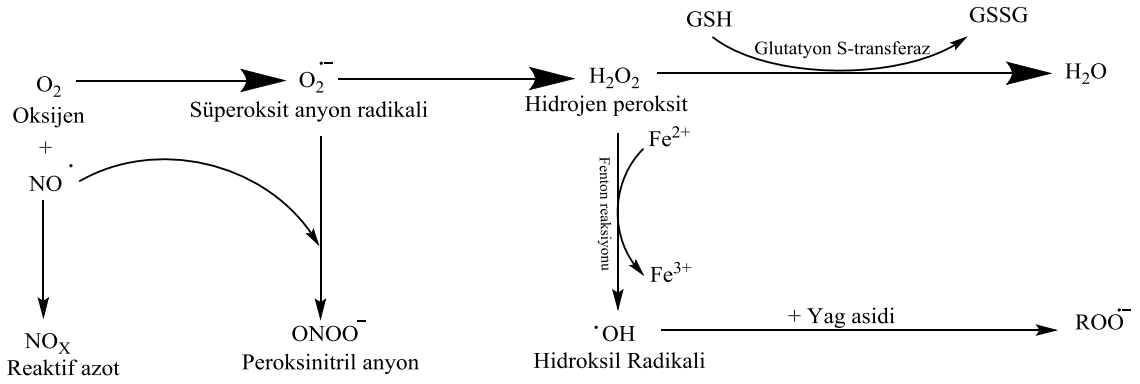
Şekil 4. 6 *Kickxia lanigera* ekstrelerinin HeLa hücresine karşı antiproliferatif aktivitesi

Testlerde 5-florourasil (5-FU) pozitif kontrol olarak kullanılmıştır. 5-FU, bir nükleobaz olan urasil bileşiğinin 5. pozisyondaki hidrojenin flor ile değişmesiyle oluşan bir bileşiktir. Bileşik; aktif deoksinükleotide dönüşümüne takriben hücresel timidilat sentetaz enzim tarafından deoksiüridilik asid'e dönüştürülmesini engelleyerek DNA sentezini inhibe eder ve böylece tümör büyümesini yavaşlatır.

Antiproliferatif aktivite test sonuçları incelendiğinde; $CHCl_3$ ekstresinin en düşük derişimde bile (50 µg/ml) neredeyse bütün kanserli hücreleri öldürdüğü yani maksimum aktiviteye ulaştığı ve bu derişimde 5-FU standardından çok daha aktif olduğu görülmektedir. Etil asetat ve hekzan ekstrelerinin ise derişimle birlikte dikkate değer bir şekilde aktivitenin arttığı ve en yüksek derişimde (250 µg/ml) maksimum aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. Standart olarak kullanılan 5-FU ise 50 ve 100 µg/ml derişimlerde hekzan ve EA ekstrelerine yakın, 250 µg/ml derişimde ise aynı ekstrelerden daha düşük aktiviteye sahip olduğu görülmektedir. Bütanol ekstresinin ise derişimin artmasının aktiviteye önemli bir katkısının olmadığı belirlenmiştir.

4.4. Antioksidan test sonuçları

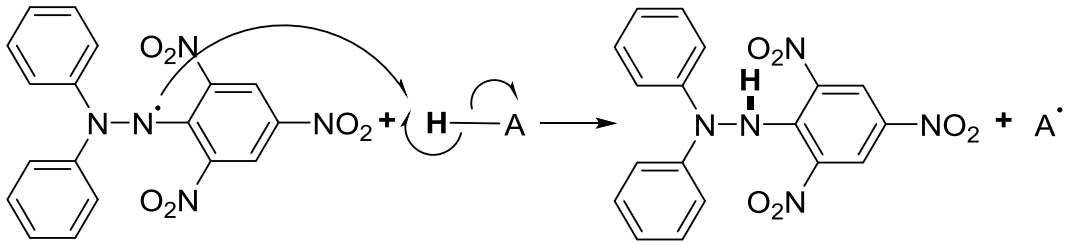
Oksijen ve azot canlı organizmalarda hayati derecede önemli olsa da, normal metabolizma sürecinde ROS ve RNS olarak bilinen çok tehlikeli radikalik ara ürünler oluşturmaktadır (Şekil 4.6). ROS ve RNS türlerinin zararlı etkilerine karşı organizma doğal savunma sistemini kullansa da, savunma sisteminin yetersiz olduğu dönemlerde önemli olumsuz etkilere neden olmaktadır. Bu olumsuz durumları engellemek için bitkiler kendi bünyesinde çok çeşitli bileşikleri sınıflarını (fenolik, alkaloid, terpen vb.) kendi bünyesinde sentezlemektedir ve bu bileşikler sayesinde eşsiz biyolojik aktivitelere (antioksidan, antikanser, antifungal, antimikrobiyal vb. gibi) sahip olmaktadır.



Şekil 4. 7 Reaktif ROS ve RNS türlerin oluşumu

Canlı organizmalarda oluşan bu reaksiyonları azaltmak veya engellemek amacıyla, laboratuvar koşullarında muhtemel antioksidan özelliğe sahip ekstrelerin ve bileşiklerin belirlenmesinde literatürde pek çok antioksidan test yöntemi yer almaktadır.

Bu çalışmada *Kickxia lanig*era ve *Kickxia spuria* ekstreleri için, total antioksidan, indirgeme gücü, H_2O_2 giderme ve DPPH radikal giderme aktivite testleri yapılmıştır. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), nötral kararlı bir radikal moleküldür. Laboratuvar koşullarında yapılan radikal giderme aktivite testinde kullanılan DPPH• radikali, antioksidan özellikli bir bileşikten elektron veya hidrojen alarak daha kararlı $DPPH_2$ molekülüne dönüşür ve bu mekanizma şematik olarak aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4. 8 $DPPH^{\bullet}$ Radikalinin giderilme mekanizması

*Kickxia lanig*era ve *Kickxia spuria* örneklerine uygulanan total antioksidan, indirgeme gücü ve H_2O_2 giderme aktivite testleri için $A_{0.5}$ (µg/mL), DPPH radikal giderme aktivite

testi için IC_{50} (µg/mL) değerleri Çizelge **4.4** de verilmiştir. $A_{0.5}$ ve IC_{50} değerleri sırasıyla örneklerin maksimum aktivite gösterdiği absorpsiyon ve derişimlerin yarısı olarak nitelendirilmektedir. Bu $A_{0.5}$ ve IC_{50} değerleri ile aktivite arasındaki ilişki ters orantılıdır.

Çizelge 4. 4 Bitki örneklerinin antioksidan test sonuçları

ÖRNEKLER	Toplam Antioksidan Aktivitesi	İndirgeme Gücü	H_2O_2 giderme Aktivitesi	$DPPH^{\bullet}$ giderme Aktivitesi
	Aktivite, $A_{0.5}$ (µg/mL)			**Aktivite, IC_{50} (µg/mL)**
KSS-09.2017	127.34±3.74^{be}	334.82±4.77^{m}	27.18±6.82^{a}	99.15±3.85^{g}
KSY-09.2017	123.27±3.81^{b}	180.36±5.17^{ef}	231.06±0.14^{i}	134.43±0.62^{h}
KL-09.2017	144.04±4.81^{de}	307.83±0.40^{l}	186.81±1.80^{g}	60.51±4.01^{bc}
KL-31.07.2017	132.74±1.89^{bcd}	278.98±6.75^{k}	107.57±5.89^{e}	74.70±1.35^{de}
KL-14.07.2017	140.53±3.08^{de}	217.17±6.46^{g}	60.70±2.12^{c}	73.84±3.99^{de}
KL-28.06.2017	132.25±1.90^{bcd}	242.06±0.79^{hi}	31.24±4.54^{ab}	80.20±1.47^{ef}
KL-07.2012	135.51±3.79^{bcd}	272.65±3.27^{jk}	46.10±6.41^{bc}	74.99±0.12^{de}
KL-H	339.61±2.23^{i}	196.98±2.71^{f}	529.10±8.58^{k}	64.45±4.83^{cd}
KL-Bu	282.88±2.91^{h}	375.61±5.95^{n}	98.92±8.32^{de}	82.87±3.46^{ef}
KL-EA	205.16±1.29^{f}	284.87±6.84^{k}	265.97±5.56^{j}	86.71±2.10^{f}
KL-CH	245.84±1.17^{g}	277.77±3.26^{k}	64.67±0.89^{c}	50.11±0.94^{b}
Mosloflavon	560.23±0.68^{l}	82.78±0.05^{a}	85.55±3.17^{d}	84.89±0.40^{ef}
5,6,7-baicalein	338.54±5.40^{i}	145.31±4.39^{c}	83.43±3.40^{d}	138.47±3.37^{hi}
Salvigenin	441.81±0.56^{k}	283.83±2.21^{k}	53.92±4.68^{c}	154.52±1.82^{j}
Chrysin	192.28±8.02^{f}	233.93±2.43^{gh}	24.17±2.00^{a}	154.53±3.80^{j}
Daucosterol	249.04±1.80^{g}	155.01±3.07^{cd}	88.43±4.46^{d}	106.72±4.43^{g}
Hispidulin	389.84±0.52^{j}	256.90±4.76^{ij}	54.63±2.69^{c}	249.36±0.09^{k}
Yeni Bileşik	283.53±3.36^{h}	219.46±6.35^{g}	26.90±2.56^{a}	148.89±4.16^{ij}
STANDARTLAR				
BHT	95.16±0.60^{a}	163.26±3.49^{de}	210.48±2.13^{h}	53.77±0.19^{bc}
BHA	138.33±2.83^{cd}	124.56±4.44^{b}	208.53±1.09^{h}	10.00±2.14^{a}
C vitamin	153.41±0.20^{e}	120.22±0.84^{b}	129.82±5.70^{f}	74.48±3.12^{de}

Bu çalışmada Elazığ ilinin Baskil ilçesinden 2017 yılında toplanan KS bitkisinin sap ve yaprak kısımları, 2012 (Temmuz) ve 2017 (28 Haziran, 14 Temmuz, 31 Temmuz ve Eylül) yıllarında toplanan KL bitkileri ve 2012 Temmuz ayında toplanan KL bitkisinin antikanser aktivitesi yüksek olan $CHCl_3$ ekstresinden bileşiklerin (KLCH) saflaştırılan (Mosloflavon, 5,6,7-baicaleintrimethyl eter, salvigenin, chrysin, jaceosidin, hispidulin, daucosterol ve yeni bileşik) antioksidan kapasiteleri incelenmiştir.

Çizelge 4.4'de verilen test sonuçları incelendiğinde, genel olarak, bitki ekstrelerinin indirgeme gücü aktivitesi standartlardan daha düşük, H_2O_2 giderme aktivitelerinin ise daha yüksek olduğu görülmektedir.

Toplam antioksidan aktivitesinde KS ekstrelerinin standartlardan (BHT hariç) ve KL bitkisinin bütün ekstrelerinden daha aktif olduğu, DPPH giderme aktivitesinde ise KL bitkisinin $CHCl_3$ ekstresinin ise BHT ve C vitamini standartlarından daha yüksek aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. KS örnekleri ele alındığında; yaprak ekstresinin indirgeme gücü aktivitesinin sap kısmından oldukça yüksek, H_2O_2 giderme ve DPPH radikali giderme aktivitelerinin ise düşük, toplam antioksidan aktivitesinin ise yakın olduğu belirlenmiştir.

Farklı dönemlerde toplanan KL bitki (2012-2017) ekstreleri göz önünde bulundurulduğunda; KL092017 (2017 Eylül) ekstresinin DPPH testinde en yüksek, diğer testlerde ise en düşük olduğu, KL28062017 ekstresi ise diğer KL ekstrelerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur.

KL072012 kodlu bitkiden elde edilen hekzan (KLH), kloroform (KLCH), etil asetat (KLEA) ve bütanol (KLBU) ekstreleri incelendiğinde, KLCH ekstresinin H_2O_2 giderme aktivitesi ve DPPH radikal giderme aktivitesinde en yüksek, indirgeme gücü ve toplam antioksidan aktivitesinde ise 2. en yüksek aktiviteye, KLH ekstresinin ise en düşük H_2O_2 giderme en yüksek indirgeme gücü aktivitesine sahip olduğu tespit edilmiştir. KLH, KLCH, KLEA ve KLBU fazlarının ham ekstresi olan KL072012 ekstresini

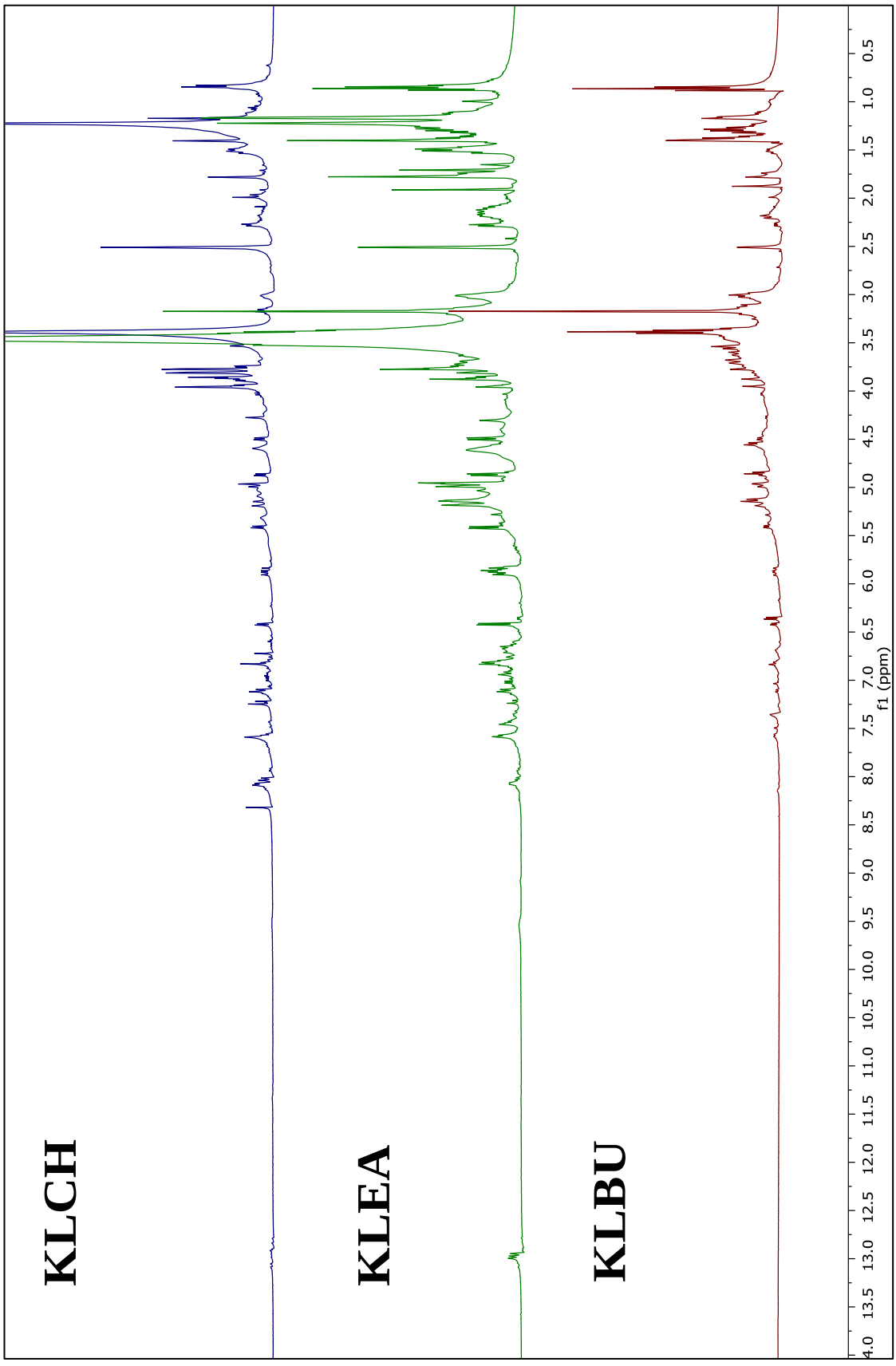
karşılaştırdığımızda, ham ekstrenin toplam antioksidan ve H_2O_2 giderme aktivitelerinin diğer ekstrelerden oldukça yüksek, indirgeme gücü ve DPPH radikali giderme aktivitelerinin ise birbirine yakın olduğu görülmektedir.

Saflaştırılmaya tabi tutulan KLCH ekstresi ile bu ekstreden saflaştırılan bileşiklerin aktiviteleri incelendiğinde, ekstre bazındaki karşılaşılan karışık seyir söz konusudur. Ekstrenin toplam antioksidan (chrysin hariç) ve DPPH radikali giderme aktivitesinin saflaştırılan bileşiklerden daha yüksek olduğu, indirgeme gücü aktivitesinin daha düşük (salvigenin hariç) olduğu tespit edilmiştir. H_2O_2 giderme aktivitesinde ise ekstrenin aktivitesinin Mosloflavon, 5,6,7-baicaleintrimethyl eter, daucosterol bileşiklerinden daha yüksek, salvigenin, chrysin, hispidulin ve yeni bileşiğin aktivitelerinden daha düşük aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Son olarak saflaştırılan bileşiklerin aktiviteleri incelendiğinde ise toplam antioksidan ve H_2O_2 giderme aktivitelerinde chrysin, indirgeme gücü ve DPPH radikali giderme aktivitelerinde ise Mosloflavon bileşiğinin en aktif olduğu belirlenmiştir. Yeni bileşiğin toplam antioksidan aktivite, indirgeme gücü ve DPPH• giderme aktiviteleri düşük iken H_2O_2 giderme aktivitesi ise chrysin hariç diğer bütün örneklerden ve standartlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

4.5. Ekstrelerin ^{1}H-NMR spektrumları

Kickxia lanigera bitkisinin $CHCl_3$, EA ve BuOH ekstrelerinin ^{1}H-NMR spektrumları aşağıdaki şekilde gösterilmektedir.



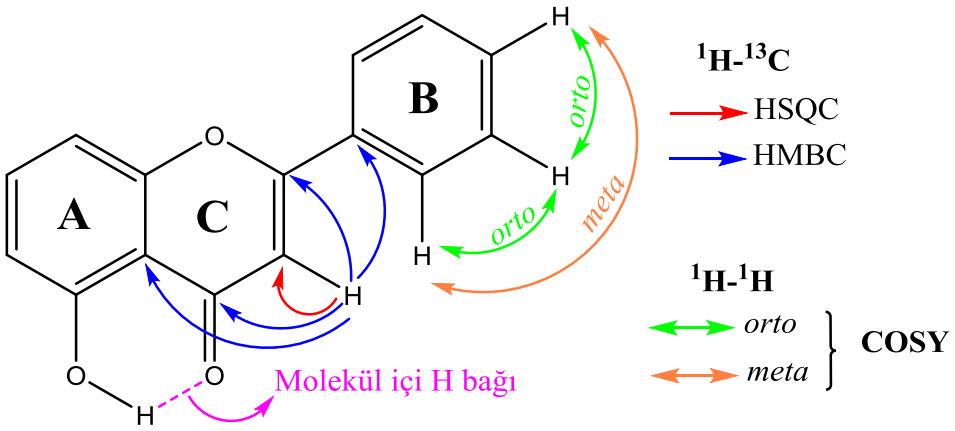
Şekil 4. 9 KL ekstrelerinin NMR spektrumları

Bitki ekstreleri genellikle çok bileşik içerdiği için ^{1}H-NMR spektrumları da karmaşık gözükmektedir. Fakat KL ekstrelerinin 1H-NMR spektrumları göz önünde bulundurulduğunda, nispeten basit spektrumlara sahip olduğu görülmektedir ve ekstrelerin içeriği ile ilgili bazı önemli ipuçları vermektedir. Spektrumlar genel olarak incelendiğinde $CHCl_3$ ve EA ekstrelerinin aromatik bölge (6-8 ppm) açısından BuOH ekstresinden, şeker bölgesi (3,5-4 ppm civarındaki CH pikleri ve 5-5,5 ppm civarındaki OH proton pikleri) açısından ise BuOH ekstresinin daha yoğun olduğu görülmektedir. Dolayısıyla $CHCl_3$ ve EA ekstrelerinin aromatik bileşik, BuOH ekstresinin ise glikozit içeriği açısından daha zengin olduğu söylenebilir. Benzer kimyasal bileşik sınıfına sahip olduğu görülen $CHCl_3$ ve EA ekstrelerinin spektrumlarındaki proton sinyalleri daha dikkatli incelendiğinde ise birkaç ortak sinyal dışında oldukça fazla farklılık gösterdiği, özellikle 4 ppm civarındaki çok sayıda keskin piklerin -OCH_3 piklerine, etil asetat ekstresindeki şeker bölgelerindeki OH ve CH piklerinin daha şiddetli olduğu görülmektedir. Bu verilere göre aromatik bileşik oranının $CHCl_3$ ekstresinde, glikozit içeren bileşiklerin oranının ise EA fazında daha fazla olduğu söylenebilir. Sonuç olarak çözücünün polaritesine bağlı olarak ekstrakte edilen bileşiklerin polaritesinin arttığı görülmektedir.

4.6. Flavonların NMR spektrumları hakkında genel bilgi

NMR spektroskopisi, diğer organik bileşiklerde olduğu gibi flavonoidlerin kimyasal yapılarını aydınlatmak için kullanılan en kuvvetli tekniklerden biridir. Bu teknikte yaşanan ilerlemeler sayesinde, çok düşük miktarda bile saflaştırılan bileşiklerin NMR spektrumlarındaki bütün proton ve karbon sinyallerinin (kimyasal kayma ve etkileşim sabitlerinin) belirlenmesi ve böylece tam olarak yapıların tayinini mümkün olmaktadır.

Kimyasal yapıların tayininde ^{1}H-NMR ve ^{13}C-NMR gibi bir boyutlu (1D) NMR tekniklerinin yanında, HMBC, HETCOR, COSY, DEPT vb. gibi en az onun kadar önemli (belki çok daha fazla) NMR teknikleri de kullanılmalıdır. Aşağıda flavon iskeletinin üzerinde bazı 2D NMR etkileşimleri gösterilmektedir (Şekil 4.6). Bu NMR etkileşimleri önerilen yapıyla uyumlu ise doğru bir yapı tayini yapıldığı söylenebilir. Aksi takdirde bu 2D NMR pikleriyle uyumlu başka bir yapı önerilmesi gerekir.



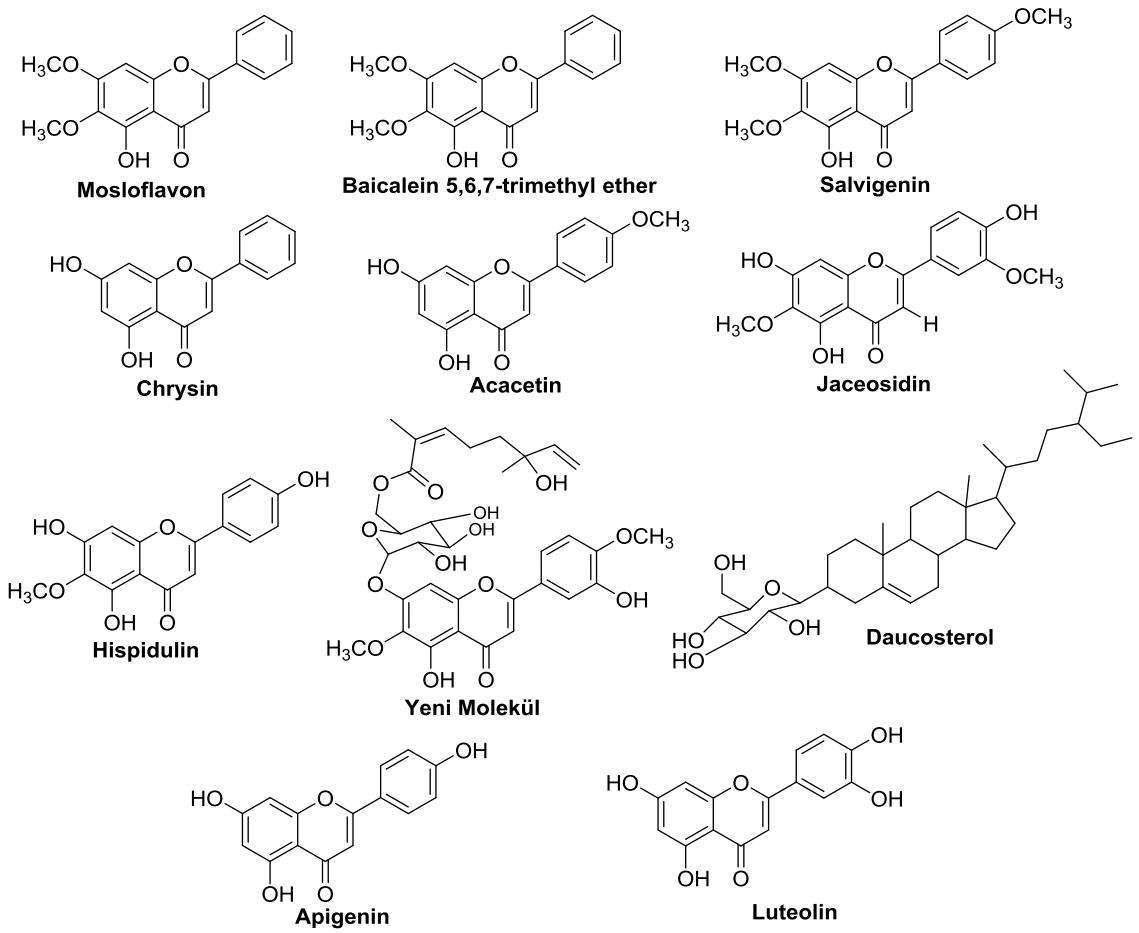
Şekil 4. 10 Flavon yapısındaki bir ve iki boyutlu etkileşimler

COSY (Correlated Spectroscopy) birbirine komşu olan protonların (^{1}H-^{1}H) etkileşimlerini vermektedir. Yukarıdaki flavon yapısındaki gibi protonlar birbirine komşu ise kendi aralarında 7-10 Hz'lik *orto*, birbirine uzak ise 2-3 Hz'lik *meta* etkileşimine girer ve bu etkileşim protonlara ait sinyallerin yarılmasına neden olarak dublet (d) gözükmesine neden olur. Eğer yukarıdaki yapıda olduğu gibi herhangi bir proton, iki *orto* pozisyonunda iki protona veya bir *orto* ve bir *meta* pozisyonunda iki komşu protona sahip ise, sadece bu protonlara ait sinyaller iki defa dublete yarılarak *dubletin dubleti* (*dd*) olarak gözükmektedir. Bu dublet piklerin etkileşim sabitleri hesaplanarak protonların birbirine *orto* veya *meta* pozisyonunda olup olmadığı tespit edilebilir ve bu bilgi yapı tayininde önemli bilgiler vermektedir.

HSQC (heteronuclear single quantum coherence) hidrojen atomunun bağlı olduğu karbon atomu ile olan etkileşimini (^{1}H-^{13}C) gösterir. HMBC (heteronuclear multiple bond correlation) ise hidrojen atomuna uzak olan karbon atomlarıyla etkileşimlerini gösteren 2D NMR tekniğidir. HMBC her ne kadar diğer tekniklere göre çok karmaşık gibi görünse de, çok daha fazla bilgi verir ve bu durum HMBC yöntemini yapıların tam tayinlerinde vazgeçilmez bir teknik olmasını sağlar.

4.6.1. Saflaştırılan bileşiklerin NMR analizi

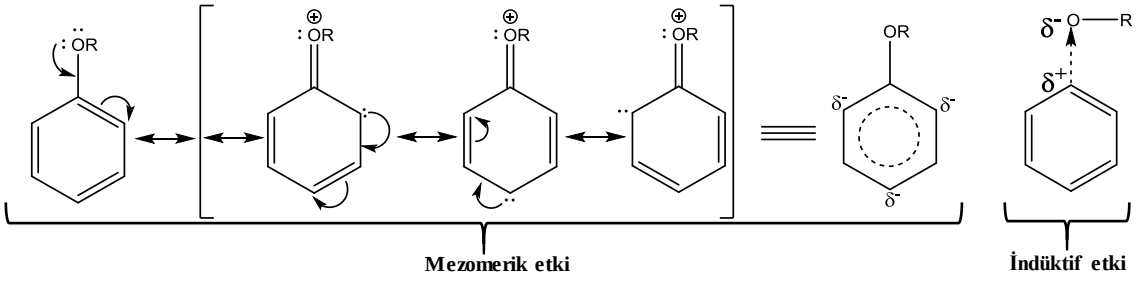
Bu çalışma kapsamında *Kickxia lanigera* bitkisi üzerine yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda, $CHCl_3$ ekstresinden 8 flavonoid (Mosloflavon, Baicalein 5,6,7-trimethyl ether, Salvigenin, Chrysin, Acacetin, Jaceosidin, Hispidulin) ve 1 steroid (Daucosterol), EA ekstresinden ise 2 flavonoid (Luteolin ve Apigenin), olmak üzere toplam 11 bileşik saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bileşikleri yapıları (Şekil 4.7); bir boyutlu (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR), iki boyutlu (HSQC, HMBC, DEPT, COSY) ve 3 boyutlu (NOESY, ROESY) NMR teknikleri (literatürdeki değerler ile karşılaştırarak) ve kütle spektroskopisi (HPLC-TOF/MS) yöntemleri ile aydınlatılmıştır.



Şekil 4. 11 *Kickxia lanigera* bitkisinden saflaştırılan bileşikler

Diğer bütün bileşiklerde olduğu gibi bu bileşiklerde de *α-β* doymamış sistemlerinin yer alması, elektron verici veya çekici atom veya grupların bağlanması durumunda, hidrojen ve karbon atomlarına ait ppm değerleri yukarı veya alana kaymaktadır. Saflaştırılan bileşikler göz önünde bulundurulduğunda, bileşiklerin (biri hariç) flavon yapısında olduğu görülmektedir.

Flavon yapısındaki ABC halkaları tam aromatik özelliğe sahip olduğu için, bu halkada yer alan karbon ve proton sinyalleri (ppm cinsinden kimyasal kayma değerleri; δ) NMR spektrumu skalasında aromatik bölgede yer almaktadır. Flavon yapılarında 2 nolu (C-2) karbon atomunda çift bağ bulunduğundan C2-C3-C4 atomları arasında bir *α-β* doymamış sistemleri bulunur. "Mezomerik etki" ile ifade edilen bu rezonans yapı aynı zamanda C9-C10-C4 atomları arasında da bulunmaktadır. Buna ek olarak, elektron çekici oksijen atomu C2 ve C9 atomlarından "indüktif etki" ile elektron çekmektedir. Bu mezomerik ve indüktif etki; C2 ve C9 atomlarının sırasıyla C3 ve C10 atomlarına göre daha az elektron yoğunluğuna sahip olmasına ve NMR spektrumlarında daha aşağı alanda gelmesini sağlamaktadır. Bu durum sonucunda; karbonil karbonuna (C4) mezomerik olarak elektron (e^-) sağladığından C4 karbonu, yaklaşık olarak 200 ppm'den daha yukarı alanda (yaklaşık 180 ppm'de) rezonans olurlar ve bu karakteristik sinyal, flavon bileşiklerin tanınmasında önemli bir bilgi vermektedir.



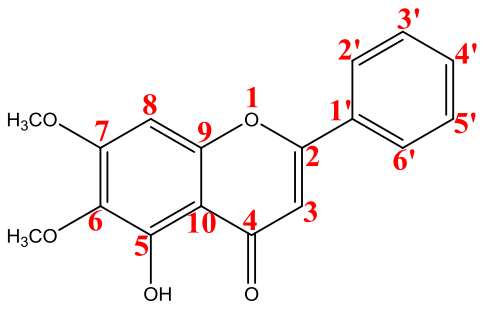
Şekil 4. 12 Aromatik bileşiklerdeki mezomerik ve indüktif etki

Flavonoidlerin diğer spesifik sinyali ise sıklıkla karşılaşılan ^{1}H-NMR spektrumunda 12-13 ppm civarındaki sinyaldir. Bu keskin singlet sinyal karbonil oksijeni ile molekül içi hidrojen bağı yapmış olan 5-OH protonuna aittir. Bu durum saflaştırılan Bileşik **2** hariç bütün flavonlarda mevcuttur. ^{1}H-NMR spektrumunda yaklaşık 3.7-3.9 ppm aralığında

gelen ve integrasyonu 3 olan keskin pik -OCH_3 protonuna ait sinyaldir. Bu sinyal bileşik 4 (chrysin) hariç bütün flavonlarda bulunmaktadır. Ayrıca flavonların sadece 4'-C atomunda bir grup bağlı ise C-1' ve C-4' atomları arasında simetri merkezi olacağından H-2' ve H-6' ile H-3' ve H-5' hidrojen atomları aynı ppm'de görülmektedir. Bu durumda bu hidrojen atomları birbirinin yarılmasına neden olarak ^{1}H-NMR integrasyonu 2, etkileşim sabiti 7-10 Hz olan iki dublet görülmektedir. Bu bileşiklerde OH ve OCH_3 grupları mezomerik etkiden dolayı H-3' ve H-5' protonlarını, H-2' ve H-6' protonlarına göre daha yukarı alana kaymasına neden olur. Bu sistem **Salvigenin**, **Acacetin**, **Jaceosidin**, **Hispidulin** ve **Luteolin** bileşiklerinde yer almaktadır.

Yukarıda belirtilen sistemlerin dışında başka sistemlere sahip olan **Daucosterol** ve **yeni bileşik** kendi içinde ayrıca detaylı yorumlanacaktır.

Mosloflavon (FR14)



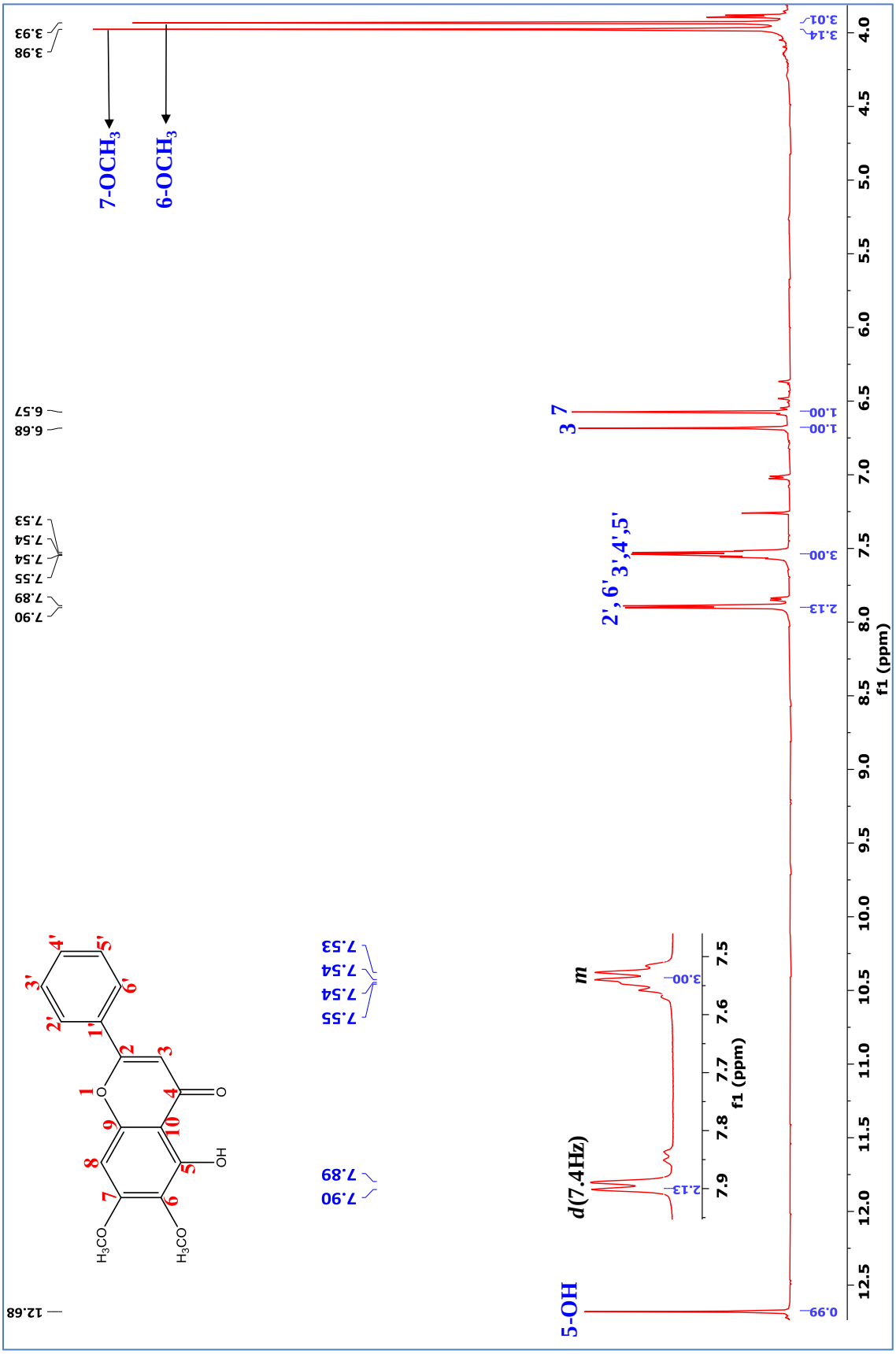
Şekil 4. 13 Mosloflavon yapısı

KL bitkisinin $CHCl_3$ ekstresinin silikajel kolonundan elde edilen fraksiyonundan (%100 $CHCl_3$) saflaştırılmıştır. Bu fraksiyon nispeten apolar olduğu için, safsızlıkları gidermek amacıyla MeOH ile safsızlıklar giderilmiş, bileşik tekrarlanan santrifüjleme işlemlerinden sonra çözünmeyen sarı renkli katı olarak izole edilmiştir.

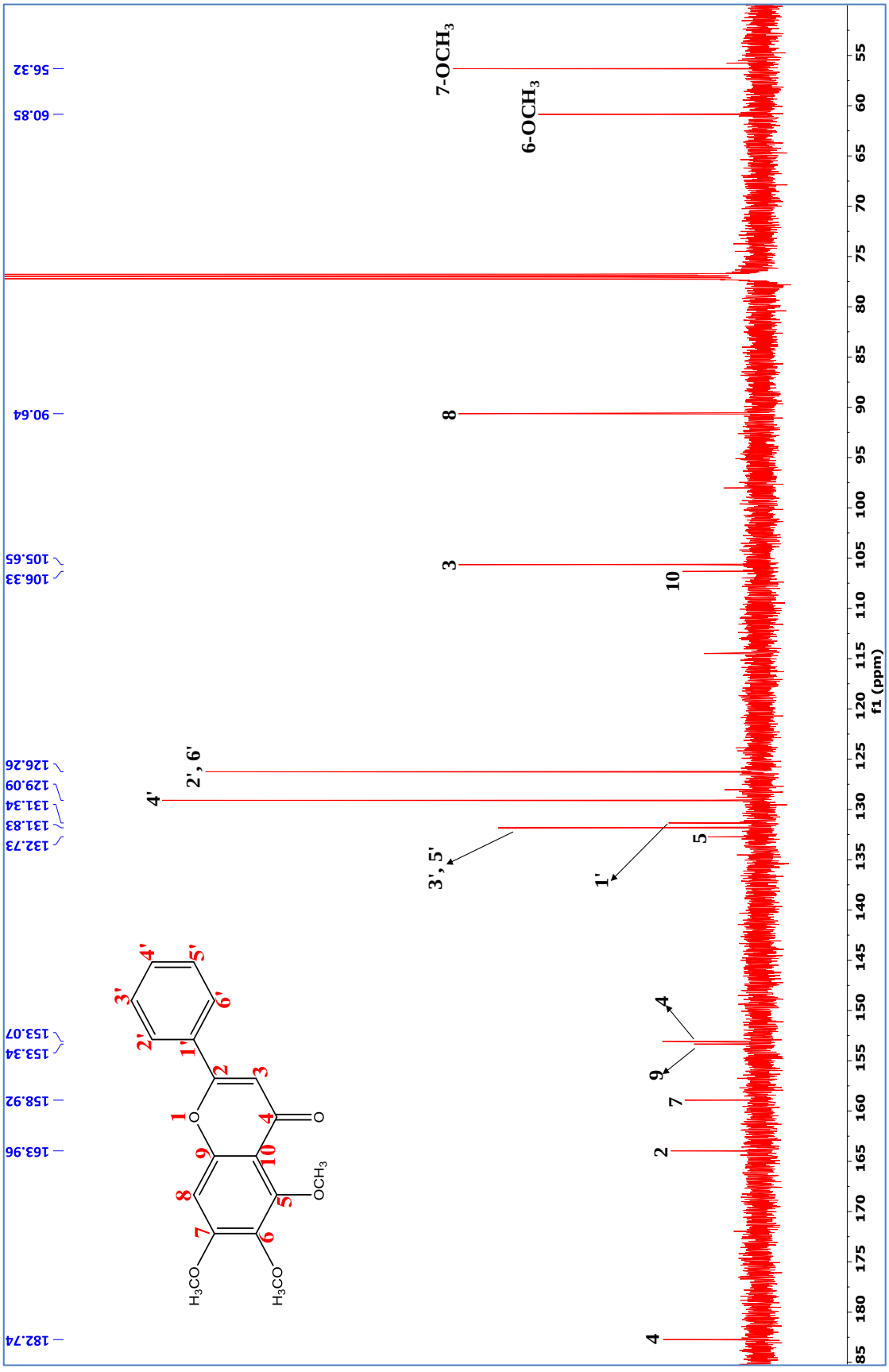
^{1}H-NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 12.68 (1H, *s*, 5-OH), 7.90 (2H, *d*, J= 7.4 Hz, 2', 6'-H), 7.54 (2H, *m*, 3've 5'-H), 7.53 (1H, *m*, 4'-H), 6.68 (1H, *s*, 3-H), 6.57 (1H, *s*, 8-H), 3.98 (3H, *s*, 7-OCH_3) 3.93 (3H, *s*, 6-OCH_3)

^{13}C-NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 182.74 (C-4), 163.96 (C-2), 158.92 (C-7), 153.34 (C-9), 153.07 (C-5), 132,73 (C-6), 131.83 (C-3', C-5'), 131.34 (C-1'), 129.09 (C-4'), 126.26 (C-2', C-6'), 106.33 (C-10), 105.64 (C-3), 90.63 (C-8), 60.85 (6-OCH_3), 56.32 (7-OCH_3) (Wang *et al.* 1999).

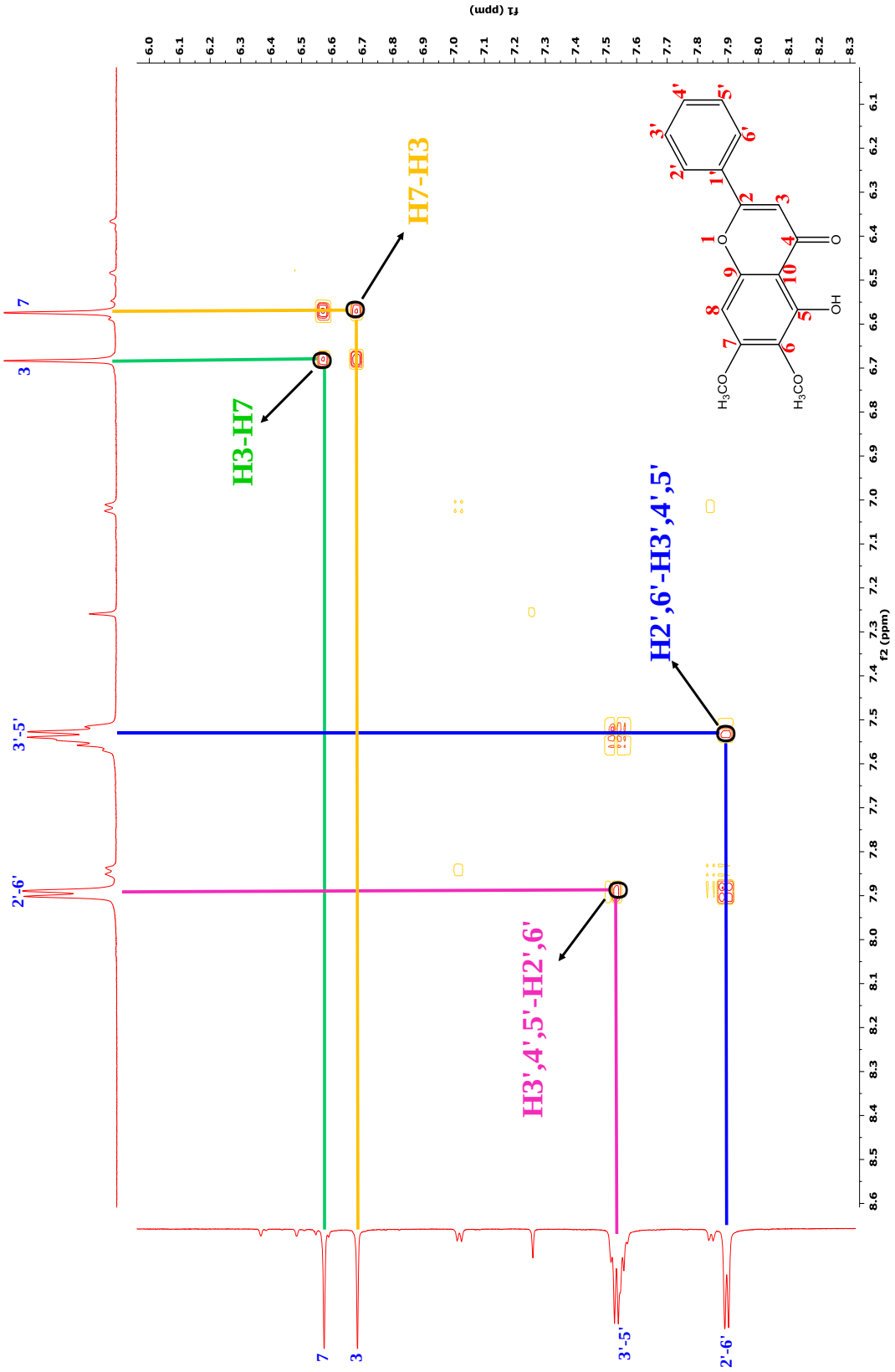
Şekil 4.19'daki HMBC spektrumu incelendiğinde 5-OH (δ 12.68 ppm) ile 6-OCH_3 protonları C-6 karbonu etkileştiği görülmektedir. 6.57 ppm'deki singlet pike ait aromatik protonun C6 karbonuyla etkileşmemesi, fakat 7-OCH_3 protonlarının etkileştiği C7 ve C9 karbonuyla etkileşmesi, ayrıca karbonil karbonuyla etkileşmesi, bu singlet pike ait protonun 8 pozisyonunda olduğunu kanıtlar. ^{13}C-NMR spektrumunda 131.36 ppm'deki kuarterner sinyal karakteristik C1' karbonuna aittir. Bu karbon HMBC spektrumunda 7.89 ppm'deki proton ile etkileşmesi nedeniyle bu protonun pozisyonunun 2' ve 6'olduğunu ve integrasyonu 2 olmasından dolayı B halkasının simetrik olduğunu gösterir. Bu protonlar ile etkileşen 3' ve 5' protonlarına ait pik grubunun (yaklaşık δ 7.53 ppm) integrasyonun 3 olması, 4' protonuna ait sinyalin bu muliptlet pik grubunun içinde rezonans olduğunu göstermektedir.



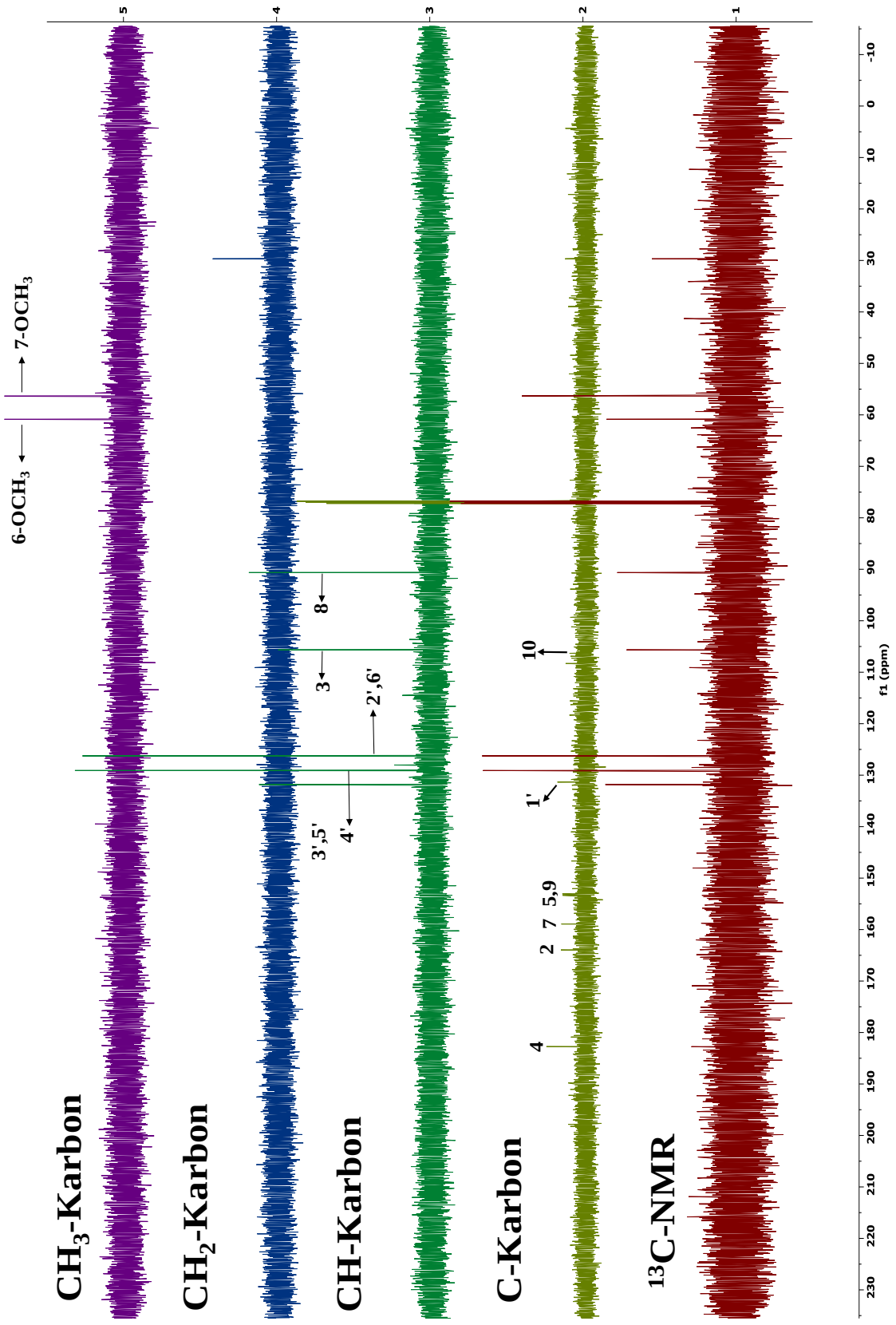
Şekil 4. 14 Mosloflavon'un ^{1}H-NMR spektrumu



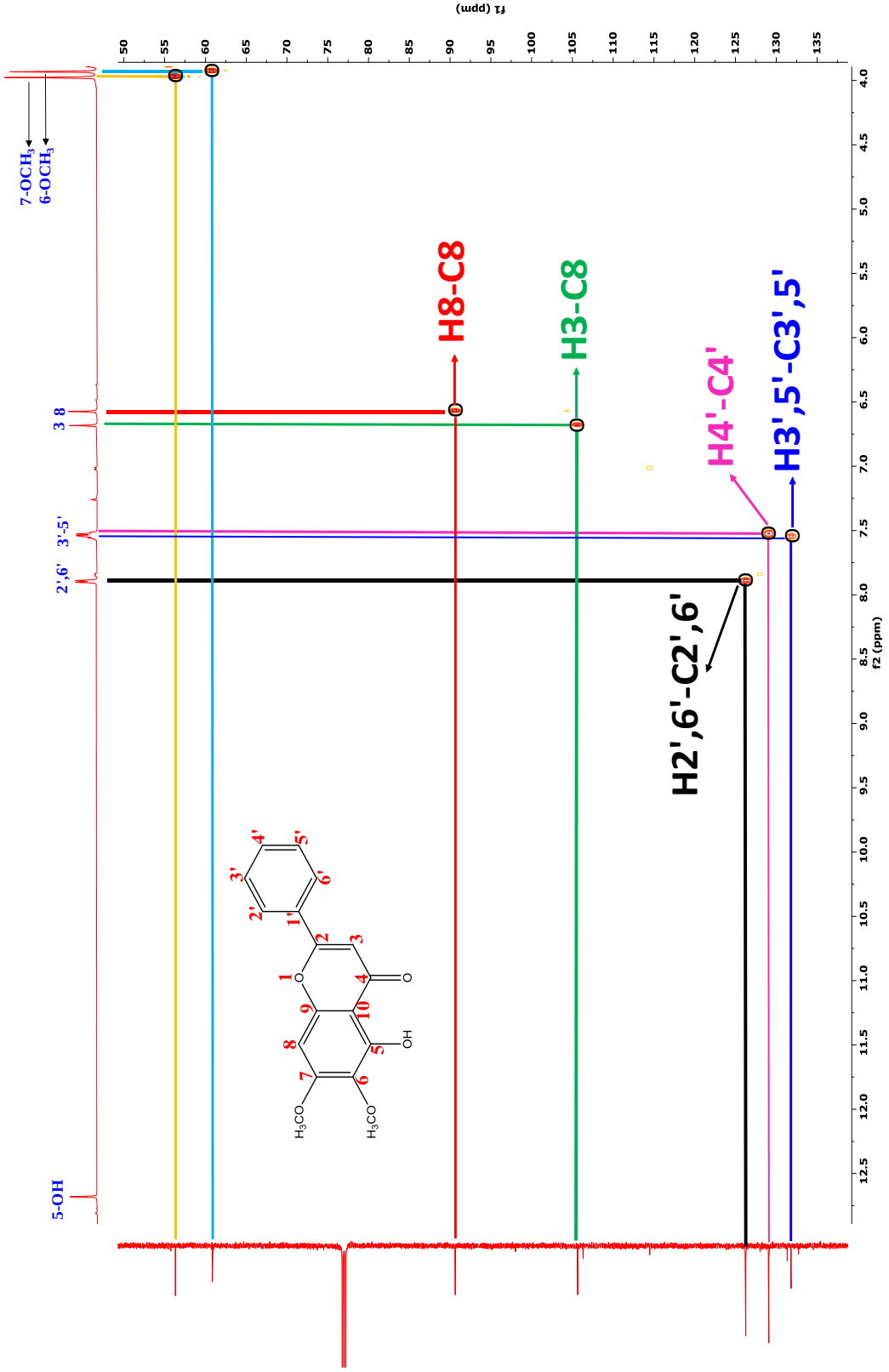
Şekil 4. 15 Mosloflavon'un ^{13}C-NMR spektrumu



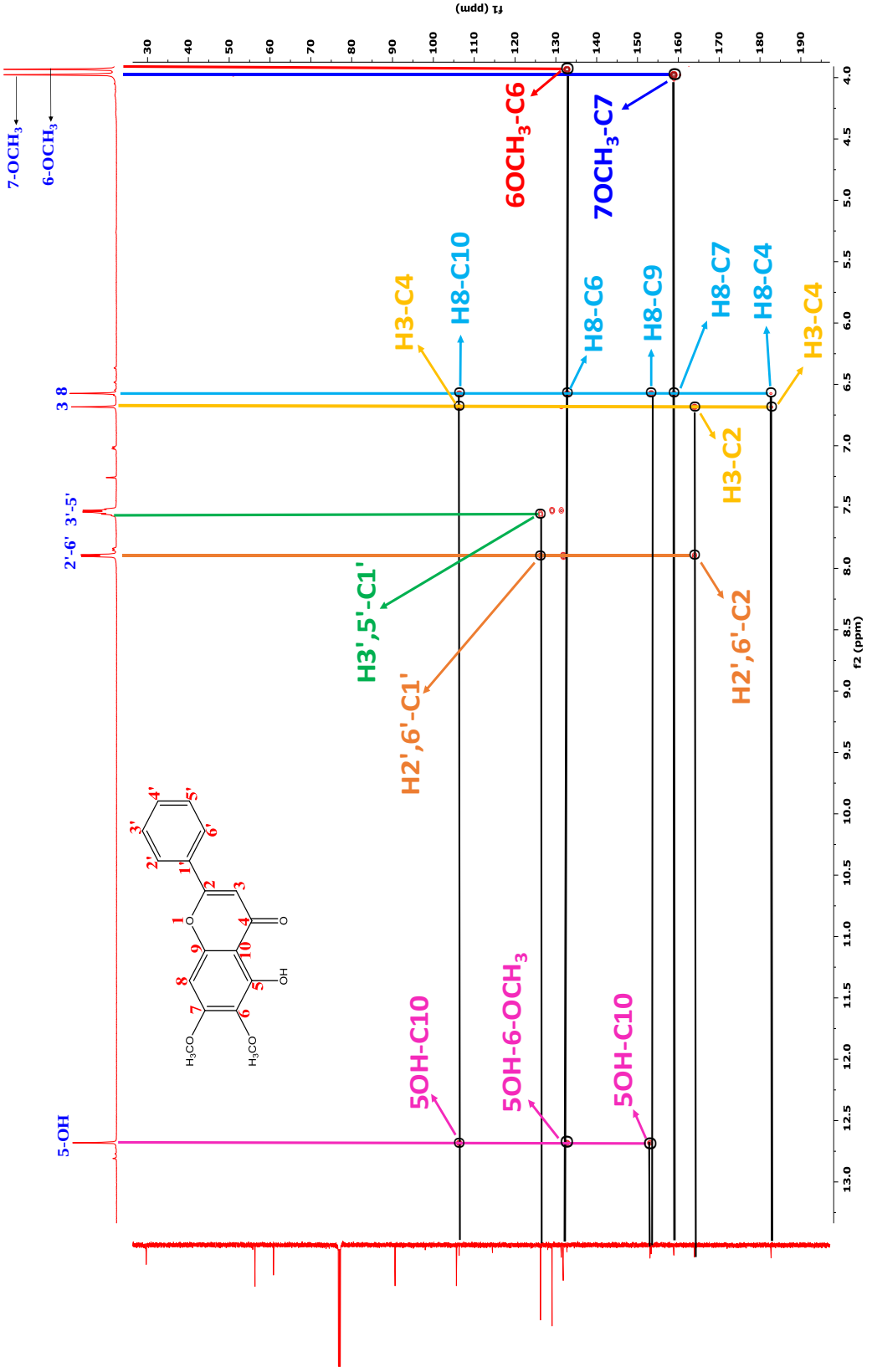
Şekil 4. 16 Mosloflavon'un COSY spektrumu



Şekil 4. 17 Mosloflavon'un DEPT spektrumu

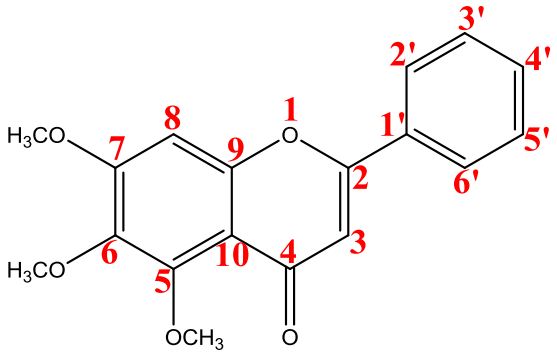


Şekil 4. 18 Mosloflavon'un HSQC spektrumu



Şekil 4. 19 Mosloflavon'un HMBC spektrumu

Baicalein 5,6,7-trimethyl ether (FR15-18-1)



Şekil 4. 20 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in kimyasal yapısı

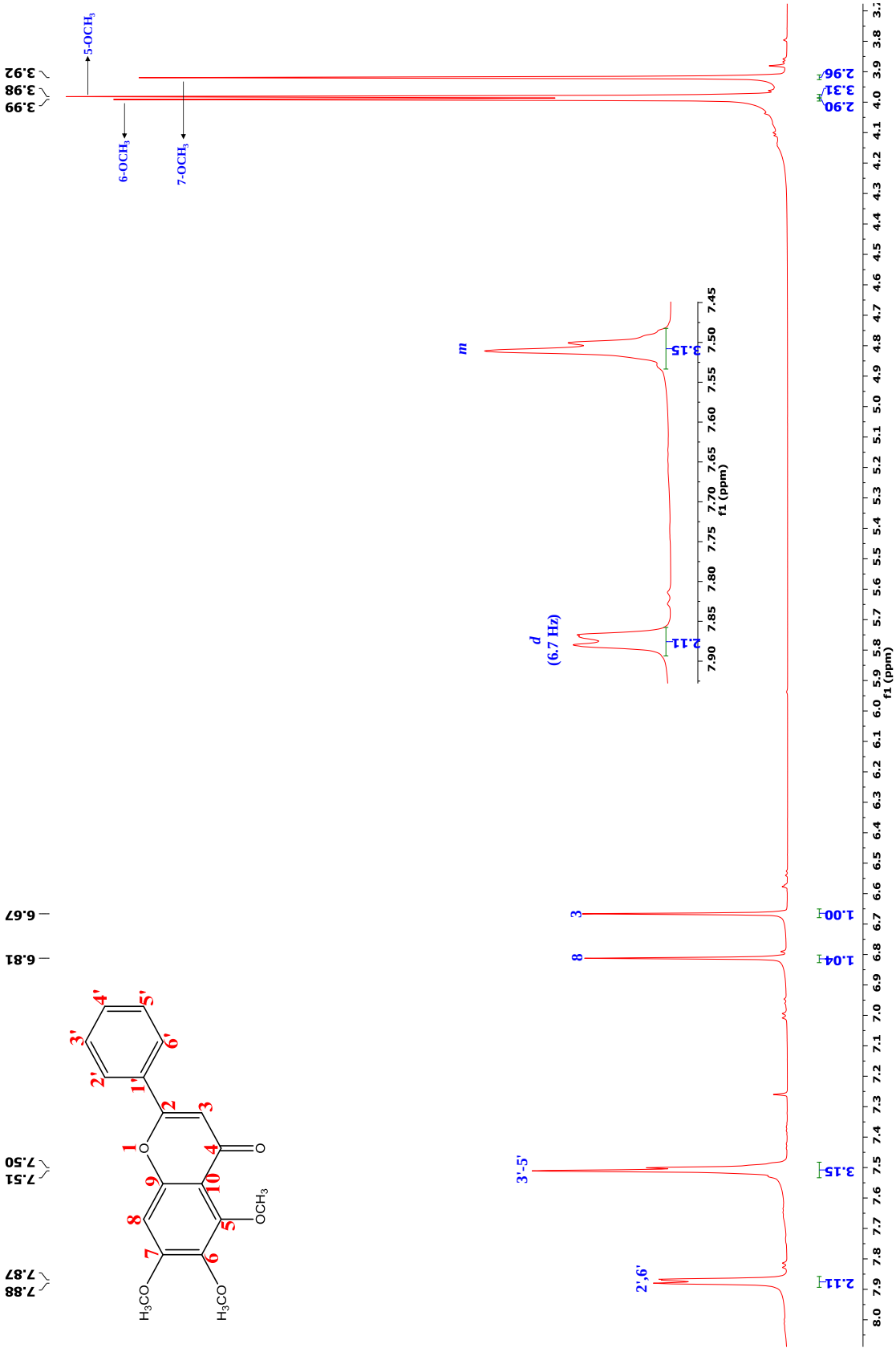
KL bitkisinin $CHCl_3$ ekstresinin silikajel kolonundan elde edilen fraksiyonundan (%100 $CHCl_3$) saflaştırılmıştır (fr15). Bu fraksiyonun sıvı kısmında bulunan yeşil renkli safsızlıklar uzaklaştırıldıktan sonra çöken katı kısmında beyaz ve sarı maddeler olduğu tespit edildi. MeOH ile çözünen sarı kısım yıkama ve santrifüjleme işlemleri uygulanarak uzaklaştırıldı ve saf beyaz katı olarak Baicalein 5,6,7-trimethyl ether izole edildi.

