

**T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BATI ANADOLU'DA YAYILIŞ GÖSTEREN *CENTAUREA ATHOA* DC. VE  
ENDEMİK *CENTAUREA POLYCLADA* DC. TAKSONLARI ÜZERİNDE  
ARAŞTIRMALAR**

**Farmasötik Botanik Anabilim Dalı**

**Doktora Tezi**

**Uzman Eczacı  
Serdar DEMİR**

**Danışmanlar  
Prof. Dr. Canan KARAALP  
Prof. Dr. Erdal BEDİR**

**İZMİR  
2016**

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

Adı Soyadı	İmza
Başkan : Prof. Dr. Canan KARAALP (Danışman)	
Üye : Prof. Dr. Erdal BEDİR (2. Danışman)	
Üye : Prof. Dr. Ulvi ZEYBEK	
Üye : Prof. Dr. Özgen ALANKUŞ ÇALIŞKAN	
Üye : Prof. Dr. İ. İrem TATLI ÇANKAYA	

Doktora tezinin kabul edildiği tarih: 20.06.2016

## ÖNSÖZ

Tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana destek olan ve yol gösteren tez danışmanlarım Prof. Dr. Canan KARAALP ve Prof. Dr. Erdal BEDİR'e sonsuz teşekkürler.

Laboratuvarda günlerimizi beraber geçirdiğimiz Yük. Kim. Özgür TAĞ, Yrd. Doç. Dr. İsmail Hakkı AKGÜN ve Uzm. Biy. Onur MUŞMULA'ya çok teşekkür ederim.

*Centaurea* taksonları üzerindeki değerli çalışmasıyla bana rehberlik yapan Doç. Dr. Şura BAYKAN'a çok teşekkürler.

Spektroskopik çalışmalardaki yardımlarından dolayı Kim. Dr. Salih GÜNNAZ'a, Yük. Kim. Müh. Çiğdem YENGİN'e ve Yük. Biyomüh. Sinem Şimşek'e sonsuz teşekkürler.

Biyoktivite çalışmaları esnasında bilgi ve tecrübesi ile bana yardımcı olan Doç. Dr. Ayşe NALBANTSOY'a çok teşekkürler.

Bitki örneklerinin tayin edilmesinde bana yardımcı olan Doç. Dr. Serdar Gökhan Şenol'a ve optik rotasyon ölçümlerindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Nehir SOMER'e teşekkür ederim.

Farmasötik Botanik Anabilim Dalı'nda görevli tüm öğretim üyesi hocalarıma, arkadaşlarıma ve fakültedeki dostlarıma ilgi ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu süreçte bana destek olan ve hayatı kolaylaştıran Uzm. Biy. Selin AKTAR'a sonsuz teşekkürler.

Bu çalışma, Ege Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 12/ECZ/009 no'lu araştırma projesi ile desteklenmiştir. Adı geçen kuruma katkılarından dolayı teşekkür ederim.

**Uzm. Ecz. Serdar DEMİR**

## ÖZET

### Batı Anadolu'da Yayılış Gösteren *Centaurea athoa* DC. ve Endemik *Centaurea polyclada* DC. Taksonları Üzerinde Araştırmalar

*Centaurea* L. (Asteraceae) cinsi, Türkiye florasında 110 tanesi endemik olmak üzere 200 takson ile temsil edilmektedir. *Centaurea* türleri halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde dahilen ve haricen kullanılmaktadır. Yapılan biyoaktivite araştırmaları ile *Centaurea* türlerinin antienflamatuvar, antimalaryal, antiprotozoal, antimikrobiyal, antiülserojenik ve sitotoksik aktivitelerinin bulunduğu belirlenmiştir.

Biyoaktif sekonder metabolitler açısından zengin olan *Centaurea* taksonları ile gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalar, genellikle seskiterpen laktonların, flavonoidlerin, lignanların ve bunların glikozitlerinin izolasyonu ile sonuçlanmıştır.

*Centaurea athoa* DC. ve endemik *Centaurea polyclada* DC. türlerinden hazırlanan metanol ekstraktlarında antioksidan; kloroform ekstraktlarında ise sitotoksik ve antienflamatuvar aktivite gözlenmesi, çalışmamızın çıkış noktasını oluşturmuştur.

Bu çalışmada *C. athoa* ve *C. polyclada* türlerinin toprak üstü kısımlarından hazırlanan kloroform, metanol ve *n*-butanol ekstraktları, sekonder metabolit içerikleri açısından incelenmiştir. Çeşitli kromatografik yöntemler [Açık kolon kromatografisi (AKK), vakum sıvı kromatografisi (VSK), katı faz ekstraksiyonu (KFE)] ile izolasyonu gerçekleştirilen moleküllerin yapıları spektroskopik metotlar [1 ve 2 Boyutlu (1D ve 2D) Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR), kütle ve İnfrared (IR) spektroskopileri] kullanılarak aydınlatılmıştır.

Yapılan izolasyon çalışmaları sonucunda, *C. athoa* kloroform ekstresinden 3 eleman tip [athoin (CA-1), 14-*O*-asetil athoin (CA-2) ve 14-*O*-asetilathoin-12 metil esteri (CA-3)] ve 1 germakranolit tip [4'-hidroksipekterolit-14-*O*-asetat (CA-4)] olmak üzere 4 seskiterpen; *n*-butanol ekstresinden ise 2 basit fenolik ve 2 fenolik glukozit [*p*-hidroksibenzoik asit (CA-5), protokateşik asit (CA-6), vanilik asit-4-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozit metil esteri (CA-7) ve picein (CA-8)], 2 fenil propanoit türevi [9-*O*-metil koniferin (CA-9) ve siringin (CA-10)] ve 1 fitosterol [ $\beta$ -sitositerol-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozit (CA-11)] elde edilmiştir.

*C. polyclada* kloroform ve *n*-butanol ekstrelerinden ise 5 eleman tip [6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit (CP-2) ve metil esteri (CP-1), 8 $\alpha$ -*O*-[2'-(hidroksimetil)-but-2'-enoil]-6 $\alpha$ ,15-dihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit (CP-3), 13-*N*-prolin melitensin (CP-4), 13-*N*-prolin-6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3-dien-12-oik asit (CP-5)] ve 1 ödesman tip [1 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -trihidroksi-15-okso-ödesm-11(13)-en-12-oik asit metil esteri (CP-6)] olmak üzere 6 seskiterpen, 3 flavon [salvigenin (CP-7), öpatorin (CP-8) ve 3'-*O*-metil öpatorin (CP-9)], 1 lignan [arktiin (CP-10)], 1 fenolik glukozit [taçiozit (CP-11)] ve 1 fenilpropanoit glukoziti [siringin (CP12)] izole edilmiştir.

*C. athoa* ve *C. polyclada*'nın toprak üstü kısımlarından 6 eleman türevi (CA-1, CA-2, CA-3 ve CP-3, CP-4, CP-5) ve 1 ödesman türevi olmak üzere (CP-6) 7 yeni seskiterpen bileşiği elde edilmiştir. Germakranolit türevi CA-4 ve eleman türevi CP-2 kodlu seskiterpenler ise *Centaurea* türlerinden ilk defa rapor edilmektedir.

Bitkilerden izole edilen seskiterpen yapıdaki moleküller, farklı hücre hatlarında sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri yönünden incelenmiştir.

3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) canlılık metodu ile gerçekleştirilen sitotoksik aktivite çalışmasında; *C. athoa*'dan elde edilen germakranolit türevi 4'-hidroksipekterolit-14-*O*-asetat (CA-4) tüm hücre hatlarında (A549, CaCO-2, HeLa, MCF-7, MDAMB231, mPanc-96, PC3, U87MG ve HEK293) sitotoksik aktivite göstermiştir.

RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri üzerinde iNOS (indüklenebilir nitrik oksit sentaz) inhibisyonuna ve NF- $\kappa$ B (Nükleer Faktör kappa B) lusiferaz raportör stabil HeLa hücre hattında da NF- $\kappa$ B inhibisyonuna dayalı antienflamatuvar aktivite testleri gerçekleştirilmiştir. 4'-hidroksipekterolit-14-*O*-asetat (CA-4) ve 13-*N*-prolin melitensin (CP-4) moleküllerinde her iki yöntemle de inhibitör aktivite gözlenmiştir. iNOS aktiviteleri sonrası gerçekleştirilen MTT testi ile moleküllerin RAW 264.7 fare makrofaj hücrelerine karşı sitotoksik etki göstermedikleri belirlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** *Centaurea athoa*, *Centaurea polyclada*, seskiterpen, sitotoksikite, antienflamatuvar

## ABSTRACT

### **Investigations on *Centaurea athoa* DC. and Endemic *Centaurea polyclada* DC. Taxa Naturally Distributed in West Anatolia**

The genus *Centaurea* L. (Asteraceae) is represented by 200 taxa in the flora of Turkey, 110 of which are endemic. *Centaurea* species are used orally or externally as traditional medicines for various purposes. Bioactivity studies on several *Centaurea* species have reported antiinflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antimicrobial, antiulserogenic and cytotoxic properties.

Phytochemical investigations on *Centaurea* species that are rich in bioactive secondary metabolites are generally resulted in isolation of sesquiterpene lactones, flavonoids and lignan glucosides.

In our preliminary studies, the methanol and chloroform extracts from *C. athoa* and *C. polyclada* exhibited *in vitro* antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activities, which prompted us to start a detailed investigation on these species.

In this thesis, the chloroform, methanol and *n*-butanol extracts obtained from the aerial parts of *C. athoa* and *C. polyclada* were studied for their secondary metabolite content. Structures of the compounds purified by chromatographic methods [Open column chromatography (OCC), vacuum liquid chromatography (VLC), solid phase extraction (SPE)] were established using spectral methods [1 and 2 dimensional (1D and 2D) Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy (NMR), mass spectroscopy and infrared (IR) spectroscopy].

Fractionation of the chloroform extract from the aerial parts of *C. athoa* led to the isolation of three elemene-type sesquiterpenes; [athoin (CA-1), 14-*O*-acetylathoin (CA-2) and methyl 14-*O*-acetylathoin-12-oate (CA-3)] with a germacrane type sesquiterpene [4'-hydroxypecterolide-14-*O*-acetate (CA-4)], whereas the *n*-butanol extract afforded two simple phenolic compounds and two phenolic glucosides [*p*-hydroxybenzoic acid (CA-5), protocatechuic acid (CA-6), vanillic acid-4-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside methyl ester (CA-7) and picein (CA-8)], two phenylpropanoid derivatives [9-*O*-methyl coniferin (CA-9) and syringin (CA-10)] and a phytosterol [ $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (CA-11)].

Fractionation of the chloroform and *n*-butanol extracts of the *C. polyclada* aerial parts provided five elemene-type sesquiterpenes [ $6\alpha,8\alpha,15$ -trihydroxyelema-1,3,11(13)-trien-12-oic acid (CP-2) and its methyl ester (CP-1),  $8\alpha$ -*O*-[2'-(hydroxymethyl)-but-2'-enyl]- $6\alpha,15$ -dihydroxyelema-1,3,11(13)-trien-12-oic acid (CP-3), 13-*N*-proline melitensin (CP-4) and 13-*N*-proline- $6\alpha,8\alpha,15$ -trihydroxyelema-1,3-dien-12-oic acid (CP-5)], an eudesmane-type sesquiterpene [ $1\beta,6\alpha,8\alpha$ -trihydroxy-15-oxo-eudesm-11(13)-en-12-oic acid methyl ester (CP-6)], three flavonoids [salvigenin (CP-7), eupatorin (CP-8) and 3'-methoxy eupatorin (CP-9)], a lignan [arctiin (CP-10)], a phenolic glucoside [tachioside (CP-10)] and a phenylpropanoid glucoside [syringine (CP-12)].

The investigation of the aerial parts of *C. athoa* and *C. polyclada* afforded six new elemanolide derivatives (CA-1, CA-2, CA-3 and CP-3, CP-4, CP-5) and one new eudesmane (CP-6). Also the germacranolide CA-4 and the eleman derivative CP-1 have been reported from the genus *Centaurea* for the first time.

Antiinflammatory and cytotoxic activities of the isolated sesquiterpenes were investigated on different cell lines.

The highest cytotoxic activity against all cell lines (A549, CaCO-2, HeLa, MCF-7, MDAMB231, mPanc-96, PC3, U87MG and HEK293) was observed with the germacranolide 4'-hydroxypecterolide-14-*O*-acetate (CA-4) isolated from *C. athoa* by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) cell viability assay.

Antiinflammatory activities were studied by iNOS (Inducible nitric oxide synthase) inhibition assay on RAW 264.7 murine macrophage cell line and NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B) inhibition assay on NF- $\kappa$ B luciferase reporter stable HeLa cell line. 4'-hydroxypecterolide-14-*O*-acetate (CA-4) and 13-*N*-proline melitensin (CP-4) showed significant inhibitory activities while they had no cytotoxicity on RAW 264.7 cell line.

**Keywords:** *Centaurea athoa*, *Centaurea polyclada*, sesquiterpene, cytotoxicity, antiinflammatory

## İÇİNDEKİLER

TABLolar LİSTESİ.....	III
ŞEKİL ve RESİMLER LİSTESİ.....	IV
ŞEMALAR LİSTESİ.....	V
SPEKTRUMLAR LİSTESİ.....	V
KISALTMALAR.....	X
<b>BÖLÜM 1. GİRİŞ ve AMAÇ.....</b>	<b>1</b>
<b>BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. ASTERACEAE FAMILİYASI.....	4
2.2. <i>CENTAUREA</i> L. CİNSİ.....	11
2.2.1. <i>Centaurea</i> L. Cinsinin Genel Morfolojik Özellikleri.....	12
2.2.2. <i>Centaurea</i> L. Cinsinin Genel Kimyasal Özellikleri.....	13
2.2.3. <i>Centaurea</i> L. Taksonlarının Halk Arasında Tıbbi Amaçla Kullanımları.....	30
2.2.4. <i>Centaurea</i> L. Taksonları ile Gerçekleştirilen Biyoaktivite Çalışmaları.....	31
2.3. <i>Centaurea athena</i> DC.....	38
2.4. <i>Centaurea polyclada</i> DC.....	41
<b>BÖLÜM 3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>44</b>
3.1. KULLANILAN CİHAZLAR.....	44
3.2. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR.....	45
3.2.1. Bitkisel Materyal.....	45
3.2.2. Kromatografik Çalışmalar.....	45
3.2.2.1. Açık Kolon Kromatografisi (AKK).....	45
3.2.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK).....	47
3.2.3. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları.....	49
3.2.3.1. <i>C. athena</i> Üzerinde Yapılan Ekstraksiyon Çalışmaları.....	49
3.2.3.2. <i>C. athena</i> Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları.....	50
3.2.3.3. <i>C. polyclada</i> Üzerinde Yapılan Ekstraksiyon Çalışmaları.....	55
3.2.3.4. <i>C. polyclada</i> Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları.....	57
3.3. BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI.....	63
3.3.1. Antienflamatuvar Aktivite.....	63
3.3.2. Sitotoksik Aktivite.....	65
<b>BÖLÜM 4. BULGULAR.....</b>	<b>67</b>
4.1. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALARLA İLGİLİ BULGULAR.....	67
4.1.1. <i>Centaurea athena</i> DC.....	67



4.1.1.1. SESKİTERPENLER .....	68
4.1.1.2. BASİT FENOLİK BİLEŞİKLER ve GLUKOZİTLERİ.....	110
4.1.1.3. FENİLPROPANOİT GLUKOZİTLERİ .....	124
4.1.1.4.FİTOSTEROL .....	132
4.1.2. <i>Centaurea polyclada</i> D.C. ....	133
4.1.2.1. SESKİTERPENLER .....	134
4.1.2.2. METOKSİ FLAVONLAR .....	188
4.1.2.3. LİGNAN GLUKOZİTİ .....	204
4.1.2.4. BASİT FENOLİK GLUKOZİT .....	215
4.1.2.4. FENİLPROPANOİT GLUKOZİTİ.....	218
4.2. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR .....	219
4.2.1. Sitotoksik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	219
4.2.2. Antienflamatuvar Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	221
<b>BÖLÜM 5. TARTIŞMA ve SONUÇ .....</b>	<b>223</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>235</b>

## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 1. Centaureinae altribusunda yer alan gruplar ve bu gruplara ait cinsler .....	7
Tablo 2. <i>Centaurea</i> türlerinden izole edilen germakranolitler .....	17
Tablo 3. Germakranolitlere ait <sup>13</sup> C NMR verileri .....	18
Tablo 4. <i>Centaurea</i> türlerinden izole edilen elemanolitler .....	19
Tablo 5. Elemanolitlere ait <sup>13</sup> C NMR verileri .....	20
Tablo 6. <i>Centaurea</i> türlerinden izole edilen ödesmanolitler .....	21
Tablo 7. Ödesmanolitlere ait <sup>13</sup> C NMR verileri .....	22
Tablo 8. <i>Centaurea</i> türlerinden izole edilen guayanolitler .....	23
Tablo 9. Guayanolitlere ait <sup>13</sup> C NMR verileri-1 .....	26
Tablo 10. Guayanolitlere ait <sup>13</sup> C NMR verileri-2 .....	27
Tablo 11. <i>C. athoa</i> 'dan izole edilen bileşikler .....	55
Tablo 12. <i>C. polyclada</i> 'dan izole edilen bileşikler .....	62
Tablo 13. CA-1 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	71
Tablo 14. CA-2 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	85
Tablo 15. CA-3 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	95
Tablo 16. CA-4 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	104
Tablo 17. CA-5 <sup>1</sup> H NMR verileri (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	111
Tablo 18. CA-6 <sup>1</sup> H NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	114
Tablo 19. CA-7 <sup>1</sup> H NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	117
Tablo 20. CA-8 <sup>1</sup> H NMR verileri (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	121
Tablo 21. CA-9 <sup>1</sup> H NMR verileri (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....	125
Tablo 22. CA-10 <sup>1</sup> H NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	129
Tablo 23. CP-1 ve CP-2'ye ait <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	137
Tablo 24. CP-3 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	149
Tablo 25. CP-4 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	161
Tablo 26. CP-5 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	171
Tablo 27. CP-6 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	180
Tablo 28. CP-7, CP-8 ve CP-9'a ait <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri .....	191
Tablo 29. CP-10 <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	207
Tablo 30. CP-11 <sup>1</sup> H NMR verileri (CD <sub>3</sub> OD) .....	216
Tablo 31. Ekstreler ve izole edilen seskiterpen moleküllerine ait sitotoksik aktivite bulguları .....	220

Tablo 32. Ekstreler ve izole edilen seskiterpen moleküllerine ait antiinflamatuvar aktivite bulguları. ....	222
---	-----

## ŞEKİL VE RESİMLER LİSTESİ

Şekil 1. APG-III sistemine göre Asteraceae altfamilyaları .....	5
Şekil 2. APG-III sistemine göre Carduinae alttribusunun sınıflandırılması .....	6
Şekil 3. <i>Centaurea</i> türlerinde orta sıradaki involukrum braktelerinin taşıdığı temel ek yapı tipleri ve tayin grupları. ....	13
Şekil 4. <i>Centaurea</i> türlerinden elde edilen seskiterpenlerin ana iskelet yapıları .....	14
Şekil 5. <i>C. scoparia</i> 'dan izole edilen pirano-flavon türevleri .....	29
Şekil 6. İNOS inhibisyonu testinde nitrikoksit ile Griess reaktifinin reaksiyon mekanizması.....	64
Şekil 7. NF-κB inhibisyonu testinde lusiferin/oksilusiferin dönüşüm reaksiyonu ....	65
Şekil 8. MTT testinde formazan kristali oluşum reaksiyonu .....	66
Şekil 9. CP-4 molekülünün olası biyosentez mekanizması (Michael tip 1,4 katılma reaksiyonu).....	160
Şekil 10. <i>C. hierapolitana</i> 'dan elde edilen Hierapolitanin A ve B .....	225
Şekil 11. <i>Saussurea lappa</i> 'dan izole edilen saussureamin türevleri .....	227
Şekil 12. Sinisin molekülünün yapısı.....	228
Şekil 13. Seskiterpen laktonların alkilasyon mekanizması .....	229
Şekil 14. Arktigenin ve Matairesinol moleküllerinin kimyasal yapıları .....	232
Resim 1. <i>C. athena</i> genel görünüşü, involukrum braktelerinde ek yapılar ve aken meyveler.....	38
Resim 2. <i>C. polyclada</i> genel görünüşü ve aken meyveler .....	41
Resim 3. CA-11 İTK profili (F: CA-11; β-sitosterol-3-O-β-D-glukopiranozit); Silika jel alüminyum plak; Çözgen sistemi: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (90:10:1); V/S reaktifi). 132	
Resim 4. CP-12 İTK profili (F: CP-12, S: Siringin; Silika jel alüminyum plak; Çözgen sistemi: CHCl <sub>3</sub> :MeOH:H <sub>2</sub> O (80:20:2); A: UV-254 nm, B: V/S reaktifi)...	218

## ŞEMALAR LİSTESİ

Şema 1. <i>C. athoa</i> bitkisi ekstraksiyon işlemleri.....	50
Şema 2. <i>C. athoa</i> CHCl <sub>3</sub> ekstresinden elde edilen moleküllere ait izolasyon şeması	53
Şema 3 <i>C. athoa</i> <i>n</i> -BuOH ekstresinden elde edilen moleküllere ait izolasyon şeması .....	54
Şema 4. <i>C. polyclada</i> bitkisi ekstraksiyon işlemleri .....	56
Şema 5. <i>C. polyclada</i> <i>n</i> -BuOH ekstresinden elde edilen moleküllere ait izolasyon şeması.....	60
Şema 6. <i>C. polyclada</i> CHCl <sub>3</sub> ekstresinden elde edilen moleküllere ait izolasyon şeması.....	61

## SPEKTRUMLAR LİSTESİ

Spektrum 1. CA-1 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod).....	72
Spektrum 2. CA-1 <sup>1</sup> H NMR spektrumu (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	73
Spektrum 3. CA-1 <sup>13</sup> C NMR spektrumu (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	74
Spektrum 4. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)-1 .....	75
Spektrum 5. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)-2 .....	76
Spektrum 6. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-1 .....	77
Spektrum 7. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-2 .....	78
Spektrum 8. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-3 .....	79
Spektrum 9. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-1 .....	80
Spektrum 10. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-2 .....	81
Spektrum 11. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H dipolar çapraz relaksasyon spektrumu (NOESY)-1..	82
Spektrum 12. CA-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H dipolar çapraz relaksasyon spektrumu (NOESY)-2..	82
Spektrum 13. CA-2 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod).....	86

Spektrum 14. CA-2 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	87
Spektrum 15. CA-2 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	88
Spektrum 16. CA-2 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY) .....	89
Spektrum 17. CA-2 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-1 .....	90
Spektrum 18. CA-2 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-2 .....	91
Spektrum 19. CA-2 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	92
Spektrum 20. CA-3 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod).....	96
Spektrum 21. CA-3 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	97
Spektrum 22. CA-3 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	98
Spektrum 23. CA-3 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY) .....	99
Spektrum 24. CA-3 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	100
Spektrum 25. CA-4 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod).....	105
Spektrum 26. CA-4 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	106
Spektrum 27. CA-4 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	107
Spektrum 28. CA-4 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY) .....	108
Spektrum 29. CA-4 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	109
Spektrum 30. CA-5 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod).....	111
Spektrum 31. CA-5 $^1\text{H}$ NMR spektrumu ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz).....	112
Spektrum 32. CA-6 LC-MS spektrumu (Negatif mod) .....	114
Spektrum 33. CA-6 $^1\text{H}$ NMR spektrumu ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) .....	115
Spektrum 34. CA-7 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod).....	118
Spektrum 35. CA-7 $^1\text{H}$ NMR spektrumu ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz) .....	119
Spektrum 36. CA-8 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod).....	122
Spektrum 37. CA-8 $^1\text{H}$ NMR spektrumu ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz).....	123
Spektrum 38. CA-9 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod).....	126
Spektrum 39. CA-9 $^1\text{H}$ NMR spektrumu ( $\text{DMSO}-d_6$ , 400 MHz).....	127

Spektrum 40. CA-10 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod).....	130
Spektrum 41. CA-10 <sup>1</sup> H NMR spektrumu (DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> , 400 MHz).....	131
Spektrum 42. CP-1 QTOF kütle spektrumu (Pozitif mod) .....	137
Spektrum 43. CP-1 <sup>1</sup> H NMR spektrumu (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	138
Spektrum 44. CP-1 <sup>13</sup> C NMR spektrumu (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	139
Spektrum 45. CP-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY) .....	140
Spektrum 46. CP-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu NMR spektrumu (HSQC) .....	141
Spektrum 47. CP-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-1 .....	142
Spektrum 48. CP-1 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-2 .....	143
Spektrum 49. CP-2 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod) .....	144
Spektrum 50. CP-2 <sup>1</sup> H NMR spektrumu (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	145
Spektrum 51. CP-2 <sup>13</sup> C NMR spektrumu (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	146
Spektrum 52. CP-3 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod) .....	150
Spektrum 53. CP-3 <sup>1</sup> H NMR spektrumu (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)-1.....	151
Spektrum 54. CP-3 <sup>1</sup> H NMR spektrumu (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)-2.....	152
Spektrum 55. CP-3 <sup>13</sup> C NMR spektrumu (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	153
Spektrum 56. CP-3 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY) .....	154
Spektrum 57. CP-3 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC) .....	155
Spektrum 58. CP-3 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-1 .....	156
Spektrum 59. CP-3 2D <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-2 .....	157
Spektrum 60. CP-4 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod) .....	162
Spektrum 61. CP-4 <sup>1</sup> H NMR spektrumu (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) .....	163
Spektrum 62. CP-4 <sup>1</sup> H NMR spektrumu (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD)-2.....	164
Spektrum 63. CP-4 <sup>13</sup> C NMR spektrumu (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	165
Spektrum 64. CP-4 2D <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY) .....	166

Spektrum 65. CP-4 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC) .....	167
Spektrum 66. CP-4 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	168
Spektrum 67. CP-5 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod) .....	172
Spektrum 68. CP-5 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	173
Spektrum 69. CP-5 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	174
Spektrum 70. CP-5 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY) .....	175
Spektrum 71. CP-5 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC) .....	176
Spektrum 72. CP-5 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ NMR heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	177
Spektrum 73. CP-6 QTOF kütle spektrumu (Pozitif mod) .....	181
Spektrum 74. CP-6 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )-1 .....	182
Spektrum 75. CP-6 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )-2 .....	183
Spektrum 76. CP-6 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	184
Spektrum 77. CP-6 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY) .....	185
Spektrum 78. CP-6 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC) .....	186
Spektrum 79. CP-6 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	187
Spektrum 80. CP-7 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod) .....	192
Spektrum 81. CP-7 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	193
Spektrum 82. CP-7 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	194
Spektrum 83. CP-7 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	195
Spektrum 84. CP-8 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod) .....	196
Spektrum 85. CP-8 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	197
Spektrum 86. C-8 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ ) .....	198
Spektrum 87. CP-8 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	199
Spektrum 88. CP-9 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod) .....	200

Spektrum 89. CP-9 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	201
Spektrum 90. CP-9 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	202
Spektrum 91. CP-9 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu NMR spektrumu (HMBC) .....	203
Spektrum 92. CP-10 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod) .....	208
Spektrum 93. CP-10 $^1\text{H}$ NMR spektrumu (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) .....	209
Spektrum 94. CP-10 $^{13}\text{C}$ NMR spektrumu (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	210
Spektrum 95. CP-10 2D $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ homonükleer korelasyonlu NMR spektrumları (COSY) .....	211
Spektrum 96. CP-10 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC) .....	212
Spektrum 97. CP-10 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-2 .....	213
Spektrum 98. CP-10 2D $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC) .....	214
Spektrum 99. CP-11 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod) .....	216
Spektrum 100. CP11 $^1\text{H}$ NMR spektrumu .....	217



## KISALTMALAR

$^{13}\text{C}$ NMR	Karbon Nükleer Manyetik Rezonans
$^1\text{H}$ NMR	Proton Nükleer Manyetik Rezonans
A-549	İnsan akciğer adenokarsinom
AAE	Askorbik asit eşdeğeri
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)
Ac	Asetil
AChE ve BChE	Asetilkolinesteraz ve butirilkolinesteraz
akb	Atomik kütle birimi
AKK	Açık Kolon Kromatografisi
APG	Angiosperm Phylogeny Group (Evrimsel Kapalı Tohumlu Gelişimi Topluluğu)
BuOH	Butanol
CaCo-2	İnsan kolon kolorektal adenokarsinom
$\text{CD}_3\text{OD}$	Dötero Metanol
$\text{CDCl}_3$	Dötero Kloroform
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Diklorometan
$\text{CHCl}_3$	Kloroform
-CHO	Aldehit
$\text{CO}_2$	Karbondioksit
-COOH	Karboksilik asit
COSY	Correlation Spectroscopy (Homonükleer Korelasyon Spektroskopisi)
COX	Cyclooxygenase (Siklooksijenaz)
CUPRAC	Cupric ion reducing antioxidant capacity [Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite]
<i>d</i>	Dublet
DC.	Augustin Pyramus de Candolle
<i>dd</i>	Dublet dublet
DMEM/F12	Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DMSO	Dimetilsülfoksit
$\text{DMSO-}d_6$	Dötero Dimetilsülfoksit
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EtOAc	Etil asetat
EtOH	Etanol
FBS	Fetal Bovine Serum (Fetal sığır serumu)
FRAP	Ferric ion reducing antioxidant power [Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü]
g	Gram
<i>g s</i>	Geniş singlet
GAE	Gallik asit eşdeğeri
$\text{H}_2\text{O}$	Su
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit
$\text{H}_2\text{SO}_4$	Sülfürik asit
HEK 293	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
HeLa	İnsan servikal adenokarsinom
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence Spectroscopy (Heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe spektrumu)

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy (Heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe spektrumu)
Hz	Hertz
IC <sub>50</sub>	%50 inhibitör konsantrasyon
IR	Infrared spektroskopisi
iNOS	İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
<i>J</i>	Hz cinsinden etkileşme sabiti
KFE	Katı faz ekstraksiyonu
L.	Carl Linnaeus
LC-MS	Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi)
LPS	Lipopolisakkarit
<i>m</i>	Multiplet
MCF-7	İnsan meme epitelyal adenokarsinom
-Me	Metil
MeOH	Metanol
MHz	MegaHertz
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	Mililitre
mPANC96	İnsan pankreas adenokarsinom
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NF-κB	Nuclear Factor kappa-light chain enhancer of activated B cells (Nükleer faktör kappa B)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans)
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
-OMe	Metoksil
OCC	Open column chromatography
PBS	Phosphate-buffered saline (İzotonik fosfat tamponu çözeltisi)
PC-3	İnsan prostat adenokarsinom
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate (Forbol-12-miristat-13-asetat)
<i>qd</i>	Kuartet dublet
Q-TOF MS	Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) Mass Spectrometry (Kuadropol-Uçuş zamanlı kütle spektrometresi)
RE	Rutin eşdeğeri
RP-C18	Terz faz silika
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium
<i>s</i>	Singlet
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis (Sodyum dodesil sülfat- Poliakrilamid jel elektroforezi)
subsp.	subspecies (Alttür)
<i>t</i>	Triplet
<i>td</i>	Triplet dublet
TE	Troloks eşdeğeri
U87MG	İnsan glioblastom-astrocitoma
UV	Ultravirole
VLC	Vacuum liquid chromatography (Vakum sıvı kromatografisi)
VSK	Vakum sıvı kromatografisi

$\mu\text{g}$   
 $\mu\text{M}$

Mikrogram  
Mikromolar



## BÖLÜM 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünya genelinde yaklaşık 1100 cins ve 25000 tür ile temsil edilen Asteraceae familyası, ekonomik değeri yüksek birçok bitkiyi de içerisinde bulunduran, en büyük familyalardan birisidir ve moleküler biyoloji alanındaki filogenetik çalışmalar doğrultusunda 11 altfamilya ve 35 tribusa ayrılmıştır. Carduinae alttribusunda yer alan Centaureinae alttribusu, Susanna ve Jacas tarafından 7 grup altında toplamış olup *Centaurea* grubu, içerisinde 32 cins barındıran en geniş gruptur(1-4).

*Centaurea* türleri, son yıllarda gerçekleştirilen morfolojik, karyolojik, palinolojik incelemeler ve moleküler sekans analizleri sonucunda *Centaurea* L., *Cyanus* Miller, *Psephellus* Cassini ve *Rhaponcoides* Vaillant olmak üzere 4 cins altında toplanmıştır. Bu ayrılmalara rağmen dünya genelinde yaklaşık olarak 500 tür ile temsil edilen *Centaurea* cinsi, Asteraceae familyası içerisinde hala en çok tür barındıran cinstir (5).

Ülkemizde özellikle Batı, Güneybatı ve Orta Anadolu'da yayılış gösteren *Centaurea* cinsi, 110 tanesi endemik olmak üzere 200 takson ile temsil edilmektedir (Endemizm %56.7). Tür sayısının fazlalığı ve endemizm oranının yüksek olması Anadolu'nun *Centaurea* için gen merkezi olabileceğini düşündürmektedir (6, 7).

Ülkemizde peygamber çiçeği, çakır diken, zerdali diken gibi isimlerle anılan birçok *Centaurea* türü, genel olarak abse, astım, hemoroit, midevi rahatsızlıklar gibi enflamatuvar hastalıklara karşı dahilen kullanılmaktadır. Bazı türlerin ezilerek lapa şeklinde cilt rahatsızlıklarına karşı haricen kullanıldığı da belirlenmiştir (8).

*Centaurea* taksonlarının farklı kısımlarından elde edilen uçucu yağlar, total ekstraktlar veya bu ekstraktlardan izole edilen sekonder metabolitler çeşitli biyoaktivite çalışmalarına konu olmuşlardır. Yapılan çeşitli araştırmalar ile *Centaurea* türlerinin antienflamatuvar, antimalaryal, antiprotozoal, antimikrobiyal, antiülserojenik, antioksidan ve sitotoksik aktivitelerinin bulunduğu belirlenmiştir (9).

Biyoaktif sekonder metabolitler açısından zengin olan *Centaurea* taksonları ile gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalar sonucunda elde edilen ana bileşen grupları, genel olarak farklı tipte seskiterpenler, flavonoidler, lignanlar ve fenolik bileşiklerdir. Bunun yanında megastigman türevleri, triterpenik yapılar ve steroidal glikozitler de rapor edilen bileşikler arasında bulunmaktadır (10-12).

Tür sayısının fazlalığı, halk arasındaki yaygın kullanımı ve zengin kimyasal içeriği nedeniyle *Centaurea* cinsi giderek önem kazanmış ve son yıllarda taksonomik, kimyasal ve biyolojik aktivite açısından oldukça fazla araştırmaya konu olmuştur.

*Centaurea* türlerinin sahip olduğu zengin biyoaktivite potansiyeli sebebiyle beş *Centaurea* türü (*C. aethoa*, *C. aphrodisia*, *C. hyalolepis*, *C. iberica* ve *C. polyclada*) üzerinde gerçekleştirdiğimiz biyolojik aktivite taramalarında, bitkilerden elde edilen metanol ekstraktlarının MCF7 (İnsan meme epitelyal adenokarsinom), A549 (İnsan akciğer adenokarsinom), U2OS (İnsan osteosarkoma) kanser hücre hatları ve normal HEK293 (İnsan embriyonik böbrek) hücre hattına karşı sitotoksik aktiviteleri karşılaştırılmış ve *C. polyclada* metanol ekstresinin MCF7, U2OS ve HEK293 hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivite gösterdiği saptanmıştır (IC<sub>50</sub>: 61, 63, 72 µg/ml) (13).

SK-MEL (İnsan malign melanom), KB (İnsan oral epidermal karsinom), BT-549 (İnsan meme duktal karsinom), SK-OV-3 (İnsan ovaryum karsinom), Vero (Maymun böbrek fibroblast) ve LLC-PK11 (Domuz böbrek epitelyal hücre) hücre hatlarının dahil edildiği sitotoksik aktivite taramasında ise bitkilerin kloroform ekstraktlarının değişen konsantrasyonlarda sitotoksik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. *C. aethoa* kloroform ekstresinin SK-MEL, SK-OV-3 ve LLC-PK11 hücre hatlarına karşı (IC<sub>50</sub>: 56, 40 ve 20 µg/ml), *C. polyclada* kloroform ekstresinin ise KB ve BT-549 hücre hatlarına karşı (IC<sub>50</sub>: 33 ve 30 µg/ml) etki gösterdiği saptanmıştır. Bunun yanında *C. polyclada*'dan elde edilen ekstrenin Vero hücrelerini etkilemediği, fakat *C. aethoa* ekstresinin toksik olduğu (IC<sub>50</sub>: 52 µg/ml) belirlenmiştir.

NF-κB, SP-1 (Transkripsiyon faktörü SP-1) ve iNOS inhibisyonuna bağlı antienflamatuvar aktivite taramasında ise bitkilerin kloroform ekstraktlarının etkili olduğu, NF-κB ve iNOS salınımını değişen oranlarda inhibe ettikleri (IC<sub>50</sub>: 6-37 µg/ml ve 16-33 µg/ml aralığında) fakat SP-1'e bağlı lusiferaz ekspresyonunu etkilemedikleri gözlenmiştir. *in vitro* koşullarda doğal kaynaklı bir antienflamatuvar ajan olan partenolite eşdeğer NF-κB inhibisyonu gözlenen *C. aethoa* kloroform ekstresinin (IC<sub>50</sub>: 6 µg/ml) antienflamatuvar aktivitesi *in vivo* olarak incelenmiş ve 25 mg/kg dozda karagen indüklü sıçan pençe ödemesine karşı indometazine (10 mg/kg) yakın etki gösterdiği saptanmıştır (14).

Yapılan literatür taramasında, Batı Anadolu Bölgesi'nde doğal yayılış gösteren *Centaurea athoa* ve *Centaurea polyclada* taksonlarına ait herhangi bir fitokimyasal çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez kapsamında, adı geçen bitkiler üzerinde ayırma ve saflaştırma çalışmaları yapılması, elde edilen moleküllerin spektral yöntemlerle tayininin gerçekleştirilmesi ve seçilen bileşiklerin sitotoksik ve antiinflamatuvar aktiviteleri yönünden taranması amaçlanmıştır.



## BÖLÜM 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Asteraceae Familyası

Birçok küçük çiçekçiğin, konik, küresel ya da düzleşmiş bir reseptakulum üzerine yerleşmesiyle oluşan ve kapitulum adı verilen kompozit çiçek durumuyla diğer familyalardan kolayca ayırt edilebilen Asteraceae familyası, ekonomik değeri yüksek birçok bitkiyi de içerisinde bulunduran, en büyük familyalardan birisidir. Dünya genelinde yaklaşık 1100 cins ve 25000 tür bu familya içerisinde yer almaktadır.

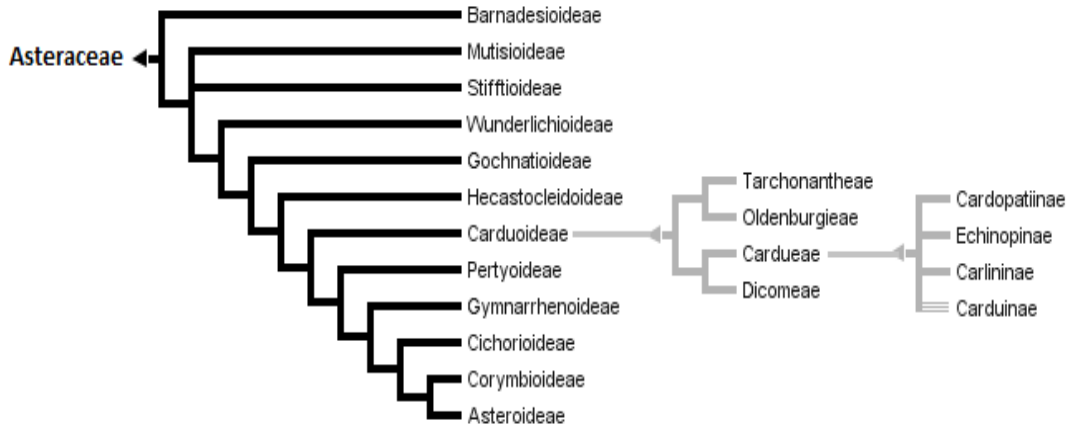
Asteraceae familyası, Evrimsel Kapalı Tohumlu Gelişimi Topluluğu (Angiosperm Phylogeny Group, APG) tarafından, evrimsel soy ilişkisinin değerlendirildiği filogenetik çalışmalar ile 11 altfamilya ve 35 tribusa ayrılmıştır. Bu tribuslardan en büyüğü, dünya genelinde yaklaşık 2500 tür içeren ve 4 alttribusa (Cardopatiinae, Echinopinae, Carlininae ve Carduinae) ayrılmış olan Cardueae Cass. tribusudur (Şekil 1 ve Şekil 2).

Carduinae alttribusunda yer alan Centaureinae alttribusu, dünya genelinde yaklaşık 800 tür içeren en geniş gruptur ve diğer gruplardan; akenlerdeki lateral-eksensel bağlantı kısmı, iki sıralı papus ve birkaç istisna dışında dikensiz yapraklar ile ayrılmaktadır. Moleküler çalışmalar doğrultusunda, Centaureinae alttribusunda yer alan 72 cins, Susanna ve Jacas tarafından 7 grup altında toplamış olup, *Centaurea* grubu, içerisinde 32 cins barındıran en geniş gruptur. Bu gruplar ve içerdikleri cinsler tablo halinde verilmiştir (Tablo 1) (1-4, 6).

Bu gruplara ait morfolojik özellikler şu şekildedir;

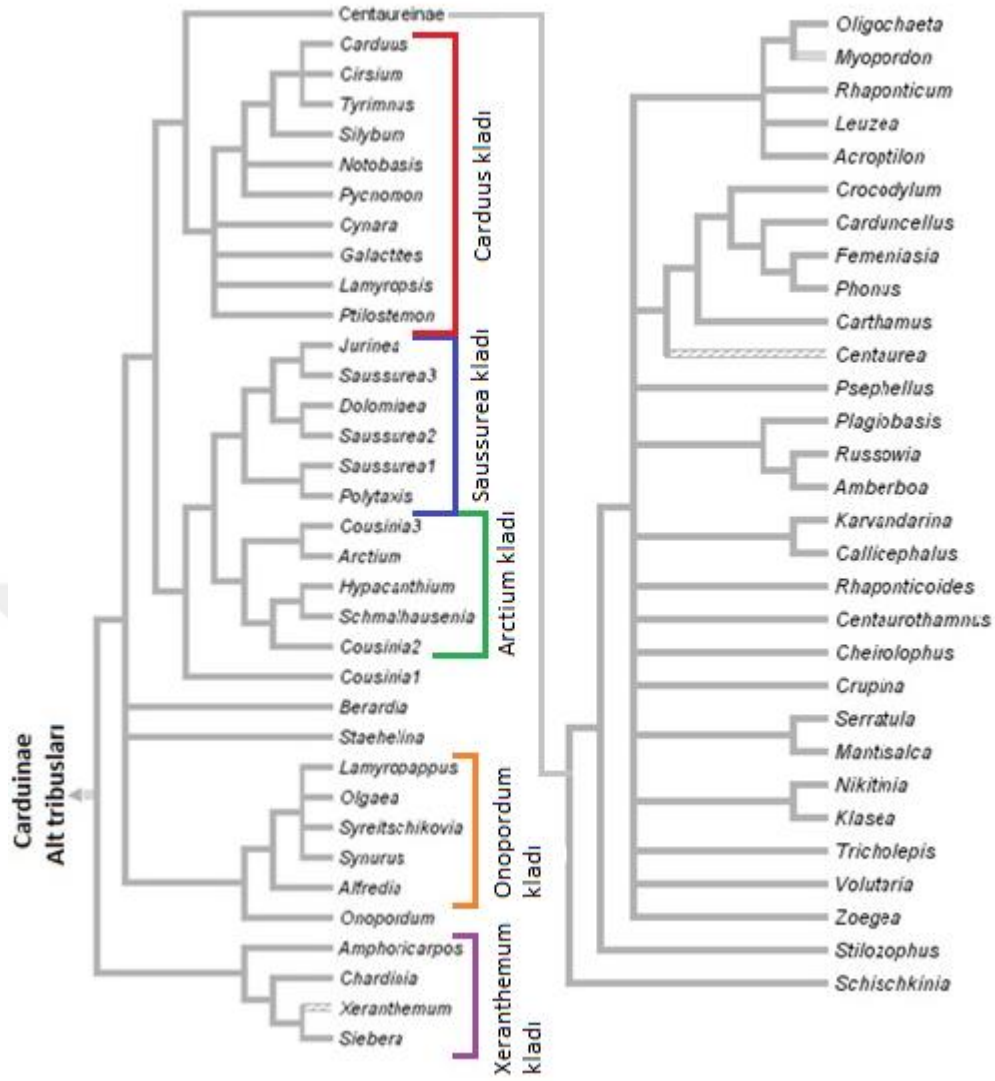
- Temel cinsler (Basal genera): Tek veya çok sayıda (korimboz) kapitulum taşıyan, dikensiz tek-çok yıllık otsular veya çalılardır. Akenlerde iki sıralı papus bulunur. Bazal kromozom sayıları genellikle 15'tir.
- *Volutaria* grubu: Verimsiz stamenler bulunan steril, büyük ve gösterişli radyant çiçekçiklere sahip heterogam kapitulum taşıyan, tek-çok yıllık otsulardır. Akenlerde bazal hilum bulunur ve papus pulsu dizilişlidir.
- *Rhaponticum* grubu: Homogam kapitulum taşıyan, dikensiz çok yıllık otsulardan oluşur. İnvolutkrum braktelerinin üzerinde çok büyük, zarımsı ve genellikle gümüş-beyaz renkli ek yapılar bulunmaktadır. Papus halka şeklinde dizilmiş ve düşüçüdür.

- *Serratula* grubu: Homogam kapitulum taşıyan, dikensiz çok yıllık otsular veya küçük çalılardır. Brakte üzerindeki ek yapılar tam gelişmemiştir. Akenlerde bazal hilum bulunur. Papus iki sıralıdır ve kolayca dökülür.
- *Carthamus* grubu: Homogam kapitulum taşıyan, genellikle dikenli tek veya çok yıllık otsular veya küçük çalılardır. Yassı şekilli ve çok sert olan aken meyvelerde lateral hilum ve iki sıralı papus bulunmaktadır.
- *Crocodylium* grubu: Heterogam kapitulum taşıyan, etli ve guddeli yaprakları bulunan, tek veya çok yıllık otsulardır. Tüm çiçekçiklerde çok sayıda saplı salgı tüyleri ve akende yoğun ipeksi tüyler bulunmaktadır.
- *Centaurea* grubu: Heterogam kapitulum taşıyan, genellikle dikensiz tek, iki veya çok yıllık otsular veya çalılardır. İnvolutrum braktelerinin üzerinde zarımsı, dikenli veya dikensiz, çok çeşitli şekillerde ek yapılar bulunmaktadır. Verimsiz çiçekçikler radyan ve gösterişlidir. Aken meyveler oblong ve yassı, bağlantı yerinde kalan iz ise lateral-eksenseldir. Papus çift sıralı, pinnulat veya pinnat şekillidir ve dış sırada yer alanlar tüyler serttir. Bazal kromozom sayıları 7-12'dir.



Şekil 1. APG-III sistemine göre Asteraceae altfamilyaları





Şekil 2. APG-III sistemine göre Carduinae alttribusunun sınıflandırılması

**Tablo 1.** Centaureinae alttribusunda yer alan gruplar ve bu gruplara ait cinsler

<b>Temel cinsler (Basal genera)</b>	<b><i>Volutaria</i> grubu</b>	<b><i>Rhaponticum</i> grubu</b>	<b><i>Serratula</i> grubu</b>	<b><i>Carthamus</i> grubu</b>	<b><i>Crocodylium</i> grubu</b>	<b><i>Centaurea</i> grubu</b>	
<i>Aetheopappus</i> (Cass.) Wagenitz & Hellwig <i>Amblyopogon</i> (DC.) Wagenitz & Hellwig <i>Cheirolophus</i> Cass. <i>Crupina</i> (Pers.) DC. <i>Czerniakowskya</i> (Czerep.) Wagenitz & Hellwig <i>Heterolophus</i> (Cass.) Wagenitz & Hellwig <i>Hyalinella</i> (Tzvelev) Wagenitz & Hellwig <i>Odontolophoidei</i> (Tzvelev) Wagenitz & Hellwig <i>Odontolophus</i> (Cass.) Wagenitz & Hellwig <i>Plectocephalus</i> D.Don <i>Psephellus</i> Cass. <i>Rhaponticoides</i> Vaill. <i>Sosnowskya</i> (Takht.) Wagenitz & Hellwig <i>Stizolophus</i> Cass. <i>Uralepis</i> (DC.) Wagenitz & Hellwig <i>Xanthopsis</i> (DC.) Wagenitz & Hellwig <i>Zoegea</i> L.	<i>Amberboa</i> Vall. (= <i>Volutarella</i> Cass.) <i>Cyanopsis</i> Cass. <i>Goniocaulon</i> Cass. <i>Karvandarina</i> Rech. <i>Mantisalca</i> Cass. <i>Plagiobasis</i> Schrenk <i>Russowia</i> C.Winkl. <i>Tricholepis</i> DC. <i>Valutaria</i> Cass.	<i>Acroptilon</i> Cass <i>Callicephalus</i> C.A.Mey. <i>Centaurothamnus</i> Wagenitz & Dittrich <i>Leuzea</i> DC <i>Ochrocephala</i> Dittrich <i>Oligochaeta</i> (DC) K. Koch <i>Rhaponticum</i> Vall. <i>Stemmacantha</i> Cass.	<i>Serratula</i> L. s.str.	<i>Carthamus</i> L. <i>Phonus</i> Hill. <i>Carduncellus</i> Adans. <i>Femeniasia</i> Susanna	<i>Crocodylium</i> Vaill	<i>Acrolophus</i> Cass. <i>Aegialophila</i> Boiss. & Heldr <i>Calcitrapa</i> Adans. <i>Centaurea</i> L. s.str. <i>Chartolepis</i> Cass. <i>Cnicus</i> L. <i>Colymbada</i> Hill <i>Corethrospis</i> DC. <i>Cyanus</i> Mill. <i>Grossheimia</i> Sosn. & Takht <i>Hymenocentron</i> (Cass.) DC. <i>Jacea</i> Mill. <i>Lepteranthus</i> (DC.) DC. <i>Melanoloma</i> Cass. <i>Mesocentron</i> (Cass.) DC. <i>Microlophus</i> (Cass.) DC <i>Paraphysis</i> (DC.) Wagenitz <i>Pectinastrum</i> (Cass.) DC. <i>Phalolepis</i> (Cass.) DC.	<i>Plumosipappus</i> (Czerep.) Wagenitz <i>Pseudophaeopappus</i> Wagenitz <i>Pseudoseridia</i> Wagenitz <i>Protocyanus</i> Dobrocz. <i>Pteracantha</i> Wagenitz <i>Ptosimopappus</i> Boiss <i>Seridia</i> Juss. <i>Seridioides</i> DC. <i>Solstitiaria</i> (Hill) Dobrocz. <i>Stephanochilus</i> Coss. & Hook <i>Tetramorphaea</i> (DC.) Boiss. <i>Triplocentron</i> (Cass.) Spach <i>Wagenitzia</i> Dostal

Shi Zhu ve arkadaşları, filogenetik çalışmalar ve morfolojik verileri birlikte değerlendirerek, Cardueae tribusu ve Centaureinae altribusuna ait dikotomik tayin anahtarları hazırlamış ve 2011 yılında yayınlamışlardır. Centaureinae altribusuna ait tayin anahtarında Çin’de yayılış gösteren 16 cinse yer verilmiştir (15).

### **Cardueae tribusuna ait tayin anahtarı**

**1a.** Aken bağlantı yerinde kalan iz lateral veya taban altında meyilli; kapitulum homogam veya heterogam ve çoğunlukla dış çiçekçikler ışımsal olarak yayılmış.

.....**Centaureinae altribusu**

**1b.** Aken bağlantı izi  $\pm$  tabanda; kapitulum her zaman homogam.

**2a.** Yaprak kenarı dikensiz; düz veya küt, küçük mukrolu batıcı olmayan dişler bulunur; involukrum braktelerinin uç kısmı bazen geriye kıvrık fakat asla kanca şeklinde değil.....**Saussurea grubu**

**2b.** Yaprak kenarları dikenli veya dikencikli, veya eğer  $\pm$  düz ise involukrum braktelerinin uç kısmı kanca şeklindedir.

**3a.** Papus belirgin tek tek dökülen kısa sert tüyler şeklinde veya (nadiren) papus yok; stilus dalları belirgin ve ayrık.....**Arctium grubu**

**3b.** Papus sert, kısa sert/yumuşak uzun tüyler şeklinde (nadiren pulsu dizilişli) tabandan itibaren halka şeklinde bitişik ve beraber dökülür; stilus dalları uç kısmında ayrılır.

**4a.** Akenin tepe kıvrımında ya gösterişsiz ya da belirgin küçük oymalı (nadiren tam) taç bulunur; tepe plakasında oleozom bulunmaz.....

.....**Onopordum grubu**

**4b.** Akenin tepe kıvrımında düz kenarlı dik bir taç bulunur; tepe plakasının ortasında belirgin yağlı bir tümsekçik (oleozom) bulunur.....**Carduinae altribusu**

## Centaureinae alttribusuna ait cins tayin anahtarı

- 1a.** Kapitulum homogam; tüm çiçekçikler hermafrodit
- 2a.** Ortadaki involukrum braktelerinin uç kısmı yuvarlak, ince saydam kenarlı veya zarımsı bir ek yapı bulunur.
- 3a.** İnvolukrum 3-6 cm çapında, veya eğer involukrum daha küçükse papus elementleri üstte pinnat ve kalıcıdır.....*Rhaponticum*
- 3b.** İnvolukrum 1-2.5 cm çapında, ve papus elementleri ince testere dişlidir ve kolayca dökülür.....*Plagiobasis*
- 2b.** Ortadaki involukrum braktelerinin uç kısmı sivri veya uca doğru daralan şekilde, ek yapı bulunmaz veya sade bir diken, dikencik veya iğnemi bir uç ile sonlanır.
- 4a.** Dıştaki involukrum brakteleri yapraklara benzer veya yaprağa benzer ek yapı taşımaktadır.....*Carthamus*
- 4b.** İnvolukrum braktelerinin tamamı ±derimsi ve yaprak benzeri ek yapı taşımaz fakat en uçtaki yapraklar sıklıkla kapitulumla yakınlaşmıştır.
- 5a.** Tek yıllık; papus elementleri iki tiptir (örn., en içteki sert tüyler daha geniş ve daha uzundur)
- 6a.** Ortadaki involukrum braktelerinin ucunda dikencik bulunur; gövde sıklıkla taban kısmında dallanır ve dallar yatık veya yükselidir.....*Oligochaeta*
- 6b.** Ortadaki involukrum braktelerinin ucunda dikencik bulunmaz; gövde dik ve sadece üst kısımda dallanır.....*Russowia*
- 5b.** Çok yıllık; papus elementleri hepsi ± tek tip.
- 7a.** Ortadaki involukrum brakteleri 0.5-1 mm genişliğinde, biz şeklinde veya dar ovat, üst kısmı uzun biz şeklinde daralmıştır.....*Tricholepis*
- 7b.** Ortadaki involukrum brakteleri 1-6 mm genişliğinde; dar üçgen veya dar ovat, üst kısmında kısa bir dikencik bulunur veya bulunmaz.
- 8a.** Gövde çubuksu şekilde dallanmış, terminal dallar kapitulumla kadar yoğun yapraklı.....*Archiserratula*
- 8b.** Gövde basit veya dallanmış, terminal dallar seyrek yapraklı veya yapraksız.....*Klasea*

- 1b.** Kapitulum heterogam; dış çiçekçikler dişi veya verimsiz, iç kısımdaki çiçekçikler hermafrodit.
- 9a.** Dıştaki veya ortadaki involukrum brakteleri saçaklı, dikenli, zarımsı veya saydam ek yapılar taşır.
- 10a.** Ortadaki involukrum braktelerinin üzerindeki ek yapılar saçak şeklinde ve tabana kadar kayıcı; hermafrodit çiçekler menekşe-mavi renkli.....*Cyanus*
- 10b.** Ortadaki involukrum braktelerinin üzerindeki ek yapılar saçaklı, parçalı, veya tam, çok az kayıcı veya kayıcı değil; hermafrodit çiçekler mor, pembe, beyaz veya sarı renkli.
- 11a.** Yapraklar özellikle alt kısmında yoğun yumuşak tüylü.....*Psephellus*
- 11b.** Yapraklar tüysüz veya çeşitli ince tüyler var fakat yoğun değil.
- 12a.** Yaprak ayasının kenarları sivri dişli; ortadaki involukrum braktelerinde boyuna çizgiler belirgin.....*Rhaponticoides*
- 12b.** Yaprak ayasının kenarları tam, kaba dişli, veya dikenli; ortadaki involukrum braktelerinde boyuna çizgiler belirgin değil veya yok..... *Centaurea*
- 9b.** Dıştaki ve ortadaki involukrum braktelerinin üzerinde ek yapı bulunmaz fakat bazen bir dikencik ve/veya saydam kenarlı olabilir.
- 13a.** Ortadaki involukrum braktelerinin uç kısmı genişçe yuvarlak.
- 14a.** Papus elementleri pulsu dizilişli; bitkiler tek veya iki yıllık.....*Amberboa*
- 14b.** Papus elementleri sert tüylü; bitkiler çok yıllık.
- 15a.** Korolla pembe veya morumsu renkli; yaprak ayası bölünmemiş veya kenarı testere dişli.....*Plagiobasis*
- 15b.** Korolla sarı/sarımsı renkli; yaprak ayası pinnatisekt, pinnat, veya 2-pinnatisekt.....*Rhaponticoides*
- 13b.** Ortadaki involukrum braktelerinin uç kısmı sivri veya uca doğru daralan şekilde.
- 16a.** Çok yıllık bitkiler; involukrum brakteleri yünsü veya kadifemsi tüylü.....*Serratula*
- 16b.** Tek yıllık bitkiler; involukrum brakteleri tüysüz veya az tüylü.
- 17a.** Yaprak ayasının kenarı dikenli; 20 cm'den kısa bodur bitkiler.....*Schischkinia*
- 17b.** Yaprak ayasının kenarları testere dişli/dişli, dikenli değil; 20-60 cm uzunluğunda dik gövdeli bitkiler.....*Crupina*

## 2.2. *Centaurea* L. Cinsi

*Centaurea* L. Asteraceae familyasının en çok türe sahip cinsi olup dünyada yaklaşık olarak 500 tür ile temsil edilmektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen morfolojik, karyolojik, palinolojik incelemeler ve moleküler sekans analizleri sonucunda *Centaurea* cinsi; *Centaurea* L., *Cyanus* Miller, *Psephellus* Cassini ve *Rhaponcoides* Vaillant olmak üzere 4 cinse ayrılmıştır. Bu ayrılmalara rağmen *Centaurea* cinsi Asteraceae familyası içerisinde hala en çok tür barındıran cinstir (5, 16).

2012 yılında Adil Güner başeditörlüğünde yayınlanan “Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı bitkiler)” kitabında yer alan son düzenlemeye göre; *Centaurea* cinsi, özellikle Batı, Güneybatı ve Orta Anadolu’da yayılış gösteren, 110 tanesi endemik olmak üzere 194 takson ile temsil edilmektedir (Endemizm %56.7) (7, 17). Son yıllarda yeni bulunan; *C. baseri* Köse & Alan (18), *C. aytugiana* Bancheva, Kaya & Binzet (19), *C. ziganensis* Yüzb., M. Bona & İ. Genç. (20), *C. goksivriensis* M. Bona (21), *C. amanosensis* M. Bona (22) ve *C. sennikoviana* Negaresh & Kaya (23) türlerinin ilavesiyle takson sayısı 200’e ulaşmıştır. Tür sayısının fazlalığı ve endemizm oranının yüksek olması Anadolu’nun *Centaurea* için gen merkezi olabileceğini düşündürmektedir.

“Türkiye Bitkileri Listesi” ve “APG-III sistemi”ne göre *Centaurea* cinsinin taksonomik durumu şu şekildedir;

Türkiye Bitkileri Listesi		APG-III	
<b>Bölüm</b>	:Magnoliophyta (Tohumlu Bitkiler)	<b>Klad</b>	:Angiosperms
		<b>Klad</b>	:Eudicots
<b>Altbölüm</b>	:Magnoliophytina (Kapalı Tohumlular)	<b>Klad</b>	:Core Eudicots
		<b>Klad</b>	:Asterids
<b>Altsınıf</b>	:Magnoliidae (Manolya Altsınıfı) ( <i>Monocotyledonae</i> ve <i>Dicotyledonae</i> dahildir)	<b>Klad</b>	:Euasterids II
		<b>Takım</b>	:Asterales
<b>Familya</b>	:Asteraceae (Papatyagiller)	<b>Familya</b>	:Asteraceae
		<b>Altfamilya</b>	:Carduoideae
<b>Cins</b>	: <i>Centaurea</i> L.	<b>Tribus</b>	:Cardueae
		<b>Alttribus</b>	:Carduineae
		<b>Alttribus</b>	:Centaureinae
		<b>Cins</b>	: <i>Centaurea</i> L.

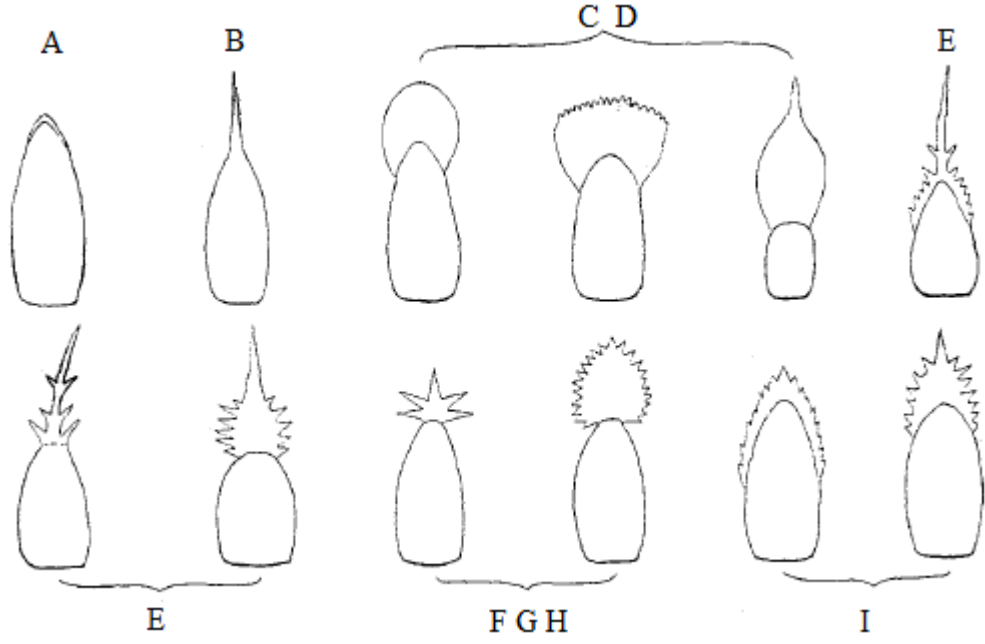
### 2.2.1. *Centaurea* L. Cinsinin Genel Morfolojik Özellikleri

*Centaurea* cinsinde yer alan bitkiler; tek, iki veya çok yıllık otsu, ender olarak da dikenli dalları veya herdemyeşil yaprakları olan çalı şeklinde bitkilerdir. Bitkilerin gövde ve yaprak yüzeyleri genellikle sık veya kısa tüylü ya da pürtüklü olmakla beraber nadiren çıplaktır. Yapraklar gövde üzerinde almaçlı (alternat) olarak dizilir ve bazen sadece tabanda rozet formunda bulunmaktadır. Gövde ve rozet yaprakları basitten derin parçalıya (pinnatipartit) kadar değişen tiplerdedir. Türkiye’de *C. odyssei* hariç diğer türlerin yaprak kenarları dikenli değildir.

Heterogam kapitulum, iki farklı tip çiçekçik taşıyan radyan formda veya çiçekçiklerin tamamı benzer şekilde olup disk formundadır. İnvolukrum genel olarak oval, küremsi, dikdörtgenimsi (oblong) veya yukarı doğru daralan gibi farklı şekillerdedir. Reseptakulumun çevresini saran involukrum brakteleri çok sıralı kiremit dizilişli ve dik konumlu olup, neredeyse hepsinde zarımsı, saman renginde veya derimsi ek yapılar bulunmaktadır.

Çiçekler pembe, mor, sarı veya beyaz renklidir. Merkezdeki çiçekçikler tüpsü ve hermafrodit, kenarda yer alan çiçekçikler ise genel olarak huni şeklinde, daha büyük ve gösterişli, fakat verimsizdir. Genellikle yüzeyi tüysüz ve olgunlaştığı zaman yassılaştırmış olan aken tipi meyvelerin tepesi yuvarlak veya düzdür. Aken üzerinde, dıştakiler sert tüylü, iç kısımdakiler ise daha kısa ve pulsu dizilişli olmak üzere iki/çok sıralı papus bulunmaktadır. Papus kalıcı veya nadiren düşüçüdür, bazen yoktur.

*Centaurea* türlerinin tayininde önemli bir karakter olan ek yapılar, tam veya saçak-kirpik şeklinde, dairemsi, üçgenimsi, uca doğru daralan veya küt gibi değişik formlarda bulunabilmektedir. Bu yapıların uç kısmı bir mukro, dikencik veya sert bir dikenle sonlanmış olabilir. Bazen ek yapılar sadece bir mukro veya küçük bir dikenden ibarettir ve nadiren bulunmayabilir. Floramızda yayılış gösteren *Centaurea* türleri, involukrum braktelerinin ucunda bulunan ek yapılara göre (Şekil 3) 10 gruba ayrılmış ve grup tayin anahtarı oluşturulmuştur (6). Aynı populasyon içerisinde yer alan bireylerde dahi ek yapıların boyut ve şekillerinde gözlenebilen farklılıklardan dolayı *Centaurea* L., taksonomik olarak tanımlanması ve sınıflandırılması zor, modern kimyasal ve sitolojik teknikler kullanılarak ileri araştırmalar yapılması gereken bir cinstir (6).



**Şekil 3.** *Centaurea* türlerinde orta sıradaki involukrum braktelerinin taşıdığı temel ek yapı tipleri ve tayin grupları.

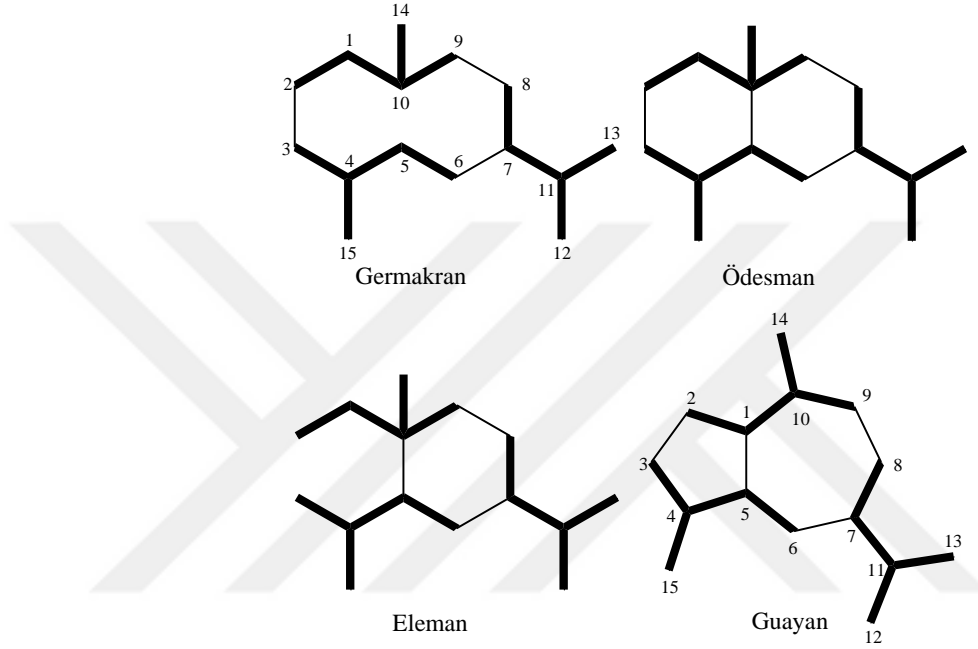
### 2.2.2. *Centaurea* L. Cinsinin Genel Kimyasal Özellikleri

Biyoaktif sekonder metabolitler açısından zengin olan *Centaurea* taksonları ile gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalar sonucunda, ana bileşen gruplarının farklı tipte seskiterpenler (10, 24-28), flavon ve flavonoidlerden (10, 12, 28, 29) oluştuğu görülmektedir. Bunun yanında lignanlar (30, 31), basit fenolik bileşikler, megastigman glikozitleri (11), triterpenik yapılar ve steroidal glikozitler de (10, 32) rapor edilen bileşikler arasında bulunmaktadır. Daha önce *Centaurea* cinsine dahil olup filogenetik çalışmalar doğrultusunda başka cinslere taşınan *Amberboa moschata* (*C. moschata*) (33), *Cyanus triumfettii* (*C. montana*) (34), *Cyanus segetum* (*C. cyanus*) (35) ve *Psephellus schischkinii* (*C. schischkinii*) (36) türlerinden indol alkaloidleri de rapor edilmiştir.



## SESKİTERPENLER

Üç izopren ünitesinin birleşmesiyle oluşan, 15 karbonlu bir bileşik grubu olan seskiterpenler, *Centaurea* türleri ile gerçekleştirilen çalışmalarda karakteristik moleküller olarak karşımıza çıkmaktadır. Fitokimyasal çalışmalar, *Centaurea* türlerinde germakran, eleman, ödesman ve guayan tip olmak üzere dört ana seskiterpen yapısının bulunduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4).



**Şekil 4.** *Centaurea* türlerinden elde edilen seskiterpenlerin ana iskelet yapıları

Birkaç istisna dışında, *Centaurea* türlerinden elde edilen tüm seskiterpenlerde C-6 konumunda  $\alpha$  yönelimli, oksijen taşıyan fonksiyonel bir grup bulunmaktadır. Bu grup, bazı moleküllerde serbest bir hidroksil halinde bulunurken, genel olarak 6,12- $\gamma$ -lakton halkası halindedir. Moleküller adlandırılırken kullanılan “-olit” son eki, molekülün lakton halkası taşıdığına işaret etmektedir. Yapıların çoğunda, karakteristik olarak, lakton ünitesine konjuge ekzosiklik metilen grubu bulunmaktadır. Moleküllerin çoğunun C-8 konumunda bulunan hidroksil grubu, her zaman  $\alpha$  yönelimli olup, moleküllerin taşıdıkları ester yan zincirleri bu noktadan bağlanmaktadır. Bazı moleküllerde laktonizasyon C-8 konumundan gerçekleşmekte ve 8,12- $\gamma$ -lakton yapıları oluşmaktadır. Molekül yapılarında görülen bir diğer karakteristik özellik ise C-10 konumundan uzanan bir metil grubunun (C-14) bulunmasıdır.

**Germakranolitler**, genel olarak C1-C10 ve C4-C5 arasında trans konfigürasyonlu çift bağ taşıyan germakra-1(10),4-dien yapısındadırlar. C11 ve C13 arasında karakteristik ekzosiklik çift bağ bulunurken, bazı moleküllerde C13'ün metil halinde uzandığı, 11,13-dihidro türevleri de bulunmaktadır. Hemen hepsinde 15 no'lu karbon, bir primer alkol veya asetiloksi türevi şeklindedir. C-8'de ise serbest bir  $\alpha$ -OH veya bu noktadan esterleşmiş bir yan zincir bulunmaktadır.

**Ödesmanolitler**, trans-dekalin yapısındaki seskiterpenlerdir. Genel olarak C-1 üzerinde  $\beta$ -OH grubu, C-4 üzerinde ise  $\alpha$  veya  $\beta$  konfigürasyonlu bir aldehit grubu bulunmaktadır. C-4'ün stereokimyasal özelliği,  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda, aldehit sinyalinin durumuna göre belirlenebilmektedir.  $\delta_{\text{H}}$  9.94–9.91 (gs) sinyali  $15\beta$ -CHO grubunun; sinyalin yukarı alana kayarak  $\delta_{\text{H}}$  9.68–9.33'de (*d*,  $J= 4.2\text{--}3.9$  Hz) rezonansa gelmesi ise  $15\alpha$ -CHO grubunun varlığına işaret etmektedir. Bazı yapılarda  $\gamma$ -lakton ünitesinin oluşmadığı, bunun yerine C12'nin serbest bir karboksilik asit halinde bulunduğu veya bu noktada metil esterlerinin olduğu rapor edilmiştir.

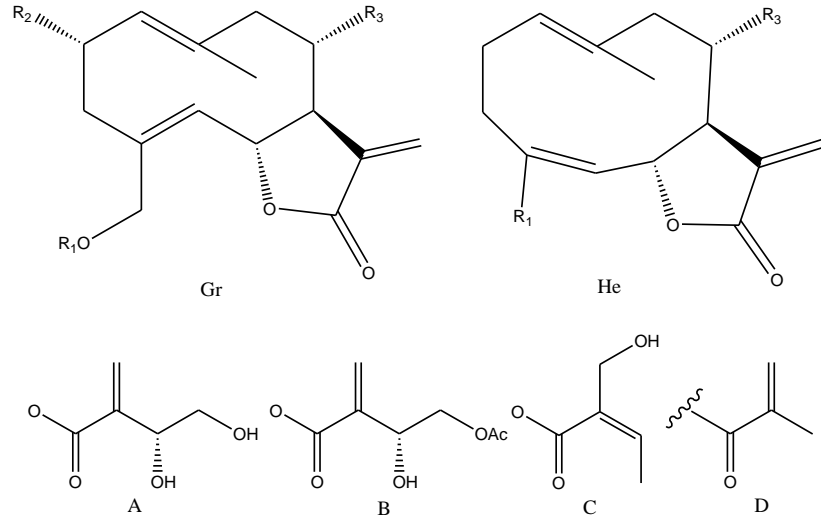
**Elemanolitler** de C-8 konumunda serbest bir  $\alpha$ -OH veya bu konumdan esterleşen bir yan zincir taşımaktadırlar. C-15 çoğunlukla primer alkol grubu halinde bulunurken, birkaç molekülde aldehit grubunun bulunduğu bildirilmiştir. Bazı yapılarda  $\gamma$ -lakton yapısı yerine, C-6'da  $\alpha$  konfigürasyonlu serbest bir hidroksil grubu ve C-12'de serbest bir karboksilik asit grubunun veya metil esterinin bulunduğu rapor edilmiştir.

**Guayanolitler**, *Centaurea* türlerinden izole edilen seskiterpenlerde, en kalabalık grubu oluşturmaktadırlar. Farklı fonksiyonel gruplar taşıyan 100'den fazla guayanolit türevi rapor edilmiştir. Hepsinde 1,5 konumlarından *cis* bağlı iki halka ve *trans*-6,12- $\gamma$ -lakton yapısı bulunmaktadır. Çoğunda C8'de  $\alpha$ -OH ve yan zincir bulunurken, bazılarında C-9'da da ilave bir  $-\text{OH}$  grubunun bulunduğu bildirilmiştir. Moleküllerin çoğunda C-14 metil grubunun yerini, C10'dan uzanan ekzosiklik metilen grubu almıştır. C15 ise çift bağ (ekzosiklik metilen), epoksi, klorhidrin, -diol, metil veya C15-nor gibi farklı şekillerde bulunabilmektedir. Moleküle bağlı yan zincirlerin çoğunda, heteroatom içeren stereojenik bir merkez bulunmaktadır. C11-C13 ekzosiklik metilen grubunda, H13b protonunun rezonansından hareketle, merkezin *R* veya *S* konfigürasyonunda olduğu söylenebilmektedir. H-13b protonu, stereojenik merkez *R* ise  $\delta_{\text{H}}$  5.56–5.64'de, *S* ise  $\delta_{\text{H}}$  5.71–6.07'de gözlenmektedir.

2013 yılında Maurizio Bruno ve arkadaşları, Centaureinae alttribusunda yer alan bitkilerden izole edilmiş olan seskiterpenler ile ilgili bir derleme makalesi yayınlamışlardır. 1958-2011 yıllarını kapsayan bu derlemede 166 *Centaurea* taksonu yer almaktadır. İzole edilmiş olan seskiterpenlerin yapıları ve bu moleküllere ait  $^{13}\text{C}$  NMR verileri de derlemede yer almaktadır (3). 2011-2016 yıllarında *Centaurea* taksonlarından elde edilen seskiterpen bileşikleri ve bunlara ait  $^{13}\text{C}$  NMR verileri tablolar halinde sunulmuştur (Tablo 2, Tablo 3, Tablo 4, Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7, Tablo 8, Tablo 9 ve Tablo 10)



**Tablo 2.** *Centaurea* türlerinden izole edilen germakranolitler.

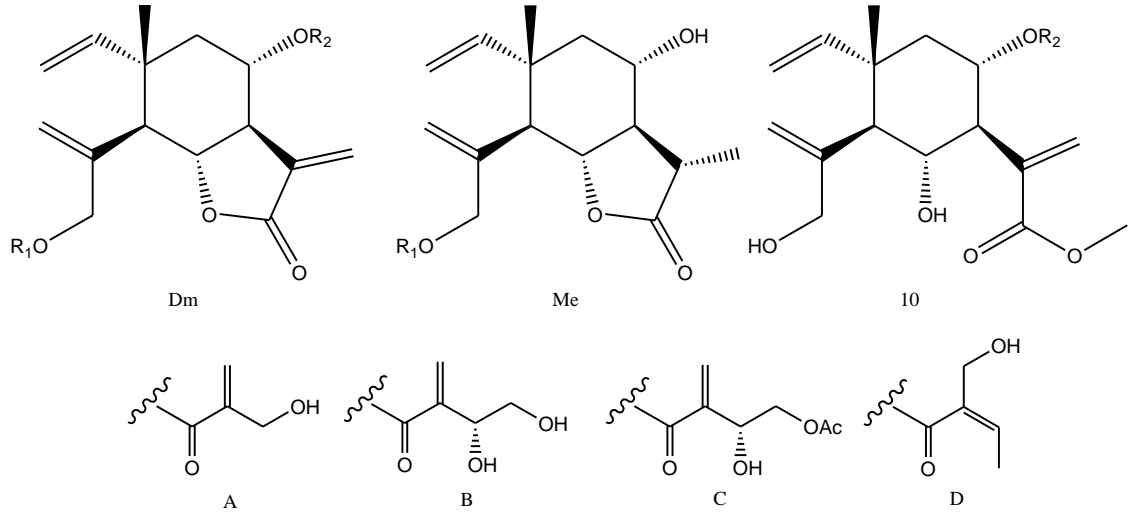


No	Ana yapı	R1	R2	R3	İsim	Takson (Ref.)
1	Gr	H	H	A	Sinisin; 8 $\alpha$ -O-(3',4'-dihidroksi-2'-metilen butanoiloksi) salonitenolit	<i>C. calcitrapa</i> (37) <i>C. foucauldiana</i> (38) <i>C. galicicae</i> (39) <i>C. jacea</i> (40) <i>C. parviflora</i> (41) <i>C. soskae</i> (39) <i>C. tomorosii</i> (39) <i>C. tougourensis</i> (42) <i>C. zuccariniana</i> (43)
2	Gr	H	H	B	4'-asetil sinisin; Sinisin 4'-O-asetil	<i>C. jacea</i> (40) <i>C. zuccariniana</i> (43)
3	Gr	H	H	C	8 $\alpha$ -(5'-hidroksiangeloil)-salonitenolit	<i>C. davidovii</i> (44)
4	Gr	D	OH	H	2 $\alpha$ -hidroksi-15-metakrilat-germakra 1(10)E,4E,11(13)-trien-12,6 $\alpha$ -olit	<i>C. pannonica</i> (45)
5	He	-CH <sub>2</sub> -OH	-	B	(1E,4Z)-15-hidroksi-8 $\alpha$ -O-[(4-asetoksi-3-hidroksi-2-metilenbutanoil)oksi]-6 $\beta$ H,7 $\alpha$ H-germakra-1,4,11(13)-trien-6,12-olit	<i>C. zuccariniana</i> (43)
6	He	-CH <sub>2</sub> -O-Ac	-	A	(6R,7R,8S,3'R)-8 $\alpha$ -O-(3',4'-dihidroksi-2'-metilen butanoiloksi)-15-asetoksi-helianga-1(10),4(5),11(13)-trien-6,12-olit	<i>C. foucauldiana</i> (38) <i>C. tougourensis</i> (42)
7	He	-CHO	-	A	Sulfurein; (6R,7R,8S,3'R) 8 $\alpha$ -(3',4'-dihidroksi-2'-metilenbutanoiloksi)-15-okso-helianga-1(10),4(5),11(13)-trien-6,12-olit	<i>C. tougourensis</i> (42)

**Tablo 3.** Germakranolitlere ait  $^{13}\text{C}$  NMR verileri

C	1 <sup>a</sup>	1 <sup>d</sup>	1 <sup>c</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>	6 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>
1	129.8	130.8	130.9	129.9	129.8	129.8	128.7	128.5	127.8
2	26.1	26.8	26.9	26.3	26.3	69.7	24.5	24.6	24.1
3	34.6	35.5	35.2	34.7	34.7	44.5	27.0	27.0	22.3
4	144.6	145.6	145.5	144.1	143.9	139.2	134.2	134.2	142.0
5	128.0	129.6	129.7	128.4	128.6	132.6	125.1	125.4	146.7
6	77.1	78.7	78.7	76.4	76.6	79.7	76.5	76.5	75.6
7	53.0	54.1	54.1	53.0	53.0	50.8	50.5	50.5	49.1
8	73.1	74.6	74.5	73.3	72.8	27.5	70.1	70.1	69.1
9	48.6	47.0	49.0	48.6	48.9	40.6	46.1	46.1	45.5
10	132.1	133.1	133.2	132.3	132.4	137.6	132.3	131.1	131.6
11	135.3	137.3	137.4	135.4	135.5	139.1	135.1	136.7	132.8
12	170.5	172.0	172.1	169.8	169.8	169.8	170.5	169.5	169.2
13	125.5	125.2	125.3	125.3	125.3	120.1	127.5	127.5	129.9
14	16.7	17.0	17.0	16.8	16.8	16.9	16.8	16.7	15.0
15	60.7	60.9	60.7	61.5	61.5	62.2	61.7	66.8	194.0
1'	165.1	166.6	166.6	164.6	166.1	166.7	165.0	164.8	164.8
2'	139.7	142.4	142.3	138.8	131.6	135.5	138.4	139.4	139.3
3'	70.8	71.8	71.9	69.5	141.7	126.4	70.9	70.9	70.1
4'	65.8	66.7	66.7	67.3	15.9	18.2	66.2	65.7	65.0
5'	127.1	127.2	127.0	127.8	64.9		127.1	126.6	126.1
1''				171.3			171.0	170.5	
2''				20.8			20.7	20.8	

<sup>a</sup>  $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ ; <sup>b</sup>  $\text{CDCl}_3$ ; <sup>c</sup>  $\text{CD}_3\text{OD}$ ; <sup>d</sup> Aseton- $d_6$  içerisinde

**Tablo 4.** *Centaurea* türlerinden izole edilen elemanolitler

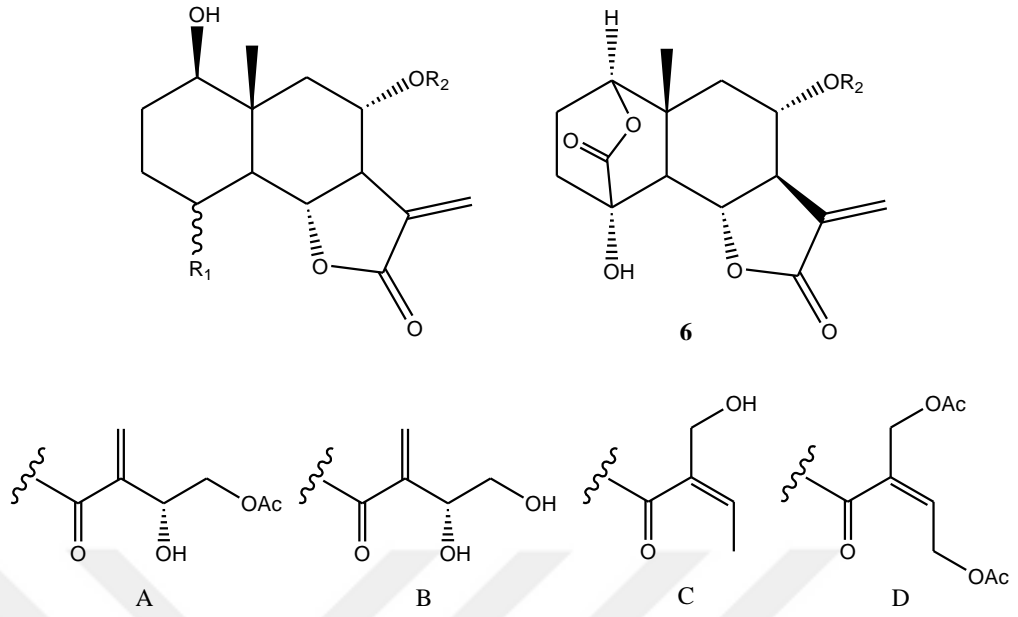
No	Ana Yapı	R1	R2	İsim	Takson (Ref.)
1	Dm	H	H	Dehidromelitensin; 11,13-dehidromelitensin	<i>C. maroccana</i> (46) <i>C. zuccariniana</i> (43)
2	Dm	Ac	H	15-asetil dehidromelitensin	<i>C. omphalotrica</i> (47)
3	Me	H	-	Melitensin	<i>C. nicaeensis</i> (48)
4	Me	Ac	-	15-asetil melitensin	<i>C. omphalotrica</i> (47)
5	Dm	H	A	8-(4'-hidroksi metakrilat)- dehidromelitensin	<i>C. omphalotrica</i> (47)
6	Dm	H	B	Izosinisin; 8 $\alpha$ -O-(3',4'-dihidroksi-2'- metilenbutanoiloksi) dehidromelitensin	<i>C. foucauldiana</i> (38) <i>C. maroccana</i> (46) <i>C. parviflora</i> (41) <i>C. tougourensis</i> (42) <i>C. zuccariniana</i> (43)
7	Dm	H	C	8 $\alpha$ -O-(4'-asetoksi-3'-hidroksi-2'- metilenbutanoiloksi) dehidromelitensin	<i>C. zuccariniana</i> (43)
8	Dm	H	A	8 $\alpha$ -O-(3',4'-dihidroksi-2'- metilenbutanoiloksi)-15-okso 5H $\alpha$ ,6H $\beta$ ,7H $\alpha$ , - elema-1,3,11(13)-trien- 6,12-olit	<i>C. zuccariniana</i> (43)
9	Dm	H	D	8 $\alpha$ -[2'-hidroksimetil-2'-butenoiloksi]- dehidromelitensin	<i>C. maroccana</i> (46)
10	-	-	C	Metil 8 $\alpha$ -O-(4'-asetoksi-3'-hidroksi-2'- metilen butanoiloksi)-6 $\alpha$ ,15- dihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oat	<i>C. zuccariniana</i> (43)

**Tablo 5.** Elemanolitlere ait <sup>13</sup>C NMR verileri

<b>C</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>2<sup>a</sup></b>	<b>3<sup>a</sup></b>	<b>5<sup>a</sup></b>	<b>6<sup>a</sup></b>	<b>7<sup>a</sup></b>	<b>10<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	146.1	146.0	146.3	145.6	145.6	145.6	146.2
<b>2</b>	112.7	113.0	112.5	113.1	113.1	113.1	112.1
<b>3</b>	114.9	116.9	114.5	115.1	115.1	115.1	114.9
<b>4</b>	143.9	138.7	144.4	143.6	143.6	143.6	146.2
<b>5</b>	50.6	51.5	50.4	50.6	50.6	50.6	55.3
<b>6</b>	78.8	78.3	78.7	78.6	78.7	78.7	70.9
<b>7</b>	55.0	55.1	58.4	52.3	52.4	52.4	54.7
<b>8</b>	67.5	67.5	68.8	69.6	69.7	69.7	71.1
<b>9</b>	49.8	49.8	49.4	45.0	45.0	45.0	43.5
<b>10</b>	41.9	42.0	41.7	41.9	41.9	41.9	40.2
<b>11</b>	137.4	137.4	41.5	136.6	136.7	136.7	138.0
<b>12</b>	169.7	169.7	178.6	169.2	169.1	169.1	167.1
<b>13</b>	120.5	120.5	14.3	120.2	120.1	120.1	128.4
<b>14</b>	18.9	19.0	18.9	18.7	18.4	18.4	18.3
<b>15</b>	67.3	67.2	67.3	67.3	67.3	67.3	67.8
<b>1'</b>				165.3	165.2	164.6	165.2
<b>2'</b>				139.1	139.0	138.3	139.1
<b>3'</b>				126.7	127.5	127.6	126.8
<b>4'</b>				62.3	71.2	69.7	71.6
<b>5'</b>					64.8	67.1	65.7
<b>1''</b>						171.4	171.3
<b>2''</b>						20.8	20.9
<b>-OMe</b>							52.0

<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub> içerisinde

**Tablo 6.** *Centaurea* türlerinden izole edilen ödesmanolitler



No	R1	R2	İsim	Takson (Ref.)
1	$\alpha$ -CHO	A	8 $\alpha$ -O-(4'-asetoksi-3'-hidroksi-2'-metilenbutanoiloksi)-sonkukarpolit	<i>C. zuccariniana</i> (43)
2	$\beta$ -CHO	A	8 $\alpha$ -O-(4'-asetoksi-3'-hidroksi-2'-metilenbutanoiloksi)-4-epi-sonkukarpolit	<i>C. zuccariniana</i>
3	$\beta$ -CHO	B	8 $\alpha$ -O-(3',4'-dihidroksi-2'-metilenbutanoiloksi)-4-epi-sonkukarpolit; Malasitenolit	<i>C. zuccariniana</i>
4	$\alpha$ -CHO	D	8 $\alpha$ -O-(4,5-diasetoksiangeloil) sonkukarpolit	<i>C. zuccariniana</i>
5	$\alpha$ -CHO	C	8 $\alpha$ -O-(2'-hidroksimetil-2'-butenoiloksi)-sonkukarpolit	<i>C. maroccana</i> (46)
6	-	A	Zukkarinin	<i>C. zuccariniana</i>

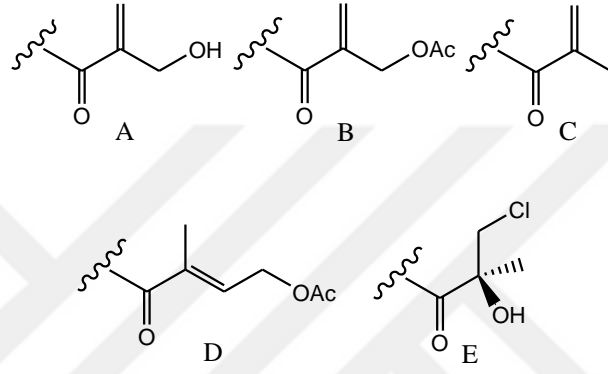
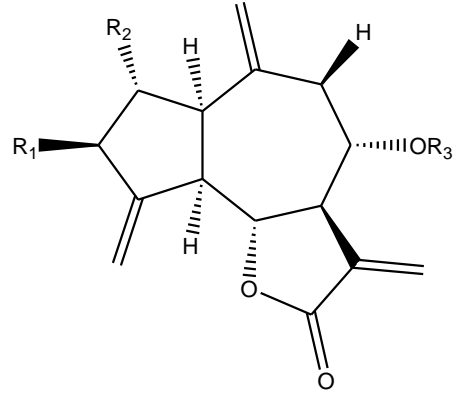


**Tablo 7.** Ödesmanolitlere ait  $^{13}\text{C}$  NMR verileri

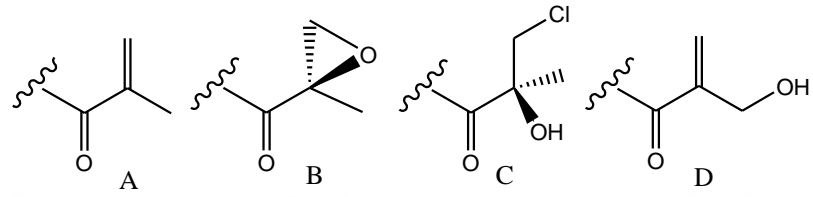
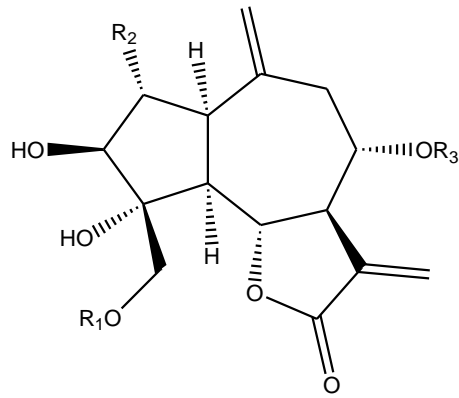
<b>C</b>	<b>1<sup>a</sup></b>	<b>2<sup>a</sup></b>	<b>3<sup>b</sup></b>	<b>4<sup>a</sup></b>	<b>5<sup>a</sup></b>	<b>6<sup>a</sup></b>
<b>1</b>	76.3	78.0	75.9	76.8	78.1	76.1
<b>2</b>	27.6	27.1	26.7	24.1	27.2	30.2
<b>3</b>	22.6	22.7	21.8	27.2	22.3	39.0
<b>4</b>	47.5	44.9	44.7	47.3	45.0	--
<b>5</b>	48.2	48.8	47.2	47.8	48.8	57.1
<b>6</b>	78.6	76.1	76.0	78.2	76.2	73.6
<b>7</b>	52.7	53.7	52.3	52.3	53.9	51.8
<b>8</b>	69.8	69.7	69.5	69.3	69.3	68.9
<b>9</b>	43.6	43.8	43.4	42.5	44.0	42.1
<b>10</b>	40.8	41.5	41.0	40.4	41.4	44.1
<b>11</b>	136.0	136.4	137.5	135.6	136.4	135.6
<b>12</b>	169.2	171.5	169.3	168.0	169.2	168.7
<b>13</b>	120.4	120.8	118.7	119.8	120.5	119.8
<b>14</b>	14.1	13.9	13.4	12.3	13.9	12.8
<b>15</b>	201.8	201.9	203.7	201.9	201.7	--
<b>1'</b>	164.6	164.7	165.2	163.2	166.5	164.2
<b>2'</b>	138.3	138.3	141.9	145.5	131.6	126.3
<b>3'</b>	127.6	128.1	125.3	126.3	141.7	127.6
<b>4'</b>	69.7	69.7	70.2	62.5	14.4	69.1
<b>5'</b>	67.1	67.1	65.4	63.3	56.7	67.1
<b>1''</b>	171.4	171.5		170.3		171.0
<b>2''</b>	20.8	20.8		20.4		20.3
<b>1'''</b>				169.9		
<b>2'''</b>				20.4		

<sup>a</sup>  $\text{CDCl}_3$  içerisinde; <sup>b</sup>  $\text{DMSO}-d_6$  içerisinde

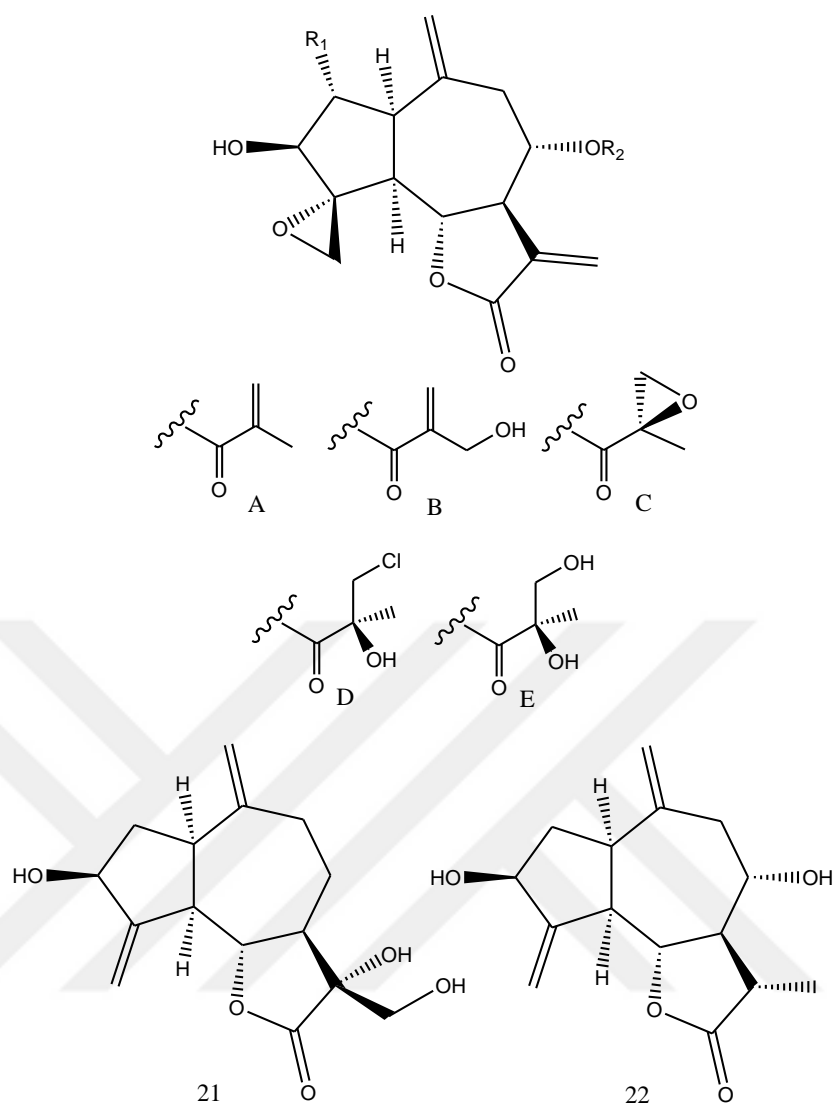
**Tablo 8.** *Centaurea* türlerinden izole edilen guyanolitler



No	R1	R2	R3	İsim	Takson (Ref.)
1	OH	H	H	Dezaçilsinaropikrin	<i>C. omphalotricha</i> (47)
2	OH	H	A	Sinaropikrin	<i>C. omphalotricha</i> <i>C. salmantica</i> (49)
3	OH	H	B	4'-asetil sinaropikrin	<i>C. omphalotricha</i>
4	OH	H	D	4'-asetil cebellin F	<i>C. omphalotricha</i>
5	OH	H	E	Liniklorin B	<i>C. omphalotricha</i>
6	-OAc	H	A	3-asetil sinaropikrin	<i>C. omphalotricha</i>
7	H	OH	H	2 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -dihidroksi- dehidrokostus lakton	<i>C. pannonica</i> (45)
8	OH	OH	C	Reptiolit	<i>C. pannonica</i>



No	R1	R2	R3	İsim	Takson (Ref.)
9	H	H	B	Babylin B	<i>C. pannonica</i> (45)
10	H	H	C	Cebellin J	<i>C. pannonica</i>
11	Ac	OH	A	Pannonin	<i>C. pannonica</i>
12	Ac	H	C	Raposerin	<i>C. pannonica</i>
13	Cl	OH	A	Klororeptiolit	<i>C. pannonica</i>
14	H	H	D	15-dekloro-15-hidroksi-klorojanerin	<i>C. solstitialis</i> ssp. <i>solstitialis</i> (50)



No	R1	R2	İsim	Takson (Ref.)
15	H	A	19-dezoksi janerin	<i>C. pannonica</i> (45)
16	H	B	Janerin	<i>C. pannonica</i>
17	H	C	Repin	<i>C. pannonica</i>
18	H	D	Kloro hisopifolin C	<i>C. pannonica</i>
19	H	E	Babylin A	<i>C. pannonica</i>
20	OH	A	Epoksi reptiolit	<i>C. pannonica</i>
21	-	-	Solstitialin A	<i>C. solstitialis</i> ssp. <i>solstitialis</i> (50)
22	-	-	8-hidroksi-11,13-dihidro zaluzanin C	<i>C. omphalotricha</i> (47)

**Tablo 9.** Guayanolitlere ait <sup>13</sup>C NMR verileri-1

C	1 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	3 <sup>a</sup>	4 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	8 <sup>b</sup>	9 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	11 <sup>a</sup>	12
1	45.2	45.3	45.4	45.4	45.6	57.5	46.8	43.9	44.1	55.1	47.6
2	39.2	39.1	39.1	39.1	39.1	71.5	78.9	38.0	38.1	79.8	40.4
3	73.7	73.7	73.8	73.9	73.7	41.5	79.8	77.0	77.9	81.3	77.0
4	152.4	152.2	152.3	152.3	152.0	141.1	151.3	83.5	84.5	82.0	84.3
5	51.3	51.4	51.4	51.4	51.7	50.9	52.9	55.3	56.1	56.5	58.3
6	79.0	78.6	78.4	78.6	78.1	78.6	78.5	78.0	77.5	76.9	77.5
7	51.0	47.6	46.7	47.9	47.3	50.3	48.4	47.5	47.6	47.8	46.8
8	71.9	74.3	74.6	74.5	75.9	73.2	74.5	75.2	76.2	72.9	75.4
9	41.3	37.0	37.1	37.3	35.8	41.1	36.8	36.9	37.8	38.5	35.5
10	142.7	141.8	141.7	141.8	141.4	145.8	141.5	141.3	141.8	139.6	144.5
11	138.1	137.4	137.4	137.4	137.5	137.3	138.9	136.6	136.8	136.5	138.9
12	169.9	169.2	168.9	169.0	168.8	169.2	169.2	168.9	169.7	168.5	169.1
13	123.2	122.7	122.5	122.1	122.1	123.4	121.3	123.2	123.5	123.0	121.0
14	117.1	118.2	118.2	118.1	118.7	118.8	119.2	117.7	118.4	118.0	117.0
15	113.2	113.5	113.6	113.6	114.1	112.8	111.9	63.8	63.8	64.7	67.5
1'		165.4	164.3	166.1	171.7		166.5	169.8	173.5	166.2	173.4
2'		139.4	135.2	130.2	74.7		136.7	53.9	75.1	135.8	75.4
3'		126.6	129.1	136.4	51.1		124.6	52.8	51.7	126.9	52.2
4'		62.1	62.3	61.0	23.4		18.3	14.4	23.4	18.1	24.3
5'				12.9							
1''			170.3	170.7						172.3	171.1
2''			20.8	20.8						21.3	20.9

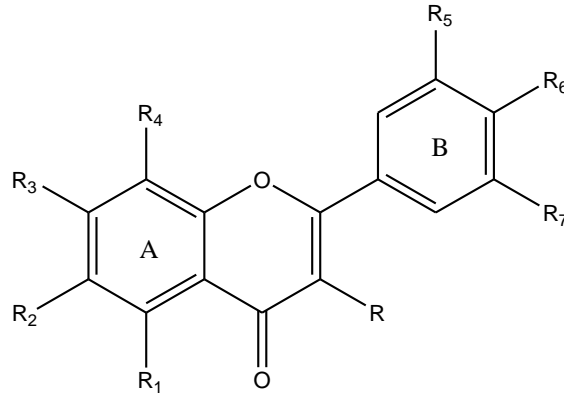
<sup>a</sup> CDCl<sub>3</sub>; <sup>b</sup> Piridin-*d*<sub>5</sub>; <sup>c</sup> CD<sub>3</sub>OD içerisinde

**Tablo 10.** Guayanolitlere ait  $^{13}\text{C}$  NMR verileri-2

<b>C</b>	<b>13<sup>b</sup></b>	<b>14<sup>c</sup></b>	<b>15<sup>a</sup></b>	<b>16<sup>a</sup></b>	<b>17<sup>a</sup></b>	<b>18<sup>b</sup></b>	<b>19<sup>a</sup></b>	<b>20<sup>b</sup></b>	<b>21<sup>a</sup></b>	<b>21<sup>b</sup></b>	<b>22</b>
<b>1</b>	58.4	48.3	45.7	45.7	45.6	46.1	46.2	47.2	42.8	43.5	44.2
<b>2</b>	83.3	37.5	37.7	37.7	37.5	38.9	38.0	78.3	38.0	39.4	39.0
<b>3</b>	84.1	77.9	76.1	76.1	75.0	75.3	76.5	79.5	72.7	73.2	73.6
<b>4</b>	83.9	85.8	68.3	68.2	68.3	69.1	68.2	66.6	152.3	155.4	153.0
<b>5</b>	60.1	55.5	53.1	53.1	53.0	53.2	53.7	53.1	52.2	53.4	50.7
<b>6</b>	77.6	79.4	77.0	76.8	76.7	77.3	76.6	78.0	82.1	83.2	79.1
<b>7</b>	47.2	57.6	47.9	47.9	47.9	47.6	47.5	49.4	49.9	50.7	56.0
<b>8</b>	74.4	75.7	74.0	74.2	76.0	75.2	75.8	74.4	26.2	27.7	74.9
<b>9</b>	36.7	36.8	36.5	36.5	36.1	36.1	35.3	37.0	35.6	37.6	44.8
<b>10</b>	142.8	144.7	141.6	141.4	140.9	142.8	140.9	141.0	148.7	150.5	143.2
<b>11</b>	138.8	43.1	137.2	137.0	137.0	138.5	137.3	138.4	n.r.	78.6	42.0
<b>12</b>	169.0	180.5	169.2	169.0	168.9	169.0	168.7	169.0	179.0	180.5	178.6
<b>13</b>	120.9	16.1	122.6	122.7	122.3	121.3	122.2	121.4	62.9	64.9	15.9
<b>14</b>	118.0	116.1	118.4	118.6	118.8	118.0	119.3	119.4	113.1	112.9	116.2
<b>15</b>	50.9	64.3	48.5	48.5	48.5	48.9	48.5	47.8	110.4	108.7	112.0
<b>1'</b>	166.5	165.3	166.5	165.3	169.9	173.3	175.0	165.5			
<b>2'</b>	136.7	141.9	136.0	139.3	53.8	75.3	75.8	136.6			
<b>3'</b>	126.3	125.9	126.7	126.7	52.8	52.1	68.5	126.5			
<b>4'</b>	18.3	62.4	18.2	62.2	17.3	24.2	21.6	18.3			
<b>5'</b>											

<sup>a</sup>  $\text{CDCl}_3$ ; <sup>b</sup> Piridin-*d*<sub>5</sub>; <sup>c</sup>  $\text{CD}_3\text{OD}$  içerisinde

## FLAVONOİTLER



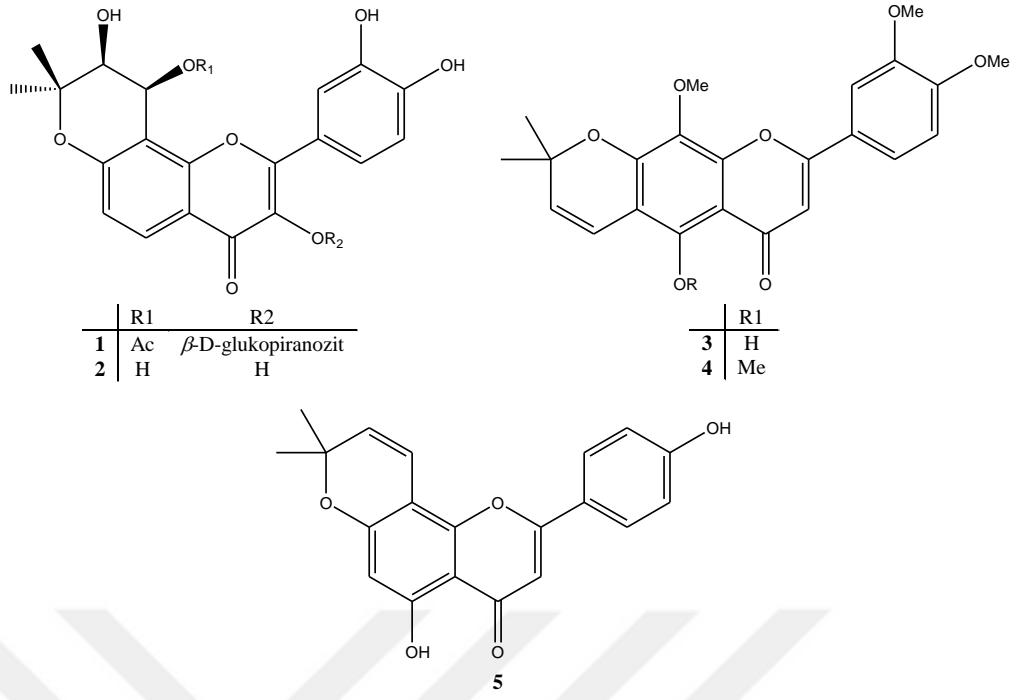
R = H Flavon  
R = OH Flavonol

İki fenil grubunun heterosiklik bir halka oluşturarak birleştiği, 2-fenil-kroman iskeletine sahip 15 karbonlu bir yapı olan flavonoitler, *Centaurea* türlerinden elde edilen bir diğer önemli molekül grubudur.