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 7.87 (2H, *d*, J= 7.5 Hz, 2', 6'-H), 7.52 (3H, *m*, 3',4',5'-H), 6.81 (1H, *s*, 8-H), 6.67 (1H, *s*, 3-H), 3.99 (3H, *s*, 5-OCH_3), 3.98 (3H, *s*, 6-OCH_3), 3.92 . (3H, *s*, 7-OCH_3)

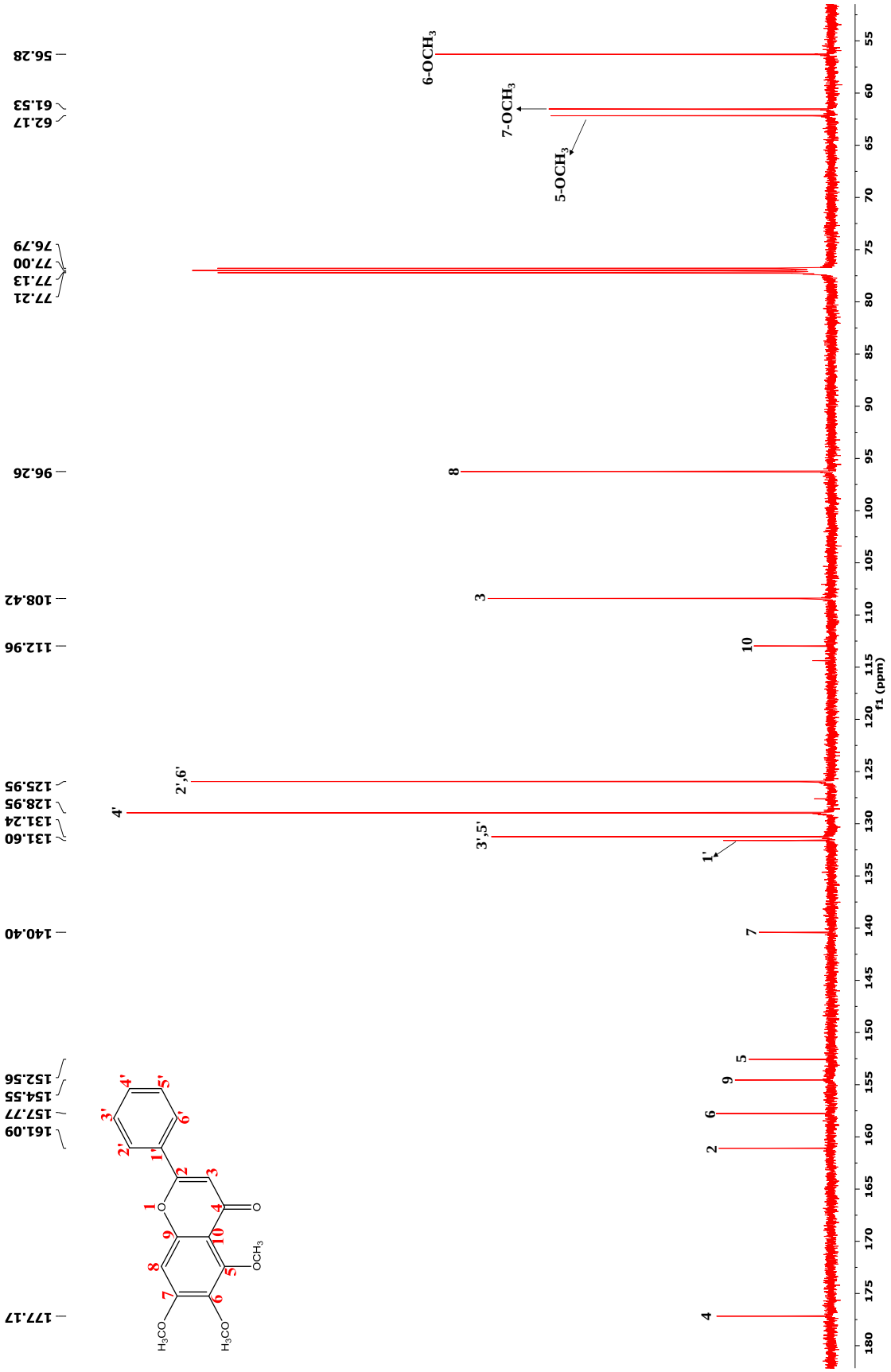
^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 177.17 (C-4) , 161.08 (C-2), 157.76 (C-6), 154.55 (C-9), 152.56 (C-5), 140.40 (C-7), 131.60 (C-1'), 131.23 (C-3', C-5'), 128.95 (C-4'), 125.95 (C-C-2', C-6'), 112.87 (C-10), 108.42 (C-3), 96.26 (C-8), 62.17 (OCH_3-5), 61.52 (OCH_3-7), 56.28 (OCH_3-6) (Huang *et al.* 2003).

Mosloflavon ve Baicalein 5,6,7-trimethyl ether yapıları incelendiğinde, Baicalein 5,6,7-trimethyl ether bileşiğinde sadece 5 nolu karbonda OH yerine OCH_3 grubu bulunmaktadır. Bu benzerlik NMR spektrumunda da karşımıza çıkmaktadır. ^{1}H-NMR

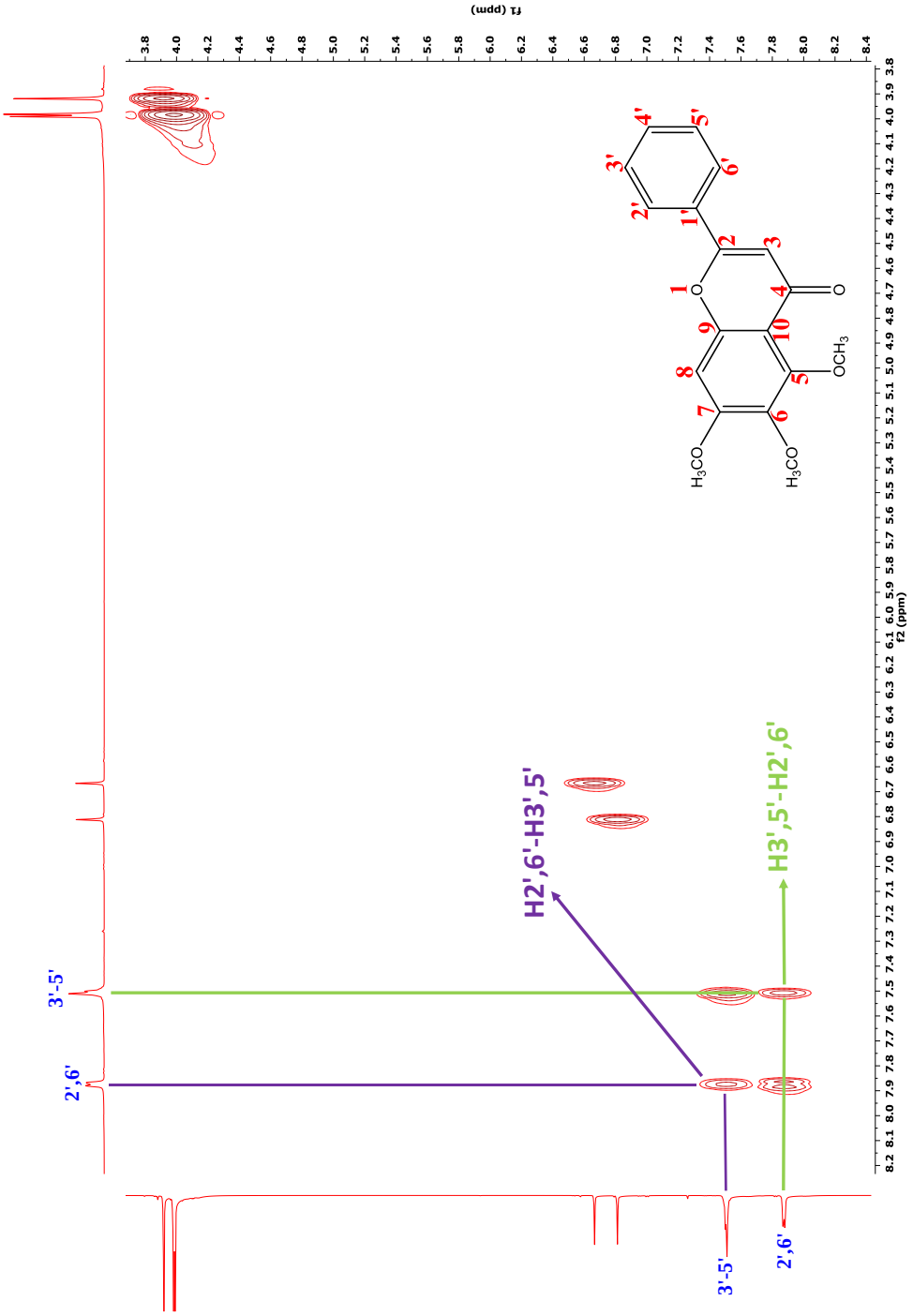
spektrumunda 7.87 ppm'deki integrasyonu 2, etkileşim sabiti 8.3 Hz dublet pik 2' ve 6' protonlarına, integrasyonu 3 olan multiplet pik grubu 3', 4' ve 5', integrasyonu 3 olan üç singlet pik metoksi protonlarında protonlarına aittir. HMBC spektrumunda 6.81 ppm'deki sinyalin, C3,C7, C9 ve C10 karbonlarıyla etkileşmesi, bu sinyale ait protonun 8 pozisyonunda olduğunu gösterir. HMBC spektrumunda C2, C4 ve C10 karbonlarıyla etkileşen 6.67 ppm'deki sinyal ise karakteristik H3 protonuna aittir.



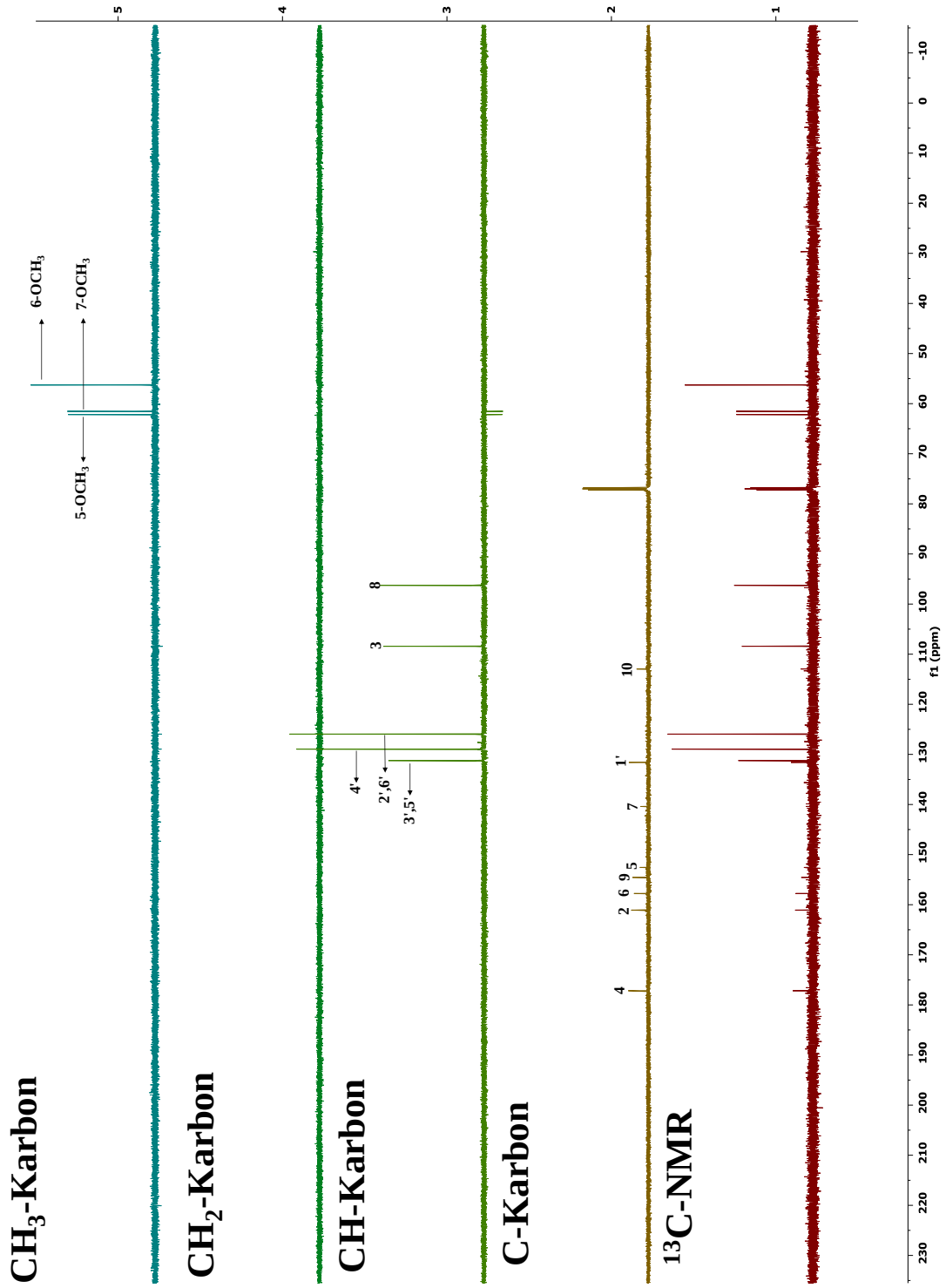
Şekil 4. 21 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in ^{1}H-NMR spektrumu



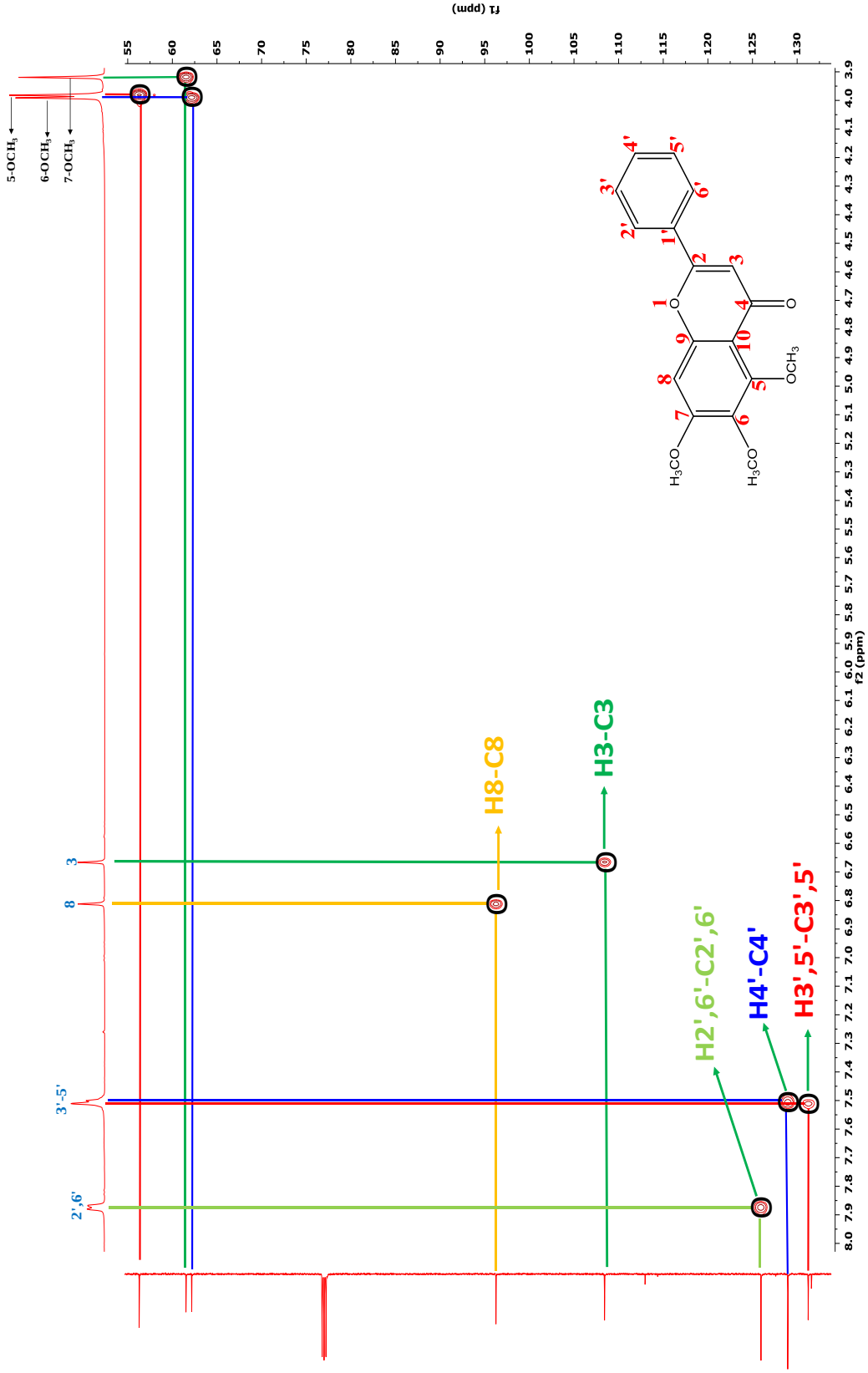
Şekil 4. 22 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in ^{13}C-NMR spektrumu



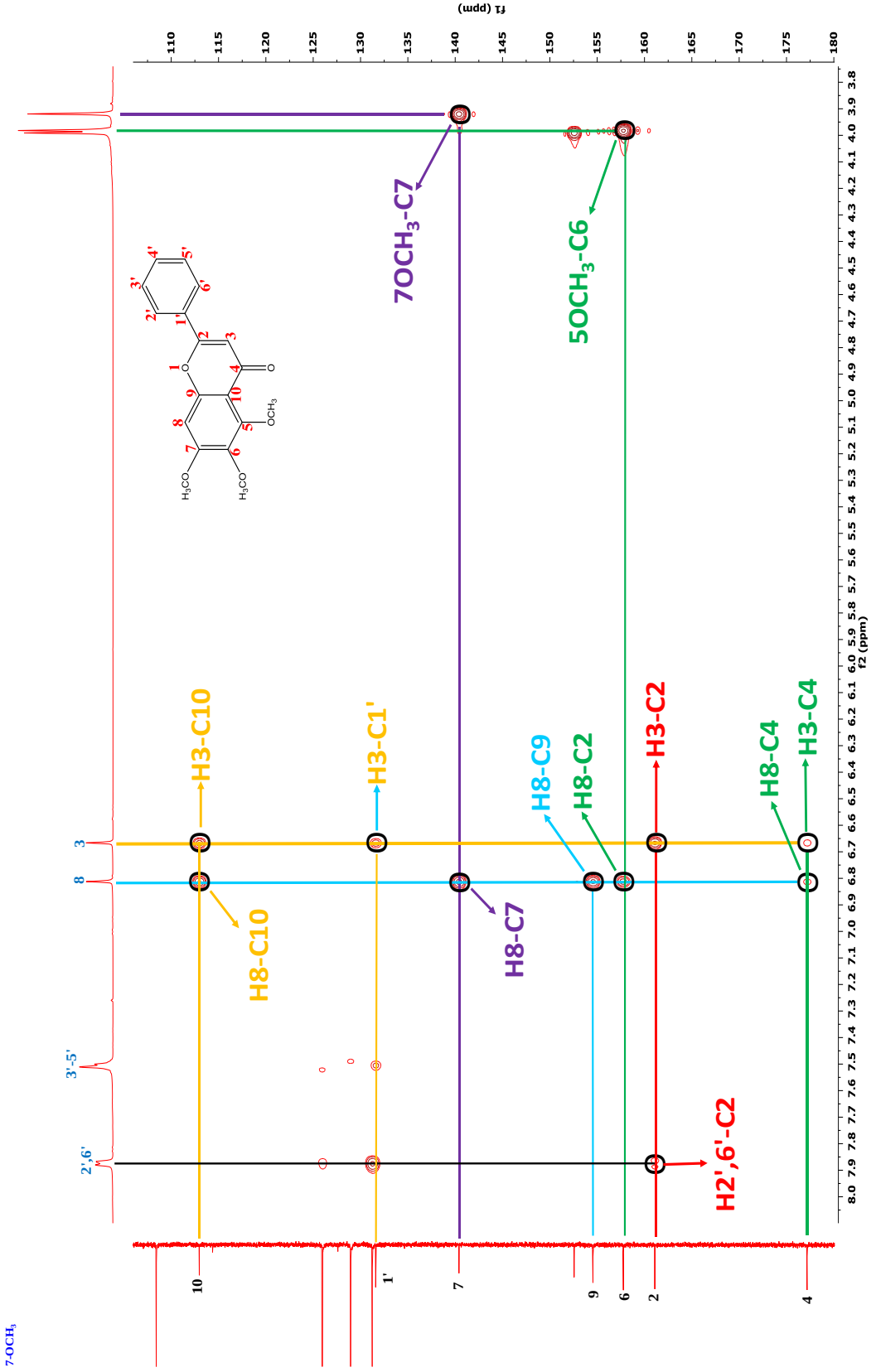
Şekil 4. 23 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in COSY spektrumu



Şekil 4. 24 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in DEPT spektrumu

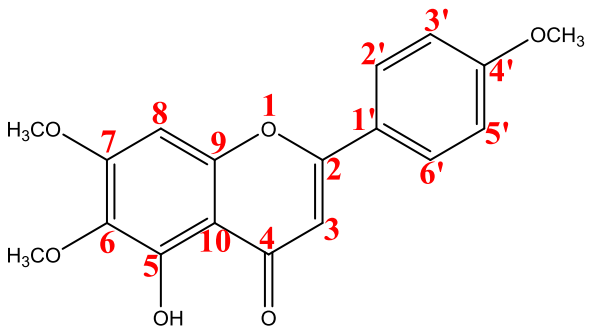


Şekil 4. 25 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in HSQC spektrumu



Şekil 4. 26 Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in HMBC spektrumu

Salvigenin (FR15-18-2)



Şekil 4. 27 Salvigenin'in kimyasal yapısı

Salvigenin (5-Hidroksi-6,7,4′-trimetoksi flavonlar) ve özellikle *Salvia officinalis* (adaçayı) bitkisinde bulunan aktif flavonoidlerin başında yer alır.

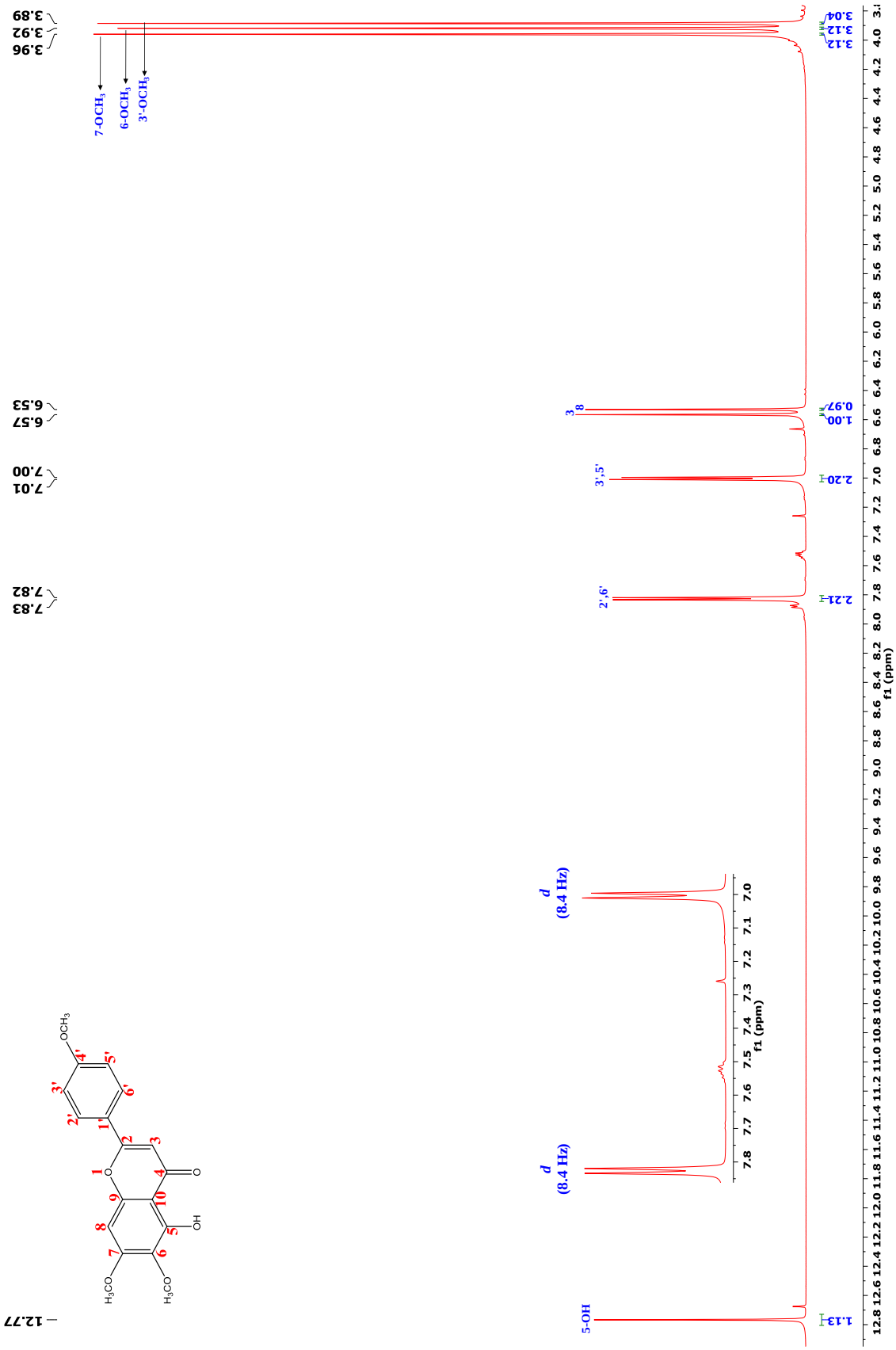
Salvigenin; aynı fraksiyondan (fr15) izole edilen Baicalein 5,6,7-trimethyl ether'in saflaştırılması işlemleri sürecinde elde edilen sarı çözeltinin MeOH çözücüsünde çöktürme tekniğiyle sarı katı olarak saflaştırılmıştır.

^{1}H NMR (600 MHz, $CDCl_3$) δ 12.76 (1H, *s*, 5-OH), 7.82, (2H, *d*, *J*= 8.84 Hz, 2', 6'-H), 7.00, (2H, *d*, *J*= 7.4 Hz, 3', 5'-H), 6.56 (1H, *s*, 3-H), 6.52 (1H, *s*, 8-H) 3.95 (3H, *s*, 7-OCH_3), 3.91 (3H, *s*, 6-OCH_3), 3.88 (3H, *s*, 3'-OCH_3).

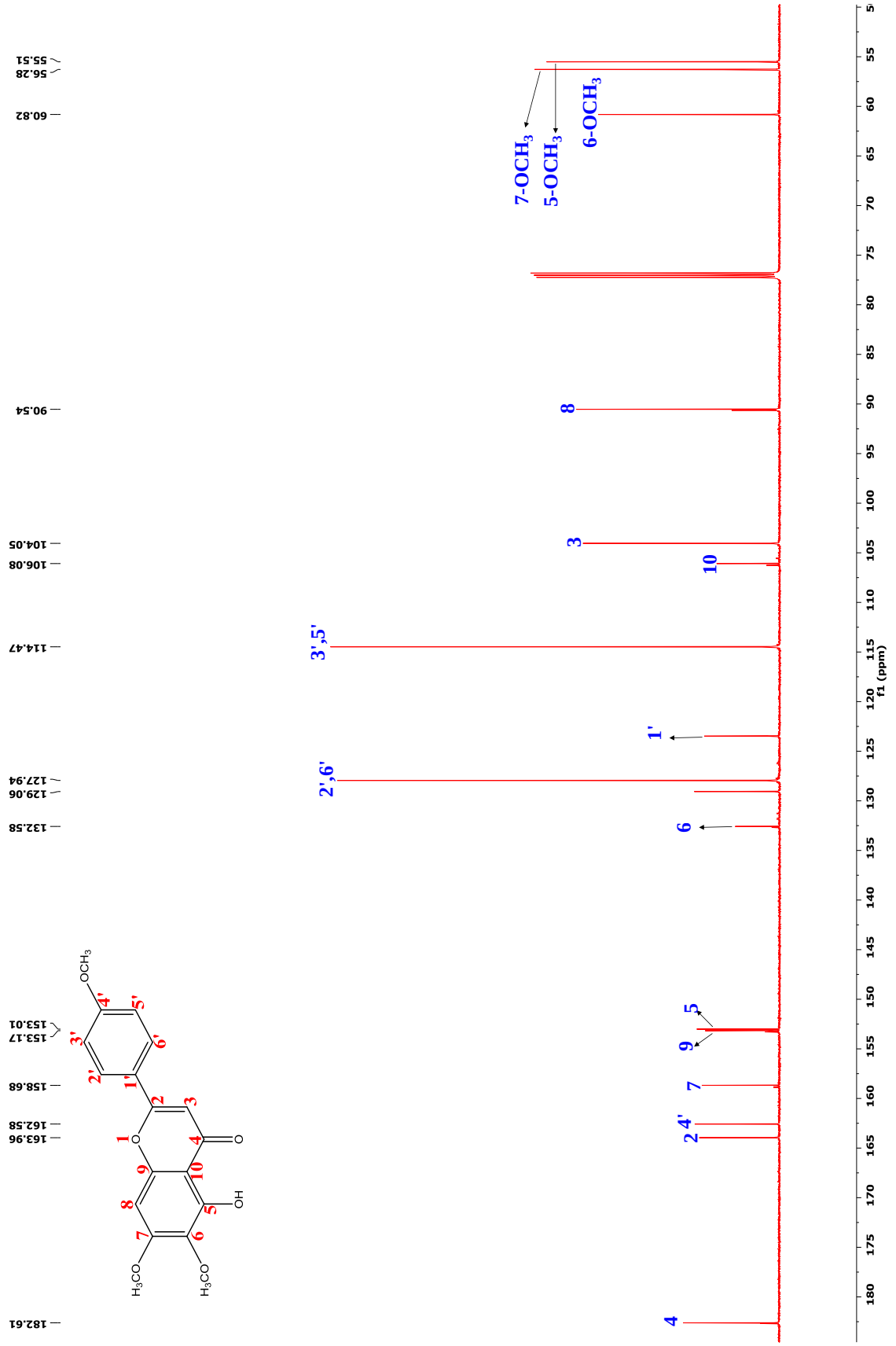
^{13}C NMR (150 MHz, $CDCl_3$) δ 182.61 (C-4), 163.96 (C-2), 162.58 (C-4'), 158.68 (C-7), 153.17 (C-9), 153.01 (C-5), 132.58 (C-6), 127.94 (C-2', C-6'), 123.48 (C-1'), 114.47 (C-3', C-5') , 106.08(C-10), 104.05 (C-3), 90.63 (C-8), 60.81 (6-OCH_3), 56.28(7-OCH_3), 55.51 (OCH_3-4') (Shokoohinia *et al.* 2015).

Salvigenin bileşiğindeki flavonun A halkası bakımından Mosloflavon ile aynı olduğu için kimyasal kayma değerleri ve etkileşmeler benzerlik göstermektedir. Sadece B halkasında 4' konumunda metoksi grubu içerdiğinden simetri merkezi bulunmaktadır. Bundan dolayı da 2' ve 6', 3' ve 5' protonları aynı ppm değerlerine sahiptir ve bu iki

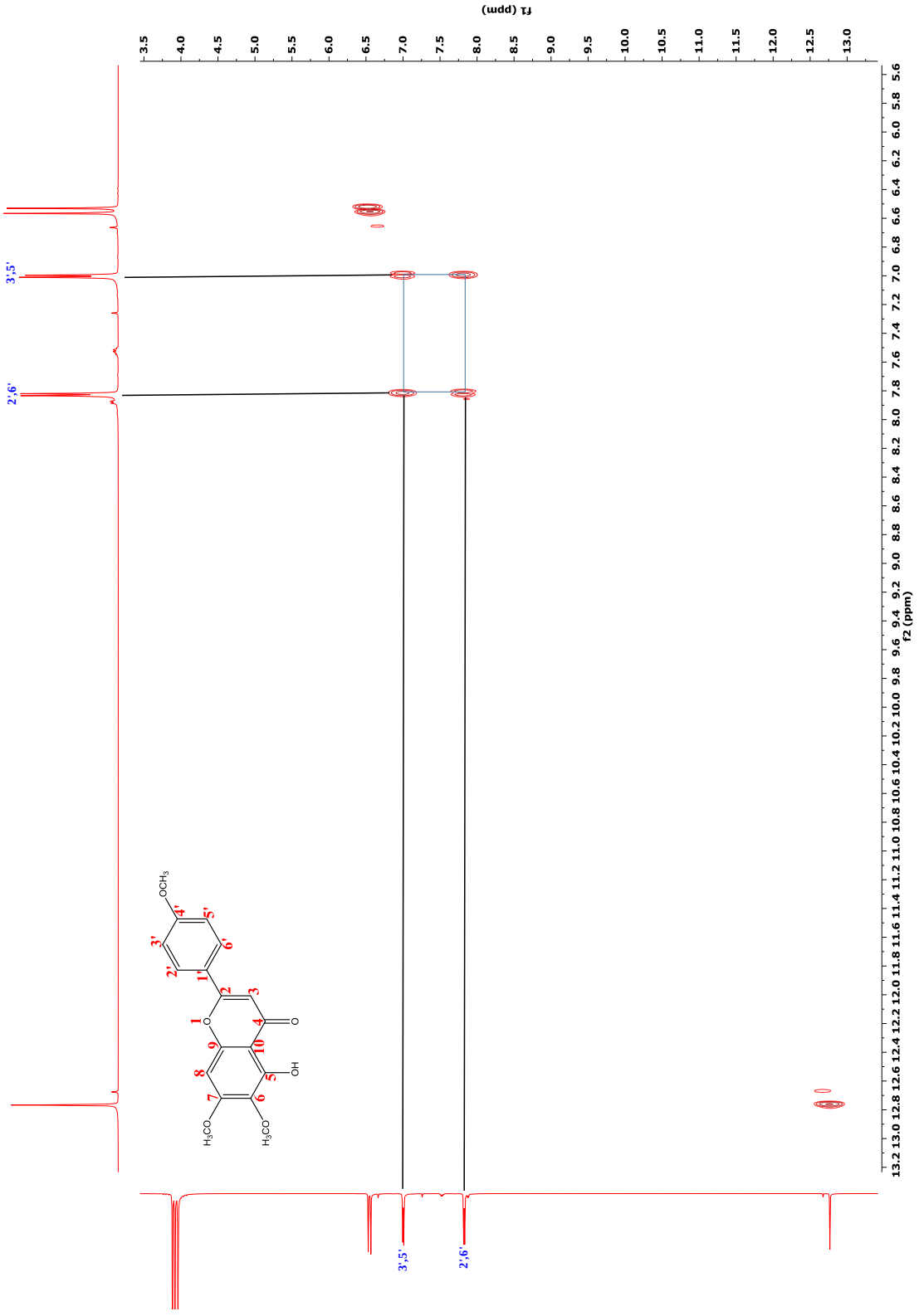
farklı pik grubu *orto* pozisyonunda olduğu için dublet (integrasyonu 2, etkileşim sabiti 8.84 Hz olan) şeklinde gözlenmektedir.



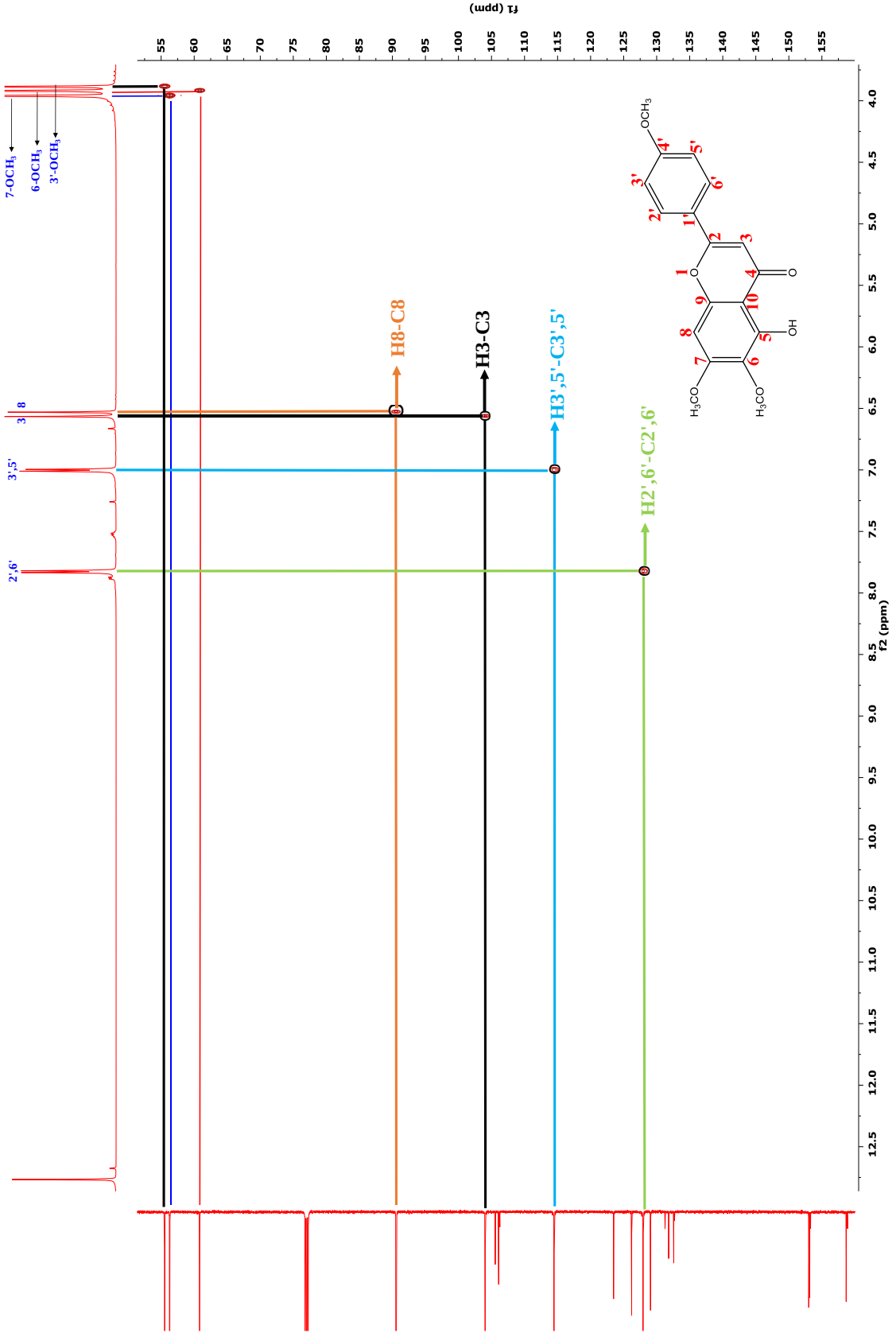
Şekil 4. 28 Salvigenin'in ^{1}H-NMR spektrumu



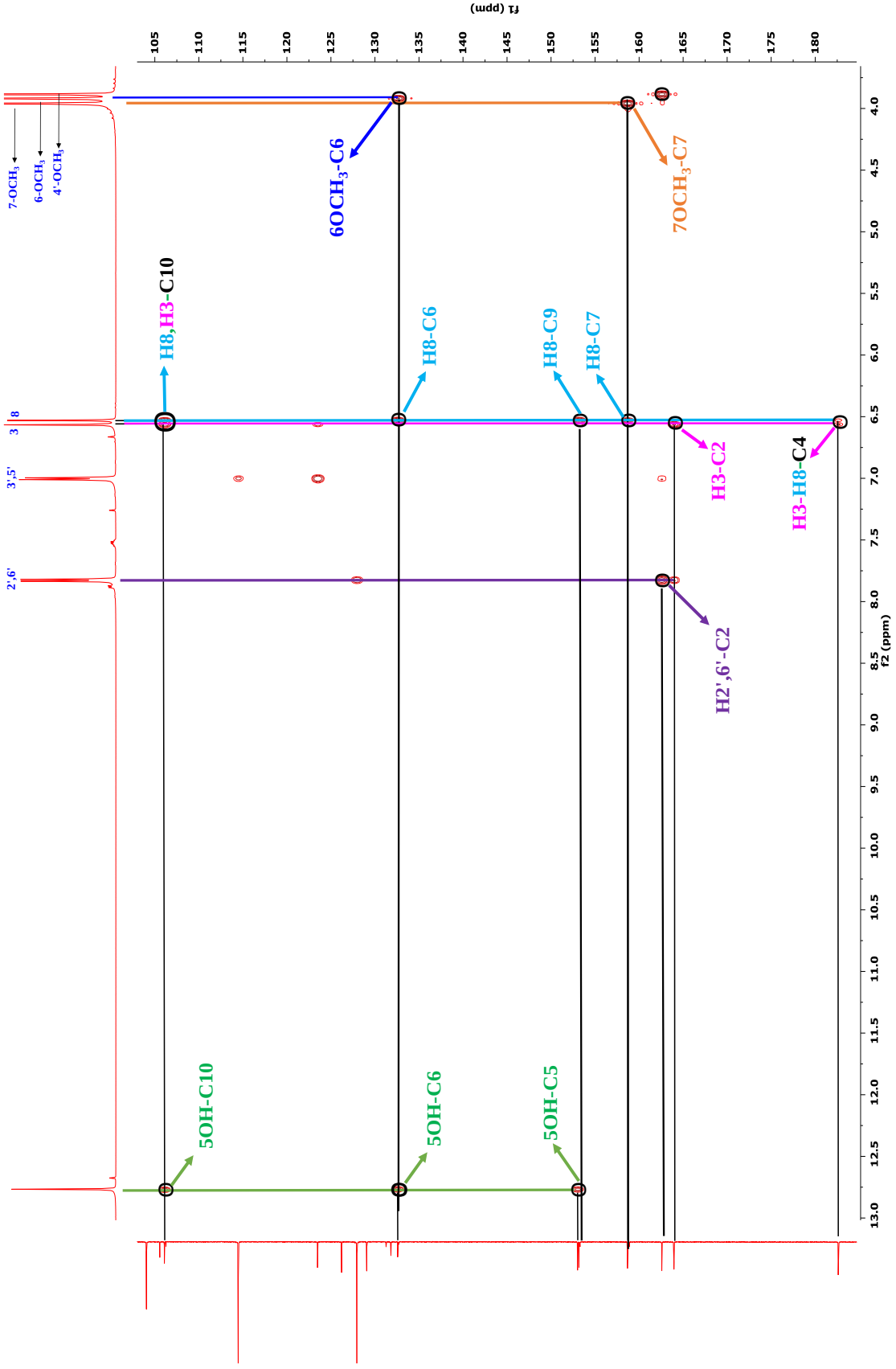
Şekil 4. 29 Salvigenin'in ^{13}C-NMR spektrumu



Şekil 4. 30 Salvigenin'in COSY spektrumu

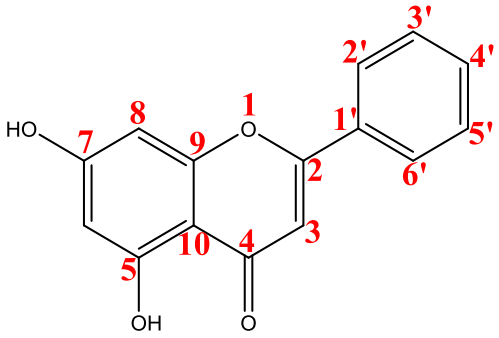


Şekil 4. 31 Salvigenin'in HSQC spektrumu



Şekil 4. 32 Salvigenin'in HMBC spektrumu

Chrysin (FR31-32)



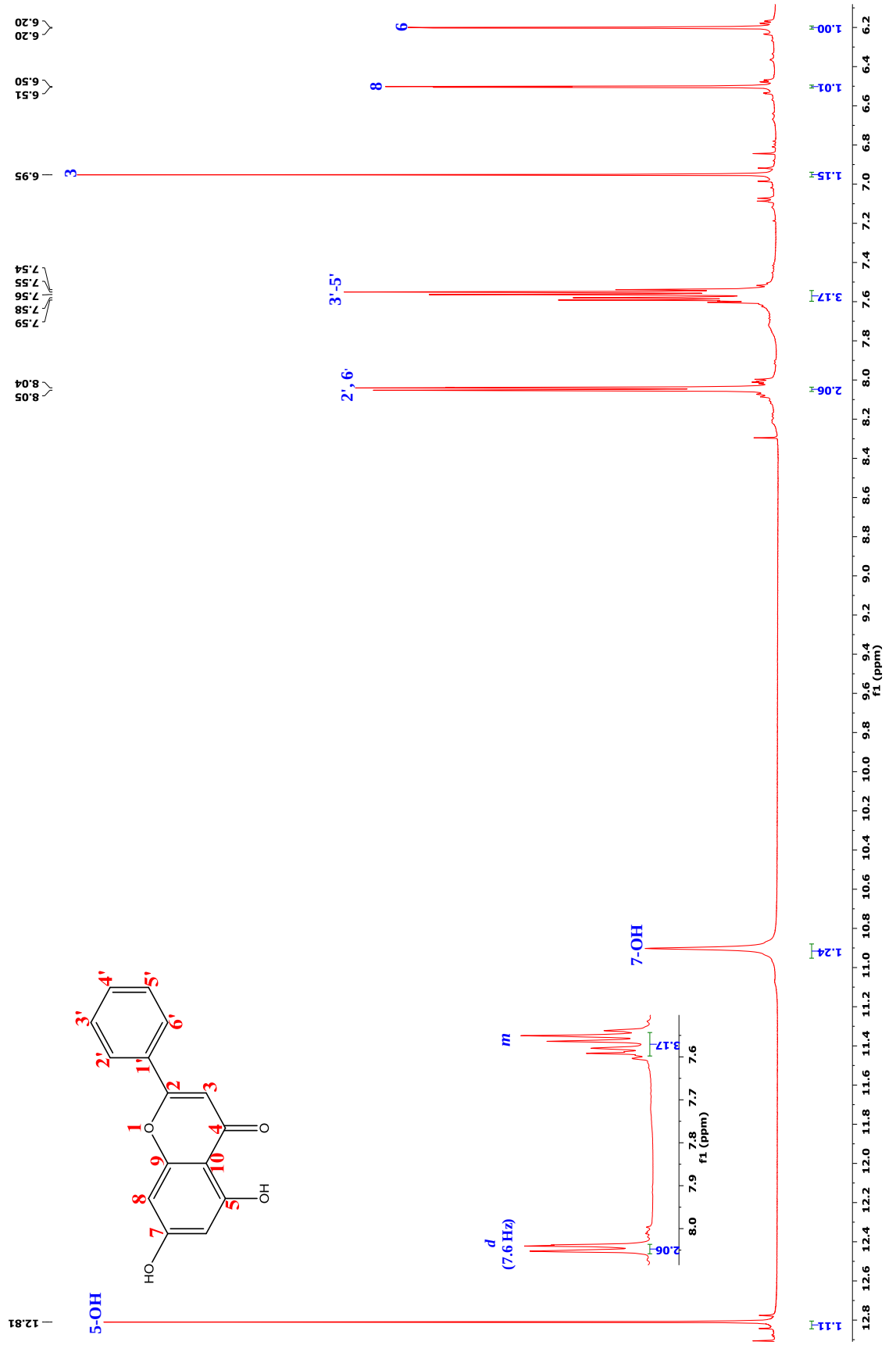
Şekil 4. 33 Chrysin'in kimyasal yapısı

Chrysin bileşiğinin B halkası; Mosloflavon ve Baicalein 5,6,7-trimethyl ether ile aynı olsa da, 3',4',5' protonların ait pik grubu (7.51-7.64 ppm aralığı) bakımından Mosloflavon ile neredeyse aynıdır. HMBC'de karbonil karbonuyla etkileşen singlet pik H3 protonuna, etkileşim sabiti 7 olan 8.05 ppm'deki dublet pik H3' ve H5' protonlarıyla etkileşen H2' ve H6' protonlarına, etkileşim sabiti 1.76 Hz olan 2 dublet pik ise H6 (6,20 ppm) ve H8 (6.50 ppm) protonlarına aittir. H6 protonu iki OH, H8 ise tek OH grubuna komşu (*orto* konumunda) olduğu için, H6 H8'den daha yukarı alana kaymaktadır.

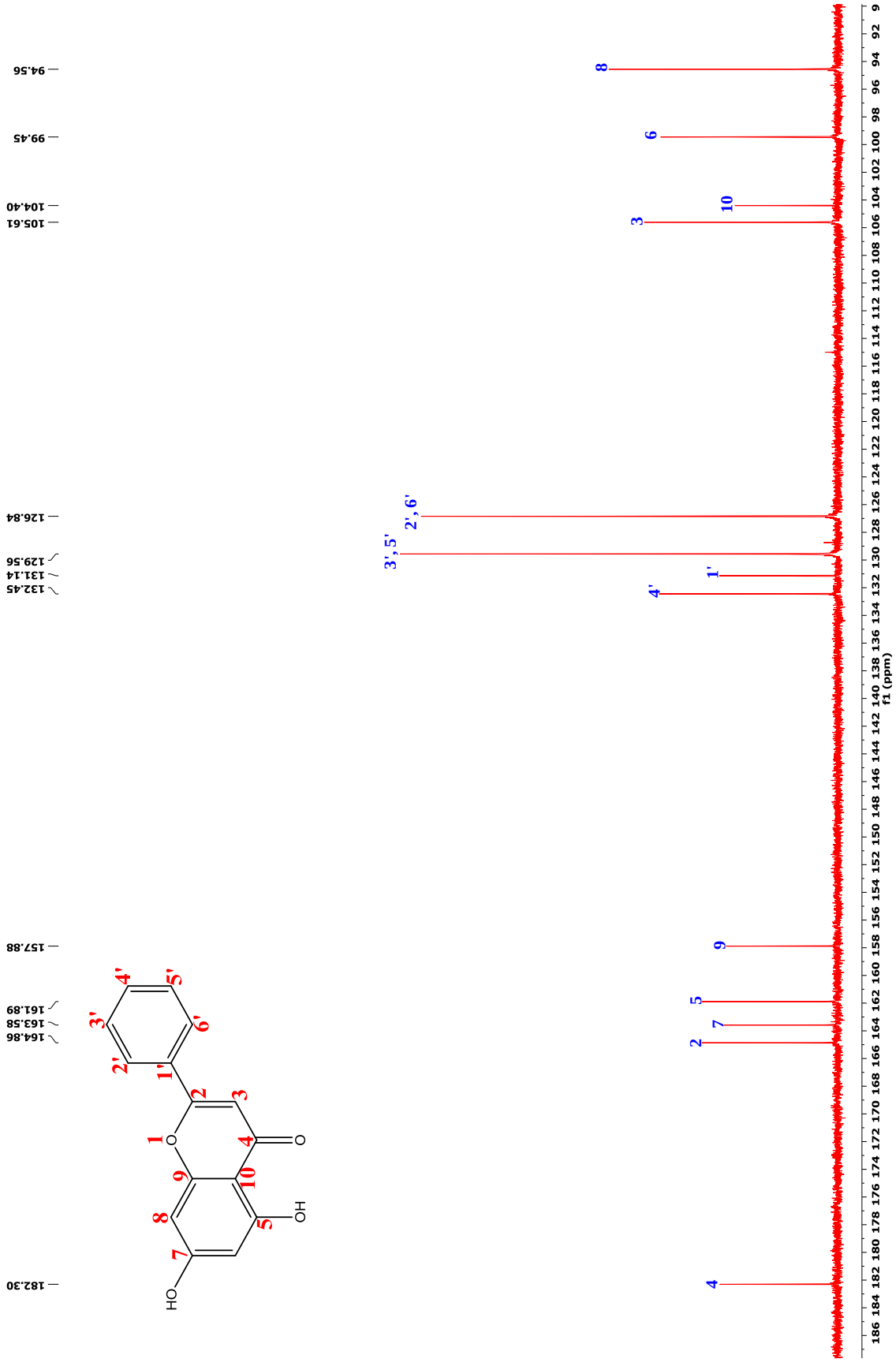
Bu bileşik 31 ve 32 fraksiyonların birleştirilip çözücüleri uzaklaştırıldıktan sonra MeOH ile safsızlıkları giderilip santrifüjleme işlemi uygulanarak saflaştırılmıştır.

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*): δ 12.81 (1H, *brs*, 5-OH), 10.90 (1H, *brs*, 7-OH), 8.05 (2H, *d*, *J*=7.04 Hz, 2'-H), 7.51-7.64 (3H, *m*, 3', 4', 5'-H), 6.95 (1H, *s*, 3-H), 6.50 (1H, *d*, *J*=1.76 Hz, 8-H), 6.20 (1H, *d*, *J*=1.76 Hz, 6-H)

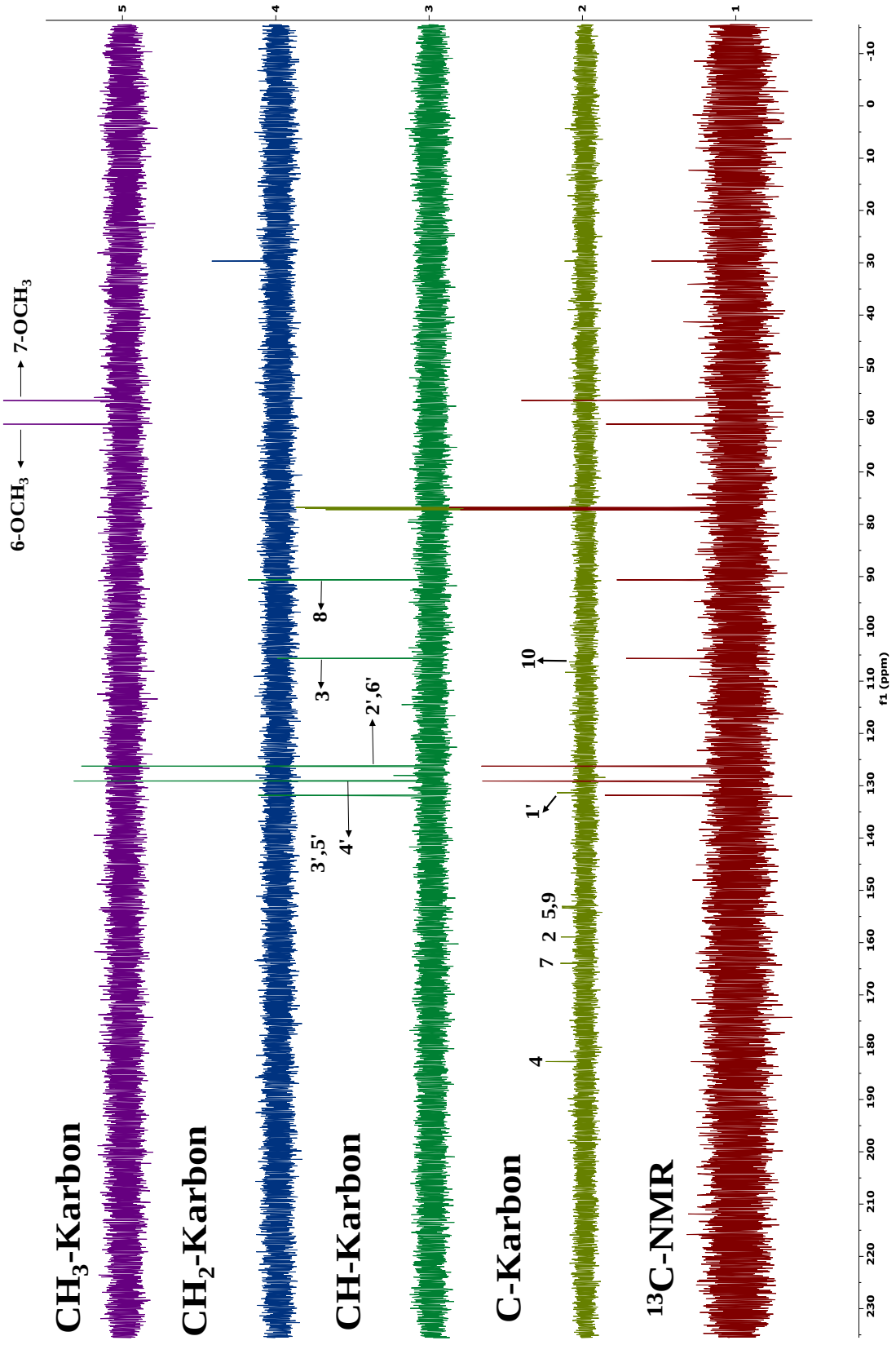
^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*) δ 182.30 (C-4), 164.86 (C-7), 163.58 (C-2), 161.89 (C-5), 157.88 (C-9), 132.45 (C-4'), 131.14 (C-1'), 129.56 (C-3',5'), 126.84 (C-2',6'), 105.61(C-3), 104.40(C-10), 99.45 (C-6), 94.56 (C-8) (Segueni *et al.* 2016).



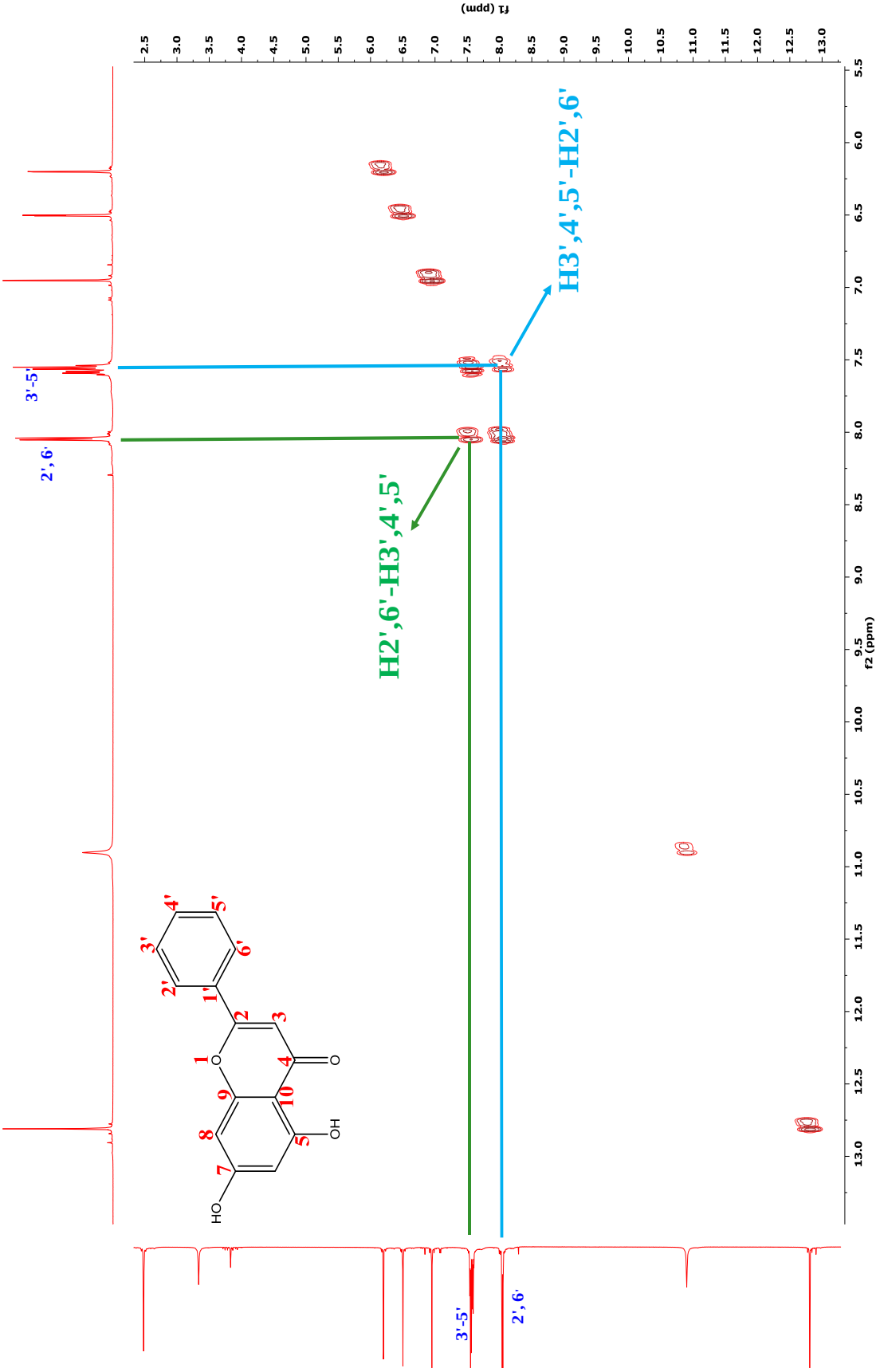
Şekil 4. 34 Chrysin'in ^{1}H-NMR spektrumu



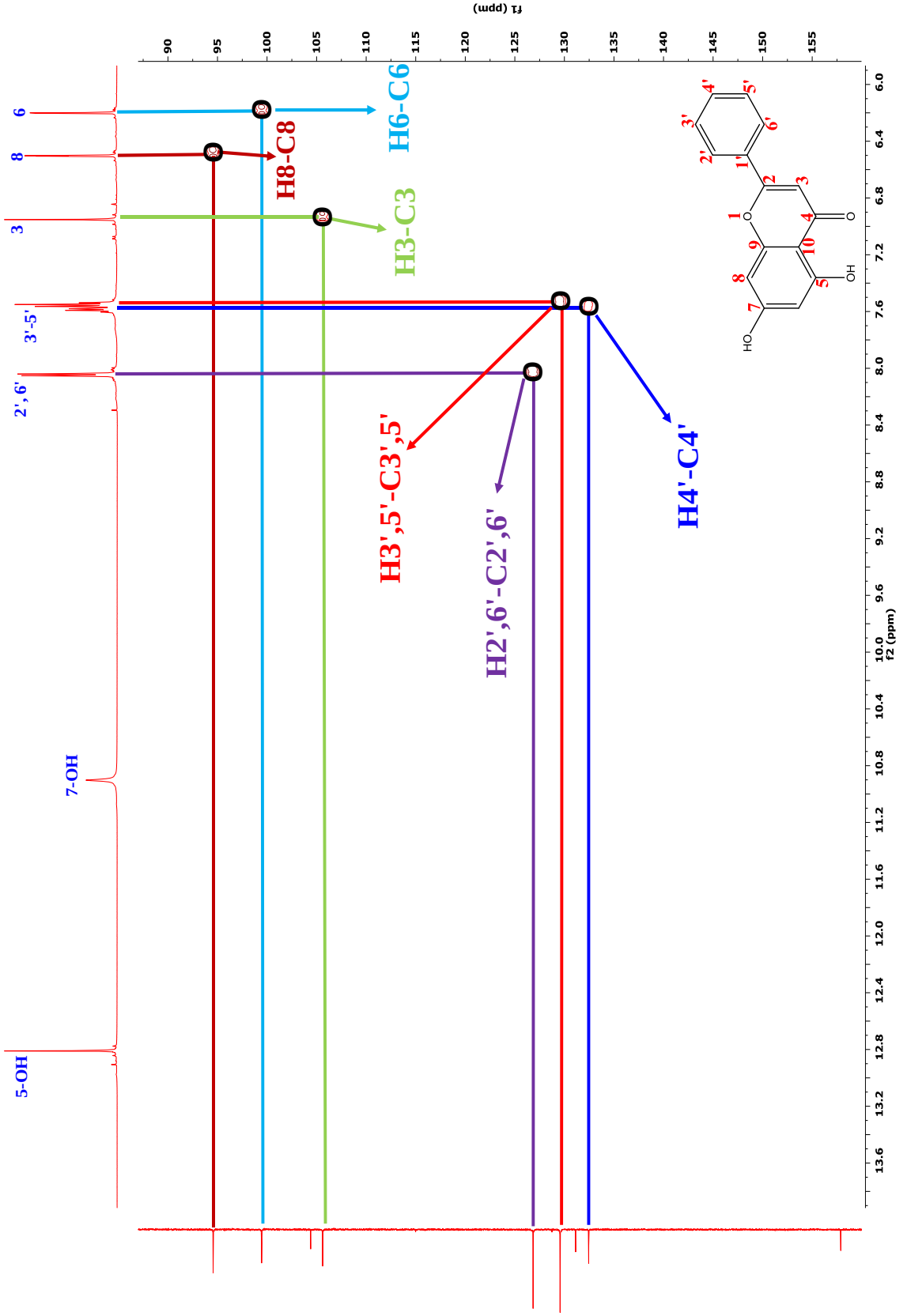
Şekil 4. 35 Chrysin'in ^{13}C-NMR spektrumu



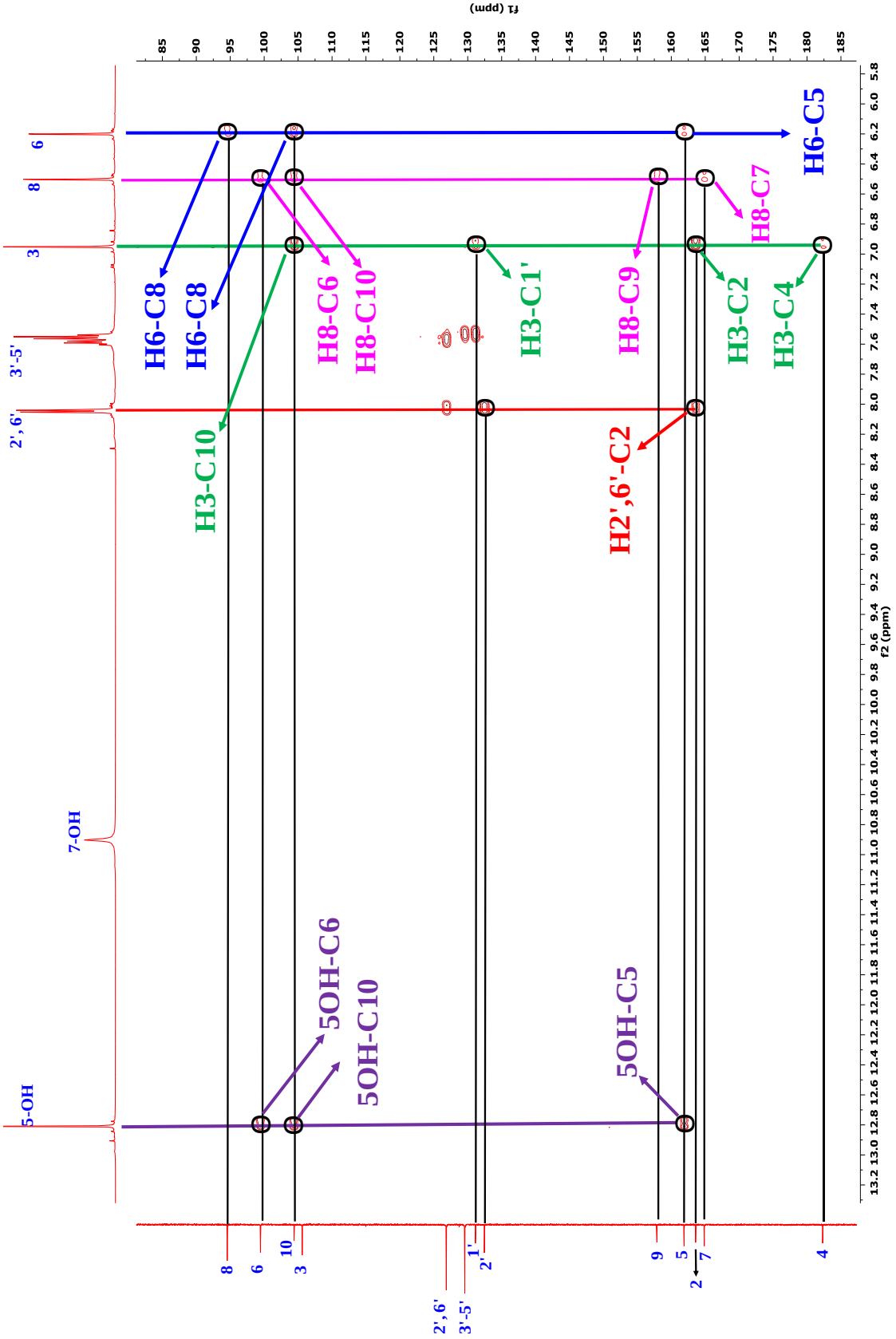
Şekil 4. 36 Chrysin'in DEPT spektrumu



Şekil 4. 37 Chrysin'in COSY spektrumu

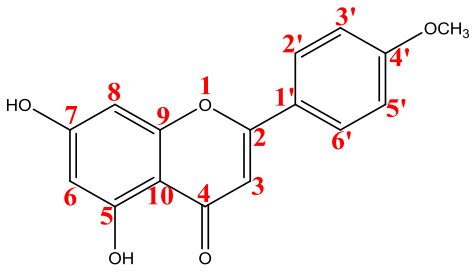


Şekil 4. 38 Chrysin'in HSQC spektrumu



Şekil 4. 39 Chrysin'in HMBC spektrumu

Bileşik 5. Acacetin (FR-33)



Şekil 4. 20 Acacetin'in kimyasal yapısı

Acacetin bileşiğinin Chrysin bileşiğinden farkı B halkasındaki 4' pozisyonundaki metoksi grubudur. Bu durum A ve C halkasına ait piklerde benzerlik sağlasa da, B halkasındaki metoksi grubu, bu halkadaki proton ve karbon piklerinin tamamıyla değişmesine neden olmaktadır. B halkası açısından Acacetin ile Salvigenin aynı olduğu için, bu iki bileşiğin proton ve karbon sinyalleri benzerlik göstermektedir.

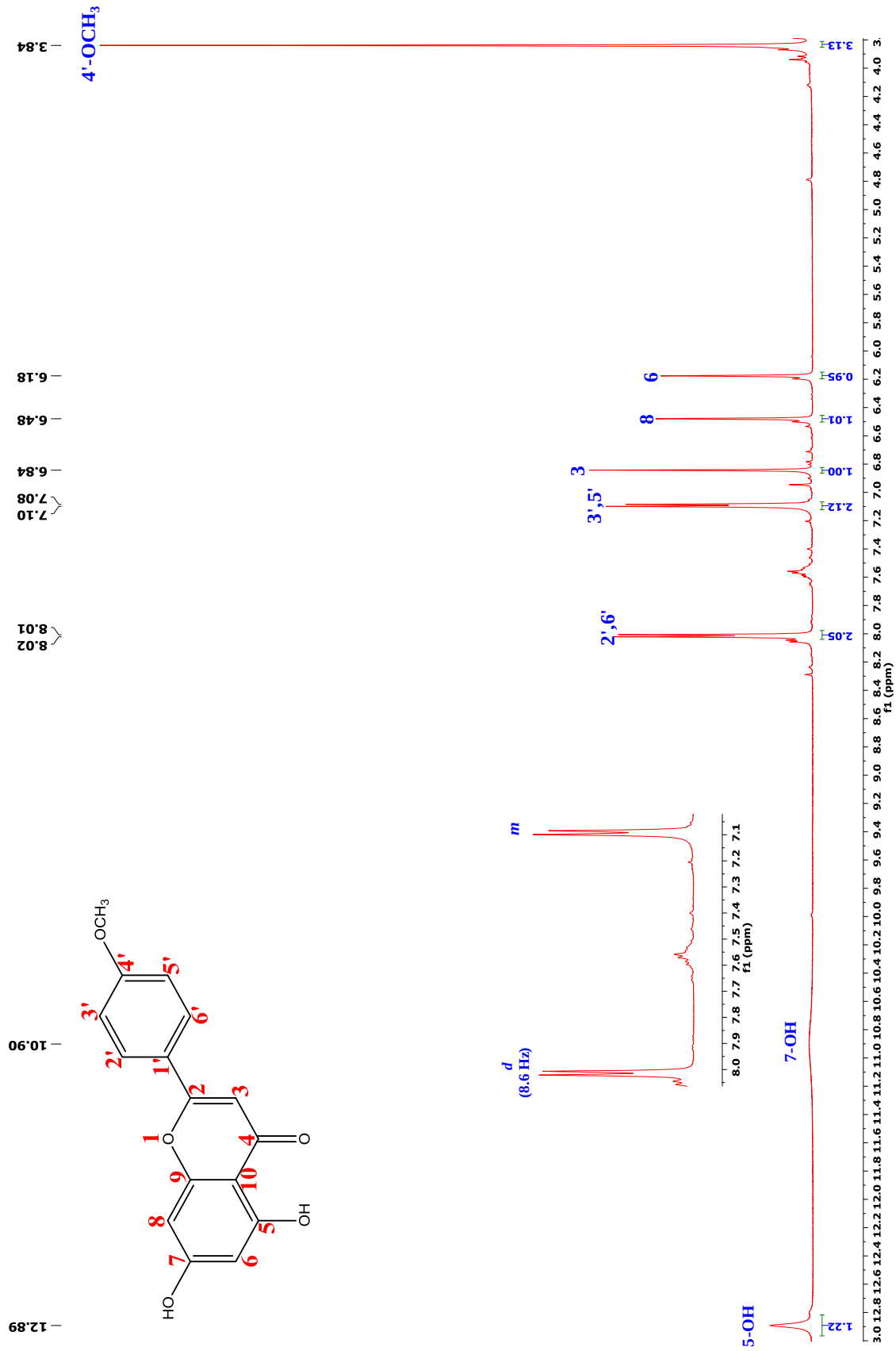
^{1}H-NMR spektrumunda 12.89 ppm'deki keskin singlet pik molekül içi H bağı yapmış 5-H protonuna ve 10.90 ppm'deki oldukça yayvan çıkan singlet pik ise molekül için H bağı yapmış 7-OH protonuna aittir. İntegrasyonu 3 olan 3,84 ppm'deki singlet pik 4'-OCH_3 grubuna aittir ve bu gruptan dolayı B halkasında simetri merkezi bulunmaktadır 2', 6' ile 3', 5' protonları ve karbonlarına ait sinyaller aynı ppm değerinde rezonans olmuştur. 4'-OCH_3 grubunun mezomerik etkisinden dolayı, 3', 5' protonları etrafındaki elektron yoğunluğu, 2', 6' protonlarınkinden çok daha fazladır. Bundan dolayı integrasyonu 3 olan singlet 2 pike ait olan 3', 5' protonları 7.10 ppm'de, 2', 6' protonları ise 8.02 ppm'de gözükmektedir.

HMBC spektrumunda karbonil karbonu (C4) ile etkileşen ve komşu proton ile etkileşmesi olmayan H3 protonu ise 6.84 ppm'deki gözükmektedir. Geriye kalan integrasyonu 1 olan 6.18 ve 6.48 ppm'deki pikler H6 ve H8 protonlarına aittir. Ayrıca HMBC spektrumunda (Şekil 4.45) 6,48 ppm'deki protonun C9 ile ve 6.18 ppm'deki protonun C5 karbonuyla etkileşmesi önerilen yapıyı kanıtlamaktadır. 2-OH grubunun

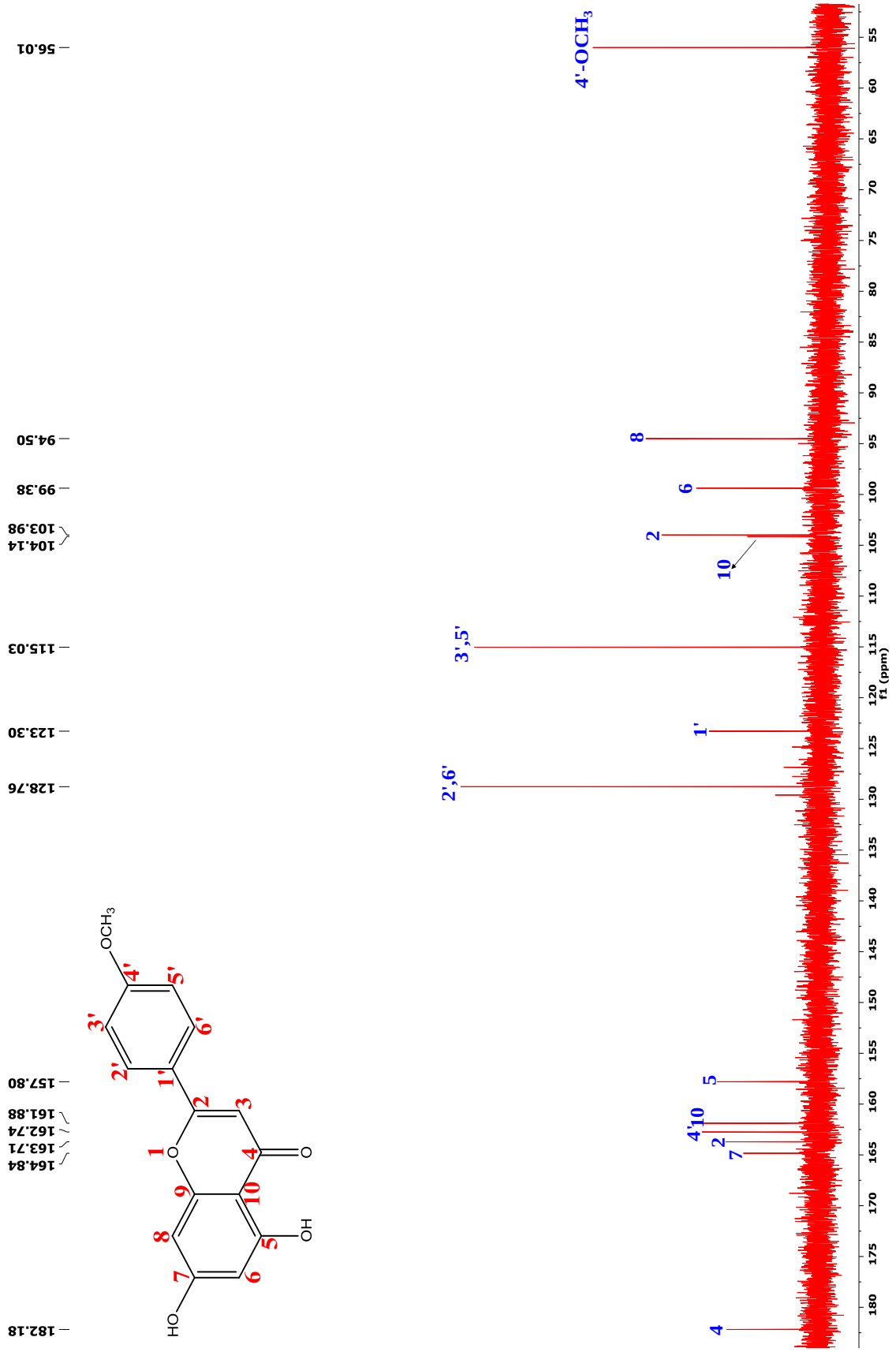
orto pozisyonuna mezomerik katkısından dolayı H6 daha yukarı alana kaymaktadır. H6 ve H8 meta konumunda olmasına rağmen arasındaki etkileşim sabiti çok düşük olduğundan yayvan singlet olarak görünmektedir.

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*): δ 12.89 (1H, *brs*, 5-OH), 10.90 (1H, *brs*, 7-OH, 8.02 (2H, d, *J*=8.6 Hz, 2', 6'-H), 7.10 (2H, d, *J*=8.6 Hz, 3', 5'-H), 6.84 (1H, *s*, 3-H) 6.48 (1H, *brs*, 8-H), 6.18 (1H, *brs*, 6-H), 3.84 (3H, *s*, 4'-OCH_3).

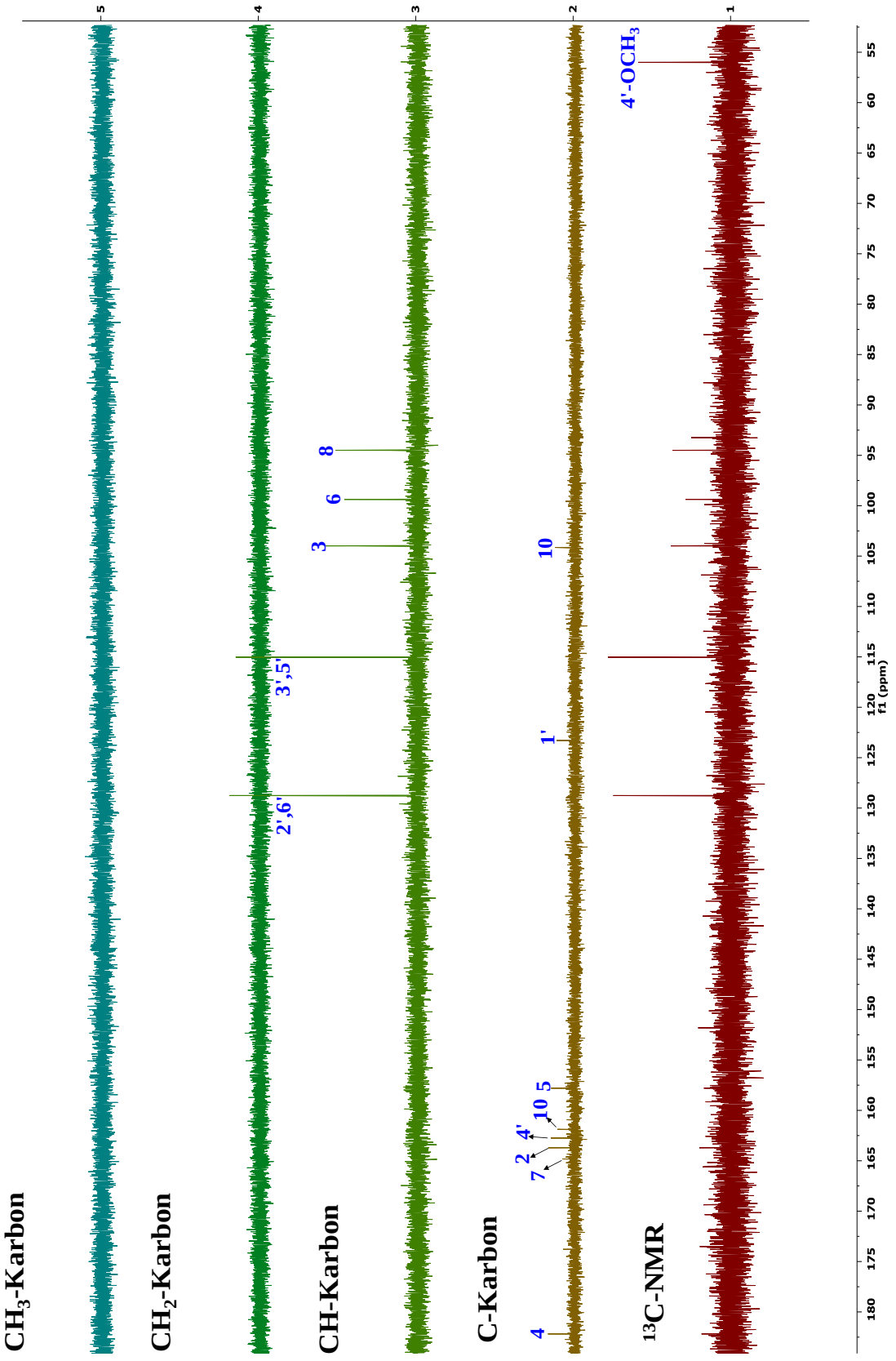
^{13}C NMR (150 MHz, DMSO-*d6*) δ 182.20 (C-4), 164.86 (C-7), 163.73 (C-2), 162.76 (C-4'), 161.90 (C-5), 157.87 (C-9), 128.77 (C-2', 6'), 123.30 (C-1'), 115.04 (C-3', 5'), 104.55 (C-10), 103.99 (C-2), 99.39 (C-6), 94.51 (C-8), 56.01 (4'-OCH_3) (Nath *et al.* 2015)



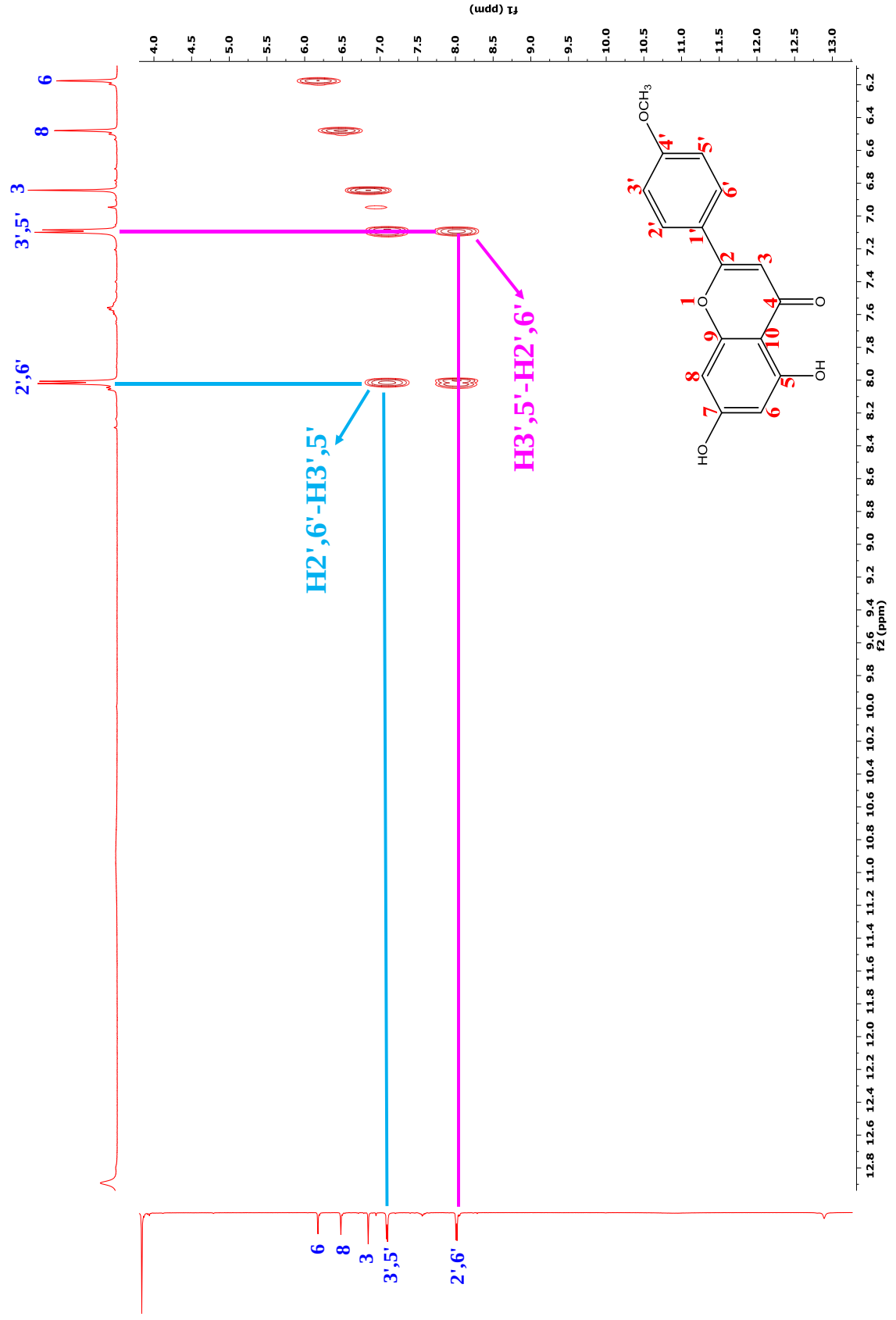
Şekil 4. 40 Acacetin'in ^{1}H-NMR spektrumu



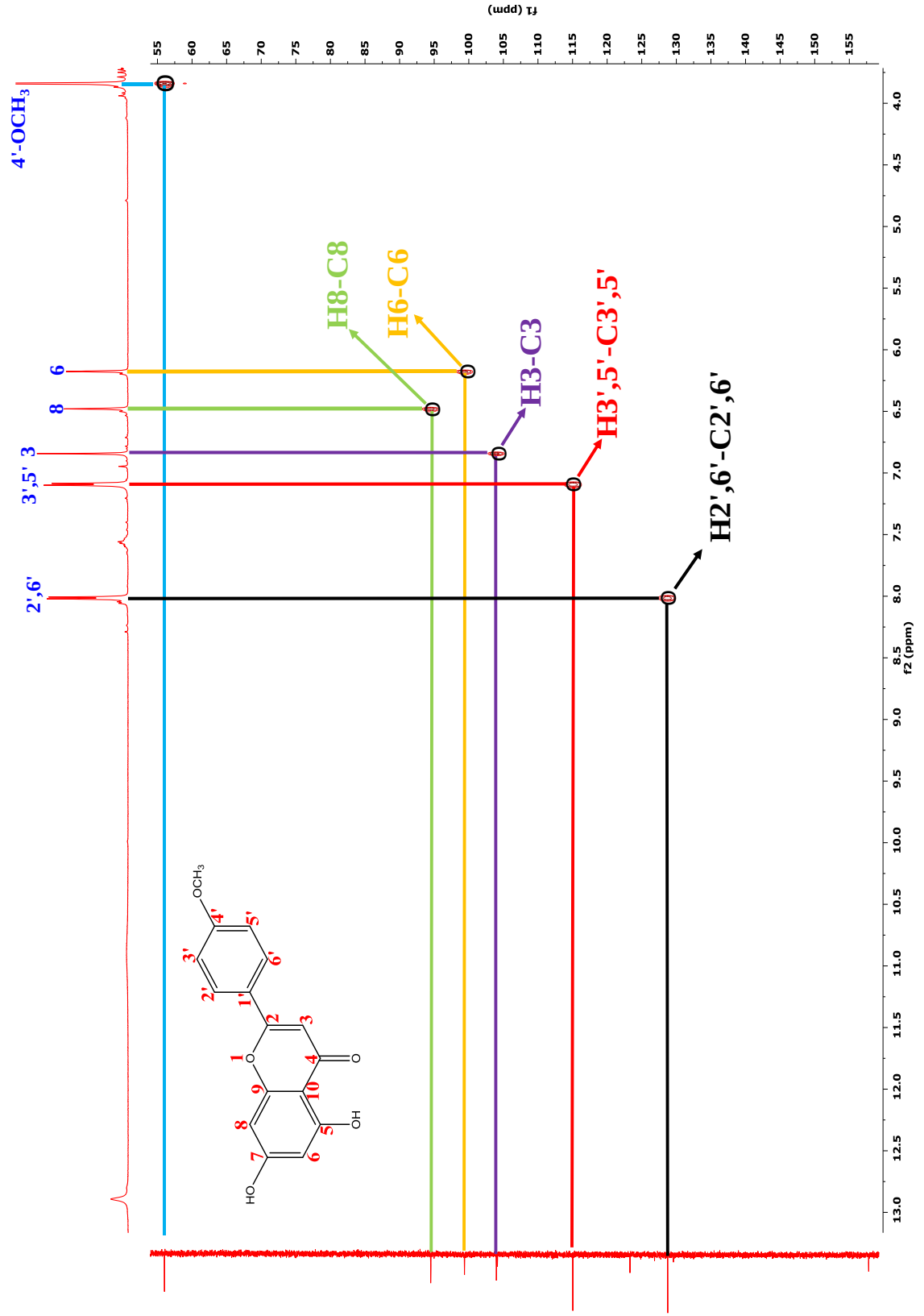
Şekil 4. 41 Acacetin'in ^{13}C-NMR spektrumu



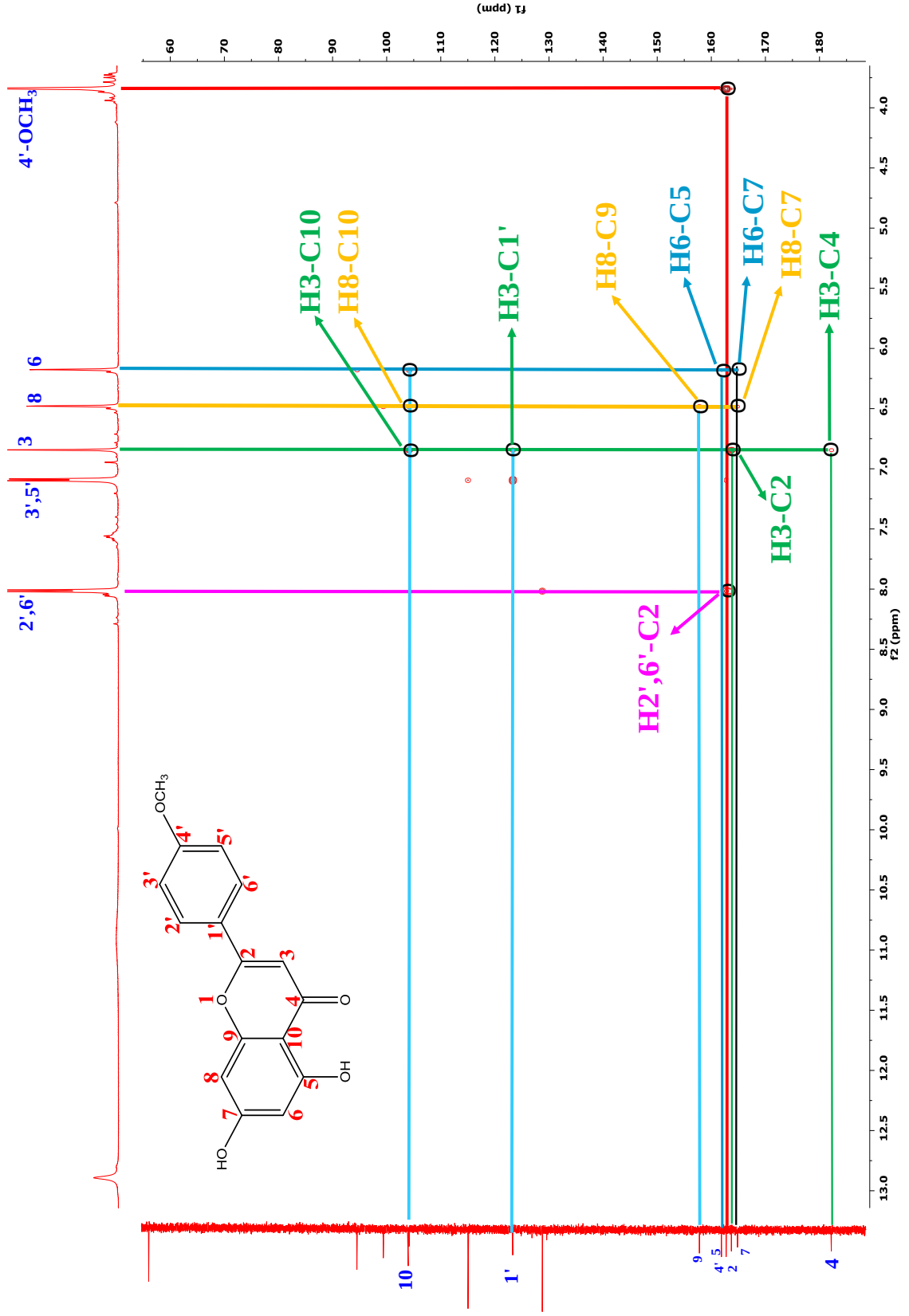
Şekil 4. 42 Acacetin'in DEPT spektrumu



Şekil 4. 43 Acacetin'in COSY spektrumu

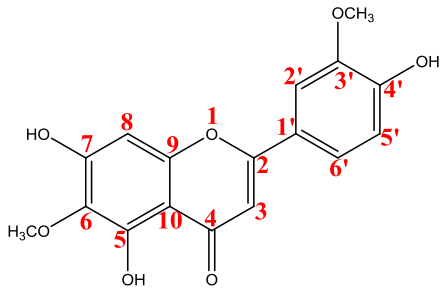


Şekil 4. 44 Acacetin'in HSQC spektrumu



Şekil 4. 45 Acacetin'in HMBC spektrumu

Bileşik 6. Jaceosidin (FR-38)



Şekil 4. 46 Jaceosidin'in kimyasal yapısı

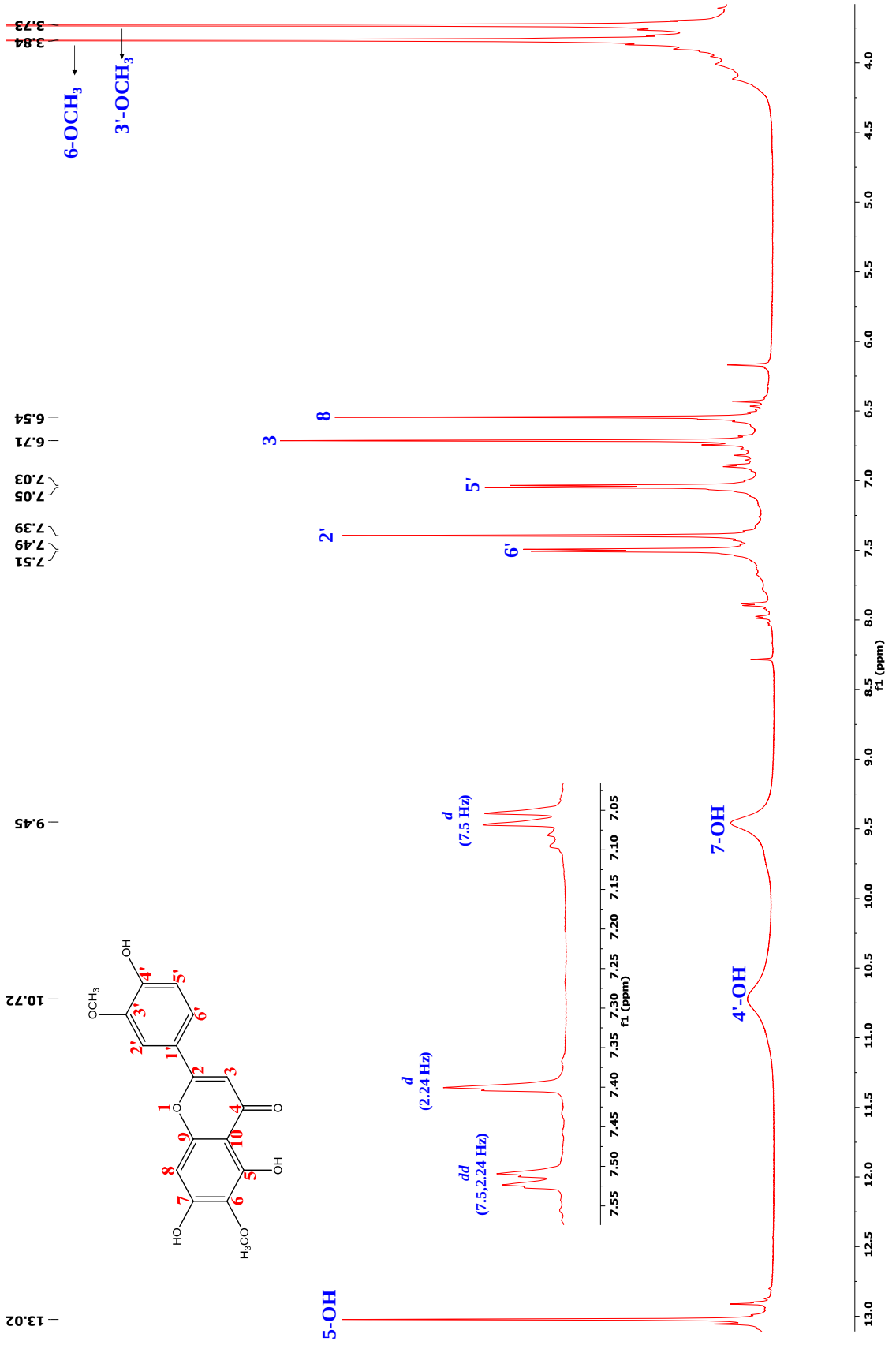
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*) δ 13.07 (1H, *s*, 5-OH), 9.45 (1H, *s*, 4'-OH), 7.50, (1H, *d*, *J*= 8.5 Hz, 6'-H), 7.40, (1H, *s*, 2'-H), 7,04 (1H, *d*, *J*= 8.5 Hz, 5'-H), 6.71 (1H, *s*, 3-H), 6.54 (1H, *s*, 8-H) 3.83 (3H, *s*, 6-OCH_3), 3.73 (3H, *s*, 3'-OCH_3)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*) δ 182.48 (C-4), 163.98 (C-2), 157.76 (C-8), 153.21 (C-5), 152.82 (C-7), 151.53 (C-3'), 147.20 (C-4'), 131.78 (C-6), 123.46 (C-1'), 119.10 (C-5'), 113.33 (C-2), 112.51 (C-5'), 104.55 (C-10), 103.45 (C-3), 94.60, (C-8), 60.37 (OCH_3-6), 56.16 (OCH_3-3') (Zater *et al.* 2016).

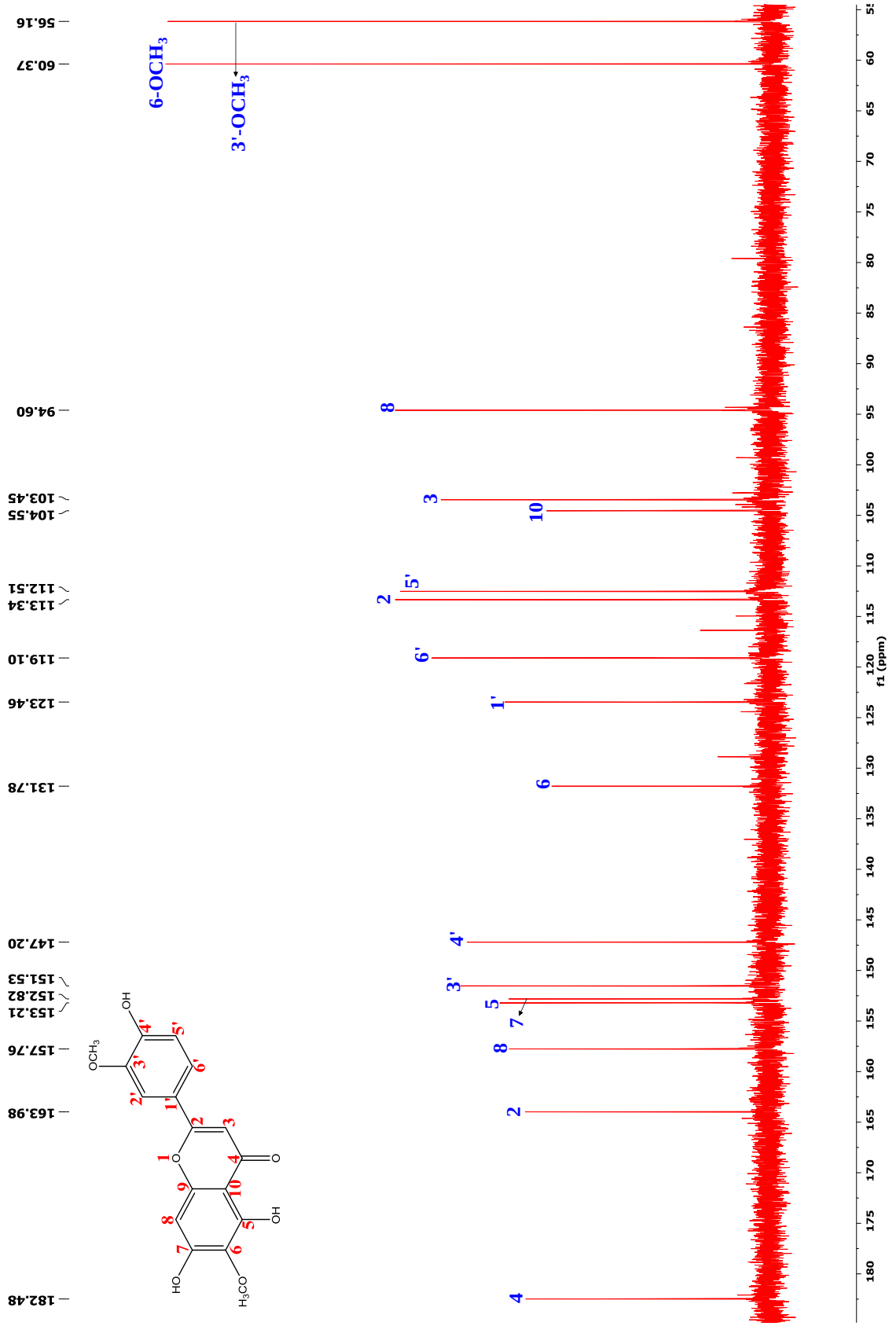
Jaceosidin'in H-NMR spektrumu incelendiğinde 13 ppmdeki keskin pik molekül içi hidrojen bağı yapmış olan 5-OH protonuna, 10.72 ve 9.46 ppm'deki geniş singlet pik moleküller arası hidrojen bağı yapmış olan 7-OH ve 4'-OH protonlarına, HMBC'de karbonil karbonuyla etkileşen 6.71 ppm'deki karakteristik sinyal pik ise H3 protonuna aittir. Bu singlet pik haricinde 6.54 ppm'deki singlet pik ise HMBC'de C3, C7, C9 ve C10 karbonlarıyla etkileşen H8 protonuna aittir. 5-OH protonu ile metoksi protonlarının (3.83 ppm) 131.78 ppm'deki karbon ile etkileşmesi, bu metoksi grubunun C6 karbonuna bağlı olduğunu gösterir.

H-NMR spektrumunda 7-7.5 ppm aralığındaki 3 farklı pik grubu, yapıda ABX sisteminin varlığını, HMBC spektrumunda C2 ve C3 karbonlarıyla etkileşmesi nedeniyle 7.40 ppm'deki protonun H2' pozisyonunda olduğunu kanıtlamaktadır. COSY

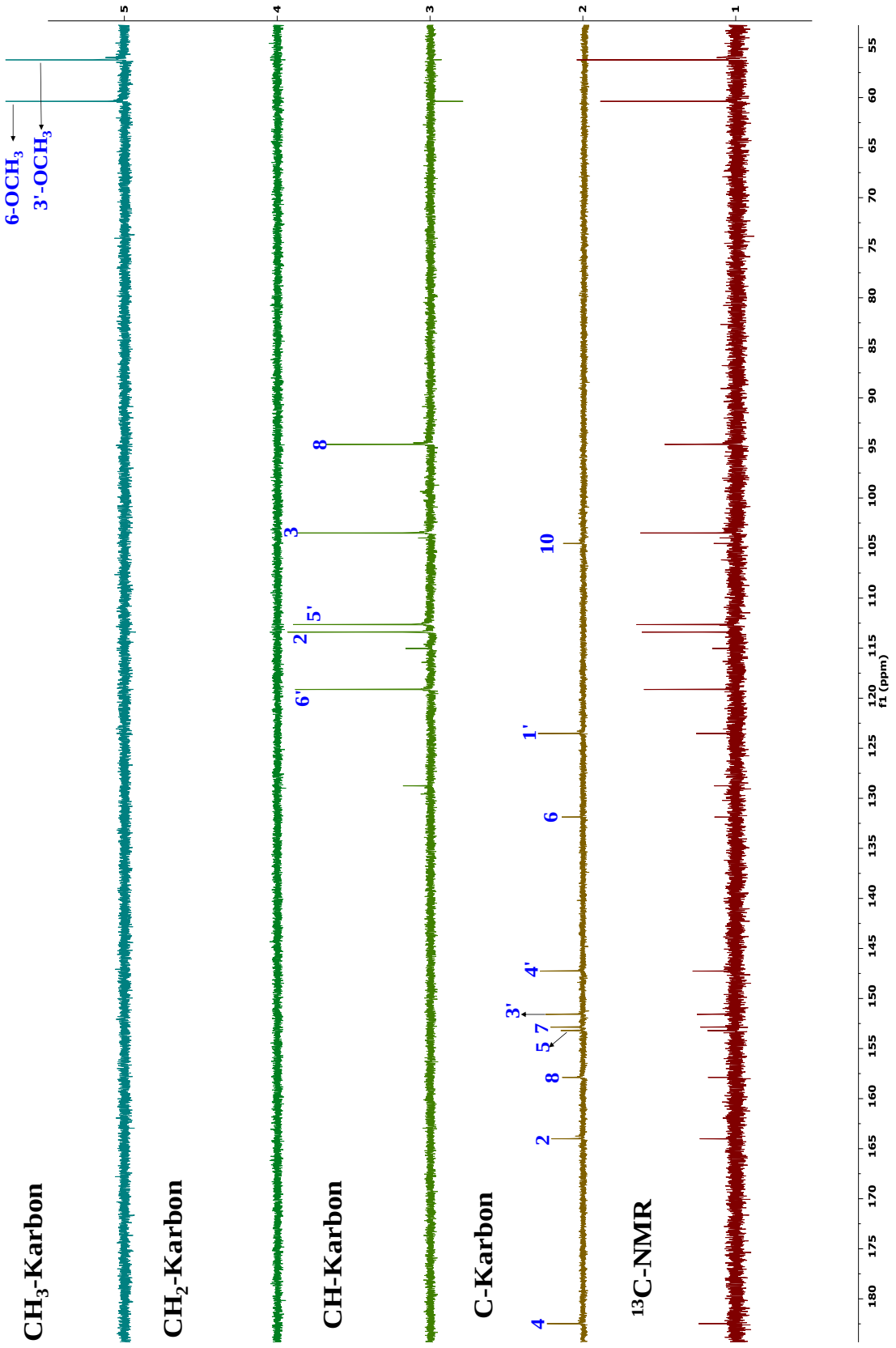
spektrumunda bu proton ile etkileşen 7.04 ppm'deki protonun etkileşim sabitinin 2.24 Hz olması, bu protonun meta komununda olduğunu, 7.04 ppm'deki protonun ise yine HMBC'de C2 karbonuyla etkileşimi, bu protonun C6' karbonuna bağlı olduğunu göstermektedir. H6' protonuna ait sinyalin dd olması ve 7.5 Hz lik başka bir etkileşim olması ise bu protona orto pozisyonunda başka bir proton (H-5', 7.50 ppm) olduğunu kanıtlar.