Flavonoitler genel olarak, flavon veya flavonol iskeleti üzerinde, değişen sayılarda serbest hidroksil grubu taşıyan yapılardır. Hidroksil grupları üzerinden metil ve/veya çeşitli oz gruplarının süstitüsüyonu ile çok sayıda metoksi veya *O*-glikozidik türevler oluşmaktadır. Bunun yanında oz ünitesinin doğrudan halkaya bağlanmasıyla oluşan *C*-glikozitler de rapor edilen yapılar arasındadır (10, 12, 29).

2012 yılında Carmen Forminaso ve arkadaşları, *Centaureinae* alttribusunda yer alan bitkilerden izole edilmiş olan flavonoitler ile ilgili bir derleme makalesi yayınlamışlardır. 1922-2010 yıllarını kapsayan bu derlemede 112 *Centaurea* taksonu bulunmaktadır. İzole edilmiş olan moleküller ve bu moleküllere ait <sup>13</sup>C NMR verileri de derlemede yer almaktadır. Flavonoitler arasında apigenin, luteolin, hispidulin ve jaceosidin en çok rapor edilen moleküllerdir (51).

2010 sonrasında *Centaurea* türleri üzerinde gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalarda da benzer moleküller izole edilmiştir (37, 52-57). *C. scoparia* ile gerçekleştirilen bir çalışmada ise flavonoit iskeletinin A halkasına bir piran halkasının bağlanmasıyla oluşan pirano-[5",6":7,8]-flavon ve pirano[5",6":6,7]-flavon yapılarına sahip beş farklı piranoflavon türevi rapor edilmiştir (Şekil 5) (58).



- (1) 3',4'-dihidroksi-(3'',4''-dihidro-3''-hidroksi-4''-asetoksi)-2'',2''-dimetilpirano-[5'',6'':7,8]-flavon-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozid
- (2) 3,3',4'-trihidroksi-(3'',4''-dihidro-3'',4''-dihidroksi)-2'',2''-dimetilpirano-[5'',6'':7,8]-flavon
- (3) 5-hidroksi-3',4',8-trimetoksi-2'',2''-dimetilpirano-[5'',6'':6,7]-flavon
- (4) 3',4',5,8-tetrametoksi-2'',2''-dimetilpirano-[5'',6'':6,7]-flavon
- (5) Atalantoflavon

**Şekil 5.** *C. scoparia*'dan izole edilen pirano-flavon türevleri



### 2.2.3. *Centaurea* L. Taksonlarının Halk Arasında Tıbbi Amaçla Kullanımları

Ülkemizde yayılış gösteren *Centaurea* cinsine ait birçok bitki, genel olarak abse, astım, hemoroit, midevi rahatsızlıklar gibi enflamatuvar hastalıklara karşı dahilen kullanılmaktadır. Bazı türlerin ezilerek lapa şeklinde cilt rahatsızlıklarına karşı haricen kullanıldığı da belirlenmiştir. Ülkemizde *Centaurea* taksonlarının halk arasında kullanımları, Doç. Dr. Şüra Baykan tarafından hazırlanan doktora tezinde geniş biçimde özetlenmiştir (59-61).

Son yıllarda yapılan etnobotanik çalışmalarda da benzer kullanımlar bildirilmiştir.

Antakya yöresinde, *C. calcitrapa* (dirdar) ve *C. iberica*'nın (çakırdikeni) taze yaprak ve çiçekleri, infüzyon şeklinde hazırlanarak, dahilen diyabete karşı kullanılmaktadır. Aynı yörede, *C. virgata*'nın (verem otu) geçmiş dönemlerde konsantre dekoksasyon halinde tüberküloza karşı kullanıldığı da kayıtlıdır. Elazığ-Sivrice yöresinde ise *C. virgata*'nın (acı süpürge) dekoksasyonu, alerjik durumlarda haricen uygulanmaktadır (62, 63).

Batı Toroslar'da bulunan *C. cheiranthifolia*'nın (düğmeli ot) toprak üstü kısımları, lapa halinde, yara iyi edici olarak ve bunun yanında dermatite karşı kullanılmaktadır (64).

Van ve Hakkari yöresinde "tahlış" adıyla bilinen *C. glastifolia*'nın toprak üstü kısımları ezilerek olgunlaştırıcı ve yara iyi edici olarak haricen; prostat rahatsızlığında ise dahilen kullanılmaktadır (65, 66).

*C. iberica*'nın (Elazığ'da, çakır diken; Hakkari'de, kelemeşk) yılan ısırıklarında hemen ezilerek bölgeye uygulandığı bildirilmiştir. Bunun yanında haricen yara iyi edici olarak, dahilen ise ateşli rahatsızlıklar ve spazm gibi midevi şikayetlerde kullanıldığı da kayıtlıdır (66, 67).

Haricen yara iyi edici olarak kullanılan *C. pterocaula*'nın (Van'da, tahlış; Hakkari'de, şermnik), çay şeklinde hazırlanarak, diyareye karşı kullanıldığı belirlenmiştir (65, 66).

Bingöl'de "papaz tacı" olarak tanınan *C. kurdica* çiçekleri dekoksasyon halinde hazırlanarak, haricen yara iyi edici ve romatizmaya karşı kullanılmaktadır. Elazığ-Sivrice yöresinde ise "pamuk diken" adıyla tanınan bitkinin çiçeklerinin, dahilen sinir yatıştırıcı ve sedatif olarak kullanımı da mevcuttur (63, 68).

Kahramanmaraş'ta yayılış gösteren *C. lycopifolia*'nın toprak üstü kısımlarından süt ile hazırlanan dekoksilyonun, dahilen yara iyi edici olarak kullanıldığı bildirilmiştir (69).

#### **2.2.4. *Centaurea* L. Taksonları ile Gerçekleştirilen Biyoaktivite Çalışmaları**

*Centaurea* taksonlarının farklı kısımlarından elde edilen uçucu yağlar, total ekstraktlar veya bu ekstraktlardan izole edilen saf maddeler üzerinde gerçekleştirilen çeşitli biyoaktivite çalışmaları bulunmaktadır.

2004 yılında Reyhan Arif ve arkadaşları, çeşitli *Centaurea* türlerinin antienflamatuvar, antipiretik, antimikrobiyal, antiviral, antifitoviral, antiülserojenik, hipoglisemik, immünolojik, nörotoksik ve sitotoksik etkileri ile vazodilatör etkilerinin yer aldığı bir derleme makalesi yayınlamışlardır (9). Doç. Dr. Şüra Baykan tarafından hazırlanan doktora tezinde, bitkilerin uçucu yağları ile bitkilerden hazırlanan ekstraktlar veya bu ekstraktlardan izole edilen bileşikler ile gerçekleştirilen antibakteriyel, antifungal, sitotoksik ve antienflamatuvar biyoaktivite çalışmaları geniş biçimde özetlenmiştir (61). Uzman Biyolog Tuğçe Demiröz tarafından hazırlanan Yüksek Lisans tezinde de son dönemde yapılan biyoaktivite çalışmalarına yer verilmiştir (70). 2013 yılında Maurizio Bruno ve arkadaşları tarafından yayınlanan derleme makalesinde, *Centaurea* türlerinden izole edilmiş olan seskiterpenler ile gerçekleştirilen antimikrobiyal, antienflamatuvar ve sitotoksik aktivite gibi çeşitli biyoaktivite çalışmaları değerlendirilmiştir (3).

*Centaurea pullata*, *C. grisebachii* subsp. *grisebachii* ve *C. affinis* uçucu yağlarının, 6 bakteri ve 8 fungus üzerinde, değişen konsantrasyonlarda antibakteriyel [Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK): 100-400 µg/ml] ve antifungal (MİK: 50-300 µg/ml) etki gösterdikleri belirlenmiştir (71).

Bir diğer çalışmada; *C. ragusina*'nın çiçek ve yapraklarından elde edilen uçucu yağların, antibakteriyel ve antifungal (MİK: 16-128 µg/ml) etki gösterdikleri, disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlenmiştir (72).

Esmaili ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; *C. behen* uçucu yağının antioksidan kapasitesinin metanol (MeOH) ekstresine yakın olduğu [DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) radikal süpürücü aktivite, IC<sub>50</sub>: 220 ve 195 µg/ml; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> süpürücü aktivite, IC<sub>50</sub>: 58 ve 60 µg/ml] fakat antimikrobiyal etkisinin daha düşük

olduğu (Disk difüzyon metodu; MeOH ekstresi: 10-22 mm; Uçucu yağ: 0.4-1.2 mm) gözlenmiştir (73).

*C. zuccariniana*'dan izole edilen heliangolit ve ödesmanolit yapısındaki üç yeni seskiterpenin, antibakteriyel ve antifungal aktiviteleri yönünden incelendiği bir çalışmada; zukkarinin molekülünün *B. cereus*, *E. coli* ve *P. mirabilis*'e karşı, amoksisilin'den daha etkili olduğu belirlenmiştir (Zukkarinin ve amoksisilin; MİK: 222 ve 274  $\mu$ M). Bunun yanında üç molekülün de ticari fungusitlere (bifonazol ve ketokonazol) yakın veya daha etkili oldukları belirlenmiştir (43).

Antiprotozoal aktivite rehberli bir çalışmada, *C. salmantica*'nın diklorometan ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) ekstresinin, 4.7  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda, *Trypanosoma brucei rhodesiense* gelişimine karşı %61 oranında inhibisyon sağladığı ve etkiden sorumlu molekülün sinaropikrin olduğu belirlenmiştir. Sinaropikrin, *T. cruzi* ve *Plasmodium falciparum*'a karşı etkisiz bulunurken ( $\text{IC}_{50}$ : 4.4 ve 3.0  $\mu\text{M}$ ), *T. brucei rhodesiense* ve *T. brucei gambiense*'ye karşı güçlü aktivite gösterdiği ( $\text{IC}_{50}$ : 0.3 ve 0.2  $\mu\text{M}$ ) belirlenmiştir. Daha sonra *T. brucei rhodesiense* ile parazitemi oluşturulan fare modelinde; günde iki defa 10 mg/kg dozda sinaropikrin uygulanan farelerde, paraziteminin %93 oranında gerilediği gözlenmiştir (49).

Kolli ve arkadaşları; *C. omphalotricha*'dan izole ettikleri, guayanolit ve elemanolit tipte, yedi seskiterpen laktonun sitotoksik etkilerini iki hücre hattında incelemişlerdir. İnsan lösemi hücre hatları olan HL-60 ve U937 üzerinde, en güçlü etki 3-asetil sinaropikrin ile gözlenmiştir ( $\text{IC}_{50}$ : 2.0 ve 3.1  $\mu\text{M}$ ). Diğer moleküller; 4'-asetil sinaropikrin, 4'-asetil cebellin F, liniklorin B ve 8-(4-hidroksimetakrilat)-dehidromelitensin de etkili bulunurken (HL-60 ve U937;  $\text{IC}_{50}$ : 5.1-7  $\mu\text{M}$  ve 6.8-11.7  $\mu\text{M}$  aralığında), 15-asetil dehidromelitensin'in etkisinin daha düşük olduğu belirlenmiştir ( $\text{IC}_{50}$ : 25.8 ve 29.9  $\mu\text{M}$ ) (47).

*C. ainetensis*'ten izole edilen salograviolit A molekülünün, kolon kanser hücre hatlarına karşı etkili olduğu (HCT-116 ve DLD-1;  $\text{IC}_{50}$ : 8  $\mu\text{g/ml}$ ) ve 20  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda normal intestinal hücrelere etki göstermediği (FHs 74 Int ve Mode-K) belirlenmiştir. *Achillea falcata*'dan izole edilen izo-seko-tanapartolit (5  $\mu\text{M}$ ) ile salograviolit A (3 $\mu\text{M}$ ) karışımının hücrelerin hassasiyetini arttırdığı da rapor edilmiştir (74).

Forgo ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışmada; *C. jacea*'dan izole edilen 14 molekül, sitotoksik aktiviteleri yönünden incelenmiştir. HeLa, MCF-7 ve A431 hücre hatlarının dahil edildiği çalışmada, IC<sub>50</sub> değerleri; sinisin için 34.5, 16.8 ve 17.9 µM, 4'-asetil sinisin için ise 6.8, 37.9, 31.3 µM olarak belirlenmiştir.

Flavon yapısındaki moleküllerden apigenin ve sirsiliol'ün ise seskiterpenlerden daha etkili oldukları belirlenmiştir (IC<sub>50</sub>: 10.6, 13.9, 12.3 µM ve 10.9, 10.1, 12.3 µM). 3,6-dimetoksi flavonol yapısındaki aksillarin molekülünün etkisiz olduğu belirtilirken, en etkili sonuçların 3,6,4'-trimetoksiflavonol yapısındaki sentaureidin molekülü ile elde edildiği (IC<sub>50</sub>: 0.08, 0.13 ve 0.15 µM) bildirilmiştir (40).

Son dönem ülkemizde yapılan çalışmalarda ise uçucu ve sabit yağ bileşenlerinin belirlenmesi ve bitkilerden hazırlanan çeşitli ekstratlar ile gerçekleştirilen antimikrobiyal ve antioksidan aktivite çalışmaları dikkat çekmektedir.

Yener Tekeli ve arkadaşları, 12 *Centaurea* taksonu ile hazırladıkları MeOH ekstratlarını, 4 farklı mikroorganizma üzerinde, antimikrobiyal aktiviteleri yönünden incelemiştir. *C. cariensis* subsp. *microlepis* bütün hücre hatlarına karşı etki gösterirken (MİK: 2-4 mg/ml), en etkili sonuçlar *C. solstitialis* subsp. *solstitialis* ile elde edilmiştir (MİK: 0.5 mg/ml) (75).

İsmet Uysal ve arkadaşları, 3 *Centaurea* türünün etanol (EtOH), aseton, etil asetat (EtOAc) ve kloroform (CHCl<sub>3</sub>) ekstratlarının aktivitelerini değerlendirmiştir. 29 mikroorganizmanın dahil edildiği çalışmada, *C. persica*, *C. polyclada* ve *C. consanguinea* ekstratlarının çeşitli konsantrasyonlarda etkili oldukları; EtOAc ekstratlarının ise diğer ekstratlara kıyasla, daha güçlü ve daha geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite gösterdikleri (MİK: 125-250 µg/ml) belirlenmiştir. EtOH ekstratlarının 0.5 mg/ml konsantrasyonda DPPH radikal süpürücü aktivitelerine bakıldığında ise, *C. polyclada*'nın %43.2 inhibisyon oranı ile en yüksek antioksidan aktiviteye sahip olduğu rapor edilmiştir (76).

Abdurrahman Aktümsek ve arkadaşları tarafından, 3 endemik *Centaurea* türünden (*C. polypodiifolia* var. *pseudobehen*, *C. pyrrhoblephara* ve *C. antalyense*) hazırlanan MeOH ve sulu ekstratlarının total fenol, flavonoid ve saponin içerikleri belirlenmiş ve ekstratlar antioksidan, antikolinesteraz aktiviteleri yönünden incelenmiştir.

*C. polypodiifolia* var. *pseudobehen* ve *C. antalyense*'den elde edilen sulu ekstrelerin total antioksidan kapasiteleri 549.48 ve 528.56 mg/g askorbik asit eşdeğeri (AAE) olarak bulunmuş ve 500 µg/ml konsantrasyonda, DPPH radikal süpürücü kapasiteleri %87.8 ve 80.7 olarak belirlenmiştir. *C. polypodiifolia* var. *pseudobehen*'in MeOH ekstresinin ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)] radikal süpürücü kapasitesi ise 50 µg/ml konsantrasyonda %93.4 olarak belirlenmiştir.

Bunun yanında ekstrelerin asetilkolinesteraz (AChE) ve butirilkolinesteraz (BChE) üzerinde inhibitör etkileri de Ellman yöntemi ile incelenmiştir. *C. polypodiifolia* var. *pseudobehen*'in MeOH ekstresinin AChE üzerinde %24.5, BChE üzerinde ise %45.5 oranında inhibisyon sağladığı belirlenmiştir (77).

Bir diğer çalışmada; *C. kurdica*, *C. rigida*, *C. amanicola*, *C. cheirolopha* ve *C. ptosimomappoides* türlerinden hazırlanan MeOH ekstreleri incelenmiş ve *C. cheirolopha*'nın en yüksek total fenolik (175.4 mg Gallik asit eşdeğeri (GAE)/g) ve total flavonoit (245.0 mg Rutin eşdeğeri (RE)/g) içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Buna bağlı olarak en yüksek total antioksidan kapasite de (234.8 mg AAE /g) bu bitkide gözlenmiştir. Bunun yanında serbest radikal süpürücü aktivite ( $IC_{50}$ : 227.4 µg/ml), FRAP [Demir (III) iyonu indirgeyici antioksidan gücü] ve CUPRAC [Bakır (II) iyonu indirgeyici antioksidan kapasite] testleri ( $EC_{50}$ : 205.9 ve 154.5 µg/ml) ve β-karoten/linoleik asit inhibisyonu (%79.5) testlerinde de en etkili sonuçlar *C. cheirolopha* ile elde edilmiştir (78).

Bir diğer çalışmada da *C. pseudoscabiosa* subsp. *araratica*, *C. pulcherrima* var. *pulcherrima*, *C. salicifolia* subsp. *abbreviata* ve *C. babylonica* MeOH ekstrelerinin antioksidan aktiviteleri karşılaştırılmıştır. Total fenol (348.6 mg GAE/g) ve total flavon (182.6 mg RE/g) içeriği ve buna bağlı olarak total antioksidan kapasitesi (179.3 mg AAE/g) en yüksek tür *C. pulcherrima* olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler DPPH, FRAP, CUPRAC ve β-karoten/linoleik asit inhibisyonu testleri ile desteklenmiştir (79).

Şengül Uysal ve arkadaşları, *C. urvillei* subsp. *stepposa* ile gerçekleştirdikleri bir çalışmada; bitkinin MeOH ekstresinin antioksidan kapasitesini, DPPH, FRAP ve CUPRAC metodlarını kullanarak incelemişler ve  $EC_{50}$  değerlerini 43.4, 52.2 ve 98.8 mg Troloks eşdeğeri (TE)/g olarak belirlemişlerdir. Fosfomolibden indirgenmesine

bağlı olarak ölçülen total antioksidan kapasitesi ise 335.9 mg TE/g olarak bulunmuştur (80).

*C. kotschyi* var. *persica*, *C. urvillei* subsp. *hayekiana* ve *C. drabifolia* subsp. *detonsa* ile gerçekleştirilen bir seri çalışmada, bitkilerden hazırlanan MeOH ekstresinin DPPH, FRAP ve  $\beta$ -karoten/linoleik asit inhibisyonu testleri ile değişen oranlarda antioksidan etki gösterdikleri belirlenmiştir. Total fenol içeriği (40.45 mg GAE/g) ve buna bağlı olarak en yüksek antioksidan kapasite (100.8 mg AAE/g) *C. drabifolia*'da gözlenmiştir (81-83).

Endemik bir tür olan *C. kilaea*'nın insan tümör hücre hatlarına karşı *in vitro* antiproliferatif aktivitesinin incelendiği bir çalışmada; bitkinin  $\text{CHCl}_3$  ekstresinin HeLa, MCF-7 ve PC-3 hücre hatlarına karşı etkili olduğu ( $\text{IC}_{50}$ : 53.1, 68.6 ve 73.9  $\mu\text{g/ml}$ ) belirlenmiştir. Bunun yanında, bitkinin MeOH ekstresinin de PC-3 hücre hattına karşı etkili olduğu belirlenmiş ve  $\text{IC}_{50}$  değeri 70.1  $\mu\text{g/ml}$  olarak rapor edilmiştir (84).

Bir diğer antiproliferatif aktivite çalışması da *C. carduiformis* subsp. *carduiformis* var. *carduiformis* ile gerçekleştirilmiştir. Bitkinin kök ve toprak üstü kısımlarından hazırlanan lipofilik ekstraktların Vero, C6 ve HeLa hücre hatlarının proliferasyonunu engellediği belirlenmiştir (85).

2015 yılında Özsoy ve arkadaşları, *C. antiochia* var. *praealta*'nın MeOH ekstresinin antioksidan kapasitesini; lipit peroksidasyonu, DPPH ve ABTS radikal süpürücü aktivite ve FRAP yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir ( $\text{EC}_{50}$ : 7, 5.1 ve 9.15 mg/ml ve 17.7 mM  $\text{Fe}^{+2}/\text{g}$ ). Bunun yanında ekstrenin antimikrobiyal, antiinflamatuvar ve antikolinesteraz aktiviteleri de incelenmiştir. Ekstrenin, 20 mg/ml konsantrasyonda, AChE, COX-1 (Siklooksijenaz-1) ve COX-2'yi %46.1, 63.6 ve 65.4 oranlarında inhibe ettiği belirlenmiştir (86).

*C. lycopifolia*, *C. balsamita* ve *C. iberica*'dan hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağların, 200  $\mu\text{g/ml}$  konsantrasyonda, AChE üzerinde %63.5, 44.9 ve 49.6 oranlarında, BChE üzerinde ise %65.8, 51.6 ve 58.9 oranlarında inhibitör etki gösterdikleri belirlenmiştir (87).

Erenler ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen aktivite rehberli bir çalışmada; *C. solstitialis* subsp. *solstitialis* toprak üstü kısımlarından hazırlanan EtOAc ekstresinden, solstitialin A ve 15-dekloro-15-hidroksi klorojanerin

molekülleri izole edilmiştir. Solstitialin A molekülünün C6 ve HeLa hücre hatlarına karşı antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (IC<sub>50</sub>: 10.78 ve 48.78 µM) (50).

Baykan ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada; *C. calolepis*'in CHCl<sub>3</sub> ekstresinden izole edilen sinisin molekülü antienflamatuvar ve sitotoksik aktiviteleri yönünden incelenmiştir. Sinisin SK-MEL, BT-549 ve LLC-PK11 hücre hatlarına karşı etkili bulunurken (IC<sub>50</sub>: 14.0, 18.3 ve 23.3 µM), KB, SK-OV-3 ve Vero hücre hatlarına karşı etki göstermediği (IC<sub>50</sub>: >25 µM) belirlenmiştir. SW1353 hücrelerinde, NF-κB ve SP-1 inhibisyonu ile belirlenen, antienflamatuvar aktivite denemesinde ise partenolite kıyasla daha etkili inhibisyon sağladığı (sinisin IC<sub>50</sub>: 1.8 ve 16 µM; partenolit IC<sub>50</sub>: 6.4 ve 49.3 µM), fakat RAW 264.7 fare makrofajlarına karşı sitotoksik olduğu (sinisin ve partenolit; IC<sub>50</sub>: 7.9 ve 41.3 µM) belirlenmiştir (29).

Bir diğer aktivite taramasında *C. aphrodisea*, *C. athoa*, *C. hyalolepis*, *C. iberica* ve *C. polyclada* türlerinden hazırlanan *n*-hekzan, CHCl<sub>3</sub> ve MeOH ekstreleri, antioksidan, sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri yönünden incelenmiştir. En yüksek total fenol ve total flavonoit içeriği *C. hyalolepis* MeOH ekstresinde görülürken (11.4 mg GAE/L ve 34.9 mg QE (Kersetin eşdeğeri)/L), MeOH ekstrelerinin total antioksidan kapasiteleri konsantrasyona bağlı olarak değişiklik göstermiştir. 500 µg/ml konsantrasyonda *C. iberica* MeOH ekstresi daha etkili bulunurken (3.0 mM TE), 1000 µg/ml konsantrasyonda en yüksek değer *C. aphrodisea* MeOH ekstresinde (5.9 mM TE) gözlenmiştir (14).

Bitkilerin MeOH ekstrelerinin MCF7, A549, U2OS ve HEK293 hücre hatlarına karşı sitotoksik aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada ise en etkili sonuçlar *C. polyclada* ile elde edilmiştir (MCF7, U2OS ve HEK293; IC<sub>50</sub>: 61, 63, 72 µg/ml). Bunun yanında *C. aphrodisea*'nın da MCF7 ve HEK293 hücrelerine karşı etkili olduğu belirlenmiştir (IC<sub>50</sub>: 90, 85 µg/ml) (13).

SK-MEL, KB, BT-549, SK-OV-3, Vero ve LLC-PK11 hücre hatlarının dahil edildiği sitotoksik aktivite taramasında ise bitkilerin CHCl<sub>3</sub> ekstrelerinin değişen konsantrasyonlarda etkili oldukları belirlenmiştir. SK-MEL, SK-OV-3 ve LLC-PK11 hücre hatlarına karşı *C. athoa*'nın (IC<sub>50</sub>: 56, 40 ve 20 µg/ml), KB ve BT-549 hücre hatlarına karşı ise *C. polyclada*'nın (IC<sub>50</sub>: 33 ve 30 µg/ml) daha etkili olduğu görülmüştür. Bunun yanında *C. polyclada* ekstresinin Vero hücrelerini etkilemediği, fakat *C. athoa*'nın sitotoksik etki gösterdiği (IC<sub>50</sub>: 52 µg/ml) belirlenmiştir.

NF- $\kappa$ B, SP-1 ve iNOS inhibisyonuna bağlı antienflamatuvar aktivite taramasında ise yine CHCl<sub>3</sub> ekstrelerinin etkili olduğu, NF- $\kappa$ B ve iNOS salınımını değişen oranlarda inhibe ettikleri (IC<sub>50</sub>: 6-37  $\mu$ g/ml ve 16-33  $\mu$ g/ml aralığında), fakat SP-1'e bağlı lusiferaz ekspresyonunu etkilemedikleri gözlenmiştir. Partenolite eşdeğer NF- $\kappa$ B inhibisyonu gözlenen *C. athoa* CHCl<sub>3</sub> ekstresinin (IC<sub>50</sub>: 6  $\mu$ g/ml), karagen indüklü sıčan pençe ödemine karşı etkisi incelenmiş ve 25 mg/kg dozda indometazine yakın etki gösterdiği belirlenmiştir (14).





### 2.3. *Centaurea athoa* DC.



**Resim 1.** *C. athoa* genel görünüşü, involukrum braktelerinde ek yapılar ve aken meyveler.

#### ***C. athoa*'nın Morfolojik Özellikleri:**

Basit veya 1-2 dala ayrılmış, (2-) 20-30 cm boyunda, yatık gövdeli çok yıllık bir bitkidir. Yaprakları, yoğun ince tüylüdür. Alt ve dip kısımdaki yapraklar saplı ve 4-5 çift (1.5-3 mm genişliğinde) lineer-lanseolat parçalı pinnatipartit, orta ve üst kısımdaki yapraklar ise sapsız ve daha az parçalıdır. İnvolutrum 15-18 x 10-13 mm büyüklüğünde, oblong, braktelerin alt kısımlarının kenarlarında hafif ağsı yapılar bulunmaktadır. İnvolutrum brakteleri, alt kısım boyunca zarımsı kulakçık şeklinde, üst kısmın her iki tarafında ise 1.5-2.5 mm uzunluğunda 7-10 tane kirpiksi uzantı bulunan ve 1.5-5 mm boyunda kahverengi bir dikencik ile sonlanan, ek yapılar taşımaktadır.

5 mm boyundaki aken meyvelerde 2(-3) mm uzunluğunda papus bulunmaktadır (Resim 1). Çiçekler sarı renkli ve radyant değildir (Kenar ve merkezde yer alan çiçekler benzer boyutlardadır). Çiçeklenme dönemi Temmuz ve Ağustos ayları olan bitki 1700 m yükseklikte, kayalık dağ yamaçlarında yetişmektedir (6).

**Sinonimleri:** *C. parolinii* DC. (1838), *C. rupestris* L. var. *athoa* DC. (1844), *C. nipestris* L. subsp. *athoa* (DC.) Gugler (1908), *C. trojana* Bornm. (1923), *Colymbada athoa* (DC.) Holub (1972).

**Tip örneği:** [Yunanistan] Athos Dağı (Monte Athone), 3176 (holo. G-DC)

**Yayılışı:** *C. athoa* Türkiye'nin Kuzeybatısında (1Ç–Güney Marmara Bölümü) Balıkesir, Kaz Dağları, Susuz Dağ ve Baba Dağ, 1700 m'de yayılış göstermektedir ve Doğu Akdeniz (dağ) elementidir (6, 7).

Bitkinin bir diğer yayılış gösterdiği alan ise Yunanistan, Aynoroz yarımadasında bulunan Athos dağdır. Bu iki bölgeden alınan numunelerin, ayrı birer tür olarak değerlendirilmesini sağlayacak farklı bir özellik bulunmadığı belirtilmiştir. Bitki Avrupa Florası'nda *C. rupestris* L. subsp. *athoa* (DC.) Gugler (1907) olarak kayıtlıdır ve *C. athoa* DC. sinonim olarak verilmiştir. "Flora of Turkey"de, bitkinin Balkanlarda yayılış gösteren *C. rupestris* ile ilişkili olduğu ve Anadolu'da hiç yakın akrabasının bulunmadığı belirtilmiştir. 2010 yılında, Tuna Uysal ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, 47 *Centaurea* türüne ait protein dizilişleri SDS-PAGE metodu ile incelenmiş ve dendogram oluşturularak türlerin akrabalık ilişkileri belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *C. athoa*'nın, *C. carduiformis* subsp. *carduiformis* ve *C. carduiformis* subsp. *orientalis* ile ilişkili olduğu belirlenmiştir.(6, 88-90)

Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabında bitkinin IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources-Uluslararası Doğa ve Doğal Kaynakları Koruma Birliği) kategorisi "Zarar görebilir (Vulnerable)" olarak belirtilmiştir.

### **C. athoa ile Gerçekleştirilen Fitokimyasal Çalışmalar:**

Bitkiden hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağın bileşimi %94.8 oranında tanımlanmış, ana bileşenin karyofilen oksit (%17.1) olduğu belirlenmiş fakat majör bir bileşene rastlanmamıştır. Uçucu yağın bileşimi %33.9 oranında oksijenlenmiş seskiterpenden oluşmaktadır (91).

Biyolojik aktivite taramasında ise bitkinin MeOH ekstresinin total fenol içeriği 7.42 mg GAE/L, total flavonoit içeriği ise 32.34 mg QE/L olarak belirlenmiştir (14).

### **C. athoa ile Gerçekleştirilen Biyoaktivite Çalışmaları:**

Baykan ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen biyolojik aktivite taramasında, bitkinin MeOH ekstresinin ABTS radikal süpürücü aktivitesine bağlı antioksidan kapasitesi 1 mg/ml konsantrasyonda, 4.233 mM TE olarak belirlenmiştir.

Bitkinin CHCl<sub>3</sub> ekstresinin kanser (SK-MEL, KB, BT-549, SK-OV-3) ve normal (LLC-PK11) hücre hatları üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (IC<sub>50</sub>: 56, 50, 48, 40 ve 20 µg/ml). Bunun yanında ekstrenin Vero (maymun böbrek fibroblast) hücrelerine karşı da sitotoksik etki gösterdiği (IC<sub>50</sub>: 52 µg/ml) görülmüştür.

Nf-κB, SP-1 ve iNOS inhibisyonuna dayalı *in vitro* antienflamatuvar aktivite denemesinde ise bitkinin CHCl<sub>3</sub> ekstresinin, doğal kaynaklı bir antienflamatuvar ajan olan partenolite eşdeğer Nf-κB inhibisyonu gerçekleştirdiği belirlenmiştir (IC<sub>50</sub>: 6 µg/ml). Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bitkinin kloroform ekstresinin, karagenan indüklü sıçan pençe ödemeine karşı etkisi incelenmiş ve 25 mg/kg dozda sentetik bir antienflamatuvar ajan olan indometazine (10 mg/kg) yakın etki gösterdiği belirlenmiştir. Akut oral toksisite denemesinde ise ekstrenin 2 g/kg dozda toksik olmadığı gözlenmiştir (14).

## 2.4. *Centaurea polyclada* DC.



**Resim 2.** *C. polyclada* genel görünüşü ve aken meyveler

### ***C. polyclada*'nın Morfolojik Özellikleri:**

Gövdesi dik, 25-60 cm boyunda ve çok sayıda dala ayrılmış çok yıllık (veya bazen sadece iki yıllık) bir bitkidir. Birincil dallar uzundur ve kapitulümler boyu çok kısa olan ikincil (veya üçüncül) dalların ucunda bulunmaktadır. Yapraklar alt kısımda sert, üst kısımda ise yünsü tüylüdür. Alt kısımdaki yapraklar 1-2 parçalı, orta kısımdakiler, 1-1.5(-2) mm genişliğinde lineer segmentli pinnatipartit ve üst kısımdaki yapraklar lineerdir.

Üzerinde pembe-mor renkli çiçekler taşıyan involukrum 8-10 x 4-5(-6) mm boyutlarında, ovoid (yumurta şeklinde) veya üst kısma doğru daralan koni şeklindedir. İvolukrum braktelerinin yüzeyi düz şekilli veya üzerinde hafif çıkıntılar bulunmaktadır ve tüsüzdür. Braktelerin üzerinde, düz veya her iki tarafında da 0.3-1 mm boyutlarında 3-5 kirpiksi çıkıntı bulunan ve uç kısmı 0.3-1 mm uzunluğunda bir dikencik ile sonlanan, sarımsı renkte, oldukça küçük ek yapılar yer almaktadır. 2.5 mm uzunluğundaki aken tipi meyvelerde papus yoktur veya yaklaşık 0.5 mm uzunluğunda çok küçük çıkıntılar halindedir. Çiçeklenme dönemi Haziran-Ağustos ayları olan bitki, deniz seviyesinden 500 m yüksekliğe kadar, kızılçam ormanlarında, maki ve kuru çayırlarda bulunmaktadır (6).

**Sinonimleri:** *C. polyclada* var. *subciliata* DC. (1838), *Acosta polyclada* (DC.) Holub (1973)

**Tip örneği:** [Türkiye] Bozcaada (Yunanca; Is. Tenedos), 1820, *Dumont d'Urville* 192 (holo. & iso. G).

**Yayılışı:** *C. polyclada*, ülkemizde Batı Anadolu ve adalarda yayılışı bulunan endemik bir türdür ve Doğu Akdeniz elementidir. Çanakkale Güzelyalı, Ezine-İntepe arası; Balıkesir, Zeytinli-Akçay (1Ç Güney Marmara Bölümü); İzmir çevresinde Nif dağı ve Kavaklıdere'den (3A Asıl Ege Bölümü) rapor edilmiştir. Bitkinin *C. olympica* ile akraba olduğu belirtilmiştir (6, 7).

“Flora of Turkey”de bitkinin Sakız adasında da bulunduğu rapor edilmiş fakat “Flora Europea”da, elde edilen verilerin *C. polyclada*'ya değil *C. diffusa*'ya uygun olduğu belirtilmiştir (89).

Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabında bitkinin IUCN kategorisi “Zarar görebilir (Vulnerable)” olarak belirtilmiştir.

#### **C. polyclada ile Gerçekleştirilen Fitokimyasal Çalışmalar:**

Bitkiden hidrodistilasyon yöntemi ile elde edilen uçucu yağın bileşimi %88.8 oranında tanımlanmış ve içeriğinde hegzadekanonik asit (%8.1), hegzahidrofarnesil aseton (%7.1) ve  $\beta$ -ödesmol (%6.4) olduğu belirlenmiştir (91).

Biyolojik aktivite taramasında, bitkinin MeOH ekstresinin total fenol içeriği 8.56 mg GAE/L, total flavonoit içeriği ise 29.85 mg QE/L olarak belirlenmiştir (14).

#### **C. polyclada ile Gerçekleştirilen Biyoaktivite Çalışmaları:**

Granger ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada; bitkinin *n*-hekzan, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ve MeOH ekstreleri antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri açısından incelenmiştir. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstresinin antioksidan etkisi düşük bulunurken, MeOH ekstresinin güçlü DPPH radikal süpürücü aktivite gösterdiği belirlenmiştir (EC<sub>50</sub>: 15 µg/ml). *B. cereus*, *B. subtilis*, *E. coli*, Ampisiline dirençli *E.coli*, *S. aureus*, *S. typhi*, *P. aeruginosa* (2 klinik izolat) suşlarının dahil edildiği antimikrobiyal aktivite taramasında ise bitkinin *n*-hekzan ve MeOH ekstrelerinin etkisiz olduğu, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> ekstresinin ise *E.coli* dışındaki diğer bakteriler üzerinde aktivite gösterdiği belirlenmiştir (MİK: 1.25-2.5 mg/ml). 500 µg ekstre yüklenen disklerle gerçekleştirilen çalışmada ise en etkili sonuç ampisiline dirençli *E. coli* suşunda gözlenmiştir (inhibisyon çapı: 14 mm) (92).

Baykan ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen biyolojik aktivite taramasında, bitkinin MeOH ekstresinin ABTS radikal süpürücü aktivitesine bağlı antioksidan kapasitesi 1 mg/ml konsantrasyonda, 4.673 mM TE olarak belirlenmiştir.

Bunun yanında bitkinin MeOH ekstresinin MCF7, U2OS ve HEK293 hücre hatlarına karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir (IC<sub>50</sub>: 61, 63, 72 µg/ml). Bitkinin CHCl<sub>3</sub> ekstresi ise KB, BT-549, SK-OV-3 ve LLC-PK11 hücre hatları üzerinde güçlü sitotoksik etki gösterirken (IC<sub>50</sub>: 33, 30, 47 ve 65 µg/ml), SK-MEL üzerinde etkisinin düşük olduğu, VERO hücrelerine karşı ise sitotoksik etki oluşturmadığı gözlenmiştir (13, 14).

Nf-κB, SP-1 ve iNOS inhibisyonu ile gözlenebilen *in vitro* antiinflamatuvar aktivite denemelerinde, bitkinin kloroform ekstresinin, Nf-κB inhibisyon gücü doğal kaynaklı bir antiinflamatuvar ajan olan partenolite yakın bulunurken (IC<sub>50</sub>: 18 ve 6 µg/ml), İNOS üzerindeki aktivitesinin partenolite kıyasla daha düşük olduğu belirlenmiştir (IC<sub>50</sub>: 28 ve 1.2 µg/ml) (14).

## BÖLÜM 3. GEREÇ VE YÖNTEM

### 3.1. KULLANILAN CİHAZLAR

- Evaporatör (Heidolph Laborota-4000)
- Hassas terazi (OHAUS Adventurer AR 3130)
- Isı tabancası (Bosch PHG 630 DCE)
- Kızıl ötesi (Infrared) spektrometresi (Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR)
- Kütle spektrometresi
  - Thermo-Scientific TSQ Quantum Access Max LC-MS/MS (ESI)
  - Agilent 6200 TOF ve 6500 QTOF-MS system (ESI)
- Mekanik öğütücü (Waring HGB2WT blender)
- Mikroplaka Okuyucu (Thermo-Scientific Varioskan Flash)
- NMR spektrometresi (Varian Oxford AS400)
- Polarimetre (Perkin Elmer Model-351)
- Vakum konsantratör sistemi
  - Vakumlu santrifüj (Christ RVC 2-25)
  - Soğutucu (Christ LT-105 Cooling trap)
  - Vakum Pompası (Vacuubrand RZ 2.5)
- Vakum manifoldu (Alltech 16 girişli KFE manifoldu)
- Vakum pompası (KNF Laboport N810-3FT-18)
- Ultrasonik su banyosu ( Bandelin-Sonorex RK-514-BH)
- UV lambası 254/366 nm (CAMAG)

## 3.2. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALAR

### 3.2.1. Bitkisel Materyal

*Centaurea athoa* Balıkesir, Kaz Dağları, Sarıkız tepesi, 1700 m'den (39°42'08.2" K, 26°51'50.4" D); *Centaurea polyclada* ise İzmir, Bornova, Kayadibi Köyü yolu 500 m'den (38°30'21.0" K, 27°14'35.6" D) 2010 Haziran ayında toplanmışlardır.

Bitkilerin herbaryum örnekleri hazırlanarak, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, IZEF Herbaryumu'na sırasıyla IZEF-5916 ve IZEF-5914 kod numaralarıyla kaydedilmiştir.

### 3.2.2. Kromatografik Çalışmalar

#### 3.2.2.1. Açık Kolon Kromatografisi (AKK)

##### *Vakum Sıvı Kromatografisi (RP-VSK)*

İzolasyon çalışmaları esnasında, ekstrelerden ön fraksiyonların eldesi ve bunun yanında bazı fraksiyonların temizlenmesi amacıyla ters faz silika (RP C18) dolgu materyali ile VSK yöntemi kullanılmıştır. Ayrımı yapılacak madde miktarına bağlı olarak çeşitli büyüklükteki cam kolonların ucuna nuçe erleni takılarak veya büyük enjektör şeklinde, alt kısmında filtre bulunan sinterli kartuşlar ile vakum manifoldu yardımıyla fraksiyonlama gerçekleştirilmiştir. Mobil fazın ilerleyişi vakum pompası ile hızlandırılmıştır.

MeOH ile doygun hale getirilmiş süspansiyon halindeki dolgu materyali, alt kısmına pamuk yerleştirilmiş cam kolona veya sinterli kartuşa aktarılmıştır. Sürekli MeOH akışıyla dolgu materyalinin oturması sağlanmıştır. Daha sonra İTK plakları değerlendirilerek elüsyona başlanması uygun görülen çözgen sistemi ile kolon şartlandırılmıştır.

Ayrımı yapılacak fraksiyon az miktarda mobil fazda çözünerek adsorban yüzeyine tatbik edilmiştir. Fraksiyonda çözünme problemi olduğunda, madde bir miktar adsorban ile karıştırılarak kurutulmuştur. Homojen olacak şekilde havanda toz hale getirilen adsorban/madde karışımı kuru olarak tatbik edilmiştir. Yüzeyin bozulmaması amacıyla adsorban üzerine pamuk yerleştirilmiştir. Mobil faz üstten ilave edilerek elüsyon işlemlerine başlanmış ve polarite azalacak şekilde devam edilerek fraksiyonlama işlemi tamamlanmıştır.



Sabit Faz: Lichroprep RP 18 (Merck, 25-40 µm, )

Mobil Faz: H<sub>2</sub>O:MeOH değişen oranlarda karıştırılarak farklı polarite geçişleri sağlanmıştır.

Kullanılan dolgu materyali miktarları ve çözgen sistemi değişimleri izolasyon kısmında ayrıntılandırılmıştır.

#### *Silika Jel Kolon Kromatografisi*

İzolasyon çalışmaları esnasında fraksiyonların temizlenmesi ve moleküllerin saflaştırılması amacıyla silika jel dolgu materyali kullanılmıştır. İşlem esnasında ayrımı yapılacak madde miktarına bağlı olarak çeşitli büyüklükteki cam kolonlar kullanılmıştır. İTK plakları değerlendirilerek elüsyona başlanması uygun görülen çözgen sistemi ile doğun hale getirilmiş süspansiyon halindeki dolgu materyali, alt kısmına pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmıştır. Aynı sistem geçirilerek dolgu materyalinin oturması ve kolonun şartlandırılması sağlanmıştır.

Ayrımı yapılacak fraksiyon az miktarda mobil fazda çözünerek veya kuru tatbik şeklinde uygulanmıştır. Yüzeyin bozulmaması amacıyla adsorban üzerine pamuk yerleştirilmiştir. Mobil faz üstten ilave edilerek elüsyon işlemlerine başlanmış ve polarite artacak şekilde devam edilerek fraksiyonlama ve saflaştırma işlemleri tamamlanmıştır.

Sabit Faz: Silica gel 60 (Merck, 63-200 µm)

Mobil Faz: *n*-hekzan, EtOAc, CHCl<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>O çözgenleri değişen oranlarda karıştırılarak farklı polarite geçişleri sağlanmıştır.

Kullanılan dolgu materyali miktarları ve çözgen sistemi değişimleri izolasyon kısmında ayrıntılandırılmıştır.

#### *Jel Filtrasyon (Sephadex) Kolon Kromatografisi*

Ekstrelerden elde edilen ön fraksiyonların temizlenmesi amacıyla kullanılmıştır. İşlem esnasında ayrımı yapılacak madde miktarına bağlı olarak çeşitli büyüklükteki cam kolonlar kullanılmıştır.

Sabit faz olarak Sephadex™ LH-20 dolgu materyali, mobil faz olarak MeOH kullanılmıştır. Dolgu materyali, şişmesi ve doğun hale gelmesi için kolon hazırlanmadan bir gün önce MeOH ile karıştırılıp bekletilmiştir.

Süspansiyon halindeki dolgu materyali, alt kısmına pamuk yerleştirilmiş cam kolona aktarılmış ve üst kısımdan çözgen ilave edilerek dolgu materyalinin oturması ve kolonun şartlandırılması sağlanmıştır.

Ayrımı yapılacak fraksiyon az miktarda mobil fazda çözünerek adsorban yüzeyine tatbik edilmiştir. Yüzeyin bozulmaması amacıyla adsorban üzerine pamuk yerleştirilmiştir. Mobil faz üstten ilave edilerek fraksiyonlama ve saflaştırma işlemleri tamamlanmıştır.

Sabit Faz: Sephadex™ LH-20 (GE Healthcare)

Mobil Faz: MeOH

Kullanılan dolgu materyali miktarları izolasyon kısmında ayrıntılandırılmıştır.

#### *Katı Faz Ekstraksiyonu*

İzolasyon çalışmaları esnasında fraksiyonların temizlenmesi ve saflaştırılması amacıyla; büyük enjektör şeklinde, içerisinde ters faz silika dolgu materyali bulunan, alt ve üst kısmında filtre ile kapatılmış, hazır kartuşlar (Supelclean LC-18, 10 g/60 ml) kullanılmıştır.

İTK plakları değerlendirilerek elüsyona başlanması uygun görülen çözgen sistemi ile kartuş şartlandırılmış ve ayrımı yapılacak fraksiyon az miktarda mobil fazda çözünerek tatbik edilmiştir. Kartuş, vakum manifoldu üzerine oturtulmuş ve mobil fazın ilerleyişi vakum ile sağlanmıştır.

Mobil faz (değişen oranlarda H<sub>2</sub>O:MeOH karışımları) üstten ilave edilerek elüsyon işlemlerine başlanmış ve polarite azalacak şekilde devam edilerek fraksiyonlama işlemi tamamlanmıştır.

#### **3.2.2.2. İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)**

İTK, yüzeyi çeşitli adsorbanlar ile kaplı plaklar ile gerçekleştirilen kromatografi yöntemidir. Sabit faz, cam veya alüminyum gibi düz bir yüzeye tutturulmuş çeşitli adsorbanlardan oluşmaktadır. Alt kısmına madde veya madde karışımı tatbik edilmiş sabit fazın üzerinden mobil faz geçirilerek madde karışımının sürüklenmesi ve bu esnada molekül özelliklerine göre birbirinden ayrılması sağlanmaktadır.

İTK, elüsyonda kullanılacak çözgen sistemlerinin belirlenmesi, izolasyon çalışmalarının izlenmesi, izole edilen maddelerin saflıklarının kontrolü, fraksiyonlar içerisinde bilinen bir maddenin varlığının belirlenmesi amaçlarıyla uygulanmıştır.

Bu amaçla uygun büyüklüklerde kesilen hazır alüminyum plaklar kurşun kalem ile işaretlenmiş ve kılcal pipet yardımıyla fraksiyonlardan örnek alınarak plak yüzeyine tatbik edilmiştir. Hazırlanan plaklar, çeşitli çözgen karışımları ile doymuş hale gelmiş İTK tanklarının içerisine konarak maddelerin sürüklenmesi sağlanmıştır.

Tanktan çıkarılan plaklar kurutulularak UV aktif maddelere ait bantlar UV lamba altında (254-366 nm) incelenmiştir. UV aktif olmayan bantlar ise vanilin/sülfürik asit belirteci kullanılarak görünür hale getirilmiştir.

Bunun yanında madde saflaştırılması amacıyla preparatif İTK yöntemi kullanılmıştır. Preparatif İTK, çeşitli çözgen sistemlerinde iyi ayırım görülen maddelerin izolasyonu için uygulanan bir yöntemdir. Bu amaçla 20x20 cm boyutlarında, silika kaplı hazır alüminyum plak kullanılmıştır. Plagın alt kısmına 2.5 cm yükseklikte, kenarlarda 2 cm boşluk kalacak şekilde düz bir çizgi çizilmiştir. Çözünmüş haldeki fraksiyonun tamamı kılcal pipet yardımıyla çizgi boyunca adsorban yüzeyine tatbik edilmiş ve kurutulmuştur. Hazırlanan plak, doymuş haldeki İTK tankı içerisinde sürükledikten sonra kurutulmuş ve UV lamba altında 254 nm'de incelenmiştir. UV altında görülen bantlar işaretlenmiş ve bir spatül yardımıyla kazınmıştır. Kazınan kısım, alt kısmına pamuk yerleştirilen pastör pipeti içerisine alınmış ve üzerinden çözgen geçirilerek adsorbandan ayrılması sağlanmıştır.

*İTK'da kullanılan adsorbanlar ve genel olarak kullanılan çözgen sistemleri:*

Normal faz silika jel 60 F<sub>254</sub> hazır alüminyum plak (Merck, 1.05554)

*n*-Hekzan:EtOac:MeOH (10:10:1, 10:10:2)

CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:1, 85:15:0.5, 80:20:2, 70:30:3, 61:32:7, 64:50:10)

EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (100:5:1, 100:10:5, 100:15:10, 100:17:13, 100:20:15)

Ters faz silika jel 60 RP-18 F<sub>254S</sub> hazır alüminyum plak (Merck, 1.05559)

H<sub>2</sub>O:MeOH (100:0, 80:20, 70:30, 50:50, 30:70, 20:80)

### *Vanilin/Sülfürik Asit Reaktifi (V/S Reaktifi)*

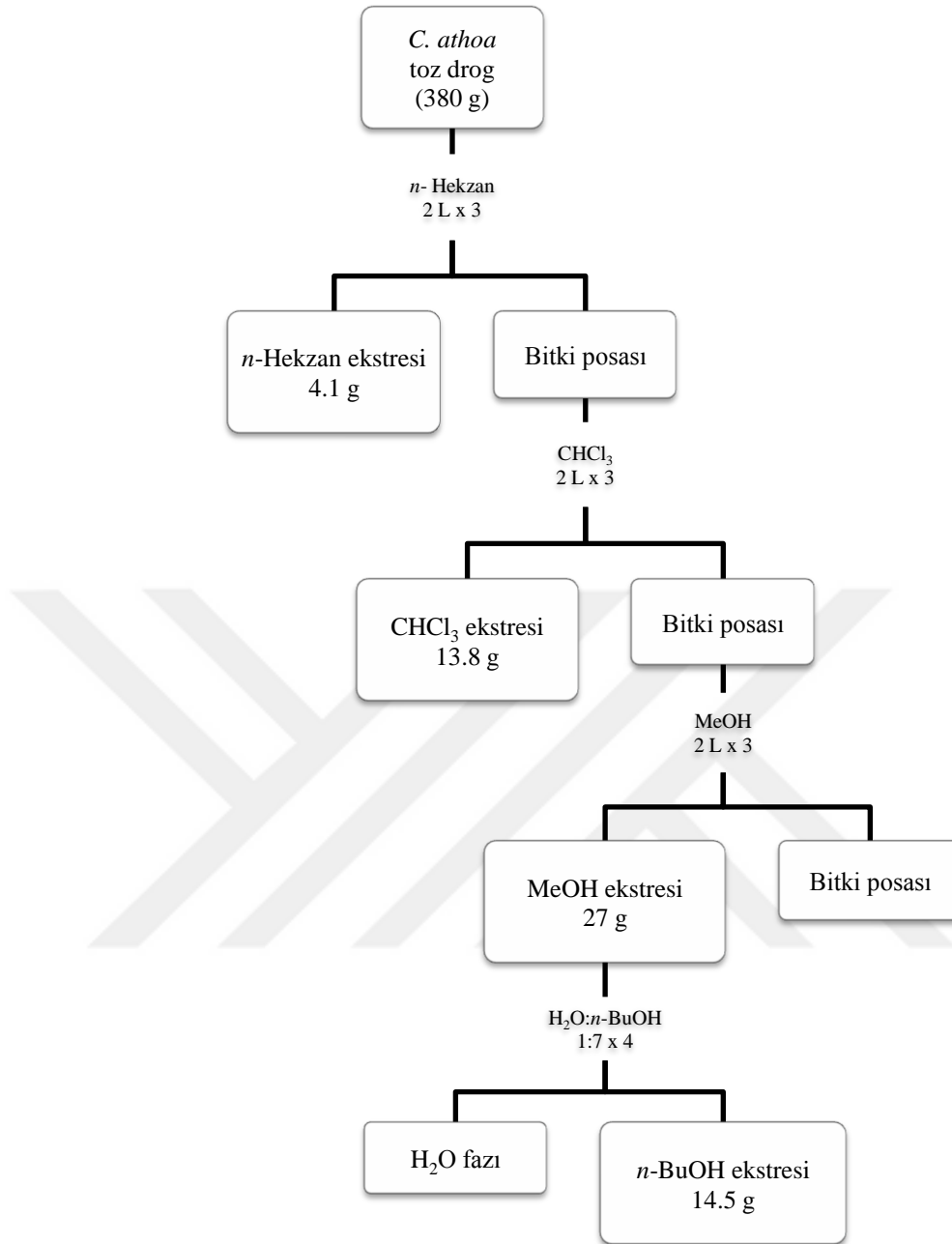
0.1 g Vanilin 100 ml etanolde çözünerek üzerine 2 ml derişik sülfürik asit ilavesiyle hazırlanmıştır. Reaktif plağın üzerine püskürtüldükten sonra ısıtılarak lekeler görünür hale getirilmiştir.

### **3.2.3. Ekstraksiyon ve İzolasyon Çalışmaları**

#### **3.2.3.1. *C. athoa* Üzerinde Yapılan Ekstraksiyon Çalışmaları**

Bitkinin toprak üstü kısımları gölgede kurutulmuş ve mekanik öğütücü ile toz hale getirilmiştir. Öğütülen kısım (380 g) sırası ile *n*-hekzan, CHCl<sub>3</sub> ve MeOH ile, ultrasonik su banyosunda, 24 saat süreyle ekstre edilmiştir (2LX3). Ekstreler filtre kağıdından süzülerek birleştirilmiş ve 40 °C sıcaklıkta, düşük basınç altında evaporatör ile kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. İşlem sonucunda 4.1 g *n*-hekzan, 13.8 g CHCl<sub>3</sub> ve 27 g MeOH ekstreleri elde edilmiştir. Şeker gruplarını uzaklaştırmak amacıyla, kuru haldeki MeOH ekstresi 250 ml su ile süspanse edilip *n*-BuOH ile partisyona tabi tutulmuştur (H<sub>2</sub>O:BuOH; 1:7). Evaporasyon işlemi sonucunda 14.5 g BuOH ekstresi elde edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemi Şema 1’de sunulmuştur.



**Şema 1.** *C. athoa* bitkisi ekstraksiyon işlemleri

### 3.2.3.2. *C. athoa* Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları

Bitkinin kloroform ekstresi (6 g) ters faz dolgu materyali (RP-C18, 150 g) ile hazırlanmış ve H<sub>2</sub>O:MeOH (70:30) sistemi ile şartlanmış VSK sistemine kuru tatbik şeklinde verilmiştir. %70 H<sub>2</sub>O ile başlanan elüsyon işlemine %10 MeOH artışlarıyla devam edilmiş (her biri 300 ml) ve %100 MeOH (1 L) ile işlem sonlandırılmıştır. İşlem sonunda 27 ana fraksiyon elde edilmiştir. İTK profilleri incelenerek iki ana fraksiyon üzerinde (Fr.2 ve Fr. 3-4) saflaştırma işlemlerine devam edilmiştir.

Fr.3-4 (473 mg), silika jel kolona (25 g) uygulanmıştır. %100 CHCl<sub>3</sub> ile elüsyon işlemine başlanmış ve %5 MeOH artışlarıyla (her biri 300 ml) devam edilerek CHCl<sub>3</sub>:MeOH (80:20) ile tamamlanmıştır. İşlem sonucunda 270 fraksiyon elde edilmiştir.

Fr.3-4/240-270 (35 mg) fraksiyonu silika jel kolona (12 g) uygulanmış ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20:1, 300 ml) sistemi ile izokratik elüsyon sonrası **CA-1** (22 mg) bileşiği saflaştırılmıştır.

Fr.3-4/190-215 (30 mg) fraksiyonu silika jel kolona (10 g) uygulanmış, elüsyona CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20:1, 300 ml) sistemi ile izokratik olarak devam edilmiş ve **CA-2** (14 mg) kodlu bileşik elde edilmiştir.

Fr.2 (1200 mg) bir miktar MeOH içerisinde çözülmüş ve Sephadex LH-20 kolona (80 g) tatbik edilmiştir. %100 MeOH (500 ml) ile gerçekleştirilen elüsyon işlemi sonucunda 80 alt fraksiyon alınmıştır. Fr.2/15-35 (1000 mg) silika jel kolona (25 g) uygulanmış ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH (100:0→%2 MeOH artışı→90:10, her biri 300 ml) kademeli geçişi ile elüe edilmiştir. Elde edilen 350 fraksiyondan 121-140 fraksiyonları birleştirilerek **CA-4** (398 mg) kodlu bileşik elde edilmiştir. 168-190 (92 mg) fraksiyonu ise silika jel kolona (10 g) uygulanarak CHCl<sub>3</sub>:MeOH (100:0 →%2 MeOH artışı→90:10, her biri 50 ml) kademeli geçişi ile elüe edilmiş ve **CA-3** (56 mg) bileşiği saflaştırılmıştır.

Bitkinin *n*-BuOH ekstresi (14.5 g) ters faz dolgu materyali (RP-C18, 250 g) ile hazırlanmış ve %100 H<sub>2</sub>O ile şartlanmış VSK sistemine kuru tatbik şeklinde uygulanmıştır. %100 H<sub>2</sub>O ile başlanan elüsyon işlemine %10 MeOH artışlarıyla devam edilmiş (her biri 1 L) ve %100 MeOH (2 L) ile işlem sonlandırılmıştır. İTK profilleri incelenerek altı ana fraksiyon seçilmiş [A (Fr.5-16), B (Fr.46-50), C (Fr.56-58), D (Fr.59-60), E (Fr.75-82) ve F (Fr.134-138)] ve bunlar üzerinde saflaştırma işlemlerine devam edilmiştir.

Fr.A (400 mg) Sephadex LH-20 kolona (80 g) uygulanarak %100 MeOH (600 ml) ile elüe edilmiştir. Fr.A/65-92 (67 mg) fraksiyonu silika jel kolona (10 g) tatbik edilmiş ve EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (100:10:5, 200 ml ve 100:15:10, 100 ml) sistemi ile elüe edilmiştir. Fraksiyon 13-23 birleştirilerek **CA-5** (8 mg) bileşiği kazanılmıştır.

Fr.B (199 mg) Sephadex LH-20 kolona (80 g) uygulanmış ve %100 MeOH (700 ml) ile elüe edilmiştir. Fr.B/12-18 (24 mg) fraksiyonu preparatif İTK yöntemi (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 61:32:7) ile ayrılmış ve UV (254 nm) altında işaretlenen spot kazanarak **CA-8** (6 mg) elde edilmiştir.

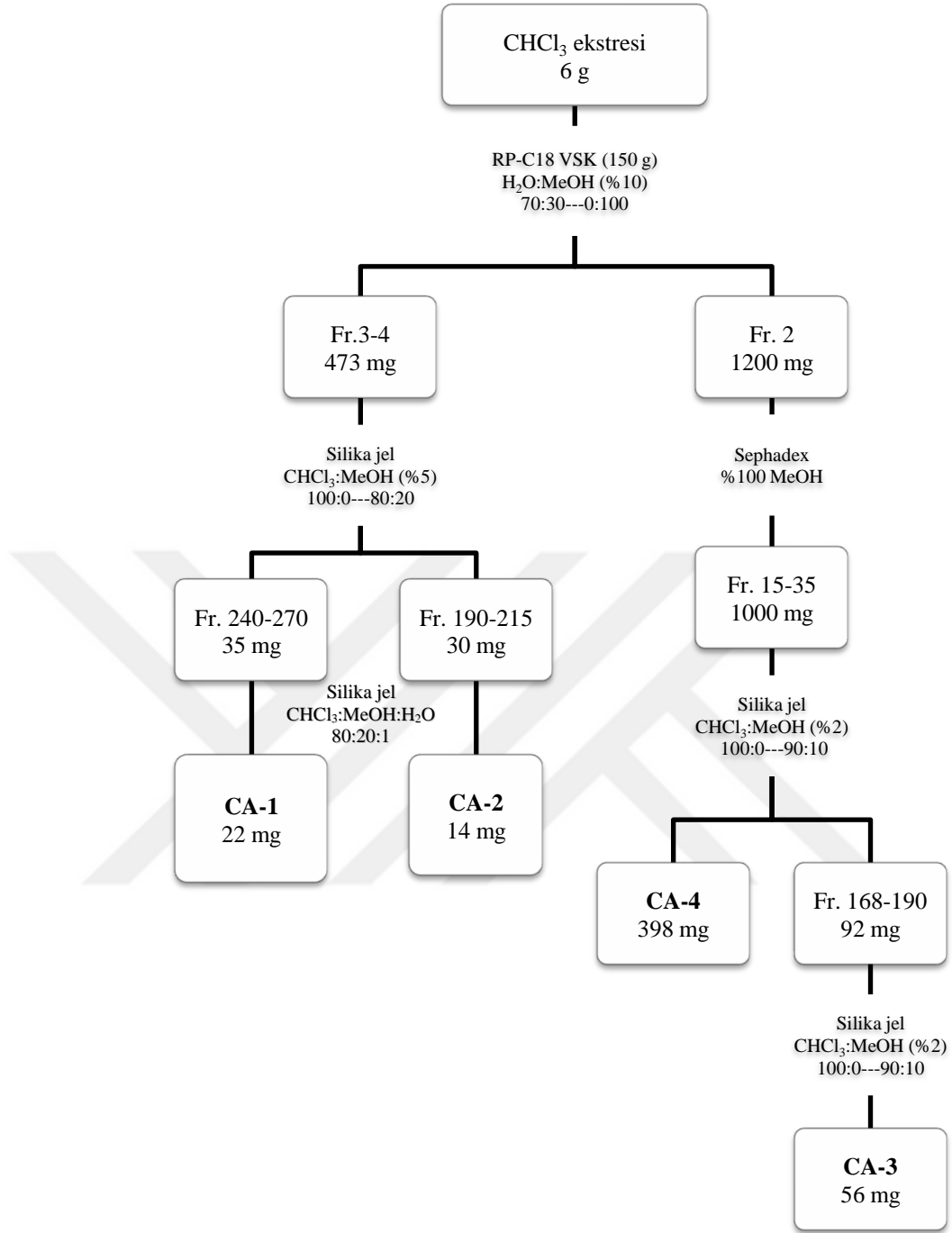
Fr.C (209 mg) Sephadex LH-20 kolona (80 g) uygulanmış ve %100 MeOH (700 ml) ile elüsyon gerçekleştirilmiştir. 29-40 alt fraksiyonu birleştirilerek (43 mg) silika jel kolona (10 g) kuru tatbik şeklinde uygulanmış ve CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (90:10→%2 MeOH artışı→80:20, her biri 50 ml) çözgen sistemi ile elüe edilmiştir. Elüsyon sonucunda 3-18 fraksiyonları birleştirilerek **CA-9** (9 mg) bileşiği kazanılmıştır.

Fr.D (291 mg) Sephadex LH-20 kolona (80 g) uygulanmış ve %100 MeOH (700 ml) ile elüe edilmiştir. Fr.D/36-41 (145 mg) fraksiyonu silika jel kolona (20 g) kuru tatbik şeklinde uygulanmış ve EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (100:10:5, 600 ml) sistemi ile izokratik olarak elüe edilen kolondan **CA-10** (109 mg) kodlu bileşik saf olarak alınmıştır.

Fr.E (1320 mg) ters faz dolgu materyali (RP-C18, 75 g) ile hazırlanmış ve %100 H<sub>2</sub>O ile şartlanmış VSK sistemine uygulanmıştır. %100 H<sub>2</sub>O ile başlanan elüsyon işlemine %5 MeOH artışlarıyla devam edilmiş (her biri 300 ml) ve %100 MeOH (500 ml) ile işlem sonlandırılmıştır. Fr.E/26-41 (110 mg) fraksiyonu silika jel kolona (25 g) tatbik edilerek elüsyon işlemi CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (61:32:7, 600 ml ve 64:50:10, 100 ml) ile gerçekleştirilmiştir. Fr.E/26-41/37-75 (30 mg) fraksiyonu silika jel kolona (10 g) uygulanarak CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30:3, izokratik, 200 ml) sistemi ile elüe edilmiş ve **CA-6** (8 mg) bileşiği saflaştırılmıştır. Fr.E/26-41/168-208 (34 mg) fraksiyonu da silika jel kolona (10 g) uygulanmış ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (61:32:7, izokratik, 300 ml) sistemi ile **CA-7** (12 mg) kodlu bileşik elde edilmiştir.

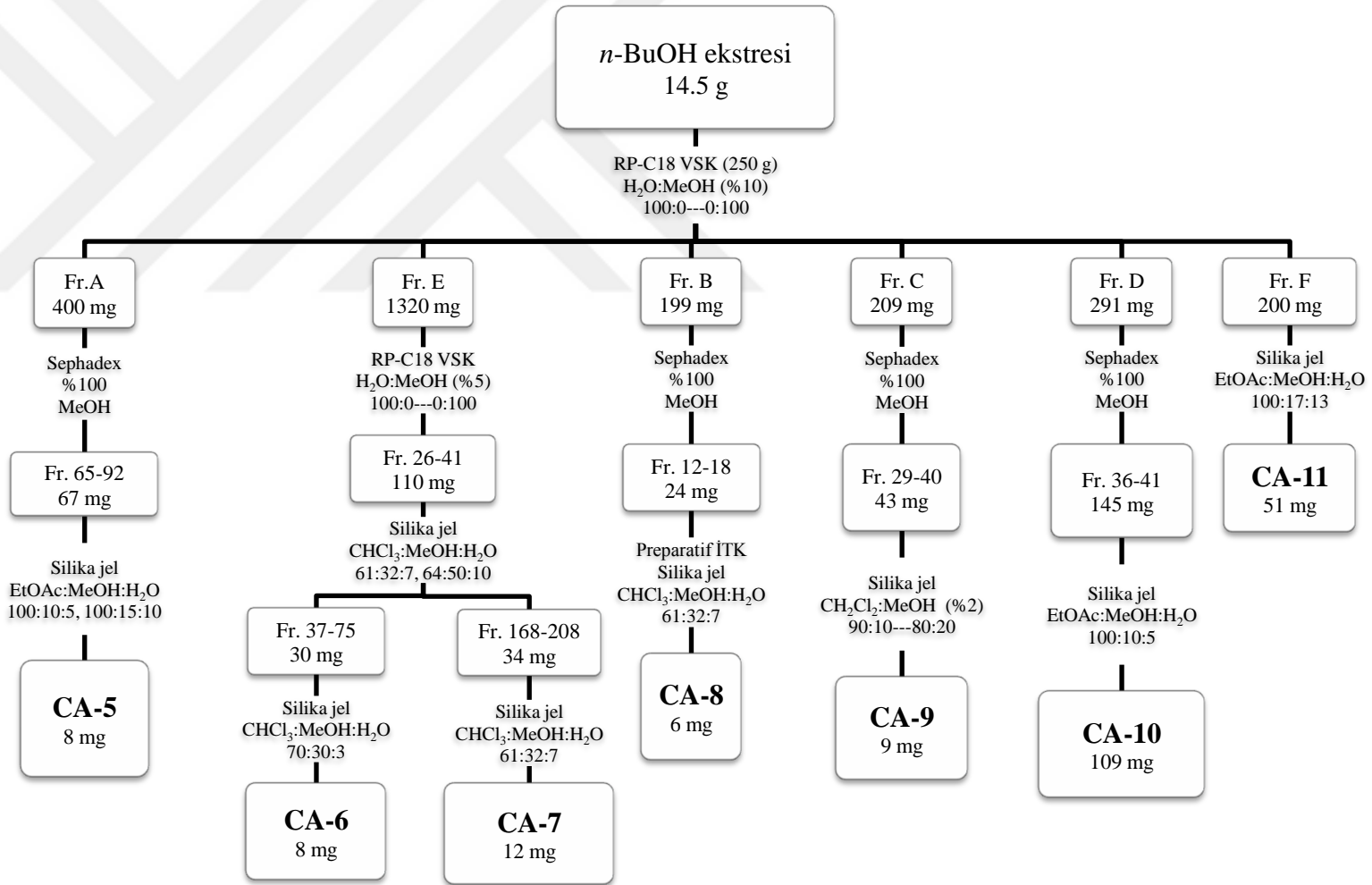
Fr.F (200 mg) silika jel kolona (25 g) tatbik edilmiş ve EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (100:17:13, izokratik, 400 ml) sistemi ile **CA-11** (51 mg) bileşiği saflaştırılmıştır.

*C. athoa* üzerinde gerçekleştirilen kromatografik çalışmalar Şema 2 ve Şema 3'de gösterilmiştir. Maddelerin açık isimleri Tablo 1'de sunulmuştur.



Şema 2. *C. athoa* CHCl<sub>3</sub> ekstresinden elde edilen moleküllere ait izolasyon şeması





Şema 3 *C. athoa* *n*-BuOH ekstresinden elde edilen moleküllere ait izolasyon şeması

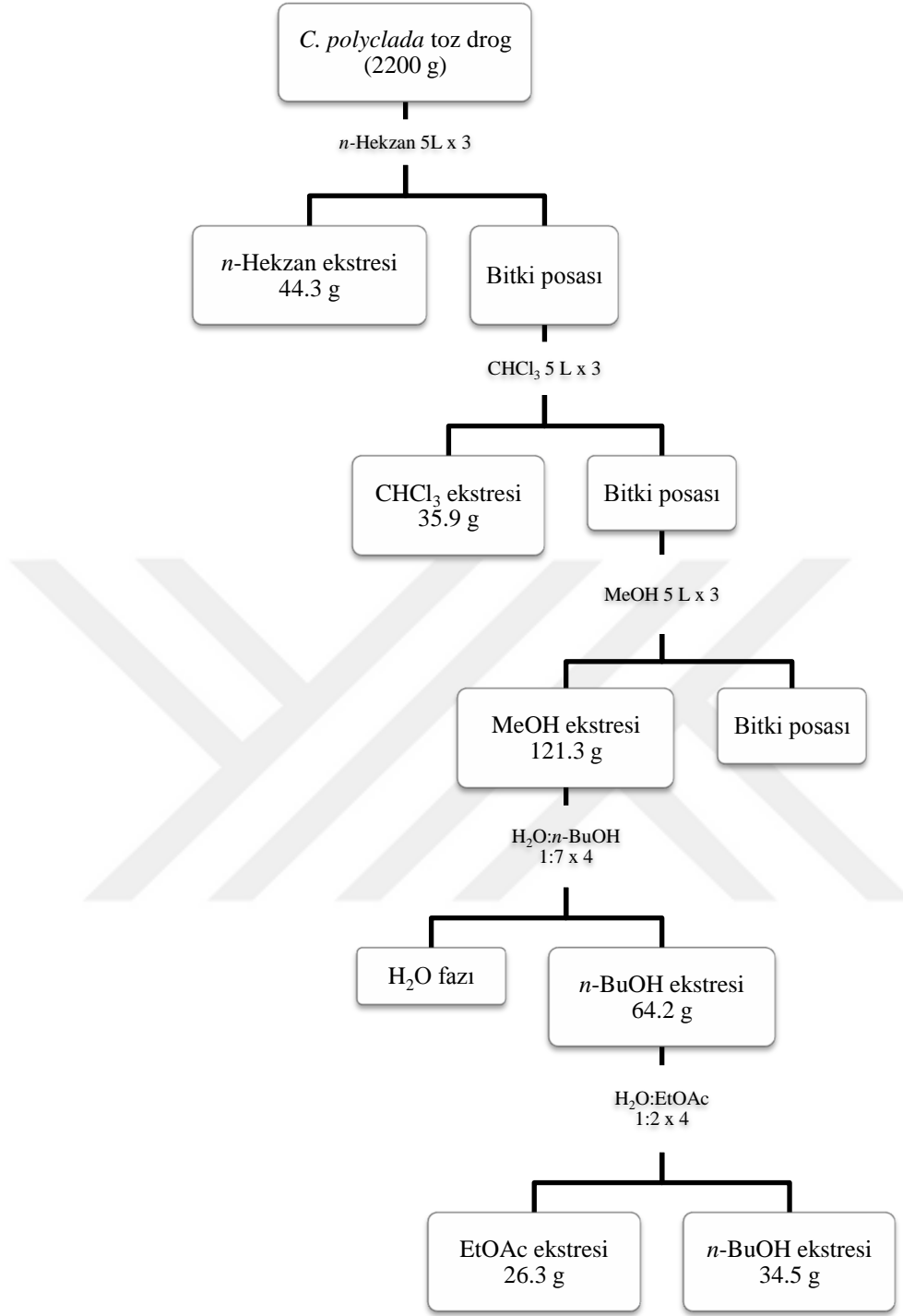
**Tablo 11.** *C. athoa*'dan izole edilen bileşikler

Bileşik Kodu	Açık Adı
<b>CA-1</b>	8 $\alpha$ - <i>O</i> -(4'-hidroksimetakrilolil)-6 $\alpha$ ,14,15-trihidroksi-elema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit (Athoin)
<b>CA-2</b>	8 $\alpha$ - <i>O</i> -(4'-hidroksimetakrilolil)-14-asetoksi-6 $\alpha$ ,15-dihidroksi-elema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit (14- <i>O</i> -asetil athoin)
<b>CA-3</b>	8 $\alpha$ - <i>O</i> -(4'-hidroksimetakrilolil)-14-asetoksi-6 $\alpha$ ,15-dihidroksi-elema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit metil esterleri (14- <i>O</i> -asetilathoin-12 metil esterleri)
<b>CA-4</b>	4'-hidroksipekterolit-14- <i>O</i> -asetat
<b>CA-5</b>	<i>p</i> -hidroksibenzoik asit
<b>CA-6</b>	Protokateşik asit
<b>CA-7</b>	4- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranozil-vanilik asit metil esterleri
<b>CA-8</b>	Picein
<b>CA-9</b>	9- <i>O</i> -metil koniferin
<b>CA-10</b>	Siringin
<b>CA-11</b>	$\beta$ -sitositerol-3- <i>O</i> - $\beta$ -D-glukopiranoziti

### 3.2.3.3. *C. polyclada* Üzerinde Yapılan Ekstraksiyon Çalışmaları

Bitkinin toprak üstü kısımları gölgede kurutulmuş ve mekanik öğütücü ile toz hale getirilmiştir. Öğütülen kısım (2200 g) sırası ile *n*-hekzan, CHCl<sub>3</sub> ve MeOH ile ultrasonik su banyosunda, 24 saat süreyle ekstre edilmiştir (5LX3). Ekstreler filtre kağıdından süzülerek birleştirilmiş ve 40 °C sıcaklıkta, düşük basınç altında evaporatör ile kuruluğa kadar yoğunlaştırılmıştır. İşlem sonucunda 44.3 g *n*-hekzan, 35.9 g CHCl<sub>3</sub> ve 121.3 g MeOH ekstreleri elde edilmiştir. Şeker gruplarını uzaklaştırmak amacıyla, kuru haldeki MeOH ekstresi 250 ml su ile süspanse edilip *n*-BuOH ile partisyona tabi tutulmuştur (H<sub>2</sub>O:BuOH; 1:7). Evaporasyon işlemi sonucunda elde edilen BuOH ekstresi (64.2 g) tekrar suda süspanse edilip EtOAc ile partisyona tabi tutulmuştur. İşlem sonucunda 26.3 g EtOAc ekstresi ayrılmış ve 34.5 g BuOH ekstresi elde edilmiştir.

Ekstraksiyon işlemi Şema 4'de sunulmuştur.



Şema 4. *C. polyclada* bitkisi ekstraksiyon işlemleri

### 3.2.3.4. *C. polyclada* Üzerinde Yapılan İzolasyon Çalışmaları

Bitkinin kloroform ekstresi (30 g), H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20) ile şartlanmış ters faz silika jel kolona kuru tatbik şeklinde uygulanmıştır (RP-C18 VSK, 200 g). %80 H<sub>2</sub>O ile başlanan elüsyon işlemine %10 MeOH artışlarıyla devam edilerek %100 MeOH ile sonlandırılmıştır (Her biri 1L). İşlem sonunda elde edilen 12 ana fraksiyona ait İTK profilleri incelenerek 6 ana fraksiyon üzerinde izolasyon işlemlerine devam edilmiştir.

Fr.8-9 (970 mg), silika jel kolona (25 g) tatbik edilmiş ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 90:10:1 (200 ml) sistemi ile başlayan elüsyona 80:20:1 (100 ml) ve 70:30:3 (200 ml) sistemleri ile devam edilerek 95 alt fraksiyon toplanmıştır. Fr.8-9/3-11 (285 mg) silika kolona (10 g) uygulanarak Hekzan:EtOAc (60:40→%2 EtOAc artışı→50:50, her biri 100 ml) kademeli geçişi ile elüe edilmiştir. 94-156 fraksiyonu (137 mg) tekrar silika kolona (10 g) tatbik edilmiş ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:0.5, izokratik, 200 ml) çözgen sistemi ile **CP-1** (38 mg) bileşiği saflaştırılmıştır.

Fr.14-18 (2685 mg), CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:1) ile şartlanan silika kolona (40 g) uygulanmış ve 90:10:1 (400 ml), 80:20:1 (200 ml) geçişleriyle elüsyon tamamlanmıştır. MeOH ile yıkama işleminde elde edilen son fraksiyon (212 mg) silika kolona (15 g) tatbik edilmiş ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:1, 200 ml; 85:15:0.5, 300 ml) ile elüsyon sonucunda **CP-3** (59 mg) bileşiği saf olarak elde edilmiştir.

Fr.3-5 (827 mg) bir miktar MeOH içerisinde çözünerek Sephadex LH-20 kolona (80 g) tatbik edilmiş ve (%100 MeOH, 600 ml) ve 60 alt fraksiyon elde edilmiştir. Fr.3-5/16-27 (335 mg) silika kolona (15 g) uygulanmış ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:1, 200 ml; 85:15:0.5; 80:20:2, 100 ml) sistemleri ile fraksiyonlanmıştır. 17-28 (143 mg) alt fraksiyonu silika jel kolona (20 g) uygulanarak EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (100:5:0.5, izokratik, 300 ml) sistemi ile elüe edilmiş ve Fr.3-5/16-27/17-28/61-75 (76 mg) fraksiyonu CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:1, izokratik, 100 ml) ile silika jel (10 g) kolonda temizlenerek **CP-6** (31 mg) bileşiği elde edilmiştir.

Fr.10-12 (1979 mg) silika jel kolona (35 g) uygulanmış ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:1, 400 ml; 80:20:1, 200 ml) sistemleri ile elüe edildikten sonra 110 alt fraksiyon elde edilmiştir.

Fr.10-12/39-66 (772 mg) alt fraksiyonu silika jel kolona (10 g) tatbik edilmiş ve EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O (100:5:1, izokratik, 200 ml) çözgen sistemi ile **CP-10** (640 mg) bileşiği saflaştırılmıştır.

Fr. 19-23 ana fraksiyonunda çökelti olduğu gözlenmiş ve çöken kısım santrifüjlenerek ayrılmıştır. Çöken kısım (788 mg) silika jel kolonda (15 g) %100 CHCl<sub>3</sub> ile (300 ml) elüe edilerek **CP-8** (247 mg) bileşiği saflaştırılmıştır. Çözünen kısım (1300 mg) ise silika kolona (25 g) tatbik edilmiş ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:1, 300 ml; 70:30:3, 100 ml) sistemleri kullanılarak elüe edilmiştir. 5-28 (730 mg) alt fraksiyonu Sephadex LH-20 kolona (50 g) (%100 MeOH, 500 ml) tatbik edilmiş ve elde edilen Fr.19-23/5-28/21-31 (51 mg) silika jel kolona uygulanmıştır. %100 CHCl<sub>3</sub> (100 ml) ile elüsyon sonucunda **CP-9** (9 mg) kodlu bileşik elde edilmiştir.

Fr.24-27 fraksiyonu (1400 mg), bir miktar MeOH ile çözünerek Sephadex LH-20 kolona (80 g) tatbik edilmiş (%100 MeOH, 600 ml) ve 120 alt fraksiyon elde edilmiştir. 84-Yık alt fraksiyonunun (78 mg) silika jel kolonda (15 g) %100 CHCl<sub>3</sub> (200 ml) ile elüsyonu sonucunda **CP-7** (35 mg) saf olarak alınmıştır.

Bitkinin *n*-BuOH ekstresi (30 g) ters faz dolgu materyali (RP-C18, 200 g) ile hazırlanmış ve %100 H<sub>2</sub>O ile şartlanmış VSK sistemine kuru tatbik şeklinde verilmiştir. %10 MeOH artışlarıyla (her biri 1L) devam eden elüsyon işlemi %100 MeOH ile sonlandırılmış ve İTK profilleri incelenerek 8 ana fraksiyon üzerinde saflaştırma işlemlerine devam edilmiştir.

Fr.2-6 (6000 mg), H<sub>2</sub>O ile şartlanmış RP-C18 VSK (100 g) sistemine tatbik edilmiş ve %100 H<sub>2</sub>O (500 ml) ile elüsyon sonucunda 100 alt fraksiyon elde edilmiştir.