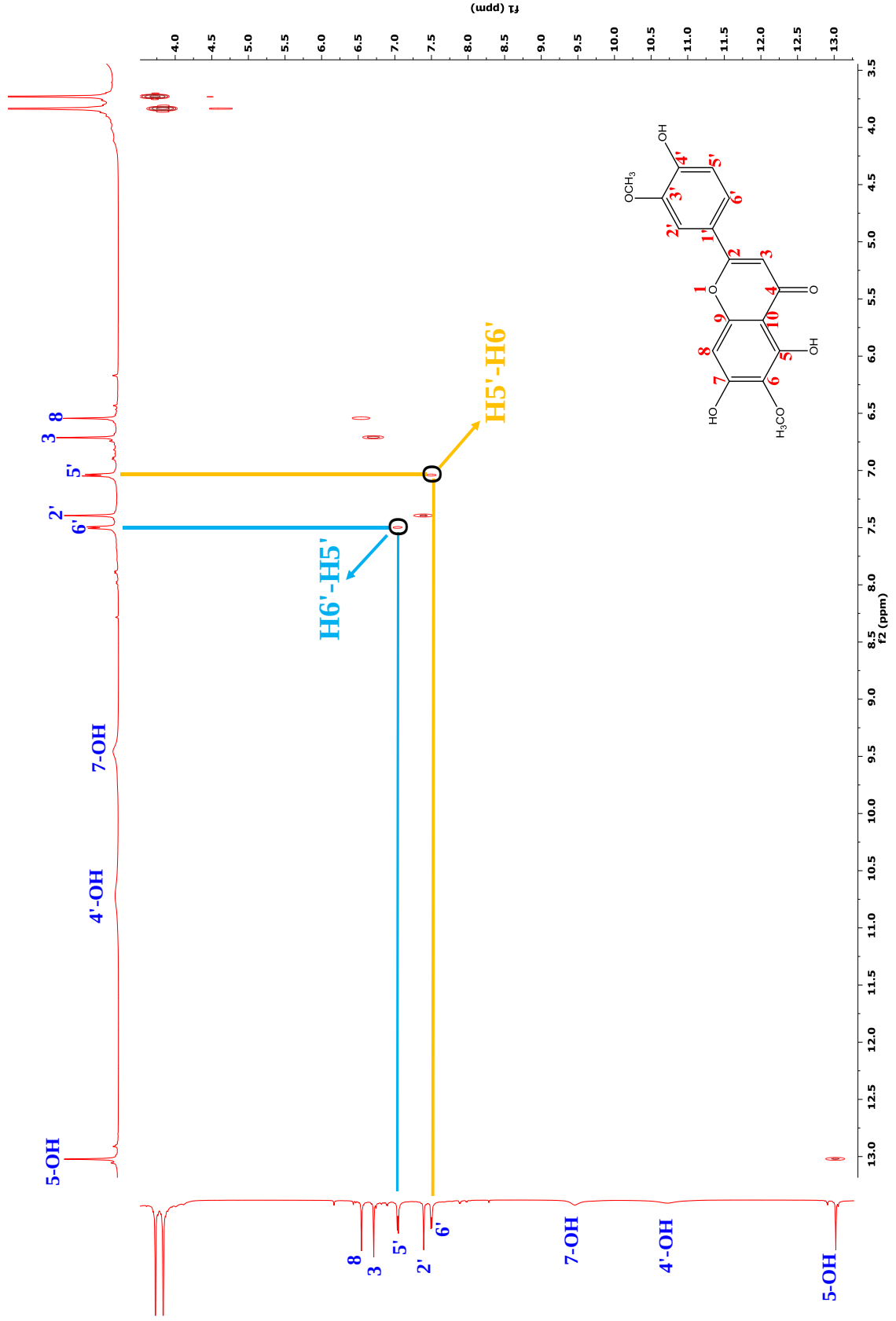
Şekil 4. 47 Jaceosidin'in ^{1}H-NMR spektrumu



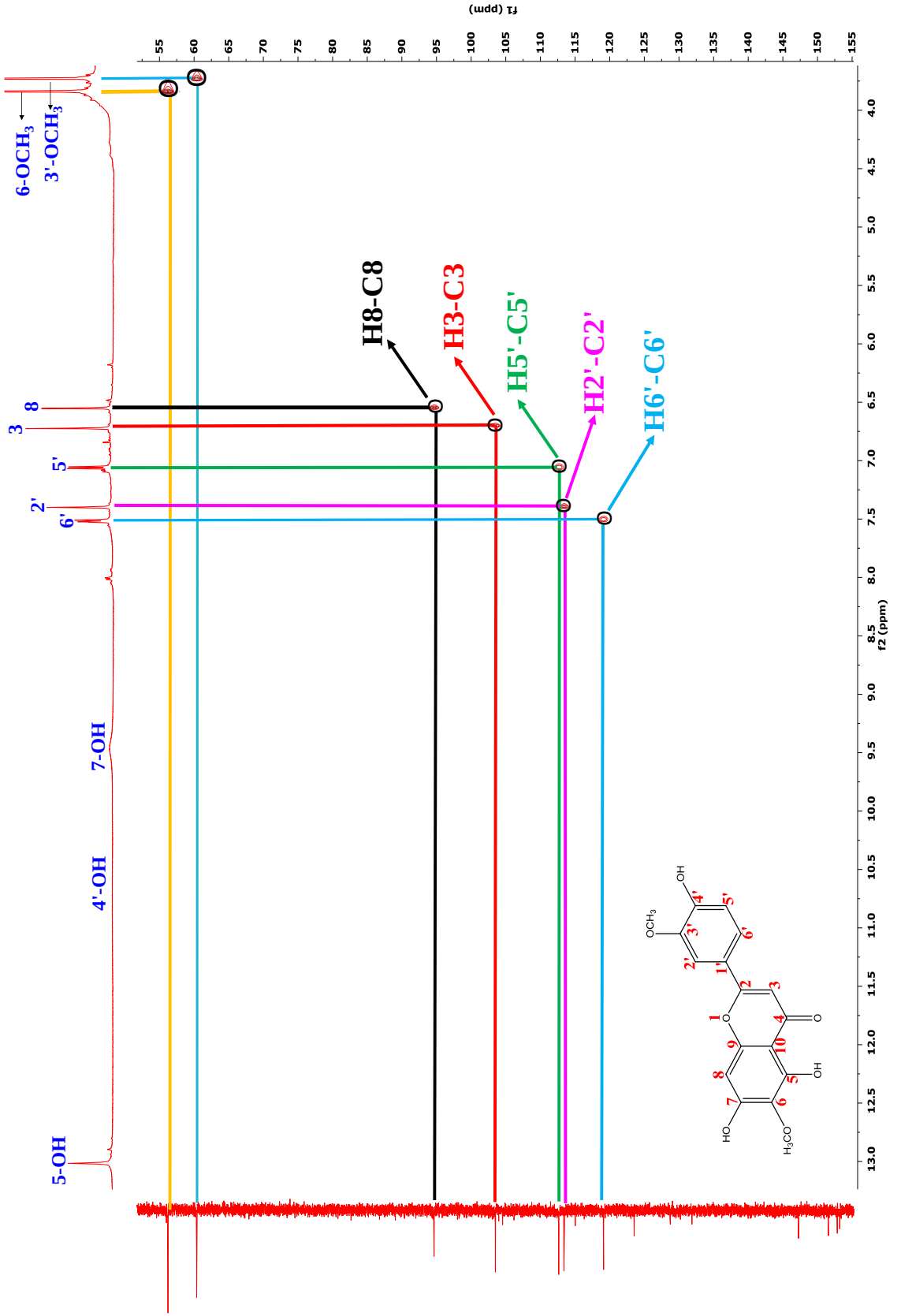
Şekil 4. 48 Jaceosidin'in ^{13}C-NMR spektrumu



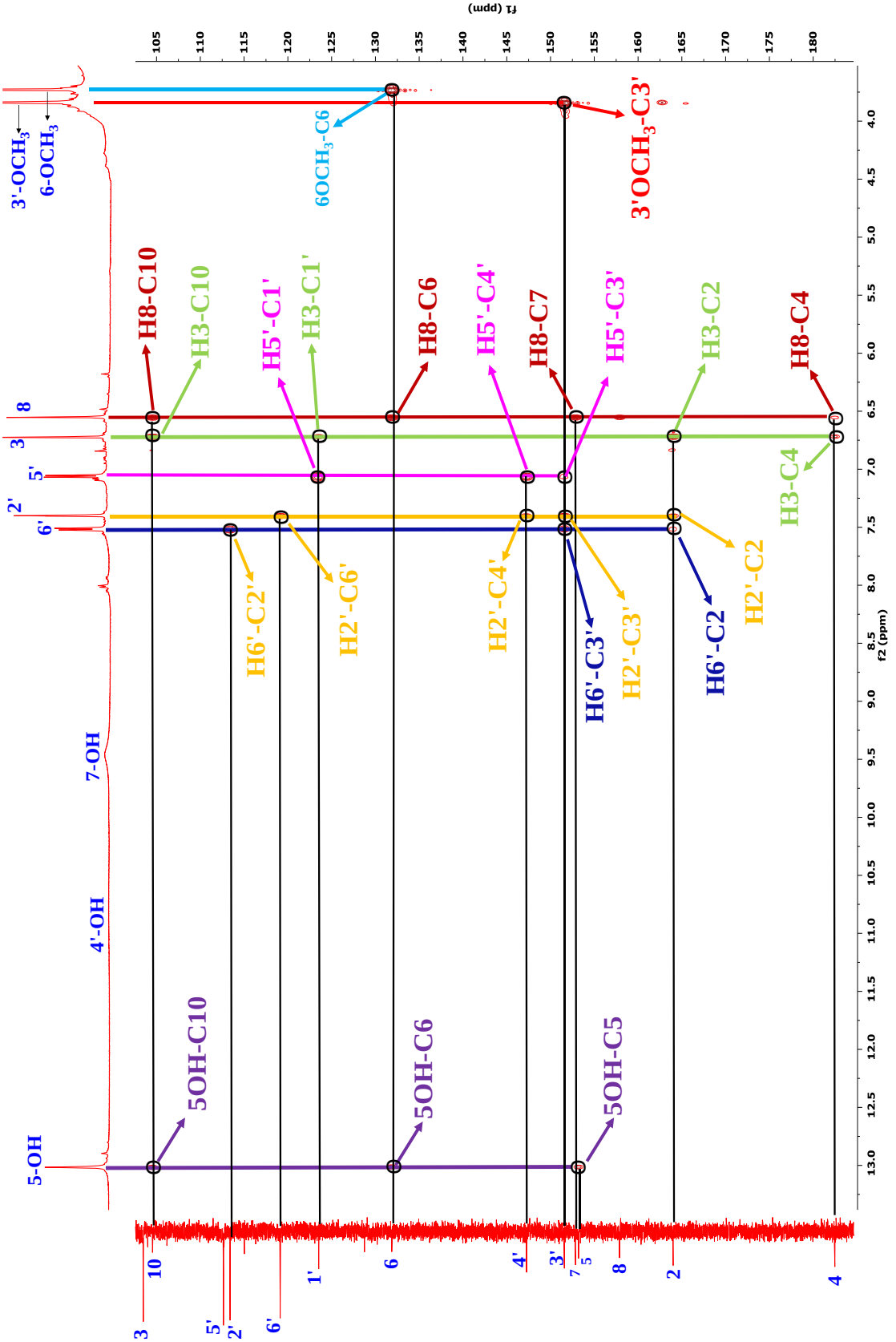
Şekil 4. 49 Jaceosidin'in DEPT spektrumu



Şekil 4. 50 Jaceosidin'in COSY spektrumu

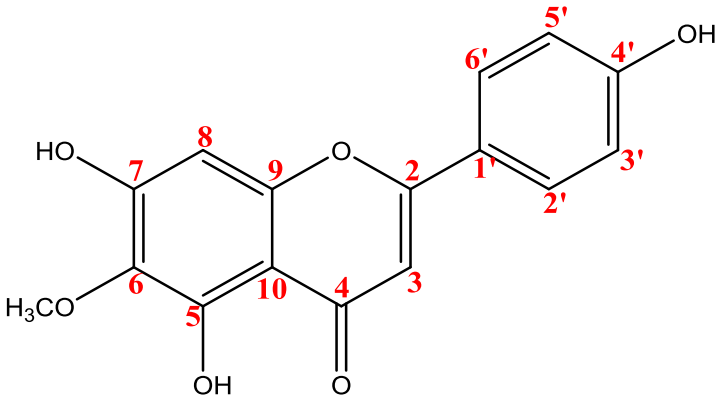


Şekil 4. 51 Jaceosidin'in HSQC spektrumu



Şekil 4. 52 Jaceosidin'in HMBC spektrumu

Hispidulin (FR-40)



Şekil 4. 53 Hispidulin'in kimyasal yapısı

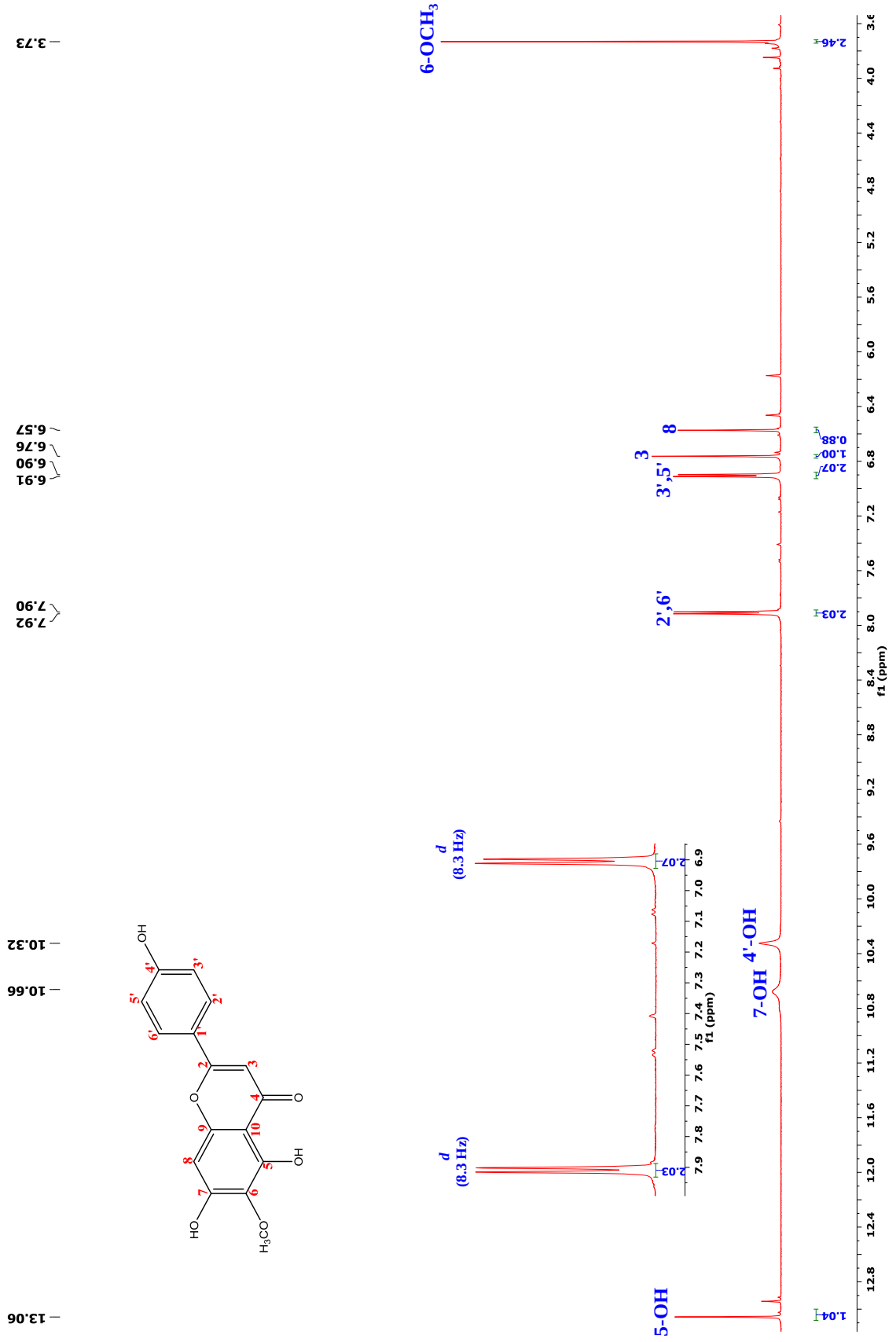
^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*) δ 13.07 (1H, *s*, 5-OH), 10.68 (1H, *s*, 7-OH), 10.32 (1H, *s*, 4'-OH), 7.90, (2H, *d*, *J*= 8.3 Hz, 2',6'-H), 6.90, (2H, *d*, *J*= 8.3 Hz, 3', 5'-H), 6.75 (1H, *s*, 3-H), 6.57 (1H, s, 8-H), 3.73 (3H, *s*, 6-OCH_3)

^{13}C NMR (151 MHz, DMSO-*d6*) δ 182.57 (C-4), 164.25 (C-2), 161.61(C-3'), 157.70 (C-7), 153.22 (C-5), 152.82 (C-9), 131.79 (C-6), 128.91(C-2', 6'), 121.65 (C-1'), 116.40 (C-3', 5'), 104.51 (C-10), 102.83 (C-3), 94.68 (C-8), 60.39 (6-OCH_3) (Lee *et al.* 2016).

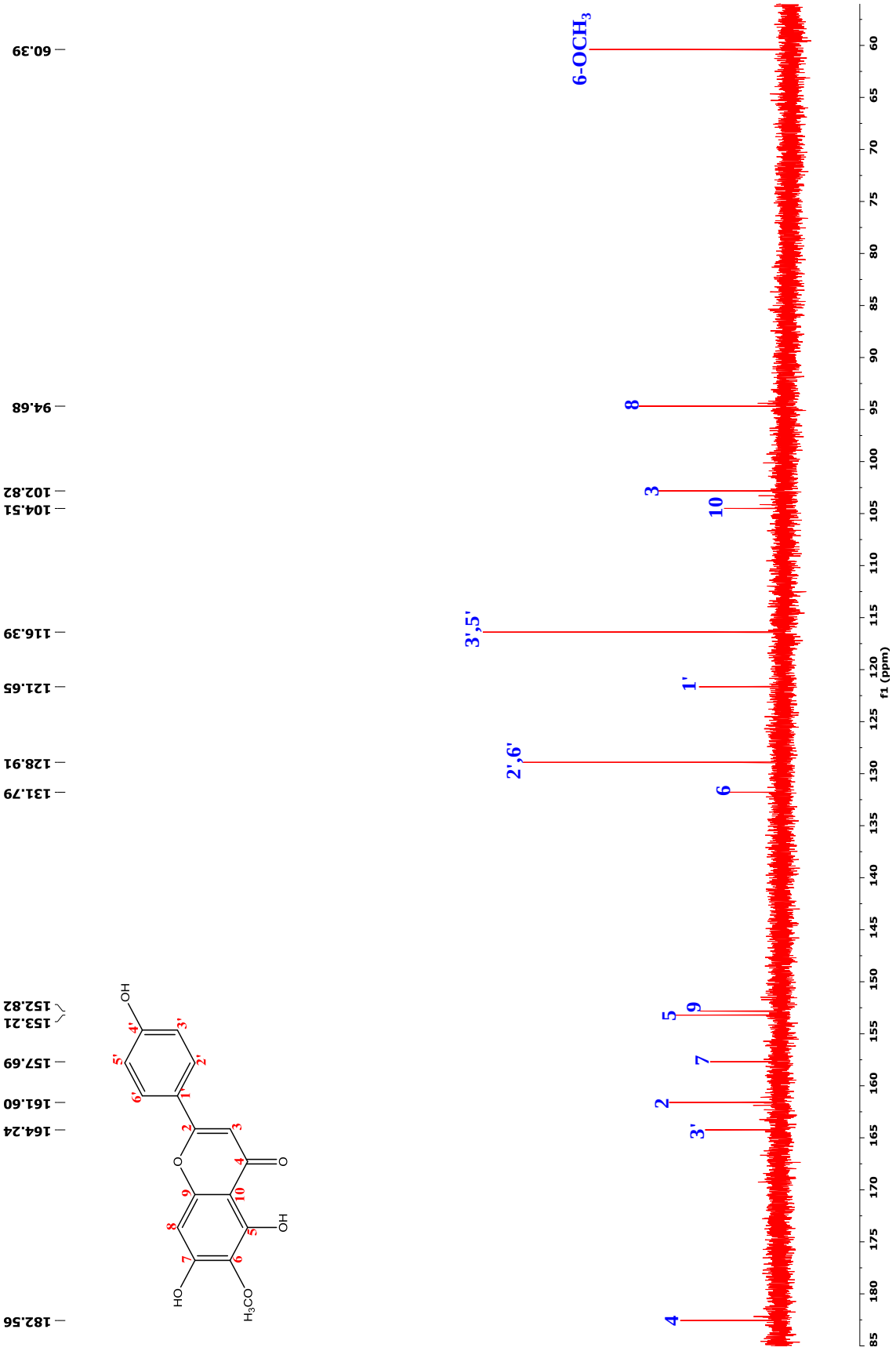
Hispidulin bileşiği, yapısında 3 tane OH grubu içermesinden dolayı daha önceki flavon yapılarından çok daha polar karakterlidir ve MeOH'de bile zor çözünmektedir. Hispidulin bileşiğinin bu yapısal özelliğinden yararlanılarak hispidulin içeren fraksiyondaki safsızlıklar kloroform, etil asetat ve aseton ile yıkandı. Geriye kalan kısım ise MeOH ilave edilerek santrifüjleme işlemiyle birlikte hispidulin bileşiği saf katı olarak saflaştırıldı.

Hispidulin'in Mosloflavon bileşiğinden farkı ise B halkasında 4' konumunda OH grubunun olmasıdır. Jaceosidin bileşiğinden farkı 3' konumunda metoksi grubunun olmamasıdır. Dolayısıyla Hispidulin'in A ve C halkasındaki ^{1}H NMR ve ^{13}C NMR sinyalleri Jaceosidin bileşiği ile benzerlik göstermektedir. B halkasında ise simetri

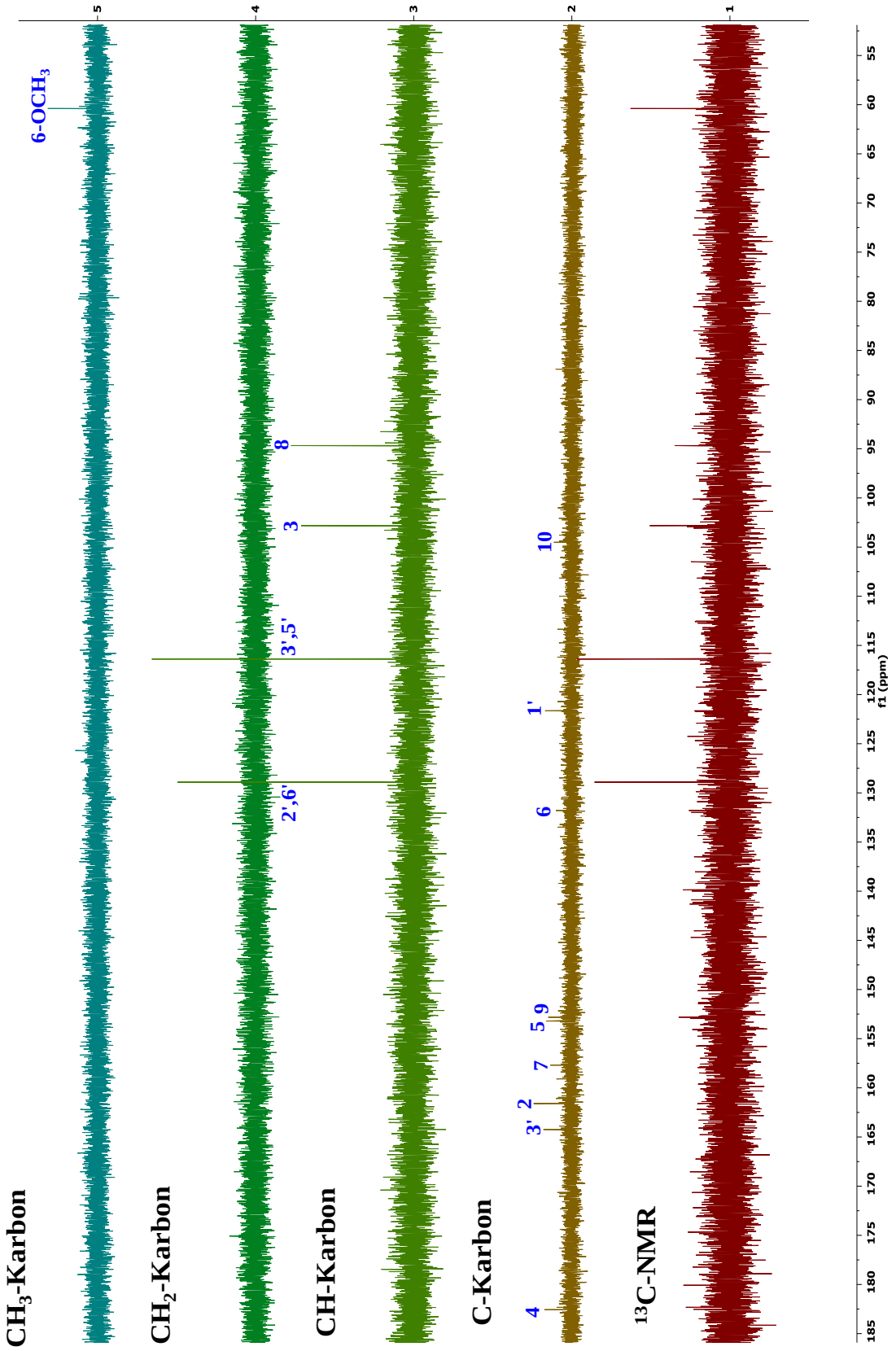
merkezi olduğundan H-NMR spektrumunda integrasyonu 2 ve etkileşim sabiti 8.3 Hz olan 6.90 ve 7.90 ppm'deki iki dublet pik karşımıza çıkmaktadır.



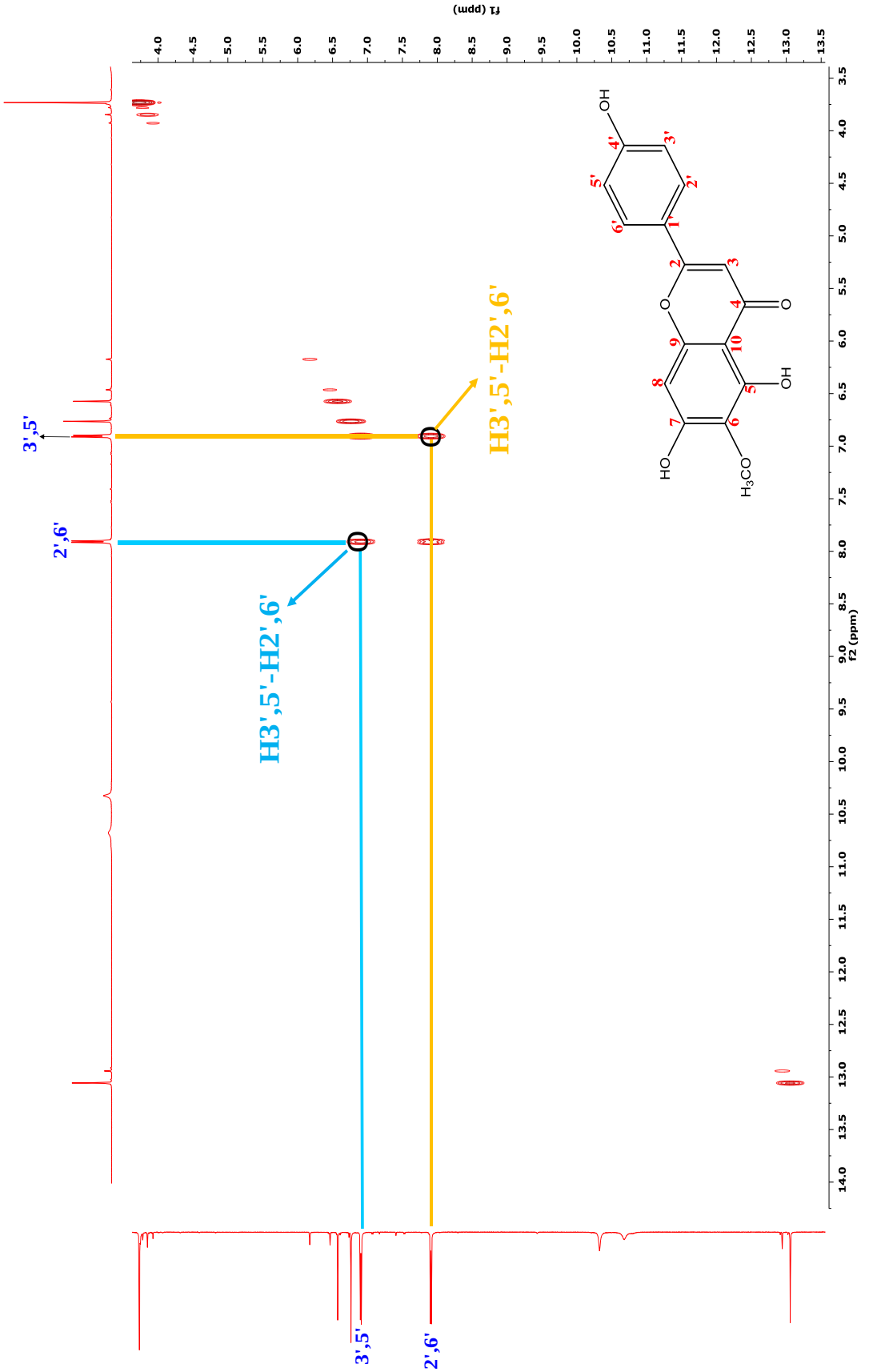
Şekil 4. 54 Hispidulin'in ^{1}H-NMR spektrumu



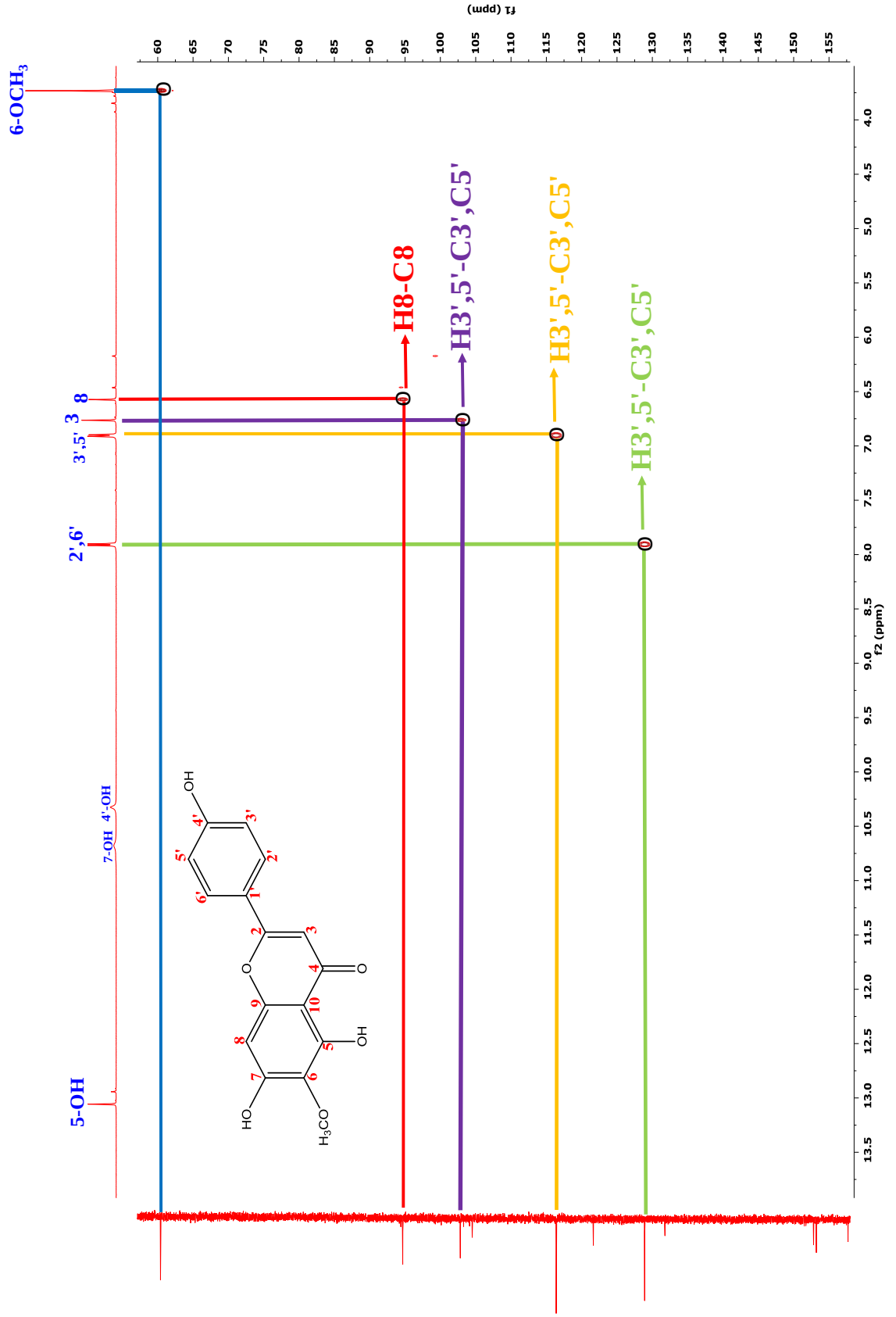
Şekil 4. 55 Hispidulin'in ^{13}C-NMR spektrumu



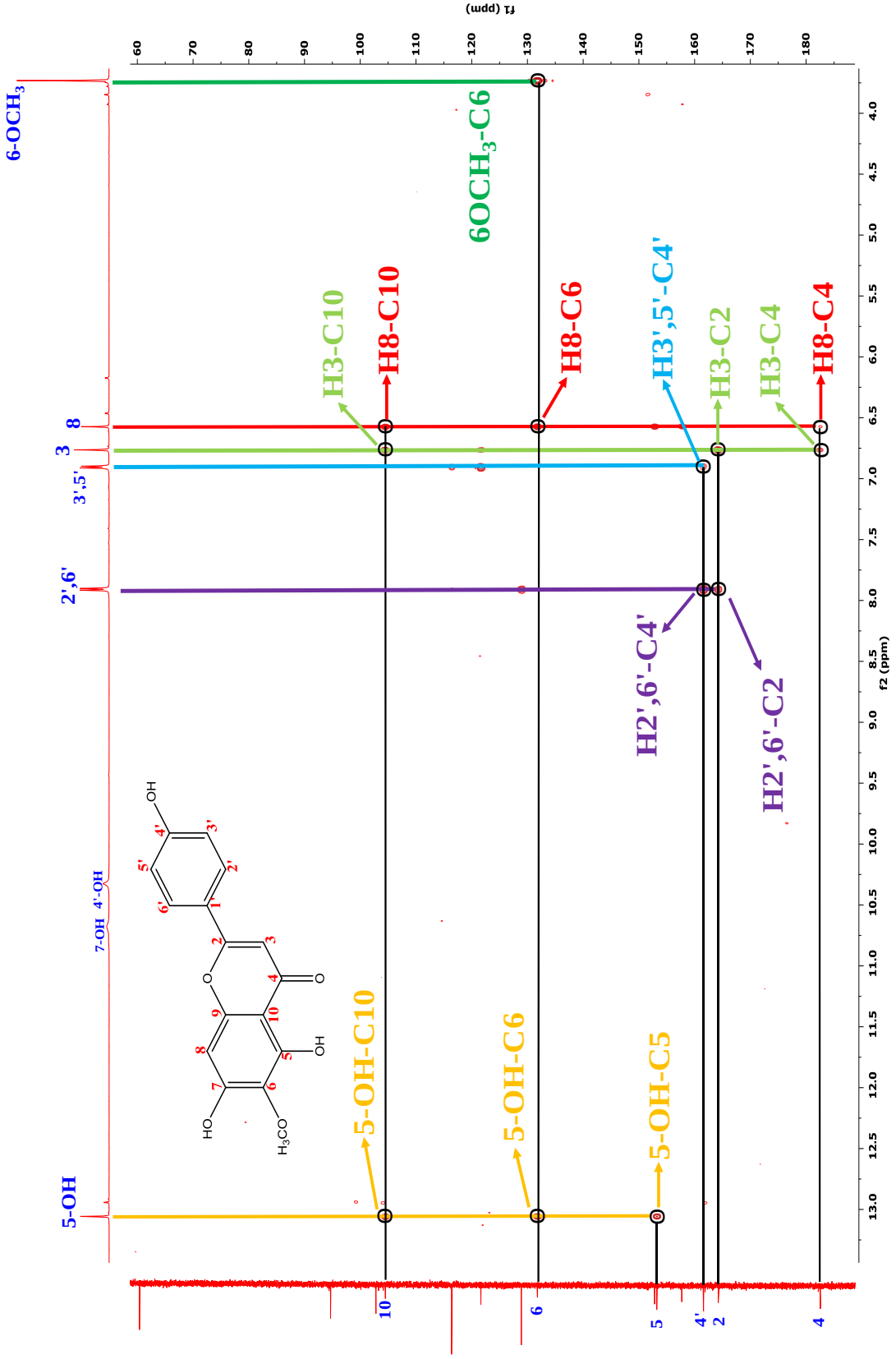
Şekil 4. 56 Hispidulin'in DEPT spektrumu



Şekil 4. 57 Hispidulin'in COSY spektrumu

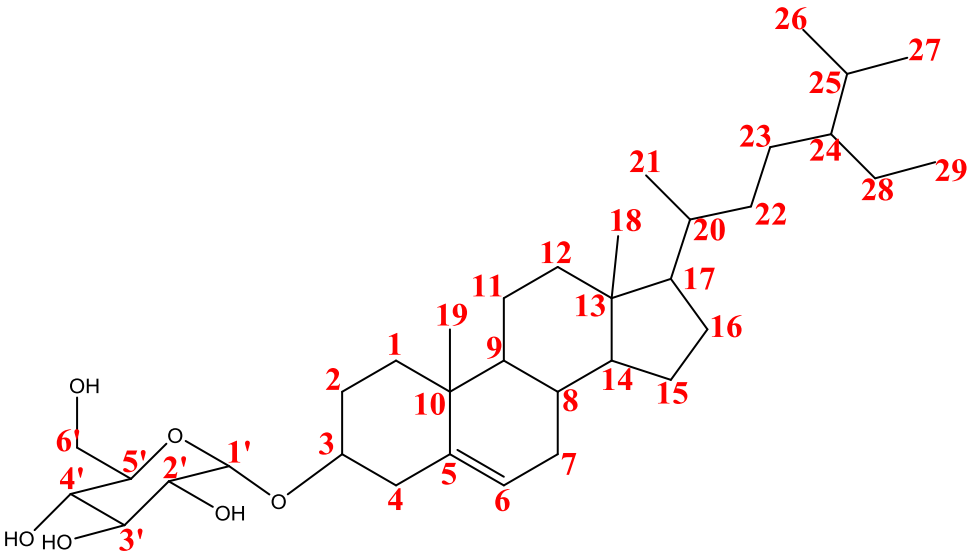


Şekil 4. 58 Hispidulin'in HSQC spektrumu



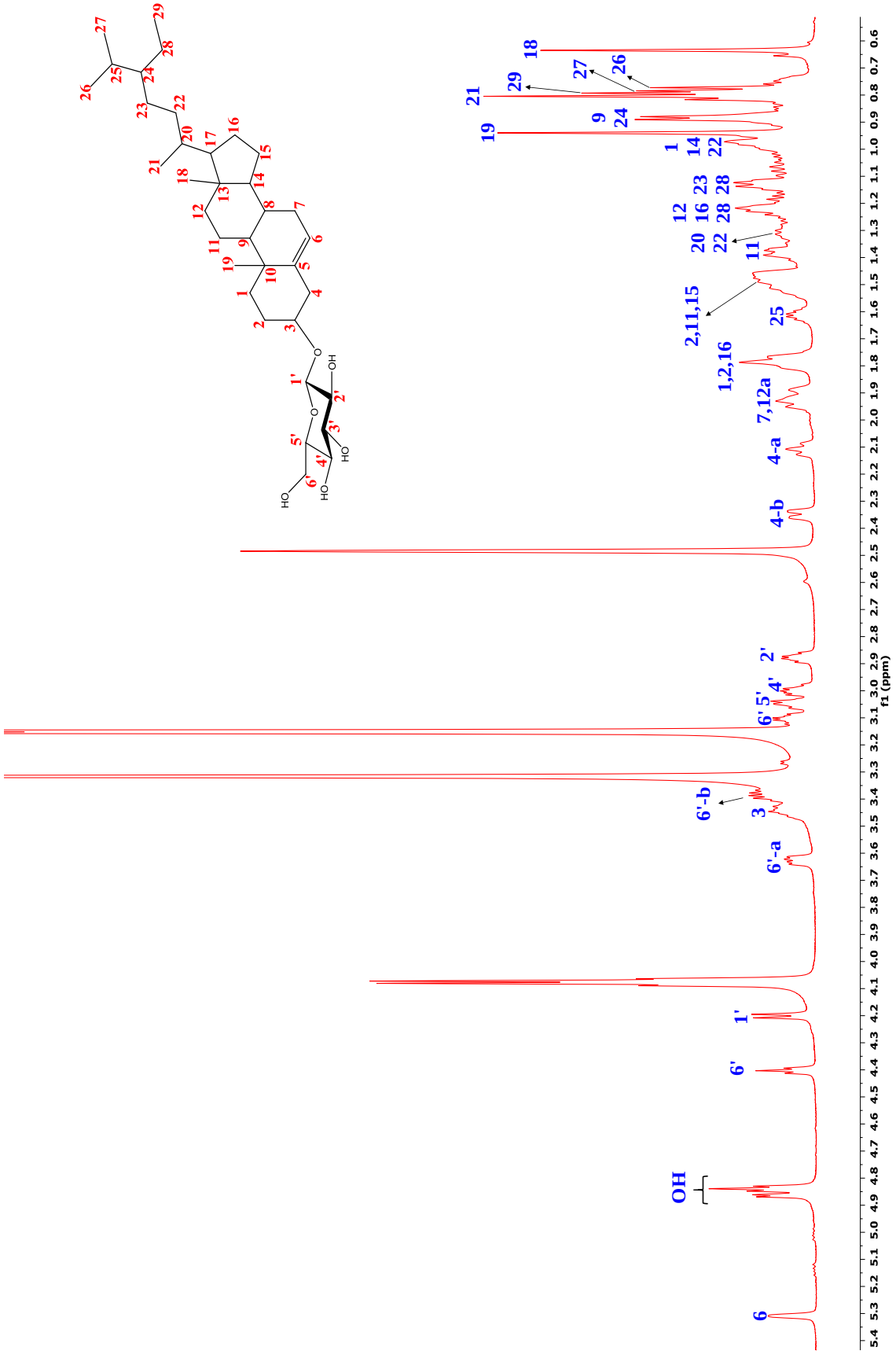
Şekil 4. 59 Hispidulin'in HMBC spektrumu

Daucosterol (FR-55)

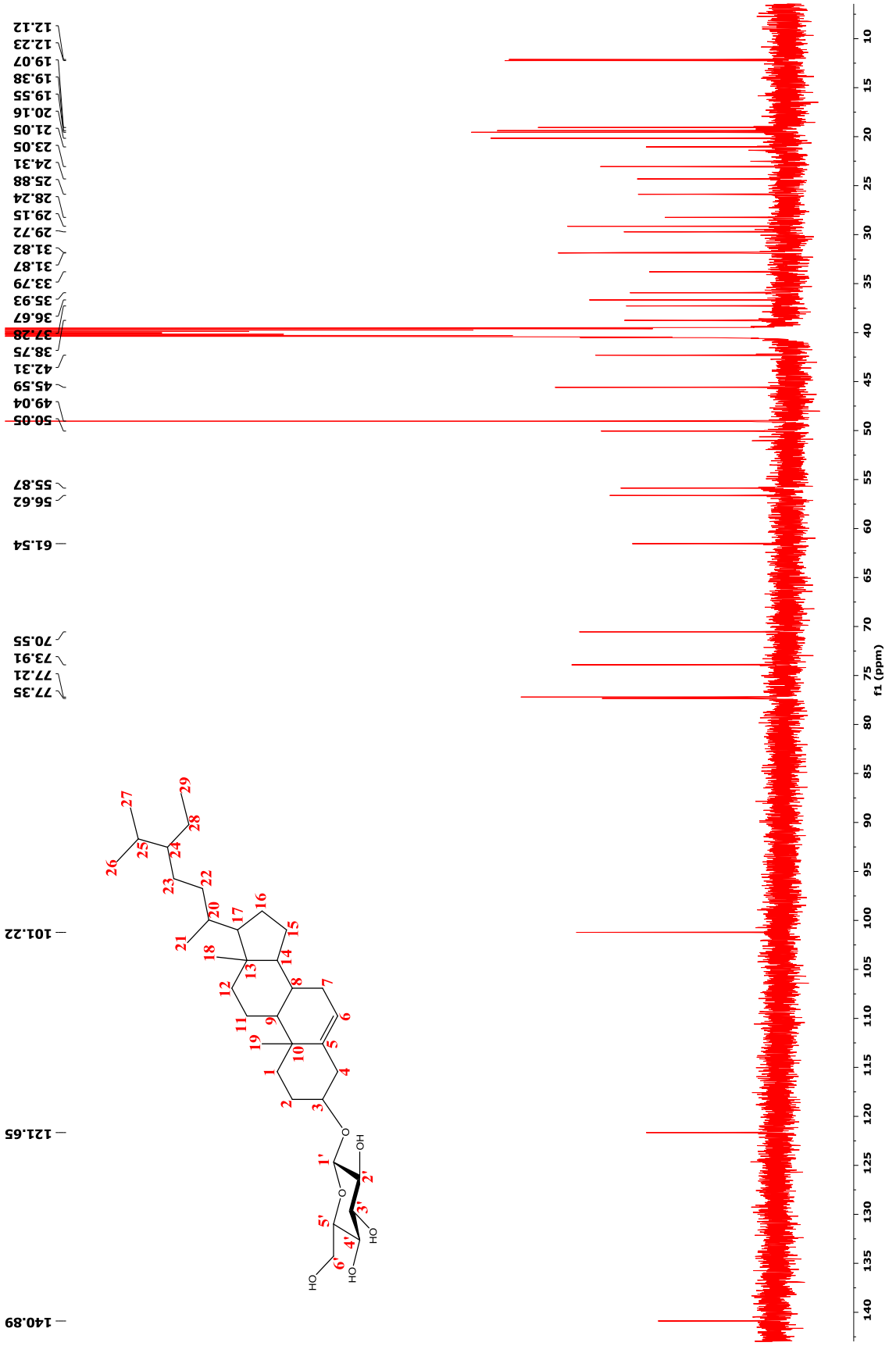


Şekil 4. 60 Daucosterol'ün kimyasal yapısı

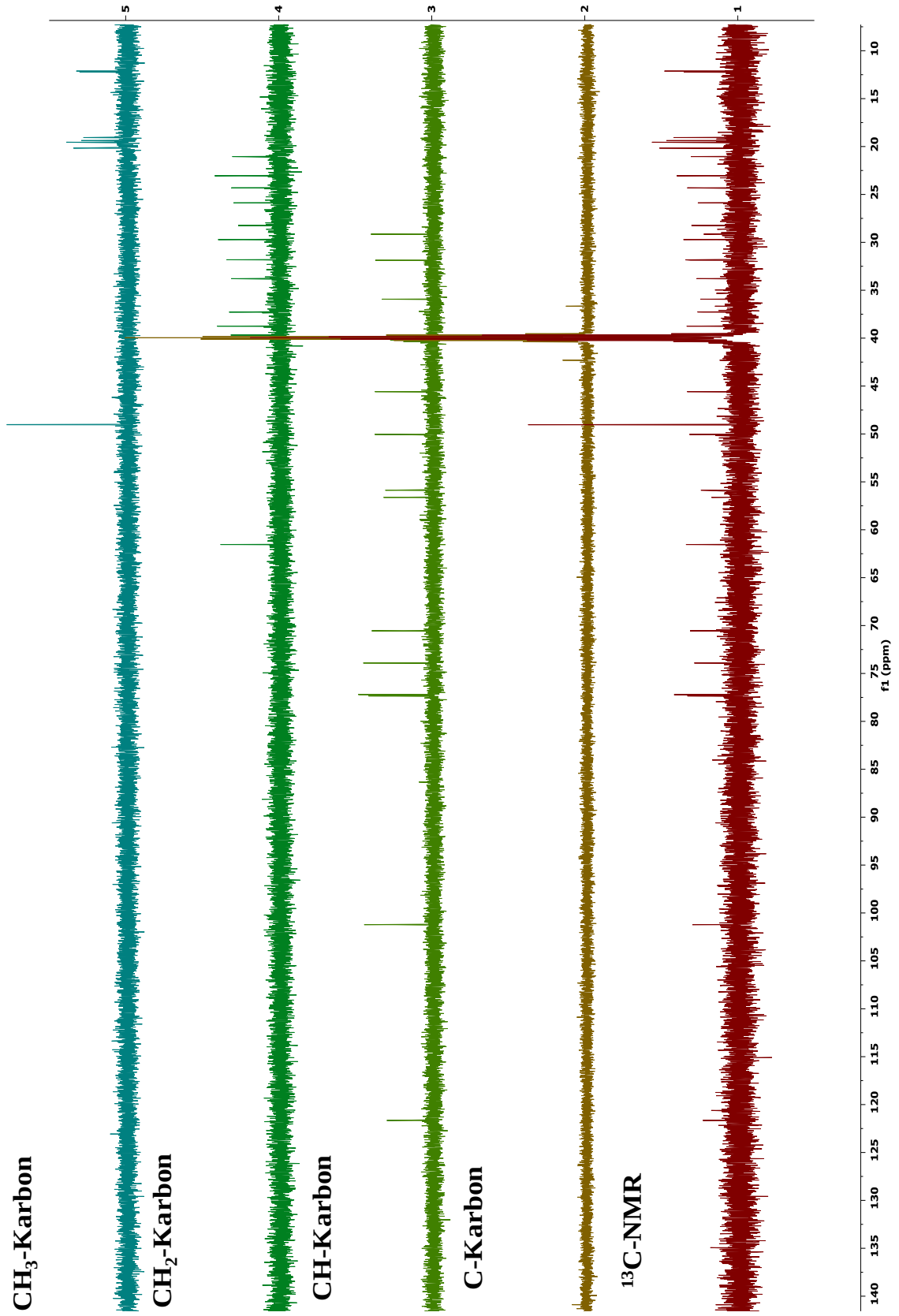
Bu bileşik silikajel kolon kromagrafisinden elde edilen fr55 fraksiyonundan saflaştırılmıştır. Kolon kromatografisinden elde edilen fr55 fraksiyonu, %65:35 $CHCl_3$:MeOH çözücü sistemi içeren sefadeks kolonundan sabit çözücü sistemi (fraksiyonlar 10 mL olacak şekilde) ile elüe edilmiştir. En son fraksiyonun (fr7) çözücüsü uzaklaştırılmış, kalan katı kısım MeOH ile yıkanarak safsızlıklar uzaklaştırılarak (eklenen çözücü şeffaf olana kadar) **Daucosterol** olarak bilinen steroid izole edilmiştir.