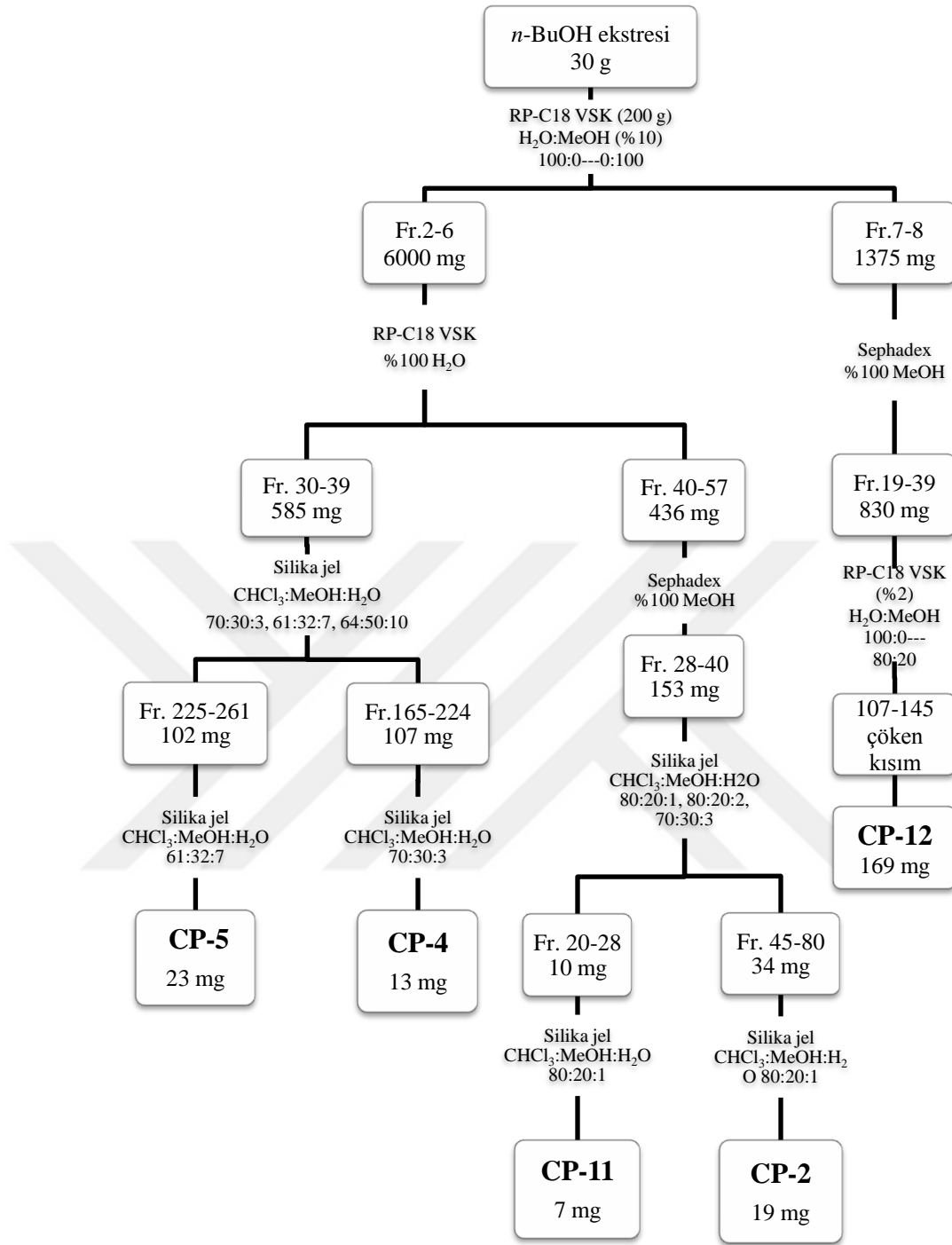
Fr.2-6/30-39 (585 mg), silika jel kolona (45 g) uygulanmış ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30:3, 500 ml) ile başlanan elüsyon işlemine 61:32:7 (300 ml) ve 64:50:10 (500 ml) sistemleri ile devam edilmiştir. 165-224 alt fraksiyonu (107 mg), silika jel kolona (10 g) tatbik edilmiş ve CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30:3, izokratik, 200 ml) ile temizlenerek **CP-4** (13 mg) bileşiği elde edilmiştir. Fr.2-6/30-39/225-261 (102 mg) alt fraksiyonu da CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (61:32:7, izokratik, 300 ml) sistemi ile temizlenerek **CP-5** (23 mg) saflaştırılmıştır.

Fr.2-6/40-57 (436 mg) alt fraksiyonu Sephadex LH-20 kolona (40 g) tatbik edilmiştir (%100 MeOH, 500 ml). Elde edilen 80 fraksiyondan 28-40 (153 mg) alt fraksiyonu silika jel kolona (10g) kuru tatbik şeklinde uygulanmış ve

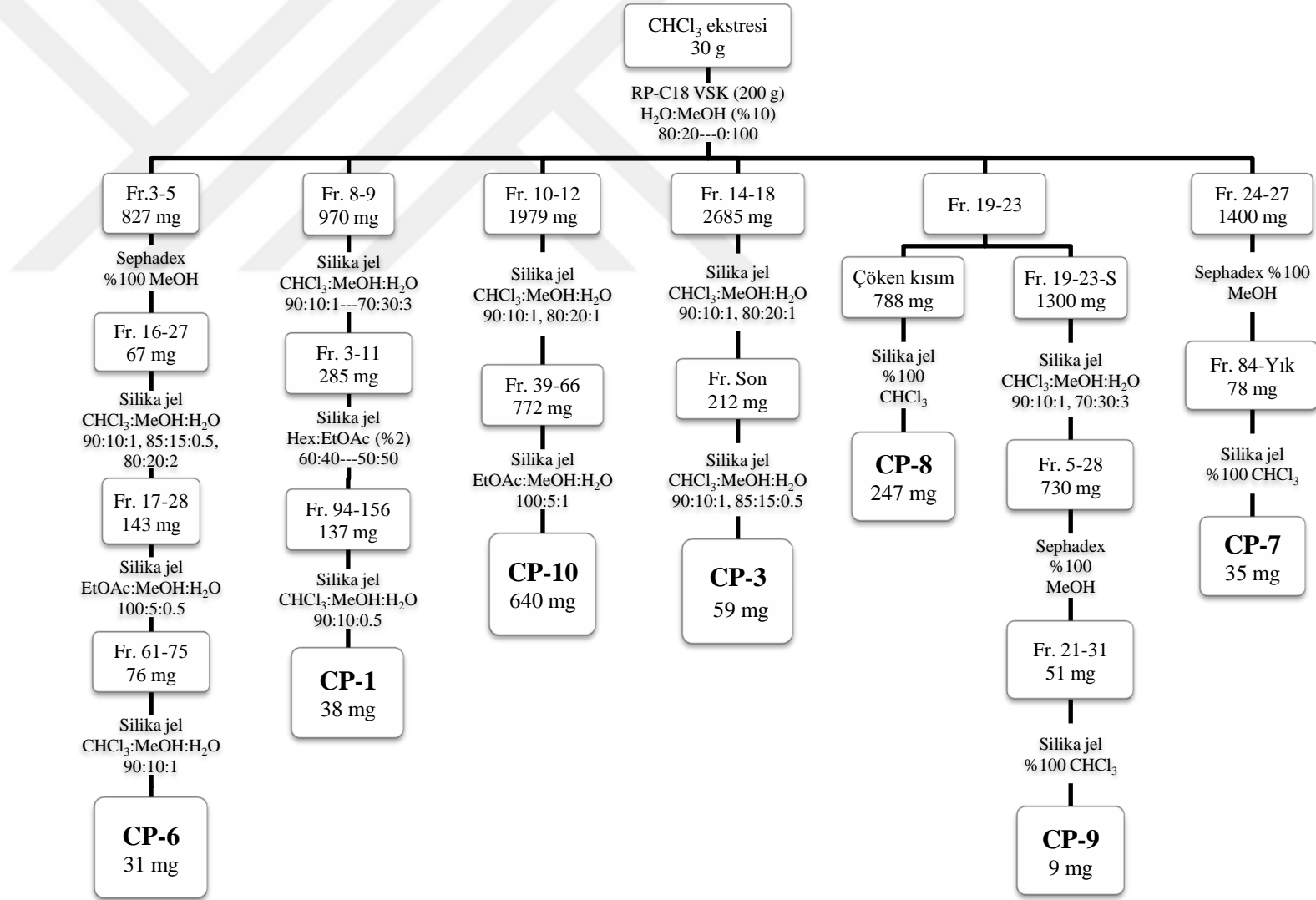
CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20:1, 100 ml; 80:20:2, 400 ml; 70:30:3, 100 ml) sistemleri ile elüsyona devam edilmiştir. İşlem sonucunda elde edilen Fr.2-6/40-57/28-40/20-28 (10 mg) ve Fr.2-6/40-57/28-40/45-80 (34 mg) alt fraksiyonları silika jel kolonda (10 g) (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 80:20:1, izokratik, her biri 100 ml) elüe edilmiş ve işlem sonucunda sırasıyla **CP-11** (7 mg) ve **CP-2** (19 mg) bileşikleri saflaştırılmıştır.

Fr.7-8 (1375 mg) Sephadex LH-20 kolona (80 g) tatbik edilmiş ve %100 MeOH (500 ml) ile gerçekleştirilen elüsyon sonucunda 150 fraksiyon elde edilmiştir. Fr.7-8/19-39 (830 mg) %100 H<sub>2</sub>O ile şartlanmış, hazır RP-C18 kartuşa (10 g) uygulanmış ve elüsyon işlemine %2'lik MeOH artışlarıyla (her biri 100 ml) devam edilerek H<sub>2</sub>O:MeOH (80:20) sistemi ile tamamlanmıştır. 107-145 alt fraksiyonunda çöken kısım santrifüjlenerek ayrılmış ve **CP-12** (169 mg) bileşiği elde edilmiştir.

*C. polyclada* üzerinde gerçekleştirilen kromatografik çalışmalar Şema 5 ve Şema 6'da gösterilmiştir. Maddelerin açık isimleri Tablo 2'de sunulmuştur



Şema 5. *C. polyclada* n-BuOH ekstresinden elde edilen moleküllere ait izolasyon şeması



Şema 6. *C. polyclada* CHCl<sub>3</sub> ekstresinden elde edilen moleküllere ait izolasyon şeması.



**Tablo 12.** *C. polyclada*'dan izole edilen bileşikler

Bileşik Kodu	Açık Adı
<b>CP-1</b>	6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit metil esteri
<b>CP-2</b>	6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit
<b>CP-3</b>	8 $\alpha$ - <i>O</i> -[2'-(hidroksimetil)-but-2'-enoil]-6 $\alpha$ ,15-dihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit
<b>CP-4</b>	13- <i>N</i> -prolin melitensin
<b>CP-5</b>	13- <i>N</i> -prolin-6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3-dien-12-oik asit
<b>CP-6</b>	1 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -trihidroksi-15-okso-ödesm-11(13)-en-12-oik asit metil esteri
<b>CP-7</b>	Salvigenin
<b>CP-8</b>	Öpatorin
<b>CP-9</b>	3'-metoksi öpatorin
<b>CP-10</b>	Arktiin
<b>CP-11</b>	Taçiozit
<b>CP-12</b>	Siringin

### 3.3. BİYOAKTİVİTE ÇALIŞMALARI

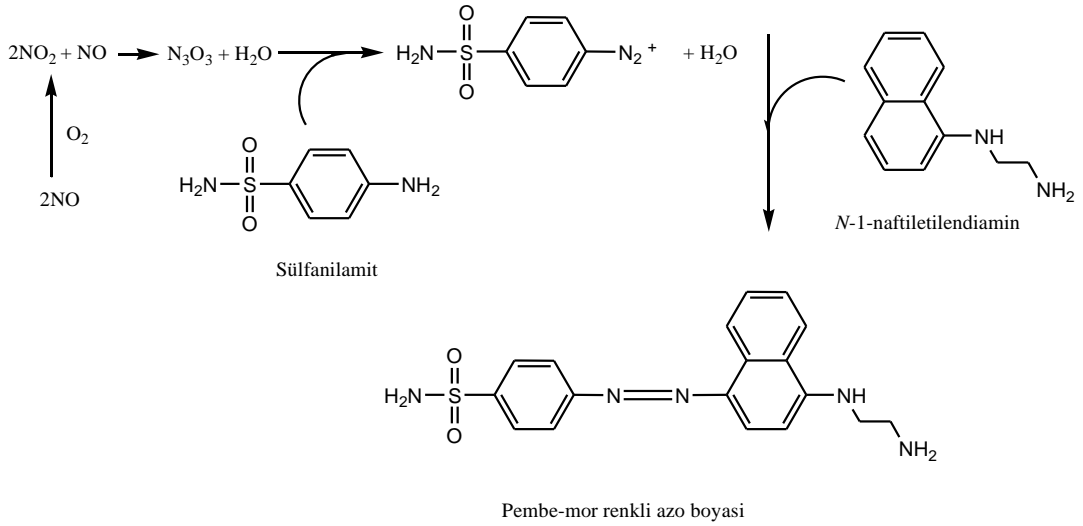
Tez çalışması kapsamında, izole edilen seskiterpen yapıdaki moleküller üzerinde *in vitro* sitotoksikite ve antienflamatuvar aktivite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sitotoksik aktivitenin belirlenmesi amacıyla modifiye edilmiş MTT metodu; antienflamatuvar aktivitenin belirlenmesi amacıyla ise iNOS (İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz) ve NF-κB (Nükleer Faktör Kappa B) inhibisyonuna dayalı metotlar kullanılmıştır. Moleküller DMSO içerisinde çözünerek, 10 mg/ml konsantrasyonda stok çözeltiler hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak partenolit, taşıyıcı kontrol olarak ise DMSO-LPS (iNOS inhibisyonu) ve DMSO-PMA (NF-κB inhibisyonu) testlere eklenmiştir.

#### 3.3.1. Antienflamatuvar Aktivite

Moleküllerin, iNOS üzerindeki inhibitör etkisinin belirlenmesi amacıyla RAW 264.7 fare makrofaj hücreleri kullanılmıştır. Fenol kırmızısı içermeyen, %10 fetal sığır serumu (FBS), 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 2 µM *L*-glutamin ilave edilmiş RPMI-1640 besiyerinde, 37 °C'de ve %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda kültüre alınan hücreler, yüzeyi kaplayınca, hücre kazıyıcısı yardımıyla toplanmıştır.

Sayım yapılarak uygun miktarda besiyeri ile süspande edilen hücreler,  $1 \times 10^5$  hücre/göz/100 µl olacak şekilde 96 gözlü mikropalakaya dağıtılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. 10 mg/ml'lik stoklardan seyreltme yapılarak, farklı konsantrasyonlarda test örnekleri hazırlanmış ve sırasıyla 60 µl serumsuz ortam ile 20 µl test örneği kuyucuklara ilave edilmiştir (final konsantrasyonları 50, 5 ve 0.5 µg/ml). Daha sonra hücrelerde iNOS'u indüklemek için 20 µl LPS (5 µg/ml) eklenmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonunda, kuyucukların üst kısmından 35 µl alınarak başka bir mikropalakaya aktarılmış ve üzerine Griess reaktifi ilave edilmiştir. 30 dk sonra 540-630 nm'de absorpsiyon ölçülerek besiyerinde bulunan nitrikoksit (NO) miktarı belirlenmiştir. Nitrikoksit ile Griess reaktifinin reaksiyon mekanizması Şekil 6'de verilmiştir.

Yanlış pozitif cevap kontrolü amacıyla, hücrelerin bulunduğu mikropalakada, MTT metodu uygulanarak, maddelerin RAW 264.7 hücreleri üzerindeki sitotoksik aktiviteleri belirlenmiştir.

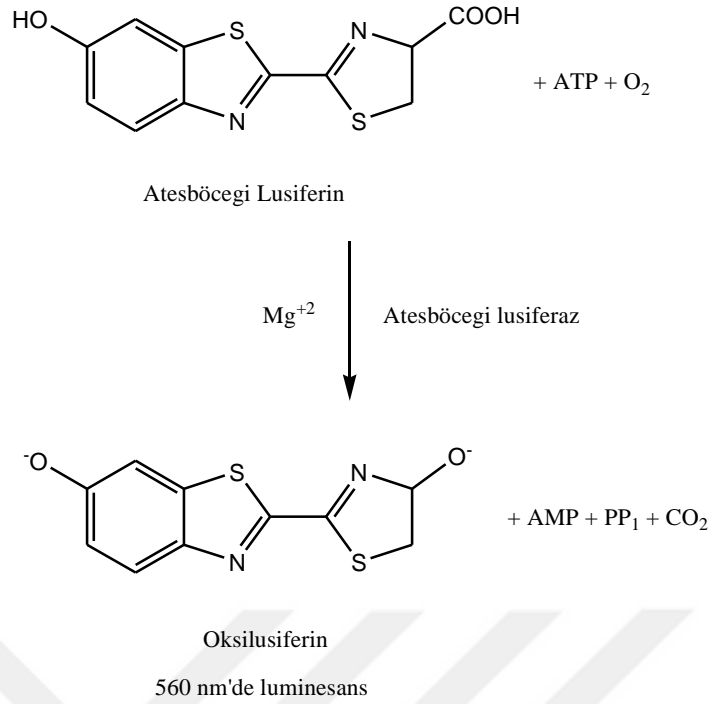


**Şekil 6.** İNOS inhibisyonu testinde nitrikoksit ile Griess reaktifinin reaksiyon mekanizması

Moleküllerin, enflamasyon durumunda uyarılan ve enflamatuvar-proenflamatuvar sitokinlerin transkripsiyonundan sorumlu NF-κB üzerindeki inhibitör etkisinin belirlenmesi amacıyla, NF-κB lusiferaz raportör gen sistemi taşıyan stabil HeLa hücreleri (Signosis-SL0001) kullanılmıştır.

Hücreler, %10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ilave edilmiş DMEM/F12 besiyerinde, 37 °C’de ve %5 CO<sub>2</sub>’li ortamda kültüre alınmıştır. Hücreler yüzeyi kaplayınca, tripsinasyon ile yüzeyden alınmıştır.

Sayım yapılarak uygun miktarda besiyeri ile süspande edilen hücreler, 5x10<sup>4</sup> hücre/göz/90 µl olacak şekilde 96 gözlü beyaz renkli mikropalakaya dağıtılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. 10 mg/ml’lik stoklardan seyreltme yapılarak, farklı konsantrasyonlarda test örnekleri hazırlanmış ve 10 µl test örneği kuyucuklara ilave edilmiştir (final konsantrasyonları 50, 5 ve 0.5 µg/ml). 30 dk inkübasyondan sonra, indükleyici ajan olarak, kuyucuklara 10 µl PMA (70 ng/ml) ilave edilmiş ve 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki ortam aspire edilerek 200 µl PBS ile yıkanmış ve 20 µl lizis çözeltisi ilave edilerek 1 saat oda sıcaklığında çalkalayıcıda bekletilmiştir. Daha sonra kuyucuklara 20 µl ateşböceği lusiferaz substratı eklenmiş ve substrat ilavesiyle oluşan ışımaya (Şekil 7) hızlı bir şekilde, luminometre ile ölçülmüştür.



**Şekil 7.** NF-κB inhibisyonu testinde lusiferin/oksilusiferin dönüşüm reaksiyonu

### 3.3.2. Sitotoksik Aktivite

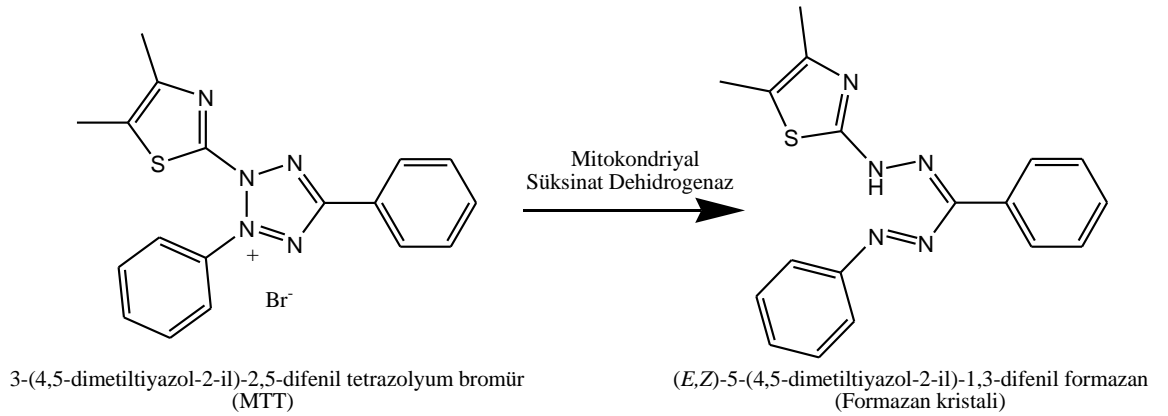
Moleküllerin sitotoksik aktivitelerini belirlemek amacıyla MTT metodu kullanılmıştır. Sarı renkli tetrazolyum tuzunun [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H-tetrazolyumbromür], canlı hücrelerin mitokondrisinde bulunan süksinat dehidrogenaz enzimi ile indirgenerek, koyu mavi-mor renkli formazan kristallerine dönüşmesine dayanan bu kolorimetrik metod ile hücrelerin canlılık oranı belirlenmektedir (Şekil 8).

*In vitro* sitotoksite denemesinde insan solid tümör hücre hatları (A549: Akciğer adenokarsinom; CaCo-2: Kolon kolorektal adenokarsinom; HeLa: Servikal adenokarsinom; MCF-7: Meme epitelyal adenokarsinom; MDA-MB-231: Meme adenokarsinoma; mPANC-96: Pankreas adenokarsinom; PC3: Prostat adenokarsinom ve U87MG: Glioblastoma-astrocitoma hücreleri) ve kanser olmayan insan embriyonik böbrek hücreleri (HEK293) kullanılmıştır.

Tüm hücre hatları ATCC'den (American Type Culture Collection) temin edilmiş olup Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü stoklarından sağlanmıştır.

Hücre hatları, %10 FBS, 100 U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ve 2 mM L-glutamin içeren DMEM F12 besiyerinde %95 nem içeren %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37 °C'de kültüre alınmıştır. Hücreler yüzeyi kaplayınca, tripsinasyon ile yüzeyden alınmıştır.

Sayım yapılarak uygun miktarda besiyeri ile süspende edilen hücreler, 1x10<sup>5</sup> hücre/göz/90 µl olacak şekilde 96 gözlü mikropalakaya dağıtılmış ve 24 saat inkübe edilmiştir. 10 mg/ml'lik stoklardan seyreltme yapılarak, farklı konsantrasyonlarda test örnekleri hazırlanmış ve 10 µl test örneği (final konsantrasyonları 50, 5 ve 0.5 µg/ml) kuyucuklara ilave edilerek 48 saat inkübasyona bırakılmıştır. Daha sonra fizyolojik su (%9 NaCl) içerisinde 5 mg/ml konsantrasyonda hazırlanan MTT stoğundan her kuyucuğa 25 µl ilave edilerek 4 saat daha inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda kuyucuklardaki ortam uzaklaştırılarak 150 µl DMSO eklenmiş ve formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Hücre canlılığını belirlemek amacıyla mikropalaka okuyucuda 570 nm ve 620 nm'de (referans filtre) absorbans ölçümleri yapılmıştır. Denemeler 2 tekrarlı olarak yapılmış ve hücre canlılığında %50 inhibisyon sağlayan etkili konsantrasyon (IC<sub>50</sub>) GraphPad Prism 5 kullanılarak belirlenmiştir. Pozitif kontrol olarak partenolit ve doksorubisin çalışmaya dahil edilmiştir.



**Şekil 8.** MTT testinde formazan kristali oluşum reaksiyonu

## BÖLÜM 4. BULGULAR

### 4.1. FİTOKİMYASAL ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR

#### 4.1.1. *Centaurea athoa* DC.

*C. athoa* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen CHCl<sub>3</sub> ve MeOH ekstraktları ile çeşitli kromatografik yöntemler kullanılarak izolasyon ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

CHCl<sub>3</sub> ekstresi ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmaları sonucunda üçü eleman türevi ve birisi ise germakranolit türevi olmak üzere 4 seskiterpen bileşiği (CA-1 – CA-4) elde edilmiştir.

Bitkinin MeOH ekstresinden hazırlanan *n*-BuOH ekstresinden ise farklı fenolik yapılarda 7 molekülün izolasyonu gerçekleştirilmiştir (CA-5 – CA-11).

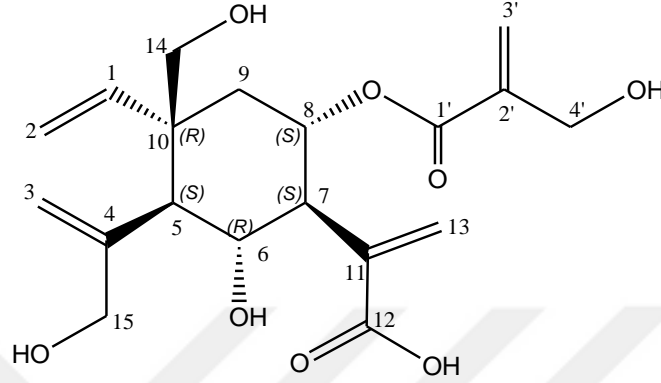
İzole edilen moleküllerin yapı tayinleri 1D (<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR) ve 2D (COSY, HSQC, HMBC ve NOESY) NMR ve kütle spektrumları değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir. Bilinen bileşiklere ait yapılar ise (CA-5 – CA-11) literatür verileri ile kıyaslanarak doğrulanmıştır.

#### 4.1.1.1. SESKİTERPENLER

##### ELEMAN TİP SESKİTERPENLER

##### CA-1

##### 8 $\alpha$ -O-(4'-hidroksimetakriloil)-6 $\alpha$ ,14,15-trihidroksi-elema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit



Kapalı Formül : C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>

Molekül Ağırlığı : 382.1628

QTOF-MS *m/z* : 405.1516 [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub>Na: 405.1525) (Spektrum 1)

787.3140 [2M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>38</sub>H<sub>52</sub>O<sub>16</sub>Na: 787.3153) (Spektrum 1)

381.1550 [M-H]<sup>-</sup> (381.1549 C<sub>19</sub>H<sub>25</sub>O<sub>8</sub>) (Spektrum 1)

<sup>1</sup>H NMR : Spektrum 2, Tablo 13

<sup>13</sup>C NMR : Spektrum 3, Tablo 13

COSY : Spektrum 4, Spektrum 5

HSQC : Spektrum 6, Spektrum 7, Spektrum 8

HMBC : Spektrum 9, Spektrum 10

NOESY : Spektrum 11, Spektrum 12

Optik Rotasyon [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +17.1 (*c.* 0.009, MeOH)

IR  $\nu_{\max}$ = 2987, 1695, 1553, 1393, 1274, 1166, 1050, 1027, 1000, 916, 814

Renksiz zambak halinde elde edilen CA-1 kodlu bileşik, İTK profilinde, UV aktif olmayan ve V/S reaktifi ile koyu mor renk veren bir bant halinde gözlenmiştir (EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O, 100:17:13; R<sub>f</sub> ~0.35).

QTOF kütle spektrumunda görülen 405.1516 [M+Na]<sup>+</sup>, 787.3140 [2M+Na]<sup>+</sup> pozitif ve 381.1550 [M-H]<sup>-</sup> negatif iyon pikleri ile <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen sinyaller birlikte değerlendirildiğinde CA-1'in molekül formülü C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub> olarak belirlenmiştir.

Moleküle ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumu incelendiğinde, düşük alanda görülen karakteristik ekzosiklik metilen grubuna ait iki dublet proton ( $\delta_{\text{H}}$  6.16 ve 5.61,  $J=1.2$  Hz, H<sub>2</sub>-13) ile  $\delta_{\text{H}}$  3.93 ve 4.02'de hidrosimetilen grubuna işaret eden AB sistemi şeklinde gözlenen iki dublet protonun ( $J=15.2$  Hz, H<sub>2</sub>-15) varlığı bileşiğin seskiterpen yapısında olabileceğini düşündürmüştür. Bunun yanında birbiri ile *cis* ve *trans* yarıma sabitleri ile etkileşen 3 olefinik protonun varlığı ( $\delta_{\text{H}}$  5.73 *dd*;  $J_{1-2a}=17.6$  ve  $J_{1-2b}=10.8$ , H-1; 5.03 *dd*,  $J=17.6/1.2$ , H-2a ve 5.06 *dd*,  $J=11.2/0.8$ , H-2b) ve bir diğer ekzosiklik metilen grubuna ait  $\delta_{\text{H}}$  5.04 ve 5.42'de gözlenen geniş singlet sinyaller (H-3a ve H-3b) molekülün eleman yapısında bir seskiterpen olduğuna işaret etmiştir. <sup>1</sup>H NMR spektrumunda gözlenen diğer sinyaller ( $\delta_{\text{H}}$  5.65 *td*, H8; 4.31 *t*, H6; 2.70 *dd*, H7; 2.30 *dd* ve 1.54 *dd*, H9a ve H9b; 1.93 *d*, H5) ile <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen sinyallerin literatür verileriyle karşılaştırılması bu görüşü desteklemiştir (3, 10).

Bunun yanında,  $\delta_{\text{H}}$  5.83 ve 6.19'da bir diğer ekzosiklik metilen grubuna işaret eden iki adet dublet proton (H-3'a ve H-3'b) ve  $\delta_{\text{H}}$  4.20'de iki proton yüksekliğindeki geniş singlet proton (H<sub>2</sub>-4') sinyalleri ile HMBC spektrumunda H<sub>2</sub>-3' ve H<sub>2</sub>-4' protonları ile etkileşen 4 adet karbon sinyali ( $\delta_{\text{C}}$  166.8, C1'; 142.0, C2'; 124.9, C3' ve 61.6, C4') literatür verileriyle karşılaştırılmış ve yapının, çeşitli *Centaurea* türlerinden elde edilen seskiterpenlerde yan zincir olarak karşılaşılan "4-hidroksi metakrilik asit" ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (10, 27, 93).

Molekül formülünden hareketle CA-1'in doymamışlık derecesi yedi olarak belirlenmiştir. İkili bağlardan gelen altı doymamışlık derecesi (dört ekzosiklik metilen grubu ve iki karbonil grubu: C1/C2, C3/C4, C11/C13, C2'/C3', C12 ve C1') değerlendirildiğinde molekülün monosiklik yapıda olduğu yargısına varılmıştır.



*Centaurea* türlerinden izole edilen seskiterpenlerde, C10'a bağlı bir metil ve C4'e bağlı bir hidroksimetilen grubunun bulunduğu rapor edilmiştir. CA-1 molekülünde ise  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumlarında metil grubu varlığını gösteren herhangi bir sinyal gözlenmemiştir.

$^1\text{H}$  NMR spektrumunda,  $\delta_{\text{H}}$  3.93 ve 4.02'de [ $\text{CH}_2\text{-15(O)}$ ] ile  $\delta_{\text{H}}$  3.68 ve 3.90'da [ $\text{CH}_2\text{-14(O)}$ ] AB sistemi şeklinde dört adet dublet proton sinyalinin gözlenmesi, iki farklı hidroksimetilen grubunun varlığına işaret etmiştir. Moleküle ait HMBC spektrumunda gözlenen uzak mesafe etkileşimlerinden hareketle hidroksimetilen gruplarının sırasıyla C4 ( $\delta$  147.8) ve C10 ( $\delta$  45.8) karbonlarına bağlı oldukları doğrulanmıştır.

C8'e ait olduğu belirlenen triplet dublet protonun  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda düşük alana kayarak 5.65 ppm'de gözlenmesi, C8-OH grubundan bir açilasyon olduğunu ve metakrilik asit ünitesinin bu konumdan bağlı olabileceğine işaret etmiştir. HMBC spektrumunda C-1' ( $\delta$  166.8) ve H-8 arasında gözlenen etkileşimden hareketle metakrilik asit ünitesinin bu konumdan bağlı olduğu doğrulanmıştır.

Seskiterpenlerde görülen bir diğer karakteristik özellik ise C6 hidroksil grubu ile C12 karboksilik asit grubunun esterleşmesiyle oluşan 6,12- $\gamma$ -lakton yapısıdır. Doymamışlık derecesinden hareketle, CA-1 molekülünün monosiklik olduğu değerlendirildiğinde, lakton halkasının yapıda yer almadığı anlaşılmıştır. COSY spektrumunda H<sub>2</sub>-13 ve H-7 protonları arasında görülen zayıf allilik etkileşim ve HMBC spektrumunda C12/H<sub>2</sub>-13, C11/H-6, H-7 ve C13/H-7 arasında gözlenen uzak mesafe etkileşimlerinden hareketle, C7 üzerinde bir metakrilik asit uzantısının bulunduğu ve C6 üzerinde serbest bir hidroksil grubunun bulunduğu belirlenmiştir. Lakton sisteminde C12 ve H-6 arasında beklenen uzak mesafe etkileşiminin gözlenmemesi de bulgularımızı desteklemiştir.

Molekülün stereomerkezlerine ait relatif konfigürasyonlar NOESY spektrumu ve yarıлма sabitlerinin değerlendirilmesi ile belirlenmiştir. *Centaurea* türlerinden elde edilen eleman-tip seskiterpenlerde H6 ve H8'in  $\beta$  yönelimli olduğu bildirilmiştir. H5-H6 ile H6-H7 arasında belirlenen yarıлма sabitleri ( $J_{5,6}=10.8$  Hz ve  $J_{6,7}=10.4$  Hz) bu protonların birbirleri ile *trans* konformasyona (antiperiplanar) sahip olduklarını göstermiştir. NOESY spektrumunda H-5/H-7 arasında gözlenen kuvvetli korelasyon bu görüşü desteklemiştir. Bunun yanında H-6/H-8 ve H-14 arasında gözlenen korelasyonlar da C8-OH grubunun  $\alpha$  ve H-14'ün  $\beta$  yönelimli olduğunu

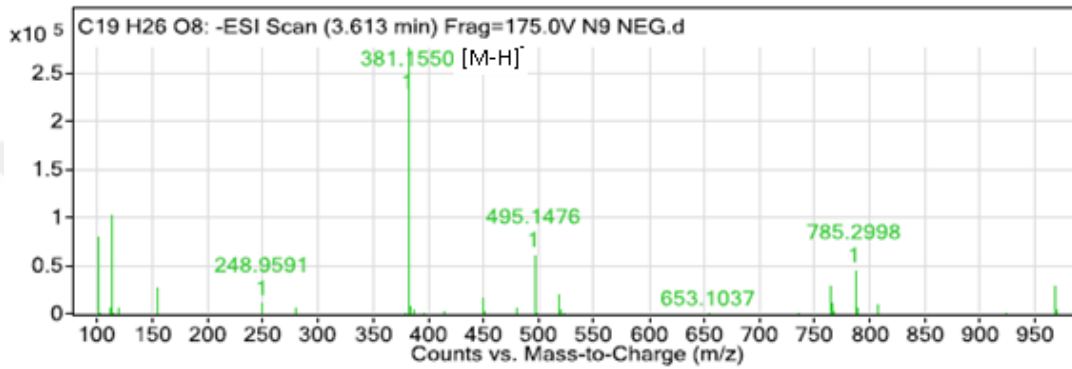
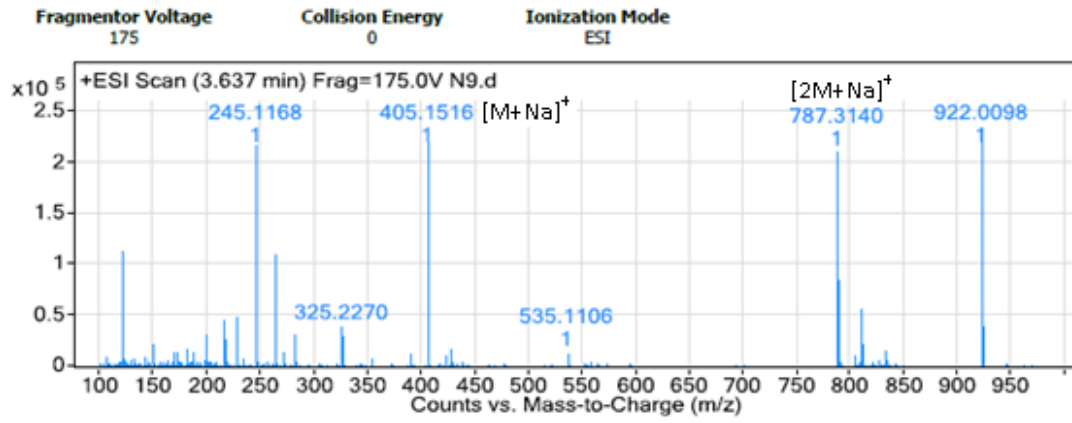
göstermiştir. Bu bulgular stereomerkezlerin H-5( $\alpha$ )/H-6( $\beta$ )/H-7( $\alpha$ )/H-8( $\beta$ ) konfigürasyona sahip olduklarını göstermiştir (10).

Tüm veriler birlikte değerlendirildiğinde CA-1 molekülünün yapısı 8 $\alpha$ -O-(4'-hidroksimetakriloil)-6 $\alpha$ ,14,15-trihidroksi-elema-1,3,11(13)-triene-12-oik asit olarak belirlenmiş ve bitkinin tür epiteti ile uyumlu olarak moleküle athoin adı verilmiştir.

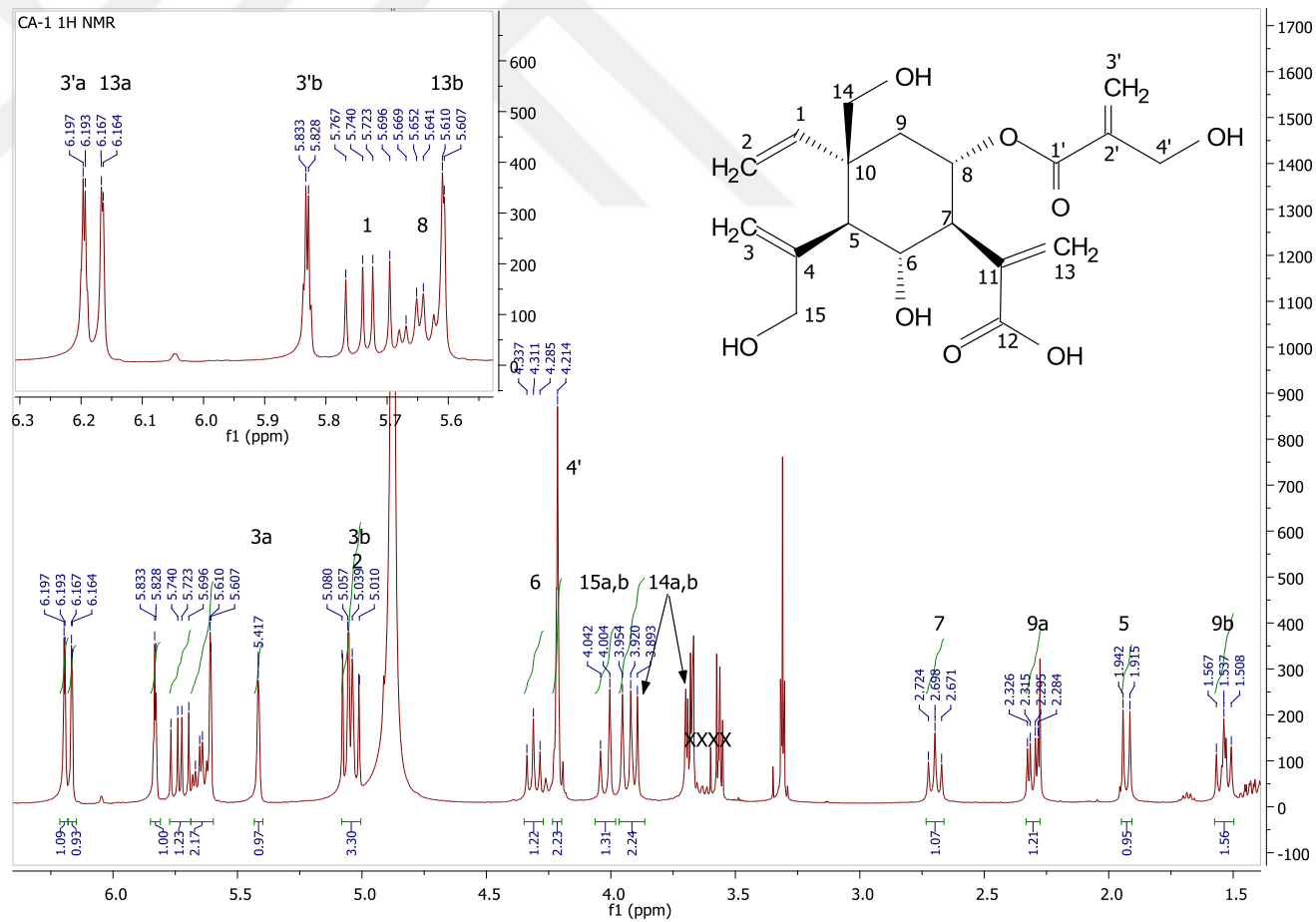
**Tablo 13.** CA-1  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

H/C	Mult.	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	CH	5.73	<i>dd</i> (17.6/10.8)	145.1
2	CH <sub>2</sub>	5.03	<i>dd</i> (17.6/1.2)	113.9
		5.06	<i>dd</i> (11.2/0.8)	
3	CH <sub>2</sub>	5.04	<i>g s</i>	112.6
		5.42	<i>g s</i>	
4	C			147.8
5	CH	1.93	<i>d</i> (10.8)	57.2
6	CH	4.31	<i>t</i> (10.4)	73.2
7	CH	2.70	<i>dd</i> (10.8/10.4)	55.6
8	CH	5.65	<i>td</i> (11.2/4.4)	73.1
9	CH <sub>2</sub>	1.54	<i>dd</i> (12/11.6)	38.8
		2.30	<i>dd</i> (12.4/4.4)	
10	C			45.8
11	C			143.4
12	C			172.6
13	CH <sub>2</sub>	5.61	<i>d</i> (1.2)	125.6
		6.16	<i>d</i> (1.2)	
14	CH <sub>2</sub>	3.68	†	64.6
		3.90	<i>d</i> (10.8)	
15	CH <sub>2</sub>	3.93	<i>d</i> (15.2)	67.8
		4.02	<i>d</i> (15.2)	
1'	C			166.8
2'	C			142.0
3'	CH <sub>2</sub>	5.83	<i>d</i> (2.0)	124.9
		6.19	<i>d</i> (1.6)	
4'	CH <sub>2</sub>	4.21	<i>g s</i>	61.6

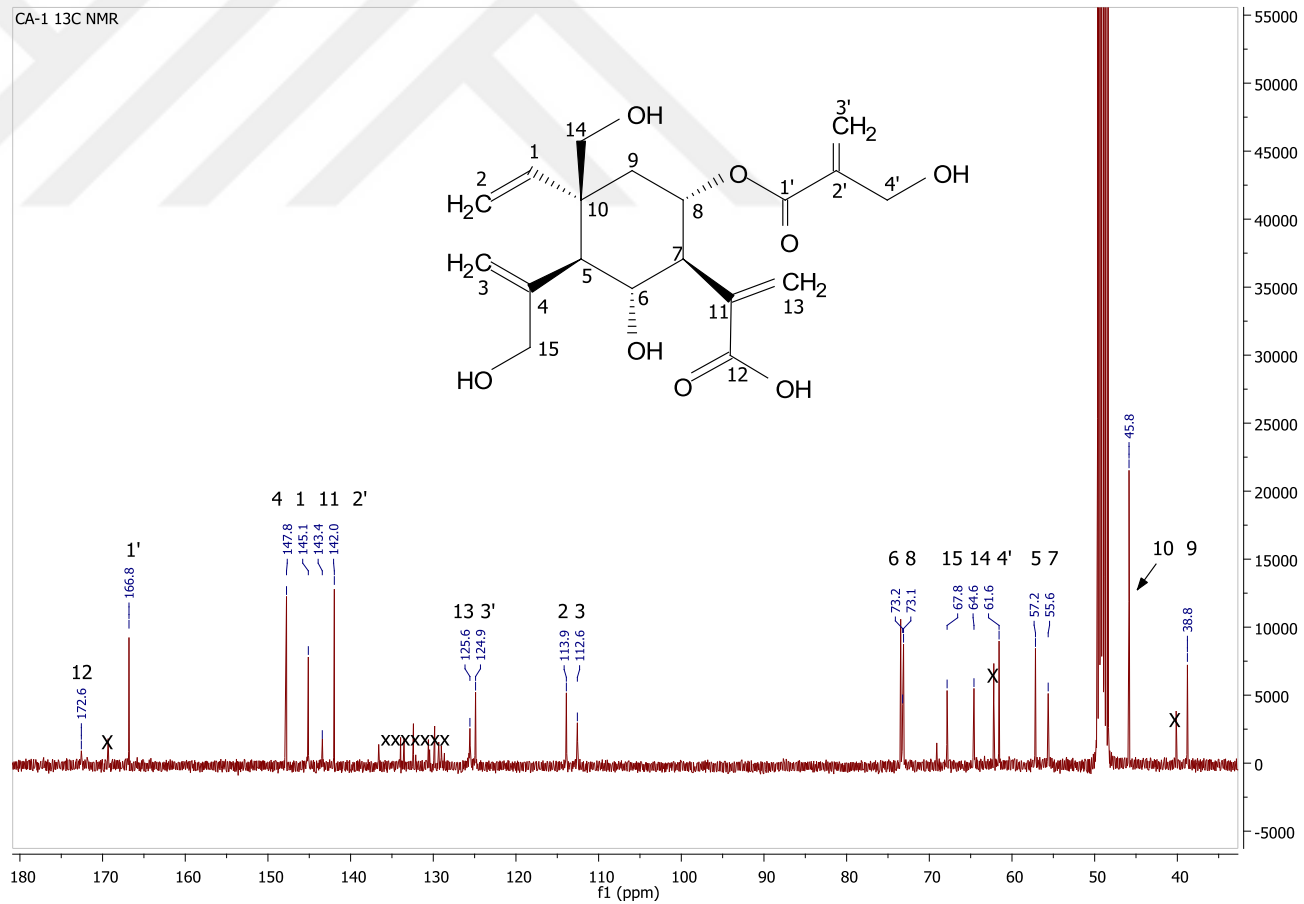
† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülememiştir.



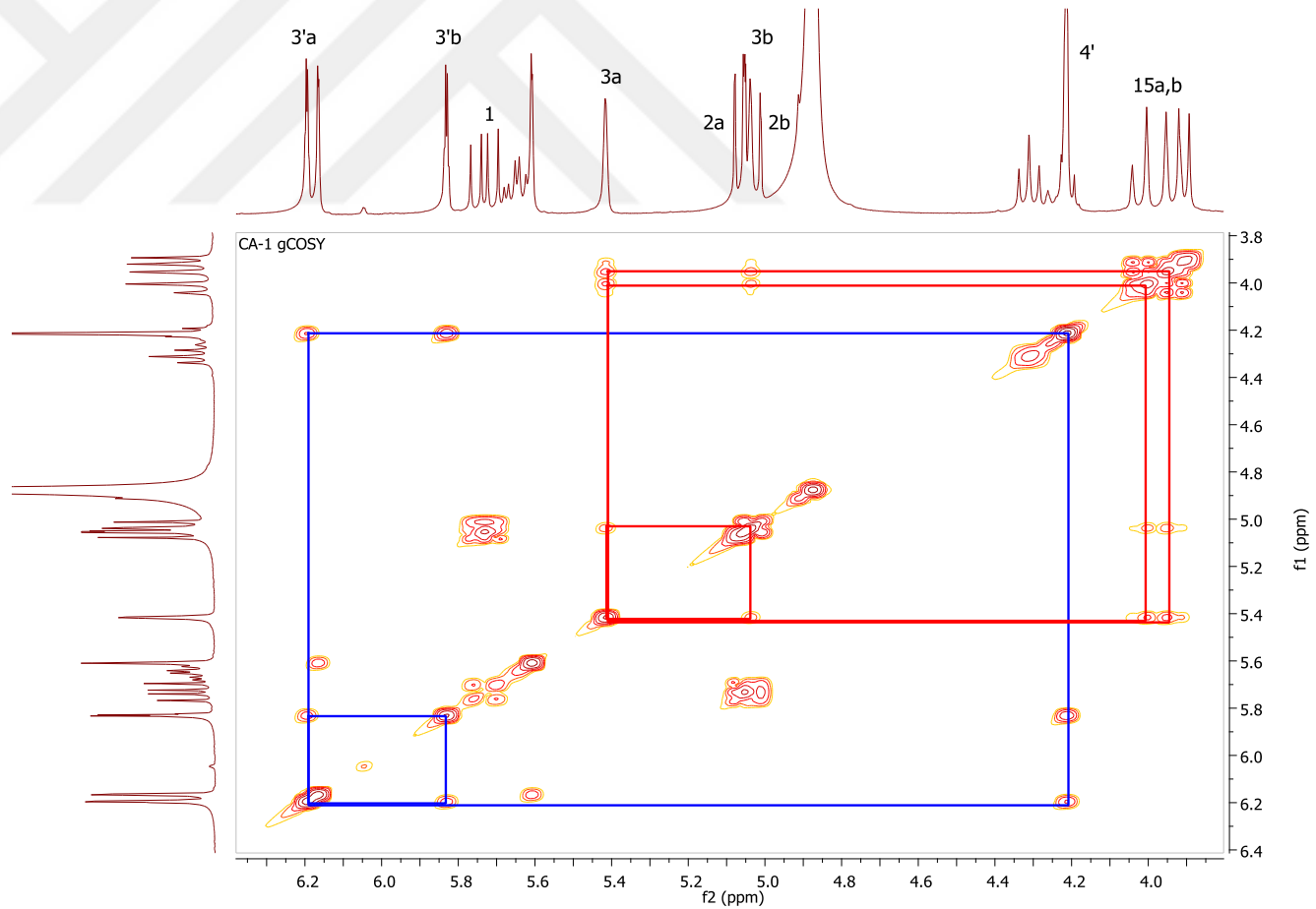
**Spektrum 1.** CA-1 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod)



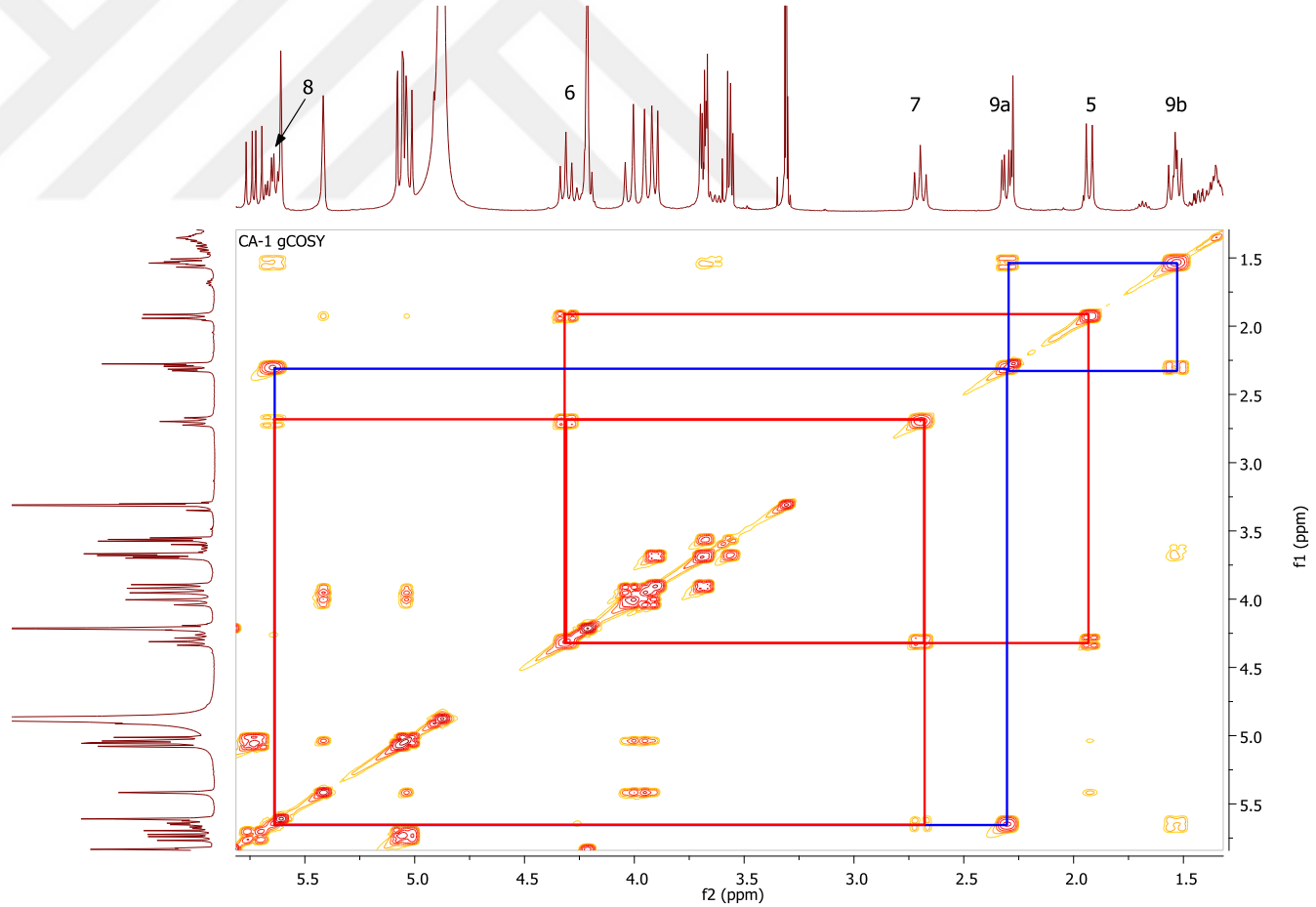
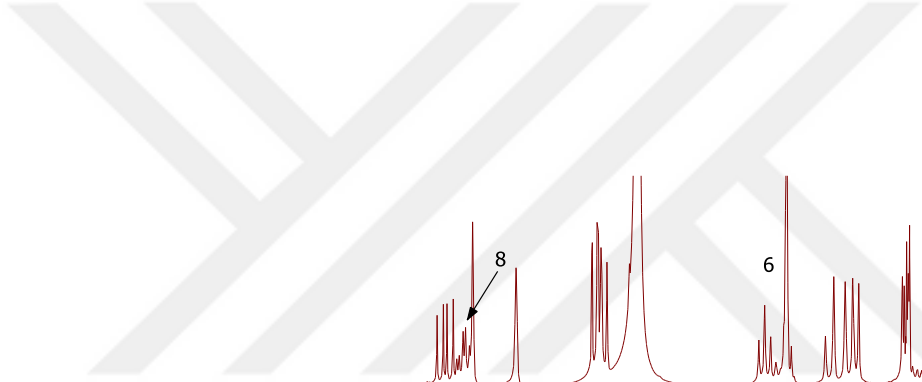
Spektrum 2. CA-1 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



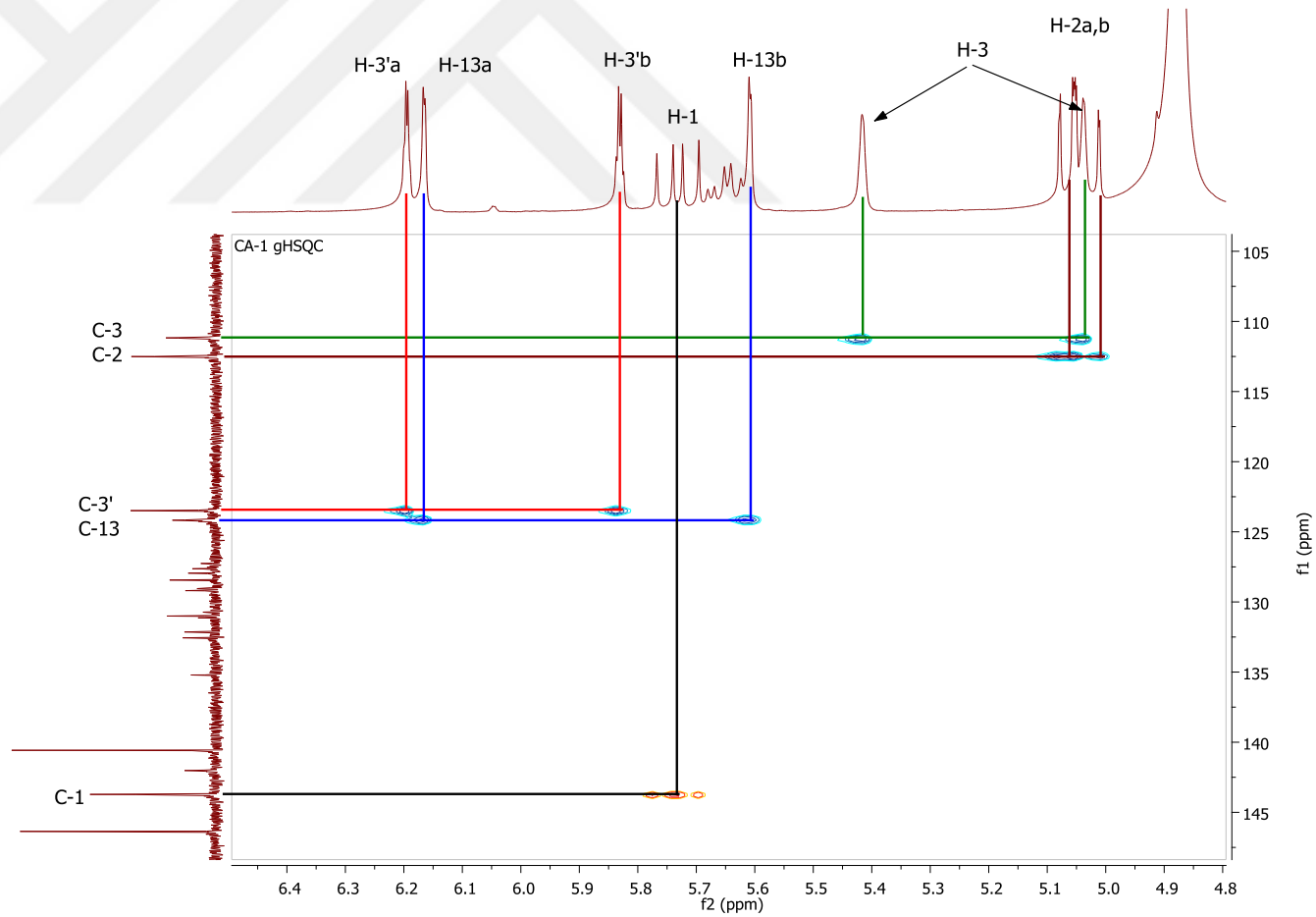
Spektrum 3. CA-1 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



**Spektrum 4.** CA-1 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)-1

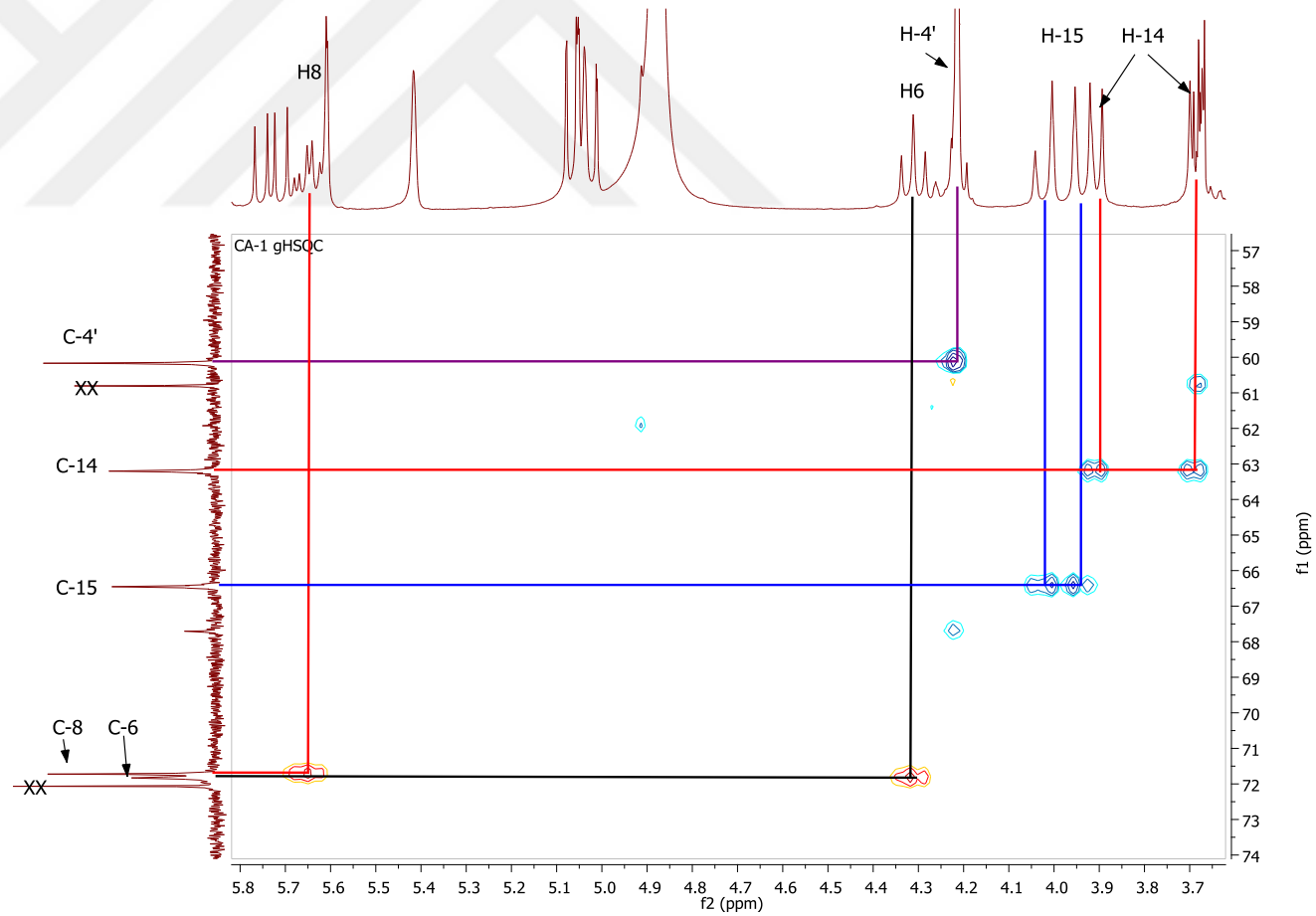


**Spektrum 5.** CA-1 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)-2

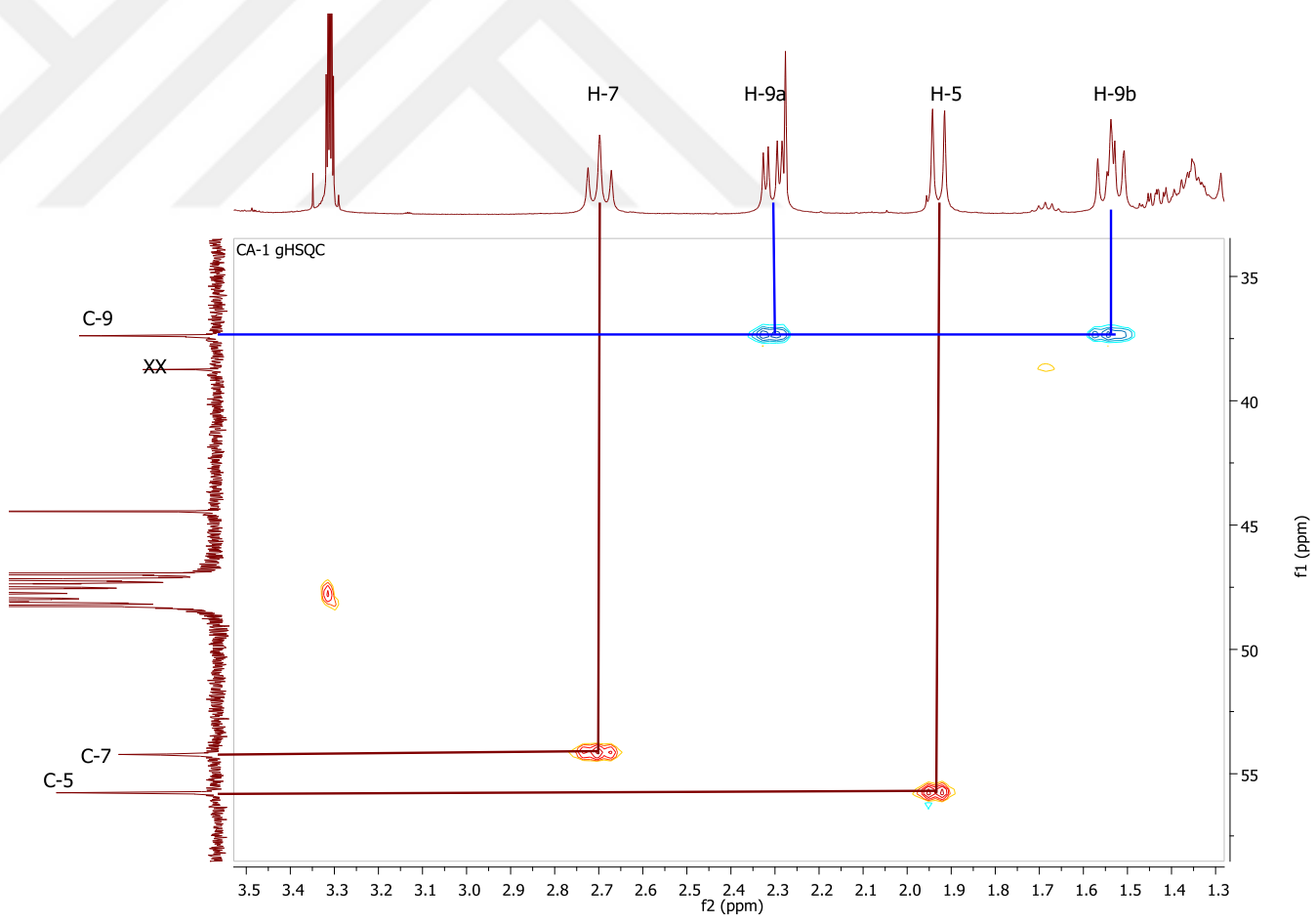


**Spektrum 6.** CA-1 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-1

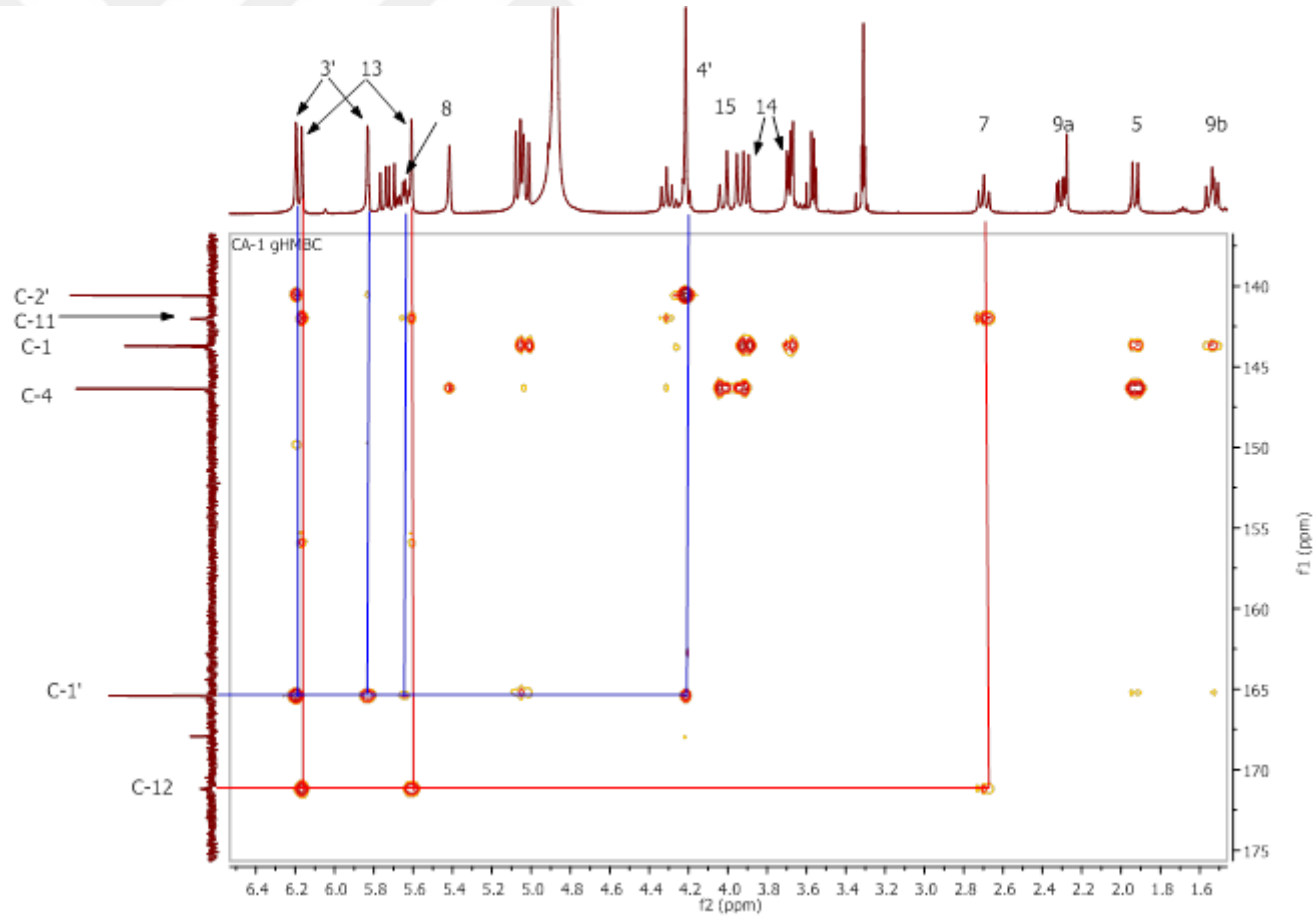




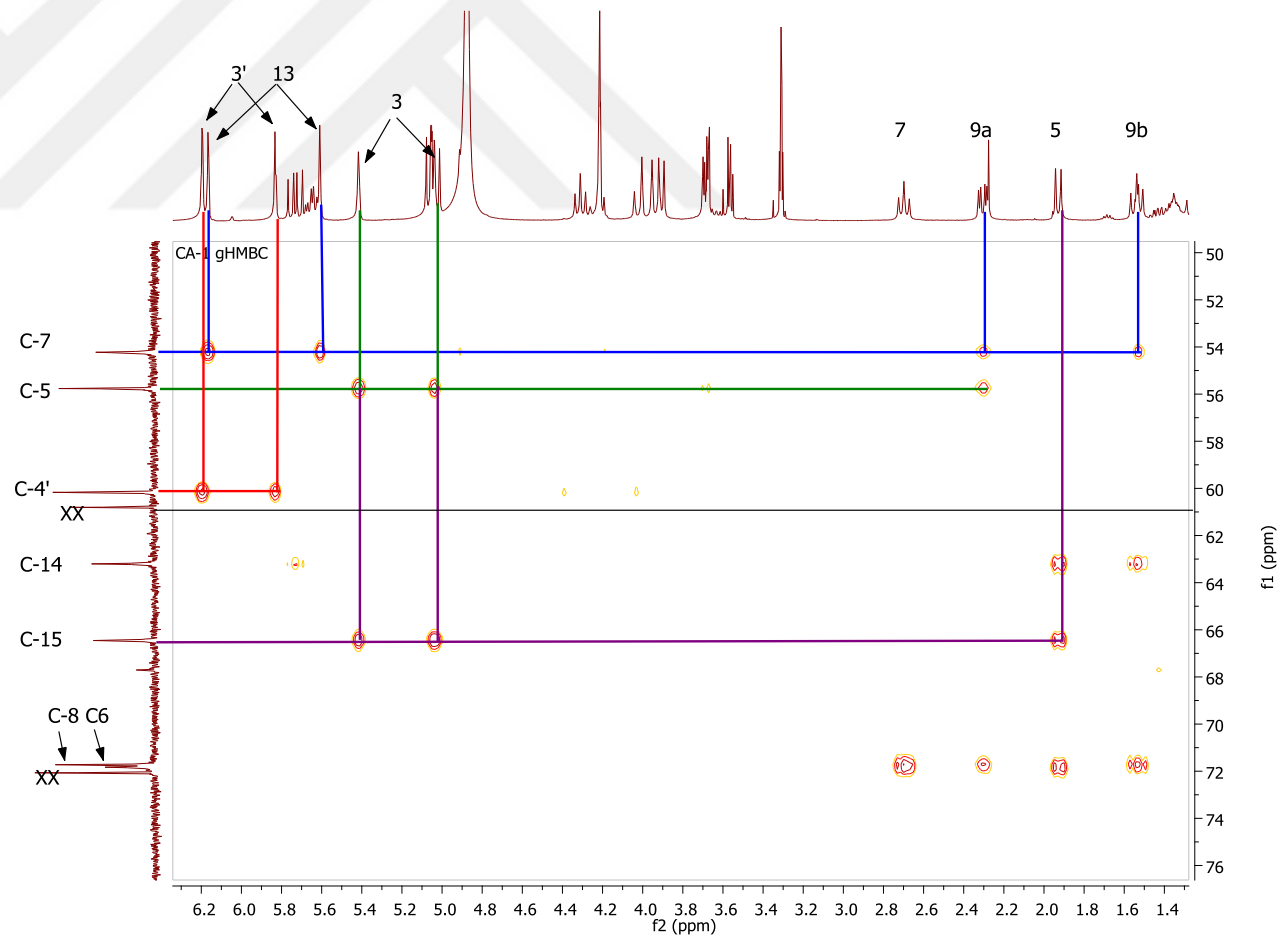
**Spektrum 7.** CA-1 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-2



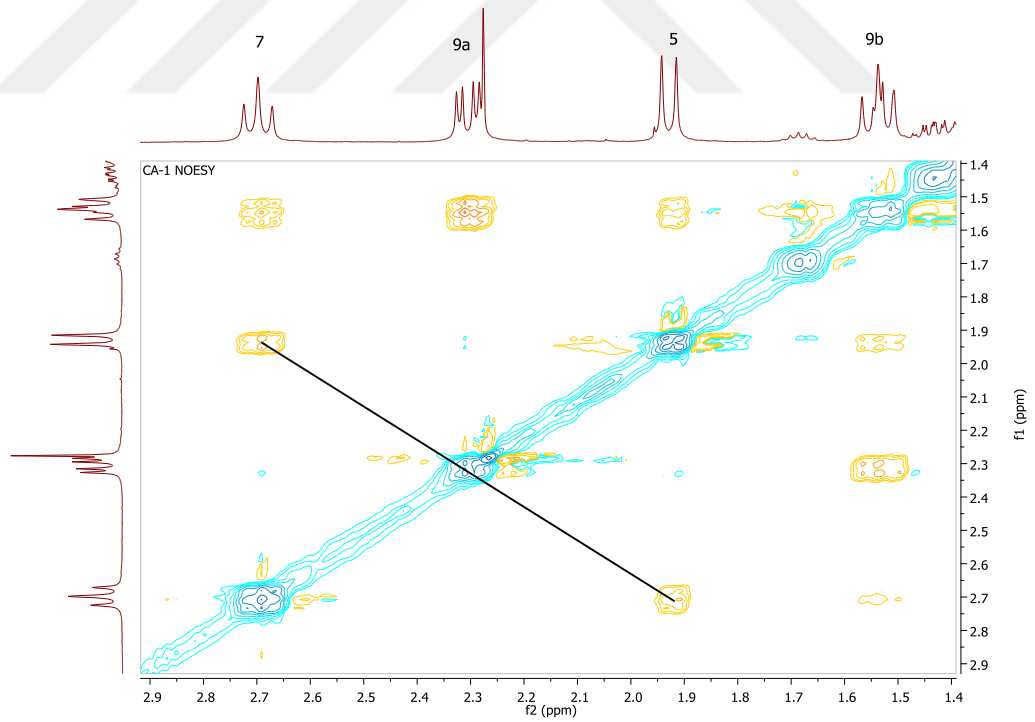
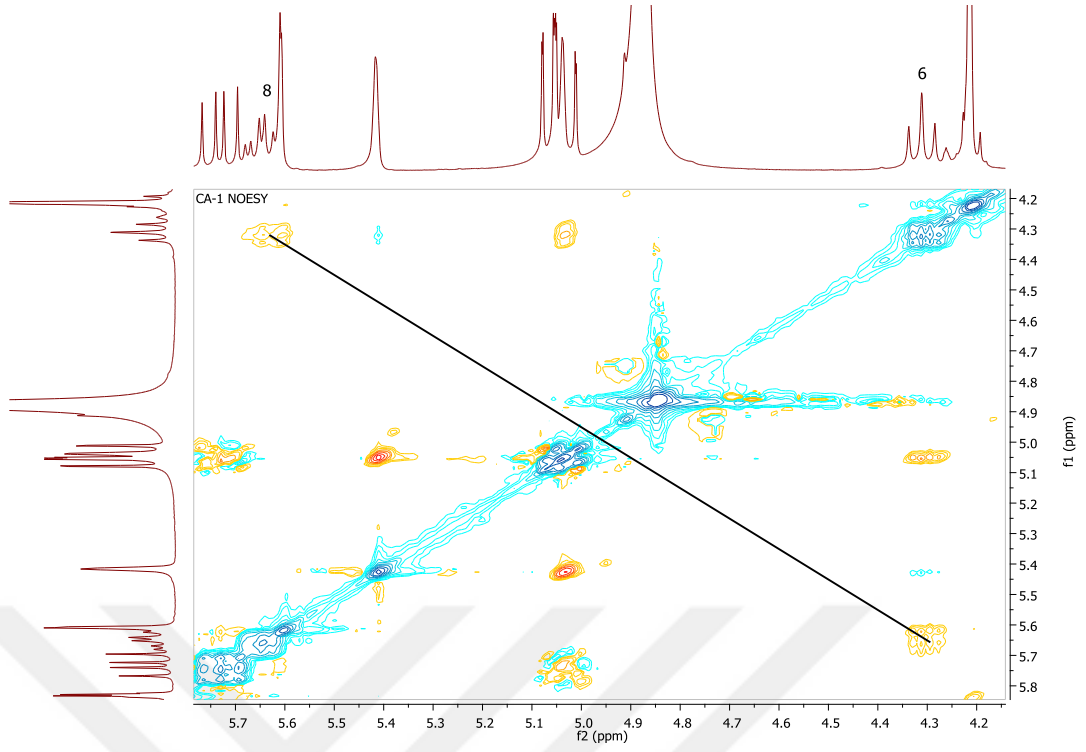
**Spektrum 8.** CA-1 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-3



**Spektrum 9.** CA-1 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-1

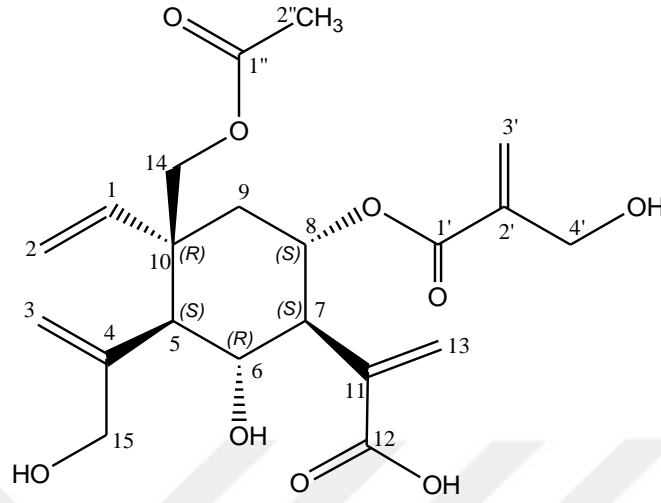


**Spektrum 10.** CA-1 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-2



CA-2

**8 $\alpha$ -O-(4'-hidroksimetakriloil)-14-asetoksi-6 $\alpha$ ,15-dihidroksi-elema-1,3,11(13)-  
trien-12-oik asit**



Kapalı formül	:C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub>
Molekül ağırlığı	:424.1733
QTOF-MS <i>m/z</i>	:447.1602 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>21</sub> H <sub>28</sub> O <sub>9</sub> Na: 447.1631), Spektrum 13 871.3322 [2M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>42</sub> H <sub>56</sub> O <sub>18</sub> Na: 871.3364), Spektrum 13 423.1653 [M-H] <sup>-</sup> (C <sub>21</sub> H <sub>27</sub> O <sub>9</sub> : 423.1655), Spektrum 13
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 14, Tablo 14
<sup>13</sup> C NMR	: Spektrum 15, Tablo 14
COSY	: Spektrum 16
HSQC	: Spektrum 17, Spektrum 18
HMBC	: Spektrum 19
Optik rotasyon [α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+16.0 ( <i>c.</i> 0.001, MeOH)
IR <i>v</i> <sub>max</sub>	= 2687, 1592, 1405, 1350, 1274, 1139, 1051, 1023

Renksiz zambak halinde elde edilen CA-2 kodlu bileşik, İTK profilinde, 254 ve 366 nm’de UV aktif olmayan ve V/S reaktifi ile koyu mor renkli bir bant halinde gözlenmiştir (EtOAc:MeOH:H<sub>2</sub>O, 100:17:13; R<sub>f</sub>~0.45).

CA-2’nin QTOF kütle spektrumunda görülen 447.1602 [M+Na]<sup>+</sup>, 871.3322 [2M+Na]<sup>+</sup> pozitif ve 423.1653 [M-H]<sup>-</sup> negatif iyon pikleri ile <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen sinyallerden hareketle molekül formülü C<sub>21</sub>H<sub>28</sub>O<sub>9</sub> olarak belirlenmiştir.

<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumu incelendiğinde molekülün yapısının CA-1 ile çok benzer olduğu görülmüştür. <sup>1</sup>H NMR spektrumları arasındaki iki temel fark; δ<sub>H</sub> 2.09’da üç protonluk alana sahip singlet bir metil protonunun (H-2'') varlığı ve bir çift metilen oksijen sinyalinin düşük alana kayarak 4.26 ve 4.44 ppm’de (H<sub>2</sub>-14) rezonansa gelmiş olmasıdır. δ<sub>H</sub> 2.09’da gözlenen metil sinyali ve <sup>13</sup>C NMR spektrumunda δ<sub>C</sub> 172.9 (C-1'') ve 20.9 (C-2'') gözlenen karbon rezonansları molekül üzerinde bir asetil grubunun varlığına işaret etmiştir.

Molekülün yapısı, COSY, HSQC ve HMBC spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi ile kesinleştirilmiştir. CA-1’den farklı olarak, H<sub>2</sub>-14 oksimetilen protonlarının yaklaşık 0.5 ppm düşük alana doğru kayması bu noktadan bir açılasyon olduğuna işaret etmiş ve HMBC spektrumunda C1'' (δ 172.9) ile H<sub>2</sub>-14 (δ 4.26 ve 4.44) protonları arasında gözlenen korelasyondan hareketle, asetil grubunun C14(O) konumundan bağlı olduğu doğrulanmıştır.

Bu bulgular ışığında CA-2 molekülünün yapısı 8α-*O*-(4'-hidroksimetakrilol)-14-asetoksi-6α,15-dihidroksi-elemen-1,3,11(13)-triene-12-oik asit olarak belirlenmiş ve CA-1 ile uyumlu olarak moleküle 14-*O*-asetilathoin adı verilmiştir.

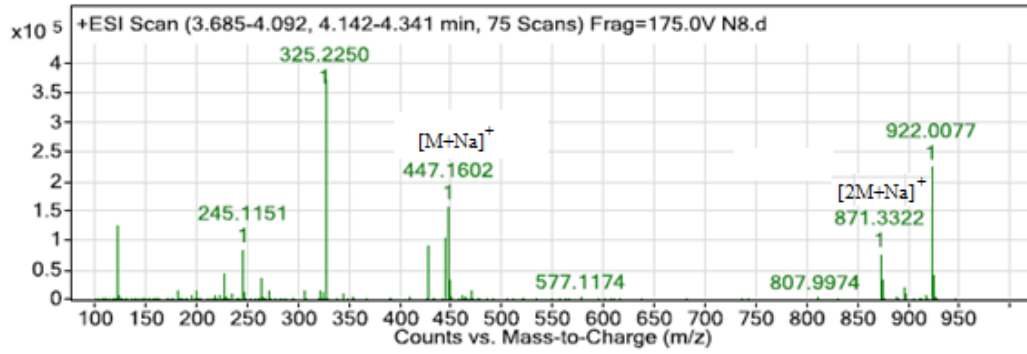
**Tablo 14.** CA-2 <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR verileri (CD<sub>3</sub>OD)

H/C	Mult.	$\delta_H$	$J$ (Hz)	$\delta_C$
1	CH	5.73	<i>dd</i> (17.6/10.8)	144.3
2	CH <sub>2</sub>	5.03	<i>d</i> (18.0)	114.2
		5.09	<i>d</i> (11.2)	
3	CH <sub>2</sub>	4.99	<i>g s</i>	112.2
		5.44	<i>g s</i>	
4	C			147.7
5	CH	1.98	<i>d</i> (10.8)	56.5
6	CH	4.29	<i>t</i> (10.4)	72.6
7	CH	2.72	<i>t</i> (10.8)	56.0
8	CH	5.44	†	72.1
9	CH <sub>2</sub>	1.57	<i>dd</i> (12.4/12)	38.8
		2.28	<i>dd</i> (12.4/4.4)	
10	C			44.2
11	C			142.6
12	C			172.1
13	CH <sub>2</sub>	5.62	<i>d</i> (0.8)	126.4
		6.20	<i>d</i> (0.8)	
14	CH <sub>2</sub>	4.26	<i>d</i> (11,2)	66.5
		4.44	<i>d</i> (11.2)	
15	CH <sub>2</sub>	3.92	<i>d</i> (15.2)	67.8
		4.01	<i>d</i> (15.2)	
1'	C			166.6
2'	C			141.9
3'	CH <sub>2</sub>	5.83	<i>d</i> (1.6)	124.9
		6.19	<i>d</i> (1.6)	
4'	CH <sub>2</sub>	4.21	<i>g s</i>	61.5
1''	C			172.9
2''	CH <sub>3</sub>	2.09	<i>s</i>	20.9

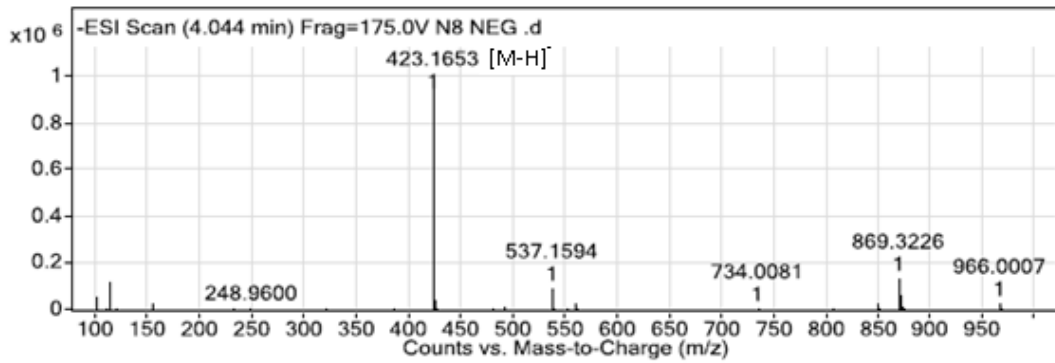
† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülemedi.



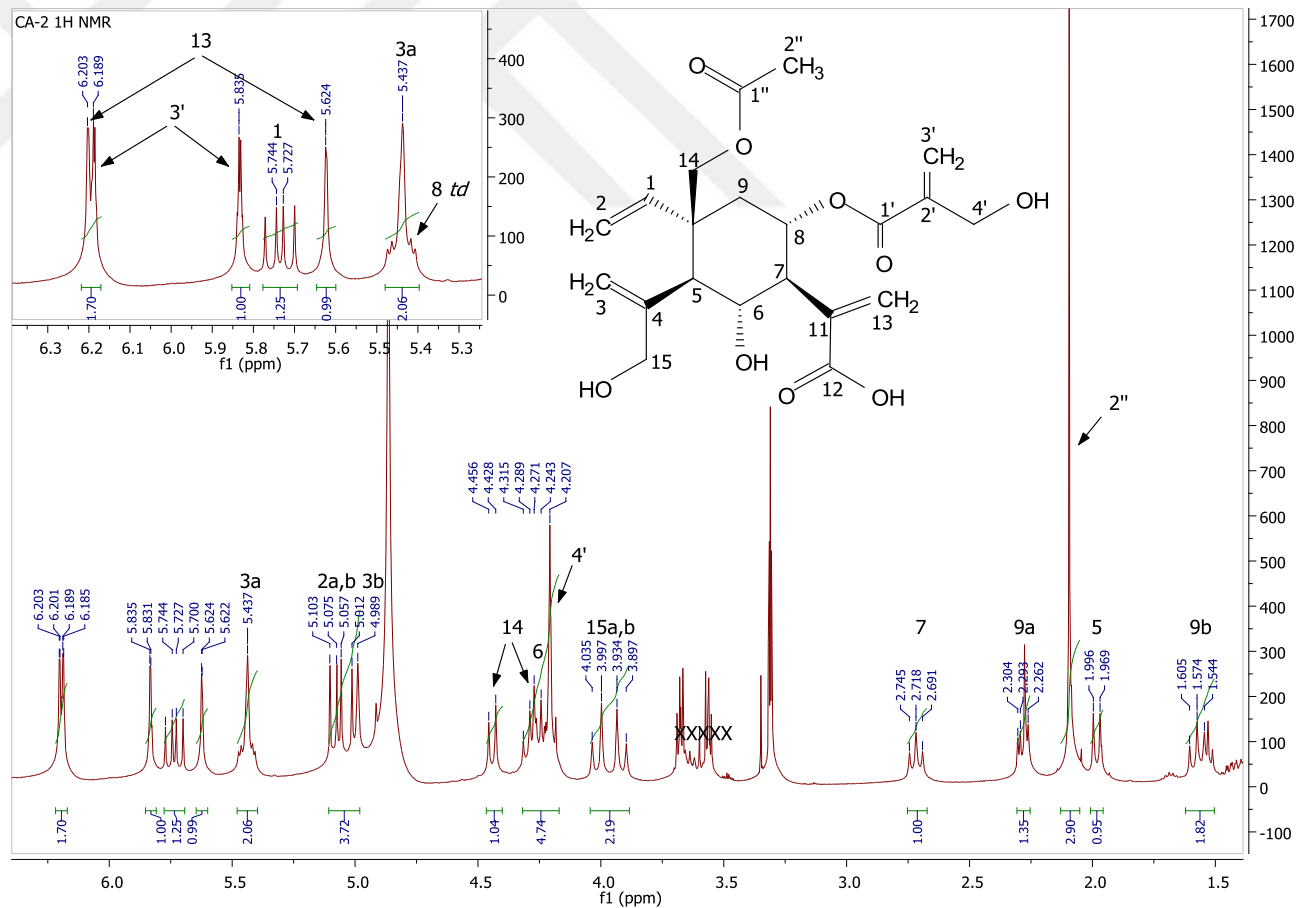
Spectrum Source  
Peak (3) in "+ TIC Scan"      Fragmentor Voltage 175      Collision Energy 0      Ionization Mode ESI



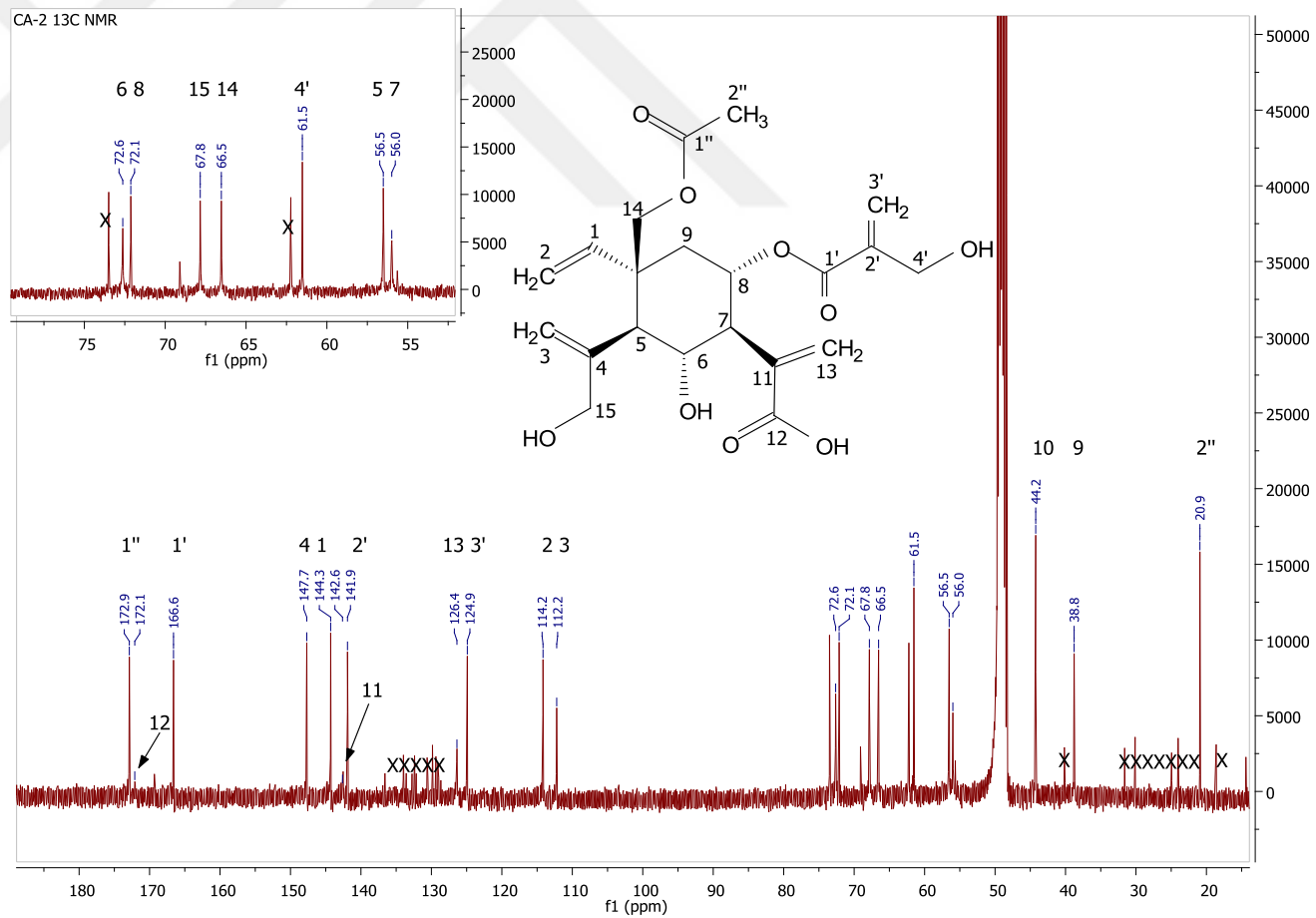
Fragmentor Voltage 175      Collision Energy 0      Ionization Mode ESI



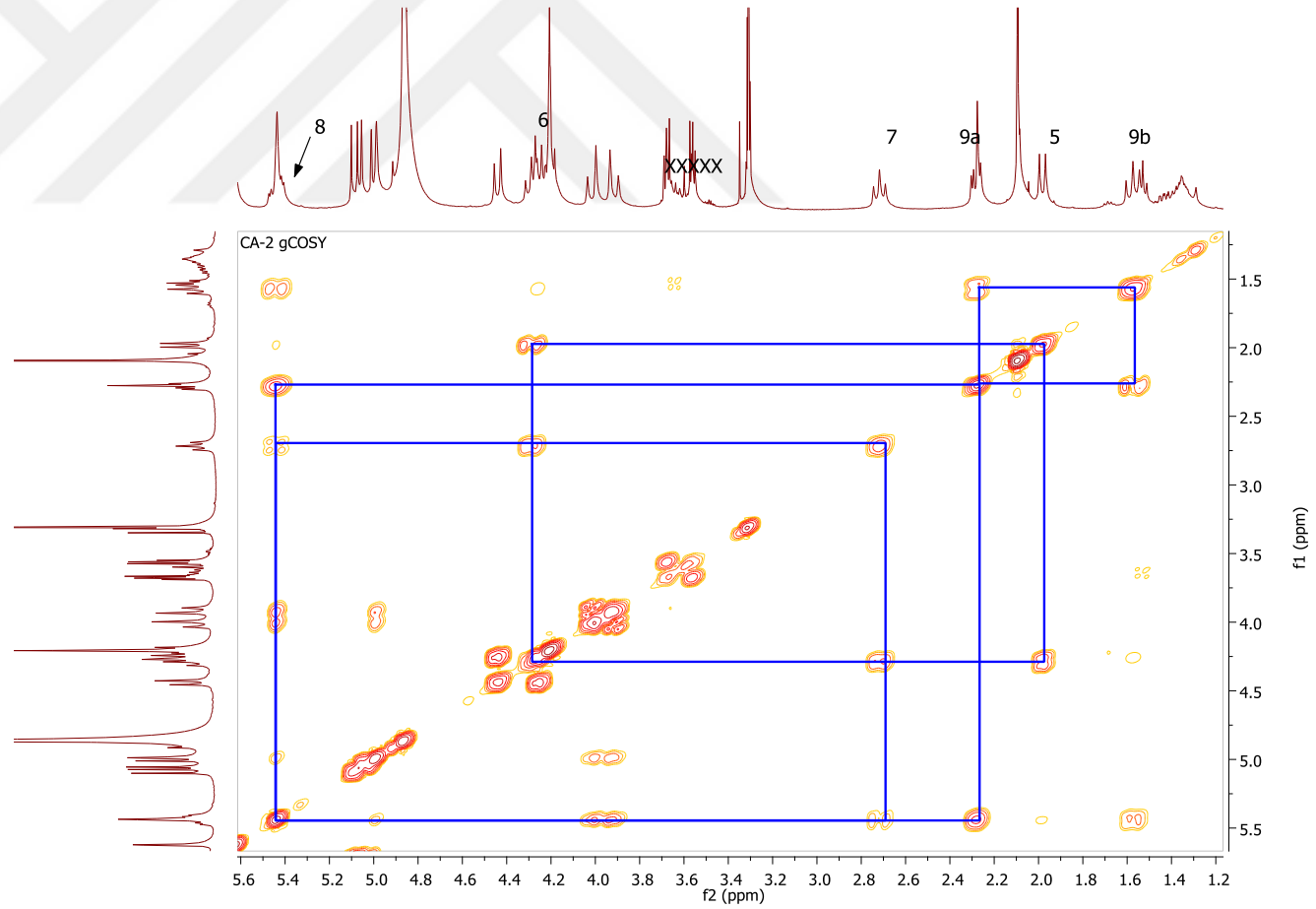
Spektrum 13. CA-2 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod)



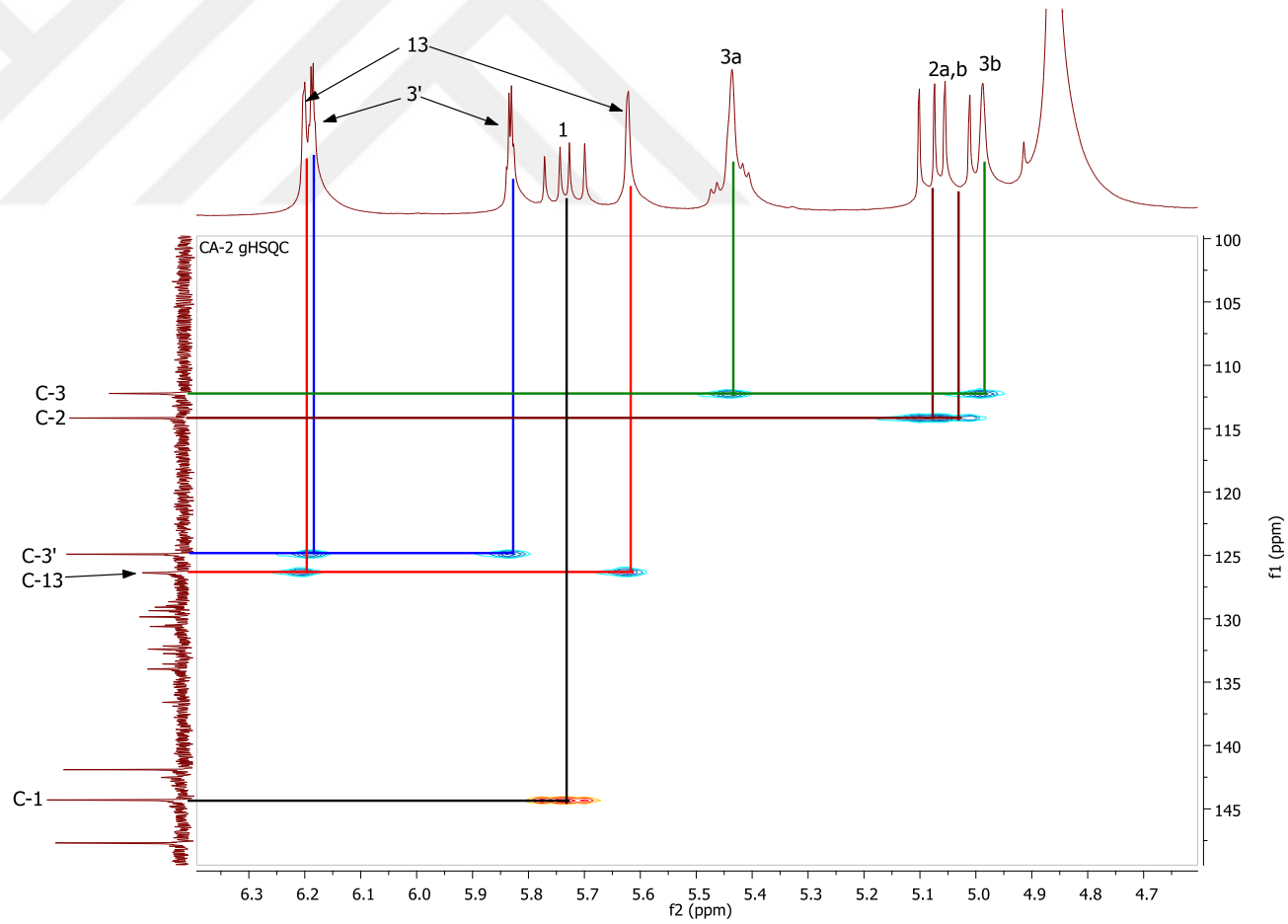
**Spektrum 14.** CA-2 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



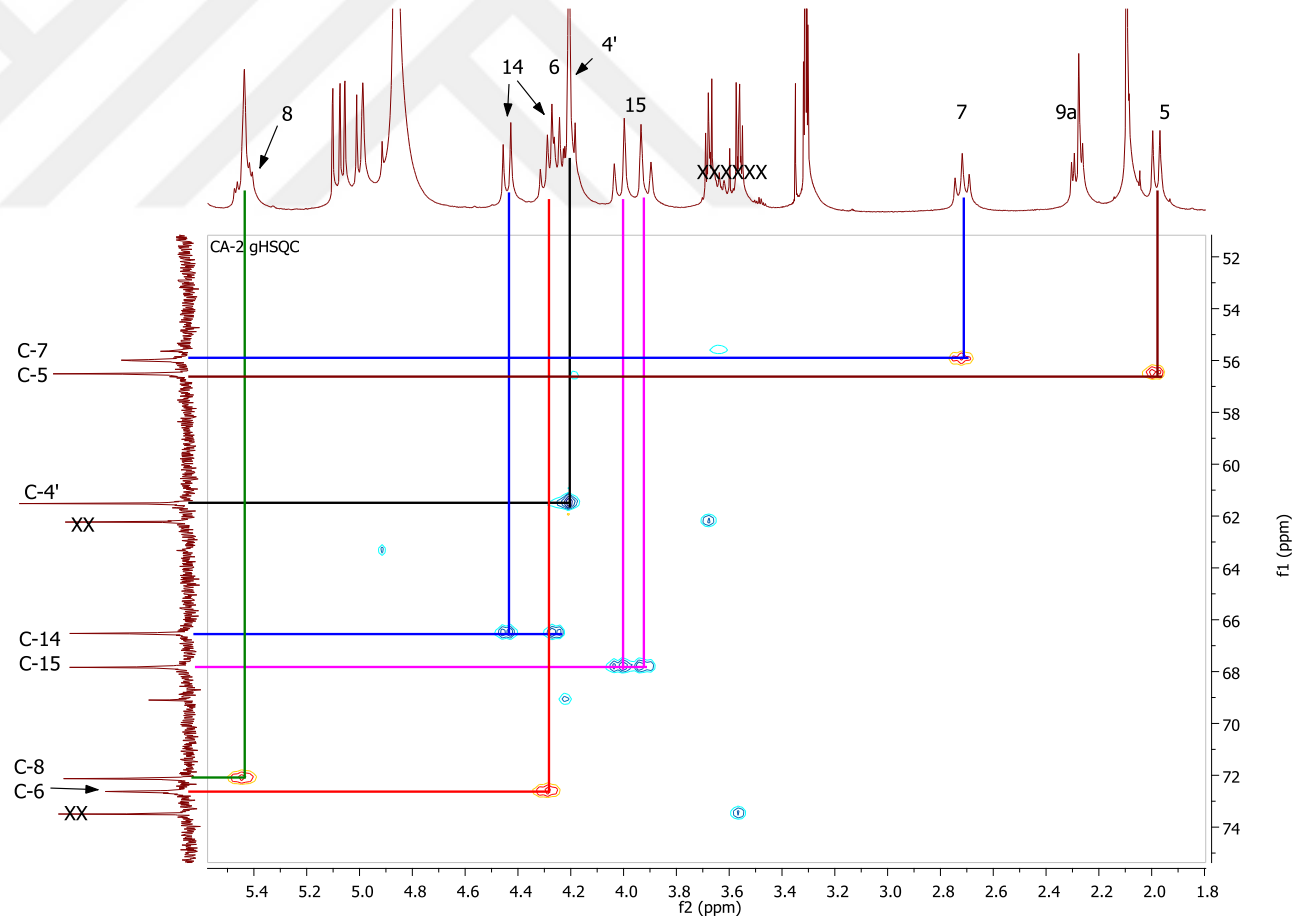
Spektrum 15. CA-2  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



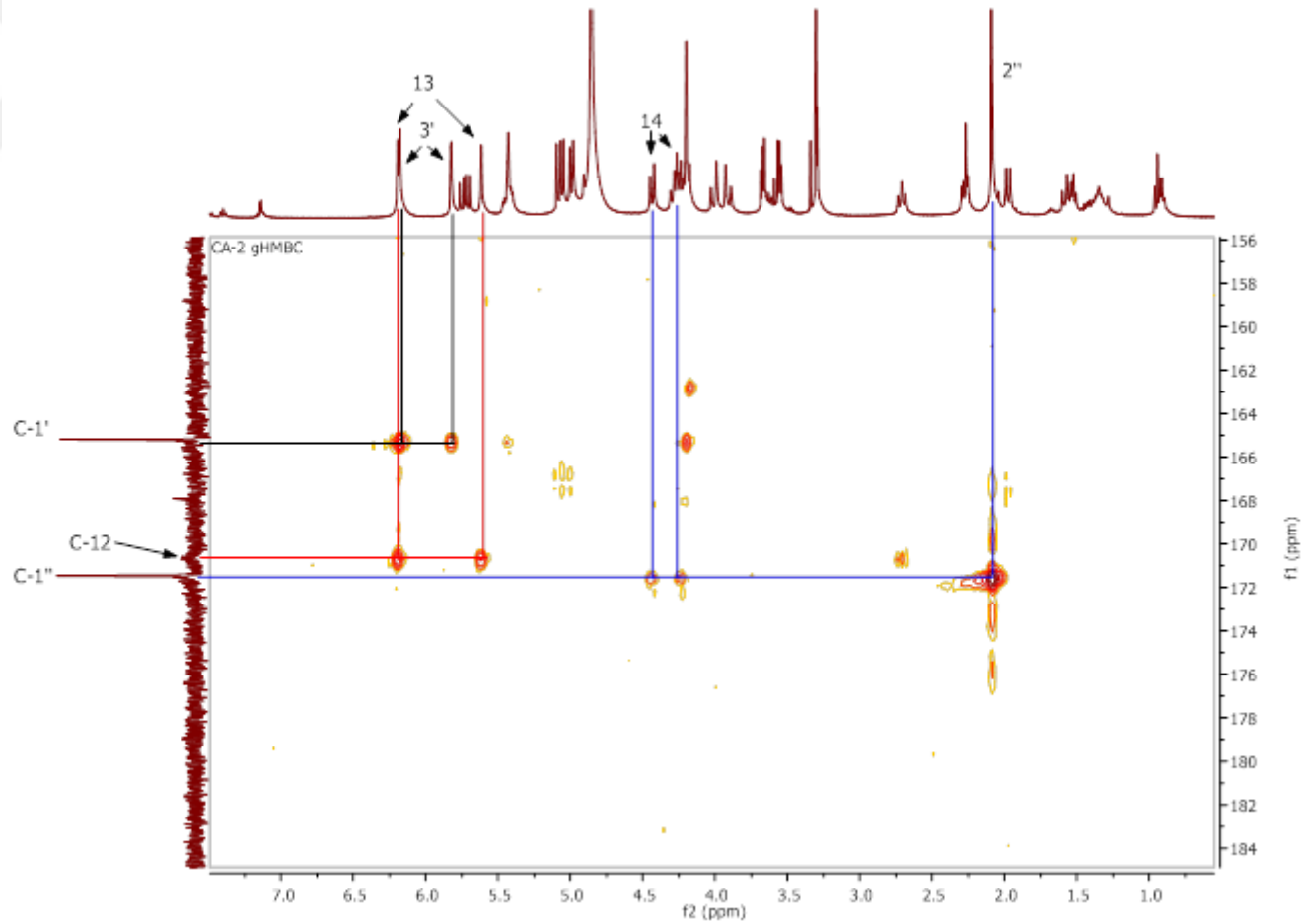
**Spektrum 16.** CA-2 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)



**Spektrum 17.** CA-2 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-1



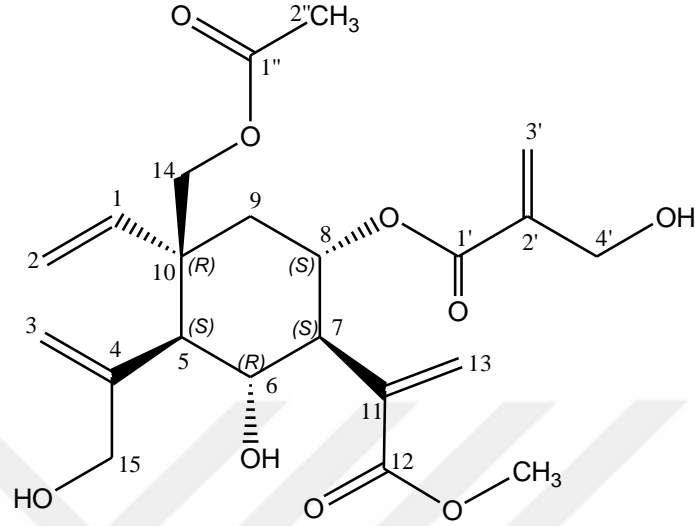
**Spektrum 18.** CA-2 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-2



**Spektrum 19.** CA-2 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)

### CA-3

#### **8 $\alpha$ -O-(4'-hidroksimetakriloil)-14-asetoksi-6 $\alpha$ ,15-dihidroksi-elema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit metil esteri**



Formül : C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>

Molekül ağırlığı : 438.1890

QTOF-MS *m/z* : 461.1767 [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub>Na: 461.1788), Spektrum 20  
483.1866 [M+COOH]<sup>-</sup> (C<sub>23</sub>H<sub>31</sub>O<sub>11</sub>: 483.1866), Spektrum 20

<sup>1</sup>H NMR : Spektrum 21, Tablo 15

<sup>13</sup>C NMR : Spektrum 22, Tablo 15

COSY : Spektrum 23

HMBC : Spektrum 24

Optik Rotasyon [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> +23.5 (*c.*0.0007, MeOH)

IR  $\nu_{\max}$  = 3051, 2665, 2384, 1703, 1627, 1270, 1237, 1150, 1028



Açık sarı renkli zambak halinde elde edilen CA-3 kodlu bileşik, İTK profilinde, 254 nm'de UV aktif, V/S reaktifi ile koyu sarı-kahve renkli bant halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 90:10:1; R<sub>f</sub> ~0.35).

CA-3'ye ait QTOF kütle spektrumunda görülen 461.1767 [M+Na]<sup>+</sup> pozitif ve 483.1866 [M+COOH]<sup>-</sup> negatif iyon pikleri ile <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen sinyallerden hareketle molekül formülü C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>9</sub> olarak belirlenmiştir.

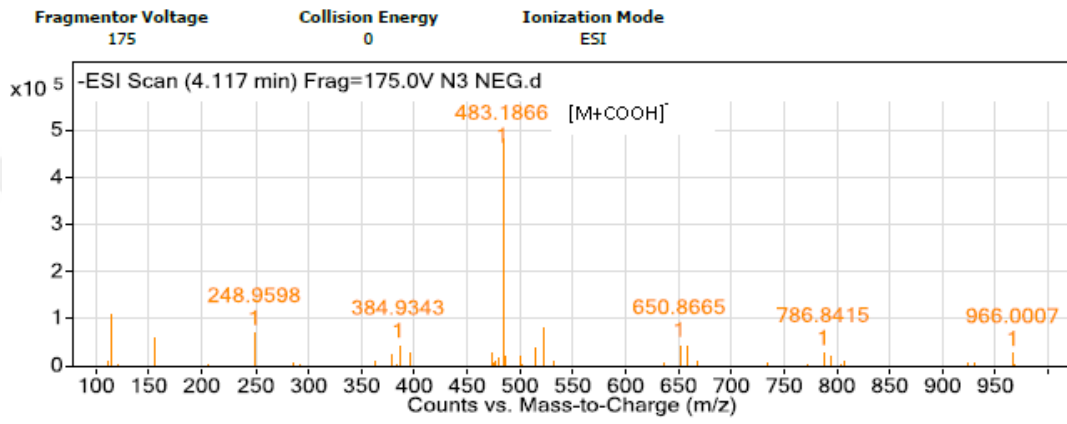
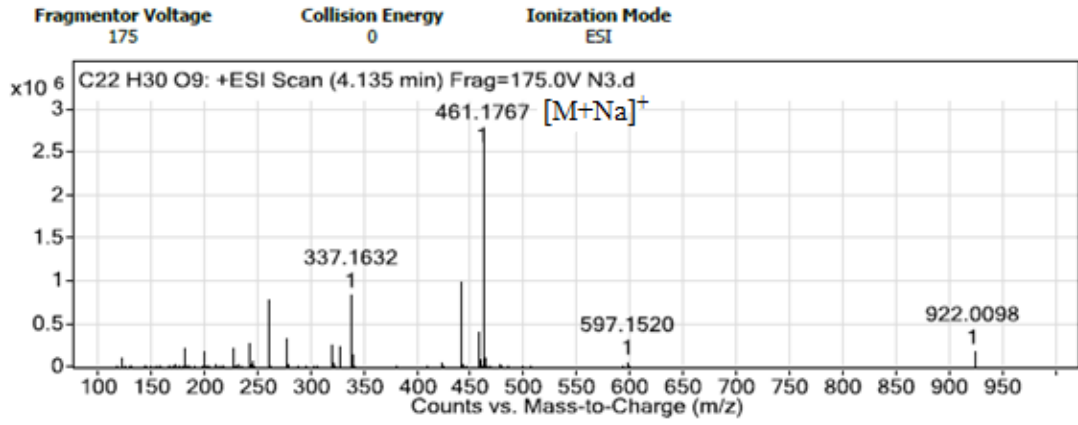
<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumu incelendiğinde molekülün yapısının CA-2 ile çok benzer olduğu görülmüştür. <sup>1</sup>H NMR spektrumunda asetil grubuna ( $\delta_H$  2.11 s, 3H, H<sub>2</sub>) ek olarak,  $\delta_H$  3.75'de gözlenen üç proton yüksekliğindeki singlet metil protonu, molekülün yapısında bulunan bir metoksi grubuna işaret etmiştir. <sup>13</sup>C NMR spektrumunda 52.3 ppm'de gözlenen karbon sinyali de metoksi grubunun varlığını doğrulamıştır. Molekülün yapısı COSY ve HMBC spektrumları yardımıyla irdelenmiştir.

HMBC spektrumunda C1" ( $\delta$  172.8) ile H<sub>2</sub>-14 ( $\delta$  4.26 ve 4.44) protonları arasındaki korelasyondan hareketle, asetil grubunun C14(O) konumundan bağlı olduğu belirlenmiştir.  $\delta_C$  168.2 (C12) ve  $\delta_H$  3.75 arasında gözlenen korelasyon da metoksi grubunun C12 üzerinden bağlı olduğunu ve bir metil esteri oluşturduğunu göstermiştir.

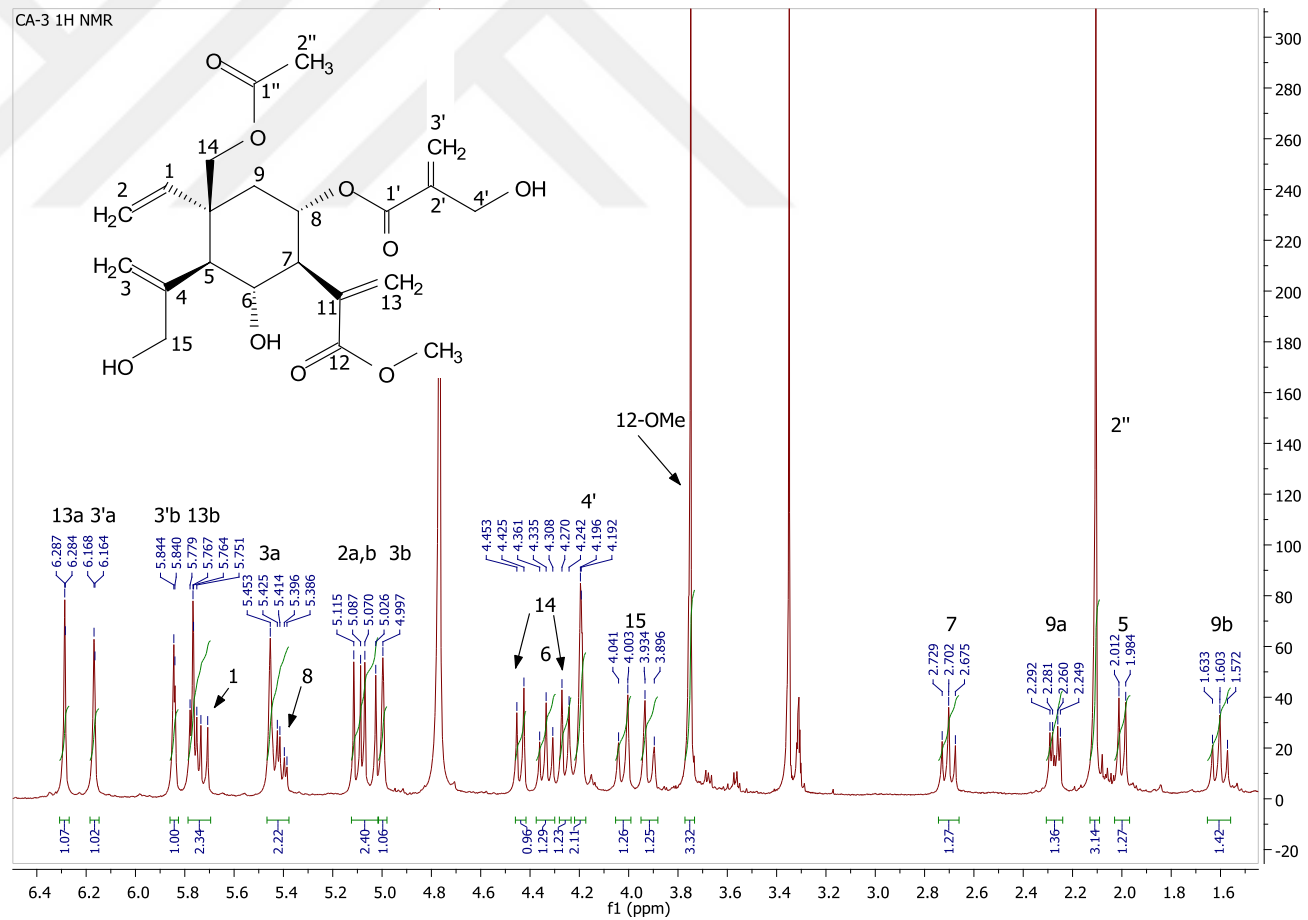
Bu veriler ışığında CA-2 molekülünün yapısı 8 $\alpha$ -O-(4'-hidroksimetakrilol)-14-asetoksi-6 $\alpha$ ,15-dihidroksi-elema-1,3,11(13)-triene-12-oik asit metil esteri olarak belirlenmiş ve CA-1 ile uyumlu olarak moleküle 14-O-asetilathoin-12 metil esteri adı verilmiştir.

**Tablo 15.** CA-3 <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR verileri (CD<sub>3</sub>OD)

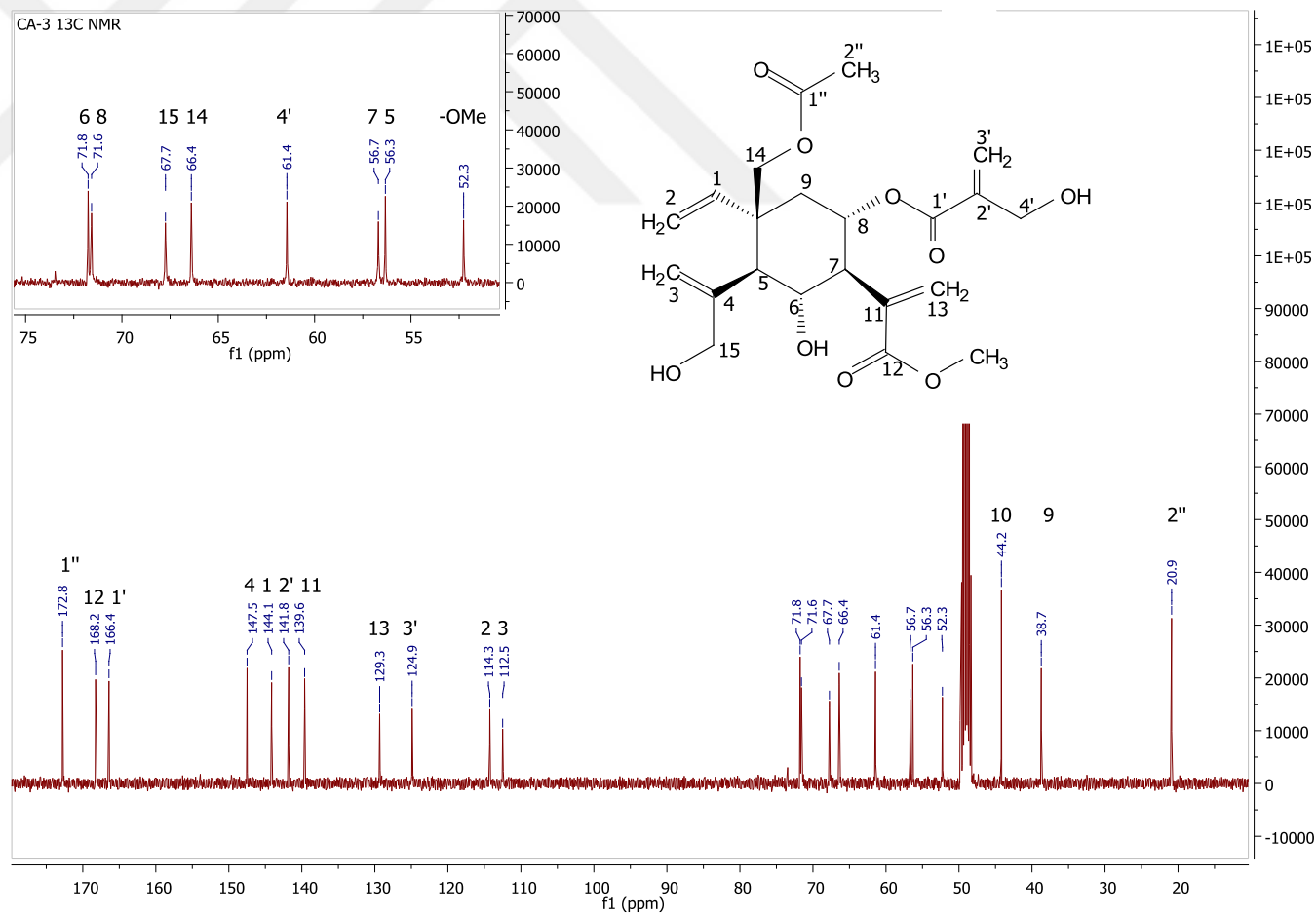
H/C	Mult.	δ <sub>H</sub>	J (Hz)	δ <sub>C</sub>
1	CH	5.74	<i>dd</i> (17.6/11.2)	144.1
2	CH <sub>2</sub>	5.05	<i>d</i> (17.6)	114.3
		5.10	<i>d</i> (11.2)	
3	CH <sub>2</sub>	4.99	<i>g s</i>	112.5
		5.45	<i>g s</i>	
4	C			147.5
5	CH	1.99	<i>d</i> (11.2)	56.3
6	CH	4.34	<i>dd</i> (10.8/10.4)	71.8
7	CH	2.70	<i>t</i> (10.8)	56.7
8	CH	5.42	<i>td</i> (11.2/4.4)	71.6
9	CH <sub>2</sub>	1.60	<i>dd</i> (12.4/12.0)	38.7
		2.27	<i>dd</i> (12.8/4.4)	
10	C			44.2
11	C			139.6
12	C			168.2
13	CH <sub>2</sub>	5.76	<i>d</i> (1.2)	129.3
		6.28	<i>d</i> (1.2)	
14	CH <sub>2</sub>	4.26	<i>d</i> (11.2)	66.4
		4.44	<i>d</i> (11.2)	
15	CH <sub>2</sub>	3.91	<i>d</i> (15.2)	67.7
		4.01	<i>d</i> (15.2)	
1'	C			166.4
2'	C			141.8
3'	CH <sub>2</sub>	5.84	<i>d</i> (1.6)	124.9
		6.16	<i>d</i> (1.6)	
4'	CH <sub>2</sub>	4.19	<i>d</i> (1.6)	61.4
1''	C			172.8
2''	CH <sub>3</sub>	2.11	<i>s</i>	20.9
-OMe	CH <sub>3</sub>	3.75	<i>s</i>	52.3



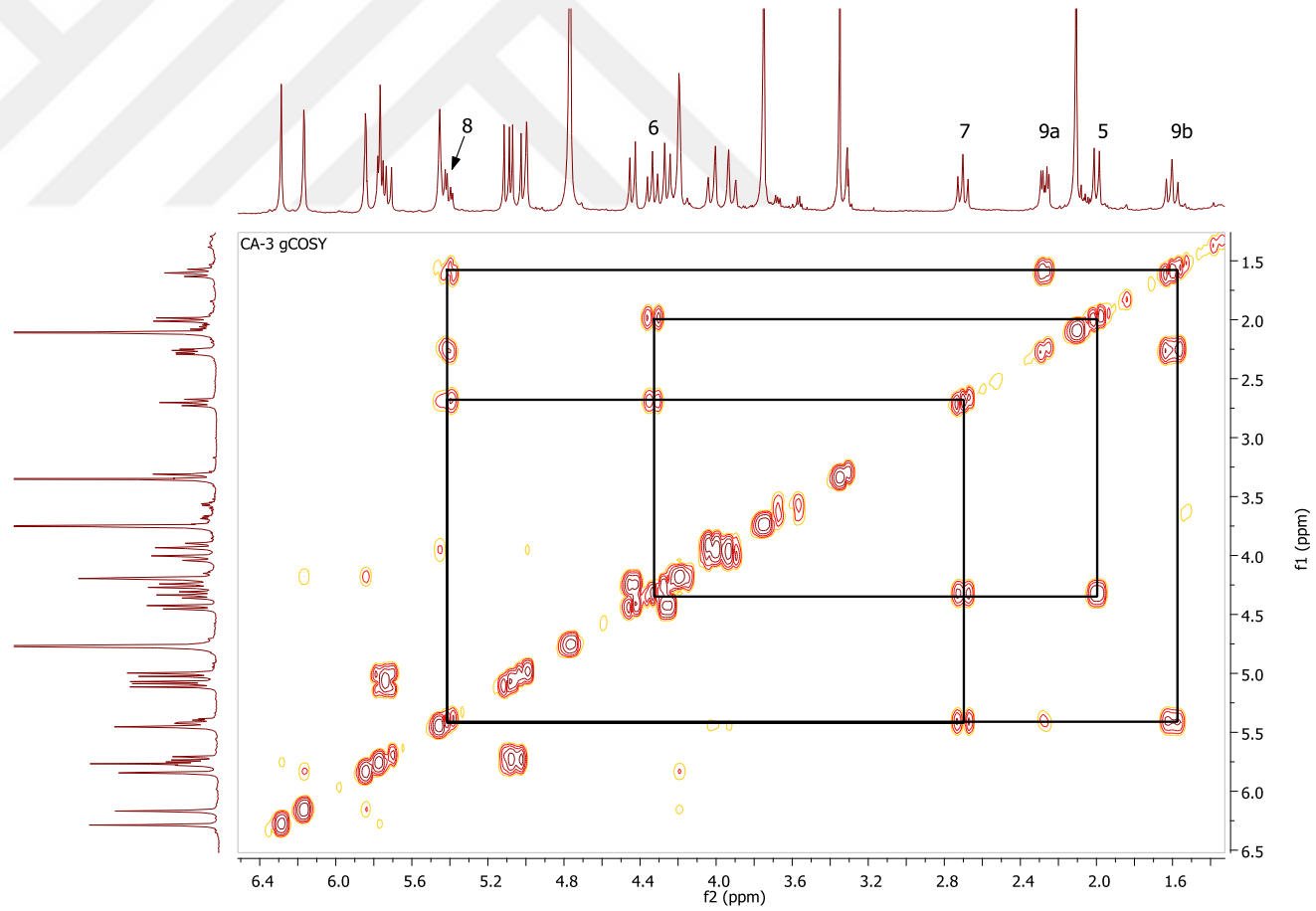
**Spektrum 20.** CA-3 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod)



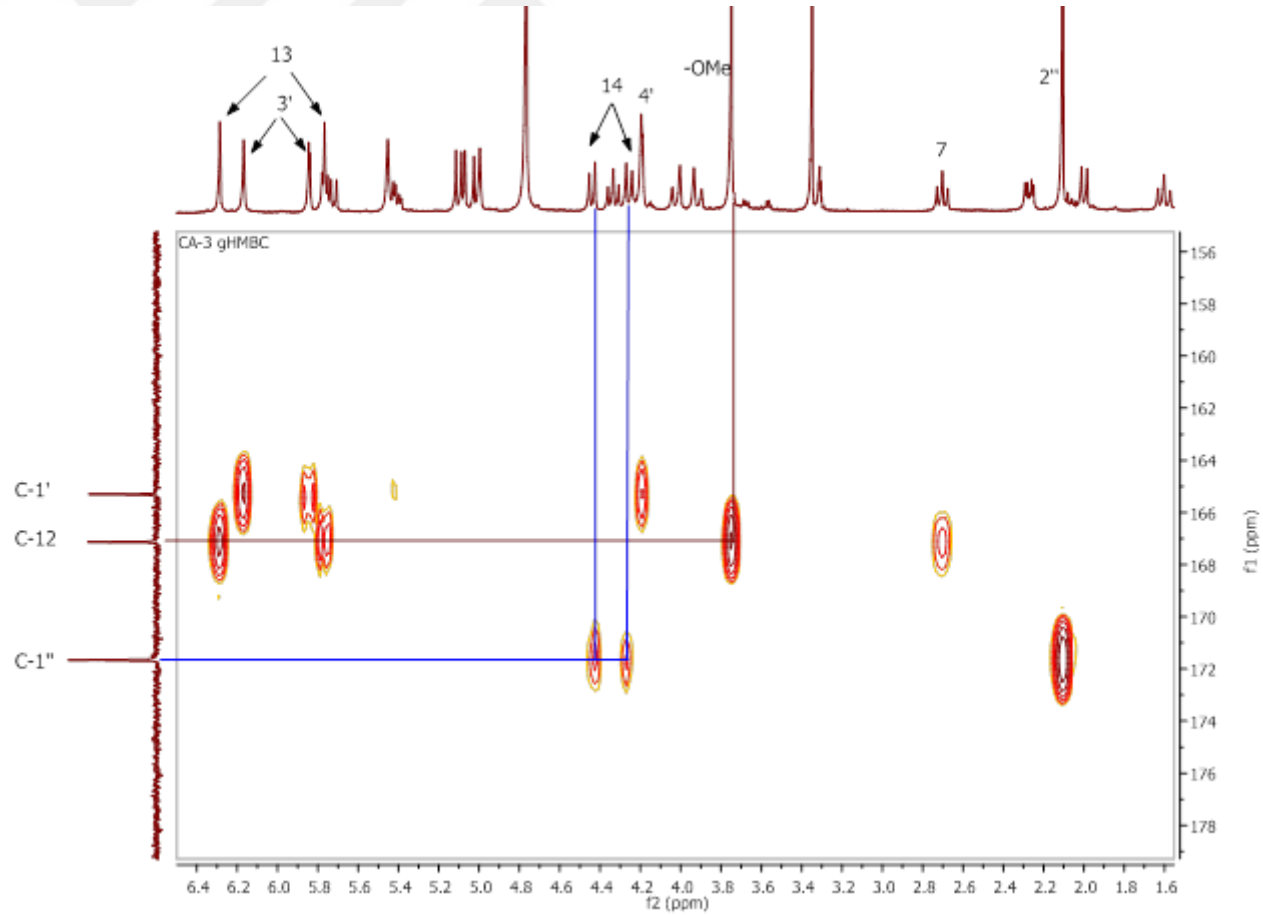
Spektrum 21. CA-3 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



Spektrum 22. CA-3  $^{13}\text{C}$  NMR spektrum (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )



**Spektrum 23.** CA-3 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)

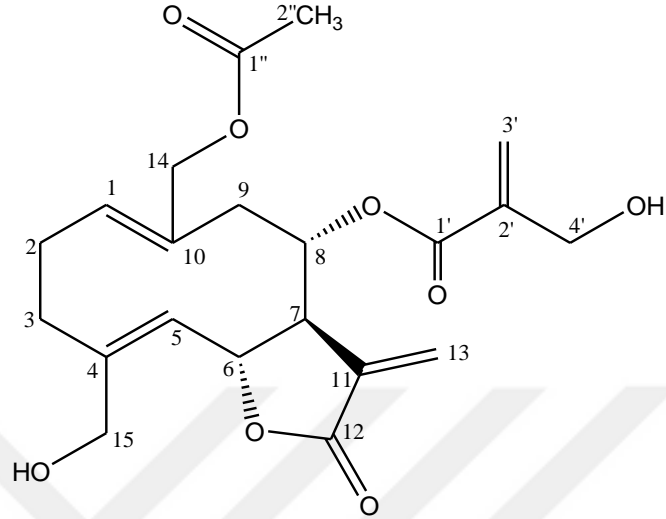


**Spektrum 24.** CA-3 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)

# GERMAKRANOLİT TİP SESKİTERPEN

## CA-4

### 4'-hidroksipekterolit-14-O-asetat



Formül	: C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub>
Molekül ağırlığı	: 406.1628
QTOF-MS <i>m/z</i>	: 429.1498 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> O <sub>8</sub> Na: 429.1525), Spektrum 25 835.3127 [2M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>42</sub> H <sub>52</sub> O <sub>16</sub> Na: 835.3153), Spektrum 25 451.1609 [M+COOH] <sup>-</sup> (C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub> : 451.1604), Spektrum 25
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 26, Tablo 16
<sup>13</sup> C NMR	: Spektrum 27, Tablo 16
COSY	: Spektrum 28
HMBC	: Spektrum 29



Açık sarı renkli zambak halinde elde edilen CA-4 kodlu bileşik, İTK profilinde, CA-3'ün hemen üstünde, 254 nm'de UV aktif, V/S reaktifi ile koyu sarı-kahve renkli bant halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 90:10:1; R<sub>f</sub> ~0.37).

CA-4'e ait QTOF kütle spektrumunda görülen 429.1498 [M+Na]<sup>+</sup>, 835.3127 [2M+Na]<sup>+</sup> pozitif ve 451.1609 [M+COOH]<sup>-</sup> negatif iyon pikleri ile <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen sinyaller birlikte değerlendirildiğinde, bileşiğin molekül formülü C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>O<sub>8</sub> olarak belirlenmiştir.

Moleküle ait <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumu incelendiğinde δ<sub>H</sub> 5.96 ve 6.29'da ekzosiklik metilen grubuna işaret eden iki dublet proton (*J*=1.2 Hz, H<sub>2</sub>-3') ve δ<sub>H</sub> 4.27'de iki protonluk alana sahip geniş singlet proton (H<sub>2</sub>-4') sinyalleri ile HMBC spektrumunda bu protonlar ile etkileşen dört karbon sinyali (δ<sub>C</sub> 166.4, C1'; 141.8, C2'; 125.9, C3' ve 61.6, C4') CA-1 - CA-3 kodlu moleküllerde yan zincir olarak görülen, 4'-hidroksi metakrilik asit yapısının bu molekülde de bulunduğunu göstermiştir (10).

<sup>1</sup>H-NMR spektrumunda, γ-lakton ünitesine konjuge ekzosiklik metilen grubuna işaret eden iki dublet proton (δ<sub>H</sub> 5.79 ve 6.18, *J*=2.8 ve 3.2, H<sub>2</sub>-13) ile δ<sub>H</sub> 3.97 ve 4.21'de (*J*=13.6 ve 14 Hz) hidrosimetilen grubuna işaret eden AB sistemi şeklinde iki dublet protonun (H<sub>2</sub>-15) varlığı, bileşiğin bir seskiterpen olabileceğini düşündürmüştür.

<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarında görülen olefinik protonlar (δ<sub>H</sub> 5.39, H-1 ve 5.06, H-5), yüksek alanda multipler sinyaller halinde gözlenen siklik metilen (<sup>1</sup>H: δ 2.43 ve 2.68, H<sub>2</sub>-2; 2.16 ve 2.64, H<sub>2</sub>-3; 2.28 ve 2.60, H<sub>2</sub>-9; <sup>13</sup>C: δ 26.6, C2; 34.8, C3 ve 45.2, C9) sinyallerinin varlığı ile COSY spektrumunda gözlenen korelasyonlar, molekülün germakranolit tipte bir seskiterpen olduğu yargısını güçlendirmiştir. H-6 protonunun düşük alana doğru kayarak 5.24 ppm'de gözlenmesi, C6 hidroksil grubu ile C12 karboksilik asit grubunun birleşmesiyle oluşan 6,12-γ-lakton ünitesinin varlığına işaret etmiştir. Spektral datamızın literatür verileriyle uyumluluğu bu görüşü desteklemiştir (29).

CA-4 molekülünde de (CA-1 - CA-3'de olduğu gibi) C10'a bağlı bir metil yerine hidrosimetilen grubunun bulunduğu belirlenmiştir (δ<sub>H</sub> 4.48 ve 4.63 *d*, *J*=12.8 ve 12.4 Hz, H<sub>2</sub>-14). Spektrumlarda, δ<sub>H</sub> 2.05 (H-2'') ve δ<sub>C</sub> 172.6 ile 20.9'da (C1'' ve C2'') gözlenen sinyaller, bir asetil grubu varlığına işaret etmiştir. Moleküle ait HMBC spektrumunda gözlenen uzak mesafe etkileşimlerinden hareketle,

hidroksimetilen grubunun C10 ( $\delta$  137.1) karbonuna, asetil grubunun ise C-14 ( $\delta$  63.1) karbonuna bağlı olduğu saptanmıştır.

C8'e ait olduđu belirlenen protonun  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda dűřük alana kayarak 5.10 ppm'de gűzlenmesi, C8-OH grubunda bir ađilasyon olduđunu ortaya koymuř ve HMBC spektrumunda C-1' ( $\delta$  166.4) ile H-8 arasında gűzlenen korelasyon, 4'-hidroksi metakrilik asit űnitesinin űngűrűlen yerini dođrulanmıřtır.

Bűtűn bulgular literatűr verileri ile birlikte deđerlendirildiđinde CA-4 molekűlűnűn *Jurinea eriobasis*'den izole edilmiř olan 4'-hidroksipekterolit-14-O-asetat olduđu anlařılmıřtır (94).

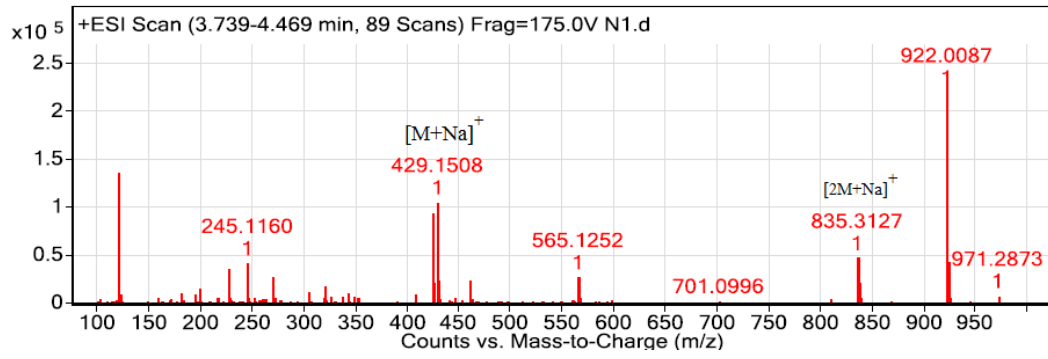


**Tablo 16.** CA-4 <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR verileri (CD<sub>3</sub>OD)

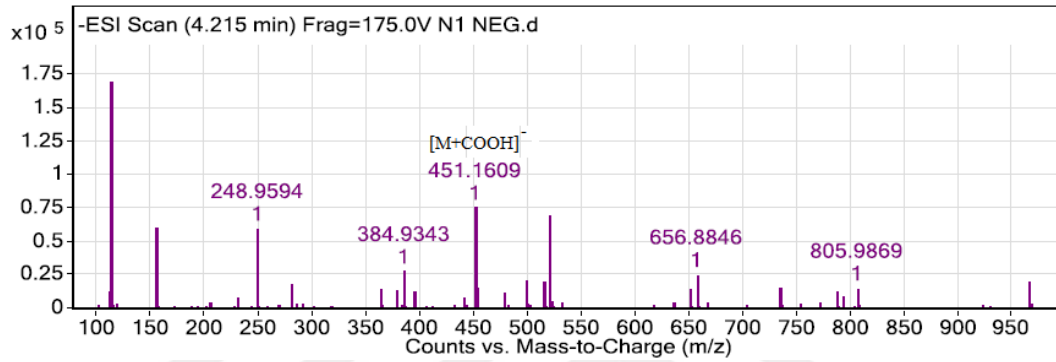
H/C	Mult.	$\delta_H$	$J$ (Hz)	$\delta_C$
1	CH	5.39	<i>dd</i> (12/3.2)	131.1
2	CH <sub>2</sub>	2.43	<i>td</i> (12.4/5.6)	26.6
		2.68	<i>m</i> †	
3	CH <sub>2</sub>	2.16	<i>m</i>	34.8
		2.64	<i>m</i> †	
4	C			145.4
5	CH	5.06	<i>d</i> (10)	129.9
6	CH	5.24	<i>t</i> (8.8)	78.9
7	CH	3.32	†	53.8
8	CH	5.10	<i>m</i> †	74.6
9	CH <sub>2</sub>	2.28	<i>m</i> †	45.2
		2.60	<i>m</i> †	
10	C			137.1
11	C			137.1
12	C			171.9
13	CH <sub>2</sub>	5.79	<i>d</i> (2.8)	125.4
		6.18	<i>d</i> (3.2)	
14	CH <sub>2</sub>	4.48	<i>d</i> (12.8)	63.1
		4.63	<i>d</i> (12.4)	
15	CH <sub>2</sub>	3.97	<i>d</i> (13.6)	60.8
		4.21	<i>d</i> (14)	
1'	C			166.4
2'	C			141.8
3'	CH <sub>2</sub>	5.96	<i>d</i> (1.2)	125.9
		6.29	<i>d</i> (1.2)	
4'	CH <sub>2</sub>	4.27	<i>g s</i>	61.6
1"	C			172.6
2"	CH <sub>3</sub>	2.05	<i>s</i>	20.9

† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülememiştir.

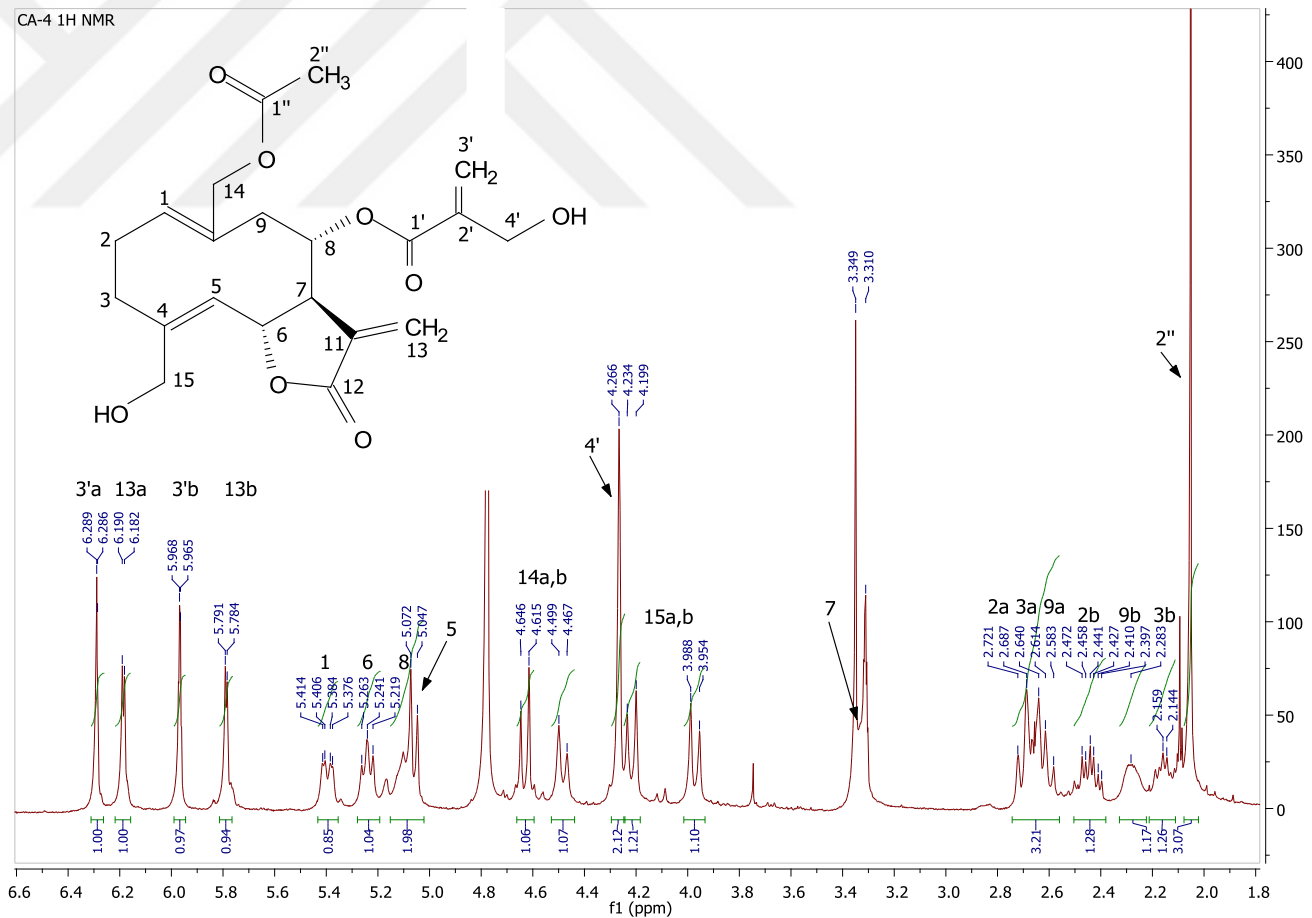
Spectrum Source: Peak (2) in "+ TIC Scan Smo"  
Fragmentor Voltage: 175  
Collision Energy: 0  
Ionization Mode: ESI



Fragmentor Voltage: 175  
Collision Energy: 0  
Ionization Mode: ESI

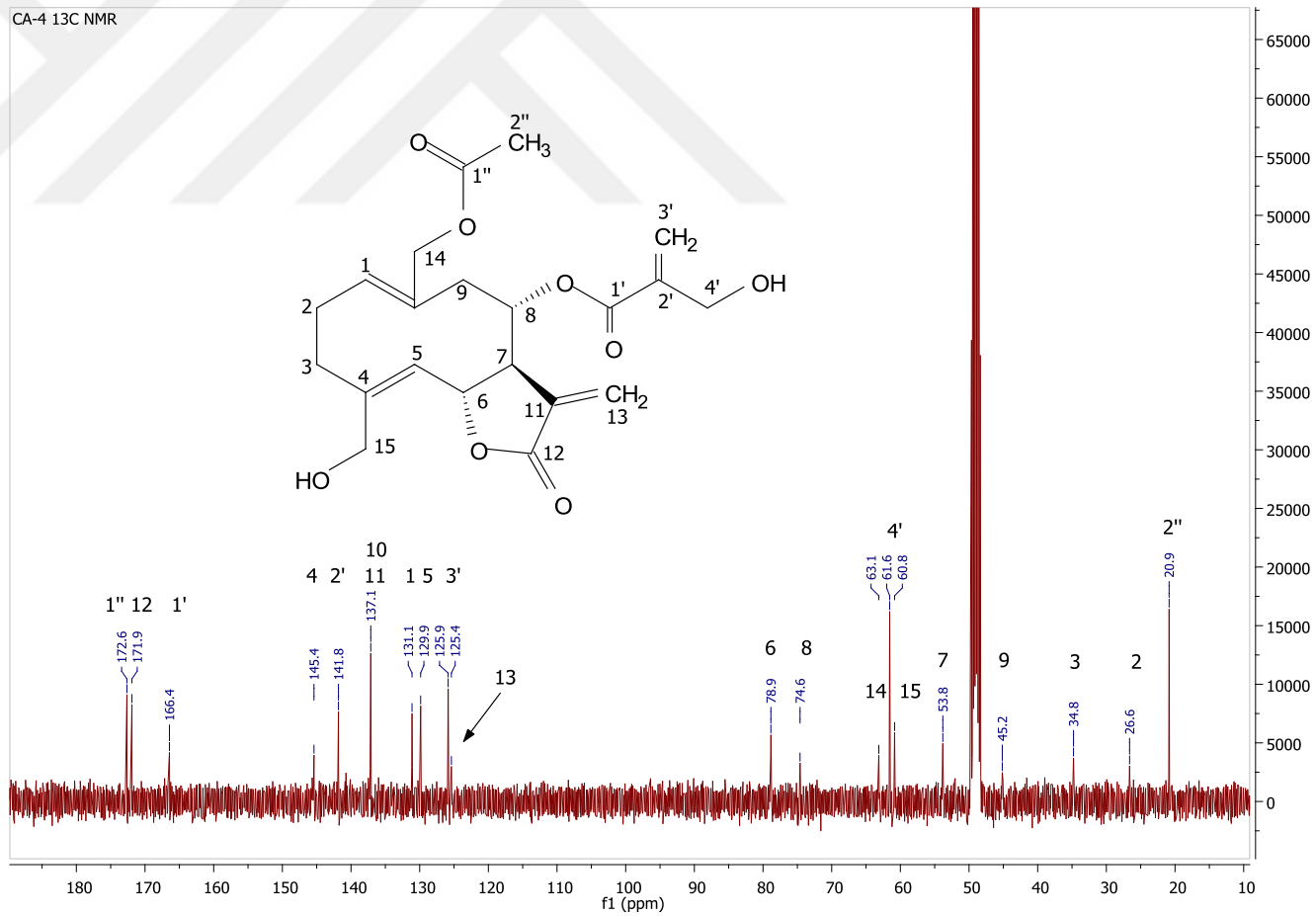


**Spektrum 25.** CA-4 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod)

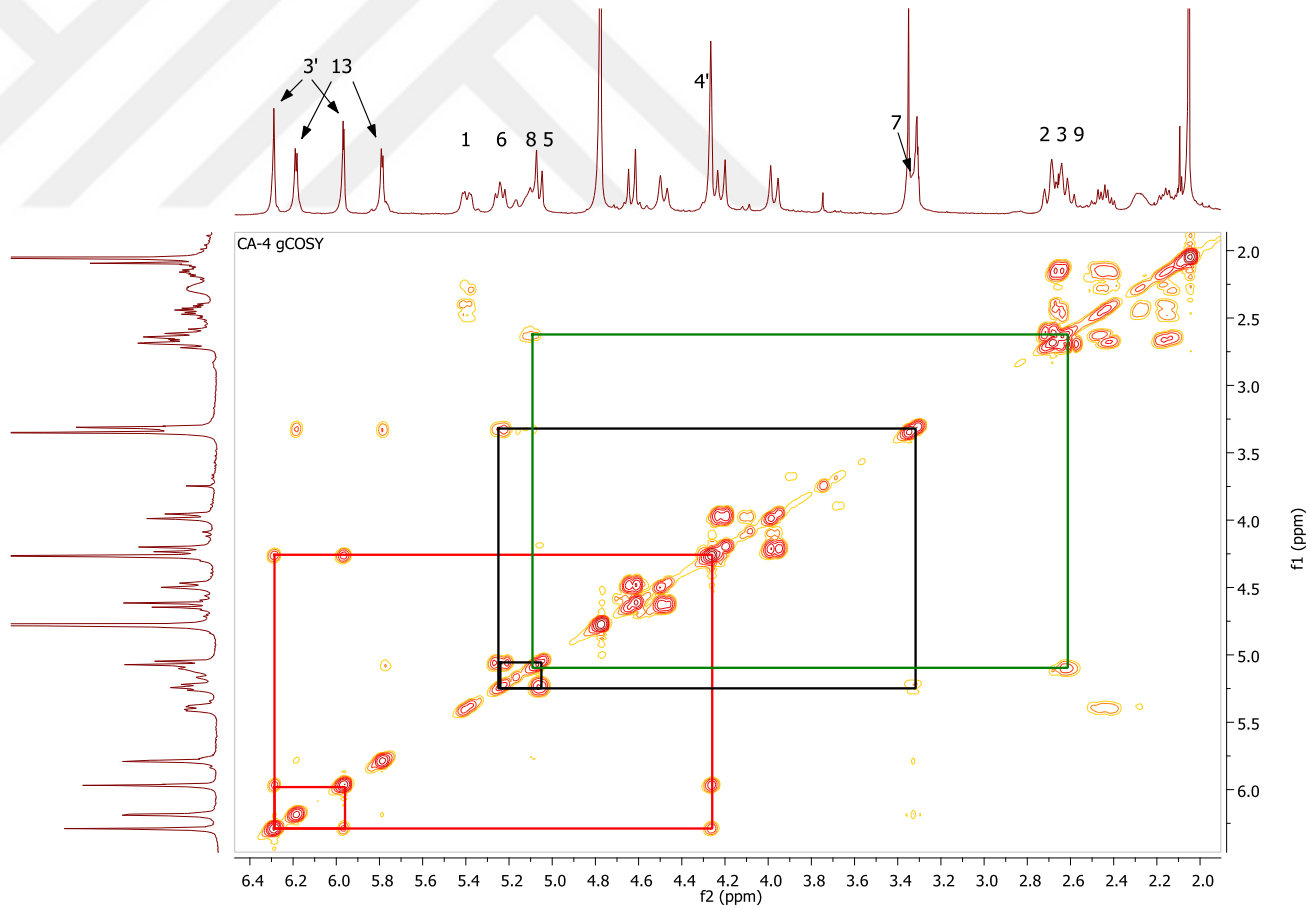


Spektrum 26. CA-4 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

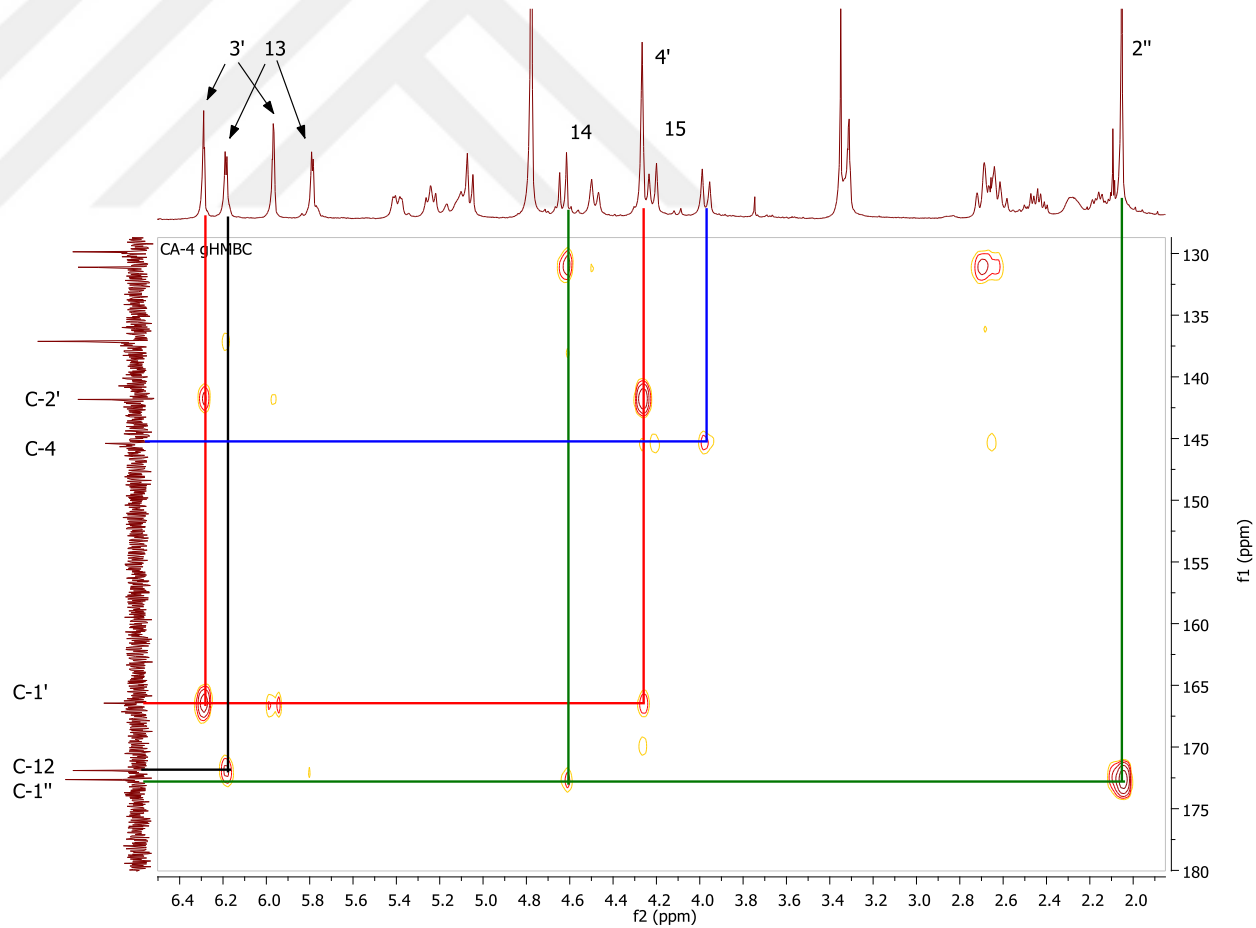
CA-4 <sup>13</sup>C NMR



Spektrum 27. CA-4 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



**Spektrum 28.** CA-4 2D <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)



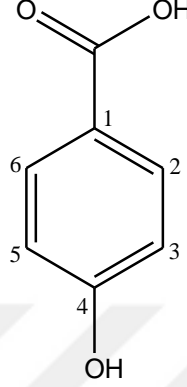
**Spektrum 29.** CA-4 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)



#### 4.1.1.2. BASİT FENOLİK BİLEŞİKLER ve GLUKOZİTLERİ

CA-5

##### *p*-hidroksi benzoik asit



Sinonim	: 4-hidroksibenzoik asit
Formül	: C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
Molekül ağırlığı	: 138.03
LC-MS/MS m/z	: 139.14 [M+H] <sup>+</sup> (C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub> : 139.04), Spektrum 30
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 31, Tablo 17

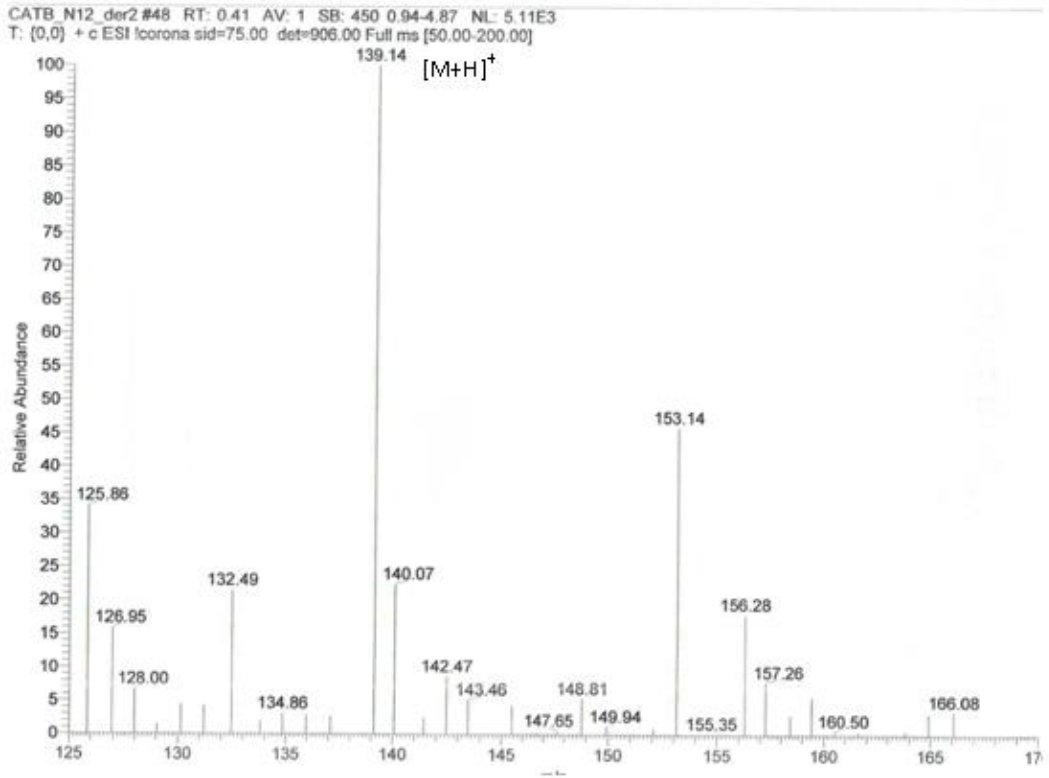
Sarımsı beyaz renkli amorf toz halinde elde edilen CA-5 kodlu bileşik, İTK profilinde, 254 nm'de UV altında koyu bordo renkli bant halinde görülürken, V/S reaktifi ile herhangi bir renklenme gözlenmemiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 61:32:7; R<sub>f</sub> ~0.6).

Molekülün <sup>1</sup>H NMR spektrumunda δ<sub>H</sub> 6.81 ve 7.78'de ikişer proton yüksekliğinde ve orto yarıлма sabiti (J=8.4 Hz) görülen sinyaller para disüstitüe bir aromatik halkanın varlığına işaret etmiştir. H<sub>2</sub>/H<sub>6</sub> protonlarının düşük alana kayarak 7.78 ppm'de görülmesi, C1 konumunda elektron çekici bir grubun bulunduğunu ve molekülün basit bir fenolik asit olabileceğini düşündürmüştür. Molekülün pozitif iyon kütle spektrumunda gözlenen m/z 139.14 [M+H]<sup>+</sup> sinyali bu görüşü desteklemiştir.

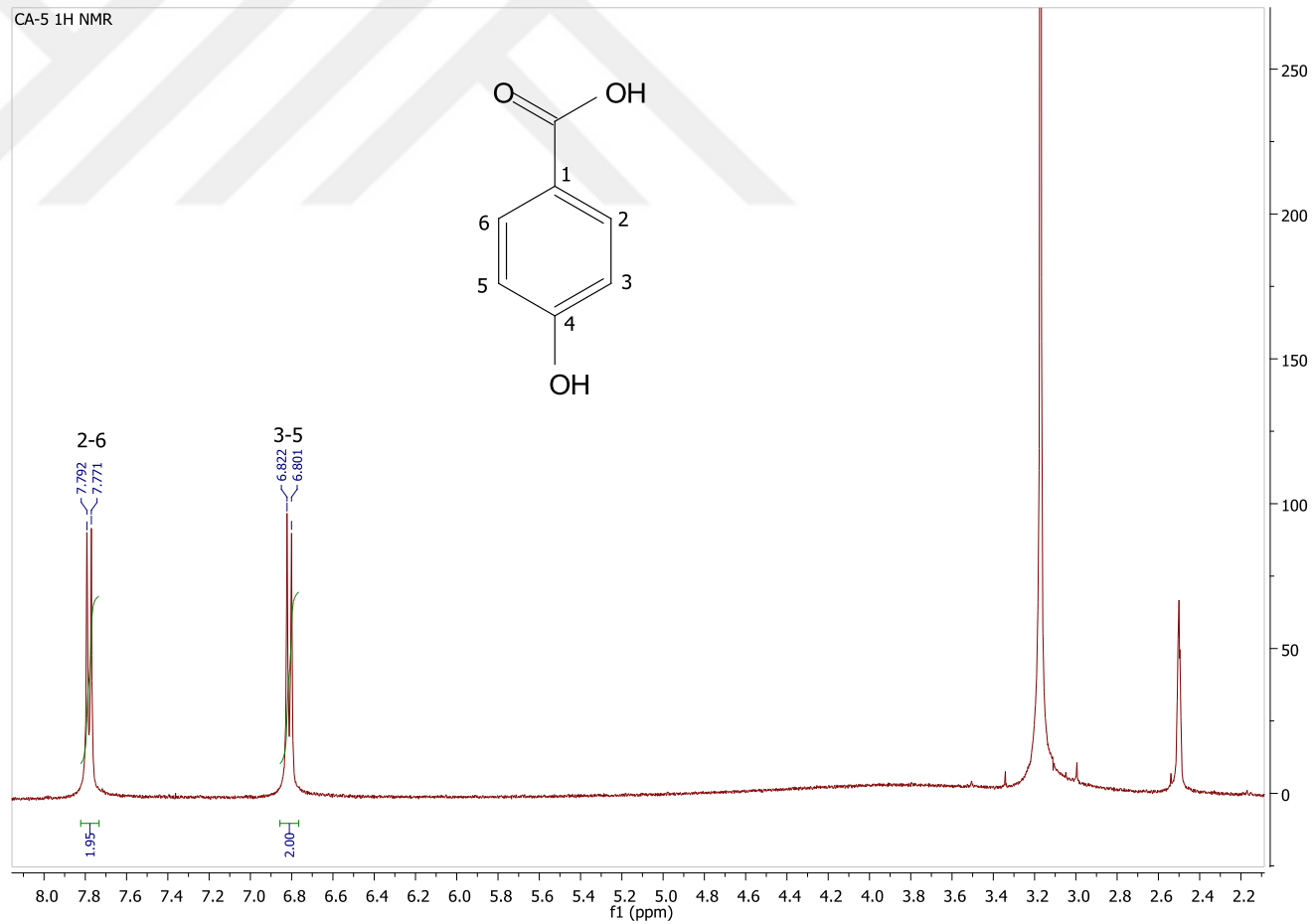
Elde edilen bulgular literatür verileri ile kıyaslanarak CA-5 molekülünün yapısının *Centaurea* türlerinden daha önce elde edilen bir fenolik asit olan, *p*-hidroksibenzoik asit olduğu doğrulanmıştır (95-97).

**Tablo 17.** CA-5  $^1\text{H}$  NMR verileri (DMSO- $d_6$ )

H/C	Mult.	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)
1	C		
2	CH	7.78	$d$ (8.4)
3	CH	6.81	$d$ (8.4)
4	C		
5	CH	6.81	$d$ (8.4)
6	CH	7.78	$d$ (8.4)

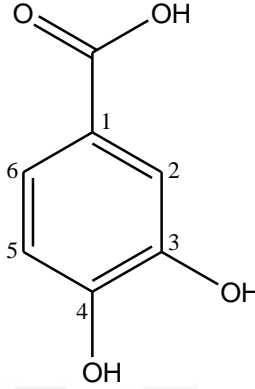


**Spektrum 30.** CA-5 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)



Spektrum 31. CA-5 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)

**CA-6**  
**Protokateşik asit**



Sinonim	: 3,4-dihidroksibenzoik asit
Formül	: C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>
Molekül ağırlığı	: 154.03
LC-MS/MS	: 152.94 [M-H] <sup>-</sup> (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> : 153.02), Spektrum 32
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 33, Tablo 18

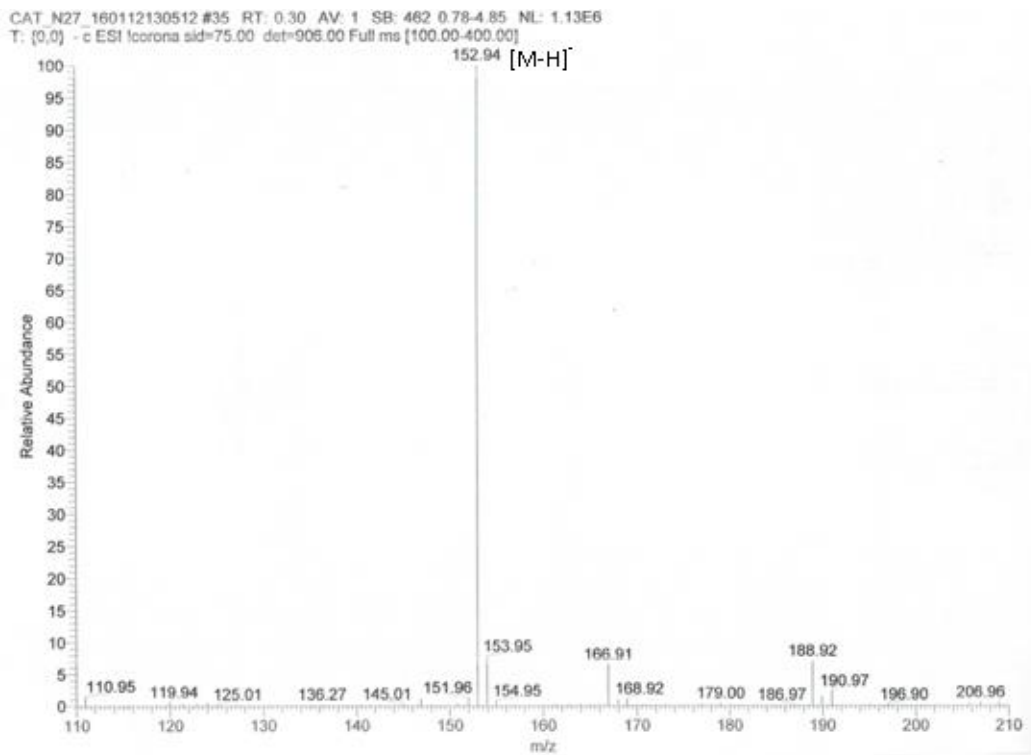
Krem renkli amorf toz halinde elde edilen CA-6 kodlu bileşik, İTK uygulamasında, 254 nm’de UV altında koyu bordo bir bant halinde gözlenirken, V/S reaktifi ile herhangi bir spot oluşturmamıştır (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 61:32:7; R<sub>f</sub>~0.6).

<sup>1</sup>H NMR spektrumunda δ<sub>H</sub> 6.79 (*d*, *J*=8.4 Hz, H-5), 7.42 (*dd*, *J*=8.4/2 Hz, H-6) ve 7.44 (*d*, *J*=2 Hz, H-2)’de gözlenen sinyaller molekülün trisüstitüe bir aromatik halka taşıdığını göstermiştir. Yarılma sabitlerinden hareketle süstitüsyonun 1, 3 ve 4 konumlarından olabileceği değerlendirilmiştir. Molekülün negatif iyon kütle spektrumunda gözlenen *m/z* 152.94 [M-H]<sup>-</sup> sinyalinin 3,4-dihidroksibenzoik asit yapısı ile uyumlu olduğu görülmüştür.

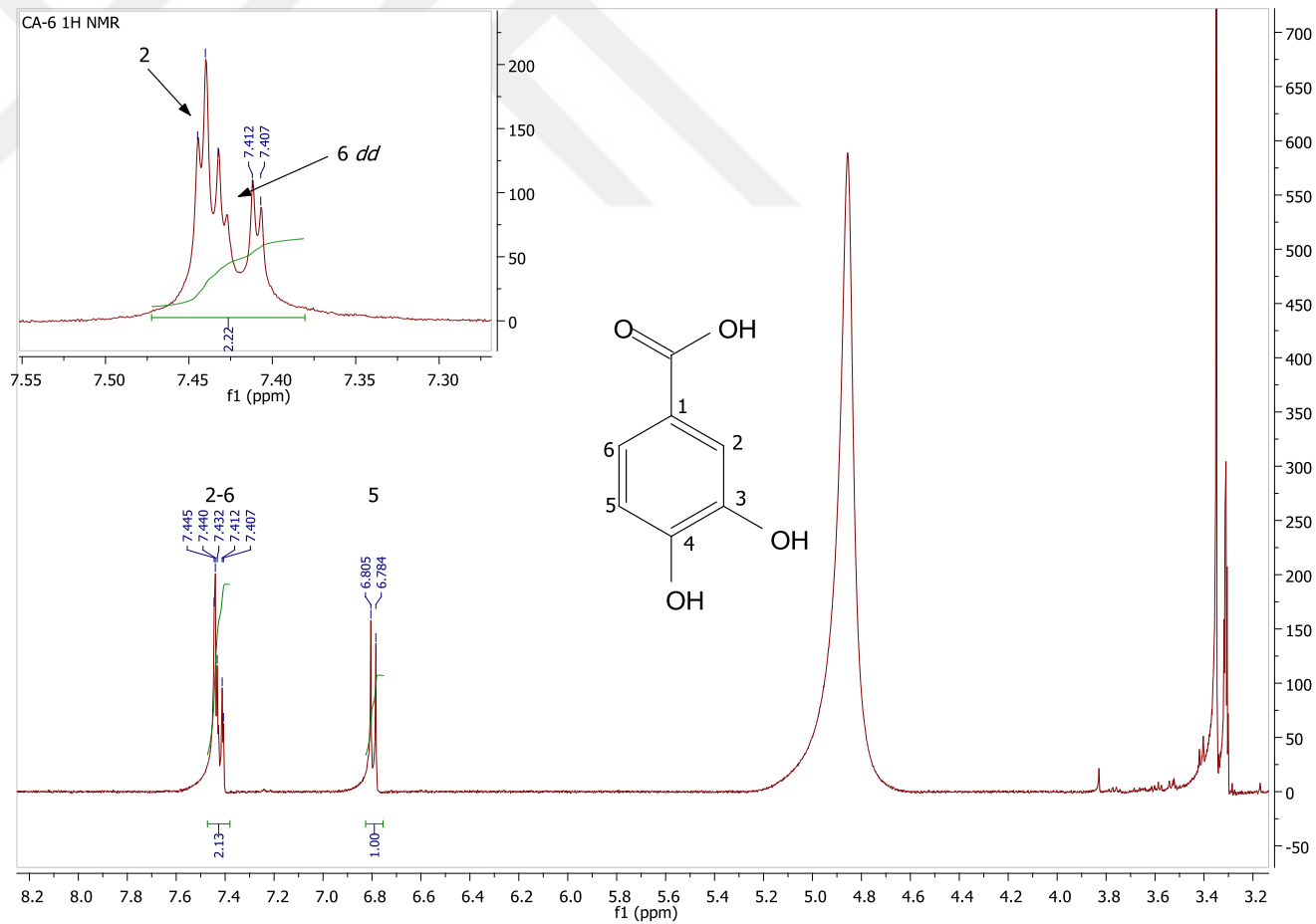
Elde edilen spektral veriler literatür ile karşılaştırıldığında, molekülün *Centaurea* türlerinde yaygın olarak bulunan protokateşik asit olduğu belirlenmiştir (61, 98).

**Tablo 18.** CA-6 <sup>1</sup>H NMR verileri (CD<sub>3</sub>OD)

H/C	Mult.	δ <sub>H</sub>	J (Hz)
1	C		
2	CH	7.44	<i>d</i> (2)
3	C		
4	C		
5	CH	6.79	<i>d</i> (8.4)
6	CH	7.42	<i>dd</i> (8.4/2)



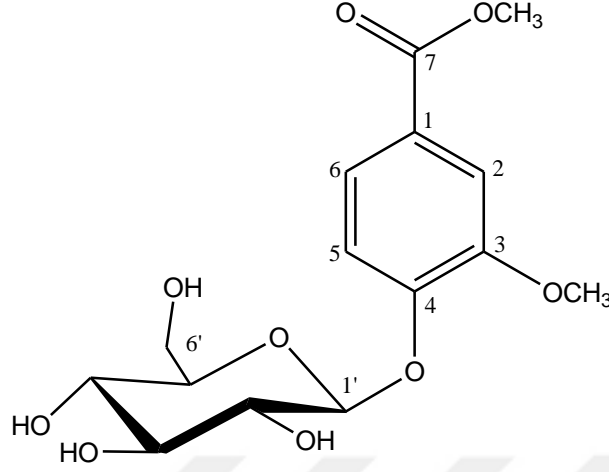
**Spektrum 32.** CA-6 LC-MS spektrumu (Negatif mod)



Spektrum 33. CA-6  $^1\text{H}$  NMR spektrumu ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)

## CA-7

### 4-O-β-D-glukopiranozil-vanilik asit metil esteri



Sinonim : 3-metoksi-4-β-D-glukopiranoziloksi-benzoik asit metil esteri

Formül : C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>

Molekül ağırlığı : 344.11

LC-MS/MS : 367.01 [M+Na]<sup>+</sup> (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>Na: 367.10), Spektrum 34  
383.30 [M+K]<sup>+</sup> (C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sub>9</sub>K: 383.07), Spektrum 34

<sup>1</sup>H NMR : Spektrum 35, Tablo 19

Kahverengi amorf halde elde edilen ve İTK profilinde, 254 nm'de koyu mor renkli bant halinde gözlenen CA-7 kodlu bileşik, V/S reaktifi ile hafif sarı renkli bir spot halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 61:32:7; R<sub>f</sub>~0.4).

<sup>1</sup>H NMR spektrumunda δ<sub>H</sub> 6.94 (*d*, *J*=8.8 Hz, H-5), 7.43 (*dd*, *J*=8.8/1.2 Hz, H-6) ve 7.52 (*d*, *J*=1.2 Hz, H-2)'de gözlenen sinyaller molekülün yapısının trisüstitüe bir aromatik halka olduğunu göstermiştir. δ<sub>H</sub> 4.86'da gözlenen bir anomerik proton ve 3-3.80 ppm aralığında gözlenen multiyet proton sinyalleri, yapıya bir oz ünitesinin bağlı olduğunu göstermiş ve anomerik proton için gözlenen yarıma sabitinden (*d*, *J*=8 Hz) hareketle bu yapının β-konfigurasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında 3.54 ve 3.65 ppm'de gözlenen üçer proton yüksekliğindeki singlet sinyaller iki adet metoksi grubunun varlığına işaret etmiştir.

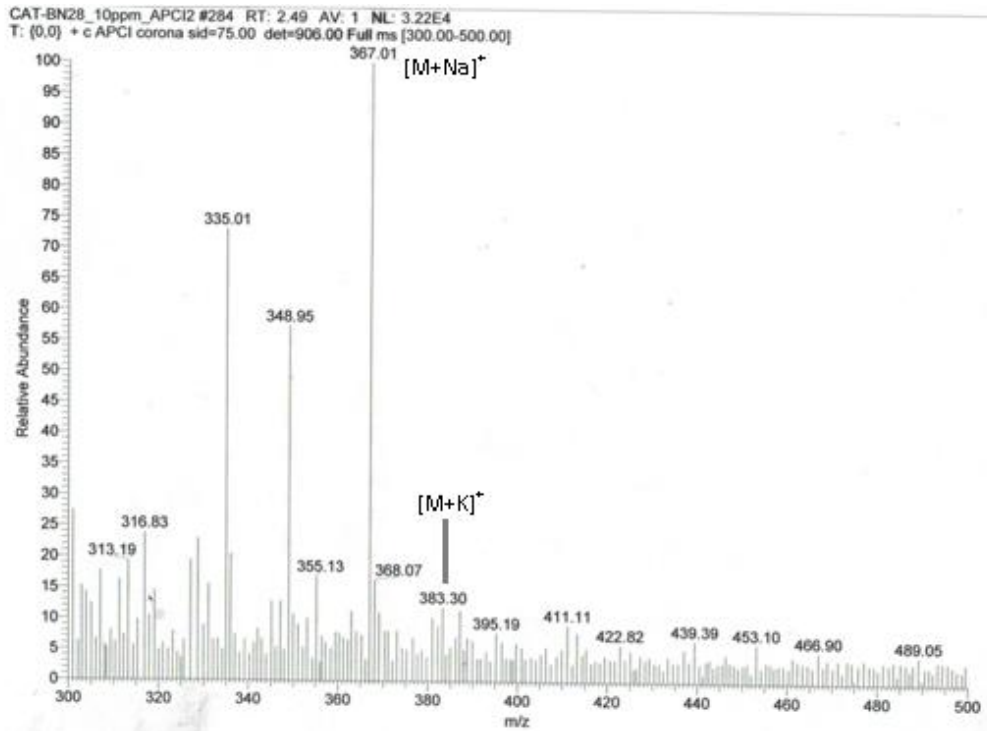
Literatür ile karşılaştırıldığında, spektral verilerimizin daha önce *C. ensiformis*'ten elde edilen 4-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozil vanilik asit'e ait veriler ile uyumlu olduğu görülmüş ve molekülün pozitif iyon kütle spektrumunda gözlenen  $m/z$  367.01 [M+Na]<sup>+</sup> ve 383.30 [M+K]<sup>+</sup> moleküler iyonlar ile molekülün yapısı 4-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozil-vanilik asit metil esteri olarak belirlenmiştir (61, 99).

**Tablo 19.** CA-7 <sup>1</sup>H NMR verileri (CD<sub>3</sub>OD)

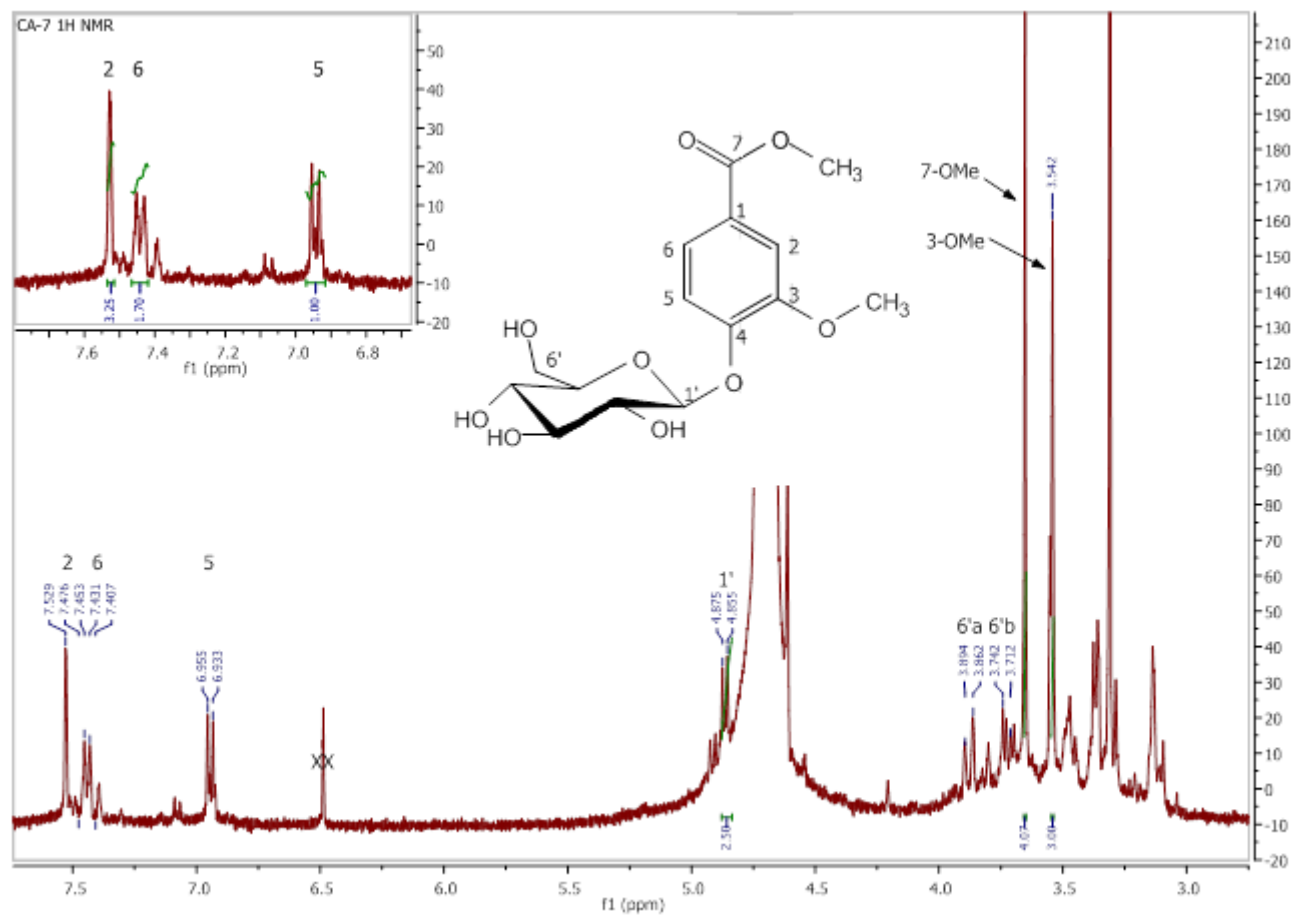
H/C	Mult.	$\delta_H$	$J$ (Hz)
1	C		
2	CH	7.52	<i>d</i> (1.2)
3	C		
4	C		
5	CH	6.94	<i>d</i> (8.8)
6	CH	7.43	<i>dd</i> (8.8/1.2)
7	C		
3-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.54	<i>s</i>
7-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.65	<i>s</i>
Glukoz			
1'	CH	4.86	<i>d</i> (8)
2'	CH	3-3.60	<i>m</i> †
3'	CH	3-3.60	<i>m</i> †
4'	CH	3-3.60	<i>m</i> †
5'	CH	3-3.60	<i>m</i> †
6'	CH <sub>2</sub>	3.87	<i>d</i> (12.4)
		3.71	<i>dd</i> (12.4/5.6)

† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülememiştir.





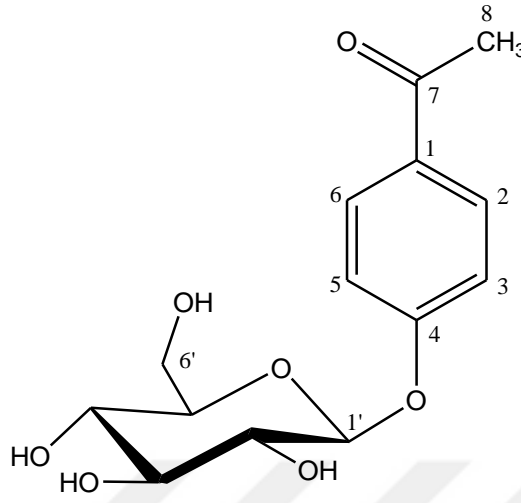
**Spektrum 34.** CA-7 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)



Spektrum 35. CA-7 <sup>1</sup>H NMR spektrum (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz)

## CA-8

### Picein



Formül	: C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>
Molekül ağırlığı	: 298.11
LC-MS/MS	: 299.08 [M+H] <sup>+</sup> (C <sub>14</sub> H <sub>19</sub> O <sub>7</sub> : 299.11) 321.10 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub> Na: 321.09), Spektrum 36
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 37, Tablo 20

Sarı renkli amorf toz halinde elde edilen CA-8 kodlu bileşik, İTK plağı üzerinde, 254 nm'de koyu mor renkli bir bant halinde gözlenmiş ve V/S reaktifi uygulandıktan sonra açık kahverengi bir spot oluşturmuştur (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 61:32:7; R<sub>f</sub>~0.5).

Molekülün <sup>1</sup>H NMR spektrumunda δ<sub>H</sub> 7.12 ve 7.91'de ikişer proton yüksekliğinde ve orto yarımla sabitine sahip olarak (*J*=8 Hz) gözlenen sinyaller, para disüstitüe bir aromatik halkanın varlığına işaret etmiştir. δ<sub>H</sub> 4.99'da gözlenen bir anomerik proton ve 3.10-3.70 ppm aralığında gözlenen multipler proton sinyalleri yapıya bir oz ünitesinin bağlı olduğunu göstermiş ve anomerik protonun yarımla sabitinden (*d*, *J*=7.2 Hz) hareketle konfigürasyonunun β olduğu saptanmıştır.

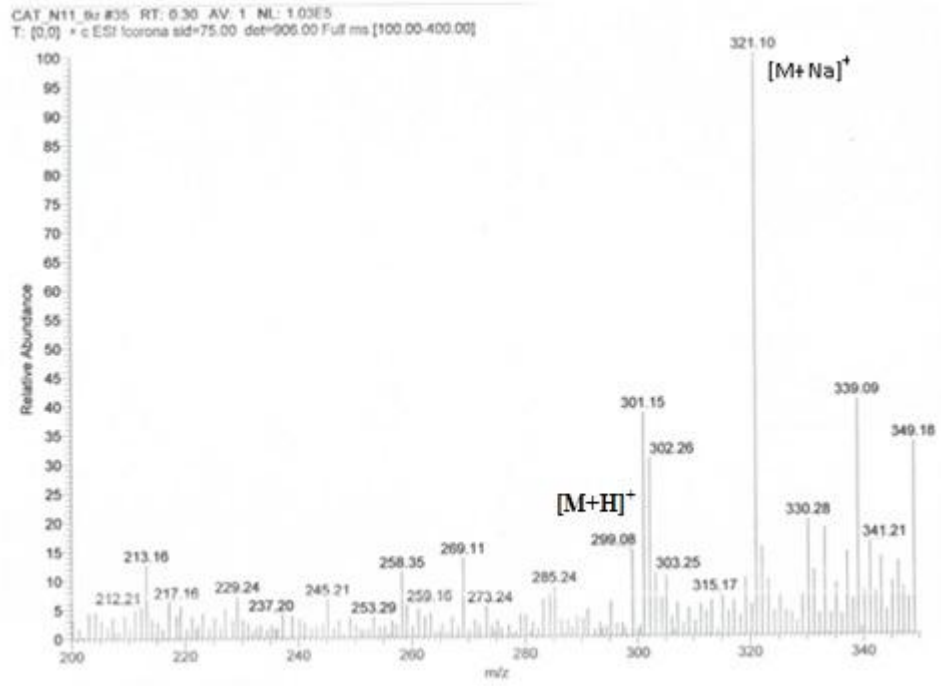
Bunun yanında δ<sub>H</sub> 2.52'de gözlenen üç proton yüksekliğindeki singlet sinyalin, kimyasal kayma değerinden hareketle, ketona komşu bir metil grubuna ait olabileceği ve molekülün bir asetofenon glukoziti olabileceği düşünülmüştür.