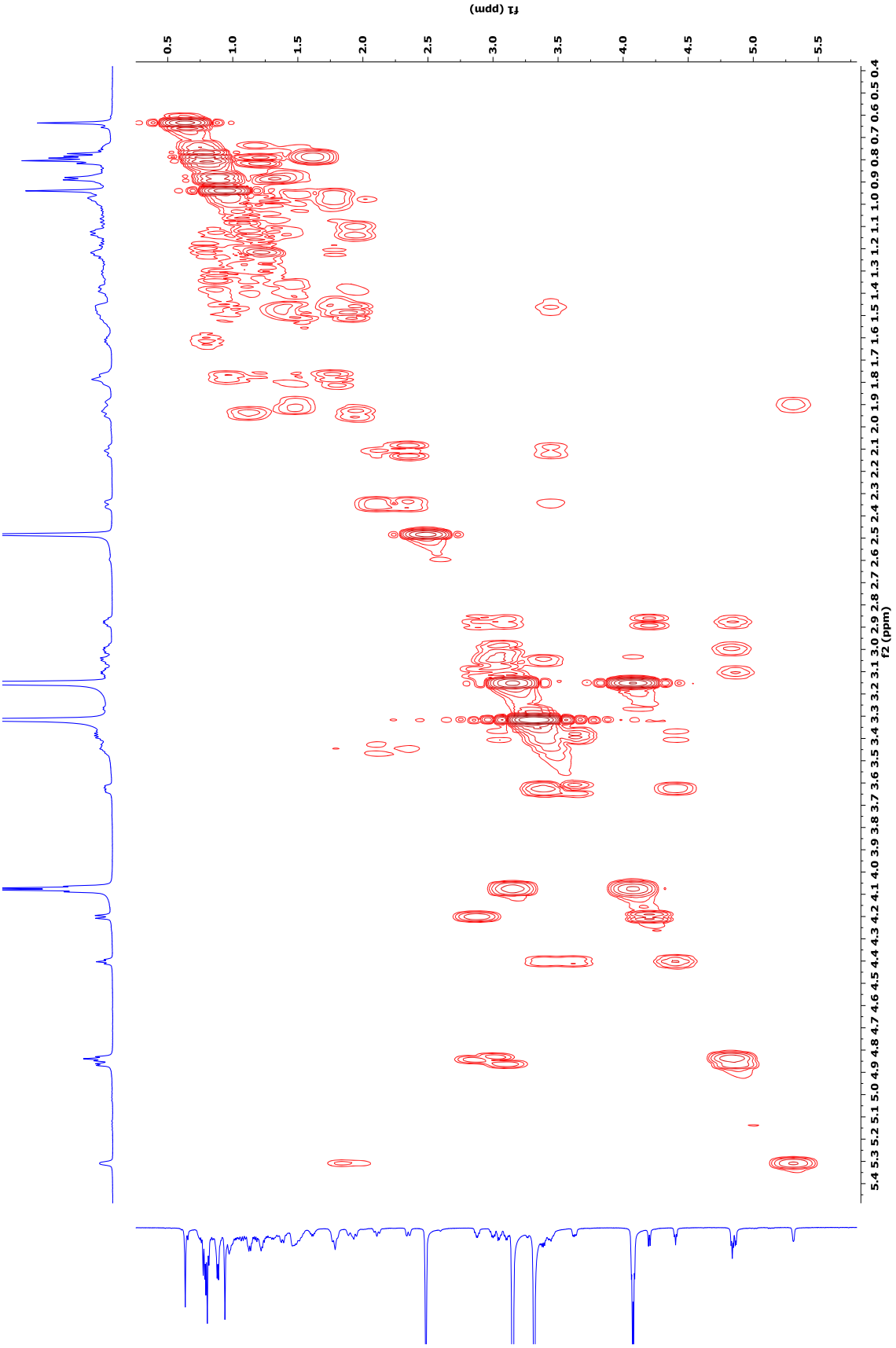
Şekil 4. 61 Daucosterol'ün ^{1}H-NMR spektrumu



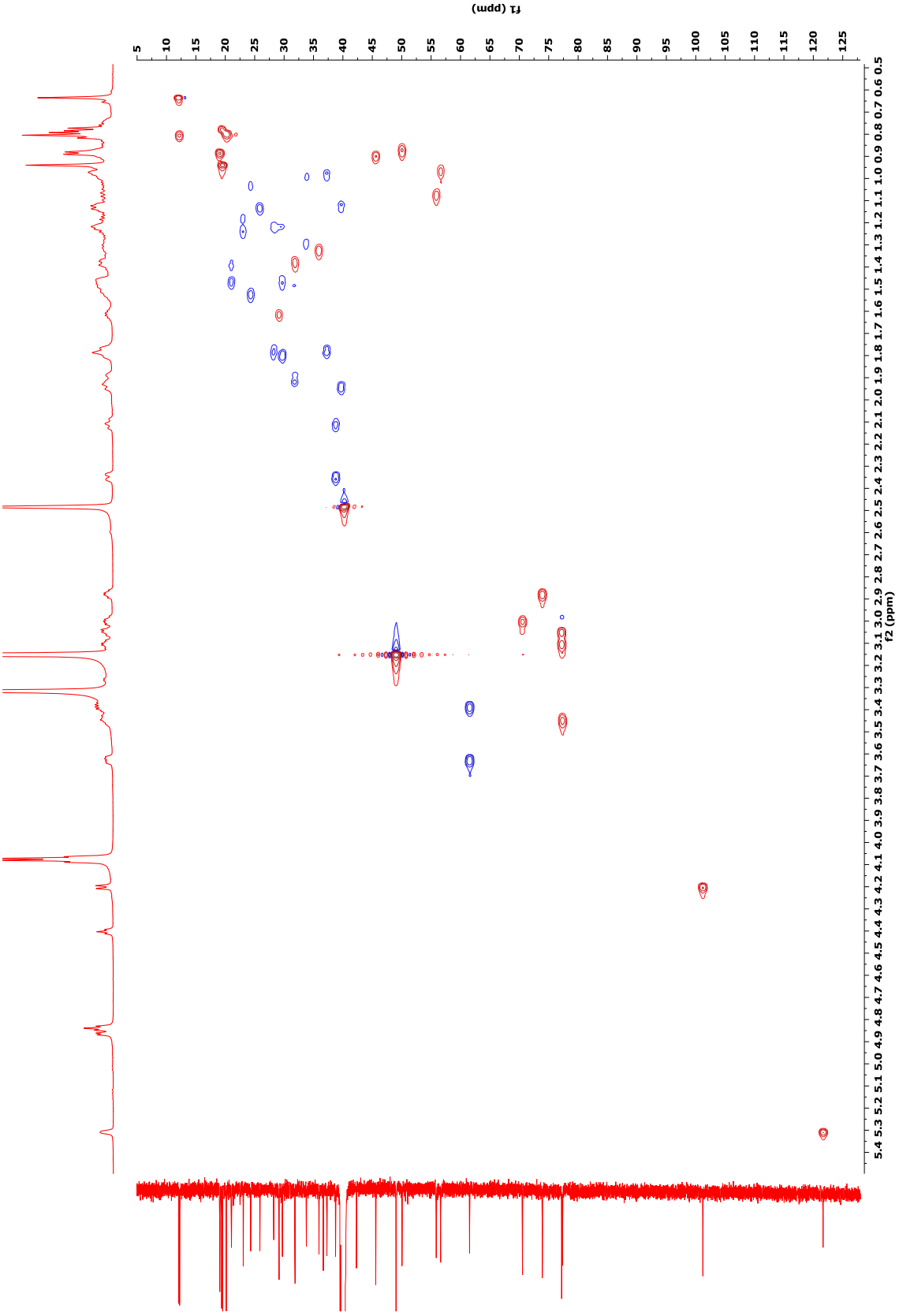
Şekil 4. 62 Daucosterol'ün 13C-NMR spektrumu



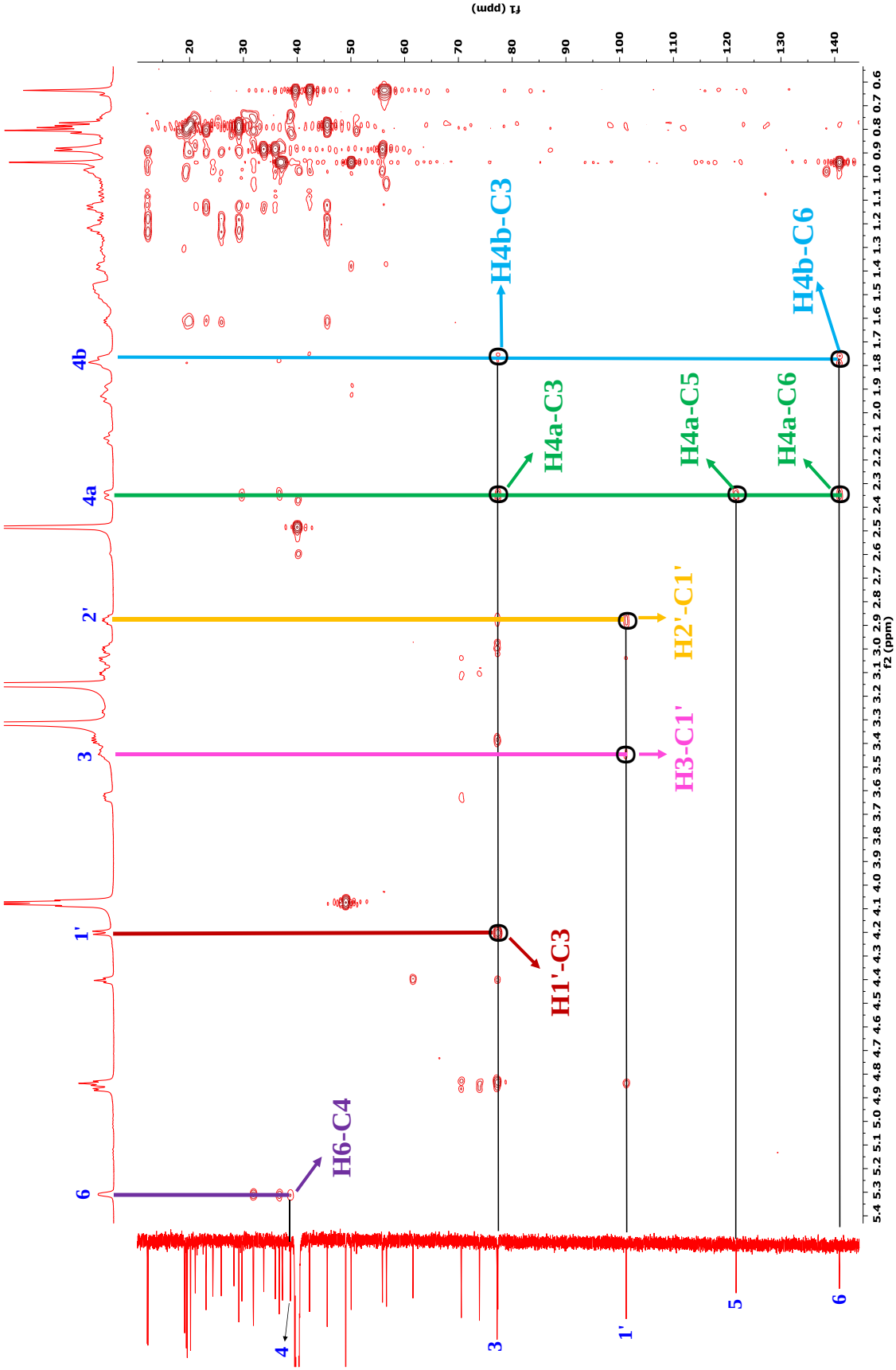
Şekil 4. 63 Daucosterol'ün DEPT spektrumu



Şekil 4. 64 Daucosterol'ün COSY spektrumu



Şekil 4. 65 Daucosterol'ün HSQC spektrumu



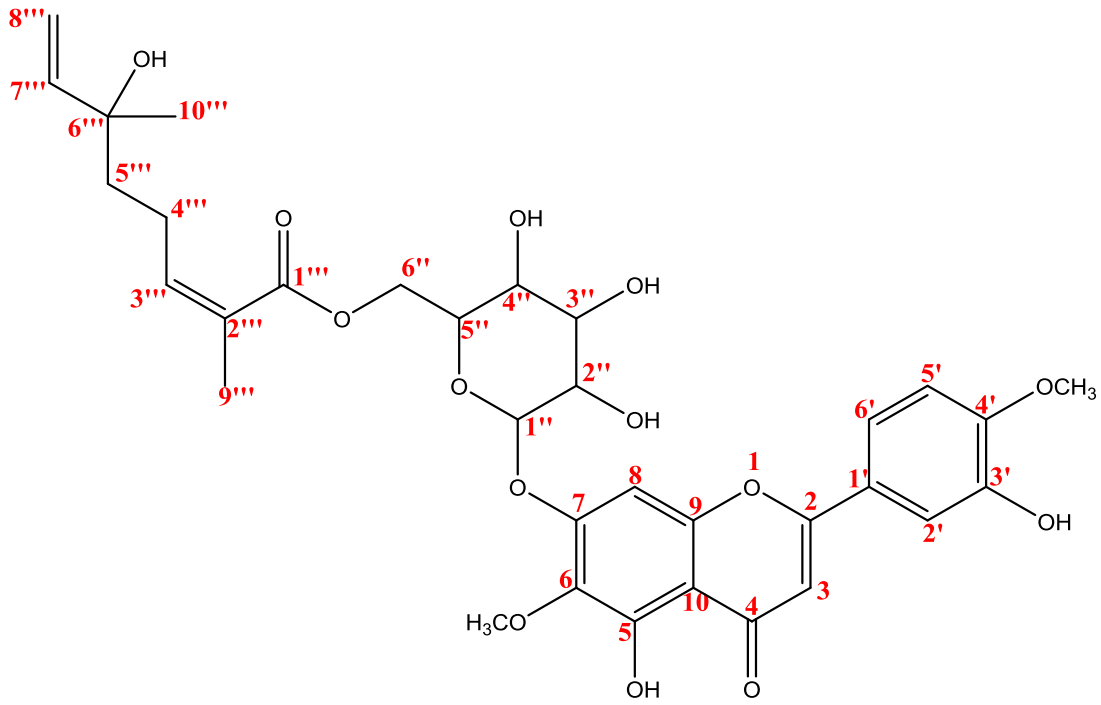
Şekil 4. 66 Daucosterol'ün HMBC spektrumu

Daucosterol'ün NMR spektrumları karmaşık gibi gözükse de, belirli pikler ve etkileşimler, literatürdeki veriler ile incelerek bileşiğin yapı tayini yapılmıştır (Li *et al.* 2010).^{1}H-NMR spektrumu incelendiğinde; 1-3 ppm, ^{13}C-NMR spektrumunda 10-60 ppm aralığındaki kalabalık pik grubunun bileşiğin "sterol iskeleti" içeren bir steroid olduğunu, ^{13}C-NMR spektrumunda 70-80 ppm'deki 5 pik, anomer karbon (99 ppm) ve proton (4.2 ppm) sinyalleri yapıda glikoz biriminin olduğu göstermektedir. ^{1}H-NMR spektrumunda 5,30 ppm'deki olefinik protonun, ^{13}C-NMR spektrumunda 140 (C-5) ve 122 (C-6) ppm'deki kaurterner (C) ve metin (CH) sinyalleri ise C-5 karbonunda çift bağ olduğunu göstermektedir. Bunun yanında karakteristik 6 tane CH_3 piki yapının Daucosterol olarak bilinen steroid glikozit olduğunu, anomer protonun 7,75 Hz lik etkileşmeden dolayı β izomerinin olduğu tespit edilmiştir (Feng *et al.* 2009). Literatürdeki NMR değerleri ile deneysel verileri karşılaştırıldığında (Çizelge 4.5) sonuçların uyumlu olduğu görülmektedir.

Çizelge 4. 5 Daucosterol bileşiğinin NMR verileri

		Deneysel		Literatür	
NO	DEPT	^{1}H	^{13}C	^{13}C	^{1}H
5	C		140,7	140,8	
6	CH	5,3	121,66	122,3	5,3
1'	CH	4,2	101,22	101,3	4,35
3	CH	3,45	77,35	79,3	3,53
3'	CH	3,1	77,22	76,7	3,38
5'	CH	3,05	77,2	76,1	3,23
2'	CH	2,88	73,91	73,8	3,19
4'	CH	3,01	70,55	70,5	3,35
6'	CH_2	3,63/3,38	61,54	62	3,70/3,81
14	CH	0,97	56,62	57	1,01
17	CH	1,08	55,87	56,3	1,15
9	CH	0,87	49,04	50,4	0,95
24	CH	0,9	45,59	46,1	0,98
13	C		42,31	42,5	
12	CH_2	1,17/1,93	39,7	40	1,17/2,11
4	CH_2	2,11/2,36	38,75	38,3	2,29/2,37
1	CH_2	1,78/0,97	37,28	37,5	1,09/1,86
10	C		36,67	36,9	
20	CH	1,32	35,93	36,3	1,36
22	CH_2	0,99/1,29	33,79	34,1	1,04/1,35
8	CH	1,38	31,87	32,2	1,45
7	CH_2	1,89/1,92	31,82	32,1	1,56/1,96
2	CH_2	1,47/1,80	29,72	29,8	1,36/1,91
25	CH	1,62	29,15	29,3	1,67
16	CH_2	1,22/1,78	28,24	28,4	1,85
23	CH_2	1,13	25,88	26,3	1,12
15	CH_2	1,03/1,52	24,31	24,5	1,10/1,59
28	CH_2	1,18/1,23	23,05	23,2	1,23/1,28
11	CH_2	1,40/1,47	21,05	21,2	1,48/1,53
27	CH_3	0,80	20,16	19,9	0,76
19	CH_3	0,94	19,55	19,4	0,95
26	CH_3	0,78	19,38	19,1	0,75
21	CH_3	0,88	19,07	18,9	0,85
29	CH_3	0,81	12,23	12,1	0,8
18	CH_3	0,63	12,12	12	0,61

Yeni Bileşik (FR-52A)



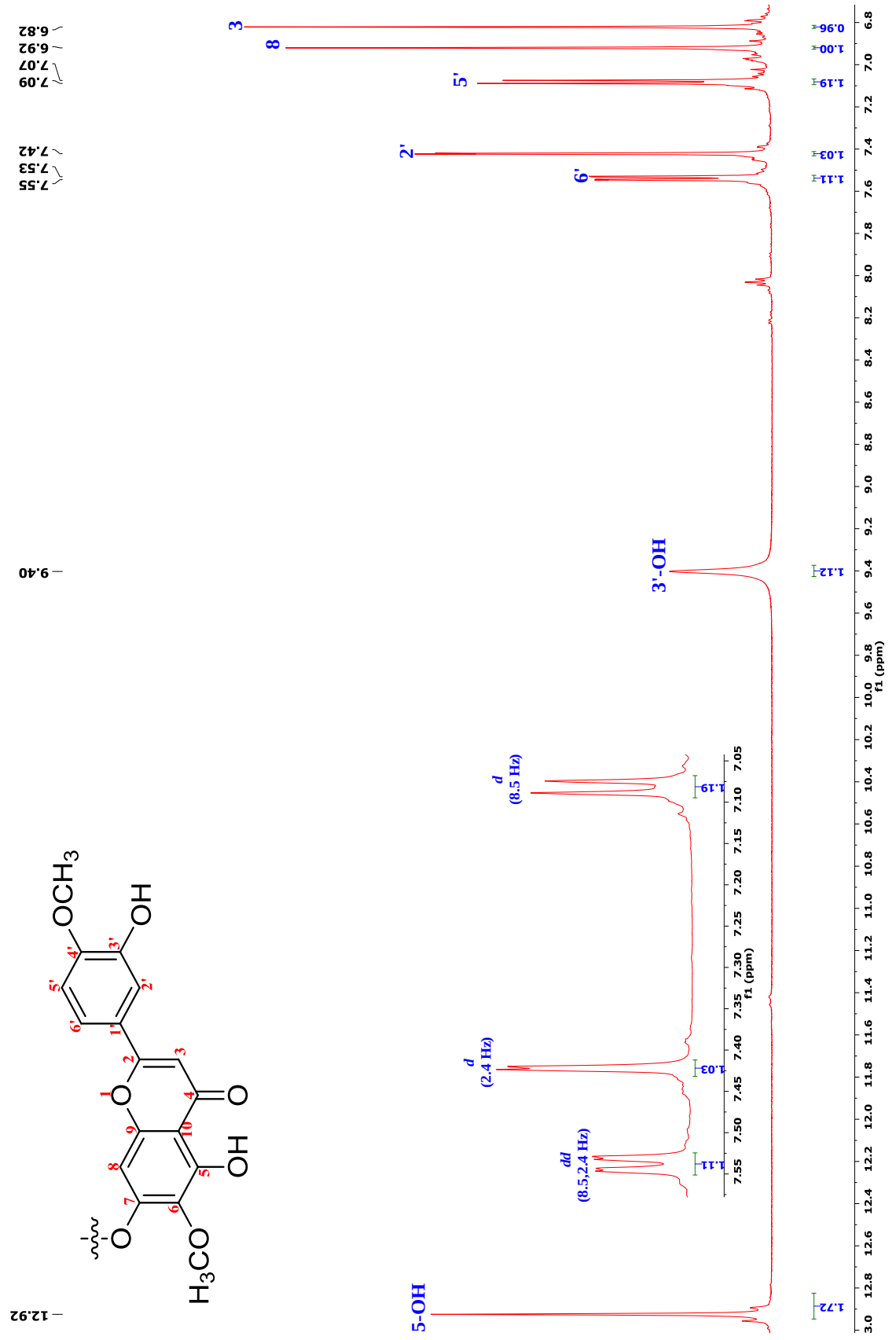
Şekil 4. 67 Yeni bileşiğin kimyasal yapısı

Bu bileşik silikajel kolonunda %20:80 MeOH:$CHCl_3$ çözücü sistemi ile gelen fraksiyonundan izole edilmiştir. Bu fraksiyonda çöken katı, MeOH, aseton ve $CHCl_3$ ile yıkama ve santrifüjleme işlemi ile sarı renkli katı olarak saflaştırılmıştır.

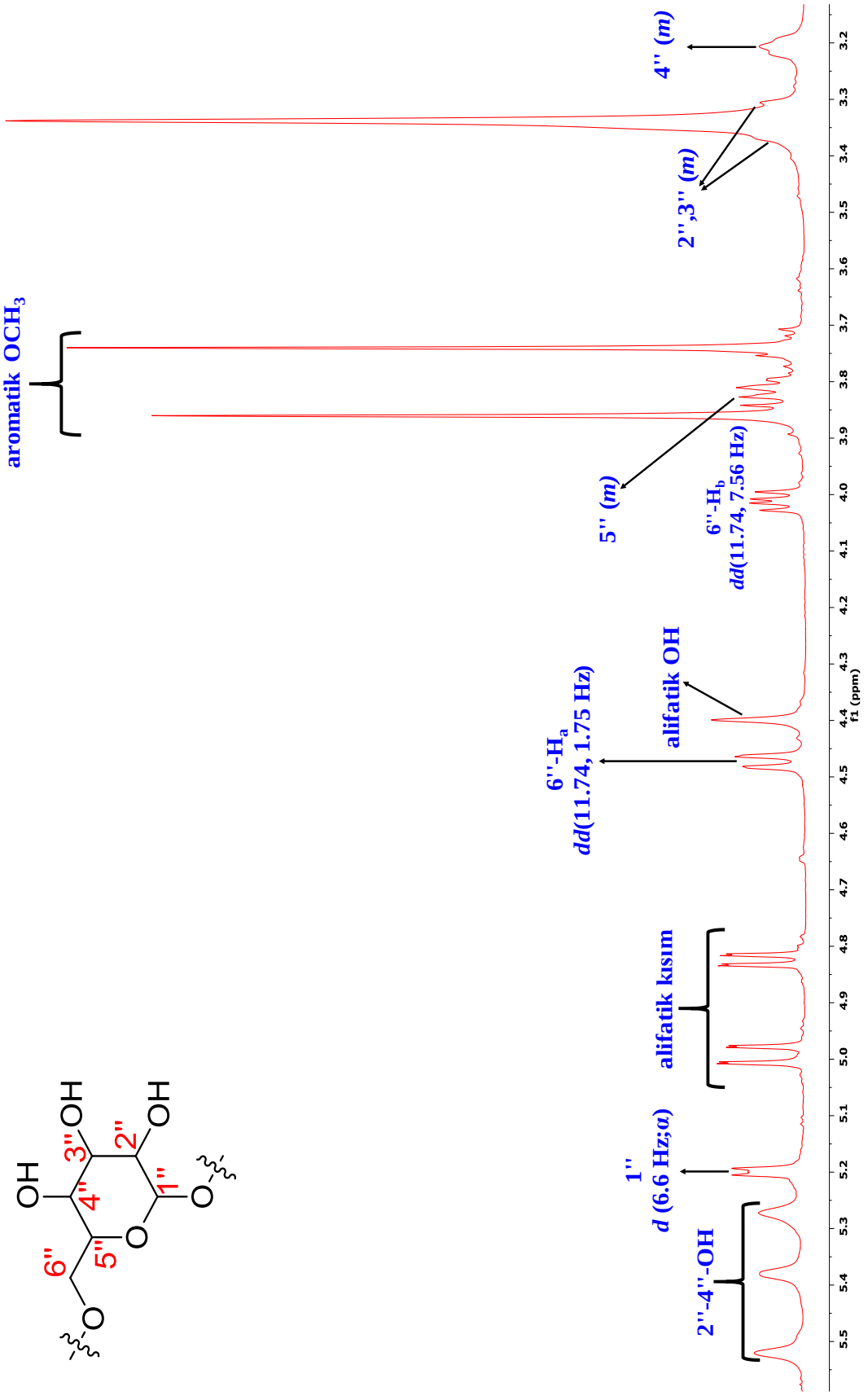
Bileşiğin NMR spektrumları incelendiğinde ^{1}H-NMR'da 6.50-12,92 ppm ve ^{13}C-NMR spektrumunda 94-182 ppm aralığındaki pik grubunun flavon yapısına, ^{1}H-NMR'da 3.2-5.50 ppm ve ^{13}C-NMR'da 64-76 ppm aralığındaki pikler ile 99,66 ppm'deki anomer karbon piki glikoz grubuna, 0.90-1.80 ppm arasındaki piklerin ise alifatik gruba ait olduğu görülmektedir. Ayrıca 5.62, 4.99 ve 4,82 ppm deki 17.3 (vinilik *trans*), 10.7 (vinilik *cis*) ve 1.91 (vinilik *geminal*) Hz'lik etkileşme sabiti içeren 3 *dd* pik grubu, ABX sistemi içeren tipik uç alken sisteminin varlığının göstergesidir.

1H-NMR spektrumunda integrasyonu 1 olan; 9.40 ppm'deki yayvan pik moleküller arası hidrojen bağı yapan OH protonuna, 12.92 ppm'deki pik ise molekül içi hidrojen bağı yapan 5-OH protonuna aittir.

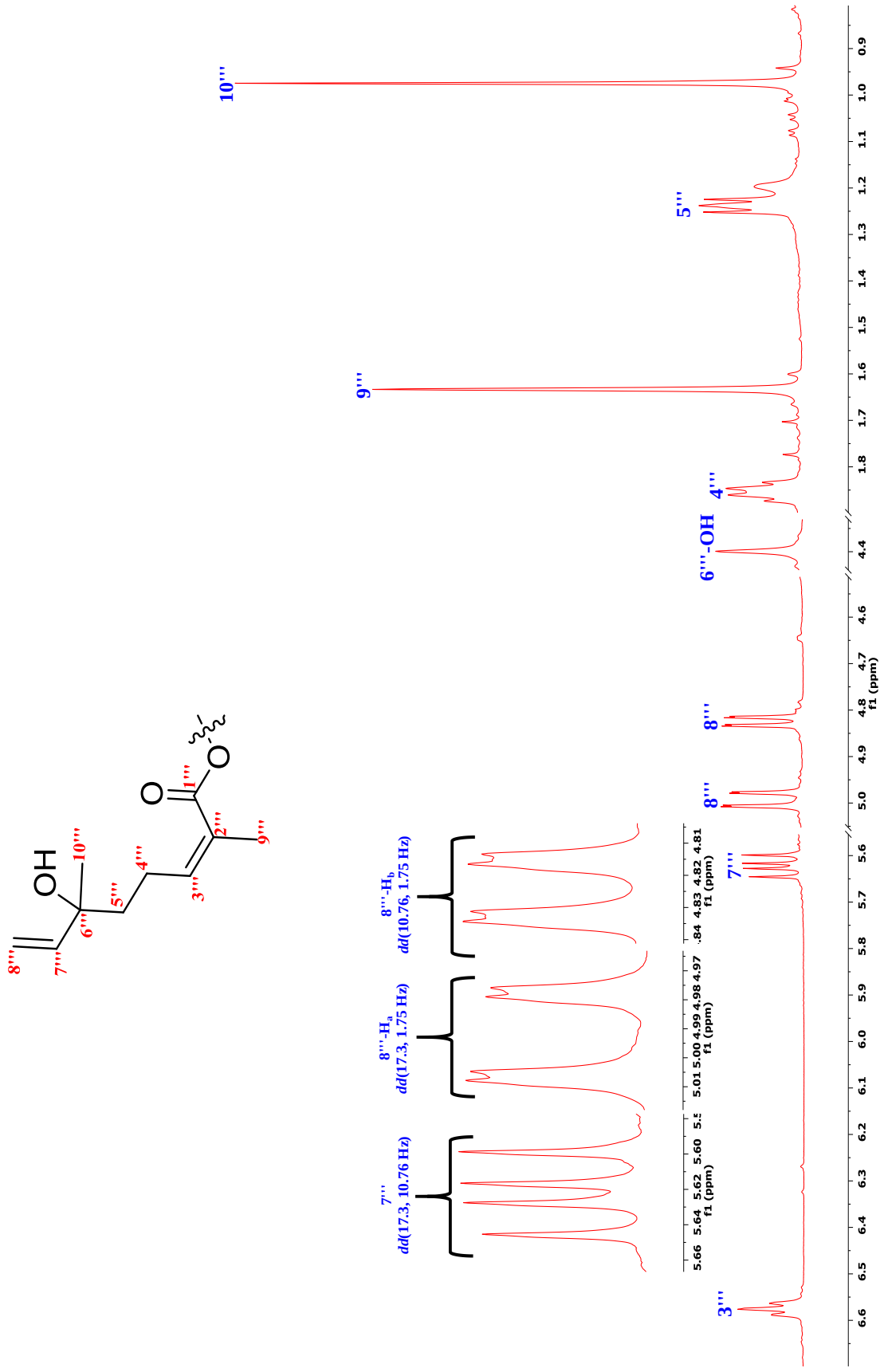
1H-NMR spektrumunda integrasyonu 3 olan 3,73 ve 3,86 ppm'deki singlet pikler metoksi piklerine aittir. 6,82 ppm'de singlet pik, HMBC spektrumunda C2, C4, C10, C1' karbonlarıyla etkileşen H3 protonuna, 6,92 ppm'de singlet pik ise C3, C6, C7, C9, C10 karbonlarıyla etkileşen H8 protonuna aittir.



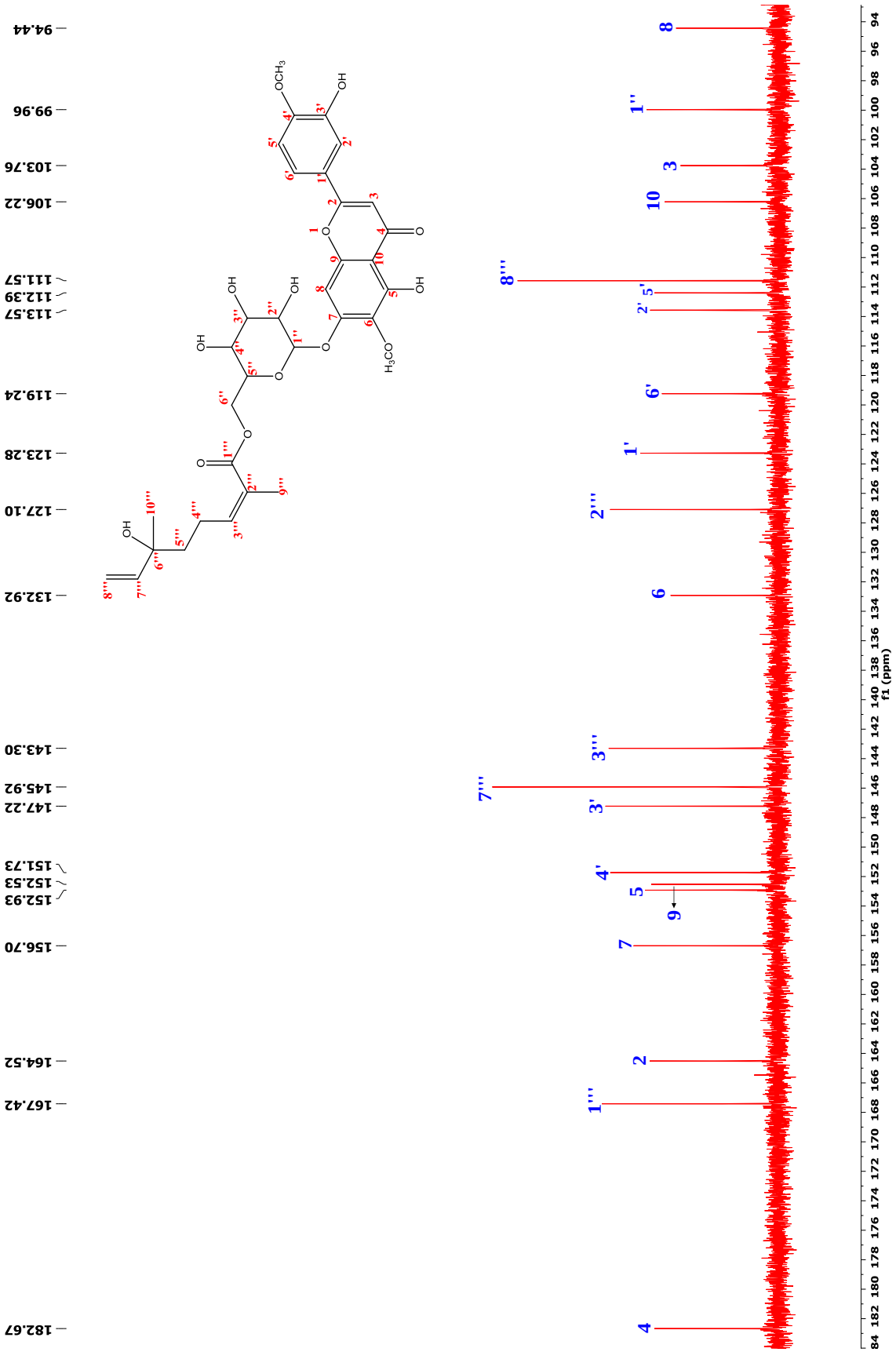
Şekil 4. 68 Yeni bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Aromatik Bölge)



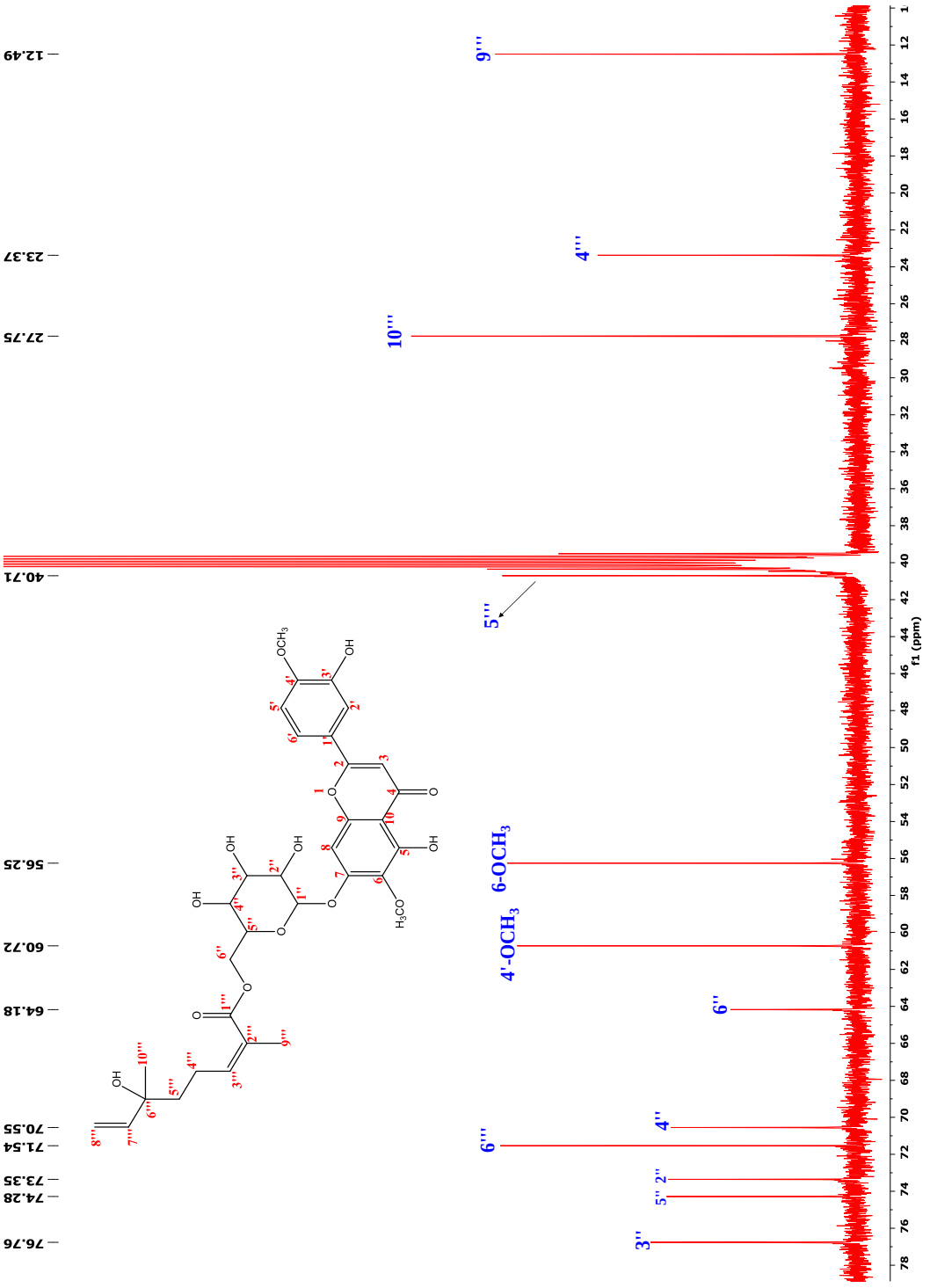
Şekil 4. 69 Yeni bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Şeker Bölgesi)



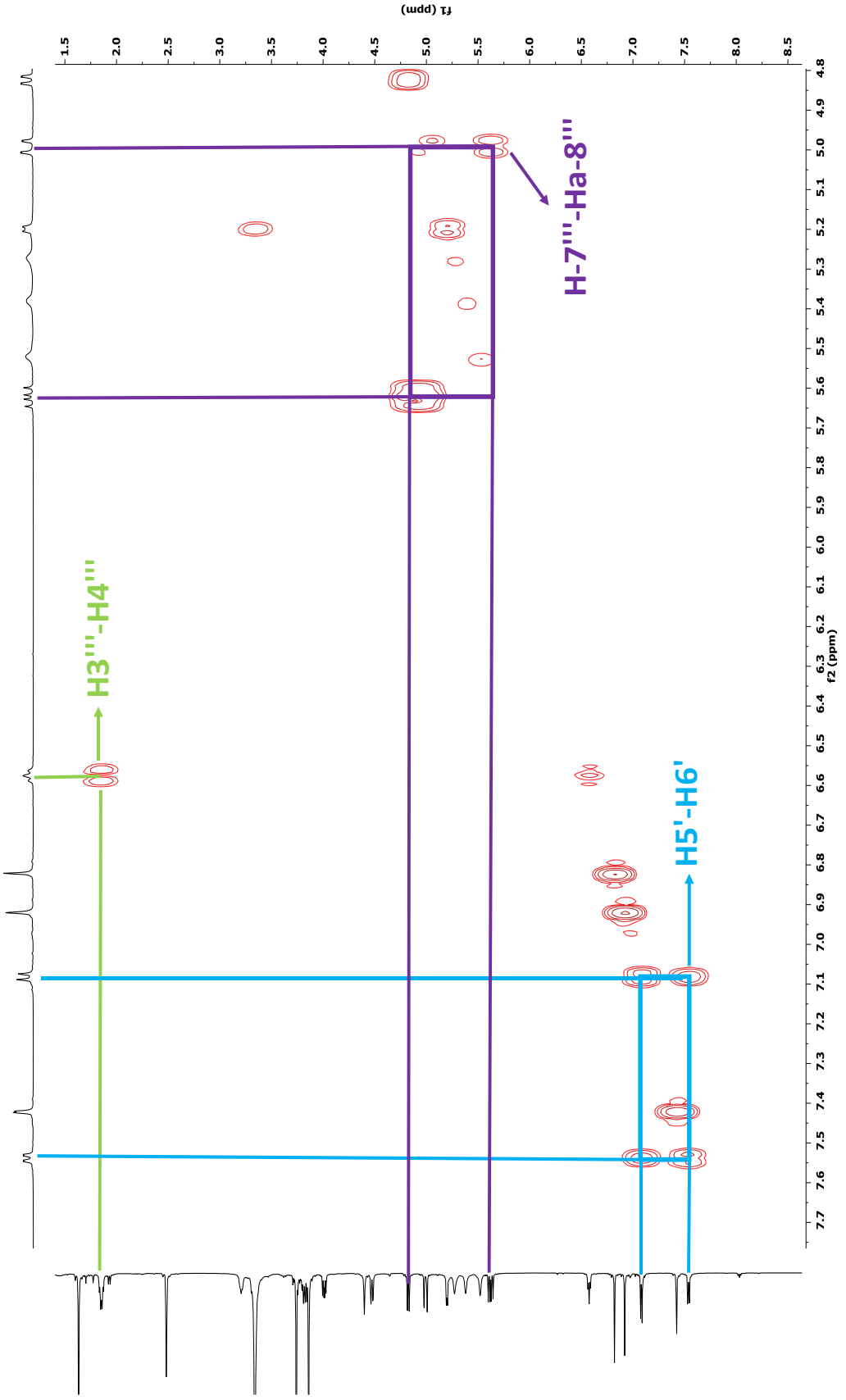
Şekil 4. 70 Yeni bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu (Alifatik Bölge)



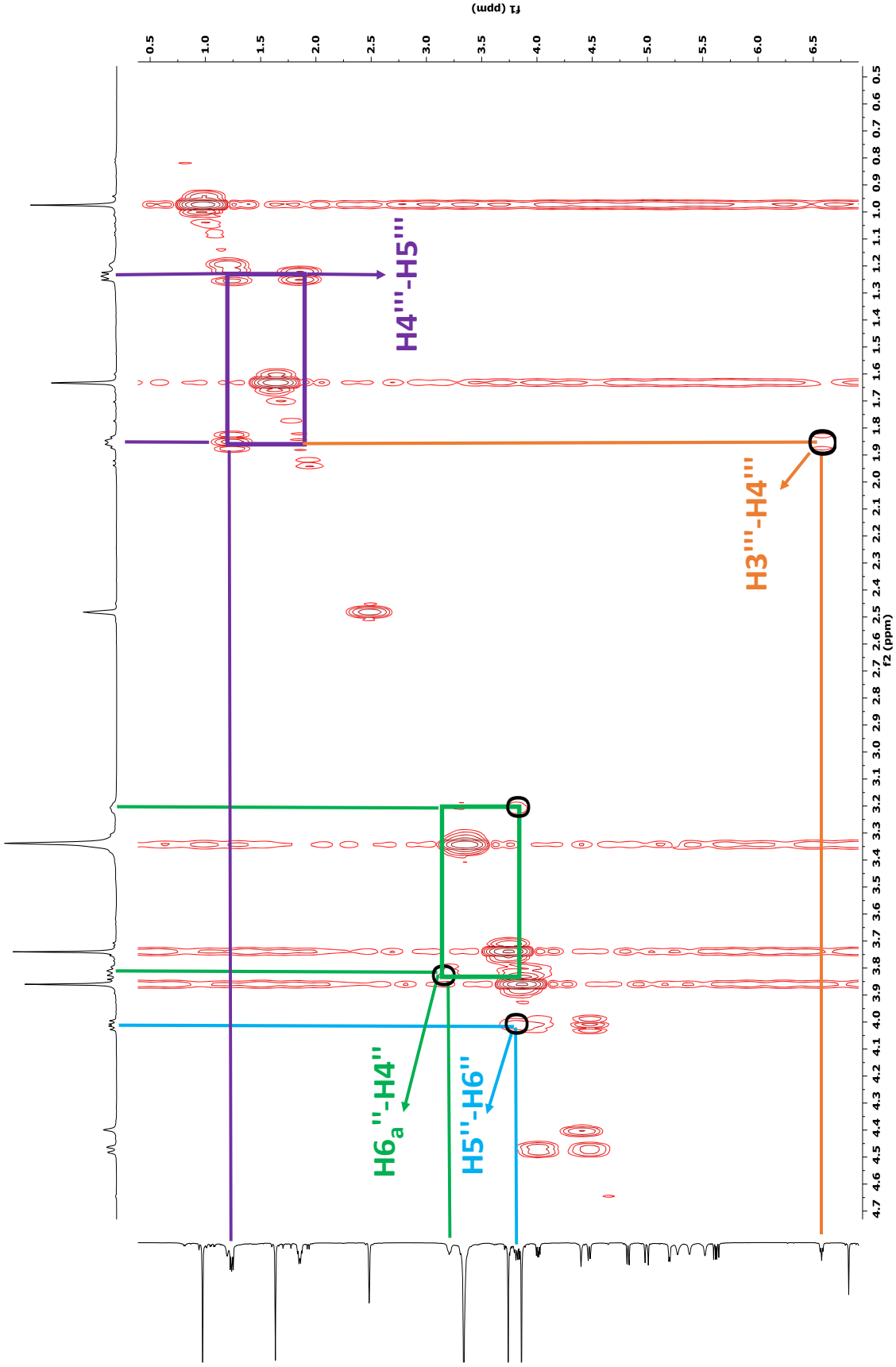
Şekil 4. 71 Yeni bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumu (Aromatik Bölge)



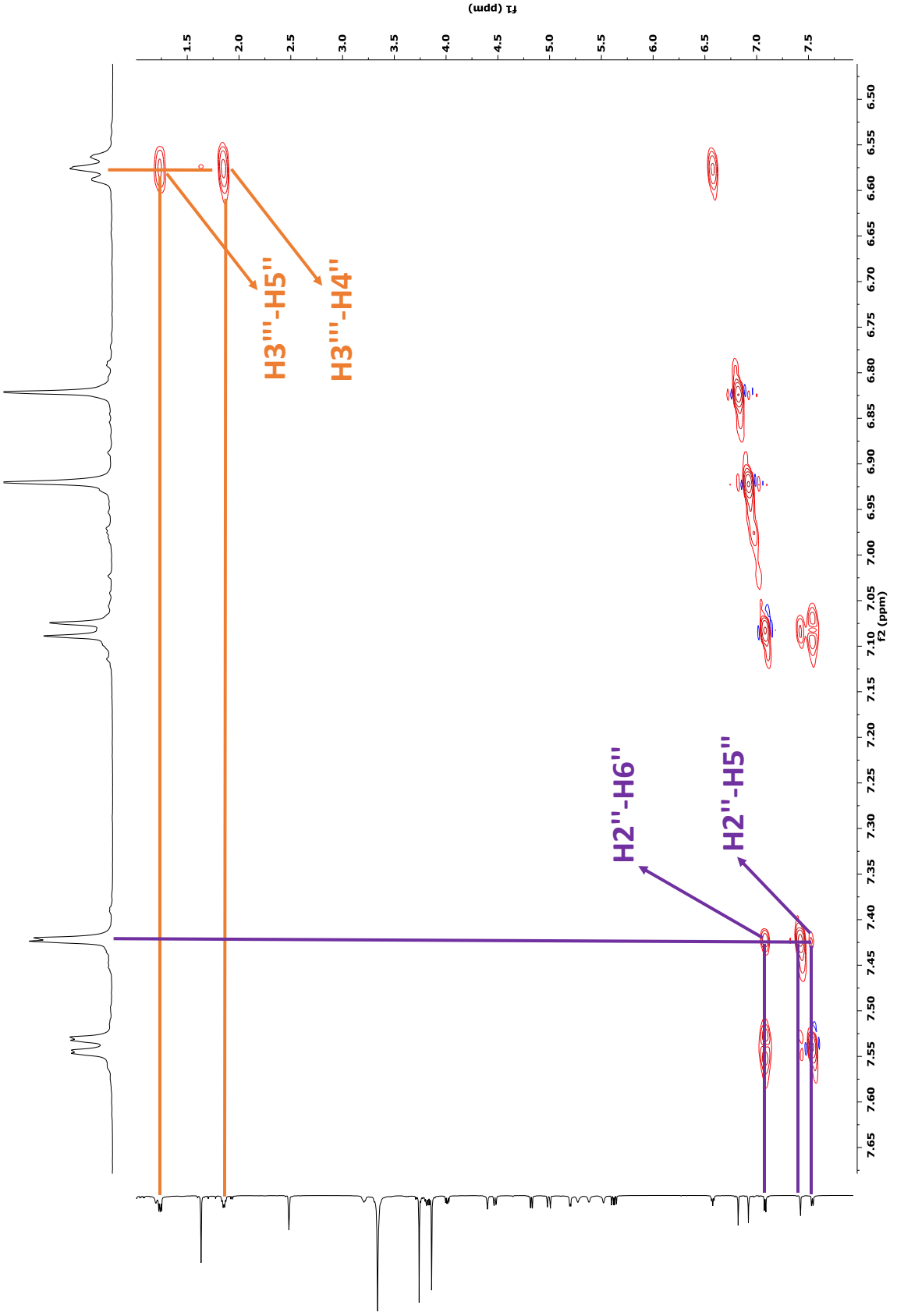
Şekil 4. 72 Yeni bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumu (Alifatik ve Şeker Bölgesi)



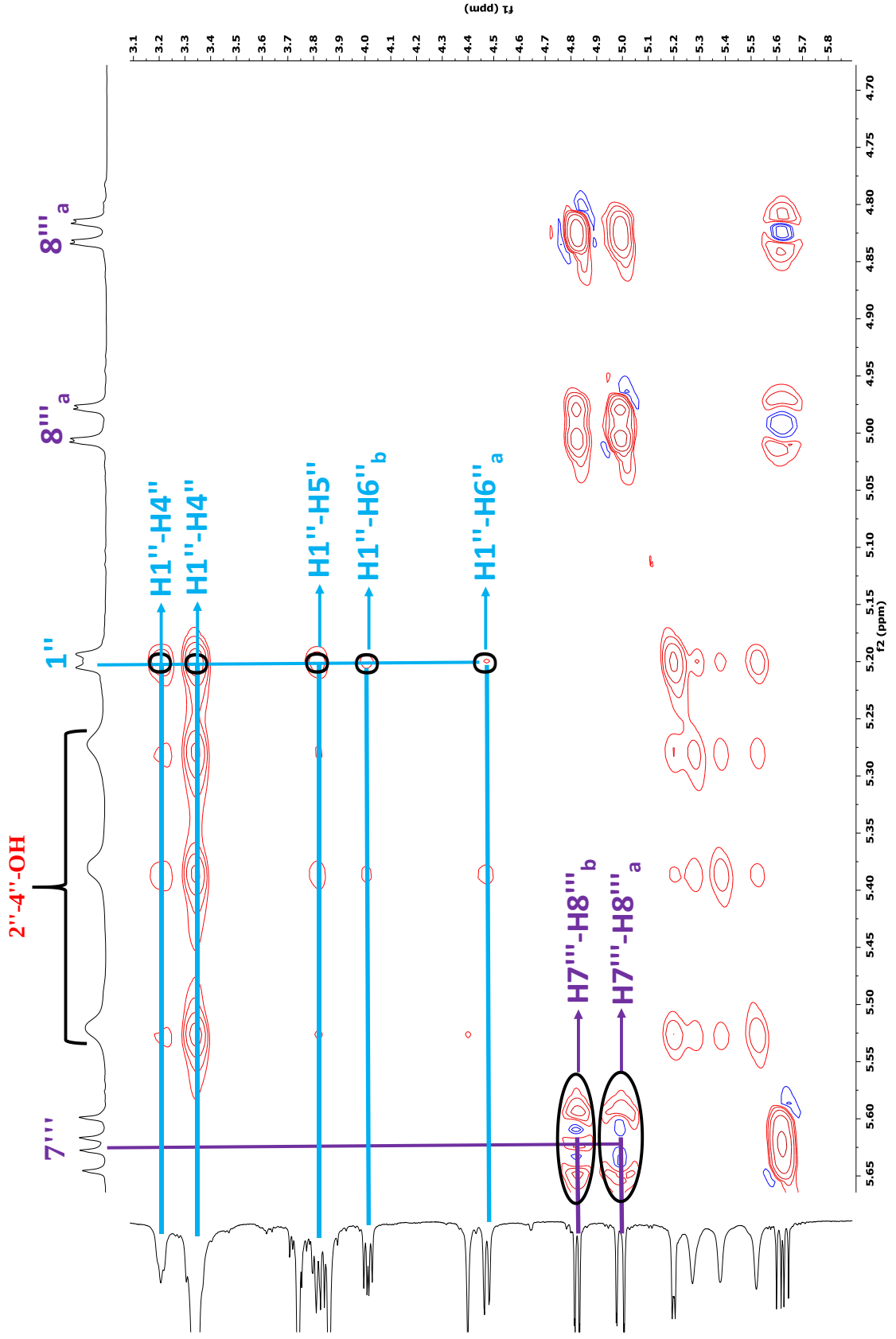
Şekil 4. 73 Yeni bileşiğin COSY-1 spektrumu



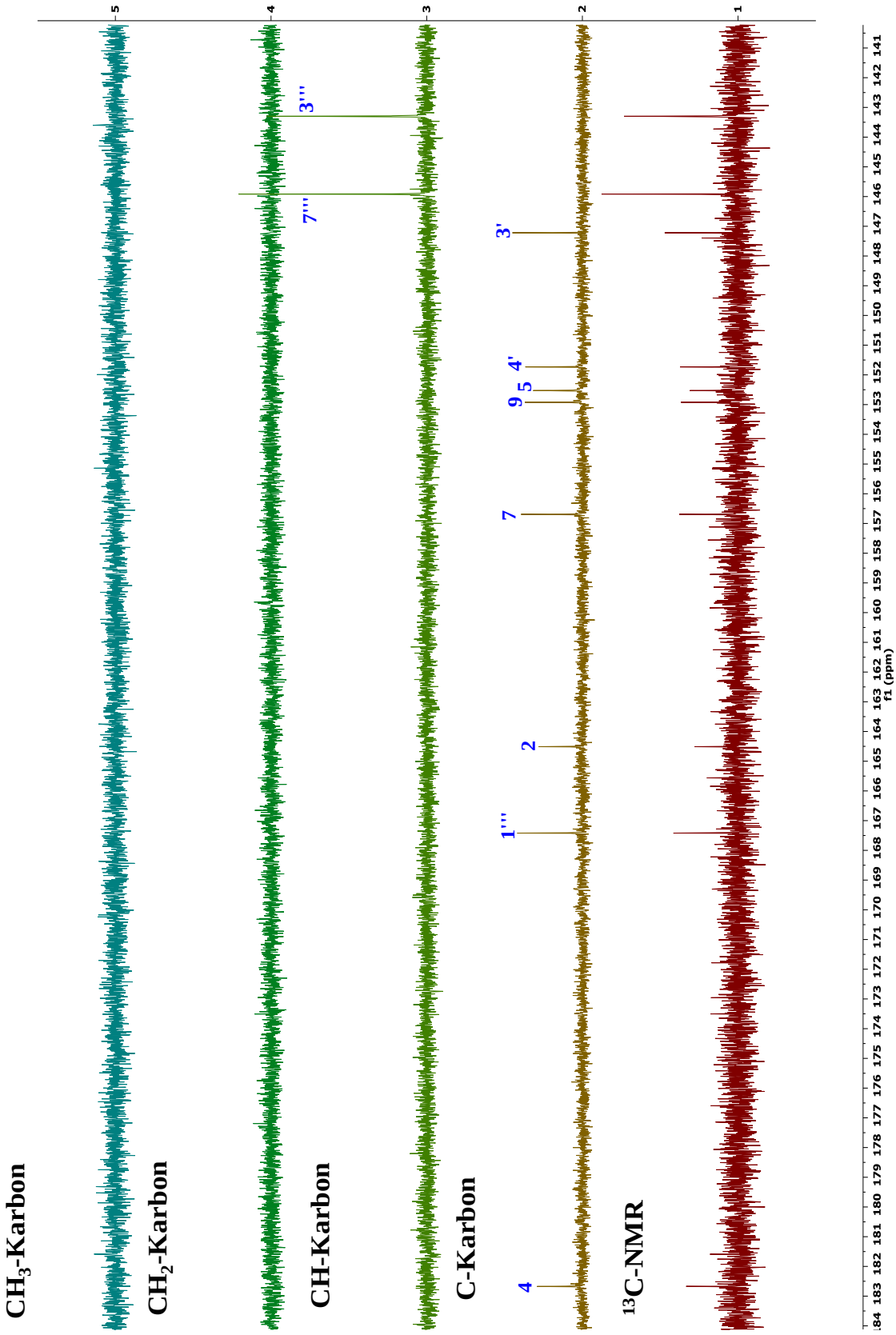
Şekil 4. 74 Yeni bileşiğin COSY-2 spektrumu



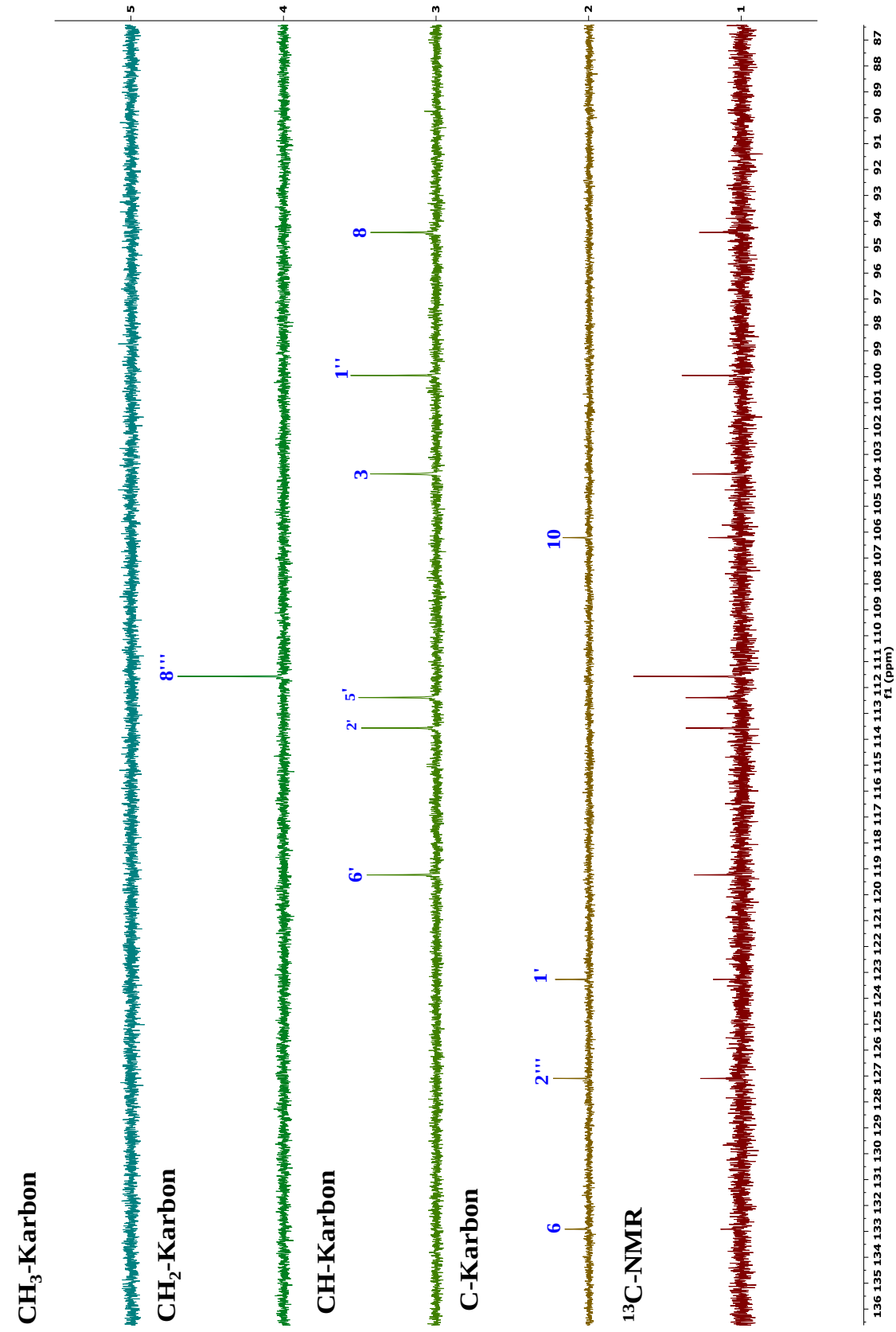
Şekil 4. 75 Yeni bileşiğin TOCSY spektrumu



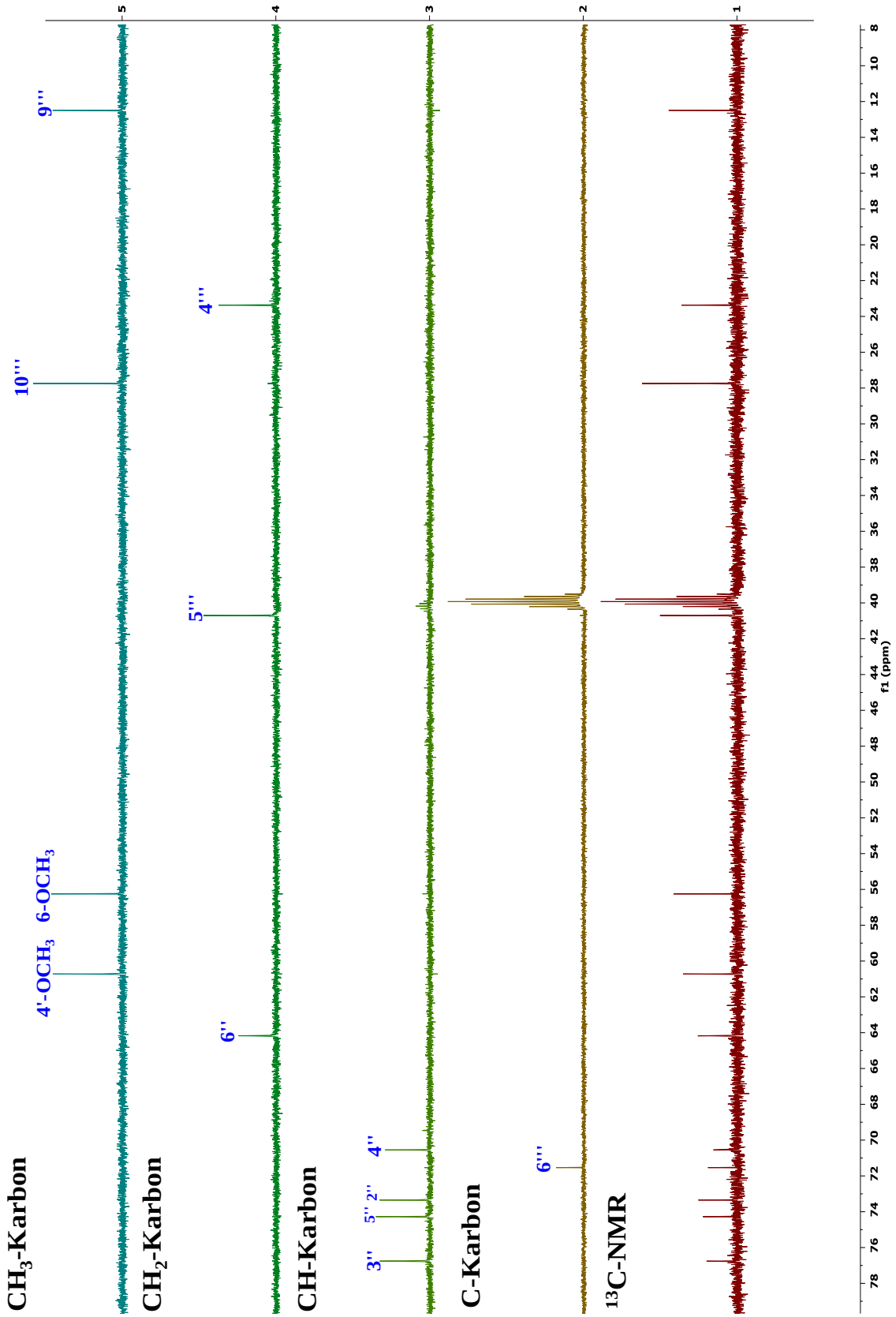
Şekil 4. 76 Yeni bileşiğin TOCSY-2 spektrumu



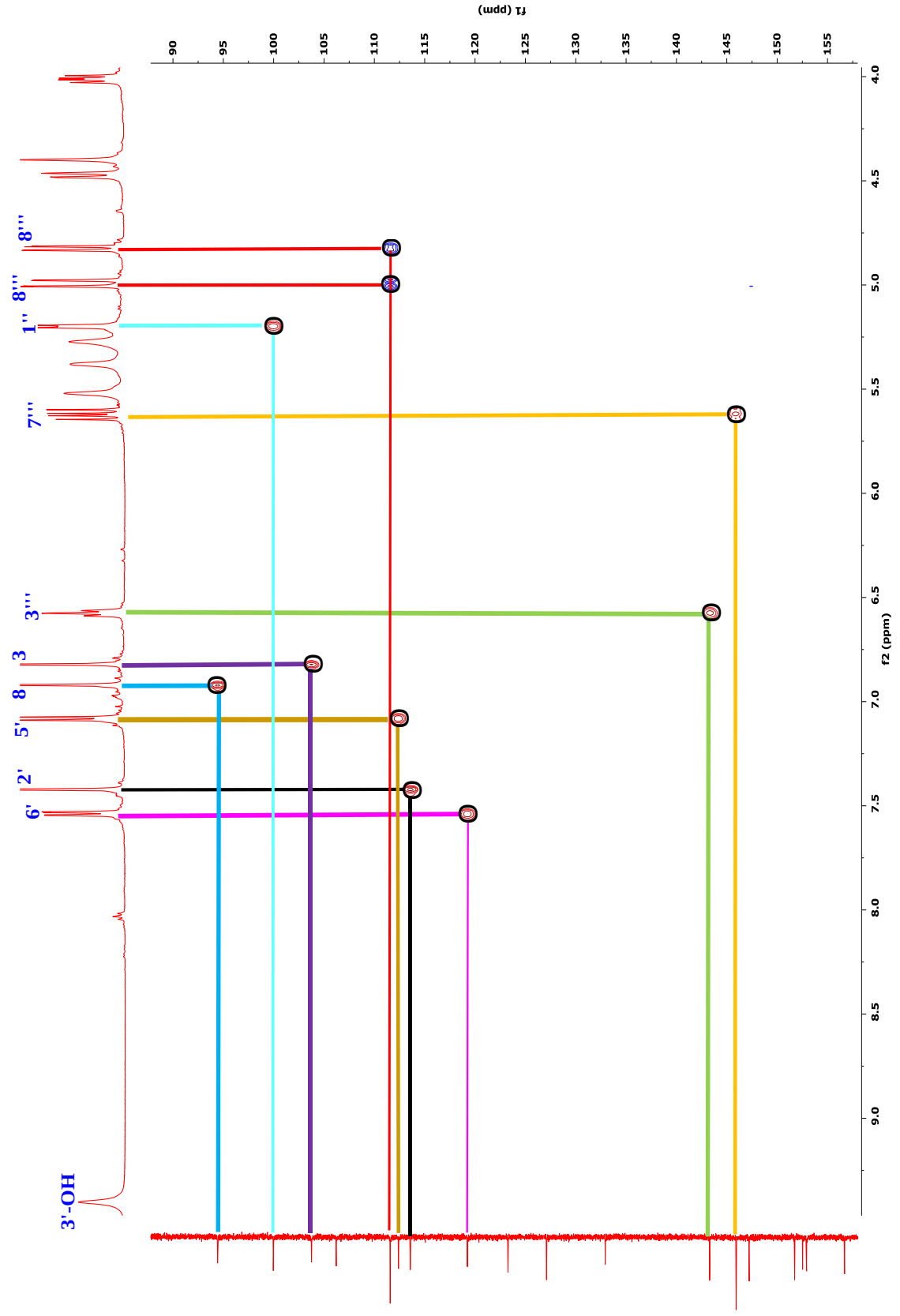
Şekil 4. 77 Yeni bileşiğin DEPT spektrumu (Aromatik Bölge-1)



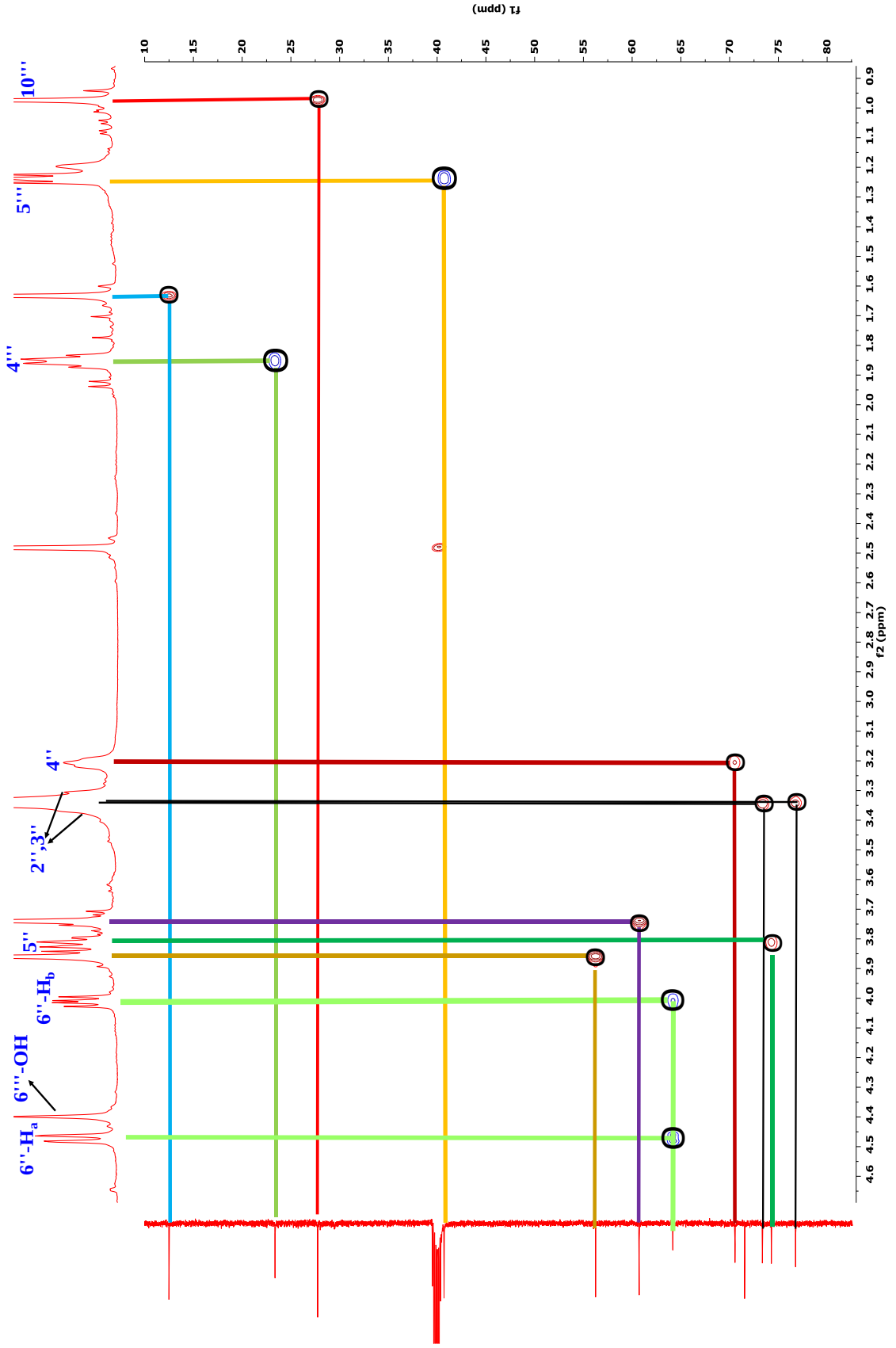
Şekil 4. 78 Yeni bileşiğin DEPT spektrumu (Aromatik Bölge-2)



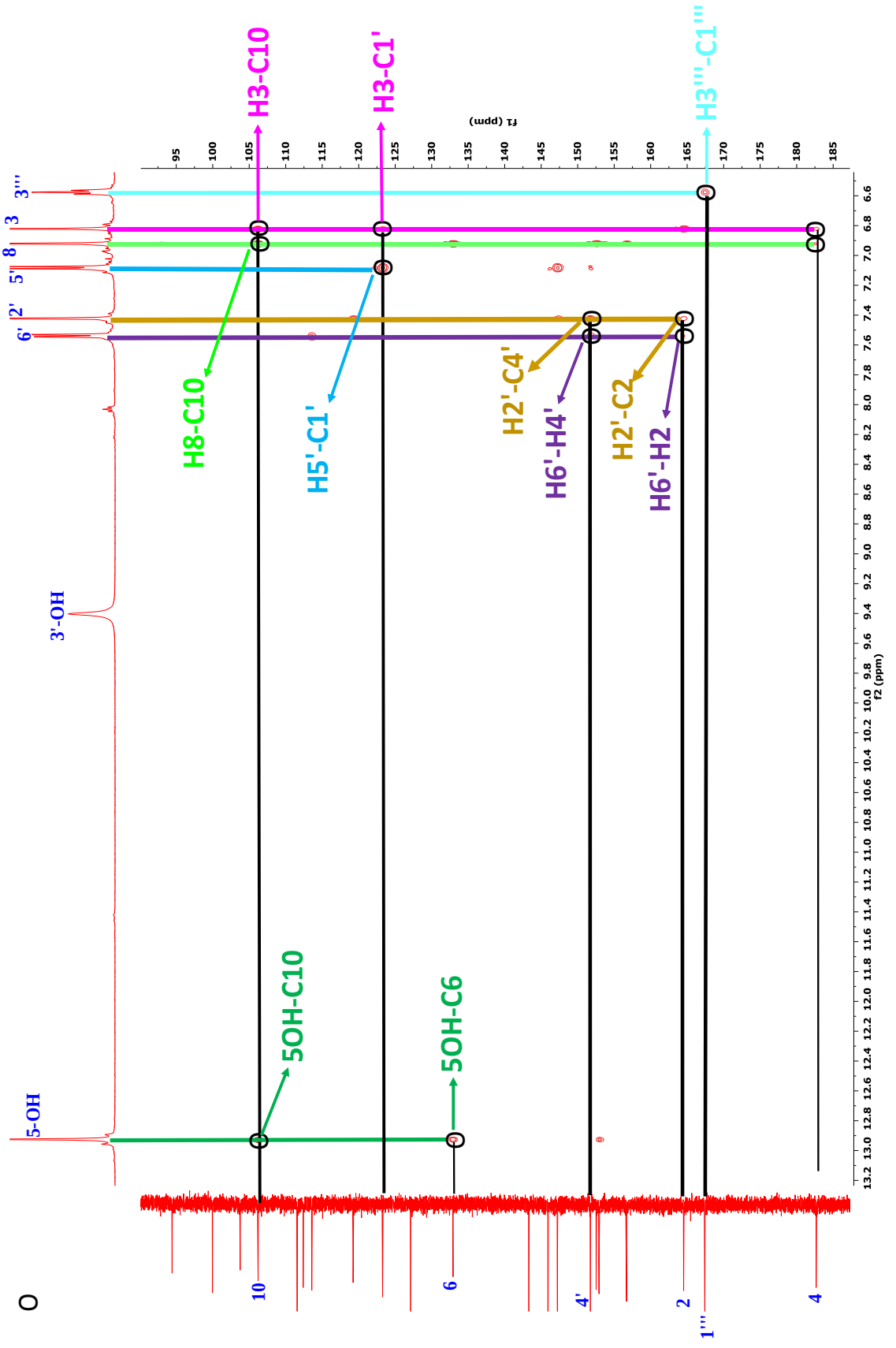
Şekil 4. 79 Yeni bileşiğin DEPT spektrumu (Alifatik ve Şeker Bölgesi)



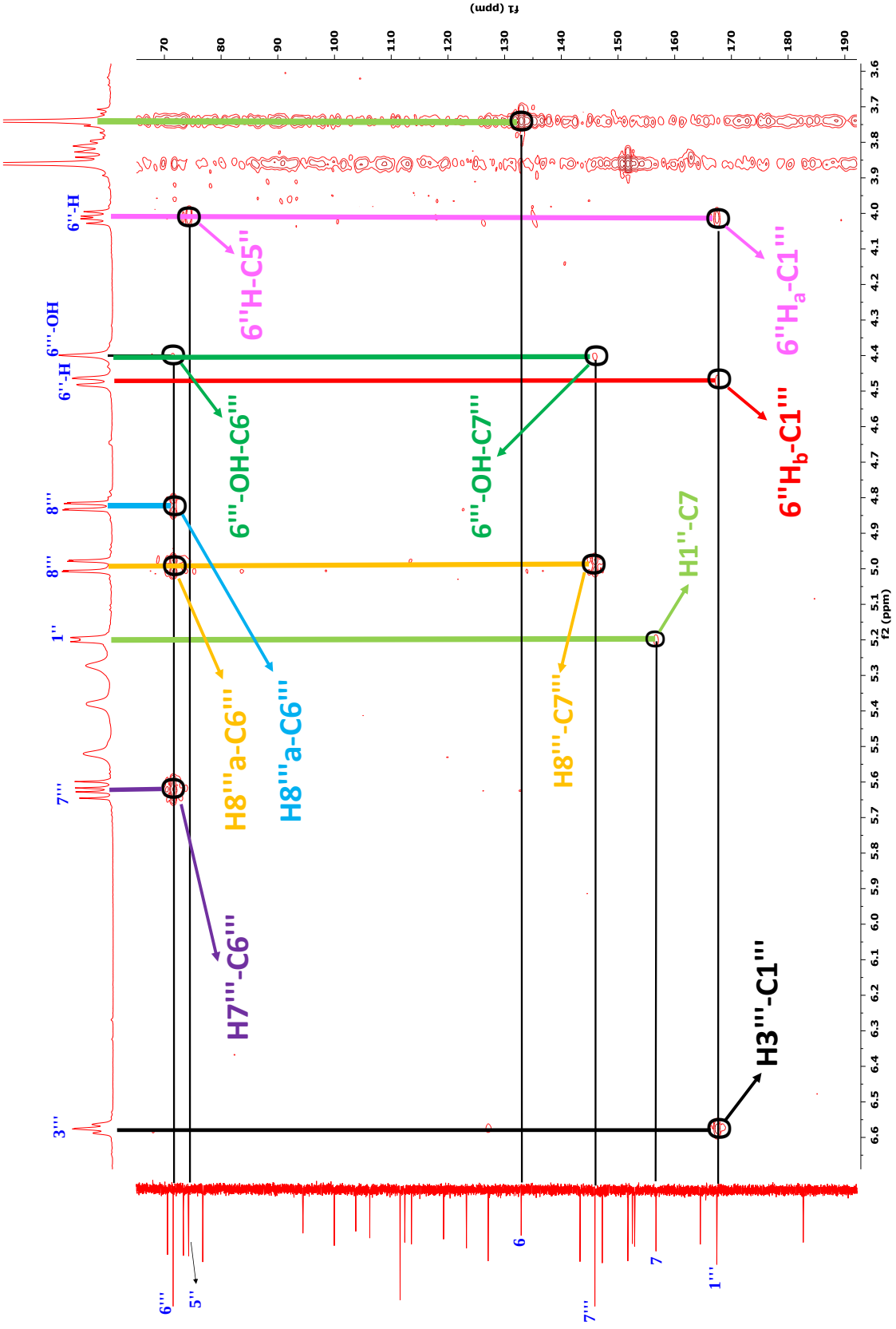
Şekil 4. 80 Yeni bileşiğin HSQC spektrumu (Aromatik Bölge)



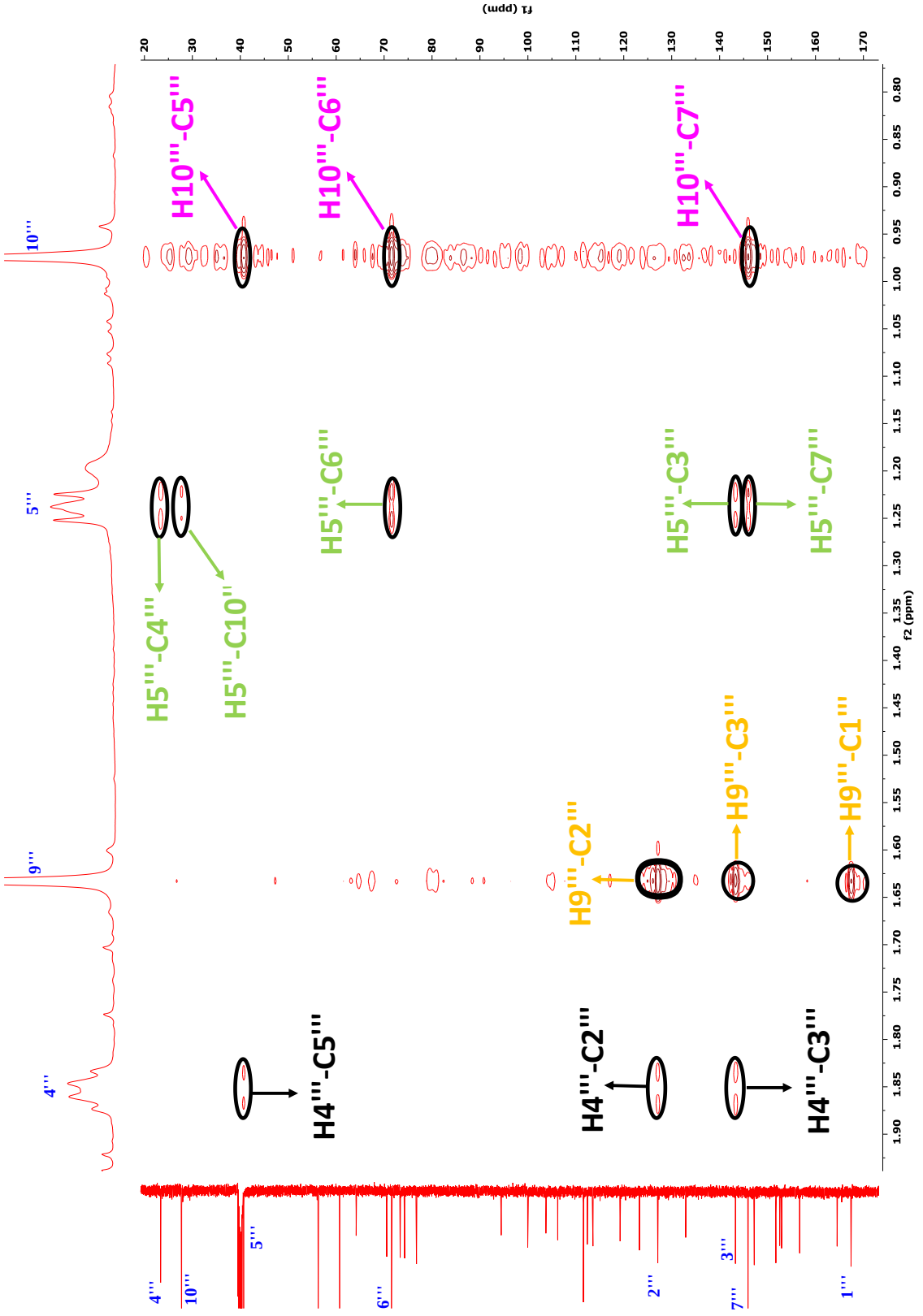
Şekil 4. 81 Yeni bileşiğin HSQC spektrumu (Alifatik Bölge)



Şekil 4. 82 Yeni bileşiğin HMBC spektrumu (Aromatik Bölge)



Şekil 4. 83 Yeni bileşiğin HMBC spektrumu (Şeker Bölgesi)



Şekil 4. 84 Yeni bileşiğin HMBC spektrumu (Alifatik Bölge)

Flavon yapısındaki B halkasındaki 8.6 ve 2.1 Hz etkileşim bulunan 7.08, 7.42 ve 7.55 ppm'deki 3 dd pik grubu, ABX sisteminin bir göstergesidir. HMBC spektrumunda OCH_3 ^{1}H-NMR'deki 3.86 ppm protonlar, ^{13}C-NMR ppm'deki 151.73 karbon ile etkileşmektedir. Bu karbonun H-5' ve H-6' protonlarının etkileşmesi, fakat H-2' ile etkileşmemesi, bu karbonun C-4', böylece OH grubunun ise C-3' olduğunu kanıtlamaktadır.

Glukoz grubuna ait diastereotopik H-6" protonlarının HMBC spektrumunda 1'" (167.43 ppm) karbonuyla etkileşmesi, alifatik zincirinin glukoz birimine C-5" karbonundan bağlı olduğunu göstermektedir. H-6" protonlarının HMBC spektrumunda C-5" karbonu ve COSY spektrumunda H-5" ile kuvvetli etkileşmesinden dolayı menthiafoloyl grubunun glukoz biriminin C-5" karbonundan bağlı olduğunu gösterir.

Glikozit birimindeki H-1" ve H-2" protonları arasındaki etkileşim sabitinin 7,27 Hz'lik etkileşimi, şeker biriminin beta formunda olduğunu göstermektedir. Ancak H-4" (3.20 ppm) protonuna ait pik yarılması net olmadığı için H-4" ve H-5" protonları arasındaki etkileşim sabiti hesaplanamamıştır ve bundan dolayı alfa-beta pozisyonu aydınlatılamamıştır.

^{13}C-NMR spektrumunda 143.30 ve 127.10 ppm'deki olefinik karbon pikleri ile nispeten yukarı alana kaymış 167.43 ppm'deki karbonil piki (ester grubu olmasının etkisi ile birlikte), yapıda *α,β* doymamış keton grubunun varlığını kanıtlar. DEPT spektrumuna göre bu grupta birer C ve CH karbonu tespit edilmiştir. *α,β* sistemindeki protonun triplet olması ve komşu CH_2 protonlarıyla (H-4'") COSY spektrumunda etkileşmesi, *α,β* doymamış keton sistemlerinde nispeten aşağı alanda rezonans olan beta karbonunun HSQC spektrumunda 6.58 ppm'deki (^{1}H-NMR) proton ile etkileşmesi, bu olefinik protonun beta karbonuna (C-3'") bağlı olduğunu göstermektedir. C-6'" karbonu kiral olduğu için teorik olarak C-5'" karbonu ve protonları diastereotopiktir. Bu protonların farklı kimyasal değerlere sahip olması beklenirken böyle bir durum söz konusu değildir. Bunun nedeni olarak da kimyasal yapı, safsızlık, anlık cihaz ayarı veya hassasiyetinin düşüklüğü söylenebilir.

Çizelge 4. 6 Yeni Bileşiğin NMR verileri

	^{13}C	DEPT	HSQC	HMBC	COSY
4	182.68	C		3,8	
1'''	167.43	C		9''',6'''(4.48,4.01),3'''	
2	164.52	C		3,2',6'	
7	156.70	C		8,1''	
5	152.93	C		5-OH	
9	152.53	C		8	
4'	151.74	C		2',3',4'-OCH_3	
3'	147.23	C		2',3',6'	
7'''	145.93	CH	5.62	5''',6'''	4.99 (17.3 Hz) 4.82 (10.7 Hz)
3'''	143.30	CH	6.58	1''',2''',4'''5''',10'''	1.77
6	132.93	C		5-OH,6-OCH_3,8	
2'''	127.10	C		4''',6-OCH_3,9'''	
1'	123.28	C		2',3,6'	
6'	119.24	CH	7.55 (dd)	2'	7.08 (8.6 Hz) 7.42 (2.1 Hz)
2'	113.57	CH	7.42	6'	7.55 (2.1 Hz)
5'	112.40	CH	7.08	4'-OCH_3	7.55 (8.6 Hz)
8'''	111.57	CH_2	4.99/4.82	---	1.75 Hz
10	106.22	C		3,8	
3	103.76	CH	6.82	2,4,10,1'	
1''	99.66	CH	5.19	---	3.35 (7.27 Hz)
8	94.44	CH	6.92	---	
3''	76.76	CH	3.35	---	
5''	74.29	CH	3.81	6''(4.01)	4,48 (2,18 Hz) 4,01 (7,56 Hz)
2''	73.36	CH	3.35	3''	
	71.54	C		5''',7''',8''',10'''	
4''	70.55	CH	3.20	---	3,81 (*m*)
6''	64.18	CH_2	4.48/4.01	1'''	3.81 (2.18 Hz) 4.01 (11.98 Hz)
4'-OCH_3	60.72	CH_3	3.74	---	
6-OCH_3	56.26	CH_3	3.86	---	
5'''	40.71	CH_2	1.24	4''', 10'''	1.86
10'''	27.75	CH_3	0.93	5''',6''',7'''	
4'''	23.38	CH_2	1.86	3''',5'''	1.24
9'''	12.49	CH_3	1.63	10'''	
5-OH	-		12.92	5,6,10	
2'', 3'',4''			5.27,5.38,5.52		
6'''			4.40		

Yeni bileşiğin alifatik kısmı literatürde "Menthiafoloil" grubu olarak bilinmektedir ve bu alifatik grubu içeren bazı bileşikler *Penstemon ambiguus* (Arslanian *et al.* 1990), *Globularia alypum* (Kırmızıbekmez *et al.* 2008), *Gleditschia Australis* Hemsl. (Van *et al.* 2009) ve *Anarrhinum pedatum* (Beladjila *et al.* 2019) gibi bitkilerden saflaştırıldığı rapor edilmiştir. Bu gruptaki karbon ve etkileşim sabitlerini içeren proton değerlerini karşılaştırmalı olarak gösteren literatür verileri Çizelge 4.7'de verilmiştir.

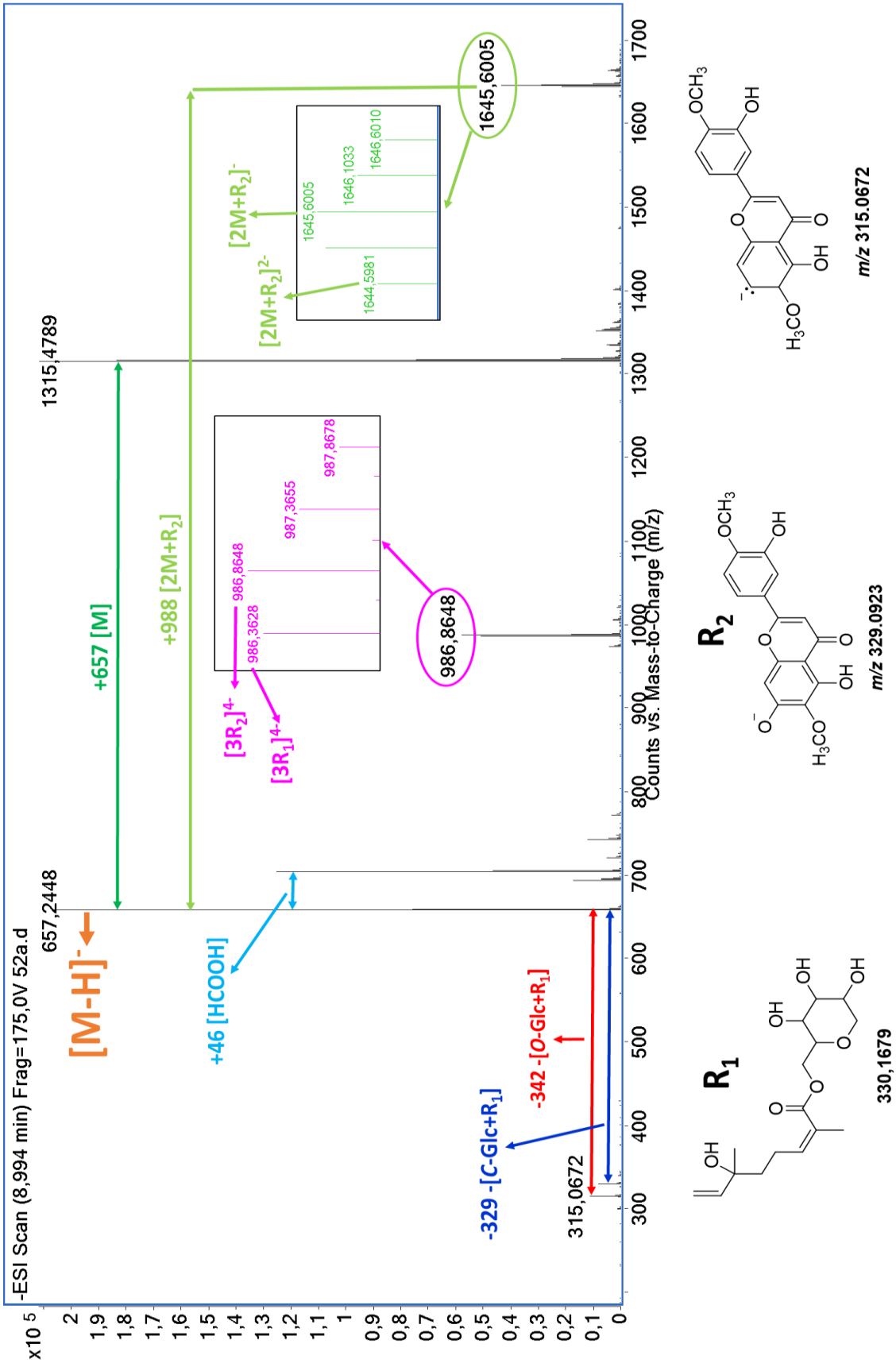
Çizelge 4.7'deki verilere göre literatür ile mevcut veriler arasında uyum olmakla beraber özellikle H-3''' olefinik protonunun kimyasal kayma değeri bakımından belirgin bir farklılık göstermektedir. Literatürlerdeki bu protona ait değerler 6.7-7.1 ppm aralığında değiştiği görülmektedir. Bu yayınlarda bu çift bağın (C2'''-C3''') *cis* olması durumunda H-3''' proton sinyalinin daha yukarı alanda gözükeceğini rapor eden yayınlar göz önünde bulundurulduğunda 6.58 ppm'de gözüken H-3''' protonundan dolayı yapının *cis* (*Z*) olduğu söylenebilir. Fakat C-9''' karbonuna ait sinyalin cis olması durumunda 19-25 ppm (Huong *et al.* 2008), H-9''' protonuna ait sinyalin ise 6.4 ppm civarında gözlendiği bilgileri literatürlerde mevcuttur. Her ne kadar proton sinyali yakın olsa da (6.40-6.58 ppm) karbon sinyali arasındaki fark (12-19 ppm) çok fazla olduğu için yapının *trans* (*E*) olduğu daha olasıdır. Yeni bileşiğin C-6''' karbonu kiral karbon olduğu yapıda (*R*) ve (*S*) konfigürasyonu söz konusudur. Literatürde (Guo *et al.* 2014) yer alan kimyasal kayma değerleri ile C-5''' (41.5-40.7), C-7''' (145.9-145.93), C-8''' (112.4-112.4) ve C-10''' (27.8-27.8) mevcut kayma değerleri karşılaştırıldığında yapının konfigürasyonu (*S*) olduğu söylenebilse de yapısal ve çözücü faktörler göz önünde bulundurulduğunda daha ileri analizler gerektiği söylenebilir.

Yeni bileşiğin HPLC-TOF/MS analiz sonucunda moleküler negatif iyon pikinin 657.2448 (*m/z*) ve bu değer ile hesaplanan moleküler formülünün ($C_{33}H_{38}O_{14}$), NMR değerleri ile uyum içinde olduğu görülmektedir (Şekil 4.31). Şekil 4.31'deki gösterilen MS spektrumundaki 703.2508 *m/z* değerinin [M+46]) HPLC analizinde kullanılan çözücü sisteminde bulunan formik asidin yapıya bağlanması sonucunda oluşan moleküle (veya 2Na sodyum atomu bağlanması sonucu oluşan moleküle), 315.0672 ve 329.0923 *m/z* değerleri flavondan yapısından glikozit grubun ayrılması ile oluşan aglikon kısımlarına, 986.3628 ve 986.8648 *m/z* değerleri sırasıyla trimeri oluşan aglikon

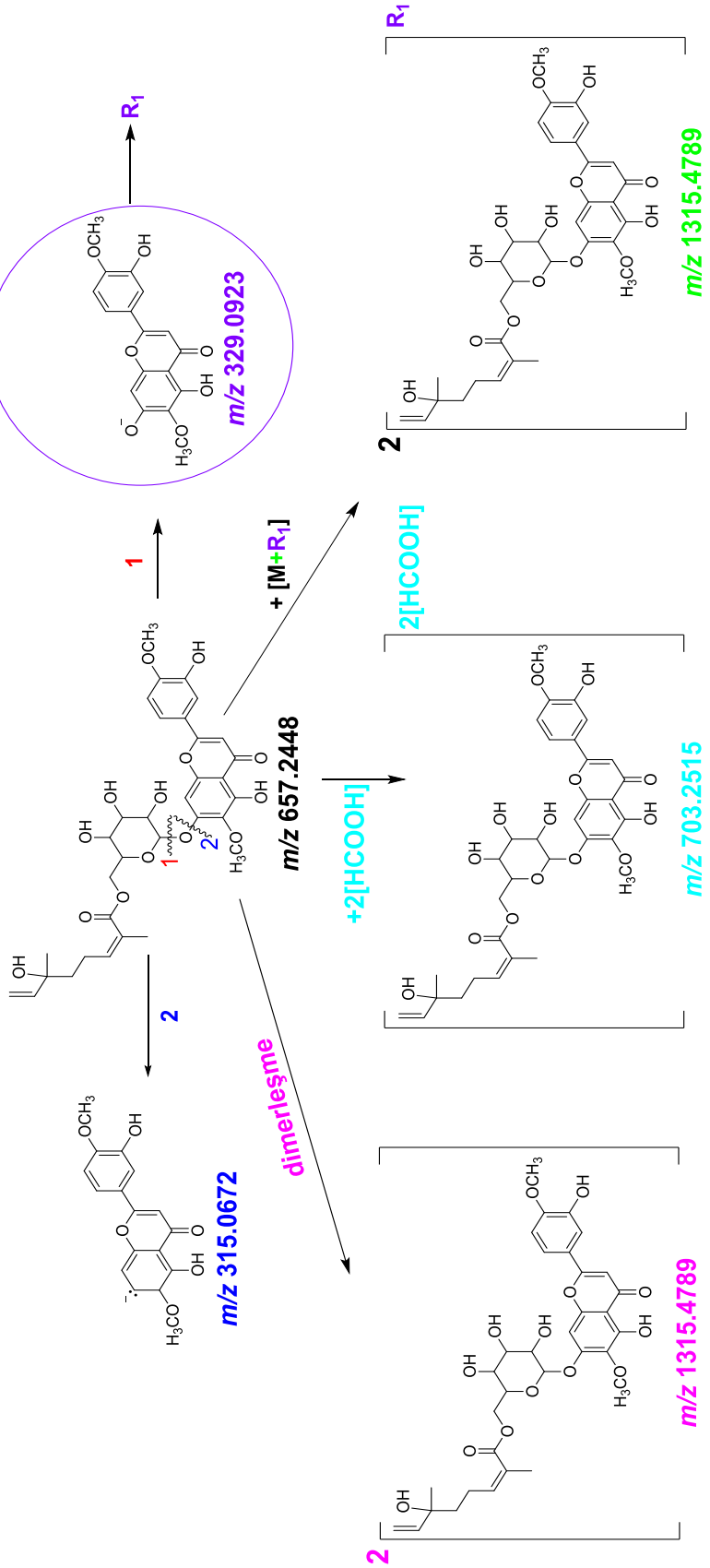
ve menthiafoloyl grubuna, 1315.4794 *m/z* değeri yeni bileşiğin dimerleşmesi (aynı 2 iki bileşiğin birleşmesi ile yeni molekülün oluşması) ile oluşan dimer yapısın ve son olarak da 1644.5981 ve 1645.6005 *m/z* değeri dimer yapısına aglikon kısmının bağlanması ile oluşan dimerlerin (-2) ve (-1) iyonlarına ise ait olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4. 7 Menthiafoloil grubunun deneysel ve literatür NMR verileri

	(Kırmızıbekmez *et al.* 2008)	(Beladjila *et al.* 2019)	Deneysel	Deneysel	(Beladjila *et al.* 2019)	(Kırmızıbekmez *et al.* 2008)	(Van *et al.* 2009)	(Arslanian *et al.* 1990)
	^{13}C-NMR	^{13}C-NMR	^{13}C-NMR	^{1}H-NMR	^{1}H-NMR	^{1}H-NMR (H=)	^{1}H-NMR (H=)	^{1}H-NMR (H=)
1'''	169.1	166.0	167.43					
7'''	145.8	145.5	145.93	5.62 *dd* (17.3/10.7)	5.93	5.86(17.6/10.9)	5.92 dd (16.0/10.0)	5.82 (17.4/10.8)
3'''	144.9	144.3	143.30	6.58 (7.63)	6.71	6.80 *t* (7.5)	6.83	6.84 *ddq*
2'''	127.9	125.1	127.10					
8'''	112.2	112.1	111.57	4.99 *dd* (17.3/1.75 H=) 4.82 *dd* (10.7/1.75 H=)	5.27 5.07	5.21(17.6/1.4H=) 5.06 (10.9/1.4)	5.24 *dd* (16.0/1.5) 5.07 *dd* (10.0/1.5)	5.22 (17.4/1.6) 5.05 (10.8/1.6)
5'''	41.6	41.5	40.71	1.24	1.59	1.52	1.61	1.62
10'''	27.5	27.4	27.75	0.93	1.30	1.23	1.27	1.27
4'''	24.2	24.1	23.38	1.82-1.88	2.23	2.13-2.2	2.24	2.25
9'''	12.0	12.0	12.49	1.63	1.80	1.80	1.84	1.84
6'''	73.3	71.8	71.54	4.40 (OH)			Veri yok	



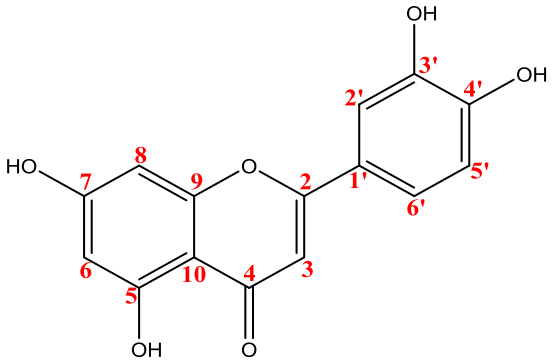
Şekil 4. 85 Yeni bileşiğin MS spektrumu ve iyonlaşma ürünleri



Şekil 4. 86 Yeni bileşiğin iyonlaşma ürünleri

Nispeten polar maddeler içerdiği düşünülen EA fazındaki polar karakterli maddelerin, aynı özellikteki kolon dolgu maddesi olan silikajelde fazla tutunması ve bunun sonucunda madde kaybı riski olacağı öngörüldüğü için, bu ekstrede saflaştırma işlemi için sefadeks LH-20 kolon dolgu maddesi kullanılmıştır. Sefadeks kolonunda yapılan saflaştırma işlemleri sonucunda $CHCl_3$ ekstresinde saflaştırılan Chrysin dışında luteolin ve apigenin olarak bilinen 2 flavon daha saflaştırılmıştır.

Luteolin (EAS1)



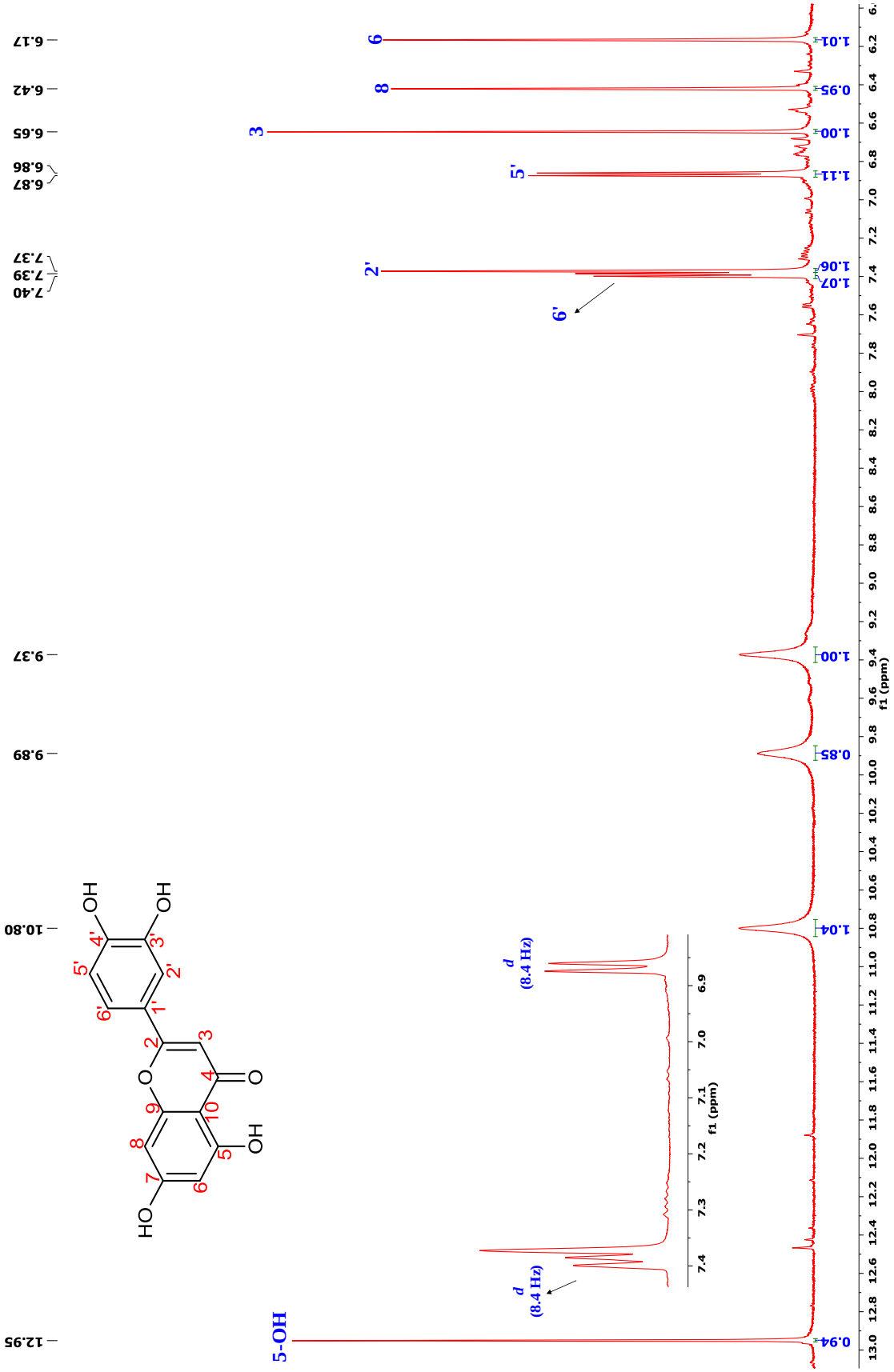
Şekil 4. 87 Luteolin'in kimyasal yapısı

^{1}H NMR (600 MHz, DMSO-*d6*) δ 12.95 (1H, *s*, 5-OH), 7.40 (1H, *d*, *J* = 8.37 Hz, H-2'), 7.39 (1H,*m*,2', 6-H′), 6.87 (1H, *d*, *J* = 8.37 Hz, H-5'), 6.65 (1H,*s*,3-H), 6.42 (1H,*m*, H-8), 6.19 (1H,*s*, H-6).

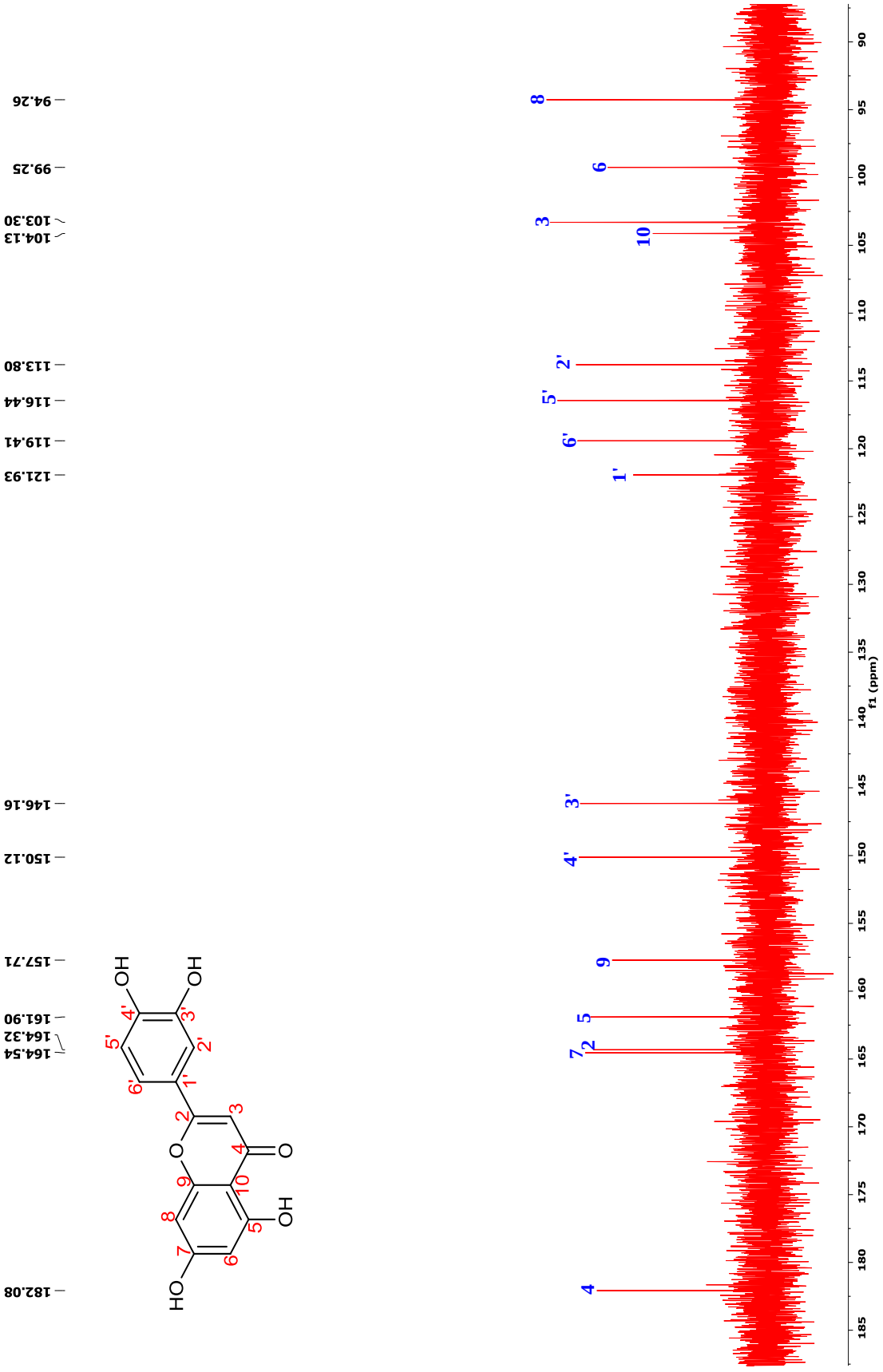
^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-*d6*): δ 182.08 (C-4), 164.54 (C-7), 164.32 (C-2), 161.90 (C-5), 157.71 (C-9), 150.12 (C-4'), 146.16 (C-3'), 121.93 (C-1'), 119.41 (C-6'), 116.44 (C-5'), 113.80 (C-2'), 104.13 (C-10), 103.30 (C-3), 99.25 (C-6), 94.26 (C-8) (Lin *et al.* 2015).

Luteolin, *Kickxia lanigera* bitkisinin EA fazından saflaştırılmıştır. Bu amaç için ekstre, sefadeks kolonuna tatbik edildi ve düşük bir sabit akış hızı ile (yaklaşık 4-5 sn de bir damla) sefadeks kolonundan elüe edildi. Fraksiyonlar 5 ml olarak toplandı ve izolasyon çalışması sonucunda 9-11 aralığındaki fraksiyondan birleştirildi. Çöken katı $CHCl_3$ ve

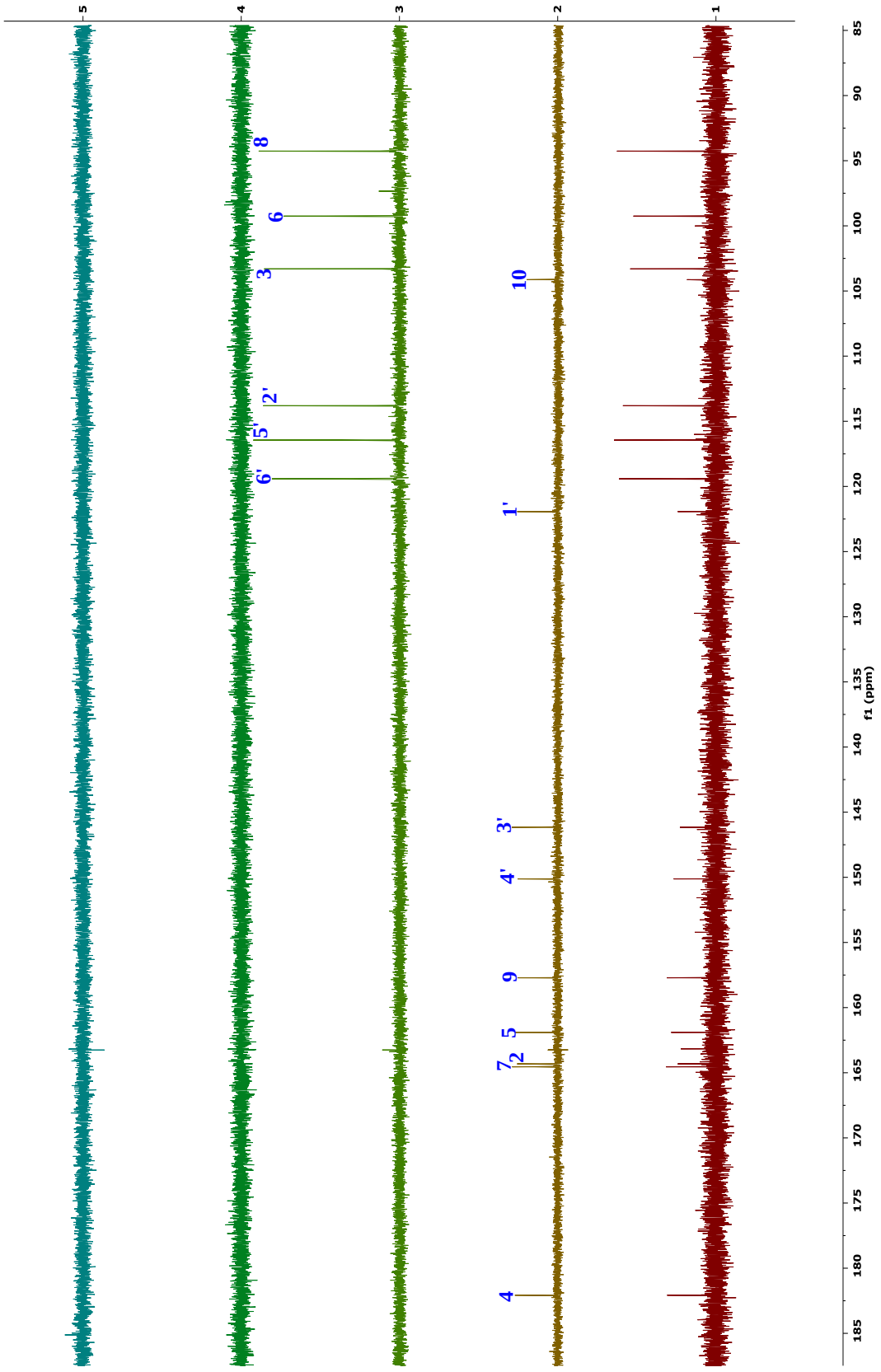
aseton ile yıkama ve tekrarlanan santrifüjleme işlemlerinden sonra MeOH ile çöktürme teknikleri işlemlerinden sonra sarı katı olarak saflaştırıldı.