Spektral verilerin, daha önce *C. ensiformis*'ten izole edilmiş olan picein'e ait veriler ile uyumlu olduğu gözlenmiş ve molekülün pozitif iyon kütle spektrumunda gözlenen  $m/z$  321.10  $[M+Na]^+$  sinyali bu görüşü desteklemiştir. Sonuç olarak CA-8 molekülünün yapısı picein olarak belirlenmiştir (61).

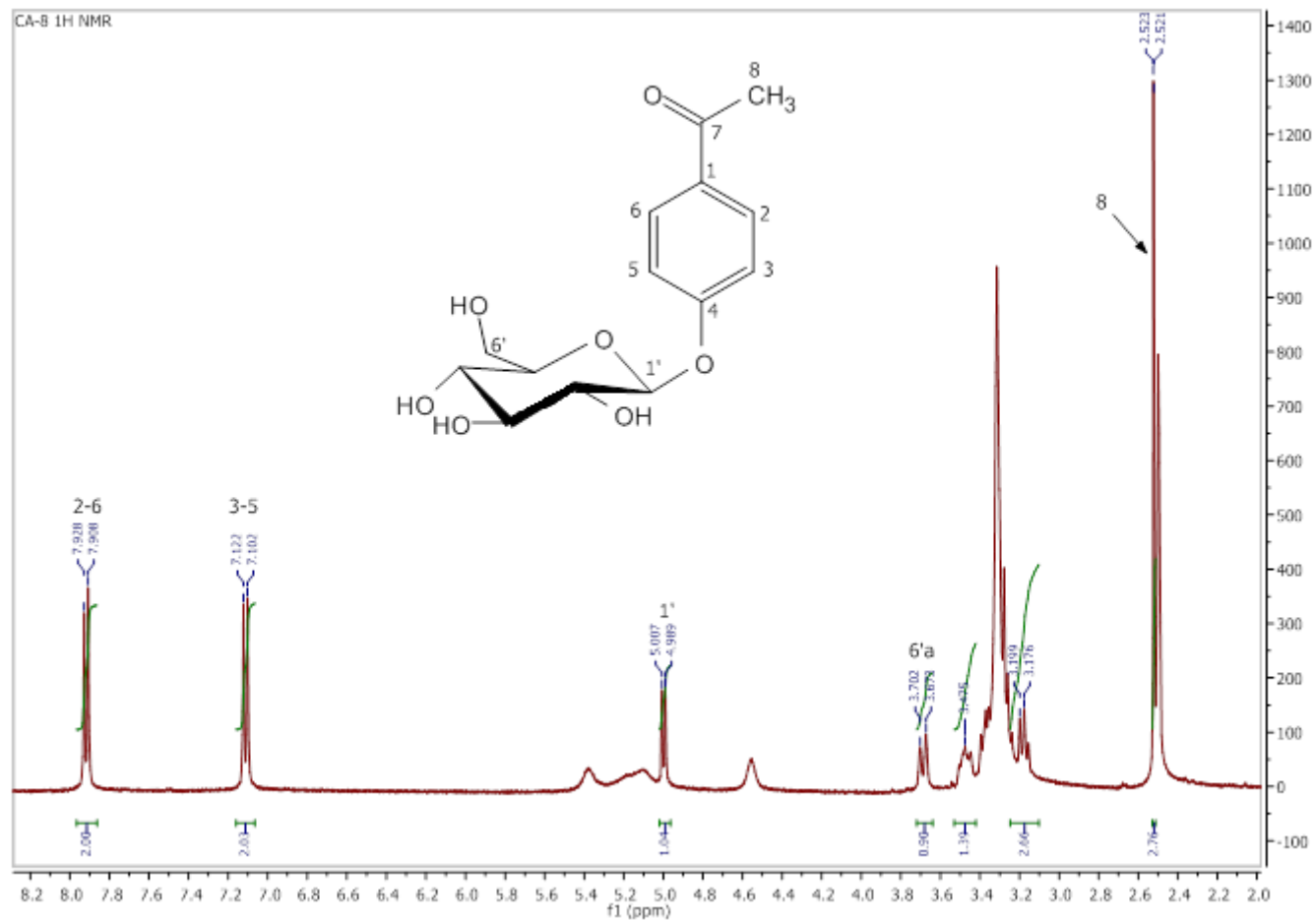
**Tablo 20.** CA-8  $^1H$  NMR verileri (DMSO- $d_6$ )

H/C	Mult.	$\delta_H$	$J$ (Hz)
1	C		
2	CH	7.91	$d$ (8)
3	CH	7.12	$d$ (8)
4	C		
5	CH	7.12	$d$ (8)
6	CH	7.91	$d$ (8)
7	C		
8	CH <sub>3</sub>	2.52	$d$ (0.8)
Glukoz			
1'	CH	4.99	$d$ (7.2)
2'	CH	3.10-3.60	$m^\dagger$
3'	CH	3.10-3.60	$m^\dagger$
4'	CH	3.10-3.60	$m^\dagger$
5'	CH	3.10-3.60	$m^\dagger$
6'	CH <sub>2</sub>	3.69	$d$ (11.6)
		3.48	$m^\dagger$

$^\dagger$  Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülemedi.



**Spektrum 36.** CA-8 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)

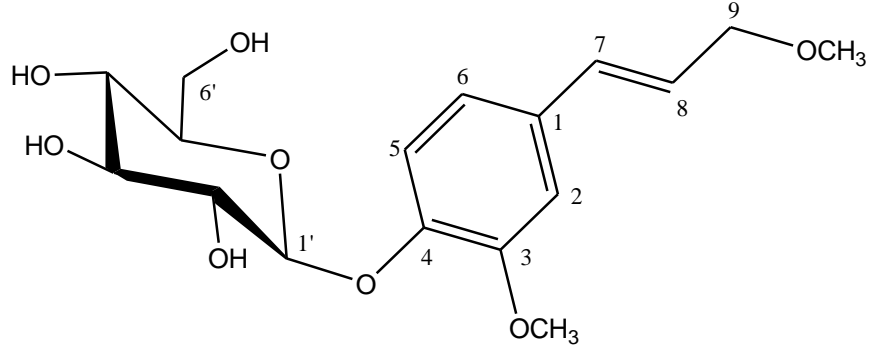


Spektrum 37. CA-8 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)

#### 4.1.1.3. FENİLPROPANOİT GLUKOZİTLERİ

##### CA-9

##### 9-O-metil koniferin



Sinonim	: Metil koniferin
Formül	: C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub>
Molekül ağırlığı	: 356.15
LC-MS/MS	: 357.05 [M+H] <sup>+</sup> (C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>8</sub> : 357.15), Spektrum 38 379.05 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>8</sub> : 379.13), Spektrum 38
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 39, Tablo 21

Krem rengi amorf toz halinde elde edilen ve İTK profilinde, 254 nm UV altında koyu renkli bir bant halinde gözlenen CA-9 kodlu bileşiğin, V/S reaktifi ile açık kahverengi bir renk verdiği görülmüştür (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 61:32:7; R<sub>f</sub>~0.6).

<sup>1</sup>H NMR spektrumunda δ<sub>H</sub> 6.89, 7.02 ve 7.05'de ABX sistemi şeklinde görülen aromatik sinyaller ve δ<sub>H</sub> 6.47 ve 6.27'de gözlenen *trans* olefinik etkileşim görülen proton rezonansları (*J*<sub>7-8</sub>=16 Hz) bileşiğin fenil propanoit iskeletine sahip olduğunu düşündürmüştür. 6.27 ppm'deki protonda (H-8) gözlenen dublet triplet yarımla, bu protonla etkileşen bir metilen grubunun (δ 4.09 *d*, *J*<sub>8-9</sub>=5.2 Hz, H<sub>2</sub>-9) varlığına işaret etmiştir. Bu metilen protonunun 2H şeklinde δ 4.09'da rezonansa gelmesi, oksimetilen karakterde olduğunu göstermiştir.

δ<sub>H</sub> 4.87'de gözlenen anomerik proton ve 3.10-3.70 ppm aralığında gözlenen multipler sinyaller ve anomerik protona ait 7.2 Hz'lik yarımla sabiti, diğer aromatik bileşiklerimizde (CA-7 ve CA-8) olduğu gibi, β-glukoz ünitesinin yapıda

bulduğunu düşündürmüştür. Bunun yanında 3.78 ve 3.32 ppm'de gözlenen üç proton yüksekliğindeki singlet sinyaller iki adet metoksi grubuna işaret etmiştir.

Spektral verilerin daha önce *C. ensiformis*'ten izole edilmiş olan 9-*O*-metil koniferin verileri ile uyumlu olduğu görülmüştür. Moleküle ait pozitif kütle iyon spektrumunda  $m/z$  357.05  $[M+H]^+$  ve 379.05'de  $[M+Na]^+$  gözlenen moleküler iyonlar CA-9'un yapısının 9-*O*-metil koniferin olduğunu doğrulamıştır (61, 100).

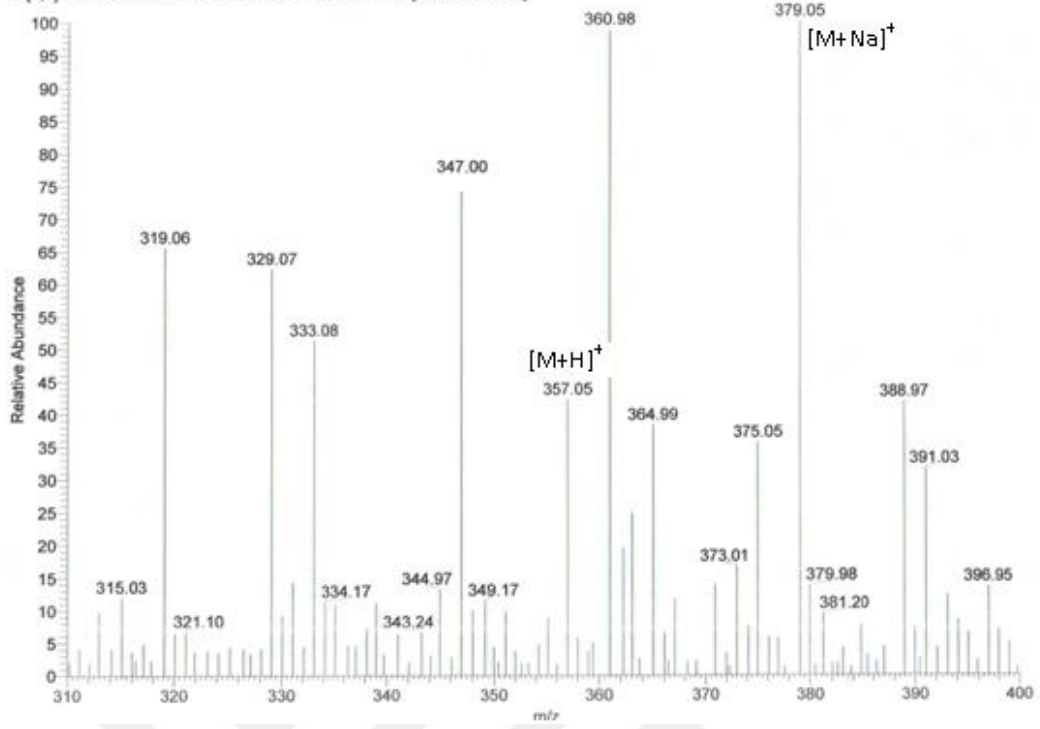
**Tablo 21.** CA-9  $^1H$  NMR verileri (DMSO- $d_6$ )

H/C	Mult.	$\delta_H$	$J$ (Hz)
1	C		
2	CH	7.05	$d$ (2)
3	C		
4	C		
5	CH	7.02	$d$ (8.4)
6	CH	6.89	$dd$ (8.4/1.6)
7	CH	6.47	$d$ (16)
8	CH	6.27	$dt$ (16/5.2)
9	CH <sub>2</sub>	4.09	$d$ †
3-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.78	$s$
9-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	~3.32	$s$
Glukoz			
1'	CH	4.87	$d$ (7.2)
2'	CH	3.10-3.70	†
3'	CH	3.10-3.70	†
4'	CH	3.10-3.70	†
5'	CH	3.10-3.70	†
6'	CH <sub>2</sub>	3.81	$m$ †
		3.75	$m$ †

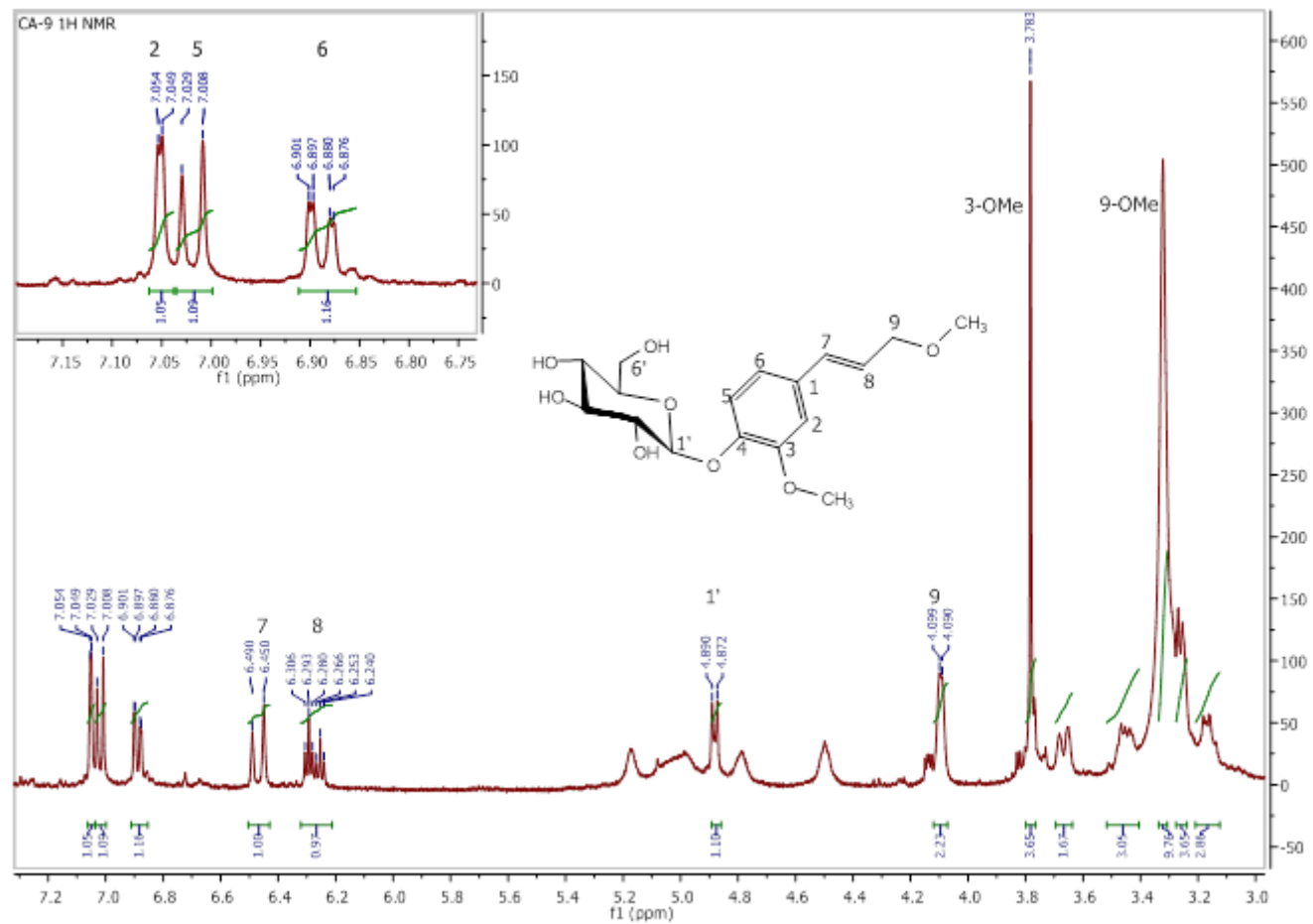
† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülememiştir



CATB N10 #26 RT: 0.22 AV: 1 NL: 3.02E4  
T: (0,0) + c ESI Icorona sid=75.00 det=906.00 Full ms [100.00-400.00]

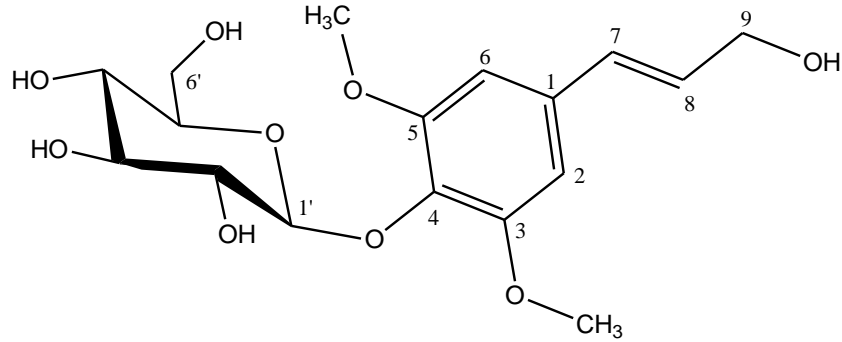


**Spektrum 38. CA-9 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)**



**Spektrum 39.** CA-9 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)

**CA-10**  
**Siringin**



Sinonim	: Siringozit, Eleuterozit B, Metoksi koniferin
Formül	: C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>
Molekül ağırlığı	: 372.14
LC-MS/MS	: 395.02 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub> Na: 395.13), Spektrum 40
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 41, Tablo 22

Beyaz renkli amorf toz halinde elde edilen CA-5 kodlu bileşik, İTK profilinde, UV<sub>254</sub> altında koyu mor renkli bir spot halinde gözlenirken, V/S reaktifi uygulandığında maviden mor renge dönen bir bant halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 80:20:2; R<sub>f</sub> ~0.4).

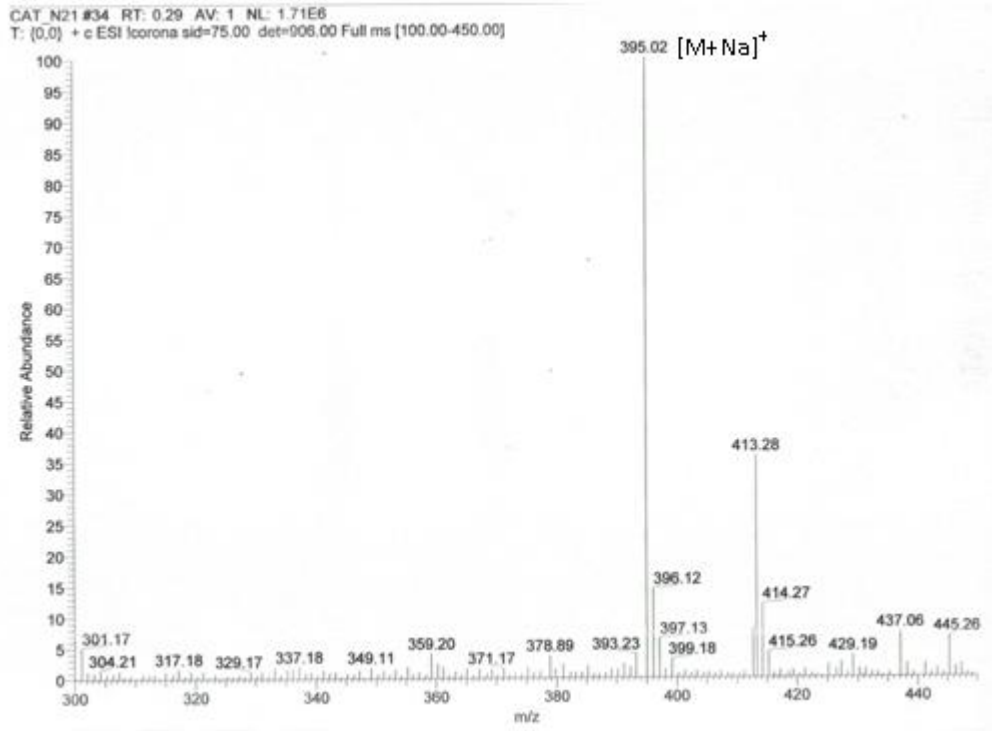
<sup>1</sup>H NMR spektrumunda  $\delta_H$  6.72'de gözlenen iki protonluk singlet sinyal, tetrasüstitüe bir aromatik halkanın varlığını gösterirken 6.47 ve 6.33 ppm'de gözlenen *trans* olefinik proton sinyalleri ( $J_{7-8}=16$  Hz) ve bu protonlarla etkileşen bir hidroksimetilen grubu ( $\delta_H$  4.10, 2H, *dd*,  $J=4.8/4$  Hz, H<sub>2</sub>-9), bileşiğin CA-9 gibi fenil propanoit iskelete sahip olduğunu düşündürmüştür. Bunun yanında  $\delta_H$  3.77'de gözlenen 6 proton şiddetindeki singlet sinyal, aromatik halka üstünde iki metoksi grubunun bulunduğunu göstermiştir. Aromatik halka üstünde yer alan 2 proton ve metoksi grubu kaynaklı metil protonlarının kendi içinde özdeş olması yapıda simetrik yerleşime işaret etmiştir.  $\delta_H$  4.90'da gözlenen bir adet anomerik proton ve 3.10-3.70 ppm aralığında gözlenen multipler sinyaller yapıya bir oz ünitesinin bağlı olduğunu göstermiştir. Anomerik protonda gözlenen yarımlama sabitinden ( $d$ ,  $J=7.2$  Hz) hareketle oz ünitesinin  $\beta$ -konfigurasyona sahip olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen veriler literatür ile birlikte değerlendirildiğinde, molekülün yapısının siringin olduğu belirlenmiştir (61, 101).

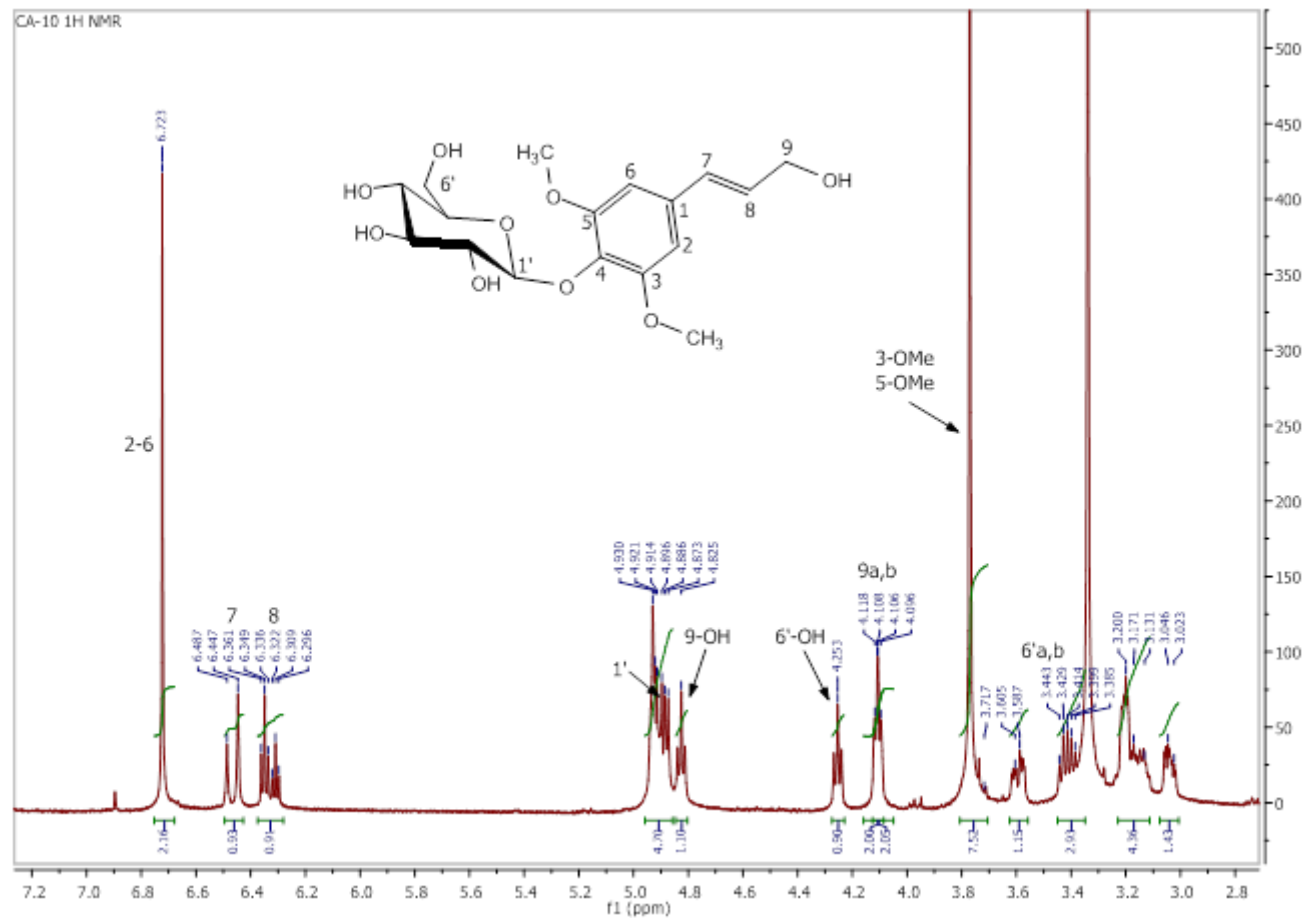
**Tablo 22.** CA-10 <sup>1</sup>H NMR verileri (CD<sub>3</sub>OD)

H/C	Mult.	$\delta_H$	<i>J</i> (Hz)
1	C		
2	CH	6.72	<i>s</i>
3	C		
4	C		
5	C		
6	CH	6.72	<i>s</i>
7	CH	6.47	<i>d</i> (16)
8	CH	6.33	<i>dt</i> (16/4.8)
9	CH <sub>2</sub>	4.09	<i>dd</i> (4.8/4)
3-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.77	<i>s</i>
5-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.77	<i>s</i>
Glukoz			
1'	CH	4.90	<i>d</i> (7.2)
2'	CH	3.00-3.50	<i>m</i> †
3'	CH	3.00-3.50	<i>m</i> †
4'	CH	3.00-3.50	<i>m</i> †
5'	CH	3.00-3.50	<i>m</i> †
6'	CH <sub>2</sub>	3.59	<i>dd</i> (12/4.8)
		3.43	<i>m</i> †

† Sinyal örtüşmesi nedeniyle *J* değeri ölçülememiştir.



**Spektrum 40.** CA-10 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)

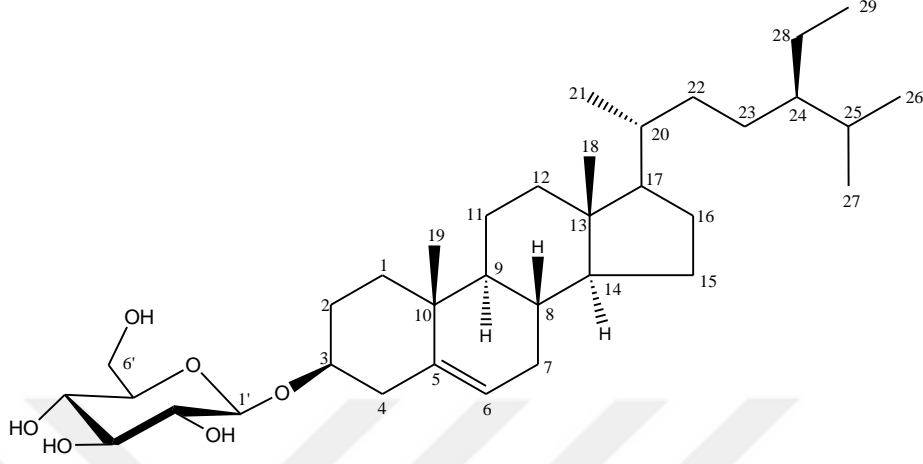


Spektrum 41. CA-10 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)

#### 4.1.1.4.FİTOSTEROL

#### CA-11

#### $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozit



Beyaz renkli ve yağmsı bir halde elde edilen CA-11 kodlu bileşik, İTK plağında, UV aktif olmayan, V/S reaktifi ile pembeden mor renge dönen bir bant halinde gözlenmiştir. Moleküle ait İTK profili ( $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O, 90:10:1;  $R_f \sim 0.4$ ) ve reaktifle görülen renk değişimi değerlendirildiğinde, molekülün daha önce *C. cadmea*'dan izole edilen  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozit ile aynı olabileceği düşünülmüştür. Mevcut örnek ile farklı sistemlerde İTK karşılaştırmalarının sonucunda maddelerin aynı olduğu belirlenmiştir (102).



**Resim 3.** CA-11 İTK profili (F: CA-11;  $\beta$ -sitosterol-3-O- $\beta$ -D-glukopiranozit); Silika jel alüminyum plak; Çözgen sistemi:  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (90:10:1); V/S reaktifi)

#### 4.1.2. *Centaurea polyclada* D.C.

*C. polyclada* bitkisinin toprak üstü kısımlarından elde edilen CHCl<sub>3</sub> ekstresi ve MeOH ekstresinden hazırlanan *n*-BuOH ekstresi ile çeşitli kromatografik yöntemler (AKK, VSK, KFE ve İTK) kullanılarak izolasyon ve saflaştırma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Bitkinin CHCl<sub>3</sub> ve *n*-BuOH ekstresi ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmaları sonucunda beşi eleman türevi ve birisi ise ödesman türevi olmak üzere altı seskiterpen bileşiği (**CP 1 – CP-6**) elde edilmiştir.

Bunun yanında, CHCl<sub>3</sub> ekstresinden üç metoksi flavon türevi (**CP-7 – CP-9**) ve bir lignan (**CP-10**); *n*-BuOH ekstresinden ise bir fenolik glukozit (**CP 11**) ve bir fenilpropanoit glukoziti (**CP-12**) elde edilmiştir.

İzole edilen moleküllerin yapı tayinleri 1D (<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C) ve 2D (COSY, HSQC, HMBC) NMR ve kütle spektrumları değerlendirilerek gerçekleştirilmiştir. Bilinen bileşiklere ait yapılar ise (**CP-1 ve CP-7 – CP-12**) spektral verilerin literatür ile karşılaştırılmasıyla doğrulanmıştır.



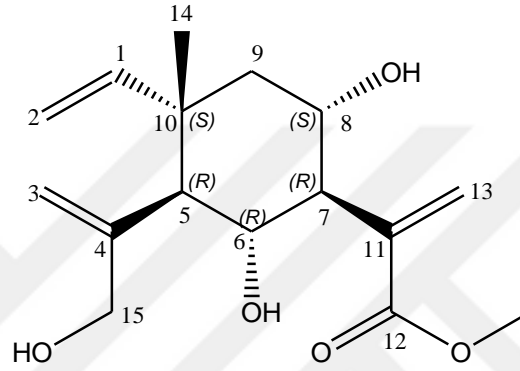
#### 4.1.2.1. SESKİTERPENLER

#### ELEMAN TİP SESKİTERPENLER

#### CP-1 ve CP-2

#### 6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit metil esteri

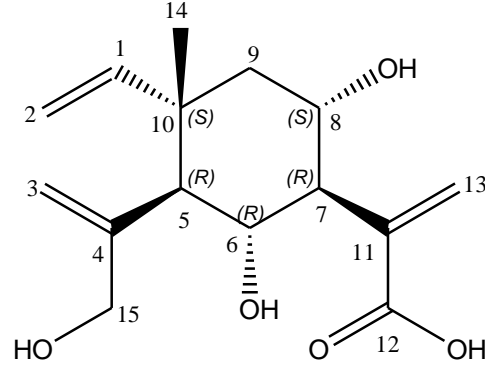
#### (CP-1)



Sinonim	: Metil 8 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oat
Formül	: C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub>
Molekül ağırlığı	: 296.1624
QTOF-MS <i>m/z</i>	: 319.1518 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>5</sub> Na: 319.1521), Spektrum 42
<sup>1</sup> H NMR	:Spektrum 43, Tablo 23
<sup>13</sup> C NMR	:Spektrum 44, Tablo 23
COSY	:Spektrum 45
HSQC	:Spektrum 46
HMBC	: Spektrum 47, Spektrum 48

**6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit**

**(CP-2)**



Sinonim	: Sikloheksanasetik asit-4-etenil-2,6-dihidroksi-3-[1-(hidroksimetil)-etenil]-4-metil- $\alpha$ -metilen
Formül	: C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>
Molekül ağırlığı	: 282.1467
QTOF-MS <i>m/z</i>	: 587.2832 [2M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>30</sub> H <sub>44</sub> O <sub>10</sub> Na: 587.2832), Spektrum 49 281.1371 [M-H] <sup>-</sup> (C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> O <sub>5</sub> : 281.1389), Spektrum 49
<sup>1</sup> H NMR	:Spektrum 50, Tablo 23
<sup>13</sup> C NMR	:Spektrum 51, Tablo 23

Sarımsı zamk halinde elde edilen CP-1 kodlu bileşik, İTK profilinde zayıf UV<sub>254</sub> aktif ve V/S reaktifi ile mor renkten kahverengiye dönen bir bant halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 90:10:1; R<sub>f</sub>~0.35). Açık sarı renkli zamk halinde elde edilen CP-2 kodlu bileşik ise, İTK plağında, CP-1'den daha polar, UV aktif olmayan (254 ve 366 nm) ve V/S reaktifi ile açıktan koyu kahverengiye dönen bir bant şeklinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 70:30:3; R<sub>f</sub>~0.35).

CP-1'in molekül formülü, QTOF kütle spektrumunda gözlenen *m/z* 587.2832 [2M+Na]<sup>+</sup> ve 281.1371 [M-H]<sup>-</sup> moleküler iyonlar ile <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen sinyallerden hareketle C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>5</sub> olarak belirlenmiştir. Moleküle ait <sup>1</sup>H-NMR spektrumu incelendiğinde, düşük alanda görülen ekzosiklik metilen grubuna ait karakteristik iki dublet proton ( $\delta_H$  6.34 ve 5.75, *J*=1.6 Hz, H<sub>2</sub>-13); hidroksimetilen grubuna işaret eden AB sistemi şeklinde yarılmış dublet sinyaller ( $\delta_H$  3.89 ve 3.99, *J*=14.4 Hz, H<sub>2</sub>-15) ve yüksek alanda  $\delta_H$  1.13'de gözlenen 3 proton şiddetindeki singlet metil rezonansı, bileşiğin seskiterpen yapıda olduğunu düşündürmüştür.

$\delta_H$  4.93 ve 5.34'de gözlenen geniş singlet sinyaller (H<sub>2</sub>-3) ve birbiri ile *cis* ve *trans* yarıma sabiti veren monosüstitüe çift bağ sistemine ait 3 rezonans ( $\delta_H$  5.76 *dd*,  $J_{1-2a}=10.4$  ve  $J_{1-2b}=18$ , H-1; 4.93 *dd*, H<sub>2</sub>-2) eleman tip bir seskiterpen yapıya işaret etmiştir. Bunun yanında  $\delta_H$  3.76'da görülen 3 protonluk alana sahip singlet sinyal, molekül üzerinde bir metoksi grubunun varlığına işaret etmiş ve <sup>13</sup>C NMR spektrumunda 52.1 ppm'de görülen rezonans bu görüşü desteklemiştir. HMBC spektrumunda gözlenen korelasyonlardan hareketle, metil grubunun C-10 ( $\delta_C$  41.0), hidroksimetilen grubunun C-4 ( $\delta_C$  148.3), metoksi grubunun ise C-12 ( $\delta_C$  168.7) karbonları üzerinde yer aldığı belirlenmiştir.

Molekülün stereomerkezlerine ait relatif konfigürasyonlar, <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR verilerinin literatür verileriyle karşılaştırılması ve protonlar arasında görülen yarıma sabitlerinden hareketle belirlenmiştir. Eleman tip seskiterpenlerde C-8 üzerinde yer alan hidroksil grubunun  $\alpha$  konfigürasyonda bulunduğu bildirilmiştir. Protonlara ait yarıma sabitleri ( $J_{7-8}=10.4$  Hz,  $J_{6-7}=10.4$  Hz,  $J_{5-6}=10.8$  Hz) H5/H6, H6/H7 ve H7/H8'in transdiaksiyal yerleştiğini göstermiştir. Biyosentetik temeller ışığında, H8'in ( $\beta$ ) konfigürasyonda olduğu kabul edildiğinde, H5, H6 ve H7 protonlarının sırasıyla  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\alpha$  konfigürasyonda buldukları belirlenmiştir.

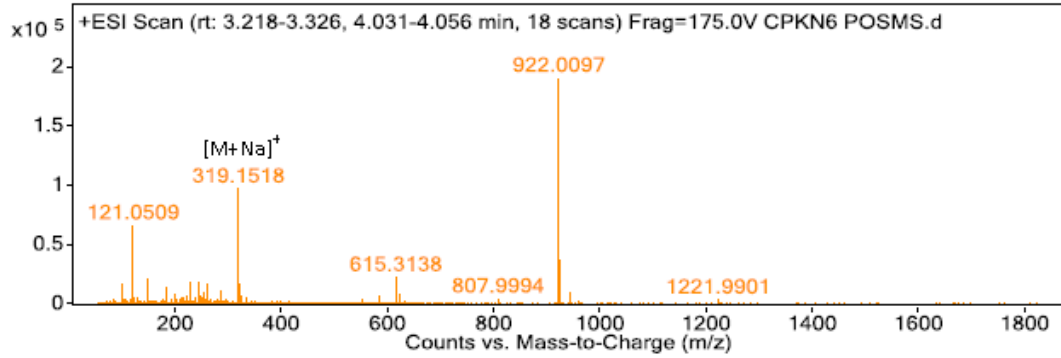
CP-2 kodlu moleküle ait kütle spektrumunda gözlenen  $m/z$  587.2832 [2M+Na]<sup>+</sup> ve 281.1371 [M-H]<sup>-</sup> moleküler iyon pikleri, <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile birlikte değerlendirildiğinde, molekülün kapalı formülü C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub> olarak belirlenmiştir. Moleküle ait <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının incelenmesi ve verilerin CP-1'den elde edilen veriler ile karşılaştırılması ile moleküllerin yapısal olarak benzer olduğu belirlenmiştir. Fakat CP-1 molekülünde yer alan metoksi grubuna ait proton ve karbon sinyallerinin bulunmadığı belirlenmiştir.

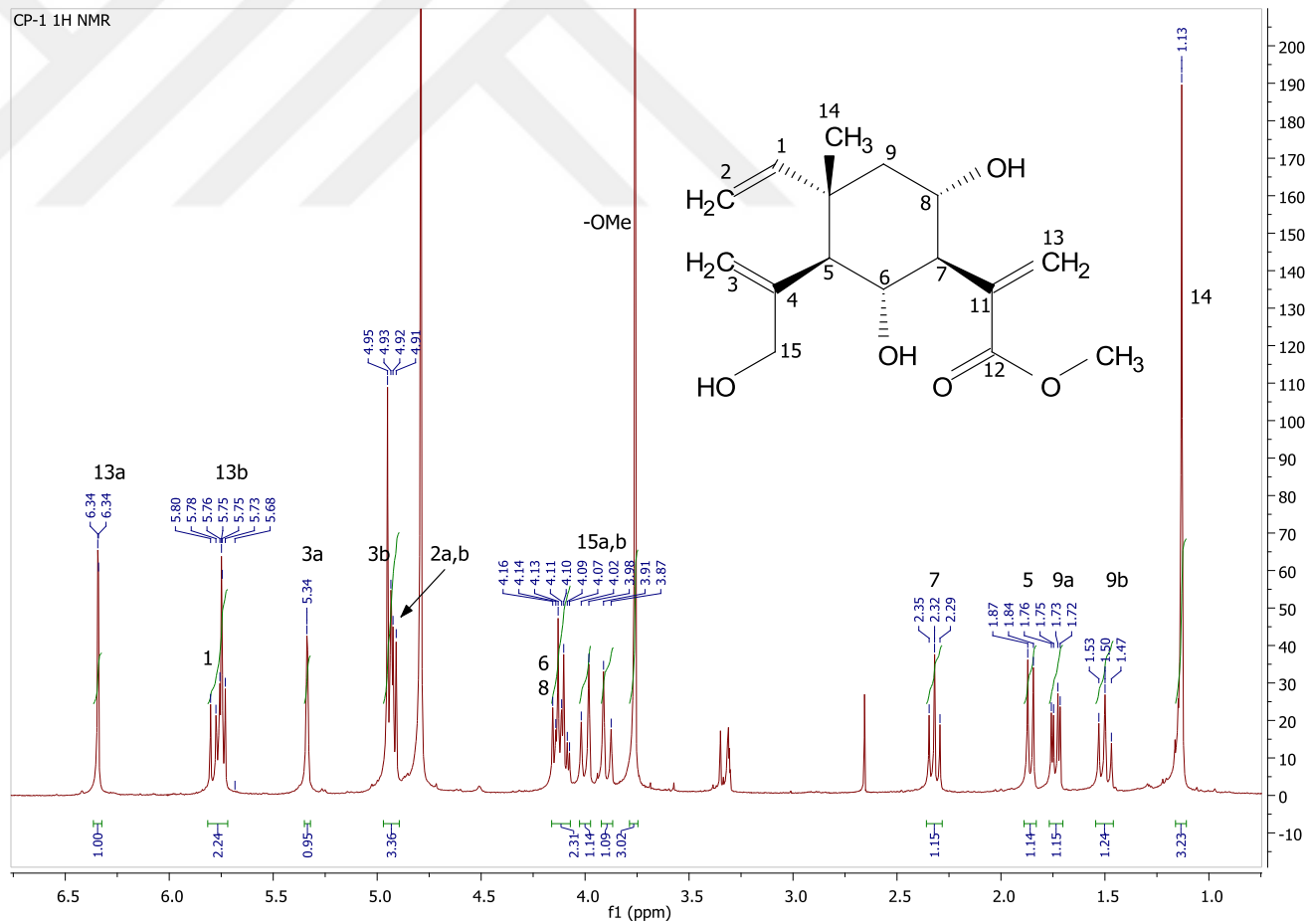
Elde edilen verilerin literatür ile karşılaştırılması sonucunda CP-2 kodlu molekülün yapısı 8 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit olarak belirlenmiştir. CP-1 kodlu bileşiğin ise CP-2'nin metil esteri olduğu ve spektral verilerin daha önce *C. aspera* var. *subinermis*'den izole edilmiş olan metil 6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oat ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (3, 103).

**Tablo 23.** CP-1 ve CP-2'ye ait  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

H/C	Mult.	CP-1			CP-2		
		$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	CH	5.76	<i>dd</i> (18/10.4)	149.0	5.76	<i>dd</i> (18/10.4)	149.2
2	CH <sub>2</sub>	4.93	<i>dd</i> (10.8/6.4)	111.4	4.91	<i>dd</i> (11.2/6)	111.3
3	CH <sub>2</sub>	5.34	<i>g s</i>	112.0	5.33	<i>g s</i>	11.9
		4.93	<i>g s</i>		4.94	<i>g s</i>	
4	C			148.3			148.5
5	CH	1.85	<i>d</i> (10.8)	56.7	1.87	<i>d</i> (10.8)	56.7
6	CH	4.13	<i>dd</i> (10.8/10.4)	71.6	4.10	<i>t</i> (10.4)	72.5
7	CH	2.32	<i>t</i> (10.4)	60.6	2.33	<i>dd</i> (10.8/10.4)	59.7
8	CH	4.11	<i>td</i> (10.8/4.4)	68.2	4.08	<i>td</i> (10.4/4)	68.9
9	CH <sub>2</sub>	1.74	<i>dd</i> (12.4/4)	49.6	1.73	<i>ddd</i> (12.8/12.4/4)	49.8
		1.50	<i>dd</i> (12.4/12)		1.50	<i>t</i> (12)	
10	C			41.0			41.0
11	C			140.2			142.5
12	C			168.7			166.8
13	CH <sub>2</sub>	6.34	<i>d</i> (1.6)	129.4	6.22	<i>g s</i>	125.4
		5.75	<i>d</i> (1.6)		5.62	<i>g s</i>	
14	CH <sub>3</sub>	1.13	<i>s</i>	19.4	1.11	<i>s</i>	19.4
15	CH <sub>2</sub>	3.99	<i>d</i> (14.4)	67.6	3.99	<i>d</i> (14.4)	67.7
		3.89	<i>d</i> (14.4)		3.89	<i>d</i> (14.8)	
-OMe	CH <sub>3</sub>	3.76	<i>s</i>	52.1			

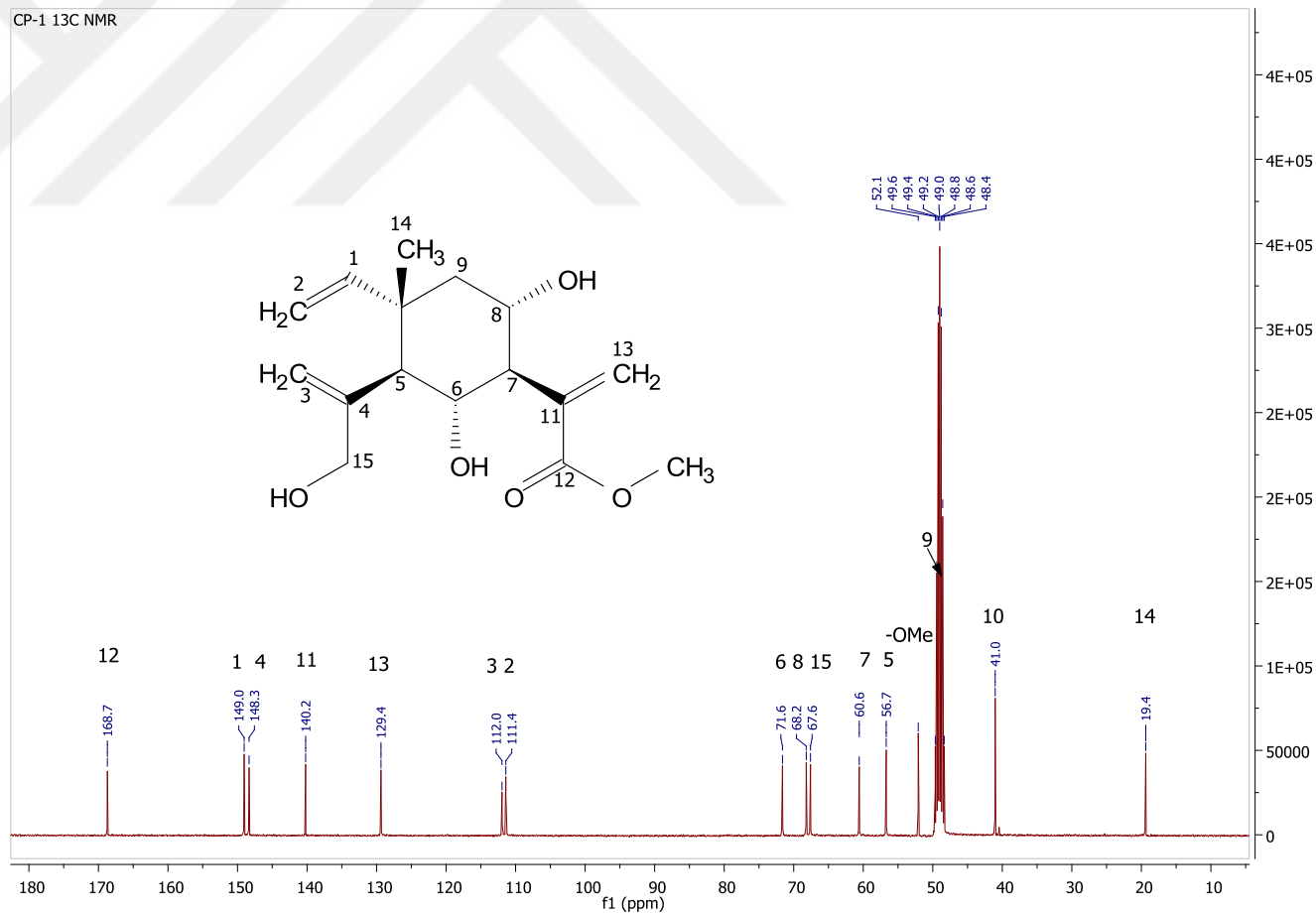
Spectrum Source: Peak (2) in "+ BPC(all [-1]) Scan 5mo - CPKN6 POSMS.d"  
Fragmentor Voltage: 175  
Collision Energy: 0  
Ionization Mode: ESI

**Spektrum 42.** CP-1 QTOF kütle spektrumu (Pozitif mod)

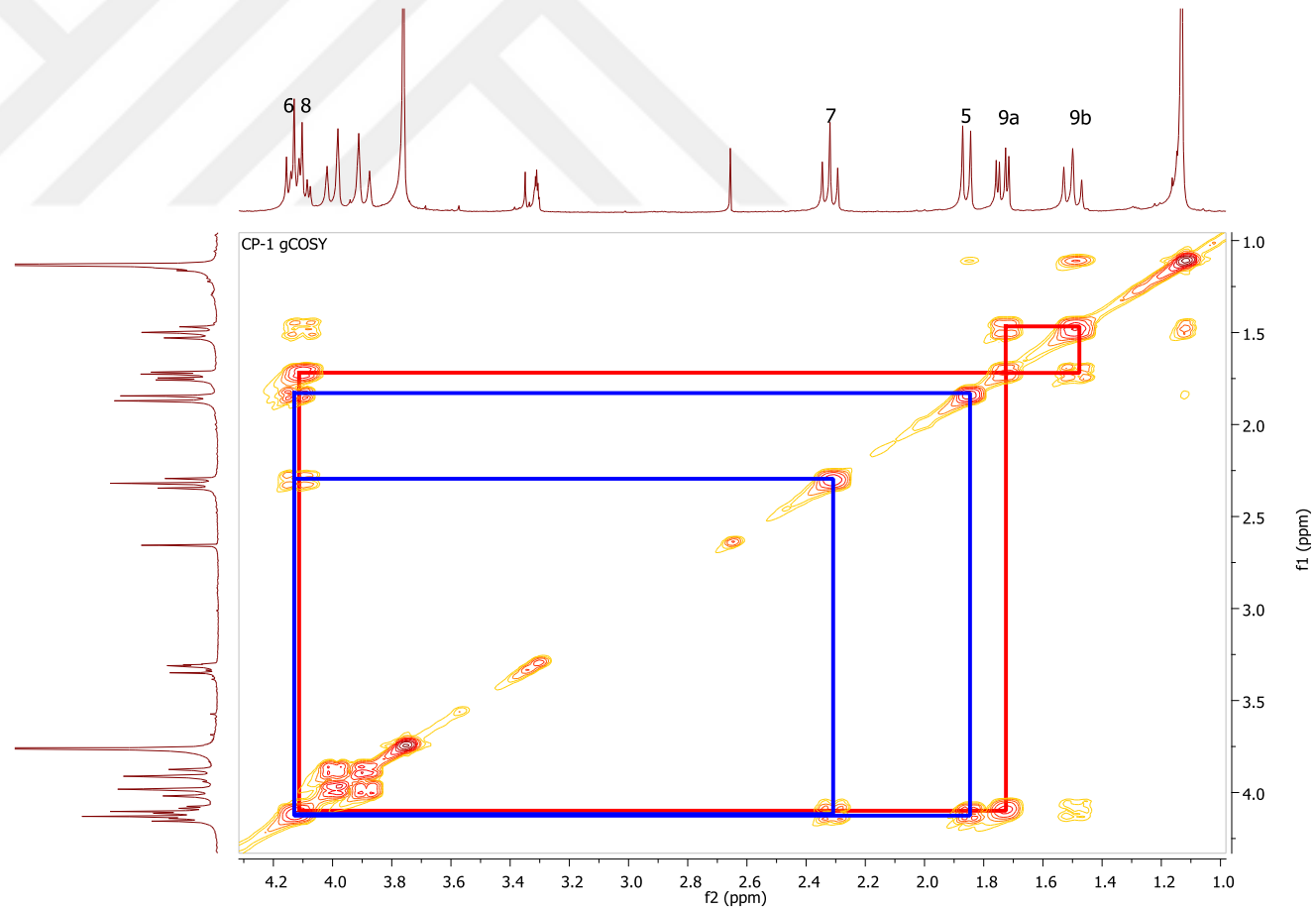


Spektrum 43. CP-1 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

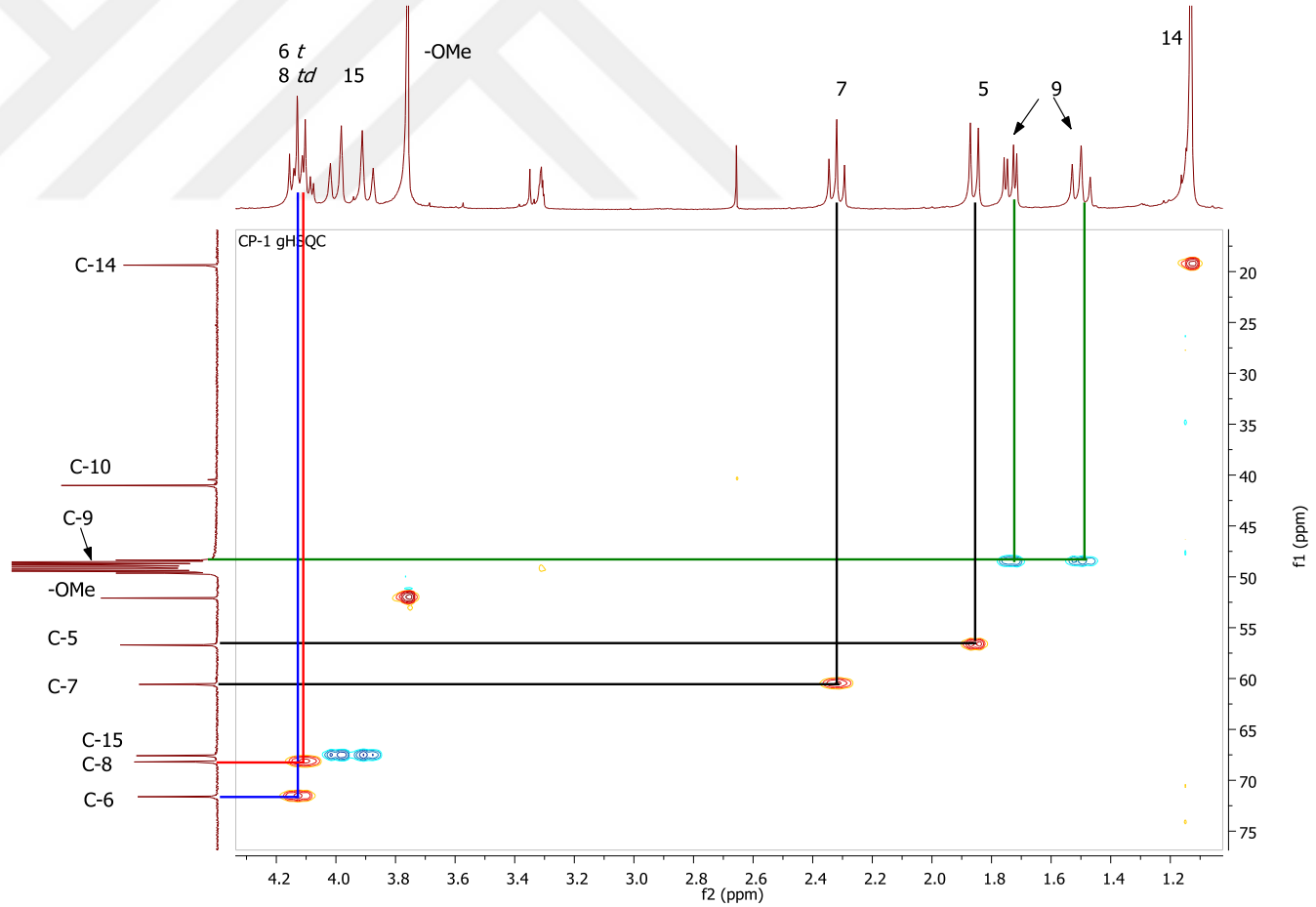
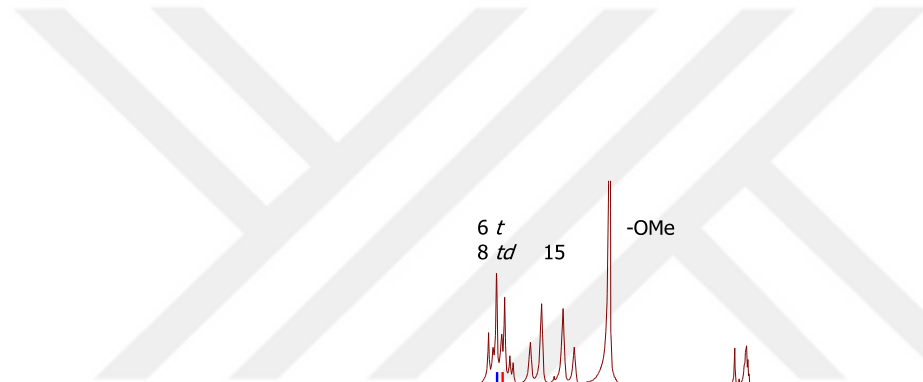
CP-1 <sup>13</sup>C NMR



**Spektrum 44.** CP-1 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

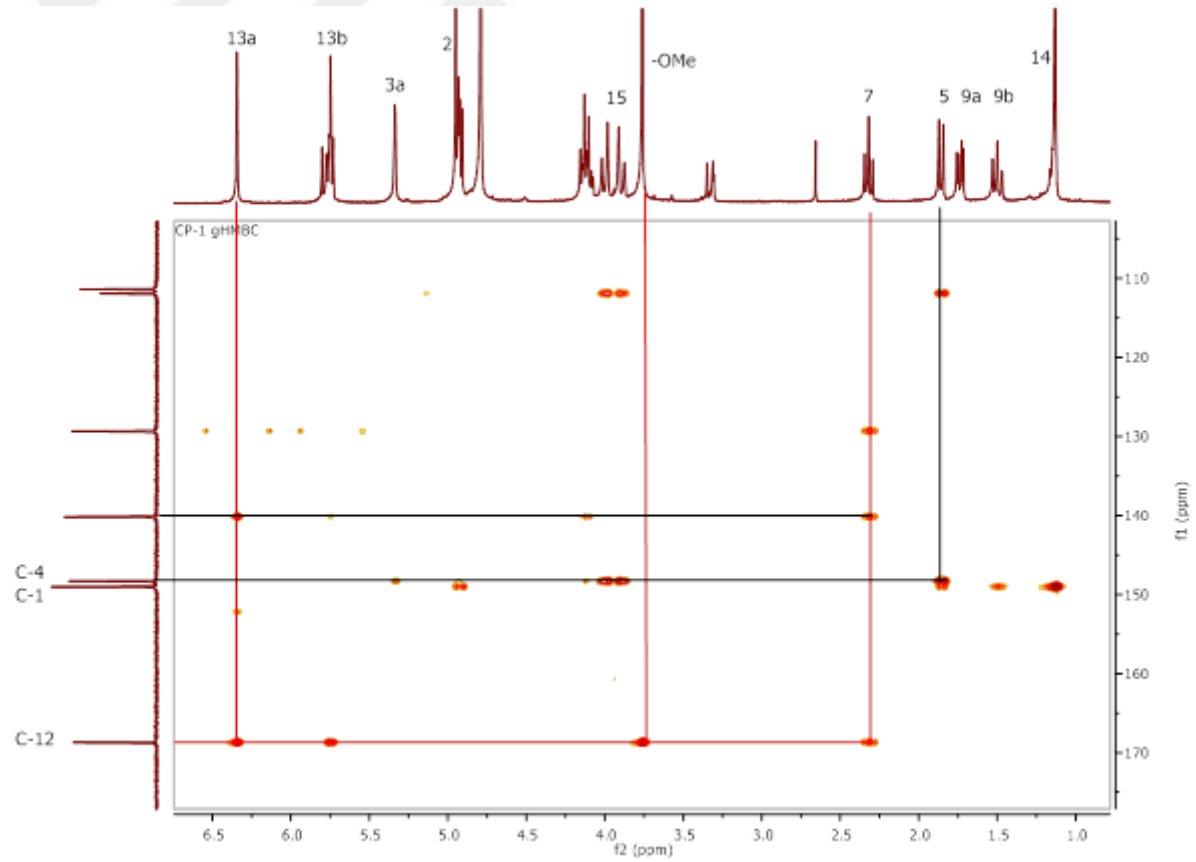


**Spektrum 45.** CP-1 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)

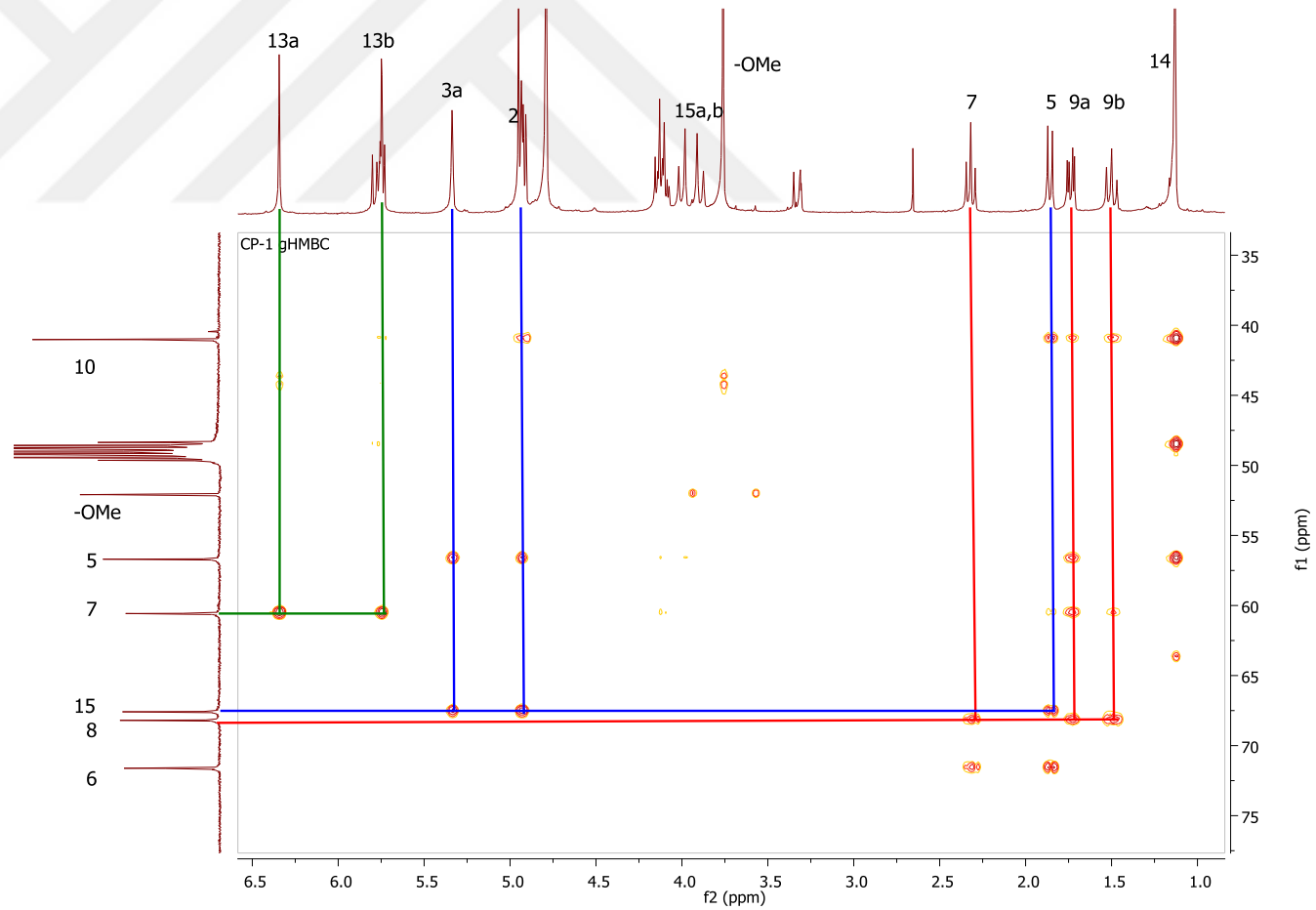
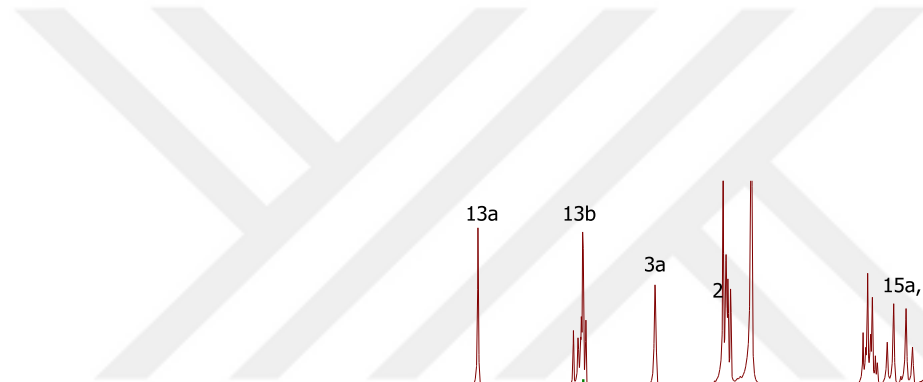


**Spektrum 46.** CP-1 2D <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C heteronükleer korelasyonlu NMR spektrumu (HSQC)

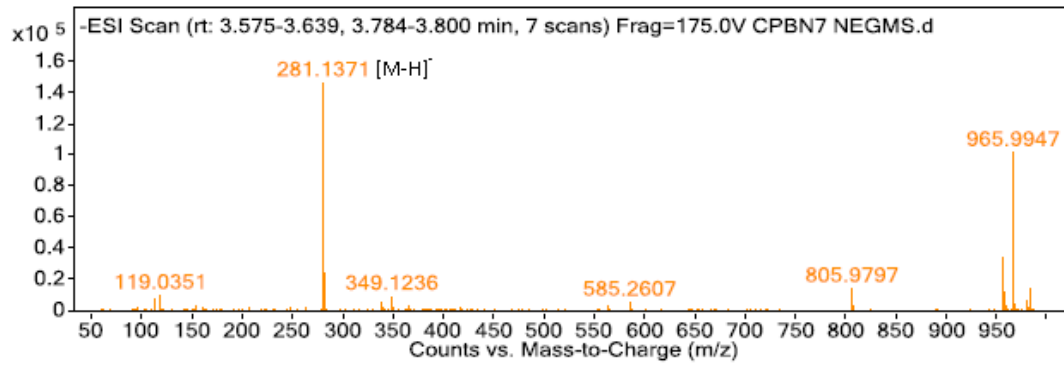
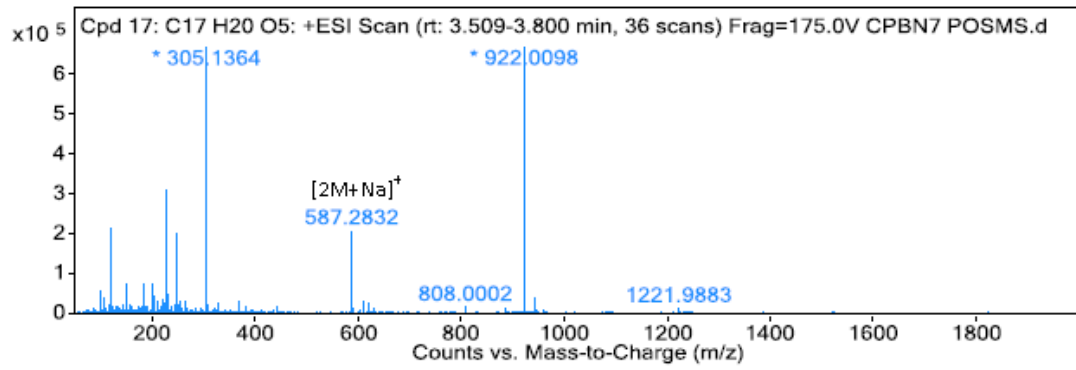




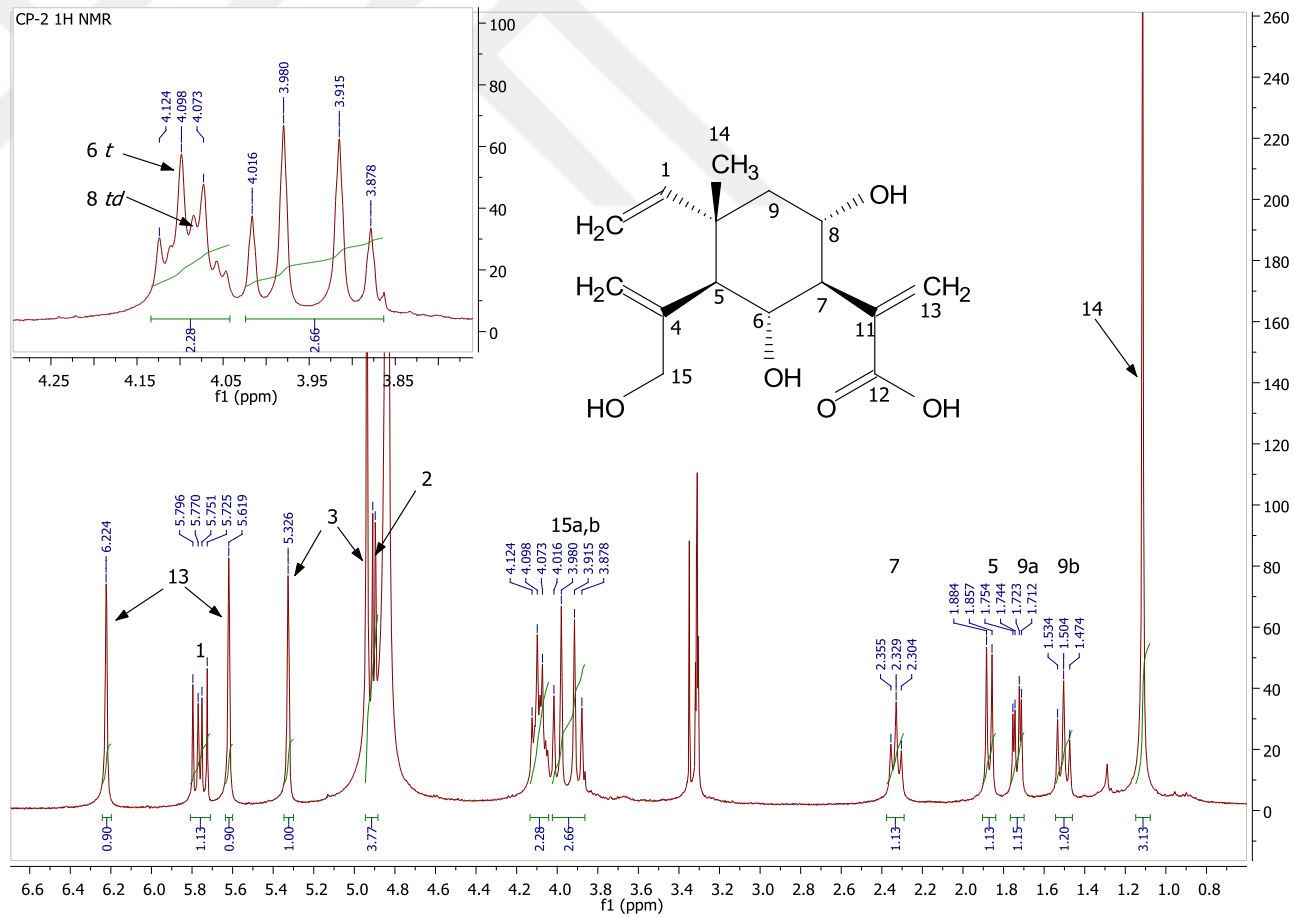
**Spektrum 47.** CP-1 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-1



**Spektrum 48.** CP-1 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-2

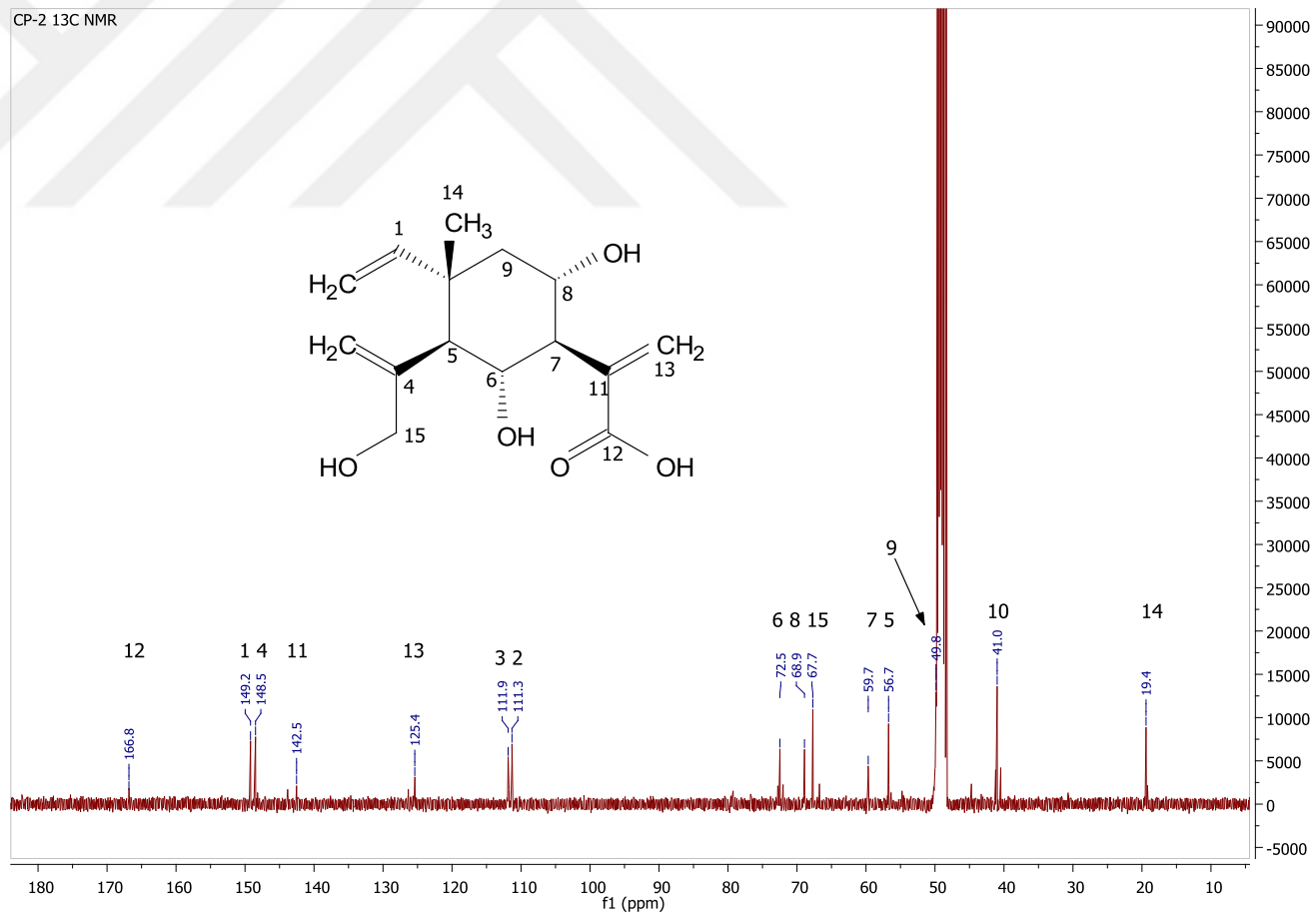


**Spektrum 49.** CP-2 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod)



Spektrum 50. CP-2 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

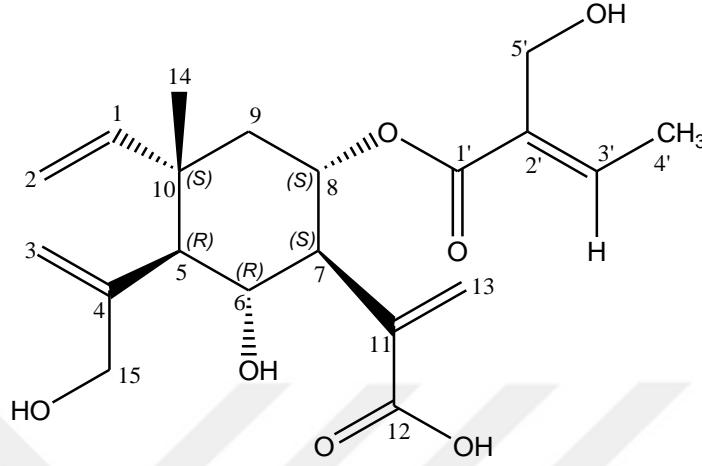
CP-2 13C NMR



Spektrum 51. CP-2 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

### CP-3

#### 8 $\alpha$ -O-[2'-(hidroksimetil)-but-2'-enoil]-6 $\alpha$ ,15-dihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit



Formül	: C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub>
Molekül ağırlığı	: 380.1835
QTOF-MS <i>m/z</i>	: 403.1726 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> O <sub>7</sub> Na: 403.1733) Spektrum 52 379.1590 [M-H] <sup>-</sup> (C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> O <sub>7</sub> : 379.1757) Spektrum 52
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 53, Spektrum 54, Tablo 24
<sup>13</sup> C NMR	: Spektrum 55, Tablo 24
COSY	: Spektrum 56
HSQC	: Spektrum 57
HMBC	: Spektrum 58, Spektrum 59
Optik rotasyon [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	+27 (c. 0.003, MeOH)
IR $\nu_{\max}$	= 3405, 2931, 1702, 1396, 1238, 1165, 1052, 1002, 915

Sarımsı zambak halinde elde edilen CP-3 kodlu bileşik, İTK plağında zayıf UV<sub>254</sub> aktivite gösteren ve V/S reaktifi ile kahverengiye dönen bir spot şeklinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 80:20:1; R<sub>f</sub>~0.3).

CP-3'e ait QTOF kütle spektrumunda görülen *m/z* 403.1726 [M+Na]<sup>+</sup> ve 379.1590 [M-H]<sup>-</sup> moleküler iyonları ile <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen rezonanslardan hareketle molekülün formülü C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>O<sub>7</sub> olarak belirlenmiştir.

1D ve 2D NMR spektrumları incelendiğinde, 6.30 ppm'de gözlenen bir olefinik proton (H-3'), 4.16 ve 4.10 ppm'de AB sistemi şeklinde görülen iki dublet rezonans (H<sub>2</sub>-5') ve 1.97 ppm'de görülen dublet metil protonu (H-4') ile bu protonlarla HMBC spektrumunda uzak mesafe etkileşimi veren beş karbon sinyali (<sup>1</sup>H: δ 6.30, *qd*, H-3'; 4.16 ve 4.10, *dd*, H<sub>2</sub>-5'; 1.97, *dd*, H-4'; <sup>13</sup>C: δ 167.5, C-1'; 133.6, C-2'; 139.1, C-3', 15.7, C-4' ve 63.9, C-5') literatür verileriyle karşılaştırılmış ve bu yapısal parçanın, *Centaurea* türlerinden elde edilen seskiterpenlerde yan zincir olarak rastlanan 2-(hidroksimetil)-but-2-enoik asit ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (3, 104).

2-(hidroksimetil)-but-2-enoik asit yapısına ait rezonansların tespitinden sonra, δ<sub>H</sub> 6.28 ve 5.75'de (H<sub>2</sub>-13) görülen ve bir ekzosiklik metilen grubuna işaret eden iki singlet sinyal; AB sistemi şeklinde yarılmış iki dublet proton (δ<sub>H</sub> 4.01 ve 3.91, *J*=14.8 Hz, H<sub>2</sub>-15); δ<sub>H</sub> 1.21'de gözlenen 3 protonluk singlet metil rezonansı (H-14); δ<sub>H</sub> 5.35 ve 4.97'de gözlenen geniş singlet sinyaller (H<sub>2</sub>-3) ve ilave olefinik protonların varlığı (δ<sub>H</sub> 5.77; *dd*; *J*<sub>1-2a</sub>=10.8 ve *J*<sub>1-2b</sub>=18, H-1; 4.94 d, *J*=10.8 ve 4.92 d, *J*=17.6, H<sub>2</sub>-2) molekülün eleman tip bir seskiterpen olduğunu göstermiştir.

<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumunda, H-8'e ait triplet dublet protonun 5.53 ppm'e, (düşük alana doğru) kayması, C8-OH grubundan bir açılasyon olduğunu ve 2-(hidroksimetil)-but-2-enoil fragmentinin bu noktadan bağlı olabileceğini düşündürmüştür. HMBC spektrumunda C-1' (δ<sub>C</sub> 167.5) ve H-8 arasında gözlenen uzak mesafe korelasyonu ile bu öngörü doğrulanmıştır.

Molekülün stereomerkezlerine ait relatif konfigürasyonlar, <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR verilerinin literatür ile karşılaştırılması ve protonlar arasında görülen yarıлма sabitlerinden hareketle belirlenmiştir. Protonlara ait yarıлма sabitleri değerlendirildiğinde (*J*<sub>7-8</sub>=11.2 Hz, *J*<sub>6-7</sub>=10.4 Hz, *J*<sub>5-6</sub>=10.8 Hz) H5/H6, H6/H7 ve H7/H8'in transdiaksiyal yerleştiği belirlenmiştir. Biyosentetik temeller ışığında, H8'in (β) konfigürasyonda olduğu kabul edildiğinde H5, H6 ve H7 protonlarının sırasıyla α, β ve α konfigürasyona sahip olduklarına karar verilmiştir.

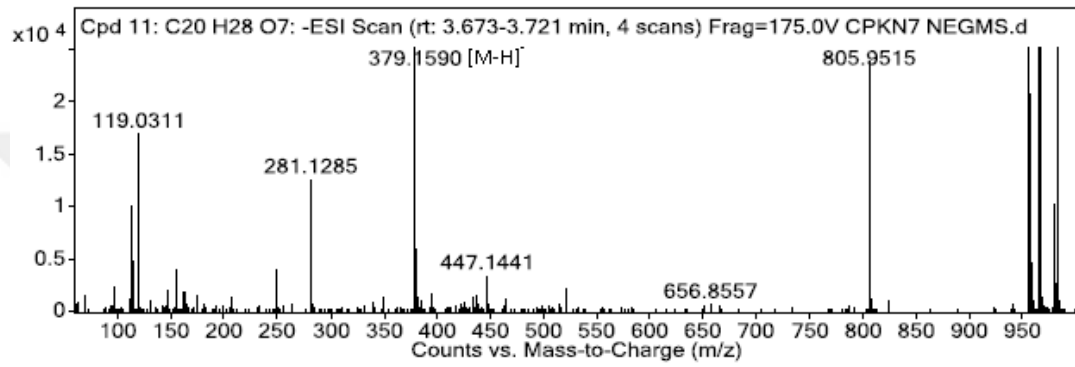
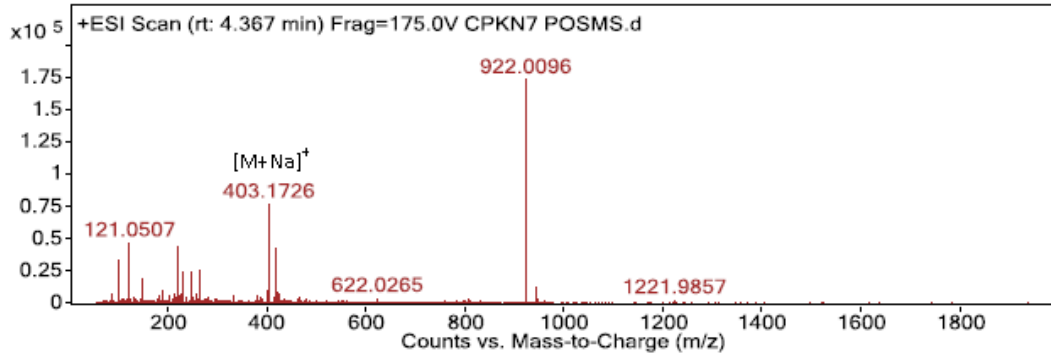
Spektral verilerimiz literatür ile karşılaştırılarak, CP-3 kodlu molekülün yapısı 8 $\alpha$ -O-[2'-(hidroksimetil)-but-2'-enoil]-6 $\alpha$ ,15-dihidroksi-elema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit olarak saptanmıştır (3).