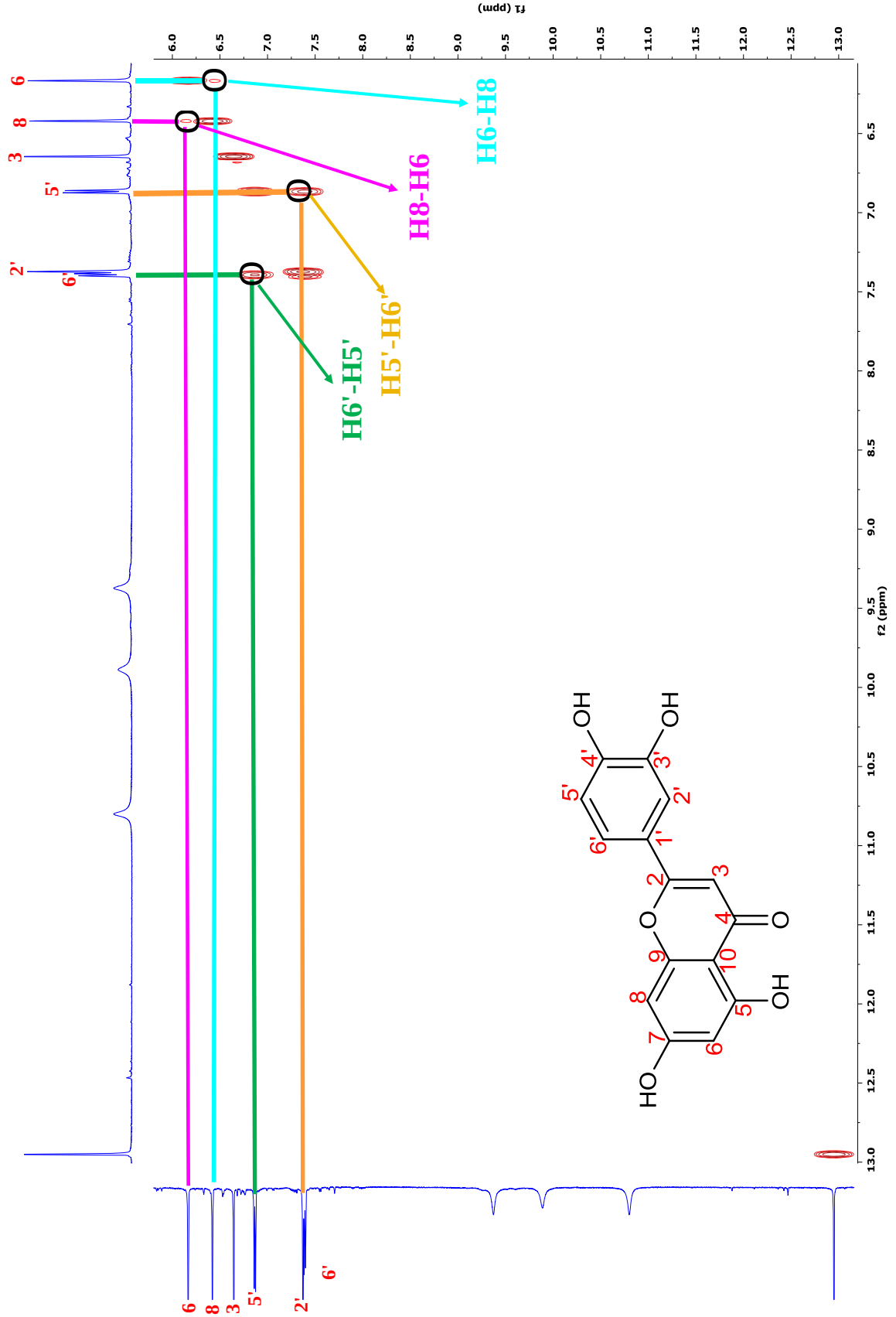
Şekil 4. 88 Luteolin'in ^{1}H-NMR spektrumu



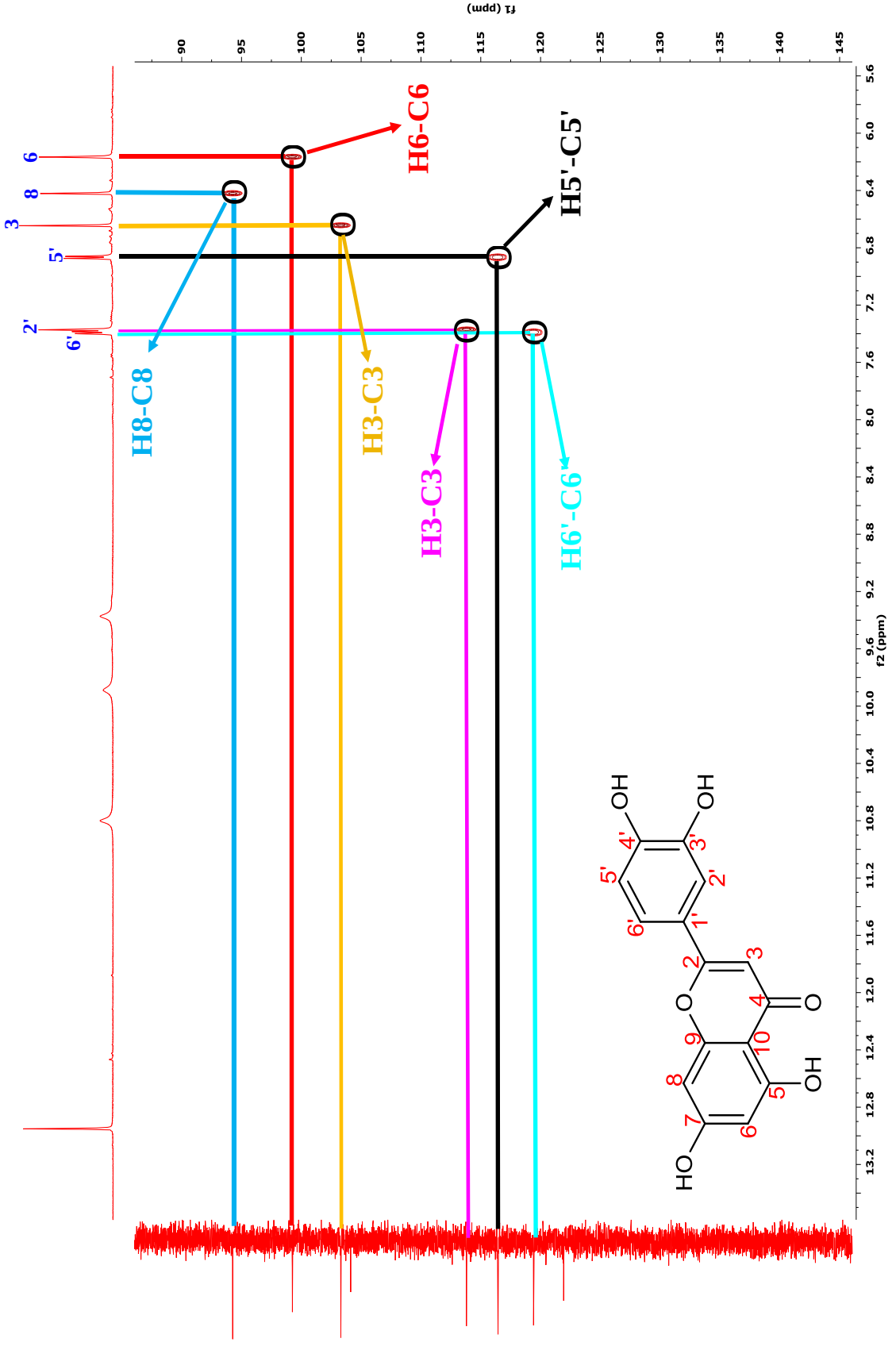
Şekil 4. 89 Luteolin'in ^{13}C-NMR spektrumu



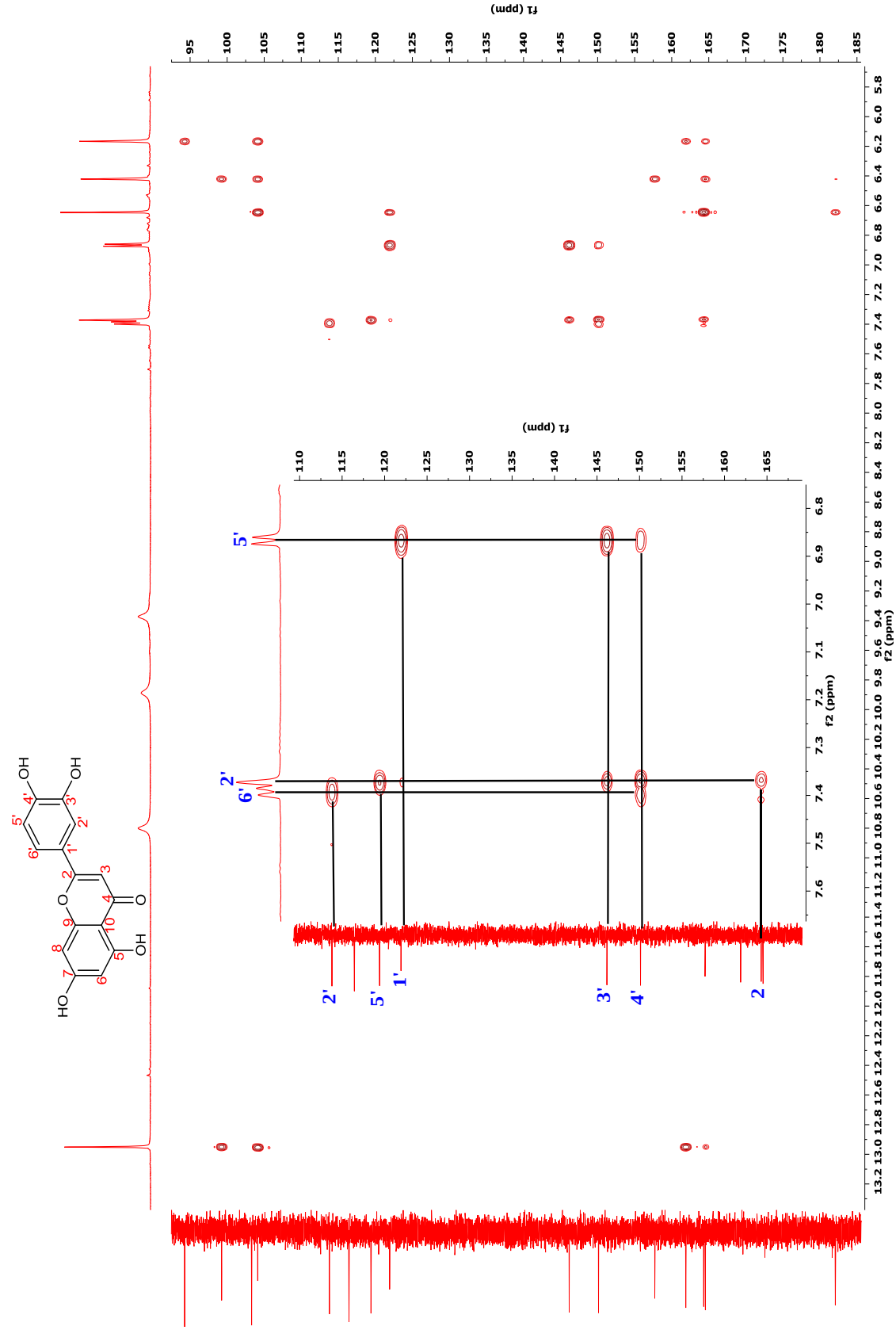
Şekil 4. 90 Luteolin'in DEPT spektrumu



Şekil 4. 91 Luteolin'in COSY spektrumu



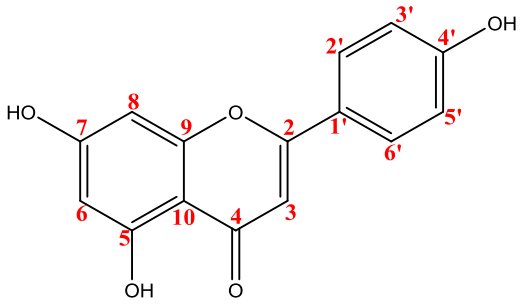
Şekil 4. 92 Luteolin'in HSQC spektrumu



Şekil 4. 93 Luteolin'in HMBC spektrumu

Luteolin ile Jaceosidin ve yeni bileşiğin B halkaları ile aynı olduğundan; bu iki bileşiğin ^{1}H ve ^{13}C-NMR spektrumlarındaki kimyasal kayma değerleri ile birebir örtüşmektedir. ^{1}H-NMR spektrumundaki 12.95 ppm'deki molekül için H bağı yapmış karakteristik OH protonu piki (12.95 ppm), moleküller arası H bağı yaparak yayvan pik olarak görünen OH protonu pikleri (10.80, 9.89 ve 9.37 ppm), *meta* pozisyonunda bulunan (6.17 ve 6.42 ppm) H6 ve H8 protonları yayvan multiplet pik, komşu protonu olmayan H3 (6.65 ppm) protonu ise singlet olarak rezonans olmaktadır. 6.87 ppm'deki 8.37 Hz etkileşime sahip *dublet* pik, 6.87 ppm'deki protonlar etkileşen 7.40 ppm'deki protona ait pikin *dd* olması (ekstra küçük etkileşim içermesi), 7.40 ppm'deki protonun *meta* pozisyonunda başka bir proton ile etkileştiğini göstermektedir. Dolayısıyla 6.87, 7.39 ve 7.40 ppm'deki bu üç pik grubu B halkasında ABX sistemi olduğu göstermektedir. Birbiriyle meta pozisyonunda olan ^{1}H-NMR spektrumunda 6.87 ve 7.40 ppm'deki protonların, ^{13}C-NMR spektrumundaki 164.32 ppm'deki C2 karbonuyla etkileşmesinden dolayı; bu protonların 2' ve 6' pozisyonunda olduğunu, H-6' protonuyla *orto* etkileşen 7.39 ppm'deki protonun ise 5' pozisyonunda olduğunu göstermektedir.

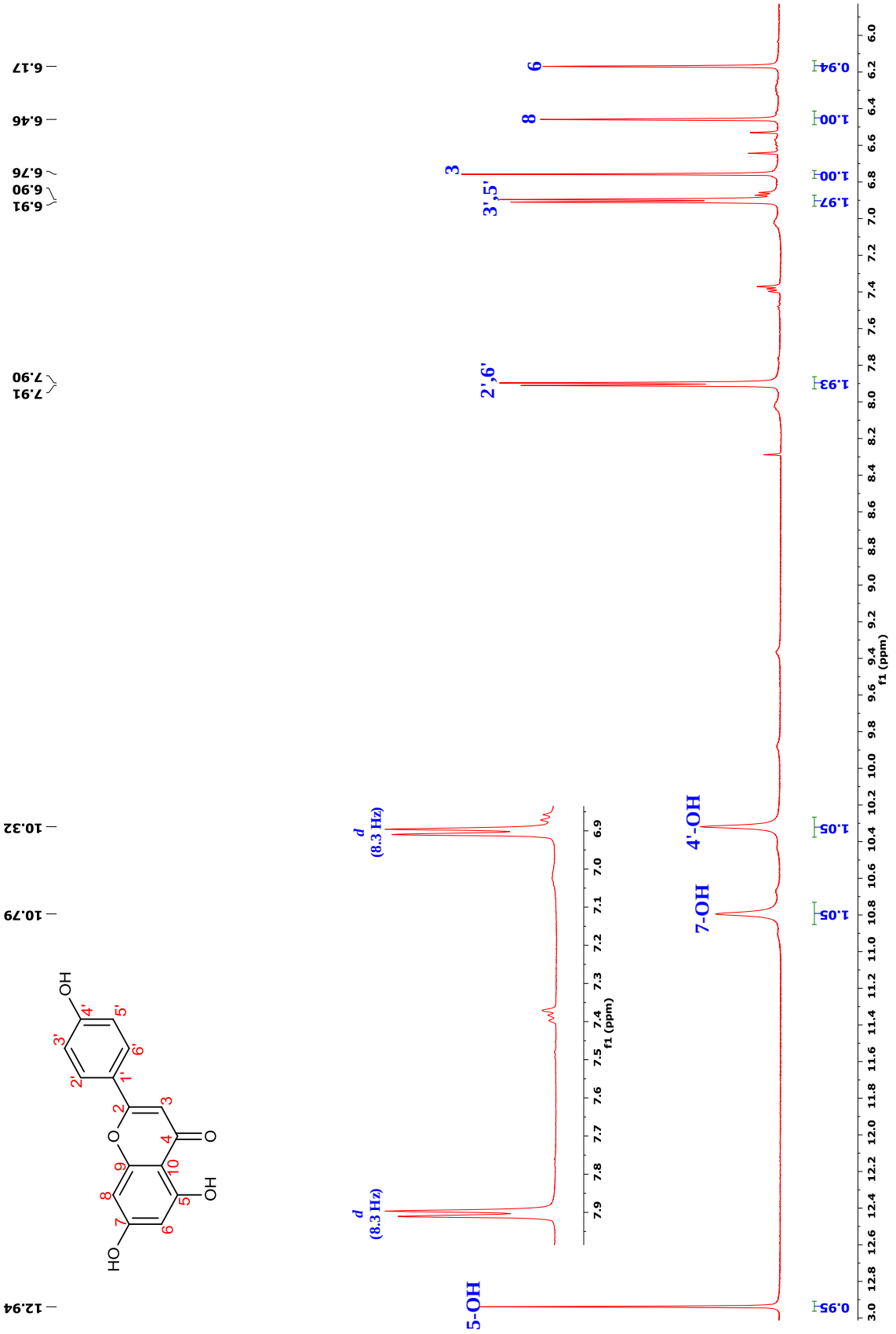
Apigenin (EAS2)



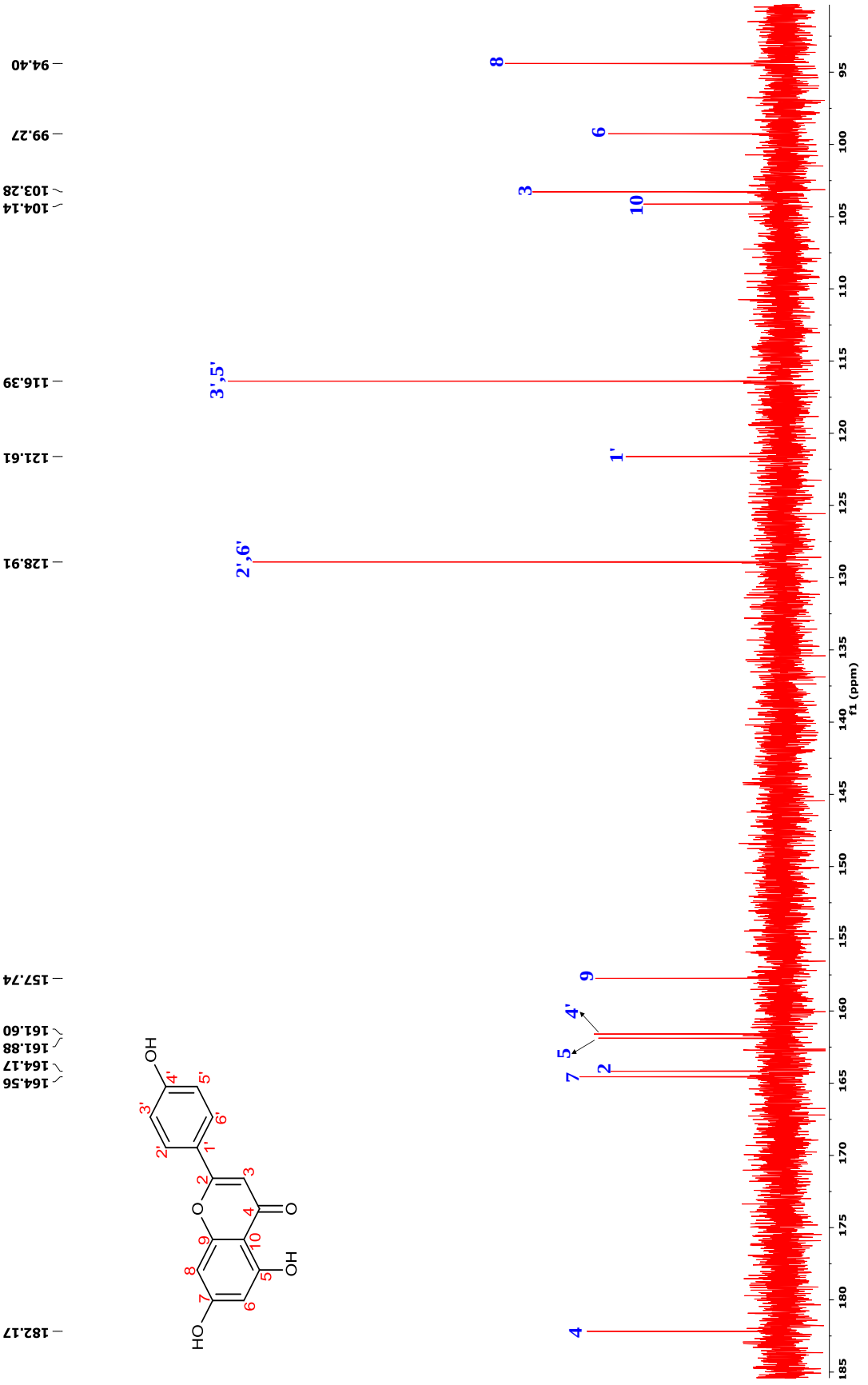
Şekil 4. 94 Apigenin'in kimyasal yapısı

^{1}H-NMR (600 MHz, DMSO-d6): δ 12.95 (1H,*s*, 5-OH), 7.90 (2H,*d*, *J*= 8.4 Hz, H-2', 6'), 6.90 (2H,*d*, *J* = 8.4 Hz, H-3', 5'), 6.78 (1H,*s*, H-3), 6.48 (1H, *d*, *J*= 2.1 Hz, H-8), 6.19 (d, *J* = 2.1 Hz, 1 H, H-6).

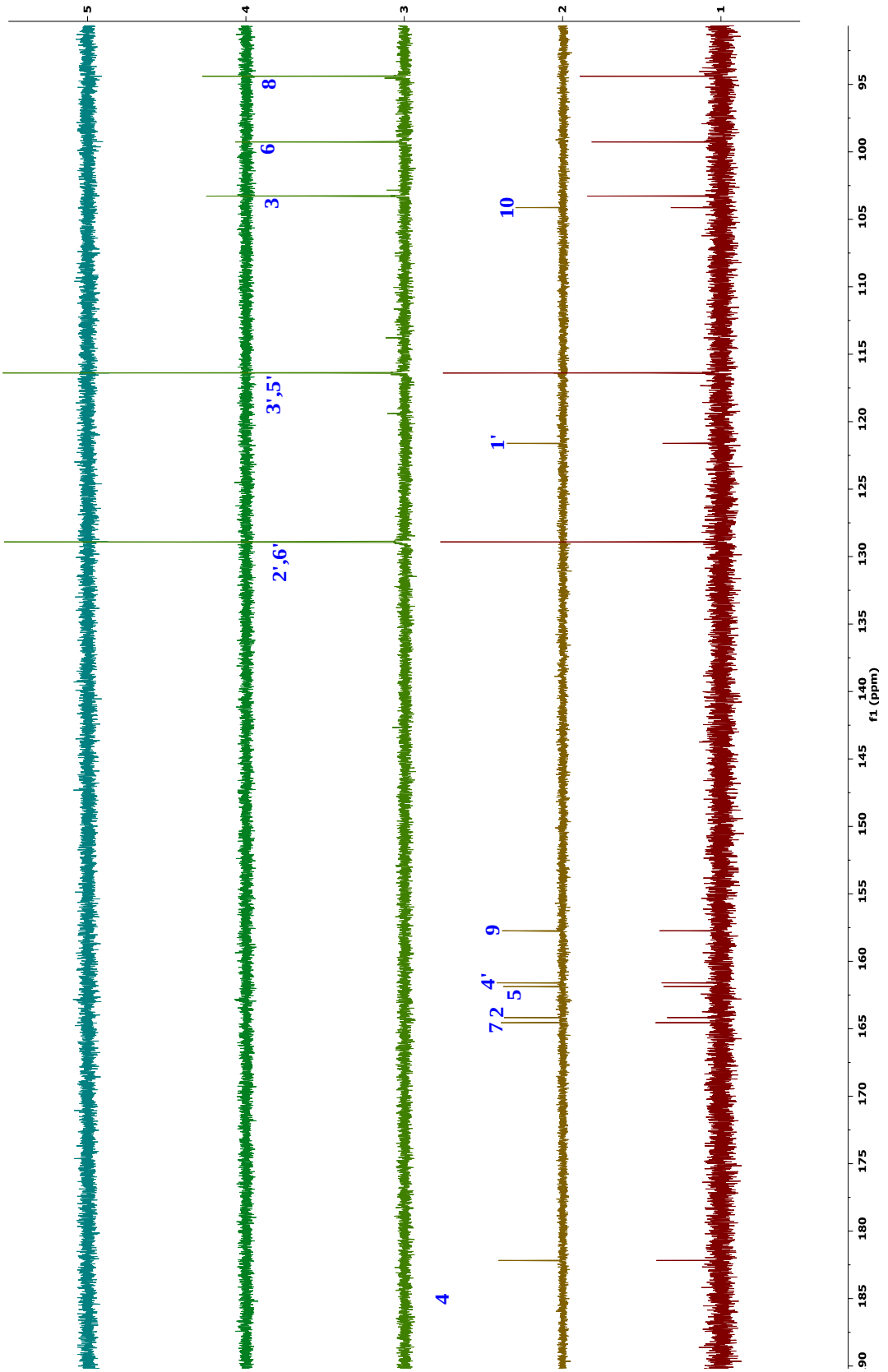
^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d6): δ 181.75 (C-4), 164.29 (C-7), 163.72 (C-2), 161.46 (C-5), 161.20 (C4'), 157.33 (C-9), 128.48 (C-2', 6'), 121.17 (C-1'), 115.97 (C-3', 5'), 103.65 (C-10), 102.82 (C-3), 98.87 (C-6), 93.99 (C-8) (Alwahsh *et al.* 2015).



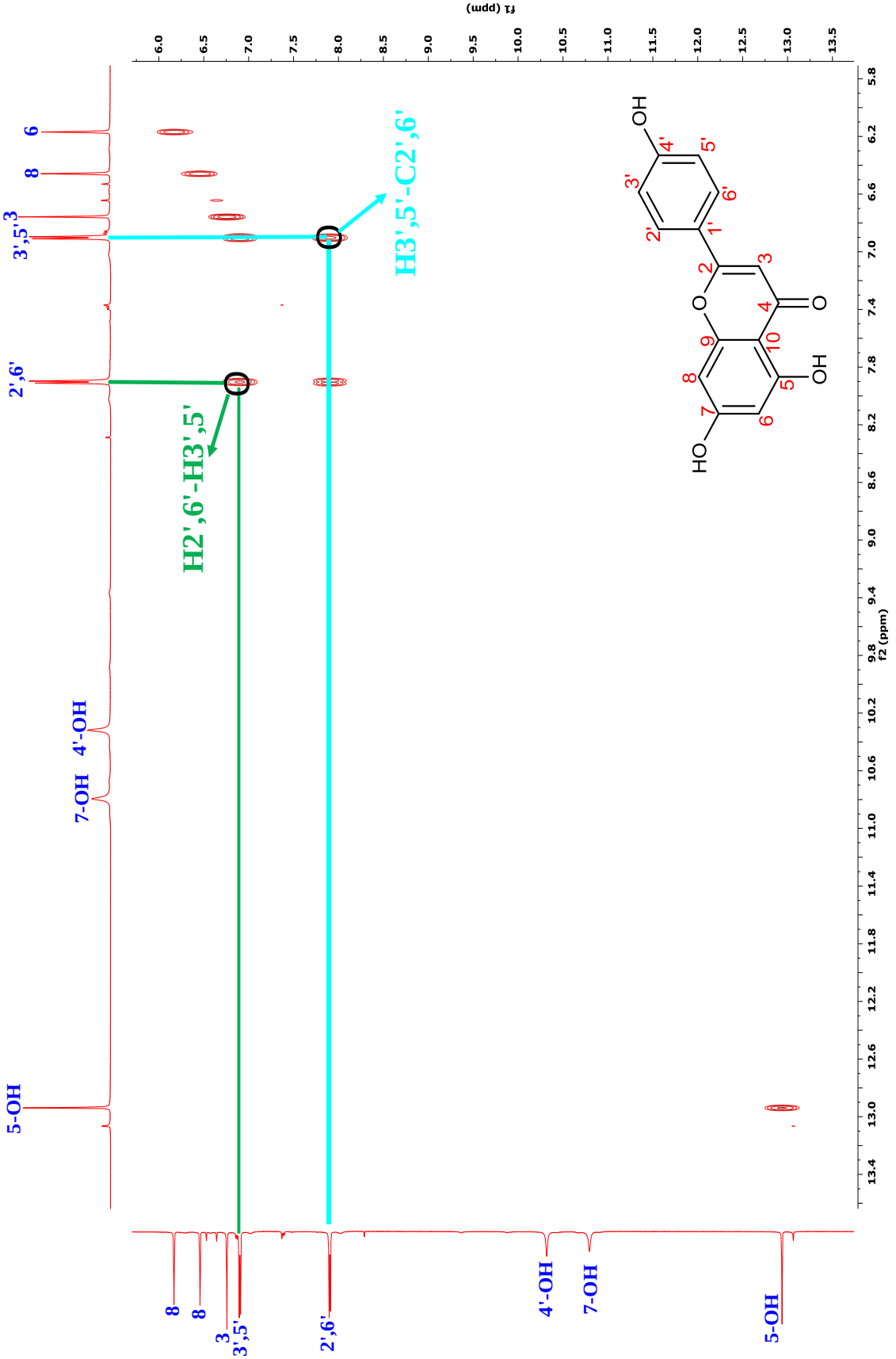
Şekil 4. 95 Apigenin'in ^{1}H-NMR spektrumu



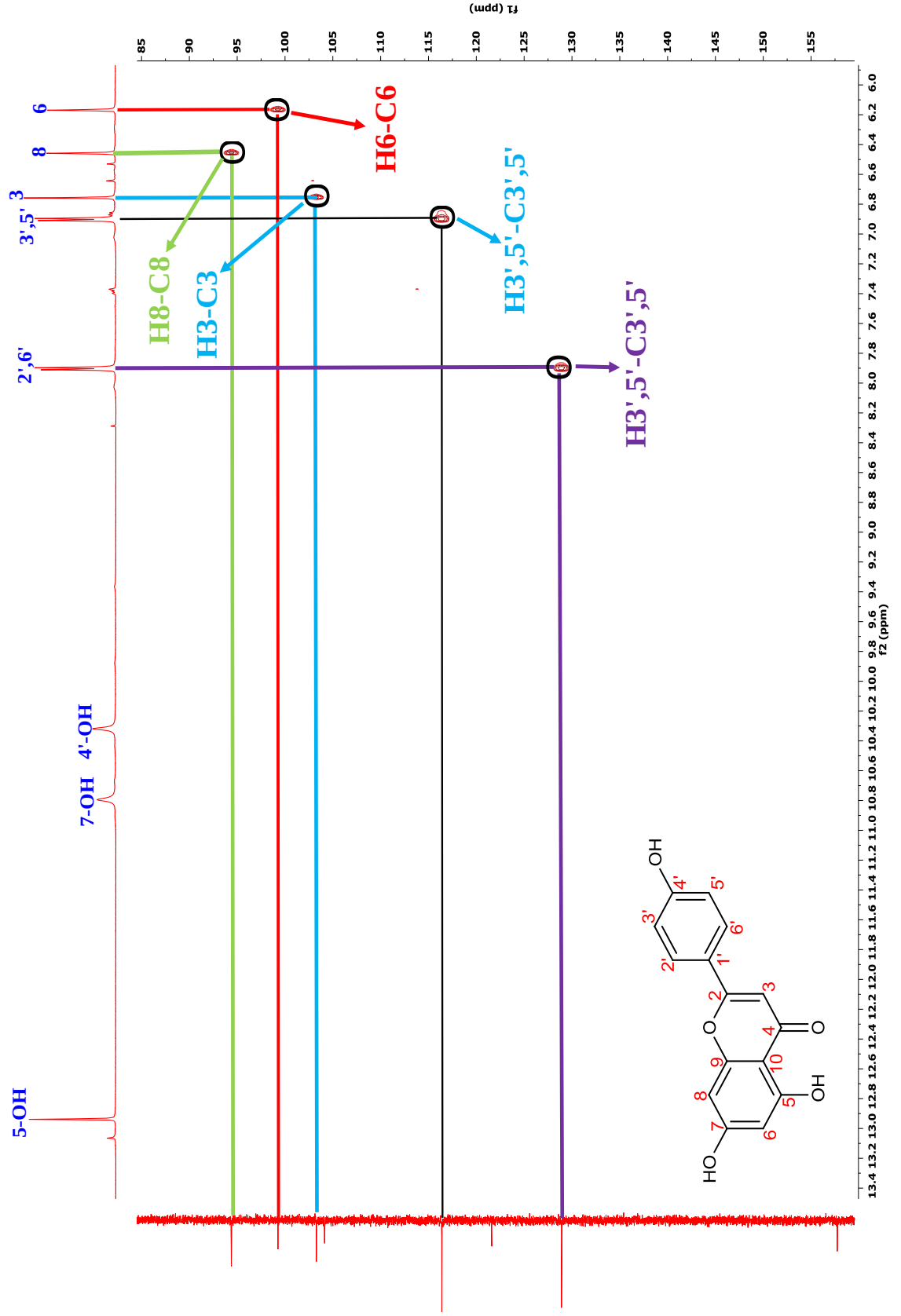
Şekil 4. 96 Apigenin'in ^{13}C-NMR spektrumu



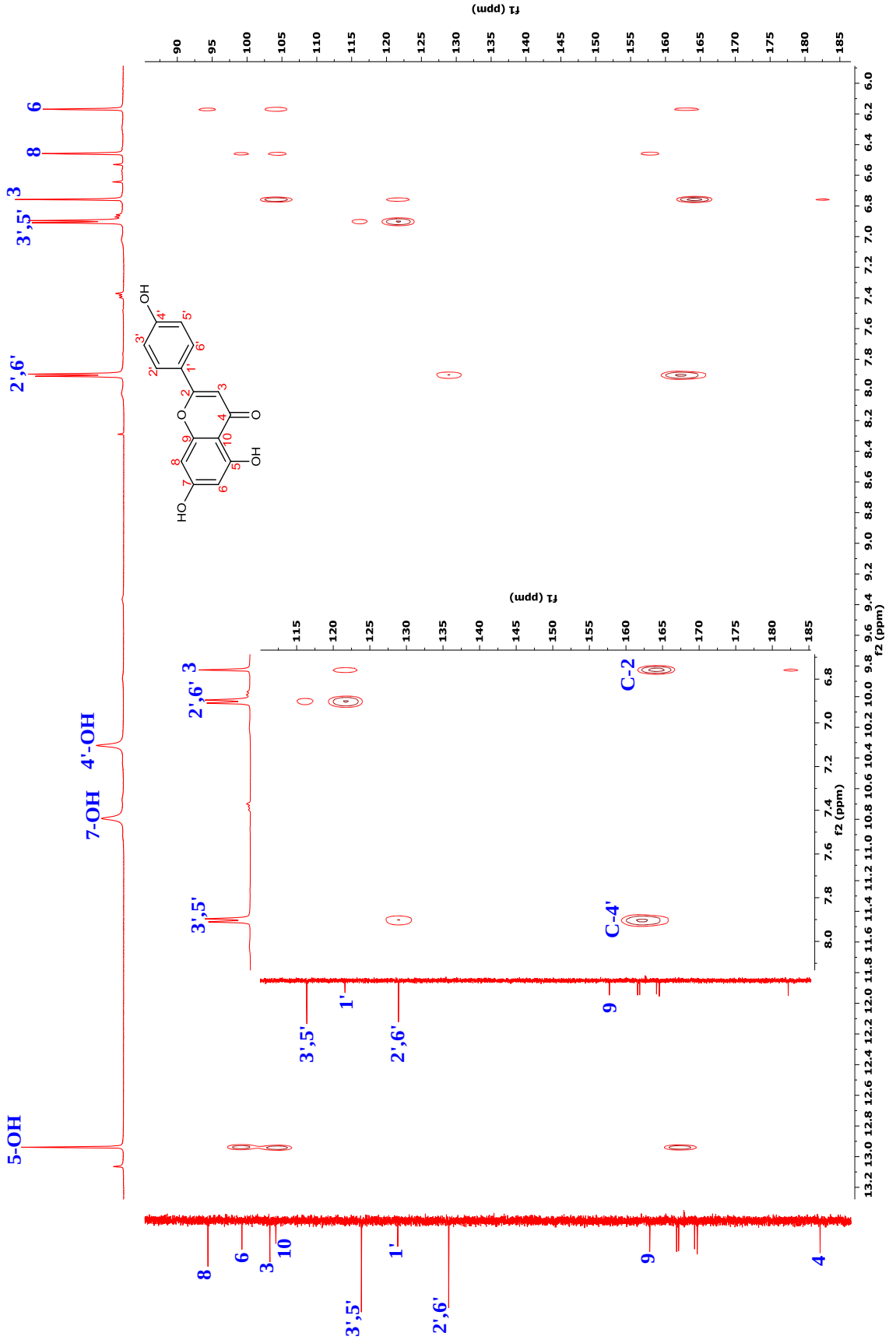
Şekil 4. 97 Apigenin'in DEPT spektrumu



Şekil 4. 98 Apigenin'in COSY spektrumu



Şekil 4. 99 Apigenin'in HSQC spektrumu



Şekil 4. 100 Apigenin'in HMBC spektrumu

Apigenin, uygulanan sefadeks kolonundan elüe edilen 12-16 fraksiyon aralığından MeOH ile kristallendirme işlemi ile saflaştırılmıştır.

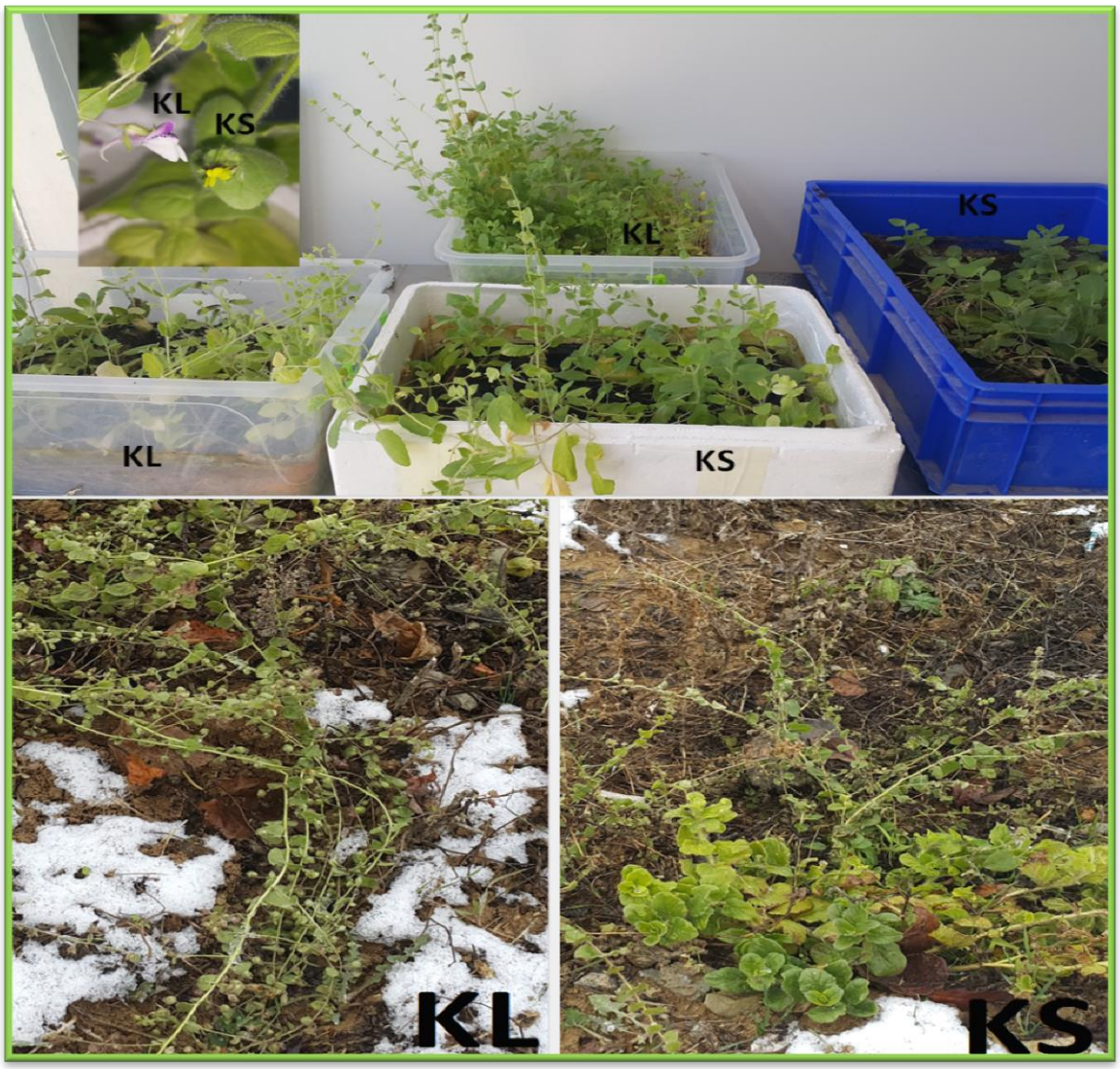
Apigenin kimyasal yapısı itibariyle daha basit NMR spektrumlarına sahip olduğu görülmektedir. HMBC spektrumunda karbonil karbonu (C4) ile etkileşen ve 1H-NMR spektrumundaki 6.76 ppm'deki singlet pik H3 protonuna, COSY spektrumunda etkileşen ve 1H-NMR spektrumunda 2.1 Hz'lik etkileşime giren 6.17 ve 6.46 ppm'deki pikler H6 ve H8 protonlarına aittir. Son olarak da ^{1}H-NMR spektrumunda integrasyonu 2 olan ve 8.4 Hz'lik *orto* etkileşmesi olması 2 dubletin varlığı, B halkasının 4' pozisyonunda OH varlığını göstermektedir.

4.7. Bitkilerin Kültüre Edilmesi

Bitki ekstrelerinin ve ekstrelerden izole edilen biyoaktif bileşiklerin aktivite testlerinde yeterli düzeyde olabilmesi için, bu proje kapsamında, Elazığ ilinin Baskil ilçesinden toplanan bitkilerin *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* bitkilerinden elde edilen tohumlara, özel çimlendirme toprakları kullanılarak laboratuvar koşullarında ve ÇKÜ kampüs arazisinde kültüre etme işlemi uygulandı. Tohumlardan kültüre etme çalışmaları sonucunda çiçekleri sırasıyla mor menekşe ve sarı renkli olan (Şekil 4.36) *Kickxia lanigera* ve *Kickxia spuria* bitkileri başarıyla kültüre edilmiştir. Koşulların birbirine benzer olması için her iki toprak kaynağına mümkün olduğunca benzer yoğunlukta tohum ekilmeye özen gösterilmiştir. Ekilen tohum başına filizlenen bitki sayısı bakımından bariz bir farklılık olduğu ve laboratuvar koşullarında daha iyi sonuç elde edildiği Şekil 4.35'de görülmektedir. Fakat arazideki bitkilerin (özellikle *Kickxia spuria*) daha kalın sap ve yaprak yapısında olduğu ve daha çok sayıda (özellikle *Kickxia lanigera*) çiçek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu bitkinin oldukça yayılmacı (istilacı) karakter gösterdiği belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak laboratuvar koşullarında bitkinin yayılması için gerekli toprak yüzeyinin olmaması düşünüldüğünden, davranışlarının gözlenmesi için bu kökler (ılıman koşullarda bitki köklerine zarar vermeden) arazi koşullarına transfer edildi ve birkaç gün içerisinde köklerin canlılığını kaybettiği gözlendi. Ayrıca davranışları incelemek amacıyla laboratuvar koşullarına yetişen bitkiler 1-2 gün arazi koşullarına çıkarıldığında, yeterince sulama yapılsa da bitkilerin

güneşli havada canlılığını kaybettiği ve bariz bir şekilde solduğu, aynı koşullardaki ekstra sulama yapılmayan (yağmurla sulanan) arazide yetiştirilen bitkilerin güneşten etkilenmediği gözlenmiştir. Bu son iki gözlem; laboratuvar koşullarına adapte olan bitkilerin, aşırı sıcak ve nispeten daha serin hava koşullarına adapte olamadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada ayrıca laboratuvar ve arazi koşullarında kültüre edilen bitkilerden az da olsa yeni tohumlar elde edilmiştir. Böylece aynı yöntem ile yapılacak çalışmalarda daha fazla bitki materyali edilmesi mümkün olacaktır.



Şekil 4. 101 Bitkilerin laboratuvar ve arazi koşullarında kültüre edilmesi

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

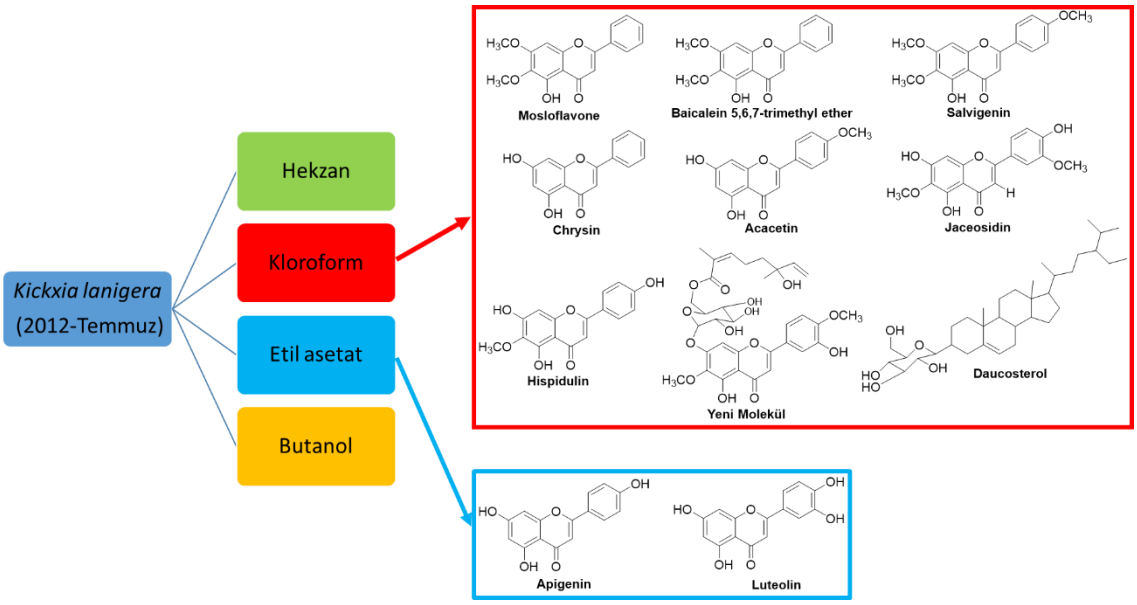
İnsan vücudunda psikolojik ve biyokimyasal süreçler sonucunda kanserojen özellikteki serbest radikaller üretilmektedir. Bu radikal bileşiklerin neden olduğu olumsuz durumlar; sadece insan vücudunda değil, aynı zamanda gıda ürünlerinde oksidasyona, bozunmaya ve mikrobiyal reaksiyonlara sebep olarak ekonomik kayba yol açmaktadır.

Bitkiler bu negatif sonuçları önleyebilecek biyoaktif bileşiklerin ana kaynağı olduğundan dolayı büyük öneme sahiptir. Bu hayati öneme sahip olması neticesinde dünya nüfusunun yaklaşık % 60-80'i, yaygın hastalıkların tedavisi için tıbbi bitki ve bitkisel kökenli ürünleri tercih etmektedir. Bu tercih ile birlikte sentetik ürünlerin olumsuz yan etkileri nedeniyle, modern tıpta kullanılan ilaçlardaki bitkisel kökenli aktif bileşiklerin keşfi için yapılan çalışmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Ayrıca gelişmekte olan bilim ve yeni tekniklerin keşfi bu çalışmalara oldukça olumlu katkılar sağlamaktadır.

Bitkiler kendi bünyelerinde terpen, alkaloid, fenolik vb. gibi bileşik sınıflarına ait çok çeşitli bileşikler bulundururlar. Bu durumda biyoaktif olduğu tespit edilen bir bitki ekstresindeki bütün maddeler, bu aktiviteye sahip olduğu anlamına gelmez. Bunun yanında biyoaktif olmayan ekstrelerde bile çok aktif özellikte olan bileşikler bulunma ihtimali vardır. Dolayısıyla bitkilerin biyolojik aktivitelerini ham ekstre bazında incelemek ve bu sonuca göre değerlendirme yapmak çok doğru bir yaklaşım değildir. Bitki ekstrelerinin taranması, biyoaktivite yönlendirmeli fraksiyonlandırma, aktif bitki bileşenlerinin izole edilmesi ve tanımlanması gibi seri halinde yapılan çalışmalar, bitkisel kökenli yeni ürünlerin keşfi için yapılan en başarılı yöntemlerden biri olarak kabul edilmektedir (Chermenskaya *et al.* 2012).

Bu çalışmada *Kickxia lanigera* bitkisinin hekzan, kloroform, etil asetat ve bütanol ekstrelerinin kimyasal içerikleri analiz edilmiş, antioksidan ve antiproliferatif aktiviteleri incelenmiş ve testler sonucunda özellikle kloroform ekstresinin aktif olduğu tespit edilmiştir. Kloroform ekstresinin yüksek aktivitesine etki eden bileşiklerin

yapılarını aydınlatmak amacıyla saflaştırılma işlemine bu ekstreden başlanmıştır. Saflaştırma işlemleri sonucunda 1'i steroid (Daucosterol), 1'i yeni bileşik olmak üzere 7 bilinen (Mosloflavon, Baicalein 5,6,7-trimethyl ether, Salvigenin, Chrysin, Acacetin, Jaceosidin, Hispidulin) toplam 8 flavon bileşik saflaştırılmıştır. Bunun yanında ekstreler için de antioksidan ve antiproliferatif aktivitesinde genel olarak 2. yüksek aktiviteye sahip olan EA ekstre için de saflaştırma işlemi uygulanmış ve Luteolin ve Apigenin diye bilinen iki farklı bileşik daha saflaştırılmıştır.



Şekil 5. 1 Saflaştırma şeması

Literatürde 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone olarak bilinen Mosloflavon bileşiğinin ilginç nadir bulunan bir doğal ürün olduğu, *Mosla soochowensis*, *Popowia cauliflora* ve *Actinocarya tibetica* (Singh *et al.* 2013) bitkilerinden izole edildiği ve anti-enflamatuar bileşiklerin geliştirilmesi için öncü bir bileşik olarak önerildiği rapor edilmiştir (Hassan *et al.* 2019).



Şekil 5. 2 *Mosla soochowensis* (URL-10) ve *Popowia cauliflora* (URL-11) bitkileri

Choi ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, Mosloflavon'un viral protein ekspresyonunu inhibe ederek EV71'e karşı antiviral aktiviteye sahip olduğunu ve dolayısıyla EV71 tedavisi için antiviral ilaç adayları olarak kabul edilebileceği ileri sürülmektedir (Choi *et al.* 2016). Yapılan diğer bir çalışmada ise *C. eleyense* (iplik kurdu) üzerine mosloflavon'un *in vitro, in vivo* ve *in silico* olarak yapılan incelemeler sonucunda bileşiğin bakteriyel enfeksiyonu kontrol altına aldığını ve potansiyel bir antienfektif ajan olduğu önerilmiştir (Hnamte *et al.* 2019).

Lombardo ve arkadaşları tarafından yapılan *in vivo* çalışmada (Lombardo *et al.* 2013), kimyasal yapısı bakımından benzer olan Mosloflavon, negletin, baicalein ve 5,6-dihydroxyflavone bileşiklerinin kümen hidroperoksite maruz kalan THP-1 veya L-6 hücrelerine karşı hücre içi antioksidan kapasiteleri incelenmiş, testler sonucunda metoksi grubu içermeyen baicalein ve 5,6-dihydroxyflavone bileşiklerinin metoksi grubu içeren negletin ve Mosloflavon bileşiklerden daha aktif olduğu, bu etkinin ise metoksili bileşiklerin genellikle daha yavaş metabolize olmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada *in vitro* koşullarında ise bu bileşiklerin DPPH radikali giderme aktivitesi incelenmiş, *in vivo* koşullarında aktif olan 5,6-dihydroxyflavone ve baicalein bileşiklerin yanı sıra inaktif olan negletein bileşiğinin de *in vitro* koşullarında aktif olduğu, Mosloflavon bileşiğinin ise aktif olmadığı tespit edilmiştir. Popoola ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (Popoola *et al.* 2015) Güney Afrika'dan toplanan *Helichrysum teretifolium* bitkisinden saflaştırılan Mosloflavon bileşiğinin 5-dihydroxy-4-keto yapısı sayesinde anti-tyrosinase aktivitesinin yüksek olduğu, C2-C4

atomları arasında bulunan α-β doymamış sistemi sayesinde lipit peroksidasyonunu yüksek oranda inhibe ettiği rapor edilmiştir.



Şekil 5. 3 *Helichrysum teretifolium* bitkisi (URL-12)

Baicalein 5,6,7-trimethyl ether bileşiğinin literatürde umut verici bir flavon olduğu, *Zeyhera tuberculosa* (Kutney and Hanssen 1971), *Callicarpa japonica* (Hosozawa *et al.* 1972) ve *Kickxia lanigera* (Pinar 1973) bitkilerinden saflaştırıldığı rapor edilmiştir.



Şekil 5. 4 *Zeyhera tuberculosa* (URL-13) ve *Callicarpa japonica* bitkileri (URL-14)

Son yapılan çalışmalar sonucunda; bileşiğin NF-κB aktivasyonunun baskılanması ve ardından proenflamatuar aracılar için kodlayan genlerin ekspresyonunun azaltılması yoluyla RAW 264.7 makrofajlarında proenflamatuar aracıların üretimini inhibe ettiği bulunmuştur (Rim *et al.* 2013). Hayashia ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Baicalein 5,6,7-trimethyl ether bileşiğinin herpes simpleks virüsü tip 1 (HSV-1), insan sitomegalovirüsü ve poliovirüs üzerinde yüksek inhibitör etki gösterdiği belirlenmiştir (Hayashi *et al.* 1997). Ayrıca Baicalein 5,6,7-trimethyl ether bileşiği üzerine Alzheimer (Liao *et al.* 2015) hastalığı tedavisi, potansiyel p38-alpha MAPK inhibitörü ve sitotoksik ajanı dizaynında yapısal model olarak kullanılmıştır.

Salvigenin, *Artemisia* cinsi türleri arasında bol miktarda bulunan, alfa-amilaz ve alfa-glukozidaza karşı belirgin önleyici aktivite de dâhil olmak üzere tıbbi önemi ile iyi bilinen biyoaktif doğal bir flavondur (Olennikov *et al.* 2018). Bu bileşiğin antioksidan ve antikanser (Nageen *et al.* 2018), antienflamatuar ve analjezik (Mansourabadi *et al.* 2015), (Nageen *et al.* 2018) ve nöroprotektif özellik (Sapkota *et al.* 2017) olmak üzere çok çeşitli farmakolojik özelliklere sahip olduğu ve Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanabileceği (Rafatian *et al.* 2012) literatürlerde yer almaktadır. Başka bir çalışmada tümör taşıyan sıçanlar üzerine Salvigenin'in antitümör ve immünomodülatör etkileri incelenmiş, yapılan çalışmalar sonucunda bileşiğin tümör büyüme oranını azalttığı, olası bir antitümör aktivitesinin, bağışıklık yanıtlarının modülasyonuna dâhil olmasından kaynaklanabileceği, antitümör aktivitesini iyileştirmek için daha fazla çalışma yapılabileceği ve yeni bir immünoterapi formunun antitümör gücünü büyük ölçüde artırabileceği rapor edilmiştir (Nagao *et al.* 2002; Androutsopoulos *et al.* 2008). Özellikle kanser araştırmalarında çok çeşitli fitokimyasal aktiviteye sahip salvigenin, melanom, rahim, mide adenokarsinomu ve kolon kanseri gibi farklı hücresel kanser modellerinde antiproliferatif, antienflamatuar ve sitotoksik etkilere sahip olduğu bulunmuştur.

Chrysin, mavi çarkıfelek bitkileri (*Oroxylum indicum, Passiflora incarnata* ve *Passiflora caerulea*), *Scutellaria baicalensis*, mantar, arı propolis ve bal dâhil olmak üzere çeşitli meyve ve sebzelerde bol bulunan bir fitokimyasaldır ve ilk basamağı Fenilalanin'in Sinnamik asid'e dönüştürülmesi olan bir dizi enzimatik reaksiyonla

sentezlenir (Mani and Natesan 2018). Genel olarak; antioksidan, anti-enflamatuar, antikanser ve antiviral aktiviteler dâhil olmak üzere birçok biyolojik aktivite ve farmakolojik etkiye sahiptir. Ayrıca, chrysin'in biyoyararlanımı (bir ilacın alınması sonrası etkinleşmesi için gereken süre) üzerine birçok çalışma bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bileşiğin tehlikeli biyoyararlanımı ve gelişmiş protein stabilitesi sayesinde, chrysin katı lipit nanoparçacık (SLN) sentezini, proteolitik bozulmayı ve ilaç iletiminin sürekli salımını önlediği belirlenmiştir. Chrysin'in etki mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için araştırmacılar, Chrysin'in kenetlenme hesaplama yöntemi ile yapısal bağlanma ilişkisini araştırmaktadırlar (Renuka and Natesan 2017).

Literatürde "linarigenin" olarak da bilinen acacetin (5,7-dihydroxy-4′-methoxyflavone); bitki kaynaklı bir flavonoid, son zamanlarda, in vitro nöroprotektif, kardiyoprotektif, anti-aging, antikanser ve antimikrobiyal özellikler dâhil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri nedeniyle dünya çapında dikkat çekmiştir (Zhou *et al.* 2014). Acacetin'in monoamin oksidaz B (Han *et al.* 1987), insan topoizomeraz-I (Boege *et al.* 1996), glutatyon redüktaz (Liao *et al.* 1999), siklo-oksijenaz (COX) I/II (Liao *et al.* 1999), asetilkolinesteraz (Lim *et al.* 2007), aromataz (Zhao *et al.* 2008), aldoz redüktaz (Manivannan *et al.* 2015) ve ksantin oksidaz (Rauf *et al.* 2016) dâhil olmak üzere birçok önemli enzimi inhibe ettiği bildirilmiştir.

Birkaç farmakolojik çalışma, acacetin molekülünün viral hastalıkların, enflamatuar durumların, oksidatif stres, toksik reaksiyonlar (Pan *et al.* 2005; Kim *et al.* 2015) sıtma ve hücre çoğalmasının tedavisinde potansiyel rolünü doğrulamıştır. Bu biyoaktif flavonun, *Carthamus tinctorius* L. (Roh *et al.* 2004), *Tanacetum sinaicum* (Fresen.) Delile, K.Bremer & Humphries (Marzouk *et al.* 2016a), *Chrozophora tinctoria* (L.) Raf. (Marzouk *et al.* 2016b), *Wissadula periplocifolia* (L.) C.Presl (Teles *et al.* 2015), *Agastache mexicana* (Kunth) Lint & Epling (Flores-Flores *et al.* 2016) ve *Turnera diffusa* dâhil olmak üzere çeşitli bitkilerin önemli bir bileşeni olduğu bildirilmiştir. Aktif bileşen olarak tek başına, diğer bileşikler veya bitki özleri ile birleşim halinde acacetin içeren çeşitli ürünler sağlık takviyeleri olarak mevcuttur.



Şekil 5. 5 Acacetin ihtiva eden bazı bitki türleri (URL-15-20)

Jaceosidin (4',5,7-Trihydroxy-3',6-dimethoxyflavone), antiülser, antialerjik, antidiyabetik, antimutajenik, antiproliferatif, antienflamatuar, antioksidatif ve antikanser aktiviteleri dâhil olmak üzere geniş spektrumlu farmakolojik aktiviteleri nedeniyle büyük ilgi görmektedir. (Yoon *et al.* 2011) . Yapılan incelemeler sonucunda jaceosidin'in hücre döngüsünü bozarak apoptozu indüklediğini, ayrıca mitokondriyal membran potansiyelini değiştirerek apoptozu indüklediğini (Han *et al.* 2018) ve insan yumurtalık kanseri hücrelerinde mitokondriyal yollar yoluyla apoptozu indüklediğini kanıtlamıştır (Lv *et al.* 2008). Bu bileşik *Kickxia* türü ile aynı ailede bulunan *Plantago hakusanensis* bitki türünden de saflaştırılmıştır (Murai *et al.* 2008).



Şekil 5. 6 *Plantago hakusanensis* bitkisi (URL-21)

Hispidulin (4',5,7-trihidroksi-6-metoksiflavon) doğal bir bileşiktir (Merfort 1984; Yin *et al.* 2008) ve *Petasites* (kabalak), *Artemisia* (pelin otu) ve *Salvia* (adaçayı) gibi bazı yenilebilir ve şifalı bitkilerde bulunur (Patel and Patel 2017). Bu bileşiğin sağlığa etkileri ile ilgili çalışmalar az olsa da (Patel and Patel 2017), antienflamasyon, antifungal, antiepileptik, antihipnotik ve antiosteoklastogenez (Tan *et al.* 1999; Atif *et al.* 2015; Lin *et al.* 2015). Ek olarak, hispidülin'in lösemi ve hepatoblastoma hücrelerinde apoptozu indüklemesi ve ksenograft fare modellerinde anjiyogenezi baskılayarak tümör büyümesinin inhibisyonu gibi etkileri olduğu rapor edilmektedir. (Qi *et al.* 2011)

Daucosterol; doğal bir fitosterol benzeri bir bileşiktir ve *Panax japonicus* var. major ve *Breynia fruticosa*'dan izole edilmiştir. Literatürde lyoniside, sitogluside, alexandrin, coriandrinol, daucosterin, *beta*-sitosterol glucoside ve eleutheroside A olarak da bilinmektedir. Yapılan bir çalışmada (Esmaeili and Farimani 2014) Daucosterol'ün MCF-7 hücreleri üzerindeki etkileri incelenmiş, Daucosterol'ün apoptozu indükleyerek hücre proliferasyonunu inhibe ettiği ve bundan dolayı da çalışmadaki bulguların Daucosterol'ün MCF-7 hücrelerinde yeni farmakolojik tedavi stratejilerden birisi olarak kabul etme olasılığını destekleyen öncü deneysel kanıtlar sağladığı rapor edilmiştir.

Yapılan çalışmalarda Daucosterol molekülünün, *Artemisia apiaceae*'nin önemli terapötik etkiden sorumlu bir fitosterol olduğu ve antiosteoartritik, antianjiyojenik gibi farmakolojik etkilere sahip olduğu rapor edilmiştir (Zhao *et al.* 2015). Daucosterol'ün, insan meme kanseri hücre hattı MCF-7, mide kanseri hücre hattı MGC803, BGC823 ve AGS'nin çoğalmasını doza bağlı olarak inhibe ettiği, ICR farelerinde sıçangil hepatom H22 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiği bulunmuştur. Başka bir çalışmada daucosterol'ün, hücre içi reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu ve otofajiyi indüklerken apoptotik hücre ölümüne neden olmadığını, ROS'a bağlı otofajiyi indükleyerek kanser hücresi çoğalmasını inhibe ettiği, bunun sonucu olarak güçlü bir anti-kanser ajanı olarak geliştirilebileceği rapor edilmiştir (Zhao *et al.* 2015).

Birçok bitki ve gıdada en önemli flavonlardan biri olarak bulunan Luteolin (3′,4′,5,7-tetrahidroksiflavon) antioksidan, anti enflamatuar, antiviral, antitümör gibi özelliklerinden dolayı klinik tıpta ve birçok hastalık modelinde yaygın olarak kullanılmıştır (Havsteen 2002). Bu nedenle, luteolin kesin olarak belirlenmesi ilaç kalite kontrolü ve biyokimyasal araştırmalar için çok önemlidir. Birçok çalışma Luteolin'in hem in vitro hem de in vivo nöroprotektif etkiler uyguladığını göstermiştir. (Xu *et al.* 2014; Caltagirone *et al.* 2016; Kwon 2017; Luo *et al.* 2019). Luteolin'in kimyasal yapısı dikkate değer tıbbi ve güçlü bir antioksidan moleküldür. Bileşiğin antioksidan özellikleri, öncelikle flavonoid yapılarındaki en aktif kısım olan B halkasındaki 3′,4′-dihidroksi yapısına bağlanmaktadır (Ahmadi *et al.* 2020). Bileşiğin C halkasındaki 1,4-pyrone kısmı ile C2-C3 arasındaki çift bağının konjugasyonu, A,B ve C halkaları boyunca eşleşmemiş elektronlarının delokalizasyonuna izin verir ve bu sayede daha kararlı fenoksi radikali oluşmasına yol açmaktadır (Maestri *et al.* 2006).

Flavonoid bileşikleri arasında apigenin (4′,5,7-trihidroksiflavon) bitki âlemi içinde en yaygın olanlardan ve en çok çalışılan fenoliklerden biridir. Apigenin esas olarak sebzelerde (maydanoz, kereviz, soğan) meyvelerde (portakal), bitkilerde (papatya, kekik, kekik, fesleğen) ve bitki bazlı içeceklerde önemli miktarda glikosile olarak bulunur. Apigenin ayrıca kan-beyin bariyerini geçebilir ve p38 ve JNK'nin inhibisyonu

yoluyla BV-2 ve primer mikroglial hücreler üzerinde anti-enflamatuar etkiler sergilediği gösterilmiştir. Apigenin, nöronları enflamatuar streslere karşı koruyarak nöronal apoptozu önlemektedir (Balez *et al.* 2016). Apigenin'in, meme, prostat, deri, akciğer ve yumurtalık kanserleri gibi birkaç kanser hastalığında antimetastatik etkisi olduğu bildirilmiştir (Lindenmeyer *et al.* 2001; Liu *et al.* 2005; Hu *et al.* 2008; Mirzoeva *et al.* 2008; Hwang *et al.* 2011; Balez *et al.* 2016). Apigenin önemli bir antioksidan kapasiteye sahip olduğu tespit edilmiştir ve sağlığa yararlı ve farmakolojik etkilerinin antioksidan aktivitelerinden kaynaklandığı bilinmektedir (Jung 2014).

KL bitkisinden saflaştırılan bileşikler ile ilgili yukarıda yer verilen çok az sayıdaki literatür çalışmaları incelendiğinde, $CHCl_3$ ekstresinden saflaştırılan bileşiklerin antioksidan aktivitelerinin düşük olduğu görülmektedir. Bununla beraber çok sayıda yapılan çalışmada ise bu bileşiklerin antikanser, antiviral ve antimikrobiyal gibi aktivitelerinin oldukça yüksek olduğu ve ilaç dizaynında kullanıldıkları tespit edilmiştir.

KL bitkisinin EA fazından saflaştırılan bileşikler ise metoksi grubu içermediği (Apigenin ve Luteolin), bunun yerine polihidroksi grubu içerdiği görülmektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda $CHCl_3$ ekstresinden saflaştırılan bileşiklerin aksine apigenin ve luteloin'in antioksidan aktivitesinin de oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir. Bunun ise apigenin ve luteolin bileşiklerin fenoksi radikallerinin yapısından dolayı oldukça kararlı olması ve bunun bir sonucu olarak yüksek kapasitede serbest radikalleri gidermesinden kaynaklandığı belirtilmektedir.

Bu çalışma kapsamında yapılan ekstraksiyon işlemi sonucunda hekzan, $CHCl_3$, EA ve BuOH ekstrelerinin toplam miktarları göz önünde alındığında verim %11,97 olarak bulunmuştur.

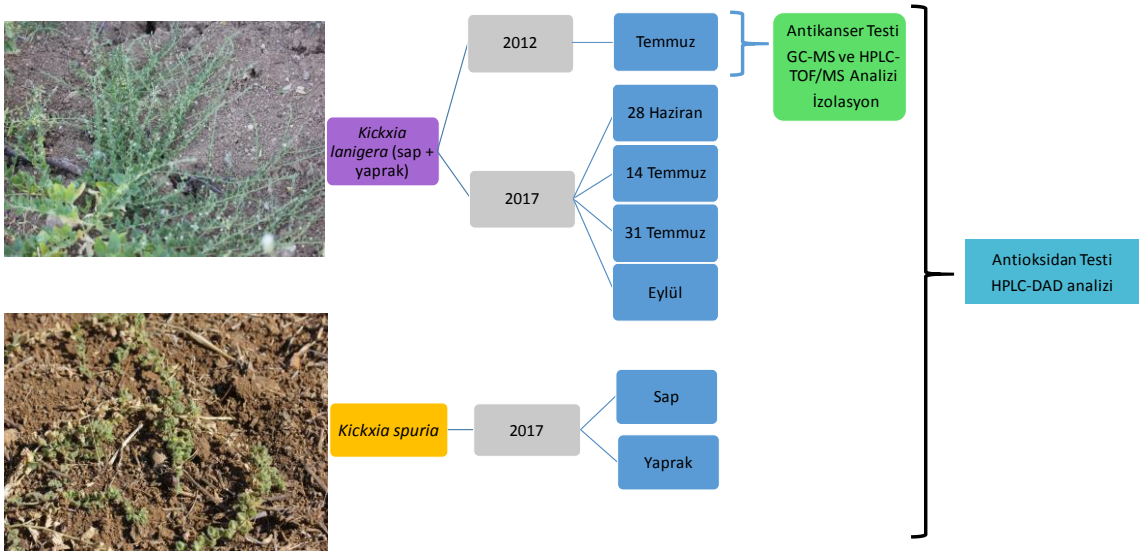
KL ekstrelerindeki aktivite farklılıklarının kaynağını incelemek amacıyla GC-MS ve HPLC-TOF/MS cihazları ile kimyasal içerikleri incelenmiştir. GC-MS analiz sonucunda; hekzan ve $CHCl_3$ ekstrelerinin yüksek oranda yağ asidi olduğu (sırasıyla % 65,60 ve % 93,72), doymuş yağ asidi ve hidrokarbon oranının hekzan fazında daha

fazla, doymamış yağ asidi ve hidrokarbon oranının ise $CHCl_3$ ekstresinde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca ekstre verimlerine göre $CHCl_3$ ekstresinin (14g) hekzan ekstresinden (6g) iki katından daha fazla bir verime sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3.4). Bunun nedeni olarak $CHCl_3$ çözücüsünün klor atomları sayesinde hem hücre duvarını parçalaması hem de polaritesinin çok daha yüksek olması gibi etkenlerin ekstraksiyon veriminin artmasında rol oynadığı söylenebilir. Bu verim farklılığı ekstraksiyon metodu seçiminde önemli bir faktör olsa da, bitkiden apolar karakterli maddeleri uzaklaştırılması açısından hekzanın kullanılması da mevcut çalışmada saflaştırma işlemi için önemli bir katkı sağlamıştır.

Yapılan GC-MS analizleri sonucunda hekzan ekstresinin ana bileşenlerinin oleik asit (%19,76), palmitik asit (%19,08), $CHCl_3$ ekstresinin ise linoleik asit (%38,13), oleik asit (%34,08) ve palmitik asit (%13,79) olduğu belirlenmiştir. Bu oranlara göre doymamış yağ asidine göre polaritesi daha düşük olan doymuş yağ asidinin polaritesi $CHCl_3$ çözücüsüne göre daha apolar olan hekzan çözücüsünü ekstresinde daha yüksek olduğu görülmektedir. Ayrıca hidrokarbon oranları açısından da hekzan (% 26.5) $CHCl_3$ (1.86) ekstresinden çok daha zengin olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1).

Farklı çözücü ekstrelerin kimyasal içerikleri incelenmesi için, KL bitki ekstrelerinin HPLC-TOF/MS analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçlarına göre; etil asetat ekstresinin apigetrin, hesperidin ve *p*-kumarik asit bakımından zengin olduğu, $CHCl_3$ ve özellikle bütanol ekstrelerinde fenolik bileşiklerin sayısı ve oranı bakımından az olduğu belirlenmiştir. Ancak bu sonuçlar $CHCl_3$ ve BuOH ekstrelerinde madde olmadığı anlamına gelmemektedir (Şekil 4.1, Şekil 4.2). Ekstrelerin kantitatif analizler ile kalitatif analizler sonuçları dikkate alındığında (ayrıca ekstrelerin NMR spektrumları), çözücü ile ekstre içeriğinin polaritelerinin benzerlik gösterdiği görülmektedir. Bu sonuçlara göre ekstrelere ön işlem yapılmasının ekstraksiyon yönteminin saflaştırma işlemlerine pozitif katkı sağlayacağını söylenebilir.

Yüzeysel bir çalışma olarak varsayılan HPLC-UV analizleri sonucunda ise hasat döneminin değişmesi ile bitkilerin fotokimyasal içeriğini ve oranlarının az da olsa değiştiği, fakat genel olarak ekstrelerin benzer içeriklere sahip olduğu tespit edilmiştir. Antioksidan aktivite testlerinde sonuçlar; hasat dönemi ile aktivite arasında karışık bir ilişkiye sahip olduğunu gösterse de, ekstrelerin H_2O_2 giderme ve indirgeme gücü testlerinde farklı aktivite göstermesi dikkat çekici bir sonuçtur. KL ekstreleri kendi arasında karşılaştırıldığında ise; antikanser aktivitelerde en aktif olan $CHCl_3$ ekstresinin H_2O_2 ve DPPH radikali giderme aktivitelerinde en iyi, toplam antioksidan aktivite testinde en düşük aktiviteye sahip olduğu tespit edilmiştir. $CHCl_3$ ekstresinin özellikle antiproliferatif aktivitesinin olmak üzere antioksidan aktivitesinin yüksek olması; saflaştırılan bileşikler ve HPLC, NMR gibi spektroskopik analizlerde varlığı kanıtlanan polimetoksiflavon ve diğer fenolikler ile GC-MS analizlerinde tespit edilen yüksek orandaki doymamış yağ asidi içeriğinden (Bodkowski *et al.* 2014; Nengroo and Rauf 2019) kaynaklandığı söylenebilir.

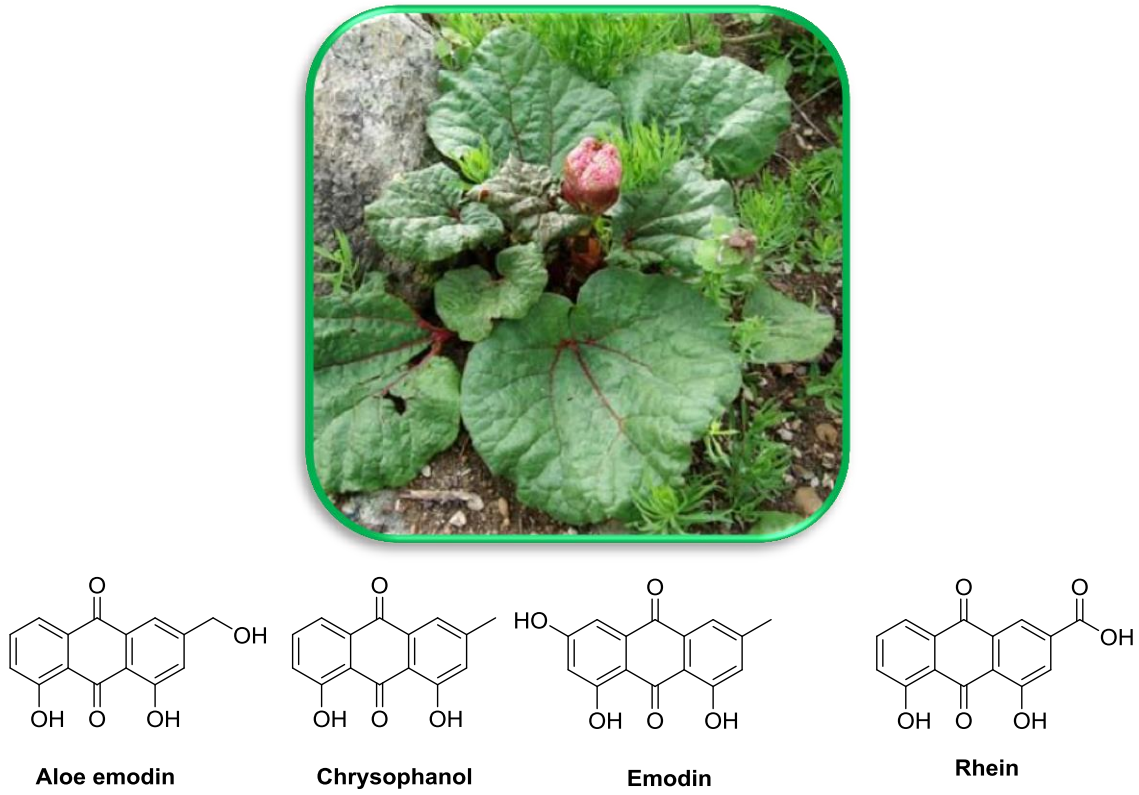


Şekil 5. 7 Bitki ekstrelerinin fitokimyasal analiz ve aktivite şeması

KL bitkisinin $CHCl_3$ ekstresinden saflaştırılan 5,6,7-baicaleintrimetil ether, Salvigenin, Chrysin, Daucosterol, Hispidulin ve yeni bileşiğin antioksidan aktiviteleri incelenmiştir. Testler sonucunda diğer bitki örneklerinde olduğu gibi, H_2O_2 giderme aktivitesinin standartlardan daha yüksek, toplam antioksidan, indirgeme gücü ve DPPH giderme

aktivitelerinin ise daha düşük olduğu belirlenmiştir. Saflaştırılan bileşikler kendi aralarında karşılaştırıldığında ise toplam antioksidan ve H_2O_2 giderme aktivitelerinde chrysin, indirgeme gücü ve DPPH radikali giderme aktivitelerinde ise Mosloflavon bileşiğinin en aktif olduğu belirlenmiştir. Yeni bileşiğin toplam antioksidan aktivite, indirgeme gücü ve DPPH• giderme aktiviteleri düşük iken H_2O_2 giderme aktivitesi ise chrysin hariç diğer bütün örneklerden ve standartlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen ilginç bir sonuç ise Mosloflavon'un toplam antioksidan testinde en düşük DPPH testinde ise en yüksek aktiviteye, daucosterol gibi fenolik olmayan bir bileşiğin (steroid) özellikle DPPH testinde diğer flavonlara göre daha aktif olması ilgi çekici bir durumdur. Sonuçlardaki bir ilginç seyir, bu çalışmanın benzeri olan literatürdeki pek çok çalışmada da karşılaşılan bir durumdur. Son olarak da saflaştırılan bileşikler ve bu bileşikleri ihtiva eden KL bitkisinin $CHCl_3$ ekstresi (KLCH) karşılaştırıldığında, KLCH ekstresinin özellikle DPPH radikali giderme aktivitesinin bileşiklerden belirgin olarak daha aktif, diğer antioksidan testlerde birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda DPPH testinde saflaştırılan bileşiklerin sinerjik etkisi ile KLCH ekstresinin saf bileşiklerden daha aktif olmasını sağladığı ileri sürülebilir.

Himalayalar'dan toplanan *Rheum emodi* Wall. Ex. Meissen bitkisi üzerine yapılan bir çalışmada (Bhatia *et al.*) kuzeybatı %80 su-metanol çözücü ekstresinin ve bu ekstreden elde edilen hekzan, kloroform, etil asetat ve bütanol fraksiyonlarının antimutajenik potansiyel incelenmiştir. Testler sonucunda % 80 su-MeOH ekstresinin güçlü antimutajenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Etil asetat ekstresinin antimutajenik aktiviteden sorumlu bileşiklerin tespiti amacıyla yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda 4 antrakinon (aloe-emodin, chrysophanol, emodin ve rhein) bileşiğinin etil asetat ekstresinden daha düşük aktiviteye sahip olduğu, dolayısıyla ana bileşenlerin ekstrede sinerjik etki gösterdiği belirlenmiştir.



Şekil 5. 8 *Rheum emodi* bitkisi (URL-22) ve saflaştırılan bileşikler

NMR spektrumunda ve HPLC-TOF/MS kromatogramında bariz olarak görünen metabolitleri içeren BuOH ekstresi H_2O_2 ve DPPH testlerinde yüksek aktivite gösterse de, bu bileşiklerin antiproliferatif aktiviteye katkıda bulunmadıkları belirlenmiştir. Etil asetat ve hekzan ekstrelerinin dikkate değer bir aktivitesinin olması (hatta 5-FU standardına yakın aktivite gösterdiği), EA ekstresindeki fenoliklerden, hekzan fazındaki yüksek oranda yağ asidi bileşenlerden (oleik asit, linoleik asit) kaynaklandığı ileri sürülebilir (Zakaria *et al.* 2011; Mericli *et al.* 2017). $CHCl_3$ ekstresi ise diğer ekstrelerden ve standart olarak kullanılan 5-FU'dan çok daha yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun nedeni olarak ise hem hekzan hem de EA ekstresinde bulunan yağ asidi ve fenolikleri de ihtiva etmesinden kaynaklanabilir. Ayrıca literatürde polimetoksiflavonların hidroksillenmesinin aktiviteyi artırdığına yönelik elde edilen sonuçlar (Li *et al.* 2007) ile bu çalışmada saflaştırılan bileşikler ve ekstrenin NMR spektrumu göz önünde bulundurulduğunda, $CHCl_3$ ekstresinin yüksek aktiviteye sahip olması şaşırtıcı bir sonuç olmadığını göstermektedir.

Saflaştırılan bileşiklerin yapıları incelendiğinde bitkinin OH ve OCH_3 grupları içeren birçok flavon iskeletine sahip bileşik içerdiği ve daha hassas saflaştırma teknikleriyle (kültüre etme tekniğinden yararlanarak) bitkiden çok daha değişik bileşiklerin saflaştırılabileceği anlaşılmaktadır. Bu sayede saflaştırılan ve saflaştırılacak flavon serisi ile (literatürlerde de var olan çalışmalarda olduğu gibi) fonksiyonel grupların içeriği, sayısı ve pozisyonu gibi parametrelerin biyolojik aktiviteye etkisi incelenecektir

Sonuç olarak aktivite değerleri, saflaştırılan bileşiklerin yapısı ve kantitatif/kalitatif analiz verileri göz önünde bulundurulduğunda, saflaştırılan ve muhtemel saflaştırılamayan diğer flavon bileşiklerin $CHCl_3$ ekstresinin yüksek antioksidan ve antiproliferatif aktiveye sahip olmasına katkıda bulunduğu söylenebilir. KL bitkisinin ham ekstrelerinin (KL072012, KL28062017 vb. gibi) hekzan, $CHCl_3$, EA ve BuOH ekstrelerinden daha yüksek aktiviteye sahip olmasında, olası sinerjik etkiyle açıklanabilir.

Mevcut çalışmadan sonraki hedefler ise kültüre etme yönteminden yararlanılarak daha fazla bitki materyali elde etmek, bu sayede miktarı çok az olduğu için saflaştırılması mümkün olmayan bileşikleri mevcut ve güncel kromatografik metotlar ile izole etmek, saflaştırılan bileşiklerin ise miktarını artırarak biyolojik aktivitelerini (antikanser, antioksidan, antimikrobiyal vb.) *in vitro* ve *in vivo* koşullarında test etmek olacaktır. Bu çalışmada yapılan saflaştırma teknikleri sonucunda; literatürde yer alan *Kickxia* ait birçok çalışmada saflaştırılan ve biyolojik aktivitesi yüksek olan iridoid bileşiklere rastlanmamıştır. Bunun için ekstraksiyon ve saflaştırma teknikleri revize edilerek literatüre olası yeni biyoaktif iridoid glikozitleri (Tundis *et al.* 2008). kazandırmak amaçlanmaktadır.

KAYNAKLAR

Agelet, A. and Vallès, J. 2001. Studies on pharmaceutical ethnobotany in the region of Pallars (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). Part I. General results and new or very rare medicinal plants. Journal of Ethnopharmacology, 77, (1); 57-70.

Ahmadi, S.M., Farhoosh, R., Sharif, A. and Rezaie, M. 2020. Structure- Antioxidant Activity Relationships of Luteolin and Catechin. Journal of Food Science, 85, (2)

Ajmal Ali, M. 2018. Inclusion of *Kickxia abhaica* D.A. Sutton in the genus *Nanorrhinum* (Plantaginaceae): Evidence from its nuclear ribosomal DNA sequences. Bangladesh Journal of Plant Taxonomy, 25, (2); 209-214.

Al Masoudi, L.M., Bukhari, N.A. and Al Wahibi, M. 2020. Pollen Morphological Study on Some Species of *Kickxia*, *Scrophularia* in Relation to *Plantago* from Saudi Arabia. Arabian Journal for Science and Engineering, 45, (1); 41-52.

Alwahsh, M., Khairuddean, M. and Chong, W. 2015. Chemical Constituents and Antioxidant Activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers. Records of Natural Products, 9 (1), 159-163.

Amin, A., Tuenter, E., Foubert, K., Iqbal, J., Cos, P., Maes, L., Exarchou, V., Apers, S. and Pieters, L. 2017. In vitro and in silico antidiabetic and antimicrobial evaluation of constituents from *Kickxia ramosissima* (*Nanorrhinum ramosissimum*). Frontiers in pharmacology, 8, 232.

Androutsopoulos, V., Arroo, R.R., Hall, J.F., Surichan, S. and Potter, G.A. 2008. Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism. Breast Cancer Research, 10, (3); R39.

Arslanian, R.L., Anderson, T. and Stermitz, F.R. 1990. Iridoid glucosides of *Penstemon ambiguus*. Journal of natural products, 53, (6); 1485-1489.

Atif, M., Ali, I., Hussain, A., Hyder, S.V., Niaz, B., Khan, F.A., Maalik, A. and Farooq, U. 2015. Pharmacological assessment of hispidulin–a natural bioactive flavone. Acta Poloniae Pharmaceutica, 72, (5); 829-842.

Balez, R., Steiner, N., Engel, M., Muñoz, S.S., Lum, J.S., Wu, Y., Wang, D., Vallotton, P., Sachdev, P. and O'Connor, M. 2016. Neuroprotective effects of apigenin against inflammation, neuronal excitability and apoptosis in an induced pluripotent stem cell model of Alzheimer's disease. Scientific reports, 6, 31450.

Beladjila, K.A., Berrehal, D., Kabouche, Z., Germanò, M.P., D'Angelo, V., De Tommasi, N., D'Andrea, F., Braca, A. and De Leo, M. 2019. Antiangiogenic Activity of Compounds Isolated from *Anarrhinum pedatum*. Journal of natural products, 82, (3); 510-519.

Bhatia, A., Arora, S., Nagpal, A. and Singh, B. Screening of rhizomes of *Rheum emodi* Wall. Ex. Meissen for antimutagenic potential employing Ames assay. The Nucleus, 1-11.

Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, (4617); 1199.

Bodkowski, R., Patkowska-Sokola, B., Filip-Psurska, B., Kempińska, K., Wietrzyk, J., Czyż, K., Walisiewicz-Niedbalska, W. and Usydus, Z. 2014. Evaluation of the anti-proliferative activity of natural lipid preparations against tumor cell lines. Journal of East Asian Studies, 13 (4), 257-266.

Boege, F., Straub, T., Kehr, A., Boesenberg, C., Christiansen, K., Andersen, A., Jakob, F. and Köhrle, J. 1996. Selected novel flavones inhibit the DNA binding or the DNA religation step of eukaryotic topoisomerase I. Journal of Biological Chemistry, 271, (4); 2262-2270.

Caltagirone, C., Cisari, C., Schievano, C., Di Paola, R., Cordaro, M., Bruschetta, G., Esposito, E., Cuzzocrea, S. and Group, S.S. 2016. Co-ultramicronized palmitoylethanolamide/luteolin in the treatment of cerebral ischemia: from rodent to man. Translational stroke research, 7, (1); 54-69.

Chermenskaya, T.D., Stepanycheva, E.A., Shchenikova, A.V., Savelieva, E.I. and Chakaeva, A.S. 2012. Insecticidal effects of *Ungernia severtzovii* bulb extracts against the grain aphid *Schizaphis graminum* (Rondani). Industrial Crops and Products, 36, (1); 122-126.

Choi, H., Song, H., Lee, J.S., Ko, H.-J. and Song, J.H. 2016. Inhibitory Effects of Norwogonin, Oroxylin A, and Mosloflavon on Enterovirus 71. Biomolecules & Therapeutics, 24, (5); 552-558

Demain, A.L. and Fang, A. (2000). The natural functions of secondary metabolites. In History of modern biotechnology I (Springer), pp. 1-39.

Esmaeili, M.A. and Farimani, M.M. 2014. Inactivation of PI3K/Akt pathway and upregulation of PTEN gene are involved in daucosterol, isolated from *Salvia sahendica*, induced apoptosis in human breast adenocarcinoma cells. South African Journal of Botany, 93, 37-47.

Farid, M.M., Marzouk, M.M., El-Shabrawy, M., Salem, M.A., Mounier, M.M. and Hussein, S.R. 2019. Isoscutellarein 8, 4′-Dimethyl ether glycosides as cytotoxic agents and chemotaxonomic markers in *Kickxia aegyptiaca*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 22, 101431.

Feng, X.S., Qu, Y., Wu, Z.H., Xu, L., Zhang, D.S., Gao, H.Y. and Wu, L.J. 2009. Two new secoiridoid glucosides from *Syringa velutina* Kom. Chinese Chemical Letters, 20, (6); 702-705.

Flores-Flores, A., Hernández-Abreu, O., Rios, M.Y., León-Rivera, I., Aguilar-Guadarrama, B., Castillo España, P., Perea Arango, I. and Estrada Soto, S. 2016. Vasorelaxant mode of action of dichloromethane-soluble extract from *Agastache mexicana* and its main bioactive compounds. Pharmaceutical biology, 54, (12); 2807-2813.

Gairola, S., Shabana, H.A., Mahmoud, T. and Santo, A. 2019. Seed germination of *Kickxia acerbiana*, a rare annual of the Arabian Desert. Seed Science and Technology, 47, (1); 53-58.

Guo, Z.Y., Li, P., Huang, W, Wang. J.J., Liu, Y.J., Liu, B., Wang, Y.L., Wu, S.B., Kennelly, E.J., Long, C.L. 2014. Antioxidant and anti-inflammatory caffeoyl phenylpropanoid and secoiridoid glycosides from *Jasminum nervosum* stems, a Chinese folk medicine. Phytochemistry, 106, 124-133.

Han, H.Y., Kim, H.J., Jeong, S.H., Kim, J., Jeong, S.H., Kim, G.C., Hwang, D.-S., Kim, U.K. and Ryu, M.H. 2018. The flavonoid Jaceosidin from *Artemisia princeps* induces apoptotic cell death and inhibits the Akt pathway in oral cancer cells. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, (12); 1-9

Han, Y.N., Noh, D.B. and Han, D.S. 1987. Studies on the monoamine oxidase inhibitors of medicinal plants I. Isolation of MAO-B inhibitors from *Chrysanthemum indicum*. Archives of Pharmacal Research, 10, (2); 142-147.

Handjieva, N., Tersieva, L., Popov, S. and Evstatieva, L. 1995. Two iridoid glucosides, 5-O-mentiafoloylkickxioside and kickxin, from *Kickxia* Dum. species. Phytochemistry, 39, (4); 925-927.

Hassan, A.H.E., Yoo, S.Y., Lee, K.W., Yoon, Y.M., Ryu, H.W., Jeong, Y., Shin, J.S., Kang, S.Y., Kim, S.Y., Lee, H.H., Park, B.Y., Lee, K.T. and Lee, Y.S. 2019. Repurposing Mosloflavon/5,6,7-trimethoxyflavone-resveratrol hybrids: Discovery of novel p38-α MAPK inhibitors as potent interceptors of macrophage-dependent production of proinflammatory mediators. European Journal of Medicinal Chemistry, 180, 253-267.

Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & therapeutics, 96, (2-3); 67-202.

Hayashi, K., Hayashi, T., Otsuka, H. and Takeda, Y. 1997. Antiviral activity of 5, 6, 7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 39, (6); 821-824.

Hnamte, S., Parasuraman, P., Ranganathan, S., Ampasala, D.R., Reddy, D., Kumavath, R.N., Suchiang, K., Mohanty, S.K. and Busi, S. 2019. Mosloflavon attenuates the quorum sensing controlled virulence phenotypes and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: *In vitro*, *in vivo* and *in silico* approach. Microbial Pathogenesis, 131, 128-134.

Hosozawa, S., Kato, N. and Munakata, K. 1972. 5,6,7-Trimethoxy flavone from Callicarpa japonica. Phytochemistry,

Hu, X.-W., Meng, D. and Fang, J. 2008. Apigenin inhibited migration and invasion of human ovarian cancer A2780 cells through focal adhesion kinase. Carcinogenesis, 29, (12); 2369-2376.

Huang, W.H., Chien, P.Y., Yang, C.H. and Lee, A.R. 2003. Novel synthesis of flavonoids of *scutellaria baicalensis* Georgi. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 51, (3); 339-340.

Huong, N.T.H., Cu, N.K.Q., Quy, T.V., Zidorn, C., Ganzera, M. and Stuppner, H. 2008. A new phenylpropanoid glycoside from Jasminum subtriplinerve Blume. Journal of Asian natural products research, 10, (11); 1035-1038.

Hwang, Y.P., Oh, K.N., Yun, H.J. and Jeong, H.G. 2011. The flavonoids apigenin and luteolin suppress ultraviolet A-induced matrix metalloproteinase-1 expression via MAPKs and AP-1-dependent signaling in HaCaT cells. Journal of dermatological science, 61, (1); 23-31.

Jan, S. and Khan, M.R. 2016. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory effects of *Kickxia ramosissima*. Journal of ethnopharmacology, 182, 90-100.

Jung, W.W. 2014. Protective effect of apigenin against oxidative stress-induced damage in osteoblastic cells. International journal of molecular medicine, 33, (5); 1327-1334.

Kim, C.D., Cha, J.D., Li, S. and Cha, I.H. 2015. The mechanism of acacetin-induced apoptosis on oral squamous cell carcinoma. Archives of oral biology, 60, (9); 1283-1298.

Kırmızıbekmez, H., Bassarello, C., Piacente, S. and Çalış, I. 2008. Phenylethyl glycosides from *Globularia alypum* growing in Turkey. Helvetica Chimica Acta, 91, (8); 1525-1532.

Kutney, J.P. and Hanssen, H.W. 1971. 5,6,7-Trimethoxyflavone and 5,6,7,8-tetramethoxyflavone from *Zeyhera tuberculosa*. Phytochemistry, 10, (12); 3298-3302.

Kwon, Y. 2017. Luteolin as a potential preventive and therapeutic candidate for Alzheimer's disease. Experimental gerontology, 95, 39-43.

Lee, S.J., Jang, H.J., Kim, Y., Oh, H.M., Lee, S., Jung, K., Kim, Y.H., Lee, W.S., Lee, S.W. and Rho, M.-C. 2016. Inhibitory effects of IL-6-induced STAT3 activation of bio-active compounds derived from *Salvia plebeia* R.Br. Process Biochemistry, 51, (12); 2222-2229.

Li, S., Lo, C.Y., Pan, M.H., Sergeev, I., Dushenkov, V. and Ho, C.T. 2007. The source and biological activity of hydroxylated polymethoxyflavones. Abstracts of Papers, 234th ACS National Meeting, Boston, MA, United States, August 19-23, 2007, AGFD-234.

Li, T.L., Yin, X.H., Pan, W.D., Yang, J. and Liang, G.-Y. 2010. Chemical constituents of *Humulus scandens*. Zhong yao cai = Zhongyaocai = Journal of Chinese medicinal materials, 33, 55-57.

Liao, S.X., Deng, H., Huang, S.B., Yang, J.Y., Wang, S.Q., Yin, B.D., Zheng, T.L., Zhang, D.F., Liu, J.S., Gao, G.H., Ma, J.F. and Deng, Z.N. 2015. Design, synthesis and evaluation of novel 5,6,7-trimethoxyflavone-6-chlorotacrine hybrids as potential multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 25, (7); 1541-1545.

Liao, Y.H., Houghton, P.J. and Hoult, J. 1999. Novel and known constituents from *Buddleja species* and their activity against leukocyte eicosanoid generation. Journal of Natural Products, 62, (9); 1241-1245.

Lim, S.S., Han, S.M., Kim, S.Y., Bae, Y.S. and Kang, I.J. 2007. Isolation of acetylcholinesterase inhibitors from the flowers of *Chrysanthemum indicum* Linne. Food Science and Biotechnology, 16, (2); 265-269.

Lin, L.C., Pai, Y.F. and Tsai, T.H. 2015. Isolation of luteolin and luteolin-7-O-glucoside from *Dendranthema morifolium* Ramat Tzvel and their pharmacokinetics in rats. Journal of agricultural and food chemistry, 63, (35); 7700-7706.

Lin, T.Y., Lu, C.W., Wang, S.J. and Huang, S.K. 2015. Protective effect of hispidulin on kainic acid-induced seizures and neurotoxicity in rats. European journal of pharmacology, 755, 6-15.

Lindenmeyer, F., Li, H., Menashi, S., Soria, C. and Lu, H. 2001. Apigenin acts on the tumor cell invasion process and regulates protease production. Nutrition and cancer, 39, (1); 139-147.

Liu, L.Z., Fang, J., Zhou, Q., Hu, X., Shi, X. and Jiang, B.H. 2005. Apigenin inhibits expression of vascular endothelial growth factor and angiogenesis in human lung cancer cells: implication of chemoprevention of lung cancer. Molecular pharmacology, 68, (3); 635-643.

Lombardo, E., Sabellico, C., Hajek, J., Stankova, V., Filipsky, T., Balducci, V., De Vito, P., Leone, S., Bavavea, E.I., Silvestri, I.P., Righi, G., Luly, P., Saso, L., Bovicelli, P., Pedersen, J.Z. and Incerpi, S. 2013. Protection of cells against oxidative stress by nanomolar levels of hydroxyflavones indicates a new type of intracellular antioxidant mechanism. PLoS One, 8, (4); e60796.

Luo, S., Li, H., Mo, Z., Lei, J., Zhu, L., Huang, Y., Fu, R., Li, C., Huang, Y. and Liu, K. 2019. Connectivity map identifies luteolin as a treatment option of ischemic stroke by inhibiting MMP9 and activation of the PI3K/Akt signaling pathway. Experimental & molecular medicine, 51, (3); 1-11.

Lv, W., Sheng, X., Chen, T., Xu, Q. and Xie, X. 2008. Jaceosidin induces apoptosis in human ovary cancer cells through mitochondrial pathway. BioMed Research International, 2008.

Maestri, D., Nepote, V., Lamarque, A. and Zygadlo, J. (2006). Natural products as antioxidants. Phytochemistry: Advances in Research. F. Imperato (Ed.), Chapter 5 (Research Signpost Publisher).

Mani, R. and Natesan, V. 2018. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. Phytochemistry, 145, 187-196.

Manivannan, A., Soundararajan, P., Park, Y.G., Sakkiah, S. and Jeong, B.R. 2015. Binding mode investigation of polyphenols from *Scrophularia* targeting human aldose reductase using molecular docking and molecular dynamics simulations. Journal of Chemistry.

Mansourabadi, A.H., Sadeghi, H.M., Razavi, N. and Rezvani, E. 2015. Anti-inflammatory and analgesic properties of salvigenin, *salvia officinalis* flavonoid extracted. Advanced Herbal Medicine, 1, (3); 31-41.

Marzouk, M.M., Hussein, S.R., Kassem, M.E., Kawashty, S.A. and El Negoumy, S.I. 2016a. Phytochemical constituents and chemosystematic significance of *Chrozophora tinctoria* (L.) Raf. Natural product research, 30, (13); 1537-1541.

Marzouk, M.M., Mohamed, T.A., Elkhateeb, A., El-toumy, S.A. and Hegazy, M.E.F. 2016b. Phenolics from *Tanacetum sinaicum* (Fresen.) Delile ex Bremer & Humphries (Asteraceae). Biochemical Systematics and Ecology, 65, 143-146.

Merfort, I. 1984. Methylierte Flavonoide aus *Arnica montana* und *Arnica chamissonis*. Planta medica, 50, (1); 107-108.

Mericli, F., Becer, E., Kabadayı, H., Hanoglu, A., Yigit Hanoglu, D., Ozkum Yavuz, D., Ozek, T. and Vatansever, S. 2017. Fatty acid composition and anticancer activity in colon carcinoma cell lines of *Prunus dulcis* seed oil. Pharmaceutical biology, 55, (1); 1239-1248.

Mirzoeva, S., Kim, N.D., Chiu, K., Franzen, C.A., Bergan, R.C. and Pelling, J.C. 2008. Inhibition of HIF- 1 alpha and VEGF expression by the chemopreventive bioflavonoid apigenin is accompanied by Akt inhibition in human prostate carcinoma PC3- M cells. Molecular Carcinogenesis: Published in cooperation with the University of Texas MD Anderson Cancer Center, 47, (9); 686-700.

Mohamed, R., Pineda, M. and Aguilar, M. 2007. Antioxidant capacity of extracts from wild and crop plants of the Mediterranean region. Journal of food science, 72 (1); 59-63.

Morteza-Semnani, K., Saeedi, M. and Akbarzadeh, M. 2008. The essential oil composition of *Kickxia spuria* (L.) Dum. Journal of Essential Oil Research, 20, (1); 24-25.

Murai, Y., Kanemoto, T. and Iwashina, T. 2008. Flavone glucuronides from *Plantago hakusanensis* endemic to Japan. Biochemical Systematics and Ecology, 10, (36); 815-816.

Nagao, T., Abe, F., Kinjo, J. and Okabe, H. 2002. Antiproliferative Constituents in Plants 10. Flavones from the Leaves of *Lantana montevidensis* B RIQ. and Consideration of Structure–Activity Relationship. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 25, (7); 875-879.

Nageen, B., Sarfraz, I., Rasul, A., Hussain, G., Rukhsar, F., Irshad, S., Riaz, A., Selamoglu, Z. and Ali, M. 2018. Eupatilin: a natural pharmacologically active

flavone compound with its wide range applications. Journal of Asian natural products research, 22, (1); 1-16.

Nath, L.R., Gorantla, J.N., Joseph, S.M., Antony, J., Thankachan, S., Menon, D.B., Sankar, S., Lankalapalli, R.S. and Anto, R.J. 2015. Kaempferide, the most active among the four flavonoids isolated and characterized from *Chromolaena odorata*, induces apoptosis in cervical cancer cells while being pharmacologically safe. Rsc Advances, 5, (122); 100912-100922.

Nengroo, Z.R. and Rauf, A. 2019. Fatty acid composition and antioxidant activities of five medicinal plants from Kashmir. Industrial Crops and Products, 140, 111596.

Nicoletti, M., Serafini, M., Tomassini, L., Bianco, A. and Passacantilli, P. 1987. Iridoids in the Flora of Italy; Part 111. Kickxioside, A New Iridoid Glucoside from *Kickxia spuria*. Planta medica, 53, (03); 295-297.

Nicoletti, M., Tommassini, L. and Serafini, M. 1989. Two linalool-1-oic acids from *Kickxia spuria*. Fitoterapia, 60, 252-254.

Olennikov, D.N., Chirikova, N.K., Kashchenko, N.I., Nikolaev, V.M., Kim, S.-W. and Vennos, C. 2018. Bioactive phenolics of the genus *Artemisia* (Asteraceae): HPLC-DAD-ESI-TQ-MS/MS profile of the Siberian species and their inhibitory potential against α-amylase and α-glucosidase. Frontiers in pharmacology, 9, 756.

Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics, 44 (6); 307-315

Pan, M.H., Lai, C.S., Hsu, P.C. and Wang, Y.J. 2005. Acacetin induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by activation of caspase cascades and production of reactive oxygen species. Journal of agricultural and food chemistry, 53, (3); 620-630.

Patel, K. and Patel, D.K. 2017. Medicinal importance, pharmacological activities, and analytical aspects of hispidulin: A concise report. Journal of traditional and complementary medicine, 7, (3); 360-366.

Pinar, M. 1973. 5,6,7-Trimethoxyflavone and 5,6,7,4′-tetramethoxyflavone from *Kickxia lanigera*. Phytochemistry, 12, (12); 3014-3015.

Popoola, O.K., Marnewick, J.L., Rautenbach, F., Ameer, F., Iwuoha, E.I. and Hussein, A.A. 2015. Inhibition of Oxidative Stress and Skin Aging-Related Enzymes by Prenylated Chalcones and Other Flavonoids from *Helichrysum teretifolium*. Molecules, 20, (4); 7143-7155.

Qi, X., Disatnik, M.H., Shen, N., Sobel, R.A. and Mochly Rosen, D. 2011. Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase Cδ under oxidative stress conditions *in vivo*. Molecular biology of the cell, 22, (2); 256-265.

Rafatian, G., Khodagholi, F., Farimani, M.M., Abraki, S.B. and Gardaneh, M. 2012. Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by Salvigenin promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with H_2O_2. Molecular and cellular biochemistry, 371, (1-2); 9-22.

Ramawat, K., Dass, S. and Mathur, M. 2009. The chemical diversity of bioactive molecules and therapeutic potential of medicinal plants. In Herbal drugs: ethnomedicine to modern medicine (Springer), pp. 7-32.

Rates, S. 2001. Plants as source of drugs. Toxicon, 39, (5); 603-613.

Rauf, A., Khan, R., Khan, H., Khan, I. and Akram, M. 2016. Xanthine oxidase inhibition of bioactive constituents isolated from *Potentilla evestita*. Journal of the Chemical Society of Pakistan, 38, (1).

Renuka, M. and Natesan, V. 2017. Chrysin: Sources, beneficial pharmacological activities, and molecular mechanism of action. Phytochemistry, 145, 187-196.

Rim, H.K., Yun, C.H., Shin, J.S., Cho, Y.W., Jang, D.S., Ryu, J.H., Park, H. and Lee, K.T. 2013. 5, 6, 7-Trimethoxyflavone suppresses pro-inflammatory mediators in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages and protects mice from lethal endotoxin shock. Food and chemical toxicology, 62, 847-855.

Roh, J.S., Han, J.Y., Kim, J.H. and Hwang, J.K. 2004. Inhibitory effects of active compounds isolated from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds for melanogenesis. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 27, (12); 1976-1978.

Samuelsen, A.B. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. Journal of ethnopharmacology, 71, (1-2); 1-21.

Sapkota, A., Gaire, B.P., Cho, K.S., Jeon, S.J., Kwon, O.W., Jang, D.S., Kim, S.Y., Ryu, J.H. and Choi, J.W. 2017. Eupatilin exerts neuroprotective effects in mice with transient focal cerebral ischemia by reducing microglial activation. PLoS One, 12, (2).

Segueni, N., Zellagui, A., Moussaoui, F., Lahouel, M. and Rhouati, S. 2016. Flavonoids from *Algerian propolis*. Arabian Journal of Chemistry, 9, 425-428.

Shokoohinia, Y., Sajjadi, S.E., Jassbi, A.R., Moradi, H., Ghassemi, N. and Schneider, B. 2015. Sesquiterpenes and flavonoids of *Anthemis odontostephana* var. odontostephana. Chemistry of Natural Compounds, 51, (3); 491-494.

Singh, B., Sidiq, T., Joshi, P., Jain, S.K., Lawaniya, Y., Kichlu, S., Khajuria, A., Vishwakarma, R.A. and Bharate, S.B. 2013. Anti-inflammatory and immunomodulatory flavones from *Actinocarya tibetica* Benth. Natural Product Research, 27, (23); 2227-2230.

Tan, R., Lu, H., Wolfender, J.-L., Yu, T., Zheng, W., Yang, L., Gafner, S. and Hostettmann, K. 1999. Mono-and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species. Planta medica, 65, (1); 64-67.

Teles, Y.C., Horta, C.C.R., Agra, M.D.F., Siheri, W., Boyd, M., Igoli, J.O., Gray, A.I. and De Souza, M.D.F.V. 2015. New sulphated flavonoids from *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl (Malvaceae). Molecules, 20, (11); 20161-20172.

Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Statti, G.A. and Menichini, F. 2008. Biological and pharmacological activities of iridoids: recent developments. Mini reviews in medicinal chemistry, 8, (4); 399-420.

URL-1 https://kocaelibitkileri.com/plantago-bellardii/

URL-2 https://en.wikipedia.org/wiki/Kickxia_elatine

URL-3 https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/kickxia/spuria/

URL-4 http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names 37748-1 # source-HC

URL-5 http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Plantaginaceae/Kickxia

URL-6 http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-2335124

URL-7 http://www.tubives.com

URL-8 http://www.dineshkhedkar.co.in/mpdb/ record. php ?act=view&id=MH179

URL-9 http://dryades.units.it/saline/index.php?procedure =taxon_page &id=4846&num =6060

URL-10 https://www.flickr.com/photos/152491279@N04/24159647108/
URL-11 http://annonaceae.myspecies.info/taxonomy/term/2117
URL-12 https://xplorio.com/xplorio/content/8868/IMG_1578%20Asteraceae%20 helichrysum %20Teretefolium%20-Awila.JPG
URL-13 https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/14/Zeyheria_Tuberculosa _1.jpg
URL-14 https://c8.alamy.com/comp/B61KGT/japanese-beautyberry-callicarpa-japonica -B61KGT.jpg
URL-15 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Carthamus_tinctorius_050709b.JPG
URL-16 http://www.plantsoftheworldonline.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names: 30005379 -2
URL-17 https://en.wikipedia.org/wiki/Chrozophora_tinctoria
URL-18 https://www.inaturalist.org/taxa/155671-Wissadula
URL-19 https://www.zengardentr.com/urun/sangria-zufa-cicegi-fidesi-agastache-mexicana
URL-20 https://sv.m.wikipedia.org/wiki/Fil:Turnera_diffusa_var._aphrodisiaca_002. JPG
URL-21 https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Plantago_hakusanensis_1.JPG
URL-22 https://i0.wp.com/strictlymedicinalseeds.com/wp-content/uploads/2018/03/ Rheum _emodii_350.jpg?fit=350%2C346&ssl=1

Van, N.T.H., Quang, T.H., Cuong, N.X., Dung, N.T., Van Minh, C. and Van Kiem, P. 2009. Chemical Constituents of the Fruits of *Gleditschia Australis* Hemsl. Natural product communications, 4, (2); 213-216.

Venditti, A., Frezza, C., Serafini, I., Ciccola, A., Sciubba, F., Serafini, M. and Bianco, A. 2018. Iridoids of Chemotaxonomy Relevance, a New Antirrhinoside Ester and Other Constituents from *Kickxia spuria* subsp integrifolia (Brot.) R.Fern. Chemistry & Biodiversity, 15, (2); e1700473

Wang, Q., Terreaux, C., Marston, A., Tan, R.X., Stoeckli Evans, H. and Hostettmann, K. 1999. A new 2-hydroxyflavanone from *Mosla soochouensis*. Planta medica, 65, (8); 729-731.

Xu, J., Wang, H., Ding, K., Zhang, L., Wang, C., Li, T., Wei, W. and Lu, X. 2014. Luteolin provides neuroprotection in models of traumatic brain injury via the Nrf2–ARE pathway. Free Radical Biology and Medicine, 71, 186-195.

Yin, Y., Gong, F.Y., Wu, X.X., Sun, Y., Li, Y.H., Chen, T. and Xu, Q. 2008. Anti-inflammatory and immunosuppressive effect of flavones isolated from *Artemisia vestita*. Journal of ethnopharmacology, 120, (1); 1-6.

Yoon, K.D., Chin, Y.W., Yang, M.H. and Kim, J. 2011. Separation of anti-ulcer flavonoids from *Artemisia* extracts by high-speed countercurrent chromatography. Food chemistry, 129, (2); 679-683.

Yuldashev, M.P. 1996. Flavonoids of the epigeal part of *Kickxia elatine*. Chemistry of Natural Compounds, 32, (1); 30-32.

Zakaria, Z.A., Mohamed, A.M., Jamil, N.S., Rofiee, M.S., Hussain, M.K., Sulaiman, M.R., Teh, L.K. and Salleh, M.Z. 2011. In vitro antiproliferative and antioxidant activities of the extracts of *Muntingia calabura* leaves. The American Journal of Chinese Medicine, 39, (1); 183-200.

Zater, H., Huet, J., Fontaine, V., Benayache, S., Stevigny, C., Duez, P. and Benayache, F. 2016. Chemical constituents, cytotoxic, antifungal and antimicrobial

properties of *Centaurea diluta* Ait. subsp. algeriensis (Coss. & Dur.) Maire. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, 9, (6); 554-561.
Zhao, C., She, T., Wang, L., Su, Y., Qu, L., Gao, Y., Xu, S., Cai, S. and Shou, C. 2015. Daucosterol inhibits cancer cell proliferation by inducing autophagy through reactive oxygen species-dependent manner. Life sciences, 137, 37-43.
Zhao, J., Dasmahapatra, A.K., Khan, S.I. and Khan, I.A. 2008. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). Journal of ethnopharmacology, 120, (3); 387-393.
Zhou, Y., Zhong, B. and Shi, W. 2014. Progress in research of acacetin biologic properties. Chinese Journal of New Drugs, 23, 1053-1056.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatih GÜL

Doğum Yeri : TOKAT

Doğum Tarihi : 16.08.1985

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Fakültesi Dekanlığı

Tel :0376 218 95 37-8053

E-posta :fatihgul3018@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Tokat Mehmet Akif Ersoy Lisesi-2003

Lisans : Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi-2008

Yüksek Lisans: Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi-2011

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Çankırı Karatekin Üniversitesi 2012-

Yayınları (SCI ve diğer)

1. Abay, G., Altun, M., Karakoc, O. C., Gul, F., & Demirtas, I. (2013). Insecticidal activity of fatty acid-rich Turkish bryophyte extracts against Sitophilus granarius (Coleoptera: Curculionidae). *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, *16*(10), 806-816.

2. Azzouzi, D., Bioud, K., Demirtas, I., Gul, F., Sarri, D. S., Benayache, B. F., & Mekkiou, R. (2016). Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Centaurea choulettiana Pomel (Asteraceae) Extracts. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*, *19*(10), 841-846.

3. Bayan, Y., Genc, N., Kusek, M., Gul, F., & Imecik, Z. (2017). Determination of Chemical Compositions, Antifungal, Antibacterial and Antioxidant Activity of Thymbra Spicata L. From Turkey. *Feb-Fresenius Environmental Bulletin*, 7595.

4. Bayar, Y., Onaran, A., Yilar, M., & Gul, F. (2018). Determination of the Essential Oil Composition and the Antifungal Activities of Bilberry (Vaccinium myrtillus L.) and Bay Laurel (Laurus nobilis L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, *21*(2), 548-555.

5. Bencherchar, I., Demirtas, I., Altun, M., Gul, F., Sarri, D., Benayache, F., . Mekkiou, R. (2017). HPLC analysis, anti-oxidant activity of Genista ferox and its anti-proliferative effect in HeLa cell line. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 12(3), 260-267.

6. Bouriche, H, Kada S,. Assaf AM, Senator A, Gül F., & Demirtas I. (2016). Phytochemical screening and anti-inflammatory properties of Algerian Hertia cheirifolia methanol extract. *Pharmaceutical Biology*, 1-7.

7. Bulut, F., Demirtas, I., Koldas, S., Gul, F., Behcet, L., Ozen, T., & Oke-Altuntas, F. (2019). The cytotoxicity and antioxidant activity analysis of the isolated constituents and extracts from endemic Centaurea derderiifolia. *Natural Product Research*, 1-4.

8. Demirci, M. A., Ipek, Y., Gul, F., Ozen, T., & Demirtas, I. (2018). Extraction, isolation of heat-resistance phenolic compounds, antioxidant properties, characterization and purification of 5-hydroxymaltol from Turkish apple pulps. *Food Chemistry*, 269, 111-117.

9. Erenler, R., Pabuccu, K., Yaglioglu, A. S., Demirtas, I., & Gul, F. (2016). Chemical constituents and antiproliferative effects of cultured Mougeotia nummuloides and Spirulina major against cancerous cell lines. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 71(3-4), 87-92.

10. Erenler, R., Telci, İ., Elmastaş, M., Aksit, H., Gül, F., Tüfekçi, A. R., . . . Kayir, Ö. (2018). Quantification of flavonoids isolated from Mentha spicata in selected clones of Turkish mint landraces. *Turkish Journal of Chemistry*, 12, 1695-1705.

11. Erenler, R., Telci, I., Ulutas, M., Demirtas, I., Gul, F., Elmastas, M., & Kayir, O. (2015). Chemical Constituents, Quantitative Analysis and Antioxidant Activities of E chinacea purpurea (L.) M oench and E chinacea pallida (N utt.) N utt. *Journal of Food Biochemistry, 39*(5), 622-630.

12. Geçibesler, I. H., Demirtas, I., Koldaş, S., Behçet, L., Gül, F., & Altun, M. (2019). Bioactivity-guided isolation of compounds with antiproliferative activity from Teucrium chamaedrys L. subsp. sinuatum (Celak.) Rech. F. *Progress in Nutrition*, 21(1-S), 458-470.

13. Oke- Altuntas, F., Demirtas, I., Tufekci, A. R., Koldas, S., Gul, F., Behcet, L., & Gecibesler, H. I. (2016). Inhibitory effects of the active components isolated from Satureja boissieri Hausskn. Ex Boiss. On human cervical cancer cell line. *Journal of Food Biochemistry*, 40(4), 499-506.

14. Ozen, T., Zenginbal, H., Yazicioglu, E., Gul, F., & Demirtas, I. (2019). A Comparison Investigation on Antioxidant Activities, Physicochemical Properties and Phytochemical Contents of Kiwifruit Genotypes and Cultivars. *International Journal of Fruit Science*, 19(2), 115-135.

15. Rahman, A., Siddiqui, S. A., Oke-Altuntas, F., Okay, S., GÜL, F., & Demirtas, I. (2019). Phenolic Profile, Essential Oil Composition and Bioactivity of Lasia spinosa (L.) Thwaites. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 62.

Diğer Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Azzouzi, D., Mekkiou, R., Demirtas, I., Gül, F., Seghiri, R., Boumaza, O., . . Benayache, F. (2016). Qualitative and Quantitative Analysis of Polar Extract from Centaurea fragilis Dur. Using HPLC-TOF/MS. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research, 8*(9), 1526-1528

2. Benslama, A., Harrar, A., Gul, F., & Demirtas, I. (2017). Phenolic Compounds, Antioxidant and Antibacterial Activities of Zizyphus lotus L. Leaves Extracts. *The Natural Products Journal*, 7(4), 316-322.

3. Benslama, A., Harrar, A., Gül, F., & Demirtaş, I. (2019). In vitro Antioxidant, Antibacterial Activities and HPLC-TOF/MS Analysis of Anvillea radiata (Asteraceae) Extracts. *Current Nutrition & Food Science*, 15(4), 376-383.

4. Gecibesler, I. H., Yaglıoglu, A. S., Gul, F., Temirturk, M., & Demirtas, I. (2019). Phytochemicals of Chrysophthalmum montanum (DC.) Boiss. Roots and Their Antiproliferative Activities Against HeLa and C6 Cell Lines. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1-10.

5. Ipek, H., Savranoglu, S., Tufekci, A. R., Gul, F., Demirtas, I., & Tumer, T. B. (2016). Apigenin and luteoline were identified as active anti-inflammatory constitutents of Lavandula stoeachas by bioassay guided fractionation. *Conference Paper Conference: 41th FEBS Congress*

6. Kada, S., Bouriche, H., Senator, A., & Gul, F. (2016). Phytochemical screening, antioxidant and antimicrobial activities of Algerian Cistus salvifolius extracts. *Advances in Environmental Biology*, 10(1), 23-33.

7. Ozen, T., Telci, I., Gul, F., & Demirtas, I. (2017). Chemical Analyzes and Antioxidant Activities of Essential Oils of Four Wild Mentha Species Growing in the Tokat and Its Districts. *International Journal of Chemistry and Technology*, 1(1), 46-57.

8. Sekeroglu, N., Karaoglan, M., Gezici, S., Kulak, M., Ozkutlu, F., Kacar, O., & Gul, F. (2018). Variation in the composition of the essential oils, hypericin and mineral elements in aerial parts, stem and flower of Hypericum capitatum (CHOISY) growing in Turkey with oxidative DNA damage protective activity. *Journal of Pharmaceutical Research*, 17(2), 67-77.

9. Tevfik, O., Telci, I., Gul, F., & Demirtas, I. (2018). A Comprehensive Study on Phytochemical Contents, Isolation and Antioxidant Capacities in wild mind, Mentha longifolia subsp. typhoides var. typhoides PH. Davis. *Moroccan Journal of Chemistry*, 6(4), 6-4.

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Demirtaş, İ., İnah, N. K., Koldaş, S., Karakoç, Ö., Tüfekçi, A. R., Gül, F., . . . Altun, M. (2013). Potential of agricultural products which cannot be evaluated. *TABAD, Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 6(1), 168-173.

2. Elkiran, O., & Gül, F. (2018). Chemical composition of the essential oil of endemic Heracleum platytaenium BOISS.(Apiaceae) growing wild in Turkey. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 8(1), 59-62.

3. Erenler, R., Demirtas, I., Karan, T., Gul, F., Kayir, O., & Karakoc, O. C. (2018). Chemical constituents, quantitative analysis and insecticidal activities of plant extract and essential oil from Origanum onites L. *Trends in Phytochemical Research*, 2(2), 91-96.

4. İpek, G., Vural, E., Şenkal, B., Bingöl, Ü., İpek, A., Tüfekçi, A. R., & Gül, F. (2014). Determination of contents and components of essential oils of Salvia albimaculata HEDGE ET HUB.-MOR. grown in endemic of Turkey. *TABAD, Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi*, 7(2), 25-27.

5. Tüfekçi, A. R., Akşit, H., Fatih, G., & Demirtaş, İ. (2018). Determination of Phenolic Profile of Cirsium arvense (L.) Scop. Subsp. vestitum (Wimmer et Grab.) Petrak Plant. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1(2), 33-36.

6. Tüfekçi, A. R., Küçük, S., Fatih, G., & Demirtaş, İ. (2018). Determination of Phytochemical Contents of Some Medicinal Aromatic Plants (Echinacea pallida, Melissa officinalis, Hypericum perforatum and Sideritis syriaca) Belonging to Antalya Region. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1(1), 29-32.