**Tablo 24.** CP-3  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

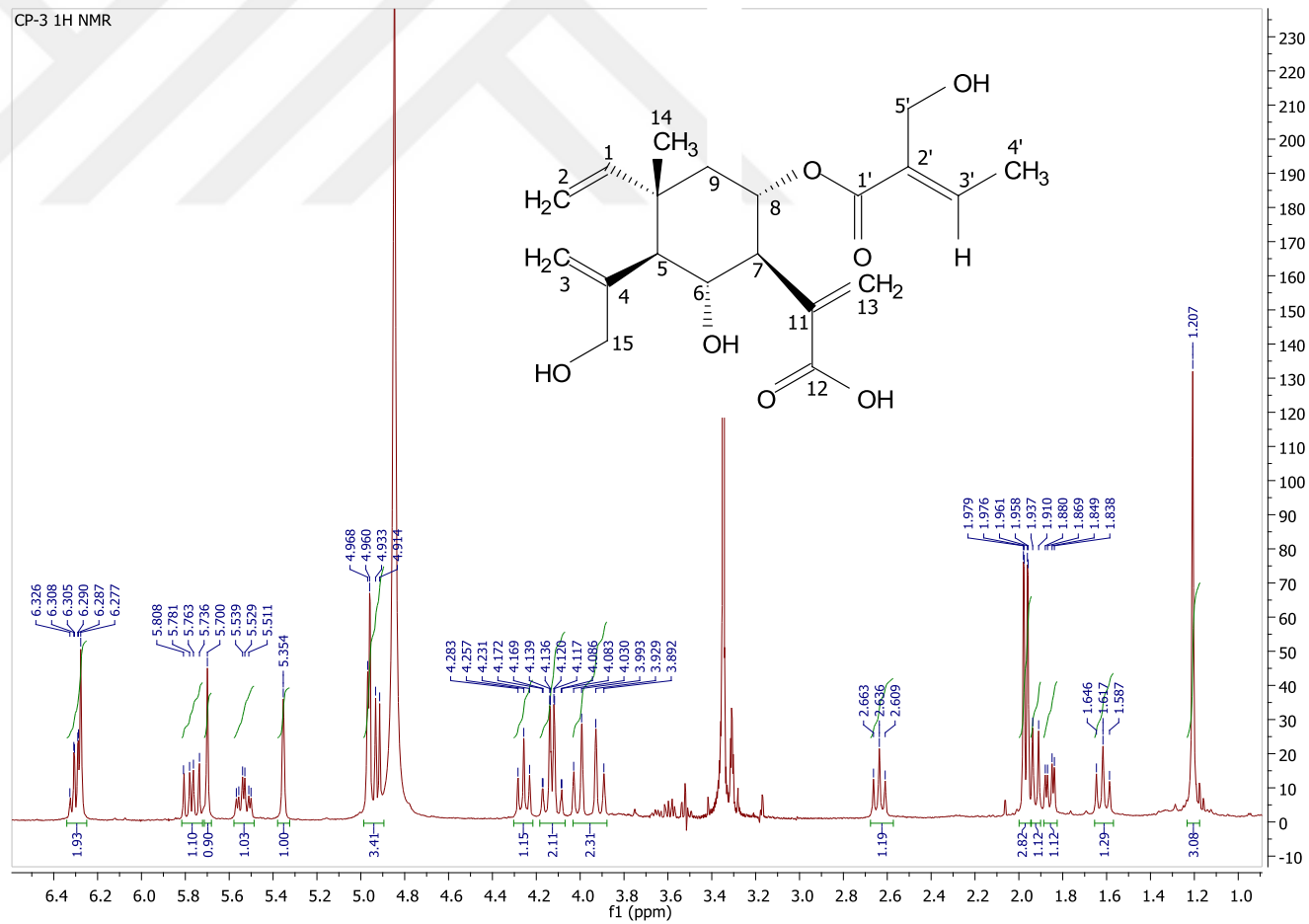
H/C	Mult.	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	CH	5.77	<i>dd</i> (18/10.8)	148.5
2	CH <sub>2</sub>	4.94	<i>d</i> (10.8)	111.8
		4.92	<i>d</i> (17.6)	
3	CH <sub>2</sub>	5.35	<i>g s</i>	112.0
		4.97	<i>g s</i>	
4	C			148.1
5	CH	1.92	<i>d</i> (10.8)	56.6
6	CH	4.26	<i>t</i> (10.4)	72.0
7	CH	2.64	<i>t</i> (10.8)	56.9
8	CH	5.53	<i>td</i> (11.2/4)	72.0
9	CH <sub>2</sub>	1.86	<i>dd</i> (12.4/4.4)	44.8
		1.62	<i>dd</i> (12/11.6)	
10	C			41.2
11	C			140.8
12	C			170.4
13	CH <sub>2</sub>	6.28	<i>g s</i>	128.7
		5.70	<i>g s</i>	
14	CH <sub>3</sub>	1.21	<i>s</i>	19.1
15	CH <sub>2</sub>	4.01	<i>d</i> (14.8)	67.6
		3.91	<i>d</i> (14.8)	
1'	C			167.5
2'	C			133.6
3'	CH	6.30	<i>qd</i> (7.2/1.2)	139.1
4'	CH <sub>3</sub>	1.97	<i>dd</i> (7.2/1.2)	15.7
5'	CH <sub>2</sub>	4.16	<i>dd</i> (13.6/1.2)	63.9
		4.10	<i>dd</i> (13.6/1.2)	



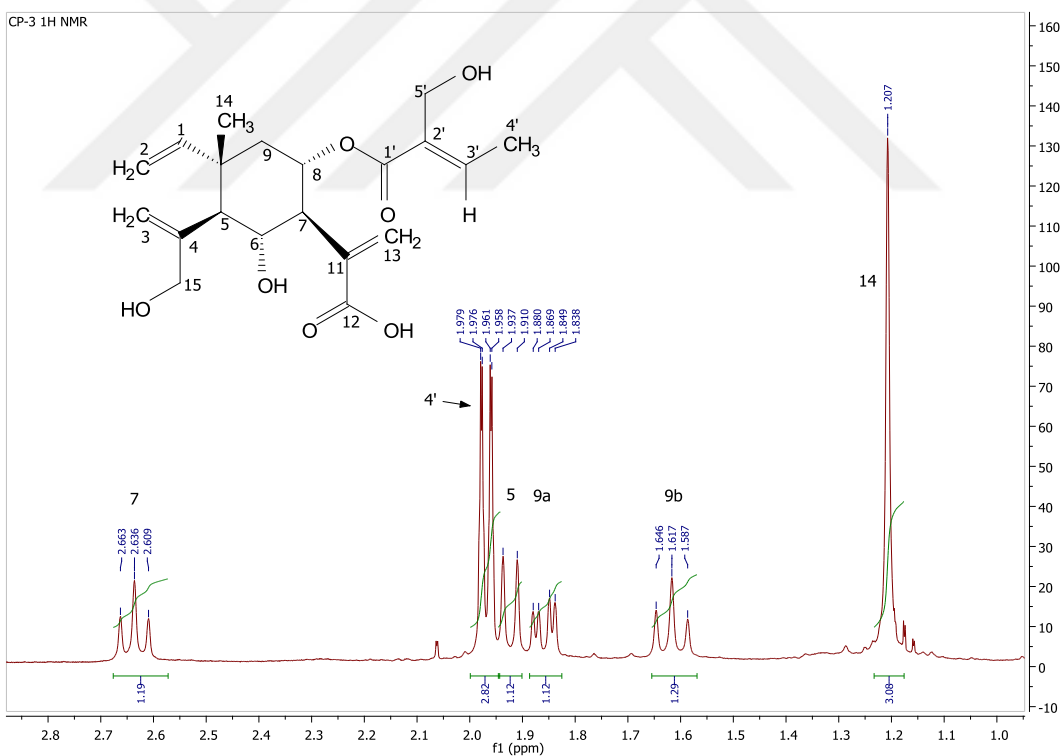
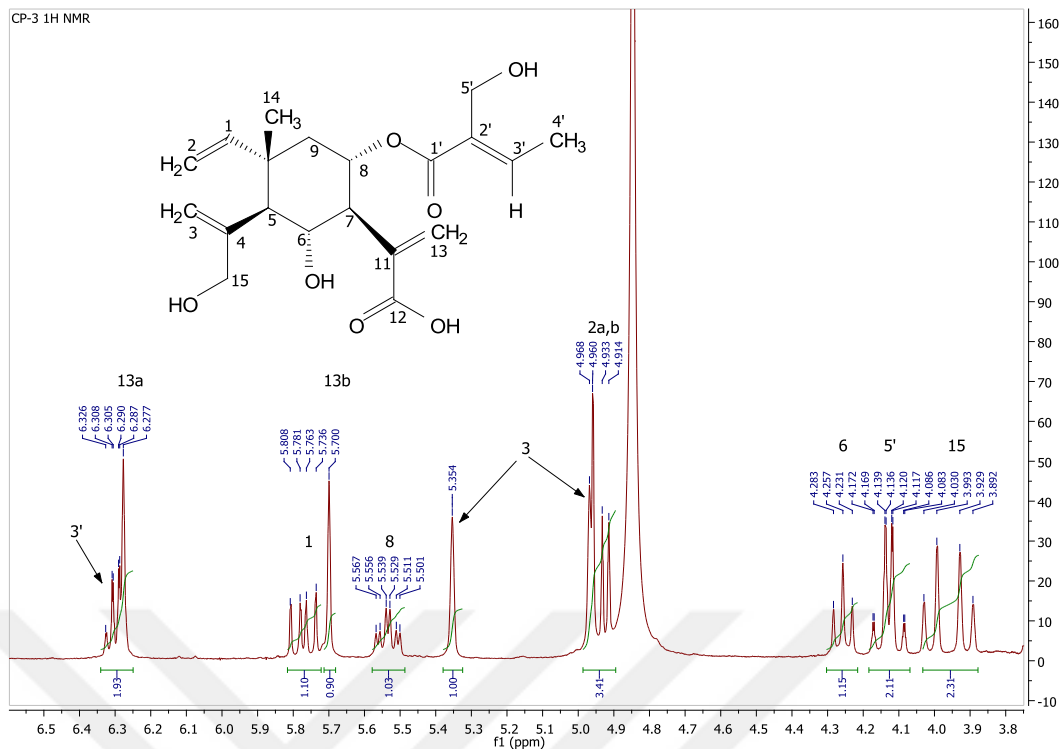
Spectrum Source Peak (1) in "+ BPC(all [-1]) Scan Smo - CPKN7 POSMS.d" Fragmentor Voltage 175 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



Spektrum 52. CP-3 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod)

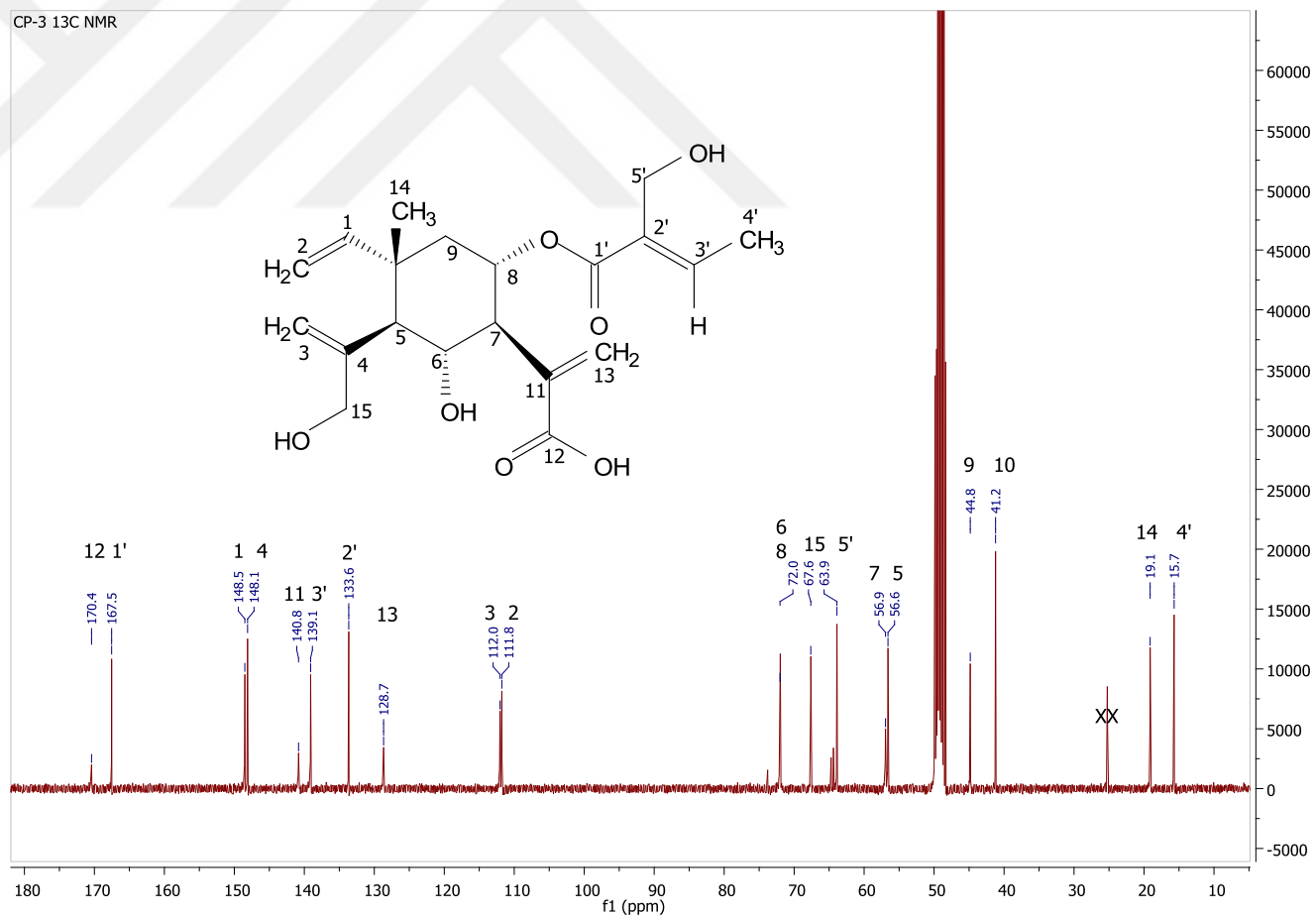


Spektrum 53. CP-3 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)-1

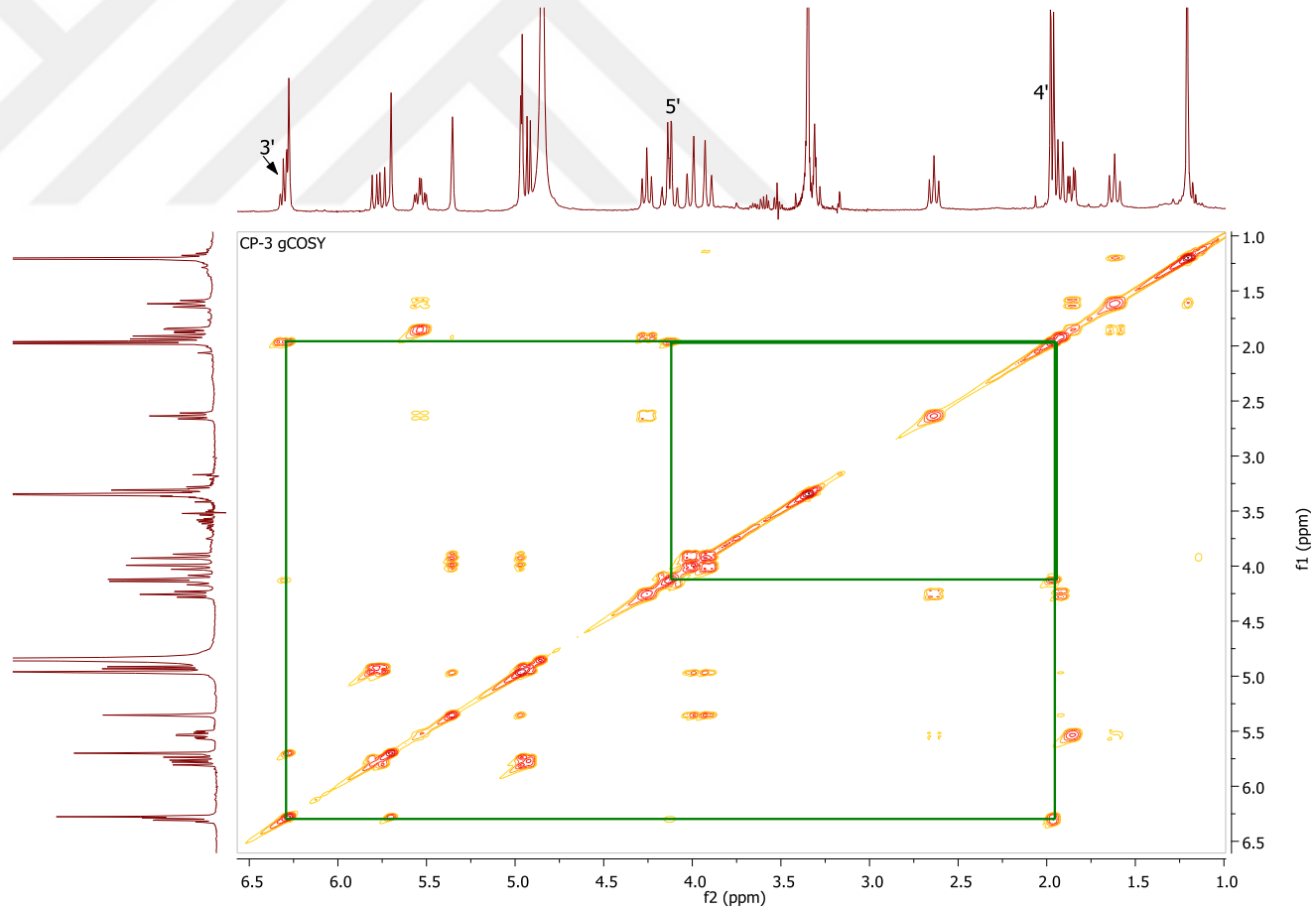


**Spektrum 54.** CP-3 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)-2

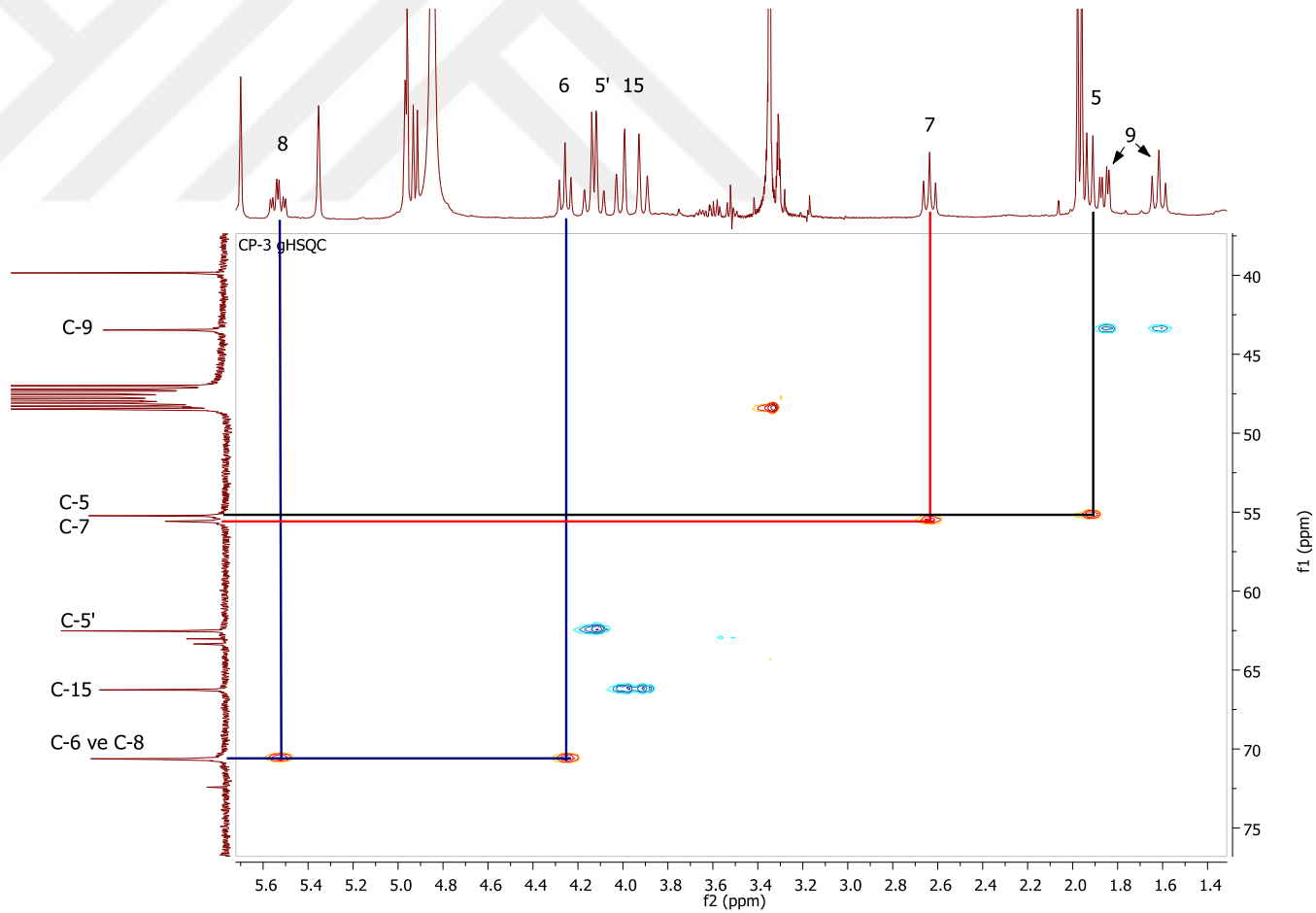
CP-3 <sup>13</sup>C NMR



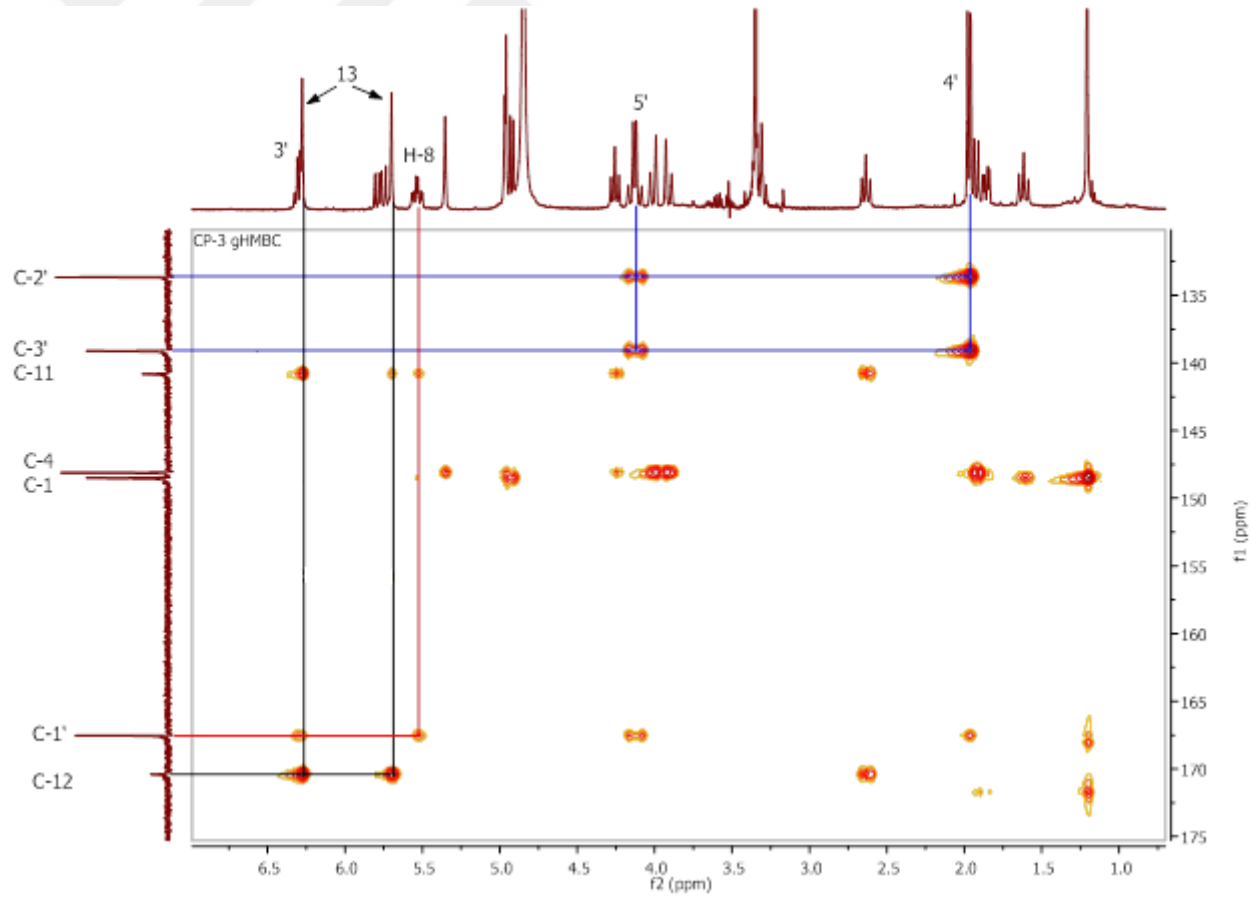
Spektrum 55. CP-3 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



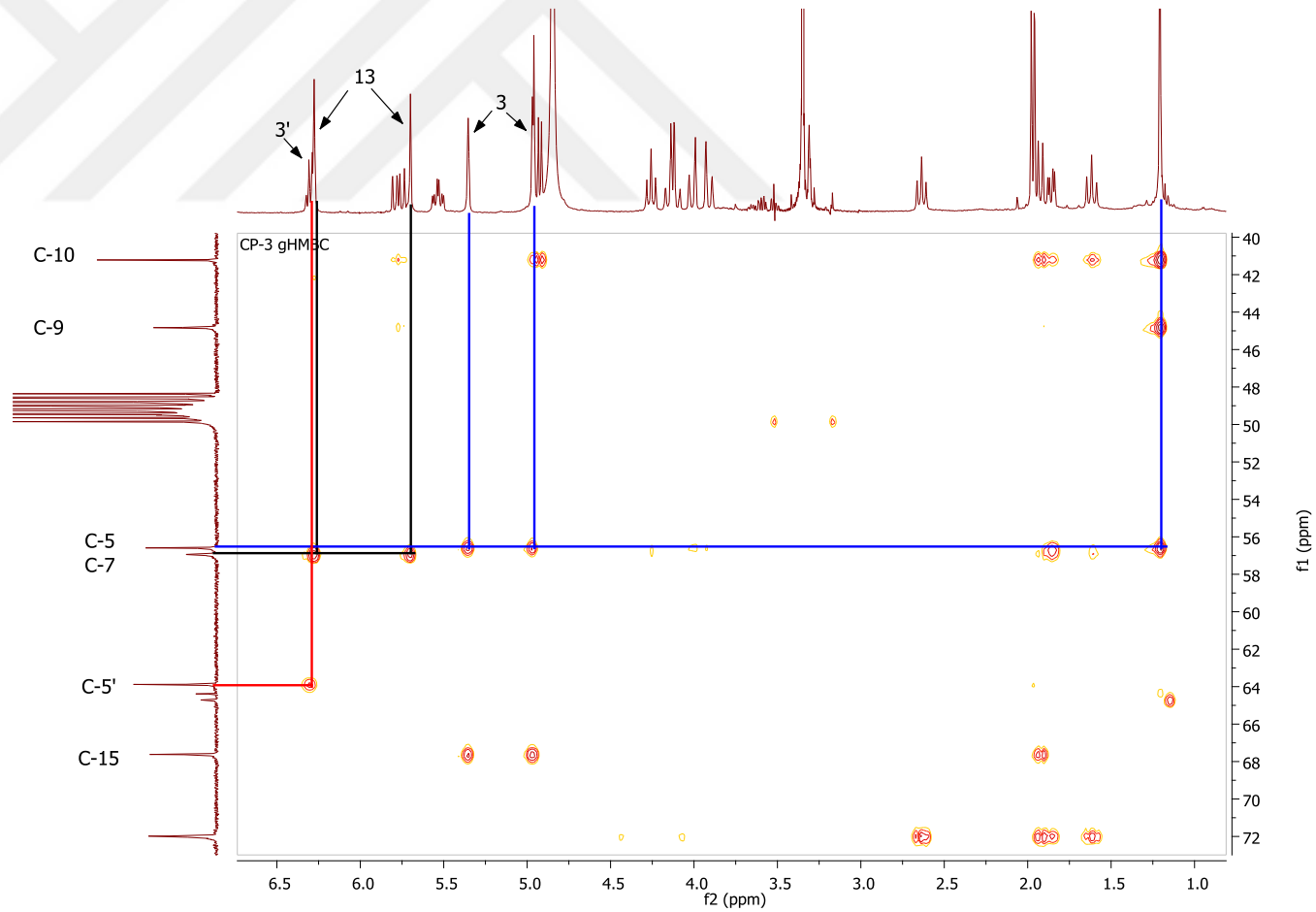
**Spektrum 56.** CP-3 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)



**Spektrum 57.** CP-3 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)



**Spektrum 58.** CP-3 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-1

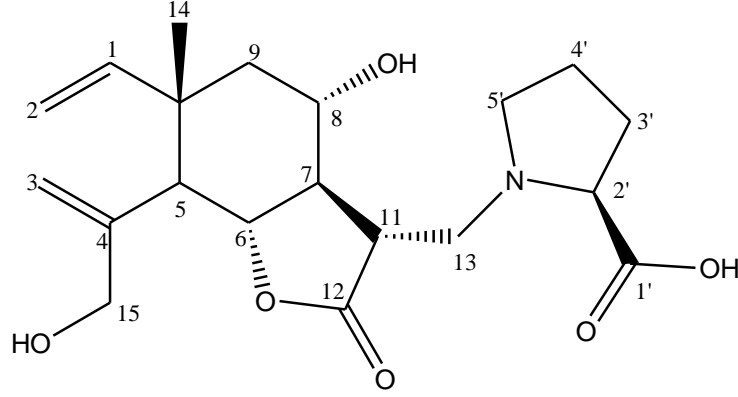


**Spektrum 59.** CP-3 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)-2



## CP-4

### 13-N-prolin melitensin



Formül	: C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> NO <sub>6</sub>
Molekül ağırlığı	: 379.1995
QTOF MS <i>m/z</i>	: 380.2028 [M+H] <sup>+</sup> (C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>6</sub> : 380.2073), Spektrum 60 378.1921 [M-H] <sup>-</sup> (C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> NO <sub>6</sub> : 378.1917), Spektrum 60
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 61, Spektrum 62, Tablo 25
<sup>13</sup> C NMR	: Spektrum 63, Tablo 25
COSY	: Spektrum 64
HSQC	: Spektrum 65
HMBC	: Spektrum 66
Optik rotasyon [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	: -17.5 (c. 0.005, MeOH)

Sarımsı zambak halinde elde edilen CP-4 kodlu bileşik, İTK'da V/S reaktifi ile mor renkli bir spot halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 61:32:7; R<sub>f</sub> ~0.5).

CP-4'ün QTOF kütle spektrumlarında gözlenen *m/z* 380.2028 [M+H]<sup>+</sup> ve 378.1921 [M-H]<sup>-</sup> iyon piklerinden hareketle, molekül ağırlığı 379 olarak belirlenmiştir. Molekül ağırlığının tek sayı olması, molekülün yapısında tek sayılı azot atomu bulunduğunu düşündürmüştür. Molekülün kütlesi ve <sup>13</sup>C NMR spektrumunda saptanan rezonanslar birlikte değerlendirildiğinde, molekülün formülü C<sub>20</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>6</sub> olarak belirlenmiştir.

$\delta_H$  5.39 ve 4.98'de gözlenen geniş singlet sinyaller (H<sub>2</sub>-3) ve  $\delta_H$  5.84'de *cis* ve *trans* yarılama sabiti görülen olefinik protonların varlığı ( $\delta_H$  5.84 *dd*;  $J_{1-2a}$ =10.8 ve  $J_{1-2b}$ =17.2, H-1; 5.01 *d*,  $J$ =10.8 ve 4.99 *d*,  $J$ =17.6, H<sub>2</sub>-2) molekülün eleman iskeletine sahip olduğuna işaret etmiştir. Yapısı belirlenen diğer moleküllerden farklı olarak H-

6 protonunun düşük alana kayarak 4.56 ppm'de rezonansa gelmesi, yapının bir seskiterpen lakton olduğunu düşündürmüştür.

Seskiterpenlerde, genel olarak  $\gamma$ -lakton halkası üzerinde bulunan veya yan zincirlerin yapısında yer alan ve düşük alanda geniş singlet sinyal çifti halinde gözlenen karakteristik ekzosiklik metilen protonlarının, moleküle ait  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda bulunmayışı dikkat çekmiştir.

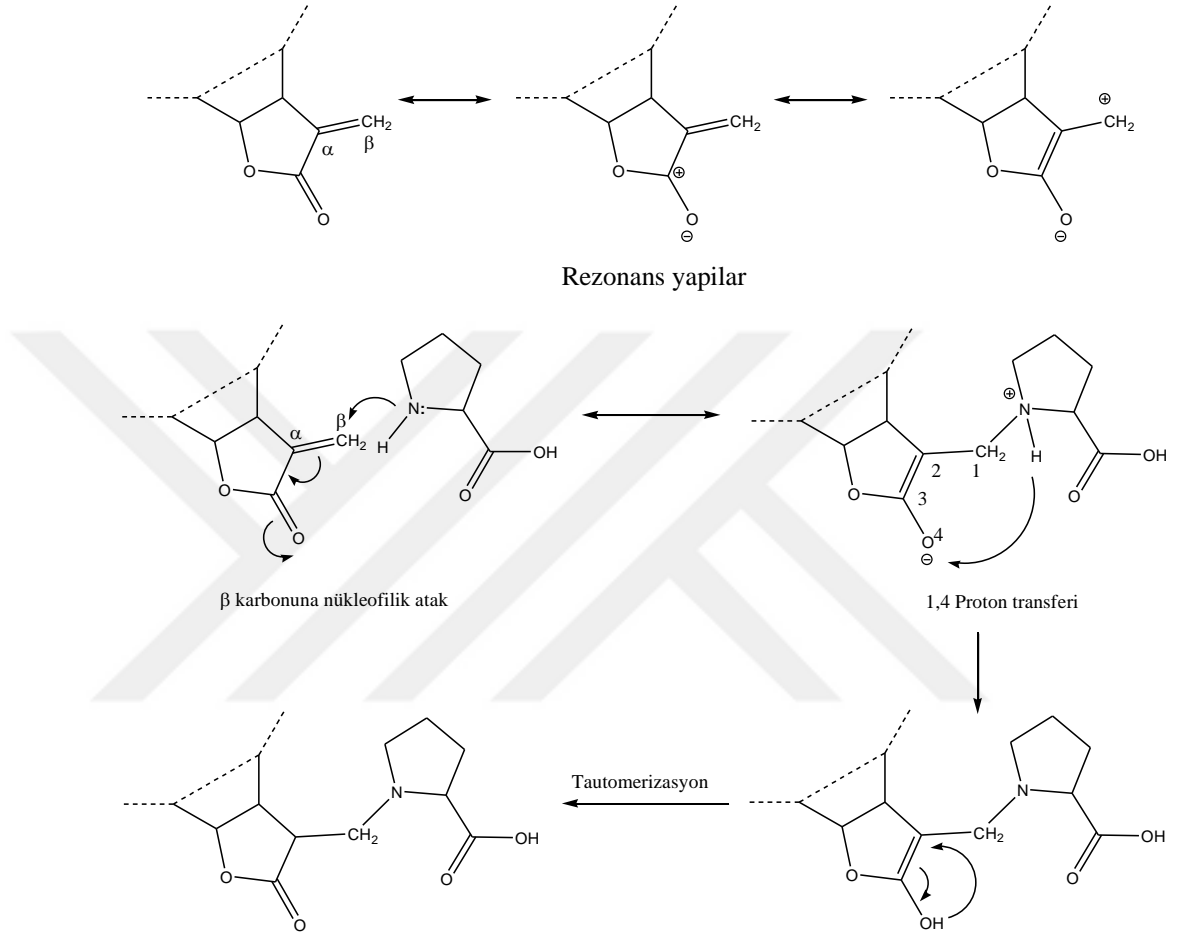
Karbon rezonanslarında görülen kimyasal kayma değerleri ile HMBC ve COSY spektrumlarında gözlenen korelasyonlardan hareketle, bir katerner karbon ( $\delta_{\text{C}}$  174.0, C-1'), bir metin ( $\delta_{\text{C}}$  72.0, C-2') ve üç siklik metilen ( $\delta_{\text{C}}$  30.5, 24.8 ve 57.1; sıra ile C-3', C-4' ve C-5') grubunun azot atomu ile heterosiklik bir halka oluşturduğu ve spektral verilerin, *L*-prolin yapısı ile uyumlu olduğu görülmüştür.

COSY spektrumunda, H7 ile aynı spin sistemi içinde yer alan bir metin ( $\delta_{\text{H}}$  3.30, H11;  $\delta_{\text{C}}$  44.5, C-11) ve bir metilen grubunun ( $\delta_{\text{H}}$  3.66 ve 3.44, H<sub>2</sub>-13;  $\delta_{\text{C}}$  56.6, C-13) varlığı; C11/13 arasındaki çift bağın doyduğuna işaret etmiş ve prolin halkasının bu noktadan bağlı olabileceği öngörülmüştür. HMBC spektrumunda C-2' ve H<sub>2</sub>-13 protonları arasında gözlenen korelasyon, prolin ünitesinin yapıya C-13 üzerinden bağlandığı öngörüsünü doğrulamıştır.

Molekülün olası biyosentez mekanizması Şekil 9'da verilmiştir. Seskiterpen laktonlarda,  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton ünitesinde oluşan rezonans yapıları ile konjugat katılma reaksiyonları gerçekleşmektedir. Çift veya üçlü bağ gibi aktif  $\pi$ -sistemlerine nükleofilik katılma tepkimeleri Michael tip katılma tepkimesi olarak bilinmektedir.  $\alpha$ , $\beta$ -doymamış bir karbonil olan ekzosiklik metilen grubu Michael akseptörü olarak, prolin yapısında bulunan sekonder amin grubu ise Michael donörü olarak davranmaktadır.  $\beta$  karbonuna nükleofilik atak sonrasında H atomunun 4. atoma transferi nedeniyle, gerçekleşen reaksiyon Michael tip 1,4 katılma reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır.

Molekülün stereomerkezlerine ait relatif konfigürasyonlar ise  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verilerinin literatür ile karşılaştırılması ve protonlar arasında görülen yarımla sabitlerinden hareketle belirlenmiştir. H5, H6, H7 ve H8'e ait yarımla sabitleri ( $J_{7,8}=10.8$  Hz,  $J_{6,7}=10.8$  Hz,  $J_{5,6}=12$  Hz) bu protonların birbirleri ile transdiaksiyal konumlarda yerleştiklerini göstermiştir. H8'in ( $\beta$ ) konfigürasyonda olduğu kabul edildiğinde H5, H6 ve H7 protonlarının konfigürasyonları sırasıyla  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\alpha$  olarak belirlenmiştir.

Bütün veriler birlikte değerlendirildiğinde CP-4 kodlu molekülün yapısı 13-*N*-prolin-8 $\alpha$ ,15-dihidroksi elema-1,3-dien-6,12-olit olarak belirlenmiş ve literatürde yer alan melitensin molekülü ile uyumlu olarak yapıya 13-*N*-prolin melitensin adı verilmiştir (105).

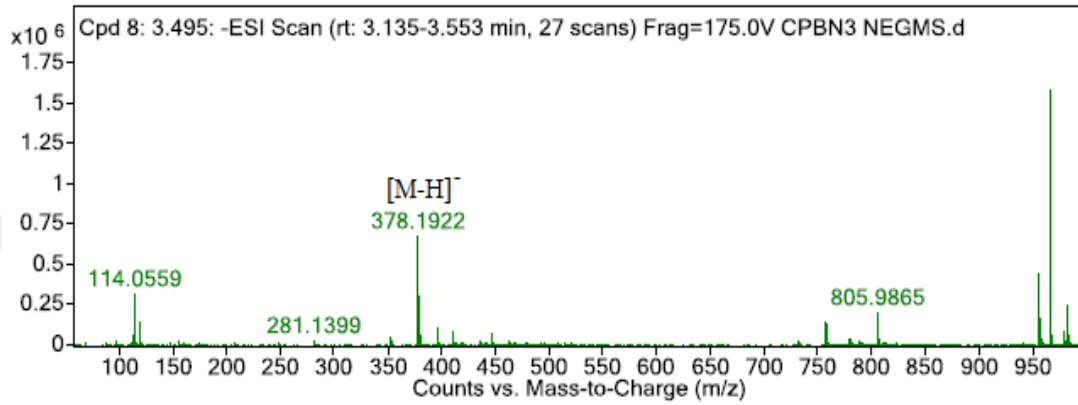
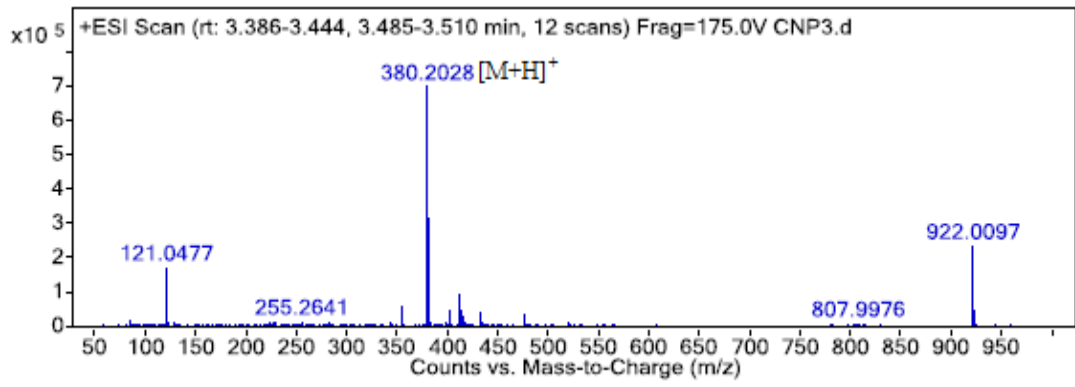


**Şekil 9.** CP-4 molekülünün olası biyosentez mekanizması (Michael tip 1,4 katılma reaksiyonu)

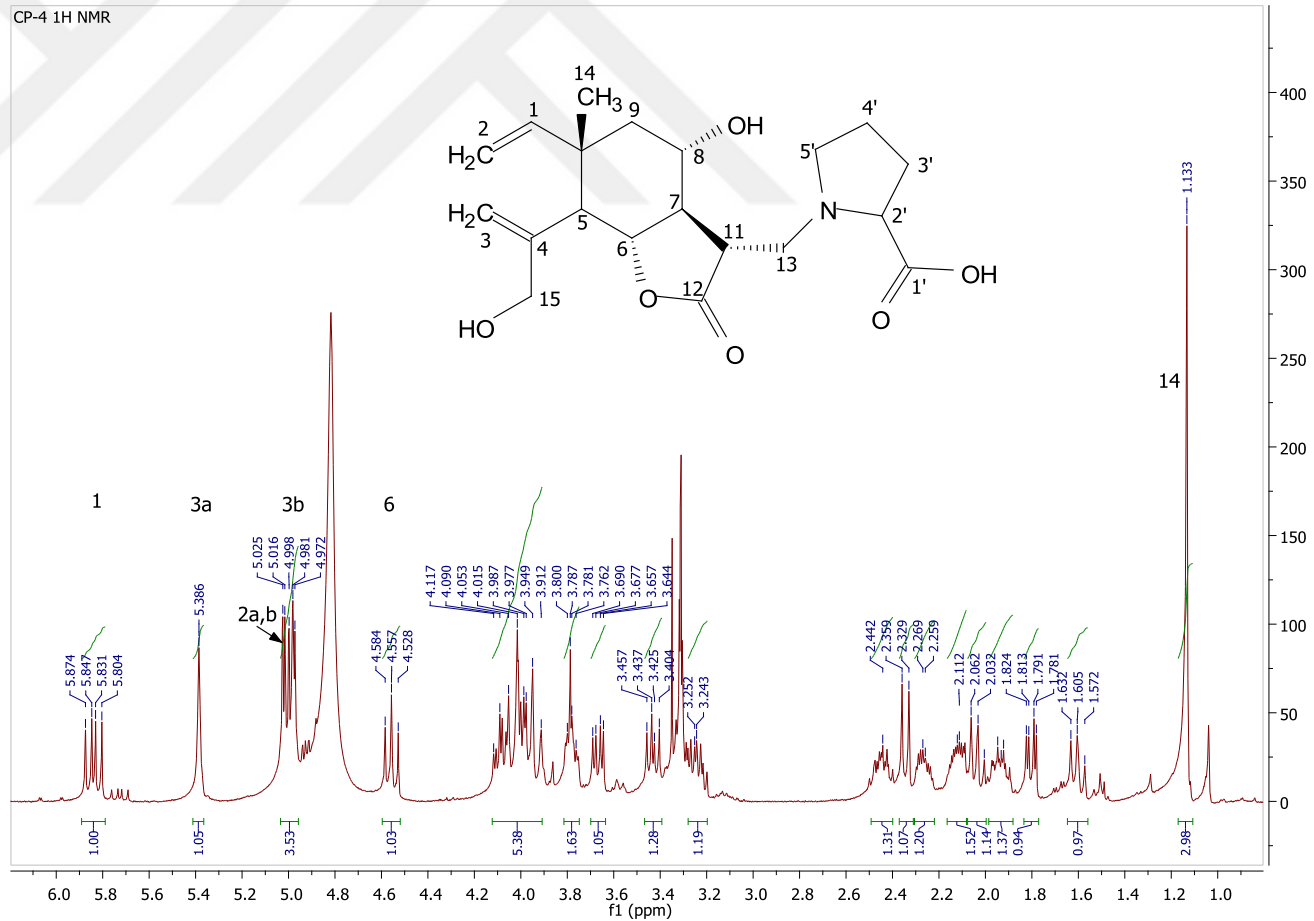
**Tablo 25.** CP-4  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

H/C	Mult.	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	CH	5.84	<i>dd</i> (17.2/10.8)	148.4
2	CH <sub>2</sub>	5.01	<i>d</i> (10.8)	112.5
		4.99	<i>d</i> (17.6)	
3	CH <sub>2</sub>	5.39	<i>g s</i>	112.9
		4.98	<i>g s</i>	
4	C			146.2
5	CH	2.34	<i>d</i> (12)	51.6
6	CH	4.56	<i>dd</i> (11.6/10.8)	80.7
7	CH	2.03	<i>dd</i> (12/10.8)	58.0
8	CH	4.08	<i>td</i> (10.8/4.4)	67.6
9	CH <sub>2</sub>	1.80	<i>dd</i> (13.2/4.4)	49.8
		1.61	<i>dd</i> (13.2/10.8)	
10	C			43.0
11	CH	3.30	<i>m</i> †	44.5
12	C			176.8
13	CH <sub>2</sub>	3.66	<i>dd</i> (13.2/5.2)	56.6
		3.44	<i>dd</i> (12.8/8)	
14	CH <sub>3</sub>	1.13	<i>s</i>	19.1
15	CH <sub>2</sub>	4.03	<i>d</i> (15.2)	66.8
		3.93	<i>d</i> (15.2)	
1'	C			174.0
2'	CH	3.99	<i>dd</i> (9.2/4)	72.0
3'	CH <sub>2</sub>	2.44	<i>m</i>	30.5
		2.26	<i>m</i>	
4'	CH <sub>2</sub>	2.12	<i>m</i>	24.8
		1.93	<i>m</i>	
5'	CH <sub>2</sub>	3.78	<i>td</i> (7.6/2.8)	57.1
		3.24	<i>m</i> †	

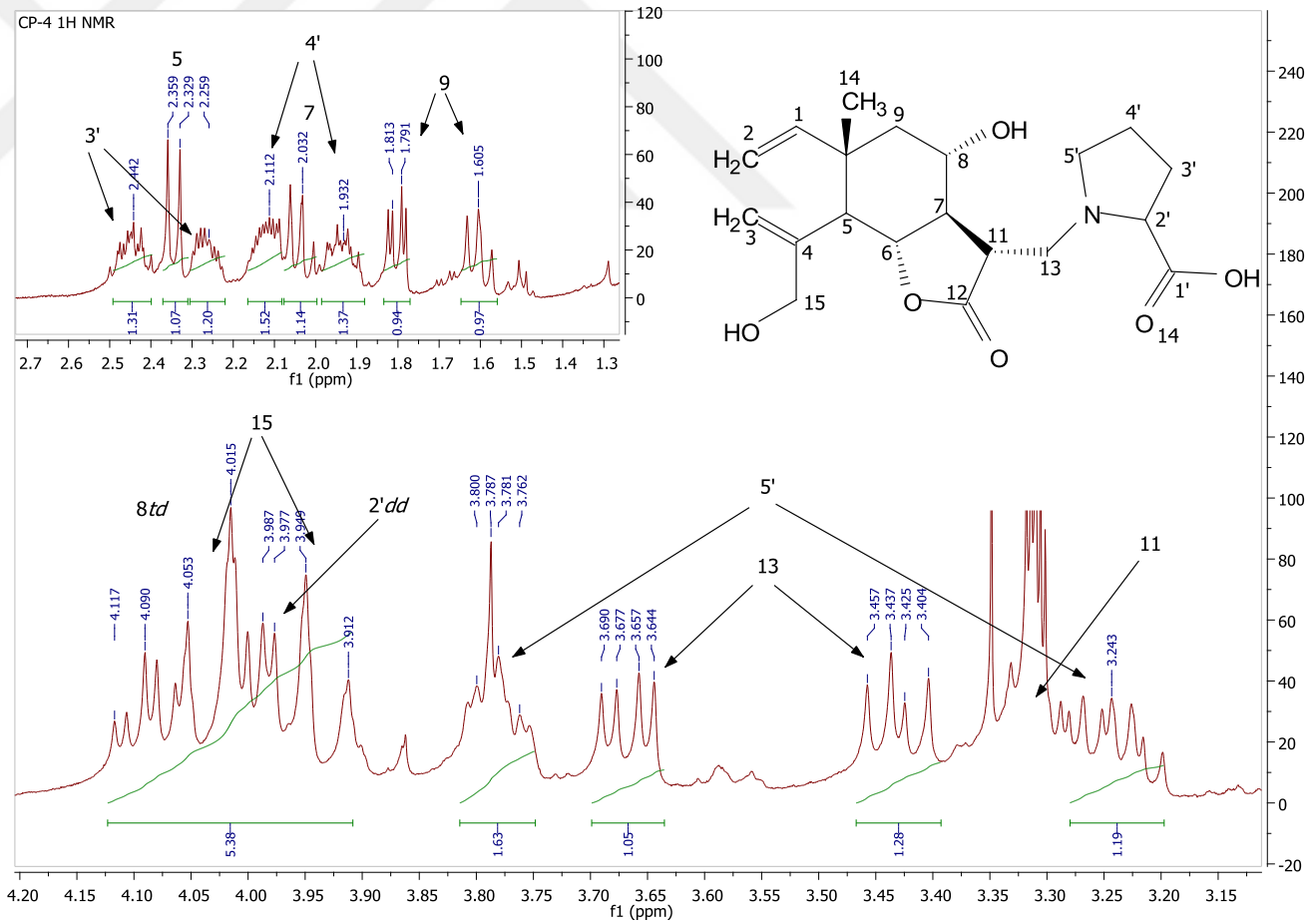
† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülememiştir.



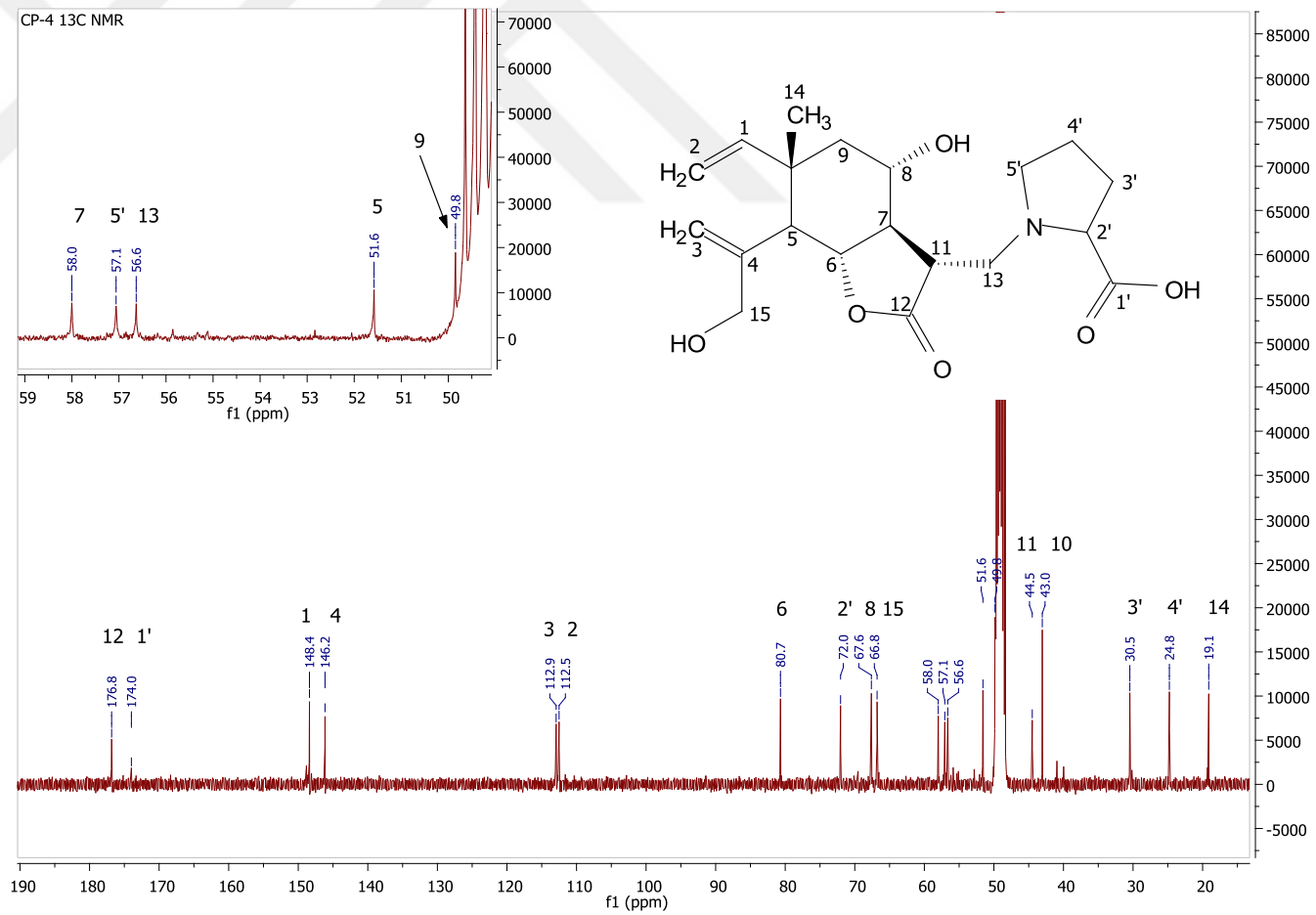
**Spektrum 60.** CP-4 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod)



Spektrum 61. CP-4 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

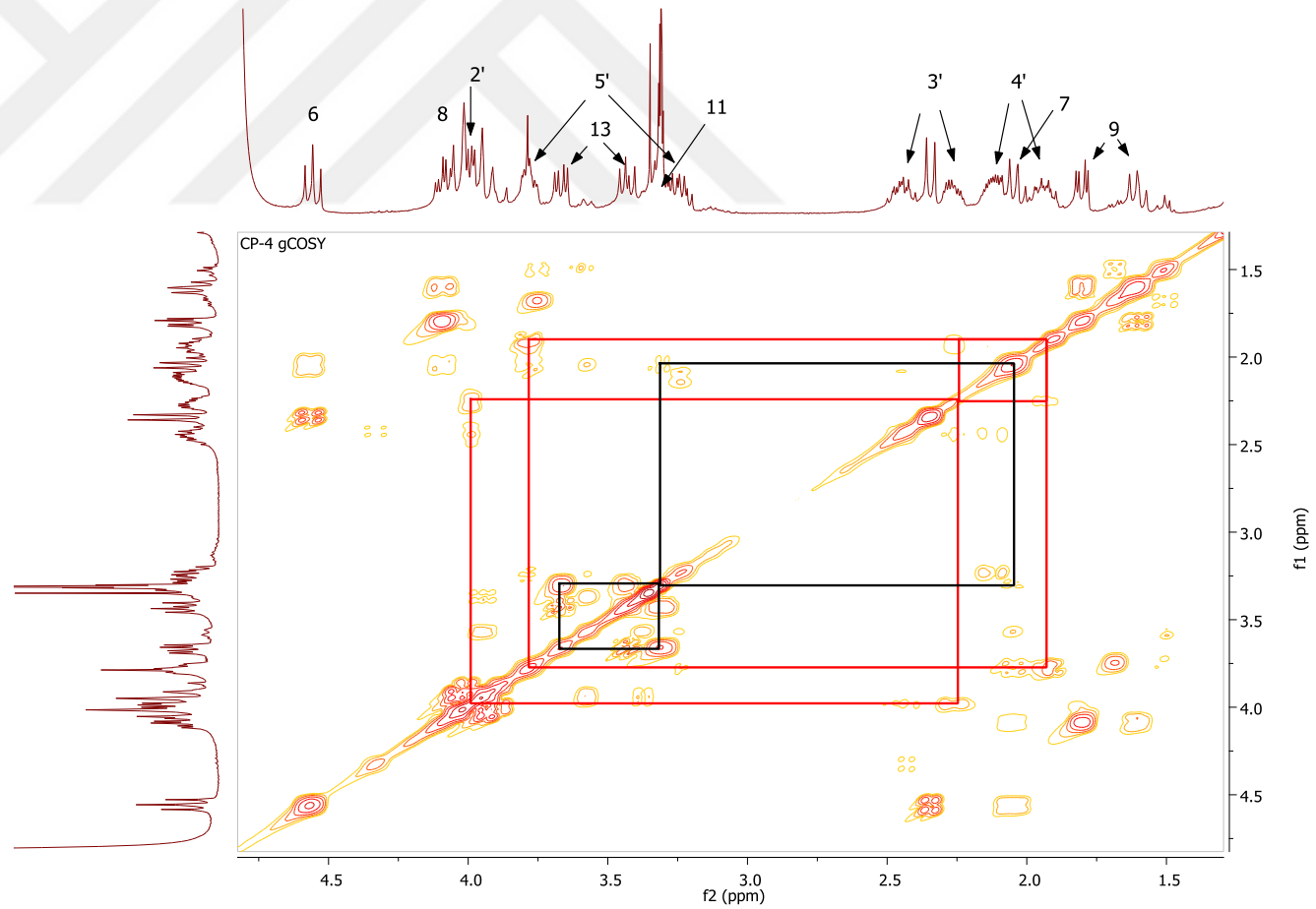


**Spektrum 62.** CP-4 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)-2

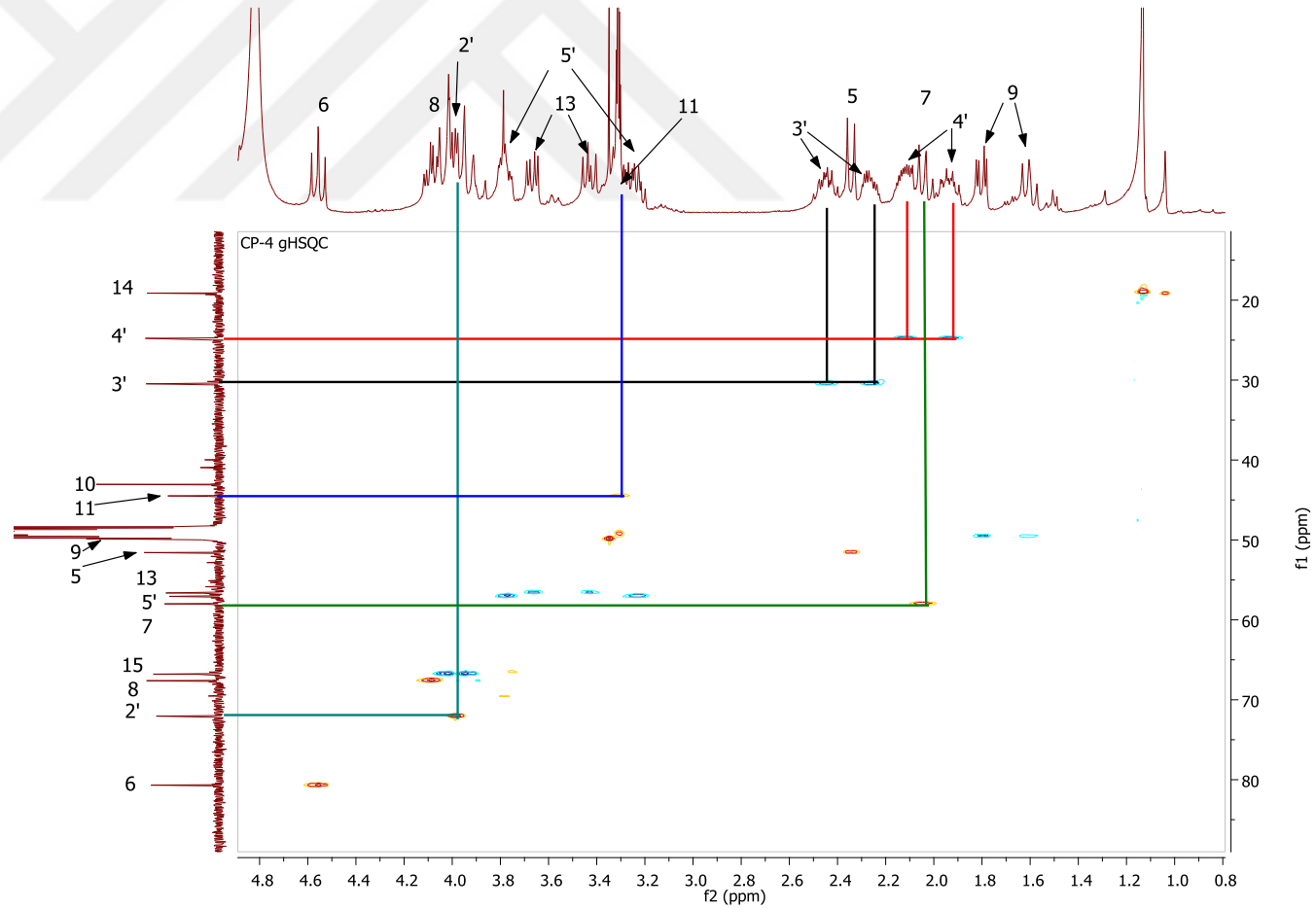


Spektrum 63. CP-4 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

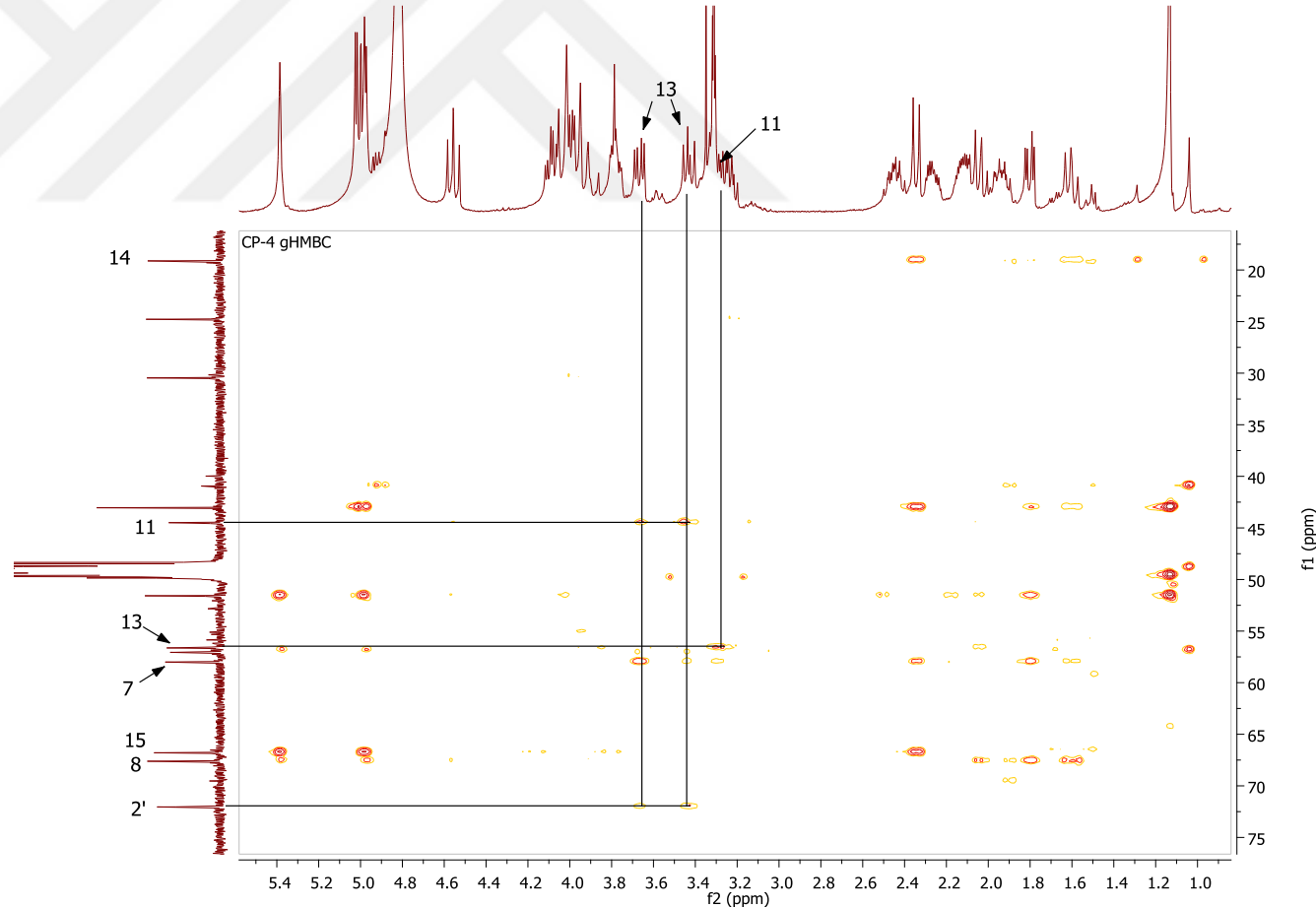
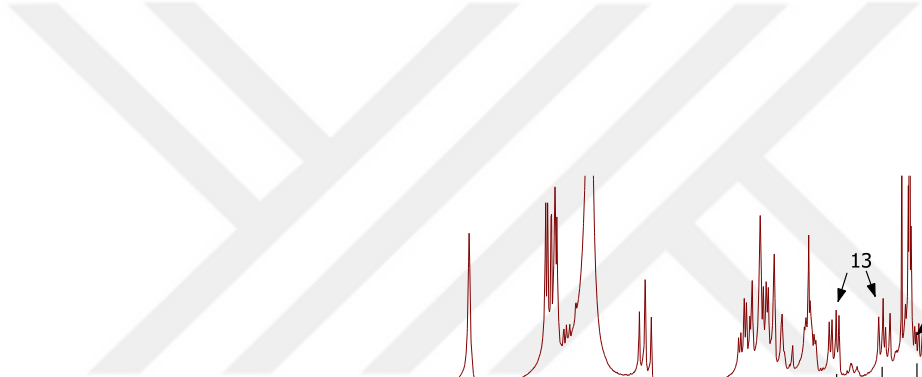




**Spektrum 64.** CP-4 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)



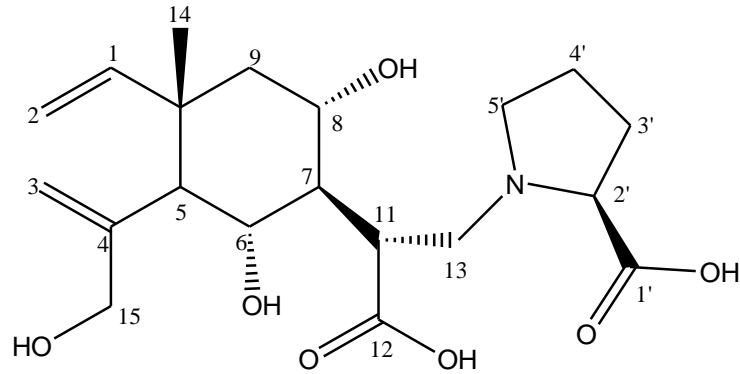
**Spektrum 65.** CP-4 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)



**Spektrum 66.** CP-4 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)

## CP-5

### 13-N-prolin-6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3-dien-12-oik asit



Formül	: C <sub>20</sub> H <sub>31</sub> NO <sub>7</sub>
Molekül ağırlığı	: 397.2101
QTOF MS <i>m/z</i>	: 398.1655 [M+H] <sup>+</sup> (C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> NO <sub>7</sub> : 398.2179), Spektrum 67 396.2018 [M-H] <sup>-</sup> (C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> NO <sub>7</sub> : 396.2022), Spektrum 67
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 68, Tablo 26
<sup>13</sup> C NMR	: Spektrum 69, Tablo 26
COSY	: Spektrum 70
HSQC	: Spektrum 71
HMBC	: Spektrum 72
Optik rotasyon [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	- 11.3 (c. 0.008, MeOH)
IR $\nu_{\max}$	= 3389, 2929, 1590, 1411, 1339, 1208, 1135, 1049, 1008

Renksiz zambak halinde elde edilen CP-5 kodlu bileşik, İTK'da V/S reaktifi ile mor renkli bir bant olarak gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 61:32:7; R<sub>f</sub>~0.3).

QTOF kütle spektrumlarında gözlenen  $m/z$  398.1655 [M+H]<sup>+</sup> ve 396.2018 [M-H]<sup>-</sup> moleküler iyonlarından hareketle, molekül ağırlığı 397 olarak belirlenmiştir. Molekül ağırlığı yapıda tek sayıda azot atomu varlığına işaret etmiş ve <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen sinyaller ile birlikte değerlendirilerek molekülün formülü C<sub>20</sub>H<sub>31</sub>NO<sub>7</sub> olarak belirlenmiştir.

Moleküle ait <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarının incelenmesi, molekülün yapısal olarak CP-4 ile benzer olduğunu göstermiştir.

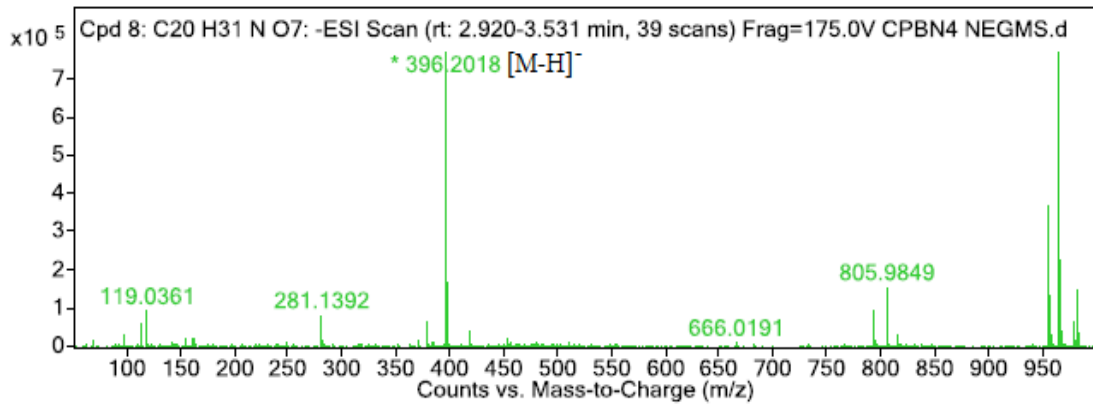
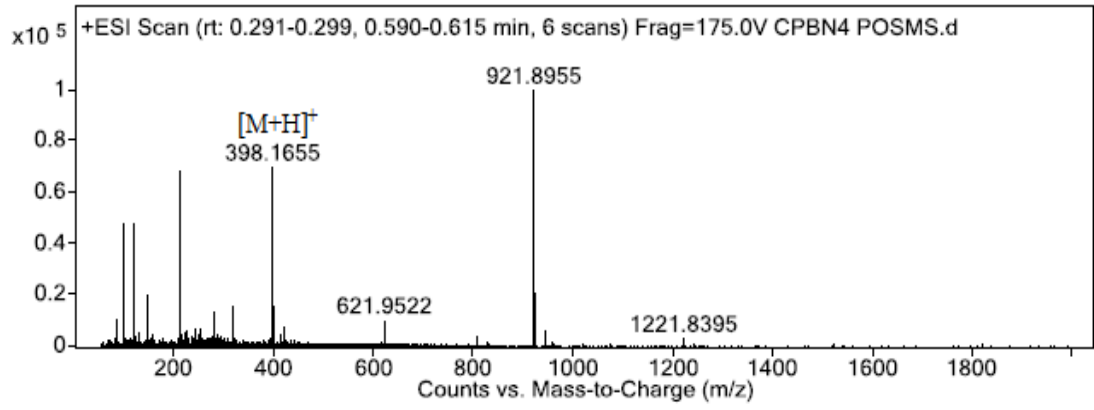
HSQC spektrumunda H6'ya ait olduğu belirlenen protonunun yaklaşık olarak 0.6 ppm, yüksek alana kayarak δ<sub>H</sub> 3.90'da rezonans göstermesi, C-6 konumunda serbest -OH grubu olabileceğini düşündürmüştür. C-6'nın serbest -OH taşıması 6,12-γ-lakton ünitesinin açık olduğu anlamına gelmektedir. İki molekülün kütleleri arasındaki 18 akb (atomik kütle birimi) farkı, molekülde laktonizasyonun gerçekleşmediğini ve C-12'nin serbest karboksilik asit, C-6'nın da hidroksimetin şeklinde bulunduğunu doğrulamaktadır.

Spektral verilerimiz literatür ile karşılaştırılarak, CP-5 kodlu molekülün yapısı 13-*N*-prolin-6α,8α,15-trihidroksielema-1,3-dien-12-oik asit olarak belirlenmiştir (105).

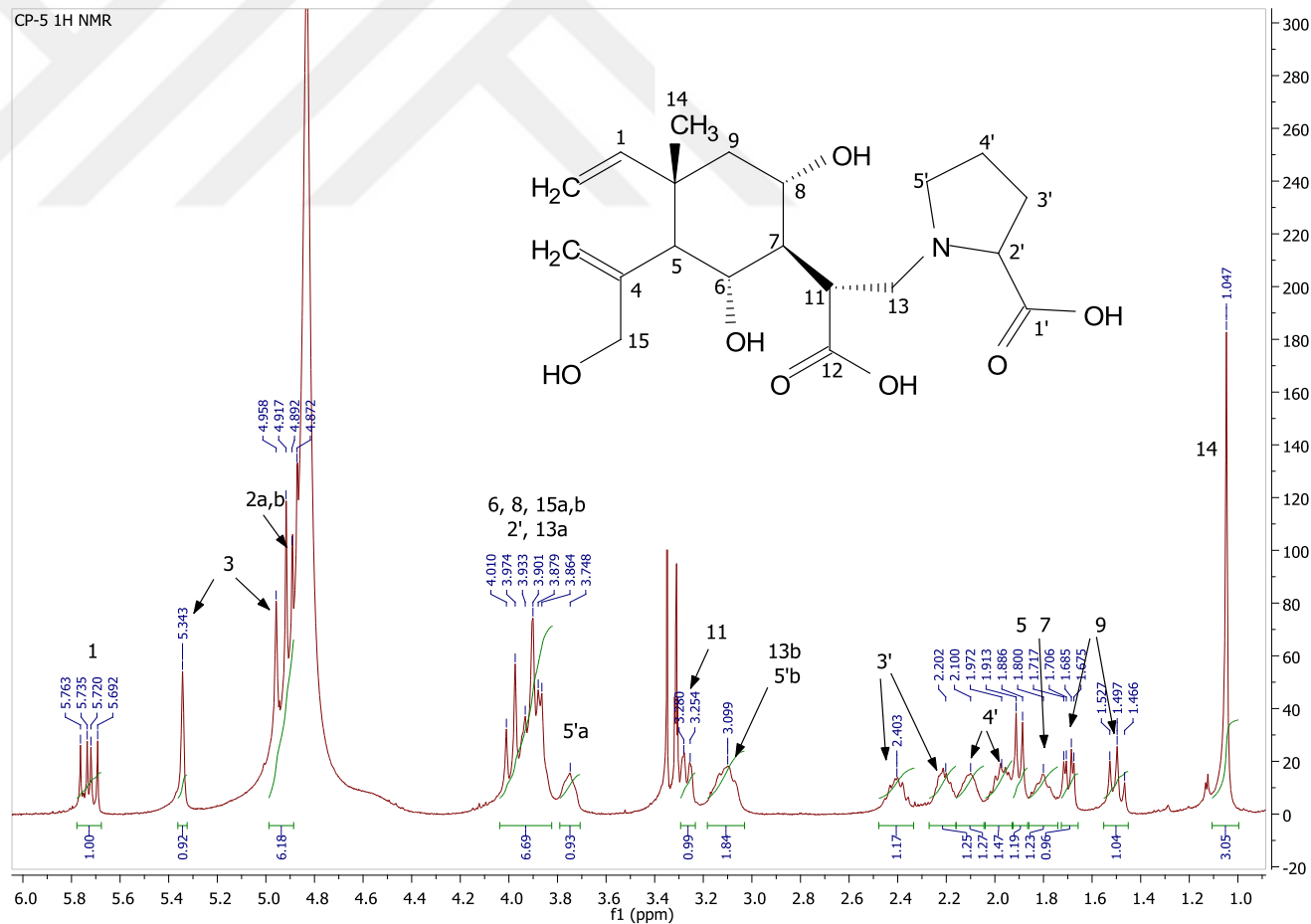
**Tablo 26.** CP-5  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

H/C	Mult.	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
1	CH	5.73	<i>dd</i> (17.2/11.2)	149.1
2	CH <sub>2</sub>	4.87	<i>m</i> †	111.3
		4.89	<i>d</i> (18.0)	
3	CH <sub>2</sub>	5.34	<i>g s</i>	112.4
		4.96	<i>g s</i>	
4	C			148.5
5	CH	1.89	<i>d</i> (10.8)	57.1
6	CH	3.90	<i>m</i> †	70.5
7	CH	1.80	<i>m</i>	55.1
8	CH	3.93	<i>m</i> †	67.4
9	CH <sub>2</sub>	1.69	<i>dd</i> (12.8/4.4)	49.8
		1.50	<i>dd</i> (12.4/12)	
10	C			41.0
11	CH	3.25	<i>d</i> †	41.3
12	C			180.3
13	CH <sub>2</sub>	3.88	<i>m</i> †	57.3
		3.10	<i>m</i> †	
14	CH <sub>3</sub>	1.05	<i>s</i>	19.4
15	CH <sub>2</sub>	3.98	<i>m</i> †	67.7
		3.88	<i>m</i> †	
1'	C			173.7
2'	CH	3.87	<i>m</i> †	72.1
3'	CH <sub>2</sub>	2.40	<i>m</i>	30.1
		2.20	<i>m</i>	
4'	CH <sub>2</sub>	2.10	<i>m</i>	24.6
		1.97	<i>m</i>	
5'	CH <sub>2</sub>	3.75	<i>m</i>	53.6
		3.10	<i>m</i> †	

† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülememiştir.

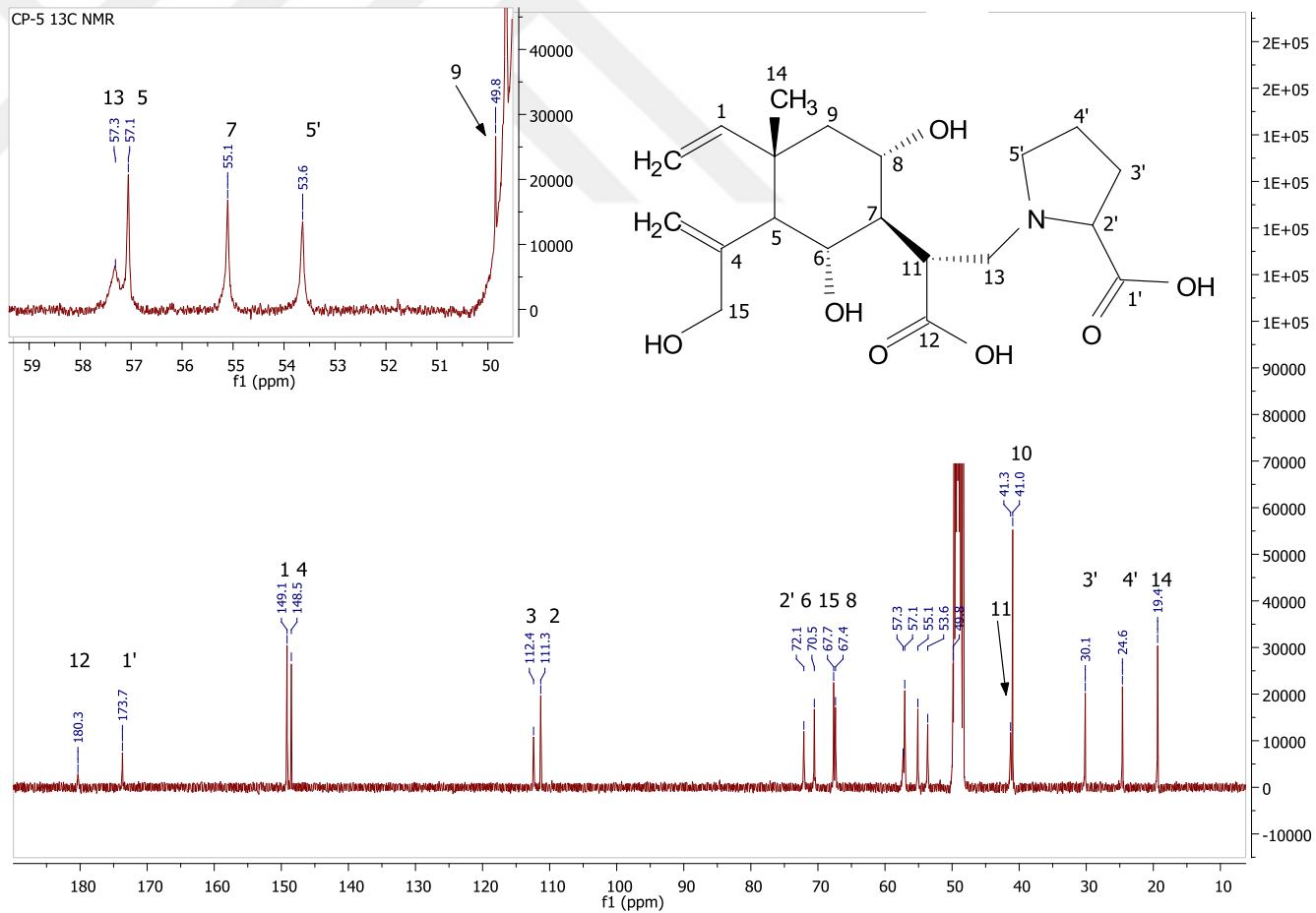


**Spektrum 67.** CP-5 QTOF kütle spektrumu (Pozitif ve negatif mod)

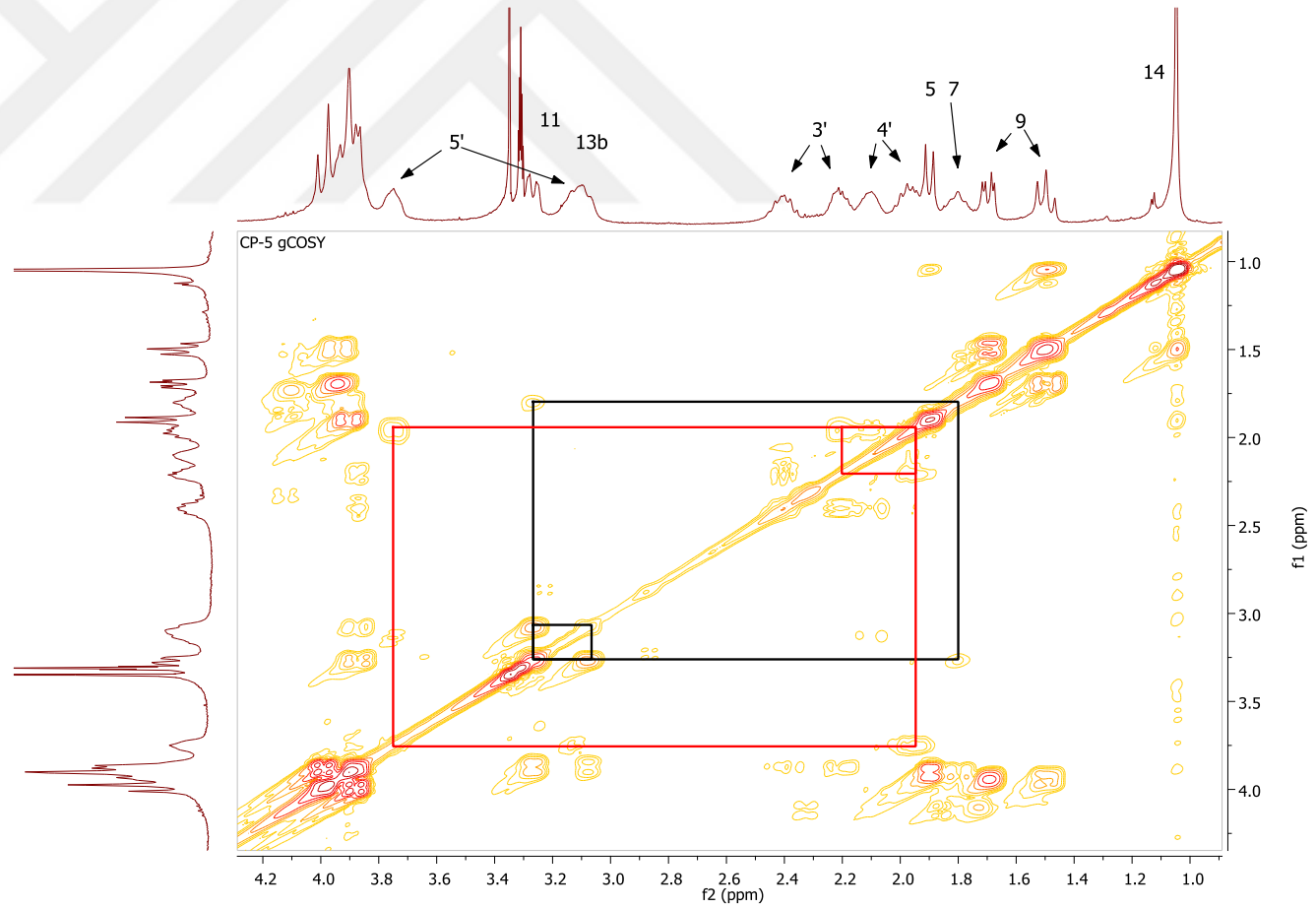


Spektrum 68. CP-5 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)

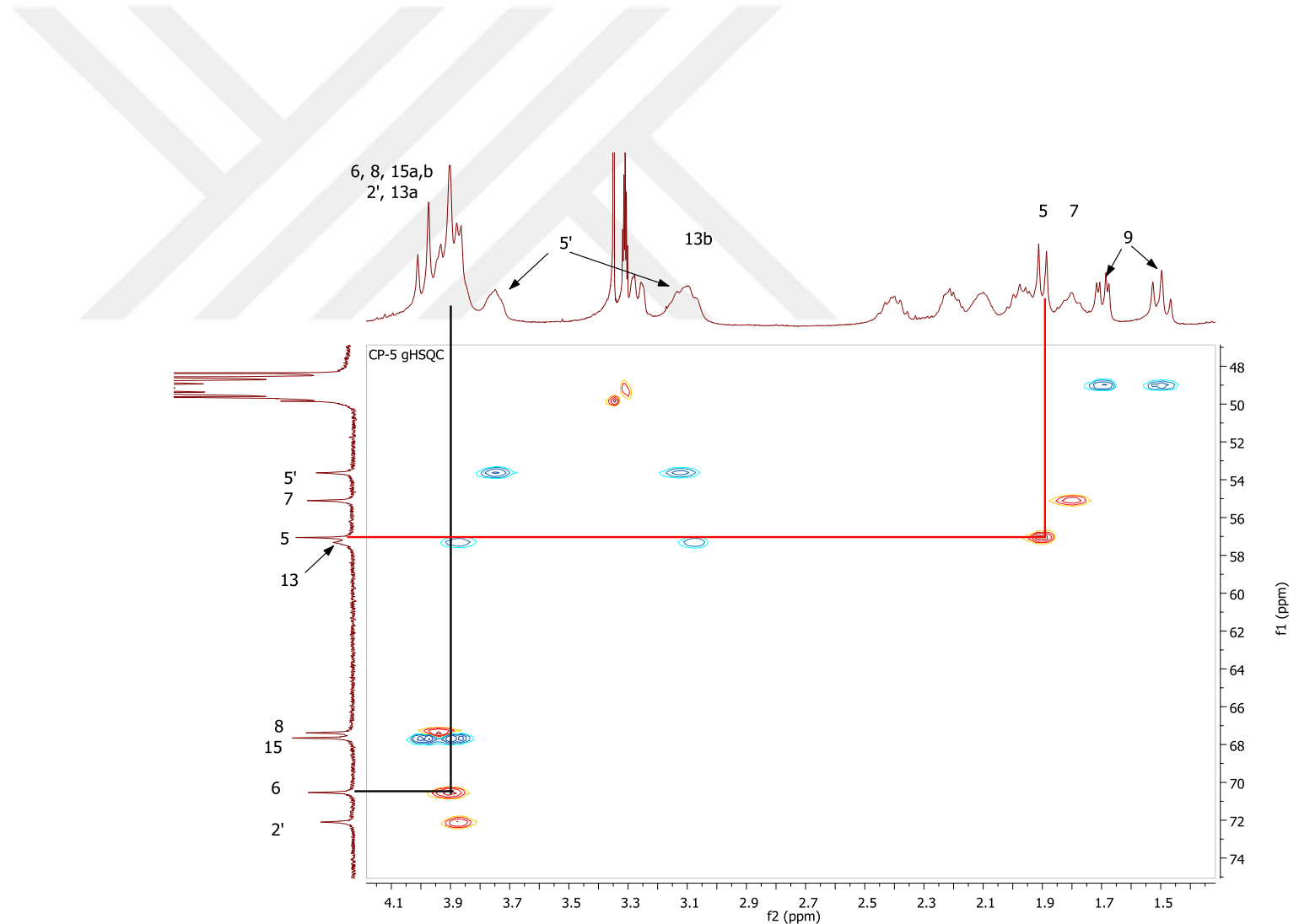




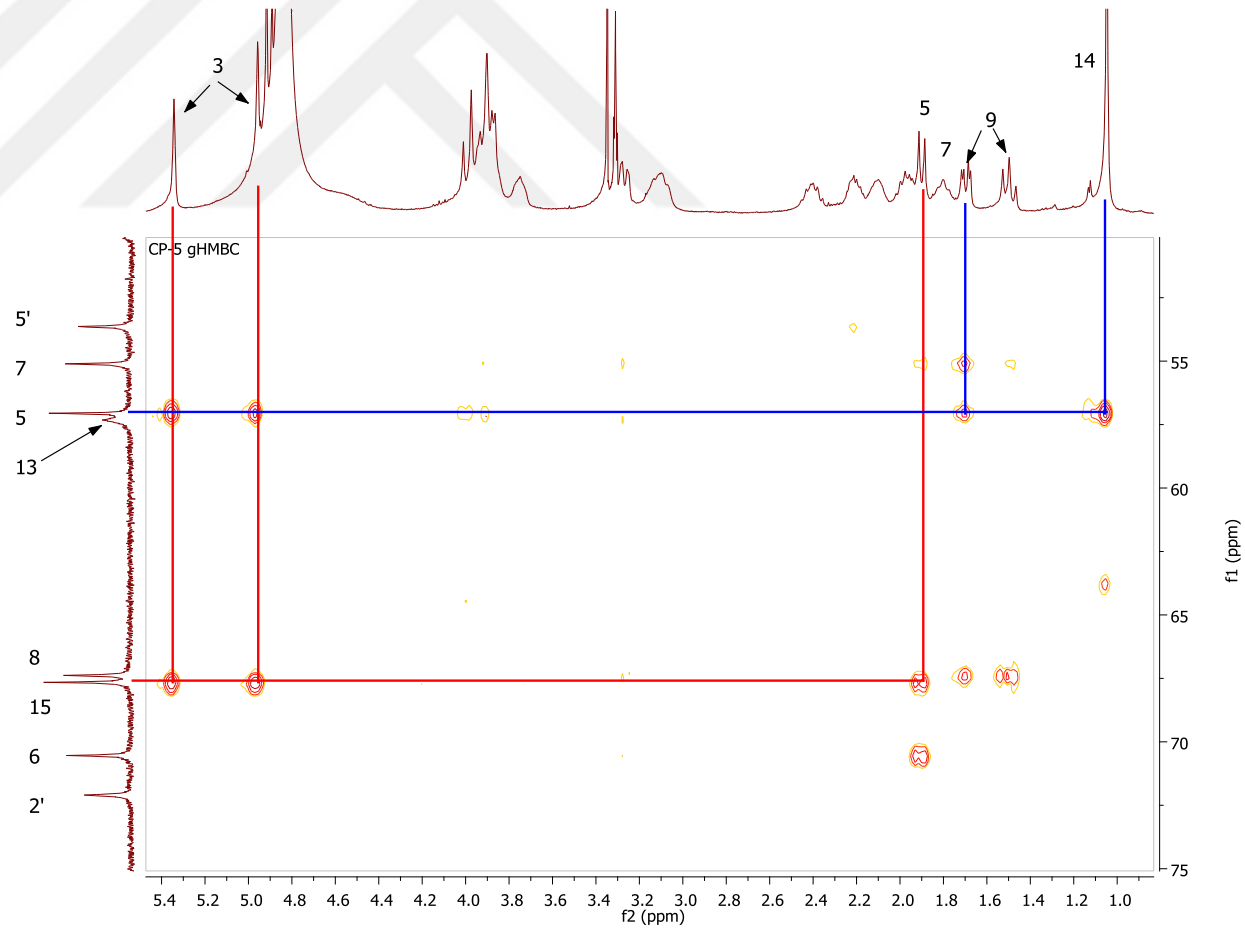
Spektrum 69. CP-5 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



**Spektrum 70.** CP-5 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)



**Spektrum 71.** CP-5 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)

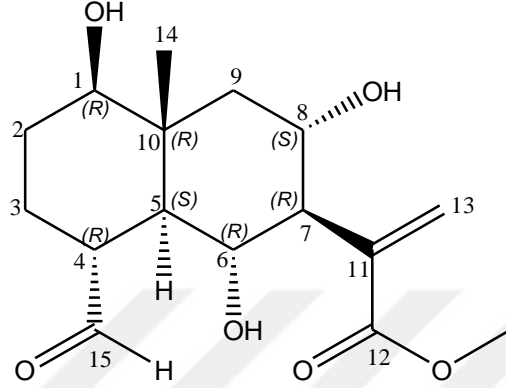


**Spektrum 72.** CP-5  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  NMR heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)

## ÖDESMAN TİP SESKİTERPEN

### CP-6

1 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ -trihidroksi-15-okso-ödesm-11(13)-en-12-oik asit metil esteri



Formül	: C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub>
Molekül ağırlığı	: 312.1573
QTOF MS <i>m/z</i>	: 335.1466 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> O <sub>6</sub> Na: 335.1471), Spektrum 73
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 74, Spektrum 75, Tablo 27
<sup>13</sup> C NMR	: Spektrum 76, Tablo 27
COSY	: Spektrum 77
HSQC	: Spektrum 78
HMBC	: Spektrum 79
Optik rotasyon [ $\alpha$ ] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	- 15 (c. 0.003, MeOH)
IR $\nu_{\max}$	= 3405, 2949, 2353, 1712, 1626, 1442, 1334, 1262, 1198, 1167, 1033

Açık sarı zambak halinde elde edilen CP-6 kodlu bileşik, İTK profilinde zayıf UV<sub>254</sub> aktif ve V/S reaktifi ile mor renkten kahverengiye dönen bir bant halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 90:10:1; R<sub>f</sub>~0.35).

CP-6'ya ait QTOF kütle spektrumunda görülen  $m/z$  335.1466 [M+Na]<sup>+</sup> pozitif iyon piki ve <sup>13</sup>C NMR spektrumunda gözlenen sinyallerden hareketle molekül formülü C<sub>16</sub>H<sub>24</sub>O<sub>6</sub> olarak belirlenmiştir.

<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları incelendiğinde, <sup>1</sup>H: 3.74 ppm, 3H, s ve <sup>13</sup>C: 52.0 ppm'de görülen sinyaller, molekül üzerinde bir metoksi grubuna işaret etmiştir. Metoksi grubuna ait sinyal belirlendikten sonra, geriye kalan 15 karbon sinyali,  $\delta_H$  6.33 ve 5.70'de görülen iki dublet proton ( $J=1.2$  Hz, H<sub>2</sub>-13) ile  $\delta_H$  0.95'de gözlenen singlet metil protonunun (H-14) varlığı yapının bir seskiterpen olduğunu düşündürmüştür. Seskiterpen yapılarında genel olarak C-4'e bağlı hidroksimetil grubu varlığında görülen ve AB sistemi şeklinde bulunan dublet sinyallerin <sup>1</sup>H NMR spektrumunda bulunmaması dikkat çekmiştir. Yüksek alanda (1-2.5 ppm aralığında) görülen multipler sinyaller ise COSY ve HSQC spektrumları ile çözümlenmiş ve elde edilen spektral verilerin literatürde yer alan ödesman tip seskiterpenler ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Ödesman tip seskiterpenler, genel olarak C-1 konumunda serbest  $\beta$ -OH grubu ve C-4 konumundan bağlı  $\alpha$  veya  $\beta$  yönelimli bir aldehit (-CHO) grubu taşımaktadırlar.

<sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR spektrumlarında  $\delta_H$  3.28 (H-1) ve  $\delta_C$  78.3'de (C-1) görülen rezonanslar, C-1 üzerinde serbest bir  $\beta$ -OH grubunun varlığını desteklemiştir. Bunun yanında  $\delta_H$  9.31'de (H-15) gözlenen proton sinyali, yapıda bir aldehit grubunun varlığına işaret etmiş ve  $\delta_C$  204.9 (C-15) sinyali bu görüşü desteklemiştir. Aldehit grubunun konfigürasyonu <sup>1</sup>H NMR spektrumundan yararlanılarak ayırt edilebilmektedir. ( $\beta$ ) konfigürasyonda 9.94-9.91 ppm'de singlet bir sinyal olarak gözlenen aldehit protonu, ( $\alpha$ ) konfigürasyonda yüksek alana doğru kayarak 9.68-9.33 ppm'de dublet ( $J=4.2-3.9$  Hz) olarak görülmektedir. Molekülün <sup>1</sup>H NMR spektrumunda  $\delta_H$  9.31'de gözlenen aldehit protonunun dublet yarılmaması ve 5.2 Hz'lik yarımlama sabitinden hareketle aldehit grubunun  $\alpha$  konfigürasyona sahip olduğu belirlenmiştir (3).

HMBC spektrumu incelendiğinde, C-4 ( $\delta_C$  49.9) ve H-15 arasında gözlenen uzak mesafe korelasyonu ile aldehit grubunun C-4 konumundan bağlandığı doğrulanmıştır. Bunun yanında C-12 ( $\delta_C$  168.5) ve  $-OCH_3$  ( $\delta_H$  3.74) arasında gözlenen etkileşim ile metoksi grubunun da C-12'den bağlı olduğu belirlenmiştir.

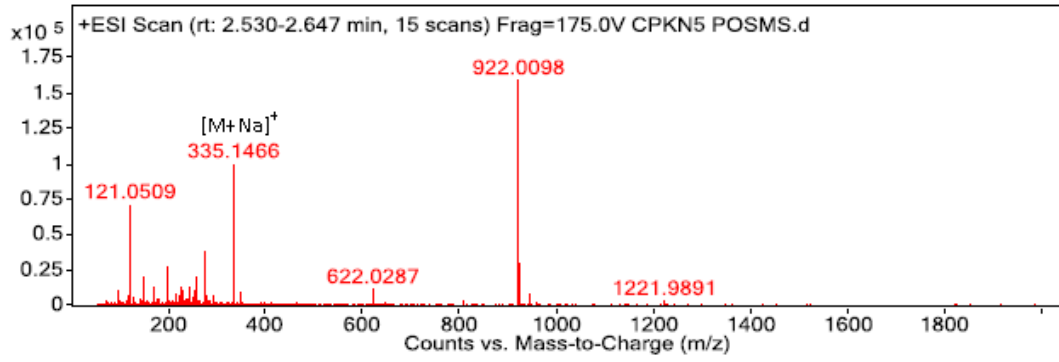
Elde edilen spektral verilerin literatürde yer alan verilerle karşılaştırılması sonucunda CP-6 kodlu molekülün yapısı  $1\beta,6\alpha,8\alpha$ -trihidroksi-15-okso-ödesm-11(13)-en-12-oik asit metil esteri olarak belirlenmiş ve daha önce *C. achaiia*'dan elde edilen 4-*epi*-karmanın ile uyumlu olarak, yapıya 8-deaçil-4-*epi*-karmanın adı verilmiştir (3, 106).

**Tablo 27.** CP-6  $^1H$  ve  $^{13}C$  NMR verileri ( $CD_3OD$ )

H/C	Mult.	$\delta_H$	$J$ (Hz)	$\delta_C$
1	CH	3.28	<i>dd</i> (11.2/4.4)	78.3
2	CH <sub>2</sub>	1.77	†	28.8
		1.67	<i>qd</i> (12.8/4.8)	
3	CH <sub>2</sub>	1.53	†	25.4
4	CH	2.19	†	49.9
5	CH	1.52	†	53.0
6	CH	3.87	<i>t</i> (10.4)	71.4
7	CH	2.23	<i>t</i> (10)	61.6
8	CH	4.07	<i>td</i> (10.8/4.8)	68.1
9	CH <sub>2</sub>	2.27	<i>dd</i> (12.8/4.8)	46.5
		1.09	<i>t</i> (12)	
10	C			39.8
11	C			139.8
12	C			168.5
13	CH <sub>2</sub>	6.33	<i>d</i> (1.2)	130.0
		5.70	<i>d</i> (1.2)	
14	CH <sub>3</sub>	0.95	<i>s</i>	12.6
15	CH	9.31	<i>d</i> (5.2)	204.9
$-OCH_3$	CH <sub>3</sub>	3.74	<i>s</i>	52.0

† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülememiştir

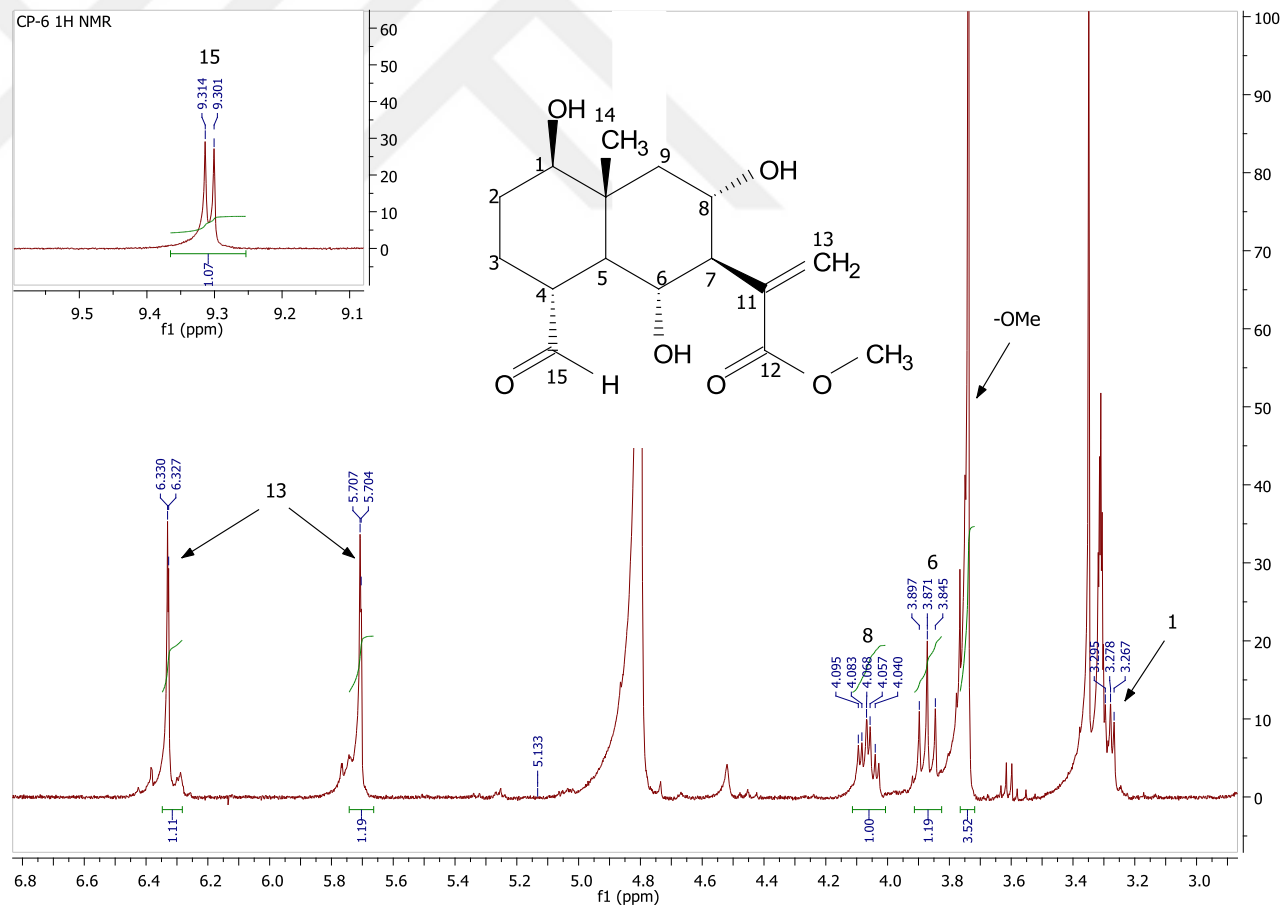
Spectrum Source Peak (3) in "+ BPC(all [-1]) Scan Smo - CPKN5 POSMS.d" Fragmentor Voltage 175 Collision Energy 0 Ionization Mode ESI



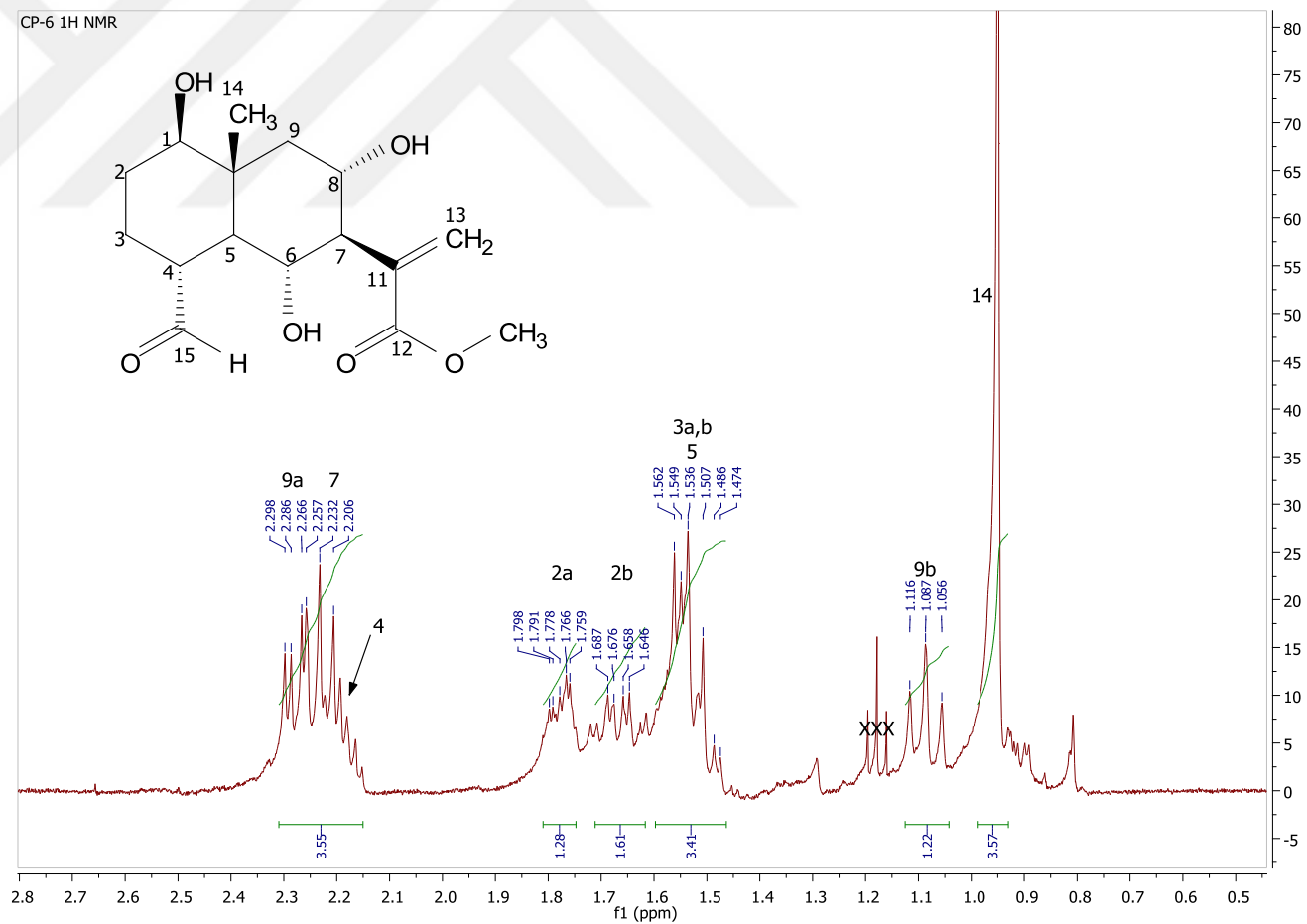
Spektrum 73. CP-6 QTOF kütle spektrumu (Pozitif mod)



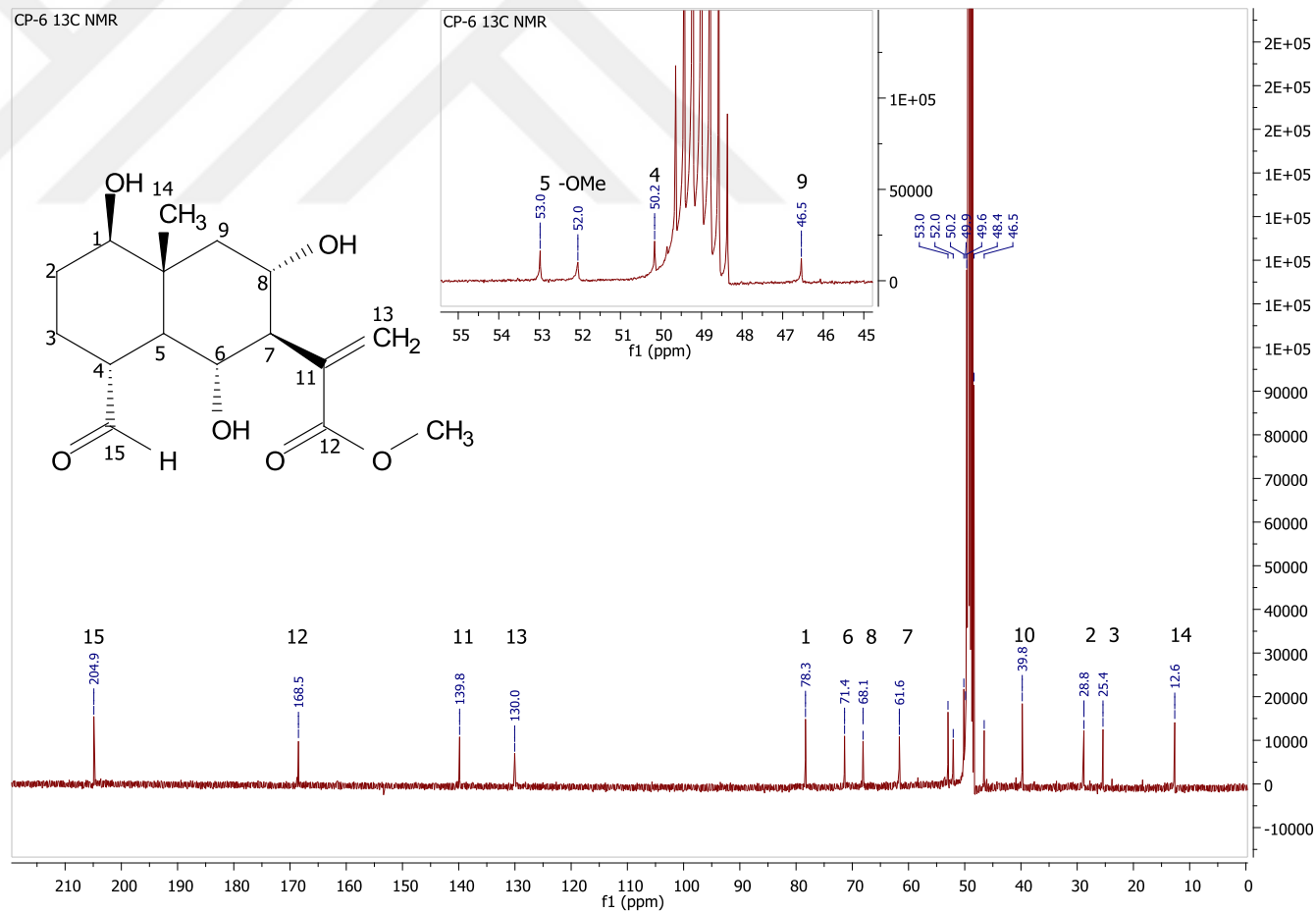




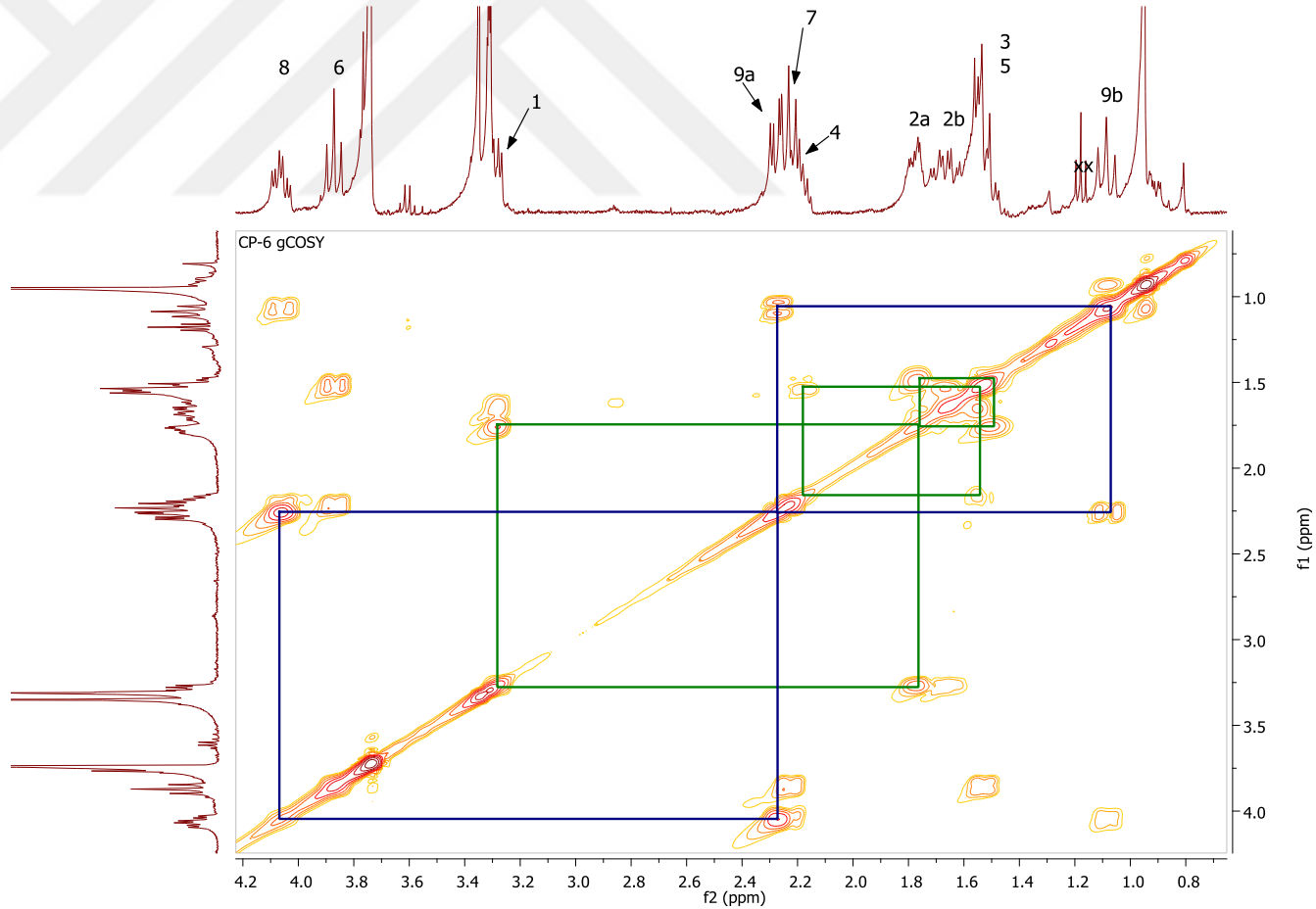
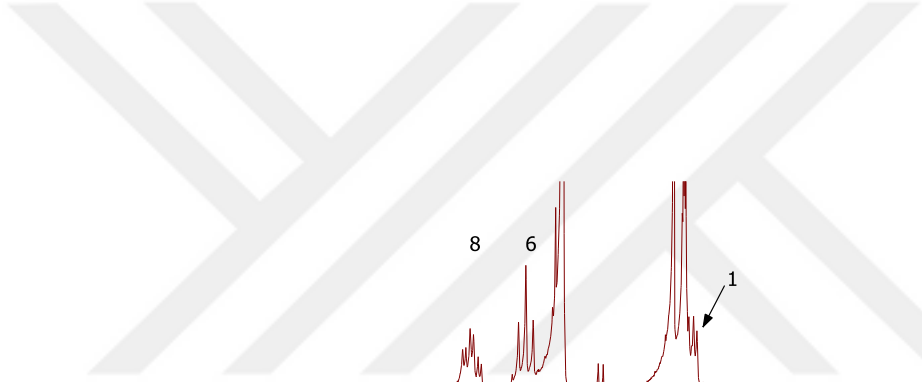
Spektrum 74. CP-6 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)-1



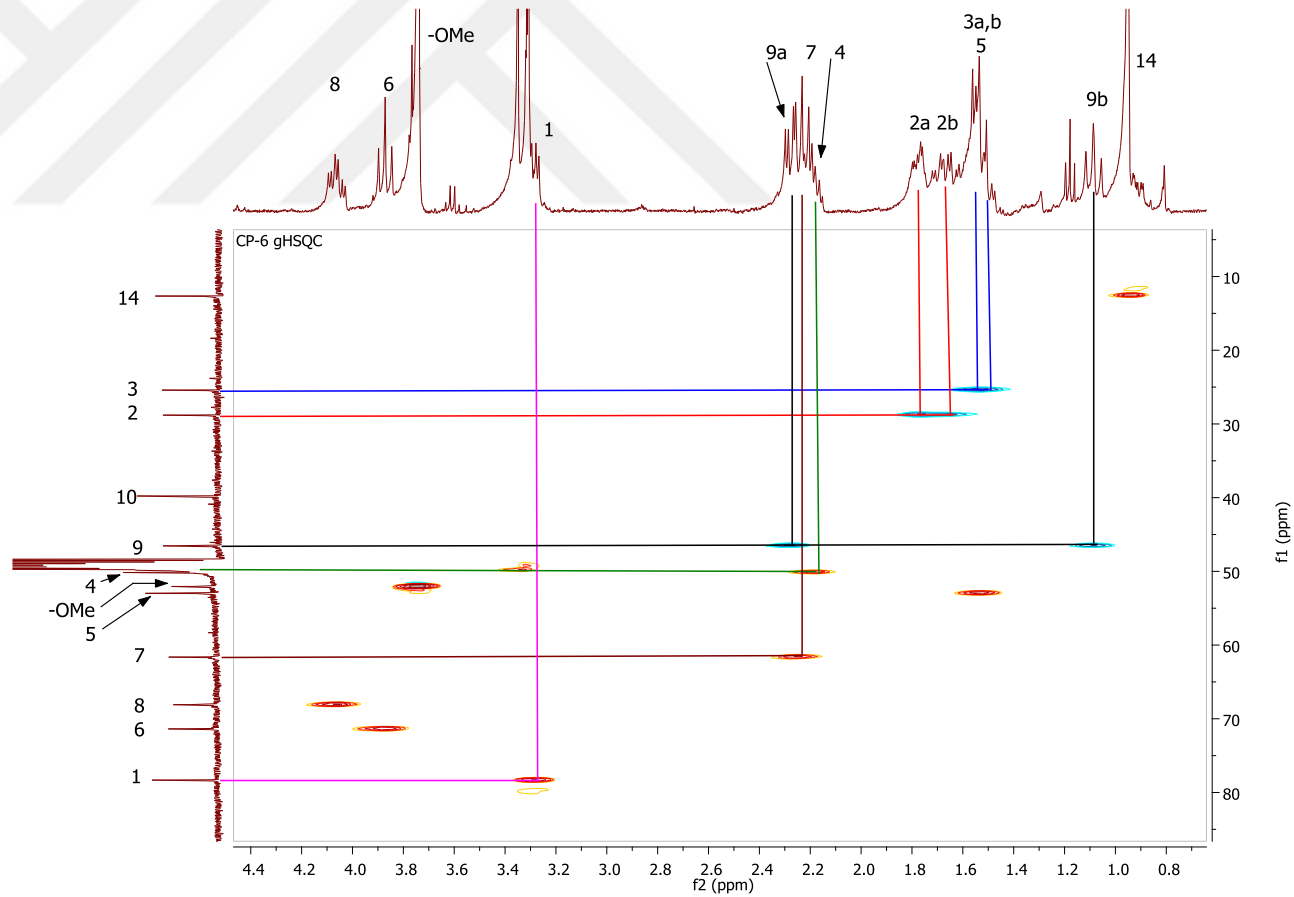
Spektrum 75. CP-6 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)-2



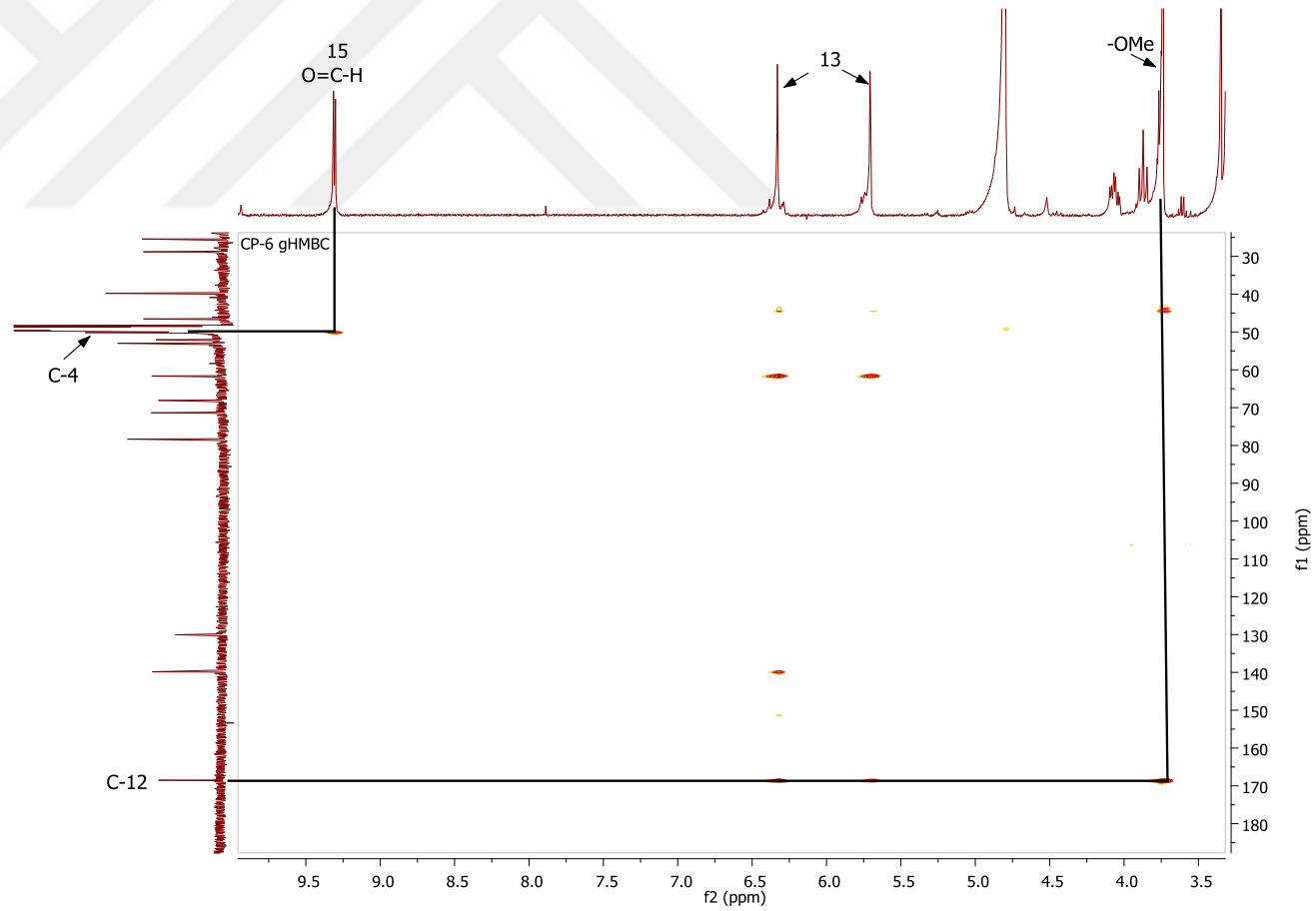
Spektrum 76. CP-6 <sup>13</sup>C NMR spektrum (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



**Spektrum 77.** CP-6 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumu (COSY)

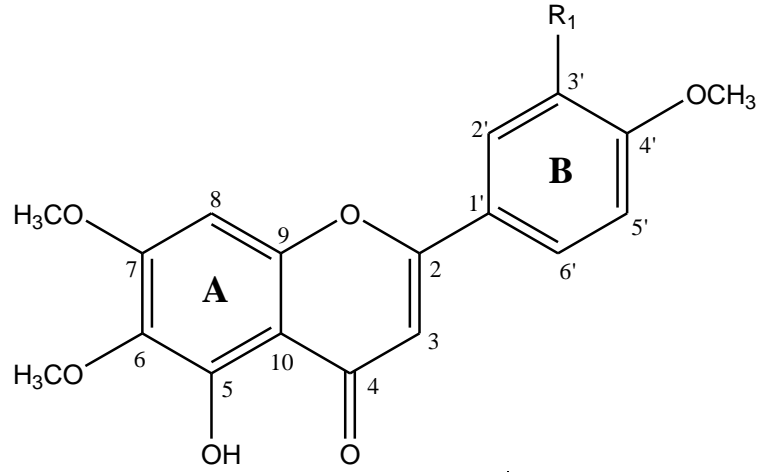


**Spektrum 78.** CP-6 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)



**Spektrum 79.** CP-6 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)

#### 4.1.2.2. METOKSİ FLAVONLAR



	<b>R<sub>1</sub></b>
Salvigenin (CP-7)	H
Öpatorin (CP-8)	OH
3'-metoksi öpatorin (CP-9)	OCH <sub>3</sub>

	Salvigenin (CP-7)	Öpatorin (CP-8)	3'-metoksi öpatorin (CP-9)
Sinonim	5-hidroksi-4',6,7-trimetoksiflavon	5,3'-dihidroksi-4',6,7-trimetoksiflavon	5-hidroksi-6,7,3',4'-tetrametoksiflavon; Santaflavon
Formül	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>6</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>
Molekül ağırlığı	328.09	344.09	358.11
LC-MS <i>m/z</i>	329.08 [M+H] <sup>+</sup> 351.03 [M+Na] <sup>+</sup> Spektrum 80	345.08 [M+H] <sup>+</sup> 367.05 [M+Na] <sup>+</sup> Spektrum 84	359.06 [M+H] <sup>+</sup> 381.06 [M+Na] <sup>+</sup> Spektrum 88
<sup>1</sup> H NMR	Spektrum 81	Spektrum 85	Spektrum 89
<sup>13</sup> C NMR	Spektrum 82	Spektrum 86	Spektrum 90
HMBC	Spektrum 83	Spektrum 87	Spektrum 91
Moleküllere ait <sup>1</sup> H ve <sup>13</sup> C NMR spektral değerleri Tablo 28'de verilmiştir			

Açık sarı renkli amorf toz halinde elde edilen **CP 7-9** kodlu bileşikler, İTK profilinde, 254 nm'de UV altında çok belirgin bordo renkli spotlar halinde gözlenirken, V/S reaktifi ile sarı renkli bantlar halinde gözlenmişlerdir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH, 97:3, sırasıyla R<sub>f</sub> ~ 0.8, 0.4, 0.75). Maddelerin sarı renkli bantlar halinde gözlenmeleri moleküllerin flavon yapısında olduklarını düşündürmüştür.

**CP-7** molekülüne ait <sup>1</sup>H NMR spektrumunda (Spektrum 81) δ<sub>H</sub> 7.77 ve 6.96'da ikişer proton yüksekliğinde, AA'BB' simetrisine sahip 4 adet aromatik proton sinyalinin gözlenmesi ve yine aromatik bölgede δ<sub>H</sub> 6.52 ve 6.69'da görülen 2 adet singlet proton, molekülün tetra-sübstitüe (4 üyeli) flavon yapısında olduğunu düşündürmüştür. AA'BB' simetrisine sahip dublet protonları yarılama sabitinden hareketle (*J*=8.8 Hz) molekülün B halkasının para-disübstitüe aromatik yapıda olduğu ve A halkasında 2 adet serbest hidrojenin bulunduğu belirlenmiştir. Bunun yanında δ<sub>H</sub> 3.94, 3.90 ve 3.86'da görülen üçer proton yüksekliğindeki singlet sinyaller, molekül üzerinde üç adet metoksi grubunun varlığına işaret etmiş ve <sup>13</sup>C NMR spektrumunda (Spektrum 82) δ<sub>C</sub> 60.9 ve 56.4 ve 55.6'da yer alan üç sinyal bu görüşü desteklemiştir. <sup>13</sup>C NMR spektrumunda yer alan verilerin literatür ile karşılaştırılması ve moleküle ait HMBC spektrumunda gözlenen uzak mesafe etkileşimlerinin değerlendirilmesi sonucunda, singlet protonların moleküldeki 3 (δ<sub>H</sub> 6.52; δ<sub>C</sub> 104.0) ve 8 (δ<sub>H</sub> 6.49; δ<sub>C</sub> 90.6) numaralı karbonlara ait olduğu; metoksi gruplarının ise 6, 7 ve 4' (δ<sub>C</sub> sırasıyla 132.7, 158.8 ve 162.7) numaralı karbonlar ile etkileşimde oldukları belirlenmiştir (Spektrum 83).

Spektral verilerin literatür ile karşılaştırılması sonucunda, **CP-7** kodlu bileşiğin yapısı salvigenin olarak belirlenmiştir (107).

**CP-8** kodlu bileşiğin <sup>1</sup>H NMR spektrumu (Spektrum 85) incelendiğinde ABX sistemi oluşturan birer proton yüksekliğindeki 3 adet sinyal [δ<sub>H</sub> 7.04, *d*, *J*=8.4 Hz (H-5'); 7.42, *d*, *J*=2.4 Hz (H-2') ve 7.50, *dd*, *J*=8.4/2.4 Hz (H-6')] trisübstitüe bir aromatik halkanın varlığına işaret etmiş (B halkası) ve yine δ<sub>H</sub> 6.72 ve 6.80'de görülen 2 adet singlet proton, molekülün penta-sübstitüe (5 üyeli) bir flavon olduğuna işaret etmiştir. Bunun yanında δ<sub>H</sub> 3.90, 3.86 ve 3.73'de görülen üçer proton yüksekliğindeki singlet sinyaller, molekül üzerinde üç adet metoksi grubunun varlığına işaret etmiş ve <sup>13</sup>C NMR spektrumunda (Spektrum 86) δ<sub>C</sub> 60.0 ve 56.4 ve 55.8'de yer alan üç sinyal bu görüşü desteklemiştir.



$^{13}\text{C}$  NMR ve HMBC spektrumlarının değerlendirilmesi sonucunda, singlet protonların moleküldeki 3 ( $\delta_{\text{H}}$  6.72;  $\delta_{\text{C}}$  103.3) ve 8 ( $\delta_{\text{H}}$  6.80;  $\delta_{\text{C}}$  91.4) numaralı karbonlara ait olduğu; metoksi gruplarının ise 6, 7 ve 4' ( $\delta_{\text{C}}$  sırasıyla 131.9, 158.6 ve 151.2) numaralı karbonlar ile etkileşimde oldukları gözlenmiştir (Spektrum 87).

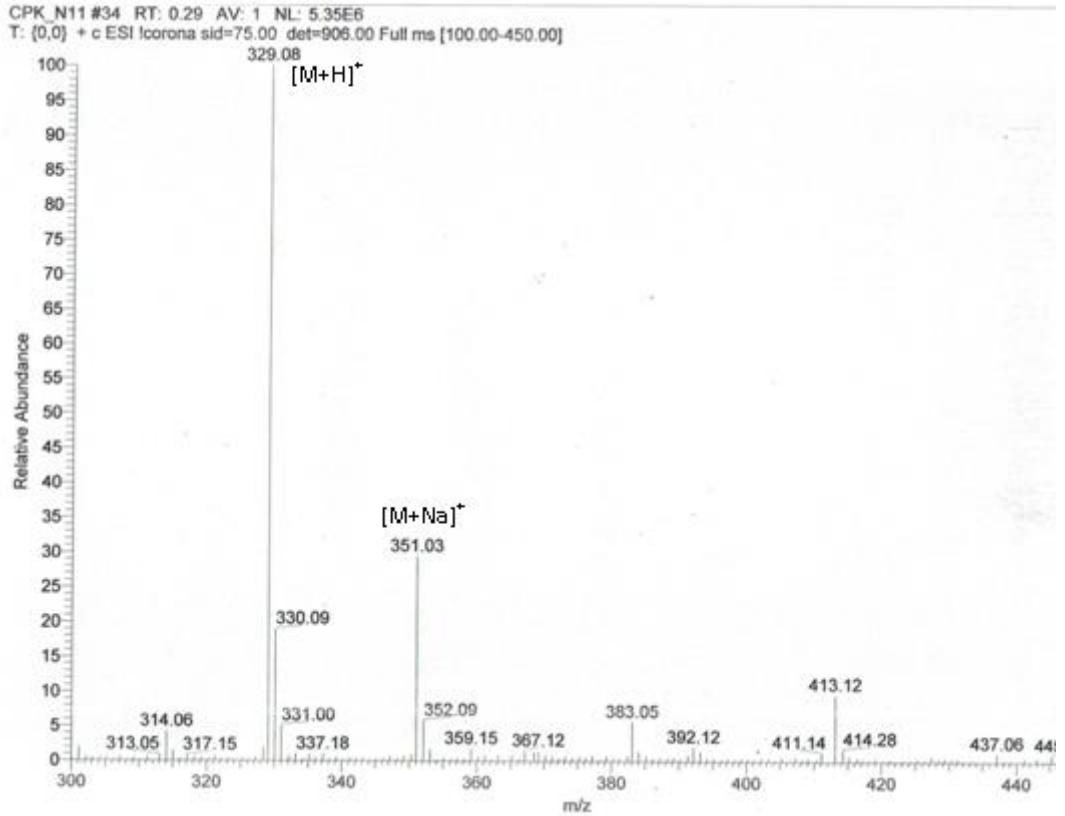
Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde **CP-8** kodlu bileşiğin öpatorin olduğu belirlenmiştir.

**CP-9** molekülüne ait  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları (Spektrum 89 ve Spektrum 90) incelendiğinde molekülün yapısının CP-8 molekülü ile benzer olduğu (Penta-süstitüe flavon aglikonu ve B halkası ABX sistemi şeklinde tri-süstitüe) görülmüştür.  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda  $\delta_{\text{H}}$  3.98, 3.97, 3.96 ve 3.92'de görülen üçer proton yüksekliğindeki dört singlet sinyal, CP-8'den farklı olarak, dört metoksi grubunun varlığına işaret etmiş ve moleküllerin pozitif iyon kütle spektrumları arasında gözlenen 14 akb fark (CP-8:  $m/z$  345.08  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ve CP-9:  $m/z$  359.06  $[\text{M}+\text{H}]^+$ ) molekül üzerinde ilave bir metil süstitüsyonu olduğu görüşünü desteklemiştir. HMBC spektrumunda gözlenen uzak mesafe etkileşimlerinden (Spektrum 91) hareketle, metoksi gruplarının 6, 7, 3' ve 4' ( $\delta_{\text{C}}$  sırasıyla 132.8, 158.9, 149.5 ve 152.5) karbonları üzerinde buldukları belirlenmiştir.

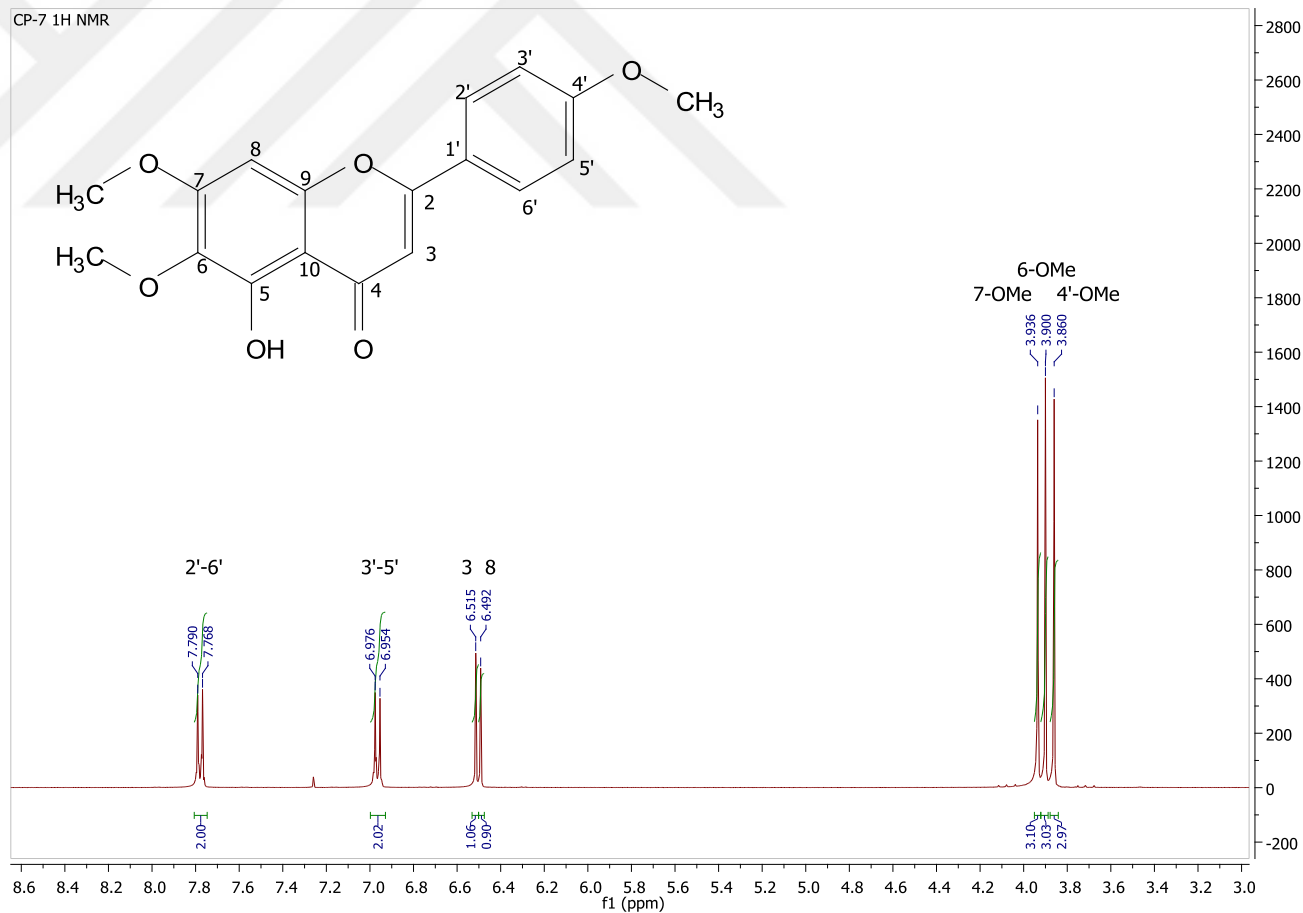
Spektral verilerin literatürde yer alan veriler ile karşılaştırılması sonucunda **CP-9** kodlu bileşiğin 3'-metoksi öpatorin olduğu belirlenmiştir (107).

**Tablo 28.** CP-7, CP-8 ve CP-9'a ait  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  NMR verileri

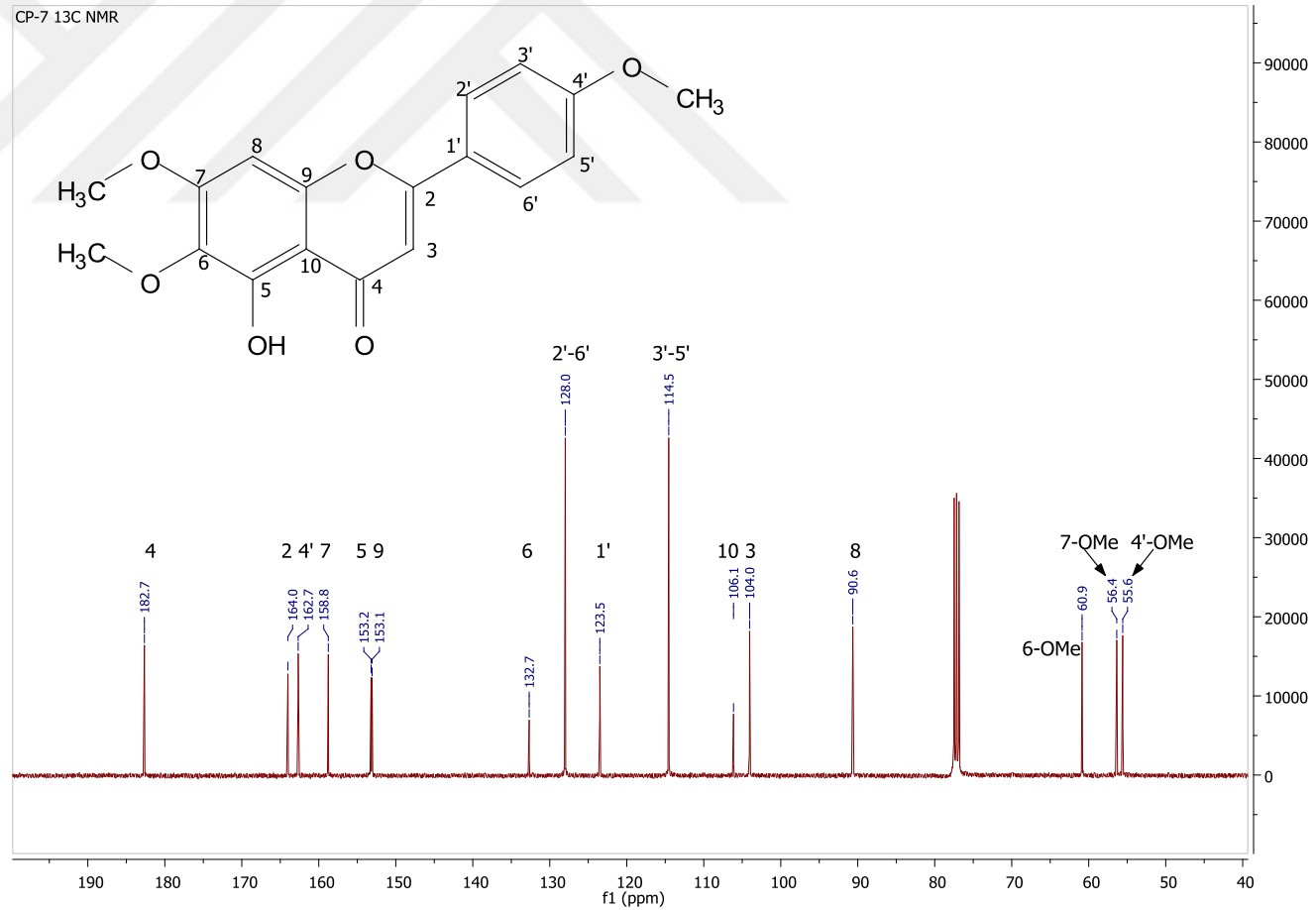
		CP-7 $\text{CDCl}_3$			CP-8 $\text{DMSO-}d_6$			CP-9 $\text{CDCl}_3$		
H/C	Mult.	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$J$ (Hz)	$\delta_{\text{C}}$
2				164.0			163.8			164.1
3	CH	6.52	<i>s</i>	104.0	6.72	<i>s</i>	103.3	6.58	<i>s</i>	104.6
4	C			182.7			182.1			182.7
5	C			153.2			152.1			153.3
6	C			132.7			131.9			132.8
7	C			158.8			158.6			158.9
8	CH	6.49	<i>s</i>	90.6	6.80	<i>s</i>	91.4	6.54	<i>s</i>	90.7
9	C			153.1			152.6			153.2
10	C			106.1			105.1			106.3
1'	C			123.5			122.9			123.9
2'	CH	7.77	<i>d</i> (8.8)	128.0	7.42	<i>d</i> (2.4)	113.0	7.33	<i>d</i> (2)	109.0
3'	CH/C	6.96	<i>d</i> (8.8)	114.5			146.8			149.5
4'	C			162.7			151.2			152.5
5'	CH	6.96	<i>d</i> (8.8)	114.5	7.04	<i>d</i> (8.4)	112.0	6.97	<i>d</i> (8.4)	111.4
6'	CH	7.77	<i>d</i> (8.8)	128.0	7.50	<i>dd</i> (8.4/2.4)	118.7	7.51	<i>dd</i> (8.4/2)	120.2
6-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.90	<i>s</i>	60.9	3.73	<i>s</i>	60.0	3.92	<i>s</i>	61.0
7-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.94	<i>s</i>	56.4	3.90	<i>s</i>	56.4	3.97	<i>s</i>	56.3
3'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>							3.98	<i>s</i>	56.2
4'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.86	<i>s</i>	55.6	3.86	<i>s</i>	55.8	3.96	<i>s</i>	56.5



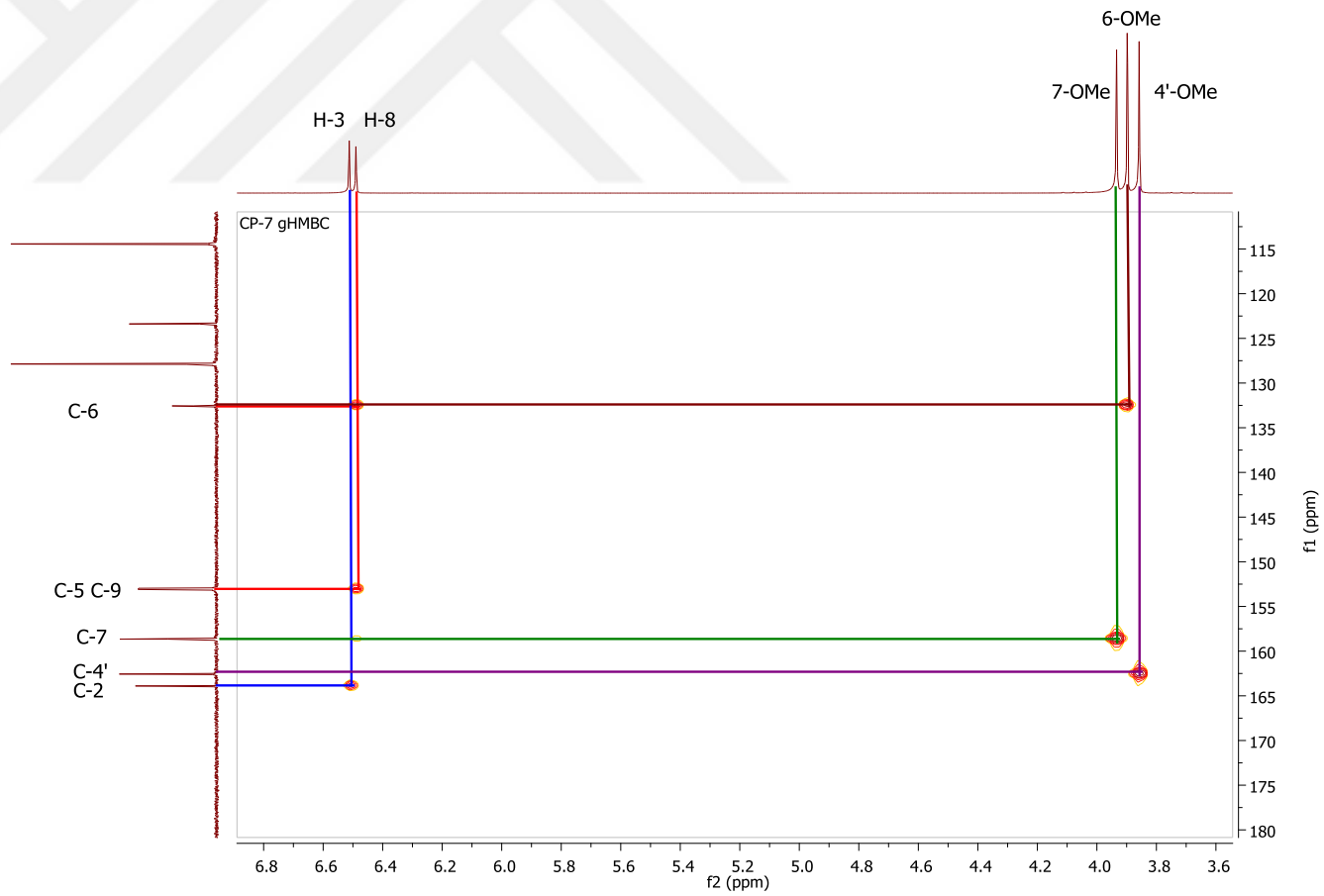
**Spektrum 80.** CP-7 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)



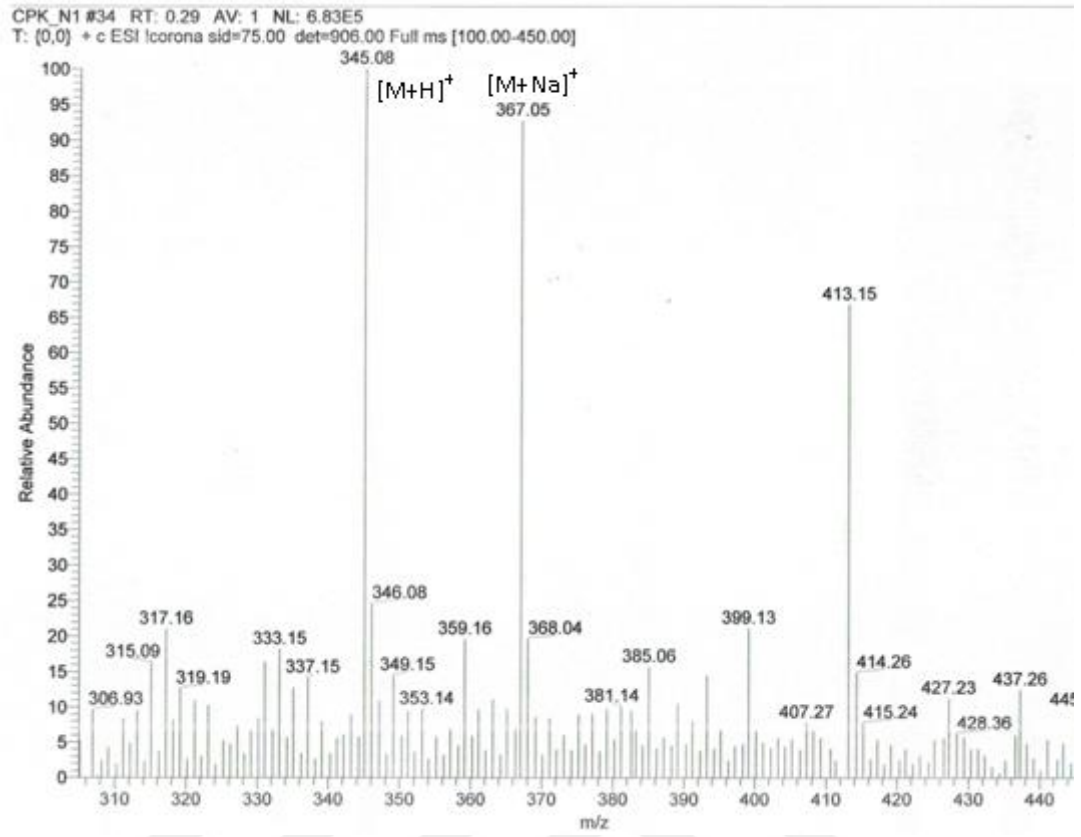
Spektrum 81. CP-7 <sup>1</sup>H NMR spektrum (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



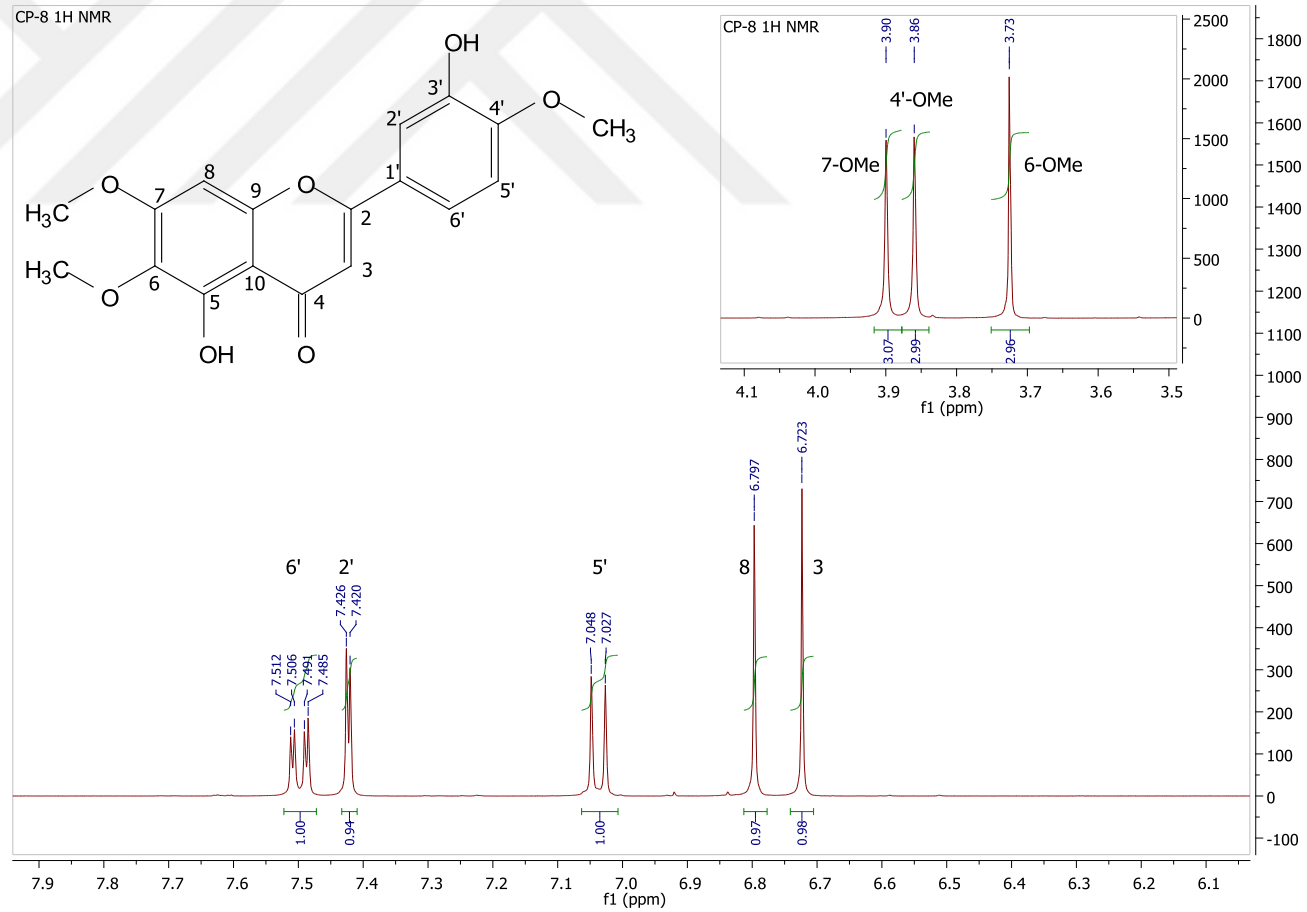
Spektrum 82. CP-7 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



**Spektrum 83.** CP-7 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)

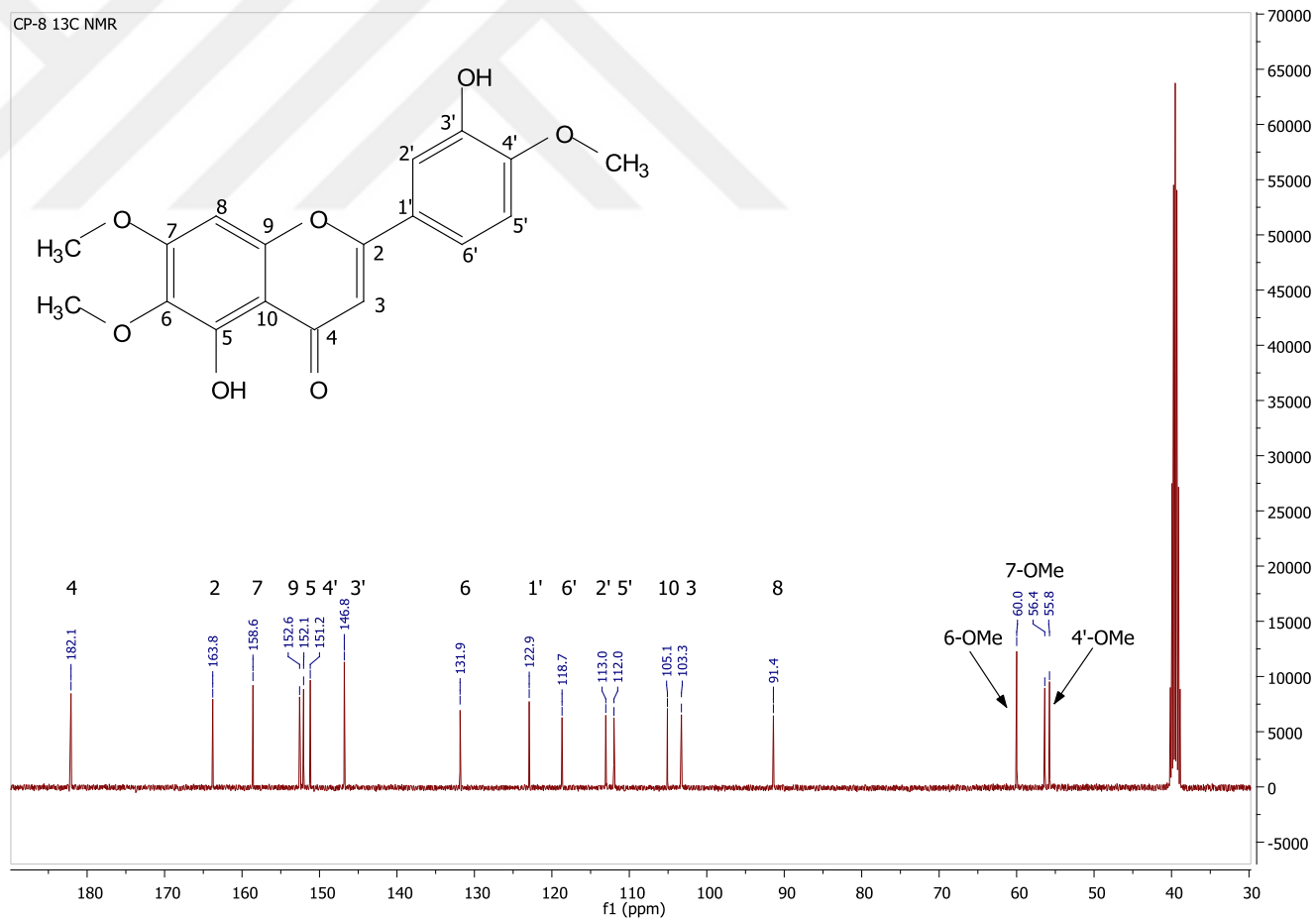


**Spektrum 84.** CP-8 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)

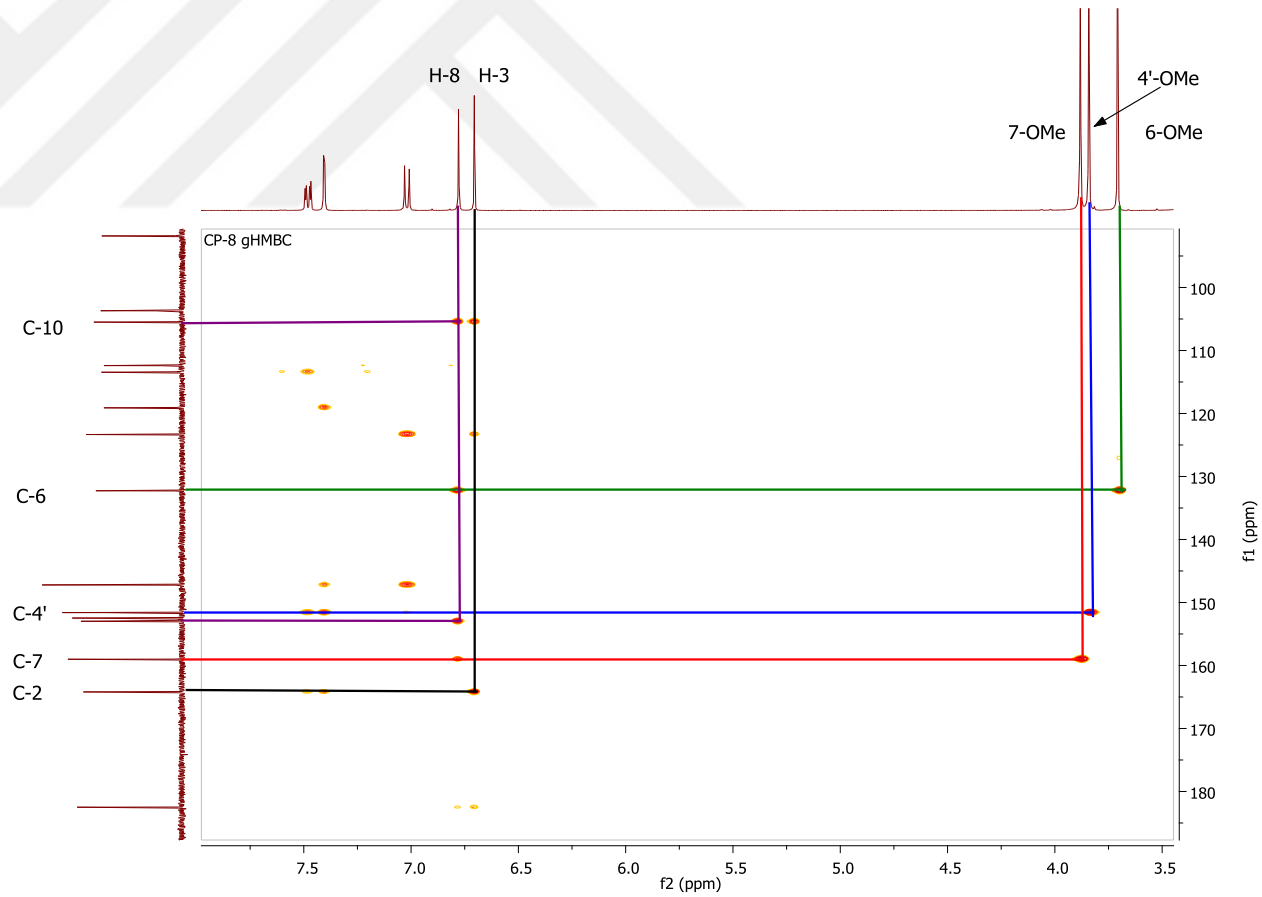


Spektrum 85. CP-8  $^1\text{H}$  NMR spektrumu (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )

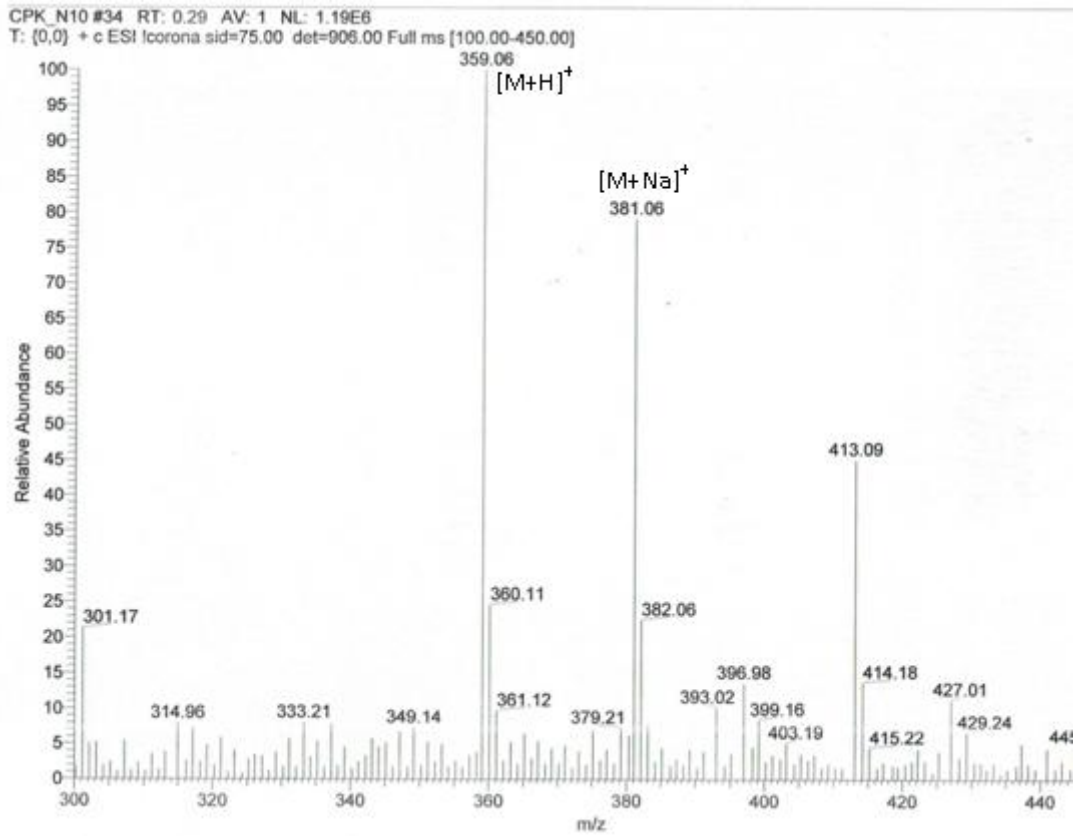




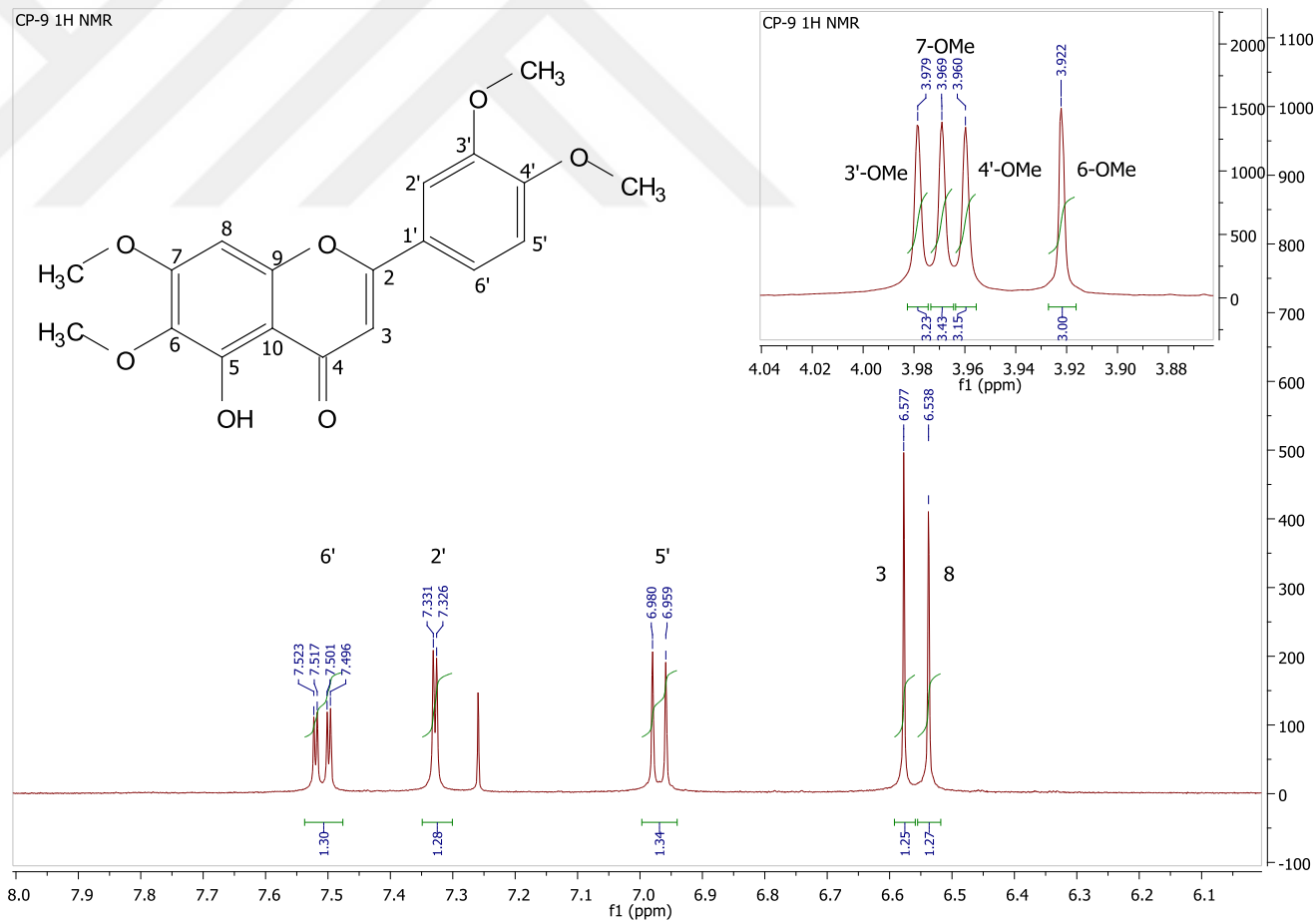
Spektrum 86. C-8 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)



**Spektrum 87.** CP-8 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)

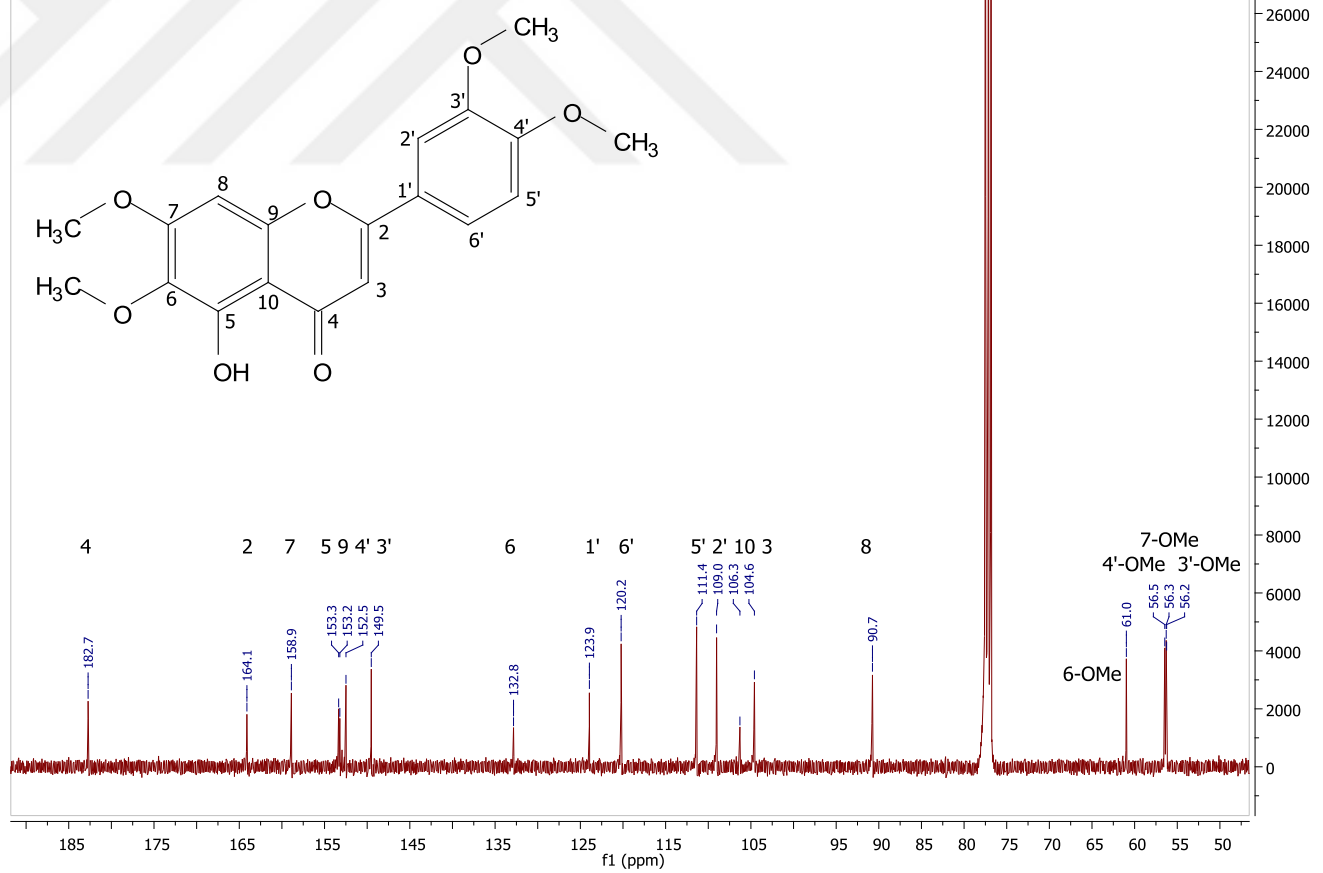


**Spektrum 88.** CP-9 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)

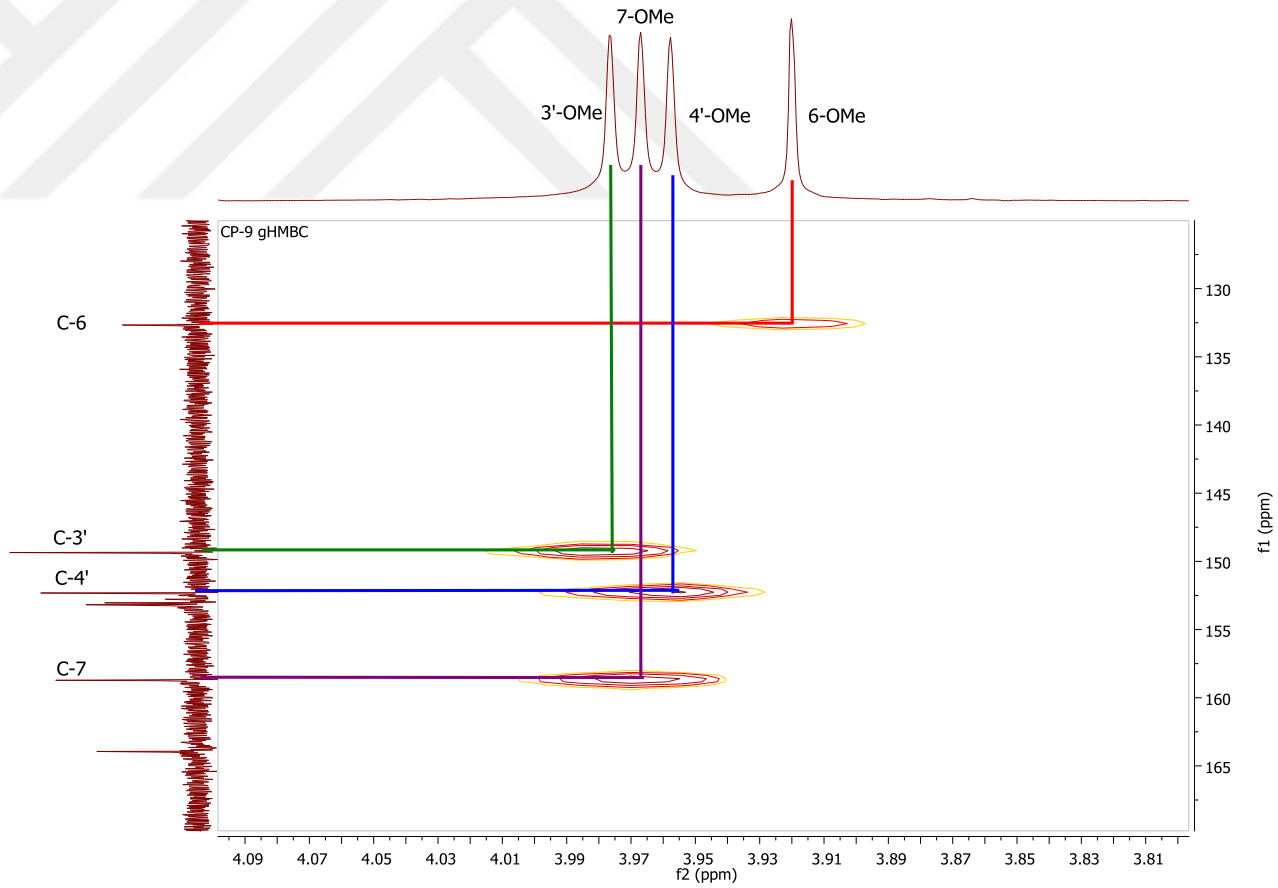


**Spektrum 89.** CP-9 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

CP-9 13C NMR



Spektrum 90. CP-9 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

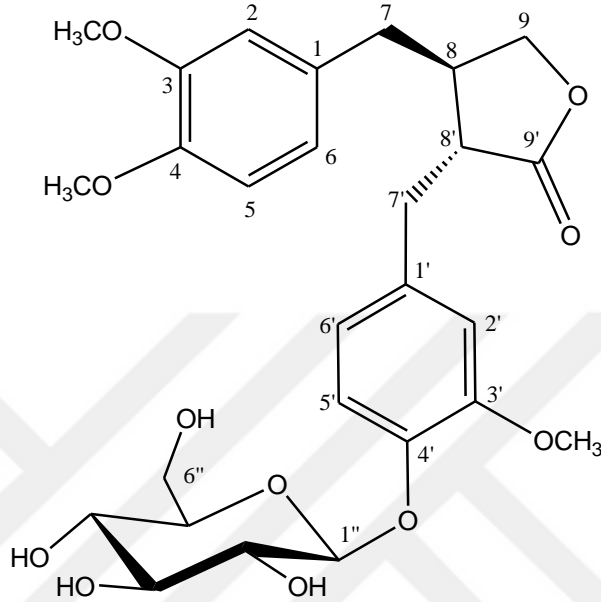


Spektrum 91. CP-9 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu NMR spektrumu (HMBC)

### 4.1.2.3. LİGNAN GLUKOZİTİ

CP-10

Arktiin



Sinonim	: Arktigenin-4'- <i>O</i> -glukozit
Formül	: C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub>
Molekül ağırlığı	: 534.21
LC-MS <i>m/z</i>	: 557.28 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub> Na: 557.20), Spektrum 92 573.25 [M+K] <sup>+</sup> (C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> O <sub>11</sub> K: 573.17), Spektrum 92
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 93, Tablo 29
<sup>13</sup> C NMR	: Spektrum 94, Tablo 29
COSY	: Spektrum 95
HSQC	: Spektrum 96, Spektrum 97
HMBC	: Spektrum 98

Renksiz zambak halinde elde edilen **CP-10** kodlu bileşik, İTK plağında, UV<sub>254</sub> altında koyu bordo renkli spot halinde görülmüş ve V/S reaktifi ile kırmızıdan bordo renge dönen bir bant halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 90:10:1; R<sub>f</sub>~0.3).

Molekülün pozitif ESI kütle spektrumunda gözlenen *m/z* 557.28 [M+Na]<sup>+</sup> ve 573.25 [M+K]<sup>+</sup> moleküler iyonlar, <sup>13</sup>C NMR spektrumu ile birlikte incelendiğinde molekülün formülü C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>O<sub>11</sub> olarak belirlenmiş ve doymamışlık derecesi 11 olarak hesaplanmıştır.

<sup>1</sup>H NMR spektrumu incelendiğinde, aromatik bölgede ABX sistemi şeklinde gözlenen 6 proton sinyali iki farklı trisüstitüe benzen halkasının varlığına işaret etmiş ve COSY spektrumunda <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H etkileşimleri değerlendirilerek iki ayrı spin sisteminin varlığı doğrulanmıştır ( $\delta_H$  6.59 *d*, *J*=2 Hz, H-2; 6.82 *d*, *J*=8.8 Hz, H-5; 6.59, *m*, H-6 ve 6.75 *d*, *J*=2 Hz, H-2'; 7.06 *d*, *J*=8.4 Hz, H-5'; 6.65 *dd*, *J*=2/8.4 Hz, H-6').

$\delta_H$  4.86'da gözlenen bir anomerik proton ve 3.40-3.90 ppm aralığında gözlenen multiyet proton sinyalleri yapıya bir oz ünitesinin bağlı olduğunu düşündürmüştür. Anomerik protonda gözlenen 7.6 Hz'lik yarıma sabiti oz ünitesinin  $\beta$  konfigürasyona sahip olduğunu göstermiştir. Oz ünitesine ait karbon rezonansları literatür ile karşılaştırıldığında yapının  $\beta$ -glukoz ile uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Bunun yanında  $\delta_H$  3.75 ve 3.79'da gözlenen 3 ve 6 proton yüksekliğindeki singlet sinyaller molekül üzerinde üç metoksi grubunun varlığına işaret etmiş ve  $\delta_C$  56.5 ve 56.7'de gözlenen karbon rezonansları bu görüşü desteklemiştir.

Aromatik yapılar, oz ünitesi ve metoksi gruplarına ait karbon sinyalleri ile 9 doymamışlık derecesi tespit edildikten sonra  $\delta_C$  37.7 (C-7), 42.5 (C-8), 72.8 (C-9), 35.4 (C-7'), 47.6 (C-8'), 181.2 (C-9') sinyalleri ve 2 doymamışlık derecesi, aromatik halkalara metilen köprüleri ile bağlanmış bir lakton halkasının varlığına işaret etmiş ve molekülün dibenzil-butiro lakton yapısında bir lignan olduğu düşünülmüştür.

Moleküle ait HMBC spektrumunda, H-1" ( $\delta_H$  4.86) ve C-4' ( $\delta$  149.1) arasında gözlenen uzak mesafe etkileşiminden hareketle,  $\beta$ -glukoz ünitesinin moleküle C-4' konumundan bağlı olduğu belirlenmiştir. Metoksi gruplarının da aromatik halkaların C-3, C-3' ve C-4 konumlarından bağlandıkları yine HMBC spektrumundaki uzak mesafe etkileşimleri ile doğrulanmıştır.



Spektral verilerimizin, daha önce çeşitli *Centaurea* türlerinden rapor edilen, arktin ile uyumlu olduğu gözlenmiş ve literatür ile karşılaştırılarak molekülün yapısı kesinleştirilmiştir (108).

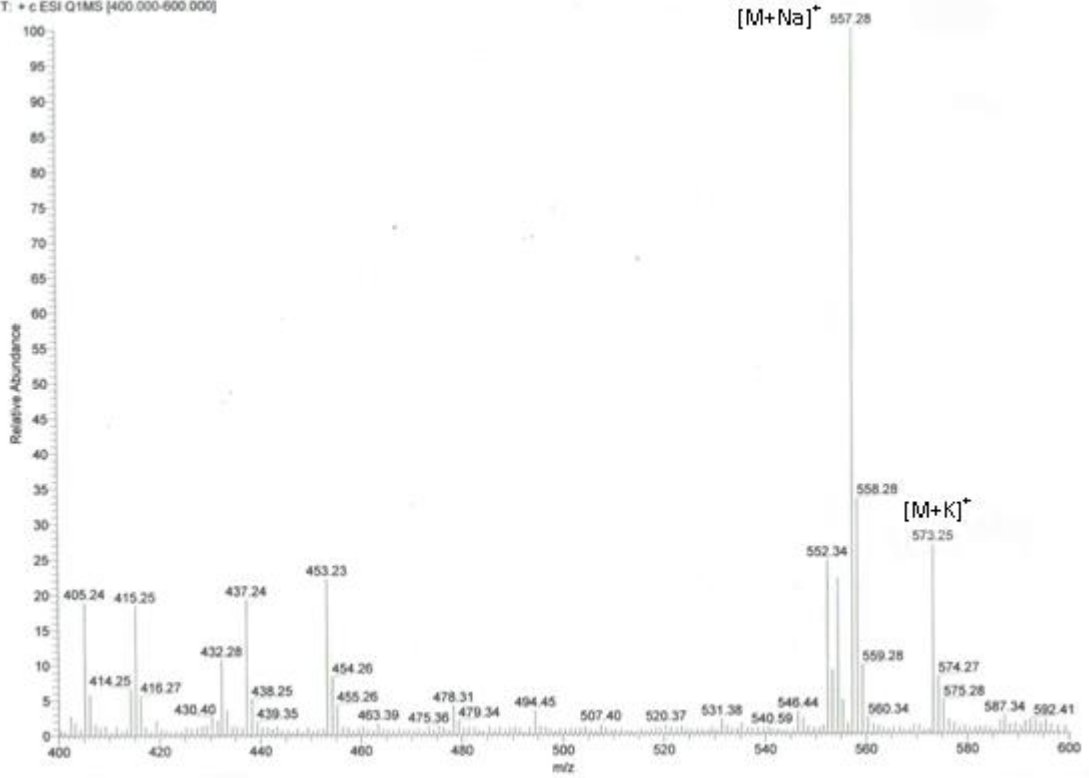


**Tablo 29.** CP-10 <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR verileri (CD<sub>3</sub>OD)

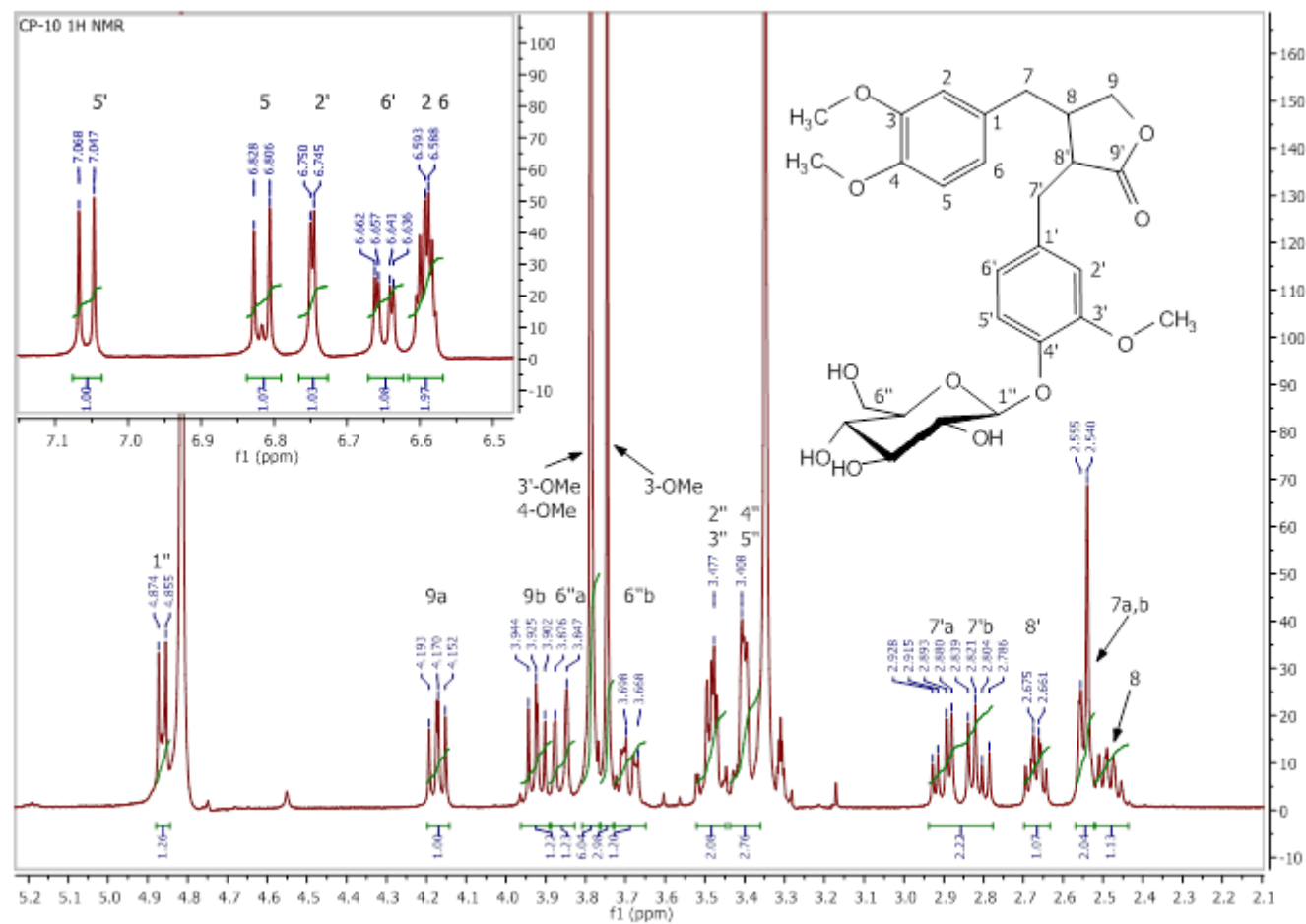
H/C	Mult.	$\delta_H$	$J$ (Hz)	$\delta_C$
Aglikon				
1	C			132.7
2	CH	6.59	<i>d</i> (2)	113.7
3	C			150.4
4	C			149.1
5	CH	6.82	<i>d</i> (8.8)	113.1
6	CH	6.59	<i>m</i> †	122.1
7	CH <sub>2</sub>	2.54	<i>m</i>	38.8
8	CH	2.48	<i>m</i>	42.5
9	CH <sub>2</sub>	4.17	<i>ddd</i> (8.8/7.6/7.2)	72.8
		3.92	<i>dd</i> (9.2/7.6)	
1'	C			134.2
2'	CH	6.75	<i>d</i> (2)	114.8
3'	C			150.6
4'	C			146.8
5'	CH	7.06	<i>d</i> (8.4)	117.9
6'	CH	6.65	<i>dd</i> (8.4/2)	123.0
7'	CH <sub>2</sub>	2.90	<i>dd</i> (14/5.2)	35.4
		2.81	<i>dd</i> (14/7.2)	
8'	CH	2.66	<i>m</i>	47.6
9'	C			181.2
3-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.75	<i>s</i>	56.5
3'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.79	<i>s</i>	56.7
4-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.79	<i>s</i>	56.5
Glukoz				
1''	CH	4.86	<i>d</i> (7.6)	102.9
2''	CH	3.48	<i>m</i> †	74.9
3''	CH	3.48	<i>m</i> †	77.8
4''	CH	3.41	<i>m</i> †	71.3
5''	CH	3.41	<i>m</i> †	78.1
6''	CH <sub>2</sub>	3.86	<i>d</i> (11.6)	62.5
		3.69	<i>dd</i> †	

† Sinyal örtüşmesi nedeniyle  $J$  değeri ölçülememiştir.

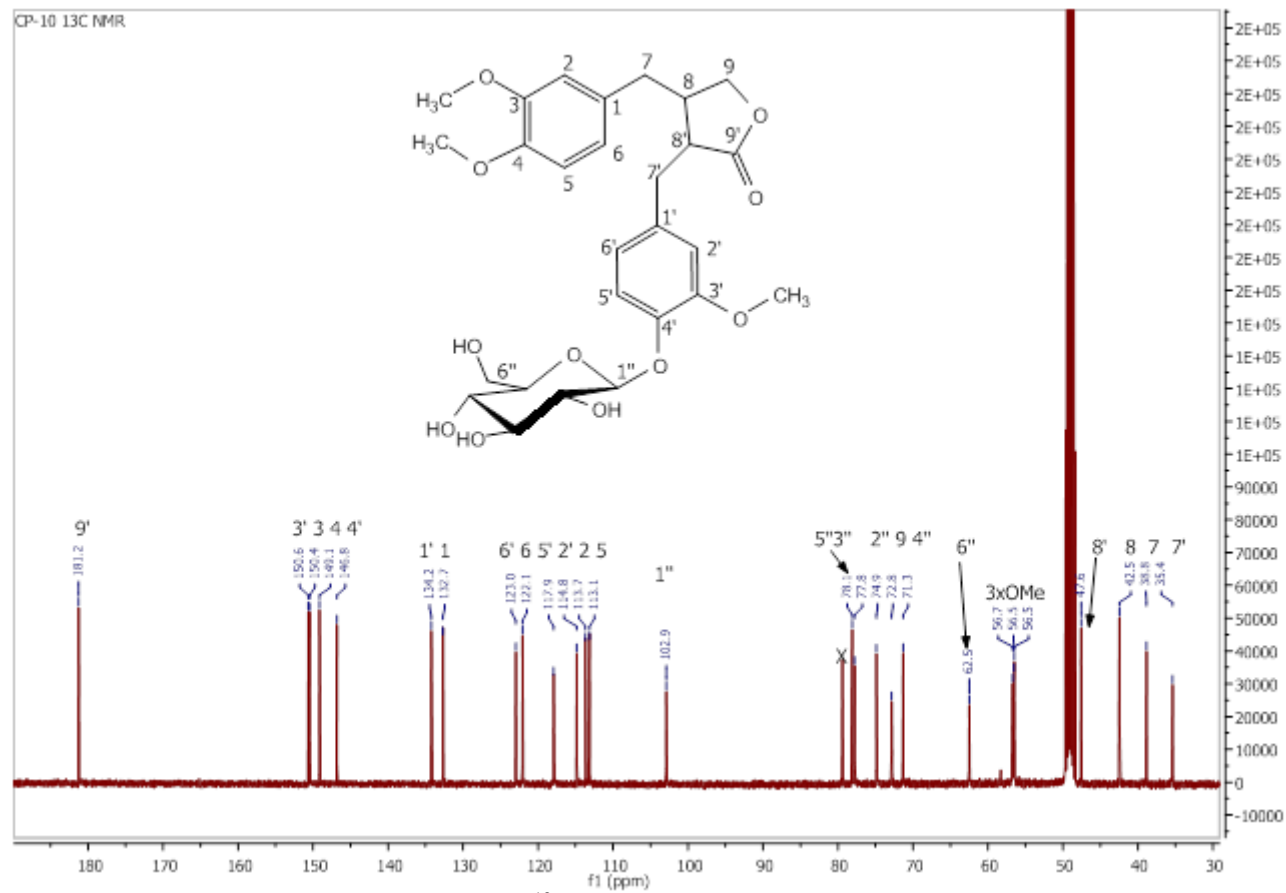
CPK-N2 #09 RT: 0.32 AV: 1 NL: 2.39E9  
T: + c ESI Q1MS [400.000-600.000]



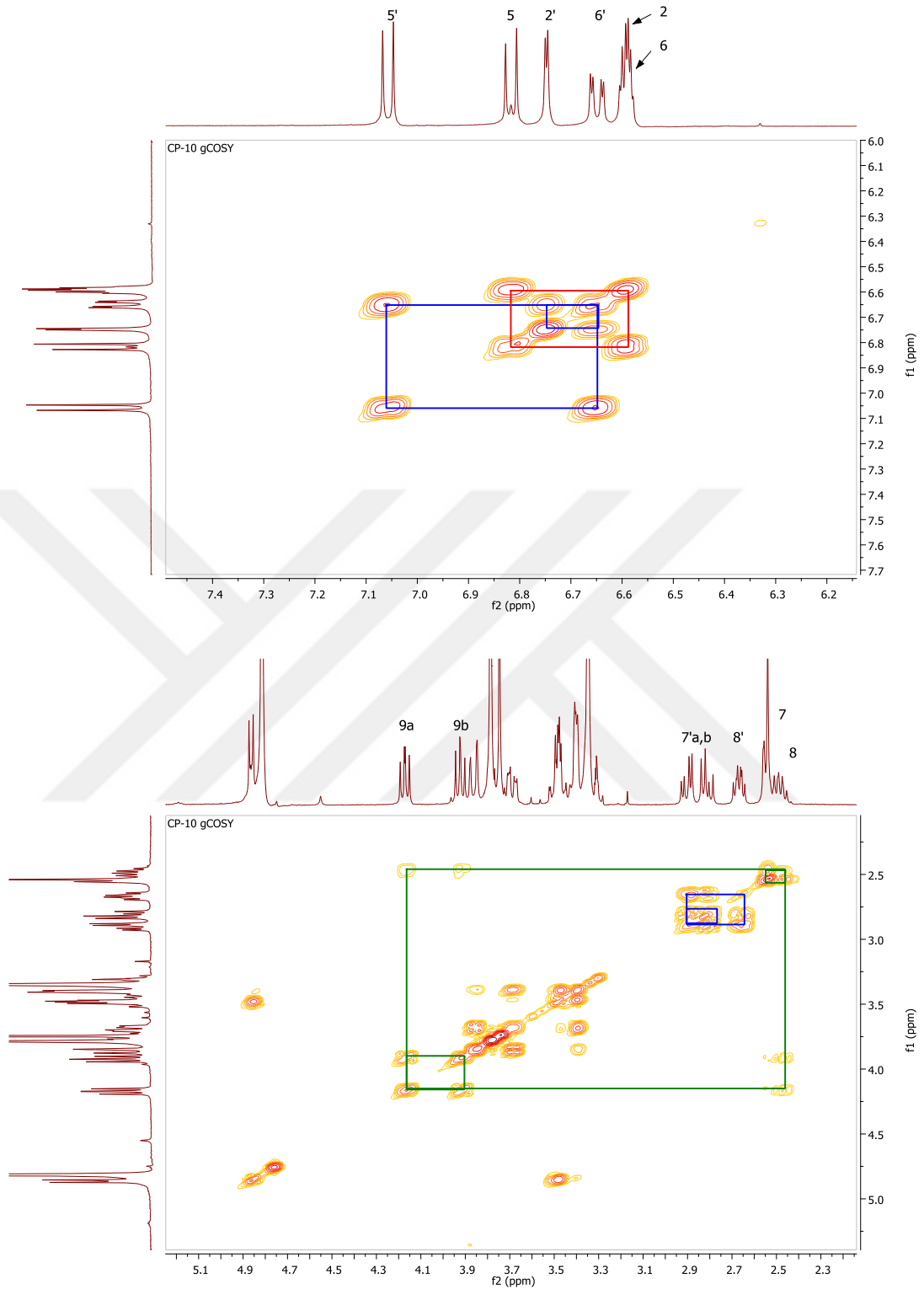
Spektrum 92. CP-10 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)



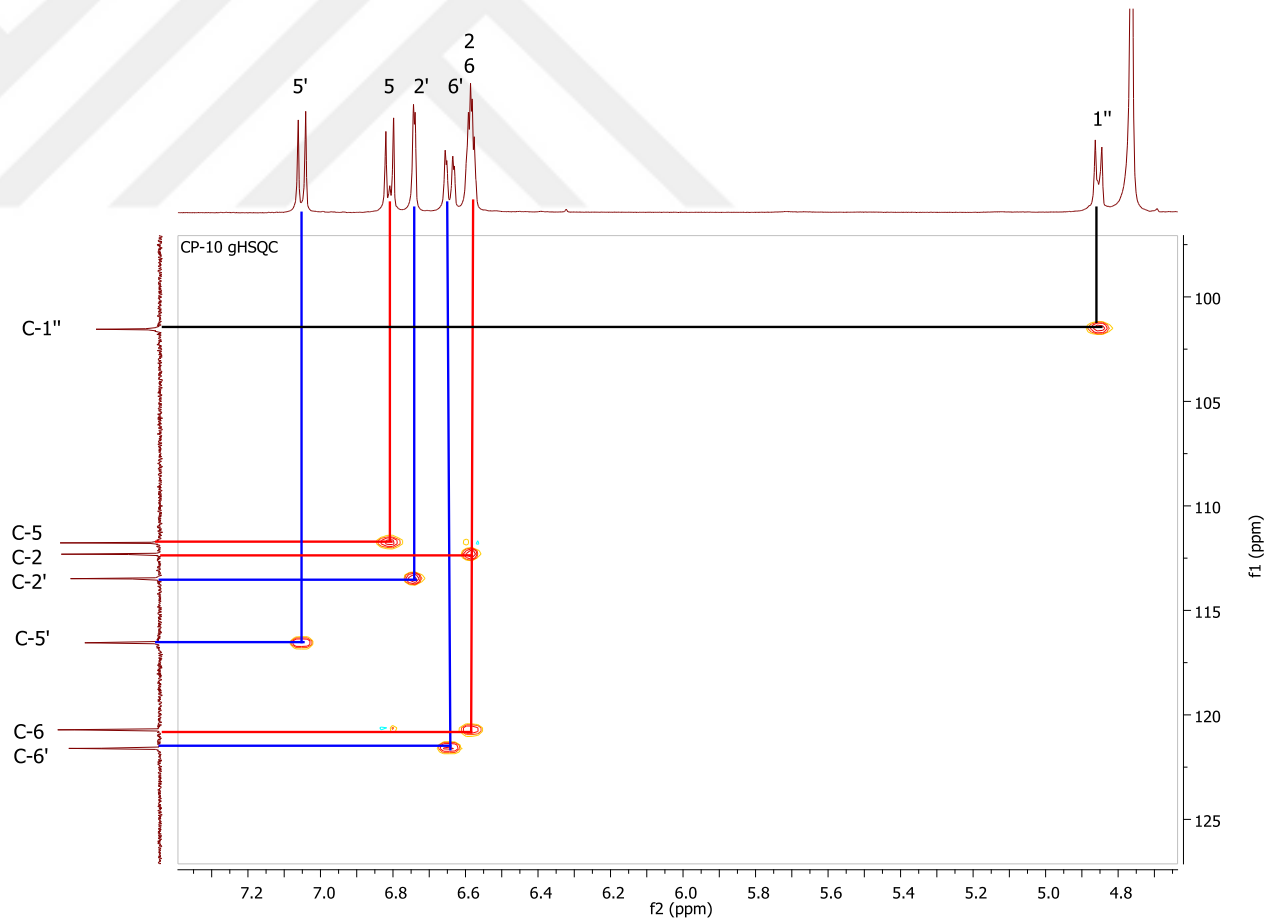
Spektrum 93. CP-10 <sup>1</sup>H NMR spektrumu (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



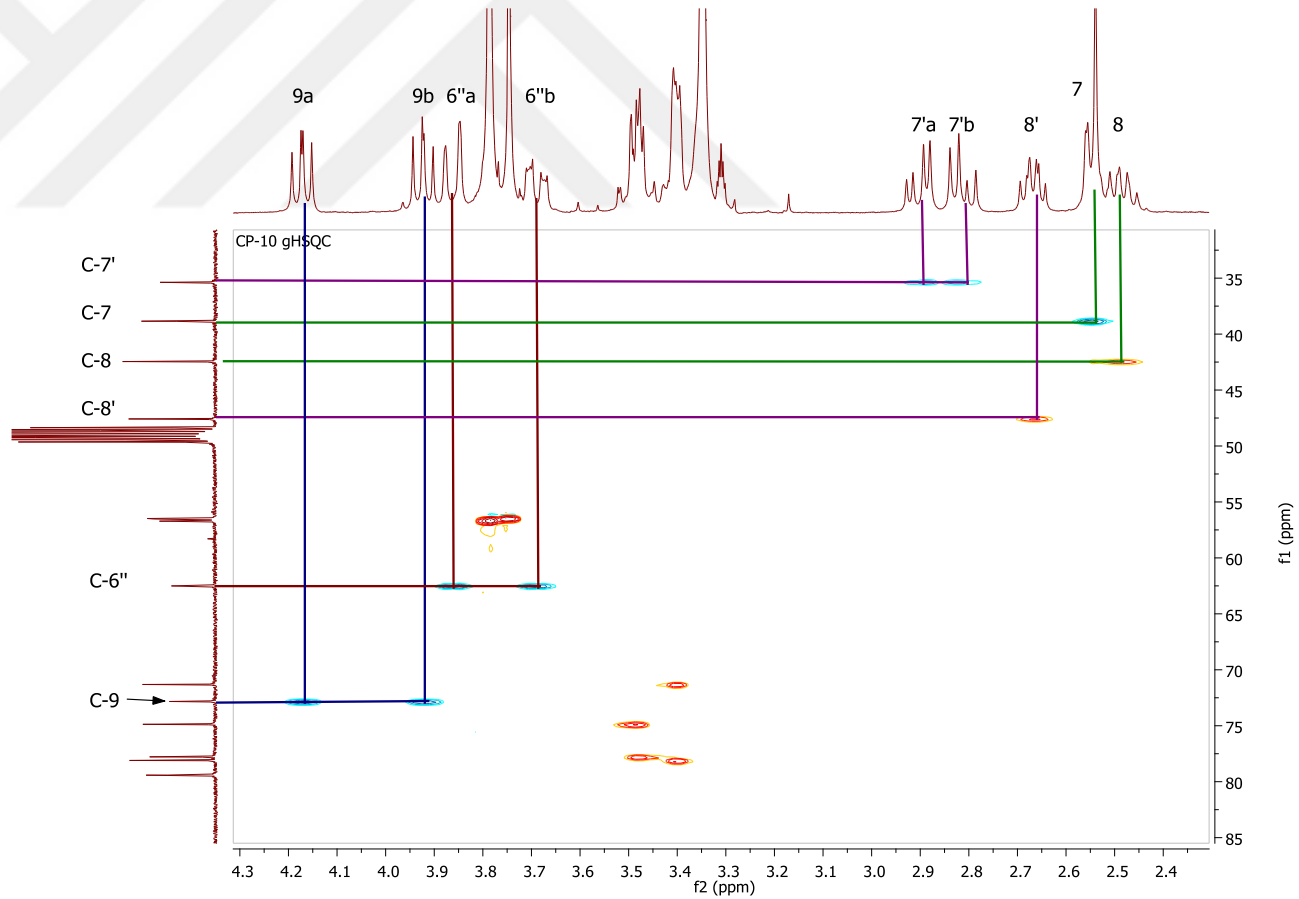
Spektrum 94. CP-10 <sup>13</sup>C NMR spektrumu (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



**Spektrum 95.** CP-10 2D  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  homonükleer korelasyonlu NMR spektrumları (COSY)

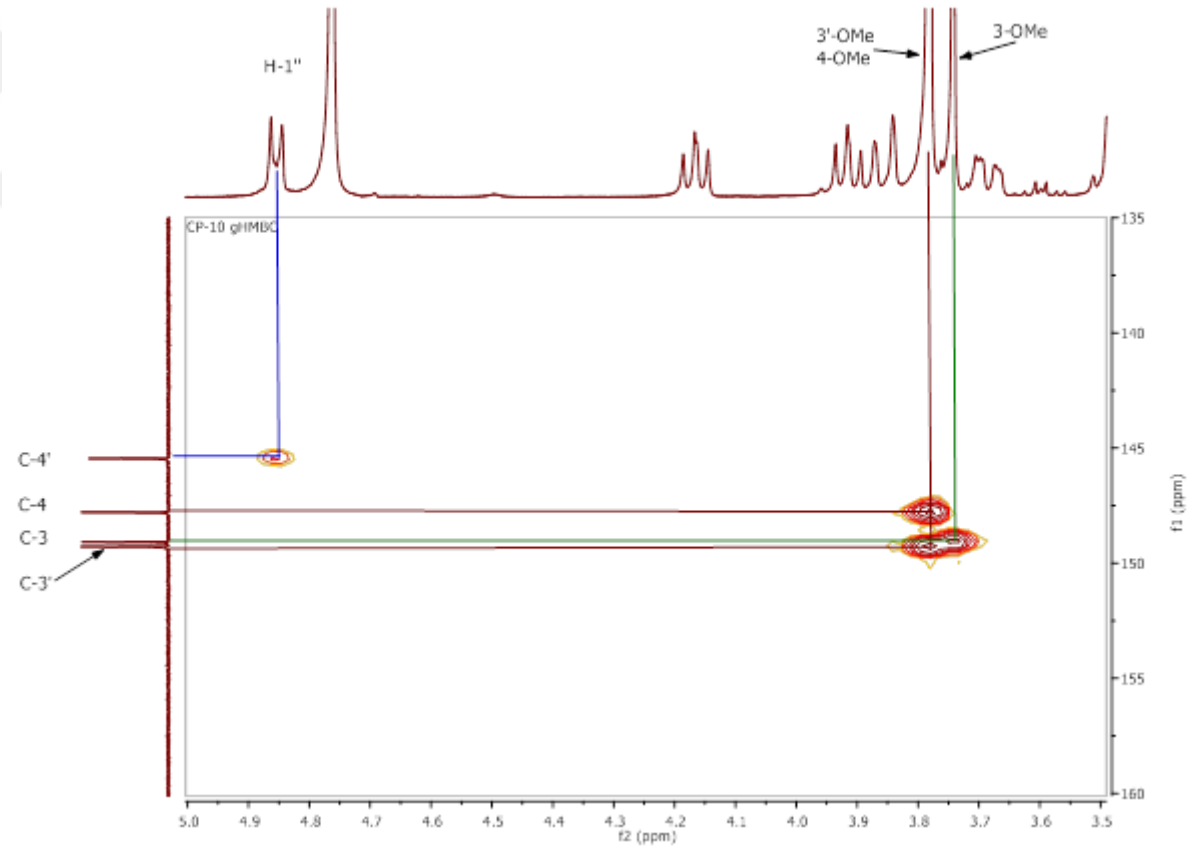


**Spektrum 96.** CP-10 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)



**Spektrum 97.** CP-10 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu yakın mesafe NMR spektrumu (HSQC)-2



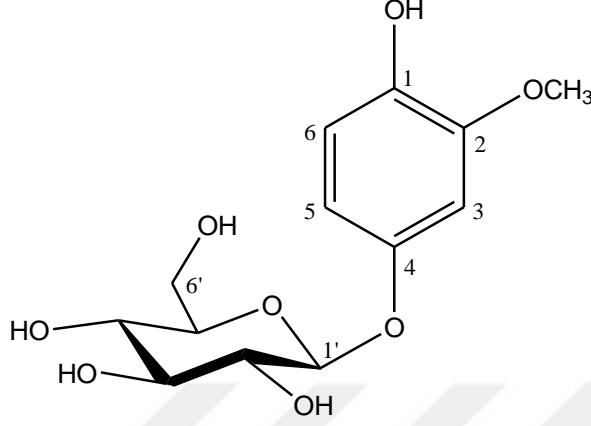


**Spektrum 98.** CP-10 2D  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  heteronükleer korelasyonlu uzak mesafe NMR spektrumu (HMBC)

#### 4.1.2.4. BASİT FENOLİK GLUKOZİT

##### CP-11

##### Taçiozit



Formül	: C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>
Molekül ağırlığı	: 302.10
LC-MS <i>m/z</i>	: 325.14 [M+Na] <sup>+</sup> (C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> Na: 325.08), Spektrum 99 341.15 [M+K] <sup>+</sup> (C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> K: 341.06), Spektrum 99
<sup>1</sup> H NMR	: Spektrum 100, Tablo 30

Kahverengi amorf toz halinde elde edilen CP-11 kodlu bileşik, İTK plağında, UV altında belirgin olmayan fakat V/S reaktifi uygulandığında zamanla açık kahverengiye dönen kiremit kırmızısı renkli bant halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 70:30:3, R<sub>f</sub> ~ 0.45).

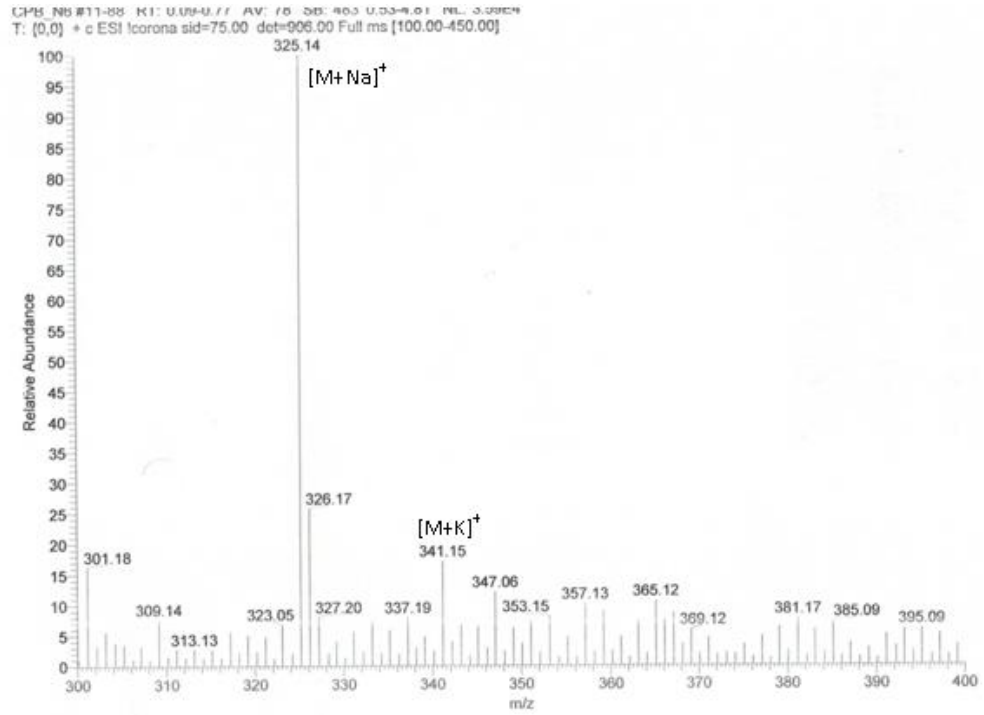
Moleküle ait <sup>1</sup>H NMR spektrumunda δ<sub>H</sub> 6.69 (*d*, *J*=8.4 Hz, H-6), 6.58 (*dd*, *J*=8.4/2.8 Hz, H-5) ve 6.80'de (*d*, *J*=2.8 Hz, H-3) gözlenen sinyaller molekülün trisüstitüe bir aromatik halka olduğunu göstermiştir. δ<sub>H</sub> 4.74'da gözlenen anomerik proton ve 3-3.90 ppm aralığında gözlenen multipler rezonanslar yapıya bir oz ünitesinin bağlı olduğunu göstermiş ve anomerik protonda gözlenen yarıma sabitinden (*d*, *J*=7.6 Hz) hareketle oz ünitesinin β-konfigurasyona sahip olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında 3.83 ppm'de gözlenen ve üç proton şiddetindeki singlet sinyal, aromatik yapı üzerinde bir metoksi grubunun varlığına işaret etmiştir.

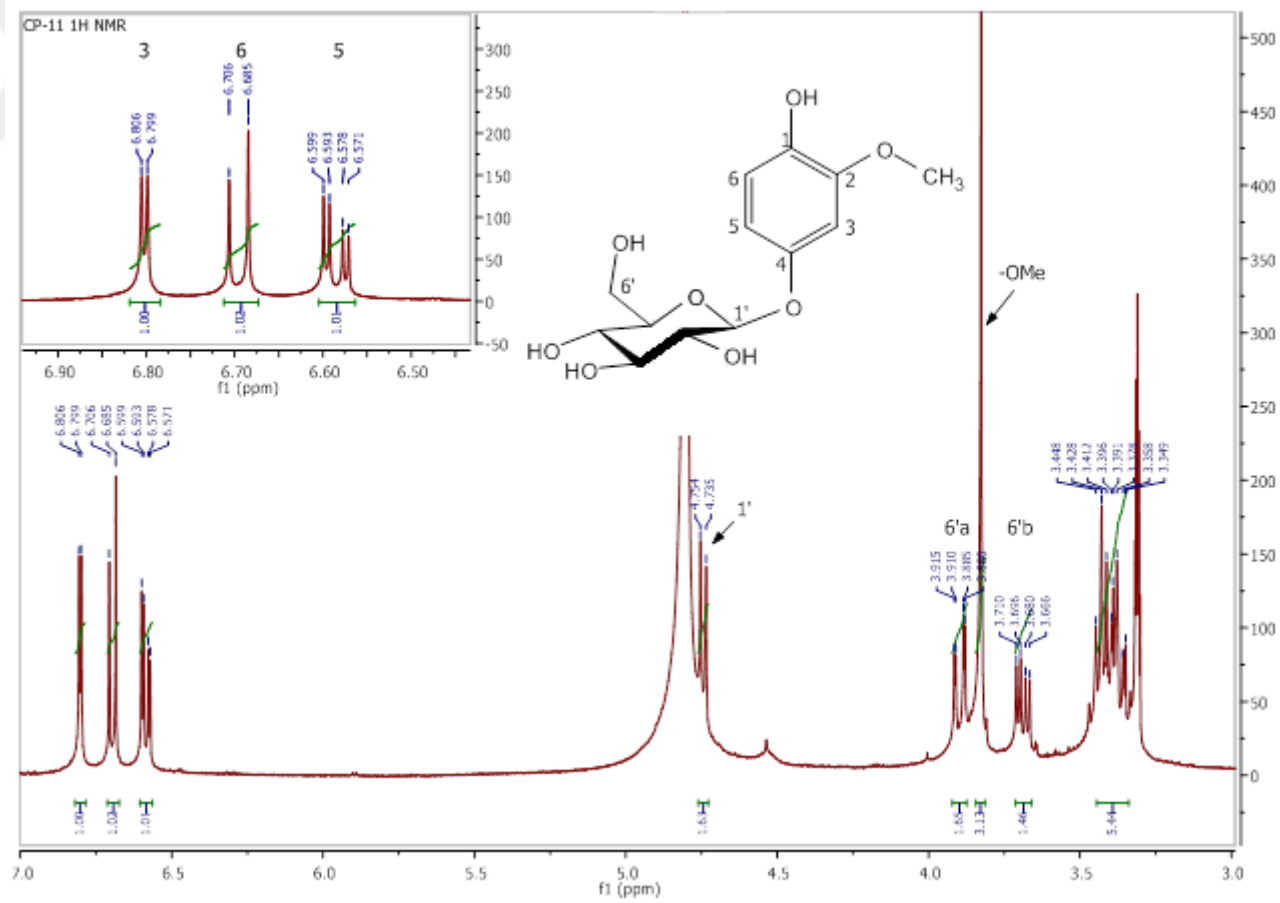
Spektral verilerimizin, daha önce *C. ensiformis*'ten izole edilen taçiozit ile uyumlu olduğu belirlenmiştir. Pozitif iyon kütle spektrumunda gözlenen *m/z* 325.14 [M+Na]<sup>+</sup> ve 341.15 [M+K]<sup>+</sup> sinyalleri de bu görüşü desteklemiştir. Sonuç olarak CP-11 molekülünün yapısı taçiozit olarak belirlenmiştir (61, 109).

**Tablo 30.** CP-11 <sup>1</sup>H NMR verileri (CD<sub>3</sub>OD)

H/C	Mult.	$\delta_H$	<i>J</i> (Hz)
1	C		
2	C		
3	CH	6.80	<i>d</i> (2.8)
4	C		
5	CH	6.58	<i>dd</i> (8.4/2.8)
6	CH	6.69	<i>d</i> (8.4)
OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	3.83	<i>s</i>
Glukoz			
1'	CH	4.74	<i>d</i> (7.6)
2'	CH	3.34-3.48	†
3'	CH	3.34-3.48	†
4'	CH	3.34-3.48	†
5'	CH	3.34-3.48	†
6'	CH <sub>2</sub>	3.89	<i>dd</i> (12/2)
		3.69	<i>dd</i> (12/5.6)

† Sinyal örtüşmesi nedeniyle *J* değeri ölçülememiştir.

**Spektrum 99.** CP-11 LC-MS kütle spektrumu (Pozitif mod)



Spektrum 100. CP11 <sup>1</sup>H NMR spektrumu

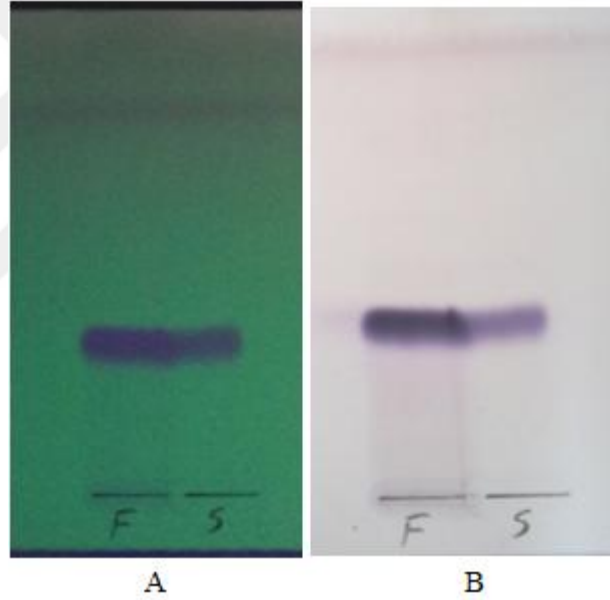
#### 4.1.2.4. FENİLPROPANOİT GLUKOZİTİ

##### CP-12

##### Siringin

Beyaz renkli amorf toz halinde elde edilen **CP-12** kodlu bileşik, İTK profilinde, UV<sub>254</sub> altında çok belirgin koyu mor spot olarak ve V/S reaktifi ile maviden mor renge dönen bir bant halinde gözlenmiştir (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O, 80:20:2; R<sub>f</sub> ~0.4).

Molekülün İTK profili ve V/S reaktifi ile gözlenen renk değişimi değerlendirilerek CP-12 kodlu molekülün yapısının *C. athoa*'dan izole edilen siringin (CA-10) ile aynı olabileceği düşünülmüştür. Mevcut örnek ile farklı sistemlerde İTK karşılaştırmalarının sonucunda maddelerin aynı olduğu görülmüştür.



**Resim 4.** CP-12 İTK profili (F: CP-12, S: Siringin; Silika jel alüminyum plak; Çözgen sistemi: CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O (80:20:2); A: UV-254 nm, B: V/S reaktifi)

## 4.2. BİYOLOJİK AKTİVİTE ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

### 4.2.1. Sitotoksik Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

*C. athoa* ve *C. polyclada* ekstrelerinden izole edilen seskiterpen yapısındaki 10 molekülün, 8 kanser (A549, CaCo-2, HeLa, MCF-7, MDA-MB-231, mPanc-96, PC3 ve U87MG) ile 1 normal (HEK293) hücre hattı üzerindeki sitotoksik aktiviteleri, MTT yöntemi kullanılarak araştırılmış ve pozitif kontrol olarak partenolit ve doksorubisin çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmada 50 µM konsantrasyon, aktivite için sınır olarak kabul edilmiş ve 100 µM konsantrasyonun üzeri etkisiz olarak değerlendirilmiştir.

Çalışma sonunda *C. athoa*'dan elde edilen 4'-hidroksipekterolit-14-O-asetat (CA-4) molekülünün tüm hücre hatlarına karşı etkili olduğu belirlenmiştir. En etkili sonuç MDA-MB-231 hücre hattına karşı gözlenirken (IC<sub>50</sub>: 25.6 µM) HEK293 (normal hücre hattı) üzerinde daha yüksek toksisite (IC<sub>50</sub>: 8.7 µM) gözlenmiştir. Elde edilen bulgular tablo halinde sunulmuştur.

**Tablo 31.** Ekstreler ve izole edilen seskiterpen moleküllerine ait sitotoksik aktivite bulguları

	IC <sub>50</sub> (µg/ml)±SS								
Ekstreler	A549	CaCo-2	HeLa	MCF-7	MDA-MB-231	mPanc-96	PC3	U87MG	HEK293
CAK	21.77 ± 1.45	21.62±0.8	24.87±0.73	-	23.05±1.71	47.97±0.98	>50	33.35±1.45	16.63±1.92
CAM	-	-	>50	-	-	-	-	-	>50
CPK	30.63±1.99	15.34±1.56	10.42±1.49	-	10.13±1.01	49.82±0.25	>50	34.56±1.96	7.23±1.01
CPM	-	-	38.1±1.90	-	-	-	-	-	>50
- Aktif değil (>75 µg/ml)									

	IC <sub>50</sub> (µM)±SS								
Saf Maddeler	A549	CaCO-2	HeLa	MCF-7	MDA-MB-231	mPanc-96	PC3	U87MG	HEK293
CA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CA3	-	-	-	-	>50	-	-	-	>50
CA4	>50	37.79±1.87	39.43±1.09	>50	25.58±0.86	47.97±0.58	>50	35.40±0.30	8.69±1.75
CP1	-	-	-	-	-	-	-	-	>50
CP2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CP6	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Partenolit	6.05	4.41	23.36	>50	5.06	5.92	14.86	8.01	4.42
Doksorubisin	1.15	-	6.21	-	16.86	3.6	13.91	1.68	1.46
- Aktif değil (>100 µM)									

#### 4.2.2. Antienflamatuvar Aktivite Çalışmalarına Ait Bulgular

*C. athoa* ve *C. polyclada* ekstrelerinden izole edilen seskiterpen yapıdaki 10 molekülün, antienflamatuvar aktiviteleri, NF- $\kappa$ B ve iNOS inhibisyon yöntemleri ile incelenmiş ve pozitif kontrol olarak partenolit çalışmaya dahil edilmiştir.

Moleküllerin HeLa hücreleri üzerindeki NF- $\kappa$ B aktivitesini inhibe edici etkilerini belirlemek amacıyla, hücreler PMA ile indüklenmiş ve inkübasyon sonrasında lusiferaz substratı kullanılarak açığa çıkan ışınım miktarı luminometre ile ölçülmüştür.

iNOS aktivite inhibisyonunu belirlemek amacıyla ise hücreler LPS ile indüklenerek enflamasyon oluşturulmuş, inkübasyon sonrasında Griess reaktifi ile ortama salınan nitrit miktarı belirlenmiştir. Bununla birlikte maddelerin RAW 264.7 hücreleri üzerindeki etkilerini belirlemek için MTT yöntemi ile hücre canlılıkları kontrol edilmiştir. Moleküllerin RAW 264.7 hücreleri üzerinde sitotoksosite göstermedikleri ( $IC_{50}$ :  $>50 \mu M$ ) belirlenmiştir.

Çalışma sonunda 4'-hidroksipekterolit-14-*O*-asetat (CA-4) ve 13-*N*-prolin melitensin (CP-4) moleküllerinde aktivite saptanmıştır. Moleküllerin NF- $\kappa$ B ve İNOS üzerindeki inhibitör aktiviteleri ( $IC_{50}$  değerleri) tablo halinde sunulmuştur.



**Tablo 32.** Ekstreler ve izole edilen seskiterpen moleküllerine ait antienflamatuvar aktivite bulguları.

Ekstreler	IC <sub>50</sub> (µg/ml)±SS	
	iNOS	Nf-κB
CAK	22.93 ± 1.13	10.44±0.63
CAM	>50	-
CPK	17.57 ± 1.27	14.34 ± 0.13
CPM	>50	-
- Aktif değil (>75 µg/ml)		

Saf maddeler	IC <sub>50</sub> (µM)±SS	
	iNOS	NF-κB
CA1	-	-
CA2	-	-
CA3	-	-
CA4	19.94 ± 0.06	40.52 ± 0.5
CP1	-	-
CP2	-	-
CP3	-	-
CP4	42.36 ± 1.28	13.10 ± 1.33
CP5	-	-
CP6	-	-
Partenolit	3.23	6.78
- Aktif değil (>100 µM)		

## BÖLÜM 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, Türkiye florasında doğal yayılış gösteren iki *Centaurea* türünün toprak üstü kısımlarından hazırlanan kloroform ve metanol ekstreleri, taşıdıkları sekonder metabolitler yönünden incelenmiştir. Elde edilen bileşikler daha sonra antienflamatuvar ve sitotoksik aktiviteleri yönünden araştırılmıştır.

Araştırma materyali olarak seçilen *C. athoa* DC., Balıkesir, Kazdağı ve endemik *C. polyclada* DC., İzmir, Kayadibi köyü mevkilerinden, Haziran 2010 tarihinde toplanmış ve herbaryum örnekleri Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Herbaryumu'na kaydedilmiştir (IZEF-5916 ve IZEF-5914).

Bitkilerin açık havada ve gölgede kurutulmuş toprak üstü kısımları sırasıyla *n*-hekzan, kloroform ve metanol ile ekstre edilmiştir. *Centaurea* türleri üzerinde gerçekleştirdiğimiz biyoaktivite taramasında, *C. athoa* ve *C. polyclada*'dan elde edilen kloroform ekstrelerinin, çeşitli kanser hücre hatları üzerinde sitotoksik etki gösterdikleri belirlenmiştir. Nf-κB, SP-1 ve iNOS inhibisyonuna dayalı *in vitro* antienflamatuvar aktivite denemelerinde ise bitkilerin kloroform ekstrelerinin aktiviteleri doğal kaynaklı bir antienflamatuvar ajan olan partenolite yakın bulunmuştur. *C. athoa*'nın antienflamatuvar aktivitesi, karagenan indüklü sıçan pençe ödemi yöntemi ile *in vivo* olarak incelenmiş ve 25 mg/kg dozda sentetik bir antienflamatuvar ajan olan indometazine (10 mg/kg) yakın etki gösterdiği belirlenmiştir (13, 14).

Çeşitli kromatografik yöntemler ile gerçekleştirilen izolasyon çalışmaları sonucunda; *C. athoa* bitkisinden 11, *C. polyclada* bitkisinden ise 12 sekonder metabolit elde edilmiştir. Elde edilen moleküllerin kimyasal yapıları IR, 1D- ve 2D NMR ve kütle spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Bu maddeler kimyasal olarak sınıflandırıldığında, geniş bir profil ortaya koymuşlardır.

- a) Seskiterpenler
  - a. Eleman tip (CA1, CA2, CA3, CP1, CP2, CP3, CP4, CP5)
  - b. Ödesman tip (CP6)
  - c. Germakran tip (CA4)
- b) Flavonlar (CP7, CP8, CP9)
- c) Basit fenolik bileşikler ve glukozitleri (CA5, CA6, CA7, CP11)
- d) Fenilpropanoit glukozitleri (CA9, CA10=CP12)
- e) Asetofenon glukoziti (CA8)
- f) Lignan glukoziti (CP10)
- g) Fitosterol glukoziti (CA11)

Seskiterpenler, *Centaurea* türlerinden izole edilen sekonder metabolitlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalar, *Centaurea* türlerinde germakran, eleman, ödesman ve guayan tip olmak üzere dört ana seskiterpen yapısının bulunduğunu ortaya koymuştur. Dört temel yapı arasında, en kalabalık grubu guyanolit türevleri oluşturmaktadır ve bunu germakranolit türevleri takip etmektedir. *Centaurea* türlerinde farklı fonksiyonel gruplar taşıyan 100'den fazla guyanolit türevi rapor edilmiştir (3).

Çalışmamızda her iki bitkiden, 8 eleman, 1 ödesman ve 1 germakranolit olmak üzere, toplam 10 seskiterpen yapıda molekülün izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Moleküllerin yapıları değerlendirildiğinde, 8 tanesinin eleman tip olması dikkat çekicidir.

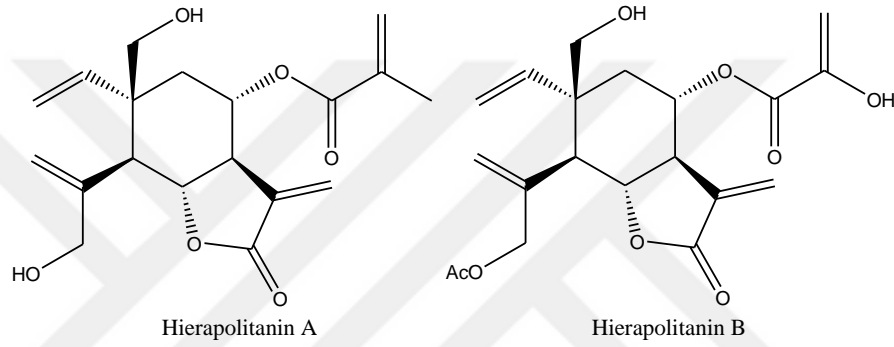
Seskiterpenler ile gerçekleştirilen türevlendirme çalışmalarında, elemanolitlerin, Cope düzenlenme reaksiyonu (termal izomerizasyon) ile germakranolit türevlerinden kolayca oluşabildiği ve bu yapıların artefakt olabileceğini bildiren çeşitli çalışmalar mevcuttur (110, 111). Çalışmamızda ise bitkilerin kurutulması, ekstraksiyon ve izolasyon çalışmaları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiş, yoğunlaştırma aşamasında 40 °C'nin üzerinde bir sıcaklık uygulanmamış ve böyle bir reaksiyonu katalizleyebilecek herhangi bir reaktif ilave edilmemiştir. Bu nedenle her iki bitkinin de eleman tip seskiterpenleri doğal olarak içerebilecekleri düşünülmektedir (111).

Çeşitli *Centaurea* taksonları ile gerçekleştirilen fitokimyasal çalışmalarda izole edilen eleman tip seskiterpenlerde,  $\gamma$ -lakton ünitesine konjuge ekzosiklik metilen grubu bulunan dehidromelitensin veya C-13 metil türevi olan melitensin olmak üzere, iki ana iskelet yapısı göze çarpmaktadır. C-8 konumunda farklı tipte yan zincirler taşıyan melitensin ve dehidromelitensin türevleri de rapor edilmiştir (111). Bunun yanında bazı yapılarda laktonizasyonun olmadığı; C-6'da serbest bir  $\alpha$ -OH grubu ile C-12'de bir karboksilik asit grubunun bulunduğu ve elemakarmanın yapısında olduğu gibi C-12-metil esterlerinin (-COOMe) oluştuğu görülmektedir (3, 43, 47).

Çalışmamızda *C. athena* CHCl<sub>3</sub> ekstresinden elde edilen athenin (CA-1), 14-O-asetil athenin (CA-2) ve 14-O-asetil athenin metil esteri (CA-3) moleküllerinin yapılarına bakıldığında, seskiterpenlerde C-10'a bağlı olarak bulunan karakteristik metil grubunun yerine bir hidroksi metilen (-CH<sub>2</sub>-OH) grubunun bulunması dikkat çekicidir.

14,15-dihidroksi elemanolit türevlerinin, daha önce *Jurinella moschus* ve *Mikania minima*'dan elde edildikleri literatürde kayıtlıdır (112, 113). *Centaurea* taksonları arasında ise sadece *C. hierapolitana*'dan, hierapolitanin A ve B (Şekil 10) olmak üzere, iki farklı 14,15-dihidroksi elemanolit türevinin izole edildiği, 2007 yılında Karamenderes ve arkadaşları tarafından yayınlanan bir çalışma ile rapor edilmiştir (10).

14,15-dihidroksi eleman türevleri olan athoin (CA-1), 14-*O*-asetil athoin (CA-2) ve 14-*O*-asetil athoin metil esteri (CA-3) molekülleri, bu çalışma ile ilk defa rapor edilmektedir (114).



**Şekil 10.** *C. hierapolitana*'dan elde edilen Hierapolitanin A ve B

Çalışmamızda *C. polyclada* *n*-BuOH ekstresinden elde edilen ve C-12'de serbest bir -COOH grubu taşıyan; 6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit (CP-2) ise bir diğer eleman türevi seskiterpen molekülüdür. Ticari olarak iki firma tarafından tedarik edilebilen molekülün, *Centaurea* cinsinden izolasyonu ilk kez bu çalışma ile gerçekleştirilmiştir. Bitkinin CHCl<sub>3</sub> ekstresinden izole edilen ve CP-2 molekülünün metil esteri olan; 6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit metil esteri (CP-1) ise ilk defa Cardona ve ark. tarafından 1992 yılında, *Centaurea aspera* ssp. *subinermis*'ten (103) elde edilmiş ve daha sonra *Onopordon acaulon* (115) ve *Onopordum cynarocephalum* (116) bitkilerinden de izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

8 $\alpha$ -OH konumunda [2'-(hidroksimetil)-2'-butenoil] (=5'-hidroksiangeloil) yan zinciri taşıyan bir elemanolit olan 8 $\alpha$ -(5'-hidroksiangeloil)-11,13-dehidromelitensin, daha önce *C. phrygia*, *C. maroccana*, *Onopordon myriacanthum* ve *Onopordum cynarocephalum* türlerinden izole edilmiştir (46, 104, 116, 117). Molekülün C-12 metil esterinin ise *O. cynarocephalum*, *O. myriacanthum* ve *O. sibthorpiatum*

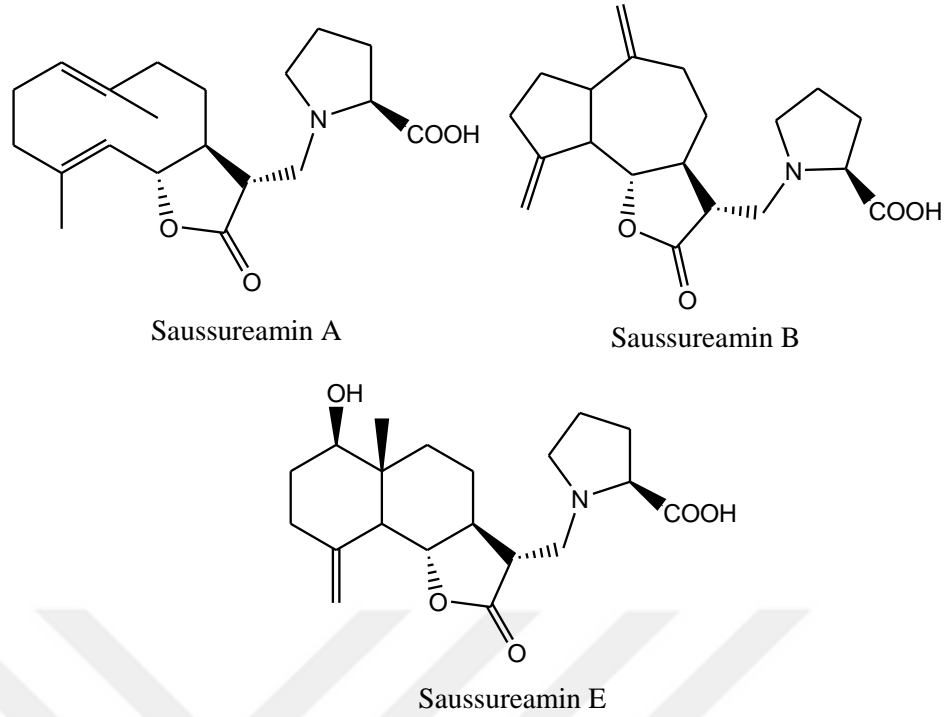
türlerinden elde edildiği kayıtlıdır (104, 116, 118). Çalışmamızda *C. polyclada* CHCl<sub>3</sub> ekstresinden elde edilen ve C-12'de serbest –COOH grubu bulunan; 8 $\alpha$ -O-[2'-(hidroksimetil)-but-2'-enoil]-6 $\alpha$ ,15-dihidroksielema-1,3,11(13)-trien-12-oik asit (CP-3) molekülü ise ilk defa bu çalışma ile rapor edilmiştir.

Çalışmamızda izole edilen diğer seskiterpenlerden farklı olarak, oldukça polar bir İTK profiline sahip olan ve *C. polyclada* n-BuOH ekstresinden elde edilen 13-*N*-prolin melitensin (CP-4) ve 13-*N*-prolin-6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3-dien-12-oik asit (CP-5) molekülleri, C-13 konumunda heteroatom içeren bir ünite taşıyan iki elemanolit türevidir.

*Centaurea* türlerinden elde edilen seskiterpenlerde, yan zincirler genel olarak C-8 konumundan bağlanmakta ve C-13 karbonu, metil veya ekzosiklik metilen grubu halinde bulunmaktadır. Çeşitli türevlendirme çalışmalarında 13-sübstitüe türevler elde edilse de, doğal olarak nadir moleküllerdir. Marco ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, *C. aspera* subsp. *stenophylla* bitkisinden, C-13 konumunda valin aminoasiti bulunan iki germakranolit birleşmesiyle oluşan, onopordopikrin-valin dimeri izole edilmiştir (93).

13-*N*- sübstitüe guyanolit, germakranolit ve ödesmanolit türevi seskiterpenler ise Uzak Doğu ülkelerinde, halk arasında çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan *Saussurea* (Asteraceae) türleri için karakteristik bileşiklerdir. Kore'de yayılış gösteren *Saussurea pulchella*'nın toprak üstü kısımlarından, guyanolit iskeletine sahip, pulkelamin türevleri (Pulchellamine A, B, C, D, E, F ve G) rapor edilmiştir (119). Çin'de kültürü yapılan *S. lappa* köklerinden ise, C-13 konumunda prolin halkası taşıyan germakranolit, ödesmanolit ve guyanolit yapısında saussureamin türevlerinin (Saussureamine A, B, D ve E, Şekil 11) elde edildiği bildirilmiştir (105). Bunun yanında yine geleneksel Çin tıbbında kullanılan ve Asteraceae üyesi olan; *Inula helenium* (120), *Ixeris dentata* (121) ve *Scorzonera divaricata* (122) türlerinden de lakton ünitesine bağlı prolin halkası taşıyan ödesmanolit ve guyanolit türevleri rapor edilmiştir.

Eleman iskeletine sahip 13-*N*-prolin melitensin (CP-4) ve 13-*N*-prolin-6 $\alpha$ ,8 $\alpha$ ,15-trihidroksielema-1,3-dien-12-oik asit (CP-5) molekülleri ise bu çalışma ile ilk defa rapor edilmektedir.



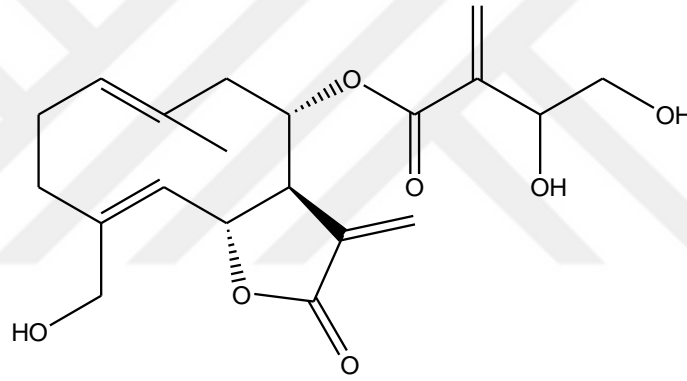
**Şekil 11.** *Saussurea lappa*'dan izole edilen saussureamin türevleri

C-4'e bağlı  $\alpha$  veya  $\beta$  yönelimli aldehit grubu bulunan ve C-8 konumunda çeşitli yan zincirler taşıyan ödesmanolit türevleri, daha önce çeşitli *Centaurea* ve *Onopordum* taksonlarından rapor edilmiştir (26, 27, 106, 116, 123). *C. polyclada*  $\text{CHCl}_3$  ekstresinden elde edilen ve ödesman tip bir seskiterpen türevi olan  $1\beta,6\alpha,8\alpha$ -trihidroksi-15-okso-ödesm-11(13)-en-12-oik asit metil esteri (CP-6) ise ilk defa bu çalışma ile rapor edilmektedir.

*C. athoa*  $\text{CHCl}_3$  ekstresinde ayırma ve saflaştırma işlemleri sırasında, ana fraksiyonların İTK profillerinde baskın bir komponent olarak gözlenen 4'-hidroksipekterolit-14-O-asetat (CA-4) molekülü ise germakranolit türevi bir seskiterpendir. Daha önce çeşitli *Centaurea* türlerinden elde edilmiş olan germakranolitlerden farklı olarak; molekülün C-1 konumundan bağlı bulunan metil grubunun oksidasyona uğrayarak bir primer alkole dönüştüğü belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında, 14,15-dihidroksi-germakranolit türevlerinin *Dicoma* (124-126) ve *Jurinea* türleri (94, 127-129) için karakteristik bileşikler olduğu belirlenmiştir. Bu bitkiler dışında *Acanthospermum hispidum* (130), *Eupatorium fortune* (131), *Jurinella moschus* (112) ve *Mikania minima* (113, 132) türlerinden de farklı yan zincirler taşıyan türevler rapor edilmiştir.

İlk defa 1987 yılında Rustaiyan ve Ganji tarafından *Jurine eriobasis* bitkisinden elde edilen, 4'-hidroksipekterolit-14-*O*-asetat (CA-4) molekülü ile ilgili başka bir literatür kaydına rastlanmamıştır. 14,15-dihidroksi-germakranolit yapısına sahip bir seskiterpen molekülü, *Centaurea* cinsi için ilk kez bu çalışma ile bildirilmektedir (114).

Germakranolit türevi bir seskiterpen olan sinisin bileşiği (Şekil 12), bugüne kadar 80'den fazla *Centaurea* türünden izole edilmiş veya kromatografik yöntemler ile varlığı saptanmıştır (3). İTK plağında, UV<sub>254</sub> altında koyu mor bir spot olarak gözlenen bileşik, V/S reaktifi uygulandığında, zamanla açık kahverengiye dönen mavi renkli bir bant halinde gözlenmektedir (61). *C. athoa* ve *C. polyclada* CHCl<sub>3</sub> ekstraherinin alt fraksiyonları ile yapılan İTK kıyaslamalarında ise sinisin molekülünün varlığı belirlenememiştir.



Şekil 12. Sinisin molekülünün yapısı

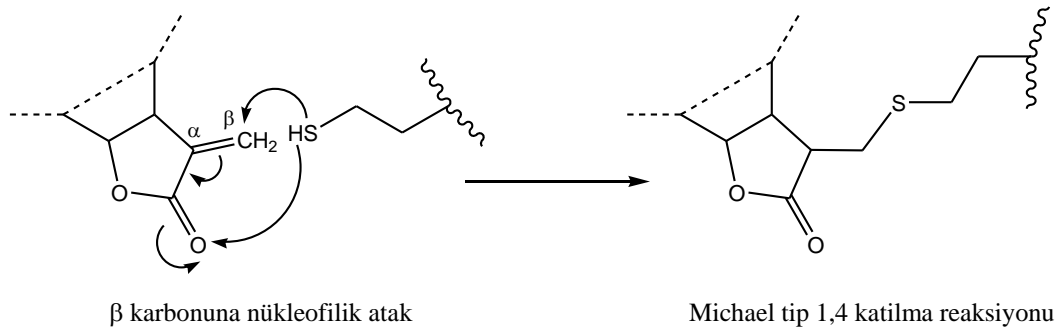
Seskiterpen laktonlar antimikrobiyal, antitümöral, antienflamatuvar gibi çok farklı biyolojik aktivitelere sahip olan ve son dönemde birçok araştırmaya konu olan molekül gruplarından birisidir. Tez çalışması kapsamında elde edilen eleman, ödesman ve germakranolit yapısındaki seskiterpenler, sitotoksik ve antienflamatuvar aktiviteleri yönünden incelenmiştir.

Sitotoksik aktivite çalışmasında, germakranolit türevi olan 4'-hidroksipekterolit-14-*O*-asetat (CA-4) molekülü, denemesi yapılan tüm hücre hatlarına karşı değişen konsantrasyonlarda etki göstermiştir. Lakton halkası ve lakton halkasına konjuge ekzosiklik metilen grubu bulunmayan diğer moleküllerde ise aktivite gözlenmemiştir (IC<sub>50</sub>: >100 µM) (Tablo 31).

iNOS ve NF- $\kappa$ B inhibisyonuna dayalı antienflamatuvar aktivite testinde ise *C. athoa*'dan elde edilen 4'-hidroksipecterolit-14-*O*-asetat (CA-4) (IC<sub>50</sub>: 19.9 ve 40.5  $\mu$ M) ve *C. polyclada*'dan elde edilen 13-*N*-prolin melitensin (CP-4) (IC<sub>50</sub>: 42.4 ve 13.1  $\mu$ M) moleküllerinde aktivite saptanmıştır. Kontrol olarak çalışmaya dahil edilen ve doğal kaynaklı bir antienflamatuvar ajan olan partenolit (IC<sub>50</sub>: 3.2 ve 6.8  $\mu$ M) ile kıyaslandığında ise moleküllerin orta/düşük seviyelerde etkili oldukları söylenebilir (Tablo 32).

Seskiterpen laktonların yapı-aktivite ilişkisi incelendiğinde, moleküllerin biyoaktivitelerinin, Michael tip 1,4 katılma reaksiyonlarında alkilleyici bir ajan olan,  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton ünitesinin varlığına bağlı olduğu görülmektedir.  $\alpha$ , $\beta$ -doymamış bir karbonil olan ekzosiklik metilen grubu Michael akseptörü olarak, enzimlerin yapısında bulunan -SH (sülfidril) grubuna bağlanmaktadır (Şekil 13). Antienflamatuvar aktivitenin de sitokinler ve kemokinler gibi enflamatuvar medyatörlerin sentezi ile ilişkili bir transkripsiyon faktörü olan NF- $\kappa$ B'nin inhibisyonu ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Moleküllerin, NF- $\kappa$ B'nin p65 alt ünitesinin DNA bağlanma bölgesindeki sisteini alkillemesi sonucunda, inhibisyonun gerçekleştiği belirlenmiştir. Molekül üzerinde epoksi grupları, konjuge karbonil grupları gibi diğer alkilleyici bölgelerin varlığının da biyoaktiviteyi etkilediği gözlenmiştir. Bunun yanında, hücre zarının yapısı nedeniyle, moleküllerin lipofilik özellikleri de aktivite üzerinde önemli bir rol oynamaktadır (3, 47).

4'-hidroksipecterolit-14-*O*-asetat (CA-4) ve 13-*N*-prolin melitensin (CP-4) moleküllerinden farklı olarak, C-7 konumundan bir metakrilik asit ünitesi uzanan ve lakton halkası taşımayan diğer moleküllerde, aktivitenin ortadan kalkması, moleküllerin alkilleyici özelliklerinin ortadan kalkması ile açıklanabilmektedir.



**Şekil 13.** Seskiterpen laktonların alkilasyon mekanizması



Daha önce *S. pulchella*'dan elde edilen ve C-13 konumunda prolin taşıyan bir guayanolit türevi olan pulkelamin C'nin A549, SK-OV-3, SK-MEL-2 ve HCT-15 hücre hatlarına karşı sitotoksik etkili olduğu belirlenmiştir (IC<sub>50</sub>: 27.6, 11.8, 5.7 ve 18.3 µM). *Scorzonera divaricata* ve *Ixeris dentata* türlerinden elde edilen 13-N-prolin guayanolit türevlerinde ise sitotoksik aktivite gözlenmemiştir (119, 121, 122).

Elde ettiğimiz seskiterpen moleküller üzerinde gerçekleştirdiğimiz aktivite denemelerinde elde edilen sonuçların, literatür ile uyumlu olduğu görülmektedir.

Flavonoidler, *Centaurea* türlerinden izole edilen sekonder metabolitlerin önemli bir kısmını oluşturmaktadırlar. Bugüne kadar *Centaurea* türlerinden çok sayıda flavonoid türevi izole edilmiştir. Bu maddelerin büyük bir kısmı metil sübtitüe türevler olmakla birlikte, flavon ve flavonoller ile bunların O- ve C-glikozitleri de elde edilmiştir (10-12, 51, 61).

Çalışmamızda, *C. polyclada* bitkisinin kloroform ekstresinden, 3 adet metil sübtitüe flavon türevinin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Açık sarı renkli amorf toz halinde elde edilen salvigenin (CP-7), öpatorin (CP-8) ve 3'-metoksi öpatorin (CP-9) molekülleri, İTK'da, 254 nm'de UV altında çok belirgin koyu bordo renkli ve V/S reaktifi ile sarı renk veren bantlar halinde gözlenmişlerdir. *C.athoa* kloroform ekstresinden elde edilen ana fraksiyonların İTK profillerinde ise metoksi-flavon türevi olabilecek bantlar gözlenmemiştir.

*C. polyclada*'dan elde edilen bu üç bileşiğin, *C. tomorosii*, *C. soskae*, *C. galicicae*, *C. grisebachii*, *C. affinis* ve *C. cadmea* gibi çeşitli *Centaurea* taksonlarında, değişen oranlarda bulunduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (28, 31, 39, 61, 102). Çalışmamızda elde edilen öpatorin (CP-8), kloroform ekstresinin ayrımı sırasında, baskın bir komponent olarak gözlenmiş ve diğer flavonlara kıyasla, daha yüksek miktarda elde edilmiştir.

Biyoaktif bir sekonder metabolit olan öpatorinin, çeşitli hücre hatlarına karşı güçlü sitotoksik aktivite gösterdiği literatürde kayıtlıdır. Yapılan çalışmalarda, molekülün MDAMB-468, K562, RPMI-8226, MOLT-4, 26-L5 hücre hatlarına karşı 0.5, 4.3, 4.8, 4.8 ve 3.3 µM konsantrasyonlarda etkili olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında HL-60, U937 ve MOLT-3 hücrelerine karşı da aktif olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (IC<sub>50</sub>: 5 µM) (133-135).

Çalışmamızda basit fenolik bileşikler olan *p*-hidroksi benzoik asit (CA5), protokateşik asit (CA6) ve bir fenolik glukozit olan vanilik asit-4-*O*-β-D-glukopiranozit (CA7), *C. athoa*'dan; yine bir fenolik glukozit olan taçozit (CP-11) ise *C. polyclada*'dan elde edilmiştir.

Güçlü antioksidan özelliklere sahip *p*-hidroksi benzoik asit (CA-5), protokateşik asit (CA-6) ve taçozit (CP11) moleküllerinin daha önce çeşitli *Centaurea* türlerinden elde edildiği belirlenmiştir (11, 96-98, 136, 137). Vanilik asit-4-*O*-β-D-glukopiranozit ise daha önce *C. ensiformisten* rapor edilmiştir (11, 61).

Bitkinin BuOH ekstrelerinden elde edilen bu moleküllerin, total ekstrenin antioksidan aktivitesinde diğer maddelerin sinerjik etkisiyle birlikte, rol alabilecekleri düşünülmektedir (14).

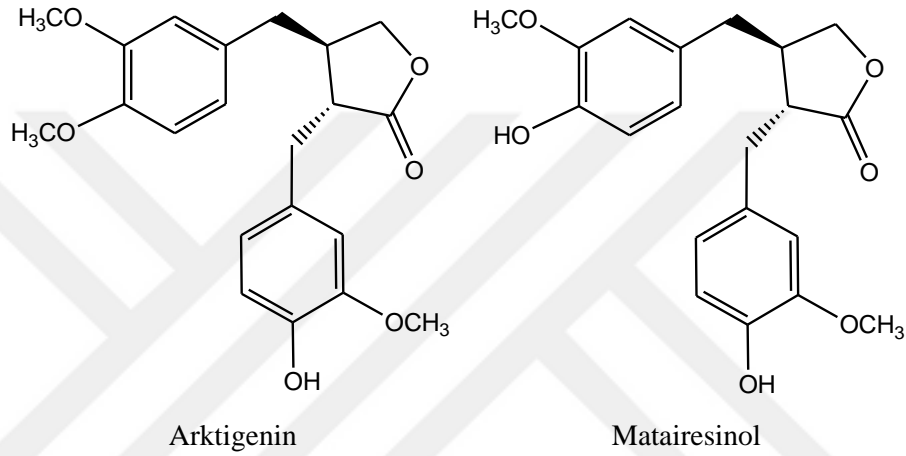
Çalışmamız sırasında 2 adet fenilpropanoit glukoziti elde edilmiştir. Bir veya daha fazla C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> ünitesinden oluşan fenilpropanoitler, birçok bitkide doğal olarak bulunmaktadır ve biyosentetik yollarda flavonoit ve lignanların öncülü olan bileşiklerdir. *Centaurea* türlerinden de çeşitli fenilpropanoit türevleri rapor edilmiştir.

İTK çalışmasında, UV<sub>254</sub> aktif olan ve V/S reaktifi ile maviden mor renge dönen bant halinde gözlenen siringin, her iki bitkiden de beyaz renkli amorf toz halinde elde edilmiştir (CA-10 ve CP-12 kodlu bileşikler). Daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalarda, molekülün *C. ensiformis* ve *C. cadmea* türlerinde de varlığı belirlenmiştir (11, 138). Bunun yanında molekülün, *C. parviflora* (41), *C. pannonica* (45), *C. deflexa* (98) ve Türkiye kaynaklı *C. salonitana* ile *C. ptosimopappoides* (61) türlerinden de elde edildiği literatürde kayıtlıdır.

Koniferil alkol türevi bir fenilpropanoit olan 9-*O*-metil koniferin (CA-9) ise *C. athoa*'nın *n*-BuOH ekstresinden elde edilmiştir. Metil koniferin molekülünün, tropikal bölgelerde yayılış gösteren parazit bir bitki olan *Balanophora* türlerinden elde edildiği kayıtlıdır (139-141). *Centaurea* türleri arasında ise sadece *C. ensiformis* bitkisinden rapor edilmiştir (11).

Bir asetofenon glukoziti olan picein (CA-8), *Picea* türlerinde strese karşı oluşan fenolik bir bileşiktir (142, 143). Daha önce *Helichrysum* (144), *Artemisia* (145) gibi Asteraceae üyelerinden de elde edilen molekülün *Centaurea* türlerinden izolasyonu ise ilk defa *C. ensiformis* ile gerçekleştirilmiştir (11).

*C. polyclada* CHCl<sub>3</sub> ekstresinden yüksek miktarda elde edilen arktiin (CP-10) molekülü, lignan iskeletine sahip bir bileşiktir. İki adet C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> fenilpropanoit ünitesinin, propan zincirindeki 2 numaralı karbonlar üzerinden birleşmesi ile oluşan, dibenzil- $\gamma$ -butirolakton tip lignanlar, *Centaurea* türlerinden izole edilen lignanların büyük bir kısmını oluştururlar. Arktigenin ve matairesinol, en sık elde edilen lignan bileşikleridir (Şekil 14). Arktigenin-4'-*O*-glukozit yapısında olan arktiin molekülünün de birçok *Centaurea* türünden rapor edildiği belirlenmiştir (36, 43, 45, 98, 146, 147).



Şekil 14. Arktigenin ve Matairesinol moleküllerinin kimyasal yapıları

*C. athoa*'nın *n*-BuOH ekstresinden beyaz renkli yağimsı bir halde elde edilen  $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozit (CA-11) molekülü, fitosterol yapısındaki bir maddedir. Bitkilerin çoğunda aglikon veya glikozitleri şeklinde bulunabilen fitosterol türevleri, *Centaurea* türlerinde de pek çok çalışma ile rapor edilmişlerdir (102, 148, 149). *C. polyclada*'nın ana fraksiyonlarıyla yapılan İTK kıyaslamalarında ise  $\beta$ -sitosterol-3-*O*- $\beta$ -D-glukopiranozit molekülüne ait bir bant gözlenmemiştir.

Daha önceki çalışmamızda, *C. athoa* bitkisinden elde edilen kloroform ekstresinin antienflamatuvar aktivite gösterdiği *in-vitro* ve *in-vivo* çalışmalarla belirlenmiştir. Bunun yanında çeşitli hücre hatlarında sitotoksik aktivite de gözlenmiştir (14). Kloroform ekstresinin ayrımı sırasında elde edilen 4'-hidroksipekterolit-14-*O*-asetat (CA-4) molekülünün baskın bir komponent olduğu göz önünde bulundurulduğunda, bu molekülün aktivitelerde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Fakat Nf-kB inhibisyonunun partenolite kıyasla daha düşük olması (IC<sub>50</sub>: 40.5 ve 6.8  $\mu$ M) antienflamatuvar aktiviteden sorumlu olabilecek farklı

bileşiklerin olabileceğini düşündürmekte ve daha ayrıntılı izolasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Diğer çalışma materyalimiz olan *C. polyclada*'dan elde edilen kloroform ekstresinin de antienflamatuvar ve sitotoksik aktivitelere sahip olduğu daha önce belirlenmiştir (14). Bitkinin kloroform ekstresinden elde edilen seskiterpen moleküllerinde, antienflamatuvar ve sitotoksik aktivite gözlenememesi,  $\alpha$ -metilen- $\gamma$ -lakton yapının olmaması ile açıklanabilmektedir. Bu da aktiviteden sorumlu başka moleküllerin varlığına işaret etmiştir. Dibenzil- $\gamma$ -butirolakton tip bir lignan olan arktiin (CP-10) ve bir metoksiflavon türevidir olan öpatorin (CP-8) molekülleri, kloroform ekstresinin ayrımı sırasında, yüksek miktarda elde edilmişlerdir (Bknz. Şema 6).

Genel olarak *Arctium lappa* bitkisinin meyvelerinden elde edilen arktiin ile gerçekleştirilen *in vitro* sitotoksikite denemelerinde, molekülün HeLa ve A431 hücre hatlarına üzerinde sitotoksik etkisinin bulunduğu (IC<sub>50</sub>: 1.8 ve 19.5  $\mu$ M) belirlenmiş fakat birçok hücre hattına karşı (MCF-7, PC-3, HL-60, CaCo-2, SW-480) etkisiz olduğu rapor edilmiştir (148, 150-152). Güçlü sitotoksik aktiviteye sahip bir metoksiflavon türevidir olan öpatorinin, *C. polyclada*'nın sitotoksikitesinde önemli bir rol aldığı düşünülmekte ve aktivite çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Genel bir değerlendirme yapıldığında, bu çalışma ile *C. athena* ve *C. polyclada* bitkileri sekonder metabolitleri yönünden ilk defa incelenmiştir. Çalışma sonunda farklı molekül gruplarına ait 23 sekonder metabolitin izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu moleküller arasında, yedisi doğa ve bilim için yeni olmak üzere on seskiterpen molekülü elde edilmiştir.

*C. athena*'nın kloroform ekstresinden elde edilen ve 14,15-dihidroksi germakranolit iskeletine sahip bir seskiterpen türevidir, *Centaurea* cinsi için ilk kez tarafımızdan rapor edilmiştir.

Bunun yanında 13-*N*-prolin türevidir seskiterpenler, *Centaurea* cinsi için yeni bileşiklerdir. Daha önce farklı Asteraceae üyelerinden germakran, ödesman ve guayan türevleri rapor edilmiş fakat 13-*N*-süstitüe elemanolit türevleri ilk defa *C. polyclada*'dan elde edilmiştir.

Ayrıca, çalışmamız sırasında yüksek miktarlarda elde edilen arktiin ve öpatorin molekülleri için *C. polyclada*'nın bir kaynak olarak değerlendirilebileceği görülmektedir.

Elde edilen sitotoksik ve antiinflamatuvar aktivite bulguları değerlendirildiğinde, *C. athoa*'dan elde edilen 4'-hidroksipekterolit-14-*O*-asetat (CA-4) ve *C. polyclada*'dan elde edilen 13-*N*-prolin melitensin molekülleri, umut vadeden ve ileri araştırmalarla değerlendirilebilecek bileşikler olarak karşımıza çıkmaktadırlar.



## KAYNAKLAR

1. Garcia-Jacas N, Garnatje T, Susanna A, Vilatersana R. Tribal and subtribal delimitation and phylogeny of the Cardueae (Asteraceae): A combined nuclear and chloroplast DNA analysis. *Mol Phylogenet Evol.* 2002;22(1):51-64.
2. Susanna A, Garcia-Jacas N, Hidalgo O, Vilatersana R, Garnatje T. The Cardueae (Compositae) revisited: Insights from its, trnL-trnF, and matK nuclear and chloroplast DNA analysis. *Ann Mo Bot Gard.* 2006;93(1):150-71.
3. Bruno M, Bancheva S, Rosselli S, Maggio A. Sesquiterpenoids in subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort (tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution, <sup>13</sup>C NMR spectral data and biological properties. *Phytochemistry.* 2013;95:19-93.
4. Panero JL, Funk VA. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. *Mol Phylogenet Evol.* 2008;47(2):757-82.
5. Bona M. Systematic implications of achene characteristics in genera *Centaurea* L., *Cyanus* Mill., *Psephellus* Cass. And *Rhaponticoides* Vaill. (Asteraceae). *Bangl J Plant Taxon.* 2015;22(2):125-36.
6. Wagenitz G., *Centaurea* L. In: Davis P.H., editor. *Flora of Turkey and the East Aegean Islands. Volume V.* Edinburgh University Press, 1975. p. 465-585.
7. Uysal T., *Centaurea*. In: Güner A., Aslan S., Ekim T., Vural M., Babaç MT., editors. *Türkiye Bitkileri Listesi (Damarlı Bitkiler). Nezahat Gökyiğit Botanik Bahçesi ve Flora Araştırmaları Derneği Yayını (İstanbul), 2012.* p. 127-40.
8. Baytop T. *Türkiye'de Bitkilerle Tedavi (Geçmişte ve Bugün).* 2. Baskı ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; 1999.
9. Arif R, Küpeli E, Ergun F. The biological activity of *Centaurea* L. Species. *GU J Sci.* 2004;17(4):149-64.
10. Karamenderes C, Bedir E, Pawar R, Baykan S, Khan KA. Elemanolide sesquiterpenes and eudesmane sesquiterpene glycosides from *Centaurea hierapolitana*. *Phytochemistry.* 2007;68(5):609-15.
11. Baykan-Erel S, Bedir E, Khan IA, Karaalp C. Secondary metabolites from *Centaurea ensiformis* PH Davis. *Biochem Syst Ecol.* 2010;38(5):1056-8.
12. Gulcema D, Alankus-Caliskan O, Karaalp C, Ors AU, Ballar P, Bedird E. Phenolic glycosides with antiproteasomal activity from *Centaurea urvillei* DC. subsp *urvillei*. *Carbohyd Res.* 2010;345(17):2529-33.
13. Erel SB, Demir S, Kose FA, Ballar P, Karaalp C. Cytotoxic properties of five *Centaurea* L. species from Anatolia. *Planta Med.* 2011;77(12):1436-.
14. Erel SB, Demir S, Nalbantsoy A, Ballar P, Khan S, Yavasoglu NUK, et al. Bioactivity screening of five *Centaurea* species and in vivo anti-inflammatory activity of *C. athoa*. *Pharmaceutical Biology.* 2014;52(6):775-81.
15. Shi Z., Raab Straube E., Greuter W., Martins L., Cardueae. In: Wu ZY., Raven PH., Hong DY., editors. *Flora of China. Volume 20-21 (Asteraceae).* , Science Press (Beijing) & Missouri Botanical Garden Press (St. Louis), 2011. p. 42-194.

16. Hellwig FH. Centaureinae (Asteraceae) in the Mediterranean - history of ecogeographical radiation. *Plant Syst Evol.* 2004;246(3-4):137-62.
17. Özhatay N, Kültür Ş, Gürdal B. Check-list of additional taxa to the supplement Flora of Turkey VI. *Istanbul Eczacılık Fakültesi Dergisi.* 2013;43(1):33-82.
18. Kose YB, Alan S. *Centaurea baseri* (Compositae), a new species from Turkey. *Phytotaxa.* 2013;117(1):23-9.
19. Bancheva S, Kaya Z, Binzet R. *Centaurea aytugiana* (Asteraceae), a new species from North Anatolia, Turkey. *Novon.* 2014;23(2):133-8.
20. Yuzbasioglu IS, Bona M, Genc I. A new species of *Centaurea* sect. *Pseudoseridia* (Asteraceae) from North-Eastern Turkey. *Phytokeys.* 2015;53:27-38.
21. Bona M. *Centaurea goksivriensis* (Asteraceae), a new species from Turkey. *Phytotaxa.* 2015;203(1):63-8.
22. Bona M. *Centaurea amanosensis* (Asteraceae), a new species from Turkey. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology.* 2015, DOI: 10.1080/11263504.2014.1001465.
23. Negaresh K, Kaya Z, Rahiminejad MR. *Centaurea sennikoviana* (Asteraceae, Cardueae), a new species from Central Anatolia, Turkey. *Ann Bot Fenn.* 2015;52(5-6):321-7.
24. Daniewski WM, Nowak G, Pankowska E, Georgiadis T, Routsis E, Rychlewska U, et al. Sesquiterpene lactones of *Centaurea salonitana*. *Phytochemistry.* 1993;34(2):445-7.
25. Cardona L, Garcia B, Munoz MC, Navarro FI, Pedro JR. New sesquiterpene lactones and other constituents from *Centaurea pauii*. *Liebigs Ann-Recl.* 1997(3):527-32.
26. Skaltsa H, Lazari D, Panagouleas C, Georgiadou E, Garcia B, Sokovic M. Sesquiterpene lactones from *Centaurea thessala* and *Centaruea attica*. Antifungal activity. *Phytochemistry.* 2000;55(8):903-8.
27. Fortuna AM, de Riscala EC, Catalan CAN, Gedris TE, Herz W. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tweediei*. *Biochem Syst Ecol.* 2001;29(9):967-71.
28. Djeddi S, Argyropoulou C, Skaltsa H. Secondary metabolites from *Centaurea grisebachii* ssp *grisebachii*. *Biochem Syst Ecol.* 2008;36(5-6):336-9.
29. Erel SB, Karaalp C, Bedir E, Kaehlig H, Glasl S, Khan S, et al. Secondary metabolites of *Centaurea calolepis* and evaluation of cnicin for anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic activities. *Pharmaceutical Biology.* 2011;49(8):840-9.
30. Bruno M, Diaz JG, Herz W. Guaianolides and lignans from *Centaurea solstitialis* subsp *schouwii*. *Phytochemistry.* 1991;30(12):4165-6.
31. Janackovic P, Tesevic V, Milosavljevic S, Vajs V, Marin PD. Sesquiterpene lactones, lignans and flavones of *Centaurea affinis*. *Biochem Syst Ecol.* 2004;32(3):355-7.

32. Oksuz S, Serin S. Triterpenes of *Centaurea ptosimopappoides*. *Phytochemistry*. 1997;46(3):545-8.
33. Sarker SD, Savchenko T, Whiting P, Sik V, Dinan LN. Moschamine, cis-moschamine, moschamindole and moschamindolol: Four novel indole alkaloids from *Centaurea moschata*. *Nat Prod Lett*. 1997;9(3):189-99.
34. Shoeb M, MacManus SM, Jaspars M, Trevidu J, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, et al. Montamine, a unique dimeric indole alkaloid, from the seeds of *Centaurea montana* (Asteraceae), and its in vitro cytotoxic activity against the CaCo2 colon cancer cells. *Tetrahedron*. 2006;62(48):11172-7.
35. Sarker SD, Laird A, Nahar L, Kumarasamy Y, Jaspars M. Indole alkaloids from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae). *Phytochemistry*. 2001;57(8):1273-6.
36. Shoeb M, Celik S, Jaspars M, Kumarasamy Y, MacManus SM, Nahar L, et al. Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkini*. *Tetrahedron*. 2005;61(38):9001-6.
37. Kitouni R, Benayache F, Benayache S. Flavonoids of the exudate of *Centaurea calcitrapa*. *Chem Nat Comp*. 2015;51(4):762-3.
38. Bensouici C, Kabouche A, Kabouche Z, Touzani R, Bruneau C. Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Centaurea foucauldiana*. *Chem Nat Comp*. 2012;48(3):510-1.
39. Tesevic V, Aljancic I, Milosavljevic S, Vajs V, Dordevic I, Jadranin M, et al. Secondary metabolites of three endemic *Centaurea* L. species. *J Serb Chem Soc*. 2014;79(11):1355-62.
40. Forgo P, Zupko I, Molnar J, Vasas A, Dombi G, Hohmann J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. *Fitoterapia*. 2012;83(5):921-5.
41. Belkacem S, Belbache H, Boubekri C, Mosset P, Rached Mosbah O, Marchioni E, et al. Chemical constituents from *Centaurea parviflora* Desf. *RJPBCS*. 2014;5(3):1275-9.
42. Nacer A, Merza J, Kabouche Z, Rhouati S, Boustie J, Richomme P. Sesquiterpene lactones from *Centaurea tougourensis*. *Biochem Syst Ecol*. 2012;43:163-5.
43. Ciric A, Karioti A, Koukoulitsa C, Sokovic M, Skaltsa H. Sesquiterpene lactones from *Centaurea zuccariniana* and their antimicrobial activity. *Chem Biodivers*. 2012;9(12):2843-53.
44. Trendafilova A, Jadranin M, Gorgorov R, Stanilova M. Bioactive compounds in wild, *in vitro* obtained, *ex vitro* adapted, and acclimated plants of *Centaurea davidovii* (Asteraceae). *Nat Prod Commun*. 2015;10(6):839-41.
45. Ifantis TM, Solujic S, Pavlovic-Muratspahic D, Skaltsa H. Secondary metabolites from the aerial parts of *Centaurea pannonica* (Heuff.) Simonk. from Serbia and their chemotaxonomic importance. *Phytochemistry*. 2013;94:159-70.



46. Bicha S, Chalard P, Hammoud L, Leon F, Brouard I, Garcia VP, et al. Maroccanin: A new gamma-lactone and other constituents from *Centaurea maroccana* Ball. (Asteraceae). *Rec Nat Prod*. 2013;7(2):114-8.
47. Kolli E, Leon F, Benayache F, Estevez S, Quintana J, Estevez F, et al. Cytotoxic sesquiterpene lactones and other constituents of *Centaurea omphalotricha*. *J Brazil Chem Soc*. 2012;23(5):977-83.
48. Hammoud L, Seghiri R, Benayache S, Mosset P, Lobstein A, Chaabi M, et al. A new flavonoid and other constituents from *Centaurea nicaeensis* All. var. *walliana* M. *Nat Prod Res*. 2012;26(3):203-8.
49. Zimmermann S, Kaiser M, Brun R, Hamburger M, Adams M. Cynaropicrin: The first plant natural product with in vivo activity against *Trypanosoma brucei*. *Planta Med*. 2012;78(6):553-6.
50. Erenler R, Sen O, Yaglioglu A, Demirtas I. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2016;19(1):66-72.
51. Formisano C, Rigano D, Senatore F, Bancheva S, Maggio A, Rosselli S, et al. Flavonoids in Subtribe Centaureinae (Cass.) Dumort. (Tribe Cardueae, Asteraceae): Distribution and <sup>13</sup>C-NMR Spectral Data. *Chem Biodivers*. 2012;9(10):2096-158.
52. Bicha S, Bentamene A, Benaissa O, Benayache S, Garcia VP, Leon F, et al. Flavonoid aglycones from *Centaurea maroccana*. *Chem Nat Comp*. 2011;47(1):105-6.
53. Kabouche A, Kabouche Z, Touzani R, Bruneau C. Flavonoids from *Centaurea sulphurea*. *Chem Nat Comp*. 2011;46(6):966-7.
54. Khalfallah A, Berrehal D, Kabouche A, Touzani R, Kabouche Z. Flavonoids from *Centaurea omphalodes*. *Chem Nat Comp*. 2012;48(3):482-3.
55. Kubacey T, Haggag E, El-Toumy S, Ahmed A, El-Ashmawy I, Youns M. Biological activity and flavonoids from *Centaurea alexanderina* leaf extract. *J Pharm Res*. 2012;5(6):3352-61.
56. Curkovic-Perica M, Likic S, Rusak G. Phenolic Compounds in *Centaurea rupestris* Tissues and Their Antiphytoviral Activity. *Croat Chem Acta*. 2014;87(1):79-84.
57. Sen A, Gurbuz B, Gurer US, Bulut G, Bitis L. Flavonoids and biological activities of *Centaurea stenolepis*. *Chem Nat Comp*. 2014;50(1):128-9.
58. Ahmed SA, Kamel EM. Cytotoxic activities of flavonoids from *Centaurea scoparia*. *Sci World J*. 2014.
59. Akkol EK, Arif R, Ergun F, Yesilada E. Sesquiterpene lactones with antinociceptive and antipyretic activity from two *Centaurea* species. *J Ethnopharmacol*. 2009;122(2):210-5.
60. Ozelik B, Gurbuz I, Karaoglu T, Yesilada E. Antiviral and antimicrobial activities of three sesquiterpene lactones from *Centaurea solstitialis* L. ssp. *solstitialis*. *Microbiol Res*. 2009;164(5):545-52.

61. Baykan Erel Ş. Doktora tezi, Batı Anadolu'da Yayılış Gösteren Endemik *Centaurea ensiformis* P.H. Davis ve *Centaurea calolepis* Boiss. Taksonları Üzerinde Araştırmalar. İzmir: Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
62. Guzel Y, Guzelsemme M, Miski M. Ethnobotany of medicinal plants used in Antakya: A multicultural district in Hatay Province of Turkey. J Ethnopharmacol. 2015;174:118-52.
63. Cakilcioglu U, Turkoglu I. An ethnobotanical survey of medicinal plants in Sivrice (Elazig-Turkey). J Ethnopharmacol. 2010;132(1):165-75.
64. Ozdemir E, Alpınar K. An ethnobotanical survey of medicinal plants in western part of central Taurus Mountains: Aladaglar (Nigde - Turkey). J Ethnopharmacol. 2015;166:53-65.
65. Mukemre M, Behcet L, Cakilcioglu U. Ethnobotanical study on medicinal plants in villages of Catak (Van-Turkey). J Ethnopharmacol. 2015;166:361-74.
66. Kaval I, Behcet L, Cakilcioglu U. Ethnobotanical study on medicinal plants in Gecitli and its surrounding (Hakkari-Turkey). J Ethnopharmacol. 2014;155(1):171-84.
67. Hayta S, Polat R, Selvi S. Traditional uses of medicinal plants in Elazig (Turkey). J Ethnopharmacol. 2014;154(3):613-23.
68. Polat R, Cakilcioglu U, Satil F. Traditional uses of medicinal plants in Solhan (Bingol-Turkey). J Ethnopharmacol. 2013;148(3):951-63.
69. Demirci S, Özhatay N. An ethnobotanical study in Kahramanmaraş (Turkey); Wild plants used for medicinal purpose in Andırın, Kahramanmaraş. Turk J Pharm Sci. 2012;9(1):75-92.
70. Demiröz T. Yüksek Lisans Tezi, Endemik *Centaurea goeksunense* Aytaç & H. Duman Bitkisinin Kimyasal İçeriğinin Ve Biyoaktivite Potansiyelinin Araştırılması. İzmir: Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2016.
71. Djeddi S, Sokovic M, Skaltsa H. Analysis of the essential oils of some *Centaurea* species (Asteraceae) growing wild in Algeria and Greece and investigation of their antimicrobial activities. J Essent Oil Bear Pl. 2011;14(6):658-66.
72. Politeo O, Skocibusic M, Carev I, Burcul F, Jerkovic I, Sarolic M, et al. Phytochemical profiles of volatile constituents from *Centaurea ragusina* leaves and flowers and their antimicrobial effects. Nat Prod Commun. 2012;7(8):1087-90.
73. Esmaeili A, Panahi ZA, Ebrahimzadeh MA. Investigation of phytochemistry of gene of *Centaurea* grown in Iran. J Essent Oil Bear Pl. 2014;17(5):806-12.
74. Salla M, Fakhoury I, Saliba N, Darwiche N, Gali-Muhtasib H. Synergistic anticancer activities of the plant-derived sesquiterpene lactones salograviolide A and iso-seco-tanaparholide. J Nat Med-Tokyo. 2013;67(3):468-79.
75. Tekeli Y, Zengin G, Aktumsek A, Sezgin M, Torlak E. Antibacterial activities of extracts from twelve *Centaurea* species from Turkey. Arch Biol Sci. 2011;63(3):685-90.

76. Uysal I, Celik S, Saglam H, Guven K. Antimicrobial and antioxidant activities of some species of *Centaurea* collected from Turkey. *Asian J Chem.* 2013;25(2):666-70.
77. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Antioxidant potentials and anticholinesterase activities of methanolic and aqueous extracts of three endemic *Centaurea* L. species. *Food Chem Toxicol.* 2013;55:290-6.
78. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Screening for in vitro antioxidant properties and fatty acid profiles of five *Centaurea* L. species from Turkey flora. *Food Chem Toxicol.* 2011;49(11):2914-20.
79. Aktumsek A, Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Duran A. Assessment of the antioxidant potential and fatty acid composition of four *Centaurea* L. taxa from Turkey. *Food Chem.* 2013;141(1):91-7.
80. Uysal Ş, Ceylan R, Zengin G, Aktümsek A, Zengin N, Güler GÖ, et al. Phytochemical characterization of an endemic plant used as foodstuff in Turkey: *Centaurea urvillei* subsp. *stepposa* and its antioxidant properties. *Int Res J Pharm.* 2014;5(8):646-52.
81. Zengin G, Aktumsek A, Guler GO, Cakmak YS, Yildiztugay E. Antioxidant properties of methanolic extract and fatty acid composition of *Centaurea urvillei* DC. subsp. *hayekiana* Wagenitz. *Rec Nat Prod.* 2011;5(2):123-32.
82. Zengin G, Aktumsek A, Guler GO, Cakmak YS, Kan Y. Composition of essential oil and antioxidant capacity of *Centaurea drabifolia* Sm. subsp. *detonsa* (Bornm.) Wagenitz, endemic to Turkey. *Nat Prod Res.* 2012;26(1):1-10.
83. Zengin G, Guler GO, Cakmak YS, Aktumsek A. Antioxidant capacity and fatty acid profile of *Centaurea kotschyi* (Boiss. & Heldr.) Hayek var. *persica* (Boiss.) Wagenitz from Turkey. *Grasas Aceites.* 2011;62(1):90-5.
84. Şen A, Özbaş ST, Akbuga J, Bitiş L. In vitro antiproliferative activity of endemic *Centaurea kilaea* Boiss. against human tumor cell lines. *MÜSBED.* 2015;5(3):149-53.
85. Demirtas I, Sahin A. Bioactive volatile content of the stem and root of *Centaurea carduiformis* DC. subsp. *carduiformis* var. *carduiformis*. *J Chem-Ny.* 2013.
86. Ozsoy N, Kultur S, Yilmaz-Ozden T, Celik BO, Can A, Melikoglu G. Antioxidant, anti-inflammatory, acetylcholinesterase inhibitory and antimicrobial activities of Turkish endemic *Centaurea antiochia* var. *praealta*. *J Food Biochem.* 2015;39(6):771-6.
87. Ertas A, Goren AC, Boga M, Demirci S, Kolak U. Chemical composition of the essential oils of three *Centaurea* species growing wild in Anatolia and their anticholinesterase activities. *J Essent Oil Bear Pl.* 2014;17(5):922-6.
88. Routsis E, Georgiadis T. Cytogeographical study of *Centaurea* L.-sect. *Acrocentron* (Cass.) DC-(Asteraceae) in Greece. *Bot Helv.* 1999;109(2):139-51.
89. Dostal J. , *Centaurea*. In: Moore DM, Tutin TG, Walters SM, editors. *Flora Europea (Asteraceae).* , Volume 4. Cambridge University Press, 1976. p. 977.

90. Uysal T, Arslan E, Tugay O, Ertugrul K. Determination of the relationship between some *Centaurea* species based on SDS-PAGE. *Turk J Biol.* 2010;34(2):125-31.
91. Erel SB, Demirci B, Demir S, Karaalp C, Baser KHC. Composition of the essential oils of *Centaurea aphrodisaea*, *C. polyclada*, *C. athoa*, *C. hyalolepis* and *C. iberica*. *Journal of Essential Oil Research.* 2013;25(2):79-84.
92. Granger M, Samson E, Sauvage S, Majumdar A, Nigam P, Nahar L, et al. Bioactivity of extracts of *Centaurea polyclada* DC. (Asteraceae). *Arch Biol Sci.* 2009;61(3):447-52.
93. Marco JA, Sanz-Cervera JF, Yuste A, Sancenon F, Carda M. Sesquiterpenes from *Centaurea aspera*. *Phytochemistry.* 2005;66(14):1644-50.
94. Rustaiyan A, Ganji M. Germacranolides from *Jurinea eriobasis*. *Phytochemistry.* 1988;27(9):2991-2.
95. Chen GY, Dai CY, Wang TS, Jiang CW, Han CR, Song XP. A new flavonol from the stem-bark of *Premna fulva*. *Arkivoc.* 2010:179-85.
96. Işık E, Öksüz S. Chemical constituents of *Centaurea amanicola*. *J Fac Pharm Istanbul.* 2000;33:49-54.
97. Abdallah HM, Mohamed MA, Abdou AM, Hamed MM, Abdel-Naim AB, Ashour OM. Protective effect of *Centaurea pallescens* Del. against CCl<sub>4</sub>-induced injury on a human hepatoma cell line (Huh7). *Med Chem Res.* 2013;22(12):5700-6.
98. Chicca A, Tebano M, Adinolfi B, Ertugrul K, Flamini G, Nieri P. Anti-proliferative activity of aguerin B and a new rare nor-guaianolide lactone isolated from the aerial parts of *Centaurea deflexa*. *Eur J Med Chem.* 2011;46(7):3066-70.
99. Li YL, Sun JS, Gong YQ, Yu B. Synthesis of oligomeric 4-(glycosyloxy)benzoate macrocyclic glycosides. *J Org Chem.* 2011;76(10):3654-63.
100. Han MH, Yang XW, Zhang M, Zhong GY. Phytochemical study of the rhizome of *Pinellia ternata* and quantification of phenylpropanoids in commercial *Pinellia tuber* by RPAC. *Chromatographia.* 2006;64(11-12):647-53.
101. Konuklugil B, Bahadir O. Phenylpropanoid glycosides from *Linum olympicum* (Linaceae). *Turk J Chem.* 2004;28(6):741-4.
102. Karamenderes C, Bedir E, Abou-Gazar H, Khan IA. Chemical constituents of *Centaurea cadmea*. *Chem Nat Comp.* 2007;43(6):694-5.
103. Cardona L, Fernandez I, Pedro JR, Vidal R. Polyoxygenated terpenes and cyanogenic glucosides from *Centaurea aspera* var *subinermis*. *Phytochemistry.* 1992;31(10):3507-9.
104. Garcia B, Skaltsa H, Navarro FI, Pedro JR, Lazari D. Sesquiterpene lactones and elemene derivatives from *Onopordon myriacanthum*. *Phytochemistry.* 1996;41(4):1113-7.
105. Matsuda H, Kageura T, Inoue Y, Morikawa T, Yoshikawa M. Absolute stereostructures and syntheses of saussureamines A, B, C, D and E, amino acid-sesquiterpene conjugates with gastroprotective effect, from the roots of *Saussurea lappa*. *Tetrahedron.* 2000;56(39):7763-77.

106. Skaltsa H, Lazari D, Garcia B, Pedro JR, Sokovic M, Constantinidis T. Sesquiterpene lactones from *Centaurea achaia*, a Greek endemic species: Antifungal activity. *Z Naturforsch C*. 2000;55(7-8):534-9.
107. Salan U, Topçu G, Öksüz S. Flavonoids of *Centaurea kilaea* and *C. salonitana*. *J Fac Pharm Istanbul*. 2001;34(1):55-61.
108. Shoeb M, Rahman MM, Nahar L, Delazar A, Jaspars M, MacManus SM, et al. Bioactive lignans from the seeds of *Centaurea macrocephala*. *Daru*. 2004;12(3):87-93.
109. Liu SK, Que S, Cheng W, Zhang QY, Liang H. Chemical constituents from whole plants of *Carduus acanthoides*. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2013;38(14):2334-7.
110. Gonzalez AG, Bermejo J, Toledo F, Daza LR. Constituents of the Compositae 42. Sesquiterpene lactones from *Centaurea arbutifolia*. *Phytochemistry*. 1981;20(8):1895-7.
111. Negrete RE, Backhouse N, Cajigal I, Delporte C, Cassels BK, Breitmaier E, et al. Two new antiinflammatory elemanolides from *Centaurea chilensis*. *J Ethnopharmacol*. 1993;40(3):149-53.
112. Rustaiyan A, Ganji MT. Sesquiterpene lactones from *Jurinella moschus*. *Phytochemistry*. 1987;26(10):2857-9.
113. Cuenca MD, Borkosky S, Catalan CAN, Goedken VL, Diaz JG, Herz W. Sesquiterpene lactones of *Mikania minima*. *Phytochemistry*. 1993;32(6):1509-13.
114. Demir S, Karaalp C, Bedir E. Unusual sesquiterpenes from *Centaurea athoa* DC. *Phytochem Lett*. 2016;15:245, 50.
115. Cardona L, Bardon A, Garcia B, Pedro JR. Eudesmane and elemene derivatives from *Onopordon acaulon*. *Phytochemistry*. 1993;33(6):1457-60.
116. Formisano C, Rigano D, Russo A, Cardile V, Caggia S, Arnold NA, et al. Phytochemical profile and apoptotic activity of *Onopordum cynarocephalum*. *Planta Med*. 2012;78(15):1651-60.
117. Tsankova E, Ognyanov I. New sesquiterpene lactones from *Centaurea phrygia*. *Planta Med*. 1985;51(5):465-6.
118. Lazari D, Garcia B, Skaltsa H, Pedro JR, Harvala C. Sesquiterpene lactones from *Onopordon laconicum* and *O. sibthorpiatum*. *Phytochemistry*. 1998;47(3):415-22.
119. Yang MC, Choi SU, Choi WS, Kim SY, Lee KR. Guaiane sesquiterpene lactones and, amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from the aerial parts of *Saussurea pulchella*. *J Nat Prod*. 2008;71(4):678-83.
120. Zaima K, Wakana D, Demizu Y, Kumeta Y, Kamakura H, Maruyama T, et al. Isoheleproline: a new amino acid-sesquiterpene adduct from *Inula helenium*. *J Nat Med-Tokyo*. 2014;68(2):432-5.
121. Cha MR, Choi CW, Lee JY, Kim YS, Yon GH, Choi SU, et al. Two new amino acid-sesquiterpene lactone conjugates from *Ixeris dentata*. *B Korean Chem Soc*. 2012;33(1):337-40.

122. Yang YJ, Yao J, Jin XJ, Shi ZN, Shen TF, Fang JG, et al. Sesquiterpenoids and tirucallane triterpenoids from the roots of *Scorzonera divaricata*. *Phytochemistry*. 2016;124:86-98.
123. Braca A, De Tommasi N, Morelli I, Pizza C. New metabolites from *Onopordum illyricum*. *J Nat Prod*. 1999;62(10):1371-5.
124. Bohlmann F, Singh P, Jakupovic J. Naturally occurring terpene derivatives .428. Germacranolides from *Dicoma tomentosa*. *Phytochemistry*. 1982;21(8):2122-4.
125. Bohlmann F, Singh P, Jakupovic J. Naturally occurring terpene derivatives .439. New Germacranolides and other sesquiterpene lactones from *Dicoma* Species. *Phytochemistry*. 1982;21(8):2029-33.
126. Zdero C, Bohlmann F. Sesquiterpene lactones from *Dicoma* species. *Phytochemistry*. 1990;29(1):183-7.
127. Todorova M, Ognyanov I. Sesquiterpene lactones in leaves of *Jurinea albicaulis*. *Planta Med*. 1984;50(5):452-3.
128. Adekenov SM, Turdybekov KM, Kadirberlina GM, Lindeman SV, Struchkov YT. Molecular and crystal structure of Jurineolide as germacrane lactone from *Jurinea multiflora*. *Khim Prir Soedin*. 1991(4):490-4.
129. Rustaiyan A, Saberi M, Habibi Z, Jakupovic J. Melampolides and other constituents from *Jurinea leptoloba*. *Phytochemistry*. 1991;30(6):1929-32.
130. Cartagena E, Bardon A, Catalan CAN, de Hernandez ZNJ, Hernandez LR, Joseph-Nathan P. Germacranolides and a new type of guaianolide from *Acanthospermum hispidum*. *J Nat Prod*. 2000;63(10):1323-8.
131. Haruna M, Sakakibara Y, Ito K. Structure and conformation of eupafortunin, a new Germacrane-type sesquiterpene lactone from *Eupatorium fortunei* Turcz. *Chem Pharm Bull*. 1986;34(12):5157-60.
132. Cuenca MD, Catalan CAN, Kokke WCMC. 14,15-Dihydroxygermacranolides and other constituents of *Mikania minima*. *J Nat Prod*. 1990;53(3):686-91.
133. Doleckova I, Rarova L, Gruz J, Vondrusova M, Strnad M, Krystof V. Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves. *Fitoterapia*. 2012;83(6):1000-7.
134. Androutsopoulos V, Arroo RRJ, Hall JF, Surichan S, Potter GA. Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism. *Breast Cancer Res*. 2008;10(3).
135. Estevez S, Marrero MT, Quintana J, Estevez F. Eupatorin-induced cell death in human leukemia cells is dependent on caspases and activates the mitogen-activated protein kinase pathway. *Plos One*. 2014;9(11).
136. Kenny O, Smyth TJ, Walsh D, Kelleher CT, Hewage CM, Brunton NP. Investigating the potential of under-utilised plants from the Asteraceae family as a source of natural antimicrobial and antioxidant extracts. *Food Chem*. 2014;161:79-86.

137. Flamini G, Pardini M, Morelli I, Ertugrul K, Dural H, Bagci Y, et al. Flavonoid glycosides from *Centaurea pseudoscabiosa* subsp *pseudoscabiosa* from Turkey. *Phytochemistry*. 2002;61(4):433-7.
138. Astari KA, Erel SB, Bedir E, Karaalp C. Secondary metabolites of *Centaurea cadmea* Boiss. *Rec Nat Prod*. 2013;7(3):242-4.
139. She GM, Zhang YJ, Yang CR. A new phenolic constituent and a cyanogenic glycoside from *Balanophora involucrata* (balanophoraceae). *Chem Biodivers*. 2013;10(6):1081-7.
140. Wang KJ, Zhang YJ, Yang CR. New phenolic constituents from *Balanophora polyandra* with radical-scavenging activity. *Chem Biodivers*. 2006;3(12):1317-24.
141. Luo B, Zou K, Guo ZY, Dan FJ, Wang JZ, Wang H. Balanoinvolin, a new steroid derivative from *Balanophora involucre*. *Chem Nat Comp*. 2009;45(3):371-3.
142. Delvas N, Bauce E, Labbe C, Ollevier T, Belanger R. Phenolic compounds that confer resistance to spruce budworm. *Entomol Exp Appl*. 2011;141(1):35-44.
143. Stolter C, Ball JP, Niemela P, Julkunen-Tiitto R. Herbivores and variation in the composition of specific phenolics of boreal coniferous trees: a search for patterns. *Chemoecology*. 2010;20(4):229-42.
144. Lavault M, Richomme P. Constituents of *Helichrysum stoechas* variety *olonense*. *Chem Nat Comp*. 2004;40(2):118-21.
145. Zhao Y, Geng CA, Chen H, Ma YB, Huang XY, Cao TW, et al. Isolation, synthesis and anti-hepatitis B virus evaluation of *p*-hydroxyacetophenone derivatives from *Artemisia capillaris*. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(7):1509-14.
146. Erdemgil Z, Rosselli S, Maggio AM, Raccuglia RA, Celik S, Michalska K, et al. An unusual pregnane derivative and dibenzylbutyrolactone lignans from *Centaurea sclerolepis*. *Pol J Chem*. 2006;80(4):647-50.
147. Shoeb M, MacManus SM, Kumarasamy Y, Jaspars M, Nahar L, Thoo-Lin PK, et al. Americanin, a bioactive dibenzylbutyrolactone lignan, from the seeds of *Centaurea americana*. *Phytochemistry*. 2006;67(21):2370-5.
148. Csapi B, Hajdu Z, Zupko I, Berenyi A, Forgo P, Szabo P, et al. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytother Res*. 2010;24(11):1664-9.
149. Flamini G, Stoppelli G, Morelli I, Ertugrul K, Dural H, Tugay O, et al. Secondary metabolites from *Centaurea isaurica* from Turkey and their chemotaxonomical significance. *Biochem Syst Ecol*. 2004;32(6):553-7.
150. Iranshahy M, Tayarani-Najaran Z, Kasaian J, Ghandadi M, Emami SA, Asili J, et al. Highly oxygenated sesquiterpene lactones from *Cousinia aitchisonii* and their cytotoxic properties: Rhaserolide induces apoptosis in human T lymphocyte (jurkat) cells via the activation of C-Jun N-terminal kinase phosphorylation. *Phytother Res*. 2016;30(2):222-6.
151. Su S, Cheng XL, Wink M. Natural lignans from *Arctium lappa* modulate P-glycoprotein efflux function in multidrug resistant cancer cells. *Phytomedicine*. 2015;22(2):301-7.

152. Yoo JH, Lee HJ, Kang K, Jho EH, Kim CY, Baturen D, et al. Lignans inhibit cell growth via regulation of Wnt/beta-catenin signaling. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(8-9):2247-52.





## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Balıkesir’de dünyaya geldim. 2000 yılında başladığım Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, lisans eğitimini 2006 yılında tamamladım. Aynı yıl Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans çalışmalarına başladım. 2008 senesinde mezun olarak Uzman Eczacı ünvanı aldım. Ekim 2008’de Araştırma Görevlisi kadrosuna atanarak Doktora çalışmalarına başladım. 2011 senesinde askerlik görevimi yerine getirdim.